

**日韓バイオマテリアル学会若手研究者交流  
AWARD セッション（ポスター発表）  
11月20日（月）**

**F会場（1F 展示ホール）**

JK-01—JK-06

**一般演題（ポスター発表）  
11月20日（月）**

**F会場（1F 展示ホール）**

**\* 日本バイオマテリアル学会 優秀研究ポスター賞応募ポスター**

金属・無機材料（1）	1P-001—1P-009
高分子材料（1）	1P-010—1P-031
マテリアルと細胞（1）	1P-032—1P-061
血液とマテリアル（1）	1P-062—1P-065
DDS, イメージング（1）	1P-066—1P-094
医療用デバイス（1）	1P-095—1P-100
再生医療・組織工学（1）	1P-101—1P-122
検査・診断法, バイオセンサー（1）	1P-123—1P-125

## JK-01

### Surface design of polyrotaxane-based materials with growth factors for enhancing cell differentiation

Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

○Arisaka Yoshinori, Yui Nobuhiko

Polyrotaxane (PRX) is a supermolecule with many cyclic molecules threaded onto an axis polymer and PRX-coated surfaces have the potential for molecular mobility of the threading cyclic molecules along the chain. Previously, we have reported the PRX surfaces can modulate cell differentiation by mechano-signaling through the surface molecular mobility. In addition, we have also reported that sulfonated-PRXs can form polyelectrolyte complexes with bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), resulting in the acceleration of the osteogenic differentiation of preosteoblasts (MC3T3-E1 cells). Hence, we hypothesized that sulfonated-PRX surfaces would be useful substrates for inducing cell differentiation by the effects of modulating molecular mobility and surface-tethering BMP-2 via electrostatic interactions. In the present study, we synthesized sulfopropyl ether-modified PRX (SPE-PRX) triblock copolymers, which consist of an SPE-PRX as a middle block segment and poly(benzyl methacrylate) as both terminal segments, and coated the copolymers onto polystyrene surfaces. Subsequently, BMP-2 was tethered on the SPE-PRX surfaces by electrostatic interactions. MC3T3-E1 cells were cultured on various PRX surfaces, and the mRNA expression levels of *runx2*, *alp* and *ocn* genes were analyzed by qRT-PCR. BMP-2 tethered SPE-PRX surfaces with the low mobility induced the highest expression levels of specific genes among all culture conditions. This result indicated that BMP-2 tethering via electrostatic interactions using PRX architectures contributed to the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells. Therefore, it may be concluded that the SPE-PRX surfaces can effectively potentiate the induction of osteogenic differentiation by both mechano-signaling through the molecular mobility of PRXs and cytokine-signaling through tethered BMP-2 on the surfaces.

## JK-02

### Design of biomimetic polymer brush surfaces with autonomous property changes

Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo

○Masuda Tsukuru, Akimoto Mizutani Aya, Yoshida Ryo

Functional surfaces modified with stimuli-responsive polymers are great focus because they can change the property dynamically in response to external stimuli. In the past decades, they have been investigated as various biomaterials including bioseparation system, bioanalysis, and cell culture dishes. On the other hand, living systems regulates mechanical motion, mass transport, or signal transduction autonomously. If the “autonomous” function can be mimic by artificial materials as functional surfaces, it would be versatile for novel nanotechnologies and applications. It is possible to create a novel dynamic functional surface by modifying a self-oscillating polymer that that involves a built-in system of energy conversion from oscillating chemical reaction to mechanical motion. The basic structure of the self-oscillating polymer is a copolymer of *N*-isopropylacrylamide and Ru(bpy)<sub>3</sub> as a catalyst for the oscillating chemical reaction (BZ reaction). Periodic hydrophilic/hydrophobic change of the polymer chain is spontaneously induced by the BZ reaction and the polymer can act as a molecular motor. In this study, self-oscillating polymer brush as an autonomous functional surface has been designed by surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP). The prepared polymer surface was characterized by ATR/FT-IR and UV-vis. Swelling behavior of the grafted polymer in respond to the oxidization of Ru(bpy)<sub>3</sub> was observed by QCM-D. For the characterization of the autonomous functions, fluorescence microscopy observation revealed that autonomous propagation of chemical occurred on the self-oscillating polymer brush. This study would contribute novel application of functional surface such as autonomous mass transport or fluid control.

## JK-03

### Development of oral redox nanomedicines for gastrointestinal disorders

Department of Materials Science, University of Tsukuba

○Long Binh Vong, Nagasaki Yukio

Excessive generation of reactive oxygen species (ROS) cause oxidative damage to biomolecules including nucleic acids, lipids, and proteins. ROS-mediated injuries are strongly related to numerous human diseases such as inflammatory, stroke, myocardial infarction, diabetes, neurodegenerative diseases, aging, and cancer. Low-molecular-weight (LMW) drugs are not completely effective due to their low bioavailability, non-specific drug distribution, causing severe adverse effects. Recently, we have been developing a novel redox nanoparticle (RNP<sup>o</sup>) prepared by self-assembly of an amphiphilic block copolymer possessing stable nitroxide radical TEMPO, an ROS scavenger, as a nanotherapeutics for treatment of various ROS-associated disease models in mice including kidney injury, inflammatory bowel disease, cerebral damage, cancer, myocardial infarction. In this research, we focused on oral administration of redox nanomedicine RNP<sup>o</sup> for treating ulcerative colitis and colon cancer models in mice. Unlike LMW nitroxide radicals, which spread to entire body after oral administration, RNP<sup>o</sup> tended to accumulate in colon mucosa particularly in inflamed and cancer tissues. As the result, RNP<sup>o</sup> effectively scavenged overproduced ROS in inflamed sites to suppress the inflammation in colitis model in mice. Interestingly, by scavenging ROS in tumor tissues, RNP<sup>o</sup> could also enhance anticancer efficiency and suppress the adverse effects of conventional chemotherapies. In addition, the extremely low toxicity of RNP<sup>o</sup> was confirmed using zebrafish embryos as compared to LWM drugs. Oral administration of redox nanomedicine is promising therapy for treatment of gastrointestinal disorders.

#### Reference

- 1) T. Yoshitomi, A. Hirayama, Y. Nagasaki, *Biomaterials*, **32**, 8021-8028 (2011)
- 2) L.B. Vong, T. Tomita, T. Yoshitomi, H. Matsui, Y. Nagasaki, *Gastroenterology*, **143**, 1027-1036 (2012)
- 3) L.B. Vong, M. Kobayashi, Y. Nagasaki, *Molecular Pharmaceutics*, **13**, 3091-3097 (2016)
- 4) L.B. Vong, J. Mo, B. Abrahamsson, Y. Nagasaki. *Journal of Controlled Release*, **201**, 19-25, (2015)
- 5) L.B. Vong, T. Yoshitomi, H. Matsui, Y. Nagasaki, *Biomaterials*, **55**, 54-63 (2015)
- 6) L.B. Vong, Y. Nagasaki, *Molecular Pharmaceutics*, **13** (2), 449-455 (2016)

## JK-04

### In situ direct formation of organic/inorganic hybrid hydrogels for tissue engineering

<sup>1</sup>Center for Biomaterials, Korea Institute of Science and Technology, <sup>2</sup>Department of Nano-biomedical Science, Dankook University, <sup>3</sup>Department of Biomedical Science, Cha Bio Complex

○Cheol-Min Han<sup>1</sup>, Jun-Sung Oh<sup>2</sup>, Jeong-Soon Park<sup>2</sup>, Eun-Jung Lee<sup>2</sup>, Yoon Ki Joung<sup>1</sup>, Dong Keun Han<sup>3</sup>

Hydrogels have been widely studied as three-dimensional scaffold materials in tissue engineering field. Naturally sourced polysaccharides, including alginate are frequently used as hydrogel materials due to their biocompatibility and biodegradability. These materials, however, require chemical cross-linking, which may cause cellular damages. In this study, sol-gel based silica was introduced for *in situ* direct formation of hydrogel without additional cross-linking process. An aqueous sodium alginate solution and a silica sol with a molar ratio of tetramethyl orthosilicate : water of 1 : 10 were prepared and then mixed each other with various weight ratios (alginate/silica: 80/20, 60/40, 40/60 and 20/80). The gelation of hybrid hydrogels was accelerated with increasing silica content. In addition, compressive modulus of the hydrogels dramatically increased with increasing silica content. In this hybrid hydrogel system, gelation process mainly occurs by formation of semi-interpenetrated polymer network between silica networks and alginate chains. Therefore properties of hybrid hydrogels were directly affected by silica content. *In vitro* cytotoxicity of hydrogels was assessed by Live/Dead assay using fibroblast cells. After 7 days of culturing, pure alginate hydrogel cross-linked by CaCl<sub>2</sub> possessed a number of dead fibroblast cells, while hybrid sample rarely had dead cells. *In vivo* biocompatibility of cell-laden hydrogels was evaluated under rat subcutaneous tissue using mesenchymal stem cells (MSCs). Under *in vivo* condition, MSCs encapsulated in the hybrid hydrogels survived well without any significant inflammation. Silicon ions released from silica network might stimulate cell growth. These results suggest that alginate/silica hybrid hydrogels have great potential in tissue engineering field.

## JK-05

### Photodynamic Therapy in Cancer Treatment via Stimuli-Responsive Polymeric Photosensitizers

Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea

○Hee Sook Hwang,, Jeongdeok Seo, Kun Na

#### 【緒言】

Photodynamic therapy(PDT) is a clinically approved therapeutic method that uses a photosensitizing drug to treat cancer and many diseases. When photosensitizers(PS) are exposed to a specific wavelength of light, it generates cytotoxic reactive oxygen species that can rapidly destroy cells. However, there are severe side effects including photosensitivity reactions and swelling in the treated area. To overcome these side effects of PDT, we designed and prepared polymeric PS that are sensitive to tumor microenvironment such as pH, and enzyme. The pH-responsive PS is designed to respond tumor pH, where solid tumor pH is 6.8. Tumor also has been reported that it expresses about 104-fold higher enzyme concentration than normal tissue. Thus, the enzyme-responsive PS is designed to activate upon enzyme concentration in tumor regions.

#### 【実験】

To prove the stimuli-responsive polymeric PS, we have been demonstrated the physicochemical characterization of these materials to show the tumor responsive activity. Physicochemical characterizations include NMR, HPLC/GPC, zeta potential, particle size, and release study. In addition, In vitro and vivo studies in cancer cell lines and animal models have been also conducted to prove stimuli-responsive reactions and cell death upon laser irradiation in cells and tumor models.

#### 【結果と考察】

Based on the tumor microenvironment, polymeric PS have been shown to response in specific stimuli in tumor regions. As a consequence, tumor targeted ability was enhanced upon laser irradiation. Therefore, the tumor environment sensitive polymeric PS are able to provide tumor targeted treatment and enable tumor selective PDT for enhanced cancer treatment.

## JK-06

### Prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity and liver injury by systemic cellular delivery of protein nanoparticles

School of Pharmacy, Sungkyunkwan University

○Min Sang Lee, Ji Hoon Jeong

Acetaminophen (APAP) is one of the most frequently prescribed drugs and the leading cause of drug-induced liver toxicity and hepatic failure. Reactive oxygen species (ROS) is known to play critical roles in the pathogenesis of APAP-induced liver injury. Although superoxide dismutase (SOD) is an excellent ROS scavenger, its clinical implementation requires safe and effective delivery of the enzyme into the cells of the target tissue. To achieve the effective removal of cellular ROS in the liver, an injectable carrier should have the capability to deliver the enzyme to target cells, escape from the endosome, and maintain its colloidal and enzymatic stability in the blood and the cytosol. In this study, we combine a hydrophilic natural polymer with inorganic calcium phosphate for the facile preparation of an SOD-containing bio-hybrid nanoparticle system having multiple functions such as liver-targeting property, endosomal escape function, and desirable stability both in the blood stream and the cells.

## 1P-001-I

### c 面配向ハイドロキシアパタイトの結晶性に対するフッ化アパタイトバッファ膜質依存性

近畿大学大学院生物理工学研究科

○岡田悠希 (Okada Yuki), 楠 正暢

#### 【緒言】

我々は、パルスレーザーデポジション(PLD)法によりアモルファス基板にフッ化アパタイト(FA)をバッファ層として用いることで、c 面配向のハイドロキシアパタイト(HA)を結晶化させることに成功した。これまで、高品質な c 面配向 HA 膜を得るにはサファイア単結晶基板が必要であったが、ディスプレイ型デバイスへの応用を考えた場合、単結晶基はコスト面で不利である。そこで、1/10 以下のコストで入手可能なアモルファス石英ガラス基板上で実現する手法を考案した。今回、アモルファス基板上で HA 膜を高結晶化させる方法について検討したので報告する。

#### 【実験】

HA はアモルファス基板上で一軸配向させることは困難であることがこれまでの研究で明らかになっているため、アモルファス石英基板上にでも自己配向する FA をバッファ層として用いた。今回、バッファ FA 膜の結晶性を高めることにより、メイン層の HA を高結晶化させることを試みた。レーザー周波数が異なる 1Hz と 5Hz の FA バッファを準備し、その上に同一条件で HA を成膜した。その後、X 線回折(XRD)でそれぞれの膜質を比較した。

#### 【結果と考察】

1Hz、5Hz で成膜した FA バッファ膜に対し、いずれの試料においても HA が c 面配向しているのが確認できた。XRD の半値幅はレーザー周波数 1Hz で成膜した試料の方が小さくなり、結晶性が高くなっていることが明らかとなった。

## 1P-002-III

### ハイドロジンカイトとシモンコライト間の創傷治癒効果の比較

<sup>1</sup>山形大学大学院理工学研究科, <sup>2</sup>JFE ミネラル株式会社

○永島美希<sup>1</sup> (Nagashima Miki), 中山賢典<sup>1</sup>, 佐々木優<sup>1</sup>, 中田圭美<sup>2</sup>, 宇田川悦郎<sup>2</sup>, 山本 修<sup>1</sup>

【緒言】 現在、皮膚創傷治療には自家皮膚移植が用いられているが、患者への侵襲性が高いという欠点がある。したがって、患者自身の治癒能力を利用して治療を行うことができる創傷治療材料の開発が求められている。本研究では、細胞遊走や血管新生の促進に寄与する  $Zn^{2+}$  イオンに着目した。創傷部に対して  $Zn^{2+}$  イオンの溶出が期待できる亜鉛含有創傷治療材料として、ハイドロジンカイト( $HZ; Zn_{5\pm x}(CO_3)_{2\pm y}(OH)_{6\pm z}$ )及びシモンコライト( $SK; Zn_5(OH)_8Cl_2 \cdot 5H_2O$ )を選択した。本研究の目的は、異なるアニオンを持つ HZ と SK を創傷部に適用した際の創傷治癒効果を明らかにすることである。

【実験】 HZ は硫酸亜鉛と炭酸水素ナトリウムを、SK は塩化亜鉛と塩化アンモニウムを原料として、中和反応により粉末合成を行った。合成した試料に、X 線回折装置、pH 測定及び誘導結合プラズマ発光分光分析装置を用いて粉末特性評価を行った。動物実験は、山形大学動物実験委員会の承認の下、SD ラットの腹側部に皮下組織に至る創傷を作成し、control 群は医療用創傷被覆材のみ適用した。Sample 群は HZ または SK 粉末 0.005g を塗布後、control 群同様に医療用創傷被覆材を適用した。経過観察期間を創傷作成後 1 及び 2 週間とし、巨視的観察、統計学的評価及び組織学的評価を行った。

【結果と考察】 X 線回折パターンにより HZ は  $Zn_{5\pm x}(CO_3)_{2\pm y}(OH)_{6\pm z}$ 、SK は  $Zn_5(OH)_8Cl_2 \cdot 5H_2O$  と同定された。測定された pH 値はいずれの試料も角化細胞及び線維芽細胞増殖における至適 pH の範囲内であった。測定された  $Zn^{2+}$  イオン溶出量は、いずれの試料とも同程度の溶出量であり、細胞増殖を阻害しない  $500\mu\text{mol/L}$  以下であった。創傷作成 1 及び 2 週間後の巨視的観察では、いずれの試料を塗布した場合でも白色組織の形成が認められた。ヘマトキシリン・エオシン染色による組織学的な評価は、観察された細胞種による違いは認められなかった。マッソントリクローム染色によるコラーゲン形成について観察したところ、試料を塗布した方が control よりコラーゲン形成は進行していたが、粉末試料間による違いは認められなかった。新生血管数計測の結果は、創傷作成 1 週間後ではいずれの試料においても炎症期～増殖期、2 週間後では control 及び HZ は炎症期～増殖期、SK は増殖期～再構築期に相当した。以上の結果より SK が血管新生を促進していることから、HZ より SK の方が創傷治療材料としてより良い材料であると示唆される。

## 1P-003- I

### 陽極酸化処理を施した Ti-Cu 合金の抗菌性

<sup>1</sup>名古屋大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>名古屋大学未来材料・システム研究所, <sup>3</sup>北見工業大学工学部地球環境工学科  
○北澤 丈<sup>1</sup> (Kitazawa Joe), 黒田健介<sup>2</sup>, 興戸正純<sup>2</sup>, 大津直史<sup>3</sup>

【緒言】Ti は優れた生体適合性を示すものの、抗菌性に乏しいため、Ag や Cu の添加などによる抗菌性付与が試みられてきた。一般に、銀や銅による抗菌性は、金属によるものよりイオンの方が効果的と考えられているが、そのイオン添加手法は多いとは言えない。当研究室では、Ti 合金に陽極酸化を施すと、①合金元素がイオンとして酸化皮膜中に混入すること、②平滑でかつ親水性の高骨伝導性を期待できる酸化皮膜が得られる場合があること、そして Ti-Ag 合金の陽極酸化により作製した Ag<sup>+</sup>を含有した皮膜が抗菌性を有することを明らかにした。そこで本研究では、①と②の結果を組み合わせ、あらかじめ溶製した Ti-Cu 合金に陽極酸化を施すことにより、合金表面に銅を Cu イオンとして含む酸化皮膜を形成させ、その酸化皮膜の抗菌性を調べることを目的とした。

【実験】アーク溶解炉により Cu 濃度が～5 mass%となるように Ti-Cu 合金を溶製し、直径 1 cm 程度の円形平板に切断後、表面粗さ Ra/μm < 0.1 となるようにバフ研磨した。室温にて 0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、0.1M NaOHaq で最大印加電圧をそれぞれ 100 V、200 V、70 V、昇圧速度は 0.1 Vs<sup>-1</sup>で陽極酸化を施し酸化皮膜を作製した。酸化皮膜の Ra 測定 (150 × 112 μm) にはレーザー顕微鏡を、表面観察には SEM を用いた。表面親水性評価には水滴接触角 (WCA) 測定 (2 μL) を用いた。合金ならびに酸化皮膜中での銅の存在状態を調べるため、XPS 分析および XRD 分析を行った。酸化皮膜からの Cu イオンの徐放性を調べるため、37 °C に保持した 0.9 mass%NaClaq 中で最長 14 d 浸漬し、ICP-AES を用いて水溶液中に溶出したイオンの定量分析を行った。酸化皮膜の抗菌性評価には、大腸菌と表皮ブドウ球菌を用いた (JIS Z2801)。

【結果と考察】Ti-Cu 溶製試料の XPS 分析の結果、添加 Cu 濃度に依存せず Cu は 0 価として合金中に存在していた。0.1M NaOHaq 中で陽極酸化を施したところ、酸化皮膜表面ならびに皮膜内部には、Cu が Cu<sup>+</sup>ならびに Cu<sup>2+</sup>として存在していることが確認された。生理食塩水中への酸化皮膜からの Cu イオンの徐放性を静的溶出試験により調べた結果、どの試料でも定量下限以下であった。陽極酸化材の抗菌性試験の結果、抗菌性を有することが確認された。Ti-Ag 合金の陽極酸化材の抗菌性と比較して議論する。

## 1P-004- I

### 表面親水性を制御した Ti への Ag イオン吸着による抗菌性の付与

<sup>1</sup>名古屋大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>名古屋大学未来材料・システム研究所, <sup>3</sup>北見工業大学工学部地球環境工学科  
○大脇充裕<sup>1</sup> (Owaki Mitsuhiro), 黒田健介<sup>2</sup>, 興戸正純<sup>2</sup>, 大津直史<sup>3</sup>

【緒言】Ti は高強度・高靱性であり、優れた生体適合性を示すため生体材料として広く用いられているものの、単独では抗菌性に乏しいため、金属 Ag や Ag<sup>+</sup>の添加などによる抗菌性の付与が試みられてきた。これまでに著者らは、Ti-Ag 合金に陽極酸化を施すことにより合金表面に Ag<sup>+</sup>を含む酸化皮膜を作製し、それが抗菌性能を発揮することを報告した。その一方で、表面を高度に清浄化した Ti を金属イオンを多量に含有する水溶液に浸漬することで、Ti 表面に金属イオンが強固に吸着し、脱離しにくいことをすでに見出している。そこで本研究では、表面を清浄化した Ti を Ag<sup>+</sup>を含む水溶液に浸漬することにより Ti 表面に Ag<sup>+</sup>を吸着させ、その抗菌性能を調べることを目的とした。

【実験】表面粗さ Ra/μm < 0.1 となるように湿式研磨を施した Ti 試料に、180 °C の蒸留水中に 3 h 保持する水熱処理を施した後、室温の大気中に最長 7 d 保存することで表面親水性 (10 < WCA < 65 deg.) を制御した。その後、～0.75 M AgNO<sub>3</sub> 水溶液あるいは飽和 AgCl 水溶液に最長 7 d 浸漬し、蒸留水中で 5 min 超音波洗浄を行うことで試料を作製した。表面粗さ評価としてレーザー顕微鏡を用いて試料表面の Ra 測定 (測定範囲: 150 × 112 μm) を行い、表面親水性評価には水滴接触角 (WCA) 測定 (滴下量: 2 μL) を用いた。試料表面の銀の存在状態の調査には XPS 分析を用いた。また、生体模擬環境に保存した際の試料表面の Ag<sup>+</sup>吸着量の変化を調べるため、37 °C の PBS(-) 中に 7 d 浸漬した試料について XPS 分析を行った。試料の抗菌性評価には、大腸菌と表皮ブドウ球菌を用いた (JIS Z2801 に準拠)。

【結果と考察】各種の処理を施した試料表面は初期表面粗さを維持していた (Ra/μm < 0.1)。AgNO<sub>3</sub> 水溶液、AgCl 水溶液のどちらに浸漬した場合でも、4 d 程度の浸漬で Ti 表面に Ag<sup>+</sup>が最大量吸着することが分かった。また、Ag<sup>+</sup>の最大吸着量は表面 WCA に依存し、WCA が大きくなるほどより多くの Ag<sup>+</sup>が存在していた。AgNO<sub>3</sub> 水溶液、AgCl 水溶液への浸漬により、WCA ≒ 65 deg. の試料は WCA ≒ 30 deg. へ、WCA ≒ 10 deg. の試料は WCA ≒ 15 deg. へと変化した。当日は試料の抗菌性ならびに生体模擬環境に保存した際の試料表面の Ag<sup>+</sup>吸着量の変化についても報告し、Ti-Ag 合金を陽極酸化した抗菌性能を有する試料と比較する。

## 1P-005- I

### Ti へのタンパク質模擬物質吸着挙動

<sup>1</sup>名古屋大学大学院工学研究所, <sup>2</sup>名古屋大学未来材料・システム研究所

○森 祐輔<sup>1</sup> (Mori Yusuke), 黒田健介<sup>2</sup>, 興戸正純<sup>2</sup>

【緒言】骨内に埋植された材料表面に骨が形成するには、タンパク質が吸着し、その上に、骨芽細胞（様細胞）が接着する必要があるとされる。しかし、インプラントに吸着するタンパク質の種類が骨伝導性への影響は必ずしも明らかになっていない。本研究では、吸着タンパク質種が骨形成に与える影響を明らかにすることを最終目的とし、タンパク質を模擬した界面活性剤およびポリペプチドのインプラントへの吸着挙動ならびにその表面へのタンパク質吸着の評価を行った。

【実験】湿式鏡面研磨（表面粗さ  $Ra/\mu\text{m} < 0.1$ ）した Ti 板に、水熱処理（180°C、蒸留水、3 h）を施した後、室温の大気中に最長 7 日、または 240 の密閉容器中で 24 h 保持した。その後、試料に界面活性剤またはポリペプチドの水溶液を滴下し、吸着させた（37°C、最長 3 日）。タンパク質には、アルブミン（平均分子量 66 k）あるいはフィブロネクチン（440 k）を用いた。ポリペプチドには、アンギオテンシン II（1046）あるいは副甲状腺ホルモン（9425）を用いた。界面活性剤には、末端にカルボキシ基とアミノ基の両方をもつ 4-アミノ酪酸のほか、片末端にカルボキシ基をもつ酪酸ナトリウムあるいはアミノ基をもつプロピルアミン塩酸塩を用いた。これらの物質を蒸留水、HCl または NaOH aq に溶解した。界面活性剤およびポリペプチド吸着試料にタンパク質の吸着を行った。各試料表面を XPS、水滴接触角（WCA）測定（2  $\mu\text{L}$ ）により、タンパク質吸着量を FT-IR のスペクトル面積（1650  $\text{cm}^{-1}$ ）から評価した。

【結果と考察】ポリペプチドはタンパク質と同様、親水性 Ti 表面に吸着したが、分子量の小さい 4-アミノ酪酸は吸着しなかった。副甲状腺ホルモン吸着後の WCA は約 39 deg. となったが、アンギオテンシン II 吸着後に WCA は変化しなかった。界面活性剤およびポリペプチドの吸着試料にタンパク質を吸着させると、未吸着試料に吸着させた場合より WCA 値は小さくなっており、タンパク質の吸着量は吸着表面の WCA に依存していた。これらのことから、吸着物質上にタンパク質がさらに吸着したものと考えられる。プロピルアミン塩酸塩は Ti 表面に吸着し、酪酸ナトリウムは吸着しなかったことから、タンパク質はカルボキシ基ではなくアミノ基で材料表面に吸着していることが示唆された。当日は各種物質の吸着量の WCA 依存性についても報告する。

## 1P-006- I

### フッ化物溶液中における MDF チタンの腐食特性

<sup>1</sup>鶴見大学歯学部有床義歯補綴学講座, <sup>2</sup>神奈川歯科大学口腔機能修復学講座, <sup>3</sup>豊橋技術科学大学機械工学系, <sup>4</sup>鶴見大学歯学部歯科理工学講座

○鈴木銀河<sup>1</sup> (Suzuki Ginga), 星 憲幸<sup>2</sup>, 木本克彦<sup>2</sup>, 三浦博己<sup>3</sup>, 早川 徹<sup>4</sup>, 大久保力廣<sup>1</sup>

【緒言】多軸鍛造（MDF）法は巨大加工ひずみ法の 1 つであり、結晶組織の超微細化により純金属の組成を変化させることなく、強度を向上させることが可能である。これまで、インプラント材料として広く利用されている純チタンに対して MDF 法を適応し、引張強さやビッカース硬さが向上したことが報告されている。本研究では、この MDF 純チタンのフッ化物溶液中における腐食特性について評価した。

【実験】直径 15 mm、厚さ 1 mm の MDF 純チタンディスク（川本重工）および一般的な純チタンディスク（フルウチ化学）を用いた。以下、単純に MDF チタンと純チタンと称す。それぞれ耐水研磨紙（#1200 まで）を用いて研磨した後、純水中およびエタノール中で超音波洗浄し、デシケーター内で 1 日間保存した。これらの試料を用いて、電気化学的測定とフッ化物溶液への浸漬実験を行った。電気化学測定の溶液には生理食塩水を用い、自然電極電位と不動態保持電流密度、不動態破壊電位を計測した。浸漬実験には 2% フッ化ナトリウム溶液とリン酸酸性フッ化ナトリウム溶液（ビーブランド・メディコーデンタル）を用い、1 日、3 日、7 日間浸漬後、SEM にて表面状態の観察を行った。

【結果と考察】不動態保持電流密度および不動態破壊電位は、MDF チタンと純チタンの間に有意差を認めなかったが、自然電極電位は MDF チタンが有意に大きかった。2% フッ化ナトリウム溶液への浸漬では、MDF チタン、純チタンどちらも SEM 像において明瞭な腐食を認めなかった。一方、リン酸酸性フッ化ナトリウム溶液への浸漬ではどちらも明らかな腐食形状が確認でき、MDF チタンの方が純チタンよりも腐食の程度が進行している像が観察できた。これは結晶粒微細化の影響と考えられる。以上の結果から、MDF チタンは生理食塩水中では純チタンよりも腐食しにくい、酸性条件下では純チタンよりもフッ素による腐食が進行しやすい可能性が示唆された。また、MDF チタンの酸環境下でのより速い腐蝕進行により、均一な表面酸処理が容易になると考えられる。

## 1P-007- I

### マイクロアーク酸化によってチタン表面に導入した銀、銅、亜鉛、ガリウムの抗菌効果

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科, <sup>2</sup>東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○島袋将弥<sup>1</sup> (Shimabukuro Masaya), 堤 祐介<sup>2</sup>, 山田理沙<sup>1</sup>, 野崎浩介<sup>2</sup>, 蘆田茉希<sup>2</sup>, 陳 鵬<sup>2</sup>, 土居 寿<sup>2</sup>, 永井亜希子<sup>2</sup>, 埴 隆夫<sup>2</sup>

【緒言】体内に埋入したインプラント表面でのバイオフィーム形成に起因する炎症や感染症の長期化によるインプラント体の緩みが近年になって問題視されている。バイオフィーム形成防止のためには、抗菌性を有した材料表面の創出が肝要である。本研究では、電気化学的陽極酸化処理の一つであるマイクロアーク酸化 (Micro-arc oxidation (MAO)) 処理に着目し、チタン表面への抗菌元素の導入を試みた。抗菌元素には抗菌効果の期待される銀、銅、亜鉛に加えて、多剤耐性菌 *Acinetobacter baumannii* に対しての有効性が近年報告されたガリウムを、MAO によりチタン表面にそれぞれ導入し、抗菌効果を比較検討した。

【実験】工業用純チタン (JIS2 種, 25 mmφ) を厚さ 1.5 mm に切断し、表面を #800 まで湿式研磨した試料に対して、上限電圧 400 V, 処理時間 600 s, 電流密度 251 Am<sup>-2</sup> の条件でマイクロアーク陽極酸化処理を行った。電解液の基本組成を 0.15 M 酢酸カルシウム, 0.10 M グリセロリン酸カルシウムとし、これに 0~2.5 mM の硝酸銀、塩化銅、塩化亜鉛、塩化ガリウムのいずれかを添加した混合溶液を処理に用いた。MAO を施した試料を用いて SEM/EDS による表面観察と元素分析を行い、生理食塩水中での各イオンの溶出挙動を ICP-AES によって評価した。また、極表面の抗菌元素濃度を XPS により定量分析し、JIS Z 2801 に準拠して黄色ブドウ球菌および大腸菌に対する抗菌性評価を行った。

【結果と考察】SEM/EDS による表面観察と元素分析の結果から、チタン表面上での多孔質酸化物層の形成と各抗菌元素の導入が確認された。ICP-AES による溶出挙動評価では、抗菌元素によって特有の溶出挙動が確認された。XPS による極表面の定量分析では、抗菌元素によって存在量が異なり、2~13 at.% の抗菌元素が極表面で検出された。抗菌性評価の結果では、銀を導入した試料は大腸菌、黄色ブドウ球菌に対しての殺菌効果、銅、亜鉛を導入した試料は増殖抑制効果を示し、ガリウムを導入した試料では抗菌効果を示さなかった。また、抗菌元素によって抗菌メカニズムは異なり、主として銀はイオンの徐放により殺菌効果を発現し、銅は接触、亜鉛は腐食生成物との接触によって増殖抑制効果を発現した。

## 1P-008- I

### 抗菌性を備えた銀含有リン酸カルシウム微小球の合成とその特性評価

<sup>1</sup>明治大学大学院, <sup>2</sup>オルソリバーズ株式会社, <sup>3</sup>名古屋工業大学

○横田倫啓<sup>1</sup> (Yokota Tomohiro), 本田みちよ<sup>1</sup>, 大坂直也<sup>2</sup>, 牧田昌士<sup>2</sup>, 西川靖俊<sup>2</sup>, 春日敏宏<sup>3</sup>, 相澤 守<sup>1</sup>

#### 【緒言】

骨充填材や人工関節などのインプラント材は整形外科領域において広く普及されているが、それらの使用に伴う術後感染症は重篤な合併症の一つであり、近年大きな問題となっている。本研究では、骨充填材の無機フィラーとして利用することを想定し、生体内で吸収されるリン酸三カルシウム (TCP) に銀を担持させ、それが溶解するタイミングで抗菌性を発現する「銀担持 TCP (Ag-TCP) 粉体」の合成を目的とした。Ag-TCP の合成にはマイクロメーターサイズの粒径をもつ中空球状粒子が得やすい超音波噴霧熱分解法<sup>1)</sup>を適用し、今回は合成した粉体の特性を調査した。

#### 【実験】

Ag-TCP 粉体は、超音波噴霧熱分解法を用いて合成した。噴霧熱分解に用いた出発溶液の Ag イオン濃度は、TCP に対して Ag が 1, 5, 10, 20 mol% となるよう調製した。試料の略号は出発溶液の Ag 濃度に応じて、“Ag-TCP(20)”のように表記する。得られた粉体は、粉末 X 線回折法 (XRD)、誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP-AES)、走査型電子顕微鏡法 (SEM) により評価した。また、粉体の溶出試験は中性および酸性条件下で行ない、Ca, P および Ag を ICP により測定した。

#### 【結果と考察】

得られた Ag-TCP 粉体は、いずれも α-TCP と β-TCP の混合相であり、Ag 濃度が高くなるにつれて、β-TCP 相の割合が増加する傾向が見られた。ICP による元素分析の結果、Ag 濃度が 10 mol% までは仕込みとほぼ同等の Ag 含有量を示したが、Ag-TCP(20) では仕込み値より低い Ag 含有量であった。また、いずれの Ag-TCP 粉体も、約 2.0 μm のメジアン粒子径をもつ球状粒子であり、Ag 添加量による違いは見られなかった。溶出試験の結果、Ca および P については、Ag 濃度による違いはなかったが、中性条件に比べて酸性条件で著しく溶出量が増加していた。このときの Ag 溶出量も中性条件と比べて増加しており、基材である TCP の溶解とともに Ag<sup>+</sup>イオンが溶出されたものと考えられる。

[1] M. Aizawa, K. Itatani and I. Okada, *Phosphorus Res. Bull.*, **20**, 61-78 (2006).

## 1P-009- I

### スパッタ製膜したチタン酸化物薄膜の結晶構造制御

<sup>1</sup>成蹊大学大学院理工学研究科, <sup>2</sup>成蹊大学理工学部, <sup>3</sup>東海大学

○竹内将人<sup>1</sup> (Takeuchi Masato), 吉澤慶祐<sup>2</sup>, 細谷和輝<sup>3</sup>, 大家 溪<sup>1,2,3</sup>, 岩森 暁<sup>3</sup>, 中野武雄<sup>1,2</sup>

#### 【緒言】

チタンは優れた生体親和性をもつことからバイオマテリアルとして広く使われている。チタンは表面に細胞適合性に優れる TiO<sub>2</sub> をはじめとする複数の酸化物を形成して不働態化している。これまでに、皮膜中のチタン酸化物の組成比や結晶構造が、細胞応答に影響をおよぼすことが示唆されている。これらの関係性を解明することは、新規チタン製バイオマテリアルの開発につながると期待できる。そこで本研究では、反応性スパッタを用い、酸素流量を制御してチタン酸化物薄膜を作製し、作製した薄膜に対して熱処理を行った。製膜した試料および熱処理をした試料に対して、表面化学組成と結晶構造を評価した。

#### 【実験】

DC 反応性マグネトロンスパッタを用いてシリコンないしガラス基板の上にチタン酸化物薄膜を作製した。ターゲットにチタン、雰囲気ガスに Ar を使用し、流量 10 sccm 一定とした。Ar 圧力: 1.0~3.0 Pa、O<sub>2</sub> 流量: 0.1~2.0 sccm、電力: 100 W とした。また、製膜後、酸素雰囲気下で温度を 400~600°C とした熱処理を 1 h 施した。熱処理前後の表面化学組成を X 線光電子分光 (XPS)、結晶構造を X 線回折 (XRD) により評価した。

#### 【結果と考察】

酸素流量を制御して反応性スパッタを行うことにより、TiO<sub>2</sub> 量を 71% から 94% の間で変化させることができた。600°C で熱処理を施すと、すべての試料表面はほぼ完全に酸化され、TiO<sub>2</sub> 量は 95% 以上となった。Ar 圧力 1.0 Pa、酸素流量 2.0 sccm の試料に対して 600°C の熱処理を行った結果、ルチル (110) ピークが確認された。Ar 圧力を上げた試料に対して 400°C の熱処理を行った結果、アナターゼ (101) ピークが確認され、600°C ではルチル (110) ピークとアナターゼ (101) ピークの共存状態が確認された。酸素流量と Ar 圧力の制御により、結晶構造の制御が可能であることが示唆された。これは、スパッタ時の薄膜の内部組成や構造が関わっていると考えられる。

## 1P-010- II

### Development of chemically applicable blood compatible materials using MPC copolymer and poly olefin elastomer

Department of polymer Science & Engineering, Sungkyunkwan University

○Seung Kyun Yoon, Dong June Chung

#### 【緒言】 abstract

There are few blood compatible materials in spite of many researches. One of artificial blood compatible material is MPC(2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) complex. MPC acts as phospholipid in living body that can show blood compatibility. But MPC has good hydrophilicity and solubility in body fluids. MPC copolymer with hydrophobic monomer will be one solution for commercially available polymer based-blood compatible material. We select as hydrophobic monomers methacrylate-derivative monomer e.g. lauryl methacrylate. MPC copolymer with hydrophobic monomer can blend with poly ethylene or poly propylene elastomer.

#### 【実験】 experiment part

MPC and hydrophobic monomers are polymerized with DMSO or THF/EtOH as solvent, AIBN(Azobisisobutyronitrile) as initiator. Acetone and water are used for extraction solvent, freeze drying is to remove the solvent. NMR analysis, FT-IR analysis are used to confirm the polymerization product. Obtained copolymer is blended with polyolefin and do platelet adhesion test to check the blood compatibility.

#### 【結果と考察】 result and discussion part

MPC copolymerization with hydrophobic monomers is confirmed and synthesized copolymer is well blend with poly olefin.

Copolymer blend shows good at antiplatelet adhesion and also good blood compatibility.

MPC copolymer is good candidate for blood bag additive and blood contact polymer product.

1P-011-I

## MPC ポリマーによる歯科用修復物の *in situ* 処理によるう蝕予防

<sup>1</sup>自治医科大学歯科口腔外科学講座, <sup>2</sup>東京大学大学院工学系研究科

○小山 潤<sup>1,2</sup> (Koyama Jun), 深澤今日子<sup>2</sup>, 井上祐貴<sup>2</sup>, 石原一彦<sup>2</sup>, 森 良之<sup>1</sup>

【緒言】現在、う蝕治療の歯科用修復物としてコンポジットレジン(CR)が広く使用されている。しかしながら、CRの表面に *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) などのう蝕原因菌が付着することによって二次う蝕が起こることが問題となっている。う蝕原因菌はタンパク質の吸着層が主となるデンタルプラークの中に存在するため、二次う蝕を抑制するためにはCR表面へのタンパク質吸着層の形成を抑制することが必須である。そこで、タンパク質や細胞、細菌の付着を抑制する 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine(MPC)ポリマーに着目した。本研究では、MPCポリマーにより口腔内でCR表面を処理し、タンパク質吸着層形成および細菌付着を抑制することを目的とする。口腔内で処理するためには、歯肉、頬粘膜、舌等の口腔内軟組織に侵襲を与えないような溶媒の選択や反応条件が必要となる。そこで、歯科治療で通常用いられている光反応を用いてCR表面にMPCポリマーを結合させることにした。具体的には、側鎖に重合性基を有するMPCポリマー(PMAMA)溶液をCR表面に塗布し、光照射することで、CR表面の未反応の重合性基とMPCポリマーを化学結合させた。表面処理後のCR基板の表面特性およびタンパク質吸着、細菌付着挙動を評価した。

【実験】PMAMAを高分子反応により合成した。PMAMAのエタノール溶液をCR表面に小筆を用いて塗布した後、光照射を20秒間行った。試料の表面解析としてX線光電子分光法による表面元素分析、静的接触角測定、ムチンの吸着量測定及び*S.mutans*菌の付着試験を行った。

【結果と考察】PMAMA70をCR表面に処理した場合、CR表面の水接触角は66°から32°に低減し、親水性表面となった。また、ムチンの吸着量は8.0µg/cm<sup>2</sup>から0.54µg/cm<sup>2</sup>に大きく減少した。*S.mutans*の付着試験においても、大きな付着細菌数の減少が観察された。これらの結果から、PMAMAは20秒間の実用時間での光照射でCR表面に結合可能であり、ムチンの吸着、*S.mutans*菌の付着を有効に抑制したといえる。本技術は、歯科用修復物の二次う蝕を予防する新しい表面処理方法として期待できる。

1P-012-I

## エレクトロスピンングを用いたコラーゲンゲルファイバーの創製と異方性組織への応用

<sup>1</sup>福井大学大学院工学研究科繊維先端工学専攻, <sup>2</sup>福井大学大学院学術研究院工学系部門繊維先端工学分野

○和久田弓加<sup>1</sup> (Wakuda Yuka), 末信一朗<sup>2</sup>, 藤田 聡<sup>2</sup>

【緒言】細胞外マトリクス(ECM)は、コラーゲンやプロテオグリカンなどから構成されている繊維状あるいは網目状で異方性を有するハイドロゲルである。再生医療等の実現に向け、特にコラーゲンはハイドロゲル材料としておれまでよく研究されてきた。しかし、現在用いられているコラーゲンゲルは、等方的であるためECMが本来的に有する異方性のある構造を十分に反映したものではない。等方的なゲル中では、細胞が周辺の微細環境から受ける物理的なシグナルも生体ECM中の異方性のある環境とは異なり、結果として細胞の生理活性も異なるとの報告もある。そこで異方性を有したコラーゲンハイドロゲルの作製が強く望まれている。本研究では、これを実現するために、芯鞘エレクトロスピンニング法を用いた。本手法によれば、化学架橋や熱架橋を施すことなく、繊維状のコラーゲンゲルを作製することができ、生体が有するECMの異方性を反映したnativeな材料を作製できると期待される。

【実験】芯鞘型のノズルを有するエレクトロスピンニング装置を用いて、コラーゲン酸性溶液を芯材、繊維化しやすい水溶性高分子溶液を鞘材として紡糸することで、芯鞘構造のナノファイバーを得た。ファイバー回収時にドラム型コレクタを高速で回転させることにより、一方向に揃った異方性ナノファイバーシートを作製した。その後、37°C、塩基性バッファに浸漬させることでゲル化させ、ガイド高分子を除去することで異方性のあるコラーゲンゲルファイバーのみを得た。

【結果と考察】免疫染色および円二色性測定により、コラーゲンゲルファイバーの作製を確認し、作製ファイバー表面の鞘材高分子も完全に洗浄され、コラーゲンが変性せず異方性を保っていることを明らかにした。作製した異方性コラーゲンゲルファイバー上で血管内皮細胞を培養することで、無配向ゲルとは違い、細胞を一方向に配向させることもできた。このゲルファイバーは、加工が容易で架橋剤等の添加物を必要としないことから、人工血管等の異方性組織の作製に応用できる安全な材料として期待される。

## 1P-013- I

### 創傷被覆材への応用を目指したキトサン-高分子ミセル複合化ゲルシートの開発

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○伊藤朋紀 (Ito Tomoki), 高見 拓, 村上義彦

#### 【緒言】

近年、創傷部位を「湿潤環境」に保つことで、創傷がより速く、綺麗に治癒されることが報告され始め、ゲル状の創傷被覆材の開発が進んでいる。ゲルは水分を保持する性質に優れ、創傷部位に湿潤環境を提供することが可能である。一方、甲殻類に多く含まれるキトサンは、創傷治癒促進効果を有し、さらに抗菌剤との併用により治癒効果が向上することも報告されている。しかし、キトサンは、強固な分子間水素結合により水への溶解性が非常に低く、キトサンを素材としたゲルの開発の妨げとなっている。そこで本研究では、生体適合性が高い両親媒性ブロック共重合体が形成する自己組織化体（反応性高分子ミセル）に着目し、PEG 修飾によって溶解性を大幅に改善したキトサンと反応させることによって形成される、「薬物徐放効果と創傷治癒効果を兼ね備えた新しいハイブリッド型ゲルシート」の開発を目指した。

#### 【実験】

酢酸緩衝液中でキトサンと片末端アセタール化 PEG を反応させて PEG 修飾キトサンを得た。TNBS 測定によりキトサン主鎖に含まれるアミノ基量を評価し、PEG 修飾率を算出した。PEG の分子量や修飾率がキトサンの水溶性に及ぼす影響を評価した。さらに、ゲルシートの歪みに対する弾性率の値を評価し、低歪領域での弾性率をゲル強度の、降伏点歪みの値を柔軟性の指標として評価した。強度および柔軟性がともに高いゲルシートを用いて、その薬物放出特性を評価した。

#### 【結果と考察】

PEG 修飾率、分子量の増加にともない、キトサンの水溶性が向上した。これは、キトサン主鎖上に存在する PEG の量の増加にともない、キトサン主鎖同士が離れ、水素結合が抑制されたためであると考えられる。ゲルシートの力学的特性を評価した結果、分子量 10000 程度の PEG を少量修飾したキトサンが、高い強度と柔軟性を示す傾向が確認できた。これは、架橋点となるアミノ基の量と水溶性を両立できたためであると考えられる。薬物を内包した高分子ミセルを架橋点として用いることによって、ゲルシートからの放出速度を制御することができた。

## 1P-014- I

### 溶液処理を用いたポリマー表面の親水化ならびにタンパク質吸着能評価

1名古屋大学大学院工学研究科, 2名古屋大学未来材料・システム研究所, 3東北大学大学院歯学研究科

○秋山洋輝<sup>1</sup> (Akiyama Hiroki), 黒田健介<sup>2</sup>, 興戸正純<sup>2</sup>, 金高弘恭<sup>3</sup>

【緒言】ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) をはじめとする多くのポリマーが生体材料として利用されている。材料を体内で用いる場合には、その表面特性が骨伝導性などの生体親和性に強く影響することが知られている。著者らのこれまでの研究により、金属 Ti では、表面の水滴接触角 (WCA) が 65 deg.程度より親水性または疎水性となるほどタンパク質吸着能が向上し、また高い骨伝導性を示すことが明らかになっている。しかし PEEK などのポリマー材料の多くは、タンパク質吸着能が低いため、生体親和性が期待できない。そこで本研究では、タンパク質吸着能の向上を目的とした各種ポリマー表面の溶液処理を用いた親水化を試み、タンパク質吸着試験により生体親和性を評価した。

【実験】ポリマー材料としてアクリロニトリル・ブタジエン・スチレン樹脂 (ABS 樹脂)、ポリアミド (PA)、ポリカーボネート (PC)、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK)、ポリオキシメチレン (POM)、ポリプロピレン (PP)、ポリテトラフルオロエチレン (PTFE)、ポリ塩化ビニル (PVC) を用いた。親水化処理として、あらかじめ湿式研磨 (表面粗さ  $R_a / \mu\text{m} < 0.1$ ) を施したこれらを、薬品耐性を考慮して選定した薬品に濃度、時間、温度を変化させて浸漬後、必要に応じて紫外線、大気圧プラズマを照射した。親水性評価として静的水滴接触角測定 (2  $\mu\text{L}$ )、表面形態観察・構造分析として SEM, FT-IR を用いた。タンパク質吸着試験として材料表面にフィブロネクチン含有水溶液 40  $\mu\text{L}$  を滴下・吸着させ、十分に洗浄後、FT-IR 分析にてペプチド結合 (1650  $\text{cm}^{-1}$ ) のスペクトルからタンパク質吸着能を評価した。

【結果と考察】ポリマーの構造によって、親水化の生じやすさが異なった。アミド結合をもつ PA では加水分解、ベンゼン環をもつ ABS 樹脂ではスルホン化を行い、親水基を付与することで、WCA 値 20 deg.程度の親水化を達成した ( $R_a / \mu\text{m} < 0.1$ )。また、PP や PEEK などでは化学的安定性から溶液処理のみでの親水基の付与は困難であり、溶液処理で破壊した結合を紫外線やプラズマ処理でオゾン酸化させる二段階プロセスで、カルボキシル基を付与することができ、WCA 値 20 deg.程度の親水化を達成した ( $R_a / \mu\text{m} < 0.1$ )。イオン性水溶液中で保存することでいずれの親水性表面も保持できた。当日はそれぞれのポリマー表面の親水化処理の結果とタンパク質吸着試験による生体親和性の評価についても報告する。

## 1P-015- II

### Studies of core – shell type hyaluronic acid – chitosan particle for degradable tissue augmentation filler.

Department of polymer Science & Engineering, Sungkyunkwan University  
○Seo Won Kim, Dong June Chung

#### 【緒言】 abstract

Nowadays, hyaluronic acid (HA) is widely applied as a biocompatible filler for soft tissue augmentation. But HA shows fast degradation behavior to adjust long term durable filler material. To overcome such instability of HA after injection as filler, additional X-linker is adapted as an auxiliary material in this study. By crosslinking HA with chitosan(CS) through ionic interaction and amide bond formation, core – shell structure was able to obtain and the in vivo stability and auto sterilization are improved. In this study HA(Core) - CS(Shell) and CS(Core) - HA(Shell) structured particles were synthesized, and compared to each other through an animal experiment.

#### 【実験】 experiment part

To form HA(Core) – CS(Shell) structure, HA was dissolved in DI water with NaOH. After removing unsolved HA, DVS(divinyl sulfone) was added to HA solution as coupling agent. Spheres of HA was first manufactured by the aluminium mold. And then HA sphered particles were dropped into CS solution. To form CS(Core) – HA(Shell) structure, HA was dissolved in DI water, then EDC (1-ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)carbodiimide), NHS (N-hydroxysuccinimide) were added to activate carboxylic groups, and TPP(Soduim tripolyphosphate) was added for CS crosslinking by ionic interaction.

#### 【結果と考察】 result and discussion part

From SEM images, the core – shell structure having double layer were confirmed. EDS show increased nitrogen content in CS layer which showed the formation of twin layers composed of HA and CS. In vivo analysis shows that HA(Core) – CS(Shell) showed late degradation rate than that of CS(Core) – HA(Shell).

## 1P-016- I

### 多糖複合フィルムが異なる細胞種へ与える影響の評価

<sup>1</sup>東京理科大学大学院総合化学研究科, <sup>2</sup>東京理科大学薬学部

○栗城和泉<sup>1</sup> (Kuriki Izumi), 辻 優奈<sup>1</sup>, 柿本敦史<sup>1</sup>, 二ノ宮理恵<sup>2</sup>, 飯島一智<sup>1</sup>, 伊豫田拓也<sup>2</sup>, 深井文雄<sup>2</sup>, 橋詰峰雄<sup>1</sup>

#### 【緒言】

我々は熱プレス法によりコンドロイチン硫酸 (CS) などのアニオン性多糖とカチオン性のキトサン (CHI) から水に不溶な複合フィルムの作製に成功している。以前種々のフィルム上で線維芽細胞を培養し、用いるアニオン性多糖により細胞接着・増殖性が異なることを明らかにした。フィルムを構成するCSやヒアルロン酸 (HYA) などのグリコサミノグリカンは様々な認識能や生理活性を有している。本研究ではCSやHYAの細胞膜受容体であるCD44を高発現するヒト肺癌基底上皮癌細胞株 A549 細胞の接着・増殖性を評価し、フィルムが異なる細胞種へ与える影響について評価した。

#### 【実験】

アニオン性多糖溶液とCHI溶液を混合することでポリイオンコンプレックスゲルを形成させた。このゲルを遠心分離によって回収後凍結乾燥し、120℃で熱プレスすることでフィルムに成膜した。作製したフィルムを穴あけパンチで組織培養用ポリスチレンプレートのウェルに収まる大きさに裁断し、UV滅菌 (254 nm, 9 W) と血清含有ダルベッコ変法イーグル培地中での膨潤後、各ウェルへ設置した。このフィルム上へ細胞を播種し、6~48 h培養した。培養後、ヘマトキシリンによる核染色後に光学顕微鏡を用いた形態観察によって接着性評価、WSTアッセイによって増殖性評価を行った。

#### 【結果と考察】

マウス胎児皮膚由来線維芽細胞株 NIH3T3 細胞と A549 細胞の各フィルムに対する細胞接着性において両細胞間に差異はみられなかった。ヘパリン (HEP)/CHI フィルムに関しては増殖性の差異もみられなかったが、CS/CHI あるいは HYA/CHI フィルム上の A549 細胞は NIH3T3 細胞と比較して高い増殖性を示すことが示唆された。これはフィルム表面に存在する、あるいはフィルムから遊離したCSあるいはHYAとCD44との相互作用を介した増殖シグナルの活性化に起因すると推測される。すなわちフィルムを構成するアニオン性多糖の種類に依存して、フィルム上で特定の細胞の機能を制御できる可能性が見出された。

## 1P-017- II

### In vivo 表面再修飾を目指した光反応性リン脂質ポリマーによる生体親和性表面の創出

東京大学工学系研究科

○辻 和志 (Tsuji Kazushi), 深澤今日子, 井上祐貴, 石原一彦

【緒言】人工関節や人工心臓などの生体内埋め込み型医療デバイスには、生体親和性を付与するために機能性高分子や生体分子による表面修飾が行われる。しかし、デバイスの長期間の使用により表面特性が失われ、炎症反応などの生体応答が誘起されることが懸念される。この医療デバイスの機能回復手法には再置換手術があるものの、患者への負担は甚大である。しかし、生体内で医療デバイスの表面修復を直接行う技術が実現すれば、患者への負担を小さくすることが可能である。生体内表面修飾において他の組織を傷つけずに反応を進行可能な光エネルギーの利用が有効である。そこで本研究では、光エネルギーを用いた生体内表面修飾の実現を目指し、医療デバイスに生体親和性表面を再構築することを目的とする。具体的には 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ユニットと光照射により炭化水素との結合を形成する光反応性基を有するモノマーユニットから構成されるポリマーを設計・合成し、これを用いた表面修飾を検討する。

【実験】光反応性モノマー 4-methacryloyl oligo(ethylene glycol) oxycarbonyl-4-phenylazide (MOEPAz) を合成し、MOEPAz unit を 8 mol% 含む poly(MPC-co-MOEPAz) (PMEPAz) を合成した。水溶液中での表面修飾におけるポリマーの挙動の表面修飾における重要性を評価するため、ポリマー水溶液の表面張力およびポリマーの吸着量測定を行なった。その後、PMEPAz 水溶液中で光を照射することで基材の表面修飾を行い、ポリマー修飾層の膜厚を測定した。修飾表面の生体親和性を、タンパク質吸着量測定を行うことで評価した。

【結果と考察】PMEPAz 水溶液の表面張力測定の結果、 $\text{Log}[\text{Polymer}] \text{ (mg/mL)} = -3$  程度からポリマーは会合体を形成し始め、0 以上では安定な会合体を形成していることが示された。また、基材に対するポリマー吸着量は濃度の増加に従い、増加するのではなく、 $\text{Log}[\text{Polymer}] \text{ (mg/mL)} = -1$  で極大値を示した。光照射後の表面修飾層の膜厚測定においても同様の傾向が見られた。この結果より、表面修飾において会合体の状態が不安定であることが、表面吸着と光反応において重要であることが示された。この条件で表面修飾を行った表面は、未処理に対してタンパク質吸着量を 1/8 以下に抑制した。本研究は戦略的イノベーション創出推進プログラム(AMED)による。

## 1P-018- I

### 水溶液中で安定にパクリタキセルを保持するための水溶性・両親媒性ブロック型 MPC ポリマー

東京大学大学院工学系研究科

○牟 鳴薇 (Mu Mingwei), 金野智浩, 石原一彦

【緒言】パクリタキセル (PTX) は、肺ガンなどの治療に利用されており、有効な抗腫瘍剤であるが、使用にあたって水溶性が低い (0.3mg/L 未満) ことが問題となっている。患者に投与する際には、界面活性剤などの可溶化剤による乳化製剤とされている。しかしながら、使用する可溶化剤の副作用が強いため、投与治療する前に、ステロイドなどによる抗炎症処置が必要となっている。ここでは、構造明確な水溶性で両親媒性 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーを利用し、PTX の可溶化を行い、ポリマー構造が特性に与える効果について検討した。

【実験】リビングラジカル重合を利用して MPC および n-ブチルメタクリレート (BMA) からなる水溶性・両親媒性ポリマー(PMB)を設計、合成した。ここでは、4 種類の PMB をランダム型およびジブロック型で調製し、疎水性の BMA ユニット組成 (モル比で 40% および 20% BMA) を変化させた。ポリマー水溶液を調製し、溶存状態を解析した。この水溶液に PTX を可溶化し、血清タンパク質への移行をゲル透過クロマトグラフィーにより解析した。

【結果と考察】全ての合成された両親媒性ポリマーは水溶性であった。ランダム型 PMB を水に溶解すると、1mg/mL の濃度以上で水溶液の表面張力が低下し、ポリマー会合体が形成されることが認められた。一方で、ジブロック型 PMB では表面張力の低下は認められなかった。しかしながら、疎水性蛍光色素を用いた極性測定では、水中に疎水性領域が形成されていることがわかった。これより、ジブロック型 PMB は安定なコア-シェル型ミセル構造を取ると考えられる。PTX はいずれの PMB も、PTX の溶解度を劇的に向上させることがわかった。血清タンパク質(BSA)への PTX の移行を追跡した結果、40%BMA ユニットを含むジブロック型 PMB は、安定に PTX を保持できることが明らかとなった。

【参考文献】Mingwei Mu, Tomohiro Konno, Yuuki Inoue, and Kazuhiko Ishihara. Colloids Surf. B: Biointerfaces, 2017, 158: 249-256. DOI: doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.040

## 1P-019- I

### 新規生体素材の開発を指向したシクロデキストリンポリカテナンの one-pot 合成

<sup>1</sup>熊本大学大学院生命科学研究部, <sup>2</sup>National University of Singapore, <sup>3</sup>東京医科歯科大学生体材料工学研究所, <sup>4</sup>熊本大学リーディング大学院 HIGO プログラム

○森田健太郎<sup>1</sup> (Morita Kentaro), 東 大志<sup>1,2</sup>, Xia Song<sup>2</sup>, Jingling Zhu<sup>2</sup>, Jun Li<sup>2</sup>, 田村篤志<sup>3</sup>, 由井伸彦<sup>3</sup>, 本山敬一<sup>1</sup>, 有馬英俊<sup>1,4</sup>

#### 【緒言】

近年、分子マシンや生体素材の基盤分子として、ポリロタキサンやポリカテナンが注目されている。特に、環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CyD) は、汎用性や生体適合性に優れるため、CyD ポリロタキサンの生体素材への応用研究が精力的に行われている。しかし、CyD ポリカテナンの合成・単離に成功した報告例は皆無である。ここで、CyD ポリカテナンを簡便に合成・単離することができれば、エンドキャップフリーの新たな生体素材として有効利用が期待できる。そこで本研究では、 $\beta$ -CyD を用いて、ポリカテナンの one-pot 合成ならびに単離を行った。

#### 【実験】

軸分子としてポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコール-ポリエチレングリコール共重合体 (PEG-PPG-PEG) を、環状分子として PPG 鎖と選択的にポリ擬ロタキサンを形成する  $\beta$ -CyD を選択した。まず、PEG-PPG-PEG の両末端をチオール化し、 $\beta$ -CyD とポリ擬ロタキサンを形成させた。その懸濁液に  $H_2O_2$  を添加し、ジスルフィド結合を形成させ、ポリ擬ロタキサンを環化させた。粗生成物を DMSO に溶解し、未反応のポリ擬ロタキサンを解離させた後、水およびアセトンで洗浄することにより、ポリカテナンを単離した。

#### 【結果と考察】

得られたポリカテナンのゲル浸透クロマトグラフィーを測定した結果、1 本、2 本あるいは複数本のポリ擬ロタキサンが環化したポリカテナンの調製が示唆された。また、<sup>1</sup>H-NMR の結果より、約 14 個の  $\beta$ -CyD が 1 本の PEG-PPG-PEG を包接していることが示唆された。以上の結果より、 $\beta$ -CyD を含有するポリカテナンの one-pot 合成および単離に成功した。本知見は、新たな生体素材を開発する際の有益な基礎資料になり得る。

## 1P-020- I

### ムチンとボロン酸含有合成高分子とのハイブリッドに基づいた糖刺激応答性ゲルの開発

大阪大学大学院基礎工学研究科

谷野雄哉 (Tanino Yuuya), 中畑雅樹, 境 慎司, 田谷正仁

【緒言】生体高分子と合成高分子のハイブリッド化により、所望の特性を付加しつつも生体適合性を保持した材料の創製が可能である。生体高分子の一種であるムチンは、胃液などに含まれる上皮の保護膜の主成分である。これまでに、ムチンを他の物質と物理的に混合することによって、ムチンの特性を付加した材料の開発が行われてきた。本研究では、ムチンを化学的に組み込んだハイブリッドゲル材料の開発を目指した。また、合成高分子にはボロン酸修飾ポリマーを使用した。ボロン酸はジオール化合物と結合し、ジエーテル化合物を形成することが知られている。この知見に倣い、ボロン酸とムチンに含まれる糖鎖のジオールの架橋によるゲルの合成を行った。また、ムチンの糖鎖とボロン酸の架橋が外部から注入する糖(フルクトースなど)によって解離するかどうかを検証することで、得られたゲルの機能を評価した。

【実験】NaOH aq. によって中和し可溶化したムチン水溶液を溶媒として、ボロン酸モノマーとビニルモノマーとの共重合によりムチンを骨格に組み込んだゲルの形成を試みた。この際、NaOH 濃度、ムチン濃度、ボロン酸モノマーおよびビニルモノマーの種類、ビニルポリマー重合時のモノマー濃度、ボロン酸モノマーの比率、モノマーと重合開始剤との比率をパラメーターとして、最適化を行った。最適化によって合成した材料の粘弾性測定によりゲルであることの確認を行い、さらに、ゲルをフルクトース溶液 (in PBS) もしくは PBS に浸漬し、ゲルの糖刺激に応答した分解性の評価を行った。

【結果と考察】最適化の結果、NaOH 濃度を 0.05 M、ムチン濃度を 1 w/v%、ボロン酸モノマーを (3-acrylamidophenyl)boronic acid (APBA)、ビニルモノマーを *N,N*-dimethylacrylamide (DMA)、ビニルポリマー重合時の総モノマー濃度を 0.7–0.9 mol/kg とすることにより、ゲル状物質の合成に成功した。このゲル化は粘弾性測定 (周波数分散) において、測定周波数範囲で  $G' > G''$  を示したことから確認された。さらに、作製したゲルをフルクトース溶液 (in PBS) もしくは PBS に浸漬したところ、フルクトース溶液 (in PBS) 中の方が PBS 溶液よりも膨潤が速く進んでおり、糖-ボロン酸結合による架橋ゲルの合成とゲルの糖応答性が確認できた。これにより、ムチンを化学的に組み込んだハイブリッドゲルに基づいた糖刺激に応答するゲルの開発に成功した。

## 1P-021- I

### 折り畳み様形状回復を発現する生分解性形状記憶ポリマー材料の作製

<sup>1</sup>関西大学化学生命工学部, <sup>2</sup>関西大学 ORDIST, <sup>3</sup>関西大学医工薬連携研究センター  
○川岸弘毅<sup>1</sup> (Kawagishi Koki), 能崎優太<sup>2</sup>, 葛谷明紀<sup>1,3</sup>, 大矢裕一<sup>1,3</sup>

【緒言】近年、形状を変形・固定させた後、温度変化に応答して元の形状へ回復する生分解性温度応答性形状記憶ポリマーの研究が行われており、医療材料への応用も期待されている。形状記憶特性の発現には、高分子鎖に元の形状(永久形状)を記憶するための架橋点と、一時的な形状(一次記憶)へ固定する可逆的な固定相(結晶相)が必要であり、その結晶相が温度上昇に伴い融解することで、一時的な形状から元の形状へ回復する。しかし、従来の形状記憶ポリマー作製方法では、作製できる形状に制約がある。小さく折り畳んだ状態から広がる方向への形状回復は容易であるが、その逆の広がった状態から折り畳まれた状態への形状変化は困難である。これは、折り畳まれた状態の鋳型を作成することが難しいことが主要因である。我々はこれまでに、鋭敏な温度応答性を示す生分解性形状記憶ポリマーとして分岐型ポリカプロラクトン(Branched PCL: br-PCL)架橋体を開発した<sup>1)</sup>。今回、我々は架橋前の溶融ポリマーを平面支持層全体の両側に塗布して、目的の形状へ折り畳んだ後に架橋することで、鋳型を用いることなく、複雑な形状を永久記憶とした形状記憶材料の開発に成功した。この手法を用いれば、折り紙細工のように複数回折り畳んだ複雑な形状へと段階的に回復する材料を作成できると期待できる。本発表では、br-PCL フィルムを折り畳むことによって作成した形状記憶材料の形状回復能について検討した結果を報告する。

【実験・結果・考察】平均8個の水酸基を有する polyglycerine の水酸基を開始点としたε-caprolactone (CL)のバルク開環重合により、1本あたりの重合度(DP)=19、26のbr-PCLを合成した。得られたbr-PCLを加熱溶融し、Hexamethylene diisocyanate (HMDI)と混合後、架橋反応させることにより、br-PCL フィルム(支持層)を作製した。そして、DP=19、26のbr-PCLを支持層の異なる折り目部分に対して形状回復層として幅約2cmで塗布し、4つ折りにしてから架橋反応を行うことで、3層構造を有する形状記憶フィルムを得た。DP=26のbr-PCLは、DP=19のbr-PCLと比較して約10℃形状回復温度が高いことを利用して、折り目ごとに異なるポリマーを塗布して折り畳み順序を制御した。その結果、温度上昇に伴って意図した通りの順序で、段階的に2回折り畳まれた構造の元の形状に回復する形状記憶フィルムを作製できた。

【参考文献】1) K. Nagahama, Y. Ohya *et al.*, *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 1789–1794.

## 1P-022- I

### メトキシ基を有するメタクリレート系ポリマーの血小板適合性について

東海大学大学院工学研究科医用生体工学専攻  
○小野 大 (Ono Dai), 望月 明

#### 【緒言】

我々はこれまで、血液適合性に優れる poly(2-methoxyethyl acrylate): PME A について、熱分析に基づくポリマー中の水の構造の観点から研究を進め、-40℃付近で低温結晶化する特異な水(中間水:適度な分子運動性を有する)が血液適合性発現に関わると考えるに至った。中間水は、PME A の側鎖末端にある、分子運動性の高いメトキシ基(エーテル基)の部分で形成されることが知られている。そこで今回、末端及び側鎖エステル部が同一の構造で、かつメトキシ基を有するメタクリレート系ポリマーを合成し、そのメトキシ基の運動性と血小板適合性の関係について検討したので報告する。

#### 【実験】

- 1) ポリマー合成: 原子移動ラジカル重合法にて  $M_n = 5000 \sim 7000$  のメタクリレート系ポリマーを合成した。
- 2) 接触角測定: 各ポリマーにおいて液滴法及び水中気泡法より表面接触角を測定した。
- 3) 血小板刺激性評価: 各ポリマー表面と血小板とを接触させ、走査型電子顕微鏡にて血小板粘着数を定量した。
- 4) 運動性評価: NMR を用い、ポリマー側鎖(メトキシ基) $^{13}C-T_1$ 緩和時間、及び重水を含む各ポリマーにおける重水の $^2H-T_1$ 緩和時間を求め、これを運動性の指標とした。

#### 【結果と考察】

メトキシ基を有する末端及び側鎖が直鎖構造又は分岐鎖構造となるメタクリレート系ポリマーを6種類合成し、実験を行った。側鎖が直鎖型のポリマーでは鎖長が長くなるにつれ、接触角は疎水性の傾向を示し、メトキシ基 $^{13}C$ の運動性は小さくなることがわかった。側鎖分岐型のポリマーでは分岐鎖が嵩高くなるにつれ、接触角は疎水性の傾向を示し、メトキシ基 $^{13}C$ の運動性は小さくなることがわかった。また、メトキシ基の運動性が大きくなると血小板粘着数が減少し、血小板適合性が良くなることが示唆された。含水ポリマーにおいては、適合性の良いポリマーで適度に束縛された水が観測され、この水が適合性発現に関与することが示唆された。

## 1P-023- I

### 三分岐型オリゴ(エチレングリコール)からなる温度変化により物質を濃縮可能な材料の設計

<sup>1</sup>東京理科大学大学院基礎工学研究科, <sup>2</sup>大阪大学大学院工学研究科

○茅野英成<sup>1</sup> (Kayano Hidenari), 麻生隆彬<sup>2</sup>, 石原 量<sup>1</sup>, 菊池明彦<sup>1</sup>

【緒言】ポリ(エチレングリコール)(PEG)誘導体は温度応答性を有することが知られている。下限臨界溶液温度 (LCST) 型温度応答性を有するポリマーから形成されるコアセルベート液滴は水中で LCST 以上に加熱すると形成する。また、LCST は疎水性部位と親水性部位の比により制御可能なため直鎖 PEG では疎水性部位の導入が必要となる。そこで、三分岐型オリゴ(エチレングリコール) (trisOEG)に注目した。trisOEG は末端数が多く疎水性部位の導入量を制御可能であり、LCST 制御の点で優位である。また、誘導体形成の際にジスルフィド結合を導入することで、還元環境下での分解が期待できる。本研究は温度変化で物質の濃縮が可能な高分子の調製を目的に、trisOEG からなる温度/還元環境応答性高分子の調製を行った。

【実験】TrisOEG-*p*-nitrophenyl carbonate エタノール溶液と、シスタミン (CA)、触媒の *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine を加えた 3 mmol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を 72 h 攪拌し、CA で結合された trisOEG (trisOEG<sub>x</sub>: x は CA 導入率)を調製した。次に、10 °C で trisOEG<sub>x</sub> 溶液に疎水性低分子の Rhodamine B (RB) 0.1 wt%を溶解させ、LCST 以上で静置(70 °C, 7 days)した後に、上澄み溶液の蛍光強度を測定した。さらに、10 mmol L<sup>-1</sup> Dithiothreitol PBS 溶液中での trisOEG<sub>x</sub> の分解試験を行った。直鎖構造の linear OEG からなるポリマー (LOEG<sub>x</sub>)を同様に調製し、比較対象とした。

【結果と考察】調製した trisOEG<sub>72</sub> ( $M_n = 7.6 \times 10^3$ ) 溶液は温度上昇に伴いコアセルベート液滴を形成し、冷却すると透明化したことから、LCST 型の温度応答性を有することがわかった。また、RB は LOEG<sub>91</sub> ( $M_n = 7.1 \times 10^3$ ) ではポリマー相への濃縮がされなかったのに対し、trisOEG<sub>72</sub> は水相と比較して 320 倍濃縮されることがわかった。これは、trisOEG は分岐構造による水と半径の拡大により水溶性が増加し、水和した状態で温度応答性を示したためコアセルベート液滴を形成したのに対し、LOEG は温度上昇に伴い凝集体を形成したためと考えられる。一方、trisOEG<sub>72</sub> の Dithiothreitol での分解試験を行った後は温度応答性を示さず、還元環境下において水溶性分子となることがわかった。以上から、調製した trisOEG<sub>x</sub> は LOEG<sub>x</sub> では見られない生体内温度付近に LCST をもち、さらに物質を濃縮し、還元環境下において分解可能な材料である。

## 1P-024- II

### 脂質とタンパク質からなる生体ナノ粒子のワンステップ再構成法

<sup>1</sup>富山県立大学工学部, <sup>2</sup>富山県立大学大学院工学研究科, <sup>3</sup>金沢大学新学術創成研究機構, <sup>4</sup>京都大学物質-細胞統合システム拠点

○齊藤実央<sup>1</sup> (Saito Mio), 福田亮介<sup>2</sup>, 角野 歩<sup>3</sup>, 村上達也<sup>1,2,4</sup>

【緒言】高比重リポタンパク質 (High-density lipoprotein, HDL) は、ディスク状リン脂質二重膜の側面に脂質結合タンパク質 apoA-I が吸着した生体ナノ粒子である。HDL は試験管内で再構成することができ、その代表的な方法はコール酸透析法と呼ばれる。我々は、遺伝子改変・薬物内包された HDL が、がん (1) ・後眼部疾患治療のためのナノ粒子製剤として機能することを明らかにしている。一方で、コール酸透析法では脂質膜とコール酸水溶液からの脂質ミセルの形成、脂質ミセルと apoA-I 水溶液との脂質膜相転移温度での混合・静置、コール酸除去のための長時間の透析など、多段階の繊細な操作を必要とする。今回我々は、意外な方法で HDL を再構成できることを見いだしたので報告する。

【実験】リン脂質 (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DMPC) のエタノール溶液と apoA-I の PBS 溶液 (尿素含む) をマイクロチューブに入れ、すぐにボルテックス混合した。得られた混合液をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で精製し、HDL に相当する画分を電気泳動、動的分散法 (DLS)、原子間力顕微鏡 (AFM) により分析した。

【結果と考察】脂質：タンパク質モル比 200 対 1 でボルテックス混合した溶液を SEC 分析すると、コール酸透析法で作製された HDL と同じ保持時間にピークが出現した。この HDL 相当画分を DLS と液中 AFM で分析したところ、平均粒子径は 8-9 nm、粒子高さは約 5 nm となった。タンパク質と脂質の組成モル比は 1 対 96 となり、これらの値はすべてコール酸透析法で得られる HDL の値と同等であった。脂質：タンパク質混合モル比を種々検討した結果、200 対 1 の時に HDL 画分のピーク面積が最大になった。またこのピーク出現にボルテックス混合は必須であり、その時間は 10 秒で十分であることもわかった。以上の結果から、わずか 10 秒のボルテックスという極めて迅速・単純な方法で、HDL を再構成できることが明らかになった。現在、様々な脂質、apoA-I 変異体および疎水性薬物を用いて本手法の汎用性を検討中である。

(1) Murakami, T. et al. *Nanomedicine (London, U. K.)* **2010**, *5*, 867.

## 1P-025- II

### アフィニティーリガンド含有感温性ポリマーブラシ表面とタンパク質の相互作用

東京理科大学大学院基礎工学研究科

○上原功己 (Uehara Koki), 石原 量, 菊池明彦

【緒言】 固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC)は、標的タンパク質の分離・精製法として有用と考えられるものの、IMACにおける煩雑なタンパク質脱着プロセスと標的タンパク質変性の可能性が問題と考えられている。そこで本研究では、簡便なタンパク質脱着プロセスの検討として、IMAC リガンドとなるニトリロトリ酢酸 (NTA)を側鎖に有するポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm)ブラシ表面を構築し、PNIPAAm の感温性を用いて、リガンド-タンパク質間の特異的相互作用を温度により制御してきた。しかし、PNIPAAm の感温性がリガンド-タンパク質間の特異的相互作用へ与える影響の解明は未だ不十分である。そこで本研究では、PNIPAAm ブラシに導入されたりガンド-タンパク質間の特異的相互作用変化を明らかにすることを目的に、研究を行った。

【実験】 ガラス基板上に(PNIPAAm- $\alpha$ -NTA) (PIN)ブラシを表面開始原子移動ラジカル重合により修飾し、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて表面形状を観察した。調製した PIN ブラシ表面に吸着したタンパク質の蛍光観察と AFM によるフォースカーブ測定により、温度及びリガンド導入位置がリガンド-タンパク質間の特異的相互作用に与える影響を解析した。

【結果と考察】 AFM を用いて調製した PIN ブラシ表面の形状を観察し、調製した PIN ブラシ表面が均一であることを確認した。また、タンパク質修飾カンチレバーを用いた AFM によるフォースカーブ測定を行ったところ、表面とタンパク質修飾カンチレバーとの間に強い引力が観察されたことから、調製した PIN ブラシ表面はタンパク質と特異的に相互作用することを定量的に確認した。また、リガンドをランダムに導入した PIN ブラシ表面では両温度で吸着した FITC-BSA の蛍光強度差が生じなかったのに対し、リガンド導入位置を基材近傍のみに制御した PIN ブラシ表面では 4 °C における FITC-BSA の吸着が 37 °C における吸着よりも抑制された。これは、4 °C で水和伸長した PIN 鎖の排除体積効果により FITC-BSA の吸着を抑制したためと考えられる。以上より、本研究で調製した PIN ブラシ表面は温度変化のみでリガンド-タンパク質間の特異的相互作用を制御できることが示唆され、新規タンパク質脱着プロセスへの応用が期待できる。

## 1P-026- I

### PEG グラフト鎖を有する polyallylamine による二酸化チタン基板への表面修飾

大阪府立大学大学院工学研究科

○戸田 樹 (Toda Tatsuki), 青野圭剛, 弓場英司, 遠藤達郎, 原田敦史

【緒言】 生体材料の開発において、細胞や細菌、生体高分子が吸着すると、体内の異物反応や医療器具の故障のような重大な被害を引き起こすことから、材料表面の吸着を抑えることが重要である。非特異的な吸着を抑制する方法として、柔軟な水溶性高分子鎖であるポリエチレングリコール (PEG) の排除体積効果を利用したポリマーブラシ層や、双性イオン型ポリマーコーティングすることによる材料表面への水和構造の付与が、医療材料で実用化されている。一方、屈折率の高い二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) 結晶はセンシング材に有用であるが、TiO<sub>2</sub> 表面のタンパク質の非特異的な吸着による感度の減少が課題となっている。我々は、ポリアリルアミン (PAA) に、生体適合性の高いポリエチレングリコール (PEG) をグラフト化した PAA-g-PEG と、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を静電相互作用により複合化させたポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルについて研究を行ってきた。この PIC ミセルの特性として、PAA 主鎖が多価アニオンを効果的に濃縮できる対イオン濃縮効果を示すことを確認されている (*Langmuir* **31**, 8583-8588 (2015))。PAA-g-PEG による TiO<sub>2</sub> 基板の表面修飾により、PAA-g-PEG アミノ基の対イオン濃縮効果による静電遮蔽及び抗体等のセンシング分子の固定化、PEG グラフト鎖による非特異的な吸着抑制を示す界面の構築について検討を行った。

【実験】 Methoxy-PEG-OH (平均分子量 2000) を 4-nitrophenyl chloroformate と反応させることで片末端を活性エステル化した後、PAA 側鎖のアミノ基と反応させることで、異なる PEG 導入率 (18, 20, 30, 40, 52 mol%) の PAA-g-PEG を合成した。液相析出法によって、TiO<sub>2</sub> 基板を作製し、原子間力顕微鏡 (AFM) 観察により基板表面の観察を行った。ローダミン B で蛍光標識した PAA-g-PEG を用いた蛍光測定 (Ex = 555 nm, Em = 580 nm) により TiO<sub>2</sub> 基板への PAA-g-PEG の修飾を評価した。

【結果と考察】 液相析出法で作製した TiO<sub>2</sub> 基板の表面を AFM により観察した結果、TiO<sub>2</sub> 層とガラス基板の境界が観察され、TiO<sub>2</sub> 層の厚さ (84nm) が確認された。蛍光標識した PAA-g-PEG 溶液に TiO<sub>2</sub> 基板を浸し、蛍光顕微鏡を用いて基板表面を観察したところ、ローダミン B 由来の赤色蛍光が均一に分布していることが観察された。さらに浸漬前後の蛍光強度差により、静電相互作用により PAA-g-PEG が TiO<sub>2</sub> 基板に修飾されていることが確認された。

1P-027- I

## 非球状会合体を形成する両親媒性ブロック共重合体が及ぼすスフェロイド培養への影響

<sup>1</sup>山形大学工学部, <sup>2</sup>山形大学大学院有機材料システム研究科, <sup>3</sup>山形大学大学院理工学研究科, <sup>4</sup>山形大学有機材料フロンティアセンター (FROM), <sup>5</sup>九州大学先端物質化学研究所

○藤村 望<sup>1</sup> (Fujimura Nozomi), 大治雅史<sup>2</sup>, 松崎広大<sup>3</sup>, 土屋 遥<sup>4</sup>, 田中 賢<sup>4,5</sup>, 福島和樹<sup>1,2,4</sup>

【緒言】 組織再生医療の実現や普及には、細胞を低コストで大量培養する技術が必要である。スフェロイド培養はボトムアップ的三次元組織の構築法として期待されている。一方で近年、培養基板のトポロジーが細胞の増殖・伸展に作用する例や、ロッド状の高分子ミセルが血中循環時間や細胞取り込みに対する優位性を示す例などが報告されており、高アスペクト比のナノ構造を利用したバイオマテリアルへの関心が高まっている。我々はこれまでに水中で非球状の会合形態を示す両親媒性ブロック共重合体を合成し、疎水ブロックの結晶性によってアスペクト比が調節できることを見出している。本研究ではそれらのポリマー会合体の形状異方性がスフェロイド形成過程に与える影響について調べた。

【実験】  $\omega$ -methoxypoly(ethylene glycol) (MeO-PEG-OH<sub>5k</sub>)に N-(4-(ureidomethyl)benzyl)benzamide (4UMBA)構造を導入したマクロ開始剤 PEG<sub>5k</sub>-4UMBA-OH を用いて、L-lactide (LLA)、 $\epsilon$ -caprolactone (CL)、trimethylene carbonate (TMC)をそれぞれ重合し、ブロック共重合体を得た。その後、透析によって会合体の水分散液を作製し、住友ベークライト社製 PrimeSurface®(U底)内で細胞培養培地( $\alpha$ -MEM+10%FBS)と混合後 (ポリマー濃度 0.05 wt%)、ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)を播種し 5%CO<sub>2</sub>、37 °C のインキュベーター内で培養し、位相差顕微鏡を用いて細胞の集合形態の観察を行った。

【結果】 ポリマー無添加系では一貫して等方的な細胞凝集が観察され、培養 12 時間でスフェロイドが形成された。一方、ブロック共重合体の会合体を添加した培地内では、培養 2 時間後から、細胞凝集の粗密勾配が見られ、異方的な凝集形態が観察された。その後、徐々に細胞塊の異方性は減少していったが、細胞の粗密が解消された培養 12 時間後においても細胞塊の形態に異方性は残っていた。発表では、細胞凝集過程と最終的な細胞塊の形状に対する会合体のアスペクト比との相関についての詳細も議論する。

1P-028- I

## 骨再生のための生分解性コアセルベート液滴を用いたピッカリングエマルジョンの調製

<sup>1</sup>東京理科大学大学院基礎工学研究科, <sup>2</sup>大阪大学大学院工学研究科

○池戸佑衣<sup>1</sup> (Ikedo Yui), 小松周平<sup>1</sup>, 麻生隆彬<sup>2</sup>, 石原 量<sup>1</sup>, 菊池明彦<sup>1</sup>

【緒言】 骨粗鬆症は、海綿骨の骨密度の低下により、大腿骨や椎体の骨折を引き起こす。現在、ヒドロキシアパタイト焼結体などの無機材料を用いた骨欠損修復及び骨再生のための人工骨による治療が行われている。しかし、高骨転換、非侵襲的な治療方法が必要となる。そこで我々は、生体適合性を持ち、骨成分である炭酸カルシウム (CaCO<sub>3</sub>)を用いた、有機-無機ハイブリット粒子に注目した。当研究室では、2-methylene-1,3-dioxepane (MDO)と、2-hydroxyethyl acrylate (HEA)の共重合により、コアセルベート液滴を形成する生分解性温度応答性高分子を合成してきた。このコアセルベート液滴表面に CaCO<sub>3</sub>の固体微粒子を付着させ結晶成長を行うことで CaCO<sub>3</sub>をシェルにコアセルベート液滴をコアに持つコア-シェル粒子を調製可能であると考えられる。そこで、本研究では骨再生をめざした海綿骨類似構造を持つ有機-無機ハイブリット粒子の調製を目的とした。

【実験】 合成した P(MDO-*co*-HEA)水溶液 1.0 mL に、CaCO<sub>3</sub> 20 mg、1.0 mol/L CaCl<sub>2</sub> 1.0 mL、Rhodamine B 1 mg/L を加え、30°C、2.5 h 攪拌し、ピッカリングエマルジョンを調製した。次に、30°C で CO<sub>2</sub> 雰囲気下において調製したピッカリングエマルジョンを 4 日間静置させ液滴表面に付着した CaCO<sub>3</sub> を結晶成長させた。

【結果と考察】 P(MDO-*co*-HEA)コアセルベート液滴に CaCO<sub>3</sub> を付着させ顕微鏡観察すると、液滴同士は互いに融着せず、安定に存在した。これは、コアセルベート液滴表面に CaCO<sub>3</sub> が付着し、CaCO<sub>3</sub> が物理的なシェルの役割をしたことで、液滴同士の融着を防いだためと考えられた。Rhodamine B を加え蛍光観察すると、ピッカリングエマルジョン内に強い蛍光を観察したことから、疎水性低分子の内包が可能であった。次に、ピッカリングエマルジョン表面の CaCO<sub>3</sub> を結晶成長させると、平均粒径  $24.6 \pm 4.5 \mu\text{m}$  ( $n = 10$ ) の粒子が観察された。この粒子は LCST 以下の温度においても安定に存在した。付着した CaCO<sub>3</sub> の周りに新たな CaCO<sub>3</sub> が結晶成長することで、コアが P(MDO-*co*-HEA)、シェルが CaCO<sub>3</sub> の有機-無機ハイブリット粒子が作製できたと考えられる。以上より、本研究により調製した粒子は、新規の手法を用いた骨再生の材料としての応用が期待できる。

1P-029- I

## カチオン性くし型共重合体／ペプチドナノ複合体による脂質膜形態の時限応答制御

東京工業大学生命理工学院

○落合拓郎 (Ochiai Takuro), 嶋田直彦, 丸山 厚

### 【緒言】

我々は、膜融合 E5 ペプチドとポリアリルアミン-*graft*-デキストラン(PAA-g-Dex)による複合体を中性条件下で脂質小胞に作用させると、脂質シートへと構造変換後、時間経過とともに小胞へ再復帰することを見出してきた。E5/PAA-g-Dex 複合体がむき出しになった脂質シートの疎水部を覆い、PAA-g-Dex の親水性側鎖であるデキストランが界面を安定化することで形成されると考えられている。そこで本研究では、デキストランのグラフト率に注目し、様々なグラフト率を有する PAA-g-Dex を合成することで E5 との複合体が脂質二重膜にどのように作用するか評価した。その結果、グラフト率をコントロールすることで脂質膜形態の時限応答制御が可能であることが明らかになった。

### 【実験】

グラフト率の異なる PAA-g-Dex を作製した。蛍光標識したリポソームの懸濁液 (組成比 0.2 mol% Rhodamine labeled-DOPE, 0.2 mol% PEG2k-DSPE, 99.6% DOPC) に様々な濃度の E5 と各 PAA-g-Dex (600  $\mu$ M) を混合後、カバーガラスに乗せ共焦点顕微鏡で観察した。脂質シートを形成した E5/PAA-g-Dex 複合体においては、37  $^{\circ}$ C における経時的観察を行った。各条件で 10 視野撮影し、脂質膜全体に対する脂質シートの割合をカウントした。

### 【結果と考察】

グラフト率の異なる PAA-g-Dex (PDx: x はデキストランのグラフト率(mol%))のうち PD8、PD10、PD13 は E5 とともに脂質小胞を脂質シートへと展開した。効果的なベシクル-シート転移には、適切なグラフト率が必要であることがわかった。脂質シートの経時的な安定性を評価したところ、面白いことに PD8 では約 30 分、PD10 では約 60 分でそれぞれ小胞に復帰するのに対し、PD13 ではシート構造を約 2 時間保持した後、速やかに小胞に復帰することがわかった。PAA-g-Dex の親水性側鎖が脂質シートの安定性に寄与することが示唆された。これらを利用すると、PAA-g-Dex のグラフト率により脂質シートから小胞の復帰時間をプログラムでき、自律応答的な脂質膜の構造制御ができると期待される。

1P-030- I

## がん選択的に相互作用するグルタミン担持高分子の創製と機能評価

東京工業大学科学技術創成研究院化学生命科学研究所

○山田直生 (Yamada Naoki), 本田雄士, 武元宏泰, 野本貴大, 松井 誠, 友田敬士郎, 西山伸宏

【緒言】がん細胞は亢進したグルタミン代謝を維持するため ASCT2 に代表されるグルタミントランスポーターを過剰発現し、グルタミンを正常細胞に比べ多量に取り込んでいる。したがって、グルタミンはがんへの薬物送達などにおいて利用される標的指向性分子(リガンド分子)として大きな可能性を秘めていると考えられるものの、グルタミンとトランスポーターとの結合力は既存のリガンド分子に比べ非常に弱いため、グルタミン単体のままではリガンド分子として利用しにくい。そこで本研究では多価結合によるトランスポーター密度選択的な結合力の強化に着目し、がん細胞と選択的かつ強固に相互作用するグルタミン担持高分子の創成と機能評価を行った。

【実験】アミノ酸無水物の開環重合により重合度の異なるポリリシンを重合し、縮合反応と脱保護反応によりこれらポリリシン側鎖にグルタミン構造を導入した後、蛍光色素を高分子末端に導入した。合成したグルタミン担持高分子とヒト膵臓がん由来細胞の BxPC3 細胞(グルタミントランスポーター過剰発現)およびヒト腎由来細胞の HEK293 細胞(グルタミントランスポーター低発現)との相互作用をフローサイトメトリーにより評価した。

【結果と考察】 $^1$ H NMR および GPC による分析から、全ての合成した高分子において定量的な側鎖修飾(~100%)と単分散な分子量分布( $M_w/M_n < 1.2$ )を確認した。フローサイトメトリーによる細胞内取り込みの評価では、重合度 100 のグルタミン担持高分子は重合度 50 および 30 のものに比べそれぞれ約 10 倍、18 倍の取り込みを示した。この細胞内取り込みの向上はグルタミン担持高分子側鎖のグルタミン構造と BxPC3 細胞表面のグルタミントランスポーターとの多価結合によるものと推察される。実際にグルタミントランスポーターの阻害剤は重合度 100 のグルタミン担持高分子の細胞内取り込みを有意に阻害した。続いて BxPC3 細胞および HEK293 細胞における重合度 100 のグルタミン担持高分子の取り込み挙動を経時的に評価したところ、BxPC3 細胞での細胞内取り込みは HEK293 細胞と比べ非常に速く、8 時間インキュベーション後における取り込み量は約 5 倍多かった。このことから重合度 100 のグルタミン担持高分子はグルタミントランスポーターを過剰発現するがん細胞と選択的に相互作用することが示唆された。

## 1P-031-I

### アゾベンゼンを有する UCST 型ウレイド高分子の合成と相転移の光制御評価

東京工業大学生命理工学院

○池内 尚 (Ikeuchi Nao), 嶋田直彦, 丸山 厚

#### 【緒言】

我々は、ウレイド基を有する高分子が生理的条件下、体温付近においてコアセルベート滴形成を伴う上限臨界溶液温度 (UCST) 型の温度応答性を示すことを見出した。また、相分離を利用したタンパク質分離や細胞培養形態制御の基材としてのバイオマテリアル応用を行ってきた。本研究では非侵襲的な光刺激によるウレイド高分子の相転移制御を目的とした。光官能基であるアゾベンゼンを導入したウレイド高分子を合成し、光応答性について報告する。

#### 【実験】

ポリビニルアミン ( $M_w = 150k$ ) にシアン酸カリウムを添加することでウレイド基が 92 mol% 導入されたポリビニルアミン- $\alpha$ -ビニルウレア (PVU) を調製した。PVU に 4-(フェニルアゾ)安息香酸を加え縮合を行い、アゾベンゼンが 4.4 mol% 導入された PVU (Azo-PVU) を合成した。Azo-PVU 水溶液 (1.0 mg/mL in 10 mM HEPES-NaOH, pH7.5, 150 mM NaCl) に対して UV 光 (372 nm) あるいは Vis 光 (453 nm) を 2 分間照射し様々な温度において透過率を測定した。

#### 【結果と考察】

Azo-PVU 溶液の透過率の温度依存性を測定した。Azo-PVU 溶液は高温側で透過率が高く溶解、低温側で透過率が低く相分離状態であり UCST 型挙動を示すことが確認された。透過率が急激に変化する温度 ( $T_p$ ) は、疎水基であるアゾベンゼンの導入により導入前に比べ 40 °C 上昇した。また、UV 照射後と Vis 照射後では、透過率曲線に差が生じ、 $T_p$  は Vis 照射後で 41 °C に対し UV 照射後では 32 °C に低下した。これは側鎖のアゾベンゼンが光刺激によってシス体となり極性が大きくなったためと考えられる。さらに、光照射による相転移の可逆性を評価した。生理的条件下、35 °C において UV、Vis を交互に照射後 700 nm の透過率を測定した。Azo-PVU 溶液の透過率は、UV を照射することによって 80 % まで上昇し、Vis を照射することで 35 % まで低下した。以上から、アゾベンゼンを有するウレイド高分子は光刺激によって可逆的に相転移を制御可能なバイオマテリアルとして期待される。

## 1P-032-II

### 細胞培養基材としての増殖因子固定化ジスルフィド架橋型ハイドロゲルの設計

<sup>1</sup>九州大学工学研究院応用化学部門, <sup>2</sup>九州大学未来化学創造センターバイオテクノロジー部門

○香川元気<sup>1</sup> (Kagawa Genki), 濱田祐成<sup>1</sup>, 南畑孝介<sup>1</sup>, 若林里衣<sup>1</sup>, 後藤雅宏<sup>1,2</sup>, 神谷典穂<sup>1,2</sup>

#### 【緒言】

細胞の増殖や分化には培地に増殖因子成分を添加することが必須となるが、増殖因子は一般的に不安定であり、且つ非常に高価である。従って、細胞培養において増殖因子添加量の低減は強く求められている。そこで、我々は増殖因子を固定化可能な細胞培養基材を設計することで課題解決を試みた。基材には、当研究室で開発された新たな酵素触媒ゲル化法により得られるハイドロゲルを採用した。チオール基修飾高分子、フェノール誘導體、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) の各水溶液を混合するだけで得られるハイドロゲル中に、増殖因子を固定化するための新たなタンパク質因子を導入し、ハイドロゲル中への増殖因子の固定化ならびにハイドロゲル上での細胞増殖性を評価した。

#### 【実験】

4 分岐型 SH 基修飾ポリエチレングリコール、フェノール誘導體としてのグリシルチロシン、HRP に加えて、細胞接着性を有するゼラチンに SH 基修飾を施した gela-SH、ヘパリンに SH 基を修飾した hepa-SH を準備した。また、固定化増殖因子として、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を選択した。異なる条件下でハイドロゲルを形成した後、ゲル上に NIH3T3 線維芽細胞を播種し、3 日間培養を行い、トリプシン処理後、細胞数を計測した。また、増殖因子の固定化効率の向上を目指し、異なる様式で bFGF を固定化可能な組換えタンパク質を設計し、その効果についても検証した。

#### 【結果と考察】

ゲル上での接着性細胞の培養に際して、Gela-SH を導入したハイドロゲルにのみ細胞が良好に接着した。一方、細胞増殖性の評価の結果、hep-SH 濃度の増加に伴って細胞増殖性が向上した。これはハイドロゲル内に導入されたヘパリンユニットが、bFGF の固定化及び徐放に寄与し、ゲル表面での細胞増殖を促進したためと考えられる。以上より、ゼラチン及びヘパリンを導入したハイドロゲルは増殖因子添加量を低減可能なことが示唆された。発表では、固定化用タグが導入された組換え増殖因子の細胞培養基材への固定化に向けた基礎検討結果も報告する。

## 1P-033- II

### 単層/スフェロイド培養における NT2 細胞の神経分化特性

<sup>1</sup>北九州市立大学大学院, <sup>2</sup>北九州市立大学

○北野温女<sup>1</sup> (Kitano Otome), 吉田詩朗<sup>1</sup>, 宮本大輔<sup>1</sup>, 中澤浩二<sup>2</sup>

#### 【緒言】

培養基材上において細胞が二次元的な伸展形態を形成する単層培養法は、汎用的な細胞培養法として幅広く利用されている。一方、近年では培養下において生体構造を模倣することを目的に、細胞を三次元組織化させる技術が確立されてきており、スフェロイド（球状細胞組織体）培養法はその代表例の一つである。本研究では、神経研究のモデル細胞として知られる NT2 細胞の単層（二次元）培養とスフェロイド（三次元）培養を行い培養法の違いが神経分化特性に与える効果を明らかにした。

#### 【実験】

スフェロイド培養基材として、PMMA 基板（24mm 角）上に 195 個のマイクロウェル（直径 600 μm）を規則的に配置し、その表面を細胞非接着分子である PEG で修飾したマイクロウェルチップを作製した。また、組織培養ディッシュを単層培養基材として用いた。これらの基板に NT2 細胞を播種し、神経分化誘導剤として知られるレチノイン酸（RA）含有培地にて培養を行い、単層培養とスフェロイド培養の細胞特性を比較した。

#### 【結果と考察】

単層培養では、細胞が基板上に接着・伸展し、培養経過に伴って増殖した。スフェロイド培養では、培養 24 時間以内に各マイクロウェル内において細胞同士が凝集してスフェロイドを形成し、その形態を維持したまま増殖した。細胞の増殖性はスフェロイド培養よりも単層培養が高く、また、両培養系ともに RA 処理によって細胞の増殖性は抑制された。培養経過に伴う NT2 細胞の分化特性を比較した結果、神経分化は単層培養よりもスフェロイド培養が高く、さらに RA 処理を施すことによってスフェロイド培養の神経分化は飛躍的に向上した。この現象を理解するため、細胞接着分子の解析を行ったところ単層培養よりもスフェロイド培養では N-カドヘリンの高発現がみられた。この活性が下流に位置する転写因子の発現を促し、神経分化を促進していると考えられる。これらの結果から、NT2 細胞の神経分化は培養法の違いによって影響を受け、スフェロイド培養は神経分化を促進できる培養法であることが示された。

## 1P-034- I

### 基板弾性率変化に伴う肝細胞特性の変動

北九州市立大学大学院

○長谷川千裕 (Hasegawa Chihiro), 中澤浩二

#### 【緒言】

培養細胞に加わる力学的作用は細胞の応答性に影響を与えることが知られており、細胞が接着する培養基板の弾性率を変化させることは細胞と力学的刺激の関係性を知るための有効な手段の一つといえる。現在、このような基板弾性率と細胞特性の関係は、線維芽細胞や間葉系幹細胞などを中心に多くの研究が行われているが、上皮系細胞を用いた報告例は少ない。そこで本研究では、上皮系細胞の代表例として肝細胞に注目し、基板弾性率が肝細胞特性に与える影響を評価した。

#### 【実験】

培養基材としてシリコンエラストマーである PDMS（ポリジメチルシロキサン）を用いた。この基材は主剤と副剤の混合反応によって硬化が進むことから、副剤の混合比を減少させることで柔らかい培養基板を作製することができる。そこで本研究では、主剤：副剤の混合比を 5：1、10：1、20：1 の 3 条件とすることで弾性率の異なる培養基板を作製した。また、ポリスチレン製組織培養基板（TCPS）をコントロール条件とした。すべての基板条件は I 型コラーゲンの表面コートを行うことで細胞接着性を高め、初代ラット肝細胞の形態や機能発現の違いを比較した。

#### 【結果と考察】

すべての基板表面においてラット肝細胞は接着したが、相対的に硬い培養基板である TCPS と PDMS 5：1 の条件では細胞はよく伸展し、ストレスファイバーの形成が発達した。これに対し、PDMS 10：1 と PDMS 20：1 の条件では細胞伸展が抑制される傾向にあり、立体的な細胞形態が維持された。また、本検討のなかで最も柔らかい基板である PDMS 20：1 の条件では、細胞間ギャップ結合を形成するコネクシン 32 の発現比が有意に高く、かつアルブミンの産生活性も最も高かった。これらの結果から、柔らかい培養基板では細胞の伸展が抑制されることによって細胞間コミュニケーションが向上し、その結果として細胞の高機能発現へとつながっていると考えられる。

以上の結果より、基板弾性率は肝細胞の形態や機能発現に大きく影響することが示された。

## 1P-035- I

### 上皮間葉転換における細胞周辺微小環境の影響

<sup>1</sup>福井大学大学院工学研究科繊維先端工学専攻, <sup>2</sup>福井大学学術研究院工学系部門繊維先端工学分野, <sup>3</sup>国際科学振興財団

○早水亮貴<sup>1</sup> (Hayamizu Ryoki), 末信一朗<sup>2</sup>, 赤池敏宏<sup>3</sup>, 藤田 聡<sup>2</sup>

#### 【緒言】

上皮間葉転換 (EMT) とは、細胞間接着分子である E カドヘリン (E-cad) を介した細胞間接着が消失し、細胞外マトリクス (ECM) との接着を高めて遊走性が亢進する現象であり、発生のみならず癌細胞の浸潤の過程でも見られる。たとえば高転移性の乳癌では、腫瘍組織の周辺に高配向したコラーゲン繊維が蓄積しており、細胞が繊維軸方向に伸展して接着し、EMT 様の変化を示す。このように EMT にもなう細胞形態の変化はよく知られているが、細胞形態の変化は EMT の結果なのか原因なのかは十分に理解されていない。

そこで本研究では、細胞-基材間の接着様式と細胞形態が EMT の進行にどのように影響するか調べた。接着様式については E-cad の細胞接着部位と IgG の Fc 部位を結合させた E-cad-Fc キメラタンパクを吸着させた表面により、E-cad 依存接着で細胞を接着させた。またフィブロネクチン (FN) を吸着させた表面により FN 依存接着で細胞を接着させた。細胞形状の制御は、極細繊維を作製する手法であるエレクトロスピンニング法を用いてファイバーシートを作製しこの上で細胞を培養することで細胞を伸展させ、平面フィルム上で培養した細胞と、細胞形態、タンパク質発現、細胞移動等を観察した。

#### 【実験】

ポリスチレンのファイバー基材および、フィルム基材に E-cad-Fc 溶液 (10 µg/ml) または FN 溶液 (10 µg/ml) を添加してインキュベートすることにより基材に吸着させた。ここにマウス乳腺由来細胞株 NMuMG を播種し、数日間に渡り細胞形状の変化をタイムラプス顕微鏡ならびに表面マーカー発現をもとに解析した。

#### 【結果と考察】

E-cad 上に接着した細胞は、FN 上よりも大きな接着面積を示した。また、ファイバーに接着した細胞は、繊維の配向方向に沿って長く伸展した形態を示した。本基材を用いて細胞の接着様式ならびに細胞形態を制御することができた。これらの基材上での EMT 挙動を観察したところ、細胞周辺微小環境が EMT に与える影響が示唆された。

## 1P-036- I

### 孔貫通型ポリウレタン多孔質薄膜による血管様構造構築を目指した HUVEC と AoSMC の共培養

<sup>1</sup>山形大学有機材料システム研究推進本部ソフトバイオマテリアル研究センター, <sup>2</sup>豊田合成株式会社研究開発部, <sup>3</sup>九州大学先端物質化学研究所

○土屋 遥<sup>1</sup> (Tuchiya Haruka), 高城誠太郎<sup>2</sup>, 中川博之<sup>2</sup>, 田中 賢<sup>1,3</sup>

#### 【緒言】

一般的な細胞培養法として単層培養がある。しかし、実際の組織は複数の細胞から構成されており、単層培養ではその細胞本来の機能を損なうことがある。一方、多孔質膜を介した共培養では実組織に見られるような異種細胞からなる層状構造を再現できない。そこで異種細胞の共培養により層状構造が再現できる足場材料を目指し検討を行ってきた。

本研究では、薄膜多孔質でも材料強度が保持できるポリウレタンに着目した。薄膜化したウレタン膜を発泡させることで細胞の大きさよりやや小さい孔径を持つ孔貫通型薄膜を作製することに成功した。この材料を足場として用いることで血管内皮細胞 (以下 HUVEC) と血管平滑筋細胞 (以下 AoSMC) の共培養を行い血管様構造形成を試みた

#### 【実験】

孔貫通型ポリウレタン (表面の平均孔径: 5 - 12 µm, 空孔率: 40 - 70%, 裏面の平均孔径: 5 - 9µm, 空孔率: 7 - 15%, 膜厚: 5 - 10 µm) を共培養用足場材料として、孔のない平膜ポリウレタンを単層培養用足場材料としてそれぞれ作製した。単層培養では HUVEC 専用培地にてプレコンディショニングを 24 時間後、HUVEC の培養を 3 日間行った。共培養では AoSMC 専用培地にてプレコンディショニングを 24 時間後、膜の表面で AoSMC の培養を 5 日間行った。その後、膜を反転させ HUVEC 専用培地にて HUVEC の培養を 3 日間行った。培養後に蛍光染色を行い、共焦点定量イメージサイトメーターにて HUVEC の細胞接着数を計測した。

#### 【結果と考察】

孔のない平膜ポリウレタンに対し孔貫通型ポリウレタンでは HUVEC の接着量が 11.5 倍と高かった。本結果より貫通型ポリウレタンでは HUVEC と AoSMC が、孔を介して直接接触することや AoSMC から分泌される細胞外マトリクス成分により HUVEC の接着量が向上する可能性が示唆された。

## 1P-037-II

### 高強度化アパタイトファイバースキャフォールドビーズによる株化肝細胞培養と肝機能評価

<sup>1</sup> 明治大学理工学研究科, <sup>2</sup> 東京慈恵会医科大学

○森田恵里香<sup>1</sup> (Morita Erika), 本田みちよ<sup>1</sup>, 中村まり子<sup>2</sup>, 松浦知和<sup>2</sup>, 相澤 守<sup>1</sup>

#### 【緒言】

我々はこれまでに優れた生体活性を示すアパタイトファイバーからなり三次元連通気孔を有する「高強度化アパタイトファイバースキャフォールド (AFS)」を作製し、この AFS を三次元培養基材としてアルブミン生産能やアンモニア代謝能を有する「肝再生オルガノイド」の構築に成功している<sup>1)</sup>。本研究の目的は、バイオリクターを用いて安価に血漿製剤などを製造するための物質生産能に特化した AFS を創製することである。今回は、球状の「高強度化 AFS ビーズ」を試製するとともに、株化肝細胞 (FLC-4) を培養し、細胞増殖性や侵入性と肝機能の評価を行なったので報告する。

#### 【実験】

高強度化 AFS ビーズは既報<sup>2)</sup>にしたがって作製した。本研究では気孔率の異なる 3 種のビーズ (平均径 3.2 mm) に株化肝細胞 FLC-4 を播種し、7 日間静置培養した。細胞増殖性は WST-1 キットを用い、細胞の局在状態を調査するために、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および免疫染色したのち、観察を行なった。また、肝機能評価として ELISA キットを用いてアルブミンの定量を行なった。

#### 【結果と考察】

WST-1 キットの結果より、すべてのビーズにおいて良好な細胞増殖性が確認できた。また、HE 染色と免疫染色より、気孔率が高くなるほど基材の深部に細胞が侵入し、三次元的に細胞が培養できていることが観察された。アルブミンの定量結果では、気孔率が高くなるほど積算生産量が増加し、良好なアルブミン生産も確認できた。これらの結果より、高強度化 AFS ビーズは血漿製剤などの物質生産に特化した、株化肝細胞の新たな培養基材として有用であることが分かった。

1) T. Matsuura, and M. Aizawa, *Polymeric Biomaterials: Medicinal and Pharmaceutical Applications, Volume 2*, CRC press (2012) pp. 691-713.

2) 森田恵里香 ほか, 日本セラミックス協会 第 29 回秋季シンポジウム講演予稿集, 1F05(2016).

## 1P-038-II

### ナノ周期構造による直交性骨基質配向化機構

<sup>1</sup> 大阪大学大学院工学研究科, <sup>2</sup> キャノンマシナリー株式会社

○中西陽平<sup>1</sup> (Nakanishi Yohei), 松垣あいら<sup>1</sup>, 川原公介<sup>2</sup>, 二宮孝文<sup>2</sup>, 沢田博司<sup>2</sup>, 中野貴由<sup>1</sup>

【緒言】骨組織が有する特徴的な異方性微細構造は骨系細胞の有機的連携に基づき構築される。我々はこれまでに、材料表面形状制御により骨芽細胞配列パターンを自在に操ることで、骨アパタイトの秩序だった結晶学的配向性を作り出すことに成功している。一方で驚くべきことに、金属表面をナノオーダーで制御することにより、従来の科学的常識を根底から覆し、細胞方向に垂直に配向化した骨基質を形成することを初めて見出している<sup>1)</sup>。このような「直交性」骨基質配向化機構の解明は、部位に応じて異なる配向方向・配向度を有する骨の配向化誘導に必須である。本研究では、生体用金属材料表面に、レーザ照射により自己組織的に形成される波長オーダーの微細周期構造 (レーザ誘起周期表面構造; LIPSS) を形成し、「直交性」「平行性」の二つの相反する骨配向化機構について、遺伝子レベルからメカニズム解明を目指す。

【実験】フェムト秒レーザ (パルス幅; 250 fs, 中心波長; 800 nm) の直線偏光照射により、Ti-6Al-4V 表面に LIPSS を導入した。対照群として、鏡面研磨 (Ra<0.01 μm) 基板および表面粗さを保ちつつ指向性を持たない円偏光基板を作製した。マウス新生児頭蓋冠より単離した初代骨芽細胞を基板上で培養し、初期接着に基づく細胞配向性および細胞骨格タンパク質・接着斑の形態を免疫細胞化学にて定性的・定量的に解析した。長期培養では、石灰化誘導を行い、レーザラマン顕微鏡によりコラーゲン配向性を、微小領域 X 線回折法によりアパタイト結晶配向性を解析した。Total RNA 抽出後、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

【結果と考察】鏡面および円偏光基板に比較して、LIPSS 上でのみ有意に骨芽細胞の配列化が達成された。細胞はナノ周期構造に沿って優先配列した一方、細胞方向に垂直方向への骨基質形成が明らかとなった。このとき、細胞-材料表面の相互作用を司る接着斑は、表面形状に応じた特異的な形態を示し、接着斑成熟化が細胞配列化とともに、骨基質配向化を制御する可能性が示唆された。さらに、遺伝子発現解析から、材料表面-細胞間の界面で機能するタンパク質群 (接着斑構造・機能を制御) による新規の骨配向化制御機構の存在が明らかになった。

【参考文献】 1) A. Matsugaki, T. Nakano et al., *Biomaterials*, 2015, 37, 134-143.

1P-039- I

## 生細胞代謝の効率的制御を指向したレドックスリン脂質ポリマーの設計

<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科, <sup>2</sup>名古屋大学大学院工学研究科, <sup>3</sup>産業技術研究所, <sup>4</sup>大阪大学  
○金子真大<sup>1</sup> (Kaneko Masahiro), 石川聖人<sup>2</sup>, 加藤創一郎<sup>3</sup>, 石原一彦<sup>1</sup>, 中西周次<sup>4</sup>

【緒言】細胞内におけるレドックス状態は、代謝経路・活性と密接に関係している。したがって、細胞内レドックス状態を制御することは、生細胞が関与するエネルギー技術や医療の分野において極めて重要である。細胞膜透過性の電子伝達分子の利用は、細胞内レドックス状態を制御する一つの有効な方法である。しかし、従来用いられる脂溶性低分子化合物は細胞毒性を示し、細胞が成育できる条件下での代謝制御には適していない。こうした背景のもと、我々は、親水性の生体親和性ユニット 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) と疎水性の酸化還元ユニット vinyl ferrocene (VFc) からなる、細胞膜透過性の細胞親和性電子伝達ポリマー poly(MPC-co-VFc) (pMFc,  $E = 0.5 \text{ V vs. SHE}$ ) を開発してきた。一方、任意の目的に応じた生細胞代謝制御を実現する上においては、より精密で柔軟な細胞内レドックス状態の調整が必要である。こうした課題認識の下、pMFc における分子量 ( $M_w$ )・疎水性 VFc ユニット含有比 ( $R$ ) をパラメータとした、細胞膜透過性、ひいては電子伝達速度の制御を試みた。

【実験】pMFc は対応するモノマーのフリーラジカル重合により合成し、 $M_w \cdot R$  は、それぞれ開始剤濃度およびモノマー仕込み比を変えることにより制御した。pMFc の電子伝達速度の評価は、モデル生細胞 (大腸菌と酵母) においてグルコース代謝由来の代謝電流を測定することにより行った。また、電子伝達速度と代謝改変の度合いの関係を検討するため、pMFc 存在下、非存在化において、酵母の嫌気培養を行った。

【結果と考察】異なる  $M_w \cdot R$  を有する pMFc の電子伝達速度を比較した結果、 $M_w$  が小さく、 $R$  が大きくなると電子伝達速度が向上すること、 $R$  が電子伝達速度に対してより大きな影響を及ぼすことが確認された。また、pMFc 共存下では、通常培養時に比べ酵母エタノール生産量が減少し、生育が向上する傾向となった。これは、pMFc が酵母ミトコンドリア内電子伝達系から電子を受け取り、代謝様式を嫌気発酵から酸化的リン酸化に切り替えたことを示唆している。さらに、代謝改変の度合いは、電子伝達速度と良い相関を示していた。以上の結果から、pMFc の適切な分子設計により、電子伝達速度・代謝改変の度合いが制御可能であることが明らかとなった。

1P-040- I

## Hybrid ECM by MPC Polymer Network for Active Cell Immobilization

The University of Tokyo

○Ren Zhang, Yuuki Inoue, Tomohiro Konne and Kazuhiko Ishihara

【Introduction】 In the field cell engineering, it is still an obstacle to regenerate tissues or organs from living cells. The control of the immobilized cells in the cytocompatible scaffold biomaterials is demanded. In the previous research, poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-*co*-*n*-butyl methacrylate-*co*-*p*-vinylphenylboronic acid) (PMBV) and poly(vinyl alcohol) (PVA) spontaneously form a hydrogel under mild condition from these solutions with cell culture medium. Meanwhile, for effectively controlling and enhancing the activity of the immobilized cells in the hydrogels, some cytokines are added in the hydrogel previously. Basic FGF (bFGF) can stimulate the proliferation and ECM secretion of cells. Active ester groups were added in PMBV chain to introduce bFGF on PMBV to fabricate PMBV-bFGF. And hydrogel matrix was prepared with PVA. The PMBV-bFGF/PVA matrix would provide suitable circumstances for 3 dimensional-cell culture and tissue fabrication.

【Experiment】 The hydrogels were fabricated by a simple mixing of PMBV-bFGF (5.0 wt%, with L929 cells) with PVA (2.5 wt%) under room temperature. After cell culture, hydrogel was dissolved by adding 5.0 wt% of the sorbitol solution for more than 1 h and by using trypan blue exclusion method to evaluate the proliferation of the L929 cells.

【Results and discussion】 The gelation reaction between PMBV-bFGF and PVA was performed successfully. The storage modulus of the hydrogel was depended on the blend ratio of PMBV and PVA, and the storage modulus can be adjusted from 0.1 kPa to 12 kPa. The L929 cells were immobilized successfully in the PMBV-bFGF/PVA hydrogel. Evenly distributed cell immobilization was observed in the hydrogel with storage modulus from 3 kPa to 7 kPa. The bFGF is active after the fixation on the PMBV and gelation reaction with PVA. The proliferation of the immobilized cells was performed by the existence of bFGF. Also, ECM secretion was promoted by the existence of the bFGF from proliferated cells. Herewith, a hybrid ECM material capable of maintaining the cell environment can be obtained.

## 1P-041-Ⅱ

### フェムト秒レーザーで表面修飾したジルコニア上における細胞挙動の評価

<sup>1</sup>早稲田大学理工学術院, <sup>2</sup>産業技術総合研究所健康工学研究部門, <sup>3</sup>産業技術総合研究所電子光技術研究部門  
○橋本祥吾<sup>1</sup> (Hashimoto Shogo), 安永菜由<sup>2</sup>, 廣瀬志弘<sup>2</sup>, 欠端雅之<sup>3</sup>, 屋代英彦<sup>3</sup>, 山崎淳司<sup>1</sup>, 伊藤敦夫<sup>2</sup>

【緒言】細胞の足場となる生体材料の表面性状は細胞の接着、増殖、分化などの基本的細胞挙動に影響を与えることが分かりつつある。これまで我々は、生体活性セラミックスである水酸アパタイトの表面性状がラット間葉系幹細胞の初期細胞接着に影響を与え、初期細胞接着面積と骨分化能が逆相関することを見出した。生体不活性セラミックスの1つであるジルコニアは難加工材料であるが、フェムト秒レーザーを用いて表面の微細加工が可能である。そこで今回、フェムト秒レーザーで表面修飾したジルコニア上での初期の細胞接着挙動を評価したので報告する。

【実験】イットリア安定化正方晶ジルコニア多結晶体 (3Y-TZP) にフェムト秒レーザー (中心波長 810 nm、パルス幅 80 fs) を照射しレーザー誘起表面周期構造を形成させた。品質確認後、滅菌処理したものを細胞実験に使用した。表面修飾した 3Y-TZP での細胞接着の表面選択性および毒性の有無について検証するため、TCPS の well に 3Y-TZP を静置し、マウス線維芽細胞 (NIH3T3) を播種し、3 時間培養後、3Y-TZP 上と well 底に接着している細胞を区別し、生細胞数について CellTiter-Glo、Cell Counting Kit-8 を用いて解析した。さらに初期細胞接着面積への影響を解析するため、3Y-TZP 上で NIH3T3 を 2 時間培養し、Live/Dead 試薬を添加し、さらに 1 時間培養後、画像解析で細胞接着面積を測定した。

【結果と考察】NIH3T3 播種 3 時間後の 3Y-TZP 上と well 底に接着している生細胞数を測定した結果、表面修飾無し 3Y-TZP と比較して、表面修飾有り 3Y-TZP ではジルコニアに接着した細胞数が多く、細胞接着における表面選択性が高い可能性が示唆された。また、3Y-TZP 上と well 底に接着している生細胞数の総和は表面修飾の有無で変化しないことから、毒性は無いと判断した。さらに播種 3 時間後の表面修飾有り 3Y-TZP での細胞接着面積は、表面修飾無し 3Y-TZP と比較して小さくなる傾向が観察され、水酸アパタイトと同様に、生体不活性セラミックスにおいても表面性状が細胞接着に質的影響を与える可能性が示唆された。現在、材料の表面性状と細胞分化の相関性など、表面性状の細胞に対する機能の解析を、ラット間葉系幹細胞の骨分化能を指標に検討している。



図1. 表面修飾無し(左)及び表面修飾有り(右)のジルコニア上におけるNIH3T3の蛍光顕微鏡画像

## 1P-042-Ⅰ

### 血管内皮細胞を活性化するための硫酸化ポリロタキサン表面の設計

<sup>1</sup>東京医科歯科大学生体材料工学研究所, <sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
○兵頭克弥<sup>1,2</sup> (Hyodo Katsuya), 有坂慶紀<sup>1</sup>, 山口 聡<sup>2</sup>, 由井伸彦<sup>1</sup>

【緒言】血管内皮細胞は、その細胞周囲環境や液性因子による細胞内シグナリングによってその機能が調節されている。例えば、血流や細胞周囲の細胞外マトリックスは細胞骨格タンパク質であるアクチン繊維の形成に関与し、血管新生や脈管形成に働く低分子量 GTPase である Rho ファミリーの活性化を制御している。また液性因子である血管内皮細胞増殖因子(VEGF)はこの Rho ファミリーの活性化を促進する働きがあり、細胞周囲環境と VEGF シグナルの両因子は血管内皮細胞の活性化に重要な役割を担っている。一方で、これまでに当分野では線状高分子(e.g. ポリエチレングリコール)が環状分子(e.g. シクロデキストリン)の空洞部を貫通したポリロタキサン(PRX)の構造特性に着目し、線状高分子鎖に沿って環状分子が運動し得る分子可動特性を有した PRX 表面を用いて RhoA や Rac1 の活性制御に成功している。さらに硫酸化した PRX 表面を作製することによって、ヘパリン結合性成長因子を表面導入することが可能となり、液性因子シグナルと分子可動性に依存したメカノシグナルを両立した細胞育成環境が構築できることを報告している。そこで今回、ヘパリン結合性成長因子である VEGF を表面導入した硫酸化 PRX 表面を設計し、この表面が血管内皮細胞に与える影響について解析した。

【実験】PRX および硫酸化 PRX を被膜した表面を用いて、VEGF の表面導入群および添加群でのヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)の細胞形態・細胞増殖評価を行った。細胞播種、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 後の細胞を位相差顕微鏡で撮影し、Image-Jにて細胞形態・細胞数の解析を行った。

【結果と考察】HUVEC の細胞形態は、PRX 表面の $\alpha$ -CD 貫通数、VEGF の表面導入・添加群において有意な差は見られなかった。しかし細胞増殖は $\alpha$ -CD 貫通数が多い表面において促進される傾向が認められた。さらに VEGF 添加群と比較して、VEGF 表面導入群は効率的に細胞増殖を促すことが明らかとなった。これらの結果は、PRX 表面の分子可動性制御と VEGF の表面導入によってヒト由来血管内皮細胞に効率的にシグナル伝達できる可能性を示唆している。現在、他種細胞との共培養を組み合わせてながらヒト由来血管内皮細胞の機能について評価を行っている。

## 1P-043- II

### 正電荷を有する温度応答性高分子を用いた細胞分離カラムの作製

慶應義塾大学 薬学部

○稲永大夢 (Inanaga Daimu), 永田勇貴, 長瀬健一, 金澤秀子

#### 【緒言】

近年、細胞を用いて疾患を治療する細胞移植療法が行われており、原料となる細胞の分離・精製技術が必要不可欠である。しかし、フローサイトメトリー (FACS)・磁気細胞分離法 (MACS) に代表される細胞分離法は、細胞表面への修飾を必要とするため、細胞移植等に用いる場合には問題となる。そこで本研究では、細胞表面に修飾をせずに温度変化のみで細胞を分離する細胞分離カラムを作製し、各温度による細胞の溶出挙動を観察した。

#### 【実験】

球状のシリカゲルビーズ (粒子径: 75~150  $\mu\text{m}$ ) の表面に温度応答性の *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm)、正電荷を有する *N,N*-dimethylaminopropyl acrylamide (DMAPAAm)、疎水性の *n*-butylmethacrylate (BMA) の架橋構造を有する共重合体 P(NIPAAm-*co*-DMAPAAm-*co*-BMA) を修飾した。作製した高分子修飾ビーズを固相抽出用カラム (1 mL) に充填した。37°C の細胞培養液 (RPMI) でカラムをコンディショニングし、ヒト骨髄性白血病細胞 (HL-60) の細胞懸濁液 1 mL (1.0  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL) をカラムに負荷させた。その後、温度 37°C で細胞培養液 1 mL を 2 回流し、温度 20°C で細胞培養液 1 mL を 3 回流した。それぞれの条件で流出した細胞培養液中に含まれる細胞数を生死細胞数計測機により測定し、細胞溶出挙動を観察した。

#### 【結果と考察】

作製したカラムからの HL-60 の溶出挙動を観察したところ、正電荷を有する P(NIPAAm-*co*-DMAPAAm-*co*-BMA) を修飾した充填剤を用いたカラムの 37°C での HL-60 の保持が大きくなる傾向が確認できた。また温度 37°C 一定の場合に比べて、温度 20°C に変化させた場合では溶出量が増加し、温度変化によるビーズ表面の性質変化により細胞脱着を促進していることが示唆された。また修飾された温度応答性高分子層の厚さを増加させる事により細胞の溶出が増加することもわかった。これらの検討により、正電荷を有する温度応答性高分子を修飾したビーズを用いる事で細胞の保持・溶出を制御できることがわかった。

## 1P-044- II

### アポトーシス抵抗性細胞に殺作用を示すオートファジー誘導性ポリロタキサン<sup>o</sup>の機能評価

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○西田 慶 (Nishida Kei), 田村篤志, 由井伸彦

【緒言】アポトーシスに対する感受性の低下は、悪性腫瘍や動脈硬化性疾患などの治療抵抗性に関連している。これに対して、細胞内成分の分解機構であるオートファジーが関与する細胞死はオートファジー細胞死と呼ばれ、非アポトーシス型の細胞死機序であることからこの経路を利用した新規治療法が試みられている。そこで我々はオートファジー細胞死による細胞死誘導法を確立するために、メチル化 $\beta$ -シクロデキストリン (Me- $\beta$ -CD) を線状高分子に複数貫通させた超分子構造を有するポリロタキサン (Me-PRX) を設計した。Me- $\beta$ -CD は強い細胞膜障害性を有することが知られているが、酸分解性を賦与した Me-PRX は細胞内のリソソーム局所に Me- $\beta$ -CD を放出すると期待される。このような細胞内における Me- $\beta$ -CD の作用は細胞小器官にストレスを負荷し、オートファジーならびにオートファジー細胞死の誘導に寄与すると考えられる。本発表では、酸分解性 Me-PRX によるオートファジー細胞死の誘導およびアポトーシス抵抗性細胞に対する殺細胞作用について評価した。

【実験】 末端封鎖基に *N*-(triphenylmethyl)glycine を用いて Me- $\beta$ -CD を含有する酸分解性 Me-PRX を合成した。Me-PRX を作用したマウス胚線維芽細胞 (MEF) に対して LC3 の産生を評価した。また、Me-PRX のアポトーシス抵抗性細胞に対する殺細胞作用を、アポトーシス関連因子を複数ノックアウトした MEF に対する細胞生存率から評価した。

【結果と考察】 Me-PRX の超分子構造は pH 7.4 では安定に維持したが、pH 5.0 では 24 時間以内に完全な崩壊を示した。次に Me-PRX を MEF に作用した結果、Me-PRX はリソソームへの局在化とともにオートファジー誘導の指標となる LC3-I から LC3-II への転換を促進した。この結果より、Me-PRX はリソソーム pH 環境に応じて Me- $\beta$ -CD を放出しオートファジーを誘導したと考えられる。さらに Me-PRX は作用時間に伴って、caspase-3 非依存的に MEF の細胞生存率が低下した。オートファジーの阻害下では細胞生存率の低下が有意に抑制されたため、Me-PRX によるオートファジー細胞死の誘導が示唆された。また Me-PRX は、アポトーシス抵抗性細胞に対しても通常の細胞と同程度の細胞生存率を示したことから、オートファジー細胞死の誘導によるアポトーシス抵抗性細胞の殺作用が明らかになった。

## 1P-045- I

### 二種類の可逆的な架橋により形成された形状記憶ゲルのメカノバイオマテリアルへの応用

大阪大学大学院基礎工学研究科

○前田純貴 (Maeda Junki), 中畑雅樹, 境 慎司, 田谷正仁

【緒言】生体内でバイオマテリアルは常に様々な力学的刺激に晒されており、それらの「力」に対する制御機構の解明を目指す「メカノバイオロジー」が近年注目を集めている。刺激応答性材料の一種である形状記憶材料は、刺激を加えるだけで材料の力学特性を制御できるため、メカノバイオロジー研究への応用が期待できる。しかし、細胞生育環境において生体適合性の高い刺激を用いて力学特性を制御することは未だ難しく、化学架橋を用いた多くの形状記憶材料は、使用後に分解できない等の問題がある。本研究では、ボロン酸-ジオール相互作用と金属-配位子相互作用の 2 種類の可逆的な架橋を組み込んだ水溶性高分子からなるヒドロゲルを作製した。相互作用の可逆性を活かして、力学的に活性な架橋点の数を競争反応により制御することで材料の硬さ・形状を制御した。また刺激に応答した分解可能性を調べた。更に、形状記憶されたヒドロゲル表面上での細胞の動態を時空間的に観察し、メカノバイオロジー材料への応用可能性を調査した。

【実験】アルギン酸にフェニルボロン酸を導入した Alg-3APBA とポリビニルアルコールにゼラチンを修飾した PVA-gela の 2 種類の高分子水溶液を混合し、ボロン酸-ジオール相互作用で架橋した超分子ヒドロゲルを調製した。さらに FeCl<sub>3</sub> 水溶液に浸漬することでアルギン酸間の金属イオン相互作用による架橋を形成させた。ゲルに様々な濃度、種類の糖を加えることで制御されるゲルの硬さ変化を評価した。またゲルの培養基材としての利用可能性、および形状記憶されたゲル上の 10T1/2 細胞の動態を時空間的に評価した。

【結果と考察】ゲルに様々な濃度 (0-100 mM) のフルクトースを添加することで、ゲルのヤング率を 15-50 kPa の範囲で制御することができた。種々の糖 (グルコース、ガラクトース、フルクトース) を用いた場合、ボロン酸との結合定数の違いによりゲルの硬さを制御することができた。ゲル上で 10T1/2 細胞が接着・伸展可能であり、高い生存率を保ったまま増殖することを確認した。ゲルへの糖の添加と洗浄によるゲルからの糖の除去により、ゲルが所望の形に形状記憶可能であることが示された。この形状記憶はマイルドな刺激 (50 mM 程度のフルクトースの添加) によって制御でき、ゲルの上で細胞培養を行いながら形状記憶を行なうことにも成功した。

## 1P-046- II

### 薬物を用いないがん治療戦略：がん細胞表面でのゲル形成による細胞死誘導

甲南大学フロンティアサイエンス学部

○真田ゆか (Sanada Yuka), 長濱宏治

【緒言】がん組織内には、がん細胞だけでなく、悪性化に関与する細胞 (がん幹細胞、がん関連線維芽細胞、腫瘍関連マクロファージなど) も含まれている。そのため、がん根治のためには、がん細胞に加え、これらの細胞も死滅させる必要がある。その手法として、私たちはがん組織内のすべての細胞表面で高分子ゲルを形成させることで、栄養分やシグナル伝達分子の細胞内取り込みを抑制し、さらに老廃物の細胞外排出を抑制することで、がん組織内の細胞外環境を悪化させ、がん組織内の全ての細胞を死滅させるというアイデアを考案した。本発表では、細胞表面でのゲル形成、細胞表面でのゲル形成が細胞接着、細胞浸潤、細胞死、細胞増殖などに及ぼす影響について報告する。

【実験】細胞表面に高分子を結合するため、細胞の糖代謝反応を利用して、膜タンパク質の糖鎖末端シアル酸にアジド基を導入した。がん細胞 (MCF-7) 表面アジド基とアルキン化アルギン酸をクリック反応させ、細胞表面にアルギン酸を共有結合した。カルシウムイオンを添加し、細胞表面のアルギン酸分子間をイオン結合により架橋することで、細胞表面でのみゲルを形成した。共焦点顕微鏡と SEM 観察により、細胞表面で形成されたゲルについて解析した。WST-1 アッセイ及び Live/Dead アッセイにより、細胞表面へのアルキン化アルギン酸の結合、及びカルシウムイオン添加によるゲル形成が細胞の生存性にどう影響するかを調べた。担がんマウスの腫瘍内の細胞表面糖鎖をアジド化し、尾静脈もしくは腹腔内にアルキン化アルギン酸を投与することで、*in vivo* で腫瘍内細胞にアルキン化アルギン酸の共有結合が可能かを検証した。

【結果と考察】細胞膜タンパク質の糖鎖末端シアル酸にアジド基を導入し、アルキン化アルギン酸を与えると、30 分後には細胞表面にアルギン酸が共有結合した。また、カルシウムイオン (溶液濃度 0.5%) を添加すると、30 分後にはゲルが形成された。細胞表面にアルギン酸を共有結合したがん細胞では、細胞死は起こらず、細胞は増殖したが、ゲル形成したがん細胞の活性は徐々に低下し、細胞死が誘導された。最終的に、72 時間後には生存率が 30% 以下となった。以上より、がん細胞表面でゲルを形成させることは、がん細胞に細胞死を誘導する効果的な手法であることが示された。さらに、マウス体内でも、細胞のアジド化やアルギン酸との共有結合は起こることを確認した。

## 1P-047- I

### 機械特性に優れる二成分系ファイバー基材への温度応答性ブラシ修飾と細胞分離

<sup>1</sup>早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻, <sup>2</sup>東京女子医科大学先端生命医科学研究所, <sup>3</sup>慶應義塾大学薬学部

○宿輪理紗<sup>1,2</sup> (Shukuwa Risa), 長瀬健一<sup>2,3</sup>, 高橋宏信<sup>2</sup>, 武田直也<sup>1</sup>, 岡野光夫<sup>2</sup>

【緒言】再生医療分野において、容易に大量の細胞を分離する技術の開発が求められている。我々は比表面積の大きなマイクロ形状の分離基材を充填したカラムに細胞懸濁液を通し、段階的に細胞を回収することで、基材への細胞の接着性の差を利用した細胞分離を行なっている。さらに、マイクロファイバーの表面に対して温度応答性高分子 Poly(*N*isopropyl acrylamide) (PIPAAm) を修飾し、温度変化による大量の細胞の分離を目指している。本研究では、PIPAAm の重合開始点を有する Poly(4-vinylbenzyl chloride) (PVBC) とガラス転移点の低い Poly(*n*-butyl methacrylate) (P*n*BMA) を混合したファイバーの表面に PIPAAm を修飾することにより、機械的強度を向上させたファイバー分離基材を作製した。

【実験】PVBC と P*n*BMA を重量比 1:0、3:1、1:1、1:3、0:1 で混合し、エレクトロスピンニング法によりファイバーを紡糸した。これら 5 種類のファイバーに対して引張試験を行い、引張強度とヤング率を算出した。続いて、表面開始原始移動ラジカル重合法により PIPAAm をファイバー表面へ修飾した。このファイバー上にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と正常ヒト皮膚繊維芽細胞 (NHDF) を播種し、37°C で 3 時間培養後、20°C でさらに 1 時間培養した。各段階で核とアクチンを染色後に蛍光観察することにより、接着率を算出した。

【結果と考察】いずれのポリマー混合条件でも、紡糸したファイバーの直径は同じオーダーとなり、15-30 μm であった。また、P*n*BMA の比率が増加するにつれてファイバーの引張強度やヤング率が大きくなり、機械的強度が向上した。この 5 種類の中で最大強度を有する PVBC:P*n*BMA=1:3 のファイバー表面に PIPAAm ( $M_n$ : 1200,  $M_w/M_n$ : 1.14) をグラフトした後、このファイバー上で細胞の接着・脱着の挙動を評価した。37°C で 3 時間培養後にはファイバー表面に多くの NHDF が接着する一方で、ほとんどの HUVEC は接着しなかった。その後、20°C で 1 時間培養すると、接着していた NHDF の多くが脱着した。また、PIPAAm 重合や細胞播種などにおける物理的な負荷を与えた際にもファイバーの破損は見られなかった。この結果より、37°C で 3 時間培養して未接着の HUVEC を分離し、さらに 20°C で 1 時間培養後に脱着した NHDF を回収することで、2 種類の細胞を分離できることが示唆された。

## 1P-048- II

### 細胞培養基材への応用を目指した光・温度応答性ヒドロゲルの創製

<sup>1</sup>関西大化学生命工, <sup>2</sup>関西大 ORDIST

○松田安叶<sup>1</sup> (Matsuda Akana), 河村暁文<sup>1,2</sup>, 宮田隆志<sup>1,2</sup>

【緒言】細胞の接着挙動や分化挙動は周辺環境の化学的性質や物理的性質に影響されることから、これらの性質を変化できる細胞培養足場が研究されている。しかし、外部刺激を利用した時間ファクターを含む“四次元培養”によって細胞挙動を制御する研究はほとんど行われていない。そこで本研究では、光照射時間により弾性率を制御でき、温度により親水性-疎水性を変化させる四次元細胞制御基材の開発を目的として、可逆的な光二量化反応を示す 7-メタクリロイルオキシシクマリン (MAC) と下限臨界溶解温度 (LCST) を有するメトキシオリゴエチレングリコールメタクリレート (OEGMA) とを用いて、光照射によりゾル-ゲル相転移する新規な光・温度応答性ポリマーを合成した。このポリマーの光・温度応答挙動やそのゲル上で細胞培養した際の細胞挙動も調べた。

【実験】MAC と OEGMA との共重合により P(MAC-*co*-OEGMA) を合成した。得られたポリマー水溶液の各温度における透過率を測定し、その温度応答性を評価した。また、ポリマー水溶液に所定時間光照射した際の弾性率をレオメーターにより測定した。さらに、光照射時間により弾性率を変化させた P(MAC-*co*-OEGMA) ゲル上にマウス線維芽細胞 (L929) を播種した際の細胞接着挙動や異なる温度で培養した際の挙動も観察した。

【結果と考察】得られたポリマー水溶液の透過率は体温付近を境に大きく低下し、LCST を示すことがわかった。また、ポリマー水溶液に光を照射するとゾル状態からゲル状態に相転移し、その弾性率は光照射時間の増加に伴って増加することが明らかになった。これは、光照射により共重合体中の光二量化基が二量体を形成してゲルの架橋点として作用したためと考えられる。そこで光照射時間により弾性率を変化させた P(MAC-*co*-OEGMA) ゲル上で L929 を培養すると、弾性率の高いゲルの方が接着細胞数は多かった。これは、細胞が足場の弾性率の影響を受けたためと考えられる。さらに、30 °C で細胞を培養すると、接着している細胞数の割合が低くなることがわかった。P(MAC-*co*-OEGMA) ゲルは 33 °C に LCST を有しているため、33 °C ではゲル表面が親水性となるために、細胞接着率が低下したと考えられる。以上の結果より、光・温度応答性共重合体は光照射により弾性率を変化でき、細胞接着を制御できる細胞制御材料として期待できる。

## 1P-049- I

### フジツボ由来ペプチドを用いた組織工学用ハイドロゲルの設計と機能評価

<sup>1</sup>関西大学化学生命工, <sup>2</sup>関西大学先端機構, <sup>3</sup>製品評価技術機構

○藤井大輔<sup>1</sup> (Fujii Daisuke), 紙野 圭<sup>3</sup>, 柿木佐知朗<sup>1,2</sup>, 平野義明<sup>1,2</sup>

#### 【緒言】

医療の分野では幹細胞を用いた組織再生に注目が集まっており、様々な研究が盛んに行われている。しかし、組織再生において2次元培養では細胞同士の相互作用が少ないため、組織構築が困難である。そのため細胞を3次元的に培養する必要がある。そこで、 $\beta$ -シート構造を有するフジツボ由来ペプチド RRKYSGLIGDLIQVAVIRYY (R-Y)の利用を考えた。われわれはR-Yに細胞接着性配列RGDSを導入し3次元培養用足場への応用を考えた。本研究では、RGDSをC末端に導入したもの(RGDS-R-Y)、中央部に導入したもの(R-RGD-Y)、N末端に導入したもの(RGDS-RY)の3種類の導入位置が異なるペプチドを設計し、これらのペプチドが3次元培養用足場への応用が可能か検討した。

#### 【実験】

ペプチドをFmoc固相合成法で合成し、円偏光二色性スペクトル法(CD)および赤外分光法(IR)で二次構造を解析した。次にペプチドゲルを作製し、電子走査顕微鏡(SEM)で内部構造の観察を行った。また、レオメーターを用いてペプチドゲルの強度を測定した。作製したゲルを用いて細胞実験を行い、細胞の形態および接着数を評価した。さらに、ペプチドゲルで2次元的に培養したものと、3次元的に培養したものとで細胞の機能の違いを評価した。

#### 【結果と考察】

CDスペクトルおよびIRスペクトルの結果より、RGDSの導入位置により $\beta$ -シート構造の安定性が異なることが明らかになった。これは、RGDSの電荷およびターン構造がR-Yの $\beta$ -シート構造の形成を阻害するために起こっていると考えられる。SEMの結果から、すべてのペプチドゲルで多孔質な構造を形成していることが示唆された。また、レオメーターの結果よりすべてのペプチドゲルがコラーゲンゲル以上の力学強度を有していることが明らかになった。細胞実験の結果はポスターにて発表する予定である。

## 1P-050- I

### 種々の陽イオンを置換した水酸アパタイトセラミックスの作製とそれらの細胞応答性

明治大学大学院理工学研究科

○伊東莉菜 (Ito Rina), 横田倫啓, 相澤 守

#### 【緒言】

ヒトの硬組織を構成している主な無機成分は水酸アパタイト( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp)であり、それには多くの微量元素が含まれている。これら微量元素のHApへの置換は、純粋なHApと比較して高い生体適合性および生体活性を与えることができる。本研究では、硬組織中に含まれるミネラルの中でカルシウムの次に多く含まれる $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ の3種類の陽イオンに着目し、超音波噴霧熱分解法 [1]を用いて陽イオン置換HApを調製し、それらの細胞応答性について評価した。

#### 【実験】

陽イオン置換アパタイト粉体は、出発溶液の陽イオン濃度を仕込み組成でHAp中に5 mol%含有されるように調製し、それらを噴霧熱分解することで合成した。なお、合成した試料粉体の略号は置換する陽イオンにもとづいて“NaAp”, “KAp”および“MgAp”と表記する。得られた粉体を成形・焼成することで陽イオン置換アパタイトセラミックスを作製した。得られた粉体およびセラミックスは粉末X線回折法(XRD)などにより評価した。さらに、各セラミックス上でマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)もしくはラット骨髄由来間葉系幹細胞(RBMC)を一定期間培養し、細胞の初期付着率や形態、骨分化レベルの違いなどについて評価した。

#### 【結果と考察】

XRDの結果より、NaApおよびKApではHAp単一相であったのに対し、MgApでは一部 $\beta$ -TCP相も検出された。また、陽イオン置換アパタイトセラミックスの相対初期付着率は、純粋なHApセラミックスのそれよりも低かったが、培養24 h後の細胞形態より、すべてのセラミックス上で細胞が伸展していることが確認できた。また、骨分化評価において、最も高いアルカリホスファターゼ(ALP)活性を示したのはMgApセラミックスであった。これらのことから、今回調査した3種類の陽イオンの中で、 $\text{Mg}^{2+}$ が骨芽細胞の分化の促進に有用であることがわかった。

[1] M. Aizawa, K. Itatani and I. Okada, *Phosphorus Res. Bull.*, **20**, 61-78 (2006).

1P-051- I

## 免疫賦活剤を担持させた水酸アパタイトセラミックスの免疫細胞応答性

<sup>1</sup> 明治大学大学院理工学研究科応用化学専攻, <sup>2</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子免疫学分野

○加々見早苗<sup>1</sup> (Kagami Sanae), 木造理萌子<sup>1</sup>, 永井重徳<sup>2</sup>, 相澤 守<sup>1</sup>

【緒言】近年、がん治療では副作用の少ない免疫療法が注目されており、この療法に用いられる一般的な免疫賦活剤として抗 CD3 抗体とコンカナバリン A (Con A) があげられる。我々はこれまでに表面にナノ気孔を備えたリン酸カルシウム微小球を薬剤徐放システム (DDS) のキャリアとし、薬剤として血管新生抑制剤を担持させた、新しい化学塞栓療法を提案している[1]。本研究は、その微小球に免疫賦活剤 (抗 CD3 抗体, Con A) を担持させ、新しい免疫療法を確立することを目的としている。今回は、その予備的検討として、水酸アパタイト (HAp) 粉体およびセラミックスに免疫賦活剤を担持させ、その徐放特性およびそれらの免疫細胞応答性を調査したので報告する。

【実験】HAp-100 粉体 (太平洋化学) ~0.01 g に対し、免疫賦活剤溶液 1.5 cm<sup>3</sup> を加え、マイクロチューブ内で 25 °C、48 h 振とうすることで免疫賦活剤を担持した。その後、中性および酸性条件下で免疫賦活剤の徐放特性を調査した。また、HAp-100 粉体を成形、焼成後、Con A は 1500 ppm、抗 CD3 抗体は 5 ppm の溶液に浸漬させ、免疫賦活剤担持 HAp セラミックスを得た。セラミックスに C57BL/6N マウス由来脾臓細胞を播種し、培養 1 日後、フローサイトメーターを用いて活性化免疫細胞 (CD69 陽性細胞) の割合の決定し、走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察を行なった。

【結果と考察】リリース実験では、どちらの薬剤も酸性条件下の方が中性条件下よりも多くの薬剤を放出した。サイトグラムの解析結果より、どちらの薬剤を担持したセラミックスでも、活性化マーカー発現細胞の割合は増加し、特に抗 CD3 抗体を担持したセラミックス上で活性化免疫細胞の高い割合を示した。さらに、SEM による観察結果から、球状の細胞が基材上に接触していることが観察された。これらの結果から、免疫賦活剤担持 HAp セラミックスは、がん免疫療法に用いる DDS のキャリア材料として期待できる。

[1] M. Emoto *et al. Cancer Sci*, **101**, 984-990 (2010).

1P-052- I

## 血清存在下で分解されるゲルを作製可能な溶解性の高いアミロペクチン誘導体の開発

<sup>1</sup> 大阪大学大学院基礎工学研究科

○服部晃治<sup>1</sup> (Hattori Koji), 境 慎司<sup>1</sup>, 中畑雅樹<sup>1</sup>, 田谷正仁<sup>1</sup>

【緒言】近年、生体外でより機能的な 3 次元組織体を構築するためのキーマテリアルとして、細胞の足場となる様々な機能をもったヒドロゲルの研究が広く進められている。これまで、我々のグループではフェノール性水酸基を導入したアミロペクチン誘導体 (AP-Ph) を溶解させた水溶液と西洋わさび由来ペルオキシターゼ (HRP) を用いたヒドロゲルの開発を進めてきた。アミロペクチンはウシ胎児血清 (FBS) にも含まれるアミラーゼでの分解が可能なることから、このヒドロゲルは FBS を含んだ培地中で除去が可能であるため、血管構造の構築や細胞が伸展するための空間の付与などに応用することができる。一方で AP-Ph の溶解性の低さから、これまでのヒドロゲルは白濁によって視認性が悪く、また AP-Ph の溶解に長時間の攪拌が必要といった問題があった。これらを解決するために、本報告ではフェノール性水酸基だけでなく、新たに親水基であるカルボキシメチル基を導入したフェノール水酸基導入カルボキシメチル化アミロペクチン (CMAP-Ph) を作製した。また、作製したアミロペクチン誘導体の溶解性や HRP によるゲル形成能、得られるヒドロゲルの分解性に関する調査を行った。

【実験】トウモロコシ由来のアミロペクチンにクロロ酢酸を用いてカルボキシメチル基を導入し、次いで NHS、WSCD、チラミンを用いてフェノール基を修飾することで CMAP-Ph を作製した。この CMAP-Ph を PBS に溶解させ、吸光分析を行い AP-Ph の溶液と比較することで溶解性の変化を調査した。また、得られた高分子溶液に HRP (300 U/ml) 及び H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 ml) を添加することでヒドロゲルを作製し、ゲル化に要する時間を調査した。また、作製したヒドロゲルを 10% の FBS 含む DMEM 培地中に浸して 37 °C で 48 h 静置した。

【結果と考察】CMAP-Ph はフェノール性水酸基のみを導入した AP-Ph と比較して PBS に対する溶解性が改善されていることが確認された。この CMAP-Ph 溶液に HRP と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> をそれぞれ 300 U/ml と 1 mM となるように添加したところ、約 4 s でゲル化が可能であった。さらに、作製したヒドロゲルは血清添加培地中で 48 h 以内に分解された。これらの結果より、CMAP-Ph のヒドロゲルを用いれば、任意の形に成形した後に異なる高分子から作製したヒドロゲルで覆い、血清を含む培養液に浸すことで、細胞に対して穏和に任意の形の中空構造を形成可能であると期待できる。

1P-053- I

## リゾチーム金ナノクラスター/ローズベンガル複合体の創製と光線力学的評価

<sup>1</sup>北海道大学大学院歯学研究院歯周・歯内療法学教室, <sup>2</sup>関西大学化学生命工学部化学・物質工学科, <sup>3</sup>北海道大学大学院歯学研究院生体材料工学教室

○岡本一絵<sup>1</sup> (Okamoto Ichie), 宮治裕史<sup>1</sup>, 宮田さほり<sup>1</sup>, 薮佳奈子<sup>1</sup>, 川崎英也<sup>2</sup>, 赤坂 司<sup>3</sup>, 菅谷 勉<sup>1</sup>

### 【緒言】

歯周病等の口腔感染症に対する抗菌的光線力学療法 (aPDT) が注目されている。今回、我々は金ナノクラスター粒子を中心に、光感受性色素ローズベンガル (RB) を配置した複合体を新規に創製、aPDT に応用することを考えた。これは金ナノクラスターが吸収した光エネルギーを共鳴エネルギー移動 (RET) により RB に受け渡し大量の一重項酸素を発生する可能性がある。本研究では、リゾチーム (Lys) によって保護された金ナノクラスター (AuNCs) を RB と複合化した Lys-AuNCs/RB 複合体を創製し、その光線力学的特性を評価した。

### 【実験】

塩化金酸に Lys と NaOH を添加後、攪拌し Lys-AuNCs を作製、さらに RB を添加し 2 時間攪拌、遠心濾過を行って複合体を創製した。光源は白色 LED (SPF-D2、松電舎、420-750 nm) を使用した。まず複合体の粒径測定、一重項酸素の発生、RET の発生を評価した。次に Lys-AuNCs/RB 複合体 (1 µg/mL) を *S. mutans* 懸濁液へ添加して、光照射 (1 min) を行った際の細菌に与える影響を濁度測定、コロニーカウント、SEM 観察、LIVE/DEAD 染色により評価した。また、Lys-AuNCs、Lys-AuNCs/RB 複合体、RB による濁度の比較測定を行った。さらに細胞毒性の評価として、複合体と光照射の生体細胞 (NIH-3T3) への影響を LDH および WST 測定、LIVE/DEAD 染色、免疫染色によって評価した。

### 【結果と考察】

Lys-AuNCs/RB 複合体の分散性は良好で、粒径約 11nm であり、一重項酸素を発生し、RET の発生が確認された。抗菌評価の結果、複合体の添加と光照射によって濁度および細菌数は低い値を示し、バイオフィーム形成量の減少、死菌を認めた。また Lys-AuNCs、Lys-AuNCs/RB 複合体、RB の比較では複合体が有意に低い濁度を示した。細胞毒性評価の結果、複合体添加と光照射による LDH、WST の値に有意差はなく、死細胞数の変化や、細胞骨格に対する影響も認められなかった。これらのことから、Lys-AuNCs/RB 複合体の光照射によって発生した一重項酸素が殺菌効果を発揮したと考えられた。また、複合体の生体細胞に対する毒性は少ないと考えられた。

1P-054- I

## Bacterial adhesion behavior influenced by environmental condition

<sup>1</sup>Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo, <sup>2</sup>LIXIL Corporation

○Zhou Lu<sup>1</sup>, Aya Noguchi<sup>1</sup>, Makoto Nakakido<sup>1</sup>, Kohei Tsumoto<sup>1</sup>, Norifumi Isu<sup>2</sup>, Madoka Takai<sup>1</sup>

[Introduction] Biofilm is a tough nut to crack in health care department, food industry, water treating system, etc. Antibacterial polymer modification supposed to be an effective and popular way of dealing with this problem. However, bacteria display various adhesion characteristics depend on the local condition, the design of antibacterial polymer modification should focus on the application problems. There are so many factors that affect the bacterial adhesion include the surface wettability, surface charge, nutrition contained and flow condition of the environment and so on. Additionally, bacterial species also play an important role in biofilm formation. Understanding the bacteria-material interaction story helps people solving the biofilm related problems. We aim to figure out the influence of material surface properties on bacterial adhesion behavior in this approach and discuss on the suitable bacterial species for an antibacterial material testing.

[Experiment] *Escherichia coli* (ATCC 8739) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) are used in the experiments. Glass and polydimethylsiloxane (PDMS) were employed as substrates with different surface characters. Bacteria were cultured in nutrient rich Lysogeny broth (LB, for *E. coli*), Tryptic soy broth (TSB, for *S. aureus*) and nutrient deficiency M9 minimal medium (for either), respectively. Fluorescence microscope and scanning electron microscope (SEM) were introduced to image the adhered bacteria.

[Result and discussion] *S. aureus* could be clearly detected on glass and PDMS surface within 24 hours incubation in TSB and M9, However, *S. aureus* in TSB grew to a substantial number, huge biofilm was formed and less adhered *S. aureus* was seen in M9. *E. coli* was not able to form biofilm on neither glass nor PDMS surface despite the incubation time extended to 6 days. Altering the medium made no difference. The *S. aureus*, but not *E. coli*, in this study was found to be an ideal species for antibacterial material testing.

## 1P-055- I

### a面を多く露出した水酸アパタイトセラミックス上での間葉系幹細胞の細胞応答性

明治大学大学院理工学研究科

○山田祐大 (Yamada Yuta), 玉澤成記, 相澤 守

【緒言】水酸アパタイト (HAp) は a 面と c 面の二つの結晶面を有しており、生体内において長骨では a 面を、歯のエナメル質では c 面を多く露出している。このような組織部位による HAp の配向性の違いは、細胞の接着や分化に影響を与えていると考えられる。本研究では間葉系幹細胞の分化を促進するセラミックスを作製するため、a 面を多く露出した HAp セラミックスを作製し、そのセラミックス上でラット骨髄由来間葉系幹細胞 (RBMC) を培養し、その細胞応答性について調査したので報告する。

【実験】既報<sup>1)</sup>にしたがって、アパタイトファイバー (AF) に対してアパタイトゲル (AG) を 30 mass% の仕込み組成で添加して混合粉体を合成し、その粉体から作製したセラミックスを「AG30%AF セラミックス」とした。また、比較として等方的な HAp 粉体から作製したセラミックスを「iHAp セラミックス」とした。細胞応答性の評価は、control (ポリスチレンプレート)、AG30%AF セラミックスおよび iHAp セラミックスを培養基材とし、RBMC を播種することで接着、増殖および分化を調査した。細胞接着は播種後 1 日の細胞の核および骨格を染色して評価した。また、細胞増殖性は播種後 1, 3, 5, 7 日の細胞数をカウントして調べた。細胞分化は播種後 2 および 3 週間の細胞のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を染色および定量して調査した。

【結果と考察】細胞の接着形態観察では、AG30%AF セラミックス上で培養した細胞は iHAp セラミックス上で培養した細胞と比べ伸展面積が小さかった。細胞の初期付着率は AG30%AF セラミックスが最も低かったが、増殖性はどの培養基材においても同程度であった。ALP 活性は AG30%AF セラミックス上で培養した細胞が他の 2 つの基材上で培養したものよりも高かった。これらのことから、HAp の a 面は間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を誘導しているものと考えられる。

【引用文献】1) Z. Zhuang *et al.*, *Acta Biomaterialia*, **9**, 6732-6740 (2013).

## 1P-056- I

### 高強度化アパタイトファイバースキャフォールドでの株化軟骨細胞の培養とその定量評価

明治大学大学院理工学研究科

○吉田友資 (Yoshida Yusuke), 本田みちよ, 相澤 守

#### 【緒言】

軟骨組織は血管を持たず、自己修復能の乏しい組織である。そこで、近年ではティッシュエンジニアリングによる軟骨組織再生が注目されている。これまでに我々は、繊維状の水酸アパタイトを用いて、三次元的に細胞培養が可能なアパタイトファイバースキャフォールド (AFS) の開発に成功している<sup>[1]</sup>。今回は AFS の機械的強度を向上させた高強度化 AFS<sup>[2]</sup> を用いて株化軟骨細胞 ATDC5 を培養し、その細胞増殖性を調査するとともに軟骨基質の定量を行なったので報告する。

#### 【実験】

高強度化 AFS は既報<sup>[2]</sup>にしたがい、気孔形成剤である 150  $\mu\text{m}$  径のカーボンビーズ (CB) のみを添加したものと 150  $\mu\text{m}$  径と 20  $\mu\text{m}$  径の CB を等量添加したものと 2 種類の高強度化 AFS (直径約 15 mm $\phi$ , 高さ約 2.5 mm, 気孔率 93~95%) を作製した。各高強度化 AFS に ATDC5 ( $1 \times 10^5$  個) を播種し、細胞増殖性を DNA の定量によって評価した。軟骨基質の発現は Sirius red & Fast green (S&F) 染色および II 型コラーゲンの免疫染色によって調査し、軟骨基質の成分であるグリコサミノグリカンの定量を行なった。

#### 【結果と考察】

ATDC5 は高強度化 AFS 内において良好な増殖を示した。S&F 染色の結果から、コラーゲンが産生されていることがわかった。免疫染色の結果より、ここで発現しているコラーゲンは II 型である可能性が高い。また、150  $\mu\text{m}$  径の CB のみを添加している高強度化 AFS では、より内部まで細胞が侵入し、II 型コラーゲンはより広い範囲で発現していた。これは 150  $\mu\text{m}$  径の CB 由来の気孔が細胞侵入および軟骨基質の産生に有利に働いたためと考えられる。さらに、高強度化 AFS 内において培養日数とともにグリコサミノグリカン量が増加することが確認された。以上の結果より、高強度化 AFS は株化軟骨細胞が増殖し、軟骨基質を産生するための優れた環境を提供していると考えられる。

[1] M. Aizawa *et al.*, *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273(2004).

[2] S. Motojima *et al.*, *Bioceramics*, **22**,

177-180(2009).

## 1P-057-II

### REDV 固定化表面上での血管内皮前駆細胞ホーミングの定量解析

<sup>1</sup> 国立循環器病研究センター研究所生体医工学部, <sup>2</sup> 龍谷大学大学院理工学研究科物質化学専攻

○北川和宜<sup>1,2</sup> (Kitagawa Kazuki), 馬原 淳<sup>1</sup>, 中沖隆彦<sup>2</sup>, 山岡哲二<sup>1</sup>

【緒言】血管の恒常性や微細血管網の発達に関与する血管内皮前駆細胞は、白血球と同様に血管内膜上の選択的なリガンドとの相互作用によりローリングして目的部位へホーミングする。我々はインテグリンリガンドとして知られている REDV ペプチドを脱細胞人工血管の内腔表面に固定化することで、早期内皮化に伴う小口径人工血管の開存を報告した。これには、内皮系前駆細胞がリガンドで捕捉され、ローリングしながら接着するという人工的な内皮化プロセスが関与しているものと考えている。しかしながら血管内皮前駆細胞のローリングに REDV ペプチドが関与することは未だ報告されておらず、ローリング細胞の割合や、細胞接着効率に対するリガンド密度の影響は明らかにされていない。そこで本研究では、REDV ペプチド固定化マイクロ流路を用いて、せん断流下における内皮細胞のホーミング過程の定量化を試みた。

【実験】マイクロ流路 (幅: 5 mm、深さ: 0.2 mm) 表面に MEONP ユニットを含む MPC ポリマーをコートした後、ジエチレングリコールを末端に持つ REDV (diEG-REDV) を固定化した。コントロール界面としてグリシン固定化表面を用いた。インテグリン $\alpha 4\beta 1$  が発現しているヒト臍帯内皮静脈細胞 (HUVEC、 $1.0 \times 10^5$  cells/ml) 懸濁液をマイクロ流路へ注入し、 $1 \text{ dyn/cm}^2$  のせん断応力下で細胞の流れを観察し、捕捉細胞、ローリング細胞、接着細胞の割合と、移動速度を定量化した。

【結果と考察】マイクロ流路に対する MPC ポリマーのコーティングとペプチドの固定化は、接触角、顕微鏡観察によって確認した。マイクロ流路へ細胞を流した場合、REDV ペプチド界面上では、50%の細胞が表面に捕捉されローリングし、その平均移動速度は  $1.5 \text{ mm/sec}$  だった。コントロール表面では、 $2.4 \text{ mm/sec}$  で 29%の細胞がローリングしていたことから、21%の細胞は REDV リガンド選択的なローリングが誘起されていると考えられる。この系に対して、遊離の REDV ペプチドを添加した場合、ローリング細胞の割合は、コントロール界面で観察された値まで減少した。一方で、界面に接着する細胞はいずれの場合でも観察されなかった。これらの結果より、REDV ペプチド固定化表面はインテグリン $\alpha 4\beta 1$  を介してせん断流下で細胞ローリングを誘導できることが示された。また、細胞が界面で接着するためには REDV ペプチドの密度向上が重要であることも判明した。

## 1P-058-I

### CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 系ガラスセラミックスと免疫細胞との相互作用

<sup>1</sup> 明治大学大学院理工学研究科, <sup>2</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

○木造理萌子<sup>1</sup> (Kizukuri Rihoko), 本田みちよ<sup>1</sup>, 永井重徳<sup>2</sup>, 相澤 守<sup>1</sup>

#### 【緒言】

近年、がんの治療法として患者自身の免疫細胞を体外で培養・活性化し、再び患者の体内に戻すことにより治療する「養子免疫療法」が注目されている。我々は免疫賦活効果を備えた新規なバイオセラミックスの創製を最終目的とし、これまでにホウ素含有アパタイト (BAp) を主成分とする CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (CPSB) 系ガラスセラミックス上でのマウス由来脾臓細胞の応答性を調査したところ、ヘルパーT細胞とキラーT細胞の細胞比率が増加することを明らかにしている[1]。本研究では、その要因がセラミックスと細胞との直接的な相互作用によるものと作業仮説を立て、その検証を行なった。

#### 【実験】

既報 [2] に準じて、ゾルゲル法により Ca/P モル比を 1.67, 2.00 および 2.50 に変化させた 3 種類の CPSB 系ガラスセラミックスを作製した。得られたセラミックスに C57BL/6N マウス由来脾臓細胞を播種した。また、Transwell® インサート上にセラミックスを置くことで、セラミックスと細胞が直接接触しない環境での培養を行なった。Control には細胞培養用ポリスチレンプレートをを用いた。培養 1 日後、フローサイトメーターを用いて各種免疫細胞の割合を調査した。

#### 【結果と考察】

CPSB 系ガラスセラミックス上で直接培養した脾臓細胞は、Control と比較してヘルパーおよびキラーT細胞の割合が増加していた。一方、セラミックスと接触させずに培養した際は、T細胞の割合に大きな変化は見られなかった。すなわち、セラミックスに T細胞が接触することで刺激が与えられていることが示唆された。BAp はその構造中に糖鎖と結合することができる BO<sub>2</sub> 基を有しており、セラミックス中の BO<sub>2</sub> 基と細胞表面の糖鎖が結合することによって、T細胞へ刺激が与えられていると考えられる。

[1] R. Kizukuri *et al.*, 16th Australasian BioCeramics Symposium, Brisbane, Australia, 5th-6th, December 2016.

[2] M. Aizawa *et al.*, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **103**, 547-551(1995).

## 1P-059- I

### 温度応答性高分子ブラシ修飾シリカビーズを用いた細胞分離の検討

<sup>1</sup>慶應義塾大学大学院薬学研究科, <sup>2</sup>東京大学大学院工学系研究科

○永田勇貴<sup>1</sup> (Nagata Yuki), 長瀬健一<sup>1</sup>, 秋元 文<sup>2</sup>, 金澤秀子<sup>1</sup>

【緒言】近年、細胞移植により生体の治癒能力を引き出す再生医療が新たな治療法として展開されており、移植細胞を分離・精製する技術の重要性が高まっている。しかし、代表的な細胞分離方法であるフローサイトメトリー (FACS)、磁気細胞分離法(MACS)は、細胞表面への修飾が必要となり、移植細胞の精製法としては望ましくない。そこで本研究では、温度応答性高分子ブラシをシリカビーズ表面に原子移動ラジカル重合 (ATRP) を用いて修飾し、これを用いた細胞分離カラムを作製した。このカラムを用いて、細胞を未修飾で分離する検討をおこなった。

【実験】シリカゲルビーズ (粒径: 75-150  $\mu\text{m}$ ) 表面にシランカップリング反応により ATRP 開始剤を修飾し、ATRP により温度応答性高分子ポリ *N*-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm)ブラシを修飾した。この際、NIPAAm モノマーの仕込み濃度を調節することで表面に修飾される PNIPAAm 鎖長を制御した。作製したシリカビーズを CHN 元素分析により評価し、反応溶液中に生成した PNIPAAm の分子量をゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)により測定した。温度応答性シリカビーズを固相抽出カラムに充填した。作製したカラムにヒト骨髄性白血病細胞 (HL-60)を負荷し、37°Cでの保持挙動、20°Cでの溶出挙動を観察した。

【結果と考察】CHN 元素分析の結果より、炭素、窒素の質量分率が ATRP の前後により増加していることから、ATRP により PNIPAAm がシリカビーズ表面に修飾されていることを確認した。また GPC の結果より、分子量が NIPAAm の仕込み濃度に伴い増加することがわかった。作製したカラムに HL-60 を 37°Cで負荷したところ、シリカビーズ表面に修飾された PNIPAAm の鎖長により保持挙動が異なることがわかった。また 20°Cでの HL-60 の溶出率もシリカビーズ表面の PNIPAAm 鎖長により異なることがわかった。これらはシリカビーズ表面に修飾された PNIPAAm の濡れ性変化に起因すると考えられる。これらの結果により、温度応答性高分子ブラシ修飾シリカビーズを充填した細胞分離カラムを用いて温度変化による細胞の保持、溶出が可能であることがわかった。

## 1P-060- I

### イノシトールリン酸を修飾した水酸アパタイト焼結体の免疫細胞に与える表面粗さの影響

<sup>1</sup>明治大学, <sup>2</sup>東京医科歯科大学

○上野太郎<sup>1</sup> (Ueno Taro), 木造理萌子<sup>1</sup>, 山田清貴<sup>1</sup>, 永井重徳<sup>2</sup>, 相澤 守<sup>1</sup>

#### 【緒言】

現在、副作用の少ない新規のがん治療法として養子免疫療法が注目されている。我々は養子免疫療法における新規の培養基材の開発を目的として、イノシトールリン酸 (IP6) を水酸アパタイト (HAp) セラミックスに表面修飾した「IP6-HAp セラミックス」が高い免疫賦活効果を示すことを明らかにしている[1]。本研究では、表面粗さを変化させた IP6-HAp セラミックスを作製し、それらに対するマウス由来脾臓細胞の接着性について調査したので報告する。

#### 【実験】

HAp セラミックスは太平化学製 HAp-100 粉体を用いて、1200 °C で 5 時間焼成して作製した。鏡面研磨後、#60 または #2000 の研磨紙でセラミックス表面を研磨して表面粗さの異なる HAp セラミックスを得た。このセラミックスを IP6 溶液にインキュベータ (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 内で 24 時間浸漬させた。ついで、 $1.0 \times 10^6$  cells $\cdot$ cm<sup>-3</sup> の C57BL/6N マウス由来脾臓細胞を各セラミックス上に播種し、培養 1 日後、フローサイトメーターにより T 細胞の割合を測定するとともに、走査型電子顕微鏡法 (SEM) および抗 CD3 抗体を用いた免疫染色により形態観察を行なった。

#### 【結果と考察】

#60 および #2000 の研磨紙を用いて作製した IP6-HAp セラミックスの表面粗さ  $R_a$  は、それぞれ  $2.025 \pm 0.049 \mu\text{m}$  および  $0.056 \pm 0.009 \mu\text{m}$  であった。これらのセラミックス上に免疫細胞を培養したところ、粗いセラミックスの方が平滑なものよりも T 細胞の割合は増加した。SEM による形態観察の結果から、細胞のセラミックス上への接着が観察され、特に粗いセラミックスでは研磨痕に沿って細胞が接着していた。また、免疫染色の結果から、各セラミックス上で CD3 陽性の細胞が観察されたことから、セラミックス上には T 細胞が接着していることが分かった。表面が粗くなると、材料と細胞との接触箇所が増えるため、T 細胞の割合が増加したものと考えられる。

[1] 相澤 守・中村まり子・山田清貴・永井重徳、特願 2014-192763

## 1P-061-Ⅱ

### AFS 内三次元培養時の Hypoxia が P19.CL6 cells 心筋分化に与える影響の解析

上智大学大学院理工学研究科

○高野宏基 (Takano Hiroki), 神澤信行

#### 【緒言】

新薬開発において心毒性に関する薬剤の安全性評価を行うための三次元 *in vitro* 心筋モデルが必要とされている。そこで我々は明治大学の相澤らによって作製された直径 150  $\mu\text{m}$  のマクロポアと、apatite-fiber の絡み合いにより生じるマイクロポアを合わせ持つ多孔体、かつ優れた生体親和性を示す apatite-fiber-scaffold (以下 AFS) を足場材料として用い、三次元心筋モデル作製を試みた。P19.CL6 cells は DMSO 存在下で浮遊培養することで凝集体を形成し、その後静置培養することで心筋分化誘導されることが報告されている。先行研究では、AFS 内で DMSO を用いず培養すると、心筋分化マーカー遺伝子 (*nkx2.5*, *tnnt2*) を発現することが示された。このことから AFS 内培養が心筋様細胞への分化を促進する可能性が考えられた。本研究では AFS 内培養時の環境要因の一つとして低酸素状態 (Hypoxia) に着目した。そして Hypoxia と心筋分化の関係を明らかにするために Hypoxia 時の P19.CL6 cells における心筋関連遺伝子の発現様式を調べた。

#### 【実験】

1) AFS 内培養における細胞局在を SYTOX-Green 染色により観察した。2) 分化誘導時と AFS 内培養時の P19.CL6 cells において HIF1- $\alpha$  の核移行を免疫蛍光染色により観察した。3) Hypoxia の心筋分化への影響を調べるために酸素濃度 1.0% 下、dish 培養の P19.CL6 cells において心筋分化関連因子 (*GATA4*, *nkx2.5*, *tnnt2*, *HCN4*) の遺伝子発現解析を行った。

#### 【結果と考察】

1) より経時的に細胞塊が形成されることを確認した。2) より AFS 内培養された P19.CL6 cells において HIF1- $\alpha$  の核移行が確認された。3) より酸素濃度 1.0% 下で dish 培養した P19.CL6 cells では心筋最終分化を示す *tnnt2* のみ遺伝子発現を確認できなかった。2) 3) の結果から AFS 内培養時の Hypoxia は P19.CL6 cells における *GATA4*, *nkx2.5*, *HCN4* の遺伝子発現を促進すると考えられる。また 3) の結果から過去に AFS 内培養時の P19.CL6 cells で確認された *tnnt2* の遺伝子発現には AFS 内の三次元培養により生じる別の要因が関わっていると考えられる。

## 1P-062-I

### PMEA 類似高分子／水界面の微細構造とタンパク質吸着挙動の相関性評価

<sup>1</sup>九州大学大学院工学府, <sup>2</sup>九州大学先端物質化学研究所, <sup>3</sup>山形大学有機材料システム研究推進本部

○上田智也<sup>1</sup> (Ueda Tomoya), 村上大樹<sup>1,2</sup>, 田中 賢<sup>1,2,3</sup>

【緒言】多くの医療現場で活用されている人工臓器や人工血管など、生体組織や生体成分に接触する材料には生体親和性が必須である。当研究室では合成高分子の表面に形成される水和層、特に高分子と緩やかに相互作用する「中間水」に着目して研究を行い、この中間水が生体親和性を定める重要な一因であることを明らかにしてきた。また最近新たに、中間水を有する合成高分子／水界面において高分子と水の相分離により高分子密部・疎部がナノメートルスケールで分布した微細構造の存在が確認され、中間水の存在や生体親和性との関係が注目されている。本研究では、原子間力顕微鏡を用いて吸着タンパク質分布を観察し、また微細構造／タンパク質間の相互作用を測定することで、微細構造と生体反応の重要な初期過程であるタンパク質吸着挙動との相関を解明することを目的とした。

【実験】中間水を有し優れた生体親和性を示す PMEA およびその類似高分子であり中間水を有さないポリ (*n*-ブチルアクリレート) (PBA) の各高分子膜をスピニング法により作製した。フォースカーブ測定はフィブリノーゲン (FNG) 修飾したカンチレバーを用い、37  $^{\circ}\text{C}$  にて高分子／リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 界面で発現した高分子密部・疎部のそれぞれで行った。また FNG-PBS 溶液中および FNG 吸着後洗浄・乾燥を行った PMEA の界面観察もあわせて行った。

【結果と考察】フォースカーブ測定の結果、高分子密部では PMEA、PBA どちらにおいても FNG-界面間の吸着力が観察された。また、高分子疎部に着目すると中間水を有さない PBA では僅かな引力が働いていた。一方、中間水を有する PMEA では緩やかな斥力のみを示し、吸着力が観察されなかった。PMEA の高分子疎部に FNG が吸着しない様子は、FNG 溶液中の吸着 FNG が PMEA の高分子密部に選択的に分布していることから確認された。さらに、洗浄・乾燥後の界面では FNG 吸着量が明らかに減少していたことから PMEA 表面に存在する FNG は脱離しやすいと考えられる。これらの結果はこれまでにアルブミンや FNG の CD スペクトル測定や動的な吸着・脱離挙動解析から報告されている、PMEA 表面に吸着した FNG は変性が低く、脱離速度定数が大きく脱離しやすいという結果と一致している。講演ではフィブロネクチン等の他種タンパク質の吸着挙動についてもあわせて議論する。

1P-063- I

## 複数の血液凝固過程をブロックする抗血栓性 PEEK の創製

東京大学大学院工学系研究科

○矢野口聡 (Yanokuchi Satoshi), 井上祐貴, 石原一彦

【緒言】 本研究は、オールプラスチック製医療デバイスへの応用を志向した、優れた抗血栓性を有するスーパーエンジニアリングプラスチックの創製を目的とする。医療デバイスのオールプラスチック化は、3Dプリンター技術の併用によるテーラーメイド医療デバイスの創製や、CT や MRI といった医療機器による診断を阻害しない非干渉性の獲得を可能とする。スーパーエンジニアリングプラスチックは、優れた力学的強度と化学的安定性を持つことから、金属やセラミックスに代わる次世代医療材料として、これらのデバイスの設計に極めて有効である。とりわけ poly(ether ether ketone) (PEEK) は、モノマー溶液中での紫外光照射により表面にラジカルを発生し、ポリマー鎖を形成することから、材料と生体組織との接触界面における相互作用を制御することが可能となる。この自己開始光グラフト重合と呼ばれる表面修飾法により、PEEK 表面に 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーとヘパリンを修飾する。MPC ポリマーとヘパリンは、それぞれ血小板吸着の抑制と血液凝固因子の活性化抑制を担うことから、複合効果による複数の血液凝固過程の進行抑制が期待できる。加えて MPC ポリマーのタンパク質吸着抑制によってヘパリンの活性維持を可能とする。本研究では、PEEK 表面に MPC ポリマーとカチオン性ポリマーをパターンニングし、負電荷を持つヘパリンを静電的相互作用によってカチオン性ポリマー表面に固定化することで MPC ポリマーとヘパリンのハイブリッド表面を構築する。

【実験】 自己開始光グラフト重合により、MPC、[2-(methacryloyloxy)ethyl]-trimethylammonium chloride (TMAEMA) を PEEK 表面にそれぞれグラフト化した。ヘパリンを 0.1 wt% となるよう PBS で調製し、TMAEMA-graft-PEEK 片を 6 時間浸漬後、洗浄、減圧乾燥した。表面解析として、XPS による表面元素分析および表面ゼータ電位測定を行った。

【結果と考察】 ヘパリン溶液浸漬後の TMAEMA-graft-PEEK について、表面元素分析では TMAEMA のアミン基およびヘパリンのスルホン酸基に由来するピークがそれぞれ検出された。表面ゼータ電位はヘパリン溶液浸漬の前後で 46 mV から -20 mV に低下した。以上の結果から、TMAEMA-graft-PEEK 表面へのヘパリンの固定化が示された。

本研究の一部は、AMED 戦略的イノベーション創出推進プログラム (S-イノベ) の研究費によった。

1P-064- I

## 側鎖長およびその間隔を制御した水酸基導入高分子の合成と抗血栓性評価

<sup>1</sup>九州大学大学院工学府, <sup>2</sup>九州大学先端物質化学研究所, <sup>3</sup>山形大学有機材料システム研究推進本部

○藤田直輝<sup>1</sup> (Fujita Naoki), 小林慎吾<sup>2</sup>, 田中 賢<sup>1,2,3</sup>

【緒言】 人工心肺などの血液接触型医療機器の表面には、血栓形成を抑制する抗血栓性が要求される。我々はこれまでに、優れた抗血栓性を示す Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) が抗血栓性を発現する機構の解明を目指した研究を進めてきており、水と接触した材料表面には、分子構造と運動性の異なる水分子からなる水和層が存在し、中でも材料表面に弱く束縛された「中間水」と呼ばれる水和構造が抗血栓性発現において重要な役割を果たしていることを報告してきた。本研究では、側鎖末端官能基をより水素結合能の高い水酸基に変更した高分子を合成し、高分子の一次構造と発現する中間水量および抗血栓性との相関について検討を行った。具体的には、水酸基を有する側鎖における側鎖長および側鎖間隔を制御した高分子の合成を行い、得られた高分子が発現する中間水量と、抗血栓性との相関性について検討した。

【実験】 モノマーとして、アリル位に水酸基を保護基で保護した置換基を有するシクロオクテン誘導体を合成し、第二世代 Grubbs 触媒 (G2) を用い、アルゴン雰囲気下、CHCl<sub>3</sub> 中で開環メタセシス重合 (ROMP) を行った。その後、水素添加反応および脱保護反応を行うことで、側鎖間隔が規則的な高分子を合成した。得られた高分子の構造解析は NMR を用いて行い、GPC 測定により分子量評価を行った。材料表面の親水性評価として、スピンコート基板を用いた静的接触角測定を行った。また、各高分子を脱イオン水中に浸漬させることで含水試料を調製し、示差走査熱量計 (DSC) を用いた高分子の水和構造解析を行った。さらに、抗血栓性評価として、ヒト全血より遠心分離で調製した血小板懸濁液を 37 °C で 1 時間ポリマーコート基板に接触させ、血小板の粘着数と形態を SEM 観察により確認した。

【結果と考察】 G2 を用いたシクロオクテン誘導体の ROMP は、アリル位に置換基を持つモノマーを用いた場合には regio 選択的に進行し、高い *trans*-head-to-tail 規則性を有する側鎖間隔が規則的な高分子が得られていることを確認した。DSC による解析では、いずれの高分子においても -40 °C 付近で中間水の低温結晶形成が観測され、高分子の側鎖長および側鎖間隔の違いにより異なる中間水量が観測された。ヒト血小板粘着試験により合成した高分子の抗血栓性評価を行い、中間水量との相関性について検討した結果、概ね中間水量の増大に伴って血小板粘着数が減少する傾向が得られた。

## 1P-065- II

### 血管中膜異方性構造の部位依存性

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>大阪大学大学院医学系研究科

○永石武流<sup>1</sup>(Nagaishi Takeru), 小笹良輔<sup>1</sup>, 神崎万智子<sup>2</sup>, 坂田泰史<sup>2</sup>, 森井英一<sup>2</sup>, 倉谷 徹<sup>2</sup>, 中野貴由<sup>1</sup>

【緒言】血管中膜は、エラスチン線維とコラーゲン線維により構成され、*in vivo* 応力に対する荷重支持により、血管組織全体の形態維持を行う。従来の血管研究では、血管内腔径や血管厚さ変化など基質の量的変化についての議論が多く、マクロ構造の変化を伴わない、動脈解離などの血管疾患誘発メカニズムを十分に説明できていない。一方で、血流・血圧変化により惹起される応力場は、血管円周方向への異方性を示す。したがって、*in vivo* 応力の大きさ・方向に対応した、血管中膜の微細構造変化が血管の力学機能発揮に必須であると考えられるものの、未解明な部分が多い。本研究では、*in vivo* 応力場の異なる血管として、心臓近位の大動脈から末梢血管まで動脈各部位に注目し、中膜コラーゲン線維、エラスチン線維配向性変化を明らかにすることで、血管中膜における微細構造の部位依存性を解明するとともに、その制御要因を明らかにすることを目的とした。

【実験】ラットより動脈を摘出し、4% PFA にて組織固定を行った。パラフィン包埋後、5  $\mu\text{m}$  に薄切した試料に対して、Picrosirius red 染色、Sulforhodamine B 染色を行い、コラーゲン線維とエラスチン線維をそれぞれ可視化した。コラーゲン配向性は、複屈折顕微鏡法を用いて、523・543・575 nm の3波長の円偏光にて定量解析を行った。エラスチン線維配向性は、共焦点レーザー顕微鏡にて取得した血管横断面画像を基に、Image J により各ピクセルの輝度を算出、エッジ検出アルゴリズムを用いて定量化した。One-way ANOVA により有意差検定を行った。

【結果と考察】血管円周方向への配向化コラーゲン量は、上部胸大動脈にて最大値を示し、剛性構造を有することが明らかとなった。一方で、エラスチン層数は、血流量の最も多い上行大動脈と大動脈弓において最大値を示し、血管種によって異なるエラスチン配向性を示した。以上の結果より、血管中膜の異方性構造は、局所的な血流、血圧によって規定され、*in vivo* 応力場に応じた、部位依存的な最適化構造を形成することが示唆された。

## 1P-066- II

### 細胞の生物機能可視化のためのモレキュラービーコン内包ゼラチンナノ粒子の作製

京都大学ウイルス・再生医科学研究所

○村田勇樹 (Murata Yuki), 城潤一郎, 田畑泰彦

#### 【緒言】

細胞移植治療のさらなる発展には、移植細胞の生体内における分布や機能を、生体の外部から非侵襲的に可視化するイメージング技術の研究開発が必要である。モレキュラービーコン (MB) は、両末端に蛍光分子と消光分子をもつ核酸誘導体であり、標的核酸との特異的結合を介した構造変化によって蛍光強度が変化し、細胞内でさまざまな生物機能に関係する mRNA を検出することができる。そこで本研究では、MB を効率よく細胞内に送達・機能させることができる担体 (キャリア) を作製することを目的とした。

#### 【実験】

ゼラチン (等電点 9.0、重量平均分子量 100,000、新田ゼラチン株式会社より供与) のカルボキシル基に対して、異なる仕込みモル比のスペルミンを結合させることで、スペルミン導入ゼラチンを作製し、2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) 法によって、その導入率を算出した。次に、スペルミン導入ゼラチン水溶液にアセトンを滴下することでコアセルベーションを形成させた。その後、グルタルアルデヒド水溶液を添加し、ゼラチンを化学架橋することでゼラチンナノ粒子を得た。過剰量のグリシン水溶液により未反応のアルデヒド基をブロックし、遠心分離によりナノ粒子を水洗浄した。得られたナノ粒子のサイズおよびゼータ電位を、それぞれ動的光散乱測定 (DLS) および電気泳動光散乱測定 (ELS) により測定した。また、得られたゼラチンナノ粒子と MB を混合することで、MB 内包ゼラチンナノ粒子を作製した。

#### 【結果と考察】

スペルミンの仕込みモル比の増加とともに、ゼラチンへのスペルミン導入率は増加し、ある仕込み比以上で一定となった。これは、ゼラチンと反応できるスペルミン分子数が増加したためであり、ゼラチンの立体障害により導入率が一定となったと考えられる。また、得られたスペルミン導入ゼラチンナノ粒子のサイズは 130~200 nm であり、ゼータ電位は +8~+10 mV であった。本発表では、MB 内包ゼラチンナノ粒子の機能評価および細胞内 mRNA のイメージング結果についても報告する。

## 1P-067-II

### ケイ酸ゲル被覆ポリイオンコンプレックスによるメッセンジャーRNA デリバリー

<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科, <sup>2</sup>東京大学大学院医学系研究科

○亀川凜平<sup>1</sup> (Kamegawa Rimpei), 内藤 瑞<sup>2</sup>, 内田智士<sup>1</sup>, 宮田完二郎<sup>1</sup>

メッセンジャーRNA (mRNA) は、ゲノムへの挿入変異がなく、非分裂細胞にもタンパク質産生を誘導できることから、近年 DNA に代わる遺伝子治療用医薬として注目を集めている。しかし、mRNA は生体内において酵素分解を受けやすく、かつ細胞による取り込み効率が極めて低いことが知られている。したがって、mRNA による遺伝子治療の実現には、mRNA を酵素分解から保護し、標的細胞内へ送達する核酸キャリアの構築が重要だと考えられる。mRNA とカチオン性ポリマーの混合により得られるポリイオンコンプレックス (PIC) は、内包 mRNA を酵素分解から保護できるため核酸キャリアとして有望視されている。その一方で、生体内環境下における安定性が十分でないことや標的細胞指向性に乏しいことが改善すべき課題として残されている。

そこで本研究では、mRNA 内包 PIC の生体内環境下における安定性向上と標的能付与を目的とし、PIC 溶液とケイ酸溶液の混合による PIC 表面のケイ酸ゲル被覆を検討した。粒径が約 100 nm の mRNA 内包 PIC 溶液とケイ酸溶液を混合したところ、粒径が 10-20 nm 増加し、ゼータ電位が負へと反転した。このことから PIC 表面がケイ酸ゲルで被覆されたことが示唆された。また、ケイ酸ゲル被覆 PIC は被覆なしの PIC と比べ生理イオン濃度下における優れたコロイド安定性およびポリアニオン交換反応耐性を示した。また、ケイ酸ゲル被覆 PIC を用いて培養マクロファージに対するルシフェラーゼ mRNA 導入実験を行ったところ、PIC に比べて 100 倍以上のルシフェラーゼ発現が得られた。さらに、ケイ酸ゲル被覆 PIC は生理条件下でアニオン性表面を有し、マクロファージは細胞表面にポリアニオンを認識し取り込むスカベンジャーレセプターを有する。このことから、スカベンジャーレセプターの競合阻害剤であるデキストラン硫酸共存下での mRNA 導入実験を行ったところ、取り込み量が 60%低下したことから、ケイ酸ゲル被覆 PIC はスカベンジャーレセプターを介してマクロファージに取り込まれたことが示唆された。以上より、mRNA 内包ケイ酸ゲル被覆 PIC は、マクロファージ選択的な mRNA デリバリーに向けて有望な核酸キャリアとなり得ることが示された。

## 1P-068-II

### Prolonged secretion of IL-10 by transfected macrophages with cationized gelatin nanospheres incorporating IL-10 mRNA

京都大学ウイルス・再生医科学研究所

○許 峻睿 (Hsu Chun Jui), 城潤一郎, 佐久間恵, 田畑泰彦

The objective of this study is to design the non-viral nano carrier of mRNA delivery system for the anti-inflammatory cytokine secretion in a controlled manner. Ethylenediamine was chemically introduced to the carboxyl groups of gelatin to obtain a cationized gelatin. Coacervation was performed by adding acetone to the cationized gelatin aqueous solution, followed by the chemical crosslinking with glutaraldehyde to obtain cationized gelatin nanospheres. Anti-inflammatory related mRNA (Interleukin (IL)-10 mRNA) was prepared by the in vitro transcription method. The IL-10 mRNA was gently mixed in aqueous solution with different types of cationized gelatin nanospheres to obtain cationized gelatin nanospheres incorporating IL-10 mRNA (IL-10 mRNA C-NS). The size and surface charge of IL-10 mRNA C-NS changed by the amount of cationized gelatin nanospheres and the cationized extent of cationized gelatin used for nanospheres preparation. Gene transfection experiments revealed that the secretion level of IL-10 depended on the characteristics of IL-10 mRNA C-NS, such as their intracellular uptake and degradation. The internalization of IL-10 mRNA C-NS to macrophages and the release profile of IL-10 mRNA from the C-NS will be reported.

## 1P-069-Ⅱ

### 親水性物質の内包を可能とする PEG 修飾 encapsulin 中空ナノ粒子の開発

<sup>1</sup>東京農工大学大学院工学府応用化学専攻, <sup>2</sup>東京農工大学大学院工学府生命工学専攻

○園瀧誠一<sup>1</sup> (Sonotaki Seiichi), 高見 拓<sup>1</sup>, 野口恵一<sup>2</sup>, 養王田正文<sup>2</sup>, 村上義彦<sup>1</sup>

#### 【緒言】

タンパク質や核酸などの親水性の生体高分子を薬物として利用するためには、血中において目的部位への送達を補助する薬物キャリアが必要である。本研究では、親水性物質のための性能が良い薬物キャリアを開発するため、細菌由来のタンパク質である encapsulin 中空ナノ粒子の薬物キャリアとしての応用を目指した。encapsulin 中空ナノ粒子は、タンパク質である encapsulin のホモ 60 量体が形成する直径約 20 nm の強固な中空粒子である。この粒子は、発現過程において特定の酵素の内包が可能であることが報告されており、親水性物質を内包する薬物キャリアとしての応用が期待できる。そこで本研究では、ポリエチレングリコール (PEG) を表面修飾した encapsulin 中空ナノ粒子を調製し、その解離および再構成の制御方法を確立することで、粒子の薬物キャリアとしての応用を目指した。

#### 【実験】

放線菌由来の encapsulin 遺伝子に変異を導入することで、表面にアミノ基を配置した encapsulin 中空ナノ粒子を構築した。次に、methoxy-PEG-SCM を粒子に反応させることで、表面が PEG に修飾された粒子を調製した。得られた PEG 修飾粒子をタンパク質変性剤で解離させ、透析による粒子の再構成を検討した。また、新奇な再構成法として、ゼオライトを利用した粒子の再構成を検討した。

#### 【結果と考察】

透析による PEG 修飾粒子の再構成を検討した結果、高い再構成率で粒子の再構成が可能になったことが明らかになった。また、この方法によって、特定の酵素ではない親水性物質でも粒子に内包できることがわかった。しかし、透析による粒子の再構成過程においては、内包させる親水性物質がタンパク質変性剤に接触してしまうため、タンパク質の内包は困難である。この問題を解決するために、ゼオライトを利用した PEG 修飾粒子の再構成法を検討した結果、内包させる親水性物質をタンパク質変性剤に接触させずに、粒子の再構成が可能であることが示唆された。

## 1P-070-Ⅱ

### 多孔質粒子を「一段階乳化」で調製する新技術の開発と経肺投与 DDS への応用

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○西村真之介 (Nishimura Shinnosuke), 高見 拓, 村上義彦

【緒言】肺は広い表面積を有し、肺胞腔内と毛細血管の距離が非常に近い。肺を薬物の送達経路として利用する「経肺投与方法」を実現するためには、高い肺送達能と肺内の免疫機構からの回避能を付与された薬物キャリアが必要である。我々は、ポリエチレングリコール、ポリ乳酸からなる両親媒性ブロック共重合体の水-油界面への配向性と自己乳化特性を巧みに利用することによって、「一段階のみの乳化操作」による多孔質粒子の新奇な調製方法<sup>[1]</sup>を提案してきた。本研究では、この新奇な調製法によって得られる多孔質粒子を経肺投与用の薬物キャリアとして応用することを目的とし、幾何学径および表面形態の異なるさまざまな粒子の空気力学的動態を評価することによって、高い肺送達能および肺胞の免疫機構からの回避能を両立する粒子の開発を検討した。

【実験】組成が異なる末端メトキシ化両親媒性ブロック共重合体 PEG-*b*-PLA を用い、一段階乳化による多孔質粒子形成法<sup>[1]</sup>における乳化速度を調整することによって、約 5 あるいは 10  $\mu\text{m}$  の幾何学径を有し、表面形態のみが異なる多孔質粒子を調製した。得られた粒子をアンダーセンノンバーブルサンプラー (模擬肺) によって分級することにより、肺内の各部位における粒子沈着率を評価した。さらに、分級後の粒子の表面形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) によって評価した。

【結果と考察】無空孔粒子は鼻腔において最も高い沈着率を示したのに対し、多孔質粒子は気管支において高い沈着率を示した。このことから、無空孔粒子に対する多孔質粒子の肺送達能の優位性が示された。また、分級後の粒子の形態を観察した結果、肺内の免疫機構を回避できると考えられる 3  $\mu\text{m}$  以上の粒径を有する多孔質粒子が、治療効果を期待できる気管支深において多く沈着することが明らかとなった。以上の結果から、本研究において得られた多孔質粒子は、高い効率で肺内へ送達され、かつ、沈着後生体内の免疫機構を回避できることが期待される薬物キャリアであると考えられる。本発表では、肺結核の治療薬であるリファンピシンを内包した粒子の肺内沈着挙動も併せて示す。

[1] Takami, T., Murakami, Y., *Langmuir*, **30**, 3329-3336 (2014)

## 1P-071-II

### 温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーとリポソームを用いた薬物徐放システム

<sup>1</sup> 関西大 ORDIST, <sup>2</sup> 関西大化学生命工, <sup>3</sup> 関西大医工薬研セ

○ 能崎優太<sup>1</sup> (Yoshizaki Yuta), 葛谷明紀<sup>2,3</sup>, 大矢裕一<sup>2,3</sup>

【緒言】近年、生体外ではゾル状態、生体内に注入すると *in situ* でヒドロゲルを形成するインジェクタブルポリマー (IP) に関する研究が注目を集めている。我々はこれまで、カプロラクトン-グリコール酸共重合体 (PCGA) とポリエチレングリコール (PEG) から成る ABA 型トリブロック共重合体 (PCGA-*b*-PEG-*b*-PCGA: tri-PCG) を用いた生分解性 IP に関する研究を展開してきた<sup>1)</sup>。tri-PCG 水溶液は、室温下ではゾル状態であり、体温付近で即座にゲル状態へと転移するので、水溶性薬物の徐放システムとして有用であると考えられる。しかし、低分子量の薬物はゲルの網目に比べて小さいため、単に tri-PCG 水溶液に薬物を混合してゲルを調製しただけでは、薬物の徐放を達成するのは難しい。そこで本研究では、薬物キャリアとして様々な研究が行われてきたリポソームを tri-PCG 水溶液に混合することで薬物徐放システムの構築を試みた。

【実験】卵黄ホスファチジルコリンの脂質薄膜を蛍光物質ピラニン (モデル薬物) と消光剤 DPX を含む水溶液で分散した。分散液を孔径 100 nm のフィルター膜に通して粒径を調整し、遠心分離により未内包の蛍光物質を除去することでリポソームを得た。リポソーム分散液と tri-PCG の PBS 溶液を混合し、37°C に加温することでゲル化させた。そこに PBS を加えて 37°C で所定時間インキュベーションして PBS を回収し、放出されたピラニンの蛍光をモニターすることで放出挙動を評価した。さらに界面活性剤である Triton-X を加えて PBS 中のリポソームを崩壊させた際の蛍光もモニターすることでゲルからの薬物放出メカニズムを検討した。

【結果と考察】ピラニン水溶液のみを混合したゲルに比べてリポソームを用いるとゲルからのピラニン放出は著しく遅くなることが分かった。これは、tri-PCG 溶液がゲル化した後もリポソーム内にピラニンが安定に保持され、リポソームの粒径がゲルの網目サイズより大きいので、ゲルからの拡散が抑えられたことを示唆する結果である。また回収した PBS 中に Triton-X を加えた際に蛍光強度の変化が無かったことからゲル中でリポソームからピラニンが放出され、そのピラニンがゲルから拡散するという放出メカニズムが示唆された。

【引用文献】1) Y. Ohya *et al.*, *Polym. J.*, **2014**, *46*, 632-635.

## 1P-072-I

### プロテインデリバリーを指向したゲルカプセルの創製とその薬物キャリアとしての機能

<sup>1</sup> 関西大化学生命工, <sup>2</sup> 関西大 ORDIST

○ 中浦 宏<sup>1</sup> (Nakaura Hiroshi), 河村暁文<sup>1,2</sup>, 宮田隆志<sup>1,2</sup>

【緒言】タンパク質医薬品はその高い薬効と低い副作用から注目されているが、生体内の酵素により容易に分解されるため、十分な治療効果が発揮できないことが多い。そこで、タンパク質キャリアとしてリポソームやポリマーベシクルなどの内水相を有するカプセルが研究されている。しかし、これらのキャリアは低い機械的強度や内包効率が課題である。そこで本研究では、可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合を利用したエマルジョン表面へのゲル層の形成によりゲルカプセルの調製を試みた。親水性ブロックと両親媒性ブロックとを有するブロック共重合体を RAFT 重合により合成し、これを用いて w/o エマルジョンを形成させると両親媒性ブロックは油相に分配される。さらに、このエマルジョン表面から両親媒性モノマーを用いてゲル層を形成させることにより水相にも分散可能なゲルカプセルを調製した。

【実験】RAFT 重合により親水性である 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) と両親媒性であるオリゴエチレングリコールメタクリレート (OEGMA) とのブロック共重合体 (PMPC-*b*-POEGMA) を合成した。得られた PMPC-*b*-POEGMA を水-クロロホルム混合溶液に加え、1時間超音波照射して w/o エマルジョンを形成させた。その後、ミニエマルジョン表面 RAFT 重合によりポリエチレングリコールメタクリレートと還元応答性の架橋剤であるビス(2-メタクリロイル)オキシエチルジスルフィドとを共重合することによりゲルカプセルを調製した。さらに、得られたゲルカプセルの還元環境下での薬物放出挙動や細胞毒性を検討した。

【結果と考察】ゲル層を形成した後に反応溶液を水に置換し、動的光散乱測定を行ったところ、約 300 nm のゲルカプセルの形成が確認された。また、モデル薬物としてフルオレセイン修飾デキストラン (FITC-Dex) をゲルカプセルに内包させ、薬物放出挙動について検討した。その結果、還元剤であるジチオトレイトールの添加によりゲルカプセルからの FITC-Dex の放出が促進されることがわかった。また、ゲルカプセルをマウス線維芽細胞に接触させたところ、細胞内に取り込まれることがわかった。以上の結果から、本研究で調製したゲルカプセルは、親水性薬物を内包でき、細胞内などの還元環境に反応して薬物を放出する薬物キャリアへの応用が期待できる。

## 1P-073- II

### ヒアルロン酸被覆高分子ミセルによる肝星細胞への効率的デリバリー

<sup>1</sup> 関西大学化学生命工学部, <sup>2</sup> 関西大学 ORDIST, <sup>3</sup> 奈良県立医科大学, <sup>4</sup> 関西大学医工薬連携研究センター  
○永田拓也<sup>1</sup> (Nagata Takuya), 山田莉央<sup>1</sup>, 能崎優太<sup>2</sup>, 鍛冶孝祐<sup>3</sup>, 吉治仁志<sup>3</sup>, 葛谷明紀<sup>1,4</sup>, 大矢裕一<sup>1,4</sup>

【緒言】肝硬変とは慢性的な肝炎などによる肝損傷の修復の際に、過度に活性化した肝星細胞が過剰にコラーゲン線維を産出することで肝臓が硬化する疾病である。そのため、肝硬変の治療には肝星細胞の活性化を抑制する抗線維化薬剤を肝星細胞にデリバリーすることが第一選択肢となる。加えて肝星細胞は肝類洞壁内部に存在するため、肝星細胞へ薬物を送達するには、まず肝類洞内皮細胞(LSEC)層への薬剤分布および透過が必要であると考えられる。一方、我々はこれまで、生分解性のポリリシン-ポリ乳酸・AB ジブロック共重合体(PLys<sup>+</sup>-b-PLLA)から調製した表面に高密度の正電荷を有するナノサイズのコア-シェル型ミセルを、負電荷を持つ高分子電解質でポリイオンコンプレックス (PIC) 形成により被覆した PIC 被覆ミセルが、通常の高分子ミセルよりも著しく高い希釈安定性を示すことを報告している<sup>1)</sup>。また、ヒアルロン酸(HA)は、LSEC 表面に存在するレセプターによって認識され、HA で被覆したミセルが *in vitro* において LSEC に取込まれることも見出している<sup>2)</sup>。そこで、本研究では、高効率な肝星細胞への薬物配送を目的として、抗肝線維化薬剤(OLM)を内包した HA 被覆ミセルの調製と機能評価を行った。

【実験および結果と考察】既報に従い合成した PLys<sup>+</sup>-b-PLLA を用いて OLM 内包 PLys<sup>+</sup>-PLLA ミセルを調製した。調製したミセルは正の表面電荷を有しており、薬物未内包のミセルと比較して粒径及びゼータ電位に変化はなかった。次に HA(MW=90,000Da)水溶液に PLys<sup>+</sup>-PLLA ミセル水溶液を滴下し、未反応の HA を限外ろ過にて除去した後に、上澄み液を凍結乾燥して、HA 被覆ミセルを調製した。粒径が大きくなったことと、ゼータ電位が正から負へと変化したことから、HA による被覆が進行したことが示唆された。一方、4-amino fluorescein を用いて HA を蛍光ラベル化した Flu-HA を用いて Flu-HA 被覆ミセルを同様に調製し、マウスに尾静脈注射した。3 時間後、マウスの各臓器を取り出し、生体蛍光イメージング装置を用いて評価した結果、Flu-HA 被覆ミセルは肝臓に多く集積していることが分かった。この結果から、HA 被覆ミセルは肝臓への高い集積性を示すことが示唆された。

1) Y. Ohya *et al.*, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211*, 1750-1756. 2) Y. Ohya *et al.*, *J. Contr. Rel.* **2011**, *155*, 104-110.

## 1P-074- I

### 分子認識ポリマーを架橋部位とした生体適合性ヒドロゲルの開発と徐放システムへの応用

<sup>1</sup> 大阪大学大学院基礎工学研究科, <sup>2</sup> 大阪大学大学院理学研究科  
○吉川裕人<sup>1</sup> (Yoshikawa Yuto), 中畑雅樹<sup>1</sup>, 境 慎司<sup>1</sup>, 原田 明<sup>2</sup>, 田谷正仁<sup>1</sup>

【緒言】ドラッグデリバリーシステム (DDS) のキャリアとして、これまでに多くの高分子が開発されてきた。キャリアに求められる性能として①水溶性、②生体適合性、③ターゲット物質に対する認識能、④刺激に応答した徐放能、⑤生分解性などが挙げられる。生体内で使用できる刺激は限られており、材料の形成から機能発現、分解までをマイルドな刺激で行う必要がある。中でも酵素を介した反応は、温和な条件で行える点が大きな利点であり、生体適合性の面で大きなメリットを有する。DDS のターゲットである医薬品には数多くの種類があるが、中でも近年低分子医薬品だけでなくバイオ医薬品などの大きく複雑な分子が用いられつつあり、これらをテイラーメイドで認識・徐放できるキャリアの開発が望まれている。シクロデキストリン (CD) は、D-グルコース数分子が結合した環状オリゴ糖であり、その空孔内に水中で疎水性分子を取り込む性質をもつ。構成するグルコースの個数によってその物理的、化学的性質が異なり、ヒトの唾液や膵臓由来の  $\alpha$ -アミラーゼによって分解可能であるという特徴もある。本研究では、CD を架橋ポリマーとし高分子ヒドロゲルの架橋点として用いることで、多点認識によるターゲットの認識と外部刺激に応じた徐放が行えるシステムの開発を目指した。

【実験】種々の CD をエピクロロヒドリンとの反応により架橋した CD ポリマーを合成し、さらに、CD にラジカル重合可能なビニル基を修飾することによって CD ポリマー架橋剤を合成した。この CD ポリマー架橋剤と生体適合性モノマーであるポリエチレングリコールアクリレートとを、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> アセチルアセトンを用いた酵素反応による開始剤系を用いてラジカル重合した。得られたゲルのレオロジー特性を動的粘弾性測定により評価した。さらに、ターゲット物質の徐放可能性とゲルの分解性についても調査した。

【結果と考察】重合により系は流動性を失いゲル化した。レオメーターによる周波数分散測定を行ったところ、測定周波数範囲において貯蔵弾性率  $G'$  が損失弾性率  $G''$  を上回っており、安定なヒドロゲルの形成が支持された。これにより、酵素反応による重合が可能であることが示された。CD へのビニル基導入量や重合時のモノマー比に応じてゲルの物性を制御することができ、必要に応じてゲルをアレンジできることが分かった。徐放特性とゲルの分解については当日詳細に報告する。

## 1P-075-II

### がん幹細胞を標的とする細胞内酵素応答型遺伝子キャリアの開発

<sup>1</sup>九大院工, <sup>2</sup>九大未来化セ, <sup>3</sup>九大分子 CMS, <sup>4</sup>九大先端医療 IC

○遠山聖子<sup>1</sup> (Toyama Shoko), 中村雄太<sup>1</sup>, 松本 蛍<sup>1</sup>, 秀野智大<sup>1</sup>, 岸村顕広<sup>1,2,3</sup>, 森 健<sup>1,2</sup>, 片山佳樹<sup>1,2,3,4</sup>

【緒言】がんの再発や転移の原因とされるがん幹細胞は、化学療法による治療が困難である。現在までに、がん幹細胞の性質維持に関わる酵素に対し阻害剤を用いる治療法が研究されているが、阻害剤に対する耐性の獲得という本質的な問題がある。本研究では、がん幹細胞に対し高い治療効果を示す新しい治療法の開発を目指し、細胞内の酵素に応答して遺伝子発現を制御するシステムを応用した。近年、がん幹細胞性との関連や高活性化が報告されたプロテインキナーゼ  $\text{C}\alpha$  (PKC $\alpha$ ) に着目し、がん幹細胞において PKC $\alpha$  に応答する遺伝子発現の制御が可能か検討した。

【実験】直鎖状ポリエチレンイミン (LPEI) に PKC $\alpha$  特異的な基質ペプチドのみを導入したポリマー (LPEI-1) と、さらにヘキサ酸を導入したポリマー (LPEI-hex-1) を合成した。コントロールとして PKC $\alpha$  非応答性のポリマーも同様に合成した (LPEI-2, LPEI-hex-2)。各ポリマーが pDNA と複合体を形成することを確認し、その物性を評価した。がん幹細胞マーカー CD44v が高発現したヒト口腔がん細胞に対し、細胞取り込み効率を評価した。ルシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA を用いてトランスフェクションを行い、ルシフェラーゼ活性から遺伝子発現の制御を確認した。

【結果と考察】反応効率の高い縮合剤 COMU を用いて基質ペプチドを LPEI に直接修飾し、それぞれ同程度のペプチド修飾率をもつ LPEI-1/2 と LPEI-hex-1/2 を合成した。ヘキサ酸の導入により立体障害が生じ、LPEI-hex-1/2 のペプチド修飾率は LPEI-1/2 より低い結果となった。各ポリマーは同じ物性をもつ複合体を形成し、粒子径約 120-150 nm、ゼータ電位約 +25 mV を示した。細胞取り込み効率においても差は見られず、LPEI と同様に高い値を示した。トランスフェクションでは、LPEI-1 において LPEI と同様に高い遺伝子発現を確認したが、LPEI-2 は遺伝子発現を抑制しなかった。一方、ヘキサ酸導入ポリマーでは、LPEI-hex-2 において遺伝子発現が抑制され、LPEI-hex-1/2 の遺伝子発現量の差が 17 倍以上も向上した。ヘキサ酸の導入により、pDNA と強い正電荷をもつ LPEI との静電相互作用が抑制され、pDNA が基質ペプチド選択的に静電相互作用したことで、PKC $\alpha$  に応答した遺伝子発現の制御が達成されたと示唆された。今後は、がん幹細胞性の高い細胞を選別し治療効果を評価し、遺伝子発現制御の向上のため新たなポリマーの開発に取り組む。

## 1P-076

### 演題取り下げ

## 1P-077-II

### 外部刺激により薬物放出制御可能ながん幹細胞標的リポソームの特性評価

慶應義塾大学大学院薬学研究科

○山之内翔 (Yamanouchi Tsubasa), 長瀬健一, 米谷芳枝, 金澤秀子

【緒言】がん組織中にはその増殖や転移に関与するがん幹細胞が存在することが知られている。がん幹細胞は抗酸化ストレス機構を有し、従来の放射線療法等に耐性を持つため、がん幹細胞を標的とした薬物送達キャリアの開発が望まれている。がん幹細胞特異的に発現するマーカーの中でも特にヒアルロン酸(HA)レセプターである CD44 を介した薬物の送達を目指した研究が盛んに行われており、薬物と HA のコンジュゲートなどが開発されてきた。そこで本研究では、薬物を封入したリポソーム表面に HA 及び温度応答性高分子を同時に修飾することで、CD44 ターゲティングと温度変化による薬物放出制御の達成を目指した。

【実験】卵黄由来ホスファチジルコリン(EYPC)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、ジオレオイルトリメチルアンモニウムプロパン(DOTAP)を用いて、エタノール注入法により内相を硫酸アンモニウム Buffer とするリポソームを作製した。作製したリポソームに下限臨界溶液温度(LCST)を体温付近である 38°C となるように合成した温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N,N*-dimethylacrylamide) P(NIPAAm-*co*-DMAAm)と HA を修飾し、リモートローディング法によりドキシソルビシン(DOX)を封入した。温度変化時のサイズや DOX 放出率などの物性評価を行い、温度応答性高分子修飾の効果を確認した。CD44 発現細胞である A549 細胞と非発現細胞である RAW264.7 細胞での細胞取り込み及び薬物放出について蛍光顕微鏡とフローサイトメトリーにより観察し、MTT 試験により細胞障害性を確認した。

【結果と考察】ゼータサイザーを用いたサイズ測定より HA 及び温度応答性高分子を表面に修飾した DOX 封入リポソームの生成を確認した。温度応答性高分子修飾リポソームは LCST 以上において顕著な DOX の放出が見られた。また、HA 修飾により CD44 発現細胞にのみ選択的に取り込みが起ることが確認され、MTT 試験においても強い細胞障害性を確認できた。以上のことから、本研究で作製したリポソームは CD44 を高発現するがん幹細胞への薬物送達キャリアとして有用であると考えられる。今後ターゲティングのための修飾分子や内封薬物を変更することにより、がん幹細胞のみならず幅広い標的に対する応用が期待できる。

## 1P-078-II

### 低侵襲な体内送達を可能とする多層構造を利用した自己展開型薬剤徐放シートの開発

<sup>1</sup>東北大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>東北大学大学院医学系研究科

○佐藤悠人<sup>1</sup> (Sato Yuto), 鈴木 仁<sup>1</sup>, 永井展裕<sup>2</sup>, 西澤松彦<sup>1</sup>, 阿部俊明<sup>2</sup>, 梶 弘和<sup>1</sup>,

従来の埋め込み型 DDS デバイスには患部に留めやすく、標的化した薬剤放出が出来るメリットがある一方で、薬剤の初期バーストや切開・縫合が必要で侵襲性が高いことなどが課題として挙げられる。そこで本研究では、薬剤の初期バーストを低減した長期徐放と細管からの射出による低侵襲な体内送達、体内送達後の自己展開を可能とする高分子シート型デバイスの開発を目指した。

高分子薄膜材料として Poly(ethylene glycol) dimethacrylate (PEGDM, Mw 750)、Tri(ethylene glycol) dimethacrylate (TEGDM, Mw 286.32)を用いた。PEGDM と TEGDM の比率を変えて光重合させることで、シート内の薬剤透過性を制御できる。PEGDM の比率が大きくなると透過性が高くなり、TEGDM の比率が大きくなると透過性が低くなる。はじめにモデル薬剤として蛍光色素 Fluorescein を含んだ薬剤層を作製した。次に徐放に方向性を持たせるため、薬剤層の下に薬剤透過率の極めて低いガード層を設けた。また、薬剤層の上に徐放制御のための放出制御層を設けることで三層構造シートとした。更に、細管からデバイスを体内に送達後に自己展開を可能とするため、ガード層の下側に四層目となる展開層の導入を検討した。まず、三層構造のシート型デバイスについて薬剤徐放特性を検証した。その後、三層構造及び四層構造シートについて理論と実験から自己展開性の検証を行った。また、インジェクターを用いて in vivo への射出試験も行った。

一層シートでは初期バーストが起きていたが、三層シートでは初期バーストが抑制され、約三カ月にわたって徐放の継続が確認された。このことからガード層と放出制御層が、初期バーストを抑え、長期的な薬剤放出を可能としていることが分かった。薬剤徐放の方向性について調べた実験では、放出制御層側と比較してガード層側で薬剤の放出が有意に抑制されていた。このことからガード層が徐放に方向性を付与していることが分かった。また、自己展開性についての実験では、展開のための四層目を設けることで自己展開が可能になるものと予想された。実際に四層シートを作製し展開試験を行った結果、展開し患部接着に適切な曲率の維持が確認できた。射出試験では、デバイスはインジェクターから射出され、ウサギの強膜上で展開する様子が確認された。

1P-079- I

## インスリン徐放デバイスの開発と糖尿病網膜症治療への応用

東北大学大学院医学系研究科細胞治療分野

○星 絢子 (Hoshi Ayako), 永井展裕, 西條早絢, 大學玲子, 阿部俊明

### 【緒言】

糖尿病の合併症のひとつとして糖尿病性網膜症があげられる。糖尿病患者のうち15%が罹患するといわれる糖尿病性網膜症であるが、治療法は網膜症の原因になる網膜無血管領域をレーザー凝固する方法などに限られてくる。このため糖尿病初期から血糖値のコントロールを行うことにより新生血管の発生を抑えることは、糖尿病性網膜症の重要な予防法の1つであると言える。本研究はインスリン徐放デバイスを開発し、持続的な血糖コントロールによって糖尿病網膜症を予防する方法を検討した。

### 【実験】

ストレプトゾトシン(STZ)の皮下投与によって糖尿病ラット(血糖値400mg/dL以上)を作成した。糖尿病ラットの網膜症評価として、網膜電図(ERG)を経時的に評価した。インスリン徐放デバイスの基材としてゼラチンとキトサンの混合物を水溶性カルボジイミドで架橋したインジェクタブルゲル(iGel)を作成した。iGelからのインスリン徐放性を高速液体クロマトグラフィーで評価した。iGelを皮下投与した糖尿病ラットの血糖値を経時的に測定し、インスリン溶液の皮下投与群と比較した。

### 【結果と考察】

糖尿病ラットでは、糖尿病発症から4週目で暗順応ERGのb波の振幅値の低下および潜伏時間の遅れが見られた。iGelのキトサン濃度が高いほど、インスリンの放出性が低下した。これは正電荷のキトサンと負電荷のインスリンの静電的な作用によるものと推定された。iGelを皮下投与した糖尿病ラットの血糖値は、インスリン溶液の皮下投与と同様に低下傾向が見られた。iGelは、これまでの侵襲的なインスリン溶液の頻回皮下投与を減らし、低侵襲でより確実な血糖値コントロールに応用できると期待できる。今後はインスリン徐放デバイスによる血糖値コントロールの持続性と、網膜症発生に対する影響を検討する。

1P-080- I

## 細胞核ナノトランスポーターを用いた機能性タンパク質デリバリーによる細胞反応制御

甲南大学フロンティアサイエンス学部

○増田真鈴 (Masuda Marin), 佐野由倫, 前川紗恵子, 長濱宏治

【緒言】細胞核内は遺伝情報の保持・複製や発現など細胞の運命を決定する重要な反応場であるため、それらの反応に関わる物質を核内に輸送し機能させれば、人為的な細胞の運命制御が実現する。近年、私たちは、細胞内に存在する核輸送タンパク質であるインポーチンの核膜孔通過メカニズムに倣い、自発的に細胞質から核内に移行する高分子ナノ組織体(細胞核ナノトランスポーター)を作製した。本発表では、細胞核ナノトランスポーターを用いて核内に様々な機能性タンパク質を輸送し、核内の物質と反応させることで、細胞反応を制御した結果を報告する。

【実験】デキストランと疎水性アミノ酸誘導体のカップリング反応により、両親媒性分子を合成した。両親媒性分子の粉末を水で溶解することで自己会合させ、細胞核ナノトランスポーターを作製した。DLS測定により、サイズおよび分布を解析した。細胞核ナノトランスポーターに $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -Gal)やヌクレアーゼなどを担持し、それらタンパク質の反応性について*in vitro*実験により解析した。機能性タンパク質を担持したナノトランスポーターをエレクトロポレーション法により細胞質に導入した後、核内輸送特性および核内での反応について調べた。また、輸送した機能性タンパク質の核内反応がもたらす細胞反応についても解析した。

【結果と考察】細胞核ナノトランスポーターと複合化した $\beta$ -Galの酵素活性を*in vitro*実験により調べたところ、フリーの $\beta$ -Galと同等であったことより、高次構造を維持した状態での複合化が示唆された。ナノトランスポーターにより $\beta$ -Galを細胞核内へ輸送した1時間後、細胞培養液に基質TG $\beta$ -Galを添加すると核内で酵素反応を示したことから、 $\beta$ -Galの機能を保持したまま核内輸送し、核内で反応可能であると示された。ヌクレアーゼ担持ナノトランスポーターとDNAを*in vitro*で30分間反応させて電気泳動により解析したところ、DNA分解の半減期はフリーのヌクレアーゼと同等であったことから、ナノトランスポーターに担持したタンパク質は、ナノトランスポーター外にある巨大な生体高分子と特異的に反応できることが分かった。発表では、機能性タンパク質を核内輸送・反応させることにより、細胞の形質、機能、反応を制御可能かについて調べた結果もあわせて報告する。

## 1P-081-II

### 金ナノ粒子を用いた超音波による血液脳関門透過性向上機構の検討

<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科, <sup>2</sup>東京大学大学院医学系研究科

○菊地映美<sup>1</sup> (Kikuchi Emi), 石島 歩<sup>1</sup>, 小林英津子<sup>1</sup>, 東 隆<sup>1,2</sup>, 佐久間一郎<sup>1</sup>, 伊藤大知<sup>1,2</sup>, 太田誠一<sup>2</sup>

#### 【緒言】

アルツハイマー病や脳虚血などの中枢神経系疾患は高齢化に伴い患者数が増加しており、ナノ粒子を用いた脳への薬物送達による治療が期待されている。しかし、脳への薬物送達は血液脳関門 (BBB) が障壁となっている。近年、脳に超音波を照射することで BBB の物質透過性が一時的に亢進することが報告された。一方で超音波照射によってどの程度のサイズの物質がどれほどの期間脳に透過できるかは明らかとされていない。本研究では、培養細胞を用いた BBB *in vitro* モデルに超音波を照射してサイズが異なる金ナノ粒子を透過させ、粒子サイズと粒子透過性との相関を検討した。

#### 【実験】

塩化金(III)の還元によって粒径 3 nm、15 nm、120 nm の 3 種類の金ナノ粒子を合成し、粒子表面をポリエチレングリコールで修飾した。*In vitro* において超音波照射による BBB の開通を評価するため、トランズウェル上でマウス脳微細血管内皮細胞株 (bEND. 3) を培養して BBB モデルを作製し、超音波を照射した。超音波照射後に BBB モデルの経内皮電気抵抗の時間変化を測定した。また、超音波照射直後に BBB モデルの内側に金ナノ粒子を含む培地を加えてインキュベートし、12 時間後に BBB モデルの外側の培地を回収して透過した金ナノ粒子の濃度を ICP-MS で測定した。

#### 【結果と考察】

3 種類の金ナノ粒子を透過型電子顕微鏡で観察したところ、粒径はそれぞれ  $3.7 \pm 0.5$ 、 $14.4 \pm 1.7$ 、 $120.4 \pm 7.6$  (平均 ± 標準偏差) nm であり、均一な粒径を持つことが確認された。BBB の透過性の指標となる経内皮電気抵抗は、超音波照射前と比較して照射から 5 分後は 76.7%、1 時間後は 69.3%、80.9% となり、BBB モデルのバリア機能の低下が確認された。一方で 4 時間後は 105.1% となり、バリア機能が回復した。この結果より、BBB は超音波照射直後から 4 時間程度、一時的に開通すると唆された。超音波を照射しない場合と比較して超音波照射後の粒子の透過量は 3 nm、15 nm の粒子では有意に増加し、3 nm の方が 15 nm のものよりも 2.1 倍程度高かった。一方で 120 nm の粒子の透過量に有意差はなかった。

## 1P-082-II

### Development of pH-sensitive polymeric micelles for intracellular delivery of bioactive molecules loaded through imine bond.

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, <sup>2</sup>Innovation Center of Nano Medicine (iCONM)

○Anqi Tao<sup>1</sup>, Horacio Cabral<sup>1</sup>, Sabina Quader<sup>2</sup>, Kazunori Kataoka<sup>1,2</sup>

#### 【Introduction】

Two polymer platforms with functional aldehyde are proposed for conjugating with amine-bearing bioactive molecules including chemical drugs, peptides and proteins. This preliminary study of conjugating fluoresceinamine to aldehyde polymer was considered as a convenient and economic model to investigate the formation of endosomal-pH labile bond and the intracellular release based on pH-sensitive imine bond. Moreover, it lays the foundation for further selection and study on drug conjugation to the aldehyde polymer systems.

#### 【Experiment】

Two aldehyde-containing block copolymers were synthesized and characterized by NMR and GPC. Polymer cytotoxicity was evaluated in HeLa-Luc and HUVEC cell lines using CCK-8. Fluoresceinamine was used as a preliminary model molecule and conjugated to the polymer. The drug-polymer conjugate made micelles in PBS buffer. Size and PDI of the micelles were determined by DLS. Release of fluoresceinamine-loaded micelles was measured by UV-spectrophotometer.

#### 【Result and Conclusion】

A micelle system for loading amine-bearing drugs through Schiff base formation was successfully constructed. The polymer system was confirmed *in vitro* to be non-toxic. The fluoresceinamine-loaded micelles were successfully constructed with sub-100 nm size and narrow distribution, which could be a good model to observe intracellular disruption and drug release of the micelles. Given the large number of amine-bearing drug candidates and the incidence of mild acidic pH in pathological events, this micelle system represents a versatile platform for the development of a wide range of targeted therapeutic applications.

## pH 応答性コンドロイチン硫酸を修飾したリポソームの抗原キャリア機能

大阪府立大学大学院工学研究科

○大久保みのり (Okubo Minori), 弓場英司, 原田敦史, 河野健司

【緒言】効果的ながん免疫療法の実現には抗原特異的な細胞性免疫の誘導が必須である。そのためには、樹状細胞 (Dendritic cell, DC) の細胞質に抗原を導入すると同時に成熟化させ、MHC class I を介した抗原提示を誘導する必要がある。当研究室ではこれまで、弱酸性 pH に応答して膜融合性を示す 3-メチルグルタリル(MGlu)基または 2-カルボキシシクロヘキサン-1-カルボキシ(Chex)基をデキストランに導入し、これらを修飾したリポソームを用いて、DC への抗原キャリアを開発してきた(*Biomaterials* **35**, 3091-3101 (2014)., *J Control Release* **213**, e30 (2015))。一方、高活性な抗原キャリアには、抗原デリバリー機能に加えて、DC を成熟化させるアジュバント機能が必要である。そこで本研究では、アジュバント作用の報告があるコンドロイチン硫酸(CS)に MGlu/Chex 基を導入することで、CS に由来するアジュバント作用と pH 応答性基に由来する抗原デリバリー機能の相乗効果で強力な細胞性免疫を誘導できる抗原デリバリーシステムの開発を目的とした。

【実験】CS の水酸基と 3-メチルグルタル酸無水物または 1,2-シクロヘキサジカルボン酸無水物を反応させ pH 応答性基を導入した(MGlu/Chex-CS)。さらにリポソームへの固定化部位としてデシル基を導入した(MGlu/Chex-CS-A)。MGlu/Chex-CS で処理したマウス樹状細胞由来 DC2.4 細胞が産生するサイトカインを ELISA 法により測定した。MGlu/Chex-CS-A を修飾したピラニン封入卵黄ホスファチジルコリン(EYPC)リポソームを作製し、種々 pH における蛍光強度をモニターし、その pH 応答性を評価した。蛍光脂質でラベル化し、FITC ラベル化オボアルブミン(FITC-OVA)を封入したリポソームの DC2.4 細胞による取り込み量と細胞内挙動をフローサイトメーターおよび共焦点顕微鏡により評価した。

【結果と考察】Chex-CS で処理した DC2.4 細胞からは CS で処理した細胞に比べ IL-12・TNF- $\alpha$  が著しく産生された。MGlu/Chex-CS-A 修飾リポソームの粒径は 150 nm 程度であり、負の  $\zeta$  電位を示したことから、CS 誘導体の表面固定化が示唆された。MGlu/Chex-CS-A 修飾リポソームは、低 pH において内包物のピラニンを放出した。また CS 誘導体修飾リポソームは、未修飾リポソームに比べ樹状細胞に効率良く取り込まれた。これらのことから、樹状細胞の成熟化作用と pH 応答特性を併せ持つ CS 誘導体を修飾したリポソームは、免疫療法用の抗原キャリアとして有用である。

## 細胞外小胞の体内動態解析に向けた標識法の検討

1 東京大学大学院工学系研究科, 2 ナノ医療イノベーションセンター, 3 東京大学政策ビジョン研究センター

○乗松純平<sup>1,2</sup> (Norimatsu Jumpei), 赤木貴則<sup>1,2</sup>, 藤加珠子<sup>2</sup>, John D. Martin<sup>1,2</sup>, 一木隆範<sup>1,2</sup>, 片岡一則<sup>2,3</sup>, Horacio Cabral<sup>1,2</sup>

## 【緒言】

エクソソームに代表される細胞外小胞 (EV) は、内部に細胞由来の核酸やタンパク質を含み、細胞間情報伝達を担っている。近年、種々の疾患の発症や悪性化への関与が報告され、疾患の病態解明や診断・治療への応用の観点で EV が注目されている。その際、EV の体内動態の正確な把握が重要となるが、EV を標識する手法が確立されていないことが問題となっている。そこで、本研究では、EV 標識手法を開発し、その正確な体内動態の把握を目指す。

## 【実験】

マウス乳がん 4T1 細胞の培養上清から超遠心法を用いて EV を回収した。従来は、脂溶性色素と EV 膜との疎水性相互作用を利用した標識が行われていたが、今回は SulfoCy5-NHS エステルを用いて EV 表面のアミノ基に共有結合により蛍光色素を付与した。この手法と従来の脂溶性色素 PKH を用いて EV を蛍光標識し、マウスへの投与後の血中滞留性・臓器分布を比較した。さらに、4T1 細胞が脳転移を示すことから、EV のその過程への関与を調べるために、生体内リアルタイム共焦点顕微鏡を用いて、脳内血管付近における EV の挙動を直接観察した。

## 【結果と考察】

従来の脂溶性色素 PKH で標識した EV は投与後数分で血中から消失したのに対し、SulfoCy5 を共有結合で標識した EV は 2 時間後も安定して血中を滞留した。PKH 標識 EV は肺へ多く集積すること、さらには、肺のリアルタイム観察により、PKH 標識 EV が血中で凝集し、肺の毛細血管に捕捉されることがわかった。PKH による標識では EV が凝集し、その体内動態を正しく評価できない可能性が示唆された。一方で、SulfoCy5 による標識ではこのような現象は観られなかった。さらに、この手法を用いることで乳がん細胞由来 EV が脳の血管内皮細胞と相互作用する様子の直接観察に成功した。本研究の EV 標識法は、疾患悪性化機構の解明、新規診断/治療法開発など、EV 分野全体の発展が期待される。

## 1P-085- I

### 酵素耐性向上を目指したメッセンジャーRNA ナノ集合体の設計

<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科, <sup>2</sup>川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター  
○趙 オル<sup>1</sup> (Cho Eol), 吉永直人<sup>1</sup>, 持田祐希<sup>2</sup>, 内田智士<sup>1,2</sup>, オラシオ カブラル<sup>1</sup>

#### 【緒言】

メッセンジャー(m)RNA 導入は、効率的かつ安全に生体へ遺伝情報を送達する手段として注目されているが、mRNA が生体内で急速に酵素分解を受ける点が大きな課題である。これに対して、mRNA 輸送担体の研究が盛んである一方で、mRNA 設計に関する検討はほとんどない。そこで、我々は、mRNA 鎖同士を、RNA リンカーを介して結合させることで、mRNA ナノ集合体を調製した。RNA の2本鎖形成や高次構造形成に伴う立体障害によって、酵素分解を抑制できることが期待された。

#### 【実験】

mRNA に対して相補的な2つの同じ配列の17 nt RNA を10 nt アデニン RNA で繋いだ44 nt RNA をリンカーとし、それをmRNA にハイブリダイズさせることで、mRNA 鎖同士を結合させた。計8種類のリンカーを用い、多数のmRNA を結合させることで、mRNA ナノ集合体の調製を目指した。その後、その物性、酵素耐性、翻訳効率を評価した。

#### 【結果と考察】

相補鎖長を20 nt 以下にした場合、2本鎖RNA 形成に伴う免疫原性の増大や翻訳阻害は観られなかった。ハイブリダイズ過程で65°Cへの加温操作を行ったが、mRNA 分解や翻訳効率の低下は観られなかった。ハイブリダイズ後の動的光散乱法による解析では、mRNA 鎖同士の結合により、散乱光強度が増大し、径100 nm程度のmRNA ナノ集合体が形成されたことが確認された。分析超遠心では、4分子以上のmRNA からなる集合体の形成が示唆された。次に血清中での酵素耐性を定量PCR法にて評価したところ、mRNA ナノ集合体でmRNA 単体と比べて、最大で10倍程度の酵素分解抑制効果を認めた。一方で、mRNA の翻訳活性を、無細胞翻訳系や、HuH-7細胞への導入により評価したところ、mRNA ナノ集合体でもmRNA 単体と同程度の翻訳効率を得られた。以上のように、mRNA ナノ集合体の設計により、翻訳効率を維持したまま、酵素耐性を飛躍的に向上させることに成功した。今後、このナノ集合体をmRNA 輸送担体へ搭載することで酵素耐性を更に向上できるだけでなく、投与経路によっては輸送担体を用いない安全なmRNA 導入システム構築へと展開できることが期待される。

## 1P-086- II

### 高せん断応力下におけるディスク状粒子の接着挙動と血栓溶解能の付与

<sup>1</sup>東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻, <sup>2</sup>東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター, <sup>3</sup>東海大学工学部機械工学科

○吉田翔太<sup>1</sup> (Yoshida Shota), 中川 篤<sup>2</sup>, 横山 奨<sup>2</sup>, 木村啓志<sup>2,3</sup>, 岡村陽介<sup>1,2</sup>

【緒言】血栓症とは、血管内に病的血栓が形成されて血流が閉塞する疾患である。その治療薬として、組織プラスミンogen活性化因子(t-PA)が臨床応用されているが、血中半減期が短く過剰投与による出血傾向が課題とされている。他方、病的血栓形成部位におけるせん断応力は、正常血管と比較して10-100倍増大することが知られている<sup>1)</sup>。本研究では、高せん断応力下において効率よく集積するt-PA結合担体を創製することを目的とした。具体的には、球状粒子を変形させたディスク状粒子を調製し、高せん断応力下におけるマイクロ流路壁面への接着挙動と血栓溶解能を検証した。

【実験】膜乳化法にてアルギン酸ナトリウム修飾PLGA球状粒子(1.0 μmφ)を調製した。また、熱プレス法によりディスク状粒子(2.1 μmφ)へと変形させた。ポリ-L-リジンコートしたマイクロ流路内(モデル界面)に両粒子を流動させ(せん断応力: 10、1000 dyn/cm<sup>2</sup>)、接着挙動を比較した。また、両粒子表面にt-PAを結合させ、その血栓溶解能を検証した。

【結果と考察】膜乳化法にて調製したPLGA球状粒子(1.0 μmφ)を、熱プレス法にてディスク状(2.1 μmφ)に変形させた。両粒子を高せん断応力下で流動させたところ、ディスク状粒子の接着数は球状粒子と比較して顕著に増加した。これは、ディスク状となることで界面に対して面接触となり接着性が向上したと考えられる。従って、ディスク状粒子は高せん断応力となる血栓形成部位への集積性が向上する可能性が示唆された。次いで、粒子表面のカルボキシル基を標的とし、縮合剤を用いてt-PAを結合させた。得られたt-PA結合粒子はフィブリン塊を溶解できることから、化学修飾してもt-PAの機能は保持できることを確認した。現在、マイクロ流路内にフィブリン血栓を調製し、t-PA結合ディスク状粒子の流動状態下における血栓溶解能評価を行っており、当日併せて報告する予定である。

1) N. Korin *et al.*, *Science* **337**, 738-742 (2012).

## 1P-087-II

### 経鼻吸収剤への応用を指向したフェノバルビタール内包ディスクの創製と機能評価

<sup>1</sup>東海大学工学研究科応用理化学専攻, <sup>2</sup>東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター, <sup>3</sup>東海大学医学部基礎医学系, <sup>4</sup>城西大学薬学部製剤学講座

○長島和希<sup>1</sup> (Nagashima Kazuki), 中川 篤<sup>2</sup>, 畑中朋美<sup>3,4</sup>, 小沢春香<sup>4</sup>, 金丸達哉<sup>4</sup>, 内田昌希<sup>4</sup>, 夏目秀視<sup>4</sup>, 岡村陽介<sup>1,2</sup>

【緒言】抗てんかん薬は通常経口投与されるが、てんかん治療は長期に渡ることから、乳幼児や高齢者では嚥下困難な場合が想定される。経鼻投与は、薬物を安全かつ簡便に投与出来る利点を有していることから薬剤の有用な投与経路として注目されている。本研究では、抗てんかん薬(フェノバルビタール, PHB)の経鼻吸収剤への応用を指向し、PHB内包ディスク状粒子を調製することを目的とした。特に、粒子形状と鼻粘膜モデルへの接着性・薬剤放出挙動の相関を検証した。

【実験】分散相を乳酸/グリコール酸共重合体(PLGA)/PHB 溶液、連続相をポリビニルアルコール水溶液とし、SPG 膜乳化法(細孔径 10  $\mu\text{m}$ , 1 kPa, 800 rpm)により球状粒子を調製した。得られた粒子をアルギン酸ゲルに内包し加熱圧縮(10 MPa, 55  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s)してディスク化した。両粒子表面をポリ-L-リジン(10 mg/mL)によりカチオン化し、鼻粘膜モデルのゲル界面に対する接着性を比較した。また、フェノバルビタールを内包させた両粒子を PBS 中で転倒攪拌し、経時的な薬剤放出挙動を観察した。

【結果と考察】膜乳化法にて真球状の PLGA 粒子(30.0  $\mu\text{m}\phi$ )を調製した。NMR 測定により薬剤内包率を算出したところ、 $12 \pm 4.2\%$ であった。次いで、熱プレス法を用いることで、薬剤内包ディスク状粒子(55.1  $\mu\text{m}\phi$ )を得ることに成功した。表面をカチオン化した粒子分散液をゲル上に滴下後、ゲル界面に対する粘着率を測定したところ、球状粒子と比較してゲル上に多く残留し、粒子形状により界面に対する接着性が飛躍的に向上することを見出した。また、分散体からの薬剤放出率を測定したところ、ディスクの放出速度は球状粒子より顕著に増大した。現在、粒子サイズの異なる粒子を用いて放出挙動を検討しており、当日併せて報告する。

## 1P-088-II

### リガンド導入ポリグリセロール dendriマーのアルギニンデリバリー評価

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻

○酒元 竜 (Sakemoto Ryu), 板倉幸枝, 大谷 亨

近年、L-アルギニン(L-Arg)をマクロファージへ送達することによって高濃度一酸化窒素(NO)を産生し、がん細胞死を誘導するがん免疫療法が注目されている<sup>1)</sup>。われわれは、生体適合性に優れかつナノサイズのポリグリセロール dendriマー(PGD)が L-Arg と極めて高い結合定数 ( $10^6 \text{ M}^{-1}$ ) を示すことを見出し、L-Arg デリバリーの可能性がある分子としての予備的知見を得た<sup>2)</sup>。そこで本研究では、PGD ががん細胞指向性を示すリガンドを導入することで、PGD の L-Arg キャリアとしての可能性を評価した。

葉酸(FA)もしくは Biotin をがん細胞標的リガンドとして第三世代の PGD (PGD-G3)に修飾し、がん細胞表面上に存在するこれら受容体との相互作用を介してがん細胞へ選択的に L-Arg を送達するキャリアとしての評価を行った。FA 受容体過剰細胞、biotin 受容体過剰細胞、どちらの受容体も無い細胞を用い、L-Arg 取り込み能を評価したところ、一部の細胞では L-Arg 取り込みに伴う蛍光強度の増大がみられた。さらに、マクロファージへの標的指向性を付与するために、グルコースを PGD に導入することを試みた。アリル基の導入された PGD (PGD-G2.5)を光開始剤存在下、1-チオ- $\beta$ -D-グルコースを重 DMSO 中に溶解させ、2 分間 UV 照射した。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルから反応追跡を行ったところ、リガンド導入率が 100%となった。等温滴定型熱量(ITC)測定により L-Arg との相互作用を確認したところ、グルコース導入後も相互作用が保持されていた。現在、血清存在下での L-Arg 保持能の解析、並びにマクロファージ様細胞の標的指向性について解析中であり、これらについても報告する予定である。

#### 【参考文献】

- 1) S. Kudo, Y. Nagasaki, *J. Controlled Rel.*, **2015**, 217, 256.
- 2) T. Ooya, H. Lee, *ChemNanoMat* **2015**, 1, 264.

## 1P-089-III

### ドライアイ治療を目指した抗酸化能を有するインジェクタブルハイドロゲルの開発

<sup>1</sup>筑波大学大学院数理物質科学研究科, <sup>2</sup>徳島大学大学院社会産業理工学研究部, <sup>3</sup>徳島大学大学院先端技術科学研究部, <sup>4</sup>筑波大学大学院人間総合科学研究科

○岡田隆策<sup>1</sup> (Okada Ryusaku), 中川寛之<sup>1</sup>, 宇都義弘<sup>2</sup>, 勝占華世<sup>3</sup>, 楠橋由貴<sup>3</sup>, 二若真菜<sup>3</sup>, 林 佑美<sup>3</sup>, 長崎幸夫<sup>1,4</sup>

#### 【緒言】

ドライアイは涙液層の不安定化に特徴づけられる眼疾患の一つであり、涙液量の低下によって眼表面に生ずる酸化ストレスが角結膜での炎症を惹起し、視覚障害による患者のQOL低下を招く。ドライアイ治療薬としては主に点眼薬が用いられるが、従来の液剤型点眼薬では滞留性が低く、頻回投与が必要になるなどの問題があった。そこで我々は、既往研究において開発した抗酸化ストレス能を有するインジェクタブルハイドロゲル (Redox-active Injectable Gel: RIG) を点眼治療薬として用いることを考えた。投与された点眼薬は眼球表面温度に応答してゲル化するため滞留性の向上が期待できることに加え、構造中の抗酸化剤 TEMPO 部位が減少した涙液に代わって酸化ストレスを低減し炎症を抑える効果を併せ持つ。

#### 【実験】

PEGの両末端に抗酸化ユニットを重合・修飾することで得たABA型トリブロックコポリマーをポリアクリル酸と作用させてポリイオンコンプレックスフラワーミセルを調整し、動的光散乱によって粒径を測定した。また、レオメータを用いて動的粘弾性を測定した。キットを用いてSOD様抗酸化活性を測定した。受精鶏卵を用いたHET-CAM法により毒性評価を実施した。またミセルを蛍光標識化し、IVISを用いて眼表面での滞留性評価を行った。塩化ベンザルコニウムの投与によってドライアイモデルマウスを作成し、RIGの評価を行った。

#### 【結果と考察】

得られたポリイオンコンプレックスフラワーミセルの粒径は213nm程度であり、温度不可逆的なゲル化が確認された。ゲル化温度点は32°Cであった。SOD様活性は84.2U/mLであり、RIGが構造中のTEMPOユニットに起因する抗酸化能を有することが確認された。HET-CAM法による毒性試験では、RIG・抗酸化能を有さないコントロールゲルともに毒性は見られなかった。IVISを用いた滞留性評価では、低分子抗酸化剤に比してRIGが長期に眼表面に滞留することが確認された。

## 1P-090-I

### 温度応答性デンドロン脂質-金ナノロッドハイブリッドベクターの開発

大阪府立大学大学院工学研究科

○橋本拓弥 (Hashimoto Takuya), 平田智哉, 弓場英司, 原田敦史, 河野健司

【緒言】 遺伝子導入技術は、再生医療や遺伝子治療などの医療技術の実現に重要なバイオ技術であり、遺伝子を細胞内に導入して高効率な遺伝子発現を導く遺伝子ベクターの開発が急務である。遺伝子ベクターには、遺伝子との効果的な複合化能、細胞に取り込まれるための適切なサイズ、細胞取り込み後のエンドソーム脱出など、様々な機能が求められる。我々はこれまで、デンドリマーと脂質の融合分子であるポリアミドアミン(PAMAM)デンドロン脂質(DL, *J Control Release* **160**, 552-560 (2012))を、近赤外光発熱体である金ナノロッド(AuNR)に複合化したハイブリッドベクターを開発し、その遺伝子ベクターとしての機能を検討してきた。本研究では、エトキシジエチレングリコール(EDEG)鎖をデンドロン末端に導入した温度応答性DLをベクターに組み込むことで、光と熱への応答性を有する多機能ベクターの創製を試みた。照射によりAuNRが発熱し、温度応答性DLのEDEG鎖が脱水和することで、疎水性相互作用による細胞取り込み・エンドソーム脱出の促進が期待される。ここではハイブリッドベクターの調製と、遺伝子導入の光制御について検討を行った。

【実験】 温度応答性DLは、既報(*Bioconjugate Chem.* **18**, 1349-1354 (2007))により合成したDLのデンドロン末端に、EDEG鎖を導入することで合成した。シードレス法で作製したAuNRと11-メルカプトウンデカン酸(MUA)との反応によりMUA修飾AuNRを作製した。DL分散液に対して種々のAu/DL比となるようにMUA-AuNRを加え、混合することでハイブリッドベクターを作製した。ベクターとpDNAを種々N/P比となるように混合することでリポプレックスを調製した。

【結果と考察】 ハイブリッドベクターのZeta電位を測定したところ、MUA-AuNRの値とは異なり、ハイブリッドベクターはDLと同程度の値を示していることからDLがAuNR表面に結合した構造をとっていると考えられる。pDNAとの複合体形成をアガロースゲル電気泳動により評価すると、リポプレックスを形成していることが確認された。作製したリポプレックスの温度応答性を評価するために透過率測定を行ったところ、透過率は37°C以下までは一定の値を示したのに対し、40°C付近まで加温すると減少に転じたことから、リポプレックスが温度応答時に脱水和して凝集したことが示唆された。作製したリポプレックスは、照射により細胞取り込み・エンドソーム脱出の促進ができる遺伝子ベクターとして期待される。

## 1P-091-II

### 蛍光標識法によるリポソームの活性化血小板に対する結合能の評価法

<sup>1</sup>早稲田大学大学院先進理工学研究科, <sup>2</sup>早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構

○中原景子<sup>1</sup> (Nakahara Keiko), 陳 素雲<sup>1</sup>, 李 天舒<sup>2</sup>, 武岡真司<sup>1</sup>

【緒言】血小板輸血は血小板減少症や大量出血の治療法として有効であるが、長期保存が困難であり、感染やアレルギーなどの副作用が懸念されている<sup>1,2</sup>。当研究室では長期保存、大量調製可能な血小板代替物としてH12-(ADP)リポソームを開発してきた。本リポソームはリポソーム表面上に担持されたフィブリノゲン $\gamma$ 鎖C末端ドデカペプチドであるH12を介して活性化血小板上のGPIIb/IIIaと結合することで、出血部位特異的に集積し内包ADPを放出して血小板凝集を増強する<sup>3</sup>。H12-リポソームは活性化血小板凝集塊中に巻き込まれると考えられているが、これまで具体的かつ定量的なデータは得られていなかった。本研究では蛍光標識法によるリポソームの活性化血小板に対する結合能評価法の構築を目的とする。

【実験】96ウェルガラスプレートに血小板、蛍光標識リポソーム、血小板を活性するADPを添加し、固定した後、蛍光顕微鏡を用いて血小板凝集塊中の蛍光標識リポソームの観察及び蛍光定量を行った。始めに最適な血小板数、リポソーム濃度、洗浄回数を検討した。続いて血小板のタンパク量を測定し、タンパク量あたりの蛍光強度を比較することによりサンプル間の血小板数の差異を補正し評価法を構築した。構築した評価法を用いて血小板凝集塊中に巻き込まれる蛍光標識リポソーム量をH12修飾の有無により検討した。

【結果と考察】蛍光顕微鏡を用いた血小板凝集塊中の蛍光標識リポソームの観察及び蛍光定量において、最適な血小板数は $20 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 、リポソーム濃度は $200 \times 10^6 \text{ M}$ 、洗浄回数は4回であった。タンパク量あたりの蛍光強度を比較することによりサンプル間の血小板数の差異を補正することで評価法を構築した。また、H12修飾リポソームはH12未修飾リポソームに比べ2倍血小板凝集塊中に巻き込まれることが示唆された。

1) Blajchman M.A., *Transfus Clin Biol*, **8**, 267-271(2001), 2) Taguchi K *et al.*, *Drug Metab Dispos*, **41**, 1584-1591(2013), 3) Okamura Y *et al.*, *Transfusion*, **7**, 1221-1228 (2005).

## 1P-092-III

### ナノ EPR 増強剤である NO 搭載型アルブミンダイマーを駆使した次世代型がん治療法の開発

<sup>1</sup>熊本大学薬学部薬剤学分野, <sup>2</sup>徳島大学薬学部薬物動態制御学分野, <sup>3</sup>崇城大学薬学部, <sup>4</sup>崇城大学 DDS 研究所

○木下 遼<sup>1</sup> (Kinoshita Ryo), 異島 優<sup>2</sup>, 池田真由美<sup>2</sup>, 中村秀明<sup>3,4</sup>, 方 軍<sup>3,4</sup>, 渡邊博志<sup>1</sup>, 小田切優樹<sup>3,4</sup>, 丸山 徹<sup>1</sup>

【緒言】ナノ粒子アルブミン結合パクリタキセルである Abraxane®は Enhanced Permeability and Retention effect (EPR 効果)を基盤として開発された高分子抗がん剤であり、臨床でも用いられている。しかしながら、近年の受動的経血管デリバリーでは、EPR 効果を利用して、満足のいく治療効果を得るための十分量の薬剤を送達することはできていない。そのため、内因的な EPR 効果を向上させるため、我々は EPR 効果増強因子である一酸化窒素 (NO)に焦点を当て、さらに効果的な NO キャリアである一酸化窒素搭載型アルブミンダイマー (SNO-HSA Dimer)を開発した。そこで、本研究において、我々は SNO-HSA Dimer が Abraxane®治療へ及ぼす効果を評価した。

【実験】SNO-HSA Dimer による EPR 効果の増強は in vivo における EPR 効果の指標であるエバンスブルー色素 (EB)を用いて評価した。Abraxane®の治療効果への SNO-HSA Dimer の効果を確認するために、我々は3種類の担がんモデル (マウス大腸がん (C26)担がんマウス、マウスメラノーマ (B16)担がんマウス、ヒト膵臓がん (SUIT2)同所移植マウス)において、Abraxane®と SNO-HSA Dimer の併用療法を行い、Abraxane®の治療効果及び体内分布の評価を行った。

【結果と考察】C26 担がんマウスにおいて、SNO-HSA Dimer は腫瘍中の EB 濃度を向上させた。加えて、SNO-HSA Dimer は Abraxane®の腫瘍選択性を増強させた。これらの結果を反映して、SNO-HSA Dimer は Abraxane®の抗腫瘍効果を増強させ、Abraxane®の用量制限毒性である骨髄抑制を軽減した。さらに、血管透過性の低い B16 担がんマウスや、臨床条件を反映した SUIT2 同所移植モデルにおいても Abraxane®の治療効果を向上させた。

【結論】SNO-HSA Dimer はアルブミン結合型抗がん剤の増強剤として有望であり、我々の知見は Abraxane®の次世代型治療法開発のカギになると期待できる。

## 1P-093- II

### 細胞送達キャリアとしてのリン酸カルシウム被覆 PLGA 微粒子封入アルギン酸ビーズの開発

武蔵野大学薬学部薬学科

○松林信人 (Matsubayashi Makoto), 照喜名孝之, 服部祐介, 大塚 誠

#### 【緒言】

生体の自己再生能力を活かすために、幹細胞等を用いた細胞療法が徐々に実現されている。我々は、骨欠損部において骨芽細胞を生体内で安定に長期間機能することが可能な細胞送達キャリアの粒子設計を行った。アルギン酸は  $\text{Ca}^{2+}$  などの二価カチオンでゲル化するが、 $\text{Na}^+$  存在下ではゾル化する。この性質を利用し、アルギン酸ビーズ内部から  $\text{Ca}^{2+}$  供給源である各種リン酸カルシウム(CP)コーティング粒子 (シンバスタチン (SIM) 含有 PLGA ナノ粒子及びマイクロ粒子) を封入し、薬物徐放可能で病態応答性のあるアルギン酸ビーズの細胞送達キャリアとしての有用性を *in vitro* において評価した。

#### 【実験】

SIM 封入 PLGA マイクロ及びナノ粒子はそれぞれ O/W 水中乾燥法及び水中拡散法を用いて調製後、高濃度疑似体液 (SBF) 中に浸漬し、各種リン酸カルシウムコーティング PLGA 粒子を得た。骨欠損部での病態応答性を評価するために、正常状態及び低  $\text{Ca}^{2+}$  血漿環境のモデルとして、それぞれ疑似体液 (SBF) 及びリン酸生理緩衝液 (PBS) 中での SIM の溶出挙動を *in vitro* 評価した。また、アルギン酸ビーズ内に細胞を封入し、細胞生存率を評価した。

#### 【結果と考察】

走査型電子顕微鏡、X 線結晶回折及び  $\text{Ca}^{2+}$  の定量の結果から、リン酸カルシウムコーティングした各 PLGA 粒子が得られたことが示唆された。次に、各 PLGA 粒子を封入したアルギン酸ビーズを SBF 中で溶出試験を行った結果、アルギン酸ビーズは崩壊に時間を要した一方、PBS 中では速崩壊性を示し、崩壊後は PLGA の粒子径に応じた溶出挙動に依存した薬物放出性を示唆した。また、リン酸カルシウムコーティング粒子が封入されたアルギン酸ビーズにおいて、細胞生存率の上昇が示唆されたため、病態応答性細胞送達キャリアとしての応用が期待される。

## 1P-094- II

### バキュロウイルス発現系による機能性膜タンパク質提示細胞外ベシクルの構築と機能

<sup>1</sup> 京都大学大学院工学研究科, <sup>2</sup> JST-ERATO

○石川良賀<sup>1</sup> (Ishikawa Raga), 吉田昭介<sup>1</sup>, 澤田晋一<sup>1,2</sup>, 佐々木善浩<sup>1</sup>, 秋吉一成<sup>1,2</sup>

【緒言】バキュロウイルスゲノムに膜タンパク質遺伝子を組込むことで作製した組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させると、目的膜タンパク質は昆虫細胞膜、および細胞外ベシクル (Extracellular Vesicle: EV) に提示される。本システムは、目的膜タンパク質が大量に提示された EV を得られるだけでなく、真核細胞を用いるため、タンパク質の翻訳後修飾が期待できるなどの特徴がある。本研究では、生体内の過剰な免疫応答を抑制する免疫チェックポイントタンパク質、PD-1 に着目した。癌細胞は PD-1 のリガンドである PD-L1 が高発現しており、PD-1/PD-L1 シグナルにより免疫細胞を不活性化することで免疫システムから巧妙に逃れている。本研究では、バキュロウイルス発現系により PD-1 が提示された組換え EV を作製し、その機能解析を行った。

【実験】バキュロウイルスゲノムのポリヘドリンプロモーター下流に PD-1 遺伝子を組込んだ組換えバキュロウイルスを作製し、Sf9 昆虫細胞に感染させた。感染 4 日後、培養上清を回収し、ショ糖密度勾配遠心によりウイルス遺伝子を含まない組換え EV (PD-1 EV) を分取した。ナノ粒子トラッキング解析 (NTA) により PD-1 EV の粒径を測定し、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により PD-1 EV の形態観察を行った。抗 PD-1 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、Sf9 昆虫細胞、EV における PD-1 の発現を調べた。また、脂質膜を蛍光標識した PD-1 EV を PD-L1 発現細胞である Hela 細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、EV の局在を調べた。

【結果と考察】NTA 解析と TEM 観察により、平均粒径 158 nm のベシクル様構造体が確認された。ウエスタンブロット解析により、Sf9 昆虫細胞、EV の両方において PD-1 の発現が確認された。また、PD-1 EV と Hela 細胞との相互作用評価において、PD-1 を発現していない EV と比較して、PD-1 EV が Hela 細胞内により多く取り込まれている様子が観察された。これらの結果から、EV 上に発現した PD-1 がその機能を保持しており、PD-L1 発現細胞と相互作用することが示唆された。

## 1P-095-III

### ナノ秒パルスレーザージルコニアの表面性状評価

<sup>1</sup>東北大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>鶴見大学歯学部歯科理工学講座, <sup>3</sup>東北大学大学院医工学研究科  
○原井智広<sup>1</sup> (Harai Tomohiro), 廣田正嗣<sup>2</sup>, 早川 徹<sup>2</sup>, 嶋田慶太<sup>1</sup>, 水谷正義<sup>1</sup>, 厨川常元<sup>3</sup>

#### 【緒言】

近年、白色で審美的であるという理由から、ジルコニア製の歯科用インプラントへの注目が高まっている。しかし、その骨親和性に関しては不明な点が多く、これを向上させる適切な表面処理法の確立には至っていない。

著者らは、チタン材に対してナノ秒パルスレーザーを適用することにより、微細な凹凸の創成と表面の組成変化に起因した骨親和性の向上に成功している。一方、セラミクス材であるジルコニアに対しても同様の効果が得られるかは明らかとなっていない。そこで本報では、イットリアまたはセリア添加型の部分安定化正方晶ジルコニアに対してナノ秒パルスレーザー照射を行い、表面性状の変化を確認するとともに、本手法の有用性について検討・考察を行った。

#### 【実験】

供試材は、Y-TZP および Ce-TZP を用いた。同材を 2 mm × 3 mm、厚さ 1 mm の平板状に機械加工し、一方の端面に耐水研磨紙 (#320~#1200) を用いて鏡面状に仕上げた。本実験では、パルス幅 3 ns の Nd:YAG レーザのスポットを 30 μm × 60 μm のトップハット形状に整形し、波長 1064 nm、出力 150 μJ/pulse、周波数 50Hz、送り速度 7 μm/s、標準大気雰囲気中で基材鏡面に対し垂直にレーザー照射を行った。

#### 【結果と考察】

SEM 観察により、両材のレーザー照射面には幅 30 μm、深さ 30~40 μm 程度の溝が創成されていることを確認した。以上より、形状に起因する骨親和性の向上が期待できる。しかし、レーザー照射面の様子は Y-TZP はある程度原色を保っていたが、Ce-TZP は黒化しており審美性を欠く結果となった。表面の組成変化を確認するため、EDX により酸素原子数濃度分析を行ったところ、レーザー照射後の Ce-TZP は 25%程度低下していた。さらに、表面ゼータ電位を取得したところ、レーザー照射後の Ce-TZP の表面ゼータ電位は 80%程度低下していた。これより、表面ゼータ電位の亞太タイト析出依存性を考慮すると、Ce-TZP へのレーザー照射は骨親和性を低下させる可能性が示唆された。

## 1P-096-II

### 血液透析代替システムを目指した吸水性ナノファイバーメッシュの作製及び性能評価

<sup>1</sup>東京理科大学大学院基礎工学研究科, <sup>2</sup>物質・材料研究機構 (NIMS) 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 (MANA), <sup>3</sup>筑波大学大学院数理物質科学研究科  
○柘植美礼<sup>1,2</sup> (Tsuge Mirei), 栗本理央<sup>2,3</sup>, 菊池明彦<sup>1</sup>, 荏原充宏<sup>1,2,3</sup>

【緒言】腎臓は、血液から老廃物や余分な水分を濾過及び排出し、また再吸収することで体液の恒常性を維持している。この機能が低下した慢性腎不全患者の多くは、血液透析を始めとする血液浄化法により延命・社会復帰している。日本国内において透析患者数は 32 万人を超えている。しかし、現行の透析治療は高度なインフラを要するため、東日本大震災 (2011 年) では、現地の透析患者は集団疎開を余儀なくされた。このような背景のもと当研究室では、ライフラインが寸断された緊急時や通院できない非常時においても、一時的に急性尿毒症の応急処置が可能な新規治療システムの開発を行っている。本研究では、体内からの速やかな水分除去を目指し、高吸水性ポリマーである poly(sodium acrylate) (PSA) からなるナノファイバーメッシュの開発を行った。

【実験】methanol 中に poly(acrylic acid) (PAA) ( $M_n=250,000$ ) と ethylene glycol を溶解した。調製した溶液に硫酸を加え、エレクトロスピンニング法によりナノファイバーを作製した。その後、130°C で 2 時間静置した。また比較として、同じ材料からなるフィルムも作製した。続いて、フィルム及びナノファイバーを水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムの混合溶液に 1 時間浸漬させ、PSA フィルム及び PSA ナノファイバーを作製した。さらに、作製した PSA フィルム及び PSA ナノファイバーの形状及び吸水能について評価した。

【結果と考察】作製した PSA フィルム及びナノファイバーの走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像から、フィルムは平滑で明らかな孔は認められなかったのに対し、ナノファイバーは比較的均一な繊維径を有することを確認した。PSA フィルム及びナノファイバーの吸水能を、マウス血液中における吸水量を測定した。PSA ナノファイバーは、約 10 倍の膨潤度を示し、PSA フィルムは約 4 倍であった。したがって、ナノファイバーはフィルムの約 2.5 倍の吸水能を示しており、これは、ナノファイバーの繊維状ナノ構造による毛細管現象に起因すると考えられる。この結果から、ナノファイバーの形状をとることで、より効率的に吸水可能であることが示唆された。

## 1P-097-III

### タラゼラチンの疎水化による組織・臓器接着性の向上

<sup>1</sup>筑波大学大学院数理物質科学研究科, <sup>2</sup>物質・材料研究機構機能性材料研究拠点

○水野陽介<sup>1,2</sup> (Mizuno Yosuke), 水田 亮<sup>1,2</sup>, 西口昭広<sup>2</sup>, 田口哲志<sup>1,2</sup>

【緒言】外科手術において、接着剤は肺縫合部からのエアリーク防止や血管等の吻合部などに用いられている。しかし、現在医療現場で使用されている外科用接着剤は接着強度と生体親和性の両立に課題があり、両者を併せ持つ接着剤が求められている。我々はこれまでにブタ由来ゼラチンにコレステリル基を導入することで湿潤組織に対して高いシーリング効果を示す組織接着剤を開発した。しかし、ブタ由来ゼラチンは高濃度・低温において流動性が低いため、使用前に加温の必要があった。そこで、ブタ由来ゼラチンと比較してイミノ酸含有量が低いことにより常温流動性を示すタラ由来ゼラチン(Alaska Pollock-derived gelatin, ApGltln)に着目し、疎水化 ApGltln を用いた接着剤の調製と機能について評価した。

【実験】ApGltln の疎水化は、ApGltln に含まれるリジン残基にドデカノールを反応させ、その後 2-ピコリンボランにより還元することでドデシル基導入 ApGltln(C12-ApGltln)合成し、4S-PEG 架橋剤と混合することで接着剤とした。C12-ApGltln 接着剤の生体組織に対する耐圧試験は、穴を開けたブタ大動脈およびラット肺エアリークモデルに対して行った。一方、生体内分解性は接着剤を硬化させたディスク状接着剤をラット皮下に埋入することで評価した。

【結果と考察】C12-ApGltln 接着剤のブタ大動脈組織およびラット肺に対する耐圧強度は Org-ApGltln 接着剤およびフィブリン系接着剤と比較して有意に高い耐圧強度を示した。これは、C12-ApGltln 中のドデシル基がコラーゲン・エラスチンなどの疎水性タンパク質や細胞の脂質二重層と疎水性相互作用をすることに起因すると考えられた。接着剤の生体内分解性については、C12-および Org-ApGltln 接着剤は強い炎症が確認されることなくラット皮下において 28 日以内に完全に分解・吸収された。

以上の結果から、C12-ApGltln 接着剤は高い組織接着性を有するだけでなく、優れた生体親和性も有していることから、既存品に代わる組織接着剤として、医学応用が期待される。

#### 【参考論文】

Y. Mizuno, R. Mizuta, M. Hashizume and T. Taguchi, *Biomater Sci*, 2017, **5**, 982-989.

## 1P-098- I

### 水溶液法を用いた生体吸収性マグネシウム合金の結晶性リン酸カルシウム被覆

京都大学大学院エネルギー科学研究科

○渡邊 慎 (Watanabe Shin), 藪塚武史, 高井茂臣

#### 【緒言】

生体吸収性を有する Mg 合金は次世代の金属生体材料として近年注目を集めている。しかし Mg 合金は生体内での吸収が速すぎる欠点を持つ。この合金を安定な結晶相からなる十分な膜厚のリン酸カルシウム (CaP) で被覆することができれば、適度な生体吸収性と骨結合性を併せ持つ新規生体材料を開発することができる。Mg イオンはアパタイトの結晶成長を阻害することが報告されており、従来の水溶液法では Mg 合金の結晶性 CaP 被覆には長期間を要する。本研究では、前処理として陽極酸化を施すことで、擬似体液(SBF)のイオン濃度を改変した水溶液を用いて、Mg 合金表面に結晶性 CaP を短時間で成長させた。これらの各過程での Mg 合金の表面、断面形態および結晶相の変化を評価した。

#### 【実験】

CaP 被覆に用いる反応溶液として、従来の SBF の 3 倍の  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$  と低い  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  濃度をもつ水溶液(conc.SBF)を調製した。# 400 研磨紙で研磨した Mg 合金(AZ-31)を陽極、白金板を陰極、電解液を 1.0 M NaOH 水溶液として定電圧 10 V を 10 分間印加し、合金表面に酸化被膜を形成させた。この試料を、36.5 °C、pH 5.0 に調整した conc.SBF に浸漬し、36.5 °C 恒温槽中で 1 日静置した。コントロールとして、未処理の Mg 合金も同条件で浸漬した。浸漬後の試料表面および断面を XRD、SEM、EDX を用いて分析した。

#### 【結果と考察】

conc.SBF 浸漬 1 日後、未処理の試料表面では ACP が形成していた。一方、陽極酸化を行った試料では、浸漬 1 日以内で表面全体に鱗片状結晶が観察され、XRD 測定ではアパタイトに帰属されるピークが検出された。断面を観察したところ、アパタイト層は約 7 μm の厚みであった。これらの結果から、conc.SBF の高い  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{HPO}_4^{2-}$  により CaP 成長が加速したことに加え、陽極酸化皮膜が Mg 合金からの Mg イオンの溶出を抑えたことにより、1 日以内という短期間でアパタイトが成長したと考えられる。

1P-099- I

## 膝関節機能の改善効果に優れた新規ヒアルロン酸誘導体の開発および特性評価

東京電機大学大学院理工学研究科生命理工学専攻

○金子 凜 (Kaneko Rin), 柳田湧太, 関口はつ美, 田島佑也, 村松和明

【緒言】初期の変形性膝関節症(膝 OA)における対症療法の一つに、生体多糖である高分子量ヒアルロン酸(HA)の関節内投与が挙げられる。しかし、OAなどの関節症患者の関節液では健常者と比較してヒアルロニダーゼ活性が高く、関節内投与されたHAの半減期は短い傾向にあることから、効果の持続性は乏しいことが示唆されている。それ故、複数回の経皮的投与の必然性が生じるが、感染リスクの増加や局所組織の炎症・損傷といった課題が存在する。そこで演者らは、効果の持続性に優れた単回投与型の新規なHA誘導体の開発を試み、新規誘導体の機能性や有効性を評価した。【実験】カルボジイミド縮合剤を用いて、低分子量ポリグルタミン酸(PGA)を高分子量HAにグラフト化した誘導体(PGA-g-HA)を作製した。このPGA-g-HAがヒアルロニダーゼに対し分解抵抗性を示すことを検証するため、酵素反応物をSDS-PAGEおよびStains All染色で可視化した。グラフトされたPGA鎖に起因するPGA-g-HAの免疫原性は、骨髄由来樹状細胞(BMDCs)に対するサイトカイン産生誘導を指標として、RT-PCR法により解析した。また、PGA-g-HAの生理活性を評価するため、in vitroにおいてIL-1 $\beta$ で刺激された軟骨細胞に対する細胞外マトリックス代謝調節機能をRT-PCR法にて評価した。さらに、モノヨード酢酸(MIA)で誘導されたラット膝関節炎モデルに対する軟骨保護効果を確認するため、投与2週間後に関節軟骨を組織化学的手法にて評価した。【結果と考察】未修飾HAが完全に分解される酵素反応条件において、見かけ上、PGA-g-HAの分解は確認されなかったことから、グラフトされたPGAはHA主鎖の分解抵抗性に寄与することが示された。未修飾HAおよびPGA-g-HAがそれぞれ暴露されたBMDCsを比較した結果、PGA-g-HA群でIL-10の発現が有意に増加した点を除き、免疫原性を示唆する主要なサイトカインの発現挙動に統計的な差は見られなかった。IL-1 $\beta$ で刺激された軟骨細胞に対するin vitro活性も未修飾HAとPGA-g-HAで同等であった。一方、MIA誘導ラット膝関節炎モデルに対するin vivo有効性は、未修飾HA投与群と比較しPGA-g-HA投与群で相対的に優れることが示され、これらの差は分子の分解性の違いに起因したものと推察された。以上の結果より、分解抵抗性と生理活性が両立されたPGA-g-HAは、未修飾HAよりもOAにおける関節機能の改善に有望であることが期待された。

1P-100- I

## アパタイト核を用いた摺動グレードPEEKへの生体活性付与

<sup>1</sup>京都大学大学院エネルギー科学研究科, <sup>2</sup>香川高等専門学校

○昼田智子<sup>1</sup> (Hiruta Tomoko), 藪塚武史<sup>1</sup>, 福島啓斗<sup>1</sup>, 高井茂臣<sup>1</sup>, 八尾 健<sup>2</sup>

【緒言】骨に近い弾性率(4.50 GPa)を特徴とし、摺動性・耐摩耗性に優れた摺動グレードPEEKに生体活性を付与することで、材料の特性を活かした人工骨材料の開発を目指した。本研究では摺動グレードPEEK表面に、硫酸処理により細孔を形成後、体液または擬似体液(SBF)中で高活性にアパタイト形成を誘起するリン酸カルシウム微粒子(アパタイト核)を析出する手法[1]により、生体活性を有する摺動グレードPEEKを開発した。

【実験】摺動グレードPEEK(炭素繊維、グラファイト、PTFE含有)の基板を、98 wt%硫酸に浸漬することで、表面に細孔を形成させた。この基板に、酸素雰囲気下で出力200 W、4分間のグロー放電処理を行い、表面の親水性を向上させた。この基板を、速やかに25.0 °C、pH 8.40に調整したSBFに浸漬し、70 °Cの恒温槽中で1日保持することで、細孔内にアパタイト核を析出させた。得られた材料を、SBF(pH 7.40、36.5 °C)に浸漬することで、SBF中でのアパタイト形成能を評価した。試料表面をTF-XRD、FE-SEM、EDXを用いて分析した。また、基板表面に形成したアパタイト層と基板間の接着強度を、万能材料試験機による引っ張り試験で測定した。

【結果と考察】硫酸により摺動グレードPEEK表面に網目状の細孔が形成された。アパタイト核を析出させた基板をSBFに1日浸漬したのちFE-SEMで観察すると、基板表面全体が骨類似アパタイトに特徴的な鱗片状結晶で覆われていた。EDXではPとCaのピークが確認され、TF-XRDではアパタイトの回折ピークが確認された。また形成されたアパタイト層と摺動グレードPEEK間の接着強度は、 $13.3 \pm 3.27$  MPa(試験片10)であった。硫酸処理を行わなかった試験片ではアパタイト層が剥がれやすく、接着強度の測定が困難であった。グロー放電処理を行わなかった試験片では $6.79 \pm 1.58$  MPa(試験片9)であった。以上の結果から硫酸による細孔形成が、アパタイト層と基板とのより強い接着強度に寄与することが示唆された。

【参考文献】[1] T.Yabutuka, K. Fukushima, T. Hirura, S. Takai, T. Yao, *Mater. Sci. Eng. C*, in press.

【謝辞】本研究の一部は、科研費(16K16401)の助成を受け遂行した。

### 1P-101-III

#### 頭蓋冠臨界欠損モデルにおける rhBMP-2 担持ナノシートの骨形成促進効果

<sup>1</sup> 東京大学大学院医学系研究科整形外科, <sup>2</sup> 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻, <sup>3</sup> Graduate Institute of Clinical Medical Sciences, College of Medicine, Chang Gung University, <sup>4</sup> 東京大学医学系研究科疾患生命工学センター, <sup>5</sup> 東海大学工学部応用化学科, <sup>6</sup> 東京大学大学院医学系研究科関節機能再建学講座  
○村橋靖崇<sup>1</sup> (Murahashi Yasutaka), 石原一彦<sup>2</sup>, Kuo-Chin Huang<sup>3</sup>, 矢野文子<sup>1</sup>, 北浦義昭<sup>4</sup>, 張成虎<sup>1</sup>, 田中 栄<sup>1</sup>, 岡村陽介<sup>5</sup>, 齋藤 琢<sup>1</sup>, 茂呂 徹<sup>6</sup>

【緒言】我々は以前、医療材料として汎用されているポリ乳酸 (PLLA) を材料に、60-100 nm 厚のシート (ナノシート) を簡便に構築する手法を開発した。PLLA ナノシートは、ナノ厚特有の柔軟な構造により臓器や組織の細かい凹凸に合わせて密着し、高い接着性を示すとともに、生体で分解、吸収される。今回我々は、ナノシートを二重にして間に薬剤を封じ込めることで、ラッピングとドラッグデリバリーの両方の効果を併せ持つナノシートを新たに開発した。本研究では、rhBMP-2 を担持させたナノシートを作成し、マウス頭蓋冠臨界欠損モデルを用いて骨形成促進効果を検証した。

【実験】C57BL/6J マウスの 8 週齢オスの頭蓋骨に直径 3.5mm の骨欠損を作成し、ナノシートを移植しない群 (自然経過群, n= 29)、溶媒 (PBS) のみ担持させたナノシートを移植した群 (PBS ナノシート群, n= 27)、rhBMP-2 (50 µg) を担持させたナノシートを移植した群 (BMP ナノシート群, n= 15) に分けて、骨形成能を経時的に評価した。PBS ナノシート群は自然経過群と比較し、術後 2 週目から骨欠損面積がやや小さい傾向はあったが、移植後 20 週までの間では統計学的な有意差は認めなかった。一方、BMP ナノシート群では自然経過群と比較し、術後 2 週から骨欠損面積は有意に小さく、再生骨の体積も有意に大きくなり、移植後 8 週の時点で骨欠損部の半分近くまで骨再生がみられた。組織学的変化を Masson' s trichrome 染色で評価したところ、自然経過群、PBS ナノシート群では術後 2 週から欠損部辺縁に線維性組織の肥厚が見られたが、術後 8 週の時点では消失していた。一方、BMP ナノシート群では術後 2 週の時点で欠損部辺縁から中央にかけて旺盛な新生骨形成が認められ、8 週まで骨組織の増大と成熟が続いた。薬剤徐放性を調べるため、BMP ナノシートを細胞培養液に浸し、培養液中に放出される rhBMP-2 を経時的に ELISA で定量したところ、2 か月以上にわたって rhBMP-2 が緩やかに徐放されることが確認された。【結果と考察】 rhBMP-2 を担持させたナノシートには強力な骨形成促進作用があり、優れた徐放効果を持つことが明らかになった。PLLA ナノシートは、ラッピングと薬剤徐放の 2 つの効果を併せもち、骨再生以外の多くの分野で応用が期待できる。

### 1P-102-III

#### 硫酸化ポリロタキサン/骨形成因子複合体によるマウス頭蓋骨欠損モデル骨形成促進効果

<sup>1</sup> 東京医科歯科大学生体材料工学研究所, <sup>2</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
○寺内正彦<sup>1</sup> (Terauchi Masahiko), 稲田大佳輔<sup>2</sup>, 田村篤志<sup>1</sup>, 山口 聡<sup>2</sup>, 由井伸彦<sup>1</sup>

#### 【緒言】

BMP-2 は強力な骨誘導能を有することから骨再生において注目されているが、生理的条件下での速やかな失活、多量投与による副作用の懸念から臨床応用が疑問視されている。負電荷を有する硫酸基を多く含むヘパリンは、正電荷の BMP-2 と静電相互作用による複合体を形成することで BMP-2 の失活を防止し、骨誘導能力を増強することが知られており、低投与量での骨再生が期待される。しかし、ヘパリンは強力な血液抗凝固作用を有するため、臨床応用は難しいことが想定される。本研究では、線状分子上に  $\alpha$ -シクロデキストリンが複数貫通した超分子ポリロタキサン (PRX) に着目し、ヘパリンの機能を模倣することを目的に硫酸基を導入した硫酸化 PRX (SPE-PRX) を設計し、マウス頭蓋骨欠損モデルにおける骨形成能及び、生体安全性を評価した。

#### 【実験】

5 週齢・雄の ICR マウス頭頂骨上に直径 3.5mm に生検用パンチにて頭蓋骨欠損を作製し、SPE-PRX / BMP-2 複合体溶液を浸したアテロコラーゲンスポンジを欠損部に埋入した。各マウスの骨形成量は、手術後 1、2、3、4 週目にマイクロ X 線 CT 及び、ヘマトキシリン・エオジン染色切片を作製し評価した。また、術後 24 時間での血液生化学検査を行い、腎・肝機能を評価した。

#### 【結果と考察】

SPE-PRX/BMP-2 群は術中・術後の止血が容易であったことに対し、ヘパリン/BMP-2 群は術後 30 分経過しても創部からの出血を認めた。SPE-PRX/BMP-2 群は、術後 4 週でヘパリン/BMP-2 群及び、BMP-2 単体群よりも優位な骨形成能を示した。血液生化学検査では腎・肝機能に異常な値を認めなかった。以上より、SPE-PRX は、毒性および抗凝固活性を有さず、BMP-2 の骨誘導能を増強する有望な高分子材料として期待される。

## 1P-103- I

### 血管内皮細胞増殖因子を特異的に捕捉する RNA アプタマー修飾材料の機能評価

<sup>1</sup>国立医薬品食品衛生研究所, <sup>2</sup>株式会社リボミック, <sup>3</sup>東京大学医科学研究所

○森下裕貴<sup>1</sup> (Morishita Yuki), 野村祐介<sup>1</sup>, 福井千恵<sup>1</sup>, 中村義一<sup>2,3</sup>, 齧島由二<sup>1</sup>

【緒言】生体内に埋植した材料の表面に形成される蛋白質層の組成を人為的に制御できれば、同材料に特定の機能を発揮させることが可能と考えられる。RNA アプタマーは任意の標的を選択的に捕捉する機能を持ち、自在に設計できると共に、化学合成可能であるため、抗体や成長因子等を固定化した材料と比較して、コスト、安全性、品質管理等の点で優れた機能性材料の創成に応用できる可能性がある。本研究では、埋植部位への血管内皮前駆細胞の遊走や血管新生を促進可能な医用材料の開発を目指し、活性を保持した状態で血管内皮細胞増殖因子 (VEGF<sub>165</sub>) を選択的に捕捉する RNA アプタマーを修飾した材料を作製し、その機能を評価した。

【実験】試験管内選択法により取得した VEGF<sub>165</sub> 捕捉型 RNA アプタマー候補の VEGF<sub>165</sub> 結合能及び RNA アプタマー/VEGF<sub>165</sub>/VEGF 受容体三者複合体形成能は表面プラズモン共鳴法により評価した。三者複合体形成時の VEGF<sub>165</sub> 活性は、ヒト臍帯静脈内皮細胞に RNA アプタマーと VEGF<sub>165</sub> の混合溶液を添加した際の VEGF 受容体のリン酸化を指標としてウェスタンブロットにより評価した。VEGF<sub>165</sub> 捕捉能は、RNA アプタマー候補を固定化した金板を作成し、VEGF<sub>165</sub> 添加血清中でインキュベート後、材料表面に吸着した VEGF<sub>165</sub> を回収し、ELISA により定量した。

【結果と考察】表面プラズモン共鳴法による解析の結果、RNA アプタマー候補はランダム配列 RNA アプタマーと比較して、VEGF<sub>165</sub> に対して高親和性 ( $K_d = 58.9$  pM) を示すと共に、RNA アプタマー/VEGF<sub>165</sub>/VEGF 受容体複合体を形成可能であった。また、ウェスタンブロットによる解析の結果、ヒト臍帯静脈内皮細胞に RNA アプタマー候補と VEGF<sub>165</sub> を共添加しても、VEGF<sub>165</sub> 単独添加時と比較して、VEGF 受容体のリン酸化は減弱しなかったことから、当該 RNA アプタマーは、活性を保持した状態で VEGF<sub>165</sub> を捕捉可能であることが明らかとなった。この RNA アプタマーを固定化した金板上への VEGF<sub>165</sub> 吸着挙動を評価した結果、未修飾の金板や、対照群として poly dT を固定化した金板と比較して、VEGF<sub>165</sub> の吸着量が有意に増加することが明らかとなった。今後、VEGF<sub>165</sub> 捕捉型 RNA アプタマー材料の in vivo における有用性を評価していく予定である。

## 1P-104- I

### 細胞間の接着を誘起するアンカー分子の合成と新規三次元細胞パターンニング技術への応用

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>JST さきがけ

○柳澤公祐<sup>1</sup> (Yanagisawa Kosuke), 松崎典弥<sup>1,2</sup>

#### 【緒言】

生体の組織や臓器では、複数の細胞が三次元的に集合、相互作用することで高い細胞機能を発現している。これを再現した三次元組織体の構築は再生医療や創薬の観点で重要である。これまで、基板表面での二次元の細胞パターンニングは報告されているが、細胞層の上での細胞パターンニングの報告例はわずかであり、1細胞レベルで細胞表面へのパターンニングをした例はない。細胞表面での細胞の精密配置制御が可能になれば、複雑な形状の三次元組織体の構築を実現できると期待される。本研究では、細胞間接着を誘起するアンカー分子を考案した。まず、脂肪酸の細胞膜挿入能に着目し、蛍光ラベル化脂肪酸を合成することで、細胞間接着に最適な脂肪酸を見出した。得られた最適脂肪酸を多分岐ポリエチレングリコール (PEG) の末端に修飾することでアンカー分子を合成し、実際に細胞間接着能を評価した。

#### 【実験】

各種脂肪酸 (FA) とフルオレセイングリシンアミド (FGA) を混合し、FA-FGA を合成した。これを正常ヒト皮膚繊維芽細胞 (NHDF) の表面上に添加し、培養した後、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### 【結果と考察】

飽和 FA はいずれも低い挿入能であったが、不飽和 FA は炭素数・二重結合数の増加につれて高い挿入能を示し、特にエイコサペンタエン酸 (EPA) が最も高い値を示した。この結果より、最適な脂肪酸として EPA を選択した。次に、末端に EPA を修飾した 4-arm-PEG-EPA を合成し、細胞-細胞間接着能を検討した。本分子を吸着させた NHDF を、あらかじめ数日間培養した NHDF の表面にインクジェットでプリントしたところ、細胞毒性を示さずに安定的に留まることが確認された。細胞間の接着を誘起することから、本分子の細胞表面への 1細胞パターンニングの可能性を見出した。また、イオン応答性ゾルゲル転移を示すゼランガムを補助剤として用いることで、824 個の細胞クラスターのパターンニングが可能であった。これらの結果より、アンカー分子は細胞の三次元パターンニングに有用だと期待される。

## 1P-105-II

### がん細胞周囲の弱酸性環境を認識してがん殺傷効果を示すモレキュラーブロックの創製

<sup>1</sup>大阪大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>JST さきがけ

○塩路雄大<sup>1</sup> (Shioji Yudai), 松崎典弥<sup>1,2</sup>

【緒言】 がん治療を目的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) では、薬物を担持させるキャリアが必要である。しかし、高濃度で薬物を担持するためには、キャリアのサイズを大きくする必要があり、また、細胞内に薬物を届ける多段階プロセスが必要であった。そこで、細胞内部へ薬物を送達するのではなく、がん細胞の周囲で作用させることでがん細胞を死滅させる手法を考案した。この手法では、血管を通して分子レベルでがん細胞に到達し、がん細胞周囲で自己集合することによって、がんを死滅させることが期待される。がん細胞周囲への自己集合の駆動力として、がん細胞周囲の微小環境がおおよそ pH6.5 の弱酸性であることに着目した。二次胆汁酸の一種であるデオキシコール酸 (DCA) は、 $pK_a = 6.6$  であり、 $pK_a$  以下でゲル化が起こることが報告されている。この DCA を用いて、がん細胞周囲の弱酸性環境を認識して自己集合し、がん細胞殺傷効果を示すモレキュラーブロックを考案した。本研究では、モレキュラーブロックとして、4-arm polyethylene glycol-deoxycholate (4-PEG-DCA) を合成し、その自己集合挙動を、pH を調整したがん細胞培養モデルで評価した。

【実験】 弱酸性環境に応答したがん細胞への影響を評価するために、1 mg/mL の 4-PEG-DCA 培地溶液を pH7.4 と 6.2 で調整した。1 日培養後のヒト結腸腺がん由来細胞 (HT-29) の培地を、調整した 4-PEG-DCA 培地に交換し、さらに 1 日培養した。培養後のがん細胞の状態を顕微鏡で観察し、細胞生存率を計測した。

【結果と考察】 4-PEG-DCA 培地交換 1 日後において、多数の浮遊細胞が観察された。そこで、浮遊細胞と接着細胞を別々に回収し、生存率を計測したところ、pH6.2 で浮遊細胞が多く、また接着細胞の生存率が低いことが分かった。また、顕微鏡観察において、がん細胞の接着と細胞間の結合が阻害されていることを見出した。これらの結果より、4-PEG-DCA は弱酸性環境で pH 応答性を示し、がん細胞の周囲に集合することで細胞死を誘導したことが考えられる。がん細胞周囲の微小環境を認識して自己集合により殺傷する本分子は、新規のがん治療法として期待される。

## 1P-106-III

### 人工真皮への応用を指向したコラーゲンナノシートの創製と機能評価

<sup>1</sup>東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻, <sup>2</sup>東海大学医学部再生医療科学, <sup>3</sup>東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター

○五十嵐敦<sup>1</sup> (Igarashi Atsushi), 住吉秀明<sup>2</sup>, 稲垣 豊<sup>2</sup>, 岡村陽介<sup>1,3</sup>

【緒言】 現在、皮膚全層欠損創の治療には、コラーゲンスポンジが人工真皮として使用されている<sup>1</sup>。しかし、その最表面は多孔質の構造であるため表皮細胞が伸展しにくく、患者の他部位からの表皮移植が必要となる。他方、高分子を超薄膜 (ナノシート, 面積  $> \text{cm}^2$ , 膜厚  $< 100 \text{ nm}$ ) に加工するとナノ厚特有の高接着性が発現し、物理吸着のみで種々の界面を被覆できる<sup>2</sup>。本研究では、コラーゲンナノシートの調製法ならびにコラーゲンスポンジ表面を閉鎖する手法を提案する。

【結果と考察】 シリコン基板上にアルギン酸ナトリウム水溶液をスピコートした後、塩化カルシウム水溶液にてゲル化させ、犠牲層とした。次に、コラーゲン水溶液をスピコートし、加熱操作で不溶化させた。クエン酸ナトリウム水溶液中に浸漬させたところ、犠牲層が瞬時に溶解し、基板の形状を維持したナノシートが水面に浮いた状態で回収できた (膜厚:  $41 \pm 13 \text{ nm}$ )。その表面を電顕観察したところ、平滑な表面であることが確認できた。さらに、AFM 観察にてコラーゲン特有の 67 nm 周期の線維束構造も一部に観察できたことより、コラーゲンからなるナノシートの調製に成功したといえる。続いて、液体窒素にて凍結させたコラーゲンスポンジを水面に浮遊させたコラーゲンナノシートと面接触吸着させ、瞬時に凍結乾燥することにより、コラーゲンスポンジの形状を維持したまま回収できた。その最表面を電顕観察したところ、ナノシートが貼付されている領域を境に孔が閉鎖され、平滑になっている様子を確認することができた。以上、コラーゲンナノシートを用いたスポンジ表面の閉鎖法を確立した。現在、ナノシートを貼付したコラーゲンスポンジの *in vivo* における表皮再生能評価を検討しており、当日併せて報告する。

1) Koide M. *et al. J Bio Mater Res.* 27, 79-87 (1993).

2) Okamura, Y. *et al. Adv. Mater.* 21, 4388-4392 (2009).

## 1P-107-I

### 多糖・コラーゲンをを用いたペプチド高機能化足場材料の開発

<sup>1</sup>名古屋大学大学院創薬科学研究科, <sup>2</sup>名古屋大学大学院医学系研究科, <sup>3</sup>農研機構生物機能利用研究部門

○金子喬士郎<sup>1</sup> (Kaneko Kyoshiro), 蟹江 慧<sup>1</sup>, 堀川美希<sup>1</sup>, 緒方藍歌<sup>2</sup>, 成田裕司<sup>2</sup>, 竹澤俊明<sup>3</sup>, 加藤竜司<sup>1</sup>

#### 【緒言】

細胞足場材料には、合成高分子から生体由来高分子まで、多くの有用な材料が報告されている。合成高分子は、極めて高度なデザイン性と工業生産の容易さを有する半面、細胞との親和性や機能性付与能については限定的な側面があり、生体組織と近い柔軟性と強度のバランスをとることが難しい側面もある。一方、タンパク質などの高分子は、生体内に近い細胞の応答性や機能性を与えることが可能であり、生体組織に近い力学的強度を実現できる性質を持つ半面、工業的な生産においてはコスト的に高くなってしまいう側面がある。このため、再生医療応用の為の足場材料には、化学合成可能な高分子の利点と生体高分子の利点とをハイブリッドした材料の開発が求められている。さらに、特色ある力学特性を有した材料開発には、合成方法に加え、その加工・形成方法も極めて重要な設計因子であることが知られている。我々はこれまで、細胞接着ペプチドや細胞外マトリクス集積ペプチドなどをはじめとした細胞機能を制御する生体由来短鎖ペプチドの探索を行い、目的細胞と目的外の細胞のバランスを制御するような機能的ペプチドを報告してきている。本研究では、多糖やコラーゲンなどを基材としてペプチドと組み合わせ、細胞機能を制御する短鎖ペプチドの機能性を提示できる低コストかつ特色ある足場材料の開発を試みたので、これを報告する。

#### 【実験】

種々のタンパク質や多糖を基礎材料とした足場材料の配合比や強度を調整し、これに対して機能性ペプチドを修飾する条件検討および in vitro 評価を行った。機能性ペプチドとしては、我々のグループがこれまで報告してきている細胞選択的接着ペプチドを用い、ペプチドの機能が足場材料表面で発揮できるかを検証した。

#### 【結果と考察】

今回開発した足場材料において、極めて短いペプチドである細胞選択的接着ペプチドが多糖やコラーゲンの存在下でも目的の機能性示し、目的の細胞の接着を促進し、目的外の細胞の接着を抑制できることを示すことができた。

## 1P-108-II

### マイクロ流路チップを用いた脈絡膜毛細血管培養モデルの開発

<sup>1</sup>東北大学大学院工学研究科, <sup>2</sup>東北大学大学院医学系研究科

○伊藤 竣<sup>1</sup> (Ito Shun), Li-Jiun Chen<sup>1</sup>, 永井展祐<sup>2</sup>, 西澤松彦<sup>1</sup>, 阿部俊明<sup>2</sup>, 梶 弘和<sup>1</sup>

現在、加齢黄斑変性と呼ばれる疾患が失明の主要な原因の一つとなっている。これは網膜中心部の黄斑において、脈絡膜からの新生血管が上層の網膜色素上皮に侵入して網膜が障害される病気である。また、近年、Organ on a Chipの開発により生体内の臓器や組織をマイクロ流路チップ内に再現することが可能となり、疾患モデルの開発や薬剤スクリーニングに大きな期待が持たれている。そこで本研究では、加齢黄斑変性において見られる脈絡膜新生血管を再現するためにマイクロ流路チップを用いて毛細血管網である脈絡膜を模倣した培養モデルを開発した。

#### 【実験】

チャンネル間にマイクロポストアレイを形成した流路チップを用いて眼底組織モデルを作製した。まず、ソフトリソグラフィの技術を用いてポリジメチルシロキサン(PDMS)製のマイクロ流路チップを作製した。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト肺線維芽細胞(NHLF)を懸濁させたフィブリノーゲンとトロンビンの混合溶液を中央と両脇のチャンネルにそれぞれ注入し、ゲル化させた後、培養液で満たした。インキュベータで培養を続け、血管が形成した後、血管上面から網膜色素上皮細胞(RPE)を播種することで共培養系を作製した。

#### 【結果と考察】

HUVECは単独培養において、播種直後粒状であり時間の経過とともに細胞の伸長のみが観察された。一方でHUVECとNHLFの共培養においてはHUVECが単独培養のものよりも早く成長し、細胞同士が結合して毛細血管網を形成することが観察された。この作製した血管において蛍光粒子を導入したところ、血管内に粒子が灌流した様子が観察されたことから管腔構造が形成されていることが示唆された。今後は、マイクロ流路チップ内に灌流可能な毛細血管網を作製し、血管層の上ではRPE細胞を培養することで脈絡膜毛細血管培養モデルを構築することを予定している。また、細胞周辺環境を制御することで病的新生血管を誘導し、病態モデルとしての評価を行う。

## 1P-109-II

### 生分解性インジェクタブルゲルを用いた血管再生医療技術の開発

甲南大学フロンティアサイエンス学部

○角谷真菜美 (Sumiya Manami), 長濱宏治, 大山菜穂

【緒言】幹細胞や体細胞を移植し機能化・組織化させる再生医療が多く研究されている。再生医療を行うため再生させる組織に栄養や酸素を運搬する血管を速やかに新生させることが重要である。本研究では組織を再生させるため移植細胞と同時に血管細胞の血管新生を促進させる薬物を移植細胞の足場となるゲルに担持し共に移植することで、薬物により速やかに移植細胞を増殖、組織化させ、担持した薬物の効果により再生させる組織に酸素や栄養などを運ぶ血管をゲルの内側から作らせ、ゲルの外側からも血管の侵入を促進することで再生効率を良くしようと研究している。その研究結果について報告する。

【実験】体温にตอบสนองゲル化する生分解性ポリマーの PLGA-PEG-PLGA と、高分子電解質を強く吸着する特性を持つクレイナノ粒子である Laponite を複合したインジェクタブルゲルに鉄除去剤である Deferoxamine (以下、DFO) を担持させたゲルを作製した。ゲル内に担持されている DFO がどの程度の時間経過でゲル外に放出されるのかをゲル上清の PBS を吸光度測定することで調べた。複合ゲルに DFO を担持させる際 DFO 濃度の変化によりゲルのネットワーク形成にどのような影響がみられるのか、ゲルを SEM 観察し確認した。DFO 担持複合ゲルと DFO を担持しない複合ゲル上に HUVEC 細胞を播種し細胞の接着性と増殖性を調べた。

【結果と考察】ゲルの上清を吸光度測定した結果ゲルに担持させた DFO は2週間ではほぼ全量放出された。これより本複合ゲルは薬物運搬材料としての働きが可能であるとわかる。複合ゲルを SEM 観察したところ DFO 濃度が高くなるにしたがってゲルの孔が密になった。DFO 担持複合ゲルの上で HUVEC 細胞を培養すると培養シャーレ上では見られない血管形成初期にみられる細胞同士が集合し分岐構造が形成される現象が観察された。また DFO を含まない複合ゲル上でも細胞の分岐構造形成が確認されたことから本複合ゲルは血管再生の足場として大変優秀であるとわかった。本複合インジェクタブルゲルは既存のインジェクタブルゲルの性能をはるかに上回っており、*in vivo* 組織工学の実用化に推進可能な基盤材料であることが示された。

## 1P-110-II

### 生体高分子により成分置換されるインジェクタブルゲルを用いた皮膚再生技術の開発

甲南大学フロンティアサイエンス学部

○小野公佳 (Ono Kimika), 長濱宏治

【緒言】皮膚には多くの種類の細胞が存在し、それらが組織化して表皮・真皮・皮下組織からなる階層構造を形成しており、さらには内外分泌腺や毛胞など付属器を形成する。皮膚の構造的かつ機能的再生には、これらの階層構造と付属器の再構築が求められる。現在、皮膚の再生医療では主に人工真皮 (コラーゲンスポンジ) や自己培養表皮が用いられているが、これらの手法では皮膚の構造・付属器の一部しか再建できない。従って、皮膚を構造的かつ機能的に完全に再生する技術の開発は重要な課題である。私たちは、*in vivo* で生体高分子 (細胞外基質や増殖因子など) により成分置換されるインジェクタブルゲルを開発し、ゲル内部が生体本来の細胞外環境ようになることで、ゲル内での細胞の組織化や機能発現を誘導することを見出した。本研究では、本インジェクタブルゲルを用いて、皮膚組織の完全再生技術の開発を試みた。

【実験】本インジェクタブルゲルは、PLGA-PEG-PLGA と高分子電解質を強く吸着するクレイナノ粒子 (LAPONITE) から成る。*In vitro* 実験において、ゲルの細胞足場として機能を調べるため、ゲル上に線維芽細胞を播き、接着・伸展・増殖を共焦点顕微鏡により調べた。また、ゲルに線維芽細胞などを内包し、三次元増殖や遊走について、共焦点顕微鏡により調べた。*In vivo* 実験では、皮膚創傷マウスへゲルを塗布したのち経過観察し、創傷治療および再建した皮膚組織の構造解析を行った。また、あらかじめマウス皮下に投与しておくことで生体組織に置換させたゲル (コンディションドゲル) を取り出し、皮膚創傷マウスに塗布した。*in vitro* で作製したゲルとコンディションドゲルの創傷治癒効果を比較した。

【結果と考察】ゲル上で線維芽細胞は接着・伸展し、増殖した。また、ゲル内においても線維芽細胞や血管内皮細胞、脂肪組織由来幹細胞など様々な細胞種で増殖が見られたことから、ゲルは細胞の足場として機能することを確認した。*In vitro* で作製したゲルを用いて処置した皮膚創傷マウスでは、肉芽形成が初期から観察され、効果的に創傷縮小が起こった。また、組織切片の解析より、再建された皮膚には表皮・真皮が形成され、さらに血管や腺、毛包などの付属器も見られた。コンディションドゲルを用いた処置では、より早い段階から創傷縮小が起こり、厚みのある皮膚組織が再建された。以上より、本インジェクタブルゲルは、皮膚の完全再生技術を開発するために有用な医療材料になると期待できる。

## 1P-111-I

### マクロファージに作用する2種類の疎水性薬物の徐放化材料の作製

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所

○百鳥直樹 (Momotori Naoki), 田中隆介, 田畑泰彦

#### 【緒言】

マクロファージは炎症性と抗炎症性の2つの性質をもつ細胞に分極することが知られている。その中で抗炎症性マクロファージは、炎症を抑制して組織再生修復を促す働きをすることが知られている。そこでこのマクロファージを損傷部位に移動させることができれば組織再生を助けることができるであろう。骨髄で作られた単球が血液循環を経て体内の組織へ移動しそこでマクロファージへと分化する。そのため必要部位で抗炎症マクロファージを出現させるためには、単球の血中での遊走および抗炎症性マクロファージへの分極という2つを達成することが必要である。本研究では、単球細胞活性をもつ薬物である SEW2871、および抗炎症マクロファージに分極させる作用をもつ薬物である pioglitazone を取り上げた。これらの2種類の薬物を同時に徐放化できる材料を調製し、その徐放挙動と細胞への作用を調べた。

#### 【実験と結果】

ゼラチン (重量平均分子量 100,000、等電点 5、新田ゼラチン株式会社より供与) にコレステロールを化学導入した疎水性ゼラチンを作製した。この疎水性ゼラチンを難水溶性の SEW2871 と混合、ゼラチンミセルにより SEW2871 を水可溶化させた。ゼラチンとコレステロールの仕込み比を変化させることによりコレステロール導入率が変化した。SEW2871 の水可溶化量はコレステロール導入率に依存した。この SEW2871 内包ゼラチンミセルの *in vitro* 単球移動活性を調べたところ、単球が移動することがわかった。pioglitazone を内包した乳酸-グリコール酸共重合体 (乳酸/グリコール酸 75 : 25、重量平均分子量 10,000、和光純薬工業株式会社、以下 PLGA) 粒子を作製し、pioglitazone の内包量を評価した。pioglitazone 内包 PLGA 粒子を骨髄由来マクロファージとともに培養することで抗炎症性マクロファージへの分極について評価した。pioglitazone 内包 PLGA 粒子の *in vitro* において pioglitazone の徐放が認められた。SEW2871 水可溶化ミセルおよび pioglitazone 内包 PLGA 粒子を同時に組み込んだゼラチンハイドロゲル (ゼラチンの重量平均分子量 100,000、等電点 9、新田ゼラチン株式会社より供与) を調製し、*in vitro* での SEW2871 および pioglitazone の徐放も評価した。

## 1P-112-II

### 微量の過酸化水素を含む空気と HRP を用いた微量押し出し式 3D-Bioprinting 技術の開発

大阪大学基礎工学研究科物質創成専攻化学工学領域

○望月 佳 (Mochizuki Kei), 境 慎司, 中畑雅樹, 田谷正仁

#### 【緒言】

細胞の配置や組織の形状を制御できる組織作製法「3D-Bioprinting 技術」が注目を集めてきた。3D-Bioprinting 技術に用いられてきたゲル化方法の中で、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を用いたゲル化には、過酸化水素を基質とし生体に穏和な条件下で、フェノール性水酸基をもつ様々な高分子からゲルを作製できるという利点がある。HRP を用いた先行研究では、高分子溶液と過酸化水素溶液の接触によってゲル化を達成してきた。しかしこの方法には、ゲル周囲に存在する過酸化水素溶液によって細胞が悪影響を受ける危険性があった。そこで我々は、微量の過酸化水素を含む空気と高分子溶液を接触させることで過酸化水素を供給する手法を考案した。本手法を用いれば、ゲル化後に過酸化水素の供給を即座に止められるだけでなく、形成したゲルを順次培養液に浸していくことで、過酸化水素の過剰供給を抑えられる。

#### 【実験】

過酸化水素 1.0 M 水溶液に流量 540 mL/min の空気を送り込み、過酸化水素を 16 ppm で含む空気を発生させた。フェノール性水酸基導入ヒアルロン酸 0.38 w/v%、フェノール性水酸基導入ゼラチン (type B) 0.30 w/v%、ヒアルロン酸 0.75 w/v%、HRP 5.0 U/mL の高分子溶液を用いて、過酸化水素を含む空気の下で微量押し出し式 3D-Bioprinting を行ない、ゲル構造物を作製した。作製した円柱状のゲルを培地中に2週間浸し、膨潤率を測定した。また、マウス胎児由来繊維芽細胞を  $2.0 \times 10^6$  cells/mL で含む高分子溶液を用いて細胞含有ゲル構造物を作製し、培養1、3日目に細胞の生存率と挙動を観察した。

#### 【結果と考察】

培地に浸したゲルは分解することなく形状を維持し、2週間後の膨潤率は直径比で約5%と極めて安定であった。作製した細胞含有ゲル構造物を培養し、3日目に細胞生存率を測定したところ、高い値 (>90%) を維持した。また共焦点顕微鏡を用いた解析により、内部の細胞が3次的に伸展していく様子が見られた。以上の結果から、微量の過酸化水素を含む空気を用いたゲル化が細胞の挙動に悪影響を与えないこと、本手法での 3D-Bioprinting の有用性が確認された。

## 1P-113-III

### 人工多能性幹細胞をソースとした口腔上皮細胞様細胞作製の効率化

<sup>1</sup> 広島大学大学院医歯薬保健学研究所生体材料科学, <sup>2</sup> 広島大学大学院医歯薬保健学研究科歯科矯正学

○大西 梓<sup>1,2</sup> (Onishi Azusa), Aimi N. Abdullah<sup>1,2</sup>, 谷本幸太郎<sup>2</sup>, 加藤功一<sup>1</sup>

#### 【緒言】

口腔上皮細胞は発生初期の歯堤に出現し、間葉系細胞との相互作用を通して歯牙の形成の主要な細胞である。この口腔上皮細胞を取得することができれば、歯の完全再生やエナメル質を対象とする再生治療への道が開けるものと期待される。しかしながら、口腔上皮細胞は成体には存在せず、その取得が困難であることから、口腔上皮細胞を得るための方法を確立することには大きな意義がある。このような背景のもと当研究室では、マウス人工多能性幹細胞 (miPS 細胞) に神経栄養因子の一種である neurotrophin-4 (NT-4) を作用させることにより口腔上皮細胞特有の遺伝子を発現する細胞が誘導されることを見出した。本研究では口腔上皮細胞様細胞をより効率的に分化誘導する方法について検討した。

#### 【実験】

フィーダー細胞上で未分化維持培養された miPS 細胞を回収し、NT-4 含有培地を使用してハンギングドロップ法により胚葉体を形成させた (Stage 1)。6 日後に胚葉体を回収し、その後 9 日間接着培養を行った (Stage 2)。口腔上皮細胞様細胞を効率的に分化誘導させる培養条件を模索するため、Stage 1 および 2 において、それぞれの培地に上皮成長因子 (EGF) を添加し、その効果を調べた。上皮細胞マーカーである CK14 および p63 の発現を口腔上皮細胞様細胞への分化の指標とし、蛍光免疫染色法および定量 PCR 法によって解析した。

#### 【結果と考察】

Stage 2 において、基材上に接着した胚葉体から、数石上の細胞が同心円状にマイグレーションした。免疫染色の結果、それらの細胞は CK14 および p63 を高頻度に発現していることがわかった。また、EGF 添加の比較実験において、Stage 1 では EGF 添加群、さらに Stage 2 では EGF 非添加群において上皮細胞マーカーの発現量が上昇した。この結果から、胚葉体形成時には増殖を促進する目的で EGF を添加し、接着培養時には EGF を添加せず分化を促進することで効率的に上皮細胞様細胞を得ることができるものと考えられた。

## 1P-114-II

### 化合物誘導型ゲノム編集技術の開発

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○松本大亮 (Matsumoto Daisuke), 野村 渉, 玉村啓和

【緒言】近年、CRISPR-Cas9 システムの開発によりゲノム編集技術は大幅に進歩している。ゲノム編集技術で用いられる人工ヌクレアーゼは、20 塩基前後の DNA 配列を認識するため、ゲノム配列上の選択的な切断が可能である。人工ヌクレアーゼの活性制御は、オフターゲット効果の抑制などの課題克服に向けて重要である。本研究では、FK506 binding protein (FKBP) と FKBP12-rapamycin associated protein1 (FRB) が rapamycin を介して会合することを利用した誘導型ヌクレアーゼシステムの開発を行った。

【実験】DNA 結合ドメインと FKBP、DNA 切断ドメインと FRB をそれぞれ融合することで、rapamycin が存在する時のみ DNA 切断が可能となる。本研究では、DNA 結合ドメインとして zinc finger ドメインと transcription activator-like effector ドメインの 2 種類を用い、AAVS1 遺伝子を標的とした。また、DNA 切断ドメインとして FokI ヌクレアーゼの酵素ドメインを利用した。分割したルシフェラーゼ遺伝子内に標的の AAVS1 遺伝子配列を組み込んだレポータープラスミドを用い、細胞内での活性評価を行った。リポフェクション法を用いて人工ヌクレアーゼベクター及びレポータープラスミドを導入し、24 時間後に rapamycin による誘導を行い、48 時間培養した。その後、ルシフェリン-ルシフェラーゼ発光を利用し、細胞溶解液の発光輝度を計測した。

【結果と考察】通常型の人工ヌクレアーゼと比較し、最大で約 35% のルシフェラーゼ活性が得られ、rapamycin の有無によって最大で 2.3 倍のルシフェラーゼ活性の向上が確認された。さらに、2 箇所の DNA 結合配列間のスパーサー塩基対の長さを調節することによって、切断効率が向上した。また、切断不活性型 Cas9 (dCas9) を DNA 結合ドメインとして利用した場合にも通常型 TALEN との組み合わせで DNA 切断活性を示すことが明らかになった。このことは本システムが dCas9 にも適用可能であることを示唆しており、より広い標的配列選択が可能であると考えられる。今後は dCas9 の配向性や最適なスパーサー長を詳細に検討することでシステムの切断効率の向上が期待される。

## 生理活性物質の表面固定を意図した DNA 結合ポリ乳酸の合成

<sup>1</sup> 関西大学化学生命工学部, <sup>2</sup> 関西大学 ORDIST, <sup>3</sup> 関西大学医工薬連携研究センター

○ 田中啓迪<sup>1</sup> (Sumida Hiromichi), 能崎優太<sup>2</sup>, 葛谷明紀<sup>1,3</sup>, 大矢裕一<sup>1,3</sup>

近年、ポリ乳酸 (PLA) 等の生分解性高分子をスキャホールドとした再生医療に期待が寄せられている。臓器のような階層的 3 次元構造をもった組織を再生するためには、特定の細胞をスキャホールド上の望む位置に配置することが有効であると考えられ、各種の細胞を特異的に認識する多種類の認識素子を材料表面の任意の位置に導入する技術の開発が望まれる。DNA は、配列特異的に 2 重鎖や 4 重鎖を形成し、多種類の組合せで分子同士を接合させることができる「分子のり」として用いることができる。従って、特定の配列を有する DNA を PLA 等の生分解性 3 次元材料の特定部位に導入し、それと特異的に結合する DNA を導入した細胞認識素子と組み合わせることにより、DNA 間の結合を介して多種の細胞認識素子を材料表面の任意の位置に配置することができると考えられる。DNA を PLA 材料表面に固相反応により導入した例も報告されているが<sup>1)</sup>、その方法では PLA 材料を成形後、DNA 導入反応を行う必要があり、使用できる DNA 量に限界があり、その配置や密度の制御も困難である。この問題は、DNA と PLA との結合体を大量合成し、それを 3D プリンタやインクジェットプリンタなどのアディティブマニファクチャリング手法と組み合わせ、成形体表面に導入することで解決できると考えられる。近年、我々は DNA の液相大量合成<sup>2)</sup>による機能材料の創出を試みている。この手法ではポリエチレングリコール (PEG) が結合した DNA の大量合成が可能である。そこで、本研究では、この手法を用いて調製した PEG-DNA 結合体を使用して PLA との結合体を合成した。この PEG-DNA 結合体は、DNA 単独より有機溶媒に対する溶解性が高く、PLA と DNA との結合体合成に有利である。まず、ヘテロ二官能 PEG (HO-PEG<sub>10k</sub>-NH<sub>2</sub>) を使用して片末端に 3 残基のグアニンを結合させた PEG-DNA 結合体 (dG<sub>3</sub>-PEG<sub>10k</sub>-NH<sub>2</sub>) を合成した。次にこれと、活性化させた PLA とのカップリング反応により、DNA-PLA 結合体 {PLA<sub>3k</sub>-b-(PEG<sub>10k</sub>-dG<sub>3</sub>)} を合成した。この結合体溶液を、PLA 基盤表面に塗布したものに、結合体の DNA と特異的に 4 重鎖を形成する配列を有する DNA-蛍光色素 (FAM) 水溶液を接触させ、洗浄後、蛍光顕微鏡観察することにより特異的な配列認識を介して DNA-FAM を固定できることを確認した。

1) T. Matsui, H. Iwata *et al.*, *Acta Biomaterialia*, **2015**, *13*, 32-41. 2) G. M. Bonora *et al.*, *Biol. Proced. Online*, **1998**, *44*, 60-69.

## 1P-116-III

### シランカップリング修飾剤を用いた組織再生型脱細胞血管への細胞親和性付与

<sup>1</sup> 国立循環器病研究センター研究所生体医工学部, <sup>2</sup> 関西大学大学院理工学研究科

○ 古島健太郎<sup>1,2</sup> (Kojima Kentaro), 馬原 淳<sup>1</sup>, 平野義明<sup>2</sup>, 山岡哲二<sup>1</sup>

【緒言】脱細胞組織はコラーゲンなどの ECM 成分のみで構成され、生体内で穏やかに分解されながら再細胞化し、リモデリングすることで組織再生用足場として機能することが期待されている。我々は、ダチョウ頸動脈組織から小口径脱細胞血管を作製し、内腔に (Pro-Hyp-Gly)<sub>7</sub>-G<sub>3</sub>-REDV ペプチドを 60°C の加温プロセスを介して固定化することで血管の良好な開存を示すことを明らかとした。しかし、ペプチド固定化における 60°C の加温プロセスは、マトリックスのわずかな熱変性を誘起することから生体内において、急激な分解や再細胞化プロセスにおける力学強度の不安定化を引き起こす可能性がある。そこで本研究では、脱細胞組織に対する新規リガンドペプチド固定化としてシランカップリング反応に着目した。リガンドペプチドを結合させたシランカップリング剤を合成すれば、加温を必要とせず有害な副生成物も生成しない条件でペプチドを固定化できるものと考えている。発表では、ペプチド結合型シランカップリング剤 (PCSi) の合成と脱細胞組織への修飾効率の評価、ならびにリガンド固定化脱細胞組織に対する細胞接着性について評価した結果を報告する。

【実験】REDV ペプチドに対して 3-(triethoxysilyl) propyl isocyanate と反応させて PCSi を得た。脱細胞組織に対する固定化反応は EDS による表面元素分析及び、TAMRA 標識 PCSi を用いて蛍光観察により評価した。次に PCSi 修飾脱細胞組織に HUVECs, NIH-3T3Cs を播種し、24 時間後の接着細胞数を wst-8 アッセイにより評価した。

【結果・考察】EDS 測定の結果、脱細胞組織表面で Si 由来ピークを認めた。さらに顕微鏡観察により TAMRA 標識 PCSi 由来の蛍光が脱細胞組織表面で認められたことから、PCSi が脱細胞組織に固定化されたと判断した。次に PCSi 修飾脱細胞組織に対して HUVECs を播種した結果、接着細胞数は PCSi 固定化量とともに増加し、脱細胞組織上で細胞が進展する様子を認めた。一方で NIH-3T3Cs を播種した場合には細胞の進展は認められなかった。以上より、シランカップリング剤は加熱プロセスを必要とせず脱細胞組織へリガンドを固定化できる新たな手法であると考えている。発表では PCSi を動物へ移植した結果も併せて報告する。

## 1P-117- II

### 細胞が産生する活性酸素種を用いた細胞包括ヒドロゲルの作製

大阪大学大学院基礎工学研究科

○本田尚之 (Honda Naoyuki), 境 慎司, 劉 楊, 田谷正仁

【緒言】ヒドロゲルは保水性や透過性に優れるため、体外での組織作製の重要なツールである。ヒドロゲル形成法の一つに、酵素による高分子の架橋反応を用いる方法がある。この反応は穏和な条件で進行するため、細胞へのダメージが小さい。本研究グループでは、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を用いて様々な性質をもつヒドロゲルを作製してきた。HRP は、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を基質として、フェノール性水酸基 (Ph 基) の酸化反応を触媒する酵素である。一般的に、HRP を用いて Ph 基導入高分子を含む水溶液からヒドロゲルを得る際、 $H_2O_2$  水溶液を添加することによって行われる。本研究では、細胞が呼吸に伴って産生する微量の  $H_2O_2$  を用いて、細胞包括ヒドロゲルを作製することを試みた。細胞は代謝とともに活性酸素種を産生し、その中には  $H_2O_2$  が含まれることが知られている。我々はこの  $H_2O_2$  に注目し、HRP 酵素反応を用いながら  $H_2O_2$  水溶液の添加を必要としない新規なヒドロゲル作製法の開発を検討した。

【実験】 すい臓由来がん細胞  $4.0 \times 10^7$  cells/mL、HRP 300 U/mL、フェノール基導入ヒアルロン酸 1.0 w/v%、グルコース 1.0 mg/mL を含む溶液を室温で調製した。この溶液をエッペンドルフチューブに 200  $\mu$ L 加え、37 °C の  $CO_2$  インキュベーターに 1 h 静置した。コントロールとして、細胞を含まない溶液を同様に調製した。

【結果と考察】細胞を含む溶液はヒドロゲルを形成したが、細胞を含まない溶液ではヒドロゲルは形成されなかった。このことより、細胞が産生した  $H_2O_2$  により HRP によるフェノール性水酸基の架橋が進行したことが示された。ヒドロゲル内の細胞は、培養 10 days 後も生存していることが観察できた。ヒドロゲル作製後の細胞生存率は 70 % だった。生存率がそれほど高くなかった原因としては、ヒドロゲル内の高い細胞密度により、酸素を十分に供給できなかったことが考えられる。生存率を高めるためには、ヒドロゲル作製時の酸素供給のための厚みや、細胞密度の最適化を行うことが有効であると考えられる。以上より、細胞が産生する活性酸素種に含まれる  $H_2O_2$  を用いて、細胞包括ヒドロゲルを作製することに成功した。

## 1P-118- I

### 導電性高分子をコアにもつ二層ファイバー足場を用いた電圧無印加での効率的筋管形成

早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻

○田中啓太 (Tanaka Keita), 中谷美沙, 今任景一, 武田直也

【緒言】筋芽細胞どうしを融合・多核化して再生筋組織を *in vitro* で作製するにあたり、細胞の配向性を容易に制御できるマイクロファイバー足場は有用である。また、ファイバーを介して細胞に電位を印加することを目的に導電性ポリマーを含むファイバー足場の作製が行われてきた。中でも PEDOT/PSS は高い導電性を示すため、このようなファイバー足場材料として有望だが、単体でのマイクロファイバー化が困難である点や、高い水分散性のため培養液中で形状が安定しない点が課題である。本研究では細胞接着を担う生体適合性高分子のゼラチン (GN) とポリカプロラクトン (PCL) の混合材料のシース層で PEDOT/PSS のコア層を同軸二層状に包埋した配向マイクロファイバーをエレクトロスピンング法で作製し、筋管形成誘導足場として用いた場合の機能を定量的に評価した。

【実験】 GN と PCL は 5:8 (w/v) で混合した HFIP 溶液を使用し、PEDOT/PSS はナガセケムテクス社製のものを用いた。これら材料を用いて安定的に紡糸できるコア溶液とシース溶液の流量比を最適化し、ファイバー形状は走査型電子顕微鏡 (SEM) で、同軸二層構造は透過型電子顕微鏡 (TEM) によって調べた。流量比が 1:10 で紡糸したファイバー足場についてマウス由来筋芽細胞 C2C12 を播種し、増殖と筋管形成誘導効率を調べた。同様に、シース材料のみで紡糸した足場と、コアとシース材料を単純に混合した場合の足場も使用し、増殖と分化効率を比較した。

【結果と考察】コアとシースのポリマー溶液の濃度や流量比を最適化したところ、ファイバーの平均径は 1.53  $\mu$ m となった。同軸二層構造は TEM 観察で確認し、コア層の直径はファイバー径の約半分を占めることを見出した。このマイクロファイバー足場で C2C12 細胞を培養したところ、興味深いことに、電位を印加しない条件下で筋芽細胞の増殖と筋管形成の効率が有意に向上した。具体的には、コアシース二層マイクロファイバーに C2C12 細胞を  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し培養 5 日目に観察したところ、シース層のみのファイバー足場と比較して 2.4 倍、コアシース材料を単に混合したファイバー足場と比較して 1.7 倍に増殖率が增大した。また、播種密度を  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> に増やし培養したところ、シース層のみの足場および混合材料足場のそれぞれと比較して、培養 5 日目で筋管形成効率が約 4 倍と約 2 倍に向上した。

## 1P-119-I

### ヘパリンによる表面修飾は $\alpha$ 型リン酸三カルシウム多孔質顆粒の初期骨形成能を増強する

<sup>1</sup>大阪歯科大学口腔インプラント学講座, <sup>2</sup>大阪歯科大学中央歯学研究所, <sup>3</sup>国立循環器病研究センター生体医工学部  
○武田吉裕<sup>1</sup> (Takeda Yoshihiro), 本田義知<sup>2</sup>, 柿木佐知朗<sup>3</sup>, 山岡哲二<sup>3</sup>, 馬場俊輔<sup>1</sup>

【緒言】骨欠損治療に対し、成長因子の添加は治療効果の向上をもたらす潜在能力を持つが、最適量の探索が困難である。これらの背景から演者らは、生体内に遍在する成長因子を効率的に集積する界面の構築は、 $\alpha$ 型リン酸三カルシウム ( $\alpha$ -TCP) などのリン酸カルシウム系骨補填材の骨置換能を安全に向上させるという仮説を立て、成長因子との親和性が知られているヘパリン分子を表面に固定化する技術を開発した。本研究では、ラット頭蓋冠骨欠損モデルを用いてヘパリン化 $\alpha$ -TCPの骨形成能を評価したので発表する。

【実験】直径 500-600  $\mu\text{m}$  の $\alpha$ -TCP 顆粒を対照群として用いた。実験群としては、海洋性由来ペプチド (接着性ペプチド) を用いてヘパリンを表面に固定化した $\alpha$ -TCP 顆粒 (以下 $\alpha$ -Ph と表記) を用いた。材料学的評価は、X 線光電子分光分析、X 線回折法、走査型電子顕微鏡観察によって行った。また顆粒間隙は、BET 法にて計測した。8 週齢雄性 SD ラットの頭蓋冠に形成した直径 9 mm の臨界骨欠損モデルに両顆粒を埋入し、4 週間後の頭蓋冠を採取後、 $\mu\text{CT}$  による骨形態計測、組織学的評価 (ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色、アルシアンブルー染色) を行い、骨形成能評価とそのメカニズム解明を試みた。アルシアンブルー好性部位および骨-顆粒接触部位の長さ測定には Image J を用いた。

【結果と考察】材料学的評価から、 $\alpha$ -Ph は、ヘパリンペプチドが修飾されているものの、 $\alpha$ -TCP の結晶構造を維持されている事を確認した。修飾による顆粒間隙の大きな変化は認められなかった。 $\mu\text{CT}$  および H-E 染色の所見から、 $\alpha$ -Ph は、 $\alpha$ -TCP に比べ優れた初期骨形成能を示した。アルシアンブルー染色好性の  $\alpha$ -Ph 表面では、骨との接触が有意に認められた。一方、 $\alpha$ -TCP 表面および骨との接触がない  $\alpha$ -Ph 表面では、青色の染色は乏しかった。アルシアンブルーは、骨形成調節機能や成長因子への相乗効果を持つグリコサミノグリカンなどを強く染色することが知られている。以上の結果を考慮すると、 $\alpha$ -TCP に対するヘパリン修飾は、顆粒周囲の細胞を刺激し、グリコサミノグリカンなどの細胞外基質分泌機構を変化させることで、初期骨形成を促進させた可能性が示唆された。

## 1P-120-III

### スパッタ法を用いた超音波造影下で視認可能な脱細胞化組織用薄膜マーカの作製

<sup>1</sup>成蹊大学理工学部, <sup>2</sup>東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○木村成輝<sup>1</sup> (Kimura Naruki), 鈴木夕稀<sup>1</sup>, 名和裕一朗<sup>1</sup>, 橋本良秀<sup>2</sup>, 船本誠一<sup>2</sup>, 張 永巍<sup>2</sup>, 山下暁立<sup>2</sup>, 大家 溪<sup>1</sup>, 岸田晶夫<sup>2</sup>, 中野武雄<sup>1</sup>

#### 【緒言】

脱細胞化組織は生体由来のバイオマテリアルの一種であり、脱細胞化処理によって免疫原となる細胞やウイルスは除去されているが、組織構造や力学特性は維持しているため、組織代替材料や組織工学材料、足場材料として有用である。しかし、脱細胞化組織を生体内に埋入すると、CT、MRI、超音波造影といった非侵襲的な検査法では自己組織と識別ができない。本研究では、生体適合性に優れたチタンの薄膜を、スパッタ法によって部分的に脱細胞化組織表面に製膜し、超音波造影で視認可能な脱細胞化組織用薄膜マーカを作製した。また、薄膜の安定性を評価した。

#### 【実験】

脱細胞化組織として脱細胞化ウシ心膜を用いた。脱細胞化組織の一部に薄膜を製膜するために、ハニカム構造マスクやサージカルテープによるマスキング後、DC マグネトロンスパッタ法を用いて金属チタン薄膜を製膜した。チタン薄膜の膜厚とスパッタ時間の検量線から、膜厚約 100 nm および 500 nm の薄膜を製膜した。作製した試料は、X 線光電子分光法で表面および内部の組成を評価した。さらに種々の試料を 9 週齢の Wistar 系雄性ラット 6 匹の背部皮下に埋入後、直ちに超音波造影を行った。埋入 2 週間後、再び超音波造影および目視での試料の観察を行った。

#### 【結果と考察】

ハニカム構造マスクあるいはサージカルテープを用いることによって部分的にチタン薄膜を脱細胞化組織に製膜することが可能であった。薄膜の表面はチタン酸化物であり、内部は金属チタンが占めていた。ラットに埋入した直後の試料は超音波造影で視認可能であり、膜厚が厚い試料ほど高い視認性を有していた。しかし、埋入 2 週間後の超音波造影では薄膜の視認が不可能だった。埋入組織を摘出して目視で確認したところ、薄膜の一部が崩壊していた。薄膜の密着性の不足またはラットの体液により薄膜が溶出したためと考えられる。

## 1P-121- II

### 微小環境制御可能な人工微小血管モデルを用いた血管バリア機能評価

<sup>1</sup>東京大学生産技術研究所, <sup>2</sup>東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻  
○薄葉 亮<sup>1,2</sup> (Usuba Ryo), Joris Pauty<sup>1</sup>, 高橋治子<sup>1</sup>, 松永行子<sup>1,2</sup>

#### 【緒言】

全身へ血液を輸送する臓器である血管は、菅の内外を隔てると同時に必要な物質は透過させるというバリア機能を有する。このバリア機能の低下は、糖尿病、高血圧症、そして動脈硬化症などの疾患と関係することが報告されている。よって、疾患モデルや創薬研究の観点において、微小環境を制御し、疾患状態の血管を模倣した血管のバリア機能評価系が必要である。しかしながら、細胞レベルでの研究のみでは疾患状態の微小環境を模倣することが困難であり、動物実験等の *in vivo* 試験を行う必要があった。そこで、我々はヒト血管内皮細胞を用いて細胞外マトリクス (ECM) のハイドロゲル内に人工微小血管構造を作製すれば、疾患状態を効果的に模倣し、血管バリア機能 *in vitro* 評価系を構築できると考えた。今回、培養ハイドロゲルの性質を変化させ、微小環境が血管内皮細胞層の機能に与える影響を検討した結果について報告する。

#### 【実験】

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をコラーゲンゲルまたはゼラチンゲルを足場として培養し、血管内皮細胞層を形成させた。この細胞層に対して、血管内皮細胞の接着結合分子である血管内皮カドヘリンの免疫染色および白血球細胞株 HL60 細胞の接着試験を行うことで機能評価を行った。また、三次元血管構造作製のために、マイクロニードル法によりゲル内に直径 200  $\mu\text{m}$  の管腔を形成させ、そこへ HUVEC を導入して微小血管を作製した。血管透過性の評価のために、蛍光標識したデキストラン分子を流し、血管外への流出を検出した。

#### 【結果と考察】

培養足場となるゲルの濃度および架橋度により硬度を変化させたところ、細胞面積や血管内皮カドヘリンによる接着結合の形状に違いが現れ、細胞層の挙動へ影響を与えることを示唆する結果となった。また、血管透過性試験を行った結果、炎症性因子であるトロンピンに反応して 70 kDa のデキストラン分子の流出増大が起きることを確認した。疾患状態の微小環境を模倣し、精度の高い血管機能評価モデルが実現できることを確認した。

## 1P-122- I

### 3D 微小血管モデルを用いた血管新生促進におけるペリサイトの役割の可視化

<sup>1</sup>東京大学生産技術研究所, <sup>2</sup>東京大学大学院工学系研究科, <sup>3</sup>LIMMS/CNRS-IIS (2820)国際連携研究センター  
○李 裕珍<sup>1,2</sup> (Lee Eujin), 高橋治子<sup>1</sup>, ポティ ジョリス<sup>1,3</sup>, 松永行子<sup>1,2,3</sup>

#### 【緒言】

血管新生とは既存の血管から新たな血管が形成される過程をいう。血管新生の促進により虚血性疾患を治療、また、抑制により腫瘍形成の阻害が期待できる理由から、有望な治療ターゲットとして注目されている。血管新生は複数のステップから成る複雑な現象であり、周皮細胞や細胞外基質などの微小環境が大きく影響している。周皮細胞の一つであるペリサイトは血管新生において必須であるとされているがどのように関与しているのかはまだ解明されていない。過去のペリサイトに関する *in vitro* 試験ではすでに存在する血管から新生血管が誕生する全体像を反映しておらず、ペリサイトの血管新生のプロセス全体における役割を示したものはない。そこで、本研究はペリサイトの血管新生のプロセス全体における役割、血管内皮細胞との相互作用を *in vitro* 微小血管モデルを用いて解明することを目的とした。

#### 【実験】

微小血管モデルは PDMS 製マイクロ流体デバイスを用いて作製した。type I コラーゲンをデバイス流路に流し込み、マイクロニードル法により直径 200  $\mu\text{m}$  の筒型に細胞を成型し、血管構造を作製した。ゲル内にはヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とマウス由来のペリサイトを 5:1 で混合したものを導入した。血管モデルは血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 50 ng/mL を添加した内皮細胞用培地中で最大 8 日間培養し、共焦点顕微鏡により観察した。

#### 【結果と考察】

HUVEC 単独培養血管および内皮細胞 (EC)-ペリサイト (ECPC) 共培養血管を作製し、VEGF を加えて培養したところ添加 3 日後より血管発芽の顕著な形成が ECPC 共培養血管では観察された。その後 VEGF 添加培養 5 日後以降では ECPC 共培養血管において新生血管数が EC 単独培養血管に比べ著しく多く、また新生血管の構造は長く引き締まっていた。新生血管を共焦点顕微鏡で確認するとペリサイトが外側から内皮細胞に付着し、管状構造のメカニカルな支持に貢献している可能性が示唆された。以上より、ペリサイトの存在は密度の高い血管ネットワークの構築を可能にしていると考えられる。

## 1P-123-II

### 酵素増感に基づくフローサイトメトリーの高感度化

<sup>1</sup>九州大学大学院システム生命科学府, <sup>2</sup>九州大学大学院工学研究院, <sup>3</sup>未来分子システム科学センター, <sup>4</sup>九州大学未来科学創造センター

○神野健太<sup>1</sup> (Kamino Kenta), 本部大輝<sup>2</sup>, 登 貴信<sup>2</sup>, 川村真朱美<sup>2</sup>, 岸村顕弘<sup>1,3,4</sup>, 森 健<sup>1,3,5</sup>, 片山佳樹<sup>1,3,4,5</sup>

#### 【緒言】

フローサイトメトリー(FCM)は、注目する細胞特有の膜抗原を蛍光修飾抗体で標識して検出する技術である。細胞の自家蛍光があるため、1000~3000 コピー以上発現している膜抗原が検出対象となる。しかし、膜抗原の多くは発現量が 1000 分子以下であることから、従来の方法では検出の対象外となっているのが現状である。そこで我々は、FCM の増感法として Catalyzed Reporter Penetration (CARP) 法を提案する。これは、任意の膜抗原を酵素修飾抗体で標識しておき、ここに蛍光性基質を添加する。フォスファターゼや $\beta$ -ガラクトシダーゼなどの酵素反応によって親水性の蛍光性基質が疎水化することで、細胞膜を透過し細胞内部を染色するという原理である。これまでに、ペプチドをベースとして設計した蛍光性基質を開発し、原理実証に成功した。しかし、適切な親疎水バランスとするために基質の構造が複雑になり、また染色時に可溶化剤の添加が必要という課題があった。そこで本研究では、より単純な構造を有する新たな蛍光性基質を設計し、その細胞染色能を評価した。

#### 【結果と考察】

蛍光性基質として、ローダミン B に対して $\beta$ -ガラクトシルが複数個修飾された分子を設計・合成した。この細胞染色能を蛍光顕微鏡およびイメージングサイトメーターにより評価した。その結果、この分子は可溶化剤の添加を必要とせず、従来のペプチド型の蛍光基質に対して同等以上の染色能を有することが分かった。当日は、この新規の蛍光性基質を用いて、低発現の抗原の検出に適用した結果を報告する予定である。

## 1P-124-II

### インクジェット印刷による薄膜状微小電極の開発と神経活動電位の *in vivo* 計測

<sup>1</sup>早稲田大学先進理工学研究科, <sup>2</sup>防衛医科大学校生理学講座, <sup>3</sup>早稲田大学高等研究所, <sup>4</sup>JST さきがけ

○小久保奈々<sup>1</sup> (Kokubo Nana), 山岸健人<sup>1</sup>, 武岡真司<sup>1</sup>, 太田宏之<sup>2</sup>, 藤枝俊宣<sup>3,4</sup>

【緒言】脳科学研究の進展に伴い、柔らかく脆い脳組織の構造を破壊せずに生体電気信号を計測可能なバイオデバイスの開発が求められている。脳組織に比べて硬い従来の神経電極は組織損傷を引き起こすことが懸念される。また、脆く壊れやすい。本研究では、インクジェット印刷と膜厚数百ナノメートルからなる自己支持性高分子超薄膜を組み合わせることで、柔軟かつ丈夫な薄膜状神経電極を開発し、脳組織に注入することで *in vivo* 神経活動電位の計測を試みた。

【実験】PET フィルム上に製膜した poly(d,l-lactic acid) (PDLLA) からなるナノシート (膜厚: 369 nm) の表面に、Au ナノインクおよび導電性高分子である poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrene sulfonate) (PEDOT:PSS) をインクジェット印刷した (線幅: 50  $\mu\text{m}$ )。次に、PET フィルムから剥離した配線印刷ナノシートの表裏面を含フッ素高分子(CYTOP<sup>®</sup>)にて被膜し、絶縁層を形成した。この薄膜の先端部を 4 回捻り、水溶性高分子である polyvinyl alcohol (PVA) (濃度: 10 wt%) にて先端部を被覆・硬化させ、脳組織に注入可能な針状構造に成型加工した。さらに、配線先端部をカミソリにて切断することで電極窓を露出させた。最後に、ナノシートからなる神経電極をマウス脳組織に穿刺することで、神経活動電位を計測した。

【結果と考察】PDLLA ナノシートの表面に PEDOT:PSS および Au ナノインクを重ね印刷したところ、断線の無い均一な配線を形成できた (線幅 52 $\pm$ 2  $\mu\text{m}$ 、厚さ 122  $\pm$ 18nm)。PET フィルムから剥離した配線印刷ナノシート (膜厚 約 500 nm) は、注射針 (内径: 0.8 mm) にて射出可能な柔軟性と強靱性を有していた。CYTOP<sup>®</sup> からなる電気絶縁層を形成後、薄膜状構造 (総膜厚: 6  $\mu\text{m}$ 、幅 3 mm) に起因する柔軟性を利用することで、シート状から針状に先端構造を成型した。この時、先端部を PVA 水溶液にて固化することで、脳組織を想定したゲルに対して、穿刺可能な硬さと強度に加工した。ゲル挿入後 7 時間で PVA は完全に溶解し、再び柔軟な構造に戻った。次に、先端部をカミソリにて切断することで、切断面に Au からなる薄膜状電極 (厚さ: 110 nm) を露出した。最後に、針状の神経電極をマウス脳内部に穿刺したところ、神経細胞の自発発火に由来する活動電位を計測することに成功した。以上の結果より、ナノシートとインクジェット印刷を組み合わせることで、柔軟・丈夫・成型可能な薄膜状神経電極を開発することに成功した。

## ポストインプリント官能基修飾によるバイオマーカータンパク質認識ナノ空間創製

<sup>1</sup>神戸大学大学院工学研究科

林 智彦 (Hayashi Tomohiko), 砂山博文, ○香門悠里, 北山雄己哉, 竹内俊文

【緒言】 標的タンパク質に対する認識ナノ空間を持つ高分子材料は、抗体に代わる機能性材料として近年注目されている。当研究室ではこれまでに、分子インプリンティングで構築されたナノ空間内を特異的に官能基修飾可能なポストインプリント修飾(PIM)法を開発し、標的バイオマーカータンパク質の認識能を自在に制御可能な分子インプリントポリマー(MIPs)の開発に成功している[1]。本研究では、前立腺がんマーカータンパク質である前立腺特異抗原(PSA)を標的とし、PIMにより PSA に対する相互作用官能基を PSA インプリント空間内のみを導入し、フェニルボロン酸による PSA 上の糖鎖認識の相乗効果により PSA の高感度・高選択的 PSA 認識分子インプリント空間の創製を目指す。

【実験】 鑄型分子として 2-イミノチオランでチオールを導入したチオール化 PSA、および機能性モノマーとしてインプリント空間内を選択的に官能基修飾するための可逆結合部位であるオキシム結合を介してチオール反応性のピリジルジルスルフィド基と重合可能な官能基を連結した化合物を合成した。重合開始剤とフェニルボロン酸を修飾した金コート基板に、機能性モノマーをジルスルフィド結合により導入したチオール化 PSA の糖鎖とボロン酸の環状ジエステル形成で PSA を金コート基板表面に固定した。親水性モノマーと架橋剤を加えて表面開始原子移動ラジカル重合を行ったのち、ボロン酸エステルとオキシム結合の加水分解により PSA を切り出すことで PSA インプリント空間を形成した。PIMとして、インプリント空間内に残存するオキシアミノ基に 4-ホルミル安息香酸をシッフ塩基形成により導入して、安息香酸を PSA に対する相互作用官能基とする MIP を得た。

【結果と考察】 表面プラズモン共鳴(SPR)測定により PIM の後 PSA の結合レスポンスが大きくなったことから、PIM による相互作用官能基の導入が確認された。MIP のタンパク質結合選択性は、架橋性 MIP の方が架橋していない MIP より高く、糖鎖をもち分子量、等電点ともに類似するトロンビンに対して PSA を有意に識別可能となった。検出限界も PSA の疾病判断閾値(4.0 ng/mL)を下回り、高感度 PSA センシングシステム開発の可能性が示唆された。

[1] R. Horikawa et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13023-13027.