

一般演題（ポスター発表）

11月21日（火）

F会場（1F 展示ホール）

金属・無機材料（2）	2P-001—2P-014
高分子材料（2）	2P-015—2P-030
マテリアルと細胞（2）	2P-031—2P-040
血液とマテリアル（2）	2P-041—2P-046
DDS, イメージング（2）	2P-047—2P-051
医療用デバイス（2）	2P-052—2P-054
再生医療・組織工学（2）	2P-055—2P-067
検査・診断法, バイオセンサー（2）	2P-068—2P-072

2P-001- II

根尖歯周組織の再生誘導に用いるバイオガラス-ゼラチンスポンジの作製と評価

¹九州歯科大学口腔保存治療学分野, ²日本歯科薬品株式会社, ³京都大学ウイルス・再生医科学研究所生体材料学分野
○鷲尾絢子¹ (Washio Ayako), 手嶋浩貴², 横田兼欣², 北村知昭¹, 田畑泰彦³

【緒言】

現在の歯内治療では、根尖歯周組織に根尖病変が生じた際に感染根管治療および外科的歯内療法を行うが、複雑な歯・根尖歯周組織の解剖学的形態の前では治療にも限界があることから、抜歯にいたることも少なくない。このような現状を克服するためには根尖歯周組織に対する局所的再生誘導療法の開発が必要となる。確実な組織再生を誘導するには良好な物性・生体親和性・再生誘導能などの性質を有する材料が必要不可欠であるが、現時点では明確なメカニズムに基づいた組織再生を誘導する歯科用材料は存在しない。今回我々は、歯槽骨欠損部が再生誘導される生体材料の開発を目的として、骨組織再生研究で汎用されている Bioactive glass (BG) と生体適合性に優れた水溶性高分子であるゼラチン (Gel) とを用いたバイオガラス-ゼラチンスポンジ (BG-Gel) を作製し、物性を検討した。

【実験】

3 wt.%Gel (等電点 5、重量平均分子量 100,000) 水溶液に BG 粉末 (平均粒径 4.6 μ m、10~50 wt.%) を加え、5,000 rpm で攪拌した。得られた溶液を凍結乾燥後、熱脱水架橋処理 (140 $^{\circ}$ C、24、48、72、および 96 時間) することで Gel を架橋しスポンジを作製した。電解放出型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) により BG-Gel の形態と細孔径を評価、圧縮強度および分解性試験を行った。さらに、擬似体液中に各 BG-Gel を浸漬後、スポンジ表面におけるハイドロキシアパタイト (HAp) 生成量をエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) により解析した。

【結果と考察】

FE-SEMにより Gel スポンジ内部に BG が分散しているのが観察され、BG-Gel の細孔径は 100~250 μ m であった。圧縮強度は約 2 kPa であり、BG 含有量や熱脱水架橋処理時間により BG-Gel の分解性および HAp の生成量は変化した。以上より、BG 含有量や熱脱水架橋処理時間を調整することで分解性および HAp 生成量の異なる BG-Gel の作製が可能であることが示された。

2P-002- I

創傷治癒剤として効果を示す塩基性亜鉛塩の開発

¹JFE ミネラル株式会社, ²山形大学大学院理工学研究科

○中田圭美¹ (Nakata Yoshimi), 中山賢典², 永島美希², 佐々木優², 宇田川悦郎¹, 山本 修²

【緒言】重度の皮膚創傷治癒後の皮膚は、審美性のみならず、機能性に多くの課題がある。創傷部位で発現する酵素の 1 つに亜鉛依存性マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) があり、細胞外マトリックスや血管基底膜のコラーゲンを分解して細胞遊走を亢進させる。このことから亜鉛イオンを創傷部位に供給することで創傷治癒が促進し、自家皮膚類似組織となると予想された。そこで、持続的に亜鉛イオンが溶出する塩基性亜鉛塩 ($Zn_xA^y(OH)_z$) に着目した。本研究では、皮膚創傷治癒用の塩基性亜鉛塩の合成条件を確立するとともに、動物試験による創傷治癒評価を行った結果を報告する。

【実験】塩基性亜鉛塩は湿式合成法により合成した。まず陰イオン源となる化合物を溶解した反応場を用意し、この溶液の pH をアルカリにて一定値に保持しながら酸性である亜鉛化合物水溶液を滴下した。得られた沈殿物を一晩攪拌・養生し、その後固液分離、洗浄、真空乾燥することで塩基性亜鉛塩粉末を得た。本実験では陰イオン化合物、亜鉛原料、設定 pH 値条件を振ることで種々の塩基性亜鉛塩を作製した。生体条件模倣下での亜鉛イオン溶出量測定試験は次の通り行った。生理食塩水 40ml に試料 0.8g を加え 37 $^{\circ}$ C 下でスターラーにて攪拌を行い、3 時間後の pH、亜鉛イオン溶出量を測定した。

【結果と考察】塩基性亜鉛塩は合成時の反応場溶液を炭酸系、塩素系とすることでハイドロジンカイト ($Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$) およびシモンコライト $Zn_5Cl_2(OH)_8$ を分離合成できることが XRD 測定から明らかとなった。ハイドロジンカイトにおいては合成の設定 pH が低いほど、また亜鉛原料が硝酸亜鉛<塩化亜鉛<硫酸亜鉛の順に亜鉛イオン溶出量が多くなることが示された。硫酸亜鉛原料、設定 pH7 の系のイオン溶出量は 17.8ppm であり、硝酸亜鉛原料、設定 pH9 の系の溶出量 (0.8ppm) と比較して約 20 倍高かった。生理食塩水中で 7 日間攪拌し、1 日毎に亜鉛イオン溶出を測定したところ、イオンが持続的に溶出することがわかった。シモンコライトは pH6.5 条件でのみ単一相で得られ、塩化亜鉛、硝酸亜鉛原料ともに溶出量が約 17ppm となり、比較的が多量の溶出が確認された。合成条件を変えることで、亜鉛イオンを持続的且つ多量に溶出する材料の作製方法を確立した。合成したこれら材料は創傷治癒に効果があることを動物試験において実証した。

(特許 2 件国際公開 : WO/2016/199905、WO/2016/199907)

2P-003- I

ウサギ大腿骨へ埋植した炭酸アパタイト顆粒の吸収性に関する評価

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座生体材料学分野

○土谷 享 (Tsuchiya Akira), 林幸彦朗, 杉浦悠紀, 石川邦夫

【緒言】

我々は溶解析出型の相変換反応を応用して、炭酸アパタイト (CO₃Ap) の顆粒の合成に成功しており、現在各種評価を進めている。本発表では、CO₃Ap 顆粒の吸収期間を評価することを目的とし、ウサギ大腿骨内に材料を埋植した結果について報告する。

【実験】

日本白色種雄ウサギ(体重 2.5 kg 以上)の大腿骨に直径 5 mm、深さ 8 mm の穴を開け、試験側に CO₃Ap 顆粒(GC)、対照側にハイドロキシアパタイト (HAp) 製人工骨(ポーンタイト、HOYA)を埋植し、2、4、12、26 週および2年での状態を評価した。組織摘出後、X線学および組織学的評価(トルイジンブルー染色)を行った。

【結果と考察】

X線学的評価では、HAp 群では2年経過時においても埋植部の不透過性に変化がなかったのに対し、CO₃Ap 群は経時的に埋植部の不透過性が減少した。組織学的評価では HAp 群では2年経過時も顆粒が残存しているのに対し、CO₃Ap 群は経時的に顆粒が吸収されていることを確認した。顆粒の残存面積率と残存している数及びサイズ変化率を算出したところ、HAp 群は全て変化がなかった。一方で、CO₃Ap 群では2週での状態を100%とした場合、残存面積率については4週 100.2%、12週 47.7%、26週 13.3%、2年 7.5%であった。また、残存している顆粒の数及びサイズ変化率は4週 172個、95.5%、12週 138個、58.4%、26週 57個、38.9%、2年 44個、28.4%と経時的に数が減少しており、残存している顆粒のサイズも減少していた。以上の結果から、CO₃Ap 顆粒はウサギ大腿骨内で経時的に吸収されることが確認された。その吸収変化は初期に大きく、以後緩やかに吸収される傾向にあり、吸収期間はおよそ2年程度であることが示唆された。

2P-004- II

歯科治療に用いられる多孔質インプラントの製作に関する研究

¹大分工業高等専門学校機械工学科, ²大分工業高等専門学校専攻科機械・環境システム工学専攻

○坂本裕紀¹ (Sakamoto Yuki), 都甲 光²

【緒言】

チタンは人骨と弾性係数が異なることからストレスシールドが発生し、直接結合しにくいことが問題となっているが、チタンを多孔質化することで人骨の弾性係数に近づけることができる。多孔質チタンインプラントの実用化のために in vivo 実験が必須であるが、多孔質チタンの加工は困難とされてきた。本研究では、インプラント加工に最適な強度と多孔性を有する多孔質チタンを放電プラズマ焼結によって製作した。

【実験】

3種類の焼結条件にて試料を製作した。圧縮力を30MPaに変更し570°Cで10分保持したものを条件①、保持時間を15分に変更し圧縮力は25MPaのものを条件②、圧縮力を30MPaに変更し570°Cで15分保持したものを条件③として製作した。また、それぞれの気孔率は条件①が約30%、条件②が約32%、条件③が約30%である。インプラント型試料の製作にはNC旋盤を用いて加工を行った。本研究ではウサギの骨に試料を埋め込む in vivo 実験を目標としているため実際に歯科医療で用いられているインプラントよりも小型化したインプラント型の試料を製作した。

【結果と考察】

圧縮試験の結果、条件①の試料は約100MPa、条件②の試料は約100MPa、条件③の試料は約120MPaの圧縮強度を示した。この結果からSPSを行う際の保持時間の延長と圧縮力の増加は両方とも多孔質チタンの強度増加に有効であることが分かった。更に条件を変更することで強度の高い多孔質チタンを製作できることが期待できる。製作した試料は比較的延性の性質を示して破壊している。従って、加工中の試料の破壊を防げると予想できる。また気孔率との相関を見てみると、圧縮力を上げた際は保持時間を長くした際より気孔率が下がっている。多孔質チタンは強度が高く気孔率が大きいものが生体材料として最適である。従って多孔質チタンを製作する際は保持時間をさらに延長したものを考えるべきと考えられる。

2P-005- I

置換イオン含有量の異なるアパタイトの水和構造の評価

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, ²山形大学有機材料システム研究推進本部, ³九州大学先端物質化学研究所
○岡田正弘¹ (Okada Masahiro), 小椋景子², 田中 賢^{2,3}, 松本卓也¹

【緒言】 バイオマテリアルは主に湿潤環境で使用される。これまでに、高分子系バイオマテリアルの表面近傍に存在する水和構造の異なる水（不凍水・中間水・自由水）が生体適合性などの機能発現に大きな影響を与えることが明らかとされている。我々は、セラミックス系バイオマテリアルであるアパタイトに注目し、その水和構造の評価を始めており、これまでに、合成アパタイトの表面近傍にも水和構造の異なる水が存在することを報告した。ここで、アパタイトはリン酸イオンとカルシウムイオン等からなるイオン結晶であり、様々なイオンが置換することが知られている。

本研究では、生体骨に含まれ、かつ、アパタイトの生体活性に影響を与えることが報告されているマグネシウム (Mg) イオンに着目し、その含有量を変化させて合成したアパタイトの水和構造を評価した。

【実験】 Mg 含有量の異なるアパタイトは、湿式法により調製した。調製したアパタイト分散液を遠心洗浄した後、減圧下で水を蒸発させることで水分量を調整した。各水分量のサンプルを用いて示差走査熱量計 (DSC) 測定およびフーリエ変換型赤外分光分析 (FT-IR) を行い、アパタイト近傍の水和状態を評価した。また、アパタイトの形態および結晶構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) および X 線回折装置 (XRD) を用いてそれぞれ評価した。

【結果と考察】 SEM 観察および XRD 測定結果から、湿式法の合成条件を制御することで、置換イオン含有量を変化させた場合においてもアパタイト結晶が得られたことを確認した。水分量の異なるサンプルを -100°C まで降温し、その後の昇温過程を DSC にて測定した結果、 0°C 以下で融解する中間水が存在することが確認でき、さらに、無置換アパタイトと比較して Mg 置換アパタイトの中間水の割合は増加することが明らかとなった。次に、FT-IR 測定を行ったところ、中間水に由来する OH 伸縮振動の低波数領域のブロードニングが観察され、さらに、Mg 含有量によってブロードニングの程度が変化することが確認された。発表では、Mg 含有量の違いによる水和構造の違い（不凍水・中間水・自由水の割合）についても報告し、アパタイトの水和状態に与える Mg 置換の影響を明確化し、さらに、セラミックス系バイオマテリアル表面近傍における水和状態と生体適合性などの機能との関係について考察する。

2P-006- I

炭酸アパタイト顆粒の *in vitro* における溶解性試験

九州大学大学院歯学研究院生体材料学分野

○林幸孝朗 (Hayashi Koichiro), 土谷 享, 杉浦悠紀, 石川邦夫

【緒言】

我々は、生体骨の無機成分である炭酸アパタイトに着目し、溶解析出型の相変換反応を応用することで生体骨と同等以上の炭酸基を含む炭酸アパタイト顆粒の開発に成功している。本研究では、炭酸アパタイト顆粒の吸収特性を評価することを目標として、*in vitro* 溶解性試験においてβ-リン酸三カルシウム (β-TCP)、ハイドロキシアパタイト (HAp)、ウシ骨由来 HAp 製の顆粒状人工骨と比較評価したので報告する。

【実験】

被験物質は CO₃Ap 顆粒 (GC、粒径:300-600 μm)、対照物質はウシ骨顆粒 (Bio-Oss、Geistlich、粒径:250-1000 μm)、β-TCP 顆粒 (Cerasorb M、Curasan AG、粒径:150-500 μm)、HAp 顆粒 (NEOBONE、Coorstek、粒径:500-1000 μm) とした。*In vitro* 溶解性試験は JIS T 0330-3 に準拠して実施した。体液を模した pH 7.30 の溶液及び破骨細胞産生液を模した pH 5.50 の溶液中に各被験物質を浸漬し、測定時間内 30 分の平均溶解速度 R_{a30} (mmol/s) を求めた。試験は n=3 で実施した。

【結果と考察】

各被験物質の pH 5.50 における R_{a30} はそれぞれ CO₃Ap 顆粒:2.185±0.291 mmol/s、ウシ骨顆粒: 2.241±0.155 mmol/s、β-TCP 顆粒:4.899±0.485 mmol/s、HAp 顆粒:0.267±0.015 mmol/s であった。また、pH 7.30 における R_{a30} は CO₃Ap 顆粒:0.101±0.019 mmol/s、ウシ骨顆粒:0.159±0.004 mmol/s、β-TCP 顆粒:0.389±0.066 mmol/s、HAp 顆粒:0.015±0.010 mmol/s であった。pH 5.50 において、吸収性人工骨である β-TCP 顆粒の R_{a30} は他の被験物質よりも有意に高く、非吸収性人工骨である HAp 顆粒は有意に低くなっていた。CO₃Ap 顆粒及びウシ骨顆粒の R_{a30} は β-TCP 顆粒及び HAp 顆粒の中間であった。また、pH 7.30 でも同様の傾向が見られたが、β-TCP 顆粒を除き各被験物質の溶解量は微量であった。以上の結果から CO₃Ap 顆粒は体液中では安定であり、破骨細胞の働きにより吸収される、生体骨と類似した特性を有する人工骨であることが示唆された。

2P-007- I

液相合成法にて形成した ZnO/HAp 被膜の抗菌性能

北見工業大学工学部地球環境工学科

○大津直史 (Ohtsu Naofumi), 角地優子, 大槻飛翔

【緒言】チタン (Ti) 材料はその高い生体安全性および優れた機械的特性から医療用素材として幅広く利用されているが、Ti 材料には骨組織と積極的に馴染んだり病原性細菌を死滅させたりする機能はない。表面に抗菌性金属を含むハイドロキシアパタイト (HAp) 被膜を形成することで骨適合性と抗菌性を同時に Ti 材料に付与することができ、その抗菌性金属として Ag がこれまで検討されてきた。我々は Ag に代わる抗菌性金属として体内必須ミネラルである Zn に着目した。Zn はそのイオンが抗菌性能を示す他に、ZnO にも接触殺菌機能があることが報告されている。そこで本研究では、表面に ZnO が析出している HAp 被膜 (ZnO/HAp) を液相合成法にて Ti 基材上に形成しその被膜構造を調べた後、疑似体液中への Zn イオン溶出速度および被膜の抗菌性能を調べた。

【実験】コーティング溶液は、1.0M の $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ エタノール溶液と 0.6M リン酸水溶液を等量混合したものに、ZnO 水溶液を $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ 比が 0.012, 0.12 及び 1.2 になるように加えて調整した。Ti 基板上にスピコート法で被膜を形成し、その後、大気中・923K で熱処理した。被膜の結晶性を XRD で、膜厚を XRF で、表面構造を SEM で、深さ方向プロファイルを XPS でそれぞれ調べ、さらに Zn 溶出速度を原子吸光光度法で測定した。抗菌試験は JIS Z2801 に準拠した方法で大腸菌 (ATCC 25922) 及び表皮ブドウ球菌 (ATCC 14990) に対しておこなった。

【結果と考察】XRF より、被膜膜厚は約 200 nm であり、その $[\text{Ca}]/[\text{P}]$ はアパタイトの比である 1.67 とほぼ一致することがわかった。また XRD パターンより、結晶化した HAp 被膜の形成が確認され、さらに $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]=1.2$ の場合のみ ZnO に対応するピークも観察された。深さ方向プロファイルより Zn の表面濃化が観察され、SEM 像からこの濃化は ZnO の析出によるものであることがわかった。ZnO/HAp 被膜をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液に浸漬すると、その表面から Zn イオン溶出していくことがわかり、その速度は Zn 含有量の増加とともに増加した。また、これら試料の抗菌性能を調べると、 $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ 比が 0.12 以上の被膜においては、大腸菌の生存率の著しい減少が観察され、さらに、表皮ブドウ球菌でも同様の減少が確認された。また、 $[\text{Zn}]/[\text{Ca}]$ 比が 0.12 と 1.2 に試料間では、抗菌性能の差異はほとんど観察されなかった。

2P-008- I

炭酸アパタイト顆粒のイヌ抜歯窩における吸収性評価

九州大学大学院歯学研究院生体材料学分野

○杉浦悠紀 (Sugiura Yuki), 林幸壱朗, 土谷 享, 石川邦夫

【緒言】

骨再建術において医師の第 1 選択は自家骨移植であるが、骨採取に伴う健常部位への侵襲や採取可能な骨量の制限など課題も多い。この課題を解決するために、我々は生体骨の無機成分である炭酸アパタイト (CO_3Ap) に着目して、生体骨と同等以上の炭酸基を含む CO_3Ap 顆粒の開発に成功している。本発表では、 CO_3Ap 顆粒をビーグル犬下顎骨抜歯窩へ埋植した際の経時的な吸収と骨置換を評価したので報告する。

【実験】

被験物質は S サイズ (300-600 μm) 及び M サイズ (600-1000 μm) の CO_3Ap 顆粒 (GC) とした。動物試験は AAALAC 認定施設にて、動物倫理委員会の承認を得て実施した。ビーグル犬 (11 ヶ月齢以上、雄) の左右下顎前臼歯 (P3、P4) を抜歯し、抜歯窩に被験物質を埋植した。所定の期間埋植後 (12、26、39、52 週) に被験部位を取り出し、非脱灰標本 (Villanueva bone 染色) を作製した。デジタル化した顕微鏡観察像の顆粒面積を Image J (NIH) を用いて算出し、経時的なサイズの変化を評価した。また、病理組織標本から治癒の形体を評価した。

【結果と考察】

病理組織学的評価から、膿瘍形成による異常な炎症細胞の浸潤等の異常な所見が見られないことを確認した。 CO_3Ap 顆粒の経時的なサイズ変化を評価したところ、S サイズは初期: $0.098 \pm 0.062 \text{ mm}^2$ 、12 週: $0.050 \pm 0.040 \text{ mm}^2$ 、26 週: $0.039 \pm 0.042 \text{ mm}^2$ 、39 週: $0.047 \pm 0.035 \text{ mm}^2$ 、52 週: $0.030 \pm 0.021 \text{ mm}^2$ であり、M サイズは初期: $0.337 \pm 0.249 \text{ mm}^2$ 、12 週: $0.169 \pm 0.135 \text{ mm}^2$ 、26 週: $0.144 \pm 0.111 \text{ mm}^2$ 、39 週: $0.157 \pm 0.132 \text{ mm}^2$ 、52 週: $0.084 \pm 0.070 \text{ mm}^2$ であった。各埋植期間において、初期のサイズから有意に小さくなっていった (有意水準 0.5%)。以上の結果から、 CO_3Ap 顆粒は抜歯窩において骨のリモデリングとともに吸収されて、骨に置換される材料であることが確認された。

2P-009- I

Au-Nb 合金の熱処理条件が磁化率に与える影響

¹徳島大学大学院生体材料工学分野, ²徳島大学歯学部, ³徳島大学大学院歯科放射線学分野
○宇山恵美¹ (Uyama Emi), 児玉彩子², 誉田栄一³, 浜田賢一¹

【緒言】

体内に金属製デバイスが留置されていると、磁気共鳴画像 (MRI) 撮影時に生体と金属の磁化率差に起因するアーチファクトを生じ、周囲組織の画像情報が劣化し診断の妨げとなることが深刻な問題となっている。この問題を解消するために磁化率が、生体とほぼ等しく (-9ppm)、アーチファクトを生じない生体医療用合金の候補として Au-Nb 合金を開発した。Au-Nb 合金は熱処理によって過飽和固溶体から Au₂Nb を析出させると、Au₂Nb の磁化率が小さいため合金全体の磁化率は減少するはずだが、時効処理温度によって増減両方を示すことが分かった。そこで、本研究では時効処理温度が、磁化率に与える影響を詳細に調べた。

【実験】

Au-12Nb 合金、Au-15Nb 合金をアルゴンアーク溶解で作製し、1000°Cにて1週間均質化処理を施した。その後、インゴットを300°Cで熱間圧延し、1000°Cで20時間焼鈍を行った。時効処理温度は600°C、800°Cとし、熱処理条件は①100時間まで600°C、100時間以降800°C、②100時間まで800°C、100時間以降600°C、とした。磁気天秤で磁化率を測定し、XRDで相構成を調べた。

【結果と考察】

Au-12Nb 合金 (焼鈍後: α相)、Au-15Nb 合金 (焼鈍後: α相+Au₂Nb) とともに、①では600°C処理で磁化率が増加、800°C処理で磁化率が減少し、②では800°C処理で磁化率が減少、600°C処理では磁化率はほとんど変化しなかった。時効処理後の磁化率は①、②でほぼ等しく、相構成はいずれもα相+Au₂Nbであった。このことから、磁化率の増減の違いは析出したAu₂Nbの違いではないと考えられた。Au₂Nb析出により合金に内部歪が生じて、800°Cでは焼鈍により歪が解消され歪が磁化率に影響することはないが、600°Cでは温度が低く焼鈍されず歪が磁化率を増加させる、と考えるところの結果は説明できる。

2P-010- I

リン酸八カルシウムを前駆体としたフルオロアパタイトの溶解性に関する研究

¹東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野, ²東北大学大学院歯学研究科歯学イノベーションリエゾンセンター
筒井 生¹ (Tsutsui Sei), ○穴田貴久¹, 塩飽由香利^{1,2}, 土屋香織¹, 鈴木 治¹

【緒言】

歯牙を構成する主成分は、ハイドロキシアパタイト (以下、HAと記載) を基本型とする無機リン酸カルシウムであり、アパタイトの水酸基にフッ化物イオンが置換したフッ化アパタイト (FA) を形成することにより、生理的 pH における溶解性が HA よりも低くなることが知られている。また、オーラルケアにおいては、キシリトールやソルビトールなどのポリオールは、う蝕予防に有効と考えられ、歯磨剤の汎用原料として用いられている。我々は、歯磨剤の汎用原料であるポリオールとフッ化物の共存下におけるハイドロキシアパタイト(HA)ペレットへの F 付着について報告した (第69回日本歯科理工学会学術講演会)。本研究では、リン酸八カルシウム (OCP) を前駆体として形成された FA などのリン酸カルシウム粉体を用いてそのメカニズムについて検討するとともに、モデル材料として用いた各種粉体の化学的物性についても評価を行った。

【実験】

モデル粉体としては、市販の HA 粉体および FA 粉体と、合成により得た FA 粉体 (Laboratory synthesized FA: LS-FA) を用いた。各粉体に、種々の濃度 (0~200 ppm) のフッ化物イオンを含む乳酸水溶液 (pH 4.5 に調整) を添加し、室温で振とうした後、遠心分離を行い、上清カルシウム濃度およびリン酸濃度を比色法により測定した。また、乳酸水溶液の代わりにポリオール水溶液を用いて同様の検討を行った。

【結果と考察】

LS-FA は溶解性を有し、FA や HA とその挙動が異なっていた。また、ポリオールは HA を溶解させてカルシウムイオン濃度を増加させ、共存するフッ化物イオンと反応することで、フッ化カルシウムの沈着を促進する可能性が示唆された。

2P-011- I

炭酸アパタイトとコラーゲン複合化による柔軟性のある骨再建用バイオマテリアルの開発

¹徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔外科学分野, ²福岡歯科大学学生体工学分野, ³九州大学歯学研究院生体材料学分野
○秋田和也¹ (Akita Kazuya), 福田直志¹, 藤澤健司¹, 宮本洋二¹, 都留寛治², 石川邦夫³

【緒言】

炭酸アパタイトは、生体内で吸収され骨に置換する性質を有するため、新規骨再建材料として期待されている。われわれは、低結晶性炭酸アパタイトの合成に成功し、治験を経て、現在、顆粒状の緻密体炭酸アパタイトについて承認申請中である。顆粒状の骨補填材は充填などの操作性に劣り、術後に顆粒が移動するなどの問題がある。そこで、われわれは、炭酸アパタイト顆粒の操作性向上のため、炭酸アパタイトをアテロコラーゲンと混合することにより、柔軟性を示すスポンジ状の炭酸アパタイト・コラーゲン複合体を作製し、その物理学的特性を検討したので報告する。

【実験】

1%アテロコラーゲン溶液と炭酸アパタイト顆粒(平均粒径 33 μ m, 112 μ m)を炭酸アパタイト含有量 10wt%で混合し、円柱型のモールドに填入後、液体窒素にて急速凍結後に、-80 $^{\circ}$ Cで2時間以上凍結した。次に、24時間凍結乾燥を行い、155 $^{\circ}$ Cで4時間熱架橋を行うことで、スポンジ状の炭酸アパタイト・コラーゲン複合体を作製し、形態の観察、物性および生理食塩水中での安定性を評価した。

【結果と考察】

作製した炭酸アパタイト・コラーゲン複合体は、走査型電子顕微鏡による形態観察で、炭酸アパタイト顆粒はコラーゲン繊維と密に結合し、多孔性の構造が保たれていた。また、圧縮試験により、どちらの粒径の複合体もコラーゲンスポンジと同等な弾性を認めた。さらに生理食塩水中に浸漬した場合も、形態は保持されていた。以上のことより、炭酸アパタイト・コラーゲン複合体は臨床応用可能な弾性を有し、体液中で形態を維持できる可能性が明らかになった。今回、動物実験の結果も合わせて報告する。

2P-012- I

人工関節コーティング用途向けハイドロキシアパタイトの紹介

富田製薬株式会社

○宮城大輔 (Miyagi Daisuke)

【緒言】

これまで弊社では生体材料向けの無機素材の開発を行っており、現在は人工骨、歯科インプラント、人工関節コーティングといった用途向けの無機素材を製造している。今回、人工関節コーティングの用途向けに開発、現在製造販売しているハイドロキシアパタイトを紹介する。また形態制御の開発も行っており、繊維状に加工したハイドロキシアパタイトを紹介する。

【実験】

酸化カルシウムを製造水に懸濁して加温し、水酸化カルシウム懸濁液を調製した。次に、この懸濁液にリン酸水溶液を加えハイドロキシアパタイトを調製した。この合成液を噴霧乾燥機で乾燥し、さらに整粒した後、電気炉で焼成してハイドロキシアパタイトを得た。これら一連の工程をプラントスケールで実施し、得られたハイドロキシアパタイトについて、人工関節用途としての評価試験を行った。

一方で、繊維状のハイドロキシアパタイトについて、はじめにハイドロキシアパタイト懸濁液を調製し、次に任意の比率となるように分散剤及び増粘剤を添加して混練液を調製し、この混練液から繊維状のハイドロキシアパタイト乾燥品を得た。さらに、この乾燥品を焼成し、得られた繊維状のハイドロキシアパタイト焼成品の評価を行った。

【結果と考察】

cGMP 認定工場人工関節コーティングの用途向けに適した物性を有したハイドロキシアパタイトの製造が可能である。

また、純粋な組成のままの繊維状ハイドロキシアパタイトを得ることができ、さらに β TCP との組成比率を任意に制御できることを確認した。

2P-013- I

ハイドロキシアパタイトエレクトレットの帯電特性に与える熱処理条件の影響

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○堀内尚紘 (Horiuchi Naohiro), 大塚啓介, 野崎浩佑, 中村美穂, 永井亜希子, 山下仁大

【緒言】 バイオセラミックスであるハイドロキシアパタイト (HAp) は、近年ではエレクトレット材料としての可能性が見出されている。エレクトレットとは、表面に安定な電荷を保持し、外部に電界を半永久的に形成する材料であり、フィルターや振動発電などに利用される。エレクトレット化のメカニズムについては、既存の研究において、分極処理による水酸化物イオンの配向分極やプロトンの移動による分極が関与することが明らかになっているが、分極形成とエレクトレットの性能の関係についての詳細は未解明である。本研究では、異なる条件で作製した HAp エレクトレットに対して熱刺激脱分極電流 (TSDC) 測定を行うことによりその分極状態を評価し、さらにその分極状態のエレクトレット性能を評価することで、分極形成とエレクトレットの帯電特性との関係を調査した。

【実験】 合成した HAp 粉を加圧成型し、水蒸気雰囲気での熱処理により焼結体を得た。エレクトレット化処理 (ポーリング) は、4000 V/mm の直流電圧により行った。200 °C に昇温して電圧印加を開始し、15 分間の保持後、冷却した。電圧は冷却中も保持した。作製したエレクトレットについて、異なる温度 (100–280 °C) で 30 分間熱処理を行った後、分極状態の評価として TSDC 測定を行い、また、エレクトレットの帯電特性評価として表面電位計 (春日電機 KSD-3000) により表面電荷が作る電位差を測定した。

【結果と考察】 各熱処理条件によって得られた TSDC 曲線では、熱処理温度の上昇に伴い、ピークが右にシフトした。これは、熱処理により一部の分極成分が脱分極したためである。200 °C 熱処理を施した試料では、水酸化物イオンの配向分極が脱分極され、プロトン伝導によって形成された分極を持つエレクトレットとなった。また、280 °C で熱処理をした試料では、水酸化物イオンの配向分極に加えて、結晶粒界に関連する界面分極が消失した。すなわち、試料に対して異なる温度の熱処理をおこない部分的な脱分極を起こすことにより、分極状態を変化させた試料を得ることが可能であることが示された。分極状態と表面電位を比較した結果、エレクトレットの帯電は、結晶粒界に関連する界面分極が最も重要な要因であることが分かった。

2P-014- I

カルシウム欠損がβ型リン酸三カルシウムエレクトレットの電気特性に与える影響

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ²千葉工業大学

○野崎浩佑¹ (Nozaki Kosuke), 遠藤敬幸², 堀内尚紘¹, 山下仁大¹, 橋本和明², 位高啓史¹, 永井亜希子¹

【緒言】

β型リン酸三カルシウム (β-TCP) は骨補填材として幅広く臨床応用されており、優れた骨形成能を示す。我々は電気分極処理により表面電荷を制御したリン酸カルシウム系セラミックスは、接着した骨芽細胞の機能を制御し、骨形成能を亢進することを報告してきた。カルシウム欠損は電気分極処理による表面電制御のキャリアとなりうるが、β-TCP におけるその詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究では、カルシウム欠損が β-TCP の電気分極処理による表面電荷制御に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

【実験】

カルシウム欠損量を制御する為に、Na イオン固溶量の異なる Na イオン固溶 β-TCP (Na-β-TCP) を固相反応法により合成した。この時、出発原料である炭酸カルシウムとリン酸二水素二アンモニウム、炭酸ナトリウムのモル比 ($[\text{Ca}]+[\text{Na}]+[\text{r}]/[\text{PO}_4]$) を 1.571 になるように混合した。また、Na イオン仕込み量を 0~9.09mol% で調整した。得られた粉体を一軸加圧成形し、昇温速度 3°C/min で 1100°C、12 時間で焼結した。得られた試料の表面電荷制御のため、試料を 400°C まで加熱し、直流電源装置を用いて 1 V を印加した。なお、構造ひずみの解放を防ぐために、室温に降下するまで、電圧は印加し続けた。表面電荷の測定には熱刺激脱分極電流 (TSDC) 測定を行った。

【結果と考察】

いずれの試料も β-TCP 結晶構造に帰属する ICDD の回折パターンと一致するピークが見られた。TSDC 測定の結果、蓄積電荷量は Na イオンを 2.37mol% 固溶した試料においてはリニアに減少し、その後プラトーに達したことから、活性化エネルギーの結果と同様に物質移動の温度依存性の低下が示唆された。以上の結果より、β-TCP の電気分極処理による表面電荷の発生は A カラムのカルシウム欠損を起点とすることが示唆された。

2P-015- I

タンパク質固定化生分解性フィルムへの骨芽細胞様細胞の付着および増殖

¹ 日本大学松戸歯学部歯科臨床検査医学, ² 鶴見大学歯学部歯科理工学

○布施 恵¹ (Fuse Megumi), 福本雅彦¹, 早川 徹²

【緒言】 ポリ乳酸(PLA)などの生分解性材料は、組織再建材料として再生医療やドラッグデリバリーシステムなどに応用されている。歯科領域においても歯周組織や歯槽骨の再生、或いは顎骨の再生用メンブレンとして使用されている。しかしながら、これらの材料は、細胞の接着、増殖、分化促進や抑制を制御するような生理活性機能は付与されていない。本研究では、操作性を考慮して、より弾性を有するポリε-カプロラクトン(PCL)/PLA 共重合体(PLCL)に着目し、PLCL フィルムに細胞接着タンパクであるフィブロネクチン(FN)、細胞非接着性タンパク質であるアルブミン(Alb)の固定化を試みた。固定化フィルムへのマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の付着、増殖、および形態変化について比較検討した。

【実験】 PCL/PLA 共重合体(PLCL: 75/25)をクロロホルムに溶解した。この溶液をキャストして得られた PLCL フィルムを 0.5M NaOH 水溶液に 3 時間浸漬して、カルボキシル基導入フィルムを得た。その後、FN または Alb 水溶液に 48 時間浸漬して、FN または Alb 固定化フィルム (FN-PLCL, Alb-PLCL) を得た。固定化フィルムに MC3T3-E1 を播種し、90 分後、3 日後および 7 日後の細胞数の測定、細胞形態の観察を行った。

【結果と考察】 90 分間細胞培養後では、FN-PLCL は、Alb-PLCL に比較して有意に細胞付着数の増加を示したが ($p < 0.05$)、3 日後および 7 日後の細胞数には有意差は認められなかった。細胞形態は、90 分間培養後では FN-PLCL は、Alb-PLCL に比較して細胞が扁平化し、葉状仮足と糸状仮足がみられ、3 日後および 7 日後ではさらに細胞は扁平化し、広がりが増えられた。Alb-PLCL では、細胞は球状で伸展はみられなかった。Fn 固定化は、細胞の初期付着や増殖に効果的であり、付着細胞の形態に影響を与え、一方、Alb 固定化は細胞の初期付着や増殖に抑制的に作用することが分かった。以上、この方法により、生体材料の目的に応じて細胞の増殖を向上、あるいは抑制できる可能性が示され、新規の傾斜機能フィルムの開発が期待できるものと思われる。

2P-016- I

N-アセチルグルコサミン糖鎖修飾絹フィブロインの血管再生用基材としての特性評価

¹ 農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門, ² 農業・食品産業技術総合研究機構高度解析センター,

³ 株式会社バイオ未来工房, ⁴ 国立医薬品食品衛生研究所, ⁵ 九州大学先端物質化学研究所

○後藤洋子¹ (Gotoh Yohko), 山崎俊正², 石塚保行³, 新見伸吾⁴, 伊勢裕彦⁵

【緒言】 絹フィブロイン (SF) は蚕が生産する繊維タンパク質であり、その成形性及び物理化学特性を生かして人工血管材料への応用が検討されている[1]。人工血管材料は抗血栓性を有することが必要なため、天然の抗血栓性機能を持つ血管内皮細胞が接着・増殖しやすい材料が人工血管材料として有望と考えられている。一方、血管内皮細胞などの間葉系細胞の表面では細胞骨格タンパク質のビメンチンが発現し、ビメンチンを介して細胞が N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 糖鎖を認識・結合することが明らかになっている[2]。本研究では人工血管材料に適するように SF を改変することを目的に、GlcNAc の二糖 N,N'-ジアセチルキトビオース (GlcNAc2) を化学修飾した SF の作製を行った。そして GlcNAc2 修飾 SF (SF-GlcNAc2) を基材に用いた血管内皮細胞の培養により糖鎖導入効果を検証した。

【実験】 アルカリ条件下塩化シアヌルとの反応でトリアジニル誘導体とした GlcNAc2 による SF のアミノ酸残基の化学修飾で、SF-GlcNAc2 を作製した。生成物における糖鎖導入を確認するため、¹H-NMR スペクトル測定と小麦胚芽レクチンを用いた凝集反応を行った。SF-GlcNAc2 あるいは SF を吸着コートした組織培養用マイクロプレートを用いてヒト臍帯静脈内皮細胞を血清添加条件下で 2 時間及び 3 日間培養し、試料コートプレート上の細胞数を WST-8 アッセイにより評価した。

【結果と考察】 SF-GlcNAc2 の ¹H-NMR スペクトルにおける N-アセチル基のメチル水素由来ピークの出現と、小麦胚芽レクチンの GlcNAc 糖鎖への結合・凝集に基づくレクチン添加時の SF-GlcNAc2 水溶液の濁度上昇から、目的物の作出を確認した。細胞培養を行ったところ、SF-GlcNAc2 上の細胞数は培養 2 時間後及び 3 日後ともに SF 上の細胞数より有意に高い値を示したが、2 時間後に比べ 3 日後の基材間の細胞数の差は減少した。これらの結果から、SF への GlcNAc 糖鎖の導入は血管内皮細胞の増殖性よりも接着性を向上させるのに有効であることが示唆された。

[1] Derya A et al., Adv Healthcare Mater 2, 361-368 (2013). [2] Ise H et al., Glycobiology 20, 843-864 (2010).

2P-017- I

多剤徐放制御を可能とするヒアルロン酸-高分子ミセル複合化ゲルの開発

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○高橋京香 (Takahashi Hiroka), 高見 拓, 村上義彦

【緒言】 現在、がん治療において、複数の抗がん剤同士の相乗効果を利用して治療効果を高める多剤併用療法が広く行われている。しかし、適切な投与量や投与タイミングは抗がん剤ごとに異なるため、複数の薬物の投与を独立に制御することができる材料の開発が求められているが、そのような材料は実用化に至っていない。そこで本研究では、異なる薬物を内包した複数の高分子ミセルによってヒアルロン酸を架橋することで、体内留置可能な多剤徐放性・組織接着性ゲルの開発を目指した。架橋剤として用いる高分子ミセルは疎水性薬物を内核に担持可能であり、ミセルを構成するブロック共重合体の組成を変化させることによって薬物放出速度を制御することができる。

【実験】 カリウムナフタレンで末端をメタル化した 3, 3'-ジエトキシプロパノールを開始剤として、エチレンオキサイド、DL-ラクチドを順に添加した後、酢酸を加えて重合反応を停止することによって片末端アセタール化 PEG-*b*-PLA を合成した。得られたブロック共重合体と蛍光性物質を有機溶媒に溶解し、純水中で透析することによって、蛍光物質内包ミセルを調製した。その後、塩酸を加えてミセル表面のアセタール基を脱保護することによって、表面アルデヒド化高分子ミセルを得た。得られた高分子ミセルと側鎖にアミノ基を導入したヒアルロン酸と混合することによって、ゲルを形成した。粘弾性測定装置を用いてゲルの形成特性を、蛍光顕微鏡を用いてゲルの物質放出特性を詳細に評価した。また、表面メトキシ化高分子ミセルを調製し、高分子ミセル表面のアルデヒド化率がゲルの形成に及ぼす影響を評価した。

【結果と考察】 高分子ミセルを形成するブロック共重合体の疎水部 (PLA) の分子量が大きいほど、得られるゲルの貯蔵弾性率は高くなった。これは、PLA の分子量が大きいほどミセル形成の駆動力である疎水性相互作用が強くなり、内核が密に絡み合ったミセルを形成したためであると考えられる。表面メトキシ化高分子ミセルを用いてもゲルは形成せず、片末端メトキシ化 PEG-*b*-PLA と片末端アセタール化 PEG-*b*-PLA の混合によってゲルの強度を制御できる可能性が示唆された。さらに、蛍光物質の放出速度が PLA の分子量に依存することを明らかにし、蛍光顕微鏡で観察することによって、ゲルからの複数の物質の放出挙動を三次元的に評価することができた。

2P-018- I

ゾル-ゲル転移を利用して形成した多糖-高分子ミセル複合化シートの開発

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○伊藤正規 (Ito Masanori), 高見 拓, 村上義彦

【緒言】 がん組織の摘出手術は根治の可能性が高いため積極的に行われているが、手術後の再発や転移を抑制する目的で抗がん剤を併用することが一般的である。通常抗がん剤は経口投与や静脈注射を利用するが、患部に直接投与する局所投与が実現すれば、副作用の抑制や治療効果の増大により、患者の QOL の向上が期待できる。しかし、局所への過剰な薬物の投与は副作用の原因となるため、局所投与材料には「患部に長期間留まり」「生体組織を侵さず」「薬物を徐々に放出する」性質が必要とされているが、これらの性質を有する材料の開発は困難である。本研究では、生体適合性の高い多糖類であるゲランガムのゾル-ゲル転移を利用したシート状材料の開発を検討した。シート状材料は分子間力による適度な密着性を有しているため、生体組織への炎症のリスクを抑制できる。ゾル状態のゲランガム水溶液中に、抗がん剤などの疎水性薬物の放出を制御可能な高分子ミセルを共存させることで、ゲル化の際に高分子ミセルを内部に固定化し、薬物を放出制御可能な多糖-高分子ミセル複合化シートの実現を目指した。

【実験】 親水部にポリエチレングリコール、疎水部にポリ乳酸を有する両親媒性ブロック共重合体 (methoxy-PEG-*b*-PLA) を利用して高分子ミセルを調製した。高温の純水中でゲランガムと高分子ミセルを混合し、高分子ミセル分散ゲランガム水溶液を調製し、キャスト、冷却、乾燥を経てシートを作製した。作製したシートの各種物性 (粘弾性や厚みなど)、およびシートからの疎水性蛍光物質 (ローダミン B) の放出挙動を評価した。

【結果と考察】 動的光散乱 (DLS) 測定の結果から、シート作製時の温度 (90°C) においても高分子ミセルは安定に分散した。さらに、二種類のゲランガム (脱アシル型ゲランガム・ネイティブ型ゲランガム) の混合比を変化させることで、用途に応じた任意の強度および柔軟性を有するシートを作製できることを明らかにした。シート断面の SEM 観察像から、数 μm 程度の厚さのシートが得られた。さらに、シートからの蛍光物質の放出挙動から、高分子ミセルに内包することで内包物の放出制御が可能であることが示唆された。

2P-019- I

組織接着性材料への応用を目指した多糖-高分子ミセル複合化ゲルの開発

¹東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○清水大輔 (Shimizu Daisuke), 高見 拓, 村上義彦

【緒言】 所望の部位に留置し、薬物の徐放を制御することができる材料の実現は、現在の DDS 研究の大きな課題の一つである。そこで本研究では、内包した疎水性物質の放出制御が可能な高分子ミセルを架橋構造として利用し、側鎖にアミノ基を有する高分子を架橋することで形成される組織接着性ハイドロゲルの開発を目指した。このゲルは組織接着性と薬物徐放性を併せもち、薬物放出材料、止血材、癒着防止材などへ応用可能であると考えられる。特に今回は、アミノ化ヒアルロン酸 (HA-ADH) と PEG 修飾キトサン (PC) をゲルの主鎖として用い、より弾性率が高くゲル化時間が短いゲルの形成条件の探索を検討した。

【実験】 末端アセタール化ポリエチレングリコール-*l*-ポリ乳酸 (acetal-PEG-PLA) を用いて高分子ミセルを調製した。次に、ヒアルロン酸 (1.63 MDa) を純水に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドおよびアジピン酸ジヒドラジドの混合溶液を添加することによって、HA-ADH を得た。また、キトサンを酢酸緩衝液に溶解し、末端アセタール化 PEG、NaCNBH₃ を添加することによって PC を合成した。さらに、PEG をアセトニトリルに溶解し、トリエチルアミンと *N,N'*-ジスクシンイミジルカーボナートを順に添加することによって、両末端スクシンイミジル化 PEG (DS-PEG) を合成した。HA-ADH と DS-PEG を反応させることによって、あらかじめ部分架橋された HA-ADH (cl-HA-ADH) を合成した。高分子ミセル、HA-ADH (あるいは cl-HA-ADH)、PC を用いてゲルを調製し、レオメーターで粘弾性測定を行った。

【結果と考察】 混合する二液の pH を変化させてゲルを形成させることによって、測定から 60 分後の貯蔵弾性率 (G'_{60}) が大きく、ゲル化時間が短いゲルが得られる条件を見出した。また、HA-ADH 水溶液と PCD 水溶液の混合溶液からゲルを調製したところ、 G'_{60} の増加やゲル化時間の短縮は見られなかったが、柔軟性の向上が示唆された。さらに、アミノ基の 5~20% を部分架橋した cl-HA-ADH 水溶液を調製し、ミセル水溶液と混合して粘弾性測定を行ったところ、あらかじめ部分架橋しなかったゲルと比較して、 G'_{60} が 3 倍以上大きく、ゲル化時間が短いゲルが得られた。

2P-020- I

RAFT 重合によるタンパク質固定化用高分子の合成と機能評価

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○森 悠太 (Mori Yuta), 高見 拓, 村上義彦

【緒言】 ハイドロゲル中に抗体や酵素などの生体分子を組み込むことで、特定の分子を認識して体積変化を起こす分子応答性ゲルが注目されている。このようなゲルを実現するためには、ゲルネットワーク中に抗体や酵素などのタンパク質を固定化する技術が重要である。そこで本研究では、複数のタンパク質を固定化可能な高分子架橋剤を合成し、そのゲル形成能を評価した。

【実験】 本研究室で開発した新奇な RAFT 剤 2-[*N*-(2-hydroxyethyl)carbamoyl]prop-2-yl 4-hydroxydithiobenzoate (HECPHD)、*N*-acryloylmorpholine (NAM)、*N*-succinimidyl acrylate (NSA)、2,2'-azobis[2-methyl-*N*-(2-hydroxyethyl)propionamide] (VA-086) を 1,4-dioxane 中において 90°C で 24 時間攪拌し、RAFT 重合によって両末端に OH 基を有する高分子 DTB-PAS-diol を合成した。反応溶液には ¹H-NMR 解析時に基準物質となる 1,3,5-trioxane をあらかじめ添加した。任意の時間において採取した反応溶液に対して ¹H-NMR 測定を行うことによって、モノマー転化率を算出した。さらに、DTB-PAS-diol に対し acryloyl chloride と triethylamine を加え、dichloromethane 中において室温で 18 時間攪拌することによって、両末端がアクリロイル化された高分子架橋剤 DTB-PAS-DA を合成した。さらに、合成した DTB-PAS-DA を架橋剤とし、acrylamide、ammonium peroxodisulfate (APS)、および tetramethylethylenediamine (TEMED) をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、20 mM、pH7.4) 中で反応させることでゲルを調製した。

【結果と考察】 ¹H-NMR 測定によって算出したモノマー転化率の経時変化から、両モノマーの消費速度が非常に近いことが確認された。この結果から、ランダム性が高い共重合体が合成され、タンパク質を固定化するための活性エステル部位が高分子鎖中へ均一に導入されたことが示唆された。また、得られた高分子架橋剤を用いてゲルを形成することによって、反応開始から 30 分後にゲル化が完了したことをバイアル傾斜法によって確認した。この結果より、DTB-PAS-DA がゲルの架橋剤として機能することが確認された。

2P-021- I

PEG 化リシン連鎖ペプチドと DNA との複合体形成における PEG 鎖の寄与の解析

東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻

○佐々木一貴 (Sasaki Kazuki), 山崎裕一

【緒言】

当研究室では遺伝子デリバリー用のベクター候補としてリシン鎖長を精密に制御した PEG 化オリゴリシンを研究している。PEG 化オリゴリシンと DNA との複合体は PEG 部分を外殻とした高分子ミセルを形成し、二次凝集が抑制され、水溶液中での安定性に優れることがわかっている。先行研究では、このオリゴリシンと、PEG 化オリゴリシンとの間で DNA 凝縮における複合体形成能の比較がなされ、PEG 鎖の付与によって複合体形成能が向上する可能性が示唆されたが、DNA との相互作用の違いは明らかとなっていない。そこで本研究では、PEG 鎖の有無によるペプチドの DNA との相互作用の違いを定量化し、PEG 鎖が DNA とオリゴリシンとの複合体形成機構へ与える影響を考察することを目的とする。

【実験】

トリプトファンで蛍光標識したオリゴリシンと、それを PEG 化した PEG 化オリゴリシンをペプチド溶液として用い、DNA 溶液を各ペプチド溶液へ滴下する滴定を行い、蛍光分析によって DNA との結合定数を求めた。

次に、オリゴリシンと PEG 化オリゴリシンで DNA 凝縮の完了する N/P 比(ポリカチオンの正電荷と DNA のリン酸基による負電荷の比)を、EtBr を用いた色素排除試験、アガロースゲル電気泳動、TEM 観察によって比較した。

【結果と考察】

結合定数解析の結果、Lys-Trp-Lys の DNA に対する結合定数が 37 mol^{-1} であったのに対し、PEG-Lys-Trp-Lys の結合定数は 1060 mol^{-1} となり、約 30 倍の差があることを確認した。EtBr を用いた色素排除試験の結果、PEG 化オリゴリシンの方がオリゴリシンよりも低い N/P 比で蛍光強度の落ち込みが見られ、低い N/P 比で DNA 凝縮が誘起されていると考えられる。ゲル電気泳動と TEM 観察においても PEG 鎖を有するペプチドと DNA との複合体の方が低い N/P 比で凝縮形態をとるという結果が得られ、ペプチドへの PEG 鎖の付与により DNA 凝縮能も大きくなることが明らかになった。これらの結果から、PEG 鎖の有無によるオリゴリシンの DNA との相互作用の違いを定量化することができた。

2P-022- I

ポリプロピレングリコール系ブロック共重合体の分子運動性と血液適合性について

東海大学大学院工学研究科医用生体工学専攻

○奥田知熙 (Okuda Chihiro), 望月 明

【緒言】

これまで医用材料の血液適合性についての多くの報告があるが、血液適合性の理由はいまだに十分解明されてない。これまで我々はこの適合性発現において、材料中の水の構造が関与すると仮定し種々研究を進めている。そこで、メチルメタクリレート(MMA)(A)と PPG 鎖を構造の中心に持つ開始剤(B)を用いて AB 型ジブロック共重合体および ABA 型トリブロック共重合体を合成し、それぞれの血液適合性への影響について PPG 鎖、PMMA 鎖の運動性および PPG 中の水の運動性の観点から検討したので報告する。

【実験】

- 1.試料：PPG をもととした開始剤(α -ブロモイソブチル酸エステル)を合成し、MMA を PPG 鎖末端から重合してブロック共重合体を合成した。合成したポリマーは 500MHzNMR、および GPC により同定した。
- 2.血小板適合性：血小板浮遊血漿を試料と接触後、SEM 像から求まる血小板数を適合性の指標とした。
- 3.分子運動性：400MHzNMR を用いてポリマー及び開始剤(PPG)について緩和時間を測定し、運動性の指標とした。

【結果と考察】

PPG または PMMA の分子量が異なるジブロックおよびトリブロック共重合体を合計 6 種類合成し、各ポリマーについて実験を行った。血小板適合性はジブロック共重合体の方がトリブロック共重合体より優れる傾向が見られた。ポリマーの運動性については PPG 鎖のエーテル酸素隣接炭素および PMMA 鎖のメチルエステル基のカルボニル炭素について $^{13}\text{C-T}_1$ 緩和時間を測定した。各ポリマーの PPG 鎖の運動性に差はみられなかったが、PMMA 鎖についてはすべてのポリマーで PMMA のホモポリマーよりも運動性が抑制されている事が分かった。これより、PPG によって PMMA の運動性が制限されていることが示唆される。さらに $^2\text{H-T}_1$ 緩和時間から、PPG 開始剤中に配位している水分子の運動性は PPG 分子量依存性があることが示された。当日は、ポリマー中の水の運動性と血液適合性についても加えて報告する。

2P-023- I

エポキシを幹ポリマーPMEA を側鎖ポリマーとする血液適合性材料の開発

¹山形大学大学院理工学研究科, ²山形大学工学部バイオ化学工学科, ³九州大学先端物質化学研究所
○佐藤力哉^{1,2} (Sato Rikiya), 吉田 航¹, 長根元貴², 星野文香², 田中 賢³

【緒言】

Poly (2-methoxyethylacrylate) (PMEA) は、高い血液適合性を示すことから生体適合性材料として人工心肺等の表面コーティングに利用されている。当研究室では、汎用高分子であるエポキシ(EVOH)の側鎖に PMEA 構造を導入することによる新しい血液適合性材料の開発を行っている。本研究では、EVOH に導入した PMEA 鎖数と血液適合性について検討した。

【実験】

EVOH の側鎖水酸基への直接利用、または glycidol や 2-propenylchloride—O₃O₄ との反応により新たに導入した水酸基利用による ATRP を用いた PMEA 構造の導入を行い、生成ポリマーの、水との接触角、DSC による中間水の測定、また血小板粘着試験等により血液適合性を評価した。

【結果と考察】

得られたポリマーの ¹H-NMR による解析から、合成した溶媒可溶性ポリマーに導入された PMEA は、側鎖数が主鎖モノマーユニットの 40~100%程で、重合度が約 20~40 程度であることが確認できた。ここで得られたポリマーと原料の EVOH との水との接触角を比較したところ、EVOH に比べ、生成したポリマーの水との接触角が減少したことから、ポリマー表面に PMEA が分布していることが示唆された。また DSC による中間水の測定から、生成ポリマー中に、中間水の存在が確認できた。さらに生成ポリマーを用いた血小板粘着試験では、PMEA 単体程ではないが、EVOH に比べて生成ポリマー表面における血小板の粘着数の減少が見られた。これらのことから、EVOH の側鎖水酸基へ PMEA 構造の導入によって合成されたポリマーは、血液適合性を持つ可能性が示唆された。本発表ではこれらの詳細について報告する。

2P-024- I

ホスト-ゲスト相互作用を利用した刺激応答性ヒドロゲル上での細胞の力学的制御

¹大阪大学大学院基礎工学研究科, ²Institute of Biomaterials and Biomolecular Systems (IBBS), University of Stuttgart, ³Institute for Physical Chemistry, University of Heidelberg, ⁴京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS), ⁵大阪大学大学院理学研究科

○中畑雅樹¹ (Nakahata Masaki), Marcel Hörning², Philipp Linke³, 山本暁久⁴, Mariam Veschgini³, Stefan Kaufmann³, 高島義徳⁵, 原田 明⁵, 田中 求^{3,4}

【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いる。生体内における「力」が生体構成要素に与える影響の解明と応用を目指す「メカノバイオロジー」の枠組みの中で、特に細胞のメカノバイオロジーを時空間的に明らかにすることは基礎・応用の両面で非常に意義深い。これまでに、生理条件下で使用可能な酸化還元反応や pH などの刺激に応答する高分子材料上での細胞動態が研究されてきたが、材料の力学特性と細胞動態の関係をより詳細に議論するために、より生体適合性の高い刺激を用いて可逆的・時空間的に制御可能なシステムの構築が望まれている。本研究ではシクロデキストリン (CD)-ゲスト分子間のホスト-ゲスト相互作用にて架橋された水溶性高分子からなるヒドロゲルを用いた。相互作用の可逆性を活かして、力学的に活性化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を制御した。ヒドロゲル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のモデル表面としての適用可能性を調査した。

【実験】ポリアクリルアミドを BCD-Adamantane (Ad) 間の相互作用で架橋した超分子ヒドロゲルを調製した。得られたヒドロゲルに細胞接着タンパクであるフィブロネクチンを修飾し、細胞接着性を付与した。ゲルへの BCD の添加・除去により制御される競争反応によるゲルの硬さ変化と、ゲル上に接着した C2C12 細胞の動態を時空間的に評価した。

【結果と考察】ゲルへの BCD の添加・除去により、ゲルの硬さを 11 kPa ⇄ 4 kPa の範囲で可逆的に制御することができた。シート状に成型したゲル上で、C2C12 細胞は基材の硬さに応じて接着面積を変化させた。硬さの動的な変化により、細胞骨格内でのアクチンファイバーの再構成が起こり細胞の形状が変化することが分かった。可逆的な制御にも成功し、マイルドな刺激で細胞の動態を制御することに成功した。[1]

[1] M. Hörning, M. Nakahata, A. Harada, M. Tanaka et al. *Sci. Rep.* 2017, in press.

2P-025- I

シルクフィブロインの二次構造解析と機能性ペプチド固定化

¹奈良女子大学生生活環境学部, ²国立循環器病研究センター研究所生体医工学部, ³農研機構, ²信州大学繊維学部
○橋本朋子¹ (Hashimoto Tomoko), 中村優佳¹, 佐野奈緒子¹, 山岡哲二², 亀田恒徳³, 玉田 靖⁴, 黒子弘道¹

【緒言】

われわれは、創傷被覆材への応用を目指し、フィブロイン結晶領域内の配列 (GAGAGS 等) との相互作用を駆動力とし、創傷治癒活性を有するペプチドのフィブロイン材料への固定化に取り組んでいる。フィブロイン材料のバルク、表面のタンパク質二次構造を種々の分光法により詳細に調べた。機能性ペプチドの固定化と構造含有率の関係、固定化の局在について評価するとともに、フィブロインと固定化ペプチド間の相互作用解析を行った。

【実験】

既報に従い作製したフィブロインフィルムの二次構造、その分布を固体 ¹³C CP/MAS NMR 測定、FTIR-ATR 測定および顕微ラマン測定により調べた。Fmoc 固相法によりフィブロインへの接着配列を有する (GAGAGS)_nGRGDS (n=0~5) ペプチドを合成した。精製済ペプチドは水または 80% のアルコールに溶解し、フィブロインフィルムへ固定化を行った。固定化後フィルムの蛍光顕微鏡による観察、および回収液の蛍光強度測定によりフィブロインフィルムへの固定化ペプチド量を算出した。ペプチドとフィブロインフィルム間の相互作用は DSC 測定により評価した。さらに、固定化ペプチドの機能性評価として、マウス繊維芽細胞の初期細胞接着数および接着細胞の伸展率を調べた。

【結果と考察】

各分光法による解析の結果、フィルム作製時の温度、またアルコール処理の有無によりβシート含有率に変化が認められ、表面構造解析により、構造が局在化する可能性が示唆された。蛍光ラベルペプチドを用いた固定化評価、およびフィブロインとペプチド間の相互作用解析より、GAGAGS 配列を有するペプチドは、βシート構造含有率が高いフィブロインフィルムにより多く固定化される結果が得られ、またその固定化にはフィブロインとペプチドの間の相互作用が寄与していることが示唆された。

2P-026- I

金属—高分子間相互作用を用いたハイドロゲル材料の作製

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
○穴水美菜 (Anamizu Mina), 田畑泰彦

【緒言】

細胞移植治療では、移植細胞を体内にとどめる工夫が必要である。これまで、細胞とともに体内に注入することで、注射部位でゲル化する材料の研究開発が行われている。しかしながら、ゲル化に不可逆的な結合を用いた材料デザインが多く、体内での材料の分解性に改良の余地がある。そこで、この問題を解決する一つの方法として、可逆的な相互作用である金属—高分子間相互作用を架橋点として用いることを試みた。本研究では、細胞親和性の水溶性高分子であるゼラチンと塩化鉄 (III) とを混合することで、ハイドロゲルを作製し、評価した。

【実験】

ゼラチン (重量平均分子量 10,000、等電点 5.0 および 9.0、新田ゼラチン株式会社より供与) のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 100 μl と種々の濃度の塩化鉄 (III) PBS 溶液 100 μl とを混合し、10 秒間攪拌した。その後、溶液を傾倒、その流動性を観察することにより、ハイドロゲルの形成を評価した。低濃度の塩化鉄 (III) ではハイドロゲルの形成は認められなかったが、塩化鉄 (III) の濃度の増加とともに、ハイドロゲルの形成が認められた。これは、塩化鉄 (III) の濃度を大きくすることで、ゼラチンと相互作用する鉄 (III) イオンが増加し、それに伴い、架橋点が増加したためだと考えられる。

作製したハイドロゲルを 1 mL の PBS 中に入れ、37°C で 3 日間振とうした。タイムポイントごとに上清を採取し、BCA 法により、溶出したゼラチンを定量することで、ハイドロゲルの保持を評価した。コントロールであるゼラチンハイドロゲルに比べて、塩化鉄 (III) を混合して作製したハイドロゲルは PBS 中で長時間保持された。

作製したハイドロゲル上に細胞を播種し、細胞毒性を評価した。また、細胞を懸濁したゼラチン PBS 溶液と塩化鉄 (III) 溶液とを混合することで、細胞をハイドロゲルに内包させ、細胞毒性評価を行った。

2P-027- I

生体環境近傍でマルチ応答性を有する新規スルホベタインポリマーの創製

東北大学大学院工学研究科

○大石佳史 (Oishi Yoshifumi), 森本展行, 山本雅哉

【緒言】モノマーユニット中に正と負の荷電基からなるベタイン構造を有したポリマーは、特異なレオロジー挙動、高い生体適合性、pH 応答性など興味深い特性を示す。その中でもスルホベタイン型ポリマーの一つであるポリ 3-ジメチル (メタクリロイルオキシエチル) アンモニウムプロパンスルホネート (PDMAPS) は、双極子-双極子相互作用により純水中で上限臨界共溶温度 (UCST) 型の温度応答性を示すが、生理塩強度では、UCST は消失する。本研究では、生体環境近傍で塩、熱、pH などのマルチ応答性を示すバイオマテリアルとして、生理塩強度で UCST を有する新規スルホベタインポリマーについて検討した。すなわち、ピリジニウムカチオンを正の荷電基とするスルホベタインモノマーとそのホモポリマーとを合成し、得られたホモポリマーの UCST を評価した。

【実験】4-(2-アミノエチル)ピリジンとメタクリル酸との縮合反応から得たピリジン置換メタクリルアミドに対して、1,3-プロパンスルフトンを開環反応させることによって、ピリジニウムカチオンを有したスルホベタインモノマー (PySMAAm) を合成した。次に、水溶性の連鎖移動剤を用いて可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により、合成した PySMAAm のホモポリマーを調製した。ポリマーの UCST は、1 mg/mL のポリマー溶液を 1°C/min で昇温および降温したときの 550 nm における透過率変化から評価した。

【結果と考察】モノマーと連鎖移動剤は、1 M NaCl 中で中性にすることによって可溶化できた。可溶化したモノマーと連鎖移動剤から分子量が 14,000~42,000、分子量分布が 1.3 以下に分子量制御されたホモポリマーが得られた。次に、分子量が 26,000 のホモポリマーをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に分散させ、UCST を評価した。その結果、純水中では昇温しても溶解しないが、PBS 中において非常に狭い温度域で転移が起こり、その転移温度は昇温時に 18.3°C であった。また、降温時でも、昇温時と同様の鋭い転移を示すことがわかった。発表では pH および塩強度応答性についても報告する。

2P-028- I

オリゴ核酸架橋多糖ナノゲルの設計と機能

¹京都大学大学院工学研究科, ²JST-ERATO

○澤田晋一^{1,2} (Sawada Shin-ichi), 岩本大和¹, 佐々木善浩¹, 秋吉一成^{1,2}

【緒言】近年、温度や光などの外部刺激によって体積相転移を引き起こす刺激応答性ナノゲルが開発され、DDS や組織再生用材料などバイオ・医療分野において応用が進められている。我々はこれまでに疎水化多糖が水中で疎水性相互作用により会合し、20-30 nm の自己組織化ナノゲルを形成し得ることを報告しており、そのナノゲルの DDS への応用やナノゲル集積ゲルを構築するナノゲル工学を展開している。本研究では、会合性因子としてオリゴ核酸を用いた、新規温度刺激応答性ナノゲルについて報告する。水溶性多糖にオリゴ核酸を修飾したオリゴ核酸置換多糖はオリゴ核酸同士で配列特異的に塩基対を形成し、その会合力で自己集積化し得ると考えた。このような核酸の相互作用を架橋点としたナノゲルは、温度刺激によって塩基対が解離し、ゲル構造が崩壊するため、その相転移挙動を利用したマテリアルとしての応用が期待される。本研究では、天然型の核酸および人工架橋化核酸である BNA (Bridged Nucleic Acid) を部分的に挿入した短鎖オリゴ核酸を有する新規会合性高分子を設計した。末端にアルキンを導入したオリゴ核酸を、アジド基を置換したプルランにクリックケミストリーにより修飾し、オリゴ核酸置換プルランを合成するとともに、このオリゴ核酸置換プルランの会合体形成挙動などの特性について検討を行った。

【実験】アジド化プルランにクリック反応により末端アルキン化オリゴ核酸を置換した。得られたオリゴ核酸置換プルラン PBS に溶解させ、90°C まで昇温した後、降温させることでオリゴ核酸の二重鎖形成を行った。このサンプルの動的散乱測定を行うとともに、核酸の二重鎖形成蛍光プローブを用いてオリゴ核酸置換プルランの PBS 溶液内での T_m を測定した。

【結果と考察】¹H-NMR 測定から、100 単糖あたり 5 個のオリゴ核酸がアジド化プルランに導入されたことが確認された。BNA 導入オリゴ核酸置換プルランおよび天然型オリゴ核酸置換プルランの動的散乱測定より、オリゴ核酸置換プルランが 300-400nm 程度の会合体を形成していることが確認された。また、T_m 測定から天然型オリゴ核酸と比較して、BNA を導入したものは同じ配列にも関わらず T_m が 10°C 以上上昇することが明らかとなった。

2P-029-III

親水性 uHA/PLLA メンブレンを用いた骨再生誘導の評価

東京医科歯科大学歯学総合研究科インプラント・口腔再生医学分野

○井汲玲雄 (Ikumi Reo), 立川敬子, 宮原宇将, 秋野徳雄, 春日井昇平

【緒言】インプラント治療における骨欠損部への骨再生法として、保護膜（吸収性あるいは非吸収性）を用いた骨再生誘導法(Guided Bone Regeneration、以下 GBR と略す)が応用されている。チタンメッシュなどの非吸収性の膜は移植後に再度取り出すための手術が必要であり、患者および術者にとって負担がかかる。吸収性の膜として主にコラーゲン膜が使用されているが、コラーゲン膜は生体への吸収速度が速くチタンメッシュのような賦形性を有していないため、幅広い骨欠損において不利である。また、動物由来コラーゲンを主成分とするため、その抗原性は否定できない。非焼結(unsintered)のhydroxyapatite(HA)とポリ-L-乳酸(PLLA)の複合材料である uHA/PLLA 膜は、優れた機械的強度、生体適合性、骨伝導性を有し、また UV 照射による親水化処理で骨再生能が向上することが報告されている。本研究の目的は、GBR におけるコラーゲン膜と親水化処理を行った uHA/PLLA 膜の骨再生を比較し、組織学的及び放射線学的に評価することである。

【実験】東京医科歯科大学動物実験倫理委員会の承認を得た後、Wister ラット(雄:12週齢)を24匹用いて実験を行った。吸入麻酔として4%イソフルラン、全身麻酔としてケタミン及びキシラジンを筋注にて投与した。8万分の1アドレナリン添加型2%リドカインにて浸潤麻酔後、トレフィンバーにて頭蓋骨に8mmの骨欠損を作製した。実験群としてコラーゲン膜群、uHA/PLLA 膜群、対照群として欠損部の作製のみを施した群、各群8匹ずつに割り当てた。術後2週、4週で屠殺し、マイクロCT撮影及び組織標本(脱灰及び非脱灰)の作製を行った。BMC及びBMDはTRI/3DBoneを用いて算出し、各データをone-way ANOVA Tukey HSD testsにて統計学的に検討した。

【結果と考察】術後治癒は良好で、軟組織の腫脹や保護膜の露出などは観察されなかった。BMDは2週、4週共にuHA/PLLA 群で最も高い値を示し、2週において各群に対して有意差を示した(<0.05)。BMCは2週においてuHA/PLLA 群が最も高い値を示し、対照群と比較して有意に高い値を示したが、4週ではコラーゲン群とほぼ同等の値を示した。組織学的にはuHA/PLLA 群における成熟した新生骨が認められた。一方、コラーゲン群では一部未成熟な骨形成を示した。上記の結果より、uHA/PLLA 膜はGBRに有用であることが示唆された。

2P-030-I

高強度ポリマー材料の歯科矯正ワイヤーへの応用

¹東京医科歯科大学大学院医科学総合研究科先端材料評価学分野, ²東京医科歯科大学大学院医科学総合研究科咬合機能矯正学分野

○宇尾基弘¹ (Uo Motohiro), 和田敬広¹, 前川 南², 簡野瑞誠², 小野卓史²

【緒言】

現在の歯科矯正用ワイヤーは金属材料を主に用いられているが、審美性及び金属アレルギーの観点から代替材料への要求が高まっている。工業的に広く用いられているスーパーエンジニアリングプラスチック(以下、SEP)は強度や耐熱性に優れたプラスチックである。我々はSEPワイヤーの中でも特に機械的特性や耐化学性に優れるPEEK、PES、PVDFに注目し、メタルフリーの審美性矯正ワイヤーとしての応用可能について、機械的特性、色調、水中での長期耐久性の観点から検討を行った。

【実験】

Poly ether ether ketone (PEEK)、poly ether sulfone (PES)、poly vinylidene difluoride (PVDF)を1mm角断面の線状に加工し、3点曲げ試験(支点間14mm)、定ひずみクリーブ(たわみ2mm)を計測した。加えて厚さ1mmの板状試料を用いて重量変化から吸水率(37°Cおよび121°C)を評価した。

【結果と考察】

3種の材料ではPEEKが最も高い曲げ強さを示し、特に延伸加工を施したPEEKワイヤーでは現行のNi-Ti矯正ワイヤーの1/3~1/4程度の曲げ応力を発揮することが分かった。一般に歯列の移動には数十gfの弱い荷重で十分とされ、SEP矯正ワイヤーは矯正ワイヤー材料として十分な矯正力を発揮できると推測された。また2mmたわみを37°C、水中で1か月付与した後もPEEKの永久変形は十分に小さく、実際の矯正治療において十分な優れたクリーブ耐性を持つことが示された。またPEEK、PVDFは37°Cおよび121°Cの蒸留水中において0.4wt%を超えない極めて低い吸水率を示し、口腔内の長期使用に耐える十分な耐水性を有していた。審美性の点でもPEEKは薄い黄褐色、不透明を呈し、PESは透明琥珀色、PVDFは半透明白色で、いずれも審美的に非常に優れていた。以上よりSEPの中でも特にPEEKは歯科矯正ワイヤー用の素材として応用可能であると考えられた。

2P-031-II

硬さの異なるゼラチンハイドロゲルとマクロファージとの相互作用

京都大学 ウイルス・再生医学研究所

○森岡智子 (Morioka Tomoko), 城潤一郎, 田畑泰彦

【緒言】

細胞は、生理活性物質などの化学刺激だけでなく、基材の硬さなどの力学的な性質にも影響をうけ、その挙動を変化させることが知られている。本研究の目的は、細胞培養の際に、培養基材の硬さが細胞挙動に与える影響を調べることである。本研究では、細胞親和性をもつゼラチンを化学架橋することで硬さの異なるゼラチンハイドロゲルを作製した。ゼラチンハイドロゲル基材上で培養された RAW264.7 マクロファージ様細胞の挙動を調べた。

【実験】

異なる濃度のゼラチン（重量平均分子量 100,000, 等電点 5.0, 新田ゼラチン株式会社より供与）の水溶液を調製し、濃度の異なるグルタルアルデヒド（GA）水溶液を添加して、ゼラチンハイドロゲルを作製した。グルタルアルデヒドの重量は、ゼラチンの重量に対して 1 wt% となるようにした。得られたゼラチンハイドロゲルを 37°C の 2 回蒸留水中で 3 日間膨潤させた後、クリープメーター（株式会社 山電製 REONER II RE2-33005C）を用いて圧縮し、得られた応力-ひずみ曲線の直線部分の傾きから弾性率を計算した。また、RAW 細胞（ 4×10^4 細胞 / ml）を、異なる弾性率をもつゼラチンハイドロゲル上に播種した。37°C, 5%CO₂ 条件で 3 時間培養した後、細胞接着数を細胞の DNA 量を計測することで算出した。細胞の形態と、サイトカインの産生について調べた。

【結果と考察】

ゼラチン水溶液の濃度の増加とともに、ゼラチンハイドロゲルの弾性率は増加した。弾性率増加の理由として、単位体積あたりに存在するゼラチンの分子数が増加し、架橋点が増加したことが考えられる。また、異なる弾性率をもつゼラチンハイドロゲル上で RAW 細胞を培養したところ、ゼラチンハイドロゲルの弾性率に関係なく、いずれのゼラチンハイドロゲルにも、細胞が接着、増殖することがわかった。細胞の接着形態は、ゼラチンハイドロゲルの硬さによって変化しなかった。発表では、ゼラチンハイドロゲルの硬さがサイトカインの産生に与える影響についても報告する。

2P-032-II

低密度バイオマテリアルの新規安全性評価法の検討

¹信州大学先鋭領域融合群バイオメディカル研究所, ²信州大学医学部運動機能学教室, ³信州大学大学院総合理工学研究科生命医工学専攻, ⁴信州大学医学部保健学科

○羽二生久夫^{1,2,3} (Haniu Hisao), 傍島 淳², 青木 薫⁴, 石田 悠^{1,3}, 上田勝也^{1,3}, 岡本正則², 加藤博之², 齋藤直人^{1,3,4}

【緒言】我々は多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を超高分子量ポリエチレン（UHMWPE）と複合させた MWCNT/UHMWPE の新規人工関節ライナーとしての開発を行っている。この MWCNT/UHMWPE は耐衝撃性と耐摩耗性の向上という相反する性能を有しているが摩耗「ゼロ」ではない。このため、この MWCNT/UHMWPE の摩耗粉の安全性を評価する必要がある。しかし、MWCNT/UHMWPE 複合材の中で多くを占める UHMWPE は低密度であり、粒子状では培養液中で浮いてしまい、これまで正確な安全性評価が行われてこなかった。そこで我々はまず低密度である UHMWPE 粒子に対する *in vitro* の新規の安全性評価法を検討した。

【実験】UHMWPE は SIGMA-ALDRICH 社から購入した粒径 40-48 μm で密度は 0.94 g/ml のものを使った。評価細胞はマウスマクロファージ様細胞である Raw264 細胞とした。ミリポア社のセルカルチャーインサート（Millicell®PCF 3 μm, P1TP01250）を 24 ウェル培養プレートにセットし、 2×10^5 /ml に調製した細胞を Millicell 内に 0.5 ml 加え、24 時間培養した。培養液を完全に除き、培養液で懸濁直後の高濃度と低濃度 UHMWPE 0.2 ml を Millicell 内に加えて 400 g、15 min 遠心し、培地を除去した。Millicell 内に培地 20 μl とウェル内に 200 μl を加えて細胞に UHMWPE が接した状態で 24 時間培養した。24 時間後に培養液を保存した上で全て除去し、アラマーブルー試薬を用いた細胞毒性試験を行った。さらに、細胞からトータル RNA を抽出し、IL-1β、IL-6、TNF の発現を測定した。評価方法の比較対象として Millicell を使わない暴露実験を行った。

【結果と考察】用いた UHMWPE は 10% FBS を含む培養液中で浮遊した。この培地で混和した UHMWPE をアラマーブルー法による細胞毒性試験で評価したところ、Millicell の有無に関わらず高暴露群でさえも細胞毒性はなかった。しかし、サイトカインの発現では Millicell を使って暴露した群では IL-1β 発現だけ濃度依存的な発現抑制が見られた。これらの結果は Millicell を使った暴露方法が低密度バイオマテリアルの新規安全性評価法として使える可能性を示している。

2P-033- II

再構築ヒト表皮モデル LabCyte を用いた皮膚刺激性試験動物実験代替法の性能検証

¹ 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部, ² 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

○加藤玲子¹ (Kato Reiko), 小森谷薫¹, 宮島敦子¹, アミシワタル², 加藤雅一², 畠中内子², 舘島由二¹

【緒言】現在、医療機器の刺激性は皮膚刺激性試験、皮内反応試験、眼刺激試験等により評価されているが、世界的に *in vitro* 動物代替法の開発・利用が推奨されている。昨年度、ISO/TC194/WG8 において、2 種類の再構築ヒト表皮(RhE)モデル(EpiDerm™ EPI-200 RhE モデル、SkinEthic™ RHE モデル)を用いた *in vitro* 皮膚刺激性試験法の性能を検証する国際ラウンドロビンスタディ(RRS)が行われ、その有用性が示された(日本バイオマテリアル学会シンポジウム:演題番号 2P-086)。一方、LabCyte EPI-MODEL24 は、化学物質を対象とした *in vitro* 皮膚刺激性試験である OECD TG439 に記載されている RhE モデルであるが、今回、医療機器の皮膚刺激性試験用にプロトコルを改変し、その性能を検証した。

【実験】被験物質としては、WG8 RRS において配布された 7 種類の標準品を使用した。試験液は、ISO 10993-12 に準拠し、生理食塩水(生食)及びゴマ油を用いて、37°C 下 72 時間抽出して作製した。抽出液を 18 時間暴露後、DPBS で十分洗浄し、後培養することなく、直ちに MTT 法を用いて細胞生存活性を測定した。陽性及び陰性対照として、それぞれ 1% SDS 及び DPBS を用いた。陰性対照の細胞生存率を 100% とし、陽性対照及び被験物質の生存率を算出し、生存率 50% 以下を刺激性有り と判定した。

【結果と考察】7 種の被験物質のうち、2 検体は生食及びゴマ油抽出液ともに刺激性陽性と判定された。1 検体は生食抽出液のみに明瞭な刺激性が確認されたが、3 検体は両抽出液ともに刺激性陰性と判定された。残りの 1 検体は抽出溶媒の種類に関わらず、判定に再現性が認められなかった。WG8 が実施した RRS において、ゴマ油抽出のみで刺激性陽性となる Heptanoic Acid 含有標準品は施設間で異なった判定結果が得られたことから、今回再現性が認められなかった検体は当該被験物質であることが推測され、試験系ではなく被験物の品質自体に問題があると考えられた。他 6 検体については、理論どおりの結果が再現性良く得られていることから、LabCyte EPI-MODEL24 を用いた試験系は医療機器の刺激性評価に利用できることが示唆された。

2P-034- II

中間水含有高分子の界面微細構造上における細胞接着挙動の直接観察

¹ 九州大学先導物質化学研究所, ² 山形大学有機材料システム研究推進本部

○村上大樹¹ (Murakami Daiki), 平井晴香¹, 田中 賢^{1,2}

Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) は優れた生体親和性を有することが知られている高分子材料である。我々はこれまでの研究から PMEA やその類似化合物は含水状態において通常観測される自由水、不凍水に加え、「中間水」と呼ばれる高分子鎖と緩やかに相互作用した水を有しており、この中間水がタンパク質吸着や細胞接着挙動に大きく関与していることを明らかにしてきた。^[1] 最近では原子間力顕微鏡観察を用いた高分子/水界面の構造解析を行い、中間水を有する生体親和性高分子に共通してナノメートルスケールの微細構造が界面に自発的に形成していることを発見した。^[2] この微細構造は界面における高分子と水のナノメートルスケールでの相分離によって生じていると考えている。さらに最新の研究ではこの微細構造の存在により界面においてナノメートルスケールでのタンパク質の吸着分布が生じることを明らかにし、さらにその温度応答性を利用して細胞接着挙動を制御することにも成功した。その細胞接着挙動との相関から機能性の培養基板としての応用も期待されている。

本研究ではこの界面微細構造と細胞接着挙動の関係をより詳細に検討することを目的とした。最新の原子間力顕微鏡を使用することで、培地中の生きた細胞を直接的に観察し、形態だけでなく粘弾性や相互作用の観点からも定量的に議論することが可能である。講演では中間水を有する高分子の微細構造上において細胞がどのように接着しているのか、さらに細胞種による違いやその原因について、ナノメートルスケールでの観察に基づいて報告する。さらにそれらの結果を通して界面における中間水の働きに関しても議論を行う。

[1] M. Tanaka et al. *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, **2010**, *21*, 1849.

[2] D. Murakami et al. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2016**, *2*, 2122.

2P-035- I

分子量の異なるタイコ酸模倣リン酸エステルポリマーのマクロファージ取込み能評価

¹関西大学化学生命工学部, ²関西大学大学院理工学研究科

○大高晋之¹ (Otaka Akihisa), 井上直之², 岩崎泰彦¹

【緒言】タイコ酸はグラム陽性菌に広く保存されている細胞膜構成物質の一つである。体内に侵入したグラム陽性菌は、マクロファージの細胞表面にあるパターン認識受容体 (toll-like receptor 2) がタイコ酸と結合することで、捕食対象として認識される。我々は、人工的に合成可能なポリリン酸エステル (PPEs) がタイコ酸と類似した構造を持つことから、合成高分子によって抗原提示を活性化するワクチン抗原-PPEs 複合体を開発している。マクロファージが分子を取込む際、接触分子の分子量が小胞形成能に影響を与えることから、PPEs の取込みを促進する上で至適分子量の探索が重要となる。そこで本研究は、分子量の異なる PPEs をマクロファージに接触させその取込み能を評価した。

【実験】既報に従い、エタノール開始剤濃度が異なる条件で環状リン酸モノマーを開環重合し、アルキン側鎖を持つ三種類 (長・中・短鎖) の PPEs を合成した。側鎖に導入したアルキンに、アジド化フルオレセインを環化付加反応させ蛍光標識 PPEs を作成した。マウス由来マクロファージ様細胞 (RAW264.7) に PPEs を 24 時間接触させた後、細胞数を測定して細胞毒性・増殖活性を評価した。蛍光標識 PPEs を 24 時間接触させた RAW264.7 の蛍光顕微鏡観察を行い、また同細胞を溶解した溶解液の蛍光強度から細胞あたりの PPEs 取込み量を定量した。

【結果と考察】合成した PPEs の分子サイズは長鎖 127、中鎖 85、短鎖 38 ユニットであり、またいずれの PPEs も添加濃度が 10 mg/mL 以下では RAW264.7 への細胞毒性が見られなかった。短鎖添加群においてのみ、PPEs 濃度 100 µg/mL の条件で有意な細胞増殖活性が見られた。つぎに蛍光標識 PPEs を 100 µg/mL 添加したところ、長鎖添加群で、最も多く PPEs を内包した小胞形成が観察された。24 時間接触後に取込まれた PPEs の分子の数は、長鎖添加群で細胞 1 個あたりに 12×10^7 、中鎖添加群で 9×10^7 、短鎖添加群で 4×10^7 であった。今回合成した分子量範囲では、PPEs 分子量の増加に伴ってマクロファージへの取込みが促進することがわかった。

2P-036- II

Epidermal growth factor enhances cellular uptake of polystyrene nanoparticles by clathrin-mediated endocytosis

¹Cellular functional nanomaterials group, research center for functional materials, National institute for materials science, ²Graduate school of advanced science and engineering, Waseda university

○Le Thi Minh Phuc^{1,2}, Akiyoshi Taniguchi^{1,2}

【Introduction】The interaction between nanoparticles (NPs) and cells has been studied extensively, but most research has focused on the effect of various nanoparticle characteristics, such as size, morphology, and surface charge, on the cellular uptake of NPs. In contrast, there have been very few studies to assess the influence of cellular factors, such as growth factor responses, on the cellular uptake efficiency of NPs. The aim of this study was to clarify the effects of epidermal growth factor (EGF) on the uptake efficiency of polystyrene nanoparticles (PS NPs) by A431 cells, a human carcinoma epithelial cell line which expressed high levels of EGF receptors (EGFRs)

【Experiment】A431 cells were exposed to 100 ng/ml of EGF with or without 50 nm PS NPs in 24 h. Cellular uptake efficiency of PS NPs by A431 cells and effect of inhibitors on uptake were determined by flow cytometry. Localization of NPs and EGFRs in cells was checked by using confocal laser scanning microscope (LSM510 META).

【Results and discussion】The results showed that EGF enhanced the uptake efficiency of A431 cells for PS NPs. In addition, inhibition and localization studies of PS NPs and EGFRs indicated that cellular uptake of PS NPs is related to the binding of EGF-EGFR complex and PS NPs. Different pathways are used to enter the cells depending on the presence or absence of EGF. In the presence of EGF, cellular uptake of PS NPs is via clathrin-mediated endocytosis, whereas, in the absence of EGF, uptake of PS NPs does not involve clathrin-mediated endocytosis. Our findings indicate that EGF enhances cellular uptake of PS NPs by clathrin-mediated endocytosis. This result could be important for developing safe nanoparticles and their safe use in medical applications.

2P-037-II

電荷を有する高分子基板上への細胞の初期接着挙動の細胞生物学的手法による再解析

¹山形大学有機材料システム研究推進本部, ²山形大学フロンティア有機材料システム創成フレックス大学院, ³物質・材料研究機構, ⁴京都大学化学研究所

○干場隆志^{1,2,3} (Hoshiba, Takashi), 吉川千晶³, 榊原圭太⁴

培養基板への細胞の接着は、細胞の増殖や生存、形態、分化など様々な機能を制御しているため、その制御は重要である。細胞の接着を促進するために、これまで様々な方法が開発されてきたが、培養基板を、電荷を有する高分子で被覆する方法もよく用いられている。従来は、細胞膜が帯びている電荷との静電的相互作用や、培養基板への接着性タンパク質の吸着が促進されることにより、細胞の接着が促進されると理解されてきた。一方で、細胞膜は負に帯電すると考えられているが、培養用ポリスチレンのような負電荷を有する高分子上でも細胞は無血清培地中で接着することができる。そのため、我々は電荷を有する高分子基板上への細胞の接着挙動の再解析が必要なのではないかと考えた。そこで、このような基板上への細胞の初期接着挙動の細胞生物学的手法を用いた再解析を試みた。本研究では、負電荷を有する高分子としてメタクリル酸(MA)共重合体、正電荷を有する高分子としてメタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチル(DMAEMA)共重合体を用い、未処理ポリスチレン(PSt)基板にキャスト法にて塗布し、培養基板を作製した。また、線維肉腫細胞株である HT-1080 および子宮頸がん細胞株である HeLa を用いて解析を行った。各細胞は血清培地中では DMAEMA>MA>PSt の順に多く細胞は接着した。一方、無血清培地中での各基板上への細胞接着は5分以内に生じていた。さらに細胞接着機構を確認するために、インテグリン依存的な細胞接着を阻害する EDTA を添加したところ、無血清培地中では細胞接着は抑制されなかった。血清培地中では、MA 上へ細胞接着は完全に阻害された一方、DMAEMA 上への接着は完全には阻害されなかった。この結果は血清培地中において、DMAEMA 上ではインテグリンを介在しない機構で細胞が接着していることを示唆している。さらに、Single Cell Force Spectroscopy により基板への細胞接着力を測定したところ、無血清培地中では、MA>DMAEMA>PSt の順に接着力は弱くなったが、血清培地中では DMAEMA>>MA、PSt と大きな違いが見られた。また、無血清培地中の方が血清培地中よりも細胞接着力は総じて大きかった。以上の結果は、電荷を有する高分子基板上への細胞の接着は従来考えられているよりも複雑であることを示唆している。発表にて詳細をさらに議論したい。

2P-038-II

ナノパターン基材上での間葉系幹細胞の増殖と抗炎症サイトカイン分泌

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所

○成田 萌 (Narita Moe), 田畑泰彦

【緒言】

間葉系幹細胞(MSC)は、体内移植時の炎症反応の制御に重要なトランスフォーミング増殖因子- β 1(TGF- β 1)やプロスタグランジン-2(PGE2)などの抗炎症性サイトカインを分泌することが知られている。この抗炎症性サイトカインが細胞治療効果に関わる重要な因子である。そこで、これらのサイトカインを分泌する能力を保持した MSC の培養方法が必要とされている。本研究では、ナノサイズで構造の異なるナノパターン基材を調製し、MSC からの抗炎症性サイトカイン分泌に与えるナノ構造の影響を調べた。

【実験】

表面に異なるサイズおよび形状のナノパターン構造をもつポリエチレンテレフタレートフィルム(東京応化工業株式会社から供与)を 1 cm×0.8 cm サイズに成形し、滅菌処理を行った。その後、ナノパターン基材上に脂肪組織由来ヒト間葉系幹細胞(Lonza) 2×10^4 個を播種した。培養開始 48 時間後に培養上清を回収し、ELISA キットにより PGE2 の産生量を評価した。界面活性剤を含む緩衝液によりナノパターン基材上の細胞を溶解した。DNA および BCA タンパク質アッセイ法により、得られた細胞溶解液中の細胞数およびタンパク質を定量した。また、ナノパターン基材上の培養細胞の形態を走査型電子顕微鏡(SEM)観察した。

【結果と考察】

ナノパターン構造の形およびサイズによって、MSC からの PGE2 産生量が異なっていた。また、各基材間における培養細胞数に違いは見られなかったが、タンパク質量については違いが認められた。このことは、基材の違いによって、細胞タンパク質産生量が増加している可能性を示唆している。ストライプ構造の幅が大きくなるとともに、細胞はストライプ構造に沿って伸展し、配向している様子が観察された。

2P-039- II

細胞低接着性コラーゲンを培養足場とした線維芽細胞スフェロイドの遺伝子発現量の変化

¹近畿大学生物理工学部, ²新田ゼラチン株式会社

○森本康一¹ (Morimoto Koichi), 國井沙織¹, 伊田寛之², 平岡陽介², 加藤暢宏¹

【緒言】線維芽細胞は結合組織中に存在し、コラーゲンなどを合成・分泌・分解することで周囲の微小環境を整え、さらに血管新生や幹細胞の分化に影響することが報告されている。線維芽細胞の機能を調べる培養では、細胞増殖の向上を目的として接着細胞用のプラスチック製培養皿が汎用されている。しかし、本法で培養した線維芽細胞の観察結果が生体内の形態と必ずしも一致するわけではない。例えば、培養した細胞の核は押しつぶされた形で、生体内で観察される卵形と異なる。一方、我々は細胞の接着能を低下させるコラーゲン (Low Adhesive Scaffold Collagen, LASC_{Col}) の開発に成功し、培養足場としての新しい性質を見いだしている。昨年度の本会では、LASC_{Col} を培養足場として線維芽細胞を培養し、形成した細胞凝集塊 (スフェロイド) の増殖能や細胞周期などを示した。本発表では、形成したスフェロイドの遺伝子発現量などを比較解析したので報告する。

【実験】ブタ真皮由来 I 型コラーゲンから LASC_{Col} を調製した (特許出願中)。LASC_{Col} を培養皿に固定化してマウス胎仔由来線維芽細胞株 (NIH/3T3) を播種し、形成したスフェロイドの形態を位相差顕微鏡と走査型電子顕微鏡で観察した。次にスフェロイドの細胞から mRNA を抽出し、線維芽細胞が分泌するタンパク質や細胞周期関連タンパク質などの遺伝子発現量を定量 RT-PCR 装置にて解析した。対照群は単層培養の NIH/3T3 細胞とした。

【結果と考察】播種した線維芽細胞は LASC_{Col} に弱く接着しながら能動的に移動し、細胞同士が接触・接着して互いに集まり始め、さらに数時間後にはスフェロイドが形成された。単層とスフェロイドの各細胞において、遺伝子発現量の差異が 2 倍以上あるものが複数見つかった。それら遺伝子には細胞機能に関するタンパク質も含まれていた。以上の結果より、線維芽細胞が LASC_{Col} 上で凝集するメカニズムは未だ不明だが、LASC_{Col} は細胞の機能を変化させるダイナミックなバイオマテリアルとして有望である。

【謝辞】本発表内容は、JST A-STEP シーズ育成タイプの研究支援で得られた成果である。

2P-040- I

フィブロネクチン由来ペプチドの固定化による ePTFE 表面の細胞機能化

¹関西大学化学生命工学部, ²関西大学科学技術先端機構

○西岡 悟¹ (Nishioka Satoru), 平野義明^{1,2}, 柿木佐知朗^{1,2}

【緒言】延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)は、超撥水性に基づく優れた抗血栓性を示すことから、小口径人工血管に臨床利用されている。しかし、ePTFE には血小板のみならず血管内皮細胞や結合組織も接着しないことが、内膜再生不全による閉塞やカプセル化に伴う感染症などの合併症の原因と考えられている。これまで、細胞接着性ペプチドの修飾による ePTFE 表面の細胞機能化は多く検討されてきたが、脱フッ素化剤や長鎖アルキル化合物を用いるなど、いずれも人工血管の機能化に利用できるものではない。本研究では、アミノ酸であるチロシンを酸化することで生じるキノンを利用した ePTFE へのフィブロネクチン由来 Leu-Asp-Val (LDV) ペプチドの直接固定による細胞機能化を検討する。

【実験】 Fmoc 固相法で合成した 3 種類のペプチド、Ac-YG₃LDV (Y-LDV), Ac-(YK)₃-G₃LDV (YK-LDV) および Ac-(YE)₃-G₃LDV (YE-LDV) の水溶液 (1.0 mM) に ePTFE フィルム (φ15 mm) を浸漬し、CuCl₂ (0.05 当量) と H₂O₂ (4.4 当量) を添加後、遮光して 50°C で 24 時間反応させた。反応後の ePTFE フィルムを純水で洗浄し、水接触角および X 線光電子分光 (XPS) で表面を分析した。さらに、LDV ペプチドを固定化した ePTFE フィルム上にヒト臍帯血静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を播種し、細胞の接着形態や接着数を評価した。

【結果と考察】反応後の ePTFE フィルムの水接触角は、Y-LDV が約 110°, YK-LDV が約 90° となり、反応前 (130°) と比べて有意に減少した。XPS 測定では、全てのペプチドにおいて反応後の ePTFE フィルム表面にペプチド由来の N1s ピークが検出され、かつその傾向は YK-LDV でもっとも顕著であった。表面解析の結果、全てのペプチドが ePTFE に固定化されたこと、さらにその固定量が YK-LDV で最も大きいことが示唆された。さらに HUVEC は、YK-LDV を固定化した ePTFE 表面に最も多く伸展しつつ接着した。アンカー部分のチロシンにリジン残基を隣接させた YK-LDV は、最も固定量が多く、かつ抗血栓性と血管内皮細胞接着性を兼備した人工血管として理想的な表面を構築できることが示唆された。

【謝辞】本研究の遂行に際して御助言賜りました、国立循環器病研究センター研究所生体医工学部 山岡哲二 先生に御礼申し上げます。

2P-041-IV

代替可塑剤を利用した non-DEHP 血液バッグの SAGM 加赤血球濃厚液保存能評価

¹国立医薬品食品衛生研究所, ²東京大学医学部附属病院, ³川澄化学工業, ⁴新日本理化

○野村祐介¹ (Nomura Yusuke), 福井千恵¹, 森下裕貴¹, 河上強志¹, 池田敏之², 向井智和³, 柚場俊康³, 稲村健一³, 山岡久時³, 宮崎謙一⁴, 岡崎 仁², 靄島由二¹

【緒言】DEHP はポリ塩化ビニル (PVC) 製医療機器の代表的可塑剤であるが、リスク回避の観点から各国において規制が強化され、代替可塑剤又は非 PVC 製品の使用が推奨されている。一方、血液バッグについては、DEHP が溶血抑制能を発揮することから、その使用が例外的に認められている。近年、我々は DEHP と比較して生物学的安全性の高いサンソサイザー-DOTH/DL9TH 及び DOTH/DINCH を配合した PVC シートが、DEHP 配合 PVC シートと同等の溶血抑制能を有すると共に、前者のシートは優れた耐寒性を示すことを見出した (日本バイオマテリアル学会 2015, 2016)。本研究では、既存製品より高い安全性と同等以上の性能を有する新規 non-DEHP 血液バッグの開発を目指し、DOTH/DL9TH-及び DOTH/DINCH-PVC 製血液 4 連バッグを作製し、海外で使用されている SAGM 加赤血球濃厚液 (SAGM/RCC) の保存能に関わるフィージビリティ試験を実施した。

【実験】ボランティア 18 名から、DEHP (50 parts/100 parts PVC, w/w) -PVC 製、DOTH/DINCH (22.7:30 parts/100 parts PVC, w/w) -PVC 製及び DOTH/DL9TH (22.7:30 parts/100 parts PVC, w/w) -PVC 製血液 4 連バッグに各 400 mL 採血した (n=6群)。常法に従って SAGM/RCC を調製し、4°C で 6 週間保存した。経週的に SAGM/RCC を採取し、可塑剤濃度の測定、赤血球浸透圧脆弱性試験及び血液生化学的検査に供した。

【結果と考察】海外における SAGM/RCC の使用期限内 (42 日) において、DOTH/DL9TH-PVC 及び DOTH/DINCH-PVC 製バッグは DEHP-PVC 製バッグと同等の総可塑剤溶出量及び赤血球浸透圧脆弱性を示した。また、各 SAGM/RCC のヘマトクリット、赤血球数、総蛋白質、アルブミン、グロブリン、ヘモグロビン、グルコース、ATP、2,3-DPG、アンモニア、リン、ナトリウム、カリウム、クロール、マグネシウム、カルシウム等の経時的推移に、バッグ間で有意差は認められなかった。これらの成績から、DOTH/DL9TH-PVC 及び DOTH/DINCH-PVC 製バッグは新規 non-DEHP 血液バッグ候補として有望であった。特に、優れた耐寒性を有する DOTH/DL9TH-PVC 製バッグは従来の製品を越える性能を発揮すると考えられる。

2P-042-IV

代替可塑剤を利用した non-DEHP 血液バッグの MAP 加赤血球濃厚液保存能評価

¹国立医薬品食品衛生研究所, ²東京大学医学部附属病院, ³川澄化学工業, ⁴新日本理化

○森下裕貴¹ (Morishita Yuki), 福井千恵¹, 野村祐介¹, 河上強志¹, 池田敏之², 向井智和³, 柚場俊康³, 稲村健一³, 山岡久時³, 宮崎謙一⁴, 岡崎 仁², 靄島由二¹

【緒言】ポリ塩化ビニル (PVC) 製医療機器の代表的可塑剤である DEHP は、生殖発生毒性への懸念から、世界的に規制が強化され、代替可塑剤又は非 PVC 製品の使用が推奨されている。一方、DEHP は溶血抑制能を発揮することから、血液バッグへの使用は認められているが、近年、我々は DEHP と比較して遙かに生物学的安全性の高いサンソサイザー-DOTH/DL9TH 及び DOTH/DINCH を配合した PVC シートが、DEHP 配合 PVC シートと同等の溶血抑制能を有すると共に、前者のシートは優れた耐寒性を示すことを見出した。本研究では、既存製品より高い安全性と同等以上の性能を有する新規 non-DEHP 血液バッグの開発を目指し、DOTH/DL9TH-及び DOTH/DINCH-PVC 製血液 4 連バッグを作製し、MAP 加赤血球濃厚液 (MAP/RCC) の保存能に関わるフィージビリティ試験を実施した。

【実験】ボランティア 18 名から、DEHP (55 parts/100 parts PVC, w/w) -PVC 製、DOTH/DINCH (25:33 parts/100 parts PVC, w/w) -PVC 製及び DOTH/DL9TH (25:33 parts/100 parts PVC, w/w) -PVC 製血液 4 連バッグに各 400mL 採血した (n=6群)。常法に従って MAP/RCC を調製し、4°C で 6 週間保存した。経週的に MAP/RCC を採取し、可塑剤溶出量の測定、溶血性試験、赤血球浸透圧脆弱性試験及び血液生化学的検査に供した。

【結果と考察】本国における MAP/RCC の使用期限内 (21 日) において、DOTH/DL9TH-PVC 及び DOTH/DINCH-PVC 製バッグは DEHP-PVC 製バッグと同等の総可塑剤溶出量、溶血率及び赤血球浸透圧脆弱性を示した。また、各 MAP/RCC のヘマトクリット、赤血球数、総蛋白質、アルブミン、グロブリン、ヘモグロビン、グルコース、ATP、2,3-DPG、アンモニア、リン、ナトリウム、カリウム、クロール、マグネシウム、カルシウム等の経時的推移に、バッグ間で有意差は認められなかった。これらの成績から、DOTH/DL9TH-PVC 及び DOTH/DINCH-PVC 製バッグは新規 non-DEHP 血液バッグ候補として有望であった。特に、優れた耐寒性を有する DOTH/DL9TH-PVC 製バッグは従来の製品を越える性能を発揮すると考えられる。

2P-043-IV

開放実験系及び閉鎖型拍動循環回路による血液適合性評価マーカの性能検証

¹国立医薬品食品衛生研究所, ²東京大学, ³早稲田大学, ⁴九州大学

○葩島由二¹ (Haishima Yuji), 橋井則貴¹, 井上祐貴², 鮫島 啓³, 松橋祐輝³, 保延慶紀³, 福井千恵¹, 戸井田瞳¹, 野村祐介¹, 森下裕貴¹, 平井晴香⁴, 小林慎吾⁴, 田中 賢⁴, 岩崎清隆³, 石原一彦²

【緒言】生体内に埋植した医用材料は吸着蛋白質層を介して細胞・組織と相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与する。近年、我々は材料表面への蛋白質吸着挙動から医用材料の血液適合性を評価できる可能性を多変量プロテオミクス解析により見出した。本研究では、現在までに選定したマーカ候補の有用性を検証する一環として、新たに合成した高分子材料への血漿蛋白質吸着挙動を従来法である開放実験系並びに閉鎖型拍動循環血液回路を用いて解析し、両実験系で得られる成績を比較検討した。

【実験】開放実験系では、中間水量が異なる新規高分子 (PBuEA, PMC3A, PEt2A, PEt2MA, PMC6A, PEtEA, PEA, PBuA, PEtEMA)、PHEMA 及びPMEA (陰性対照) を各々コーティングした PC シートを 37°C 下 1 時間ヒト血漿に浸漬した。閉鎖実験系では、拍動ポンプを組み込んだ内容量 55 mL の閉鎖型回路の内面を PMPC (陰性対照)、PMEA (陰性対照)、PEA (中間水不含) で各々コーティングし、ヒト血液を充填後、平均血液流量 100 mL/min、平均圧力 70 mmHg で 37°C 下 1 時間循環させた。シート又は回路内面の吸着蛋白質は、それぞれ PBS 洗浄後、M-PER 試薬を用いて回収した。得られた蛋白質試料は、常法に従って、LC-MS/MS ショットガン解析並びに多変量解析に供した。

【結果と考察】各 PC シート表面に吸着する血漿蛋白質の多変量プロテオミクス解析を行った結果、VTNC は従来の評価同様、擬陽性及び擬陰性と判定される材料が存在しなかった。PHEMA への VTNC 吸着量は比較的低値であったが、PHEMA と PMEA の血液適合性の差異は C3 吸着量を指標として明確に判定できることが確認された。C3 は PBuA、C1s は PHEMA がそれぞれ偽陰性と判定される結果が得られたが、その他の材料については中間水量と相関して吸着量が増減したことから、VTNC を 1 次マーカ、C3 及び C1s を 2 次マーカとして総合的に評価することにより、高分子材料の血液適合性を判定できることが確認された。閉鎖型回路内面への VTNC 及び C3 吸着量は PMPC=PMEA<PEA の順であったことから、これらのマーカ候補の有用性は閉鎖実験系でも検証された。

2P-044-IV

医療用プラスチック製品の各種可塑剤に対する炎症誘導能評価法の再現性・頑健性評価

¹東京大学大学院工学系研究科, ²国立医薬品食品衛生研究所, ³化合物安全性研究所, ⁴ニプロ, ⁵Ig-M, ⁶食品薬品安全センター, ⁷東京大学大学院医学系研究科

○藤澤彩乃¹ (Fujisawa Ayano), 福井千恵², 野村祐介², 森下裕貴², 奥村佳奈子³, 加藤洋一⁴, 秦 信子⁵, 古谷真美⁶, 渡辺美香⁶, 鄭 雄一⁷, 葩島由二²

【背景】軟質ポリ塩化ビニル (PVC) は柔軟性、化学的安定性、耐久性等に優れ、医療の場で広く用いられている。PVC 製品の代表的な可塑剤である Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) は、齧歯類に対する雄性生殖毒性に加えて、炎症誘導能も示すことが近年報告された。我々は、ヒト新鮮血を用いた炎症誘導能評価法 (Human Cell-based Pyrogen Test) を用いて、可塑剤が種類に応じて異なる炎症惹起性を示すことを明らかにした。本研究では、当該評価法の再現性・頑健性を評価するために、ラウンドロビン (RR) テストを実施した。

【実験】RR テストは日本医療機器テクノロジー協会及び安全性試験受託研究機関協議会を通じて参画機関を公募し、4 試験施設において実施した。検体は、DEHP、Acetyl tributyl citrate (ATBC)、創傷被覆材 2 種及び精製 LPS (陽性対照)、ウシ胎児血清 (FBS、陰性対照及び溶媒) を配布し、統一プロトコルに従って試験を行った。可塑剤は FBS 分散液として、創傷被覆剤は直接法により試験に供した。試験施設毎に倫理審査の承認を取得して採取したヒト新鮮血を RPMI-1640 培地で 9 倍希釈後、試験液 (終濃度 10%) と混和し、24 時間共培養した。培養上清中の IL-6 濃度は ELISA 法で測定した。

【結果と考察】LPS に対する反応性は全ての試験施設、供血者において同程度であった。創傷被覆材に対する反応性は、1 試験施設で高値を示した他は類似の結果が得られ、全ての試験施設において 2 種の材料間の炎症誘導能の傾向は同一であった。FBS への反応性は供血者毎に異なり、DEHP、ATBC への反応性は FBS への反応性に準じて全例が同一の傾向を示した。以上より当該評価法の再現性が高いことが示されたが、頑健性に関しては、試験施設毎に可塑剤試料に対する反応の鋭敏度が異なる結果が得られた。陽性対照ではこの差異はほぼ見られなかったため、可塑剤の分散効率に関与している可能性が高い。今後、可塑剤分散に関するプロトコルを検討すると共に、適切な指標を用いて分散効率を担保することで、より精度の良い試験法として改良できると考えられる。

2P-045-IV

開放系及び空気非接触/拍動循環型閉鎖系回路による血液適合性試験の比較

¹ 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部, ² 東京大学大学院工学系研究科, ³ 早稲田大学理工学術院先進理工学研究科, ⁴ 九州大学先端物質化学研究所

○宮島敦子¹ (Miyajima Atsuko), 小森谷薫¹, 比留間瞳¹, 加藤玲子¹, 井上祐貴², 鮫島 啓³, 松橋祐輝³, 保延慶紀³, 平井晴香⁴, 小林慎吾⁴, 田中 賢⁴, 岩崎清隆³, 石原一彦², 靄島由二¹

【緒言】医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、血液に接触する製品については血液適合性試験が要求される。本邦では厚生労働省通知において、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系に関する標準的な評価項目が示されているが、具体的方法が記載されている試験法は溶血性試験のみである。本研究では、中間水量の異なる9種類の新規高分子材料を対象として、*in vitro* 開放系による血液適合性試験を実施した。また、空気非接触拍動循環閉鎖系回路により血液適合性試験を実施し、評価マーカの挙動について比較検討した。

【実験】開放系による血液適合性試験は、被験高分子材料を両面コートしたPCシート2枚(直径34 mm)をヒト血液6 mLに37°C下1時間浸漬・振とうして行った。閉鎖実験系では、拍動ポンプを組み込んだ内容量55 mLの閉鎖系回路の内面を被験高分子材料で各々コーティングし、ヒト血液を充填後、平均血液流量100 mL/min、平均圧力70 mmHgで37°C下1時間循環させた。インキュベーション又は循環終了後、血液をサンプリングし、評価項目毎に処理を行った。血液凝固系因子(TAT)及び血小板系因子(β-TG、PF4)は、それぞれELISA法により測定した。

【結果と考察】被験シートを用いて開放系による血液適合性試験を行った結果、9種類の高分子材料はTAT、β-TG及びPF4の変動値を指標として3群(血液適合性良好、中程度、不良)に分類された。PMEA(良好群)、PEA(不良群)又はPMPC(陰性対照)を各々内面コーティングした閉鎖系回路を用いて、血液適合性試験を行った結果、開放実験系同様、各評価マーカはPEA>PMPC>PMEAの順で高値を示した。開放系と閉鎖系の評価マーカ値を比較した結果、いずれも開放系の値が高く、TATで平均2.2倍、β-TGで2.7倍、PF4で4.2倍であった。開放実験系では0時間に比べて、シート非浸漬の対照群でもβ-TG、PF4の値が大きく上昇していたことから、両実験系における評価マーカ値の差異は空気接触に伴う血小板活性化度の相違に由来すると考えられた。

2P-046-I

血管内治療デバイスへの応用に向けたフッ素添加ダイヤモンドライクカーボン膜の評価

¹ お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科, ² 東京大学医学部附属病院輸血部, ³ 慶應義塾大学大学院理工学研究科, ⁴ 東海大学医学部附属八王子病院放射線科, ⁵ 東京大学医科学研究所附属病院脳腫瘍外科, ⁶ 日本赤十字社血液事業本部

○堀川あゆみ^{1,2} (Horikawa Ayumi), 長谷部光泉^{3,4}, 前川駿人³, 田中 実⁵, 鈴木哲也³, 高橋孝喜⁶

【緒言】

フッ素添加ダイヤモンドライクカーボン(F-DLC)膜は血小板接着を抑制することが知られているが、その炎症性については明らかになっていない。血小板を用いた抗血栓性の評価に加え、白血球、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた生体適合性評価を実施する。

【実験】

F-DLC膜をstainless steel(SUS)上にコーティングした。SUSとF-DLCコーティングしたSUSに、血小板、白血球およびHUVECを接触させ、各細胞の接着数を測定した。また、血小板上のCD62Pの発現および白血球とHUVECから産生されるサイトカインを測定した。

【結果と考察】

F-DLC膜コーティングにより、SUS上の血小板接着数が減少し、血小板活性化マーカーであるCD62Pの発現が抑制された。また、F-DLC膜では白血球接着数も減少し、白血球からのIL-8の産生増加およびHUVECからの抗炎症性サイトカインIL-10の産生増加が認められた。HUVECはSUSと比べて少ないながらもF-DLC膜に接着し、増殖することを確認した。

F-DLC膜コーティングは血小板接着を抑制するだけでなく、活性化も抑制することで抗血栓性を示すことを明らかにした。また白血球接着を抑制すると同時に、IL-10産生を増加させており、炎症反応を誘引しづらい材料であることが明らかになった。HUVECの接着・増殖も起きるため、血管内留置用のバイオマテリアルとしての有用性が示された。

2P-047- II

多糖のゾル-ゲル転移を利用した温度応答性マイクロ粒子の開発

東京農工大学大学院工学府応用化学専攻

○佐藤拓未 (Sato Takumi), 高見 拓, 村上義彦

【緒言】薬物治療においては、必要最小量の薬物が標的部位に送達され、その効果を発現することが理想である。そこで、薬物を保持したキャリアの体内動態を精密にコントロールするドラッグデリバリーシステムが広く研究されている。薬物キャリアの素材として利用可能な多糖の一部は、固有の温度において、ゲルからゾル、ゾルからゲルに状態変化する現象（ゾル-ゲル転移）を示す。この現象を利用し、親水性物質が溶解した多糖水溶液と、界面活性剤が溶解した有機溶媒から調製した w/o エマルションを冷却することによって、分散相である多糖液滴のゲル化によって粒子が得られると考えられる。本研究では、多糖のゾル-ゲル転移挙動を制御することによって、温度に応答し薬物を放出するマイクロ粒子の開発を目的とした。

【実験】カチオン共存・非共存下において多糖 (κ -カラギーナン) を 95°C の純水に溶解し、冷却することによってゲルを形成した。得られたゲルを用いて、多糖のゾル-ゲル転移温度を示差走査熱量計 (DSC) によって測定した。80°C で静置することによってゾル状態にした多糖ゲル (0.3 g) をトルエン (10 mL, 各種界面活性剤を含む) と混合し、80°C において攪拌することによって w/o エマルションを調製した。得られた w/o エマルションを氷浴中で冷却し、粒子分散液を調製した。得られた粒子分散液および自然乾燥によって得られた粒子を、光学顕微鏡および SEM によってそれぞれ観察した。

【結果と考察】DSC 測定によって、多糖濃度とカチオン濃度によって多糖のゾル-ゲル転移挙動を制御できる可能性が示された。また、界面活性剤として poly(ethylene glycol)-*b*-poly(ϵ -caprolactone) (PEG-*b*-PCL, PEG M_n : 3,500, PCL M_n : 6,000) を用いた場合に w/o エマルションが形成し、その安定性がカチオンの添加によって向上する傾向が見られた。w/o エマルションの形成は、適切な構造および HLB 値を有する界面活性剤の使用が重要であることが示唆された。さらに、粒子分散液の自然乾燥で得られた粒子を SEM で観察することによって、w/o エマルションの形状が粒子の形状に寄与する可能性が示された。今後は得られた粒子の精製を検討する予定である。

2P-048- I

チミン含有両親媒性ブロック共重合体を用いた ATP 応答性ナノ集合体の調製

¹関西大化学生命工, ²関西大 ORDIST

○河村暁文^{1,2} (Kawamura Akifumi), 土谷 平¹, 宮田隆志^{1,2}

【緒言】細胞内のアデノシン三リン酸 (ATP) とアデノシン二リン酸 (ADP) の比は一定に保たれているが、細胞へのストレスによりその比が変化する。そのため、細胞内 ATP/ADP 比の変化を認識して応答する材料は、細胞ストレスを感知する新規なバイオマテリアルとして期待されている。しかし、既存の細胞内 ATP 濃度の測定法は細胞を破碎する必要があるため、生細胞内の ATP 濃度を可視化できる技術が必要とされている。そこで本研究では、生細胞内の ATP 濃度を可視化するイメージング材料の創製を目的として、原子移動ラジカル重合 (ATRP) により、側鎖にチミンを有する両親媒性ブロック共重合体を合成した。また、得られたブロック共重合体を用いてナノ集合体を調製し、その ATP 応答挙動について検討した。

【実験】側鎖にチミンを有する疎水性モノマーである vinylbenzyl thymine (VBT) を合成した。次に、ATRP により oligo(ethylene glycol)methacrylate (OEGMA) を重合することで POEGMA マクロイニシエーターを合成した。続いて、ATRP により POEGMA マクロイニシエーターから VBT を重合することで POEGMA-*b*-PVBT を合成した。得られた POEGMA-*b*-PVBT を透析法によりナノ集合体形成させた。動的光散乱法により、さまざまな ATP および ADP 濃度におけるナノ集合体の粒径を測定し、ナノ集合体の応答挙動を評価した。

【結果と考察】ATRP により合成した POEGMA-*b*-PVBT を透析法により自己集合させたところ、約 140 nm のナノ集合体を得られた。得られたナノ集合体分散液に ATP を添加したところ、ATP 濃度の増加にもなってナノ集合体の粒径が増加した。一方、ADP もしくは ATP と ADP の混合物 (ATP/ADP = 1/1 (mol/mol)) を添加したところ、ナノ集合体の粒径はあまり増加しなかった。水素結合によりナノ集合体中の PVBT ブロックのチミンに ATP や ADP が結合すると、PVBT ブロックの親水性が増加すると推察される。また、ADP と比較して ATP は親水性が高いため PVBT ブロックの親水性がより増加し、ナノ集合体の粒径が大きく増加したと推察される。以上の結果から、調製したナノ集合体は ATP に応答して大きく粒径が増加するため、ATP 濃度に応答した新規なバイオマテリアルへの応用が期待できる。

2P-049- II

ナノ構造体シリカからの薬剤徐放挙動と生体適合性の評価

¹北海道大学大学院歯学研究院, ²北海道大学大学院歯学院, ³北海道大学病院, ⁴北海道大学大学院歯学研究科
○阿部薫明^{1,2} (Abe Shigeaki), 中西 康^{1,3}, 坂東洋祐⁴, 成徳英理⁴, 江良裕子⁴, 飯田順一郎^{1,2}, 佐野英彦^{1,2}, 吉田靖弘^{1,2}

【緒言】

ミュータンスレンサ球菌 (*S. mutans*) を始めとする齶蝕原生菌は飲食物に含まれる糖類を原料として乳酸を産生し、歯質を脱灰する。この酸産生能は細菌数に比例する。つまり口腔内の *S. mutans* などの齶蝕原生菌を減らすことが、齶蝕の発生抑制に繋がる。現在、抗菌作用を発揮するマウスウォッシュが市販されているが、一時的には細菌数が減少するが、全ての菌をなくすことは困難である。最近増殖の制御には、抗菌効果の持続的な発現が必要とされる。そこで我々は、カチオン性分子の吸着・放出能を有するメソポーラスシリカ (MPS) に着目し、その生体適合性と MPS 含有歯科材料の抗菌剤徐放能の評価を行った。

【実験】

サイズの異なる、各種 MPS (Sigma-Aldrich 社)/PBS 懸濁液を HeLa 細胞へと様々な濃度で曝露し、細胞活性を評価した。また MPS と歯科用ガラスイオノマーセメント (GIC, GC 社) とを練和し、試料片 ($\phi = 10 \text{ mm}$, $h = 1 \text{ mm}$) を作成した。得られた試験片をカチオン性蛍光色素、若しくは抗菌剤水溶液へと浸漬した後、蒸留水へと浸漬、24 時間毎に上澄み液への溶出量を吸光度測定により検出した。また、上記試料存在下で *S. mutans* を培養し、濁度測定・SEM 観察により、抗菌剤徐放能の評価を行った。

【結果と考察】

今回の検討条件では、MPS のサイズ・濃度に依存した細胞活性の低下、形態的变化は見られなかった。GIC に含有した MPS からのカチオン性分子の放出挙動を経時的に追跡したところ、1 週間以上に渡るカチオン分子の徐放が確認され、コントロール試料 (MPS 0%) との有意な差が認められた。また、抗菌剤を充填した MPS 含有 GIC 存在下で *S. mutans* を培養した場合、試料表面から *S. mutans* は殆ど観察されず、コントロール試料とは顕著な差異が見られた。これらの結果は、今回用いた MPS が高い生体親和性と薬剤徐放能を持つ事を示唆している。

2P-050- II

細胞内環境応答性ペプチドナノファイバーを用いた抗原デリバリーシステムの開発

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

○和久友則 (Waku Tomonori), 小枝清花, 渋谷忠杜, 田中直毅

【緒言】従来のがん治療法と比較して、副作用が少ないことからペプチドワクチン療法に注目が集まっている。高効率な免疫誘導には細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化が重要であり、そのためには抗原が主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class I 分子を介して抗原提示される必要がある。しかしながら通常、外来性抗原はエンドサイトーシス経路で取り込まれた後、MHC class II 分子を介してヘルパー T 細胞に提示される。従って、MHC class I 経路での提示を効率化するための抗原デリバリーシステムの開発が求められている。我々は β -シートペプチドナノファイバーに着目し、これを用いた抗原デリバリーシステムの開発に取り組んでいる。これまでに線維形成配列 (FVIFLD) に抗原配列 (SIINFEKL) および親水性配列 (オリゴエチレングリコール) を導入したペプチドを合成し、その自己組織化による抗原担持ペプチドナノファイバー (NFs) の作製及びその細胞内取り込みに成功した。しかしながら、NFs を作用させた樹状細胞による MHC class I 分子を介した抗原提示の効率は低いという問題点があった。これは、細胞内に取り込まれた後も、NFs が安定な構造を取っているため、プロセッシングによる抗原ペプチドの遊離が困難であったことが原因の一つとして考えられる。そこで、ヒスチジン (His) を線維形成配列に導入した細胞内環境応答性ペプチドナノファイバーを新たに設計することで、この問題点を解決することを本研究の目的とする。エンドソーム内 pH 環境下における His のプロトン化によるナノファイバーの解離に加えて、プロトンスポンジ効果によるエンドソーム脱出の促進が期待される。

【実験】His を付加した線維形成配列 (HHFVIFLDH) をもつビルディングブロックペプチドを Fmoc 固相合成法により合成し、このペプチドを pH 7.4 の McIlvaine 緩衝液中で 80°C、1 h 加熱することで NFs を作製した。JAWS II 細胞と NFs を 24 h 共存させた後、MHC class I 分子を介した抗原提示量を免疫染色により定量的に評価した。

【結果と考察】作製した NFs を作用させた JAWS II 細胞による抗原提示量を評価した。His 未導入の NFs を作用させた樹状細胞は、未処理の場合とほぼ変わらない蛍光強度を示したのに対して、His 導入 NFs では、蛍光強度の顕著な増加がみられた。以上より、His 導入により、MHC class I 分子を介した抗原提示の効率が改善されることが明らかになった。

2P-051-II

化合物ライブラリーおよび天然物を基にした新奇性が高い光機能性分子の開発

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○影近弘之 (Kagechika Hiroyuki), 平野智也

【緒言】

光照射によって蛍光、化学反応が起こる光機能性分子は、特定の生体内分子、疾患組織の局在を解析するイメージング、疾患組織に限局した治療薬の光放出を可能とする DDS の基盤となる。光機能性分子の開発においては、既存の分子の誘導体化や蛍光制御機構を基にした論理的分子設計法がこれまで汎用されてきたが、開発される分子の機能は類似することが多く、新奇性が高い機能、構造要素を得ることは困難である。我々はこうした分子の開発には、効率的な合成または植物等に由来する天然物により構築されるライブラリーからの探索による開発が有用だと考えた。

【実験】

我々は蛍光物質クマリンを母核として構築した化合物ライブラリーから、pH の変化に伴い、蛍光が OFF-ON-OFF と二相的に変化することで特定の pH 領域を検出するセンサー、溶媒の粘性変化を蛍光波長の変化により検出するセンサーを得た。さらにニガキ科の植物からは数種の蛍光性天然物を単離、同定した。今回、これらの誘導体合成と蛍光特性の解析から、各機能に必要な構造要素を解明し、さらに有用な光機能性分子の開発を目指した。

【結果と考察】

特定の pH 領域を検出する蛍光センサーにおいては、機能に必要な二つの水酸基を様々な蛍光団に導入することにより長波長化、強蛍光などの改良、適切な官能基の導入により測定する pH 領域の調整を行ったセンサー群を得ることに成功した。中でも pH6 付近の環境を選択的に検出するセンサーは、癌イメージング、エンドサイトーシス過程の解析に応用できる有用なセンサーとなる。粘性変化を検出するセンサーにおいても、長波長化、検出する粘性領域の調整した分子を得た。蛍光性天然物においては、共通する構造の誘導体群の合成と機能解析から、溶媒の極性に伴い、二波長の蛍光強度比が大きく変化する分子などを得ることに成功した。これらの分子の持つ特定の環境下での蛍光発光は、選択的な光分解反応性へと変換可能であるため、光を利用した DDS への展開も行っている。

2P-052-I

傾斜機能型ナノハイブリッドチタン上における間葉系幹細胞の影響

¹愛知学院大学歯学部有床義歯学講座, ²岩手医科大学歯学部補綴・インプラント学講座, ³岩手医科大学生化学講座細胞情報科学分野

○武部 純¹ (Takebe Jun), 横田 潤², 秦 正樹¹, 青柳敦士¹, 松川良平¹, 帖佐直幸³, 石崎 明³

【緒言】口腔インプラントの表面性状は、埋入後の初期安定性と二次安定性に重要な因子である。演者らは、チタンインプラントの生体適合性向上による二次安定性の早期獲得を目的として、純チタン (Ti) 表面に陽極酸化・水熱処理 (SA 処理) を施すことで形成された“傾斜機能型ナノハイブリッドチタン”の検討を行い、臨床への有用性を報告してきた。一方、骨組織が減少した骨-インプラント界面部における早期のインテグレーション獲得を目指した治療戦略としては、骨再生に有効な間葉系幹細胞 (MSC) を移植する方法が有効であると考えられる。そこで、本研究では、Ti インプラント表面への SA 処理の効果が MSC へ与える影響を検索することを目的として、SATi 上における MSC の分化能を評価した。

【実験】Ti ディスクを電解質溶液中 (β-GP, CA) にて放電陽極酸化処理を施したもの (AOTi) と、その後に水熱処理を施したもの (SATi) を用いた。1)各試料表面は、接触角測定および表面自由エネルギー測定によるぬれ性に関する表面性状を分析した。2)GFP マウスの骨髄から樹立した MSC 株を各試料上に播種し、培養 28 日後に RT-PCR 法による骨分化マーカー遺伝子の mRNA 発現量を解析した。

【結果と考察】1)ぬれ接触角測定では、400ms にて AOTi では 23.3 ± 12.6 度を示したが、SATi チタンでは 0 度を示した。表面自由エネルギーは、17ms にて AOTi では 62.8 ± 1.6 mJ/m² を示したが、SATi では 69.2 ± 2.3 mJ/m² と有意差を認めた。2) 遺伝子発現量解析では、Ti と比較して AOTi, SATi では培養 28 日後において ALP, RUNX2 の mRNA 発現量が有意に増加した。一方、OSTERIX, OCN は培養 28 日後の SATi において有意に増加した。演者らは、SATi 表面上に形成される HA は高結晶構造体、陽極酸化被膜はナノ構造体であることを報告してきた。さらに、本結果より SATi 表面上ではぬれ性と表面自由エネルギーが高いことが確認された。従って、これらの SATi 表面特性により MSC の細胞内シグナル伝達経路を介して骨分化マーカーが促進されたと考えられる。本研究より、傾斜機能型ナノハイブリッドチタンの微細形状と物理化学的性状は MSC の骨原性細胞への分化誘導能を促進させる可能性が示唆された。

2P-053-III

ナノ秒パルスレーザー照射ジルコニアの骨適合性

¹鶴見大学歯学部歯科理工学講座, ²東北大学大学院工学研究科, ³東北大学大学院医工学研究科

○廣田正嗣¹ (Masatsugu Hirota), 原井智広², 水谷正義², 厨川常元³, 早川 徹¹

【緒言】 正方晶部分安定化ジルコニア多結晶体(TZP)は、室温で白色、高強度であり、歯科材料として注目を集めている。近年では、インプラント(人工歯根)としての臨床応用が始まっているが、骨適合性については未だ不明な点が多い。さらに TZP は機械加工が困難であるという欠点が指摘されている。本研究では、マイクロオーダーで微細加工可能なナノ秒パルスレーザーを使用し、TZP 表面に微細凹凸構造を作製し、その骨適合性について検討した。

【実験】 イットリア 3 mol%添加正方晶部分安定化ジルコニア多結晶体(Y-TZP)および 30 vol%アルミナ含有セリア 10 mol%添加正方晶部分安定化ジルコニア多結晶体(Ce-TZP)の平板試料(3×2 mm、厚さ 1 mm)を用いた。それぞれに、Nd:YAG レーザ照射により表面加工を行った(laser/Y-TZP、laser/Ce-TZP)。コントロールは、歯科用インプラントの表面加工として多く採用されている SLA(サンドブラスト処理+酸処理)表面とした(SLA/Y-TZP、SLA/Ce-TZP)。各インプラントは、Wistar 系ラットの大腿骨欠損部に埋入した(鶴見大学歯学部動物実験委員会: 承認番号 28A042)。術後 2 週および 3 週目にキシリノールオレンジとカルセインによるラベリングを行い、術後 4 週で試料を摘出して非脱灰薄切研磨標本を製作した。共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)および光学顕微鏡により周囲骨を観察した後、骨-インプラント間接触率(BIC)および新生骨量(BM)を算出し、定量的に評価を行った。

【結果と考察】 レーザ加工された laser/Y-TZP および laser/Ce-TZP は、SEM によりその表面状態を確認した。レーザーのスポット幅 30 μm と同程度の深さ 30 μm、幅 30 μm の規則的な凹凸形状が作製できた。インプラント埋入実験の結果、laser/Y-TZP が SLA/Y-TZP および SLA/Ce-TZP に比較して、より多くの新生骨形成が確認され、統計学的に有意に高い BIC が得られた ($p<0.05$)。また、CLSM 像においてインプラント体凹凸部に垂直的な骨形成が観察された。一方、laser/Ce-TZP では他の試料よりも BIC が有意に低く ($p<0.05$)、レーザー照射により表面の特性が変化し、骨形成に影響を与えた可能性が推察された。BM はすべての試料において有意な差は認められなかった。以上により、ジルコニアへのナノ秒パルスレーザーによる凹凸微細加工は、骨形成に影響を及ぼし、インプラントの表面改質として応用可能と示唆された。

2P-054-III

骨粗鬆症モデルラットによるリン酸オクタカルシウムの骨組織応答性に関する研究

¹東北大学医学部整形外科, ²東北大学大学院歯学研究科, ³東北大学大学院歯学イノベーションリサーチセンター

○馬場一慈¹ (Baba Kazuyoshi), 穴田貴久², 森 優¹, 塩飽由香利^{2,3}, 井樋栄二¹, 鈴木 治²

【緒言】 リン酸オクタカルシウム (OCP) は生理的環境下でハイドロキシアパタイト (HA) に徐々に加水分解し骨芽細胞の分化を促進することから骨形成能を持つ人工材料として期待される (Suzuki O et al. Biomaterials 2006; Anada T et al. Tissue Eng A 2008)。また OCP は破骨細胞様細胞による吸収を受け、in vitro で破骨細胞形成を促進する性質を有する生体内吸収材料である (Takami M et al. Tissue Eng A 2009)。骨粗鬆症は破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回ることで骨量が減少する病態である。そこで細胞活性化能を有する OCP が骨粗鬆症下においても骨形成を示すかどうか検討した。本研究では骨粗鬆症モデルラットを用い、天然高分子である gelatin (Gel)、および OCP と Gel の複合体 (OCP/Gel 複合体) を作製し、Gel との比較で OCP/Gel 複合体の骨組織反応について X 線学的、組織学的に検討することを目的とした。

【実験】 12 週齢 Sprague-Dawley(SD)雌ラットに卵巣摘出手術を行い、その後 12 週間飼育した。その後に左脛骨内側に直径 3 mm、深さ 3 mm の骨孔を作製し、Gel もしくは OCP/Gel 複合体を埋入した。埋入後 8 週で安楽死させ脛骨を回収した。μCT 画像で X 線学的評価を行い、脱灰標本を作製してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、埋入部位について組織学的評価を行った。

【結果と考察】 μCT 画像では、Gel は埋入後に放射線透過性が亢進していたのに対し、OCP/Gel 複合体では埋入部の放射線透過性は低下しており、特に材料埋入部周辺でその傾向が強かった。HE 染色では OCP/Gel 複合体において、材料埋入部では材料周囲を取り囲むように骨新生が見られた。以上の検討から OCP/Gelatin 中の OCP は骨粗鬆症環境下においても骨形成を促進する可能性が示唆された。今後定量的に評価を加え正常骨内での OCP の骨組織反応性との違いを明らかにしていく。

2P-055- I

骨形成因子を捕捉する新規医用材料の性能評価

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

○野村祐介¹ (Nomura Yusuke), 福井千恵¹, 森下裕貴¹, 中村義一^{2,3}, 靄島由二¹

【緒言】医用材料は細胞や組織のような生きた生体システムと接触すると、その界面に存在する吸着蛋白質層を介して機能を発揮するが、その吸着特性は材料の物性に依存する。一方、医用材料に特定の機能を付与することを目的として、機能性蛋白質等を固定化した表面の創成に関する研究が進められている。近年、我々は生理活性を保持した状態で標的蛋白質を捕捉する RNA アプタマー固定化材料を開発した（日本バイオマテリアル学会 2014-2016）。本研究では骨再生を促進する医用材料の開発を目指し、骨形成因子（BMP2）を捕捉する RNA アプタマーを選定し、その性能を評価した。

【実験】SELEX 法により取得した RNA アプタマー候補の BMP2 結合能は SPR 法によって解析した。RNA アプタマー候補及び BMP2 添加培地を用いてマウス筋芽細胞を培養し、ウェスタンブロッティング法により、Smad1/5/8 のリン酸化状況を観察した。RNA アプタマー候補の二次構造予測結果を基に短鎖化 RNA アプタマーをデザインし、その特性を同様に評価した。同 RNA アプタマー固定化材料を創製し、BMP2 捕捉能及び細胞への影響について評価した。

【結果と考察】得られた RNA アプタマー候補の一部は、BMP2 による細胞内シグナル伝達を阻害することなく BMP2 に特異的に結合することが確認された。短鎖化 RNA アプタマーも同様な機能を有することが明らかとなり、同短鎖化アプタマー固定化材料がヒト血清中の BMP2 を特異的に捕捉濃縮できることが判明した。また、同材料上でマウス筋芽細胞を培養し、ALP 及び MHC 産生を指標として評価した結果、当該材料は BMP2 を捕捉して意図した機能を発揮することが明らかとなった。今後、FGF2 捕捉型 RNA アプタマーとの併用も考慮して、新たな骨再生用基材の開発を進める。

2P-056- I

抗炎症性マクロファージ動員のための疎水性薬剤徐放化フィブリンハイドロゲルの作製

京都大学ウイルス・再生医科学研究所

○田中隆介 (Tanaka Ryusuke), 田畑泰彦

【緒言】

抗炎症性マクロファージは炎症を抑制して再生を誘導する働きをもつことが知られており、これを損傷部位に積極的に動員することで組織再生を促すことが可能である。マクロファージを損傷部位に動員するには、その前駆細胞である単球を動員することが必要である。そして、動員された単球および未成熟なマクロファージを抗炎症性マクロファージに分極させるためには、損傷部位の分極環境を調節することが必要となる。本研究では、接着したマクロファージを抗炎症性に分極させる作用をもつフィブリンのハイドロゲルに、単球動員薬剤として知られる SEW2871 を組み込むことで、局所に抗炎症性マクロファージを動員可能な材料を作製することを目指した。

【実験】

ゼラチンに疎水性基としてコレステロールを導入した高分子ミセル材料を作製し、これを用いて難水溶性の単球動員薬剤である SEW2871 を水可溶化させた。得られた SEW2871 内包ミセルの *in vitro* での単球動員活性を調べた。様々な組成のフィブリンハイドロゲル上で骨髄由来マクロファージを培養し、抗炎症性マクロファージへの分極作用を評価した。フィブリンハイドロゲルに SEW2871 内包ミセルを組み込み、*in vitro* および *in vivo* での徐放作用を検討した。

【結果と考察】

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で導入率が変化し、それにともない SEW2871 の水可溶化量も変化した。SEW2871 内包ミセルを培地に添加した群は、何も添加しなかった群と比較して、有意に単球の動員数が増加し、遊離 SEW2871 を添加した群と同程度の活性を示した。フィブリンハイドロゲル上でマクロファージを培養することで、抗炎症性サイトカインであるインターロイキン 10(IL-10)の産生が増加した。*in vitro* での実験の結果、SEW2871 内包ミセルを組み込んだフィブリンハイドロゲルはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中では SEW2871 をほとんど放出せず、プラスミンを添加してハイドロゲルを溶解させると SEW2871 の放出が見られた。本発表では、*in vivo* での徐放試験の結果についても報告する。

2P-057- I

新規亜鉛ガラス塗布材による歯根面のコラーゲン分解抑制

株式会社ジーシー

○吉満亮介 (Yoshimitsu Ryosuke), 熊谷知弘

【緒言】

根面はう蝕リスクが非常に高いため、抗菌、脱灰抑制等の効果を有する材料が求められる。また、根面う蝕の進行原因として細菌由来のコラゲナーゼ、象牙質・歯髄由来の MMP によるコラーゲン分解が報告されている。そこで、MMP 活性阻害、抗菌、脱灰抑制効果が報告されている亜鉛に着目し、亜鉛、フッ素、カルシウム、ケイ素を含有する新規亜鉛ガラスおよびガラス塗布材を開発した。この塗布材は歯面に亜鉛ガラス、リン酸亜鉛、フッ化カルシウム等のナノ粒子層を形成し、亜鉛イオン等を溶出する。本研究では新規亜鉛ガラス塗布材 (ZFC-03)による根面象牙質のコラーゲン分解抑制効果を検証した。

【実験】

材料：ZFC-03、亜鉛非含有ガラス塗布材 (FAC)、塗布材なしとし、評価した。

コラーゲン分解抑制試験：#2000 耐水研磨紙にて研磨した牛歯根象牙質に直径 3mm の穴をあけたテフロンシールを貼り付け試験面とした。脱灰液 (pH4.5、50 mM 酢酸、1.5 mM CaCl₂、0.9 mM KH₂PO₄)にて 60 時間脱灰した試験面に材料を塗布し、コラゲナーゼ溶液 (pH6.5、0.4 U/ml コラゲナーゼ、50 mM PIPES、150 mM NaCl₂、5 mM CaCl₂)に 37°C下にて 5 時間浸漬した。試験面部を厚さ 1 mm にスライスし、位相差顕微鏡にて象牙質のコラーゲン分解深さ (□m)を算出した。

【結果と考察】

ZFC-03 (9.8 μm)のコラーゲン分解深さは、FAC (29.4 μm)、コントロール (34.6 μm)よりも有意に低い値を示した (p<0.05)。コラゲナーゼは亜鉛イオンが過剰に存在するとその働きが阻害されることが報告されている。FAC は亜鉛イオンを溶出ししないのに対し、ZFC-03 は亜鉛イオンを溶出するため、コラゲナーゼの亜鉛最適濃度を上まわることでコラゲナーゼの活性が阻害され、コラーゲンの分解が抑制されたと考える。以上のことより、新規亜鉛ガラス塗布材 ZFC-03 はコラーゲン分解抑制効果が高く、根面う蝕の予防・治療に有用な材料であることが示唆された。

2P-058-IV

QCM 法による医用高分子材料の血液適合性評価におけるデータ解析手法の検討

¹帝京平成大学薬学部, ²国立医薬品食品衛生研究所

○伊佐間和郎¹ (Isama Kazuo), 河上強志², 薮島由二²

【緒言】 医用材料の界面特性の一つである蛋白質吸着は、その材料が持つ血液適合性に関与することが知られている。そのため、材料表面への蛋白質吸着挙動を指標として、その材料の血液適合性を評価・予測することが可能であると考えられている。そこで、生体適合性の異なる医用材料表面に対する血液適合性評価マーカー候補蛋白質の吸着挙動を動力学的に解析するため、ポリマーをコーティングした水晶発振子マイクロバランス (QCM) センサーに吸着するフィブリノーゲン及びアルブミンの解離定数を指標として、蛋白質を逐次添加する飽和法における最適な解析条件等を検討した。

【実験】 ポリエステル系のポリエチレンテレフタレート及びポリブチレンテレフタレート並びにポリアミド系のナイロン 6 及びナイロン 66 をコーティングしたポリマーコート QCM センサーを作製した。血液凝固因子のひとつであるフィブリノーゲン及び血清蛋白質であるアルブミンを逐次添加し、QCM センサーの共振周波数を測定した。解離定数の算出において、非線形回帰モデルの Langmuir plot 並びに線形回帰モデルの double reciprocal plot、reciprocal plot 及び Schatchard plot を比較した。

【結果と考察】 フィブリノーゲン及びアルブミンとも材料間の相違による解離定数の傾向に顕著な差は認められなかった。非線形回帰モデル及び線形回帰モデルの各プロットから算出した解離定数は、フィブリノーゲン及びアルブミンとも同様な傾向を示し、Langmuir plot が最も小さく、reciprocal plot、Schatchard plot、double reciprocal plot の順に大きくなった。しかし、いずれも Langmuir plot から得られた値の 2 倍程度の範囲内で収まっていた。

Double reciprocal plot 及び reciprocal plot は、Y 軸が測定値の逆数を取るため、測定における誤差が増幅されるおそれがある。また、reciprocal plot 及び Schatchard plot は、X 軸及び Y 軸の両方に同じ変数が使われているため、線形回帰モデルにおける独立性が成り立たず、線形性の指標である相関係数を適用することができない。したがって、非線形回帰ソフトウェアが使用可能であれば、非線形回帰分析を行った方がより信頼性の高い結果が得られると考えられる。

2P-059- I

ゼラチン用量の変化がエピガロカテキンガレート結合ゼラチンの骨再生能に及ぼす影響

¹大阪歯科大学歯科矯正学講座, ²大阪歯科大学中央歯学研究所, ³京都工芸繊維大学バイオバースマテリアル学専攻, ⁴大阪歯科大学小児歯科学講座

○原 瑛紀¹ (Hara Eiki), 本田義知², 田中知成³, 橋本正則², 有田憲司^{2,4}, 松本尚之¹

【緒言】緑茶から抽出される Epigallocatechin gallate (EGCG)は抗炎症等の薬理効果を持つものの、骨形成能に関しては更なる解明の余地を残す。近年演者らは、EGCG をゼラチンに結合させることで、生体内で EGCG の骨形成能を増強しうる事を明らかにした。更に、この実験で用いた EGCG 結合ゼラチンスポンジ (EGCG-GS) に対し真空加熱処理を施した真空加熱 EGCG-GS (vhEGCG-GS) は、その骨形成能が飛躍的に高められる事を明らかにした。しかしながら、その詳細な骨形成機序は明らかになっておらず、本骨形成が、ゼラチンによる足場依存性なのか、EGCG の徐放効果のみによるものか明らかでない。本研究では、EGCG とゼラチンの配合比を変化させた vhEGCG-GS と、ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いて、同材料の骨形成機序の解明を試みた。【実験】水中にて EGCG とゼラチンの配合比を変化させた EGCG-GS を合成し、凍結乾燥後、真空加熱を行い vhEGCG-GS を作製した。合成時、EGCG が 0.0007wt% に対して、ゼラチンを 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0wt% と変化させ 5 種類の vhEGCG-GS を合成した (以下各試料は vhEGCG-GS[EGCGwt%:ゼラチン wt%]と表記)。vhEGCG-GS の形状及び表面性状は、走査型電子顕微鏡にて確認した。骨形成能評価には、8 週齢の雄性ラットの頭蓋冠に直径 9mm の骨欠損を形成し、各試料を埋入して評価した。4 週後に、頭蓋冠を摘出し μ CT による骨形態計測、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色による組織学的評価を行った。【結果と考察】vhEGCG-GS[0.0007:0.01]を除き、多孔質のスポンジが形成された。 μ CT 画像解析において、vhEGCG-GS[0.0007:0.1]に対して他の vhEGCG-GS 群では優位に不透過像の増加がみられ、H-E 染色像からこれらの不透過像が新生骨であることを確認した。本実験では、骨欠損内に埋入した EGCG 量は固定されているものの、試料による充填度はゼラチン量に応じてそれぞれ異なる。充填度が低かった vhEGCG-GS[0.0007:0.1]において著しく骨形成が乏しかった事を考慮すると、vhEGCG-GS[0.0007:0.5]以上のゼラチンを持つ試料ではまず足場効果が発揮された上で、EGCG の薬理効果が発揮されたと推察された。以上の結果から、vhEGCG-GS の骨形成には、足場効果を発揮しうる一定量以上のゼラチンが必須である事が明らかとなった。

2P-060- II

三次元構造を有する脱細胞化組織を用いた硬組織再構築

¹芝浦工業大学システム理工学部, ²東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ³東北大学大学院歯学研究科, ⁴大阪工業大学工学部, ⁵理化学研究所多細胞システム形成研究センター, ⁶京都大学

○中村奈緒子¹ (Nakamura Naoko), 木村 剛², 山田将博³, 藤原俊哉⁴, 辻 孝⁵, 岩田博夫⁶, 岸田晶夫²

【緒言】

脱細胞化生体組織は三次元構造を有する細胞外マトリックスで構成されており、新しいバイオマテリアルとして高いポテンシャルを有すると考えられている。われわれは、硬組織である脱細胞化皮質骨および脱細胞化海綿骨のバイオマテリアルとしての特性について、骨形成能および造血環境構築能に着目して検討を行った。

【実験】

脱細胞化皮質骨に関しては、任意のサイズのピース状に加工し、それぞれを種々の間隙を持たせて固定して、ラット皮下に埋植した。脱細胞化海綿骨に関しては、海綿骨の髓腔を満たす骨髓組織とともにマウス皮下に埋植し、造血に関与する細胞の生着について評価した。

【結果と考察】

脱細胞化皮質骨のある間隙では新生骨が形成されることを見出した。これは、骨片間隙に細胞が浸潤し、脱細胞化皮質骨の骨基質面によって異所性での骨形成が促されたと考えられる。皮下には骨形成を行う骨芽細胞は存在しないため、皮下に存在する幹細胞が骨芽細胞に分化し、異所性に骨形成を促すことが明らかになった。一方、脱細胞化海綿骨に関しても、異所性において脱細胞化海綿骨への造血に関わる細胞の生着が示された。造血を制御する要因は、主に造血幹細胞とそのニッチである。ニッチは支持細胞と細胞外マトリックスで構成されている。造血に必要な複雑な微小構造を有する脱細胞化海綿骨の応用を試みた結果、骨髓組織を構成する細網組織や脂肪組織の細胞外マトリックスが、造血幹細胞が生着できる環境を構築し、異所性の造血を導くことが明らかになった。異所性における脱細胞化皮質骨および脱細胞化海綿骨による骨形成および造血細胞の生着は、生体外での組織再構築には細胞同士の相互作用やサイトカインだけではなく、三次元構造を有する材料も必須であることを示しており、これらの応用可能性が示された。

2P-061-III

多分岐 PEG 修飾脱細胞化心膜の開発と癒着防止材への応用

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ²信州大学繊維学部

○橋本良秀¹ (Hashimoto Yoshihide), 山下暁立¹, 根岸 淳², 張 永巍¹, 木村 剛¹, 船本誠一¹, 岸田 晶夫¹

【緒言】

外科的処置を受けると高頻度に組織や臓器同士の癒着が生じ、機能障害や疼痛を引き起こす。また、再手術の長時間化やそれに関連する合併症リスクの増加などが問題となっている。腹部領域においては、癒着が発生する可能性のある部位に高分子膜あるいはハイドロゲルなどの癒着防止材を利用することで術後癒着防止が試みられている。一方、胸部領域においては利用可能な癒着防止材は開発されていない。本研究では、胸部領域で使用可能な癒着防止材の開発を目的とし、脱細胞化ウシ心膜-多分岐ポリエチレングリコール複合材料の開発と機能評価を行った。

【実験】

脱細胞化ウシ心膜を 2×2.5 cm に成形し、分子鎖末端に N-ヒドロキスクシンイミド基を有する多分岐ポリエチレングリコール(multi-PEG-NHS)を修飾した。コントロールとして末端がヒドロキシ基である多分岐 PEG(multi-PEG-OH)修飾および未修飾脱細胞化ウシ心膜を用いた。癒着防止効果の評価として、ウサギ心臓擦過モデルを用いた。麻酔下にてウサギ心膜を切除した後、心室前壁表面を擦過した。擦過部分を被覆するように種々の脱細胞化ウシ心膜を縫合固定した。所定期間後、スコア評価、病理組織学的ならびに免疫組織化学的評価を行った。

【結果と考察】

留置した種々の脱細胞化ウシ心膜とウサギ心外膜との間の癒着は、multi-PEG-NHS > multi-PEG-OH > 未修飾の順で抑制される傾向が観察された。multi-PEG-NHS が脱細胞化ウシ心膜を構成するコラーゲンのアミノ基を介して化学的に結合し、材料表面に安定的に存在したため癒着防止効果が発現したと考えられる。以上より multi-PEG-NHS 修飾脱細胞化ウシ心膜は癒着防止材としての応用可能性が示唆された。

2P-062-II

ヘパリン修飾温度応答性表面と増殖因子および細胞とのアフィニティー結合制御

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

○小林 純 (Kobayashi Jun), 秋山義勝, 大和雅之, 岡野光夫

【緒言】我々は、肝特異的機能を生体外で維持する目的で、細胞外マトリックス構造を模倣したヘパリン修飾温度応答性細胞培養表面を設計した。具体的には、温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) グラフト表面にヘパリン分子を共有結合により導入し、ヘパリン結合性上皮細胞増殖因子様増殖因子 (HB-EGF) をアフィニティー固定した温度応答性培養表面を作製した。細胞外マトリックス (ECM) や細胞膜表面のプロテオグリカンが増殖因子の安定性や活性を向上させるのと同様に、HB-EGF は表面固定化ヘパリン分子に安定に保持され、培養細胞を刺激すると期待される。本報告では、ヘパリン修飾温度応答性表面と HB-EGF をはじめとするヘパリン結合性増殖因子および細胞とのアフィニティー結合能に関する分子メカニズムについて報告する。

【実験】 Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-2-carboxyisopropylacrylamide)修飾培養表面上にヘパリンを共有結合的に固定化し、ヘパリンとのアフィニティー結合により HB-EGF を表面に導入した。ヘパリン修飾温度応答性培養表面と HB-EGF 間のアフィニティー結合能を EILSA 法により測定した。

【結果と考察】温度に対する HB-EGF/固定化ヘパリン間のアフィニティー結合能の変化を評価するために、ELISA 法による解離定数の測定を行った。20°C および 37°C における HB-EGF/固定化ヘパリン間の解離定数はそれぞれ 3.6 nM、2.1 nM であり、温度変化が解離定数に与える影響は小さいことがわかった。これは、温度応答性高分子鎖の膨潤/収縮に関わらず、HB-EGF は立体障害をほとんど受けずに温度応答性高分子鎖内部に拡散するためと考えられる。一方、37°C において HB-EGF 固定化ヘパリン修飾温度応答性培養表面で培養したラット肝細胞シートの培養温度を PIPAAm の相転移温度以下の 20°C に低下すると、肝細胞シートとともに HB-EGF も脱着した。以上のことから、温度低下による HB-EGF 固定化ヘパリン修飾温度応答性培養表面からの肝細胞シートの脱着は、表面固定 PIPAAm 分子の水和・膨潤による表面親水化と細胞自身の形態変化をとともなう複合的な現象であり、その過程でアフィニティー結合能が動的に変化していると考えられる。

2P-063- I

脱細胞化血管上での *in vitro* 細胞挙動における脱細胞化法の影響

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ²芝浦工業大学システム理工学部, ³大阪工業大学

○木村 剛¹ (Kimura Tsuyoshi), 近藤真由香¹, 中村奈緒子², 橋本良秀¹, 藤里俊哉³, 岸田晶夫¹

【緒言】

生体組織から細胞を除去した細胞外マトリックスである脱細胞化生体組織の医療応用が進んでいる。様々な脱細胞化生体組織の調製方法が報告されており、手法の違いにより脱細胞化効率、組織構造の維持、物性変化などの特性が異なる。我々のグループでは、高静水圧処理による細胞破壊と洗浄による細胞残渣の除去による高静水圧処理法 (HHP 法) を用いた脱細胞化生体組織の開発を行っている。本研究では、脱細胞化方法の違いの細胞挙動への影響について、一般的な界面活性剤脱細胞化法である SDS 法と HHP 法にて得られた脱細胞化血管上での細胞挙動を検討した。

【実験】

ブタ大動脈を芝浦臓器 (株) が購入した。SDS 法(Korossis et al. J Heart Valve Dis. 14:408-421, 2005) および HHP 法にて脱細胞化血管を調製し、血管全層および外膜層を除去した内中膜層とした。血管内皮細胞 (HUVEC)、繊維芽細胞 (NIH3T3、NHDF) を用いて、それぞれ 1×10^4 あるいは 2×10^5 cells/cm² の密度で播種した。細胞播種では、血管全層の内腔面、外膜面、内中膜層の内腔面、中膜面へ細胞を播種した。所定時間培養後、Calcein-AM にて細胞を染色し蛍光顕微鏡下で細胞の接着、接着、増殖を観察した。また、細胞を固定後、走査型電子顕微鏡を用いて接着細胞の形態観察を行った。

【結果と考察】

SDS 法、HHP 法にて得られた脱細胞化血管の脱細胞化を HE 染色、DNA 定量により確認した。また、脱細胞化血管の構造は、SDS 法での繊維間の拡がりが見られたが、HHP 法では未処理血管と類似であった。脱細胞化血管内腔面への HUVEC の播種では、SDS 法での接着率は非常に低く、HHP 法にて高い接着率が示され、初期接着に大きな違いがあることがわかった。これは脱細胞化血管の構造の違いが影響していると推察される。また、HHP 法では、培養に伴う細胞の増殖が示され、敷石状でコンフルエントとなった。断面の HE 染色像では、脱細胞化血管上での HUVEC の単層状態が観察され、SEM 像では、細胞間接着様子が観察された。以上より、脱細胞化法の違いは細胞の初期接着に強く影響を与えることがわかった。

2P-064- II

Development of three-dimensional fat tissues as a hypodermis layer

¹大阪大学大学院工学研究科先端細胞制御化学 (TOPPAN) 共同研究講座, ²大阪大学大学院工学研究科, ³JST-さきがけ

○Fiona Louis¹, 北野史朗¹, 入江新司¹, 松崎典弥^{1,2,3}

【緒言】

Fat cells are existed in a hypodermis layer of human skin and it has an important function such as energy source, release of growth factor, and cushioning property. Accordingly, fabrication of fat tissues is a key challenge for *in vitro* reconstruction of a full thickness skin model for regenerative medicine and pharmaceutical assay. Here, we report *in vitro* reconstruction of three-dimensional (3D) fat tissues by sedimentary culture using collagen microfibers. We recently discovered a novel technique to fabricate millimeter-sized connective tissues with high concentration of extracellular matrix (ECM) similar to our natural connective tissues. The reconstructed 3D-fat tissues will be useful as a hypodermis layer for *in vitro* fabrication of a full thickness skin model.

【実験】

Porcine type I collagen were kindly donated from NH Foods Ltd. Collagen microfibers were prepared by homogenization and the length and diameter of the obtained microfibers are approximately 100 μ m and 20 μ m, respectively. Adipose derived stem cells (ADSC) were cultured and differentiated by the sedimentary culture with collagen microfibers to fabricate 3D-fat tissues. The collected matured fat cells from mice or rats were also used instead of ADSC.

【結果と考察】

The differentiation of ADSC in 3D-fat tissues was evaluated using a Nile red staining by observation of confocal laser scanning microscopy (CLSM). Although about 70 days culture are necessary for maturation of fat cells in general two-dimensional (2D: monolayer) culture, less than 20 days were enough for the maturation of the fat cells in 3D-tissues. Moreover, the matured fat cells were stably cultured in the 3D-tissues for over 1 week whereas they were not stable in 2D-culture due to dedifferentiation. From these results, the constructed 3D-fat tissues were expected to be useful for application as a hypodermis layer.

2P-065-II

幹細胞から骨芽細胞への分化を短期間に誘導する細胞低接着性コラーゲン

¹近畿大学生物理工学部, ²新田ゼラチン株式会社

○國井沙織¹ (Kunii Saori), 堀内喜高¹, 山本 衛¹, 伊田寛之², 平岡陽介², 森本康一¹

【緒言】 I型コラーゲンは再生医療などの分野で、体性幹細胞を効率的に増殖させるために利用されている。幹細胞は培養足場に接着して分裂を開始し、増殖が接触障害で停止すると、分化しやすくなる。しかし、分裂過多により老化や分化能の低下が起こりうる。最終的には未分化細胞が混在した状態となるので分化効率の改善が待たれている。我々はこれまでに細胞が接着しにくくなる I型コラーゲン (Low Adhesive Scaffold Collagen, LASCOL) を調製し、新規な性状などを見出してきた。昨年の本会では、LASCOL 上で培養した線維芽細胞が能動的に移動し、接触・接着して凝集塊を形成することを示した。本年度は、骨髄間質細胞に含まれる間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導に与える LASCOL 培養の効果を解析したので報告する。

【実験】 ブタ真皮由来 I型コラーゲンから LASCOL を調製した (特許出願中)。LASCOL を培養皿に固定化してラット骨髄間質細胞 (rMMCs) を播種し、翌日に骨芽細胞分化培地で培養を開始した。形成した細胞凝集塊を位相差顕微鏡で観察した。また骨芽細胞への分化状態をアルカリホスファターゼ (ALP) 活性染色、石灰化をアリザリンレッド染色にて調べた。さらに分化した骨芽細胞により沈着したリン酸カルシウムを走査型電子顕微鏡/エネルギー分散型 X線分光法 (SEM/EDX) にて定量化した。次に細胞から mRNA を抽出し、細胞が分泌する石灰化タンパク質や転写因子などの遺伝子発現量を定量 RT-PCR 装置にて解析した。対照群は単層培養の間質細胞とした。

【結果と考察】 LASCOL で培養した rMMCs は、細胞分裂が停滞することが示された。また、短期間で ALP 活性が上昇し、アリザリンレッド染色も有意に充進した。さらにリンとカルシウムが培養皿一面に沈着していることが示された。LASCOL で培養した rMMCs は骨芽細胞への分化を示す遺伝子発現量が増加していた。よって、分子機構は未だ不明だが、LASCOL を培養足場として活用することで、幹細胞から骨芽細胞への分化誘導は著しく促進することが明確に示された。

【謝辞】 本発表内容は、JST A-STEP シーズ育成タイプの研究支援で得られた成果である。

2P-066-II

転写因子タンパク質導入による細胞機能制御

東京工業大学 生命理工学院

○島村萌里 (Shimamura Hori), 眞下泰正, 三重正和, 小島英理

【緒言】

細胞への転写因子導入による細胞分化誘導は、基礎研究のみならず組織工学において目的細胞を取得するうえでも重要な技術である。この転写因子導入の手法として、ウイルスベクターを使用した遺伝子導入が行われている。当研究室では、遺伝子導入に代わる手法として、転写因子タンパク質導入による分化誘導を試み、MyoD、NeuroD2、Olig2 といった転写因子タンパク質導入による細胞分化の誘導に成功した。一方近年、Mash1、Brn2、Myt1l などの複数種類の転写因子の導入により線維芽細胞から神経細胞へのリプログラミングが可能であることが報告されている。そこで本研究では、複数種類の転写因子タンパク質導入による細胞機能制御を目的とする。ここでは線維芽細胞から神経細胞への分化転換を目指し、Mash1 タンパク質の発現と機能評価を行った。また、同一細胞に効率よく複数種類の転写因子タンパク質を導入する手法の開発を行った。

【実験】

マウス cDNA よりクローニングした Mash1 の大腸菌発現用ベクターを作製したのち、大腸菌を形質転換したタンパク質を発現させた。精製後、神経芽細胞 N1E-115 細胞に Mash1 タンパク質を添加し、神経突起伸張を指標として細胞の形態変化を観察し、Mash1 タンパク質の活性を評価した。また、複数種類の転写因子タンパク質を同一細胞内に効率よく導入するために、導入するタンパク質にコイルドコイル構造を形成するペプチド配列を導入した。ここでは当研究室の先行研究において使用した転写因子 Olig2 と EGFP に、それぞれコイルドコイル構造を形成するペプチドを付加した helixA-Olig2 と EGFP-helixB を作製し、コイルドコイル構造を介した Olig2-EGFP 複合体を作製した。

【結果と考察】

Mash1 タンパク質は細胞膜透過能ペプチドを付加しなくても細胞内に取り込まれることが明らかになった。また、helix を付加した Olig2 と EGFP の発現ベクターを作製し、タンパク質の発現・精製を行った。今後、Olig2-EGFP 複合体形成能、細胞内導入能、および機能発現について評価する。

2P-067-II

タンパク質ハイドロゲルを利用した三次元神経組織の構築

東京工業大学 生命理工学院

○長田紗也加 (Osada Sayaka), 水口佳紀, 眞下泰正, 三重正和, 小島英理

【緒言】

組織を構築するにあたり、その高度な機能を再現するためには生体内の環境に近づけた三次元足場材料の設計が不可欠である。当研究室で作製したタンパク質 O-CUBE((AVGVP)42-D88-CL2)は、温度に応答してゲル状に変化する。この O-CUBE ゲル内で細胞は生存、増殖が可能である。したがって O-CUBE に細胞機能を制御する様々なペプチド配列を遺伝子工学的に導入すれば、組織構築の足場材料として利用可能になることが期待される。そこで本研究では、神経組織構築のための足場となるタンパク質の作製、および三次元神経組織を構築することを目的とした。ラミニン由来のペプチド配列 AG73 は神経細胞の接着、神経突起伸長を促す。また、NCAM 由来のペプチド配列 C3 は神経突起伸長を促す。これらのペプチド配列をそれぞれ O-CUBE に挿入し、三次元神経組織の構築を試みた。

【実験】

O-CUBE に AG73、C3 ペプチド配列をそれぞれ挿入したタンパク質をコードするプラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3)を用いて菌体内に発現させた。菌体破碎後、ITC 法を用いて目的タンパク質の精製を行った。得られたタンパク質溶液を加温することでハイドロゲルを作製し、そのゲル化温度・ゲル崩壊温度を測定した。また、ハイドロゲルに神経細胞への分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞である P19 細胞を内包し、ゲル内で細胞が生存可能であるかを検討した。

【結果と考察】

タンパク質発現誘導時の培養条件と精製条件の検討により、目的タンパク質を得ることができた。得られたタンパク質は 2.5 ~ 5.0 w/v %において加温するとゲル化することが確認された。ハイドロゲルに P19 細胞を内包し培養を行ったところ、細胞はハイドロゲル内で生存、接着、増殖が可能であること、更に神経分化誘導条件下では神経突起伸長が促進されることが明らかとなった。以上より、作製したタンパク質ハイドロゲル内で細胞の三次元培養が可能であることが示された。

2P-068-II

ナノインプリント製フォトニック結晶を用いる DNA 非標識検出法の検討

¹大阪府立大学大学院工学研究科, ²大阪府立大学大学院生命環境科学研究科, ³JST さきがけ

○西辻凌輔¹ (Nishitsuji Ryosuke), 末吉健志¹, 三宅眞実², 久本秀明¹, 遠藤達郎^{1,3}

【緒言】 DNA チップは、医療・生命科学分野において遺伝子の発現や変異、1塩基多型の検出・定量に用いられる重要な分析ツールの一つである。しかし DNA チップは、DNA 検出に①蛍光標識が必要、②光学系が高額、③操作が複雑、という課題があった。これら課題を解決するために我々は、ナノ周期構造を有する光デバイス「フォトニック結晶 (Photonic crystal : PhC)」をナノインプリントリソグラフィ (Nanoimprint lithography : NIL) を用いてポリマーフィルム上へ作製し、DNA 非標識検出への応用研究を行っている。PhC は周囲の屈折率変化に依存した光学特性変化を示すため、非標識の簡易な操作で DNA 検出できる。加えて、可視領域の光を回折・反射可能な NIL 製 PhC の作製により安価な光学系も利用できる。今回は、NIL 製 PhC を用いて DNA ハイブリダイゼーションによる周囲の屈折率変化を反射スペクトル変化として検出することに成功し、また pH による光学特性変化への影響を評価したので報告する。

【実験】 実験では、初めに NIL にて作製したピラーアレイ型 PhC (ピラー径・間隔: 230 nm、ピラー高さ: 200 nm) 表面へプローブ DNA (5'-NH₂-GGG CAG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT 3') を固定化した。そしてターゲット DNA (5'-ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT CTG 3') 水溶液 (濃度 1-100 nM) を滴下し、60°C にて 1 時間静置・反応させた。なお各操作後は NIL 製 PhC を洗浄・風乾させ、白色光を照射した際の反射スペクトル測定を行った。また反応時に使用する緩衝液 (リン酸バッファー) の pH を変化 (pH 6-9) させ、反射スペクトル変化を観察した。

【結果と考察】 本 PhC は、ターゲット DNA 水溶液をプローブ DNA 固定化 PhC に滴下すると、濃度に依存した反射スペクトル変化が観察された。また pH 8 の緩衝液を用いたとき最も反射スペクトル変化量が大きかった。これは塩基性条件下でプローブ DNA 同士が反発するために PhC 表面に空隙が形成され、ターゲット DNA とのハイブリダイゼーション効率が向上したためと考えられる。以上の結果から pH 条件の最適化により更なる高感度化に成功した。

2P-069- I

ウイルス認識ナノ粒子を用いた電気抵抗ナノパルス法によるウイルス計測

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

○堀口諭吉¹ (Horiguchi Yukichi), 合田達郎¹, 松元 亮¹, 武内寛明², 山岡昇司², 宮原裕二¹

【緒言】電気抵抗ナノパルス法 (RPS) は微細な孔を通過する微粒子を電気抵抗として検出する手法であり、粒子が通過するイオン電流値の変化 (パルス波形) から、微粒子のサイズ、電荷といった粒子の特性に関する情報を粒子個別に得ることができる。RPS は細菌やウイルス等、生物学的な微粒子の計測に応用が期待されているが、微粒子の物理的な情報を得るにとどまるため、高度な微粒子の解析を行うことは難しい。そこで、RPS の手法に分子認識機能を盛り込むため、人工のウイルス認識ナノ粒子を作製し、ウイルスと相互作用させることに依る物理的特性変化を計測した。

【実験】ヒトインフルエンザが認識するシアル酸構造 (Neu5Ac(2-6)Gal-) を含む糖リガンドを固定化した金ナノ粒子 (6'sia-AuNP) を調製した。不活化 A 型インフルエンザウイルス H1N1 の粒径および、6'sia-AuNP と混合した場合のウイルスの粒径を測定し、その比較を行った。参照実験として、非特異的な糖鎖リガンドの固定を行った金ナノ粒子 (3'sia-AuNP) を用いて同様の実験を行った。

【結果と考察】RPS の測定の結果、6'sia-AuNP と混合を行ったサンプルでは、インフルエンザウイルスとナノ粒子の結合に由来する粒径の増大が見られた。このことから、ウイルス認識ナノ粒子を用いたウイルス計測は原理的に可能であることが示唆された。しかしながら、3'sia-AuNP を用いた粒子を用いた場合でも粒径の増大が見られ、非特異吸着による相互作用が特異的な認識を阻害することも明らかとなった。そこで、この非特異吸着を抑制するため、両性イオンであるスルホベタイン構造を有する分子を金ナノ粒子に共固定化したところ、分散安定性が向上し、非特異的な結合によるウイルスの粒径変化を抑制することができた。以上から、粒径分布変化によるウイルス診断が可能であることが示された。本報告では、数百個のウイルス粒子の粒径分布を用いたウイルス診断を示したが、RPS の技術が向上し、より詳細な粒子の特性を解析できるようになれば、将来的に数個のウイルスを計測するだけで診断が可能になることが期待される。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議が主導する革新的研究開発推進プログラム (ImPACT) の一環として実施したものです。

2P-070- II

アレルギー糖タンパク質を認識可能な配向性分子インプリント空間の構築

神戸大学大学院工学研究科

佐伯哲郎 (Saeki Tetsuro), 砂山博文, ○北山雄己哉, 竹内俊文

【緒言】

糖タンパク質は生物学的・病理学的プロセスにおいて重要な働きをすることから、アレルギーやバイオマーカーとして検出対象とされている。しかし、分子認識材料として一般に用いられる抗体では、糖鎖に対する高親和性抗体の調製が困難なことから、抗体に代わる人工分子認識材料の開発が必要とされている。本研究では、分子インプリンティング技術により構築される標的分子認識空間内の相互作用部位として、糖鎖と可逆的共有結合を形成可能なボロン酸を用いることで、高感度・高選択的に標的糖タンパク質を検出可能な配向性分子インプリント空間の構築を試みた。

【実験】

標的糖タンパク質として卵アレルギーとして知られる ovalbumin (OVA) を選択した。ボロン酸を修飾した表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーチップ上に、OVA 糖鎖とのボロン酸エステル形成を介して OVA の配向固定化を行った。OVA と静電相互作用を示す pyrrolidyl acrylate および 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine をそれぞれ機能性モノマーおよびコモノマーとして用い、OVA 固定化基板上から表面開始原子移動ラジカル重合を行った後、ボロン酸エステル結合を切断することにより配向制御認識空間を有する分子インプリントポリマー (MIP) 薄膜を作製した。得られた MIP 薄膜の OVA 認識特性を表面プラズモン共鳴 (SPR) によって評価した。

【結果と考察】

得られた MIP の OVA に対する結合能及び選択性を SPR によって評価した結果、結合定数は $4.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と推定され、同時に類似糖タンパク質に比べて有意に OVA を結合したことから、OVA に対する MIP の選択性を確認した。OVA 親和性および選択性は、鋳型分子を用いずに作製したリファレンスポリマー (NIP) に比べて明らかに向上し、分子インプリンティングによる認識空間構築の有効性を示した。さらに、実際の卵白サンプルをモデル実サンプルとし、MIP 薄膜を用いた OVA 添加回収実験を行ったところ、高い回収率を示し実試料に対しても MIP 薄膜の有用性が示された。

2P-071-II

肝がんマーカー糖タンパク質を高感度検出可能な分子インプリントセンシングシステム

神戸大学大学院工学研究科

森重貴裕 (Morishige Takahiro), 香門悠里, 高野恵里, ○北山雄己哉, 竹内俊文

【緒言】 α -Fetoprotein (AFP)は肝臓疾患のバイオマーカーとして知られている糖タンパク質であり、その高感度検出は肝臓がんの早期診断に有用である。分子インプリントポリマー(MIPs)は、標的分子を選択的に結合可能な三次元認識空間を構築した人工分子認識材料であり、抗体などの生体由来分子に代わる分子認識素子として注目を集めている。さらに、当研究室では分子認識空間内選択的修飾法であるポストインプリンティング修飾(PIM)を開発し、種々のMIPsの高機能化に成功している。本研究では、相互作用部位としてAFPのもつ糖鎖と可逆的共有結合を形成可能なボロン酸と負電荷や疎水性アミノ酸残基と相互作用可能なpyrrolidyl基を同一鑄型空間内に配置したAFP二点認識空間を形成した。さらに、認識空間内選択的に蛍光分子を導入することで、AFP結合情報を蛍光として発信可能な分子インプリントセンシングシステムを構築した。

【実験】ジスルフィド結合を介してメタクリロイル基をAFP上に導入した鑄型AFPを合成した。3-fluorophenyl boronic acid および Br 基を修飾した金薄膜蒸着ガラス基板上に、ボロン酸エステル形成によって鑄型AFPを固定化した。機能性モノマーとして pyrrolidyl methacrylate, コモノマーとして 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine を用いて表面開始原子移動ラジカル重合によりポリマー薄膜を形成した。可逆結合切断によりAFPを除去した後、鑄型空間内に残存するチオール基に対して蛍光分子を導入し、得られたMIP薄膜のAFP結合特性を表面プラズモン共鳴(SPR)測定および蛍光測定によって評価した。

【結果と考察】SPR 測定の結果、MIP薄膜のAFP認識能を確認し、その際の親和性および選択性は、鑄型分子を用いずに合成したノンインプリントポリマー(NIP)や機能性モノマーを用いずに合成したリファレンスMIP(R-MIP)薄膜に比べて高い親和性・選択性を示した。また、蛍光検出によってヒト血中におけるAFP閾値以下の10 pM AFPが検出可能であった。さらに、ウシ血清アルブミンを用いたブロッキング処理によってMIPの認識空間外への非特異吸着を抑制し、1%の血清溶液中においても、高感度にAFP蛍光検出を行うことに成功した。

2P-072-II

ポストインプリンティング修飾による前立腺癌特異抗原インプリント空間の高機能化

神戸大学大学院工学研究科

松本大樹 (Matsumoto Hiroki), 砂山博文, 高野恵里, ○北山雄己哉, 竹内俊文

【緒言】

前立腺特異抗原(PSA)は、前立腺がんにおけるバイオマーカーとして知られ、前立腺がん早期診断や経過観察などに役立つため、高感度検出法の開発が求められている。本研究では、非共有結合型分子インプリンティングによって、PSAを高感度に検出するための分子インプリントポリマー(MIP)薄膜の合成を試みた。その際、当研究室独自に開発したポストインプリンティング修飾(PIM)によって、高親和性空間を低濃度の標的分子によって動的に保護し、低親和性空間を無効化するキャッピング処理によって高親和性認識空間のみを有するMIP薄膜への改変を試みた。

【実験】

相互作用部位として安息香酸部位とPIM用官能基として二級アミノ基を有する機能性モノマーを合成した。金蒸着基板上に、アミノ基および重合開始基として働くプロモ基を末端にもつ混合自己組織化単分子膜を作製した後、アミノ基にポリエチレングリコール鎖を介して4-carboxy-3-fluorophenylboronic acidをアミンカップリングにより導入した。PSA上の糖鎖と基板上のボロン酸による環状ジエステル形成を利用してPSAを基板表面に配向固定化し、機能性モノマー、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine、 N,N' -methylenebisacrylamideの表面開始原子移動ラジカル重合を行い、ポリマー薄膜を形成した。その後、環状ジエステルを切断することで鑄型PSAを除去し、PSA認識空間を有するMIP薄膜を得た。

【結果と考察】

表面プラズモン共鳴(SPR)測定の結果、PSA濃度の上昇に伴ってMIP薄膜のSPRレスポンスが増加し、得られた吸着等温線からその結合定数は $6.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ と推定されたことから、得られたMIP薄膜は、抗体にせまる親和性を有していることがわかった。さらにPIM(低親和性空間に対するキャッピング処理)により、参照タンパク質 human serum albumin, immunoglobulin Gの非特異的吸着が明らかに低減し、明確な選択性の向上が確認されたことから、PIMにより高親和性認識空間のみを有する高選択的なMIP薄膜への改変が可能であることが示された。