

一般演題（口頭発表）

11月20日（月）

A会場（5F 大ホール）

マテリアルと細胞（1） 1A-01－1A-03

B会場（5F 小ホール）

DDS, イメージング（1） 1B-01－1B-07

マテリアルと細胞（2） 1B-08－1B-14

マテリアルと細胞（3） 1B-15－1B-21

C会場（2F 桃源）

医療用デバイス（1） 1C-01－1C-07

DDS, イメージング（2） 1C-08－1C-14

DDS, イメージング（3） 1C-15－1C-21

D会場（2F 福寿）

金属・無機材料（1） 1D-01－1D-07

金属・無機材料（2） 1D-08－1D-12

金属・無機材料（3） 1D-13－1D-16

金属・無機材料（4） 1D-17－1D-21

E会場（2F 平安）

再生医療・組織工学（1） 1E-01－1E-07

再生医療・組織工学（2） 1E-08－1E-14

再生医療・組織工学（3） 1E-15－1E-21

1A-01- I

ポリアミンへのランダムなカルボキシル基導入による双性イオン型高分子の作製

¹東京大学大学院工学系研究科, ²Uppsala University

○東 倫之¹ (Azuma Tomoyuki), 高井まどか¹, 寺村裕治^{1,2}

【緒言】

ホスホベタイン基、カルボキシベタイン基およびスルホベタイン基を側鎖に有する双性イオン型高分子は低タンパク質吸着を示すことが知られている。それぞれの双性イオン型高分子のモノマーユニットは、カチオン性官能基とアニオン性官能基を同時に有する。本研究では、カチオン性のポリマーブラシにアニオン性官能基をランダムに導入することで、双性イオン型ポリマーブラシを作製した。2-Aminoethyl methacrylate (AEMA)ポリマーブラシ(0.56 ± 0.01 chains/nm²)を無水コハク酸で処理することで AEMA の一級アミンをカルボキシル基に変換し、無水コハク酸溶液の濃度を変化させることで一級アミンとカルボキシル基の比を制御した。

【実験】

0.001、0.1 および 10 mg/mL の無水コハク酸溶液を作製し、poly(AEMA)ブラシを処理した。それぞれの表面を poly(AEMA)-COOH_XX (XXは無水コハク酸の濃度)と呼ぶこととする。それぞれの表面へのタンパク質および細胞の接着を評価した。モデルタンパク質としてアニオン性の Albumin、中性の IgG およびカチオン性の Lysozyme を用いた。

【結果と考察】

XPSにより無水コハク酸の反応率を評価したところ、poly(AEMA)-COOH_10 では88 ± 11%、poly(AEMA)-COOH_0.1 では50 ± 3%、poly(AEMA)-COOH_0.001 では28 ± 10%であった。これは、poly(AEMA)-COOH_0.1 が一級アミンとカルボキシル基をほとんど同数ランダムに有しており、双性イオン型高分子であることを示唆する結果である。poly(AEMA)-COOH_0.1 への Albumin および IgG の吸着はほとんど見られず、特に Albumin の吸着量は29 ± 8 ng/cm² であった。これは、カルボキシベタイン型ポリマーブラシに匹敵する値である(D. Nagasawa et al., 2015)。また、マウス線維芽細胞の接着挙動を評価したところ、播種二日後においても poly(AEMA)-COOH_0.1 への細胞接着はほとんど見られなかった。これらの結果により、poly(AEMA)-COOH_0.1 が他の双性イオン型高分子同様、優れた低タンパク質吸着を示すことが示された。

1A-02- I

リン酸カルシウム被覆 Mg 合金表面の *in vitro*における骨形成能評価

¹物質・材料研究機構構造材料研究拠点, ²物質・材料研究機構機能性材料研究拠点

○廣本祥子¹ (Hiromoto Sachiko), 野田なほみ¹, 山崎智彦²

【緒言】

生体吸収性/生体内溶解性 Mg 合金は骨固定材やステントなどへの適用が検討され、生体内での Mg 合金の溶解速度制御および生体適合性向上の必要性が明らかになっている。本研究グループでは、水酸アパタイト (HAp) およびリン酸八カルシウム (OCP) 被膜を開発した。これらの被覆により培養液中およびマウス皮下での Mg 合金の腐食溶解が抑制され、両被覆表面に軟組織の接着がみられた¹。一方、*in vitro*では、表面の結晶粒子密度が高い HAp 被覆表面では細胞はよく接着・増殖したが、結晶粒子密度の低い OCP 被覆表面では細胞の接着が抑制された²。本研究においては、HAp および OCP 被覆が骨芽細胞の骨形成能に及ぼす影響を検討した。

【実験】

Mg-3mass% Al-1mass% Zn (AZ31) 合金ディスク (15 mm^φ x 2 mm^t) 表面に水溶液浸漬処理により HAp および OCP を被覆した。試験片表面に MC3T3-E1 を 5x10⁴ cells/mL 播種し、1日目と8日目に培養液を交換して15日間培養した。培養2日、8日および15日目に ALP、タンパク質量および Mg 濃度測定を行った。培養液にはα-MEM+10% FBS を用い、比較材に研磨まま AZ31 およびガラス板を用いた。細胞なしの培養液浸漬試験も同様の手順で行った。

【結果と考察】

研磨まま AZ31 表面では細胞の接着・増殖がほとんどみられなかった。HAp 被覆 AZ31 およびガラス表面では、培養15日目に ALP 活性の顕著な増加がみられた。一方、OCP 被覆 AZ31 表面では細胞の局所的な接着・増殖はみられたが、ALP の発現はみられなかった。これらの結果より、Mg 合金の HAp 被覆により細胞の接着・増殖を促進して骨形成能を促進できる一方、OCP 被覆においては細胞の接着・増殖が抑制されるために骨形成がほとんど促進されないことがわかった。マウス皮下では OCP 被覆表面にも軟組織の接着がみられたことから、OCP 被覆表面についてはさらに検討が必要と考える。

1) S. Hiromoto et al., Acta Biomater., 11, 520 (2015). 2) S. Hiromoto et al., STAM, 18, 96 (2017).

1A-03-I

高分子／水界面に形成される温度応答性界面構造の細胞接着制御への応用

¹九州大学大学院工学府, ²九州大学先端物質化学研究所, ³山形大学有機材料システム研究推進本部
○北原洋子¹ (Kitahara Yoko), 村上大樹^{1,2}, 田中 賢^{1,2,3}

【緒言】

生体組織との接触下で使用される高分子材料には、生体親和性の付与が必須である。我々は、生体親和性に優れた高分子材料の多くは、その水界面に数十ナノメートルスケールの規則的な界面構造を自発的に発現する現象を報告してきた。生体親和性に優れ、温度応答性を有する Poly[2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate] (PMe2MA)を用い、PMe2MA/PBS 界面の原子間力顕微鏡観察を行った。界面構造が下部臨界溶液温度よりわずかに高い温度で温度可逆的に発現・消失したことから、この界面構造は高分子/水界面領域の面内相分離現象に起因して形成されており、界面には「Polymer-rich 相 (界面構造の凸部)」と「Water-rich 相 (凹部)」が存在していると考えられる。本研究では、この面内相分離現象と細胞接着との相関性を明らかにするために、タンパク質吸着と細胞接着の温度依存性を調べた。

【実験】

細胞外マトリックスの主要タンパク質であるフィブロネクチン (FN) の吸着量を、 μ BCA 法により測定した。細胞接着挙動の観察は PET 基板にコートした PMe2MA 上で、NIH3T3 細胞を用いて行った。

【結果と考察】

37 °C から 22 °C への温度変化に伴う面内相分離構造の消失に伴い、FN 吸着量の明らかな減少が確認されたことから、FN は面内相分離構造における「Polymer-rich 相」に選択的に吸着していることが示唆された。細胞接着挙動の観察では、37 °C において PMe2MA 上に接着した細胞は 22 °C においても脱着することはなかったが、PMe2MA 上に FN をコートし、無血清培地中で同様の実験を行うことで温度低下に伴って脱着する様子が確認された。37 °C において FN を足場として接着した細胞が、22 °C における FN の脱離に伴い接着の足場を失ったために脱着したと考察している。この結果は PMe2MA が FN のような特定のタンパク質だけを選択的に吸着・脱離可能であることを示唆しており、今後は細胞種を増やして検討を行うことで詳細を明らかにしたいと考えている。講演ではその検討内容についても紹介する予定である。

1B-01-II

温熱療法と paclitaxel 徐放の併用を可能にするナノファイバーの開発

¹筑波大学大学院数理物質科学研究科, ²物質・材料研究機構 MANA, ³大阪大学医学部附属病院未来医療開発部,
⁴東京理科大学大学院基礎工学研究科

○新山瑛理^{1,2} (Niiyama Eri), 宇都甲一郎², 李 千萬³, 荏原充宏^{1,2,4}

【緒言】

体外からの高周波や磁場照射を利用して行われる温熱療法は、毒性が低いことと他の治療法と併用することで高い治療効果が得られるとして注目されている。肺がん等の治療に用いられる paclitaxel は、温熱と組み合わせることでその抗がん効果を増強させることが報告されている¹。これまでに我々は、癌治療のための様々なナノファイバーの研究を行ってきたが^{2,3,4}、本研究では局所温熱療法と化学療法との相乗効果に着目し、併用療法により効果的ながん治療を実現するためのナノファイバーの開発を行った。

【実験と結果】

温熱療法と化学療法の併用のため、同時に2つの療法を実現するために、以下の方法でナノファイバーを作製した。生分解生能を有する poly(ϵ -caprolactone)、交流磁場に応答して自己発熱を生じる磁性ナノ粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、そして paclitaxel を溶解・分散させた混合溶液を用意した。これを電界紡糸することで、磁性ナノ粒子および paclitaxel を内包したナノファイバーを作製した。肺腺癌細胞(NCI-H23)を用いて温熱と薬物の細胞毒性評価を行い、実際に作製したナノファイバーをモデルマウスに用いた抗癌活性について評価を行った。いずれの実験においても、ファイバー未使用時や抗がん剤のみ担持させたファイバーを使用した系と比較して、温熱と薬物の併用による相乗効果と考えられる、強力な殺傷効果を示す結果を得られた。本発表では、ファイバーの各種物性に加え、薬物放出評価および細胞・動物実験における結果について報告する。

参考文献 (1) A. Cividalli, et al., Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 44, 407-412 (1999) (2) R. Garrett et al., Fibers., 3, 478-490 (2015), (3) Y.J. Kim et al., Adv. Funct. Mater., 23, 5753-5761 (2013) (4) T. Okada et al., Materials, 9, 12 (2016)

1B-02-Ⅱ

がんイメージングと治療のための近赤外光励起型ナノセラノスティクス粒子

¹東京理科大学基礎工学部, ²東京理科大学イメージングフロンティアセンター, ³台湾國立清華大學生醫工程與環境科學系

○上村真生^{1,2} (Kamimura Masao), 大本 歩¹, 関山翔太¹, 梅澤雅和¹, 邱 信程³, 曾我公平^{1,2}

【緒言】

近年、組織透過性の高い近赤外(NIR)光を励起光として、可視アップコンバージョン(UC)および波長 1000 nm を超える(OTN-) NIR 発光を示す希土類含有セラミックナノ粒子(RED-CNPs)の光線力学療法(PDT)への応用が注目されている。本研究では、NIR 光(980 nm)励起により赤色(660 nm)の可視 UC 発光および OTN-NIR 発光(1550 nm)を示す RED-CNPs である希土類ドーパ NaYF₄ ナノ粒子の表面に、赤色光に反応して一重項酸素を発生する光増感剤である Chlorin e6 (Ce6)とポリエチレングリコール(PEG)を固定することで、体内深部における PDT と蛍光イメージングを同時に行うための新たなセラノスティクスナノ粒子(PEG/Ce6-NPs)を作製し、その機能評価を行った。

【実験】

PEG/Ce6-NP のマウス由来大腸がん細胞(Colon-26)に対する細胞毒性と PDT の効果を、WST 法によって評価した。さらに、PEG/Ce6-NPs を担癌モデルマウスの腫瘍部位に投与し、PDT の効果を評価した。また同時に、OTN-NIR 蛍光 *in vivo* イメージングシステムにより、腫瘍部位の OTN-NIR 蛍光を観察した。

【結果と考察】

PEG/Ce6-NPs を培養細胞に添加して NIR 光を照射したところ、高い細胞毒性を示すことがわかった。さらに、担がんマウスを用いて PDT の効果を検討したところ、PEG/Ce6-NPs を投与して NIR 光を照射した場合は、腫瘍の成長をほとんど抑制できることが明らかになった。また、腫瘍に投与した PEG/Ce6-NPs が発する強い OTN-NIR 蛍光を、マウスを切開することなく観察することもできた。これらの結果から、作製した PEG/Ce6-NPs は、PDT と OTN-NIR 蛍光イメージングを同時に行うことが可能な、新たなセラノスティクス材料としての利用が期待される。

1B-03-Ⅱ

金ナノロッドのフォトサーマル効果を用いた経皮送達システム

¹熊本大学大学院自然科学研究科, ²熊本大学大学院生命科学研究部, ³熊本大学大学院先端科学研究部

○宮本悠司¹ (Miyamoto Yuji), Aung Thu Haine¹, 橋本雄太¹, 古閑雄貴¹, 本山敬一², 有馬英俊², 新留琢郎³

【緒言】

経皮からの薬物送達 (TDS) は適用時間、血中薬物濃度のコントロールが、注射、経口投与と比べ容易である。本研究では多糖のゲルパッチを用い、金ナノロッドのフォトサーマル効果で促進される経皮送達システムを開発した。

【実験】

ゲルパッチの主成分として微生物由来の多糖であるゲランガムを用いた。それにコンドロイチン硫酸を混合し、アニオン性とした。これを乾燥させ、FITC ラベルしたオボアルブミン (FITC-OVA) あるいはその抗原ペプチド (FITC-OVA-peptide) と、カチオン性のポリアリルアミンで表面コートした金ナノロッドを含む水溶液で膨潤させた。このゲルをマウス背部に貼り付け、近赤外光を照射した。その後、皮膚の薄膜切片を作製し、蛍光顕微鏡で皮内への移行を観察し、また、ヘマトキシリン染色によって皮内の好中球の有無、角質層の肥厚が見られるかを評価した。さらに、ELISA 法によりマウス血中の OVA 特異的な IgG1 の抗体産生を調べた。

【結果と考察】

金ナノロッドを塗布したゲルに近赤外光を照射するとマウス背部のゲルパッチの温度はすぐに 45°C 近辺へと上昇し、その後一定となった。蛍光顕微鏡で皮膚薄膜切片を観察した結果、光照射していないものと比較して、多くの FITC-OVA、FITC-OVA-peptide が皮内へと移行している様子が観察された。また、光照射したマウスの血清中に抗 OVA IgG1 の誘導を確認した。さらに、*in vivo* の場合においてヘマトキシリン染色を行ったところ、温度上昇の見られたサンプルにおいて、皮膚組織内の好中球の増加、角質層の肥厚は観察されなかった。これらの結果より、本手法を用いることで炎症を誘導することなく、皮内へタンパク質あるいはペプチドを移行させることが可能であることが分かった。

1B-04-Ⅱ

原子間力顕微鏡 (AFM) を用いたリポソームの液中観察および粒子径分布解析

東レリサーチセンター材料物性研究部

○村司雄一 (Muraji Yuichi)

【緒言】

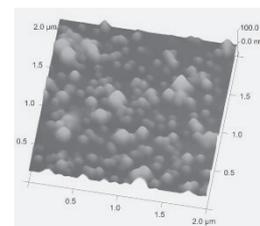
リポソームは表面修飾が容易、粒子径や電荷を制御し易い、生体適合性が高いといった利点があるため、DDS 分野で古くから広汎に研究・応用されている。リポソームを DDS のキャリアとして用いる場合、血中滞留性を向上させるため、粒子径が重要であることが知られている。粒子径の評価には透過型電子顕微鏡 (TEM) が用いられてきたが、真空中の観察になるという制約があった。ここでは、原子間力顕微鏡 (AFM : Atomic Force Microscopy) の特徴である「液中観察が可能」という利点を活かし、リポソームを液中で観察し、粒子径分布解析を行った事例を報告する。

【実験】

ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) /ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG) / コレステロールを 66.7 : 3.3 : 30 のモル比率で混合した試料をクロロホルムに溶解し、真空乾燥後、Tris-NaCl/EDTA バッファーを加え、室温で 5 分間ソニケーションすることによりリポソーム懸濁液を調製した。また、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (APTES) でシラン化したシリコンウェハ (基板) を作製し、これにリポソーム懸濁液を滴下後、液中で AFM 観察を実施した (液中でリポソームを AFM 観察するためには基板に固定する必要があり、本試料はアニオン性であるため、正に帯電した基板を用いた)。

【結果と考察】

得られた AFM 像を右図に示す。リポソームのベシクル構造が基板に吸着したと考えられる球状構造が観察された。また、得られた AFM 像から粒子径分布解析を行った結果、平均粒子径 68.3 nm、標準偏差 25.7 nm であった。これは、動的光散乱 (DLS) の結果 (66.3 nm ± 17.4 nm) と良い一致を示した。本報告ではリポソームを液中で基板に安定して固定・AFM 観察することに成功し、また、粒子径分布解析の有効性も示された。



1B-05-Ⅱ

マクロファージ検出のための磁性酸化鉄ナノ粒子含有リン酸カルシウム系粒子の作製

¹産業技術総合研究所, ²首都大学東京, ³筑波大学

○中村真紀¹ (Nakamura Maki), 大矢根綾子¹, 黒岩輝代子¹, 三澤雅樹¹, 沼野智一^{1,2}, 小菅寿徳³

【緒言】免疫細胞の一種であるマクロファージは、多くの炎症性疾患と関連している。患部に集積するマクロファージを安全かつ高感度に検出することができれば、これらの疾患の早期診断に有効であると考えられる。発表者らは、造影機能を付加したリン酸カルシウム (CaP) 系サブミクロン粒子が有用と考え、その単分散粒子を医療用注射液原料のみから合成することを目指した。具体的には、Sogo らの手法 [Curr. Appl. Phys., 2005, 5, 526] を参考に、認可済みの医療用注射液を原料とする CaP 過飽和溶液に、磁性酸化鉄ナノ粒子からなる核磁気共鳴イメージング (MRI) 用造影剤であるフェルカルボトランと、負電荷を有し分散剤としての効果の期待される抗凝固薬のヘパリンを添加し、共沈析出反応を起こした。得られた試料の組成・構造、分散性、およびマクロファージへの取込や毒性、MRI 造影能を評価した。

【実験】6 種の医療用注射液から調製した CaP 過飽和溶液と、フェルカルボトラン注射液、ヘパリンナトリウム注射液を混合し (最終濃度として、Ca : 3.68 mM, P : 1.83 mM, Fe : 0.25 mM)、37°C で 30 分静置した。析出物の洗浄により得られた試料の構造は、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX)、動的光散乱法などにより調べた。また、試料の濃度を変化させてマウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7) に添加し、RAW264.7 への取込や毒性を評価した。さらに、得られた試料を寒天液で固定し、MRI による計測を行った。

【結果と考察】SEM、EDX 分析の結果、得られた試料は、一次粒子径 100 nm 程度の粒子であり、Ca, P, O, C, Fe, S (ヘパリン由来) を含むことが分かった。以上より、過飽和溶液中での CaP とフェルカルボトラン、ヘパリンの共沈により、これらの複合粒子が生成したと考えられた。注射用水中に分散させた粒子は、ゼータ電位 -15 mV、平均粒子径約 300 nm の単分散粒子であった。ヘパリンを除いた系では分散性粒子は得られなかったことから、粒子に取り込まれたヘパリンが分散剤として機能したと考えられた。また、本粒子は RAW264.7 に効率良く取り込まれ (濃度によって 50-65% 程度)、検討した濃度においては毒性を示さなかった。MRI 測定の結果、本粒子がフェルカルボトラン単体と同等の緩和度を有することを確認した。

【謝辞】本研究は、科研費 (JP16H03831、JP16K09511) の助成を受けて実施された。

1B-06-II

がん細胞を標的とした高機能化タンパク質ナノ粒子の開発

東京工業大学生命理工学院

○池田裕介 (Ikeda Yusuke), 眞下泰正, 三重正和, 小島英理

【緒言】

ドラッグデリバリーシステム(DDS)の中でもキャリアを用いた DDS は、標的部位への親和性や生体内での安定性を付与することが可能となるため注目されている。特にタンパク質により構築されるナノキャリアは、生体適合性や低抗原性、生分解性、低コスト化などといった利点があり DDS キャリアとして大変優れている。そこで本研究では、タンパク質ナノキャリアにがん細胞への標的能と細胞内透過能を付加した高機能化タンパク質ナノ粒子を開発した。

【実験】

これまで当研究室では、エラスチン由来の温度応答性ペプチド(AVGVP)₄₂と、ポリアスパラギン酸(以下、D₄₄)の融合タンパク質を作製した。この D₄₄を導入したエラスチンポリペプチドは、疎水性薬剤と混合して加熱すると、D₄₄の反発力により粒径が 30 nm 程度に制御されたミセル状の粒子を形成する。この(AVGVP)₄₂ D₄₄タンパク質に、がん細胞への標的能と細胞内透過能を有する iRGD 環状ペプチドを融合した新規融合タンパク質 ADiR を構築し、高機能ナノキャリアの構築を試みた。作製したナノ粒子は、薬剤内包能、細胞標的能、細胞死誘導評価を行い、DDS キャリアとしての有用性を評価した。

【結果と考察】

融合タンパク質 ADiR は遺伝子工学的手法により作製した。アフィニティー精製により得られた融合タンパク質を加熱したところ、ナノサイズに制御された 30 nm ほどの粒子を形成し、疎水性低分子化合物とともに加熱することで、粒子化の際にそれらを内包することが明らかとなった。そこで蛍光色素 Coumarin-6 を内包させ、がん細胞に添加したところ、iRGD ペプチドを介した細胞内部への取り込みによる、蛍光の顕著な蓄積が確認された。また、抗がん剤 Paclitaxel を内包したナノ粒子をがん細胞に添加し、細胞生存率を評価したところがん細胞の死滅が確認された。これら結果より融合タンパク質 ADiR で構成されたタンパク質ナノ粒子は、表層に提示された iRGD ペプチドにより、がん細胞に対する優れた標的能と細胞内透過能を有し、DDS キャリアとして高い素質を有することが示された。

1B-07-II

再注入可能な持続性薬物徐放デバイスの開発と経強膜型網膜 DDS への応用

¹ 東北大学大学院医学系研究科, ² 東北大学大学院工学研究科

○西條早絢¹ (Saijo Saaya), 永井展裕¹, Song Yuanhui¹, 梶 弘和², 西澤松彦², 阿部俊明¹

【緒言】加齢黄斑変性症等の難治性網膜疾患は根本的な治療法がなく薬物投与による視力維持が治療の中心である。治療として一般的な点眼治療や臨床での抗 VEGF 抗体の硝子体注射が用いられているが後眼部(網膜)への不十分な薬物移行、服薬忘れ等のコンプライアンス、硝子体注射による頻回投与に伴う眼内への副作用リスクが課題にある。そこで当研究室では眼内に非侵襲的な経強膜薬物徐放デバイスを新規薬物投与方法として開発してきた。これまでのデバイスは薬物徐放終了時に摘出し再度新しいデバイスを埋植する必要があった。本研究はこの課題に注目し摘出不要な眼内持続徐放システムの開発を目的とした薬物を繰り返し再注入(Refill)できる機能をもつデバイスの研究に取り組んだ。

【実験】デバイスは徐放面にマイクロポアを有するカプセルと薬物を含んだキトサン/ゼラチンハイドロゲルで構成した。デバイスは CAD-CAM 微細加工法で 3 次元成型し基材にシリコーンのポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いた。ハイドロゲルは水溶性カルボジイミドによりゲル化させた。このインジェクタブルゲル(iGel)と PDMS の生物学的安全性は V79 細胞を用いた細胞毒性実験とラット強膜上埋植試験により確認した。iGel 独自の徐放性、デバイスの徐放制御はモデル薬物蛍光色素により確認しデバイスは動物の眼球曲面に適する形状を検討した。蛍光色素は低分子薬、生物学的製剤(抗 VEGF 剤等)の徐放モデルとしてそれぞれフルオレセイン、蛍光標識デキストラン(150kDa)を用いた。次に蛍光色素を含有したデバイスをウサギ強膜上へ埋植し蛍光カメラで観察した。また空のデバイスをウサギ強膜上に埋植後 iGel 注入試験を行った。

【結果と考察】PDMS のゴム性や刺し穴が閉じる性質によりデバイスへの穿刺、数回に渡る薬剤注入を可能にした。iGel 基材の配合によりデバイス内でのゲル化を可能にし、徐放試験では iGel 自体の徐放性、カプセルのポアとゲルによる二段階長期徐放が確認できた。デバイスの形状はステンレス製ワイヤーを内部に組み込むことで多様な眼球に適したカーブを描くことを可能とし、蛍光色素を含有したデバイスをウサギ強膜上へ埋植した実験では強膜上での徐放性を蛍光カメラで確認した。またウサギ強膜上に埋植したデバイス内への iGel 注入が可能であることを確認した。これらの結果から PDMS 製カプセルと iGel を用いた再注入型デバイスは眼内に侵襲性の低い長期薬物徐放デバイスとして期待できると考えられた。

1B-08- I

再生医療への糖鎖含有高分子の応用

国際科学振興財団再生医工学バイオマテリアル研究所

○後藤光昭 (Goto Mitsuaki), 関 禎子, 赤池敏宏

【緒言】

再生医療の実現のためには、様々な高分子マテリアルの利用が欠かせない。しかし、高分子マテリアルに関する理解は浅く、再生医療研究者の多くが実際に細胞培養に使用しているポリスチレンシャーレの可塑剤、成形方法すら認知せずに使用している。

我々は、生体に学び、生体を超越する人工的なマテリアル開発は、今後の再生医療には欠かせないと考えている。このコンセプトに基づき研究・応用されてきた糖鎖含有高分子は、ポリスチレンシャーレを均一にコーティングでき、細胞とシャーレ表面の認識条件を糖鎖のみに限定した培養条件を提供できることを実証してきた。

本報告では、糖鎖高分子に対する ES/iPS 細胞を含めた幹細胞系の接着挙動に関して報告する。

【実験】

糖鎖高分子を 0.01w/v% の濃度で、ポリスチレンシャーレにコーティングし、各種細胞を 1×10^4 cells/ml の濃度で播種し、4 時間、24 時間～後の細胞接着や増殖挙動を観察した。

【結果と考察】

糖鎖に応じて、細胞の接着挙動が変化すると共に増殖挙動も変化することが明らかになった。さらに興味深いことにガラクトースを有するポリマー上でガン幹細胞を培養するとポリマー上にガン幹細胞が接着せず、なおかつガン幹細胞のスフェロイド化が起こり未分化性が維持されることが判った。報告時にはより詳細に結果を示す予定である。

1B-09- I

弾性率可変型培養基材：超生理学的弾性領域における動的変化の効果

¹物質・材料研究機構若手国際研究センター、²日本大学理工学部物質応用化学科、²ワシントン大学ケミカルエンジニアリング専攻、⁴物質・材料研究機構国際ナノアーキテクトニクス研究拠点

○宇都甲一郎¹ (Uto Koichiro), 青柳隆夫², DeForest Cole A³, 荏原充宏⁴

【緒言】弾性やトポロジーなど細胞足場の構造力学的要因が発生、組織の再生、病気の発症などの生命現象と密接に関係することが明らかにされつつあるが、その動的変化のレンジや時間軸に対する検討はほとんど報告されていない。そこで本研究では、生体適合性を有し半結晶性高分子として知られるポリ(ϵ -カプロラクトン)(PCL) が示す結晶-非晶転移現象に着目し、様々な“タイミング”で細胞に弾性変化を誘起可能な動的培養基材を設計し、その細胞機能に与える超生理的基材弾性の静的・動的効果について検討した。

【実験】多価アルコールを開始剤とし、触媒としてオクチル酸スズを用いて窒素気流下で CL の開環重合により分岐型の PCL を合成した。さらに分岐型ポリマーの末端水酸基にアクリロイル基を導入し、熱重合により架橋膜を調製した。種々の方法により、合成したポリマーの構造、熱的性質および力学的性質は評価した。PCL 架橋膜の弾性率や温度変化に対する細胞機能についても評価した。

【結果と考察】4 分岐 10 量体 PCL および 2 分岐 20 量体 PCL マクロモノマーの混合組成を変えることで、融点 (T_m) の精密制御が可能であり細胞培養可能な領域に融点を持つ架橋膜の作製に成功した。架橋膜の力学的特性評価を行った結果、 T_m 前後で弾性率を変化させることが確認され、混合組成を最適化した材料は、わずかな数度の違いにより弾性率を劇的に変化させることが示唆された。表面濡れ性を評価した結果、PCL 架橋膜は T_m 以下・以上でほぼ同等の接触角の値を示すことが確認され、本研究で調製した PCL 架橋膜が細胞培養可能な狭い温度域で表面の濡れ性を変化することなく劇的な弾性変化を誘起可能な細胞培養基材となり得ることを明らかとした。興味深いことに、37 °C で高い弾性率を示す架橋膜を融点以上に加熱した後、再度 37 °C にすると固体状態を維持したまま低弾性を維持することが確認され、同一材料・同一条件でありながら弾性率が異なる基材材料の作製にも成功した。本研究で用いた PCL 基材は温度変化前後のどちらにおいても超生理学的弾性を有しているにもかかわらず、その動的変化が細胞機能に影響を及ぼすことを明らかにした。

1B-10- I

メカノバイオロジーによるがん細胞老化制御—Materials-induced Senescence (MIS)

¹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), ²筑波大学大学院数理物質科学研究科,

³東京理科大学大学院基礎工学研究科

Sharmy S. Mano¹, 宇都甲一郎¹, ○荏原充宏^{1,2,3} (Ebara Mitsuhiro)

【緒言】近年、弾性やトポロジーなど細胞足場の構造力学的物性が発生、組織の再生や病気の発症などの生命現象と密接に関係することが明らかにされつつある。本研究では、材料の流動性のがん細胞の老化 (senescence) に及ぼす影響について検討した。材料の流動性が上がると、がん細胞が自発的に senescence を起こすことが確認された。さらに流動性が上がると細胞周期が G1/G0 に捕捉され、抗癌剤の効き方にも影響を及ぼすことを見出した。このように、材料の流動性のみでがん細胞の senescence を誘導できれば、新たな治療法としての期待が持てる。

【実験】多価アルコールを開始剤とし、触媒としてオクチル酸スズを用いて窒素気流下で CL または D,L-ラクチド (DLLA)との開環共重合により分岐型の P(CL-co-DLLA)を合成した。得られたポリマーはスピコート法によりガラス基板上に成膜化することで未架橋基材を調製した。ヒト肺癌細胞(NCI-H23)を用いて細胞老化に及ぼす影響を検討した。特に細胞老化のバイオマーカーである p53、IGFBP5 に注目しその発現挙動について評価した。

【結果と考察】本研究は、細胞に対して流動的環境を提供する新規基材材料の作製に成功した。架橋・未架橋基材上での細胞挙動を比較することで、基材の動的かつ散逸的な物性が強く影響を及ぼすことを明らかとし、これまでほとんど検討されることがなかった基材の流動性の重要性を明らかとした。特に、細胞老化のバイオマーカーである p53、IGFBP5 に注目しその発現挙動について評価した。流動性基材の上では IGFBP5 の発現が見られ、細胞老化の挙動が観察された。この基材の「流れ」を積極的に利用することで従来法と比較して簡便かつ安価な細胞操作可能な培養基材あるいは三次元培養用基材としての応用が可能であり、組織工学、再生医療や創薬スクリーニングなど幅広い分野への応用が期待される。

1B-11- I

ペプチド修飾 PEG 脂質を用いた流動性平面膜上における細胞接着挙動

東京大学大学院工学系研究科

○野入信人 (Noiri Makoto), 久代京一郎, 寺村裕治, 高井まどか

【緒言】

医用材料の開発において材料表面への細胞接着を理解し、制御することは重要である。生体内は流動的環境にあることが知られ、静的な材料表面とは大きく異なるため、流動性表面と細胞との相互作用を解析することが重要だと考えられる。本研究では、表面の流動性が細胞接着に及ぼす影響を評価することを目的とした。機能性ペプチド(RGD、K8)を修飾したポリエチレングリコール結合リン脂質(PEG 脂質)を用いて流動性表面を作製し、流動性表面と細胞との相互作用を解析した。

【実験】

流動性表面の作製は、PEG 脂質溶液(100 µg/mL in PBS)に末端がメチル基の自己組織化単分子膜 (CH₃-SAM)を修飾した金基板を室温で 30 min 浸漬することで行った。作製した表面のペプチド密度および流動性をそれぞれ水晶振動子微量天秤(QCM)、光褪色後蛍光回復(FRAP)法により評価した。さらに、作製した表面上にヒト乳腺上皮細胞 MCF-10A を播種、培養し(37 °C, 5 %CO₂)、顕微鏡観察により細胞接着挙動を評価した。

【結果と考察】

CH₃-SAM 表面へのペプチド修飾 PEG 脂質の導入量を QCM-D を用いて評価した結果、導入量はペプチドの種類によらずおよそ 0.8 chains/nm²であった。また、FITC 標識 RGD ペプチドを修飾した PEG 脂質の流動性を FRAP 法により評価したところ、PEG 脂質の拡散係数は 2.96±0.34 µm²/s であった。これは細胞膜にある膜タンパク質の 10-1000 倍ほど高い値である。流動性 RGD 表面では、播種から 3 日後も細胞接着が見られなかった。比較として作製した非流動性 RGD 表面では細胞の接着および増殖が見られることから、流動性の高い表面では細胞膜のインテグリンが RGD ペプチドを認識できなくなることが示された。一方で、カチオン性の K8 ペプチドを修飾した表面では流動性があっても細胞の接着および増殖が見られた。また、このでは細胞が伸展せずに丸い形状のまま接着していた。このことから、流動性表面では細胞が伸展するための牽引力が発揮できないことが示唆された。

1B-12- I

3次元血管ネットワーク形成を誘導する高機能タンパク質ハイドロゲルの構築

東京工業大学生命理工学院生命理工学系

○水口佳紀 (Mizuguchi Yoshinori), 真下泰正, 三重正和, 小島英理

【緒言】

機能性3次元生体組織を構築するには、播種された細胞の壊死を防ぐための3次元血管ネットワークが不可欠である。3次元的に脈管形成、血管新生を誘導するには、血管内皮細胞周辺の細胞外微小環境を制御する必要があり、この3次元空間が精密にデザインされた高機能性3次元足場材料の開発が求められている。本研究では、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの結合を介して血管新生を誘導することが知られている骨シアロタンパク質 (BSP) 由来のRGD配列 (bRGD) を組み込んだ温度応答性タンパク質からなる超分子ハイドロゲルを構築し、*in vitro*での3次元血管ネットワーク形成の誘導を行った。

【実験】

本研究では、エラスチン由来の感温性ポリペプチド配列 (AVGVP)₄₂に着目し、このタンパク質に静電的反発により凝集を制御するポリアスパラギン酸 D₈₈、架橋点となるアンチパラレルコイルドコイルを形成する Coil-LL ペプチド CL2 を連結することにより、新規温度応答性ゲル化タンパク質 (AVGVP)₄₂-D₈₈-CL2 (coiled-coil unit bound elastin-like polypeptide: CUBE) を開発した。さらに、この融合タンパク質に生理活性ペプチド bRGD を導入することにより bRGD-CUBE の構築を行った。本高機能タンパク質ゲル内でヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を3D培養し、脈管形成能の評価を行った。

【結果と考察】

CUBEの物性を評価したところ、低温ではゾル、高温ではゲル状態へと可逆的に変化する温度応答性ゾルゲル転移を示し、bRGDペプチド導入後もゲル化能を保持していることが観察された。bRGD-CUBE内で培養したHUVECは16時間以内に3次元血管ネットワークが形成されている様子が観察された。したがって、CUBEゲル内に3次元的に配置されたbRGDは適切な構造を保っており、本高機能タンパク質ハイドロゲルはHUVECの血管誘導に適した微小環境を提供していると考えられる。また、この3次元脈管形成はbRGD濃度依存的に誘導されていることから、bRGDが3次元的に適切に配置されることがHUVECの機能制御に重要であることが示唆された。

1B-13- I

ラット頭蓋骨欠損モデルを用いたヒトデ骨由来Mg固溶 β -TCPの骨形成能の評価

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

○石田 悠^{1,2} (Ishida Haruka), 田中 学³, 滝澤 崇³, 傍島 淳³, 鎌仲貴之³, 竹内あかり², 小林亜祐実², 金子雅之², 黒田千佳³, 上田勝也^{1,2}, 齋藤直人^{1,2}, 羽二生久夫^{1,2,3}

【緒言】昨年、我々は天然素材であり、均質かつ微細な連通多孔構造を持つヒトデ骨から得た β -TCP (Sf-TCP) が *in vitro* で生体親和性を示すことについて報告した。そこで今回はラット頭蓋骨欠損モデルに Sf-TCP を埋入し、骨形成能について評価した。

【実験】ヒトデ骨はリン酸水素二アンモニウム水溶液を用いた水熱処理により、生来の連通多孔質 (平均気孔径 10 μm) を維持したまま炭酸カルシウムから β -TCPへと組成変換を行い、XRDによりMg固溶 β -TCPであると同定した。比較対象である歯科用 β -TCP (セラソルブM; 粒径 150~500 μm , 気孔径 5~500 μm) とサイズをそろえるため、Sf-TCPを150~500 μm で篩分して用いた。実験には8週齢、オスのWistar Ratを使用し、頭蓋骨に5mm径の骨欠損部を設け、骨欠損部に何も埋入しないsham群、Sf-TCP群、セラソルブM群の3群で行った。各群は術後4週と8週で安楽死させ、各群の骨欠損部を含む頭蓋骨を採取してホルマリン固定した。マイクロCTスキャンによる観察後、頭蓋骨を脱灰処理して薄切切片を作製し、HE染色とマッソントリクローム染色による組織学的評価を行った。

【結果と考察】マイクロCT像において、sham群は欠損部の縮小を示さず、Sf-TCP群とセラソルブM群では埋入した β -TCPが欠損部内に留まっている像が得られた。組織学的検討において、4週の時点でSf-TCPとセラソルブMともに周辺部では新生骨と思われる染色箇所が散見したが、連通多孔構造内部への細胞侵入はセラソルブM群と比較してSf-TCP群で顕著に見られた。さらに、Sf-TCP群はマッソントリクローム染色でその内部に赤血球の存在を示す像が得られたことから、毛細血管がSf-TCP内部に形成されている可能性が示唆された。これらの結果からSf-TCPの非常に優れた骨補填材としての可能性が示された。

1B-14- I

Nanoarchitectures of Ti surface promote adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²Aisin Seiki Co., Ltd.

○Peng Chen¹, Toshihiro Aso², Ryuichiro Sasaki², Maki Ashida¹, Yusuke Tsutsumi¹, Hisashi Doi¹, Takao Hanawa¹

Introduction Direct coating of tissue or stem cells on medical and dental implants is predicted as a next generation surface modification, which could bring a significant innovation of biomaterials. Surface topography plays an important role to control of the attachment of cells or formation of tissue on substrate materials. To clarify the effects of the nanoscale surface topography on cell initial adhesion and differentiation behaviors, we studied the morphology and multi differentiation capacities of human mesenchymal stem cells (hMSCs) on titanium (Ti) surfaces with periodic nanoscale surface architectures fabricated using a femtosecond laser irradiation.

Methods CP Ti was mirror-polished (Mirror) and scanned using a femtosecond laser. Three types of grid patterns on Ti was obtained: micron (Micron, fluence: 0.7J cm⁻²), nano (Nano, fluence: 0.8J cm⁻²), and micron/nano hierarchy (Hybrid: scanned by both polarization beams). Extended cells were observed by fluorescent staining. The differentiations for neurocytes, adipocytes, osteocytes or chondrocytes were induced with induction mediums, respectively. Differentiation of hMSCs response to topographies was evaluated with target genes expression levels and fluorescent antibody staining.

Results and discussion: A distinct grid pattern of focal adhesions of cells was observed on Micron and Hybrid. The shape of cell and position of vinculin indicated that the Micron promoted the cellular immobilization on the substrate, while, Nano promoted the cellular locomotion. A superposed effect was obtained by Hybrid. The results of target gene expression after 5-d induction indicated that Nano promoted the differentiation inductions of hMSCs in all four detected cellular differentiations. In particular, alizarin red s staining results showed Nano strongly promoted osteogenic differentiation of hMSCs after 3-w induction. These unique nanoarchitectures fabricated by femtosecond laser irradiation possibly contribute to achieve next generation surface modification for biomaterials applied for orthopedic and dental implant.

1B-15- I

血管新生能と骨形成能を兼ね揃えた多孔質スキャフォールドの作製および生物学的評価

¹明治大学大学院 理工学研究科

○針谷 諒¹ (Hariya Ryo), 本田みちよ¹, 相澤 守¹

【緒言】

大きな骨欠損を修復するには、優れた骨形成能と血管新生能を有する生体材料が望ましい。我々は三次元的な骨組織の再生のために、優れた生体活性を示す水酸アパタイトからなる多孔質スキャフォールド、Apatite-fiber Scaffold (AFS)の開発に成功している。本研究では、AFSに血管誘導能を付与する因子として、結合組織成長因子 (CTGF) に着目した。この CTGF は骨形成能を有するだけではなく、三次元組織を維持するために必要な血管新生能を有することが知られている。そこで、本研究では、三次元的な骨組織を再生することを最終目標とし、CTGF を担持した AFS を作製し、*in vitro* および *in vivo* の観点から生物学的評価を行なった。

【実験】

Apatite-fiber (AF) は均一沈殿法により合成し、AF とカーボンビーズを所定の割合で混合し、一軸加圧成形、焼成することで AFS を作製した。AFS に 0-1 μg の CTGF を担持できるように調製した CTGF 溶液を滴下し、減圧脱気することによって CTGF 担持 AFS (CTGF-AFS) を作製した。CTGF-AFS の生物学的評価は、*in vitro* (骨芽細胞と血管内皮細胞を使用) および *in vivo* (Wistar rat (7 週齢, 200-220 g, ♂) の背部皮下への埋入)における試験により行なった。

【結果と考察】

培養 7 日目において、細胞が AFS の播種表面から最大 300 μm まで侵入していることがわかった。細胞は CTGF を担持することによって内部まで侵入している傾向を示した。特に、血管内皮細胞は骨芽細胞が存在する場所に局在していたことから、骨芽細胞が分泌した液性因子だけでなく、細胞-細胞間の相互作用が重要だと考えられる。また、ラット背部皮下へ埋入したサンプルの組織学的評価 (HE 染色) を行なったところ、AFS の気孔率に依存して多くの細胞が内部に侵入していることがわかった。さらに、内皮細胞のマーカーである CD31 の免疫染色の結果、CD31 陽性の細胞が AFS と比較して CTGF-AFS に多く観察された。これらの知見は CTGF-AFS は高い血管新生能を有することを示している。

1B-16-I

感温性ロッド状微粒子の調製と細胞取り込み制御

¹東京理科大基礎工, ²大阪大院工

○菊池明彦¹ (Kikuchi Akihiko), 小助川陽太¹, 川瀬雅俊¹, 石原 量¹, 麻生隆彬²

【緒言】初期免疫に関与するマクロファージは、微粒子の表面物性の違いを認識し、貪食能の発現が変化することが知られる。また微粒子サイズ、形状の違い(球状・ロッド状)がそれぞれ貪食能の発現に影響することが最近報告されている。一方、表面に抗原を有するロッド状微粒子は、抗原提示細胞の機能を模倣してリンパ球のT細胞の活性化を促進させることが報告された。以上の結果は、微粒子と細胞との相互作用の制御において、微粒子の形状と表面物性を同時に設計することが重要であることを示す。そこで我々は、温度制御による微粒子の表面物性・形態が細胞内送達制御に与える影響を明らかにすることを目的に研究を行った。

【実験】 ATRP 法と末端官能基変換により、ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド-*co*-ジメチルアクリルアミド) (P(NIPAAm-*co*-DMAAm))マクロモノマーを調製した。マクロモノマーを所定量のプロピルメタクリレート(PMA)、メチルメタクリレート(MMA)とともにメタノール/水 = 9/1 (v/v)混合溶媒中、30℃で14h分散共重合し、球状微粒子を得た。次に微粒子含有ポリビニルアルコール (PVA)膜を作製し、微粒子コアの T_g 以上で一軸延伸しロッド状微粒子を得た。走査型電子顕微鏡(SEM)により微粒子の形状を観察した。さらに微粒子存在下マウス単球由来マクロファージ(RAW264.7)を培養し、微粒子の表面物性と形態がマクロファージの貪食に与える影響を議論した。

【結果と考察】 仕込み組成を変化させることでP(NIPAAm-*co*-DMAAm)では37.6-43.5℃の範囲で制御しうることがわかった。DMAAm を 25 mol%有するマクロモノマーを用い微粒子を調製したところ粒径が 650-700 nm でコアの T_g が 35-40℃の球状微粒子を得た。 T_g を 40℃に有する微粒子を分散させた PVA フィルムを一軸延伸して得たロッド状微粒子の温度変化に伴うアスペクト比の変化を調べた結果、コアの T_g 以下の温度である 37℃では初期に形状が若干変化したものの3h以降24h後までアスペクト比は2.0前後でそれ以下になることはなかったのに対し、コアの T_g 以上の温度である 42℃では24h後にアスペクト比が1.2にまで低下し、SEMからはほぼ球状微粒子に戻った。以上より、温度変化に応答して形状変化する微粒子を得た。発表では細胞との相互作用についても議論する。(本研究は科研費(16H03184)により実施した。)

1B-17-I

新規 GlcNAc 糖鎖高分子を用いた Type3 中間径フィラメントの新機能の発見

¹九州大学先端物質化学研究所, ²九州大学工学研究院科学工学部門

○伊勢裕彦¹ (Ise Hirohiko), 三浦佳子²

【緒言】ビメンチンを初めとする Type3 型中間径フィラメントは、細胞の形態維持として働く細胞骨格分子である。これらの分子のガン組織や慢性炎症性疾患の疾患部位における高発現が以前より知られているが、近年、ビメンチンにおいては悪性度の高いガン細胞における細胞膜表面上への出現が報告され、治療に対する新たな標的分子として期待されている。また細胞表面上のビメンチンが、GlcNAc を多価に有する GlcNAc 糖鎖高分子と結合することも報告されている。従って、GlcNAc 糖鎖高分子によるビメンチンを標的とした治療戦略が期待できる。本研究では、細胞表面のビメンチンに対して高い相互作用有する GlcNAc 糖鎖高分子の新たな設計を試みた。さらに Type3 中間径フィラメントであるグリア線維性酸性タンパク質(GFAP)及びペリフェリンの細胞表面上への出現と新たな GlcNAc 糖鎖高分子に対する相互作用を検討した。

【実験】新規 GlcNAc 糖鎖高分子としてカルボキシエチルアクリル酸に1位をアミノ化した GlcNAc 単糖を結合したモノマーを作製した。このモノマーの reversible addition-fragment chain transfer (RAFT) 剤によるリビングラジカル重合を行い、分子量が異なる新規 GlcNAc 糖鎖高分子(AC-GlcNAc)を作製した。AC-GlcNAc の末端に蛍光基を導入し、HeLa 細胞や GFAP を発現するグリオーマ細胞、ペリフェリンを発現する PC12 細胞の相互作用をフローサイトメトリーで検討した。さらにビメンチン欠損 HeLa 細胞に GFAP やペリフェリンを遺伝子導入した細胞と AC-GlcNAc の相互作用を検討した。

【結果と考察】 AC-GlcNAc は、RAFT 剤による重合で重量平均分子量 12000、9300、4700 の3種類が作製できた。これらの分子量が異なる AC-GlcNAc と HeLa 細胞との相互作用の検討では、分子量の最も低い 4700 (n=13) が高い相互作用を示した。またグリオーマ細胞や PC12 細胞、GFAP 発現ビメンチン欠損細胞、ペリフェリン発現ビメンチン欠損細胞においても AC-GlcNAc (n=13) の相互作用が観察された。低い分子量に制御された新規 GlcNAc 糖鎖高分子 AC-GlcNAc が作製され、ビメンチンを発現する HeLa 細胞に高い相互作用を有することが示された。またこの AC-GlcNAc により Type3 中間径フィラメントの共通の機能としての細胞表面出現と GlcNAc 結合活性が明らかにされた。

1B-18-II

血液適合性高分子材料を用いたがん細胞の認識性と運動性の制御

¹九州大学先端物質化学研究所, ²山形大学大学院理工学研究科, ³山形大学有機材料推進本部

○荒津史裕¹ (Aratsu Fumihito), 蔡 孟諭¹, 小林慎吾^{1,2}, 田中 賢^{1,3}

【背景と目的】がん疾患において原発巣から他の組織や臓器へのがん細胞の浸潤・転移はがんの悪性化に深く関与しており、これを制御できる生体接触型の医療デバイスの開発が急務である。がんの浸潤・転移の制御に関与する細胞運動には、主要な足場タンパク質である fibronectin (FN) とのインテグリンを介した接着によるアクチン骨格の再構成が重要であることから、足場材料を用いてがん細胞の接着・運動性を制御することで効果的ながんの治療法の確立が期待される。一般的に、材料は血液などの生体成分に接触すると炎症反応、免疫反応、血栓形成、感染などが生じるため、医療材料には血液中のタンパク質などが吸着・変性せず血球系細胞の接着・活性化が生じない血液適合性が必須である。当研究室で開発された合成高分子 poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) は高い血液適合性を示し、人工心肺などの医療デバイスの被覆材料に応用されている。含水時に PMEA 表面には自由水、不凍水、中間水から成る水和構造が形成され、とりわけ中間水が PMEA の血液適合性に重要な役割を担うことが示された。また、PMEA およびその構造類似体において、この中間水の量によって材料表面に吸着するタンパク質の種類、量、構造が変化し、中間水量に依存してがん細胞が選択的に接着することが確認された。これらより、高分子材料の血液適合性と細胞認識性は高分子中の中間水量により制御できることが示唆された。本研究では、PMEA 表面におけるがん細胞の選択的な接着と運動性の制御とその分子機構の解明を目的とする。

【手法と結果】中間水量の異なる PMEA およびその類似体である poly(butyl acrylate) (PBA), poly(tetrahydrofurfuryl acrylate) (PTHFA), poly[2-(2-(2-methoxyethoxy) ethoxy)ethyl acrylate] (PMe3A), poly{2-(2-methoxyethoxy)ethyl acrylate} (PMe2A) を精密合成し、スピニング法により polyethylene terephthalate (PET) を表面処理して高分子基板を作製した。高分子中の中間水量に依存して血清タンパク質の吸着・変性量が増加し、がん細胞の接着性や形態に違いが確認された。特に、中間水の含有量によってインテグリン依存性および非依存性な細胞接着様式が確認された。また、がん細胞の運動性において運動の方向や速度に違いが確認された。以上より、中間水量の異なる血液適合性材料において中間水によりタンパク質の吸着挙動やがん細胞の接着様式が変化してがん細胞の運動性が制御されることが示唆された。

1B-19-I

酸化チタン薄膜を利用した光応答型細胞培養器の試作

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 (院)

○上田正人¹ (Ueda Masato), 山口莉嘉¹, 藤田智香², 池田勝彦¹

【緒言】TiO₂は、バンドギャップ (E_g) が 3.0-3.2 eV の n 型半導体であり、紫外光 (UV) を照射すると、起電力・電流の発生、表面における水酸基密度の上昇などの反応が生じる。この光化学反応を細胞の接着・増殖・剥離挙動の制御に利用できないかと考えた。そこで本研究では、SiO₂ 板、または純 Ti 板上に TiO₂ 薄膜を合成し、播種した細胞に UV が直接照射されないような構造の細胞培養器を試作すると共に、その光応答性を様々な観点から調査することを目的とした。

【実験】合成 SiO₂ 板に Ti(OC₃H₇)₄ を原料としたゾル・ゲル法により TiO₂ 薄膜を合成した。さらに、純 Ti ターゲットを Ar-O₂ 混合ガス中 (流量比 8:5) でスパッタリングすることによっても同様の薄膜を合成した。この構造では、TiO₂ 表面が細胞培養面、SiO₂ 側が UV 照射面である。一方、純 Ti 板の片面には、H₂O₂/HNO₃ 水溶液による化学処理の後、NH₃ 水溶液による水熱処理を施すことで TiO₂ 薄膜を合成した。同膜は Hanks 液を接触させた状態で SiO₂ 板とエポキシ接着剤を用いて封入した。この構造では、Ti 表面が細胞培養面、SiO₂ 側が UV 照射面である。合成膜の光透過・吸収スペクトル、UV 照射下での自然電位、光電流、水滴接触角変化などを測定することで光応答性を評価した。一部の細胞培養器では、マウス由来初代骨芽細胞の接着挙動に及ぼす UV 照射の影響も調査した。

【結果と考察】合成した TiO₂ 膜では、波長が 370~390 nm の光を吸収することが確かめられた。その吸収は、膜厚の増加と共に増大し、膜厚が約 100μm になると、UV 成分は完全に吸収された。また、ゾル・ゲル法で合成した TiO₂ 膜では、37 nAmm⁻² の光電流が発生した。これらは、TiO₂/SiO₂ 構造の細胞培養器において SiO₂ 側から UV を背面照射することによって、TiO₂ 表面に播種した細胞に UV を曝すことなく、光化学反応による刺激のみを細胞に伝達することが可能であることを示している。Ti/TiO₂/Hanks/SiO₂ 構造の細胞培養器では、UV 照射によって約 0.3V の起電力が発生した。短時間の UV 予備照射を行った TiO₂ 表面では、その後の暗所下での細胞接着が促進される傾向が認められた。それに対して、UV を背面から連続的に照射すると、TiO₂/SiO₂ 構造、Ti/TiO₂/Hanks/SiO₂ 構造共に、細胞の接着が忌避された。これらは、細胞の接着挙動を光照射によって非接触、かつ局所的に制御できる可能性を示唆している。

1B-20-I

ウレイド高分子を使った細胞培養形態制御

東京工業大学生命理工学院

○嶋田直彦 (Shimada Naohiko), 斎藤美奈子, 丸山 厚

【緒言】我々はウレイド基を有する高分子(ウレイド高分子)が生理的な pH および塩濃度条件下において、上限臨界溶解温度(UCST)型のコアセルベート滴形成に基づいた相分離挙動を示すことを報告してきた。ウレイド高分子は血清を含む細胞培養条件下においても UCST 型挙動を示すことが分かっている。面白いことに、単層培養細胞にウレイド高分子を相分離温度以下で添加すると細胞凝集塊であるスフェロイドへと形態変化した。本研究では、温度刺激等の外部刺激によってウレイド高分子の相分離状態をコントロールすることで、単層-スフェロイド培養の切り替えを行った。

【実験】ウレイド高分子であるポリ(アリルアミン-co-アリルウレア)はポリアリルアミンにシアン酸カリウムを加えることで得た。NIH-3T3 (3×10^5 cells)を 35 mm の培養皿に播種後、37 °C で 24 時間インキュベートした。ウレイド高分子を 1mg/mL になるように添加し、25 °C で 48 時間観察した。その後、37 °C に温度を切り替え、24 時間タイムラプス観察を行った。また、ウレイド高分子を添加後の細胞に、ヘパリンを添加し、37°C で培養しながらタイムラプス測定を行った。

【結果と考察】血清を含む細胞培養条件下において、37 °C に相分離温度を持つウレイド高分子($A_{91:91}$ mol%アリルウレア, 9 mol% アリルアミン)を NIH-3T3 細胞に添加し、25 °C に温度を冷却した際、培養皿にコアセルベート滴が付着し、スフェロイドへと形態変化した。その後、37 °C へと培養温度を変えたところ、コアセルベート滴は消失し、スフェロイドは単層培養へと戻った。ウレイド高分子は相分離温度以下においてコアセルベートとして相分離し、培養皿へ付着し細胞-培養皿間あるいは細胞-細胞外マトリックス間の相互作用が阻害され、スフェロイド形成をしたものと考えられる。相分離温度以上にすることで、コアセルベート滴が消失し、細胞と培養皿との相互作用が可能になったため、単層培養へと戻ったと考えられる。以上のように温度変化によって、単層とスフェロイド培養を可逆的に切り替えるシステムの構築に成功した。また、スフェロイド形成後、ヘパリンを添加することで温度変化を行うことなく、単層培養へと切り替えることができた。

1B-21-I

光分解性高分子を利用した細胞パターンニング表面の開発

¹富山大学大学院理工学教育部, ²富山大学工学部, ³富山大学大学院理工学研究部, ⁴富山大学大学院生命融合科学教育部, ⁵高分子-水界面研究所, ⁶阪有機化学工業株式会社

○小川広晃¹ (Ogawa Hiroaki), 奥山勇斗², 山澤由佳¹, 中路 正^{1,2,3,4}, 北野博巳⁵, 猿渡欣幸⁶

【緒言】

表面の一部を改質し細胞等の生体物質をパターン化する技術は多数報告されているが、改質によって生成された産物の細胞への毒性の問題やそもそも生体物質存在下での改質には向かない等から、in situ (培養状態等の生体環境下)での表面改質方法の確立には至っていない。そのため現状では、細胞-細胞間、細胞-材料間の相互作用を in vitro で同時に評価できる実験系は確立されていない。そこで生体物質に対して、比較的影響が少ない 360~370 nm の紫外線で改質できる methoxy-poly(ethyleneglycol)₈ acrylamide (MEGAm) を主構成要素としたポリマーを元とした表面改質剤を創製した。このポリマーで改質した表面は、光により一部分のみ改質でき、位置特異的に異種細胞を接着させることができることが期待される。加えて、改質過程で生成される産物はポリエチレングリコールであり細胞に対して無害である。

【実験】

MEGAm と 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane (MPTMS) の共重合体をフリーラジカル重合により合成した。そして、洗浄したガラス基板を、1w/v% P(MEGAm-*r*-MPTMS) の溶液に浸漬させ修飾した。ポリマー修飾基板は、UV 照射有無での表面特性、タンパク質吸着試験、細胞接着試験を行った。また、異種細胞のパターンニングについても検討した。

【結果と考察】

ポリマー修飾基板の液滴接触角の測定を行ったところ、UV 照射前の基板に比べ、UV 照射後の基板は接触角の値が増加した。これは UV 照射によって親水基であるポリエチレングリコール (PEG) 側鎖が切断されたことによるものであると示唆された。次にタンパク質吸着を評価したところ、UV 照射前の基板に比べ UV 照射後の基板はタンパク質の吸着量が大幅に増加した。加えて、細胞接着評価の結果、UV 照射前の基板に比べ、UV 照射後の基板は細胞接着量が増加した。これらの結果は UV 照射によって生体物質非応答性を示す PEG 側鎖が切断されたことに由来している。

1C-01- I

繊維強化ナイロン MXD6 へのアパタイト形成能付与による低弾性率型骨修復材料の開発

¹ 京都大学大学院エネルギー科学研究科, ² 香川高等専門学校

○ 藪塚武史¹ (Yabutsuka Takeshi), 福島啓斗¹, 昼田智子¹, 高井茂臣¹, 八尾 健²

【緒言】細孔を形成した基材を擬似体液 (SBF) に浸漬し、pH および温度を上昇させると、非晶質リン酸カルシウム微粒子 (アパタイト核) が孔内に析出する[1]。演者らは最近、PEEK 表面に細孔を形成し、孔内にアパタイト核を導入することにより、PEEK にアパタイト形成能を付与する研究に取り組んできた[2]。本研究では、皮質骨に匹敵した弾性率を有するガラス繊維強化ナイロン MXD6 (GFR-MXD6) 表面に細孔を形成し、アパタイト核を孔内に形成することで、GFR-MXD6 にアパタイト形成能を付与する手法を検討した。さらに、基材とアパタイト層との接着強度を評価した。

【実験】GFR-MXD6 (50 wt% ガラス繊維強化、弾性率 20.3 GPa) に硫酸処理を施し、細孔を形成した。その後、200 W の酸素プラズマ処理を 2 分間行った。SBF にトリス緩衝剤を溶解して pH 8.4、25 °C に調整した溶液に基材を浸漬し、70 °C で 24 時間保持した。これにより、アパタイト核を GFR-MXD6 表面の孔内に形成し、基材に生体活性を付与した。得られた生体活性 GFR-MXD6 を SBF (pH 7.4, 36.5 °C) に浸漬し、アパタイト形成能を XRD、SEM を用いて評価した。さらに、SBF 中で形成したアパタイト層と基材との接着強度を万能材料試験機により評価した。

【結果と考察】硫酸処理により、GFR-MXD6 表面に網目状の細孔が形成された。得られた生体活性 GFR-MXD6 を SBF に浸漬したところ、浸漬 1 日後の XRD 測定でアパタイトの回折ピークが観察された。また、浸漬 1 日後の SEM 観察では骨類似アパタイトに特有の鱗片状結晶の形成が観察された。孔内に形成したアパタイト核が SBF 中で 1 日以内にアパタイト形成を誘起し、高いアパタイト形成能を発現したと考えられる。アパタイト層-基材間の接着強度は 5.0 ± 0.8 MPa (n=5) であった。孔内に形成されたアパタイトによるアンカー効果により、アパタイト層が基材に対して高い密着性を示すことが示唆された。

【文献】[1] 八尾 健, 日比野光宏, 藪塚武史, 特許 5252399 (2013), US Pat 8512732 (2013).

[2] T. Yabutsuka et al., *Mater. Sci. Eng. C*, in press.

【謝辞】本研究の一部は、公益財団法人京都技術科学センター研究開発助成のご支援により遂行した。

1C-02- I

β型リン酸三カルシウムとシアノアクリレートを利用した新規な骨接着剤の物性評価

¹ 千葉工業大学大学院工学研究科生命環境科学専攻, ² 株式会社福山医科

○ 會田周平¹ (Aida Shuhei), 柴田裕史¹, 福山茂雄², 目黒 嵩², 橋本和明¹

【緒言】シアノアクリレート接着剤は、食道、胃、腸管、消化管、血管、気管、気管支の吻合などの医療用接着剤として用いられている。とくに瞬間接着剤としても使われており、優れた接着性を示すが、大量に使用すると生体に対して弱い毒性を示し、軟組織においては適応箇所に制限がある。本研究では、生体親和性が高く、生体内で自家骨に置換するβ型リン酸三カルシウム (以下β-TCP) にシアノアクリレート接着剤を混合させて新たな硬組織用骨接着剤を開発することを目的とする。そこでβ型リン酸三カルシウムとシアノアクリレート接着剤とをさまざまな比率で混合し、可使時間を想定した硬化時間とその硬化体の物性を測定した。

【実験】作製したβ-TCP スプレードライ (SP 処理)、Si、Na および Mg を固溶させたβ-TCP(β-TCP-Si) SP 処理のリン酸三カルシウムとシアノアクリレート接着剤とをさまざまな比率で混合して骨接着剤を調製した。硬化体を調製する際には、リン酸カルシウムとシアノアクリレート接着剤とをシリンジにそれぞれ入れ、それらをシリコンチューブ(内径φ3mm×3mm)で繋ぎ、混合させた。その後、混合させた試料をシリコンチューブ内(内径φ8mm×20mm)に流して 5 分毎に針で刺して表面にささらなくなったら、硬化したと定めて硬化時間を測定した。また、得られた硬化体を厚さ 5mm 程度に切り出し、断面を研磨して走査型電子顕微鏡(SEM 観察)をおこない、硬化体の上下表面を平行になるように切り出し(内径φ8mm×10mm)、機械的強度試験(圧縮試験)をおこなった。

【結果と考察】Mg、Na および Si を固溶したβ-TCP の SP 処理後の試料は可使時間を生じて十分に混合でき、硬化体の作製ができた。とくにβ-TCP-Si0% SP 処理後、β-TCP-Si1% SP 処理後、β-TCP-Si2% SP 処理後の混合比 1:1.0~1:1.3 の場合で混合することができ、β-TCP-Si3% SP 処理後では 1:1.1~1:1.3 の場合に混合することができた。また、圧縮強度試験を行ったところ、硬化体に応力をかけると 30~60MPa で押しつぶされ始め、シアノアクリレート接着剤の混合比が少なくなるほど、圧縮強度は高くなった。以上の実験結果から、スプレードライ処理した Mg、Na および Si を固溶したβ-TCP を用いれば、可使時間が 15 分~40 分のシアノアクリレートを主剤とした接着剤ができ、新たな骨接着剤としての臨床応用が期待される。

1C-03-III

表面改質したポリエーテルエーテルケトンの骨結合性評価

¹ 日本特殊陶業株式会社技術開発本部, ² 慶応義塾大学医学部

○毛利和磨¹ (Mori Kazuma), 北村昌大¹, 笠原真二郎¹, 宮本健史², 松本守雄²

【緒言】

ポリエーテルエーテルケトン(以下 PEEK)はヒトの皮質骨と類似した力学的特性を有しており、医療分野においては脊椎ケージや頭蓋骨代替物などの生体インプラントに応用されているが、生体不活性な材料であることから骨結合性の付与が求められている。我々は、PEEK への骨結合性の付与を目的に表面改質技術の検討を行い、これまでに、PEEK 表面にマクロ気孔を有する多孔層を形成し、更に、その表面にハイドロキシアパタイト(以下 HAp)粒子を固定化する技術を開発している。今回、本技術を適用した開発材のウサギ大腿骨への埋植試験を実施し、骨結合性を評価したのでその概要を報告する。

【実験】

PEEK を濃硫酸に浸漬して表面を粗化した後、発泡剤として炭酸カリウムを担持させ、さらに濃硫酸、希硫酸に順次浸漬することで表面に多孔層を形成させた試料(表面多孔 PEEK)を得た。続いて、HAp 懸濁液中に表面多孔 PEEK を浸漬し、HAp 粒子を付着させた後に熱処理をすることで、多孔表面に HAp 粒子を固定化した試料(表面多孔 PEEK + HAp)を得た。得られた試料をウサギ大腿骨顆部へ埋植し、Push-Out 試験による骨結合強度の評価、組織観察による骨形成状態の確認を行った。尚、埋植期間は 4,8,12 週とした。

【結果と考察】

Push-Out 試験の結果、表面多孔 PEEK は未処理品と比較して高い骨結合強度を示した。組織観察の結果、表面多孔層の内部まで新生骨が侵入しており、インターロッキング効果により骨結合強度が向上したと考えられる。また、組織観察像から生体骨と材料表面の接触率を算出した結果、HAp 粒子を固定させた試料において最も高い骨接触率を示した。これは、固定化された HAp 粒子により骨形成が促進されたためと考えられる。以上の結果から、我々の開発した技術は PEEK の骨結合性の向上に有用であり、開発材の新規インプラント材としての応用可能性が示唆された。

1C-04-III

ヒドロキシアパタイト/コラーゲンペーストおよび骨形成タンパク質-2 による骨折治癒の増強

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科整形外科学分野

○平井敬悟 (Hirai Keigo), 江川 聡, 松本連平, 早乙女進一

【緒言】骨折治療において、生物学的骨結合は、一般に、外科的に治療された場合でさえ、骨の自然の骨折治癒能力に依存する。ヒドロキシアパタイト/コラーゲン複合体 (HAp / CoI) は、高い骨伝導性を有し、骨形成前駆体を刺激する。さらに、それは骨形成タンパク質 (BMP) を吸着する強力な能力を有する。この研究では、注射可能な HAp / CoI ペーストを作成し骨癒合に及ぼす効果を評価し、さらに BMP-2 と組み合わせた HAp / CoI ペーストの効果も評価した。

【実験】径 1mm の骨欠損を有するラット大腿骨モデルを使用した。ラットを次の 4 群に別け (HAp / CoI のインプラント群、BMP-2 (1 μg) を含浸させた吸収性コラーゲンスポンジ (ACS) インプラント群、BMP を含浸させた HAp / CoI インプラント群およびコントロール群)、マイクロ CT 解析、骨強度 (3 点曲げ試験) および組織学的評価を行った。

【結果と考察】手術後 8 週で、HAp / CoI 群では 8 例中 2 例、ACS + BMP-2 群では 8 例中 5 例、HAp / CoI + BMP-2 群のすべての症例で骨合併が達成された。対照群は骨結合を達成しなかった。さらに、手術側/対側大腿骨の機械的強度の比は 1.00 ± 0.151 (SD) であり、骨癒合後の大腿骨強度は対側の無傷大腿骨のそれに匹敵していた。

これらの結果は、BMP-2 の有無にかかわらず、HAp / CoI ペーストが骨結合を増強することを示しており、骨折治癒に貢献していることが示された。

1C-05-II

タンパク質を用いた多機能マイクロデバイスの創製

産業技術総合研究所

○山添 泰宗 (Yamazoe Hironori)

【緒言】生体内における過剰な活性酸素が多くの病気に関与することが知られている。本研究では、生体適合性に優れ、多彩な機能を持つタンパク質が高度な機能を備えたバイオマテリアルの創製に適した素材であることに着目し、3種類のタンパク質（血清アルブミン、抗体、SOD）を用いて、「タンパク質の構造や機能の保持」、「安定性の向上」、「配向の制御」を考慮に入れながら、活性酸素の除去に役立つ医療用マイクロデバイスの作製を行った。

【実験】末端にメチル基、または、ビオチン（抗原）を有するアルカンチオールを用いて、抗原固定化基板を作製した。この基板に抗ビオチン抗体を結合させた後、微量（590 ng）の架橋アルブミン-SOD とトレハロースの混合溶液を滴下し乾燥させることで、本体部はアルブミンと SOD で構成され、表面に配向が制御された抗体が組み込まれたタンパク質マイクロデバイスを作製した。このデバイスと活性酸素を分泌する細胞（HL60 細胞を好中球様細胞に分化させた後、抗体を用いて細胞表面にビオチンを導入した細胞）を混合し、デバイスの細胞捕捉能を評価した。また、細胞を捕捉したデバイスを用いて、周囲に分泌される活性酸素の量を化学発光法にて測定することでデバイスの活性酸素除去能を評価した。さらに、デバイスに抗炎症薬（ジアボシニン）を担持させ、この薬剤担持デバイスと好中球様細胞を共培養した系を用いて、デバイスから放出された薬剤が細胞の活性酸素生成挙動に及ぼす影響を検証した。

【結果と考察】タンパク質マイクロデバイス（直径：約 100 μm 、厚み：数百 nm）は、表面に組み込まれている抗体の働きにより良好に活性酸素分泌細胞を捕捉した。また、細胞がデバイスに捕捉された場合、捕捉されていないフリーの状態と比べて、検出される活性酸素の量が 70%減少することが分かった。これは捕捉された細胞が分泌した活性酸素の大部分をデバイス内部の SOD が即座に除去したためだと考えられる。さらに、ジアボシニンを担持したデバイスと活性酸素分泌細胞を共培養した結果、デバイスから放出された薬剤の効果により、細胞の活性酸素生成を著しく抑制することが分かった。このように、本タンパク質デバイスは、細胞捕捉、活性酸素除去、薬剤徐放の多様な機能を備え、その連携プレーにより活性酸素を減らす効果があり、炎症性疾患の治療などへの応用が期待される。

1C-06-II

ポリマーグラフト化酵素からなるナノオブジェクトを用いた細胞環境操作ツールの開発

慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻

○松坂脩平 (Matsusaka Shuhei), 福井有香, 藤本啓二

【緒言】タンパク質は分子同士の協同的および構造相補的相互作用に基づく自己組織化によって、ユニークな高次構造を有する複合体を形成している。われわれはタンパク質に新たな分子間相互作用を付与し、組織化をコントロールすることで、多彩な構造・機能を有するタンパク質ナノ構造体（ナノオブジェクト）の構築を行ってきた。本研究では、光開始リビングラジカル重合を用いて、酵素表面から温度応答性ポリマーのグラフト化を行い、それらをビルディングブロックとして組み上げることで、細胞およびその周囲の環境を調節して機能を発現する酵素ナノオブジェクトの作製を行った。

【実験】酵素としてグルコースオキシダーゼ(GOD)、西洋わさびペルオキシダーゼ(POD)およびカタラーゼ(CAT)を選択した。各酵素のアミノ基に対して、縮合剤の DMT-MM を用いて iniferter 基を導入した。導入率は、未反応のアミノ基を定量することで算出した。次に、iniferter 基固定化酵素と *N*-isopropylacrylamide(NIPAM)を混合し、5°Cにおいて UV 照射（高圧水銀灯）を行うことでリビングラジカル重合を行った(gEnzyme)。作製したグラフト化酵素を 37°Cで集積化させてナノオブジェクトを作製し、動的光散乱法を用いた粒径測定と電子顕微鏡による形状観察を行った。gGOD-gPOD からなるナノオブジェクトではグルコース濃度の測定を行った。また、gGOD と gCAT からそれぞれナノオブジェクトを作製し、正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)に集積化させて、Alamar blue assay、トリパンブルー染色などによって細胞および細胞環境に与える作用の評価を行った。

【結果と考察】DMT-MM の量によって、iniferter 基導入率を調節できた。また、UV 照射時間によって gEnzyme のグラフト鎖長を制御できた。gEnzyme を集積化させることで、粒径約 100 から 200 nm の微粒子型ナノオブジェクトを作製できた。gGOD-gPOD ナノオブジェクトは高い酵素活性を示し、集積化により連鎖反応が効率的に進行したと考えている。また、HUVEC に作用させた gGOD ナノオブジェクトには細胞毒性が観察され、グルコースから過酸化水素が生成されて、局所的に細胞に作用したと考えている。一方、gCAT ナノオブジェクトは過酸化水素を基質として酸素と水に変換する活性を有しており、HUVEC に対して活性酸素 (ROS) 種から保護するツールとなることがわかった。

1C-07-II

低侵襲手術器具のための相互誘導を用いたマイクロアクチュエータの開発

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○宮寄哲郎 (Miyazaki Tetsuro), 菅野貴皓, 川嶋健嗣

【緒言】

本研究では、低侵襲手術器具のための相互誘導を用いたマイクロアクチュエータを開発する。提案するマイクロアクチュエータはポリウレタン容器の内部に加熱用コイルと低沸点のフッ素系不活性液体を封入した構造を持ち、人体の内部で駆動される。駆動の方法は、人体の外部に設置した駆動用コイルを交流電源と接続してマイクロアクチュエータの周囲に時間変化する磁界を発生させる。マイクロアクチュエータ内部の加熱用コイルは相互誘導により加熱され、この熱でフッ素系不活性液体を気化させることで、ポリウレタン容器を膨張させる。駆動用コイルが発生する磁界を制御し、ポリウレタン容器の膨張と収縮を制御することで、マイクロアクチュエータの機械的な駆動力を得る。

【実験】

提案するマイクロアクチュエータが相互誘導により駆動可能であることを実験で確認する。まず、駆動原理の確認のために、駆動用コイルと加熱用コイルを製作し、実験で相互誘導現象が起こることを確認する。駆動用コイルは直径 0.5 mm の被覆銅線を高さ 30 mm、直径 22 mm の純鉄鉄心に巻いて製作し、コイルの巻き数は 300 とした。一方、加熱用コイルは直径 0.1 mm の被覆銅線を高さ 10 mm、直径 5 mm の非磁性材料に巻いて製作し、巻き数は 830 とした。

【結果と考察】

駆動用コイルが発生させる磁界中に加熱用コイルを置くことで、加熱用コイルの銅線内部に 1 V、0.7 mA 程度の交流電流が発生することを確認した。ただし、加熱用コイルを水に浸し実験を行ったところ、水の大きな温度上昇は確認できなかった。今回選定したフッ素系不活性液体の沸点は 56 度であり、比熱は水とほぼ同等である。これを沸騰させるためには、加熱用コイルの出力をさらに増強させることが必要であり、今後コイルの性能改良を行っていく。

1C-08-I

経皮 DDS を指向した温度応答性ディスク状リン脂質集合体

¹理化学研究所, ²東京大学大学院工学系研究科

○内田紀之¹ (Uchida Noriyuki), 相田卓三^{1,2}, 石田康博¹

【緒言】

リポソームに代表されるリン脂質の自己集合体はその生体適合性の高さから薬剤送達システム (DDS) キャリアを設計する上で最も代表的な材料の一つである。一方で近年、ディスク状の構造体は球状のものよりも毛細血管接着能や経皮浸透能が優れていることがわかっており、ディスク状リン脂質集合体は新たな DDS の材料モチーフとして有望である。しかし、現在まで報告されているディスク状リン脂質集合体は、相転移温度が室温よりも低い脂質膜で構成された速度論的に不安定な構造体であり、生体環境のような希釈条件下でも利用可能なものは報告されてこなかった。

【実験】

コール酸ナトリウムから誘導された界面活性剤を合成し、ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) と混合することで、DPPC 膜の端が界面活性剤で安定化されたディスク状リン脂質集合体が得られた。そのディスク状リン脂質集合体に関し、希釈安定性、温度応答性、サイズ制御能、細胞取り込み能などを評価した。DPPC 膜は相転移温度が室温より高く、室温においては速度論的に安定なゲル相を形成するため、希釈条件下でも安定なディスク状質集合体が形成された。

【結果と考察】

ディスク状リン脂質集合体の形成を顕微鏡観察、³¹P NMR 解析および小角 X 線解析により確認した。³¹P NMR によってディスク状集合体の温度安定性を調べたところ、室温から体温 (37°C) への昇温操作によってミセル構造へと相転移し、この構造変化によって集合体の粒径が大きく減少することが明らかになった。さらに、抗がん剤であるドキシソルビシンを内包させたディスク状集合体を Hep3B 細胞に投与したところ、25°C のディスク状構造の場合はほとんど細胞に取り込まれなかったのに対し、37°C でミセル状態へ転移させた場合にはドキシソルビシンとともに細胞内へ取り込まれ細胞死を誘導した。皮膚組織においては室温の皮膚の外部から皮下組織に移行するに従って体温へと昇温されるため、この新規リン脂質集合体は皮下の組織内部へと浸透した後に薬剤を放出する経皮 DDS キャリアとして応用可能である。

1C-09- I

ポリマー積層化リポソーム（リポナノカプセル）の酵素分解による機能発現

慶應義塾大学大学院理工学研究科

○大塚日加里 (Otsuka Hikari), 福井有香, 藤本啓二

【緒言】リポソームの表層を高分子や無機物で被覆することにより、物質保持能、膜安定性、刺激応答性など新しい機能を付与することができる。本研究では、リポソーム表面にポリペプチドとその分解酵素からなるカプセルウォールを構築し、酵素によるポリペプチドの分解に伴う機能発現（担持物質および封入物質の放出、標的指向性層の提示）を目指した。

【実験】粒径が約 100 nm のアニオン性のリポソーム(Lipo(-))を作製し、その表面にカチオン性の poly-arginine (PArg) とその分解酵素である trypsin(Try) (pI= 10.5)の吸着を行った(Lipo(-)-Try/PArg)。種々の pH や温度において酵素分解を行い、PArg の分解に伴うアミノ基の増加を測定した。水中粒径測定、表面電位測定および電子顕微鏡観察も行った。次に、ナノカプセル内部にグルコースなどのモデル物質を封入し、酵素分解に伴って放出された物質の量を測定することで放出挙動の検討を行った。さらに、Lipo(-)に PArg を吸着し、さらにアニオン性の poly-L-glutamic acid (PGlu) とその分解酵素である pepsin(Pep) (pI=3.0)の吸着を行い(Lipo(-)-PArg-Pep/PGlu)、PGlu の分解に伴うアミノ基の増加を測定した。また、骨の主無機成分である hydroxyapatite (HAp)と親和性を有する PGlu をカチオン性のリポソーム(Lipo(+))に吸着させ、さらにその表面に Try、PArg を順に吸着させた(Lipo(+)-PGlu-Try/PArg)。このナノカプセルについて、最外層の PArg の酵素分解に伴う PGlu 層の表面提示と、骨モデル(HAp)への付着性を評価した。

【結果と考察】Lipo(-)-Try/PArg の酵素分解性を測定したところ、Try の至適条件(pH 10、37°C)において、最も高い分解性が見られた。また、表面電荷が正から負に反転し、PArg 層の剥離が確認された。ナノカプセルは酵素分解後も中空構造を維持していた。さらに、PArg 層の酵素分解・剥離に伴い内包物質の放出が促進され、Try および PArg の吸着量によって放出性を調節できた。Lipo(-)-PArg-Pep/PGlu の酵素分解性については、Pep の至適条件(pH 2.0、37 °C)において、最も高い PGlu 層の分解性が見られ、PArg 層が提示されることを確認した。また、Lipo(+)-PGlu-Try/PArg は、Try の至適条件において最も高い PArg 層の分解性がみられ、表面電荷が正から負に反転した。HAp への付着性は、最外層が PArg の場合は低かったが、PArg の酵素分解に伴う PGlu 層の提示によって付着量が増大することがわかった。

1C-10- I

Progressive Freeze Concentration based Model System for Delivery of Biomolecules

Japan Advanced Institute of Science and Technology

○Sana Ahmed and Kazuaki Matsumura

【Introduction】Protein based therapeutics have been widespread for the applications in biomedical engineering and regenerative medicines. Previously, electroporation and ultra-sonication process have been developed to delivered biomolecules inside the cells. But parameters such as voltage shock and ultrasound irradiation might induce cell damage. In our previous research, we developed novel freeze concentration based method to delivered protein safely. Freeze concentration is a physical process wherein at ultra-cold low temperature; the concentration of solutes becomes high after separation from the ice crystals. In this study, we describe the relation of continuous freeze concentration in internalization of proteins.

【Materials and methods】The samples were started freezing from -3 to -20 °C at the rate of 1 °C/min. After this step, the straw solution were withdrawn from particular temperatures and thawed at 37 °C. The samples were observed through confocal microscope.

【Results and discussion】The confocal images revealed that on progressive lowering down the temperature after the introduction of ice seeding at every step, the fluorescent intensity of proteins were significantly improved. However, the fluorescence was weak at higher temperature specifically around at -3 °C but on continuously dropping the temperatures, adsorption of protein towards the cells was greatly improved. Moreover, the quantification of fluorescent intensity from FITC-OVA proteins confirmed that progressive freeze concentration can affect for adsorption/internalization of OVA proteins around the peripheral of the cell membrane.

【Conclusion】This result demonstrated that progressive freezing is able to deliver proteins efficiently into the cytosol of the cells and circumvent the exposure of long time ultra cold temperature. This simple strategy with less time taking, cost-effective and lack of toxicity may used as a new alternative for the delivery of therapeutics.

10-11- I

内在化受容体を標的とした生理活性ペプチド運搬体の合成と生体親和性評価

¹九州大学先端物質化学研究所, ²九州大学大学院工学府, ³山形大学有機材料推進本部

○柏崎亜樹¹ (Kashiwazaki Aki), 上原広貴², 田中 賢^{1,2,3}

【緒言】下垂体や副甲状腺から血中に分泌されるホルモンは、標的となる器官の受容体に結合し効果を現す生理活性物質である。受容体はホルモンによって刺激されると細胞質内に内在化し、続いて起こるエクソサイトーシスにより細胞外にホルモンが排出されると細胞膜に戻り、再びホルモンと結合できるようになる。しかし、受容体が繰り返し刺激されると、細胞質内から細胞膜に戻ることができなくなる。これまで、多くのホルモンは水溶性であるため、細胞質内に内在化した受容体にホルモンを結合させることは困難であった。本研究は、合成高分子にホルモンである生理活性ペプチドを担持させることにより、細胞質内に内在化した受容体に生理活性ペプチドを結合させることを目的とした。

【実験】双性イオン化合物を用いて放射性リガンド受容体結合実験を行い、候補物質となり得るモノマーを探索した。続いて、候補物質である双性イオンモノマーを用いて双性イオンポリマーを合成し、生理活性ペプチドであるバゾプレッシンの担持を試みた。

【結果と考察】双性イオン化合物を用いた放射能標識バゾプレッシンと受容体との結合実験の結果、スルホベタインは臨界ミセル濃度以下において放射能標識バゾプレッシンと受容体との結合を阻害しなかった。スルホベタインを有する微粒子は膜透過性を持ち、かつ血中安定性が高いことが知られている。したがって、スルホベタインをバゾプレッシン運搬体の候補物質とし、スルホベタインを有するブロック共重合体を可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合法により合成した。初めに、水中で正の電荷を持つバゾプレッシンと静電相互作用による結合が可能なメタクリル酸ナトリウムを用いて macro-chain transfer agent (macro-CTA) を合成した。合成した macro-CTA は、数平均分子量 (M_n) が 2,000、および分子量分布 (M_w/M_n) が 1.04 と狭い分子量分布を持つことが水系 SEC 測定より明らかとなった。続いて、合成した macro-CTA を用いて、[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]ジメチル-(3-スルホプロピル)アンモニウムヒドロキシドをモノマーとし、ブロック共重合体を合成した。合成したブロック共重合体について DSC 測定を行った結果、含水時に中間水を有することが確認されたことから、生体親和性を示すことが示唆された。

10-12- I

肺および脾臓への蓄積を回避する赤血球状ポリマー粒子の作製と肝硬変治療への応用

¹名古屋大学未来材料・システム研究所 ²九州大学大学院歯学研究科

○山田翔太¹ (Yamada Shota), 林幸壱朗², 坂本 渉¹, 余語利信¹

【緒言】

薬物キャリアのサイズを増大させることで、一度に運搬できる薬剤の種類と量は増加するが、肺や脾臓に蓄積しやすくなるという問題がある。本研究では、赤血球特有の体内動態に着想を得て、この問題の解決に取り組んだ。赤血球は窪んだ円盤状であり、その形状を活かしてパラシュートのように変形しながら自径よりも細い血管を通過する。本研究では、赤血球様の形状と変形能を有するマイクロ粒子を作製し、その体内動態を調査した。さらに、赤血球状粒子の体内動態を活用し、肝硬変治療への応用を試みた。

【実験】

セルロースからなる赤血球状粒子 (赤血球状ポリマー粒子) をエレクトロスプレー法により作製した。比較のために、同様の方法で、セルロースから成る球状粒子 (球状ポリマー粒子) とシリカを含有する赤血球状粒子 (赤血球状シリカ粒子) を作製した。各粒子の形状、弾性、粒子内弾性分布を評価し、これらの因子が体内動態へ与える影響を調査した。さらに、肝硬変マウスに投与することで、赤血球状ポリマー粒子を用いた肝硬変の治療効果および肺への副作用を調査した。

【結果と考察】

赤血球状ポリマー粒子は、実物の赤血球と類似した形状を有していた。粒子の弾性を評価したところ、窪みのヤング率が縁のヤング率よりも低く、窪みを基点として変形できるような粒子内弾性分布を示した。この結果、赤血球状ポリマー粒子は自径よりも細い細孔を通過した。一方、球状ポリマー粒子および赤血球状シリカ粒子は細孔を通過することはできなかった。

各粒子の体内動態を評価したところ、赤血球状ポリマー粒子は肺および脾臓への蓄積を回避し、肝臓に特異的に集積した。一方、球状ポリマー粒子および赤血球状シリカ粒子は肺および脾臓に蓄積した。赤血球状ポリマー粒子を肝硬変マウスに静脈内投与したところ、肺への副作用なく、線維化の程度を改善した。

10-13- I

ペプチドナノファイバーの集合-解離制御に基づく抗原ペプチドの細胞内デリバリー

京都工芸繊維大学大学院工学科学研究科

○出呂町剛大 (Deromachi Takehiro), 和久友則, 田中直毅

【緒言】近年、細胞性免疫を利用したがんペプチドワクチン療法の実用化に期待が高まっており、高効率ながん免疫誘導には細胞障害性 T 細胞の活性化が重要である。そのためには、抗原が抗原提示細胞に取り込まれた後、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) I 分子を介して細胞表面に提示される必要があり、このプロセスを効率化するデリバリーシステムの開発が求められている。我々は、自己組織化 β シートペプチドナノファイバー (NFs) をキャリアに用いた抗原ペプチドの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、 β シート配列に抗原配列及び親水性セグメントとしてオリゴエチレングリコール鎖を導入したペプチドを合成し、このペプチドの自己組織化を利用することで高効率に抗原を担持したペプチド NFs を作製することに成功した。また、NFs をキャリアに用いることで抗原ペプチドの樹状細胞による取り込み効率が向上することを明らかにした。しかし、NFs を作用させた樹状細胞による MHC クラス I 分子を介した抗原提示の効率は低く改善が必要であった。この原因として、細胞内においても NFs が安定である為、プロセッシングによる抗原ペプチドの遊離が困難であることが考えられた。そこで本研究では、抗原提示の効率化を狙いとして、細胞内環境に応答して集合-解離をスイッチングさせる機能を持つ NFs の開発を目的とする。

【実験】線維形成配列 (FVIFLD) にモデル抗原配列 (SIINFEKL) およびオリゴグルタミン酸 (E3, E4, E5, E7) を導入したペプチドを合成し、各ペプチドを 600 mM NaCl を含むリン酸緩衝液中で 80°C、1 時間インキュベートすることで NFs を作製した。得られた NFs のリン酸緩衝生理食塩水溶液 (PBS) 中における安定性を、円偏光二色性 (CD) 測定により評価した。

【結果と考察】オリゴグルタミン酸の導入数が異なる 4 種類の NFs を PBS 中に分散させた後、CD スペクトルにおける β シートに特徴的な 217 nm の負のコットン吸収のピーク強度を経時的に測定した。その結果、ペプチドのネットチャージが NFs の安定性に大きく影響することが分かった。今後、この知見を基に細胞内環境に応答してネットチャージが変化する NFs を設計し、細胞内における集合-解離についても評価する。

10-14- I

ミネラル架橋・金属架橋を有するリン酸化キトサンナノ粒子の創製と機能化

慶應義塾大学大学院理工学研究科

○小門佳奈子 (Kokado Kanako), 福井有香, 藤本啓二

【緒言】カチオン性多糖のキトサン(CHI)に水溶性の付与と両性化を行うために、リン酸基の導入を行った。得られたリン酸化キトサン(P_{CHI})に界面活性剤を加えることによってナノ粒子の作製を行い、さらに無機・金属架橋を行うことで、色材、DDS 担体、バイオイメージング材料などに応用可能な機能性ナノ粒子の創製を試みた。

【実験】キトサンと五酸化二リンを反応させることによって P_{CHI} を作製し、カチオン性界面活性剤(DTAB)とアニオン性界面活性剤(SDS)を添加することで P_{CHI} の集積化を行った($P_{CHI}(+)$ 粒子と $P_{CHI}(-)$ 粒子)。次に、 $P_{CHI}(+)$ 粒子のミネラル架橋を行うために、 $CaCl_2$ 水溶液とリン酸緩衝液(PB)で交互透析を行うことによってリン酸カルシウム(CaP)の析出を行った($P_{CHI}(+)CaP1$ 粒子)。さらにイオン添加とエージングによって析出量と結晶構造の調節を試みた($P_{CHI}(+)CaP2$ 粒子)。電子顕微鏡による形状観察、X 線回折測定による結晶構造の評価を行い、 Ca^{2+} 量を測定して CaP の生成量を求めた。続いて、蛍光色素の封入と放出について検討を行った。また、 $P_{CHI}(-)$ 粒子の金属架橋を行うために、 $HAuCl_4$ とアスコルビン酸を添加して、粒子内で金ナノ粒子(AuNPs)の生成を行い($P_{CHI}(-)Au$ 粒子)、紫外可視分光とラマン分光測定により AuNPs 由来のプラズモン特性の評価を行った。

【結果と考察】pH 9.0 で P_{CHI} に 6 mM の DTAB を加えると、粒径 164 nm で負電荷を帯びた $P_{CHI}(+)$ 粒子が得られた。また、pH 2.0 で 0.6 mM の SDS を P_{CHI} に加えたところ、粒径 133 nm で正電荷を帯びた $P_{CHI}(-)$ 粒子が得られた。続いて、50°C で 3 mM $CaCl_2$ aq. と 2 mM PB に対して $P_{CHI}(+)$ 粒子を交互透析することによってミネラル架橋を行うことができた($P_{CHI}(+)CaP1$ 粒子)。さらに、CaP 成長を促すことで、CaP は針状へと変化し、pH を高くすることで析出量を増大させることができた($P_{CHI}(+)CaP2$ 粒子)。粒子全体の負電荷と CaP 由来の正電荷を利用して、カチオン性とアニオン性の蛍光色素をいずれも封入することができた。さらに、外部環境(イオン濃度、pH など)によって放出制御が可能であった。一方、 $P_{CHI}(-)Au$ 粒子では内部に AuNPs の生成が観察され、SDS を除去しても粒子の形状は維持され、金属架橋の形成が認められた。さらに、還元剤と金イオンの濃度を変化させることで、AuNPs の量や形状を調節することができた。

10-15- I

ICG 誘導体結合マイクロバブルによる近赤外蛍光-超音波イメージングシミュレーション

¹千葉大学工学研究科人工システム科学専攻, ²千葉大学フロンティア医工学センター, ³東京大学大学院総合文化研究科

○江島将彦¹ (Ebata Masahiko), 吉田憲司², 豊田太郎³, 林 秀樹²

【緒言】臨床現場において、インドシアニングリーン(ICG)は近赤外蛍光プローブとして、マイクロバブルは超音波診断用造影剤として、それぞれ血管やリンパ管の可視化に使用されている。両者の特性を併せ持つ新規造影剤を開発することができれば、近赤外蛍光により生体表面を広く観察することが可能であることに加え、超音波により生体深部も観察可能になり、より幅広く観察できる造影剤とすることが期待される。そこで、ICG よりも脂質膜との親和性を向上させた ICG 誘導体を脂質膜を介してマイクロバブルに結合することを着想し、そのマイクロバブルの検出効果を ex-vivo 実験により検証した。

【実験】我々がこれまでに開発した ICG 誘導体(ICG-C18)とホスファチジルコリンを ICG-C18 が 1.2 mol%になるように混合し、さらにポリエチレングリコール結合型リン脂質を加え、リン酸緩衝生理食塩水に分散した。これを空気と体積比 2 (リン脂質溶液) : 1 (空気) で混合することで ICG 誘導体結合マイクロバブル分散液を調製した。マイクロバブルそのものは明視野/近赤外蛍光顕微鏡 (BX51, OLYMPUS) で観察した。マイクロバブル分散液をトリムぬ肉の皮下 5 mm、15 mm の位置に 0.1 mL ずつ局注した後、超音波診断装置 (Aplio 500、東芝メディカルシステムズ) および近赤外光観察装置 (Hyper Eye Medical Systems、瑞徳医科器械) を用いて観察した。比較対象として、市販の超音波診断用造影剤 (Sonazoid®) を用いて同様に観察を行った。

【結果と考察】本実験で調製されたマイクロバブルの粒子径は 5~40 μ m で、バブルの輪郭から強い蛍光が観察された。皮下 5 mm にマイクロバブル分散液を局注した場合、超音波観察および近赤外蛍光観察の両者において検出可能であった。皮下 15 mm に局注した場合は、超音波では検出できたものの、近赤外蛍光観察では深さ 5 mm の場合と比較して蛍光強度が著しく低下した。Sonazoid®を皮下 5 mm、または 15 mm に局注した場合、超音波観察においてはいずれも明瞭な検出が可能であったが、近赤外蛍光観察においては局注箇所からの蛍光強度は得られなかった。従って、今回作製したマイクロバブルは組織表面からは近赤外蛍光と超音波の両者で、組織深部では超音波で検出可能であった。このマイクロバブルの粒径をナノサイズとすることで、従来の近赤外蛍光色素と比較し、より広範なリンパ系の可視化が期待できるものと考えられた。

10-16- I

ハイブリッド中空ナノ粒子を用いた肝線維化治療

¹名古屋大学未来材料・システム研究所, ²九州大学大学院歯学研究院

○林幸孝朗^{1,2} (Hayashi Koichiro), 丸橋卓磨¹, 坂本 渉¹, 余語利信¹

【緒言】

肝硬変は肝臓が線維化し本来の機能を果たせなくなった状態である。線維化が進行すると、肝性脳症や食道静脈瘤などの重篤な症状や合併症が現れる。さらに、食道静脈瘤が破裂すると大量の出血によりショック死を招く。また、線維化により肝がんのリスクも高まる。本研究では、①線維化を引き起こす二種類の細胞 (クッパー細胞と肝星細胞) をターゲットにする機能、②これらの細胞内の活性化を阻害する物質を細胞内で放出する機能、③線維化を引き起こす活性酸素を除去する機能を併せ持つハイブリッド中空ナノ粒子を合成し、このナノ粒子を用いて線維化した組織を修復し、肝機能を回復させることを試みた。

【実験】

すでに報告している方法により、ハイブリッド中空ナノ粒子を one-pot で作製した^[1]。ハイブリッド中空ナノ粒子の構造および機能を評価した。マウスへの四塩化炭素継続的投与により肝線維症を誘発した。肝線維症マウスにハイブリッド中空ナノ粒子を投与し、免疫組織染色および生化学検査により治療効果を評価した。

【結果と考察】

ハイブリッド中空ナノ粒子の骨格はジスルフィドとシロキサンからなり、粒子表面にはチオールを有する。このような構造をもつため、ハイブリッド中空ナノ粒子はクッパー細胞が作り出す活性酸素を除去した。さらに、細胞内においてハイブリッド中空ナノ粒子は崩壊し、肝星細胞の増殖と損傷部への遊走性を阻害する物質を放出した。肝組織の免疫染色により、ハイブリッド中空ナノ粒子はクッパー細胞および肝星細胞をターゲットにすることが明らかになった。さらに、ハイブリッド中空ナノ粒子の静脈内投与を週一回のペースで二週間行くと、線維化した組織が修復され、肝機能が回復することが、肝組織のシリウスレッド染色および生化学検査により明らかになった。

[1] Hayashi et al. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 8613.

1C-17-I

プロテインコロナ組成を制御してステルス性を獲得する分子認識ナノ粒子

¹神戸大学大学院工学研究科, ²川崎市産業振興財団, ³東京大学大学院医学系研究科

○竹内俊文¹ (Takeuchi Toshifumi), 吉田碧衣¹, 木口健太郎¹, 山田託也¹, 藤加珠子², 松本 有³, 片岡一則^{2,3}, 北山雄己哉¹

【緒言】ナノ材料が血中に投与された時、ナノ材料表面には、体液中に存在するタンパク質が吸着してプロテインコロナ層が形成される。このプロテインコロナのタンパク質組成は、細胞や組織に対するナノ材料の反応性、取り込みや分布に大きく影響を及ぼすことが報告されている。そこで我々は、プロテインコロナ層の組成をコントロールすることで、ナノ材料の生体内挙動が制御できると考えた。具体的には、免疫反応のトリガーとなるオプソニン化を抑制する血中タンパク質であるアルブミンを認識するナノゲルを分子インプリンティングにより合成し、アルブミンを主成分とするプロテインコロナ層を形成させることで、ナノ材料にステルス性を付与することを試みた[2]。

【実験】無乳化剤沈殿重合により粒径 100 nm 以下のアルブミンインプリントナノゲル(MIP-NGs)を合成した。鑄型分子として HSA、機能性モノマーとして HSA と相互作用するピロリジルアクリレート、コモノマーとして *N*-イソプロピルアクリルアミドと 2-メタクリロイルホスホリルコリン、共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察のための蛍光モノマーとしてフルオレセインアクリルアミド、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミドを架橋剤として、無乳化剤沈殿重合を行った後、HSA を除去することにより MIP-NGs を得た。

【結果と考察】MIP-NGs および NIP-NGs をマウス尾静脈から注入し、耳毛細血管の共焦点レーザー蛍光顕微鏡像の時間経過を観察することで血中循環性を評価したところ、MIP-NGs の血中半減期は約 7 時間であったのに対し、NIP-NGs では約 3 時間であった。また、肝細胞への蓄積性は MIP-NGs のほうが NIP-NGs に比べて明らかに低いことも示され、MIP-NGs は血中投与後速やかに HSA を吸着し、ステルス性を獲得することが示唆された。さらに HeLa 細胞を移植した担がんマウスを用いて MIP-NGs の腫瘍蓄積性を評価したところ、時間と共に MIP-NGs は腫瘍組織に蓄積する一方、正常細胞にはほとんど集積しなかったことから、MIP-NGs は EPR 効果による Passive Targeting 性があることがわかった。さらになん治療性物質を含む MIP-NGs も合成したのであわせて報告する。

[1] Takeuchi, T., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 7088-7092.

1C-18-III

免疫賦活化能を向上させた 2 本鎖メッセンジャー RNA ワクチンの開発

¹東京大学 ²川崎市産業振興財団 ³大阪府立大学工学院

○内田智士^{1,2} (Uchida Satoshi), 吉永直人¹, 柳原歌代子^{1,2}, 弓場奨司³, 位高啓史^{1,2}, 片岡一則^{1,2}

【緒言】

メッセンジャー(m)RNA ワクチンには、安全かつ強力な免疫賦活化アジュバントが必要である。本研究では、mRNA に相補鎖 RNA をハイブリダイズし、免疫原性の高い 2 本鎖 RNA 構造を形成させることで、アジュバント機能を組み込んだ mRNA を設計した。この 2 本鎖 mRNA ワクチンは、RNA 分子のみからなるため安全であるほか、様々なデリバリーキャリアに搭載できる、抗原タンパク質発現とアジュバント活性が同じ抗原提示細胞に得られるといった利点を持つ。

【実験】

mRNA の全長に相補鎖を結合させた全長 2 本鎖 mRNA に加え、mRNA の poly A 配列にのみ、その相補鎖(poly U)を結合させた mRNA:pU を調製し、その免疫誘導作用を評価した。

【結果と考察】

培養樹状細胞(DC)を用いた実験で、全長 2 本鎖 mRNA は、1 本鎖 mRNA と比べて、強い自然免疫応答を誘導した一方で、mRNA のタンパク質翻訳活性は大きく低下した。一方で、mRNA:pU は、翻訳活性を維持したまま、全長 2 本鎖 mRNA と同様の強い自然免疫応答を誘導した。mRNA:pU はマウス及びヒト DC に対してその活性マーカーである CD86, CD40 の発現を上昇させた一方で、1 本鎖 mRNA では DC 活性化は観られなかった。mRNA:pU の免疫誘導メカニズムに関して、相補鎖 RNA の 5' 末端トリリン酸基の RIG-I による認識、及び Toll 様受容体(TLR)3 の関与が示唆された。最後に、モデル抗原(OVA)発現 mRNA をマウス単径リンパ節へ投与したところ、mRNA:pU は 1 本鎖 mRNA と比較して、OVA 特異的な細胞性免疫、及び液性免疫をより効果的に誘導した。この 2 本鎖 mRNA ワクチンは、様々な mRNA ワクチン導入システムと併用し、その効果を増強できる汎用性の高いプラットフォーム技術である。

10-19-III

抗酸化ナノメディシンを用いた重度感染治療法の開発

¹筑波大院数理工学物質科学研究科、²筑波大学医学医療系、³筑波大学大学院人間総合科学研究科、⁴MANA-NIMS
○池田 豊¹ (Ikeda Yutaka) , 庄司和弘¹, Chitho P. Feliciano¹, 齋藤慎二², 長崎幸夫^{1,3,4}

【緒言】

細菌やウイルス等の病原体が体内に侵入することで引き起こされる種々の感染症は、感染直後に免疫応答により活性酸素が大量に産出され、それに伴い大量の炎症性サイトカインが産出される。その結果、全身性炎症症候群、更には多臓器不全が併発され患者を死に至らしめる。感染初期における過剰な活性酸素を抑制することにより、この炎症性サイトカイン産出を抑制できれば、エボラのような致死性の高い感染症の緩和が期待できる。本研究ではリステリア感染症モデルマウスに対し当研究室においてこれまでに開発された抗酸化ナノメディシン(RNP)の単独投与及び抗菌剤であるアモキシシリンとの共投与を行うことで、様態改善効果を検証した。

【実験】

リステリア・モノサイトゲネスをマウスに腹腔投与する事で、リステリア感染症モデルマウスを作成した。抗酸化物質である 4-hydroxy-TEMPO を結合させた抗酸化ポリマーを自己組織化する事で作成した抗酸化ナノ粒子(RNP)を単独投与及び抗菌剤であるアモキシシリンとの共投与を行い、臓器中の細菌数及び、酸化ストレスによる臓器障害の指標である脂質過酸化を TBARS アッセイにより解析した。

【結果と考察】

感染症モデルマウスに対して、アモキシシリンと RNP の共投与（腹腔投与）を行ったところ、各臓器の細菌数の減少及び、臓器障害の抑制が確認された。更に、生存率の改善及び感染後に減少した体重の回復も確認された。この結果は、RNP の持つ抗炎症能が、感染症患者の生存及び様態に大きく寄与する医療用材料として活用される可能性を示唆している。

10-20-III

ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体 (HAp/Col) の抗菌剤担体としての評価

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科整形外科学分野、²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科整形外科学先端治療開発学講座

○江川 聡¹ (Egawa Satoru), 松本連平¹, 平井敬悟¹, 早乙女進一², 大川 淳¹

【緒言】骨髄炎は血行性または開放骨折や骨関節手術などによる外因性の骨感染症である。現在のところその治療法は抗菌剤の全身投与と外科的なデブリドマンがメインである。しかし骨組織は抗菌剤の移行性が不良であることが知られており、十分な抗菌作用を発揮できず治療に難渋することも少なくない。また抗菌剤含有セメントによる局所投与方法もあるが、セメントの抜去手術を要するという問題もある。多孔体 HAp/Col は柔軟性とむろ人工骨として現在臨床使用されているが、今回抗菌剤の担体としての多孔体 HAp/Col の有用性を評価した。

【実験】抗菌剤は CEZ, MINO, VCM, TEIC, AMK, DPT について検討した。まず HAp/Col の抗菌剤吸着性を調べるため、抗生剤溶液中 1ml に HAp/Col 粉末 50mg を添加し、震盪させて溶液中に残存した抗生剤濃度を吸光度より求め、吸着した抗菌剤の量を算出した。続いて Wister rat の皮下に抗菌剤含有多孔体 HAp/Col (4x4x4mm) を埋植し術後 1, 3, 5, 7 日 (各 n=4) で摘出した。1x10⁷CFU/ml に調整した黄色ブドウ菌菌液 1ml と普通寒天培地 20ml を混合してペトリ皿に入れ、その中央に摘出した HAp/Col を静置して 24 時間培養し、阻止円の様子を観察した。また抗菌剤の骨形成への作用を調べるため、Wister ラットの大腿骨外顆部へφ3mm の骨孔を作成し、3x3x4mm の抗菌剤含有 HAp/Col を埋植し CT、組織切片にて骨形成の様子を観察した。

【結果と考察】CEZ は HAp/Col にほとんど吸着しないのに対し、VCM や MINO はよく吸着した。阻止円の面積はいずれの抗菌剤も術後日数を経るごとに縮小傾向であったが、吸着の少ない CEZ では術後 3 日以降は極度に小さくなっていたのに対し、吸着性のある MINO、VCM は術後 5 日以降も阻止円の面積が保たれていた。また、大腿骨への埋植実験ではいずれの抗菌剤も明らかな骨形成の阻害は認めなかった。これらの結果より、VCM や MINO などの HAp/Col に吸着する薬剤はその徐放作用が期待できるため、骨髄炎に対し HAp/Col を担体とした局所投与が有効である可能性が示唆された。

1C-21-III

乳癌骨転移モデルラットに対するパクリタキセル含浸 HAp/CoI による局所制御実験

¹東京医科歯科大学医歯学総合研究科整形外科学, ²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科整形外傷外科治療開発学講座

○松本連平¹ (Matsumoto Rempei), 江川 聡¹, 平井敬悟¹, 偉 雪濤¹, 吉井俊貴¹, 大川 淳¹, 早乙女進一²

【緒言】乳癌は骨転移をきたしやすく、骨転移後の生存期間が長いいため骨折や麻痺などのリスクが高く、局所制御が治療戦略の一つと考えられる。孔質ハイドロキシアパタイトコラーゲン複合体 (HAp/CoI) は湿潤化するとスポンジ状となるため、抗癌剤局所投与の担体として適していると考えられる。また HAp/CoI は優れた骨伝導を有し、抗癌剤の局所投与と同時に骨再生も実現できる可能性がある。以前我々は、ラット正常大腿骨にパクリタキセル含浸 HAp/CoI を移植し術後 8 週まではパクリタキセルの影響により骨形成が阻害されていたが、術後 12 週では HAp/CoI 内部に骨形成が確認されたこと、またパクリタキセル含浸 HAp/CoI は全身的な骨形成には影響を及ぼさないことを報告した。今回、我々はパクリタキセル含浸 HAp/CoI の局所投与が乳癌骨転移の局所制御において有効か否かを、乳癌骨転移モデルラットを作成し検証した。【実験】マウス乳癌細胞 (CRL1666) を培養し F344 ラットの背部皮下に移植した。移植 1 週間後、結節状になった癌細胞を摘出、切断し癌細胞移植片とした。その後、F344 ラットの大腿骨に径 3mm の骨孔を作成し、癌細胞移植片と共に 400 μ g のパクリタキセルを含浸させた HAp/CoI を移植した。癌細胞移植片と共に生食を含浸させた HAp/CoI を移植した群を Control 群とし、 μ CT による画像評価や組織学的評価で癌細胞の進展を評価した。また術後平均生存期間についても評価を行った。

【結果と考察】 μ CT では、Control 群において全ての症例で術後 1 週には癌細胞の骨内から皮下への進展がみられたが、パクリタキセル含浸群では、少なくとも術後 2 週までは癌細胞の進展はみられず、そのうちの 2 例は術後 12 週でも癌細胞の進展はみられなかった。術後 12 週まで癌細胞の進展がみられず生存した 2 例を除いた術後平均生存期間はパクリタキセル含浸群が 26.5 日、Control 群が 17.4 日と有意差を認めた。組織学的所見では死亡例では両群共に癌細胞が増殖し、骨外・骨髄内浸潤を認めたが、生存例では乳癌細胞は消失していた。以上より、パクリタキセル含浸 HAp/CoI は乳癌骨転移モデルラットの局所制御に有効であると考えられる。今後、人に対する安全性が確認されれば、抗癌剤の局所投与が骨転移に対する治療戦略の一つとなり得ると考えられる。

1D-01-II

過飽和液中レーザー照射によるフッ素担持リン酸カルシウム成膜と抗菌性評価

¹産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門, ²北海道大学 大学院歯学研究院

A. Joseph NATHANAEL¹, ○大矢根綾子¹ (Oyane Ayako), 中村真紀¹, 薮佳奈子², 宮裕裕史²

【緒言】歯周病の再生治療においては、細菌増殖により破壊されたペリオドンタルアタッチメントを早期に再構築させることが重要である。本研究では、歯周治療後の感染予防とペリオドンタルアタッチメント再構築に有効と期待される、フッ素担持リン酸カルシウム (CaP) を歯面上に迅速成膜する技術の確立を目指した。成膜法としては、発表者らが最近開発した過飽和液中レーザー照射法 (J. Mater. Chem. B, 4, 6289, 2016) を用いた。エナメル質・象牙質のモデル材料として焼結水酸アパタイト (sHA) 基材を用い、NaF を添加した CaP 過飽和液中で同基材表面にパルスレーザー光を照射した。得られた基材の表面構造と組成、フッ化物イオン徐放挙動、ならびに抗菌性を評価した。

【実験】種々の濃度 (0, 10, 100, 1000 μ M) で NaF を添加した CaP 過飽和溶液中に sHA 基材を設置した。同基材の表面に、非集光の Nd:YAG パルスレーザー光 (30 Hz, 355 nm, 6 W/cm²) を 5 分あるいは 30 分間照射した。得られた基材の表面構造と組成を SEM、EDX、TEM により評価した。また、基材からのフッ化物イオンの徐放挙動を調べるため、生理食塩水 (pH 7.4, 36.5°C) 中に基材を浸漬し、液中のフッ化物イオン濃度をイオン電極により経時的に測定した。さらに、基材の抗菌性を調べるため、基材上に *Streptococcus mutans* 菌 (ATCC35668) を生着させた後 24 時間嫌気培養し、培地の濁度を測定した。

【結果と考察】SEM、EDX 分析の結果によれば、いずれの NaF 添加濃度でも、照射 5 分以内に、ナノからマイクロスケールの微細構造を有する緻密な CaP 膜が sHA 基材上に形成された。EDX による組成分析、ならびに TEM 電子線回折による結晶構造解析の結果、過飽和溶液への NaF 添加濃度の増加に伴い、CaP 膜のフッ素担持量が增大するとともに、結晶構造がリン酸八カルシウム (NaF : 0 μ M) からアパタイト (NaF : 1000 μ M) へと変化することが分かった。得られたフッ素担持 CaP 膜 (NaF : 1000 μ M) は、生理食塩水中にフッ化物イオンを 24 時間以上にわたって徐放した。また、Sm 菌培養培地の濁度測定の結果から、フッ素担持 CaP 膜は、Sm 菌に対し抗菌性を示すことが確認された。以上の結果から、本過飽和液中レーザー照射法により、歯周治療後の歯面を改質できる可能性が示された。

【謝辞】本研究は、JSPS 科研費 (JP17H02093, JP15F15331) および天田財団の助成を受けて実施された。

1D-02- I

極薄フッ素ドーブ非晶質リン酸カルシウムシートによるエナメル質の修復効果

¹近畿大学生物理工学部, ²大阪歯科大学歯科理工学講座, ³大阪歯科大学歯科保存学講座

○本津茂樹¹ (Hontsu Shigeki), 平井瑞樹¹, 橋本典也², 吉川一志³

【緒言】我々は、新しく開発した極薄 HAp シートを歯質上に貼付することで、HAp の人工エナメル質によるエナメル質修復法の検討を行ってきた。しかし、HAp には耐酸性の問題が残されているため、耐酸性に優れたフッ素ドーブ非晶質リン酸カルシウム(F-ACP)に着目し、耐酸性を有する歯質修復用 F-ACP シートを作製したが、シートの耐酸性が上がると歯質に固着しにくいという問題が生じた。そこで本研究では、非晶質リン酸カルシウム(ACP)接着層をもつ F-ACP/ACP 複合シートの作製を試み、その象牙質への固着効果と象牙質上へのエナメル質修復効果について調べたので報告する。

【実験】フッ化アパタイト(FAp)とハイドロキシアパタイト(HAp)粉末(太平化学産業株)をプレス機にて約 20MPa で加圧成形することにより、直径 16mm, 厚さ約 3mm のバルク体を作製した。その後、電気炉にて 750°C-10 時間で焼結したものを成膜用のターゲットとした。このターゲットを用いて、パルスレーザー堆積(PLD)法により室温にてこれまでの報告と同条件[1]で、膜厚 1 μ m のレジスト塗布した Si 基板上に、膜厚 2 μ m の F-ACP 薄膜と膜厚 0.1 μ m の ACP 薄膜を成膜した。続いて、得られた積層膜をもつ基板をアセトンに浸漬し、中間層であるレジストを溶解させることで基板から積層膜を単離し、これを F-ACP/ACP 複合シートとして回収した。次にこのシートを、歯根歯冠境界部で切断して象牙質を露出させ、その表面を#2000 の耐水研磨紙で研磨したヒト抜去歯象牙質上に貼付した。貼付液として pH を 2.0 の飽和リン酸カルシウム水溶液を用いて複合シートを象牙質上に貼付し、シートと象牙質の界面を一度脱灰させた。10 分後に人工唾液を塗布して界面の再石灰化を行った。その後、37°C の恒温槽に 1 時間静置したのち、荷重 200g、ブラッシング回数 20 stroke の条件下でブラッシング試験を行うことで、シートの固着特性とエナメル質修復効果を評価した。

【結果と考察】シートを貼付後 1 時間でブラッシング試験をした結果、F-ACP 単体シートは象牙質から剥離したが、F-ACP/ACP 複合シートは剥離しなかった。このことより、ACP 接着層の固着効果と F-ACP/ACP 複合シートのエナメル質修復効果を確認することができた。 [1] S.Hontsu et al. *Key Engineering Materials*, 493-494, 615-619(2011)

1D-03- I

ナノ秒パルスレーザー照射を施した純チタンの生体活性に及ぼす表面性状の影響

¹慶應義塾大学理工学部機械工学科, ²東北大学大学院工学研究科機械システムデザイン工学専攻

○倉科佑太¹ (Kurashina Yuta), 村上 諒¹, 水谷正義², 小茂鳥潤¹

【緒言】インプラント材料として従来から使用されている純チタンの生体活性を向上させる方法には、様々な表面処理がある。その中でレーザー照射処理は、単一のプロセスで基材に局所的な高エネルギー密度の加工を施すことができ、微細な凹凸と酸化皮膜を同時に付与できるため注目されている。純チタンにナノ秒パルスレーザーを照射することで、被処理面の生体活性が向上することも報告されている。しかし、このとき創成される形状とハイドロキシアパタイトの析出量との関係について詳細な検討は行われていない。本研究では、レーザー照射時のデフォーカスの大きさを種々に変化させてナノ秒パルスレーザー照射を施した純チタンを準備し、その生体活性に及ぼす表面性状の影響について検討・考察を加えた。

【実験】鏡面状に仕上げた純チタンをアセトンと超純水により超音波洗浄し、基材全面にナノ秒 Nd:YVO₄ レーザ装置を照射して供試材とした。その際、デフォーカスは 0, 2, 4 mm とした。供試材の表面性状を評価するために、供試材の表面と断面を走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) により観察し、表面積をレーザー顕微鏡により測定した。また、ラマン分光光度計を用いて供試材の表面に形成される化合物を同定した。さらに生体活性の評価は、供試材を 1.5 倍濃度の擬似体液 (SBF) に浸漬した状態で 37 °C の恒温槽に 1, 2 週間静置し、表面の元素濃度の評価をエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (EDX) で調べることに由り行った。なお、形成されたハイドロキシアパタイトは、FE-SEM により詳細に観察した。

【結果と考察】レーザー顕微鏡の結果から、レーザー照射処理を施すことで供試材の表面積が向上することが確認された。とくに、デフォーカスが 0, 2 mm の際に表面積は大きく上昇した。また、ラマン分光光度計の結果から、レーザー照射を施すことでルチル型およびアナターゼ型の TiO₂ が形成されることが明らかとなった。一方で、EDX の結果から、SBF 浸漬後の供試材の表面には Ca および P が確認され、特にデフォーカスが 0, 2 mm の際にこれらが顕著に検出された。また、SBF 浸漬後の FE-SEM 観察結果から、デフォーカス 0, 2 mm では、板状と針状の混在するハイドロキシアパタイトの結晶、およびデフォーカス 4 mm では、網目状のハイドロキシアパタイトの結晶が観察された。これは、デフォーカスの短い条件では、形成した凹凸の表面積が大きく、形成したハイドロキシアパタイトの総量が多くなることを示唆している。

1D-04- II

低ヤング率骨インプラント創製のための積層造形法による β 型 Ti 合金の結晶集合組織形成

¹大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻, ²大阪大学大学院工学研究科知能・機能創成工学専攻
○石本卓也¹ (Ishimoto Takuya), 久本健太¹, 萩原幸司², 孫 世海¹, 中野貴由¹

【緒言】金属インプラントは骨医療において不可欠なデバイスであり、今日では骨機能代替のために多数使用されている。しかしながら、一般に金属材料と骨との間にはヤング率の大きな乖離があるため、金属インプラントの埋入によって応力遮蔽により骨に負荷される応力は減少し、骨がそのマクロ・ミクロ構造に於ける定常状態を維持するための十分に大きな応力が得られなくなる。その結果として骨吸収、骨質劣化が起り、骨は力学機能低下を来す。応力遮蔽を回避するための 1 つの方策としてインプラントのヤング率をできるだけ低下させることが有効であると期待される。我々の研究室では、ISO 認可済の低ヤング率 β 型 Ti 合金である Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金の単結晶化により、 $\langle 100 \rangle$ にて 44.4 GPa という、骨類似レベルの低ヤング率化に成功している。一方で、3D プリンタの一種である積層造形法は、任意の三次元形状が作製可能であるのみならず、集合組織形成を可能とすることが近年示され始めており、形状と材質異方性を同時に付与可能な手法として我々は注目している。本研究では、積層造形法に基づく β 型 Ti 合金部材の造形と、造形体の集合組織形成挙動の解明を試みた。

【実験】ガスアトマイズ法により Ti-15Mo-5Zr-3Al 合金粉末を作製した。レーザビーム積層造形法を用いて、スキャンストラテジーをはじめとする造形パラメータを変化させて数種の緻密な造形体を作製した。作製した造形体に対し、FE-SEM-EBSD 法により集合組織解析を、ひずみゲージを用いての圧縮試験によるヤング率解析を行った。

【結果と考察】造形体の集合組織はスキャンストラテジーに依存して顕著に変化し、スキャンストラテジー X では造形方向に $\langle 100 \rangle$ 、スキャンストラテジー XY では $\langle 110 \rangle$ が優先配向した単結晶ライクな造形体が作製された[1]。結果として、 $\langle 100 \rangle$ が優先配向した方向での低ヤング率化が達成された。本手法が、金属集合組織制御に有用であるとともに、集合組織制御を通じた低ヤング率インプラント材の作製手法として極めて重要であることが示された。

<文献>

[1] T. Ishimoto, K. Hagihara, K. Hisamoto, S.-H. Sun, T. Nakano: Scripta Materialia, 132 (2017) 34-38.

1D-05- I

Effect of hot isostatic pressing on the microstructure of Zr-1Mo alloy builds fabricated by powder bed fusion process using fiber laser

¹Department of Materials Processing, Tohoku University, ²Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

○Sun Xiaohao¹, Keiko Kikuchi¹, Naoyuki Nomura¹, Akira Kawasaki¹, Hisashi Doi², Yusuke Tsutsumi², Takao Hanawa²

【Introduction】Magnetic resonance imaging (MRI) is widely used as a powerful diagnostic tool in orthopedics and brain surgery. However, MRI diagnosis is inhibited when metallic implant exists in the human body. This is mainly due to the formation of artifacts around the implants in MR images caused by the magnetic susceptibility difference between human body and metals. On the other hand, powder bed fusion process using fiber laser (PBFL) has attracted increasing attention in biomedical and aerospace industries, because PBFL has the ability in fabricating complex parts with high yield ratio compared to conventional manufacturing routes. To decrease artifact, we fabricated a low magnetic Zr-1Mo alloy by PBFL and investigated the effect of hot isostatic pressing (HIP) which has been known as a post-treatment process for PBFL parts for decreasing the porosity in the builds.

【Experimental procedure】The Zr-1Mo alloy builds were fabricated by PBFL using an optimized processing parameters from the viewpoint of mechanical properties. HIP treatment was carried out at four different temperatures for 7.2 ks under a pressure of 110 MPa. Pore distribution was observed using optical microscope (OM). Microstructure was observed by scanning electron microscopy (SEM). Phase constitution was examined by X-ray diffraction (XRD). Mechanical properties were determined by tensile test.

【Results】Fully dense builds were obtained after HIP treatment and randomly distributed pore observed in as-build specimen almost disappeared. The SEM observation revealed that martensitic acicular structure observed in as-build specimens changed to lamellar structure at high HIP temperature and basket wave structure at low HIP temperature. Intercept length of α phase and the colony size also varied depending on the HIP conditions.

1D-06- I

Evaluation of microstructure and mechanical properties of additively manufactured β -type Zr-Nb-Sn alloy

Department of Materials Processing, Tohoku University

○Torun Gözden, Kikuchi Keiko, Nomura Naoyuki, Kawasaki Akira

【緒言】 One of the fundamental medical diagnosis technique used to visualize parts of human body in 3D is magnetic resonance imaging (MRI). However, the presence of foreign parts/objects in the body is one of the reasons of MR artifacts which may cause signal loss in their vicinity. Therefore, biomaterials with low magnetic susceptibility are required to overcome the problem. Withal, another problem associated with implants is the mismatch in the Young's modulus between the bone and implant. One way to solve the problem stress-shielding effect, is to reduce the Young's modulus of the implant. Previous studies showed that the as-cast β -type Zr-9Nb-3Sn has a lower magnetic susceptibility than most of commercial implants. In this study, Zr-9Nb-3Sn alloy was fabricated by the powder bed fusion process using a fiber laser (PBFL). The influence of process parameters on the microstructure and properties of PBFLed builds were examined.

【実験】 Gas atomized Zr-9Nb-3Sn alloy powder was prepared as the starting material. Dumb-bell shaped specimens were additively manufactured with different process parameters on a PBFL machine equipped with Yb fiber laser. The relative density, surface roughness of PBFLed builds was obtained by the Archimedes' method and laser microscope. The tensile properties, Young's modulus, hardness and magnetic susceptibility were measured by tensile test, Vickers hardness test, free vibration resonance methods and magnetic balance respectively. The microstructures were evaluated by SEM, EBSD, XRD and TEM.

【結果と考察】 All of the PBFLed builds showed a relative density of more than 99%. The metastable β -Zr was confirmed as the predominant phase. The dumb-bell specimen produced with higher energy density shows preferential growth along $\langle 100 \rangle$. The preferentially oriented specimen shows yield strength and tensile strength, 704 MPa and 743 MPa respectively. Young's modulus was successfully reduced by up to 55 GPa. Interestingly, the modulus tended to decrease with increase in elongation after cyclic tensile tests.

1D-07- I

Mechanical properties and magnetic susceptibility of swaged and heat-treated Zr-1Mo alloy

¹Department of Materials Processing, Tohoku University, ²Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

○Zhou Weiwei¹, Kikuchi Keiko¹, Nomura Naoyuki¹, Kawasaki Akira¹, Doi Hisashi², Tsutsumi Yusuke², Hanawa Takao²

【Introduction】 Due to their low magnetic susceptibility, low cytotoxicity and high corrosion resistance, Zr-Mo alloy has enormous potential in the application of surgical implants. In particular, the swaged Zr-1Mo (mass %) alloy possessed a similar tensile strength as Ti-6Al-4V, and the magnetic susceptibility was decreased by two-thirds. Unfortunately, since a high dislocation density was induced by severe plastic deformation, the swaged Zr-1Mo showed a poor ductility. To improve this issue, heat treatment (HT) was conducted for the swaged Zr-1Mo in this work. Simultaneously, the effects of HT on the microstructures, mechanical properties and magnetic susceptibility were systematically investigated.

【Experimental】 Firstly, the as-cast Zr-1Mo alloy was fabricated by high-frequency induction melting process. Subsequently, the ingots were hot-forged at 1323 K, and machined into a rod with 18 mm in diameter for removing the surface oxide. After that, the initial rod was swaged into a bar with the diameter of 9 mm under an area reduction of 75 %. Finally, the swaged bars were cut into small pieces and heat-treated at 773 K for various periods. The tensile properties, Young's modulus and magnetic susceptibility were measured using instron-type universal testing machine, free vibration resonance methods and magnetic balance, respectively. The microstructures were evaluated by SEM, EBSD, XRD and TEM.

【Results and discussion】 All the heat-treated Zr-1Mo alloy mainly consisted of the alpha phase. Their grains remained the elongated shape. $\{10\cdot10\}$ texture formation was confirmed along the longitudinal direction for both the swaged and HT alloy. The Young's modulus showed slight increase after HT. The mechanical strength of swaged Zr-1Mo was slightly decreased with increasing HT time at 773 K, while the ductility was largely increased. That may be mainly attributed to the decrease of dislocation density.

1D-08- I

高い生体吸収性を備えた β -リン酸三カルシウム粉体の調製とその粉体性状

¹明治大学, ²岡山大学, ³シンガポール国立大学

○永田幸平¹ (Nagata Kohei), 本田みちよ¹, 小西敏功^{2,3}, 相澤 守¹

【緒言】

β -リン酸三カルシウム(β -TCP)は生体吸収性材料として臨床応用されている。我々はイノシトールリン酸のキレート能を利用することで β -TCPを主結晶相として硬化するキレート硬化型ペースト状人工骨の開発に成功している。本研究では、キレート硬化型ペースト状人工骨の吸収性をさらに向上させることを目的とし、出発原料である β -TCP粉体の溶解性を高めることに取り組んだ。具体的には、 β -TCP粉体をメカノケミカル法により調製し、得られた粉体の粉体性状を調査したので報告する。

【実験】

炭酸カルシウム(0.01 mol)とリン酸水素二ナトリウム(0.02 mol)と純水(40 cm³)をジルコニアポットに加え、300 rpmで3時間粉碎した。得られたスラリーを吸引ろ過後、110°Cで乾燥した。その後、700°C-1200°Cの温度範囲で加熱することにより原料粉体を調製した。得られた加熱粉体のキャラクタリゼーションとして、結晶相の同定、メジアン粒子径の測定、JIS T 0330-3に基づくCa²⁺イオン溶解性試験などを行なった。

【結果と考察】

加熱温度が700°C-1100°Cの範囲では粉体は β -TCP単一相であったが、1200°Cの場合、 β -TCPと α -TCPの混合相であった。これは β -TCPが α -TCPに相転移したためであると考えられる。加熱温度の増加に伴い、メジアン粒子径も増加した。この結果は加熱温度の増加により粒成長が進んだことによるものであると考えられる。また、溶解性試験を行なったところ、700°C-1100°Cの範囲では加熱温度が高くなると溶解速度は低下し、1200°Cでは逆に溶解速度は増加した。これは温度依存的に粒子径が増加することで、比表面積が小さくなったことが原因で溶解速度も低くなったものと思われる。一方、1200°Cでは、 α -TCPの存在により溶解速度が増加したと考えられる。これらのことから、700°Cで加熱した粉体は β -TCP単一相であり、優れた吸収性を持つ β -TCPセメント原料粉体として期待できる。

1D-09- II

酸および加熱処理を施したチタン合金のアパタイト形成能に合金元素が及ぼす影響

中部大学生命健康科学部生命医科学科

○山口誠二 (Yamaguchi Seiji), 橋本英樹, 中井隆介, 高玉博朗

【緒言】チタン合金は高い機械的強度と優れた生体親和性を示すので整形外科や歯科の分野に広く使用されている。しかし、これらは骨と結合しない。我々はチタン金属を硫酸と塩酸の混酸に浸漬して加熱すると、処理後の金属が擬似体液中で1日以内にアパタイトを形成し、生体内で骨と強固に結合することを報告した。しかし、同処理は多くのチタン合金には有効でない。本研究は、酸及び加熱処理を施したチタン合金のアパタイト形成能に合金元素が及ぼす影響を調べることを目的とする。

【実験】Ti-6Al-4V, Ti-15Mo-5Zr-3Al及びTi-15Zr-4Nb-4Ta合金を#400のダイヤモンドパッドで研磨し、66.3% H₂SO₄と10.6% HCl混酸に70°Cで1h浸漬し、その後600°Cで1h加熱処理した(混酸-加熱)。また、研磨後の合金を5MのNaOH水溶液に60°Cで24h浸漬し、50mM HClに40°Cで24h浸漬し、加熱する処理も施した(NaOH-HCl-加熱)。処理後の表面の化学組成をEDX, XPS, GDSにより調べ、表面形態、構造、及びゼータ電位をFE-SEM, XRD, ゼータ電位測定装置により調べた。また、処理後の合金を擬似体液(SBF)に浸漬してそのアパタイト形成能を評価した。

【結果と考察】混酸-加熱処理を施した合金をSBFに浸漬したところ、いずれも3日以内にアパタイトを形成しなかった。純チタンを混酸-加熱処理を施すと、処理後の金属にSO₄²⁻やCl⁻の酸基が残存することが報告されている。これらはSBF中で解離して周囲の溶液を酸性雰囲気にし、金属表面を正に帯電させてアパタイトの形成を誘起する。本研究において処理後の合金をGDSにより分析したところ、これらの酸基はいずれの合金表面にも残存していたが、ゼータ電位はほぼゼロであった。EDX及びXPS分析によると、Al, V, Nbなどの合金元素のTiに対する割合は処理後に最大35倍にも達していた。また、XRD分析ではNb₂O₅, TiZrO₄の合金酸化物も検出された。これらの合金元素が表面電位を減少させ、アパタイト形成を抑制したと考えられる。一方、NaOH-HCl-加熱処理を施すと、いずれの合金も表面から合金元素が選択的に除去され、合金元素をほとんど含まないリチル及びアナタース型のTiO₂が形成された。同処理後の合金はいずれも正の表面電位を示し、SBF中で3日以内にアパタイトを形成した。同処理を施した合金は生体内でもアパタイトを形成し、骨と結合すると期待される。

1D-10-I

アパタイト核との複合化によるセルロースナノファイバーへのアパタイト形成能の付与

¹京都大学大学院エネルギー科学研究科, ²香川高等専門学校

○吉岡拓哉¹ (Yoshioka Takuya), 藪塚武史¹, 高井茂臣¹, 八尾 健²

【緒言】セルロースナノファイバーは、軽量、高強度、低熱膨張性を併せ持つ植物由来材料であり、近年様々な産業分野で注目を集めている。このセルロースナノファイバーに生体活性を付与することができれば、適度な強度と弾性率、骨伝導性の3点を併せ持つ新規骨修復材料への展開が期待できる。本研究では、体液またはSBF中で高活性にアパタイト形成を誘起するアパタイト核[1]をセルロースナノファイバー母材に導入することで、セルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与条件の最適化を試みた。

【実験】ヒトの血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液 (SBF) の2倍濃度の水溶液を調製した。これを36.5℃、pH 8.2に調整し36.5℃の恒温槽にて4日間保持し、アパタイト核を析出させた。得られたアパタイト核を0 wt.%、1 wt.%、5 wt.%、10 wt.%、20 wt.%の重量割合でスラリー状のセルロースナノファイバーに混合し、金型を用いて一軸加圧成型を行い、50℃の恒温槽にて乾燥させた。得られたアパタイト核とセルロースナノファイバーの複合体をダイヤモンドカッターにより切断して表面を研磨し、試験片とした。得られた試験片を36.5℃、pH 7.4のSBFに浸漬し、アパタイト形成能を評価した。試験片表面を電界放出型走査型電子顕微鏡(FE-SEM)、エネルギー分散型X線分析装置(EDX)、薄膜X線回折測定装置(TF-XRD)を用いて観察および分析を行った。

【結果と考察】複合体に対して0 wt.%、1 wt.%、5 wt.%のアパタイト核を混合した試験片では、SBFに7日間浸漬後、試験片表面にアパタイト薄膜の形成は観察されなかった。一方、10 wt.%の試験片ではSBF浸漬4日後、20 wt.%の試験片ではSBF浸漬1日後において試験片表面が骨類似アパタイトに特徴的な鱗片状の結晶で被覆され、EDXにおけるCaとPのピーク強度が大きく増加した。さらに、TF-XRDにおいて、アパタイトの回折ピークが強く検出された。

これらの結果から、本条件では10 wt.%以上のアパタイト核をセルロースナノファイバーに添加することで良好なアパタイト形成能を示すことが分かった。

[1]T. Yao et al, US Patent /US8,178,066 (2012), Japan Patent/5261712 (2013).

1D-11-I

ケイ酸カルシウム水和物を基材とした元素徐放体の創製：アルキルアンモニウムの導入

¹名古屋大学大学院工学研究科, ²名古屋大学工学部

○中村 仁¹ (Nakamura Jin), 生川涼介², 鳴瀧彩絵¹, 大槻主税¹

【緒言】生体微量必須元素は生命機能の維持に重要な役割を担っており、これらを徐放できる材料は、生体の自己修復機能を促進する機能を持つインプラントになると期待される。一方、骨伝導性を示すセラミックスの基礎組成としてケイ酸カルシウム化合物が利用できることが知られている。ケイ酸カルシウム水和物は、構造中にケイ酸を骨格とするナノシートを有しており、その層間を有機修飾し、生体微量必須元素を導入すれば、層間の構造に依存したイオンの徐放機能が付与できると考えられる。しかし、ケイ酸カルシウム水和物の層間を有機修飾するための合成条件は未解明である。そこで本研究では、ケイ酸カルシウム水和物 ($C_1S-H; Ca_xSi_yO_{x+2y} \cdot ZH_2O$) への、アルキルアンモニウムの導入について調べた。

【実験】ケイ酸ナトリウムと水酸化テトラブチルアンモニウム(TBAOH)を含む水溶液に、硝酸カルシウム水溶液を $Ca:Si:TBAOH = x:1:y$ (mol比、 $x = 0.7 \sim 1.0, y = 0 \sim 2$)の組成となるように混合し、沈殿を得た。得られた沈殿を濾別し、超純水で洗浄した後に100℃で24h乾燥させた。試料を C_xS-TBA_y と表記する。試料を粉末X線回折装置(XRD)およびフーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)を用いて調べた。

【結果と考察】 C_1S-TBA_y ($y=0 \sim 2$)の粉末XRD図形からは、C-S-Hに帰属される顕著なピーク(ICDD No.34-0002)とカルサイト型炭酸カルシウムに帰属される微弱なピークが検出された。原料やシリカゲル由来するピークは検出されなかった。

。FT-IRスペクトルからは、試料のTBA/Si (mol比)の増大に伴い、Si-O結合のバンド(1000cm^{-1})に対するC-H結合のバンド(2900cm^{-1})の相対強度が増大した。 C_xS-TBA_2 ($x=0.7 \sim 1.0$)の粉末XRD図形からは、C-S-Hに帰属される顕著なピークが確認された。C-S-Hの積層周期に由来する $2\theta = 7^\circ$ 近傍のピークから層間距離を求めたところ、出発原料のCa/Siモル比が0.9の時に最も層間が拡大し、FT-IRスペクトルにおいても顕著なC-H結合のバンドが検出された。これらの結果から、ケイ酸カルシウム水和物を合成する際のSi/Ca比によりTBAカチオンの導入が促進されることを示唆された。

1D-12- I

反応性スパッタリングでシリカを被覆したジルコニア基材の安定性

¹大阪市立大学工学研究科, ²朝日大学歯学部歯学科

○横川善之¹(Yokogawa Yoshiyuki), 森嶋大志¹, 宇野光乗², 倉知正和², 石神 元², 土井 豊², 川木晴美², 堀田正人²

【緒言】ホワイトメタルと呼ばれるジルコニアが、歯冠（クラウン）として実用化されている。上皮組織細胞の接着性の向上の観点から、ジルコニア基材の親水化が検討されている[1]。UV照射、オゾン処理など光酸化分解処理を施すと、超親水性になるが、大気中で保管すると静的接触角は経時的に高くなり、元の高い接触角に戻る。我々は、反応性スパッタリングでジルコニア基材表面にシリカ薄膜を被覆することで親水性が長期にわたり保持できることを見だし、形成されたシリカ薄膜の安定性について検討したので報告する。

【実験】東ソー製 8Y-TZP を一軸加圧成形、大気中焼成した直径 10mm のジルコニア基材を用いた。ターゲットにシリコンウェハ（ノンドープ、2 インチ、99.999%）を用い、rf マグネトロンスパッタリング装置を用いて高周波電圧 100W 一定、プラズマガスは高純度 Ar ガス(99.999%)、ガス圧 5 mTorr (=0.67pa) とした。マスフローコントローラーを用い、プラズマガス中の高純度 O₂ ガスの体積割合を 2, 5, 8, 10% としてスパッタリング処理を行った。スパッタリング処理したジルコニア基材表面に、ピンオンディスク法により力学的作用を与え、その接触角変化等から薄膜の安定性を検討した。

【結果と考察】ジルコニア基材の結晶相は正方晶と単斜晶であり、スパッタリング処理前後で変わらず、ジルコニア基材の相変態は見られなかった。スパッタリング処理直後、ジルコニア基材に滴下した水滴はジルコニア基材全体に広がり、メニスカスにより基材表面に留まっていた。O₂ ガス体積割合が 5% でスパッタリング処理を施すと、デシケーター中保管 3 週間後も接触角は 20~30° であり、親水性を示した。3 週間後のスパッタリング処理したジルコニア基材の XPS スペクトルに Cls ピークが見られることから、接触角の増大は大気中の炭化物等の吸着によると考えられた。ジルコニア基材は白色であるが、反スパッタリング処理を施すと、見る角度により色が異なる干渉色を示す。薄膜は干渉色を示す通り極めて薄く、密着強度測定は困難である。ピンオンディスク法等で薄膜に一定荷重を与え、力学的作用と薄膜の安定性について検討した。

【参考文献】 [1] 吉成正雄, 歯科学報, 113, 485(2013)。

1D-13- I

血管内皮新生を目的としたチタン粒子焼結による多孔性チタン表面の軟組織癒合性評価

徳島大学大学院医歯薬学研究部

○関根一光 (Sekine Kazumitsu), 山下菊治, 浜田賢一

【緒言】補助人工心臓に利用される血管カニューレの吻合部では、術後の早い段階での血液接触表面における血管内皮新生が、血栓形成などのリスク低減に繋がる。それらを早期に達成することを目的として、チタン (Ti) マイクロ粒子焼結による“多孔性チタン材の作成”と基材チタンの“細胞賦活効果表面処理”の2つを特徴とした足場材の検討をおこなっている。今回、両者の組合せによる軟組織癒合性評価をおこなったので報告する。

【実験】平均粒径 170 μm に粒度調整した球形 Ti マイクロ粒子を 10wt% 比のワックス樹脂と加熱混和し、直径 4 mm 厚み 2 mm に成形したものを opened 試料、直径 4 mm 厚み 1 mm の Ti 円板上に同直径厚み 1mm で成形したものを semi-opened 試料として作成した。これらは成形後に 1, 100°C、Ar 置換下の条件で試料を焼結した。また、直径 4 mm 厚み 2 mm の Ti 円板を用意し、closed 試料（比較対称試料）とした。また、各群の一部試料は表面処理として、60°C、48 時間の 30% 過酸化水素水による水酸化 Ti 化処理の後、0.5 mg/mL のコラーゲン溶液を塗布した後に風乾処理した。さらに 60°C、2 時間のイソシアネート処理をおこなった。計 6 群の各試料は、洗浄後に EOG 滅菌し、埋入用試験片として準備した。各試料を麻酔下とした 10 週齢雄性ラットの背部筋層にポケットを作成し、左右側で表面処理の群を隔て、ランダムに opened、semi-opened、closed の各群試料を固定せずに配置して縫合した。埋入 1 週間後、麻酔下でポケット上方側から切開し、各試料を固定治具に固定した状態での垂直方向への引き抜き試験をおこなった。

【結果と考察】非表面処理群について、closed 試料では試料の癒合がおこっておらず、測定不能であった。Semi-opened 試料および opened 試料ではそれぞれ約 40kPa、約 50kPa の引き抜き強度であった。また、表面処理群では、closed 試料はわずかな強度を確認できたのみであったが、semi-opened 試料および opened 試料ではいずれも約 90kPa となり、表面処理による癒合促進効果が確認でき、また両者での差はほとんどなかった。以上の結果は、多孔性形状および表面処理による術後早期での癒合性の促進を示すものであった。チタン試料の水酸化処理法は優位な細胞賦活効果を示したことから、チタン多孔体などの表面積の広い足場材料には極めて有効であることが示された。

1D-14- I

各種起泡剤を用いた骨充填材用β型リン酸三カルシウム多孔体の調製

¹千葉工業大学大学院生命環境科学専攻・²千葉工業大学生命環境科学科、³株式会社福山医科
○竹田力哉¹ (Takeda Rikiya), 佐々木捷利², 柴田裕史¹, 福山茂雄³, 目黒 嵩³, 橋本和明¹

【緒言】近年、骨欠損部の充填剤としてリン酸三カルシウム(Tricalcium Phosphate: TCP、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)などのセラミック材料が臨床使用されている。TCPは徐々に吸収されて骨に置き換わることが知られていて、実用化されているβ-TCPセラミックスには緻密体、多孔体、顆粒状のものがある。そのなかでもβ-TCP多孔体は適切な気孔性状を有するため、細胞伸展の良い足場材料として使用されている。多孔体の作製方法はさまざまあるが、演者らは多孔体の作製が比較的簡易である発泡法に注目し、β-TCP多孔体を作製した。そこで本研究では、発泡法を用いて各種起泡剤が及ぼす影響について検討した。

【実験】リン酸水素カルシウム二水和物($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)と炭酸カルシウム(CaCO_3)をβ-TCPの出発原料とし、Ca/P mol比が1.50となるように調製した。その後、80°Cの純水を加え、ジルコニアボールを用いて24時間粉碎混合をおこない、70°C乾燥機にて24時間乾燥後、めのう乳鉢を用いて粉碎をおこなった。粉碎した粉末試料は仮焼温度750°C、昇温速度3°C/min、大気雰囲気下で10時間仮焼した。再度めのう乳鉢を用いて粉碎をおこない、X線回折(XRD)測定、フーリエ変換赤外吸収(FT-IR)スペクトル測定および電子型走査顕微鏡(SEM)観察によって評価した。つぎに、作製した粉末試料に分散剤として10%ポリアクリル酸アンモニウム水溶液を加え、5分間超音波照射をおこないながら混合し分散させた。その後、所定量の各種起泡剤を加え5分間超音波照射をおこないながら混合し起泡させた後に、70°C乾燥機を用いて15時間乾燥させた。その後、焼成温度1000°C、昇温速度5°C/min、大気雰囲気下で40分間焼成した。作製した多孔体をXRD測定、FT-IRスペクトル測定、SEM観察、アルキメデス法による気孔率測定等によって評価した。

【結果と考察】XRD測定結果とFT-IRスペクトル測定結果より、作製した試料はβ-TCPの回折ピークと一致し、また、β-TCPに帰属される PO_4 の吸収帯だけが確認された。以上のことより、作製した試料粉末はβ-TCPであることが示唆された。SEM像より、作製した多孔体は各種起泡剤の種類や添加量によってさまざまな気孔の数や気孔のサイズが観察された。また、起泡剤の添加量を増やすことで気孔のサイズが大きくなっていくことが確認された。以上のことより、発泡法による多孔体の作製において、起泡剤の種類や添加量の検討により多孔体の気孔を制御できることがわかった。

1D-15- I

無機・有機複合ビーズを用いた3次元多孔質構造体の開発

¹九州大学大学院総合理工学府、²福岡歯科大学、³九州大学応用力学研究所
○新村勇氣¹ (Imamura Yuki), 中牟田侑昌¹, 荒平高章², 都留寛治², 東藤 貢³

【緒言】骨腫瘍や事故により大規模な骨組織の欠損が生じた場合に、人工骨を埋め込んで骨組織を再生させる治療が行われるようになってきている。人工骨の材料としてはリン酸カルシウム系バイオセラミックスが主に使用されているが、セラミックス単体であるために、脆的な力学的特性を示すことが問題となっている。一方、最近ではバイオセラミックスとポリマーを複合化した微小なビーズが開発され医療用材料としての応用が検討されている。そこで本研究では、医療用バイオセラミックスであるβ-TCPとアルギン酸を複合化したマイクロビーズを作製し、さらにビーズを3次元状に組み立てることで構造体の作製を試みた。さらに、3D構造と力学特性の関係について検討した。

【実験】β-TCPの微粉末をアルギン酸ナトリウム水溶液に溶かしスラリーを調整した。これを1% CaCl_2 溶液にインジェクトしてβ-TCPとアルギン酸が複合化した球状のゲルを作製した。これら球状ゲルをエタノールにより段階的に脱水後、24時間自然乾燥させβ-TCP/Algビーズを作製した。ビーズ粒径の分布状態は100-1000 μmであり、ある程度粒径を揃えるために、ふるいを使い粒径ごとに区分した。作製したビーズを円柱形の型に規則的に詰め込むことで、アルギン酸またはポリ乳酸(PLLA)をバインダーとして3D構造体を作製した。FE-SEMにより3D構造体の観察を行った後、圧縮試験を行い荷重-変位関係を記録した。得られた力学特性データから、圧縮状態での剛性と強度を評価した。また、試験後の構造体をFE-SEMで観察し、変形・損傷のメカニズムについて考察した。

【結果と考察】FE-SEMによるビーズ断面の観察結果より、β-TCPとアルギン酸は均一に分布していることが分かった。圧縮特性の測定結果より、バインダーとしてアルギン酸よりポリ乳酸を使用した構造体の方が、剛性や強度が高く、バインダーであるポリマー相を制御することで、構造体の力学特性の制御が可能であることが示唆された。また、3D構造体におけるビーズの配置の仕方も力学特性に影響を及ぼし、同粒径ビーズの構造体では細密構造をとると力学特性が向上すること、さらに異なる粒径ビーズを組み合わせることでさらなる向上が期待できることが明らかになった。以上のことからビーズの粒径やビーズの配置により3D構造体の力学特性の制御が可能であることが示唆された。

1D-16- I

ケイリン酸塩ガラス/ポリ乳酸ファイバーマットを用いた骨芽細胞の配向制御

¹大阪大学, ²名古屋工業大学

○李 誠鎬¹ (Lee Sungho), 春日敏宏², 中野貴由¹

【緒言】骨組織は、アパタイトの結晶方位・コラーゲンファイバーの配向からなる異方性構造を示す。当研究グループでは、骨の力学特性は骨量より骨組織の配向に支配的に影響されることを初めて報告し、骨芽細胞を配向させることで骨配向構造の形成が可能であることを明らかにした。よって、生体材料上の骨芽細胞の配向方向を制御することにより、配向化した骨組織の再生及び、力学特性を早期に回復することが期待される。当研究グループで開発された、ケイリン酸塩インバートガラスは、オルトリン酸・オルトケイ酸を Mg がクロスリンクすることでガラスのネットワークを形成する、長鎖構造持たないガラスである。その構造により、優れたイオン溶出能を示す。今回は、ケイリン酸塩ガラスと生分解性ポリマーであるポリ乳酸(PLLA)を複合化させ、細胞の配向性を制御可能なスキャフォールドをエレクトロスピンニング法にて作製した。得られたファイバーマットのイオン溶出能及び、細胞増殖性を評価した。

【実験】15MO-15MgO-8P₂O₅-4SiO₂ (モル比, $M = Ca, Zn$, 略称:PSG-M)組成のガラスを熔融法(1500°C, 30min)にて作製し、ボールミルにて粉碎した。PLLA を 14wt%となるようクロロホルムに溶解させ、PLLA に対する PSG-M の含有率が 10, 30 vol% (略称: PSG-M_x, $M = Ca, Zn, x = 10, 30$)のガラス粉末が混合された紡糸溶液を用いて、エレクトロスピンニング法にてコレクターを回転させることにより配向化ファイバーマットを作製した。作製したファイバーマットは、Tris 緩衝溶液中でのイオン溶出挙動を評価し、新生マウスの頭蓋冠より初代骨芽細胞を抽出し、培養 3 日後の細胞数を評価した。

【結果と考察】作製したファイバーマットの繊維径は約 16 μm で、回転方向に対する繊維配向度は 0.85 であった。PSG-Ca30 と PSG-Zn30 の溶出挙動は、含有するガラスの溶出挙動と類似しており、高いイオン溶出能を示した。PSG-Ca10, PSG-Zn10 は、それぞれ PSG-Ca30, PSG-Zn30 と比べ 1/10 程度の溶出量を示した。ファイバー表面に存在する粉末が少なくなるためと考えられる。培養 3 日後の PSG-Ca10, PSG-Ca30, PSG-Zn10 細胞数は有意差を示さなかったが、PSG-Zn30 は有意に小さい細胞数を示した。PSG-Zn30 は、Zn²⁺イオンの溶出量が多く細胞増殖を阻害したと考えられる。3 日間培養後の細胞は、ファイバー上に配向方向に沿って進展していた。

1D-17- I

抗菌性と骨芽細胞活性を兼ね備えた分散性アパタイトナノ粒子の開発

¹近畿大学大学院生物理工学研究科, ²物質・材料研究機構機能性材料研究拠点

○古菌 勉¹ (Furuzono Tsutomu), 岡田将典¹, 大下真璃¹, 東 慶直¹, 田口哲志²

【緒言】

我が国では高齢化時代を迎えており、椎体圧迫骨折等の整形外科領域における疾患が増加傾向にある。特に椎体圧迫骨折の治療に椎体形成術が行われているが、生体親和性の欠如、治療効果の不十分さや細菌感染等の治療上および管理の問題点が指摘されているのが現状である。そこで我々はハイドロキシアパタイト(HAp)に亜鉛(Zn)をドーブした分散性アパタイト(Zn-HAp)ナノ粒子を調製し、そのキャラクターゼーション、材料特性および生物学的評価を行ったので報告する。

【実験】

硝酸カルシウム四水和物、硝酸亜鉛六水和物およびりん酸水素二アンモニウムを用い、Zn 置換率の異なる Zn-HAp ナノ粒子を湿式法により調製した。キャラクターゼーションは XRD、FT-IR、ICP-OES、SEM および DLS を用いた。また生物学的評価として、骨芽細胞増殖試験および抗菌性評価を実施した。前者についてサンプル粉末添加後、1 日後および 3 日後の MC3T3-E1 細胞の増殖率を評価した。後者について、OD₆₀₀=0.1 に調製した菌液と Zn-HAp 粉末を加えた NaCl 水溶液を 1 時間接触させ、培養後コロニー数を計数して殺菌率を評価した。

【結果と考察】

XRD および FT-IR 結果より、調製したサンプルは HAp に由来する構造を呈しており、Zn 置換率の増加に伴う軸長の減少が認められた。これは Zn イオン(0.74 Å)が Ca イオン(1.00 Å)に置換されたことによると考えられた。また ICP 結果より、仕込みに対して約 9 割の Zn イオンが HAp 中に含有されていた。SEM 観察および DLS 測定結果より、得られたナノ粒子は平均粒径が約 60~100nm のほぼ均一な球状ナノ粒子であることが認められた。骨芽細胞活性試験では、3 日後に Control(HAp)と比較して高い骨芽細胞活性が認められた。抗菌試験結果では、大腸菌等に対する抗菌性が認められた。さらに徐放試験結果より、Zn イオンの徐放が極めて僅かであったことから、当該ナノ粒子の抗菌機序および骨芽細胞活性機序は、接触および細胞内への取り込みによるものと考えられた。

1D-18- I

ハイドロキシアパタイト メガ結晶合成の試み

昭和大学歯学部保存学講座歯科理工学部門

○成澤英明 (Narusawa Hideaki), 大和田弘幸, 片岡 有, 宮崎 隆

【緒言】ハイドロキシアパタイト (以下 HAP とする) の合成については多くの先行研究が存在するが、良質かつ大きな結晶を得る簡便な方法は示されていない。低倍率の光学顕微鏡で観察、操作可能な HAP 単結晶を研究室で容易に得られれば骨や歯の研究の一助となると考えられる。演者らはポリリン酸と酸化カルシウムの混和物を起点に水熱合成によって光学顕微鏡で観察可能な結晶の生成を得たので報告する。

【実験】116%の強リン酸 (太平化学工業) 4g と電融カルシア (0.3mm 以下、タテホ化学) 4.8g を混和し 20ml の蒸留水を加え、50ml 容量のテフロン製容器を水熱容器に入れ 5 日間 200°C に昇温した電気炉で係留加熱した。放冷後に開放して再度 200°C で加熱し水分を取り除き、XRD 測定 (rigaku ultimaIV) および光学顕微鏡 (Nikon Eclipse 600E) で観察を行った。XRD のデータは付属のアプリケーションで Rietveld 解析を行い定量分析し、顕微鏡像は motic image Plus で取り込んだ後、Helicon Focus 6 で深度合成を行った。

【結果と考察】本サンプルの定量分析結果は、HAP 58.3% Monetite 30.5% Ca(OH)₂ 7.3% TCP 3.9% (Rwp=13.4% S4.3) であった。光学顕微鏡の観察では 10 ミクロン以上の短径をもつ棒状の結晶が認められ、いくつかは明瞭な六角柱形状を認めることができた。この方法は酸化カルシウムとポリリン酸のキレート物と余剰ポリリン酸の水溶液で酸性の状態から反応を開始するため、炭酸の混入を起こさない。酸化カルシウムは水と反応し膨張しながら水酸化カルシウムになる。ポリリン酸は最終的には分解し、強アルカリ性で反応を終了する。室温で長期間係留すれば Monetite が HAP に変換することが予測されるが、大きな結晶に発達するとは考えにくい。結晶表面がポリリン酸で封鎖された状態からある程度分解した段階でカルシウムイオンと水酸イオンが高温高压の環境に放たれる。この段階で遊離したリン酸が優位にあれば PH が低い場合 monetite が生成すると考えられる。酸化カルシウム結晶粒径とポリリン酸の重合度の組み合わせに最適値が存在すると考えられる。また、この結晶の大きさは単結晶解析にはやや小さいが、放射光を用いれば解析可能と考えられた。

1D-19- I

ナノアパタイト表面修飾における細胞取り込み向上が及ぼすトランスフェクションの効果

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, ³ 東京医科歯科大学保険衛生学研究科

○小室博明^{1,2} (Komuro Hiroaki), 笹野哲郎³, 山下仁大¹, 永井亜希子¹

【緒言】

遺伝子治療はガンなどの疾患の治療に革命を起こす可能性がある治療法として期待されている。そこで、高いトランスフェクション効率と安全性を兼ね備えた遺伝子デリバリーシステムの進歩は臨床における遺伝子治療成功に向けて必要不可欠である。非ウイルスベクターの中のハイドロキシアパタイト (HAp) は優れた生体親和性や低毒性のため研究されてきたが、トランスフェクション効率が低いために臨床にはいたっていない。本報告では、ナノ粒子のハイドロキシアパタイトを作製し、これに生体分子を修飾させることでトランスフェクション効率に与えた効果について報告する。

【実験】

ナノアパタイトの作製には W/O エマルジョン法を用いた。表面修飾は糖類をナノアパタイトと混合した後の沈殿物として得た。作製したナノアパタイトの物性は XRD、FT-IR、TEM で評価した。ナノアパタイトとプラスミド DNA の相互作用はアガロースゲル電気泳動を用いて評価した。トランスフェクション実験で用いるナノアパタイト濃度を決定するために、ブタ血管内皮細胞 (EC) へ 1、10、100、1000 μg/ml の濃度の粒子を加えて培養後、MTT assay にて細胞毒性を行った。ナノアパタイトとプラスミド DNA を混合し、EC への遺伝子導入効率を蛍光顕微鏡で観察した。FITC で修飾したナノアパタイトを用いて、粒子の取り込みや細胞内動態を共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。

【結果と考察】

XRD から HAp 単相であることが確認できた。FT-IR から HAp に存在するイオンと炭酸イオンがあり、また、表面修飾も炭化水素基から観察できた。TEM からナノアパタイトの粒径は長さ 40 nm、幅 15 nm の結晶が観察できた。細胞毒性は 1000 μg/ml でのみ有意に観察された。表面修飾したナノアパタイトを用いたところ、ナノアパタイトのみと比較して遺伝子導入効率と細胞への粒子の取り込み量の増加を認めた。遺伝子導入効率の違いには表面修飾による、細胞への取り込みが優位に働いたと推測される。

1D-20- I

Fundamentals of the theory of biodegradable metals

¹International Research Organization for Advanced Science and Technology, Kumamoto University, ² Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, ³Department of Materials Science and Engineering, Kumamoto University

○Yufeng Zheng¹, Liqun Ruan², Kazuki Takashima³

Abstract

Biodegradable polymers and bioactive glasses for biomedical applications have been developed for decades, forming mature theory including definition, classification, criteria and design strategy. However, currently no such strategy and theory are applicable in the field of biodegradable metals despite thousands of publications have been made. In this talk we propose the theory on biodegradable metals, based on biodegradability and biocompatibility. Most metallic elements with accessible data have been reviewed and discussed from both aspects of biodegradability and biocompatibility. As for biodegradability, electrode potential and reactivity have been used as parameter to classify biodegradable and non-biodegradable metals. For the biocompatibility, a comprehensive insight with “ADI”, “RDI”, “LD₅₀” and “IC₅₀” have been used describe. Based on it, guidance on biodegradable metal design with suitable content have been made. In addition, the definition of Biodegradable Metals (BMs) have been revised and the category have been illustrated more detailed.

1D-21- I

バイオミメティック法で作製したアパタイトカプセル表面における酵素吸着特性の評価

¹京都大学大学院エネルギー科学研究科, ²香川高等専門学校

○山本雅也¹ (Yamamoto Masaya), 藪塚武史¹, 高井茂臣¹, 八尾 健²

【緒言】

ヒドロキシアパタイト (HAp) は生体親和性が高く、結晶表面にリン脂質やタンパク質、糖などが吸着する性質を有している。擬体液 (SBF) の pH を上昇させるとリン酸カルシウムナノ粒子が析出する。我々は、このナノ粒子が体液または SBF 中で HAp の形成を高活性に誘起することを発見し、アパタイト核と名付けた[1]。本研究ではアパタイト核を用いて $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 粒子を HAp で被覆し、磁性アパタイトマイクロカプセルを作製した。作製したカプセルを用いて様々な等電点を持つ酵素を固定化し、カプセルの酵素吸着特性を調べた。

【実験】

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 粒子表面にアパタイト核を付着させて SBF に浸漬し、磁性アパタイトマイクロカプセルを作製した。PBS (pH=7.4) を溶媒として作製した酵素溶液にカプセルを分散し、24 時間攪拌して酵素の固定化を行った。酵素はペプシン (pI=2.6)、ウレアーゼ (pI=5.0)、トリプシン (pI=10.1)、リゾチーム (pI=11.0) を使用した。攪拌後、遠心分離機でカプセルを分離して上澄みを採取し、ブラッドフォード法により酵素濃度を測定した。測定した酵素濃度から固定化効率を求めた。

【結果と考察】

SEM 画像から、作製したカプセル表面には鱗片状結晶が観察され、直径は 1~2 μm であることがわかった。EDX からは HAp 由来と思われるリンとカルシウムのピークが見られ、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 粒子が HAp で被覆されたことがわかった。固定化効率はペプシン、リゾチーム、トリプシン、ウレアーゼの順に高くなった。すなわち、等電点と溶液の pH の値の差が小さいほど固定化効率が高くなることがわかった。これは、酵素の溶解度が等電点で最小となって溶媒相から析出し、吸着相であるカプセル表面に吸着されたことによるものである。

【参考文献】 [1] T. Yao, M. Hibino, S. Yamaguchi H. Okada, Japanese Patent 5261712 (2013), U.S. Patent 8178066 (2012).

【謝辞】 本研究の一部は関西エネルギー・リサイクル科学研究振興財団の研究助成を受けたものである。

1E-01- I

セルロースナノファイバー・チキソトロピックゲルでの三次元培養による長大な筋管形成

¹早稲田大学大学院先進理工学研究所, ²早稲田大学ナノ創新研究機構, ³早稲田大学大学院ナノ理工学研究所
○米田憲司¹ (Yoneda Kenji), 今任景一¹, 尹 棟鉉², 関口哲志², 庄子習一³, 武田直也¹

【緒言】マイクロ流体デバイスを用いて連続的に作製する二層ゲルファイバーの芯層に細胞を包埋させて、再生組織を構築する研究が行われている。しかし細胞培養において一般的に用いられるコラーゲン系の材料では、この培養系において細胞を確実に担持できず、細胞がゲルファイバーから漏出・凝集するといった問題点がある。そこで本研究ではチキソトロピー性を示すセルロースナノファイバー (CNF) のゲルを細胞培養層 (芯層) に用いた。チキソトロピー性の CNF ゲルは、マイクロデバイス内での送液の加圧時に流動するが、出口で射出され圧力が解消した後はゲル化し三次元包埋培養場として機能する。さらに、強度に優れるアルギン酸ゲルで鞘層を形成し CNF を同軸状に覆うことにより、長期培養も可能な安定な三次元培養場となる。これら材料を用いてマウス筋芽細胞株 (C2C12) を包埋し培養することで、筋管組織への誘導と骨格筋組織の構築を目指した。

【実験】 CNF 懸濁液の濃度を変化させ粘度測定を行い、マイクロデバイスで安定して送液が可能な条件を検討した。また作製したゲルファイバー内で C2C12 を培養し、Day21 で細胞核と筋管形成の指標となるミオシン重鎖を蛍光染色することで筋管形成の有無を確認した。

【結果と考察】 CNF 懸濁液は、従来用いていたアテロコラーゲンと同様の粘度をもつ濃度において十分な流動性を示した。マイクロゲルファイバーは数十 cm の長さで作製でき、C2C12 は芯層全体にわたり 2 週間以上も安定的に担持できることも見出した。ゲル包埋当初には球状であったこれら細胞は、わずか 1 日目にはゲルファイバーの長軸方向に配向した cm スケールの以上の連続した構造体を形成した。さらに 21 日目にこの構造体の細胞核と筋管形成の指標となるミオシン重鎖を蛍光染色したところ、多数の細胞が融合し多核化した長さ 300 μm 以上の筋管組織の形成が確認できた。以上より、チキソトロピー性 CNF ゲルの三次元培養場としての新たな有用性を見出した。筋管組織の更なる成熟化と積層化により長大な骨格筋組織の作製が期待できる。

1E-02- I

細胞足場材料を目指した分解性感温性ハイドロゲルの合成と細胞接着評価

東京理科大学大学院基礎工学研究科¹・大阪大学大学院工学研究科²

○小松周平¹ (Komatsu Syuuhei), 麻生隆彬², 石原 量¹, 菊池明彦¹

【緒言】

細胞足場材料として、感温性ハイドロゲルが注目されており、生体近傍の温度でゲル表面の親水性・疎水性を制御できれば、刺激に応じ細胞接着因子の吸着などを制御できる細胞足場材料として有望である。一方、体内で使用する際は、分解性を有することが望ましい。我々はラジカル重合により感温性と分解性を有する、poly(2-methylene-1,3-dioxepane (MDO)-co-2-hydroxyethyl acrylate (HEA))を報告している。本研究では、架橋剤存在下における MDO と HEA とのラジカル共重合で、分解性感温性ハイドロゲルを合成し、温度応答挙動とその分解特性を明らかにするとともに、ハイドロゲル表面における細胞接着挙動を解析することを目的とした。

【実験】

MDO と HEA を架橋剤存在下で、ラジカル共重合させハイドロゲルを合成した。合成したハイドロゲルの温度による膨潤度の変化と、加速実験としてアルカリ加水分解試験を行った。またウシ血管内皮細胞を用い、Poly(D-Lysine) (PLys) 修飾ハイドロゲルへの細胞接着評価を行った。

【結果と考察】

合成した P(MDO-co-HEA)ゲルは、昇温により膨潤度が低下し、体積相転移温度を示したため、感温性を有することが分かった。またゲルの組成比に応じて体積相転移温度の制御が可能であった。さらに 37 °C におけるアルカリ加水分解では、反応時間の延長に伴い膨潤し、最終的には分解、溶解した。分解時の温度で収縮しているゲルでは、分解初期において、分解の抑制が確認されたことから、感温性により分解の制御が可能であった。また、PLys 修飾ゲルを用いてウシ血管内皮細胞の細胞接着性を評価したところ、疎水的なゲルほど細胞が伸展、接着していることがわかった。以上の結果から、分解性と感温性を有し、細胞接着因子の導入で 37°C での細胞接着を可能とする材料として、細胞足場材料へ応用が期待できる。

1E-03- I

フィブロイン基質に対する CP フラクシオンの混合が軟骨細胞の移動挙動に与える影響

¹京都大学工学研究科, ²京都大学工学部, ³京都大学ウイルス・再生医科学研究所, ⁴信州大学繊維学部
○建島祥司¹ (Tatehata Shoji), 中村祐樹¹, 福島慎之介², 有馬祐介³, 玉田 靖⁴, 富田直秀¹

【緒言】フィブロインスポンジ内において軟骨細胞は脱分化せずに増殖して、良好な軟骨組織を形成することが報告されている。我々の研究室では、フィブロイン基質上ではプロネクチン基質上と比べ、軟骨細胞の移動速度が大きく、この移動速度がフィブロイン基質上での軟骨組織形成に影響する可能性がある事を報告してきた。一方、フィブロイン分子はアミノ酸配列が規則正しく並んでいる結晶領域と、不規則で無秩序に並んでいる非晶領域からなり、プロネクチン分子はフィブロイン分子の結晶領域を構成するアミノ酸配列を含んでいることが知られている。本研究では、フィブロイン基質上での軟骨細胞の移動挙動と結晶領域と非晶領域の割合との関係を調べるために、フィブロイン基質に対して CP フラクシオン(フィブロイン分子のうち結晶部配列のみを分離させた結晶部試料)を混合した表面上での軟骨細胞の移動挙動を評価した。

【実験】 CP フラクシオン、フィブロイン、及びこれらの二つの混合物質をコートしたディッシュ上に、日本白色家兎の軟骨細胞を播種し、24 時間のタイムラプス観察を行った。得られた画像データより細胞の中心座標を取得し、各基質上での細胞の移動速度、細胞形状別の割合及び移動速度をそれぞれ算出した。

【結果と考察】 CP フラクシオンの割合が高くなるにつれ、細胞の平均の移動速度が低下し、その傾向は伸展状態にある細胞においてより顕著に見られた。また、CP フラクシオンの割合が高くなるにつれ、伸展状態にある細胞の割合が上昇した。さらに、仮足が見られ、かつ球形の輪郭線が見られる細胞が、フィブロイン基質上において最も多く観察された。以上の結果より、フィブロインスポンジ内における軟骨細胞の挙動及び形態の特徴は、フィブロインの非晶領域に由来していることが示唆された。

1E-04- I

生分解性繊維を用いたシート状足場材料の創製と評価

¹九州大学大学院総合理工学府物質理工学専攻, ²九州大学応用力学研究所
○遠藤喜嗣¹ (Endo Yoshitsugu), 東藤 貢²

【緒言】 組織工学において、細胞培養のための基材として重要な役割を担う足場材料は、連通多孔質構造が基本であり、力学的特性を付与するためにランダムにポリマー繊維を配向させた足場材料も検討されている。より微細な繊維構造の作製方法として、エレクトロスピンニング法が注目を集め広く用いられているが、作製条件の最適化が難しい等の問題も存在する。近年、より簡便に繊維構造を得る方法として、メルトスピンニング法が検討されているが、本手法をもちいた足場材料の作製に関する研究は少ないのが現状である。本研究では、医療用生分解性樹脂である乳酸とカプロラクトンの共重合体 (PLCL) を原料とし、市販の簡易的な綿菓子製造機を用いて繊維シートの作製を試みた。また、エレクトロスピンニング法を用いて作製した繊維シートを用いて、細胞親和性と力学的特性の観点から比較検討を試みた。

【実験】 メルトスピンニングの場合は、180℃程度に加熱した回転釜に PLCL ペレットを装填し、溶融した PLCL が遠心力で飛ばされ空気中で冷却されることで繊維状に成形される。その繊維をアルミフォイルで包んだ棒で巻き取ることで、中空円筒状の試料を得た。一方、エレクトロスピンニングの場合は、ジクロロメタンで溶解させた PLCL を、25kV の電圧下でシリンジにより噴出させることでシート状に成形した。作製した繊維シートを適当な大きさに切断し、細胞培養実験の足場材料とした。播種し培養した細胞は、ヒト間葉系細胞 (hMSC) と iPS 細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) である。37 °C の環境下で培養実験を行い、細胞の接着・増殖状態について観察し、細胞数評価を試みた。また、引張試験による力学特性変化を測定した。

【結果と考察】 メルトスピンニングで作製したポリマーシートは、エレクトロスピンニングに比べ繊維径の分布がより広範囲であったが、細胞培養実験の結果より、細胞培養の足場材料として十分に適用可能であることがわかった。また、径が大きな繊維の影響により引張りの機械的特性はメルトスピンニングの方がより高いことも明らかになった。以上より、メルトスピンニング法を応用することで、より簡便で安価な方法で足場材料としての繊維シートを作製可能であることが示唆された。

1E-05- I

骨再生用材料としての2相連通多孔質構造体の創製と力学特性評価

¹九州大学大学院総理工学府, ²福岡歯科大学, ³九州大学応用力学研究所

○井上朋美¹ (Inoue Tomomi), 中牟田侑昌¹, 荒平高章², 東藤 貢³

【緒言】 骨再生用の人工骨として、バイオセラミックスの連通多孔体が開発され広く臨床応用されている。最近では、特に力学特性向上の観点からバイオポリマーとの複合構造体の研究も進められている。これまで我々の研究グループは、バイオセラミックス多孔体の空孔内にポリマースポンジ構造を導入した2相多孔質構造体を開発し研究を進めてきた。本研究では、HA多孔体に生体吸収性ポリマーブレンドPLLA/PCLのスポンジ構造を導入した2相多孔質構造体を作製し、圧縮力学特性に及ぼすブレンド比の影響について調査した。

【実験】 HA多孔体はテンプレート法を用いて作製した。HA粉末とPVA溶液の混合溶液にPUスポンジを含浸し乾燥させた後、電気炉を用いて1300°C、4時間で焼結させHA多孔体を得た。次にペレット状のPLLAとPCLをジオキサン溶液に溶解して3wt%の溶液を調整した。PLLA/PCLの混合比は100/0、80/20、60/40、40/60、20/80、0/100とした。これらの溶液にHA多孔体を浸漬し凍結乾燥を施すことで、2相多孔質構造を有する複合体を作製した。これらの複合体に関して、FE-SEMによる微細構造の観察を行った。また、小型材料試験機を用いて圧縮試験を行い応力-ひずみ関係を評価した。初期直線部の傾きから圧縮弾性率を求め、さらに応力が大きく低下する直前のピーク値を圧縮強度と定義して評価した。

【結果と考察】 FE-SEM観察結果より、すべての混合比に対してHAの骨格構造内にポリマー相の多孔質構造が形成された事が確認できた。次に圧縮試験の結果より、HA多孔体にポリマーのスポンジ構造を導入することで、圧縮弾性率および強度が増加することが分かった。弾性率増加の原因は、空隙(弾性率ゼロ)内にポリマー相が導入されることで、複合効果によりその分の弾性率が増加したことが考えられる。また、強度増加の主因としては、HA多孔体の骨格内部にスポンジ状ポリマーが存在することで、HA多孔体の柱構造が破壊した後も全体の構造が維持されることで、大規模な破壊の開始が遅れることが考えられる。また、より高弾性で高強度のPLLAの含有率が増加すると、複合体の弾性率および強度はほぼ線形的に増加する傾向を示すことが分かった。これらの結果より、混合比を変化させたPLLA/PCLポリマーブレンドの導入により、HA/PLLA/PCL複合体の圧縮力学特性の制御が可能であることが示唆された。

1E-06- I

血管内膜誘導活性と抗血栓性を併せもつ新たな機能性ペプチドの探索

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 (Yamaoka Tetsuji), Munisso Maria

【緒言】

我々は、ダチョウ頸動脈由来の小口径脱細胞血管の長期開存化を目指して研究を続けている。これまでに、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ のリガンドとして知られているREDVペプチドで内腔を修飾することで、早期の内膜形成とその開存化に成功してきた。その詳細解析により、ペプチド修飾脱細胞組織表面が強く血栓形成を抑制している事を見いだした。この系では、①REDVによる血中循環血管内皮前駆細胞(EPC)の補足と②血栓形成が競争的に進むと考えられるが、速度的には、後者がドミナントと考えられる。詳細は不明であるが、その一つのメカニズムとしてREDVペプチド自身がEPC親和性に加えて抗血栓性に優れていることが考えられる。そこで、本研究では、強いEPC補足能に加えて優れた抗血栓性を有する新たなペプチド配列をファージディスプレイ法(PD法)により探索し、その効果を*in vitro* および *in situ* にて検討した。

【実験】

7量体あるいは12量体ペプチドのPDライブラリーを用いて*in vitro* バイオパニング実験を進めた。まず、EPC細胞をターゲットとして従来型のPD法により、EPC親和性ペプチドの候補分子を探索した。この際、細胞親和性以外に、配列の細胞内での増殖効率がバイアスとなり、サイクル数を増やすごとにその効果が大きく影響する。そこで、候補となったファージ・クローンの親和性を定量的に決定するために、ファージバインディングインデックス(PBI)という指標を導入してその効率を向上させた。得られたペプチド配列で、延伸ポリテトラフルオロエチレンを修飾し、*in vitro* にて細胞接着選択性試験を実施した。さらに、上述の目標を達成するために、血小板に対して結合しないファージを回収するネガティブセレクションステップを併用することで、目的となるダブル活性ペプチドの探索を進めた。

【結果】

有意な特異性を得られるクローンのうち12株について詳細に検討した結果、EPC親和性に優れるクローンを得た。さらに、その中に有意に血小板粘着性を抑制するクローンが見いだされ、今後の血管開発に有用であると期待される。

1E-07-III

血液適合性候補ペプチド分子の in situ スクリーニングシステムの構築

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 (Yamaoka Tetsuji), 馬原 淳, Munisso Maria

【緒言】

我々は、インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ のリガンドである REDV ペプチドで脱細胞ダチョウ頸動脈内腔面を修飾することによって高い開存性を報告してきた。長期開存化のため、あるいは、この戦略を合成材料表面に適応するためには、さらに活性の高い修飾プローブが必要と考えている。そこで、独自に改良したファージディスプレイ法により、強いEPC補足能に加えて優れた抗血栓性を有する新たなペプチド配列を見いだした。しかしながら、これらの候補配列の性能を評価する有用なスクリーニングシステムが無い。血液適合性と血管内皮前駆細胞接着性を、従来の in vitro 試験で進めることはできるが、移植血管の環境とは大きく異なる。また、修飾脱細胞血管の内腔表面では、①REDV による血中循環血管内皮前駆細胞(EPC)の補足と②血栓形成が競争的に進み、前者が勝った場合に開存するので、別々の定性的評価では信頼できる選択はできない。そこで、ミニブタ体外循環回路に取り付ける評価モジュールを開発し、多サンプルのスクリーニングシステムを構築した。

【実験】

基材として延伸ポリテトラフルオロエチレン縫合糸を選択し、その表面を候補ペプチドにより修飾した。繊維状サンプルを静脈内に留置して血栓形成性を評価する手法が野一色らにより報告されているが、1動物で1サンプルであり大動物で進めるには適していない。そこで、内径10mmの透明チューブ内に6~12本の繊維を留置するためのカートリッジを3種類設計した。ミニブタ体外循環システムに設置して所定時間環流した後に、サンプル縫合糸に対して、顕微鏡観察、SEM観察、EPCに対する免疫染色、血小板に対する免疫染色、等を施し、内膜形成活性と抗血栓性について比較評価した。

【結果】

それぞれの候補配列は多聞異なる EPC 補足能と抗血栓性を示した。本来はチューブ状の血管内腔で起こる現象であるが繊維状サンプルモジュールにより一度に12種類のサンプルを簡便に評価することが可能となった。

1E-08-III

高圧処理による母斑組織の不活化・再移植と自家培養表皮を用いた皮膚再生臨床研究

¹関西医科大学形成外科学講座, ²国立循環器病研究センター研究所生体医工学部

○森本尚樹 (Morimoto Naoki) ¹, 馬原 淳², 光井俊人¹, 覚道奈津子¹, 楠本健司¹, 山岡哲二²

【緒言】

先天性巨大色素性母斑は悪性黒色腫の発生源ともなり、その再建に用いる自家皮膚が不足し治療に難渋する疾患である。この治療のブレイクスルーとなるべく、2016年12月より自家培養表皮(ジェイス[®]: J-TEC社)が世界に先駆けて先天性巨大色素性母斑に保険適用された。しかし、培養表皮の母床となる自家真皮の再生方法は未だに確立されていない。組織再生研究分野では、1990年代に製品化された二層性人工真皮もしくは同種皮膚移植(同種皮膚製品を含む)によって真皮再生方法が既に確立されているかのように誤解されているが、臨床的に自家培養表皮の母床として使用可能な真皮再生方法は確立されておらず、そのような治療も実施されていない。我々は、母斑組織を高圧処理によって不活化し、脱細胞化せずに移植し、自家真皮を再生する治療を着想し非臨床研究を行い、臨床研究を開始している。

【実験】

高圧処理は、組織深部の細胞まで均一に処理可能で、真皮マトリックスは損傷しない理想的な方法である。非臨床研究で、200MPa以上での細胞の死滅、600MPa以上での表皮基底膜構造の変性および表皮細胞の接着率低下を明らかにした。細胞残渣は有害な炎症を惹起しないこと、大型動物実験で自家不活化皮膚の方が同種脱細胞化皮膚よりも拘縮が少なく優れていること、メラニン色素は再移植後吸収されるため、取り除く必要はないことも確認した。そして、臨床研究で用いる処理条件を200MPa、10分間と設定し、高圧処理母斑組織の再移植による真皮再生および自家培養表皮移植による皮膚再生治療の臨床研究を、再生医療等安全性確保法に基づく第二種再生医療等技術を用いる再生医療研究として開始した。

【結果と考察】

現在、目標症例数10例で開始し症例登録が完了する見込みである。まだ試験途中であり、最終結果は得られていないが、今後先進医療を目標にさらに研究を継続する予定である。

1E-09-III

内皮系前駆細胞による血管修復過程を人工的に誘導するペプチド修飾脱細胞血管

¹ 国立循環器病研究センター研究所生体医工学部, ² 関西大学化学生命工学部

○馬原 淳¹ (Mahara Atsushi), 古島健太郎², 平野義明², 山岡哲二¹

【緒言】血管内皮へ分化する前駆細胞や幹細胞は、恒常性の維持や損傷した部位の再生過程における微細血管網の構築に寄与していることが知られている。近年、血液内を循環していることが報告されている血管内皮前駆細胞は、血管形成や炎症部位での微細血管網の構築、さらには虚血部位における血管再構成にも関わることが報告された。これまでに我々は、内腔にインテグリン $\alpha 4 \beta 1$ 結合リガンドである REDV ペプチドを固定化した脱細胞血管がミニブタ大腿動脈バイパス移植において良好な開存を示すことを報告した。移植した血管は内径 2 mm、長さ 20-30 cm であり人工血管中央部においても 1 週間後に内皮化形成している事から、吻合部からの内皮細胞の増生ではなく血中を循環する前駆細胞の関与が考えられていた。そこで本研究では、ミニブタへの血管移植モデルにより移植 1 日から 3 ヶ月間の組織染色と細胞表面マーカーの解析データに基づいて、早期内皮化形成メカニズムを検証した。

【実験】従来法にもとづいて内腔に REDV ペプチドが固定化された脱細胞化人工血管を作製した。移植 1 時間における血管内腔での血栓形成を調べるために、人工心肺回路に人工血管を接続し 1 時間血液を通液した。また大腿動脈へ人工血管を移植し 1, 3, 7 日の人工血管中央部の組織を摘出して内腔に形成される細胞層を免疫染色、電子顕微鏡により評価した。さらに捕捉された細胞を *in vitro* で培養し FACS により表面マーカーの発現を定量した。

【結果と考察】1 時間血液を通液した場合、未修飾の脱細胞血管表面では微細血栓が形成したが、REDV ペプチドを固定化することで血栓形成は完全に抑制された。移植 1 日後には内腔に細胞が捕捉され 3 日後には細胞間が接着した内皮層を形成した。この細胞層は CD34, Flk-1 陽性を示し、99% の細胞で CD34 を発現しており、62% の細胞で Flk-1 陽性細胞を認めた。この細胞は内皮系マーカーである CD31 や CD105 を発現していることから、内皮系の前駆細胞であることが判明した。移植 3 ヶ月後には内皮層において CD34, Flk-1 マーカーが消失していたことから、ペプチド修飾脱細胞表面は、血中に循環している内皮系前駆細胞を補足して人工的に血管修復過程を誘導することで内皮化形成している事が示唆された。

1E-10-III

生体内初期石灰化過程を模倣したミネラル形成に関する考察

¹ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, ² 岡山大学歯学部先端領域研究センター

○ハラ エミリオ サトシ¹ (Hara Emilio Satoshi), 長岡紀幸², 岡田正弘¹, 松本卓也¹

【緒言】近年、骨再生を目的とした新材料の研究開発が進められているが、より効果的な骨誘導材料が必要とされている。生体内における石灰化過程を生命科学・材料学の双方向から検討することは、より生体内骨アパタイトに近い材料のデザインと合成につながると考えられる。本研究では、生体内における初期石灰化過程、つまり無機物が初めて有機物内に析出するステージに注目し、生命科学・材料学の双方向からの検討を行った。さらに獲得された情報をもとに *in vitro* での生体擬似的ミネラル形成を行った。

【実験】マウス大腿骨骨端部を摘出し、石灰化領域を X 線マイクロ CT (SkyScan 1174 compact microCT, Bruker, Aartselaar, Belgium) を用い、初期石灰化を同定した。また、摘出したサンプルをもとに凍結切片を作製し、組織学的に検討した。骨ミネラルの定性・定量解析を行うため、摘出した組織を樹脂包埋し、走査型電子顕微鏡 (FE-SEM, JSM-6701F, JEOL) または透過型電子顕微鏡 (TEM, JEM-2100, JEOL) にて観察を行った。得られたデータをもとに *in vitro* 軟骨細胞、骨芽細胞存在下での物理化学環境を制御し、石灰化形成能についての検討も行った。

【結果と考察】大腿骨骨端部では生後 6 日目に初期石灰化が認められた。初期石灰化物の定性について、結晶化していないアモルファスリン酸カルシウムとハイドロキシアパタイトの存在を認めた。初期石灰化クラスターの面積は約 1200 nm² を示した。次に、軟骨細胞、骨芽細胞を用いて、物理化学環境を制御した *in vitro* ミネラル形成を行った結果、迅速な石灰化物形成を認めた。

1E-11-III

ケモカイン CCL21 を用いた軟骨再生のためのインテリジェントマテリアルの開発

¹北海道大学大学院医学研究院整形外科科学教室

○上徳善太 (Joutoku Zenta), 小野寺智洋, 松岡正剛, 馬場力哉, 本谷和俊, 宝満健太郎, 岩崎倫政

【緒言】自然修復能の低い関節軟骨の再生は困難であり、新たな治療法の実現が必要である。幼若個体は組織自然修復能が高いことが知られており、その機序の解明は再生医療の発展に重要である。本実験では組織修復に重要な役割を担うケモカインに着目した。本研究の目的は、軟骨修復に関わるケモカインを同定し、そのケモカインを用いた軟骨再生のためのインテリジェントマテリアルを開発し、その効果を検証する事である。

【実験】軟骨修復に関わるケモカイン選別の為、以下の実験を行った。1. 骨髄間葉系幹細胞(BMSC)の軟骨細胞分化過程で、遺伝子発現の上昇するケモカインレセプターを抽出。2. BMSC 平面培養による脱分化過程で、遺伝子発現の上昇しないケモカインレセプターを抽出。3. 抽出されたケモカインの BMSC 遊走能の評価。次に、軟骨修復過程における候補ケモカインの発現を確認した。抽出されたケモカインレセプターの全身性 Knockout マウス (KO)を用いて軟骨修復能を評価した。KO と野生型マウス (WT)に、軟骨全層欠損を作成し、3 週齢(幼若)及び 8 週齢(成熟)の軟骨修復能を評価した。最後に、ウサギ骨軟骨欠損部に候補ケモカインを混和した高純度アルギン酸ゲル(UPAL[®] gel)を移植し、未治療群、UPAL[®] gel 単独群、ケモカイン群に分け軟骨修復能を評価した。

【結果と考察】本実験の結果、CCL21、そのレセプターである CCR7 が抽出された。幼若齢(WT)では、損傷早期に CCL21、及び CCR7 の一過性集積を認めたが、成熟齢ではどちらも集積しなかった。幼若齢の WT で良好な自然修復が得られたのに対し、CCR7KO の修復能は著しく低かった一方で、成熟齢では両群の修復能に差は認めなかった。成熟ウサギ骨軟骨損傷モデルに対して、CCL21 を加えた UPAL[®] gel を埋植したところ、良好な軟骨修復を認めた。渉猟する限り CCL21/CCR7 と軟骨修復に関する報告はない。幼若個体では、CCL21 は軟骨修復過程に発現を認め、CCR7KO マウスでは軟骨修復能が低下したことから、CCL21/CCR7 は幼若個体における軟骨修復に寄与すると考えられた。また、CCL21 を UPAL[®] gel に加えることで成熟個体でも軟骨修復が促進した。CCL21 を加えることで内在性幹細胞を損傷部に誘導し、軟骨分化誘導能を有する UPAL[®] gel が Scaffold として働くことで、軟骨修復を促進した可能性が示唆された。

1E-12-III

椎間板再生治療における組織修復材の開発

¹北海道大学大学院医学研究院脊椎・脊髄先端医学分野, ²北海道大学大学院医学研究院整形外科科学教室, ²北海道大学大学院工学研究院

○須藤英毅¹ (Sudo Hideki), 辻本武尊², 東藤正浩³, 山田勝久², 大西貴士², 岩崎倫政²

【緒言】椎間板は生体内における自然再生能力が著しく低く、例えば椎間板ヘルニアに対する手術治療では、摘出部に生じた空隙は術後容易に変性を来す要因となる。我々は、AMED の革新的医療技術創出拠点プロジェクトによる支援のもと、アルギン酸ナトリウムを基盤とした高純度硬化性ゲルを椎間板ヘルニア術後の椎間板再生を促す組織修復材として開発しているので報告する。

【実験】非臨床 POC 取得のため PMDA 薬事戦略相談 (対面助言) による合意を得て、1) GLP 下生物学的安全性試験として家兎を用いた埋植試験による全身及び埋植局所への影響、2) 信頼性基準による性能試験として大型動物 (成羊) を用いた埋植試験、3) 生体力学試験として成羊屍体腰椎を用いた動的軸圧縮試験 (±300N, 1Hz, 1000 回) を行った。

【結果と考察】1) 埋植 4, 24 週後に全身毒性及び神経毒性がないことを確認した。2) 埋植手術後の 3T-MRI 及び病理組織にて、術後 4, 12, 24 週のいずれの時期においても、ゲル投与群は椎間板部分摘出単独群に比べ椎間板変性が有意に低く、免疫組織染色による Type II collagen 陽性細胞率も高かった。3) 動的圧縮試験後もゲルが椎間板外へ逸脱せず、椎間板摘出単独群より高い脊柱剛性を示した。

椎間板再生に対する最先端治療戦略は、幹細胞移植や組織変性を抑制する遺伝子工学的治療である。しかし、自家細胞移植では二期的手術である他、採取する細胞数も限られる点や、遺伝子工学的手法は導入効率の課題など超えるべきハードルは高い。そこで我々は、生体内における組織修復環境を最適化することで組織再生が促進されるという仮説のもと、エンドトキシン含有量を極限まで排除した高純度硬化性ゲルを用いた無細胞移植椎間板組織自然再生誘導法を検討した (PCT 国際出願中)。細胞を用いた cell-based medicine に対し、matrix-based medicine といわれる本治療戦略に対する臨床への橋渡し研究の成果が証明されたことで、現在、探索的治験の準備に移行している。

1E-13-III

テリパラチド酢酸塩によるリン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体の骨形成促進効果

¹ 東北大学大学院医工学研究科骨再生医工学分野, ² 東洋紡株式会社, ³ 東北大学大学院歯学研究科顎顔面・口腔外科学分野

○梶井文彦^{1,2} (Kajii Fumihiko), 岩井敦史², 田中秀典², 川井 忠³, 松井桂子³, 鎌倉慎治¹

【諸言】リン酸オクタカルシウム (OCP) とコラーゲン (Co1) を複合化させたリン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体 (OCP/Co1) はこれまで種々の動物実験において有意な骨再生能を示し、現在は臨床試験を実施し実用化を目指している。今回私たちは、骨粗しょう症治療薬として用いられるヒト副甲状腺ホルモンの N 端側の 1-34 ペプチド断片であるテリパラチド酢酸塩 (PTH) を OCP/Co1 に滴下含有させ、骨欠損部に直接的に局所埋入することによって、骨形成促進作用が向上するかどうかについて検討した。

【実験】湿式合成法にて作製した OCP とブタ真皮由来のアテロコラーゲン (Co1) を複合化させ、直径 9mm・厚さ 1.5mm のディスクを作成し熱脱水架橋を施した後、滅菌する目的で電子線照射 (約 15Kgy) した。ラット頭蓋冠に直径 9mm の臨界骨欠損を作製し、OCP/Co1 のみを埋入した「OCP/Co1 群」、埋入時に OCP/Co1 へ PTH 溶液 0.1 μg を滴下含有させた「OCP/Co1/PTH0.1 群」、同様に PTH 溶液 1.0 μg を滴下含有させた「OCP/Co1/PTH1.0 群」の 3 群 (各群 5 匹) を用意し、観察期間は術後 12 週までとした。術後 4 週時、12 週時には生存状態で CT 撮影を行い、12 週時に標本採取後、軟エックス線写真撮影ののち脱灰標本から組織学的・組織定量学的観察を行った。

【結果】エックス線学的観察では、OCP/Co1 群よりも PTH が含まれる 2 群 (OCP/Co1/PTH0.1 & 1.0) の両方とも 4 週時の時点で欠損内の不透過像の充進が著しく 12 週時においても同様であった。また、12 週時の組織学的定量的結果、新生骨の割合が有意に高値であった。

【考察】OCP/Co1 埋入時に PTH を滴下含有させ局所作用させることによって、OCP/Co1 の骨形成促進効果を向上させることが示唆された。

1E-14-III

うろこコラーゲンを使用した培養口腔粘膜の開発

¹ 新潟大学大学院医歯学総合研究科小児歯科学分野, ² 新潟大学大学院医歯学総合研究科生体組織再生工学分野, ³ 新潟大学大学院医歯学総合研究科高度口腔機能教育研究センター, ⁴ 新潟大学大学院医歯学総合研究科歯学教育研究開発学分野, ⁵ 多木化学株式会社

○鈴木絢子^{1,2} (Suzuki Ayako), 加藤寛子^{2,3}, 干川絵美², 塩見 晶⁴, 河上貴宏⁵, 兒玉泰洋⁵, 齋藤一誠¹, 早崎治明¹, 泉 健次²

【緒言】これまで我々は、人獣共通感染症がない海産物由来材料を足場材とする口腔内移植可能な培養口腔粘膜の開発を行ってきた。これまで、キトサンを主成分とする多孔質の足場材を開発し培養口腔粘膜を作成したところ、上皮再生は認めたものの、口腔への移植材として操作性、物性に難点があった。この課題を解決するために、昨年の本学会で報告したように、1%魚うろこ (I 型) コラーゲンゲルを足場材とし、かつ、生体模倣の観点から上皮細胞播種面に凸凹構造を付与して培養口腔粘膜を作成した。この結果、移植材としての操作性が改善され、組織学的に生体の口腔粘膜に類似した上皮層が形成された一方で、作成中に培養口腔粘膜が著明に収縮していた。本研究では、コラーゲンゲルにコンドロイチン硫酸 (CS) を添加することが収縮の抑制に有効という仮説に立ち、CS を加えたうろこコラーゲンゲルの足場材を作成し、足場材の物性と、作成中の培養口腔粘膜の収縮、および形成された上皮の組織像について検討した。

【実験】インフォームドコンセントを得た患者から採取した口腔粘膜から、角化細胞を単離し連続培養した。使用する足場材は、1%うろこコラーゲンゲルに (1) CS 無添加群 (2) 1%CS 添加群、(3) 2%CS 添加群とし、細胞播種面には、ナイロンメッシュの圧接により凸凹を付与した。作成した足場材に対して、引っ張り強度と圧縮強度を測定。また、本学の培養口腔粘膜臨床応用プロトコールに準じて作成した培養口腔粘膜は、経時的にサイズを測定し、完成後に 4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン切片を作成後、HE 染色を行い上皮の組織像を観察した。

【結果と考察】CS 添加濃度が増すにつれて、1%コラーゲンゲルの引っ張り強度と圧縮強度は減少した。とくに (3) の足場材は摂子で把持すること自体が困難であった。一方、濃度に関わらず CS を 1%コラーゲンゲルに添加すると、作成中の培養口腔粘膜の収縮が (1) に比べ大きく改善した。組織学的には、いずれの群においてもゲル上には重層化した上皮が形成されていた。従って、1%CS 添加した 1%コラーゲンゲルは、培養口腔粘膜の足場材としての良好な操作性と収縮が少ないというバランスを兼ね備えていることが明らかとなった。

1E-15-II

超音波振動刺激が軟骨前駆細胞 (ATDC5) の分化に及ぼす影響

¹慶應義塾大学理工学研究科, ²慶應義塾大学

○井田雄太¹ (Ida Yuta), 岩永健太郎², 倉科佑太², 宮田昌悟², 小茂鳥潤²

【緒言】

軟骨前駆細胞の分化は、超音波振動刺激の付与により促進されることが知られている。しかしながら、従来の研究では、プラスチック製の培養器の直下にシリコーンゲルや水を介して低強度超音波パルス (LIPUS) を置き、それによって振動を付与する手法がとられており、細胞に付与する振動の周波数や振幅の大きさを制御することは困難であった。そこで本研究では、細胞に付与する超音波振動の特性を制御することが可能な金属製の培養器をまず作製した。つぎにこれを用いて、超音波振動刺激が軟骨前駆細胞の分化に及ぼす影響について検討・考察を加えた。

【実験】

細胞が接着する培養面は、微粒子ピーニング処理により微細凹凸を加工した SUS316L とした。その下部に、ボルト締めランジュバン型振動子を具備することで、細胞に所望の特性の超音波振動を付与することができる細胞培養システムを作製した。このシステムを用いて、周波数を 25kHz とし、振幅を 0.05、0.1、0.5、1.0、5.0 および 10 μ m とした超音波振動刺激を、1 日 30 分間、マウス由来軟骨前駆細胞 (ATDC5) に付与し、合計 14 日間培養を行った。分化の度合いは sGAG 量を測定することにより評価した。また、DNA 量の測定も行った。

【結果と考察】

0.05 から 1.0 μ m の振幅の超音波振動は、軟骨細胞への分化には影響を及ぼさないことが明らかとなった。それに対して、5.0 μ m の振幅の超音波振動を付与した場合には、軟骨細胞への分化が促進され同時に増殖性が低下することが明らかとなった。なお、10 μ m の振幅の振動を与えた場合には、細胞の増殖性が著しく低下した。これは、実験中にキャビテーションが発生し、それにより細胞膜が大きく損傷したためと考えられる。

1E-16-II

シングルファイバーを用いた神経膠芽腫細胞遊走におけるミトコンドリア動態の解析

¹福井大学院工学研究科繊維先端工学専攻, ²福井大学学術研究院医学系部門統合生理学分野

○河合佑介¹ (Kawai Yusuke), 竹内綾子², 松岡 達², 藤田 聡

【緒言】

癌は日本人の死因第一位である。特に高い浸潤能を有し、治療困難な部位に発現する脳腫瘍細胞について、早急な理解が求められている。腫瘍細胞は、転移と浸潤を繰り返して身体中に広がっていくため、腫瘍細胞の遊走性を理解することは癌の理解には欠かせない。腫瘍細胞の遊走にはエネルギー (ATP) が不可欠であるが、ATP 産生のものであるミトコンドリアが腫瘍細胞遊走能にどの程度関与するか、明らかになっていない。本研究においては、脳腫瘍細胞遊走の方向性や移動速度とミトコンドリア局在やミトコンドリア膜電位の関連を 1 細胞レベルで明らかにすることで、神経膠芽腫細胞の遊走能とミトコンドリアの細胞内局在と機能との関係を明らかにすることを目的とする。

【実験】

神経膠芽腫細胞 (U-87) をミトコンドリア膜電位感受性色素 (TMRE) で染色し、二次元平面上の細胞遊走を 1 時間隔で 1.5 時間タイムラプス観察を行った。また、酸化的リン酸化、解糖系を阻害する試薬をそれぞれ用いて遊走を観察することでミトコンドリア動態と腫瘍細胞遊走との関係を調べた。さらに、細胞の前後方向を明確にする目的で、遊走方向を一次元方向に限定することが可能であるエレクトロスピンニング法によりシングルファイバーを作成し、より生体内を模倣した 3 次元環境下で細胞遊走を観察できる実験系を構築し、腫瘍細胞遊走時におけるミトコンドリア局在の定量化を行った。

【結果と考察】

タイムラプスによる観察から、ミトコンドリアが核周囲から仮足の方向へ流動的に移動していくと共に、アクチンの重合が活発に行われている様子が観察された。ミトコンドリアの分布は、非常に動的であり、エネルギーの需要が高い場所での富化を示すといった報告もあることから、突出先端部において、アクチン単量体、分子モーター等の働きにより、エネルギー需要が高まった結果ミトコンドリアが流入したと考えられる。また、ファイバー上での観察ではミトコンドリア局在が進行方向前方に存在し、本実験系において腫瘍細胞遊走とミトコンドリア局在についての関係性を明らかにできると期待される。

1E-17-II

生分解性高分子を用いた細胞・ナノ薄膜複合体の電気化学的マニピュレーション

¹東北大学大学院工学研究科, ²東北大学大学院医学系研究科

○鈴木 仁¹ (Suzuki Jin), 永井展祐², 西澤松彦¹, 阿部俊明², 梶 弘和¹

【緒言】

近年、細胞シートを用いる再生医療が広く検討されているが、細胞シートは脆く壊れやすいため、扱いが難しい。それを改善するために我々は細胞の足場材料として高分子ナノ薄膜を用いた検討を行ってきた。しかし細胞・ナノ薄膜複合体を基板からオンデマンドで回収する技術はまだ確立されていない。そこで本研究では、自己組織化単分子膜(SAM)が金属基板から還元脱離する性質に着目し、細胞・ナノ薄膜複合体の基板からの剥離を電気化学的に制御する方法を開発した。

【実験】

SAMとしてL-cysteineを、高分子ナノ薄膜として乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)を用いて検討を行った。シリコーンゴムシートを用いてガラス基板上にAuをパターニングし、その上にSAMを形成して電極基板を作製した。SAMの上にPLGAナノ薄膜を載せ、その上で網膜色素上皮細胞を培養することで細胞・ナノ薄膜複合体を作製した。乾電池を用いて電極基板に還元電位を印加し、SAMの還元脱離によって細胞・ナノ薄膜複合体を剥離させる実験を行った。また、細胞・ナノ薄膜複合体を動物に移植するin vivo試験を行った。ラット眼球網膜下へ細胞・ナノ薄膜複合体を送達し、眼球を摘出して観察を行った。

【結果と考察】

-1.5V乾電池を用いた簡便な手法で細胞・ナノ薄膜複合体を基板から短時間で剥離させることに成功した。また回収後の細胞の生存率が約100%に保たれていることを確認した。さらにポーラス薄膜を基板に用いることでノンポーラス基板と比較してより早く高分子ナノ薄膜を回収することができた。In vivo試験では細胞・ナノ薄膜複合体をラット眼球という非常に狭小なスペースに送達できたことを確認した。

1E-18-II

クローン性株細胞を用いた腔組織再構築系の開発

¹東京理科大学基礎工学研究科, ²神戸大学大学院工学研究科

○上妻 雅¹ (Kozuma Miyabi), 安富 諒², 中島忠章¹, 大谷 亨², 友岡康弘¹

性同一性障害のための性転換手術には腔組織を移植する必要がある。腔は単層上皮から成るミューラー管から分化し、間質から分泌される因子によって、多層角質化の腔上皮となるが、その形成メカニズムは解明されていない。そこで、本研究では腔由来のクローン性株細胞を用い、マウス体内への移植による腔組織の再構築を試みた。

新生仔期の腔間質から樹立された株細胞とコラーゲン溶液を混合して固め、そのゲルの上にミューラー管上皮のクローン性株細胞(E1細胞)を播種し、気相液相界面で3週間培養を行った(3D培養)。その結果、E1細胞は腔上皮様の多層上皮を形成した。また、その腔間質株細胞から2種類の細胞(M2細胞、M6細胞)を樹立し、それぞれをE1細胞と3D培養したところ、M2細胞は単層上皮を、M6細胞は多層上皮を誘導した。さらなる分化を誘導するため、3D培養サンプルを腎被膜下に移植したが、血管新生に乏しく、体循環に接続されず退縮した。そこで、組織再構成のカギとなる血管新生を移植片に誘導するため、われわれは、ヒアルロン酸にポリエチレングリコール(PEG)をグラフトした高分子(PEG-g-HA)を架橋したヒドロゲルにfibroblast growth factor 2(FGF2)を浸漬させることで、腎被膜下への血管新生誘導を促し、E1細胞の多層化および分化の誘導を試みた。PEG-g-HA架橋ゲルは、成長因子を極めて安定に保持し、組織再生に適した放出制御を可能とする独自のヒドロゲルである。FGF2を含浸したPEG-g-HA含有コラーゲンゲルを移植した結果、コラーゲンゲルのみでの移植と比較して、移植片への血管誘導が促進され、退縮が阻害された。その移植片においては、内腔側に多層化した上皮組織が確認できた。この血管新生効率の定量的評価についても発表する。

再生医療の分野においては、iPS細胞の臨床応用に向け、分化誘導効率の向上と細胞分離技術の向上によって単一細胞群を得ることが近い将来に期待されている。したがって、単一細胞群から組織構造を再構築可能なこの系は、多種多様な組織の再構築に応用可能だと考えられる。

1E-19-Ⅱ

フィブリンゲルを用いた骨格筋組織の構築と組織モデルとしての応用

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

○高橋宏信 (Takahashi Hironobu), 清水達也, 大和雅之, 岡野光夫

【緒言】再生医療の実現に向けた組織工学技術の発展に伴い、様々な組織を構築することが可能となってきた。温度応答性基材で培養した細胞は培養温度を変化させることで培養基材から剥離させ、細胞シートとして回収することができる。この技術により、細胞を高密度に集積させた組織を作製することが可能になっているが、より複雑な構造・機能を有する組織を再現できる技術がさらに望まれている。本研究では、高分子パターンニング技術によって表面修飾した温度応答性基材を用いて構造制御した骨格筋細胞シートを作製し、より生体に近い構造・機能を有する骨格筋組織の構築を試みた。

【実験】温度応答性基材表面に部位選択的にポリアクリアミドをグラフトすることで2種類のポリマーがストライプ状に形成されたパターン化温度応答性基材を作製した。筋芽細胞をこの基材に播種し、細胞がコンフルエント状態になるまで培養した後、培養温度を 20°C にすることで細胞シートとして回収した。これをフィブリンゲル上に転写した後、筋管分化を誘導するために分化誘導培地で培養した。筋組織の分化に関しては、筋芽細胞の形状変化および筋細胞特異的なタンパク質の発現から評価を行った。さらに、電気刺激による筋収縮挙動について観察し、作製した筋組織の機能評価を行った。また、リアノジンを培地に添加し、筋収縮に及ぼす影響を観察することで筋組織の薬剤応答性を評価した。

【結果と考察】パターン化基材に播種した筋芽細胞は同一方向に配向し、低温培養することにより細胞シートとして回収できた。回収した細胞シートは配向構造を維持した状態のままフィブリンゲル上に転写することが可能であった。さらに分化誘導 3 週間後、筋収縮に必須のサルコメア構造を有する配向した筋管組織を得ることに成功した。次に、作製した筋組織を電氣的に刺激したところ、電気刺激に反応して筋組織が収縮する様子を観察することができた。さらに、筋組織モデルとしての有用性を評価するため、培地中にリアノジンを添加したところ、電気刺激下において筋収縮が徐々に抑制されていく様子が見られた。この抑制効果はリアノジンの濃度に依存的であり、作製した骨格筋組織は生理的な薬剤応答性を持つことが示された。本手法により作製した筋組織は構造的にも機能的にも生体を模倣しており、優れた組織モデルとして創薬開発などに応用できると期待される。

1E-20-Ⅱ

束状構造ゲルによる神経足場材料の開発

¹東京大学生産技術研究所, ²東京理科大学基礎工学部, ³東北工業大学大学院工学研究科

○高橋治子¹ (Takahashi Haruko), 立澤彩佳^{1,2}, 小田原あおい³, 鈴木郁郎³, 菊池明彦², 松永行子¹

【緒言】柔軟性、含水性に優れたハイドロゲルは、生体に近い環境を模倣するのに適した材料であり、様々な組織の再生を指向した細胞足場としての利用が期待される。特に生体に存在する、筋線維・神経線維などの束状線維構造を有する組織の再生のためには、束状構造をもつハイドロゲル足場材料が適していると考えられるが、束状構造ゲルを、ゲル繊維を撚り合わせて作製するのは一般的に難しい。そこで我々は、溶液の相分離状態とマイクロ流路技術を組み合わせることで、ゲル化と束化を同時に行うことのできる「動的ゲル化法」を用いて束状構造ゲルを作製した。本発表では、さまざまな固さの束状構造ゲルを作製し、その物理科学的な特性評価および神経細胞足場への応用を検討した。

【実験】生体適合性および温度応答性を有するヒドロキシプロピルセルロース(HPC) 5 wt%に対し、アルギン酸ナトリウム(Na-Alg)の濃度を 1.0、1.5、2.0 wt%に変化させたポリマーブレンド溶液を調製した。これらのポリマーブレンド溶液を、同軸フロー型マイクロ流路デバイスの内層流側に送液し、外層流側に Na-Alg の架橋剤である塩化カルシウム水溶液を送液することで、束状構造ゲルファイバーを作製した。ポリマーブレンド溶液の相分離状態、得られたゲルファイバーの顕微鏡による構造観察、引張試験による力学的強度測定を行なった。さらに、ゲルファイバー上にマウス・ラット由来の神経細胞である PC-12、DRG 細胞およびヒト iPSC を播種し、神経細胞の接着およびネットワークの形成を検討した。

【結果と考察】HPC と Na-Alg のブレンド比を変化させると、Na-Alg の含有量が増大するにつれて、ブレンド溶液中のポリマーリッチ相の減少および束状構造ゲルを構成する微小線維直径の減少が観察された。これは水合力の高い Na-Alg 量が増大したことで、ポリマーリッチ相の水分子が溶媒リッチ相へ移動し、結果としてポリマーリッチ相内の凝集力が高まったためと考えられる。さらに、Semi-wet 状態の束状構造ゲルの破断強度を測定したところ、Na-Alg 含有量の増大に伴って破断強度が大きくなった。得られた束状構造ゲルに神経細胞を播種したところ、Na-Alg の含有量が多いゲルファイバーにおいて、神経細胞の伸展とネットワーク形成が見られた。以上のことから、束状構造ゲルの微細構造と固さを適正に制御することによって、神経細胞の接着とネットワーク形成を誘導できることが明らかとなった。

1E-21-II

細胞外マトリックスを高密度に有する三次元がん-間質組織体の構築

¹大阪大学大学院工学研究科, ²JST さきがけ

○松崎典弥^{1,2} (Matsusaki Michiya), 米田美咲¹, 加藤菜津子¹

【緒言】

がん細胞は、周囲の間質（線維）組織に含まれる線維芽細胞や免疫細胞、血管網と密接に相互作用し、腫瘍を形成している。そこで、生体の腫瘍に類似した三次元微小環境を有する *in vitro* ヒトがんモデルを構築できれば、がん細胞と周囲の線維芽細胞や免疫細胞、血管網との相互作用の理解や抗がん剤の開発などに有用である。生体の間質組織（結合組織）は、20-30 wt%という高濃度の膠原繊維（コラーゲン線維）を有するが、コラーゲンは中性水溶液への溶解性に乏しく、高濃度化は困難であった。そこで、我々は、I型コラーゲンのマイクロファイバー（CMF）を作製し、マイクロファイバーと細胞を懸濁・沈殿させて組織化する新規手法「沈殿培養法」を考案した。本手法により、高密度なコラーゲン線維を有する三次元がん-間質組織体の構築が期待される。

【実験】

ブタ皮膚由来 I 型コラーゲン（日本ハム（株）より提供）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中でホモジナイザーを用いて細断し、無血清培地で洗浄後、CMFを得た。得られた CMF を大腸がん細胞（HT29）と正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）と混合し、沈殿培養によりがん-間質組織体を構築した。

【結果と考察】

得られた組織体の組織標本をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色や抗サイトケラチン抗体染色により評価した。その結果、緻密なコラーゲン線維の内部に HT29 がコロニーを形成して存在し、周囲に NHDF が存在する様子が観察された。組織体のコラーゲンの濃度を計算すると約 30 wt%であり、生体の間質組織に類似した高濃度化を実現できた。組織体内部の細胞生存率を評価するため、1 週間培養後に DNA 量を定量評価した。その結果、CMF を用いない通常のスフェロイドでは生存率が 40%以下まで低下したが、組織体では条件を最適化することで、ほぼ 100%の生存率を維持できることを見出した。本三次元がん-間質組織体は、生体の三次元環境を反映した *in vitro* ヒトがんモデルとして応用が期待される。