

一般演題（口頭発表）

11月21日（火）

B会場（5F 小ホール）

DDS, イメージング (4)	2B-01—2B-05
DDS, イメージング (5)	2B-06—2B-12

C会場（2F 桃源）

高分子材料 (1)	2C-01—2C-05
高分子材料 (2)	2C-06—2C-10
高分子材料 (3)	2C-11—2C-15
高分子材料 (4)	2C-16—2C-22

D会場（2F 福寿）

検査・診断法, バイオセンサー	2D-01—2D-05
血液とマテリアル	2D-06—2D-09
再生医療・組織工学 (4)	2D-10—2D-14
金属・無機材料 (5)	2D-15—2D-21

E会場（2F 平安）

マテリアルと細胞 (4)	2E-01—2E-05
マテリアルと細胞 (5)	2E-06—2E-10
マテリアルと細胞 (6)	2E-11—2E-15
マテリアルと細胞 (7)	2E-16—2E-19

2B-01-II

タンパク質精密徐放微粒子の応用性・新用途の探索

¹富山大学大学院理工学教育部, ²富山大学大学院理工学教育部, ³富山大学大学院生命融合科学教育部

○森 駿介¹ (Mori Shunsuke), 藤本くる美¹, 中路 正^{1,2,3}

【緒言】

現在、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、神経幹/前駆細胞 (NSPC) 等の分化誘導法で最も頻繁に使われる方法の一つとして無血清胚様体法 (Serum free embryo body, SFEB) が知られている。しかし、胚様体は細胞の凝集体であるため、中心部の細胞への栄養源・分化因子・酸素の送達が不十分となり、死滅 (低細胞生存率) や、ヘテロジニアスな細胞集団 (低分化効率) となることが課題として挙げられる。

そこで、本研究では、当研究室が開発したタンパク質精密徐放微粒子 (*J. Controlled Release*, 168, 307-16 (2013)) を細胞凝集体内部に内包させ構築した微粒子複合化胚様体による高効率分化誘導について検討した。この手法は、凝集体内部の細胞への栄養源や分化因子の供給を可能にすることが期待され、SFEB 法における課題を克服できると考えられる。

【実験】

Hyaluronic acid (HAc) と HAc 結合ペプチド融合グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF-HBP) の混合溶液 (水層, 内層) と、乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) を溶解させたクロロホルム溶液 (油層, 外層) を等量混合し、超音波処理を行うことで微粒子を作製した。この微粒子を NSPC (1.0×10^4 cells) 懸濁液中に分散させ、V bottom 96-well plate へ播種し、増殖培養により微粒子複合化胚様体を形成させた。そして、この微粒子複合化胚様体のドーパミン神経への誘導について評価した。

【結果と考察】

これまでに、内層 HAc の分解酵素が存在しない限り、内層に担持された GDNF-HBP は放出されないことが分かっている。また、NSPC が未成熟・成熟神経に分化するとヒアルロニダーゼを発現することが知られている。これらを踏まえ、NSPC が未成熟神経へ分化すると GDNF が微粒子から放出されドーパミン神経へ選択的に誘導されると予想し本研究を進めた。SFEB 法に比べ、効率良く誘導できることが明らかとなったが、現在のところ、高効率誘導が可能な微粒子数と細胞数の最適条件が見いだせておらず、引き続き検討を進めている。

2B-02-II

腫瘍イメージングと治療を可能にする中空ハイブリッドナノ粒子の one-pot 合成

名古屋大学大学院工学研究科未来材料・システム研究所

○丸橋卓磨 (Maruhashi Takuma), 林幸壱朗, 坂本 渉, 余語利信

【緒言】

現在の主ながん治療は外科手術、化学療法、放射線療法であるが、これらの治療法には機能損失や副作用といった問題がある。また、化学療法は薬剤耐性を獲得したがん細胞に対しては期待したほどの効果が得られない。これらの問題は、多機能ナノ粒子を用いて物理療法と化学療法 (ドラッグデリバリーシステム: DDS) を同時に達成することで解決できる可能性がある。そこで本研究では、光を用いた二種類の物理療法 (光温熱療法と光線力学療法) と、光と細胞内の還元環境を利用した DDS を組み合わせた三種併用療法 (トリモーダルセラピー) を可能にする多機能ナノ粒子の合成に取り組んだ。

【実験】

原料液滴と溶媒との液-液界面において次の二つの反応を同時に起こすことにより、中空構造であり、ジスルフィドとシロキサンから成るハイブリッドナノ粒子を one-pot で作製した: ①シリコンアルコキシドの加水分解・縮合、②チオールとチオシアネートとの求核置換反応。蛍光イメージングにより、抗がん剤と光増感剤を含有したハイブリッド中空ナノ粒子の体内動態を調査した。ナノ粒子投与後、腫瘍部に光を照射し、腫瘍体積の変化を調査することにより、治療効果を評価した。

【結果と考察】

原料濃度および反応温度を最適化することにより、抗がん剤および光増感剤を含有するハイブリッド中空ナノ粒子が one-pot で得られた。このナノ粒子は近赤外光に反応して発熱するとともに一重項酸素を発生した。さらに、細胞内の還元環境により、ナノ粒子骨格中のジスルフィドが開裂し、抗がん剤を放出した。光照射はこの開裂を促進し、光照射による薬剤放出制御が可能であった。担癌マウスにハイブリッド中空ナノ粒子を静脈内投与すると、ナノ粒子は腫瘍に集積し、蛍光イメージングで腫瘍を検出することができた。さらに、ハイブリッド中空ナノ粒子が腫瘍に集積するタイミングで腫瘍部に光照射を行うと、腫瘍細胞の増殖が著しく抑制された。治療による深刻な副作用は確認されなかった。

2B-03-II

細胞核 DDS のためのナノトランスポーターの設計

甲南大学フロンティアサイエンス学部

○長濱宏治 (Nagahama Koji), 佐野由倫, 中西健太

【緒言】細胞核内は遺伝情報の保持・複製や発現など細胞の運命を決定する重要な反応場であるため、それらの反応に関わる物質を核内に輸送し機能させれば、人為的な細胞運命制御が実現する。近年、私たちは、細胞内に存在する核輸送タンパク質であるインポーチンの核膜孔通過メカニズムに倣い、自発的に細胞質から核内に移行する高分子ナノ組織体（細胞核ナノトランスポーター）を作製した。本発表では、ナノ組織体の合成、物性、核膜孔通過特性、タンパク質担持特性、タンパク質の核内輸送特性、輸送したタンパク質の核内での機能発現について報告する。

【実験】へパリンと疎水性アミノ酸誘導体のカップリング反応により、両親媒性分子を合成した。両親媒性分子の粉末を水で溶解することで自己会合させ、ナノ組織体を作製した。DLS 測定により、サイズおよび分布を解析した。ピレンを蛍光プローブとして用い、ナノ組織体の CAC を算出した。ナノ組織体の核膜孔通過能を調べるため、組織体をエレクトロポレーション法により HeLa 細胞の細胞質内に導入し、共焦点顕微鏡観察により細胞内動態を解析した。ナノ組織体にモデルタンパク質であるβ-ガラクトシダーゼ (β-Gal) を担持し、エレクトロポレーション法により細胞質に導入した後、核内輸送特性および核内での酵素活性について調べた。

【結果と考察】HeLa 細胞の細胞質に導入した緑色蛍光ラベル化ナノ組織体は、導入 1 時間後には核膜孔を通過し、核内に自発的に移行した。また、ナノ組織体は一定時間核内に蓄積することも分かった。ナノ組織体を核内に移行・蓄積させた HeLa 細胞の増殖曲線は、無処理の細胞と同様であったことから、ナノ組織体の核内移行・蓄積は細胞に無毒であると示唆される。ナノ組織体と複合化したβ-Gal の酵素活性 (K_m および V_{max}) はフリーのβ-Gal と同等であったことより、高次構造を維持した状態での複合化が示唆された。細胞質に導入したβ-Gal 担持ナノ組織体は、2 時間後から核内移行・蓄積を示した。また、核内輸送したβ-Gal は、核内で 12 時間以上酵素活性を維持した。本研究では、核内 DDS を開発するための基盤材料となるナノキャリアの創製に成功した。本ナノ組織体のさらなる機能解析や分子修飾などにより、核内 DDS への応用が期待できる。

2B-04-II

コレステロール末端修飾 PEG によるインスリンの非共有結合 PEGylation

¹ 首都大学東京大学院都市環境科学研究科, ² 東京薬科大学薬学部

○朝山章一郎¹ (Asayama Shoichiro), 長嶋果南¹, 根岸洋一², 川上浩良¹

【緒言】我々は、モノカチオン性 PEG と pDNA との複合体であるモノイオンコンプレックス (MIC) を創製すると共に、MIC をタンパク質デリバリーに展開し、カタラーゼの非共有結合 PEGylation に成功してきた [1]。一方、インスリンにおいては、MIC 形成のコントロールとして合成したプロピル基 (Pr) とウレタン結合 (U) をスペーサーに有する非イオン性のコレステロール末端修飾 methoxy PEG (Chol-U-Pr-mPEG) [2] がコンプレックス形成をすることを見出した。本研究では、Chol-U-Pr-mPEG とインスリンとの複合体形成能を詳細に検証した。

【実験】Aminopropyl 基を有する methoxy PEG とクロロ酸コレステロールを反応させ、Chol-U-Pr-mPEG を得た。得られた Chol-U-Pr-mPEG とインスリンを単純混合し、複合体の形成能を、Native-PAGE、GFC、超遠心分析、動的光散乱測定などにより評価した。得られた複合体中のインスリンのコンフォメーションを、CD スペクトル測定により、タンパク質加水分解酵素であるトリプシンによる分解耐性を、固相結合抗インスリン抗体 ELISA 実験により評価した。さらに、得られた複合体をマウスの皮下へ注射し、経時的に血糖値を測定した。

【結果と考察】Native-PAGE におけるインスリンのバンドは、Chol-U-Pr-mPEG 存在下、陽極方向に対する遅れが見られた。また、GFC においては、高分子量側へ溶出時間が早まった。超遠心分析や動的光散乱測定からも、インスリン単独とは異なる結果が得られた。従って、Chol-U-Pr-mPEG とインスリンとの複合体形成が明らかとなった。得られた複合体中のインスリンの CD スペクトルは、ほぼ変化しなかった。Chol-U-Pr-mPEG との複合化は、インスリンのコンフォメーションに影響を及ぼさないと考えられる。ELISA 実験から、複合化により、トリプシンによる加水分解処理後も残存インスリンが認識された。Chol-U-Pr-mPEG /インスリン複合体の形成による酵素加水分解耐性の獲得が示唆された。さらに、その複合体をマウスに皮下注射すると、インスリン単独投与と比べて、4 時間後も血糖値が持続的に低下していた。以上より、Chol-U-Pr-mPEG は、インスリンの PEGylation に有用なマテリアルになると考えられる。

【参考文献】 [1] S. Asayama et al., *ACS Omega*, 2, 2382-2386 (2017). [2] 朝山章一郎他, 特願 2017-013942

2B-05-II

血液脳関門突破を指向した高分子ミセル表面のリガンド分子の標的認識能評価

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

○中村乃理子^{1,2} (Nakamura Noriko), 安楽泰孝^{1,2}, 福島重人², 藤加珠子², カブラル・オラシオ^{1,2}, 片岡一則^{2,3}

【緒言】高分子ミセルの構造設計においてポリエチレングリコール(PEG)の鎖長に着目すると、長鎖長ほど血中蛋白質との非特異相互作用を抑制し構造を安定化する効果は高くなるが、PEG 末端に修飾したリガンド分子の標的認識能は短鎖長ほど高い。中枢神経系疾患の治療において障壁となっているのが血液脳関門(Blood-brain barrier: BBB)である。本研究グループはリガンド密度、血糖操作の最適化によりグルコーストランスポーター1(GLUT1)と相互作用し脳実質へと移行するグルコース修飾高分子ミセル(Gluc/m)を開発した。中枢神経系疾患の治療において有用性が注目されている核酸医薬を安定に送達するには長鎖長 PEG の利用が不可欠であるが、一方で長鎖長 PEG を用いるとグルコース分子と GLUT1 の相互作用が著しく低下し Gluc/m が脳へ集積しないという課題を有している。この解決策として、本研究ではリガンド分子を修飾した長鎖長 PEG に短鎖長 PEG を混合する”cocktail PEGylation”の手法をこの Gluc/m の調製に適用し、ミセル表面のグルコース分子と GLUT1 の相互作用を評価した。

【実験】既往の報告に従い Gluc/m の調製に用いるブロック共重合体を合成、”cocktail PEGylation”による Gluc/m を調製した。動的光散乱法(DLS)により粒径を測定、透過型電子顕微鏡(TEM)により形態を観察した。グルコースリガンド率を糖の定量法であるフェノール硫酸法により定量した。Gluc/m 表面のグルコースと細胞表面に発現する GLUT1 の相互作用を MDA-MB-231 細胞への蛍光修飾 Gluc/m の取り込みをプレートリーダーで定量することで評価した。さらに、既往の研究と同様に血糖操作を施したマウスに Gluc/m を投与し脳への集積量を定量、BBB 通過能を評価した。

【結果と考察】グルコースリガンド率、短鎖長 PEG の混合比によらず粒径 40 nm 程度の単分散な球形の粒子が得られた。短鎖長 PEG を 50-60%混合した Gluc/m の MDA-MB-231 への取り込みは長鎖長 PEG のみで調製した Gluc/m よりも有意に向上し、短鎖長 PEG の混合により長鎖長 PEG に修飾したグルコースの標的認識能が向上することが確認された。50, 60, 70 %短鎖長 PEG を混合した 25%Gluc/m のマウスの脳への集積量も有意に増加し、60%短鎖長 PEG を混合した Gluc/m で最大値である 4.0 %dose/g を示し”cocktail PEGylation”の最適化が Gluc/m の BBB 通過能向上に有効であることを確認した。

2B-06-II

活性保持型 PEG 化技術およびポリ擬口タキサン技術の融合によるインスリンの制御放出

¹熊本大学大学院生命科学部, ²熊本大学リーディング大学院 HIGO プログラム

○東 大志¹ (Higashi Taishi), 弘津辰徳^{1,2}, 本山敬一¹, 有馬英俊^{1,2}

【緒言】

最近我々は、 β -シクロデキストリン (β -CyD) とアダマンタン (Ad) のホスト-ゲスト相互作用を介して、インスリンにポリエチレングリコール (PEG) を修飾すると、活性が低下することなく血中滞留性や血糖降下作用が持続することを明らかにし、活性保持型自己会合 PEG 化技術 (Self-assembly PEGylation Retaining Activity (SPRA) 技術) と命名した。さらに我々は、共有結合型の PEG 化インスリンに、 α -CyD あるいは γ -CyD を添加すると、難水溶性の分子ネックレスが形成され、PEG 化インスリンを徐放化できることを明らかにした (polypseudorotaxane (PPRX) 技術)。そこで本研究では、SPRA 技術により PEG 化したインスリン (SPRA-インスリン) を、PPRX 技術により分子ネックレス化し、更なる持続放出特性を示すインスリンの構築を行った (SPRA-PPRX 技術)。

【実験】

β -CyD 1 分子に、平均分子量 20 kD の PEG が約 2.8 個修飾された PEG- β -CyD を調製した。さらに、Ad 修飾インスリンを調製し、PEG- β -CyD と水中で混合することにより、SPRA-インスリンを調製した。SPRA-インスリン水溶液に、 α -CyD あるいは γ -CyD 水溶液を添加し、4°C で静置することにより、SPRA-インスリン/CyD PPRX を調製した。PPRX の調製の確認は、FT-IR スペクトル、粉末 X 線回折および ¹H-NMR スペクトルにより行った。また、PPRX からの SPRA-インスリンの *in vitro* 放出挙動や、SPRA-インスリン/CyD PPRX をラットに皮下投与後の血糖降下作用を評価した。

【結果と考察】

SPRA-インスリンに、 α -CyD あるいは γ -CyD を添加すると、PPRX 由来の沈殿が得られた。PPRX からの SPRA-インスリンの放出は *in vitro* において持続し、その放出速度は、溶出溶媒中の CyD 濃度を調節することにより制御可能であった。さらに、PPRX をラットに皮下投与すると、持続して高い血糖降下作用を示した。以上のことから、SPRA-PPRX 技術は、インスリンの新規制御放出システムとして有用である可能性が示唆された。

2B-07-II

ROS を感知してルチンを放出する高分子ミセル型 ROS スカベンジャーの開発

¹東京大学大学院工学系研究科, ²ナノ医療イノベーションセンター, ³東京大学政策ビジョン研究センター
○中村直人^{1,2} (Nakamura Naoto), 吉永直人^{1,2}, 安楽泰孝^{1,2}, カブラル・オラシオ^{1,2}, 片岡一則^{2,3}

【緒言】

ルチンはその高い抗酸化作用から生理活性物質として大きな注目を集めているが、その水溶性の低さから医療応用に際しては多くの課題が残っている。またルチンはその抗酸化作用により正常組織において電子伝達系などの必要な活性酸素種(ROS)をも除去してしまうことから、疾患選択的な送達技術の開発が望まれている。本研究ではこれらの要求を満たすため、ブロック共重合体の自己組織化に基づく ROS 応答型ルチン内包高分子ミセル(Rutin/m)の開発を検討した。

【実験】

Rutin/m のビルディングブロックとして、ポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸からなるブロック共重合体の側鎖に、ルチンの持つジオール構造とエステル結合を形成し ROS により分子内で切断されるフェニルボロン酸(PBA)を導入した。これを水中でルチンと混合することにより、ブロック共重合体側鎖へのルチンの担持およびそれにより亢進した疎水性を駆動力とする高分子ミセルの形成を狙う。Rutin/m の形成は動的光散乱(DLS)および透過型電子顕微鏡(TEM)により確認した。Rutin/m の ROS に対する応答性の評価として、ROS 存在下での粒径・多分散指数(PdI)変化により形態の変化を、吸光スペクトルの変化によりルチンの放出を確認した。

【結果と考察】

まず PBA 導入率を制御したブロック共重合体を合成した。これをルチンと混合した結果、DLS および TEM より約 60% の PBA 導入率を持つブロック共重合体を用いたときのみ粒径 30 nm 程度の単分散な球形高分子ミセルの形成が確認された。次に、ROS のうち水中で最も安定な H₂O₂ を用いて ROS 応答性の評価を行った。結果、1 mM H₂O₂ 存在下で形態変化・吸光スペクトル変化が確認され、Rutin/m の崩壊とルチンの放出が確認された。一方、0.1 mM H₂O₂ 存在下ではこれらの応答が見られなかった。このことから、送達過程においては Rutin/m が内包ルチンを担持したまま安定に存在し、ROS 濃度の高い標的組織において Rutin/m の崩壊に伴うルチンの放出が期待される。

2B-08-II

PEG に対する抗体産生と抑制に関する研究

¹東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター医用エンジニアリング研究部, ²北九州市立大
○白石貢一¹ (Shiraishi Koichi), 望月慎一², 櫻井和朗², 横山昌幸¹

【緒言】PEG 化製剤の投与によって PEG に対する抗体 (anti-PEG antibodies) 産生が誘導される。さらに、PEG 化たんぱく製剤投与による anti-PEG antibodies 産生は治療に影響を及ぼすことが報告されている。一方、DDS に用いられるナノ粒子製剤の場合において、特に PEG-リポソームにおいて anti-PEG antibodies 産生は影響を及ぼすことがよく知られている。PEG 化は簡便、かつ有効な手段であり、現在でも 20 以上の PEG 化たんぱく製剤の臨床試験が実施されている状況において、PEG を用いることの有用性から、PEG に対する anti-PEG antibodies 産生をいかに抑制するかは重要な検討事項と考えられる。本研究は、これまで我々が行ってきた PEG を有するブロックコポリマーに対する anti-PEG antibodies 産生の知見に基づき、anti-PEG antibodies 産生の抑制を行うことを目的に検討を行った。

【実験】PEG (末端メトキシ基、分子量 12,000) を有し、ポリアスパラギン酸、ポリフェニルアラニンからなるジブロック、及びトリブロックコポリマーを合成した。また、同じ構造のランダムコポリマーも合成した。合成したポリマーを水溶液中で高分子ミセル化させ、その希釈溶液を動物実験に用いた。動物実験は、マウス (C57BL/6, male, 6w) に尾静脈より各ポリマーサンプルを様々な投与量を用いて投与し、1 週間後の血清成分中に含まれる anti-PEG IgM 抗体を ELISA にて同定した。

【結果と考察】これまで、PEG を有するブロックコポリマーの中で最も効率的に anti-PEG IgM 抗体を産生した PEG-PBLA (PBLA 分子量=6000、重合数 30) の anti-PEG IgM 抗体量を基準として、各ポリマーに対する anti-PEG IgM 抗体産生量を比較すると、PEG を有するトリブロックコポリマーにおいて抗体産生量が低下した。anti-PEG IgM 抗体産生量が低下した理由についてディスカッションする。

2B-09- II

多孔質超薄膜の創製と新規浮遊細胞用ライブイメージングツールへの応用

¹東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻, ²東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター

○青木拓斗¹ (Aoki Takuto), 張 宏², 岡村陽介^{1,2}

【緒言】高分子を超薄膜(膜厚<100 nm)に加工すると、ナノ厚特有の高接着性が発現し、物理吸着のみで種々の界面に貼付できる性質をもつ。他方、浮遊細胞のイメージングは、ガラス基板に乗せて緩衝液を滴下した状態で観察するのが常套手段である。しかし、液中では浮遊細胞はブラウン運動し焦点が定まらない他、液性刺激因子等を添加すると拡散し未活性状態からの刺激反応の追跡は難しい。本研究では、熱ナノインプリント法による多孔質超薄膜の調製法を確立するとともに、浮遊細胞をラッピングしてぶれずに刺激反応を可視化できるライブイメージングツールへの応用を図る。

【結果と考察】SiO₂基板上にポリビニルアルコール水溶液(10 mg/mL、犠牲層)、ポリ乳酸トルエン溶液(20 mg/mL)の順にスピコート(4000 rpm, 60 s)した。基板にピラーモールド(高さ: 0.89 μm)をインプリント(70°C、30 MPa)した後、純水中に浸漬し犠牲層を溶解させ、多孔質超薄膜が回収した(膜厚: 55.0 ± 0.2 nm)。Anodisk™に掬い取り走査電顕にて観察したところ、ピラーパターンと同周期にAnodisk™の表面が観察されたことから、貫通孔(平均直径: 0.65 μm)が付与されたと判断した。得られた多孔質超薄膜を用いて浮遊細胞(血小板)のラッピングを行った。多血小板血漿(PRP, 35 × 10⁴ platelets/μL, 50 μL)をBSAブロッキングしたガラス基板に滴下後、ワイヤループを用いてBSAブロッキングした多孔質超薄膜をガラス基板ごとラッピングした。基板をフローチャンバーにセットしHepes緩衝液を流動させた(0.5 mL/min)ところ、ラッピングしない群では流動方向に沿って移動(8.5 ± 2.7 μm/s)するのに対し、ラッピング群では流動せずに留まる傾向が観察された(1.1 ± 2.0 μm/s, 約87%抑制)。これはラッピングにすることにより流動の影響を受けにくくなるためであると考えられる。また、ラッピング固定された血小板は未活性状態であった。そこで、液性刺激因子(TRAP)を流動させたところ、90秒以内に活性化、凝集する一連の現象を可視化できた。従って、多孔質超薄膜による浮遊細胞ラッピングに成功し、未活性状態から刺激反応を追跡できる新規ライブイメージングツールとして応用できる可能性を実証した。

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

2B-10- II

温度応答性蛍光分子を内包した生体不活性ポリマーミセルによる細胞内温度の評価

東京大学大学院工学系研究科

○浅輪健大 (Asawa Kenta), 久代京一郎, 高井まどか

【緒言】

細胞内の温度変化は疾患による細胞の異常を示す有用な指標である。本研究では、温度応答性、不感応性の蛍光分子であるMethacryloxyethyl thiocarbonyl rhodamine B (Rho B)と、7-diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methyl coumarin (Cou)を*n*-butylmethacrylate(BMA)セグメントに結合させ、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)セグメントとブロック化したポリマーを合成し、ナノ粒子化することで生体不活性な温度計測用プローブを作製した。蛍光強度比により細胞内の温度応答を評価した。

【実験】

RAFT重合によりPoly(MPC)とPoly(BMA-*r*-Rho B)のブロックコポリマーを合成し、疎水部末端にCouを結合した。合成したポリマーを粒子化し、粒径および形態を透過型電子顕微鏡(TEM)と動的光散乱測定装置(DLS)で評価した。また、蛍光輝度の温度変化に対する応答を蛍光光度計で測定した。ヒト乳腺上皮細胞MCF-10Aに作製されたプローブを導入し、共焦点顕微鏡(CLSM)で観察した。また、蛍光光度計を用いて細胞内の粒子の外部温度への応答を評価した。

【結果と考察】

¹H-NMRの解析より、合成されたポリマーの平均組成比はMPC:BMA=24:21であった。TEMとDLSにより、作製された粒子は直径約25 nmで均一な球体であることが分かった。蛍光光度計では、Rho Bの蛍光はCouの蛍光に比べて温度の変化に大きく応答し、Rho Bの蛍光輝度の温度応答を用いた温度計測の可能性が示唆された。PMPCで被覆されたナノ粒子は細胞へ容易に取り込まれた。CLSМによる観察では、細胞内にRho B及びCouに由来する蛍光が確認された。また、蛍光光度計による細胞内蛍光の外部温度応答を計測した。Rho BとCouの蛍光輝度の強度比は、温度の上昇に対しほぼ一定の割合で減少しており、外部温度30~40°Cの範囲で直線近似ができた。これより細胞内の温度が外部温度に相関して変化することが分かった。粒子に結合した二蛍光の強度比を用いることによる細胞内温度計測の応用可能性が示された。

2B-11-II

生体組織イメージングへの応用を目指した撥水性超薄膜の表面改質

¹東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻, ²東海大マイクロ・ナノ研究開発センター, ³北海道大学電子化学研究所
○鎗野目健二¹ (Yarinome Kenji), 張 宏², 青木拓斗¹, 川上良介³, 根本知己³, 岡村陽介^{1,2}

【緒言】厚みをナノ寸法(100 nm 以下)に制御した高分子超薄膜は、ナノ厚特有の高接着性が発現し、接着剤なしで様々な界面に貼付できる¹⁾。最近、フッ素含有高分子(CYTOP)からなる撥水性超薄膜の開発に成功し、摘出組織をラッピングすることで乾燥を防ぐことを実証した²⁾。この超薄膜は生体組織と近い屈折率(1.34)であることから、問題となる組織とカバーガラスの屈折率の相違(ガラス: ca. 1.53)による非点収差を解決し、組織の深部まで観察できる可能性を秘めている。しかし、超薄膜の撥水性ゆえに濡れた組織への接着性は低いことを予備検討で確認している。本研究では、撥水性超薄膜が組織と接着するよう、その表面改質技術を確立し、カバーガラスいらずの生体深部イメージングツールへの応用を目指す。

【実験】SiO₂基板上にポリビニルアルコール水溶液(PVA, 10 mg/mL)を滴下後スピコートし、犠牲膜とした。次いで、CYTOP 溶液(30 mg/mL, 旭硝子社製)を滴下、スピコートした。その上にポリジメチルシロキサンへのキサン溶液(1 wt%)を滴下、スピコートし、加熱(80°C, 2 h)した。酸素プラズマ処理を行い、PEO 鎖を有するシランカップリング剤トルエン溶液(SiCl₃-mPEO, 2 mM, Gelest 社製)に浸漬(1 h)させた。表面を洗浄後、基板ごと純水に浸漬して PEO-CYTOP 超薄膜を調製した。超薄膜表面の接触角測定(DMe-211, KYOWA 社製)から表面改質を判定した。また、マウス脳表面に対する PEO-CYTOP 超薄膜の貼付を試みた。

【結果と考察】基板ごと純水に浸漬させたところ、PVA 犠牲層が溶解し、基板の形状を維持した超薄膜が水面に浮いた状態で回収できた(膜厚: ca. 130 nm)。得られた PEO-CYTOP 超薄膜の水接触角は 44±1°と計測され、未処理の超薄膜(115 ± 1°)と比較して明らかに親水性に改質されていた。そこで、マウスの脳表面に PEO 側が密着するように超薄膜を貼付したところ、脳表面に接着することが確認できた。また貼付から 1 日経過しても、出血や乾燥が確認されず、貼付による出血と乾燥の防止を確認した。

1) Okamura Y. et al. Adv. Mater. 21, 4388-4392 (2009). 2) Zhang H. et al. Adv. Mater. in press (2017).

2B-12-II

腫瘍新生血管標的ペプチドを結合した温度応答性リポソームのがん治療 DDS としての機能

¹大阪府立大学大学院工学研究科, ²大阪大学大学院理学研究科

○林 孝彰¹ (Hayashi Takaaki), 弓場英司¹, 原田敦史¹, 青島貞人², 河野健司¹

【緒言】温度応答性リポソームは、体外からの局所加温によって標的部位選択的に薬物放出を誘導できるため、DDS キャリアとして有用である。我々はこれまで、温度応答性部位とアンカー部位からなるブロック共重合体(EOEOVE₆₇-ODVE₉)を PEG 修飾リポソームに複合化することで、加温により抗がん剤(ドキシソルビシン, DOX)を放出する温度応答性高分子修飾リポソームを開発した[Biomaterials, 31, 7096-7105 (2010)]。さらに、リポソームへの抗体修飾により標的特異性を付与し、そのがん治療効果の向上にも成功している[J. Control. Release, 216, 69-77 (2015)]。本研究では、新生血管内皮細胞に高発現するα₃β₁インテグリンに特異性を持つ環状ペプチド cRGD を温度応答性高分子修飾リポソームに導入することで、腫瘍組織血管への特異性と温度応答性を併せ持つ多機能型リポソーム(cRGD-Polym-lip)を設計し、そのがん治療 DDS としての機能を、脂質膜相転移に基づく従来の温度感受性リポソーム(cRGD-TTSL)と比較した。

【実験】卵黄ホスファチジルコリン、コレステロール、EOEOVE₆₇-ODVE₉、末端反応性 PEG 脂質を用いてリポソームを作製した後、システイン残基に由来するチオール基と PEG 脂質先端のマレイミド基との反応によってリポソームに cRGD を修飾した。インテグリンを高発現するマウス血管内皮由来 F-2 細胞およびインテグリン低発現の大腸がん由来 Colon26 細胞と、リポソームとの相互作用をフローサイトメトリー、共焦点レーザー顕微鏡、細胞毒性試験を用いて評価した。リポソームを Colon26 担がんマウスに尾静脈投与し、8 時間後に腫瘍部位を 44°C で 10 分間局所加温し、その後の腫瘍成長をモニターした。投与 8 時間後の腫瘍組織を回収し、蛍光ラベル化リポソームの腫瘍内分布を免疫染色により観察した。

【結果と考察】cRGD-Polym-lip, cRGD-TTSL は 37°C では DOX を安定に保持した。加温下では、前者は温度上昇とともに徐々に放出が誘起されたのに対し、後者は 42°C 以上で急激に放出を促進した。cRGD の結合によりいずれのリポソームも F-2 細胞への取り込みが上昇し、加温との併用によって in vitro において高い細胞殺傷効果が確認された。リポソームを担がんマウスに投与後、腫瘍部位を局所加温すると、腫瘍成長が強く抑制された。特に、cRGD を結合したリポソームが高い治療効果を示したことから、腫瘍新生血管へのターゲティングが、がん治療 DDS の設計において有効であることが分かった。

2C-01- I

機能性部位を導入した側鎖型液晶高分子の相転移挙動を利用したバイオマテリアルの創製

¹ 関西大化学生命工, ² 関西大 ORDIST

○ 間嶋健矢¹ (Majima Kenya), 井上泰彰¹, 河村暁文^{1,2}, 宮田隆志^{1,2}

【緒言】液晶高分子 (LCP) は、固体の規則構造と液体の流動特性とを兼ね備えた物質である。特に、液晶発現分子であるメソゲン基を側鎖に有する側鎖型液晶高分子は、ポリシロキサンなどの柔軟な主鎖に依存してメソゲン基が配向するため、比較的低温に液晶一等方相転移温度 (T_{NI}) をもっている。本研究では、LCP の動的規則構造を利用した新規なバイオマテリアルの創製を目的として、ポリメチルシロキサン (PMS) を主鎖とする LCP の側鎖に様々な機能部位を導入し、薬物放出や標的分子認識などへの応用を試みた。特に、LCP に親水性のポリエチレングリコールメタクリレート (PEGMA) を導入した LCP-*g*-PEG の自己集合体を調製し、得られた自己集合体内部に薬物を内包させ、液晶の相転移による薬物放出挙動を検討した。また、分子認識部位としてビオチンを導入した LCP-*g*-Biotin の薄膜も調製し、ビオチンと特異的に結合するタンパク質であるアビジンの吸着挙動と LCP-*g*-Biotin 薄膜の液晶構造との関係を検討した。

【実験】ヒドロシリル化反応によりメソゲン基と PEGMA とを PMS に導入することにより LCP-*g*-PEG を合成した。モデル薬物としてフルオレセイン (Flu) を選択し、Flu を内包した LCP-*g*-PEG 自己集合体を調製し、その薬物放出挙動の温度依存性を調べた。また、LCP-*g*-PEG の PEGMA の末端水酸基にビオチンを縮合させた LCP-*g*-Biotin を合成し、スピンコート法によって LCP-*g*-Biotin 薄膜を調製した。この LCP-*g*-Biotin 薄膜にアビジンを添加し、相転移前後における吸着挙動の変化について検討した。

【結果と考察】LCP-*g*-PEG 自己集合体の粒径は約 130 nm であった。Flu を内包した LCP-*g*-PEG の薬物放出と温度との関係を検討したところ、 T_{NI} 以上で Flu の放出速度が大きく増加し、集合体内部の液晶構造の変化により Flu の放出を制御できることがわかった。一方、LCP-*g*-Biotin 薄膜の液晶構造とアビジンの吸着との関係を検討したところ、LCP-*g*-Biotin 薄膜は、液晶状態と比較して等方相状態の方がより多くのアビジンと吸着することがわかった。以上の結果から、本研究で調製した LCP-*g*-PEG 自己集合体や LCP-*g*-Biotin 薄膜は、液晶の動的規則構造を利用した新規なバイオマテリアルとして期待される。

2C-02- I

光により集合する光応答性高分子微粒子の調製と医用材料修復への応用

¹ 関西大化学生命工, ² 関西大 ORDIST, ³ 国立循環器病研究センター

○ 澁 高行¹ (Namera Takayuki), 劉 懿華³, 河村暁文^{1,2}, 山岡哲二³, 宮田隆志^{1,2}

【緒言】体内埋入型のバイオマテリアルは、その表面を生体適合性材料で被覆することによって血液や組織への適合性が付与されてきた。しかし、このようなバイオマテリアルは長期間の使用により欠損や劣化が生じると、外科手術による交換が必要になり、患者の体に大きな負担がかかる。そのため *in situ* で欠損部を修復できる低侵襲な修復技術の開発が望まれる。一方、高分子微粒子はナノからマイクロサイズで粒径を制御でき、光学材料や診断材料などさまざまな分野で用いられてきた。物質の拡散速度はそのサイズに依存するため、粒径の大きな粒子は拡散速度が小さく、特定部位に留まることができる。そこでわれわれは、外部刺激により粒子集合状態を変化させることにより、時空間的に粒子配置を制御できる応答性材料システムが開発できると考えた。本研究では、粒子表面に光二量化基を導入し、光照射により粒子間結合が生じて集合体を形成する光応答性高分子微粒子を調製した。また、この粒子分散液に光照射することで粒子集合状態の制御を試みた。

【実験】モノマーとしてスチレン (St) とメタクリル酸 (MAA)、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC)、架橋剤としてジビニルベンゼン、開始剤として過硫酸アンモニウムを超純水に加え、窒素雰囲気下、85 °C、6 時間のソープフリー乳化重合により P(St-*co*-MAA-*co*-MPC) 粒子を調製した。次に、粒子表面のカルボキシ基と *N*-(2-アミノエチル)マレイミド塩酸塩とを縮合させ、光二量化基であるマレイミドを導入した粒子を調製した。この粒子分散液に光照射した際の粒子の凝集挙動を検討した。また、粒子膜上への細胞接着および血小板粘着挙動も調べた。

【結果と考察】得られたマレイミド導入粒子は、生理的イオン強度条件下において安定に分散し、その粒径は約 130 nm であった。粒子分散液に光照射したところ、粒子は凝集して沈殿することがわかった。これは、光照射により粒子表面のマレイミド基が二量化し、粒子間結合が形成したためと考えられる。また、粒子膜を調製した後、その上にマウス繊維芽細胞を播種して細胞接着挙動を調べたところ、MPC を導入していない粒子膜と比較して MPC を導入した粒子膜の方が細胞数は少なかった。したがって、本研究で調製した光応答性微粒子は光照射部で集合し、細胞接着も抑制できることから、医用材料欠損部の修復への応用が期待できる。光応答性微粒子表面への血小板粘着挙動を検討した結果も報告する予定である。

2C-03- I

DNA 四重鎖ゲルからの薬物徐放挙動の解析

¹関西大化学生命工, ²関西大医工薬連携研究センター

○阪本康太¹ (Sakamoto Kota), 福島和季¹, 田中静磨¹, 若林建汰¹, 遊上晋佑¹, 葛谷明紀^{1,2}, 大矢裕一^{1,2}

【緒言】近年、高分子鎖同士の架橋点部に DNA の相互作用を利用した DNA ヒドロゲルが数多く報告されている。我々は、DNA ヒドロゲルの調製法として、PEG を担体とする DNA の液相合成法に注目した。グラムスケールで DNA を合成可能なこの手法を応用することで、DNA-PEG 複合体を大量に合成し、これをマクロモノマーとして用いている。これまでに我々は、PEG の末端にデオキシグアノシン (dG) が数塩基伸長されたマクロモノマーを用いて、グアニン四重鎖構造 (GQ) を架橋点とする K⁺や Na⁺応答性ヒドロゲルの開発に成功した。本研究では、このヒドロゲルの DDS への応用を検討する。Crystal Violet (CV) などの芳香族化合物は、GQ を熱的に安定化することが報告されている。そこで、3 種のモデル薬物及び 1 種の薬物をゲルに内包し、薬物と GQ 間の相互作用の強さによるゲストの放出挙動の傾向を調査した。

【実験】2-arm PEG (Mw= 4, 600) 及び 4-arm PEG (Mw= 20, 000) を担体とした DNA 液相合成法により、PEG の各末端にデオキシグアノシン (dG) を 4 塩基伸長し、2 種類のマクロモノマー (L4.6k-dG₄, X20k-dG₄) を合成した。次いで、マクロモノマーを 0.2 M Tris/HCl Buffer (pH 7.0) に溶解した。その溶液に種々のモデル薬物/薬物を混合し、4 M KCl を添加することで 200 μ L スケールのヒドロゲルを調製した。得られたゲルの物性評価を行った。そして、ゲルを PBS (37°C) に浸漬し、所定時間毎に上澄みを回収した。UV 測定や蛍光強度測定により、ゲストの放出挙動を調査した。

【結果と考察】モデル薬物を内包したゲルの内、GQ との親和性が高いゲスト分子 CV を内包したゲルが高い物性を示した。薬物放出試験では、ゲルに GQ を安定化するゲスト分子を内包することで、水中でのゲルの安定性が向上し、より長期間に渡って薬物が放出されることが確認された。次に、テロメラーゼ阻害剤の 1 つである 5, 10, 15, 20-Tetrakis (1-methylpyridinium-4-yl) porphyrin (TMPyP4) を内包したゲルの薬物放出試験を行った。CV 同様に初期バーストが無く、緩やかな薬物放出が観測された。また、マクロモノマーの濃度を高めたり、外液に PEG を添加したりすることで、より長期間に渡る薬物放出が確認された。HeLa 細胞を用いた細胞毒性試験では、マクロモノマー水溶液による毒性はほとんどみられず、薬物とマクロモノマーがスタッキング構造を形成しても、薬効は阻害されないことが分かった。

2C-04- I

タンパク質吸着抑制能と薬剤徐放能を有するコンタクトレンズの開発

¹富山大学大学院理工学教育部, ²富山大学大学院理工学研究部, ³富山大学大学院生命融合科学教育部, ⁴北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系, ⁵高分子-水界面研究所, ⁶大阪有機化学工業株式会社

○小川広晃¹ (Ogawa Hiroaki), 中路 正^{1,2,3}, 松村和明⁴, 北野博巳⁵, 猿渡欣幸⁶

【緒言】

コンタクトレンズ使用者の増加に比例して、アレルギー性結膜炎患者も増加の一途をたどっている。この眼病の原因は、タンパク質吸着とそれに伴う炎症反応である。このことから、タンパク質が付着しないコンタクトレンズ素材の開発が進められている。双性イオン型高分子はタンパク質吸着抑制能を持つことがすでに知られているが、その一つである Carboxymethyl betaine (CMB) をコンタクトレンズ素材に導入することでタンパク質の吸着を防ぐことのできる素材の開発を目指す。また、水への溶解性が低いことで知られる結膜炎治療用薬剤を単分散で均一で含有させ、装着時に徐放させることのできる仕組みも合わせて導入し、結膜炎の進行を抑え、且つ治療できる薬用コンタクトレンズの開発を進める。

【実験】

原子移動ラジカル重合により CMB の重合を行い、高分子末端の修飾を行うことで PCMB マクロモノマーを合成した。次に PCMB マクロモノマーと 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), N-vinyl pyrrolidone (VP) をメタノールに溶解し、Hot-press 法を用いてシートを作製した。様々な CMB 含率のシートに対して、表面の特性解析、およびタンパク質の吸着試験を行った。

【結果と考察】

Hot-press 法により透明度の高いシートが形成された。これらのシートに対する液滴接触角測定の結果、PCMB を導入していないシートに比べ、導入したシートでは濡れ性の向上が認められた。これは PCMB の高い親水性に由来するものと考えられる。次に、シートに対するタンパク質の吸着を評価したところ、PCMB 導入シートは、導入していないシートに比べ、タンパク質吸着量の大幅な減少を示した。これらの結果から PCMB を含むコンタクトレンズ素材はアレルギー性結膜炎の予防に効果的であると期待できる。加えて、薬剤徐放に関しても本発表で報告する予定である。

2C-05- I

リビングラジカル重合法によるポリ酢酸ビニル誘導体の合成と生体親和性評価

¹山形大学大学院理工学研究科, ²九州大学大学院工学府, ³九州大学先端研, ⁴山形大学有機材料推進本部
○関下明日香^{1,2} (Sekishita Asuka), 柏崎亜樹³, 小林慎吾³, 田中 賢^{2,3,4}

【緒言】ポリ (2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA) は、優れた抗血栓性を有する高分子である。しかし、抗血栓性を発現する詳細な機構については明らかになっていない。当研究室では、材料表面の水和構造の中でも中間水と呼ばれる水和層を構築することで、材料表面が高い抗血栓性を発現する可能性を示してきた。我々はこれまでに、PMEA と側鎖の組成は変わらないが、化学構造が異なる高分子としてポリ (3-メトキシプロピオン酸ビニルエステル) (PMePVE) を合成し、水和構造解析および抗血栓性評価を行った。その結果、PMePVE の水和構造はPMEAと比較すると、中間水と自由水の量が増加し、不凍水量が減少していた。さらに PMePVE は PMEA と同程度の優れた抗血栓性を示した。材料表面の抗血栓性の発現における側鎖構造の影響については、これまでに用いたフリーラジカル重合法ではなくリビングラジカル重合法により、PMEA と同程度の分子量かつ狭い分子量分布を持つPMePVEを合成することで側鎖構造を詳細に比較することが必要である。本研究では、リビングラジカル重合法により分子量分布を制御した高分子を合成し、得られた各高分子について水和構造解析、原子間力顕微鏡 (AFM) 観察、および抗血栓性評価を行った。

【実験】Reversible addition fragmentation chain transfer (RAFT) 重合により、分子量分布を制御した PMEA および PMePVE を合成した。得られた高分子を脱イオン水に浸漬させることで含水試料を調製し、示差走査熱量計 (DSC) 測定により水和構造解析を行った。また、高分子溶液を用いて高分子被膜基板を作製し、AFM 画像観察、血小板粘着試験、およびタンパク質吸着実験を行った。

【結果と考察】PMEA の RAFT 重合について条件検討を行い、モノマー、RAFT 剤、および開始剤のそれぞれの比率を変更することで、数平均分子量 (M_n) が 20.1 kgmol^{-1} であり、分子量分布が 1.20 の狭い分布を持つ PMEA を合成することに成功した。さらに DSC 測定を行った結果、フリーラジカル重合で得られた PMEA と同様に中間水が確認された。フリーラジカル重合およびリビングラジカル重合により得られた PMEA と PMePVE の水和構造解析結果・AFM 観察結果とタンパク質吸着実験・抗血栓性評価との相関について、側鎖構造の違いに着目し議論する。

2C-06- II

生体適合性ポリマーにおける中間水ダイナミクスの評価

¹株式会社東レリサーチセンター, ²九州大学先端物質化学研究所

○中田 克¹ (Nakada Masaru), 石田宏之¹, 古島圭智¹, 河出直哉¹, 中野隆行¹, 児玉尚士¹, 村上大樹², 田中 賢²

人工腎臓や人工血管のような医療材料において、抗血栓性などの生体適合性は重要な性能の一つである。ポリマー材料界面に存在する“中間水”は生体適合性が発現するための重要因子であると考えられている。しかし、中間水の存在に基づく生体適合性発現メカニズムは未だ解明されておらず、また、中間水がどのような特性を有した水であるかについては不明な点が多い。本研究では、さまざまな医療材料用途に使用されているポリビニルピロリドン (PVP) を対象とし、PVP に吸着した中間水の状態や量、水和構造、運動性に着目し、DSC や誘電緩和スペクトロスコーピー、NMR、さらに中性子散乱などを用いて、多角的に中間水の特性解析を行った。

DSC と ²H NMR で PVP に吸着した水の状態と量の解析を行ったところ、両手法間で水の状態・量の比較から ²H NMR では DSC で不凍水として観測された水がさらに不凍水・遅い中間水として存在していることがわかった。これは DSC ではおよそ数 nm 以上のスケールでの水の凍結・融解に伴う系の熱収支を観測しているのに対して、²H NMR では水分子の自由回転を観測しており、両手法間の観測(時間)スケールの差異によるものと考えられる。この考察から、遅い中間水は PVP 近傍で速い中間水や自由水とは孤立して存在している可能性が示唆された。

誘電緩和と磁場勾配 NMR からは水分子の運動性が評価できる。前者は水分子の配向分極の緩和時間、後者は並進拡散係数をすることができる。両手法から得られた水分子の運動性の含水率依存性はよく一致しており、中間水は不凍水や自由水の中間の運動性を有していることが確認できた。また、拡散係数のアレニウスプロットから求めた活性化エネルギーから、自由水に比べて中間水や不凍水は拡散の活性化エネルギーが高く、より強くポリマーに拘束されていることが明らかになった。さらに中性子準弾性散乱を用いた中間水の動的構造解析の結果、遅い中間水はピロリドン環側鎖に拘束され共同的に運動し、一方で速い中間水は比較的広い領域を連続拡散している可能性が示唆された。

2C-07- I

枝分かれポリグリセロールの枝分かれ度と水和状態の相関性

¹神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻, ²九州大学大先導物質化学研究所

○大谷 亨¹ (Ooya Toru), 杉本洋輔¹, 田中 賢²

枝分かれ構造を有する生体適合性ポリマーであるポリグリセロール dendrimer (PGD)やハイパーブランチポリグリセロール (HPG)は化学修飾可能な多数の末端基を有し、バイオフィウリングやゲスト分子包接能など、直鎖状ポリマーと異なるユニークな性質を有しており、バイオマテリアルの分野で応用が期待されている。PGD が完璧な分岐構造を有している一方で、HPG は分岐構造と直鎖構造の両方を有し、ランダムに分岐している。また、PGD や HPG は繰り返し単位の疎水性のメチレン、メチン骨格を有しているため、水中において分子内に極性の低いマイクロ構造を形成することが報告されている。PGD, HPG は同じ構造式、同じ分子量であっても、分岐度の違いにより末端水酸基の位置が異なるため、ポリマー自体の物理化学的性質や、生体分子との相互作用が変化する可能性がある。このような分岐度効果の検証は新たなバイオマテリアルをデザインする上で多様な選択肢を生み出す足がかりになると考えられる。しかし、個々のポリマーに関する研究は多数行われているものの、それぞれのポリマーを比較した際の特性の違いは明らかではない。そこで本研究では、PGD 及び HPG の分岐性が生体適合性の指標である水の構造 (自由水、中間水、不凍水) を定量化した。

PEG(分子量 2,000), HPG(分子量 2,184), PGD(分子量 2,275)の様々な濃度の水溶液を調製し、DSC 測定から得られたチャートにおける水の融解エンタルピーから、中間水量、自由水量、不凍水量を算出した。その結果、ガラス転移温度と融点の間の温度で生じる低温再結晶は枝分かれ度に関わらず全ての試料において観測された。これらの結果は中間水も含まれることを示しており、多くの報告例がある PGD や HPG の非タンパク質吸着特性を支持するものであった。さらに、水の融解エンタルピーから、ポリマーと強く相互作用し、-100°C 以下でも凍らないとされる「不凍水」量を各ポリマーについて算出したところ、分岐度の増大に伴って不凍水量は増大した。分岐度の高い PGD や HPG は水中で 3 次元の球状構造をとっており、球内に入り込んだ水分子はポリマー中のエーテル酸素や水酸基と多点で相互作用したために、直鎖の PEG よりも不凍水が増えたことが考えられる。一方で PGD や HPG のグリセロール骨格に囲まれた水分子は運動性が制限され、他の水分子との水素結合が弱まるために凍結しにくくなったことが示唆された。

2C-08- I

側鎖の官能基による脂肪族ポリカーボネートの含水性の制御と抗血栓性の評価

¹山形大学大学院有機材料システム研究科, ²九州大学先導物質化学研究所

○羽賀悠太¹ (Haga Yuta), 箱崎俊太¹, 田中 賢², 福島和樹¹

【緒言】 ポリトリメチレンカーボネート (PTMC) は柔軟な生分解性ポリマーとして知られ、近年では側鎖に種々の官能基を導入した PTMC 誘導体が開発されている。本研究では 2-メトキシエチル基を側鎖に導入した PTMC 誘導体を合成し、その血小板粘着性が無置換の PTMC と比較して大きく減少することを確認している。これには側鎖のエーテル基の水和が大きく寄与していると考えられ、水和の効果を制御することで抗血栓性の更なる向上が見込まれる。本研究では、より親水的な官能基を側鎖に導入した PTMC 誘導体やその共重合体を合成し、含水性や血小板粘着性への影響を調べた。

【実験】 側鎖への親水性官能基の導入法として、アリル基を側鎖に有する PTMC 誘導体に対する thiol-ene 反応を利用した。その後、スピンコート膜を作製し、水に対する静的接触角やヒト血小板の粘着性を評価した。また、示差走査熱量測定 (DSC) を用いて含水させたポリマーの熱特性を解析することで、ポリマーに水和した水の特性を調べた。

【結果】 数平均分子量 5.5 万、分子量分散度 1.3 のアリル基を側鎖に有するプレポリマーが得られた。その後の thiol-ene 反応はアリル基に対して 2 当量のチオール化合物を添加し、ラジカル開始剤存在下 60°C で行われ、若干の溶媒不溶部を生成するも側鎖の変換率は 90%以上を達成した。一方で、ポスト反応中でのポリマー主鎖の分解は確認されず、これまでにない高分子量の側鎖にエーテル基を導入した PTMC 誘導体が高収率で得られた。側鎖にチオグリセロール由来の水酸基を 2 つ有する PTMC 誘導体とメトキシエチル基を導入した PTMC 誘導体の血小板粘着性は、従来の抗血栓性 PTMC 誘導体よりも若干高い結果となったが、粘着した血小板の多くは球形を維持していた。一方、水の接触角は比較的低い値を示し、また、含水ポリマーの DSC 結果からは、これまでは見られなかった代表的な抗血栓性ポリマーであるポリ(2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA) や MPC ポリマーで観測される昇温過程における -40°C 付近での水の低温結晶化が観測され、中間水の形成が示唆された。このことから、親水的官能基によって水和水の状態を制御できることが示されたが、血小板粘着性との相関を説明するためには界面の水和状態についてさらに詳細な解析が必要である。発表では、この他の親水性側鎖を導入した PTMC 誘導体の含水性や血小板粘着性についても議論する。

2C-09- I

Effect of zwitterionic polymers on insulin aggregation

Japan Advanced Institute of Science and Technology

○Robin Rajan, Kazuaki Matsumura

【Introduction】 Insulin regulates sugar in the bloodstream and is widely used in the treatment of diabetes. It is usually injected in the body, which is not always suitable for everyone. Insulin is extremely prone to aggregation, which has hampered widespread development of alternate forms of its delivery. Many compounds have been developed previously to overcome this issue, however satisfactory results have not been achieved yet. In this report, we developed a zwitterionic polymer (poly-sulfobetaine) and introduced varying amounts of hydrophobicity (butyl methacrylate; BuMA) and checked its propensity to suppress insulin aggregation.

【Materials and methods】 Polymers were synthesized using RAFT polymerization and were characterized using NMR and GPC. Insulin aggregation was monitored using UV-Vis spectroscopy, Thioflavin T Assay and CD spectroscopy.

【Results and discussion】 UV-Visible experiments clearly showed that insulin aggregates on incubation at 37 °C and addition of polymer markedly suppresses aggregation. Thioflavin T assay unambiguously demonstrated that these polymers are effective in suppressing fibrillation. Incorporating hydrophobicity lead to a massive increase in its overall efficiency, and polymer containing 30% BuMA shows suppression of around 98% fibrillation. Lag times for aggregation were almost quadrupled in presence of these polymers, indicating that these polymers arrests the process of fibrillations and aggregation. CD spectroscopy revealed that secondary structural elements of insulin are retained by the addition of zwitterionic polymers.

【Conclusion】

Zwitterionic polymers have extremely high efficiency in inhibiting insulin aggregation. Hydrophobicity increases the efficiency by masking the hydrophobic surfaces of proteins. These polymers exhibit protection by preventing any destructive change in the higher order structure of insulin.

2C-10- I

ブロックポリマー会合体存在下における細胞増殖と伸展：会合体形状の効果

¹山形大学大学院有機材料システム研究科, ²山形大学工学部, ³山形大学有機材料フロンティアセンター (FROM),

⁴九州大学先端物質化学研究所

○大治雅史¹ (Oji Masashi), 松崎広大¹, 藤村 望², 土屋 遥³, 田中 賢^{3,4}, 福島和樹^{1,2,3}

【緒言】 両親媒性ブロックコポリマーが形成するミセルの多くは、薬剤キャリアへの応用が検討されている。近年では、標的指向性や刺激応答性などを付与した高機能化キャリアの開発も盛んに行われている。一方、ロッドや繊維状の高分子ミセルが、球状のものと比較して血中滞留性の向上や癌組織への集積性の増加を示すことが報告されている。また、カチオン性の超分子会合体やポリマーミセルのうち、繊維状の形態において球状形態にはない抗菌活性を発現することも報告されており、ナノ材料の形態が及ぼす生体応答への効果を利用した機能材料の開発が注目されつつある。本研究では、生体適合性の poly(ethylene glycol) (PEG)を親水ブロックとし、生分解性の poly(L-lactide) (LLA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL), poly(trimethylene carbonate) (PTMC)のいずれかが疎水ブロックを構成する両親媒性のブロックコポリマーに着目し、このうちブロック間に導入された N-(4-(ureidomethyl)benzyl)benzamide (4UMBA)構造の効果によって形成される異方性会合体の形状 (アスペクト比)や物性が細胞増殖や伸展にどのように作用するのか調べた。

【実験】 各 PEG 系両親媒性ブロックコポリマーは各ブロックの分子量が 5,000 となるように合成した。その後、水中に分散させて会合体を形成させ、ポリマー濃度 0.05 wt%とした α -MEM 培地 (10%FBS 含む)を調整し、ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)を 37°C で 48 時間培養した。

【結果】 4UMBA を含まない通常のブロックコポリマーの会合体はいずれも 100 nm 以下の球状会合体を形成し、その存在下で培養した NHDF は、ポリマー非存在下で培養した NHDF と比較して細胞の増殖や伸展に大きな違いは見られなかった。これに対し、4UMBA を含むブロックコポリマーの会合体の存在下で培養した NHDF では、ブロックコポリマーの疎水セグメントによって細胞増殖と伸展に有意な差が見られた。疎水セグメントが PLLA の場合、伸展した細胞多く見られ、一方、PTMC の場合では伸展した細胞があまり見られず、細胞数も少なかった。これらの結果より、会合体のサイズや形状が細胞増殖や伸展に作用することが示唆され、その作用機序の解明に向けた解析結果についても発表する。

2C-11-II

シアル酸糖鎖修飾型導電性高分子の創製とインフルエンザウイルスの電氣的検出

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○合田達郎 (Goda Tatsuro), 海 文峰, 堀口諭吉, 松元 亮, 宮原裕二

【緒言】インフルエンザウイルスの迅速な同定は社会的ニーズが高い。従来の遺伝子解析法や免疫法によるウイルスの検出は時間とコストがかかるため、個人が簡便に検査するには小型化・微細化に適した電気計測が有効である。そこで、本研究ではウイルス表面のタンパク質であるヘマグルチニンと特異的に結合する糖鎖を poly(3,4-ethylenedioxythiophene)(PEDOT)に導入し、電気化学的にインフルエンザウイルス(H1N1)のリアルタイム、ラベルフリー検出することを目的とした。

【実験】EDOT の側鎖に oxylamine (OA)基を導入した EDOTOA を合成し、EDOT と EDOTOA を任意の割合で電解共重合した。その後、glycoblotting 反応を用いてウイルス表面のヘマグルチニンと特異的に結合する 6-sialyllactose を修飾した。水晶発振振動子(QCM)と電位計測法により、ニワトリ胚培養したヒトインフルエンザウイルス A 型(H1N1)を検出した。

【結果と考察】6-sialyllactose を導入した poly(EDOTOA-co-EDOT)表面では、ウイルス力価依存的に吸着量が増大した。一方、3-sialyllactose 修飾表面ではウイルスの吸着は抑制されたことから、ヒトインフルエンザウイルス A 型(H1N1)は末端 6-sialyllactose に対して選択性を有することが確認された。QCM 測定において、検出限界(LOD)が 0.12 HAU、動作範囲が 0.125 ~ 2 HAU、Kd が 0.96 HAU であった。同様に電位計測をおこなったところ、6-sialyllactose を導入した poly(EDOTOA-co-EDOT)表面は、力価依存的な正の電位応答を示した。これはヘマグルチニンの正電荷を検出したものと考えられる。3-sialyllactose 修飾表面では、顕著な電位応答を示さなかった。電位計測法による LOD は 0.013 HAU、動作範囲が 0.015 ~ 1 HAU、Kd が 0.16 HAU となった。電位測定法によるインフルエンザウイルスの LOD は市販の免疫法と比べて、二桁程度高感度であったことから、早期ウイルス検出への応用が期待される。

【謝辞】本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議が主導する革新的研究開発推進プログラム (ImPACT) の一環として実施した。

2C-12-II

グラム陽性菌を選択的に認識するボロン酸修飾 dendriマーの開発

上智大学理工学部物質生命理工学科

○土戸優志 (Tsuchido Yuji), 堀内良介, 橋本 剛, 早下隆士

【緒言】近年、過剰に使用された抗生物質を環境中へ排出することで薬剤耐性菌が発生することが社会的な問題となっている。そのため、細菌種の簡易な判別法の開発は、医療現場での診断技術の向上、並びに水質汚染等の環境問題の改善に繋がることが期待される。現在の細菌検出法は培養法が主流であるが、環境中の細菌には培地上でのコロニー形成能が低く、培養法のみでは検出、計量し難いものが数多く存在することが明らかとなってきた。そこで、従来の生物学的手法とは異なる、迅速かつ簡便に検出を行える手法の開発が望まれている。我々はこれまでに、ジピコリルアミノ基を修飾したナノ粒子による細菌検出やボロン酸修飾 dendriマーによる単糖認識について報告してきた^{1,2}。本研究では、糖認識部位であるフェニルボロン酸に注目し、樹状高分子のポリアミドアミン (PAMAM) dendriマーにフェニルボロン酸を修飾した多点認識型ナノ粒子センサーを設計し、細菌の菌種の迅速な簡易判別を目指した。

【実験と結果】糖認識機能を有するフェニルボロン酸を細菌認識部位として、PAMAM dendriマーへ修飾した B-PAMAM を設計し、水溶液中、中性条件下での黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)、大腸菌(*E. coli*)との相互作用をそれぞれ濁度測定 (OD₆₀₀) により評価した。B-PAMAM 溶液と細菌溶液を数分混合すると、*E. coli*においては濁度の変化はほとんどみられず、*S. aureus*においてのみ急激に濁度が減少し、容易に肉眼で確認できる程の大きな細菌凝集体が形成され、数分静置すると沈殿してほぼ透明の溶液になった。これは、プローブが細菌表面の糖を多点認識することで細菌間を架橋、連結した結果と考えられる。B-PAMAM による凝集作用の違いは、*S. aureus* が分類されるグラム陽性菌、*E. coli* が分類されるグラム陰性菌の違いである細菌表面の膜構造に起因すると考えられ、B-PAMAM は細菌の膜構造の違いを認識している可能性が考えられ、現在その認識部位の解明を進めている。以上の結果から、細菌を含む溶液に対して B-PAMAM を添加・混合することで、目視または濁度測定によって細菌の菌種を迅速に簡易判別できることを明らかにした。

1) Y. Kasai, H. Kobayashi, Y. Tsuchido, T. Hashimoto, N. Kanzawa, T. Hayashita, *Chem. Lett.*, **2016**, 45, 749-751.

2) Y. Tsuchido, Y. Sakai, K. Aimu, T. Hashimoto, K. Akiyoshi, T. Hayashita, *New J. Chem.*, **2015**, 39, 2620-2626.

2C-13- I

変形体力学によるバルーンカテーテルの引張変形挙動の予測の試み

¹九州大学大学院総合理工学府, ²九州大学応用力学研究所, ³九州大学大学院医学研究院

○鎌田祥平¹ (Kamada Shohei), 東藤 貢², 吉屋圭史³, 古山 正³

【緒言】 動脈硬化が進んだ血管内において拘束されたバルーンカテーテル (以下 BC) の破損例が報告されている。したがって、カテーテルの変形・破壊特性を定性的および定量的に把握する必要があるが、そのような特性を詳細に評価した研究はほとんど行われていない。そこで本研究では、実際に臨床で用いられている 2 種のカテーテルの引張試験を行い、変形体力学を用いて接合部とシャフト部の荷重 - 変位挙動を予測する理論モデルの構築を試みた。

【実験】 臨床で用いられている 2 種類の BC を試験体として使用した。BC は内筒と外筒からなる 2 層構造を形成している。本研究では、強度的に弱いバルーンの根元を含む接合部と、それ以外のシャフト部に 2 分割し、それぞれ引張試験を行った。また、内筒と外筒の単独での試験も行い応力 - ひずみ関係を評価した。線図を得るために、カテーテルを内筒と外筒に分解し試験を行った。引張試験には小型卓上試験機を使用し、引張部分の長さ 30mm、負荷速度は 600mm/min と 100mm/min とした。変形体力学を用いて、BC 接合部とシャフト部の荷重 - 変位曲線、内筒と外筒の応力 - ひずみ曲線の予測を試みた。

【結果と考察】 2 種類の BC とともに、接合部では外筒が先に破断し、最終的に内筒が破断した。この場合の荷重 - 変位挙動は、内筒と外筒をそれぞれ 2 段階の線形弾塑性モデルで表し、これらを組み合わせた力学モデルで精度よく予測できることが分かった。一方、シャフト部においては、外筒が先に破断するものと内筒が先に破断するものに分かれた。外筒が先に破断するものについては、接合部と同様の力学モデルが一致した。しかし、内筒が先に破断するものについては、内筒の破断後も外筒から受ける圧縮力の影響で内外筒が一体化して変形を行うため、この現象を考慮した理論モデルの構築が必要であった。また低速で試験を行うと一度目の降伏点を過ぎた頃から屈曲する箇所が多く見られ、その現象が荷重 - 変位挙動にも反映された。内筒と外筒それぞれの応力 - ひずみ曲線は弾塑性の全ひずみ理論を用いて予測可能であった。現在、内外筒の応力 - ひずみ関係を表す理論モデルから、BC の荷重 - 変位関係を予測する力学モデルの構築を試みている。

2C-14- I

機能性蛋白質を封入した多孔質層状超薄膜の創製と押圧放出挙動

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

○瀧本 駿¹ (Takimoto Shun), 住吉秀明², 稲垣 豊², 岡村陽介^{1,3}

【緒言】 生分解性高分子のポリ乳酸(PLLA)を超薄膜(膜厚 100 nm 以下)に加工すると、ナノ厚特有の高柔軟性と高接着性が発現し、物理吸着のみで臓器面に貼付し、縫合術の代替となることを実証している¹⁾。しかし、超薄膜単層ではナノ厚のため破断強度に限界がある。そのような背景の下、我々は、高接着性を維持したまま破断強度を向上させた層状超薄膜の開発に成功し、臓器用次世代絆創膏としての応用例を発信した²⁾。本研究では、層状超薄膜の更なる機能向上を目指し、層間に蛋白質を封入する技術を確立すると共に、貼付する際の押圧刺激によって封入蛋白質を迅速に放出する機構を付与した多孔質層状超薄膜を提案する。

【結果と考察】 モデル蛋白質として Fluorescein 5(6)-isothiocyanate 標識した BSA(FITC-BSA)を用いた。FITC-BSA を溶解させたアルギン酸ナトリウム(Na-Alg)/ポリビニルアルコール(PVA)水溶液と PLLA 溶液をシリコン(SiO₂)基板上に多層積層(5 回)させた。得られた SiO₂ 基板ごと CaCl₂ 水溶液に浸漬させ、Alg ゲル複合体を剥離・回収した。複合体を乾燥、ポリシーラーで全辺を加熱溶断(187°C)、クエン酸ナトリウム水溶液中での振とう操作を経て、Alg-Na/PVA 層を液状化させた。乾燥後、封入蛋白質が放出されるよう剣山を用いて物理的に貫通孔を付与し、最表面のみ均質な超薄膜で被覆したところ、液体が透過せずに水面に浮遊している様子が確認できた。得られた超薄膜を蛍光実体顕微鏡で観察したところ、剣山のパターン通りに貫通孔が付与されており、それ以外の領域は一面に蛍光標識されていた。従って、蛋白質が封入された多孔質層状超薄膜の調製に成功したと判断した。また、臓器界面を模倣したアガロースゲル(4%, 37°C)表面に貼付した後、分銅(500 g, 40 mm Φ)にて押圧したところ、超薄膜の貫通孔に相当する領域が局所的に蛍光を発し、それ以外の領域にも拡散していた。他方、貫通孔のない層状超薄膜では、その辺縁部からわずかに漏出したものの、多孔質体には匹敵しなかった。従って、押圧刺激によって迅速に封入蛋白質を放出する機構を実証した。

1) Okamura, Y. *et al. Adv. Mater.* **21**, 4388-4392 (2009). 2) Komachi, T. *et al. J. Biomed. Mater. Res. B* (2016) *in press*.

2C-15-III

バイオ界面制御により優れた接着性を示す外科用接着剤の創製

¹筑波大学大学院数理工学物質科学研究科, ²物質・材料研究機構機能性材料研究拠点

○水田 亮^{1,2} (Mizuta Ryo), 伊藤典明^{1,2}, 西口昭広², 田口哲志^{1,2}

【緒言】

外科用接着剤は、生体組織間吻合のため外科手術において頻繁に使用される。フィブリン接着剤は生体親和性に優れ、汎用性が高い一方で、十分なシーリング効果が得られていない。そのため、手術中の湿潤環境において生体組織・臓器に接着し、優れたシーリング効果を発揮する接着剤の開発が望まれている。我々はこれまでに疎水化ブタ由来ゼラチン接着剤による接合強度の改善を報告した。しかし、ブタ由来ゼラチンの低い流動性のため、臨床現場で事前に加温する煩雑な操作が必要であった。そこで本研究では、常温流動性に優れたタラ由来ゼラチン(ApGltN)にて疎水化ApGltN(Hm-ApGltN)を合成し、Hm-ApGltN とポリエチレングリコール系架橋剤から成る外科用接着剤の湿潤組織へのシーリング効果を評価した¹⁾。

【実験】

Hm-ApGltN の合成は、ApGltN のアミノ基の脂肪酸クロライド (C3~18) への求核置換反応により行った。合成したHm-ApGltN と水溶性架橋剤である pentaerythritol poly(ethylene glycol) ether tetrasuccinimidyl glutarate(4S-PEG)を用いて外科用接着剤とした。耐圧試験はASTM(F2392-04)に従い、ブタ大動脈に対する耐圧強度の測定を行った。

【結果と考察】

ApGltN の疎水化反応は、ブタゼラチンを用いた場合と同様に可能であった¹⁾。 ¹³C-NMR および FT-IR で分析した結果、アルキル基導入に伴うメチレンおよびメチルピークの増大が確認された。血管組織に対する耐圧強度は、いずれのHm-ApGltN においても未修飾オリジナル ApGltN(Org-ApGltN)と比較して1.05~2.06 倍以上の高い値を示した。さらに、アルキル鎖長の増加に伴って耐圧強度が向上した。耐圧強度試験後のシーラント-大動脈組織界面の観察を行うと、Org-ApGltN では広範囲な組織との破断が観られたのに対し、耐圧強度の高いC18-ApGltN では組織破壊が観測された。これらは疎水基を導入することにより、組織浸透性が向上し、シーラントと組織間の界面強度が増加したことに起因すると考えられた。

¹⁾ Mizuta, R., Ito, T., Taguchi, T., *Colloids Surf., B*2016, 146, 212-220.

2C-16- I

高分子ブラシと相互侵入高分子網目を組み合わせた生体親和性薄層ゲルの構築

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

○加藤 響¹ (Kato Hibiki), 山澤由佳¹, 中路 正^{1,2,3}, 北野博巳⁴, 猿渡欣幸⁵

【緒言】

生体親和性付与のための表面修飾法として、ポリマーブラシ構築やポリマーコーティング等数多く報告されている。これらの表面は、生体環境を乱さず共存できる優れた界面特性を有していることが *in vitro* では証明されているが、様々なバイアス (圧縮・ずり応力) がかかる環境下では、その界面特性が損なわれることが懸念される。そこで本研究では、高分子ブラシと相互侵入高分子網目 (semi-IPN) の融合という新しい発想により、薄層ゲルの創製とその最適化を検討した。

【実験】

表面開始ラジカル重合を用いて構築した、Poly(methoxy diethyleneglycol methacrylate-2-hydroxyethyl methacrylate) (P(MDM-HEMA)) ブラシに、Hexamethylene diisocyanate (HDI) を用いてブラシ間を架橋した。さらに、フリーラジカル重合により、架橋ブラシ中に種々の高分子を重合することで semi-IPN 表面を構築した。作製した薄層ゲル表面の特性解析、およびタンパク質・細胞との相互作用の評価を行った。

【結果と考察】

表面電位測定により、電荷を有さない P(MDM-HEMA) ブラシ構築後の電位は 0 に近い値となったことから、P(MDM-HEMA) ブラシの構築が示された。さらに、正または負の電荷を有する高分子を導入した表面では、各導入高分子が有する電荷に依存して表面電位が変化した。この結果より、架橋ブラシ内への高分子鎖の侵入が推察された。次に、タンパク質吸着を評価したところ、P(MDM-HEMA) ブラシ表面における、タンパク質の吸着量が比較的低かったのに対し、高分子を導入することで、タンパク質吸着量が変化した。加えて、細胞接着については、P(MDM-HEMA) ブラシ表面では細胞接着の抑制効果が見られたのに対し、高分子を導入した表面ではタンパク質吸着の時と同様に、細胞の接着数が増加した。以上の結果より、架橋ブラシ内への高分子鎖の導入が認められ、薄層ゲルを創製できたことがわかった。

2C-17- I

エラスチン類似ポリペプチドの配列設計による自己集合性の制御とハイドロゲルの形成

¹名古屋大学大学院工学研究科, ²名古屋大学ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー

○鳴瀧彩絵¹ (Narutaki-Sugawara Ayae), 安永佐和子¹, 奈良俊佑¹, 中嶋優友¹, Duc H. T. Le^{1,2}, 中村 仁¹, 大槻主税¹

【緒言】エラスチン類似ポリペプチドは、生体エラスチンの特色である弾性や自己集合性を再現できる機能性高分子であり、細胞培養足場や薬剤キャリアとしての応用が期待されている。なかでも、生体エラスチンのアミノ酸配列に頻出する2種類のモチーフを連結したブロックポリペプチド GPG は、(VGGVG)₅-(VPGXG)₂₅-(VGGVG)₅ のアミノ酸配列を基本骨格に持ち、37°C の水中で自己集合してナノファイバーを形成する¹⁾。GPG の末端へ機能性配列を付加することにより、ナノファイバーに抗菌性や細胞接着性を付与することもできる²⁾。本演題では、GPG の中央ブロック鎖長が自己集合性に与える影響について議論するとともに、GPG 類を用いたハイドロゲルの形成について報告する。

【実験】GPG の中央ブロックを2回繰り返した (VGGVG)₅-(VPGXG)₂₅-(VPGXG)₂₅-(VGGVG)₅ の骨格を持つ GPPG のプラスミド DNA を作製し、これを用いて大腸菌 BLR 株を形質転換した。GPPG ポリペプチドを発現させ、金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。GPG と GPPG をそれぞれ 20 μM (GPG: 0.034 wt%, GPPG: 0.055 wt%) の濃度で冷水に溶解させたのち 37°C に升温した。ポリペプチド二次構造の変化を円二色 (CD) 分散計を用いて調べた。また、37°C で1週間静置したサンプルをマイカ基板に滴下し、原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した。さらに、ポリペプチド濃度を 0.2 wt% として 37°C に升温し、溶液の外観の変化を目視により観察した。

【結果と考察】CD スペクトル測定より、GPG と GPPG の両方において、37°C で β-sheet 構造の割合が経時的に増加することが示された。一方、AFM では、GPG において太さ 40 nm 程度のナノファイバーが、GPPG において直径 30 nm 程度のナノ粒子と、ナノ粒子の凝集体が観察された。GPPG では、中央ブロック鎖長の増加によりコンフォメーションの自由度が増し、より等方的な自己集合構造であるナノ粒子を形成したと考えられる。ポリペプチド濃度を 0.2 wt% に増加させた場合、GPG を含む水溶液は 37°C で流動性を失いハイドロゲルを形成した。一方、GPPG を含む水溶液からは沈殿を生じた。GPG はより高濃度において、ナノファイバーの絡み合いによりゲルを形成したと考えられる。

1) D. H. T. Le *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res. A*, in press (10.1002/jbm.a.36105).

2C-18- I

医療材料への応用を目的とした形状記憶ナノファイバーメッシュの設計と温度応答特性

¹東京理科大学大学院基礎工学研究科, ²物質・材料研究機構国際ナノアーキテクニクス研究拠点, ³筑波大学大学院数理物質科学研究科

○田辺貫太^{1,2} (Tanabe Kanta), 新山瑛理^{2,3}, 宇都甲一郎², 菊池明彦¹, 荏原充宏^{1,2,3}

【緒言】形状記憶ポリマー (Shape Memory Polymers: SMPs) は外部から力を加えて変形させた後、冷却することでその形が維持され、再度加熱すると自発的に元の形に戻る性質を備えたスマート高分子材料である。本研究室ではこれまでに生分解性のポリ(ε-カプロラクトン) (PCL) を用いてさまざまな医療材料 SMPs の開発を行ってきた。その際、PCL の分子構造を制御することで形状記憶温度を生体温度付近に制御することに成功してきた。本研究では、形状記憶特性をもたせる材料として、比表面積の大きいファイバーを選択した。さらに、この PCL を用いて物理架橋を有する新たな形状記憶ナノファイバーを開発し、抗がん剤を内包させることで生体材料への応用を目指した。

【実験】まず、開始剤に 1,4-ブタンジオール (BDO) を用いて両末端に水酸基を有する PCL を重合し、ジイソシアネートと反応させることでポリウレタンを合成した。さらに、鎖延長剤として BDO と反応させることで直鎖状のポリウレタンを合成した。ウレタン結合はウレタン基同士が水素結合により凝集することで、物理架橋点の役目を果たすハードセグメント (HS) を形成した。最後に、電界紡糸法により形状記憶ナノファイバーメッシュを作製した。

【結果と考察】¹H-NMR により PCL の重合を確認し、ATR-FTIR により合成したポリウレタンのウレタン結合を確認した。さらに、SEM を用いて直径が約 650nm のナノファイバーが作製できていることを確認した。さらに、HS の仕込み比を変化させたナノファイバーメッシュを作製したところ、HS の量が増加すると PCL の融点以上でもナノファイバーメッシュの形状が保たれたことより、物理架橋密度も上昇することがわかり、結果としてナノファイバーメッシュの熱安定性の向上を確認した。さらに、形状記憶特性を評価したところ、60°C において一方向にナノファイバーメッシュを伸長させた後、室温まで下げると、その構造に固定することに成功した。再度熱を加えることで、初期のナノファイバーメッシュの構造に変化した。ナノファイバーの構造変化は SEM を用いて観察した。本発表では、より詳細な形状記憶特性に加え、ナノファイバーに抗がん剤を内包させ、薬物徐放やがん細胞に与える影響を報告する予定である。

2C-19- I

バイオマスナノファイバー融合素材の骨補填材料への応用

¹富山大学大学院理工学教育部, ²富山大学大学院理工学研究部, ³富山大学大学院生命融合科学教育部, ⁴富山大学水素同位体科学研究センター, ⁵北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系

○増山一平¹ (Masuyama Kazuhira), 中路 正^{1,2,3}, 田口 明⁴, 松村和明⁵

【緒言】

骨の欠損治療では、インプラントや人工骨などの移植が挙げられるが、移植後の細菌感染や、材料の摩耗など種々の課題が残されている。従来から自家骨移植が行われているが、採骨部の変形などの合併症も問題視されている。このような問題を解決するため、骨の無機質主成分であるヒドロキシアパタイト (HAp) をベースとする骨補填材料開発が進められている。これまで当研究室では、チタン合金表面に正負両電荷を有する高分子を被覆することで、タンパク質成分をほとんど含まない強固で安定な HAp 層を形成させることに成功した (*Colloids Surf. B, 152, 302-10 (2017)*)。そこで本研究では、電荷中和された生体物質吸着抑制能を有するナノファイバー (NF) 材料 (*Colloids Surf. B, 139, 95-99 (2016)*) においても強固で安定な HAp 層の形成が可能ではないかと考え、骨補填材料への応用を見据えた種々の特性評価を実施した。

【実験】

負電荷型のカルボキシメチルセルロースナノファイバー (CMC NF) および正電荷型のキトサンナノファイバー (Ch NF) の分散液を混合し製膜することでシート状材料を得た。そのシート表面に HAp 沈着を施し、HAp 被覆天然高分子ナノファイバーコンポジットを作製した。この素材の特性を明らかにするために化学的・物性的な各種評価を行った。

【結果と考察】

シート表面を SEM により観察した結果、HAp のミネラル核が形成されていることが分かった。また、シートへのカルシウム沈着量は、これまでに報告されている HAp 表面被覆の結果に比べ多く、負荷を与えても剥離しないことがわかった。さらに、XRD、XPS および ¹³C・³¹P NMR より、NF 上の正負両電荷に対して、静電的相互作用により HAp が沈着し、層形成が促進されていると推察される結果を得た。以上のことより、電荷中和された NF 材料へ強固で安定な HAp 層を形成させることができると判断され、本材料が骨補填材料に応用できる可能性が示された。

2C-20- II

コラーゲンのゲル紡糸：線維配向と直径制御を可能にする連続紡糸技術

¹東京都立産業技術研究センター, ²北海道大学大学院医学研究科, ³八木整形外科病院, ⁴北海道大学国際連携研究教育局

○柚木俊二¹ (Yunoki Shunji), 海老澤瑞枝¹, 畑山博哉¹, 近藤英司², 安田和則^{3,4}

【緒言】

線維配向したコラーゲンファイバー (CF) には人工腱 (束化)、人工靭帯・膜強化 (織物) など多彩な応用が期待される。発表者らは先行する研究[Yunoki et al. JBMR-A. 2015;103:3054]で、配向コラーゲン線維束を立体的なゲルとして作製するための要件および配向化原理を明らかにした。数 10 s 以内で完了する急速な線維化が必須で、線維形成過程での剪断力 (剪断速度 1~10 s⁻¹) がテンションを与え線維配向させる原理であった。本研究では、この知見を連続紡糸技術として発展させた。

【実験】

医療用コラーゲン水溶液 (濃度 1%、日本ハム製) を濃縮し、リン酸緩衝液を溶媒としたコラーゲン濃度 2.5%かつ NaCl 濃度 280 mM の中性ゾルを調製した。シリンジにゾルを充填し、先端にステンレス管を取り付けたシリコーンゴムチューブを接続した。水浴で 38°C に加温したリン酸ナトリウム緩衝液にステンレス管部のみ浸漬した状態で、シリンジポンプを用いてゾルを一定速度 (2.83~56.5 mL・h⁻¹) で吐出した。得られたゲルの線維配向を二次元複屈折測定および SEM により評価した。

【結果と考察】

高濃度 NaCl により急速な線維化を示すコラーゲンゾルは、先行研究から予想された通りステンレス管でゲル化を終え、ゲル状の CF が連続的に吐出された。線維配向性は剪断速度とともに増加し、剪断速度が 5~10 s⁻¹ (計算上の吐出線速度 0.56~1.1 mm・s⁻¹) でほぼ飽和した。ゲル状の CF の内部を SEM 観察し、ファイバー軸方向に配向したコラーゲン線維から成ることを認めた。ステンレス管長 (すなわち剪断付与時間) に関しては、ゲル化の完了と同時に吐出させる長さが最適であり、剪断速度 5 s⁻¹ における最適管長はわずか 26.3 mm であった。内径の異なるステンレス管 (内径 0.90 mm および 2.84 mm) を用いても同一の剪断条件でゲル状 CF を作製することができ、乾燥により作製される CF の断面積 (1.23×10⁻²~0.135 mm²) はステンレス管の断面積に比例した。以上の結果から、内部が線維配向した CF を連続成型でき、断面積が制御可能であり、線維化能の低い医療用コラーゲンにも応用できる簡易な紡糸技術“ゲル紡糸”を開発したと結論した。

20-21-Ⅱ

メディカルデバイスにおけるモールドイング製法の与える高分子構造への影響

¹(株)メニコン, ²名古屋工業大学大学院工学研究科, ³名古屋工業大学材料フロンティア研究所
○伊藤恵利^{1,2} (Ito Eri), 佐竹好輝², 山本勝宏^{2,3}

【緒言】

メディカルデバイスの中でも、汎用性が高く、広く使用される製品の一つにコンタクトレンズがある。現在コンタクトレンズは、シリコーンハイドロゲルという両親媒性物質が素材の主流となっている。また、その大量供給の希求に基づき、ほとんどがモールド製法によって製造される。樹脂材料の汎用製法の一つであるモールド製法であるが、コンタクトレンズの製造においては、両親媒性物質を、レンズに使用可能な要件である透明性を維持した状態で、重合・成型を完結しなければならないという制約事項がある。

また、このモールド製法においては、レンズ重合・成形時に溶媒を使用するウエットモールドと、溶媒を使用しないドライモールドとに大別できる。これらの製法は、高分子科学でいうところの、溶液重合と塊状重合にあたる。これら重合法の差異が、共重合反応及び得られるポリマー構造に与える影響を解明した。

【実験】

実験には、赤外光度分光・核磁気共鳴・小角X線散乱等を使用した。モデルシリコーンハイドロゲル素材の共重合挙動を時間分割分析するため、原料と開始剤を混合した試験液を準備し、しかるべき重合エネルギーを与えた環境下、高分子形成過程を観察した。また、別途、得られた重合体構造を観察した。

【結果と考察】

ウエットモールドとドライモールドの比較から、重合溶媒がレンズ素材の共重合反応に与える影響を解明し、重合溶媒を用いない場合、共重合体が白濁した状態で得られる原因、並びに、同一系において重合溶媒を使用することで、得られる共重合体が透明性を維持できる機序を解明するなど、得られる高分子構造に関する検証を行った。

20-22-Ⅱ

メディカルデバイスにおけるモールドイング製法の与える高分子機能への影響

¹(株)メニコン, ²名古屋工業大学大学院工学研究科, ³名古屋工業大学材料フロンティア研究所
○伊藤恵利^{1,2} (Ito Eri), 丸山広美¹, 佐竹好輝², 山本勝宏^{2,3}

【緒言】

メディカルデバイスの中でも、汎用性が高く、広く使用される製品の一つにコンタクトレンズがある。現在コンタクトレンズは、シリコーンハイドロゲルという両親媒性物質が素材の主流となっている。また、その大量供給の希求に基づき、ほとんどがモールド製法によって製造される。樹脂材料の汎用製法の一つであるモールド製法であるが、コンタクトレンズの製造においては、両親媒性物質を、レンズに使用可能な要件である透明性を維持した状態で、重合・成型を完結しなければならないという制約事項がある。

また、このモールド製法においては、レンズ重合・成形時に溶媒を使用するウエットモールドと、溶媒を使用しないドライモールドとに大別できる。これらの製法は、高分子科学でいうところの、溶液重合と塊状重合にあたる。これら重合法の差異、特に重合時に加える溶媒の有無やその添加量が、得られる重合体、すなわちレンズ素材の性質、特に機能や物性値に与える影響を解明した。

【実験】

実験には、示差走査熱量計・X線光電子分光器等、その他レンズ素材の物性評価用機器を使用した。モデルシリコーンハイドロゲル素材に対し、重合反応時に重合溶媒を使用する・しない、更には使用する場合の添加量を変化させてレンズ素材をモールド製法により作製した。得られたレンズ素材に関し、素材のガラス転移点・残留成分・共重合組成等の機能評価、含水率・酸素透過性・柔軟性・脂質親和性等の物性評価を実施し、また、別途、得られた重合体特性を検証した。

【結果と考察】

ウエットモールドとドライモールドの比較から、重合溶媒がレンズ素材の機能並びに物性値に与える影響を検証し、モールド製法がレンズ素材にもたらす差異を総合的に検証した。

2D-01- II

NH₄Cl 刺激による上皮細胞シート基底部の過渡的 pH 変化を指標とした密着結合の評価

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

○合田達郎 (Goda Tatsuro), 波多野豊晃, 松元 亮, 宮原裕二

【緒言】

上皮細胞間密着結合 (Tight Junction: TJ) は、クローデインを中心としたタンパク質からなり、大腸菌・ウイルス等の侵入を防ぐバリア機能と、養分・イオンの選択的物質透過機能を有する。TJ 異常は、免疫障害、炎症、潰瘍等の原因となる。従来の *in vitro* 評価法として、上皮細胞シートのインピーダンス (Trans-Epithelial Electric Resistance: TEER) 測定と、低分子マーカーの透過率測定がある。しかし、TEER 測定では上皮細胞シート全体の变化を測定するため、TJ のインピーダンス成分を帰属することが困難である。一方、低分子マーカーの透過率測定は静的な測定であり、TJ の経時変化測定が困難である。本研究では、NH₄⁺と H⁺の TJ 透過を指標とした NH₄Cl 刺激によるアクティブ型 pH 計測法を新たに開発し、従来法では困難であった TJ の崩壊過程を非侵襲かつ高感度に測定する方法を開発した。

【実験】

イヌ腎臓由来上皮細胞 (MDCK) を pH センサであるイオン応答性電界効果トランジスタのゲート絶縁膜上に播種し、72 時間培養後、TEER より TJ 形成を確認した。上皮細胞シートの基底部側の pH 変化を電位計測法 (59.1 mV/pH) にて求めた。次に、Ca²⁺キレート剤 EGTA を用いて TJ を崩壊させ、その間、NH₄Cl 刺激時の pH 応答を測定した。TJ 非形成条件 (MDCK24 時間培養) や TJ 非形成細胞 (HepG2, HeLa, NIH/3T3) においても同様の測定を行った。

【結果と考察】

上皮細胞シートに EGTA 添加した後、18 分間にわたって pH 変動量 (Δ pH) が+70%変化した。これは、TJ 崩壊に伴って NH₄⁺と H⁺の paracellular 経路での透過性が向上したこと由来し、シミュレーション結果とも合致した。一方、TJ 非形成条件では、EGTA 添加後に Δ pH は最大で-20%変化した。以前の結果より、細胞膜崩壊時は Δ pH が減少することが判明しており、TJ の崩壊と細胞膜の崩壊は Δ pH が逆方向に変動するため容易に区別できる。TEER 測定では、EGTA の添加により、TJ 形成/非形成条件に関わらず 10 kHz におけるインピーダンス値は最大で-57%変化した。

2D-02- I

医療診断への応用を目指した色素結合微粒子の創製と標的分子に対する応答挙動

¹関西大化学生命工, ²関西大 ORDIST

○菅原淳弘¹ (Sugahara Atsuhiko), 河村暁文^{1,2}, 宮田隆志^{1,2}

【緒言】生体内では、細菌やウイルスなどの抗原が侵入するとそれに応じた抗体が生成され、抗原と抗体の特異的な反応により感染症から身を守っている。免疫検査は、この抗原抗体反応を利用して感染症の診断や治療効果を判定できる。その中でも、高分子微粒子を用いたラテックス凝集法では、表面に抗体を固定化した高分子微粒子が標的抗原に応答して凝集することを利用して、特定の疾患が診断される。しかし、疾患の診断は数種の生体分子の組み合わせにより行うため、より簡便かつ少量の検体で複数の生体分子を検出する必要がある。そこで本研究では、検体中の複数の標的分子を視覚的に検出可能な診断材料の創製を目的として、標的分子に対するリガンドを導入した色素結合微粒子の調製を試みた。また、この色素結合微粒子の標的分子に応答した凝集沈殿挙動について検討した。

【実験】重合性基を有する染料の RDW (赤、緑、青:和光ケミカル社製) と 2-(2-ethoxyethoxy)ethyl acrylate, ethylene glycol dimethacrylate とを、超音波照射により超純水に分散させた。この分散液に側鎖グルコース含有モノマーの 2-glucosyloxyethyl methacrylate (GEMA) と ammonium persulfate とを加え、アルゴン雰囲気下、70 °C で 4 時間ソープフリー乳化重合し、3 色の GEMA 導入色素結合微粒子を調製した。また、GEMA 導入色素結合微粒子分散液に、グルコースと特異的に複合体を形成する concanavalin A (ConA) を添加し、粒子の凝集沈殿挙動を評価した。

【結果と考察】GEMA を導入した粒子と導入していない粒子の分散液に ConA を添加すると、GEMA を導入していない粒子は均一に分散した状態であったのに対して、GEMA を導入した粒子は沈殿が生じた。これは、GEMA と ConA とが複合体を形成することにより粒子間に結合が生じ、凝集が引き起こされたためと考えられる。さらに、GEMA を導入した粒子と、導入していない異色の粒子を混合した分散液に ConA を添加したところ、GEMA を導入した粒子のみが沈降し、粒子分散液と沈殿との間に色彩の変化が生じた。以上の結果から、本研究で用いたリガンド導入色素結合微粒子は、標的分子の存在を可視化できる医療診断材料としての応用が期待できる。

2D-03-II

細胞外ベシクルの高感度検出のための表面機能化自律駆動マイクロチップの作製

¹東京理科大学基礎工学部材料工学科, ²東京理科大学基礎工学部生物工学科, ³理化学研究所前田バイオ工学研究室
○石原 量¹ (Ishihara Ryo), 中島忠章², 片桐明日香¹, 細川和生³, 前田瑞夫³, 友岡康弘², 菊池明彦¹

【緒言】

細胞外ベシクル(EV)とは、細胞が分泌する脂質二重膜からなるベシクルであり、これまでに、がん(S.A. Melo *et al.*, 2015)やC型肝炎(M. Kornek *et al.*, 2012)などのバイオマーカーとしての可能性が報告されている。EVの分離、精製、分析手法は未確立であり、報告されている手法は概して多くの必要試料体積、長い検出時間を必要とする。そこで本研究では、少ない必要試料体積、短い検出時間を特長とする自律駆動マイクロ流体チップ(以後、マイクロチップ)を機能化したマイクロチップ(SF-PF microchip)を作製し、検出プロトコルを最適化することによってEVの簡易高感度検出をめざした。

【実験】

ポリジメチルシロキサン製のマイクロチップのマイクロ流路内表面に開始剤である benzophenone を担持し、洗浄後、流路を種々の濃度の 2-aminoethyl methacrylate (AEMA)モノマーで満たし、UV光(365 nm, 100W)を10分照射することよりのマイクロ流路内に PAEME 鎖を付与した。次に、PAEMAに縮合反応によって抗ヒトCD63抗体を固定し、洗浄、脱気を経て、EV検出用の SF-PF microchip を作製した。流路内表面への抗CD63抗体の固定は蛍光標識二次抗体の吸着により確認した。作製したマイクロチップに層流樹状増幅法(LFDA)適用して、乳がん細胞株(MCF7)由来のEVを検出した。

【結果と考察】

抗CD63抗体の固定量は、はじめAEMA濃度の増加と共に上昇し、その後減少した。これはAEMA濃度が増加するにつれて、流路表面に抗体と結合するアミノ基が増える一方で、あまり濃度が高くなるとPAEMA鎖が密になり抗体の固定スペースが減少するからである。EV検出に関して、EV捕捉部分を一部狭窄させた流路の利用およびLFDAにおけるEV捕捉ステップを長くすることで検出感度が向上した。これは、EV捕捉界面へのEV接触回数が向上したからである。本検出に用いたサンプル量は1.0 μL、測定時間は20分以内であったことから、SF-PF microchipを用いて、EVを簡便かつ高感度に検出できることを実証できた。

2D-04-II

炎症マーカーの非標識検出と選択除去を可能にする双性イオン型磁性粒子の調製

¹関西大学大学院理工学研究科, ²関西大学化学生命工学部, ³関西大学ORDIST
○岩崎紗奈¹ (Iwasaki Sana), 川崎英也^{2,3}, 岩崎泰彦^{2,3}

【緒言】C反応性タンパク質(CRP)は体内の炎症などに応答して産生され、炎症の程度に伴い血中濃度が急激に上昇する。このため、炎症マーカーとして医療現場で測定されている。近年、CRPの低濃度の増加と心筋梗塞など慢性炎症の関連が明らかにされ、低濃度のCRPを高感度に検出する方法が求められている¹⁾。また、CRPが動脈硬化や血管内皮機能の低下を引き起こすことも指摘されており、血中のCRPを除去する方法も必要となる²⁾。本研究では、CRPがホスホリルコリン(PC)基とCa²⁺存在下で結合することから、PC基を持ちタンパク質との非特異的吸着を抑制するポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)(PMPC)を修飾した磁性粒子を用い非標識でのCRPの高感度な検出と選択的除去を試みた。

【実験】水熱合成法で作成したFe₃O₄ナノ粒子の表面に原始移動ラジカル重合(ATRP)法により、PMPCを修飾し、PMPC-Fe₃O₄を得た。得られたPMPC-Fe₃O₄と所定濃度のCRPを緩衝液中で1時間接触させた。その後、動的光散乱(DLS)によりPMPC-Fe₃O₄の粒径を測定した。CRPの除去では緩衝液中でPMPC-Fe₃O₄とCRPを2時間接触後、遠心分離によってPMPC-Fe₃O₄を除き、PMPC-Fe₃O₄と接触前後の溶液中のタンパク質濃度をELISA法によって測定した。

【結果と考察】検出では緩衝液中でCRPとPMPC-Fe₃O₄を接触させたところ、CRPの濃度が20 nM以上でPMPC-Fe₃O₄の粒径とCRPの濃度に正の相関が認められた。さらに、CRPと接触させたPMPC-Fe₃O₄を磁石で集め、再分散させたところCRPの濃度が10 nM以上からPMPC-Fe₃O₄の粒径変化が現れた。これは磁石によってCRPとPMPC-Fe₃O₄の凝集が促進されたためであり、磁性粒子を用いることにより低濃度のCRPを非標識検出できることがわかった。一方、PMPC-Fe₃O₄をアルブミンとCRPを含む緩衝液中で2時間接触させ、各タンパク質の濃度を測定したところ、CRPの濃度のみが接触前に比べ有意に低下(13 → 0.2 nM)し、アルブミンの濃度は変化しなかった。すなわち、系内からCRPを高選択的に除去するためにPMPC-Fe₃O₄を利用できることも明らかにした。CRPとPMPC-Fe₃O₄の結合にはCa²⁺が必須であり、EDTAを作用させることで、PMPC-Fe₃O₄を再生できた。

【参考文献】1) P. M. Ridker *et al.*, *Circulation*, **2001**, 103, 1813. 2) H. Sun *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **2005**, 167, 1139.

2D-05- I

リガンド結合ドメインと形状識別能による構造類似性タンパク質認識ナノ空間の創製

神戸大学大学院工学研究科

○香門悠里 (Kamon Yuri), 竹内俊文

【緒言】構造が類似し、共通のリガンド結合ドメイン(LBD)を有するタンパク質の識別には誤認識の生じにくい分子認識ナノ空間の構築が求められる。特定のアミノ酸残基からなる LBD に特異的に結合するリガンド分子は、LBD をもつタンパク質の認識素子として期待される。一方、分子インプリンティング(MI)は、標的タンパク質の形状およびサイズに適した分子認識ナノ空間を高分子材料内に構築可能であることから、タンパク質認識能をもつ機能性高分子材料の創製法としての期待が高まっている[1]。本研究では、ヘパリン結合ドメイン(HBD)をもつ血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に着目し、中でも構造類似性の高い VEGF165 と VEGF189(配列相同性 87%)を識別可能な VEGF アイソフォーム識別ナノ空間を HBD に対する特異リガンドを用いた MI 法により構築することを目指した。

【実験】本研究では VEGF165 を標的 VEGF とし、ヘパリンと重合開始剤を修飾した金蒸着ガラス基板にリガンドタンパク質相互作用によって VEGF165 を固定化した。基板に固定化した VEGF165 に対してメタクリル酸を相互作用させて親水性モノマーと架橋剤を加えて表面開始原子移動ラジカル重合を行った。得られた高分子ナノ薄膜から VEGF165 を除去することで、ヘパリンとメタクリル酸由来のカルボキシル基をもつ VEGF165 の分子インプリントポリマー(MIP)ナノ薄膜を得た。対照としてヘパリン固定化基板、重合時にメタクリル酸を添加せずに重合した MIP without MAA 薄膜も作製した。得られた基板の VEGF165 結合能を表面プラズモン共鳴(SPR)測定により評価した。

【結果と考察】SPR 測定から、標的である VEGF165 の MIP 薄膜に対する結合親和性(解離定数 3.4 nM)は、MIP without MAA 薄膜やヘパリン固定化基板に比べて 10 倍高いことが分かった。さらに、MIP は VEGF189 に比べて標的 VEGF165 をより選択的に結合可能であり VEGF アイソフォーム結合選択性が見られたが、MIP without MAA 薄およびヘパリン固定化基板では VEGF189 と 165 を有意に識別できなかった。以上の結果は、ヘパリンによる HBD の認識に加えて MI 法による形状識別能を付与した VEGF ナノ空間がアイソフォーム識別に有効であることを示している。

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

2D-06- I

側鎖導入間隔を拡大した新規 PMEА 類似体の合成と抗血栓性の変化

¹九州大学大学院工学府物質創造工学専攻, 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
○園田敏貴¹ (Sonoda Toshiki), 小林慎吾², 田中 賢^{2,3}

【緒言】Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) は優れた抗血栓性を有し、人工心肺などのコーティング材として用いられている。我々はこれまで、PMEA が抗血栓性を発現する具体的なメカニズムの解明を目指した研究を進めてきており、抗血栓性を発現する材料に共通して観測される”中間水”が抗血栓性発現において重要な役割を果たしていることを報告してきた。中間水は、示差走査熱量計 (DSC) 測定や赤外分光分析、固体 NMR 測定において観測されており、高分子と相互作用する水の中で中程度の分子運動性を有する水であることがわかっている。本研究では、PMEA の側鎖導入間隔を変更した新規 PMEА 類似体を合成・解析することにより、側鎖導入間隔の変更が水和構造と抗血栓性に与える影響を評価した。

【実験】側鎖導入間隔を 4, 5, 7, 8 炭素とした新規 PMEА 類似体の合成・解析を行った。側鎖導入間隔の制御は、regio 選択的開環メタセシス重合 (ROMP) により行った。まず、それぞれの側鎖導入間隔に対応した環状オレフィンモノマーを合成し、ROMP によりポリマーを合成し、残存した主鎖二重結合を水素添加反応により還元することで合成した。得られた類似体について DSC 測定による水和構造解析、接触角測定による表面親水性の変化、タンパク質吸着試験と血小板粘着試験による抗血栓性評価を行った。

【結果と考察】得られた新規 PMEА 類似体について NMR や GPC による解析を行い、側鎖導入間隔が制御された目的的高分子が合成できたことを確認した。側鎖導入間隔を 5 炭素とした類似体は PMEА と比較して中間水が著しく増加しており、優れた抗血栓性を示した。このことから、中間水の発現に適した側鎖導入間隔が存在する可能性が示された。側鎖導入間隔を拡大した類似体は、血液と接触した際に表面に吸着するタンパク質の量が非常に多いことが明らかとなった。このことから、側鎖導入間隔を制御することで、PMEA の抗血栓性を保持しながら、かつ細胞の足場となる吸着タンパク質の量を変化させることができ、抗血栓性と細胞接着性の両立を達成することができる可能性が示された。側鎖導入間隔の変更による抗血栓性の変化を考察するために、表面の解析を行った結果、表面親水性が空気界面と水界面とで大きく変化し、変化に要する時間も変化することが明らかとなり、側鎖導入間隔の変更が表面物性に大きな影響を与えることが示唆された。

2D-07- I

ポリマー濃縮層が提供する動的界面による血小板接着抑制の効果

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科

○青木隆史 (Aoki Takashi), 野神寛太

【緒言】 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer や poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)は、優れた生体適合性を示し、また、polyethylene glycol や poly(2-hydroxyethyl methacrylate) などの親水性ポリマーのブラシ型表面においても、血液成分に対する著しい repelling 効果が報告されている。これらの全てのポリマーは水和力を持ち、その一方でポリマー鎖が高濃度に界面に存在するという共通点がある。われわれは、水溶性ポリマーの中で、水和力を保持しながらも、ポリマー鎖間に疎水性凝集を生起し、液-液相分離状態となるポリマー濃縮層 (コアセルベート) に着目している。この固体沈殿ではない液-液相分離状態が、血液成分との相互作用を弱める役割を果たしていると考え、血小板の接着挙動について検討してきた。ポリマー濃縮層を形成するポリマーとして、汎用性の2種類のモノマー、*N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm)と *n*-butyl methacrylate (BMA) とからなる共重合体(PDB)を合成し、血小板接着の抑制効果について議論する。

【実験】 共重合体中の BMA 組成が 8 から 88 mol% の PDB 共重合体をフリーラジカル重合で合成した。PET 基板に PDB 共重合体を化学修飾した。37 °C に保温した水中で気泡と基板とのなす角度から、修飾基板表面の接触角を求めた。成人男性の血液より調製した多血小板血漿 (PRP) をポリマー修飾基板に添加し、37 °C で 30 分間静置後、血小板の接着数と形態変化を走査型電子顕微鏡 (SEM) より観察した。

【結果と考察】 BMA 組成が 34 mol%以上の PDB は水に不溶であり、PDB-8 と 17 は、それぞれ 53 と 20 °C で液-液相分離状態となった。PET 基板に化学修飾した PDB 共重合体の親疎水性度を、37 °C の水中での気泡と基板とのなす角度から評価した。PDB-17 修飾基板表面は、水に不溶の PDB-34 や 68 の基板表面とほぼ同じ接触角を示した。PDB-17 が 37 °C でポリマー濃縮層を形成し、その表面が疎水性を示したと考えられる。しかし、血小板の接着数を SEM から計測すると、PDB-17 修飾基板上で血小板の接着数をもっとも低い値を示した。ポリマー濃縮層を形成して、水和状態を維持したポリマーが高濃度に集合した動的界面を作り、これが PRP と相分離し、血小板の接着を抑制したと考えられる。

2D-08- I

Effects of phosphorylcholine-based polymer coating thickness on silicones

¹ 東京大学工学系研究科, ² 東京大学大学院医学系研究科

○葉 シュイン¹ (Yeh Shuyun), 肥後圭哉², 原伸太郎², 磯山 隆², 阿部裕輔², 久代京一郎¹, 高井まどか¹

【緒言】 Silicones-based biomaterials induce blood clotting, and typical surface treatments only last for a limited time on silicone surfaces due to hydrophobic recovery. However, the newly developed crosslinking-type polymer composed of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), 3-(methacryloyloxy) propyltris (trimethylsiloxy) silane (MPTSSi), and 3-methacryloxypropyl-trimethoxysilane (MPTMSi) could stably coat silicone (Sylgard 184) for up to 12 weeks. In this study, silicone tubes used for artificial blood vessels (KE1310ST) were modified by this crosslinking-type MPC copolymer (cross-MPC), and evaluated through *in vivo* and *in vitro* experiments.

【実験】 Cross-MPC coating was applied to KE1310ST artificial blood vessel treated by oxygen plasma for 2 mins and coated by 0.1 wt% polymer solution, and implanted into a goat. To compare the effect of cross-MPC coatings with different thicknesses, Sylgard 184 and KE1310ST silicone substrates were treated by oxygen plasma for 2 or 20 mins and coated by 0.01, 0.1 or 1 wt% polymer solutions. Protein adsorption was evaluated using micro BCA protein assay with 4.5 mg/mL bovine serum albumin (BSA). Also, platelet adhesion was tested using platelet-rich plasma (PRP).

【結果と考察】 Blood clotting was found in polymer-coated KE1310ST tubes used as artificial blood vessels in goats, so surface evaluations (thickness, uniformity, protein adsorption, platelet adhesion) for KE1310ST were performed by varying the thickness of coating. The results showed that albumin adsorbed more on thinner cross-MPC-coated silicone substrates than the thicker ones, and the platelets were also found to be less activated on the thicker polymer-coated silicone substrates. This study suggested that the cause of blood clotting might be the thickness of coating, and the relationship of polymer film thickness to anti-blood-clotting function was identified. The findings will be useful in providing anti-coagulation functions to various silicone-based materials used in cardiovascular devices.

2D-09-III

PMPC グラフト PEEK 心臓弁の短期 *in vivo* 評価

¹ 国立循環器病研究センター研究所生体医工学部, ² 東京大学大学院工学研究科

○神戸裕介¹ (Kambe Yusuke), 馬原 淳¹, 深澤今日子², 劉 懿華¹, 石原一彦², 山岡哲二¹

【緒言】弁膜症に対する外科的治療法の一つに人工弁置換術が挙げられる。二種類の人工弁（生体弁、機械弁）の内、機械弁は耐久性の面で優れているものの、移植を受けた患者は抗血液凝固剤を生涯に渡り服用する必要があり、QOLの低下が問題となる。そこで、我々は抗血栓性高分子による抗凝固剤フリー・服用量削減型の機械弁の開発に取り組んでいる。

ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) は、インプラント用金属に置き換わる高強度素材として着目されている。また近年では、紫外線照射によって PEEK 表面に発生したケチルラジカルが、雰囲気中存在するモノマーの PEEK 表面へのグラフト重合反応を開始し得ることが報告されている (ACS Appl Mater Interfaces 2009;1:537)。本研究では、二葉弁形状とした PEEK にポリ 2-メトクロイルオキシエチルホスホコリン (PMPC) をグラフトし、その機能や抗血栓性の *in vivo* 評価を行った。

【実験】二葉弁形状に切削加工した PEEK を 0.5 M の MPC モノマー水溶液 (4 M NaCl 含有) に浸漬し、60°C で 30 分間、27 mW/cm² の紫外線を照射することで PEEK 表面に PMPC をグラフトした (Acta Biomater 2016;40:38)。

ヘパリンの血中投与の下、ゲッチングミニブタ (雄、19-28 kg) の大動脈弁を PEEK-*g*-PMPC 弁で置換した。そして、ヘパリンを中和した状態で、短期 (<26 時間) 評価を行った (n=4)。なお、比較対照群として、未処理の PEEK 弁を移植した (n=2)。

【結果と考察】PEEK 群の 2 頭、PEEK-*g*-PMPC 群の 1 頭は、それぞれヘパリン中和後 2、10、1.5 時間で心機能の低下が認められたため、その時点で弁を回収した。一方、PEEK-*g*-PMPC 群の残り 3 頭では、ヘパリン中和後 13、24、26 時間で弁を回収した。なお、これらの 3 頭では、回収時点でも心臓は正常に拍動しており、移植した弁を介した圧較差は、9-24 mmHg と正常値を示した。回収した弁表面の SEM 観察の結果、PEEK 弁表面には線維性物質と血球が複合体を形成した付着物が見られたものの、PEEK-*g*-PMPC 弁表面には線維性の付着物のみが見られた。これより、PMPC グラフトによる PEEK 弁の抗血栓性の向上が確認できた。

2D-10-II

回転浮遊培養を用いた 3 次元組織塊の構築と自動スクリーニングシステムへの応用

¹ 大阪大学大学院工学研究科, ² 株式会社ジェイテックコーポレーション

○植村寿公^{1,2} (Uemura Toshimasa), 上村 葉², 楠本憲司², 桜井靖久², 小野貴弘², 森田健一², 津村尚史²

【緒言】肝臓の代謝毒性は、薬剤開発における臨床試験中止、発売後に生じた有害事象による販売中止などの大きな要因になっている。肝臓だけでなく、3次元組織を用いたスクリーニングシステムの構築が切望されるが、様々な困難な問題が存在する。我々は、種々困難を解決すべく、プロトタイプとしての3次元自動スクリーニング装置の開発を行ったので紹介する。3次元肝臓細胞や癌組織は回転浮遊培養法 (Cell Float System) を用いて多数構築することに成功している。回転浮遊培養では、円筒形又の培養ベッセルを、その軸方向を水平にセットし、軸回りにベッセルを回転する。ベッセル内にある細胞、組織は、重力により沈もうとする力と、ベッセルの回転に伴う培養液の流れによって浮き上がろうとする力を受け、力のバランスにより、ふかふかと浮遊した状態で、細胞、組織は生育する。

【実験】3次元組織は HepG2 細胞、HUVEC 細胞、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSCs) の混合培養系を用いて、癌組織は MG63 細胞を用いて、コラーゲンスポンジ担体 (数ミリ) に播種、3次元培養することにより構築した。肝臓組織では、Troglitazone, Acetaminophen などに対する毒性試験を行った。スクリーニングシステムとしては、3次元培養、細胞組織を物理的に捉えウエルプレートに分配するためのピックアップ装置、薬剤投与のためのシステム、ウエルの各々にビーズを入れ組織を振とうにより粉砕するシステム、遠心により必要な上澄みを採用するシステムを用いた連続動作のできるシステムを構築した。通常の自動化装置に加え、ピックアップシステムと粉砕システムを新たに開発し、全システムに組み込んだ。最後に、手培養と自動スクリーニング装置との比較を行った。

【結果と考察】HepG2/HUVEC/hMSCs 混合培養系では、2次元培養より3次元培養により構築した組織の方が Troglitazone, Acetaminophen とともに毒性物質に対して感受性が有意に高いことが分かった。MG63 組織を用いた抗がん剤 Doxorubicin に対する増殖率の検討を自動システムと手培養で比較した結果、両者に差は見られず、自動培養システムの有効性が示された。3次元スクリーニング用に新たに開発した、ピックアップシステム、粉砕システムは今後、種々の用途に有効であると期待される。

2D-11-II

多糖類ナノファイバー分散培地を用いた間葉系幹細胞の品質保持培養

¹九州大学工学府, ²九州大学先端物質化学研究所, ³日産化学工業

○席谷 翠¹ (Toratani Midori), 辻ゆきえ², 林 寿人³, 岩間武久³, 堀川雅人³, 木戸秋悟²

【緒言】近年、間葉系幹細胞(MSC)の細胞性医薬品としての応用が加速する一方、培養環境条件に起因する細胞老化・劣化や望まぬ系統偏向などの問題があり、その品質保持を保証する培養基材・技術の開発が求められている。この課題に対し我々は最近、多糖類微結晶のナノファイバー固相を分散させた培養液が MSC の休眠状態を維持した浮遊三次元培養に適することを見出している。本研究では多糖類分散培養による MSC の品質保持評価、及び分散培養後の休眠状態の持続特性と幹細胞性の評価を目的とする。

【実験】多糖類試料には、市販の微結晶セルロースを純水に分散し、高圧粉碎処理を行ってナノファイバー化したもの(CNF)を用いた。1・2・4週間培養中MSCの状態を確かめるためにEdU/PIによる二重染色を施し、フローサイトメーターにより細胞周期評価を行った。また、3週間培養後MSCから抽出したRNAサンプルについてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析、及びReal-time PCR解析を行った。更に本系で培養後のMSCについてその品質を評価するため、ナノファイバーから回収した後の細胞について骨・軟骨・脂肪の3方向への分化能評価、及びMTT法による細胞増殖活性評価を行なった。

【結果と考察】まず、1・2・4週間培養中のMSCについて細胞周期評価を行った。各期間いずれにおいても、PI染色では3日間に渡って2倍体、4倍体の細胞数に変化はなく、EdUの取り込みも見られなかった。以上より、本培養系においてMSCは大多数がG0期となり、一部がG2期からM期中後期の間、おそらくはG2/Mチェックポイントを越えずに細胞分裂前の状態で止まった休眠状態であると考えられる。次に、DNAマイクロアレイ解析を行い培養前後での遺伝子発現の変化を評価した。CNF分散培養MSCは細胞接着性皿培養MSCと比較して2239遺伝子で2倍以上の発現差が見られた。また、CNF培養後のMSCに対し骨・軟骨・脂肪への分化誘導を行ったところ、三方向いずれについても分化が確認された。更に、CNF培養より回収し平面培養に移したMSCについてMTT法による増殖活性評価を行なったところ、平面培養期間においても増殖活性の低下が一定期間持続した。今回は、この休眠培養の持続および休眠状態の解除の挙動について報告する。

2D-12-II

膜透過性ペプチド結合PEG脂質による細胞接着誘導：3次元組織構築を目指した細胞接着剤

¹東京大学大学院工学研究科バイオエンジニアリング専攻, ²ウプサラ大学ルドベック研究所

○寺村裕治^{1,2} (Teramura Yuji), Bo Nilsson²

【緒言】

再生医療の目的は、幹細胞から分化誘導して得られた細胞を利用して、3次元状の組織や臓器を作成し、患者の体内へ移植することである。しかし、我々の組織や臓器は複雑な構造をしているため、分化誘導により作成した機能性細胞を組織や臓器のように3次元状に配列することが容易ではない。本研究では、細胞接着を誘導できる表面修飾剤の作成を目指し、ポリエチレングリコール結合脂質(PEG脂質)の末端に様々なペプチドを導入した。膜透過性ペプチド(CPP)を含むカチオン性の短鎖ペプチドをPEG脂質末端に導入し、PEG鎖長を変化させ、細胞の接着挙動を詳細に調べた。

【実験】

PEG鎖長の異なるMal-PEG脂質(1, 5, 20, 40kDa)を既報に従い合成した。また、CPPをMal-PEG脂質と反応させて、peptide-PEG脂質を合成した。ここでは、浮遊系細胞や接着細胞を使用した。これらの細胞に、peptide-PEG脂質(1mg/mL in PBS)を反応させ(30 min, RT)、PBSで洗浄後、培養ディッシュへ播種し、顕微鏡にて観察した。3次元状ポリスチレンファイバーは、エレクトロスピンニング法により作製した。CCRF-CEM、L929細胞あるいはヒト肝細胞をTat-PEG脂質(1mg/mL in PBS)により処理した後、ポリスチレン(PS)マイクロファイバー上へ播種し、15分間反応させた。培養液にて洗浄後、共焦点顕微鏡により細胞を観察した。細胞は、あらかじめ蛍光標識した

【結果と考察】

CPP-PEG脂質のPEG鎖分子量1kと5kでは、細胞の接着が見られなかったものの、分子量20kと40kでは、細胞の接着誘導がみられ、細胞の伸展に伴う強い細胞接着が観察された。3次元組織構築を目指し、PSマイクロファイバーからなる三次元足場材料に対する細胞接着を試みた。CCRF-CEM、L929細胞、ヒト肝細胞をCPP-PEG脂質で処理し、播種後、観察した。処理した細胞では、3次元構造のPSファイバーへ接着していることがわかり、細胞表面修飾の効果が見られた。また、固定化した肝細胞は機能を保持していることから、細胞毒性なく3次元組織状に細胞を配列できた。

2D-13-II

高分子プリンティング法による温度応答性パターン化表面作製と細胞接着/脱着挙動評価

¹東京理科大学大学院基礎工学研究科, ²東京女子医科大学先端生命医科学研究所

○利根川純一^{1,2} (Tonegawa Junichi), 中山正道², 豊島侑樹^{1,2}, 菊池明彦¹, 大和雅之², 岡野光夫²

【緒言】異種の高分子による表面へのパターン形成技術は細胞アレイや二次元細胞パターンニングにおいて重要である。従来のフォトリソグラフィ法を用いた多段階の反応による作製法では煩雑な操作が必要であった。そこで、本研究では簡便な作製法の確立を目的として、機能性ブロック共重合体を用いたスピニング法とマイクロコンタクトプリンティング (μ CP) 法との併用による簡便な温度応答性表面パターン化技術について検討した。

【実験】疎水性アンカーとして作用する poly(*n*-butyl methacrylate) (PBMA) と poly(*N*isopropylacrylamide) (PIPAAm) とのブロック共重合体の溶液をポリスチレン培養皿上にスピニングし温度応答性表面を作製した。次に、PBMA と poly(*N*-acryloylmorpholine) (PACMo) とのブロック共重合体の溶液に、特定のパターン形状をもつ polydimethylsiloxane スタンプを浸漬後、温度応答性表面に転写して温度応答性/親水性領域を有するパターン化表面を作製した。高分子転写前後の表面での静的接触角、タンパク吸着及びウシ血管内皮細胞 (BEC) の接着/脱着挙動について解析した。また、ストライプパターン表面 (幅/間隔: 50 μ m/50 μ m) 上で BEC と正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) の接着挙動を評価した。

【結果と考察】調製した表面の接触角および血清タンパクの吸着量は、37°Cにおいて高分子転写前後で 45.4°から 27.0°、35.5 μ g/cm²から 18.5 μ g/cm²に減少した。これは、温度応答性表面では PIPAAm の脱水和に伴う比較的疎水性表面であったのに対し、PBMA-*b*-PACMo 転写後は PACMo で表面被覆され、高い親水性を示したためと考えられた。また、37°Cにおいて高分子転写後の表面に対して BEC は接着しなかった。PACMo 表面では細胞接着タンパクの吸着が抑制されたためと推測された。良好な細胞接着性を示した PIPAAm 表面では、20°Cにおいて2時間で細胞脱着が完了した。これは PIPAAm 鎖の水和に伴う高分子の構造変化によるものだと考えられた。ストライプパターン表面では、BEC が7日後も細胞接着パターンを維持したのに対し、NHDF では3日目から高分子転写領域でも接着・増殖が確認され、7日後には表面全体で細胞配向を有した接着が確認された。以上より、 μ CP 法によって簡便に温度応答性パターン表面を作製することが可能であった。本手法は2次元細胞パターンニングと細胞群の回収技術へ応用が期待される。

2D-14-II

温度応答型生分解性インジェクタブルポリマーを用いた幹細胞デリバリー

¹関西大学化学生命工学部, ²大阪医科大学, ³関西大学 ORDIST, ⁴関西大学医工薬連携研究センター

○高井宏樹¹ (Takai Hiroki), 伊井正明², 能崎優太³, 葛谷明紀^{1,3,4}, 大矢裕一^{1,3,4}

【緒言】室温ではゾル状態で生体内に注入すると体温に感応してゲル化し、生体内で分解・代謝される温度応答型生分解性インジェクタブルポリマー(IP)は、体内蓄積性を示さずに薬物や細胞などを溶解・懸濁することができるため、組織再生用足場材料への応用が期待されている。我々はこれまでに、生分解性 IP としてカプロラクトン-グリコール酸共重合体 (PCGA) とポリエチレングリコール (PEG) から成るトリブロック共重合体 (PCGA-*b*-PEG-*b*-PCGA)を基盤として、それらの利便性向上などについて報告してきた¹⁾。特に最近では、体温に感応して物理架橋ゲルを形成したのちに共有結合ゲルへと移行し、体内で長期間ゲル状態を維持できるシステムを報告している²⁾。一方、脂肪由来幹細胞(AdSC)は入手が容易な幹細胞ソースとして注目されており、分泌される生理活性物質が抗炎症作用などを示すことが報告されている。本研究では、IP ゲル内に保持した AdSC からの生理活性物質の分泌などによる組織の修復・再生を目指して、IP 水溶液と AdSC を混合後ゲル化させた後の細胞増殖について調査した。さらに AdSc のゲル内での細胞生着のための足場としてゼラチンを IP ゲルに混合させた効果についても調査した。

【実験および結果と考察】培地を用いて調製したIP溶液にマウス由来AdSCを懸濁後、37°Cに加熱すると速やかにゲルを形成した。ゲル化後の細胞計数結果から、ゾル-ゲル転移が細胞の生死に影響を与えないことを確認した。さらに所定時間経過後の細胞を回収し、Live / Dead Assayにより細胞数を計数した。化学架橋を生じない物理架橋ゲルでは、ゲル状態を維持している2日目まで細胞数の増減は観察されず、ゾル化した後に増殖に転じる傾向が見られた。これに対し、化学架橋を形成するゲルでは1日経過後までに細胞数は約半数程度にまで減少するが、2日目以後には生細胞数が増加し、初期細胞数程度にまで回復するという結果が得られた。ゼラチンを添加した化学架橋ゲルでは、非添加の場合と比較して生細胞の割合が全体的に増加し、ゲル内での細胞の増殖傾向がより顕著に見られた。以上の結果から、IPゲル内においてAdSCを一定期間生存させた状態で保持させることが可能であるとわかった。

1) Y. Yoshida, Y. Ohya *et al.*, *Polym. J.*, **2014**, *46*, 632-635. 2) Y. Yoshida, Y. Ohya *et al.*, *Biomater.Sci.*, **2017**, *5*, 1304-1314.

2D-15-III

水酸アパタイト/コラーゲン-GPTMS 系骨ペーストの急性期における骨組織反応評価

¹ 明治大学大学院理工学研究科, ² 九州工業大学大学院工学研究院, ³ 物質・材料研究機構 バイオセラミックスグループ, ⁴ 茨城大学大学院理工学研究科

○佐藤 平¹ (Sato Taira), 城崎由紀², 大島 翔^{3,4}, 小山富久³, 相澤 守¹, 菊池正紀³

【緒言】

これまで、液成分にシランカップリング剤の (3-グリシドキシプロピル) トリメトキシシラン (GPTMS) 水溶液を用いた自己硬化型水酸アパタイト/コラーゲン骨類似ナノ複合体 (HAp/Col) ペーストが非崩壊性とブタ脛骨内での 3 ヶ月以内の骨置換性を示すことを明らかにしてきた。今回は、ラット脛骨内でのペーストの初期動態調査結果を報告する。

【実験】

HAp/Col 粉末は、同時滴下法により合成した HAp/Col を一軸加圧により脱水、凍結乾燥した後、粉碎して調製した。GPTMS 水溶液は 1.0 および 10 vol% に調製後 1 時間攪拌し、GPTMS の加水分解を進行させた。本実験における HAp/Col 粉末と GPTMS 水溶液の混練比はこれまでの結果で最適値であった 1.00 g/cm³ とした。埋入試験は、SD ラット (オス、8 週齢) の脛骨に作製した直径 2 mm の骨孔に、オンサイトで作製したペースト 5 mm³ を注入して行った。その後、移植から 1, 2, 3, 7 日目に周囲の骨組織ごとペーストを採取し、 μ -CT 像を撮影して試料の残存量を測定し、GPTMS の溶出挙動を確認するために周辺部を含めた Si の濃度をエネルギー分散型 X 線スペクトロスコピーで測定した。

【結果と考察】

μ -CT 測定の結果、ペースト残存量は GPTMS の濃度に依存せず、1 日目でおおよそ 3 mm³ まで減少した後、3 日目までは体積の減少は見られなかった。7 日目ではペーストが複数に分裂していたため、 μ -CT による体積測定は困難であったが、吸収の進行は進んでいると考えられた。埋入 1 日以内の吸収は、ペーストの GPTMS による硬化が十分に進行していない埋入最初期に、ペースト表面での HAp/Col 粒子が徐々に食細胞によって吸収されたものであると考えられる。その後、ペーストの硬化が進んだことで食細胞による吸収反応は抑制されたが、7 日目には従来の HAp/Col 緻密体に関する報告の通り、破骨細胞による分解が開始されたと考えられる。初期の GPTMS の溶出挙動については、当日報告する。

2D-16-I

ウサギ大腿骨へ埋植した炭酸アパタイト顆粒における骨置換率の評価

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座生体材料学分野

林幸孝朗, 土谷 享, 杉浦悠紀, ○石川邦夫 (Ishikawa Kunio)

【緒言】

我々は、生体骨の無機成分である炭酸アパタイト (CO₃Ap) に着目し、溶解析出型の相変換反応を応用することで、生体骨と同等以上の炭酸基を含む CO₃Ap 顆粒の開発に成功した。本発表では、ウサギ大腿骨および脛骨に作製した骨欠損へ CO₃Ap 顆粒を埋植した時の、新生骨の形成量および材料の吸収の推移を計測、評価した結果について報告する。

【実験】

日本白色種雄ウサギ (体重 2.5 kg 以上) の大腿骨及び脛骨に直径 5 mm、深さ 8 mm の穴を開け、被験物質、対照物質を埋植し、4 週、12 週及び 26 週で評価した。被験物質は CO₃Ap 顆粒 (GC)、対照物質はウシ骨顆粒 (Bio-Oss、Geistlich)、 β -リン酸三カルシウム (β -TCP) 顆粒 (Cerasorb M、Curasan AG) とした。埋植期間終了時に大腿骨及び脛骨を取り出し、レジン包埋した後に Villanueva Goldner 染色を行った。顕微鏡観察像をデジタル化し、Image J を用いて、1 視野あたりの新生骨面積率 (%) 及び残存埋植試料面積率 (%) をそれぞれ算出した。

【結果と考察】

新生骨面積率は、ウシ骨群 4 週 11.2 \pm 4.7%、12 週 15.6 \pm 4.2%、26 週 16.6 \pm 5.7%、 β -TCP 群 4 週 19.8 \pm 9.3%、12 週 21.7 \pm 6.0%、26 週 21.5 \pm 8.3% に対し、CO₃Ap 群においては、4 週で 14.7 \pm 3.3%、12 週で 13.8 \pm 3.0%、26 週で 18.1 \pm 5.4% であり、群間差および埋植期間による著差は認められなかった。残存埋植試料面積率は、ウシ骨群で 4 週 16.9 \pm 5.7%、12 週 23.5 \pm 7.1%、26 週 25.3 \pm 5.9% と経時的な減少傾向が認められなかったのに対し、 β -TCP 群では 4 週 23.4 \pm 6.4%、12 週 10.7 \pm 4.8%、26 週 1.7 \pm 0.8% と明らかに減少した。CO₃Ap 群は 4 週 29.1 \pm 6.7%、12 週 16.0 \pm 3.5%、26 週 7.2 \pm 3.1% と、なだらかな吸収が確認され、吸収期間は β -TCP 群よりも長かった。以上の結果から、CO₃Ap 顆粒は既存の製品と同等の骨形成能を示し、 β -TCP よりも緩やかな吸収を示すことが確認された。

2D-17-III

新しい人工骨、多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体の臨床使用

東京医科歯科大学整形外科学分野

○吉井俊貴 (Yoshii Toshitaka), 湯浅将人, 新井容嘉, 湯浅将人, 大川 淳, 早乙女進一

目的 ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合型多孔質人工骨(HA/Col) は自家骨類似の構造・組成を有し、骨伝導性に優れる。我々は、この新しい人工骨 HA/Col を開発し、材料の基礎的データや、動物実験における有用性を発表してきた。HA/Col は近年、本邦で認可され、臨床使用が可能となり、以前に我々は頸椎固定術における HA/Col 使用の有用性を報告している。本研究では、腰椎椎体間固定術における HA/Col の臨床使用を紹介し、その短期成績を報告する。

方法 腰椎固定術 40 例 43 椎間において、骨髄穿刺液を含浸させた HA/Col をポリエーテルエーテルケトン(PEEK)製ケージの中に充填し椎体間に移植、椎弓根スクリューを併用し固定を行った。術後 1 年以上経過観察し、臨床症状、画像評価を行った。画像評価はレントゲン機能撮影およびリコンストラクションCTにて骨形成、骨性架橋の評価を行った。

結果 術後 1 年で臨床症状は良好に改善した。レントゲン機能撮影にて 3°以上の椎間の動きを認めなかった。リコンストラクションCTでは、全椎間でケージ内に骨形成を認め、30 椎間 (69.8%) にて骨性架橋を認めた。手術後に HA/Col 人工骨移植に伴う有害事象は認めなかった。

考察 HA/Col はスポンジ状の弾力性を有しているため、複雑な形状をした部位においても、容易に補填することができる。脊椎椎体間の移植においても上下終板に密着した状態で移植することが可能であり、良好な骨組織の侵入が期待できる。術後 1 年の時点での骨性架橋は頸椎 (80%以上) にはやや劣るものの、椎体間距離の長い腰椎では癒合により時間を要する可能性が考えられた。今後は、より長期での骨癒合の評価を行っていく必要がある。

2D-18-III

生体分解性 WE43 マグネシウム合金の *in vivo*における長期検討

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎顔面外科学分野, ²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科顎口腔外科学分野

○押部成美¹ (Oshibe Narumi), 丸川恵理子², 原田浩之²

【緒言】 生体分解性マグネシウム合金は、1990 年頃から骨接合材や血管用ステントとしての応用に向け広く研究されてきた。特に WE43 合金は血管用ステントとして既に臨床応用されていることから、我々は骨接合材としても注目し、イヌ骨折モデルを用いて骨組織内で優れた生体安全性と機械的強度を有していることを報告した。しかし WE43 合金に関する骨組織内における長期経過後の Mg の生体内挙動は明らかではない。そこで本研究では、WE43 合金の *in vivo* における分解性および生体安全性を長期的 (12 か月) に検討し、さらに WE43 合金の表面処理による影響を評価した。

【実験】 合金表面を陽極酸化した WE43 合金を陽極酸化群、単純構造の WE43 合金を表面未処理群とし、φ0.3mm×10mm の材料を 14 頭の SD ラットの左右脛骨にそれぞれ移植した。術後 7 日、6 か月、12 か月の材料分解率を μ CT から放射線学的に算出し、生物学的反応を組織学的に評価した。また、水素ガスの発生ならびに移植材料の破損状況を評価した。

【結果と考察】 最終的な分解率 (中央値) は、陽極酸化群 25.8%、表面未処理群 36.3%となり、両群で比較的低い分解率を示した。表面未処理群に比較し陽極酸化群では、水素ガスの抑制ならびに早期消失が認められたが、表面未処理群でも 1 か月までには水素ガスの消失が認められた。また、どの評価時期においても材料分解率は陽極酸化群が有意に小さかった。すべてにおいて臨床的な合併症や組織学的な炎症反応はほとんど見られず、両群共に術後 6 か月、12 か月において移植材料周囲に良好な骨形成が認められた。これらの結果から骨組織内における WE43 合金は、長期的に優れた生体安全性と骨形成能を有していることがわかった。しかし、合金が完全分解するにはさらに長期間を要する可能性が示唆された。陽極酸化処理は初期の水素ガス抑制と急激な分解抑制に有効であるが、それゆえに長期的な分解速度はさらに遅延した。分解速度の遅延は移植材料の異物反応と関連しているため、理想的な生体分解性材料は組織修復後に完全に分解されることが望ましく、今後の課題と考えられた。

2D-19-III

Mg スメクタイト粉末の創傷治癒効果の検討

¹山形大学大学院理工学研究科, ²オリパステルモバイオマテリアル (株)

○山本 修¹ (Yamamoto Osamu), カジィ・グルサンアラシヤティ¹, 佐々木優^{1,2}

【緒言】深部創傷治療には臨床用創傷被覆剤が用いられ、創傷部位において湿潤環境を維持することによって細胞遊走を促すことで治癒することが知られている。しかし、十分な治癒効果が得られないことや被覆剤との癒着の問題があった。そのため、湿潤環境を維持し、良好な治癒効果と癒着低減の新規材料の開発が求められている。我々は、創傷治癒過程で重要となる新生血管の充進に寄与するケイ素イオンとI型コラーゲンの発現に寄与するマグネシウムイオンを放出する材料として、粘土鉱物である Mg スメクタイトを創傷治療に利用することを考えた。本研究では、Mg スメクタイト粉末の創傷治癒効果を検討したので、報告する。

【実験】Mg スメクタイト粉末は、ケイ酸ナトリウムと塩化マグネシウムを出発原料とした液相合成法により得た。得られた Mg スメクタイト粉末の結晶構造を X 線回折測定 (XRD) により同定し、粉末からのイオン放出量を結合誘導プラズマ質量分析 (ICP-MS) により求めた。実験動物を用いた皮膚創傷治癒効果は、山形大学動物実験委員会承認の下で行った。ラット腹側部に皮膚全層欠損を作成して Mg スメクタイト粉末を塗布し、1~2 週後に採取した再生皮膚の組織観察により治癒効果の検討を行った。

【結果と考察】XRD より、合成した粉末は Mg スメクタイトであることがわかった。ICP-MS の結果から、粉末からのイオン溶出量はマグネシウムイオンが 1 日目に最大値を示し、その後徐々に溶出量の減少が見られた。一方、ケイ素イオンは持続的に放出していることがわかった。2 週後の組織において、Control 群は創縁および創傷部で血管新生が見られたが、スメクタイト群では創縁および創傷部で新生血管数の減少と上皮化が認められた。そこで、再生皮膚組織に形成された血管数比較した。1 週間において、スメクタイト群は有意な血管新生の増大が認められ、2 週間ではスメクタイト群における有意な血管数の減少が認められた。創傷治癒過程では、新生血管の数は治癒の進行に伴い、減少することが知られていることが知られている。スメクタイト群における血管新生の有意な増大と減少は組織再生の促進を表しており、Mg スメクタイト粉末は、創傷に対して高い治癒効果を持つことが示唆された。

2D-20-III

シモンコライトの創傷適用による皮膚再生

¹山形大学大学院理工学研究科, ²JFE ミネラル株式会社

○永島美希¹ (Nagashima Miki), 中田圭美², 宇田川悦郎², 山本 修¹

【緒言】創傷治癒過程は様々な酵素により制御され、酵素の発現によって進行する。創傷部で発現する酵素の 1 つに亜鉛依存性マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)がある。この酵素は活性部位に Zn²⁺イオンを持ち、細胞外マトリックスや血管基底膜のコラーゲンを分解し、細胞遊走を促進させる。そのため、創傷部に Zn²⁺イオンを導入することで、創傷治癒は充進すると推定される。そこで、本研究では Zn²⁺イオンの溶出が期待できる材料としてシモンコライトに注目した。本研究の目的は、シモンコライト粉末を創傷部に適用した際の創傷治癒過程を検討することである。

【実験】塩化アンモニウム水溶液と塩化亜鉛水溶液を原料とし、粉末 Zn₅(OH)₈Cl₂・5H₂O (シモンコライト; ZC) を作製した。作製した粉末をセラミックボールミルで 75 時間粉碎し、シモンコライト微粉末(MZC)を得た。粉末特性評価として X 線回折装置、pH 測定及び誘導結合プラズマ発光分光分析(ICP-AES)装置を用いた。山形大学動物実験委員会の承認の下、ラットの腹側部に皮下組織に至る創傷を作成した。右腹側部を control 群とし、医療用創傷被覆材のみ適用した。左腹側部を sample 群とし、シモンコライト粉末 0.005 g を塗布後、創傷被覆材を適用した。1、2 及び 4 週間後、創傷部における新生血管数の計測、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色及びマッソントリクローム(MT)染色による組織評価を行った。

【結果と考察】X 線回折パターンによりいずれの粉末も Zn₅(OH)₈Cl₂・5H₂O と同定された。しかし、MZC では相対強度の減少が認められたので、結晶性が低下したと予想される。各試料の pH 値は、角化細胞及び線維芽細胞増殖における至適 pH の範囲内であった。また、ボールミル粉碎による Zn²⁺イオン溶出量の増加が認められたが、細胞増殖を阻害しない Zn²⁺イオン溶出量である 500 μmol/L 以下であった。新生血管数の計測結果から、1 週間後の組織はいずれの試料においても炎症期~増殖期、2 週間後では control 及び ZC は炎症期~増殖期、MZC は増殖期~成熟期に相当した。HE 及び MT 染色による組織評価は、1、2 及び 4 週間後に観察された細胞種に違いはなかったが、MZC ではコラーゲン形成が充進していた。さらに 4 週間後の MZC では、創傷部において毛包の再生が観察された。これは MZC が自家組織と類似組織であることを示している。したがって、MZC は新規創傷治療材料として有効であると示唆される。

2D-21-III

ハイドロジンカイト粉末による深部皮膚創傷の治癒

¹山形大学大学院理工学研究科, ²JFE ミネラル株式会社

○中山賢典¹ (Nakayama Masanori), 佐々木優¹, 中田圭美², 宇田川悦郎², 山本 修¹

【緒言】皮膚の癒痕組織は正常皮膚組織と内部構造が異なり、体温調節機能や審美性の低下につながる。先行研究において Zn^{2+} イオン、 Si^{4+} イオンによる創傷治癒効果が報告されているが、 Zn^{2+} イオンのみの創傷治癒効果、最適な Zn^{2+} イオン濃度は検討されていない。本研究では Zn^{2+} イオンのみを創傷部位に供給し、合成条件によって Zn^{2+} イオン溶出量および pH 値が制御できるハイドロジンカイトを用いた皮膚創傷治癒効果の検討と創傷治癒に適した合成条件の確立を行った。

【実験】炭酸水素ナトリウム(Na)水溶液中に、硝酸亜鉛(ZN)もしくは硫酸亜鉛(ZS)水溶液を滴下し、中和反応によって粉末試料を合成した。合成した粉末は粉末 X 線回折測定(XRD)により結晶構造の同定をした。 Zn^{2+} イオン溶出量と pH 測定は粉末スラリー液を用いて測定した。山形大学動物実験委員会承認の下、粉末試料の創傷治癒効果を検討した。麻酔下のラットの両腹側部に皮下組織に至る創傷を作成し、右腹側部を Control 群として創傷被覆材を適用し、左腹側部には 0.005 g の粉末試料を塗布した後に創傷被覆材を適用した。2 週間経過後、創傷部位の組織学的観察と血管数計測を行った。

【結果と考察】合成した粉末試料のサンプル名は(亜鉛源-炭酸源-合成時の pH)とし、ZN-Na-7、ZN-Na-9、ZS-Na-6.5、ZS-Na-7、ZS-Na-9 を実験に使用する試料とした。これら粉末試料の XRD 回折パターンは ZS-Na-6.5 のみブライアンヤングイトと同定され、他の粉末試料はハイドロジンカイトと同定された。 Zn^{2+} イオン溶出量測定の結果、ハイドロジンカイト粉末から Zn^{2+} イオンの溶出が認められた。粉末スラリーの pH は、pH 6.99 から pH 8.19 の範囲であった。2 週間経過後のヘマトキシリン・エオシン染色の結果、ZN-Na-9 を塗布した創傷部には、Control や他の粉末で観察されなかったリンパ球による炎症性細胞の浸潤が見出された。この理由は、ZN-Na-9 を塗布したことで創傷部位の pH 値が生体内の至適な pH 値からはずれてしまったためであると考えられる。マッソントリクローム染色を行った切片を観察したところ、ZS-Na-7 を塗布した創傷部位では正常皮膚に類似したコラーゲン線維を観察した。Lansdown らは線維芽細胞増殖を阻害しない範囲の Zn^{2+} イオン量を 500 $\mu\text{mol/L}$ 以下であると報告している。従って Zn^{2+} イオン量が 500 $\mu\text{mol/L}$ の範囲で最大イオン量を示した ZS-Na-7 が好適材料であると考えられる。

2E-01-I

培養基材の UV/ozone 表面改質を用いたヒト iPS 細胞培養における接着基質コート量の低減

¹慶應義塾大学理工学部機械工学科, ²慶應義塾大学医学部循環器内科学教室, ³慶應義塾大学大学院理工学研究科

○宮田昌悟¹ (Miyata Shogo), 遠山周吾², 笠井浩平³, 藤田 淳², 福田恵一²

【緒言】

ヒト iPS 細胞の培養においては、多能性を維持しながら細胞を増殖させるために培養基材に matrigel や laminin などの接着基質をコートすることが一般的である。接着基質は高価であるため、ヒト iPS 細胞の大量培養における高コスト化の主要因の一つとなっている。

そこで本研究では、酸素で満たされた雰囲気下において紫外線(UV)光をポリスチレン製培養基材に照射することで表面性状を改質し、細胞接着・増殖性を向上させることを目的とした。具体的には、表面改質を施したポリスチレン基材上でヒト iPS 細胞を培養し、接着基質のコート量の低減に与える効果を調査した。

【実験】

UV/ozone 表面改質を施したポリスチレン製培養基材に matrigel, laminin511 を通常量の 0.2~0.5 倍濃度でコート後に、ヒト iPS 細胞を培養して細胞の増殖性および多能性を評価した。増殖性については基材への細胞播種 5 日後の未分化形態の細胞数を定量することで評価し、未分化形態の維持については未分化マーカーを用いた免疫染色により評価した。

【結果と考察】

表面改質を施すことで、接着基質のコート量を低減しても細胞接着性および増殖性は維持された。また、未分化マーカーである Oct3/4、Nanog に代表される未分化マーカーを用いた免疫染色に対しても、通常の濃度で接着基質を施した培養基材上で培養した iPS 細胞と同様の染色性を呈した。以上より、培養基材に対して UV/ozone 表面改質を施すことで、接着基質量を低減した環境でも多能性を維持しながらヒト iPS 細胞の増殖培養が可能であることが示された。

2E-02-II

ゾルゲル転移および自己組織化を生起する細胞内包可能なブロック共重合体の開発

¹ 東京大学大学院工学系研究科, ² 物質材料機構

○秋元 文¹ (Akimoto Mizutani Aya), 高橋こと美¹, 玉手亮多¹, 上木岳士², 吉田 亮¹

【緒言】

複雑な生体組織構造を *in vitro* で再構築するためには、複数種類の細胞を秩序高く配置する手法、細胞のみから成る (Scaffold を含まない) 再生組織の調製法が必須であり、これらの手法は細胞毒性、炎症惹起、感染症等の観点から安全で、ロット間誤差の小さい均一な結果を生み出す必要がある。本研究では、これらを満たす方法論の確立を目指し、精密分子設計技術を戦略として細胞の内包が可能な機能性合成ハイドロゲルの開発を行った。具体的には、可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により温度応答性部位、親水性部位、一対の分子認識部位を含む 2 種類のブロック共重合体を合成し、温度変化に応答した可逆的ゾルゲル転移およびゲル界面を介した特異的分子認識によるバルクゲル間接着の機能性を付与した。本システムは、細胞あるいはスフェロイドを容易にゲル内に内包させること、および内包後のゲル同士を特異的に接着させることが可能であり、さらに任意の時間にゲル成分をゾル化させることもできる。

【実験】

二段階の RAFT 重合により、両末端に温度応答性部位、中央部に親水性部位を有する ABA 型トリブロック共重合体を合成した。続いて親水性部位中にフェニルボロン酸(PBA)またはカテコール基の修飾を行った。作製した 2 種類の高分子を細胞培養液(DMEM)に溶解して 20 wt% 溶液を調製し、レオロジー測定による粘弾性特性の評価、生理条件下でのゲル間接着試験を実施した。また、HeLa 細胞を 2 種類の物理ゲル内に三次元的に内包し、ゲル間接着を起こした後にゲルをゾル化させて細胞を取り出し、回収した細胞を細胞培養ディッシュ(TCPS)に播種して接着挙動を確認した。

【結果と考察】

2 種類のトリブロック共重合体の 20 wt% DMEM 溶液はいずれも約 25 °C にゲル化温度を持ち、37 °C で 3kPa 程度の強固なゲルを形成した。異種官能基を有する 2 種類の物理ゲルを DMEM 中で接触させたところ、分子認識に起因するゲル間接着に成功した。ゲルに内包後、回収した HeLa 細胞は、播種 1 日後に通常通り TCPS に接着することが確認された。

2E-03-II

磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子を用いたオートファゴソームの磁気分離

¹ 北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系, ² 東京大学大学院薬学系研究科, ³ 大阪大学大学院医学系研究科, ⁴ 金沢大学医薬保健研究域医学系, ⁵ 金沢医科大学産科婦人科

○高橋麻里¹ (Takahashi Mari), プリヤンク モハン¹, 向井康治朗², 武田裕一³, 松本多圭夫⁴, 松村和明¹, 高倉正博⁵, 新井洋由², 田口友彦², 前之園信也¹

【緒言】

オートファジーとは細胞の恒常性維持の為に、タンパク質やオルガネラを分解し再利用する機構である。ガンや神経変性疾患などとも密接に関わることが知られているが、オートファジーに関与するタンパク質の包括的な理解は未だ十分ではない。オートファゴソーム (AP) に存在するタンパク質を解析するためには、細胞から AP を分離することが直接的な方法で望ましいが、既存の AP 分離法では遠心分離が利用されており、煩雑かつ長時間・超高速の工程が必要であった。そこで本研究では、短時間で簡便に行える磁気分離法に注目し、磁気分離能とイメージング能を併せ持つ磁性-プラズモンハイブリッドナノ粒子を用いた AP の磁気分離を試みた。

【実験】

Ag@FeCo@Ag コア@シェル@シェル型ナノ粒子を化学合成し、ポリ-L リジンで粒子表面の配位子交換を行い、水分散ナノ粒子 (NPs) を作製した。NPs を COS-1 細胞へリポフェクションし、異なる培養時間における細胞内での NPs と初期エンドソーム又は AP との共局在を共焦点顕微鏡で追跡した。また NPs をリポフェクションしてから一定時間培養後に、細胞膜を破碎し、自動細胞磁気分離装置 (Miltenyi Biotec) に供して磁気分離分画を得た。その後、磁気分離分画と細胞破碎液に含まれるオルガネラ特有のマーカータンパク質の有無をウェスタンブロット (WB) で確認した。

【結果と考察】

共焦点顕微鏡、電子顕微鏡、WB の結果から、NPs の局在は時間経過とともに、初期エンドソームから AP、最後はオートリソソームへと変化することが明らかとなった。また、AP の膜結合型 LC3-II タンパク質が磁気分離分画において顕著に濃縮されていたことから、AP の磁気分離が成功したことが示された。

2E-04- II

未分化間葉系細胞とリン酸オクタカルシウムによる三次元複合組織体の構築

¹東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野, ²東北大学大学院歯学研究科口腔システム補綴学分野, ³東北大学大学院歯学イノベーションリエゾンセンター

○佐藤智哉^{1,2} (Sato Tomoya), 穴田貴久¹, 塩飽由香利^{1,3}, 土屋香織¹, 佐々木啓一², 鈴木 治¹

【緒言】再生医療において移植を目的とした三次元培養が注目を集めている。スフェロイド（球状細胞凝集塊）は、細胞密度・細胞間相互作用が高く、生体内環境に近い状態で細胞を培養することができる。近年では、共培養や材料との複合化によりスフェロイド自体の活性を向上させる試みが行われている。我々は酸素透過性スフェロイド培養器（Oxy chip）を開発し、これを用いることで間葉系幹細胞（MSC）とリン酸オクタカルシウム（OCP）の三次元複合組織体形成が可能であること、またOCPとの複合化によってMSCの骨芽細胞分化を促進できる可能性を示した（Anada T et al. Biomaterials 2012; Regen Therapy 2016）。OCPはハイドロキシアパタイトの前駆体と考えられており、優れた骨再生能を有している（Suzuki O et al. Tohoku J Exp Med 1991; Biomaterials 2006）。本研究では、MSCの骨芽細胞分化を促進する最適な条件と、生体への移植を想定した大きな組織体形成の可能性について検討を行った。【実験】マウス胚由来未分化間葉系細胞であるC3H/10T1/2細胞とOCPの混合比を変えてOxy chipに播種した。スフェロイド直径の経時的変化、アルカリフォスファターゼ（ALP）酵素活性、リアルタイムPCR法による骨分化マーカーの測定を行った。またこれらのスフェロイドを一定期間培養後に回収し、新たに製作した酸素供給型移植用デバイスに播種し直すことでミリサイズの複合組織体を作製した。形態の経時的変化およびALP酵素活性を測定し、生体への移植を想定した操作性の検討を行った。【結果と考察】スフェロイド培養におけるALP酵素活性および骨分化マーカーの検討から、OCPの混合比率を変化させると混合するOCPの量に応じて骨芽細胞への分化が促進した。また、Oxy chipで作製したスフェロイドを移植用デバイスに播種することで、ミリサイズの複合組織体を容易に形成できることが示された。さらに、これらの組織体はピンセット等を用いて一塊として取り扱うことができ、良好な操作性を有することが示された。

2E-05- II

破骨細胞を起点とした骨基質配向性制御機構

大阪大学大学院工学研究科

○小笹良輔 (Ozasa Ryosuke), 松垣あいら, 中野貴由

【緒言】骨が有する特徴的な異方性微細構造は、複雑な骨系細胞間ネットワークにより構築・制御されるものの、その分子レベルでの制御メカニズムは未解明である。我々はこれまでに、造血幹細胞を起源とする破骨細胞分化系譜は種々のサイトカイン・転写因子等によりその分化・成熟化・活性化過程が制御され、遺伝子変異により活性化破骨細胞を欠損したマウスにおいては野生型と比較して顕著な骨配向性低下を示すことを明らかにしてきた。本研究では、分化段階の異なる破骨細胞との相互作用に着目し、破骨細胞の成熟化、活性化が骨芽細胞配列化に与える影響について、破骨細胞由来の液性因子を同定することにより遺伝子レベルから骨系細胞間相互作用による骨配向性制御機構解明を目指した。

【実験】野生型および遺伝子欠損マウス頭蓋冠より初代骨芽細胞を抽出した。破骨細胞分化は脾臓由来の破骨細胞前駆細胞をM-CSF・RANKL刺激により分化制御を行った。得られた破骨細胞はメンブレンを介して、コラーゲン分子配列を人工的に制御した配向化コラーゲン基板上的骨芽細胞と共培養し、骨芽細胞配列度を定量解析した。さらにtotal RNA抽出後、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析、real time RT-PCR、ELISAによる定量解析から、骨芽細胞配列制御因子の同定を行った。2群間、多群間における有意差検定は、Student's t-test、One-way ANOVAを用いてそれぞれ行った。

【結果と考察】骨芽細胞—破骨細胞共培養系において、活性化破骨細胞の存在下で、骨芽細胞は有意に高い配向度を示した。分化段階の異なる破骨細胞由来の液性因子に着目することで骨芽細胞配列化の制御因子を特定し、骨芽細胞配列、ならびに骨基質配向性の制御に成功した。以上より、骨配向化には破骨細胞との相互作用を介した骨芽細胞配列化が必須であり、破骨細胞により産生され、骨配向化を制御する可溶性因子の存在が初めて明らかとなった。

2E-06-Ⅱ

ファイバーを用いた選択的な細胞捕捉のためのカチオン性ペプチド設計の検討

¹東京大学大学院工学系研究科, ²群馬県繊維工業試験場, ³(株) 梁瀬産業社

○吉原彬文¹ (Yoshihara Akifumi), 寺村裕治¹, 近藤康人², 須永芳幸³, 高井まどか¹

【緒言】

血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cell, CTC) は、癌診断におけるバイオマーカーとして近年注目を集めている。しかしながら、血中の CTC は希少細胞であるため、検出感度とハイスループット性の両立が重要である。そこで本研究では、細胞捕捉率向上のため、基板として3次元構造を有するポリスチレンファイバーを用い、固定化抗体の増加を目指してポリスチレン結合ペプチドの配列を検討した。

【実験】

24 量体の PEG を含み、活性エステル及びマレイミド基を有する二官能性架橋剤と、抗 EpCAM 抗体を反応させた。その後、ポリスチレンに対して高い吸着能を持つカチオン性配列を含むペプチドを反応させ、スピニングにより精製した。酸素プラズマ処理を施したポリスチレン表面に対するペプチド及びペプチド結合抗体の固定化量を評価した。ポリスチレンに結合するペプチドとしては、ポリスチレンに対するアフィニティの高いポリスチレンタグ、及びカチオン性アミノ酸リッチな配列を用いた。また、エレクトロスピンニング法により作製したポリスチレンファイバー不織布にペプチド結合抗 EpCAM 抗体を固定化し、蛍光標識済みの EpCAM 発現細胞 (MCF-7 細胞、 2×10^2 cells) を混合したヤギ全血を吸引により透過させ、共焦点顕微鏡によりファイバーを観察した。

【結果と考察】

カチオン性配列を有するペプチドはポリスチレン表面に吸着することが示された。しかしながら、ペプチド結合抗体の吸着量は、ペプチドが有するカチオン性配列によって異なることが分かった。また、ペプチド結合抗体を固定化したファイバーを用いて行った血液透過実験において、ヤギ全血 10 mL 中の MCF-7 細胞がファイバーに捕捉されたことが分かった。この結果から、ファイバーに吸着するペプチドを用いることで、効率的な血中細胞の検出が可能になることが示唆された。

2E-07-Ⅱ

タンパク質非吸着表面での初期細胞接着挙動に与える細胞接着分子の可動性の効果

東京大学大学院工学系研究科

○井上祐貴 (Inoue Yuuki), 石原一彦

【緒言】細胞接着の機序を正確に理解することは、マテリアル表面における細胞接着の高度な制御を実現し、使用環境や目的に応じた医療デバイスを適切に創製することに直結する。特に、タンパク質の高次構造は水中で動的に変化することから、タンパク質吸着層に含まれる細胞接着分子の微小な可動性が、細胞接着に大きな影響を与えると考えられる。本研究では、細胞接着分子の配置が明確な表面により、その可動性が細胞接着挙動に与える影響を定量的に解析することを目的とする。この実現のため、ナノメートルオーダーで明確な構造を有するポリマーブラシ層のポリマー末端に細胞接着分子を導入した表面を作製した。タンパク質吸着を完全に排除するリン脂質ポリマーブラシ層の三次元構造により制御した細胞接着分子の可動性が、細胞接着挙動に与える効果を定量的に解析した。

【実験】異なる開始基密度を有する表面を金基板上に作製し、表面開始型原子移動ラジカル重合法を用いて、重合度 400 の poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) ブラシ表面を作製した。Huisgen 環化付加反応を利用して、PMPC 鎖の末端に細胞接着活性の異なる環状 RGD (cRGD) および RDG ペプチドを様々な組成で固定した。エネルギー散逸型水晶振動子マイクロバランス (QCM-D) を用いて、水中での PMPC 鎖末端の可動性を定量的に解析した。10% ウシ胎児血清 (FBS) 溶液からのタンパク質吸着量を QCM-D 測定を用いて定量し、ヒト子宮頸ガン (HeLa) 細胞の初期接着密度を定量した。

【結果と考察】開始基密度により、PMPC 鎖の密度を 0.01 から 0.18 chains/nm^2 の範囲で制御できた。また、グラフト密度の増加に伴い、PMPC 鎖一本当たりのエネルギー散逸量が減少した。すなわち、PMPC 鎖がパッキングされるにつれて、水中での PMPC 鎖の可動性が低下した。PMPC ブラシ表面への FBS からのタンパク質吸着量は、グラフト密度によらず 30 ng/cm^2 以下であり、細胞接着も観察されなかった。これらの結果は、PMPC ブラシ層は非特異的な吸着タンパク質層を介した細胞接着を排除することを示す。ペプチドを固定化した場合でも、タンパク質非吸着特性は維持された。加えて、cRGD 密度が同等の表面で、可動性の増加に伴い細胞接着密度の増加が認められた。これらより、細胞接着分子の高い可動性が、細胞接着分子と膜タンパク質との間の結合数を増加させ、初期細胞接着挙動に有利に働くことが明らかとなった。

2E-08-Ⅱ

生体骨模擬共培養システムによる骨配向化メカニズムの解明

大阪大学大学院工学研究科

○山崎大介 (Yamazaki Daisuke), 松垣あいら, 中野貴由

【緒言】骨の特徴的な異方性微細構造は、骨系細胞間の分子レベルでの相互作用により制御・構築される。我々は骨基質配向性を決定する骨芽細胞配列は、他の骨系細胞とのクロストークや他臓器連関を通じて緻密に制御されることを見出し、遺伝子変異により活性化破骨細胞を欠損したマウスでは、破骨細胞による骨芽細胞配列制御機構の破綻により顕著な骨配向性低下を示すことを明らかにしてきた。一方で、骨中で応力感受細胞として機能するオステオサイトは、他の骨系細胞との情報伝達を介して骨異方性微細構造を制御すると考えられる。すなわち、骨配向化機構解明のためには、これら3種の骨系細胞の相互作用を考慮した生体模擬共培養システムの構築が必須である。本研究では、生体骨の異方性環境を模擬しつつ、オステオサイト、破骨細胞および骨芽細胞の相互作用を再現可能な骨系細胞共培養システムを構築し、骨配向化機構解明を目指した。

【実験】新生マウス頭蓋冠より初代骨芽細胞を、成熟マウス長管骨より初代オステオサイトを抽出した。初代破骨細胞は脾臓由来の破骨前駆細胞を M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor)・RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) により分化制御した。得られた破骨細胞は、コラーゲン分子配列を人工的に制御した配向化コラーゲン基板上の骨芽細胞と共培養した。一方、カルチャーインサート上で流体せん断刺激を負荷しつつ、オステオサイトの培養を行うことで、3種の骨系細胞共培養系を構築した。培養後、real time RT-PCR による遺伝子発現解析ならびに ELISA によるタンパク質量定量解析を行った。

【結果と考察】せん断刺激負荷下でのオステオサイトとの共培養により、骨芽細胞配列は有意に充進した一方で、破骨細胞分化が制御された。すなわちメカノセンサーとしてのオステオサイトとの細胞間情報伝達に基づく破骨細胞分化制御機構の存在が示唆された。本研究により、生体内環境に類似した骨芽細胞・破骨細胞・オステオサイト共培養系の構築に成功し、骨配向性を決定する骨芽細胞配列化は、力学刺激を起点とするオステオサイト・破骨細胞との相互作用を介して制御されることを明らかにした。

2E-09-Ⅱ

温度応答性高分子ブラシを修飾した微細構造基板による細胞分離

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

○長瀬健一^{1,2} (Nagase Kenichi), 宿輪理紗^{1,3}, 小沼隆大^{1,3}, 大和雅之¹, 武田直也³, 岡野光夫¹

【緒言】近年、細胞を生体内に移植して治療する再生医療が注目を集めており、細胞の活性を維持したまま分離する細胞分離技術の開発が望まれている。我々は温度応答性高分子の各種共重合体を修飾したガラス基板を用いて、細胞種ごとの細胞接着性の差を利用して、温度変化により細胞を分離する細胞分離システムを提案している。一方で、細胞は微細構造表面上での細胞接着挙動が異なることが多数報告されている。そこで本研究では、ナノインプリントリソグラフィを用いて表面に微細構造を作製し、その表面に温度応答性高分子を修飾した基板を作製した。これらの作製した基板の細胞分離用基材としての応用を検討した。

【実験】表面を疎水性化したガラス基板に、スチレンとビニルベンジルクロライドの共重合体の薄膜をスピニングにより修飾した。その後、ピラー、ホール、ライン形状を有するナノインプリントモールドをガラス転移温度以上の温度で押し付け、表面に微細構造を形成した。さらに表面開始原子移動ラジカル重合(ATRP)により、ブラシ状の温度応答性高分子を修飾した。作製した表面にヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)、ヒト骨格筋芽細胞を播種し、37°Cでの接着挙動、20°Cでの脱着挙動を観察した。

【結果と考察】走査型電子顕微鏡による観察により、表面にナノインプリントモールドと同様の形状のパターンが形成されていることが確認できた。また、大気中での水滴を用いた接触角測定により、温度に応答した濡れ性変化を示すことがわかった。作製した基板に細胞を播種し、細胞の接着・脱着挙動を確認したところ、ホール形状の基板表面では、NHDF、HUVEC は37°Cで接着したのに対し、HUVEC は接着しなかった。さらに、温度を20°Cに変化させたところ、接着していたNHDFは脱着し、HSMC は脱着しなかった。この特性を利用して、三種類の混合細胞を37°Cで播種し、20°Cで回収したところ、NHDF を多く含む細胞懸濁液が回収されることがわかった。これらの結果より、本研究で作製した微細構造を有する温度応答性基板は、温度制御による細胞分離基材として有用であることが示された。

2E-10-II

中間水を有する生体適合性材料上における細胞の接着挙動に関する研究

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山形大学有機材料推進本部

○入江俊也¹ (Irie Shunya), 荒津史裕², 柏崎亜樹², 村上大樹^{1,2}, 田中 賢^{1,2,3}

【緒言】細胞は、膜タンパク質であるインテグリンと足場タンパク質中の細胞接着部位との結合を介して基板上に接着し、インテグリンを介するシグナルが誘導されると伸展や運動などの機能を発現する。初期段階の接着を制御することで続く細胞機能の発現を制御できると考えられる。生体適合性高分子材料である poly (2-methoxyethyl acrylate)

(PMEA) は水環境下で、自由水、中間水、不凍水から成る水和構造を形成する。中間水を有する PMEA および PMEA 類似体を細胞培養の基板として用いると、インテグリンを介した接着をエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) により阻害しても細胞が接着することが報告されている。また、中間水の含有量が多い PMEA 類似体上ではインテグリンを介さない接着の存在によりインテグリンシグナルが抑制され、マウス脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化が促進されることが報告されている。本研究では、中間水を有する PMEA 類似体上における細胞接着挙動、細胞の伸展や運動性を明らかにすることを目的とした。

【実験および結果】中間水量の異なる PMEA およびその類似体である poly (tetrahydrofurfuryl acrylate) (PTHFA)、poly (2-ethoxyethyl acrylate) (PEEA)、poly (2-butoxyethyl acrylate) (PBEA)、および poly (butyl acrylate) (PBA) をそれぞれ PET 基板上にスピコート法により製膜した。各高分子基板上にマウス線維芽 (NIH3T3) 細胞を播種し、培養 1 時間後の接着数を評価したところ、いずれの高分子基板上においても細胞接着が確認された。また、インテグリンを介した細胞接着を阻害した際の細胞の接着性を評価したところ、中間水の含有量が少ない PMEA 類似体上でもインテグリンを介さない接着があることが示唆された。また、各高分子膜上に細胞を播種して 3 時間培養後および 6 時間培養後の細胞の接着形態を観察したところ、中間水を有する PMEA 類似体上では細胞の伸展が抑制された。これは、インテグリンを介するシグナル伝達が誘導されず、細胞骨格形成に関わるアクチンファイバーの形成が抑制されたためだと考えられる。今後は、インテグリンを介さない細胞接着と細胞の伸展および運動性との相関性を考察する。

2E-11-II

リン酸オクタカルシウムが骨芽細胞・骨細胞分化に与える影響の検討

¹東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野, ²東北大学大学院歯学研究科顎顔面・口腔外科学分野, ³東北大学大学院歯学研究科歯学イノベーションリエゾンセンター

○穴田貴久¹ (Anada Takahisa), 蔡 優広^{1,2}, 塩飽由香利^{1,3}, 高橋 哲², 鈴木 治¹

【緒言】近年、ハイドロキシアパタイト(HA)、 β -リン酸三カルシウム(β -TCP)は、自家骨に代わる骨補填材として、臨床応用されているが、依然自家骨移植が第一選択となっている。しかし、自家骨移植は採取部位の侵襲や合併症が避けられず、患者への負担は大きい。これらの問題点を解決するため、我々はより高い骨形成能と生体内吸収性を示す骨補填材の開発を目指し、合成のリン酸オクタカルシウム(OCP)材料の研究を行ってきた。OCP は骨や歯などの生体アパタイト結晶の前駆物質と考えられているリン酸カルシウムである。OCP は生理的環境で HA へと結晶転換を起し、イオンの出入りが起こることが知られている。これまでに、我々は OCP が骨形成を促進すること、初期骨芽細胞の分化を促進することを報告しているが、後期骨芽細胞分化や骨細胞分化に与える影響については不明な点が多い。そこで本実験では OCP が骨芽細胞から骨細胞への分化に与える影響について検討した。HA、 β -TCP を比較として実験を行った。

【実験】骨芽細胞から骨細胞へ分化する特徴を持つマウス骨細胞様細胞株 IDG-SW3 を用いて分化培地で培養を行った。トランスウェルを用いて HA, β -TCP, OCP 存在下で培養を行い、継時的に DNA 量、ALP 活性を測定した。また骨細胞分化マーカーの測定を、リアルタイム PCR を用いて行った。

【結果と考察】35 日まで培養した結果、DNA 量の経時変化は材料間であまり差がなかったが、骨分化マーカーは OCP 存在下で有意に高くなった。

これらの結果より、OCP が他のリン酸カルシウム系生体材料と比較し、骨芽細胞の骨細胞への分化を促進する可能性が示唆された。

2E-12-II

上皮成長因子担持金ナノ粒子の特異的アポトーシス誘導活性における脂質ラフトの役割

¹物質・材料研究機構(NIMS), ²農業・食品産業技術総合研究機構, ³神奈川大学理学部

○山本翔太¹ (Yamamoto Shota), 岩丸祥史², 清水善久¹, 山口和夫³, 中西 淳¹

【緒言】細胞増殖・分化を促進する上皮成長因子(EGF)は、ナノ粒子に固定化されることでがん細胞のアポトーシスを誘導する。このことより EGF コンジュゲートはがん治療薬としての可能性が指摘されているが、その詳細な作用機構は明らかになっていない。そこで本研究では、EGF 受容体(EGFR)が高密度に存在する細胞膜の脂質ラフトに注目し、EGF コンジュゲートが特異的に誘起するアポトーシス活性に対するこれらのドメインの関与を調べた。

【実験】 α -aminopropyl- ω -methoxy PEG (MW = 5000)と disuccinimidyl 11,11'-dithiobisundecanoate (DSU)を反応させて得たジスルフィド体と DSU 自身を 8:2 の割合で混合した DMSO 溶液で 15 nm 金ナノ粒子の表面修飾を行い、得られた粒子と EGF を 4°C にて終夜反応させ、EGF-GNPs を得た。調製した EGF-GNPs を HeLa 細胞に投与し、下流のシグナル伝達の活性化と膜質の分布をリン酸化アッセイ、Annexin V 染色、脂質ラフトの生化学的分離および暗視野観察により調べた。

【結果と考察】調製された EGF-GNPs は約 50 nm の平均粒径を持ち、1 粒子あたり 51 個の EGF が固定化されている。この EGF-GNPs を HeLa 細胞へ投与すると、72 時間後に約 80% の細胞でアポトーシスが誘導された。この際の Akt のリン酸化状態は、溶液状態の EGF (soluble EGF) で刺激した場合の半分に留まっており、Akt の活性化状態の変化が鍵を握ることが示唆された。ショ糖密度勾配超遠心法により EGFR の脂質膜内分布を調べたところ、通常の soluble EGF で刺激した細胞では、脂質ラフトから脱出が観察されたのに対し、EGF-GNPs を作用させた場合は、ほとんどの EGFR が脂質ラフト内に留まっていた。また、暗視野観察による金ナノ粒子の細胞内分布がラフトマーカー GM1 と共局在する結果を踏まえると、確かに EGF-GNPs は脂質ラフト内の EGFR と相互作用するが、そこからの脱出を阻害していることが明らかとなった。最後に、脂質ラフトの形成を阻害する β -CD であらかじめ処理した細胞で同様の実験を行うと、EGF-GNPs が誘起する Akt の活性は soluble EGF と同程度まで回復し、EGF-GNPs のアポトーシス誘導能はほとんど失われた。以上の結果より、EGF コンジュゲート材料による特異的アポトーシス活性において、脂質ラフトにおける特異的な膜輸送が関与していることが分かった。

2E-13-II

がん骨転移による異方性骨微細構造破綻機構

大阪大学大学院工学研究科

○松垣あいら (Matsugaki Aira), 木村友美, 関田愛子, 中野貴由

【緒言】骨は基質中に多様な増殖因子を含み、リモデリングにより極めて肥沃な環境を形成することから、肺や肝臓と並んで高頻度でがん転移が起こる組織である。がん転移骨は顕著な力学機能の低下を示し、病的骨折を引き起こす。我々は *in vivo* のがん転移モデルにおいて転移骨での骨配向性の顕著な低下が力学機能の低下を招くことを明らかとしているが、がん骨転移による骨微細構造変化についてのメカニズムは未解明である。がんの骨転移には破骨細胞による骨溶解が優位となる溶骨性転移および骨芽細胞による骨形成が優位となる造骨性転移の 2 つの様式が存在する。本研究ではこれら 2 つの転移様式に着目し、*in vitro* での細胞共培養モデルのみならず、生体内での応力負荷状態を再現しつつ、複雑ながん転移現象を人為的に制御可能な *ex vivo* 骨転移モデルの構築に成功した。本研究では、転移骨における骨微細構造変化に分子レベルからアプローチすることで、骨-がん細胞相互作用による骨配向化制御因子を明らかとすることを目的とした。

【実験方法】溶骨性転移を誘発する B16F10 (メラノーマ)、MDA-MB-231 (乳がん) および造骨性転移を誘発する MDA-PCa-2b (前立腺がん) 細胞をがん細胞として用いた。生体内での骨への負荷ひずみ量に基づき純チタン製のおもりを用い、骨長手方向に静的一軸圧縮応力を負荷可能な *ex vivo* 骨培養系を作製した。胎生 16 日齢マウス大腿骨を摘出し、静的応力負荷を与えつつがん細胞を含む培養液中で 7 日間培養した。骨形態・骨密度およびアパタイト結晶配向性の解析にはそれぞれ μ CT 法および透過型微小領域 X 線回折法を用いた。免疫染色により骨系細胞の挙動観察を行うとともに、Total RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。

【結果】*In vitro* 共培養において、骨芽細胞とがん細胞との細胞間接着を介した直接的相互作用により、骨芽細胞配列は有意に低下した¹⁾。 *Ex vivo* 骨組織培養において、アパタイト配向性はいずれのがん転移モデルにおいても正常骨と比較して有意な低下を示した。転移骨表面においては骨芽細胞の不連続な配置が認められ、がん細胞との相互作用による骨異方性発現低下に寄与する可能性が示唆されるとともに、転移骨配向性を制御する分子メカニズムの一端が明らかとなった。

【参考文献】 1) Y. Kimura, A. Matsugaki, A. Sekita, T. Nakano, *Scientific Reports*, 2017, 7, 44824.

2E-14- II

細胞膜上に混在する分子が細胞間相互作用へ及ぼす影響

京都大学ウイルス・再生医科学研究所

○磯部 潤 (Isobe Jun), 有馬祐介

【緒言】 細胞間相互作用は、細胞間の情報伝達や多細胞組織の形成において重要な過程である。我々は工学的アプローチによる細胞機能の制御を目的に、単鎖 DNA-ポリエチレングリコール脂質複合体(ssDNA-PEG-脂質)を用いた細胞表面修飾による細胞間接着の制御を行ってきた。この手法では、種々の分子が混在する細胞膜で ssDNA-PEG-脂質が相補対を形成することが重要である。しかし、生細胞同士の接着では細胞膜に存在する分子の種類や量が不明確であり、ssDNA-PEG-脂質を介した細胞間接着過程を理解するのは困難である。本研究では、ガラス上に形成した支持脂質二分子膜(supported lipid bilayer, SLB)へ ssDNA-PEG-脂質を導入し、モデル細胞膜として用いた。ssDNA を有さず分子量の異なる PEG-脂質を細胞膜上の混在分子として共存させ、PEG-脂質の混在が細胞-SLB 間での ssDNA-PEG-脂質の挙動に及ぼす影響を調べた。

【実験】 カバーガラス上に egg phosphatidylcholine (eggPC) の SLB を形成させた。次に、fluorescein 標識 ssDNA-PEG-脂質 (PEG 分子量 5k) と rhodamine 標識 PEG-脂質 (PEG 分子量 5k, 20k) の混合液で SLB を修飾した。細胞にはヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株(CCRF-CEM)を用い、ssDNA-PEG-脂質で細胞表面を修飾した。その細胞を SLB 上に播種したときの蛍光像を全反射蛍光顕微鏡を用いて観察し、ssDNA-PEG-脂質と PEG-脂質それぞれの分布を調べた。

【結果と考察】 細胞播種後の SLB では細胞が接着した箇所で ssDNA-PEG-脂質に基づく蛍光は強くなり、細胞接着に伴い ssDNA-PEG-脂質が接着部に集積することが分かった。一方、混在分子である PEG-脂質は分子量 5k の場合は細胞接着後も一様に分布しているのに対し、分子量 20k の場合は接着部から排除されることが分かった。さらに、細胞接着部での ssDNA-PEG-脂質由来の蛍光強度を測定したところ、PEG(20k)-脂質が混在している方が蛍光強度が高く、ssDNA-PEG-脂質がより集積していることが分かった。これらの結果から、かさ高い PEG-脂質が混在すると、接着に伴い接着面から排除され、ssDNA-PEG-脂質の集積が間接的に増強されることが分かった。

2E-15- II

細胞サイズリポソームおよび生細胞への親水性ナノゲルのサイズ依存的取り込み挙動

¹神戸大学大学院工学研究科, ²北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス系

市川晶子¹ (Ichikawa Shoko), 下川直史², 高木昌宏², ○北山雄己¹, 竹内俊文¹

【緒言】

ナノテクノロジーによって創出されるナノ材料は、ドラッグデリバリーシステムや In vivo イメージングなどの目的で生体への応用が期待される機能性材料として注目されているが、未だナノ材料の生体内における挙動は未解明の部分が多い。中でも、細胞内外を区切る細胞膜に対するナノ材料の相互作用は上記アプリケーションにおいて重要な知見となるため、その理解が求められているが、細胞膜は組成や構造が複雑であり相互作用を解析することは困難であった。本研究では細胞膜モデルとして使用可能な細胞サイズリポソームに対する電荷的に中性な蛍光ラベル化親水性ナノ粒子(FL-NPs)の相互作用を解析し、取り込み機構やそのサイズ効果を詳細に検討した。さらに、細胞サイズリポソームを用いた実験で得られた知見が生細胞においても適用できるか検討した。

【実験】

均一な膜表面を有する homogeneous リポソームと表面に相分離構造を有する heterogeneous リポソームを作製し、これらに対する FL-NPs の取り込みについて共焦点レーザー顕微鏡によって評価し、細胞サイズリポソームの組成が FL-NPs 取り込みに与える影響を詳細に検討した。さらに、生細胞である NIH3T3 細胞に対して、FL-NPs を加え、リポソーム染色試薬とのピアソン共局在係数を算出することで FL-NPs の細胞内局在を評価した。

【結果と考察】

Homogeneous リポソームへ FL-NPs を添加したところ、リポソーム内部の粒子濃度の上昇はほとんど観察されなかったのに対し、相分離構造を有する heterogeneous リポソームでは内部粒子濃度の上昇が有意に観察された。リポソーム膜由来蛍光がリポソーム内で上昇しなかったことから、FL-NPs は、膜の揺らぎによる取り込みではなく、相分離界面における粒子サイズ依存的な膜透過による取り込みであることを明らかにした。さらに、この膜透過によるサイズ依存的細胞内取り込みは、生細胞系においても生じることを明らかとし、細胞膜と親水性ナノ粒子間相互作用に関する重要な知見獲得に成功した。

2E-16- II

ヒト間葉系幹細胞とコラーゲン足場材料の培養系に及ぼす糖化反応の影響

¹九州大学大学院総合理工学府, ²九州大学応用力学研究所

○近藤聖奈¹ (Kondo Seina), 中牟田侑昌¹, 東藤 貢²

【緒言】

生体内に取り込んだ糖や炭水化物は細胞のエネルギー源である一方で、過剰な血糖値の上昇は糖尿病、心臓病（動脈硬化）、アルツハイマー等の生活習慣病や老化の原因になることが知られている。この原因は、たんぱく質や脂質が糖と結びつく糖化反応として知られている。本研究では、糖化反応がヒト間葉系幹細胞（hMSC）の3次元培養系に及ぼす影響を調べることを目的とした。コラーゲン多孔質足場材料を用いて、過剰な糖を含む培地中でMSCを培養し、細胞の増殖や足場材料とMSCの培養系の力学特性に及ぼす糖化反応の影響について定量的評価を試みた。

【実験】

足場材料であるコラーゲンスポンジは、I型コラーゲン溶液を用いて凍結乾燥法により作製した。コラーゲンスポンジの直径と厚さはそれぞれ約5.0mmである。コラーゲンスポンジ1個当たりhMSCを 2.0×10^5 播種し培養実験を行った。使用した培地は、細胞増殖用培地(MEM- α 、10%FBS、1% penicillin-streptomycin)とこれに糖(D(-)-フルクトース)を30mMまたは300mM含む2種類の糖培地である。最長14日間培養し、細胞数の計測や圧縮力学特性として圧縮弾性率の評価を行った。また、コラーゲンスポンジ自体に及ぼす培養環境や糖の影響を検討するために、細胞存在下と同じ条件で足場材料のみの浸漬実験を行った。

【結果と考察】

コラーゲンスポンジ外に存在する細胞形態を観察したところ、7日目と14日目共に増殖培地と糖培地の両条件における細胞の形態的な違いは見られなかった。また、細胞数については、無糖と30mMの培地では、その差はほとんどなく順調な細胞数の増加が観察されたが、300mMの培地では細胞の増殖が抑制される結果となった。圧縮弾性率については、14日目と比較すると、細胞の播種により無糖培地と300mM培地では低下する傾向にあり、30mM培地では若干増加する傾向にあった。また、細胞培養の場合、糖を含む培地により弾性率は増加する傾向にあったが、そのメカニズムについては現在検討中である。

2E-17- I

酸化処理 UHMWPE 擬似摩耗粉の *in vitro* 生体反応に及ぼす Vitamin E 含有の効果

¹帝人ナカシマメディカル株式会社, ²京都大学大学院工学研究科

○湯谷知世¹ (Yutani Tomoyo), 植月啓太¹, 富田直秀²

【緒言】

人工関節の問題点の一つにオステオライシスがある。これは摺動面材料から発生する摩耗粉が原因の一つであることが報告されている。現在人工関節に用いられている高分子材料として、UHMWPE が使用されており、更に抗酸化機能を付与した Vitamin E 含有 UHMWPE、架橋処理をした XL-UHMWPE などの材料が臨床に用いられている。我々の過去の研究より、XL-UHMWPE 材料を用いて作製した擬似摩耗粉は架橋処理をしていない UHMWPE 材料と比べ、マウスマクロファージ様細胞と培養した際の TNF- α 産出量が優位に増加した。一方で Vitamin E を含有した材料の XL 材ではこのような現象が起こらなかったことより、生体反応性の上昇原因として材料の酸化に着目した。本研究では、酸化処理前後の UHMWPE 擬似摩耗粉を用いて TNF- α 産出量を測定し、酸化処理が生体反応性に与える影響について評価することを目的とした。

【実験】

UHMWPE 材料を粉砕して粉末状の擬似摩耗粉を作製した。対象サンプルとしては、Virgin(XL 処理無)、VE(Vitamin E 含有)、XLVirgin(XL 処理)、XLVE(Vitamin E 含有、XL 処理)の4種類を対象とした。擬似摩耗粉を ASTM F 2003 に従い酸素雰囲気下・温度 70°C・圧力 503 kPa の条件において 2 週間強制酸化を実施した。擬似摩耗粉のキャラクターゼーションは酸化度および結晶化度を評価した。マウスマクロファージ様細胞 RAW264 を 1.0×10^5 個/well で播種した後、強制酸化前後の擬似摩耗粉と上下倒置培養法を用いて 24 時間培養し、培養後の TNF- α 産出量を測定した。

【結果と考察】

強制酸化処理によって Virgin、XLVirgin 材料では酸化ピークであるカルボニルピークが上昇し高い酸化度が確認され、Vitamin E 含有サンプル(VE、XLVE)ではカルボニルピークは検出されなかった。TNF- α 産出量は酸化処理後の Virgin、XLVirgin 材料のみ上昇した。しかし、UHMWPE の酸化もしくは Vitamin E 含有が TNF- α 産出量に影響するメカニズムはいまだ不明である。

2E-18-III

Comparison of gene expression profiles of human macrophages stimulated by conventional and vitamin E-blended ultra-high molecular weight polyethylene particles of orthopedic implants

Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University
○Mohamad Alaa Terkawi, Masanari Hamasaki, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki

Osteolysis is a serious postoperative complication of hip arthroplasty that leads to aseptic loosening and surgical revision. Osteolysis is initiated when the immune cells including macrophages recognize the implant debris and release inflammatory mediators leading to recruitment of other type of inflammatory cells and formation of inflamed granuloma. Better understanding of the molecular mechanisms of osteolysis should lead to a novel approach for preventing implant loosening. To this end, RNA-Seq technology was used to analyze the transcriptional profiling of human macrophages co-cultured with either conventional (UHMWPE) or vitamin E-blended (VE-UHMWPE) ultra-high molecular weight polyethylene particles. Results demonstrated that 1218 and 1032 genes were differentially up-regulated, and 1126 and 746 genes were differentially down-regulated in response to UHMWPE and VE-UHMWPE particles, respectively. Macrophages in response to these particles generate a broad and vigorous set of gene expression functionally classified in cytokines, chemokines, growth factors and receptors. Intriguingly, UHMWPE particles seemed to trigger greater inflammatory responses and osteolytic cytokines than VE-UHMWPE particles. Upregulated genes were categorized into multiple functional processes including inflammatory response, regulation of cell proliferation, response to stress, cell surface receptor signaling, cell communication and migration. Moreover, bioinformatics analyses revealed that macrophages exposed to UHMWPE and VE-UHMWPE particles trigger a common gene expression signatures for inflammation and rheumatoid arthritis. Importantly, bioinformatics analysis identified a new molecule involved in osteoclastogenesis and bone-resorbing osteoclastic activity. Our data provide new insight into the molecular pathogenesis of osteolysis and highlight a novel therapeutic target.

2E-19-II

抗体固定化フィルターによる免疫細胞の捕集

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ²芝浦工業大学システム理工学部, ³大阪大学免疫学フロンティア研究センター, ⁴京都大学大学院工学研究科

○木村 剛¹ (Kimura Tsuyoshi), 中村奈緒子², 橋本良秀¹, 坂口志文³, 木村俊作⁴, 岸田晶夫¹

【緒言】

がんは、免疫系から逃避したがん細胞が抗腫瘍免疫応答を抑制する環境を作り上げることで生存する。近年では、PTLA-4 や PD-1 の抗体による免疫抑制のブロックや制御性 T 細胞による免疫抑制機構の解除など、抗腫瘍免疫応答の抑制解除に向けた取り組みがなされている。我々のグループは、体内からの制御性 T 細胞の除去により免疫抑制を解除することを目指し、細胞捕集デバイスの開発を行っている。本研究では、抗体固定化フィルターによる免疫細胞の捕集について検討した。

【実験】

基材として、ポリエチレン (PE) メッシュ・フィルムを用いた。コロナ放電処理、熱重合によってアクリル酸 (AAc) をグラフトした。グラフト重量の測定、FT-IR 測定、メチレンブルー染色等にてグラフト化 PE の作製を確認した。PAAc グラフト化 PE に Biotin を導入し、Avidin を介して Desthiobiotin 修飾 mCD25 抗体を PE に固定化した。GFP マウス脾臓より脾臓細胞を採集し、mCD25 抗体固定化 PE に播種し、細胞捕集を検討した。また、マウス全血を用いて、血小板粘着を走査型電子顕微鏡観察により評価した。

【結果と考察】

PAAc のグラフト化では、重量の増加、メチレンブルーでの陽性染色が示され、PAAc グラフト鎖の導入が確認できた。PAAc グラフト量は、1.5~45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。mCD25 抗体を固定化した基材の免疫染色において陽性染色が示され、抗体固定化 PE が得られたと判断した。GFP マウス脾臓細胞 (CD25 陽性細胞 : 30-50%) を用いて mCD25 抗体固定化 PE 上での細胞捕獲を検討した。PAAc グラフト化 PE では約 1.4%であったが、mCD25 抗体固定化 PE では約 22.8% の高い細胞接着率であり、選択的な細胞捕獲を示された。Biotin 修飾水溶性高分子を解離剤として添加した結果、約 0.6%の接着率に低下し、捕獲細胞のほぼ全ての細胞を回収できた。以上より、抗体固定化基材による免疫細胞の捕集が示された。