

創傷治癒における細胞外小胞の可能性 Potential of extracellular vesicles in wound healing

張為旭^{*1}, 倉持明子^{*2}, 小淵里恵^{*2}, 寺村裕治^{*1,2,3}

Weixu ZHANG^{*1}, Akiko KURAMOCHI^{*2}, Satoe OBUCHI^{*2}, Yuji TERAMURA^{*1,2,3}

※¹筑波大学, つくば市天王台 1-1-1、※²国立研究開発法人産業技術総合研究所, つくば市東 1-1-1、※³ウプサラ大学, スウェーデン,ウプサラ 753 10

^{*1} University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, ^{*2} National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, ^{*3} Uppsala University, 753 10 Uppsala, Sweden

1. Introduction

Extracellular vesicles (EVs), particularly exosomes (30–150 nm), have emerged as critical mediators of intercellular communication, playing significant roles in various physiological and pathological processes. ⁽¹⁾ These nanoscale vesicles, enriched with bioactive molecules like miRNA, DNA, and proteins, significantly influence cellular behaviors such as proliferation, migration, and angiogenesis. ⁽²⁾ Chronic wounds, such as diabetic ulcers, represent a major clinical challenge characterized by impaired healing, persistent inflammation, and poor angiogenesis. ⁽³⁾ In this study, we focused on exosomes derived from human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells and human adipose-derived stem cells (hADSCs) and their effects on NIH3T3 fibroblasts through the ERK1/2 signaling pathway.

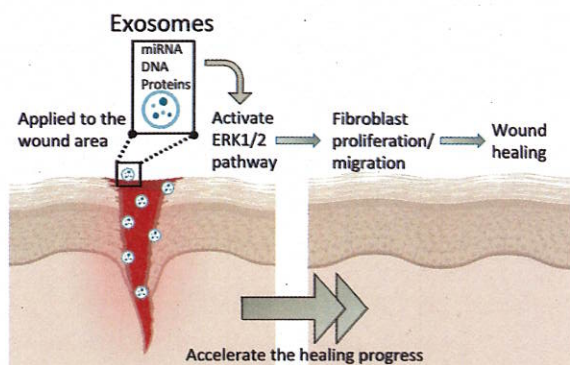


Fig. 1 Mechanism of extracellular vesicles in wound healing.

2. Materials and methods

Exosomes were isolated from conditioned media of HEK293T and hADSC cultures using ultrafiltration and Total Exosome Isolation™ reagent, with characterization by TEM (Tecnaï G2 Spirit), NanoSight (NS300, Malvern Instruments) for size and concentration, and western blotting for markers CD63, CD81, and CD9. NIH3T3 fibroblasts were treated with 20 µg/mL of exosomes in scratch assays, with migration analyzed using ImageJ. ERK1/2 pathway activation was assessed by western blot detecting phosphorylated ERK1/2, visualized using the Bio-Rad ChemiDoc MP system.

3. Results and discussion

HEK293T-derived exosomes exhibited a particle concentration of 3.1×10^{11} particles/mL and a mean size of 178 ± 4 nm, compared to 2.3×10^9 particles/mL and 153 ± 5 nm for hADSC exosomes, as confirmed by NanoSight analysis. Western blot analysis indicated

stronger expression of CD63, CD81, and CD9 in HEK293T-derived exosomes, correlating with their higher bioactive molecule content. In scratch assays, HEK293T exosomes increased the migration index of NIH3T3 fibroblasts to $63.2 \pm 4.3\%$, while hADSC exosomes achieved $48.9 \pm 2.7\%$. This enhanced migration was further supported by western blot data showing significant phosphorylation of ERK1/2 following exosome treatment. The critical role of the ERK1/2 pathway in mediating these effects was confirmed by the addition of MEK1/2 inhibitor PD98059, which reduced the migration index to $9.6 \pm 3.2\%$ for HEK293T exosomes and $2.6 \pm 0.2\%$ for hADSC exosomes. These findings highlight the superior efficacy of HEK293T-derived exosomes in activating the ERK1/2 pathway, which plays a pivotal role in fibroblast migration, cytoskeletal dynamics, and extracellular matrix remodeling. Such characteristics underscore the therapeutic potential of exosomes as next-generation agents for promoting wound healing, particularly for chronic wounds like diabetic ulcers, by targeting cellular pathways more effectively than conventional therapies.

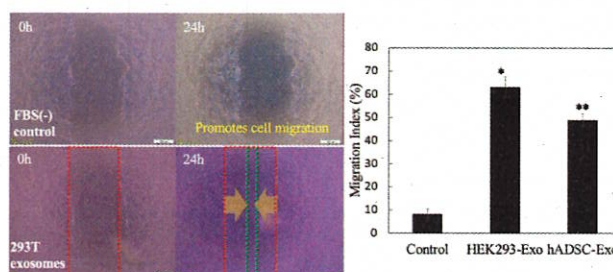


Fig. 2 The scratch assay of NIH3T3 fibroblasts.

4. Reference

- (1) Théry, C., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750.
- (2) Colombo, M., et al. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255-289.
- (3) Sen, C. K., et al. (2009). Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, 17(6), 763-771.

水和の制御によるタンパク質吸着の抑制を目的とした シルクフィブロイン基盤循環器デバイスコーティング剤の創製

Interaction Analysis of Water Molecules with Silk Fibroin-Based Materials for Cardiovascular Device Coating

中田健大^{*1}, 菅野孝佑^{*1}, 斎藤拓^{*1}, 秋岡翔太^{*1}, 野口恵一^{*2}, 中澤靖元^{*1}
Takiehiro NAKADA^{*1}, Kosuke SUGENO^{*2}, Hiromu SAITO^{*2}, Shota Akioka^{*1}, Keiichi NOGUCHI^{*1},
Yasumoto NAKAZAWA^{*1}

^{*1} 東京農工大学大学院工学府、^{*2} 東京農工大学学術研究支援総合センター機器分析施設、小金井市中町 2-24-16

^{*1} Tokyo University of Agriculture and Technology, ^{*2} Instrumentation Analysis Center, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Naka-chou, Koganei Tokyo, 184-8588 Japan

1. 緒言

ステントや人工血管などの生体留置型デバイスの使用において、血栓形成や感染が問題となっている。これらの防止のため、ヘパリンなどの血液適合性ポリマーによるコーティングが行われているものの、溶出による機能の低下や合併症は依然として課題となっている。血栓や感染症の発生機序にはタンパク質の吸着が関与しており、デバイス表面にタンパク質が吸着することで血小板や細菌が付着しやすくなることが知られている⁽¹⁾。そこで、過度なタンパク質吸着を抑制しつつ、細胞接着を可能とする材料の開発を目指すこととした。一般に、生体内では材料表面に水分子が吸着することで水和層を形成しており、材料との相互作用が強い順に結合水(BW)・IW・自由水(FW)と分類される。BWはタンパク質吸着や細胞接着を促進する一方、IWはタンパク質吸着や細胞接着を阻害する⁽¹⁾。また、FWはそのどちらにも関与しないことから、BWおよびIWの割合を制御することによるタンパク質吸着の最適化に期待した。IWを保持するコーティング材料としてポリ(2-メトキシエチルアクリレート)(PMEA)が知られているが、PMEAは生体内における分解が困難である。そこで、本研究においてはコーティング剤としてシルクフィブロイン(SF)にポリエチレングリコール(PEG)を固定化したSF-PEGに着目した。SFは低炎症性や穏やかな生分解性を持つ天然由来高分子であり、組織工学材料として利用されている^(2,3)。また、PEGは親水性高分子であり、低免疫原性や癒着防止能を有するものの、長期間水に接触することによる溶出が課題となっている。そのため、SF側鎖にPEGを固定化することで、コーティング剤としての機能を長期間発揮できると考えた。

以上より本研究では、分子量の異なるPEGを導入したSF-PEGを作製し、PEGによる水分子との相互作用への影響について検証することとした。

2. 実験

SF水溶液に塩化シアヌル(CY)を反応させたのち、分子量の異なる両末端アミノ化PEG(Mw=192.26, Mn=1500, 3400)水溶液を加えてCYと反応させることでSF-PEG(SP)水溶液を作製した。なお、サンプル名はPEGの分子量に応じてSP02, SP15, SP34とした。SF水溶液および作製した各SP水溶液をシャーレにキャスト、乾燥したのちに70(v/v)%エタノールに30分間浸漬することで水に不溶なフィルムを作製した。

得られたSFまたはSPフィルムを超純水に浸漬したのち、示差走査熱量計を用いたDSCによる昇温測定を実施した。

3. 結果・考察

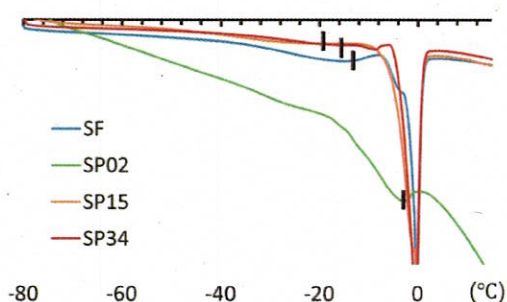


Fig. DSC 昇温スペクトル
(FW融解ピークの強度で規格化)

Fig.にDSCの測定結果を示す。全てのサンプルにおいて観測された-30℃~-5℃付近の吸熱ピークはIWの低温融解に由来する。また、SFとSP15、SP34の間においてはピーク強度が減少しており、融点も低温シフトしていた。相互作用が強いほど融点が降下することから、PEGの固定化によりIWがより強く材料と相互作用したと考えられる。各スペクトルはFWのピーク強度において規格化しており、またDSCにおいて結合水は-100℃まで冷却されても検出されない⁽¹⁾ことから、IW由来ピークの減少分はより強い相互作用を持つBWへと変化したと考えられる。なお、SP02においては他のSPと同様の相関は取れていない。分子量の小さいPEGは不安定な水和構造を取るとの報告もある⁽¹²⁾ことから、PEGの分子量と折りたたみ構造などを考慮したスケールについて検証する必要があると考えられる。

4. 参考文献

1. Toyokawa, Y., Kobayashi, S., Tsuchiya, H., et al. A fully covered self-expandable metallic stent coated with poly (2-methoxyethyl acrylate) and its derivative: In vitro evaluation of early-stage biliary sludge formation inhibition. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 120, 111386 (2021).
2. Alessandrino, A., Chiarini, A., Biagiotti, B., et al. Three-Layered Silk Fibroin Tubular Scaffold for the Repair and Regeneration of Small Caliber Blood Vessels: From Design to *in vivo* Pilot Tests. *Front Bioeng Biotechnol* 7, 356 (2019).
4. Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., et al. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 31, 1-16 (2016).
5. Hoffmann, M., Too, M., Paddock, N., et al. Molecular Dynamics study of the Green solvent polyethylene glycol with water impurities. *Molecules* 29, 2070 (2024).

血管グラフト用途を目指したシルクフィブロイン/シルクエラスチン®材料の創製 Development of Silk Fibroin/Silk-Elastin® Composite Materials for Vascular Graft Applications

亀井陽平*¹, 島田香寿美*², 太良修平*³, 川端慎吾*⁴, 柚本聡*⁴, 秋岡翔太*¹, 中澤靖元*¹
Yohei KAMEI*¹, Kazumi SHIMADA*², Shuhei TARA*³, Shingo KAWABATA*⁴,
Satoshi SOMAMOTO*⁴, Shota AKIOKA*¹, Yasumoto NAKAZAWA*¹

*¹ 東京農工大学大学院工学府, 東京都小金井市中町 2-24-16、*² 東京農工大学大学院農学府, 東京都府中市晴見町 3-8-1、*³ 日本医科大学循環器内科, 東京都文京区千駄木 1-1-5、*⁴ 三洋化成工業株式会社, 京都府京都市東山区一橋野本町 11-1

*¹ Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology (TUAT), 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo, 184-8588, Japan, *² Graduate School of Agriculture, TUAT, 3-8-1 Harumi-cho, Fuchu, Tokyo, 183-8538, Japan *³ Department of Cardiovascular Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo, Tokyo, 113-8602, Japan, *⁴ Sanyo Chemical Industries, Ltd., 11-1 Hitotsubashinomoto-machi, Higashiyama, Kyoto, 605-0995, Japan

1. 緒言

緒言小口径人工血管はその低開存率が障壁となり実用化に至っていない。そのため、生体吸収性血管グラフト(bio-absorbable vascular graft, BVG)の開発・臨床応用における課題解決が期待されている。しかし、材料の吸収が短期的に進むとBVGの強度低下を引き起こし、反対に吸収が軽微であると狭窄のリスクを生じる。そのため、材料の強度を維持しながら生体吸収挙動を制御することで内腔側での血管組織成長を外腔側に向けて促進する必要がある⁽¹⁾。そこで本研究では、生体吸収性の異なる2種のタンパク質を用い、その存在比率を内腔側から外腔側にかけて段階的に変化させた「傾斜構造」を付与することで、グラフト強度低下の軽減、狭窄防止および正常組織の再建を狙った新規BVG材料を作製した。外腔側には緩やかな生体吸収性と高い機械的強度を有する家蚕シルクフィブロイン(SF)、内腔側には速やかな生体吸収性、組織再生促進能、柔軟性を有するシルクエラスチン®(SELP)を用いた。SELPは、SF特徴的な反復配列と血管壁弾性成分(エラスチン)のアミノ酸配列から構成される人工タンパクであり、創傷治癒・半月板再建において優れた実績がある⁽²⁾。本発表では、傾斜構造がBVG材料の分解性、組織再生、機械的特性(伸展性)に及ぼす影響について報告する。

2. 実験方法

SELPとSFスポンジを9:1の質量比で1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールに溶解した5.0(w/v)%の混合溶液を、SFスポンジのみで同様にSF溶液を調製した。電界紡糸装置(LE-50, Fluidnatek)を用い、2種類の溶液の吐出量比を経時的に変化させながら傾斜シート・チューブ、2種類の溶液を等量吐出し続けることで作製した傾斜なしチューブ、2種類の溶液を等量混合したものを用いて作製したブレンドチューブ、SFのみで構成されるSFシート・チューブも作製した。また、傾斜シートの外腔側、中層、内腔側と同組成のシートを作製した。傾斜・SF・同組成シートを 1.5×10^{-2} (w/v)%エラストマーゼ溶液に5日間浸漬し、重量損失率を算出した。傾斜シートをラット腹部大動脈に4週間埋植後Elastica van Gieson (EVG)染色を実施した。機械的特性(伸展性)評価は、試験規格(ISO7198-2016)に準じて作製したコンプライアンス試験装置を用いて行った。チューブ内に空気を流入して徐々に加圧を行い、内径・直径変化を圧力センサおよびImageJソフトウェアを用いて測定し、80-120 mmHgの圧力範囲でコンプライアンス値(直径変化率/内圧変化量)を算出した。

3. 結果・考察

エラストマーゼ溶液浸漬における5日目の重量損失率について、外腔側は $61.1 \pm 2.3\%$ 、中層は $72.2 \pm 8.6\%$ 、内腔側は $86.5 \pm 0.9\%$ であり、内腔側ほど分解性に優れていることを確認した。EVG染色では1か月という僅かな期間で狭窄等を引き起こさず血管壁中膜を構成するエラスチン層の組織再生を確認した(Fig.1)。コンプライアンス試験では、いずれのチューブも破裂せず、SFチューブと比較してブレンド・傾斜なし・傾斜チューブの順に高値となった(Fig.2)。この結果は、SELPとの複合化に加え、材料に傾斜構造を備えたことで伸展性が効果的に向上したことを示す。また、自家血管の値(約4.5%)と同程度以上となったことから、移植部位で自家血管グラフト同様に伸展することができ、血流の乱れによる血栓・動脈瘤形成といった術後合併症の防止に期待できる⁽³⁾。今後は、傾斜チューブによるグラフトが機械的特性を維持しながら正常な血管組織再建を補助できることを、拍動耐久試験、動物移植試験にて検証する。

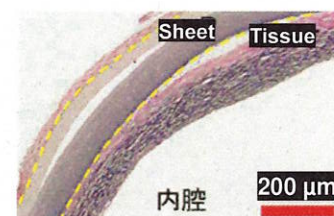


Fig. 1 Histology of rat abdominal aorta implantation after 4 weeks (Gradient, EVG staining)

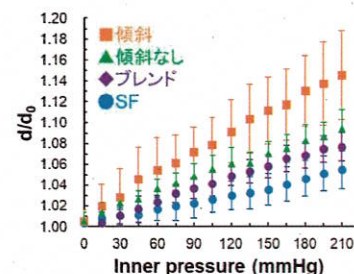


Fig. 2 Compliance curves of each tube (n = 5)

4. 参考文献

- (1) Miyachi, H. et al. Imatinib attenuates neotissue formation during vascular remodeling in an arterial bioresorbable vascular graft. *JVS Vasc Sci* 1, 57-67 (2020).
- (2) Inoue, T. et al. Development of a novel approach for restoration of the meniscus using silk-elastin in a rabbit meniscus injury model. *BMC Musculoskelet. Disord.* 25, 545 (2024).
- (3) Heydarkhan-Hagvall, S. et al. Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials* 29, 2907-2914 (2008).

マグネシウム合金ヘッドレスコンプレッションスクリューの 機械的安全性と長期埋植における分解挙動

Mechanical Safety and Long-term Degradation Behavior of Magnesium Alloy Headless Compression Screw

花田幸太郎^{*1}, 三島初^{*2}, 野口裕史^{*2}, 渡邊竜之介^{*2}, 張ルウルウ^{*1}, 藤田宏介^{*3},
田食里沙子^{*3}, 岩崎聖子^{*3}, 大類穂子^{*3}, 北川全^{*3}

Kotaro HANADA^{*1}, Hajime MISHIMA^{*2}, Hiroshi NOGUCHI^{*2}, Ryunosuke WATANABE^{*2}, Lulu ZHANG^{*1}, Kosuke FUJITA^{*3}, Risako TAJIKI^{*3}, Sakiko ORUI^{*3}, Akira KITAGAWA^{*3}

^{*1} 国立研究開発法人産業技術総合研究所, つくば市並木 1-2-1, ^{*2} 国立大学法人筑波大学, つくば市天王台 1-1-1, ^{*3} メルフロンティア株式会社, つくば市千現 2-1-6

^{*1}National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-2-1 Namiki, Tsukuba, ^{*2}University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, ^{*3}Mel-Frontier Ltd., 2-6-1 Sengen, Tsukuba

1. はじめに

我々が開発を進めている生体マグネシウム合金 (FAsorbMg®) を用いた生体吸収性ヘッドレスコンプレッション (HC) スクリューは, ①初期固定の接合強度確保, ②MRI 等によるクリアな観察, ③生体内で分解・吸収されるため長期残存による不具合を解消, ④小児等を対象とした必ず抜去を必要とする固定術や抜去困難な部位への適用等が期待されている。本研究では, 開発した HC スクリューについて, ねじり破壊試験, ねじ込み・プッシュアウト試験による機械的安全性評価, 及び家兎への長期埋植におけるスクリュー分解挙動観察を実施した結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 マグネシウム合金 HC スクリュー

Fig. 1 にマグネシウム合金 HC スクリュー外観を示す。本 HC スクリューはヘッドレス・フルスレッドタイプで先端外径 2.8 mm, 後端外径 3.2mm, スクリュー長 10~30 mm の仕様であり, 本研究ではスクリュー長 10mm のものを使用した。



Fig.1 Appearance of Magnesium alloy HC screws (FAsorbMg®)

2.2 機械的強度試験

マグネシウム合金 HC スクリューについて, JIS 規格 T0311 に基づき海綿骨ブロック (20pcf) を用いた機械的強度試験 (ねじり破壊試験, ねじ込み・プッシュアウト試験) を実施した。また, チタン合金製及び PLLA 製の既承認品についても同様の試験を実施し, 比較を行った。表 1 に使用した各種スクリュー仕様と試験条件を示す。

2.3 長期埋植試験

日本白色家兎 (12 週齢) の大腿骨, 脛骨にマグネシウム合金 HC スクリューを埋植し, 埋植 10 ヶ月後に組織を採取した。採取した組織は, MMA 樹脂包埋後に μ CT 測定, 次いでトルイジンブルー染色した非脱灰研磨標本を作製し, スクリューの分解挙動観察と組織学的評価を行った。

Table 1 Screw specifications and mechanical test conditions

Materials	Screw specifications	Test conditions
FAsorbMg®	Cannulated screw with full thread, O.D.2.8-3.2 mm, I.D. 1.0 mm, L10 mm	<Torsional breaking> 1 r/min
Ti6Al4V alloy	Cannulated screw with full thread, O.D.2.5-2.8 mm, I.D. 1.0 mm, L10 mm	<Driving torque> 1 r/min, Loading 10 N
PLLA	Solid screw with head O.D.30 mm, L12mm	<Pushout> 10 mm/min

3. 実験結果及び考察

3.1 マグネシウム合金 HC スクリューの機械的安全性

マグネシウム合金スクリューのねじり破壊強度 (降伏トルク, 破壊トルク) は, 非吸収性チタン合金スクリューの約 40% 程度, 吸収性 PLLA スクリューの 3 倍以上であった。また, マグネシウム合金スクリューのねじ込み特性は, チタン合金スクリューに比べ最大トルクが若干高いものの挿入性はほぼ同じであった。プッシュアウト荷重は, チタン合金スクリューの 1.5 倍程度, PLLA スクリューの 2 倍以上の値であった。以上の結果より開発したマグネシウム合金 HC スクリューの機械的安全性は, 吸収性の PLLA 既承認品に比べ初期強度が高く, スクリューの挿入性及び保持力はチタン合金既承認品と同等以上であることが実証された。

3.2 長期埋植における分解挙動

長期埋植試験 (10 ヶ月) では, 埋植部位の外観観察で骨折や炎症等の重篤な所見は見受けられず, μ CT 観察で HC スクリューがほぼ消失していることを確認した。組織標本観察では, 埋植部位でスクリュー残部がわずかに確認されたほか周囲に骨組織の形成が観察され, スクリューの骨親和性が認められた。また, 埋植部位及び周辺組織においてガスキャビティ, 壊死, 骨形成不全等を示す所見は認められなかった。

4. まとめ

マグネシウム合金 HC スクリューは, 開発コンセプト通りの機械的安全性と分解能・骨形成能を有しており, ある一定の期間で体内に完全に吸収されることが予想され, 安全性上の懸念は低いと考えられる。

謝辞

本研究は, AMED の課題番号 JP20he1302028j0003, JP22pc0101072h0001 の支援を受けた。

多糖誘導体の開発～歯科医療機器から体内埋植材料へ Development of Polysaccharide Derivatives - From Dental Devices to Implantable Materials

吉原久美子
Kumiko YOSHIHARA

*1 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研),香川県高松市林町2217-14

*1 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),

2217-14 Hayashi-cho, Takamatsu, Kagawa

1. 歯質接着材の開発

歯科治療では、診療内容に応じた多様な材料が使用されている。修復物にはレジン系材料やセラミックスが用いられ、補綴治療では、金属材料やジルコニア、レジン系材料が選択されるが、審美的要求の高まりにより金属の代替が進んでいる⁽¹⁾。また、3Dプリンターを活用した新材料の登場が個別化医療を可能にしている。

歯科治療においては、材料に加えて接着技術も重要な役割を果たしている。特に、修復物と歯質の接着は治療の耐久性と審美性を左右する要因である。接着技術は、歯質(象牙質やエナメル質)と材料の界面を安定化させ、隙間の発生を防ぐ役割を果たす。セルフエッチングタイプのボンディングシステムや多機能プライマーの登場により、審美的かつ耐久性の高い接着が可能となった。

私たちは、歯質接着材の開発において、特に歯質接着性機能性モノマーに注目してきた。機能性モノマーは、メタクリレート基とカルボン酸やリン酸など酸性の反応基を両端に持つモノマーである。市販の歯質接着材に用いられている4-methacryloyloxyethyl trimellitic acid (4-MET), 2-methacryloyloxyethyl phenyl hydrogen phosphate (Phenyl-P) および 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (10-MDP) の歯質との反応性を検討した。この中で特に10-MDPはカルシウムと化学的に結合する特性を有し、歯質表面のハイドロキシアパタイトと反応して化学的接着界面を形成する。さらに、10-MDPは長い疎水性部分と歯質などと結合部位に親水性部分を持つため、湿潤環境でも安定した接着が可能であり、耐久性にも優れていることがわかった⁽²⁻⁵⁾。

2 新規多糖誘導体の開発

生体吸収性材料は、コラーゲンやヒアルロン酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸が一般的だが、これらは生体への接着性がほとんどない。私たちは、歯科接着のメカニズムに着目し、新たな接着性を持つ生体吸収性材料の開発を目指した。特に、天然多糖プルランにリン酸基を導入し、骨と接着する体内吸収性材料の創製を試みた^(6,7)。

プルランは、黒酵母の発酵で製造される天然多糖類であり、水に溶けやすく、粉末やフィルム形態に加工できる。長年、食品分野で使用されてきたが、狂牛病問題の際には非ゼラチン性の薬用カプセル材料として需要が高まり、日本薬局方に製造専用の多糖として収載された。このような特徴を持つプルランを接着材料の基盤とすることで、被着体と材料の機械的嵌合および界面の化学的相互作用を高めることが可能となった^(6,7)。

接着材料においては、“ぬれ”の良さが接着強度に大きな影響を与える。プルランは多糖の中でも水溶性が高く、粘性も低いので、優れた“ぬれ”を実現できる可能性が高い^(6,7)。私たちは、このプルランをリン酸化したリン酸化プルランの合成方法を確立した⁽⁶⁻¹⁰⁾。その後、医療機器クラスIIに分類される歯科歯髄治療材料⁽⁸⁾や内視鏡用粘膜下注入材としての開発を進め、薬事承認を得た。現在では、医療機器クラスIV材料である唇顎口蓋裂治療材料の研究開発を進めている^(6,7)。

5. 参考文献

1. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Van Landuyt K, Yoshida Y, Peumans M. From Buonocore's Pioneering Acid-Etch Technique to Self-Adhering Restoratives. A Status Perspective of Rapidly Advancing Dental Adhesive Technology. *J Adhes Dent*. Vol. 22 No. pp: 7-34 (2020).
2. Yoshihara K, Yoshida Y, Nagaoka N, Fukegawa D, Hayakawa S, Mine A, Nakamura M, Minagi S, Osaka A, Suzuki K, Van Meerbeek B. Nano-controlled molecular interaction at adhesive interfaces for hard tissue reconstruction. *Acta Biomater*. Vol. 6 No. 9 pp:3573-3582 (2010).
3. Yoshihara K, Nagaoka N, Nakamura A, Hara T, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Nano-Layering Adds Strength to the Adhesive Interface. *J Dent Res*. Vol. 100 No.5 pp:515-521 (2021).
4. Yoshihara K, Nagaoka N, Yoshida Y, Van Meerbeek B, Hayakawa S. Atomic level observation and structural analysis of phosphoric-acid ester interaction at dentin. *Acta Biomater*. Vol.97 pp: 544-556 (2019).
5. Yoshihara K, Hayakawa S, Nagaoka N, Okihara T, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Etching Efficacy of Self-Etching Functional Monomers. *J Dent Res*. Vol. 97 No.9 pp:1010-1016 (2018)
6. 吉田靖弘, 中西康, 赤坂司, 日下輝雄, 山本照子. 北海道大学におけるデンタルイノベーション. *日本歯科医学会連合雑誌*, Vol. 1 No.1 pp:17-21 (2022).
7. 吉田靖弘, 中西康, 赤坂司. 非動物由来の生体吸収性ポリマーを用いた骨再生・再建. *日本口腔インプラント学会誌*, Vol: 37 No.2 pp:103-111 (2024).
8. Pedano MS, Li X, Camargo B, Hauben E, De Vleeschauwer S, Yoshihara K, Van Landuyt K, Yoshida Y, Van Meerbeek B. Injectable phosphopullulan-functionalized calcium-silicate cement for pulp-tissue engineering: An in-vivo and ex-vivo study. *Dent Mater*. Vol:36 No.4 pp:512-526 (2020).
9. Takahata T, Okihara T, Yoshida Y, et al. Bone engineering by phosphorylated-pullulan and b-TCP composite. *Biomed Mater* Vol:10 pp:065009 (2015)
10. Nagamoto K, Nakanishi K, Akasaka T, Abe S, Yoshihara K, Nakamura M, Hayashi H, Takemoto S, Tamura M, Kitagawa Y, Van Meerbeek B, Yoshida Y. Investigation of a new implant surface modification using phosphorylated pullulan. *Front Bioeng Biotechnol*. Vol:22 No.12 pp:1378039 (2024).

消化管手術における縫合不全リスク軽減を目指した水中強硬化接着剤の研究 Underwater tough adhesives to reduce the risk of anastomotic leakage in gastrointestinal surgery

小松ひより^{*1,2}, 伊藤椎真^{*1,2}, Palai Debabrata^{*2}, 西口昭広^{*2}, 田口哲志^{*1,2}

Hiyori KOMATSU^{*1,2}, Shima ITO^{*1,2}, Debabrata PALAI^{*2}, Akihiro NISHIGUCHI^{*2}, Tetsushi TAGUCHI^{*1,2}

※1 筑波大学理工情報生命学術院, つくば市天王台 1-1-1、※2 物質・材料研究機構, つくば市並木 1-1

^{*1}University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, ^{*2}National Institute for Material Science, 1-1 Namiki, Tsukuba

1. 背景

消化管がんを腹腔鏡等により切除する場合、術部は縫合や自動吻合機により閉鎖されるが、術後の合併症として縫合不全が高頻度で生じることが報告されている。縫合不全は、術部の血行不良、閉鎖不良、腸管内圧上昇などにより引き起こされるが、根本的な対策は未だ確立されていない。そのため、術部の閉鎖と共に縫合不全の発生率を抑えるバイオマテリアルの開発が期待されている。これまで我々は、 α -シクロデキストリン (α CD) とデシル基 (C10) 導入スケソウダラ由来ゼラチン (C10-ApGltin) による包接ポリマーとポリエチレングリコール系架橋剤 (4S-PEG) から成る *in situ* 組織接着剤を開発し、水環境での膨潤を抑制すると共に脳硬膜の閉鎖を可能にすることを明らかにした⁽¹⁾。

本研究では、 α CD と中長鎖アルキル基導入 ApGltin による包接ポリマー (α CD/Alkyl-ApGltin) と 4S-PEG からなる組織接着剤を設計した (Fig. 1)。得られたゲルの水環境における膨潤・収縮特性、機械的強度およびブタ大腸組織閉鎖能について評価した。

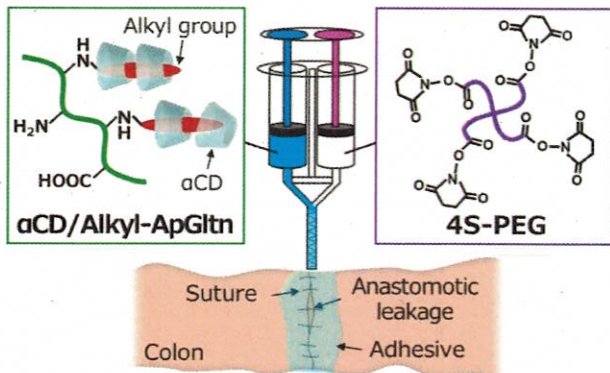


Fig. 1 Application of α CD/Alkyl-ApGltin adhesive for prevention of anastomotic leakage of the gastrointestinal tract.

2. 実験

Alkyl-ApGltin はタラ由来ゼラチン (Org-ApGltin) に含まれるリジン残基に中長鎖アルキルアルデヒドを反応させ Schiff 塩基とした後、2-ピコリンボランにより還元することで合成した⁽¹⁾。Alkyl-ApGltin と α CD を緩衝液に溶解することで α CD/Alkyl-ApGltin 溶液を調製し、4S-PEG 溶液と *in situ* 架橋することで水環境接着剤を調製した。膨潤・収縮率は、ディスク状に成型したゲルをダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) に浸漬し、浸漬前後の質量を測定することで評価した。機械的強度は、ダンベル状に成型した D-PBS 浸漬前後のゲルをテクスチャーアナライザーにより評価した。組織閉鎖能はコラーゲンゼラチンおよびブタ大腸を用いて ASTM F2392-04 規格に従った耐圧試験により評価した。

3. 結果・考察

疎水鎖長と疎水基導入率の異なる Alkyl-ApGltin を合成した。Alkyl-ApGltin 溶液の粘度は、 α CD を添加することにより減少した。これは、ApGltin に導入した中長鎖アルキル基が α CD によって包接され、中長鎖アルキル基間の疎水性相互作用が阻害されたことに起因すると考えられた。アルキル鎖長 14、導入率 43 mol% の Alkyl-ApGltin (α CD/43C14-ApGltin) を用いた接着剤硬化物において、D-PBS 中での収縮が観察された (Fig. 2a)。D-PBS に浸漬後の α CD/43C14-ApGltin 接着剤硬化物の引張強度は浸漬前の 10 倍以上の最大引張強度と 2 倍以上の最大伸び率を示した (Fig. 2b)。また、 α CD/43C14-ApGltin 接着剤硬化物の耐圧強度は、Org-ApGltin と比較して有意に高く、D-PBS への浸漬により耐圧強度が最大 1.7 倍上昇することが明らかになった。 α CD/43C14-ApGltin 接着剤硬化物の水環境での収縮性と強硬化は、接着剤硬化物中の α CD が D-PBS 中へ拡散し、中長鎖アルキル基間の疎水性相互作用による自己組織化 (物理架橋形成) が促進されたことに起因すると考えられた。

以上の結果より、 α CD/43C14-ApGltin 接着剤は、消化管吻合部へ適用することで術後に生じる浸出液等の水分に対応して収縮し、強硬化するため縫合不全の発生率を低減できると考えられる。

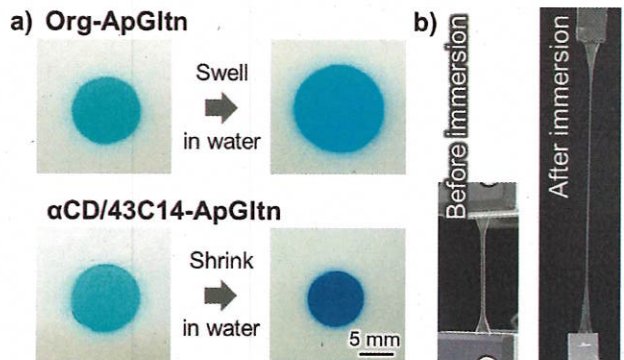


Fig. 2 Physico-chemical properties of α CD/43C14-ApGltin hydrogel adhesive before/after immersion in D-PBS. a) Swelling/shrinking behavior of Org and α CD/43C14-ApGltin hydrogel adhesives after immersion in D-PBS for 24 hrs. b) Enhanced mechanical strength of α CD/43C14-ApGltin hydrogel adhesive after immersion in D-PBS for 24 hrs.

5. 参考文献

- (1) Komatsu, H.; Watanabe, S.; Ito, S.; Nagasaka, K.; Nishiguchi, A.; Taguchi, T., "Improved Swelling Property of Tissue Adhesive Hydrogels Based on α -Cyclodextrin/Decyl Group-Modified Alaska Pollock Gelatin Inclusion Complexes", *Macromol. Biosci.*, 23, 2300097 (2023).

直鎖／分岐アルキル基導入組織接着剤の設計と機能評価

南阪本咲月^{*1*3}, 小松ひより^{*2*3}, 渡邊志春^{*3}, 伊藤椎真^{*2*3}, 田口哲志^{*2*3}*¹ 筑波大応用理工,つくば市天王台 1-1-1、*² 筑波大院数理物質,つくば市天王台 1-1-1、*³ 物質・材料研究機構,つくば市並木 1-1

1. 緒言

医療用の組織接着剤は肺の切除部位からの空気漏れ防止および大動脈血管吻合部からの血液滲出防止等を目的として使用される。現在臨床で使用されている組織接着剤にはシアノアクリレート系、アルデヒド系、フィブリン系などが挙げられるが、これらは組織接着性と生体親和性の両立に課題がある。我々はこれまでスケトウダラ由来ゼラチン (ApGltin) に直鎖アルキル基を導入した Alkyl-ApGltin とポリエチレングリコール系の架橋剤 (4S-PEG) を混合することによりゲル化する組織接着剤を開発しており、化学架橋と疎水基による疎水性相互作用により優れた湿潤組織接着能と生体親和性の両立を実現することを明らかにしている⁽¹⁾⁽²⁾。一方これまで分岐構造を有するアルキル基を導入したアルキル化 ApGltin に関する知見は得られていない。そのため本研究では、炭素数 8 の 3 種類 (stC8/asC8/syC8-ApGltin) および炭素数 10 の 2 種類 (stC10/syC10-ApGltin) の直鎖／分岐アルキル基導入 ApGltin を合成し、4S-PEG を架橋剤とする接着剤の組織接着性および生体親和性について評価した。

2. 実験

8 個の炭素を有する直鎖 Octyl 基、分岐 2-Ethylhexyl 基および分岐 2-Propylpentyl 基、10 個の炭素を有する直鎖 Decyl 基、分岐 2-butylhexyl 基を導入したアルキル化 ApGltin は、水／エタノール混合溶媒中で ApGltin のアミノ基をアルデヒドと反応させて Schiff 塩基とした後、2-ピコリンボランによる還元的アミノ化により合成した (Fig1)。得られたアルキル化 ApGltin を濃度 15w/v% でホウ酸緩衝液に溶解し、4S-PEG のリン酸緩衝液とダブルシリンジにより混合することで接着剤を調製した。なお、4S-PEG は Org-ApGltin のアミノ基量に対して 40% として調製した。ゲルの引張強度、膨潤度のほか ASTM F2392-04 規格に従ったコラーゲンケーシング、ブタ肺胸膜に対する耐圧強度試験を行った。さらに、細胞毒性試験およびラットの皮下埋入試験を行うことにより生体適合性および生体分解性についても評価した。

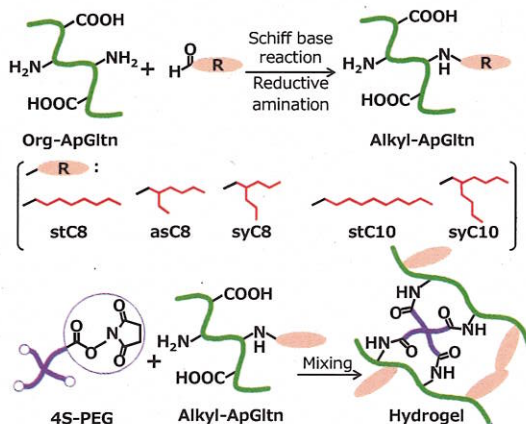


Fig.1 Modification of ApGltin with alkyl groups. Crosslinking reaction of ApGltin with 4S-PEG.

3. 結果と考察

低・中・高導入率の stC8/asC8-ApGltin、低導入の syC8-ApGltin および低・中導入率の stC10/syC10-ApGltin を合成し、TNBS 法によりそれぞれの疎水基導入率を決定した。得られた疎水化タラゼラチンの溶液粘度は 45stC8 の方が 45br(as)C8 の 6 倍以上高い傾向を示した (Fig2)。粘度とゲル化時間に正の相関関係が見られたことから、粘度の増加は架橋剤との混合不良の原因となることが示唆された。また、コラーゲンケーシングに対する耐圧強度の疎水基導入率依存性について調べたところ、耐圧強度は stC8/asC8 のいずれの場合でも、ゼラチン溶液の粘度が 4S-PEG 溶液の粘度と最も近い低導入率 (9mol%) のとき最大となり、導入率の増加、すなわちゼラチン溶液の粘度の増加に伴って耐圧強度が低下する傾向が確認された。さらに、同程度の導入率では、stC8 よりも asC8 および syC8 の方が有意に高い耐圧強度を示すことが明らかとなり、asC8 と syC8 の間に有意な差は確認できなかった。これは直鎖よりも分岐鎖の方がコラーゲン等のタンパク質との疎水性相互作用が強く、接着剤とコラーゲンケーシングとの界面強度が高くなったことに起因すると考えられる。また、マウス由来線維芽細胞 (L929) を用いた細胞毒性試験を実施したところ全てのサンプルで細胞生存率 80% を上回り、また細胞生存率に有意な差はなかったため、細胞毒性はないと判断できた。本研究ではさらにラット皮下埋入試験による生体内分解性の評価についても報告する。

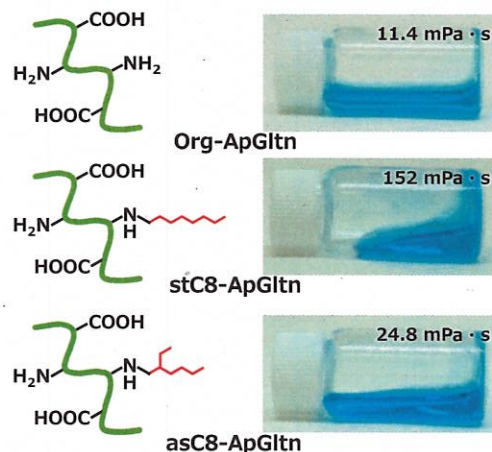


Fig.2 Chemical structures and their solution viscosities of Org-ApGltin and stC8/brC8 ApGltins.

5. 参考文献

- (1) Y Mizuno, R Mizuta, M Hashizume, et al. Enhanced sealing strength of a hydrophobically-modified Alaska pollock gelatin-based sealant, *Biomater. Sci.*, Vol. 5, pp. 982–989 (2017).
- (2) R Mizuta, T Taguchi. Enhanced Sealing by Hydrophobic Modification of Alaska Pollock-Derived Gelatin-Based Surgical Sealants for the Treatment of Pulmonary Air Leaks, *Macromol. Biosci.*, Vol. 17, No. 1600349 (2017).

異なる架橋密度を有する組織接着性止血粒子の設計と機能評価

西野初音^{*1,3}, 伊藤椎真^{*2,3}, 小松ひより^{*2,3}, 南阪本咲月^{*1,3}, 小林康子^{*3}, 渡邊志春^{*3},
西口昭広^{*3}, 田口哲志^{*2,3}

※¹ 筑波大応用理工, つくば市天王台 1-1-1, ※² 筑波大院数理工, つくば市天王台 1-1-1,
※³ 物質・材料研究機構, つくば市並木 1-1

1. 緒言

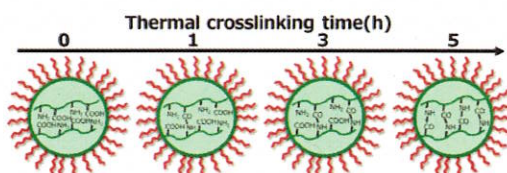
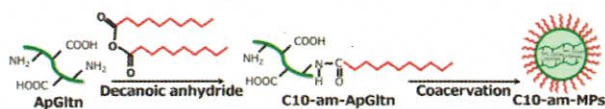
近年、早期消化管がんの低侵襲治療として内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)が広く用いられているが、その術後出血などの合併症が偶発することが課題となっている。我々はこれまでに、ESDの術後合併症抑制への応用を目指し、デシル基導入タラゼラチン(C10-sa-ApGltN)を用いた粒子(C10-sa-MPs)を開発した。C10-sa-MPsは、湿潤環境下において粘膜下層剥離組織に接着し、水中安定性にも優れていることが明らかとなった⁽¹⁾。さらに、デカノイル基導入タラゼラチン(C10-am-ApGltN)を用いた粒子(C10-am-MPs)を開発し、C10sa-MPsの接着強度を維持しつつ、水和能と血液凝固能を向上させることに成功した⁽²⁾。一方、C10-am-MPsの架橋密度と水和速度、接着強度および止血能の関係は明らかになっていない。

そこで本研究では、C10-am-ApGltNを用いて架橋密度の異なる粒子を調製し、止血・接着能を評価した。さらに、得られた粒子の生体適合性を細胞毒性試験によって評価した。

2. 実験

C10-am-ApGltNは、ApGltNと無水デカン酸を塩基性条件下で反応させることにより合成した。得られたC10-am-ApGltNは、FT-IR, ¹H-NMR、および2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム二水和物(TNBS)を用いた疎水基導入率測定により評価した。粒子は、未修飾ApGltNまたはC10-am-ApGltNから、水/エタノール混合溶液を用いたコアセルベーション法により、Org-MPsおよびC10-am-MPsを調製した。粒子の熱架橋時間を0、1、3、5時間とすることで架橋密度を制御した。以後、それぞれの熱架橋時間で調製されたOrg-MPsおよびC10-am-MPsの略称をOrg-0、1、3、5hおよびC10-0、1、3、5hとした。

まず、熱架橋時間の異なる粒子を生理食塩水に浸漬し、水中でのコロイドゲル形成を位相差顕微鏡で観察した。また、架橋密度が組織接着能に与える影響を明らかにするため、テクスチャーアナライザーを用いて、ブタ胃粘膜下層剥離組織に対する粒子の接着強度を測定した。さらに、架橋密度が止血能に与える影響を明らかにするため、ブタ血液を用いた血液凝固時間と血液-粒子混合物のレオロジーを測定した。また、調製した粒子の細胞毒性を評価するため、粒子に曝露させたヒト結腸癌由来細胞Caco-2の生存率を測定した。



Scheme.1 Synthesis and preparation process of C10-am-MPs.

3. 結果と考察

無水デカン酸とApGltNの反応により、C10-am-ApGltNが収率82%で得られた。FT-IRおよび¹H-NMRスペクトルから、ApGltNにデカノイル基が導入されていることが確認された。TNBSによる疎水基導入率は45 mol%であった。Fig. 1(a)は、熱架橋前後のOrg-MPsおよびC10-MPsの電子顕微鏡観察結果を示している。デカノイル基導入の有無にかかわらず新球場の粒子が得られた。粒径はC10-MPsの方がOrg-MPsと比較してやや小さい傾向が認められた。一方、熱架橋時間の異なる粒子を生理食塩水中で30分間水和させた後の様子を位相差顕微鏡観察により観察するとOrg-0、1hおよびC10-0、1hはともに生理食塩水に溶解した。Org-3、5hを生理食塩水に浸漬すると、水和して膨潤した。一方、C10-3、5hを水和させると、凝集してコロイドゲルを形成する様子が確認された。これらの結果から、C10-MPsの架橋密度を調整することにより、生理食塩水中でのコロイドゲル形成を制御できることが示された。

ブタ胃粘膜下層における粒子の接着強度を測定したところ、デシル基導入と熱架橋により接着強度が増大する傾向がみられた。これは、熱架橋したC10-MPsが組織の湿潤環境下でも粒子形状を保持することで、組織接着の維持に重要な疎水性相互作用を可能にしたことに起因すると考えられる。

一方、Fig. 1(b)は、ブタクエン酸加血を用いた粒子の血液凝固試験の結果を示している。デシル基導入と熱架橋による血液凝固の促進効果が認められた。これは、粒子と血球間の疎水性相互作用による凝集と、粒子の水和による血球成分の濃縮という2つの要因によるものと考えられた。

粒子より作製したコロイドゲルを抽出した培地でCaco-2を培養したところ、粒子に曝露していないControl群と比較していずれの群でも生存率に有意な差は認められなかった。

以上の結果より、C10-3、5hが組織接着性止血粒子として有用であることが明らかとなった。

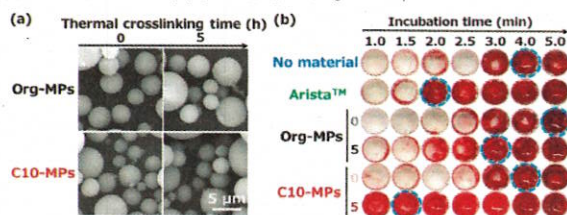


Fig.1 (a) SEM images of different MPs. (b) Images of porcine whole blood mixed with different MPs after washing with PBS at different time points.

4. 参考文献

- (1) A. Nishiguchi, Y. Kurihara, T. Taguchi, Underwater-adhesive microparticle dressing composed of hydrophobically-modified Alaska pollock gelatin for gastrointestinal tract wound healing, *Acta Biomaterialia*, Vol. 99, pp. 387–396 (2019).
- (2) S. Ito, K. Nagasaka, H. Komatsu, et al., Improved hydration property of tissue adhesive/hemostatic microparticle based on hydrophobically-modified Alaska pollock gelatin, *Biomaterials Advances*, Vol. 159, pp. 213834 (2024).

フェノール性水酸基修飾タラゼラチンを用いた 医療用接着剤の設計と置換基効果

宮田真理^{1,2}, 小松ひより^{1,3}, 伊藤椎真^{1,3}, 渡邊志春¹, 南阪本咲月^{1,3}, 田口哲志^{1,3}

¹物質・材料研究機構, つくば市並木 1-1, ²長岡工業高等専門学校, 長岡市西片貝町 888,

³筑波大学, つくば市天王台 1-1-1

1. はじめに

多様な環境下で活用されている接着剤は機能性材料として有用性が高く、湿潤な生体内でも使用可能な医療用接着剤は、大動脈手術後の血管吻合部の血液の漏れ防止など、創傷閉鎖や止血などの効果的な方法として期待されている。一方、海洋生物であるイガイは、接着環境には厳しい水中において有機・無機・金属材料等の様々な材料に接着する特徴を有しており、カテコール基を持つタンパク質が接着力をもたらすことが知られている。これまで我々は、スケソウダラ由来ゼラチン (ApGlttn) にカテコール基を導入した医療用接着剤を開発し、優れた組織接着性と生体親和性を両立できることを明らかにしてきた⁽¹⁾。その一方で、フェノール性水酸基はその化学構造によって金属材料等に対する水中接着性が変化することが明らかになっているが、フェノール性水酸基の化学構造による生体組織接着性および生体親和性に関する効果は明らかになっていない。

そこで本研究では、種々のフェノール性水酸基を修飾した ApGlttn を合成し、これらを用いた医療用接着剤の機能評価を行った結果を報告する。

2. 実験

種々のフェノール性水酸基修飾スケソウダラ由来ゼラチン (nHy-ApGlttn (n = 0, 1, 2, 3)) は、還元アミノ化反応を用いて合成した (Fig. 1)。得られた nHy-ApGlttn 中のフェノール性水酸基導入率は TNBS 法により算出し、FT-IR 及び ¹H-NMR による構造評価を行った。nHy-ApGlttn (n = 0, 1, 2, 3) 接着剤は、得られた nHy-ApGlttn と臨床使用実績のあるポリエチレングリコール系架橋剤 (4S-PEG) を *in situ* 混合することで調製した。調製した種々の接着剤硬化物 (ゲル) について、ゲル単体の膨潤度や引張強度等の基礎物性を評価した。耐圧強度は、被着体にコラーゲンケーシングやブタ大動脈を用い、ASTM F2392-04 に準拠した方法で評価した。被着体中央に約 3 mm の欠損部を作製し、2 液混合 W シリンジで接着剤を塗布して欠損部を塞いだ後、接着強度試験を行った。その後、試験片をヘマトキシリン・エオジン (HE) で染色し、接着剤-大動脈組織界面の組織学的評価を行った。また、ラットの背部皮下に nHy-ApGlttn 接着剤硬化物を埋入し、3, 7, 14, 28, 64 日後に埋入組織を採取し、接着剤硬化物および組織を HE 染色することで組織反応を評価した。

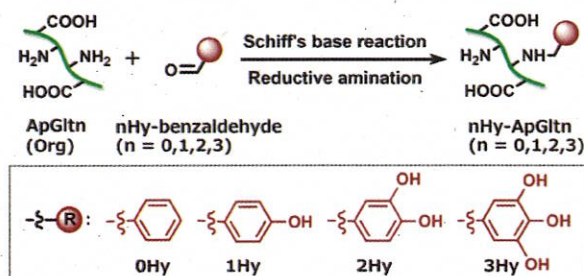


Fig.1 Synthesis of phenolic hydroxyl groups-modified Alaska pollock gelatins (nHy-ApGlttn (n = 0, 1, 2, 3)).

3. 結果・考察

nHy-ApGlttn (n = 0, 1, 2, 3) の合成収率は 90%前後の高収率を示した。nHy-ApGlttn 接着剤の膨潤度は、未修飾 ApGlttn (Org-ApGlttn) 接着剤よりも低下し、水酸基由来の相互作用やベンゼン環由来の疎水基導入による膨潤性の低減が確認された。nHy-ApGlttn 接着剤の引張強度を比較すると、水酸基を有する nHy-ApGlttn (n = 1, 2, 3) 接着剤の引張応力は、Org-ApGlttn および 0Hy-ApGlttn 接着剤よりも向上し、水素結合形成に伴うバルク強度の向上が確認された。

各被着体に対する nHy-ApGlttn 接着剤の耐圧強度は、Org-ApGlttn よりも大きく向上した (Fig. 2(a))。さらに、被着体にブタ大動脈を用いた場合、ヒト血圧 (120-130 mmHg) を超える耐圧強度を有することが明らかとなった。また、フェノール性水酸基の種類や導入率の違いによって耐圧強度が変化することが示された。フェノール性水酸基の種類および導入率を制御することによって、接着強度の制御が可能であることが明らかとなった。耐圧強度試験片の HE 染色画像から、種々のフェノール性水酸基が修飾された nHy-ApGlttn は、Org-ApGlttn と比較して組織接着性に違いが見られた。4S-PEG 架橋剤による被着体とのアミド結合形成に加え、フェノール性水酸基がもたらす相互作用が組織接着性を強化したと考えられる。

ラット皮下に埋入した nHy-ApGlttn 接着剤は、経過に伴い生体内で徐々に分解が進行し、2 か月程で完全に分解することが明らかとなった (Fig. 2(b))。修飾置換基の種類で生体内分解速度に違いが得られることも確認された。

湿潤な環境下で高度な組織接着性と生体親和性を有し、且つ、それらは接着強度の制御が可能であることから、種々の生体内環境に合わせた応用展開が期待される。

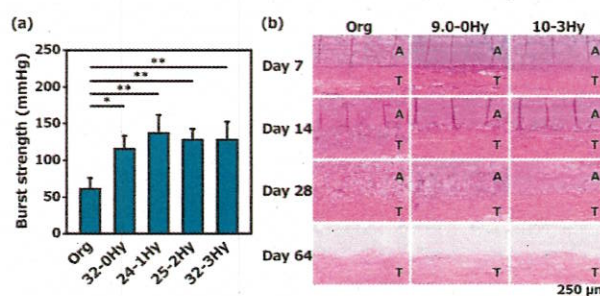


Fig.2 Performance of phenolic hydroxyl group modified Alaska pollock gelatins (nHy-ApGlttn (n = 0, 1, 2, 3)). (a) Burst strength of nHy-ApGlttn adhesives against collagen casing (degree of substitution: 24-32 mol%, n = 3-4, *P < 0.05, **P < 0.01). (b) Images of Org-ApGlttn and nHy-ApGlttn (n = 0, 3) adhesives implanted subcutaneously in rats and obtained by staining with hematoxylin and eosin (HE). A: adhesive; T: tissue.

4. 参考文献

(1) K. Nagasaka, S. Watanabe, T. Taguchi, *et al.*, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, Vol.220, No.112946 (2022).

The influence of matrix on magnetothermal property and anticancer effect of Fe₃O₄ nanoparticles

Man WANG^{*1,*2}, Rui SUN^{*1,*2}, Huajian CHEN^{*1}, Xiaohan LIU^{*1,*2}, Toru YOSHITOMI^{*1}, Naoki KAWAZOE^{*1} and Guoping CHEN^{*1,*2}

^{*1}National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, ^{*2}University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba,

In recent years, magnetic hyperthermia (MH) has emerged as a promising approach for cancer therapy. MH uses magnetic nanoparticles (MNPs) to convert magnetic energy into thermal energy under an alternating magnetic field (AMF) to increase local temperature for ablation of cancer cells. The magnetic-thermal conversion efficiency of MNPs is not only decided by the intrinsic properties of MNPs (shape, size, dispersion, composition, etc.), but also affected by the microenvironmental matrix surrounding the MNPs⁽¹⁾. Hydrogels and porous scaffolds have been used to deliver MNPs for MH, while it is unclear how hydrogels and porous scaffolds affect the magnetic-thermal conversion efficiency of MNPs. In this study, the influence of hydrogels and porous scaffolds on magnetic-thermal conversion efficiency of MNPs was investigated (Fig. 1).

Fe₃O₄ NPs were synthesized via solvothermal method and characterized by TEM. The magnetic heating effect of free Fe₃O₄ NPs, agarose/Fe₃O₄ hydrogels. The same concentration of Fe₃O₄ NPs was used in different microenvironments (phosphate buffer saline (PBS), agarose hydrogels and gelatin porous scaffolds) to compare the influence of different matrices on magnetic thermal effects. Different concentration of Fe₃O₄ NPs in the same matrix was used to study the Fe₃O₄ NPs concentration dependence of magnetic-thermal conversion. The anticancer effect was investigated in vitro by incubating breast cancer cells with free Fe₃O₄ NPs, agarose/Fe₃O₄ hydrogels and gelatin/Fe₃O₄ porous scaffolds under AMF irradiation. The synthesized Fe₃O₄ NPs were visualized by TEM and the images (Fig. 2A and 2B) showed that the MNPs had a flower-like shape with an average size of 30.8 ± 5.7 nm. As shown in Figure 2C, with citrate ion modification, the MNPs were well-dispersed in aqueous solution. The hydrodynamic size of Fe₃O₄ NPs was 108.5 ± 28.5 nm (Fig. 2D). The free Fe₃O₄ NPs in PBS exhibited the best magnetic thermal property, while embedding in agarose hydrogels or gelatin porous scaffolds decreased the temperature change during AMF irradiation (Fig. 3A). The free Fe₃O₄ NPs showed the highest anticancer effect under AMF irradiation, followed with Fe₃O₄ NPs embedded in agarose hydrogels and then Fe₃O₄ NPs embedded in gelatin porous scaffolds (Fig. 3B). The results suggested that the microenvironmental matrices could affect the magnetic-thermal performance of Fe₃O₄ NPs and appropriate matrices should be designed to maximize the therapeutic effect of Fe₃O₄ NPs for biomedical applications⁽²⁾.

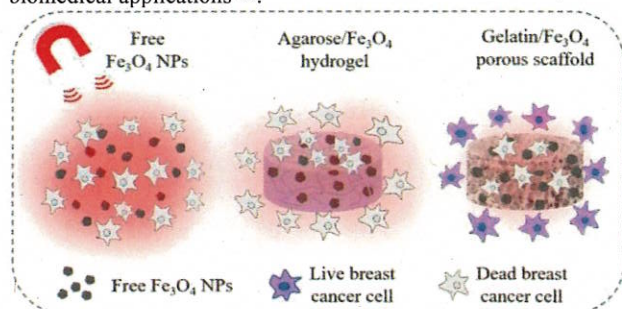


Fig. 1. Graphic abstract of the anticancer effect of Fe₃O₄ NPs embedded in different matrices.

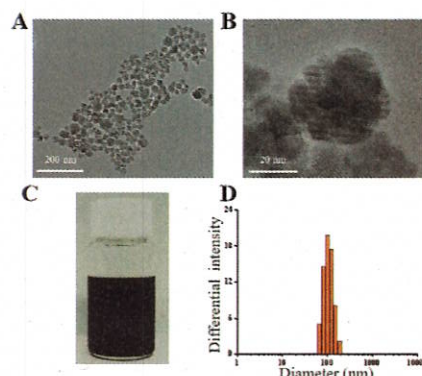


Fig. 2. TEM images of citrate modified Fe₃O₄ NPs at (A) low and (B) high magnification. (C) Gross appearance of citrate modified Fe₃O₄ NPs in aqueous solution. (D) The hydrodynamic size distribution of citrate modified Fe₃O₄ NPs.

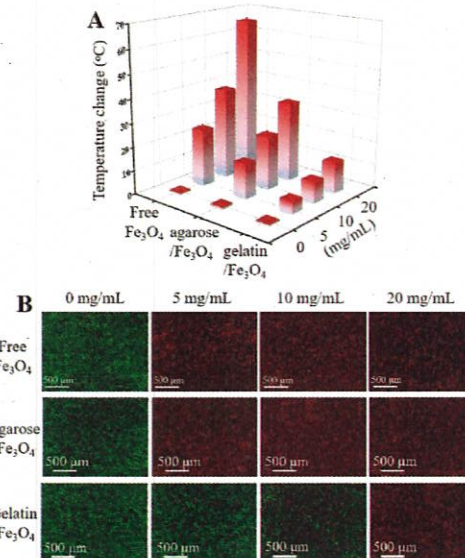


Fig. 3. (A) The temperature increments of free Fe₃O₄ NPs, agarose/Fe₃O₄ hydrogels and gelatin/Fe₃O₄ porous scaffolds with different amounts of NPs after AMF irradiation. (B) The live/dead staining of cells coculture with free Fe₃O₄ NPs, agarose/Fe₃O₄ hydrogels and gelatin/Fe₃O₄ porous scaffolds with different amounts of NPs (0, 5, 10 and 20 mg/mL) after AMF irradiation.

(1) H. Gavilán, SK Avugadda, T. Fernández-Cabada, et al. Magnetic nanoparticles and clusters for magnetic hyperthermia: optimizing their heat performance and developing combinatorial therapies to tackle cancer. *Chem. Soc. Rev.* 50, 11614–11667 (2021).

(2) M Wang, R Sun, HJ Chen, et al. Influence of hydrogel and porous scaffold on the magnetic thermal property and anticancer effect of Fe₃O₄ nanoparticles, *Microstructures.* 3, 2023042 (2023).

ナノ材料による放射線免疫治療の最適化

Development of radiosensitized nanoparticle

孫略^{*1}、杉浦悠紀^{*1}
Lue Sun^{*1}, Yuki Sugiura^{*1}

^{*1} 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市東 1-1-1

^{*1} National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba

1. 背景

がん罹患したことで、(治療のために)仕事をやめてしまい、経済的貧困に陥ることが社会問題となっている。仕事が続けられるがん治療を行うことが必要であり、副作用が手術や抗がん剤に比べて小さい放射線治療が注目を浴びている。正常組織を通過して放射線ががん組織に届くことになるので、正常組織の耐容線量に応じて照射可能な放射線量が決まる。このため、がんの治癒に必要な線量が必ずしも当てられるわけではない。

一方で、がん組織は様々な方法で免疫逃避を行い、がん細胞の生存に有利な環境を構築している。放射線治療は抗腫瘍免疫を活性化する方向にも、抑制する方向にも動かすことができる2面性をもっており、どちらに動くかによって予後が左右されると考えられる。

2. 本研究の目的

本研究ではがん組織に直接投与することで放射線増感(放射線の殺細胞効果を増強する)作用と抗腫瘍免疫活性化作用を示すナノ粒子の開発を行っている。

3. 方法

3.1 ナノ粒子の細胞毒性

試験管で培養したがん細胞にナノ粒子を投与して、LDHの放出量を指標に細胞毒性評価を行った。

3.2 ナノ粒子の放射線増感作用(in vitro)

試験管で培養したがん細胞に毒性が出ない程度のナノ粒子を投与後、放射線を照射して、コロニー形成アッセイによって放射線増感作用を定量した。

3.3 ナノ粒子の放射線増感作用(in vivo)

がん細胞をマウスの皮下に移植し、ナノ粒子の投与後に放射線を照射して、腫瘍の増殖速度を指標にナノ粒子の放射線増感作用を評価した。

3.4 ナノ粒子の抗腫瘍免疫作用(in vivo)

上記3.3の実験後にマウスから脾臓を採取し、腫瘍免疫関連サイトカイン量を測定した。

4. 結果

(ナノ粒子単独では)細胞毒性が出ない濃度で、ナノ粒子に放射線増感作用があることが分かった。動物実験においてもいくつか濃度を振って投与し、放射線増感効果が得られる濃度を特定した。脾臓の解析から、ナノ粒子+放射線群は放射線単独群より抗腫瘍免疫が亢進していることが示唆された。また、ナノ粒子投与によって、マウスの体重が減少するなどの毒性は認められなかった。

抗炎症治療を目指したアポトーシス細胞模倣ポリマーの分子設計

Design of Phosphatidylserine-inspired Polymers for Anti-inflammatory Treatments

○佐藤孝祐^{1,2}, Ahmed NABIL¹, 荻原充宏^{1,2}
Kosuke SATO^{1,2}, Ahmed NABIL¹, Mitsuhiro EBARA^{1,2}

¹ 国立研究開発法人物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター, つくば市並木 1-1,

² 筑波大学大学院 理工情報生命学術院 数理工物質科学研究群, つくば市天王台 1 丁目 1-1

¹ Research Center for Macromolecules and Biomaterials (RCMB), National Institute for Materials Science (NIMS), 1-1 Namiki, Tsukuba, ² Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba

1. 緒言

近年、アポトーシス細胞が有する免疫寛容効果 (抗炎症効果) が注目されている⁽¹⁾。免疫寛容を誘導することで抗炎症作用が得られるため、ステロイドのような副作用を持たない、新規の抗炎症作用を持つ物質として期待されている。アポトーシス細胞の免疫寛容のメカニズムの一つとしてマクロファージなどの免疫細胞が細胞膜表面に露出した phosphatidylserine (PS) と呼ばれるリン脂質を認識することが明らかになっている⁽²⁾⁽³⁾。当研究室では PS を模倣した poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylserine) (eMPS ポリマー) の開発に成功しており、マクロファージ及びミクログリア細胞における抗炎症効果を報告している⁽⁴⁾。しかし、抗炎症効果に関する MPS モノマー構造の影響について明らかになっていない。そこで本研究では、PS 模倣モノマーのアルキル構造が異なる新たな PS 模倣ポリマーを合成し、細胞毒性及び抗炎症効果を評価した (Fig. 1)。

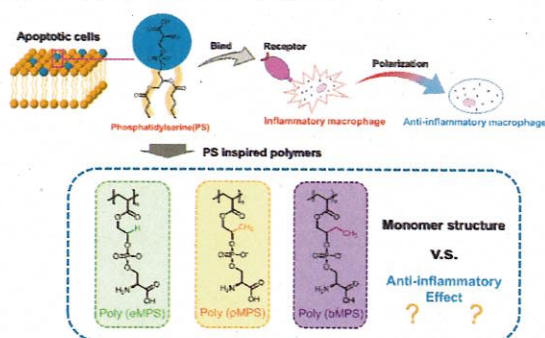


Fig. 1 Design of PS-inspired polymers for anti-inflammatory treatments.

2. 実験方法

先行研究をもとにホスホロアミダイト法により 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), *N*-Boc-*L*-serine *tert*-butyl ester, *O*-*tert*-butyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropyl phosphorodiamidite を用いて PS 模倣モノマーを合成した⁽⁵⁾。また、HEMA の代わりに 2-hydroxypropyl methacrylate (HPMA), 2-hydroxybutyl methacrylate (HBMA)を用いることで合計 3 種類のアルキル構造の異なる PS 模倣モノマーを合成した。続いて、可逆的付加開裂連鎖移動重合により各 PS 模倣ホモポリマーを重合した。最後にマクロファージ細胞株 (RAW 264.7 cells) を用いて alamarBlue™による細胞毒性評価および酵素結合免疫吸着法 (ELISA) による抗炎症効果評価をおこなった。

3. 結果及び考察

プロトン核磁気共鳴による構造解析結果より、各モノマーにおいてアルキル構造の違いに基づく、異なるプロトンピー

クが確認された。これより、アルキル構造の異なる 3 種類のモノマーの合成が示唆された。また、ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量解析結果より、各ポリマーの重合が確認された。

次に、alamarBlue™を用いて RAW 264.7 cells の細胞毒性評価をおこなった。Poly (eMPS), poly (bMPS)では PS 濃度 10 mM 以上、poly (pMPS)では PS 濃度 30 mM 以上において細胞毒性が確認された。これより抗炎症効果評価は PS 濃度 5mM 以下でおこなった。抗炎症効果評価ではリポ多糖で刺激した RAW 264.7 cells に各ポリマー (コントロール: リン酸緩衝液) を加え、炎症性サイトカインである IL-6 産生量を ELISA により測定した (Fig. 2)。コントロールと比較し、すべてのポリマー投与群での有意差が確認できなかった。これより、PS 模倣ポリマーの抗炎症効果への影響はアルキル構造以外に由来する可能性が示唆された。本研究によりアルキル構造が抗炎症効果に影響を与えないことが示唆され、今後、光学異性体などについて検討していく。

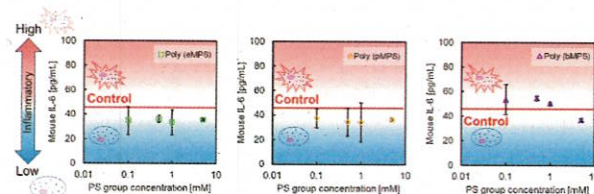


Fig. 2 Mouse IL-6 production by RAW 264.7 cells treated with PS-inspired polymers. (n = 3)

4. 参考文献

- (1) A. L. McCubrey, S. A. McManus, J. D. McClendon, et al. Polyamine import and accumulation causes immunomodulation in macrophages engulfing apoptotic cells, *Cell Reports*, Vol. 38, No. 8, 110222 (2022)
- (2) R. E. Voll, M. H. E. A. Roth, C. S. J. R. Kalden, Immunosuppressive effects of apoptotic cells, *Nature*, Vol. 390, pp. 350-351 (1997)
- (3) M. Cvetanovic and D. S. Ucker, Innate Immune Discrimination of Apoptotic Cells: Repression of Proinflammatory Macrophage Transcription Is Coupled Directly to Specific Recognition, *J Immunol*, Vol. 172, No. 2, pp. 880-889 (2004)
- (4) Y. Nakagawa, J. Lee, Y. Liu, et al. Microglial Immunoregulation by Apoptotic Cellular Membrane Mimetic Polymeric Particles, *ACS Macro Lett.*, Vol. 11, No. 2, pp. 270-275 (2022)
- (5) Y. Nakagawa, A. Saitou, T. Aoyagi, et al. Apoptotic Cell Membrane-Inspired Polymer for Immunosuppression, *ACS Macro Lett.*, Vol. 6, No. 9, pp. 1020-1024 (2017)

ベンゾイル基導入タラゼラチンを用いた組織接着性粒子の設計と機能評価

Design of tissue adhesive microparticles based on benzoyl group modified Alaska pollock gelatin

清水悠太郎^{*1,2}, 伊藤椎真^{*1,2}, 小松ひより^{*1,2}, 西野初音^{*1,2}, 南坂本咲月^{*1,2}, 小林康子^{*2},
渡邊志春^{*2}, 田口哲志^{*1,2}

Yutaro SHIMIZU^{*1,2}, Shima ITO^{*1,2}, Hiyori KOMATSU^{*1,2}, Hatsune NISHINO^{*1,2}, Satsuki MINAMISAKAMOTO^{*1,2}, Yasuko KOBAYASHI^{*2}, Shiharu WATANABE^{*2}, Tetsushi TAGUCHI^{*1,2}

※¹ 筑波大学, つくば市天王台 1-1-1, ※² 国立研究開発法人物質・材料研究機構, つくば市並木 1-1

^{*1} University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, ^{*2} National Institute of Materials Science (NIMS), 1-1 Namiki, Tsukuba

1. 背景

悪性胸膜中皮腫は主にアスベスト被ばくから数十年後に発症し、術後の生存期間が数年程度と極めて低いことが知られている。近年では悪性胸膜中皮腫の外科療法として、肺表面の胸膜に局在する腫瘍を剥がして除去する胸膜切除剥皮術が主流だが、胸膜に残存する腫瘍を完全に取り除くことが難しいという課題がある。そのため、低侵襲で肺表面に接着して肺からの空気漏れを防止すると共に残存する腫瘍を完全に殺傷するために抗がん剤徐放性を兼ね備えた材料開発が望まれている。我々はこれまでに種々のアルキル基を導入したスケトウダラ由来タラゼラチン(ApGltin)から調製した疎水化タラゼラチン粒子(C10-MPs)が、スプレー噴霧可能であり、湿潤環境において優れた組織接着性を有することを報告している⁽¹⁾⁽²⁾。本研究では、悪性胸膜中皮腫の標準的な抗がん剤であり、骨格にベンゼン環を有するペメトレキセド(PEM)と組織接着性粒子を複合化することを目的として、ベンゾイル基(Bz)導入した ApGltin (Bz-ApGltin) を合成した。得られた Bz-ApGltin を用いた粒子 (Bz-MPs) の調製および粒子の特性について評価した(Fig. 1)。

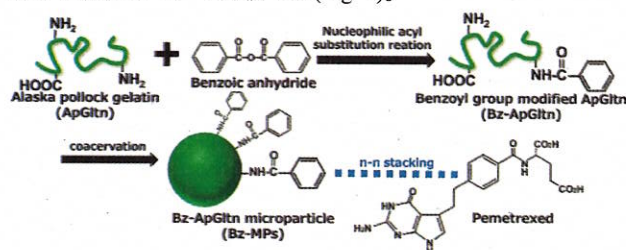


Fig. 1 Synthesis process for benzoyl group-modified Alaska pollock gelatin (Bz-ApGltin) to prepare Bz-MPs.

2. 実験

ApGltin 側鎖のアミノ基と Benzoic Anhydride の求核アシル置換反応により 4 種類の Bz 導入率の Bz-ApGltin を合成し、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法により Bz 導入率を定量した。Bz-MPs は、水/エタノール混合溶媒を用いた Bz-ApGltin のコアセルベーション法により調製し、異なる 4 種類の時間で熱架橋(150°C)を行った。調製した Bz-MPs は電子走査顕微鏡(SEM)を用いた形状観察と粒子径の測定、水接触角測定による表面の疎水性の評価、および D-PBS 中での水和挙動の経時的な観察を実施した。続いて Bz-MPs を D-PBS で水和することでコロイドゲルを調製し、経時的な含水率測定とレオロジー評価を行った。コロイドゲルの強度や組織に対する安定性は、耐圧強度試験をブタ胸膜に対して実施することで評価した。また、PEM を内包したコロイドゲルを調製し、同様に安定性を評価した。

つくば医工連携フォーラム 2025 講演予稿集 (2025.1.24, 国立研究開発法人産業技術総合研究所)

3. 結果と考察

合成した Bz-ApGltin のベンゾイル基導入率はそれぞれ 39, 49, 63, 92 mol%であり、これらの Bz-ApGltin はこれまで我々が報告してきたアルキル基導入 ApGltin と同様に、コアセルベート法により真球に近い粒子を形成することが確認された。Bz-MPs の水接触角は Bz 導入率が 63 mol%の際に最大となった。これらの粒子を D-PBS で水和させたところ、39mol%の Bz-MPs を除き水和から 60 分後までに会合体の形成が確認された。(Fig. 2)Bz-MPs の含水率は未修飾の ApGltin-MPs と比較して低く、水和から 30 分時点で膨潤速度が減少し、平衡膨潤に近づいたことが確認された。レオロジー試験では、92mol%の Bz-MPs を除いて低剪断ひずみ領域では貯蔵弾性率が損失弾性率よりも高く、ゲル状態に達していることが確認された。また、熱架橋が 0h, 1h の Bz-MPs は測定した剪断ひずみ領域ではゲル状態を示さず、92mol%の Bz-MPs と同様に不十分な架橋が原因で Bz-MPs が D-PBS 中に溶解したことが示唆された。一方で、ゲル状態が確認された熱架橋時間が 3h, 5h の Bz-MPs のうち、3h の Bz-MPs は 5h よりも高い弾性率を示し、ゲルの機械的強度が他の架橋時間と比較して高いことが確認された。コロイドゲルの耐圧強度は、Bz 導入率が 63 mol%の際に肺平均内圧を超え最大となっており、粒子表面の高密度なベンゾイル基によって、粒子間および粒子組織間で形成される強い相互作用に起因して耐圧強度が向上したことが示唆された。また、熱架橋時間が 3h の Bz-MPs のコロイドゲルのみで肺平均内圧を超えた平均耐圧強度が確認された。ペメトレキセドを内包したコロイドゲルでは、内包前後で耐圧強度の有意差は確認されず、また内包量を変化させても耐圧強度に影響を与えなかった。

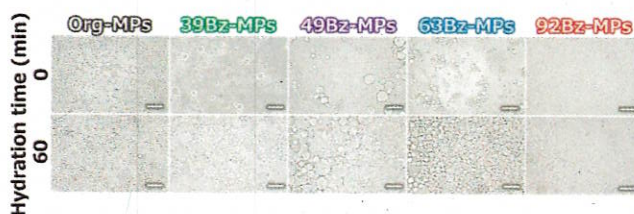


Fig. 2 Colloidal gel formation of Org-/Bz-MPs after hydration in D-PBS for 60 min. Scale bar: 5 μ m.

(1) A Nishiguchi, Y Kurihara, T Taguchi, Underwater-adhesive microparticle dressing composed of hydrophobically-modified Alaska pollock gelatin for gastrointestinal tract wound healing, *Acta Biomater*, Vol. 99, 387–396 (2019).

(2) S Ito, K Nagaska, H Komatsu, D Palai, et al. Improved hydration property of tissue adhesive/hemostatic microparticle based on hydrophobically-modified Alaska pollock gelatin, *Biomater Adv*, Vol. 159, 21384 (2024).

Composite scaffolds with synergistic effects of stepwise photothermal therapy and chemotherapy for breast cancer treatment

Huajian Chen¹, Tianjiao Zeng^{1,2}, Toru Yoshitomu¹, Naoki Kawazoe¹, Guoping Chen^{*1,2}

¹Research Center for Macromolecules and Biomaterials, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki, ² Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba.

[Introduction]

In recent years, the synergistic effect of photothermal therapy (PTT) and chemotherapy has been recognized as an effective strategy for cancer treatment. Controlling PTT temperature and drug delivery is desirable for minimizing the unexpected damage to normal cells. In this study, a smart platform of composite scaffolds with drug loaded liposome was developed. The composite scaffolds could attain strong synergistic effect of PTT and chemotherapy at early stage of treatment and a mild hyperthermia effect for chemotherapy in the late stage (Figure 1).

[Methods]

Firstly, gold nanorods (AuNRs) with 70 nm in length were synthesized based on a seed-growth method. BP nanosheets (BPNSs) were exfoliated by liquid phase exfoliation method. Doxorubicin-encapsulated thermosensitive liposomes (Dox-lipo) were prepared by thin-film hydration method. Secondly, Composite scaffolds of AuNRs, BPNSs, gelatin (Gel) and polyglutamic acid (PGA) were prepared after mixing and freeze-drying. Finally, Dox encapsulated thermosensitive liposomes were incorporated into composite scaffolds by amidation reaction.

[Results]

The morphologies and absorbances of AuNRs and BPNSs were characterized and confirmed by TEM and UV-visible spectrophotometer. Four composite scaffolds (Au/Gel/PGA, BP/Au/Gel/PGA, Dox-lipo/Au/Gel/PGA and Dox-lipo/BP/Au/Gel/PGA scaffolds) were prepared. SEM observation showed that all scaffolds had similar porous structures. After 10 min of irradiation with the 1.6 W/cm² NIR laser, the temperatures of the Au/Gel/PGA, BP/Au/Gel/PGA, Dox-lipo/Au/Gel/PGA and Dox-lipo/BP/Au/Gel/PGA composite scaffolds reached 47.6, 58.6, 47.0 and 58.4 °C, respectively. Dox release from composite scaffolds was accelerated during laser irradiation but slowed down when the laser was turned off. In vitro cell culture and in vivo animal experiments demonstrated that the composite scaffolds could kill breast cancer cells by the synergistic effect of PTT and chemotherapy in the early stage and a chemotherapy effect in the late stage. Furthermore, the composite scaffolds could support the proliferation of hMSCs for guiding new tissue regeneration.

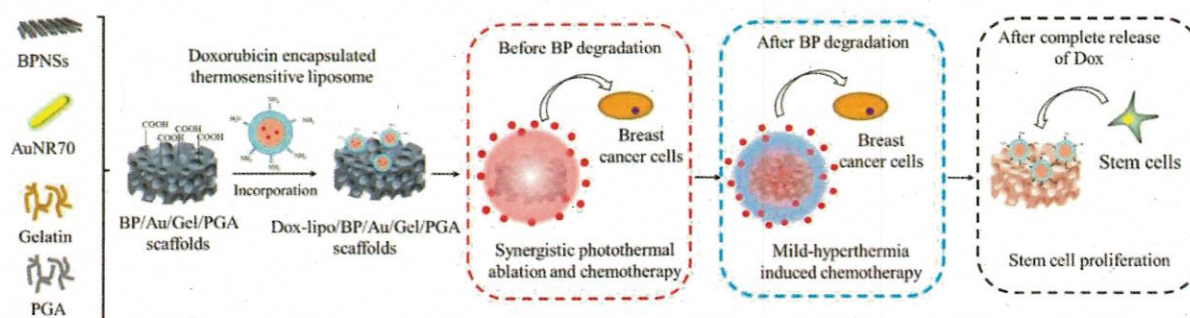


Figure 1 Illustration of composite scaffolds immobilized with Dox-liposome for stepwise photothermal and chemotherapy.

生命工学のための酸化亜鉛ナノ粒子の合成

Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles for Bioengineering

小部航太郎^{*1}, 山崎淳司^{*2}, 孫略^{*3}
Kotaro KOBE^{*1}, Atsushi YAMAZAKI^{*2}, Lue SUN^{*3}

※¹ 早稲田大学、※² 早稲田大学、※³ 産業技術総合研究所

^{*1}Waseda University, ^{*2}Waseda University, ^{*3}National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

1. はじめに

酸化亜鉛は、広波長域に対して光を反射する特性から白色顔料や化粧品として用いられるほか、皮膚の収れん効果を持つことから医薬品、加硫促進剤としてのゴム材料など様々な工業利用がされている。また、代表的な光触媒物質である二酸化チタンに近いバンドギャップを持つため有機物分解への利用、導電性と透明性を有することから透明電極への利用、半導体としての性質からLEDへの応用など、多分野での研究が進められている。

本研究では、生命工学に利用するための酸化亜鉛粒子を合成した。

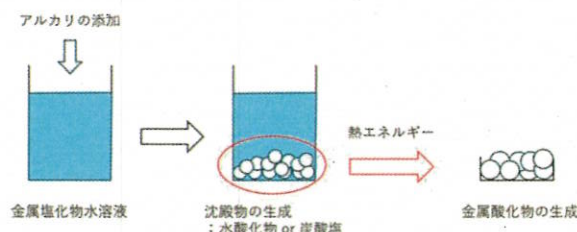
2. 合成方法

一般に、固体はその大きさが10~100 nm程度の超微粒子になると、内部のエネルギーに比べて表面エネルギーの効果が無視できなくなり、バルクの状態に比べて特異な物性を示すことがある。無機超微粒子は、触媒反応、電子材料、生体材料など様々な分野での応用が期待されている。

酸化亜鉛粒子など金属酸化物粒子を合成する方法は、大きく分けて、固相法、液相法、気相法の3つがある。固相法は、バルク(塊)状態の固体に機械的エネルギーを加えることで粉碎し、粒子化させる方法である。磨耗しにくい硬質の小さなビーズとバルク固体を容器に入れて攪拌させることで粉碎するボールミルがよく用いられる。固相法には、得られる粒子径の下限が大きいことと、粒径分布のばらつきが大きいことが課題として挙げられる。液相法は、前駆体溶液に沈殿剤を入れるなどして、目的物の過飽和溶液を作り、析出させる方法である。液相法は量産性に優れるほか、多成分系化合物の合成や微量成分の添加が容易である。しかし、不純物の分離が困難である場合があることや粒子の凝集などの問題点がある。気相法は、高温下で気化させた前駆体の蒸気を酸素と反応させたのち、冷却し酸化物微粒子を得る方法である。純度が高く、粒度の揃った粒子が得られるのが特徴だが、粒子回収が他と比べて難しい、コストが高いなどの問題点がある。

本研究では、液相法により酸化亜鉛粒子を合成した。硝酸亜鉛水溶液あるいは塩化亜鉛水溶液を前駆体、水酸化ナトリウムあるいは炭酸水素ナトリウムを沈殿剤として利用した。水酸化ナトリウムを沈殿剤として用いる場合、水酸化亜鉛が、炭酸水素ナトリウムを沈殿剤として用いる場合は塩基性炭酸亜鉛が沈殿するが、熱エネルギーを加えるとどちらも酸化亜鉛に熱分解される。熱エネルギーを加える方法として、沈殿物を分離しマッフル炉で焼成する方法と水溶媒に沈殿した状態でマイクロ波を当てる方法の二つを試した。沈殿剤、焼成温度、マイクロ波照射時間の変更により酸化亜鉛粒子の

粒径や形状がどう変わるのかを調べた。



3. 結果

合成された粒子は、X線回折法により結晶構造を、透過型電子顕微鏡により粒径と形状を調べた。X線回折分析では合成されたどの粒子もウルツ鉱型構造のZnOだと同定された。まず、沈殿剤として水酸化ナトリウムを用いた場合について述べる。焼成温度200℃では20-40 nm、500℃では50-70 nm、800℃では100-200 nm程度一次粒子の凝集体が合成された。また、焼成温度が高まるにつれて粒子の形状が球状から六角形状へと成長した。沈殿剤として炭酸水素ナトリウムを用いた場合は、500℃、800℃で焼成した粒子は水酸化ナトリウムを用いた場合に比べて、粒径と形状に大きな違いは見られなかったが、200℃で焼成した粒子は10-20 nmであり、粒径が減少した。これは、200℃という焼成温度が、水酸化亜鉛の熱分解温度に比べて塩基性炭酸亜鉛の熱分解温度により近いためだと考えられる。また、水酸化亜鉛を熱分解するためにマイクロ波を用いた場合、アスペクト比の大きく異なる針状の粒子が合成された。X線回折分析によると焼成により合成された粒子に比べて、(002)面が成長しており、これが粒子の形状に寄与していると考えられる。

4. 今後の展望

合成された酸化亜鉛粒子を用いて細胞毒性評価や活性酸素種の生成評価を行い、粒径や形状によりどのような違いが生まれるのかを調べる。

皮膚表皮層の多層構造再生への挑戦：スズメバチのシルクで作る医療素材開発

Development of hornet silk films to regenerate the multilayered structure of skin tissue

濱理佳子^{*1}, 神戸裕介^{*1}, 吉岡太陽^{*1}, 中澤靖元^{*2}, 亀田恒徳^{*1}
 Rikako HAMA^{*1}, Yusuke KAMBE^{*1}, Taiyo YOSHIOKA^{*1}, Yasumoto NAKAZAWA^{*2},
 Tsunenori KAMEDA^{*1}

^{*1} 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構(農研機構),つくば市大わし 1-2、^{*2} 東京農工大学大学院工学府,東京都小金井市中町 2-24-16

^{*1}National Agriculture and Food Research Organization Institution of Agrobiological Sciences (NARO), 1-2 Owashi, Tsukuba, ^{*2}Tokyo University of Agriculture and Technology, 2-24-16 Naka-cho, Koganei, Tokyo

1. 背景

世界的な高齢化に伴う皮膚欠損患者の増加を受け、火傷や糖尿病性潰瘍などを対象とする「高度創傷ケア用創傷被覆材」市場は、2023年で約46億ドル、2032年には約72億ドルに達すると予想される。国産の被覆材として、皮膚真皮様構造の再生に使用される人工真皮「ペルナック®」などが挙げられる。しかし、表皮層の再生には培養表皮や他の被覆材を併用する必要があり、再生皮膚の拘縮や質感の違いによる美観の低下が課題となる。ブタなどの動物由来コラーゲンの使用による感染やアレルギーの懸念をも回避しつつ、表皮層の秩序だった多層構造再生を達成できる新規被覆材の使用が望ましい。原料の段階から日本国内での自給を達成しつつ、より表皮再生に働くものを探すにあたって目に留まるのが、我が国における昆虫由来タンパク質の豊富さである。

茨城県では、年間5,000件以上もスズメバチの巣の駆除が行われている。我々は、これまでほぼ未利用であったスズメバチの繭(まゆ)タンパク質(ホーネットシルク, HS)について、爪や毛を構成するケラチンと同じコイルドコイル構造をとるタンパク質であることから、特に皮膚表皮層の再生に着目して被覆材への利用を目指してきた。HSは、 α -helix分子鎖同士が絡み合ったような超二次構造のcoiled-coilをとる。単一分子鎖の α -helixからなるフィルムと、coiled-coilを再形成させたフィルムの2種類を作製して、立体構造の違いが細胞応答、皮膚欠損の再生誘導能(特に表皮層の多層構造の再生能)に与える影響を評価したので報告する。

2. 実験方法

スズメバチの巣から採取したHSを臭化リチウム水溶液に溶解して木くず等の夾雑物を除去し、透析により脱塩した。0.01 N アンモニア水での透析により得た水溶液と、超純水での透析により得た凝集物を溶解したHexafluoro-2-propanol (HFIP) 溶液を、キャスト、風乾することで透明なフィルム

を作製した(それぞれ、NMaq, M-HFIP)。

不溶性・滅菌処理としてアルコールへ浸漬後、小角 X 線散乱測定による構造解析、フィルム表面の物性、ヒト由来ケラチノサイト(NHEK)・皮膚線維芽細胞(NHDF)の増殖挙動の評価、ラット全層皮膚欠損モデルを用いた皮膚再生誘導能の評価を実施した。

3. 実験結果・考察

HS/アンモニア水溶液をキャストして作製したNMaqフィルムにおいて、coiled-coil構造の再形成を確認した。一方M-HFIPフィルムでは単一の α -helix鎖として存在していることを確認し、この立体構造の違いはアルコール浸漬後も保存されていた。coiled-coil構造の有無によらず、フィルム表面の粗さは同程度であり、濡れ性も約80度と同等の値を示した。しかしながら、フィルム上での細胞培養では細胞種特異的な挙動を示し、ケラチノサイトが両フィルム上で増殖した一方、皮膚線維芽細胞はcoiled-coil構造を持つフィルム上でのみ接着と増殖を生じた(Fig. 1b, c)。

全層皮膚欠損の再生誘導評価において、HSフィルムはcoiled-coil構造の有無によらず、コントロールに用いた市販キトサンフォーム材と同等の創閉鎖速度、コラーゲン沈着量を誘導した。また、HS群ではキトサン群よりも薄くて均一な再生上皮が確認されたため、表皮基底層マーカーの発現から再生上皮の成熟度を評価した。無処置群とキトサン群ではマーカーの発現を示さなかった一方、HS群では創中央までの均一な発現が確認された。さらに、coiled-coil構造を持つHS NMaq群では、正常皮膚組織に特徴的な波打った形状が示され、最も成熟した表皮基底層の発達を確認した。以上より、HSは皮膚組織全体の再生を誘導するだけでなく、その立体構造の制御を通じて、皮膚表皮層の多層構造の再生までを誘導可能な新規創傷被覆材としての応用が期待される。

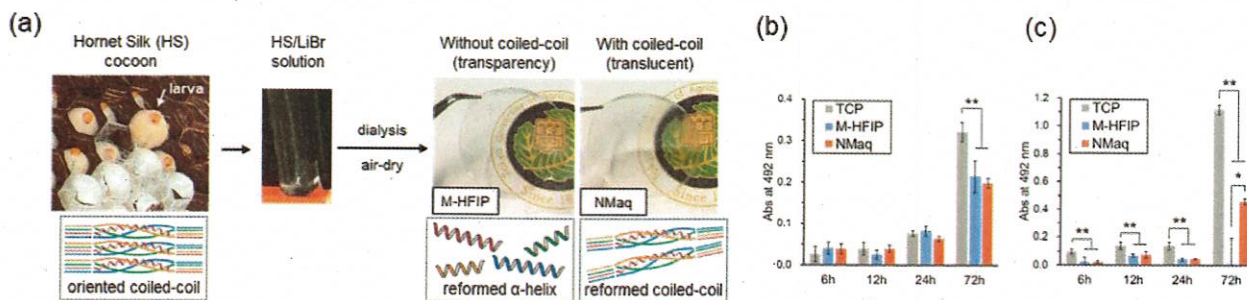


Fig. 1. (a) Schematic diagram of Hornet Silk (HS) film fabrication. Cell proliferation of (a) human keratinocyte and (b) human dermal fibroblast by MTS assay (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

アルキル化ポリビニルアルコールによる細胞捕捉の評価及び応用検討

Evaluation of cell capturing by alkylated polyvinyl alcohol and application study

吉原栄理佳^{*1}, 須丸公雄^{*1}
Erika YOSHIHARA^{*1}, Kimio SUMARU^{*1}

^{*1} 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市東 1-1-1

^{*1} National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba

緒言

浮遊細胞はディッシュ等の基板に接着しないため、これらの観察やハンドリングにおいて、浮遊細胞を基板に固定化する技術は生物学的分野において有用である。細胞を基板表面に固定化する技術は既に報告例があるが、その中でも細胞捕捉性を有する材料として Biocompatible Anchor for cell Membrane (BAM)が特に知られている¹⁾。これはポリエチレングリコール (PEG) の片末端に長鎖アルキル基を導入した高分子材料であり、もう片末端に反応性残基を有する BAM を特定の官能基を有する基板表面に修飾することで、浮遊細胞を捕捉する表面を構成することが可能である。このような細胞を捕捉する要素技術にバリエーションが加われば、新たな細胞プロセッシングへのさらなる応用展開が期待される。

そこで本研究では、ポリビニルアルコール(PVA)の側鎖に、細胞膜への挿入性を有する長鎖アルキル基を導入し、これを基材表面に固定化することで、新しい細胞捕捉性表面の調製を検討した(Fig. 1)。この手法ではアルキル基がグラフト状にポリマー主鎖に結合しているため、BAM とは異なる様式で基板表面にアルキル基が修飾され、異なる細胞の捕捉特性が得られる可能性がある。また、ポリマー主鎖へのイオン性などの第二成分の導入が容易であるため、幅広い展開が期待される。

実験方法

オクタデカノール(OD)とグリオキシル酸(GOac)、PVA のアセタール化反応により、様々な比率で側鎖にヘプタデシル (HD) 基とカルボキシル基を有する PVA (PVA-OD) を合成した。PVA ベースのポリマーで細胞接着阻害処理をしたポリスチレンディッシュの底に、PVA-OD を局所的に滴下して固定化もしくは一面にスピンコートし、加熱処理により細胞捕捉性を有する表面の作製を行なった。これらのディッシュを用いて、接着細胞及び浮遊細胞に対する捕捉性を、蛍光顕微鏡等を用いて評価し、長鎖アルキル基とカルボキシル基の導入率が細胞捕捉性に及ぼす影響を調べた。

結果・考察

PVA に対して HD 基をそれぞれ 0.09, 0.18, 0.37 mol% 導入し、¹HNMR 測定により 1.25 ppm に HD 基由来のピークを確

認した。測定したプロトンの積分比から仕込み比に対してはほぼ 100%の導入率であることを示し、PVA に対して定量的に長鎖アルキル基を導入することに成功した。オクタデカノール及びグリオキシル酸の仕込み比を変えることで、各種 PVA-OD の合成を行なった。

次に、細胞接着の阻害処理を施したポリスチレンディッシュに PVA-OD を局所的に固定化、これに HeLa または Jurkat 分散液をロードしたところ、蛍光修飾した PVA-OD 固定化域に HeLa または Jurkat が速やかに捕捉される様子が観察された。この結果から、PVA-OD は接着細胞及び浮遊細胞を捕捉し基板表面に固定化することが可能であることが示された。また、PVA-OD を局所的に固定化した場合、カルボン酸の導入されたポリマーの方が、有意な細胞捕捉性を示した。これはカルボン酸による水和の増加や負電荷間の静電反発力により、アルキル基が水相に連れ出され、細胞と相互作用できるチャンスが増加したためと考えられる。

最後に各種 PVA-OD を一面にスピンコートしたディッシュで Jurkat の細胞捕捉を行い、捕捉した箇所の細胞数を計測し、細胞の捕捉能を評価した。その結果、GOac の導入量が 2.24 mol% のサンプルが一番に細胞を捕捉していることが確認された。GOac の導入量が 4.49 mol% のサンプルでは捕捉した細胞数が減少したが、この理由として一定量の GOac の導入は親水性を向上させアルキル基を水相に連れ出すが、それ以上の親水性は細胞膜とアルキル基の疎水性相互作用に影響し細胞捕捉能を低下させるためだと考えられる。次に OD の導入量が 0.18 mol% および 0.37 mol% のサンプルが一番に細胞を捕捉していることが確認された。スピンコートでは、局所的な固定化よりも高い細胞捕捉性を示した。これはスピンコートでは基板表面に単層に近い状態で均一にポリマーを固定化されたことにより、アルキル基同士の凝集が制限され、結果的に水相側に連れ出されるものが増える可能性が示唆された。これらの結果により、OD の導入量と GOac の導入量の比率により、細胞捕捉能に対して影響を及ぼすことを確認し、高効率な細胞捕捉性を示す最適なアルキル化 PVA の組成比を明らかにした。

参考文献

1) K. Kato, et. al, *BioTechniques*, 35,1014-1021 (2003).

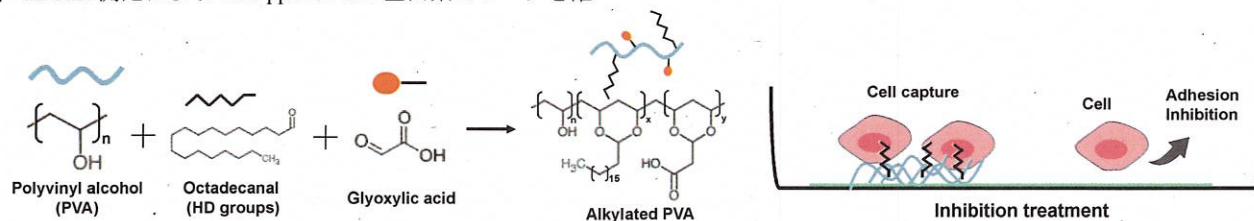


Fig. 1 Schematic diagram of this study.

セルソーターと飛行時間型質量分析計による ハイスループット単一細胞中多元素同時分析 High-throughput simultaneous multi-elemental analysis in single cells using cell sorter and time-of-flight mass spectrometer

八井田朱音¹, 安東侑吾¹, 山路周¹, 福智魁¹, 清水祐哉¹,
前本佑樹², 青木元秀², 梅村知也², 沖野晃俊¹
Akane YAIDA¹, Yuwa ANDO¹, Syu YAMAJI¹, Kai FUKUCHI¹, Yuya SHIMIZU¹,
Yuki MAEMOTO², Motohide AOKI², Tomonari UMEMURA², Akitoshi OKINO¹

¹東京科学大学 未来産業技術研究所, 横浜市緑区長津田町 4259,

²東京薬科大学 生命科学部, 東京都八王子市堀之内 1432-1

¹FIRST, Institute of Science Tokyo, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama,

²School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo

1. はじめに

近年, 創薬や再生医療分野において単一細胞内元素の分析が注目されている。現在, 微量元素分析に広く用いられている誘導結合プラズマ質量分析計 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, ICP-MS) は, 0.1 pg/mL レベルの超高感度分析が可能である。しかし, 直径数 μm の単一細胞の体積は 1 pL 程度と非常に小さいため, 従来の装置では測定できない。そこで我々のグループでは, 細胞を含む液滴を高温プラズマに射出導入して, 細胞一個に含まれる超微量元素を分析するための単一細胞導入システムを開発してきた¹⁾。しかし, 以前に開発したシステムでは, 細胞懸濁試料中の目的細胞だけでなく, すべての細胞と細胞を含まない液滴もプラズマ中に順次導入していたため, 細胞分析のスループットは約 0.5 細胞/秒と低かった。高いスループットを達成するためには, 目的細胞だけを選択して導入する必要がある。そこで本研究では, セルソーターを用いた単一細胞導入システムと誘導結合プラズマ飛行時間型質量分析計 (ICP Time-of-Flight Mass Spectrometer: ICP-TOF-MS) を結合した装置を開発した。質量信号が重複しないように細胞導入頻度を電氣的に制御して, 単一細胞中の多元素同時分析を行った。

2. 実験方法

試料にはヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を用い, 溶媒には細胞が破裂しない濃度に調製した高純度塩化ナトリウム水溶液を使用し, セルソーターは Allied Flow 社製の FENIX を用い, ICP-TOF-MS は TOFWERK 社製の icpTOF R を用いた。単一細胞中元素分析システムの概略図を Fig. 1 に示す。細胞試料はセルソーターに内蔵されているレーザーで, 液滴中の細胞の有無と種類, 大きさを判別する。その結果に応じて液滴に電荷を与えて射出する。液滴の飛行経路は, 高電圧が印加された偏向板によって, 与えられた電荷に応じて変えられる。この機能により, 分析したい細胞だけを選択的に ICP-TOF-MS に導入した。細胞中元素からの質量信号の時間的広がり約 1 ms であるため, 前後に導入された細胞からの質量信号が重ならないよう, 導入頻度を 1,000 Hz 以下に制限する制御を行った。

3. 結果と考察

ICP-TOF-MS を用いて得られた単一細胞からの質量信号を Fig. 2 に示す。図の縦軸を信号強度, 横軸を元素とし, 信号取得回数は溶媒のみの試料と目的細胞を含む試料でそれ

つづば 100 回, 目的細胞を含む試料でそれ

ぞれ 4,000 回とした。その結果, Na, Mg, K, Ca, Fe, Cu, Zn については, 標準偏差を考慮しても, 溶媒のみに比べて細胞試料の方が高い信号強度を示した。このことから, 開発したシステムが, 単一細胞に含まれる主成分元素や微量元素の分析に使用できる可能性が示された。

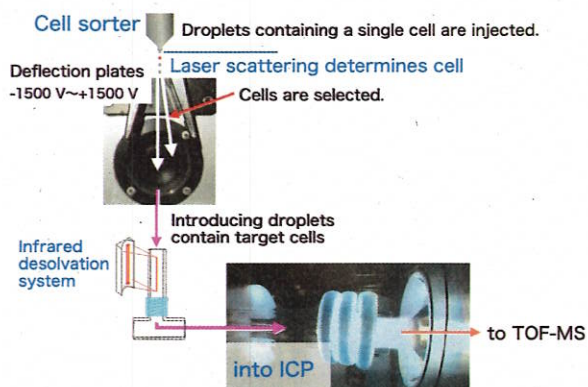


Fig. 1 Schematic of single cell elemental analysis system

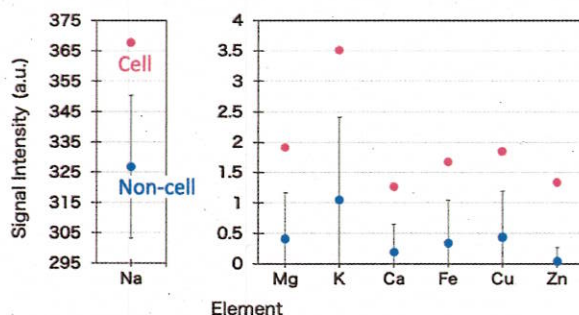


Fig. 2 Results of single cell elemental analysis using ICP-TOF-MS with cell sorter

4. 参考文献

1) Kaori Shigeta, Akitoshi Okino, Norbert Jacobowski, *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.*, Vol. 28, No. 5, pp. 637–645 (2013).

謝辞

本研究の一部は基盤研究(S) 22H04973 の支援を受けたものである。

つくば医工連携フォーラム 2025 講演予稿集 (2025.1.24, 国立研究開発法人産業技術総合研究所)

単回注射で高効率かつ長期的な抗がん免疫を誘導できるアジュバント Size Tuning of Mesoporous Silica Adjuvant for One-Shot Vaccination with Long-Term Anti-Tumor Effect

王 秀鵬*¹
Xiupeng WANG*¹

*¹ 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市東 1-1-1

*¹ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki

1. Background

Cancer immunotherapy is an important complementary therapy to conventional cancer treatments. It is a promising therapy that can control metastasis and recurrence by activating immune cells to recognize and destroy cancer cells. However, frequent administration of cancer immunotherapy drugs over several months to several years is needed to induce efficient and long-term anti-cancer immunity. Such frequent administration of drugs over a long period of time causes problems such as a large physical, psychological, and economic burden on cancer patients.

On the other hand, adjuvants are essential for activating anti-cancer immunity. However, conventional immune adjuvants such as aluminum salts mainly induce humoral immunity, which is effective against infectious diseases; but do not induce cellular immunity, which is essential for cancer immunotherapy. Therefore, we synthesized and comprehensively evaluated dozens of inorganic particles with different components, particle sizes, shapes, and porous structures, and clarified the relationship between the composition/structure and anti-cancer immune activity. As a result, we identified mesoporous silica, which has the potential to be a versatile adjuvant for cancer immunotherapy (Wang et al. *Angew Chem Int Ed* 2016; *Small* 2016; Patent No. JP5999639; Patent No. JP6868862; *Nature Communications* 2020). Furthermore, we found that small adjuvants on the order of hundreds of nanometers promoted efficient anti-cancer immunity in a short period of time, while large adjuvants on the order of tens of micrometers promoted immune stimulation for a long period of time, elucidating that adjuvants exhibit size-dependent anti-tumor immune responses (Wang et al. *ACS Nano* 2019, Figure 1).

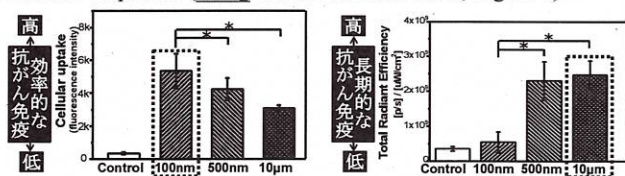


Figure 1. Adjuvant size-dependent antitumor immune response (*ACS Nano*, 2019, 13, 7705-7715, with some modifications)

2. Results

Based on the above findings, a gradient design strategy combining nanometer-sized mesoporous silica particles with micrometer-sized mesoporous silica particles enabled the realization of efficient and long-term anti-cancer immunity with a single injection (Fig. 2). The combination of nanometer-sized mesoporous silica particles with micrometer-sized mesoporous silica particles suppressed tumor growth and increased CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD86⁺ cells, effector memory CD8⁺ T cells, and tumor-specific CD8⁺ T cells 4 months after a single immunization (Figs. 2 and 3).

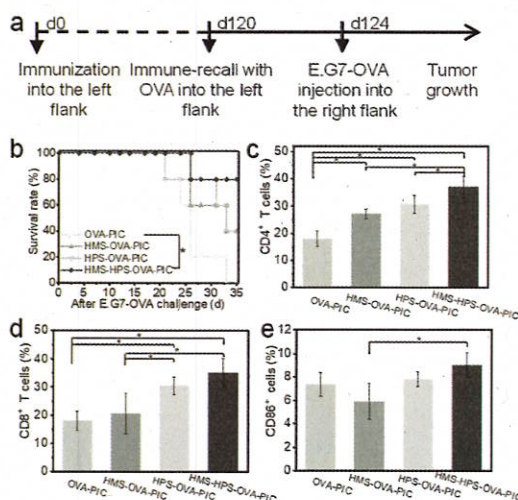


Figure 2. A single injection induces efficient and long-lasting anti-cancer immunity (*Pharmaceutics* 2024, 16, 516, with some modifications)

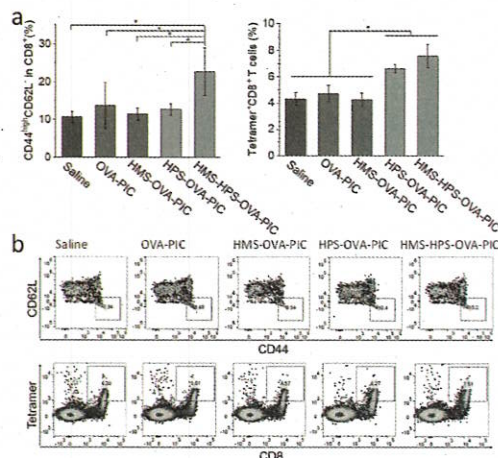


Figure 3. Mechanism of induction of efficient and long-lasting anti-cancer immunity by a single injection (*Pharmaceutics* 2024, 16, 516, with some modifications)

3. 参考文献

- ① Xiupeng Wang, et al. Rod-scale design strategies for immune-targeted delivery system toward cancer immunotherapy. *ACS Nano*. 2019; 13: 7705-7715
- ② Xiupeng Wang, et al. Size tuning of mesoporous silica adjuvant for one-shot vaccination with long-term anti-tumor effect. *Pharmaceutics*, 2024, 8, 516

カーボンナノチューブ(SWCNT)近赤外蛍光プローブ Carbon Nanotube (SWCNT) Near-Infrared Fluorescent Probes

飯泉陽子^{*1}, 岡崎俊也^{*1}
Yoko IIZUMI^{*1}, Toshiya OKAZAKI^{*1}

^{*1} 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研) ナノカーボンデバイス研究センター

^{*1}Nano Carbon Device Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba

1. 緒言

カーボンナノチューブ(CNT)は、近年バイオ、医療応用可能なナノ材料として注目され、研究が進んでいる。その中でも、単層 CNT(SWCNT)は、水や生体分子の影響が少ない近赤外領域での光励起によって発光する性質があるため、バイオマーカー検出プローブや *in vivo* イメージングプローブへの応用が期待されている。また、SWCNT は、可視光領域においても光吸収があり視認性が良く、呈色材として利用することも可能である。一方で、SWCNT は表面に化学修飾を施すことも容易であるため、機能性材料として、既存の材料と比較して高いアドバンテージを有している。

本発表では、近年我々が合成した酸素導入 SWCNT (o-SWCNT)をバイオ、医療分野へ応用した例を紹介する。

2. 背景

SWCNT は、グラフェンシートを円筒状に巻いた構造を持つナノ材料であり、直径 1~2 nm、長さは数 μ m に達する。そのユニークな物理的および化学的特性により、さまざまなバイオ応用が注目されている。特に、SWCNT は生体透過性が高い近赤外領域の蛍光を有するため、*in vivo* イメージングや高感度な体外診断への応用が進められてきた。

これまでに我々は、SWCNT 表面に酸素分子を導入し、より生体透過性が高い近赤外領域(1000-1400 nm)で強い蛍光を有する酸化 SWCNT (o-SWCNT)を合成した。この o-SWCNT は、表面修飾することで、様々な機能を付与することができる⁽¹⁾。この o-SWCNT の特性を最大限に活用し、医療やバイオテクノロジー分野での新たな革新を目指して、o-SWCNT を基盤としたバイオマーカー検出プローブの開発や免疫クロマトグラフィーアッセイへの応用、*in vivo* イメージングプローブの研究を進めてきた。

3. 研究内容

3.1 バイオマーカー検出プローブの構築

SWCNT 表面には、リン脂質ポリエチレングリコール(PEG)分子を介してタンパク質を修飾することができる⁽²⁾。我々はストレプトアビジン(SA)修飾 o-SWCNT (SA-PEG-CNT)プローブを合成し、免疫沈降法にて、その機能を確認した。ビオチン修飾磁気ビーズに SA-PEG-CNT 溶液を加え、反応させた後、磁気ビーズのみを回収、磁気ビーズ溶出を得た。この溶液の蛍光を測定すると、o-SWCNT 由来のシグナルが確認できた(Fig. 1)。その効率は、最大 79.3%であった⁽³⁾。SA はビオチンを介して様々な抗体と

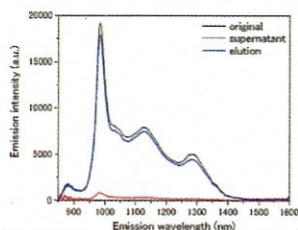


Fig. 1 NIR fluorescence spectra of the original SA-PEG-CNT, the supernatant, and the eluted solutions from immunoprecipitation.

容易に結合することができるため、多様な抗体修飾 o-SWCNT プローブの合成につながると考えている。

3.2 イムノクロマトアッセイへの展開

o-SWCNT 同様のプロセスで合成した、市販 SWCNT 使用のプローブを、免疫クロマトメンブレン上で反応させた。Fig. 2 は、ビオチン修飾抗体を免疫クロマトメンブレン上に滴下、乾燥させたうえで、SA-PEG-CNT 溶液を流した後のメンブレンの写真である。メンブレン上のビオチンによって SA-PEG-CNT がトラップされ、黒いスポットが確認できる。黒色は視認性が高いため、高感度、迅速診断が可能なプローブとして期待できる。

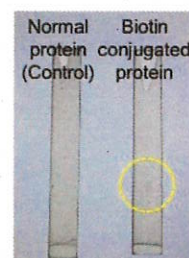


Fig. 2 The immunochromatographic membrane with SWCNT probes.

3.3 *in vivo* イメージングプローブの合成

我々が合成した o-SWCNT は、980 nm の光励起により、1300 nm 付近で強い蛍光を発する。そのため、生体透過性が非常に高く、*in vivo* イメージングプローブへの応用が可能である。PEG で表面被覆した o-SWCNT を、マウス体内へ尾静脈注射すると、プローブは生体内を 5 時間にわたって滞留し、血管を明瞭に描出する(Fig. 3)⁽⁴⁾。また、経口投与によってマウス腸管の動きを長時間モニターすることも可能である⁽¹⁾。このプローブは、創薬プロセスにおける薬理効果の検証に使用できると考えている。

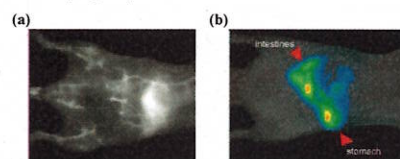


Fig. 3 (a) NIR fluorescence image of mouse intravenously injected with o-SWCNTs. (b) Overlays of white light and NIR fluorescence images of mouse 5 min after oral administration of o-SWCNTs.

4. 参考文献

- (1) Y Iizumi, M Yudasaka, J Kim, et al. Oxygen-doped carbon nanotubes for near-infrared fluorescent labels and imaging probes, *Sci. Rep.*, Vol. 8, 6272 (2018).
- (2) Y Iizumi, T Okazaki, Y Ikehara, et al. Immunoassay with Single-Walled Carbon Nanotubes as Near-Infrared Fluorescent Labels, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, Vol.5, No. 16, pp. 7665-7670 (2013).
- (3) K Kojima, Y Iizumi, MF Zhang, et al. Streptavidin-Conjugated Oxygen-Doped Single-Walled Carbon Nanotubes as Near-Infrared Labels for Immunoassays, *Langmuir*, Vol.38, No. 4, pp. 1509-1513 (2022).
- (4) T Takeuchi, Y Iizumi, M Yudasaka, et al. Characterization and Biodistribution Analysis of Oxygen-Doped Single-Walled Carbon Nanotubes Used as *In Vivo* Fluorescence Imaging Probes, *Bioconj. Chem.*, Vol.30, No. 5, pp. 1323-1330 (2019).

Anti-inflammatory Nanoparticles as Potential Treatment for Aortic Dissection

Maria Thea Rane Dela Cruz Clarin^{*1,2,3}, Eri Motoyama^{*3}, Ahmed Nabil^{*2}, Koichiro Uto^{*2}, Sachiko Kanki^{*4}, Kenichi Kimura^{*3}, Hiromi Yanagisawa^{*3}, Mitsuhiro Ebara^{*2}

^{*1}Ph.D. Program in Humanics, University of Tsukuba, ^{*2}Research Center for Macromolecules and Biomaterials, National Institute for Materials Science (NIMS), ^{*3}Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA) Center, University of Tsukuba, ^{*4}Osaka Medical and Pharmaceutical University, Osaka

1. Introduction

The aorta is the largest artery that supplies blood and nutrients to the body. Aortic dissection (AD) is characterized by the disruption of the aortic wall, which could be fatal as it might lead to rupture (Figure 1). Moreover, inflammation has been implicated in AD development, wherein immune cells such as macrophages are key players. Generally, they are categorized into pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages. However, current treatments are still limited to surgery and anti-hypertensive agents.

This research aims to develop a targeted polymeric particle that can suppress inflammation in the aorta through the modulation of the macrophage phenotype.

Previously, it has been shown that phosphatidyl serine-inspired polymeric particles (PSPs) can induce anti-inflammatory effects in-vitro using cell lines, and delivered in-vivo through local brain injection^(1,2). In this work, PSPs were further validated using peritoneal macrophages isolated from wild-type (WT) mice.

Indeed, the cellular uptake of PSPs has been confirmed. To induce the M1 and M2 macrophages, LPS and IL-4 were used, respectively. After LPS stimulation, western blot data shows that the NF- κ B signaling, which is an important transcription factor in regulating inflammation, has been activated. In the presence of PSPs, NF- κ B signaling has been reduced (Figure 1). Consequently, pro-inflammatory genes such as *Il6*, *Il1b*, and *Tnfa* showed upregulation in the presence of LPS alone but downregulated in the presence of PSPs. To validate it at the protein level, the supernatant from macrophages treated with various groups (Control, LPS only, LPS + PSPs, IL4) was then collected after 24 hours of incubation. IL-6 shows significant downregulation (Figure 2), and TNF- α tended to downregulate (data not shown).

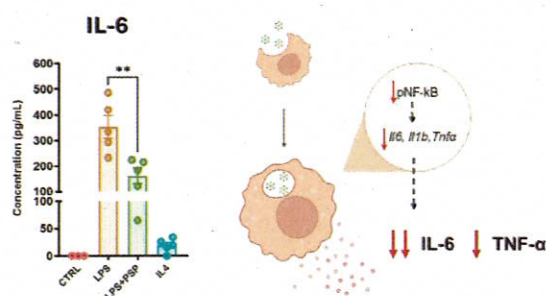


Figure 2. Representative data for the anti-inflammatory effect of PSPs in LPS-stimulated macrophages. The left panel shows the concentration of IL-6 from the supernatant of treated groups. CTRL corresponds to the non-treated sample and serves as the control. The right panel shows the scheme for the current findings.

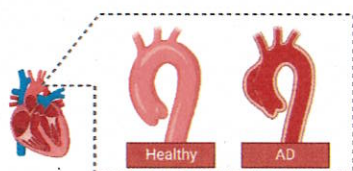


Figure 1. Healthy and AD aorta

On the other hand, we have developed a new AD mouse model carrying a pathological variant in the Fibrillin-1 (*Fbn1*^{G234D/G234D}), which has been derived from a Japanese male patient suffering from AD⁽³⁾. In this model, we have observed the accumulation of M1 macrophages, which might promote inflammation and contribute to the disease progression. Moreover, upregulation of vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) and matrix metalloproteinases (MMPs) have also been observed.

To deliver the PSPs in the aorta, rapid clearance and off-target effects must be prevented. Thus, PSPs will be modified using click chemistry to conjugate targeting moiety. Specifically, antibodies against VCAM-1 will be added and MMPs will be used as a stimulus for controlled release (Figure 3).

In addition, optimization of polymeric structure will be performed in-vitro and validated in-vivo using the *Fbn1*^{G234D/G234D} AD mouse model. In-vivo validation will include biodistribution studies, survival curve analysis, and monitoring of inflammation markers.

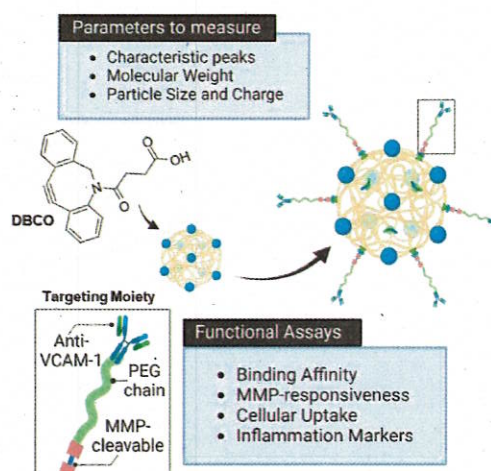


Figure 3. Experimental Design

References

- (1) Nakagawa, Y. et al. Apoptotic Cell-Inspired Polymeric Particles for Controlling Microglial Inflammation toward Neurodegenerative Disease Treatment, *ACS Biomater. Sci. Eng.* Vol. 5, No. 11, pp. 5705-5713 (2019).
- (2) Nakagawa, Y. et al. Microglial Immunoregulation by Apoptotic Cellular Membrane Mimetic Polymeric Particles, *ACS Macro Letters*, Vol. 11, No. 2, pp. 270-275 (2022).
- (3) Kimura, K. et al. A novel genetic mouse model of fatal aortic dissection reveals massive inflammatory cell infiltration in the thoracic aorta. *bioRxiv* (2024).

Effects of Viscosity on adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells during 2D culture

Chengyu Lu^{*1,*2}, Tianjiao Zeng^{*1,*2}, Man Wang^{*1,*2}, Toru Yoshitomi^{*1}, Naoki Kawazoe^{*1}, Yingnan Yang^{*3}, Guoping Chen^{*1,*2}

^{*1}Research Center for Macromolecules and Biomaterials, National Institute for Materials Science, 1-chome-1 Namiki, Tsukuba, ^{*2}Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, ^{*3}Graduate School of Life and Environment Science, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba

Accumulatively, cellular behaviours triggered by biochemical cues have been widely explored and the focus of research is gradually shifting to biophysical cues. Compared to physical parameters such as stiffness, substrate morphology and viscoelasticity, the influence of viscosity on cellular behaviors is relatively unexplored and overlooked. Thus, in this study, the influence of viscosity on the adipogenic and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) was investigated by adjusting the viscosity of the culture medium. Furthermore, the potential mechanotransduction-related mechanism of viscosity-inducing cell behaviors was also investigated.

To modulate the medium viscosity, adipogenic and osteogenic induction media containing 1% polyethene glycol (PEG) 35,000 (low molecular weight), 1% PEG 8,000,000 (high molecular weight), and 1% of their mixture at a weight ratio of 1:3 were employed as low-viscosity (L-V), high-viscosity (H-V), and middle-viscosity (M-V) groups, respectively. The induction medium without PEG supplementation was served as the normal-viscosity group (N-V). hMSCs seeded on appropriate well plates were exposed to the above-mentioned viscous induction media (Fig. 1). Cells were cultured for 21 d, and the medium was refreshed every 3 d. Cell morphology, viability and proliferation were checked during the culture period. For adipogenic differentiation, FABP4 and Oil Red O staining were performed on 3 d and 14 d, respectively. Adipogenic-related genes (CEBPA, FASN, FABP4 and LPL) were analyzed on 21 d. For osteogenic differentiation, OPN, ALP and Alizarin Red staining were performed on 3 d, 7 d, and 21 d, respectively. Osteogenic-related genes (ALPL, BMP2, RUNX2 and SPP1) were also analyzed on 21 d. To explore how viscosity affects cell mechanotransduction during differentiation, we analyzed YAP and β -catenin both by immunofluorescence staining and western blotting⁽¹⁾.

High viscosity facilitated osteogenic while inhibiting adipogenic differentiation. During adipogenic differentiation, the effect of viscosity on cell proliferation was negligible. However, during osteogenic differentiation, high viscosity decreased cell proliferation. The different effects of viscosity could be explained by the activation of mechanotransduction regulators of YAP and β -catenin. High viscosity could promote YAP and β -catenin nuclear translocation during osteogenic differentiation, which was responsible for the increased osteogenesis. High viscosity inhibited adipogenesis through promoting YAP nuclear translocation (Fig. 2 and Fig. 3). This study could broaden the understanding of how viscosity can affect stem cell differentiation during 2D culture, which is valuable for tissue engineering.

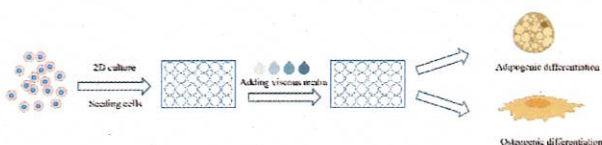


Fig. 1 Experimental illustration of how viscosity affects

つくば医工連携フォーラム 2025 講演予稿集 (2025.1.24, 国立研究開発法人産業技術総合研究所)

adipogenic and osteogenic differentiation in 2D culture.

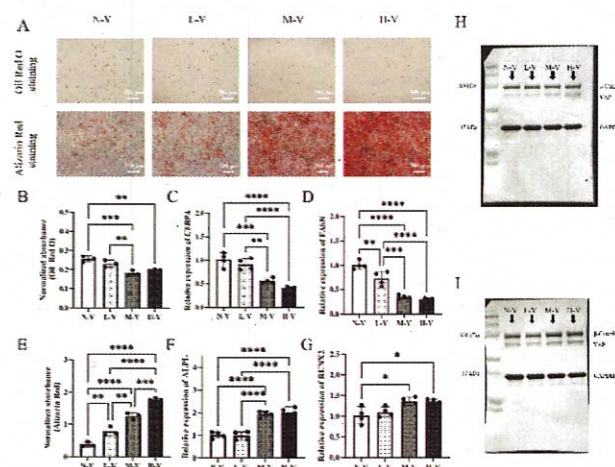


Fig. 2 Influence of viscosity on cell adipogenic and osteogenic differentiation during 2D culture. Oil Red O staining/Alizarin Red staining of hMSCs after culturing for 14 d/21 d in adipogenic and osteogenic induction media (A), scale bar = 500 μ m. Absorbance at 540 nm of the Oil Red O dye extracted from the stained cells (B), $n = 3$. Gene expression ($n = 4$) of CEBPA (C) and FASN (D) of hMSCs cultured in adipogenic induction medium of different viscosity for 21 d. Absorbance at 405 nm of the Alizarin Red extracted from the stained cells (E). Gene expression of ALPL (F) and RUNX2 (G) of hMSCs cultured in osteogenic induction medium of different viscosity for 21 d. WB analysis of YAP and β -catenin of cells after being cultured in adipogenic induction medium for 3 d (H). Western blotting analysis of YAP and β -catenin of cells after being cultured in osteogenic induction medium for 3 d (I). Data represent mean \pm SD. Significant difference: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

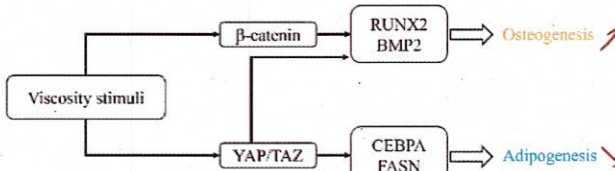


Fig. 3 Models of how viscosity modulates adipogenesis and osteogenesis through β -catenin and YAP pathways.

- (1) Chengyu Lu, Tianjiao Zeng, Man Wang, et al. Influence of viscosity on adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells during 2D culture, *Biomaterials Science*, Vol. 12, pp. 5598-5609 (2024).

再生医療等製品のための新たな搬送技術の開発

Development of Novel Transportation Technologies for Regenerative Medical Products

三浦陵平^{*1}, 橋本康平^{*1}, 回瀨修治^{*2}, 小川圭太^{*3}, 王洪宇^{*3}, 田村賢洋^{*4}

Ryohei Miura^{*1}, Kohei Hashimoto^{*1}, Shuuji Mawaribuchi^{*2}, Keita Ogawa^{*3}, Hongyu Wang^{*3}, Takahiro Tamura^{*4}

※¹ 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研),つくば市並木 1-2-1、※² 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研),東 1-1-1、※³ 東邦ホールディングス株式会社, 中央区八重洲二丁目 2-1 東京ミッドタウン八重洲セントラルタワー9階、※⁴ 東邦薬品株式会社, 八王子市大和田町 4-26-10

^{*1} National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-2-1 Namiki, Tsukuba, ^{*2} National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, ^{*3} Toho Holdings Co., Ltd., 9th Floor, Tokyo Midtown Yaesu Central Tower, 2-2-1 Yaesu, Chuo-ku, ^{*4} Toho Pharmaceutical Co., Ltd., 4-26-10 Owadamachi, Hachioji

1. はじめに

1.1 再生医療等製品の市場予測

再生医療等製品はこれまでの低分子医薬品やバイオ医薬品といったモダリティとは異なる治療効果を発揮する可能性がある為、アンメットメディカルニーズの充足への期待が高まっている。国内の再生医療等製品の市場は 2040 年に 1 兆円を超えるとされ、細胞治療・遺伝子治療の開発が活発に進んでいる [1]。

1.2 再生医療等製品の搬送

青果物や家電業界では輸送環境で温度と振動が重要であると認識されており、研究が盛んである [2, 3]。細胞における先行研究では搬送時の温度と細胞あるいは細胞と振動の関係性が示されている [4, 5]。再生医療等製品は様々な容器および装置を用いた搬送方法があるが、細かな温度設定が出来ていない。また、搬送時に起きる振動や衝撃についてあまり考慮されていない。その為、再生医療等製品の搬送で温度と振動をより詳細に検証する事は、搬送を担う医薬品卸において意味があると考えられる。

2. 目的

医薬品搬送時に使用される様々な搬送装置の庫内温度の検討と、医薬品卸の輸送環境の把握を目的に実験を行った。

3. 方法・結果

3.1 蓄冷材を用いた庫内温度変化の検討

-150°C の超低温フリーザで融点 -70°C 以下 (A、PATHERMO) と -100°C 以下 (B、ADDCOLD) の蓄冷剤を凍結させ、搬送装置の庫内の角上ならび角下の温度変化を測定した。結果、A と B の蓄冷材共に温度は 1 時間で -108°C に到達し、冷やし過ぎていた。また、24 時間後には温度が徐々に上昇し、-60°C に達していたことから、細かな温度設定が困難であることが示された (Fig. 1)。

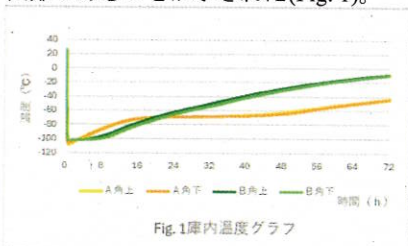
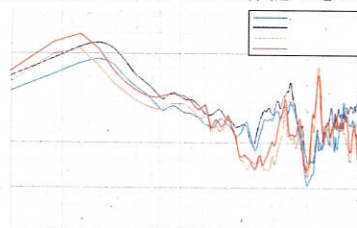


Fig.1 庫内温度グラフ

3.2 医薬品卸で使用される車両の荷台振動測定

軽自動車とワンボックスが一般道路および高速道路を走行

した際の荷台振動を、神栄テクノロジー社製の輸送環境記録計「DER-PRO」を用いて測定を行った。また、測定で取得した加速度データをパワースペクトラム密度 (PSD) を用いて荷台振動の比較を行った (Fig 2)。結果、車種や走行経路によって荷台振動が異なることを確認できた。



4. 考察

3.1 では、時間経過と共に庫内温度変化が認められた為、蓄冷材を使用した再生医療等製品の搬送時に、細胞の品質に影響を与える可能性が示唆された。

3.2 では、車種によって荷台振動が異なる為、細胞によって苦手とする周波数が存在する場合、製品を構成する細胞の種類によって車種の変更などが必要となる可能性がある。

5. おわりに

細胞は個人差や種類によっても個性が異なるため、適切な温度や振動が変わってくると考えられる。今回の測定で得られた知見をもとに、精密に制御できる搬送・保管技術の開発を目指す。

6. 参考文献

- [1] 日本医療研究開発機構. 「2019 年度再生医療・遺伝子治療の市場調査業務」.
- [2] 中馬 豊, 村田 敏, 他, 冷蔵トラックによるイチゴの長距離輸送試験-とくに振動衝撃と品質劣化について-, 農業機械学会誌, 31 (4), pp.292-297 (1970)
- [3] 喜本 誠, 家電品包装の最近の取り組みについて 2(4)環境対応包装の基準となる包装評価システム, 電機, 667 pp.50-54 (2004)
- [4] Kitahata et al., Critical Functionality Effects from Storage Temperature on Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Suspensions. Scientific Reports (2019).
- [5] Nikolaev et al., The sensitivity of human mesenchymal stem cells to vibration and cold storage conditions representative of cold transportation. J. R. Soc. Interface (2012).

筋組織再生に向けた多孔化インジェクタブルゲルによる高効率細胞デリバリー

Cell delivery using porous injectable hydrogels toward muscle tissue regeneration

安江 華^{*1,2}, 田口哲志^{*2}, 麻生隆彬^{*1,3}, 西口昭広^{*2,3}
 Hana YASUE^{*1,2}, Tetsushi TAGUCHI^{*2}, Taka-Aki ASOH^{*3}, Akihiro NISHIGUCHI^{*2,3}

※¹ 東京理科大学先進工学部, 葛飾区新宿 6-3-1, ※² 物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター, つくば市並木 1-1, ※³ 東京理科大学大学院先進工学研究科, 葛飾区新宿 6-3-1

^{*1} Faculty of Advanced Engineering, Tokyo University of Science, 6-3-1 Niijuku, Katsushika-ku, ^{*2} Research Center for Macromolecules and Biomaterials, National Institute for Material Science (NIMS), 1-1 Namiki, Tsukuba, ^{*3} Graduate School of Advanced Engineering, Tokyo University of Science, 6-3-1 Niijuku, Katsushika-ku

1. 緒言

骨格筋組織には強力な再生能力が備わっているが、重度の筋損傷 (volumetric muscle loss, VML) が起きると自己治癒は困難である。VML の治療法として、患者の細胞を移植することで損傷した組織を再生させる治療法である再生医療が注目を集めている。これまでに、損傷した筋組織の再生のために様々なアプローチが検討されており、中でもインジェクタブルゲルは、細胞の生着率を向上させるデリバリーキャリアとして有用である。しかしながら、多くのインジェクタブルゲルはマイクロサイズのポアを有していないため、宿主組織とのコミュニケーションが限定的であり、筋組織再生が阻害されることが課題であった。これまでに我々は、液-液相分離 (liquid-liquid phase separation, LLPS) を活用することでマイクロキャピラリーネットワーク (microcapillary network, μ CN) 状に多孔化したインジェクタブルゲルを開発しており、シグナル分子や細胞を介して宿主とコミュニケーションすることで高い細胞生着率と治療効果を達成している⁽¹⁾。一方で、多孔化インジェクタブルゲルは筋組織再生に有用である可能性を有しているが、VML に対する細胞生着率や治療効果については明らかとなっていない。

そこで本研究では、多孔化インジェクタブルゲルを用いて間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) のデリバリーを行うことで、VML における筋組織再生を促進することを目的とする (Figure 1)。特に、ゲルのマトリックス構造と組織再生効果の関係に着目し、移植細胞の増殖や筋分化、浸潤、シグナル分子の分泌を評価することで、筋組織再生を促進するゲルを開発する。

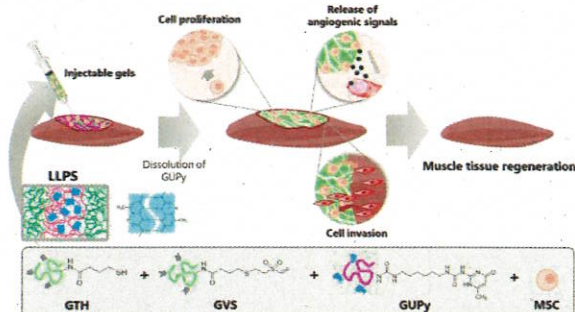


Figure 1. Muscle tissue regeneration using injectable gels engineered by LLPS.

2. 実験

γ -thiobutylolactone とゼラチン (G) からチオール化 G (thiolated gelatin, GTH) を合成し、GTH と divinylsulfone からビニルスルホン化 G (GVS) を合成した。また、末端にイソシアネート基を有するウレイドピリミジノン基 (2-

ureido-4[1H]-pyrimidinone, UPy) と G から GUPy を合成した。これらのゼラチン誘導体を所定の濃度でリン酸緩衝食塩水 (PBS) に溶解させ、pH を調整した後、37°C で混合することで non-porous ゲル (GTH+GVS), μ CN ゲル (GTH+GVS+GUPy) を作製し、ゲルの LLPS 構造を共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) によって観察した。

また、それぞれのゲルにマウス由来間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell, MSC) を内包し、2日間培養後の細胞形態を CLSM によって観察した。さらに、これらのゲルの細胞機能評価として、細胞増殖試験、ELISA による血管新生シグナルの定量、マウス C2C12 細胞浸潤試験を行った。また、ヌードマウスの前脛骨筋を $2 \times 5 \times 2 \text{ mm}^3$ の大きさで切除することで VML モデルを作製し、MSC を内包したゲルを注入した後、7日後の細胞生着を CLSM により評価した。

3. 結果と考察

蛍光ラベル化 G を用いてゲルの CLSM 観察を行ったところ、 μ CN ゲルにおいて LLPS 構造が誘起され、PBS 中で多孔化することを確認した。また、それぞれのゲルに MSC を内包して培養すると、non-porous ゲルの場合と比較して、 μ CN ゲルにおいて細胞の接着と伸張が向上した。さらに、ゲルの調製条件を変化させることで LLPS 構造を制御し、ポアサイズと MSC の細胞接着の関係の評価した結果、ポアサイズが約 $8 \mu\text{m}$ のとき、細胞の接着と伸張が最も促進された。この結果から、ゲルの空隙率だけでなく、ポアサイズが細胞接着を決定する因子として重要であることが示された。

細胞機能評価においては、 μ CN ゲルは MSC の増殖、血管新生シグナルの産生を促進することが示された。また、ゲル上にマウス C2C12 細胞を播種し、細胞浸潤を評価したところ、 μ CN ゲルにおいて有意な細胞浸潤が見られたことから、多孔構造は宿主組織からの細胞浸潤のための空隙としても機能することが明らかとなった。

さらに、VML モデルに対する MSC の生着率評価から、細胞懸濁液の注入と比較して、 μ CN ゲルにおいて細胞生着率が向上することが示された。これらの結果から、 μ CN ゲルは細胞の生着率を向上させるデリバリーキャリアとして、VML 治療に有用であることが示唆された。

4. 参考文献

(1) A. Nishiguchi, et al., Injectable microcapillary network hydrogels engineered by liquid-liquid phase separation for stem cell transplantation, *Biomaterials*, Vol. 305, pp. 122451 (2024).

老化細胞を選択的に除去することを目指したセノリティック薬内包型ナノファイバーメッシュの作製 Design of Nanofiber Meshes with Senolytic Drugs for Selective Removal of Senescent Cells

○齋藤達也^{1,2}, 谷本梨帆^{1,2}, 荏原充宏^{1,2}
Tatsuya SAITO^{1,2}, Riho TANIMOTO^{1,2}, Mitsuhiro EBARA^{1,2}

¹ 国立研究開発法人物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター, つくば市並木 1-1,

² 筑波大学大学院 理工情報生命学術院 数理物質科学研究群, つくば市天王台 1 丁目 1-1

¹ National Institute for Materials Science (NIMS), Research Center for Macromolecules and Biomaterials (RCMB), 1-1 Namiki, Tsukuba, ² Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba

1. 緒言

老化細胞とは細胞分裂が不可逆的に停止された細胞である。この老化細胞の除去は、老化細胞が引き起こす炎症およびそれがもたらすさらなる老化現象を防ぐために重要である。そこで注目されているのがセノリティック薬である。セノリティック薬は老化細胞特異的に細胞死を誘導する薬剤である(Fig. 1)。しかし経口投与などをした場合、体外排出が速いといった問題点がある。当研究室では新たな薬物放出材料として、薬剤を担持したナノファイバーメッシュを開発し、患部に直接添付する手法を提案してきた⁽¹⁾。

本研究ではセノリティック薬を体内で局所的かつ長時間にわたり除去できるよう、2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one (Fisetin)を Poly(ϵ -caprolactone) (PCL)内に拡散によって放出させるナノファイバーメッシュを開発した。

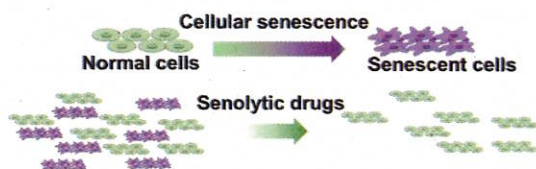


Fig. 1 Selective removal of senescent cells using senolytic drugs.

2. 実験方法

使用する老化間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells; MSC) を準備するため、継代を繰り返し培養を継続的に行った。Passage 5 (P5)から Passage 12 (P12)それぞれに対して SA- β -gal で老化の程度を確認した。確認後、老化した細胞としない細胞それぞれに Fisetin を投与し、MTT assay によりその効果 (Fisetin 投与により誘導される細胞死の程度) の違いを確認した。

PCL(80k Mn)と Fisetin を Acetone に溶解し、電解紡糸法を用いてファイバーを作製した。また、走査電子顕微鏡 (SEM) 画像からファイバー径を ImageJ で測定した。作製したファイバーを PBS 中に浸漬し、各放出時間における上澄み用液を採取した。溶液中の PBS を UV-vis で測定し、検量線に基づいて算出されたデータをもとに、ファイバーの薬物放出挙動を評価した。

さらに老化した細胞としない細胞にファイバーを投与し、MTT assay によりその効果 (ファイバー投与により誘導される細胞死の程度) の違いを確認した。

3. 結果及び考察

MSC の継代を続けると、継代を重ねるにつれ細胞増殖速度が遅くなることが確認された。SA- β -Gal 染色により、P9 から P12 の MSC が老化細胞であることが確認された。MTT-Assay の結果から、老化細胞に対してより効果的に細胞死が誘導された。

SEM 画像の解析により、繊維径が 100~300 nm 程度の均一な直径を持つセノリティック薬内包型のファイバーの作製が確認された(Fig. 2)。また薬物放出試験においては、Fisetin 放出が確認された。また、溶液中の Fisetin の割合が増加すると薬剤放出速度が遅くなることを確認した(Fig. 3)。さらにこのファイバーを用いた細胞毒性試験を行った結果では、老化細胞が通常細胞よりも細胞生存率が低くなる傾向が見えた。また、ファイバーに含有した薬の濃度によっても細胞生存率が変化したことを確認した。

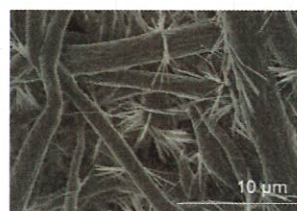


Fig. 2 SEM image of Fisetin loaded nanofibers.

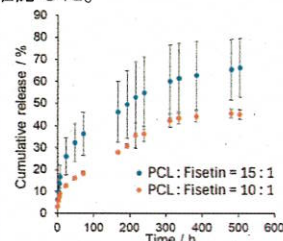


Fig. 3 Fisetin release profiles from nanofibers.

4. 結論

本研究ではセノリティック薬内包型ナノファイバーメッシュを作製し、その効果を MSC を用いて確認した。用いたセノリティック薬 (Fisetin) が MSC において老化細胞を選択的に除去することを確認した。さらに作製したファイバーメッシュはそのセノリティック薬 (Fisetin) を徐放し、徐放性能がファイバー設計により制御された。本ファイバーメッシュは、新たな老化細胞除去法として効果が期待される。

5. 参考文献

- [1] E. Niiyama, K. Uto, C. Lee, et al. Hyperthermia Nanofiber Platform Synergized by Sustained Release of Paclitaxel to Improve Antitumor Efficiency, *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 8, No.13, pp. 15-23 (2019).
- [2] S. Miyamura, T. Iwahashi, J. Sayanagi et al. A Nanofiber sheet Incorporating Vitamin B12 Promotes Nerve Regeneration in a Rat Neurotrophic Model, *Plastic and Reconstructive*, Vol. 7, No. 12, pp. 25-38 (2019).

Antibacterial properties and endothelial protection of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium

Adeline CASTRO RAMOS¹, Cat-Khanh VUONG¹, Osamu OHNEDA¹, Kazuya MORIKAWA², Yuri USHIJIMA²

^{*1}Laboratory of Regenerative Medicine and Stem Cell Biology, Institute of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan, ^{*2}Laboratory of Microbiology, Institute of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

1. Introduction

Surgical site infection (SSI) is a serious complication following cardiac surgery, significantly increasing morbidity and mortality rates among patients(1). While prophylactic antibiotic therapy is commonly used to reduce the risk of post-operative infections(2), it often comes with adverse side effects, including nephrotoxicity(3). This limitation underscores the need for alternative approaches, particularly for medically vulnerable populations. Previous clinical studies have demonstrated the efficacy of omentum grafts in cardiothoracic surgery for inhibiting SSI development(4). The omentum is a tissue reported to contain regenerative markers, growth factors, and stem cells. As well to express levels of anti-inflammatory cytokines and antimicrobial peptides (AMPs), (5,6)which have shown broad-spectrum efficacy and reduced susceptibility to bacterial resistance (7). This makes it promising candidate for tissue protection and preventing postoperative infections. Nevertheless, there is limited research regarding the antibacterial effect of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adipose tissue. Furthermore, the capacity of adipose tissue-derived MSCs to offer protection to other cells derived-tissues when exposed to bacteria is an underexplored research area. Therefore, this study aimed to investigate the antimicrobial properties of MSCs secreted from three lineages of adipose tissue and their impact on the survival and functionality of human aortic endothelial cells. Our findings revealed that conditioned medium derived from subcutaneous and omental isolated MSCs significantly inhibited the growth of *S. aureus* and *E. coli*. Furthermore, it effectively protected endothelial cells, preserving their morphology and tubular formation capacity following bacterial exposure. These results suggest significant therapeutic potential in using conditioned media from adipose-derived MSCs to prevent infections and preserve endothelial function under pathological conditions. This approach could potentially optimize infection control protocols and improve clinical outcomes in cardiac surgeries.

5. References

1. Ackah, et al. *Antimicrobial prophylaxis in adult cardiac surgery in the United Kingdom and Republic of Ireland*. J. Infect. Prev. 2021. 22, 83. <https://doi.org/10.1177/1757177420971850>. (2021)
2. Sartelli, et al. *Six Long-Standing Questions about Antibiotic Prophylaxis in Surgery*. *Antibiotics*. 12, 908. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050908>. (2023)
3. Campbell, et al. *Overview of Antibiotic-Induced Nephrotoxicity*. *Kidney Int. Rep.* 8, 2211–2225.(2023) <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2023.08.031>
4. Coselli, et al. *Treatment of postoperative infection of ascending aorta and transverse aortic arch, including use of viable omentum and muscle flaps*. *Ann. Thorac. Surg.* 50, 868–881. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(90\)91111-n](https://doi.org/10.1016/0003-4975(90)91111-n). (1990)
5. Chandra, et al. *The anti-inflammatory and antibacterial basis of human omental defense: selective expression of cytokines and antimicrobial peptides*. *PLoS One*. 2011. 6,

e20446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020446>. (2011)

6. Shah, et al. *Cellular Basis of Tissue Regeneration by Omentum*. *PLOS ONE*. 7, e38368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038368>. (2012)
7. El Shazely, et al. *Resistance Evolution Against Antimicrobial Peptides in Staphylococcus aureus Alters Pharmacodynamics Beyond the MIC*. *Front. Microbiol.* 11.(2020)

6. Proposed method

Bacterial reduction was assessed by co-incubating *E. coli* and *S. aureus* with conditioned medium, followed by CFU quantification on agar plates. Endothelial cells were co-incubated with conditioned medium and bacteria, and apoptosis/viability was evaluated using Annexin V/PI assays via flow cytometry. Data were statistically analyzed to determine the impact of the conditioned medium on bacterial reduction and cell survival.

口腔内疾患の予防・早期治療のための抗菌性リン酸カルシウム粒子

Antibacterial calcium phosphate particles for prevention and early treatment of oral diseases

中村真紀^{*1}, PAL Aniruddha^{*1}, 猪瀬智也^{*1}, 大矢根綾子^{*1}, 金本佑生実^{*2}, 西田絵利香^{*3},
宮治裕史^{*3}

Maki NAKAMURA^{*1}, Aniruddha PAL^{*1}, Tomoya INOSE^{*1}, Ayako OYANE^{*1}, Yukimi KANEMOTO^{*2},
Erika NISHIDA^{*3}, Hirofumi MIYAJI^{*3}

*¹ 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市東 1-1-1, *² 北海道大学病院, 札幌市北区北 14 条西 5 丁目, *³ 北海道大学, 札幌市北区北 13 条西 7 丁目

*¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, *² Hokkaido University Hospital, N14W5, Kita-ku, Sapporo, *³Hokkaido University, N13W7, Kita-ku, Sapporo

1. はじめに

口腔内の二大疾患であるう蝕(虫歯)と歯周病は、歯を失う原因の大半を占めており、超高齢社会における健康寿命延伸の観点からも予防や早期治療が重要である。いずれの疾患も口腔内細菌(う蝕原因菌、歯周病原細菌など)の感染を原因とするため、これらの疾患の予防と治療には、歯周ポケットや歯の噛み合わせ面の溝などの細菌の繁殖しやすい口腔内の狭い空間に、抗菌剤を送達・徐放できる粒子が有用と考えられる。我々は、歯の主要無機成分であるリン酸カルシウム(CaP)の粒子に、抗菌剤として銀ナノ粒子を担持することで、口腔内細菌に対して抗菌作用を示す粒子を開発した⁽¹⁾。さらに同粒子が、酸産生菌による口腔内環境の酸性化を緩和できる、すなわち、中和作用を有する可能性を示した。本研究では、ニューキノロン系の広域抗生物質であるシプロフロキサシン(CF)⁽²⁾ならびに牛乳に含まれる抗菌性タンパク質であるラクトフェリン(LF)をそれぞれ担持したCaP粒子を作製し、物性評価(構造・組成評価等)ならびに抗菌性評価を行った。

2. 実験

カルシウムイオン、リン酸イオン、CFを含む反応液①、ならびに、カルシウムイオン、リン酸イオン、LF、ヘパリンを含む反応液②を調製した。反応液①は2時間あるいは24時間振とう後、反応液②は24時間振とう後、析出物を洗浄・回収して試料を得た。なお、反応液②には、大きな負電荷を持つヘパリンを、粒子の分散剤かつLF(塩基性タンパク質)の担持助剤として添加した⁽³⁾。また、ヘパリンを添加しない比較用試料も作製した。得られた試料の構造・組成は、走査電子顕微鏡観察、エネルギー分散型X線分光法、紫外可視分光法、X線回折法などにより調べた。また、CFやLFの担持効率(反応液に添加したCFあるいはLF全量のうち、試料に担持された量の割合)を算出した。さらに、得られた試料の分散液を種々の濃度で、3種の口腔内細菌(*Streptococcus mutans*(*S.m.*菌、う蝕原因菌)、*Porphyromonas gingivalis*(*P.g.*菌、歯周病原細菌)、*Actinomyces naeslundii*菌(*A.n.*菌、プラークの初期付着菌))の懸濁液に添加し、24時間培養後の細菌数(濁度測定あるいは微生物増殖アッセイキットによる吸光度測定)ならびに細菌懸濁液のpHを評価した。

3. 結果と考察

構造・組成解析の結果、反応液①から得られた試料はCFを担持したCaP粒子(以下、振とう時間に応じてCF-CaP2, CF-CaP24)、反応液②から得られた試料はLFとヘパリンを

共担持したCaP粒子(以下、LF-CaP-Hep24)であった。CF-CaP2は球形に近い粒子であり、CaP相はアモルファスであったのに対し、CF-CaP24とLF-CaP-Hep24は不定形の粒子であり、CaP相は低結晶性アパタイトであった。また、CF-CaP2, CF-CaP24におけるCF担持効率はそれぞれ27%、68%であり、LF-CaP-Hep24におけるLF担持効率は94%であった。CF担持CaP粒子(CF-CaP2, CF-CaP24)では、振とう時間の延長(2時間から24時間)に伴い、CaPマトリックスが結晶化するとともに、より多くのCFを担持したと考えられた。また、LF-CaP-Hep24では、ヘパリンとの相互作用により、より多くのLFを担持したと考えられた(ヘパリンを添加せずに作製した試料のLF担持効率は62%)。

CF-CaP2, CF-CaP24について、*S.m.*菌、*P.g.*菌、*A.n.*菌に対する抗菌性評価を行った結果、いずれの粒子でも添加濃度の増加に伴って細菌数の減少が認められた。また、細菌懸濁液の培養前後のpH変化を粒子添加・無添加の系と比較したところ、酸産生菌である*S.m.*菌、*A.n.*菌では、粒子添加によって細菌懸濁液のpH低下が抑制され、粒子による中和作用が示唆された。一方、*P.g.*菌はほとんど酸を産生しないため、粒子添加の有無に関わらず、細菌懸濁液のpHの低下はわずかであった。LF-CaP-Hep24については、*A.n.*菌に対する抗菌性評価を行った結果、粒子添加濃度の増加に伴う細菌数の減少が認められた。これらの抗菌性粒子は、口腔内の狭い空間において抗菌作用や、酸性化緩和作用を発揮できると見込まれることから、日常のオーラルケアから口腔内疾患の治療まで幅広い応用が期待される。

4. 参考文献

- (1) M Nakamura, A Oyane, Y Shimizu, S Miyata, A Sacki, H Miyaji, Physicochemical fabrication of antibacterial calcium phosphate submicrospheres with dispersed silver nanoparticles via coprecipitation and photoreduction under laser irradiation, *Acta Biomater.*, 46, 299-307 (2016).
- (2) A Pal, A Oyane, T Inose, M Nakamura, E Nishida, H Miyaji, Fabrication of ciprofloxacin-immobilized calcium phosphate particles for dental drug delivery, *Materials*, 17, 2035 (2024).
- (3) M Nakamura, W Bunryo, A Narazaki, A Oyane, High immobilization efficiency of basic protein within heparin-immobilized calcium phosphate nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 11530 (2022).

謝辞：本研究は、JSPS 科研費 (JP22KF0412, JP22F21044, JP22H05148, JP22K10012)、公益財団法人天田財団の助成を受けて実施された。

VR シミュレータを活用した医薬品配送支援システムの評価環境構築 営業所から顧客施設への支援案比較

Construction of an Evaluation Environment for Pharmaceutical Delivery Support Systems Using a VR Simulator: Comparing Support Plans from Branch Offices to Customer Sites

小澤 重樹^{*1*2}, 一刈 良介^{*1}, 三浦 卓也^{*1*2}, 本山 貴志^{*2}, 風見北斗^{*2}, 蔵田 武志^{*1}
Shigeki Ozawa^{*1*2}, Ryosuke Ichikari^{*1}, Takuya Miura^{*1*2}, Takashi Motoyama^{*2}, Hokuto Kazami^{*2},
Takeshi Kurata^{*1}

^{*1} 国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研), つくば市並木 1-2-1, ^{*2} 東邦ホールディングス株式会社,
東京都中央区八重洲 2-2-1 東京ミッドタウン八重洲 八重洲セントラルタワー9 階

^{*1}National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-2-1 Namiki, Tsukuba, ^{*2} TOHO
HOLDINGS CO., LTD, 9th Floor, Yaesu Central Tower, Tokyo Midtown Yaesu, 2-2-1 Yaesu, Chuo-ku, Tokyo.

1. はじめに

人的資本経営 (HCM) を促進するには、生産性と働き方の質 (QoW) の同時改善が求められる[1]。物流倉庫では、自動化や支援技術の導入が進む一方、医薬品配送工程では煩雑な作業が残り、誤配送リスクが課題となっている。そのようなリスクを回避するため、厳密な検品、仕分け作業が実施されており、現場負担の原因となっている。

本事例の最終目的は、新たな作業支援により作業の正確性、効率性、容易性を改善することである。そのために、AR を活用した支援手法が有望視されている。しかし、日本の産業界ではまだ AR の認知度が低いいため、支援システムのプロトタイピング、既存システムとの比較、各ステークホルダーとの結果の共有からなるサイクルをできるだけ効率的に繰り返せるような VR 環境を構築した。VR 環境を用いたシミュレーションは、状況認識に関して大きな懸念がなければ、実環境と同じように AR 支援のパフォーマンスを評価することができることが先行研究[2, 3]で実証されている。

2. VR 環境の構築と支援手法のプロトタイピング

VR 環境構築のため、3 サイズの折りたたみコンテナ、28 種類の類似性が高い医薬品、営業所作業場などのオブジェクトを用意した。医薬品の種類は限定したが、28 種類でも作業ミスが確認され、プロトタイピングには十分と判断した。物理的なタスクについては、実際の動作や、それに類するジェスチャー動作によるコマンドでタスクが実行できるように実装された。また、支援手法の従来手法 (AM0) と改良手法 (AM1)、さらに 2 種類の AR 支援手法 (AM2、AM3) を VR 環境で構築した。AM2 は、上流工程を変更せず、顧客ごとに商品情報 (写真、名称、個数等) を提示し、対象商品が撮影されるとワイヤフレームを AR で表示することで、オリコンの準備や検品を支援する。AM3 は、AM2 に加え、QR コードを利用して入荷オリコンの位置を直接提示する。

3. 予備テスト

これまでに、AM0/1/2 に関してプロトタイピングサイクルの R&D チーム員 2 名 (配送業務従事経験有) による合計 22 時間以上、135 回以下の予備テスト (動作確認、比較評価) が実施されている。

本テストでは、配送作業全体での AM0 との比較を 2 つの異なる物量を設定し実施した。1 つ目の物量設定は、モデル営業所の 1/7 スケール相当の 75 個とした。結果として、AM1 では平均 10%、AM2 では平均 25% の作業時間短縮が確認さ

れた。次に、2 つ目の物量設定は、モデル営業所の 1/5 スケール相当の 100 個とした。結果として、AM1 では平均 31%、AM2 では 42% の作業時間短縮が確認された。(注: 本予備テストは、プロトタイピングサイクル中に得られたものであり、参加者実験の結果ではなく、あくまで参考情報である。)

4. 考察

プロトタイピングと VR での予備比較評価を通じて、AR 重畳提示による作業支援が、従来の配送作業よりも直感的で効率的であることが確認された。特に AR 支援により作業の中断が抑えられ、作業効率の向上が見込まれる。

一方で、AR のようなデジタル支援と伝票やオリコンなどの物理環境からの広義のアフォーダンスとのバランスを常に意識することが不可欠であることを確認した。例えば、現場では、出荷オリコンの蓋に伝票を挟むことで、出荷準備状況を把握している。しかし、筆者らが AR 支援によるペーパーレス化を試みた際、出荷可能なオリコンの把握が困難となったため、AR や他の物理的手段でオリコンの状態を確認できる方法を導入することとした。

5. おわりに

このプロトタイピングサイクルで得られた知見をもとに、VR シミュレーション環境そのものの評価と各種支援手法の比較評価を行う予定である。そのため、主観評価に関して、NASA-TLX、SUS、IPQ、SSQ などを用いた精神的負荷、作業のしやすさ、プレゼンス、VR 酔いなどの評価のためのアンケートやインタビュー項目を設計中である。加えて、客観評価に関しては、作業時間、エラー率、動作の種類や回数などに関する評価のためのシステム実装を進めている。

6. 参考文献

- [1] T. Kurata, A. Sato, S. Ogiso, K. Kato, S. Nakae, R. Ichikari and T. Shimmura. Pre-Post Analysis on Multi-Skill Development using Flow Line Data at Expressway Service Area Facilities. APMS 2024.
- [2] C. Lee, S. Bonebrake, T. Hollerer and D. A. Bowman. A replication study testing the validity of AR simulation in VR for controlled experiments. ISMAR, pp.203-204, 2009. doi: 10.1109/ISMAR.2009.5336464
- [3] J. Lacoche, E. Villain and A. Foulonneau. Evaluating Usability and User Experience of AR Applications in VR Simulation. Frontiers in Virtual Reality, Vol.3, 2022. doi:10.3389/frvir.2022.881318

デュアルプラズマ脱離イオン化を用いた 注射プラズマプローブによる薬剤の高感度分析

Highly Sensitive Analysis of Drugs by Plasma Injection Probe using Dual Plasma Desorption/Ionization System.

太原 誠也¹・清水 祐哉¹・八井田 朱音¹・守岩 友紀子²・
高松 利寛³・東海林 敦²・沖野 晃俊¹

Masaya TAHARA¹, Yuya SHIMIZU¹, Akane YAIDA¹, Yukiko MORIWA²,
Toshihiro TAKAMATSU³, Atsushi SHOJI², Akitoshi OKINO¹

¹東京科学大学, 横浜市緑区長津田町 4259, ²東京薬科大学, 八王子市堀之内 1432-1,
³産業技術総合研究所, つくば市並木 1-2-1

¹Institute of Science Tokyo, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama,

²Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji,

³National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-2-1 Namiki, Tsukuba

1. はじめに

抗がん剤などの薬剤が副作用を抑えながら十分な効果を発揮するためには、患部に適切な濃度で到達する必要がある。そのため、薬剤を評価するためには、組織に到達した薬剤の濃度を測定することが求められる。しかし、現状、生体への影響を抑えて、体内の特定位置の薬剤濃度をリアルタイムで測定することは困難である。

我々のグループでは、大気圧低温プラズマを用いた、皮膚表面の付着物分析を実現してきた⁽¹⁾。この分析法を生体内に適用するために、注射プラズマプローブを考案した。この装置の概略図を Fig. 1 に示す。この装置は、注射針内部に超小型のプラズマジェットを組み込んで作製する。分析時には、この装置を標的組織に向けて挿入し、その先端からプラズマを照射する。標的組織の薬剤分子はプラズマによって脱離され、同時にプロトンが付与されてイオン化する。この分子イオンを体外に取り出し、質量分析装置に導入することで質量分析を行う。

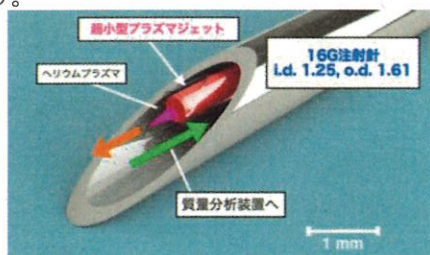


Fig. 1 注射プラズマプローブの概要

本研究では、4-イソプロピルアンチピリンを含んだ生体模擬試料を作製し、注射プラズマプローブを挿入して分析を行った。また、薬剤の輸送距離を伸ばすために、注射針出口に吸引チューブを配置して分析を行った。さらに、質量分析装置に導入される前に失活した分子に再度プロトンを付与するため、デュアルプラズマ脱離イオン化システムを用いた。

2. 実験方法

外径 220 μm の中空光ファイバーに銅電極を螺旋状に巻き付けて超小型プラズマジェットを作製した。作製したプラズマジェットの外径は約 700 μm であった。このプラズマジェットを 16G、長さ 20 mm の注入針に組み込んで注射プラズマプローブを作製した。生体模擬試料は、精製水に粉寒天と 1000 ppm の 4-イソプロピルアンチピリンを混合して作製し

た。プラズマは、ヘリウムガスを 300 mL/min で超小型ジェットに流し、9 kV, 16 kHz の交流電圧を電極に印加して生成した。

はじめに、注射プラズマプローブを用いて試料内部の分析を行った。プローブを生体模擬試料に 15 mm 挿入して試料内部でプラズマを生成して分析を行った。

この装置を実用化するためには、分析装置と離れた位置からでも分析できる必要がある。そこで、注射プラズマプローブを 70 cm の PFA チューブ（内径 2 mm, 外径 4 mm）で質量分析装置を接続し、かつ、再結合による電荷の低減を補うため、質量分析装置の直前にもプラズマを配置し、分析試料に再度電荷を付与する実験を行った⁽²⁾。

3. 結果と考察

まず、生体模擬試料内部の分析の結果、4-イソプロピルアンチピリン由来の質量信号が得られた。この結果から、注射プラズマプローブを用いて生体模擬試料内部の薬剤分子を分析できる事が示された。

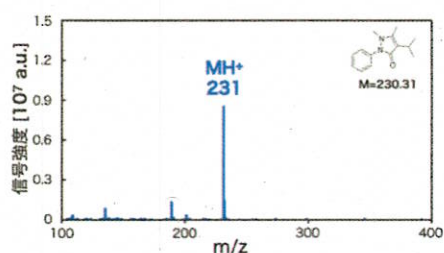


Fig. 2 生体模擬試料内の分析結果
(薬剤: 4-イソプロピルアンチピリン)

次に、薬剤分子の輸送距離を 70 cm まで延長して分析を行った結果、分析装置の直前でプラズマを再照射したときには、薬剤由来の質量信号が得られた。この結果より、実用的な分析に向けた、長距離の薬剤輸送方法が検証できた。

4. 参考文献

1. M. Aida, T. Iwai, A. Okino; J. Anal. At. Spectrom., Vol. 33, pp. 578-584 (2018).
2. M. Aida, T. Iwai, Y. Okamoto, S. Kohno, K. Kakegawa, H. Miyahara, Y. Seto, A. Okino, Mass Spectrometry, Vol. 6, No. 3, S0075 (2017).