

ナノ分子操作技術による血液界面代替デバイスの開発研究

分担研究者 妙中義之 国立循環器病センター研究所人工臓器部長

研究要旨:本研究ではナノテクノロジーを用いることにより新しい循環器用医療デバイスを開発する。ナノサイズの超分子ユニットを集合、接合、生長させることで、医療デバイスの表面構造をナノレベルで自在に操作し、生体適合性やドラッグデリバリー性などの表面機能を極めて柔軟に設計できる革新的技術である。この技術をもとに循環器用医療デバイスを開発する。特に本分担研究では、To Surface テクノロジー開発、および微細加工工学デバイスの開発として、抗血栓性のナノ分子ユニットを表面固定した血液接触デバイス（人工血管、カテーテル、人工弁、心肺補助装置など）などを開発する。プロトタイプのパフォーマンスを動物実験により評価し、最終年度までに、ナノテクノロジーから発信された上記の医療デバイスを前臨床段階にまで引き上げ、製品化をめざす。本年度は対象となる医療機器として人工肺を選び、抗血栓性の評価とともに、人工肺の重要な機能であるガス交換性能にこのナノテクノロジー技術が影響を与えるかどうかについて検討した。その結果、本ナノテクノロジー技術によりヘパリン表面固定技術を施行することで、ガス交換性能、抗血栓性のいずれにおいても優れた人工肺の可能性を示唆することができた。

A. 研究目的

本研究ではナノ分子アーキテクチャー技術を開発し、新しい循環器用医療デバイスを開発する。ナノ分子アーキテクチャー技術とは、ナノサイズの超分子ユニットを集合、接合、生長させることで、医療デバイスの表面構造をナノレベルで自在に操作し、生体適合性やドラッグデリバリー性などの表面機能を極めて柔軟に設計できる革新的技術である。この技術をもとに循環器用医療デバイスを開発する。特に本分担研究では、To Surface テクノロジー開発、および微細加工工学デバイスの開発として、抗血栓性のナノ分子ユニットを表面固定した血液接触デバイス（人工血管、カテーテル、人工弁、心肺補助装置など）などを開発する。初年度には、ナノスケールで超分子構造を

自在に操作できるナノ分子アーキテクチャー技術を確立する。同時に、上記の循環器用医療デバイスに要求される性能を詳細に調べ、プロトタイプのパフォーマンスを動物実験により評価する。最終年度までに、ナノテクノロジーから発信された上記の医療デバイスを前臨床段階にまで引き上げ、製品化をめざす。

B. 研究方法

血液凝固反応のカスケードの進行により活性化されるトロンピンはそのインヒビターであるアンチトロンピンⅢと複合体を形成することで不活化され、血栓化を防止できる。ヘパリンはアンチトロンピンⅢと複合体を形成することで、前述のトロンピンとアンチトロンピンⅢとの結合反応を触媒的に促進させることで、抗凝血剤として働く。ヘパリン分子内に

はアンチトロンビンⅢに対して特異的に結合する活性部位が存在しており、この部位に如何に自由度を与えてやるかがヘパリン固定化技術のキーポイントになる。従来はヘパリンを共有結合にて固定化させる方法とイオン結合にて固定化させる方法とが用いられてきた。共有結合では長期間にわたり材料表面にヘパリンが存在するものの、ヘパリンの自由度が制限され、その活性が低く十分な抗血栓性を確保することができなかった。イオン結合方式はヘパリンの有するマイナス電荷にプラス電荷を有するアンモニウム塩を結合させて水に不溶化、有機溶媒に可溶化し、材料表面に塗布する方法である。この際、アンモニウム塩とヘパリンのイオン結合は血液中で解離して、ヘパリンが血液中に溶出することによって高い活性を維持していた。しかしこの方法では早期にヘパリンが溶出して材料表面が非血栓化することおよびアンモニウム塩も血液中へ溶出するというように安全性に問題があった。

本研究ではアンモニウム塩のアルキル基の炭素鎖長を制御することによって、結合してもヘパリンの自由度、すなわち活性が発揮できる低疎水性のアンモニウム塩と、結合したときにヘパリンに自由度を与えず、材料表面から溶出させない疎水性の高いアンモニウム塩とを組み合わせることで長期間にわたり極めて高い活性を維持可能な新しいヘパリン固定化技術を開発する。このアンモニウム塩は長鎖ジアルキル基を二本有しており、血液接触時には疎水性の医療機器の基材表面に2本の長鎖ジアルキル基が、血液側にヘパリンの親水性部分が露出することになり、これは長

鎖ジアルキル基を内部に有し、血液接触面に親水性の高いホスファチジルコリン部分が露出している細胞膜の構造に類似している。この微細構造もこのナノテクノロジー技術が他に類を見ない、非常に優れた抗血栓性を有していることの一要素となると考えられる。

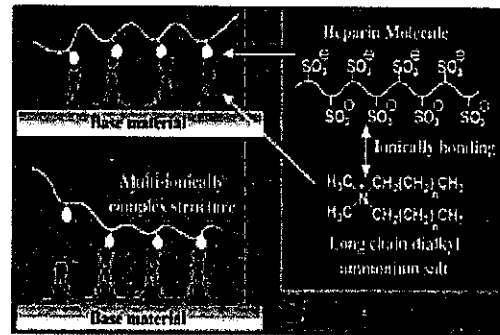


図1：本技術のコンセプト図

本年度は対象となる医療機器として人工肺を選び、抗血栓性の評価とともに、人工肺の重要な機能であるガス交換性能にこのナノテクノロジー技術が影響を与えるかどうかについて検討した。抗血栓性については実験継続中であり、本年度は概略を述べるにとどめ来年度以降にまとめて報告する。本報告では主として人工肺のガス交換性能に及ぼす影響について報告する。

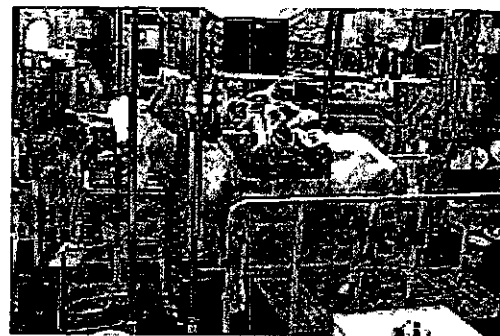


図2：人工肺の長期実験

(1) 抗血栓性分子ユニットの表面固定技術

本研究で用いた抗血栓性分子ユニット

の表面固定技術は、複数の鎖長の長鎖ジアルキル基を有する脂肪族系カップリング剤とヘパリンとのイオン結合体により、生体膜の脂質構造を模擬させた新しい血液接触面の処理技術である。本抗血栓性処理技術は、処理行程が簡便で比較的低価格かつヘパリン固定量が多いというイオン結合法の特徴を生かしつつ、異なる鎖長の結合体の割合によりヘパリンの徐放を制御することで共有結合法に匹敵する長期耐久性の獲得を目指したものである。

### (2) 抗血栓性処理が中空糸膜のガス透過性能に与える影響の評価

ガス透過性中空糸膜には、ガス透過性に優れるとともに、血液接触面に血漿リークを妨げる $0.2\mu\text{m}$ 以下の緻密層を有することで耐久性にも優れた非対称構造の多孔質膜である特殊ポリオレフィン膜を採用した。本抗血栓性処理技術が特殊ポリオレフィン膜のガス透過性能に与える影響を検討するために、本中空糸膜からなる人工肺型のモジュールを作製して、本抗血栓性処理前と処理後のガス透過性能を、加圧試験にて評価した。ガス透過性能は計測した膜透過酸素流量をモジュールの膜面積と負荷した圧力で除することにより求めた。

### (3) 試験人工肺

特殊ポリオレフィン製中空糸膜からなる人工肺(試験人工肺(-))と血液接

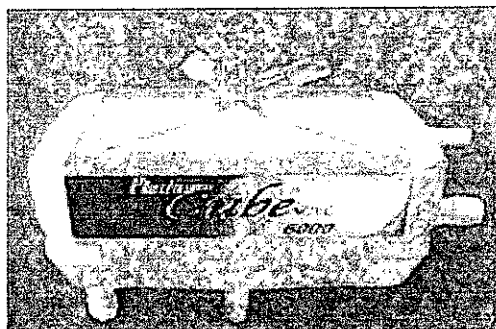


図3：実験対象と同種の人工肺

触面全体に本抗血栓性処理を施した人工肺(試験人工肺(+))についてガス交換性能の比較検討を行った。動物実験用の試験人工肺に使用した中空糸膜は前述した特殊ポリオレフィン膜のガス透過性を改良したものをを用いた。水銀圧入式ポロシメータ (porosity meter 2000) をもちいて計測した改良特殊ポリオレフィン製中空糸膜の空孔率は32.5%であり、平均孔直径は $532\text{ \AA}$ であった。人工肺型のモジュールを用いた加圧試験により測定した酸素透過性能は $120 \times 10^{-5} \text{ m}^3(\text{STP})/\text{m}^2/\text{sec}/\text{mmHg}$ であり、ガス透過膜として十分な性能を有するものであった。血漿リークを評価するためのアルブミン漏出試験では、人工肺型のモジュールのガス側出口付近に凝集した水溶液中のアルブミンの濃度は試薬の検出限界以下( $10 \text{ mg/dL}$ 以下)であり、アルブミンの漏出は認められない長期耐久性の期待できるものであった。

本試験人工肺は、同じ中空糸膜サイズ、ハウジング、中空糸膜充填率、配糸方法にて試作し、同様な流路構造とした。いずれの試験人工肺も中空糸膜内-外径は $165 - 225 \mu\text{m}$ 、ハウジングの内部寸法は $95 \times 58 \times 30 \text{ mm}$ 、中空糸充填率は44%で、有効膜面積 $1.27 \text{ m}^2$ 、血液充填量 $250 \text{ mL}$ であった。

### (4) *ex-vivo* 心肺バイパス回路によるガス交換性能の比較

成山羊を用いて、全身麻酔下のもと右心房脱血、右頸動脈送血にて体外循環を施行した。人工肺流入静脈血性状を人工呼吸器により調節した。各試験人工肺には100%酸素を吹送し、全身ヘパリン投与下に遠心ポンプ(CAPIOX-CX、Terumo、Japan)を用いて灌流した。血流量を1、3

および 5 L/min に設定し、ガス血液流量比(V/Q)を 1、3 および 5 に変化させ、各条件の下で測定を行った。人工肺の流入部および流出部で血液を採取し、血液ガス分析装置 (ABL-500 and OSM-3、Radiometer、Copenhagen、Denmark) を用いて血液ガス値を計測した。計測値より酸素移動量および炭酸ガス移動量を求めた。

なお、動物実験の施行に際しては動物愛護の精神を遵守して、適切にとり行った。

### C. 研究結果

生体の細胞膜と同様に 2 本のアルキル鎖を有する構造を基本とし、ナノメートルオーダーでこのジアルキル基の鎖長を制御することにより、先端に結合させた生理活性物質、ヘパリンを親水性環境下であたかも血中に溶出したような状態でその活性を十分に発揮させるとともに、実際にはヘパリンが血中に溶出して行くことなく材料表面に留まるための疎水性環境をも同時に維持する技術について検討を開始した。人工肺と血液ポンプを用いた心臓・肺機能の代替装置を成ヤギに装着し、最長 5 ヶ月間の長期間の動物実験を継続して行っている。表面ナノテクノロジー技術の改良により、デバイス内のヘパリンの分布の均一化や高活性化を図り、来年度以降の発展のための基礎データを蓄積しつつある。

#### (1) 中空糸膜のガス透過性能

人工肺型のモジュールによる本抗血栓性処理前と処理後の特殊ポリオレフィン製中空糸膜のガス透過性能はそれぞれ  $33.0 \text{ m}^3(\text{STP})/\text{m}^2/\text{sec}/\text{mmHg}$ 、 $27.8 \text{ m}^3(\text{STP})/\text{m}^2/\text{sec}/\text{mmHg}$  であった。これより

本抗血栓性処理によって特殊ポリオレフィン製中空糸膜のガス透過性能は 15.8 % の減少が確かめられた。

#### (2) 試験人工肺のガス交換性能

まず試験人工肺(-)および試験人工肺(+ )の酸素移動量は血流量 1、3、5 L/min に対し、V/Q=1 の時はそれぞれ 89 vs 64、175 vs 184 および 293 vs 265 mL/min、V/Q=3 の時はそれぞれ 82 vs 85、166 vs 152 および 295 vs 359 mL/min、V/Q=5 の時はそれぞれ 81 vs 88、185 vs 175 および 296 vs 349 mL/min であった。次に試験人工肺(-)および試験人工肺(+ )の炭酸ガス移動量は血流量 1、3、5 L/min に対し、V/Q=1 の時はそれぞれ 68 vs 54、127 vs 152 および 239 vs 229 mL/min、V/Q=3 の時はそれぞれ 114 vs 105、206 vs 210 および 297 vs 302 mL/min、V/Q=5 の時はそれぞれ 120 vs 119、222 vs 221 および 285 vs 295 mL/min であった。本実験範囲において、いずれの試作人工肺の酸素移動量および炭酸ガス移動量も、血流量の増加とともにほぼ直線的に増加していた。炭酸ガス移動量はともに V/Q 比の増加に対して上昇しており、とくに V/Q 比が 1 と 3 の間で顕著な上昇が認められた。特に、本抗血栓性処理による明らかな性能低下の傾向は認められなかった。

### D. 考察

本ナノテクノロジー技術派は従来の分類で言う「イオン結合型」のヘパリン化材料に該当する。本技術は長鎖ジアルキル基を有する脂肪族系カップリング剤を用いることで疎水性を高め、ヘパリンを基材表面に対して強固に固定化し、血中への溶出を抑制するように設計したものである。イオン結合型のヘパリン化

材料は材料自身の血液中への溶出による血液凝固時間の延長が問題となりうるが、本技術はカップリング剤の長鎖ジアルキル基のアルキル鎖長を制御することによってこの問題を解決している。

一方、細胞膜はリン脂質二重膜で構成されており、このリン脂質は二本のアルキル鎖を有している。本技術も同様にカップリング剤に二本の長鎖ジアルキル基を用いることによって、疎水性を高めると同時に生体膜疑似構造を有しているといえる。すなわち、本技術は生体適合性を向上させるのに必要な要素を兼ね備えていると考えられる。この様に本技術は、ナノオーダーで、ヘパリンの自由度を温存しナノテクノロジーを駆使し、優れた抗血栓性の発現と生体適合性の向上を獲得していると考えられる。

人工肺のガス交換性能に関しては、本抗血栓性処理によって特殊ポリオレフィン製中空糸膜のガス透過性能は15.8%の減少が確かめられたが、試験人工肺を用いた動物実験による本抗血栓性処理によるガス交換性能への顕著な影響は見られなかった。ガス透過性膜を介したガス層と血液層間のガス移動現象において、主たる律速抵抗となっているのは血液層側の濃度境膜抵抗であることが知られており、その値はガス透過係数の逆数で与えられる膜の移動抵抗の数百?数千倍に至るものである。このことから、本抗血栓性処理によって特殊ポリオレフィン製中空糸膜のガス透過性能に与えた影響は、試験人工肺のガス交換性能においてほぼ無視できる程度であることが確認された。

#### E. 結論

本研究により、本ナノテクノロジー技

術によりヘパリン表面固定技術を施行することで、ガス交換性能、抗血栓性のいずれにおいても優れた人工肺の可能性を示唆することができた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nishinaka T, Tatsumi E, Taenaka Y, Katagiri N, Ohnishi H, Shioya K, Fukuda T, Oshikawa M, Sato K, Tsukiya T, Homma A, Takewa Y, Takano H, Sato M, Kashiwabara S, Tanaka H, Sakai K, Matsuda T: At least thirty-four days of animal continuous perfusion by a newly developed extracorporeal membrane oxygenation system without systemic anticoagulants. *Artif Organs* 26: 548-551, 2002

2) 片桐伸将, 巽 英介, 西中知博, 妙中義之, 高野久輝, 酒井一成, 松田智昌, 田中秀典, 柏原 進, 佐藤正喜: 血漿漏出を防止する非対称膜構造の中空糸膜を用いた人工肺のガス交換性能の向上: 新規開発のヘパリンコーティングが人工肺に与える影響の評価. *膜型肺* 25: 47-52, 2002

3) 巽 英介, 築谷朋典, 片桐伸純H, 武輪能明, 西中知博, 妙中義之, 高野久輝, 酒井一成, 松田智昌, 八名純三, 小西義昭, 佐藤正喜, 田中秀典: 緊急対応性と長期耐久性を有する超小型一体型心肺補助装置の研究開発. *膜型肺* 25:58-64, 2002

4) 西中知博, 巽 英介, 妙中義之, 片桐伸将, 大西裕幸, 押川満雄, 塩谷恭子,

福田敏秀, 築谷朋典, 本間章彦, 武輪能明, 高野久輝, 佐藤正喜, 柏原 進, 田中秀典, 酒井一成, 松田智昌: 優れた抗血栓性と長期耐久性を有する心肺補助システムの開発. 膜型肺 25: 53-57, 2002  
5) 松田智昌, 酒井一成, 西中知博, 巽英介, 片桐伸将, 妙中義之, 田中秀典, 柏原 進, 佐藤正喜: 優れた抗血栓性と耐久性を有するPlatinum Cube NCVCについて. 医工学治療 14: 22-24, 2002

## 2. 学会発表

- 1) 巽 英介: ヘパリン投与が不要で2ヶ月以上の長期連続使用が可能な次世代型PCPSシステムの開発. PCPS研究会 (13), 2003, 2/6, 札幌市
- 2) Nishinaka T, Tatsumi E, Taenaka Y, Katagiri N, Ohnishi H, Fukuda T, Oshikawa M, Shioya K, Shirakawa Y, Tsukiya T, Naito H, Takewa Y, Takano H, Tanaka H, Kashiwabara S, Sato M, Matsuda T, Sakai K: Long-term durable cardiopulmonary support system with novel anti-thrombogenic coating (T-NCVC). Congress of The International Society for Rotary Blood Pumps (10), 2002, 9/11-14, 大阪市
- 3) Nishinaka T, Tatsumi E, Taenaka Y, Katagiri N, Ohnishi H, Shioya K, Fukuda T, Oshikawa M, Shirakawa Y, Takewa Y, Sakai K: A newly developed anti-thrombogenic coating (TNC) and application to VAD and an ECMO system. American Society for Artificial Internal Organs (48), 2002, 6/13-15, New York
- 4) 巽 英介: 未来型人工肺開発の現況と展望. 膜型人工肺研究会 (31), 2002,

10/3, 札幌市

- 5) 巽 英介, 西中知博, 片桐伸将, 築谷朋典, 武輪能明, 妙中義之, 高野久輝, 舟久保昭夫, 福井康裕, 酒井一成, 松田智昌, 川瀬浩二, 小西義昭, 糺屋 陸, 佐藤正喜, 田中秀典: 次世代型人工肺開発の現状と将来への展望. 日本人工臓器学会大会 (40), 2002, 10/2-4, 札幌市
- 6) 西中知博, 妙中義之, 巽 英介, 武輪能明, 本間章彦, 築谷朋典, 大西裕幸, 押川満雄, 片桐伸将, 水野敏秀, 塩谷恭子, 白川幸俊, 上村匡敬, 内藤 洋, 角田幸秀, 高野久輝: 人工臓器の開発と臨床応用, 現況と今後の展望. 日本人工臓器学会大会 (40), 2002, 10/2-4, 札幌市
- 7) 水野敏秀, 西中知博, 巽 英介, 片桐伸将, 大西裕幸, 市皮, 塩谷恭子, 築谷朋典, 本間章彦, 武輪能明, 高野久輝, 妙中義之: 長期静動脈バイパス施行による肺組織の病理学的観察. 日本人工臓器学会大会 (40), 2002, 10/2-4, 札幌市

## H. 知的財産の出願・登録状況

本年度は特になし

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

薬物代謝機能発現環境の最適化

分担責任者 絵野沢 伸 国立成育医療センター研究所移植・外科研究部・室長

研究要旨：現在の血液浄化法は限外濾過膜によって分子サイズを基準としたふるい分けによる毒性物質の排除を行っている。一方、生理的に行われる解毒は、細胞内あるいは細胞膜上の機能性高分子である酵素やトランスポーターにより、生体に対する要不要を区別して代謝、排除している。この機能を人工的に構築しようとするものがバイオ人工臓器であるが、本研究ではさらに細胞機能である薬物代謝と能動輸送を人工膜上に再構築して用いる検討を行っている。研究初年度である平成 14 年度は、まず各分担者が研究遂行上相互に必要な試料を円滑に得られる体制の確立をめざし、その結果徐々に共同研究の成果が出始めた。分担責任者である絵野沢は特に能動輸送能を有する膜タンパクである MDR1 の精製と機能評価系の確立を行った。MDR1 のソースとしてはウサギ腎近位尿細管由来細胞である PCTL-MDR 細胞及びバキュロウィルスとその宿主昆虫細胞である Sf-9 細胞を利用した。前者を利用した系では MDR 遺伝子強発現株を選別、培養し、細胞膜画分から MDR1 を粗精製した。このタンパクはほぼ 90 $\mu$ g 前後だったが、精製度は 10% 以下であった。一方、後者の系では MDR1 タンパクが約 650 $\mu$ g 得られた。また、SDS ゲル電気泳動によると精製度も 90% 以上であった。この精製標品を ATP 存在下で放射性ジゴキシンと反応させ、ゲル濾過を行ったところ、MDR タンパクの分子量 (12 万) の位置に放射活性が見られ、機能的な確認もできた。また、MDR1 タンパク埋込リポソームの ATP 水解能は全活性の 86% となり、大半の MDR タンパクが内向きに配向していることがわかった。このことから MDR により異物をリポソーム内へ移動させるという目的に合致した良好な結果

A. 研究目的

血液濾過透析や血漿交換を組み合わせた血液浄化法は 1980 年代の中空糸カラムの出現により急速に発展し、現在も劇症肝炎をはじめ様々な疾患に対する治療法の基幹をなしている。しかしながら、ひとり

の患者に対し大量の血漿が必要であることや亜急性劇症肝炎では昏睡からの一時的な覚醒効果はみられるものの最終的な救命率の向上は得られないなど問題点も多い。このような現行の血液浄化法の限界の背景には、中空糸カラムによる血中物質

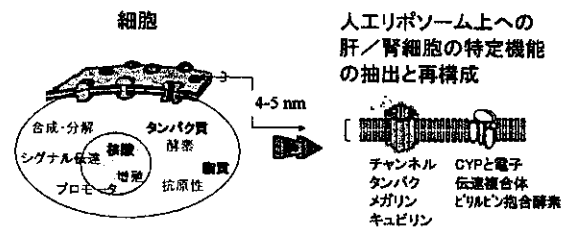
の除去が単に膜の孔径 (30kd? 0.5 $\mu$ m) にのみ依存し、生体にとって要不要の別なく排除してしまうという原因が考えられる。病期の体液には為害性物質だけでなく疾患に反応して治癒を促す物質も存在し、これらも透析・濾過によって排除されてしまう。理想的な血液浄化は生体が行っているように毒性物質のみを選択的に取り除くシステムである。

工学的手法を補う目的で肝細胞あるいは腎細胞を利用したバイオ人工肝・人工腎の開発がなされ、欧米では既に総計 100 例近い臨床治験も報告されている。しかし、生きた細胞を用いる場合、医療機器としての品質管理や安全性確保が難しく一般的な治療として普及するには多大な困難が予想される。そこで、我々は細胞全体から、バイオ人工臓器の構成に必要な機能だけを選択・抽出し、ナノメータースケールの人工膜上に生理機能を構築するという戦略を考えている (図 1)。

細胞表面に存在し、細胞内外の物質輸送を行うチャンネルタンパク分子を人工膜に固定化するという新規な発想による血液浄化システムを提案する。現在、薬物代謝酵素系や細胞膜上のチャンネルタンパクは、それぞれ分子種群をなし、新しい分子が続々と遺伝子レベルで同定されている。これらの機能性タンパクは、それぞれ異なった基質特異性を有するので肝・腎不全の病態を改善するために必要な分子種を選び出すことができる。こうして再構成された人工合成膜により生きた細胞のように統合した選択的・能動輸送を実現させ

ることが我々の計画の目標である。

A



B

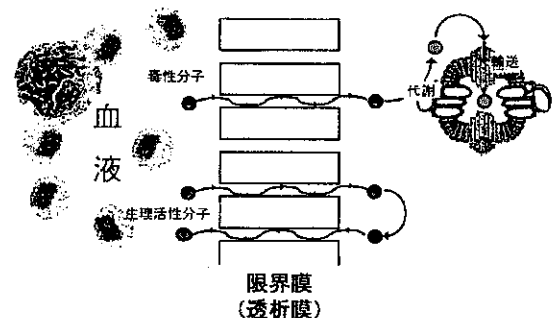


図 1 機能性プロテオリポソーム (A) とそれを用いたバイオ血液浄化システムの概念図 (B)

このプロジェクト遂行のための研究組織を表 1 に挙げ、それぞれの分担項目と相互の関係を図 2 に示した。

#### 研究組織

絵野沢伸

国立成育医療センター研究所移植・外科研究部室長  
久保井亮一

大阪大学大学院基礎工学研究科教授

大政健史

大阪大学大学院工学研究科応用生物化学助手

藤村昭夫

自治医科大学臨床薬理学教室教授

三枝順三

(独) 産業医学総合研究所人間工学特性研究部部長

本研究は薬物代謝酵素やトランスポーター分子を活性状態で膜へ固定化する技術、その機能評価、治療機器としての構築化が相互に連携して行われる必要がある。すなわち、最新のナノテクノロジー分野と



医学の融合により始めて実現するプロジェクトといえる。この医工連携のために表1に示す研究グループを分担者として組織した。久保井分担者はリポソーム系を利用して周辺環境がタンパク質におよぼすストレスの研究を行ってきた。そこで、本研究ではタンパク機能を十分に生かすためのプロテオリポソームの構築を行う。

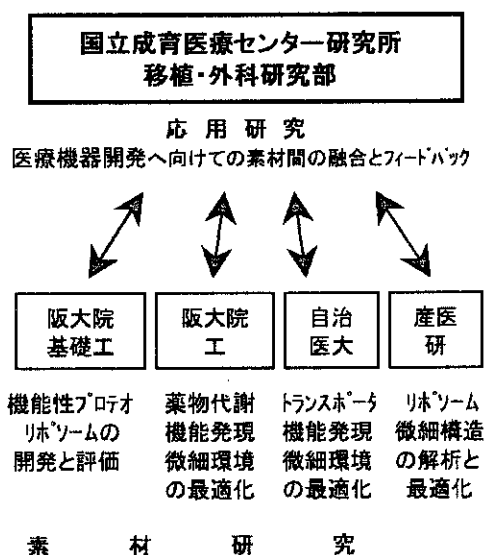


図2 研究班内の各分担研究項目及び相互の関係

また、大政分担者は遺伝子工学的に動物細胞の薬物代謝機能強化を行ってきた。薬物代謝酵素系は一連の電子伝達系であり、末端の Cytochrome P450 遺伝子の導入だけでは活性強化が難しいと考えられていたが、実際にはヒト肝細胞と同等の活性を有する細胞が得られている。この系を利用し、単純化したリポソーム膜上での活性発現環境の最適化について検討する。一方、トランスポーター分子に関しては藤村分担者が担当し、活性発現のための最適環境の整備並びに新しいトランスポーター遺伝

子の探索を担当する。さらに、微細構造を視覚的にとらえ、また体外回路内におけるリポソームの吸着挙動をしらべることなどを検討するために三枝分担者が加わった。本サブプロジェクトを統括する絵野沢は、今までのバイオ人工肝開発の経験を生かし、プロテオリポソームの機能評価面において特に臨床病態と関連の深い有機アニオン系薬物やビリルビンなどの排除が難しい物質をいかに除去するかについて、小スケールから体外循環を模した大スケールまでの実験を行う。また、分担者が相互に円滑な共同研究体制を遂行できるような機能性タンパク分子の大量精製系の確立を行う。以上のような役割分担で分担者を布陣し本研究を遂行している。

尚、この報告では研究方法ならびに結果は分担責任者絵野沢が行った部分（年度途中で研究協力者としての参加を依頼した京都大学大学院農学研究科植田和光助教との共同研究の成果分を含む）を記し、各分担者の研究成果等についてはそれぞれで報告する。

## B. 研究方法

1) PCTL-MDR 細胞からの MDR タンパクの精製と機能評価.

分担研究者藤村とその協力者の鶴岡らが作成した有機アニオントランスポーターMDR1 遺伝子（ヒト由来）を導入し強発現させたウサギ腎近位尿細管由来細胞 PCTL-MDR を MDR1 タンパクの精製ソースとした (1)。本細胞は維持培養を継続すると徐々に MDR タンパクの発現が減弱

するため、間欠的に抗生物質 (G418) 下で培養し、弱発現株の除去を行った。このようにして得られた強発現株の PCTL-MDR 細胞を培養し、 $10^8$  細胞を 3 ロット得た。次いで、既報に従い MDR1 を粗精製した

(2)。簡単に手順を記すと、1. PCTL-MDR 凍結細胞塊約 0.5ml に 2.5ml の 50mM マンニトール, 2mM HEPES/Tris pH7.0 を加え超音波破碎 (15 秒/回、10 回、氷水冷)、2. 同バッファにて 20ml に合わせる、3. CaCl<sub>2</sub> を最終濃度 10mM になるよう加える、4. 攪拌 (20 分、4℃)、5. 2,000×g、10 分。上清採取、6. 35,000×g、20 分。沈渣、7. 沈渣に 1ml の 300mM マンニトール, 1mM HEPES/Tris pH7.0 に懸濁し、8. 35,000×g、1 時間遠心、9. 沈渣に 50μl の 50mM mannitol, 2mM HEPES/Tris pH7.0 を加え懸濁し、である。

2) バキュロウィルスと昆虫細胞を用いた MDR1 タンパクの大量精製.

バキュロウィルスと宿主細胞であるシロナ夜蛾卵巣由来細胞株 Sf9 を用い、MDR1 タンパクの大量生産を行った。MDR1 遺伝子はヒト副腎由来 (3) で発現ベクターは pVL1392 (Clontech) である。また、MDR タンパクのアミノ末端側にヒスチジン領域を Tag として発現させ、精製を容易にした。

細胞をサブカルチャーとして培養ディッシュで  $10^7$  程度に増やしたのち、MDR1 遺伝子をバキュロウィルスベクターで導入、次いでスピナーフラスコにて 3-4 日間培養した。細胞死が始まらない時期に回収し、遠心後、タンパク精製を行った。

細胞ペレット約 5ml を 10 倍量の緩衝液に懸濁し超音波で破碎した。破碎液を遠心分離し、未破碎の細胞及び核を除いた後、さらに高速の遠心分離により沈殿として膜画分を回収した。回収した膜画分は終濃度 30 mg/ml となるように緩衝液に懸濁し、分注後 -80℃ で一時保存した。

次に膜画分をタンパク終濃度 4 mg/ml に緩衝液で希釈し、等量の 1.2% n-dodecyl-b-D-maltoside を加え、穏やかに攪拌・溶解した。高速遠心により非可溶化画分を沈渣として除いたのち、ヒスチジン Tag を利用して精製するために可溶化タンパク質 200 mg あたり 1 ml の割合で Ni-NTA agarose ゲルを加え冷温下で 16 時間穏やかに攪拌した。Ni-NTA agarose ゲルを回収し、緩衝液でよく洗浄し、溶出用緩衝液で精製標品を回収した。精製標品は分子量カットオフ値 10 万の YM100 メンブレンを用いて濃縮し、終濃度を 0.5 mg/ml とした。

MDR1 の機能は ATP 水解能で測定した。精製した MDR1 に 5 倍量のリン脂質を加え、23℃ で 20 分間静置したのち、超音波により再構成させ、基質、阻害剤、ATP を加えて反応を開始した。37℃ 30 min 反応させたのち 12% SDS を 15 ml 加えて反応を停止させた。活性は反応液中の無機リン酸量を定量することで算出した。

この精製標品を ATP 存在下で放射性ジゴキシンと反応させ、ゲル濾過を行った。

## C. 研究結果

1) PCTL-MDR 細胞からの MDR タンパクの精製と機能評価.

PCTL はウサギ腎近位尿細管細胞にSV40T抗原を導入し不死化した細胞で、さらに鶴岡らによりヒトMDR1遺伝子が導入されている(1)。一般に培養下では細胞の分化機能は減弱してしまうが、遺伝子導入により生理下と同程度の優れた活性を有している。しかしながら、長期にわたり継代培養を重ねると徐々に活性が低下、あるいはサブクローンの出現により組換え体の比率の減少が起きる。MDRなどの有機トランスポーターは細胞内に拡散、浸透した薬物などの低分子生体異物を細胞外にくみ出すという生理機能を有している。このことを利用し、抗生物質であるG418を培地に加え、MDR1高発現株を選別した。こうして得られた細胞ペレット(約 $10^8$ 細胞)3ロットから得られたタンパクは各ロット毎ほぼ $90\mu\text{g}$ 前後であった(図3)。

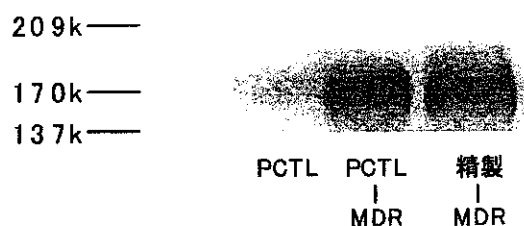


図3 粗精製MDR1タンパクのウェスタンブロット

しかしながら、SDSゲル電気泳動のバンド目視による精製度は総タンパク量に対し10%以下であった。

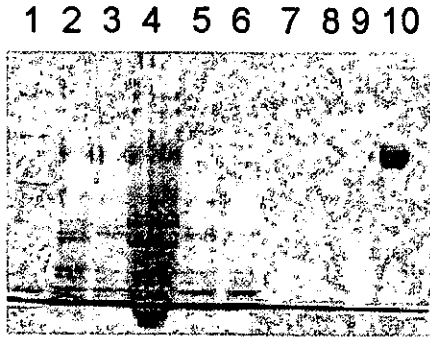
次いで、本粗精製タンパク標品を久保井分担者へ送り、プロテオリポソーム化を試みた。活性測定としてMDRタンパクが有するATP水解能を見た。界面活性剤処理後の活性に対し、プロテオリポソーム状態

のATP水解能は86%であり、大半のMDRタンパクが内向きに配向していることがわかった。MDRは細胞質側にATP結合ドメインを有し、ATPのエネルギー依存的に有機アニオンの細胞外くみ出しを行う。本プロジェクトではMDRにより異物をリポソーム内へ移動させることを計画しており、本結果は目的に合致した良好なものといえる(詳しくは久保井分担者の報告を参照)。

2) バキュロウィルスと昆虫細胞を用いたMDR1タンパクの大量精製。

医療機器としての利用、あるいはその前臨床研究の為にはこの程度のタンパク量では足りず、また精製度も低い。そこで次にバキュロウィルスとその宿主である昆虫細胞Sf9を用いたMDRタンパクの大量生産系の確立を試みた。自然界において様々な昆虫に感染するバキュロウィルスは強力なポリヘドリンプロモーターの存在下に効率のよいタンパク合成を行う。この性質と宿主細胞であるシロナ夜蛾卵巣由来細胞株Sf9を用い、タンパクの大量生産系として利用されている。

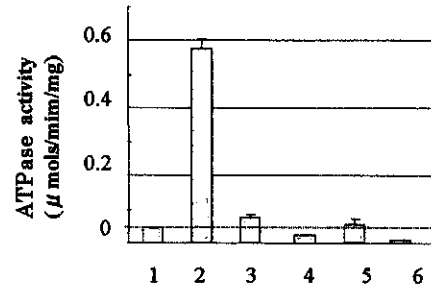
湿重量で約5gのSf9細胞ペレットから精製をした結果、比活性が $0.4\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ タンパクのMDR1タンパクが約 $650\mu\text{g}$ 得られた。SDSゲル電気泳動によると精製度も前記のPCTL-MDRから得られたMDRよりはるかに優れ90%以上と考えられた(図4)。



1. 分子量マーカー
2. 細胞膜画分
3. 0.6%BDDM可溶画分
4. 0.6%BDDM不溶画分
5. Ni-NTA非結合画分
6. Ni-NTA洗浄1回目
7. Ni-NTA洗浄2回目
8. Ni-NTA洗浄3回目
9. 40mM溶出画分
10. 300mM溶出画分(精製標品)

図4 バキュロウィルス産生系によって得られたMDR1タンパクの精製過程による純度変化

この精製標品をATP水解能を指標に機能を調べたところ、最も基質として親和性の高いVerapamilの存在下で高い水解能が得られ、この活性は阻害剤であるVanadateの添加や必須金属イオンであるMg<sup>2+</sup>の非存在下では消失していた(図5)。従って、精製を容易にするために配列を加えたヒスチジンTagは少なくとも基質依存性のATP水解能には影響を与えないことがわかった。



1. 対照
2. Verapamil
3. Digoxin
4. Verapamil + Vanadate
5. Verapamil - Lipid
6. Verapamil - Mg<sup>2+</sup>

図5 ATP水解能からみたMDR1精製標品の生理活性

一方、精製標品をATP存在下で放射性ジゴキシンと反応させ、ゲル濾過を行ったところ、MDRタンパクの分子量(12万)の位置に放射活性が見られ、機能的な確認ができた(図6)。

以上のように本年度は主に今後の実験の基盤となるMDRタンパクの大量取得の系の確立に努めた。この系はほぼ確立できたので、徐々にプロテオリポソームとしての機能解析を行っている。

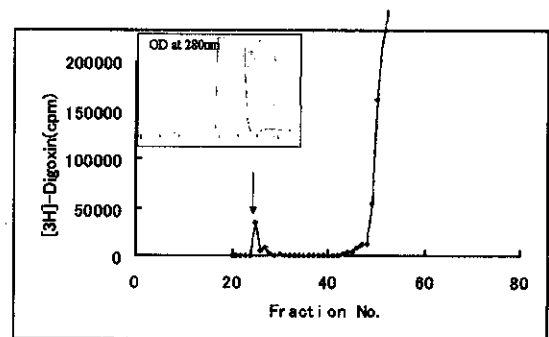


図6 ゲル濾過による放射性ジゴキシンと精製MDR1複合体の検出。挿入図はタンパク濃度(OD280nm)

#### D. 考察

劇症肝炎などに対する持続的血液濾過

透析といった急性血液浄化法や腎不全患者の維持透析などは 1980 年前後に急速に発展普及した中空糸カラムによって医療技術として完成度の高いものになっている。しかしながら、基本的には現在の血液浄化法は限外濾過膜によって分子サイズを基準としたふるい分けによる毒性物質の排除を行っている。一方、生理的に行われる解毒は、細胞内あるいは細胞膜上の機能性高分子である酵素やトランスポーターにより、生体に対する要不要を区別して代謝、排除している。この機能を人工的に構築しようとするものがバイオ人工臓器であり、特に代謝臓器である肝や腎を模した種々の体外型モジュールが試作されている(図7)。実際、米国では多数の臨床治験が行われているが、その目的が肝移植に至るまでのつなぎとされ根治治療としての効果は不明である。すなわち治療前後の症状の観察を行い、肝移植を行うことができた場合を成功としており、既存の治療法との比較による厳密な意味での効果判定はなされていない。日本では 10 グループ近くがブタ肝細胞を利用したハイブリッド人工肝の開発を行っており、それぞれが肝障害モデル動物に適用した場合の生存時間や臨床検査項目の改善を報告している。データの厳密さおよび実験の系統性では日本の研究がはるかに緻密といえる。しかしながら、国内の研究グループの場合も臨床上的効果と危険性の予測や社会的な容認が得られるかといった問題については未だ検討されていない。

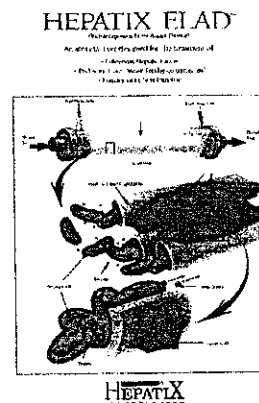


図7 体外型バイオ人工肝補助装置(ELAD)。米国ベンチャー企業(Hepatitis社)のカタログより

危険性として特に懸念されているのは、ブタ内因性レトロウイルスが体内に感染・増殖後、ヒトへの感染能力を獲得した新興感染症を生む可能性である(4)。構造的に多くのバイオ人工肝は細胞こそ肝細胞を用いているものの、血液から胆汁への毒性物質の移動という生理的経路の構築にはまだ成功していない。また、これらのバイオ人工肝は細胞培養器から発展したもので、生体の臓器・組織を模倣しているとは言い難い。生体は細胞によって分けられた区画が有機的に結びついて機能を営んでいる。肝も大きく分けて、血管、細胞、胆管という3つの区画があるのだが、この観点で考えると、今までのバイオ人工肝はこの区画を無視し、図8に示すような単相型を呈している。

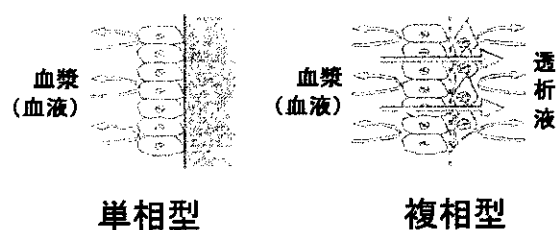


図8 バイオ人工肝リアクター一部の構造の違い、単相型と複相型

バイオ人工肝が単相型にならざるを得ない理由の一つには培養下で肝細胞はお互いに凝集し、区画化に必要な単層 (Monolayer) をなさないことがある。そこで我々は限外膜の両面に肝由来細胞と腎近位尿細管由来細胞を利用した2区画式培養装置を考案し、薬物等 (リドカイン、テストステロン) の代謝と能動輸送を行うことに成功した (5)。すなわち、通常の限外膜利用の透析だけでは達成できない生理的な肝腎共同の生体不要物質の代謝・排除を細胞というバイオパーツの利用により可能としたことになる。さらに細胞により構成された複合膜に放射線照射をおこなうと安定化し、比較的長期に渡って使用できることがわかった (6)。

次にウサギレベルの動物実験用に2区画式培養装置を試作した (図8)。この装置では膜上の細胞密度は肝、腎両細胞とも  $1 \times 10^6$  細胞/cm<sup>2</sup> で、膜全体は 200cm<sup>2</sup> である。この密度と生体の肝、腎の細胞数を単純比較すると、50枚の膜を積層する必要がある。

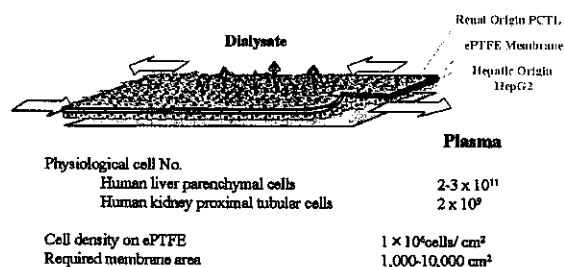


図9 2区画式培養装置の概念

また、膜としての機能を営むためには腎細胞が単層化しなくてはならない。肝細胞側の代謝機能は比較的容易に達成できるが、能動輸送機能は単層化されない限り、輸送通常の限外膜と変わらなくなってしまう。また、培養技術を用いる限り、バクテリアの混入、増殖により機器が使用不能になる危険性が常に存在し、その防止には高度なメンテナンス作業が必要で、一般化した医療技術になるまでの道は険しいと考えられた。さらに、培養下では細胞は機能を消失するので機能の維持、強化という側面も検討しなくてはならない。先に PCTL-MDR の MDR タンパク強発現株を再選択しなくてはならなかったように、培養細胞は機能を減弱または滅失してしまうことが多い。一方、バイオリアクターに新鮮臓器から初代培養細胞を得ることは、機能的には優れるが、分離に関わる手間は非常に大きい。また、基本的に細胞を用いている以上、細胞へのエネルギー供給や医療機器の安全面の配慮としてのバクテリア汚染の防止など、バイオ人工臓器には克服すべき点が非常に多い。

そこで、我々が今までに利用した細胞機能である薬物代謝と能動輸送を行う酵素およびトランスポータータンパクを人工膜上に再構築して用いるための検討を開始した。細胞という複雑系をリポソーム上で単純化することにより、品質管理が容易で再現性の高い医療機器ができるものと考えられる。しかしながら一方で、単純系になると酵素やトランスポーター反応のエネルギー供給を考えなくてはならない。

現時点ではトランスポーターに必要な ATP は安全性の高い薬物であるため、透析液側に存在させても問題がないと考えている。他方、薬物代謝酵素は前述のように電子伝達系によって成り立っているため、その微細環境を再現する必要がある。実験的には電子伝達系の最終基質である NADPH 分子の補給で成り立つが、NADPH は ATP と異なり高価かつ不安定な物質であり、医療機器の構成成分としては不相当である。そこに、微細環境整備の重要性があり、本研究のナノテクノロジーとしての取組みの必要性がある。

本研究のもう一つの生かし方として、エネルギーに依存しないタンパク性のアフィニティー利用がある。その代表としては抗体が挙げられるが、抗体タンパクはそれ自体が抗原性を有し、例えばヒト型であってもイデオタイプが抗原になりうる。我々が視野に入れているタンパク性リガンドとしてメガリンがある。メガリンはアルブミンなど比較的大きなタンパク質の異化のための細胞膜上レセプターである。生理学的な重要性としては腎近位尿細管で  $\beta$ -2-ミクログロブリンの再吸収を行っていることである。近年、透析医療の発達により長期透析患者が増加しているが、その QOL で透析アミロイドーシスが問題となっている。透析アミロイドーシスは維持透析時に除去しきれない血中  $\beta$ -2-ミクログロブリンが徐々に関節などに蓄積しアミロイド化するものである。本研究ではタンパクの有するアフィニティーを最大限に利用し、このようなピンポイント的な不

要物質の除去という機能を現在の工学的装置に組み入れたいと考えている。

## E. 結 論

現行の血液浄化法に対し全く異なった概念による新しい治療法を、ナノテクノロジー技術の一つである人工プロテオリポソームの利用により確立することを目的とし、細胞の有するバイオ機能から必要なものを抽出、再構築した機能性プロテオリポソームを構築し、体外循環技術と融合することにより、現在の血液浄化法の有する限界と問題点の解消をめざした。本年は主に研究遂行に必要な基盤技術の確保の一環としてトランスポータータンパクの大量生産を、リコンビナント腎細胞からではなく、バキュロウィルスと昆虫細胞を用いた大量精製系を立ち上げた。この系の利用により 5g 湿重量の細胞から約 650  $\mu$ g の精製 MDR1 画分が得られた。機能面でも ATP 水解能と基質としての Digoxin 結合能が確認された。また一部は久保井分担者によりプロテオリポソーム化され、活性部位から膜内の配向性を推察したところ、リポソーム内に向かっての薬毒物輸送が達成できることがわかった。

## [参考文献]

1. Tsuruoka S, Sugimoto KI, Ueda K, et al. Removal of digoxin and doxorubicin by multidrug resistance protein-overexpressed cell culture in hollow fiber. *Kidney Int* 56(1):154-63, 1999
2. Beck JC, Sacktor B. The sodium

electrochemical potential-mediated uphill transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles. *J Biol Chem.* 253(15): 5531-5. *J Biol Chem* 253; 5531-5535, 1978

3. Kioka N, Tsubota J, Kakehi Y, et al. P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: Normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 162, 224-31, 1989

4. Brown J, Matthews AL, Sandstrom PA, Chapman LE.: Xenotransplantation and the risk of retroviral zoonosis. *Trends in Microbiology.* 6(10): 411-415, 1998 他

5. Endo M, Enosawa S, Suzuki S, et al. Coculture of hepatic and renal origin cell lines provides biohemofiltration with an active transport system of metabolites. *J Artif Organs* 4: 336-41, 2001.

6. Endo M, Enosawa S, Ozaki M, et al. Artificial mimicking of physiological transport by a membrane co-cultured with two different cells: Hepatic origine HepG2 and renal origine PCTL-MDR. *Artif Organs* 26(9): 806-811, 2002  
*Artif Organs* 26(9): 806-11, 2002

7. Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/megalin, a distinctive member of the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 9725-9729, 1994

F. 健康危険情報  
該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Endo M, Enosawa S, Ozaki M, Tsuruoka S, Hiramatsu S, Kim K, Omasa T, Matsumura T, Aoki T, Koyamagi Y, Suzuki S. Artificial mimicking of physiological transport by a membrane co-cultured with two different cells: Hepatic origine HepG2 and renal origine PCTL-MDR. *Artif Organs* 26(9): 806-811, 2002

2) Ikeda T, Aoki T, Miyashita T, Kasuya K, Tsuchida A, Koyanagi Y, Matsumura T, Suzuki S, Enosawa S. Experimental study of plasma recycling system by off-line bioartificial liver in rats. *Transplant Proc* 34; 2706-2710, 2002.

3) Endo M, Enosawa S, Suzuki S, Amemiya H, Kobayashi E, Miyashita T, Aoki T, Koyanagi Y. Porcine Liver Transplantation as an Estimation System for Bridge-Use of Bioartificial Liver (BAL). *Transplant Proc* 34; 2714-2717, 2002

4) Enosawa S, Miyashita T, Endo M, Suzuki S, Amemiya H, Matsumura T. OFF-LINE BIOARTIFICIAL LIVER (BAL) -A Novel Concept of Treatment with BAL and its Potency of Liver Regeneration-. *Transplant Proc* 34; 2711-2713, 2002

5) Omasa T, Enosawa S. Construction of liver model with genetically engineered human HepG2 cells. *Cytotechnology* in press

6) Omasa T, Kim K, Hiramatsu S, Katakura Y, Kishimoto M, Matsumura T, Enosawa S, Suzuki S, Amemiya H, Suga K. Expression



and amplification of glutamine synthetase gene for constructing ammonia-metabolizing cell lines in hybrid bioartificial liver support system. In "Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects" vol.12, Shirahata S, Teruya K, Katakura Y (eds.) pp.263-267 (2002) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

7) 大政健史、絵野沢 伸. ストレスバイオテクノロジーは人工臓器に応用可能か-バイオ人工肝/腎とめぐる最近の動向と将来-. ケミカルエンジニアリング 47(10): 30-34, 2002.

## 2. 学会発表

1) Enosawa S, Omasa T. Construction of liver model with genetically engineered human HepG2 cells. Symposium I. Recent advances in the materials for reconstructive therapy and tissue engineering. The 15th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology, November 11-15, 2002 (Fuchu, Tokyo)

2) Enosawa S. In vivo estimation of Bioartificial liver with recombinant human hepatocyte cell line in pigs with ischemic hepatic failure. Meeting for Development of Artificial Liver. September 27, 2002, Jichi University School of Medicine (Tochigi, Japan)

3) Enosawa S, Miyashita T, Suzuki S, Amemiya H, Omasa T. In vivo estimation of bioartificial liver with recombinant HepG2 cells using pigs with ischemic liver failure. China-Japan Medical Conference 2002,

November 3-6, 2002 (Beijing, China)

4) 絵野沢 伸. 血液浄化法におけるバイオの力の応用可能性-OFF-Line 人工肝による自己肝再生促進. シンポジウム I. 血液浄化領域への再生医療の応用. 第 13 回日本急性血液浄化学会、平成 14 年 9 月 26-27 日、(京王プラザホテル、東京)

5) 絵野沢 伸. バイオ人工肝の生物学的効果. シンポジウム I. ハイブリッド人工肝の課題. 第 40 回日本人工臓器学会、平成 14 年 10 月 2-4 日、(京王プラザホテル札幌、札幌)

6) 大政健史、金 和美、平松慎也、片倉啓雄、岸本通雅、菅 健一、松村外志張、絵野沢 伸、鈴木盛一、雨宮 浩、福井希一. バイオ人工肝に適した薬物代謝細胞の構築と人工肝設計. 第 1 回日本再生医療学会総会、京都国際会館、平成 14 年 4 月 18-19 日 (京都)

7) 金和美、平松慎也、大政健史、片倉啓雄、岸本通雅、高木睦、吉田敏臣、絵野沢伸  
“薬物代謝細胞の構築と血液浄化システムへの応用” 日本生物工学会、平成 14 年度大会、1143、講演要旨集、p.209 10/28-30、大阪国際会議場、大阪 (2002)

8) Takeshi Omasa, Kazumi Kim, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Mutsumi Takagi, Yoshiomi Yoshida, Shin Enosawa. Evaluation and design for bio-artificial liver support system using drug-metabolizing HepG2 cell line” In the 5<sup>th</sup> International meeting of Tissue Engineering Society international (TESi) PP-155 Dec. 8-10, Kobe Hyogo JAPAN

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究  
機能性プロテオリポソームの開発

分担研究者 久保井 亮一 大阪大学大学院基礎工学研究科・教授

各種刺激条件（熱，pH）により誘起される天然高分子（タンパク質， $\alpha$ -chymotrypsin）や合成高分子（スマートポリマー，poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) (poly(NIPA-co-MAA))) の構造変化を利用してリポソームの高機能化（膜融合の促進）を試みた結果， $\alpha$ -chymotrypsin 共存下では，45℃において膜融合率が最大になり，poly(NIPA-co-MAA) 共存下では，低 pH ほど膜融合率が増加することが示された。上記の天然・合成高分子の構造変化を利用したリポソームの機能発現に伴う脂質膜特性の変化を，誘電分散測定から得られる，50? 100MHz 付近での緩和周波数を指標として評価が可能であることを示した。特に，リン脂質分子の軸回転運動の変化と，天然・合成高分子-リポソーム間相互作用とを関連付ける事ができた。このことは，膜タンパク質のリポソームへの再構成過程を評価できる可能性を示唆している。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase や MDR 活性を評価した結果より，膜タンパク質の配向性を制御して，調製したプロテオリポソームの機能の評価できることを示した。

A. 研究目的

現在，肝不全や敗血症，薬物中毒等の治療では透析・濾過と輸液・血漿輸血を組み合わせた血液浄化治療がほどこされているが，効果の限界とともに新鮮血漿の大量消費や血漿に起因するウイルス感染が大きな問題となっている。この点を克服するため，細胞利用のバイオ人工肝の開発も盛んであるが，装置の煩雑さ，細胞由来の感染危険性など普及には障害が多い。細胞の機能から必要なものだけを抽出，再構築し，機能性プロテオリポソームを構築することにより，現在の血液浄化法の有する限界・問題点を克服できると期待される。

本研究では，細胞の有するストレス応答能と，ナノテクノロジー技術の一つである人工の機能性プロテオリポソームを利用することによ

り，現行の血液浄化法に対し全く異なった概念による新しい治療技術を確立することを目的としている。

今回は，その基礎として，種々の天然・合成ポリマーを用いて修飾したりポソームの機能を評価した結果について報告する。

B. 研究方法

B-1. 試薬

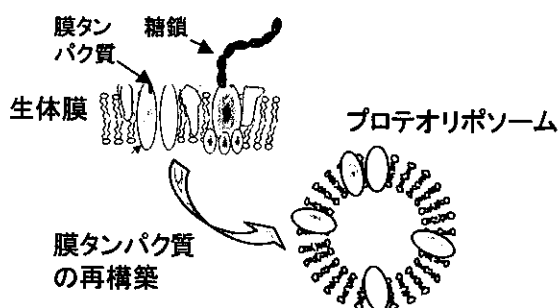
中性リン脂質として，1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)を用いた。また，Egg phosphatidylcholine (EPC)はAvanti Polar Lipids 製を用いた。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseはSIGMAから，N-IsopropylacrylamideはAldrich (Milwaukee, WI, USA)， $\alpha$ -chymotrypsin ( $\alpha$ -CT)，およびMethacrylic

acid(MAA,純度 99%), その他の特級試薬は和光純薬(Osaka, Japan)から購入した. 刺激応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide-co-metha-crylic acid) (poly(NIPA-co-MAA))は, 既報(Meyer *et al.*, 1998)と同様の方法で合成・精製した.

## B-2. リポソームの調製

### B-2-1. 一般的なりポソームの調製

リポソームは下記のプロトコールで調製した. リン脂質をクロロホルムで溶解させた溶液をナス型フラスコに入れ, エバポレータにより溶媒を留去すると脂質薄膜が得られる. これを一昼夜, デシケータにて溶媒を蒸発させる. これを適当な水溶液で水和し, 一時間振とうさせると多重層リポソーム (MLVs) が生成する.



### A-1 生体膜とプロテオリポソーム

脂質の相転移温度以下の温度 (ここでは  $-80^{\circ}\text{C}$ , 15 分) で急速に冷却すると MLVs 溶液はゲル状態で凍結される. その後, 相転移温度以上 ( $37^{\circ}\text{C}$ , 15 分) で解凍すると, 冷却により崩壊した脂質膜どうしが融合してより大きな MLVs を得ることが出来る. この操作を凍結融解法と呼び, 今回は 5 サイクル行なった. この後, 50-200nm の細孔径を有するポリカーボネートフィルターで MLVs 溶液を押し出すとフィルターの細孔径に一致する均一な粒径分布を持ったリポソーム溶液を得る事ができる. この手法 (extrusion 法) により, 今回は粒径 100nm のリポソームを調製した. 詳細は, 既報

(Yoshimoto *et al.*, 1998) を参照されたい.

### B-2-2. プロテオリポソームの調製

調製法の詳細は既報記載の通りである (Chifflet *et al.*, 1988). 中性リン脂質 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoch-oline (POPC) の脂質薄膜を水和し, 凍結融解法, および extrusion 法によってリポソーム (粒径 100nm) を調製した. ここでは, 界面活性剤 ( $\text{C}_{12}\text{E}_8$ ) で可溶化した  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 溶液と POPC リポソーム溶液を混合し, ゲルろ過でプロテオリポソームの画分を回収した.

### B-3. 誘電分散解析

解析法の詳細は既報記載の通りである (発表論文 4). 各種添加物質とリポソームとを所定の濃度比で混合した溶液を測定用セルに充填し, インピーダンスアナライザー (Agilent Technologies, 4291B) を用いて各種周波数における比誘電率を測定した. 1MHz から 100MHz の範囲のものについて以下に示す Debye の式 (二段緩和)

$$\varepsilon' - \varepsilon_{\infty} = \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + (f/f_{c1})^2} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + (f/f_{c2})^2} \dots (1)$$

を用いてフィッティング解析を行い, 緩和幅  $\Delta\varepsilon_1$ ,  $\Delta\varepsilon_2$  および緩和周波数  $f_{c1}$ ,  $f_{c2}$  を求めた.

### B-4. カルセイン放出実験

カルセイン封入りリポソームからのカルセイン放出率 (RF) は, 界面活性剤処理前後のカルセイン蛍光強度 ( $\lambda_{ex}=490$ ,  $\lambda_{em}=520\text{nm}$ ) の比から決定した.

### B-5. 膜融合実験

膜融合率はコバルト-カルセイン法に基づいて評価した. EDTA (20mM), コバルト-カルセイン (1mM/0.8mM) を内封した 2 種類のリポソームを所定の条件で混合し, 膜融合を開始させた.