

ースになりうる可能性が示された。今後の実用化に向けての研究において、 β -1,3-グルカンの分子量の制御と精製、高機能化の為の化学修飾、金粒子やシリカ等の基盤粒子への化学的修飾など、 β -1,3-グルカンの化学修飾手法を確立する必要がある。現在までに、 β -1,3-グルカンを含む多糖の化学は、主に農芸化学やバルク材料として多糖を扱う観点から研究がされていて、遺伝子とのインターフェースの観点からの精密化学的な研究は前例がない。

具体的には、遺伝子と相互作用するために必要な β -1,3-グルカンの主鎖骨格を乱さない6位の水酸基や側鎖のみを選択的に化学修飾する方法を実施し、ある種のDNA/RNAと安定な複合体を形成することを見出した。

(d) メッセンジャーRNA (mRNA) の分離精製システム

遺伝子情報をクローン技術に応用するには、cDNAを合成する必要があるが、この為にはmRNAを活性細胞より抽出することが不可欠である。すなわち、mRNAの分離精製は遺伝子工学の中核とも言える基幹技術であり、その精密化、低コスト化、簡便化への要請がますます高くなっている。現在、mRNAの精製キットは米国のバイオ関連数社から販売されている。その製品形態は固体微粒子に特殊なDNA(オリゴdT)を結合させたものである。しかし、これらの製品はDNAを結合サイトとしているが為、高価で大量生産に向かない。本提案では、固体微粒子に固定化した β -1,3-グルカンがmRNAのpoly(A)鎖に結合する性質を利用したmRNAの分離、精製システムの

開発を行った。その結果、安価なmRNAの選択的捕集系が開発されつつある。

C. 結論

本研究最大の成果は、「すべての β -1,3-グルカンがDNAやRNAなどの核酸と3重螺旋を形成する」という事実である。DNAやRNAと相互作用する化合物は遺伝子工学上重要であり、ポストゲノムやプロテオミクスの技術開発の中で、基幹技術とも言うべきものである。さらに、 β -1,3-グルカンは、体内での安全性が既に実証済みの化合物であり、実用化への障害が少ないと予想される。この様に、天然に存在し且つ安全な材料で、核酸と相互作用する材料が発見されたことの意義は大きい。すなわち、遺伝子を人工的にマニピュレート(精製、分離、運搬、配列認識、転写・翻訳のon-off)する手法として、「 β -1,3-グルカン・核酸の3重螺旋」はまったく新しい技術体系となりうる事が示された。今後は、その応用研究に力点を移して研究を継続する予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) Polysaccharide-Polynucleotide

Complexes VIII. Cation-Induced Complex Formation between Polyuridylic Acid and Schizophyllan

Kazuo SAKURAI, Ritsuko IGUCHI, Kazuya KOUmoto, Taro KIMURA, Masami MIZU, Yoshio HISAEDA, Seiji SHINKAI

Biopolymers, Vol. 65, No. 1, pp. 1-9, October, 2002

- 2) Polysaccharide-Polynucleotide Complexes. Part 12. Enhanced Affinity for Various Polynucleotide Chains by Site-specific Chemical Modification of Schizophyllan
Kazuya KOUMOTO, Taro KIMURA, Masami MIZU, Toyoki KUNITAKE, Kazuo SAKURAI, Seiji SHINKAI
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, No. 11, pp. 2477-2484, November, 2002
- 3) Polysaccharide-Polynucleotide Interaction (XI): Novel Separation System of RNAs by Using Schizophyllan-Appended Column
Taro KIMURA, Kazuya KOUMOTO, Masami MIZU, Kazuo SAKURAI, Seiji SHINKAI
Chem. Lett., No. 12, pp. 1240-1241, December, 2002
- 4) 多糖・核酸からなる3重らせんの発見とその応用
櫻井和朗、新海征治
高分子、第51巻、8月号、603-606 (2002)
- 第17回生体機能関連化学シンポジウム、2002年9月
- 4) 蛍光共鳴エネルギー移動を利用したカードラン-核酸複合体の構造評価
沼田宗典, 松本貴博, 梅田真理子, 新海征治, 甲元一也, 水 雅美, 櫻井和朗
第51回高分子討論会, 2002年10月
- 5) 化学修飾による β -1,3-グルカン系多糖の新機能の開発
松本貴博, 沼田宗典, 梅田真理子, 新海征治, 甲元一也, 水 雅美, 櫻井和朗
第51回高分子討論会, 2002年10月
- 6) 多糖シゾフィランを利用した核酸の選択的分離
木村太郎, 甲元一也, 水 雅美, 櫻井和朗, 新海征治
第51回高分子討論会, 2002年10月
- 7) 3重らせん構造を有するシゾフィランおよびその核酸複合体の電子顕微鏡による観察
ベ アヒョン, 李 丞祐, 櫻井和朗, 新海征治
第51回高分子討論会, 2002年10月
- E. 知的財産の出願・登録状況: なし

2. 学会発表

- 1) β -1,3-グルカンの核酸との相互作用における分子量の影響
甲元一也, 小林秀輝, 国武豊喜, 水 雅美, 櫻井和朗, 新海征治
第17回生体機能関連化学シンポジウム, 2002年9月
- 2) シゾフィランを利用したアンチセンス DNAの新規な遺伝子キャリアー
水 雅美, 甲元一也, 櫻井和朗, 新海征治
第17回生体機能関連化学シンポジウム, 2002年9月
- 3) カードラン硫酸と核酸との超構造複合体の形成
梅田真理子, 松本貴博, 沼田宗典, 甲元一也, 水 雅美, 櫻井和朗, 新海征治

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

ナノ表面加工技術とナノ構造表面

分担研究者 高原 淳（九州大学有機化学基礎研究センター教授）

研究要旨：172nm の波長の真空紫外光による有機シラン単分子膜の局所光分解と有機シラン化合物の化学吸着により、3種類の異なった官能基を表面に有する三成分系の有機シラン単分子膜の調製法を確立した。得られた単分子膜の各相は用いた有機シラン分子に対応した表面物性を示し、荷電を有する微粒子やタンパク質の選択吸着性を示した。

A. 研究目的

真空紫外光を用いた局所光分解と化学吸着による三成分系の有機シラン単分子膜の調製、さらにその表面構造と機能特性について検討し、生体機能材料表面のナノ設計・ナノ加工技術を確立することを目的とする。

B. 研究方法

有機シラン単分子膜形成物質として結晶性、表面自由エネルギーの異なる、n-オクタデシルトリエトキシシラン (OTES、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{OEt})_3$)、[2-パーフルオロヘキシル]エチルトリエトキシシラン (FHETES、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OEt})_3$)及び (2-アミノエチル)-3-アミノプロピルメチルジメトキシシラン (AEAPDMS、 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{SiMe}(\text{OMe})_2$)を用いた。基板としては水酸化処理した Si 基板を用いた。図 1 は、三成分系パターン化有機シラン単分子膜の調製法の模式図である。有機シラン単分子膜のパターン化は、化学気相吸着(CVA)法と 172nm の波長の

真空紫外光(VUV)を用いた局所光分解に基づき行った。有機シラン単分子膜のパターン化は X 線光電子分光測定(XPS)、走査フォース顕微鏡観察、接触角測定 有機シラン単分子膜形成物質として結晶性、表面自由エネルギーの異なる、n-オクタデシルトリエトキシシラン (OTES、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{Si}(\text{OEt})_3$)、[2-パーフルオロヘキシル]エチルトリエトキシシラン (FHETES、 $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OEt})_3$)及び (2-アミノエチル)-3-アミノプロピルメチルジメトキシシラン (AEAPDMS、 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{SiMe}(\text{OMe})_2$)を用いた。基板としては水酸化処理した Si 基板を用いた。図 1 は、三成分系パターン化有機シラン単分子膜の調製法の模式図である。有機シラン単分子膜のパターン化は、化学気相吸着(CVA)法と 172nm の波長の真空紫外光(VUV)を用いた局所光分解に基づき行った。有機シラン単分子膜のパターン化は X 線光電子分光測定(XPS)、走査フォース顕微鏡観察、接触角測定に基づき評価した。

C. 研究結果及び考察

XPS 測定に基づき、三成分系パターン化有機シラン単分子膜の形成を確認した。単分子膜の成分が追加されるにつれて、それぞれの単分子膜に起因する元素のピークが順次観測されることが確認された。OTES 単分子膜では、OTES と SiO_2 に起因する C_{1s} 、 O_{1s} 、 Si_{2s} 、 Si_{2p} ピークが、それぞれ 285、533、151、100 eV に観測された。一方、OTES/FHETES パターン化単分子膜では、上記のピークに加えて FHETES に起因する F_{1s} ピークが 690eV に観測された。更に OTES/FHETES/AEAPDMS パターン化単分子膜では、新たに AEAPDMS に起因する N_{1s} ピークが 400 eV 付近に観測され、 F_{1s} の強度の減少が観測された。OTES/FHETES/AEAPDMS パターン化単分子膜における F_{1s} の強度の減少は、VUV 照射による局所光分解に基づく FHETES 単分子膜の

面積の減少を示している。以上の結果より、三成分系パターン化有機シラン単分子膜が各段階で順次形成されていることが確認された。原子間力顕微鏡(AFM)観察、及び水平力顕微鏡(LFM)測定に基づき、三成分系パターン化有機シラン単分子膜の表面構造を評価した。図 2 (a),(b)は OTES/FHETES/AEAPDMS パターン化単分子膜の AFM 像及び LFM 像である。また、図 2 (c),(d)は図 2 (a)の白線部 c-c'、d-d'のラインプロファイルである。図 2 (a),(b)より、それぞれ格子状にパターン化された OTES/FHETES/AEAPDMS パターンが確認された。AEAPDMS のラインの幅は約 2 μm であり、フォトマスクのライン幅と非常に良い一致を示した。図 2 (c),(d)より、OTES 単分子膜と FHETES 及び AEAPDMS 単分子膜の高さの差は、それぞれ約 1.4、1.5 nm であり、これらは OTES と FHETES 及び AEAPDMS

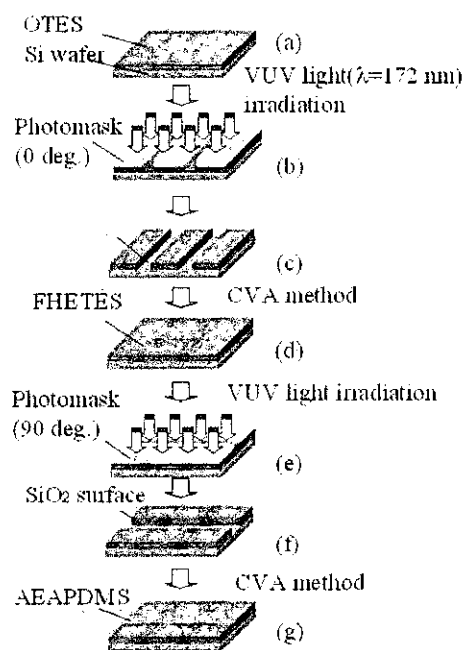


図1

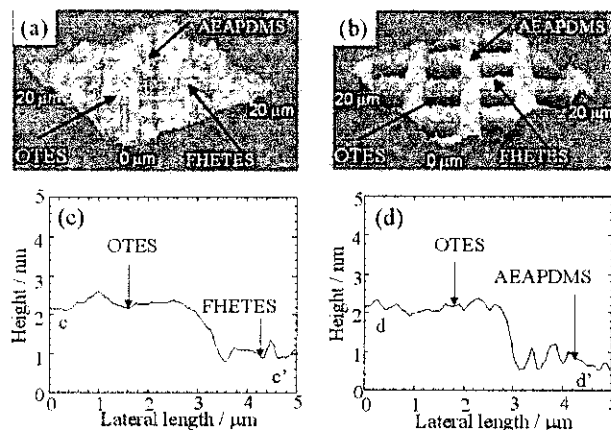


図2

の分子長の差約 1.3、1.4nm と対応している。また、FHETES と AEAPDMS 単分子膜の間の高さの差はほとんど観測されなかった。LFM 像から評価される水平力の差は、AEAPDMS、FHETES、OTES の順に低下した。AEAPDMS 単分子膜部分の高い水平力は、末端アミノ基とカンチレバー表面の-OH 基との間の強い相互作用に起因する。

OTES、FHETES、AEAPDMS 単分子膜、OTES/FHETES、OTES/FHETES/AEAPDMS パターン化単分子膜の静的接触角と表面自由エネルギーを評価した。単分子膜の表面自由エネルギー、 γ_s は、AEAPDMS、OTES、FHETES の順に増大した。FHETES の小さな表面自由エネルギーは、フルオロアルキル鎖に起因する分子間凝集力の低下に起因する。また、AEAPDMS の大きな γ_s 及び表面自由エネルギーの極性成分 γ_s^p の表面自由エネルギー γ_s に占める大きな割合は、極性の高いアミノ基に起因するものである。OTES/FHETES パターン化単分子膜の表面自由エネルギーは、OTES 単分子膜と比較して低下した。これは、均一な有機シラン単分子膜の表面自由エネルギー測定結果より、OTES よりも γ_s の低い FHETES の存在に起因するものと考えられる。一方、OTES/FHETES/AEAPDMS パターン化単分子膜では、 γ_s 及び極性成分 γ_s^p の分率の増大が観測された。これは、極性の高い AEAPDMS 相が単分子膜表面に形成されたことに起因するものと考えられる。また FHETES が OTES に比べて高い水平力を示すのはフルオロアルキル基の剛直性に起因する。これらのパターン化により親・疎水性が精密に制御さ

れた表面を利用することによりタンパク質の選択吸着、ナノ粒子のパターン化、液滴のパターン化が可能となった。

D. 結論

真空紫外光を用いた局所光分解と化学吸着による三成分系の有機シラン単分子膜の調製法を確立した。得られた単分子膜の各相は用いた有機シラン分子に対応した表面物性を示した。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Takahara, Y. Hara, K. Kojio, T. Kajiyama.
Plasma Protein Adsorption Behavior onto the Surface of Phase-separated Organosilane Monolayers on the basis of Scanning Force Microscopy
Coll. Surf. B., 23, 141-152 (2002).
- 2) A. Takahara, K. Kojio, T. Kajiyama,
Effect of Aggregation State on Nanotribological Behaviors of Organosilane Monolayers.
Ultramicroscopy, 91, 203-113 (2002).
- 3) T. Koga, H. Otsuka, A. Takahara
Area-selective Fabrication of Polyaniline /Poly(styrenesulfonic acid) Composite Ultrathin Films on Micropatterned Aminosilane Grafted Surfaces
Trans. Mater. Res. Soc., Japan, 27, 497-500 (2002).
- 4) T. Koga, H. Otsuka, A. Takahara
Fabrication of Three-component Micropatterned Organosilane Monolayer by a Stepwise Photolithography Process
Chem. Lett. 12, 1196-1197 (2002).

- 5) K. Tanaka, K. Kojio, R. Kimura, A. Takahara, T. Kajiyama
Surface Relaxation Process of Poly(methyl methacrylate) Brushes Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization
Polym. J., 35, (2003).
- 6) 高原 淳
有機超薄膜の凝集構造と表面物性、薄膜作製プロセスにおける問題点・対応策と製膜条件の最適化
技術情報協会、pp.11-19(2003).
- 7) 高原 淳、梶山千里
有機シラン単分子膜の表面ナノ構造とナノ力学物性
真空、26,98-104(2003).
- 8) T. Koga, M. Morita, H. Sakata, H. Otsuka, A. Takahara
Surface Structure and Properties of Multi-component Micropatterned Organosilane Monolayers Prepared by Stepwise Photodecomposition and Chemisorption Process
Int. J. Nanoscience in press.
- 9) A. Takahara, H. Sakata, M. Morita, T. Koga, H. Otsuka
Fabrication and Characterization of Multi-component Organosilane Nanofilms Composite Interfaces in press.
2. 学会発表
- 1) A. Takahara, T. Koga H. Otsuka
Area-selective Molecular Assembly of Organosilanes on Silicon Wafer
224th ACS National Symposium, Boston, U.S.A. (August, 2002).
- 2) A. Takahara, T. Koga H. Otsuka
Surface Structure and Surface Properties of Organosilane Monolayers Selectively Assembled on the Si-wafer Substrate
49th AVS International Symposium, Denver, U.S.A. (November 2002).
- 3) T. Koga, M. Morita, H. Sakata, H. Otsuka, A. Takahara
Surface Structure and Properties of Multi-component Micropatterned Organosilane Monolayers Prepared by Stepwise Photodecomposition and Chemisorption Process
ASIA Nano, Tokyo, Japan (November 2002).
- 4) 高原 淳
走査プローブ顕微鏡による材料の表面構造と材料表面-生体成分の相互作用の解析
第 24 回日本バイオマテリアル学会大会 (2002).
- 5) 高原 淳
有機シラン単分子膜を用いた材料表面のマイクロパターンニング
高分子学会 2002 年度印刷・情報記録・表示研究会講座(2003).
- 6) A. Takahara, T Koga, H. Sakata, M. Morita, H. Otsuka
Fabrication of Three-dimensional Structure from Organosilane Monolayer as a Template
Second International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics(2003).
- 7) A. Takahara, T Koga, H. Sakata, M. Morita, H. Otsuka
Preparation and Characterization of Area-selectively Assembled Multi-component Organosilane Monolayers
225th ACS National Meeting, New Orleans(2003).
- F. 知的財産の出願・登録状況：なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

感温性人工細胞外マトリックスの応用：

温度感応性高分子を用いたターゲット細胞の培養下 *in situ* 選別回収

分担研究者 藤井 康雄（九州大学大学院医学研究院医用工学助手）

研究要旨：幹細胞研究には多種の培養細胞の中から特定の細胞のみを選択し純化する技術が重要である。そのためにはトリプシンなどの酵素を用いて培養細胞を剥離し、マーカーで標識された浮遊状態の細胞を Flow Cytometry によって選別回収する。しかし、この方法では、細胞を培養状態で選別するのが困難であり、また、相互接着した細胞群を回収するのは不可能である。

そこで、温度感応性・細胞接着性高分子をコーティングした培養ディッシュと独自に設計・作製した顕微鏡下局所冷却装置を組み合わせた培養細胞の *in situ* 選別回収システムを提案した。

A. 研究目的

下限臨界共溶温度（Lower Critical Solution Temperature: LCST）以下では水溶性を示し、その温度以上では水中に析出するという温度応答性の相分離特性を有する高分子化合物をコーティングしたディッシュに細胞を培養し、ディッシュ底面を冷却すると細胞が剥離する。この原理を利用して、培養状態を顕微鏡下で観察しながら任意のターゲット細胞のみを脱着し回収する方法の実現性を検討する。

B. 研究方法

顕微鏡観察を行いながら、ディッシュ底面を局所冷却できる装置を独自に設計・作製し

た。（図 1）この装置では、箔状ヒータにより所望の温度に保たれる温度調節ステージ上にディッシュを載せ、中央に設けられた $\phi 1\text{mm}$ の孔の部分に冷却ガスを噴射してディッシュを局所冷却できるようになっている。この孔を通して顕微鏡の位相差観察が可能であり、任意の細胞をターゲットとして選別できる。また、約 4mm 以上の作動距離を有する対物レンズが使用可能である。

LCST が約 31°C のポリ（イソプロピルアクリルアミド）（Poly（N-isopropylacrylamide）: PNIPAAm）および 34°C の PNIPAAm 化ゼラチンの混合溶液を $\phi 35\text{mm}$ 培養用ディッシュにコーティングした。次に、上記ディッシュに 37°C 環境下にてマウス繊維芽細胞

(3T3) を播種した。細胞が十分に接着伸展した後、上記の局所冷却装置を取り付けた位相差顕微鏡ステージにディッシュを載せ、X-Y 二軸ハンドルを用いて目的の細胞を視野の中央に移動した。ディッシュの温度を約 35°C に保ったまま中央部の冷却を開始し、マイクロピペットを用いて細胞の回収を試みた。

C. 研究成果及び考察

37°C において細胞が接着し、冷却によって十分に脱着させるためには、PNIPAAm 化ゼラチンと PNIPAAm を適度な比率で混合する必要がある。

図 2 に細胞の選別回収実験の結果の一例を示した。37°C においてディッシュ底面に接着・伸展していた細胞 (a) は、顕微鏡下での局所冷却によって収縮した (b)。これは、

ディッシュ底面の冷却により、細胞の足場としてコーティングされていた PNIPAAm ゼラチン/PNIPAAm 混合物が溶解した結果と考えられる。その後、マイクロピペットで吸引する (c)。目的とする細胞以外の周囲の細胞も冷却によって収縮したが、吸引操作によっては回収されなかった。

以上の結果より、現在の実験条件下では、目的細胞のみを回収するためには、感温性高分子コーティングディッシュの冷却だけでなく、マイクロピペットによる吸引操作が必要であると考えられる。今後は、コーティング基材、感温性高分子の組成・濃度、局所冷却装置などの改良を行い、細胞選別・回収性をより一層高める予定である。



図1 顕微鏡下局所冷却システムの外観

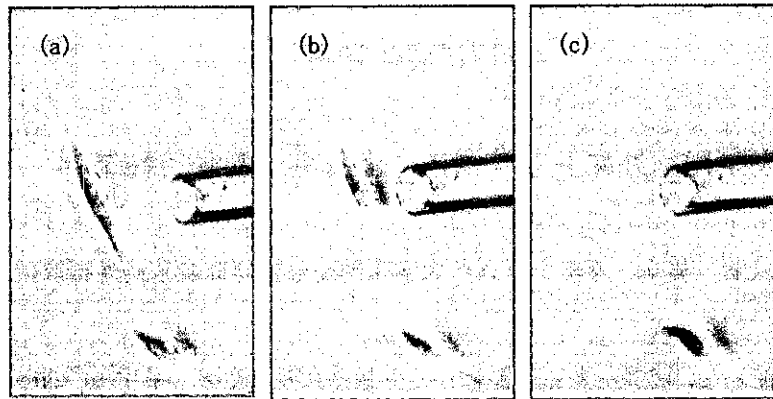


図2 顕微鏡下における培養細胞の選別回収

D. 結論

感温性高分子をコーティングしたディッシュ上で細胞を接着させた後、顕微鏡下におけるディッシュの局所冷却を行うことで、培養細胞を観察しながら選別・回収することが可能であることが示された。この方法を用いると、様々な種類の細胞が混在した培養ディッ

シュ上において、目的とする単一細胞あるいは相互接着した細胞群を容易に高純度で選別・回収することが可能になると期待できる。

E. 研究発表：なし

F. 知的財産の出願・登録状況：なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

人工細胞外マトリックスによる再生軟骨組織工学

分担研究者 岩本 幸英（九州大学大学院医学研究院整形外科教授）

研究要旨：自己修復しない組織である関節軟骨の再生を試みるため、まず *in vitro* において感温性ゼラチンと軟骨細胞を用いて軟骨様組織の再構築が可能であることを示し、次に *in vivo* にて、ウサギの膝関節に作製した関節軟骨欠損部位に軟骨細胞を用いたハイブリッド組織を移植し、欠損部の軟骨を再生できることを示した。

A. 研究目的

関節軟骨再生の際、*in situ* でゲル化する液状の骨格基材（scaffold）は複雑な形状を呈する軟骨欠損部を完全に補填することができる。この概念を基に我々は、室温では液体であり、34°C以上でゲル化するという特徴をもつ感温性ゼラチンである poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted gelatin (PNIPAAm-gelatin)を用い、軟骨欠損部の複雑な形状に適合することができる新しい軟骨再生技術の開発を試みた。

B. 研究方法

（実験1：In vitro での PNIPAAm-gelatin を用いた軟骨様組織の再構築）

まず、PNIPAAm-gelatin を以下の手順で合成した。主鎖のゼラチン（分子量：約 9.5×10^4 ）のリジン残基のアミノ基に感温性のポリマーである PNIPAAm ポリマー（分子量：約 1.3

$\times 10^5$ ）をUVを用いて重合した。このPNIPAAm ポリマーがゼラチン 1 分子当たり約 33.5 個（全アミノ基の約 91%）導入された PNIPAAm-gelatin を実験に用いた。

10 週齢の日本白色家兎の関節軟骨より単離した軟骨細胞を単層培養にて増殖させた後、この細胞を 5%PNIPAAm-gelatin-DMEM 溶液（細胞密度： 1.5×10^7 ）と懸濁し、37°C でゲル化させた後、培養を行った（Fig.1）。培養組織の評価を細胞レベルでは細胞生存率（相対的DNA量）、細胞形態（共焦点レーザー走査型顕微鏡）、細胞周期（フローサイトメーター）、細胞分泌細胞外マトリックス（タイプ II コラーゲン、硫酸化グリコサミノグリカン：s-GAG）の定性という観点で、また、組織レベルでは細胞外マトリックスの定量、荷重・除重に対する力学的特性の測定（クリープメーター）を行った。全ての計測は $n=3$ で行った。

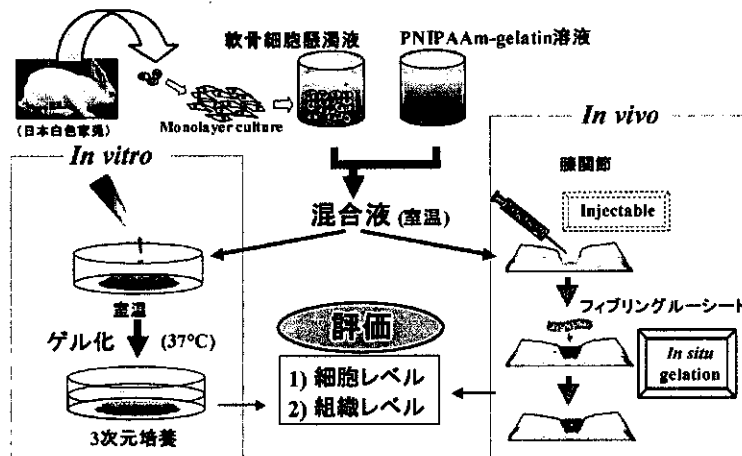


Fig. 1 *In vitro* 実験と *in vivo* 実験の概要

(実験 2: *In vivo* での PNIPAAm-gelatin を用いた関節軟骨修復)

体重約 4Kg の日本白色家兎の膝関節軟骨に直径 3.5mm の軟骨欠損を作製した。まず、欠損部位に予め 2 週間培養した軟骨様組織を入れ、この組織と周囲組織（周辺軟骨、軟骨下骨）の間に細胞-PNIPAAm-gelatin 懸濁液を入れゲル化した後、脛骨より採取した骨膜で被覆し、更にフィブリングルースシートで縫い目を密閉した。

これらの組織を術後 5 週間目に採取し、関節の拘縮・滑膜炎の有無、関節表面の外観、組織の組織学的・免疫組織化学的評価を行った。実験は n=9 で行った。

C. 研究成果

(実験 1: *In vitro* での PNIPAAm-gelatin を用いた軟骨様組織の再構築)

生細胞数は培養期間 3 週間の間、ほぼ一定であり増殖も死滅もしなかった (Fig.2)。細胞形態は球状の細胞形態が経時的に増え、培養 3 週間目には殆どの細胞が球形であった (Fig.3)。細胞周期は G0/G1 期にある細胞の全細胞数に対する割合が 3 次元培養 (ゲル内) においては単層培養時に比較し優位に多かった (Fig.4)。また、分化型軟骨細胞の特

異的マーカーであるタイプ II コラーゲンと s-GAG を共に認めた。以上の事実は、単層培養にて一旦脱分化傾向にあった細胞は再分化したことを示唆している。

培養組織内の細胞外マトリックス (タイプ II コラーゲン、s-GAG) 量は共に経時的に増加し、タイプ II コラーゲンは培養 12 週目に正常軟骨の約 1/5、s-GAG の量は正常軟骨とほぼ同等量に達した。また、培養組織の力学的特性は培養 8 週目までは正常軟骨に近づく傾向にあったが、その後はあまり変化がなかった (Fig.5)。

(実験 2: *In vivo* での PNIPAAm-gelatin を用いた関節軟骨修復)

術後 5 週目の時点で全ての膝関節において拘縮、関節炎は認めなかった。また、外観にて関節面は周囲組織との連続性を保ち、陥凹変形も殆ど認めなかったが、やや不整な表面を呈した。組織標本の HE 染色において移植組織内に炎症細胞の浸潤を認めず、周囲にも壊死、被包化などの強い炎症反応は認めなかった。サフラニン O 染色による s-GAG の存在と免疫染色によるタイプ II コラーゲンの存在 (Fig. 6) も確認できたが、その分布濃度は正常軟骨には及ばなかった。

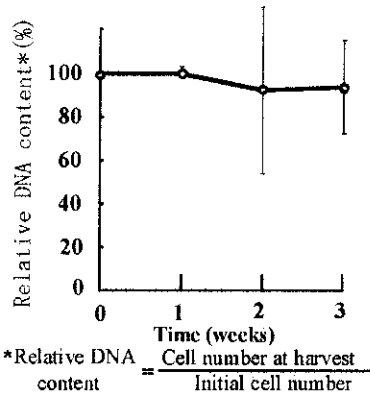


Fig. 2 細胞生存率：DNA の相対量で表す。

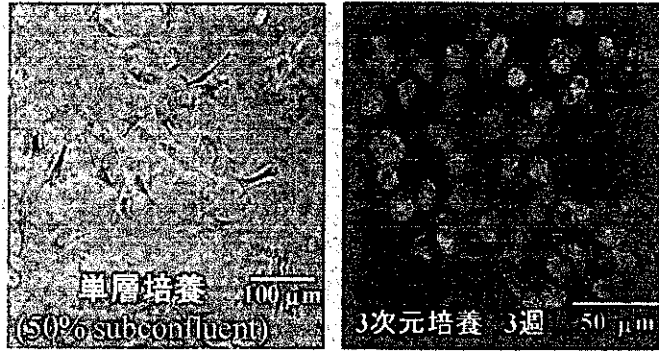


Fig. 3 細胞形態：(左図)単層培養 (右図)3次元培養

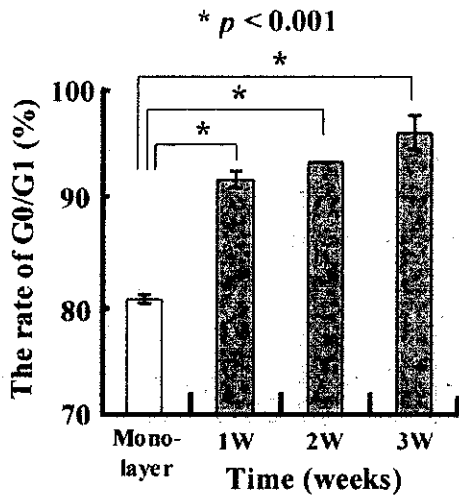


Fig. 4 Flow cytometry：G0/G1 期にいる細胞の割合

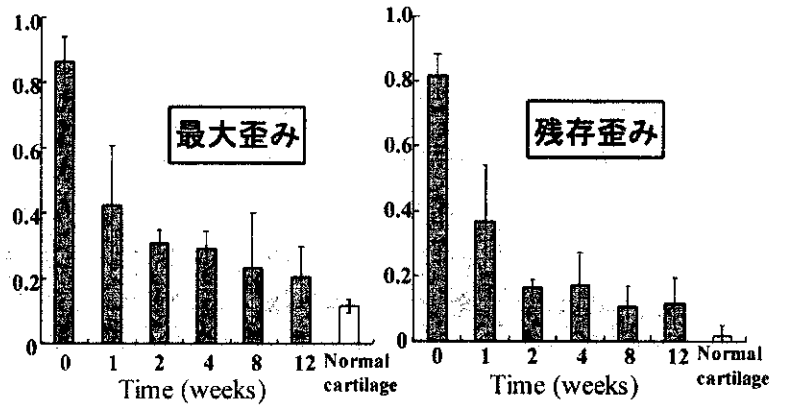


Fig. 5 力学的特性の経時的変化：(左図)硬さを表す最大歪み (右図)回復力を表す残存歪み



Fig. 6 Type II collagen (免染×100)

s-GAG (サフラニン O 染色×100)

D. 考察

(実験1: In vitroでのPNIPAAm-gelatinを用いた軟骨様組織の再構築)

PNIPAAm-gelatinゲル内で細胞が生存でき、一旦脱分化した軟骨細胞が再分化できることが確認できた。培養組織は生化学的には軟骨組織様であったが、力学的特性が正常軟骨に及ばなかった。その理由として静置培養された組織においては組織内の分泌された細胞外マトリックス分子の量、凝集状態、配向などが荷重に耐えうる物理的構造を構築できていなかったと考えられる。

(実験2: In vivoでのPNIPAAm-gelatinを用いた関節軟骨修復)

術後5週間の時点では材料に対する拒絶反応は巨視的にも組織学的にも認めなかったため、PNIPAAm-gelatinは生体適合性を持つと考えられた。また、関節軟骨は硝子軟骨として再生され関節面としての機能を果たしているように考えられた。

E. 結論

PNIPAAm-gelatinゲル内で軟骨細胞を3次元培養することでin vitroにおいて軟骨様組織を再構築することができた。また、動物実験にて軟骨欠損部位を硝子軟骨様組織で修復することができた。以上のことより、PNIPAAm-gelatinは軟骨再生用のscaffoldとして有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tissue-engineered cartilage using an injectable and in situ gelable thermoresponsive gelatin:

Fabrication and in vitro performances

Shinichi Ibusuki, Yasuo Fujii, Yukihide Iwamoto, and Takehisa Matsuda

Tissue Engineering, *In press*

- 2) System engineered cartilage using PNIPAAm-gelatin as in situ formable scaffold: In vivo performances

Shinichi Ibusuki, Yukihide Iwamoto, and Takehisa Matsuda

Tissue Engineering, *In press*

2. 学会発表

- 1) Tissue engineering for cartilage repair using a thermoresponsive gelatin as a scaffold

指宿真一、藤井康雄、岩本幸英、松田武久
第15回日本軟骨代謝学会、群馬、(2002年3月9-10日)

- 2) 感温性ゼラチンを用いた軟骨の組織工学: An injectable and in situ gellable cartilage using a thermoresponsive gelatin and chondrocytes

指宿真一、藤井康雄、岩本幸英、松田武久
第1回再生医療学会総会、京都、(2002年4月18-19日)

- 3) System engineered cartilage using thermoresponsive gelatin

指宿真一、藤井康雄、岩本幸英、松田武久
第40回日本人工臓器学会大会、札幌、(2002年10月2-4日)

G. 知的財産の出願・登録状況

国内特許出願

発明の名称: 軟骨組織再生用補助材、軟骨組織再生用キット及び軟骨組織再生方法

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

人工細胞外マトリックスのナノ超分子構造体
によるドラッグ・デリバリーシステム

分担研究者 田中 雅夫（九州大学大学院医学研究院臨床腫瘍外科教授）

研究要旨：膵癌は根治術をなし得た症例でも遺残する癌細胞による再発が高率にみられ極めて予後不良であり、術後の再発を防止する医療技術が希求されている。根治術後に癌細胞が遺残する可能性のある組織に対し組織に密着したマトリックスから直接癌細胞に薬物を送達できれば、術後の再発を大いに抑制できることが期待される。そのために我々はゼラチンに 4-ビニル安息香酸を縮合させ、光開裂剤であるカンファキノン（CQ）存在下に可視光を照射すると速やかにゲル化する光硬化性ゼラチンを作成し、薬物を担持したままゲル化し *in situ* で生体組織に薬物を徐放することが可能な医療技術の開発を考案した。導入率やゼラチン濃度といった材料パラメータ、カンファキノン濃度や薬物濃度といった組成パラメータ、光強度や照射時間といった操作パラメータなどの変数を種々組み合わせることで、光硬化性ゼラチン水溶液の粘性、ゲル化率、膨潤度、徐放率、組織接着力、生分解性を制御できた。ゲル内に包埋した薬剤（抗癌剤、タンパク質、アデノウイルス）は経時的にゲルから徐放され、生体組織に浸透した。抗癌剤であるゲムシタピンをゲルに包埋した実験ではヌードマウスに作製した膵癌モデルにおいて重篤な副作用なしに腫瘍の増殖を有意に抑制した。光硬化性ゼラチンゲルは生体組織に密着して薬剤を直接デリバリーするマトリックスとして有用であり、腹部外科領域での臨床応用が大いに期待できる。

A. 研究目的

膵癌の術後再発を抑制するために光硬化性ゼラチンゲルを用いた新しい医療技術の開発を目指した。光硬化性ゼラチン水溶液に抗癌作用を有する薬剤（抗癌剤、タンパク質、アデノウイルス）をあらかじめ包埋し、癌細胞が遺残する可能性のある組織上に可視光照射でゲル化させ、薬剤が直接組織に徐放できれば術後の再発を大いに抑制できることが期待

される。本研究では光硬化性ゼラチンゲルの物性に関する基礎的な実験をふまえた上で、臨床応用に向けての予備的実験を行った。

B. 研究方法

ゼラチンに 4-ビニル安息香酸を縮合させ、CQ 存在下に可視光を照射すると速やかにゲル化する光硬化性ゼラチンを作成した。導入率やゼラチン濃度といった材料パラメータ、

図1 照射時間とゲル化率

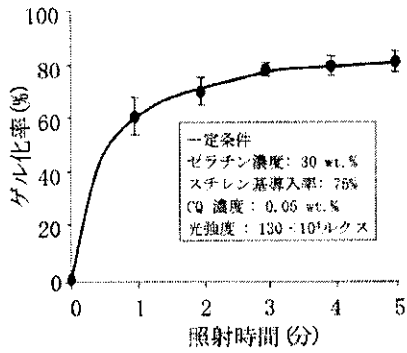


図2 ゼラチン濃度とゲル化率

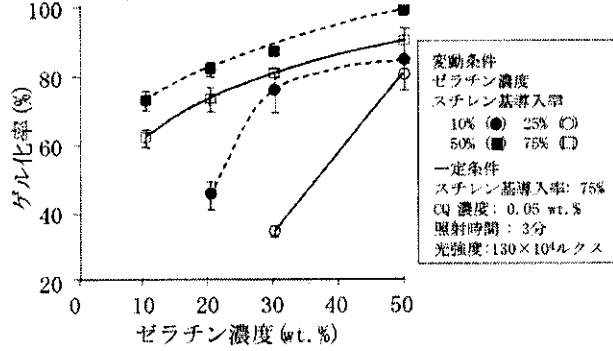


図3 コラーゲンフィルムへのゲルの接着力

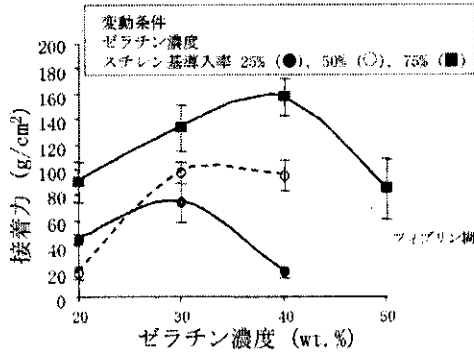


図4 光硬化性ゼラチンゲルの走査型電顕像

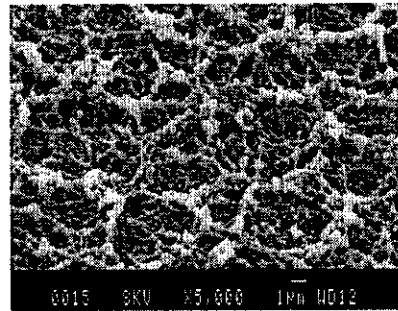


図5 ゲムシタピンのゲルからの徐放

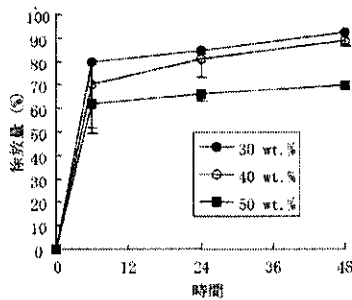


図6 アルブミン (モデル薬剤) のゲルから培地への徐放 (in vitro)

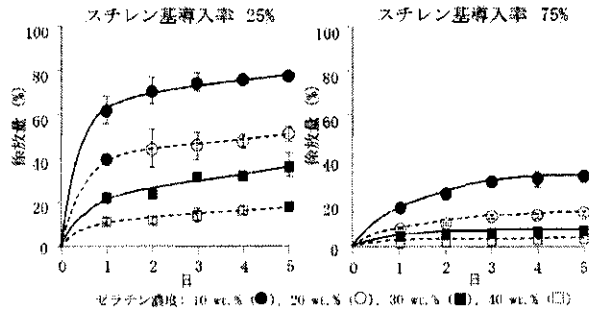
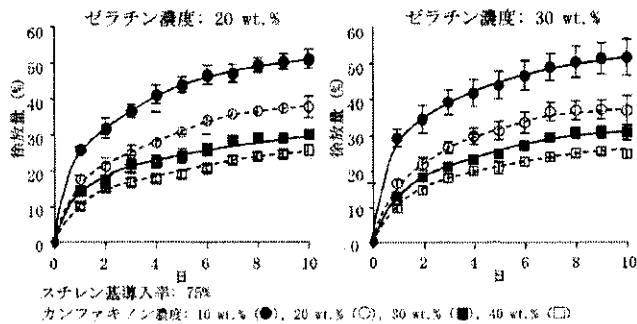


図7 ゲルから培地へのAdLacZの徐放 (in vitro)



カンファキノン濃度や薬物濃度といった組成パラメータ、そして光強度や照射時間といった操作パラメータなどの変数を種々組み合わせることで、光硬化性ゼラチン水溶液の粘性、

ゲル化率、膨潤度、徐放率、組織接着力、生分解性を制御できるか否か検討した。光硬化性ゼラチン水溶液に薬剤（抗癌剤、タンパク、アデノウイルス）をあらかじめ包埋しゲルか

らの徐放量を測定した。ゲルから徐放された薬剤の生体組織への浸透性を *in vivo* で検討した。抗癌剤であるゲムシタピンを用いて腫瘍増殖抑制効果を検討した。

C. 研究成果

光硬化性ゼラチン水溶液は 3 分の光照射で速やかにゲル化した (図 1) ゼラチン濃度と導入率を増加させるとゲル化率は増加した (図 2)。ゲルの接着力を測定すると高濃度、高導入率のゼラチンで作製したゲルは高い組織接着力を有した(フィブリン糊の約4倍)(図 3)。作製したゲルを走査型電子顕微鏡で観察するとゲルは微細孔と編目構造を有していた (図 4)。ゲムシタピン、アルブミン、アデノウイルスのゲルから培地への徐放量はゼラチン濃度と導入率に依存した (図 5-7)。ゲルから徐放された低分子の薬剤 (ローダミン、アルブミン、アデノウイルス) は生体組織に浸透した (図 8-10)。ゲムシタピンをゲルに

包埋した実験ではヌードマウスに作製した膀胱癌モデルにおいて重篤な副作用なしに腫瘍の増殖を有意に抑制した (図 11, 12)。

D. 考察

光硬化性ゼラチンゲルは抗癌剤、タンパク、アデノウイルスをゲル内に包埋した状態で組織に密着し *in situ* で薬物を徐放し組織に浸透させることが可能である。術後再発防止のための新しい治療技術として腹部外科領域に応用可能である。

E. 結論

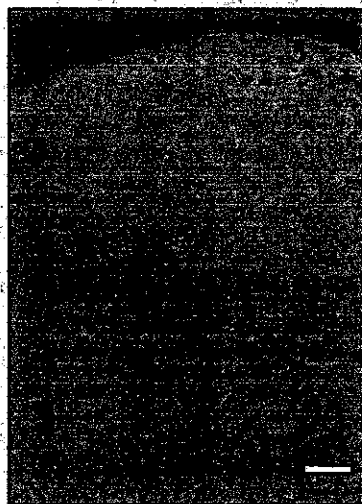
ゼラチンに4-ビニル安息香酸を縮合させ、光開裂剤であるカンファキノン (CQ) 存在下に可視光を照射すると速やかにゲル化する光硬化性ゼラチンを作成し、薬物を担持したままゲル化し *in situ* で生体組織に薬物を徐放することが可能な医療技術の開発を考案した。術直後に再発が疑われる部位に抗癌作用を有

図8 ヌードマウス皮下腫瘍結節へのローダミンの浸透



T: 腫瘍結節、Bar: 500 μ m

図9 ラット肝臓へのローダミンアルブミンの浸透



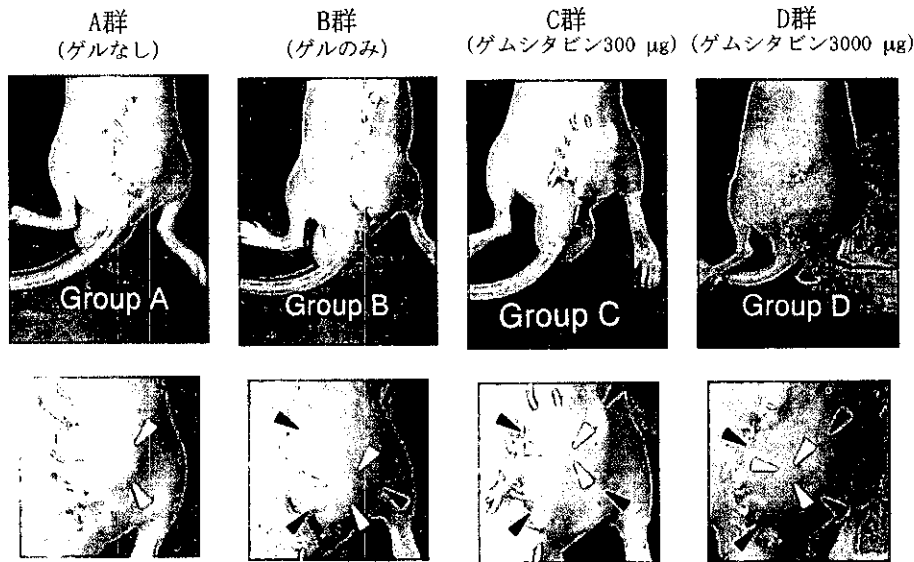
Bar: 500 μ m

図10 ラット大腿筋への AdLacZ (アデノウイルス) の浸透



Bar: 500 μ m

図11 ゲル化後10日目の腫瘍結節



黄矢頭：腫瘍結節、赤矢頭：皮下のゲムシタピン含有ゲル

する薬剤を包埋したゲルを *in situ* にコーティングする技術は癌治療の新たな戦略として期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) *In Situ* Hydrogelation of Photocurable Geratin

H. OKINO, Y. NAKAYAMA, M. TANAKA, T. MATSUDA

Journal of Biomedical Materials Research, 2002;59, 233-45

2) Novel Therapeutic Strategy for Prevention of Malignant Tumor Recurrence after Surgery: Local Delivery and Prolonged Release of Adenovirus Immobilized in Photocured, Tissue-Adhesive Gelatinous Matrix

H. OKINO, T. MANABE, M. TANAKA and T. MATSUDA

Journal of Biomedical Materials Research, *in press*.

3) Cell-based protein delivery system for pancreatic cancer therapy: NK4 gene-transduced oral mucosal epithelial cell sheet.

T. Manabe, K. Mizumoto, E. Nagai, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Nukiwa, M. Tanaka, T. Matsuda.
Submission.

2. 学会発表

1) 沖野秀宣、水元一博、永井英司、真鍋達也、松本邦夫、中村敏一、鳴海晃、貫和敏博、田中雅夫、松田武久
膵癌切除術後の局所再発・遠隔転移防止のための新しい治療戦略：光硬化性ゼラチンを Matrix とした癌摘出部位への Ad-NK4 の輸送と徐放システムの開発
第102回日本外科学会、京都、平成14年4月11-13日

2) 沖野秀宣、真鍋達也、水元一博、永井英司、松本邦夫、中村敏一、鳴海晃、貫和敏博、田中雅夫、松田武久
膵癌の集学的治療：光硬化性ゼラチンを

MatrixとしたAd-NK4の輸送と徐放システム
第33回日本膵臓学会、仙台、平成14年9月
4、5日

G. 知的財産の出願・登録状況

特許出願：

1) 名称：「局所内分散注射方法および注射針
装置」

特願：2001-333255

発明者および特許出願人：松田武久、園田
拓道、沖野秀宣

平成13年10月30日、九州大科先端科学技
術共同研究センターを通じ特許出願

2) 名称：「医療用高分子ゲル化剤および局所
に治療用物質を徐放する方法」

特願：2001-374868

発明者および特許出願人：松田武久、沖野
秀宣、田中雅夫

平成13年12月7日、九州大科先端科学
技術共同研究センターを通じ特許出願

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

分担研究報告書

ナノ加工技術による血管壁組織工学

分担研究者 安井 久喬（九州大学大学院医学研究院循環器外科教授）

研究要旨：小口径人工血管の開存性を高めるため、人工血管内面に血管内皮細胞を播種したハイブリッド人工血管の研究が為されてきた。しかしながら、成熟血管内皮細胞は手術的に細胞を採取する必要があり、広く臨床に用いられるには至っていない。近年、成人の流血中に、血管内皮細胞に分化する能力を持つ骨髄由来の血管内皮前駆細胞が発見された。この細胞は高い増殖性を持ち、生体内で血管内皮細胞へ分化、血管新生を行うため、虚血性疾患をターゲットとした細胞治療のソースとしての研究が活発に行われてきている。我々は血管壁 Tissue engineering への血管内皮前駆細胞の応用の可能性を、その採取法、増殖性、及び抗血栓性機能の面から検討し、ヒト末梢血由来の前駆細胞を用いたハイブリッド小口径人工血管のモデルを作成した。さらにイヌの総頸動脈置換実験にて前駆細胞ハイブリッド小口径人工血管の開存性について検討をおこなった。

A. 研究目的

血管壁 Tissue engineering への血管内皮前駆細胞の応用の可能性を、その採取法、増殖性、及び抗血栓性機能の面から検討し、ヒト末梢血由来の前駆細胞を用いたハイブリッド小口径人工血管のモデルを作成する。さらにイヌの総頸動脈置換実験にて前駆細胞ハイブリッド小口径人工血管の開存性について検討を行う。

B. 研究方法

成人男性の肘静脈より 100ml の採血を行い、前駆細胞が含まれる単核球分画を遠心分離し VEGF 存在下で培養し、高増殖性の前駆細胞のコロニーを継代、大量増殖培養した。これらの細胞が血管内皮細胞の系統であることを同定するために、血管内皮細胞に発現する von

Willebrand factor（以下 vWF）及び Flk-1 の免疫染色を行い、また血管内皮細胞に見られる DiI-Ac-LDL の取り込みを観察し、加えて一酸化窒素（以下 NO）反応性蛍光物質を用いた NO 産生の観察を行った。抗血栓性機能評価として、前駆細胞の eNOS、PGI₂、及び tPA の産生量を ELISA 法にて測定し臍帯静脈血管内皮細胞（以下 HUVEC）と比較した。内面を光反応性ゼラチンで処理したポリウレタン製多孔化コンプライアント人工血管（内径 1.5mm）にヒト前駆細胞を播種しハイブリッド小口径人工血管のモデルを作成し、灌流培養装置に装着、培養した。さらにイヌでの *in vivo* 実験としてコラーゲンとポリウレタンにて作成した人工血管（内径 4.5 mm）の内面にイヌの末梢血（15 ml）からヒトでの方法と同様の方法にて採取、大量培養した前駆

細胞を播種し、採血を行ったイヌの総頸動脈を置換し、3ヶ月後及び6ヶ月後に人工血管を取り出し観察した。

C. 研究成果および考察

ヒト血管内皮前駆細胞は vWF 及び Flk-1 陽性で、DiI-Ac-LDL を取り込み、また NO 反応性蛍光物質を用いた観察で NO の産生が認められ、血管内皮細胞系統であることが確認された (図 1)。前駆細胞の eNOS 産生量は HUVEC の約 3 分の 1 (前駆細胞 : 1100 ± 530 pg/ 10^6 細胞、HUVEC : 3300 ± 670 pg/ 10^6 細胞、 $p < 0.05$)、 PGI_2 の産生量は約 2 分の 1 (前駆細胞 : 93 ± 46 pg/ 10^6 細胞/24 時間、HUVEC : 190 ± 45 pg/ 10^6 細胞/24 時間、 $p < 0.05$) で、tPA の産生はほぼ同等 (前駆細胞 : 32 ± 20 ng/ 10^6 細胞/24

時間、HUVEC : 30 ± 12 ng/ 10^6 細胞/24 時間、 $p = 0.5$) であった (図 2)。小口径人工血管に播種した前駆細胞は人工血管内面を単層の敷石状構造で完全に覆い、灌流培養によって生体動脈類似の配向した前駆細胞による内面を持つ小口径人工血管のプロトタイプモデルを作成することができた (図 3)。イヌの総頸動脈に植え込まれた前駆細胞播種人工血管計 12 本のうち、植込み後 3 ヶ月に観察した 6 本中 5 本が開存、植込み後 6 ヶ月に観察した 6 本中全てが開存しており、その内面には血栓は認められなかった。走査型電子顕微鏡による表面の観察では、植込み後人工血管の内面は流れの方向に配向した前駆細胞の単層構造による被覆を保っていた (図 4)。

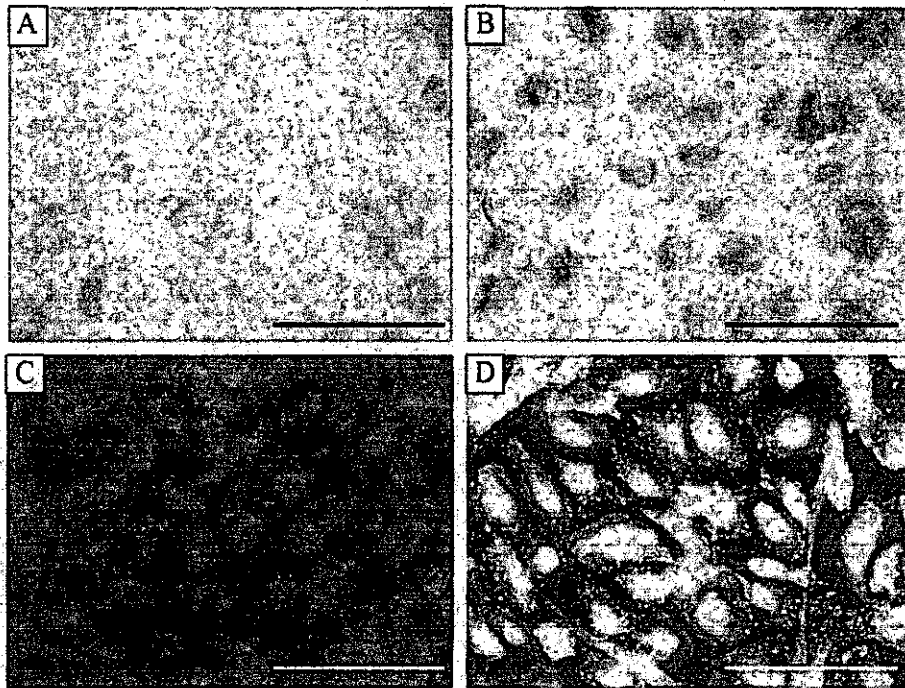


図1：ヒト血管内皮前駆細胞の組織化学的染色像。(A) Flk-1陽性に染色された前駆細胞の光顕像。(B) vWF陽性に染色された前駆細胞の光顕像。(C) DiI-アセチル化LDLを取り込んだ前駆細胞の共焦点レーザー顕微鏡写真。(D) 一酸化窒素特異的蛍光標識剤であるDAF-2DAによる陽性前駆細胞の共焦点レーザー顕微鏡像。(倍率は400倍、スケールバーは100 μ m。)