

C-2. マイクロ流路型バイオ燃料電池の性能評価

図 B-3 に示すような実験系でバイオ燃料電池の評価を行った。アノードには B-1 で作製したものを、カソードには Ag|AgCl 電極と Pt 電極を用いた。燃料溶液はヒトの正常血糖値を意識し、グルコース濃度を 5 mM とした。

燃料の供給速度の影響を評価したものを図 C-3 に示す。前述のとおり、電流値はアノードに律されており、これはアノードにおける燃料供給の様子を示していると考えられる。燃料供給速度が大きくなるほど電極へのグルコースの流束が大きくなることで、電流値が上昇している様子がわかる。

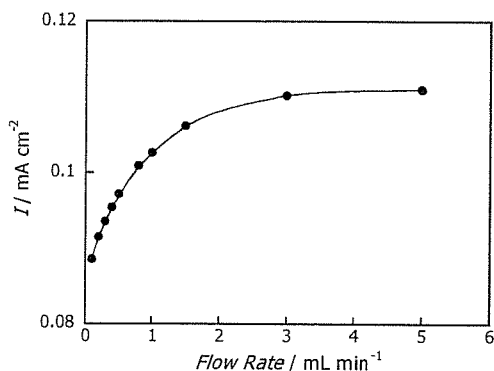


図 C-3 放電電流の流速依存性 ($R=100\text{k}\Omega$). カソードは PDMS 修飾 Pt 電極. 1.0 mM NAD^+ , 5.0 mM グルコースを含む空気飽和 PBS ($\text{pH } 7$).

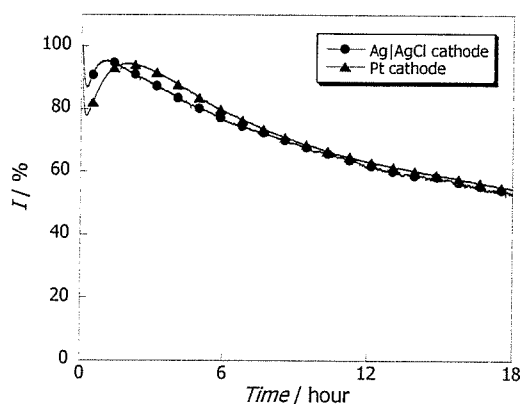


図 C-4 バイオ燃料電池の耐久性 ($R=100\text{ k}\Omega$). カソードには Ag|AgCl electrode (●), PDMS 修飾 Pt 電極 (▲)を用いた. 1.0 mM NAD^+ , 5.0 mM グルコースを含む空気飽和 PBS($\text{pH } 7.0$), 流速: 1.0 mL min^{-1} .

さらに図 C-4 のように 12 時間の連続発電を行うことで、本研究におけるバイオ燃料電池の耐久性を評価した。カソード面積を十分に大きくすることで、電池性能をアノード律速とし、実質はアノードの耐久性が評価されている。アノードの耐久性は修飾膜の膨潤に起因するものと考えられ、架橋剤の導入など化学的処理により向上できると考えられる。

C-3. 酵素カソードを用いたバイオ燃料電池

C-2 で作製したバイオ燃料電池において、酵素(BOD)を修飾した炭素電極をカソードとしたときの電池出力測定も行った。酵素カソードを用いたことで、酸素還元過電圧を小さくすることができ、電池電圧が大きくなり (0.7V)、その結果として比較的大きな電力を得ることができた。このようにメディエータを用いない酵素カソードを作製できたことから、シンプルかつ高性能、有機物のみのバイオ燃料電池が実現できる可能性が出てきた。今後この電極の最適化や反応選択性について検討を加えていく予定である。

C-4. 生分解性高分子を用いた時差式発電

ガラス基板上に、3組のバイオマイクロ燃料電池が並列に連結された構造を作り、そのうちの2組を生分解性高分子 PLGA で被覆した。PLGA の平均分子量が異なるため、加水分解によって崩壊する時間が異なる(図 C-5)。この電池システムの出力量を、 $100\text{k}\Omega$ の外部負荷をかけて計測した結果の典型的なものが図 C-6 である。PLGA の崩壊とともに電流値の上昇が見られ、さらに平均分子量の異なる二種類の PLGA を用いることで、多段階に時差をつけることができた。今後はさらに多数のバイオ燃料電池を配列させ、電池の性能劣化が起こる時間スケール丁度よく崩壊して順次発電を開始するような電池を設計していく。

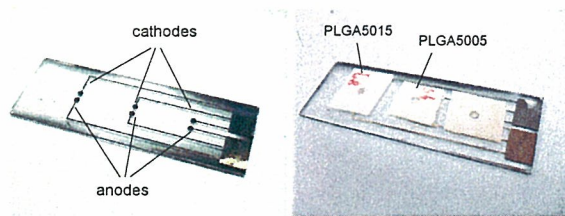


図 C-5 小型集積化へ向けた時差式バイオ燃料電池の試作. 電極基板(左)と生分解性高分子を被覆した電極基板.

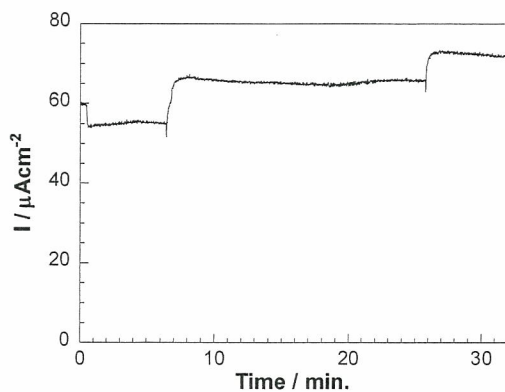


図 C-6 時差式バイオ燃料電池の放電曲線(100 kohm). 30 mM グルコース, 1 mM NAD⁺を含む PBS (pH7),35 度.

C-5. バイオ燃料電池の利用

バイオ燃料電池は安全性が高く、小型化が容易であり且つ血液（血糖）から発電できるため埋め込み型医療機器の電源として期待される。例えば埋め込み型人工筋肉用の電源としての利用も考えられる。そこで今回、人工

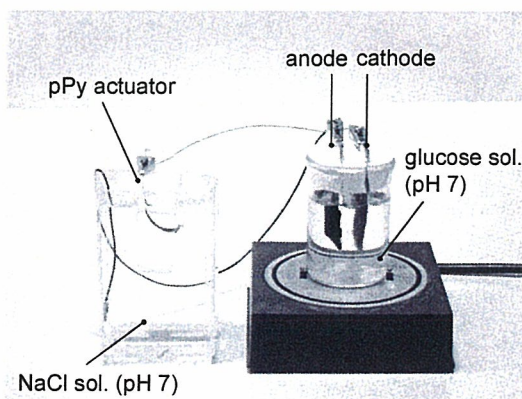


図 C-7 生理食塩水中の PPy アクチュエータ(人工筋肉)をバイオ燃料電池によって駆動

筋肉として研究されている導電性高分子ポリピロール (PPy) で作製したアクチュエータのバイオ燃料電池の電力による駆動を試みた(図 C-7). バイオ燃料電池により発生した電圧により, PPy が酸化, もしくは還元され伸縮することで, PPy アクチュエータが動作でき, その動作速度は発電量と相関関係があった. このようにバイオ燃料電池の電力で実用的なデバイスを駆動させることができることを確認した.

E. 結論

本研究では, 生体内で使用可能な安全なグルコース/O₂ 型のバイオ燃料電池の構築を目的とし, まず, ビタミンK₃をポリマー化して, 高性能の電子メディエータ材料を得た. これを用いて, ジアフォラーゼ, グルコースデヒドロゲナーゼを二層構造の酵素膜とすることで, 再現性を重視したグルコースの酸化電極(燃料電池のアノード)を作製することが出来た. 白金電極カソードと組み合わせて, グルコース水溶液, ジュースなどの身の回りの溶液, そして血液や組織液などの体液からの発電実験を行なって, 耐久性などに関する検討事項を明らかにした. 微細加工技術を用いてマイクロ流路型のセルを作製して, コントロールされた燃料送液環境における定量評価, また流路ならではの動作環境における電極配置の最適化などを行なった. 耐久性の評価を行った結果, 12 時間で 50%の電流を保つことができた. より耐久性を向上させるためには, 架橋剤の導入などの化学的な処理などによるものも考えられるが, それにも限界がある. そこで我々は生分解性高分子を用いた時差式発電を考案し, それについての基礎実験を行った. より長期的に使用するためには小型・集積化を進める必要があり, 今後さらに検討していきたい.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各年度の報告書に記載のとおり

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発
II 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 研究所先進医工学センター 人工臓器部長)

A.研究目的

我々は従来から開発を行ってきたナノサーフェステクノロジーを応用し、コーティング剤のナノ分子構造を制御し、最適化を図ることにより、血液界面における長期間の血液凝固防止作用の維持を可能とした T-NCVC コーティングを開発し得た。本技術は、既存の人工心臓（国循型 VAD，東洋紡社製）および膜型人工肺（Platinum Cube NCVC シリーズ，大日本インキ社製）に採用され、長期的な抗血栓性を飛躍的に向上させ、その長期使用における安全性の維持に大きく貢献している。しかしながら、この T-NCVC コーティング手法を発展させ、より高性能且つ高機能な次世代型生体適合性表面処理法の開発を行う上では、本コーティングの抗血液凝固機序の解析が不十分であり、不明な部分が多く認められている。

本研究は、従来法より生体適合性に優れた T-NCVC コーティングの抗血液凝固機序を細胞科学的小および生化学的に解明し、より長期的に安定した新規抗血栓手法を確立することを目的とする。

B.研究方法

B-1.ナノ分子表面処理技術の効果発現メカニズムに関する研究

B-1.1. T-NCVC コーティングのナノ表面形状に関する研究

T-NCVC コーティングを塗布した器材表面

の材料学的性状について、原子間力顕微鏡を用いたナノ微細構造学的観察を行った。

B-1.2. T-NCVC コーティング塗布面への血清タンパク質吸着状態に関する研究

T-NCVC コーティングを塗布した(コーティング溶液の濃度は 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 および 5.0 %)ポリスチレン製 ELISA プレートにウシ血清を充填し、37°C, 24 時間静置後、器材表面に吸着した血清タンパク質の質量を計測し、また電気泳動にてその分子量を計測した。

さらに、無処理プレート、1%および 3% T-NCVC コーティングプレートの各ウェルに血漿または血液を 300 μ l ずつ添加し、サーモミキサーコンフォートを用いて 37°C で血漿の場合は 1, 3, 6 および 9 hr, 血液の場合は 1 および 9 hr 震盪しながらインキュベーションしてタンパク質をプレートに吸着させた。その後 PBS で 9 回洗浄した。吸着タンパク質の定量は BSA を標準タンパク質として用い、Lowry らの方法に従って行った。

B-1.3. T-NCVC コーティング塗布面への線維芽細胞の接着性に関する研究

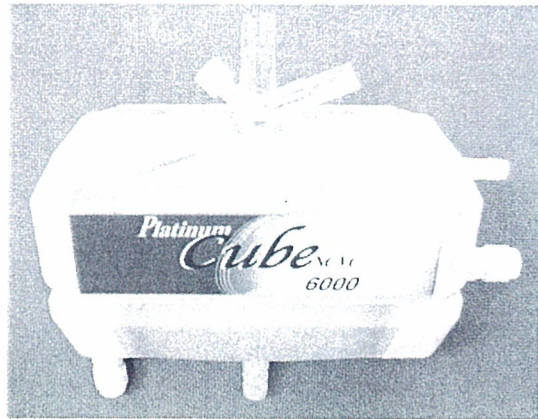
T-NCVC コーティング(コーティング溶液の濃度は 1 および 5 %)を塗布したポリスチレン製培養皿にヤギ由来線維芽細胞を播種し、皿底に接着、伸展する状態を経時的に観察を行った。

B-1.4. T-NCVC コーティングの血液細胞に対する影響に関する研究。

T-NCVC コーティングを施した高分子材料に血漿中タンパク質を吸着させ、その血漿蛋白質の存在が好中球に及ぼす影響について検討を行った。好中球は、血液細胞のなかでも液性炎症に関連する様々なメディエータの分泌を行う重要な細胞とされ、高分子素材に対する好中球の反応は、その素材の生体適合性を決める要因の一つである。本研究は、血漿タンパクを吸着させた T-NCVC コーティングプレート（ポリスチレン製）および無処理プレートを用い顆粒球分画を1時間インキュベーションし、その間に好中球内から遊離したラクトフェリンを測定することにより、器材表面での好中球の異物に対する活性化について検討した。

B-2. 高信頼性人工心肺の開発

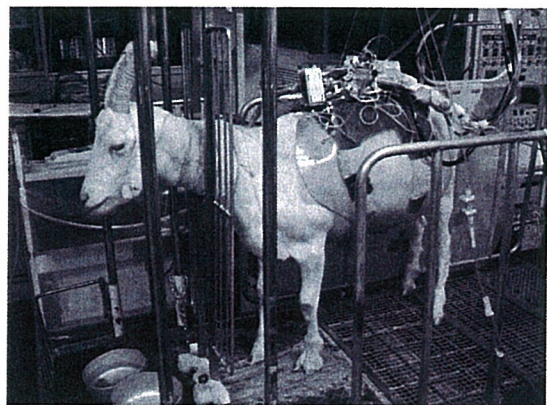
膜型人工肺を用いた経皮的心肺補助法（Percutaneous Cardiopulmonary Support, PCPS）や ECMO（Extracorporeal Membrane Oxygenation）は、重症呼吸循環不全患者への強力な治療法として、心臓外科領域に限らず、救命救急領域などにおいても広く普及し始めている。しかしながら、これら新しい救命法や治療法が普及するにつれ、その長期使用や適用の拡大などに対するハードウェア整備の立ち後れが指摘されるようになってきた。かかる問題に対し、我々は、大日本インキ株式会社と共同開発を行ってきた中空糸表面に 200 nm 以下の緻密層を形成し、ガス交換能にも優れた特殊ポリオレフィン膜を使用した膜型人工肺に、さらに T-NCVC コーティングを採用し、長期の耐久性および生体適合性に優れた次世代型膜型人工肺 Platinum Cube NCVC シリーズを完成させた。



TOYOBO-NCVC コーティング膜型人工肺

Platinum Cube NCVC6000

また、この膜型人工肺 Platinum Cube NCVC 6000 を使用し回路全体に T-NCVC コーティングを施した次世代型 PCPS システムを開発し、成ヤギを用いた長期動物試験により、本システムの血液適合性および長期耐久性について検討を行った。また同シリーズの小児用人工肺の血液接触面に本表面処理技術を適用し、より優れた抗血栓性および生体適合性を寄与した新規小児用人工肺を開発し、その長期にわたる性能安定性を検討することを目的とした。実験では、本 T-NCVC コーティングを施した小児用 ECMO システムを用いて、体重 20～30 kg の仔ヤギを用いた長期動物実験を行った。



TOYOBO-NCVC コーティング PCPS システムの長期動物実験風景

B-3. T-NCVC コーティング国立循環器病センター型空気圧駆動式補助人工心臓の開発

現在、重症心不全患者に対する人工心臓の有用性の再認識と共に患者の Quality of life を考慮した、より安全に長期間使用できる人工心臓システムの開発が急務となっている。このような現状において、我が国で主に使用されている国立循環器病センター型空気圧駆動式補助人工心臓 (Toyobo-NCVC VAS) を長期的かつ安全に使用するための改良は、非常に意義深いものである。そのための重要な課題のひとつは、人工心臓の抗血栓性を向上させ、使用患者の血栓塞栓症の発生率を低下させることであり、欧米諸国ではすでに補助人工心臓の血液ポンプ表面にヘパリン処理を施し、その抗血栓性を向上させる試みがなされ、良好な結果が得られつつある。そこで、Toyobo-NCVC VAS に対し、ナノサーフェステクノロジーから生み出された T-NCVC コーティング施すことにより、Toyobo-NCVC VAS の抗血栓性を飛躍的に向上させ、長期使用への安全性を向上させることを目標に開発を行った。

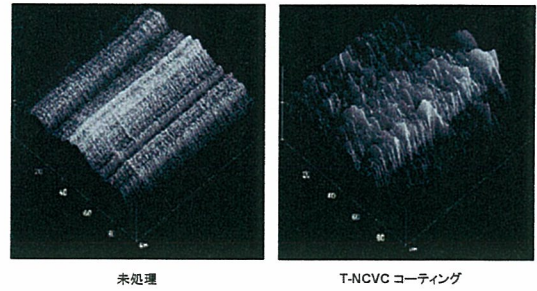
C. 結果

C-1. ナノ分子表面処理技術の効果発現メカニズムに関する研究

C-1.1 T-NCVC コーティングのナノ表面形状に関する研究

原子間力顕微鏡による観察により T-NCVC コーティングが施された部材表面は、約 200~500 nm の隆起を繰り返す顆粒状構造を持つことが観察された。

血液接触面の超微細構造

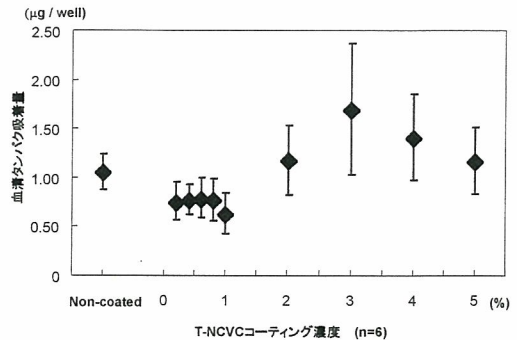


TOYOBO-NCVC コーティングのナノ表面構造

T-NCVC コーティングの超微細構造は、無処理のポリスチレン平面と比較し、顆粒状の表面を有する。

C-1.2. T-NCVC コーティング塗布面への血清タンパク質吸着状態に関する研究

0.2~1.0 %濃度の T-NCVC コーティング群では、無処理群と比べ(1.068±0.015 µg/well), 器材面に吸着したタンパク質量は少なかったものの(約 0.6~0.7 µg/well), 2.0~5.0 %の群では無処理群より吸着したタンパク質量が多い結果となった(約 1.0~1.6 µg/well)。



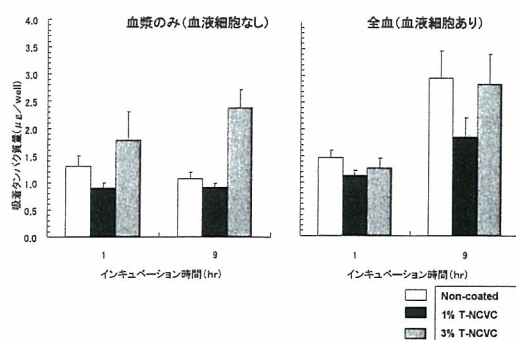
TOYOBO-NCVC コーティング各濃度における血漿吸着タンパク量の変化

高濃度の T-NCVC コーティング処理後には、無処理ポリスチレン表面に比べ、血漿中のタンパクが吸着しやすい性質になっている。

血漿を無処理プレートならびに 1%および 3% T-NCVC コーティングプレートで種々の時

間インキュベーションしたときのプレートに吸着したタンパク質量の経時的变化の観察では、無処理および1%T-NCVC プレートに吸着したタンパク質量に経時的に有意な変化は見られなかったが、インキュベーション9 hr後の3%T-NCVC プレートに吸着したタンパク質量は1 hr後のものと比べ有意に増大していた。一方で、血液細胞を含む血液を無処理プレートならびに1%および3%T-NCVC コーティングプレートで1 hrないし9 hr インキュベーションしたときのプレートに吸着したタンパク質量は、いずれのプレートにおいても、インキュベーション9 hr後のプレート吸着タンパク質量はインキュベーション1 hr後に比べ有意に増大した。インキュベーション1 hr後においては、それぞれのプレート間で吸着タンパク質量に有意な差は存在しなかったが、インキュベーション9 hr後では、1%T-NCVC プレートに吸着したタンパク質量は無処理および3%T-NCVC プレートに比べ有意に低値を示した。

T-NCVCコーティングの血漿中蛋白質吸着に対する影響

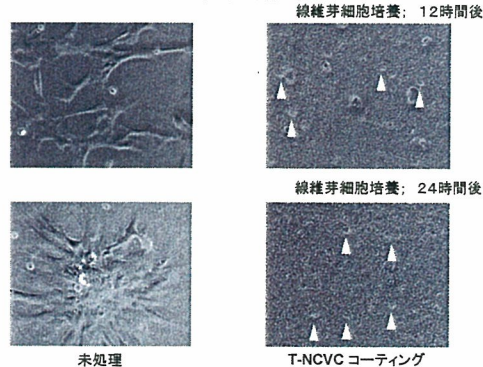


C-1.3. T-NCVC コーティング塗布面への線維芽細胞の接着性に関する研究

T-NCVC コーティングは、非常に優れた細胞接着阻害能を特徴とし、本コーティングに対する培養線維芽細胞の接着実験では、静置培養24時間後においても、コーティングを施した培養皿

底面への線維芽細胞の接着や仮足の伸展などは認められず、細胞は球形のまま培養維持が可能であることが示された。また、T-NCVC コーティングの細胞接着阻害能は、培養液中にフィブロネクチンないしビトロネクチンを添加し、細胞の接着作用を促進させた状態においても、その阻害効果が低下することはなく、非常に安定的であることが認められた。

T-NCVC コーティングによる細胞接着の抑制効果



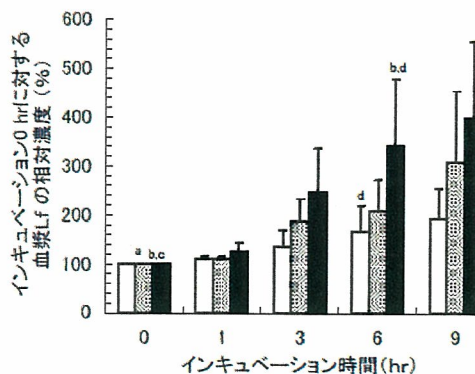
TOYOBO-NCVC コーティングの細胞接着阻害効果

T-NCVC コーティング上では、線維芽細胞培養24時間経過後においても、培養細胞は底面に付着せず、仮足の形成も行われぬ(矢頭)。

C-1.4. T-NCVC コーティングの血液細胞に対する影響に関する研究

無処理プレートにおいてはインキュベーション前に比べて9 hrのインキュベーションの間に血漿Lfの有意な増大は認められなかった。T-NCVC プレートにおいては経時的なLf量の増大が見られ、1%T-NCVC プレートでのインキュベーション9 hr後、3%T-NCVC プレートでのインキュベーション6 hrおよび9 hr後のLf量は各々インキュベーション前の値に比べて有意に増大した。1%T-NCVC プレートにおいては、いずれのインキュベーション時間においても無処理プレートに比べて血漿Lf量の有意な上昇は認められなかったが、3%T-NCVC プレートにおいてはインキュベーション6 hrおよび9 hr後のLf量は無処理プレ

トに比べて有意に高値を示した。いずれのインキュベーション時間においても 1%と 3% T-NCVC プレート間に血漿 Lf 量に有意差は見られなかった。

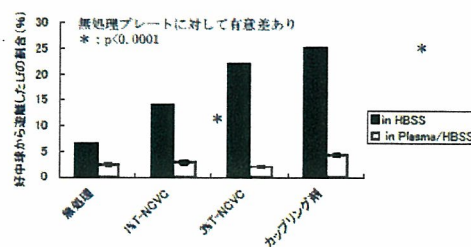


T-NCVCコーティングプレートで血液をインキュベーションしたとき血漿Lfの経時的変化

血液を無処理(□)、1%T-NCVC(▨)および3%T-NCVC(▩)プレートの時間インキュベーション後回収し、血漿を分離した。血漿Lfはインキュベーション0 hrに対するパーセンテージとして算出した。値は6頭のを用いたときの平均値±S.D.を示す。図中のアルファベットは同じ文脈差があることを示す(d: p<0.05, a-c, e: p<0.01)。

また、血漿・HBSS 混液に懸濁した顆粒球を各種プレート中でインキュベーションしたとき、好中球から遊離したラクトフェリンの割合は約 2-4 %であり、器材表面に対する好中球の活性化は軽度であった。しかし、血漿成分を含まず HBSS 液のみに懸濁した顆粒球を各種プレート中でインキュベーションして好中球の活性を検討したところ、好中球から遊離したラクトフェリンの割合は無処理プレートで 6.6 ± 0.5 %、1%T-NCVC コーティングプレートで 13.9 ± 2.5 %、3%T-NCVC コーティングプレートで 22.4 ± 4.2 %であり、いずれのプレートにおいても血漿成分を含んだ培養液を使用した群と比較し器材表面に対する好中球活性の亢進が認められ、特に T-NCVC コーティングプレートについては、有意に高値を示していた。以上より、T-NCVC コーティングについては、培養液中にタンパク質を含んでいない状態では、逆に好中球が活性化されやすく、本来の生体適合

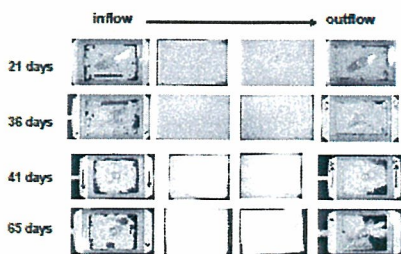
性を発揮できない状態にあることが示された。



HBSSに懸濁した顆粒球を血漿タンパク質吸着プレート中でインキュベーションしたとき好中球から遊離したLfの割合

C-2. 高信頼性人工心肺の開発

実験では成ヤギに対し、右心房脱血、頸動脈送血による静動脈バイパス術を施し、覚醒下において試験システムを最長65日間持続的に駆動させ、その血行動態、血液、血球成分の変化、および実験終了後におけるシステム内での血栓形成状況について検討を行った。その結果、全例において実験期間中には、膜型人工肺のシステムについてガス交換能などの機能低下や血漿リークなど異常所見は認められず、良好な状態で静動脈バイパスを維持することが可能であった。血液生化学的には、実験期間中の賦活化血液凝固時間 (ACT) は、術前値とほぼ変化せず、血小板数の軽度の低下を認めたのみで、アンチトロンビンⅢ、フィブリノーゲンおよびフィブリノーゲン・フィブリン分解産物も最長2ヶ月まで著変は認められなかった。実験終了後の膜型人工肺の血栓形成状況は、そのケース辺縁部に若干の血栓形成を認めたが、中空糸膜の層間内部にはほとんど認められなかった。以上より、我々の開発した次世代型膜型人工肺 Platinum Cube NCVC シリーズを組み入れ、回路全体に T-NCVC コーティングを施した PCPS システムは、抗凝血療法を不要とする持続的な長期的使用が可能であることが示された。



長期動物実験後の TOYOBO-NCVC コーティング膜型人工肺抗凝血療法を行わない長期動物実験後においても、本人工肺にはケーシング周辺に血栓形成が認められのみであり、中空糸膜には血栓の付着などは認められなかった。

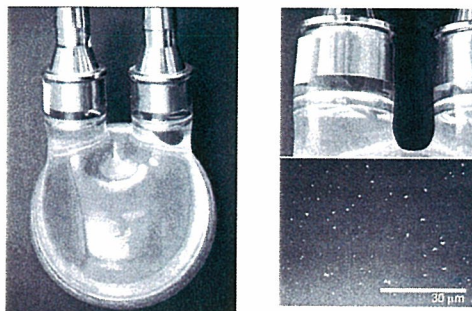
さらに、我々は現在 Platinum Cube NCVC シリーズの中でも最小モデルである Platinum Cube NCVC 2000 を組み入れた低灌流用 PCPS システムの開発を行った。小児用あるいは新生児用 ECMO に最適なシステムが実験に使用された 2 例とも全灌流期間を通して全身状態の異常は一切認められず、小児用 ECMO システムによるバイパス血流量は約 1.5 L/min を維持することが可能であった。以上より、本小児 ECMO システムは高い抗血栓性、長期耐久性を保持したままさらに小型・低充填量化を達成しており、臨床応用にあたっては小児領域における重症呼吸・循環不全症例の救命に寄与するものと思われた。

C-3. T-NCVC コーティング国立循環器病センター型空気圧駆動式補助人工心臓の開発

この T-NCVC コーティングを施した改良型 Toyobo-NCVC VAS を、成ヤギに左心バイパス方式で装着し、最長 154 日間連続的に駆動することにより、その長期的な抗血栓性について検討を行った。本動物実験に際しては、ワーファリン投与など抗凝血療法は一切行わず、血圧モニター用ライン維持を目的としたヘパリンの極めて微量な投与を行うのみであったが、実験終了後の血液ポンプ内の血栓形成状

態は、弁輪周囲のわずかな部位に認められたのみであり、ポンプの血液室内に形成される血栓は顕著に抑制されていた。本研究により、T-NCVC コーティングは、血液ポンプの耐久性に関連する物理的および化学的特性に変化を与えることなく、従来と同様の耐久性を維持しながら、ポンプの抗血栓性能を顕著に向上させることが示された。また、T-NCVC コーティング Toyobo-NCVC VAS は、2005 年に厚生労働省より医療機器として承認を受け、今後臨床使用が開始される見込みであり、補助時人工心臓装着患者の臨床成績の向上に貢献できることが期待された。

T-NCVC Coated TOYOBO-VAD for 91 Days of Use with No Anti-coagulants (Pump No. 7)



TOYOBO-NCVC コーティング国立循環器病センター型空気圧駆動式補助人工心臓

91 日間の長期動物実験後においても、人工心臓内に明らかな血栓形成は認められない。

D. 考察.

重症心不全ないし呼吸不全患者に対する人工臓器治療の適用数は、機器やその材料の発達により安全性や耐久性が向上し、年々増加傾向にある。また、傷害臓器の回復や移植 (Bridge to Transplantation) を見据えた比較的短期の使用を目的とした適用から、ドナー不足による移植待機時間の延長や、心機能の回復を見込めない症例に対する恒久的な使用を目的とした Destination Therapy への適用のための長期治療まで、その使用法は多岐にわたる傾向にある。かかる状況に対し、人工臓器

の長期的な耐久性、および確かな安全性の向上を求める声は根強く、特に、血液との接触が不可避な循環器系人工臓器においては、長期使用の安全性を確保するため抗血栓性や生体適合性の長期的な維持が重要な課題となっている。我々が開発した表面処理技術T-NCVCコーティングは、ナノサーフェステクノロジーを応用した新しいコンセプトに基づき、極めて高い血液適合性と同時に長期耐久性や処理の簡便性を実現することに成功した新規技術である。これらの技術を統合して開発する抗凝血療法不要の長期連続使用が可能な次世代型人工心臓や膜型人工肺は、従来の機器の最大の欠点であった血栓塞栓症の発生や抗凝血療法併用による致死性出血性臓器障害の発生を激減させ、外傷患者、脳血管障害既往患者および従来システムでは適応になり得なかった慢性呼吸循環不全患者の急性増悪時の短中期心肺補助に対する中長期補助も可能とするなど、その特性を十分に活用させた適用範囲、適用環境が飛躍的に拡大することが期待されている。

従来の研究では、器材表面での血栓形成を防止するための理論的手法として、

- i) 器材表面に血液凝固防止剤（ヘパリンなど）を固定化する（抗血栓物質の利用）
- ii) 器材表面への血中タンパク質吸着の防止（材料表面の性質の制御による抗血栓性の賦与）
- iii) 器材表面の均一化（平滑化）

などが挙げられている。一方、T-NCVCコーティングについては、コーティング表面が200～500 nmの凹凸を繰り返す顆粒状の構造であることが明らかにされ、コーティング効果が十分に発揮される状態においても、器材にはタンパク吸着が認められ、その過程には血液細胞との相互作用による吸着量、性質の変化が認められた。またこれらの効果にはコーティング剤に含まれているヘパリンが関与して

いないことも明らかにされた。すなわち、本研究では、T-NCVCコーティングが、器材表面に接触する細胞の接着作用を著しく阻害する効果を有することが見いだされているものの、この細胞接着阻害作用は、従来提唱されていた作用機序とは異なる結果が多く認め、T-NCVCコーティングの有する細胞接着抑制機序には、従来の抗血液凝固性機序とは異なった新しい機序が存在する可能性が想起された。かかる新機序を解明することによりT-NCVCコーティングの血液に対する適合性をより機能的に向上させることが可能になると考えられる。しかしながら、現段階において非常に優秀な成績を得ているT-NCVCコーティングを以てしても、人工臓器内に発生する血栓形成を完全に抑制することは非常に困難であり、Toyobo-NCVC VASでは、弁輪周囲部のように血栓形成に対し構造的に不利な部位への適用には限界があることも事実である。従って、これからの人工臓器開発においては、ナノ単位で表面改変が可能なナノサーフェステクノロジーと、構造学および流体工学的な見地からマクロ構造を改良するマクロサーフェステクノロジーを同時に見直すことが重要であり、ナノからマクロへ、マクロからナノへの技術の循環が、より安全で優れた次世代型デバイス開発に必要なものであると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各年度の報告書に記載のとおり

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

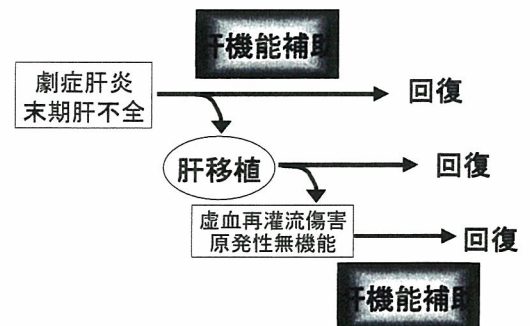
研究要旨：人工臓器は基礎科学の成果が統合されて臨床が要求するスケールと精度を達成したものである。その中で濾過や透析を基本とする血液浄化法は人工臓器の中でも完成度の高いものといえる。しかしながら、この機能は基本的に限外膜を介した物理化学的拡散による低分子の除去であり、肝および腎が行う血液浄化とは根本的に原理が異なる。ここに来て近年の移植医療の普及とともに、移植を支える補助的手段の必要性が増し、現状の血液浄化法の限界も見え始めている。そこで、新たな肝・腎機能補助デバイスの開発の開発に取り組んだ。肝・腎による生理的血液浄化は分化した細胞が有する特異機能、さらにつきつめればナノメータースケールの酵素やトランスポーターといった生体高分子機能によるものである。そこでこれら生体高分子と人工素材を組み合わせた非細胞性代謝機能代替デバイスの開発が本研究の目的である。その目的に向い、主に ABC トランスポーターのひとつの MDR1 を用い、トランスポーター分子を有する人工細胞（リポソーム）や機能性人工膜の構築と最適化、人工環境における分子移動エネルギー供給系の確立、トランスポーター分子の機能発現機構の解明、新しい医療機器素材となりうる生体高分子の探索、ナノスケールの人工構築物の可視化を遂行した。本報告は、本課題分担代表者の研究全体の総合報告という性格を生かすため、研究全体の軌跡を記しながら、各分担研究者の総合・総括報告の該当部分の引用に努める。

A. 研究目的

移植医療の普及とともに、移植を支える補助的手段の必要性が増している。腎移植後の無尿期を透析によって乗り切れることはよく知られている。移植手術にともなう保存や阻血再灌流によって障害された移植腎の機能が徐々に再生、回復すると考えられている。肝移植には補助療法として血漿交換があるが、肝移植後の機能補助としてさほど活用されていない。大量の血漿を必要とし、患者に対し治療自体の負荷も大きいからである。そこで、新たな肝機能補助療法の開発が望まれている（図1）。特に、我が国で年々増加している

成人間生体部分肝移植では、レシピエントに十分量の肝を移植できず、また生体ドナーであるが故に再移植も簡単なことではない。

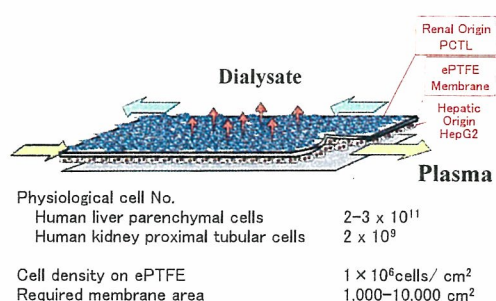
図1 本研究の標的としての肝機能補助



このためひとつの新しい医療技術として、

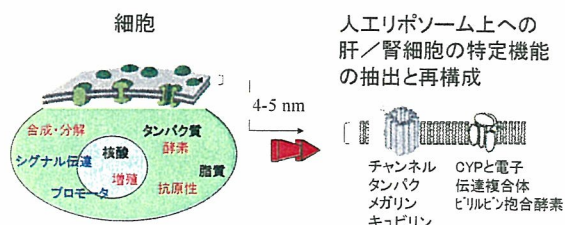
肝実質細胞を組み込んだバイオ人工肝が開発されている。当グループでも、第一世代型として回流式培養装置「キグナス」を開発し、細胞組み込み型人工臓器の生物学的効果を確認した（G. 研究発表、文献5参照）。さらに、実際の臓器により近い、第二世代型の2区画式培養装置「DCCA」を開発した（図2）。

図2 第二世代型バイオ人工肝補助装置の二区画式培養装置。肝細胞と腎細胞を膜を介して共培養することによって代謝と輸送を実現した。（G. 研究発表、文献6参照）



しかしながら、生きた細胞を組み込む人工臓器は、取り扱いに高度な技術を要し、汎用化に不向きである。そこで、細胞の有する特性を人工膜に付与し、機構的に簡素化した新しいバイオ血液浄化装置を開発することが本プロジェクトの目的である。すなわちナノレベルの機能性生体高分子を人工膜上で再構築し、人工膜に選択的・能動的な毒性物質の輸送を行わせるというものである（図3）。ジゴキシンなどの有機アニオン物質の輸送を行うトランスポーターMDR1を組み込んだ人工リン脂質膜は、ATPの存在下にジゴキシン、ベラパミルといった基質を輸送する。その原理を透析膜上に現出するために、分子そのものと周囲の環境の最適化、また、エネルギー輸送の自律性構築の為にポリリン酸-ポリリン酸キナーゼ系との共役反応の構築を行った。

図3 細胞から必要要素だけ取り出し、人工膜上に再構成する。



一方、生体由来のナノ部品を医療機器として生かす、もうひとつの試みも行った。現在、我が国では約22万人が人工透析を受けており、年々増加している。この背景には、糖尿病性腎症をはじめとする新規発症と、透析技術の進歩による長期透析患者の増加がある。腎臓の基本的機能は体内の老廃物除去と電解質平衡の維持であり、透析はこれらを代替するに優れた医療技術である。しかしながら、腎はこれだけに限らず、代謝内分泌機能も有している。そのうち、骨代謝や貧血に対しては、ビタミンD製剤やエリスロポエチンなどの投薬の効果が期待できる。しかしながら、長期透析患者で問題となっている透析アミロイドーシスは、腎の近位尿細管で代謝、再利用されるはずの血中のベータ2ミクログロブリンが関節などに蓄積することによることから、有効な予防・治療法がない（図4）。

図4 腎のタンパク再吸収機能と透析アミロイドーシス

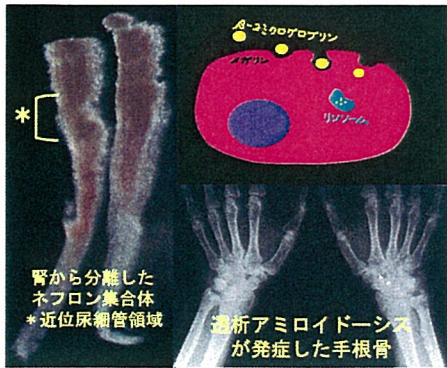
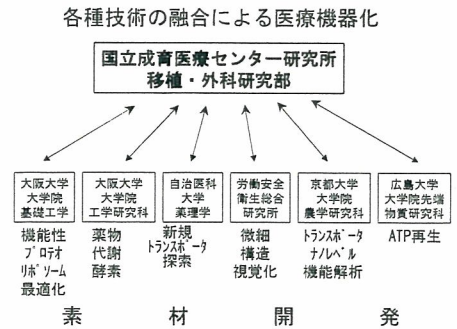


図5 研究体制



現在、同タンパクの吸着療法として、ヘキサデシルアミン分子を用いたビーズカラム（商品名リクセル）が使われる。ヘキサデシルアミンは、疎水性物質にアフィニティーを有する合成ポリマー分子で、基本的に、大多数の血清タンパクを吸着してしまう。そこで、分子量約3万以下の分子のみが接触するような多孔構造を持たせることによって、ある程度の選択性を実現している。しかしながら、血清中の中低分子量のタンパクの大部分は吸着するものと考えられ、生体にとって有用なタンパクも吸着除去している可能性がある。そこで、本研究では、ベータ2ミクログロブリンの生理的レセプターであるメガリンの主要アフィニティー部位であるクラスターIIを新たな吸着用リガンドとして利用することを目的として検討を行った。

B. 研究方法

1) 本研究グループの構成.

本研究はトランスポーター分子やエネルギー供給系、薬物代謝酵素などを実験に用いる程度の量を生産する技術、膜に固定化する技術、その機能評価、ナノスケールの構築物の視覚化など、医工が連携して推進する必要があった。そこで、図5に示す陣営で臨んだ。

2) 絵野沢分担研究.

プロテオリポソームの基質輸送を直接測定法の確立、リポソーム大量調製法の開発、膜上へのナノパーツ構築法の確立、ベータ2ミクログロブリンの生体由来リガンドとしてのメガリンの検討を行った。

3) 他の分担研究課題の相互関係.

阪大院基礎工学研究科、久保井亮一分担者はプロテオリポソームの脂質組成が活性への影響や、失活を抑制するための方法を検討した。阪大院工学研究科、大政健史分担者は複数酵素で構成される薬物代謝酵素系の再構築に影響する要素を調べた。自治医大、藤村昭夫分担者は抱合型ビリルビン輸送を行いうるトランスポーターの探索を行った。労働安全衛生総合研究所、三枝順三分担者はリポソーム、プロテオリポソームの視覚化による構造確認を行った。京大院農学研究科、植田和光分担者はトランスポーターの微細構造から見た活性発現機構の研究およびMDR1タンパク大量調製法の確立を行った。広島大学大学院先端物質科学研究科、黒田章夫分担者はMDR1などのトランスポーターの物質輸送に必要なATP供給系の人工膜上再構成を行った。

C. 研究成果

1) MDR1 プロテオリポソームの放射性ジゴキ

シン取込の確認.

従来 ATP 水解能で間接的に測定していたトランスポータ機能を、実際の基質輸送で調べる方法を確立した (図 6、詳細は平成 15 年度絵野沢分担報告参照)。また、実際の腎機能との比較を算出した (表 1)

2) リポソーム大量調製法の開発.

医療用透析カラムを用いて大量に安全性の高いリポソームを迅速に調製する方法を開発した (詳細は平成 15 年度絵野沢分担報告参照)。

図 6 MDR1 プロテオリポソームによる ATP 依存的ジゴキシン輸送

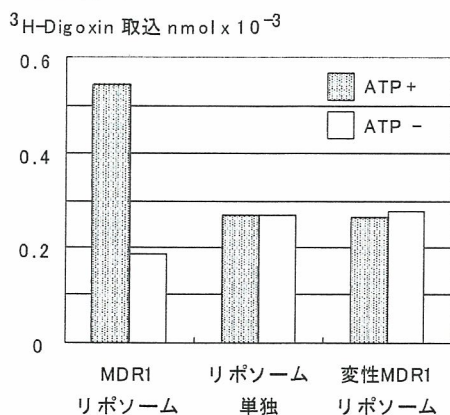


表 1 MDR1 リポソームと実際の腎機能との比較

腎近位尿細管細胞当たりの MDR1 タンパク分子数	50,000 個 (推定)
腎近位尿細管細胞の形状	直径 10 μm の球体
一腎当たり近位尿細管細胞数	2 × 10 ⁹ 細胞
リポソームの形状	直径 100nm の球体
リポソーム 1 個に固定化する MDR1 分子 (予想)	5 個
1 腎に相当するリポソーム数と体積	2 × 10 ¹³ 個、80 L

リポソームの調製は、有機溶媒を用いる方法が一般的だが、医療用を目的とした場合は、残留性などの問題から透析による方法が安全

と考えられる。そこで、透析効率が極めて高い人工透析カラムを用いる方法を考案した。この方法によると、迅速かつ連続的にリポソームが得られることがわかった。またこうして得られたリポソームは、直径 140nm 前後の均一なものであった (図 7)。膜構造は、理論的な脂質二重層ではなく、4-6 層の多重層と観察されたが、内部は中空であった。

図 6 透析カラムによるリポソームの大量調製法の概略 (特願 2004-033439)。

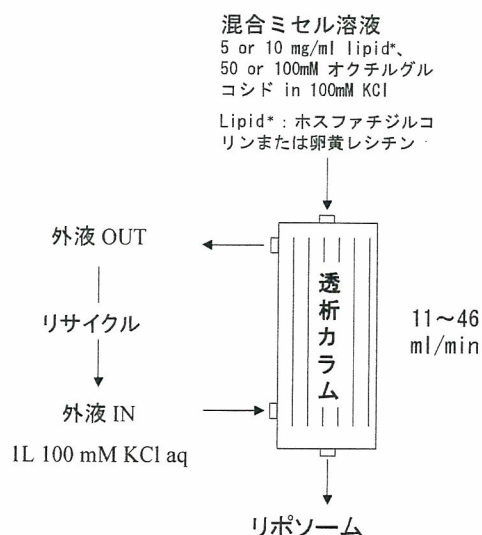
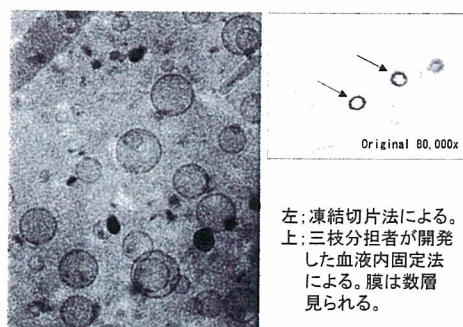


図 7 透析カラム法で得たリポソームの電顕像。

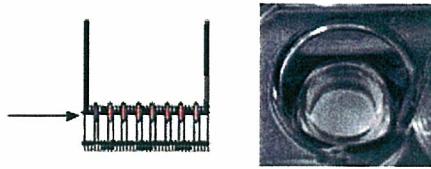


3) 透析カラム化に向けた MDR1 固定機能性膜の構築と評価

アルミナベースの親水性膜、アノディスク (Whatman 社製) を基板に用いた (図 8、詳

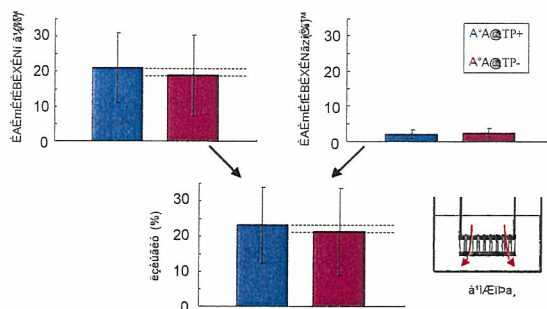
細は平成 18 年度絵野沢分担報告参照)。

図 8 アノディスクを用いた MDR1 固定化機能性膜。→がアノディスク。



作製した膜の上面に放射性ジゴキシンと ATP を加え、膜下面への輸送能を見た(図 9)。ATP の有無で、上面に加えた総量の $21.1 \pm 10.0\%$ あるいは $18.9 \pm 11.5\%$ が下槽に移動した ($n=5$)。この時、膜自体に吸着されたジゴキシンは、どちらの場合も $2.1 \pm 1.1\%$ 、 $2.5 \pm 1.2\%$ と極めて低かった。これらを合わせ、添加ジゴキシンの除去量としては、 $23.2 \pm 10.7\%$ 、 $21.3 \pm 12.4\%$ であった。

図 9 MDR1 固定機能性膜による MDR1 輸送能

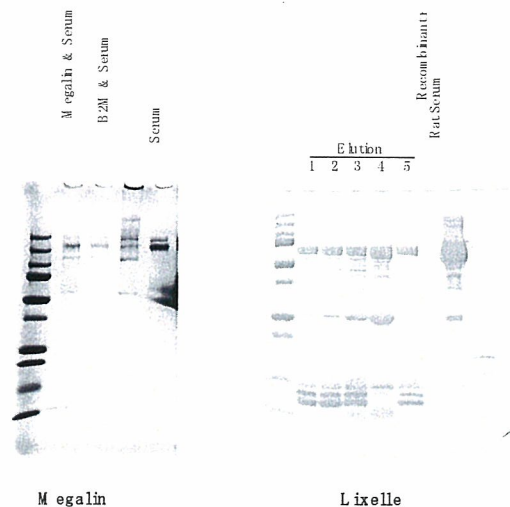


4) メガリンとベータ 2 ミクログロブリンの結合能に関する研究

リコンビナントタンパクとして作製したメガリンクラスターII と、比較として、現在臨床で使用されているベータ 2 ミクログロブリン吸着除去カラムのリクセルに充填されているビーズを取り出して、ラット血清と反応させた。メガリンには非特異的吸着は起きなかった(図 10 A 枠内)が、リクセルには非常

に多くのタンパクが吸着されていた(図 10 B 枠内)。ウェスタンブロッティング法によって確認したところ、メガリンとリクセルは同程度にベータ 2 ミクログロブリンを吸着していた(図 10 下段)(詳細は平成 17 年度絵野沢分担報告参照)。さらに、同リコンビナントタンパクを断片化して、ベータ 2 ミクログロブリンとの結合部位の特定を行っている(平成 18 年度絵野沢分担報告に経過を記載)。

図 10 血清の中低分子画成分タンパクに対する Megalin (A) とリクセル (B) の非特異吸着程度の違い。それぞれ枠で囲った部分は分子量 2 万以下の画分を示す。



D. 考 察

生体はナノメートルスケールの機能的あるいは構造分子が構成素材となり、マイクロメートルスケールの細胞を形成、さらに肉眼レベルである組織や臓器が構成されている。本研究は、この分子レベルからの統合を人工的に行い、物理的ふるい分けに依存している現在の血液浄化を生体高分子の有する選択性・能動性を利用した生物学的な力によるナノ代謝代替デバイスとして新規な血液浄化法の創生をめざすものである。同様の目的をもったも

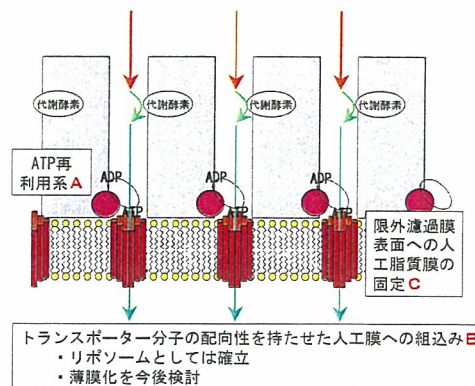
のとしてハイブリッド人工臓器という概念がある。これは主に肝を対象に開発が試みられているが、人工基材と細胞を組み合わせた人工臓器である。我々も以前よりハイブリッド（またはバイオ）人工肝の開発を行い、細胞の有する生物学的効果に現状の血液浄化法に勝るものがあることを示してきた。しかしながら、その研究過程で細胞を用いた機器は、製造、取り扱いが難しいことが欠点であることも明確になってきた。この必然的な結果として工業生産や品質管理が困難で、医療機器としての普及は難しいと考えている（表2）。

表2 現行の血液浄化法、細胞利用ハイブリッド人工肝、非細胞性ナノ代謝代替デバイスの比較

項目	優	>	劣	理由
予想される効果	ハイブリッド人工肝、 ナノ代謝代替デバイス	>	現行の血液浄化法	生体高分子が有する選択性、能動性
安全性	ナノ代謝代替デバイス	>	ハイブリッド人工肝	工業生産ラインにのせ、品質管理が可能
経済性	ナノ代謝代替デバイス	>	ハイブリッド人工肝	リポソームやリコンビナントタンパク生産技術が応用できる。

そこで我々は細胞表面に存在し細胞内外の物質輸送を行うトランスポーター分子を人工膜に固定化するという新規な発想を検討した（図11）。

図11 最終目標であるナノパーツ固定化機能性膜の概念図。技術的要素として、ATP 再利用系、膜へのナノパーツ固定、配向性の確保がある。それぞれの難度をA（近未来に達成）、B（やや難度が高い）、C（高難度）で示した。



再構成された人工合成膜であるナノ代謝代替デバイスに生きた細胞のように統合した選択的・能動輸送を行わせることが我々の目標である。

本研究では、MDR1 という生体で重要な物質輸送を担当するトランスポーター分子を取り上げ、固定化機能性膜のプロトタイプ構築を行った。生体反応を in vitro で再現する場合、反応エネルギーの供給が大きな問題となる。反応エネルギーとして代表的な ATP は、生体では、大部分がミトコンドリアで産生され、溶解した状態で必要箇所に供給されると考えられる。しかしながら、本研究の目的の機能性膜の場合は、ATP 供給系も膜近傍で局在化させることが望ましい。この点については、黒田分担者が平成 18 年度分担報告で、非常に有望な成果を報告しているので参照されたい。

リクセルは透析アミロイドーシスの原因物質であるベータ2ミクログロブリンを吸着除去する治療手段として開発されたカラムである。リクセルの本体は、高い疎水性を有するヘキサデシル基であり、形状を直径約 460um の多孔質セルロースとすることにより、主として分子量4,000-20,000のペプチドやタンパク質を吸着する。ただし、リクセルはβ2-M特異的ではなく、ヘキサデシル基に接触する分子をサイズ的に絞り込む設計であるため、

ベータ2ミクログロブリンと同程度の分子量の疎水性タンパクに対しては同様の吸着性を示すものと考えられる。実際、今回の研究で明らかになったように、やはり生理的リガンドは、生体機能の本態である特異性に優れることがわかった。メガリンそのものは、巨大分子であるが、今回用いたのはクラスターII部分（分子量2万余）である。現在、さらにそのアフィニティー決定部位を調べ、工業的応用が容易になるような中小ペプチド鎖にまで、限定化することを試みている。尚、メガリンの生理的リガンドは種々存在し、代表的なものとしてアルブミン（分子量68,000）がある。実際、今回の検討でもアルブミンとの結合がいくらか見られている。この点に関しては、リクセルと同様に、接触分子の分子サイズ分画を行うことによって、交差吸着の回避が可能と考えられる。

E. 結論

現状の限界膜の分子ふるい効果による血液浄化法を刷新する技術開発として、生体由来タンパクをナノパーツとして組み込んだ機能性膜による選択的・能動的血液浄化膜の構築に、医工連携チームを組み、取り組んだ。有機アニオントランスポーターMDR1と腎近位尿細管のタンパク再利用レセプター分子、メガリン、をモデル分子として、活性発現のための微細環境の最適化、エネルギー供給系の構築、リガンド特異性の検証などを行った。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表（一部）

- 1) 絵野沢 伸. 肝臓の中に腎臓を作る-透析アミロイドーシス克服に向けた再生医療からのアプローチ-. 腎と透析. 55(4): 631-635. 2003
- 2) 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-ICU と CCU 27; S9-10, 2003
- 3) Enosawa S, Takahashi N, Amemiya H, Motomiya Y. Transplantation of nonvascularized kidney tissue fragments into the rat liver with the aim of preserving renal function. Cell Transplantation 13:413-419, 2004
- 4) 林 美都子、絵野沢 伸. 体外血液浄化法の現状と人工細胞による非細胞系バイオ人工肝への期待. Organ Biology 12(2); 137-145, 2005
- 5) Enosawa S, Miyashita T, Saito T, Omasa T, Matsumura T. The significant improvement of survival times and pathological parameters by bioartificial liver with recominant HepG2 in porcine liver failure model. Cell Transplantation 15(10); 873-880, 2006
<http://www.nch.go.jp/MONTHREPT/bunken/p873-880.pdf> からダウンロード可能.
- 6) Takahashi M, Sakurai M, Enosawa S, Omasa T, Tsuruoka S, Matsumura T. Double-compartment cell culture apparatus: construction and biochemical evaluation for bioartificial liver support. Cell Transplantation 15(10); 945-952, 2006
<http://www.nch.go.jp/MONTHREPT/bunken/p945-952.pdf> からダウンロード可能.

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) 林 美都子、絵野沢 伸、島内寿徳、久保井 亮一. トランスポータータンパクを組み込んだプロテオリポソームによる非細胞系バイオ人工肝の構築. ワークショップ3. 人工臓器の現状と展望. 第11回日本臓器保存生物医学会総会(広島)平成16年5月21-22日

3) 絵野沢 伸. バイオの力を利用する体外型血液浄化法組立の方法論. シンポジウム. 細胞組織再生の現状と未来. 日本生物工学会第57回大会、筑波 平成17年11月15-17日

4) 絵野沢 伸. トランスポーターの医工学的利用. ワークショップ4. 薬物体内動態、代謝酵素とトランスポーター. 第12回日本臓器保存生物医学会総会、筑波 平成17年11月25-26日

5) 絵野沢 伸. 生体微細環境の再構成による選択的能動輸送血液浄化デバイス開発の試み. オーガナイズドセッション8. ナノテクと医

療の融合による機器開発. 第45回日本生体医工学会大会(旧日本エム・イー学会). 平成18年5月15日-17日、福岡

6) Saitou R, Enosawa S. An attempt of constructing biologically active membrane using recombinant transporter molecules. NANOBIO-TOKYO2006 Dec 4-7, 2006, Tokyo, Japan

7) 絵野沢 伸. からだの輸送を使った血液浄化. ナノメディスン公開講座—ナノテクが治す病気の治療— 東京コンファレンスセンター品川 2007年2月22日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 絵野沢 伸、林 美都子、島内寿徳、久保井 亮一. 中空糸透析カラムを利用したリポソームの製造方法. 特願2004-033439 平成16年2月10日出願

厚生労働省科学研究補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
総合研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発
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（大阪大学基礎工学研究科 教授）
島内 寿徳（大阪大学基礎工学研究科 助手）

研究要旨：

多剤耐性タンパク質 Multi-drug resistance protein 1(MDR1)の機能は細胞内からの毒性物質の汲み出しであり、人工臓器のナノバイオデバイスの候補として注目されている。モデル生体膜(リポソーム)に組み込む過程としてのミセル可溶化過程を誘電分散解析により検討した結果、双性イオンを有する界面活性剤 β -D-dodecyl-maltosideが適する事が分かった。次にMDR1を組み込んだリポソーム(プロテオリポソーム)を調製した。MDR1の脂質膜配向性の検討から、MDR1は血液中の薬物をリポソーム内水相に除去が可能であり、その除去効率や速度過程が脂質組成(ドメイン形成性)に依存することが示された。そこで、最もドメイン形成性が高く、MDR1の境界脂質でもあるジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)を含んだジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)/DOPE系を用いてプロテオリポソームを調製した。プロテオリポソームの凝集抑制と連続除去操作を目的として、ゲル担体への固定化条件を検討した。また、ゲルの選定やカラム長などの考課を検討した。ゲル担体へのプロテオリポソームの固定化による凝集抑制の結果、100時間以上の連続透析操作が可能であった。さらに、各種共存タンパク質を含む模擬血流を用いた連続的透析除去操作試験から、直接血流をカラムに導入するよりも透析カラムと複合化することで除去効率を維持できることが分かった。これより、プロテオリポソーム固定化カラムが非細胞性人工臓器デバイスとして利用可能であることが示された。

A.研究目的

A-1.背景

肝・腎不全や敗血症、薬物中毒症の治療において透析・濾過と輸液・血漿輸血を組み合わせた血液浄化治療が死亡率低下に効果を発揮している。しかし、長期透析治療による弊害も指摘されており、新鮮血漿の大量消費や血漿性ウイルス感染、ならびに透析アミロイドーシスは克服すべき課題として残っている。一つの模索として、細胞を利用したバイオ人工肝の開発が行なわれているが、装置の煩雑

さ、細胞性感染に関する潜在的危険性は否定できない。そこで、細胞の機能から必要なものを抽出、再構築した人工細胞膜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ことが期待される。

その一つとして膜タンパク質の利用が挙げられる。ヒトの細胞には様々な膜タンパク質があり、多くはATPの加水分解によって得られるエネルギーを利用して、細胞内外の物質やイオンの輸送を行っている。その中でもABC(ATP結合カセット)タンパク質は薬物排出能を有しており、生体防御に深く関与して

いるので、人工肝/腎臓への応用が期待されている。

膜タンパク質の再構築の場として、モデル生体膜であるリン脂質二重層からなる閉鎖系小胞(リポソーム)を選んだ。必須機能を担う膜タンパク質を組み込んだリポソーム(プロテオリポソーム)の調製や応用方法についての研究は未だ十分なものとは言い難いのが現状である。したがって、プロテオリポソームは、バイオ人工肝が有する潜在的・技術的問題点を克服するための新しい切り口として期待される。

A-2. 研究目的

本研究では ABC タンパク質である MDR-1(Multidrug Resistance-1)を配向させたリポソームの機能(薬物排出能)評価と共に、凝集による機能低下を抑制するため、プロテオリポソームのゲル担体への固定化を試みた。プロテオリポソームのゲル担体への固定化の最適化を行った。次に、人工透析装置への応用を指向し、種々の操作法(短絡, 並列化など)によるモデル薬物の除去特性を検討した。

B. 研究方法

B-1. 試薬

主な中性リン脂質として、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1,2dimirystoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1,2-dioleoyl- *sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl ethanolamine (DOPE), を用いた。また、Egg phosphatidylcholine(EPC)は Avanti Polar Lipids 製を用いた。その他の特級試薬は和光純薬(Osaka, Japan)から購入した。また、膜タンパク質 MDR1 は植田ら(京大), および絵野沢ら(国立成育医療センター)より提供して頂いた。

B-2. リポソームの調製

B-2-1. 一般的なリポソームの調製

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。脂質の相転移温度以下の温度(ここでは-80°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°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(Sharom *et al.*, 1998)。DOPC/DOPEの混合脂質薄膜を水和し、凍結融解法、および超音波照射法によってリポソーム(粒径30nm)を調製した。それを界面活性剤 CHAPS と混合した。次に、MDR1をβ-dodecyl-D-maltosideに可溶化した後、脂質膜と混合し、透析を行なった。また、Na⁺/K⁺-ATPaseを組み込んだプロテオリポソームの調製に関しては、界面活性剤(C₁₂E₈)で可溶化したNa⁺/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。