

『人に届く』関大メディカルポリマーによる未来医療の創出

研究代表者：大矢裕一

研究分担者：岩崎泰彦・宇津野秀夫・柿木佐知朗・河村暁文・葛谷明紀・小谷賢太郎・田地川勉・平野義明・古池哲也・宮田隆志・鈴木 哲・奥野陽太・田岡裕輔

学外研究分担者：根本慎太郎・星賀正明・高井真司・朝日通雄・南 敏明・武内 徹・内山和久・宮武伸一・朝井 章・大槻周平・横田淳司・大須賀慶悟

1. はじめに

大矢裕一*1

2016年文部科学省の私立大学研究ブランディング事業の採択を得て始まった『人に届く』関大メディカルポリマー（KUMP）による未来医療の創出プロジェクトは、本年度で発足から10年目の節目を迎えた。本プロジェクトは、医学部を持たない関大の材料化学および機械工学の研究者と、大阪医薬大（発足時は大阪医大）などの臨床医との医工連携により、「人に届く」=実用化される医用器材の開発を目指した研究プロジェクトである。当初5年の文科省助成期間（実質4年）が終了した後も、関大ブランディング事業として継続し、研究場所と研究費の援助をいただきながら、活発に研究活動を行ってきた。

本プロジェクトが目指したことは、主として下記の4点である。

- ① 関大メディカルポリマー（KUMP）の研究基盤を築く
 - ② KUMP を関大のブランドとして周知させる
 - ③ KUMP での研究と学びを経験した、境界領域で活躍できる人材を社会へ輩出する
 - ④ プロジェクトで開発した医用器材を社会実装する
- これらのうち、①については、私立大学有数の研究環境・研究設備・人的資源（バイオマテリアル研究者数）を得て、数多くの研究論文を発表し、基礎研究としては十分な成果が得られたと自負している。②については、様々なイベント（学会・講演会、展示会、オープンキャンパス、KUMP シンポジウムなど）、論文・著作物、授業（本学、他大学、出前講義）、Web サイト（大学、プロジェクト）、SNS、広告媒体（ポスター、各種メディア）を通じて、研究者、企業、在学生、受験生、校友、一般市民に対してアピールし、十分とは言えないまでも、かなり浸透させることができた手応えを感じている。③に

ついても、KUMP の研究室で学んだ多くの学部生・院生や、特任教員として採用した若手研究者を産業界、学界に輩出してきた。KUMP 型 AO 入試による入学生も、一部は既に社会に出て活躍している。

最後の④が、周囲から最も期待され、かつ最もハードルの高い目標であるが、これについては 残念ながら十分な成果があったとまでは言い難い。大阪医薬大の根本先生が中心となって開発された「シンフォリウム」は2024年に実用化、販売が開始された。しかし、この事業は大阪医薬大と帝人メディカルテクノロジー(株)、福井経編興業(株)の3者で進められたものであり、著者がプロジェクト開始前に、この3者がコンソーシアムを結成した際（2014年）に、アドバイザーとして参画したご縁で、根本先生のご厚志により KUMP の一つに加えさせていただいたものであり、関大の寄与は少ない。

その他の KUMP の研究成果については、基礎研究として注目はされていても、残念ながら、まだ社会実装の道筋に踏み出したとは言い難い。上記の「シンフォリウム」の製造販売認可に至る過程は、コンソーシアム発足から10年後である。しかもこれは、AMED の「先駆的医薬品等指定制度」(www.amed.go.jp/seika/senkuteki_index.html) (2018年) を利用した、異例に早い実用化であった。この例でも、根本先生の最初の発案・基礎研究から十数年以上の年月が経過していることを考えると、10年程度の期間で医用材料の研究を実用化にこぎつけることは、極めて難しい挑戦であったことが理解していただけだと思う。10年間の間に KUMP から生まれた研究成果も、新しい知見を注ぎ込み、知恵を絞って粘り強く取り組めば、扉は開かれると信じて進みたいと思う。そして、その思いが、次の世代へと受け継がれていくことを期待している。

最後になりましたが、これまでに研究活動にご尽力いただきました本学、大阪医薬大、その他の共同研究先研究機関の先生方、共同研究企業の方々、研究室で日々実験に奮闘していただいた学生・卒業生・修了生の方々、

*1 化学生命工学部教授 博士(工学)

活動の資金と場所をサポートしていただいた学校法人関西大学、プロジェクトの運営を下支えしていただいた先端科学技術推進機構の職員、コーディネーター、URA、大阪医薬大の関係部局の方々、プロジェクトを応援していただいた校友の方々に、心より御礼を申し上げる。

2. 温度応答型インジェクタブルポリマーを基盤としたレボブピバカインの徐放性局所麻酔剤の開発

大矢裕一、能崎優太*²、松井祐介*³
信澤純人*⁴、戸部 賢*⁵、齋藤 繁*⁶

2.1. 緒言

近年、術後早期回復の概念が広く普及し、適切な術後鎮痛の必要性が叫ばれている。鎮痛法には、オピオイド、アセトアミノフェン、非ステロイド性抗炎症薬の全身投与、創部周囲への局所麻酔、末梢神経における疼痛知覚を抑制する神経ブロック、ならびに局所麻酔薬を用いた硬膜外鎮痛などがある¹⁾。現在、疼痛緩和のために様々な局所麻酔薬が使用されているが、その効果持続時間は長くても数時間程度である。そのため、持続的な鎮痛を得る目的でカテーテルを用いた連続投与が行われている。しかし、この方法は感染リスクや入院期間および医療費の増加といった問題点がある。新規の局所麻酔薬を開発して作用時間を延長しようとすると、しばしばその作用時間の延長に伴い毒性が増加する。そのため、薬物送達システム (DDS) を用いた徐放性局所麻酔薬は、作用時間延長の代替手段として注目されている²⁾。

徐放性ブピバカインを用いた局所麻酔は1990年代から研究されており、2011年に米国食品医薬品局 (FDA) の承認を受けて臨床使用に至った。徐放性ブピバカインは、リポソーム内に封入されており、体内でリポソームが徐々に分解されることで、ブピバカインが徐放される。しかし、複数の死亡例を含む重篤な副作用も報告されている。レボブピバカイン (levobupivacaine) は、ブピバカインのS体光学異性体のみを含む製剤であり、心毒性および神経毒性が低く、ブピバカインより安全である³⁾。

一方、疎水性の脂肪族ポリエステルと親水性ポリエチレングリコール (PEG) からなる両親媒性ブロック共重合体の一部は、その水溶液が温度応答性のゾル-ゲル転移を示すため、インジェクタブル (注射可能) ポリマー (IP) としての利用が期待されている。中でも生分解性を示し、室温 (25°C) では液体で、体温付近 (37°C) で

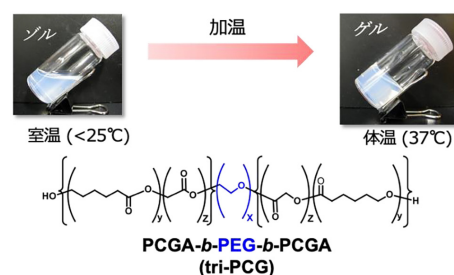


図1. 本研究で基材として使用している生分解性インジェクタブルポリマー PCGA-PEG-PCGA (tri-PCG)。

ゲル化する特性を有するものは、注射器で容易に体内に投与でき、投与後はゲル化して投与部位に留まるため、これに薬物を内包させると、持続的な薬物放出が可能になると期待される。こうしたIPの中でも、我々は、ポリ (ϵ -カプロラクトン-co-グリコリド) (PCGA) と PEG からなる ABA 型ブロック共重合体 (PCGA-*b*-PEG-*b*-PCGA, tri-PCG) (図1) の、IPとしての医療応用を検討してきた^{4,5)}。tri-PCGは、疎水性セグメントの適度な結晶性により、水溶液を凍結乾燥すると粉末状固体となり、水溶液中に迅速に溶解するという特徴を有している⁶⁾。

本研究では、tri-PCGを用いて、低毒性で長時間作用型のレボブピバカイン局所麻酔剤を開発した。調製した徐放性レボブピバカイン製剤の放出挙動を評価するとともに、ラット術後疼痛モデルにおいて、その鎮痛効果および副作用を検討した⁷⁾。

2.2. 実験

tri-PCGは、既報の方法に従い、ポリエチレングリコール (PEG、分子量 (MW) = 1,500 g/mol) をマクロ開始剤として、 ϵ -カプロラクトン (CL) とグリコリドとの開環共重合により合成した⁶⁾。tri-PCGの全分子量は5300 g/mol、CLおよびグリコール酸 (GA) の重合度は、それぞれ14および4.3であり、共重合体中のCL/GAのモル比は3.4であった。tri-PCG (25 wt%) を3.0 wt% レボブピバカイン含有生理食塩水に溶解することにより、徐放型レボブピバカインゲル (slow-release levobupivacaine gel, SRLBG) を調製した。

実験には体重250-300 gの雄Sprague-Dawleyラットを使用した。インフルラン麻酔下、ランドマーク法⁸⁾に従い、左坐骨神経周囲に0.2 mLの製剤を注射した。行動試験を担当する研究者は、薬剤投与内容について盲検化された。本動物実験は、群馬大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を得て実施された (承認番号23-003)。

術後疼痛モデルは、Brennanらの方法⁹⁾に従って作製した。このモデルでは、切開による疼痛が強く持続し、

*2 先端科学技術推進機構特任助教, 現職: 東北大学大学院薬学研究科助教 博士 (工学)

*3 高崎総合医療センター 麻酔科 医学博士

*4 群馬大学大学院医学系研究科 病態病理学准教授 医学博士

*5 群馬大学 医学部附属病院集中治療部准教授 医学博士

*6 群馬大学大学院医学系研究科 麻酔神経科学教授 医学博士

回避閾値の低下として機械的痛覚過敏が認められ、術後患者の疼痛評価と類似した時間経過を示す行動が観察される。薬剤投与後、インフルラン麻酔を維持したまま、左後足底の踵直下に1 cmの切開を加えた。続いて、足底筋を鑷子で持ち上げ剥離し、5-0絹糸を用いてマットレス縫合により創部を閉鎖した。

行動学的評価は、Tobeらの報告¹⁰⁾に従い、von Frey試験（機械刺激回避閾値試験）で実施した。切開疼痛の最も重要な特徴は機械的痛覚過敏であり、これは疼痛閾値の低下および閾値以上刺激に対する疼痛反応の増強として検出される。ラットはプラスチック製メッシュ床を有する個別のプラスチックチャンバー内に入れ、15分間環境に順応させた。機械的回避閾値は、校正済み von Frey フィラメントを用いて測定した。これらのフィラメントは長さが同一で直径の異なるナイロン製単繊維であり、直径が大きくなるにつれて屈曲に必要な力が増加する。フィラメントは、創部近傍に対して垂直に、フィラメントがわずかに曲がる程度の力で5~6秒間押し当てた。刺激に対して後肢を引っ込めた場合を陽性反応と判定した。50%の確率で回避反応を示す刺激強度（50%回避閾値）は、Chaplanらの報告したup-down法¹¹⁾を用いて算出した。実験群は、2.25% SRLBG群、0.25% レボブピバカイン群（臨床使用濃度）、tri-PCG単独群、薬剤非投与（シャム）群の4群とし、各群8匹を用いた。

投与部位周囲の筋および神経の病理組織学的評価を行った。病理評価では、SRLBG、tri-PCG、0.25%レボブピバカイン、2.25%レボブピバカインを、それぞれ2匹ずつ、前述のランドマーク法⁸⁾を用いて坐骨神経周囲に0.2 mL投与した。2.25%レボブピバカインは臨床使用濃度よりも著しく高濃度である。各群において、薬剤投与後48時間、1週間、2週間に、それぞれ2匹ずつ左坐骨神経周囲の大腿部組織を摘出し、組織学的変化を観察した。

2.3. 結果

温度を上昇させながら動的粘弾性測定を行った結果、レボブピバカイン塩酸塩-tri-PCG混合物において、貯蔵弾性率G'が損失弾性率G''を上回る温度（ゲル化温度）は30.8℃であった。この結果から、本製剤が37℃でゲル化することが示され、生体内でゲル化する徐放性製剤として使用可能であることが示唆された。

生理食塩水中でのSRLBGからのレボブピバカインの放出挙動を調べた（図2）。投与後1、2、6、12、24、36、48、60、72時間における平均放出率は、それぞれ15.1±0.1、20.6±3.9、36.1±2.3、48.3±3.2、62.8±1.9、68.4±2.4、71.2±1.8、71.0±1.8、70.8±1.7%であった。約50%のレボブピバカインが12時間以内に放出さ

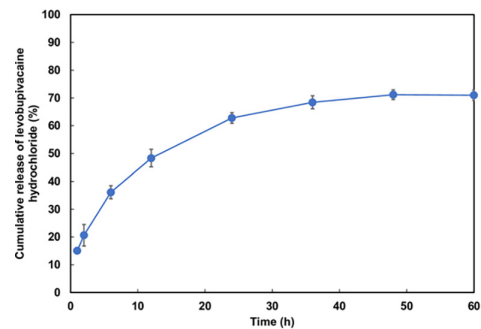


図2. 徐放型レボブピバカインゲル（SRLBG）からのレボブピバカイン *in vitro* 放出挙動⁷⁾.

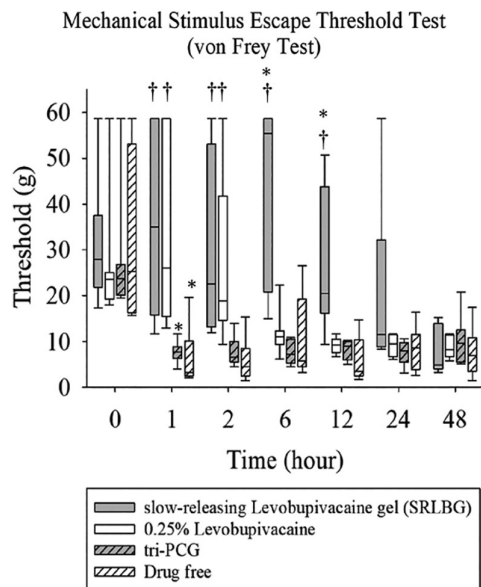


図3. 機械的刺激逃避閾値試験の結果（各群 n=8, 中央値および四分位範囲）。* $P < 0.05$ vs. 0.25%レボブピバカイン, † $P < 0.05$ vs. sham, Holm-Sidak 検定運動障害スコア⁷⁾.

れ、24時間以内には60%以上が放出された。放出速度はやや速いものの、一定の徐放性は達成された。

疼痛閾値評価試験の結果を図3に示す。Tobeらの既報では、術後疼痛ラットモデルにおける回避閾値は術後2~48時間で5~10gであった。本研究においても、薬剤非投与（Sham）群の回避閾値に有意な変化は認められなかった。投与後6、12時間において、SRLBG群の後肢回避閾値は、0.25%レボブピバカイン群と比較して有意に高かった。24時間後にはSRLBG群でやや高い傾向が認められたが、有意差は認められなかった。tri-PCG群とシャム群の間に有意差はなかった。一方、投与後2時間では、0.25%レボブピバカイン群の疼痛閾値はtri-PCG群より有意に高かったが、6時間以降では有意差は認められなかった。

運動障害評価の結果を図4に示す。tri-PCG投与群では、全観察期間を通じて麻痺は認められなかった。投与後1時間では、SRLBG群のうち1匹で高度運動障害、

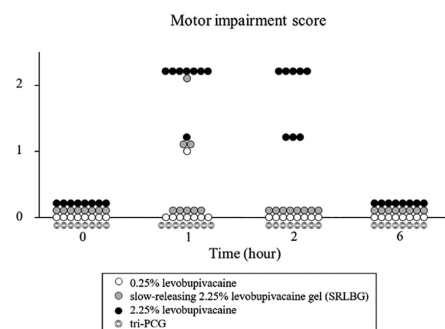


図4. 各群の運動障害スコア。0；正常，1；部分的遮断，2；重度遮断（各群 n = 8）⁷⁾。

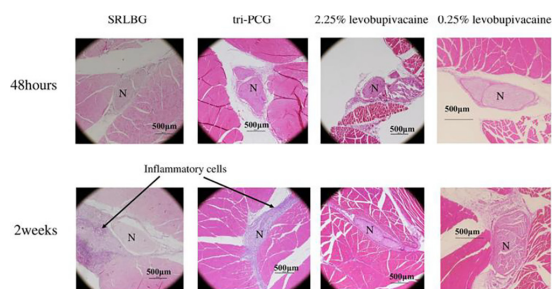


図5. 各群における投与後48時間および2週間の薬剤投与部位の組織病理学的評価⁷⁾。

2匹で部分的運動障害が認められた。一方、0.25%レボブピバカイン群では1匹に部分的運動障害が認められたのみで、残り7匹は正常であった。しかし、投与後2時間以降では、0.25%レボブピバカイン群およびSRLBG群のいずれにおいても運動障害は認められなかった。2.25%レボブピバカイン群と比較すると、投与後1時間および2時間における運動障害スコアはSRLBG群で低かった。投与後6時間では、いずれの群でも運動障害は認められなかった。

薬剤投与後48時間および2週間に採取した病理組織標本の写真を図5に示す。1週間後および2週間後の所見に大きな差がなかったため、48時間後および2週間後の結果を示した。投与後48時間では、すべての群において投与部位に炎症細胞浸潤が認められた。投与後2週間では、SRLBG群およびtri-PCG群において炎症細胞浸潤が認められたが、0.25%レボブピバカイン群および2.25%レボブピバカイン群では認められなかった。炎症細胞浸潤は観察されたものの、神経および周囲筋組織への影響は重篤ではなかった。

2.4. 考察

本研究では、長時間作用型局所麻酔薬であるレボブピバカインの作用時間を延長する目的で、基材としてtri-PCGを選択し、インジェクタブル徐放性製剤の作製を試みた。

作成した製剤は、体内でのゲル化が確認されたことか

ら、投与後に薬剤が投与部位に留まることが期待される。徐放性レボブピバカインは、現在臨床使用されている徐放性ブピバカイン製剤と比較して、心毒性や中枢神経毒性といった副作用が少ないことが期待される。また、注射可能であるため、近年再評価され、実施頻度が増加している超音波ガイド下末梢神経ブロックへの応用が可能であり、幅広い臨床場面での使用が期待される。安全性が確認できれば、硬膜外腔や末梢神経近傍への投与も可能となる。

現在、作用時間延長のために用いられている留置カテーテルによる持続投与と比較すると、本製剤は感染リスクの低減、患者体動による偶発的抜去の回避、不快なカテーテルを必要としないことによる患者QOLの向上といった利点を有すると考えられる。

in vitro 放出試験では、SRLBGから累積レボブピバカイン量の約半分が12時間以内に放出された。臨床で使用されている0.25%レボブピバカインの作用時間が約3時間であり、SRLBGでは12時間で約半分が放出されることから、0.25%レボブピバカインが持続的に投与されている状態に近いと推測される。

In vivo 行動学的評価においても、SRLBGは投与後6時間および12時間で0.25%レボブピバカインより有意に疼痛閾値を上昇させた。これは薬剤作用時間の延長に成功したことを示しており、in vitro 試験結果と整合する。24時間後においてもSRLBG群では他群より高い傾向が認められたが、統計学的有意差は認められなかった。運動障害については、臨床で一般的に使用される0.25%レボブピバカインと比較して大きな差は認められなかった。また、2.25%レボブピバカインと比較すると、SRLBGの運動障害は軽度であった。

病理評価では、臨床使用濃度では問題が生じないと考えられたため、高濃度群との比較を行った。投与後48時間では、すべての群で炎症細胞浸潤が認められたが、2週間後ではSRLBG群およびtri-PCG群で炎症細胞浸潤が残存していた。これは、異物に対する反応が長期化したためと考えられる。これらの長期炎症所見は、基材に対する反応を示唆するものである。病理医の評価によれば、徐放性レボブピバカイン投与部位周囲に軽度の炎症細胞浸潤は認められたものの、神経および周囲筋組織への影響は最小限であった。臨床応用に向けては、より多くの個体数を用いた大型動物での検討が必要である。

2.5. 結論

新規徐放性レボブピバカイン製剤の単回投与は、ラット術後疼痛モデルにおいて、約12時間にわたり比較的安全に痛覚過敏を抑制した。周囲組織への影響についてはさらなる研究が必要であるが、安全性および有効性の観

点から、徐放性局所麻酔薬は術後疼痛管理において有望である。

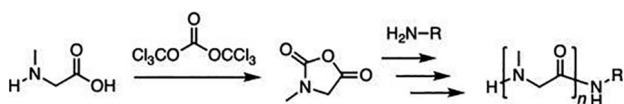
3. ポリサルコシン修飾がタンパク質の構造と活性、及び免疫応答に与える影響

奥野陽太*7、岩崎泰彦*8

3.1. 緒言

タンパク質医薬品はタンパク質の持つ薬理活性や酵素機能を用いた医薬品であり、低分子医薬品には無い薬効を持つため注目されている。例えば、L-アスパラギン分解酵素であるアスパラギナーゼは、血中のアスパラギンを分解する性質を利用して、急性リンパ性白血病の治療に用いられる。しかし外部から投与したタンパク質は肝臓や腎臓によって速やかに除去されるため血液滞留性が悪いうえ、タンパク質に対する免疫応答を引き起こす事がある。この課題の解決のため、タンパク質に高分子を結合させるバイオコンジュゲーションが試みられてきた¹²⁾。研究でも実用においても、バイオコンジュゲーションに適用されるポリマーの多くは poly(ethylene glycol) (PEG) であり、血中滞留性を向上させタンパク質の免疫原性を抑制する点で一定の成果を収めている。しかし、近年就職した PEG に対しての免疫応答、続く抗体産生が患者のアレルギー反応や、投与した薬物の血中滞留性を低下させることが報告されており、この改善が必要となっている¹³⁾。

このような経緯から PEG に代わるポリマーの探索が行われている。Poly(sarcosine) (PSAR) はポリグリシンのアミド窒素上の水素をメチル基に置換した構造を持ち、PEG 同様に非イオン性でありながら高い親水性を示す点で PEG 代替ポリマーとして注目を集めている。さらに、N-carboxy anhydride (NCA) 重合法を用いれば、任意の重合度の分子を狭小な分子量分布で得ることができる (スキーム 1)。



スキーム 1. Sarcosine を原料とした sarcosine N-carboxy anhydride の合成と、その開環重合による poly(sarcosine) の重合。

先行研究では、リポソーム表面に PSAR と PEG とをそれぞれ別に修飾したサンプルをマウスに投与したところ、PSAR は PEG に比して抗ポリマー抗体の産生を抑

制でき、補体系を活性化しにくいことが報告された^{14,15)}。しかし、PSAR をタンパク質に結合させ、タンパク質の活性や免疫原性を調べた研究は殆ど存在しない。PSAR 修飾によってタンパク質の機能の基となっている構造が壊れないか、あるいは酵素活性が消失しないかを知ることは、タンパク質に対して PSAR 修飾を検討するうえで重要な基礎的知見である。また、PSAR 修飾によってタンパク質の免疫原性を抑制できるのか、あるいは PSAR 自体が免疫応答を惹起しないかを把握しておかなければならない。そこで本研究ではこれらの解明を目指して、モデルタンパク質である牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) 及び卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) に PSAR を修飾し、タンパク質の構造と活性の変化、PSAR 修飾タンパク質に対する免疫応答について評価を行った。

3.2. Poly(sarcosine) を修飾した bovine serum albumin の二次構造と酵素活性

BSA への PSAR 修飾にあたっては、PSAR の C 端カルボキシ基と BSA のもつ一級アミン間の縮合反応を利用する戦略をとった。従って、PSAR の C 端にカルボキシ基を残存させるため、N,N-dimethyl formamide 中に溶解した sarcosine NCA (SAR-NCA) に水を添加し、SAR-NCA の一部から in situ で sarcosine を生成したものを開始剤として用いた。得られた PSAR の N 端はグリコール酸で封止し、後の縮合時に PSAR 間で縮合反応が進行しないようにした。得られた PSAR はサイズ排除クロマトグラフ (SEC) による分析から重量平均分子量 8000 で分子量分布は 1.2 と精密重合できた。

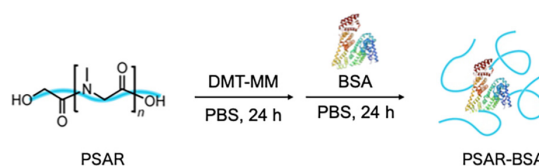


図 6. 牛血清アルブミン (BSA) に poly(sarcosine) (PSAR) を結合する概念図。

このように合成した PSAR の C 端カルボキシ基を縮合剤である DMT-MM で活性化した後、BSA の溶液と混合することで PSAR 修飾 BSA を得た (図 6)。この際、BSA に対する PSAR 混合比を変化させることで、BSA 1 分子あたりの PSAR 修飾本数の制御を試みた。得られた PSAR 修飾 BSA はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) から精製の完了と分子量の増大を確認した。さらにピシニコニン酸法 (BCA 法) から、BSA 1 分子あたりの PSAR の修飾本数は 9、18、22 本であるとわかった。

*7 化学生命工学部助教 博士 (工学)

*8 化学生命工学部教授 博士 (工学)

そこで得られた PSAR 修飾 BSA の流体力学的サイズを動的分散法 (dynamic light scattering ; DLS) で評価した。結果、コントロールの BSA の 6.5 nm に対して、PSAR 修飾数の増大に伴って流体力学的サイズは 7.0、7.8、10.3 nm と増大した。先行研究で血中滞留性改善には流体力学的サイズの増大が重要であることが報告されているが、PSAR 修飾によっても当然ながらこのサイズを制御できた。一方、PSAR 修飾数の増大は BSA の二次構造を損なう可能性がある。そこで深紫外円二色性スペクトル (CD スペクトル) の測定を行い、BSA の二次構造の変化について確認を行った。図 7 に示す通り、ネイティブの BSA は α ヘリックスに富む構造であるが、PSAR 修飾数増大に伴って若干 α ヘリックス分率が減少しているとわかる。223 nm のモル楕円率の絶対値を 100 とした際、PSAR 修飾数増大に伴ってこの割合は低下し、PSAR 修飾数 22 本の条件では 78 と約 20% の α ヘリックスが損なわれているとわかった。しかしながら、構造全体を損なう程度ではないと考え、BSA の酵素機能であるエステラーゼ活性の評価に移った。基質として *p*-nitrophenyl acetate を選択し各種濃度で測定した初期反応速度を Michaelis-Menten モデルで解析することで酵素反応速度に関するデータを整理した。その結果、酵素能を示す代表値である K_{cat}/K_m [$M^{-1}s^{-1}$] について、ネイティブのコントロールに対して PSAR 修飾 BSA でも 80% 以上維持しており、BSA の酵素能は一定維持されているとわかった。ここまでの結果から、モデルタンパク質として選定した BSA に PSAR を 9、18、22 本修飾すると、PSAR 修飾数の増大に伴って流体力学的サイズを増大させることができ、二次構造と酵素活性は 80% 程度維持されることが確認できた。

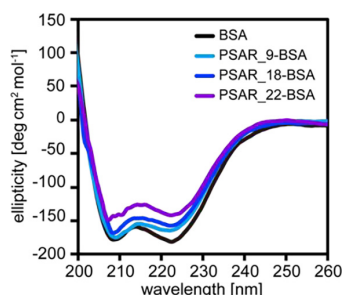


図 7. PSAR 修飾前後での円二色偏光スペクトル. BSA はネイティブの BSA, PSAR_x-BSA は BSA 1 分子あたり x 本の PSAR が修飾された BSA サンプルを示す。

3.3. Poly(sarcosine) を修飾した ovalbumin に対する免疫応答

続いた PSAR 修飾したタンパク質の免疫原性、及び修飾した PSAR 自体に対する免疫応答を調べることに

した。モデルタンパク質としては免疫の研究で広く用いられるタンパク質の OVA を適用することとした。PSAR 修飾に当たっては分子量の影響を確認するため SEC による PEG 換算重量平均分子量で 9000、5000 のものを合成した (以下 PSAR5k、PSAR9k と表記)。また比較のため重量平均分子量 5000 の PEG (PEG5k) も準備した。いずれのポリマーについてもポリマー末端に導入したカルボキシ基を縮合剤である di(*N*-succinimidyl) carbonate で活性化し、OVA の一級アミンとの反応に用いた。BSA の場合と同様に BCA 法によって修飾量を定量したところ、いずれのポリマーの修飾数も 21 本で同じであった。続いて DLS による流体力学的サイズの評価を行ったところ、PEG5k-OVA、PSAR5k-OVA、PSAR9k-OVA でそれぞれ 11.0、8.7、11.1 nm であった。これは興味深い結果で、SEC 測定より PSAR9k はポリマーとして PEG5k と同じサイズであるにも関わらず OVA に結合させると同等の流体力学的サイズであることを示す。すなわち、PSAR9k-OVA は PEG5k-OVA より密なポリマー層を形成していると推察される。

ここまでのキャラクター化を経て、ポリマー修飾 OVA、ネイティブの OVA、生理食塩水 (saline) を Balb/c マウス (7 週齢、雌) に図 8 (a) の条件で皮下投与し、一定日後に血清を採取した。血清中に含まれる抗体の量は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) で評価した (図 8 (a))。抗 OVA 抗体については、IgM では明確な効果が見られなかったが、IgG で顕著な違いが見られた (図 8 (b))。特に 2 回目投与から 7 日後 (22 日目) の血清中の抗 OVA-IgG に注目すると、ポジティブコントロールの OVA 投与群に対して、ポリマー修飾 OVA 投与群はいずれのポリマーを修飾した場合でも抗体産生量が有意に低かった。特に PSAR9k-OVA 投与群は PSAR5k-OVA や PEG5k-

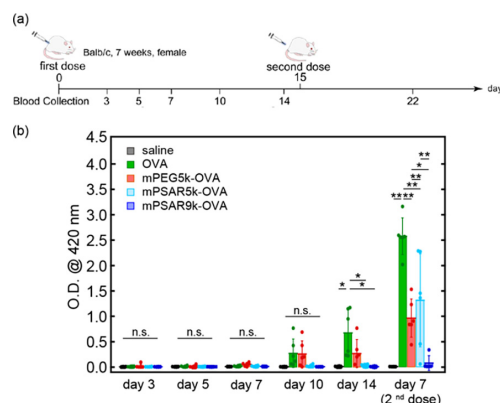


図 8. (a) ポリマー修飾 OVA のマウスへの投与及び採血のスケジュール. (b) 各日で回収した血清サンプルから enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) で検出された、(b) 抗 OVA-IgM.

OVA と比較してさらに有意に低く、ネガティブコントロールである saline 同等であった。これは上述した OVA 表面の密な PSAR 被覆層が、免疫系から OVA を遮蔽した効果であろうと考えている。

同様に抗 PSAR、PEG 抗体についても ELISA 法で評価を行った。抗 PEG 抗体は従来の報告通り 3 日目から IgM の産生、10 日目から IgG の顕著な産生が確認された。抗 PSAR 抗体については、5 日目から少量であるものの IgM が産生され、2 回目投与後には抗 PSAR-IgG が顕著に発現した。PEG との抗体産生量の比較については、本実験デザインから、厳密な比較はできなかった。抗 PSAR 抗体の産生量は PSAR の分子量で有意な差は見られなかった。

3.4. まとめ

本研究では、合成した PSAR をモデルタンパク質である BSA に結合させた PSAR 修飾 BSA が二次構造と酵素活性を 80% 以上維持できた。さらに、PSAR 修飾 OVA をマウス皮下に投与した結果、PSAR 修飾 OVA はネイティブの OVA に比べて大幅に抗 OVA 抗体を低減できた。さらに PSAR の分子量を大きくすることで OVA の免疫原性を強力に抑制できると示した。しかし、PSAR の抗体産生については本研究から依然として課題となり得ることが示され、PEG を単純に PSAR に置換するだけで抗ポリマー抗体を抑制できるわけではないことがわかった。特に、PSAR9k-OVA では OVA に対する抗体は殆ど発現しなかったにも関わらず、抗 PSAR 抗体は発現した。これは PSAR が必ずしも免疫に対して完全にステルスではないことを示している可能性がある。

3.5. 謝辞

免疫原性の評価については、京都大学医生物学研究所の安藤 満 博士のご助力のもと実施されました。ここに御礼申し上げます。

4. 逆ミニエマルション重合を利用した親水性ネットワークからなる分子応答性マイクロゲルの調製¹⁶⁾

河村暁文*⁹、宮田隆志*⁹

4.1. はじめに

温度や pH などの外部刺激に応答して体積変化する刺激応答性マイクロゲルは、薬物キャリアや診断材料などの幅広い分野への応用が期待できる。われわれはこれまでに、ソープフリー乳化重合により、グルコースに応答して膨潤するグルコース応答性マイクロゲル¹⁷⁾や酸性かつ還

元環境に応答する二重刺激応答性マイクロゲル¹⁸⁾の調製に成功している。これらのマイクロゲルは、比較的疎水的なネットワークから構成されている。疎水的な分子はマイクロゲルネットワークに非特異的に吸着して体積変化を引き起こすため、一般的なソープフリー乳化重合では、疎水的な標的分子を認識するマイクロゲルを調製することが困難であった。一方、われわれはこれまでに、双性イオンポリマーと側鎖 PEG メタクリレートポリマーとからなる水溶性ブロック共重合体が水/クロロホルム 2 相系において乳化剤として機能することを見出した¹⁹⁾。この水溶性乳化剤を用いて、逆ミニエマルション重合により親水性の双性イオンポリマーからなるコアと側鎖 PEG メタクリレートポリマーからなるシェルとを有するコア-シェル型マイクロゲルの調製に成功している²⁰⁾。本研究では、poly (sulfobetaine methacrylate) (PSB) と、poly [oligo (ethylene glycol) methacrylate] (OEGMA) および 2-(2'-methoxyethoxy) ethyl methacrylate (MEO₂ MA) の共重合体 (POEG) とからなる水溶性ブロック共重合体 (PSB-POEG) を合成し、W/O エマルションの形成について検討した。また、逆ミニエマルション重合により親水性ネットワークからなる β -cyclodextrin 含有 poly(acrylamide) ミクロゲル (CD-PAAm ミクロゲル) の調製とそのビスフェノール A (BPA) 応答挙動を評価した。

4.2. PSB-POEG の合成とその界面活性

[2-(Methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide, 4-cyano-4-(thiobenzoylthio) pentanoic acid および 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) を用いて可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により PSB macroRAFT 剤を合成した。次に、PSB macroRAFT 剤、OEGMA、MEO₂ MA および ACVA を用いて RAFT 重合により PSB-*b*-POEG を合成した。¹H NMR および GPC 測定により PSB-*b*-POEG の生成が確認され、PSB および POEG 重合度はそれぞれ 56 および 105 であり、POEG 中の OEGMA の割合は 65% と算出された。得られた PSB-POEG を添加した際のリン酸生理食塩水 (PBS(-))/クロロホルム 2 相系の

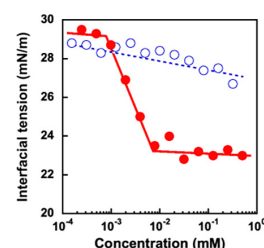


図 9. PSB (○) および PSB-POEG (●) の濃度と水/クロロホルム界面の界面張力との関係

*9 化学生命工学部教授 博士 (工学)

界面張力変化を懸滴法により測定した(図9)。その結果、PSB-POEG濃度の増加にともなって急激に界面張力が低下し、PSB-POEGがPBS(-)/クロロホルム界面を安定化することがわかった。したがって、PBS(-)/クロロホルム2相系においてPSBブロックが水相に、POEGブロックがクロロホルム相に分配されることにより、PSB-POEGが乳化剤として作用したためと考えられる。そこで、PSB-POEGのPBS(-)溶液をクロロホルムに添加した後、超音波照射したところ、粒径500 nm程度の水滴が分散したW/Oエマルジョンが形成することがわかった。

4.3. 逆ミニエマルジョン重合によるCD-PAAmマイクロゲルの合成

われわれはこれまでに、水中においてCDがBPAと2:1の包接錯体を形成することに着目して、バルクサイズのCD含有PAAmゲルを調製した。このゲルは、BPA水溶液に浸漬するとCD-BPA-CD複合体を形成し、これが動的架橋点として作用することにより収縮する²¹⁾。このBPA応答性ゲルを微小化するために、従来のソープフリー乳化重合によりpoly(diethylaminoethyl methacrylate)を主ネットワークとするCD含有マイクロゲルを調製したところ、CDリガンドの有無にかかわらずマイクロゲルが収縮することがわかった。これは、疎水性相互作用により非特異的にBPAがマイクロゲルネットワークに吸着したためと推察される。そこで、逆ミニエマルジョン重合によるCD-PAAmマイクロゲルの調製を着想した。

両親媒性の界面活性剤を用いた逆ミニエマルジョン重合により親水性ネットワークからなるマイクロゲルを調製すると、その表面には界面活性剤が吸着している。このマイクロゲルを水中に再分散させるためには、極性の高い

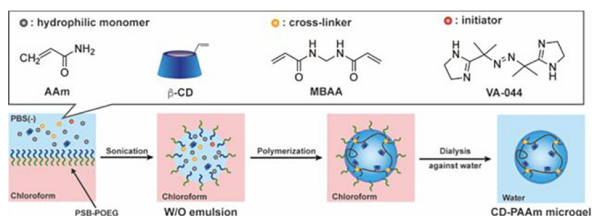


図10. CD-PAAmマイクロゲルの調製

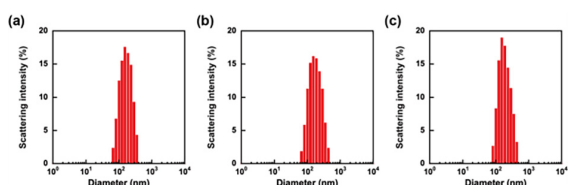


図11. CD-PAAmマイクロゲルの粒径分布。(CD含有率: 0 mol% (a); 5.0 mol% (b); 9.8 mol% (c))

有機溶媒を用いてマイクロゲルを洗浄して界面活性剤を除去必要がある。一方、水溶性乳化剤であるPSB-POEGを用いたミニエマルジョン乳化重合では、PSB-POEGが水に溶解するため、マイクロゲル調製後に直接水に再分散できる。そこで、PSB-POEGを用いた逆ミニエマルジョン重合により、CD-PAAmマイクロゲルの調製を試みた(図10)。PSB-POEG、AAm、アクリロイル基を有するCD、*N,N'*-methylenebisacrylamide (MBAA) および 2,2'-azobis [2-(2-imidazolin-2-yl) propane] dihydrochloride をPBS(-)に溶解させ、クロロホルムに添加した後、超音波照射によりW/Oエマルジョンを形成させた。得られたW/Oエマルジョンを40°Cに加熱して、エマルジョン液滴内部のモノマーを共重合させ、CD-PAAmマイクロゲルを調製した。その後、超純水を加えたのち、クロロホルムを減圧留去してCD-PAAmマイクロゲルを水中に再分散させた。

図11には、反応終了後に連続相をクロロホルムから超純水に置換した際のCD-PAAmマイクロゲルの粒径分布を示した。図より、粒径150 nm程度のマイクロゲルが得られたことがわかる。したがって、PSB-POEGを乳化剤としたW/Oエマルジョンの水滴内部のモノマーが共重合し、水中に分散可能なCD-PAAmマイクロゲルが得られたことがわかった。

4.4. CD-PAAmマイクロゲルのBPA応答性

図12には、CD-PAAmマイクロゲルおよびCDを含まないPAAmマイクロゲルの分散液に、BPAを添加した際の膨潤率の経時変化を示した。図より、PAAmマイクロゲルの膨潤率はBPA添加後にほとんど変化しないのに対して、CD-PAAmマイクロゲルの膨潤率はBPAの添加後に迅速に減少することがわかる。また、CD-PAAmマイクロゲル中のCD含有率の増加にともなって膨潤率がより低下した。したがって、CD-PAAmマイクロゲルはBPAに反応して迅速に収縮することが明らかになった。これは、CD-PAAmマイクロゲル中のCDと添加したBPAとがCD-BPA-CDからなる包接錯体を形成し、これが動的架橋として作用して架橋密度が増加したためと考えられる。また、CD含有率の増加にとも

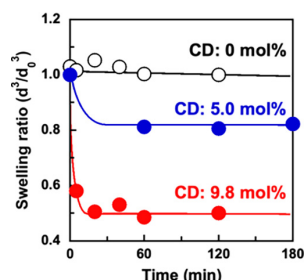


図12. CD-PAAmマイクロゲルのBPA応答挙動

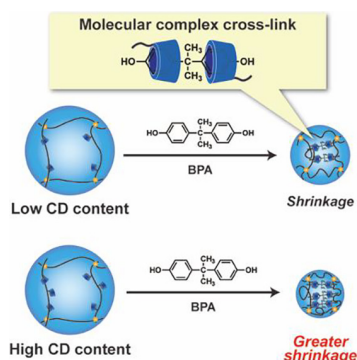


図13. CD-PAAm ミクロゲルの BPA 応答挙動の模式図

なって、BPA の添加により CD-BPA-CD 複合体架橋数が増加して架橋密度が高くなるために、より大きく収縮したと考えられる (図13)。

4.5. おわりに

本研究では、水溶性乳化剤である PSB-POEG を合成し、その PBS(-)/クロロホルム 2 相系における界面活性を明らかにした。また、PSB-POEG により安定化された W/O エマルジョンの調製に成功し、これを利用した逆ミニエマルジョン重合により BPA に応答して収縮する CD-PAAm ミクロゲルを調製できることを明らかにした。このような親水性ネットワークからなる CD-PAAm ミクロゲルは、BPA に限らず CD と複合体を形成できるため、疎水性薬物のデリバリーキャリアへの応用が期待できる。また、PSB-POEG を用いた逆ミニエマルジョン重合では、CD のみならず抗原や抗体などの生体分子リガンドも導入できるため、分子センサーや診断材料などへの応用も期待できる。

5. ペプチドハイドロゲルによる膝蓋腱損傷治癒効果

平野義明*10、石谷 貴*11、大槻周平*11

5.1. 緒言

筋骨格系は、人体を形づくり、安定させ、動作を可能にし、骨と筋肉、腱、靭帯、関節、軟骨、その他の結合組織から構成されている。半月板、腱、靭帯はいずれも運動器系を構成する重要な組織であり、共通して結合組織の構成要素である。これらは主にコラーゲン線維を含み、強度と柔軟性を兼ね備えており、関節や骨、筋肉の動きを支える役割を果たしている。また、スポーツや外傷によって損傷しやすい組織であることも共通している²²⁻²⁴⁾。半月板、腱、靭帯ともに血流が乏しいという特徴を考えた場合、現在の外科的手術による標準治療ではなく、組織の再生を含めた新たな治療方法が必要であ

る。ペプチドハイドロゲルを用いた半月板の再生治療は一定の効果が認められたが、大動物への適用に関しては力学的強度に問題があることが明らかになった²⁵⁾。そこで、軟骨や腱など適用範囲の拡大を検討するため、関節周辺組織に対する治療効果についても検証を行った。

細胞接着モチーフ RGDS を配列内に有する自己集合性ペプチドハイドロゲル KI24RGDS の腱組織修復促進作用を、ウサギ膝蓋腱全層欠損モデルにおいて組織学および生体力学的に評価した。腱・靭帯損傷は整形外科領域の受診の約 3 割を占め、特に競技者では治療満足度の低さが指摘されている。自家移植や同種移植、合成移植片といった既存治療にはドナー部位障害、免疫反応、早期破断・機械的退行といった固有の限界があり、組織工学的アプローチへの関心が高まっている。高含水・生体適合・生分解性を有し、微細構造や力学特性を制御可能なペプチドハイドロゲルは有望なスキャフォールド候補であるが、腱損傷における効果検証はほとんどない。本研究では、細胞接着・遊走・シグナル伝達に参与する RGDS モチーフを有する KI24RGDS の局所投与が、腱修復過程を加速し顕著な効果が得られるか検討した。

5.2. 実験

実験には 6 ヶ月齢の日本白色家兎 18 匹を用い、両膝の膝蓋腱中央部に長さ 10 mm × 幅 3 mm の全層欠損を作製した。左膝は欠損のみ (defect 群)、右膝には 6 wt% に調製した KI24RGDS を 30 μ L 注入 (KI24RGDS 群) し、高粘性により欠損部位に局在化させた。術後 2、4、8 週で肉眼的 (腱長) および腱長の変化を肉眼的評価、HE 染色、Masson trichrome 染色、Alcian Blue 染色による組織学的評価を行った。さらに、VEGF 免疫染色し修復過程を評価した。生体力学的評価として術後 8 週時に引張試験を行い評価した。

5.3. 結果および考察

肉眼的には、欠損群で経時的に腱長の伸長が観察されたのに対し、KI24RGDS 群では 2 週および 8 週で有意に伸長が抑制された。この所見は、KI24RGDS 投与により早期から組織連続性と荷重伝達能力が回復し、機能的に伸長が阻害されたと考えられる。組織学的解析では、2 週時点で両群の治癒相に顕著な差異が観察された (図14)。欠損群では正常腱と修復組織の境界が明瞭で、欠損域に脂肪組織が介在し、細胞外マトリックス (ECM) の配向は未熟であった。一方、KI24RGDS 群では多数の細胞が正常線維間へ早期に遊走し、境界は相対的に不明瞭化、Alcian Blue 染色は高染性を示してプロテオグリカン含量の上昇が示唆された。さらに、VEGF 免疫染色は移行域での発現亢進を示し、血管新生の早期

*10 化学生命工学部教授 博士 (工学)

*11 大阪医科薬科大学 医学部整形外科 博士 (医学)

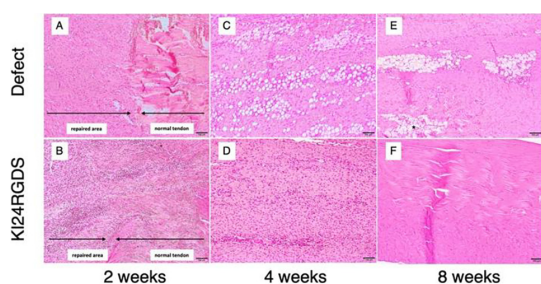


図14. HE染色による膝蓋腱の組織学的解析

- (A, B) 術後2週で、正常組織から修復組織への移行領域が観察された。
 (B) KI24RGDS群では移行領域が不明瞭であった。
 (C, E) 欠損群では脂肪組織の組織化が認められた。
 (D) 細胞外マトリックスの配列は組織化されつつあり、細胞数も多かった。
 (F) 組織所見は正常腱と類似していた。

誘導が確認された。4週では、欠損群に脂肪組織優位の修復遅延が残存する一方、KI24RGDS群ではECMの沈着と配向化が進行し、注入ハイドロゲル自体は吸収されていた。8週では、欠損群の修復組織は疎で不均質であったのに対し、KI24RGDS群は正常腱に類似する密な平行配向コラーゲン線維と良好な細胞分布を呈した。

Masson trichrome染色でも、KI24RGDS群は2週からコラーゲン線維形成と血管像が確認され、その後も一貫して欠損群を上回る染色性を示した。腱の破断強度解析結果から、8週の破断荷重が欠損群 223.3 ± 9.0 N、KI24RGDS群 267.0 ± 15.5 N、正常(腱)組織 304.2 ± 31.6 Nであり、KI24RGDS群は欠損群より有意に高値で、正常腱比約87%まで回復していた(欠損 vs KI24RGDS, $p < 0.05$; KI24RGDS vs 対照は有意差なし)。一方、剛性は欠損群 153.4 ± 34.4 N/mm、KI24RGDS群 83.3 ± 24.5 N/mm、正常組織 109.8 ± 31.9 N/mmで、欠損群が最も高かったKI24RGDS群は正常組織に近似し、機能的弾性の回復を示した²⁶⁾。

以上の所見を、腱治癒の評価項目(炎症、増殖、修復・リモデリング)に照らして解釈すると、KI24RGDSは早期の細胞接着・集積と血管新生を誘導し、プロテオグリカンやコラーゲンの沈着を促すことで、炎症相から増殖相への移行を加速したと推察できる。RGDSモチーフを介したインテグリン依存性接着は線維芽細胞や内皮細胞の遊走・増殖・マトリクス産生を賦活化し、材料自体の高粘性と局在性は“足場”としてECMの配向化を助長した。結果として、8週時点での線維の縦配向と細胞密度の最適化、ならびに荷重支持能の回復(破断荷重の正常化傾向)が得られたと考えられる。欠損群で剛性が過大であった現象は、粘弾性の破綻と不良な線維配列に伴う“硬いが脆い”組織特性を反映し、力学的実効性の観点では不利であるのに対し、KI24RGDS群は強度と

弾性のバランスにおいて生理的特性が正常組織と近接した²⁷⁾。

RGDSの存在はインテグリンなどのシグナルを介し、線維芽細胞のアクチンストレスファイバー形成やコラーゲンI産生、内皮細胞の管腔形成を促すことが先行研究から示唆されており、本モデルにおけるVEGFの過剰発現と早期血管像は、その現象学的裏付けと整合する。加えて、材料が4週時点で吸収されつつも、その後の配向化と力学回復が継続したことは、“一時的足場”としての役割を果たし、宿主組織の自律的リモデリングを効率よく果たしていることを示している²⁸⁾。

臨床応用の可能性として、KI24RGDSは注射可能な高粘性ハイドロゲルであり、縫合術の補助や温存療法への応用が期待される。特にアキレス腱断裂やスポーツ外傷において再断裂率低減や早期復帰に寄与する可能性がある。KI24RGDSペプチドハイドロゲルは、膝蓋腱欠損モデルにおいて組織学的修復と力学的強度を有意に改善し、早期再生を促進した。腱損傷治療における新たな再生医療素材として臨床応用の可能性が高い。

6. 架橋型LbLによるリガンド/ヘパリン共固定化表面の血液適合性

柿木佐知朗*¹²⁾

人工血管を代表とする埋込型循環器系デバイスの血液接触面における血栓形成は、デバイスの機能不全や重篤な合併症に直結する。これまでに我々は、アミノ酸であるチロシンの酸化で生じるキノンをアンカーに利用して種々の医用デバイス基材表面に機能性ペプチドを直接かつ安定に固定することに成功しており²⁹⁾、近年はこの技術を活用し、小・中口径血管の置換で広く使用されている延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)製人工血管の高機能化に取り組んできた。そして、ePTFE製人工血管に血管内皮細胞やその前駆細胞が高発現しているインテグリン $\alpha_4\beta_1$ のリガンドペプチドを固定化することに成功し、*in vitro*評価で血管内皮細胞の接着が促進されること、ヒト血小板の粘着が阻害されることを明らかとした。

しかし、リガンドペプチド固定化ePTFEパッチをラット頸動脈に移植したところ、わずかに内膜様組織の再生が促進されるのみであった³⁰⁾。つまり、リガンドペプチドの固定化のみでは臨床的要求を満足できるほどの*in vivo*における標的細胞の接着促進を達成できないことが示唆され、生体におけるリガンドペプチドの周辺環境も模倣する必要があると考えた。

そこで、我々は自家もしくは他家の間葉系間質細胞

*12 化学生命工学部教授 博士(工学)

(MSC) を標的とした内膜再生型デバイスへの展開を志向し、Tyr の酸化法と Layer-by-Layer (LbL) 法を併用し、(Tyr-Lys)₃ アンカーと MSC 特異的リガンド (Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg)³¹ で構成されるペプチド (YK-GER) と、抗血液凝固能と増殖因子結合能を有するヘパリンの共固定化に取り組んでいる (図15)。

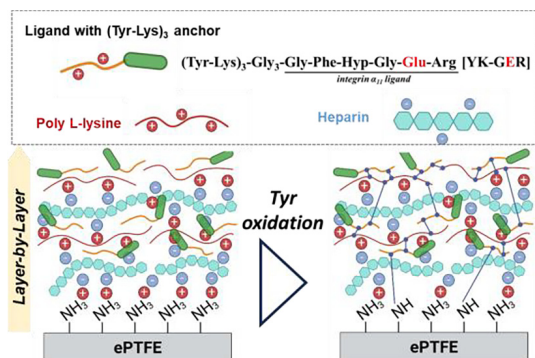


図15. リガンドペプチド/ヘパリン共固定表面

昨年度までに、上述の方法で ePTFE 製人工血管基材上にリガンド/ヘパリン共固定化表面を構築できること、その表面にマウス脂肪組織由来 MSC (AdmMSC) が良好に接着することを明らかとしている。本年度は、リガンド/ヘパリン共固定化 ePTFE 人工血管基材表面の血液適合性を評価した。

ePTFE 基材を 40 mM ドーパミン塩酸塩/10 mM Tris 緩衝液 (pH 8.5) に 12 時間浸漬後、10 mM ポリエチレンイミン (Mw = 10000)/10 mM Tris 緩衝液 (pH 8.5) に 12 時間浸漬することで、基材表面にアミノ基を導入した³²。その後、アミノ化 ePTFE 基材上にヘパリンと YK-GER を LbL 法で交互に吸着させ、最後に Tyr 残基の酸化架橋を施すことでリガンド/ヘパリン共固定表面を構築した。

まず、カバーガラス上に滴下した際に 15 分で完全に凝固するように塩化カルシウム/リン酸緩衝液を添加したヒト全血 (10 v% クエン酸血) を調製した。各種 ePTFE 試料上にこのヒト全血を滴下し、5、10、15 分後、PBS で緩やかに洗浄した。この凝固血が付着した試料を蒸留水に 24 時間浸漬して完全に溶血後、溶液中のヘモグロビン濃度を吸光光度計 ($\lambda = 576 \text{ nm}$) で定量した

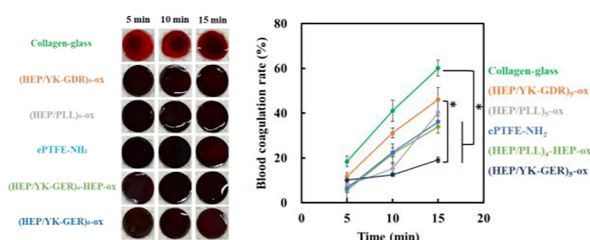


図16. 各種 ePTFE 表面での血液凝固挙動

(本学先端機構研究倫理委員会承認番号: 25-105)。その結果、ヘパリンとリガンドペプチドを共固定した ePTFE ((HEP/YK-GER)₃-ox) は、ヘパリンとポリ-L-リジン共固定したリガンドペプチドを含まない表面 ((HEP/PLL)₃-HEP-ox) やヘパリンと非活性ペプチドの共固定化表面 ((HEP/YK-GDR)₃-ox) と比較して血液凝固を抑制する傾向が認められた (図16)。非活性ペプチドはリガンドペプチドの Glu 残基を Asp 残基に置換したものであるが、このわずかな違いを血小板が認識している可能性が示唆された。また、リガンドペプチドを含まないヘパリンを最表層とする (HEP/PLL)₃-HEP-ox でも血液凝固抑制性が認められたことから、固定化されたヘパリンが機能し、その機能がリガンドペプチドの共存によって損なわれないことも分かった。今後は、同評価を繰り返し、リガンド/ヘパリン共固定化 ePTFE 基材の血液適合性を詳細に解析する。

7. 生理的イオン強度下で液液相分離する UCST 型温度応答性高分子の設計

宮田隆志、河村暁文

温度や pH などの外部刺激に応答して性質や形態が変化する刺激応答性高分子は、医療や環境分野など幅広い分野で注目されている。なかでも温度応答性高分子は、低温で溶媒に溶解し、高温では不溶となる下限臨界溶液温度 (LCST) 型と逆の溶解挙動を示す上限臨界溶液温度 (UCST) 型の温度応答性高分子に大別できる。一方、液液相分離とは、分子が均一に混ざり合った一相系から二相の液体に相分離する変化である。細胞内では液液相分離により形成された液滴が、膜のないオルガネラ (membraneless organelle) や凝縮体 (condensate) として存在し、細胞や生体の機能制御に重要な役割を果たしているため、細胞生物学において液液相分離が重要な研究対象になっている。一般に液液相分離は、分離型相分離、会合型相分離、単純相分離の 3 種類に分類できる。自然界では複数の物質が液液相分離するコンプレックスコアセルベーションが一般的であり、特定の刺激に応答して単一分子の性質変化によるシンプルコアセルベーションの研究例は少ない³³。さらに、これまで LCST 型温度応答性高分子によるシンプルコアセルベーションはいくつか報告されているが、緩衝液などのイオン強度の高い水溶液中で UCST 型のシンプルコアセルベーションを示す温度応答性高分子はほとんど報告されていない。

本研究では、2 種類の双性イオンモノマーの Sulfobetaine (2-((2-(methacryloyloxy) ethyl) dimethylammonium) ethyl sulfate : SaB) および Sulfobetaine (2-[(2-

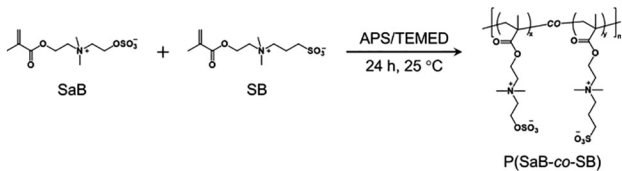


図17. P(SaB-co-SB) の合成

Solvent used in polymerization	SaB content in feed (mol%) (SaB : SB in monomer solution)				
	16.7 (1 : 5)	33.3 (1 : 2)	50.0 (5 : 5)	66.7 (2 : 1)	83.3 (5 : 1)
Water	P _{0.1} 	P _{0.2} 	P _{0.3} 	P _{0.4} 	P _{0.5}
PBS(-) (0.16 mol/L)	P _{0.16.1} 	P _{0.16.2} 	P _{0.16.3} 	P _{0.16.4} 	P _{0.16.5}
PBS10 (1.6 mol/L)	P _{1.6.1} 	P _{1.6.2} 	P _{1.6.3} 	P _{1.6.4} 	P _{1.6.5}

図18. 超純水, PBS(-), PBS10を用いて, 様々な組成で SaB と SB を共重合した後の写真

methacryloyloxyethyl) dimethylammonio] ethyl-1-sulfate : SB) を用い、フリーラジカル重合により UCST 型の液液相分離を示す温度応答性高分子の合成を試みた (図17)。さらに、合成したポリマーの温度応答挙動および曇点前後におけるコアセルベート液滴の形成過程を観察した³⁴⁾。

まず、1,3,2-dioxathiolane-2,2-dioxide および 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate (DMAEMA) を用いて、SaB を合成した。イオン強度が異なる超純水、PBS(-) (0.16 mol/L)、および PBS(-) よりも10倍イオン強度が高い緩衝液 (PBS10) にさまざまな組成の SaB と SB をそれぞれ溶解させ、開始剤および重合促進剤を用いて双性イオンポリマー P(SaB-co-SB) を合成した (図17)。得られたポリマーの共重合組成を、核磁気共鳴 (H NMR) スペクトルから決定した。次に、各ポリマーを PBS(-) に溶解させた後、その溶液の濁度測定および位相差顕微鏡観察により温度応答挙動を評価した。

図18には、溶媒として超純水、PBS(-)、PBS10を用いて SaB と SB を共重合した後の写真を示した。図より、超純水および PBS(-) を用いて SaB と SB を共重合すると、重合後の溶液は白濁することがわかる。一方、PBS10を用いて重合すると、SaB 含有率が高い場合を除いて、重合後の溶液は透明であった。したがって、イオン強度が高い PBS10中で SaB と SB を共重合した場合、SaB 間の強い双極子-双極子相互作用を弱めることができ、生成した P(SaB-co-SB) は PBS10に溶解すること

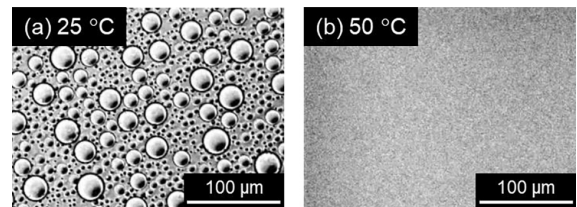


図19. P(SaB-co-SB) (SaB 含有率37 mol%) が溶解した PBS(-) (ポリマー濃度10 mg/mL) の光学顕微鏡写真 (a, 25 °C ; b, 50 °C)

が明らかとなった。

図19には、SaB 含有率37 mol% の P(SaB-co-SB) が溶解した PBS(-) の25 °C と50 °C における光学顕微鏡画像を示した。ここで、P(SaB-co-SB) としてはイオン強度が高い PBS10中で合成したポリマーを使用した。図より、25 °C でコアセルベート液滴が観察されるが、50 °C では消失することがわかる。したがって、P(SaB-co-SB) は PBS(-) 中で UCST 型の温度応答性を示すことが明らかとなった。

図20には、SaB 含有率の異なる P(SaB-co-SB) が溶解した PBS(-) の濁度測定結果を示した。図より、SaB の増加に伴って曇点が増加することが明らかである。これは、SB よりも SaB の双極子モーメントが大きく、双極子-双極子相互作用が強く働くためと考えられる。また、SaB 含有率87 mol% の P(SaB-co-SB) は溶解性が低く、PBS(-) に不溶であった。PBS(-) に溶解した P(SaB-co-SB) はすべて曇点以下の温度でコアセルベーションを誘起した。以上の結果より、P(SaB-co-SB) は、生理的イオン強度の条件下でも温度に応答してコアセルベーションを誘起する UCST 型温度応答性高分子であることが明らかとなった。このように生理的イオン強度の条件下でも UCST 型温度応答性を示す P(SaB-co-SB) は、生体分子の分離や薬物放出制御などへの応用が期待できる。

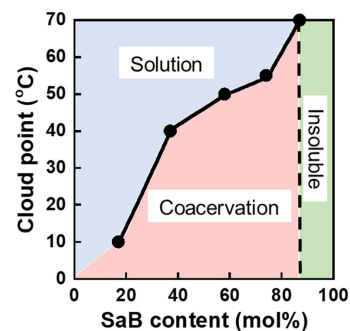


図20. 様々な SaB 含有率を有する P(SaB-co-SB) の PBS(-) 溶液の相図 (ポリマー濃度10 mig/mL)

8. 銀ナノ粒子を含有したキトサン/アルギン酸ヒドロゲルの調製

古池哲也*¹³

8.1. はじめに

銀ナノ粒子 (AgNPs) はユニークな物理的特性をもち、医療、食品包装、環境保護など多くの分野で非常に注目されている。さらに、AgNPs は銀の放出が遅く調整が可能であること、抗菌効果が長時間持続すること、比表面積が大きいため少量で高い抗菌効果が得られることから、優れた抗菌剤であるとされている。AgNPs の合成には、数多くの物理的、化学的、生物学的手法が提案されている。その中でも、安定剤の存在下で還元剤を利用する化学還元法が最も一般的である。しかし、反応性が高く、環境や生物に対して非常に毒性が高い還元剤 (水素化ホウ素ナトリウムやヒドラジンなど) を用いる必要がある。そのため、グリーンケミストリーの観点から、無毒で環境に優しい AgNPs 調製法が研究されている。また、本研究で用いたマイクロ波加熱は、反応速度を大幅に加速し、均一な AgNPs の核生成サイトを形成することによって合成中の凝集を防止し、均一な AgNPs 合成を支援する。また、優れた機能性をもつ AgNPs をポリマーマトリックスに組み込むことは、様々な分野での AgNPs の適用性を高めるために有効な戦略の一つである。以前に、Au や Ag のカチオンがグルタチオンのアニオンと相互作用し、さらにグルタチオンのアニオンがキトサン (CS) の $-NH_3^+$ 基と相互作用することで有効な分散剤として働き、AuAg バイメタルナノクラスターの大きさを制御することができることが報告された。一方、本研究室では塩基性 CS 溶液とアルギン酸ナトリウム (SA) を用いて、Glucono- δ -lactone

(GDL) の添加により均一なヒドロゲルが形成できることも報告した。これらの知見から、 Ag^+ が SA の $-COO^-$ 基と静電的相互作用し、 Ag^+ の還元によりサイズが制御された SA-AgNPs の生成が期待でき、その後、CS を添加することで、SA-AgNPs に存在する $-COO^-$ 基が CS の $-NH_3^+$ 基と静電的に相互作用することができると考えた。本研究では、SA を還元剤および安定化剤として用い、SA でコーティングした SA-AgNPs を合成し、そこに塩基性 CS を加えた SA-AgNPs/CS コロイドに GDL を添加することによって、新規な抗菌性ヒドロゲルの調製を試みた。

8.2. SA-AgNPs の調製

まず、SA 0.05 g を 10 mL の脱イオン水に完全に溶解し、0.1 M NaOH 溶液を加えて pH を 9 に調整した。その後、 $AgNO_3$ 溶液 1 mL を加え、反応混合液をマイクロ波装置に挿入して Ag^+ を還元し、SA-AgNPs を形成させた。反応終了後、混合物を氷浴で冷却し、反応を停止させた。AgNPs の生成は、UV-vis 分光光度計と TEM 画像を用いて観察し、AgNPs の存在を表す 400 nm 付近の UV ピークの変化と粒径分布を調査した。

調製した SA-AgNPs/CS ゲルは、AgNPs の存在を示す黄色を呈した (図21 (a))。UV-vis 測定の結果より、400 nm 付近で SA-AgNPs の存在が確認された。また、スペクトル変化に伴う AgNPs 量の増減と AgNPs の粒径変化から、最適な調製条件は 0.5 %SA、50 mM $AgNO_3$ 、pH 9、反応温度 80°C、反応時間 8 min であることが示された。この最適条件で調製した SA-AgNPs 試料の TEM 画像を図22に示す。SA-AgNPs の均一な分散が観察され、平均粒径は 9 ± 2 nm であった。このことから、AgNPs 粒子の均一な分散のために SA が安定化剤として重要な役割を担っていることが示唆された。

8.3. SA-AgNPs/CS ゲルの調製

まず、SA-AgNPs 溶液に SA を加え、一晩攪拌して 2.0 %SA-AgNPs 溶液を形成した。次に、CS 191.0 mg を純水 1 mL と 1 M 酢酸溶液 102.2 μ L に混合し、CS のモノマーユニットと酢酸のモル比を 1 : 1 とした。その後、炭酸水素ナトリウム粉末を CS 溶液に加え、激しく攪拌して、塩基性 CS 溶液を調製した。次に、2.0 % SA-AgNPs 溶液 1 mL を塩基性 CS 溶液 1 mL と混合し、均一になるまで攪拌した後、1 M GDL 溶液を添加した。その後、この溶液を室温、暗所で 1 h 静置して SA-AgNPs/CS ゲルを形成した。SA、CS、SA-AgNPs 溶液、SA/CS ゲル、SA-AgNPs/CS ゲルの FTIR スペクトルを図23に示す。1298 cm^{-1} と 1412 cm^{-1} のピーク

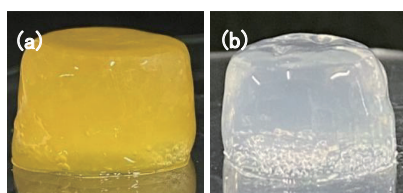


図21. (a)SA-AgNPs/CS and (b)SA/CS ゲル

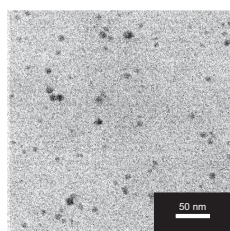


図22. SA-AgNPs の TEM 画像

*13 化学生命工学部教授 博士 (地球環境科学)

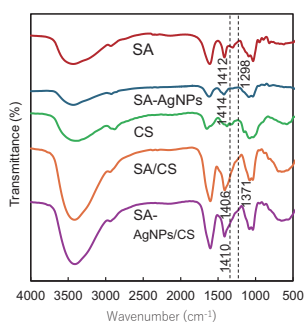


図23. FTIR スペクトル

は、SA 分子の -COO^- 基に由来したものであった。

これらのピークは重なり合い、SA-AgNPs スペクトルでは 1414 cm^{-1} に一つのピークを形成している。ピークの高波数シフトは、AgNPs と COO^- 基との結合力の増加を示していることから、SA/CS ゲルの $1371\text{-}1406\text{ cm}^{-1}$ の吸収帯が、SA-AgNPs/CS ゲルでは高波数側 (1410 cm^{-1}) にシフトしており、AgNPs が SA の -COO^- 基と相互作用していることが示唆された。

8.4. SA-AgNPs/CS ゲルを用いた抗菌性・細胞毒性試験

AgNO_3 濃度 $10\text{-}50\text{ mM}$ で調製した SA-AgNPs/CS ゲルを用いて、ディスク拡散法により抗菌活性を解析した。グラム陰性菌には *E. coli* (大腸菌)、グラム陽性菌には *B. subtilis* (枯草菌) を、各々モデル試験菌株として用いた。また、SA-AgNPs/CS ゲルの細胞毒性を確認するために、BALB-3T3 clone A31 (マウス繊維芽細胞) に対する細胞毒性についても検討した。

10 mM AgNO_3 で調製した SA-AgNPs/CS ゲルは *E. coli* と *B. subtilis* に対して、共に 19 mm の阻止帯を示し、 50 mM AgNO_3 で調製したゲルは、各々 27 mm と 22 mm の阻止帯を示した。一方、AgNPs を含まない SA/CS ゲルは十分な抗菌活性を示さなかった。また、ゲル抽出物を用いた細胞実験の結果から、SA-AgNPs/CS ゲルの細胞生存率は 87% であり、ブランク (SA/CS ゲル) と同等であった。これらの結果より、SA-AgNPs/CS ゲルは *E. coli* と *B. subtilis* に対して大きな抗菌力を示すのに対し、繊維芽細胞に対する毒性が低いことが示された。

9. 体液で瞬時に固化する DNA ヒドロゲル材料微粒子を用いた DDS キャリアの開発

葛谷明紀*¹⁴

9.1. はじめに

当研究室では、DNA の液相大量合成法を活用して、

PEG の両末端にグアニンを四塩基伸長させたマクロモノマー ($\text{dG}_4\text{-PEG-dG}_4$) を開発している³⁵⁾。このマクロモノマーは生体内に存在する K^+ イオンや Na^+ イオンに応答して、グアニン四重鎖構造を架橋点として瞬時にゲル化する。また、希薄条件下において $100\text{-}200\text{ nm}$ 程度の粒径を持つ会合体 (DNA 四重鎖メゾゲル) が形成されることも確認されている。一方で、バルクのヒドロゲルに多量の上澄み溶液 (PBS) を加えると、 20 nm 程度のナノサイズの粒子 (DNA 四重鎖ナノゲル) が放出されることもわかっている。先行研究においては、G カルテット結合性のテロメアーゼ阻害剤である TMPyP4 をロードした DNA 四重鎖ゲル微粒子は、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞に取り込まれ、抗がん活性を示した。

本研究では、DNA と親和性の高い抗がん剤であるドキシソルピシン (DOX) を TMPyP4 と同様に DNA 四重鎖ゲル微粒子に内包させ、HeLa 細胞に対する抗がん活性を評価した。また、これらの DNA 四重鎖ゲル微粒子の細胞への取り込みメカニズムおよび細胞内挙動の解析を目的とした。

9.2. 実験

マクロモノマー ($\text{dG}_4\text{-PEG-dG}_4$) の最終濃度 $0.1\text{ wt}\%$ の希薄条件下で DOX を混合し、PBS を加えて DOX 内包 DNA 四重鎖メゾゲルを調製した。薬物内包率は限外ろ過前後で DOX の吸光度を測定することで算出した。この DOX 内包 DNA 四重鎖メゾゲルを HeLa 細胞に添加し、Live/ Dead Assay を行った。共焦点レーザー顕微鏡で定性的に細胞の死滅状況を観察し、MTT Assay にて定量的に抗がん活性を評価した。より詳細に細胞内への取り込み挙動を観察するため、FAM で蛍光標識した DNA 四重鎖メゾゲルを HeLa 細胞に添加し、スピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いて高倍率で観察を行った。さらに、全てのエンドサイトーシス経路を抑制する低温条件 ($4\text{ }^\circ\text{C}$) と、クラスリン依存性エンドサイトーシス経路、およびマクロピノサイトーシス経路を選択的に阻害する各種阻害剤存在下においても同様に観察を行い、DNA 四重鎖メゾゲルの細胞内取り込みメカニズムを検討し、細胞内動態の解析を行った。

次に、 $5\text{ wt}\%$ のマクロモノマーと DOX を混合し、PBS を加えることで DNA 四重鎖ゲルを調製した。このゲルに上澄み溶液として 1 X PBS を加え、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ でインキュベートし、ゲルを溶解させることで DOX 内包 DNA 四重鎖ナノゲルを得た。DNA 四重鎖メゾゲルと同様に HeLa 細胞において細胞取り込みと抗がん活性試験を行い、ゲル微粒子の大きさの違いによる細胞内挙動の比較を行った。

*14 化学生命工学部教授 博士 (工学)

9.3. 結果と考察

DOX 内包 DNA 四重鎖メゾゲルの薬物内包率を算出すると94.3%であり、高効率でDNA 四重鎖メゾゲルに内包されることが示された。DOX 内包 DNA 四重鎖メゾゲルはHeLa 細胞内で顆粒状に局在している様子が観察された。また、Live/Dead Assay での共焦点レーザー顕微鏡の観察結果から、培養時間が長くなるにつれてDNA 四重鎖メゾゲルから放出されたDOX が細胞核まで到達し、多くの細胞死を引き起こしたことが示唆された。MTT Assay の結果から、DOX 内包 DNA 四重鎖ゲル微粒子の抗がん活性が定量的にも支持された(図24)。

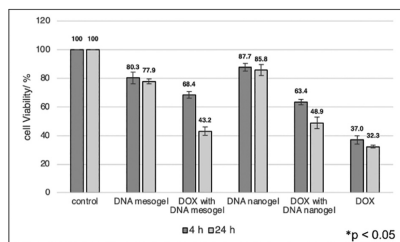


図24. DNA 四重鎖ハイドロゲルビーズの有無による HeLa 細胞の細胞生存率

共焦点蛍光顕微鏡観察の結果からは、DNA 四重鎖メゾゲル由来の緑色蛍光が細胞内で顆粒状に存在し、リソソーム由来の赤色蛍光と共局在している様子が観察された(図25)。これにより、DNA 四重鎖ゲル微粒子は細胞内に取り込まれた後、リソソームへ移行することが示唆された。

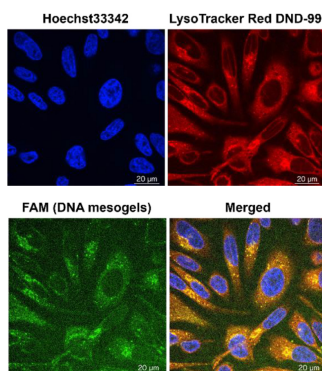


図25. FAM 修飾 DNA メゾゲルと 4 時間インキュベートした HeLa 細胞の SDCM 画像

全てのエンドサイトーシス経路が抑制される低温条件下(4℃)でインキュベーションを行ったところ、細胞内にはDNA 四重鎖メゾゲル由来の緑色蛍光はほとんど観察されなかった。この結果から、DNA 四重鎖メゾゲルはエンドサイトーシス経路を介して細胞内に取り込まれることが示された。さらに、マクロピノサイトーシス

経路を阻害する Latrunculin A 存在下では、DNA 四重鎖メゾゲルの細胞取り込みが著しく減少し、それに伴い、内包されたDOX による抗がん活性もほとんど認められなかった。以上の結果より、DNA 四重鎖ゲル微粒子は主にマクロピノサイトーシス経路を介して細胞内に取り込まれ、リソソーム内で分解された後に、放出されたDOX が核へ輸送されることで抗がん活性を示したと考えられる。

10. 生体内の力学的環境を再現するシミュレータの開発とその希少疾患用医療機器開発応用への取り組み

田地川勉*¹⁵、根本慎太郎*¹⁶、岸 勘太*¹⁷

我々は、生体内の力学的環境とそれにより生じ得る現象を生体外で再現する実験的もしくは数理的シミュレータの作製・作成と、それらを稼働・機能させることで、生体内では観察や計測が困難であったり、時間を要するような現象を簡易かつ短時間に計測・評価し、それを新しい医療機器や治療法の開発支援へ応用する取り組みをしている。本年度はこれを実際に構築した実験および数理シミュレータとこれを使った血行動態再現結果を紹介する。

先天性心疾患は出生約100人に1人の頻度でみられる心臓の構造異常であり、その症状の重症度は多岐にわたる。その代表的疾患であるファロー四徴症(以下、TOF)は、右室流出路の形成異常により肺血流量が低下し、チアノーゼや発育不良の原因となるため、早期の外科的治療が必要とされる。Blalock-Taussig シヤント術(以下、BTS)は、体循環血流の一部を肺動脈に短絡させて肺血流を増加させる姑息術であり、重症 TOF 患児の低酸素血症を緩和する目的で行われる。BTS は短絡血流量の厳密な制御が治療効果を左右し、過小であれば十分な酸素化が得られず、過大であれば肺うっ血や循環不全を招く。しかし、その最適な制御法ははまだ明確に確立されていない。

先行研究で根本ら³⁶⁾は、術後に血流量調節可能なデバイスを開発した。本研究では、これまで我々が開発してきたヒトの体循環を再現した生体外循環シミュレータ³⁷⁻³⁹⁾を、新生児や乳児の体循環と肺循環の両方を再現できるように再設計し、TOF 患児の血行動態を再現する生体外循環シミュレータを構築し、短絡血流量制御デバイスを用いたBTS 条件下での肺体血流比および心機能を評価することで、デバイスの有用性を検証することを試みた。

*15 システム理工学部准教授 博士(工学)

*16 大阪医科薬科大学 小児心臓血管外科教授 博士(医学)

*17 大阪医科薬科大学 小児科講師 博士(医学)

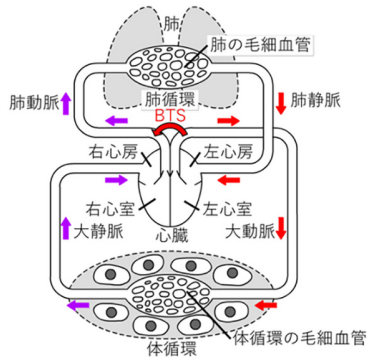


図26. 血液循環の循環動態の概略図

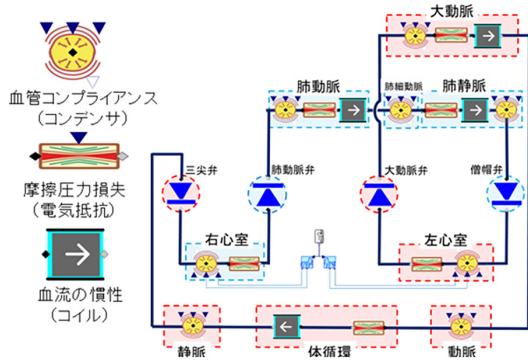


図27. 物理的に等価な健常児血液循環の回路モデル

本研究では、循環生理学における心拍による動脈圧の変動を、心臓の1回拍出量と動脈壁の弾性的性質、末梢血管での血圧発生、さらに大血管における血流が持つ慣性力の観点から物理的に説明する Windkessel モデルに基づいて、回路を構築した。

図26に健常児の血液循環の概念図を、図27に血圧変動の主な発生要因を抽出し、Windkessel モデルに基づいて置き換えた肺・体循環の流体回路モデル（数理シミュレータ）図を、図28に実際に作製した実験シミュレータの外観を示す。なお、Windkessel モデルでは、ある血管の入口から微小時間 dt の間に、流入する血流量 Q_{in} と出口から流出する血流量 Q_{out} の差により、その血管の体積が微小量 dV だけ変化する

$$\frac{dV}{dt} = Q_{in} - Q_{out} \quad (1)$$

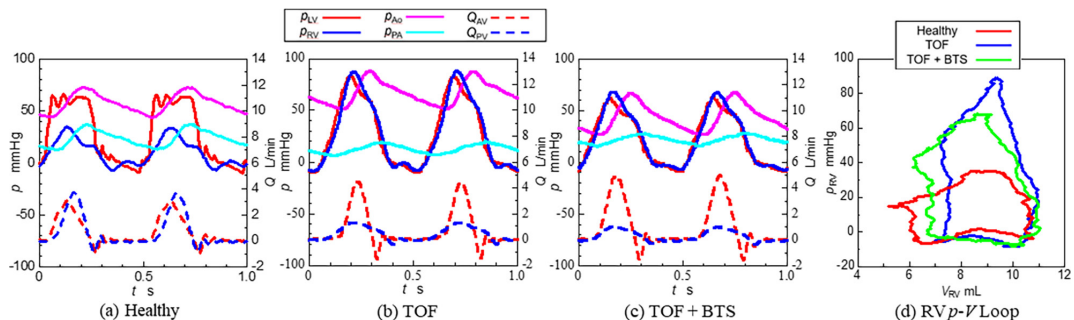


図29. 実験シミュレータで得られた各状態モデルの血流・血圧波形と右室圧・容積曲線の一例

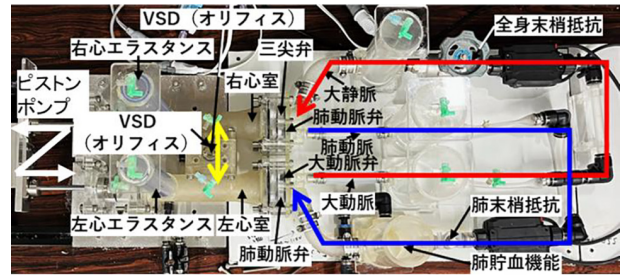


図28. 作製した健常児の全身血液循環実験シミュレータ

と考へ、この血管の体積変化と血管内の血圧の変化 dp が、中大血管の持つ柔軟性を血管コンプライアンス C' と比例関係にあると定義している。

$$dp = \frac{1}{C'} dV \quad (2)$$

また、その内部を通過する血流は質量を持つため、血流自体が慣性的（流れを維持しようとする）性質を持ち、その大きさをイナータンス I と定義した。

$$dp = I \frac{dQ}{dt} \quad (3)$$

さらに、血液循環ではその血圧のほとんどが小血管や細動脈、毛細血管において発生していることから、それらの部位の血流抵抗の大きさをレジスタンス R と定義した。

$$dp = RQ \quad (4)$$

これらの要素を基本要素として組み入れた。ただし、実際の血管では、心臓弁や大きな血管が分岐・合流する場所で、流れが血管壁に沿わずに渦が発生して圧力が損失することがある。その再現のため、本研究では、損失係数 ζ を使い、断面流速を v ($=Q/A$, A : 血管断面積) として、

$$dp = \zeta \frac{\rho v^2}{2} \quad (5)$$

と定義し、損失係数を血管直径やその変化率、分岐・合流角などの形態学的パラメータの関数することで、患者毎の違いを表現できるモデルとした。また心臓弁は、工業的に使われるオリフィスとみなし、その損失係数 ζ は便覧⁴⁰⁾の実験データを多項式近似し、さらに弁前後の圧

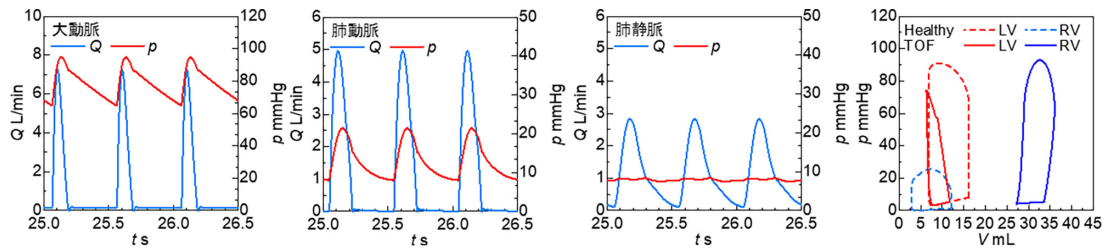


図30. 数値シミュレータで得られた健常児モデルの各血管における血流・血圧波形と健常モデルと TOF モデルの右心室・容積曲線の比較

力差 dp に応じて能動的に弁口面積 A が変化することを考慮して、

$$dp = \zeta \frac{\rho v^2}{2} + I \left(\frac{dQ}{dt} - v \frac{dA}{dt} \right) \quad (6)$$

でモデル化した。なお心拍に伴い能動的に変化する弁口面積 A は、これを弁前後の圧力差に応じて開閉状態を変化させる制御モデル⁴¹⁾を使った。また TOF 時の VSD は左右の心室をオリフィスで、BTS 時のシャント管は毛細血管と同様の摩擦抵抗に、分岐・合流やシャント管圧閉に伴う断面積変化を考慮することでモデル化した。数値モデルの作成と計算は、OpenModelica (Open Source, Modelica Consortium, Ver. 3.2.3) を使い、モデルの主要要素は Physiolibary (Ver. 2.3.1) を利用した。数値積分は DASSL を使用し、心拍数は 120 bpm、時間刻みは 2 ms で 60 心拍分の計算を行った。得られた結果は、計算の安定性を考えて計算開始 25 秒後から 10 心拍分の値で結果を整理した。

図 28 に示した実験シミュレータは、1 台の電動アクチュエータで 2 つのピストンポンプを駆動し、体循環の左心室 (LV) および肺循環の右心室 (RV) モデルとした。LV モデルと RV モデルの出入口に 4 つの心臓弁モデルを設置し、大動脈弁 (AV) および肺動脈弁 (PV) の下流に、コンプライアスタックと可変抵抗を接続し、血管の弾性的性質と末梢抵抗を模擬した。体循環 (SC) 末梢側は右心房モデルとしての開放型リザーバタンクを介して RV モデルに接続、肺循環 (PC) 末梢側は左心房モデルとしてのコンプライアスタックを介して LV モデルに接続することで、直列接続された健常児の SC と PC を再現した。さらに、LV と RV モデルをオリフィスで接続することで VSD モデルを、肺動脈弁下流側に小口径流路を接続することで PS モデルとし、これを TOF 患児モデルとした。

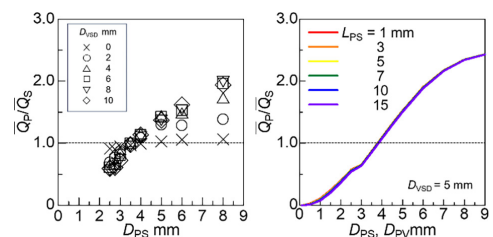
各コンプライアンス、末梢抵抗、およびピストン駆動条件を調整し、健常児の血圧・血流量波形を再現し、これを TOF モデルの駆動条件とした。実験では蒸留水を作動流体とし、ピストンポンプを行程容積 7.5 mL、心拍数 120 bpm (心収縮期・拡張期比: $SDR = 1$) で駆動させ、LV、大動脈 (Ao)、RV、肺動脈 (PA) の圧力を血圧

トランスデューサーで、AV、PV、SC と PC の流量を超音波流量計、ピストンポンプの行程容積をレーザ変位計、心室コンプライアスタック内の水位変化を超音波変位計で計測し、それらの時間変動波形を DAQ から PC に取り込み、肺体血流比 ($\equiv Q_p/Q_s$) と左右心室モデルの圧容積曲線を得た。

図 29 に実験シミュレータで得られた健常児、TOF 児、BTS 後の TOF 児に対応する血圧・血流量波形と右心室の圧・容積曲線の一例を、図 30 に数値シミュレータで得られた健常児の大動脈、肺動脈、肺静脈位の血圧・血流量波形と健常モデルと TOF モデルの右心室の圧・容積曲線を示す。これらの結果から、数値シミュレータでは実験シミュレータの全ての要素を考慮できていないことや、血液循環のポンプ機能としての心臓の機能を実験シミュレータでは完全に再現できていないことを理由として、実験と数値のシミュレータの結果は完全には一致していないが、それぞれから得られた血圧・血流量の最高・最低・時間平均値は、健常児や TOF 児の代表的な値を再現できており、両シミュレータは十分に機能していることが確認できた。

また、実験と数値シミュレータの両方で、TOF では健常モデルに比べて肺動脈狭窄と心室中隔欠損により、右室拍出流量よりも左室拍出流量が多くなっており、大動脈騎乗が再現できたと考えられる。また右心室圧の上昇が見られ、右室容積も増加していたことから、TOF の 4 特徴が再現できたことが分かった。

次に、実験・数値の両シミュレータを使い、TOF における肺動脈狭窄が肺体血流比におよぼす影響を系統的に調べた結果を図 31 に示す。この結果、VSD を有する



(a) 実験シミュレータ (b) 数値シミュレータ

図31. 肺動脈径が肺体血流比におよぼす影響

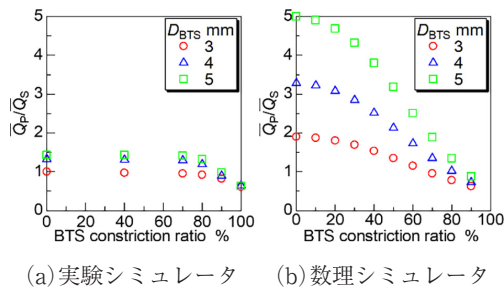


図32. BTS 時のシャント管径とその狭窄率が肺体血流比におよぼす影響

状態で肺動脈狭窄だけを改善すると、右室流出路抵抗の減少に伴い、肺動脈血流が過大な状態 ($Q_P > Q_S$) となる傾向にあり、両者の傾向は一致していた。また、両者とも肺動脈径が 4 mm 程度で、 $Q_P/Q_S \approx 1$ の適正循環となっており、 $Q_P/Q_S < 1$ となる場合は、重度の肺動脈狭窄にある傾向にあった。

また、図32に実験・数値の両シミュレータを使い、BTS 時のシャントに使用する人工血管径 D_{BTS} (長さ $L_{BTS} = 20$ mm) とそのバルーンによる圧閉率 (グラフ横軸) が肺体血流比におよぼす影響を系統的に調べた結果を示す。いずれの結果もシャント管が太いほど、またその圧閉率が低いほど、シャントによる肺動脈血流が増加し、肺動脈血流が過大な状態 ($Q_P > Q_S$) となる傾向にあった。特にシャント関係が小さいほど、シャント管圧閉度の変化に対して、肺体血流比が緩やかに変化する傾向にあることから、BTS 循環動態の制御には、小口径の人工血管を使用する方が望ましいことが示唆された。

しかし、実験シミュレータでは、その違いの影響があまり現れなかったが、数値シミュレータではその違いが顕著に表れる結果となった。これは、BTS 部周辺の実験モデルと数値モデルのモデル化に差があった可能性があり、今後その再現性を高めることを目指す。

今後、実験シミュレータについては、各血管モデルの形状やその力学特性を簡易ながらも再現したモデルを作製することで、先天性心疾患をターゲットとした医療機器の有用性評価に使用可能な非臨床の評価シミュレータとそれを使った評価法の開発を目指す。また、数値モデルについては、実際のヒト血管網の形態と力学特性を細かく再現したモデルとすると共に、成長に伴う血管形態の変化をモデル化することで、治療効果や予後の予測に繋げる予定である。

本研究の一部は、関西大学 KUMP リサーチセンター研究費、関西大学先端科学技術推進機構バイオインターフェイス研究グループ研究費、JSPS 科研費 (25K22894)、公益財団法人 JKA (競輪) の補助により実施した。

11. 気道の波動伝搬現象の抵抗に関する研究

宇津野秀夫*¹⁸

呼吸器系の疾患として、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) が知られている。この疾患は煙草の煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じる肺の炎症性疾患である。世界では死因の第 4 位となっている重大な病気である。著者らは音響波動分野の研究を行っており、多孔質材料である吸音材の特性に関して深い知見を有している。そこで、肺胞を吸音材と見做し、口唇部から音波を入射しその反射波を測定することで、肺胞の状態を診断可能かどうかの基礎的な検討を行った。

図33に COPD の概念図を示す。正常な肺胞では肺胞壁が存在するが、COPD ではこの肺胞壁が無くなっている。

一次元音場に対して、音圧 P と体積速度 U を結ぶ関係式を伝達行列によって表現する。空気の密度は ρ 、波数 k は ω/c 、角周波数は ω 、音速は c 、管の断面積は S とする。長さ L の音響管において、両端の音圧と体積速度は下式で表される。この管路の伝達行列モデルを連結して口唇から肺胞に至る解析モデルを作成し、肺胞の音波の反射の様子を解析することができる。

$$\begin{pmatrix} P_1 \\ U_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos kL & j\frac{\rho_0 c}{S} \sin kL \\ j\frac{S}{\rho_0 c} & \cos kL \end{pmatrix} \begin{pmatrix} P_2 \\ U_2 \end{pmatrix}$$

その前段階として、剛壁管路における減衰機構の解析モデルを作成する。通常、剛壁管路は非減衰とされ吸音率はゼロだが、肺胞のように細い管路ではレイノルズ数が小さくなり粘性の影響が表れやすい。そこで熱音響工学の解析理論を参考に管路壁面の粘性効果を表現する複素密度 ρ^* と、音波の圧縮で上昇した空気温度の熱が管路壁面に伝導する効果を複素体積弾性率 K^* で表現する。

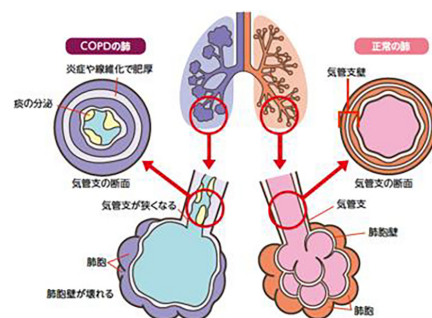


図33. 正常な肺胞と COPD の肺胞⁽⁴²⁾

*18 システム理工学部教授 博士 (工学)

$$\rho^* = \frac{\rho}{1 - \frac{2}{k_s a} \frac{J_1(k_s a)}{J_0(k_s a)}}, \quad k_s^2 = -\frac{j\omega}{\nu}$$

$$K^* = \frac{K}{1 + (\gamma - 1) \frac{2}{k_b a} \frac{J_1(k_b a)}{J_0(k_b a)}}, \quad k_b^2 = -\frac{j\omega}{a}$$

本解析モデル⁴³⁾を用いて、半径を 4 mm とした 500 mm の閉止管路の吸音率を計算し、図34に測定値と比較した。計算値と実験値は極めてよく一致しており、管路壁面の減衰を精度よく算出することが可能となった。

口から肺胞に至る声道管路をモデル化し、肺胞の破壊具合を変えて吸音率を計算したところ、計算上では吸音率に差異が得られたので、倫理審査を通したうえで図35に示す様にスピーカで音波を発生させ、その音をパイプを介して口から肺に導いて吸音率を測定した。図36に音響インピーダンス測定の一例を示す。4名の被験者の喫煙歴を聴取して吸音率を整理したが、吸音率測定結果と

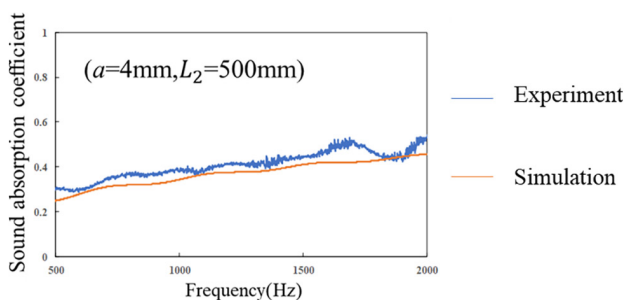


図34. 半径 4 mm の音響管路の吸音率

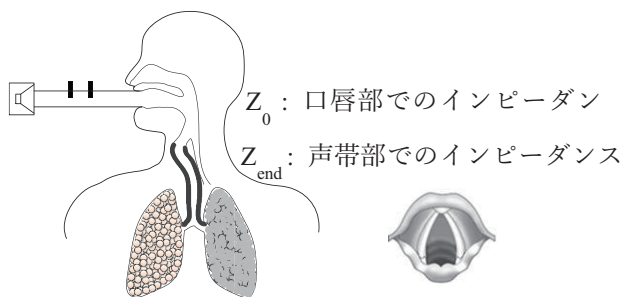


図35. 肺の吸音率測定実験の概念図

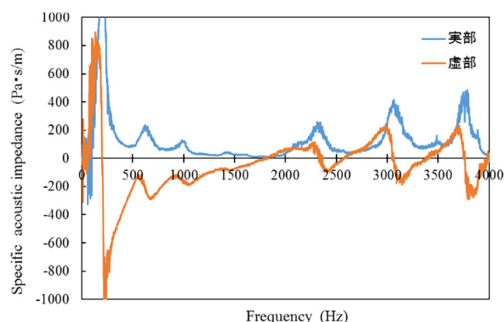


図36. 肺の音響インピーダンス測定結果の例

喫煙率との間には相関が得られず、研究は中止することとした。

謝辞

本研究（又は本研究の一部）は、「関西大学研究ブランディング事業（2025年度）」「関西大学先端科学技術推進機構研究グループ予算（2025年度）」によって実施されたものである。

参考文献

- 1) C. S. Lau *et al.*, *World J. Surg.* **2017**, *41*, 899.
- 2) B. Wang *et al.*, *Acta Biomater.* **2019**, *96*, 55.
- 3) A. G. Burm, *Clin. Pharmacokinet.* **1987**, *13*, 191.
- 4) K. Nagahama *et al.*, *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 979.
- 5) Y. Ohya, *Polym. J.* **2019**, *51*, 997.
- 6) Y. Yoshida *et al.*, *Polym. J.* **2014**, *46*, 632.
- 7) Y. Matsui *et al.*, *J. Anesth.* **2025**, *39*, 435.
- 8) J. G. Thalhammer *et al.* *Anesthesiology* **1995**, *82*, 1013.
- 9) T. J. Brennan *et al.*, *Pain* **1996**, *64*, 493.
- 10) M. Tobe *et al.*, *Anesthesiology* **2010**, *112*, 1473.
- 11) S. R. Chaplan *et al.*, *J. Neurosci. Methods* **1994**, *53*, 55.
- 12) C. Chen *et al.*, *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *105*, 101241.
- 13) Y. Gao *et al.*, *Bioeng. Transl. Med.* **2024**, *9*(1), e10600.
- 14) M. Ueda *et al.*, *J. Control. Rel.* **2020**, *322*, 209.
- 15) S. Bleher *et al.* *small* **2019**, *15*(50), 1904716.
- 16) A. Kawamura, F. Tanaka, Y. Nishimura, T. Miyata, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2026**, *27*, 2610881.
- 17) A. Kawamura, Y. Hata, T. Miyata, T. Urugami, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2012**, *99*, 74.
- 18) A. Kawamura, A. Harada, S. Ueno, T. Miyata, *Langmuir* **2021**, *37*, 11484.
- 19) H. Nakaura, A. Kawamura, T. Miyata, *Langmuir* **2019**, *35*, 1413.
- 20) M. Sasaoka, A. Kawamura, T. Miyata, *Polym. Chem.* **2022**, *13*, 3489.
- 21) A. Kawamura, T. Kiguchi, T. Nishihata, T. Urugami, T. Miyata, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11101.
- 22) M. V. Hogan *et al.*, *Arthroscopy* **2015**, *31*, 971.
- 23) R. C. Nordberg *et al.*, *Nat Rev Rheumatol.* **2024**, *20*, 323.
- 24) J. Fan *et al.*, *Polymers* **2022**, *14*, 2097.
- 25) N. Okuno *et al.*, *J. Orthop. Res.* **2021**, *39*, 165.
- 26) T. Ishitani *et al.*, *J. Biomater. Applications* **2025**, *39*, 880.
- 27) F. Oliva *et al.*, *Med. Sport Sci.* **2012**, *57*, 53.
- 28) D. Deponti, *et al.* *J Tissue Eng Regen Med* **2015**, *9*, 512.
- 29) S. Kakinoki, T. Yamaoka, *Bioconj. Chem.* **2015**, *26*, 639.
- 30) S. Kakinoki, S. Nishioka, Y. Arichi, T. Yamaoka, *Colloids Surf. B* **2022**, *216*, 112576.

- 31) W-M. Zhang, D. Gullberg *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 7270.
- 32) S. Xue, H. Zhu *et al.*, *J. Membr. Sci.* **2017**, 524, 409.
- 33) E. Spruijt, *et al.* *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, 50, 3694.
- 34) Y. Fujii, A. Kawamura, N. Morimoto, T. Miyata, *Langmuir* **2025**, 41, 7732.
- 35) S. Tanaka, *et al.*, *Chem. Asian J.* **2017**, 12, 2388.
- 36) 本橋ほか, 日本循環器学会雑誌**2016**, 32, 154.
- 37) 田地川ほか, 生体医工学**2023**, 60, 149.
- 38) 関戸ほか, 生体医工学**2021**, 59, 146.
- 39) 土井ほか, 日本機械学会関西支部第99期定時総会講演会講演論文集, 10102, (2024.3).
- 40) 日本機械学会編, 管路・ダクトの流体抵抗, 丸善, (1979).
- 41) J. P. Mynard *et al.*, *Int J Numer Method Biomed Eng* **2011**, 28, 626.
- 42) “生活習慣病を知ろう, 健康寿命をのばそう”
<https://www.smartlife.mhlw.go.jp/event/disease/copd/>
- 43) 宇津野秀夫, “音響境界層に着目した吸音材の吸音性能に関する研究”, 機械学会 D&D Conference 2025.