

『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・葛谷明紀・小谷賢太郎・平野義明・古池哲也・
宮田隆志・鈴木 哲・田地川勉・河村暁文・奥野陽太・村瀬敦郎

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・横田淳司・大槻周平

1. はじめに

大矢裕一*1

2023年は、我々のプロジェクトにとって記念すべき年となった。当プロジェクトの大阪医科薬科大側の代表的存在である根本慎太郎先生が開発した「成長する心臓修復パッチ」(製品名：シンフォリウム)が、7月に製造販売認可を得て実用化された(https://www.teijin.co.jp/news/2023/07/12/20230712_02.pdf)。この研究は、我々のプロジェクトのリーフレットの研究紹介図トップに記載されている。これを「KUMP 実用化第一号」と大々的に宣伝しなかったのは、この研究は、筆者がアドバイザーとして参画させていただいているものの、KUMP プロジェクト開始以前から進められており、実質的に99%以上が大阪医科薬科大、福井経網興業、テイジンメディカルテクノロジーの三者で進められた成果だからである。しかし、この研究は、2014年に筆者と根本教授の共同研究がスタートし、両大学の医工連携を軸とした KUMP プロジェクトの重要な起点となった。KUMP に関連の深い医療器具が社会実装される日の目を見る時が来たことは、誠に喜ばしく、根本先生に最大級のお祝いの言葉を贈りたい。実用化に際して、奮闘された関係の皆様方にも心から敬意を表したい。

一方、2024年の元旦は、突然の能登半島地震に見舞われ、その直後に航空機事故も発生して不穏な年明けとなった。犠牲となられた方々に心からお悔やみを申し上げるとともに、被災された方々にお見舞いを申し上げます。この原稿が印刷される頃になっても、まだ多くの方々が辛く不便な生活を強いられていることと推察する。ライフライン、特に電気あるいは清浄な水のどちらか一方でも供給が止まれば、例えば、人工透析を受けておられる方は、たちまち生命の危険に晒される。熱湯を被って危篤状態となり、救急車が現場に駆けつけることができなかつたために亡くなられたお子さんのニュース

にはとても心が痛んだ。これらのことは、AI やスマートフォンなどをはじめ、色々な「便利」や「最先端」が我々の生活に深く浸透してきている一方で、ほんの僅かな綻びによって、我々の生活や安全は、いとも簡単に暗転してしまう「脆弱性」を内包しているのだという現実を我々に突きつけてくる。私たちの脆弱な「日常」を守るためには、アクシデントへの事前の備えとレジリエンス(回復力)が重要であることが再認識される。折に触れ口にはしていることではあるが、医療や医療機器の使用は、難病に打ち勝つことだけでなく、こうした我々の「日常」を守ることにもあるという思いを強くする。先の例で言えば、人工透析の間隔が数日長くなったり、自宅で可能になったりすれば、心理的な負担は減り、救える命もあるだろう。人工培養皮膚とまでいなくても、熱傷を冷やす清浄な水、奪われる水分を補給する輸液システム、熱傷面からの雑菌侵入・感染を低減するしくみ、これらのうちどれか一つでも身近に有りさえすれば、幼い命は失われずに済んだのかもしれない。

自然災害だけでなく、新型コロナウイルスのような感染症パンデミックも、「日常」を脅かす脅威であることを我々は思い知らされた。国内対応は5類感染症へと移行して、学会の懇親会なども、ようやくコロナ前とほぼ変わらない様式で開催されるようになった。しかし、コロナ禍が私たちの心と生活に与えた不可逆的な変化は確実に存在する。ただし、悪いことばかりではなく、オンラインが普及したことは、出張先や遠隔地からの会議参加が可能となり、移動に要する経費と時間を大幅に節約できたり、何らかの事情で在宅せざるをえない人の会議や授業への参加も容易になったりすることも我々は学んだ。パンデミックが起こってしばらくした頃に言われ始めた「ニューノーマル」なる聞き慣れない言葉は、当時ピンと来なかったが、これがそういうことかと納得しつつある。

最近、新型コロナウイルス用ワクチン開発に関する本を幾つか読んだ。多い時期には、世界で毎日数千人の死

*1 化学生命工学部 教授 博士(工学)

者が出ていた。単純計算は難しいが、1日でも早くワクチンが供給されることによって、相当数の死を回避できる(できた)ことになる。mRNA と脂質ナノ粒子という従来にないシステムのワクチンを、1年足らずの超速で認可・供給にこぎつけた世界の幾つかのチームの偉業には、心から賛辞を送りたい。このプロセスを通じて我々は、安全性を確保した上でのことではあるが、リスクとベネフィット・緊急性のバランスを取りながら、最優先で事を進めれば、このくらいの時間で薬剤(ワクチン)の認可と供給が可能=このくらいは最低限かかる、という実例を目の当たりにした。

当プロジェクトは、関大メディカルポリマー研究センター(KUMP-RC)を拠点とする体制に移行して3年、開始からは8年が経過しようとしている。当然ながら、医療は我々の生活とそのレジリエンスを支える中心的役割を担っている。我々の研究がその下支えの一部にでも貢献できれば、という思いはますます強くなっている。新型コロナウイルスワクチンの開発に関して言えば、カリコ博士は mRNA 研究を40年以上続けており、シュードウリジン含有 mRNA の免疫回避に関するワイズマン博士との共著論文(*Immunity*, 2005, 23, 165)から約20年、その改良版メチルシュードウリジン(Kariko-Weissman technique)の特許(2012年)から約10年である。キャリアとして用いられた脂質ナノ粒子に関して、多くの地道な基礎研究の蓄積がある。既に形となった技術の標的を新型コロナウイルスに変更してから、市場に投入されるまでが1年未満だったということに過ぎない。シンポジウムも「先駆け指定承認」という例外的措置を適応しても、最終製品構想から10年以上経過して、ようやく認可に漕ぎ付けられた(これでも十分に早い)。基礎研究と実用化の間にはとても深くて大きな谷があり(所謂「死の谷」、その前に「魔の川」、後に「ダーウィンの海」がある)、医薬品・医療機器の開発には、相当に長い時間を要することに変わりはない。しかし、それを言い訳にすることなく、社会実装へ向けて、粘り強い努力を続けたい。この取り組みの主旨と意義をご理解いただき、研究費と研究場所を提供いただいている学校法人関西大学を始め、連携研究でお世話になっている大阪医科薬科大学の先生・関係部局の方、学外の共同研究者、共同研究企業、そして何よりも研究に参画している大学院生・学部生の皆様に、この場を借りて改めてお礼を申し上げます。

2. ヒアルロン酸被覆ナノ粒子を用いた抗肝線維化薬剤の肝選択的薬物配送

大矢裕一、能崎優太*²、村瀬敦郎*³
朝井 章*⁴、樋口和秀*⁵

2.1. 緒言

肝硬変とは肝炎などの際に、活性化した肝星細胞(HSC)が過剰にコラーゲン線維を産生することで肝臓が硬化する疾病であり、重篤化すると肝不全、肝臓癌に至る。高血圧治療薬であるアンジオテンシン II レセプターブロッカー(ARB)が抗線維化薬剤として肝硬変にも有効であると報告されており^{1,2)}、ARBの一種であるオルメサルタンメドキシミル(OLM)などの例が報告されている。しかし、OLMはその高い疎水性のために bioavailability が低い等の問題があって臨床使用には至っていない³⁾。

一方、我々はこれまでに、生分解性のポリリシン-ポリ乳酸・ABジブロック共重合体(PLys⁺-b-PLLA)からなる表面に高密度の正電荷を有するコア-シェル型ミセルを、ポリイオンコンプレックス(PIC)形成により負電荷を有するヒアルロン酸(HA)で被覆したHA被覆ミセル(HA-micelle)を開発した(図1)⁴⁾。このミセルは、通常の高分子ミセルよりも著しく高い希釈安定性を示し、HA受容体を有する肝類洞内皮細胞(LSEC)や樹状細胞に選択的に取込まれることを見出し^{5,6)}、経鼻ワクチンとしての有用性も報告している⁶⁾。HSCにもHA受容体が存在し⁷⁾、肝類洞のすぐ外のデイツセ腔に位置していることが知られている。さらに肝類洞は不連続内皮構造を持ちナノサイズ粒子の透過性を有しているため、このHA-micelleを使用することでHSCへの効果的な薬物送達が可能になると考えられる。そこで、本研究では、抗線維化薬剤 OLM を内包した

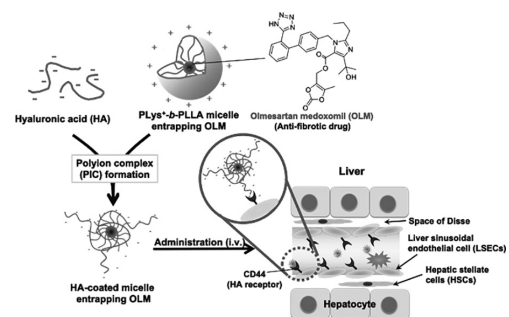


図1. オルメサルタンメドキシミル(OLM)を内包し、ヒアルロン酸(HA)で被覆したポリリシン-ポリ乳酸ブロック共重合体ミセルによる肝線維化治療の模式図⁹⁾。

*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 先端科学技術推進機構 特任助教 博士(工学)

*⁴ 大阪医科薬科大学内科学II教室 講師

*⁵ 大阪医科薬科大学先端医療開発学寄附講座顧問 名誉教授

HA-micelle を調製し、その肝ターゲティングおよび肝硬変モデルマウス⁸⁾に対する治療効果について検討した⁹⁾。

2.2. 実験、結果および考察

既報⁴⁾に従って合成した PLys⁺-*b*-PLLA (Lys セグメント重合度=22, PLLA セグメント重合度=27, 分子量=7,200 Da) を使用して、OLM 内包ミセルを調製した後、HA (分子量=75,000 Da) で被覆した。DLS 測定において HA 被覆の前後で粒径が 60 nm から 180 nm に、ゼータ電位が +20 mV から -23 mV に変化したことから HA-micelle が調製できたことを確認した。

HA および PLys-*b*-PLLA をそれぞれ FAM (緑色) および Texas Red (赤色) により蛍光標識した HA-micelle を、ヒト HSC である LX-2 細胞とインキュベートしたところ、対照である CM-Dextran 被覆ミセル (CD-micelle) と比較して、HA-micelle において高い取り込みが確認された (図 2)。また、蛍光標識した HA-micelle をマウスに静脈注射した後の臓器分布を *In vivo* imaging system (IVIS) により調べたところ、肝臓への高い集積性を示した (図 3)⁹⁾。投与後のマウス肝臓切片の蛍光顕微鏡像から、投与された HA-micelle

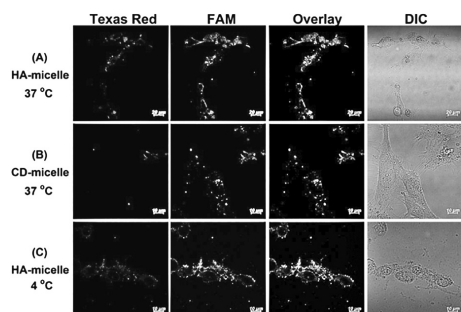


図 2. 培養 HSC 系細胞 (LX-2) と (A) HA-micelle (37°C), (B) CD-micelle (37°C), (C) HA-micelle (4°C) とを 4 時間インキュベートした時の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真. DIC: 位相差像⁹⁾。

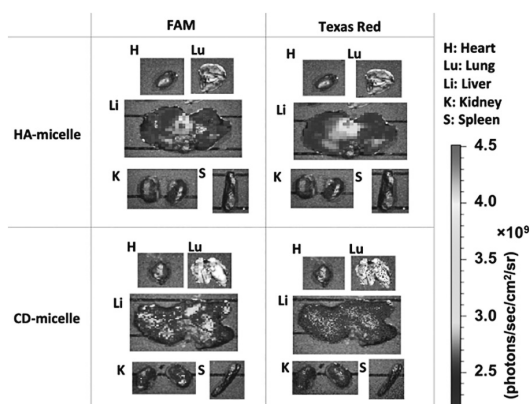


図 3. ミセルの静脈投与後の体内 (臓器) 分布. BALB/c マウスにミセルを静脈投与 4 時間後, IVIS (*In Vivo* Imaging System) で計測⁹⁾。

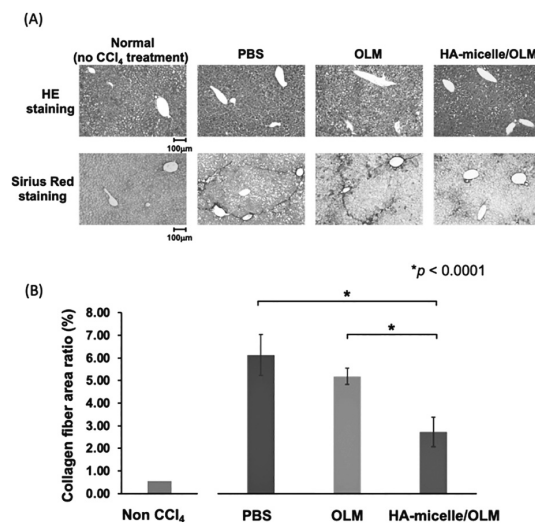


図 4. 薬剤投与開始から 8 週間後の (A) Hematoxylin & eosin 染色および Sirius red 染色した肝組織切片写真, および (B) Sirius red 染色結果から算出した線維化面積割合⁹⁾。

が肝類洞内皮細胞および肝実質細胞にわたって分布していることも示唆された⁹⁾。

In vivo での抗線維化効果は、C57BL6/N マウス (雄, 7 week) に連続的に CCl₄ を皮下注射して作成した肝炎モデル⁷⁾ に対し、OLM 内包 HA-micelle を尾静脈投与することにより検討した。薬剤投与開始から 8 週間後にマウスから肝臓を採取し、組織学的評価を行ったところ、OLM 内封 HA-micelle 投与群では、対照群と比較して線維化が抑制されていることが明らかになった (図 4)⁹⁾。Sirius red 染色結果から線維化が進行した面積を定量化したところ、OLM 内包 HA 被覆ミセルでは対照群と比較して有意に低い肝線維化量を示した (図 4)⁹⁾。以上の結果から、HA-micelle を用いることで OLM を高効率で HSC にデリバリー可能であり、肝障害治療に有効である可能性が示唆された。

2.3. 謝辞

本研究遂行にあたり、多大なる助言を頂戴いたしました奈良県立医科大学消化器内科学、鍛治孝祐講師および吉治仁志教授に厚く御礼申し上げます。

3. 活性を維持した酵素を高効率で内包したマイクロゲル微粒子の簡便な作製法

奥野陽太*⁶、岩崎泰彦*⁷

3.1. 緒言

粒径が数 μm - 数百 μm のゲル微粒子は高い比表面積

*6 化学生命工学部助教 博士 (工学)

*7 化学生命工学部教授 博士 (工学)

を持ち、内部に内包した生体分子を外部の物理化学的刺激から保護することができる。加えてゲルを構成する高分子ネットワーク間隙サイズ以下の水溶性低分子を透過可能である。このような性質を鑑み、酵素を内包したゲル微粒子は外部から高分子ネットワーク間隙を通じて基質を取り込んで生成物を放出するマイクロリアクターとして機能することが期待され、精力的に研究が行われてきた。

従来の酵素内包ゲル微粒子の代表的な作製手法の1つに油中水滴型エマルションを用いたものがある。この手法では酵素を溶解した水溶液を有機溶媒中に分散させ、エマルション (W/O エマルション) を形成させた後、水相のみをゲル化させ有機溶媒を洗浄除去することで酵素内包ゲル微粒子を得る。非常に簡便な方法でスケールアップも容易であるが、有機溶媒による酵素の失活や、医用・食品分野においては残存し得る有機溶媒の毒性懸念が残る。一方、スプレー法やマイクロフロー法などの“流れ”を利用した手法も報告されている。これらの方法では、酵素を含む水溶液をスプレー等の剪断力で微粒子化させると同時にゲル化させることで酵素内包ゲル微粒子を得る。これらの手法では活性を損なわずに高効率で酵素をゲル微粒子内に内包することができるが、比較的煩雑な装置が必要でありスケールアップも困難である。即ち、これまでの酵素内包ゲル微粒子の製法においては、酵素の活性維持と簡便さを両立できなかった。

一方、水中水滴型エマルション (W/W エマルション) は2種類の水溶性高分子水溶液の混合物を攪拌することで得られる、溶媒が水のみである。W/W エマルションの分散相のみに酵素を分配することができれば、攪拌のみの簡便な方法かつ有機フリーで酵素失活を回避しながら酵素内包ゲル微粒子を得られる。さらに W/W エマルションは W/O エマルションよりも界面張力が小さいため小径粒子を安定的に得られると考えられ、より比表面積の大きな酵素マイクロリアクターの形成が可能となり得る。

そこで本研究では魚由来ゼラチンとポリビニルピロリドン (PVP) を構成要素とする W/W エマルションを作製し、これをテンプレートとして酵素内包ゲル微粒子を作製する検討を行った。さらに得られた酵素内包ゲル微粒子が内包した酵素を保護しながら、マイクロ反応場として機能するかを検証した。

3.2. W/W エマルション内での酵素の分配と酵素内包ゲル微粒子の作製^{10,11)}

魚由来ゼラチンは哺乳類由来ゼラチンと比べてゲル化温度が低く (10℃未満)、人への感染症リスクが低い特徴がある。そこで魚由来ゼラチン中のアミノ基に無水メ

タクリル酸を反応させることでメタクリロイル化ゼラチン (GelMA) を合成した (図5)。GelMA 水溶液に対して相分離剤となる水溶性高分子には、生体適合性を有し非常に水溶解性が高い PVP を採用した。これら GelMA と PVP の水溶液を体積比 3 : 7 で混合した後に、攪拌することで W/W エマルションを作製した。GelMA を蛍光分子で修飾することで、GelMA が分散相となったエマルション (W_{GelMA}/W_{PVP}) が形成されていることを確認した。続いて、 W_{GelMA}/W_{PVP} エマルションにモデル酵素として蛍光修飾牛血清アルブミン (FITC-BSA) を添加したところ、BSA は GelMA 相に自発的に分配した。GelMA と酵素は共にポリペプチドであり電荷を有するアミノ酸残基が多数存在するため、静電相互作用により酵素が GelMA 相に分配したものと考えられる。このようにして完全有機溶媒フリーで酵素を W/W エマルションの分散相に分配することに成功した。そこで、酵素を分配させた W/W エマルションに光重合開始剤を添加し光照射することで分散相をゲル化させ、PVP を水洗浄することで酵素内包ゲル微粒子を得た。得られたゲル微粒子の共焦点蛍光顕微鏡像より BSA がゲル微粒子内に均一に内包されているとわかった (図6)。また、その内包効率は蛍光分光測定から92%と非常に高効率に内包されていることが示された。

上述のように W/W エマルションの界面張力は低いいため、セラミックス多孔フィルタによって小粒化できるのではと考えた。そこで5 μm および10 μm のフィルタを通したのちの粒径分布を評価した (図6)。図よりそれ

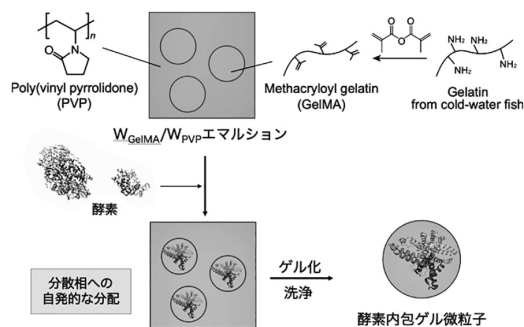


図5. W/W エマルションの構成と酵素内包ゲル微粒子の作製手法。

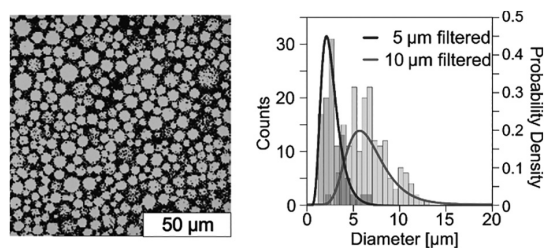


図6. BSA 内包ゲル微粒子における BSA の粒子内分布 (左) とフィルタによる粒径制御 (右)。

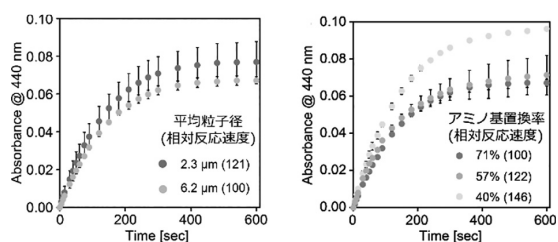


図7. β -Gal 内包ゲル微粒子における反応速度の粒径依存性 (左) と架橋密度依存性 (右). エラーバーは標準偏差 ($n=3$).

それぞれのフィルタの孔サイズに応じたゲル微粒子が得られているとわかる。また、 $5\mu\text{m}$ フィルタ通過後の W/W エマルジョンを24時間静置した後にゲル化させた際の粒子最頻径は $4\mu\text{m}$ であり、W/W エマルジョンが長時間にわたって合合せず安定であることが明らかとなった。

その他の酵素でも同様に $W_{\text{GelMA}}/W_{\text{PVP}}$ エマルジョンにおいて GelMA 相に分配し、酵素内包ゲル微粒子が得られるか検証のため、BSA と分子量及び等電点が異なる西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)、グルコースオキシダーゼ (GOD)、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal) でも評価した。結果、いずれの酵素も60%以上の効率で内包でき、ゲル微粒子内に均一に分散していた。さらに3:7としていた GelMA と PVP の体積混合比率を2:8とすることでいずれの酵素においても、内包効率を95%以上にまで高められることも明らかにした。

3.3. 酵素内包ゲル微粒子のマイクロリアクターとしての働き

ゲル微粒子内に内包された酵素の活性維持を確認するため、酵素内包ゲル微粒子のマイクロリアクターとしての機能評価をおこなった。 β -Gal 内包ゲル微粒子の緩衝液中サスペンションに β -Gal の基質を添加した後、 β -Gal による生成物の産生速度を UV/Vis 分光測定により追跡した (図7)。結果、ゲル微粒子内の β -Gal は活性を維持しており、 β -Gal 内包ゲル微粒子は外部から基質を取り込んで生成物を外部へと吐き出すマイクロリアクターとして機能することが示された。また、その反応速度は粒子径に依存することがわかった。小粒子の方がより比表面積が大きいため、スムーズに基質を取り込めると考えられる。さらにメタクリロイル基導入量の異なる GelMA を用いて、 β -Gal 内包ゲル微粒子を作製した際のマイクロリアクターとしての働きを調査した (図3)。その結果、メタクリロイル基導入率 (ゼラチンのアミノ基置換率) が低いものほど高い反応速度を有していた。すなわち、架橋密度が低いほど、基質が外部からゲルネットワーク間隙を透過しやすく、反応速度が高くなったものと考えられる。

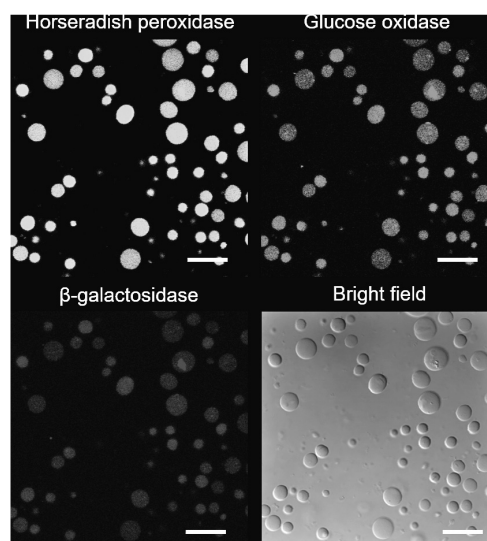


図8. 三酵素内包ゲル微粒子の共焦点蛍光顕微鏡像. スケールバーは $20\mu\text{m}$.

同様に HRP や GOD を内包したゲル微粒子についてもマイクロリアクターとしての機能を評価した。いずれの酵素においても活性が維持されており、それぞれの酵素を含んだゲル微粒子はマイクロリアクターとして機能した。さらにこれらの酵素を内包したゲル微粒子についても反応速度の粒径依存性を評価したところ、HRP 内包ゲル微粒子については β -Gal よりも粒径依存性が小さく、GOD については β -Gal よりも粒径依存性が大きかった。これは、GOD の基質が GelMA ネットワーク間隙を透過する速度が速いため、比表面積の影響を受けやすかったものと考えられる。逆に HRP 基質については GelMA ネットワーク間隙を通過しにくいいため、比表面積の影響をほとんど受けなかったと考察できる。即ち、マイクロリアクターとしての機能を考えるとゲル微粒子を構成する高分子の種類が重要であることが示唆された。

続いてゲル微粒子内に内包された酵素の保護能を評価した。 β -Gal 内包ゲル微粒子を pH 6.0 のクエン酸緩衝液中で24時間インキュベートしたところ、その酵素活性は97%維持されていた。これに対して溶液状態の β -Gal は同条件で59%失活していたことから、ゲル微粒子による内包酵素の保護が示された。

3.4. 複数酵素内包ゲル微粒子による酵素カスケード反応

3.3で見てきたように本手法では種々の酵素を同様に内包可能であることがわかった。そこで複数酵素を同時に添加することで複数酵素内包ゲル微粒子がえられ、ゲル微粒子内で酵素カスケード反応場を構築できるのではないかと考えた。 $W_{\text{GelMA}}/W_{\text{PVP}}$ エマルジョンを $10\mu\text{m}$ 孔径のセラミックフィルタに通した後、 β -Gal、GOD、

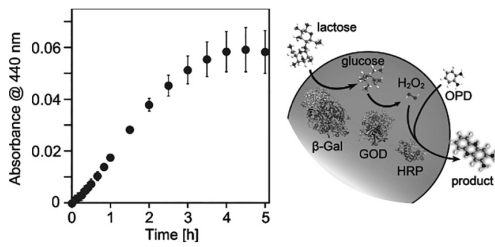


図9. 三酵素内包ゲル微粒子による酵素カスケードマイクロリアクターの概念図と生成物によるUV吸収の経時変化。エラーバーは標準偏差 (n=3)。

HRP 3種類の酵素の溶液を添加し、これまで同様にゲル微粒子を作製した。共焦点顕微鏡撮像から、3種類の酵素が同時にゲル微粒子に均一に内包されているとわかった(図8)。

β -Gal, GOD, HRP 内包ゲル微粒子のサスペンションに β -Gal及びHRPの基質を添加した。外部から透過した β -Galの基質から β -Galによってゲル微粒子内でグルコースが合成される。グルコースは同じゲル微粒子内のGODの基質となり過酸化水素が生成される。HRPはゲル微粒子内で生成された過酸化水素と外部から取り込んだ発色原料の反応を触媒することで、発色化合物を合成する。最終的に得られる発色化合物の生成をUV/Vis分光測定により追跡した結果を示す(図9)。この結果から、複数酵素を内包したゲル微粒子が酵素カスケード反応場として機能していることが示された。

3.5. まとめ

本研究では、二種類の水溶性高分子から形成されるW/Wエマルションを用いることで、完全有機溶媒フリーで酵素を高効率で内包したゲル微粒子の作製法創出に成功した。これまでに存在しなかった酵素の活性維持と簡便な高効率内包を両立できた成果である。実際に研究室レベルでも同様の手法を用いて10gスケールで酵素内包ゲル微粒子を簡単に調製することができた。工業的に比較的容易にスケールアップ可能であると推察され、今後、医用分野のみならず、食品分野やグリーンケミストリーへの応用も期待される。

4. 架橋型LbLによるリガンド/ヘパリン共固定化表面の間葉系幹細胞接着性

柿木佐知朗*⁸

近年、埋込型循環器系デバイスの血液接触面における内膜組織の再生誘導は、血液適合性を向上させるための有力なアプローチとして注目されている。これまで我々は、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いる^{12,13}。同法で人工血管基材の延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)に血管内皮細胞もしくは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すると、*in vitro*における血管内皮細胞の接着が促進され、ヒト血小板の粘着が阻害された。しかし、ラット頸動脈にリガンドペプチド固定化ePTFEパッチを移植したところ、わずかに内膜様組織の再生が促進されるのみで未修飾ePTFEパッチと顕著な差は認められなかった。これは、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、すなわち、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性を示唆している。そのため、我々は自家もしくは他家の間葉系幹細胞(MSC)を標的とした内膜再生型デバイスへの展開を志向して、Layer-by-Layer(LbL)法とTyrの酸化架橋の併用し、基材との結合部である(Tyr-Lys)₃アンカーとMSC特異的リガンド(Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg)¹⁴で構成されるペプチド(YK-GER)と、抗血液凝固性や増殖因子結合性を有するヘパリンの共固定化(図10)に取り組んでいる。昨年度までに、上述の方法でガラス基材上に安定なリガンド/ヘパリン共固定化表面を構築できること、その表面がコラーゲンコート基材に匹敵するマウス脂肪組織由来MSC(AdmMSC)の接着性を示すこと、ヒト全血に対する優れた適合性を示すことを明らかとしている。本年度は、ePTFE人工血管基材表面へのリガンド/ヘパリン共固定化とそのAdmMSC接着性を評価した。

ePTFE基材を40mMドーパミン塩酸塩/10mM Tris緩衝液(pH 8.5)に12時間浸漬後、10mMポリエチレンイミン(Mw=10000)/10mM 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¹⁵。その後、YK-GERとヘパリンとをLbL法で吸着させ、最後にTyr残基の酸化架橋によって安定化することで、ePTFE上にリガンド/ヘパリン共固定表面を構築した。

各種ePTFE試料上にAdmMSCを播種して24時間培養したところ、ポリドーパミンとポリエチレンイミンでアミノ化したePTFE(Aminated-ePTFE)と、Glu残

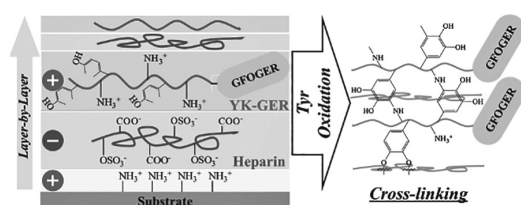


図10. リガンドペプチド/ヘパリン共固定化表面。

*8 化学生命工学部教授 博士(工学)

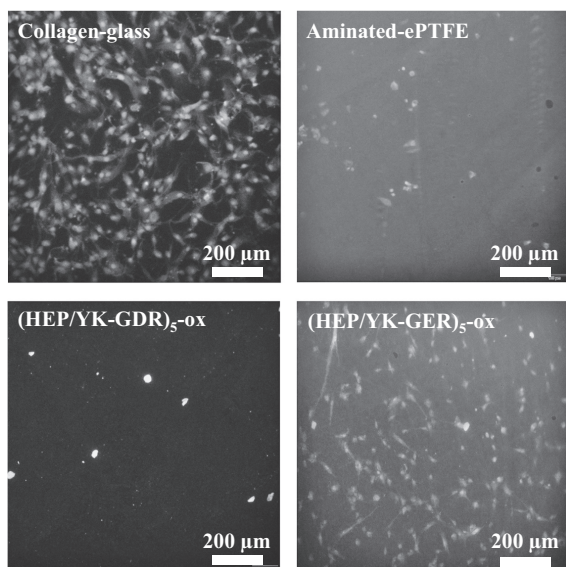


図11. 各 ePTFE 表面への AdmMSC の接着.

基を Asp 残基に置換した陰性対象ペプチドとヘパリンを共固定した ePTFE ((HEP/YK-GDR)₅-ox) には AdmMSC はほとんど接着しなかったが、リガンドペプチドとヘパリンを共固定した ePTFE ((HEP/YK-GER)₅-ox) にはコラーゲンコートガラスと同程度の AdmMSC が接着した (図11)。一般的にアミノ基を導入した基材表面はカチオン性を帯びるため、細胞は良く接着することが知られている。本評価では、アミノ化 ePTFE 表面に残留するキノンと培地中のアルブミンが結合することで AdmMSC の接着性が損なわれたと考えている。陰性対象ペプチドでは AdmMSC が接着しなかったことから、リガンドペプチドと AdmMSC との特異的な相互作用が機能していることも示唆された。

今後は、リガンド/ヘパリン共固定化 ePTFE 基材への血管平滑筋細胞の接着性や血小板の粘着性、全血の凝固挙動などを解析し、この表面の MSC に対する特異性を詳細に評価する。

5. ペプチドのバイオマテリアルへの応用

平野義明*⁹

5.1. 緒言

ペプチドは主鎖にペプチド結合を形成せず、アミド窒素上のプロトンが側鎖で置き換えられた構造を持つ。ペプチドの基本構造を図12に示す。そのため、水素結合形成能を持たず、ペプチドのように α -ヘリックスや β -シートなどの二次構造をとらない。これにより、ペプチドの構造や化学的性質は側鎖に大きく依存するので、側鎖に任意の官能基を導入することにより、分子構造の正確な制御ができ自己組織化によるナノシートの作

*9 化学生命工学部教授 博士 (工学)

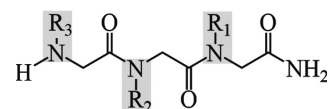


図12. ペプチドの構造.

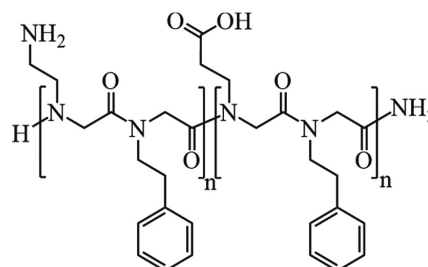


図13. (Nae-Npe)_n-(Nce-Npe)_n の構造.

製が可能である。加えて、プロテアーゼなどの加水分解酵素に対する安定性や、高い生体膜透過性が報告されている¹⁶⁾。さらに、N 末端を有するためペプチドとのハイブリッド化も可能であり、新規生体材料として有用であることが考えられる。

主にペプチドの合成には、液相合成で行われる NCA 重合などが用いられる¹⁷⁾。液相合成法では大量合成が可能であるが、反応溶液から目的分子だけを分離する必要があり、多大な労力を要する。本研究では、ペプチドの合成に、ペプチドの Fmoc 固相合成法を適用した。固相合成法は、反応させたい分子を固体樹脂上に結合させ、その樹脂上で試薬と化学反応させる合成手法であり、目的分子以外の不純物を洗浄操作のみで除けるので、分離操作なしに連続的に化学反応を行うことが可能である。そのため、手間と時間が大幅に省略されるので、20~30残基程度のペプチドを合成するには Fmoc 固相合成が有用であると考えられる。

そこで、上述のような有用性を考慮した上で Fmoc 固相合成法を適用し、図13に示したペプチドを合成した¹⁸⁾。このペプチドを用いて自己組織化させ、ナノシート形成の評価や、細胞接着性や細胞毒性試験などの細胞との相互作用についても評価した。

5.2. 実験

ペプチドの Fmoc 固相合成法を適用し、(Nae-Npe)₇-(Nce-Npe)₇ を合成した¹⁹⁾。ペプチド固相合成にはアミド樹脂として Fmoc-NH-SAL-MBHA Resin を使用し合成を行った。脱樹脂・脱保護した後、凍結乾燥し HPLC で精製を行った。MALDI-TOF-MS により分子量を測定し、さらに HPLC で純度を同定した。超純水、Tris buffer (pH 8.0) の混合液を加えたバイアルに、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したペプチドを加え、バイアルロッキング法²⁰⁾を用いて攪拌を行いナ

ノシートを作製した。その後、ナイルレッドで染色しナノシートのサイズや形状を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

ペプチド溶液をガラスプレートに滴下した後、減圧乾燥することでペプチドをコーティングした。コーティングの確認は、X線光電子分光法（XPS）を用いて行った。ペプチドをコーティングしたガラス表面にマウス線維芽細胞（L929）を播種し、1日間インキュベートし、細胞接着挙動を光学顕微鏡で観察した。また、そこにL929細胞を播種し、3日間インキュベートした後、Cell Counting Kit-8で細胞増殖試験を行った。

5.3. 結果・考察

ペプチドのFmoc固相合成法を適用し、誘導体の仕込み量や、攪拌時間等の条件を検討した結果、 $n=3, 5, 7$ の鎖長のペプチドの合成が可能となった。縮合反応終了後、樹脂からペプチドを切り出し、HPLCで分取・精製した。

その結果、MALDI-TOF-MSによって目的物由来の分子イオンピークを確認することができた。以上の結果より、鎖長の異なるペプチドをFmoc固相合成法で効率的に合成する手法が確立したことがわかった。また、溶媒を使用する合成を行うことにより、従来の手法に比べて多量にペプチドを得ることができた。

バイアルロッキング法により、鎖長の異なるペプチド ($n=3, 5, 7$) を用いてナノシートの作製を行った。共焦点蛍光顕微鏡による自己組織化ナノシートの画像を図14に示す。ペプチドの自己組織化によってナノシートを形成することが明らかになった。また、 $n=3$ のナノシートは大きさが $100\ \mu\text{m}$ 以下であったが、 $n=5, 7$ のペプチドで作製したナノシートでは $100\ \mu\text{m}$ 以上のナノシートが多数形成されることが明らかになった。Robertsonらのナノシートの分子シミュレーションよ

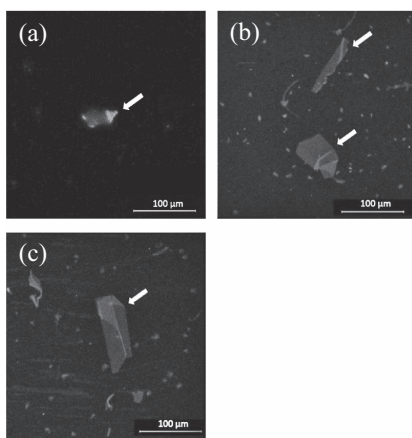


図14. $(\text{Nae-Npe})_n-(\text{Nce-Npe})_n$ のナノシート。
(a) $n=3$, (b) $n=5$, (c) $n=7$

り、ペプチドの末端付近に分子間相互作用の弱い空洞部分が存在していることが明らかになっており、鎖長のペプチドの方が密に自己組織化し空洞の数が少なくなるため、安定したナノシートが作製できたと推察できる¹⁸⁾。

これらの結果が、ナノシートの安定性や溶解性などの物性に大きく影響を及ぼすと考えられる。

ペプチドナノシートのうち $n=3$ の小さなナノシートは容易に水溶液に溶解するが、 $n=5, 7$ は水溶液中で安定に存在することが分かった。

ペプチドをコーティングしたガラスプレートを細胞培養培地に浸漬し、コーティングの安定性を検討した。XPSの結果より、 $n=3$ のペプチドのコーティングは、1日後に剥離していることが判明した。しかし、 $n=5, 7$ のペプチドは7日後でもガラス表面にコーティングできていることが明らかになった。これは、鎖長の増加により分子間相互作用が増し、ペプチドの側鎖によって安定的に自己組織化してコーティングできたからだと考えられる。以上の結果より、細胞実験には、鎖長の $n=5, 7$ のペプチドを用いた。

ペプチドをコーティングしたガラス基材表面にL929を播種し、1日間インキュベートした後、細胞接着挙動を光学顕微鏡で観察した。細胞接着数を計数し評価した結果、コントロールとして使用したポリスチレン製細胞培養用プレートと同様の接着数であった。その結果を図15に示す。

また、細胞の伸展についても、ペプチドをコーティングした基材上では、細胞培養用プレート上で培養した細胞と高い伸展率を示すことが明らかになった。

さらには、細胞毒性を調査するために、Cell Counting Kitで測定した結果、ペプチドコーティング細胞培養用プレート上で培養したL929細胞が、播種1日目と比較して顕著に増殖していることから、 $(\text{Nae-Npe})_n-(\text{Nce-Npe})_n$ ($n=5, 7$) が細胞毒性を示さないことが明らかとなった。

これらの結果より、 $(\text{Nae-Npe})_n-(\text{Nce-Npe})_n$ が、新

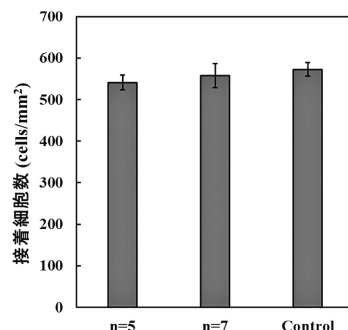


図15. $(\text{Nae-Npe})_n-(\text{Nce-Npe})_n$ 固定化基材上での細胞接着結果。

規のバイオマテリアルや培養基材としての応用が可能であると考えられる。さらには、固相法によりペプチドのN末端からペプチド鎖を導入する手法も確立できた。

6. マイクロ波照射法を用いたキトサン誘導体の系統的合成

古池哲也*¹⁰

6.1. はじめに

キチンはカニやエビなどの甲殻類の外殻の主成分である天然高分子で、将来的に枯渇しない原料として注目を浴びている。このキチンのアルカリ処理により得られるキトサン (CS) は、生分解性、生体適合性、抗菌性などの特性を有しており、医薬、化粧品、食品など様々な分野に応用されている。しかしながら、CSは、酸性水溶液には溶解するものの、有機溶媒に難溶なため、化学修飾には制限があり、より多岐にわたるCSの機能化を困難にさせている。

一般に、加熱下での化学反応を行う際、水浴や油浴を用いた外部加熱が用いられる。この際、熱は容器の外側から熱伝導によって内部に伝わるため、中心部と外側で温度差が生じ、反応効率が悪い場合長時間の反応時間を必要とする。それに対し、マイクロ波加熱は、溶媒などの分子振動により加熱されるため、熱伝導によらずに内部の温度を一定、かつ瞬時に上昇させることができる。このため、加熱に要する時間を著しく短縮でき、かつ均一に加熱できるといった特徴がある。そこで本研究では、マイクロ波照射法を用いてCS誘導体の効率的な合成法の確立を目的とし、CSのC-2位のアミノ基にフタロイル (Phth) 基を導入し、有機溶媒に可溶化した後、様々な化学修飾反応をマイクロ波照射条件下で行い、conventional法との比較検討を行った。

6.2. CS誘導体の調製

本研究で行ったCS誘導体の合成経路を図16に示す。まず、CSを有機溶媒に可溶化させるため、DMF/H₂O混合溶媒中で無水フタル酸を用いて、C-2位のアミノ基にPhth基の導入を行い、N-フタロイルキトサン (PhthCTS) を調製した。Phth化はマイクロ波を使用することにより、反応時間が従来の1/8となったが、CSのC-2位のアミノ基以外にC-6位のOH基に無水フタル酸が反応することが確認された。また、反応温度や試薬量、および溶媒が大きく反応に寄与することが確認され、C-6位のヒドロキシ基への反応を制御することでPhthCSの調製に成功した。

続いて、PhthCTSをピリジン中でトリチルクロリド

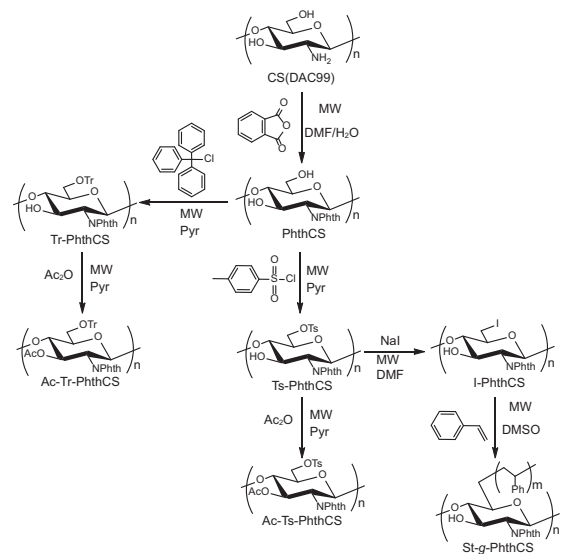


図16. CS誘導体の系統的合成経路.

(TrCl) を用いて C-6 位のみを Tr 化し、得られた Tr-PhthCS に無水酢酸 (Ac₂O) を用いて C-3 位の Ac 化を行うことで Ac-Tr-PhthCS を調製した。Tr 化はマイクロ波を用いた場合、Tr 基の置換度が低くなる傾向が確認された。Tr 基の置換度が向上しない原因の究明のため、Tr 化を行う際に副生成物として生成するピリジン塩酸塩を Tr-PhthCS に加えた後に加熱することで、Tr 基の脱離に関する検討を行った。さらに、Tr 基の高さの影響を検討するため、PhthCS に無水酢酸を用いて Ac 化し、Ac-PhthCS の調製、あるいは tert-ブチルジメチルシリルクロリド (TBDMS-Cl) を用いて TBDMS 化し、TBDMS-PhthCS を調製することで、各々の保護基の置換度を比較検討した。続いて、Tr-PhthCS の Ac 化に関しては、反応時に一部の Tr 基が脱離する傾向が見られた。

Tr 化と同様に、PhthCS をピリジン中でトリチルクロリド (TsCl) を用いて C-6 位を Ts 化し、得られた Ts-PhthCS に Ac₂O を用いて C-3 位の Ac 化を行うことで Ac-Ts-PhthCS の調製も行った。Ts 化はマイクロ波を使用することにより、反応時間が従来の1/4となり、マイクロ波の有効性が示唆された。また、反応温度を高くすると Ts 化の進行が促進されたものの、反応時間を長くすると Ts 基が Cl へ転化することが確認され、Ts 化の完了には 0℃ または 25℃ の低温である必要があることが分かった。さらに、Ts-PhthCS の Ac 化はマイクロ波を使用することにより、反応時間が従来の1/3となり、マイクロ波の有効性が示唆された。また、反応温度を高くすることや反応時間を長くすることで Ac-Ts-PhthCS の分解が確認され、過酷な条件下では Ac-Ts-PhthCS の調製ができないことが確認された。

次に、得られた Ts-PhthCS の 6-Ts 基を I に変換す

*10 化学生命工学部教授 博士 (地球環境科学)

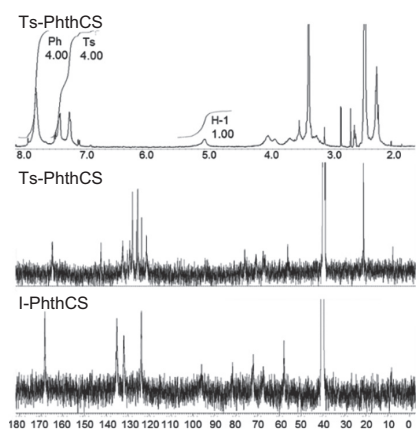


図17. CS誘導体の¹H-NMRおよび¹³C-NMRスペクトル。

るため、DMF中でNaIを作用させることでI-PhthCSの調製も行った。Ts基のI化はマイクロ波を用いても反応時間が短縮されなかった。これは反応系内のNa+がマイクロ波エネルギーの大半を反射するため、I化反応が不均一に進行したことに起因すると考えられる。そのため、I化にはマイクロ波の使用は有効ではないことが示唆された。そこで、マイクロ波を用いてI化に使用するNaIの添加量を増やす、あるいは反応温度を高くすることで完全なI化が達成された。

さらに、I-PhthCSのC-6位を開始点として、スチレン(St)のグラフト重合を行い、St-*g*-PhthCSの調製を試みた。反応における温度、時間、および試薬量などを変化させることで反応挙動を検討したが、いずれの場合においても十分な重合度を有するグラフト重合体を得ることができなかったため、今後反応条件に関して検討が必要である。

本研究で調製した全てのCS誘導体は、¹H-NMRおよび¹³C-NMRスペクトルにより同定を行い、また、得られたSt-*g*-PhthCSの平均分子量、および分子量分布はGPCを用いて測定した(図17)。

6.3. 誘導体の溶解性試験

1.2で調製した各々のCS誘導体を7種の有機溶媒(アセトン、メタノール、クロロホルム、DMF、酢酸エチル、ピリジン、DMSO)に加えて室温で2h攪拌した。その後、目視によりCS誘導体の溶解挙動を観察した。その結果、本研究で調製したCS誘導体は、DMFやピリジンなどの一般的な有機溶媒に溶解することが目視により確認された。

以上のように、本研究で調製したCS誘導体が一般的な有機溶媒に溶解挙動を示すことにより、多岐にわたる機能性CS誘導体の調製が期待される。

7. 上限臨界溶液温度(UCST)型の温度応答性を示すゾル-ゲル相転移ポリマーの創製

河村暁文^{*11}、宮田隆志^{*12}

温度やpHなどの外部刺激に応答してゾル状態からゲル状態へ可逆的に変化するゾル-ゲル相転移ポリマーは、特に医療分野においてインジェクタブルポリマーや細胞足場材料としての応用が期待されている。例えば、低温で水に溶解し、高温で水に不溶となる下限臨界溶液温度(LCST)型の温度応答性ポリマーを用いることによって、温度上昇に伴ってゾル-ゲル相転移する温度応答性ゾル-ゲル相転移ポリマーが報告されている^{21,22)}。われわれは、生体分子複合体を動的架橋として用いることにより、さまざまな生体分子に応答して体積変化する生体分子応答性ゲルやゲル微粒子について研究を進めてきた^{23,24)}。さらに、動的架橋点として生体分子複合体を用いるコンセプトを拡張して、生体分子をシグナルとしてゾル-ゲル相転移する高分子の合成にも成功している。例えば、4分岐構造を有するPoly(ethylene glycol)(PEG)の末端にピオチンを導入することにより、標的分子であるアビジンを認識してゾル-ゲル相転移する生体分子応答性ゾル-ゲル相転移ポリマーの創出に成功している²⁵⁾。このポリマーは、アビジンの添加によってアビジン/ピオチン複合体形成によりゾル-ゲル相転移する。さらに、このゲルにフリーのピオチンを添加すると、再びゾル状態へと変化する。他にも、4分岐PEGの末端に光二量化基を導入することにより、光に応答したゾル-ゲル相転移にも成功している²⁶⁾。

このように、さまざまな刺激応答性ゾル-ゲル相転移ポリマーが報告されてきたが、高温溶解型の温度応答性ゾル-ゲル相転移ポリマーは極めて報告が少ない。そこで、上限臨界溶液温度(UCST)型の温度応答性を示し、側鎖に4級アンモニウム塩と硫酸塩とを併せ持つ双性イオンポリマー(polysulfobetaine: P_{SaB})に着目した。P_{SaB}は、分子間に働く非常に強い双極子-双極子相互作用により、水中だけでなく生理的イオン強度環境下においても、UCST型の温度応答挙動を示す。P_{SaB}を用いることにより、これまでほとんど報告されていなかった生理的イオン強度環境下においてもUCST型のゾル-ゲル相転移が可能なポリマーが得られると考えられる。このような生理的イオン強度環境下におけるUCST型のゾル-ゲル相転移を示すポリマーを得るために、刺激応答性ポリマーブロックAと親水性ポリマーブロックBとからなるABA型のトリブロックポリマーに着目した。このポリマーは、刺激応答性ポリ

*11 化学生命工学部准教授 博士(工学)

*12 化学生命工学部教授 博士(工学)

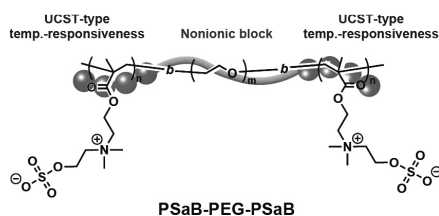


図18. UCST 型の温度応答性ゾルーゲル相転移挙動を示す PSaB-PEG-PSaB の化学構造.

マーブロックが外部刺激に応答して自己集合体を形成し、これが架橋点として機能することによりゲル化する。そこで本研究では、PEG の両末端に UCST 型の温度応答性を示す PSaB ブロックを有する ABA 型のトリブロックコポリマー (PSaB-PEG-PSaB) を合成し、その温度応答性ゾルーゲル相転移挙動について検討した (図18)。

まず、可逆的付加開裂連鎖移動重合により分子量 11000 (重合度250) の直鎖状 PEG の両末端から SaB を伸長させることより PSaB-PEG-PSaB を合成した。核磁気共鳴分光法ならびにサイズ排除クロマトグラフィーにより PSaB-PEG-PSaB の生成を確認し、PSaB-PEG-PSaB の PSaB ブロックは数平均分子量 29700 (重合度97) であることがわかった。

まず、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-)) 中での、PSaB-PEG-PSaB の自己集合体形成を評価した。PSaB-PEG-PSaB を 5 mg/mL となるように PBS (-) に加熱溶解させた後、室温まで冷却したところ溶液が白濁した。動的光散乱測定により、25および80℃における粒径分布を測定したところ、25℃では PSaB-PEG-PSaB は100 nm 程度の単峰性のピークを有しており、PBS (-) 中において自己集合体を形成していることがわかった。一方、80℃では粒径が大きく減少したことから、加熱により PSaB-PEG-PSaB 自己集合体が解離したと考えられる。以上の結果から、PSaB-PEG-PSaB は PBS (-) 中において高温で溶解し、低温で自己集合体を形成することがわかった。

次に、濁度測定により PSaB-PEG-PSaB の温度応答挙動を評価した。PSaB-PEG-PSaB の PBS (-) 溶液 (5 mg/mL) を加熱したところ、室温付近では透過率が60%程度であり、50℃付近から急激に透過率が減少し、60℃を境に透過率が急激に増加した。したがって、今回合成した PSaB-PEG-PSaB は PBS (-) 中で LCST および UCST 型の温度応答挙動を併せ持つことがわかった。室温付近から50℃までは、PSaB-PEG-PSaB の PSaB 間の双極子-双極子相互作用により、外層に PEG 鎖を有する PSaB-PEG-PSaB 自己集合体が形成していると推察される。50~60℃では、PSaB 間の双極子-双極子相互作用が弱まると共に、PSaB ブロックと PEG との相互作用が生じてメソスケールの PSaB-PEG-PSaB 自己

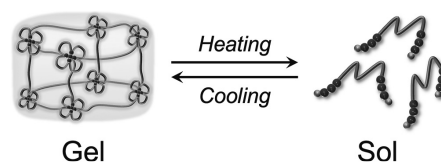


図19. UCST 型の温度応答性を示す PSaB-PEG-PSaB のゾルーゲル相転移の模式図.

集合体が形成していると推察される^{27,28)}。一方、60℃以上では PBS (-) 中に存在するイオンと PSaB 鎖とで生じるイオン-双極子相互作用および加熱による PSaB ブロック間の双極子-双極子相互作用力の減少により PSaB ブロック間の相互作用が遮蔽されるため、PSaB-PEG-PSaB が PBS (-) に溶解したと考えられる。

続いて、PSaB-PEG-PSaB の濃厚溶液 (15 wt%) のゾルーゲル相転移挙動を試験管傾斜法により評価した。その結果、25℃では溶液が流れ落ちずゲル状態であったのに対して、70℃では溶液が流れ落ちゾル状態となった。そこで、25℃においてゲル状態を示した PSaB-PEG-PSaB 濃厚溶液の粘弾性 (周波数分散) を評価した。その結果、低周波数領域において貯蔵弾性率 (G') が損失弾性率 (G'') を上回っており、平坦領域が存在した。したがって、PSaB-PEG-PSaB の PBS (-) 溶液は25℃においてゲルであることがわかった。図19には、PSaB-PEG-PSaB の温度に応答したゾルーゲル相転移の模式図を示した。低温においては、生理的イオン強度環境下においても PSaB-PEG-PSaB の PSaB ブロックの強力な双極子-双極子相互作用によって会合して自己集合体を形成し、これが架橋点として作用することによりゲルが生じる。一方、温度上昇に伴って、PSaB ブロック間の双極子-双極子相互作用力が減少し、PSaB-PEG-PSaB 自己集合体架橋が解離する。その結果、ゲルネットワークが切断されてゲル状態からゾル状態へと変化したと考えられる。

以上の結果より、PSaB-PEG-PSaB は PBS (-) 中においてゲル化することがわかった。さらに、このゲルは加熱によりゾル化する高温溶解型のゾルーゲル相転移挙動を示すことがわかった。このようなゾルーゲル相転移ポリマーは、インジェクタブルゲルや細胞培養基材として有用であると考えられる。

8. DNA を足場として活用する生物発光共鳴エネルギー伝送路システム

葛谷明紀^{*13}

DNA は、遺伝情報の保存と伝達のために最適化された、精緻かつ非常に整った立体構造形成能に加え、厳密

*13 化学生命工学部教授 博士 (工学)

な配列認識に基づく高い自己組織化能をあわせもっている。これらの特性を利用して、DNA 二重らせんを丸太のように使って自在にナノ構造をつくる「DNA ナノテクノロジー」など、DNA を「インテリジェント材料」として扱う研究分野が発展してきた。我々もこれまでに、動く DNA オリガミ構造体²⁹⁾など DNA だけからなる分子デバイスのみならず、単純な DNA 鎖やより複雑な DNA オリガミ構造体を「機能分子の制御装置」として活用することで、微小管/キネシン分子モーター系をアクチュエーターとした分子群ロボット³⁰⁾や分子人工筋肉³¹⁾などを開発してきた。

さらに我々は、DNA を用いて生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を自在に「制御」することにも成功している。NanoLuc と呼ばれる深海エビ由来の発光タンパク質は、ホタルルシフェラーゼの100倍以上の発光強度を誇りながら、反応に ATP を必要としないなど、数多くの利点を有している。さらに、これまでにスプリット体も開発されており、NanoLuc の C 末端側11残基のペプチド鎖 (HiBiT) と、残りの大断片である LgBiT が非常に強く相互作用して、発光活性を回復することが報告されている³²⁾。我々は、銅フリークリック反応で DNA 鎖の末端に HiBiT を結合し、ここで局所的に NanoLuc を再構成させることにより、DNA の二重らせん形成を介して NanoLuc 近傍に様々な機能分子を配置できる系を構築した。その結果、NanoLuc をドナー、相補鎖に導入した各種蛍光色素をアクセプターとして、非常に効率的な BRET を誘導できることを見いだした³³⁾。結合する蛍光色素の数や種類は自在に選択できるため、NanoLuc の青色発光エネルギーを互いに離して配置した2分子のフルオレセイン (FAM) で受け取り、非常に鮮明な緑色発光を得ることができる。さらに、まず FAM に BRET でエネルギーを移動させ、ついで2分子目の赤色蛍光色素である Alexa Fluor 594 にフェルスター蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によりエネルギー移動させれば、非常に鮮明な赤色発光を得ることもできる。

本研究ではこのシステムを応用して、DNA 上に配列化した複数の蛍光色素をメディエーターとした homo-FRET を介した分子内光エネルギー伝送路を開発した (図20)³⁴⁾。NanoLuc を 5'-末端で再構成した20残基の DNA 鎖に対して、主鎖内に FAM 残基を側鎖として挿入できる特殊モノマーを利用して、5 残基ごとにメディエーターを配置した相補鎖を化学合成した。二重らせんを形成した際に NanoLuc と反対側の末端に配置される相補鎖の 5' 末端には、アクセプターとして Alexa Fluor 594 を修飾した。

図21に挿入する FAM を変えて測定した発光スペクト

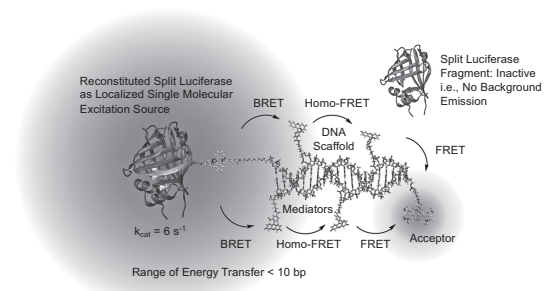


図20. システムの概略図.

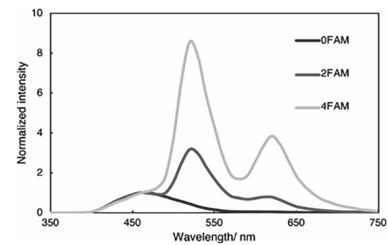


図21. 各系の発光スペクトル.

ルを示す。FAM を挿入していない系 (0FAM)、10塩基ごとに2分子挿入した系 (2FAM)、および5塩基ごとに4分子挿入した系 (4FAM) を用意した。メディエーターが存在しない場合 (0FAM)、最終アクセプターである Alexa Fluor 594 へのエネルギー移動は起こらなかった。次に10塩基毎にメディエーターを挿入すると (2FAM)、Alexa Fluor 594 由来の発光が明瞭に観察されるようになり、460 nm のドナー発光に対する強度比は0.78となった。FAM を5塩基毎に挿入した系 (4FAM) ではさらに強い赤色発光が観察され、そのドナー発光に対する発光強度比は3.86となった。

バルク光源を用いる一般的な蛍光測定の系では、励起光の局所化に限界があるため、系中の全ての蛍光色素が同時に励起されてしまい、純粋なエネルギー伝送だけを評価することは困難である。一方本系では、スプリット体の各断片には発光活性がないため、励起光源を DNA 末端に結合された発光タンパク1分子に限定できる。配列したメディエーターの配向や距離などの影響を厳密に検討することができるはずであり、今後、人工光合成系の開発などへの応用が期待される。

9. 血液循環の数値モデルに基づく Blalock-Taussig Shunt 術時の最適な短絡血流量制御要因の検討

田地川勉^{*14}、根本慎太郎^{*15}、岸 勘太^{*16}

我々の研究室では、生体内の環境を模した物理的・数

*14 システム理工学部 准教授 博士 (工学)

*15 大阪医科大学胸部外科 専門教授 博士 (医学)

*16 大阪医科大学小児科 講師 (准) 博士 (医学)

理的モデルを作製・作成し、それらを稼働・機能させることで、生体内と同じ現象を再現し、そこから医療機器の開発支援等への応用に繋げる取り組みをしている。本報告では、その一例として、ファロー四徴症 (TOF) 患者の血液循環動態を模した数理モデルの作成とそれを使った Blalock-Taussig Shunt 術 (BTS) 時の最適な短絡血流量制御要因を検討した例を紹介する。

心室中隔欠損 (VSD)、肺動脈狭窄 (PS)、大動脈騎乗 (OA)、右心室肥大 (RVH) の4つの特徴を持つチアノーゼ性先天性心疾患である TOF は、患者の発育に大きく影響するため、循環動態的な条件が整ったうえで適切な時期での治療が望ましい。患者が小さく、条件が整っていない場合は根治術には耐えられないため、まず姑息術により症状を緩和することで、患者の発育に伴う心肺機能の発達を促し、必要な体力と体格を得て循環動態的な条件が整った後に、根治術として開心術を行うことが多い。姑息術の1つの BTS は鎖骨下動脈等と肺動脈を人工血管で短絡 (shunt) することで、体循環への血流を肺循環に一部還流して肺血流量を増やすことで、体循環の酸素不足を低減する。しかし、シャント血流量が多すぎると、体循環の血流量が確保できなくなるため、厳格な制御が必要不可欠だが、臨床ではその制御要因となるシャント管の寸法や抵抗の付与などは医師の経験に依存しており、明確な根拠がない。

そこで本研究では、血液循環の基本数理モデルである Windkessel モデルに基づいて乳幼児の循環動態を再現した1次元血液循環モデルを作成し、モデル上で TOF と BTS を再現することで、BTS 後の血行動態と適正循環が得られる条件を検討した。

本研究では、物理モデリング用計算機言語 Modelica のオープンソース開発環境 OpenModelica (Open Source Modelica Consortium, Ver. 3.2.3) を使い、Matejak らが開発したヒトの生理現象の数理モデルライブラリである Physiobrary³⁴⁾ (Ver. 2.3.1) を利用し、Fernandez de Canete らが提案した成人の心血管系の血液循環モデル³⁵⁾を参考に、図22に示す健全なヒトの体循環と肺循環、左右の心室と4つの心臓弁からなる1次元血液循環モデルを作成した。使用した主要要素の力学モデル³⁶⁾を以下に示す。

Conductor

血管抵抗 R の逆数のコンダクタンス ($=1/R$) を与え、血管の摩擦圧力損失 Δp をモデル化した。

$$\Delta p \equiv p_{in} - p_{out} = Rq_{in} \quad (1)$$

ここで q_{in} は血管を通過する体積流量、 p_{in} 、 p_{out} は入口と出口の圧力である。

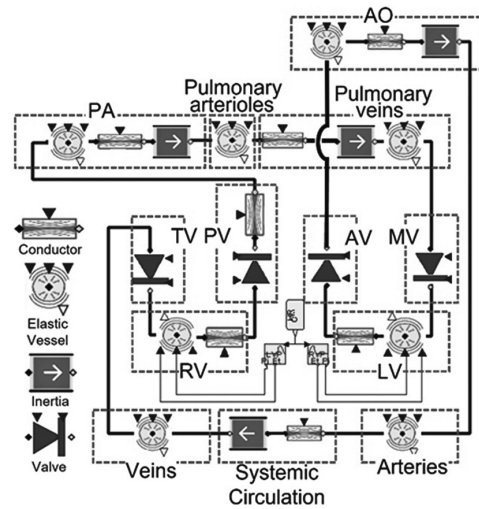


図22. 作成した健常児の循環動態を再現した1次元数理モデルの概略図。

Inertia

イナータンス I で血流の慣性をモデル化した。

$$\Delta p \equiv p_{in} - p_{out} = I \frac{dq_{in}}{dt} \quad (2)$$

Valve

弁による圧較差は、本来渦により発生するが、先行研究³⁶⁾に従って摩擦抵抗でモデル化し、心収縮期と拡張期で異なるコンダクタンス $1/R_v$ を与えた。

$$\Delta p \equiv p_{in} - p_{out} = R_v q_{in} \quad (3)$$

なお、以上3つの基本要素は連続の式を同時に満足する。

$$q_{out} = -q_{in} \quad (4)$$

ここで、 q_{in} 、 q_{out} は要素の入口・出口の流量 (流入が $q > 0$ 、流出が $q < 0$) である。

Elastic Vessel

血管が弾性を有すると血圧変化によって血管容積が変化する。それらの関係を、連続の式と血管コンプライアンス C' の定義に基づきモデル化した。

$$V - V_{NL} \equiv dV = C' dp \equiv C' (p - p_{NL}) \quad (5)$$

ここで p_{NL} と V_{NL} は血管の無負荷圧力とそのときの体積で、血管体積の最小値は無負荷時体積という条件を課した。また心室は、心拍による心室容積の変化を、コンプライアンスを時間的に変化させることで再現した³⁷⁾。

以上の構成要素からなる健常モデルに対して、図23に示すように新たに Conductor を使って作成した VSD と OA モデルを追加し、さらに肺動脈弁 (PV) コンダクタンス $1/R_{PS}$ を増加させ肺動脈狭窄状態として TOF モデル^{38,39)}を、さらに大動脈 (AO) と肺動脈 (PA) を shunt 管とみなした Conductor で接続した BTS モデル

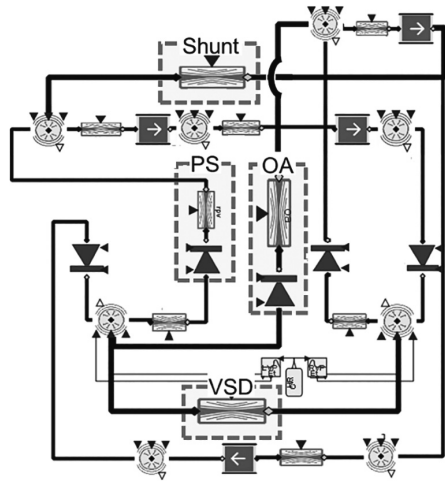


図23. 作成した TOF の循環動態に BTS を適応した循環動態に相当する 1 次元数値モデルの概略図.

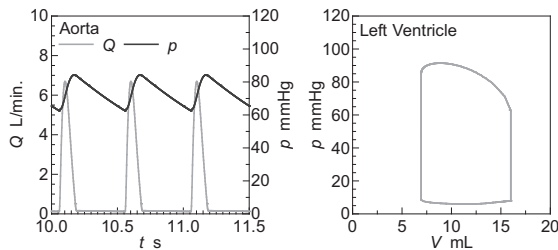


図24. 6 ヶ月齢の健常児を想定したシミュレーション例 (左: 大動脈圧・流量波形, 右: 左心室の圧容積曲線).

を作成した。

各要素のパラメータは、Goodwin らによる成人パラメータの乳児化の手法⁴⁰⁾を使うことで、生後6か月の健常児のパラメータを推定して使用した。計算条件は、心拍数は120 bpm、60心拍分(30秒間)とし、数値積分はDASSLを使用し、時間刻みは2msで計算した。得られた結果は、計算の安定性を考えて計算開始10秒後から24心拍分の結果を整理した。なお TOF の重症度の1判断指標としての肺体血流比は、本研究では肺動脈と体循環の時間平均血流量の比 $\bar{Q}_{PA}/\bar{Q}_{Sys}$ で定義し、これが0.5未満を重度とした。

得られた結果の一例として、6ヶ月齢の健常児の大動脈の圧力・流量波形と左心室の圧力・容積ループを図24に示す。これらの結果は、先行研究⁴¹⁾とよく一致していた。

そこで、TOF 患者と BTS 術後の循環動態のシミュレーションを行った。なお、TOF では肺動脈弁狭窄(PS)度は患者毎に異なるため、本研究では PS コンダクタンス $1/R_{PS}$ を系統的に変化させ、それが肺体血流比 $\bar{Q}_{PA}/\bar{Q}_{Sys}$ におよぼす影響を調べた。その結果、図25に示すように $1/R_{PS}$ の減少に伴って \bar{Q}_{PA} が減少し、それにより $\bar{Q}_{PA}/\bar{Q}_{Sys}$ が低下し、これが0.5を下回る条件はおおよそ $1/R_{PS} < 20 \text{ mL}/(\text{mmHg} \cdot \text{min.})$ であることが分かった。

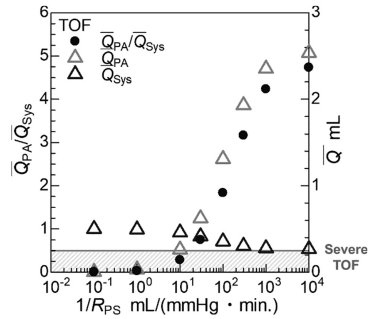


図25. 肺動脈狭窄度が肺体血流比におよぼす影響.

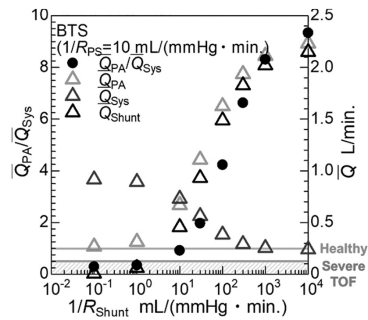


図26 肺動脈狭窄度が肺体血流比におよぼす影響.

PS コンダクタンスを $1/R_{PS} = 10 \text{ mL}/(\text{mmHg} \cdot \text{min.})$ に固定し、BTS の循環動態をシミュレーションした結果を図26に示す。その結果、シャント管コンダクタンス $1/R_{Shunt}$ の増加と共に、シャント流量 \bar{Q}_{Shunt} が増加することで、肺循環流量と肺体血流比が共に増加し、本シミュレーション条件では PS コンダクタンスと同じ $1/R_{Shunt} = 10 \text{ mL}/(\text{mmHg} \cdot \text{min.})$ で、 $\bar{Q}_{PA}/\bar{Q}_{Sys} \approx 0.917$ とほぼ適正循環が得られた。

なお、このコンダクタンス値は、血液粘度を $\mu = 4 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ⁴²⁾ として Hagen-Poiseuille の法則を適用すると、シャント管内径が $d = 3 \text{ mm}$ のとき、その長さが $l = 400 \text{ mm}$ 必要となり、これは BTS で人工血管が縫合される腕頭動脈と肺動脈の直線距離よりはるかに大きい。また、肺体血流比が1を越えると、シャント管のコンダクタンス変化に対する肺体血流比の増加率が急となるため、特に $1/R_{Shunt} = 10^1 \text{ mL}/(\text{mmHg} \cdot \text{min.})$ 付近で微調整可能なデバイスが必要となることが分かった。

今後、よりモデルを高精度化すると共に、臨床で得られる指標をつかったシミュレーションを行うことで、術前の治療効果予測やデバイス選択の援用などに繋げることを目指す。

10. 気道の波動伝搬現象の抵抗に関する研究

宇津野秀夫^{*17}

呼吸器系の疾患として、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)

*17 システム理工学部教授 博士 (工学)

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。煙草の煙を吸入することで肺の中の気管支に炎症を起こし、気管支が枝分かれした奥にあるぶどうの房状の小さな袋である肺胞が破壊される。日本の COPD 患者数は40歳以上で約530万人といわれており、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27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。

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

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。

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

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

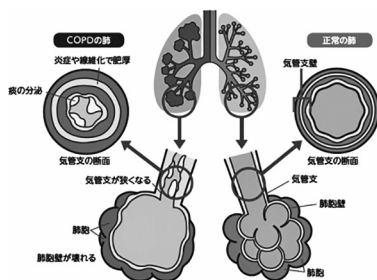


図27. 正常な肺胞と COPD の肺胞⁽³⁾。

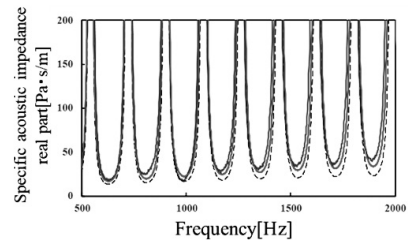


図28(a). 閉止管路の音響インピーダンスの実数部。

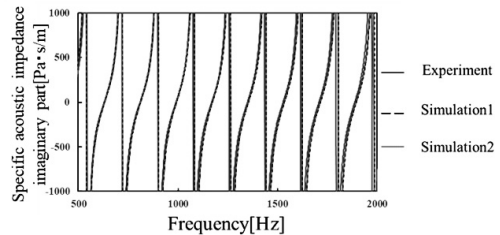


図28(b). 閉止管路の音響インピーダンスの虚数部。

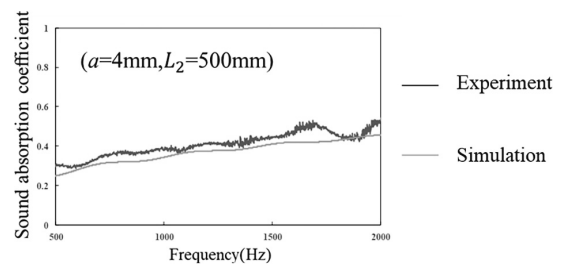


図29. 半径 4 mm の音響管路の吸音率。

本解析モデル⁽⁴⁾を用いて、半径 15 mm、長さ 1 m の剛壁管路の音響インピーダンスの計算値と測定値を図28(a)と図28(b)に比較する。音響インピーダンスの実数部は減衰を意味するが、粘性と熱伝導の両者を考慮したシミュレーション2では、計算と実験がかなりよく一致することが分かる。

次に半径を 4 mm とした 500 mm の閉止管路の吸音率を計算し、図29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。

参考文献

- 1) N. Kurikawa *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, 139, 1085 (2003).
- 2) D. E. Mire *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 46, 585 (2005).
- 3) F. Shakeel *et al.*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53, 2846 (2014).
- 4) Y. Ohya *et al.*, *Macromol. Chem. Phys.*, 16, 1750 (2010).
- 5) Y. Ohya *et al.*, *J. Control. Rel.*, 155, 104 (2011).
- 6) K. Suzuki, Y. Ohya *et al.*, *Biomater. Sci.*, 10, 1920 (2022).
- 7) S. Kikuchi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280, 15398 (2005).
- 8) M. Domenicali *et al.*, *J. Hepatol.*, 51, 991 (2009).
- 9) Y. Yoshizaki, Y. Ohya *et al.*, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 9, 3414 (2023).

- 10) Y. Okuno, Y. Iwasaki, *Soft Matter*, 20, 1018 (2024).
- 11) 特願2023-132597
- 12) S. Kakinoki, T. Yamaoka, *Bioconj. Chem.*, 26, 639 (2015).
- 13) S. Kakinoki, T. Yamaoka *et al.*, *Colloids Surf. B*, 216, 112576 (2022).
- 14) W-M. Zhang, D. Gullberg *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278, 7270 (2003).
- 15) S. Xue, H. Zhu *et al.*, *J. Membr. Sci.*, 524, 409 (2017).
- 16) S. Miller *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4, 2657 (1994).
- 17) C. Secker *et al.*, *Macromol. Biosci.*, 15, 881 (2015).
- 18) E. Robertson *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, 49, 379 (2016).
- 19) H. Tran *et al.*, *J. Vis. Exp.*, 57, e33373 (2011).
- 20) B. Sanii *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 20808 (2011).
- 21) B. Jeong *et al.*, *Nature*, 388, 860 (1997).
- 22) K. Nagahama *et al.*, *React. Funct. Polym.*, 73, 979 (2013).
- 23) T. Miyata, *Polym. J.*, 42, 277 (2010).
- 24) A. Kawamura, *Polym. J.*, 49, 751 (2017).
- 25) C. Norioka, T. Miyata *et al.*, *Polym. Chem.*, 8, 6378 (2017).
- 26) M. Okihara, T. Miyata *et al.*, *Gels*, 8, 183 (2022).
- 27) N. M. Nizardo *et al.*, *Polymers*, 10, 325 (2018).
- 28) N. Morimoto, M. Yamamoto, *Langmuir*, 37, 3261 (2021).
- 29) Y. Sakai *et al.*, *Nature Commun.*, 2, 449 (2011).
- 30) J. J. Keya *et al.*, *Nature Commun.*, 9, 453 (2018).
- 31) K. Matsuda *et al.*, *Nano Lett.*, 19, 3933 (2019).
- 32) A. S. Dixon *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, 11, 400 (2016).
- 33) 特願2021-132865
- 34) 特願2023-131184
- 35) M. Mateják *et al.*, *Proceedings of the 10th International Modelica Conference* (2014).
- 36) J. Fernandez de Canete *et al.*, *Comput. Biol. Med.*, 43, 323 (2013).
- 37) T. Kulhánek *et al.*, *MEFANET J.*, 2, 56 (2014).
- 38) G. Avanzolini *et al.*, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 32, 756 (1985).
- 39) C. D. Sa'Couto *et al.*, *Simul. Healthc.*, 1, 4 (2006).
- 40) E. H. SepIveda Oviedo *et al.*, *J. Med. Eng. Technol.*, 46, 179 (2022).
- 41) J. A. Goodwin *et al.*, *Anesth. Analg.*, 99, 1655 (2004).
- 42) 岡小天, *日本物理学会誌*, 23, 837 (1968).
- 43) 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/>
- 44) 中山陽介, *機械学会 D&D Conference* (2023).