

組織修復をコントロールする生体材料の開発

平成 18 年 度

三重大学大学院工学研究科
博士前期課程 分子素材工学専攻

長 尾 達 郎

平成 18 年度 修士論文

組織修復をコントロールする生体材料の開発

Development of Biomaterial for
Controlled Wound repair



三重大学大学院工学研究科 博士前期課程

分子素材工学専攻

長尾 達郎

修士論文目次

1章 緒言

| | |
|-------------------|----|
| 1-1 創傷治癒 | 1 |
| 1-1-1 創傷治癒の流れ | 2 |
| 1-1-2 ゲル材料 | 5 |
| 1-1-3 ジェラン | 6 |
| 1-2 創傷治癒を担う物質 | 7 |
| 1-2-1 細胞外マトリックス | 7 |
| 1-2-1-1 テネイシン | 8 |
| 1-2-1-2 アンチトロンビンⅢ | 9 |
| 1-2-2 サイトカイン | 10 |
| 1-2-2-1 炎症性サイトカイン | 11 |
| 1-2-2-2 bFGF | 12 |
| 1-3 目的 | 13 |

2章 ジェランの生体材料検討

| | |
|--------------------------|----|
| 2-1 ジェラン | 16 |
| 2-2 目的 | 17 |
| 2-3 方法 | 18 |
| 2-3-1 MTT 法による細胞活性試験 | 18 |
| 2-3-2 ジェランゲルへの細胞接着実験膨潤実験 | 19 |
| 2-3-3 タイムラグ法による透過実験 | 20 |
| 2-4 結果 | 21 |
| 2-4-1 ジェランゲルへの細胞接着実験膨潤実験 | 21 |
| 2-4-2 MTT 法による細胞活性試験 | 22 |
| 2-4-3 タイムラグ法による透過実験 | 23 |
| 2-5 考察 | 26 |

3章 硫酸化ジェランの徐放担体検討

| | | |
|---------|-------------|----|
| 3-1 | 硫酸化ジェラン | 28 |
| 3-2 | 目的 | 29 |
| 3-3 | 方法 | 30 |
| 3-3-1 | 硫酸化ジェランの固定化 | 30 |
| 3-3-2 | 吸着実験 | 32 |
| 3-3-2-1 | bFGF | 35 |
| 3-3-2-2 | テネイシン | 36 |
| 3-3-2-3 | アンチトロニンⅢ | 37 |
| 3-3-3 | 徐放実験 | 38 |
| 3-4 | 結果 | 39 |
| 3-4-1 | 硫酸化ジェランの固定化 | 39 |
| 3-4-2 | 吸着実験 | 41 |
| 3-4-2-1 | bFGF | 41 |
| 3-4-2-2 | テネイシン | 45 |
| 3-4-2-3 | アンチトロニンⅢ | 48 |
| 3-4-3 | 徐放実験 | 49 |
| 3-5 | 考察 | 51 |
| 4章 | 総括 | 53 |
| 5章 | 結論 | 59 |
| 6章 | 参考文献 | 60 |
| 7章 | 謝辞 | 62 |
| 8章 | 付録 | 63 |

語句説明

- TN-C(tenascin-C) 創傷治癒時に発現する細胞倍マトリックス
- FN(fibronectin) 創傷治癒に関連する常駐にの細胞外マトリックス
- bFGF(basic fibroblast growth factor) 繊維芽細胞増殖因子
- ATⅢ(anti thrombinⅢ) 抗血液凝固作用を持つ血漿成分
- GS(gellan sulfate) 硫酸化ジェラン
- IL(inter leukin) 創傷治癒に関わる炎症性サイトカイン
- PDGF(platelet derived growth factor) 血小板由来の増殖因子
- TGF(transforming growth factor) 形質転換増殖因子
- TNF(tumor necrosis factor)/ 腫瘍壊死因子
- DDS(drug derively system) 薬物送達システム

1 章

1-1 創傷治癒

組織が損傷を受けたとき、傷の修復が行なわれる。この期間は止血と炎症から始まるきわめて複雑な一連の生体反応が起こるが、その治癒に至るまでの過程を創傷治癒(反応)という。この反応には大きく三つの要素が関与している。一つ目は生体を構成している細胞である。基本的には細胞が主役となり、増殖や、遊走をして治癒を行なっていく。二つ目は細胞から産出されるサイトカイン(細胞間の伝達物質)である。炎症時に産生されるのを、炎症性サイトカインと呼び、細胞活性に影響を与えている。三つ目は細胞外マトリックスである。これも細胞から産出されるが、細胞の足場になって生体を構成したり、細胞の活性に影響を与え治癒にかかわっていく。以上の三つの要素が創傷治癒反応を進めていく。⁸(Fig1-1)

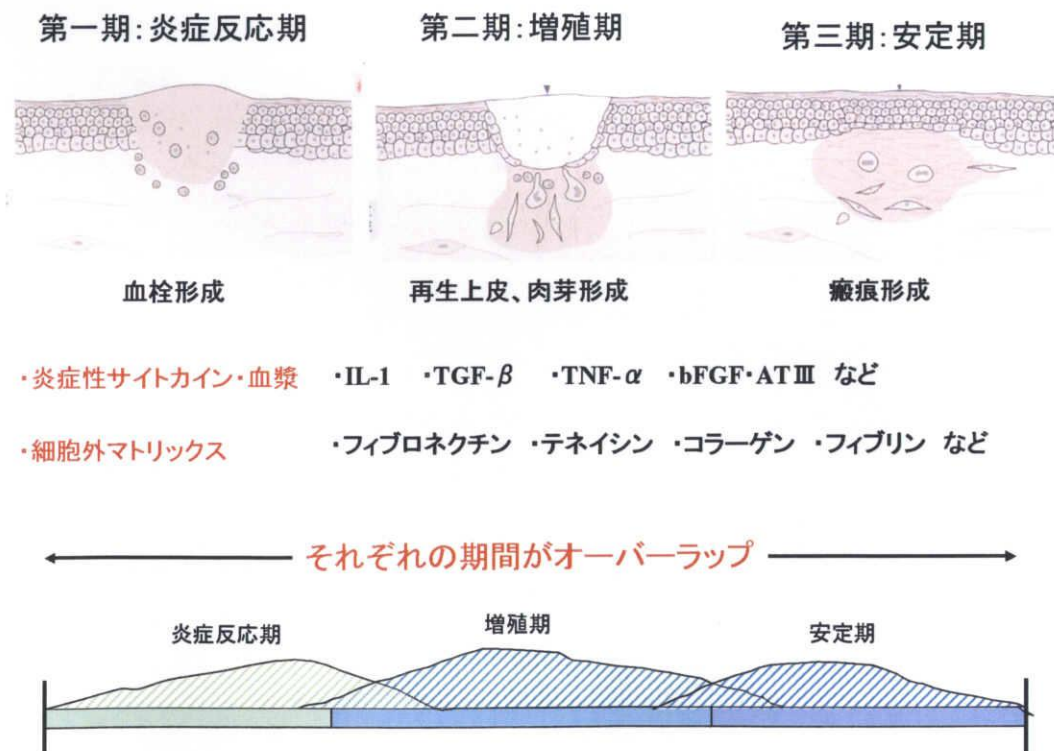


Fig1-1 創傷治癒の過程

1-1-1 創傷治癒の流れ

一般的に創傷治癒過程は大きく 3 期(炎症反応期、細胞増殖期、安定期)に分類される。それぞれの過程を詳しく説明する。^{1,11,13,23}

第 1 期：炎症反応期

皮膚が損傷を受けると、まず皮膚が断裂して組織の破壊が起こる。血管も断裂して局所に出血をする。血液に含まれている血小板は、断裂した膠原繊維に付着すると活性化し、その活性化した血小板はさらに他の血小板を付着させ活性化する。活性化した血小板から放出される凝固因子の働きで、血液成分の一つであるプロトロンビンがトロンビンに変わり、そのトロンビンの作用でフィブリノーゲンがフィブリンになる。このフィブリンがさらに血小板、赤血球等を巻き込んで血栓を形成する。同時に血管も収縮する。(止血作用)血液の中には、色々な凝固因子が前駆状態つまり不活性の状態で存在しているが、損傷をきっかけに、次々に活性化の連鎖反応を起こす。この現象は血液凝固のカスケードと呼ばれている。

凝固時の血小板からは凝固因子以外にも色々な化学物質が放出される。また、破壊された色々な細胞の細胞膜では、アラキドン酸系の連鎖反応が起こり、ここでも色々な化学物質が放出される。これらの化学物質が周囲の組織に浸透して、異変が起こったというシグナルを送る。このシグナルに刺激されて毛細血管の壁を作っている内皮細胞の間にすき間が生じ、リンパ球、多核白血球、単核球が浸出液として血管から抜け出して傷口へと移動する。これを遊走という。リンパ球、多核白血球、単核球のうち、創傷治癒で一番重要なのは単核球である。単核球は破壊物を取り込む、いわゆる貪食作用によってマクロファージとなり、これがさらに色々な化学物質を放出して、シグナルの発生源になる。以上の過程が第 1 期(炎症反応期)である。

これらの、腫脹(浸出液で組織が腫れる)、発赤(毛細管の拡張で赤くなる)、発熱(組織反応で熱を生じる)そして疼痛(末梢神経が刺激されて痛みを感じる)を、炎症の 4 主徴といい、炎症というのは細菌によって起こる感染や、化膿もその一つである、正常な創傷治癒の初期過程にも見られる大切な生体反応である。これがほぼ受傷後 4 から、5 日までの反応である。

第 2 期：細胞増殖期 (肉芽形成期)

第 1 期のマクロファージの活動で放出された物質が刺激となり、線維芽細胞が呼び寄せられ、修復の主な材料である膠原繊維 (コラーゲン) が産生される。また血管内皮細胞に対して血管を新生する指令もマクロファージから

放出される。線維芽細胞の産生したコラーゲンに支えられて毛細血管が発達し、そこへ流れ込む新鮮な血液が線維芽細胞に栄養や酸素を供給し、更にコラーゲンの産出をうながすという自己増殖のサイクルが構成される。(Fig1-2) このように線維芽細胞、毛細血管がコラーゲンを足場とし、この3者が支えあって共同作業を行い、傷口へ進出し欠損部を埋め創面を結合させる。この欠損部を埋めていく組織を肉芽組織といい、肉芽組織はコラーゲン以外の色々な物質やコラーゲン間の架橋などで結合補強しあい、少しずつ真皮に近い丈夫な組織を形成していく。この状態を癒痕組織という。肉芽組織が癒痕組織に変わっていき、皮膚の強さが正常になるには2週間から3週間かかる。この時期はほぼ1、2週間続き、次の第3期に移行する。

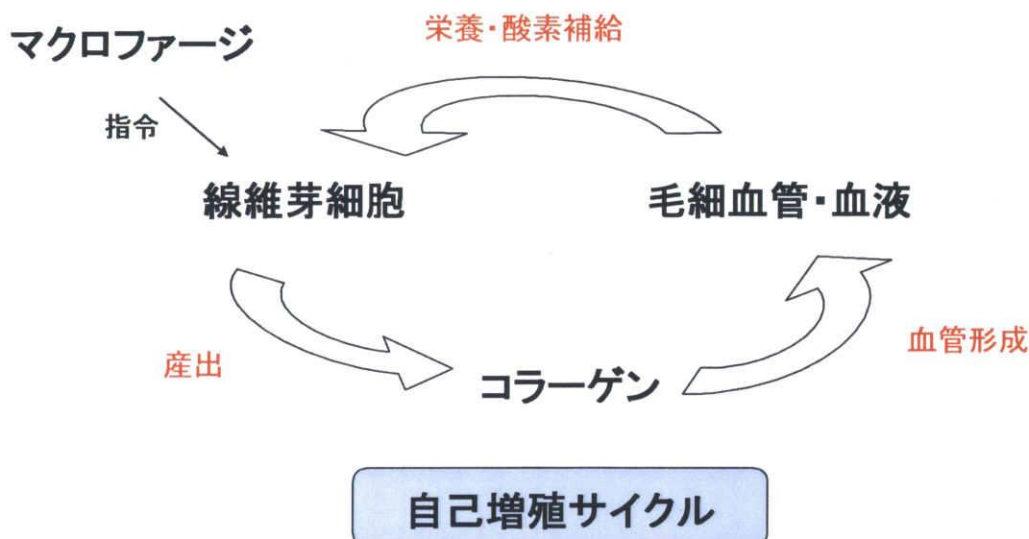


Fig1-2 自己増殖サイクル

第3期：安定期

線維芽細胞の活性が落ちてコラーゲンの産生が少なくなり、そのうちコラーゲンの産生量と分解吸収量が同じになる。見た目には安定して変化がない状態になるが、実際は生成と分解がバランスよく行われている状態である。この状態を安定期という。例えばビタミンCの欠乏などでコラーゲンの産生が低下し生成と分解のバランスが崩れと、分解吸収量のほうが多くなって癒痕組織が吸収されてしまい、結果的には傷が開くことがある。このように癒痕組織は見た目には変化はないが、常に生成と分解を続けている活動中の組織である。

再生した表皮細胞の下組織は、真皮に置き換わらず、いつまでも癒痕組織として残る。つまり第3期は傷跡として永久に続くと考えられる。再生した表皮は傷を受ける前と組織に関してはほとんど同じになるが、癒痕組織は

コラーゲンの配列が不規則なため、表皮を通して見た場合、真皮とは多少違った構造に見える。これが傷跡である。

こうして 3 つのステップは、それぞれのステップが次のステップへの準備であり、一つのステップが完了するとつぎのステップに開始のシグナルが送られている。実際はそれぞれの過程が互いにオーバーラップしながら進行していく。

具体的に血管を例にとる。⁴

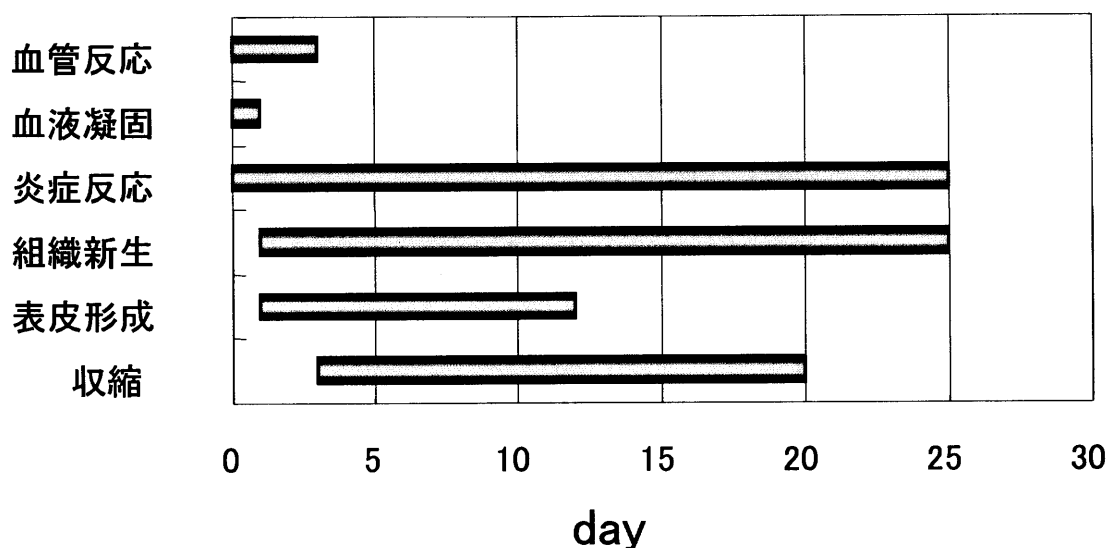


Fig1-3 創傷治癒と時間経過

これは血管の修復の例である。(Fig1-3)創傷治癒は場所と状況によって異なるが、一つの例として説明する。

傷害時にまず一番初めに反応するのが血管反応である。これは血液の流出を防ぐために、血管を収縮させ、この反応は数秒後に始まり約 3 日間続く。次に同時に血液凝固が起こる。これも傷害直後に始まり、24 h 以内にフィブリンによるネットが形成される。炎症反応は傷害を受けてから徐々に進行していき、3～5 日でピークに達する。その後徐々に収まっていく。組織新生は傷を受けて 10～12h 後に始まり、6～16 日でピークに達する。このときの新生組織は正常組織の約 80% の強さになる。これはコラーゲンによるものである。表皮形成は 24 h 以内に始まり、普通 14 日以内に完了する。しかし傷が深いときにはもっと時間を必要とすることもある。収縮は 3 日目から組織をふさぐように働く。

こうして創傷治癒はいくつかの反応が同時進行して起こる。

1-1-2 ゲル材料

創傷治癒を補助する生体材料として、ゲル材料が用いられることが多い。これはゲル化材料の特徴が創傷治癒過程において、非常に適しているためである。ゲル化材料の特徴は、きわめて親水性が高く、湿潤環境を保つ点があげられる。これは創傷被覆材として非常に有意義な特徴で、すなわち生体の傷において治癒時に湿潤環境が必要とされているからである。そのためゲル材料は創傷被覆材として使われることが多い。以下に現在使用されている代表的な材料について紹介する。^{15,16}

アルギン酸系創傷被覆材

現在アルギン酸カルシウム塩からなる創傷被覆材が慢性皮膚潰瘍の治療に使用されている。

キチン系創傷被覆材

カニの甲羅から抽出したキチンを用材に溶かして湿式紡糸法により製造した短繊維から創傷被覆材を製造している。これは浅達性Ⅱ度程度の熱傷に有用である。

コラーゲン系創傷被覆材

現在商品名テルダーミス、ペルナックといったものが市販されている。これらは全層皮膚欠損創の治癒に用いられている。

ヒアルロン酸系創傷被覆材

現在商品名セプラフィルムとして癒着防止材料が市販されている。コラーゲンに匹敵する創傷治癒効果が実証されている。

このようにいくつかのものが現在創傷被覆材料をして使用されている。しかしこれらの材料にも問題が存在する。アルギン酸は使用する際に化学架橋を必要とする点である。原料自体は天然材料であるが、使用する際に化学物質が組み込まれるため生体適合性が懸念される。キチンは創傷治癒の初期の活性を上昇するのにとても有用である。しかし、効果は初期に限定されてしまい長期に渡る生体反応への関与が課題である。コラーゲン、ヒアルロン酸は生体内に含まれる物質のため創傷治癒への活性については非常に高い効果が見込まれる。しかし、体内で吸収性が高く、キチン同様長期に渡る創傷治癒への影響は難しい。このように現在使用されているゲル材料にも様々な課題がある。つまり先にグラフで示したように創傷治癒には様々な段階があり必要な物質も異なってくる。そのため適した時期に適した物質を徐放するような長期支援ゲル化材料が望まれている。

1-1-3 ジェラン

そこで我々はジェランに注目している。ジェランは先の問題を解決する特徴を持っていると考えられる。

ジェラン(Gellan Gum)は *Pseudomonas elodea* により、細胞外で多量に生産される分子量 900KDa の直鎖上高分子多糖類である。ジェランの分子構造は、D-グルコース、D-グルクロン酸、D-グルコース、L-ラムノースからなる四糖の繰り返し単位とし、グルクロン酸中にカルボキシル基を一つ有することを特徴としている。特性としてジェランは透明性、耐熱性、耐酸性のあるゲル形成することが知られており、架橋剤を使うことなく物理架橋でのゲル形成が可能である。さらに添加する塩の種類によりゲル強度やゲルの融解温度を容易にコントロールでき、さまざまな物性のゲルを作り出すことができる。カチオン濃度の低い条件下では、柔らかく、弾性力のあるゲルを形成するが、カチオン濃度が高い条件下では硬くもろいゲルを作成することもできる。また 2 価カチオンを添加すれば非常に耐熱性のあるゲルを作ることができる。(Fig1-4)天然由来成分のため生分解性を有すが、コラーゲンやヒアルロン酸よりも長期の時間を有すると考えられる。そのためジェランには先の問題を解決する新規材料として期待できる。¹

またゲル材料の構造に注目してみると、ゲル材料は網目構造をとり、その網目の大きさはゲル濃度やゲル化させるときの条件に依存して変化している。ゲルを用いたドラッグデリバリーシステム(DDS 付録…1-1 参照)を考えると薬物などの物質の透過はこのゲルの網目の細かさと、物質の大きさによって制御されることが考えられることから、ゲルを用いた透過制御材料ではゲルの構造に注目することが重要である。先に紹介したようにジェランは架橋剤を使用せずに容易にゲル化し、イオンを加えることで物性の変化の期待できるため、ゲルの網目構造の調節が容易であると期待できる。

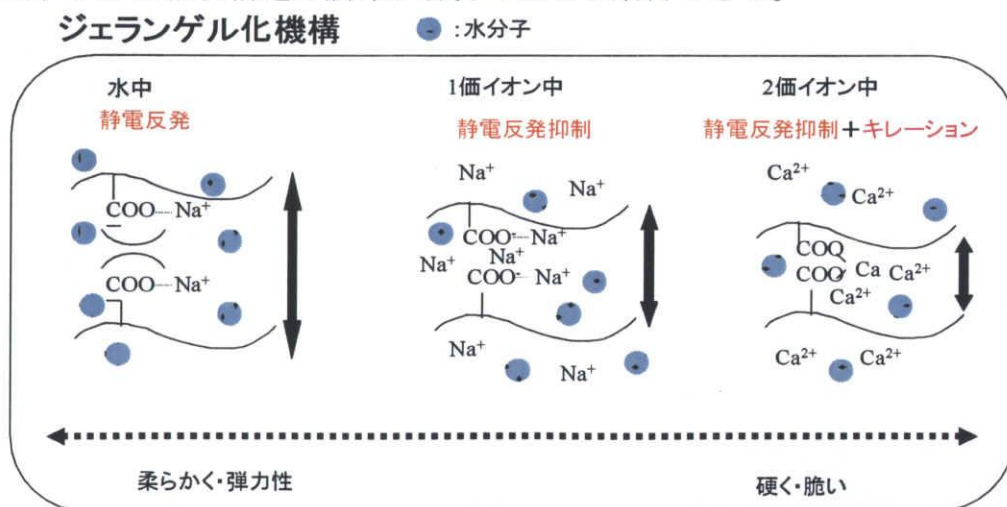


Fig1-4 ジェランとカチオンのゲル化反応

1-2 創傷治癒を担う物質

1-2-1 細胞外マトリックス

細胞の外側にある構造的なものの総称。主成分は、コラーゲン、エラスチンなどの繊維性蛋白質、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などのグリコサミノグリカンとプロテオグリカン、それにフィブロネクチン、ラミニンなどの細胞接着性蛋白質である。これら細胞外マトリックスは、脊椎動物の身体の構造要素の主体で、結合組織の主成分である。したがって、皮膚や骨に多く含まれ、脳や脊髄には少ない。生体での働きとしては、基底膜や結合組織、皮膚、骨、腱、靱帯、軟骨など骨格支持組織の成分として全身強度を支える役割りを担う。

細胞の遊走、増殖、分化、アポトーシスなど多岐にわたり細胞に大きく影響を与える。以下に創傷治癒の際に産出される細胞外マトリックスを示す。(Fig1-5)

| | 初期 | 中期 | 後期 |
|-----------|-----------|---------------|------------|
| 細胞外マトリックス | フィブリン | フィブロネクチン | I 型コラーゲン |
| | フィブロネクチン | ヒアルロン酸 | III 型コラーゲン |
| | ビトロネクチン | テネイシン | フィブロネクチン |
| | トロンボスポンジン | SPARC | SPARC |
| | | | テネイシン |
| 由来 | 血漿 血小板 | 繊維芽細胞 マクロファージ | 繊維芽細胞 |

Fig1-5 創傷治癒時産生マトリックス^{8,9}

1-2-1-1 テネイシン-C

テネイシン C は、糖タンパク質であり別名(筋結合部位抗原、J1、ヘキサブラキオン、サイトタクチン)などとも呼ばれる。一本のポリペプチド鎖は分子量約 250KDa で、3 分子が N 末付近でコイル状により合わさっており、これらがジスルフィド結合によって結合して 6 量体を形成している。(Fig1-6)一本のポリペプチド鎖は EGF(表皮細胞増殖因子)様ドメイン、FNⅢ(フィブロネクチンタイプⅢ)ドメイン、FG(フィブリノーゲン)様ドメインの三つから形成されている。テネイシンの特徴は、発現が一過性で常に存在するタンパクではない点ある。また発現も胎児、癌、炎症、創傷治癒時に多く見られ成体ではごくわずかである。

生体にもたらす機能は主に細胞接着、反接着機能である。この相反する機能を持つことにより、細胞の脱着を調節する因子とも考えられている。創傷治癒時にはこの機能が細胞の仮止めを行いスムーズな創傷治癒を促していると考えられる。^{6,7,8,20}

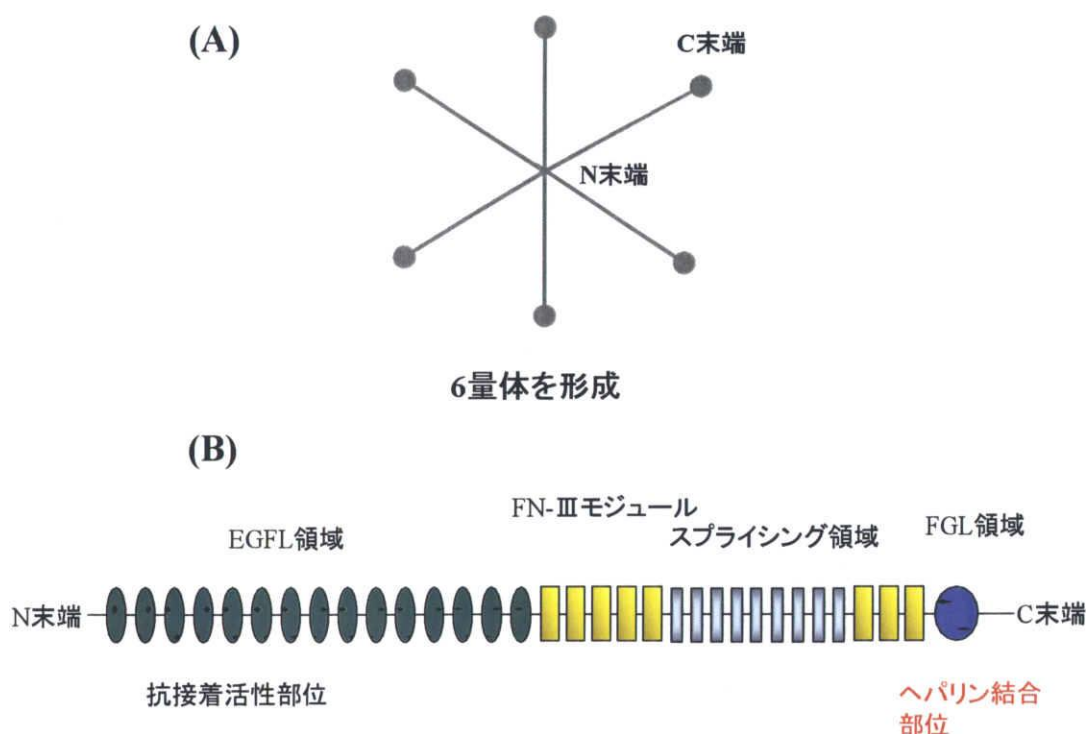


Fig1-6 テネイシンの構造^{17,18,19,20}

(A)六量体形成

(B)ポリペプチド一本鎖

1-2-1-2 アンチトロンビンⅢ

アンチトロンビンⅢ (AT-Ⅲ) は、凝固因子のトロンビンを阻害する分子量約 580KDa の糖蛋白である。AT-Ⅲ は血中におけるトロンビン阻害作用の約 80%を占めるといわれ、また他の活性化凝固因子 (IXa, Xa, XIa, XIIa) やプラスミン、カリクレインをも阻害する代表的な凝固阻害物質の一つである。

AT-Ⅲ は、トロンビンと結合してトロンビン・アンチトロンビン複合体 (TAT) を形成する。複合体形成によりトロンビンの触媒活性を抑える。さらにヘパリンが存在すると、遊離 AT-Ⅲ に構造変化が起こり、結合が促進されトロンビン阻害作用はさらに即時的となる。そのためヘパリンは抗凝固剤とも言われている。(Fig1-7)AT-Ⅲ の消費は凝固亢進状態を反映しており、AT-Ⅲ の欠如、減少は、凝固亢進状態ひいては血栓症を発生する。血漿中には約 300 μ g/dl 存在している。²⁴

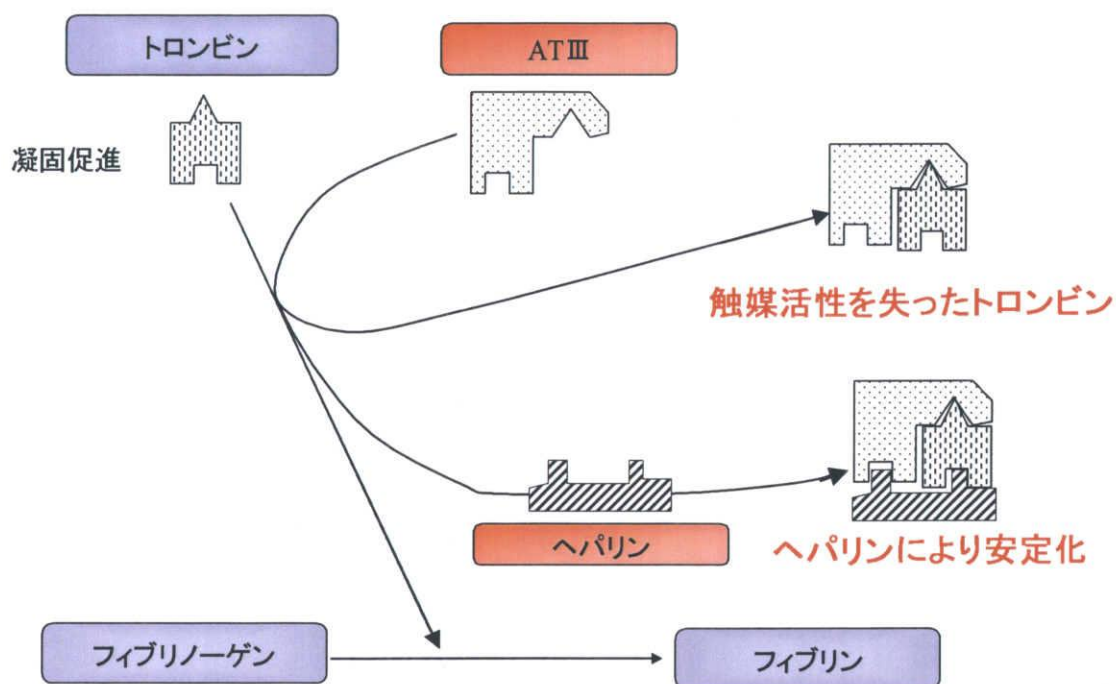


Fig1-7 ATⅢ ヘパリンの抗血液凝固能⁷

1-2-2 サイトカイン

サイトカインとは活性化した T リンパ球やマクロファージ(大食細胞)などの免疫系細胞や線維芽細胞などから分泌され、細胞間の情報伝達に働く低分子量のタンパク質の総称である。その生理機能としては、リンパ球の活性化、免疫応答の調節、血液細胞の増殖分化、炎症反応の修飾などがあげられる。サイトカインの特徴としていくつか挙げられる。まずは極めて微量で活性をあらう発現する点である。具其他的にはピコモルレベルでも効果を発揮する。また多機能性、重複製など生体反応に対し様々なサイトカインが様々な機能を発揮する事が知られている。創傷治癒に関わるサイトカインにはまとめて以下のようなものがある。^{8,10,12}(Table1-1)

Table1-1 創傷治癒時産生サイトカイン

| サイトカイン | 産生細胞 | 働き |
|--------------------------------|---------|--------------------------|
| PDGF | 血小板 | マクロファージ、線維芽細胞の走化性因子 |
| | マクロファージ | マクロファージの活性化 |
| | 角質細胞 | 間質細胞の増殖 |
| VEGF | マクロファージ | 血管新生 |
| | 角質細胞 | |
| EGF | 血小板 | 角質細胞の増殖、遊走 |
| | | 上皮間質細胞の増殖 |
| TGF-α | マクロファージ | 角質細胞の増殖、遊走 |
| | 角質細胞 | 血管新生 |
| HB-EGF | マクロファージ | 上皮間質細胞の増殖 |
| bFGF | マクロファージ | 血管新生、プロテアーゼ産生亢進 |
| | 血管内皮細胞 | 線維芽細胞の増殖 |
| KGF | 繊維芽細胞 | 上皮細胞の増殖と遊走 |
| | | 血管内皮細胞の増殖 |
| IGF | 血小板 | 血管内皮細胞、繊維芽細胞の増殖 |
| TGF-β | 血小板 | マクロファージ、繊維芽細胞の走化性因子 |
| | マクロファージ | 細胞外マトリックス、プロテアーゼインヒビター産生 |
| IL-1 | 好中球 | 細胞外マトリックス、プロテアーゼ産生 |
| TNF-α | 好中球 | 細胞外マトリックス、プロテアーゼ産生 |
| エンドセリン | 血管内皮細胞 | 平滑筋細胞、筋繊維芽細胞の収縮 |

1-2-2-1 炎症性サイトカイン

サイトカインのなかで炎症時に特に産生されるものを炎症性サイトカインと呼ぶ。炎症期には組織損傷による出血、血小板凝集とそれに伴う血小板内顆粒からの増殖因子の放出により惹起され数日間続く。これらの増殖因子は好中球、マクロファージ等の炎症性細胞や線維芽細胞の走化や遊走の因子となり損傷部位にこれらの細胞を誘導し活性化あるいは増殖させ治療を促進させる。以下に主な炎症性サイトカインを記す。¹

インターロイキン

IL と略記。分子量約 20KDa。白血球によって産生され、それ自身あるいはその他の白血球の分化、増殖、機能などに影響を与える分子の総称。免疫応答の発現や調節には免疫系の細胞に由来する多くの液性因子が関与し、複雑なネットワークを形成している。現在 10 種以上の IL 分子が同定され、それらのほとんどは物理化学的性状だけでなく、その遺伝子とアミノ酸一次構造、特異的受容体などが明らかにされている。

血小板由来増殖因子 (PDGF)

PDGF と略記。血小板の α 顆粒内に含まれる成長因子の一つ。分子量 28KDa~35KDa。A,B2 種類のサブユニットからなる二量体であり、主に繊維芽細胞や平滑筋細胞などの間葉系の細胞に作用するが、上皮系、内皮系の細胞でも作用する。創傷治癒を促進し、血管平滑筋の強力な細胞分裂誘起物質(mitogen)である。少量ながらマクロファージや平滑筋細胞においても産生される。¹

腫瘍化増殖因子

TGF と略記。正常な線維芽細胞である NRK 細胞の形質転換を引き起こし、増殖を促進する成長因子。TGF- α と TGF- β の二つの因子がある。TGF- β は血小板・胎盤・腎臓・骨などのさまざまな正常組織でもつくられている。この因子の活性型の分子量は 25KDa で、分子量 12.5KDa の相同ポリペプチドが S-S 結合して二量体を構成。TGF- β の作用は非常に多岐にわたっており、細胞の増殖と抑制、細胞分化の調節作用、細胞外マトリックスの蓄積、免疫能の抑制、単球の遊走促進などがある。¹

腫瘍壊死因子 (TNF)

特に内毒素に反応して単球・マクロファージで産出され、異常増殖する細胞を破壊するはたらきをする蛋白質。¹

内皮細胞に作用し、微小血管を形成させる。また細胞のアポトーシスを引き起こす。

1-2-2-2 bFGF (線維芽細胞増殖因子)

特に線維芽細胞に強い増殖性をもつ成長因子。分子量は約 13KDa~19KDa である。bFGF は下垂体・脳・腎・副腎・胎盤・骨基質・軟骨・内皮細胞・繊維芽細胞などに広く分布している。FGF は様々な細胞に影響を与える。

創傷治癒には三つの行程が存在するが、この三つの行程に bFGF はかかわってくる。まず第一期の炎症期。この時 bFGF 白血球、リンパ球に作用して創傷治癒を助けていく。第二期の増殖期。ここでは創傷治癒に大きく関わってくる繊維芽細胞の増殖を促進する。第三期の安定期。ここでは創傷部のリモデリングが行なわれている。その中で最も重要な役割りを果たしているのが TGF- β である。この TGF- β は組織が繊維化状態のときに過剰に発現している。この TGF- β の産生を調節するのが bFGF である。つまり bFGF により肥厚性瘢痕の回避が期待できる。また下に bFGF の産出元と細胞との相互作用を表した。^{2,25}(Fig1-8)

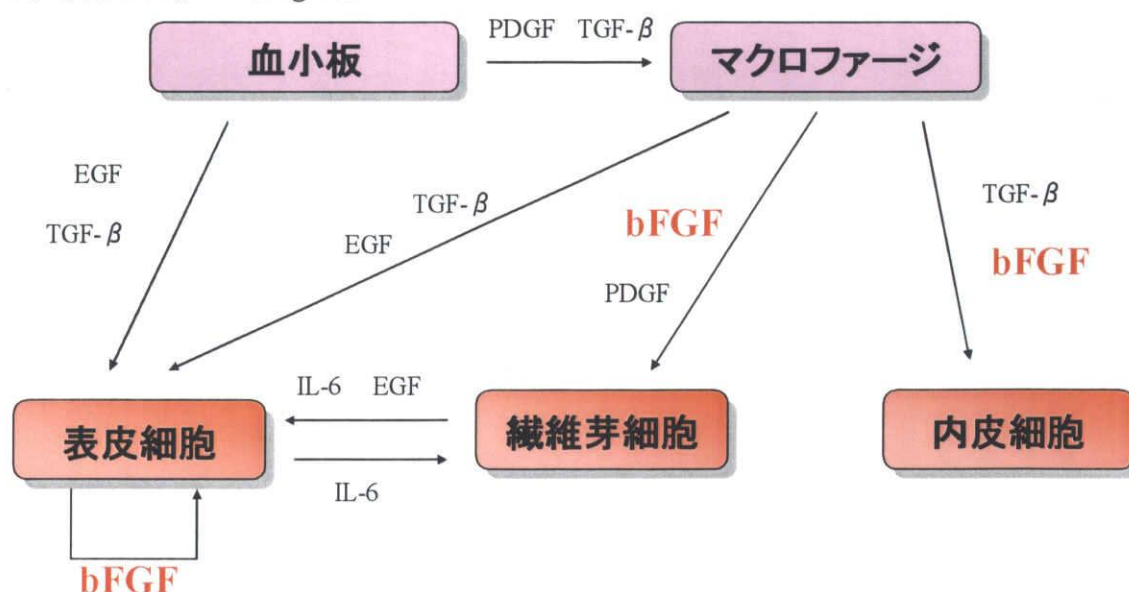


Fig1-8 bFGFの発生と作用

1-3 目的

先述したように創傷治癒は様々な生体反応が複雑に相互作用することで、活性を制御している。しかし状況によってはこの反応が正常に作用しないときがある。

例としては、修復困難な大きな傷害を受けたとき、病気にかかったとき、創傷部が感染したときである。この時は本来の微妙なバランス関係で制御されていた細胞、サイトカイン、マトリックスの関係が崩れてしまう。そのためスムーズな治癒が行なわれず、結果として癒着や動脈瘤、瘢痕組織などが引き起こされる。

本研究ではこの複雑な反応を生体材料によって制御することを目的とした。足りないものを補い、過剰なものは減らすことで特定の機能を有するサイトカインなどの生体物質は本来あるべき場所、あるべき量に調節することを材料に担わせる方法を考案した。(Fig1-9)

具体的に足りないものを補うということは、生体内に外部から補充すればよい。つまり DDS の考えである。傷を治したり、炎症を抑える物質を創傷部に直接徐放することで、崩れたバランスを整え正常で素早い創傷治癒に繋げる。また過剰のものを減らすのは同じように吸着という考えを用いればよい。過剰に産生された物質は吸着材料に吸着させることで局所的な濃度の調節が可能になる。

次に物質を本来あるべき場所、あるべき量に調節するためには物質の移動を制御すればよい。本研究ではゲルを用いてこの制御を考案した。ゲルの網目サイズを制御することで物質の拡散を制御し、創傷部での物質の調節が可能になる。これらの考えを踏まえて、本研究ではジェランを用いたコントロールドリリリース(調節徐放)材料の開発を行なった。

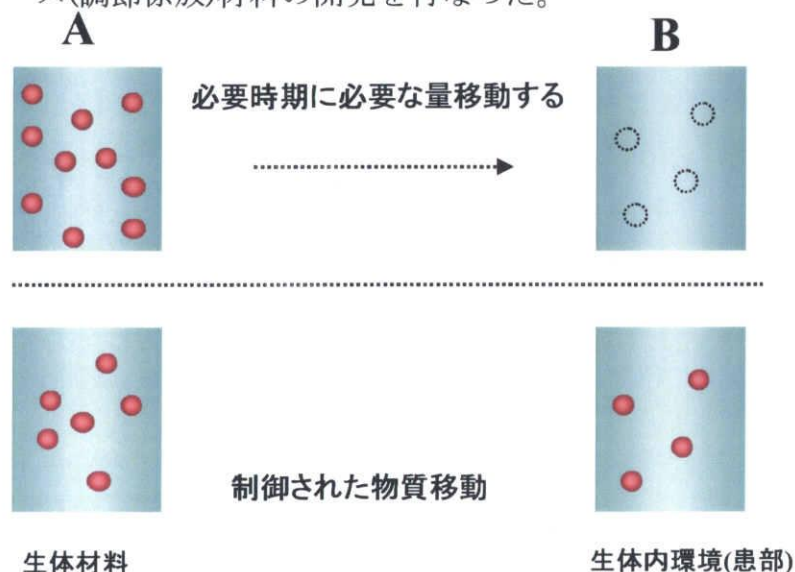


Fig1-9 創傷治癒と時間経過

Fig1-9 はコントロールリリースの基本理念である。これは材料 A から生体 B への物質の移動が、ある時間で目的の場所に目的の量移動している。つまり物質の移動を操作、制御が可能でなくてはならない。そこで本研究では実際に次のモデルを考案し開発する。

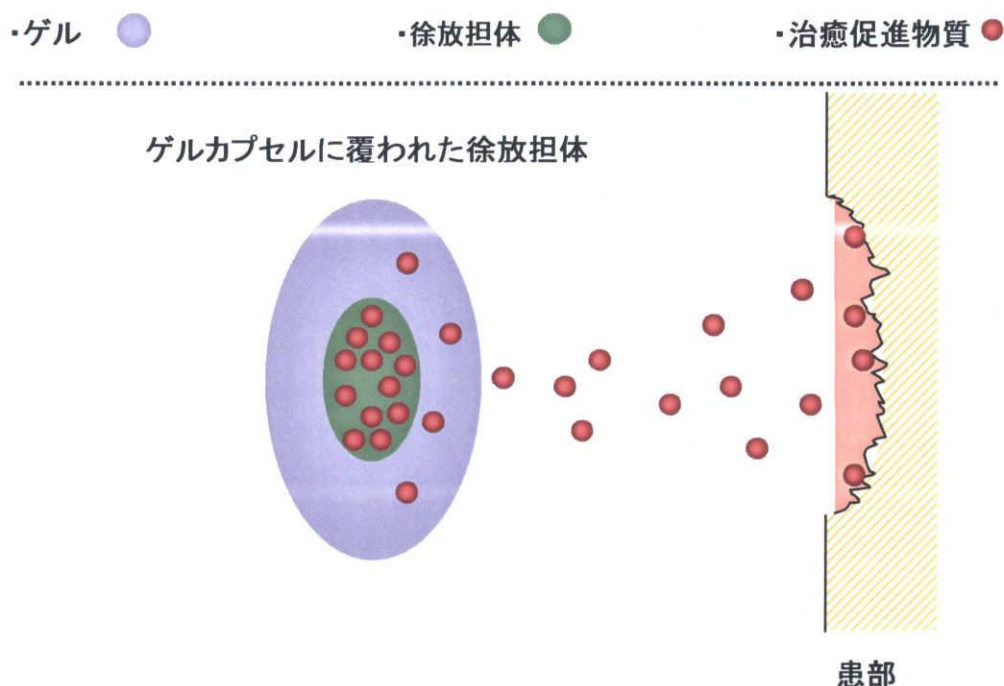


Fig1-10 新規に考案したコントロールリリース材料

これは薬物などを徐放担体に吸着させその周りをゲルで囲っているモデルである。一般に DDS の欠点としては、初期に薬物の徐放が大量におきてしまい、その後十分な徐放が行なえないということがある。そこでゲルでコーティングすることにより、薬物の放出速度を制御して必要なときに必要な量を患部に放出することを目的としたモデルを考案した。(Fig1-10)

以上の材料を作製評価するために、具体的には以下の二つの実験項目に分けて検証を行なった。

1. ジェランを用いた材料の物質透過実験
2. 硫酸化ジェランを用いた材料の徐放担体検討

ジェランを用いた材料の物質透過実験では以下の項目を検証した。

1. ジェランの作成
2. MTT 試験での細胞への影響
3. ジェランシートへの細胞接着実験
4. ジェランシートの物質透過実験
5. ジェランゲルの膨潤実験
6. 犬を用いた癒着防止実験

硫酸化ジェランを用いた材料の徐放担体検討では以下のことを検討した。

1. 硫酸家ジェラン固定化糸の作成
2. フィブロネクチン吸着実験
3. bFGF の吸着実験
4. TN-C の吸着実験
5. アンチトロニンⅢ吸着実験
6. TN-C の徐放理論値計算
7. TN-C の徐放実験

これらの実験から材料を物理化学的に解析し、実際に材料設計に応用していくことを目的とする。

2 章 ジェランの生体材料検討

2-1 ジェラン

ジェランはこれまでの研究から物性、特徴がいくつかわかっている。(Fig2-1) 一つはカチオンに反応して、ゲル濃度が操作可能な点である。これにより水中でのジェランの溶解度を越えたゲルの作製にも成功している。ジェランゲル中の物質の透過や、ジェランコート上では細胞を接着しないこともわかっている。これらの特性を活かした癒着防止材料検討では犬を用いた癒着防止実験で癒着が防止される結果を得た。

これらの経緯を踏まえ本章ではジェランのゲル癒着防止膜としての再検討を行なう。また物質を透過を制御するゲルの構造に注目し、網目を制御することで物質の透過を制限する生体材料としての検討を行なっていく。^{1,15,16}

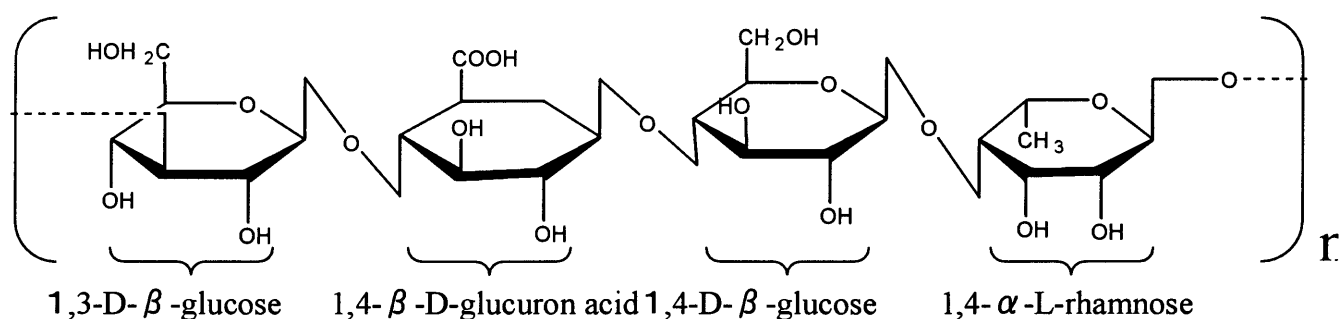


Fig2-1 ジェランの構造

2-2 目的

本章では二つのことを目的とした。

1. ジェランの癒着防止材料としての検討

今までにジェランの癒着防止材料としての検討は、物質の透過実験、膨潤実験、細胞接着実験、動物実験と行なってきた。ここから新たな材料としての可能性を提唱することができた¹⁾。しかしジェランシートの細胞に与える影響、つまり生体適合性の検証、またコートではなく実際のゲル上への細胞接着挙動の確認が不十分であった。そのためこれらのことを改めて検証する。

● MTT 試験での細胞への影響

ジェランの細胞への影響を検証する。生体適合性の一つの指標と考え癒着防止材、その他の材料の安全性を調べる。

● ジェランシートへの細胞接着実験

癒着防止材には細胞が接着しないことは、とても有利な条件である。これまでにジェランコート上で細胞接着がおきないことは確認済みである。そのため今回はより生体に応用する際の条件に近づけたゲルシート状での接着を確認する。

以上をこれまでの実験データに加えることでジェランの癒着防止材料としての可能性をより確かなものにする。

そして本章のもう一つの目的について説明する。

2. ジェランゲル中の物質透過制御

本研究では組織修復を目的とした、物質の徐放や拡散を制御できるようなコンロールドリリース材料の開発、解析を目指している。ジェランが担う役割りとしては徐放材料を包み込んで物質の透過を制御することである。(Fig2-2)その為今回は過去のデータを違う角度から解析し、材料設計に役立てていくのを目的とした。



Fig2-2 ゲル濃度による透過制御

2-3 方法

2-3-1 ジェランゲルへの細胞接着試験

目的

ジェランゲルを生体材料として使用する際細胞に対しどのような影響を及ぼすかを癒着が起きる際の原因物質を産生する線維芽細胞を用いてその接着性を見た。(Fig2-3)

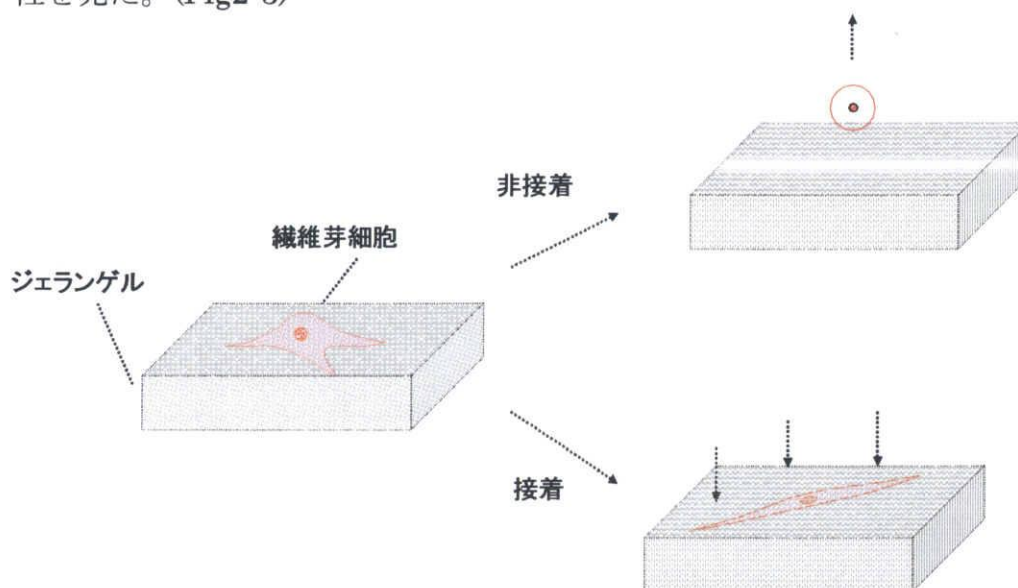


Fig2-3 細胞接着試験図

実験準備

付録…2-1 参照

操作手順

ジェランゲルへの細胞播種

I ゲルシート高圧蒸気滅菌

1. 作成したジェランゲルシートをエタノール中で 24h 滅菌を行う。
2. 1 のゲルシートを F-12 培地にて 3 時間置換する。(30 分おきに培地交換)
3. 厚さ 1mm シリコンゴムシートを外側縦、横 24mm、内側縦、横 10mm に切り出し、これを 121℃、20 分高圧蒸気滅菌を行う。
4. φ35 シャーレにゲルシートを浸し、その上からシリコンチャンバーにて固定し、F-12 培地を 2ml 加え、37℃5%CO₂でブレインキュベートする。

2-3-2 MTT 法による繊維芽細胞活性試験

目的

ジェランを生体材料として使う際の生体適合性を検討する。ここでは創傷治癒に主にかかわってくる線維芽細胞を用いて、MTT 法によりジェランと細胞が接触した際の細胞のミトコンドリア活性の測定実験を行なう。

実験準備

付録…2-2 参照

操作

1. 96 穴プレートへの播種
2. 210%FBS/M199 を 100 μ l/well 添加してプレインキュベートする。
3. 細胞懸濁液(細胞密度 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/ml)を 10 μ l/well 播種する。
4. 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で培養する。

growth arrest

5. sub-confluent 後、96 穴プレートの培地を吸引し、細胞の活動を止めるために 0.1%FBS/M199 100 μ l で置換する。
6. 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養する。

試験

7. 細胞を 24 時間 growth arrest した 96 穴プレートの培地を吸引し、PBS で洗浄後、各試料溶液を 100 μ l/well 曝露する。
8. 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で、30 分間もしくは 4 時間培養する。
9. 培養終了後、サンプル溶液を吸引し、PBS で洗浄後、10%FCS/M199 を 100 μ l/well 添加する。
10. MTT 1 液(MTT labeling reagent)を 10 μ l/well 添加する。
11. 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で 4 時間培養する。
12. MTT 2(Solubilization buffer)液を 100 μ l/well 添加し、10 分間静置する。
13. 37°C/5%CO₂ インキュベーター内で overnight 静置する。
14. Microplate Reader を用いて、測定波長 550 nm、参考波長 655 nm の吸光度を測定する。

2-3-3 タイムラグ法による透過実験

目的

ジェランゲルの物質透過性を調べるため、ゲルを透過するプローブの拡散定数を、タイムラグ法を用いて算出する。

そこから分子の大きさやゲル濃度に対する物質の透過を検討し、ゲル中の拡散を予測する。(Fig2-4)

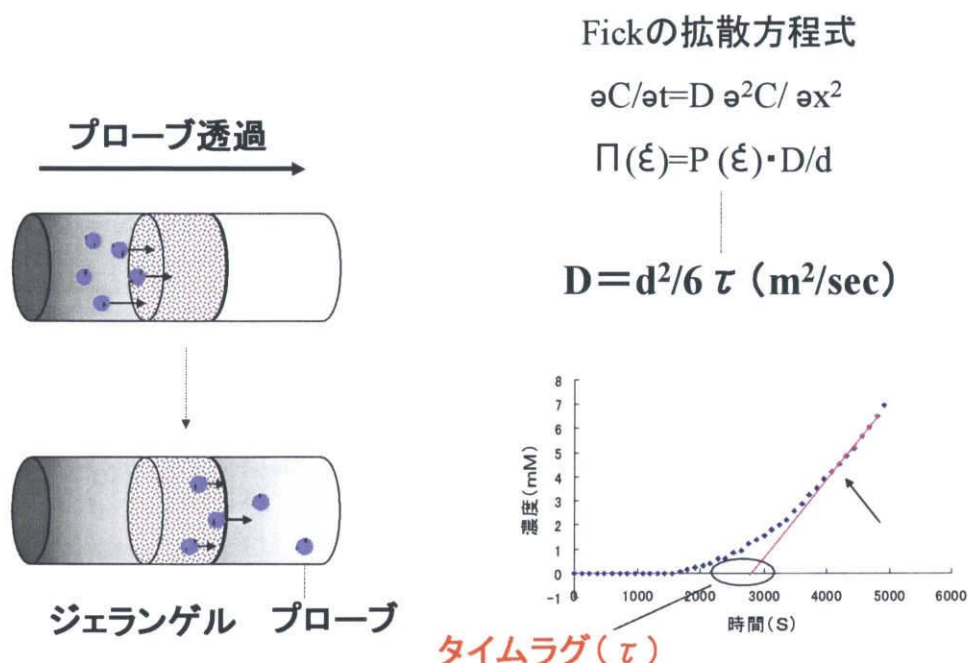


Fig2-4 タイムラグ法のモデルと解析

本実験で用いたプローブはグルコース、ビタミンB₁₂、リゾチーム、トリプシンインヒビター、オボアルブミン、アルブミンの6種である。異なるプローブ種を用いて、拡散定数へのプローブサイズ依存性を調べた。測定結果から、ジェランゲル内の物質の拡散を予測する。とくに今回はサイトカインと同等の分子量体、細胞外マトリックスと同等の分子量体に注目した。^{1,21,22}

実験準備

付録…2-3 参照

2-4 結果

2-4-1 細胞接着試験結果

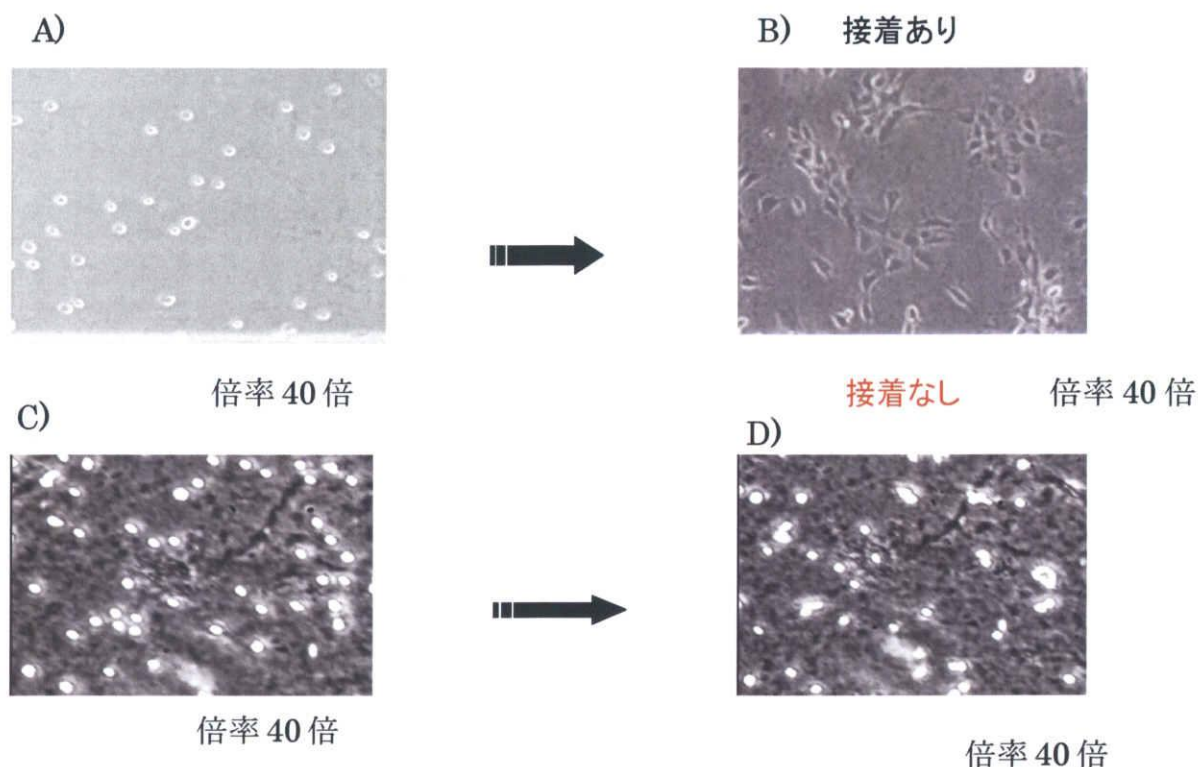


Fig2-5 細胞接着実験（線維芽細胞）

In vitro の実験として線維芽細胞を用いて A)、B)Collagen 上、C)、D)Gellan 上での細胞の接着実験を行った。A)、C)は細胞播種直後の写真である。B)、D)は播種後 24h の様子である。コラーゲン、ジェランでは播種後すぐには細胞丸く光ってみえ接着していない。(未接着で光るのは浮遊している細胞は球体であるため)24h 後ではコラーゲンで細胞が張り付き伸びているのが確認される。それに対しジェランでは播種後と変わらず細胞が浮いて光っているのが確認された。(Fig2-5)

2-4-2 MTT 試験結果

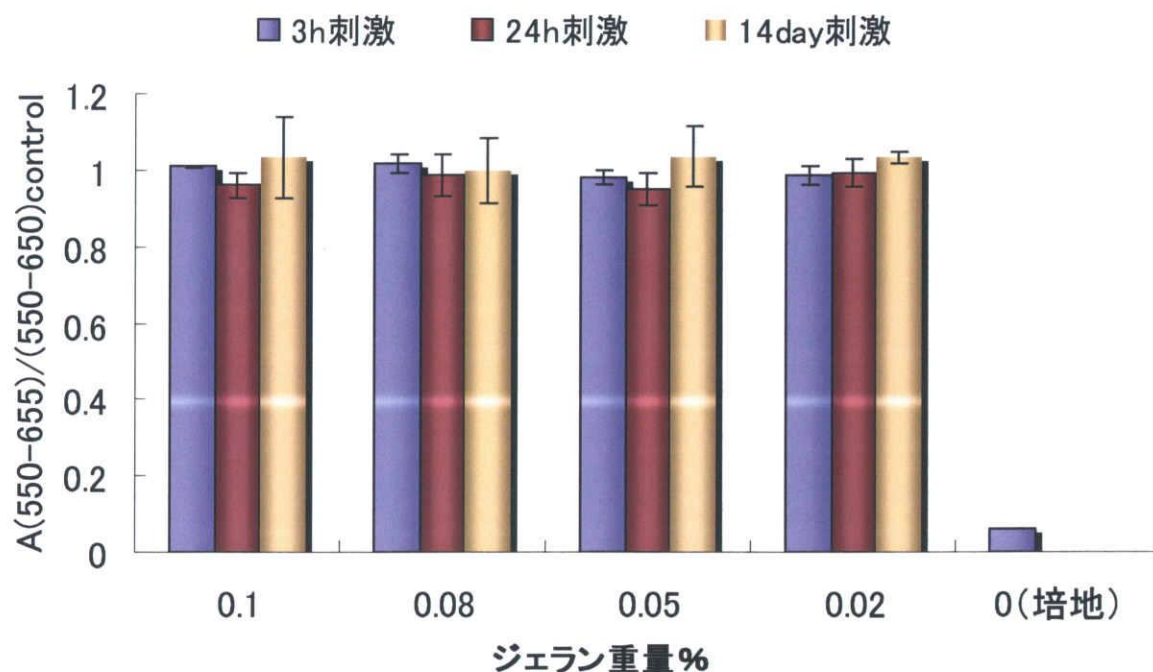


Fig2-6 ジェランの細胞活性への影響 n=1

線維芽細胞にジェラン溶解液各濃度を播種し細胞活性への影響をみた。3h、24h、14Day とも対コントロール値がほぼ 1 という結果となった。刺激時間を 3、24h と接触して初期に状態での細胞への影響は見られなかった。また 14 日後と長期に渡る刺激に線維芽細胞のミトコンドリア活性への影響はないといえる。ここからジェランは長期の使用も体内への影響は少ないと考えられる。(Fig2-6)

2-4-3 タイムラグ法による透過実験

4,5,6 及び 8% 濃度で作製したジェランゲル中でのグルコース、ビタミン B₁₂、リゾチーム、トリプシンインヒビターの拡散定数を以下に示す。

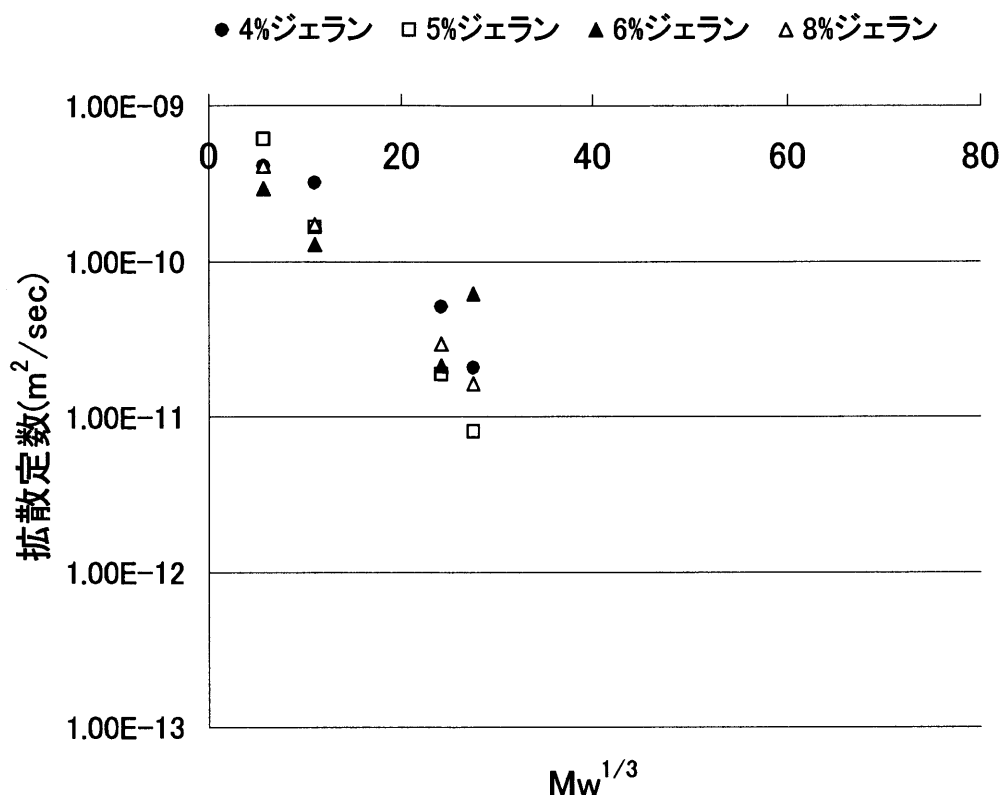


Fig2-7 ゲル濃度による拡散定数の変化

$M_w^{1/3}$

グルコース : 5.64(M_w 180)

ビタミン B₁₂ : 11.06(M_w 1355)

リゾチーム : 24.15(M_w 14100)

トリプシンインヒビター : 27.58 (M_w 21000)

ジェランゲル中の物質の透過を測定した結果、分子半径が大きくなるにつれ、拡散定数が減少した。(Fig2-7) Fig2-7 においては横軸に分子量の三乗根、縦軸に拡散定数を取り 4、5、6 及び 8%ジェラン中での上記の四種の透過を行った。縦軸には分子量の三乗根をとった。

これはプローブ分子を剛球体と仮定したためである。つまり

r :分子半径 d :密度 w :分子量 π :円周率

$$d = \frac{w}{\frac{4}{3} \pi r^3}$$

となる。さらにプローブ密度を一定と仮定する。すると次の式が成り立つ。

$$r = (3w/4 \pi d)^{1/3}$$

$$(3/4 \pi d)^{1/3} = K(\text{定数})$$

よって

$$r = K(w)^{1/3}$$

となり分子量の三乗根に比例するからである。

ゲル中の拡散はプローブの半径とゲルの網目密度に依存していると考えられるため、プローブ分子の密度を一定と仮定すると分子量の三乗根は分子半径の比例に比例する Fig から拡散定数は $Mw^{1/3}$ に依存して減少していることが確認される。また全体の傾向として高濃度のジェランゲル中で拡散定数の減少が見られる。



Fig2-8 分子半径による拡散定数の変化

$$Mw^{1/3}$$

グルコース : 5.64($Mw180$)

ビタミン B₁₂ : 11.06($Mw1355$)

リゾチーム : 24.15($Mw14100$)

トリプシンインヒター : 27.58 ($Mw21000$)

横軸をゲル濃度、縦軸を拡散定数にプロットすることで、ゲル濃度に依存してプローブ分子の拡散定数は減少していることが確認される。(Fig2-8)

Na(150mM)中での拡散 (換算ゲル濃度 4%、14.6%ジェランゲル中)

ゲル濃度と拡散定数の結果より、ゲル濃度を高くすることで透過を抑制することがわかった。しかしながらジェランの溶解度は 8%程度のため高濃度のゲルを作製できない。そこで過去の研究では一度乾燥させた後、NaCl などのカチオン水溶液中で膨潤させることで網目のサイズを制御する方法に成功している。ジェランゲルを生体内に入れたとき、生体内の NaCl(約 150mM)とのカチオン反応により 4%ジェランが 14.6%まで濃度が上昇することがわかっている。そのため実際 4%ジェランゲルを生体内に入れたときのモデルとして、14.6%ゲル中の拡散測定を行なった。結果を以下に示す。

※詳しくは 参照

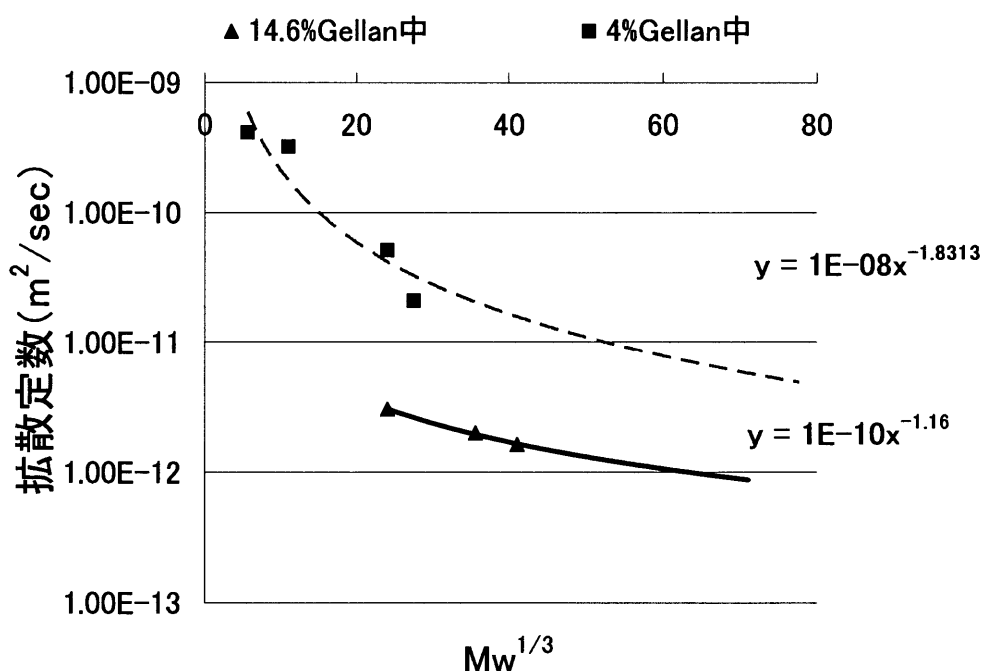


Fig2-9 4% 14.6%での拡散定数の比較

4%、14.6%ゲル中での拡散定数を比べると、全体的に拡散定数が減少していることがわかる。これはゲル濃度が高いとき網目が細くなるために分子が移動する際障害となるためと考えられる。(Fig2-9)

2-5 考察

ジェランの癒着防止膜材料の検討

MTT 試験からジェランは細胞活性について影響を及ぼさなかった。ジェランは微生物の産生する天然材料であるため、生体に特別な影響はないと考えられる。また前回ジェランコートから、ジェランゲル上で行なった接着実験でも同様に抗細胞接着性を確認できた。これはジェランのゲル表面が負に帯電しているためと考えられる。そのため細胞の足場となる細胞外マトリックスの吸着が十分に起こらず、細胞の接着を妨げていると考えられる。この結果から、ジェランは癒着防止材料により適していると考えられる。

ジェランをコントロールドリリース材料として用いたときの物質透過性

先の研究からゲル濃度に対するジェランの拡散定数が得られている。ここでは拡散定数から透過係数を算出し、物質の透過の時間のシミュレーションをしていく。ゲルの透過は Fig2-2 に示すようにゲルの網目の大きさと、通過する分子の半径によって制御される。ゲルの網目の大きさとは、ゲル濃度によって決定される。

網目の細かいゲル中を分子が移動するとき、単位時間当たりの速度(透過係数)は低くなり、網目の大きなゲル中を通過する際には透過係数は大きくなる。通過物質は生体には様々な大きさの物質が存在する。その為物質の大きさはそのときに応じて考えなくてはならない。つまり材料設計という観点から考えると、ゲルの網目を操作することで透過の制御をする。

そこで透過係数に対する透過時間を算出する。Fig2-10 に示した結果は透過係数に対する時間のグラフである。またそれぞれ三本の線はゲルの厚みが異なる場合のシミュレーションを行なった。まず透過係数に対する時間の変化は透過係数が下がるにつれて透過時間が長くなっている。これは単位時間当たりに進む距離が低くなれば等距離を進むのに多くの時間がかかるからである。またゲルの厚みに対する透過時間、これは同速度で進むとき距離が倍になれば、透過時間も倍になる。そのため三本の線はそれぞれゲルの厚みは 1、5、10mm であるため同じ透過係数でもそれぞれゲルの厚みに比例して延長されていることがわかる。(Fig2-10)

これらのシミュレーションから、ゲル中の物質の透過の制御はゲルの厚み、また透過係数を決定するゲル濃度によって行なうことができるといえる。

これは実際の材料設計に重要と思われる。生体内には生体材料を比較的挿入しやすい部分もあれば、そうでない部分もある。また体に動きが激しい場

所や、状況も人それぞれ異なってくる。そのときこの二つのパラメーターを
変えることで、材料設計の目安となる。

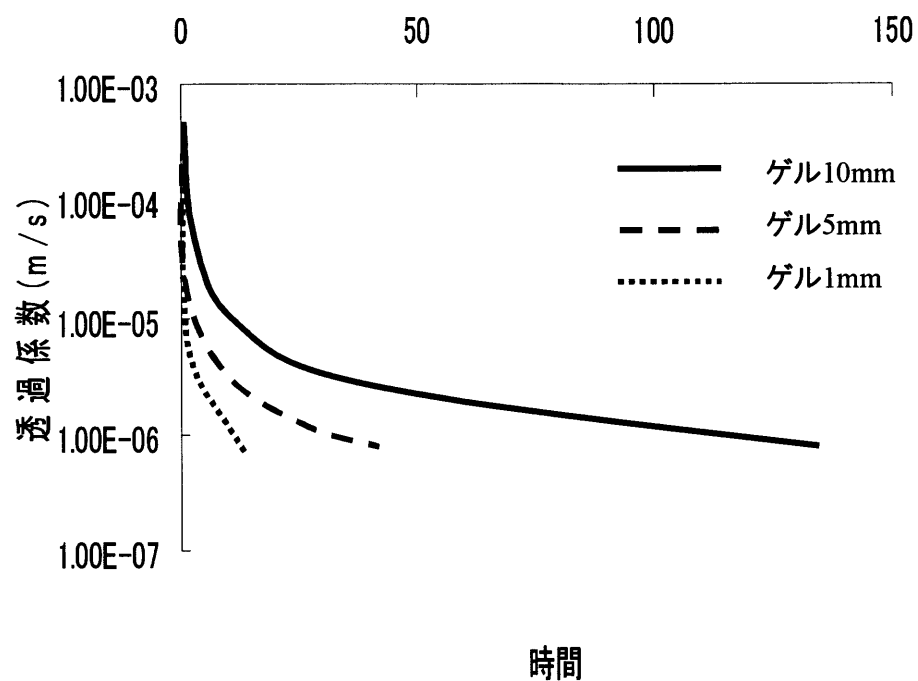


Fig2-10 透過係数とゲルの厚みによる時間変化

3章 硫酸化ジェランの徐放単体検討

3-1 硫酸化ジェラン

硫酸化ジェランはジェランとクロロスルホン酸を反応させることで得られる。硫酸化ジェランの構造は先に紹介したジェランと全く変わらないが、2つの D-Glc の 6 位(-CH₂OH 基)、D-Rha の 2 位(-OH 基)が硫酸化される。硫酸化の優先順位は D-Glc の 6 位が先に硫酸化され、続いて D-Rha の 2 位が硫酸化される。(Fig3-1)

硫酸化ジェランは細胞間物質であるグリコサミノグリカンの一種であるヘパリン様の構造を有する。ヘパリンは L-イズロン酸 4-硫酸と N-スルホ-D-グルコサミン 6-硫酸の 2 糖繰り返しユニットである。(Fig3-2)ヘパリンは生体組織中で最も負電荷の多い多価電解質であり様々な物質との親和性が高い。その為ヘパリン様の構造を持つ硫酸化ジェランも同様に上記の物質との親和性が高いと考えられる。そのため硫酸化ジェランはこれらの物質の徐放、吸着担体になることが期待できる。³

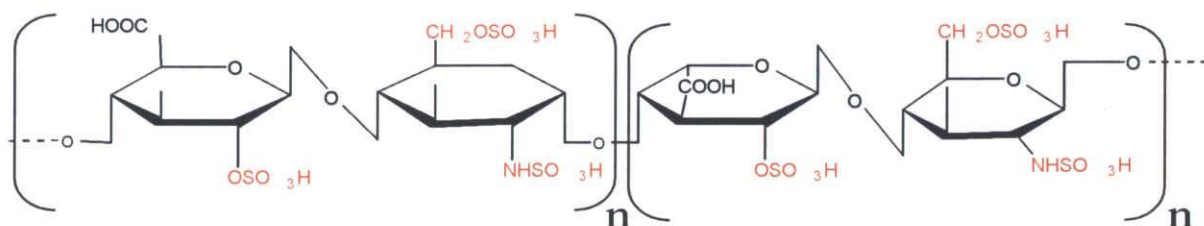


Fig3-1 硫酸化ジェラン構造

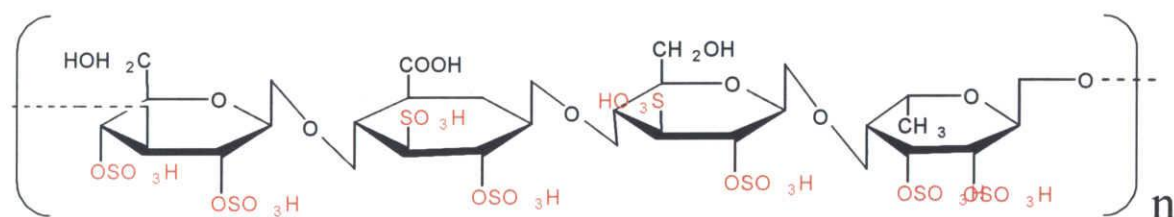


Fig3-2 ヘパリン構造

3-2 目的

硫酸化ジェランの徐放、吸着担体としての能力を検討する。
そこで本章では、

- ・ 硫酸化ジェランと創傷治癒関連物質との結合性評価および、材料からの物質徐放理論の確立を目的とした。

実験項目は以下の通りである。

8. 硫酸化ジェラン固定化系の作成
9. bFGF の吸着実験
10. TN-C の吸着実験
11. アンチトロニンⅢ吸着実験
12. TN-C の徐放理論値計算
13. TN-C の徐放実験

具体的には硫酸化ジェラン結合系を作成した後、bFGF、TN-C、ATⅢに対し結合性を吸着実験で確認する。その結果から結合定数を算出し評価する。その後任意の系での理論徐放値計算を行なう。この理論徐放値を実測徐放値の値を比べて解析を行なう。(Fig3-3)

この徐放理論を確立させることで、目的に応じた材料設計が可能となると考えられる。

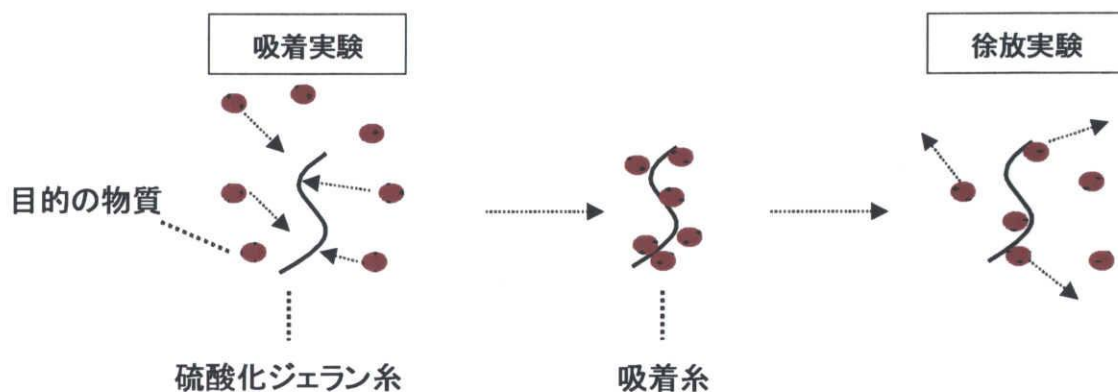


Fig3-3 吸着・徐放実験モデル

3-3 方法

3-3-1 硫酸化ジェランの固定化

目的

本実験では硫酸化ジェランをセルロースに固定することを目的とした。硫酸化ジェランは単体では水溶性であり、実験に用いるのは困難である。そのため不溶性のセルロースに固定することで、硫酸化ジェラン固定化糸を作製し今後の実験に用いた。

実験準備

試薬・器具

硫酸化ジェラン

(硫酸化度 2%、6%、17.9%、18.9%、30.8%、38.6%、52.7%、71.2%)

糸

水酸化ナトリウム

エピクロロヒドリン

アンモニア水

リン酸水素 2 ナトリウム

リン酸水素ナトリウム

塩化ナトリウム

脱イオン水

水素化ホウ素ナトリウム

無水酢酸

無水エタノール

ピペットマン(1000,200 μ L サイズ)

(GILSON)

ピペットマン用チップ

(理科研株式会社)

8 連ピペット

(Labsystems)

凍結保存チューブ(2mL サイズ)

(Assist)

震蕩器 (MICRO MIXER MODEL MX-4)

(SANKO JUNYAKU CO.,LTD)

ボルテックス

(Pasolina)

バキュームポンプ

(ULVAC)

MICRO PLATE READER

(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ (株))

メスシリンダー (10,20mL)

操作

アミノ化セルロース繊維の作製

1. セルロース繊維 0.1g を 3%水酸化ナトリウム水溶液 20ml に分散し、30℃で 20 分間攪拌
2. 5g のエピクロロヒドリンを加え、30℃で 3.5 時間攪拌
3. 脱イオン水でろ過液が中性になるまで洗浄、吸引ろ過により水を切る。
4. 20ml の 25%アンモニア水を加え、50℃で 2 時間攪拌
5. 脱イオン水でろ過液が中性になるまで洗浄
6. 完成

GS 還元末端の固定化¹⁴

1. 20ml の 0.2M リン酸バッファー(pH7)+0.1M 塩化ナトリウムに GS50mg を溶かし、アミノ化セルロース繊維 0.1g と水素化ホウ素ナトリウム 8mg を加える。
2. 60℃で 32 時間振とうする。
3. ろ過して脱イオン水で洗浄
4. 無水酢酸 2ml を無水エタノール 18ml にいれ、5 分攪拌
5. ろ過して脱イオン水で洗浄
6. 完成

セルロース繊維

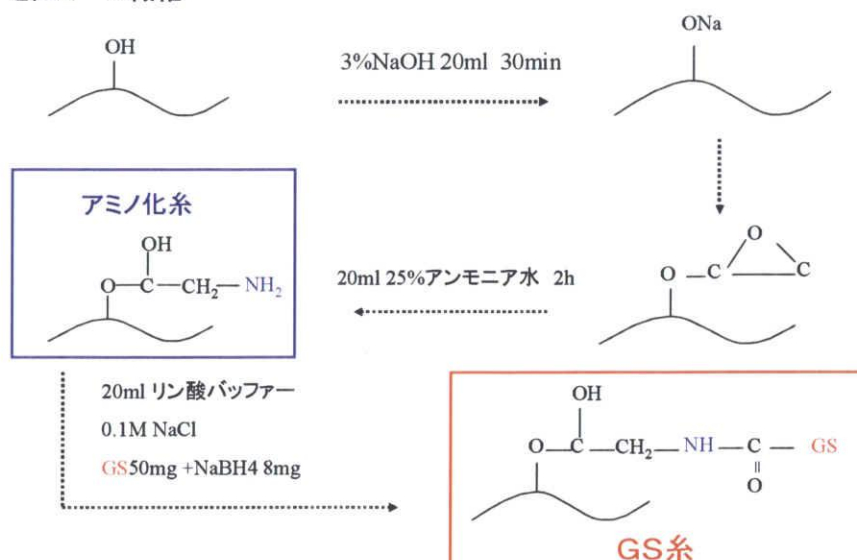


Fig3-4 硫酸化ジェランの固定化

Toluidine Blue テスト

1. 5ml の脱イオン水に 500 μ l Toluidine Blue (Fig3-5) を添加する。
2. 硫酸化ジェラン糸をいれて、攪拌する。
3. 染色確認(硫酸化多糖の場合結合に吸収波長がシフトし青から紫に変化する)

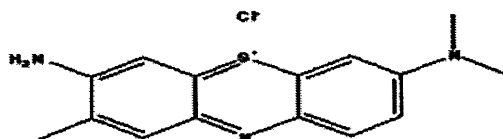


Fig3-5 Toluidine Blue 構造

SO4 分析

チッソ(株)に依頼。

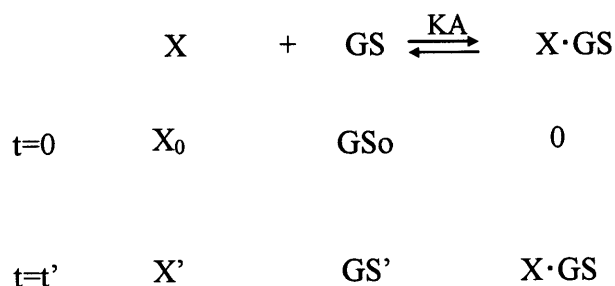
3-4-2 吸着実験

本実験はセルロースに固定化した硫酸化ジェラン糸に対する物質の吸着を測定した。測定物質には、創傷治癒に関わりが深いと考えられる細胞性フィブロネクチン、bFGF、TN-C、ATⅢを用いた。これらの硫酸化ジェランとの結合定数を算出することでアフィニティー測定を行なった。

また糸とタンパク質の結合定数の算出は Scatchard 解析を用いた。²

<Scatchard 解析について>

吸着タンパク質を X、糸に固定化してある硫酸化ジェラン量を GS とする。



$$(X' = X_0 - X \cdot GS, \quad GS' = GS_0 - X \cdot GS)$$

$$KA = \frac{X \cdot GS}{X'(GS_0 - X \cdot GS)} \quad \dots \textcircled{1}$$

展開して

$$\frac{1}{X} = KA \cdot GS_0 \cdot \frac{1}{X \cdot GS} - KA \quad \dots \textcircled{2}$$

よって $1/X$ を Y 軸に、 $1/X \cdot GS$ を X 軸にしてプロットしなおす。そしてそのグラフの近似直線より

$KA = \text{切片/傾き}$,

$GS_0 = 1/\text{切片}$

によって求められる。

また、①の平衡反応式より

$$KA = \frac{X \cdot GS}{(X_0 - X \cdot GS)(X_0 - X \cdot GS)} \quad \dots \textcircled{3}$$

これを展開して

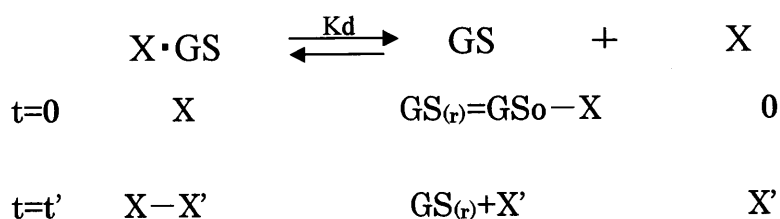
$$X \cdot GS = \frac{(X_0 + GS_0) \times KA + 1 - \sqrt{\{(X_0 + GS_0) \times KA + 1\}^2 - 4 \times KA^2 \times X_0 \times GS_0}}{2KA}$$

②式で求めた KA, GS_0 を③式にあてはめ、 X_0 を変化させて、飽和吸着に必要な初期濃度を計算により求める。

徐放実験の考え方として、TN-C で例を挙げる。GS 系に最大量の TN-C を吸着させる。それを水の中に入れ、平衡になったら GS 系を取り出す。その液を 1 回目の徐放液とする。そして、取り出した GS 系を新しい水に入れる。そして平衡に達したら 2 回目の徐放液が出来る。という方法である。これは

体内に入れたときに系溶液と TN-C 濃度が平衡になり、その後消費されたり、流れ出ることによって新しい系になると仮定した実験系である。つまり外界が総入れ替えになるのを 1 回と仮定した。

- ・ 理論徐放値の求め方



以上のような平衡の式より

$$Kd = \frac{1}{KA} = \frac{(GS_{(r)} + X') \times X'}{X - X'}$$

これを展開して

$$X' = \frac{-f + \sqrt{f^2 + 4KA \times X}}{2KA} \quad \dots \text{式①とする。}$$

($f = GS_o - X^2$)

となる。この式に Scatchard 解析より得られた KA と Ho をあてはめ、徐放量を求める。

3-4-2-1 bFGF の測定

実験準備

付録…3-1 参照

bFGF 濃度測定

1. 2ml アシストチューブに糸を各 1.5mg 入れる。
2. 37℃で 2h 攪拌する。
3. 上澄みを播種して測定へ。

次に移る前に上澄み溶液の希釈を行う。10~1000pg/ml のスタンダードに入るように計算して希釈しておく必要がある。

実験 2 の前にしておくこと

- ・ 測定サンプルの希釈倍率を計算し、希釈バッファーを用意しておく。(時間かかる)

上澄み濃度測定手順

1. プレートを常温において解凍する。
2. 100 μ l のスタンダード希釈溶液をブランクに入れる。
3. 100 μ l のスタンダード溶液を入れる。測定サンプルは 50 μ l を希釈溶液 50 μ l と加えて各ウェルに入れる。
4. プレートをカバーして 2h 常温でしんとう。
洗浄溶液の作成をしておく。
5. 洗浄溶液で 4 回洗浄する。
6. 100 μ l の biotinylated anti-FGF-b を入れる。ブランクには入れない。
7. プレートをカバーして 1h 常温でしんとう。
100X の溶液を Streptavidin-HRP 溶液に溶解させて準備をしておく。
8. 洗浄液で 4 回洗浄する。
9. 100 μ l の 100X 溶解 Streptavidin-HRP を入れる。(ブランクには入れない)
10. プレートをカバーして 30min 常温でしんとう。
暗室に発色溶液 (Stabilized Chromogen) を準備しておく。
11. 洗浄液で 4 回洗浄
12. 100 μ l の Stabilized Chromogen を各ウェルに入れる。(ここで青色に発色)
13. 30min 常温、暗室においておく。
14. 100 μ l の停止溶液を入れる。(ここで青から黄色に変化する)
15. ブランクには 100 μ l の Streptavidin-HRP と 100 μ l の停止溶液を入れておく。停止後 2h 以内に測定を済ませておく。

3-4-2-2 TN-C の測定

実験準備

付録…3-2 参照

TN-C 濃度測定

1. 2ml のアシストチューブに溶液 500 μ l 入れる。GS 糸、糸を各 3mg 入れる。
2. 37℃で 4h 攪拌する。
3. 上澄みを播種して測定へ。

検体に希釈については、希釈緩衝溶液を用いる。(吸着実験からそのままが良い)

上澄み濃度測定

1. プレート常温において解凍する。
2. 100 μ l のスタンダード希釈溶液を blanks に入れる。
3. 100 μ l のスタンダード溶液を入れる。測定サンプルは 50 μ l を希釈溶液 50 μ l と加えて各ウェルに入れる。
4. プレートをカバーして 37℃、1 h 常温でしんとう。
洗浄溶液の作成をしておく。
5. 洗浄溶液で 7 回洗浄する。(入念に洗浄をする。一回あたり 15~30 秒静置)
6. 100 μ l の二次抗体を入れる。blanks には入れない。
7. プレートをカバーして 4℃で 30min しんとう。
発色溶液の準備をしておく。
8. 洗浄液で 9 回洗浄する。
9. 100 μ l の発色溶液を入れる。(blanks には入れない)
10. プレートをカバーして暗室で 30min 常温でしんとう。(ここで青色に発色してくる)
11. 100 μ l の停止溶液を入れる。(ここで青から黄色に変化する)
12. blanks には 100 μ l の発色の溶液と停止溶液を入れておく。停止後 30min 以内に測定を済ませておく。

3-4-2-3 ATⅢの測定

実験準備

試薬・使用器具

ATⅢプレート作製

実験準備

※付録…3-3 参照

実験方法

ATⅢの測定

GS 糸、ATⅢの吸着実験。

1. 2ml アシストチューブに糸を各 0.75mg 入れる。
2. 37℃で 2h 攪拌する。
- 3 上澄みを播種して測定へ。

ELISA 法による上澄み濃度の測定

1. プレートを常温において解凍する。
2. 100 μ l のスタンダード希釈溶液をブランクに入れる。
3. 100 μ l のスタンダード溶液を入れる。測定サンプルは 100 μ l を各ウェルに入れる。
4. プレートをカバーして 1.5h 常温でしんとう
洗浄溶液の作成をしておく。
5. 洗浄溶液で 3 回洗浄する。
6. 100 μ l の二次抗体を各ウェルに入れる。
7. プレートをカバーして 60min 常温でしんとう。
8. 洗浄液で 3 回洗浄
9. 発色溶液を入れる。10~15min 常温においておく。
10. 発色後、50 μ l の停止溶液を入れる。
11. 490nm で測定

3-3-3 徐放実験

目的

徐放実験 50%硫酸化ジェラン糸と TN-C について行なった。選んだ糸を TN-C の結合定数から理論徐値を計算する。その計算値に対して、徐放量がどのような挙動を見せるかを検証し考察していく。

徐放実測値測定

TN-C が糸に対し飽和吸着まで時間を取り、その後交換をして一回の徐放量をプロットしていく。計算した吸着挙動の結果を 図 3-10 に示す。

実験準備

試薬・器具

TN-C

硫酸化ジェラン化糸 50%

| | |
|----------------------------------|--------------|
| ローテーター MTR-103 | (井内盛栄堂) |
| ピペットマン(1000,200,20, μ L サイズ) | (GILSON) |
| ピペットマン用チップ | (理科研株式会社) |
| 凍結保存チューブ(2mL サイズ) | (Assist) |
| 遠心分離機、KUBOTA2010 | (株式会社久保田製作所) |
| 24穴トランスウェル | (Corning) |

測定手順

1. 飽和吸着濃度 TN-C 中に硫酸化ジェラン糸を入れて 4h 吸着させる。
2. 糸を脱イオン水で洗浄して、希釈溶液 500 μ l 入りの 2ml アシストチューブに入れる。
3. 4h 後に新たな希釈溶液 500 μ l 入りの 2ml アシストチューブに入れる。
4. この操作を 8 回繰り返す。
5. 上澄みを測定

※上澄み測定手順は上記に従う

3-4 結果

3-4-1 硫酸化ジェランの固定化

Toluidine Blue テスト

結果

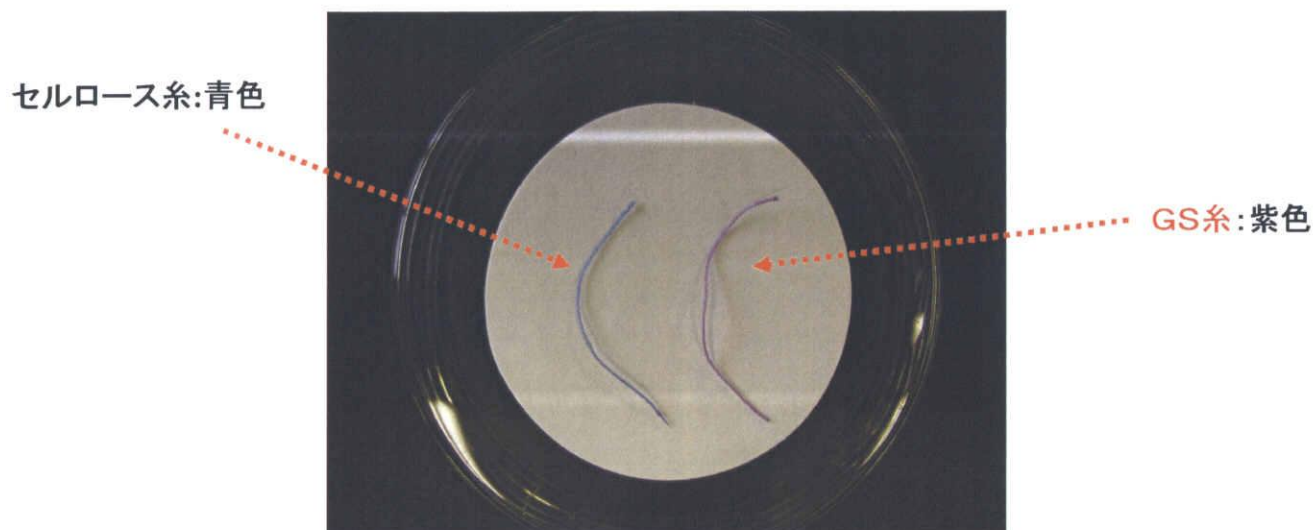


Fig3-6 Toluidine Blue 染色テスト

写真のように、作製した硫酸化ジェラン糸では、硫酸基に特有の紫色の発色を確認された。それに対しアミノ化糸では、溶液の青色に染色された。ここから、作製した糸への硫酸化ジェランの固定が確認された。(Fig3-6)

SO₄ 分析

上グラフでは糸の単位長さあたりの重量の違う三種類の糸固定化量の違いの検証を行なった。結果から三種類ともほぼ同等の固定化量をとっていたため、糸の種類による違いはほとんどないと考えられる。下のグラフでは硫酸化度の異なる硫酸化ジェランでセルロースに固定した際の固定化量の検証である。固定化量はほぼ $10\text{E-}7$ レベルをとっており。硫酸化度によるセルロースへの固定化量に違いはないと考えられる。(Fig3-7) また単位辺りの GS 置換数も、固定化量は $10\text{E-}7$ レベルなり、同様に違いはないと考えられる (Fig3-8)。これはセルロースと硫酸化ジェランの結合が Fig3-4 で示したように末端で固定化しているためと考えられる。

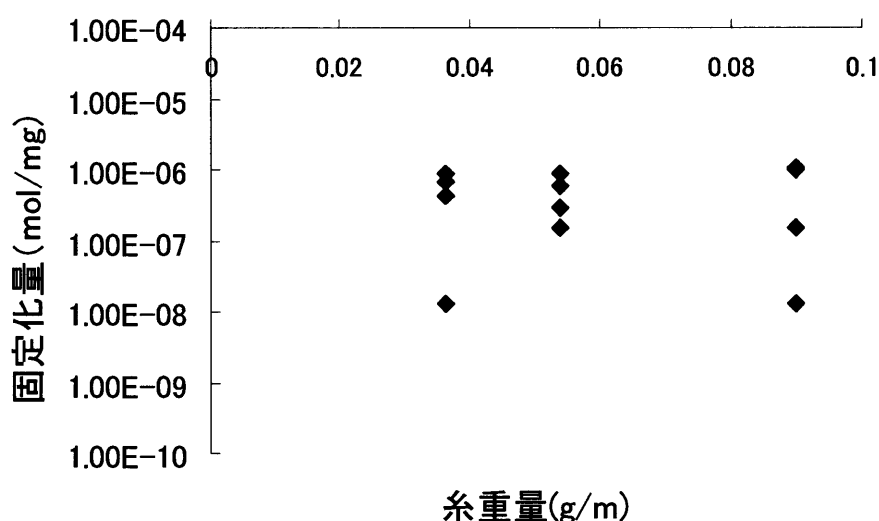


Fig3-7 糸の重量による固定化量の変化

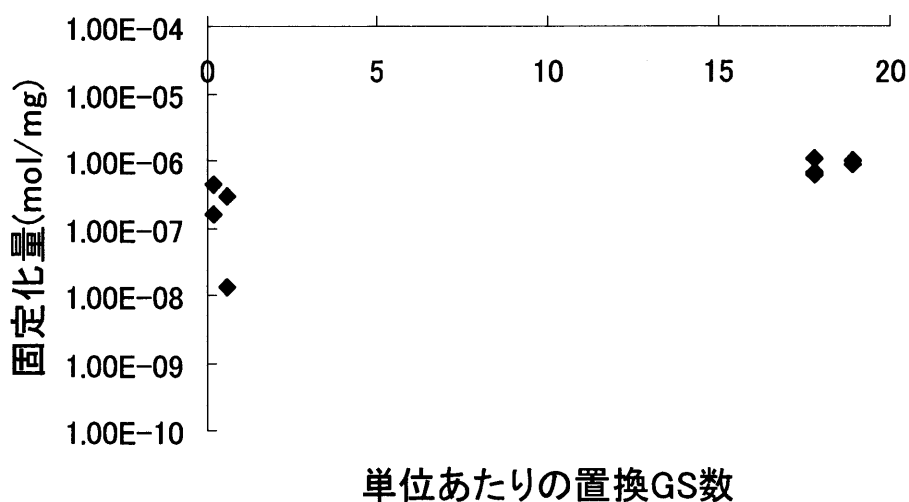


Fig3-8 GS 置換数による固定化量の変化

3-4-2 吸着実験

3-4-2-1 bFGF 結果

硫酸化度の異なる糸 4 種類(2、6、10、18.9、30、38、52、71%)について吸着実験を行なった。以下順に結果を記載していく。

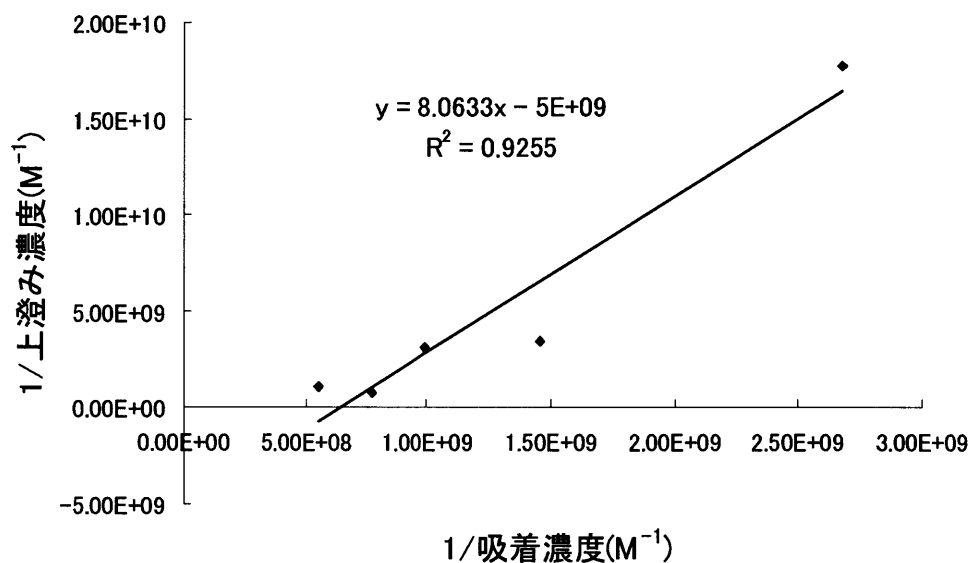


Fig3-9 2%硫酸化ジェラン糸への吸着

結合定数は $5\text{E}+9$ となった。(Fig3-9)

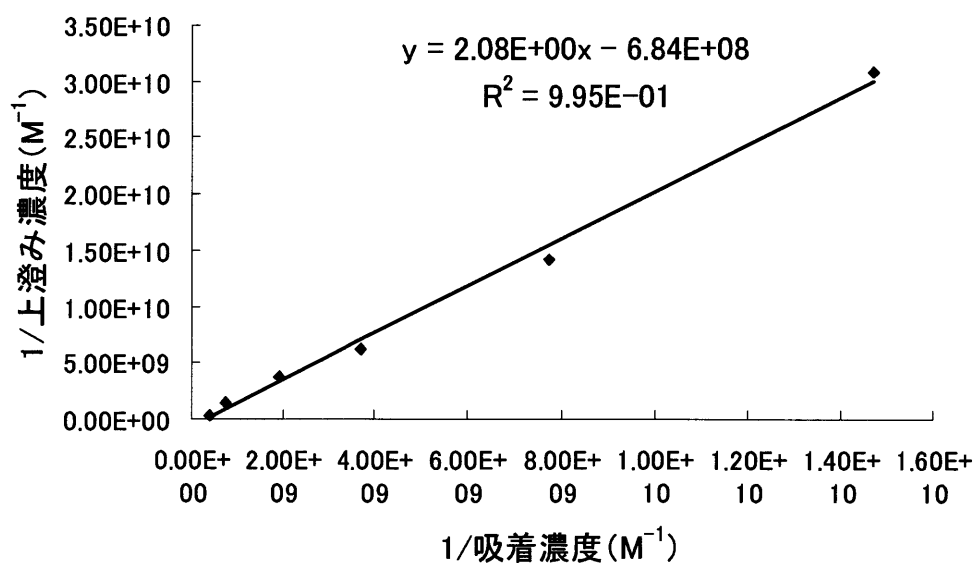


Fig3-10 6%硫酸化ジェラン糸への吸着

結合定数は $6.8\text{E}+8$ となった。(Fig3-10)

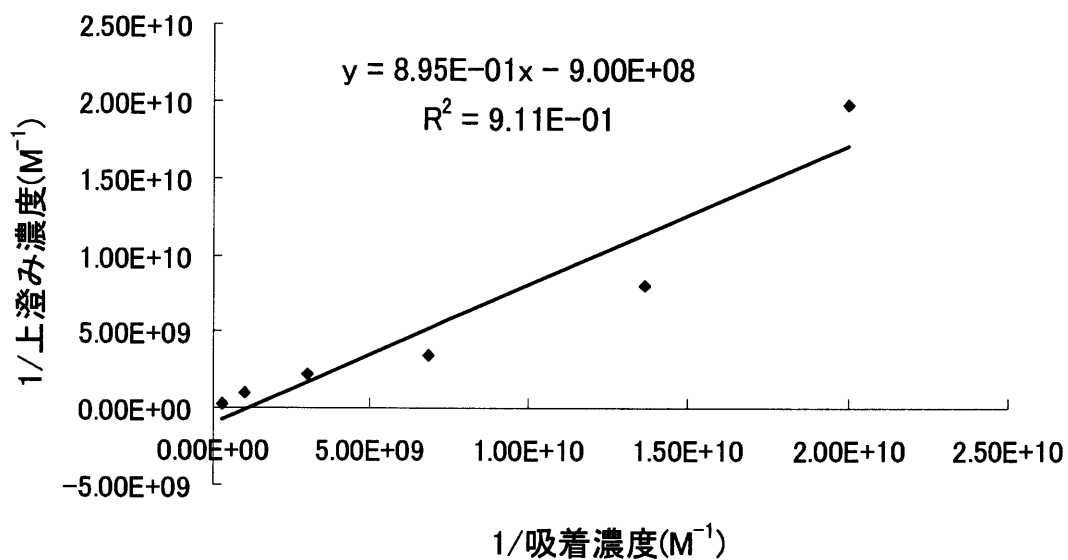


Fig3-11 18.9%硫酸化ジェラン糸への吸着

結合定数は $9\text{E+}8$ となった。(Fig3-11)

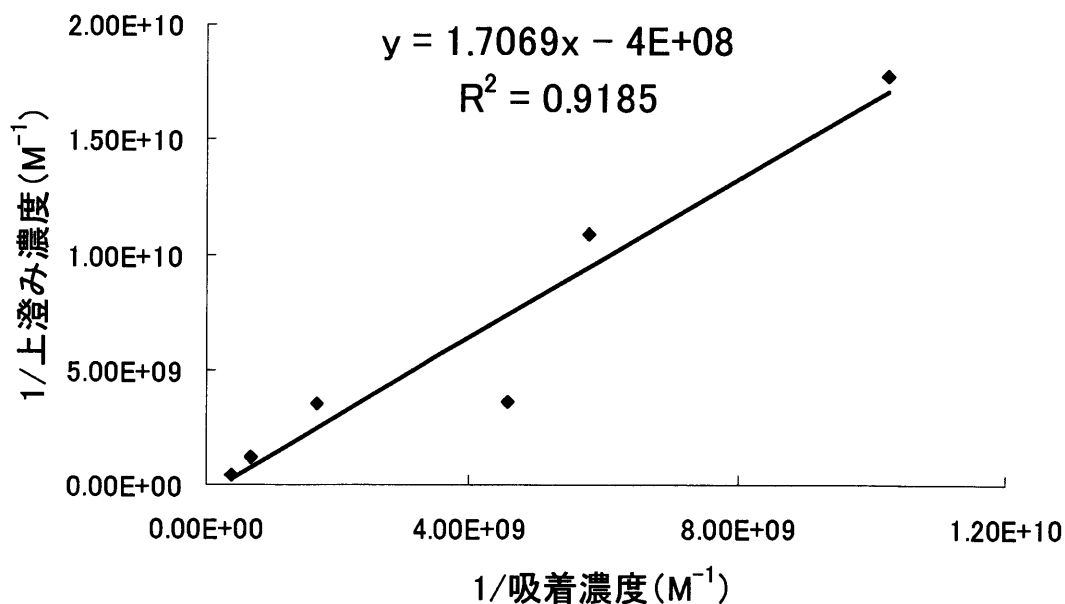


Fig3-12 30%硫酸化ジェラン糸への吸着

結合定数は $4\text{E+}8$ となった。(Fig3-12)

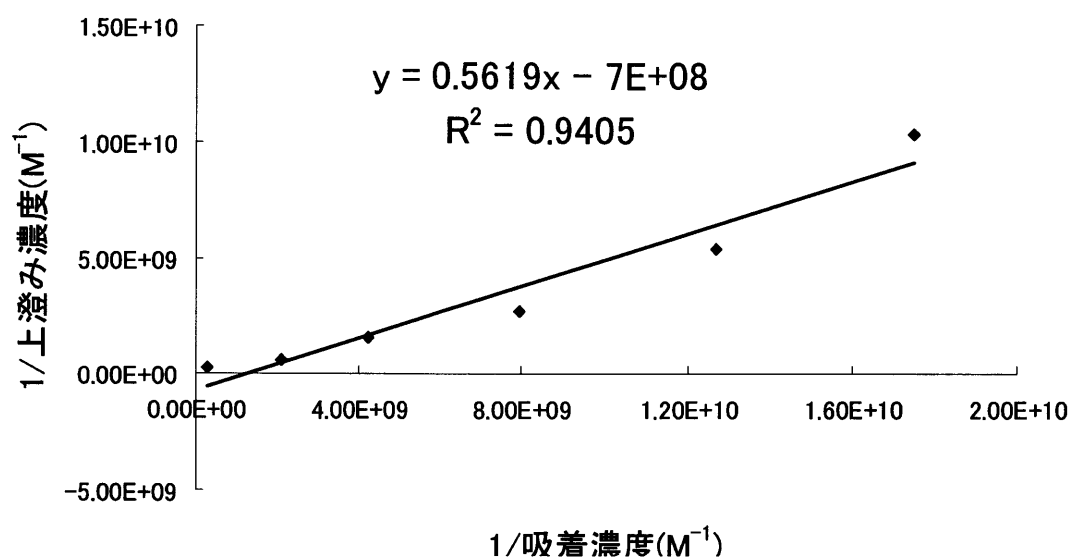


Fig3-13 38%硫酸化ジェラン系への吸着

結合定数は $7E+8$ となった。(Fig3-13)

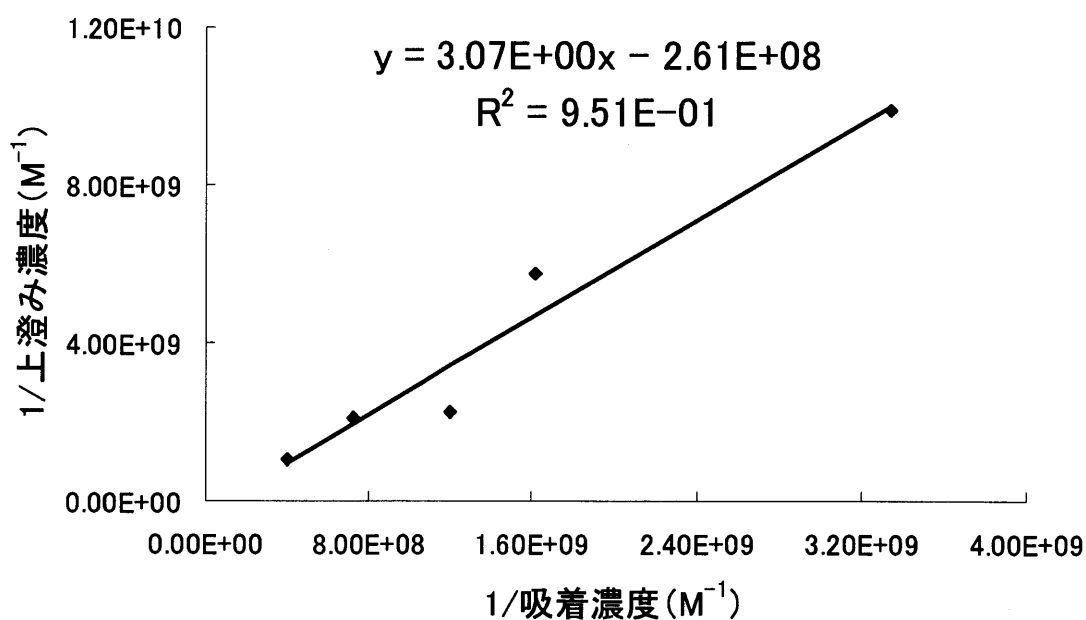


Fig3-14 52%硫酸化ジェラン系への吸着

結合定数は $2.61E+8$ となった。(Fig3-14)

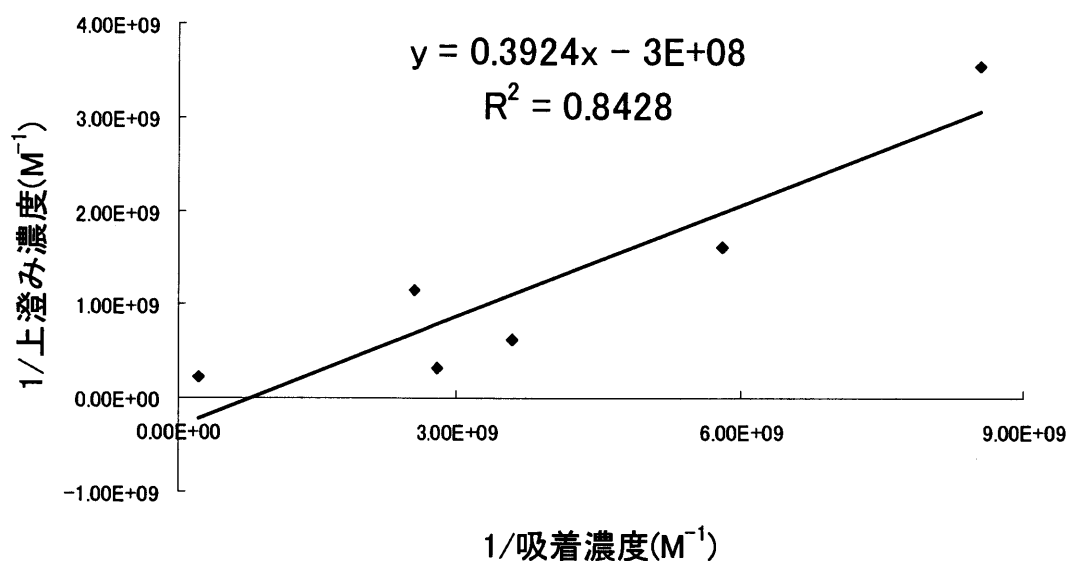


Fig3-15 71%硫酸化ジェラン系への吸着

結合定数は $3E+8$ となった。(Fig3-15)

硫酸度に対する bFGF 吸着グラフ

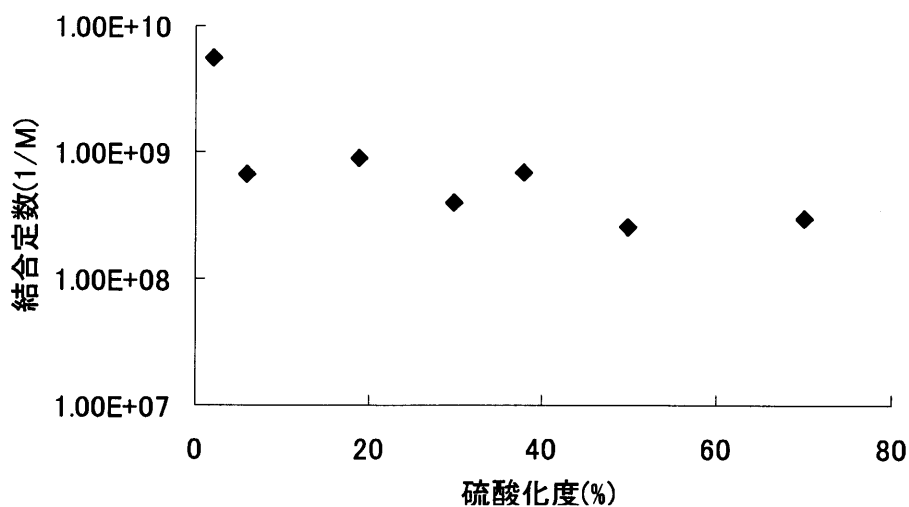


Fig3-16 硫酸化度による結合定数の変化

グラフより硫酸化度が上昇するにつれ結合定数減少していく傾向となった。また結合定数としては $10E+8$ から $10E+9$ の間をとることが確認された。(Fig3-16)

3-4-2-2 TN-C 吸着実験結果

硫酸化度の異なる糸 4 種類(30、38、52、71%)について吸着実験を行なった。以下順に結果を記載していく。

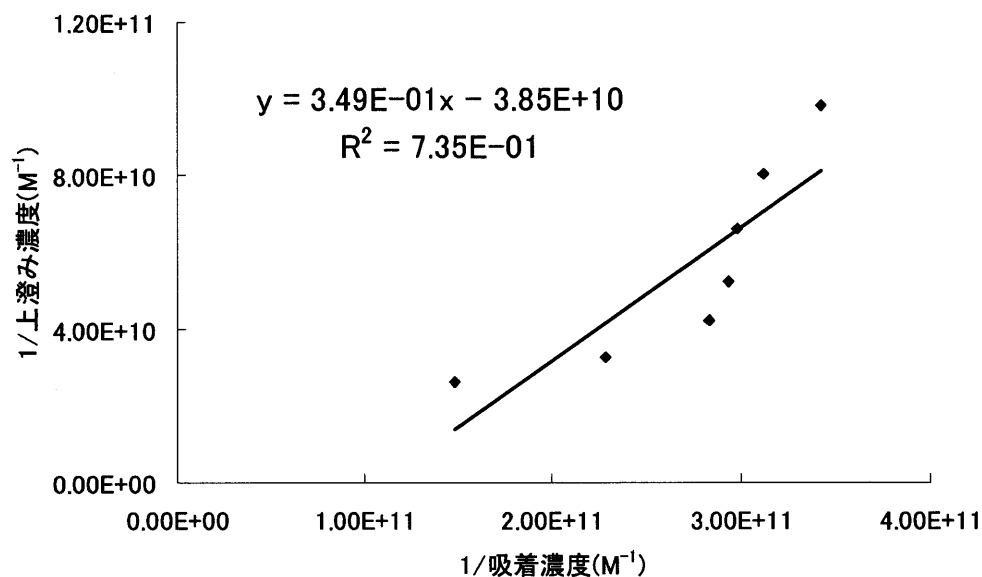


Fig3-17 30%硫酸化ジェラン系への吸着

吸着量として 12~22%だった。結合定数は約 $3.85\text{E+}10$ となった。(Fig3-17)

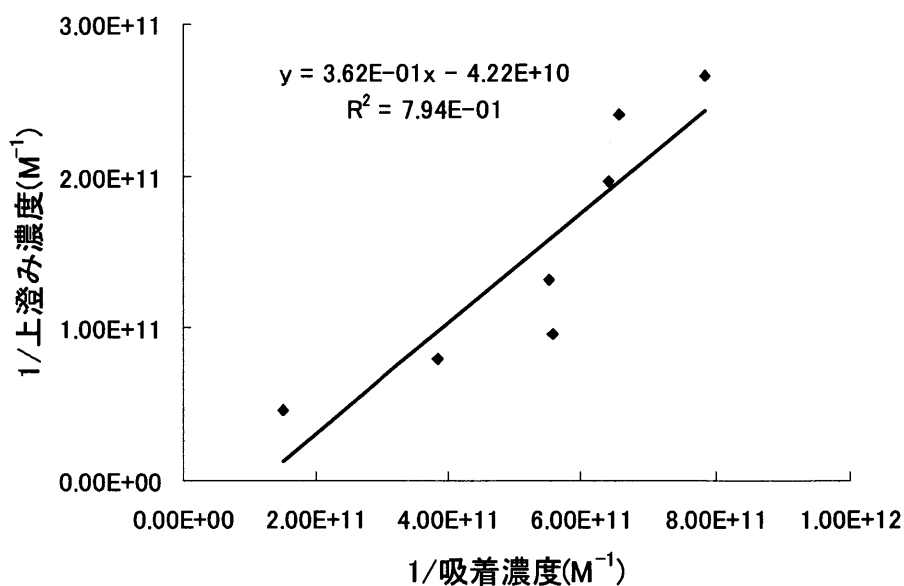


Fig3-18 硫酸化ジェラン系 38%への吸着実験 1

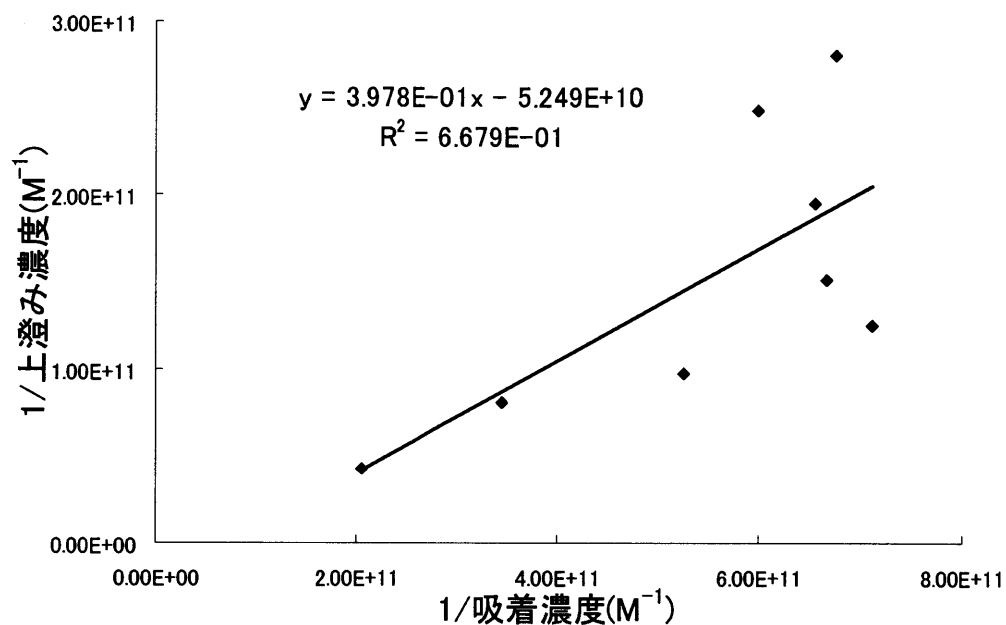


Fig3-19 硫酸化ジェラン系 38%への吸着実験 2

吸着量として 15～30%だった。結合定数は約 $4.5E+10$ となった。(Fig3-18, 3-19)

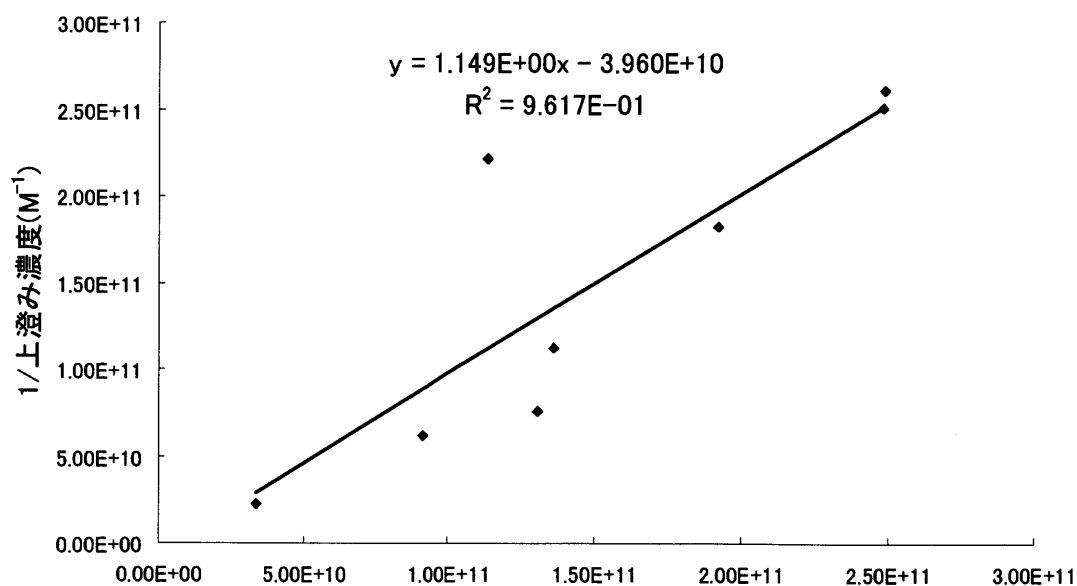


Fig3-20 硫酸化ジェラン系 52%への吸着

結合定数は約 $4E+10$ となった。(Fig3-20)

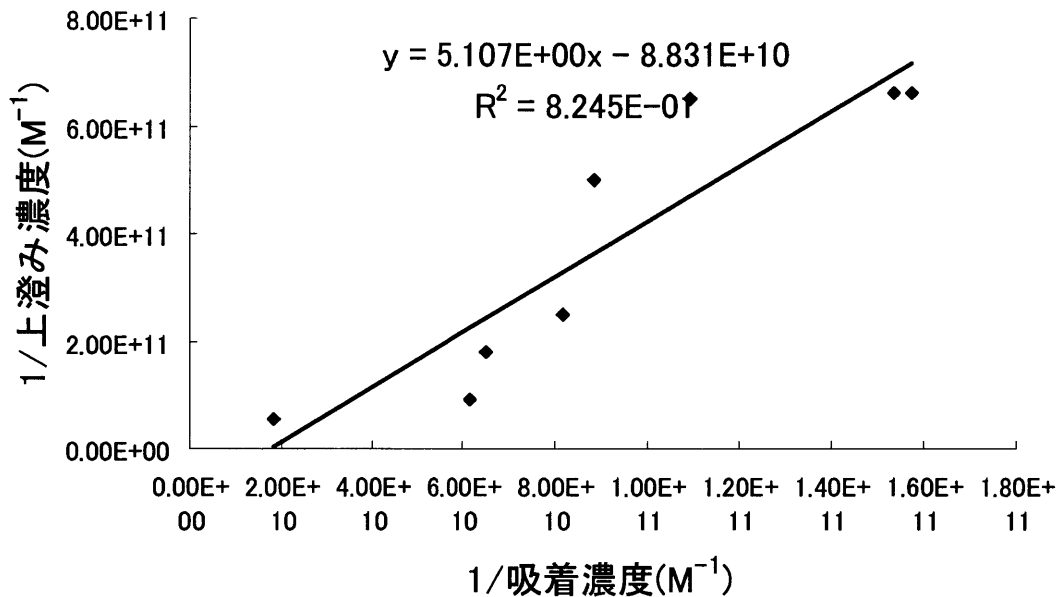


Fig3-21 硫酸化ジェラン系 70%への吸着 1

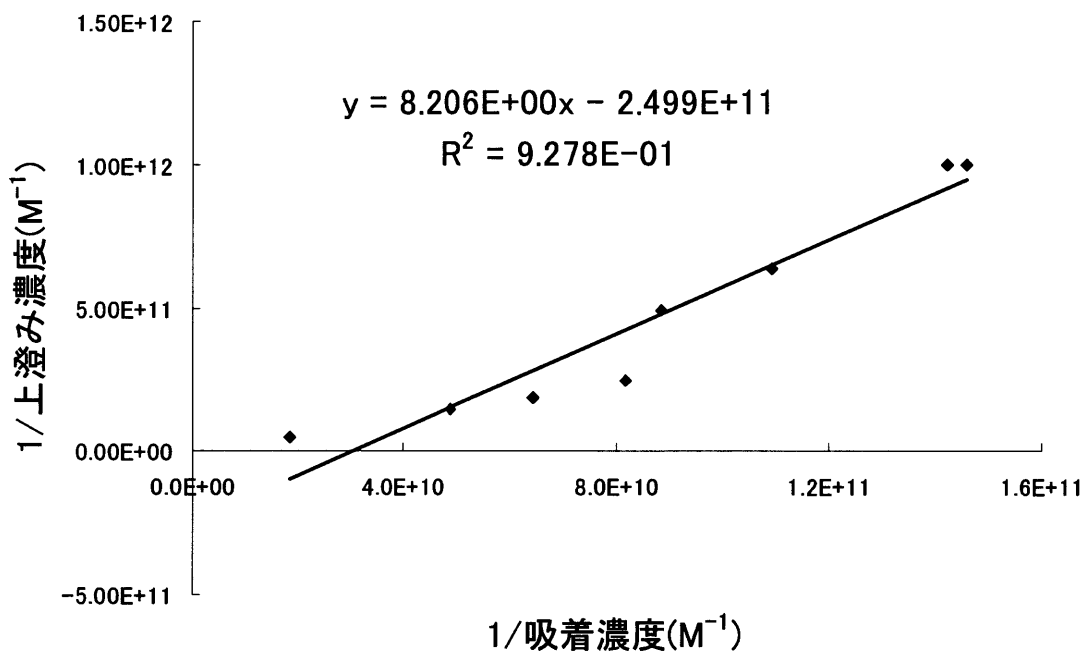


Fig3-21 硫酸化ジェラン系 70%への吸着 2

今回 70%GS を用いて、今までの 30～52%とは違いかなりの吸着が見られた。吸着量として 70～85%だった。結合定数は $2.5E+11$ 、 $8.2E+10$ とこれまでの bFGF、FN と比べて高い値を示した。(Fig3-21,3-22)

硫酸度に対する TN-C 吸着グラフ

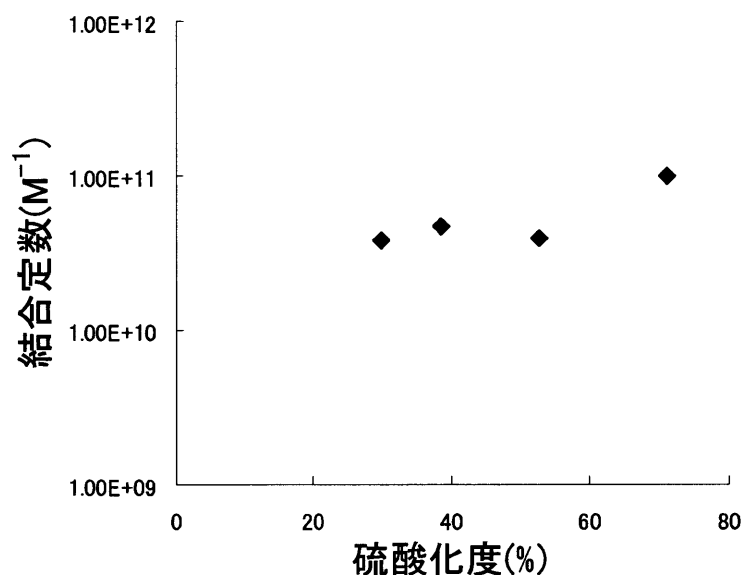


Fig3-23 硫酸化度による TN-C の結合定数の変化

グラフより 30~52%の間では結合定数に大きな差は見られなかった。しかし 70%では結合定数が約 2 倍に上昇し、また硫酸化度 20%以下では TN-C を吸着しないという結果になった。また結合定数としては 10E+10 から 10E+ 11 の間をとることが確認された。(Fig3-23)

3-4-2-3 ATⅢ

Table3-1 硫酸化度に対する ATⅢの吸着量(%)

| 初期濃度 | 2% | 6% | 18.9% | 30% | 38% | 52% | 71% |
|------|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|
| 77 | 3 | 5 | 4 | -4 | -3 | 2 | 5 |
| 46 | -4 | -13 | -12 | -16 | -19 | -35 | -33 |
| 33 | -29 | 3 | -9 | -12 | -11 | -55 | -45 |
| 22 | -18 | -11 | -24 | -28 | -24 | -55 | -40 |
| 14 | -11 | -11 | -13 | -16 | -3 | -59 | -41 |
| 7 | -24 | -27 | -23 | -25 | -19 | -3 | 14 |

初期濃度に対する吸着量を算出した。結果吸着が数%から負の値となった。結果から GS 糸は ATⅢに対して吸着をしないことがわかった。(Table3-1)(負のデータは測定の誤差と考え、吸着は 0 とした。)

3-4-3 徐放値計算

理論上値の計算

TN-C の 38、50、70% から得られた結合定数から、X 軸に交換回数を取り、Y 軸に一回の徐放量をプロットしたグラフを作成した。

硫酸化度 38%… $3.85\text{E}+10$ 52%… $4.72\text{E}+10$ 71%… $1\text{E}+11$

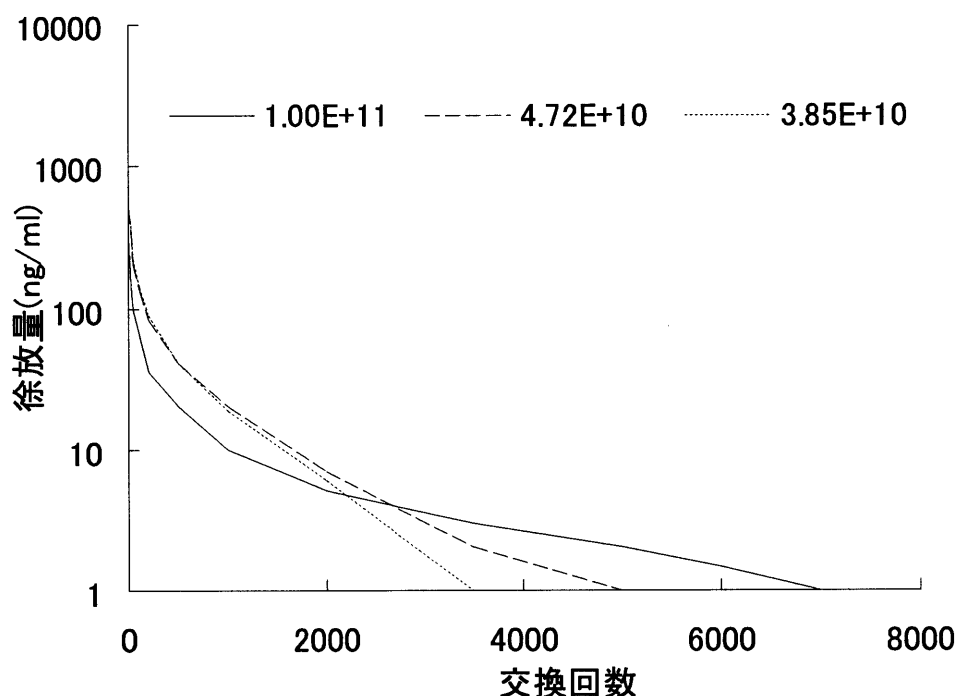


Fig3-24 結合定数による徐放挙動の比較

それぞれ一回目の徐放量を比べてみると 38%… $3.85\text{E}+10$ では 500ng/ml 、52%… $4.72\text{E}+10$ では 420ng/ml 、71%… $1\text{E}+11$ では 300ng/ml という結果になった。結合定数の高い 70% ジェランでは一回の徐放量は全体的に少なく、次に 50%、最後に 38% ジェランであった。これは結合定数に反比例して、結合定数の高いときは一回あたりの徐放は抑えられ、低いとき時は徐放が多くなった。しかし徐放可能回数を比較すると結合定数の高い順に長くなっていることがわかる。結合定数が高いということは物質と強く結合しているため、徐々に物質が乖離していき、一度の乖離は少ない。そのため結合定数と交換回数は比例し、一回の徐放量は逆の結果となった。(Fig3-24)

実測徐放値計算

硫酸化ジェラン糸の徐放実験

TN-C を硫酸化ジェラン糸(50%)5mg に吸着させた。

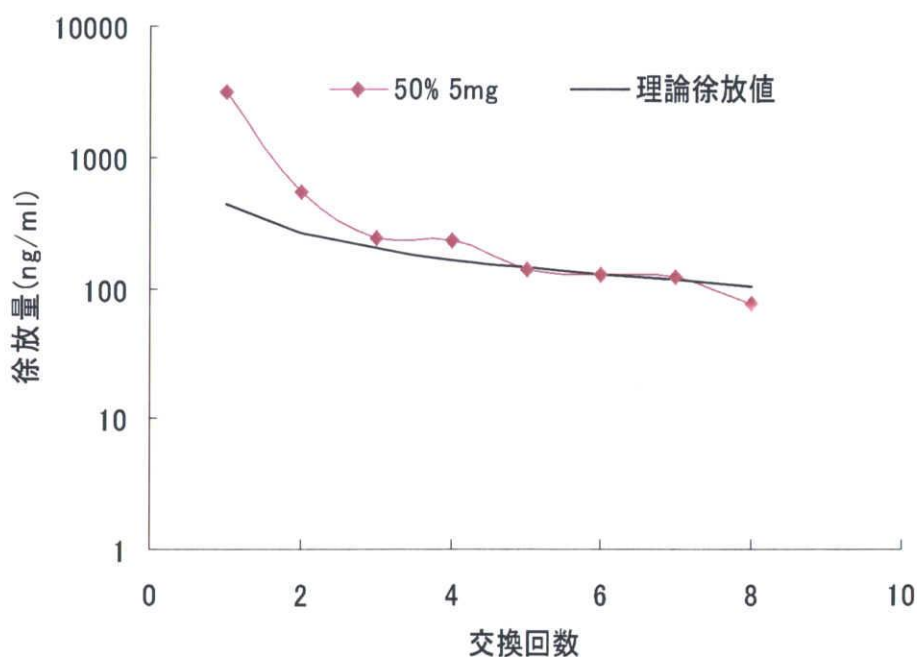


Fig3-25 徐放理論値と実測値の比較

50%糸での理論徐放値と実測値の比較をすると一回目の徐放量に大きく差がある。しかし二回目以降はほぼ同等の値を示した。これは一回目の測定時にTN-C を吸着させた糸を洗浄する作業が、不十分だったためと考えられる。実際には分子レベルでの吸着でなく、糸の吸水による誤差と考えられる。そのため二回目以降は理論値とほぼ同等の値を示している。(Fig3-25)

3-5 考察

吸着タンパク TN-C による結合定数の違いの考察

本章の結果では TN - C に対しては硫酸化度 20%以下では吸着せず、30%から吸着がおこった。30%から 52%までの硫酸化度に対する結合定数の違いは見られなかったが、70%では約二倍の結合定数といった結果になった。bFGF では TN-C とは違い、硫酸化度が下がるにつれて結合定数が緩やかに上昇していた。さらに ATIIIでは 2~71%の硫酸化度の糸に対してどれにも吸着をしない結果になった。下に結合定数を比べたグラフを示す。(Fig3-26)(ATIIIは省略)

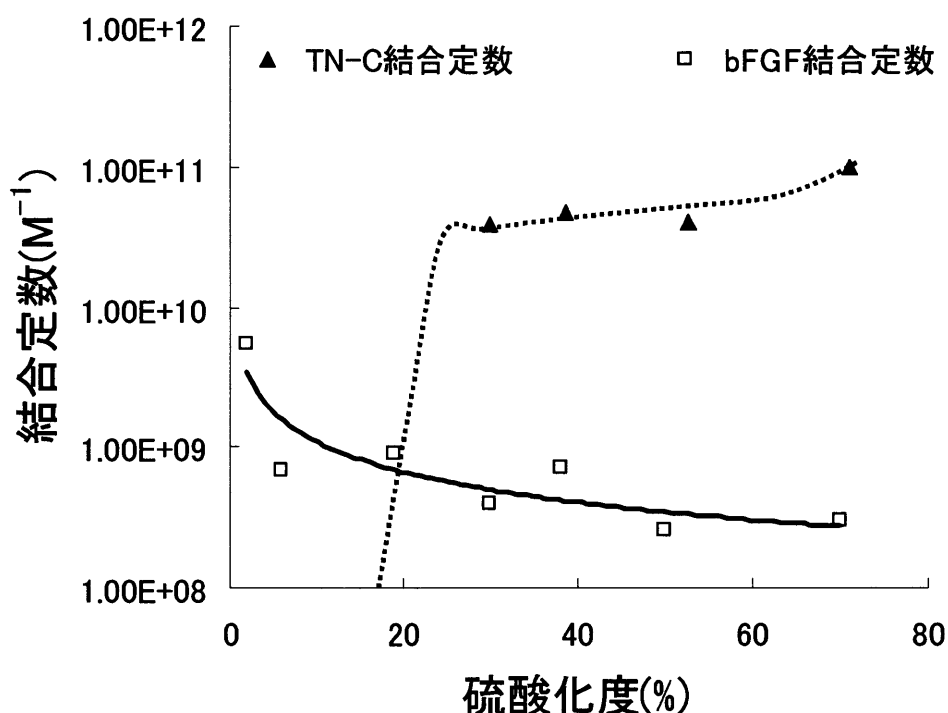


Fig3-26 bFGF TN-C 結合定数に比較

TN-C が 20%以下で吸着しない原因は硫酸化ジェランの硫酸化の構造が挙げられる。硫酸化ジェランのには単位辺りに 10 個硫酸化可能な部位を持つ。その中で最も硫酸化されやすいのが、グルコースの 6 位である。これは単位分子辺りグルコースが二つあるため、二個存在する。その硫酸化度 20%以下の硫酸化ジェランではこの部位が硫酸化された硫酸化ジェランであると予想される。以前の研究から硫酸化ジェランはグルコースの六位以外が硫酸化された状態でヘパリンの機能を示した結果が報告されている。そのため 20%以下の硫酸化度ではヘパリン類似構造をとっているとはいえず、機能としてもへ

パリン類似能を示すことはできない。そのため硫酸化度 20%以下では TN-C と結合しなかったと考えられる。

bFGF では TN-C とは違い、硫酸化度が下がるにつれて結合定数が緩やかに上昇していた。以前の研究から bFGF はゼラチンにも吸着することが確認されていて、GS に対しても認識部位を持ち特異的な結合をしているのではなく、負に帯電している bFGF に電荷による影響と考えられる。そのため硫酸化度の変化による傾向は見られないと考えられる。

ATIII が吸着しなかった原因は、ATIII がヘパリンと結合する際認識している部位が分子構造レベルでなく、より大きな立体構造などを認識して結合しているためと予想される。そのため硫酸化ジェランで硫酸化度を上昇させ、ヘパリン様の分子構造にしても、立体構造が異なるため吸着をしなかったと考えられる。

また本章の結果から TN-C と bFGF では TN-C が結合定数 $1\text{E}+10$ 、bFGF $1\text{E}+9$ と TN-C に対して強い結合を示した。これは GS が TN-C に対しては認識部位を持ち、bFGF とは電荷での結合のため TN-C のほうが強い結合を示すと考えられる。TN-C は構造にフィブリノーゲン様ドメインを持つ。現在の研究ではこの部位がヘパリンと結合することが知られている。そのため 30%以上の GS ではヘパリンと同じような機能を示すと考えられるため、TN-C が GS を認識して結合が起きていると考えられる。

理論徐放値と実測値の考察

今回の徐放理論値と実験値はほぼ同等の値をとった。ここから徐放理論値の算出式が正しいことが証明された。このことは材料設計を考えるときに非常に有意義な結果である。すなわち材料と実験系の選択を行なうことで、徐放の挙動を推測することが可能であるからである。今回理論値計算に用いた(式①)パラメーターは、

- GS 糸の量
- タンパク質の仕込み量
- GS 糸とタンパク質の結合定数
- 徐放する系の体積

の四つである。これらを先の計算式に代入することで理論徐放値の計算が可能である。またこの四つの項目の中で結合定数以外は実験の操作の系設定で行なうことが可能である。つまり GS と特定のタンパクの結合定数を測定することで、徐放値の計算は可能となる。今回用いたのは GS 糸と TN-C の例であるが、結果で算出した結合定数を用いることで、同様に理論徐放値を推定し材料設計の指標にすることが可能である。

4章 総括

これまでの研究で、ジェランゲルの物質透過性および硫酸化ジェランのタンパク質の吸着を確認した。ジェランゲル中の物質透過シミュレーションでは、ゲル中の物質の透過が、ゲルの網目(ゲル濃度)と分子の大きさから算出される拡散定数(透過係数)とゲルの厚みにより決定されることがわかった。さらに硫酸化ジェラン系では吸着させた後に徐放実験を行い徐放理論値と実験値が同等の値をとることを検証し、徐放理論計算が正しいことが証明された。これらの結果を材料の開発、設計に応用していく。

これまでの DDS 材料の問題として、目的の場所に送り込んだときに吸着していた物質をすぐに流出してしまうことがあった。この原因は物質の徐放吸着は空間での担体濃度と外界濃度により支配されると考えられる。つまり極所空間では外界濃度の変化があまり起きないため、担体の濃度の変化が小さく徐放が可能である。しかし外界が常に入れ替わるような場所(血液の流れが激しい部分)では外界濃度がすぐ 0 になるため、単体に吸着していた物質も乖離してしまい時間的には初期の脱離が多くなり長期にわたる徐放は困難になってしまう。

そこで本章では 2 章の拡散定数、3 章の結合定数を組み合わせて新規の材料の設計と解析の提案をする。具体的には Fig4-1 に示した図を目的としている。この材料は徐放担体の周りをゲルでコーティングしているモデルである。そこ上の式を導入した理論式を作る。

ゲルをコーティングしていない状態でのシミュレーションとゲルコートありのシミュレーションを比べてみる。X 軸の交換回数がある。これは一度外界の濃度が 0 になったときを想定している。そのときの徐放のシミュレーションである。つまり上記の理由で、血管などではこの交換回数の時間はきわめて 0 に近いものになる。つまり現状の問題である吸着物質の初期乖離が起こってしまう。

この交換回数に時間を持たせるのが、ジェランゲルによるコーティングである。ジェランゲルで徐放担体を包み込むことで、担体が直接外界と接することが無い。そのため担体からの物質の乖離はゲル中の物質濃度に依存してくる。ゲル中の濃度変化は透過係数にのみ支配されるため、外界の濃度が 0 であっても急激に減少することはない。ここでこの材料の物質徐放のシミュレーションを試みる。

条件

ジェランゲル

- 4%ゲルを用いる。
- 透過分子を TN-C(分子量 150 万)
- コーティングゲルの厚みを 0.1mm とする。

GS 糸

- 50%糸、TN-C 初期濃度 $1\text{E-}8(\text{M})$ を吸着。
- 糸の量を 5mg
- 結合定数 $4.72\text{E+}10$

その他の条件

外界濃度は 1 分で常に入れ替わると過程する。

この項目を元にシミュレーションを行う。

まずジェランゲルの物質透過である。TN-C(分子量 150 万)から分子半径を出すために分子量の三乗根をとる。

$$1500000^{1/3}=114.4 \cdots \textcircled{1}$$

得られた①の値を 4%ジェランゲルの Fig の拡散定数算出式に代入し、拡散定数を条件に合わせて透過係数へと変換する

$$\begin{aligned}\text{数式拡散定数} &= 1\text{E-}8 \times X^{1.8313} \quad (X=114.4) \\ &= 1.69 \times 10\text{E-}12(\text{m}^2/\text{sec}) \cdots \textcircled{2}\end{aligned}$$

さらにコーティングゲルの厚み 0.001mm から 4%ジェラン中の TN-C の透過係数と透過時間を得る。

$$\begin{aligned}\text{透過係数} &= D/d \\ &= 1.69 \times 10\text{E-}12 / 0.1\text{E-}3 \\ &= 1.69 \times \text{E-}8(\text{m}/\text{sec}) \cdots \textcircled{3}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{透過時間} &= 1.69 \times \text{E-}8 / 0.001 \times 60 \times 60 \times 24 \\ &= 0.68(\text{日})\end{aligned}$$

この計算から、4%ジェラン 0.001mm を TN-C が透過するのに 0.68 日かかることがわかった。

次に 50%GS 糸とテネイシンのシミュレーションである。これは Fig で示したように交換回数による徐放量が出されている。これらの条件でゲルコーティング GS 糸と GS 糸の理論徐放値を算出し比較する。

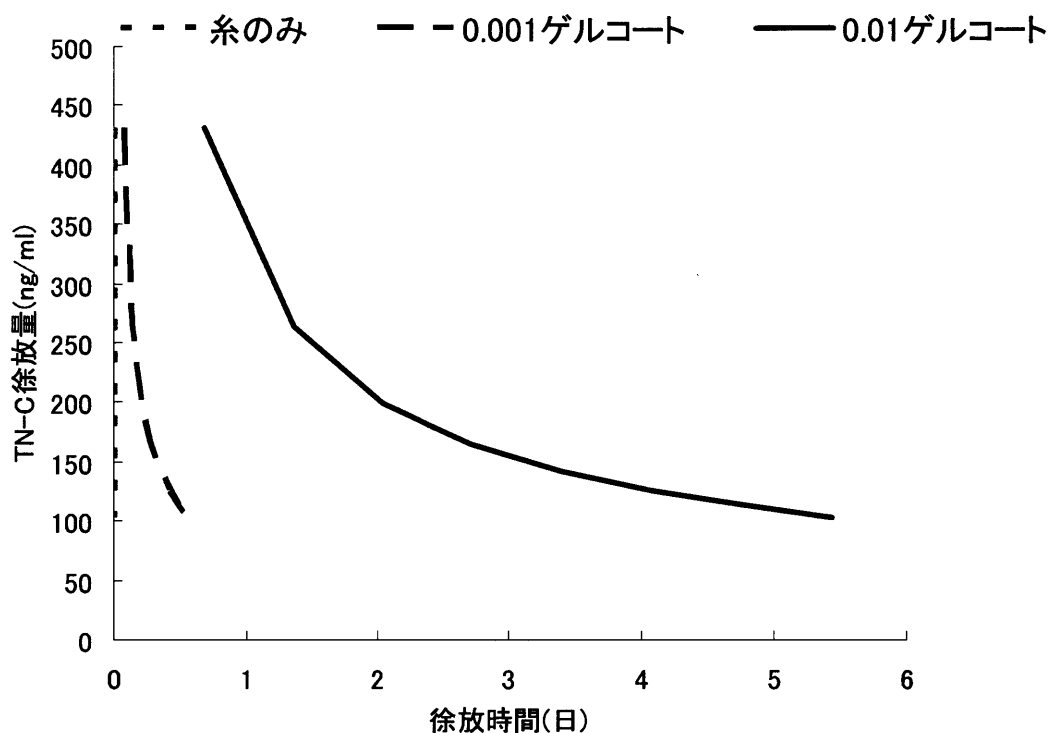


Fig4-1 各材料による徐放挙動

これは上記の式で算出した糸のみでの徐放、ゲルコーティング 0.001mm、0.01mm の三種類の比較をしたグラフである。グラフからわかるように GS 糸はすぐに徐放が終了している。しかし GS 糸をゲルでコーティングすることにより、0.001mm コートでは半日に延長、0.01mm では約六日となった。つまりゲルコートにすることで、その厚みに比例して徐放時間は延長されることが証明された。(Fig4-1)

創傷治癒において徐放の時間を調節できることは非常に有用である。1 章の Fig1-3 で示したように創傷治癒における生体反応は時間と共に変化し、必要な物質も異なってくる。そのため徐放物質の時間を調節することは創傷治癒に有効である。血液凝固や血管反応は傷害を受けた直後から三日ほどであるが、炎症反応は 3~5 日でピークに達し、組織新生は 6~16 日である。Fig4-1 で紹介したのは TN-C を用いた一例だが、他の分子でも拡散定数、結合定数を求め条件設定をすることで創傷治癒に応じて材料設計することが可能である。

Fig1-5、1-8 で紹介したいいくつかの物質について表で紹介する。

| | EGF | IGF | TNF- α | bFGF | IL-1 | TGF- β | VEGF | AtIII | PDGF | TN-C |
|--------------------------|------|------|---------------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|---------|
| 分子量 | 6000 | 8000 | 17000 | 19000 | 20000 | 25000 | 45000 | 58000 | 60000 | 1500000 |
| Mw ^{1/3} | 18.2 | 20.0 | 25.7 | 26.7 | 27.1 | 29.2 | 35.6 | 38.7 | 39.1 | 114.5 |
| 小 ◀ 分子半径 ▶ 大 | | | | | | | | | | |

Fig4-2 創傷治癒関連物質の Mw^{1/3}

Fig4-2 では分子半径と比例関係にある Mw^{1/3} を算出した。表の Mw^{1/3} から様々な材料設計が可能となる。分子半径を求めることで、ゲル中の透過定数の算出が可能である。そこで、例として TN-C を用いて、徐放時間の設計を行なう。TN-C は細胞の接着反接着に影響し、組織の傷を塞ぐため組織新生に必要である。よって組織新生のピークになる 6 日からの徐放を目的とする。するとこの徐放は以下に計算に必要な仮定条件を設定する。

条件

ジェランゲル

- 4%ゲルを用いる。
- 透過分子を TN-C(分子量 150 万)

GS 糸

- 50%糸、TN-C 初期濃度 1E-8(M)を吸着。
- 糸の量を 5mg
- 結合定数 4.72E+10

その他の条件

外界濃度は 1 分で常に入れ替わると過程する。

以上の仮定の条件から、

6 日目から 16 日目までの TN-C 徐放材料の設計を行なう。

③から透過係数=1.69×E-8(m/sec)

が求められている。六日透過を防ぐので、

$$1.69 \times E-8 \times 1000 \times (6 \times 24 \times 60 \times 60) = 8.76 \text{mm}$$

この結果から TN-C を 8.76mm の 4%ジェランゲルで SG 糸を包み込むこ

とで六日後からの徐放が可能となる。また GS 系の条件から一回目の徐放は約 430ng/ml ということも設計できる。またその後約 50 日まで約 100ng/ml 以上の徐放が行なわれる。またこのとき結合定数を同等と仮定して分子半径の小さい b FGF を入れてシミュレーションする。

$$\begin{aligned} \text{数式拡散定数} &= 1\text{E}\cdot 8 \times X^{1.8313} \quad (X=26.7) \\ &= 2.44 \times 10\text{E}\cdot 11 (\text{m}^2/\text{sec}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{透過係数} &= 2.44 \times 10\text{E}\cdot 11 / 0.1\text{E}\cdot 3 \\ &= 2.44 \times 10\text{E}\cdot 7 (\text{m}/\text{sec}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{透過時間(日)} &= 2.44 \times 10\text{E}\cdot 7 / 8.76\text{E}\cdot 3 \times 24 \times 60 \times 60 \\ &= 2.4 \end{aligned}$$

2.4 日後に徐放が開始され、その後 20 日程度まで 100ng/ml の徐放が確認される。bFGF、TN-C を比較したグラフを下に示す。(Fig4-3)予想通り、小さく分子半径の小さい bFGF が早期に徐放された。100ng/ml の徐放は 20 日程度であった。また TN-C に関しては 100ng/ml の徐放が 50 日と bFGF に比べて 2.5 倍もの値になった。以上のような様々な調節徐放材料としての設計が可能である。

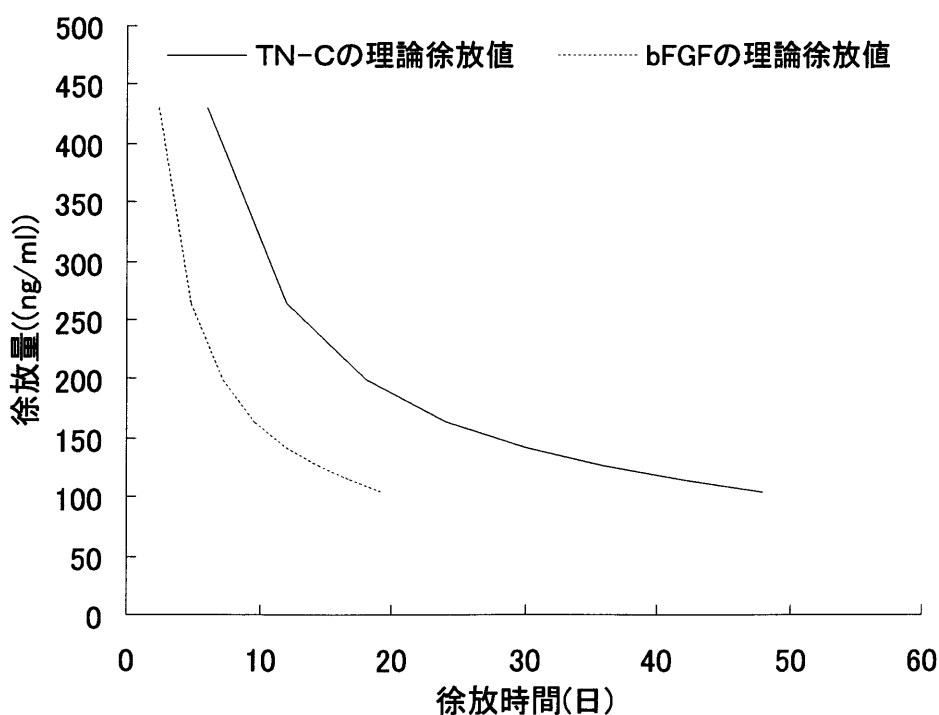


Fig4-3 bFGF TN-C の理論徐放比較

これまでの式やグラフの式をまとめると、Y 軸の徐放量に関しては条件設定で仕込み初期濃度と GS の量を変化させることで、設定が可能である。また X 軸の徐放時間はジェランゲルにより決定されている。ゲル濃度、厚みを変化させることにより設定が可能である。これらのグラフを算出した式は次の形である。(Fig4-4)

X 軸の徐放間隔を決定する式

$$I=L \times d/D$$

I: 徐放間隔 L: 透過するゲルの厚み D: 拡散定数

d: 拡散測定時のゲルの厚み

一回の徐放量計算

$$X' = \frac{-f + \sqrt{f^2 + 4KA \times X}}{2KA}$$

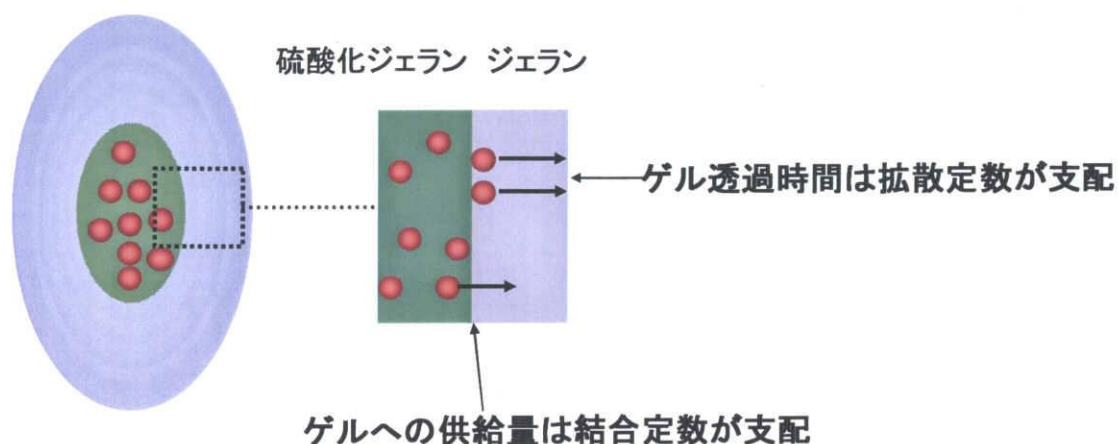
X': 一回の徐放量

KA: 結合定数

X: 初期濃度

f: $GS_0 - X^2$

※一回の徐放終了した後に、二回目の徐放量分がゲル中に放たれると仮定する。



⇒ 拡散定数、結合定数で徐放挙動予測が可能となる

Fig4-4 徐放制御材料の理論解析

5 章結論

- ・ ジェランはゲルの網目構造を変化させることで、物質の透過を制御することが可能である。
- ・ 硫酸化ジェランは bFGF、TN-C にアフィニティーを持つことが確認された。
- ・ ジェランの拡散定数、硫酸化ジェランの結合定数を用いることで徐放量、徐放期間をあらかじめ設定した材料設計が可能となる。

6 章参考文献

1. 長尾 達郎:組織癒着防止素材の基礎検討;三重大学分子素材工学科卒業論文(2005)
2. 篠田 昌俊:再生医療のためのサイトカイン徐放制御材料の開発に関する研究;三重大学分子素材工学科卒業論文(2005)
3. 伊藤 貴則:腎臓病を対象とした血液浄化材料の調整;三重大学大学院分子素材工学専攻修士論文(2004)
4. 塩谷 信幸 他:創傷治癒の原理/ライフサイエンス(1998)
5. 波利井 清紀:創傷の治療最新の進歩/克誠堂出版(2005)
6. 上出 利光:生体機能分子データブック/中外医学社(2001)
7. 筏 義人:生体材料学/産業図書(1994)
8. 坂倉 照好:細胞外マトリックス/羊土社(1995)
9. 坂倉 照好:細胞外接着のしくみと疾患/羊土社(1998)
10. 宮園 浩平:細胞増殖因子のバイオロジー/羊土社(1992)
11. 山本一彦:自己免疫のメカニズム/羊土社(1997)
12. 平野 俊夫:サイトカインを疾患/羊土社(1993)
13. 水上 茂樹 他:白血球と生体防御/講談社サイエンティフィク(1990)
14. 大津 隆行 他:高分子合成の実験法/化学同人(1973)
15. 長田 義仁 他:機能性高分子ゲルの開発技術/CMC 出版(1995)
16. 宮本 武明 他:天然、生体高分子材料の新展開/CMC 出版(1998)
17. Doris F, et al: A Single Heparin Binding Region within the Fibrinogen-like Domain Is Functional in Chick Tenascin-C. J Bio Chem, 1995;17:3378-3384
18. Tenascin-C in development and disease:generegulation and function. Matrix Bio 2000;19:581-596
19. The fibrinogen Globe of Tenascin-C Promotes Basic Fibroblast Growth Factor-induced Endothelial Cell Elongation. Mol Bio of Cell,1999;10:2933-2943
20. Tenascin-C Regulates Recruitment of Myofibroblasts during Tissue Repair after Myocardial Injury. American J Pathol, 2005;167:No.1
21. Masayuki T, et al: Time-lag Method and Transport Properties of Gel. Jpn.J.Appl.Phys, 1995; 5:2418
22. Matias P, et al: Controlled Drug Release Gels using Surfactant Aggregates; American Pharmaceutical Association. J Pharm sci, 2001;90:1216-1225

23. <http://www.ladys-home.ne.jp/faqsite/ans-files/FAQ-A/FAQ-A8.html>
24. <http://www.m.ehime-u.ac.jp/me2004dogo/ronbun/10108.pdf>
25. <http://fiblast.jp/meca.htm>

7 章 謝辞

本研究を行うにあたってご指導いただきました堀内孝教授、宮本啓一助教授、諸先輩方に心より感謝いたします。また研究以外の事務手続きや研究室での生活を陰で支えてくださった村上さん、奥田さんに感謝申し上げます。堀内教授は教授という立場でありながら、私たちのことを考えて常に真摯に接してくださりました。学会の打ち上げ、研究室の飲み会では社会人として、また大学生をしてためになる話をたくさんしてくださり、私にとっての大きな財産をなっております。また研究の面では特に宮本助教授にお世話になりました。質問や相談に行ったときは時間を惜しまず、丁寧に最後までご指導くださいました。先生の熱心なご指導があればこそ、3年間の研究をやり遂げることができたのだと思います。最後にこの大学生活、挫けそうになったとき支えてくれた同期の仲間、後輩達、貴重な3年間を本当にありがとうございました。

8 章 付録

1-1 ドラッグ・デリバリー・システム(Drug Delivery System)

薬物送達システムと訳され、頭文字から DDS(以下 DDS と略す)と呼ばれている。病気の治療において、必要なときに必要なだけの量の薬物を病巣に届けることが最も理想的である。従来の技術では、飲み薬などで体内の目的の場所に到達するまでに成分が変化してしまうことや、量が減少してしまうという問題点があった。そのため、胃酸で分解されずに腸まで届くカプセルや、血液中から特定の細胞にのみ薬剤を送るものから、磁場や超音波を利用して薬物の送達を外部からコントロールする方法などが発明された。この方法の最大のメリットはピンポイントで投薬することができることである。これにより薬剤の投与量を最低限に押さえ、利用効果を高め副作用の軽減が可能となった。

また DDS には大きく分けて以下の三つの技術がある。

1. 薬剤放出技術
2. 薬剤標的技術
3. 薬剤吸収制御技術

「薬剤放出技術」は必要なときに必要な量の薬剤を放出する技術。

「薬剤標的技術」は薬物を標的の病巣に送り届ける技術。

「薬剤吸収制御技術」は薬物の吸収率を高めて体内に効率よく吸収させる技術。

2-1 細胞接着実験

実験準備

試薬

- ・ DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM NUTRIENT MIXTURE F-12 HAM (SIGMA/Lot 74K2321)
- ・ Medium 199 (SIGMA/M2154/Lot No.22K2347)
- ・ PBS (SIGMA/D8537/Lot No.100K2311)
- ・ TRYPSIN-EDTA SOLUTION (10x) (SIGMA/T4174/Lot

No.63K2394)

- ・ FBS

器具

- ・ 75cm² 培養フラスコ ※ (住友ベークライト株式会社 /Cat.No.MS-21250)
- ・ 15ml 遠心管 ※ (住友ベークライト株式会社 /Cat.No.MS-56150)
- ・ 50ml 遠心管 ※ (住友ベークライト株式会社 /Cat.No.MS-56500)
- ・ 10ml ピペット ※ 住友ベークライト株式会社 /Cat.No.MS-66100)
- ・ セルススクレーパー ※ (住友ベークライト株式会社 /Cat.No.MS-93170)
- ・ パスツールピペット
- ・ ピペッター
- ・ チップ各種
- ・ エルマ血球計算盤
- ・ タイマー
- ・ CO₂ インキュベーター
- ・ KUBOTA2010 ※ (株式会社保田製作所 /RD3132)
- ・ ウォーターバス
- ・ Vortex
- ・ 吸引ポンプ

ゲルへの細胞播種

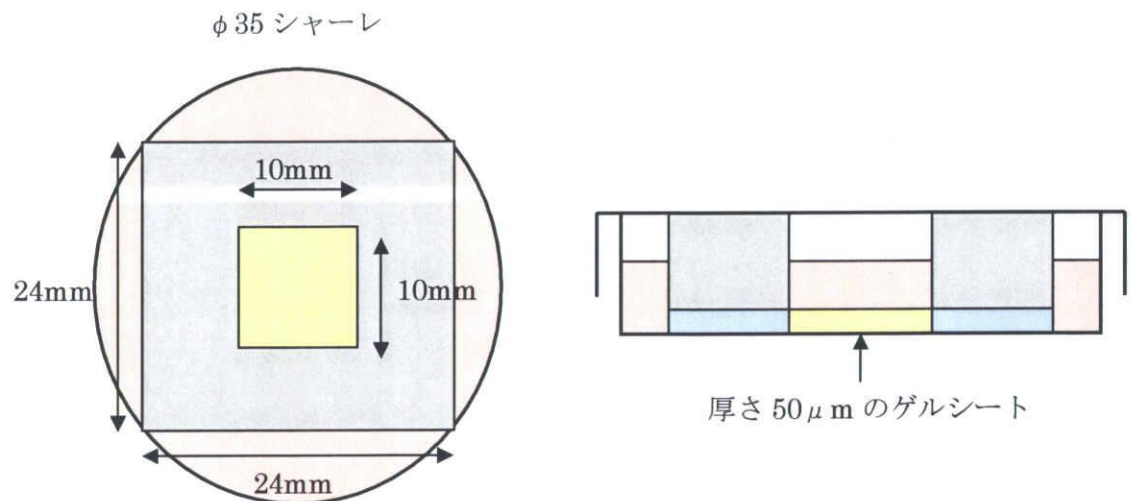
I ゲルシート高圧蒸気滅菌

1. 作成した Gellan ゲルシートをエタノール中で 24h 滅菌を行う。
2. 1 のゲルシートを F-12 培地にて 3 時間置換する。(30 分おきに培地交換)
5. 厚さ 1mm シリコンゴムシートを外側縦、横 24mm、内側縦、横 10mm に切り出し、これを 121℃、20 分高圧蒸気滅菌を行う。
6. φ35 シャーレにゲルシートを浸し、その上からシリコンチャンバーにて固定し、F-12 培地を 2ml 加え、37℃5%CO₂ でプレインキュベートする。

細胞播種

1. 継代作業で作成した細胞懸濁液を I で用意したシャーレに約 2.0×10^5 個/ml を $50 \mu\text{l}$ 播種する。

Fig6-1



観察・解析

I 位相差顕微鏡－XCAP 撮影

1. 5%CO₂ 培養装置（OLYMPUS MI-IBC）で培養しながら、光学顕微鏡（OLYMPUS IMT-2）でパソコンの XCAP ソフトに画像を取り込み、撮影枚数や撮影インターバルを設定し、撮影を開始する。
2. 撮影した画像を Adobe Photoshop にて動画処理し、解析する。
 - ※ 5%CO₂ 培養装置は TOP HEATER を 40℃、STAGE HEATER を 37℃とする。（目安として、AIR 200ml/min、CO₂ 10ml/min）
 - ※ 光学顕微鏡は位相差で対物レンズ 4 倍、接眼レンズ 10 倍を使用。光源フィルターを熱遮断フィルターのみ使用する。

II XCAP 使用方法

- 1.XCAP を開く→メニューバー「PIXCI」→「Open/Close」→「Multiple

Devices」

2. ここで、使用する顕微鏡数を決める。2 台同時使用するなら「Use Common Format & Controls W. Cameras Synchronized」を、1 台ずつ別々に使用するなら「Use Individual Format & Control」を選び、「OK」→「OPEN」
3. 左の絵文字メニューから、右側上から 3 個目のボタンで画像をパソコン画面に映し出し、顕微鏡で撮影場所、画像の明るさの調整を行う。撮影可能なら使用する顕微鏡の Unit 番号のメニューバー「Capture」→「Sequence Capture」→「Video to Image file」
4. 「File」から Browse で画像データ取り込み名を決める。画像取り込み形式は TIFF、JPEG、BMP から選択する。
□データ取り込み先は「XCAP データ」ファイル以外はできない。
5. 「Capture」から Image to Save で撮影枚数を、Time Interval で撮影インターバルを決定し、「Snap Video at Time Interval」、「Linear Sequence」、「Event Free」がチェックされていることを確認する。
6. 「Record」で撮影開始。

Ⅲ 撮影した画像を Adobe Photoshop で動画にする方法

Quick time を用いた動画処理

1. スタートメニューからプログラムを選び Adobe を選択し、Photoshop7.0 を起動させる。
2. 動画にしたいファイルを開く（撮影動画）。
3. 撮影直後の画像を開き、イメージの“モード”を選択し、“グレースケール カラー情報を破棄する”を OK する。この画像は背景となり、2 枚目の画像からは開き、選択範囲の“すべてを選択”（Ctrl+A）を選択する。
4. 編集の“コピー”（Ctrl+C）を選択する。
5. コピーした画像を閉じる。
6. 背景の画像を選び、編集の“ペースト”（Ctrl+V）を選択する。
7. ③～⑥の作業を最後の画像まで繰り返す。
8. イメージの“画像解像度”を選択しドキュメントの大きさを最適な数値に変換する。
9. イメージのモードを選択し、“RGB カラー 統合しない”にする。
10. ファイルからアプリケーション起動を選択し、Adobe Image Ready7.0 を起動させる。
11. レイヤーに付いている目のマークを背景だけ残し全て消す。（背景の目のマーク上で右クリック）

12. フレーム画面の三角マークを開き、“レイヤーからフレームを作成”を選択する。
13. ファイルの“元画像を他のファイル形式で書き出し”を選択し、最適なファイル形式を選択する。
14. 保存形式を **Quick time** にし、名前を付けて保存する。
 - * **gif** アニメーションを用いた動画処理なら、⑭のファイルを“最適化ファイル”を別名で保存”に選択し、ファイルの種類を「画像のみ (*gif)」にする。

IV 画像解析

今回、細胞を観察するのに用いたのは位相差顕微鏡である。位相差顕微鏡とは無色透明であるが屈折率がわずかにちがう2種類の物体、あるいは屈折率はひとしいが厚さの異なる2種類の物体を光が通るときに生じる、直接光と回折光の波の位相のずれ（位相差）を対物レンズの後焦点面においた位相板によって映像面で明暗の差にかえて、両物体を識別する顕微鏡をいう。

細胞が接着を行う過程において、まず最初に細胞は球状の形をしている。そしてまず第1の変化としてまず接着斑の発生である。細胞がマトリックスに対して偽足を出しインテグリンがマトリックスに接着します。するとインテグリンが集合して接着斑が形成されます。第2の変化として伸展である。細胞とマトリックスが面した部分のインテグリンがほぼ全部接着すると面した細胞膜全体（中心部）に接着斑が形成され、位相差顕微鏡において屈折率が変わることによって色の変化（黒色変化）が確認できる。

2-2 MTT 法

MTT 法を用いた腹膜中皮細胞の細胞活性（**viability**）の評価

MTT 法の原理

MTT 法とは、細胞の活性を測定する簡便な方法のひとつである。

MTT[3-(4,5-dimethylthiazo-2,5-diphenyltetrazoliumbromide); $C_{18}H_{16}N_5SBr$ （分子量 414.3）]等のテトラゾリウム塩はミトコンドリアの酸化リン酸化反応である TCA 回路の脱水素酵素（コハク酸脱水素酵素）の良い基質なる。ミトコンドリアは、真核細胞の細胞質中に見られる小器官であり、酸化的リン酸化反応によるエネルギー産出の場として重要な役割を担っている。活発に活動・増殖する細胞でエネルギー産出量が多く、細胞が破壊・阻害されると極端にミトコンドリアの機能が低下してエネルギー

産出を抑制することが知られている。細胞が活発であれば細胞がより多く分裂するために酵素活性が高く、MTT を多く分解する。このことは、代謝が活発な生細胞の定量に特に有用であり、テトラゾリウム塩を細胞で処理することによって、その細胞の活性 (viability) が測れる。特に、MTT は分解されると青紫色のホルマザンに変化するので、吸光度を測定すれば生存細胞数や細胞への毒性傷害効果を定量することができる。

実際に、本法を用いて細胞の被験物質感受性を調べたり、抗菌剤の光毒性試験や各種ヒト腫瘍細胞抗癌剤のスクリーニングテストを行ったり、リンパ球の細胞障害活性を定量測定する目的に利用される。

本研究においては、細胞数はほぼ一定の条件であるので、MTT 法によって得られた値は、細胞活性を示すものとした。

MTT 試薬の保存方法と使用上の注意

Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche) は購入後 -20°C の冷蔵庫にて保存する。

2 液の主な成分であるイソプロパノールは生成したホルマザンを溶解するために用いるが、ウェルに多くの培養成分 (特に血清) が残っていると、不溶性の沈殿物が生じ、反応性生物による正確な吸光度が得られないことがある。

試薬

- ・ Cell Proliferation Kit I (MTT) (Cat. No. 1 465 007/Roche)
 - 1 液 (MTT labeling reagent)
 - 2 液 (Solubilization buffer)

使用装置・器具・

- ・ CO_2 インキュベーター (池本理化工業株式会社)
- ・ 浸透機 (MICROTUBE MIXER) (TAITEC)
- ・ Microplate Reader Model 550 (BIO-RAD)
- ・ 96 穴プレート (Cat. No. MS-8096F/SUMILON)
- ・ オートクレーブ滅菌済みクリーンベンチ内器具
- ・ 各種ピペットおよびチップ
- ・ パスツール
- ・ 吸引ポンプ

エルマ血球計算盤 (Erma)

2-3 タイムラグ法

実験準備

試薬

プローブについて

1. グルコース

試薬は和光純薬製のD(+)-グルコース($M_w=180.16$)を用いた。プローブ溶液はD(+)-グルコース 3.6g に脱イオン水または 150mM ナトリウム溶液を加えて 20ml にすることで調整した(1M)。溶出側のプローブ濃度の検出には示差屈折計を用いた。

2. ビタミン B₁₂

試薬は和光純薬製のビタミン B₁₂($M_w=1355.38$)を用いた。プローブ溶液はビタミン B₁₂0.06g に脱イオン水または 150mM ナトリウム溶液を加えて 20ml にすることで調整した(4.43mM)。溶出側のプローブ濃度の検出には示差屈折計、紫外線吸収測定装置を用いた。

3. リゾチーム

試薬はナカライテスク社製のリゾチーム($M_w=14100$)を用いた。プローブ溶液はリゾチーム 0.02g に脱イオン水または 150mM ナトリウム溶液を加えて 10ml にすることで調整した(0.14mM)。溶出側のプローブ濃度の検出には示差屈折計、紫外線吸収測定装置を用いた。

4. トリプシンインヒビター

試薬は SIGMA 社製のトリプシンインヒビター ($M_w=21000$)を用いた。プローブ溶液は、トリプシンインヒビター $0.02g$ に脱イオン水または $150mM$ ナトリウム溶液を加えて $10ml$ にすることで調整した($0.09mM$)。溶出側のプローブ濃度の検出には示差屈折計、紫外線吸収測定装置を用いた。

5. オボアルブミン

試薬は CALBIOCHEM 社製のオボアルブミン ($M_w=45000$)を用いた。プローブ溶液は、オボアルブミン $0.05g$ に脱イオン水または $150mM$ ナトリウム溶液を加えて $10ml$ にすることで調整した($0.11mM$)。溶出側のプローブ濃度の検出には示差屈折計、紫外線吸収測定装置を用いた。

6. 牛血清アルブミン(BSA)

試薬は SIGMA 社製の牛血清アルブミン(BSA)($M_w=69000$)を用いた。プローブ溶液は、牛血清アルブミン(BSA) $0.6g$ に $150mM$ ナトリウム溶液を加えて $10ml$ にすることで調整した($0.910mM$)。プローブ側の検出には紫外線吸収測定装置を用いた。

装置・器具

| | |
|-------------------------|--------------------------|
| 示差屈折率計(RI-72) | ※昭和電工社製 |
| 紫外線吸収測定装置(Monitor UV-1) | ※Pharmaca 社製 |
| 記録計(3645 電圧ロガー) | ※日置電機株式会社 |
| (3912 コミュニケーションベース) | ※日置電機株式会社 |
| ペリスタポンプ(P-1) | ※Pharmanica 社製 |
| 透過実験装置 | ※MITSUBISHI |
| | (Fig4-1,4-2,4-3,4-4 に参照) |

示差屈折率計

示差屈折率計は高速液体クロマトグラフィーでよく用いられる検出器である。まず検出セルの参照側に溶液を含まない溶媒を固定し、試料側も移動溶

媒のみの時に、レンズ、プリズムなどを利用して二個の検出素子に当たる光量の僅かな差を検出利用するようになっている。ここで得られた屈折率の値と検量線から試料の濃度を求めることができる。この検出器紫外線吸収検出器に比べてかなり感度は劣るが、全ての有機化合物に対して利用することができる上で有用な検出器である。

紫外線吸収検出器

紫外線吸収検出器は、分子の電子状態の変化に起因する吸収を測定することにより、定性的知見を得ることおよび定量的扱いを行うことを目的とし分析器である。吸光度 A と濃度 c の関係には **Lanbert-beer** の法則として次式で表されることがよく知られている。

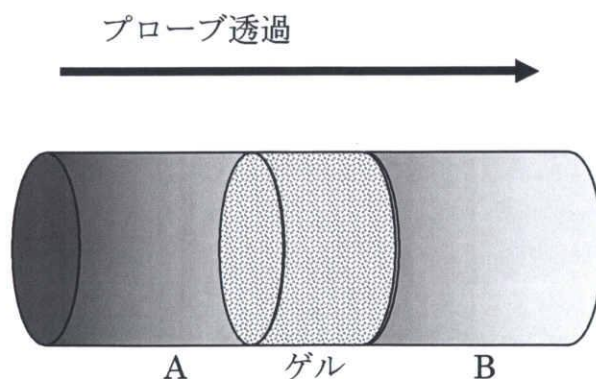
$$A=abc$$

ここで a は吸光度係数、 b は液層の長さである。この関係を用いることにより溶液濃度を求めることができる。ただし、全ての化合物に対して吸収を示すわけでなく、紫外部に発色団を持たない化合物に対しては全く適応不能である。蛋白質では芳香族鎖を持つアミノ酸：トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンが **280nm** に吸収を持つため測定可能である。

4-2-3. 測定原理

タイムラグ法

異なる濃度を有する二つの溶液が膜を隔てて存在する時、その濃度差が駆動力となって、低濃度側へプローブの移動が起こる。



この時膜は二つの溶液がすばやく混ざるのを防止する効果を示す。このような膜を介したプローブの透過機構の挙動は以下のように考えられている。まず膜の上流側(高濃度側)表面へのプローブの吸着・吸収が起こる。高分子膜では、膜表面へのプローブの吸着と吸着したプローブが膜内部へ入り込む吸収とを厳密に区別することはできない為、この二つの過程をひとまとめにして吸着と呼ぶ。また、量的に吸収の方が大きいので溶解ともいわれる。この溶解に引き続いてプローブは膜中を移動して、もう一方の下流側(低濃度側)表面へと向かう。この移動すなわち拡散を引き起こすものは、膜両表面間のプローブ濃度の勾配である。そして、下流側の膜表面に到達したプローブは膜表面から脱着して溶媒中に出ていく。このように容器の上流側の区分にあった低分子が、膜を通過して下流側の区分へと移動する過程を透過という。透過とは溶解と拡散を含む過程であるとする上記の考えは一般に溶解－拡散説と呼ばれている。ゲルを介したプローブ透過挙動もその三次元網目構造から高分子膜と同様であると考えられる。

プローブ透過挙動を定量的に扱う時に必要な式は、その移動がゲルの厚さ方向にのみ一次的に起こっていると仮定し、次の Fick の拡散方程式を適当な初期及び境界条件の下に解いて求められる。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad [2-1]$$

ここで C はプローブの濃度、 D は拡散定数である。まず境界条件として、空間的に一様な濃度分布を持つ二つの溶液が異なる濃度 ($C_A, C_B : C_A > C_B$) を有し、厚さ d のゲルにより隔てられているとする。また初期条件として、ゲルの内部にあらかじめプローブが一様な濃度分布 C_0 で存在しているとする。このような条件下では、ある時間経過の後、ゲル中に直線的な濃度勾配が確立される。このような境界条件および初期条件の下に拡散方程式を解くと次のようになる。

$$Q(t) = D \cdot (C_A - C_B) \cdot \frac{t}{d} + \frac{2d}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{C_A \cos n\pi - C_B}{n^2} \cdot \left\{ 1 - \exp\left(\frac{-Dn^2\pi^2 t}{d^2}\right) \right\} + \frac{4C_0 d}{\pi^2} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{(2m+1)^2} \cdot \left\{ 1 - \exp\left(\frac{-D(2m+1)^2 \pi^2 t}{d^2}\right) \right\} \quad [2-2]$$

ここで $Q(t)$ は時間 t の間に低濃度側へ移動したプローブの総量である。ここで

実際に興味がある初期条件は容器 B とゲル内のプローブ濃度がゼロ ($C_B = C_0 = 0$) の場合である。この条件下で[2-2]式は次のようになる。

$$Q(t) = d \cdot C_A \left[\frac{Dt}{d^2} + \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \left\{ 1 - \exp\left(\frac{-Dn^2\pi^2 t}{d^2}\right) \right\} \right] \quad [2-3]$$

ここで次の近似式を用いる。

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} = -\frac{\pi^2}{12} \quad [2-4]$$

この近似式により[2-3]式は次のようになる。

$$Q(t) = d \cdot C_A \left[\left(\frac{Dt}{d^2} - \frac{1}{6} \right) - \left\{ \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(\frac{-Dn^2\pi^2 t}{d^2}\right) \right\} \right] \quad [2-5]$$

実験において容器 B 側に移動したプローブの総量は濃度として検出する。またマトリクスがゲルであることから、その網目と相互作用によるプローブ透過障害の影響を表す無次元パラメーター $p(\xi)$ を導入し、[2-5]式を次のように書き換える。

$$C_B(t) = q \cdot P(\xi) \cdot d \cdot C_A \cdot \left[\left(\frac{Dt}{d^2} - \frac{1}{6} \right) - \left\{ \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(\frac{-Dn^2\pi^2 t}{d^2}\right) \right\} \right] \quad [2-6]$$

ここで $C_B(t)$ 、 $q = S_E/V$ は時刻 t における容器 B の濃度ならびに装置定数である。また S_E はゲルの有効断面積、 V は容器 B 側の溶液の体積である。十分時間が経過した後に確立される定常状態においては、[2-6]式の第二項は 0 に収束すると考えられることから次のような近似式になる。

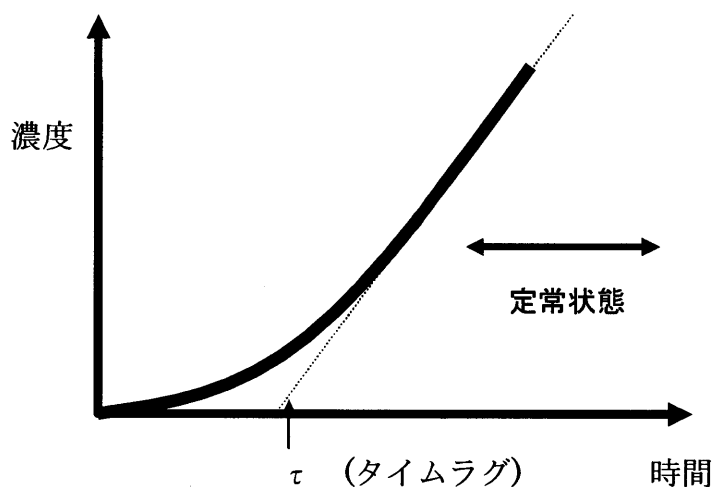
$$C_B(t) \cong q \cdot P(\xi) \cdot C_A \cdot \frac{D}{d} \left(t - \frac{d^2}{6D} \right) \\ = q \cdot \Pi(\xi) \cdot C_A (t - \tau) \quad [2-7]$$

$$\tau = \frac{d^2}{6D} \quad [2-8]$$

$$\Pi(\xi) = P(\xi) \cdot \frac{D}{d} \quad [2-9]$$

ここで $\Pi(\xi)$ は膜透過率である。[2-7]式から定常状態における $C_B(t)$ は直線的濃度勾配を示すことが明らかであり、その $C_B(t) = 0$ への外挿値がタイムラグ

τ である。



従って、ここで得られた τ から拡散定数 D を求めることができるわけである。

4-3. 操作手順

4-3-1. 示差屈折率計による測定

グルコース、ビタミン B_{12} 、リゾチーム、トリプシンインヒビターをプローブで用いる検出では、その検出器として示差屈折率計を用いた。その手順を以下に示す。

操作手順

1. 示差屈折率計を、RANGE...4、POLARITY...+、RESPONSE...FAST、OFFSET...OFF にそれぞれ設定する。
2. 検出側にポンプを用いて溶媒(脱イオン水、塩化ナトリウム溶液)を流したためておく。
3. ゲルホルダーにゲルをセットする。
4. ゲルホルダーを容器に固定する。
5. シリンジを用いて容器の中に溶媒(脱イオン水、塩化ナトリウム溶液)を注入する。

6. 容器と示差屈折率計をシリコンチューブをつなぐ。
7. ポンプで循環させて示差屈折率計につないだ検量計の値を安定させ、ゼロ点補正を行う。
8. プローブ溶液を容器 a に注入する。
9. 記録計を起動させて電圧値の変化を記録する。
10. 9で得られたプローブ透過曲線で、定常状態が見られたら測定を終了する。
11. 測定終了後ゲルホルダーからゲルを取り出し、ゲルの厚さをマイクロメーターを用いて測定する。
12. 検量線より電圧値と濃度の換算を行う。(検量線はあらかじめ濃度が分かっているプローブ溶液を検出器に流し電圧値を測定して作成する)

4-3-2.紫外線吸収測定装置による測定

ビタミン B₁₂、リゾチーム、トリプシンインヒビター、オボアルブミン、アルブミンをプローブとして用いた測定では、紫外線吸収測定装置を用いる。測定波長は全て 280nm で行った。その操作手順を以下に示す。

操作手順

1. 紫外線吸収測定装置を、RANGE…2、mode…AU にそれぞれ設定する。
2. 検出側にポンプを用いて溶媒(脱イオン水、塩化ナトリウム溶液)を流し ためておく。
3. ゲルホルダーにゲルをセットする。
4. ゲルホルダーを容器0に固定する。
5. シリンジを用いて容器の中に溶媒(脱イオン水、塩化ナトリウム溶液)を注入する。
6. 容器と紫外線吸収測定装置をシリコンチューブをつなぐ。
7. ポンプで循環させて紫外線吸収測定装置につないだ検量計の値を安定させ、ゼロ点補正を行う。
8. プローブ溶液を容器 a に注入する。
9. 録計を起動させて電圧値の変化を記録する。

- 1 0. 9で得られたプローブ透過曲線で、定常状態が見られたら測定を終了する。
- 1 1. 測定終了後ゲルホルダーからゲルを取り出し、ゲルの厚さをマイクロメーターを用いて測定する。
- 1 2. 検量線より電圧値と濃度の換算を行う。(検量線はあらかじめ濃度が分かっているプローブ溶液を検出器に流し電圧値を測定して作成する)

3-1 bFGF の測定

実験準備

試薬・使用器具

ELISA キット

- ・ ピペットマン (1000,200,20 μ l サイズ)
- ・ ピペットマン用チップ
- ・ 8連ピペット
- ・ 8連ピペット用チップ
- ・ プラスチック遠心管
- ・ pH メーター
- ・ ELISA 用プレート
- ・ プレートコーティングシール
- ・ プレート振盪器
- ・ 恒温槽
- ・ ヒーター
- ・ マイクロチューブ(2ml)
- ・ シリンジ(10ml サイズ)
- ・ シリンジ用針
- ・ 5 μ フィルター

bFGF 濃度測定

4. 2ml アシストチューブに糸を各 1.5mg 入れる。
5. 37℃で 2h 攪拌する。
6. 上澄みを播種して測定へ。

次に移る前に上澄み溶液の希釈を行う。10~1000pg/ml のスタンダードに入るように計算して希釈しておく必要がある。

実験 2 の前にしておくこと

- ・ 測定サンプルの希釈倍率を計算し、希釈バッファーを用意しておく。(時間かかる)

上澄み濃度測定手順

16. プレートを常温において解凍する。
17. 100 μ l のスタンダード希釈溶液をブランクに入れる。
18. 100 μ l のスタンダード溶液を入れる。測定サンプルは 50 μ l を希釈溶液 50 μ l と加えて各ウェルに入れる。
19. プレートをカバーして 2h 常温でしんとう。
洗浄溶液の作成をしておく。
20. 洗浄溶液で 4 回洗浄する。
21. 100 μ l の biotinylated anti-FGF-b を入れる。ブランクには入れない。
22. プレートをカバーして 1h 常温でしんとう。
100X の溶液を Streptavidin-HRP 溶液に溶解させて準備をしておく。
23. 洗浄液で 4 回洗浄する。
24. 100 μ l の 100X 溶解 Streptavidin-HRP を入れる。(ブランクには入れない)
25. プレートをカバーして 30min 常温でしんとう。
暗室に発色溶液 (Stabilized Chromogen) を準備しておく。
26. 洗浄液で 4 回洗浄
27. 100 μ l の Stabilized Chromogen を各ウェルに入れる。(ここで青色に発色してくる)
28. 30min 常温、暗室でしておく。
29. 100 μ l の停止溶液を入れる。(ここで青から黄色に変化する)
30. ブランクには 100 μ l の Streptavidin-HRP と 100 μ l の停止溶液を入れておく。停止後 2h 以内に測定を済ませておく。

スタンダードの希釈

7ng に瓶に 0.7ml の希釈溶液を入れる。

| 濃度 | 用いる濃度 | 希釈溶液 | 次にまわす量 | あ |
|-----------|-------|------|--------|-----|
| まり | | | | |
| 1000pg/ml | 100 | | 900 | 300 |
| 700 | | | | |
| 500 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| 250 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| 125 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| 62.5 | 300 | | 300 | 300 |
| 300 | | | | |
| 31.2 | 300 | | 300 | 300 |
| 300 | | | | |
| 15.6 | 300 | | 300 | 300 |
| 300 | | | | |
| 0 | | | | |

初期濃度の希釈（単位は ng/ml）

原液 10000ng/ml チューブあたり 30 μ l

| | 30 | 2970 | 3000 | →100ng/ml | 3ml 完成 |
|-----|------|------|--------|-----------|--------|
| | 溶液 | 希釈液 | 次にまわす量 | あまり | |
| 100 | 90 | 8910 | 3547 | 5250 | |
| 44 | 3547 | 4500 | 5025 | 3000 | |
| 28 | 5025 | 2859 | 4780 | 3000 | |
| 21 | 4780 | 1580 | 3260 | 3000 | |
| 13 | 3260 | 2000 | 2250 | 3000 | |
| 10 | 2250 | 1350 | | 3600 | |

測定の際の希釈

| | | | |
|-------|-------|--------|---------------------|
| 100ng | →20 倍 | 5000pg | ※100ng の希釈は 40 倍とする |
| 44ng | →20 倍 | 2200pg | |
| 28ng | →20 倍 | 1400pg | |
| 21ng | →20 倍 | 1050pg | |
| 13ng | →20 倍 | 650pg | |

10ng 20倍希釈液。

各上澄み100μlを採取し、凍結保存する(凍結保存のため)

これの上澄み50μlを採取し、凍結保存する。

前日の準備

- ・ 糸を各二種類、15mgずつ採取し、凍結保存する。
- ・ 希釈実験用試薬の準備。
- ・ スタンダード溶液の希釈液の準備。

3-2 TN-C 測定

実験準備

試薬・使用品

試薬

一次抗体

二次抗体

- ・ ピペットマン (1000, 200, 100, 50, 10ml)
- ・ ピペットマン用チップ
- ・ 8連ピペット
- ・ 8連ピペット用チップ
- ・ プラスチック遠心管
- ・ pHメーター
- ・ ELISA用
- ・ プレートコーティング溶液
- ・ プレート振盪器
- ・ 恒温槽
- ・ ヒーター
- ・ マイクロチューブ (2ml)
- ・ シリンジ (10ml)
- ・ シリンジ用針
- ・ 5μファイナ

TN-C 濃度測定

1. 2ml のアシストチューブに溶液 500 μ l 入れる。GS 糸、糸を各 3mg 入れる。
4. 37℃で 4h 攪拌する。
5. 上澄みを播種して測定へ。

検体に希釈については、希釈緩衝溶液を用いる。(吸着実験からそのままが良い)

上澄み濃度測定

13. プレートを常温において解凍する。
14. 100 μ l のスタンダード希釈溶液をブランクに入れる。
15. 100 μ l のスタンダード溶液を入れる。測定サンプルは 50 μ l を希釈溶液 50 μ l と加えて各ウェルに入れる。
16. プートをカバーして 37℃、1 h 常温でしんとう。
洗浄溶液の作成をしておく。
17. 洗浄溶液で 7 回洗浄する。(入念に洗浄をする。一回あたり 15~30 秒静置)
18. 100 μ l の二次抗体を入れる。ブランクには入れない。
19. プートをカバーして 4℃で 30min しんとう。
発色溶液の準備をしておく。
20. 洗浄液で 9 回洗浄する。
21. 100 μ l の発色溶液を入れる。(ブランクには入れない)
22. プートをカバーして暗室で 30min 常温でしんとう。(ここで青色に発色してくる)
23. 100 μ l の停止溶液を入れる。(ここで青から黄色に変化する)
24. ブランクには 100 μ l の発色の溶液と停止溶液を入れておく。停止後 30min 以内に測定を済ませておく。

スタンダードの希釈

280 μ g/ml の希釈をする。

| 濃度 | 用いる濃度 | 希釈溶液 | 次にまわす量 | あまり |
|-------------|-------|------|--------|-----|
| 280000ng/ml | | | 35 | |
| 28000 | 35 | 315 | | 350 |
| | | | | |
| 28000 | | | 60 | |
| 2800 | 60 | | 540 | 300 |
| 300 | | | | |
| 1400 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| 700 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| 350 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| 175 | 300 | 300 | 300 | 540 |
| 87.5 | 300 | 300 | 300 | 300 |

初期濃度の希釈（単位は ng/ml）

原液 28000

| | 溶液 | 希釈液 | 次にまわす量 | あまり |
|------|------|------|--------|------|
| 1400 | 270 | 5130 | 3448 | 1800 |
| 754 | 3448 | 2966 | 4618 | 1800 |
| 516 | 4618 | 2124 | 4946 | 1800 |
| 392 | 4946 | 1533 | 4644 | 1800 |
| 316 | 4644 | 1116 | 3960 | 1800 |
| 265 | 3960 | 756 | 2916 | 1800 |
| 228 | 2916 | 468 | 1580 | 1800 |
| 200 | 1580 | 220 | | 1800 |

前日の準備

- ・ 糸を各三種類、3mg に切り分けておく。容器も用意して入れておく。
- ・ 希釈実験溶液の希釈バッファーを、用意した容器にあらかじめ入れておく。
- ・ スタンダード溶液の希釈するための容器と希釈バッファーを用意しておく。

3-3 ATⅢの測定

実験1 GS糸、ATⅢの吸着実験。

実験2 ELISA法による上澄み濃度の測定

実験1

1. 2ml アシストチューブに糸を各 3mg 入れる。
2. 37℃で 2h 攪拌する。
3. 上澄みを播種して測定へ。

実験2

1. プレート常温において解凍する。
2. 100 μ l のスタンダード希釈溶液をブランクに入れる。
3. 100 μ l のスタンダード溶液を入れる。測定サンプルは 100 μ l を各ウェルに入れる。
4. プレートをカバーして 1.5h 常温でしんとう。
5. 洗浄溶液の作成をしておく。
6. 洗浄溶液で 3 回洗浄する。
7. 100 μ l の二次抗体を各ウェルに入れる。
8. プレートをカバーして 60min 常温でしんとう。
9. 洗浄液で 3 回洗浄
10. 発色溶液を入れる。10~15min 常温でしておく。
11. 発色後、50 μ l の停止溶液を入れる。
12. 490nm で測定

スタンダードの希釈

| 濃度 | 用いる濃度 | 希釈溶液 | 次にまわす量 |
|----------|-------|------|--------|
| あまり | | | |
| 100ng/ml | | | |
| 50 | 300 | 300 | 300 |
| 300 | | | |
| 25 | 300 | 300 | 300 |
| 300 | | | |
| 12.5 | 300 | 300 | 300 |
| 300 | | | |
| 6.25 | 300 | 300 | 300 |
| 300 | | | |
| 3.12 | 300 | 300 | 300 |
| 300 | | | |

初期濃度の希釈（単位は ng/ml）

原液 5000ng/ml チューブあたり 500 μ l

| | 100 溶液 | 9900 希釈液 | →100ng/ml 次にまわす量 | 10ml 完成 あまり |
|-----|-----------|-------------|---------------------|----------------|
| 100 | | | | 3000 |
| 44 | 3547 | 4500 | 5025 | 3000 |
| 28 | 5025 | 2859 | 4780 | 3000 |
| 21 | 4780 | 1580 | 3260 | 3000 |
| 13 | 3260 | 2000 | 2250 | 3000 |
| 10 | 2250 | 1350 | | 3600 |