

平成 22 度 修士論文

椎間板軟骨再生用材料の開発

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

伊藤 寛之

## 目次

<b>1 緒言</b> .....	<b>4</b>
<b>1-1 椎間板ヘルニア</b> .....	<b>5</b>
1-1-1 椎間板軟骨...	5
1-1-2 椎間板ヘルニア...	6
1-1-3 現行の治療法と問題点...	6
<b>1-2 再生医療</b> .....	<b>7</b>
1-2-1 椎間板ヘルニア治療としての再生医療...	7
1-2-2 椎間板軟骨再生用材料...	7
1-2-2-1 インジェクタブルゲルの有用性...	7
1-2-2-2 薬物の段階的徐放...	8
<b>1-3 ジェランガム</b> .....	<b>9</b>
1-3-1 ネイティブ型ジェラン(NG)...	9
1-3-2 脱アシル型ジェラン(DG)...	10
1-3-3 硫酸化ネイティブジェラン(GS)...	11
1-3-3-1 GS とサイトカインのアフィニティー...	12
1-3-4 カルボキシメチルジェラン(CMG)...	13
<b>1-4 本研究の目的</b> .....	<b>14</b>
1-4-1 目的...	14
1-4-2 実験項目...	14
<b>2 実験方法</b> .....	<b>15</b>
<b>2-1 インジェクタブルゲル材料の作製</b> .....	<b>16</b>
2-1-1 CMG の作製方法...	16
2-1-2 NMR 測定...	17
<b>2-2 インジェクタブルゲルの作製と物性評価</b> .....	<b>18</b>
2-2-1 CMG ゲルの作製方法...	18
2-2-2 CMG-GS ゲルの作製方法...	19
2-2-3 ゲル化時間測定...	20
2-2-4 弾性率測定...	21
2-2-5 破断点測定...	22
2-2-6 細胞毒性評価...	23

2-3 薬物徐放担体としての評価	24
2-3-1 薬物モデル分子を用いた徐放実験	24
2-3-2 GS の徐放実験	26
2-3-3 GS とアフィニティーを持つサイトカインの徐放実験	27
2-3-4 分解実験	28
3 実験結果	29
3-1 NMR 測定	30
3-2 ゲル化時間測定	33
3-3 弾性率測定	35
3-4 破断点測定	38
3-5 細胞毒性評価	41
3-6 薬物モデル分子を用いた徐放実験	42
3-7 GS の徐放実験	45
3-8 GS とアフィニティーを持つサイトカインの徐放実験	47
3-9 分解実験	48
4 考察	50
4-1 椎間板軟骨代替物としての CMG ゲル	51
4-2 薬物徐放担体としての CMG ゲル	56
4-3 椎間板軟骨再生用材料	62
5 結論	64
参考文献	66
謝辞	68
付録	69

# **1 緒言**

## 1-1 椎間板ヘルニア

椎間板ヘルニアの患者数は少なくとも全国で 100 万人以上と言われている。椎間板ヘルニアは多くの腰痛の原因となっており、多くの人々を苦しめている。

### 1-1-1 椎間板軟骨

椎間板軟骨は半流動性の軟骨組織である髄核、コラーゲン繊維を含む線維軟骨からなる線維輪、硝子軟骨の軟骨終板から構成されており、髄核が線維輪及び、軟骨終板によって一定の内圧化に封入された構造をとる(1)。椎間板軟骨は脊柱の支持性、運動性、衝撃緩衝作用をつかさどっている。

椎間板は無血管領域であるため、損傷後の自己修復は極めて困難である。

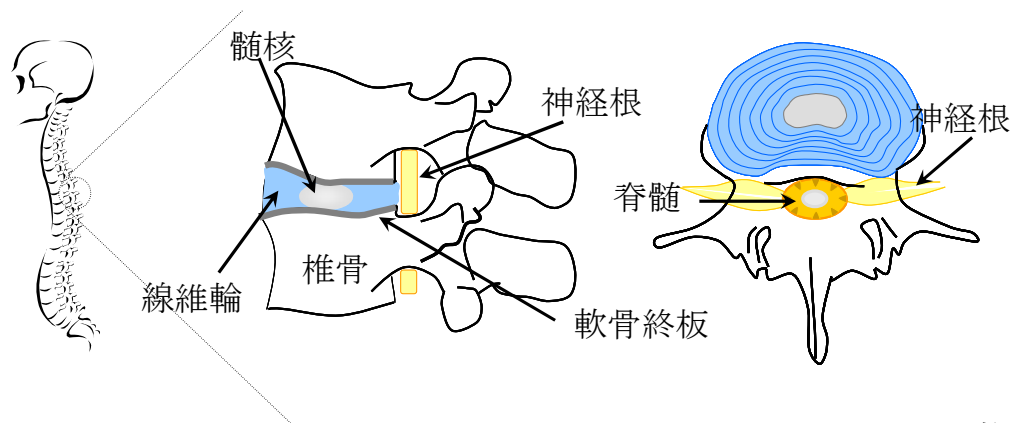


Fig1-1 脊椎と椎間板軟骨

	含水率	基質	弾性率
髄核	77%	プロテオグリカン、Ⅱ型コラーゲン	13kPa
繊維輪(内側)	70%	プロテオグリカン、Ⅱ型コラーゲン	200kPa
繊維輪(外側)		プロテオグリカン、Ⅰ型コラーゲン	13.3MPa

Fig1-2 椎間板軟骨の組成

### 1-1-2 椎間板ヘルニア

椎間板には体重や体幹筋力により常時圧力が加わっており、繊維輪がその圧に抗することができなくなり、破断すると髄核が突出する。この状態をヘルニアという。破断の原因は外因性のものとして強い外力、繰り返す軽微な外力があり、内因性のものとして椎間板の変性、すなわち繊維輪の脆弱化、髄核の水分減少がある。亜急性発症が多いが、重量物を持ち上げた時やくしゃみをした時に突然発症することや慢性的に発症することもある。ヘルニアにより神経が圧迫されると、下肢痛、しびれ、筋力低下、膀胱障害などの症状が出現する。

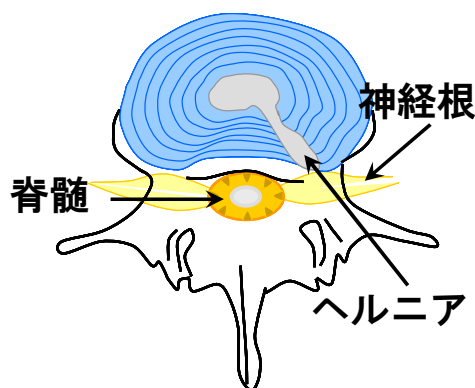


Fig1-3 椎間板ヘルニア

### 1-1-3 現行の治療法と問題点

現行の椎間板ヘルニア治療は保存療法と手術療法の大きく 2 つに分けられる。保存療法は局所麻酔やステロイド薬を注射し、痛みを和らげる神経根ブロック、けん引や針などの理学療法があり、ヘルニアが自然吸収するまでの対症療法と考えられる。ヘルニアの自然吸収メカニズムは明らかにされていないが、ヘルニア時に過剰産生された、コラゲナーゼなどの酵素、マクロファージの働きによるものだと考えられている。しかし、ヘルニアを縮小させる保存療法は今のところない。

一般的な手術療法は患部を背中側から切開し、ヘルニアを切除する後方椎間板切除術が行われている。ヘルニア切除に際して、椎間関節の切除が必要な場合などに、金属などで椎骨を固定する椎間固定術が併用される場合がある。最近は背中を切開せずに内視鏡などを用いてヘルニアを切除する、経皮的手術が行われており、入院期間の短縮や術後の疼痛の軽減に繋がるが長期成績は同等である。手術には身体的負担が伴い、手術を行っても再発する可能性がある。

現行の治療における問題点は、保存療法、手術療法ともに椎間板の損傷を治癒するものでない事である。

## 1-2 再生医療

現行の椎間板ヘルニア治療における問題点から、低侵襲性でヘルニアの進行及び、再発を抑制し、根本的な原因である損傷を修復する治療が必要である。

そこで再生医療が有効である。再生医療とは病気や創傷により機能低下に陥った組織を自己が有する再生能力を生かし、組織の機能を再生させる医療である。

### 1-2-1 椎間板ヘルニア治療としての再生医療

椎間板の再生医療へのアプローチは再建用材料を損傷部に注入し、薬物や増殖因子の徐放により、細胞が材料に生着し、組織の治癒・再生を促進することが有効であると考えられる。そこで、用いる材料が重要となる。

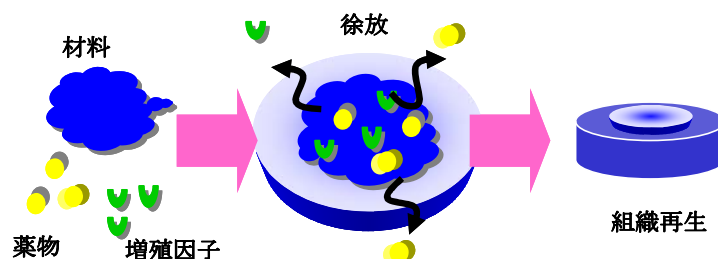


Fig1-4 椎間板再生モデル

### 1-2-2 椎間板軟骨再生用材料

椎間板の基質はプロテオグリカン、Ⅰ、Ⅱ型コラーゲンから構成され、高い含水性を有し、弾力のある組織である。そこで、椎間板再生用材料としてゲル材料が適当である。近年、椎間板の髄核代替としてゲル材料を用いた再建用材料の研究が報告されている(2、3)。しかし、それらはいずれも損傷した組織と置換する場合、切開する必要があり、患者には大きな身体的ダメージを伴うものである。そこで、低侵襲で損傷部にインジェクトでき、椎間板に加わる圧力に耐えられる強度、さらに潜在的細胞の増殖、分化、コラーゲンなどの基質産生を促す薬物や増殖因子の吸着、徐放能を有する材料が有望であると思われる。

#### 1-2-2-1 インジェクタブルゲルの有用性

損傷した椎間板に成形したゲル材料を導入する場合、切開しなければならない為、患者に大きな負担となる。そこで、ゾル材料を注射器などで目的部位に注入し、その場でゲル材料を形成させることで、傷口が小さく、治療時間も短縮され、患者の身体的負担を軽減することができる。また、組織を切除せず損傷の形にあった代替物を導入することができるため、組織の物理的機能の維持及び、組織再生能力の保持が期待できる。

### 1-2-2-2 薬物の段階的徐放

組織が障害されると、修復のための様々な反応が始まる。これらは止血、凝固のための時期、創内浄化が行われる炎症期、肉芽形成、血管新生、創収縮、上皮形成を主とした増殖期、コラーゲンやエラスチンなどの合成、増殖、再構築の成熟期に区分できる。これらの過程はそれぞれオーバーラップしながら進行していく (Fig1-5)。この過程において細胞は様々なサイトカイン、細胞外マトリックス、各種タンパクを放出し、創傷治癒を円滑に行う。

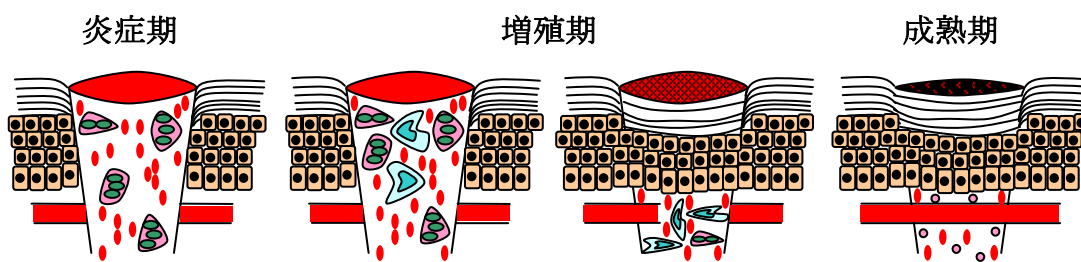


Fig1-5 創傷治癒過程

段階的な薬物徐放は、複数の徐放担体を融合させ、様々な徐放メカニズムを組み合わせることで、可能になると考えられる。例えば、Fig1-6 で示したように、初期の薬物徐放として手術中や術後の炎症を抑制する抗炎症剤を徐放し、その後、細胞の増殖、分化や基質産生を促す塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)、テネイシン-C(TN-C)などのサイトカインやアンピシリンなどの抗生物質による組織再生や治療のための徐放を行う(3,4)システムを考案した。これにより初期段階の治療薬物徐放を一度の投与で可能にし、複数回の投与や手術を必要とせず低侵襲性が期待できる。

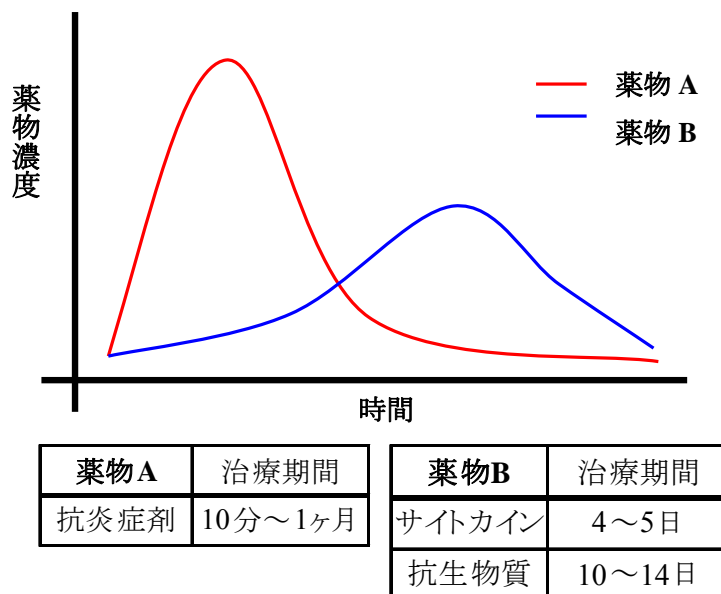


Fig1-6 2種類の薬物の段階的徐放



### 1-3 ジェランガム

本研究で椎間板再生用材料として注目したのがジェランガムである。ジェランガムは *Spingomonas elodea* という微生物が菌体外に産出する多糖類であり、増粘安定剤として各種食品に幅広く利用されている(5)。またジェランガムは湿潤性に富んだ抗血栓性材料であり、先の実験から優れた生体適合性も証明されており(6)、生体材料として様々な使用が可能であると考えられる。そしてジェランガムには性質の異なる4種類がある。

#### 1-3-1 ネイティブ型ジェラン(NG)

ネイティブ型ジェランは、1,3-β-D-グルコース、1,4-β-D-グルクロン酸、1,4-β-D-グルコース、1,4-α-L ラムノースの4糖の繰り返し単位からなり、平均分子量約1万の多糖類である。Fig1-7 中の青で示したのがアセチル基、赤で示したのがグリセリル基となり、この二つの置換基がゲルの形成に大きく関与している(5)。

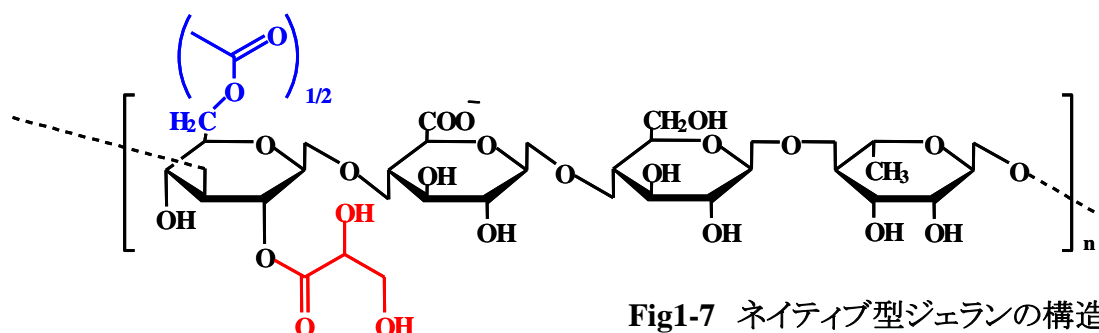


Fig1-7 ネイティブ型ジェランの構造

ネイティブ型ジェランのゲル化は、二重らせん構造を形成しその二重らせん同士が会合することでゲル化する。グリセリル基は二重らせん構造形成の際その相互作用を助け強固にする働きがあり、アセチル基は二重らせん同士の会合を阻害する働きがあるものと考えられている。グリセリル基が内側を向き、アセチル基が外側を向いてらせん構造を形成している。この二つの効果により白濁でモチ状の弾力、高い含水性を有するゲルを形成する(5)。

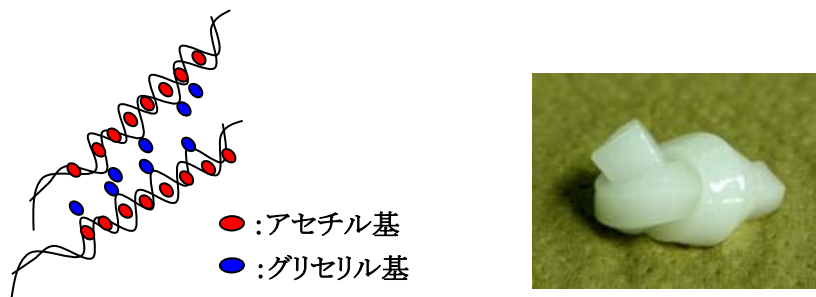


Fig1-8 ネイティブ型ジェランのゲル化機構とゲル

### 1-3-2 脱アシル型ジェラン

ネイティブ型からアセチル基とグリセリル基を除いたジェランを脱アシル型ジェランという。脱アシル型はカチオン類の存在とジェラン鎖同士の水素結合により透明な強固で脆いゲルを形成する。

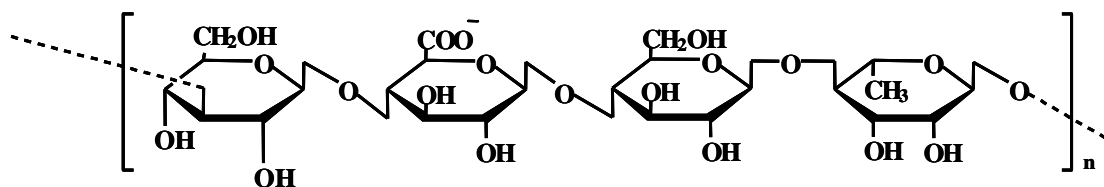


Fig1-9 脱アシル型ジェランの構造



Fig1-10 脱アシル型ジェランのゲル

### 1-3-3 硫酸化ネイティブジェラン(GS)

硫酸化ネイティブジェラン(GS)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。GSはジェランから誘導され、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(7)。GSはジェランのヒドロキシル基が硫酸化された構造を持つ(Fig1-11)。硫酸化の優先順位はD-Glcの6位がまず硫酸化され、続いてL-Rhaの2位が硫酸化された後、その他のヒドロキシル基が硫酸化されていく(8)。

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。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親和性が高いと考えられる(9,10,11)。先の研究より、創傷治癒に有用であるテネイシンCの吸着が確認されており、マウスへの埋入試験において動脈瘤閉塞の促進が確認されている(12)。以上より硫酸化ネイティブジェランはこれらの物質の徐放、吸着担体となることが期待できる。

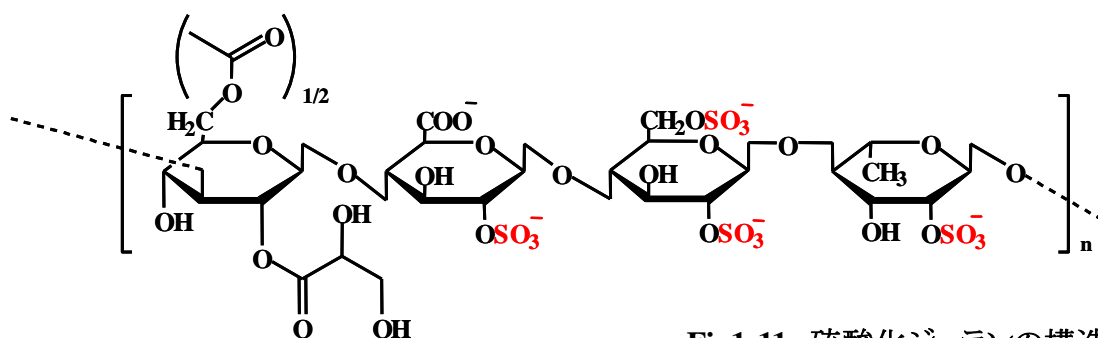


Fig1-11 硫酸化ジェランの構造

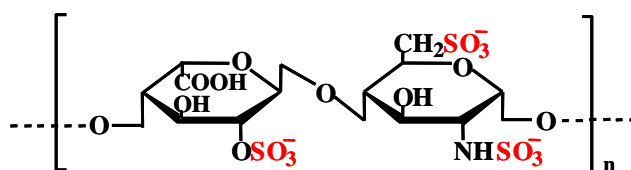


Fig1-12 ヘパリンの構造

$$\text{硫酸化率} = \frac{\text{硫酸基数}}{\text{総ヒドロキシル基数}} \times 100$$

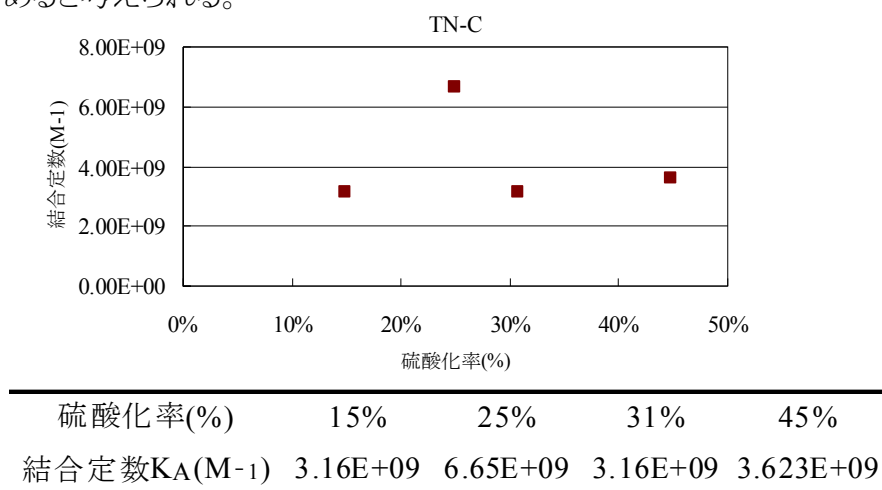
硫酸化率は総 OH 基数に対する硫酸基の割合を示す。

Fig1-13 GSの硫酸化率

### 1-3-3-1 GSとサイトカインのアフィニティー

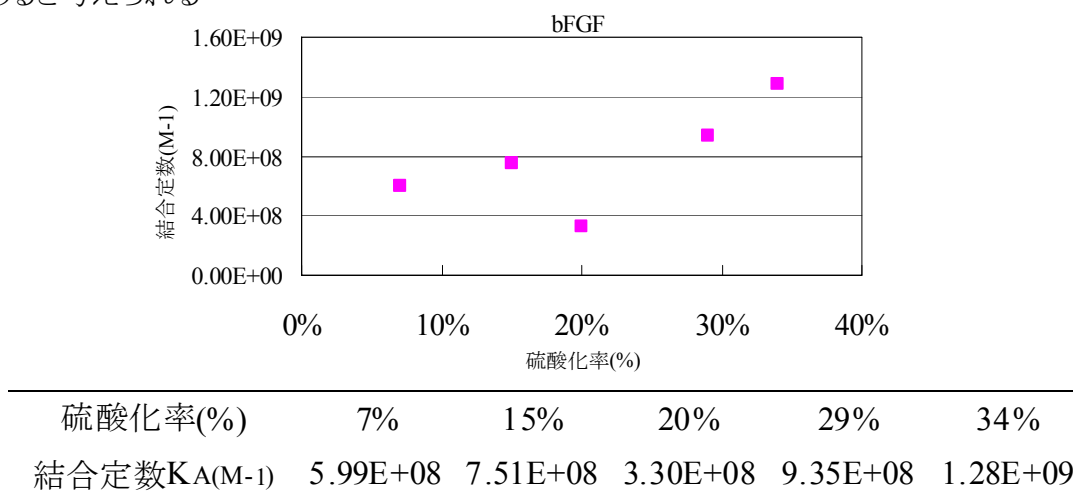
先の研究より、GSとTN-C、bFGFとの結合定数(KA)はGSを固定化したプレート96穴を用いた吸着実験によって算出されている。

・TN-C・・・創傷治癒の初期に細胞接着や増殖に関与する細胞外マトリックスで、ヘパリンとの結合部位を持つ。組織修復促進に有効な分子として薬物としての使用が有効であると考えられる。



**Fig1-15 異なる硫酸化率のGSとTN-Cの結合定数**

・b-FGF・・・組織修復の主役である線維芽細胞の増殖因子で、ヘパリンとの親和性が高い。TN-C同様、組織修復促進に有効な分子として薬物としての使用が有効であると考えられる



**Fig1-15 異なる硫酸化率のGSとbFGFの結合定数**

TN-C、bFGFともに、GSの硫酸化率に依存した結合定数を示しているわけではなく、GSとタンパクの立体構造が親和性に影響していると考えられる。

#### 1-3-4 カルボキシメチルジェラン(CMG)

カルボキシメチルジェラン(CMG)は脱アシル型ジェランを濃アルカリ中でクロロ酢酸と反応させることで、ヒドロキシル基をカルボキシメチル基に置換したものである。また、置換度は反応条件を変えることで、制御可能である(13)。

CMG のゲル化はネイティブ型ジェランとは異なり、温度に依存せず、化学架橋を用いることでゲルが形成される。カルボキシル基の影響でネイティブ型、脱アシル型と比較して、溶解性が向上した。これらの特性を持つカルボキシメチルジェランは、インジェクタブルゲル材料として有用であると考えられる。

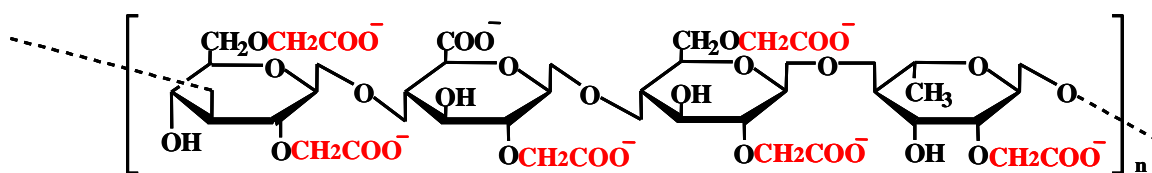


Fig1-16 カルボキシメチル化ジェランの構造

## 1-4 本研究の目的

### 1-4-1 目的

本研究は椎間板軟骨の代替及び再生を目的とした、複数の薬物の段階的徐放が可能で、高強度インジェクタブルゲル材料の開発を目的とする。

実験は以下の項目に分けて行った。

### 1-4-2 実験項目

#### 1. インジェクタブルゲル材料の作製

(内容)ジェランをインジェクタブルゲルとして用いるために、ジェランへのカルボキシメチル基の導入を行った。

- CMG の作製
- NMR 測定

#### 2. インジェクタブルゲルの作製と物性評価

(内容)作製したゲルが椎間板軟骨代替物として利用可能かを物理学的、生物学的に評価した。

- CMG ゲルの作製
- CMG-GS ゲルの作製
- ゲル化時間測定
- 弾性率測定
- 破断点測定
- 細胞毒性評価

#### 3. 薬物徐放担体としての評価

(内容)材料から薬物が段階的に徐放されるかを調査した。

- 薬物モデル分子を用いた徐放実験
- GS の徐放実験
- GS とアフィニティーを持つサイトカインの徐放実験
- 分解実験

## 2 実験方法

## 2-1 インジェクタブルゲル材料の作製

### 2-1-1 CMG の作製方法

飽和水酸化ナトリウム水溶液でジェランを膨潤させた、粘液系でクロロ酢酸ナトリウムと反応させることで、水との副反応を抑制でき高置換度のカルボキシメチルジェランが作製可能である。

#### 【試薬・器具】

- |                           |                             |
|---------------------------|-----------------------------|
| ・脱アシル型ジェラン (和光純薬)         | ・水酸化ナトリウム (和光純薬)            |
| ・モノクロロ酢酸ナトリウム (和光純薬)      | ・脱イオン水                      |
| ・乳鉢                       | ・マイヤー                       |
| ・スターラー                    | ・攪拌子                        |
| ・耐圧ビン                     | ・透析チューブ (三光純薬 分子量区画 14,000) |
| ・pH 試験紙                   | ・ガラスフィルター                   |
| ・エバポレーター(TOKYO RIKAKIKAI) | ・凍結乾燥機                      |
| ・薬さじ                      | ・薬包紙 (東京日本油紙)               |
| ・電子天秤 (SHIMADZU)          |                             |

#### 【手順】

- ①脱アシル型ジェランを乳鉢ですりつぶした。
- ②50%水酸化ナトリウム水溶液を調整した。
- ③すりつぶした脱アシル型ジェランに 50%水酸化ナトリウム水溶液を加え、室温で約 1 時間攪拌した。
- ④脱アシル型ジェランが完全に膨潤した後、氷浴に移し、モノクロロ酢酸ナトリウムを少しずつ添加し、均一になるまで攪拌した。
- ⑥添加後、室温で約 2 時間攪拌した。発熱した場合は氷浴で冷却した。
- ⑦攪拌終了後、適当な濃度に脱イオン水で希釈した。
- ⑧あらかじめ脱イオン水で洗浄しておいた透析チューブに溶液を移し、脱イオン水中で 3～4 日透析した。
- ⑨透析終了後、ガラスフィルターでろ過し、エバポレーターで 200～300ml 程度に濃縮し、凍結乾燥した。



### 2-1-2 NMR 測定

作製した CMG のカルボキシメチル基の置換度を求めるために  $^1\text{H}$  NMR 測定を行った。

#### 【試薬・器具】

CMG

D<sub>2</sub>O (CIL)

サンプル管

#### 【使用機器】

JNM-500 (JEOL )

Win Alpha(Ver 1.0) FT NMR データシステム( フ ) (JEOL )

#### 【手順】

- ①CMG40mg を D<sub>2</sub>O0.7ml に溶解させ、サンプル管に高さ 4.2cm まで入れた。
- ②下記の測定条件で測定を行った。

#### 【測定条件】

室温

実験モード:SINGL

照射モード:NON

SCANS:32

## 2-2 インジェクタブルゲルの作製と物性評価

### 2-2-1 CMG ゲルの作製方法

CMG は単体ではゲルを形成しない。そこで CMG のカルボキシル基同士を EDC とエチレンジアミンを用いた、カルボジイミド法による化学架橋によりゲルを作製した。

#### 【試薬・器具】

- ・CMG (DS\*=4.49) \*NMR 測定結果参照
- ・EDC:WSCD・HCl (ペプチド研究所)
- ・エチレンジアミン二塩酸塩 (調整方法は付録参照)
- ・15ml 遠沈管 (アズワン)
- ・35Φシャーレ (住友ベークライト)
- ・ピペットマン (GILSON)
- ・ガラス棒
- ・脱イオン水
- ・24 穴プレート
- ・パラフィルム
- ・ピペットマン用チップ (理科研)
- ・遠心機 (HITACHI)
- ・インキュベーター (AS ONE)

#### 【調製条件】

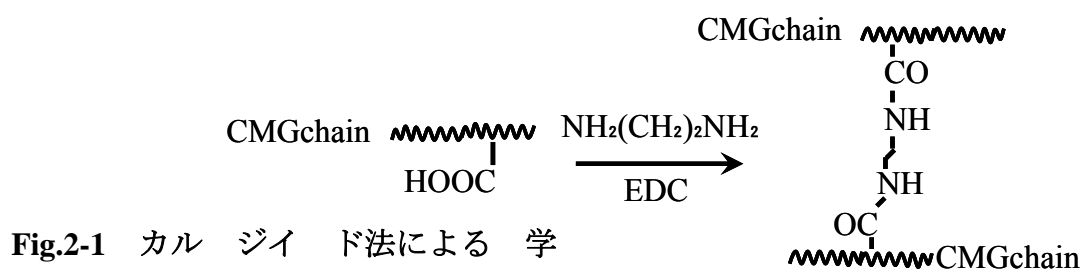
CMG 濃度 5、10、20wt%

[EDC]/[COOH]\*=1、2、5、10 [エチレンジアミン]/[COOH]=0.1、0.2、0.5、1

\*カルボキシメチルジェランのカルボキシル基に対するモル比

#### 【手順】

- ①15ml 遠沈管に CMG、エチレンジアミン二塩酸塩を量り取った。
- ②別の遠沈管に EDC を量り取った。
- ③①、②に脱イオン水を加え、ガラス棒を用いて攪拌し、溶解させた。  
2500rpm×2min 遠心機にかけた。
- ④EDC 溶液を CMG 溶液に添加し、ガラス棒で 30 秒攪拌し、プレゲル溶液とした。
- ⑤直ちに 24 穴プレートの型にプレゲル溶液を流し込んだ。
- ⑥35Φシャーレにプレゲルを型ごと入れ、乾燥を防ぐためにパラフィルムで目張りした。37℃のインキュベーターで 24 時間静置し、CMG ゲルとした。



### 2-2-2 GS-CMG ゲルの作製方法

GS のアフィニティーを利用した段階的徐放を行うために GS 固定化 CMG ゲルの作製を行った。カルボジイミド法を用いることで、基質である CMG のゲル化と CMG 鎖への GS 鎖固定化を同時に行うことが可能である。

#### 【試薬・器具】

- ・CMG (DS\*=4.49) \*付録参照
- ・GS (GS-51 硫酸化度 33.6%)
- ・EDC:WSCD・HCl (ペプチド研究所)
- ・エチレンジアミン二塩酸塩 (調整方法は付録参照)
- ・脱イオン水
- ・24 穴プレート
- ・パラフィルム
- ・ピペットマン用チップ (理科研)
- ・遠心機 (HITACHI)
- ・15ml 遠沈管 (アズワン)
- ・35Φシャーレ (住友ベークライト)
- ・ピペットマン (GILSON)
- ・ガラス棒
- ・インキュベーター (AS ONE)

#### 【手順】

- ①15ml 遠沈管に CMG、エチレンジアミン二塩酸塩、GS(所定量)を量り取った。
- ②別の遠沈管に EDC を量り取った。
- ③①、②に脱イオン水を加え、ガラス棒を用いて攪拌し、溶解させた。  
2500rpm で 2min 遠心機にかけた。
- ④EDC 溶液を CMG 溶液に添加し、ガラス棒で 30 秒攪拌し、プレゲル溶液とした。
- ⑤直ちに 24 穴プレートの型にプレゲル溶液を流し込んだ。
- ⑥35Φシャーレにプレゲルを型ごと入れ、乾燥を防ぐためにパラフィルムで目張りした。37℃のインキュベーターで 24 時間静置し、GS-CMG ゲルとした。

### 2-2-3 ゲル化時間測定

実際のインジェクタブルゲルとしての利用を考慮した場合、ゲル化時間は操作性の評価として重要である。

本実験では CMG 濃度、EDC とエチレンジアミン量を変えゲルを作製し、それらのゲル化時間に与える影響を調査した。ゲル化時間の測定は傾斜法を用いた。

【試薬・器具】

- ・CMG プレゲル                      ・インキュベーター (AS ONE)

【手順】

- ①所定の条件で作製したプレゲルを 37℃のインキュベーターで静置。  
③5分間隔で傾け、流動性の有無を調べた。

#### 2-2-4 弾性率測定

損傷した組織を同等の弾性率を有する材料で代替することは物理的機能の維持、周囲の組織への負担を小さくする上で重要である。

本実験では CMG 濃度、EDC とエチレンジアミン量を変えゲルを作製し、それらの弾性率に与える影響を調査した。また、CMG ゲルとの比較のために NG、DG ゲルも作製し、弾性率測定を行った。作製した CMG ゲル、NG ゲル、DG ゲルの弾性率は圧縮試験機によって測定した。

##### 【試薬・器具】

- |                            |                       |
|----------------------------|-----------------------|
| ・CMG ゲル                    | ・NG (三栄源)             |
| ・DG (和光純薬)                 | ・脱イオン水                |
| ・24 穴プレート                  | ・35Φシャーレ (住友ベークライト)   |
| ・パラフィルム                    | ・ネジロ試験管(NR-10) (マルエム) |
| ・ネジロ試験管用キャップ(NR-10) (マルエム) | ・恒温槽 (東京理科器械)         |
| ・インキュベーター (AS ONE)         | ・圧縮試験機(付録参照)          |

##### 【手順】

###### ◎NG、DG ゲル作製

- ①NG、DG を 2、3、4、5wt%となるように脱イオン水に溶解させた。
- ②完全溶解するまで、90℃以上で加熱した。
- ③完全溶解後、24 穴プレートの型に流し込み、35Φシャーレに型ごと入れ、乾燥を防ぐためにパラフィルムで目張りした。
- ④37℃のインキュベーターで 24 時間静置し、

###### ◎弾性率測定

- ①自然長を測定。
- ②所定の条件で作製した CMG ゲル、NG ゲル、DG ゲルを圧縮試験機によって単位時間ごとに一定量圧縮し、そのとき生じる応力を検出した。
- ③応力-歪曲線から弾性率を算出した。

### 2-2-5 破断点測定

椎間板には体重や体幹筋肉から常時圧力が加わっており、椎間板代替材料は圧縮変形に対する耐性が必要である。その評価として、圧縮試験によるゲルの破断点測定を行った。

本実験では CMG 濃度、EDC とエチレンジアミン量を変えゲルを作製し、それらの破断点に与える影響を調査した。また、CMG ゲルとの比較のために NG、DG ゲルを作製し、測定を行った。

#### 【試薬・器具】

- ・CMG ゲル
- ・NG ゲル (2-2-4 と同じ条件、手順で作製)
- ・DG ゲル (2-2-4 と同じ条件、手順で作製)
- ・直径 4mm パンチ
- ・圧縮試験機(付録参照)

#### 【手順】

- ①作製したゲルをパンチでくり抜き、自然長を測定破断点測定用サンプルとした。
- ②サンプルを圧縮試験機によって単位時間ごとに一定量圧縮し、そのとき生じる応力を検出した。
- ③検出された応力はエクセルを用いて、変形率に対する応力をプロットし、グラフを作成した。
- ④グラフの応力変化からゲルの破断点を読み取った。

(例)

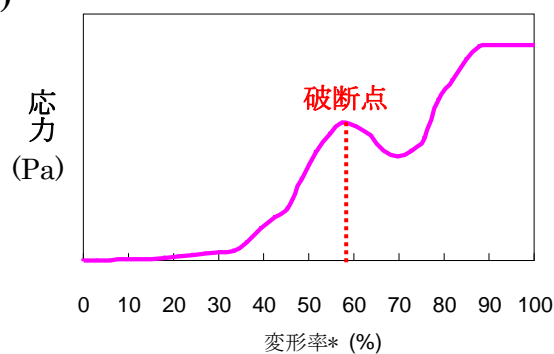


Fig2-2 点 定 と の 定 法

\*変形率(%)=変形した長さ/自然長×100

### 2-2-3 細胞毒性評価

CMG、エチレンジアミン、EDC の細胞毒性を評価するために、CMG ゲル上に軟骨細胞を播種し、位相差顕微鏡による細胞の形態観察とトリパンプルー染色による細胞の生死判定を行った。

#### 【試薬・器具】

- ・CMG (DS\*=4.49) \*付録参照
- ・GS (GS-51 硫酸化度 33.6%)
- ・EDC:WSCD・HCl (ペプチド研究所)
- ・エチレンジアミン二塩酸塩 (調整方法は付録参照)
- ・脱イオン水
- ・FBS (Invitrogen Corporation)
- ・滅菌フィルター
- ・パラフィルム
- ・ピペットマン用チップ (理科研)
- ・CO<sub>2</sub> インキュベーター (池本理化工業)
- ・Medium 199 (SIGMA)
- ・15ml 遠沈管 (アズワン)
- ・24 穴プレート (住友ベークライト)
- ・ピペットマン (GILSON)
- ・遠心機 (HITACHI)

#### 【手順】

- ①①15ml 遠沈管に CMG、エチレンジアミン二塩酸塩、GS(所定量)を量り取った。
- ②別の遠沈管に EDC を量り取った。
- ③①、②に脱イオン水を加え、ガラス棒を用いて攪拌し、溶解させた。  
2500rpm で 2min 遠心機にかけた。
- ④ベンチ内で滅菌フィルターを用い、CMG+エチレンジアミン溶液、EDC 溶液を滅菌、よく攪拌し、プレゲル溶液とした。
- ⑤24 穴プレートへプレゲル溶液を 200  $\mu$ l ずつ添加し、プレートを傾け表面が均一になるように広げる。
- ⑥一晩、37°C、インキュベーター内でゲル化させた。
- ⑦2%FBS/DMEM を 500  $\mu$ l 入れプレインキュベート。
- ⑧細胞を播種し(細胞密度:10000cell/well)で播種。
- ⑨24 時間後に形態観察及び、トリパンプルー染色による細胞生死判定を行った。

## 2-3 薬物徐放担体としての評価

体内での材料からの薬物の徐放は、拡散、アフィニティー、分解の大きく 3 タイプに分けられる。これらの作用を使い分けることで、複数の薬物を段階的に徐放することが可能であると考えられる。本実験では、CMG ゲルからの薬物徐放挙動を調査し、段階的薬物徐放担体として有用であるかの評価を行った。

### 2-3-1 薬物モデル分子を用いた徐放実験

拡散による徐放として、薬物モデルを用いた徐放実験を行った。薬物モデルはビタミン B12、フェニルアラニンと牛血清アルブミン(BSA)の分子量の異なる 3 つの分子を選択した。薬物の分子量の違い、ゲルの架橋度と濃度の違いが与える、徐放挙動への影響を調査した。

各薬物担持 CMG ゲルはゲル中の最終濃度が 10mg/ml となるように薬物分子を添加し、2-2-1CMG ゲルの作製方法に従い作製した。

#### 【試薬・器具】

薬物担持 CMG ゲル (ビタミン B12、フェニルアラニン:Wako BSA:ナカライテスク)  
PBS (pH7.4 NaCl10.9wt%) (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O、NaCl Wako)  
・サンプル瓶  
・ネジロ試験管(NM-10) (マルエム)  
・ネジロ試験管用キャップ(NM-10) (マルエム)   ・ピペットマン  
・ピペットマン用チップ   ・吸光度測定セル  
・UV-160A (SHIMADZU)

#### 【調整条件】

[EDC]/[COOH]\*=2

[CMG+エチレンジアミン]=[5%+0.5]、[5%+0.2]、[5%+0.1]、[10%+0.5]、[10%+0.2]  
[10%+0.1]

プレゲル溶液量 700  $\mu$ l



【手順】

- ①薬物担持 CMG ゲルを PBS 中(25ml)に入れ、37℃のインキュベーターで静置した。
- ②所定の時間(1、5、10、15、30、60、120、180、360、720、1440、2880、10080 分)に上澄み溶液(2.5ml)を採取し、同量の新しい PBS を追加した。
- ④採取した上澄み溶液を UV で吸光度測定し、検量線より放出量を算出した。

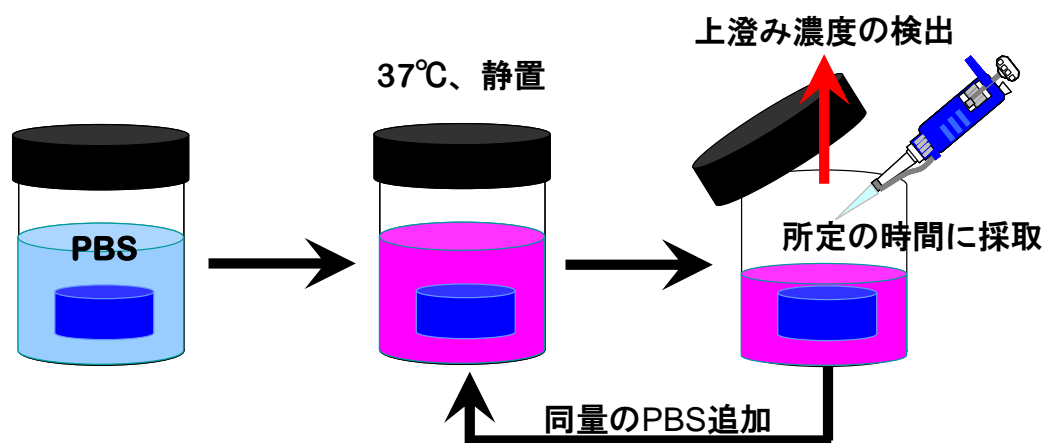


Fig2-3 徐放実験方法

### 2-3-2 GS の徐放実験

GS-CMG ゲル中には、2つの状態でGSが存在していると考えられる。1つは架橋反応によってCMG鎖に固定化された状態、もう1つはゲルの網目にトラップされている状態である。この2つの状態はGSのアフィニティーを利用した徐放の速度に影響すると考えられる。

そこで本実験ではまず、GS-CMG ゲルからのGS放出について調査した。GS-CMG ゲルはゲル中の最終濃度が10、20mg/mlとなるようにGSを添加し、2-2-2 GS-CMG ゲルの作製方法に従い作製した。

#### [試薬・器具]

- ・GS-CMG ゲル
- ・PBS (pH7.4 NaCl0.9wt%) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl Wako)
- ・0.01%トルイジンブルー溶液
- ・サンプル瓶
- ・ネジロ試験管(NM-10) (マルエム)
- ・ネジロ試験管用キャップ(NM-10) (マルエム)
- ・ピペットマン
- ・ピペットマン用チップ
- ・吸光度測定セル
- ・UV-160A (SHIMADZU)

#### 【調整条件】

[EDC]/[COOH]\*=2

[CMG+エチレンジアミン]=[5%+0.5]、[5%+0.2]、[5%+0.1]、[10%+0.5]、[10%+0.2]  
[10%+0.1]

GS 濃度 10、20mg/ml

プレゲル溶液量 700  $\mu\text{l}$

#### [手順]

- ①薬物担持 CMG ゲルを PBS 中(25ml)に入れ、37°Cのインキュベーターで静置した。
- ②所定の時間(1、5、10、15、30、60、120、180、360、720、1440、2880、10080 分)に上澄み溶液(2.5ml)を採取し、同量の新しい PBS を追加した。
- ④採取した上澄みを 100 倍希釈し、上澄み:トルイジンブルー=5:1 の割合で混合し、UV で吸光度測定した。検量線より放出量を算出。

### 2-3-3 GS とアフィニティーを持つサイトカインの徐放実験

GS は組織再生に有用であるサイトカインと親和性を有することが確認されている。ゲル中に GS を固定化、トラップさせ、そのアフィニティーを利用することで、ゲルからタンパク質を段階的に徐放することが可能になると考えられる。

そこで、本実験ではGSとの親和性が確認されているbFGFタンパクを用い、CMGゲルとGS-CMGゲルからの徐放挙動の違いを調査した。bFGFの放出濃度はELISAによって算出した。

〔試薬・器具〕

- ・bFGF 含有 CMG ゲル (bFGF:)
- ・bFGF 含有 GS-CMG ゲル (bFGF:)
- ・PBS ( pH7.0NaCl0.9wt%) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl Wako)
- ・サンプル瓶
- ・5ml アシストチューブ (AS ONE)
- ・ピペットマン
- ・ピペットマン用チップ

【調整条件】

$$[\text{EDC}]/[\text{COOH}]^*=2$$

[CMG+エチレンジアミン]=[10%+0.5]

プレゲル溶液量  $500\mu\text{l}$

bFGF 量  $1 \mu\text{g}$ 

[手順]

- ①bFGF 含有 CMG ゲル、GS-CMG ゲルを PBS 中(10ml)に入れ、37℃のインキュベーターで静置した。
- ②所定の時間(10、15、30、60、120、180、360、720 分)に上澄み溶液(1ml)を採取し、同量の新しい PBS を追加した。
- ④採取した上澄みは ELISA によって、bFGF 濃度の算出を行った(付録参照)。

### 2-3-4 分解実験

段階的徐放の後期の徐放としてゲルの分解による徐放が挙げられる。ジェランは生体内で分解することが報告されている(14)。本実験ではヘルニア時に多く産生されるコラゲナーゼ(15)、髄核に存在するリゾチーム(16)を用いて、CMG ゲルがそれらの酵素によって分解されるか調査した。反応前後の質量変化の測定を行った。

【試薬・器具】

- ・CMG ゲル
- ・PBS ( pH7.4 NaCl 0.9wt%) ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl Wako)
- ・コラゲナーゼ
- ・塩化リゾチーム
- ・サンプル瓶
- ・凍結乾燥機
- ・電子天秤 (SHIMADZU)

【調整条件】

©CMG ゲル

$$[\text{EDC}]/[\text{COOH}]^*=2$$

[CMG+エチレンジアミン]=[10%+0.5]、[10%+0.2]、[10%+0.1]

プレゲル溶液量  $300 \mu\text{l}$

### ◎酵素溶液

コラゲナーゼ溶液(6Units/ml)、一ム(0.3mg/ml)

【手順】。

- ①作製したゲルを 24 時間 PBS で完全膨潤させた。別途、凍結乾燥後質量測定した。
- ②完全膨潤させたゲルを各酵素溶液(25ml)に入れ、37℃で静置した。
- ③各反応時間後(24、96、144h)ゲルを取り出し、凍結乾燥した。
- ④質量測定、残存率を算出した。

### 3 実験結果

### 3-1 NMR 測定

DG と作製した CMG の  $^1\text{H}$  NMR のスペクトルをそれぞれ Fig3-1、3-2 に示した。1.2ppm 付近のラムノースのメチル基のピークの積分強度を 3 としてプロトンの積分強度を求めた。DG のプロトンの積分強度が 20.91、CMG のプロトンの積分強度が 29.88 であり、プロトンの積分強度の増加がみられ、カルボキシメチル基が導入されたことが確認された。

以上の結果より置換度 DS を求めた。

DS は以下の式より算出される。

$$\text{DS}^* = [\text{CMG のプロトンの積分強度} - \text{DG のプロトンの積分強度}] / 2$$

この式より、作製した CMG の DS は 4.49 であった。

\*ジェラン 1 ユニット(4 糖)あたり、カルボキシメチル基の置換が可能なのは 10 箇所であるため、DS の最高値は 10 である。

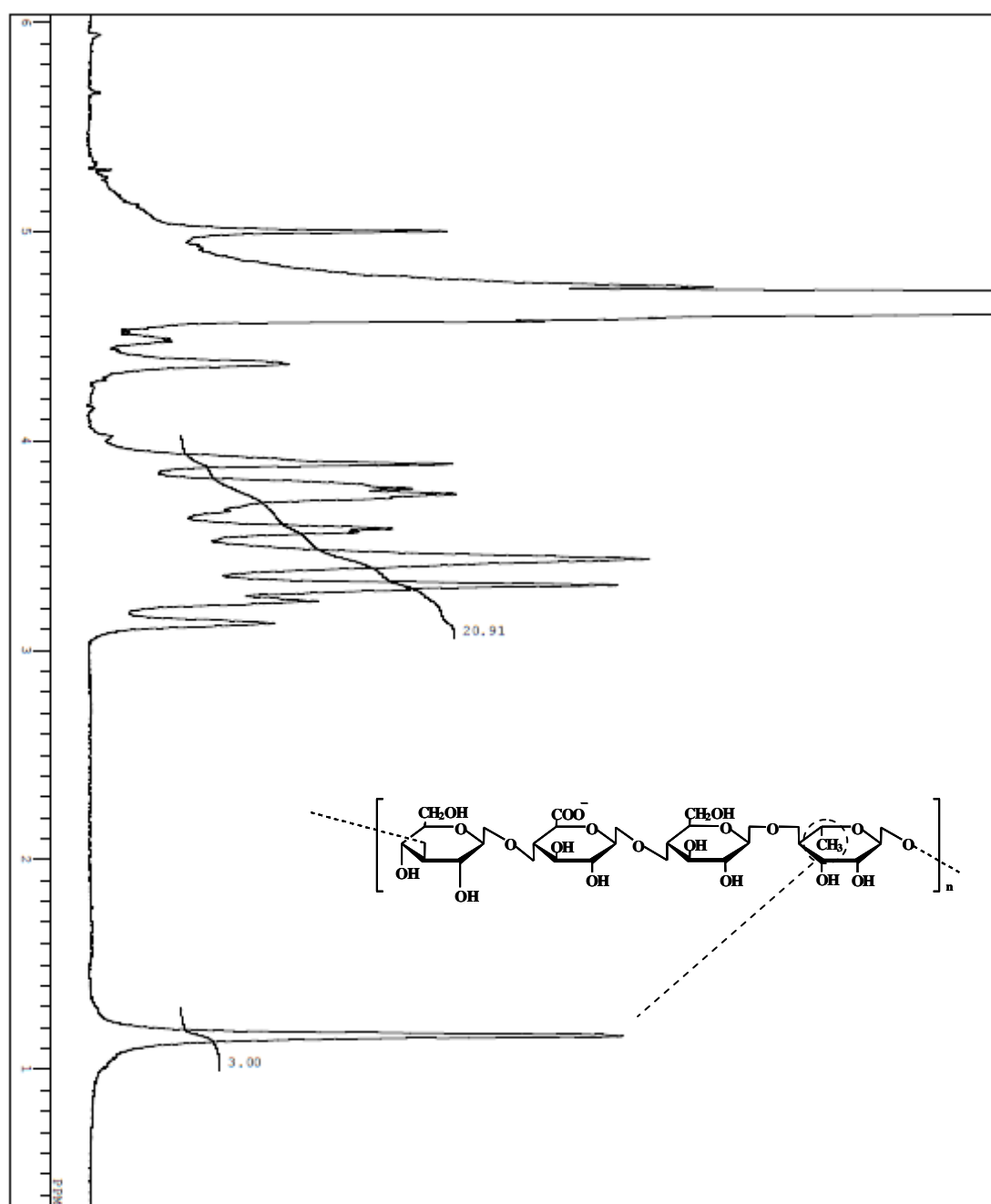
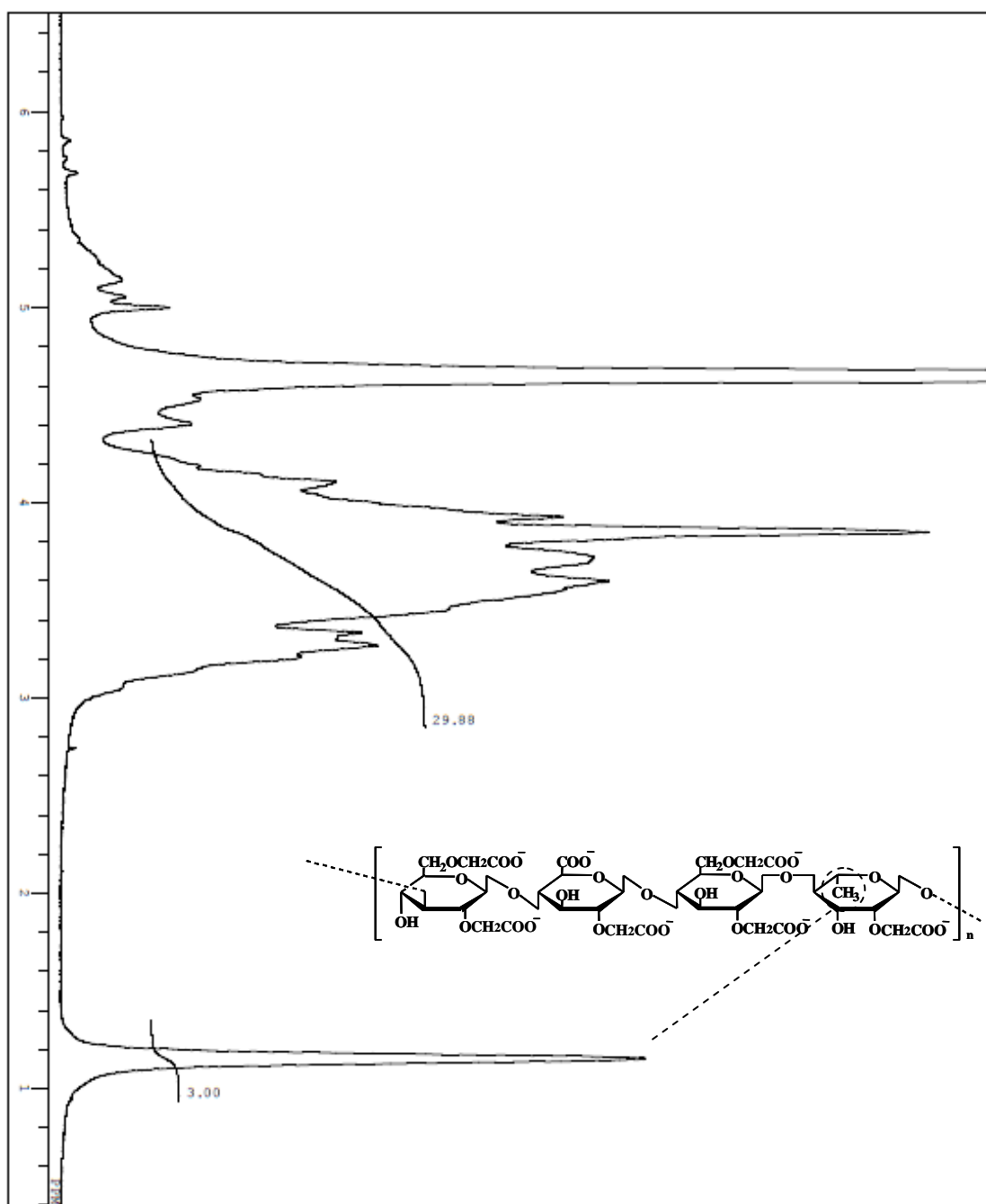


Fig3-1 脱アシル型ジェランのスペクトル



**Fig3-2** カルボキシメチルジェランのスペクトル



### 3-2 ゲル化時間測定

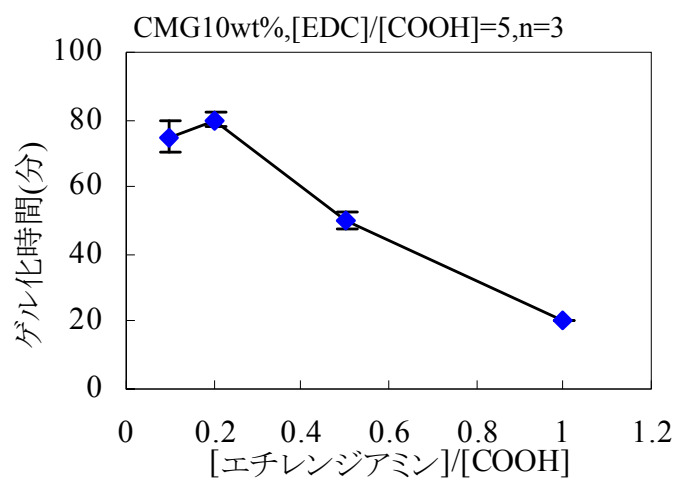


Fig3-3 ジア がゲル 時間に える

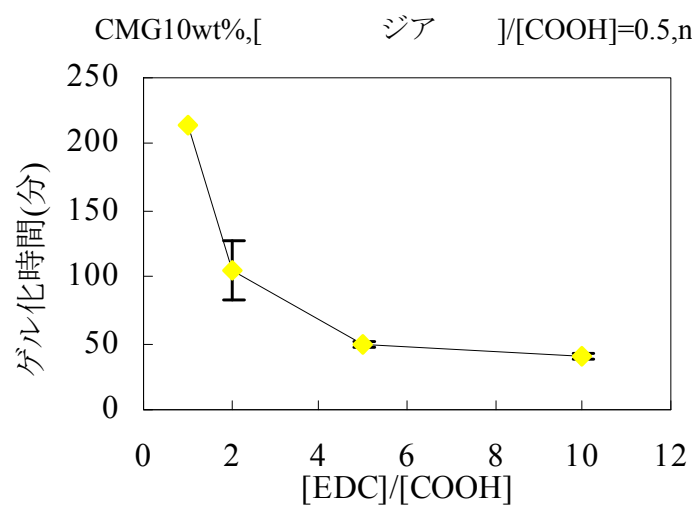


Fig3-4 EDC がゲル 時間に える

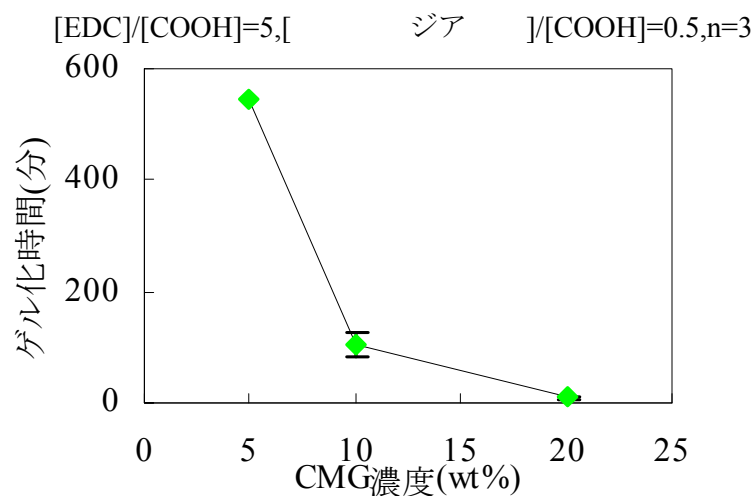


Fig3-5 CMG 濃度がゲル 時間に える

#### ◎エチレンジアミン量の影響

CMG 濃度 10wt%、EDC 量を CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して 5 倍に固定し、エチレンジアミン量を 0.1、0.2、0.5、1 倍と変化させゲルを作製した。Fig3-3 にその結果を示した。横軸がエチレンジアミン量、縦軸がゲル化時間である。

エチレンジアミン量 0.2、0.5、1 倍の増加に伴い、ゲル化時間の短縮が確認された。エチレンジアミン量が 0.2 倍の場合のゲル化時間は 80 分、1 倍の時のゲル化時間は 20 分と 4 分の 1 に短縮された。

#### ◎EDC 量の影響

CMG 濃度 10wt%、エチレンジアミン量を CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して 0.5 倍に固定し、EDC 量を 1、2、5、10 倍と変化させゲルを作製した。Fig3-4 にその結果を示した。横軸が EDC 量、縦軸がゲル化時間である。

EDC 量が 1、2、5、10 倍と増加するにつれて、ゲル化時間の短縮が確認された。EDC 量 1 倍で 215 分、10 倍で 40 分のゲル化時間で、約 5 分の 1 に短縮された。

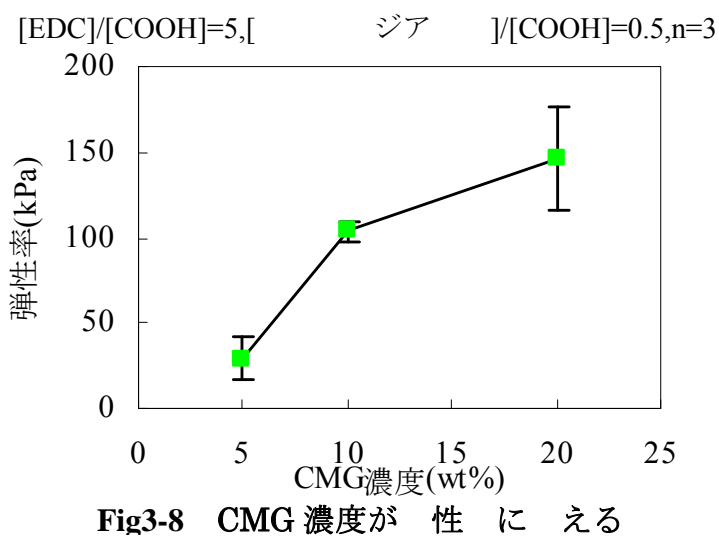
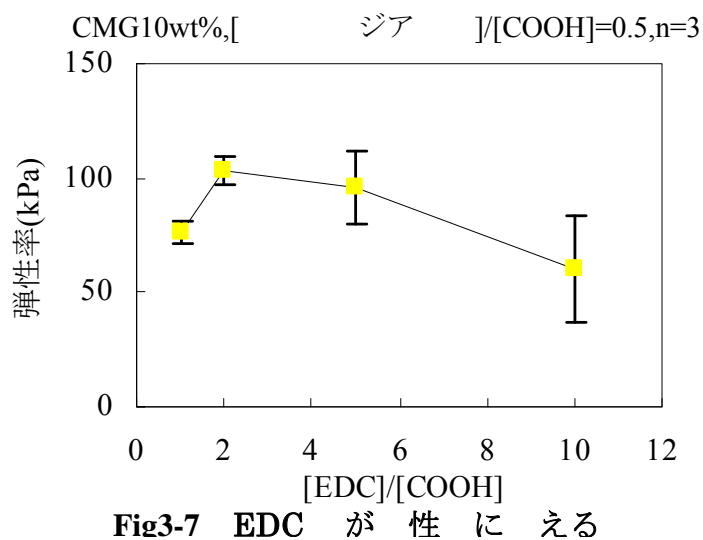
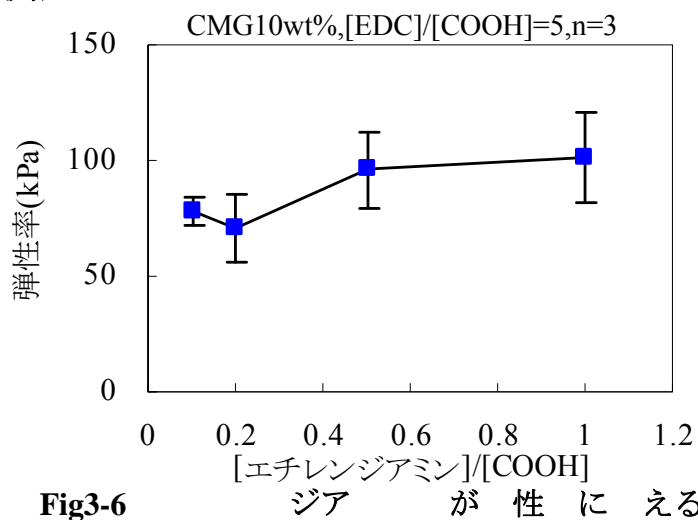
#### ◎CMG 濃度の影響

EDC 量を CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して 5 倍、エチレンジアミン量を 0.5 倍に固定し、CMG 濃度を 5、10、20wt%と変化させゲルを作製した。Fig3-5 にその結果を示した。横軸が CMG 濃度、縦軸がゲル化時間である。

CMG 濃度 5wt%のゲル化時間は 545 分、10wt%では 105 分、20wt%では 2.4 分となった。CMG 濃度が 5、10、20wt%と上昇につれて、ゲル化時間の短縮が確認された。

以上の結果より、CMG ゲルのゲル化時間はエチレンジアミン、EDC、CMG 濃度の増加に伴い、短縮されることが分かった。

### 3-3 弾性率測定



#### ◎エチレンジアミン量の影響

CMG 濃度 10wt%、EDC 量を CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して 5 倍に固定し、エチレンジアミン量を 0.1、0.2、0.5、1 倍と変化させゲルを作製した。その結果を Fig3-6 に示した。横軸がエチレンジアミン量、縦軸が弾性率である。

エチレンジアミン量が 0.1 と 0.2 倍で約 75 kPa、0.5 と 1 倍で約 100kPa の弾性率を示した。

#### ◎EDC 量の影響

CMG 濃度 10wt%、エチレンジアミン量を CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して 0.5 倍に固定し、EDC 量を 1、2、5、10 倍と変化させゲルを作製した。その結果を Fig3-6 に示した。横軸が EDC 量、縦軸が弾性率である。

EDC 量 1 から 2 倍で弾性率の上昇、5 から 10 倍で弾性率の低下が確認された。2、5 倍で 100kPa 前後、1 倍で 76.1kPa、10 倍で 59.8kPa の弾性率を示した。

#### ◎CMG 濃度の影響

CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して EDC 量 5 倍、エチレンジアミン量 0.5 倍に固定し、CMG 濃度を 5、10、20wt%と変えゲルを作製した。Fig3-8 にその結果のグラフを示した。横軸が CMG 濃度、縦軸が弾性率である。

CMG 濃度が 5wt%で 29.2kPa、10wt%で 103.5kPa、20wt%で 146.6kPa の弾性率を示した。弾性率の CMG 濃度依存性が確認された。

以上の結果より、CMGゲルの弾性率はCMG濃度、エチレンジアミン量の増加に依存した上昇を示し、EDC 量に関しては、CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して、当量及び大過剰量で弾性率の低下を導くことが示された。

◎NG ゲル

Fig3-9 に NG ゲル弾性率測定結果を示す。NG 濃度を 2、3、4、5wt%と変えゲルを作製した。横軸が NG 濃度、縦軸が弾性率である。

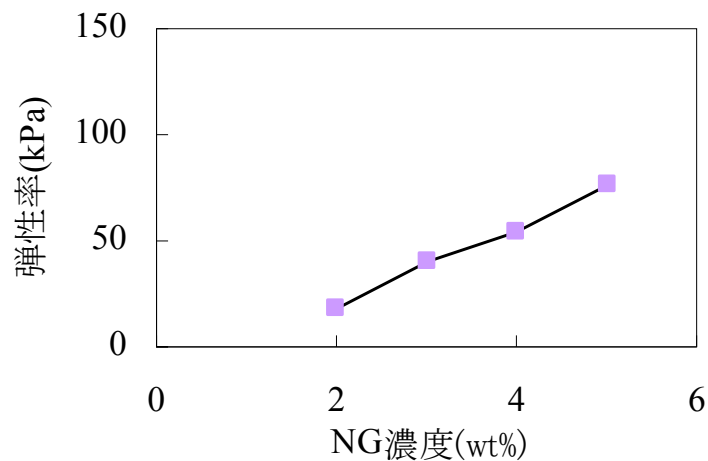


Fig3-9 NG ゲルの 性

2wt%で18kPa、3wt%で40.7kPa、4wt%で54kPa、5wt%で76.7kPaの弾性率を示した。NG 濃度に比例して、弾性率の上昇が確認された。

◎DG ゲル

Fig3-10 に DG ゲル弾性率測定結果を示す。DG 濃度を 2、3、4、5wt%と変えゲルを作製した。横軸が DG 濃度、縦軸が弾性率である。

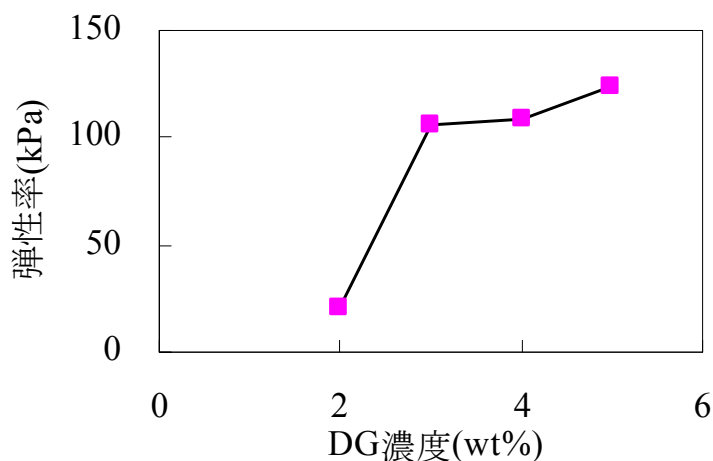
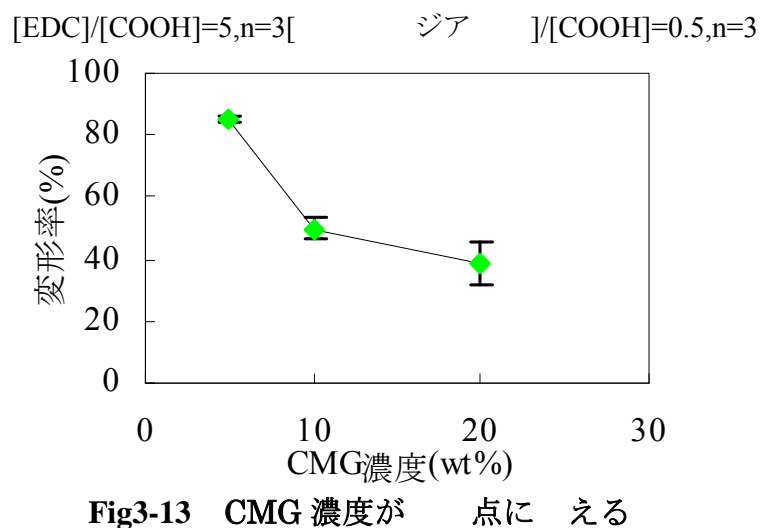
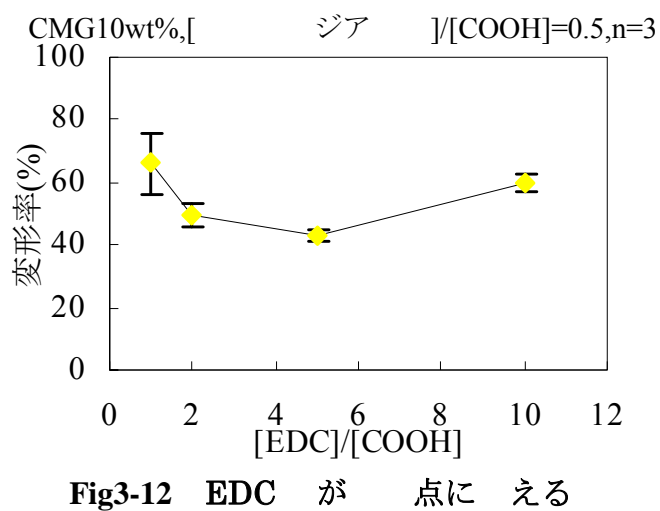
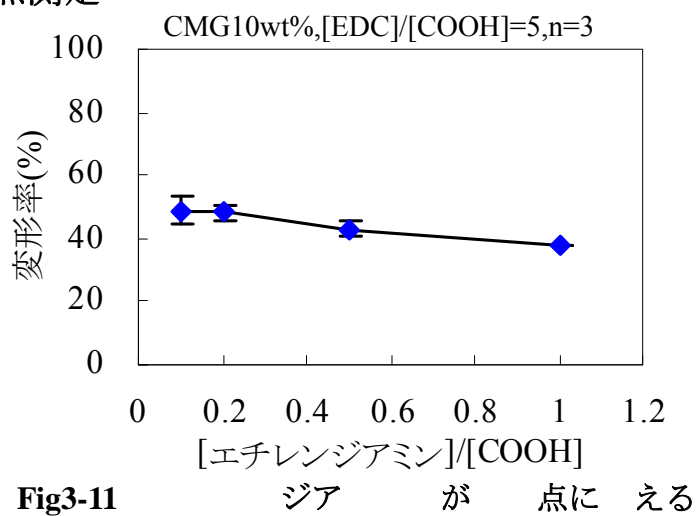


Fig3-10 DG ゲルの 性

2wt%で20.8kPa、3wt%で105.4kPa、4wt%で109.3kPa、5wt%で124kPaの弾性率を示した。DG 濃度 2 から3wt%で弾性率が約4倍になった。

### 3-4 破断点測定



#### エチレンジアミン量の影響

CMG 濃度 10wt%、EDC 量を CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して 5 倍に固定し、エチレンジアミン量を 0.1、0.2、0.5、1 倍と変化させゲルを作製した。Fig3-11 にその結果を示した。横軸がエチレンジアミン量、縦軸はゲルが破断したときの変形率である。

エチレンジアミン量が 0.1、0.2、0.5、1 と増加するにつれて、低い変形率でゲルが破断した、つまり圧縮変形耐性が低下することが確認された。エチレンジアミン量 0.1 倍において変形率 48.9%、1 倍量において変形率 38%でゲルが破断した。

#### ◎EDC 量の影響

CMG 濃度 10wt%、CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して、エチレンジアミン量を 0.5 倍に固定し、EDC 量を 1、2、5、10 倍と変化させゲルを作製した。Fig3-12 にその結果を示した。横軸が EDC 量、縦軸はゲルが破断したときの変形率である。

EDC 量 2、5 倍で約 60%、1、10 倍で約 50%の変形でゲルが破断した。EDC 量 2、5 倍で EDC 量 1、10 倍と比較すると、低い変形率でゲルが破断しており、変形率 10%の低下が確認された。

#### ◎CMG 濃度の影響

CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して EDC 量を 5 倍、エチレンジアミン量を 0.5 倍に固定し、CMG 濃度を 5、10、20wt%と変化させゲルを作製した。Fig3-13 にその結果を示した。横軸が CMG 濃度、縦軸はゲルが破断したときの変形率である。

CMG5wt%で変形率 85.2%、10wt%で変形率 49.8%、20wt%において変形率 38.6%でゲルが破断した。CMG 濃度 5、10、20wt%の増加に伴い、低い変形率でゲルが破断することが確認された。

以上の結果より、CMG ゲルの圧縮変形耐性は EDC 量 2、5 倍及びエチレンジアミン量、CMG 濃度の増加に伴い、低下することが示された。3-3 弾性率測定結果と比較すると、弾性率の上昇に伴い、低下することが確認された。

### ◎NG ゲル

NG 濃度を2、3、4、5wt%と変えゲルを作製した。Fig3-14 に NG ゲル破断点測定結果を示した。横軸が NG 濃度、縦軸はゲルが破断したときの変形率である。

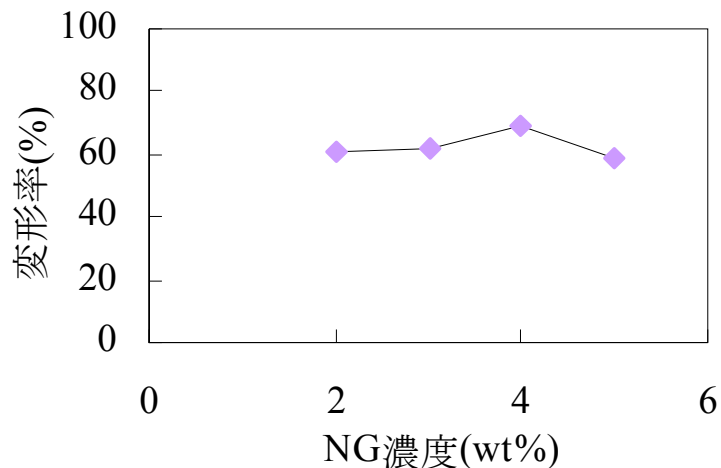


Fig3-14 NG ゲルの 性

ゲルが破断した変形率は NG 濃度 2wt%で 60.8%、3wt%で 61.7kPa、4wt%で 68.8kPa、5wt%で 58.7kPa であった。変形率は NG 濃度にほとんど影響されない結果となった。

### ◎DG ゲル

DG 濃度を2、3、4、5wt%と変えゲルを作製した。Fig3-15 に DG ゲル破断点測定結果を示す。横軸が DG 濃度、縦軸はゲルが破断したときの変形率である。

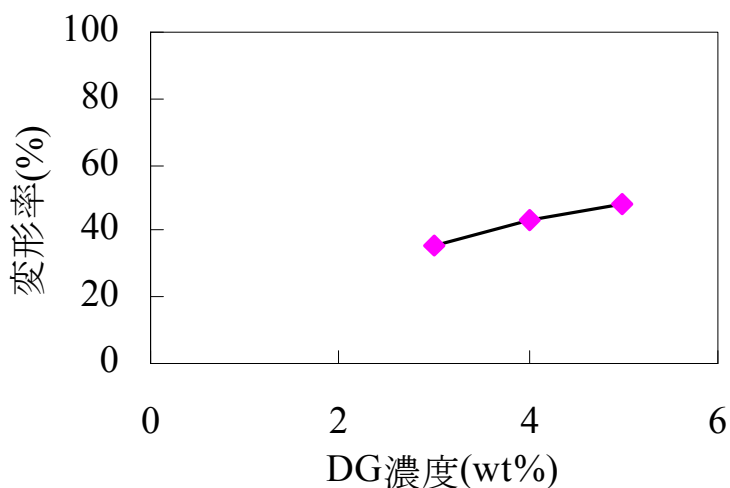


Fig3-15 DG ゲルの 性

DG 濃度 2wt%は測定できなかった。ゲルが破断した変形率は、DG 濃度 3wt%で 35.2%、4wt%で 43.6%、5wt%で 47.6%であった。



### 3-5 細胞毒性評価

各条件で撮影した顕微鏡写真を Fig3-16 に示した。左上段からプラスチックシャーレ上で培養したコントロールの 24 時間後、CMG ゲル上培養 24 時間後、GS-CMG ゲル上培養 24 時間後に撮影した写真である。下段は 96 時間後にトリパンプルー染色を行った写真である。

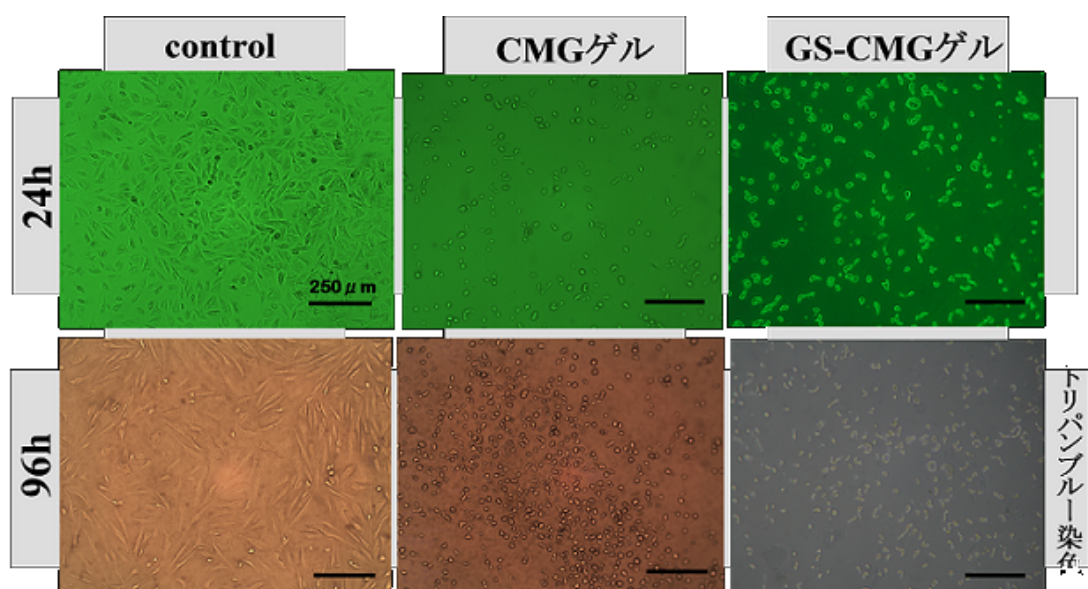


Fig3-16 ゲル 鏡

24 時間後の写真より、CMG、GS-CMG ゲル上に細胞が存在することが確認できた。96 時間後の写真より、CMG、GS-CMG ゲル上に細胞が存在することが確認できた。また、トリパンプルー染色で細胞が青く染まっていないことより、生細胞であることが確認された。

軟骨細胞はシャーレ上では線維芽細胞様の形態をとるが、ゲル上で培養することで組織内と同様な丸い軟骨細胞様の形態を取ることが観察された。

以上より、CMG、GS-CMG ゲルに用いた架橋剤及び、CMG、GS-CMG 基質の軟骨細胞に対する毒性が低いことが示された。



◎フェニルアラニン

Fig3-18 に各条件の CMG からのフェニルアラニンの時間経過に伴う、放出量を示した。CMG 濃度 10wt%、エチレンジアミン量 0.5 のゲルを[10%+0.5] と表記した。他の条件も同様に表記した。横軸が時間、縦軸が放出量である。

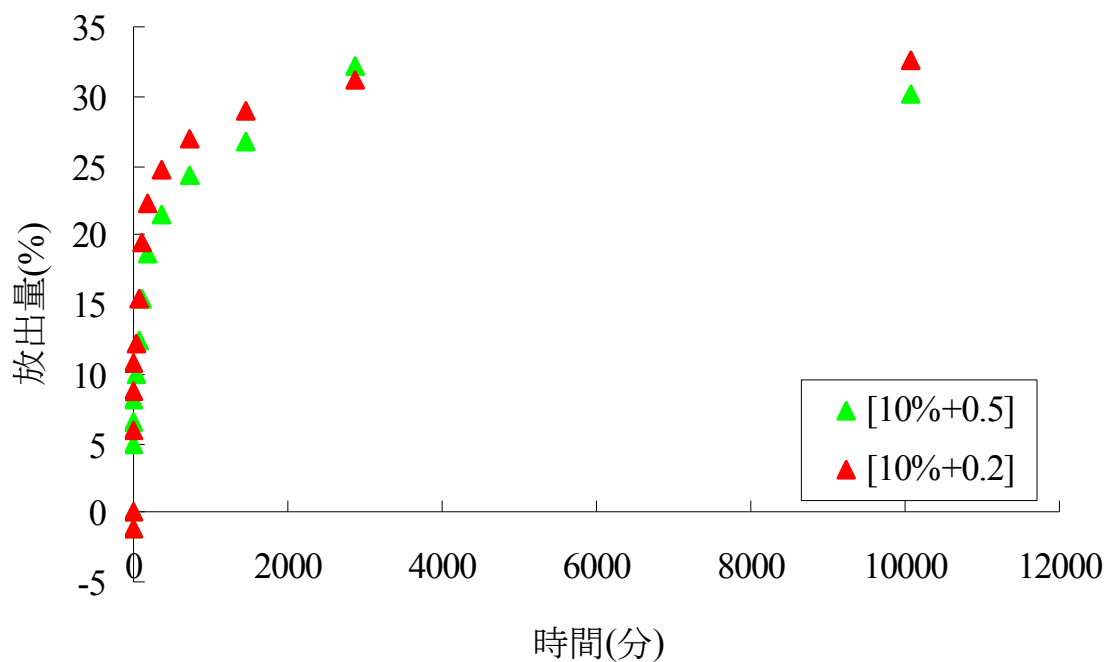
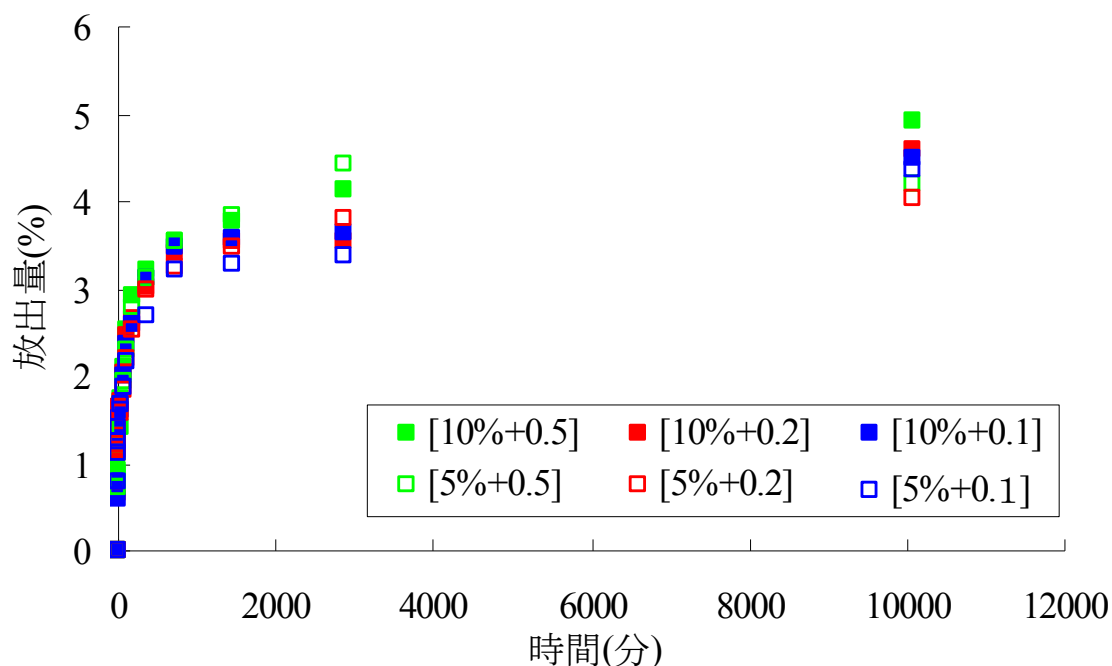


Fig3-18 フェニルアラニンの徐放挙動

CMG 濃度 10wt%、エチレンジアミン量 0.5 倍及び 0.2 倍以外の条件のサンプルはゲルを形成しなかった。フェニルアラニンはエチレンジアミン量 0.2 倍の条件の方が 0.5 倍の条件より、多く放出されることが確認された。保持させたフェニルアラニンは 10080 分後(1 週間後)、全体の約 30%が放出された。

# ◎BSA

Fig3-19に各条件のCMGからのBSAの時間経過に伴う、放出量を示した。CMG濃度 10wt%、エチレンジアミン量 0.5 のゲルを[10%+0.5] と表記した。他の条件も同様に表記した。横軸が時間、縦軸が放出量である。



**Fig3-19 BSA の徐放挙動**

保持させた BSA は 10080 分後(1 週間後)、全体量の約 4%が放出される結果となった。他の薬物と比較して放出量が少なく、含有させた BSA の 90%以上がゲル中に残留しているという結果となった。

以上の結果より、CMG ゲルの条件、薬物の種類によって異なる徐放挙動を示すことが確認された。CMG ゲルの条件に関しては、BSA を除き、エチレンジアミン量の増加に伴い、放出量が減少する結果が得られた。CMG 濃度増加に伴い、放出量が減少する結果となった。薬物の種類に関して、分子量から放出量を推測すると、フェニルアラニン、ビタミン B 12 の順であるが、逆の結果となった。放出量は分子構造に大きく影響されることが示唆された。

### 3-7 GS の徐放実験

◎GS 濃度 20mg/ml

Fig3-20 に 20mg/ml の濃度で GS を含有させた CMG からの GS 徐放実験の結果を示す。CMG 濃度 10wt%、エチレンジアミン量 0.5 のゲルを[10%+0.5]と表記した。他の条件も同様に表記した。横軸が時間、縦軸が放出量である。

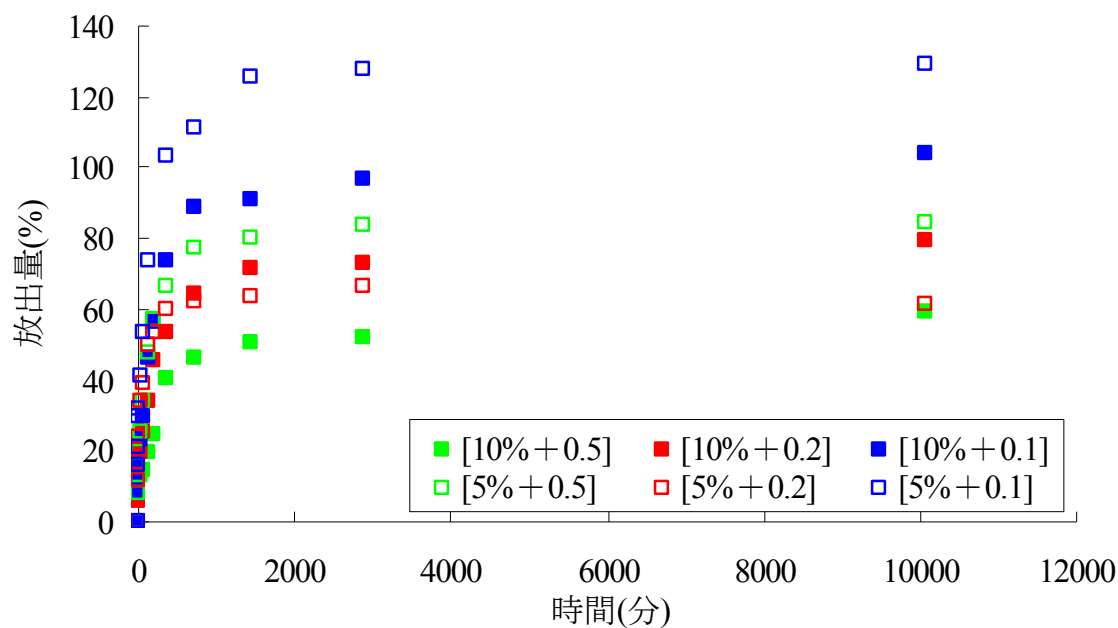


Fig3-20 GS 濃度 20mg/ml の

GS 放出量が 100%を超えているが、全体の傾向として、CMG 濃度 10wt%に関して、エチレンジアミン量の少ないゲルが GS をより早く、より多く、放出していることが確認できた。CMG5wt%に関しても、エチレンジアミン量 0.2 倍の条件を除いて、0.1 倍の方が 0.5 倍に比べてより早く、より多くの GS を放出した。10080 分後(7 日後)、保持させた GS の放出量は CMG 濃度とエチレンジアミン量の違いにより、70%程度の差があることが示された。

◎GS 濃度 10mg/ml

Fig3-21 に 10mg/ml の濃度で GS を含有させた CMG からの GS 徐放実験の結果を示す。CMG 濃度 10wt%、エチレンジアミン量 0.5 のゲルを[10%+0.5]と表記した。他の条件も同様に表記した。横軸が時間、縦軸が放出量である。

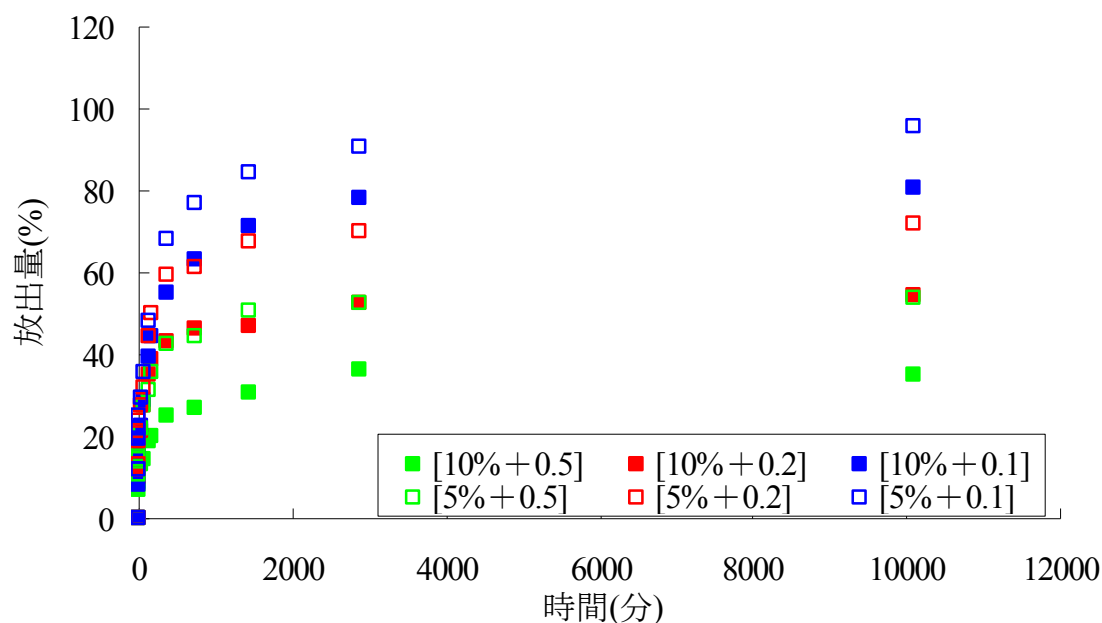


Fig3-21 GS 濃度 10mg/ml の

CMG 濃度 10wt%に関して、エチレンジアミン量の少ないゲルが GS をより早くより多く放出していることが確認できる。CMG5wt%に関して、エチレンジアミン量に依存した GS の放出が示された。

10080 分後(7 日後)、CMG 濃度とエチレンジアミン量の違いにより、放出量に 60% 程度差があることが示された。

以上の結果より、徐放挙動は担持させた GS 量には関係しないことが示された。CMG 濃度、エチレンジアミン量による架橋度に依存した徐放挙動が得られた。

### 3-8 GS とアフィニティーを持つサイトカインの徐放実験

GS-CMG ゲル、CMG ゲルからの bFGF タンパクの時間経過に伴う、放出量を Fig3-22 に示した。横軸が時間、縦軸が放出量である。

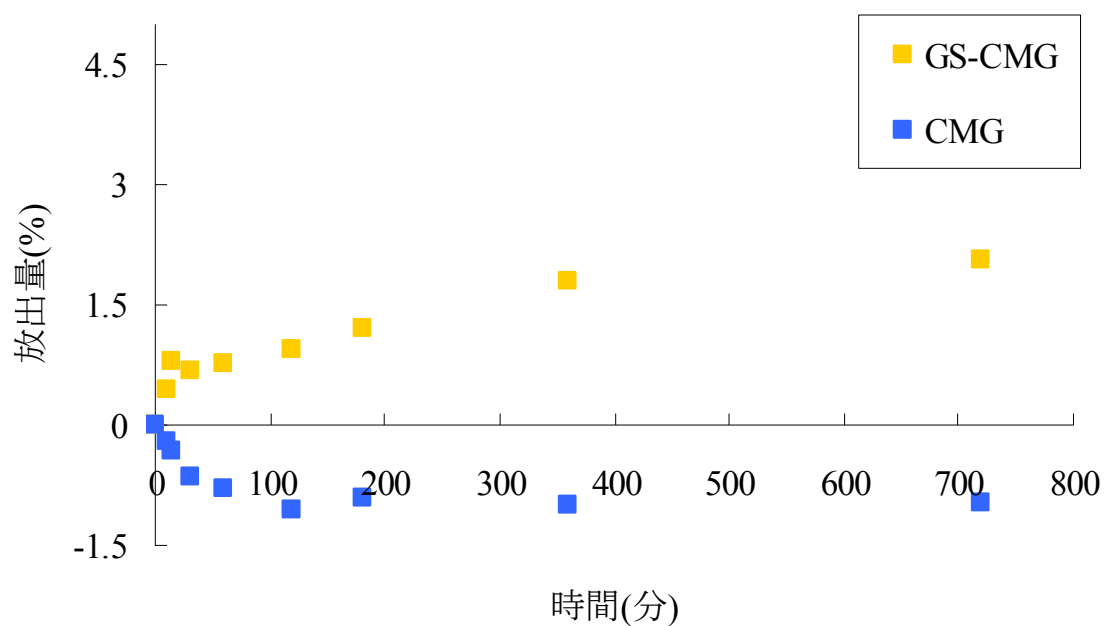


Fig3-22 bFGF ク

GS-CMG ゲルに関しては bFGF の徐放が確認された。720 分後(12 時間後)には保持させた bFGF の約 2%が放出されるという結果が得られた。しかし、CMG ゲルからの bFGF は検出されず、bFGF は放出されずにゲル中に留まっているという結果になった。

### 3-9 分解実験

各酵素溶液との所定反応時間後の CMG ゲルの残存率と弾性率の結果を示した。  
 残存率(%)=[反応前質量]/[反応後重量]×100 で算出した。

#### ◎コラゲナーゼによる分解

コラゲナーゼによる分解の時間経過に伴う、残存率の変化について Fig3-23 に示した。

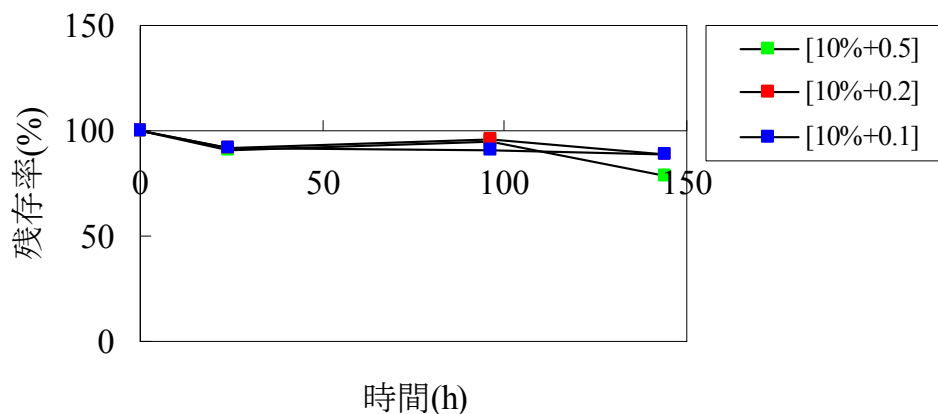


Fig3-23 コラゲナーゼ分 によるゲル 存

Table3-1 コ ロールとして用いた CMG ゲルの ( )

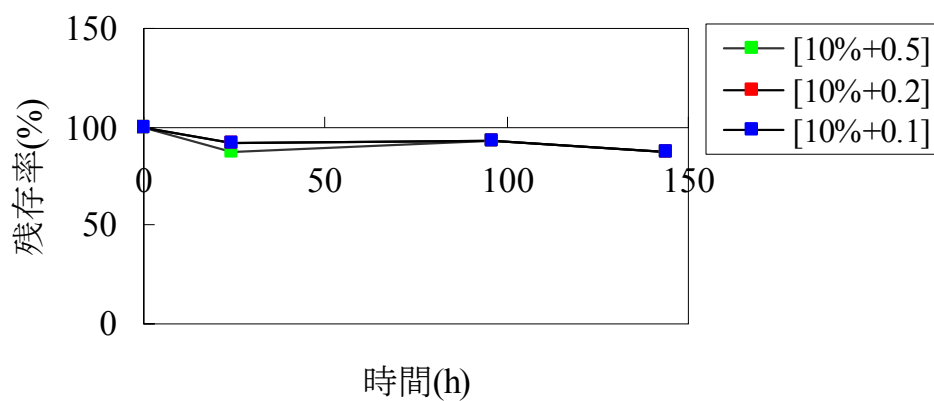
	[10%+0.5]	[10%+0.2]	[10%+0.1]
①	0.041g	0.0338g	0.0389g
②	0.0384g	0.0346g	0.0383g
平均	0.0397g	0.0342g	0.0386g

Table3-1 に示す、実験で作製した CMG ゲルのコントロールの質量差が約 10%あり、Fig3-23 の結果はこの誤差範囲に入り、反応時間 0h と比較すると、24、96、144h で残存率の減少がみられるが、分解していないと言える。



### ◎リゾチームによる分解

リゾチームによる分解の時間経過に伴う、残存率の変化について Fig3-24 に示した。



**Fig.3-24** リゾチームによるゲル分解

Table3-1 に示す、実験で作製した CMG ゲルのコントロールの質量差が約 10%あり、Fig3-24 の結果はこの誤差範囲に入り、反応時間 0h と比較すると、24、96、144h で残存率の減少がみられるが、分解していないと言える。

以上の結果より、CMG ゲルはコラゲナーゼ、リゾチームによって分解されないことが示された。

## 4 考察

#### 4-1 椎間板軟骨代替物としての CMG ゲル

・ゲル化時間測定結果から

Fig4-1 に示すように EDC を用いた CMG とエチレンジアミンのアミド結合形成機構は、CMG のカルボキシル基と EDC が反応し、活性エステル化され、酸無水物を形成し、エチレンジアミンと反応、アミド結合が形成される。また、副生成物として尿素を生成する(17)。ゲル化時間はエチレンジアミン、EDC、CMG の濃度が増加すると短縮される結果となった。CMG 濃度が上昇すると、反応点であるカルボキシル基の密度が高くなるため反応が促進され、ゲル化時間が短くなったと考えられる。同様の理由でエチレンジアミン、EDC 量を多くすることでゲル化時間が短縮されたと考えられる。

本研究で作製した CMG ゲルのゲル化時間は最短で 10 分(CMG 濃度 20wt%、エチレンジアミン 0.5 倍、EDC2 倍)、最長で 545 分(CMG 濃度 5wt%、エチレンジアミン 0.5 倍、EDC2 倍)であった。実際に使用する場合、CMG+エチレンジアミン溶液と EDC 溶液をあらかじめ作製し、使用する直前に 2 液を混合し、プレゲル溶液を調整、シリンジ等で注入するという流れであると考えられる。ゲル化するまで時間があることは操作上有用であると考ええる。

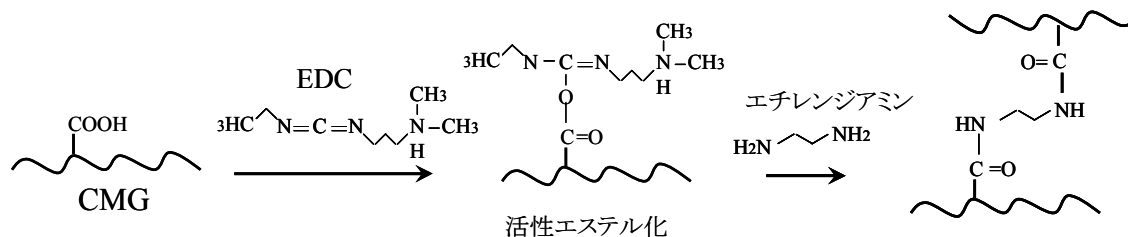


Fig.4-1 EDC によるアミド合成



Fig.4-2 椎間板インジクモデル

・弾性率測定結果から

CMG ゲルの弾性率は CMG 濃度、エチレンジアミン量の増加に依存した上昇を示し、EDC 量に関しては、CMG のカルボキシメチル基のモル比に対して、当量及び大過剰量で弾性率の低下を導くことが示された。

CMG 濃度はゲル濃度を上昇させる。その結果、CMG 濃度に比例して弾性率が上昇したと考えられる。

エチレンジアミンは CMG のカルボキシメチル基間を架橋するため、エチレンジアミン量の増加は架橋度を増加させ、ゲルの網目密度が上昇、弾性率が上昇したと考える。0.5 倍のエチレンジアミン量で反応点のカルボキシメチル基と当量であるため、エチレンジアミン量を 1 倍にしても弾性率が上昇しなかったと考えられる。

EDC は CMG 鎖同士を直接、架橋するわけではないが CMG とエチレンジアミンの架橋、また、ゲル中に残留するので EDC 量が弾性率に影響したと考えられる。EDC は副反応として周囲にカルボキシル基が少ないと加水分解し、尿素になる。エチレンジアミンがカルボキシメチル基に対して当量の条件で、この副反応が起きるとアミド結合を形成するのに必要な EDC が不足し、架橋が形成されない。そのため EDC2 倍及び 5 倍より低い弾性率となったと考える。一方、EDC を 10 倍という大過剰量加えた場合はゲルの網目中に尿素として残留し、架橋を妨げるため、低い弾性率となったと考えられる。

組織工学のためのハイドロゲルの重要な要素の一つに機械的性質が挙げられ、代替物として目的の組織と同等の弾性率を有する材料を選択することは必須である。Table4-1 に示すように、髄核の弾性率が約 13kPa、線維輪の内側の弾性率が約 200kPa である。本研究の CMG ゲル作製条件において、髄核代替物として CMG 濃度 5wt%、エチレンジアミン量 0.5 倍、EDC 量 2 倍の 29.2kPa の弾性率のゲルを、線維輪の内側の代替物として CMG 濃度 20wt%、エチレンジアミン量 0.5 倍、EDC 量 2 倍の 146.4kPa の弾性率のゲルを用いることができると考えられる。CMG ゲルは椎間板軟骨を代替するのに必要な弾性率を有するゲルを作製可能である。

Table4-1 椎間板軟骨の 性

	髄核	線維輪 内側	線維輪 外側
弾性率	13kPa	200kPa	13.3MPa

・破断点測定結果から

CMG ゲルの圧縮変形耐性は EDC 量 2 倍及び 5 倍、エチレンジアミン量、CMG 濃度の増加に伴い、低下することが示された。3-3 弾性率測定結果と検証すると、弾性率の上昇に伴い、圧縮変形耐性は低下することが分かった。

この結果はゲルの網目密度に起因すると考えられる。CMG 濃度はゲルの網目を形成する CMG 鎖を増加させる。エチレンジアミン、EDC 量は網目の架橋形成に影響するため、添加量の増加は網目の密度を上昇させる。その結果、弾性率は上昇するが、それに伴いゲルの伸縮性が低下し、低い圧縮変形耐性となった。本研究では、架橋剤としてエチレンジアミンを用いた。エチレンジアミンより分子量の大きい架橋剤(18)を用いることで、架橋点間の距離を長くし、網目の自由度が高め、伸縮性を向上させることが可能であると考ええる。

弾性率測定結果の考察でも述べたが、代替物として目的の組織と機械的性質を有する材料を選択することは重要である。椎間板には体重や体幹筋肉から常時圧力が加わっており、脊柱の支持性、運動性、衝撃緩衝作用をつかさどっている。本研究で作製した CMG ゲルは 40%以上の圧縮変形に耐え得ることができ、代替物として椎間板の機械的性質を維持できる材料であると考えられる。

・NG ゲル、DG ゲルとの弾性率、破断点の比較

弾性率に関して、同じ濃度 5wt%で比較すると、NG が 76.7kPa、DG が 124kPa、CMG が 29.2kPa(CMG5wt%、EDC2 倍、エチレンジアミン 0.5 倍)である。しかし、NG は加熱なしに溶液を調整することはできず、ゲル化温度も 80℃以上であるのでインジェクタブルとしての利用は不可能である。また、溶解度が低く、5wt%以上のゲルを作製することは困難であり、実質 76.7kPa が弾性率の最大値である。DG も NG 同様、溶液の調製は加熱が必要であり、インジェクタブルとして用いることはできない。

破断点に関して、同じ弾性率で比較すると、NG が 76.7kPa で 58.7%、DG が 105.4kPa で 35.2%、CMG が 76.1kPa(CMG10%、EDC1 倍、エチレンジアミン 0.5 倍)で 66.1%、103.5kPa(CMG10%、EDC2 倍、エチレンジアミン 0.5 倍)で 49.8%である。CMG は同等の弾性率では NG、DG よりも変形率が高く、圧縮変形に対して強い。さらに DG は離水しやすいので、軟骨組織の代替物として不適切だと考えられる。

機械的性質に違いが生じたのは CMG ゲルと NG、DG ゲルの架橋機構の違いにあると考えられる。CMG ゲルは化学架橋であるのに対して、NG、DG ゲルは物理架橋によってゲルを形成している。CMG の化学架橋ゲルは CMG のカルボキシメチル基とエチレンジアミンのアミン間が架橋する。Fig4-3(A)に示すような一本鎖が乱雑に結合した網目を形成していると考えられる。一方、NG、DG の物理架橋ゲルのゲル化機構は高温で溶解しているときはランダムコイルの状態が存在し、冷却すると二重らせん形態をとり、その二重らせん同士が会合することによりゲルを形成する Fig4-3(B)。この構造を考えると CMG は NG、DG と比べて、乱雑な鎖が存在するため、同じ濃度で弾性率が低く、同じ弾性率では高い変形率を示すと考えられる(19,20)。

CMG ゲルは高濃度の条件が必要であるが、高い弾性率、高い耐圧縮変形を持ち、NGとDGの中間的なゲルを形成し、且つインジェクタブルとして使用できるため優れた材料であると言える。

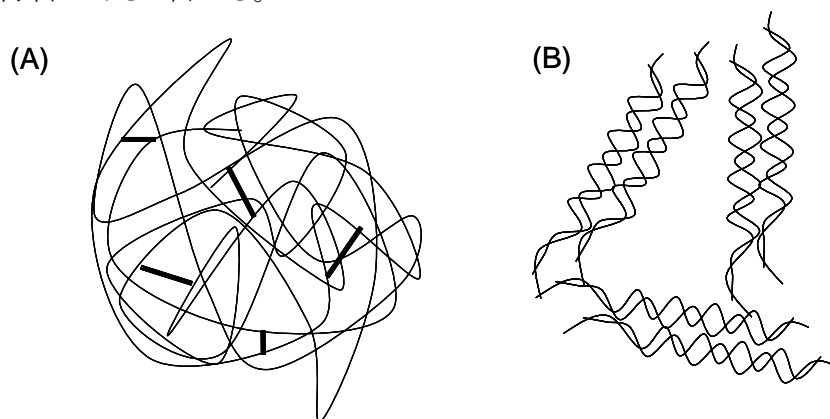


Fig.4-3 CMG の 学 ゲル と NG DG の物理 ゲル

・細胞毒性評価結果から

CMG、GS-CMG ゲルに用いた架橋剤及び、CMG、GS-CMG 基質の軟骨細胞に対する毒性が低いことが示された。本研究では CMG のカルボキシメチル基とエチレンジアミンのアミノ基でアミド結合を形成させるために、EDC を用いている。他の研究においても EDC の細胞毒性が評価されており、比較的毒性はないという結果が得られている(21)。

プラスチックシャーレ上では線維芽様の形態をとるが、ゲル上培養では、生体内に存在する際の軟骨様の円形な形態をとることが確認された。他研究においてもゲル上で軟骨細胞を培養することで、軟骨細胞の分化能が維持されるという報告がなされている(22)。

CMG ゲルは細胞毒性が低いので、患部に直接注入することが可能であり、さらに、形成した代替物への細胞接着が見込め、細胞足場となり得る。組織再生に有用な材料であると考えられる。

## 4-2 薬物徐放担体としての CMG ゲル

・薬物モデル分子を用いた徐放実験結果から

本研究では、抗炎症剤、抗生物質の薬物モデルとしてフェニルアラニン(分子量 165.19)、ビタミン B12(分子量 1355.4)、サイトカインのようなタンパク薬物モデルとして BSA(分子量 66,000)を選択した。

放出量はゲルの網目密度、薬物の分子量、分子構造、官能基に大きく影響されることが考えられる。実際、CMG 濃度の増加に伴い放出量が減少、エチレンジアミン量の増加に伴い、放出量が減少する結果が得られた。しかし、BSA においてはビタミン B12、フェニルアラニンとは異なる結果となった。これは BAS にはカルボキシル基、アミノ基が存在するため、ゲルを作製する際に CMG 鎖に固定化されたのが原因であると考えられる。また、先の研究において測定されたタイムラグ法を用いた NG シートからの拡散係数(Table4-4)(23)から 24 時間後の放出量を推測すると、フェニルアラニン、ビタミン B 12 の順であるが、フェニルアラニン約 30%、ビタミン B12 80%以上となり、逆の結果となった。フェニルアラニンはカルボキシル基、アミノ基を持ち、ゲル作製時に CMG 鎖に固定化される可能性がある。また、水に対する溶解度が低いことが分子量の大きいビタミン B12 より放出量が少なくなった原因であると考えられる。さらに、電荷の影響が考えられる。フェニルアラニンの pKa は 2.20、9.09 であり、CMG ゲルの pH は 7~8 であるので、フェニルアラニンは CMG ゲル中で正に帯電している。フェニルアラニンは CMG のカルボキシメチル基の負電荷に引きつけられ、その結果、ゲル中に留まっていたのではないかと考えられる。

CMG ゲルからの放出速度を比較するために、Fig3-17、Fig3-18、Fig3-19 のグラフの横軸の対数を取り、近似曲線の傾きを求めた。Fig4-4 には CMG ゲルの作製条件が CMG10wt%、エチレンジアミン量 0.5 倍、EDC 量 2 倍の各薬物モデルの結果をまとめたグラフを示した。放出速度はビタミン B12 が 10、フェニルアラニンが 4.1、BSA が 0.4 であった。放出量と同様の理由で、ビタミン B12 が早く放出され、BSA の放出が遅いという結果になったと考えられる。



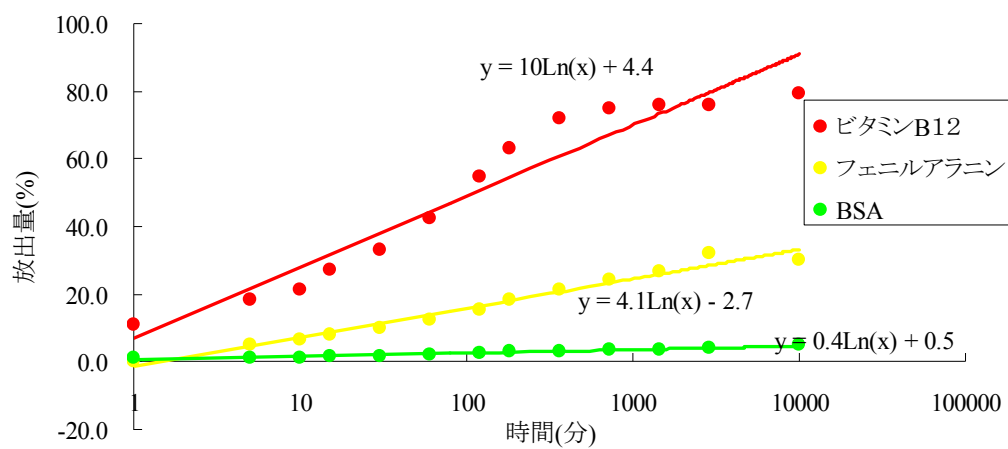
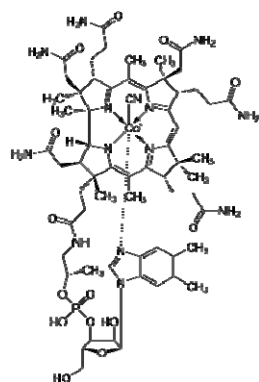


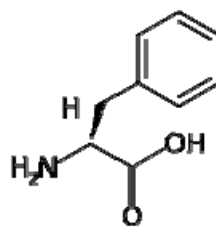
Fig4-4 薬物モデル分子の 度

Table4-2 薬物モデルの

	フェニルアラニン	ビタミンB12	BSA
拡散係数D(m <sup>2</sup> /s)	4.5E-10	5.9E-11	1.4E-11



B12



フェニルアラニン

Fig4-5 薬物モデルの分子

•GS の徐放実験結果から

薬物モデル分子の徐放実験と同様に、CMG 濃度、エチレンジアミン量による架橋度に依存した徐放挙動が得られた。Fig3-21 より、7 日後の放出量を比較すると、CMG 濃度の増加、エチレンジアミン量の増加に伴い、減少していることが確認された。これは CMG 濃度、架橋度の条件を変えることで、放出量(固定化量)を約 30～90%(10～70%)の範囲で調節可能であることを意味している。

CMG ゲルからの薬物徐放速度を比較するために横軸の対数をとると、Fig4-6 のように線形近似でき、その傾きが徐放速度  $a$  となる。

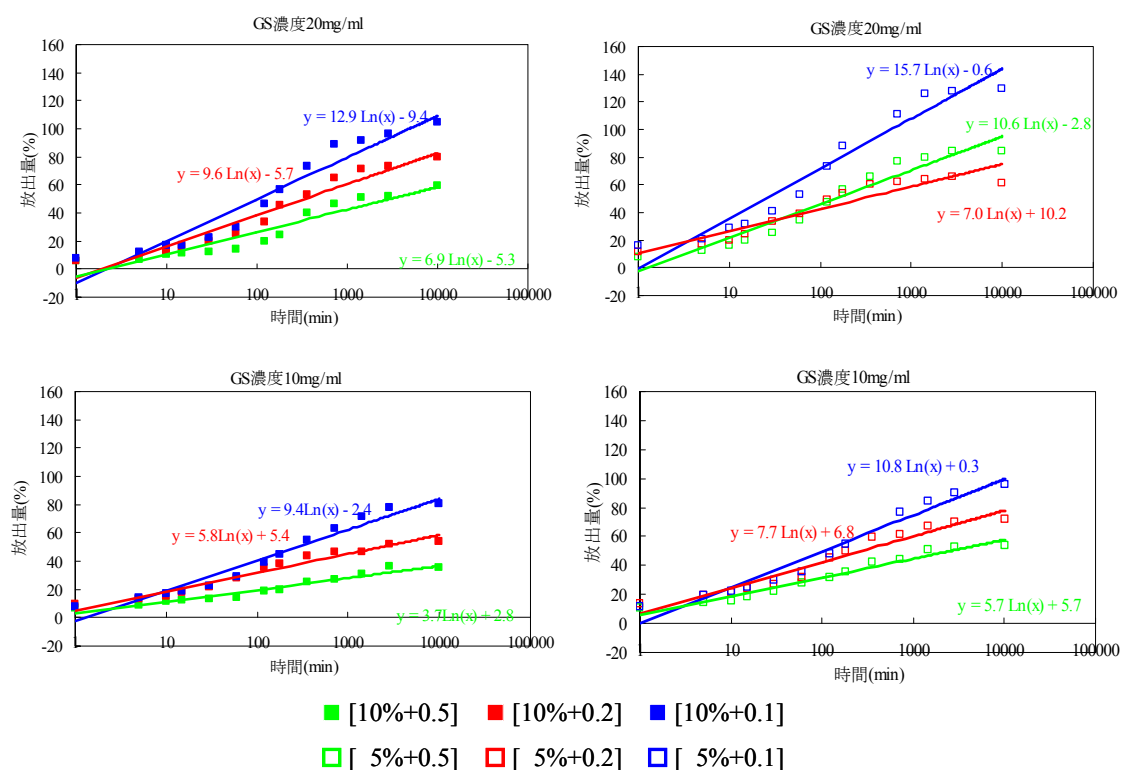


Fig4-6 GS-CMG ゲルからの GS 度

れ れのGS濃度、CMG濃度で られた 度を ジア 、つまり 度に対して ロッ し、 の対 をとった(Fig4-7)。(A)、(B)、(C)、(D)の ラフを すると きが一定である。これは GS の 度がGS濃度、CMG濃度は関 なく、 度に されていることを している。

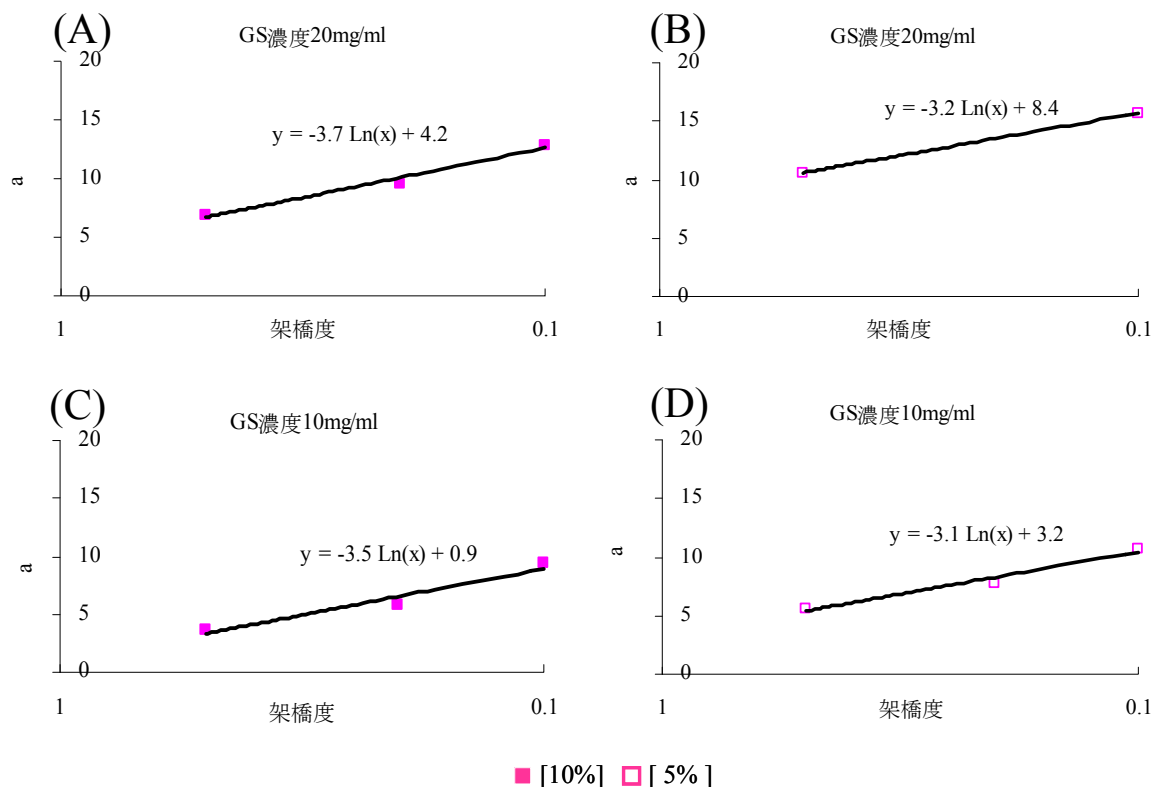


Fig4-7 度と 度の関

CMG ゲルからの GS 、GS の 度、CMG の GS 固定 、  
 を CMG 濃度、 ジア を させることで することが可能  
 であると考えられる。これは GS とアフィニティーを有する薬物を保持させた場合、  
 GS と結合し拡散する薬物、固定化された GS と結合しゲル中に留まる薬物をコント  
 ロールすることが可能になると考えられ、アフィニティーを利用した薬物徐放の幅が  
 広がると考えられる。

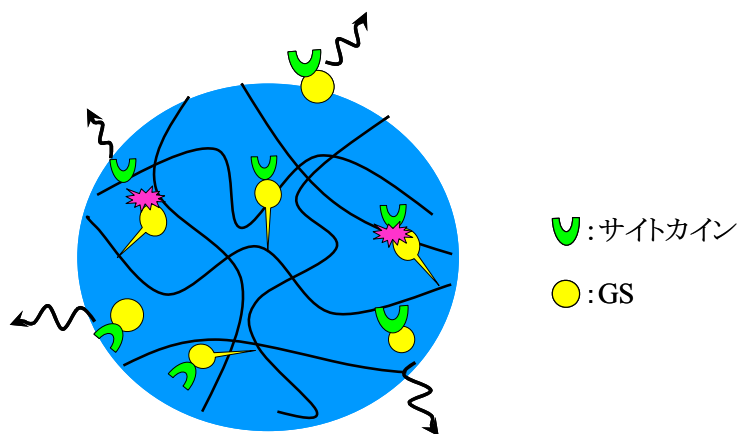


Fig4-8 アフ ニテ ーを 用した薬物

・GS とアフィニティーを持つサイトカインの徐放実験結果から

GS-CMG ゲルに関しては bFGF の徐放が確認されたが、CMG ゲルからの bFGF の徐放は検出されないという結果が得られた。GS が bFGF と高い親和性をもつことを考えると、CMG ゲルの方が GS-CMG ゲルに比べて、より多く bFGF を放出すると予測できる。この結果が得られた理由として、2 つ考えられる。

①ゲル作製条件による違い。

②CMG は GS よりも、より強く bFGF を結合することができる。

①について、BSA の徐放実験のように、bFGF はタンパクであるので、カルボキシル基やアミノ基をもつのでゲル作製過程において、CMG 鎖に固定化される可能性がある。GS-CMG ゲルは CMG ゲルの作製条件に対して GS を加えているので、CMG ゲルと比較して GS-CMG ゲルは GS が存在する分 bFGF が固定化されにくいと考えられる。その結果、本来は CMG ゲルのように bFGF はすべて固定化される条件であるが、GS を加え GS が CMG に固定化された量の bFGF が放出されたのではないかと考える。

②について、Fig1-15 より、GS の硫酸化度と bFGF のアフィニティーは TN-C と比較すると、硫酸化度に依存する傾向が見られる。bFGF の等電点 9.6、CMG ゲルの pH は 7~8 の中性付近であるため、ゲル中において bFGF は正に帯電している。GS と bFGF のアフィニティーは硫酸基の負電荷が大きく影響していると考えられる。CMG のカルボキシメチル基も負に帯電しており、GS の硫酸基よりも強く結合したため、ゲルから放出されなかったと考えられる。今後、CMG と bFGF のアフィニティーを評価する必要がある。

GS-CMG ゲルからの bFGF の放出速度を求めるために、Fig3-22 の横軸を対数化し、近似曲線の傾きを算出した。Fig4-9 に bFGF と同様の GS-CMG ゲルからの GS 放出速度をまとめたグラフを示した。bFGF の放出速度は GS の分子量(数十万)よりも bFGF の分子量(16,000)が小さいにも係わらず、GS の放出速度より遅い、これは bFGF が GS と結合し放出されていると考えられる。

GS-CMG ゲルの GS 固定化量を変化させることで、bFGF の放出量を制御できると考えられ、徐放担体として有用である。また、CMG ゲルから bFGF が全く放出されなかったことから、CMG が bFGF と高いアフィニティーを有する可能性があることが示唆された。これは GS-CMG ゲルは TN-C、bFGF を段階的に徐放させることが可能になると考えられる。

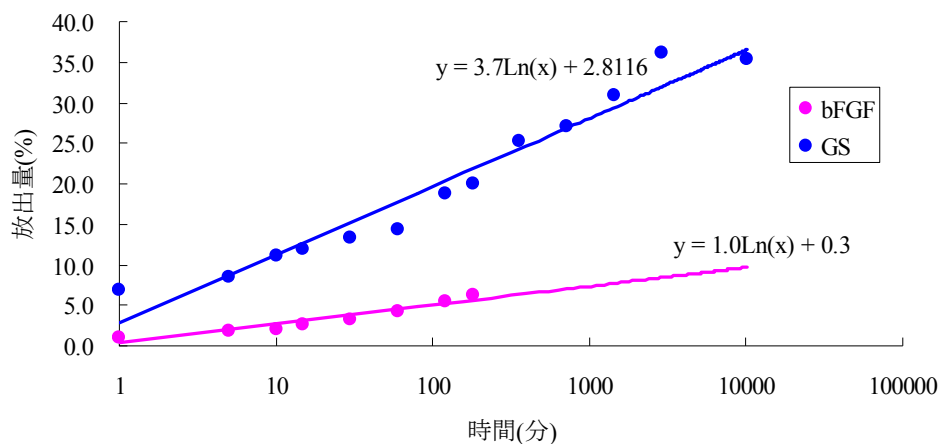


Fig4-9 bFGF と GS の 度

・酵素分解実験結果から

本実験から CMG ゲルはヘルニア発生時に多く産生されるという報告があるコラゲナーゼ、髄核に存在するリゾチーム、との短期間の接触では分解されないという結果が得られた。この結果は初期の段階(~7 日)で分解されず、長期的な加水分解やヘルニアの自然吸収を担うマクロファージなどによって分解され、残留した薬物が分解とともに放出される可能性が示唆された。実際、他研究においてジェランゲルのマウス皮下注入実験の 21 日間の観察で、徐々にジェランの重量が減少することが報告されており(24)、ゲルの分解による薬物徐放は可能である。

また、初期で酵素分解によるゲルの崩壊が起きないことは組織代替物として重要であると考えられる。新しい組織が形成される速度と同じ速度で分解する材料の開発が重要であると報告されており(25)、今後 CMG ゲルの分解に関して、詳細に調査していく必要がある。

### 4-3 椎間板軟骨再生用材料

CMG を用いたインジェクタブルゲルはプレゲル溶液を調整し、ゲル化するまで 10 分以上の時間があり、その間にシリンジ等を用い、低侵襲で患部にインジェクトすることが可能である。CMG ゲルは作製条件を変えることで、29.2~146.6kPa の幅広い弾性率、40%以上の圧縮変形に対する耐性を有する材料を作製できる。髄核の約 13kPa から線維輪内側の約 200kPa の弾性率に対応した代替物を提供できる。さらに導入した代替物は細胞接着が可能な足場となり得る。

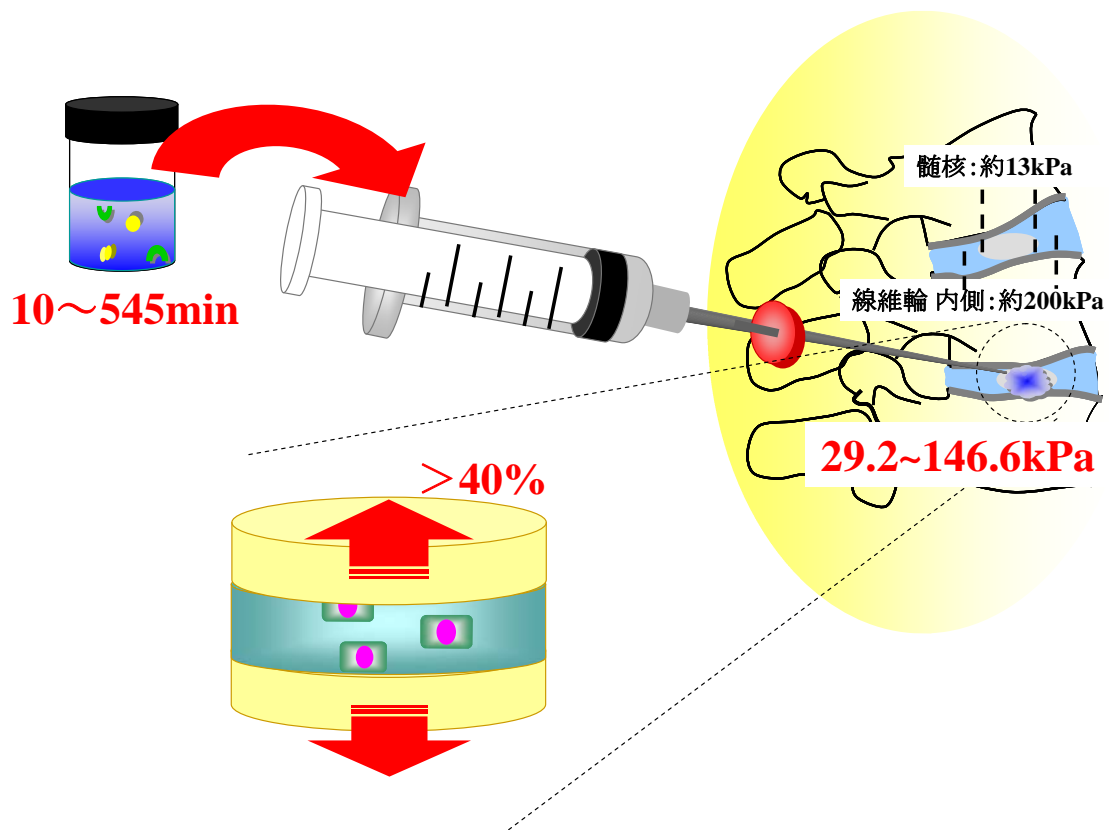


Fig4-10 椎間板軟骨 物しての CMG ゲル

CMG ゲルはゲル濃度、架橋度を変え作製することで、含有させた薬物の分子量、構造によって、拡散による徐放量、徐放速度をコントロール可能である。Fig3-17、Fig3-18の結果より、抗炎症剤、抗生物質のモデルであるビタミンB12、フェニルアラニンは数時間といった初期の段階(Fig4-10の①)で放出され、ヘルニア及び注入による炎症を抑制することができる。さらにGSを導入することで、GSとアフィニティーを持つサイトカインの段階的徐放が可能になる。各薬物モデル分子、GS、bFGFの放出速度と分子量をまとめた表をTable4-3に示した。bFGFの放出速度は分子量が小さいに係わらず、GSの放出速度より遅い、これはbFGFがGSと結合し放出され

ていると考えられる。bFGF のみより放出を遅らせることができる。また、固定化された GS に結合したサイトカインの解離による放出が考えられる。Fig.1-14、Fig1-15 より、結合定数の違いを利用して、TN-C と bFGF を段階的に放出できると考えられる。bFGF より結合定数の高い TN-C は bFGF より遅く放出されると考えられる。アフィニティーによって、拡散による徐放より後の、中期の段階(Fig4-10②)でサイトカインを放出でき、材料に接着した細胞の増殖、分化を促進させることが可能であると考えられる。他研究においてジェランゲルのマウス皮下注入実験の 21 日間の観察で、徐々にジェランの重量が減少することが報告されていることより(24)、後期の段階(Fig4-10 ③)でゲル中に固定化した薬物を分解により、細胞の基質産生を促すようなサイトカインを放出することができ、分解と並行した組織の再生が可能であると考えられる。拡散、アフィニティー、分解といった作用を用いることで、一度の注入で数分から数週間、数ヶ月間に渡り、状況に合わせた薬物を放出可能である。

Table4-3 CMG ゲルからの 度

	ビタミンB12	フェニルアラニン	BSA	bFGF(GS-CMGゲル)	GS
分子量	1355.4	165.19	66,000	16,000	数十万
放出速度	10	4.1	0.4	1	3.7

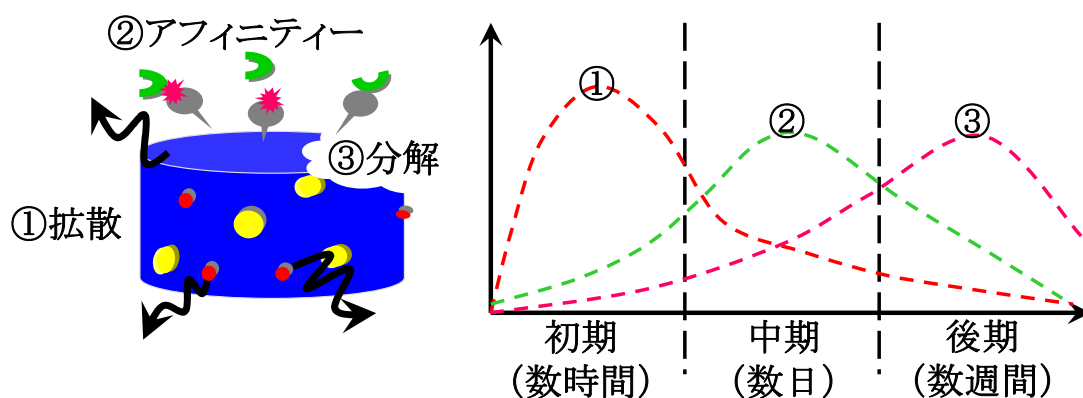


Fig4-10 薬物 担体としての CMG ゲル

本研究で作製した CMG ゲルはインジェクタブルな椎間板軟骨代替物、複数の薬物の段階的徐放担体であり、椎間板軟骨再生用材料として有用である。

## 5 結論



1. CMG を用いて、椎間板軟骨の髄核とその周囲の強度(13~200kPa)の再現、及び圧縮変形に耐え得る、高強度インジェクタブルゲルの開発に成功した。
2. CMG に GS を複合化させることで、拡散・アフィニティー・分解を利用した、複数の薬物を段階的に徐放することが可能な材料の作製に成功した。

## 参考文献

1. 戸山芳昭 図説腰椎の臨床/MEDICALVIEW
2. New developments in nucleus pulposus replacement technology .A. Carl et al. / The Spine Journal 4 (2004) 325S–329S
3. Nucleus pulposus replacement: an emerging technology The Spine Journal 5 (2005) 317S–324S
4. 田畑泰彦. 再生医療のための生体組織工学, 蛋白質核酸酵素 47(7); 770(2002)
5. FFI Reports/FFI ジャーナル
6. 長尾達郎 組織修復をコントロールする生体材料の開発 三重大学工学部分子素材工学科生体材料研究室(2007)
7. 特開 2007-099875 【出願日】平成 19 年 4 月 19 日 【発明の名称】硫酸化多糖及びその製造法 【出願人】チッソ株式会社
8. 林紘三郎 バイオメカニクス/コロナ社
9. Inbar Freeman, Alon Kedem, Smadar Cohen. The effect of sulfation of alginate hydrogels on the specific binding and controlled release of heparin-binding proteins. *Biomaterials* 2008;29:3260–3268.
10. Claudia Sissi, Ph.D., Annamaria Naggi, Ph.D., Giangiacomo Torri, Ph.D., and Manlio Palumbo, Ph.D. Modulation of Antithrombin-Protease Interactions by Semisynthetic Low-Molecular-Weight Heparins with Different Sulfation Patterns. *SEMINARS IN THROMBOSIS AND HEMOSTASIS* 2003;29:661-670
11. X. Lux Lu, Chester Miller, Faye H. Chen, X. Edward Guo, Van C. Mow. The generalized triphasic correspondence principle for simultaneous determination of the mechanical properties and proteoglycan content of articular cartilage by indentation. *Journal of Biomechanics* 2007;40:2434-2441
12. 清水康治 組織修復材料としてのジェラン 三重大学工学部分子素材工学生体材料研究室(2009)
13. 松林通 高置換カルボキシメチルジェランの調整 (平成 8 年度)
14. Oliveira JT, Santos TC, Martins L, Picciochi R, Marques AP, Castro AG, et al. Gellan gum injectable hydrogels for cartilage tissue engineering applications: in vitro studies and preliminary in vivo evaluation. *Tissue Eng Part A* 2010;16(1):343e53.

15. Herniated Lumbar Intervertebral Discs Spontaneously Produce Matrix Metalloproteinases, Nitric Oxide, Interleukin-6, and Prostaglandin E2. *Spine* Volume 21(3), 1 February 1996, pp 271-277
16. Protein and lysozyme content of adult human nucleus pulposus. *Experientia* 42 (1986)
17. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media *Bioconjugate Chem.* 1995, 6, 123-130
18. Controlling Mechanical and Swelling Properties of Alginate Hydrogels Independently by Cross-Linker Type and Cross-Linking Density *Macromolecules* **2000**, 33, 4291-4294
19. 21. Preparation and Characterization of Novel Gellan Gum Hydrogels Suitable for Modified Drug Release *Molecules* **2009**, 14, 3376-3391
20. Modified Gellan Gum hydrogels with tunable physical and mechanical properties *Biomaterials* 31 (2010) 7494e7502
21. Crosslinking Structures of Gelatin Hydrogels Crosslinked with Genipin or a Water-Soluble Carbodiimide *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 91, 4017-4026 (2004)
22. Chondrocytes Embedded in Collagen Gels. Natuo Yasui
23. 田辺潤哉 インジェクタブル硫酸化ジェランゲルの開発 三重大学工学部分子素材工学生体材料化学研究室(2010)
24. Gellan Gum Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering Applications: *In Vitro* Studies and Preliminary *In Vivo* Evaluation *Tissue Engineering Part A*. January 2010, 16(1): 343-353.
25. Liu CZ, Czernuszka JT. Development of biodegradable scaffolds for tissue engineering: a perspective on emerging technology. *Mater Sci Technol* 2007;23(4):379e91.

## 謝辞

私の研究生活に係わって下さった全ての方々に心より感謝申し上げます。

堀内教授には研究、学生生活への少ないながらも深いご助言を頂き、自分自身を見つめ直す機会を与えて頂きました。深く感謝申し上げます。これからもご指導、御鞭撻のほど宜しくお願い申し上げます。

宮本准教授には特に研究を進めるにあたり、理解が未熟な点におきましても丁寧な御指導、また研究に対する思いを熱く語って頂き、研究に対する姿勢を教えて頂きました。ありがとうございました。これからもご指導、御鞭撻のほど宜しくお願い申し上げます。

また、修士論文の副査を務めて頂いた湊元先生に感謝申し上げます。至らぬ点多々見受けられたと思います。ご指導、ご鞭撻のほど宜しくお願い申し上げます。

直属の後輩である野口君には細胞毒性評価実験を、山本君にはGSの作製及びGSのアフィニティー評価を行ってもらい、二人の助け無しには研究を進めることはできなかったと思います。丹羽君に先輩として研究の技術、知識面について良い指導ができなかったことを申し訳なく思っています。ダメな先輩に黙ってついて来てくれた三人にこの場を借りてお詫びとお礼を言いたいと思います。ごめん、そして、ありがとう。

M1の大友さん、加藤君、熊澤君、佐々木君、東君、堀井君、4年の阿部君、神谷君、葛本君、境君、塚本さん、田野さん、中村君、原君、皆のお陰で充実した研究室生活を送れました。本当に後輩達に恵まれたと感じています。ありがとう。

私たちの研究室生活をお世話して頂いた村上さん、村上さんに話し掛けて頂けると、うれしく、なんだか、ほっとした気持ちになりました。ありがとうございました。

また、影で研究室生活を快適に下さった清掃員の方に感謝申し上げます。

最後になりましたが同期の石田君、石原さん、篠原さん、永田さん、羽多野さん、前田さん、山崎君には公私共に仲良くさせて頂き、深く感謝しています。皆に出会えて本当に良かったと思っています。これからも末永くよろしくお願いします。

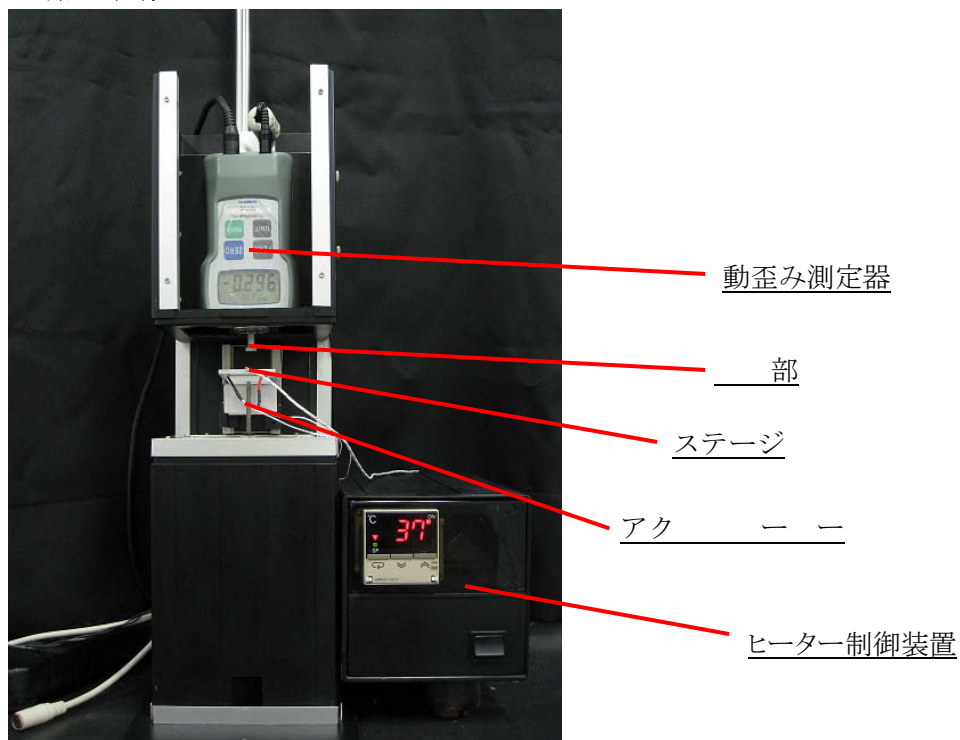
生体材料化学研究室で過ごした三年間は今後、大きく意味を成すと感じております。生体材料化学研究室という誇りを胸に、これからも日々精進してまいります。

## 付録

### エチレンジアミン二塩酸塩作製方法

- ①100ml マイヤーにエチレンジアミンを約 15g 入れ、氷浴中で攪拌する。
- ②マイヤー中に濃塩酸を約 32ml 少しずつ滴下し、反応させる。
- ③溶液は発熱し黄色に着色(塩は白色)して中性になるので、そこで滴下をやめる。
- ④減圧ろ過し、減圧乾燥させる。

### 圧縮試験機



- (1) ヒーターを 37°C になるように設定する。
- (2) 動歪み測定器の POWER を押す。
- (4) Excel:ZaberExcelVBstretchmodulus3 を起動する。
- (5) [Open Com Port and Renumber]をクリックする。
- (6) 全アナログ変換測定器を起動する。
- (7) 第1チャンネルにチェックを入れて、空欄に次のように入力した後、[設定]→[はい]をクリックする。

計測器の名称[FG]／信号の種類[±1V]／計測値の名称[F]

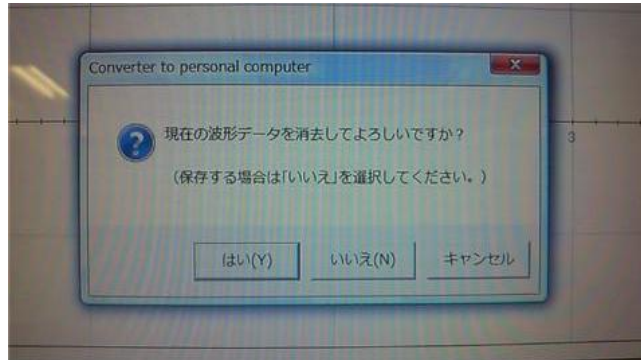
計測信号の範囲 min[-1]／max[1]／信号の単位[V]

計測値の範囲 min[-1982.6]/max[-1982.6]/計測値の工業単位[mN]

小数部桁数[1 桁]/サンプリング時間[0.1 秒]

- (8) 右下の[スタート]を押し、③で設定した値が読み取られているか、測定値側のアームを軽く押したときにグラフが変化するかを確認した後、[ストップ]を押す。

- (9) もう一度スタートを押し、下図のウィンドウを出す。



- (10) サンプルの自然長(厚み)を測定した後、ステージに載せ、検出部にサンプルが触れるまでステージを上昇させる。

- (11) Zaberへの[Execute Command Sheet]をクリックする。

- (12) [OK]を2度クリックする。

- (13) (9)で出した全アナログへの[はい]をクリックし、グラフの目盛が表示されるのと同じに、Zaberへの[OK]を再度クリックし、測定を開始する。(全アナログへのウィンドウをずらして[OK]の近くに配置しておくとうり易い)

- (14) サンプルが破断するまで測定を続ける。

- (15) サンプルが破断したら、ESC を押し、アクチュエーターを停止させる。

- (16) 全アナログへの[ストップ]を押した後、[ファイル]→[ファイル出力]を選択し、Excel:data に保存する。

- (17) Excel:data を起動し、B 列の数値データを全てコピーする

- (18) Excel:応力歪み曲線を起動し Sheet2 の A 列に(17)でコピーした数値データを[形式を選択して貼り付け]→[リンク貼り付け]で貼り付ける。

- (19) 出力された D 列・E 列をコピーし、Sheet1 の  $\Delta l$ (mm)、F(mN)の欄に張り付ける。

- (20) (10)で測定した自然長  $l$  の値を Sheet1 の指定のセルに入力する。

- (21) 得られた近似曲線の傾きを弾性率(Pa)として記録する。

- (22) サンプルを交換して測定する場合は測定済みのサンプルを取り外し、

(10)～(21)の工程を繰り返す。

\* 破断点を測定する場合は、(1)~(3)は同様の操作である。操作(4)で破断測定 Excel:ZaberExcelVBstretchmodulus3 を起動させる。(5)~(16)までは同様の操作である。

(17)Excel:data を起動し、B 列の数値データのマイナスになる数字の 1 つ前の数値から全てコピーする。

(18)Excel:破断点測定テンプレートを起動し、sheet1 の B 列に(17)でコピーした数値データを貼り付ける。

(19)(10)で測定した自然長を指定のセルに入力する。

(20)グラフの波形の変化から破断点を読み取る。

## **b-FGF ELIZA**

### **【試薬・器具】**

96 穴プレート (住友ベークライト)

希釈緩衝溶液(PBS+0.1%BSA)

コーティングバッファー(PBS NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O、NaCl)

ブロッキングバッファー(PBS+0.5%BSA)

ウォッシュバッファー(PBS+0.05%Tween20)

発色基質溶液

b-FGF

ビオチン化 b-FGF 抗体 (R&D system)

HRP 標識ストレプトアビジン (Streptavidin-HRP 200×) (R&D system)

過酸化水素 30% (三菱)

OPD タブレット (Wako)

発色停止試薬(1N 硫酸) (Wako)

振とう器 (SANKO JUNYAKU)

8 連ピペット (Labsystems)

バキュームポンプ (ULVAC)

プレートシール ((株)ハイテック)

アルミホイル (三菱アルミニウム(株))

マイクロプレートリーダー (BIO-RAD model 550)

## 【手順】

### ◎抗体プレート作製法

- ①bFGF 抗体( $2.0 \mu\text{g/ml}$ )を 12ml コーティングバッファーで調製する。
- ②①を 96 穴プレートに  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ、プレートシールをして 2 日間冷蔵する。
- ③2 日後ウォッシュバッファーで 3 回ずつ洗浄し、ブロッキングバッファーを  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ、1 日間冷蔵する。
- ④1 日後ウォッシュバッファーで 3 回ずつ洗浄する。保存する場合、乾燥させ、シリカゲル 1 袋と一緒に袋に入れ-80℃で凍結保存。

### ◎測定方法

- ①b-FGF ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) 溶液を希釈緩衝溶液で希釈していき、スタンダードを調製する。  
濃度は 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、0pg/ml。スタンダード溶液を所定の穴に入れる。サンプル溶液を所定の場所に入れる。
- ②プレートシールを貼り室温で 2 時間振とうさせる。
- ③プレート洗浄器を用い、ウォッシュバッファーで 4 回洗浄し、穴の水分を切る。
- ④ビオチン化 b-FGF 抗体を調整する。濃度は  $1 \mu\text{g/ml}$ 。各穴に  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ、プレートシールを貼り室温で 30 分間振とうさせる。
- ⑤プレート洗浄器を用い、ウォッシュバッファーで 4 回洗浄し、穴の水分を切る。
- ⑥HRP 標識ストレプトアビジンを希釈緩衝溶液で 200 倍希釈し、HRP 溶液を調製する。
- ⑦HRP 溶液を  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ、プレートシールを貼り室温で 30 分間振とうさせる。
- ⑧プレート洗浄器を用い、ウォッシュバッファーで 4 回洗浄し、穴の水分を切る。
- ⑨発色基質溶液 12ml に過酸化水素  $5 \mu\text{l}$ 、OPD タブレット 1 錠を加え、発色溶液を調製する。
- ⑩発色溶液を  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ、暗い場所(引き出し)で 30 分間静置させる。
- ⑪発色停止試薬(1N 硫酸)を  $100 \mu\text{l}$  ずつ入れ、マイクロプレートリーダーで 490nm の吸光度を測定する。

	スタンダード		GS-CMG		CMG	
	1	2	3	4	5	6
A	200	→	10min	→	10min	→
B	100		15		15	
C	50		30		30	
D	25		60		60	
E	12.5		120		120	
F	6.25		180		180	
G	3.125		360		360	
H	0		720		720	