

平成 23 年度 修士論文

組織修復を目的とした薬物徐放調節型
硫酸化ジェランゲルの開発

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

山本 光則

目次

1. 緒言

1-1 創傷治癒と軟骨再生.....	2
1-1-1 創傷治癒と軟骨再生の流れ	
1-2 グリコサミノグリカンとサイトカイン.....	4
1-2-1 グリコサミノグリカンに関して	
1-2-2 サイトカインに関して	
1-2-3 塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)	
1-2-4 消炎鎮痛剤に関して	
1-3 Drug Delivery System~DDS~.....	11
1-3-1 薬物徐放(DDS)	
1-3-2 薬物徐放シミュレーション	
1-4 ジェラン.....	14
1-4-1 ネイティブ型ジェラン	
1-4-2 硫酸化ジェラン	
1-4-3 カルボキシメチル化ジェラン	
1-5 本研究の目的.....	16
1-5-1 研究目的	
1-5-2 実験項目	

2. 実験

2-1 ネイティブ型ジェランの硫酸化.....	18
2-1-1 硫酸化ジェランの調製	
2-2 ジェランの親和性評価.....	20
2-2-1 硫酸化ジェランと bFGF 吸着実験	
2-2-2 カルボキシメチルジェランとトリメシン酸吸着実験	

2-3CMG-GS ハイドロゲルの作製と評価	22
2-3-1 ハイドロゲルの作製	
2-3-2 ハイドロゲルの洗浄	
2-3-3 硫酸化ジェラン固定化量測定	
2-3-4 硫酸化ジェラン最大固定化量測定	
2-3-5bFGF 吸着実験	
2-4 薬物徐放シミュレーション	27
2-4-1 徐放シミュレーション	
2-5CMG-GS ハイドロゲルからの徐放	29
2-5-1CMG-GS ハイドロゲルからの bFGF 徐放実験	
2-5-2CMG-GS ハイドロゲルからのトリメシン酸徐放実験	
 3. 結果	
3-1 ネイティブ型ジェランの硫酸化実験	33
3-1-1 硫酸化ジェランの調製結果	
3-2 ジェランの親和性評価	34
3-2-1 硫酸化ジェランと bFGF 吸着実験結果	
3-2-2 カルボキシメチルジェランとトリメシン酸吸着実験結果	
3-3CMG-GS ハイドロゲルの作製と評価	37
3-3-1 ハイドロゲルの作製結果	
3-3-2 ハイドロゲルの洗浄結果	
3-3-3 硫酸化ジェラン固定化量測定結果	
3-3-4 硫酸化ジェラン最大固定化量測定結果	
3-3-5bFGF 吸着実験結果	
3-4 薬物徐放シミュレーション	48
3-4-1 徐放シミュレーション結果	
3-5CMG-GS ハイドロゲルからの徐放	50
3-5-1CMG-GS ハイドロゲルからの bFGF 徐放実験	
3-5-2CMG-GS ハイドロゲルからのトリメシン酸徐放実験	

4. 考察.....	54
5. 結論.....	66
6. 参考文献.....	67
7. 謝辞.....	69
8. 付録.....	70

1.緒言

1-1 創傷治癒と軟骨再生

体の傷害の種類には、創傷と軟骨損傷が挙げられる。

創傷とは組織が互いに分断され、あるいは破壊された状態を示す。創傷は体の様々な個所で起こり得るが皮膚に最も発生しやすい。創傷付近には沢山の血管があり、豊富な栄養や成長因子を受け、自然治癒力によって創傷を塞ぎ障害組織を早く回復させようとする。しかしながら、過度な損傷を受け、自然治癒が追い付かない場合は身体の維持に支障を来す事がある。

軟骨損傷は、外部から強い力を受けて損傷を受ける場合と、加齢により軟骨が摩耗したり、変形したりする事による損傷が考えられる。しかし、軟骨損傷の場合、創傷治癒とは異なり、損傷付近の血管が乏しく、栄養や成長因子の欠乏の為、再生過程はほとんど起こらない。¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

1-1-1 創傷治癒と軟骨再生の流れ

組織が創傷を受けた場合、創部は速やかに血流によって満たされ、凝固因子やカルシウムの働きによりフィブリノーゲンがフィブリンへと変化する。これにより血液が凝固して一時的に創傷部を閉鎖する。この凝固により出血や、体外からの細菌や創の乾燥を防ぐ。続いて、細菌や組織の破壊により生じた細胞片を分解する為に、好中球やマクロファージ等により貪食を行い、分解酵素を出し創の洗浄を行う。最後に細胞やマクロファージ等が産出する成長因子(bFGF,TGF- β 等)により細胞の増殖が起こり、血管新生や細胞外基質(プロテオグリカン、コラーゲン等)の産生が起こり、創傷が治癒される。

以上のように、創傷治癒は①出血・凝固期②炎症期③増殖・合成期の過程が生じ、また互いにオーバーラップしながら創傷治癒は行われる。¹⁾

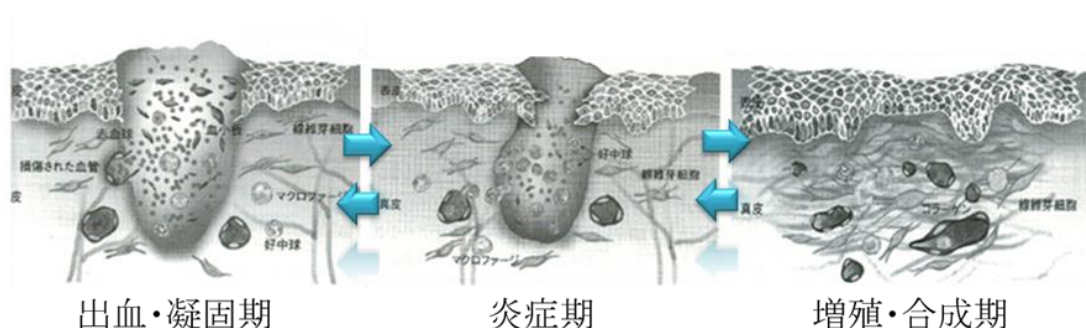


Fig.1-1-1 創傷治癒の流れ ¹⁾

軟骨が損傷した場合、周辺に血管が無く、創傷治癒のような治癒メカニズムは正常に働かない。少なからず、正常軟骨細胞に隣接している損傷の一部では軟骨が再生するという報告はあるが²⁾、軟骨損傷の治癒は自然には起こらない。

現在、損傷部位の周辺を故意に傷つけ出血させて成長因子(bFGF,TGF- β 等)を誘導する方法や、他の軟骨の一部を埋め込む等の治療方法が行われている。

しかし近年、新規的な軟骨再生治療方法として、軟骨細胞及び、細胞足場、成長因子を混合した材料を軟骨組織の代替物として体内に入れ、軟骨再生を促す方法が注目されている。²⁾



Fig.1-1-2 軟骨再生治療方法⁵⁾

上記に創傷治癒と軟骨再生に関して記したが、体が傷つくと体内では主に成長因子(サイトカイン)と呼ばれるタンパク質が作用する事により治癒を促していく。創傷では付近の細胞や血管から成長因子が誘導されてくるが、軟骨損傷では成長因子の誘導が困難であり治癒が行われない。

そこで治癒にはこの成長因子(サイトカイン)が重要であると考え、またこの成長因子の作用を促すと報告されているグリコサミノグリカンも治癒に重要な存在であると考えた。⁶⁾また、過度な炎症や痛みを抑制する消炎鎮痛剤も治癒に必要であると考えた。

本研究では創傷治癒、軟骨再生において成長因子(サイトカイン)及び、炎症を抑制する消炎鎮痛剤の二つに注目した。

1-2 グリコサミノグリカンとサイトカイン

1-2-1 グリコサミノグリカンに関して

グリコサミノグリカン(Glycosaminoglycan: GAG)とはウロン酸(グルクロン酸: GlcUA, イズロン酸: IdoA、又はガラクトース: Gal)とアミノ糖(N-アセチルグルコサミン: GlcNAc、N-アセチルガラクトサミン: GalNAc など)との二糖繰り返し構造を持った酸性ムコ多糖である。コアタンパク質に側鎖として結合しており、プロテオグリカン(Proteoglycan)として、生体内では結合組織を中心に様々な組織に普遍的に存在している。

GAG に結合している硫酸基が負に帯電する事で、種々のタンパク質と静電気的な力で親和性を持つ事が出来る。GAG の多くは、細胞増殖因子(サイトカイン: Cytokine)との相互作用により細胞の増殖・分化に働きかけ、創傷治癒に寄与すると報告されている。⁷⁾

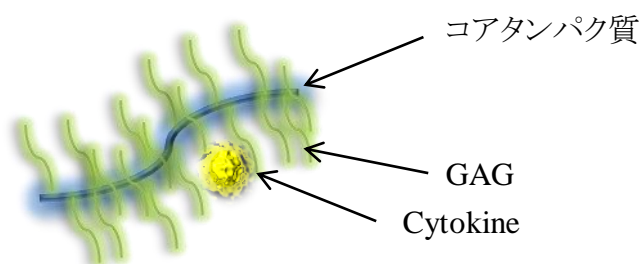


Fig.1-2-1 グリコサミノグリカン図

Table.1-2-1 主な GAG の種類と構造、分布

GAG	基本構造	分布
デルマタン硫酸	IdoA β 1-3GalNAc	皮膚・動脈・腱
コンドロイチン硫酸	GluUA β 1-3GalNAc	骨・軟骨
ヒアルロン酸	GlcUA β 1-3GlcNAc	関節液・硝子体
ヘパリン	IdoA α 1-4GalNAc	小腸・筋肉・肝臓
ヘパラン硫酸	GlcUA α 1-4GalNAc	細胞表面・基底膜

以下に、GAG の構造式を示す。⁷⁾

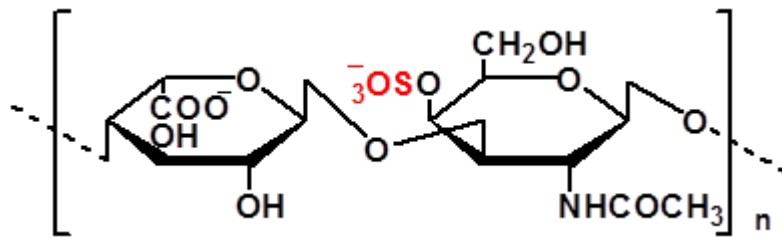


Fig.1-2-2 デルマタン硫酸の構造

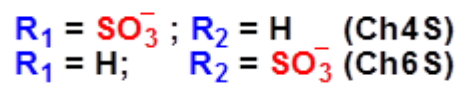
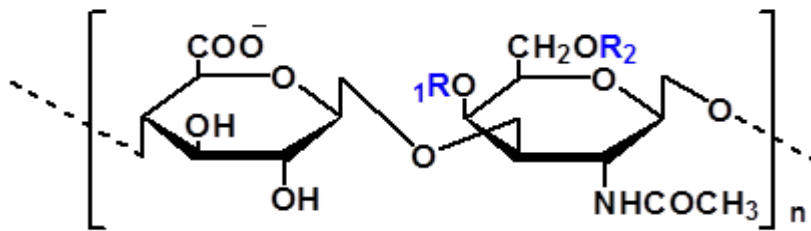


Fig.1-2-3 コンドロイチン硫酸の構造

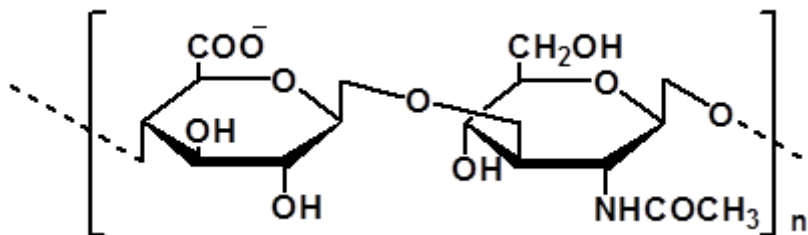


Fig.1-2-4 ヒアルロン酸の構造

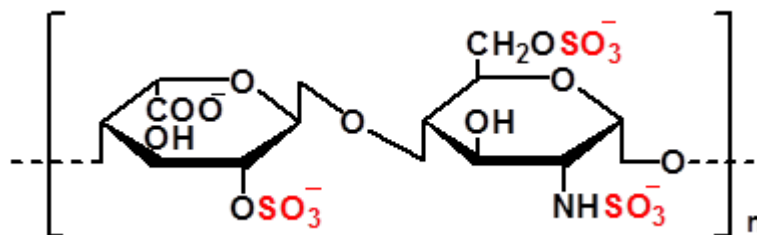


Fig.1-2-5 ヘパリンの構造

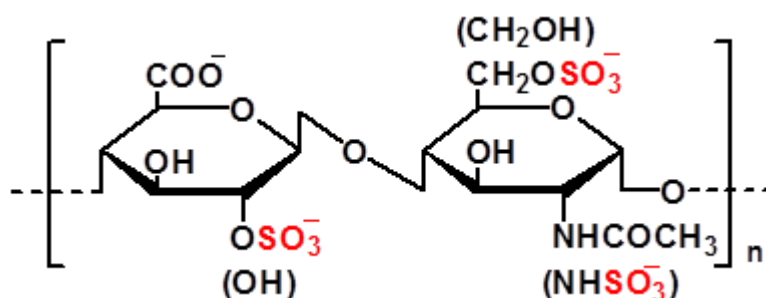


Fig.1-2-6 ヘパラン硫酸の構造

GAG は硫酸基を有しており、またその硫酸化パターンは様々である。生体内ではこの負に帯電している硫酸基といくつかのサイトカインとが親和性を持ち、自然治癒に働いている。また、この GAG の硫酸化パターンによりサイトカインとの親和性が変化しているという報告もある。例としてヘパリンを挙げるが、ヘパリンは 2 位と 6 位の位置に硫酸基を有しており bFGF と親和性を持ち、細胞増殖や基質産生に大きく関わっている。

ヘパリンはサイトカインとの親和性を持つ他に、抗凝固作用を有している。体外循環器を使用する際に使用されるが、副作用としてヘパリン起因性血小板減少症や血栓症等が生じる場合がある。

本研究では、副作用が報告されておらず、任意で硫酸基の導入数を変化させる事が可能であり、サイトカインとの親和性を調整出来る素材を考え、微生物由来の天然多糖であるジェランを選択した。

1-2-2 サイトカインに関して

サイトカイン(cytokine)⁸⁾とは、細胞から分泌されるタンパク質の中で、特定の細胞に情報伝達を促すものを指す。生体内には多くの種類が存在するが、特に炎症、免疫に関係するものが多く存在する。生理活性としては pg~ng/ ml 程で作用する。またサイトカインは多機能であり、創傷治癒、血管新生、骨修復、脳神経系の保護・再生、各臓器の再生や線維化の改善など様々な組織の修復・再生において重要な役割を持っている。サイトカインは生体が持っている自然治癒力を支える実行分子であり、薬物では無く、サイトカインを使用する事で生体が持っている自然治癒力を高めより効率的な治療が行えると考えられている。

また、近年では生体組織の再生誘導をより効率的に発揮させる為に DDS(Drug Delivery System)技術が研究されている。

以下に主なサイトカインとその作用を示す。⁹⁾

Table.1-2-2 サイトカインの種類

Cytokine	分子量	主な作用	主な産生場所
bFGF	17.2kDa	細胞増殖・血管新生	線維芽細胞・上皮細胞等
TGF-β1	25.0kDa	細胞増殖抑制・基質産生	血小板・マクロファージ
PDGF-AA	28.9kDa	細胞増殖・血管新生	血小板・上皮細胞等
VEGF-165	38.2kDa	血管新生	マクロファージ・平滑筋細胞

1-2-3 塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)

bFGF¹⁰⁾は線維芽細胞増殖因子として発見されたが、その後の研究において血管内皮細胞や軟骨細胞など他の様々な細胞に対して生理活性作用がある事が報告されている。bFGF は 23 種類の FGF ファミリーの一つとして位置付けられている。アミノ酸 146 個から構成されており、分子量約 17.2kDa の一本鎖のポリペプチドである。

bFGF を構成しているアミノ酸の約 18% がリシン、アルギニン、ヒスチジンという塩基性アミノ酸であり、アスパラギン酸やグルタミン酸の酸性アミノ酸は約 8% である。この塩基性アミノ酸と酸性アミノ酸の差が bFGF の等電点(約 10)に反映されている。この為 bFGF は強い塩基性の性質を有する為にヘパリンやヘパラン硫酸などが有している負に帯電している硫酸基を介して結合する事が可能である。

Table.1-2-3bFGF アミノ酸配列

MPALPEDGGS	GAFPFGHF KD	P KRL YCK NGG	FFL R IHPD G R
VDGV RE KSDP	HI K LQLQAE E	R GVVSI K GVC	AN R YLAM K ED
G R LLAS K CVT	DE C FFFE R LE	SN N YNT YRSR	K YTSW Y VAL K
R TGQ YK LG S K	TGPGQ K AILF	LPMSA K S	

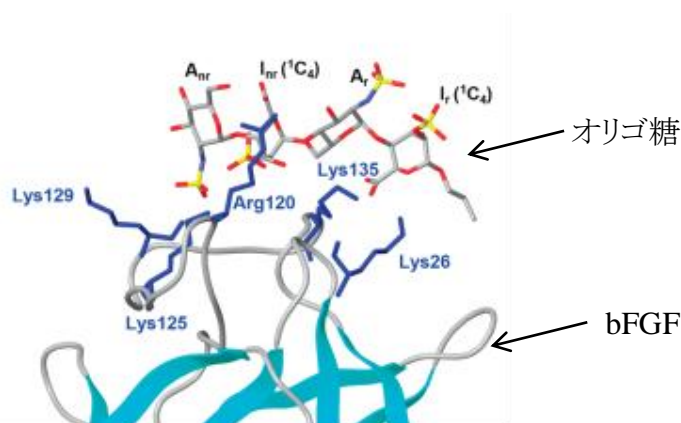


Fig.1-2-7 オリゴ糖と bFGF の相互作用図¹⁰⁾

bFGF はアミノ酸から構成されているタンパク質であるので生体内で分解されやすい。しかし、GAG に硫酸基を介して結合する事により酵素や加水分解から保護される事が報告されている。また GAG に結合する事により細胞への生理活性が増加するという報告がある。⁶⁾

以前の研究において、bFGF を静脈内投与するという研究が行われていたが、その際に過度な bFGF 量の為に肝臓及び腎臓への沈着が生じ、さらに目的部位以外に存在する癌細胞の増殖を促す事から bFGF の直接投与は極力避けるべきと考えられている。

以上の理由により、本研究では bFGF の分解保護、生理活性促進、直接投与による副作用などの理由から薬物保持担体を用いた bFGF 投与方法が必要であると考えた。

また本研究では、bFGF の多岐に及ぶ生理活性効果に注目した。以下に bFGF 有効濃度に関しての研究と、現在行われている bFGF の研究に関して述べる。創傷治癒、軟骨再生には bFGF の投与方法を先んじて考える事は今後のサイトカインを用いた治療方法に大きく影響すると考える。

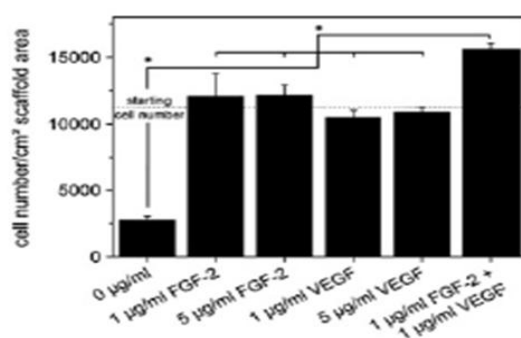


Fig.1-2-8bFGF 添加による HUVEC 細胞の増殖¹¹⁾

以前の研究¹¹⁾において、HUVEC に対する bFGF 有効濃度の報告から、HUVEC に対しては bFGF 濃度 1~5 µg/ml で細胞活性が上昇しているのです、この範囲での bFGF が有効範囲だと考えられる。¹¹⁾

Table.1-2-4bFGF を用いた研究内容とその効果

研究内容	注目されているbFGF効果
血管新生	血管新生作用
半月板の再生	軟骨細胞の増殖
創傷治癒	皮膚構成細胞の増殖
脳動脈瘤の治療	コラーゲン I の産生促進
歯周組織再生	ヒアルロン酸の産生促進

上記に示したように bFGF の生理活性作用は多岐に渡り、今後も様々な治療に用いられると考えられる。

そこで本研究では、様々な治療に利用可能な bFGF に着目し、薬物担体を用いた bFGF 徐放方法に注目した。

1-2-4 消炎鎮痛剤に関して

消炎鎮痛剤とは、創傷を受けた際に生じる痛みや炎症を和らげる薬物で、非ステロイド性抗炎症剤と呼ばれて使用されている。消炎鎮痛剤として、アスピリンやジクロフェナクが使用されている。

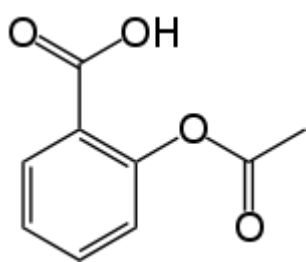


Fig.1-2-9 アスピリン¹²⁾

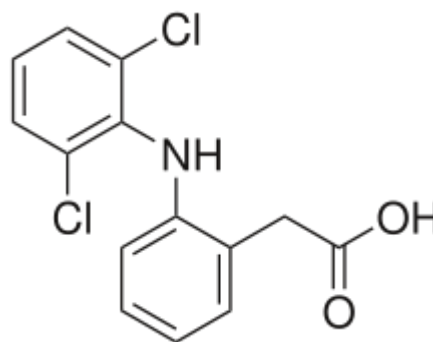


Fig.1-2-10 ジクロフェナク¹³⁾

これらの薬物には共通してカルボキシ基を持つという特徴がある。またカルボキシ基は Ca^{2+} 存在下でキレート結合をする。キレート結合とは Ca^{2+} を介してカルボキシ基同士が結合をする結合である。

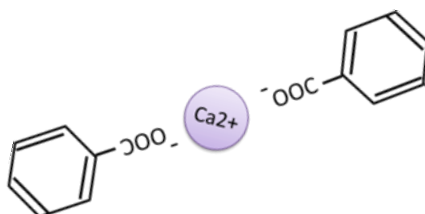


Fig.1-2-11 キレート結合図

本研究では、キレート結合を応用して消炎鎮痛剤の徐放を考えた。また、本研究では、カルボキシ基を持つ薬物モデルとして、カルボキシ基を持つトリメシン酸を用いてキレート結合を利用した消炎鎮痛剤の徐放が可能であるか検討した。

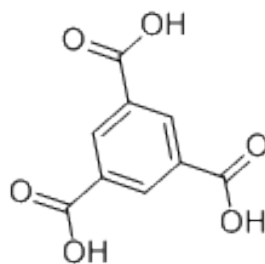


Fig.1-2-12 トリメシン酸¹⁴⁾

1-3Drug Delivery System~DDS~

1-3-1 薬物徐放(DDS)

現在、有機合成や遺伝子組み換えによって様々な薬が生み出されている。その薬が効果を示すには口から服用されたり、注射されたりする薬の分子が体内のある特定の細胞に到達し、細胞に刺激を与える為である。しかし実際は投与された薬の一部しか作用出来ず、ほとんどはそのまま排出されたり、時には正常細胞に対して副作用をもたらしたりする場合がある。以下に薬物投与回数と生体内薬物濃度に関する図を掲載する。

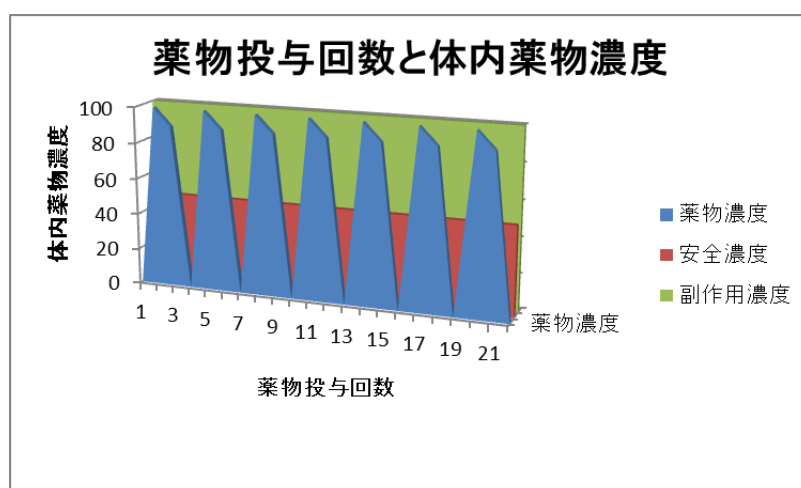


Fig.1-3-1 通常の薬物投与回数と生体内薬物濃度の関係

口からの服用や注射による投与では治療に有効な濃度を維持する為に何度も薬の投与を行わなければならない。また一度の投与で副作用が生じる濃度を投与する場合もある。その為、一度の薬物投与で、副作用が生じない濃度であり有効薬物濃度を長期間維持可能な薬物投与方法が必要であると考えられている。⁵⁾

以上より、理想的な薬の投与方法は、薬を必要な細胞にのみ、必要な量だけ、必要な時にのみ送り込む事である。そこで近年考えられている新しい薬物投与方法として Drug Delivery System(DDS)という技術が考えられている。この DDS には以下の4つの目的が挙げられる。

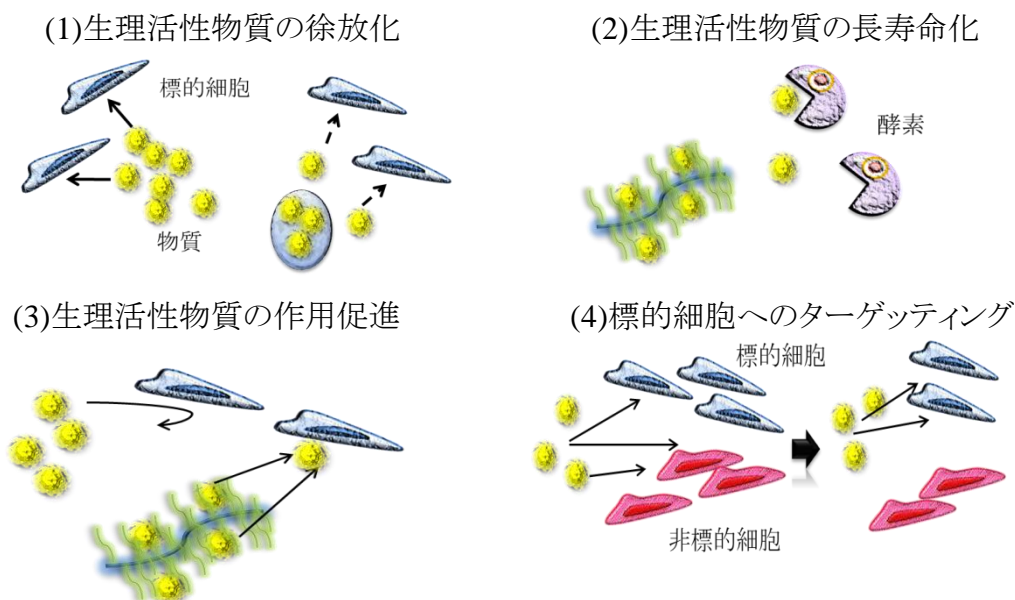


Fig.1-3-2 Drug Delivery System の目的

本研究では、薬物保持担体の使用を考え薬物保持担体と薬との結合力(親和性)を利用し、濃度平衡の考えを用いた薬物徐放方法を考えた。また硫酸化多糖に結合した薬物は生体内での酵素分解や加水分解から保護され、細胞への作用が促進されるという報告から硫酸化多糖を用いた DDS に注目した。標的細胞へのターゲッティングは目的治療部位へ薬物を保持した硫酸化多糖を直接導入する事で可能であると考えている。

1-3-2 薬物徐放シミュレーション

DDS を考える上で重要である事は、保持させた薬物がどのように、どれだけの期間の間徐放されて行くのかという情報である。薬物徐放挙動が予め予測する事が可能であれば様々な条件の創傷や軟骨損傷に対して、最も有効な薬物量と期間を調整しての薬物投与治療が可能となる。以下に創傷治癒の過程とその期間の関係を示した図を示す。

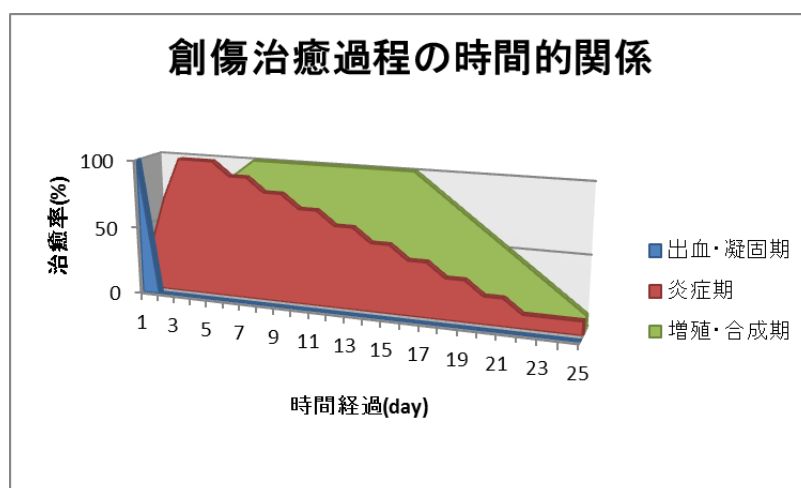


Fig.1-3-3 創傷治癒過程と時間的關係

上記に示した様に、生体が創傷を受けると出血・凝固作用が 24h 以内に完了し、炎症作用も直ちに始まり 3~5 日で最も活発に生じる。細胞増殖や基質合成はわずか 12h 後には始まり、6~16 日後に最も活発になる。

DDS は例で挙げた創傷治癒の過程に合わせた薬物徐放を行う事で、効率的な治療が可能になると思われる。

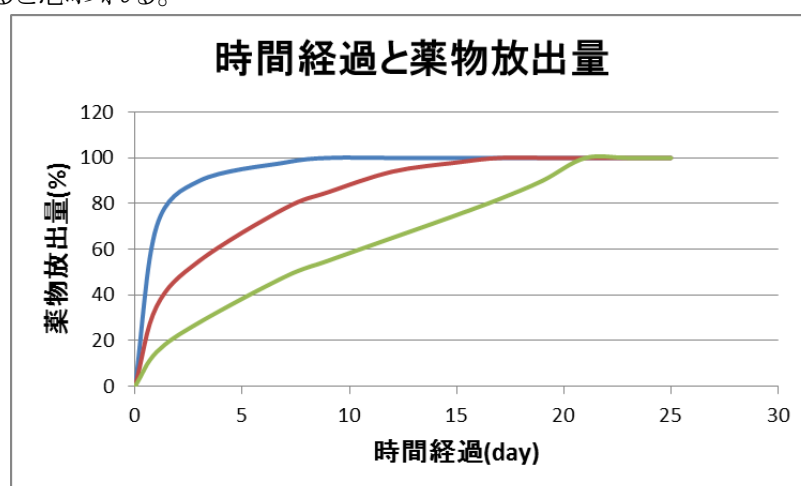


Fig.1-3-4 効率的な薬物放出シミュレーション

以上のように、治癒の段階に合わせた段階的な薬物徐放が可能になれば、より効率的な薬物治療が行えると考えられる。

1-4 ジェラン

本研究において、薬物徐放担体としてジェランという多糖に注目した。ジェランは *Spingomonas elodea* という微生物が菌体外に産出する天然多糖であり、食品へ増粘安定剤(増粘、ゲル化、安定)として使用されている。ジェランは、グルコース、グルクロン酸、グルコース、ラムノースの四糖の繰り返し構造から構成されている。¹⁵⁾

また、以前の研究で抗血栓作用を有しており、生体適合性が優れていると報告されている。

本研究では、ジェランを化学修飾した硫酸化ジェラン(GS)及び、カルボキシルメチルジェラン(CMG)を用いて実験を行った。

1-5-1 ネイティブ型ジェラン

ネイティブ型ジェラン(NG)は、直鎖状のヘテロ多糖類であり、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糖の繰り返し構造からなり、グルコースの C-2 がグリセリル基で、C-6 が¹/₂の割合でアセチル基により修飾された構造を有している。NG は 60℃以下で白い餅状のゲルを形成する。

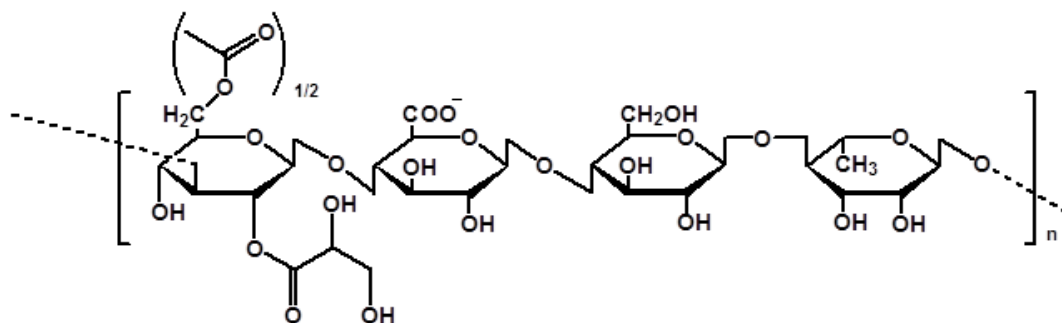


Fig.1-4-1 ネイティブ型ジェランの構造



1-5-2 硫酸化ジェラン

硫酸化ジェラン(GS)は、ジェランの遊離な水酸基に対して、DMF-SO₃ 錯体を反応させる事で硫酸基を導入したジェランである。ヘパリンやヘパラン硫酸が負電荷を帯びている硫酸基により様々なタンパク質との親和性を有する事が出来るという報告から、GS も同様に様々なタンパク質との親和性を有する事が出来ると考えられる。⁷⁾¹⁷⁾

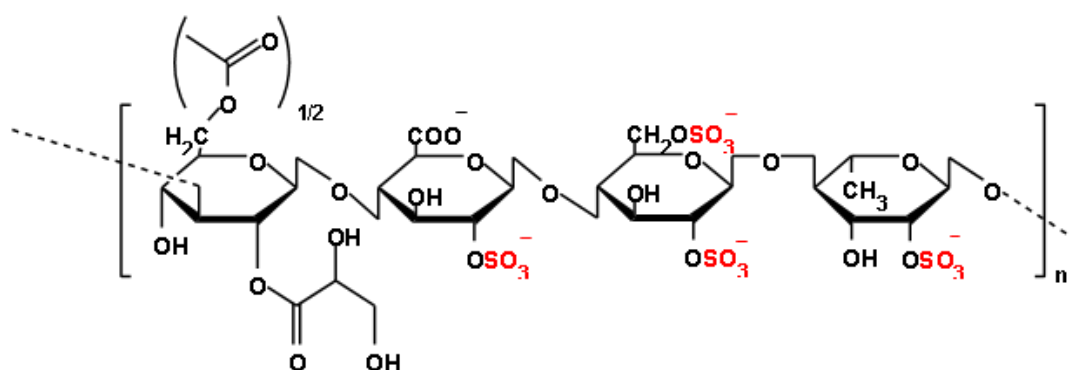


Fig.1-4-2 硫酸化ジェランの構造

1-5-3 カルボキシメチル化ジェラン

カルボキシメチルジェラン(CMG)は、ジェランを濃アルカリ中でクロロ酢酸と反応させる事で、ジェランの遊離な水酸基に対してカルボキシメチル基を導入したジェランである。CMG は NG とは異なり、温度条件によるゲル化は起きず、化学架橋によりゲル化する。CMG ゲルはカルボキシメチル基を有する為に溶解性が NG ゲルより向上し、強固なゲルを形成する。¹⁶⁾

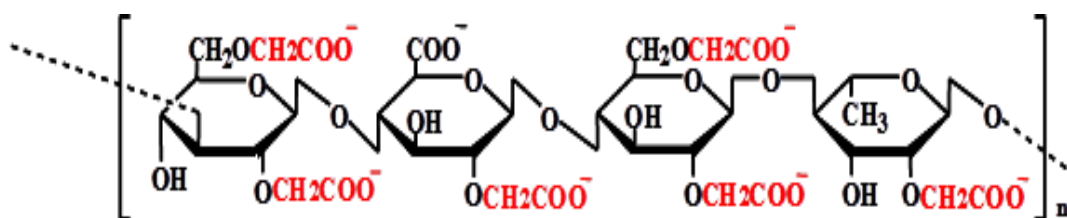


Fig.1-4-3 カルボキシメチルジェランの構造

1-5 本研究の目的

1-5-1 研究目的

先述したように、GAG は様々なサイトカインと親和性を有しており生体内において細胞への作用を促進する役割を果たしている。これは GAG に結合している硫酸基の働きにより生じる。

そこで、硫酸基を導入した多糖を用いる事で GAG 同様の働きが可能になると考え、硫酸化ジェランが薬物保持担体として利用出来ると考えた。

また硫酸化ジェランを用いて、創傷治癒や軟骨再生に必要な薬物を複数、治癒過程に合わせて段階的な薬物徐放が確立出来れば、効率的な治療が可能になると考えた。

本研究では、硫酸化ジェランゲルの薬物徐放担体としての応用を目指し、硫酸化ジェランゲルからの薬物徐放シミュレーションを行い、実際に薬物を段階的に徐放させる方法の確立を目的とした。

1-5-2 実験項目

1. 硫酸化ジェランの調製
 - ・硫酸化ジェランの調製
2. ジェランの親和力測定
 - ・硫酸化ジェランと bFGF との親和力測定
 - ・カルボキシメチルジェランとトリメシン酸との親和力測定
3. 硫酸化ジェランゲルの作製と評価
 - ・CMG-GS ハイドロゲルの作製
 - ・CMG-GS ハイドロゲルの GS 固定化率測定
 - ・CMG-GS ハイドロゲルへの bFGF, トリメシン酸吸着実験
4. 薬物徐放シミュレーション
 - ・CMG-GS ハイドロゲルからの bFGF, トリメシン酸徐放シミュレーション
5. 硫酸化ジェランゲルからの薬物徐放
 - ・CMG-GS ハイドロゲルからの bFGF, トリメシン酸徐放実験

2.実験

2-1 硫酸化ジェランの調製

本項目では、ネイティブ型ジェランに硫酸基を導入した硫酸化ジェラン(GS)の調製を行った。硫酸化反応はDMFを溶媒、硫酸化剤にはクロロスルホン酸を使用する事で、ネイティブ型ジェランの遊離な水酸基に対して硫酸化を行った。

【試薬】

- | | |
|---------------------------------------|-------------------|
| ・ Native type Gellan | (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社) |
| ・ <i>N,N</i> -Dimethyl formamide(DMF) | (和光純薬工業株式会社) |
| ・ Chlorosulfonic Acid | (和光純薬工業株式会社) |
| ・ Sodium hydroxide | (和光純薬工業株式会社) |
| ・ Aceton | (和光純薬株式会社) |

【使用器具】

- | | |
|--------------------------|------------------|
| ・ 300ml,1000ml セパラブルフラスコ | ・ ビーカー |
| ・ 恒温槽 | ・ 薬包紙 |
| ・ 攪拌機 | ・ 二方コック |
| ・ 攪拌棒 | ・ pH 試験紙 |
| ・ 攪拌し | ・ 2L マイヤー |
| ・ スターラー | ・ ガラスフィルター |
| ・ 窒素混入ゴム風船 | ・ エバポレーター |
| ・ ジムロート | ・ アスピレーター |
| ・ スタンド | ・ 脱イオン水 |
| ・ クランプ | ・ ロート |
| ・ クランプホルダー | ・ スパチュラ |
| ・ 塩化カルシウム管 | ・ 凍結乾燥機 |
| ・ 氷水 | ・ パラフィルム |
| ・ ピペット | ・ 透析チューブ(分子分画量 : |
| ・ ピペッター | 12000~14000) |

【実験方法】

- ① 蒸留した DMF(所定量)をセパラブルフラスコに入れ、0℃の恒温槽で 20min 攪拌する。セパラブルフラスコの片方には窒素混入したゴム風船を、他方には塩化カルシウム管を取り付けたジムロートをつけ窒素置換を行いつつ実験を進行した。
- ② 攪拌後、クロロスルホン酸(所定量)を DMF に滴下し、さらに 20min 攪拌した。これにより DMF-SO₃ 錯体を形成させた。
- ③ 攪拌後、フリー化ネイティブジェラン 1.0g を入れ 0℃で 20h 攪拌し膨張させた。
- ④攪拌後、恒温槽を所定の温度にして 20min 攪拌した。
- ⑤続いて、恒温槽を所定の温度にして 2h 攪拌した。
- ⑥攪拌後、恒温槽を 0℃にして 20min 攪拌した。
- ⑦攪拌後、2M NaOHaq を攪拌しながら滴下する事により反応溶液を中和した。
- ⑧pH 試験紙で中和の確認後、アセトン(1~1.5L)を攪拌しながら、反応溶液を滴下し、再沈殿化させ、沈殿物を濾過し、得られた沈殿物を脱イオン水で再溶解させた。
- ⑨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再溶解液を入れ、脱イオン水にて 3~4 日間透析を行った。
- ⑩透析終了後、透析液をガラスフィルターで濾過した。
- ⑪濾過後、濾液を凍結乾燥した。濾液が多い場合はエバポレーターを用いて 200~300ml 程度に濃縮し、同様に凍結乾燥を行った。

2-2 ジェランの親和性測定

2-2-1 硫酸化ジェランと bFGF 吸着実験

【試薬】

- FGF-2(b-FGF) (BioVision)
- Biotin-anti-FGF-basic-antibody (PTI)
- HRP-Streptavidin-anti-FGF-basic-antibody (R&D)
- H₂SO₄(1N) (Wako)
- 発色基質溶液
- PBS(0.9% NaCl)
- 希釈緩衝溶液(PBS+1% BSA)
- OPD タブレット
- H₂O₂

【器具】

- 硫酸化ジェラン固定化 96 穴アミノプレート
- プレート洗浄機
- プレートシール
- 振とう機
- マイクロプレートリーダー(490nm)
- 8 連ピペット
- 15ml 遠沈管
- チップ

【実験方法】

- ① b-FGF を希釈緩衝溶液で、任意の濃度に希釈する。
- ② 硫酸化ジェラン固定化 96 穴アミノプレートに希釈したスタンダード、試料を 100 μ l ずつ入れ、プレートシールを貼り 2h 振とう。
- ③ PBS で 4 回(15 秒静置)洗浄。
- ④ biotin 化 FGF 抗体を希釈緩衝溶液で(1 μ g/ml)に希釈し、100 μ l ずつ入れ、プレートシールを貼り 2h 振とう。
- ⑤ PBS で 4 回(15 秒静置)洗浄。
- ⑥ HRP 標識 Streptavidin(200 倍希釈)を 100 μ l ずつ入れ、プレートシールを貼り 30min 振とう。
- ⑦ 発色基質溶液 12ml に H₂O₂ 25 μ l, OPD タブレット 1 錠加え調整。
- ⑧ PBS で 4 回(15 秒静置)洗浄。
- ⑨ 発色溶液を 100 μ l ずつ入れ、暗室で 15~30min 静置。
- ⑩ 1N の H₂SO₄ を 100 μ l ずつ入れ、反応を止め、490nm で吸光度を測定

2-2-2 カルボキシメチルジェランとトリメシン酸吸着実験

【試薬】

- CMG(DS=4.49)
- トリメシン酸溶液(2mg/ml)*生理食塩水で溶解。
- CaCl₂ 溶液(2mg/ml)*生理食塩水で溶解。
- 生理食塩水(+0.9%NaCl)

【器具】

- UV-160A (SHIMADZU)
- 1.5ml アシストチューブ
- ピペットマン
- 遠心機
- プラスチックセル
- チップ

【実験方法】

- ① CMG10mg を 2ml の生理食塩水で溶解させる。
- ② 1.5ml アシストチューブに CMG 溶液を 200 μ l 入れる。
- ③ トリメシン酸溶液、CaCl₂ 溶液をそれぞれ 200 μ l ずつ入れる。
- ④ 別のアシストチューブにトリメシン酸溶液、CaCl₂ 溶液、生理食塩水 200 μ l ずつ入れる。
- ⑤ 別のアシストチューブに CMG 溶液 200 μ l に生理食塩水 400 μ l 入れる。
- ⑥ 試料を overnight 静置し、吸着させる。
- ⑦ 試料を遠心機にかける。
- ⑧ 上澄み溶液を 100 μ l 採取し、2.9ml の生理食塩水で希釈する。
- ⑨ 278nm の波長で吸光度を測定する。

2-3CMG-GS ハイドロゲルの作製と評価

カルボキシメチルジェラン(CMG)は化学架橋を行う事でハイドロゲルを形成する。今回、bFGF と親和性を持つ硫酸化ジェラン(GS)を導入する事で薬物保持担体として利用可能な CMG-GS ハイドロゲルを作成した。架橋方法はカルボジイミド法を使用し、カルボキシル基を反応させる事で CMG 及び GS の同時鎖固定化を行った。

2-3-1 ハイドロゲルの作製

【試薬】

- ・CMG (DS=4.49)
- ・GS (硫酸化度 36.1%)
- ・EDC:WSCD・HCl (ペプチド研究所)
- ・エチレンジアミン二塩酸塩
- ・脱イオン水

【器具】

- | | |
|---------------------|--------------------|
| ・15ml 遠沈管 (アズワン) | ・ピペットマン用チップ (理科研) |
| ・シリコン製鋳型 | ・ガラス棒 |
| ・35Φシャーレ (住友ベークライト) | ・遠心機 (HITACHI) |
| ・パラフィルム | ・インキュベーター (AS ONE) |
| ・ピペットマン (GILSON) | |

【手順】

- ① 15ml 遠沈管に CMG、エチレンジアミン二塩酸塩、GS(10mg)を量り取る。
- ② 別の遠沈管に EDC(所定量)を量り取る。
- ③ ①、②に脱イオン水(所定量)を加え攪拌し、溶解させる。
2500rpm で 2min 遠心機にかける。
- ④ EDC 溶液を CMG 溶液に添加し攪拌し、プレゲル溶液を調製する。
- ⑤ 直ちにシリコン製鋳型にプレゲル溶液 600 μ l を流し込む。
- ⑥ 35 Φ シャーレに鋳型ごと入れ、乾燥を防ぐためにパラフィルムを張り、インキュベーター内で 37℃、Overnight 静置する。
- ⑦ 凍結乾燥を行う。

2-3-2 ハイドロゲルの洗浄

2-2-2 で作成したハイドロゲルには未反応の架橋剤(エチレンジアミン塩酸塩)が残留していると思われる。未反応の架橋剤の影響で、生体内にハイドロゲルを入れる際に炎症が生じると思われ、吸着させる薬物が化学架橋される可能性もあると思われるので、本項目ではハイドロゲルの洗浄を行った。

【試薬】

- ・CMG ハイドロゲル
- ・CMG-GS ハイドロゲル
- ・ニンヒドリン溶液
- ・脱イオン水

【器具】

- | | |
|-----------|---------|
| ・15ml 遠沈管 | ・パスツール |
| ・ピペットマン | ・シリカゲル紙 |
| ・チップ | ・ドライヤー |
| ・振とう機 | |

【実験方法】

- ① 凍結乾燥し秤量した CMG、CMG-GS ハイドロゲルを 15ml 遠沈管に入れる。
- ② 脱イオン水 2ml 入れ、振とうさせながら 20min 洗浄を行った。
- ③ 20min 後に、上澄み溶液を回収し新しい脱イオン水 2ml 入れる。
- ④ 回収した上澄み溶液をシリカゲルに滴下し、ドライヤーで乾燥させる。
- ⑤ 乾燥した箇所にニンヒドリン溶液を滴下し、ドライヤーで温める。
- ⑥ 上記の実験をニンヒドリン反応が出なくなるまで行う。

2-3-2 硫酸化ジェラン固定化量測定

CMG-GS ハイドロゲルは、カルボジイミド法により CMG、GS のカルボキシ基と架橋剤のアミノ基が反応して架橋が起こりハイドロゲルを形成している。また以後の徐放実験に使用するハイドロゲルは未反応の架橋剤を除去する目的で 2-2-2 の項目にて洗浄を行っている。

本項目では、実際に作成した CMG-GS ハイドロゲルに GS がどれだけ固定化されており、以後の徐放実験に使用する洗浄した後のハイドロゲルに GS がどれ程保持されているのかを検討した。

【試薬】

- ・CMG-GS ハイドロゲル(S=36.1%)
- ・トルイジンブルー溶液(0.01%)
- ・脱イオン水

【器具】

- | | |
|-----------|---------------------|
| ・15ml 遠沈管 | ・振とう機 |
| ・ピペットマン | ・プラスチックセル |
| ・チップ | ・UV-160A (SHIMADZU) |

【実験方法】

- ① 凍結乾燥した CMG-GS ゲルを秤量した後に 15ml 遠沈管に入れ、2ml の脱イオン水を入れる。
- ② 振とうさせながら 20min 洗浄を行う。
- ③ 20min 毎に脱イオン水を採取し、新しい脱イオン水 2ml を入れる。
- ④ ②、③の過程を計 8 回行う。
- ⑤ 採取した上澄み溶液は 10 倍希釈を行う。(そのまま使用するとトルイジンブルーとの反応で沈殿が生じ結果に影響するので、希薄溶液に調製し使用する)
- ⑥ 希釈した上澄み溶液 3ml、トルイジンブルー溶液 600 μ l(上澄み:TB=5:1)入れ、測定用セルに 3ml 入れる。
- ⑦ 吸光度測定機で 520nm,630nm の波長を測定する。
- ⑧ 得られた吸光度と検量線を比較し GS 放出量(固定化量)を測定する。

2-3-3 硫酸化ジェラン最大固定化量測定

CMG-GS ハイドロゲル内に残留している架橋剤を洗浄する為に 2-2-2 で洗浄を行い、徐放実験に用いるハイドロゲルの GS 固定化量を調査した。本項目では、架橋剤の反応量を変える事で、CMG-GS ハイドロゲルに GS が最大でどれだけ固定化されているのか検討した。

【試薬】

- ・CMG-GS ハイドロゲル(S=36.1%)
- ・トルイジンブルー溶液(0.01%)
- ・脱イオン水

【器具】

- | | |
|-----------|---------------------|
| ・50ml 遠沈管 | ・振とう機 |
| ・ピペットマン | ・プラスチックセル |
| ・チップ | ・UV-160A (SHIMADZU) |

【実験方法】

- ① 凍結乾燥した CMG-GS ゲルを秤量した後に 50ml 遠沈管に入れ、50ml の脱イオン水を入れる。
- ② 振とうさせながら 1h 洗浄を行う。
- ③ 1h 毎に脱イオン水を採取し、新しい脱イオン水 50ml を入れる。
- ④ ②、③の過程を所定回数繰り返す。
- ⑤ 上澄み溶液 3ml、トルイジンブルー溶液 600 μ l(上澄み:TB=5:1)入れ、測定用セルに 3ml 入れる。
- ⑥ 吸光度測定機で 520nm,630nm の波長を測定する。
- ⑦ 得られた吸光度と検量線を比較し GS 放出量(固定化量)を測定する。

2-3-4bFGF 吸着実験

未反応の架橋剤を洗浄した CMG-GS ハイドロゲルに bFGF が何時間で吸着出来るのか検討した。

【試薬】

- CMG-GS ハイドロゲル(S=36.1%)
- bFGF(BioVison)
- Biotin-anti-FGF-basic-antibody(BLD)
- HRP-Streptavidin-anti-FGF-basic-antibody(R&D)
- H₂SO₄(1N)(Wako)
- 発色基質溶液
- PBS(0.9% NaCl)
- 希釈緩衝溶液(PBS+1% BSA)
- OPD タブレット
- H₂O₂

【器具】

- 96 穴 ELISA プレート(3%スキムミルクにてブロッキング済み)
- Anti-bFGF-antibody 固定化 96 穴 ELISA プレート
- 振とう機
- プレートシール
- 8 連ピペット
- マイクロプレートリーダー(490nm)
- チップ
- 15ml 遠沈管
- プレート洗浄機

【実験方法】

- ① 秤量した CMG-GS ゲルをブロッキング済みの 96 穴 ELISA プレートに入れる。
- ② PBS で希釈した 200ng,100ng,50ng,10ng/ml の bFGF 溶液を 100 μ l ずつ 96 穴 ELISA プレートに入れる。
- ③ 1h,3h,6h,24h,48h 後に、CMG-GS ゲルの上澄み溶液を採取し、その後 PBS100 μ l で 2 回プレート内を洗浄し、同じく採取する。
- ④ 採取した上澄み溶液を ELISA によって測定し、検量線から上澄み溶液中の bFGF 濃度から CMG-GS ゲルに吸着した bFGF 量を算出した。

2-4 薬物徐放シミュレーション

薬物徐放(DDS)において、薬物担体から薬物がどのように放出されていくのかを予測する事は、実際に治療に用いる際に重要な情報となる。徐放シミュレーションを基に各々の患者の症状や程度に合わせた DDS 材料が調製可能になるからである。今回、硫酸化ジェラン(GS)とカルボキシメチルジェラン(CMG)のハイドロゲルを調製し、吸着させた繊維芽細胞増殖因子(bFGF)、トリメシン酸がどのように放出されていくのかシミュレーションを行った。

ハイドロゲルからの薬物徐放は、拡散、分解、親和性(Affinity)による放出の三種類が考えられる。今回の徐放シミュレーションはハイドロゲルと bFGF、トリメシン酸の親和性による薬物放出を想定して行った。

2-4-1 徐放シミュレーション

【使用した定数】

X:フリー状態タンパク質濃度(M)

GS:フリー状態 GS 濃度(M)

X・GS:GS とタンパク質の結合状態濃度(M)

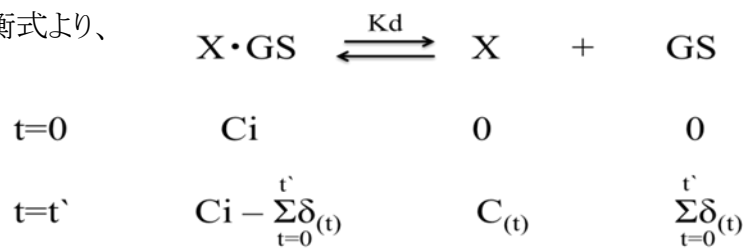
Kd:解離定数

Ka:結合定数

Ci:ハイドロゲルに吸着しているタンパク質濃度(M)

C(t):t(sec)後のハイドロゲルを入れた系内のタンパク質濃度(M)

吸着平衡式より、



また平衡式より、

$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{[C(t)] [\sum_{t=0}^{t'} \delta_{(t)}]}{[C_i - \sum_{t=0}^{t'} \delta_{(t)}]}$$

この式を変形すると、

$$\left[\begin{array}{l} K_a [C(t)] [\sum_{t=0}^{t'} \delta_{(t)}] = [C_i - \sum_{t=0}^{t'} \delta_{(t)}] \cdots \textcircled{1} \\ C_{(t)} = \sum_{t=0}^{t'} \delta_{(t)} \cdots \textcircled{2} \end{array} \right.$$

① ②式より、

$$K_a (C_{(t)})^2 = C_i - C_{(t)}$$

したがって、

$$K_a (C_{(t)})^2 + C_{(t)} - C_i = 0$$

この式より求める $C_{(t)}$ は、

$$C_{(t)} = \frac{-1 \pm \sqrt{1+4K_a C_i}}{2K_a}$$

2-5CMG-GS ハイドロゲルからの徐放

項目 2-3 において、化学架橋によって CMG に GS を固定化した CMG-GS ハイドロゲルを作成した。今回使用した CMG-GS ハイドロゲルは洗浄によって事前に未反応の架橋剤を除去したものを使用した。GS が固定化されているので、bFGF と電荷的に吸着を起こすと考え、実際に吸着させた。その後 bFGF がどのように徐放されていくのかを検討した。またキレート結合を利用し、CMG のカルボキシメチル基に対して薬物モデルとしてトリメシン酸を結合させ、どのように徐放されていくのか検討を行った。

2-5-1CMG-GS ハイドロゲルからの bFGF 徐放実験

【試薬】

- CMG ハイドロゲル
- CMG-GS ハイドロゲル
- bFGF(BioVision)
- PBS(+0.9%NaCl)
- Biotin-anti-FGF-basic-antibody(BLD)
- HRP-Streptavidin-anti-FGF-basic-antibody(R&D)
- H2SO4(1N)(Wako)
- 発色基質溶液
- 希釈緩衝溶液(PBS+1%BSA)
- OPD タブレット
- H2O2

【器具】

- | | |
|---------------------------|-----------------|
| •ブロッキング済み 96 穴 ELISA プレート | |
| •96 穴 ELISA プレート | •プレート洗浄器 |
| •振とう機 | •プレートシール |
| •ピペットマン | •15ml 遠沈管 |
| •8 連ピペット | •0.5ml アシストチューブ |
| •チップ | |

【実験方法】

- ① 凍結乾燥した CMG ゲル、CMG+GS ゲルをブロッキングした 96 穴プレートに入れる。
- ② 濃度 200ng/ml に調製した bFGF 溶液を 200 μ l ずつ入れる。
- ③ 冷蔵庫に静置して Overnigth でゲルに bFGF を吸着させる。
- ④ ブロッキングした 96 穴プレートに PBS で洗浄したゲルを入れ 200 μ l の PBS を入れる。
- ⑤ 1h,3h,6h,24h,48h 毎に上澄み溶液を採取し、新しい PBS200 μ l を入れる。
- ⑥ 採取した上澄み溶液を ELISA によって測定し、ゲルからの bFGF 放出量を測定する。

2-5-2CMG-GS ハイドロゲルからのトリメシン酸徐放実験

【試薬】

- CMG ハイドロゲル
- CMG-GS ハイドロゲル
- トリメシン酸溶液(2mg/ml)*生理食塩水で溶解させる。
- 塩化カルシウム溶液(2mg/ml)*生理食塩水で溶解させる。
- 生理食塩水(+0.9%NaCl)

【器具】

- UV-160A (SHIMADZU)
- プラスチックセル
- 1.5ml アシストチューブ
- ピペットマン
- チップ
- 遠心機
- 96 穴 ELISA プレート

【実験方法】

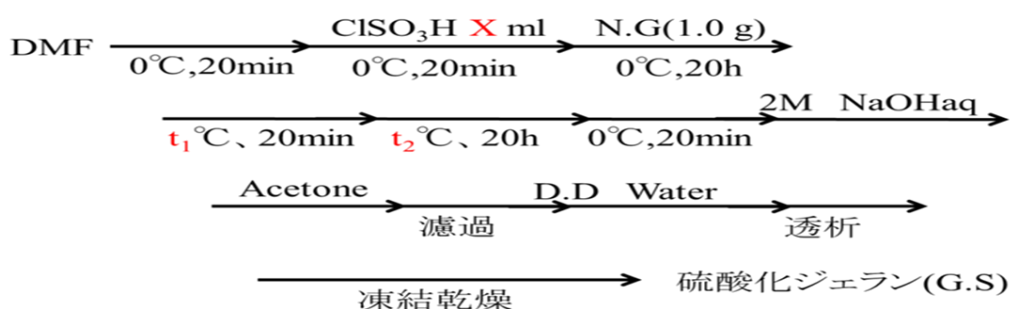
- ① 秤量した CMG,CMG-GS ハイドロゲルを 1.5ml アシストチューブに入れる。
- ② トリメシン酸溶液 200 μ l,CaCl₂ 溶液 200 μ l ずつ入れ、overnight で吸着させる。
- ③ 吸着したトリメシン酸量を測定する為にコントロールとしてトリメシン酸 200 μ l,CaCl₂ 溶液 200 μ l 入れる。
- ④ 遠心機を使用して沈殿物を沈殿させる。
- ⑤ 吸光度測定器により 278nm の波長で上澄み溶液を測定する。
- ⑥ コントロール溶液の吸光度から測定値を引いた値を CMG,CMG-GS ハイドロゲルに吸着したトリメシン酸量とする。
- ⑦ ハイドロゲルを 96 穴 ELISA プレートに入れ、生理食塩水、CaCl₂ 溶液を個々に 300 μ l ずつ入れ、それぞれの溶液にてトリメシン酸の放出を行った。
- ⑧ 1h,3h,6h,24h,48h 後に上澄み溶液を回収し、新しい溶液を 300 μ l 入れる。
- ⑨ 回収した上澄み溶液を 100 μ l、生理食塩水を 2.9ml の割合で混合する。
- ⑩ 吸光度測定器にて 278nm の波長を測定。

3.結果

3-1 ネイティブ型ジェランの硫酸化実験

ネイティブ型ジェランを DMF-SO₃ 錯体と反応させて硫酸基を導入した硫酸化ジェランの調製を行った。反応条件により硫酸化率の異なる硫酸化ジェランの調製を行いその結果を述べる。

3-1-1 硫酸化ジェランの調製結果



Schame.3-1-1 硫酸化実験方法

Table.3-1-1 硫酸化実験結果

Entry	X(ml)	Eq	t1(°C)	t2(°C)	硫酸化率(%)
1	0.73	1	70	50	6.6
2	1.46	2	70	50	20.2
3	2.19	3	70	50	28.7
4	3.63	5	70	50	33.6
5	3.63	5	r.t.	r.t.	14.8

硫酸化剤としてクロロスルホン酸を使用した。ネイティブ型ジェランの水酸基に対する当量を変化させる事で硫酸化率 6.6%~33.6%までの硫酸化ジェランを調製する事が出来た。また硫酸化させる時の反応温度を室温で行う事で硫酸化率 14.8%の硫酸化ジェランが調製出来た。ネイティブ型ジェランを 8 糖単位で考えた際に理論上、硫酸化率約 6%に対して硫酸基が 1 個導入される事になる。今回の実験では、硫酸基が約 1 個~5 個導入された硫酸化ジェランが調製できた。

3-2 硫酸化ジェランと bFGF 親和性評価

3-2-1 硫酸化ジェランと bFGF 吸着実験結果

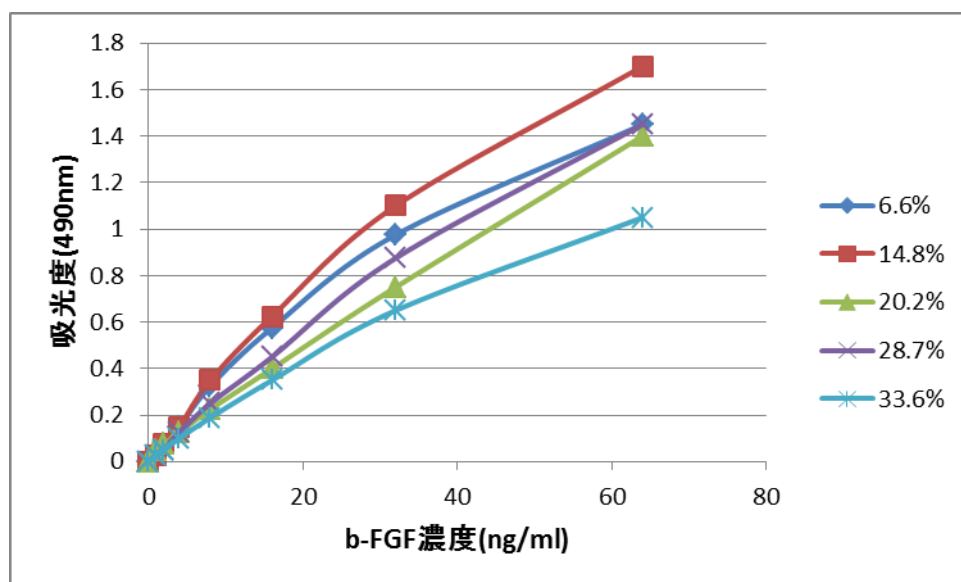


Fig.3-2-1GS と bFGF との吸光度曲線

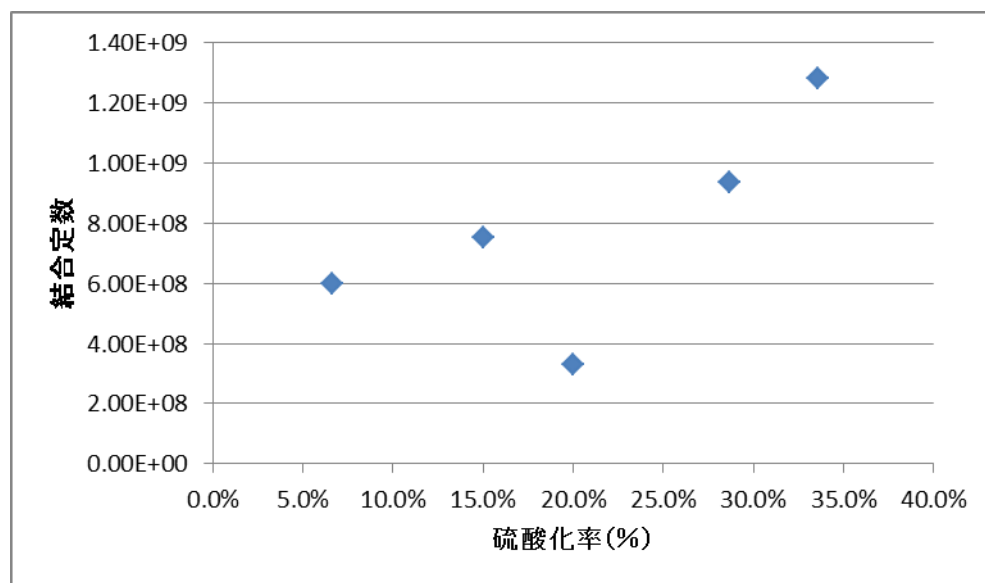


Fig.3-2-2 硫酸化率に対する bFGF との結合定数

Table.3-2-1GS と bFGF の結合定数

Entry	硫酸化率(%)	結合定数(M)
1	6.6	5.99E+08
2	14.8	7.51E+08
3	20.2	3.30E+08
4	28.7	9.35E+08
5	33.6	1.28E+09

硫酸化率が高くなるに従って GS と bFGF との結合定数(親和力)が高くなる傾向にあると思われる。しかし、硫酸化率 20.2% の GS では bFGF との結合定数が下がるという結果になった。

3-2-2 カルボキシメチルジェランとトリメシン酸吸着実験結果

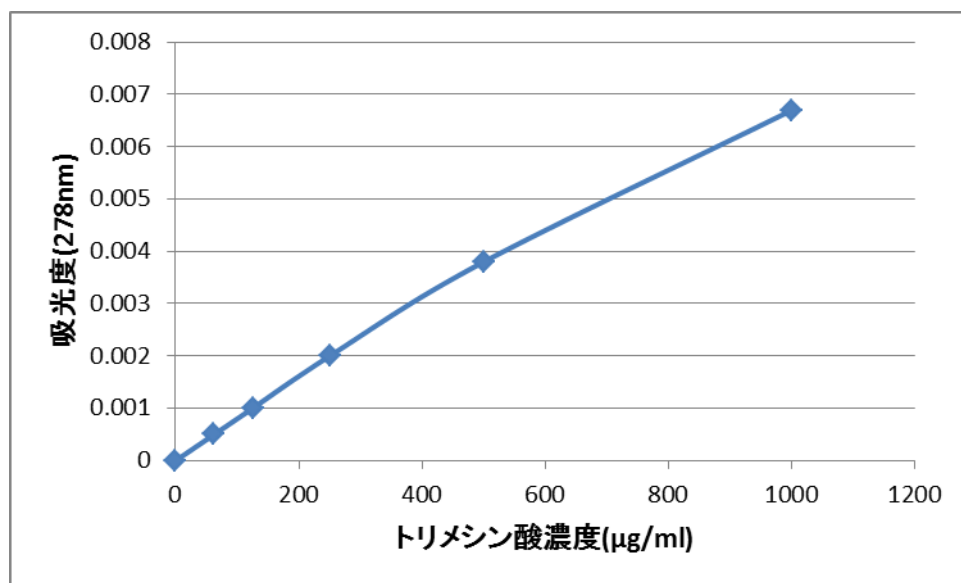


Fig.3-2-3CMG とトリメシン酸の吸光度曲線

Table.3-2-2CMG とトリメシン酸の結合定数

トリメシン酸	DS(%)	結合定数(M)
Entry1.	4.49	2.74E+06

CMG とトリメシン酸との結合定数は 2.74E+6(M)という結果になった。

3-3CMG-GS ハイドロゲルの作製と評価結果

CMG-GS ハイドロゲルの作製結果、GS 固定化に関する評価結果を述べる。また bFGF,トリメシン酸の吸着実験に関する詳細を述べる。

3-3-1 ハイドロゲルの作製結果

Table.3-3-1 ハイドロゲルの作製条件

Entry	CMG(mg)	エチレンジアミン塩酸塩(mg)	EDC(mg)	GS(mg)	脱イオン水(ml)
1	100.0	22.4	128.8	0.0	1.0
2	100.0	22.4	128.8	10.0	1.0
3	100.0	11.2	64.4	10.0	1.0
4	100.0	44.8	257.6	10.0	1.0

- *Entry1.CMG:10% wt, [EDC/COOH]=2
[エチレンジアミン塩酸塩/COOH]=0.5
- *Entry2.CMG:10% wt, [EDC/COOH]=2,
[エチレンジアミン塩酸塩/COOH]=0.5
- *Entry3.CMG:10% wt, [EDC/COOH]=1,
[エチレンジアミン塩酸塩/COOH]=0.25
- *Entry4.CMG:10% wt, [EDC/COOH]=4,
[エチレンジアミン塩酸塩/COOH]=1.0

Entry1.では GS を固定化していない CMG のみでハイドロゲルを作成した。Entry2.では、Entry1.と同じ架橋剤濃度で GS を加え、CMG に GS を固定化した CMG-GS ハイドロゲルを作成した。Entry3.では、Entry2.に対して架橋剤、脱水縮合剤の反応量を 1/2 倍に変更して CMG-GS ハイドロゲルを作成した。Entry4.では Entry2.に対して架橋剤、脱水縮合剤の反応量を 2 倍に変更して CMG-GS ハイドロゲルを作成した。

3-3-2 ハイドロゲルの溶媒交換結果

【使用したハイドロゲルの質量】

- CMG ゲル.....0.0712g
- CMG+GS ゲル...0.0679g

*Entry1.CMG:10%wt, [EDC/COOH]=2

[エチレンジアミン塩酸塩/COOH]=0.5

・CMG ハイドロゲルの溶媒交換結果

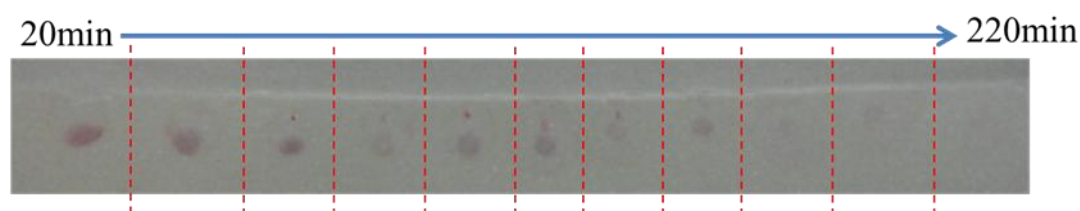


Fig.3-3-2CMG ハイドロゲルの溶媒交換結果

・CMG-GS ハイドロゲル溶媒交換結果



Fig.3-3-3CMG-GS ハイドロゲルの溶媒交換結果

CMG ハイドロゲルでは、脱イオン水 2ml での溶媒交換を 11 回行くとエチレンジアミン塩酸塩が除去出来たと確認された。CMG-GS ハイドロゲルでは脱イオン水 2ml での溶媒交換を 8 回行いう事で、エチレンジアミンの除去が出来たと確認された。CMG ハイドロゲルの溶媒交換が CMG-GS ハイドロゲルより多く必要であったのは溶媒交換に用いたゲルの質量が CMG ハイドロゲルの方が高い為にゲル内に残留していたエチレンジアミン量が多かった為である。また CMG-GS ハイドロゲルでは CMG のカルボキシ基間での架橋だけではなく、CMG-GS 間での架橋も行われ、CMG ハイドロゲルより残留していたエチレンジアミン量が少なかった為である。

3-3-3 硫酸化ジェラン固定化量測定結果

【検量線】

ネイティブ型ジェラン 8 糖単位を 1 ユニットと考えた時の分子量は 1509g/mol とする。

【使用した硫酸化ジェラン】

・GS 硫酸化率＝33.6%を使用。

遊離な水酸基の数は 1 ユニット中 17 個であるので、硫酸基数は、
 $17 \times (33.6/100) = 5.712(\text{個})$

1 ユニット中の分子量は、
 $(1509 - \text{硫酸基数} \times 1) + (\text{硫酸基数} \times 103) = 2092 \text{ (g/mol)}$

試料中に含まれる硫酸基モル数は、

$$S(\text{mol}) = \frac{\text{GSサンプル量(g)}}{\text{GSの分子量}} \times \text{硫酸基数}$$

以上より、GS の硫酸基 mol 数と吸光度の検量線を作成した。

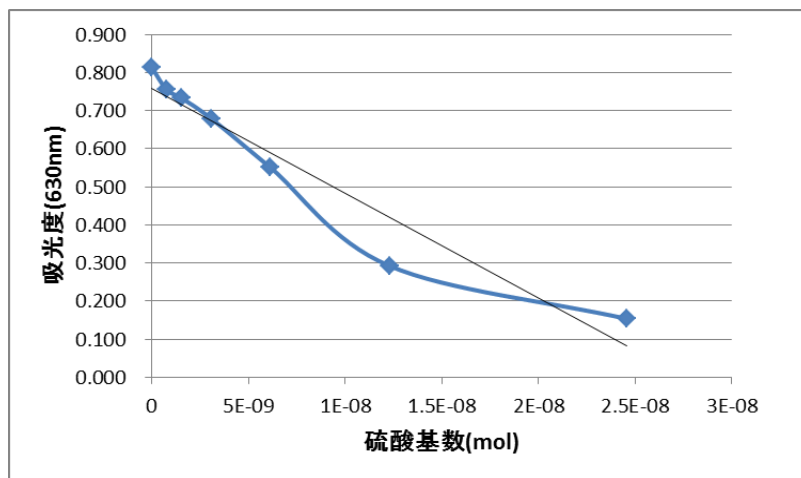


Fig.3-3-4 硫酸基 mol vs 吸光度 630nm

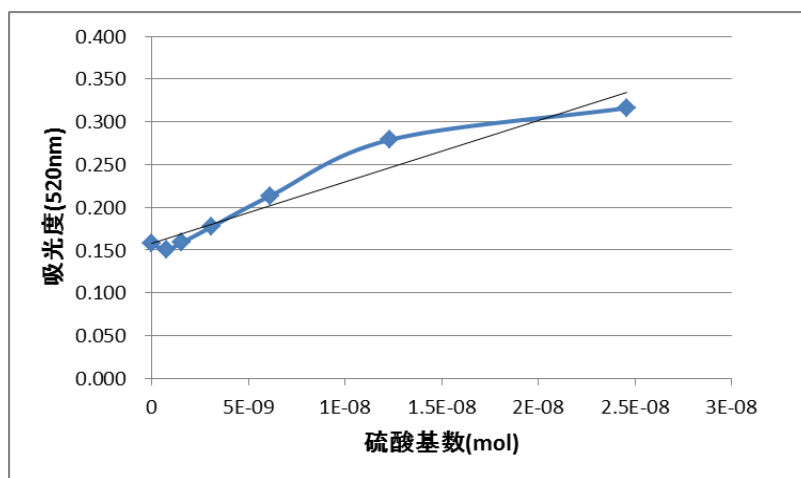


Fig.3-3-5 硫酸基 mol vs 吸光度 520nm

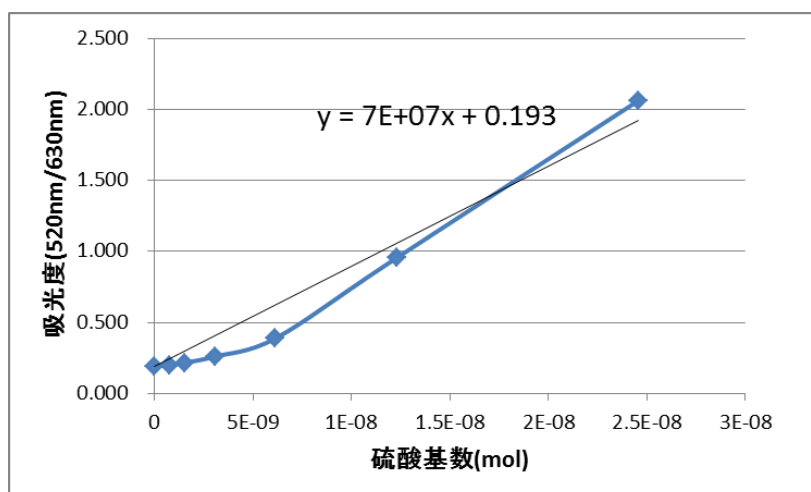


Fig.3-3-6 硫酸基 mol vs 吸光度 520nm/630nm

630nm,520nm の吸光度だけでは、検量線が直線状に書けず、今回は 630nm,520nm の波長の比を取って検量線として用いる事にした。以上の検量線より CMG-GS ハイドロゲルからの GS 固定化量を測定した。

【結果】

Table.3-3-2CMG-GS ハイドロゲルの作製条件

Entry	CMG(mg)	ジアミン塩	EDC(mg)	GS(mg)	脱イオン水(ml)
1	100.0	22.4	128.8	10.0	1.0

【理論上の GS 固定化量】

ゲル作成に用いた試料の質量から、CMG+GS ゲルに GS 含有量を計算した。

- ゲル作成に使用した全質量・・・261.2mg
- 実験に用いたゲル質量・・・・86.9mg

よって、

$$10 \times (86.9 \div 261.2) = 3.327$$

以上より、初期の GS 固定化量は、3.327mg である。

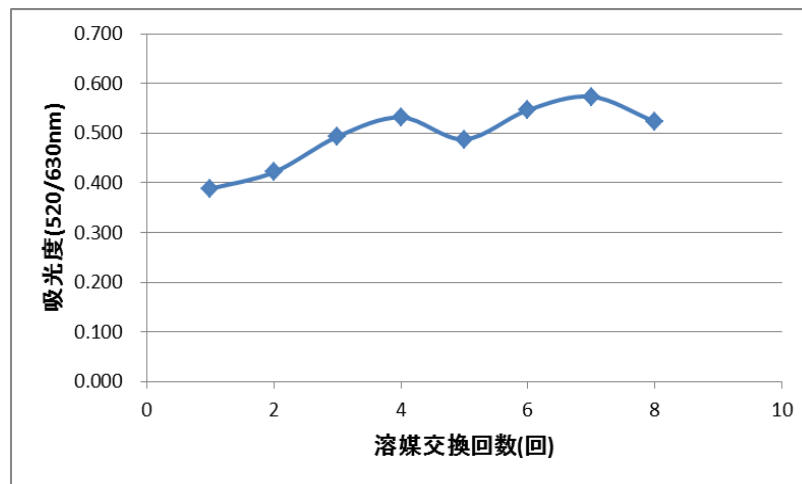


Fig.3-3-7CMG-GS ハイドロゲルの溶媒交換回数 vs 吸光度(520nm/630nm)

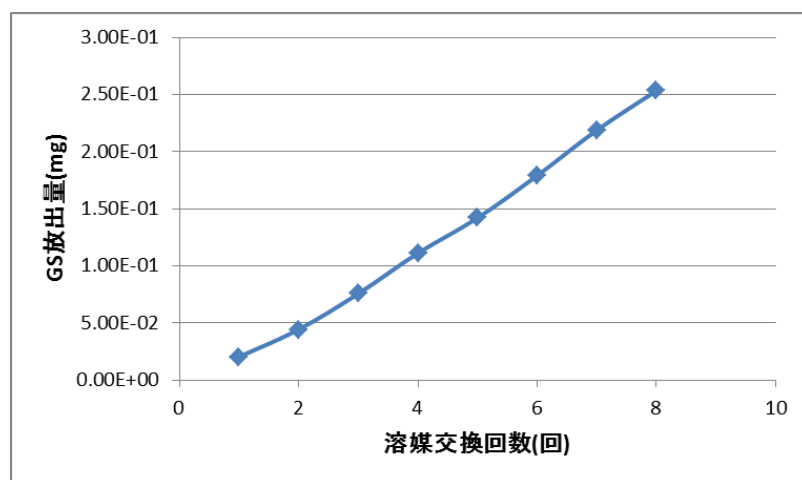


Fig.3-3-8CMG-GS ハイドロゲルの溶媒交換回数 vs GS 放出量(mg)

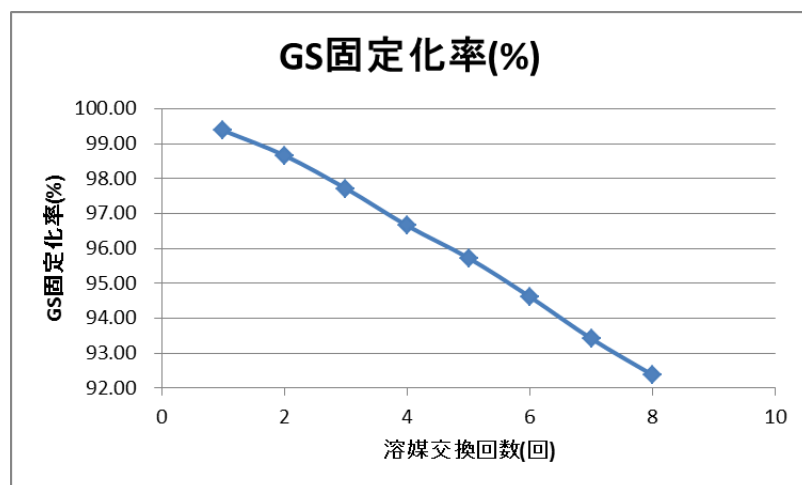


Fig.3-3-9CMG-GS ハイドロゲルの溶媒交換回数 vs GS 固定化率(%)

- GS 固定化量は、 $3.327 - 0.253 = 3.074\text{mg}$
- GS 固定化率は、 $(3.074 \div 3.327) \times 100 \div 92.3\%$ である。

2ml の脱イオン水で 20min 毎の溶媒交換を 8 回行った時の、GS 固定化率は約 92% であった。今回使用した CMG-GS ハイドロゲルはカルボキシ基に対して 0.5 当量の架橋剤を用いて作成した。これは、架橋剤として用いたエチレンジアミン塩酸塩 1mol に対してカルボキシ基 2mol と脱水縮合を行うので、ほぼ過不足のない架橋反応であった為である。

3-3-4 硫酸化ジェラン最大固定化量測定結果

【検量線】

ネイティブ型ジェラン 8 糖単位を 1 ユニットと考えた時の分子量は 1509g/mol とする。

【使用した硫酸化ジェラン】

・GS 硫酸化率=36.1%を使用。

遊離な水酸基の数は 1 ユニット中 17 個であるので、硫酸基数は、

$$17 \times (36.1/100) = 6.137 (\text{個})$$

1 ユニット中の分子量は、

$$(1509 - \text{硫酸基数} \times 1) + (\text{硫酸基数} \times 103) = 2134 \text{ (g/mol)}$$

試料中に含まれる硫酸基モル数は、

$$S(\text{mol}) = \frac{\text{GSサンプル量(g)}}{\text{GSの分子量}} \times \text{硫酸基数}$$

以上より、GS の硫酸基 mol 数と吸光度の検量線を作成した。

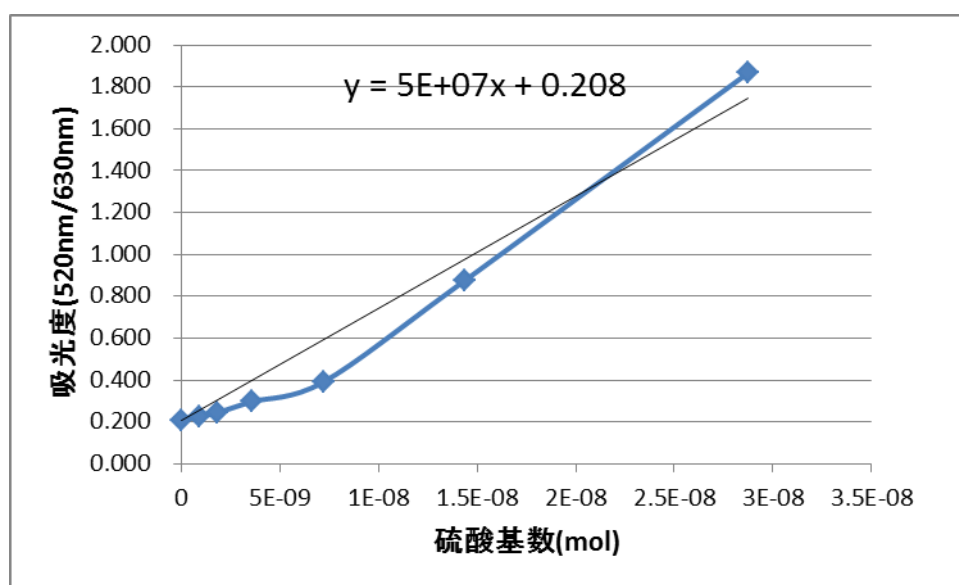


Fig.3-3-10 硫酸基 mol vs 吸光度 520nm/630nm

以上の吸光度 520nm/630nm の検量線から CMG-GS ハイドロゲルからの GS 放出量を測定した。

架橋剤量を変えた 3 種類の CMG-GS ハイドロゲルからの GS 放出量を測定した。得られた吸光度から GS の放出量を算出したが、520nm/630nm の値が 0.208 になった時点を終了点とした。吸光度 0.208 とは検量線の作製の際に GS 濃度 0ng/ml の時の数値である。

Table.3-3-3CMG-GS ハイドロゲル作成条件

Entry	CMG(mg)	ジアミン塩	EDC(mg)	GS(mg)	脱イオン水(ml)
1	100.0	22.4	128.8	10.0	1.0
2	100.0	11.2	64.4	10.0	1.0
3	100.0	44.8	257.6	10.0	1.0

【ゲル質量】

- Entry1.質量=101.1mg
- Entry2.質量=68.7mg
- Entry3.質量=96.7mg

【初期 GS 固定量】

- Entry1.GS=3.871mg
- Entry2.GS=3.702mg
- Entry3.GS=2.345mg

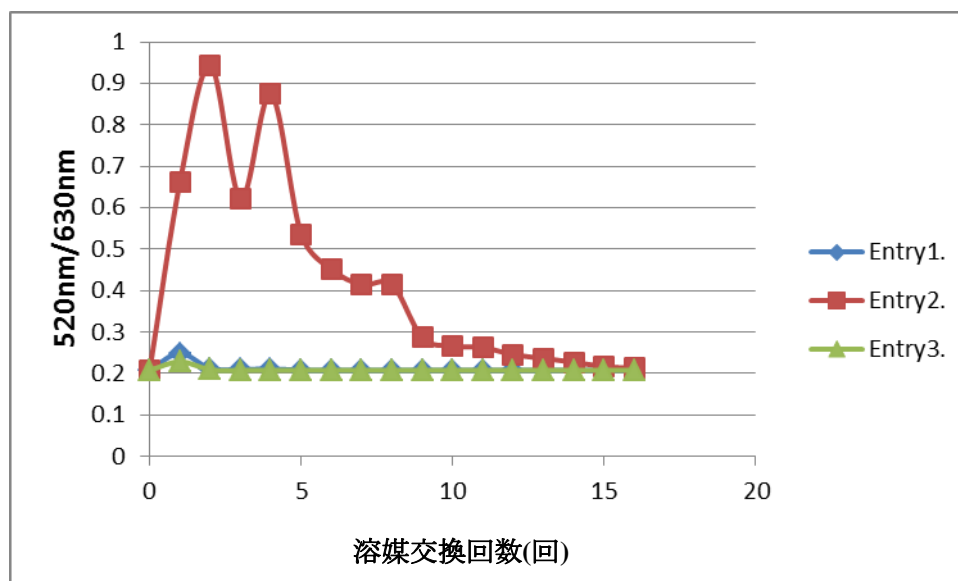


Fig.3-3-11 溶媒交換回数に対する吸光度変化

吸光度測定より、Entry1.では洗浄開始 4h 後を GS 放出終了点とした。Entry2.では洗浄開始 16h 後を GS 放出終了点とした。Entry3.では洗浄開始 2h 後を GS 放出終了点とした。

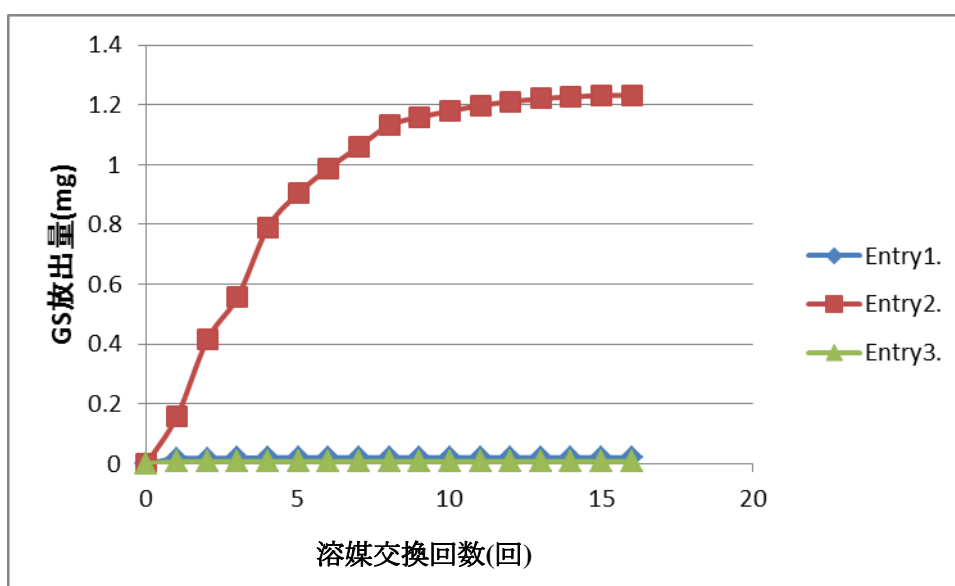


Fig.3-3-12 溶媒交換回数に対する GS 放出量(mg)

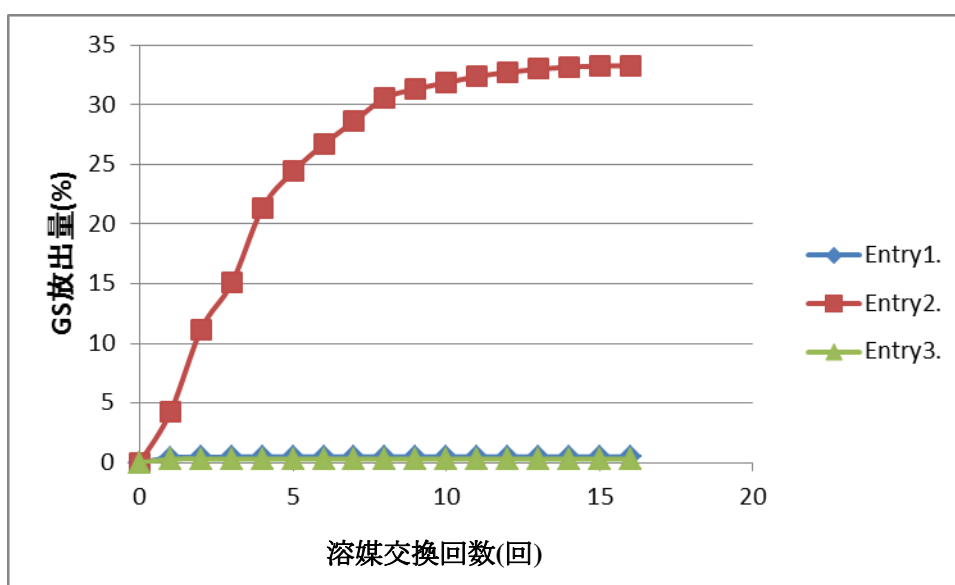


Fig.3-3-13 溶媒交換回数に対する GS 放出量(%)

Entry1.では殆ど GS の放出は確認されず固定化率は約 99%という結果になった。Entry2.では GS の放出が長時間に渡って確認され、固定化率は約 67%という結果であった。Entry3.では殆ど GS の放出は確認されず、固定化率は約 99%という結果になった。Entry1.及び Entry2.の条件での CMG-GS ハイドロゲル作成は架橋剤の不足なく GS が架橋されている。Entry2.では架橋剤の反応量不足の為に GS の架橋が十分に行われず、結果として未固定 GS がハイドロゲルの外液に放出された。

3-3-5bFGF 吸着実験結果

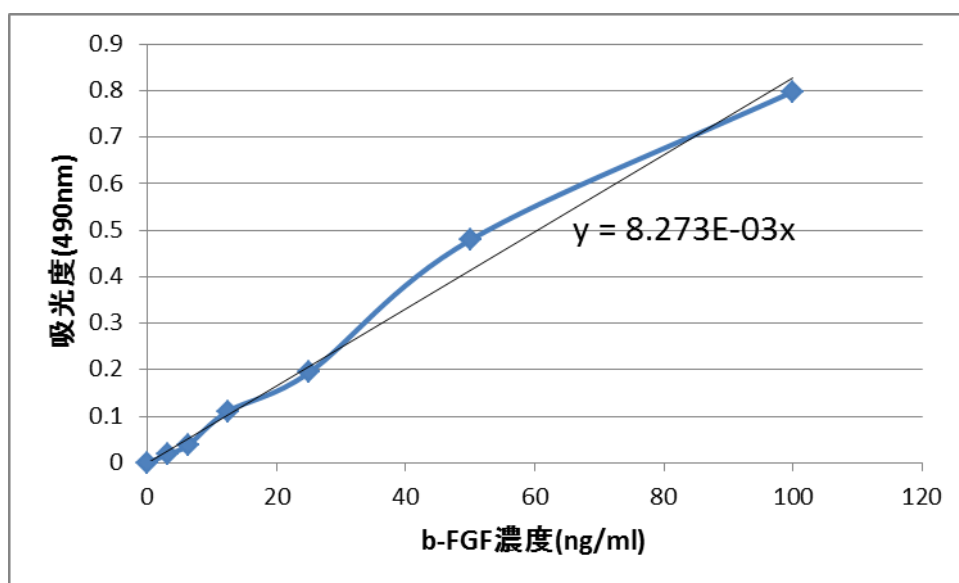


Fig.3-3-14bFGF の検量線

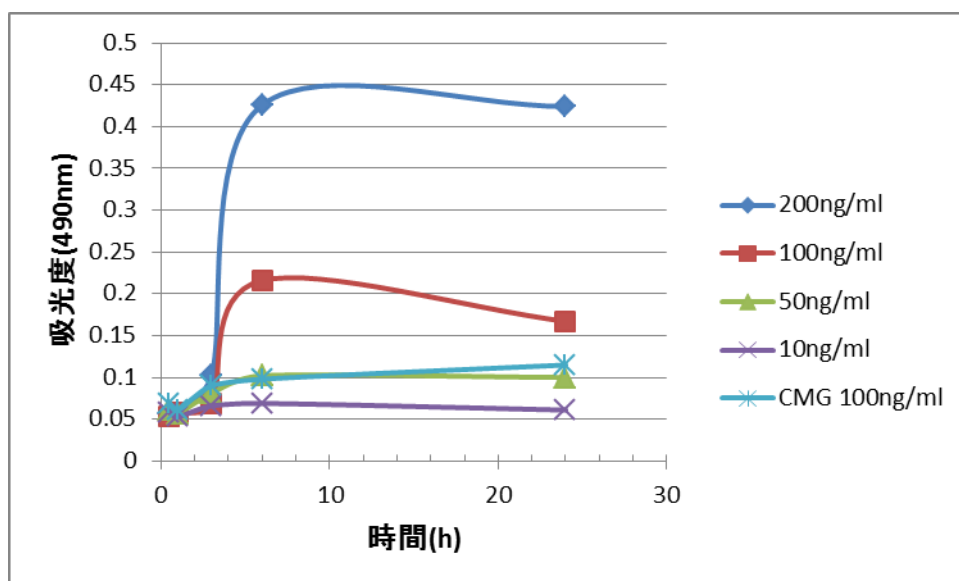


Fig.3-3-15 吸着時間に対する上澄み溶液の bFGF 濃度

bFGF 濃度が異なる溶液を CMG-GS ハイドロゲルに吸着させ、時間毎に上澄み溶液を ELISA によって調べた所、1h,3h 後の吸着量が高いという結果になった。6h,24h 後の吸着量は 1h,3h 後の吸着量と比較して下がるが、吸着量の変化が少ないことから bFGF の吸着は 6h~24h で出来ていると結果になった。1h,3h 後の吸着量が高いのは一時的に 96 穴プレートに吸着してしまった為に上澄み溶液中の bFGF 濃度が低いという結果になった。

3-4 薬物徐放シミュレーション

3-4-1 徐放シミュレーション結果

【シミュレーション条件】

- GS 硫酸化率 $S=36.1\%$ (結合定数 $K_a=9.34E+8$)
- bFGF 濃度 100ng/ml

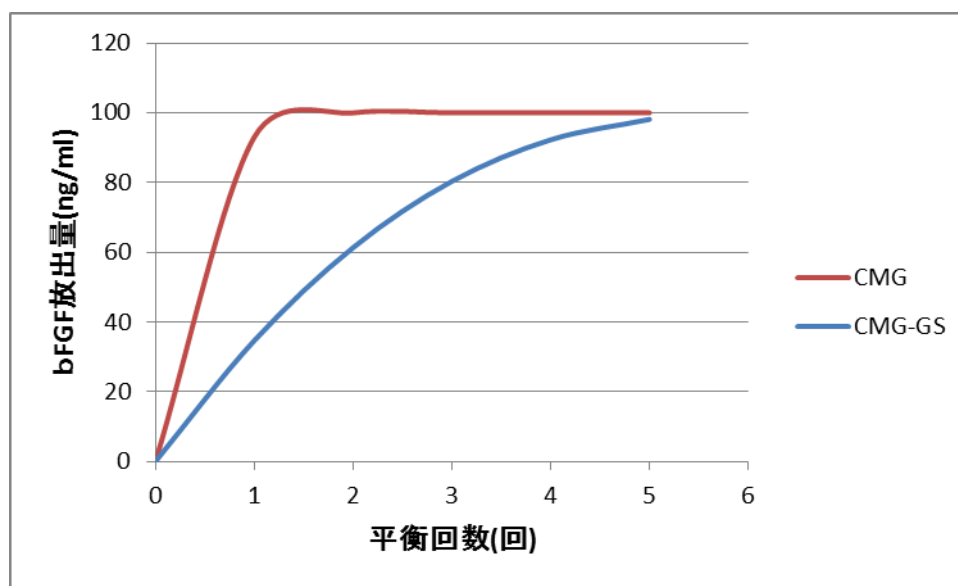


Fig.3-4-1bFGF 徐放シミュレーション

GSに吸着したbFGFは一度に放出されるのではなく、徐々に放出されていくと考えられる。今回のシミュレーションではbFGFの放出が平衡状態になったら新しい系に変えるという条件で行っており、実際の生体内では放出されたbFGFが消費される毎に徐々に放出されていくと考えられる。

【シミュレーション条件】

- CMG(DS=4.49%)
- CMG-トリメシン酸結合定数: $K_a=2.74E+6$ (CaCl₂ 溶液中)
- トリメシン酸濃度 $1 \mu\text{g/ml}$

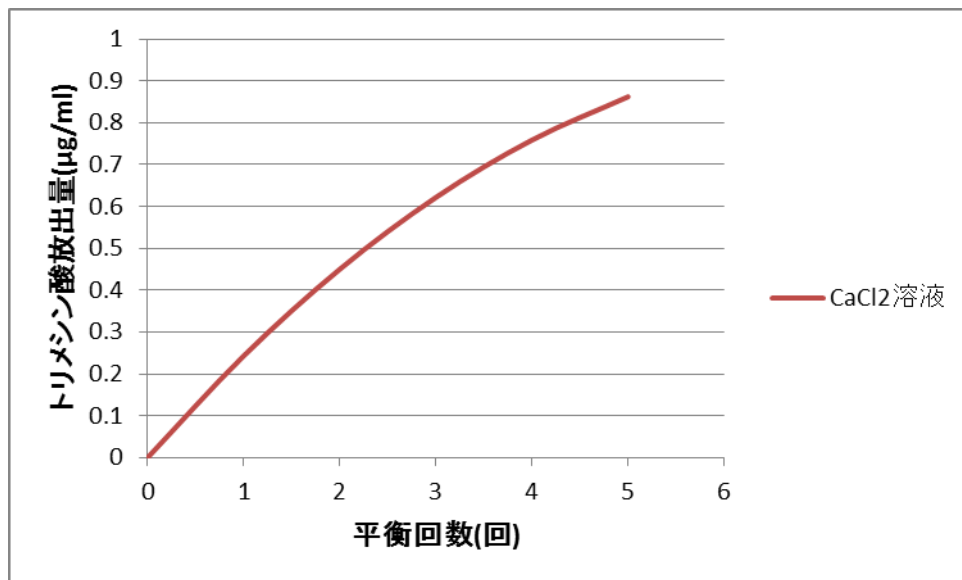


Fig.3-4-2 トリメシン酸徐放シミュレーション

CMG にキレート結合によって吸着したトリメシン酸は、一度に放出されるのではなく、徐々に放出されていくと分かった。

3-5CMG-GS ハイドロゲルからの徐放

3-5-1CMG-GS ハイドロゲルからの bFGF 徐放実験

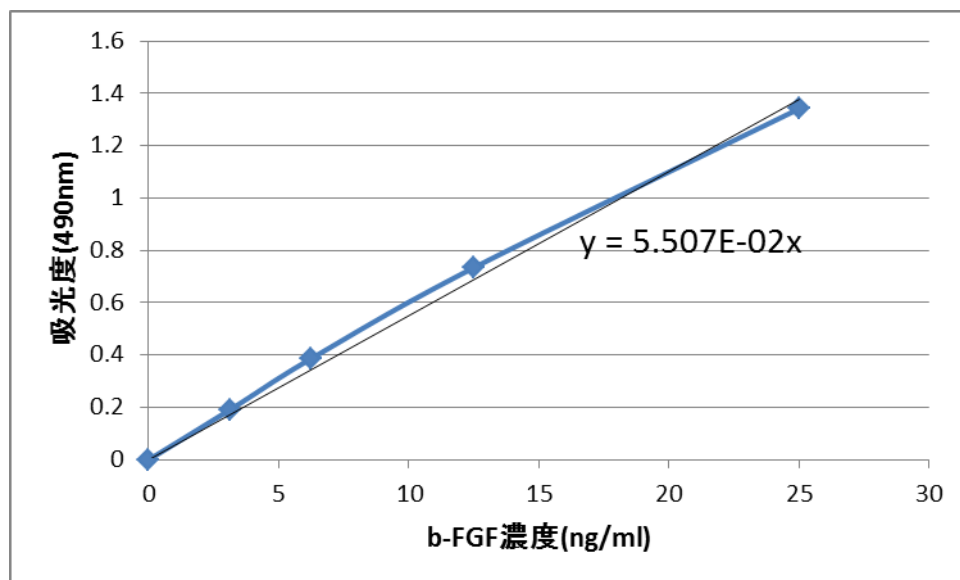


Fig.3-5-1bFGF 濃度に対する検量線

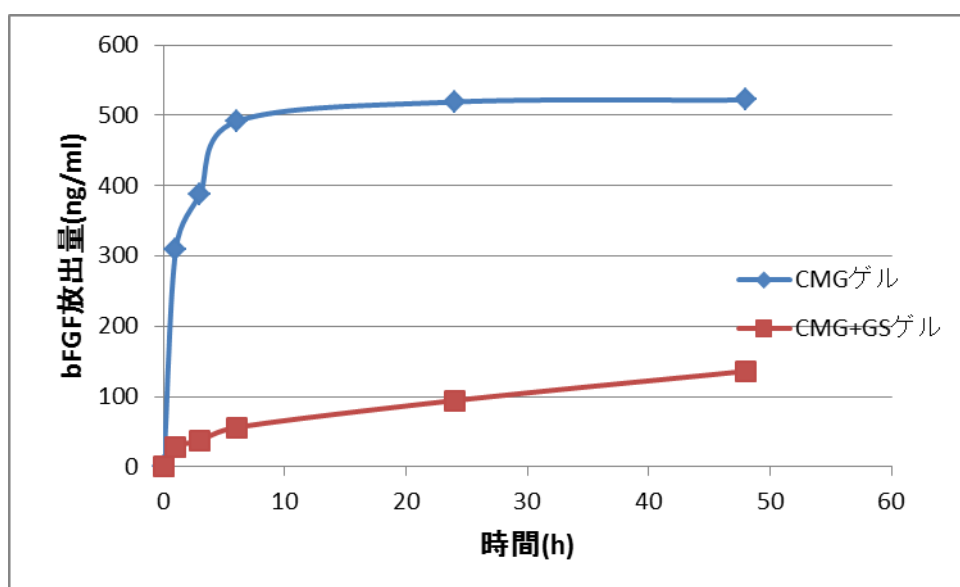


Fig.3-5-2CMG,CMG-GS ハイドロゲルからの bFGF 放出量(ゲル 100mg)

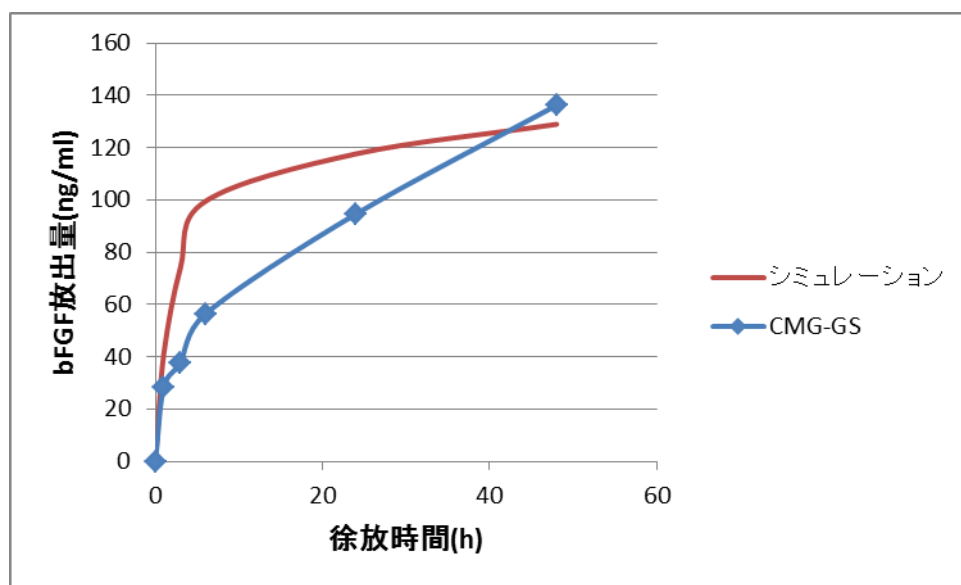


Fig.3-5-3 徐放シミュレーションとの比較(ゲル 100mg)

CMG ハイドロゲルに吸着している bFGF は 24h 後には殆ど放出された。
CMG-GS ハイドロゲルに吸着している bFGF は時間経過と共に徐々に放出された。
この結果より GS を用いて bFGF の制御された放出が可能である。
また徐放シミュレーションと比較し、CMG-GS からの bFGF 徐放がシミュレーション
出来た。

3-5-2CMG-GS ハイドロゲルからのトリメシン酸徐放実験

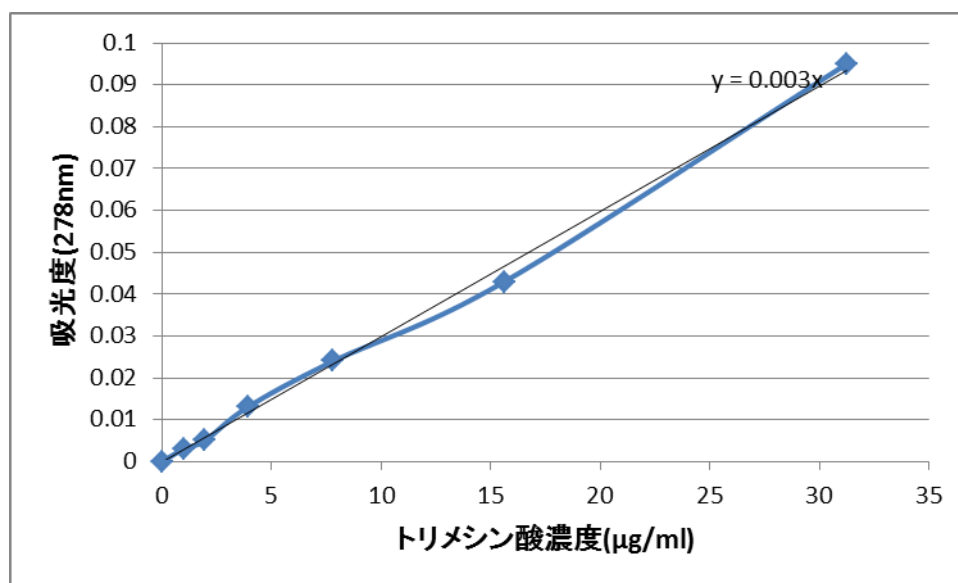


Fig.3-5-4 トリメシン酸濃度に対する吸光度

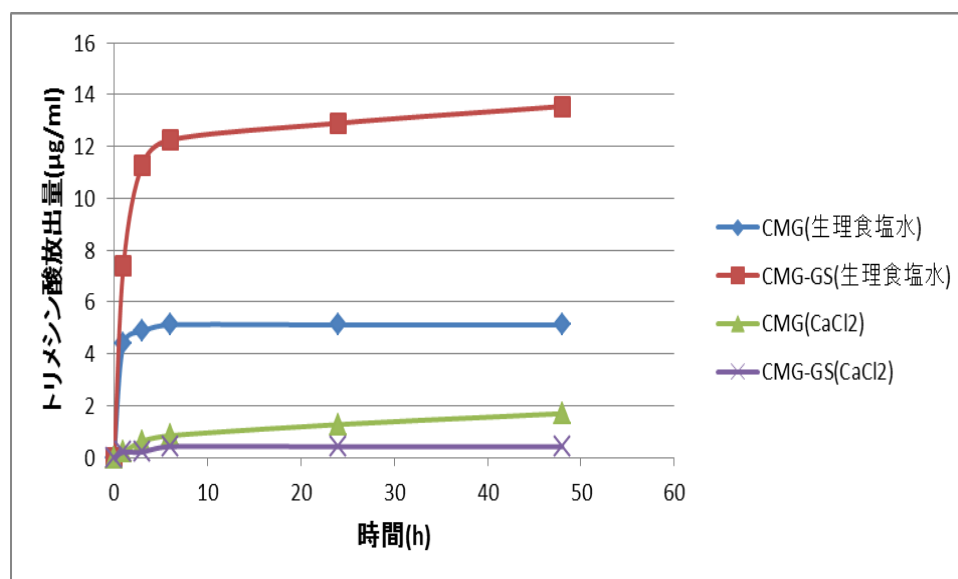


Fig.3-5-5CMG,CMG-GS ハイドロゲルからのトリメシン酸徐放(ゲル 1mg 当り)

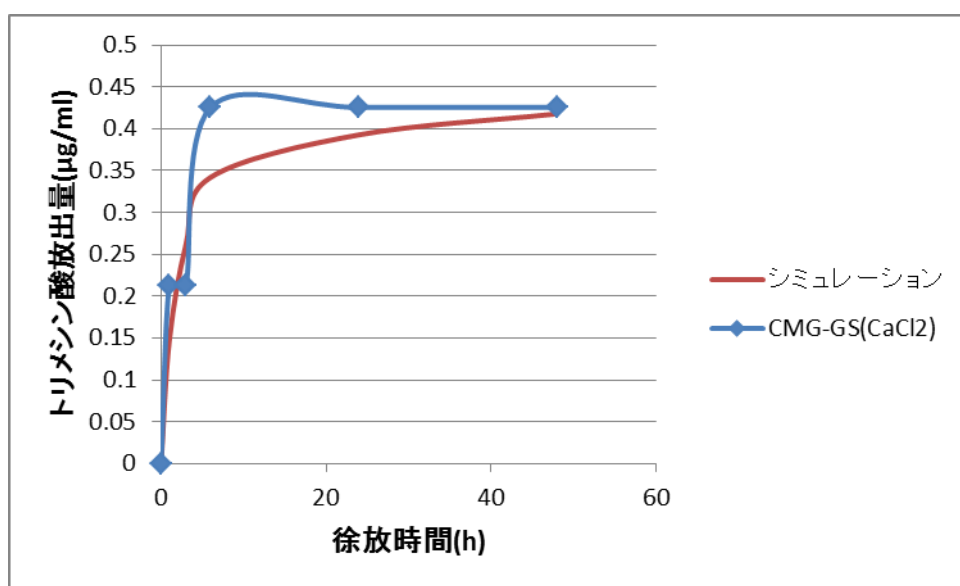


Fig.3-5-6 徐放シミュレーションとの比較(ゲル 1mg 当り)

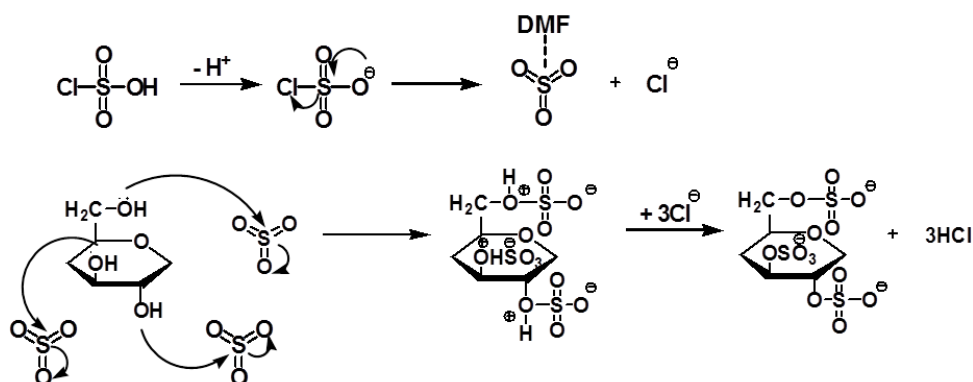
CMG,CMG-GS ハイドロゲルに吸着させたトリメシン酸は生理食塩水中では放出されたが、CaCl₂ 溶液中では殆ど放出されないという結果になった。この結果より Ca 濃度によるトリメシン酸の制御された徐放が可能である。

また徐放シミュレーションと比較した結果、CMG-GS ハイドロゲルからのトリメシン酸の徐放がシミュレーション出来た。

4.考察

4-1 ネイティブ型ジェランの硫酸化実験

3-1-1 の硫酸化ジェランの調製では、硫酸化剤 1 当量では硫酸化率 6.6%、2 当量では硫酸化率 20.8%、3 当量では硫酸化率 28.7%、5 当量では硫酸化率 33.6%となり、硫酸化剤の当量を上げるにしたがって硫酸化ジェランへの硫酸基の導入数が増加するという傾向になった。また、硫酸化は硫酸化剤であるクロスルホン酸と有機溶媒である DMF の錯体(DMF-SO₃ 錯体)がジェランの遊離な水酸基に対して求核攻撃を行うからである。したがって、硫酸化剤の当量を増加させる事によって、DMF-SO₃ 錯体が増加しジェランの水酸基に対する求核攻撃回数が増加した事が硫酸化ジェランの硫酸化率の変化に影響を与えていると思われる。



Schame.4-1 硫酸化反応機構

また硫酸化剤 5 当量の条件で、反応温度を”室温”で行った実験では硫酸化率 14.8%の硫酸化ジェランが得られ、同じ硫酸化剤 5 当量で行った実験より硫酸化率が低下した。これは、反応温度を下げる事により反応系のエネルギーが減少し、反応速度が低下した事が原因であると思われる。

今回の実験では硫酸化率 33.6%までの硫酸化ジェランしか調製できなかった。高硫酸化を行う為に必要な条件として、①硫酸化剤量②反応温度③反応時間④硫酸化剤の種類が挙げられる。以前の研究からこれらの条件は検討されているが、他に高硫酸化の条件として”水”が原因の可能性が考えられる。硫酸化反応は可逆的に起きており、水の存在で加水分解が生じ、脱硫酸化が起きる。実験で使用する溶媒は蒸留によって限りなく脱水作業を行うが、わずかに残留している水が存在するかもしれない。

出発物質であるジェランも凍結乾燥を行ってから使用するが、多糖類であるジェランは空気中の水分をわずかながら吸収してしまう可能性も考えられる。

また、硫酸化実験過程において窒素置換を行ってから硫酸化を進行させるが、実験系は外気と触れ合う状態にある。DMF-SO₃ 錯体を形成させてから、ジェランを入れ 20h 攪拌を行う間に空気中の水分が混入している事も加水分解を引き起こし、高硫酸化ジェランの調製に影響していると考ええる。

よって、DMF の蒸留方法を見直して、ジェランも凍結乾燥を行って直ちに使用するかデシケーター内で保存しておく、または実験系を完全に外部と遮断して硫酸化を行う事で硫酸化率の高い硫酸化ジェランが調製出来ると考えられる。

4-2 ジェランの親和性評価

【GS と bFGF との親和力測定】

3-2-1 において GS と bFGF の親和力測定結果から、硫酸化率が高くなるに従って結合定数(親和力)が増加する傾向にあった。結果には記載していないが、硫酸化を行っていないネイティブ型ジェランと bFGF との吸着実験よりネイティブ型ジェランは bFGF との親和力を持たない事が分かっている。先述したが、硫酸化ジェランに結合している硫酸基は負電荷を帯びておりその影響で硫酸化ジェランは負に帯電した多価電解質である。また bFGF を構成しているアミノ酸の 18%はリシンやアルギニン、ヒスチジンという塩基性アミノ酸が多く存在している。この為 bFGF は強い塩基性を示す為に硫酸基と電荷的に結合する。

よって硫酸基数が増加するに従って電荷的な結合力も増加すると考えられる。しかし、硫酸化率 20.8%の硫酸化ジェランは bFGF との親和力が低下している。これは硫酸基が導入された事により立体構造が変化し、硫酸化ジェラン自身の立体障害の影響によって親和力が低下したと考えられる。これは以前の研究の報告から、硫酸基の導入によってジェランの立体構造が変化するという結果と一致する。

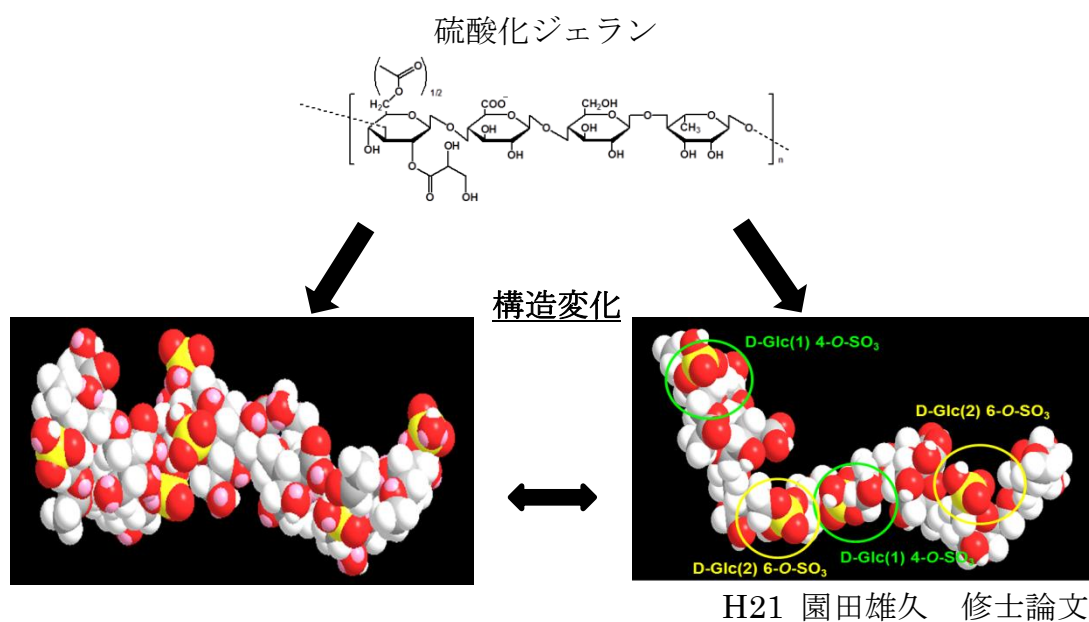


Fig.4-1 硫酸化によるジェランの構造変化

【CMG とトリメシン酸との親和力測定】

CMG とトリメシン酸の親和力にはキレート作用を利用している。キレートとは正に電荷を帯びている金属イオンに配因子が結合(配位)しキレート錯体を形成する事である。

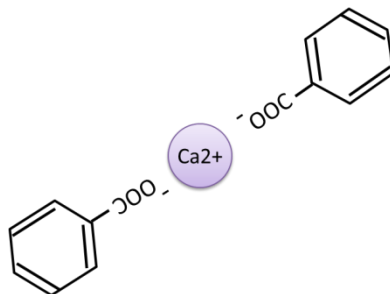


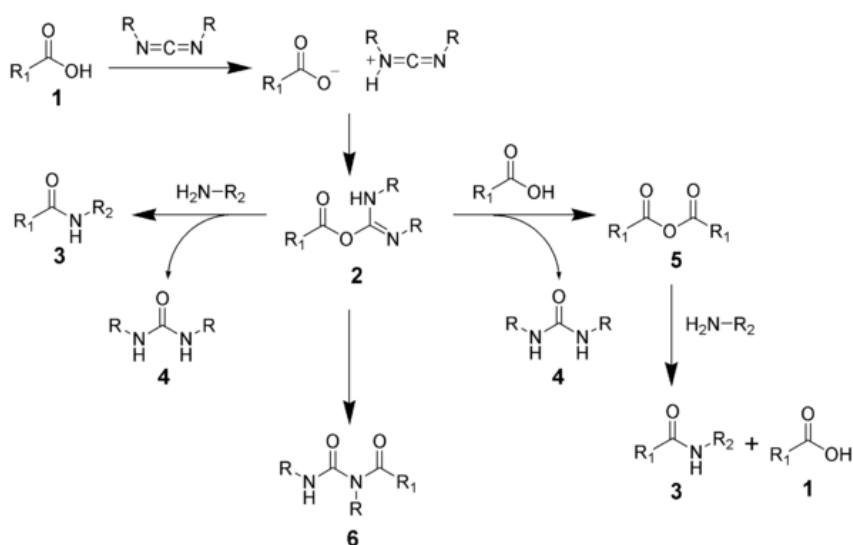
Fig.4-2 キレート結合図

本研究では、CMG に化学修飾によって導入されたカルボキシ基とトリメシン酸のカルボキシ基が Ca^{2+} を介してキレート錯体を形成していると考えている。 Ca^{2+} 存在下ではキレート作用によってトリメシン酸は CMG に結合しているが、 Ca^{2+} が濃度平衡によって溶液中へ放出されるに従って CMG に結合しているトリメシン酸も放出されていくと考えられる。

4-3CMG-GS ハイドロゲルの作製と評価

【ハイドロゲルの作製】

CMG のゲル化は CMG のカルボキシ基と EDC が反応し、活性エステルを形成しエチレンジアミンとの反応でアミド結合が行われる。また副生成物としてカルボン酸無水物を形成するが、活性が高いのでこちらもエチレンジアミンと反応してアミド結合を形成する。他には副生成物として尿素誘導体が形成されることが考えられる。



Schame.4-2.アミド形成の機構

【ハイドロゲルの洗浄】

CMG-GS ハイドロゲルを作成する際に架橋剤のエチレンジアミンが、ニンヒドリン反応による実験から、未反応のまま残留していたという結果になった。もしエチレンジアミンが残留している場合はハイドロゲルに bFGF を吸着させた際に GS と bFGF が電荷的に吸着するのではなく、化学架橋によって結合してしまう可能性がある。

本実験では CMG ハイドロゲルの溶媒交換に脱イオン水 2ml を使用し 11 回溶媒交換をおこなった時点でエチレンジアミンの除去を確認した。CMG-GS ハイドロゲルの溶媒交換では脱イオン水 2ml を使用し 8 回の溶媒を行った時点でエチレンジアミンの除去を確認した。CMG-GS ハイドロゲルの溶媒交換回数が CMG よりも少なかった原因は、アミド結合が CMG 間だけではなく、CMG-GS 間でも起きている為に架橋に使用されるエチレンジアミンが CMG より多く消費された為と考えられる。



Fig.4-3 ニンヒドリン反応によるエチレンジアミンの確認

【硫酸化ジェラン固定化量測定】

3-3-3 では、CMG-GS ハイドロゲルを洗浄して使用する際に固定化されている GS の固定化率を測定した。CMG-GS ハイドロゲルを洗浄した時の GS 放出量は全体の約 8%であり、92%が CMG-GS ハイドロゲルに残っているという結果になった。これはゲルを形成する際に架橋剤であるエチレンジアミンが CMG 及び GS のカルボキシ基に対して十分な反応量であったと考えられる。

【硫酸化ジェラン最大固定化量測定】

3-3-4 では CMG-GS ハイドロゲルに固定化された GS がどれだけ存在するのか調査した。Entry1.(エチレンジアミン/COOH=0.5, EDC/COOH=2)の条件で作成した CMG-GS ハイドロゲルは導入した GS の約 99%固定化されているという結果になった。

Entry2. (エチレンジアミン/COOH=0.25, EDC/COOH=1)の条件で作成した CMG-GS ハイドロゲルの GS の固定化率は 66%であり、導入した GS の約 34%が放出された。

Entry3. (エチレンジアミン/COOH=1, EDC/COOH=4)の条件で作成した CMG-GS ハイドロゲルの GS 固定化率は約 99%固定化されているという結果になった。

Entry1.の条件では架橋剤が不足なく反応した為に GS が十分に固定化されていると考えられる。Entry3.では Entry1.の架橋剤量の 2 倍で CMG-GS ハイドロゲルの作製を行ったが、こちらも架橋剤が不足なく反応した為に GS が十分に固定化されていると考えられる。Entry2.では Entry1.の架橋剤量の 1/2 倍を用いてハイドロゲルの作製を行ったが、架橋剤量が少なく十分に架橋が行われなかった為に未固定の GS が放出されていると考えられる。

【bFGF 吸着実験】

bFGF は GS と電荷的に吸着していると考えられる。bFGF 吸着実験から CMG-GS ゲルに吸着する時間と吸着量の関係を比較すると、1h,3h で最も吸着量が多く、6h,24h では吸着量が低下するという結果になった。このような結果になった原因として bFGF の 96 穴プレートへの一時的な吸着が考えられる。吸着実験前に 96 穴プレートにスキムミルクを用いてブロッキングを行ったが、ブロッキングが不十分であり電荷的に bFGF がプレートに吸着していた可能性があると思われる。

もう一つの原因として、一度 GS に吸着した bFGF が GS の放出と共に不出された可能性が挙げられる。CMG-GS の GS 放出を調査した実験から CMG に未固定な状態の GS の放出が確認されている。よって一度 CMG-GS ハイドロゲルに吸着した bFGF が GS と共に放出され吸着量が低下したと考えられる。

4-4CMG-GS ハイドロゲルからの徐放

【CMG-GS ハイドロゲルからの bFGF 徐放実験】

CMG ハイドロゲルからの bFGF 徐放は 6h 後には殆ど放出してしまい、48h 後には bFGF の放出は確認されなかった。しかし、GS を固定化した CMG-GS ハイドロゲルに吸着した bFGF は時間経過と共に徐々に放出されて行き、徐々に bFGF が放出されるという結果になった。

今回 bFGF は PBS に溶解させ CMG,CMG-GS ハイドロゲルに染み込ませるという方法を使用した。染み込ませた bFGF は CMG,CMG-GS ハイドロゲルの両方に存在していると考えられる。しかし、bFGF は負に帯電した硫酸基を介して GS と結合している。よって CMG ハイドロゲルでは電荷的な吸着は起きず、CMG-GS ハイドロゲルでは硫酸基を介して bFGF の電荷的な吸着が起きていると思われる。

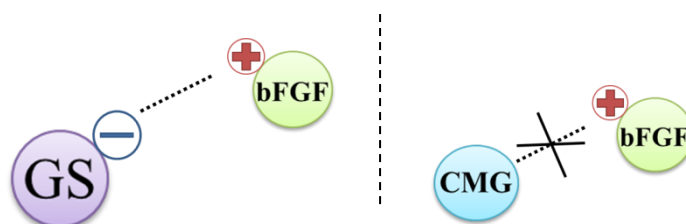


Fig.4-4GS,CMG と bFGF の吸着イメージ図

よって、CMG ハイドロゲルに存在する bFGF は濃度平衡によって溶液中へ放出される。しかし、CMG-GS ハイドロゲルに吸着している bFGF も同様に濃度平衡によって bFGF の放出が生じるが GS と電荷的に吸着しているのでその影響を受けて放出される bFGF 量は GS との親和力(結合定数)に比例して徐々に放出されていくと考えられる。

次に徐放シミュレーションとの比較した考察を述べる。

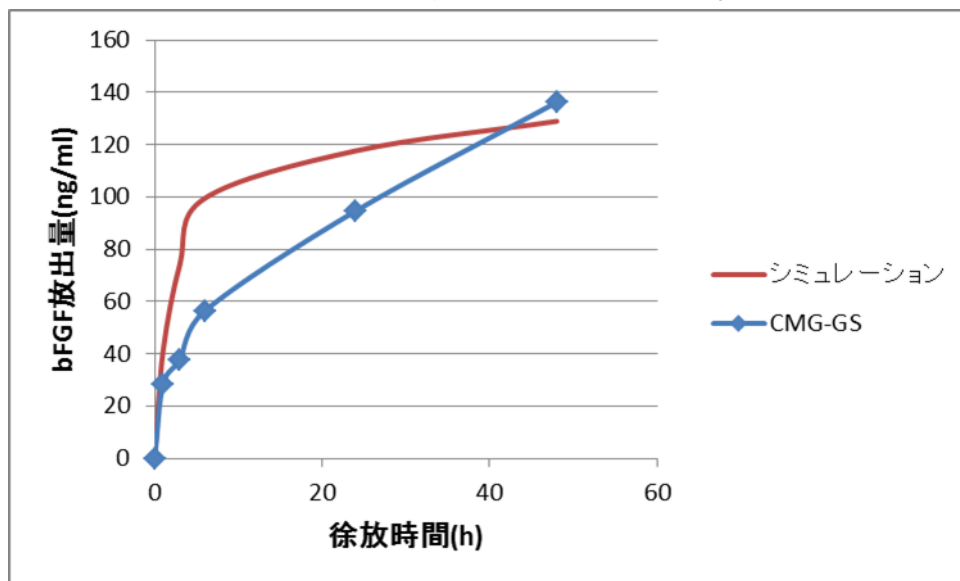
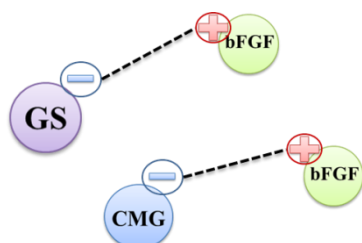


Fig.4-5 徐放シミュレーションと実験結果の比較

CMG-GS ハイドロゲルからの bFGF の徐放結果と比較し、徐放シミュレーションは bFGF の徐放を予測出来ていると思われる。しかし、実験結果との誤差があるのは、GS と bFGF の電荷的な吸着の他に、bFGF と相互作用を及ぼしている他の要素の可能性が考えられる。

可能性として考えられるのはカルボキシ基の存在である。カルボキシ基は硫酸基に比べて弱いを負に帯電している官能基である。本研究では、GS と bFGF の結合定数を算出して徐放シミュレーションを行ったが、CMG との bFGF の親和力を考慮していなかった。よって、カルボキシ基の存在によってシミュレーションより bFGF の放出量が低くなったと考えられる。

よって、本研究で用いた徐放シミュレーションの式にカルボキシ基の存在により生じる親和力や他に生じる親和力に対して係数(α)を導入する事により正確な徐放シミュレーションが出来ると考えられる。



$$C_{(t)} = \frac{-1 \pm \sqrt{1+4KaCi}}{2Ka} \times \alpha$$

Fig.4-6 GS,CMG と bFGF の電荷的吸着予想図

【CMG-GS ハイドロゲルからのトリメシン酸徐放実験】

実験結果より CMG,CMG-GS ハイドロゲルに吸着させたトリメシン酸は生理食塩水中ではトリメシン酸が放出している。しかし、CaCl₂ 溶液中ではトリメシン酸が放出されない傾向があるという事が分かった。

本研究では、トリメシン酸と CaCl₂ 溶液を用いる事で CMG のカルボキシ基に対してトリメシン酸のキレート結合を利用し吸着させた。キレートとは金属イオンに配因子が配位(結合)する反応である。よってトリメシン酸の放出はこのキレート結合が外れて生じると考えられる。生理食塩水中では溶液中に Ca²⁺が存在せず、キレートに参与している Ca²⁺が外れ、それに伴いトリメシン酸が放出されたと考えられる。しかし、CaCl₂ 溶液中では Ca²⁺の放出が起きず、トリメシン酸の放出も抑制されたと考えられる。

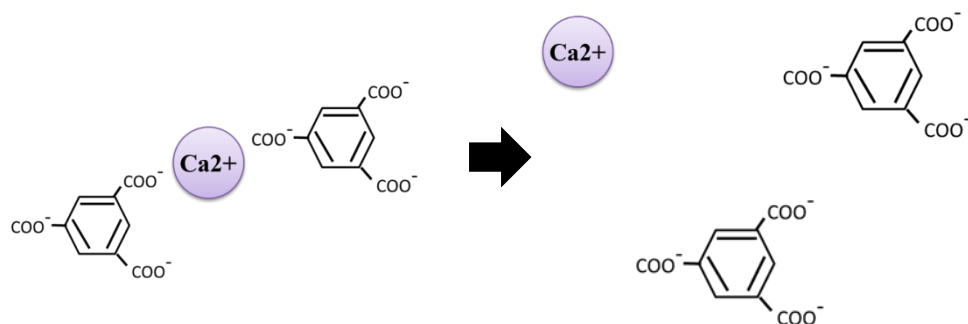


Fig.4-7 トリメシン酸のキレート結合と放出図

次に徐放シミュレーションとの比較した考察を述べる。

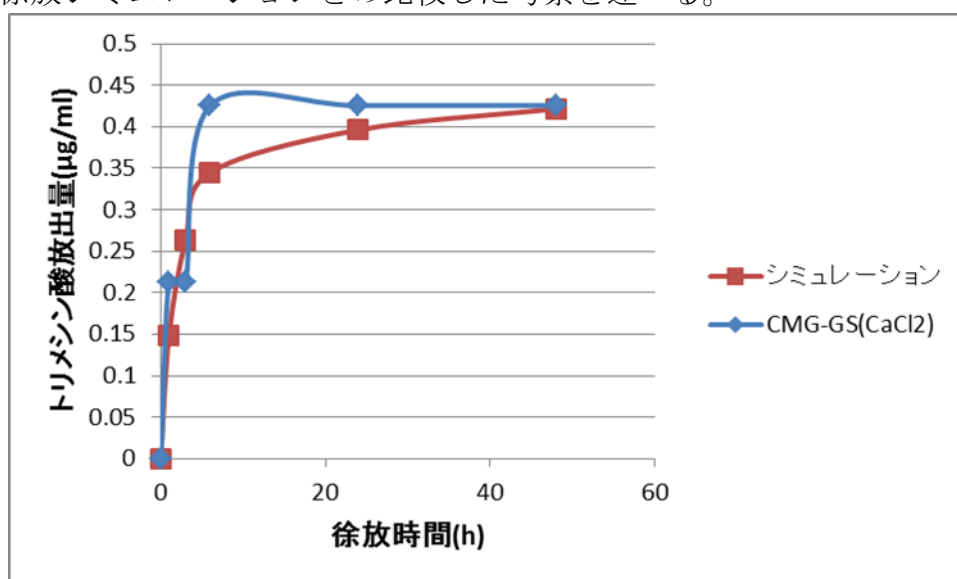


Fig.4-8 徐放シミュレーションと実験結果の比較

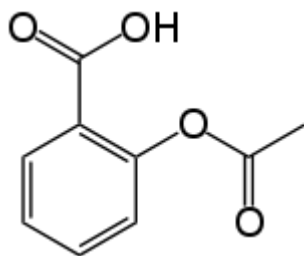
CMG-GS ハイドロゲルの CaCl_2 溶液中での徐放結果と比較し、徐放シミュレーションはトリメシン酸の徐放を予測出来ていると考えられる。実際の徐放結果がシミュレーションと比較してやや高いのは、CMG とトリメシン酸との結合定数に誤差があるからだと考えられる。実験条件を改善しより正確に結合定数の算出が出来れば、よりシミュレーションが正確に算出出来ると思われる。

4-5 薬物徐放治療シミュレーション

本研究は、薬物モデルとして bFGF、トリメシン酸の徐放を制御する硫酸化ジェランゲルの開発を目的として行った。本項目では、実際に硫酸化ジェランゲルを用いて薬物治療を行う際のシミュレーションを検討した。

➤ 薬物モデル・・・bFGF、トリメシン酸

トリメシン酸は薬物ではないが、同じカルボキシ基を持つ薬物モデルとして考えた場合の薬物徐放シミュレーションを考えた。
実際に使用可能であると思われる薬物として、消炎鎮痛剤として使用されているアスピリンが挙げられる。



- ・アスピリン
- ・分子量：180.16g/mol
- ・有効血中濃度：0.1mg/ml~0.4mg/ml

Fig.4-9 アスピリン構造

bFGF は以前の研究から有効濃度として $1\sim5\mu\text{g/ml}$ とした。

- トリメシン酸の生理食塩水中での結合定数： $K_a=2.74\text{E}+6(\text{M}^{-1})$
- bFGF の結合定数= $K_a=1.28\text{E}+9(\text{M}^{-1})$

【薬物条件】

- bFGF:100ng/ml
- トリメシン酸:150mg/ml

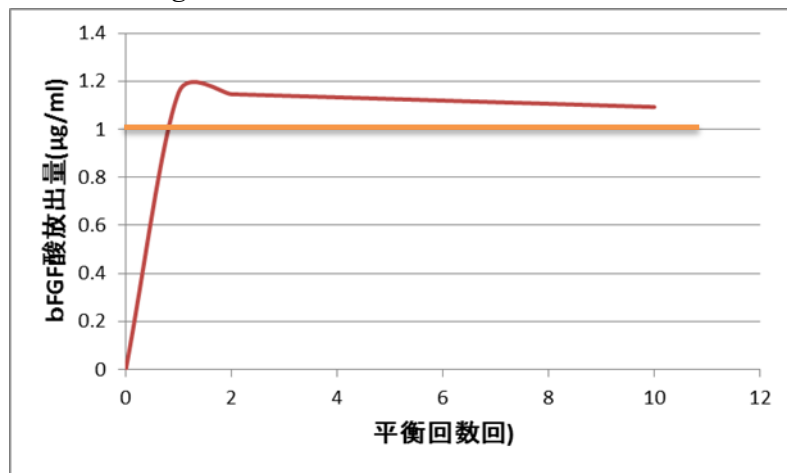


Fig.4-10bFGF の徐放シミュレーション

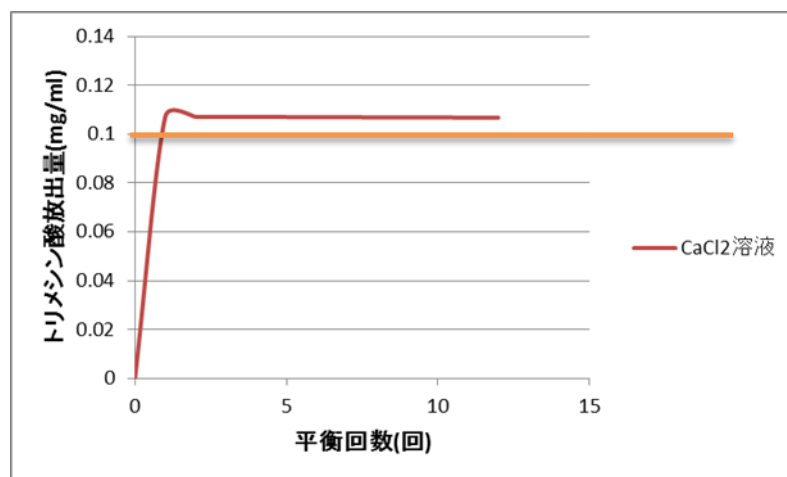


Fig.4-11 トリメシン酸徐放シミュレーション

— は、有効濃度範囲を示す。

bFGF の徐放には硫酸化ジェランゲルに 100ng/ml を吸着させ使用する事で bFGF 有効濃度内での徐放が可能であると言える。またトリメシン酸は 150mg/ml の濃度で硫酸化ジェランゲルに吸着させ徐放させる事でアスピリンの有効濃度内で徐放させる事が出来ると言える。トリメシン酸、bFGF とともに結合定数が分かれば、有効薬物濃度に合わせ予め薬物量を計算し、薬物徐放を行う事が可能であると思われる。今回はトリメシン酸を用いて徐放シミュレーションを行ったが、実際にはアスピリンのような消炎鎮痛剤の薬物徐放シミュレーションも可能であると考えられる。

5.結論

- 1.本研究より、硫酸化ジェランを固定化したハイドロゲルからの bFGF、トリメシン酸の調節した徐放が可能になった。
- 2.徐放方法に電荷的な吸着とキレート結合を用いているので、今後、硫酸化ジェランゲルから同時に二つの薬物を徐放させる事が出来る可能性が期待できる。
- 3.結合定数により薬物徐放シミュレーションが可能であると分かった。また予想した薬物モデルとの親和力以外に働く親和力に対して係数(α)と置き、徐放シミュレーションの式に導入する事でより正確なシミュレーションが出来る。

$$C_{(t)} = \frac{-1 \pm \sqrt{1+4KaCi}}{2Ka} \times \alpha$$

$C_{(t)}$:薬物放出量(M)

Ka :結合定数(M⁻¹)

C_i :吸着した薬物濃度(M)

α :他の親和力係数

6.参考文献

1. Perter D.Asmussen:Wound Care/ライフサイエンス(1998)
2. 上田 実:ティッシュ・エンジニアリング/名古屋大学出版会(1990)
3. 長尾 達郎:平成 18 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文、組織修復をコントロールする生体材料の開発
4. 清水 康治:平成 20 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文、組織修復としてのジェラン
5. <http://www5e.biglobe.ne.jp/~nurse/normal-knee.htm>
6. 田畑 泰彦:細胞増殖因子と再生医療/メディカルレビュー社(2006)
7. 園田 雄久:平成 21 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文、組織再生を誘導する硫酸化ネイティブジェランの調製
8. 上出 利光:生体機能分子データブック/中外医学社(2001)
9. 伊藤 信行:序 FGF と FGF レセプターファミリー・広がるフィールド/細胞工学 Vol24No10(2005)
10. Sara Guglieri: Minimum FGF2 Binding Structural Requirements of Heparin and Heparan Sulfate Oligosaccharides As Determined by NMR Spectroscopy /Biochemistry (2008)
11. A.Zieris:Dual independent delivery of pro-angiogenic growth factor from star-PEG-heparin hydrogels/Journal of Controlled Release(2011)
12. <http://hobab.fc2web.com/sub2-aspirin.htm>
13. <http://www.interq.or.jp/ox/dwm/se/se11/se1147002.html>
14. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_JP_CB6352437.htm
15. 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社:ジェランガムの基礎と食品への応用/FFI ジャーナル
16. 伊藤 寛之:平成 22 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文、椎間板軟骨再生材料の開発
17. 特許 2007-99875【出願日】平成 17 年 10 月 3 日【発明の名称】硫酸化多糖及びその製造法【出願者】チッソ株式会社【発明者】宮本啓一、内野正純、佐藤淳一
18. K.Nagasawa: Chemical sulfation of preparations of chondroitin 4- and 6-sulfate, and dermatan sulfate. Preparation of chondroitin sulfate E-like materials from chondroitin 4-sulfate/Carbohydrate Research(1986)
19. 所 崇:イムノアッセイ サイトカイン/科学技術総合リンクセンター(2008)
20. 糖鎖工学株式会社:産業調査会バイオテクノロジー情報センター(1993)

21. DeFail AJ: Controlled release of bioactive TGF-beta 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels./Biomaterials(2006)
22. Lu L: Controlled release of transforming growth factor beta1 from biodegradable polymer microparticles./J Biomed Mater Res.(2000)
23. B.Casu: Heparin-like compounds prepared by chemical modification of capsular polysaccharide from E. coli K5/Carbohydrate Reseach(1994)
24. Y.Inoue:Carbohydrate Reseach.46,87(1976)

謝辞

本研究において、この3年間丁寧な御指導、御指摘を受け賜りました堀内孝教授、宮本啓一准教授には深く感謝しております。また村上節子さんには日々研究室生活のお世話を頂きこの場をお借りして感謝申し上げます。

堀内孝教授には、私が大学院1年生の時突然留学の話をした所、急な事にも関わらず、留学先、留学手続き等多くの事に関して御力添えを頂き誠にありがとうございました。一か月と短く研究に関して多くの事は学べませんでしたが、この経験は今後の私の人生においてとても良い勉強になりました。

宮本啓一准教授には、本研究を行うにあたり、的確な助言や実験への取り組み方を教えて頂きました。不出来な私でありましたが、宮本先生から常日頃研究者として、人生の先輩として様々な事を学ぶ事が出来ました。これから私は社会人として様々な困難に直面すると思いますので、是非今後も宮本先生に御指導を受け賜りたく存じます。

村上節子さんには、まるで遠く離れて暮らしている母のように接して頂き、時には冗談を交えてお話し下さり、時には厳しくご指導を受け賜りして、本当に感謝しております。今後もお体に気を付けてください。

M2の大友さん、加藤君、熊澤君、佐々木君、野口君、東君、堀井君には、この3年間公私とも大変お世話になりました。皆と過ごしたこの研究室生活はとても楽しく、また大変有意義に過ごす事が出来ました。皆様の今後の御活躍を願っております。

共にジェランを研究して来た、丹羽君、小山君には本研究を行うにあたり大変お世話になりました。今後も研究に頑張ってください。

M1の阿部君、神谷君、葛本君、境君、田野さん、中村君、原君には研究生活でとてもお世話になりました。これから研究、就活と忙しいとは思いますが、御体に気を付けて残り1年間頑張ってください。

B4の伊藤君、影山君、清水君、叢さん、財部君、中町君、長谷川さんはこれから大学院へと進めますが、今後も研究を頑張ってください。北村さんは今年から同じ社会人としての道を歩むわけですが、今後益々のご活躍を願っています。

最後に、この3年間この生体材料化学研究室で過ごした皆さんとの思い出は決して忘れる事の出来ない充実した日々でした。この貴重な経験を今後社会人として歩む私の基盤として日々邁進して歩んで行こうと思います。
今まで本当にありがとうございました。

平成24年2月 吉日

8.付録

8-1 溶液の調製方法

リン酸バッファー(pH7.0).....500ml

リン酸二水素ナトリウム二水和物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....3.042g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....10.923g

リン酸バッファー(pH7.0).....1000ml

リン酸二水素ナトリウム二水和物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....6.084g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....21.846g

リン酸バッファー(pH7.4).....100ml

リン酸二水素ナトリウム二水和物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....0.296g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....2.901g

リン酸バッファー(pH7.4).....500ml

リン酸二水素ナトリウム二水和物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....1.480g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....14.505g

リン酸バッファー(pH7.4).....1000ml

リン酸二水素ナトリウム二水和物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....2.960g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).....29.01g

炭酸ナトリウムバッファー(pH9.6).....100ml

炭酸ナトリウム(Na_2CO_3).....0.1696g

炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3).....0.2856g

炭酸ナトリウムバッファー(pH9.6).....200ml

炭酸ナトリウム(Na_2CO_3).....0.3392g

炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3).....0.5712g

炭酸ナトリウムバッファー(pH9.6).....500ml

炭酸ナトリウム(Na_2CO_3).....0.848g

炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3).....1.428g

希釈緩衝溶液(pH7.0 リン酸バッファー +0.9%NaCl+1%BSA)
PBS+1%BSA

発色基質溶液・・・100ml

クエン酸一水和物・・・・・・・・・・・・・・・・0.7656g

リン酸水素二ナトリウム無水和物・・・・・・・・0.947g

ウォッシュバッファー・・・1000ml

PBS+500 μ l tween20(PBS に対して 0.05%)

2% Glutaraldehyde Solution

Glutaraldehyde Solution(50%)0.48ml を Sodium carbonate buffer(pH9.5)
11.52ml で希釈。

3.5% Mono-Ethanolamine Solution

Mono-Ethanolamine0.42ml を Sodium carbonate buffer(pH9.5)11.58ml で希釈。

8-2 フリー化ネイティブジェランの調製

【試薬】

- Native type Gellan (三栄源エフ・エフ・アイ株式会社)
- Hydrochloric acid (和光純薬工業株式会社)
- Aceton (和光純薬株式会社)

【使用器具】

- 1000ml セパラブルフラスコ
- 恒温槽
- 攪拌機
- 攪拌棒
- 攪拌子
- 塩化カルシウム管
- スタンド
- スターラー
- クランプホルダー
- クランプ
- スパチュラ
- ピペット
- ピペッター
- ビーカー
- 薬包紙
- 二方コック
- pH メーター
- 2L マイヤー
- アスピレーター
- ジムロート
- 凍結乾燥機
- 減圧乾燥機
- 氷水
- 脱イオン水
- パラフィルム

【実験方法】

- ①1000ml セパラブルフラスコにネイティブジェランを秤量し入れた。
- ②ジェラン 1g に対して 100ml の脱イオン水を加え、70℃で 20h 攪拌した。
- ③20h の攪拌後、溶液が pH3 以下になるまで 1N の HClaq を加えた。
- ④pH3 以下にした後、攪拌しながら室温まで冷却。
- ⑤冷却後、反応溶液をアセトンに滴下し再沈殿させた。
- ⑥再沈殿後、沈殿物をろ過し、得られた沈殿物を、凍結乾燥または 50℃での減圧乾燥により精製した。
- ⑦精製したフリー化ネイティブジェランはミキサーにより粉末化し、後の硫酸化ネイティブジェランの調製に用いた。

8-3FHO 測定

【試薬】

- | | |
|----------------------------|--------------|
| ➤ Dimethyl sulfonazo-III | (和光純薬工業株式会社) |
| ➤ Bariumchloride Anhydrous | (和光純薬工業株式会社) |
| ➤ Sulfuric Acid | (和光純薬工業株式会社) |
| ➤ 30% Hydrogen Peroxide | (和光純薬工業株式会社) |
| ➤ Ethanol(99%,50%) | (和光純薬工業株式会社) |
| ➤ Sodium Hydroxide 特級 | (和光純薬工業株式会社) |

【使用器具】

- | | |
|---------------|------------------------|
| ➤ FHO-A 型フラスコ | ➤ ワニロクリップ付きコード |
| ➤ 試料秤量濾紙(5A) | ➤ pH メーター |
| ➤ 100ml ビーカー | ➤ 氷水 |
| ➤ ピペット | ➤ 50ml メスフラスコ |
| ➤ パスツールピペット | ➤ スターラー |
| ➤ ガスバーナー | ➤ O ₂ ガスボンベ |
| ➤ ビュレット | ➤ 攪拌子 |
| ➤ スライドダック | ➤ パラフィルム |

【試薬の調製】

- 0.1% dimethyl sulfonazo-Ⅲ溶液

Dimethyl sulfonazo-Ⅲ(50.0mg)を脱イオン水(50.0ml)で溶解した。

- 0.02M Sodium Hydroxide

水酸化ナトリウム(80.0mg)を脱イオン水(100.0ml)で溶解した。

- 50% EtOHaq

EtOHaq(99%)と脱イオン水を 1:1 で混合した。

【0.005M 塩化バリウム水溶液の調製と力価(factor)の測定】

- ①塩化バリウム(1.221g)を秤量し、1000ml メスフラスコに入れ脱イオン水で正確に 1000ml に希釈。
- ②精密分析用 1N 硫酸 1.0ml を 100ml メスフラスコに入れ、50%EtOHaq で正確に 100ml に希釈した。
- ③2.で調製した 0.01N 硫酸 3.0ml に 5%EtOHaq17.0ml を加え、20.0ml とし、50ml サンプル瓶に入れる。これを 3 本用意した。

【力価(factor)の算出】

硫酸-エタノール溶液を各 3 本を 0.005M 塩化バリウム水溶液を用いて滴定した後、3 本の滴定量から平均滴定量を求める。ブランクについても同様に平均滴定量を求める。硫酸-エタノール溶液の平均滴定量を差し引くと正味の滴定量が求められる。滴定を行った 0.01N 硫酸 3.0ml には、硫酸(MW=98.0)が 1.47mg 含まれており、その内硫黄の含有率(S%)は、0.327%である。0.005M 塩化バリウム水溶液 1.0ml は、硫黄 0.1603mg に相当する。これらの結果を式(1)に代入した。

$$S(\%) = \frac{\text{滴定量(ml)} \times \text{factor} \times 0.1603}{\text{Sampleの量(mg)}} \times 100 \quad (1)$$

この(1)式から滴定液の factor を求めた。

【FHO の実験方法】

- ① 試料秤量用ろ紙の作成。ろ紙をハサミで適当な形に切った。直接手で触れない。
- ② カットしたろ紙の上に Sample を 20.0mg 量り取り、丁寧に適当な大きさまで折りたたんだ。
- ③ FHO-A 型フラスコに D.Dwater5.0ml、30%Hydrogen Peroxide2 滴入れ、内部を濡らした。
- ④ 白金バスケットをバーナーで焼いた。
- ⑤ ろ紙に包んだ Sample を白金バスケットに入れた。
- ⑥ ろ紙に包んだ Sample を白金バスケットにセットし、内部を酸素置換した。
- ⑦ 置換後直ちに活栓と共栓を閉じ外部と遮断し、専用クリップで止めた。
- ⑧ ワニロクリップ付きコードをスライダックに繋ぎ、ワニロクリップの両方をフラスコの銅線に挟みこんだ。
- ⑨ 電圧をかけ Sample とろ紙を燃焼させた。
- ⑩ 燃焼後、フラスコを氷水に入れて 30 分間冷やした。
- ⑪ 冷却後、白金バスケット上部のメスピペットに脱イオン水 5.0ml と 99.0%Ethanol,10.0ml を入れ、活栓を開きフラスコ内を洗浄した。
- ⑫ フラスコ内を 50.0%Ethanol で洗浄しながら溶液をメスシリンダーに移し、50.0%Ethanol で正確に 50.0ml に調製した。
- ⑬ 溶液を 100ml ビーカーに移し換え、攪拌しながら 0.02MSodium Hydroxide を滴下。pH を 6~7 に調製した。
- ⑭ 検液を 5.0ml ずつサンプル瓶 10 本に入れ、0.1%Dimethyl Sulfonazo-III Solution を 2 滴ずつ入れた。
- ⑮ ビュレットを用い、0.005M Barium Chloride Anhydrous Solution で滴定した。溶液色が 赤紫色から青緑色に変色する点を終点とした。ブランクとして 50.0%Ethanol を 5.0ml ずつ サンプル瓶に入れ、同様の滴定を行った。
- ⑯ 検液の滴定量からブランクの検定量を引いた値を正味滴定量とし、(2)式から S(%)を求めた。

$$S(\%) = \frac{\text{正味滴定量(ml)} \times \text{滴定濃度(mmol/ml)} \times S\text{原子量} \times \text{factor} \times 100}{\text{Sample(mg)}} \times 100 \quad (2)$$

以上のように滴定を行い、サンプル中の硫黄の定量を行った。

硫酸化度の算出方法

ネイティブジェランの 1repeat unit M.W.は 1505g/mol であり、FHO の測定によって得られた S(%)は重量%である。硫酸化ネイティブジェランはネイティブジェランの遊離の水酸基（全 17 個）の水素が硫酸基に置換されている。このことより、以下の Table.1 を導き、そこから Table.2 を導き(3)式を導いた²⁾。

硫酸化部位数 ~ NG : 17

8UNITの分子量~1505

Sの数	硫酸化部位数	分子量	S(%)	硫酸化率(NG)
0	0	1505	0.00	0.00
1	1	1585	2.02	5.88
2	2	1665	3.84	11.76
3	3	1745	5.50	17.65
4	4	1825	7.01	25.53
5	5	1905	8.40	29.41
6	6	1985	9.67	35.29
7	7	2065	10.85	41.18
8	8	2145	11.93	47.06
9	9	2225	12.94	52.94
10	10	2305	13.88	58.82
11	11	2385	14.76	64.71
12	12	2465	15.58	70.59
13	13	2545	16.35	76.47
14	14	2625	17.07	82.35
15	15	2705	17.74	88.24
16	16	2785	18.38	94.12
17	17	2865	18.99	100.00

Table.1 硫黄の含有数と硫酸化度の関係

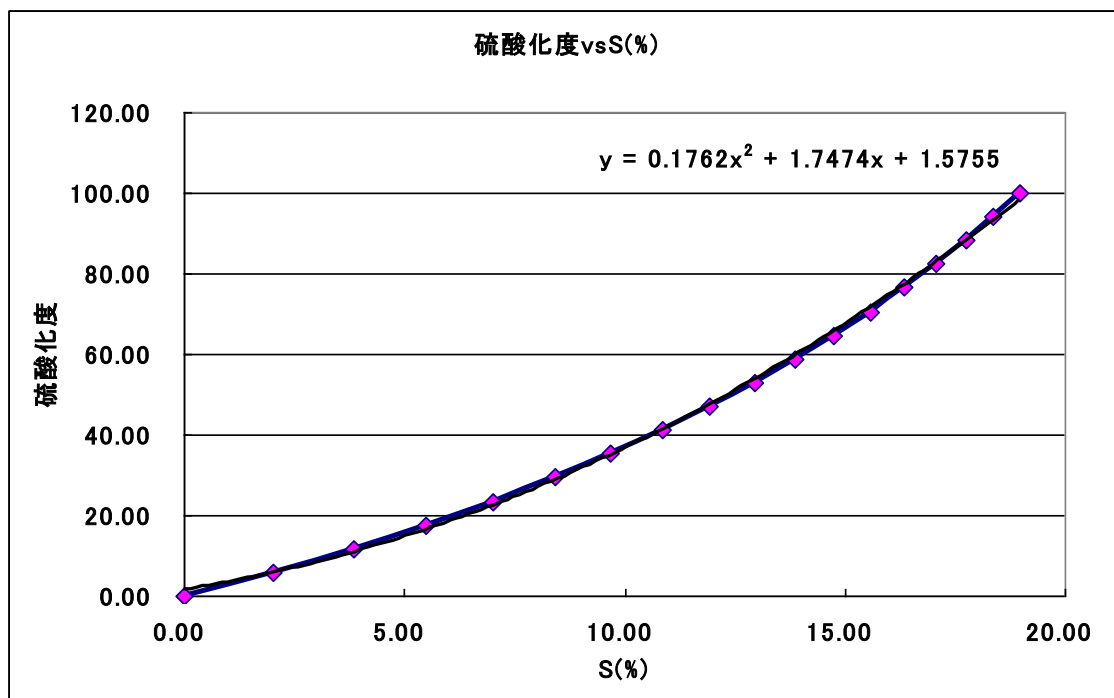


Table.2 硫酸化 vs S(%)

$$\text{硫酸化度} = 0.1762x^2 + 1.7474x + 1.5755 \quad x = S(\%) \quad (3)$$

8-4G.S 固定化プレート作成

【試薬・器具】

- | | |
|---------------------|------------|
| ➤ ELISA 用アミノ基プレート | ➤ スkimミルク |
| ➤ G.S | ➤ 振とう機 |
| ➤ NaBH ₄ | ➤ インキュベーター |
| ➤ リン酸バッファー | ➤ 8 連ピペット |
| ➤ 炭酸バッファー(pH9.5) | ➤ チップ |
| ➤ D.D.Water | ➤ プレート洗浄器 |
| ➤ グルタルアルデヒド aq 50% | ➤ プレートシール |
| ➤ モノエタノールアミン | |

【方法】

1. リン酸バッファー(pH7.0)2ml に G.S10mg を溶解させ、NaBH₄ を 0.8mg 加える。
2. 上記の溶液を ELISA 用アミノ基プレートに 100 μ l ずつ加え、37℃で 48h 静置。
3. 脱イオン水でプレートを 4 回洗浄後、2%グルタルアルデヒド溶液(炭酸ナトリウムバッファーpH9.5 で希釈)を 100 μ l ずつ入れ、37℃で 2h 静置。
4. 脱イオン水でプレートを 4 回洗浄後、3.5%モノエタノールアミン溶液(炭酸ナトリウムバッファーpH9.5 で希釈)を 100 μ l ずつ入れ、37℃で 2h 静置。
5. 脱イオン水でプレートを 4 回洗浄後、3%スキムミルク(リン酸バッファーpH7.4 で希釈)を 100 μ l ずつ入れ、37℃で 1.5h 振とう。
6. リン酸バッファー(pH7.0)+0.9%NaCl(*PBS)で 4 回洗浄し、乾燥後-80℃で冷凍保存。

8-5G.S 固定化プレートを用いた ELISA 実験方法

【器具・試薬】

- | | |
|----------------------------|----------------------------------------------|
| ➤ G.S 固定化プレート | ➤ OPD タブレット |
| ➤ bFGF | ➤ 発色停止試薬(1N H ₂ SO ₄) |
| ➤ ビオチン化 anti-bFGF(μ g/ml) | ➤ 振とう機 |
| ➤ HRP 標識ストレプトアビジン(200 倍希釈) | ➤ インキュベーター |
| ➤ PBS(pH7.0+0.9% NaCl) | ➤ 8 連ピペット |
| ➤ 希釈緩衝溶液(PBS+1% BSA) | ➤ プレート洗浄器 |
| ➤ 発色基質溶液 | ➤ プレートシール |
| ➤ 過酸化水素 | ➤ マイクロプレートリーダー(490nm) |

【実験方法】

1. bFGF を希釈緩衝溶液で希釈する。(スタンダード濃度 0～200ng/ml)
2. G.S 固定化プレートにスタンダードを 100 μ l ずつ入れ、プレートシールを貼り r.t. で 2h 振とう。
3. プレートを PBS で 4 回洗浄し、ビオチン化 anti-bFGF(1 μ g/ml)100 μ l ずつ入れ、プレートシールを貼り、r.t. で 2h 振とう。
4. プレートを PBS で 4 回洗浄し、HRP ストレプトアビジン(200 倍希釈)を 100 μ l ずつ入れ、プレートシールを貼り 30min 振とう。
5. 発色基質溶液に H₂O₂ を 5 μ l 入れ、OPD タブレットを 1 錠入れる。(溶液はアルミホイル等で遮光しておく。)
6. プレートを PBS で 4 回洗浄し、発色基質溶液を 100 μ l ずつ入れ、遮光し 15min～30min 静置。
7. 1N の H₂SO₄ を 100 μ l ずつ入れ 490nm で吸光度を測定する。