

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655149

研究課題名（和文） 免疫抑制のための生体適合性共連続体膜の創成

研究課題名（英文） Development of Biocompatible Co-continuous Membrane for Immune Depression

研究代表者

細矢 憲 (HOSOYA KEN)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00209248

研究成果の概要（和文）：異種動物の膵島移植を可能にする、免疫細胞は通さず、糖、酸素、インシュリンは出入り可能で、血管新生が容易な生体適合性共連続体膜の開発を行った。ポリエチレングリコール鎖を有するモノマーから合成した共連続体膜は、優れた生体適合性を示し、ラット埋め込み実験において、組織との癒着を抑え、血管新生を可能にする多孔質膜を得ることに成功した。また、それらを皮下埋め込み可能なバック状に試作成形することにも成功をした。

研究成果の概要（英文）：Biocompatible, co-continuous membranes which excluded immune cells but crossed by oxygen, glucose, and insulin were developed. A co-continuous membrane derived from poly-ethylene glycol based monomer showed excellent biocompatibility and controlled adhesion of tissue, while good vascularization was observed in rat body. A small bag for subcutaneous implant was also experimentally produced.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学，生体関連化学

キーワード：免疫・生体適合性・共連続体・移植・膵島

1. 研究開始当初の背景

2010年10月にインシュリン依存型糖尿病に関する膵島移植技術が先進医療として承認された。これは血糖値の安定しないインシュリン依存型の糖尿病患者の血糖値の安定化のために行われる移植治療であるが、心停止ドナー膵島移植であるため免疫抑制剤の投与が必須となる。しかし、免疫抑制剤の連続投与は患者へ与える悪影響も多く、経済的負担も大きい。

一方、申請者は骨格と空隙が3次的に絡み合い連続する共連続体の開発を行ってきた。空隙（孔）のサイズはナノサイズからミリサイズまで自在に変化させることが可能であり、骨格の性質もモノマーの選択により、

自由にその性質を変えることが可能であり生体適合性の高いソフト界面の形成も容易である。もし仮に、大きさが概ね400 μm の膵島組織を免疫細胞から膜で隔離し、かつ、糖や酸素、糖に反応して放出されるインシュリンが自由に通過可能で、かつ、生体成分や細胞の癒着の無い生体適合材料で共連続体膜を作成することができれば、免疫抑制剤を必要としない膵島移植技術に貢献できるのではないかと本研究の着想を得た。

2. 研究の目的

本課題は以下の三つの小目的により構成されている。

(1) 免疫細胞は通過できないが、糖、酸素、

インシュリンは通過できる 100 nm 程度の貫通孔を有する共連続体膜を開発する。

- (2) 膜素材を柔軟かつ生体成分や細胞の癒着が無い素材で構成、あるいは、追加表面処理する。
- (3) 共連続膜を「袋状」に成形し、膜厚 1 mm 程度、内部空洞厚み 600 μ m 程度にする。

これらの小目的の達成により、膵島細胞を内部に閉じ込め、免疫反応を受けない状態で、糖に反応してインシュリンを放出する移植用の生体適合性多孔性デバイスを創成する。すなわち本課題は、免疫抑制剤を必要としない膵島細胞の移植技術の開発という夢につながる。

3. 研究の方法

前述の三つの小目的に従って、

- (1) 免疫細胞は通過できないが、糖、酸素、インシュリンは通過できる 100 nm 程度の貫通孔を有する共連続体膜を開発した。
- (2) 膜素材を柔軟かつ生体成分や細胞の癒着が無い素材で構成、あるいは、表面処理した。
- (3) 共連続膜を「袋状」に成形し、膜厚 1 mm 程度、内部空洞厚み 600 μ m 程度にした。

これらの課題を(1)と(2)においては、同時進行で進め、成果を得た後で、その成形方法 3 について詳細に検討を行った。共連続体膜の重合段階での成形、つまり鋳型を用いる場合には、鋳型内部での重合を再度検討しなおし、1 と 2 の性質を持つ共連続体を得られるかどうか？フィードバックを行いつつ、進めた。

検討項目は下記の 5 項目である。

- (1) 反応誘起相分離を用いるナノサイズ細孔を有する有機高分子共連続体の合成
本課題の第一のポイントである。図 1 は申請者らが開発したミクロンサイズの細孔を有する共連続体構造であるが、反応条件、ポロジェン(孔を形成する溶媒)を変化させることにより、ナノサイズ、特に 100 nm 以下の細孔を有する共連続体を合成できる条件の検討を行った。

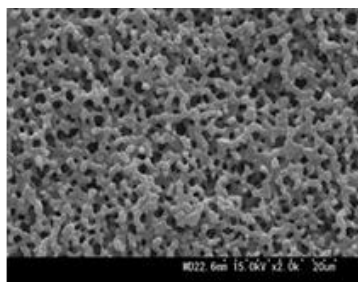


図 1 共連続構造

代表的な発泡法では、超臨界発泡でもナノサイズの連通孔を得ることは不可能であり、本法が唯一となる。

- (2) 共連続体の物質透過、およびその速度の検討

上記(1)で得られた各種細孔径サイズを有する共連続体において、まずは、低分子の糖やインシュリンに対する相互作用の検討、透過の検討、さらには、酸素透過に関する検討を行った。上図のミクロンサイズの共連続体の場合、これらの化合物の透過に全く問題は無いが、ナノサイズの細孔を有する共連続体の場合には、全く未知であるので、基礎的な検討を含めて詳細に検討を行った。

通常の「溶解」を伴ういわゆる高分子膜を用いるのではなく、物理的な連続孔を有する共連続体の場合には、透過の早さがポイントになる。透過の速度を測定することにより、共連続体膜の厚みをどの程度にすればよいか？を合わせて検討した。

- (3) 生体成分や細胞組織の癒着の無い、生体適合性有機高分子の開発と、共連続構造体の開発

図 2 に示すモノマーは本課題に用いる生体適合性の高いモノマー第一候補である。本モノマーは水溶性であり、他のモノマーには無い親水性があることに加え、ソフト界面を構築可能なプロピレンオキシド骨格を有している。このことから第一候補と考えた。

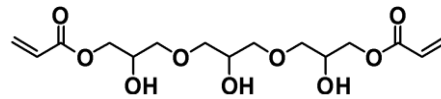


図 2 候補モノマー

このモノマーを用いて、方法(1)で検討した反応条件を応用してナノサイズを有する共連続構造膜を開発した。本モノマーを用いる合成方法の利点は、ポロジェンの洗浄などに有機溶媒を用いることなく「水」を用いることが出来る点が挙げられる。つまり、環境に優しい方法であり、また、医療器具への応用を考えた場合にも大きな利点となりうる。

- (4) 生体適合性の検討と、表面修飾による生体適合性のさらなる向上と安定性の確認

方法(3)で得られたナノサイズの細孔を有する共連続体を用いて、生体成分に対する非特異的な吸着等がないか、また、細胞の癒着がないか、等検討を行った。生体成分に関しては、血液を対象に検討を行い、リゾチームやアルブミンなどのタンパク質、グルコースに加えて、

ナトリウム、カリウム、カルシウム等のイオンについても検討を行った。

- (5) 皮下埋め込みが可能な小バック状に試作成形を行った。

4. 研究成果

前述の5つの検討項目について記載する。

- (1) 反応誘起相分離を用いるナノサイズ細孔を有する有機高分子共連続体の合成

反応条件を制御することで、図3に走査型電子顕微鏡写真を示すように、図1に示した共連続体の構造とは異なり、明確な細孔が見えない、つまりナノ細孔を有する共連続体を合成することができた。

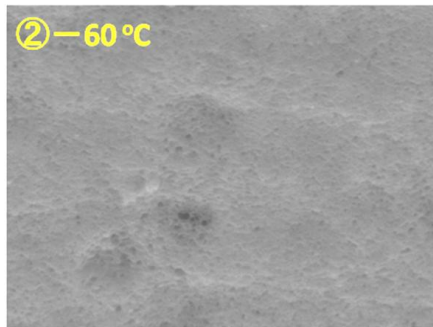


図3 ナノ細孔共連続体

重合温度は60度であり、成形温度としても許容範囲である。また、本合成には水溶性の多孔質化溶媒を用いているため、重合後の洗浄を温水で行うことが可能であった。

- (2) 共連続体の物質透過、およびその速度の検討

親水性が高いモノマーで合成したため、水に完全にぬれ、水および酸素の透過を確認した。また、グルコース、およびインジュリンの非特異的吸着は見られず、膜通過を確認したが、通過速度の測定には至らなかった。

- (3) 生体成分や細胞組織の癒着の無い、生体適合性有機高分子の開発と、共連続構造体の開発

図2に示したモノマーや、その他親水性モノマーを用いて合成した種々の共連続体を用いて、11週齢雄ラット皮下に埋め込み41日後にポリマーを観察したところ、同じモノマーから合成した共連続体でも細孔構造が異なる、つまり、表面状態が異なることで組織との癒着、血管新生に大きな影響があることが明らかとなった。

最も柔軟で比較的細孔構造が緻密な共連続体を埋め込んだ場合、図4に示すように、組織との癒着を抑え、ポリマー

上の血管新生を誘導することが明らかとなった。このことから、親水性モノマーと開発した方法で得られた共連続体膜が当初の予想通り、皮下移植に利用できる可能性が見いだせた。

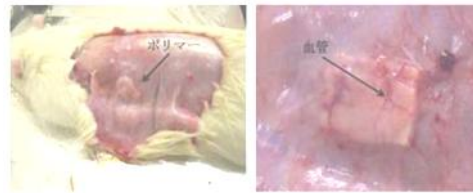


図4 ポリマーのラット皮下の状態

- (4) 生体適合性の検討と、表面修飾による生体適合性のさらなる向上と安定性の確認

本研究に用いたモノマーを用いて、液体クロマトグラフィー用共連続体カラムを作成し、種々の化合物に対する保持特性を検討した。その結果、親水性低分子化合物に対する保持特性は良好である一方で、タンパク質に対してはほぼ保持を与えず、このことから、非特異的吸着の無い素材であることを確認した。

- (5) 皮下埋め込みが可能な小バック状に試作成形を行った

上記結果で得られた共連続体を特殊な方法で合成、成形し、図5に示すようなバック状に成形することに成功した。現状内部の空隙厚みは1ミリ以下であるが、全体の厚みが成形の関係で3ミリと少し分厚く、改良の余地を残している。

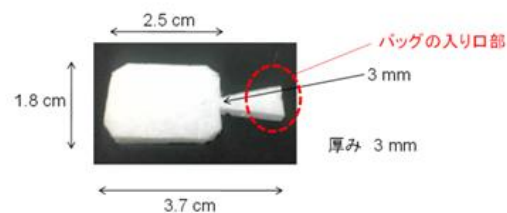


図5 成形した共連続体バック

このように、検討課題の大部分において、当初の計画通りに基礎的な成果を得ることができた。今後これらのデバイスの実用化に向けての検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

- (1) K. Hosoya,
Simple LC using New Macroporous Polymers.

Chromatography, 34, No. 1, 1 - 22 (2013). 査読有

http://chromsoc.jp/Journal/pdf/34-1_1.pdf

- (2) T. Tanigawa, T. Kubo, and K. Hosoya, Specific chromatographic retentions on polymer pore-surface of macroporous spongy monoliths. *Chem. Lett.*, Vol. 41, No. 10, pp. 1265-1266, (2012). 査読有 DOI: 10.1246/cl.2012.1265
- (3) T. Mori, T. Kubo, K. Kaya, and K. Hosoya, Comprehensive study of proteins that interact with microcystin-LR. *Anal. Bioanal. Chem.*, Volume 402, Number 3, 1137 - 1147 (2012). 査読有 DOI: 10.1007/s00216-011-5514-1
- (4) T. Mori, T. Kubo, and K. Hosoya, Polymers of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine truly work as cell membrane mimic? *Colloids Surf. B*, 84, 181 - 186 (2011). 査読有 DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.12.033

[学会発表] (計 20 件)

- ① 親水性ハイブリッドポリマーの調製と評価
伊藤晴香, 谷川哲也, 久保拓也, 細矢 憲, 第 23 回クロマトグラフィー科学会議, 岐阜, 2012 年 11 月 15 日 (ポスター)
- ② PEG 系ヒドロゲルの分子認識刺激に基づく膨潤・収縮挙動の基礎評価
富永雄一, 久保拓也, 末吉健志, 細矢 憲, 大塚浩二, 第 23 回クロマトグラフィー科学会議, 岐阜, 2012 年 11 月 15 日 (口頭)
- ③ スポンジモノリスの保持特性及び機能化の検討
谷川哲也, 久保拓也, 細矢 憲, 第 23 回クロマトグラフィー科学会議, 岐阜, 2012 年 11 月 15 日 (口頭)
- ④ 機能性高分子多孔体の開発とクロマトグラフィー分析の簡便化
細矢 憲, 第 23 回クロマトグラフィー科学会議, 岐阜, 2012 年 11 月 15 日 (受賞講演) 分子認識刺激応答・伸縮性ヒドロゲルの開発
久保拓也, 富永雄一, 細矢 憲, 大塚浩二, 第 21 回ポリマー材料フォーラム, 小倉, 2012 年 11 月 1 日 (ポスター)
- ⑤ 分子刺激応答性ヒドロゲルを用いた水溶性化合物の選択的捕捉
富永雄一, 久保拓也, 細矢 憲, 大塚浩二, 日本分析化学会第 61 年会, 金沢, 2012 年 9 月 19 日 (口頭)

⑥ 多層型親水性ハイブリッドポリマー充てん剤の調製とその基本特性

伊藤晴香, 久保拓也, 細矢 憲, 第 19 回クロマトグラフィーシンポジウム, 東京, 2012 年 5 月 25 日 (ポスター)

⑦ Mystery of molecular recognition ability on surface of polymer-based macroporous media

T. Tanigawa, T. Kubo, K. Hosoya, IACIS2012, Sendai (Japan), 23, May 2012 (Poster)

[その他]

ホームページ等

① <http://www.kpu.ac.jp/cmsfiles/contents/0000001/1645/13.pdf>

② <http://chromsoc.jp/Secretariat/pdf2/profile2012.pdf>

③ http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/poly_mat_design/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細矢 憲 (Hosoya Ken)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号 : 00209248