

# Xnano / X1

局在表面プラズモン共鳴解析システム

アプリケーションノート

## ハイドロゲルへの標的分子の吸収と充填量の計測

Tracking Adsorption & Loading of Target Molecules into Hydrogels

Insplorionの局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) 技術は、標的分子のハイドロゲルへの吸収測定を可能にし、充填量の算出を実現しました。ここでは、インプラント用の抗菌コーティングおよび生体適合性の改善への使用事例を紹介します。

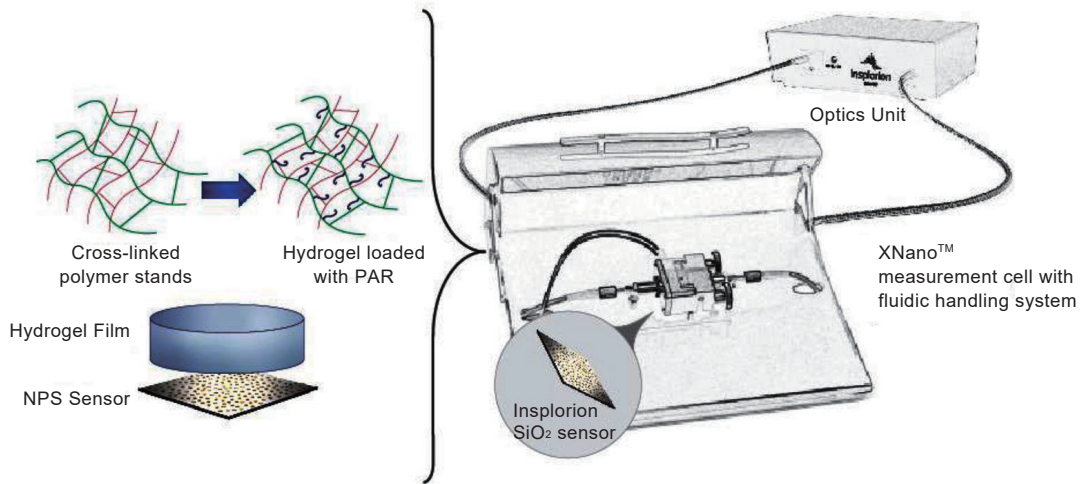
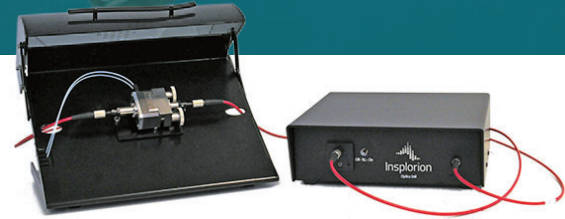


図 1. Xnano システムとセンサー：ハイドロゲル膜をコーティングしたセンサーの略図（下図）と架橋ハイドロゲルポリマー鎖への PAR の付着（上図）を示しています。

## イントロダクション

ハイドロゲルは、最大 90%の水と架橋親水性ポリマーのネットワークによって形成される固体です。アプリケーションは、農業から医療機器、ドラッグデリバリーまで多岐にわたります。吸収性が高く、拡散速度が遅いため、時間をかけて連続的に放出する必要がある標的を充填するのに理想的な候補です。特に医療用途では、抗炎症性分子、抗菌性分子、および医薬分子を放出することにより、インプラントの生体適合性と有効性を改善したり、インプラント表面を免疫調節したりするために使用できます。ここでは、NPS (Nano Plasmonic Sensing) を使用して、充填量を検証し、2つのハイドロゲルの充填能力を決定しています。

## 実験手順

1回目の試験では、ヒアルロン酸チラミン (HA-チラミン、1% (w/v)) と混合したゼラチン (14% (w/v)) の溶液を作製しました。次に、加熱した溶液を NPS センサー上にスピコートしました。2つのプロセスを使用して膜を架橋し、相互浸透ネットワーク (IPN) を取得しました。トランスグルタミナーゼを使用して、リジンとグルタミン残基の間にアミド結合を形成し、西洋ワサビペルオキシダーゼによるチラミンのジチラミンへの二量化に基づくチラミン架橋結合を形成しました。センサーを XNano フローチャンバー内に配置し、安定したベースラインを確認後、ウシ血清アルブミンタンパク質溶液を流しました。LSPR のプラズモンピークを計測し、変化量をグラフ化しました。

2番目の試験では、ゼラチン (ゲルまたはゲル / HA-Ald で、それぞれ 5% または 4.5% (w/v)) を HA-アルデヒド (0.5% (w/v)) と混合し、Tris 溶液に溶解しました。溶液を加熱し、センサー上にスピコートしました。続いて膜を室温で 30 分間、トランスグルタミナーゼ酵素で架橋させました。センサーを XNano フローチャンバーに配置し、ポリアルギニン (PAR) 溶液 (PBS 中 78 nmol) を 100  $\mu$ L/min の速度で流しました。プラズモニックピークの重心をリアルタイムで計測しました。PAR の体積質量濃度は、サンプルが均一で、NSP プロブの深さより十分厚いという仮定に基づき、以下の方程式を使用して計算されました。

$$Cs = \frac{\Delta n_s}{dn_s/dc} = \frac{\Delta \lambda_{NPS}}{S_0 \cdot dn_s/dc}$$



meiwafosis.com

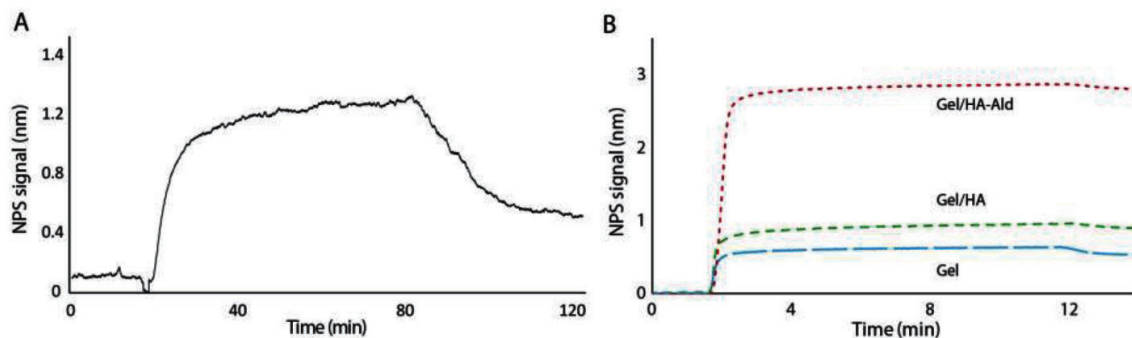


図 2： (A) センサーにコーティングされた Gel / HA チラミン膜への BSA の吸収と充填のリアルタイム計測。  
(B) PAR (ポリアルギニン) の充填量比較：Gel (青点線)、Gel / HA (緑点線)、Gel / HA-Ald (赤点線)。

## 結果

図 2 (A) は、BSA が吸着し Gel / HA チラミン膜にロードされる際の 1nm のピークシフトを示しており、その充填機能を検証しています。著者らは、3D 共焦点顕微鏡で分子の存在、SEM でコーティング膜の厚さが 20  $\mu\text{m}$  であることを確認しています。この膜は、*in vitro* でマクロファージ細胞に抗炎症カクテルを送達するための媒体として使用されました。表現型の制御に効果的に役立ち、創傷治癒アッセイの結果を改善することが示されました。

2 番目の試験では、3 種類のハイドロゲル膜 (ゼラチンタイプ B (Gel)、ネイティブ HA を含むゼラチン (Gel / HA)、および HA アルデヒドを含むゼラチン (Gel / HA-Ald) について NPS を使用して PAR の充填量を比較しました (図 2 (B))。Gel / HA-Ald が、25 nmol/mL で PAR の最大充填量を示しました。一方、Gel および Gel / HA は、それぞれ 6 nmol/mL および 5 nmol/mL の充填量がありました。Gel / HA アルデヒドの充填量の大幅な増加は、HA のアルデヒド部分と PAR のアミノ基 (末端または主鎖) の間に形成される共有イミン結合 ( $\text{CH}=\text{N}$ ) によって説明できます。上澄みの蛍光標識された PAR の量を定量化する放出試験では、Gel / HA-Ald が Gel と比較してより長い放出プロファイルを示しており、充填と同様の結果をもたらしました。このように著者らは、Gel / HA-Ald 膜が PAR のリザーバーとしてより優れた機能を発揮すると結論付けました。その後、彼らは細胞株を使用した生存率、代謝、および形態を、細菌に対する有効性の観点からシステムを評価しました。

Gel / HA-Ald および PAR も、細胞の生存率または代謝に影響しませんでした。PAR の放出により、接合部での細胞間接着が改善されました。これは血管新生 (血管成長) が改善されたことを示しています。細菌で培養した場合、PAR を経時的に放出するサンプルには目に見える細菌はありませんでしたが、PAR を含まない Gel / HA-Ald は細菌の増殖を示しました。

## 結論

各研究では、抗炎症性、抗菌性、血管新生促進の標的を放出する用途向けにハイドロゲルをテストする前に、それぞれのハイドロゲル、特に充填量の特性評価に NPS を使用しました。それらは両方とも、NPS がハイドロゲルの充填量を決定および比較するための良い方法であることを示しています。充填と放出 (これらの試験は示されていない) は、制御状態でリアルタイムに追跡できます。NPS にはさらなる利点が二つあります。光学質量は吸着水に反応しないため、水分子を交換しても質量損失は生じません。また、センサーのプロープの深さが短いため (数十 nm)、この手法はハイドロゲルの膨潤および解膨潤の影響を受けません。

この研究は、Helena Knopf - Marques と Nihal Engin Vrana が、フランスのストラスブールにある INSERM U1121、Biomaterials and Bioengineering、およびフランスのストラスブールにある PROTiP Medical の共同研究者によって実施されました。

## 参考文献

- [1]  
Multifunctional polymeric implant coatings based on gelatin, hyaluronic acid derivative and chain length-controlled poly (arginine).  
*Knopf-Marques et al.* (2019)  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.071>
- [2]  
Generation of anti-inflammatory macrophages for implants and regenerative medicine using self-standing release systems with a phenotype-fixing cytokine cocktail formulation.  
*Riabov et al.* (2017)  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.071>

**meiwafosis.com**  
メイワフォーシス 株式会社

東京 TEL (03) 5379-0051 FAX (03) 5379-0811  
〒160-0022 新宿区新宿1-14-2 KI御苑前ビル

名古屋 TEL (052) 686-4794 FAX (052) 686-5114  
〒464-0075 名古屋市千種区内山3-10-18 PPビル3F

大阪 TEL (06) 6212-2500 FAX (06) 6212-2510  
〒542-0074 大阪市中央区千日前1-4-8 千日前M'sビル9F

仙台 TEL (022) 218-0560 FAX (022) 218-0561  
〒981-3133 仙台市泉区泉中央3-4-1

テクノロジーラボ 東京都立産業技術研究センター 〒135-0064 東京都江東区青海2-4-10 製品開発支援ラボ318