

# 薬品含有型細胞膜穿孔体の開発

システム科学技術学部 機械知能システム学科

2年 樋口 京哉

1年 竹山 瑞希

1年 畠山 皓

1年 吉永 琢磨

指導教員 システム科学技術学部 機械知能システム学科

准教授 齋藤 敬

指導補助 システム科学技術研究科 機械知能システム学専攻

2年 橋本 孝博

## 1. 諸言

細胞改変を行うための手段の一つとして、細胞膜を穿孔して細胞内に物質を導入する技術がある。本研究は人工生体機構研究室の独自技術である、光化学酸化反応による細胞膜穿孔体の改良を目的としたものである。この細胞膜穿孔体は現在のところ柔軟なナノブラシ状表面を持つシリコーンポリマー（ポリジメチルシロキサン，PDMS）で作成されており、細胞群への穿孔が行えること、細胞自身が修復できる程度の酸化処理を施す等の特徴から細胞生存率が高い。穿孔のためには光化学酸化反応を誘起する光増感剤を使用するが、従来は光増感剤を分散したポリマー材料を、ナノサイズの垂直孔がエッチングにより形成された鋳型上に流し込み、ナノブラシ状に重合固化成型していた。しかしながらこのプロセスは固化成型に数時間を要するため、量産に向かない。このため本研究においては、加熱成型可能な樹脂材料（ポリエチレン・ポリプロピレン・ポリエチレンテレフタレート）へ光増感剤を直接浸潤させ、穿孔体の作成を簡略化することを目指した。なお関連するものづくり技術習得のため（鋳型設計，ポリマー重合成型等），かわさきロボット競技大会に向けてロボット製作も行った。

## 2. 実験内容

細胞膜穿孔体を用いた細胞改変に向け、ポリエチレン・ポリプロピレン・ポリエチレンテレフタレートを用いて細胞改変に使用される薬品～光増感剤～ヘマトポルフィリン類の浸透性の確認実験を行った。

### 2-1. 使用材料

光増感剤 1：ヘマトポルフィリン二塩酸塩

光増感剤 2：ヘマトポルフィリン

光増感剤溶媒 1：メタノール特級 99.8%（以下，MeOH）

光増感剤溶媒 2：トルエン

## 樹脂素材

ポリエチレン（ファイル），ポリプロピレン（クリアホルダ），ポリエチレンテレフタラート（以下，PET）（飲料水容器），ナノ突起 PET（60° 光散乱板，渋谷光学），塩化ビニル（カードケース）

### 2-2 実験手順

- ・各樹脂素材をを短冊状に切断する。
- ・切断した材料をヘマトポルフィリン二塩酸塩 16mM メタノール溶液に 10 分，40 分浸潤する。
- ・超純水で洗って乾燥させる。
- ・蛍光顕微鏡を用いてヘマトポルフィリン類の赤紫色（透過像）や赤色蛍光を観察し，浸潤具合を確認。
- ・材料をカッターで切断し，断面を観察し，表面からの浸潤状況を確認
- ・同様な実験をヘマトポルフィリン 16mM トルエン溶液でも行った。

### 3. 実験結果と考察

#### 3.1 ヘマトポルフィリン二塩酸塩メタノール溶液

図 1 に顕微鏡（倒立型蛍光顕微鏡 IX71，オリンパス）で観察した材料の表面透過像を示す。顕微鏡の倍率は対物レンズ 10 倍で観察した。それぞれ左から順にポリエチレン・PET・ポリプロピレンで上から浸潤時間 10 分，40 分である。浸潤時間 20 分，断面の撮影も行ったがスペースがないため省略する。

#### 3.2 ヘマトポルフィリントルエン溶液

図 2 に顕微鏡で観察した材料の断面蛍光像を示す。顕微鏡の倍率は対物レンズ 10 倍で観察した。左から順にポリエチレン・PET・ポリプロピレンで上から浸潤時間 10 分，40 分である。浸潤時間 20 分・断面・塩化ビニルでの実験も行ったがスペースがないため省略する。

浸潤後，素材表面に均一にヘマトポルフィリン類が付着するか確認，不均一なものは除き，断面を確認した。メタノール溶液よりはトルエン溶液が浸潤性がよく，PET，ポリプロピレン，ポリエチレンの順にヘマトポルフィリンが浸潤した，10 分間で PET が唯一染み込み，40 分間になってようやくポリプロピレンが染み込んだ。ポリエチレンは全体的に染み込まなかった。ナノ突起 PET は薄いシートであったためか 20 分頃から溶け出し，40 分ではほとんど無くなった。そのため断面の撮影は一部のみ行えた。

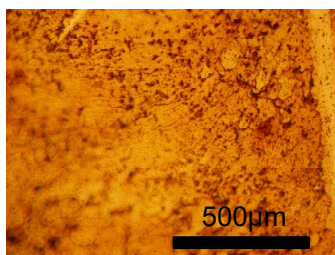


図1.1 ポリエチレン表面 (10)

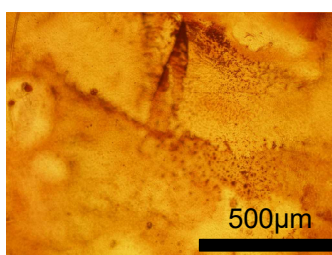


図1.3 PET表面 (10)

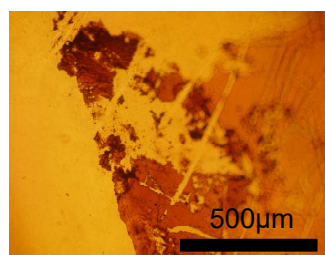


図1.5 ポリプロピレン表面 (10)

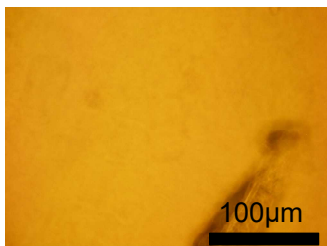


図1.2 ポリエチレン表面(40)

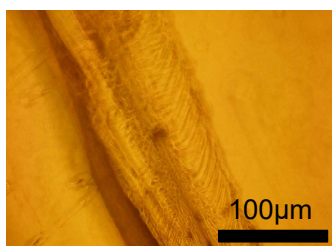


図1.4 PET表面(40)

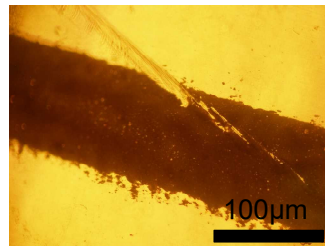


図1.6 ポリプロピレン表面(40)

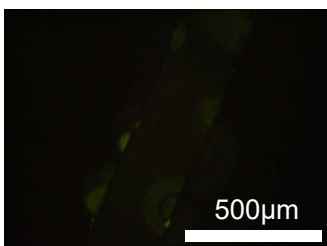


図2.1 ポリエチレンの断面(10)

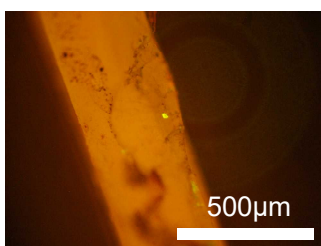


図2.3 PETの断面(10)

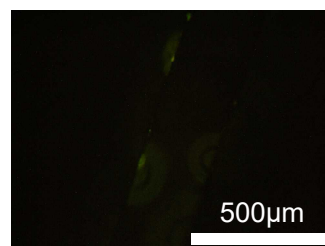


図2.5 ポリプロピレンの断面(10)

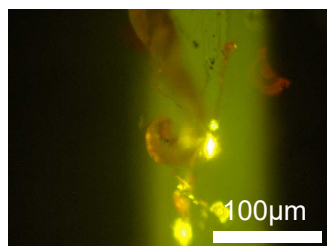


図2.2 ポリエチレンの断面(40)

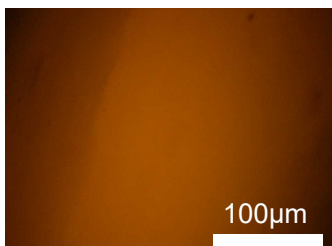


図2.4 PETの断面(40)

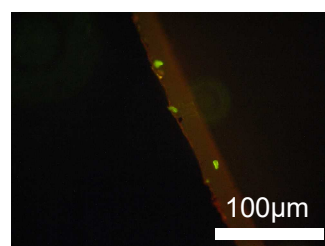


図2.6 ポリプロピレンの断面(40)

\* 図2の赤色部分は染み込んだヘマトポルフィリンによる蛍光である。  
緑色部分は表面に吸着した不純物等が蛍光を発しているものと考えられる。

#### 4. 結言

ポリエチレン・ポリプロピレン・ポリエチレンテレフタラートの染み込み具合を確認できた。しかし、身近にある材料・道具を使用したため、材料の大きさは一樣になるよう調整できたが厚さは調整できなかった。そのため、今後は大きさだけでなく厚さや湿度、温度といった条件にも注目して関連実験を重ねていきデータを収集していく必要がある。またトルエンは樹脂を溶解することから、ナノブラシ状への穿孔体成型に悪影響

が及ぶ可能性もある。今後、成型プロセスも加味したうえで、メタノール溶液中での浸潤も追加実験を行いたい。