

# ヒアルロン酸水溶液におけるナノコットン効果の研究

独立行政法人理化学研究所 環境ソフトマテリアル研究ユニット

丑田 公規

The function of aqueous hyaluronan (HA) solution is investigated focusing on the transport phenomena occurring inside the media which is a model matrix involved in extracellular matrices (ECM). With measurements of diffusion coefficient using three kinds of spectroscopy, the distance dependence of the diffusion coefficient (DDDC) was observed for small molecules and globular proteins. In short diffusion (< 10 nm), the diffusing molecules are not interfered with by the mesh structure of HA and the diffusion coefficient was the same in the aqueous solutions without HA. On the other hand, for long diffusion (> 100 nm), the diffusion coefficient was significantly dependent on the HA concentration showing that the magnitude of diffusion coefficients was decreased due to the interaction with the polymer chain. The curve of DDDC was successfully obtained by the present experiment indicating that the anomalous diffusion occurs in the 10-100 nm area of diffusion distance. The HA matrix, which is an important member of ECM, acts as if a cotton ball holding moisture the string mesh of which is in nanometer scale. We named this function as “Nano-Cotton”. HA nano-cotton acts not only as a fine matrix holding a large amount of water but also as a media controlling the transport phenomena inside ECM in terms of anomalous diffusion which affects on various dynamics of cell activities such as cell adhesion, tumor migration and invasion and others.

## 1. 緒言

細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM)<sup>1)</sup>とは、動物において細胞と細胞の間を占める、非細胞部分を総称する名である。従来細胞に比べてその役割が軽視されてきたが、体積比で言えば、細胞と同等の割合を占めると言われ、広い意味で骨や皮膚の大部分、毛髪などもECMの範疇に入ると考えてよい。ECMは、大きく分けて、コラーゲンなどのタンパク質<sup>2)</sup>、ヒアルロン酸 (Hyaluronic Acid, Hyaluronan:HA)<sup>2-6)</sup> やコンドロイチン類などの糖類から構成されているが、従来、不活性で、ちょうど細胞と細胞の間の詰め物のように、ただ体の形を作るだけのもので考えられてきた。しかし、最近の研究で、ECMと細胞は絶えず情報のやりとりをし、細胞自身の代謝を変えたり、細胞内の生体作用を制御したりする要因となっていることが判明してきた<sup>7)</sup>。

ECMは通常細胞自らが合成し、時に応じて自ら分解し、その結果、細胞の周りの環境を能動的に整えるなかだちをする。環境が変わることによって細胞は形を変えたり、代謝調節を変化させたりするので、細胞の外の環境に関する情報が再び細胞内部の動的な作用を変化させることになる。たとえば、発生、再生、分化、臓器形成などで、重要なプ

ロセスである細胞接着 (Cell Adhesion) は、接着分子<sup>8)</sup>といわれることの多い膜貫通タンパクによって引き起こされる。接着分子には、細胞間の接着を行う連結器となるもの (カドヘリン<sup>2,9)</sup> が例) の他に、外部のECMに対する親和基を有し、ECMに接着する働きを持つものがある。コラーゲン類に親和力を持つインテグリン<sup>2,10)</sup> がその代表であるが、HAに対して親和力を持つCD44<sup>2,11)</sup> もあり、どちらもよく似た働きをすると考えられている。すなわち細胞は、ECMを足場にするとともに、外部のECMの存在を情報として細胞内部に与え、代謝を調節する働きをするのである。

HAはFig. 1に示すようにグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの2糖を単位とする単純な糖鎖高分子で、ほとんどすべての脊椎、無脊椎動物が持っている多糖類である。眼球の硝子体の中に存在するものや、関節液、関節軟骨に存在するものが著名であるが、ほぼ全身に分布し、活発に代謝されている。最近ではガン細胞の増殖や転移などにもHAやCD44<sup>11)</sup> が関わっているとされている。

従来市販されている試薬としてのHAは鶏冠や臍帯から抽出したものが多く、分子量が小さいうえに共存するタンパク質などが除かれていないことが欠点であった。しかし、最近では遺伝子工学によって微生物に合成させたものが工



Investigation of “Nano-Cotton” effect in aqueous hyaluronan solution

Kiminori Ushida

Eco- Soft Materials Research Unit, Riken

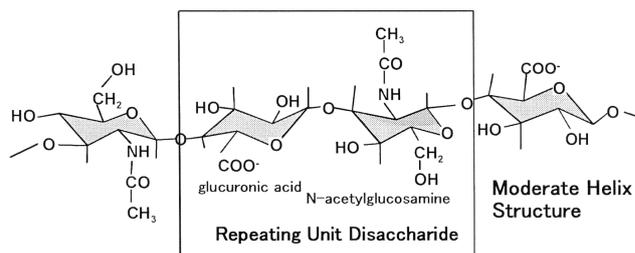


Fig. 1 The structure of Hyaluronan

業化され、純度も高く分子量の大きなものが医薬品（関節リウマチの治療薬）として実用化されている<sup>12)</sup>。一方、HAの潤い成分としての効果が注目されるに至り、化粧品材料として必要欠くべからざるものになっている。HAの消費量が増大するに従って、マヨネーズ生産の廃棄物であった卵白からHAを抽出する工場も生産を開始している。

我々は、ECM中の情報伝達の担い手としてのHA水溶液に注目し、大量に保持された水の中で、物質がどのように移動するかを調べてきた。HAをわずか1wt%しか含まない水溶液でも、Fig. 2に示すように、HAの分子量によっては数万cP（マヨネーズ程度）の粘性係数を示すが、このような高粘度の媒体中でも99%含まれる水の中を様々な分子が移動することができる。HAの高分子鎖はナノメートルスケールの糸として絡み合い、緩い網目状の空間を形成し、同時に大量の水を保持していることになる。この状況をナノメートルスケールの綿という意味で「ナノコットン」と呼ぶことにした。本研究では、HA水溶液に保持された水分＝ナノコットンの中で物質がどのように移動するかを明らかにし、そこに見られる「異常拡散現象（Anomalous Diffusion）<sup>13)</sup>」についての知見を得ることを目的とした。

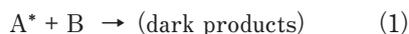
## 2. 実験

### 2.1 試料<sup>14-17)</sup>

HAは電気化学工業から提供を受けた、分子量公称30万、100万、200万の粉末試料を用いた。HEPESバッファにNaClを用いてイオン強度を調整した水溶液に、各種溶質を加えた溶液を試料に用い、測定は室温で行った。

### 2.2 光化学反応を用いた拡散係数の測定<sup>14-16)</sup>

拡散律速である光化学2分子反応



を用いて拡散係数を決定した。励起状態の蛍光あるいはリン光の消光反応で求めた2次反応速度定数 $k^{(2)}$ から拡散律速を仮定して

$$k^{(2)} = 4\pi (D_A + D_B) (r_A + r_B) \quad (2)$$

を用いて拡散係数 $D_A$ 、 $D_B$ を個々の分子の $D_{obs}$ として求める。ここで $r_A$ 、 $r_B$ は反応2分子の半径を示す。この手法を我々はPhotochemical Bimolecular Reaction (PCBR)と呼んでいる。

発光の消光反応速度は、堀場製作所製のNAES102を用い、単一光子法による寿命測定を用いて決定した。水溶液を用いた実験であり、かつ励起状態の寿命が十分に長い必要があるため、光励起分子としてRu(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>を用いたが、消光剤には、Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>、Co(acac)<sub>3</sub>、Co(edta)<sup>-</sup>、メチルビオロゲン(MV<sup>2+</sup>)、シトクロームc(cytc)を用いた。観察された蛍光減衰は単一指数関数で、Stern-Volmerプロットで問題なく2次反応速度定数が定まった。

$r_A$ 、 $r_B$ にはそれぞれのイオン半径（球形に近似）の文献値

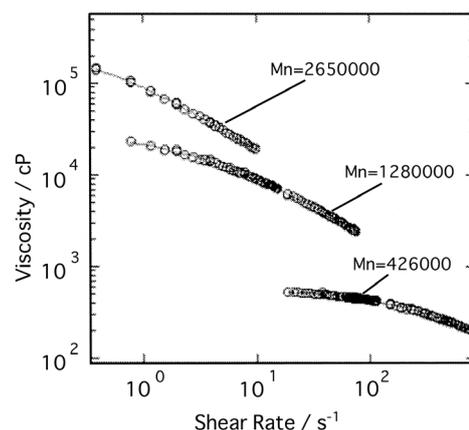


Fig.2 Shear viscosity of HA aqueous solution (1 wt%) with various molecular weight (unpublished result). The viscosity is lowered significantly because the linear polymer chains are aligned in parallel. We consider that the cylindrical ion atmosphere make the friction between two polymer chains.

を用いた。HAが存在しないときの $D_{obs}$  ( $D_0$ )については後述のNMRやFCSの結果と一致している。蛍光、吸収スペクトルなどを調べても、これらの分子について、ポリアニオンであるHAとの特異的な相互作用は見られなかった。

### 2.3 パルス磁場勾配 NMR 法による拡散係数測定<sup>15)</sup>

パルス磁場勾配 (Pulsed Field Gradient: PFG-) NMR法は最近盛んに用いられるようになった測定方法である。NMRでは磁場勾配 (FG) をかけて、適当な読みとりパルスを用いることによって空間分解能を与えることが可能で、医療用MRIはこの原理に基づいている。FGをパルス化し、2回に分け、その間隔を変化させながら信号の減衰を観測すると、特定の位置から移動して消えてしまった分子の数が見積もれ、 $D_{obs}$ を求めることができる。 $\gamma$ 、 $G$ 、 $\delta$ 、 $\Delta$ をそれぞれ磁気モーメント、FGの大きさ、FGパルス幅、FGパルス間隔とすると

$$\ln (I(G) / I(0)) = -\gamma^2 G^2 \delta^2 D_{obs} (\Delta - \delta/3) \quad (3)$$

となる。本測定は緩和時間が長く、 $D$ の大きい水分子では測定が容易で精度も高いが、今回は光化学反応で測定したRu(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>やcytcが測定対象であったので、誘導エコー法を用いたパルスシーケンスをプログラムし、できるだけ緩和時間の長い信号を探して用いた。

### 2.4 蛍光相関分光 (FCS) 法を用いた拡散係数測定<sup>16-17)</sup>

蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy)<sup>18)</sup>は、倒立型共焦点顕微鏡を用いたとき、レーザー光照射領域と（対物レンズとピンホールに依存する）受光側の効率によって決まる微小体積内 (Confocal Volume Element: CVE) に存在する、数の少ない蛍光物質からの蛍光強度が揺らぐことを

利用した測定方法で、必ずしも単分子の条件を必要としない。CW レーザーで繰り返し励起された蛍光物質が Brown 運動で CVE を出入りすることによって蛍光が揺らぐが、 $D$  の大小に応じて揺らぎの速さが決まるので、その揺らぎの時間相関関数 (TCF) を解析することによって、 $D$  を定量的に見積もることができる。

本測定では試料をウェル型チャンバーに入れて、市販の FCS 装置 (Zeiss ConfoCor) もしくは自作の装置 (Olympus IX71 ベース) を用いて測定した。

### 3. 結果

#### 3.1 PCBR 法の結果

Fig.3 に PCBR 法で測定した、様々な分子の拡散係数 ( $D_{obs}$ ) が HA の添加によってどのように相対的に変化するかをプロットした図を示す。 $D_{obs}$  は、HA の添加によりわずかに変化する。正の電荷を持った消光剤 ( $MV^{2+}$ ,  $cytc$ ) では、HA の濃度が増えるに従って  $D_{obs}$  が増大するよう見え、負の電荷を持った消光剤 ( $Fe(CN)_6^{3-}$ ,  $Co(edta)^-$ ) では減少する。しかし中性の消光剤  $Co(acac)_3$  ではその変化は見られない。NaCl を添加した実験でも同様の変化が見られることから、我々は、この系で HA の添加によりイオン強度が増大して、 $k^{(2)}$  そのものが、Debye-Smoluchowski の関係にしたがって変化したものと考えた。したがって、このそれぞれの拡散係数は HA を添加しても HA を含まないときの拡散係数  $D_0$  と等しいと結論できた。

蛍光消光で測定した  $D_{obs}$  は、指数関数減衰が大きく崩れない範囲で、励起状態寿命  $\tau$  により制限された

$$D_{obs}(\tau) = \frac{\int_0^{\infty} \exp(-\frac{t}{\tau}) \left\{ \frac{1}{N} \sum_1^N |x_i(\tau) - x_i(0)|^2 \right\} dt}{6 \int_0^{\infty} t \exp(-\frac{t}{\tau}) dt} \quad (3)$$

$$= \frac{\langle x^2 \rangle_{\text{exponent}}(\tau)}{6\tau}$$

で近似的に表される。平均 2 乗変位 (Mean Square Displacement : MSD) の平方根を単純に拡散距離  $L$  と考えると、この寿命を  $L$  に変換するのに

$$L = \sqrt{\langle x^2 \rangle_{\text{exponent}}} = \sqrt{6D_{obs}(\tau)\tau} \quad (4)$$

の式を用いるのが適当である。蛍光寿命は 300-400ns であった。

#### 3.2 PFG-NMR 法の結果

NMR で求めた  $D_{obs}$  を HA 添加量に対してプロットすると PCBR 法と全く異なった結果が得られた。Fig. 4 にこれを示す。測定した分子は、その大きさの順に水、 $MV^{2+}$ 、 $Ru(bpy)_3^{2+}$ 、 $cytc$  であるが、直径の大きな分子ほど HA の添加により相対的に  $D_{obs}$  が低下する。

$$D_{obs} \text{ の濃度依存性は Ogston}^{18)} \text{ の式}$$

$$D_{obs}/D_0 = \exp(-aC_{HA}^{0.5}) \quad (5)$$

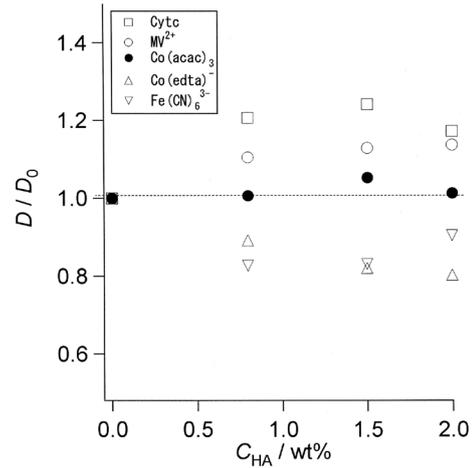


Fig.3 Relative dependence of  $D_{obs}$  on  $C_{HA}$  using various quenchers observed by PCBR method. Slight dependence of  $D_{obs}$  on  $C_{HA}$  is apparently observed for charged molecules while almost no dependence was observed for a neutral quencher,  $Co(acac)_3$ . Since the ionic strength was induced by the existence of HA polymers, no intrinsic dependence on  $C_{HA}$  is expected for the charged molecules (see text).

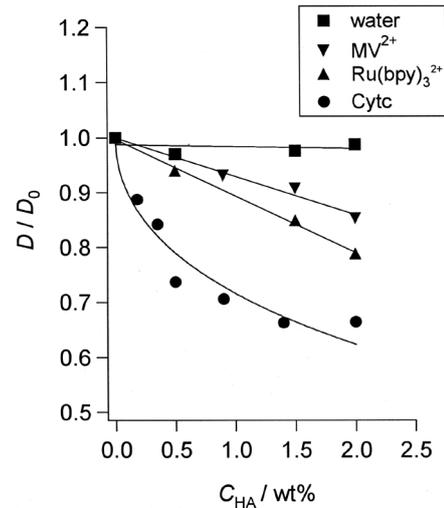


Fig. 4 Reduction of observable diffusion coefficient on HA addition measured by PFG-NMR. The fitting curves were obtained from eq. 5.

に従う。この式はゲル中の球状タンパク質の拡散について古くから用いられてきているが、その濃度における網目の大きさ  $\xi$  と、拡散する粒子の大きさ  $b$  が

$$\xi = (b/a)C_{HA}^{-0.5} \quad (6)$$

によって結びつけられる。Fig. 4 は定量的にもこの式に従うと考えている。

この測定法では磁場勾配パルスの間隔  $\Delta$  (10-100 ms) がサンプリング時間と考えられる。いったん求められた  $D_{obs}$  は等方的であると考えられるので、(4) 式と同じく  $L$  は

$$L = \sqrt{6D_{obs}\Delta} \quad (7)$$

と書けると考えればよい。

### 3.3 FCS法の結果

Fig. 5に cytc を Alexa488 でラベルして  $D_{obs}$  を測定した結果を示す。色素のみの場合も比較のために示す。FCSの場合も Fig. 4の PFG-NMRにおける cytc とほぼ同じ結果が得られ、式 (5) に従った。ただし、この場合 1 wt% におけるメッシュサイズは 7 nm で PFG-NMR よりもわずかに小さい。これは、拡散する分子が感じる網目がわずかに小さいことを示唆しており、拡散時間と同等の時間領域で網目構造そのものが動的に揺らいでいることを示していると考えている。

本測定方法においては、CVEによって空間が規定され、空間サンプリングが先に決まることが特徴である。しかし、通常用いられる CVE の高さ  $z$  と半径  $w$  を用いた TCF に対するフィッティング式

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left[ \left\{ \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \right\} \left\{ \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\left(\frac{z}{w}\right)^2 \tau_D}} \right\}^{\frac{1}{2}} + f \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_f}\right) \right] \quad (8)$$

(最後の項は蛍光寿命による補正) は実は 2次元視野における粒子の平均滞在時間  $\tau_D$  をパラメータにしており、それから拡散係数  $D_{obs}$  を

$$D_{obs} = w^2 / 4\tau_D \quad (9)$$

によって導出している。本測定方法では、先に拡散時間を  $\tau_D$  と考え、 $L$  は等方的に

$$L = \sqrt{6D_{obs}\tau_D} \quad (10)$$

と算出した。フィッティングに頼っている以上、むしろサンプリング時間を先に決めておくことになる。

## 4. 考察

### 4.1 拡散係数の距離依存性<sup>16,19,20)</sup>

3.1 – 3.3の結果を Table 1 にまとめる。

PCBR、PFG-NMR、FCS という 3つの手法で HA 水溶液中の cytc の  $D_{obs}$  が測定できた。それぞれの測定法で求めた拡散係数の数値、また HA の添加時の挙動は全く異なっていた。これはいかなる理由によるものであるか。(4)、(7)、(10) 式で求めた数値を Table 1 に示したが、この 3つの測定方法は全く異なる  $L$  に対応した  $D_{obs}$  を与えている。

1 wt% における cytc の  $D_{obs}$  を  $L$  に対してプロットした

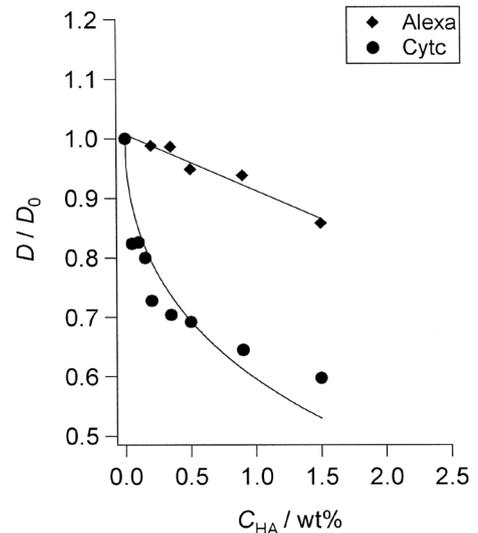


Fig. 5 Reduction of observable diffusion coefficient on HA addition measured by FCS. The fitting curve was obtained from eq. 5

Table 1 Summary of the observation time and the diffusion distance observed for various molecules by three independent techniques, PCBR2162, PFG-NMR2162, and FCS. ?obs and  $L$  were calculated from the results in the absence of HA.

Diffusing Probe Molecules	Estimated Molecular Diameter $B$ (nm)	Method	Non-perturbed Diffusion Coefficient $D_0$ ( $\times 10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ )	Observation Time $\tau_{obs}$	Diffusion Distance $L$
Cytc	3.4	PFG-NMR <sup>a</sup>	1.4	10 – 100 ms	3 – 9 $\mu\text{m}$
		FCS	1.4	67 $\mu\text{s}$	237 nm
		PCBR <sup>a</sup>	1.3	300 – 400 ns	15 – 18 nm
[Ru(bpy) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup>	1.0	PFG-NMR <sup>a</sup>	4.61	10 – 400 ms	5.3 – 33 $\mu\text{m}$
		PCBR <sup>a</sup>	4.6	300 – 400 ns	29 – 33 nm
Alexa	1.4	FCS	2.4	42 $\mu\text{s}$	246 nm
Methylviologen	0.50	PFG-NMR <sup>a</sup>	7.93	30 – 70 ms	12 – 18 $\mu\text{m}$
		PCBR <sup>a</sup>	7.9	300 – 400 ns	38 – 44 nm
Co(acac) <sub>3</sub>	1.2	PFG-NMR <sup>a</sup>	4.86	100 ms	17 $\mu\text{m}$
Co(edta) <sup>-</sup>	0.8	PFG-NMR <sup>a</sup>	6.95	80 ms	18 $\mu\text{m}$
H <sub>2</sub> O	0.30	PFG-NMR <sup>a</sup>	2.34	10 – 500 ms	3.7 – 26 $\mu\text{m}$

ものがFig. 6である。我々はこのプロットをDDDC (Distance Dependence of Diffusion Coefficient) と呼んでいる。Lが小さい極限では $D_{obs}$ は $D_0$ に外挿すべきであろう。PCBRにおける $D_{obs}$ も $D_0$ と変わらないが、FCS、PFG-NMRの $D_{obs}$ は約30%小さく、HA濃度に対して式(9)に従うことから、網目構造に妨害を受けたと考えられる挙動をとる。

先般の式(6)における $\tau$ の値や、他の研究者によるESRやFRAPの測定から、1 wt% HAの網目の大きさは約5-10 nmであると考えられるので、そのすぐ上の10-100 nmで急激に拡散係数が変化するというのは妥当であると思われる。結局この系では、大きく分けて網目内で終わるような短距離拡散 ( $L < 10$  nm) と、数個から数10個以上の編み目を経て遅くなる長距離拡散 ( $L > 100$  nm) という2つのモードが観測され、そのそれぞれでほぼ $D$ が定数 (すなわち $\langle x^2 \rangle$ が時間の1次に比例する) をとる「Normal Diffusion (素直な拡散)」になっている。

Fig. 6のDDDCプロットは、だらだらとした傾斜状の関数でなく階段状になること、すなわち2つのモードの変換が10-100 nmという比較的狭い領域で起こることは注目すべきである。これはHAの作る網目の大きさがかなり揃っていて、ばらつきが少ないことを示している。この10-100 nmという数字には、ナノバイオロジーに関わる生物学的意味があると思われるが、このことについては次項で述べる。

Fig.6では、 $D_{obs}$ が急激に変化する領域が存在する。これはこの領域で少なくとも、MSDが時間に比例しない「異常拡散 (Anomalous Diffusion)」を起こすことを示している。異常拡散現象は、様々な系ですでに議論されている。例えば、ガラス系では、ガラス転移点の前後に異常拡散が起きることが知られており、コロイド系、ゲル、さらには細胞の内部でも起こることが知られている。著しい異常拡散現象が起きる場合、時間相関関数そのものがひずむことが予想されるが、今回の系のFCS測定では(8)式からのずれは全く観測されなかった。このことは、拡散距離 (MSD)の増加に従って、拡散係数の変化が比較的ゆっくり進行し、時間相関関数のひずみからは観測できない異常拡散現象が存在するということを示している。

#### 4.2 異常拡散現象とECMの果たす役割 (ナノコットンの中の移動現象)

近年、生体内の拡散現象が通常の拡散とは異なる異常拡散に属するという報告が相次いでいる。実際細胞質や、ECMは全て複雑系であり、均一な媒体ではない。従って、拡散現象は必ずその空間構造に依存し、時間によって変化する拡散係数 (MSDの時間微分) を示す。このことについてECMを例にして考察する。Fig.7は典型的な軟骨組織のECMを模式的に示したものである。通常のECMではコラーゲン類のようなタンパク質に属する堅い網目状物

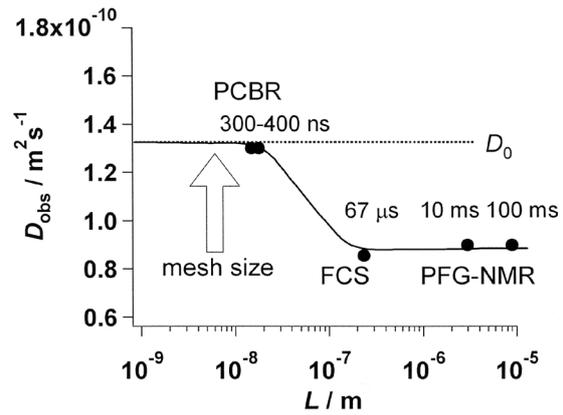


Fig.6 A plot of distance dependence of diffusion coefficients (DDDC) plot of  $D_{obs}$  at CHA = 1.5 wt% against the averaged diffusion distance  $L$  on logarithmic scale. Since the  $D_{obs}$  obtained from PCBR experiment is increased by 28 % by the ionic strength of the HA chain,  $D_0$  was used as the intrinsic value assuming that  $D_{obs}$  without the effect of ionic atmosphere is almost equal to  $D_0$  (see text). Furthermore, the curve should be extrapolated to  $D_0$  at  $L = 0$ . The profile should be a step function with a sudden drop at 10-100 nm. The numbers indicated beside each point are  $\tau_{obs}$  values corresponding to each experiment.

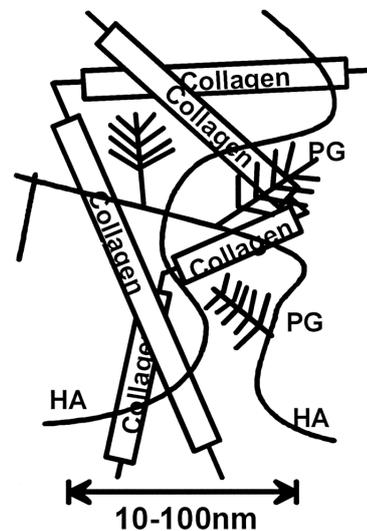


Fig.7 A drawing of the network structure in extracellular matrices (ECM) consist of a blend of proteins (Collagens), hyaluronan (HA) and other proteoglycans (PG) .

質と、HAなどの糖類の柔らかい網目状物質が共存している。コラーゲンは電子顕微鏡で見えるので、研究が進んでいるが、柔らかい糖鎖は実態がつかめていない。しかし我々の研究結果は1 wt%程度の糖鎖の作る網目構造でも十分に拡散に影響を与え、異常拡散を引き起こしていることを示している。ナノコットンはまさにこの異常拡散を生じさ

せる空間なのである。

Fig. 8にECMに接触した細胞表面を模式図として示す。細胞膜には様々な酵素、アクセプターやチャネルが存在している。これらは、細胞表面に様々な物質を分泌したり、外部からの物質と反応したり、細胞膜を通して、物質や粒子を出し入れすることもあるだろう。この細胞表面がHAの作るECM、すなわち異常拡散の起こる空間と接触している場合と、していない場合ではどのような違いがあるかを考察する。

細胞膜表面から分泌される物質は、ECM空間内に濃度勾配を作る。この濃度勾配によって、例えば他の細胞への情報伝達や代謝が進行することになる。異常拡散は、この濃度勾配に影響を与えるのは明らかで、細胞表面の反応や、情報伝達の収率に大きな影響を与えるだろう。その一方で、10nmより近距離の拡散はほとんど水と変わらず、しかも網目より小さなタンパク質なども容易に回転するので、配向してアクセプターなどと容易に反応することができるだろう。ECMの作る空間は、不均一な反応場における位置による反応性や反応収率に微妙な変化を与える。こういった小さな変化でも、細胞は敏感に感じ取り、代謝活動を調整すると考えて良い。

HAの作る網目状ECM＝ナノコットンの作る効果は、単に水分を保持する保湿成分にとどまらず、代謝物質の移動現象を微妙に調整する役割を果たし、細胞がそれを「心地よい」と感じるような環境を提供することにある。HAマトリックス中の移動現象の基本的メカニズムを積極的に利用することにより、癌の細胞レベルの治療、ドラッグデリバリー、発生の調節、再生医療への展開など、新たな応用への指針を与えることができると考えている。

## 5. 謝辞

本研究はコスメトロジー財団の援助により行われた。同財団の援助に感謝する。また本研究の主要な部分は、益田晶子、山下宏一、越野広雪、Thomas Kluge（以上理研）、西村吾朗、金城政孝、田村守（北大電子研）との共同研究である。また、HAについては、三好照三、北川広進（電気化学工業(株)）高橋泰文（(株)中外製薬）らのご協力の下提供を受けたものである。これらの方々にも謝意を表する。

### (参考文献)

- 1) B. Alberts, et al. : Molecular Biology of The Cell 4<sup>th</sup> ed. 1092-1112, New York : Garland Science 2001.
- 2) 宮坂昌之、矢原一郎 編 :Bio Science 用語ライブラリー 細胞接着 羊土社 1996
- 3) G. Abatangelo, and P. H. Weigel, editors. : New frontiers in medical sciences: Redefining hyaluronan. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- 4) T.C. Laurent, editor. : The chemistry, biology and

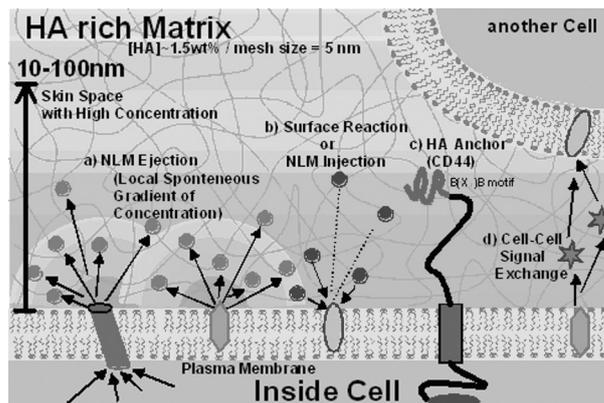


Fig. 8 A drawing of the material transports around the cell surface (Plasma Membrane). NLM stands for Non-Living Matrices.

medical applications of hyaluronan and its derivatives. London: Portland Press 1998.

- 5) L. Lapčičk, Jr., L. Lapčičk, S. De Smedt, ほか2名 :Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. Chem. Rev. 98, 2663-2683, 1998.
- 6) D. Evered, and J. Whelan, editors. :The biology of hyaluronan. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1989.
- 7) 秋山 徹, 宮園 浩平 編. :シグナル伝達研究2003 羊土社 2003.
- 8) 宮坂 昌之 監修. :新版 接着分子ハンドブック 秀潤社 2000.
- 9) 関口清俊, 鈴木信太郎編. :多細胞体の構築と細胞接着システム 共立出版 2001
- 10) 林正男 著. :新細胞接着分子の世界 羊土社 2001.
- 11) 清水元治 編 :癌転移の分子医学、羊土社 1996.
- 12) 三好照三, 田中稔一, 高橋泰文. :ヒアルロン酸の医薬品への応用 Bio Industry, 11, 632-642, 1994.
- 13) J.-P. Boucharud and A. Georges, :Anomalous Diffusion in Disordered Media : Statistical Mechanisms, Models and Physical Applications. Phys. Rep. 195, 127-293, 1990.
- 14) T. Kluge, A. Masuda, K. Yamashita, ほか1名. :Effects of charge and structure of hyaluronic acid on the luminescence quenching in aqueous solution. Photochem. Photobiol. 68:771-775, 1997.
- 15) T. Kluge, A. Masuda, K. Yamashita, ほか1名. :Concentration and molecular weight dependence of the quenching of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> by ferricyanide in aqueous solutions of synthetic hyaluronan., Macromolecules 33:375-381, 2000.
- 16) A. Masuda, K. Ushida, H. Koshino, ほか2名. :Novel distance dependence of diffusion constants in hyaluronan aqueous solution resulting from its characteristic nano-

microstructure. *J. Am. Chem. Soc.* 123:11468-11471, 2001.

- 17) A. Masuda, K. Ushida, G. Nishimura, ほか 5 名 .  
:Experimental evidence of distance-dependent diffusion coefficients of a globular protein observed in polymer aqueous solution forming a network structure on nanometer scale., *J. Chem. Phys.*, 121, 10787-10793, 2004
- 18) R. Rigler and E. S. Elson, editors. :Fluorescence

correlation spectroscopy: Theory and applications. Berlin: Springer 2001.

- 19) 丑田公規, 益田晶子. :実験で観測される拡散係数に見る時空間相関と生体系の物質輸送 *日本物理学会誌* 59, 4, 216-220, 2004.
- 20) 丑田公規, 益田晶子 :ヒアルロン酸水溶液中の物質移動と細胞外マトリックスとしての働き *光化学* 35, 1, 10-17, 2004.