

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発 と組織再建スキャホールドへの応用

所 属 京都工芸繊維大学 繊維学部
研究者 山岡 哲二

要 旨

ポリ-L-乳酸 (PLLA) セグメントと生体親和性が高いポリエーテルとして知られるプルロニック (PN) セグメントが交互に繰り返したマルチブロック共重合体の新規合成法を開発した。繰り返し乳酸単位が4~12のオリゴL-乳酸とPN、および、系中の水酸基/カルボキシル基比を1に調整するために、1,10-ドデカンジカルボン酸 (DDA) を混合し、150℃、30mmHg で直接脱水重縮合した。得られた、マルチブロック共重合体は最大で含水率86%のハイドロゲルを形成した。また、極めてマイルドな組織反応と速やかな分解性を有するバイオイナートな新規生分解性材料であることが明らかとなった。さらに、交互浸漬法によるハイドロキシアパタイトとの複合サンプルを調整して、ラット皮下埋入実験を行った結果、PNを33%含む共重合体の場合に、周囲組織のハイドロゲル内への浸潤が確認された。複合サンプルの断面をEPMAにより解析した結果、PNを33%含む共重合体の場合にのみハイドロゲル内部へのハイドロキシアパタイトの生成が確認され、このことが、ゲル内部への組織浸潤を亢進したと考えられる。従来、化学合成ハイドロゲルは細胞接着性に乏しく、組織再建用スキャホールドとしては適していないと考えられていたが、本研究により開発した複合ハイドロゲルは、今後新たな生分解性スキャホールドとして期待できる。

1. 研究目的

欠損した組織や組織の機能を回復させる方法として、組織再生工学が1980年代後半に提唱された。これは、正常な組織から取り出した幹細胞を培養し組織を構築させて損傷部位に戻す方法である。この時、細胞培養のスキャホールド (足場) が必要で、足場には、生分解性、細胞接着性、機械的強度などが求められる。スキャホールドには、ヒアルロン酸、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチンなど天然高分子やポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリ(グリコール酸-乳酸)共重合体などの合成高分子が検討されている。天然高分子は、高い生体親和性を持つが水溶性のために架橋剤が必要となる上に、ウイルスなどの汚染や人体への感染が危惧される。一方、合成高分子は、高い強度を持つものは親水性に乏しく加水分解も遅いが、大量に合成が可能であることや共重合によってその物性をコントロールすることが可能である。

ポリL-乳酸は、結晶性で高強度を持ち、代謝により分解されるので、骨補強材や骨再生の足場として主に硬組織に応用されてきたが、その優れた性質から軟組織への応用が検討された。しかし、ポリL-乳酸は、疎水性が高く加水分解速度が遅いため、ソフトセグメントとしてポリエーカプロラクトン (PCL)、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール (PPG) などとの共重合体として改質がなされてきた。本研究では、ソフトセグメントとして米国食品医薬品局の認可を受けた水溶性のポリエーテルジオールでPEG-PPG-PEG構造を持つプルロニック™ (PN) を用いた。高分子量体を得るために、反応系中の-COOH基と-OH基の調整剤としてジカルボン酸であるドデカンジカルボン酸 (DDA) を用い、新規のポリ乳酸系共重合体の合成を行った。

歯や骨などの硬組織は、緻密なハイドロキシアパタイト $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (HAp) とコラーゲンの複合体である。HApは、生体親和性が高く、骨組織を誘導する能力のみでなく、軟組織接着性も高いことが報告されており、金属や高分子材料との複合化も検討されている。本研究では、PLLA/PNマルチブロック共重合体への組織接着性や組織の誘導能を付与するため、交互浸漬によりPLLA/PNマルチブロック共重合体/HAp複合体を作製し、新規三次元組織再生用複合材料の開発を目的とした。

2. 研究方法

<マルチブロック共重合体の合成> N₂置換したフラスコに300gのL-乳酸を入れ、150℃

で760mmHgから20mmHgまで徐々に減圧しながら25時間脱水重縮合を行なうことでオリゴ乳酸を合成した。オリゴマーにすることで、続く共重合のステップにおける乳酸成分の系外への流出を防ぐことができる(スキーム1)。760mmHgで3時間、600mmHgで4時間、450mmHgで3時間、200mmHgで3時間、100mmHgで3時間、50mmHgで1時間、30mmHgで5時間、20mmHgで3時間と徐々に減圧を行ったところ、透明で樹脂状のオリゴ乳酸が得られた。得られたオリゴL乳酸の平均重合度は¹H-NMRより1.4であった。続いて、十分に乾燥した40gのPN、所定量のオリゴL乳酸、PNと等モルのDDA、触媒の酸化スズ(終濃度0.1%)をジフェニルエーテル(50%溶液)に溶解させ、150℃、30mmHgで45~78h重合した。クロロホルムに溶解後ジエチルエーテルで再沈澱し、ろ過、減圧加熱乾燥によってマルチブロック共重合体を得た(スキーム2)。

＜共重合体の組成・分子量測定および熱的性質の評価＞ 共重合体の組成比は、¹H-NMRにより求めた。溶媒にはCDCl₃を、基準物質としてはテトラメチルシランを用いた。また、各共重合体の平均分子量はゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)により求めた。溶媒にはTHFを用い、40℃、流速1.0ml/minで測定し、東ソー製の標準ポリスチレンを基準物質として測定した。T_gおよびT_mは、α-Al₂O₃を基準物質としてDSC測定より求めた。測定は1回目の昇温を室温から200℃まで10℃/minで行った後、すぐに、試料を液体窒素中に30分間浸して急冷した。続く2回目の昇温は-30℃以下から200℃まで10℃/minで行い、このセカンドスキャンのデータを用いて解析した。

＜共重合体の成形加工と力学特性評価＞ 得られた共重合体の塩化メチレン溶液(10wt%)を低温で十分に時間をかけてキャストする事でフィルム化した。得られた膜厚は何れも80~110μmであった。また、熔融紡糸法により繊維化した後に、ガラス転移点付近で再延伸することで高強度繊維を得た。これらのフィルムおよび繊維を定法に従って引っ張り試験を行い、破断強度およびヤング率を測定した。

＜膨潤率測定試験＞ 直径15mm・膜厚100μmの円形のフィルムディスクを37℃で交互浸漬法で用いる2種類の溶液(CaCl₂/Tris-HCl(pH7.4)200mM(Ca溶液), Na₂HPO₄aq120mM(P溶液))に所定期間浸漬し、表面に付着した水分をふき取った後に重量を測定して、式(1)を用いて膨潤率(SR)を求めた。また、浸漬時間を変化させて重量変化が認められなくなった時点での膨潤率を平衡膨潤率とした。

$$SR(\%) = (\text{浸漬後重量} - \text{乾燥重量}) / (\text{乾燥重量}) \times 100 \quad \text{式(1)}$$

＜交互浸漬によるヒドロキシアパタイト層の形成＞ 直径15mmの円形のフィルムを37℃でCa溶液に2h浸漬後フィルムを純水で洗い、P溶液に5min浸漬し水洗いを行った。その後、Ca溶液とP溶液に交互に5minずつ浸漬した、Ca溶液とP溶液との間には十分に精製水で洗浄した(Ca溶液-水洗い-P溶液-水洗い)の操作を1サイクルとし、合計36サイクル行い、精製水で洗浄した後に減圧乾燥した。得られた、共重合体/HAp複合体の重量測定により生成したHAp量を定量し、その正常はSEMにより観察した。また、ヒドロゲル内部でのHApの生成については、断面をEPMA解析することにより定性的、および、定量的に評価した。

＜分解速度試験と細胞増殖試験＞ 得られた共重合体フィルムの*in vitro*分解性試験は、PBS中、37℃で振とう下に所定時間インキュベートした後に、分子量低下および重量減少を測定することで行った。また、ラット皮下に所定期間埋入したサンプルの分子量測定により*in vivo*分解試験を行った。得られたフィルム上に各種の細胞を播種し、5%二酸化炭素条件下、10%牛胎児血清添加のもとで、所定期間培養することで、材料表面上での細胞接着性、細胞増殖性、および、細胞毒性について検討した。

＜ラット皮下埋入試験による組織再生能評価＞ 各組成の共重合体フィルムならびに、12サイクルの交互浸漬処理を施したフィルム(直径15mm、厚さ100μmのディスク状フィルム)を、体重約200gのウィスターラット20頭の背部皮下にポケット法により埋入した。ラット1頭あたり、左背部に3サンプルまた、右背部に3サンプルの合計6サンプルを埋入し、埋入操作による影響を無くすために、常に左右背部の組み合わせを、オリジナルフィルムと処理サンプルの組み合わせとするようにした。その後、2週、4週、6週、8週後に周囲組織ごと摘出し、10%ホルマリン中性緩衝液で固定化した。続いて、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン-エオジン染色した後に、光学顕微鏡観察を行うことで、炎症反応の程度、並びに、周囲組織の材料内部への浸潤性について検討した。

3. 研究成果

＜マルチブロック共重合体の合成＞ 得られたマルチブロック共重合体の分子量並びに分子量分布を表1に示した。LN(m)-x とは PLLA とプルロニック (PN) のマルチブロック (m) 共重合体で、PN含有量が x% の共重合体を示している。共重合体の重量平均分子量は、何れの場合にも約 80,000、また、分子量分布 (Mw/Mn) は 1.8 であった。従来から報告されているトリブロック共重合体は、分子量が 1 万程度にしかならず、フィルム化や繊維化は困難であるため、強度が要求されない薬物放出担体としての利用が検討されてきた。しかしながら、本手法より合成されたマルチブロック共重合体は、その分子量が高く、そのフィルム化、繊維化も容易であった。現在、最高で重量平均分子量約 30 万の共重合体の合成に成功している。¹H-NMR 測定を行い、化学シフト $\delta = 1.2$ ppm (CH₃ for PO)、3.6 ppm (CH₂CH₂ for EO)、5.1 ppm (CH₃CH for LA) の強度を比較することにより、LN(m)-6、LN(m)-12、LN(m)-22、および、LN(m)-30 中の PN 組成はそれぞれ、6、12、22、33 % であった。一方、2.4 ppm (β 位の DDA の H) と 4.3 ppm (PN 中の EO の α 位 H) のピーク強度の積分値がほぼ等しいことから、マルチブロック共重合体の合成も確認できる。

＜力学的性質および熱的性質の検討＞ 引っ張り強度およびヤング率は PN 組成に大きく依存した。PN を 10% 程度含む共重合体では溶融紡糸後に十分再延伸した繊維で市販の生分解性外科用縫合糸と同程度の引っ張り強度を示し、約 2 倍のヤング率を示した。共重合体のエーテルセグメントの柔軟性のために、ソフトで強い繊維を作成することが可能であり、さらに細胞接着性や組織反応が極めてマイルドなバイオイナート性に優れた材料である (後述)。また、DSC 測定においては、90°C 付近に PLLA 単位に由来する結晶化ピークが認められ、さらに 170°C 付近にはその結晶融解ピークが観測された。後者は、ポリエーテルセグメント組成の上昇に伴い僅かに低温側にシフトした。また、10~50°C にかけて観測された複雑なピークは、ポリエーテル組成の上昇に伴い高温側にシフトしたことから、ポリエーテルに由来すると考えられる。これらのことから、共重合体中では、PLLA 成分とポリエーテル成分は相分離構造をとっていると考えられる。このことは、広角 X 線散乱測定によっても確認されている。

＜細胞接着・増殖、および、分解試験＞ 図1には共重合体フィルムおよびコントロールの PLLA フィルム上での NIH3T3 細胞の接着の様子を示した。PLLA 上では細胞が強く進展しているのに対して、共重合体フィルム上では細胞はスフェロイド様の構造を呈している (図1右)。このようなスフェロイド様の構造は PVA ハイドロゲルやアガロースハイドロゲル上でよく観察される構造である。フィルム表面の接触角を測定したところ、10% 程度 PN を含むフィルムの表面の水に対する接触角は約 30°C 程度であり、少量の PN 成分を共重合するだけで、フィルム表面にはエーテルセグメントがマイグレートし、含水相としてほぼ全体を覆っていることが示唆された。このことが、細胞接着性を抑制したものと考えられる。

図2AはPBS中での、また図2Bはラット皮下に埋入した時の共重合体フィルムサンプルの経時的な分子量低下の結果である。*In vivo* での分化は *in vitro* に比較して早く、その分解速度は PN 組成の上昇とともに大きく変化した。また、*in vitro* でフィルム表面に接着した細胞の増殖速度も PN 組成に大きく依存した (図3)。このように、得られた共重合体は、そのフィルム表面はポリエーテル様の親水性を示し、バルク特性は、PN 組成に応じて連続的に変化させることが可能な材料である。このような特性を生かしたバイオマテリアルとしての応用例として、癒着防止膜としての特性を評価した。ラット子宮管にメスで傷つけた部位と腹膜との癒着モデルを作成し、市販の癒着防止膜である INTERCEED、および、本共重合体フィルムを適応した。何れも、ほぼ同様の癒着防止膜を示したが、術後 2 週間の観察によると、酸化再生セルロース製の INTERCEED は小さな断片にフラグメント化して腹腔中に広がっていたのに対して、本共重合体フィルムは適応部位に残存しており、広範囲の癒着防止膜への有効性が示唆された。

＜膨潤率測定試験＞ 各共重合体を Ca 溶液、および、P 溶液に十分な時間浸漬した時の、平衡膨潤率と共重合体の PN 組成の関係を図5に示した。何れの溶液に対しても平衡膨潤率に差は見られず、LN(m)-33 の場合に最高の 30% の平衡膨潤率を示した。PN 組成を上昇させると平衡膨潤率はさらに上昇することが確認されており、例えば PN(m)-87 フィルムの場合には 500% の平衡膨潤率を示す。しかしながらその分解速度は週間程度と速く、交互浸漬およびラット皮下背部での組織浸潤試験に耐えられないことから、以降の実験は PN 組成が 33% 以下の共重合体を用いた。

<交互浸漬によるハイドロキシアパタイト層の形成> 直径15mmの円形のフィルムCa溶液とP溶液に交互に5minづつ浸漬し、6、18、39サイクル繰り返した時の写真を図6に示した。最上段には交互浸漬前のサンプルを示しており、PN組成の上昇とともに透明度が上昇していることが判る。これは、PN組成の上昇とともにPLLAの結晶性が抑制された結果である。このことがPN組成が高い共重合体の柔軟な性質をもたらしている。フィルム表面へのHApの析出量はサイクル数ともに増加し、フィルムが白濁している。その析出量を重量測定により定量化した結果を図7に示した。LN(m)-22、LN(m)-12、LN(m)-6、PLLAの間では析出量にほとんど差は見られないが、LN(m)-33の場合には他の共重合体より析出量が多い。また、析出したHApのSEM観察像を図8に示す。何れの場合にもほぼ直径が数 μm の粒子状をしており、それらが凝集したような構造を示した。

36サイクルの交互浸漬により、多くのHApが析出した原因を調べるために、表面に析出したHApを剥離した後のフィルムの像を図9に示した。その結果、LN(m)-33の場合にのみ、フィルム表面とHApが強く接着しており、内部へのHApの析出が示唆された。EPMA測定の結果、LN(m)-33フィルムの場合には表面から約30 μm の深さまでHApが析出していることが明らかとなった。これは、LN(m)-33の膨潤率が高いことからフィルム内部へのCaイオンおよびリン酸イオンの浸透性が高かったことが原因であると考えられる。

<ラット皮下埋入試験による組織再生性評価試験> 調製したPLLA/PNマルチブロック共重合体/HAp複合フィルムをラット皮下に埋入した。埋入2週間後では、何れの初期異物反応も治まり繊維性組織によるカプセル化が進行していた。線維組織によるカプセル化の厚さは、PLLAの場合にもっとも厚く、LN(m)-33の場合には、ほぼ5分の1の厚みであった。また、初期炎症細胞の数もPN組成の上昇とともに減少していた。PN成分が形成する親水相が炎症反応を低減していると考えられる。また、4週後の組織所見によると、LN(m)-33/HAp複合体フィルムにおいてフィルム内部への組織の侵入が見られた(図10右下)。このことは、LN(m)-33の場合にのみHApがフィルム内部で生成しているためであろう。この様なHApの効果が、HAp自体の軟組織親和性によるものか、あるいは、HApから細胞接着に必須のカルシウムイオンが徐放されているためかは今後検討する必要がある。

4. 考 察

再生医工学は1980年代後半から、組織工学・細胞工学が進化したという立場で認識・注目されている。近年、分子生物学の進歩と歩調を合わせるように、ES細胞や、様々な臓器の幹細胞が発見され、その分化誘導や増殖性の制御に関する様々な成果が報告されている。これらの事から、我々が難病の治療を目的に望む細胞を大量に手にする日は遠くないであろう。そしてこのことは、心筋細胞の注入や脳神経組織の移植など細胞移植が効果があると考えられる場面においては大きな力を発揮するであろう。しかしながら再生医工学により目的臓器を再建するためにはさらに大きな障害がある。それは、細胞の三次元空間における配置および細胞同士の制御されたクロストークである。再生医工学初期にはポリグリコール酸不織布に細胞を播種して三次元ブロックを形成させる手法が提唱され、現在でも多くのアプローチがこのストラテジーに習っている。しかしながら、作成されたブロックは三次元であるが不織布表面で増殖した細胞の環境はあくまで二次元である(ポリグリコール酸表面に二次元的に広がって付着している)ため、軟骨組織のような本当の意味での三次元構造を要求しない組織でしか達成が困難である。

それに対して、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックス成分からなるハイドロゲルにおいては、細胞の三次元的クロストークも実現する可能性がある。本研究で得られたハイドロゲルは、組織接着性に優れ、炎症反応がマイルドで、かつ、ウィルスなどの汚染の危険性がない完全化学合成ハイドロゲルの最初の例である。今後、これらのゲルを用いて肝細胞やケラチノサイトの三次元培養技術の確立が重要な課題である。

5. ま と め

PLLAとPNのマルチブロック共重合体は、含水性を有する新たなハイドロゲルとなることが明らかとなった。含水率はPN組成に大きく依存し、最大では共重合体乾燥重量の500%の水分を吸収し、含水率83%のハイドロゲルが得られた。得られた、ハイドロゲルはPVAハイドロゲルなどの他の化学合成ハイドロゲルやアガロースゲルなどの生体由来ハイドロゲルと同様に細胞接着性を有さ

ず、いわゆるバイオイナートな性質を示した。このことは、細胞接着性のみならず、ラット皮下埋入試験における極めてマイルドな炎症反応性によっても確認された。

得られた PLLA 系生分解性ハイドロゲルとハイドロキシアパタイトの複合化により、ゲル内部への組織浸潤が *in vivo* 実験において確認された。コラーゲンゲルなどが高い親和性を有する事は古くから知られているが、近年、感染などの問題が浮上している。一方、PVAゲルやアガロースゲル内部には組織浸潤が起こらない。本研究で得られた、PLLA 系ハイドロゲルとハイドロキシアパタイトとの複合ゲルは、軟組織親和性が高く、周囲組織の増殖や浸潤を誘導できる上に、生物学的危険性が無い化学合成ハイドロゲルとして、組織再生用スキャホールドとしての利用が期待できる新材料である。

6. 研究発表

T. Yamaoka, T. Kimura, R. Iwase, A. Murakami, Enhanced expression of foreign gene transferred to Mammalian cells *in vitro* using chemically modified poly(L-lysine)s as gene carriers, *Chem. Lett*, 118-119 (2000).

山岡哲二、高橋佳丈、藤里俊哉、木村良晴、ポリ-L-乳酸/ポリエーテル共重合体物フィラメント系の力学特性と分解特性、*人工臓器*, 29(1), 239-244 (2000).

T. Yamaoka, Y. Makita, T. Ueda, H. Sasatani, S. -I. Kim, and Y. Kimura, Linear type azo-containing polyurethane as drug-coating material for colon-specific delivery : Its properties, degradation behavior, and drug formulation, *J. Controlled Release*, 66, 187-197 (2000).

T. Yamaoka, Y. Takahashi, T. Fujisato, C. W. Lee, T. Tuji, T. Ohta, A. Murakami, and Y. Kimura, A novel adhesion prevention membrane based on a bioresorbable copoly(ester-ether) comprising poly-L-lactide and Pluronic : *in vitro* and *in vivo* evaluations, *J. Biomed. Mater. Res.*, 54 (4), 470-479 (2001).

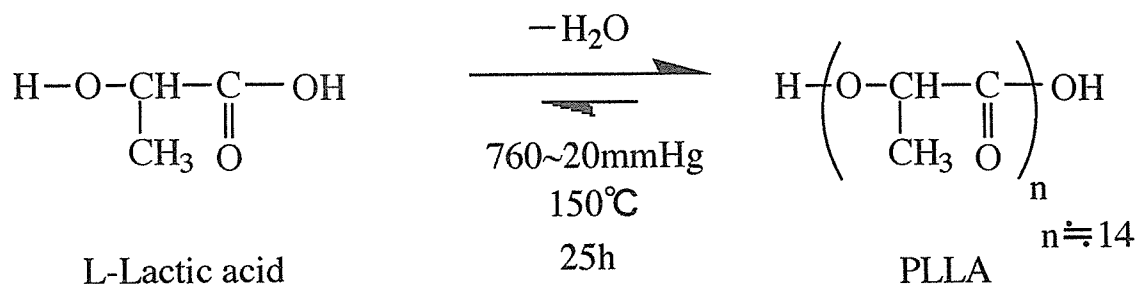
T. Tamura, T. Yamaoka, S. Kunugi, A. Panitch, and D. A. Tirrell, Effects of Temperature and Pressure on the Aggregation Properties of an Engineered Elastin Model Polypeptide in Aqueous Solution, *Biomacromolecules*, 1, 552-555 (2000).

山岡哲二、木村良晴、体内吸収性材料の分子設計、*白質核酸酵素 2000 年 9 月増刊号「再生医学と生命化学」*(浅島 誠、岩田博夫、上田 実、中辻憲夫 編), pp. 2142-2149(2000).

山岡哲二、岩田博夫、*TissueEngineering* における生分解性スキャホールド、*細胞*, 32(9) 23-26 (2000).

山岡哲二、木村良晴、生分解性高分子の医療分野への応用、*ポリマーダイジェスト*, 52(8) 17-28 (2000).

Scheme 1. Oligomerization of L-lactic acid.



Scheme 2. Multiblock copolymerization of PLLA, PN and Dodecanedioic acid (DDA).

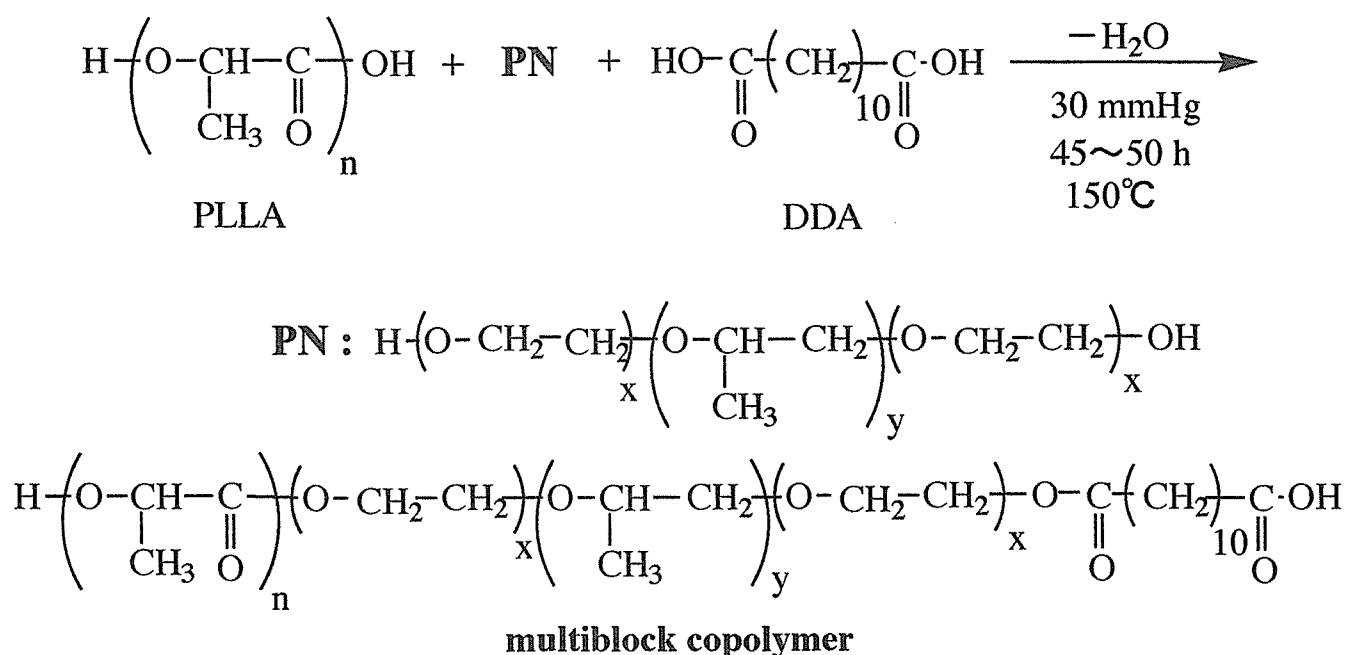


Table 1. Results of multiblock copolymerization of oligo(L-lactic acid), PN, and DDA, and thickness of multiblock copolymer film.

	Composition a) (LA/PN) (wt/wt)	M _w b)	M _w /M _n b)	Thickness (μ m)
LN(m)-6	94/6	84,000	1.97	122
LN(m)-12	88/12	100,000	1.86	125
LN(m)-22	78/22	92,000	1.83	103
LN(m)-33	67/33	72,000	1.77	127

a) Determined by ¹H-NMR spectra.

b) Determined by GPC with tetrahydrofuran as eluent.

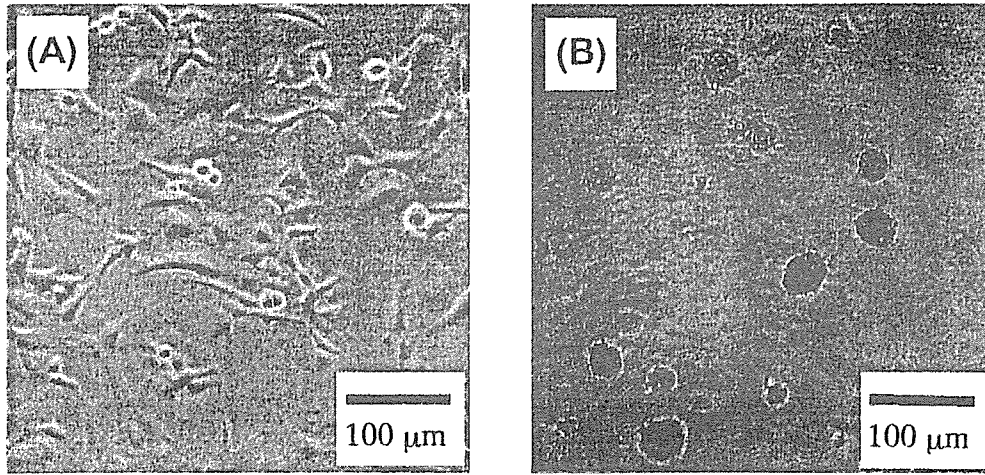


Figure 1 Micrographs of the 3T3 fibroblasts adhered on (A) PLLA and (B) LN(t)-20 films after cell culture for 48 hr.

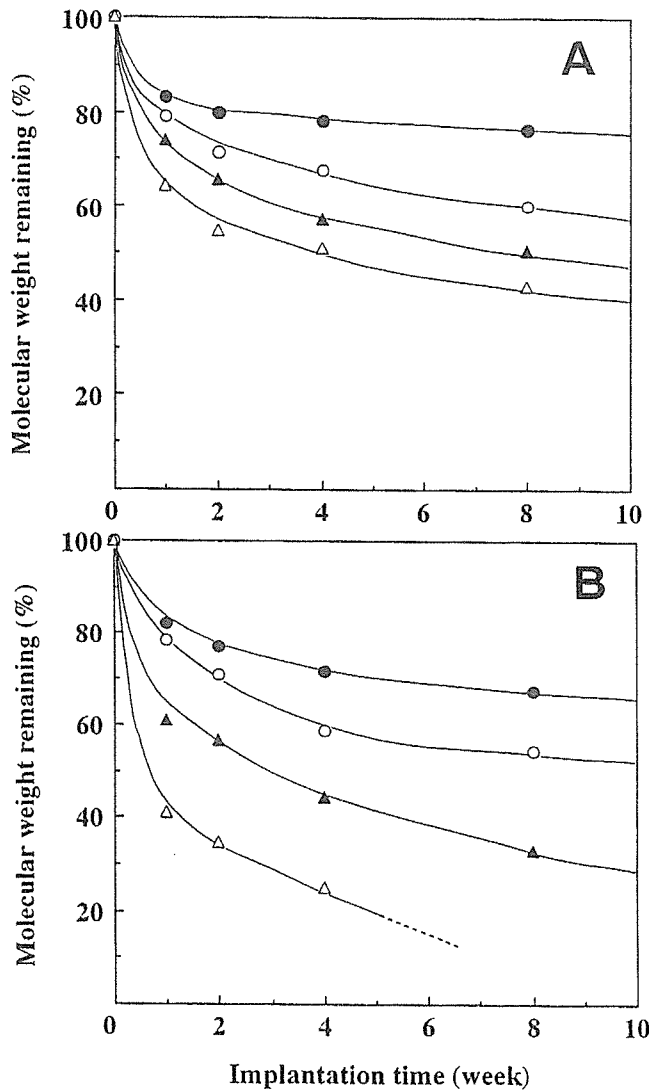


Figure 2 Changes in molecular weight of (●) PLLA, (○) LN(t)-10, (▲) LN(t)-15, and (△) LN(t)-20 *in vitro* (A) and *in vivo* (B).

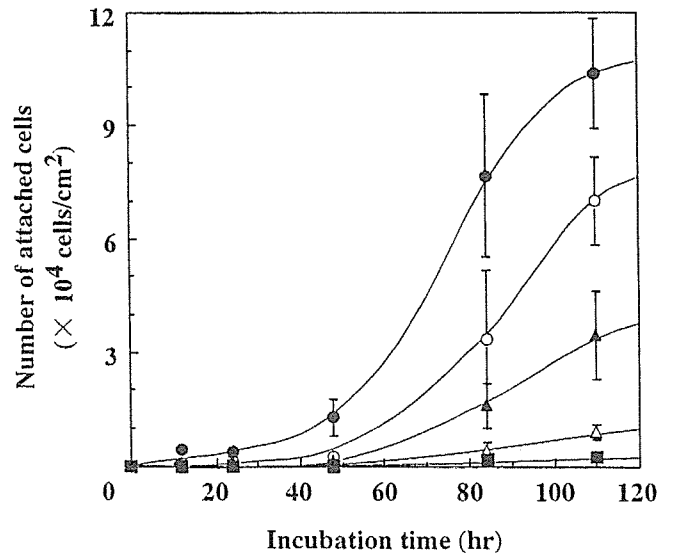


Figure 3. Time courses of the cell growth on (●) TCPS, (○) PLLA, (▲) LN(t)-10, (△) LN(t)-15, and (■) LN(t)-20 films.

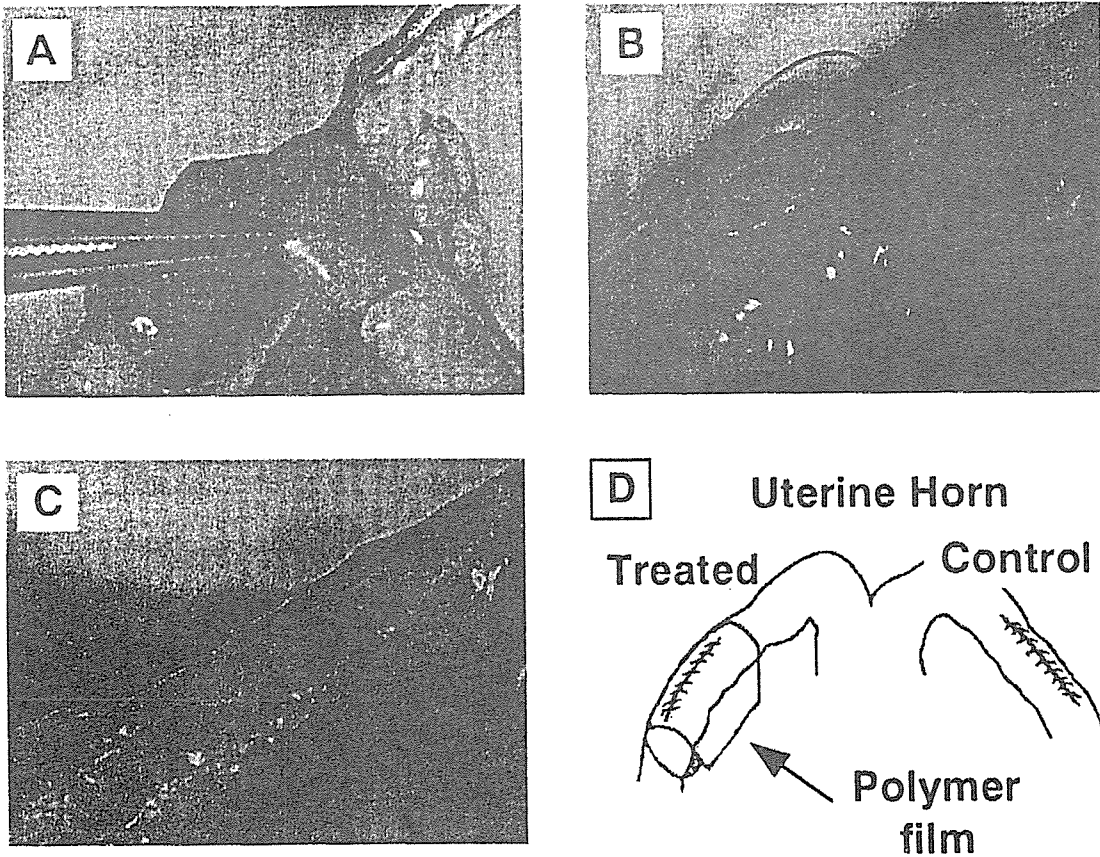


Figure 4. The appearance of the uterine horn 1 week after operation (A) without any membrane (control), (B) using Interceed®, and (C) the LN(t)-20 film. (D) shows the experimental method.

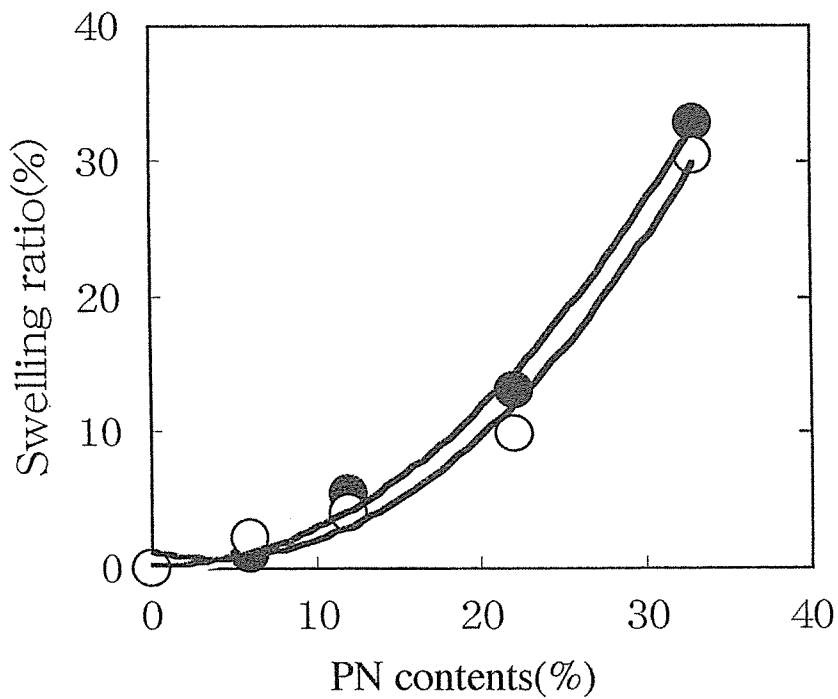


Figure 5 Relationship between swelling ratio of multiblock copolymer in $\text{CaCl}_2/\text{Tris-HCl}$ (pH7.4, 37°C , 200mM) (●), Na_2HPO_4 (37°C , 120mM) (○) aqueous solutions and PN contents in multiblock copolymers.

Figure 2.

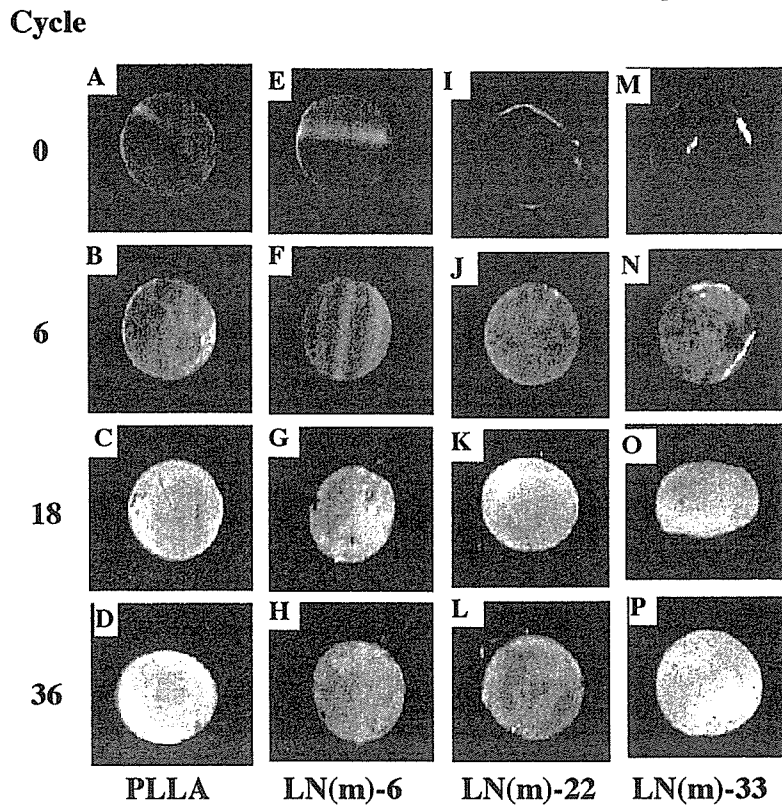


Figure 6 Optical photographs of PLLA (A, B, C, and D), LN(m)-6 (E, F, G, and H), LN(m)-22 (I, J, K, and L), and LN(m)-33 (M, N, O, and P) films after the alternate soaking process: for 0 (A, E, I, and M), 6 (B, F, J, and N), 18 (C, G, K, and O), and 36 cycle (D, H, L, and P).

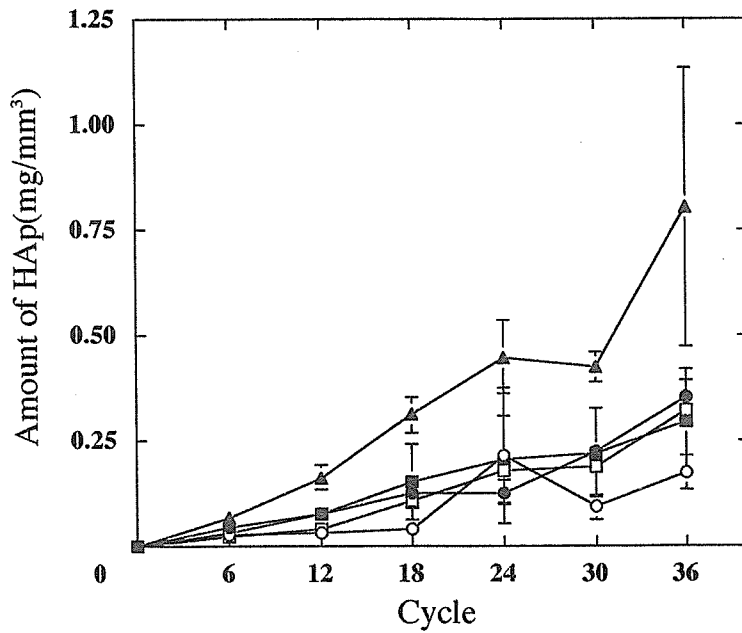


Figure 7 Relationship between cycle and amount of HAp on LN(m)-6(○), LN(m)-12(■), LN(m)-22(□), LN(m)-33(▲), and PLLA(●) after alternate soaking process.

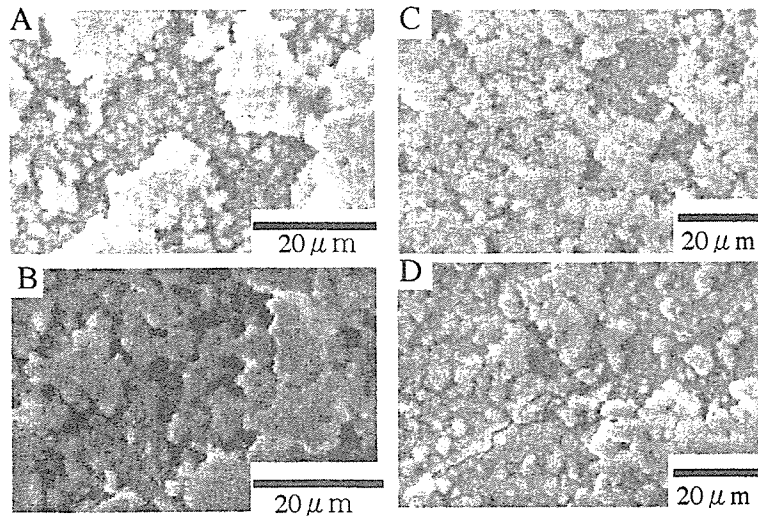


Figure 8 SEM photographs of HAp formed on PLLA (A), LN(m)-6(B), LN(m)-22 (C), and LN(m)-33 (D) in 36 cycles.

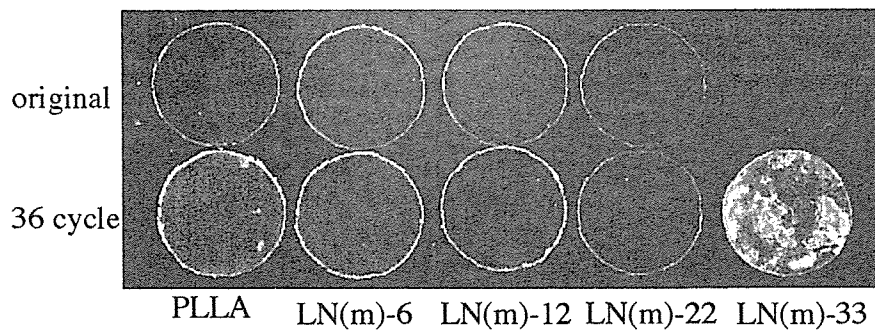


Figure 9 Optical photographs of various films after removing the HAp formed during 36 cycle alternate soaking process and original films.

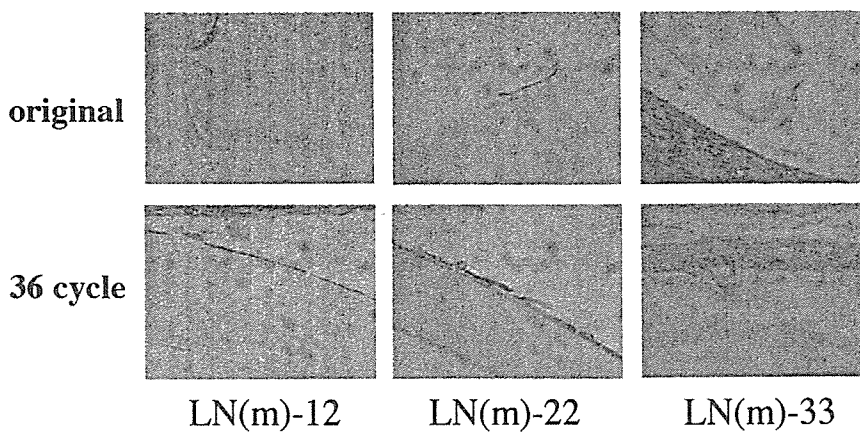


Figure 10 Histologic appearance of subcutaneously implanted PLLA, LN(m)-12, LN(m)-22, and LN(m)-33 after 4 weeks. These were before and after alternate soaking process in 12 cycle.

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社