

印加電圧・シリンジークレクタ間距離を変化させて射出し、クレクタ上に堆積した不織布の微視的構造を走査電顕観察により調べた。形成されたメッシュの空隙率を水銀注入ポロシメーターにより、弾性特性を引張り試験によりそれぞれ調べた。PLCL ファイバーに混練されたタイプ I コラーゲンまたはヘパリンの局在は、透過型電子顕微鏡観察により調べた。

C. 研究成果および考察

1. 生分解性エラストマー-PLCL 電界紡糸メッシュの構造特性、力学特性、および細胞接着性の評価： 生体内で非毒的に分解代謝され、自己組織と適切に同化・置換されることにより組織の再生を誘導し得る骨格基材の開発は、生体組織工学の主要課題の一つであるが、その材料には適切な生分解特性とともに生体力学場に適合し得る機械的特性の両者が求められる。今年度は、その両特性を有する生分解性エラストマーの一つである poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) (PLCL) を電界紡糸によりナノ・マイクロファイバーメッシュ化し、組織工学骨格基材としての活用のための基礎検討を行った。電界紡糸条件を調節することにより、三段階の異なるファイバー径を有する PLCL メッシュを作製し (図 1)、各々のメッシュに対して内部空隙構造の評価 (表 1)、引張り試験による機械的特性の評価 (図 2)、細胞接着性の評価 (図 3、4) を行った。その結果、ファイバー径の増大に対しメッシュの空隙率は増大するとともにヤング率は低下し、柔軟となった。細胞は、ファイバー径が 300 nm ~ 1 μm 程度のメッシュにはよく接着伸展および増殖したが、ファイバー径 7 μm のメッシュ上では接着・伸展・増殖は顕著に抑制された。これらの知見より、細胞をよく接着・増殖させ、かつ柔軟性に優れる PLCL

骨格基材の作製には、ファイバー径 1 μm 以下のナノファイバーの活用が有効であることが示唆された。

2. 共電界紡糸法によるコラーゲン、ヘパリン混練 PLCL ナノファイバーメッシュの作製： PLCL のナノファイバーメッシュに対して種々の生理機能分子の導入・修飾を行うことができれば、生理的機能を付与した人工細胞外マトリックス・組織工学骨格基材の作製に有効である。その手段としては電界紡糸メッシュを先に形成した後、生理機能分子を化学的あるいは物理的に固定する方法があげられるが、その際の修飾はファイバーの表面域のみで起こり、生分解性エラストマー-PLCL の場合、導入される生理的機能はその分解過程の初期段階しか維持できない。PLCL ナノファイバーメッシュに生理機能分子の導入・修飾を行う際には、ナノファイバーのバルクにも生理機能分子が混練されることが必要である。次に、電界紡糸用溶液に生理機能分子を直接混合し PLCL と同時に噴射してナノファイバーメッシュ化する方法 (共電界紡糸) を検討した。生理機能分子として、細胞外マトリックスの主要成分の一つであるコラーゲン、および抗血液凝固活性を有するヘパリンを取り上げた。コラーゲンと PLCL の共電界紡糸では、コラーゲン混合濃度の増大に伴い、ファイバー径は減少した (図 5、6)。ファイバー内においてコラーゲンは PLCL と相分離した粒状態として分布していることが TEM 観察より確認された (図 7)。細胞接着性に関しては、コラーゲン濃度 10%程度までは、コラーゲン濃度増大とともに細胞接着・増殖の増進が見られたが、30%以上では同定の接着性を示すも、増殖が顕著に抑制されることがわかった (図 8)。ヘパリンの共電界紡糸では、ヘパリンを紡糸用有機溶媒に溶かすため

の化学修飾としてトリブチルアミン化し（ヘパリン-TBA）、PLCL と混練したナノファイバーを作製した。TEM 観察から、コラーゲンの場合と同様、ファイバー内でのヘパリン-TBA の相分離状混練様式が確認された（図 10）。ヘパリン混練 PLCL ナノファイバーメッシュの加水分解時におけるヘパリンの放出特性を調べたところ、10%で混練したメッシュで約1ヶ月にわたる放出量の持続的増加が認められたが（図 11）、メッシュ構造自体は保持さ

れていた（図 12）。これらコラーゲンやヘパリンのような生理機能分子の共電界紡糸は、生理的機能の付与およびその発現調節を設計した機能的骨格基材の作製に対して、有力な手段を与えるものと期待される。

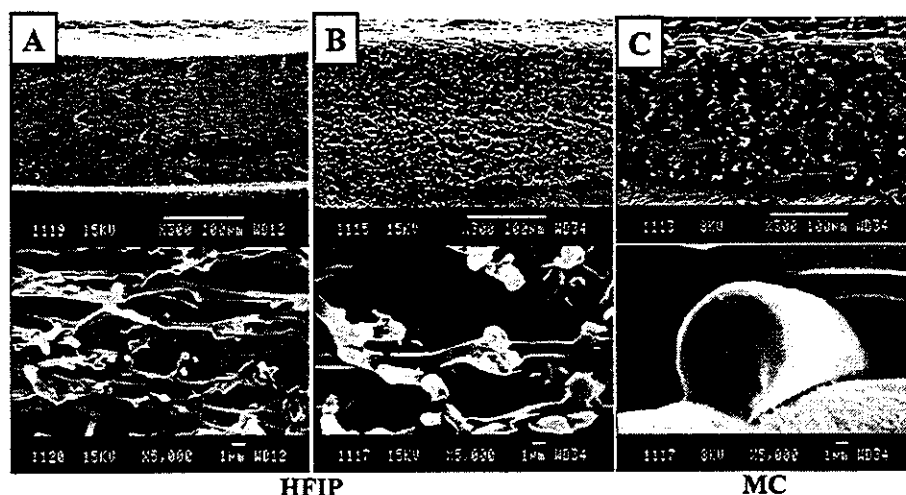


図 1. PLCL (50/50) ナノ・マイクロファイバーメッシュの SEM 写真。ファイバーの平均直径：(A) 0.3 μm 、(B) 1.2 μm 、(C) 7 μm 。

表 1. PLCL (50/50) ナノ・マイクロファイバーメッシュのポロシメトリー評価

Code name (mean fiber diameter)	Sample weight W/g	Sample volume V/cm ³	Density ^a D/g·cm ⁻³	Calculated Porosity ^c		
				Porosity ^b P _C /%	Total pore volume ^d V _p /ml·g ⁻¹	Porosity ^e P _M /%
A (0.3 μm)	0.0503	0.134	0.375	69	1.49	56
B (1.2 μm)	0.0399	0.140	0.285	76	2.29	61
C (7.0 μm)	0.0415	0.133	0.313	74	2.01	63

a) D: weight/volume.

b) Calculated porosity: $P_C = (1 - d_m/d_p) \times 100$ (d_m : density of mesh, d_p : density of PLCL 50/50 = 1.21 g/cm³).

c) Measured by a mercury intrusion porosimeter.

d) V_p: total mercury intrusion volume.

e) Measured porosity: $P_M = V_p \cdot W \cdot 100/V$.

f) Thickness: approximately 140 μm

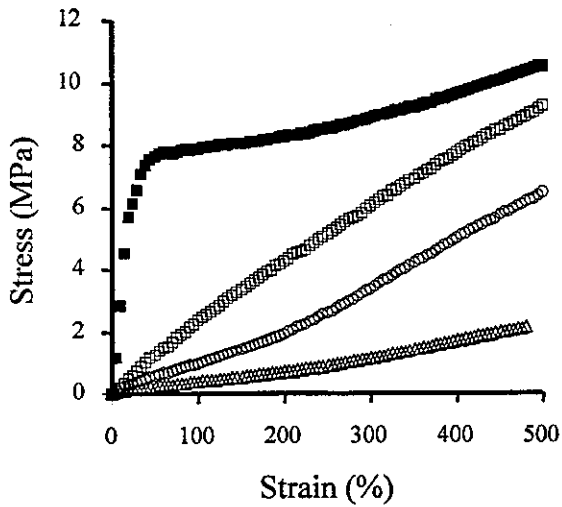


図 2. PLCL (50/50) ナノ・マイクロファイバーストレスに対する応力-歪み曲線。
 ■: 溶媒キャストフィルム、□: 直径 0.3 μm 、
 ○: 直径 1.2 μm 、△: 直径 7 μm 。

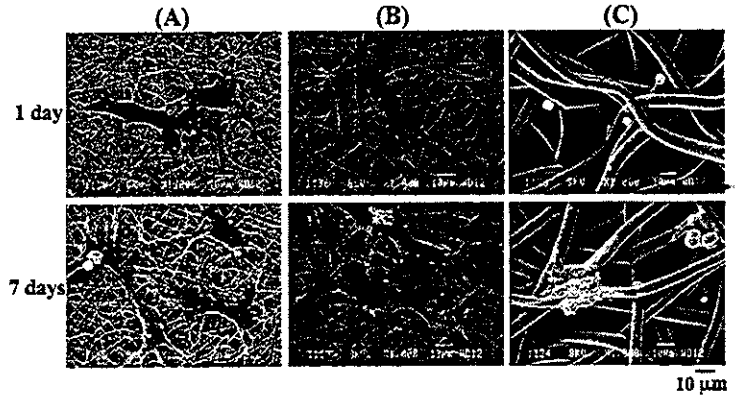


図 3. 異なるファイバ径の PLCL (50/50) 電界紡糸メッシュ上で 1 および 7 日間培養した HUVEC の SEM 写真。
 ファイバの平均直径: (A) 0.3 μm 、(B) 1.2 μm 、(C) 7 μm 。

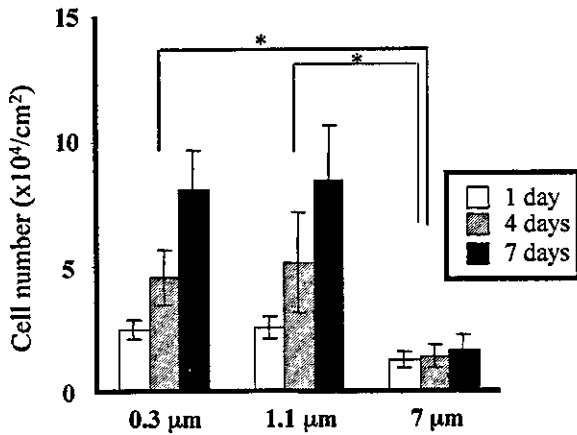


図 4. 異なるファイバ径の PLCL (50/50) 電界紡糸メッシュ上で培養した HUVEC の細胞数の経時変化。

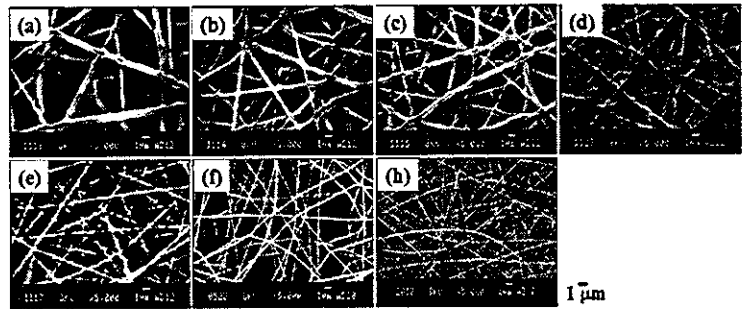


図 5. PLCL とコラーゲンの共電界紡糸メッシュの SEM 写真。
 コラーゲン濃度: (a) 0、(b) 5、(c) 10、(d) 30、(e) 50、
 (f) 70、(h) 100 wt%

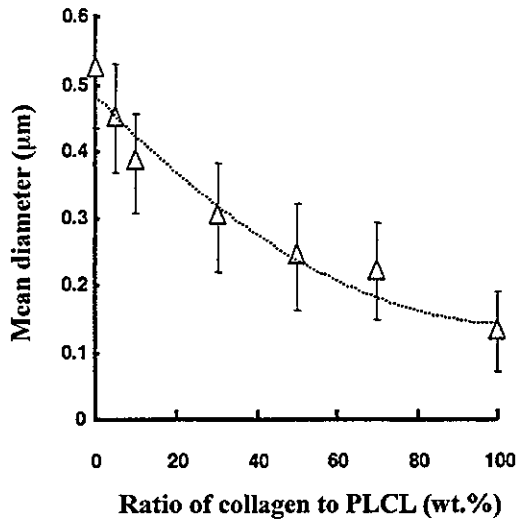


図 6. コラーゲンと共電界紡糸した PLCL ナノファイバーメッシュにおける平均ファイバー径のコラーゲン濃度依存性。

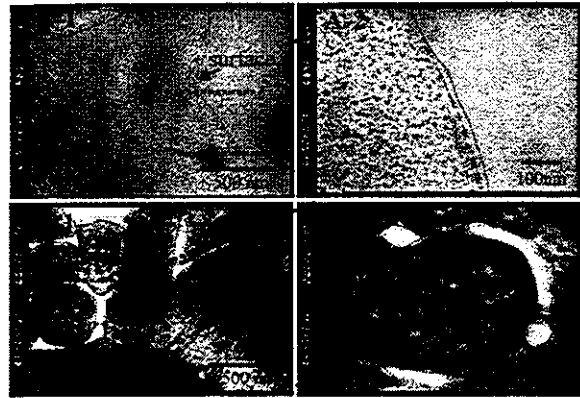


図 7. コラーゲンと共電界紡糸した PLCL ナノファイバーの TEM 写真。コラーゲン濃度：(A) 10、(B) 50 wt%。

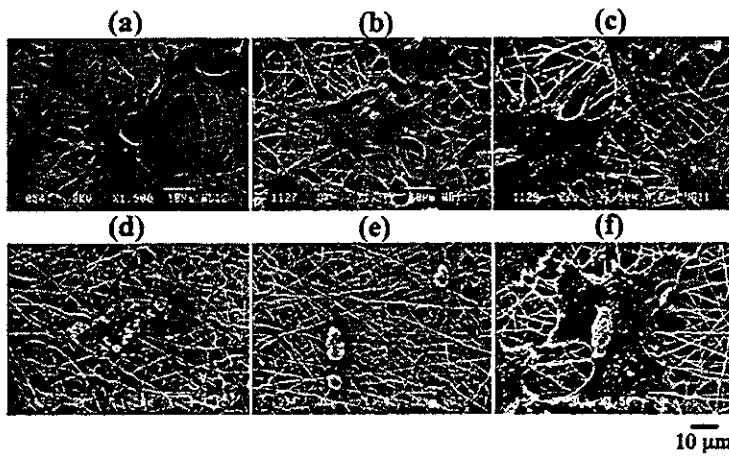


図 8. コラーゲンと共電界紡糸した PLCL ナノファイバーメッシュ上で 5 日間培養した HUVEC の SEM 写真。コラーゲン濃度：(a) 0、(b) 5、(c) 10、(d) 30、(e) 50wt%。(f) e をフィブロネクチンコートしたメッシュ。

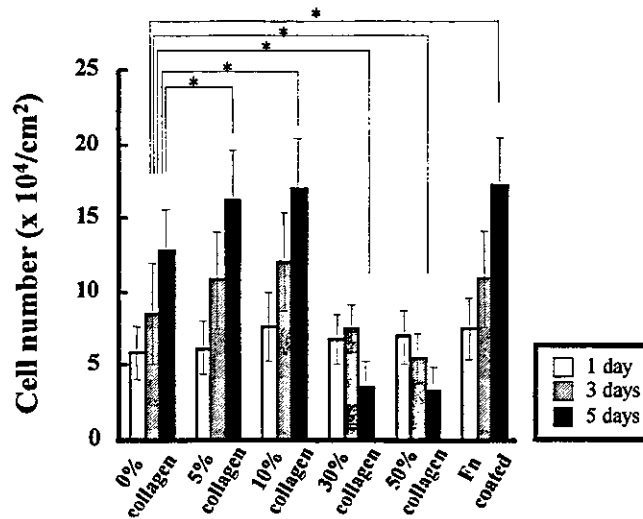


図 9. コラーゲンと共電界紡糸した PLCL ナノファイバーメッシュ上で培養した HUVEC の細胞数の経時変化。

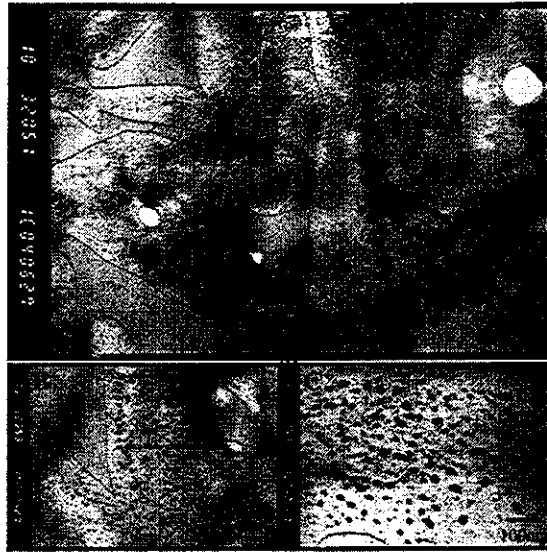


図 10. ヘパリン-TBA と共電界紡糸した PLCL ナノファイバーの TEM 写真。

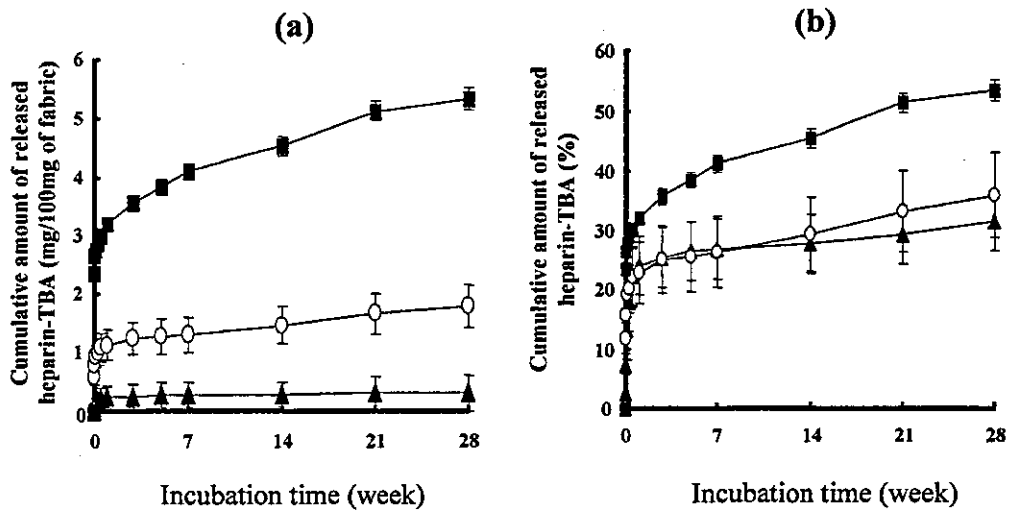


図 11. ヘパリン-TBA と共電界紡糸した PLCL ナノファイバーからのヘパリン-TBA の放出の経時変化。ヘパリン-TBA 濃度 ▲: 1%、○: 5%、■: 10%。(a) 積算放出量 (mg/メッシュ 100mg)、(b) 積算放出率 (%)。

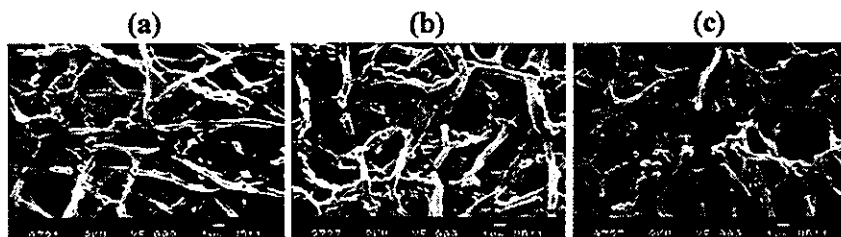


図 12. ヘパリン-TBA と共電界紡糸した PLCL ナノファイバーメッシュの 37°C 4 週間経過後の SEM 写真。ヘパリン-TBA 濃度: (a) 1、(b) 5、(c) 10%。

D. 結論

本年度は、生分解性エラストマーPLCL を電界紡糸技術によりナノ・マイクロファイバーメッシュ化し、組織工学骨格基材作製のための基礎検討を行った。(1) PLCL ナノ・マイクロファイバーメッシュの構造特性、機械的特性、および細胞との相互作用特性の評価、

(2) 新しく開発した共電界紡糸技術によるコラーゲンまたはヘパリンを混練した PLCL ナノファイバーメッシュ作製、の 2 課題を遂行した。今年度開発した PLCL ナノファイバーメッシュ骨格基材は、細胞の良好な接着・増殖特性、生体組織との力学的適合性の設計しやすさ、生体内での非毒性の分解吸収特性、などの利点を有しており、組織再生を適切に誘導し得る医用デバイスの構成素材としての応用可能性が期待される。現在、次段階として、PLCL ナノファイバーメッシュを用いた小口径人工血管(静脈グラフト用)を作製し、そのコンプライアンス特性および血管内皮細胞の preconditioning による内腔面の非血栓化を検討しつつある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. S. Kidoaki, I.K. Kwon, T. Matsuda, Mesoscopic spatial designs of nano- and micron-fiber meshes for tissue-

engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques, *Biomaterials* 2005, 26: 37-46.

2. I.K. Kwon, S. Kidoaki, T. Matsuda, Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential, *Biomaterials* 2005, 26: 3929-3939.
3. S. Kidoaki, I.K. Kwon, T. Matsuda. Structural Feature and Mechanical Property of *In Situ*-Bonded Meshes of Segmented Polyurethane Electrospun from Mixed Solvents. *J. Biomed. Mater. Res. B.* 2005 in press.

2. 学会発表

- 1) 木戸秋悟、松田武久、"電界紡糸ナノ・マイクロファイバーによる組織工学骨格基材の機能的設計と医用デバイス化"、第 15 回 繊維学会西部支部セミナー、福岡、2004 年 6 月(招待口演)

F. 知的財産の出願・登録状況：なし。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

熱応答性シゾフィランを利用した核酸分離剤の開発

分担研究者 新海 征治（九州大学大学院工学研究院応用化学部門教授）

研究要旨：天然多糖であるシゾフィランが一本鎖核酸と選択的に複合体を形成することが既に知られている。シゾフィランの主鎖骨格は β -1, 3-グルカンでありこの構造に由来する特徴的ならせん形成が核酸との複合化に不可欠となっている。このシゾフィランと核酸の複合体形成を利用すれば、シゾフィランを基体とした核酸分離剤の開発が可能となるはずである。今回、特に熱を外部刺激とした分離操作を行う目的で、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）をシゾフィランにグラフト化させた熱応答性シゾフィランの合成を行い、熱刺激による核酸の分離を試みた。その結果、mRNA の構成配列でもある poly(A) が選択的に分離・回収できることが明らかとなっている。

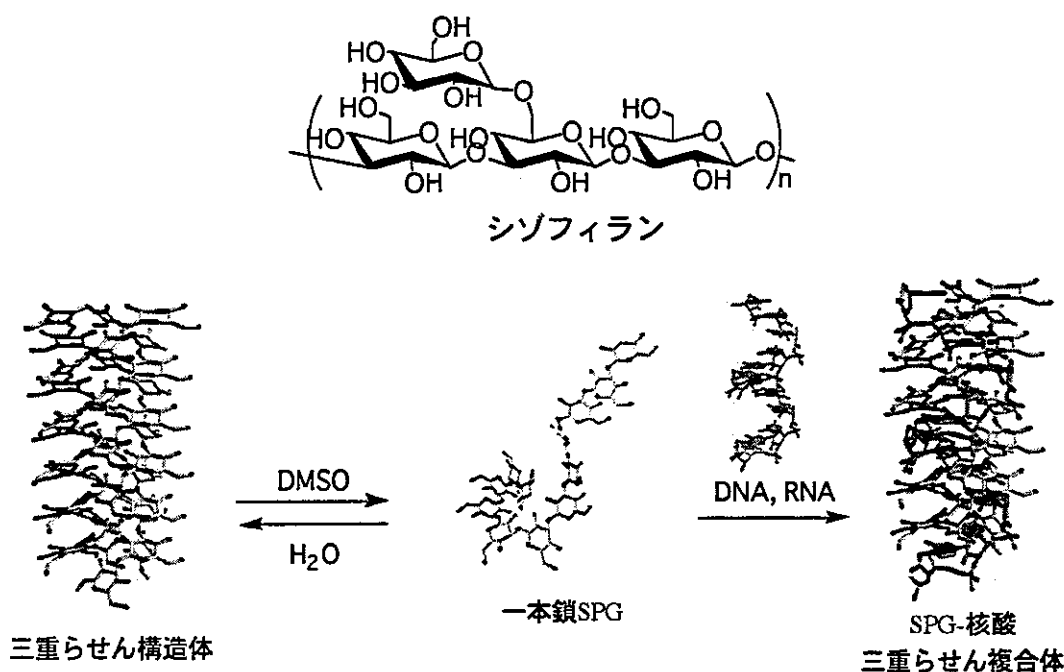


図1：シゾフィランの構造と核酸との複合体形成過程

A. 研究目的

天然多糖であるシゾフィランは β -1, 3-グルカンの一種であり、主鎖グルコースの3繰り返し単位にグルコース側鎖を一つ有する特

微的な糖鎖配列構造を持つ。図1に示す通り天然あるいは水中ではこれらの糖鎖が互いに集合し、3重螺旋構造として存在するが、DMSOなどの極性有機溶媒中では単一鎖のランダム

コイル構造を取ることが知られている。また、DMSO から溶媒を水に変換するとこのランダムコイル構造から再び3重螺旋構造が復元されることが解っている。最近我々はこの再生過程に核酸が共存するとシゾフィラン3重鎖の1本が核酸に置き換わった新規な生体高分子複合体が生成することを見いだした。ここで、この β -1,3-グルカン-核酸間の相互作用を外部刺激により制御することができれば、多糖を遺伝子インターフェイスとして活用する新しい研究分野が構築できる可能性がある。特に多糖-核酸間の特異的な相互作用を利用した複合体形成であるため、従来の静電相互作用や相補塩基対形成に頼らない全く新しい核酸親和剤の開発につながるものと考えられる。

生体内に存在する RNA の中で、mRNA は DNA からタンパク質の翻訳過程で随時生成されている。この mRNA のみを選択的に分離・検出することは遺伝子工学的にもまたタンパク質工学的にも極めて重要であると考えられる。ここで都合のよいことに、mRNA の 3'末端には通常、mRNA の輸送や安定性に関与する poly(A) 鎖が存在することが知られている。そしてシゾフィランはこの poly(A) 鎖と特異的に相互作用することが明らかとなっている。poly(A) 鎖とシゾフィランとの特異的な相互作用を利用すれば、将来は細胞内 RNA の中で数%しか存在しないとされている mRNA の選択的な分離が可能になると期待される。そこで、今回 SPG と熱応答性の高分子鎖であるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (pNIPAm) とを連結することによって、SPG に熱応答性相分離能を付与し、均一系における核酸分離システムの開発を行うことにした。また、pNIPAm より疎水性が高く凝集温度の低下が期待されるポリ(*S*-ブチルアクリルアミド) (pNSBAm) と pNIPAm の双方をグラフト化した

シゾフィラン SPG (coPB-SPG) を用いた核酸の分離・回収についても検討した。凝集温度の低下により複合体の熱的な解離が抑制され、より効率的な分離・回収が可能になるものと期待した。

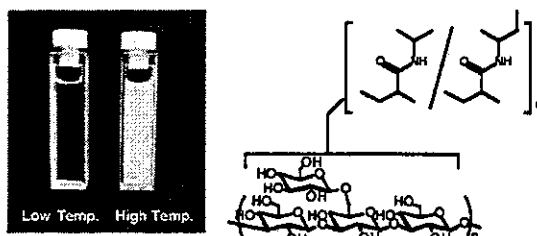


図2：pNIPAm 修飾シゾフィランの温度変化に伴う凝集（左）と pNIPAm および pNSBAm 修飾シゾフィラン (coPB-SPG) の構造（右）

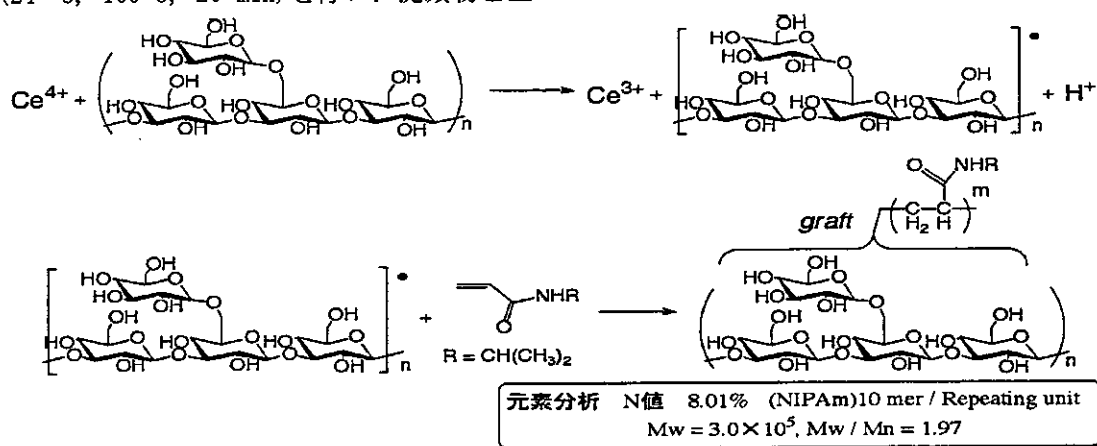
B. 研究方法

シゾフィランへのグラフト化は以下の手順で行った。coPB-SPG の合成スキームをスキーム 1 に示す。シゾフィラン 40 mg を蒸留水 8 ml に均一に溶解させ、NIPAm 362 mg (3.2 mmol), NSBAm 400 mg (3.2 mmol) を加え、アンプル管に注入した。凍結脱気操作により酸素を十分に取り除き、0.1 M Ce(IV) diammonium nitrate / 0.1N HNO₃ を入れ、再び凍結脱気操作を行った。封管をした後、40 °C にて 12 時間反応させた。開封後、メタノールにて再沈殿を行った。遠心分離により回収した沈殿物を DMSO に溶解させ、氷水で透析した後、凍結乾燥により白色固体を得た。GPC (RI detect, DMF) より平均分子量を、¹H-NMR スペクトル (600 MHz, DMSO-*d*₆, TMS std., r. t.) より NIPAm-NSBAm の組成比を算出した。また、元素分析の炭素/窒素 (C/N) 比より SPG の含有率を算出した。ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (pNIPAm) 修飾シゾフィラン (pNIPAm-SPG) も同様にして合成した。

核酸との複合化および分離能の評価は以下の手順で行った。poly(A)/10 mM Tris 溶液

を水浴上で激しく攪拌しながら、coPB-SPG/DMSO 溶液を極少量ずつ加え核酸との複合化を行った。比較対象としてシゾフィランと複合体を形成しない poly(G) を選択した。複合化させた後の試料について遠心分離 (24 °C, 100 G, 20 min) を行い、沈殿物と上

澄み溶液とに分離した。その後上澄み溶液の CD スペクトルを測定した。pNIPAm-SPG と各種核酸との複合化も同様にしてい、それぞれ共沈操作後の上澄みを CD スペクトルにて評価した。



スキーム1：アクリルアミドのシゾフィランへのグラフト化

C 研究成果

図3に coPB-SPG を分離剤、poly(A) および poly(G) をターゲット核酸とした場合の CD スペクトルをまとめて示す。図3aの結果より、poly(A) をターゲットとした場合、上澄み溶液から核酸由来の CD シグナルが減少したため、poly(A) が共沈物として回収されたことが示唆される。また、沈殿物を再溶解させた

溶液より poly(A) 由来の CD スペクトルを確認した。次いで比較実験として、SPG と複合体を形成しない poly(G) についても同様に共沈操作を行った。poly(G) については coPB-SPG を加えた共沈前の試料溶液は poly(G) 単独時と同等の CD スペクトルを与え、共沈操作後の上澄み溶液の CD シグナルにも大きな変化が見られなかったため、coPB-SPG と複合体

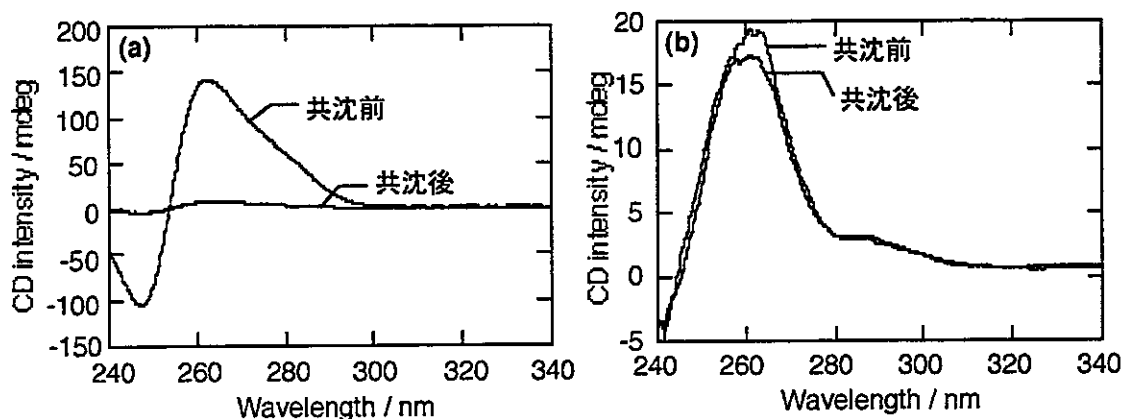


図3：(a) poly(A) をターゲットとした分離回収能の評価、(b) poly(G) をターゲットとした分離回収能の評価（それぞれ赤線が分離操作前、青線が分離操作後の上澄み）

を形成せず、共沈も起こっていないと言える (図 3b)。

一方、pNIPAm-SPG を用いた系では poly(A) が共沈操作で沈殿として回収されることは無かった。

D. 考察

coPB-SPG を用いた場合は期待したとおり poly(A) が沈殿として回収された。さらにシゾフィランが親和性を示さない poly(G) が選択的に回収されることは無かった。このことは感熱性ポリマーのグラフト化後もシゾフィラン本来の核酸選択性が維持されていることを示している。一方、pNIPAm-SPG を用いた場合は poly(A) が沈殿として回収されることは無かった。これは pNIPAm の凝集温度が約 38℃であり SPG-poly(A) 複合体の解離温度 (30℃) よりもかなり高いことに起因している。つまり、複合体は温度上昇に伴い沈殿するよりも早く解離してしまうことになる。より凝集温度が低い coPB-SPG (25℃) を用いた場合に効果的な分離・回収が実現できたのも coPB-SPG が解離温度より十分低い凝集温度を持っているためと考察できる。CD

スペクトルから回収率を算出したところ約 80% の poly(A) が溶液中から回収されたと見積もることができる。

E. 結論

NIPAm と NSBAm から成るコポリマーをシゾフィランにグラフト化した熱感受性シゾフィラン (coBP-SPG) を合成した。このシゾフィランはポリマーのグラフト化を行った後もシゾフィラン本来の核酸親和性を保持していることが明らかとなった。この核酸親和性を利用し、メッセンジャーRNA (mRNA) の構成ユニットである poly(A) の熱刺激による分離・回収を行った。その結果、poly(A) が 80% 以上の高収率で回収できることが明らかとなった。さらに、同様の操作でシゾフィランが複合体を形成しない poly(G) が回収されることも無かった。これらの結果は熱感受性シゾフィラン (coBP-SPG) が溶液中の混合物から選択的に poly(A) のみを分離・回収できる能力を有していることを示している (図 4)。Poly(A) を mRNA のモデル核酸とみなせば、本系は mRNA の分離・回収に十分適応できると期待される。

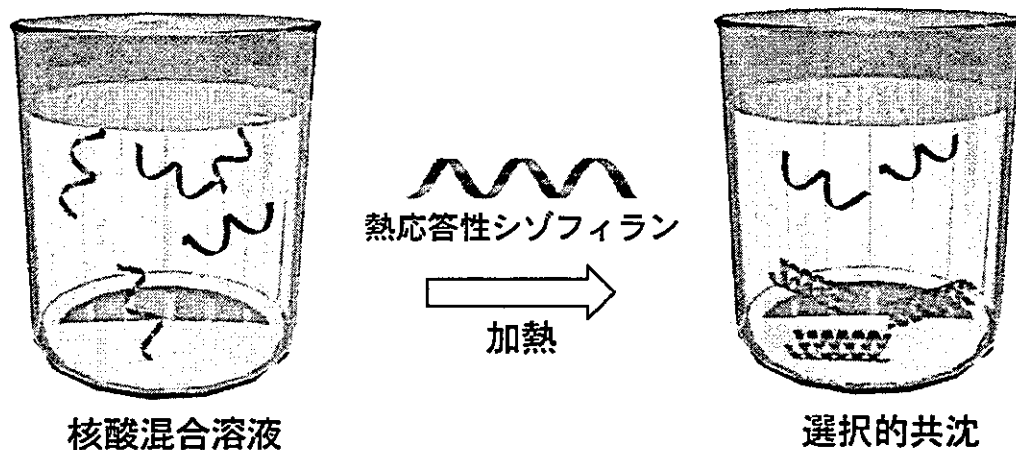


図 4 : 熱感受性シゾフィラン (coBP-SPG) を用いた poly(A) の選択的分離システム

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, K. Sakurai, S. Shinkai, Antisense oligonucleotides bound in the polysaccharide complex and the enhanced antisense effect due to the low hydrolysis. *Biomaterials* 2004, 25: 3117-3123.
2. T. Satoh, T. Nagasaki, N. Sakurai, S. Shinkai, 6-Amino-6-deoxychitosan. Preparation and application as plasmid vector in COS-1 cells. *Chem. Lett.* 2004, 33: 340-341.
3. T. Nagasaki, M. Hojo, A. Uno, T. Satoh, K. Koumoto, M. Mizu, K. Sakurai, S. Shinkai, Long-term expression with a cationic polymer derived from a natural polysaccharide: schizophyllan. *Bioconjugate Chem.* 2004, 15: 249-259.
4. K. Koumoto, M. Mizu, K. Sakurai, T. Kunitake, S. Shinkai, Complementary-strand-induced release of single-strand DNA bound in the schizophyllan complex. *Chemistry & Biodiversity*, 2004, 1: 520-529.
5. R. Karinaga, M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, S. Shinkai, K. Sakurai, First observation by fluorescence polarization of complexation between mRNA and the natural polysaccharide schizophyllan. *Chemistry & Biodiversity* 2004, 1: 634-639.
6. M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, R. Karinaga, T. Kimura, T. Nagasaki, S. Shinkai, K. Sakurai, Enhancement of the antisense effect of polysaccharide-polynucleotide complexes by preventing the antisense oligonucleotide from binding to proteins in the culture medium. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2004, 77: 1101-1110.
7. M. Mizu, K. Koumoto, T. Anada, T. Matsumoto, M. Numata, S. Shinkai, T. Nagasaki, K. Sakurai, A polysaccharide carrier for immunostimulatory CpG DNAs to enhance cytokine secretion. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126: 8372-8373.
8. K. Miyoshi, K. Uezu, K. Sakurai, S. Shinkai, Proposal of a new hydrogen-bonding form to maintain curdlan triple helix. *Chemistry & Biodiversity* 2004, 1: 916-924.
9. K. Koumoto, R. Karinaga, M. Mizu, T. Anada, K. Sakurai, T. Kunitake, S. Shinkai, Removal of the side-chain glucose groups from schizophyllan improves the thermal stability of the polycytidylic acid complexes under the physiological conditions. *Biopolymers* 2004, 75: 403-411.
10. T. Hasegawa, T. Fujisawa, M. Numata, M. Umeda, T. Matsumoto, T. Kimura, S. Okumura, K. Sakurai, S. Shinkai, Single-walled carbon nanotubes acquire a specific lectin-affinity through

- supramolecular wrapping with lactose-appended schizophyllan. *Chem. Commun.* 2004, 2150-2151.
11. T. Anada, H. Matsunaga, R. Karinaga, K. Koumoto, M. Mizu, K. Nakano, S. Shinkai, S. Sakurai, Proposal of new modification technique for linear double-stranded DNAs using the polysaccharide schizophyllan. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004, 14: 5655-5659
 12. T. Hasegawa, T. Fujisawa, M. Numata, T. Matsumoto, M. Umeda, R. Karinaga, M. Mizu, K. Koumoto, T. Kimura, S. Okumura, K. Sakurai, S. Shinkai, Schizophyllans carrying oligosaccharide appendages as potential candidates for cell-targeted antisense carrier. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2004, 2: 3091-3098.
 13. M. Numata, T. Hasegawa, T. Fujisawa, K. Sakurai, S. Shinkai, β -1,3-Glucan (schizophyllan) can act as a one-dimensional host for creation of novel poly (aniline) nanofiber structure. *Org. Lett.* 2004, 6: 4447-4450.
 14. T. Hasegawa, S. Haraguchi, M. Numata, T. Fujisawa, C. Li, K. Kaneko, K. Sakurai, S. Shinkai, Schizophyllan can act as a one-dimensional host to construct poly(diacetylene) nanofibers. *Chem. Lett.* 2005, 34: 40-41.
 15. T. Hasegawa, T. Fujisawa, S. Haraguchi, M. Numata, R. Karinaga, T. Kimura, S. Okumura, K. Sakurai, S. Shinkai, Schizophyllan-*folate* conjugate as a new non-cytotoxic and cancer-targeted antisense carrier. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15: 327-330.
 16. T. Kimura, A. Beppu, K. Sakurai, S. Shinkai, Separation technique for messenger RNAs by use of schizophyllan/poly (A) tail complexation. *Biomacromolecules* 2005, 6: 174-179.
 17. D. H. Yang, A. H. Bae, K. Koumoto, S. W. Lee, K. Sakurai, S. Shinkai, In situ monitoring of polysaccharide-polynucleotide interaction using a schizophyllan-immobilized QCM device. *Sensors and Actuators B: Chemical*, in press.
 18. R. Karinaga, K. Koumoto, M. Mizu, T. Anada, S. Shinkai, K. Sakurai, PEG-appended β -1,3-glucan schizophyllan for antisense-oligonucleotides delivery to induce endosomal escape. *Biomaterials*, in press.
 19. T. Nagasaki, T. Kawazu, T. Tachibana, S. Tamagaki, S. Shinkai, Enhanced nuclear import and transfection efficiency of plasmid DNA using streptavidin-fused importin- β . *J. Controlled Release*, in press.
 20. T. Matsumoto, M. Umeda, T. Hasegawa, M. Numata, K. Sakurai, K. Koumoto, S. Shinkai, Poly (N-substituted-

- acrylamide)-branched schizophyllans are useful for selective recovery of polynucleotide through convenient and quick precipitation procedures. *Polymer J.*, in press.
21. T. Anada, K. Sakurai, S. Shinkai, A new polynucleotide-polysaccharide complex and its application to functional oligonucleotide delivery. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, in press.
22. A. H. Bae, M. Numata, T. Hasegawa, C. Li, K. Kaneko, K. Sakurai, S. Shinkai, One-dimensional arrangement of Au nanoparticles utilizing a helical structure constructed by schizophyllan: a unique encounter of a natural product with inorganic compounds. *Angew. Chem., Int. Ed.*, in press.
23. 狩長亮二、甲元一也、櫻井和朗、新海征治、多糖・核酸複合体を用いた機能性高分子コンジュゲート-核酸医薬デリバリーへの挑戦-. 高分子加工 2004, 53(12): 561-568.
2. 学会発表
- 1) 朝井雅剛, 沼田宗典, 新海征治, 櫻井和朗, 藤田典史, 長谷川輝明. β -1,3-glucan-カーボンナノチューブ複合体の形成とその構造評価. 日本化学会第 84 春季年会, 2004 年 3 月
- 2) 沼田宗典, 新海征治. 核酸を鋳型とした新規ナノシリカの創製. 日本化学会第 84 春季年会, 2004 年 3 月
- 3) 穴田貴久, 水 雅美, 甲元一也, 狩長亮二, 長谷川輝明, 松本貴博, 櫻井和朗, 新海征治. 化学修飾シゾフィランを利用したアンチセンスオリゴヌクレオチドキャリアーの開発. 日本化学会第 84 春季年会, 2004 年 3 月
- 4) 甲元一也, 穴田貴久, 櫻井和朗, 新海征治. シゾフィランの化学修飾による複合体中の核酸鎖の加水分解速度の抑制. 日本化学会第 84 春季年会, 2004 年 3 月
- 5) 狩長亮二, 甲元一也, 穴田貴久, 櫻井和朗, 新海征治. リエチレングリコールを導入したシゾフィランを利用した新規アンチセンスキャリアー. 日本化学会第 84 春季年会, 2004 年 3 月
- 6) 長谷川輝明, 梅田真理子, 松本貴博, 沼田宗典, 水 雅美, 甲元一也, 穴田貴久, 櫻井和朗, 新海征治. ラクトース修飾シゾフィランによる肝細胞特異的アンチセンスデリバリー系の構築. 日本化学会第 84 春季年会, 2004 年 3 月
- 7) 佐藤 琢, 長崎 健, 坂入信夫, 新海征治. 6-アミノ-6-デオキシキトサンの哺乳類細胞への遺伝子導入活性評価. 日本化学会第 84 春季年会, 2004 年 3 月
- 8) 木村太郎, 別府亜希子, 櫻井和朗, 新海征治. 多糖シゾフィラン-核酸相互作用を用いた新規メッセンジャーRNA 分離システムの開発. 日本化学会第 84 春季年会, 2004 年 3 月
- 9) 梅田真理子, 沼田宗典, 長谷川輝明, 松本貴博, 櫻井和朗, 新海征治. アゾベンゼン修飾 β -1,3-グルカンを用いた新規機能性材料の開発. 日本化学会第 84 春季年会, 2004 年 3 月
- 10) 松本貴博, 梅田真理子, 沼田宗典, 長谷川輝明, 新海征治, 櫻井和朗. β -1,3-グルカン-機能性高分子コンジュゲートの構築と機能評価. 日本化学会第 84 春季年会,

2004年3月

- 11) 長崎 健, 宇野 篤, 佐藤 琢, 甲元一也, 櫻井和朗, 新海征治. カチオン化シゾフィランを用いた動物細胞への遺伝子導入. 日本化学会第84春季年会, 2004年3月
- 12) 沼田宗典, 長谷川輝明, 金子賢治, 櫻井

和朗, 新海征治. β -1,3-グルカンを一次元ホストとして利用した機能性材料の創製. 第19回生体機能関連化学部会, 2004年10月(東大)

E. 知的財産の出願・登録状況: なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
 分担研究報告書

生分解性セグメント化ポリウレタンの特性解析とマイクロファイバーの調製

分担研究者 高原 淳（九州大学有機化学基礎研究センター教授）

研究要旨：アミノ酸を原料とするジイソシアナートとポリカプロラクトン、生体成分と対応したジオールあるいはジアミンを用いて、相分離状態を制御することにより力学物性に優れた生分解性セグメント化ポリウレタン(SPUU)を開発した。SPUUの生分解性はBOD試験により確認した。さらに電界紡糸法によりSPUUマイクロファイバーあるいはマイクロファイバー不織布を調製した。

A. 研究目的

ハードセグメントとソフトセグメントからなるマルチブロック共重合体であるセグメント化ポリウレタンは、生体適合性と力学的強度を兼ね備えた材料であり、医用目的に広く用いられてきた。近年、アミノ酸(lysine)の誘導体であるイソシアナート(2,6-diisocyanatohexanoate: LDI)が開発され、毒性のない生分解性ポリウレタンの開発が可能になった。この環境適合型のイソシアネートを利用し、構造を制御したセグメント化ポリウレタンエラストマーを調製することで、

分解速度や力学特性の制御が可能となり、組織工学への応用が期待される。本研究では、LDIを用いたセグメント化ポリウレタン(SPU)及びセグメント化ポリウレタンウレア(SPUU)の力学物性、生分解挙動の評価、さらにエレクトロスプレー・デポジション(ESD)法によりマイクロファイバー調製を検討した。

B. 研究方法

SPU及びSPUUは、プレポリマー法により合成した。ポリオールには、ポリカプロラク

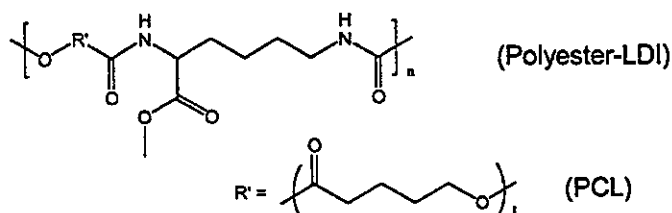
表1 SPUとSPUUの組成とソフトセグメントのPCL分率

Sample	LDI: PCL: Chain Extender	Soft Segment Fraction(wt%)
PCL(1250)(100)PDO	4:4:0	100
PCL(1250)(80)PDO	4:2:2	80
SPU PCL(1250)(69)PDO	4:1.5:2.5	69
PCL(1250)(56)PDO	4:1:3	56
PCL(1250)(0)PDO	4:0:4	0
PCL(1250)(80)BDA	4:3:1	80
PCL(1250)(75)BDA	4:2.5:1.5	75
SPUU PCL(1250)(71)BDA	4:2:2	71
PCL(1250)(64)BDA	4:1.5:2.5	64
PCL(1250)(53)BDA	4:1:4	53
PCL(1250)(0)BDA	4:0:4	0

トンジオール (PCL) ($M_n=1250$)、鎖延長剤には SPU は生物資源由来の 1,3-プロパンジオール (PDO)、SPUU は 1,4-ブタンジアミン (BDA) を用いて LDI と PCL および鎖延長剤の比率を変化させて SPU、SPUU を合成した。表 1 は SPU と SPUU の組成とソフトセグメントの PCL 分率をまとめたものである。図 1 は SPU と SPUU のハードセグメントとソフトセグメントの化学構造である。ソフトセグメントは PCL と LDI の繰り返しより、ハードセグメントは LDI と鎖延長剤の繰り返しより構成される。鎖延長剤に PDO を用いたものはウレタン基を有する SPU、鎖延長剤に BDA を用いたものが尿素基を有する SPUU である、サンプル名はポリオール (ポリオールの M_n) (PCL 分率) 鎖延長剤で表記した。例えば PCL(1250)(71)BDA は、 $M_n=1250$ の PCL を 71wt%

含む、BDA で鎖延長した SPUU を示す。特性解析は GPC、NMR、FT-IR に基づき、熱的性質は DSC 測定により、また、力学物性は引張試験、動的粘弾性測定により評価した。凝集構造は広角 X 線回折 (WAXD) および放射光 (Spring-8) を用いた小角 X 線散乱 (SAXS) により評価した。さらに、調製した SPU 及び SPUU フィルムを 310 K のトリス緩衝溶液中 ($\text{pH}=7.6$) に浸漬し重量変化を測定することにより、分解挙動を評価した。また生分解性は活性汚泥中での BOD 試験に基づき評価した。さらに ESD 法により、種々の濃度の SPU (クロロホルム溶液)、SPUU (DMF+THF) 溶液を、高電圧を印加しながら基板上に噴霧した。得られたファイバーを乾燥後、電界放出型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) を用いて観察した。

Soft Segment



Hard Segment

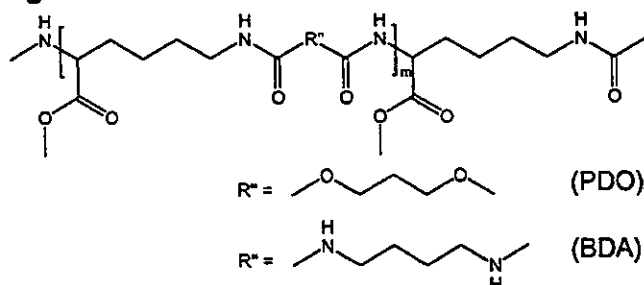


図1 SPUとSPUUのハードセグメントとソフトセグメントの化学構造

C. 研究成果

SPU と SPUU の構造と物性の PCL の分率依存性を評価した。SPUU の DSC 曲線では 225 K 付近に PCL のガラス転移が、また 300 K 付近

に PCL の結晶融解が観測された。SPUU の LDI-BDA ハードセグメントのガラス転移温度 (T_g) は 380 K 付近で、SPU の LDI-PDO ハードセグメントと比較して約 70 K 上昇してい

ることが確認された。これはウレア基の水素結合がウレタン結合と比較して強固なためである。PCL(1250)(71)BDA の場合、PCL の融解ピークが観察されなかった。このことから、ソフトセグメントとハードセグメントが部分的に相混合し、PCL の結晶化が阻害されていると考えられる。図2は PCL(1250)(X)PDO と PCL(1250)(X)BDA の動的貯蔵弾性率, E' と動的損失弾性率, E'' の温度依存性である。250–300K に観測される E'' の大きな吸収は、ソフトセグメントの PCL のマイクロブラウン運動に

対応する α_s 吸収、150K 付近の E'' の吸収は局所運動に対応する γ 吸収である。PCL(1250)(X)PDO の場合は PCL の分率の増大とともに α_s 吸収が低温側にシフトしており、相分離が良好になることを示している。一方、PCL(1250)(X)BDA の場合は、 α_s 吸収のピーク温度のソフトセグメント分率依存性は殆ど変化無く、PCL 分率が 71% の PCL(1250)(72)BDA では PCL が結晶化しないために吸収ピークが最も鋭くなった。

PCL(1250)(X)PDO と PCL(1250)(X)BDA の凝

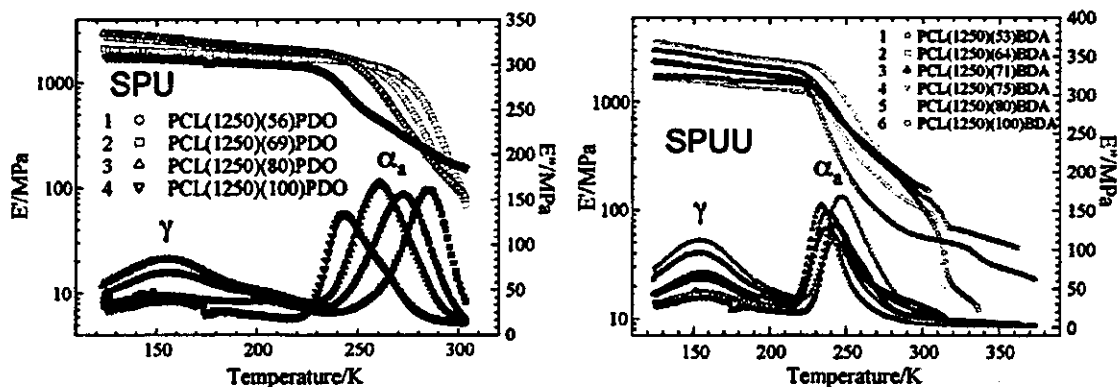


図2 PCL(1250)(X)PDOとPCL(1250)(X)BDAの動的貯蔵弾性率, E' と動的損失弾性率, E'' の温度依存性

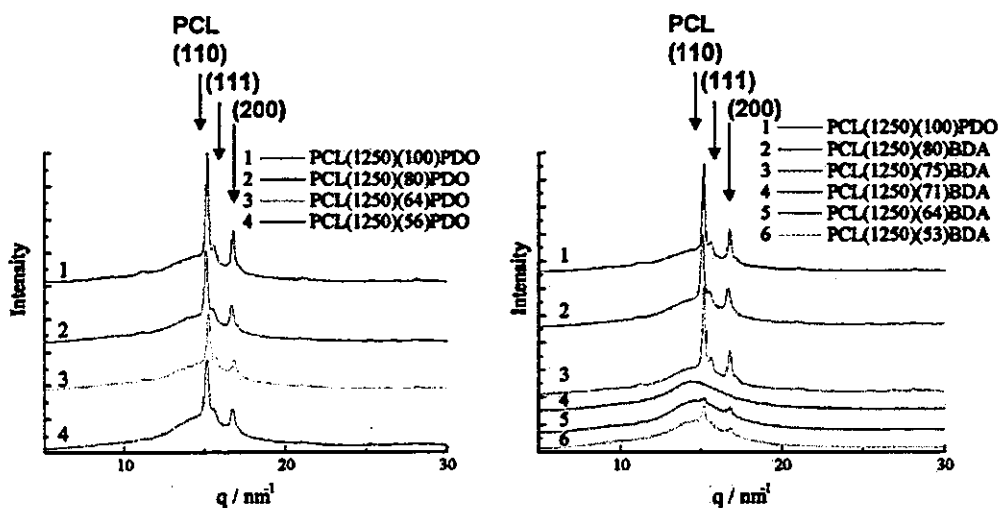


図3 PCL(1250)(X)PDOとPCL(1250)(X)BDA のWAXDプロファイル 横軸の q は散乱ベクトルで $q=4\pi \sin \theta / \lambda$

集構造は広角 X 線回折(WAXD)および小角 X 線散乱(SAXS)により検討した。WAXD ではハードおよびソフトセグメントの結晶状態について検討した。図 3 は PCL(1250)(X)PDO と PCL(1250)(X)BDA の WAXD プロファイルである。横軸は散乱ベクトル、 $q=4\pi\sin\theta/\lambda$ で定義した。ここで λ は X 線の波長である。 $q=15.1\text{nm}^{-1}$, $q=15.5\text{nm}^{-1}$, $q=16.8\text{nm}^{-1}$ にそれぞれ PCL 微結晶からの(110), (111), (200)が観測された。PCL(1250)(X)PDO の場合 PCL の回折は、PCL の分率の増大とともに鋭くなった。一方、PCL(1250)(X)BDA の場合、PCL の分率の低下とともに、PCL の回折ピークはブロードになり、PCL(1250)(71)BDA、PCL(1250)(64)BDA の場合には、PCL からの回

折が観測されず、この組成で PCL の結晶化が阻害されていることを示している。一方、PCL(1250)(53)BDA では PCL の結晶化が観測された。これらの結果は DSC の測定結果と良く対応している。

マイクロ相分離状態は SAXS 測定により評価した。図 4 は PCL(1250)(X)PDO の SAXS プロファイルである。 $q=0.25\text{--}0.4\text{nm}^{-1}$ に観測されるピークは、PCL のラメラ構造に対応する長周期である。このピークは、PCL の融点以上で消失した。従って PCL が結晶化した場合、SPU は結晶性の PCL、非晶性の PCL、ハードセグメントの三相からなるマイクロ相分離構造を形成していると考えられる。図 5 は PCL(1250)(X)BDA の SAXS プロファイルであ

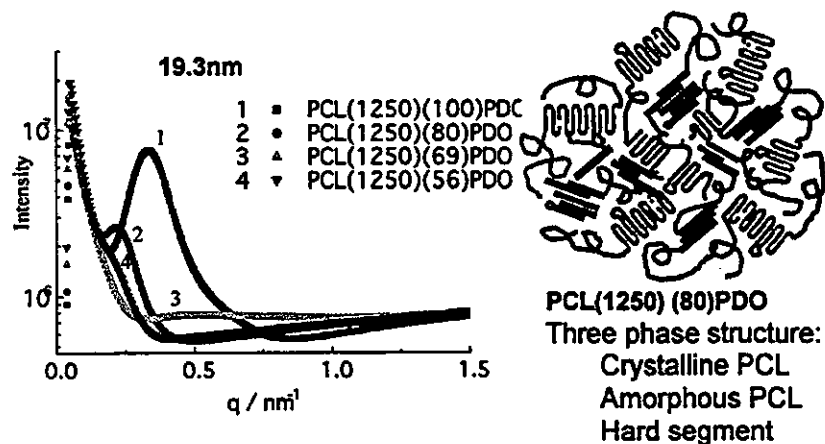


図4 PCL(1250)(X)PDOのSAXSプロファイルとSPUの凝集構造の模式図

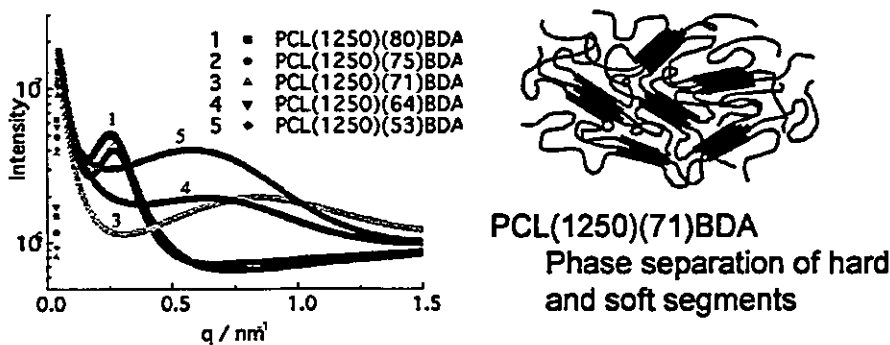


図5 PCL(1250)(X)BDAのSAXSプロファイルとSPUUの凝集構造の模式図

る。PCL の分率が高い場合には $q=0.25-0.4\text{nm}^{-1}$ 付近に。PCL 結晶の長周期が観測されるが、WAXD で PCL の結晶性が低く観測された、PCL(1250)(71)BDA、PCL(1250)(64)BDA、PCL(1250)(53)BDA ではハードセグメントとソフトセグメントのマイクロ相分離構造に対応する長周期が観測された。これは図5の右図に示すように、ハードセグメントとPCLは非晶性でソフトセグメントがマイクロ相分離構造を形成していることを示している。

SPU および SPUU の分解特性を TrisBS 中での重量変化と活性汚泥中での BOD 試験に基づき評価した。PCL 分率の増加に伴い、TrisBS 中での分解量が増大した。また、SPUU は 70 日経過後も分解量は 10 %以下であり、SPU と比較して低い分解速度を示した。これは、尿素基の水素結合で強固に凝集したハードセグメントに起因する。活性汚泥中での BOD 試験は次の方法で行った。活性汚泥として名古屋市名東区の西山水処理場から採取したものを使用し、JIS K 6950 (ISO 14851) に準じて懸濁濃度が 30mg/L になるように活性汚泥溶液を調製した。試料約 15mg と活性汚泥溶液 150mL をふらん瓶にとり試験を開始した。

TITEC BOD Tester 200F を使い、25℃で酸素消費量を測定し、試料が完全に酸化されるのに必要とする理論酸素消費量 (TOD) に対する酸素消費量 (BOD) の割合で生分解性を評価した。

$$\text{BOD 生分解度} = (S_{\text{BOD}} - B_{\text{BOD}}) / \text{TOD} \times 100$$

ここで、 S_{BOD} は試料の BOD 値、 B_{BOD} はブランクの BOD 値、TOD は試料を完全に酸化するのに必要とする酸素消費量である。含窒素サンプルについては、硝酸酸化が起こると仮定して TOD を算出した。図6は PCL(1250)(X)PDO と PCL(1250)(X)BDA の BOD 生分解度の経日変化である。いずれも比較的高い分解性を示し、特に、TrisBS 中では分解性の低かった PCL(1250)(X)BDA は PCL(1250)(X)PDO と同程度の分解性を示した。BOD 試験ではいずれも TrisBS 中に比べて高い分解性を示し、BOD 生分解は加水分解速度に比べて速いことから、LDI ベースの SPU と SPUU が生分解性を示すことが明らかとなった。

ESD 法により SPU 及び SPUU ファイバーを調製した。図7は 12 kV、電極間距離 300 mm、流量 1ml hr^{-1} の条件で、(a)10 wt%、(b)20 wt%、(c)30wt%の濃度の CHCl_3 溶液より調製した

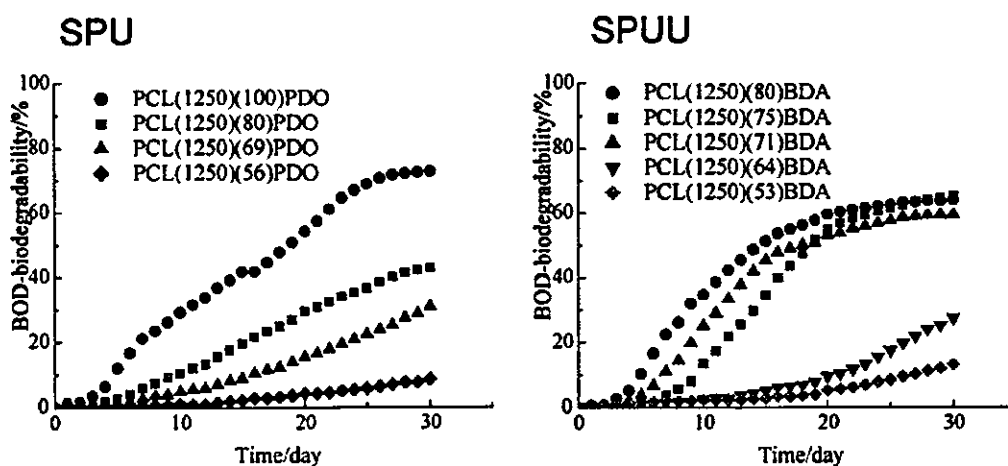


図6 PCL(1250)(X)PDOとPCL(1250)(X)BDAのBOD生分解度の経日変化

PCL(1250)(80)PDO のマイクロファイバーの SEM 像である。SPU のマイクロファイバーは比較的濃度が薄い (10 wt%) 条件では粒子とファイバーを形成したが、高濃度 (20 wt%、30 wt%) 溶液にすることにより均一なファイバーを形成した。図 8 は 10 wt%の(DMF/THF)

混合溶液から調製した PCL(1250)(71)BDA のマイクロファイバーの SEM 像である。SPUU も SPU と同様に、高濃度になるにつれて均一なマイクロファイバーを形成した。しかしながら SPUU の場合、尿素基の存在により高い粘性を示すため、7.5 wt%と比較的低濃度で

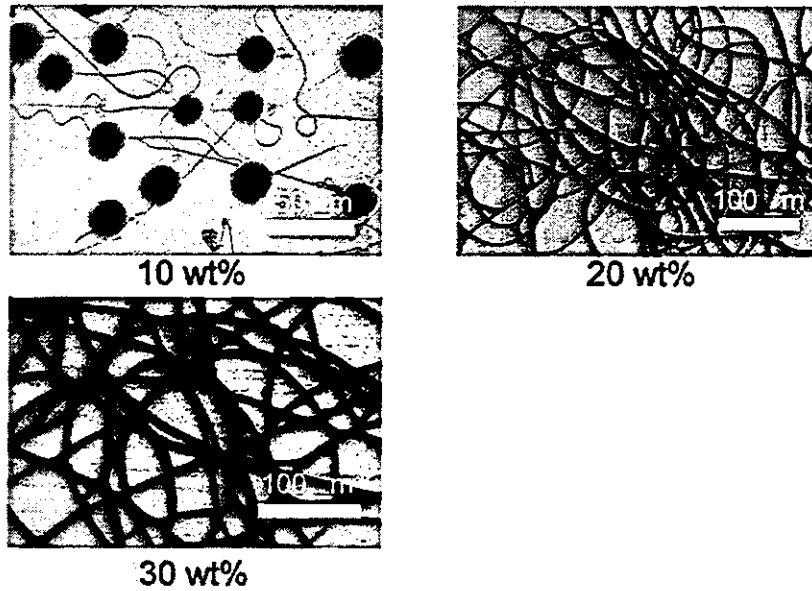


図7 12 kV、電極間距離300 mm、流量1 ml hr-1の条件で、(a)10 wt%、(b)20 wt%、(c)30wt%の濃度のCHCl₃溶液より調製した PCL(1250)(80)PDOのマイクロファイバーのSEM像

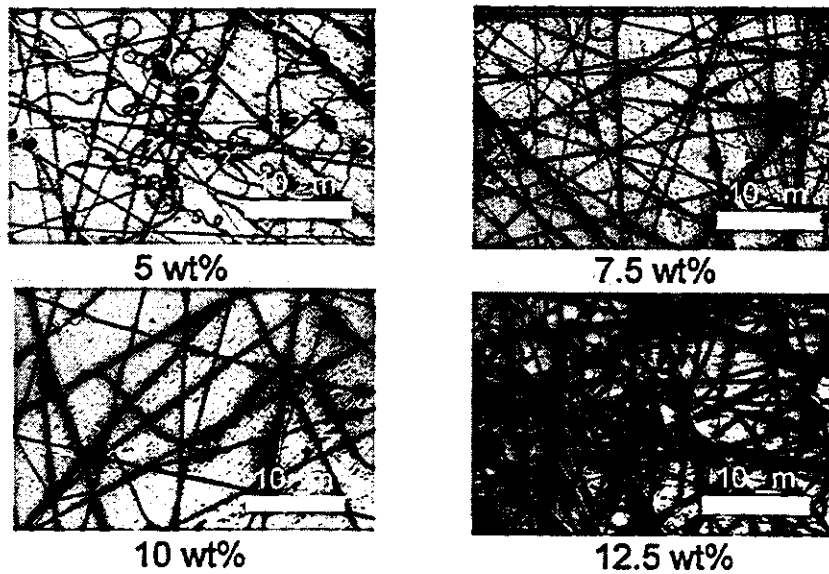


図8 10 wt%の(DMF/THF)混合溶液から調製したPCL(1250)(71)BDAのマイクロファイバーのSEM像