

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700490

研究課題名（和文） タンパク質徐放性と組織接着性を兼ね備えた新規バイオマテリアルの創製と医療応用

研究課題名（英文） Development and medical applications of novel tissue-adhesive biomaterials that can release proteins in a sustained manner

研究代表者

村上 義彦（MURAKAMI YOSHIHIKO）

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：00339748

研究成果の概要（和文）：本研究では、(1) タンパク質の内包・徐放を可能とする新しい自己組織化体（『三層構造』高分子ミセル）の開発、(2) 得られた自己組織化体を架橋構造として利用した「合成高分子のみを利用した安全性が高い」新しい組織接着性ゲルの開発を進めることによって、「タンパク質の徐放を可能とする」新しいバイオマテリアル（生体材料）を創製し、その医療応用（止血材や薬物徐放材料としての応用）を検討した。

研究成果の概要（英文）：A novel tissue-adhesive hydrogel was prepared by using a "trilayered" polymeric micelle consisting of an aldehyde-terminated poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) (PEG-PLA) block polymer. A Schiff base is chemically formed between the amino groups in a polyallylamine and the aldehyde groups on the surface of polymeric micelles. The hydrogel was rapidly formed when the polymeric micelle solution and polyamine solution were mixed in vitro. The hydrogel was rapidly formed in vivo, and it adhered to a tissue surface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：組織接着材、高分子ミセル、自己組織化体、バイオマテリアル、ハイドロゲル、ブロック共重合体

1. 研究開始当初の背景

外科手術の際には、組織に接着するゲルを切開部位（臓器や血管など）に滴下・接着することによって止血効果が促進される。現在は、フィブリンやコラーゲン等の生体由来物質を含む組織接着性ゲルが主に用いられて

いる。しかし、ヒト由来物質を用いる限り、エイズや肝炎ウイルス等の感染の危険性が高く、動物由来物質を用いる場合は、異種タンパク質に対するアナフィラキシーショックや狂牛病等の感染の危険性が生じる。そのため、「非」生体由来物質のみを用いたゲルの開発が急務であると言える。現在までに、

様々な非生体由来物質を用いたゲルが提案されてきたが、接着力が弱く、光源を必要とするため操作性が劣る等の問題点が多い。接着強度が高く、操作性が優れた非生体由来の組織接着性ゲルの報告はほとんど無いのが現状である。また、ゲルそのものには創傷治癒効果がないが、「創傷治癒効果を高める機能（例えば、タンパク質の容易な徐放制御）」を有するゲルの開発は進んでいない。

さらに、薬物治療のために、血中を安定に循環しながら患部へ届く薬物キャリアーの実現を目指した研究が数多く報告されている。しかし、ある所望の部位に薬物放出デバイスを留置し、そこから薬物を徐放する技術の研究はほとんど進んでいない。これは、組織に接着しない薬物放出デバイスを患部に留置しても、時間経過と共にデバイスが患部から徐々に移動してしまい、薬物治療効果が消滅してしまうためである。例えば、細胞増殖因子を徐放する組織接着性の材料を開発すれば、「タンパク質徐放を可能とする材料を手術部位に留置することによる創傷治癒促進」「インジェクタブルなタンパク質徐放材料による皮下注入型薬物治療」等の治療法が実現する。一般に、タンパク質の放出は、ゲルマトリックスの加水分解によってのみ制御される場合が多いが、その制御は困難であることが多い。長時間にわたって安定した『徐放』を実現するためには、タンパク質放出制御の新しい方法論の確立が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質の内包・徐放を可能とする新しい自己組織化体（『三層構造』高分子ミセル）の開発、及び得られた自己組織化体を架橋構造として利用した「合成高分子のみを利用した安全性が高い」新しい組織接着性ゲルの開発を進めることによって、「『タンパク質の徐放を可能とする』新しいバイオマテリアル（生体材料）を創製し、その医療応用（止血材や薬物徐放材料としての応用）を目指す」ことを目的とする。本申請者は近年、新規な『三層構造』型高分子ミセルの調製に成功した。そして、「タンパク質を内包した『三層構造』型高分子ミセルを組み込んだゲルからタンパク質を徐放させる」という基礎的実験に成功し、特許出願を行い（特願 2008-229700、国際出願 PCT/JP2009/004421）、高分子学会や日本バイオマテリアル学会等において発表した。そこで、本申請課題においては特に、(1) 三層構造ミセルにさまざまなタンパク質を（構造及び活性の両面で）安定に内包することができること、(2) ミセルの表面修飾密度や徐放特性が容易に制御可能であること、(3) 得られたゲルが、生体組織表面において迅速に固化・接

着すること、(4) 動物実験によって本新規組織接着性ゲルの止血・創傷被覆・癒着防止・薬物徐放性能が高いこと、等を明らかにし、用途ごとに最適な新規組織接着性ゲルの設計法を確立することが目標である。

3. 研究の方法

(1) ブロックポリマーの精密合成

親水部としてポリエチレングリコール (PEG)、疎水部として生体適合性の高い高分子（ポリ乳酸、ポリカプロラクトン等）を有するブロックポリマーの合成を検討する。合成開始剤としては3,3'-ジエトキシプロパノールあるいは2-メトキシエタノールを用いる。開始剤/モノマー濃度比、モノマー濃度、重合反応時間等を変化させることによって、様々な組成のブロックポリマーを合成する。得られたブロックポリマーの構造評価は、核磁気共鳴装置（現有）、動的・静的光散乱装置（現有）、高速液体クロマトグラフィー（現有）によって行う。

(2) 新規な『三層構造』型高分子ミセルの調製

前項の検討で得られたブロックポリマーを用いて、三層構造型高分子ミセルを調製する。まず初めに、内層を形成するブロックポリマーを溶解した有機溶媒（N,N-ジメチルアセトアミドやトルエン・ジクロロメタン混合有機溶媒など）及び水の混合溶液を、超音波処理や膜乳化法を用いることによって乳化し、w/o エマルジョンを調製する。得られたw/o エマルジョン溶液を有機溶媒（外層を形成するブロックポリマーが溶解）と混合した後に、水に対して透析することによって、三層構造の高分子ミセルを得る（超音波照射時間あるいは膜細孔径を変化させることによって、ミセルの直径は100nm~20 μ mの範囲で制御可能である）。外層を構成するブロックポリマーとしては、反応基であるアルデヒド基を保護して末端がアセタール化されたブロックポリマーを用いる。高分子ミセル水溶液を塩酸で処理して脱保護し、水に対して再び透析することによって、最外層に反応基（アルデヒド基）を導入した三層構造型高分子ミセルを得る。

(3) 『三層構造』型高分子ミセルの特性・構造評価

前項の検討で得られた三層構造型高分子ミセルの諸特性（粒径、ゼータ電位等）の評価を、動的・静的光散乱装置、高速液体クロマトグラフィーによって行う。また、再外層 PEG 及び再内層 PEG の間に存在するポリ乳酸やポリカプロラクトン等の NMR による分子運動性の評価結果及び TEM による観察結

果から、『三層構造』型高分子ミセルの構造に及ぼす調製条件の影響を解明する。

(4) 『三層構造』型高分子ミセルのゲル形成特性の評価

前項の検討で得られた三層構造型高分子ミセル、及び側鎖にアミノ基を有する様々な高分子を混合し、ゲルを形成する。側鎖にアミノ基を有する様々な高分子（ポリアミン）としては、ポリエチレンイミン等を用いて検討する。ゲル形成速度に及ぼす諸因子（各成分濃度、pH、三層構造型高分子ミセルを形成するブロックポリマーの組成等）の影響を、粘弾性測定装置によって明らかにする。

4. 研究成果

本研究では、(1) タンパク質の内包・徐放を可能とする新しい自己組織化体（「三層構造」高分子ミセル）の開発、(2) 得られた自己組織化体を架橋構造として利用した「合成高分子のみを利用した安全性が高い」新しい組織接着性ゲルの開発を進めることによって、『タンパク質の徐放を可能とする』新しいバイオマテリアル（生体材料）を創製し、その医療応用（止血材や薬物徐放材料としての応用）を目指すことを目的とした。

主な成果を以下に示す。

まず初めに、新しい自己組織化体である三層構造高分子ミセルの構造解析を検討した。FITC-dextran を内包した三層構造高分子ミセルを GPC で分析した結果、三層構造高分子ミセルと FITC-dextran が同じ溶出時間に検出された。また、TEM によって三層構造高分子ミセルを観察した結果、中空構造を有する球状の構造体が観察された。一方、二層構造の高分子ミセル（外殻：親水性、内核：疎水的）を TEM によって観察したところ、中空構造を有しない球状の構造体を確認した。これらの結果から、三層構造高分子の形成が示唆された。

両親媒性ブロック共重合体から三層構造高分子ミセルを調製する際には、副生成物として二層構造高分子ミセルが得られる。この二層構造高分子ミセルの生成を抑え、三層構造高分子ミセルが優先的に得られる調製条件を確立する必要がある。そこで、三層構造高分子ミセル水溶液（副生成物として二層構造高分子ミセルを含む）を GPC で分析し、三層構造および二層構造高分子ミセル由来のピーク面積に及ぼす調製条件の影響を検討した。その結果、(1) 原料物質である両親媒性ブロック共重合体の組成、(2) エマルジョンを滴下する先の水相における PVA 濃度、(3) ミセル調製温度、が三層構造高分子ミセルの形成に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。得られた最適調製条件においてミセ

ルを調製することによって、三層構造高分子ミセルを優先的に得ることに成功した。

さらに、三層構造高分子ミセルのゲル形成特性を粘弾性測定装置を用いて評価した。三層構造高分子ミセルとポリエチレンイミン (PEI) を混合したところ、ゲルの貯蔵弾性率は、PEI とミセル溶液の濃度や pH、PEI の分子量に影響を受けることがわかった。また、多くの実験条件においてゲルが迅速に（1 秒以内に）形成した。さらに、ほぼ同様の構造を有する二層構造高分子ミセルを架橋点としたゲルと比較したところ、三層構造高分子ミセルを架橋点としたゲルの方が貯蔵弾性率は高くなった。これは、架橋部位の構造安定性という観点から予想される結果とは逆の結果である。三層構造高分子ミセルが有する柔軟性によりこのような特徴的な結果が得られたと考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 7 件）

① Ito, F., Y. Kanakubo and Y. Murakami
"Rapid preparation of monodisperse biodegradable polymer nanospheres using a membrane emulsification technique under low gas pressure"
J. Polymer Res., 18, 2077-2085 (2011), 査読有り
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.03.019

② Takami, T. and Y. Murakami
"Development of PEG-PLA/PLGA microparticles for pulmonary drug delivery prepared by a novel emulsification technique assisted with amphiphilic block copolymers"
Colloids Surf. B: Biointerfaces, 87, 433-438 (2011), 査読有り
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.06.004

③ Uchida, Y. and Y. Murakami
"Successful preferential formation of the novel macromolecular assembly - trilayered polymeric micelle - that can incorporate hydrophilic compounds: the optimization of factors affecting its formation from amphiphilic block copolymers"
Colloids Surf. B: Biointerfaces, 84, 346-353 (2011), 査読有り
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.01.025

④ Shikinaka, K., N. Fujii, S. Egashira, Y. Murakami, M. Nakamura, Y. Otsuka, S. Ohara, K. Shigehara
"Polyfunctional nanometric particle obtained

from lignin, woody biomass resource"
Green Chem., 12, 1914-1916 (2010)
査読有り, DOI: 10.1039/C0GC00140F

なし

⑤ Uchida, Y. and Y. Murakami
"Trilayered polymeric micelle: a newly-developed macromolecular assembly that can incorporate hydrophilic compounds"
Colloids Surf. B: Biointerfaces, 79, 198-204 (2010), 査読有り
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.047

⑥ Ito, F., Y. Uchida and Y. Murakami
"Facile technique for preparing organic-inorganic composite particles: monodisperse poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) particles having silica nanoparticles on the surface"
Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp., 361, 109-117 (2010), 査読有り
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.03.019

⑦ Kanakubo, Y., F. Ito and Y. Murakami
"One-pot facile technique for preparing nanoparticles modified with hydrophilic polymers on the surface via block polymer-assisted emulsification/evaporation process"
Colloids Surf. B: Biointerfaces, 78, 85-91 (2010), 査読有り
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.02.017

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 村上義彦
"治療用デバイスとしてのハイブリッド型バイオマテリアル"
第 21 回 MRSJ 学術シンポジウム, 横浜 (2011.12.20)

② 村上義彦
"バイオマテリアルとしての高分子ミセルの新展開 ～ 精密構造高分子が形成するゲル・粒子・シート状材料 ～"
関東高分子若手研究会 2010 春の講演会, 東京 (2010.6.19)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 義彦 (MURAKAMI YOSHIHIKO)
東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 00339748

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者