

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 9 月 1 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289252

研究課題名(和文) 相分離貫通型ナノシートとナノディスクを利用する新規なナノフィルム製剤の創製

研究課題名(英文) Fabrication of novel nanofilm products using penetrated phase-separation type nanosheets and nanodiscs

研究代表者

武岡 真司 (Takeoka, Shinji)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20222094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,300,000円

研究成果の概要(和文)：医用高分子からなる膜厚数十nmの高分子薄膜(ナノシート)は、生体表面へ貼付可能な革新的な医療材料“ナノ絆創膏”として注目されている。本研究では、薬物の微結晶やナノディスクをバリア層や放出層として機能するナノシートで挟み込んだ多重層ナノフィルム製剤の製造法と薬物放出制御法を確立する。蛍光性モデル薬剤の各種医用高分子に対する透過性の相違を明らかにし、これらのブレンドによる透過性の制御法、ならびに相分離貫通構造を利用したナノディスクの大量製造方法を確立した。実薬として抗菌性AgSDの微結晶を挟んだフィルム製剤を構築して、II度熱傷感染モデルマウスにて治癒速度が有意に改善されていることを認めた。

研究成果の概要(英文)：Thin films (nanosheets) of tens nanometer thickness from medical polymers has been paid attention as an innovative medical material "nano-adhesive plaster" which can be adhered on the various surfaces of living body. This study aims to establish the fabrication process of multilayered nanosheets where drug micro/nano-crystals or nanodiscs are inserted between a barrier layer and a release layer. The drug permeability of various medical polymers was clarified by using fluorescent model drugs, and its control method was established by using penetrated phase separation. Furthermore, the multilayered nanosheets embedding antibiotic AgSD micro-crystals were prepared and showed significantly higher curing rate of infected partial-thickness burn injury in model mice.

研究分野：高分子化学

キーワード：機能材料 医療材料 ナノ材料 ドラッグデリバリー 高分子薄膜 ナノシート ナノディスク ナノクリスタル

## 1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジー分野において、サイズアスペクト(膜厚-サイズ)比が  $10^6$  を超す高分子薄膜に、ナノインプリンティング法により表面に酵素や抗体を固定化させたバイオセンサー、発光素子など分子デバイスが報告されている[1]。これらはいくまでも基板テクノロジーであり、薄膜自体を基板から剥離した状態で使用するものではない。他方、自己支持性薄膜として、界面膜の2次元架橋体[2]やIPN体[3]などが報告されたものの、特殊なモノマーやポリマーの利用であるため、それらの応用は限定される。報告者は、可溶性の足場(犠牲膜)[4]や支持膜[5]を使用して、生体適合性と生分解性に優れた医用高分子から自己支持性ナノシートを創製し、創傷被覆材などの医用材料”ナノ絆創膏“としての研究を展開してきた。その後、高分子薄膜のバイオメディカルな応用を目指す研究グループとして国際的に認知されてきたものの[6]、類似の応用研究が報告され始めている[7]。

ナノシートは、膜厚が数十 nm と薄いため柔軟性が高く、粘着剤なしで生体表面に貼付でき、透明なため創部の観察が容易、密着性が高く菌の侵入を阻止し、シート状であるために表裏面を別々に機能化できるといった特徴がある。また、術後癒着を大幅に低減し、傷痕が目立たず、極少量の使用で広範な貼付面積が稼げ、安価に大量製造できるなどの長所のため、ナノシートはバイオメディカルな応用に好適な素材である。縫合困難な軟らかい臓器(肺や消化管など)に施した穿孔性や切開性の創傷に対して癒着防止機能を有する被覆と保護効果を認めている[8]。

現在、ナノシートを薬物担体のプラットフォームとする段階にあり、既に抗生剤テトラサイクリンを担持したナノシートは、穿孔性腹膜炎モデルに対して穿孔部の閉鎖と抗菌効果によりほぼ 100% の高い生存率を認めて

いる[9]。しかし、薬物担持層が薄いため担持容量が限られ、しかも薬物が溶解し易いと初期バーストが認められる、など課題もあり、難溶性ナノクリスタルの利用による担持量の向上や薬物放出を制御するバリア層の多層化に向けた、より進歩した製造技術が求められる。そして、ナノシートの物性は、担持粒子のサイズや密度、放出層の厚さの影響を直接受けることも明らかになっている。最近、ナノシートには貫通した相分離構造が認められ[10]、この技術を利用してナノディスクも得られることが明らかとなり、これらの知見を複合させることにより、ナノシート技術を用いた新規な薬物担持フィルム製剤の創製に関する着想に至った。

## 2. 研究の目的

医用高分子から成る膜厚数十 nm の高分子薄膜(ナノシート)は、柔軟かつ生体表面へ貼付可能で癒着や癒痕が起こり難いことから革新的な医療材料”ナノ絆創膏“として注目されている。これを薬物担体とする流れは当然の方向ではあるものの、担持量や放出制御など課題がある。

本研究では、薬物の微結晶(ナノクリスタル)やナノディスクを高密度に均質に担持させ、相分離貫通型ナノシートを放出層とした新規なナノフィルム製剤の製造法と薬物放出制御法を確立することを目的としている。

コア技術として、ナノクリスタル、相分離ナノシート、ナノディスクの構築と積層法を確立し、実薬(抗生剤、抗菌剤、成長因子)を担持させたフィルム製剤を用いて *in vitro*, *in vivo* 評価を行う。

## 3. 研究の方法

機能性高分子薄膜(相分離貫通型ナノシート)に薬物(ナノクリスタル、ナノディスク)を担持させた新規な多層型ナノフィルム製

剤の創製を目的として、柔軟で貼付性の高いナノシートの特徴を保持した状態で十分な薬物の担持量と薬物の放出特性の制御を可能とする方法を確立する。

平成 25 年度では、標準型ナノシートと蛍光性ナノクリスタルを用いて多層型ナノフィルム製剤を調製し薬物放出プロファイルの基本的な制御法を明らかにすると共に、薬物ナノディスクの調製法を確立する。平成 26 年度には、相分離貫通型ナノシートとナノディスクを多層型ナノシートに適用し、同様に担持量の確保、初期バーストの抑制、物理化学的特徴の保持に関する評価を行い、コンセプトを実証する。そして平成 27 年度では、実薬(抗生剤、抗菌剤、成長因子)を用いて感染創傷部への適応に関する *in vitro*, *in vivo* 試験を実施する。

#### 4. 研究成果

本研究では、薬物の微結晶(マイクロクリスタルやナノクリスタル)やナノディスクをバリアー層となるナノシート上に高密度に均質に担持させ、ナノシートや相分離貫通型ナノシートを放出層として被覆した 3 層構造の新規なナノフィルム製剤の製造法と薬物放出制御法を検討した。

平成 25 年度は、(ナノシート A/マイクロ・ナノクリスタル/ナノシート B)で構成される多層ナノフィルムの調製法の確立に概ね成功した。本法は薬物をミクロ的には結晶として局所的に担持させつつマクロ的にはこの結晶を均質に担持させる方法であり、ナノシート本来の物性は結晶が無い領域で確保しつつ結晶として担持薬物量を確保することができるため、低分子薬物層をナノシート層間に挟み込む方法と比較して担持量と物性が大幅に改善された。ナノシートは柔軟であるために膜厚の 100 倍ほどの大きさの  $\mu\text{m}$  サイズの結晶も安定に挟み込むことができた。しかも、柔軟性や密着性などのナノシートに固有の物性は、大きく変化しないことを確認

した。また、ナノシートで挟み込まれた結晶はナノシートを透過してきた水によって徐々に溶かされてから分子状態となった薬物がナノシートを介して放出されるので、初期バーストを効果的に抑えることができた。他方、相分離貫通型ナノフィルムや膜を貫通した相分離を鋳型としたソルベントエッチング法にて得られた  $\mu\text{m}$  サイズのナノディスクの製造法もほぼ確立でき、これらに蛍光性分子やナノ粒子を担持させた。また、直径  $100\ \mu\text{m}$  程度のナノディスクは、マイクロコンタクトプリンティング法によっても製造できることが明らかとなり、より形状とサイズが均質なナノディスクを用いた研究が可能となった。また、当初の計画よりも前倒しで抗菌剤であるスルファジアジン銀のナノ粒子を担持させた多層ナノフィルムを用いた *in vitro*, *in vivo* の試験に入った。

平成 26 年度では、抗菌剤であるスルファジアジン銀のマイクロクリスタルや銀のナノクリスタルを担持させた多層ナノフィルムを調製し、諸物性を測定した。その結果、十分な銀の担持量の確保、銀イオンの放出に対して初期バーストの抑制ならびにナノシート特有の密着性を同時に達成しつつ、十分な抗菌性を *in vitro*(ディスク拡散法)にて確認した。同時に防衛医科大学の宮崎、木下、齋藤らと共同して *in vivo* 試験(度熱傷感染モデルマウス)にて創部を安定に被覆した状態で治癒速度が有意に早まることを確認した。一旦創部を細菌感染させると、そこにナノシートを被せても感染状態は改善せず、抗菌剤の担持が必要であることが明らかにした。また、LbL 法で調製したナノシート中でカウンターイオンである銀イオンを光還元法にてナノ粒子として担持させたナノシートは、持続性に優れた抗菌性被覆材となることを明らかにした。平成 26 年度では、これらの成果を 2 報の学術論文として投稿し、1 報は受理、もう 1 報は追加実験を必要とす

る修正が要求された。後者は 27 年度に受理された。これらの相分離貫通型ナノシートとナノディスク(相分離法、マイクロコンタクトプリンティング法)を大量に製造する方法に関しては、特許出願の準備を進め次年度に出願した。また、対象薬物に対して膜透過性の高い高分子と膜透過性の低い高分子を組み合わせ、組成の調節によって膜透過性を精密に制御したナノシートを透過層とした多層型ナノフィルム(相分離)の構築や、カチオン性タンパク質である成長因子(bFGF)をアニオン性ポリマーであるアルギン酸ナトリウム(Ala)とポリオンコンプレックス(ナノ粒子)を形成させ、これをナノシートで挟み込んだナノフィルムを構築し、*in vitro*試験(bFGF の放出挙動)ならびに *in vivo* 試験(マウス全層欠損モデル)による評価を行った。

平成 27 年度は最終年度であるので、薬物を担持させた相分離貫通型ナノシートとナノディスクを利用するナノフィルム製剤を設計するための指針を作る作業を完成させた。具体的には、薬物の溶解度パラメーターや要求される放出速度に対して、どのような多層構造フィルム製剤を設計したらよいかについて検討すべき因子を系統的に示すことを目的とした。まず、両親媒性蛍光色素であるフルオレセインを生分解性ポリエステルである PDLLA、PLGA に担持させてリン酸緩衝生理食塩水(PBS) に対する放出挙動を測定したところ、PLGA は PDLLA よりも高い放出速度を示した。また、親水性蛍光性色素ローダミン B を用いて PCL、PLGA、PDLLA に対する透過性の測定をしたところ PLGA、PDLLA では PCL に比べ、各々約 1/2、約 1/6 透過速度が低下した。これらは高分子のガラス転移温度( $T_g$ )の違いによるものと推測され、 $T_g$ が低い高分子ほど透過しやすいと思われた。更に、この透過性は、PCL と PDDL A とのブレンドの割合によって細かく制御することが

可能であった。従って、ナノシートからの薬物放出の速度は、過去の我々の研究からナノシートの膜厚と結晶性高分子の場合にはアニーリングによる結晶状態の制御[11]、そして今回の、ナノシートを構成する高分子の $T_g$ に着目して、異なる $T_g$ の高分子をブレンドすることによって細かく制御できることが明らかとなった。

他方、bFGF/Ala コンプレックスは、透過性を考えて結晶性の PLLA ナノシートに挟み込み、初期バーストを制御した 3 層構造を検討してきたが、放出された bFGF はコンプレックス状態なのか、フリーな状態なのか、定量時の状態も含めて確認する必要があった。また、ナノディスクを用いた表面被覆材としての展開や、磁性ナノ粒子を担持させたナノディスクの磁場による動態制御など、本研究によって派生した共同研究においても成果が得られた。

本研究にて、様々な薬剤を結晶状態として、コンプレックスの様な凝集状態として、ナノディスクに担持させた状態として、透過性の異なるナノシート(バリア層と放出層)に挟み込んで 3 層構造とすることによって、幅広い薬剤に適応できるナノフィルム製剤の原型を提案できたことは大いに意義があると考えられる。また、相分離貫通型ナノシートから多孔質ナノシートやナノディスクを大量に製造することができ、各々が機能性ナノフィルム製剤として多方面に応用展開できる基盤技術を本研究にて確立できた。

#### <引用文献>

- [1] 特許第 3020428 号, [2] 宮田ら, JACS, 2004,126,3708-3709, [3] 国武ら, Nat Mater, 2006,5,494-501, [4] Adv Mater, 2007,19,3549-3553, [5] Adv Mater, 2009,21,4388-4392, [6] Adv Funct Mater, 2010,19,2560-2568,[7] Kim *et al*, Science, 2011,333,838, [8]Surg, 2010,148,48-58, [9] Biomater, 2010,31,6289-6278, [10]Macromol, 2012,45 4315-432, [11]Macromol, 2013, 46, 395-402.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計5件)

1. Hong Zhang, Mao Fujii, Yousuke Okamura, Li Zhang, Shinji Takeoka, "Massive-Fabrication of Polymer Microdiscs by Phase Separation and Freestanding Process", ACS Applied Materials & Interfaces, 8, in press, (2016) DOI: 10.1021/acsami.6b03788.
  2. Akihiro Udagawa, Toshinori Fujie, Yuko Kawamoto, Akihiro Saito, Shinji Takeoka, Toru Asahi, "Interfacial Effects on the Crystallization and Surface Properties of Poly(l-lactic acid) Ultrathin Films, Polymer Journal, 48, 157-161 (2016) DOI:10.1038/pj.2015.95.
  3. Yosuke Okamura, Yu Nagase, Shinji Takeoka, "Patchwork Coating of Fragmented Ultra-Thin Films and Their Biomedical Applications in Burn Therapy and Antithrombotic Coating", Materials, 8, 7604-7614 (2015). DOI:10.3390/ma8115404
  4. Keisuke Ito, Akihiro Saito, Toshinori Fujie, Hiromi Miyazaki, Manabu Kinoshita, Daizoh Saito, Shinya Ohtsubo, Shinji Takeoka, "Development of a Ubiquitous Transferrable Silver-Nanoparticle-Loaded Polymer Nanosheet as an Antimicrobial Coating", Journal of Biomedical Materials Research -Part B Applied Biomaterials, 104, 585-593 (2016) DOI:10.1002/jbm.b.33429.
  5. Keisuke Ito, Akihiro Saito, Toshinori Fujie, Keisuke Nishiwaki, Hiromi Miyazaki, Manabu Kinoshita, Shinya Ohtsubo, Shinji Takeoka, "Sustainable Antimicrobial Effect of Silver Sulfadiazine-loaded Nanosheets on Infection in a Mouse Model of Partial-thickness Burn Injury", Acta Biomaterialia, 24, 87-95 (2015) DOI:10.1016/j.actbio.2015.05.035.
- ### 〔学会発表〕(計27件)
1. Keisuke Nishiwaki, Toshinori Fujie, Shinji Takeoka, "Formulation Design of Polymer Nanosheets for Controlled Release", 10<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, 2016年5月20日、Montreal(Canada).
  2. 武岡真司, 未来のナノ医療に向けた新しいナノマテリアル: 酸素マイクロナノバブル水とナノ絆創膏、日本医工学治療学会、第32回学術大会(招待)、2016年3月19日
  3. Shinji Takeoka, Fabrication of Drug-loaded Polymer Thin Films (Nanosheets) for Biomedical Applications, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015) (招待)、2015年12月17日、Hawaii (USA)
  4. 武岡真司, ナノシートの密着性に及ぼすサイズ効果と高密着性塗膜の構築、第37回日本バイオマテリアル学会(招待)、2015年11月9日、京都テルサ(京都)
  5. 武岡真司, ナノ医療のプラットフォームとしてのナノシート戦略、第10回超分子研究会講座(招待)、2015年11月5日、上智大学(東京)
  6. 藤枝俊宣、岡本麻鈴、山岸健人、武岡真司、金属ナノ粒子による高分子ナノ薄膜の機能化と医療応用、第64回高分子討論会、2015年9月15日、仙台(宮城)
  7. 石塚祐也、村田篤、藤井麻央、笠原崇史、庄子習一、水野潤、本多幸雄、武岡真司、スクラッチ試験によるポリ乳酸ナノシートの形状に依存した密着力の評価、第64回高分子学会年次大会、2015年5月27日、札幌(北海道)
  8. 西脇圭亮、藤枝俊宣、藤井麻央、武岡真司、高分子ブレンドを利用したナノシートからの薬物除放制御、日本化学会第95春季年会、2015年3月29日、船橋(千葉)
  9. 武岡真司、高分子ナノシートの新しい医療材料としての可能性、技術情報協会 - 超高齢化時代に対応する医療技術セミナー(招待)、2015年3月25日、技術情報協会(東京)
  10. 武岡真司、高分子ナノシートの機能と医療応用、秋田大学合同フォーラム~医理工融合による技術イノベーション~(招待)、2015年2月18日、秋田ビューホテル(秋田)
  11. 武岡真司、表面をつくる、高分子薄膜(ナノシート)の物性と応用、第10回表面技術会議(招待)、2015年1月29日、東京ビックサイト(東京)
  12. Shinji Takeoka, Fabrication of Antibiotics-loaded Nanosheets and Evaluation as a Novel Drug Releasing Material, International Symposium on Nano-Biomaterials and Regenerative Medicine(招待)、2014年10月9日、東京女子医大(東京)
  13. 武岡真司、伊藤佳祐、藤枝俊宣、宮崎裕美、木下学、齋藤大蔵、薬物担持ナノシートの構築と創傷被覆材としての評価、第63回、高分子討論会、2014年9月24日、長崎大学(長崎)
  14. Shinji Takeoka, "Fabrication of Drug-loaded Nanosheet and in vivo Evaluation", 1<sup>st</sup> International Conference on 'Three Dimensional Development of Lab-exchange Type Biomedical Science Research Consortium'2014、2014年9月12日、鴨川(千葉)
  15. Shinji Takeoka, "Fabrication of Functional Polymer Nanosheets for Biomedical Applications", 2<sup>nd</sup> International Symposium on Polymer Ecomaterials (PEM 2014)(招待)、2014年8月23日、昆明(中国)

16. Shinji Takeoka, "Biomolecular Assembling Science and Nanomaterials Which Contribute to the Development of Nanomedicine and Biosciences", Changchun Seminar, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science(招待) 2014年8月19日、長春(中国)
17. 武岡真司, 高分子薄膜の物性と機能"ナノ絆創膏"としての応用、第9回ケイ素フォーラム(招待) 2014年8月28日、相模中研(神奈川)
18. Shoichiro Suzuki, Toshinori Fujie, Zhang Hong, Shinji Takeoka, "Fabrication and Evaluation of Free-standing Macroporous Poly(L-lactic acid) Nanosheets", 248<sup>th</sup> ACS National Meeting, 2014年8月10日、サンフランシスコ(USA)
19. 齋藤晃広、宮崎裕美、木下学、武岡真司、創傷被覆材としての医療応用を目的とした抗菌剤担持ナノシートの構築と評価、第35回バイオマテリアル学会年会、2013年11月25日、タワーホール船堀(東京)
20. 藤井麻央、村田篤、齋藤晃広、武岡真司、相分離を利用したナノシートの構築、第35回バイオマテリアル学会年会、2013年11月25日、タワーホール船堀(東京)
21. 武岡真司、密着性、柔軟性に優れたナノシートを用いた医療材料の開発、技術情報協会セミナー「医療材料の設計と開発製品への応用」(招待) 2013年11月15日、きゅりあん(東京)
22. 武岡真司、齋藤晃広、医用高分子薄膜"ナノ絆創膏、未来医療に向けたイノベティブな材料としての可能性"、第62回高分子討論会(依頼) 2013年9月12日、金沢大学(石川)
23. 武岡真司、伊藤佳祐、医用高分子薄膜"ナノ絆創膏"の評価と応用、第7回QCM研究会(招待) 2013年8月28日、東工大蔵前会館(東京)
24. 武岡真司、高分子薄膜の高い密着性とその医療応用、第43回湘南地区講演会(招待) 2013年7月12日、古河電気工業(株)横浜研究所(横浜)
25. 武岡真司、自己支持高分子ナノシートの物性と医療応用 - ミクロ相分離構造を利用した機能化 - 、高分子ナノテクノロジー研究会(招待) 2013年6月18日、産業技術総合研究所臨海副都心センター(東京)
26. 鈴木翔一郎、齋藤晃広、武岡真司、高親水性(CaAlg ナノシート)の構築および評価、第62回高分子学会年次大会、2013年5月31日、京都
27. 武岡真司、医用高分子薄膜"ナノ絆創膏"の基本物性と応用、第24回プラスチック成形加工学会年次大会(招待) 2013年5月21日、タワーホール船堀(東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: 高分子膜及びそれを用いた分散液と集積体

発明者: 武岡真司ほか11名

権利者: 東レ、ナノシート

種類: 特許

番号: 特願 2015-96305

出願年月日: 2015年5月11日

国内外の別: 国内

名称: 薄膜状高分子構造体

発明者: 武岡真司、齋藤晃広、伊藤佳祐、藤井麻央、大坪真也

権利者: (株)ナノシート

種類: 特許

番号: 特願 2013-241544

出願年月日: 2013年11月22日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.takeoka.biomed.sci.waseda.ac.jp>

研究者データベース

<https://waseda.pure.elsevier.com/en/persons/shinji-takeoka>

6. 研究組織

(1)研究代表者

武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji)

早稲田大学 理工学術院 教授

研究者番号: 20222094