

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750178

研究課題名(和文) 高分子超薄膜の裁断化とナノパッチワーク吸着特性を利用した新規癒着防止材への応用

研究課題名(英文) Fabrication of Fragmented Nanosheets with Patchwork-adhesion Behavior and Their Biomedical Applications

研究代表者

岡村 陽介 (Okamura, Yosuke)

東海大学・創造科学技術研究機構・講師

研究者番号：40365408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生分解性超薄膜(膜厚100 nm以下)に加工すると、ナノ厚特有の高接着性が発現し、物理吸着のみで濡れた臓器表面に貼付できる。しかし、複雑に入組み蠕動する腸管には貼り難い。本研究では、超薄膜の“貼り難さ”を解決する革新的技術「微細に裁断化した超薄膜によるナノパッチワークコーティング」を提案し、腸管に対する新しい癒着防止材に応用することを目的とした。

実際、数cm角の超薄膜はホモジナイザーにて瞬時に裁断化され、複雑な形状をもつ界面にもパッチワーク状にコーティングできることを実証した。さらに、腸管擦過面も改質でき、結果として癒着を軽減できる新規癒着防止材として応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： We have proposed biodegradable ultra-thin films, so-called nanosheets. These nanosheets represent unique properties such as high flexibility and good adhesiveness. However, they are often hard to wrap irregular/uneven interfaces due to the structural aspect (cm-size). In this study, we proposed a fragmentation method of the nanosheets composed of poly(L-lactic acid) (PLLA) and a patchwork coating against various interfaces.

The PLLA nanosheets could be easily fragmented by homogenization and then reconstructed into a sheet on various interfaces without any adhesive reagents. We refer to this reconstruction as a “patchwork” technique. For a biomedical application, we demonstrated that the patchwork of fragmented nanosheets act as an anti-tissue adhesion materials.

研究分野：生体材料学

キーワード：ナノ材料 超薄膜

1. 研究開始当初の背景

代表的な生分解性高分子のひとつであるポリ乳酸(PLLA)から構成される超薄膜(膜厚: 100 nm 以下, サイズ: 数十 mm)は、ナノ厚特有の高柔軟性・高接着性が発現する¹⁾。このため、反応性官能基や接着剤等を用いずに物理吸着のみで種々の界面(ガラス・金属・プラスチック・皮膚・臓器等)に貼付できる。以前、PLLA 超薄膜をマウスの胃切開部位に貼付するだけで胃縫合術の代替となり、且つ癒着を惹起させない創傷被覆材として機能することを実証した¹⁾。しかし、数十 mm サイズの超薄膜では複雑な形状の界面には貼り難い。そのような背景の下、超薄膜を粉碎攪拌して微細に裁断する技術を確立した²⁾。興味深いことに、裁断化超薄膜を滴下するだけで、平滑面のみならず複雑な形状をもつ界面にもナノ厚且つパッチワーク様にコーティングできることを見出し、新しい水性コーティング材料としての可能性を実証した²⁾。

他方、外科手術では、術後の臓器間癒着が大きな問題となる³⁾。特に、腹腔内で複雑に入組む腸管は、隣接臓器も多く蠕動して互いに接触し合う。このため、手術で避けられない腸管表面の炎症により、癒着が惹起される。現在、臨床応用されている癒着防止材としてセプラフィルム®(膜厚: 数 mm 程度, サイズ: 数十 mm)が挙げられる。これは、広い界面をもつ主要臓器に貼りやすく癒着防止能を発揮する。しかし、剛直なフィルムゆえに腸管等の複雑に入組み湾曲した臓器には貼りにくく、適当なサイズに切って使用する手法では限界がある。このように、どこにでも簡単に貼れる新しい癒着防止材の開発には、独創的な発想が要求される。

2. 研究の目的

本研究では、超薄膜を利用した新しい水性コーティング技術「ナノパッチワーク」を提案し、腸管に対する新しい癒着防止材としての応用の可能性を探る。具体的には、裁断化 PLLA 超薄膜を調製し、それがナノパッチワークコーティングを腸管へ再現して癒着防止効果を狙う。

3. 研究の方法

(1) 裁断化 PLLA 超薄膜の調製法

ポリビニルアルコール(PVA, 100 mg/mL)水溶液をシリコン基板(SiO₂, 40 × 40 mm)上に滴下後、スピコート(4,000 rpm, 20 s)した。乾燥させた後(70°C, 90 s)、PLLA 溶液(10 mg/mL)を滴下、同条件にてスピコートし、乾燥させた。この操作を交互に繰返し、PVA と PLLA を多層積層させた。その後、純水中に SiO₂ 基板ごと浸漬させ(37°C, overnight)、基板から超薄膜を剥離、分散させた。得られた超薄膜を濾過して溶解した PVA を除去した。超薄膜を再度純水中に分散させた後、ホモジナイザーにて超薄膜を粉碎攪拌(15,000 rpm, 4°C)した。最後に、遠心分離(3,500 rpm, 10 min,

4°C)にて濃縮精製し、裁断化超薄膜分散液を回収した。

(2) 裁断化超薄膜の面積・枚数濃度の定量

裁断化工程において、経時的に分注した裁断化超薄膜を純水で適宜希釈し、SiO₂ 基板上に 50 μL 滴下し、乾燥させた。吸着した裁断化超薄膜を実体顕微鏡にて観察し、解析ソフトウェア(CellSens®)にて裁断化超薄膜 1 枚当たりの面積を計測した(87 - 255 枚を計測)。さらに、濃縮した裁断化超薄膜(20 μL)を純水で適宜希釈し、デシケータ内で乾燥させた。吸着した裁断化超薄膜を実体顕微鏡(SZX7)にて観察しながら枚数を実測し、1 mL あたりの枚数濃度に換算した。

(3) ナノパッチワークの最適濃度

3 × 3 mm の孔をあけたパラフィルムを SiO₂ 基板に貼付した。むき出しの SiO₂ 領域に裁断化超薄膜(0.25 - 6.3 × 10⁵ sheets/mL, 20 μL)を滴下し、デシケータ内で乾燥させた。吸着した裁断化超薄膜を実体顕微鏡にて観察し、目的界面(9 mm²)を完全に被覆できる裁断化超薄膜の濃度を決定した。

(4) 裁断化超薄膜の *in vivo* 癒着防止能評価

既報⁴⁾に従って、盲腸擦過癒着モデルマウスを作製した。具体的な方法を以下に示す。マウス(C57BL/6J, , 6 週齢, 20-22 g)の盲腸をガーゼで 200 回擦過すると同時に盲腸と接する腹壁をメスにて 10 回擦過した。次いで、擦過した盲腸・腹壁に裁断化超薄膜分散液(3.0 × 10⁵ sheets/mL, 200 μL)を滴下して冷風で乾燥させた後、閉腹した。癒着スコア表(表 1)⁴⁾を用いて、術後 1 週間の裁断化超薄膜の癒着防止能を判定した。この時、超薄膜未貼付群、セプラフィルム®貼付群をそれぞれ陰性・陽性対照として比較した。

表 1 盲腸擦過癒着モデルのスコア表⁴⁾

スコア	癒着の程度
0	癒着なし
1	簡単に剥離できる軽度な癒着
2	癒着は剥離可能だが、軽度な炎症を伴う状態
3	癒着は剥離しにくく、引っ張って剥離可能な状態
4	組織破壊が起こる程の強固な癒着

4) Ohya, S. et al. *Biomaterials* 26, 655-659 (2005).

4. 研究成果

(1) 裁断化超薄膜のナノパッチワーク

SiO₂ 基板上に PVA 水溶液を犠牲膜としてスピコートした。次いで PLLA 溶液をスピコートした。このときの PLLA 超薄膜の膜厚は 60 ± 6 nm であった。そこで、PVA と PLLA の積層を交互に 20 回繰返した後、純水中で振とうさせるところ、PVA 犠牲層が溶解し、20 枚の PLLA 超薄膜(cm サイズ)が分散して得られた(図 1A)。ここでは、10 枚の SiO₂ 基板を用いて計 200 枚の PLLA 超薄膜を調製した。

超薄膜分散体(裁断化前の超薄膜 1 枚の面積: 1.6 × 10³ mm²)をホモジナイザーにて粉碎攪拌したところ、瞬時に裁断化された。その

面積は粉碎攪拌時間の増大と共に徐々に縮小し、10分以降は一定値を示した(面積: $0.031 \pm 0.005 \text{ mm}^2$, 約 $170 \mu\text{m}$ 角)。得られた分散液は高粘性を示すと共に、界面活性剤等の分散安定剤が存在しなくても水に分散できることも注視すべき点であった(図 1B)。

そこで、得られた裁断化超薄膜を SiO_2 基板に滴下・乾燥させたところ、パッチワーク様に面接触吸着した(図 2)。この吸着特性は、種々の素材・形状をもつ界面(ガラス・金属・皮膚等)でも再現できた。従って、裁断化超薄膜は目的界面の形状に問わず、滴下するだけで簡便に被覆できるナノ厚のコーティング材に応用できることを再現した。

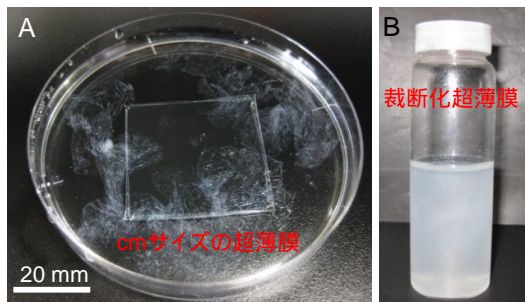


図 1 PLLA 超薄膜の写真。(A) 基板から剥離した cm サイズの 20 枚の PLLA 超薄膜。(B) 約 $170 \mu\text{m}$ 角程度まで裁断化された PLLA 超薄膜。

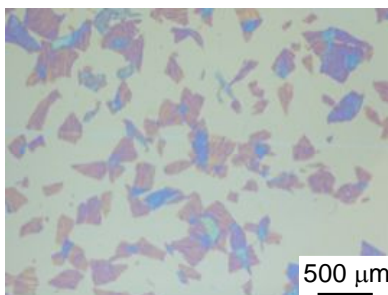


図 2 裁断化 PLLA 超薄膜のパッチワーク吸着挙動

(2) ナノパッチワークの最適濃度

濃度の異なる裁断化超薄膜分散液を SiO_2 領域(9 mm^2)に滴下、乾燥させたところ、上述のようにナノパッチワークが達成された。 2.5×10^4 sheets/mL に調整した裁断化超薄膜による基板の被覆率は $14 \pm 7\%$ であった(図 3)。この被覆率は超薄膜濃度の増大と共に増大し、 3.0×10^5 sheets/mL 以上で SiO_2 領域を 100%被覆できることを明らかにした。このナノパッチワーク条件を参考にして *in vivo* 試験を行った。

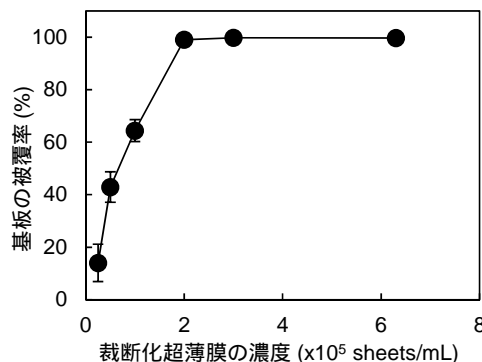


図 3 裁断化超薄膜によるナノパッチワークの最適濃度

(3) 裁断化超薄膜の *in vivo* 癒着防止能

3.(4)に示す方法にて盲腸擦過癒着モデルマウスを作製した。1週間後に開腹したところ、盲腸に対して膀胱・小腸等の隣接臓器あるいは腹壁が重度に癒着(癒着スコア: 3.4 ± 0.2)しており、癒着モデル評価系を再現することに成功した(図 4)。そこで、擦過した盲腸に裁断化超薄膜によるナノパッチワークを施したところ、癒着は顕著に軽減され(癒着スコア: 2.0 ± 0.2)、臨床応用されているセプラフィルム®とほぼ同値を示した(癒着スコア: 1.9 ± 0.4)。これは、癒着し得る擦過盲腸表面がナノパッチワークによって物理的に改質され、癒着防止層として機能したためと考えられる。従って、裁断化超薄膜は癒着を軽減できる新規癒着防止材として応用できる可能性を実証した。

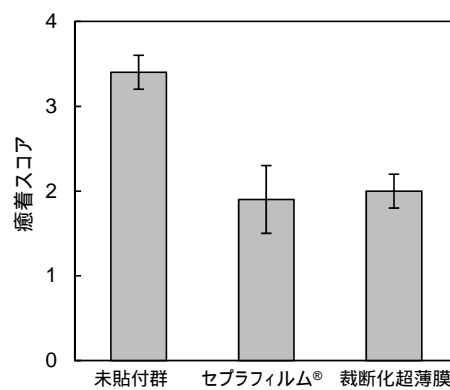


図 4 裁断化超薄膜の癒着防止能評価

<引用文献>

- 1) Okamura, Y. *et al. Adv. Mater.* **21**, 4388-4392 (2009).
- 2) Okamura, Y. *et al. Adv. Mater.* **25**, 545-551 (2013).
- 3) Burns, J.W. *et al. Eur. J. Surg. Suppl.* **577**, 40-48 (1997).
- 4) Ohya, S. *et al. Biomaterials* **26**, 655-659 (2005).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Okamura, Y. and Nagase, Y. Fabrication of Bio-friendly Polymer Nanosheets for Biomedical Applications, *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, 査読有、39 巻、2014、379-384. DOI: org/10.14723/tmrj.39.379

岡村 陽介. 高分子超薄膜の不思議 ~ 新規医用材料への挑戦 ~、*化学と工業*、査読有、67 巻、2014、705-706.

<http://www.chemistry.or.jp/journal/chemical-industry/vol67-no8.html>

岡村 陽介. ユニークな特性を発現する高分子超薄膜(ナノシート)の開発とその医療応用、*高分子論文集*、査読有、70 巻(8)、2013、351-359.

DOI: org/10.1295/koron.70.351

〔学会発表〕(計 6 件)

Okamura, Y., Takeoka, S. and Nagase, Y. Development of Size-controlled Biodegradable Polymer Nanosheets and Their Biomedical Applications, International Union of Materials Research Societies -International Conference in Asia 2014 (IUMRS-ICA2014), 2014 年 8 月 26 日、福岡大学 (博多、福岡)

Okamura, Y., Takeoka, S. and Nagase, Y. Development of Fragmented Nanosheets and Patchwork Coating as Aqueous Surface Modifiers for Biomedical Applications, 248th ACS National Meeting, 2014 年 8 月 10 日、(サンフランシスコ、米国)

岡村 陽介, 浅尾 幸平, 森田 浩平, 長瀬 裕. 裁断化高分子超薄膜の創製と水性表面改質材としてのパッチワークコーティング、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 28 日、名古屋工業大学 (名古屋、愛知)

岡村 陽介, 下野 浩貴, 齋藤 晃広, 木下 学, 齋藤 大蔵, 武岡 真司. 生分解性ナノシートの裁断化とパッチワーク吸着特性 ~新規熱傷用創傷被覆材への応用~, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、2013 年 11 月 26 日、タワーホール船堀 (江戸川区、東京)

岡村 陽介, Thorsten Lang, 武岡 真司. 生分解性高分子超薄膜(ナノシート)の構築とサイズに応じた医療展開、第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 13 日、金沢大学 (金沢、石川)

岡村 陽介. 招待講演: ナノ寸法に加工した高分子構造体の不思議 ~新規医用材料への挑戦~, 第 41 回東北地区高分子若手研究会夏季ゼミナール、2013 年 8 月 5 日、清稜山倶楽部 (郡山、福島)

〔図書〕(計 1 件)

Nagase, Y., and Okamura, Y. Synthesis of New Biocompatible Polymers and Fabrication of Nanosheets. Biomedical Engineering, 2015、印刷中.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

(受賞)

Okamura, Y. Young Scientist Awards, International Union of Materials Research Societies -International Conference in Asia 2014 (IUMRS-ICA2014)、Development of Size-controlled Biodegradable Polymer Nanosheets and Their Biomedical Applications, 2014 年 8 月 27 日

岡村 陽介. 平成 26 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞、生分解

性超薄膜の創製と医療材料への応用に関する研究、2014 年 4 月 15 日

岡村 陽介. 若い世代の特別講演会 特別講演証、ユニークな特性を発現する生分解性ナノシートの開発と医療応用、第 94 回日本化学会春季年会、2014 年 3 月 27 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 陽介 (OKAMURA, Yosuke)
東海大学・創造科学技術研究機構・講師
研究者番号: 40365408

(2) 研究協力者

稲垣 豊 (INAGAKI, Yutaka)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 80193548

住吉 秀明 (SUMIYOSHI, Hideaki)
東海大学・医学部・講師
研究者番号: 60343357

高野 秀太 (TAKANO, Shuta)