

博士論文概要

論文題目

Construction of Biomacromolecular Nanosheets and
Their Biomedical Application as a Wound Dressing Material

生体高分子からなるナノシートの構築と
創傷被覆材としての医用応用

申請者

藤枝	俊宣
Toshinori	Fujie

生命医科学専攻 生体分子集合科学研究

2008年12月

ナノバイオテクノロジーの進展に伴い、医療分野においてドラッグデリバリー

システムや再生医療工学に代表される革新的治療法が開発され、医工連携のもと臨床応用が開始されている。外科領域におけるナノバイオテクノロジーの貢献では、例えば温度応答性細胞培養皿に代表されるように体外組織・臓器を構築する組織シート工学が確立されつつあるが、救急医療における Quality of life (QOL) の向上には、培養などの長時間を要する工程や滅菌が困難な工程は不向きであり、体内にて直接創傷部を保護し、迅速な組織再生を促す機能を持つ医用材料の開発が求められている。

このような背景の下、申請者は皮膚や臓器表面における創傷治癒において、創面を広く被覆し、化学的な結合ではなく物理的な非共有結合にて接着する材料として、高分子超薄膜(ナノシート)に着目した。本論文では、分子の集合挙動を利用した生体高分子からなる自己支持性ナノシートの構築と、その表面・材料物性を評価した。従来の薄膜とは異なる物性を持つナノシートを医用材料として展開するための要件を体系的に整理した。さらに、ナノシートから構成される創傷被覆材「ナノ絆創膏」を新規に提案し、ナノシートの皮膚表面・臓器創傷部位における創傷被覆能およびバイオインターフェースにおける役割を、*in vitro*, *in vivo* 評価から明らかにすることを目的としている。

本論文は、8章から構成されている。1章は序論、2章では生体高分子からなる自己支持性ナノシートの構築とナノ絆創膏の開発、3章、4章ではナノシートの表面物性および材料力学的特性の評価、5章、6章ではナノシートの医療応用としてナノ絆創膏の胸膜欠損および穿孔性腹膜炎モデル動物に対する *in vitro* および *in vivo* 評価系を用いたナノシートの創傷被覆効果および創傷部の治癒機構に関する考察、7章では更なるナノシートの機能化として、表面修飾ナノシートを例示した。8章では終章として、本論文の結論と将来展望を述べた。各章の概説は以下の通りである。

第1章では、有機分子の自己組織化や自己集合現象を利用したナノテクノロジーの展開について概説し、有機分子から構築されるナノ材料の基礎と応用について整理した。次に、本研究に関連する有機・無機超薄膜に関して、先駆的な研究例から最新の研究動向までを調製、構造・物性、機能・応用について系統的に整理し、本研究の位置づけを明確にした。

第2章では、生体高分子からなる自己支持性ナノシートの調製手法と、任意の界面に対するナノシートの転移、脱着および貼付を補助するための多層構造の利用について記述した。ナノシートの作製には、カチオン性・アニオン性多糖高分子電解質(キトサン・アルギン酸)を基板表面で交互積層(Layer-by-Layer; LbL)させることで多糖 LbL 膜を作製し、この多糖 LbL 膜を溶媒に可溶性疎水性犠牲膜上に調製後、溶媒中で剥離させる犠牲膜法、あるいは水溶性支持膜に吸着後、水添加にて転移させる支持膜法のいずれかの方法にて、基板上的ナノシートを任意の界面に移動させる方法を確立した。制御可能な数十 nm 膜厚からなる自己支持性多

糖ナノシート(サイズアスペクト比 100 万超)を作製後、支持膜法にてナノシートの脱着が可能な「ナノ絆創膏」を構築し、皮膚表面にサイズと形状を維持したまま貼付できた。さらに、ナノシートの構成高分子をコラーゲンなどの細胞外マトリックス成分に置換すると、特異的な細胞接着を誘導できることが明らかとなり、生体高分子からなるナノシートの医療応用への道筋が提示できた。

第3章では、得られた自己支持性ナノシートの表面物性を各種顕微鏡観察および構造色解析にて詳細に評価した。金属基板表面に吸着したナノシートは、吸着箇所特異的に積層枚数依存的な構造色変化を発現し、原子間力顕微鏡(AFM)・走査型電子顕微鏡(SEM)による微細構造観察から、平滑性の高い表面を形成していた。さらに、ナノシートは化学結合を用いることなく、任意の基板表面に安定に接着でき、ナノシート同士も接合可能であることを構造色解析から明らかにした。

第4章では、ナノシートの材料力学特性(接着力、弾性率、力学的強度)を評価した。マイクロクラッチ試験およびバルジ試験より、膜厚 35 nm のナノシートでは、膜厚 1 μm 以上の薄膜に対して約 7.5 倍以上の密着性と 15 倍以上の柔軟性が認められ、特に膜厚 100 nm 領域以下における弾性率の低下と柔軟性の向上が相関することを示した。更に膜厚 75 nm のナノシートでは、ヒト正常呼吸圧以上の耐圧性と接着性が同時に実現でき、化学的な接着を用いずに臓器などの柔らかい界面を安定に被覆できる、新規なシート型医用材料が得られた。

第5章は、胸膜欠損に対するナノシートの創傷被覆効果およびその治癒機構を *in vitro*, *in vivo* 評価系から検証した内容である。膜厚 75 nm の多糖ナノシートにて胸膜欠損モデルイヌの創傷部を被覆したところ、5 分後で正常呼吸圧に耐え得る強度であり、3 時間後には既存の創傷被覆材であるフィブリンシートと同等の耐圧性が認められた。また、ナノシートは臓器創傷部位を広く密に閉鎖し、臓器内部からの血液および浸出液の露出を遮断し、臓器外側に対する術後癒着をまったく誘発しない低侵襲な医用材料であることを明らかにした。治癒機構に関する知見を得るために、血液接触界面の形態および創傷部位の組織学的な観察を行ったところ、ナノシートは血液凝固、線維芽細胞増殖、血管新生に至る一連の組織再生過程を創傷部内側において段階的に進行させるものと考察された。以上より、ナノシートは、胸部外科手術において創傷部を密に被覆し、術後癒着を誘起しない低侵襲創傷被覆材として適する性能を有することが明らかになった。

第6章にて、穿孔性腹膜炎(CP)に対するナノ絆創膏の創傷被覆効果を *in vitro*, *in vivo* 評価系にて免疫学的に検証し、消化器外科手術におけるナノシートの有効性について検証した。CP モデルマウスの創傷部を被覆したナノ絆創膏は、術後 7 日目のナノシート未貼付群(水溶性支持膜のみ)の生存率約 35%に対して、2.5 倍以上(約 90%)向上させた。そして、その効果が創傷部被覆に伴う腸内細菌漏出防止に起因することを、腹腔内細菌数、白血球数、サイトカイン測定および *in vitro* トランスウェルアッセイから明らかにした。さらに、ナノシート表面に抗生物質

テトラサイクリンを安定に担持させた抗菌性ナノ絆創膏では、術後1週間以上におけるCPモデルマウス生存率は100%であり、感染症を回避できた。以上より、ナノシートは抗生物質を担持でき消化器外科手術用創傷被覆材としての可能性も示すことができた。

第7章では、ナノシートの内視鏡外科手術への応用を視野に入れ、ナノシートの機能化に向けた。2種類の表面修飾ナノシートの構築を試みた。具体的には、まず、ナノシートの表裏面に異なる粒子径を有する微粒子を物理吸着させた微粒子担持ナノシートの構築では、粒径2 μm のラテックスビーズ(LB)を選定し、支持膜法によりナノシート片面のみにLBを選択的に吸着できた。構造色の解析から、折り返し面中のLB群がナノシートによって密に被覆されている様子が観察され、ナノシートによる表面担持粒子の高い包接能が認められた。これは、ナノシートに結晶微粒子や磁性微粒子の包接機能を示唆する重要な発見であった。同様の方法にて、表裏面にそれぞれ粒径200 nmと2 μm の微粒子を選択的に物理吸着できることをナノシートのSEM観察から確認した。他方、ナノシート表面に刺激応答性を付与するために、ナノシート表面から原子移動ラジカル重合(ATRP)法を用いて温度応答性高分子(pNIPAM)を重合させた。NIPAMモノマーの重合条件の詳細な検討から、膜厚30 nmからなるナノシート表面に対して膜厚70 nmのpNIPAMブラシ層が構築されたことをAFMおよびIR-imagingから明らかにした。得られたpNIPAM修飾ナノシートでは、水中にてpNIPAMの下限臨界溶液温度(32°C)を境に、可逆的な構造色および柔軟性の変化が認められ、刺激応答性界面を付与させたナノシートが初めて構築できた。

第8章では、本論文の総括と将来展望について述べた。本論文では、分子の集合挙動を利用することで、生体高分子からなる自己支持性ナノシートを構築し、これを医用材料として展開するための物性・機能要件を体系的に整理した。さらに、新規な創傷被覆材「ナノ絆創膏」を提案することで、医用展開への道筋を提示した。そして、ナノシートの皮膚表面・臓器創傷部位における創傷被覆能およびバイオインターフェースにおける役割を、*in vitro*, *in vivo* 評価系から精査し、ナノシートの有用性を明らかにした。最後に、ナノバイオテクノロジーを利用した材料開発の研究展開に関する予測、およびナノ絆創膏を含む高性能・高機能な医用材料開発に期待される素材、物性および機能要件に対する提言を将来展望として纏めた。