

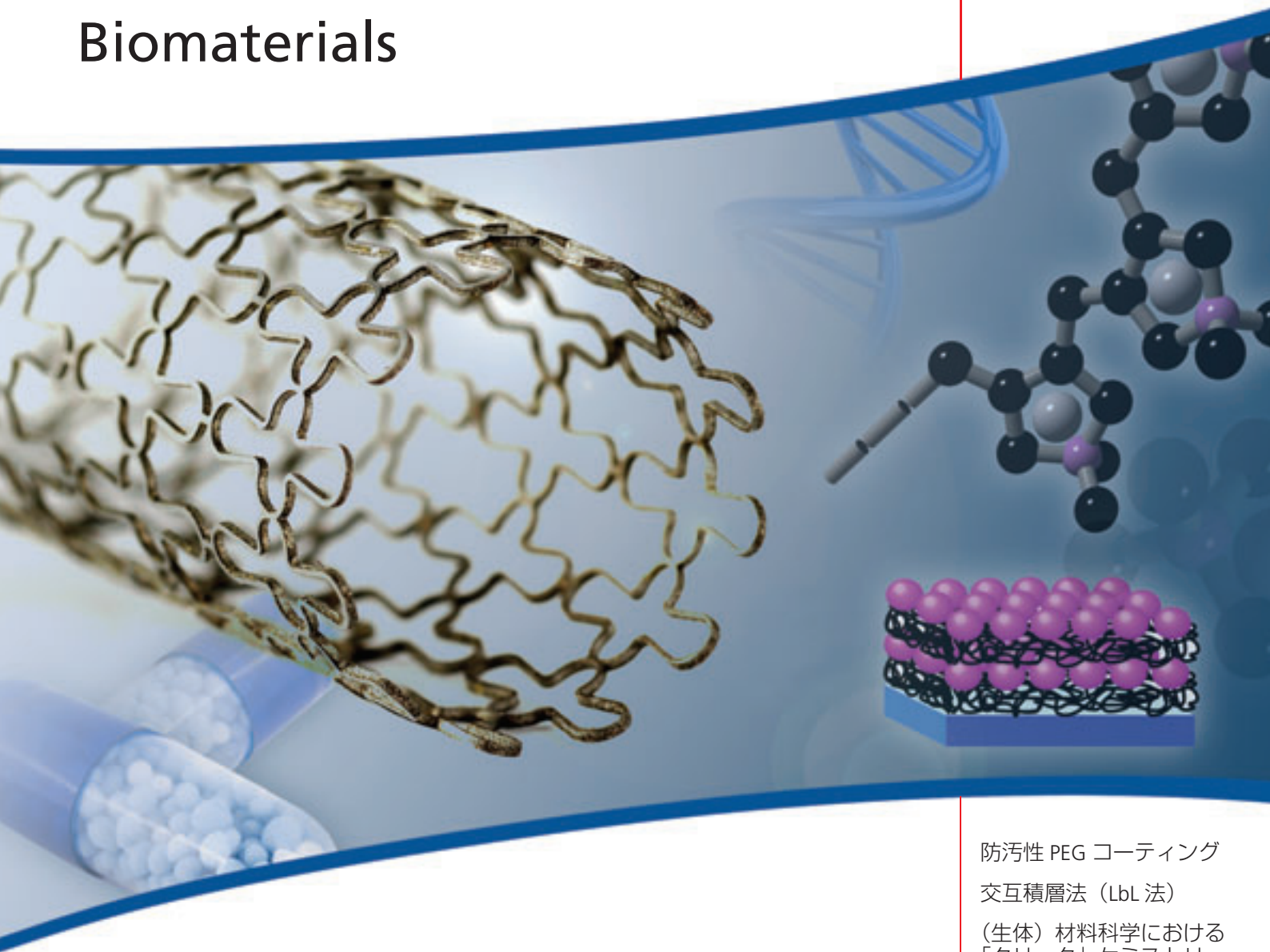
Material Matters™

Vol. 3, No. 3



生体材料

Biomaterials



Better living through Chemistry

防汚性 PEG コーティング
交互積層法 (LbL 法)
(生体) 材料科学における
「クリック」ケミストリー
自己組織化単分子層と表面化学
骨組織再生工学

SIGMA-ALDRICH®



Ilya Koltover, Ph.D.
Aldrich® Materials Science
Sigma-Aldrich® Corporation

はじめに

今回お届けする2008年第3号のMaterial Matters™ では「生体材料」を特集しました。生体材料は、生体系と接触して利用される合成材料や天然材料を扱う研究分野です。この分野は学際的な分野であり、材料科学のほか、化学、生物学、医学といった分野に関連しています。さらに、生体材料には「人間に関わる」というユニークな側面があります。診療と診断を向上させて人間の生活の質に直接影響を与えると、これに匹敵するほかの材料研究分野はまずありません。既に医療に活かされている生体材料研究の成果もあります。たとえば、構造生体材料研究の過去50年にわたる絶え間ない進歩によって、歯科インプラントや人工股関節の品質は大きく向上しています。そして今まさにわれわれの生活に影響を及ぼしつつある例として、薬物を封入してその放出速度を制御する新規高分子生体材料が、「ハイテク」ピルの設計や心臓血管用インプラント表面の被覆に利用されています。さらに、個々の患者の遺伝子型に合わせて治療をカスタマイズするための組織工学用足場材料、遺伝子送達デバイス、バイオチップなど、この研究分野では生体材料のより高度な応用が実現しつつあります。

現代の生体材料は複雑になりつつあり、新たな材料の作成（合成、製造、加工）のほか、完成した生体材料の分析や生体系との相互作用の解析に関する難題が生じています。本号では、ノースウェスタン大学の研究者が、生体分子や生物との付着を防ぐ生体材料表面の新しい調製法を説明します。また、日本の物質・材料研究機構の有賀博士とHill博士が、機能性生体材料の薄膜を調製する革新的かつ多用途な方法である交互積層法を説明します。p.14の記事では、オランダのネイメーヘン大学とEncapson B.V.の研究者が、生体材料の制御的ボトムアップ合成のビルディングブロックとして利用できるデザイナー高分子を合成するための「クリック」ケミストリーの応用を議論します。生体材料の評価に関する分野ではシカゴ大学のMrksich教授が、バイオチップの表面などの詳細な化学組成の測定に利用できる質量分析技術SAMDI-TOFを説明します。最後は、ドイツのライプツィヒ大学のHuster教授とPretzsch教授が、現在の再生医療の研究の中核をなすきわめて複雑な機能性生体材料である人工骨組織の特性を明らかにするための固体NMRの応用を説明します。

Material Matters™ では、各生体材料研究分野に役立つSigma-Aldrich® 製品のリストが各記事の後に掲載されています。材料科学研究用の材料をお探しであれば、sigma-aldrich.co.jp/aldrich/ms/をご覧ください。Material Matters™ に関するご意見やご質問、製品のご提案については sialjpts@sial.com までご連絡ください。

表紙について

現在、研究者は医療用器具の特性を向上させる機能性生体材料の新たな製造方法の開発に取り組んでいます。9ページの記事に記載されている交互積層法 (LbL: Layer-by-Layer self-assembly) は、機能性生体材料の薄膜を製造する有用な方法です。LbL法では、正の電荷をもつポリマーと負の電荷をもつポリマーを交互に溶液積層させて、医療用器具（ステントなど）の表面や徐放性カプセル（ピルなど）の壁面に多層膜（表紙の図参照）を形成することができます。帯電した薬物や生体分子（タンパク質、DNA）をLbL膜に組み込むことができ、たとえば、表紙に示されているカチオン性のポリ（塩化ジアルリウム）は、アニオン性のDNAと交互に積層することができます。この膜は封入されたDNAを放出できるため、遺伝子送達担体として機能します。LbL用途向けのポリマーのリストについては、12ページの製品リストをご覧ください。

Material Matters™

Vol. 3 No. 3

目次

生体材料

はじめに	2
表紙について	2
"Your Materials Matter."	3
生体模倣型の防汚性PEG被膜	4
交互積層法	9
(生体) 材料科学における「クリック」ケミストリー	14
自己組織化単分子層と表面化学	19
骨組織再生工学	24

容量と価格は sigma-aldrich.com をご覧ください

本カタログに掲載の製品及び情報は2008年12月現在の内容であり、収載の品目、製品情報等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。製品のご注文に際し、価格、在庫の確認は裏表紙に記載の弊社カスタマーサービスまでお問合せください。なお、米国Webサイト (sigma-aldrich.com) の製品検索でも日本円と在庫状況をご確認いただけます。

"Your Materials Matter."



Joe Porwoll, President
Aldrich Chemical Co., Inc.

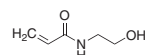
材料科学研究に有用な化合物の情報を募集しております。「こんな物質を探している」、「こんな製品があればいいのに」といったご意見がございましたら、sialjpts@sial.comまでご連絡ください。

N-Hydroxyethyl acrylamide — Tool for Lab-On-A-Chip Research

スタンフォード大学のAnnelise Barron教授から、*N*-ヒドロキシエチルアクリルアミド (*N*-hydroxyethyl acrylamide HEAA) の製品化のご提案をいただきました。これは、ラボオンチップデバイスのマイクロチャネルの壁面コーティングや分離媒体として有用なポリマーの合成に利用できるモノマーです。水中でHEAAをラジカル重合させて合成される親水性のポリ-*N*-ヒドロキシアクリルアミド (pHEAA) は、ガラスや石英ガラスのマイクロチャネルに吸着して安定な被膜を形成し、優れた生体分子分離能を付与します。pHEAAの被膜は電気浸透流を防止し、マイクロ流体チャネル内壁への生体分子の非特異的な吸着を大幅に抑制します。pHEAAを使ったマイクロキャピラリー電気泳動によって、500塩基を超えるDNA断片の分離と塩基配列の決定に成功しています^{1,2}。

References:

- (1) Albarghouthi, M.N., Buchholtz, B.A., Huiberts, P.J., Stein, T.M., Barron, A.E. *Electrophoresis* **2002**, 23, 1429.
- (2) Fredlake, C.P., Hert, D.G., Kan, C.W., Chiesl, T.N., Root, B.E., Forster, R.E., Barron, A.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 476.



N-Hydroxyethyl acrylamide (HEAA), 97%

697931-100ML

100 mL

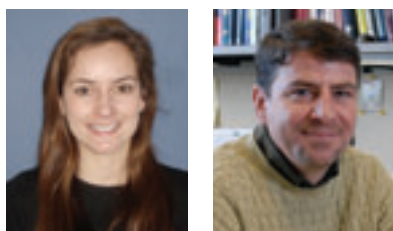
本号で特集する生体材料

材料カテゴリー	内容	Page
官能基化された PEG	単官能性、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性のポリ (エチレングリコール) ポリマー	6, 17
高分子電解質	交互積層法 (LbL: Layer-by-Layer self-assembly) に利用されるアニオン性ポリマーおよびカチオン性ポリマー	12
「クリック」ケミストリーでの生体材料作成用ポリマー	アジド基またはアルキン基を導入したポリマー	17
ポリマーソームを形成するポリマー	両親媒性ブロック共重合体	17
分子自己組織化用材料	金表面に自己組織化単分子層 (SAMs) を作製するためのアルキルチオール	22
生体適合性セラミックス	生体材料および生物医学研究に一般的に用いられている金属酸化物セラミック粒子	26
生体適合性金属	金属チタン (ワイヤー、ホイル、ロッド、スポンジ)	27

バルク供給/スケールアップのご相談は…

ファインケミカル事業部 Tel:03-5796-7340 Fax:03-5796-7345 E-mail:safcjp@sial.com

ポリ(エチレングリコール)をベースとする 防汚性の生体模倣型グラフトポリマー被膜



Lesley M. Hamming and Prof. Phillip B. Messersmith

Biomedical Engineering Department
Northwestern University
Evanston, IL
philmm@northwestern.edu

天然材料や人工材料が使用されている環境ではほぼ例外なく、表面への生物学的物質の蓄積が避けられません。生体分子や生物が表面に付着したとしてもほとんど影響を及ぼさないこともありますが、デバイスと構造の性能や安全性を維持するには、生物付着を最小限に抑えるか制御する必要があります。たとえば、医学的環境では、タンパク質、細胞、病原体といった生体液の成分が表面に強力に付着しやすく、そのために性能が変化して危険な結果をもたらすおそれがあります。例えば、カテーテルに微生物がコロニー形成することによって引き起こされる尿路感染は、最も頻度の高い院内感染です¹。また、植込み型医療器具も微生物腐食(MIC: microbially influenced corrosion)に弱く、置換手術が必要となり感染のリスクが増大します²。この他に生物付着を起こしやすい表面としては船体が挙げられます。海洋生物やその分泌物で覆われることによって、推進効率が低下し、燃費の低下を引き起こします³。本稿では、表面にポリマーを結合させる生体模倣の方法をはじめとした、ポリマーをグラフトすることによって表面への生物付着を防ぐ方法を簡単に紹介します。

生物付着を防ぐ一般的な方法は、図1に示すように表面への防汚性ポリマーのグラフト化です⁴。このようなグラフトさせたポリマーシステムの重要な点は、防汚性ポリマーの化学的特性、分子量および構造のほか、表面にポリマーをグラフトさせる方法にあります。最も広範に検討されている防汚性ポリマーのひとつにポリ(エチレングリコール)(PEG)がありますが、PEGは医薬品や薬物送達に昔から用いられている毒性の低い水溶性ポリマーです⁵。大学や企業の研究者は、直接合成したり購入することでPEGを入手することができます(p.6の表参照)。そしてそのPEGに適切な化学的誘導体化を行って表面にグラフトさせると、タンパク質、細胞、細菌の非特異的な吸着を抑制することができます。PEGを固定化した表面がタンパク質や細胞の吸着を抑制する熱力学的メカニズムや分子メカニズムは完全には解明されていませんが、数々の研究によって、グラフトされたポリマーの立体障害効果、鎖長、グラフト密度、鎖の立体配座、親水性がタンパク質の付着を予防する重要な役割を果たしていることが確認されています⁶⁻⁸。

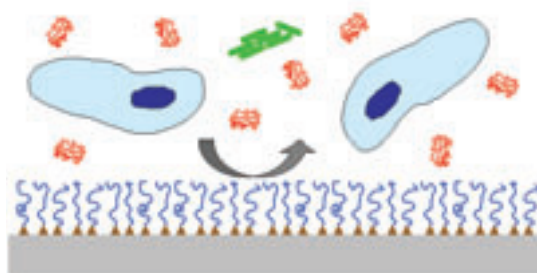


図1. 基板(灰色)の特定の官能基(三角)に防汚性ポリマー(青線)を固定したグラフト化防汚性ポリマーシステムの図。ポリマーがタンパク質(赤)、細胞(青)、細菌(緑)の表面吸着を阻む物理的な障壁になります。

防汚性ポリマーは、ふたつの基本的な方法で表面にグラフトさせることができます。*graft-to*法では、アンカー基を導入したポリマーをあらかじめ合成し、これを表面に吸着させます。対照的に、*graft-from*法ではグラフト化した開始剤から直接ポリマーを伸張させます。*graft-to*系は膜厚が通常単分子層レベル(数ナノメートル)であり、溶媒からポリマーを物理吸着または化学吸着させて形成させます。*graft-from*系の場合、膜厚がはるかに厚いものの(10~100ナノメートル以上)、適切な開始剤で基板をあらかじめ修飾する必要があります。しかし、いずれの方法を用いるにも、物理吸着または化学吸着による相互作用でポリマーを表面に固定できることが不可欠となります。物理吸着では比較的弱いファンデルワールス力や疎水性の力によってポリマーが表面に結びつけられており、その例としてブルロニック型ブロック共重合体の疎水性基材への吸着が挙げられます⁹。化学吸着では、通常、ポリマーの基材への結合がさらに強固であり、その例として金-チオラート¹⁰、金属酸化物-シラン結合¹¹、静電的相互作用¹²が挙げられます。

近年、生物の利用している方法をヒントにすることで、ポリマーを表面にグラフトさせる新たな方法を見出すようになってきました。特に興味深いのは海洋接着タンパク質に存在する特異なアミノ酸で、湿った表面への安定かつ強固な結合に利用されています。イガイ類は、湿った環境や乱流の環境の中でも岩、木、動物、貝殻といったさまざまな材料の表面に強く接着します。この貝の足糸の先端粘膜円盤と基板との接触面付近に存在するタンパク質中には、アミノ酸3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)(D9628)が最大27 mol%の濃度で存在します(図2)¹³。原子間力顕微鏡による単分子レベルの強度測定によって示されたように¹⁴、DOPAは優れた接着性をもたらし、有機物表面や無機物表面と強力な化学的相互作用を形成します。

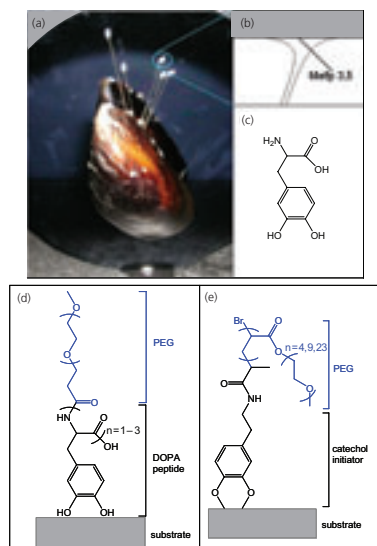


図2. 生体をヒントにした防汚性ポリマーを表面にグラフトする方法。(a) 基材に接着した貝の画像、(b) アミノ酸3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) の含有量が最も多いイガイ類の接着タンパク質 (Mefp3, Mefp5) の界面部と足糸の先端粘膜円盤の図、(c) DOPAの化学構造、(d) アンカー部分の接着ペプチドと防汚性PEGポリマーを示した *graft-to* 生体模倣型ポリマーの例 (e) 表面に結合した生体模倣型開始剤と重合化PEGポリマーを示した *graft-from* 生体模倣型ポリマーの例

最近、防汚性ポリマーを表面に結合させるさまざまな方法にDOPAの化学的多用性と堅牢性が利用されています¹⁵。DOPA含有ペプチドを結合させた末端モノメトキシ化PEGなどのポリマーは、PEGの優れた防汚性と、*graft-to*法によって簡単に結合させることができる接着性のアンカーを兼ね備えています¹⁶。1~3個のDOPA残基を使って誘導体化した鎖状PEGポリマー (図2) は、酸化チタン (TiO₂) 基板や金基板に吸着することが見出され¹⁷、光導波路分光法 (OWLS: optical waveguide spectroscopy) と分光エリプソメトリー (ELM: spectroscopic ellipsometry) で測定されたように血清成分に対する優れた防汚性を示しました。血清のin-situ吸着から、対照試料のTiO₂表面には250 ng/cm²の血清タンパク質が蓄積していたのに対して、mPEG-DOPA₃で修飾したTiO₂表面に蓄積していた血清タンパク質はわずか1 ng/cm²未満であることがわかり、DOPAを結合させたPEGの優れた防汚性が確認されました¹⁷。さらに高性能なペプチドアンカーも開発されており、たとえば、ムラサキイガイのfoot protein-1のデカペプチド類縁体をPEGに結合させ、これを用いて金表面に細胞接着防止機能を付与しています (図3)¹⁶。ペプチドを結合させたポリマーの合成は、厳密なアミノ酸の配列を求める場合は固相法を利用し、特に厳密なアミノ酸配列を必要としないペプチドオリゴマーアンカーを合成する場合はモノアミンを導入したポリマーを開始点としてN-カルボキシ無水物モノマーを重合させます。最近、生物学的な鉄キレート物質であるanachelinからヒントを得て、カテコールを基盤とする接着性のアンカーを同様に用いたところ¹⁸、表面にPEGを結合させる際に用いることのできるアンカー基の種類を大幅に増やすことができました。

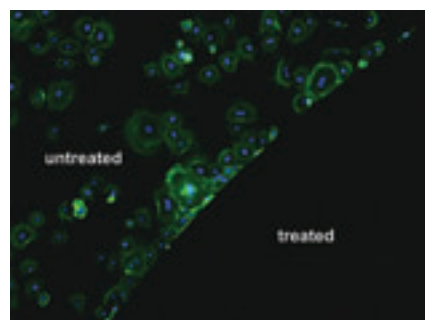


図3. 未処理の金 (左上) と、イガイ類接着タンパク質類縁体のデカペプチドAla-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Thr-DOPA-Lysで誘導体化したPEGをグラフトした金 (右下) への繊維芽細胞の接着

*graft-from*法も防汚性被膜の作製に利用されており、表面に結合した開始剤からPEGマクロモノマーを重合させる方法がとられています。例えば、開始剤を連結させた自己組織化単分子層 (SAMs) で改質した金表面から、原子移動ラジカル重合 (ATRP) を利用してアクリレートで修飾したPEGを重合させています¹⁹。得られたグラフトポリマー被膜は、このほかの大抵の *graft-from* 被膜と同じように *graft-to* 被膜よりもはるかに厚く、タンパク質や細胞の付着を防止する優れた効果を有しています。生体模倣型アンカーに関してはドーパミンをベースとする ATRP 開始剤が合成され、金属酸化物表面に防汚性被膜が調製されています²⁰。この場合、DOPAの側鎖にあるカテコール残基を使って酸化チタンやステンレス鋼表面に吸着させ、ここから ATRP を介して PEG マクロモノマーを重合し、厚みのある防汚性被膜が得られています。

最近、防汚性ポリマーでさまざまな材料を修飾できるきわめて汎用性の高いハイブリッド型 *graft-from/graft-to* 法が報告されています²¹。この方法は2段階であり、最初の段階ではアルカリ性条件下でドーパミン塩酸塩 (H8502) を重合させる方法を利用します。この方法で、ほぼすべての材料表面に薄い (50 nm以下) 接着性ポリドーパミン被膜を作製できます。この被膜加工は容易に入手できる材料を使用して簡便なディップコーティングを利用しているため、複雑な形状物にも行うことができます。ポリドーパミン被膜の作製に利用する反応は、イガイ類接着タンパク質の固化やメラニン色素の生成の際に起こる反応とよく似ています。得られる被膜は求核剤に対して潜在的な反応性を有しており、アミンやチオールを導入したPEGを、ポリドーパミンで被覆した表面に共有結合でグラフトする次のステップに好都合です (図4)。この新しい材料改質法は、面倒な表面作製段階を必要とせず、*graft-from* (1段階目) 法と *graft-to* (2段階目) 法の二つのステップによるものであり、表面に防汚性を付与する簡便で経済的な汎用性の高い方法となるでしょう。

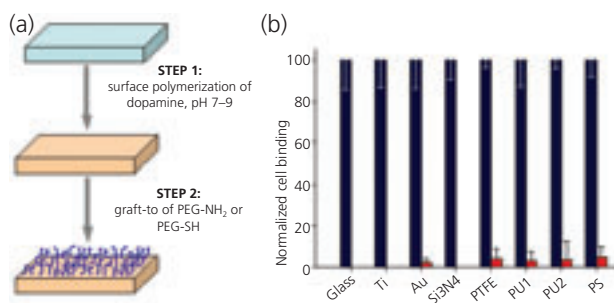


図4. 二段階の方法で基板表面に防汚性ポリマーをグラフトさせる簡便な手法。(a) 基板表面にてドーパミンを重合させたのちに、アミンまたはチオールを有するPEGを結合させる表面グラフト法の模式図。この方法を用いることによって、無機材料や有機材料をはじめとするさまざまな表面にPEGをグラフトした防汚性被膜を作製することができます。(b) ポリドーパミンとPEG-NH₂による各種基板の改質前(黒のバー)と改質後(赤のバー)の細胞接着を標準化したグラフ。ガラス、チタン、金、窒化ケイ素、テフロン(PTFE)、ポリウレタン(PU1、PU2)、ポリスチレン(PS)をそれぞれ表しています。

PEGをグラフトした被膜を利用した、表面への海洋生物の付着阻害についても検討されていて²²⁻²⁴、超分岐フルオロポリマー-PEG複合材料²²、側鎖にPEGを有する疎水性ポリマー²³、鎖状PEG²⁴といったさまざまなデザインのグラフトポリマーが使用されています。これらの研究では現在まで珪藻(*Navicula perminuta*)と緑藻類(*Ulva linza*)の付着に焦点が当てられており、PEG含有量の増大に応じて防汚性能が向上し、標準的なシリコン系防汚コーティングよりも優れた性能を示します。現在、シリコン系防汚コーティングは生物付着物の流体力学的な除去のするために水産業で利用されていますが、このコーティングはあらゆる海洋生物付着に対して完全に有効というわけではなく、速度の遅い船舶ではあまり効果を発揮しません。さらに開発を進めることによって、PEGをベースとするコーティングは海洋環境で高い防汚性能を発揮する可能性があります。

官能基化ポリ(エチレングリコール)

さまざまな分子量や末端基を有するポリ(エチレングリコール)(PEG)ポリマーをご用意しています。以下の表は、生体材料研究に一般的に利用されている官能基化鎖状PEG分子の一部を示したものです。このほかの分子量、末端基のほか、官能基化されていないPEGポリマー、分岐(星型)PEGポリマーなど、PEGポリマーの全製品リストについては、sigma-aldrich.co.jp/aldrich/polymerをご覧ください。

End-function (R)	Structure	Molecular Weight (Avg. M _n)	Prod. No.
Monofunctional PEGs			
-NH ₂	$\text{H}_3\text{CO}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$	2,000	06676-1G
		5,000	06679-1G
			06679-5G
		10,000	07965-1G
-OH	$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$	1,000	17738-250G
			17738-1KG
		2,000	202509-5G
			202509-250G
			202509-500G
		5,000	81323-250G
			81323-1KG

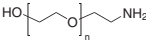
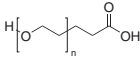
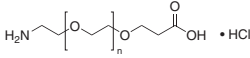
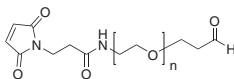
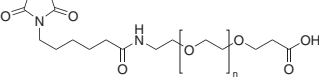
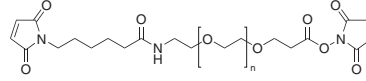
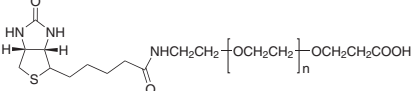
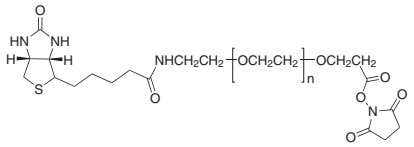
以上をまとめると、PEGをグラフトした被膜はタンパク質、細胞、細菌、このほかの生物の付着を効果的に防ぐことができます。生物からヒントを得たアンカー部分によって、PEGを表面に結合させる簡便、多用途かつ確実な方法が見出されました。このPEG被膜を使って植込み型医療器具、コンタクトレンズ、外科用器具、バイオセンサー、バイオセパレーション向けの電気泳動用キャピラリーのほか、付着を起こしやすい水処理設備や船体の表面への付着をコントロールすることができます。

References

- (1) Brosnahan, J.; Jull, A.; Tracy, C. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* **2004**, Art. no. CD004013.
- (2) Beech, I. B.; Sunner, J. A.; Arciola, C. R.; Cristiani, P. *International Journal of Artificial Organs* **2006**, *29*, 443.
- (3) Anderson, C.; Atlar, M.; Callow, M.; Candries, M.; Milne, A.; Townsin, R. L. *Journal of Marine Design and Operations* **2003**, *B4*, 11.
- (4) Nath, N.; Hyun, J.; Ma, H.; Chilkoti, A. *Surface Science* **2004**, *570*, 98.
- (5) *Polyethylene Glycol*; Harris, J. M., Ed.; Plenum: New York, 1992.
- (6) Gombotz, W. R.; Guanghui, W.; Horbett, T. A.; Hoffman, A. S. *Journal of Biomedical Materials Research* **1991**, *25*, 1547.
- (7) Jeon, S. I.; Lee, J. H.; Andrade, J. D.; De Gennes, P. G. *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *142*, 149.
- (8) McPherson, T.; Kidane, A.; Szeleifer, I.; Park, K. *Langmuir* **1998**, *14*, 176.
- (9) Neff, J. A.; Caldwell, K. D.; Tresco, P. A. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40*, 511.
- (10) Lu, H. B.; Campbell, C. T.; Castner, D. G. *Langmuir* **2000**, *16*, 1711.
- (11) Jo, S.; Park, K. *Biomaterials* **2000**, *21*, 605.
- (12) Kenausis, G. L.; Voros, J.; Elbert, D. L.; Huang, N.; Hofer, R.; Ruiz-Taylor, L.; Textor, M.; Hubbell, J. A.; Spencer, N. D. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3298.
- (13) Sagart, J.; Sun, C.; Waite, J. H. In *Biological Adhesives*; Smith, A. M., Callow, J. A., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 2006.
- (14) Lee, H.; Scherer, N. F.; Messersmith, P. B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 12999.
- (15) Dalsin, J. L.; Messersmith, P. *Materials Today* **2005**, *8*, 38.
- (16) Dalsin, J. L.; Hu, B.-H.; Lee, B. P.; Messersmith, P. B. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4253.
- (17) Dalsin, J.; Tosatti, S.; Vörös, J.; Textor, M.; Messersmith, P. B. *Langmuir* **2005**, *21*, 640.
- (18) Zuercher, S.; Waeckerlin, D.; Bethuel, Y.; Malisova, B.; Textor, M.; Tosatti, S.; Gademann, K. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 1064.
- (19) Ma, H.; Hyun, J.; Stiller, P.; Chilkoti, A. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 338.
- (20) Fan, X.; Lin, L.; Dalsin, J. L.; Messersmith, P. B. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 15843.
- (21) Lee, H.; Dellatore, S. M.; Miller, W. M.; Messersmith, P. B. *Science* **2007**, *318*, 426.
- (22) Gudipati, C. S.; Finlay, J. A.; Callow, J. A.; Callow, M. E.; Wooley, K. L. *Langmuir* **2005**, *21*, 3044.
- (23) Krishnan, S.; Wang, N.; Ober, C. K.; Finlay, J. A.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Hexemer, A.; Sohn, K. E.; Kramer, E. J.; Fischer, D. A. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1449.
- (24) Statz, A. R.; Finlay, J. A.; Dalsin, J. L.; Callow, M.; Callow, J. A.; Messersmith, P. B. *Biofouling* **2006**, *22*, 391.

End-function (R)	Structure	Molecular Weight (Avg. M _n)	Prod. No.
-COOH		2,000	17928-5G
		5,000	17929-1G
			17929-5G
N-succinimidyl		2,000	41214-1G
-SH		5,000	11124-250MG
			11124-1G
		20,000	63753-250MG
Maleimide		5,000	63187-1G
			63187-5G
Methacrylate		1,100	447951-100ML
			447951-500ML
		2,080, 50 wt.% in H ₂ O	457876-250ML
			457876-1L
Homobifunctional PEGs			
-NH ₂		2,000	14501-250MG
			14501-1G
		3,000	14502-250MG
			14502-1G
		6,000	14504-250MG-F
			14504-1G-F
		10,000	14508-250MG
			14508-1G
-COOH		2,000	14565-1G
		3,000	14567-250MG
		6,000	14569-1G
		10,000	14571-1G
N-succinimidyl		3,000	15961-1G
Acrylate		2,000	701971-1G
		6,000	701963-1G
Methacrylate		2,000	687529-1G
		6,000	687537-1G
-SH		1,500-1,800	704369-1G
		3,400-3,600	704539-1G
		10,000-10,300	705004-1G

Heterobifunctional PEGs

R1	R2	Structure	Molecular Weight (Avg. M _n)	Prod. No.
-OH	-NH ₂		3,000	07969-250MG 07969-1G
			5,000	672130-100MG 672130-500MG
			10,000	671924-100MG 671924-500MG
-OH	-COOH		3,000	670812-100MG 670812-500MG
			5,000	670936-100MG 670936-500MG
			10,000	671037-100MG 671037-500MG
-NH ₂	-COOH		3,000	671487-100MG 671487-500MG
			5,000	671592-100MG 671592-500MG
-COH	Maleimide		3,000	579319-250MG
-COOH	Maleimide		3,000	670162-250MG
N-succinimidyl	Maleimide		3,000	670278-100MG
-COOH	Biotin		3,000	669946-250MG
N-succinimidyl	Biotin		3,000	670049-100MG

Aldrich® Materials Science Catalog

Materials Science Catalog 2008-2010 (英語版) 好評配布中！

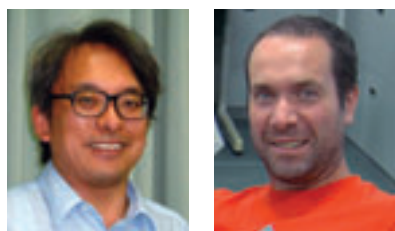
材料科学研究に必須の 4,000 品目を掲載

- 代替エネルギー
- 金属及びセラミックス科学
- マイクロ／ナノエレクトロニクス
- ナノ材料
- 有機エレクトロニクス／フォトンクス
- 高分子化学
- 書籍、実験器具

カタログのご請求は下記アドレス、もしくは sialjpts@sial.com まで。
 無料でお送りいたします！ www.sigma-aldrich.co.jp/aldrich/mscatalog



交互 (LbL) 積層法、機能性生体材料を得るための「温和かつ柔軟な」方法



Dr. Katsuhiko Ariga and Dr. Jonathan P. Hill

World Premier International (WPI) Research Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science (NIMS), Japan
ariga.katsuhiko@nims.go.jp

はじめに

科学者は機能性材料やシステムの開発に現在多くの時間と労力を費やしています。一方、自然は何十億年もの時間をかけて進化しており、その極めて高い機能性を生体材料に見ることができます。この圧倒的な開発時間の大きな差が影響してか、人工材料は生体材料に比してその機能の効率や特異性において劣ることが少なくありません。このため、合理的な材料設計の観点から、生体材料を組み込んだ機能材料開発には大きなメリットがあると考えられます。残念ながら、生体材料は人工デバイスの構成材として自然の中で進化したわけではありまないので、加工に必要な過酷な化学的条件下や物理的条件下では特性の低下や分解を来す傾向があります。よって、人工構造に効果的に生体材料を固定化するには、温和かつ柔軟な手法が必要となります。そのために、ラングミュア・プロジェクト (LB) 膜や自己組織化単分子層 (SAMs) などにより生体膜様薄膜に生体材料を組み込む方法がとられます。これらの膜は適当な媒体にはなりますが、時に操作が煩雑であったり、また、応用物質に制限があったりして、必ずしも広く適用される手法とはなりえません。最近、機能性分子を薄膜として固定するための汎用性の高い温和かつ簡便な方法として、交互積層法 (LbL: Layer-by-Layer self-assembly) が注目されています^{1,2}。本稿では、温和かつ柔軟な LbL 法によって創製される機能システムの最近の進展を紹介します。

LbL の概要: 生体材料に対して穏やかである理由と、その程度

カチオン性高分子電解質とアニオン性タンパク質の積層を一例として、LbL 積層法の一般的なプロセスを図 1a に示します。負の電荷をもつ固体担体表面にカチオン性高分子電解質が吸着すると通常は過剰吸着を起こし、表面の電荷が反転します。続いてアニオン性タンパク質を吸着させると、表面の電荷が再び反転します。この表面の電荷反転機構を利用して、層構造を連続的に作製できます。このメカニズムは電荷をもつさまざまな物質に適用できるため、使用できる生体材料の選択肢はタンパク質、核酸、糖、ウイルス粒子など、きわめて多岐にわたります。厚さナノメートルスケールの膜を作成できるこの積層プロセスを、ピーカーとピンセットのみを使用することで、温和な室温条件で水溶液を使って行うことが

できるのです。LbL 積層法の推進力は静電的相互作用に限定されるとは限りません。水素結合や金属配位といったほかの相互作用も積層に利用できます³。レクチンと糖との相互作用などの生体分子特異的な相互作用を利用すると、さらに特異的に膜を構築できる可能性があります⁴。

LbL 積層法の革新の重要な節目となったのが、プロセスにテンプレート合成を取り入れたことです⁵。図 1b には、コロイド粒子を用いる LbL 積層化と、その後の中空カプセルの作製を示しています。この方法では、従来の LbL 積層法と同じく LbL 膜を連続的に積層しますが、コアとしてコロイド粒子を用いる点で異なります。コアであるコロイド粒子を破壊すると中空カプセルが得られます。LbL 積層法によって酵素の結晶を高分子電解質で包んだのちに、酵素の結晶を溶かすとナノサイズのカプセルに多量の酵素が充填されます⁶。LbL 積層法によって、テンプレートの多孔質アルミナの内部に生体材料を積層したのちに、テンプレートを溶かすと生体材料から成るマイクロチューブが形成されます⁷。

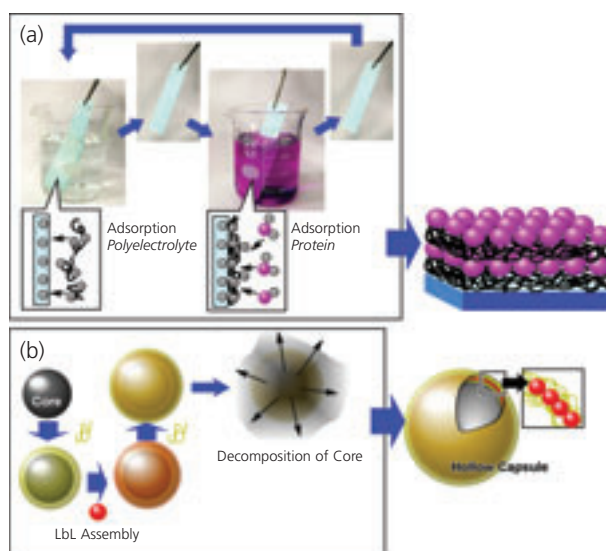


図 1. LbL 積層法のプロセス (a) 固体基板上; (b) コロイドコア上。
Ariga, K. et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2007, 9, 2319. © 2007, Royal Society of Chemistry より許可を得て転載。

バイオ関連の用途: リアクターとセンサー

LbL 膜構築の自由度の高さは、ある特定の連続反応用の薄膜型酵素リアクターを作製するのに好都合です。図 2 は、グルコースオキシダーゼとグルコアミラーゼから成る二酵素型のリアクターを限外ろ過膜上に作製することに成功した例を示しています⁸。基質のデンプン溶液をリアクターに通すと、グルコアミラーゼによってデンプンのグルコースの結合が加水分解されてグルコースが生成し、その後グルコースオキシダーゼによってグルコノラクトンと副生成物の H_2O_2 に変換されます。リアクターの効率の層の数、積層の順序、層の間隔を調節して最適化することができます。

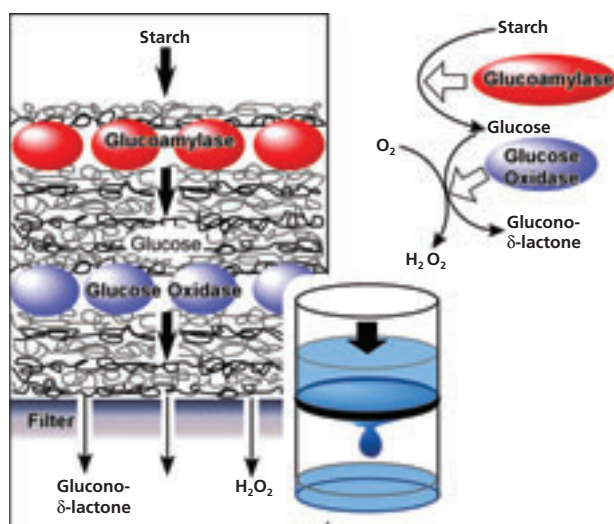


図2. LbL法で積層した複数の酵素から成るリアクター。
Ariga, K. et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, 9, 2319.
© 2007, Royal Society of Chemistryより許可を得て転載。

グルコースオキシダーゼを使ってLbL積層法で作製した一酵素型のリアクターの性能と、同じ酵素を含むLB膜の性能とを比較したところ、前者のほうがはるかに優れていました⁹。前者は厚みを増大させても酵素反応の効率に変化が見られなかったのに対して、LB膜は厚みを増大させると酵素活性が劇的に低下しました。LbL積層膜の高分子電解質層はLB膜の凝縮脂質相よりも反応前駆体の浸透性が高いと考えられます。また、単一成分型のこのLbL膜に対し、pHの変化に対する耐久性、耐熱性、安定性についても試験しました。グルコースオキシダーゼのLbLリアクターは、これら全項目において安定性の向上がみられました。高分子電解質の柔らかなクッションに酵素分子が適度に固定されているため、リアクターが外部要因を受けても立体配座の変化が抑えられた可能性があります。

センサーへの応用は、生体材料のLbL積層膜の利用法として最も重要です。LbL法では、電極やトランジスタなどのセンサー装置部品の固体表面に活性な構造をもつ酵素の薄膜を容易に作製することができます。たとえば、Ruslingらはこの分野の先駆的な研究を実施して最近の論文に報告しています¹⁰。彼らは、DNAと酵素(ミオグロビンやシトクロムP450)を使ってDNA損傷の検出システムを開発しました¹¹。膜中の酵素は、過酸化水素による活性化を受けてスチレンから代謝産物の酸化スチレンを生じ、この酸化スチレンが同じ膜中の二本鎖DNAと反応します。このプロセスはヒトの肝臓中での代謝とDNA損傷を模倣していると考えられます。DNA損傷の検出にはRu錯体とCo錯体の電気化学に基づく方形波ボルタンメトリーを利用しています。この方法には有機化合物前駆体や代謝産物の毒性のin vitroスクリーニングに広く利用できる可能性があります。

医療への高度な応用

LbL法はきわめて簡便で汎用性が高いため、近い将来にはさまざまな実用法が開発されると思われます。薬物送達や細胞工学では生物医学への応用例が既に実現しています。

LbL法を使ってカプセル構造を作るさまざまな手法が開発されていますが、このカプセルは薬物の送達や放出を制御する担体として利用することができます¹²。たとえば、Lvovらは、生体適合性的高分子電解質の微小な殻に、天然の二重らせん

構造を保持させたままDNAを封入する独特の方法を考案しています(図3)¹³。遺伝子送達ではDNAの分解が大きな問題になっています。このため、環境に優しい材料で作製した適切な担体にDNAを封入することが不可欠です。Lvovらの方法では、 MnCO_3 粒子をテンプレートのコアとして利用し、これをDNA溶液中に懸濁させます。攪拌した MnCO_3 /DNA混合溶液にスperlミジン溶液を添加すると、水に不溶なDNA/スperlミジン複合体が MnCO_3 粒子表面に析出します。続いて、混合成分である MnCO_3 /DNA/スperlミジンコアを生体適合性のポリアルギニンとコンドロイチン硫酸から成るLbL積層膜で被覆します。その後、二段階でコアを溶かします。最初に、重水素化された0.01 M HCl溶液でテンプレートの MnCO_3 粒子を溶かすと、DNA/スperlミジン複合体を含む生体適合性のカプセルが得られ、その次の段階でさらに0.1 M HCl溶液で処理するとDNA/スperlミジン複合体が分解します。この二番目のプロセスの後には、分子量の小さいスperlミジンがカプセルの内部放出されるため、DNAが閉じ込められた生体適合性のカプセルが残ります。閉じ込められた物質の高分子電解質膜に対する透過性は、pHの変化、溶媒の追加、温度の急激な上昇といった外部要因によって制御できるため、閉じ込められたDNAの放出を制御することができます。

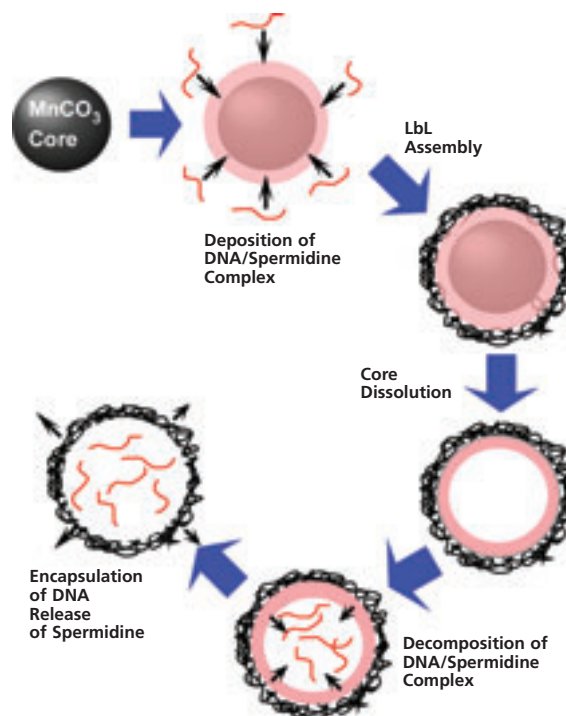


図3. LbL法で積層したカプセル中に閉じ込められたDNA。
Shchukin, D. G. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3374.
© 2004, American Chemical Societyより許可を得て転載。

平面LbL膜を薬物送達用途に利用することも提唱されています。たとえばLynnらは、分解性のカチオン性人工ポリマーと、高感度緑色蛍光タンパク質をコードするプラスミドDNAから成る最大100 nm厚のLbL膜をシリコン基板と石英基板の表面に作製しています¹⁴。このカチオン性ポリマーを分解すると、LbL膜からプラスミドDNAが放出されて転写が活性化され、細胞内での高感度緑色蛍光タンパク質の高発現が促進されます。近年、YuとArigaらは、材料の放出を制御できる中空カプセルを内部に持つLbL膜を報告しました¹⁵。作製した膜は「メソポーラスナノコンパートメントフィルム」と呼び、シリカ粒子と中空のシリカカプセルで構成されていま

す(図4)。得られたメソポーラスナノコンパートメントフィルムは分子を封入・放出する特殊な機能を有しており、フィルムに埋め込まれた堅牢なシリカカプセルのメソ細孔チャンネルを通じて、外部刺激を要さない水分子や薬物分子の自動調節 ON-OFF 型の放出が実現されています。閉じ込められた分子のON-OFF 型な放出には再現性が確認されており、これは内包分子がメソ細孔チャンネルから外部に蒸発する速度と内部からメソ細孔チャンネルに毛管浸透する速度が非平衡であることに起因します。このナノコンパートメントフィルムを用いれば治療薬の段階的な放出が可能となり、これによって治療薬の効果が改善される可能性があります。メソポーラスナノコンパートメントフィルムは薬物投与法に新しい道を拓くことでしょう。

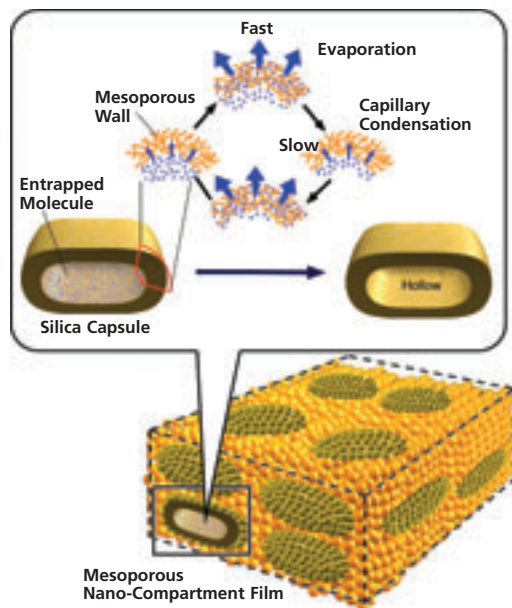


図4. メソポーラスナノコンパートメントフィルム。
Ji, Q. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2376.
© 2008, American Chemical Societyより許可を得て転載。

LbL法を細胞工学に応用することは、大変魅力的なターゲットです。これに関するいくつかの先駆的な研究の成果がKotovらの最近の総説にまとめられています¹⁶。たとえば、JanとKotovは、LbL膜が幹細胞技術に利用できる可能性があることを示しており、カーボンナノチューブと高分子電解質から成るLbL膜上で環境感受性の神経幹細胞をニューロスフェアと単細胞の両形態で分化させる研究を行っています¹⁷。Benkirane-Jesselらは、ポリ-L-グルタミン酸(P4761)とポリ-L-リジン(P9404)から成るLbL膜に埋め込まれた骨誘導因子とそのアンタゴニストであるノギンによって、細胞のアポトーシスが制御されることを示しています¹⁸。これは、高分子電解質の多層膜に埋め込まれた反応物を介して、歯の分化時のアポトーシスをin situで制御できる可能性があることを

示す優れた実験です。De Smedtらは、炭酸カルシウム微小粒子をテンプレートとしてデキストラン硫酸(D6924)の膜とポリ-L-アルギニン(P7762)の膜で作製したLbL高分子電解質マイクロカプセルの細胞取込み、分解、生体適合性についてin vivoで検討を行っています¹⁹。ほとんどのマイクロカプセルは細胞内部に取り込まれ、皮下注射の16日後には分解が始まったことから、分解性の高分子電解質で作製したLbLマイクロカプセルは薬物送達に適している可能性のあることがわかります。

今後の見通し

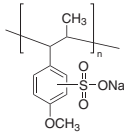
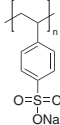
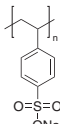
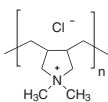
本稿では、生体材料を用いるLbL法のさまざまな特徴を簡単に紹介しました。LbL法は、この温和さが最大の特徴であり、繊細な生体材料に適しています。簡便性と汎用性が高いという他の特徴は温和な作製法を実行するうえで重要です。LbL法は既存のトップダウン式の超微細加工法(マイクロファブリケーション法、ナノファブリケーション法)と組み合わせることができます²⁰。LbL積層法は簡便であるため、フォトリソグラフィ法、インクジェット法などの超微細加工技術や他のパターンニング技術に使用でき、さまざまな目的に適応します。LbL法とトップダウン式加工法を融合させることによって、超微細加工が施された構造に生体材料を組み込むことを可能にし、その結果バイオセンサーマイクロアレイ、マイクロチップリアクターなどの次世代のバイオナノデバイスや超微細バイオデバイスをもたらすでしょう。

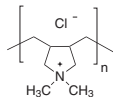
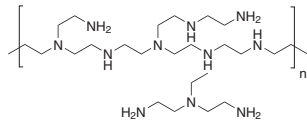
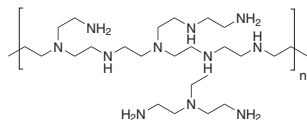
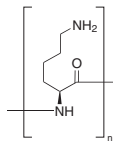
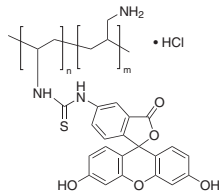
References

- (1) Decher, G., *Science*, **1997**, *277*, 1232 (2) Ariga, K., Hill, J.P., Ji, Q., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2007**, *9*, 2319. (3) Quinn, J.F., Johnston, A.P.R., Such, G.K., Zelikin, A.N., Caruso, F., *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 707. (4) Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I., Kunitake, T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 2313. (5) Wang Y., Angelatos A.S., Caruso F., *Chem. Mater.*, **2008**, *20*, 848. (6) Caruso, F., Trau, D., Möhwald, H., Renneberg, R. *Langmuir*, **2000**, *16*, 1485. (7) Lu, G., Ai, S., Li, J. *Langmuir* **2005**, *21*, 1679. (8) Onda, M., Lvov, Y., Ariga, K., Kunitake, T., *J. Ferment. Bioeng.* **1996**, *82*, 502. (9) Onda, M., Ariga, K., Kunitake, T., *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87*, 69. (10) Rusling, J.F., Hvastkovs, E.G., Hull, D.O., Schenkman, J.B., *Chem. Commun.* **2008**, 141. (11) Zhou, L., Yang, J., Estavillo, C., Stuart, J.D., Schenkman, J.B., Rusling, J.F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 1431. (12) De Geest, B.G., Sanders, N.N., Sukhorukov, G.B., Demeester, J., De Smedt, S.C., *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 636. (13) Shchukin, D.G., Patel, A.A., Sukhorukov, G.B., Lvov, Y.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3374. (14) Zhang, J., Chua, L.S., Lynn, D.M., *Langmuir*, **2004**, *20*, 8015. (15) Ji, Q., Miyahara, M., Hill, J.P., Acharya, S., Vinu, A., Yoon, S.B., Yu, J.-S., Sakamoto, K., Ariga, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 2376. (16) Tang, Z., Wang, Y., Podsiadlo, P., Kotov, N.A., *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 3203. (17) Jan, E., Kotov, N.A., *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1123. (18) Nadiri, A., Kuchler-Bopp, S., Mjahed, H., Hu, B., Haikel, Y., Schaaf, P., Voegel, J.-C., Benkirane-Jessel, N., *Small* **2007**, *3*, 1577. (19) De Koker, S., B. Geest, B.G., Cuvelier, C., Ferdinande, C.L., Deckers, W., Hennink, W.E., De Smedt, S.C., Mertens, N., *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 3754. (20) Hammond, P.T., *Adv. Mater.*, **2004**, *16*, 1271.

高分子電解質

アニオン性（負の電荷をもつ）ポリマーとカチオン性（正の電荷をもつ）ポリマーは、一般に、高分子電解質と呼ばれており、交互積層（LbL）法に利用される重要な材料です。以下の表はLbL研究に一般的に利用されている材料の一部を示したものです。高分子電解質の全製品リストと最新製品については sigma-aldrich.co.jp/aldrich/polymer をご覧ください。

Name	Structure	Property	Prod. No.
Anionic Polyelectrolytes			
Poly(anetholesulfonic acid, sodium salt)		Avg. M_v 9,000–11,000	444464-5G 444464-25G
Poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS)		Avg. M_w ~ 70,000	243051-5G 243051-100G 243051-500G
		Avg. M_w ~ 1,000,000	434574-5G 434574-100G 434574-500G
Poly(sodium 4-styrenesulfonate) solution (PSS)		Avg. M_w ~ 70,000, 30 wt. % in H_2O	527483-100ML 527483-1L
		Avg. M_w ~ 200,000, 30 wt. % in H_2O	561967-500G
		Avg. M_w ~ 1,000,000, 25 wt. % in H_2O	527491-100ML
Poly(vinyl sulfate), potassium salt		Avg. M_w ~ 170,000	271969-1G 271969-5G
Poly(vinylphosphonic acid, sodium salt) solution		25 wt. % in H_2O , technical grade	278424-250ML 278424-1L
Poly(acrylic acid, sodium salt) (PAA)		Avg. M_w ~ 2,100	420344-100G 420344-500G
		Avg. M_w ~ 5,100	447013-100G 447013-500G
Poly(acrylic acid, sodium salt), solution (PAA)		Avg. M_w ~ 1,200, 45 wt. % in H_2O	416010-100ML 416010-500ML
		Avg. M_w ~ 8,000, 45 wt. % in H_2O	416029-100ML 416029-500ML
		Avg. M_w ~ 15,000, 35 wt. % in H_2O	416037-100ML 416037-500ML
Cationic Polyelectrolytes			
Poly(allylamine hydrochloride) (PAH)		Avg. M_w ~ 15,000 (vs. PEG std.)	283215-5G 283215-25G
		Avg. M_w ~ 70,000 (vs. PEG std.)	283223-1G 283223-5G 283223-25G
Poly(diallyldimethylammonium chloride) solution (PDDA)		Avg. M_w < 100,000 very low molecular weight, 35 wt. % in H_2O	522376-25ML 522376-1L

Name	Structure	Property	Prod. No.
		Avg. M_w 100,000–200,000 low molecular weight, 20 wt.% in H_2O	409014-25ML 409014-1L 409014-4L
		Avg. M_w 200,000–350,000 medium molecular weight, 20 wt.% in H_2O	409022-25ML 409022-1L 409022-4L
		Avg. M_w 400,000–500,000 high molecular weight, 20 wt.% in H_2O	409030-25ML 409030-1L 409030-4L
Polyethylenimine solution (PEI)		Avg. M_w ~ 1,300 (by LS), 50 wt.% in H_2O	482595-100ML 482595-250ML
		Avg. M_w ~ 2,000 (by LS), 50 wt.% in H_2O	408700-5ML 408700-250ML 408700-1L
		Avg. M_w ~ 750,000 (by LS), 50 wt.% in H_2O	181978-5G 181978-18KG 181978-100G 181978-250G
Polyethylenimine, branched (PEI)		Avg. M_w ~ 25,000 (by LS)	408727-100ML 408727-250ML 408727-1L
Poly-L-Lysine hydrochloride		Avg. M_w ~ 15,000–30,000	P2658-25MG P2658-100MG P2658-500MG P2658-1G
		Avg. M_w > 30,000	P9404-25MG P9404-100MG P9404-500MG P9404-1MG
Fluorescently Labeled Polyelectrolytes			
Poly(fluorescein isothiocyanate allylamine hydrochloride)		Avg. M_w ~ 15,000, PAH:fluorescein 50:1	630217-250MG
		Avg. M_w ~ 70,000, PAH:fluorescein 50:1	630209-250MG

日本国内での価格と在庫状況をご覧になるには

- 1) まず **sigma-aldrich.com** にアクセスして下さい。
- 2) 左上の「My Profile」をクリックして ① Web language = Japanese、② MSDS language = English、③ Country = Japan の3つを選択し、Submit して下さい。
- 3) Top ページ等の右上にある **Product Name or No.** で検索して下さい。

バルク供給／スケールアップのご相談は・・・

ファインケミカル事業部 Tel:03-5796-7340 Fax:03-5796-7345 E-mail:safcjp@sial.com

(生体) 材料科学における「クリック」ケミストリー



Dr. Joost A. Opsteen,¹ Dr. Lee Ayres² and Prof. Jan C.M. van Hest¹

¹Organic Chemistry, Institute for Molecules and Materials, Radboud University Nijmegen, The Netherlands

²Encapson B.V, The Netherlands
j.vanhest@science.ru.nl

はじめに

生体分子と合成高分子を一体化することで、応用分野の広い高い汎用性を持つ新しいタイプのバイオハイブリッド材料を作製することが、近年大いに注目されています。その理由のひとつとして、生体分子と合成高分子とを的確に結合させる合成方法が開発されたことが挙げられます。銅 (I) 触媒アジド-アルキン付加環化、すなわち「クリック」ケミストリー法は、その効率性と特異性のほかに、天然高分子と合成高分子を問わず必要な官能基を導入できる可能性を持つことから、特に有用な方法です。本稿では、高分子工学分野の「クリック」ケミストリーの応用と高分子バイオハイブリッドの合成に関する概要をご紹介します。

高分子バイオコンジュゲートの合成

DNA やタンパク質などの天然高分子は、現在の合成材料に比べて極めて優れた構造制御がなされています。構造が明確な三次元組織は、高度に制御されたヌクレオチドやアミノ酸の配列に由来しており、生体高分子に特異的な機能をもたらします。この三次元構造は生体高分子の機能を担っていることが多く、立体配座が変化することで機能が失われてしまいます。一方、合成高分子はこのような完全なレベルでは制御されていませんが、比較的容易に特定の使用環境に適応させた多様なトポロジーと組成を持つものを合成できます。

最近現れたロジカルな方法に、生体高分子の構造制御と合成高分子の汎用性とを組み合わせたものがあり、プログラム化された組み立て構造、認識、生理活性などの特性につながります。現在応用されているバイオハイブリッド高分子の合成には概ね、従来の化学手法が利用されており、タンパク質のリジン残基のアミンやシステイン残基のチオールに対する反応性に依存しています。バイオハイブリッドを使って既に優れた結果が得られてはいますが、このふたつの残基、特にリジンは、タンパク質に広く存在するため、複数の合成高分子ビルディングブロックが付加する原因になっています。このため、構造が明確に制御されたバイオハイブリッド高分子を合成するには、生体高分子に存在する他の官能基に対して不活性で極めて特異性の高いカップリング法が必要です。

この点で、「クリック」ケミストリーは生体分子と合成高分子とを結合させるうえで大変有用です。「クリック」ケミストリーは Sharpless が創り出した用語で、モジュール方式で、適用範囲が広く、きわめて高収率で、クロマトグラフィーなしで除去できる無害な副生成物のみを生成する一連の化学反応を指します¹。最も有名な「クリック」反応は、銅 (I) 触媒アジド-アルキン付加環化反応 (CuAAC : copper (I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) であり、図 1 に示すような 1,4-二置換の五員環構造をもつ 1,2,3-トリアゾール環²が得られます。このアジドとアルキンとの反応は、収率が高く、ほかの官能基によって反応経路が阻害されることはありません。アジド基とアルキン基はいずれも、既存の手法で生体分子と合成高分子の特定の位置に導入することができます。これにより「クリック」ケミストリーは高分子化学やバイオコンジュゲーションの分野に革命をもたらしました。その一部をこれからご紹介します。

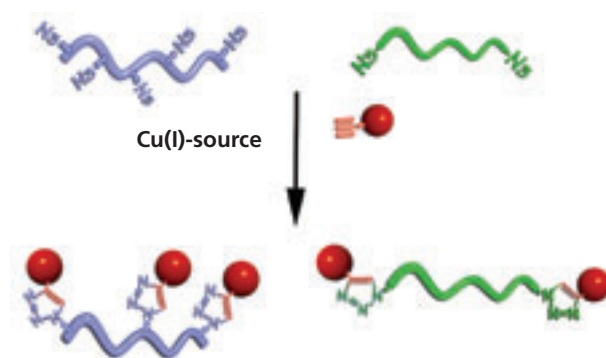


図 1. 「クリック」ケミストリーによる高分子の側基および末端基の官能基化の模式図。

高分子工学における「クリック」ケミストリーの新たな役割

開環メタセシス重合 (ROMP : ring-opening metathesis polymerization)、ニトロキシド媒介ラジカル重合 (NMP : nitroxide mediated radical polymerization)、可逆的付加開裂連鎖移動重合 (RAFT : reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization)、原子移動ラジカル重合 (ATRP : atom transfer radical polymerization) といった現在使用できるリビング (制御可能な) 重合技術によって重合プロセスの厳密な制御が可能です。重合度をあらかじめ決めることができ、多分散性を低くできます。さらに、側鎖と末端基の官能性、組成 (ブロック、グラフトおよびグラジエント共重合体など)、トポロジー (くし型、星型、樹枝状構造など) について高分子の構造をデザインすることができます³。アジド部分とアルキン部分は、制御された重合法を取り入れることによって高分子鎖のさまざまな位置に容易に導入できるため、このきわめて効率的な CuAAC 反応は高分子工学の強力なツールとなっています⁴⁻⁸。

CuAAC 反応を利用して、アルキン基を有するビルディングブロックとアジド基を有するビルディングブロックからモジュール方式で、構造が明確なトポロジーをもつ多彩な高分子が構築されており、高い収率が得られています。合成された構造の一部を図 2 に示しましたが、その範囲はブロック共重合体、グラフト共重合体、星型共重合体からハイドロゲルのような網目状高分子に至ります。たとえば、ATRP を応用

するとアジド基とアルキン基を高分子鎖の末端に導入できることが明らかになっています。

これはアルキン基を有する開始剤と、重合後にハロゲンを変換することで実現されますが、ATRPで合成した高分子では常にこのハロゲンが末端に存在することになります (p. 18のアプリケーションノート参照)。この方法によって、銅 (I) 触媒で定量的にカップリングさせることができる官能基化された高分子ビルディングブロックが得られました。

同一の高分子ビルディングブロックの末端にはアジド基のほか、アセチレン基も導入できるため、この「クリック」カップリングの概念を展開してひとつの高分子の両末端基を連続的に官能基化する方法を実現しました¹⁰。高分子の一方の末端で選択的にCuAAC反応を行うため、もう一方の末端のアセチレン部分はトリイソプロピルシリル (TIPS) 基で保護しました。この保護基はその後簡単に除去できるため、アセチレン基を次の「クリック」カップリングに利用できました。このモジュール方式のアプローチを使って、ポリ (アクリル酸メチル)-*block*-ポリスチレン-*block*-ポリ (アクリル酸 *tert*-ブチル) のABC型トリブロック共重合体 (図2の反応I参照) が合成されています¹²。なお、この方法では異なる重合メカニズムで合成された比較的结合しやすいブロックを用いることもできます。

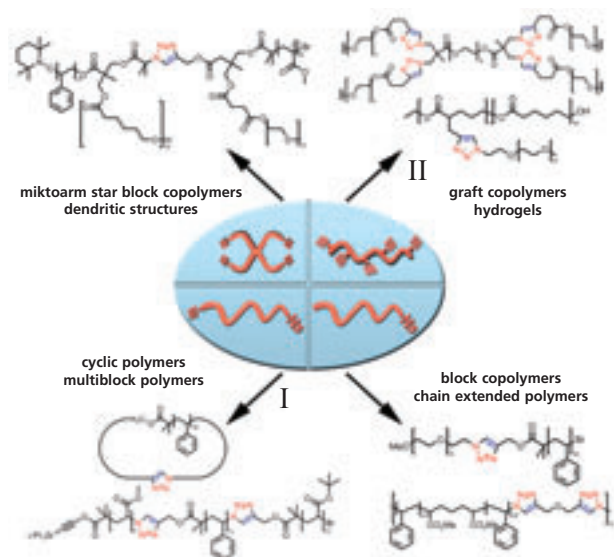


図2. 「クリック」ケミストリーによって作成された高分子の例：ブロック共重合体^{9,10}、鎖が伸張された高分子¹¹、環状高分子¹²、グラフト共重合体¹³、ハイドロゲル¹⁴およびMiktoarm星型ブロック共重合体¹⁵。

CuAAC反応は、さまざまな高分子構造の作成に加え、高分子鎖や高分子ネットワークへの官能基の導入にも利用できます⁴⁻⁶。アジド基やアルキン基を導入したモノマーを使えば、嵩高いペンダント基を高分子鎖にグラフトすることができます (図2の反応II参照)。この手法は、あらかじめ官能基を導入したモノマーの重合では問題となることがあります。一般的には、制御された重合技術に「クリック」ケミストリーを組み合わせれば、高分子の側鎖や末端基にさまざまな官能基を導入する点においてほぼ無限の可能性を秘めた強力な手法といえるでしょう。

「クリック」ケミストリーによる バイオハイブリッド高分子の合成

CuAAC反応はきわめて効率的であり、高分子などの大きな分子を高い収率で結合させることができるだけでなく、きわめて特異的でもあります。これは、用いられるアジド基とアルキン基がほかの官能基に対して不活性であり、銅 (I) 触媒存在下でのみ相互に反応することを意味します。この特異性に加え、水溶液中、室温で反応を実行できることから、「クリック」ケミストリーはペプチド、タンパク質、炭水化物、DNAといった生体分子と合成高分子とを結合させるための最適なツールです^{16,17}。まず、最初の例として、図3に示すような、末端にアジド基を有するポリスチレンを、アルキン基を導入したウシ血清アルブミン (BSA) タンパク質と結合させる反応があります¹⁸。ここでは、ATRPで調製したポリスチレンの末端のハロゲン基を求核置換してアジド基を定量的に導入しました。BSAの外側に位置するシステイン残基 (Cys-34) のチオール基に対してアルキン基を有するマレイミドによるマイケル付加を行ったところ、1箇所のみがアルキン化されたタンパク質が得られました。続いて、硫酸銅と、*in situ* でCu (I) 触媒を生じさせる還元剤としてアスコルビン酸を添加し、合成高分子とタンパク質との「クリック」反応を行いました。興味深いことに、単離されたバイオハイブリッド高分子が両親媒性のため、水溶液中でミセルが形成されていることが透過型電子顕微鏡で明らかになりました (図3)。

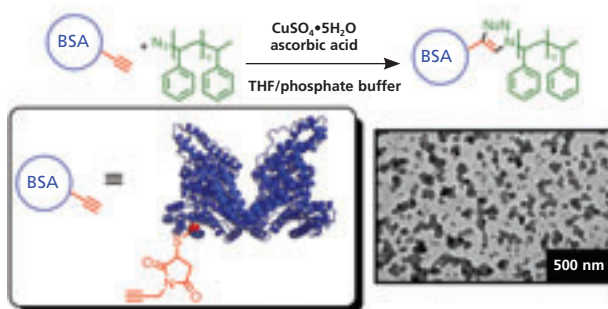


図3. ポリスチレンとウシ血清アルブミン (BSA) タンパク質との「クリック」反応の図¹⁸。得られた両親媒性のバイオハイブリッドが水溶液中でミセルを形成していることが透過型電子顕微鏡画像でわかります。参考文献 (18) より許可を得て転載。Copyright 2005 The Royal Society of Chemistry.

CuAAC反応は、タンパク質のバイオコンジュゲーションに加えて、マンノースやガラクトースなどの炭水化物を鎖状高分子や樹枝状高分子と結合させる際にも利用されています^{19,20}。このバイオハイブリッドは複数の結合部位を有しているため、細胞間相互認識プロセスや細胞タンパク質間相互作用プロセスにおける極めて特異的な経路を妨害する場合に用いられます。またさらに、炭水化物はホルモン、抗体、毒素の標的リガンドとなるため、この材料は医薬品やバイオセンサーにも適していると考えられます。このほか「クリック」反応は、ウイルス、細菌、細胞などのさらに複雑な生物学的実体に対しても適用されており、「クリック」ケミストリーが非常に有用であることがわかんと思います。

生体分子機能のほか、バイオハイブリッド合成の再現性も維持するには、タンパク質工学技術を使って生体分子の目的位置に望みのアルキン基やアジド基を導入することが極めて重要です。そのアプローチのひとつが複数部位置換法 (multisite replacement) と呼ばれるもので、タンパク質構成アミノ酸のひとつを生産できない栄養要求性の細菌株を利用します。azidohomoalanine のような非天然アミノ酸を増殖倍地に添加すると、天然アミノ酸の代わりに組み込ませることができま²¹。この方法を利用して *Candida antarctica* 由来 Lipase B 酵素 (CaLB) にアジド基を導入し、続いて、CuAAC 反応によって末端にアルキンを有するポリ (エチレングリコール) を結合させました²²。

分子集合体への機能付与

バイオコンジュゲーション反応にクリックケミストリーを応用すると、分子的に溶解した化学種に効果的に利用できるほか、分子集合体の官能基化にも利用できます。たとえば、両親媒性ブロック共重合体は溶媒中で自己組織化してベシクル構造を形成することができます。ポリマーソーム (polymersomes) とも呼ばれるこの高分子のベシクルは極めて安定性の高い球状の殻構造で、さまざまな化合物の封入に利用できます。このナノ容器を薬物送達担体やナノリアクターとして用いるには、標的リガンドや酵素を結合する必要があると考えられます。このアプローチを模式化するため、ポリスチレン-*block*-ポリ (アクリル酸) (PS-*b*-PAA) を調製し、末端の臭素をアジド基に置換しました²³。このブロック共重合体のジオキサン溶液にゆっくり水を加えると、この両親媒性ブロック共重合体は自己組織化してアジド基がベシクルの外側に露出したポリマーソームを形成しました。水で徹底的に透析を行って有機溶媒を除去したのち、高感度緑色蛍光タンパク質 (eGFP) などのアルキン基を導入したさまざまな基質を、ベシクル外側のアジド基と結合させました (図4)。eGFP が結合したポリマーソームの蛍光挙動を共焦点レーザー顕微鏡 (confocal laser-scanning microscopy) で視覚化した様子を図4に示します。銅触媒を添加しなかった対照実験では蛍光が観察されなかったため、ベシクルにeGFPが共有結合しているという結論が得られました。

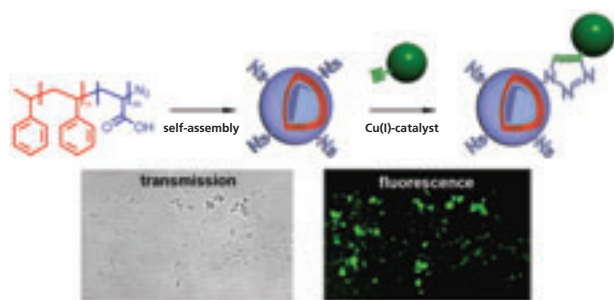


図4. アジド基を導入したポリスチレン-*block*-ポリ (アクリル酸) からのポリマーソーム形成と、「クリック」ケミストリーによるポリマーソーム表面への高感度緑色蛍光タンパク質の導入を示す模式図 (共焦点レーザー顕微鏡で視覚化)²³。参考文献 (23) から許可を得て転載。Copyright 2007 The Royal Society of Chemistry.

その後の研究で、「クリック」ケミストリーを利用して、ポリスチレン-*block*-ポリ [L-インシシアノアラニン (2-チオフェン-3-イル-エチル) アミド] (PS-*b*-PIAT) から成る半多孔性のポリマーソーム表面にCaLB酵素を結合しました²⁴。この場合、極性PIATブロックに望みのアルキン基を導入できなかったため、末端にアルキン基を有するポリスチレン-*block*-ポリ (エチレングリコール) ブロック共重合体をベシクル中に共凝集させることで、その後の官能基化の足がかりとしました。この酵素の活性は、ポリマーソームへの結合後にも維持されていました。

生体材料科学への応用展望

バイオハイブリッド高分子は、薬物送達、ナノテクノロジー、生物工学での応用に適した汎用性の高い材料であることが長年にわたって認識されています。純粋な生体分子は、立体配座が変換して機能を喪失しやすいため、バイオコンジュゲート研究が今後重要なテーマになり、新材料や改良型材料に応用されると考えられます。この点で、「クリック」ケミストリーは、ふたつの化合物をカップリングする、極めて効率的かつ特異的で、生物学的にも適した優れた手法です。高分子化学とタンパク質工学の互いの進歩とともに、科学者は、今や明確な構造と特性をもつハイブリッド高分子を調製するための包括的なツールを手に入れているのです。

References

- (1) Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004. (2) Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596. (3) Matyjaszewski, K. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 858. (4) Lutz, J.-F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1018. (5) Binder, W.H.; Sachsenhofer, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 15. (6) Golas, P.L.; Matyjaszewski, K. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *1116*. (7) Fournier, D.; Hoogenboom, R.; Schubert, U.S. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1369. (8) Nandivada, H.; Jiang, X.; Lahann, J. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2197. (9) Opsteen, J.A.; van Hest, J.C.M. *Chem. Commun.* **2005**, 57. (10) Opsteen, J.A.; van Hest, J.C.M. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45*, 2913. (11) Tsarevsky, N.V.; Sumerlin, B.S.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **2005**, *38*, 3558. (12) Laurent, B.A.; Grayson, S.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4238. (13) Parrish, B.; Breitenkamp, R.B.; Emrick, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7404. (14) Malkoch, M.; Vestberg, R.; Gupta, N.; Mespouille, L.; Dubois, P.; Mason, A.F.; Hedrick, J.L.; Liao, Q.; Frank, C.W.; Kingsbury, K.; Hawker, C.J. *Chem. Commun.* **2006**, 2774. (15) Altintas, O.; Hizal, G.; Tunca, U. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 1218. (16) Dirks, A.J.; Cornelissen, J.J.L.M.; van Delft, F.L.; van Hest, J.C.M.; Nolte, R.J.M.; Rowan, A.E.; Rutjes, F.P.J.T. *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 1200. (17) Lutz, J.-F.; Börner, H.G. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1. (18) Dirks, A.J.; van Berkel, S.S.; Hatzakis, N.S.; Opsteen, J.A.; van Delft, F.L.; Cornelissen, J.J.L.M.; Rowan, A.E.; van Hest, J.C.M.; Rutjes, F.P.J.T.; Nolte, R.J.M. *Chem. Commun.* **2005**, 4172. (19) Ladmiral, V.; Mantovani, G.; Clarkson, G.J.; Cauet, S.; Irwin, J.L.; Haddleton, D.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4823. (20) Wu, P.; Malkoch, M.; Hunt, J.N.; Vestberg, R.; Kaltgrad, E.; Finn, M.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B.; Hawker, C.J. *Chem. Commun.* **2005**, 5775. (21) Link, A.J.; Tirrell, D.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164. (22) Schoffelen, S.; Lambermon, M.H.L.; van Eldijk, M.B.; van Hest, J.C.M. *Bioconjugate Chem.* **2008**, DOI: 10.1021/bc800019v. (23) Opsteen, J.A.; Brinkhuis, R.P.; Teeuwen, R.L.M.; Löwik, D.W.P.M.; van Hest, J.C.M. *Chem. Commun.* **2007**, 3136. (24) van Dongen, S.F.M.; Nallani, M.; Schoffelen, S.; Cornelissen, J.J.L.M.; Nolte, R.J.M.; van Hest, J.C.M. *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, *29*, 321.

「クリック」ケミストリーによる生体材料作成に用いられる関連製品

Name	Structure	Molecular Weight (Avg. M _n)	Prod. No.
Azide-Functionalized			
Methoxypolyethylene glycol azide		2000, M _w /M _n < 1.2	689807-250MG 689807-1G
		5,000, M _w /M _n < 1.2	689475-250MG 689475-1G
Polyoxyethylene bis(azide)		2000, M _w /M _n < 1.2	689696-250MG 689696-1G
		5,000, M _w /M _n < 1.2	689580-250MG 689580-1G
O-(2-Aminoethyl)-O'-(2-azidoethyl) pentaethylene glycol		350	76172-500MG
O-(2-Aminoethyl)-O'-(2-azidoethyl) heptaethylene glycol		440	76318-500MG
O-(2-Aminoethyl)-O'-(2-azidoethyl) nonaethylene glycol		530	77787-500MG
O-(2-Azidoethyl)-O-[2-(diglycolyl-amino) ethyl]heptaethylene glycol		550	71613-500MG
O-(2-Azidoethyl)-heptaethylene glycol			689440-250MG
Polystyrene, azide terminated		2,000, M _w /M _n < 1.3	699772-500MG
Poly(methyl acrylate), azide terminated		2,000, M _w /M _n < 1.3	699764-500MG
Acetylene-Functionalized			
Poly(ehtylene glycol) methyl ether, acetylene terminated		2,000	699802-500MG
Poly(ethylene glycol), bis-acetylene terminated		2,000	699810-500MG
Polyester-8-hydroxyl-1-acetylene bis-MPA dendron		869, generation 3	686646-250MG
		1,798, generation 4	686638-250MG
		3,656, generation 5	686611-250MG
Polymersome-Forming Polymers			
Poly(styrene)- <i>block</i> -(poly(ehtylene glycol))		800–1,200 (PEG) 20,700–25,300 (PS)	686476-500MG
Poly(styrene)- <i>block</i> -poly(acrylic acid)		1,890–2,310 (PAA) 5,580–6,820 (PS)	686794-500MG

高分子末端へのアジド基とアルキン基の導入

Dr. Joost A. Opsteen

Institute for Molecules and Materials
Radboud University Nijmegen, The Netherlands

「クリック」ケミストリー、特に銅 (I) 触媒によるアジド-アルキン付加環化 (CuAAC) は、高分子化学と材料科学における強力な合成ツールです。(生体) 高分子構造工学において CuAAC が成功した理由としては、高分子ビルディングブロックの所定の位置に望みのアジド基やアルキン基を導入できるようになったことのほか、制御的重合技術が発展したことが挙げられます。

制御的重合によって構造が明確な末端基をもつ高分子を合成し、続いて、この末端基をアジドやアルキンに変換することができます。ポリ(エチレングリコール) (PEG) (**295906**) の末端の水酸基をアジドまたはアルキンに変換する例をスキーム 1 に示します。この PEG をピリジン (**676772**) と塩化トシル (TsCl) (**240877**) で処理すると、置換が容易なトシル基活性化 PEG が得られます。その後アジ化ナトリウム (NaN₃) (**438456**) と反応させるとアジド基を導入することができます。末端にアジドを有する高分子が得られます。PEG へのアルキンの導入は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDCI) (**E7750**) と 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (**522805**) の存在下でペンチン酸 (**232211**) でエステル化させて行います (スキーム 1)¹。

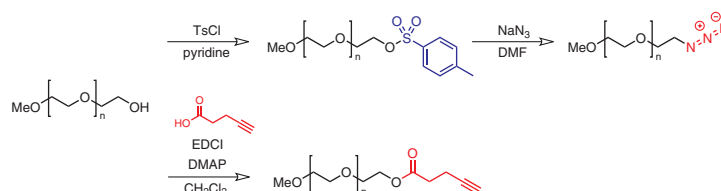
原子移動ラジカル重合 (ATRP) プロセスでは、通常、末端にハロゲン基を有する高分子が得られます。ハロゲン基は求核置換反応を受けやすいという傾向があるため、この方法を利用してさらに別の官能基を導入することができます²。たとえば (スキーム 2)、ATRP のうち、末端に臭素を有するポリスチレン (PS) をアジドトリメチルシラン (Me₃SiN₃) (**155071**) とテトラブチルアンモニウムフルオリド (TBAF) (**216143**) で処理すると、アジド基の置換を定量的に行えます^{1,3}。

重合後の末端基修飾をうまくできるかどうかは、重合時の停止反応をうまく抑制できるかに左右されます。さらに、目的の官能基の導入が不完全にならないように、末端基を定量的に操作する必要があります。重合時に副反応が起こらないのであれば、官能基を有する開始剤が、定量的に官能基を導入するうえで有用となる可能性があります。

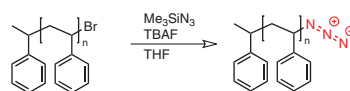
官能基を有する開始剤を使ってアルキン基を導入した例をスキーム 3 に示します。アルキン基を有する α-ブromoエステル開始剤を TIPS 保護基で保護して、ATRP 時に銅触媒と錯体形成させないようにします。アジドは「クリック」反応に利用でき、TIPS 基は重合後に取り除くことができるため、次の「クリック」反応に利用することができます⁴。

References

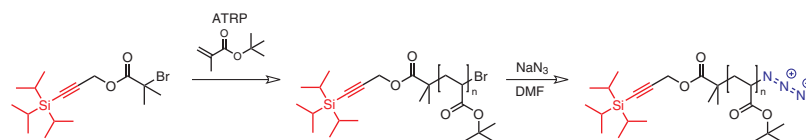
- (1) Opsteen, J.A.; van Hest, J.C.M. *Chem. Commun.* **2005**, 57. (2) Coessens, V.; Pintauer, T.; Matyjaszewski, K. *Prog. Polym. Sci.* **2001**, 26, 337. (3) Matyjaszewski, K.; Nakagawa, Y.; Gaynor, S.G. *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, 18, 1057. (4) Opsteen, J.A.; van Hest, J.C.M. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, 45, 2913.



スキーム 1. ポリ(エチレングリコール)の末端の水酸基を、アジド基またはアルキン基に変換¹。



スキーム 2. ATRPによって調製した臭素末端基をもつポリスチレンは、容易にアジドと変換できます^{1,3}。



スキーム 3. 両末端に保護されたアルキンとアジドを有するヘテロテレケリック (Hetero-telechelic) ポリ(アクリル酸 tert-ブチル)の合成⁴。

自己組織化単分子層と SAMDI-ToF 質量分析法による表面化学



Prof. Milan Mrksich
Department of Chemistry
The University of Chicago
Chicago, IL
mmrksich@uchicago.edu

現代の合成化学は、複雑な分子構造の合成を可能にし、医薬品、触媒、機能性高分子の開発には欠かせないものとなりました。化学者はもはや、目的の構造が合成できるかどうかではなく、いかに効率的に合成できるかを求めています。しかし同様の反応を表面合成に用いる場合にはかなり異なる手法が求められます。明確な構造とさまざまな官能基を有する表面を簡単に作成することができますが、界面反応の生成物の評価が難しいため、最も単純な置換を実行することさえ困難です。皮肉なことに、界面反応では後処理に反応混合物で表面を洗浄するだけなので、均一相での反応よりもはるかに簡単に実施できます。しかし、生成物、収率、反応速度の評価にかなりの困難が伴います。溶液で行う反応の場合、生成物は容易に単離・精製でき、NMR、IRや、他の分光法で確認できますが、同様の反応を2次元の界面で実行すると生成量が少ないために、上記の分析方法を用いることができません。その代わりに、得られる構造情報に制限がありますが感度の高い種々の方法を利用する必要があります¹。

本稿では、界面反応によって得られる生成物を迅速に評価できる自己組織化単分子層 (self-assembled monolayers) とマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry) とを組み合わせた「SAMDI MS」と呼ばれる手法について説明します²。自己組織化単分子層は、末端が置換されたアルカンチオール溶液中に金で被覆した基板を通常の実験室の環境で浸漬することによって容易に作成でき、合成的に柔軟であることから、表面化学にとって魅力的な方法です。この柔軟性の理由としては、さまざまな末端官能基をもつアルカンチオールを用いる成膜プロセスに使用できること、チオールの金への化学吸着がきわめて特異的であること、単分子層が熱的に安定でありさまざまな溶媒や反応物と使用できることが挙げられます³。アルカンチオールがメーカーから購入しやすくなり (本号の22ページの表参照)、大がかりな器具や設備を必要としないため、この方法は合成化学者にとって身近なものとなりつつあります。SAMDI MS技術の発展によって、最終的には自己組織化単分子層上での分子反応を評価する迅速かつ一般的な方法が確立され、分子表面化学の基礎・応用研究の大きな発展が促されることになると期待されています。

速かつ一般的な方法が確立され、分子表面化学の基礎・応用研究の大きな発展が促されることになると期待されています。

レーザー脱離質量分析法を使って自己組織化単分子層を評価した最初の例はHemminger、FritschとWilkins、Hanleyの研究室によるものでした⁴⁻⁶。FritschとWilkinsは、たとえば、308 nmのレーザーを使って単分子層を脱着させ、アルカンチオールの酸化で生じるアルカンスルホナートを観察することに成功しました。当時は、市販のレーザー脱離質量分析装置が少なく、単分子層上の界面反応の例も少なかったため、この方法はあまり普及しませんでした。数年後、われわれは、界面反応を評価する難しさに直面した際に、幅広い種類の官能基を導入した自己組織化単分子層に対して市販のマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析装置を適用できることを見出しました⁷。通常の実験では、SAMDI MSに用いる一般的なマトリックス分子の溶液を単分子層に塗布して乾燥させます。単分子層に窒素レーザーを照射すると、アルカンチオール (または類似のジスルフィド) が金基板から効率的に遊離して、この分子の質量が分かります (図1)。最初の例では、この方法を利用して、単分子層に結合したマレイミド基へのペンタメチルシクロペンタジエンの付加環化、アミドの形成、*tert*-ブチルエステルの脱保護を評価しました。いずれの場合も、SAMDIスペクトルは、反応前と反応後の置換されたアルカンチオールまたはそのジスルフィドに帰属されるピークを示しました。SAMDIは、アルカンチオール中に存在する官能基の特性ではなく、アルカンチオールの全質量に関する情報を提供するという点において、他の分光法では得られない情報が得られます。またSAMDIは、サンプルの分析にかかる時間が10分未満と、スペクトルを迅速に入手できるため、反応収率の評価や予想される生成物の存在の確認に有用です。

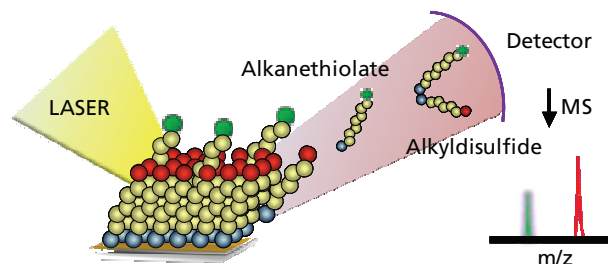


図1. SAMDI MSと呼ばれる手法でマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析を利用すると自己組織化単分子層を評価することができます。窒素レーザーを利用して単分子層を脱離させるとアルカンチオールとそのジスルフィド分子が生じます。質量分析計からは、この分子の質量電荷比が得られ、生成物、収率、界面反応の速度に関する情報が入手できます。

この初期の報告以来、SAMDIは、単分子層の電気化学反応の生成物の評価⁸、コンビナトリアル法による反応の探索⁹、酵素を介する多数の変換反応の例¹⁰⁻¹³をはじめとするさまざまな用途に利用されています。以下に説明する3つの例で、自己組織化単分子層上の界面反応の生成物を評価し、官能基を導入した表面を用いた様々な研究を可能にするSAMDIのユニークな特徴をご紹介します。

最初の例では、末端にアルキン基を有する単分子層の反応を扱います。塩基促進による末端の水素原子を重水素原子に交換する反応は単純ですが、単分子層で行う場合は評価が極めて困難です。末端がアルキン基の単分子層と末端がメチル基の単分子層との混合物から成る単分子層のSAMDIスペクトルは、混合した対称的なジスルフィドに対応するピークを示しました。この単分子層を水酸化ナトリウムで処理したのち重水で処理すると、末端の水素原子を交換することができました。これは、ジスルフィドの質量がそれぞれ1ドルトンと2ドルトン増加したことにより確認できます(図2)。この例から、質量分析法を界面反応の評価に簡単に応用できることと、この方法が優れた質量分解能を持つことが分かります。また、この方法を用いて、アルキンを水和するとメチルケトンが生じ、菌頭カップリングを行うとフェニルアセチレンが生じることも実証できました。

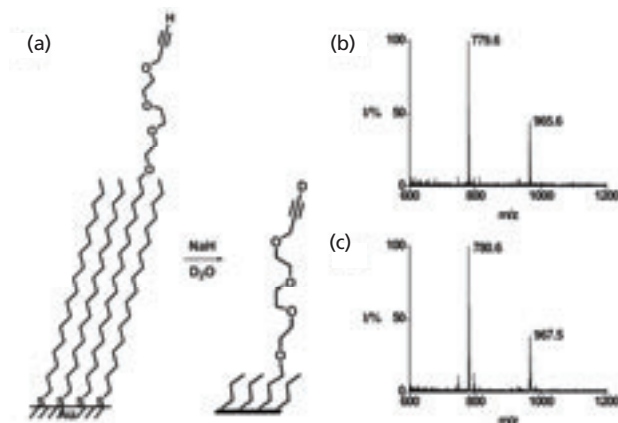


図2. SAMDI MSを使って、末端アルキンの水素が重水素に交換されたかを確認しました。反応前のマスペクトルはm/z 779.6でピークを示し、反応後は780.6にシフトしています。ジスルフィドのピークでは、予想されたとおり、質量が2ドルトン増加していることが分かります。

2番目の例は、自己組織化単分子層の構造を構築するための多段階合成反応の開発です。単分子層は「バイオチップ」用途によく用いられます。ペプチド、炭水化物または低分子が並ぶバイオチップの表面は、酵素の基質やタンパク質のリガンドを特定するために利用されます¹⁴。この用途では、多くの場合、単分子層に結合させる分子を既存の方法で最初に合成したのちに、適切な結合反応を使ってこれを単分子層に固定化します。オリゴ糖など特定の分子の場合は、調製に必要な時間と費用のために、作製できるアレイのサイズが限定されます。

ペプチドアレイやオリゴヌクレオチドアレイに関する初期の研究では、基板上に直接分子を合成することによって、数百から数千もの一連の生体分子を迅速かつ効率的に表面に作製する方法が利用されました¹⁵。この例では、アレイ合成に用いる一連の界面反応の開発と最適化を行うのにかなりの取り組みがなされ、なかでも最も大きな課題はその界面反応の生成物と収率を評価することでした。最近われわれはSAMDIを利用し、単分子層で直接多段階合成を行ってオリゴ糖アレイを調製する方法を開発しました¹⁶。

オリゴ糖アレイの合成に用いた方法を図3に示します。これは末端にトリ(エチレングリコール)を持つアルカンチオラートのバックグラウンドに対して5%の密度でフェノール基が存在する単分子層から出発します。前者は炭水化物ビルディングブロックを結合するための求核剤になります。後者は非特異的なタンパク質の吸着を効果的に防ぐため、そしてその後の固定化したオリゴ糖の生化学的アッセイに重要です¹⁷。その後の工程で選択的に脱保護できるように4番目の水酸基がレブリン酸エステルとして保護されているトリアセチル化された単糖類をトリクロロアセトイミド酸エステルに変換したのちに、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリルで活性化してフェノール基とカップリングさせました。この単分子層をヒドラジンで処理してレブリン酸エステル基を除去したのちに、もうひとつの単糖類で処理することで完全に保護された二糖類を得ました。ナトリウムメトキシドで処理するとアセチル基が除去され、固定化された二糖類が得られました。SAMDIスペクトルから、各段階が高収率で進行して予想された生成物が得られていることがわかりました(図3)。この一連の処理を24種類の異なる二糖類アレイの調製に適用しました。この作成は6時間未満で完了し、その後グリコシルトランスフェラーゼの基質特異性の解析に利用しました。このように、質量分析法は酵素反応の生成物を直接同定するうえで有用であると言えます。

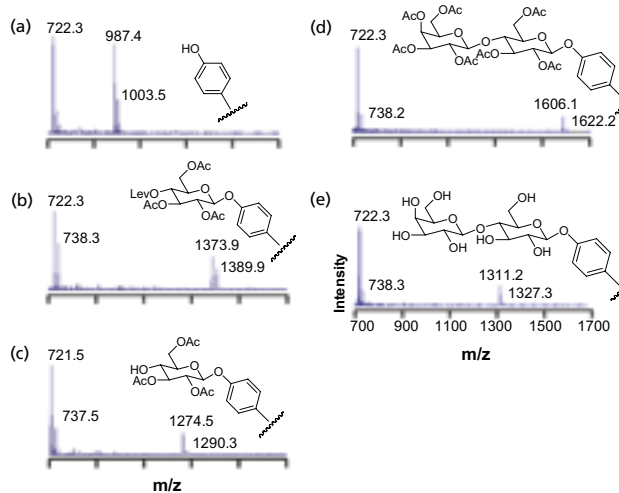


図3. 基板の単分子層上に二糖類を合成する各段階後における表面のSAMDI MSスペクトル。(a) フェノール基を有する単分子層；(b) 最初の単糖類のカップリング；(c) 保護基のレブリン酸エステルの選択的除去；(d) 2番目の単糖類のカップリング；(e) 最後の脱保護。

3番目の例では、DNAオリゴヌクレオチドの反応を扱います。現在、幾万もの異なる配列を含むDNAアレイが培養細胞の遺伝子発現パターンの解析に一般的に用いられており、最近ではタンパク質とDNAとの結合相互作用を特定するために用いられています¹⁸。このアレイは結合相互作用を検出するために蛍光標識が使用されているため、反応性の低分子化合物でDNAを処理して得られる共有結合付加物などの化学反応性を調べる研究には適用できません。SAMDIを利用して固定化したDNAの反応を評価するには、まず、トリ(エチレングリコール)基のバッググラウンドに対して5%の密度でマレイミド基が存在する単分子層を用意します¹⁹。DNAを結合させるため、末端にビオチンを有するアルカンチオールを最初に固定化したのちに、タンパク質のストレプトアビジンを結合させた表面を作製、ビオチン標識二本鎖オリゴヌクレオチドを捕捉しました。この一連の二本鎖を抗癌剤であるシスプラチンで処理し、その反応によって形成される一付加物や二付加物をSAMDIによって同定しました(図4)。SAMDI法の柔軟性とDNAアレイの確立された方法によって、アレイを用いる応用分野が大きく広がる可能性があります。

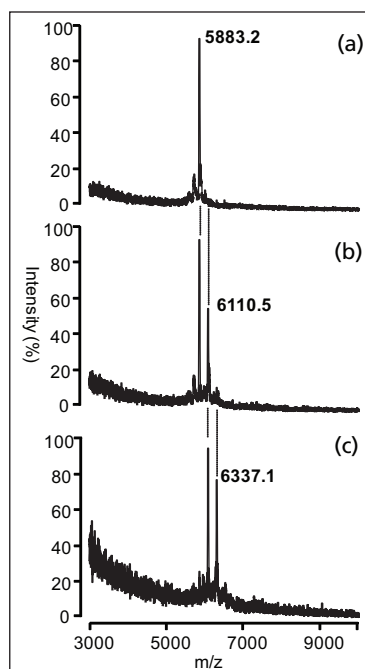


図4. ビオチン化された二本鎖DNA(5'-ビオチン-TTT TAT ATA CGT ATA TCG)とシスプラチン($cis\text{-[Pt(NH}_2\text{)}_2\text{Cl}_2\text{]}$)との反応生成物のSAMDI MSスペクトル。反応時間: 0時間(A)、4時間(B)、21時間(C)。

以上の例から、自己組織化単分子層の界面反応の生成物と収率を迅速に評価できるSAMDIの有用性がわかりいただけたと思います。合成量の多い分子ならNMR法やX線回折法で分析できますが、表面に結合した分子の構造に関する総合的な情報を提供できる方法やその組み合わせは未だにありません。現在、表面化学の研究では界面構造を把握するために(多くの場合は不完全ですが)、官能基を同定する赤外分光法、元素組成を決定するX線光電子分光法、単分子層の膜厚を測定する偏光解析法(ellipsometry)などのいくつかの方法を組み合わせ利用しています。SAMDIは、アルカンチオールを用いることでこれらの方法を補足し、他の方法では得られない分子の情報をもたらします。重要な点は、この方法が簡単に使用できること、単分子層上での様々な化学反応の開発・実行に利用できる情報が得られることです。この利点により、将来、様々な分野の基礎・応用研究に利用可能な複雑な構造を有する表面を開発できることでしょう。

References

- (1) Chechik, V., Crooks, R.M., Stirling, C.J.M., *Adv. Mater.*, **2000**, 12, 1161.
- (2) Mrksich, M., *ACS Nano*, **2008**, 2, 7. (3) Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G., Whitesides, G.M., *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1103. (4) Li, Y., Huang, J., McIver, R.T., Hemminger, J.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 2428. (5) Scott, J.R., Baker, L.S., Everett, W.R., Wilkins, C.L., Fritsch, I., *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 2636. (6) Trevoer, J.L., Lykke, K.R., Pellin, M.J., Hanley, L., *Langmuir*, **1998**, 14, 1664. (7) Su, J., Mrksich, M., *Langmuir*, **2003**, 19, 4867. (8) Yeo, W.-S., Mrksich, M., *Adv. Mat.*, **2004**, 16, 1352. (9) Li, J., Thiara, P.S., Mrksich, M., *Langmuir*, **2007**, 23, 11826. (10) Min, D.-H., Su, J., Mrksich, M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 5973.
- (11) Min, D.-H., Tang, W.-J., Mrksich, M., *Nature Biotechnology*, **2004**, 22, 717. (12) Patrie, S.M., Mrksich, M., *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 5878.
- (13) Gurard-Levin, Z., Mrksich, M., *Biochemistry*, **2008**, 47, 6242.
- (14) Gurard-Levin, Z., Mrksich, M., *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2008**, in press.
- (15) Fodor, S.P., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T., Solas, D., *Science*, **1991**, 251, 767. (16) Ban, L., Mrksich, M., *Angew. Chem.*, **2008**, 47, 3396. (17) Mrksich, M., Whitesides, G.M., *Am. Chem. Soc. Sym. Ser. on Chemistry and Biological Applications of Polyethylene Glycol*, **1997**, 680, 361. (18) Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T.L., Wilson, C.J., Bell, S.P., Young, R.A., *Science* **2000**, 290, 2306. (19) Tsubery, H., Mrksich, M., *Langmuir*, **2008**, 24, 5433.

金表面用の分子自己組織化材料

金表面での機能性自己組織化単分子層 (SAMs) の作製に用いられるチオール化合物をご紹介します。自己組織化材料の全製品リストについては sigma-aldrich.co.jp/aldrich/micronano をご覧ください。

Chain Length	Name	Purity	Structure	Prod. No.
10	1-Decanethiol	96%	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{SH}$	D1602-50ML
	11-Mercaptoundecanoic acid	99%	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{SH}$	674427-500MG
	11-Mercaptoundecanoic acid	95%	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{SH}$	450561-5G 450561-25G
	NanoThinks™ ACID11	Ethanol solution	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{SH}$	662925-100ML
	1H,1H,2H,2H-Perfluorodecanethiol	97%	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$	660493-5G 660493-25G
11	11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride	99%	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$	674397-50MG
	11-Mercapto-1-undecanol	99%	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OH}$	674249-250MG
	11-Mercapto-1-undecanol	97%	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OH}$	447528-1G 447528-5G
	11-Mercaptoundecyl trifluoroacetate	99%	$\text{F}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{SH}$	674230-50MG
	NanoThinks™ ALCO11	Ethanol solution	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OH}$	662224-100ML
	1-Undecanethiol	98%	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{SH}$	510467-5G
12	1-Dodecanethiol	≥98%	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{SH}$	471364-100ML 471364-500ML 471364-2L 471364-18L
	<i>tert</i> -Dodecylmercaptan	98.50%	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}-\text{SH}$	471585-100ML 471585-2L
	12-Mercaptododecanoic acid	96%	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	675067-1G
	4-(6-Mercaptohexyloxy)benzyl alcohol	97%	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{OH}$	673560-50MG
14	15-Mercaptopentadecanoic acid	97%	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	675091-5G
	1-Tetradecanethiol purum	≥98.0%	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2\text{SH}$	87193-5ML 87193-25ML
15	16-Mercaptohexadecanoic acid	99%	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{SH}$	674435-250MG
	16-Mercaptohexadecanoic acid	90%	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{SH}$	448303-1G 448303-5G
	NanoThinks™ ACID16	Ethanol solution	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{SH}$	662216-100ML
	1-Pentadecanethiol	98%	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{SH}$	516295-1G
16	1-Hexadecanethiol	99%	$\text{HS}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$	674516-500MG
18	NanoThinks™ 18	Ethanol solution	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_2\text{SH}$	662194-100ML
	1-Octadecanethiol	98%	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_2\text{SH}$	01858-25ML 01858-100ML

Chain Length	Name	Purity	Structure	Prod. No.
20	Triethylene glycol mono-11-mercaptoundecyl ether	95%	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	673110-250MG
23	[1-(Methylcarbonylthio)undec-11-yl] tetra(ethylene glycol)	95%	$\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{SCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	674176-250MG
24	(1-Mercaptoundec-11-yl) tetra(ethylene glycol)	95%	$\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	674508-250MG
29	(1-Mercaptoundec-11-yl) hexa(ethylene glycol)	96%	$\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{SH}$	675105-250MG

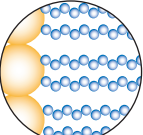
日本国内での価格と在庫状況をご覧になるには

- 1) まず **sigma-aldrich.com** にアクセスして下さい。
- 2) 左上の「My Profile」をクリックして ① Web language = Japanese、② MSDS language = English、③ Country = Japan の3つを選択し、Submit して下さい。
- 3) Top ページ等の右上にある **Product Name or No.** で検索して下さい。

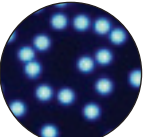


Convergence of Life Science & Materials Science Products and Expertise to Create:

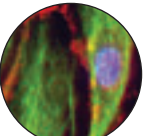
Lipids



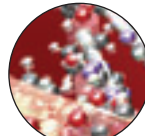
Microparticles



Fluorescent Labels

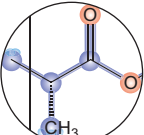


Biomaterials

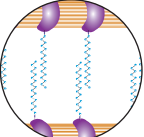


Peptides, Custom DNA Synthesis
and More

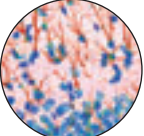
Polymers



Structural Proteins



Cell Culture



生体材料に関する情報は sigma-aldrich.co.jp/aldrich/polymer まで



バルク供給／スケールアップのご相談は...

ファインケミカル事業部 Tel:03-5796-7340 Fax:03-5796-7345 E-mail:safcjp@sial.com

リン酸カルシウムセラミックスを基盤とする骨組織再生工学

Prof. Daniel Huster¹ and Dr. Mathias Pretzsch²

¹Institute of Medical Physics and Biophysics and ²Department of Orthopedics, University of Leipzig, Leipzig, Germany
husd@medizin.uni-leipzig.de

骨は、弾性と安定性という優れた性質を併せ持つ複合材料です。この組織は、細胞外の無機物（約50～60 wt. %）と有機物（約30～40 wt. %）、水（約10 wt. %）、種々の細胞型で構成されています。この細胞外マトリックス（ECM：extracellular matrix）は骨芽細胞と呼ばれる細胞から産生され、その大部分がバイオアパタイトとコラーゲンで構成されています。骨塩は、約4～8%の CO_3^{2-} を含むヒドロキシアパタイト（HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ）とほかの微量元素で構成される炭酸アパタイトです。骨組織の最も多い成分はI型コラーゲンです。血小板様のバイオアパタイト結晶がコラーゲン繊維に沿って配列をなしています。ほかの組織のコラーゲンではこの部分に水が存在します（図1）。

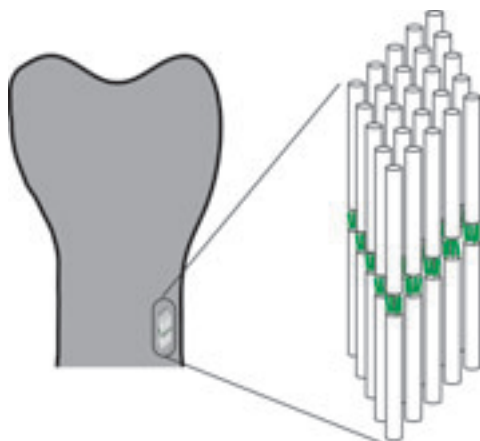


図1. ミネラルを含むコラーゲン繊維の模式図。三重らせんから成るコラーゲン（白の円柱）の接続部に結晶性の骨塩（緑）が組み込まれています。

骨は基本的に優れた自然治癒能を有しています。しかし、ある特定の大きさを超える欠損（「臨界サイズ欠損」）を来すと、骨損傷の自然治癒は不可能になります。このような欠損は、変形性関節症、骨嚢胞、骨腫瘍などのさまざまな疾患によって起こるほか、人工器官の緩みや骨切り術に伴う骨溶解など、手術療法が原因となって起こるおそれがあります。骨欠損治療における一番良い方法は自己骨移植ですが、この方法のデメリットは腸骨稜からの骨採取のほか、再手術を要することであり、これは重い併存疾患につながります¹。入手できる天然骨は限られており、多くの場合、広範な骨欠損の治療には不十分です。その一方で、大規模な骨バンクの維持には長期間の組織保存の問題によって経費がかさみ、様々な込

み入った問題が伴います。この困難を克服するため、合成または部分合成の骨代用材料が数多く開発されています。骨組織の無機成分は大部分がHAで構成されているため、臨床で最も重要な材料はHAセラミックスです。使用されている材料としては、通常サンゴから得られるHA²、ガラス繊維強化HA³、ブラッシュ（Brushite）⁴、リン酸三カルシウム⁵、これらの材料の混合物（複合材料）⁶などが挙げられます。適正な骨結合には細孔系を相互接続する必要があるため、セラミックスの構造は極めて重要となります⁷。純粋なHAセラミックスでは再吸収や骨による置換（完全治癒）は起こりません。しかし、HAとリン酸三カルシウム（TCP）を材料とするバイオセラミックスでは高い吸収を示します⁸。

小さな欠損を治癒できる高い生理活性を有する骨代用材料は数多くありますが、大きな損傷の治療に必要な骨ECMの形成を促すことは未だ困難です。このECM再生、すなわち骨誘導作用は、インプラントに間葉系幹細胞（MSCs）を導入すると実現できます¹⁰。MSCsは腸骨稜から容易に採取できるほか、複製能力が高く（最大40倍）、凍結保存が可能であり、欠損部に新たな組織を構築できることから再生医療に適しています¹¹。数多くの動物^{12,13}やヒト¹⁴のin vivo試験では、MSCsを導入したHAインプラントを用いると臨界サイズ欠損の治療効果の向上が観察されています。しかし、信頼性の高い再生骨医療のためには、HAインプラントの緩徐な分解¹⁵、最適なMSCsとインプラント材料の選択のほか、外科手術、患者の管理といったことが必要であるため、依然として大きな課題となっています。

適切な条件下でさまざまなインプラント材料中の骨ECMの形成をモニターするには定量的な解析ツールを開発する必要があります。われわれは固体NMR分光法（磁場17.6 T）を使って骨インプラント中のECMの形成を測定しました。具体的には、MSCsから分化させた骨細胞を β -TCP（ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ）セラミックスに導入し、モデル動物であるウサギの大腿顆（膝関節）の臨界サイズの欠損を治療しました¹⁶。骨髓穿刺液からMSCsを分離して培養して、骨細胞に分化させ、最大7日間かけて多孔性の β -TCPの円柱（6 mm × 10 mm）にこのMSCsを導入しました。ウサギ骨（大腿骨遠位顆の骨幹端）に6 mmの穴を開けて、この円柱を埋植したのち、3ヵ月後に屠殺して骨インプラントを取り除き、解析を行いました。

通常、固体材料のNMRスペクトルは、幅の広い異方性の形を示す特徴があります。しかし、マジック角回転（MAS：magic angle spinning）により、化学シフトに対するこの異方性の寄与が平均化され、幅の狭いセンターバンドと多数のスピンングサイドバンドにスペクトル強度が集約されます。そして、NMRスペクトルのセンターバンドは、等方化学シフトに応じて特徴的なシグナルに分離されます。このスペクトルで観察される核種によっては、新たに形成された骨ECMの有機成分と無機成分を検出できる可能性があります。図2は、(a) ウサギの骨、(b) 純粋な β -TCP、(c) 埋植3ヵ月後に取り除いたウサギのインプラントの³¹P NMRスペクトルを示しています。ウサギの骨とTCPのNMRスペクトルは、それぞれ1本と2本のラインで構成されています。ウサギのインプラントの³¹P NMRシグナルは、ウサギ骨のバイオアパタイトと β -TCPマトリックス材料のシグナルとを重ね合わせたも

のと説明できます。このスペクトルから、埋植3ヵ月後は(i)インプラント中に特徴的な炭酸バイオアパタイトミネラルが合成されていること、(ii)β-TCPマトリックス材料は完全には吸収されていないことが分かります。

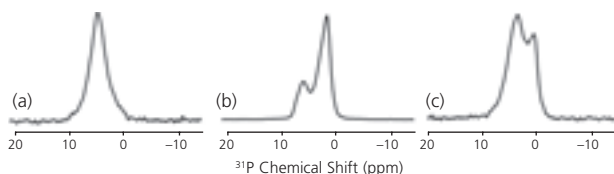


図2. (a) ウサギの骨 (b) 純粋なβ-TCP、(c) 埋植3ヵ月後に取り除いたウサギのインプラントの161.9 MHz 固体³¹P MAS NMRスペクトル。スペクトル(a)と(b)を49:51の比で重ね合わせるとスペクトル(c)を再現することができます。このNMR実験は、4 mm MASローター中、37℃、MAS周波数8 kHzでHahnエコーパルスシーケンスを用いて行いました。1.9マイクロ秒90°パルス、緩和時間400秒でスペクトルを取得しました。

以下の必要条件を満たしていれば、固体NMRの結果からインプラント材料の成分を定量することができます。第一に、シングルパルス励起実験と同様に、すべての³¹P核がいずれも等しく分極されている必要があります。第二に、シグナルの化学シフトの異方性が類似している必要があります、そうでない場合は全サイドバンドの強度を分析の対象とする必要があります。第三に、分子種のスピン格子緩和時間は実験の繰り返し時間の1/5未満である必要があります。この条件下であれば、インプラントのスペクトルが49:51の比でウサギの骨とβ-TCPのスペクトルを重ねた形に変化すると考えられます。

骨インプラントの³¹P NMRスペクトルからアパタイトの寄与を取り除くことができます。骨のアパタイトには水酸基が含まれているため、交差分極(CP: cross-polarization)法で³¹P NMRスペクトルを取得することができます。この場合、最初に1H核を分極させたのちに、この分極を³¹Pに移します。1H核が存在しないため、β-TCPの³¹P CP MASスペクトルは得られず、ウサギインプラントの³¹P CP MASスペクトルは1本の線のみで構成されます。一方、そのまま分極させた同じインプラントの³¹P NMRスペクトルでは、β-TCPのNMRスペクトルとウサギの骨のNMRスペクトルが重なってしまいます(図3)。上記の理由から、インプラント中に新たに形成された無機物の骨ECMが、水酸基を含むバイオアパタイトであることが実証されると考えられます。

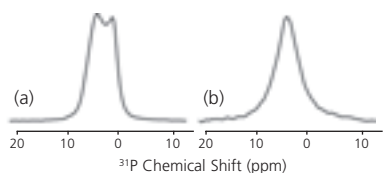


図3. 埋植3ヵ月後にウサギの大腿骨から取り除いたβ-TCPインプラントの161.9 MHz ³¹P MAS NMRスペクトル。スペクトル(a)はシングル90°パルスを使ってそのまま分極させましたが、スペクトル(b)は、1408マイクロ秒の接触時間で交差分極を行いました。いずれのスペクトルも37℃で測定しました。

骨ECMの無機物の寄与に加えて、固体NMRでは¹³C NMRを用いてインプラント中の有機成分を検出することもできます。β-TCPには¹³Cがないため、¹³C NMRスペクトルが得られません(スペクトルは未掲載)。しかし、埋植3ヵ月後に回収したウサギの骨のインプラントでは、タンパク質のアミ

ノ酸に由来する特徴的なシグナルを示す¹³C CP MAS NMRスペクトルが得られました(図4)。比較のため、ウサギの骨のNMRスペクトルとI型コラーゲンのスペクトルを示します。明らかに、3つのNMRスペクトルは互いによく対応しており、インプラントの¹³C NMRスペクトルは明らかに有機物のコラーゲン成分によることを示しています。¹³C NMRスペクトルのシグナルの等方性化学シフトに基づいて、I型コラーゲンの中で最も豊富なアミノ酸(グリシン、アラニン、プロリン、ヒドロキシプロリン、グルタミン酸)を同定することができます。骨インプラントのNMRスペクトルがコラーゲンのものであることを裏づける極めて重要なピークは、71.1 ppmのHyPro Cγピークです。通常のアミノ酸の脂肪族¹³C NMRシグナルがこの位置に現れないため、インプラント中の骨芽細胞がI型コラーゲンを合成したことがわかります。さらに、インプラント、天然のウサギ骨、単離したI型コラーゲンのスペクトルのピークは等方性化学シフトが同じであり、等方性化学シフトはタンパク質の二次構造のきわめて高感度なマーカーであることから、β-TCPインプラントに生じたコラーゲンの構造には変化がないことが分かります。

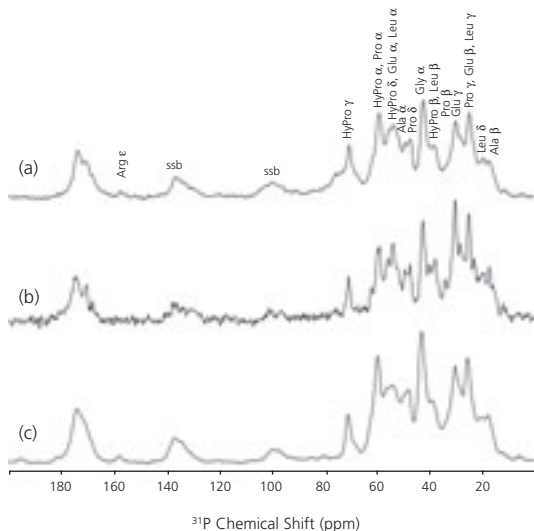


図4. (a) 天然のウサギ骨、(b) 埋植3ヵ月後にウサギの大腿骨から取り除いたβ-TCPインプラント、(c) 単離したI型コラーゲンの1Hデカップリング188.5 MHz ¹³C CP MAS NMRスペクトル。スペクトルは37℃、MAS周波数7 kHzで記録しました。ピークの同定は文献17,18から転載しました。

以上をまとめると、MSCsを導入した無機セラミックスのインプラント中には水酸化アパタイトとコラーゲンが生成されたことがわかりました。インプラント内部の無機ECMの形成を³¹P NMRで分析すると、骨塩の形成を定量することができます。コラーゲンを¹³C NMRで分析すると、分子に固有のピークとそのダイナミックな性質がわかりました。この結果は、固体NMRが骨ECMの形成を定量的にモニターするうえで有用な分析ツールであることを示唆しています。この方法は、適切な足場材料の選択、その材料の表面改質、適切な増殖条件など、骨組織工学が直面している課題を解決するのに利用できます。現在、骨組織再生工学への要求は高まりつつあり、固体NMR分光法によってインプラント材料中の骨合成を原子レベルで定量的に分析できれば、現在の手法によって大きなメリットとなると考えられます。

謝辞

本研究はドイツ学術振興会(HU 720/7-1)の支援を受けています。

バルク供給/スケールアップのご相談は…

ファインケミカル事業部 Tel:03-5796-7340 Fax:03-5796-7345 E-mail:safcjp@sial.com

References:

(1) Arrington, E. D.; Smith, W. J.; Chambers, H. G.; Bucknell, A. L.; Davino, N. A. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1996**, 300. (2) Okumura, M.; Ohgushi, H.; Dohi, Y.; Katuda, T.; Tamai, S.; Koerten, H. K.; Tabata, S. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 37, 122. (3) Lopes, M. A.; Santos, J. D.; Monteiro, F. J.; Ohtsuki, C.; Osaka, A.; Kaneko, S.; Inoue, H. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 54, 463. (4) Penel, G.; Leroy, N.; Van, L. P.; Flautre, B.; Hardouin, P.; Lemaire, J.; Leroy, G. *Bone* **1999**, 25, 815. (5) Wang, J.; Chen, W.; Li, Y.; Fan, S.; Weng, J.; Zhang, X. *Biomaterials* **1998**, 19, 1387. (6) Beychok, S. *Science* **1966**, 154, 1288. (7) Tamai, N.; Myoui, A.; Tomita, T.; Nakase, T.; Tanaka, J.; Ochi, T.; Yoshikawa, H. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 59, 110. (8) Mastrogiacomo, M.; Muraglia, A.; Komlev, V.; Peyrin, F.; Rustichelli, F.; Crovace, A.; Cancedda, R. *Orthod. Craniofac. Res.* **2005**, 8, 277. (9) Yoshikawa, H.; Myoui, A. *J. Artif. Organs* **2005**, 8, 131.

(10) Bruder, S. P.; Jaiswal, N.; Haynesworth, S. E. *J. Cell Biochem.* **1997**, 64, 278. (11) Stenderup, K.; Justesen, J.; Clausen, C.; Kassem, M. *Bone* **2003**, 33, 919. (12) Bruder, S. P.; Kraus, K. H.; Goldberg, V. M.; Kadiyala, S. *J. Bone Joint Surg. Am.* **1998**, 80, 985. (13) Petite, H.; Viateau, V.; Bensaid, W.; Meunier, A.; de, Pollack, C.; Bourguignon, M.; Oudina, K.; Sedel, L.; Guillemin, G. *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 959. (14) Quarto, R.; Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Kutevov, S. M.; Mukhachev, V.; Lavroukov, A.; Kon, E.; Marcacci, M. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 385. (15) Mistry, A. S.; Mikos, A. G. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2005**, 94:1–22, 1. (16) Schulz, J.; Pretzsch, M.; Khalaf, I.; Deiwick, A.; Scheidt, H. A.; von Salis-Soglio, G.; Bader, A.; Huster, D. *Calcif. Tissue Int.* **2007**, 80, 275. (17) Aliev, A. E. *Biopolymers* **2005**, 77, 230. (18) Forbes, J.; Bowers, J.; Shan, X.; Moran, L.; Oldfield, E.; Moscarello, M. A. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1988**, 84, 3821.

生体適合性セラミックス

以下の表は、骨組織工学、歯科材料などの生体材料・生物医学研究に一般的に利用されているセラミック粒子材料の一部を示したものです。

セラミックスの全製品リストについては sigma-aldrich.co.jp/aldrich/ceramic をご覧ください。

金属ナノ粒子の全製品リストについては sigma-aldrich.co.jp/aldrich/nano をご覧ください。

Name	Physical Form	Particle Size	“Powder Purity/ Dispersion Concentration”	Prod. No.
Aluminum oxide				
(alumina, Al ₂ O ₃)	Powder	–100 mesh	99.9%	319767-25G
				319767-100G
		10 μm (average)	99.7%	265497-25G
				265497-500G
				265497-2.5KG
	Nanopowder	< 50 nm (BET)		544833-10G
				544833-50G
	Dispersion	< 50 nm (BET)	10 wt.% in H ₂ O, pH 5–7	642991-100ML
10 wt.% in isopropanol			702129-100G	
				702129-500G
Zirconium (IV) oxide				
(zirconia, ZrO ₂)	Powder	5 mm	99%	230693-100G
				230693-500G
				230693-2KG
	Nanopowder	< 100 nm (BET)		544760-5G
				544760-25G
	Dispersion	< 100 nm (BET)	10 wt.% in H ₂ O	643025-100ML
Calcium Phosphate Ceramics				
Hydroxyapatite (Ca ₅ (OH)(PO ₄) ₃), synthetic	Powder		99.999%	574791-5G
				574791-15G
	Suspension		~ 25 wt.% in 1mM phosphate buffer, pH 6.8	H0252-10G
				H0252-25G
				H0252-65G
				H0252-250G
	Nanopowder	< 200 nm (BET)	≥97%	677418-5G
				677418-10G
Nanopowder, 5% silica doped	< 200 nm (BET)		693863-5G	
Dispersion	< 200 nm (BET)	10 wt.% in H ₂ O	702153-25ML	
Calcium phosphate (Ca ₂ O ₇ P ₂), amorphous	Nanopowder	< 100 nm (BET)		693871-5G
β-Tricalcium phosphate (Ca ₃ O ₈ P ₂)	Powder (unsintered)		≥98%	13204-10G
				13204-100G
	Powder (sintered)		≥98%	49963-10G
				49963-100G
Tricalcium phosphate hydrate (Cα ₃ (PO ₄) ₂ •xH ₂ O)	Nanopowder	< 200 nm (BET)		693898-5G

生体適合性金属：チタン

チタン (Ti) は、生体材料研究に最も一般的に利用されている金属です。金属チタンは様々な整形外科インプラントに使用されていることから、骨組織工学実験では金属チタンのホイル、メッシュ、ワイヤが細胞培養担体としてよく使用されます。以下の表はチタン製品の一部を示したものです。全製品リストについては sigma-aldrich.co.jp/aldrich/ceramic をご覧ください。

Physical Form	Dimensions	Purity	Quantity Equivalency	Prod. No.
Crystalline				
	5–10 mm (chunks)	99.99+ %	–	305812-25G
			–	305812-100G
Foil				
	thickness 2.0 mm	99.7%	90 g = 100 x 100 mm	369489-90G
			200 g = 150 x 150 mm	369489-200G
	thickness 0.5 mm	99.99%	1.4 g = 25 x 25 mm	34805-1.4G
			5.6 g = 50 x 50 mm	34805-5.6G
	thickness 0.25 mm	99.99%	700 mg = 25 x 25 mm	267481-700MG
	thickness 0.25 mm	99.7%	25.2 g = 150 x 150 mm	267503-25.2G
	thickness 0.127 mm	99.99+%	1.5 g = 50 x 50 mm	460397-1.5G
	thickness 0.127 mm	99.7%	13 g = 150 x 150 mm	348791-13G
	thickness 0.1 mm	99.99%	280 mg = 25 x 25 mm	348813-280MG
			1.1 g = 50 x 50 mm	348813-1.1G
	thickness 0.25 mm	99.98%	280 mg = 50 x 50 mm	348848-280MG
			1.1 g = 100 x 100 mm	348848-1.1G
Wire				
	diameter 2.0 mm	99.99%	1.4 g = 10 cm	348856-1.4G
			7 g = 50 cm	348856-7G
	diameter 1.0 mm	99.99%	3.5 g = 100 cm	266035-3.5G
	diameter 0.81 mm	99.7%	23 g = 10 m	267902-23G
	diameter 0.5 mm	99.99%	2.7 g = 300 cm	348864-2.7G
Rod				
	diameter 6.35 mm	99.99%	7.2 g = 50 mm	347132-7.2G
	diameter 6.35 mm	99.7%	25 g = 16.7 cm	266051-25G
Sponge				
	2–12 mm	99.5%	–	268526-250G
				268526-1KG

日本国内での価格と在庫状況をご覧になるには

- 1) まず sigma-aldrich.com にアクセスして下さい。
- 2) 左上の「My Profile」をクリックして ① Web language = Japanese、② MSDS language = English、③ Country = Japan の3つを選択し、Submit して下さい。
- 3) Top ページ等の右上にある **Product Name or No.** で検索して下さい。

バルク供給／スケールアップのご相談は...

ファインケミカル事業部 Tel:03-5796-7340 Fax:03-5796-7345 E-mail:safcjp@sial.com

材料科学研究でお困りのことはございませんか？

Material Matters™

Aldrich 材料科学分野の季刊テクニカルニュースレターです。

最新のトピックス、第一線研究者によるレビュー
アプリケーションノートなどをご紹介します

既刊特集内容(カッコ内は号数)

- ナノ材料の応用最前線 (2-1)
- 水素貯蔵材料 (2-2)
- 有機エレクトロニクス (2-3)
- 先端金属および合金 (2-4)
- 3次元ナノおよびマイクロ構造 (3-1)
- ナノ規模表面改質 (3-2)
- 生体材料 (3-3)



定期的にお送りいたします！ 新規登録募集中！

お申込は、以下の URL をご利用ください。 <http://www.sigma-aldrich.co.jp/aldrich/mscatalog>

または、 sialjp@sial.com へ「Material Matters 定期送付希望」と明記の上ご連絡ください。

本カタログに掲載の製品及び情報は、2008年12月1日現在の内容であり、掲載の品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございますので、予めご了承ください。製品のご注文に際し、価格、在庫は弊社カスタマーサービスにお問合せください。また、弊社本国サイト(sigma-aldrich.com)上の製品検索でも価格と在庫状況をご確認いただけます。なお、掲載価格には消費税は含まれておりません。弊社の試薬は試験研究用のみとして販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究用以外の用途には使用できません。

SIGMA-ALDRICH®

シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社

〒140-0002 東京都品川区東品川2-2-24 天王洲セントラルタワー4F

製品に関するお問い合わせは、弊社テクニカルサポートへ

TEL: 03-5796-7330 FAX: 03-5796-7335

E-mail: sialjpts@sial.com

在庫照会・ご注文方法に関するお問い合わせは、弊社カスタマーサービスへ

TEL: 03-5796-7320 FAX: 03-5796-7325

<http://www.sigma-aldrich.com/japan>

お問い合わせは下記代理店へ