

千葉工業大学

博士学位論文

光反応性基を結合した糖誘導体の合成と
生体材料への応用に関する研究

平成 29 年 3 月

矢野 慎也

要 旨

光反応性基を結合した糖誘導体の合成と生体材料への応用に関する研究

本論文は、多数のヒドロキシ基を有する糖に光反応性基であるシナモイル基または液晶を発現するメソゲン基を結合した誘導体の合成、および、その薄膜の新規細胞培養基材としての応用について記述したものであり4章で構成される。

近年、材料の最表面層の物性制御と、これを利用した新しいデバイスの作製が課題とされている。特に生体材料においては、材料表面の性質が重要であり、材料表面をコーティングするための新規素材の開発が進められている。以前当研究室で、トレハロースの桂皮酸エステルを合成し、その光重合による薄膜の作製について報告した。シナモイル基を有する桂皮酸誘導体は、紫外光(UV)照射により二量化し、分子間で結合することが知られている。この性質により、材料表面上で安定な架橋薄膜を容易に作製できるという利点があるが、一方で桂皮酸誘導体の光架橋生成物に関しては表面に高密度で存在する状態での毒性や細胞適合性がこれまで研究されていない。さらに、桂皮酸誘導体と液晶を組み合わせた材料が、近年、光配向性材料として注目されているが、このような材料の細胞適合性に関しても、これまでほとんど研究がなされていない。そこで、本論文では、第1章および第2章で、それぞれ、トレハロースおよびヒドロキシプロピルセルローズ(HPC)を骨格とする桂皮酸誘導体を合成し、その光架橋薄膜での線維芽細胞の培養を行った。また、第3章および第4章では、液晶性を発現するメソゲンとシナモイル基を有し、構造の異なる二種のトレハロース誘導体に対して、それぞれの液晶性を確認した上で、それらの薄膜上で線維芽細胞の培養を行い、細胞の形態観察を行った。

第1章では、まず、トレハロースと桂皮酸クロリドを、モル比1:4、1:8として混合しトレハロース桂皮酸エステル(TC)を合成した。¹H-NMR スペクトルをもとに、1分子のトレハロースに結合したシナモイル基の数(置換度)を調べたところ、概ね化学量論通りの反応が進行したことが確認された。その後、薄膜を作製し、所定時間UVの照射を行い、紫外可視分光光度計(UV-Vis)によりUV吸収スペクトルの時間依存性の測定を行った。照射時間が増加するにつれて283 nmに極大を有する吸収が減少したことから、UV照射によるシナモイル基の光反応が進行していることが確認できた。置換度の異なるTC架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、細胞数計測およびMTT試験より、いずれの薄膜上においても接着細胞数の経時的な増加が確認できた。さらに、置換度の低いTCに比べ、置換度の高いTCにおいて、接着細胞数が多いことが分かった。

第2章では、TCにおいて見られた良好な細胞適合性がシナモイル基かその二量体に起因するのかを調査するため、架橋なしでも薄膜を形成できるHPCを用いて桂皮酸エステルを合成し、その薄膜およびUV架橋薄膜上での細胞培養を行った。まず、仕込み比を変えてHPCと桂皮酸クロリドを反応し、異なる置換度を有するHPC桂皮酸エステル(HPC-C)を合成した。¹H-NMR スペクトルより、無水グルコースユニット一つにつき結合したシナモイル基の数(置換度)が1.3、2.0、3.0のHPC-Cがそれぞれ生成していることが分かった。その後、薄膜を作製し、所定時間UVを照射した。

置換度の異なる各 HPC-C の薄膜およびその架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、置換度が最も高い HPC-C において、接着細胞数が多く、UV 架橋後においてより増殖しやすい傾向にあることが分かった。これより、細胞数の増加はシナモイル基の二量体が起因する可能性があることが分かった。

第 3 章では、部分的にシナモイル基を結合したトレハロース誘導体とメソゲン基として 4-(4-ヘキシルオキシベンゾイルオキシ)フェノキシ-6-オキソヘキサ酸(HBPHA)を反応し、メソゲン基含有光反応性トレハロース誘導体(TC-HBPHA)を合成した。その後、薄膜を作製し、所定時間 UV を照射した。UV 照射前の TC-HBPHA について、温度を変化させて偏光顕微鏡による観察を行ったところ、昇温時は 153-180°C、降温時は 168-127°C の範囲で部分的な液晶相が確認された。UV 照射後の TC-HBPHA では、液晶の流動性が減少しているものの、UV 照射前と近い温度範囲で部分的な液晶相が確認された。TC-HBPHA の架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、一部の領域で細胞がある方向に沿って連なり、増殖・伸展していた。これは、TC にメソゲン基を導入したことによって、メソゲン基の自己集積化により、マクロな領域でメソゲン基が高い密度で存在し、その領域を避けるように細胞が接着・増殖するため、このような形態になった可能性が考えられる。

第 4 章では、トレハロースに光反応性のメソゲン基である 8-(4'-(シナモイルオキシ)-1,1'-ビフェニル-4-イル)オキシ-8-オキソオクタン酸(CBOA)を反応させたトレハロース誘導体(T-CBOA)を合成した。第 3 章の TC-HBPHA と異なり、メソゲン基にシナモイル基が結合しているため、これらがトレハロース 1 分子に結合している数(置換度)は互いに等しい。その後、薄膜を作製し、所定時間 UV を照射した。UV 吸収スペクトルの変化より、光反応が進行していることを確認した。偏光顕微鏡にて温度変化の観察を行ったところ、UV 照射前の T-CBOA では、液晶相が確認されたが、UV 照射後の T-CBOA では、流動性がなくなり、液晶相が見られなかったが、全体的なマイクロスケールのドメインが観察された。液晶状態での光架橋において、マクロな領域で生じたメソゲン基の集積部分が固定されていると考えられる。T-CBOA の架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、細胞が細長く伸展し接着しているのが観察された。メソゲン基が光反応性のシナモイル基に直接結合していることの影響により、メソゲン基がほぼ全面に存在するため、細胞が接着する箇所が限定され、このような形態になった可能性を考えている。

Abstract

Synthesis of saccharide derivatives carrying photoreactive groups and their application to biomaterials

This thesis, composed of four chapters, describes the synthesis of saccharide derivatives carrying photoreactive cinnamoyl groups and mesogenic groups exhibiting liquid crystal properties, and proposes their application as a new biomaterial for cell culture.

Recently, new devices with controlled properties of the most upper surface layer are attracting attention. Since the property of the biomaterial surface is especially important, coating materials are focused on in this thesis. In our laboratory, synthesis and photopolymerization of trehalose cinnamate have been studied. Cinnamate derivatives are known to dimerize by UV irradiation to yield a crosslinked material. Furthermore, cinnamate derivatives having liquid crystal properties are attracting attention as photoalignment materials. However, the cell compatibility of these materials has not been studied until now.

Chapter 1 and Chapter 2 describe the synthesis of cinnamate esters of trehalose and hydroxypropyl cellulose (HPC) and fibroblast cell culture studies on the photocrosslinked film. Chapter 3 and Chapter 4 describe the liquid crystal properties of two different types of trehalose derivatives carrying cinnamoyl groups and mesogenic groups and fibroblast cell culture studies observing cell morphology.

In chapter 1, two trehalose cinnamates (TC) with different degrees of substitution (DS) was synthesized from trehalose and cinnamoyl chloride. After TC thin films were deposited by the dip coating method, UV irradiation of the films was carried out. The maximum absorption observed at 283 nm in the UV-visible spectrum decreased by UV irradiation, implying that cinnamoyl groups underwent dimerization. Both TC showed no toxicity in fibroblast cell culture, and the number of adherent cells on the TC with a higher DS was larger than that on the TC with a lower DS.

In chapter 2, for the investigation of cell compatibility of cinnamoyl dimer, HPC cinnamates (HPC-C) with various DS values were synthesized. Analysis by ¹H-NMR spectroscopy revealed that the DS values of cinnamoyl groups attached per anhydroglucose unit of HPC were 1.3, 2.0 and 3.0. After the preparation of HPC-C films by dip coating, UV irradiation was carried out to yield photocrosslinked films. Fibroblast culture studies on HPC-C before and after photocrosslinking revealed an increase in DS of HPC-C and photocrosslinking promoted proliferation of adherent cells.

In chapter 3, a trehalose derivative carrying cinnamoyl groups and mesogenic groups at different positions (TC-HBPHA) was synthesized by esterification of partially cinnamoyl-modified trehalose with 4-(4-hydroxybenzoyloxy)phenoxy-6-oxohexanoic acid (HBPHA). TC-HBPHA thin films prepared by dip coating were irradiated with UV to yield crosslinked films. Liquid crystal phase with

droplet morphology of the TC-HBPHA thin films before UV irradiation was observed with a polarizing optical microscope (POM) in a temperature range of 153-180°C at heating, and 168-127°C at cooling. Partial liquid crystal phase of the TC-HBPHA thin films after UV irradiation was observed at a temperature range almost the same as that before UV irradiation. In the cell culture test, fibroblast cells adhered and grew on the crosslinked TC-HBPHA films, and cells with a spindle shape were aligned parallelly at some areas.

In Chapter 4, trehalose was reacted with 8-(4'-(cinnamoyloxy)-1,1'-biphenyl-4-yl)oxy-8-oxooctanoic acid (CBOA), which contains a mesogenic group and a cinnamoyl group, to yield a trehalose derivative carrying cinnamoyl groups at the same positions (T-CBOA). While the T-CBOA thin films before UV irradiation showed liquid crystal phase, the T-CBOA thin films after UV irradiation did not show liquid crystal phase. The photocrosslinked T-CBOA films showed fixed domains of self-assembled mesogens under a POM. In the cell culture test, some fibroblast cells adhered and elongated unusually. This is an interesting result because there is no example that the material prepared by homogeneous processes induces such cell elongation without any fibrous and patterned surface, as far as I know.

In summary, I found good cell compatibility of photocrosslinked saccharide derivatives carrying cinnamoyl groups and observed particular cell behaviors on photocrosslinked saccharide derivatives carrying mesogenic groups. I expect their application to new biomaterials with unique properties.

目次

序論

本論

第1章 トレハロース桂皮酸エステルの光架橋により得られる薄膜上での細胞培養

1.1 緒言	1-1
1.2 実験	1-2
1.2.1 本研究に用いた試薬	1-2
1.2.2 Trehalose cinnamoyl esters(TC)の合成	1-4
1.2.3 TC の光架橋	1-5
1.2.4 細胞培養用薄膜の作製	1-6
1.2.5 線維芽細胞による <i>in vitro</i> 細胞試験	1-8
細胞培養 / 細胞数測定(血球計算板による細胞数測定、MTT test) / 検定方法	
1.2.6 薄膜に対するタンパク質の吸着試験	1-10
蛍光観察 / 蛍光測定	
1.2.7 装置	1-11
1.3 結果および考察	1-12
1.3.1 FT-IR および ¹ H-NMR スペクトル測定による構造解析および溶解性試験	1-12
1.3.2 TC の光架橋	1-18
1.3.3 TC 薄膜の表面観察	1-20
1.3.4 TC 薄膜の接触角測定	1-23
1.3.5 TC 薄膜を用いた細胞適合性評価	1-25
1.3.6 TC 薄膜のタンパク質吸着試験	1-30
1.4 結論	1-32
1.5 参考文献	1-33

第2章 シンナモイル基修飾ヒドロキシプロピルセルロースの合成と光架橋および細胞適合性

2.1 緒言	2-1
2.2 実験	2-2
2.2.1 本研究に用いた試薬	2-2
2.2.2 Hydroxypropyl cellulose cinnamates (HPC-C)の合成	2-4
2.2.3 HPC-C の光架橋	2-6
2.2.4 細胞培養用薄膜の作製	2-7
2.2.5 線維芽細胞による <i>in vitro</i> 細胞試験	2-9

	細胞培養 / 細胞数測定(血球計算板による細胞数測定、MTT test) / 検定方法	
2.2.6	装置	2-11
2.3	結果および考察	2-12
2.3.1	FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定による構造解析および溶解性試験	2-12
2.3.2	HPC-C の光架橋	2-20
2.3.3	HPC-C 薄膜の接触角測定	2-22
2.3.4	HPC-C 薄膜を用いた細胞適合性評価	2-24
2.4	結論	2-28
2.5	参考文献	2-29
第3章	メソゲン基とシンナモイル基が異なる位置に置換したトレハロース誘導体の合成と光架橋 および細胞適合性	
3.1	緒言	3-1
3.2	実験	3-3
3.2.1	本研究に用いた試薬	3-3
3.2.2	TC4 の合成	3-6
3.2.3	4-Hydroxyphenyl-4'-hexyloxy benzoate(HPHB)の合成	3-7
3.2.4	4-(4-Hexyloxybenzoyloxy)phenoxy-6-oxohexanoic acid(HBPHA)の合成	3-8
3.2.5	TC-HBPHA の合成	3-9
3.2.6	TC-HBPHA の光架橋	3-10
3.2.7	細胞培養用薄膜の作製	3-11
3.2.8	線維芽細胞による <i>in vitro</i> 細胞試験	3-13
	細胞培養 / 細胞数測定(血球計算板による細胞数測定、MTT test) / 検定方法	
3.2.9	装置	3-15
3.3	結果および考察	3-18
3.3.1	FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定による構造解析および溶解性試験	3-18
3.3.2	TC-HBPHA の光架橋	3-39
3.3.3	TC-HBPHA 薄膜の温度変化による液晶形態観察	3-41
3.3.4	TC-HBPHA 薄膜の表面観察	3-44
3.3.4	TC-HBPHA の熱物性評価	3-46
3.3.5	TC-HBPHA 薄膜の接触角測定	3-48
3.3.6	TC-HBPHA 薄膜を用いた細胞適合性評価	3-50
3.4	結論	3-55
3.5	参考文献	3-56

第4章 シンナモイル基の結合したメソゲン基が置換したトレハロース誘導体の合成と光架橋および細胞適合性

4.1 緒言	4-1
4.2 実験	4-3
4.2.1 本研究に用いた試薬	4-3
4.2.2 4-(Cinnamoyloxy)biphenyl-4'-ol (CB)の合成	4-6
4.2.3 8-(4'-(Cinnamoyloxy)-1,1'-biphenyl-4-yl)oxy-8-oxooctanoic acid (CBOA)の合成	4-7
4.2.4 T-CBOA の合成	4-8
4.2.5 T-CBOA の光架橋	4-9
4.2.6 細胞培養用薄膜の作製	4-10
4.2.7 線維芽細胞による <i>in vitro</i> 細胞試験	4-12
細胞培養 / 細胞数測定(血球計算板による細胞数測定、MTT test) / 検定方法	
4.2.8 装置	4-14
4.3 結果および考察	4-16
4.3.1 FT-IR および ¹ H-NMR スペクトル測定による構造解析および溶解性試験	4-16
4.3.2 T-CBOA の光架橋	4-27
4.3.3 T-CBOA 薄膜の温度変化による液晶形態観察	4-29
4.3.4 T-CBOA の熱物性評価	4-32
4.3.5 FE-SEM による T-CBOA 薄膜の観察	4-35
4.3.6 T-CBOA 薄膜の接触角測定	4-36
4.3.7 T-CBOA 薄膜を用いた細胞適合性評価	4-38
4.4 結論	4-43
4.5 参考文献	4-44

総括

謝辞

研究業績

序論

1. はじめに

近年生体組織が欠損した場合には、他者の組織を移植する、もしくは非分解性の生体材料を用いることにより治療を行っている。しかし、どちらもまだ理想的な治療法とは言えない。多くの生体材料においては、生体の臓器とは本質的に異なる金属やプラスチックが用いられるため、生体適合性や生体機能性について問題がある。他者による組織提供には提供者の不足、移植された組織の受け入れ側による拒絶などの問題がある。そこで現在これらの欠点を補う治療法として、再生医療への期待が大きく高まっている。¹⁾

再生医療とは、病気や事故により機能不全に陥った組織や臓器の機能を再生する医療である。その方法は自己や他人の細胞を患者に投与したり、それらの細胞を *in vitro* で培養し組織を構築した後、患者に移植する治療法である。²⁾

再生医療において培養組織を構築する際に組織工学的手段が重要となるが、この組織工学には足場が必要である。足場はタンパク質を含む液体に接触すると、足場材料表面へタンパク質が吸着し、その後表面に形成された吸着タンパク質層に細胞が接着する。この吸着したタンパク質層は材料の特性を細胞に伝えるという重要な役割を果たしている。一般に生体組織は、細胞と細胞外マトリックスから構成されており、足場としての細胞の増殖・分化にその細胞外マトリックスが役目を果たす。再生医療のために、組織のもととなる細胞と、欠損した3次元構造での細胞から組織への再生の場(細胞の増殖・接着の足場)が重要となる。³⁾ 再生医療における足場の概念図を Fig. 1 に示す。

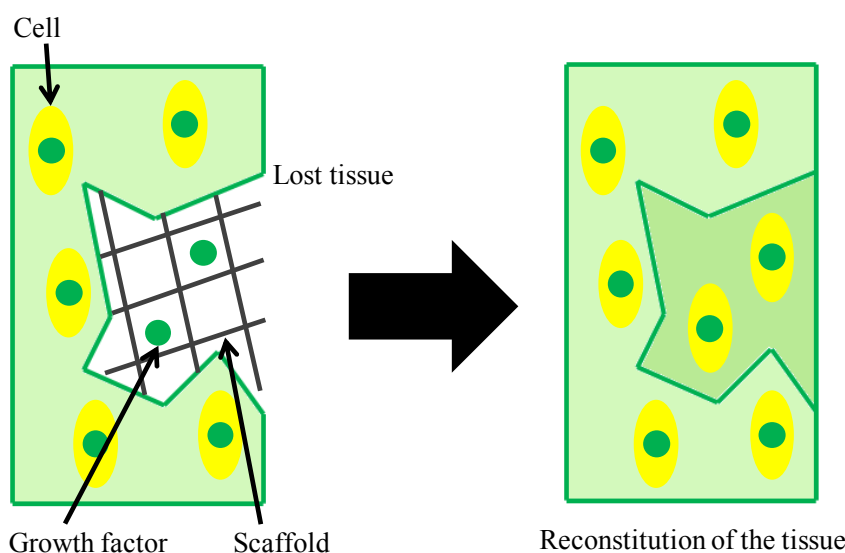


Fig. 1 Schematic concept of scaffolds in the regenerative medicine.

2. 生体吸収性高分子材料について

組織再生用足場や生体吸収性医用材料としてよく用いられているものに生体吸収性高分子材料がある。

非分解性の合成高分子は、生体内に埋入しても体の一部として同化することはできず、コラーゲンを中心とする線維性の組織で周囲を取り込まれ、「内なる外部」として隔離されてしまう。⁴⁾⁻⁶⁾

高分子もしくはその他の材料において、人工的な材料を医療に用いるときの問題点として、異物に対する人体の拒否反応がある。異物が体内に侵入した場合、生体はそれを排除しようとし、排除できない場合は生体内で問題が発生する。そこで、生体に対して無毒または低毒性で、材料が生体に接触する時間を最小限にとどめ、必要な機能、役割を果たし、生体に吸収される生体吸収性高分子材料が考えられている。⁷⁾⁻⁸⁾

現在用いられている吸収性材料の使用目的を簡潔にまとめたものを Table 1 に示す。

Table 1 Roles of use of absorbable materials.⁸⁾

Purpose	Example
1. Operation assistance	Hemostasis, Immobilization, Lumen holding, Blood vessel obstruction
2. Damaged organ healing	Wounded area healing, Tissue proliferation, Regeneration of organs
3. Drug release	Cancer treatment, Wound healing promotion, Prevention of blood clot, Prevention of infection

手術補助とは、手術操作を行いやすくするための補助材である。手術箇所が接合するまでその位置に留まらなければならない材料であり、手術後は体内に残ってしまう。このような材料に関して、治癒後は体内に吸収されて分解されることが求められている。⁸⁾

損傷部治癒と薬物放出のために用いられる吸収性材料も、再生医療やドラッグデリバリーシステム(DDS)のような機能が期待されており、今後の発展が望まれている。再生医療では結合組織や臓器において損傷部分を自己修復する機能があり、細胞が増殖しやすいような足場やそこへ他の組織が侵入できないような隔壁がある場合、容易に損傷部分が再構築される。それらの足場や隔壁のための材料も、損傷部が治癒した後は不要となる。しかし、そのためには、細胞増殖の速度や目的の機能を持つように細胞を分化させたり、細胞の形態や異方性に注目する必要がある。これへの対応として、細胞の増殖や分化に重要な役割を持つペプチド性因子をバイオテクノロジーを駆使することによって大量に生産する計画がある。それらを吸収性材料に組み込むことによって、従来材料より短期間で治療できることが期待されている。また、DDSとしてポリペプチド性増殖因子をある期間にわたって創部に一定濃度以上に保つために、高分子材料にその薬物因子を包含させ、そこから徐々に薬物を放出させる機能も考えられている。このときに用いる材料も薬物を放出し効果が発揮されると不要になるため、体内で吸収されるものでなければならない。この徐放性薬物は、創傷治癒促進のための細胞増殖因子のみでなく、制癌剤、抗血栓剤、抗菌剤などにも用いることができる。これらを目的の局所に徐放化することにより、薬物の有効濃度が

維持されている間は、それぞれ癌の進行の抑制、血栓生成の抑制、感染の防止が期待される。薬物の放出制御において、低分子材料では、長期間にわたっての薬物の徐放が不可能であるため、高分子材料が使用される。近年、吸収性材料を用いたこのような DDS の本格的な研究も行われている。⁸⁾

生体吸収性高分子材料を利用する再生医療において、対象とする組織の形態にあわせて成型した生体吸収性高分子製の細胞用足場に細胞を播種し、培養後に患部へ移植する。細胞の増殖とともに、足場が徐々に分解する。その間に、足場に播種した細胞や元からある細胞が合成・分泌したコラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス、または、増殖した細胞によって足場が置換される。これにより足場通りの形を再現した組織が再生することが期待される。しかし、生体吸収性高分子の分解・消失速度と、細胞による細胞外マトリックスの生産速度、細胞の増殖速度がうまく対応していないと形が崩れてしまう。⁴⁾⁻⁶⁾

近年では、材料表面コーティングのための新規材料の開発が研究されており、材料の最表面層の物性制御と、これを利用した新しいデバイスの作製が考えられている。このような新規材料は生分解性合成高分子材料にも適応できることが期待される。

生体吸収性を示すと考えられる材料は数多く存在するが、その中で医療に利用できるものは限られている。材料から放出される物質の生体安全性に問題があるか、まだその生体安全性が実証されていないためである。また分解物が安全であっても、材料の吸収速度があまりにも低すぎると、医療用吸収性材料として用いることはできない。

Table 2 に、現在、医療用として使用中あるいは研究開発中の吸収性材料を示す。⁸⁾

Table 2 Classification of absorbable materials.⁸⁾

Organic polymeric material			Inorganic material	
Natural polymer		Synthetic polymer	Phosphate material	carbonate material
Protein	Polysaccharide			
Collagen	Cellulose	Polyglycolic acid	Hydroxy apatite	Calcium carbonate
Gelatin	Starch	Polylactic acid	Tricalcium phosphate	(CaCO ₃)
Fibrin	Chitin	Polylactic acid copolymer	(Ca ₃ (PO ₄) ₂)	
Albumin	Chitosan	Polydioxanone		
	Hyaluronic acid	Synthetic polypeptide		

天然高分子材料にはタンパク質、多糖類、核酸、ポリエステルおよびポリイソプレンの 5 種類が知られている。いずれも中性条件下では酵素の助けを借りない限り、加水分解速度はきわめて低い。⁸⁾

天然高分子は多くが親水性であり、用いられる材料も体液に接触すると一般に含水ゲル状を呈する。高い機械的強度が得られないため縫合、接合、固定、補強などの目的には適さない。しかし、水や栄養物は透過できるため、天然高分子を必要とするが高い機械的強度は不要という場合に利用できる。機械的強度が必要な場合は、他の吸収性材料で補強す

することもできる。

また生体吸収性合成高分子の中で、最も多量に医療に用いられているのは、グリコール酸と乳酸の共重合体である。その用途は縫合糸やクリップのような接合材料と徐放製剤用担体である。前者には高い機械的強度が必要であるが、後者には高強度は不要である。⁸⁾

他にも生体吸収性合成高分子は、生体分解吸収性の医用材料として活発に研究されており、臨床応用例も多い。⁹⁾

3. 光反応性基の二量化反応について

材料の最表面層の物性制御として、光反応性基が注目を集めている。近年、桂皮酸やアントラセン等の光二量化反応を伴う物質の化学的、物理的変化をさらに追求し、その現象を活かした機能性材料の開発が進められている。

有機化合物の光化学反応は、通常の化学反応と比べると、

- 1) 溶媒を必要としない
- 2) 加熱を必要としない
- 3) 副生成物を産出しない

などの特徴がある。この特徴を生かすことによる、低環境負荷型のものづくりが期待される。また、上記の特徴を巧みに用いることにより、高機能を発現する材料の開発が行われている。¹⁰⁾

同一の 2 分子が光照射によって共有結合を形成する光二量化反応では、一般的に反応前後で大きな形状変化を伴わないので、化合物の相や状態を保持したまま反応を進行させることができる。たとえば、*trans*-桂皮酸の結晶に紫外光を照射すると、結晶相を保ったまま C=C 結合の部分が光二量化反応によりシクロブタン環を生じる。得られた二量体の立体構造は *trans*-桂皮酸の結晶多形を反映したものになることが知られている。¹¹⁾

3.1 桂皮酸について

近年、光反応性基としてアゾベンゼンやアントラセン、天然物由来の有機物である桂皮酸、カルコン、クマリンといったものが知られており、この光反応を利用した新規材料の開発が行われている。¹²⁾⁻¹⁵⁾中でも桂皮酸は毒性がなく、細胞に対する抗酸化作用も報告されている。¹⁶⁾

カシア樹の葉、樹皮の廃物などの水煮蒸留によってカシア油が得られる。このカシア油の主成分であり、食品、飲料などの香料(シナモンの香り)として利用されている桂皮アルデヒドがある。これは年間 200 トン前後生産されている。桂皮アルデヒドは容易に酸化してカルボン酸となり、このカルボン酸を桂皮酸と呼ぶ。¹⁷⁾桂皮酸の構造を Fig. 2 に示す。

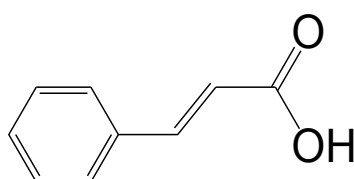
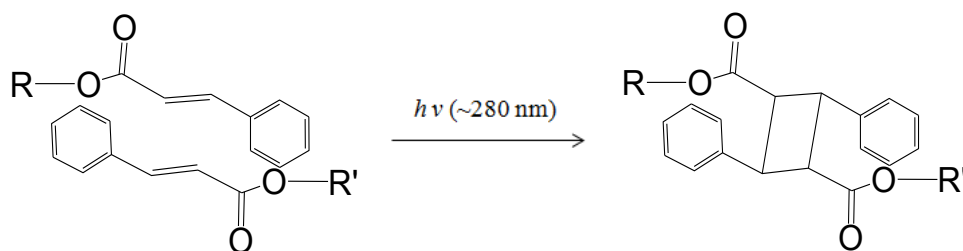


Fig. 2 Structure of cinnamic acid.

Molecular formula : $C_9H_8O_2$ (Molecular weight : 148.16)

桂皮酸の結晶に光(~280 nm)を照射すると四点反応によって二量化が起こることが知られている。シンナモイル基の二量化反応を Scheme 1 に示す。この反応を利用して、桂皮酸によってエステル化したポリマーの光架橋・不溶化による感光性フィルムなどが作られている。¹⁸⁾⁻²²⁾



Scheme 1 Dimerization reaction of cinnamate esters by UV irradiation.

近年、シンナモイル基を液晶材料の光反応性基として用いられる研究が行われており、光配向性材料としての期待も高まっている。²³⁾

桂皮酸誘導体は通常 *trans* で存在し、特定波長の紫外線が照射されると近傍にあるシンナモイル基同士で二量化するが、分子が励起されても二量化せずに光反応に不活性な *cis* 体に異性化することもある。²⁴⁾

4. 液晶材料について

ポリマー材料が開発され始めた当初は、多少の問題点があっても、軽量化や耐久性などにおける利点を有効に活用することで、数多くのポリマー材料が製品化され、使用されてきた。²⁵⁾しかし、現在では、性能や機能において従来のものより優れたものの開発が産業上重要な課題となっている。その一つに、光機能性材料や配向性分子を利用した液晶材料などが挙げられる。

配向性材料や自己組織化材料の持つ本来の機能や性能を十分に発現させるためには、分子レベルと各階層レベルでの配向を巨視的な領域でそろえることが必要とされる。分子レベルの自己組織化を巨視的な領域にまで関連付けられる代表的な材料として、液晶材料が注目されてきた。²⁵⁾⁻²⁶⁾

物質の状態は大きく、気体、液体、固体(結晶)の三つの相に分類されている。気体と液体は通常不連続な密度変化を伴い、明確に区別される。また、液体と固体は外見的に流動性で区別できる。しかし、液体の流動性と固体の異方性を併せ持つ状態があり、それが液晶である。²⁷⁾液晶の概念図を Fig. 3 に示す。

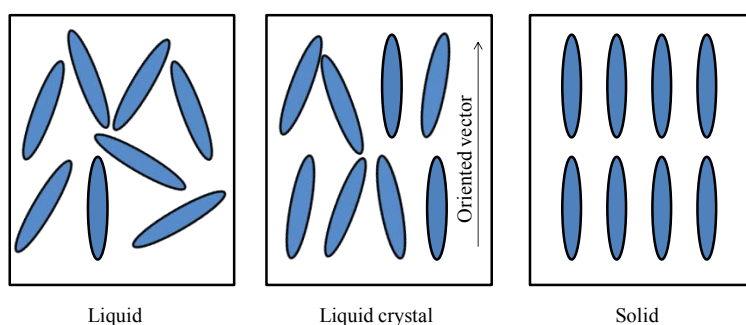


Fig. 3 Schematic concept of liquid crystal

液晶は剛直な π 骨格と柔軟なアルキル基が結合された構造となっており、主にネマティック、スメクティック、コレステリックの三種類に分類されている。ネマティック液晶では、分子の配向方向は揃っているが分子の重心はランダムである。スメクティック液晶では、一つの層内で分子の重心は揃っており、二次元の液体状態を形成している。コレステリック液晶はネマティック液晶の一つの変わり種であり、いくつものネマティック層の重なりにおいて、各層の配向方向はらせん状に配置されている。また、液晶は、表示素子として用いられることが多いが、現在も多くの研究が行われている。液晶相は自己集積し、ドメインを形成する性質があり、光応答基であるシナモイル基の二量化やアゾベンゼン基の異性化反応のような特性を利用した新しいデバイスの作製が進められている。^{12), 28)-31)}

5. 糖の生体材料への応用

一つの分子に対し多くのヒドロキシ基を有し、一つの分子に多くの官能基を持つ化合物の合成で注目されているのが糖である。糖類は分解した後も毒性を示さないため、近年、糖を含有する生体材料としてもその高い生体親和性により注目されている。その中で、二糖類であるトレハロースは細胞や生きた臓器の保存溶液等に利用されており、生体材料のベースとして期待できる。³²⁾

トレハロースは、酵母菌、昆虫、植物などの自然界に広く存在する非還元性の二糖類であり、グルコース二分子で構成されている。トレハロースの構造を Fig. 4 に示す。トレハロースは以前、酵母などからの抽出により生産されていて収率が低かったため高価な値段で販売されていた。しかし、近年、リン酸などを用いることなく、酵素をデンプンの還元性末端に直接作用させ、トレハロース構造を有する非還元性糖質であるマルトオリゴシルトレハロースを生成し、この還元性糖質から特異的にトレハロースを遊離させるという方法が確立された。この方法により必要性の高かったトレハロースは大量生産され、比較的安価(300 円 / kg)になった。これにより食品、化粧品、医薬品の原料に利用されるようになった。³³⁾⁻³⁴⁾トレハロースの製造方法を Fig. 5 に示す。

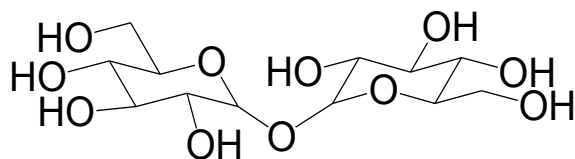


Fig. 4 Structure of trehalose.

Molecular formula : $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Molecular weight : 342.30 g / mol)

トレハロースの特徴的な性質を以下に示す。

- 1) 生体親和性を有する。
- 2) 非還元性のため、化学的に反応性の高いアミノ基を有するタンパク質、アミノ酸と併用しても褐変(メイラード反応)を起こさない。
- 3) 糖としてはきわめて安定な構造をしており、温度、pHの影響を受けにくい。
- 4) 含水結晶トレハロースは相対湿度 90%以下で吸湿を起こさない。
- 5) デンプンから安価に手に入る。(300 円 / kg)
- 6) 臓器や細胞の保存溶液に用いられる。

経験的に、タンパク質の構造を安定化させ、乾燥や凍結によるダメージを防ぐ性質が知られており、臓器の凍結保存液にトレハロースの溶液が利用されている。たとえば、近年、市販の細胞凍結保存溶液は、凍結保存後、細胞の分化に影響を及ぼすことが問題点とされている。そこで代替の細胞凍結保存溶液の溶質としてトレハロースの利用が考えられている。トレハロースのヒドロキシル基は細胞の表面タンパク質と水素結合する。これにより、細胞機能の維持に効率が良いとされ、細胞の凍結保存液にも期待されている。³⁵⁾

また、近年、遺伝的な病気を治療するため遺伝子をベクターとともに細胞内へ投与する方法が考えられている。このベクターにおいて、遺伝子導入効率・発現効率の高いカチオン性高分子の開発が注目されている。しかし、現在開発されているカチオン性高分子は細胞毒性を示すものが多く、遺伝子導入に適していない。このため、生体親和性が高い糖類、中でもタンパク質構造の安定化が報告されているトレハロースを用いたカチオン性高分子の研究が行われている。³⁶⁾

さらに、卵巣摘出を行ったマウスにトレハロースを投与させ、その骨細胞を用いた *in vitro* 試験により骨芽細胞の骨吸収機能が抑制されたという報告があり、骨粗しょう症の防止効果なども期待されている。このように、生体活性についても様々な研究が行われている。³⁷⁾

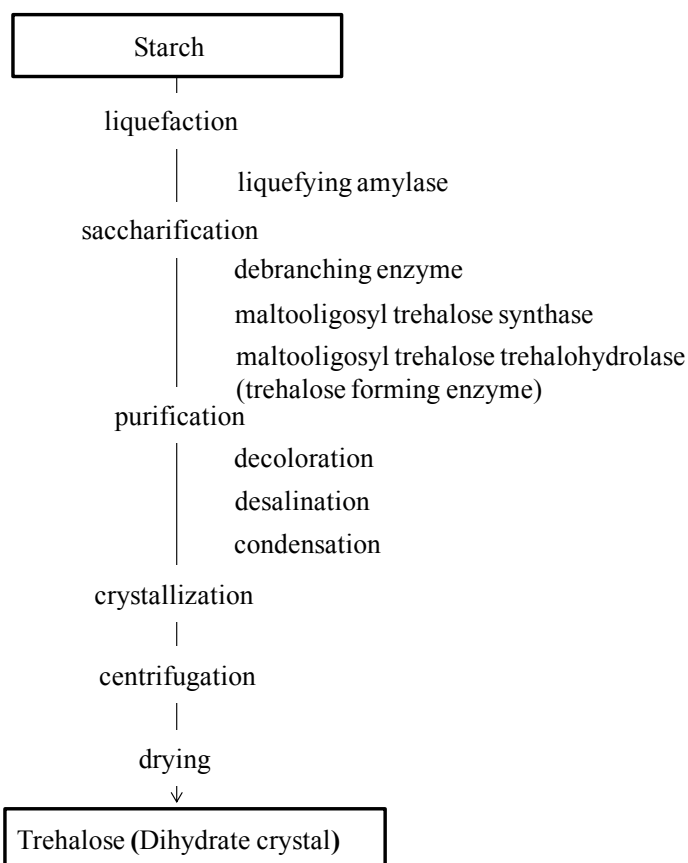


Fig. 5 Manufactural production of trehalose.

6. 近年の研究動向

近年、桂皮酸誘導体を用いた研究は盛んに行われているが、光反応による架橋ポリマーの作製やゲル材料作製のための架橋剤としての役割がほとんどであり³⁸⁾⁻⁴⁰⁾、シナモイル基が多数結合した材料上での細胞培養について報告がされていない。

シナモイル基含有物の細胞適合性として、2013年にZhuら³⁸⁾は、ポリ(グリセロール-co-セバシン酸)に異なる置換度(DS)でシナモイル基を結合したポリエステル(PGS-CinA)を作製した(Fig. 6)。その後、PGS-CinA 架橋フィルム上で細胞培養を行い、細胞適合性の調査を報告した。

異なる置換度の PGS-CinA フィルム上での細胞増殖結果を Fig. 7 に示す。Fig. 7 より、細胞培養用ポリスチレンプレート(TCPS)ほどの増殖は見られなかったが、死細胞はほとんど見られず、細胞適合性を示した。Zhu らの研究で用いられた PGS-CinA はまだ多数のヒドロキシ基が残っている。

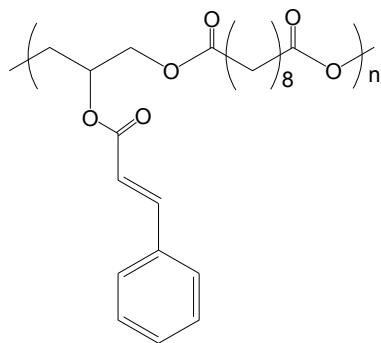


Fig. 6 Structure of poly(glycerol-co-sebacate)-cinnamate(PGS-CinA).

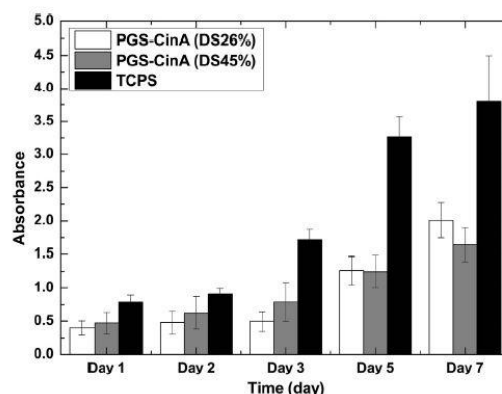


Fig. 7 WST-1 absorbance of fibroblast cells after 1, 2, 3, 5 and 7 days of culture on substrates composed of PGS-CinA (DS26% and DS45%).

また、2004年にMiyamotoら³⁹⁾は、ヒアルロン酸ゲルの作製において、ヒアルロン酸にスパーサーを介してシナモイル基を結合し、その二量化により作製したヒドロゲルの利用と生体適合性について報告した。Fig. 8 にヒアルロン酸誘導体(HAD)の構造式を、Scheme 2 に UV 照射による HAD の架橋を示す。

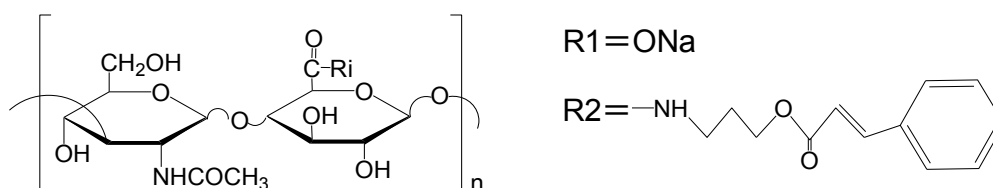
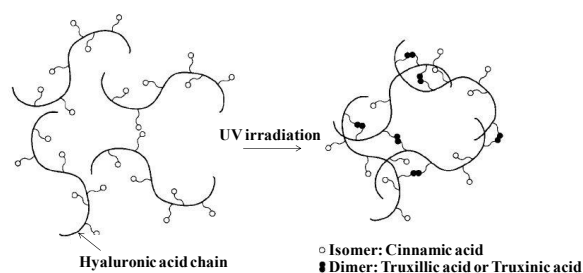


Fig. 8 Structure of hyaluronan derivative (HAD).



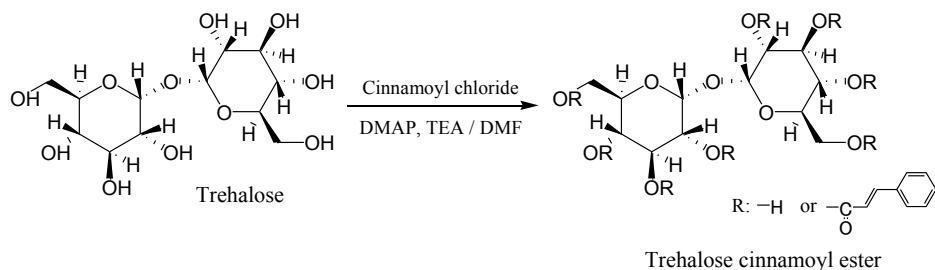
Scheme 2 Dimerization reaction of HADgel by UV irradiation.

HAD ゲルをモルモットの皮下に注入し、周辺組織の組織学的観察を行った。Hematoxylin-Eosin(HE)染色によるモルモットへのHADゲルの注射部位における組織外観の観察結果より、注射部位に少量の炎症単球は見られたものの、時間経過による毒性はほとんど見られなかった。Miyamotoらの研究で合成されたHADにおけるカルボキシル基の置換度は低く、全カルボキシル基9.1%が置換されたものであった。

このように、シンナモイル基の低置換度による細胞培養の報告はあり、毒性を示さないことが分かっている。一方で、高密度でシンナモイル基が結合した材料の細胞への影響については報告がない。

一つの分子に多くのシンナモイル基を結合した化合物の合成に関する研究として、以前当研究室で、再生可能資源を利用した新しい光架橋性材料の開発を報告している。⁴⁰⁾天然物由来であるトレハロースと桂皮酸クロリドを反応させ、トレハロース桂皮酸エステルを合成し、その光重合についての研究を行った。シンナモイル基の光二量化を利用しトレハロース骨格の光架橋薄膜を作製した。(Scheme 3)

骨格となるトレハロースのヒドロキシ基に桂皮酸誘導体を八つ置換させたもの(TC8)と四つ置換させたもの(TC4)を作製した。



Scheme 3 Trehalose cinnamoyl ester.

TC8およびTC4の紫外可視分光光度計による吸収スペクトルの時間変化より、TC8およびTC4の薄膜にUV照射をあて、UV-visにて吸収スペクトルを確認したところそれぞれ280nm付近にみられるC=Cとベンゼン環の共役の吸収ピークが照射するにつれて減少していることが確認され、シクロブタン環を形成し光架橋が起こっていることが分かった。このように、桂皮酸誘導体の光特性により、容易に架橋薄膜の作製が可能であることを明らかにした。

また、近年、桂皮酸誘導体と液晶を組み合わせた材料が光配向性材料として注目されている。シナモイル基を応用した光配向材料として、2001年にKawatsukiら⁴¹⁾は、シナモイル基が含有し、光架橋可能な液晶ポリマーの光配向性について報告した。(Fig. 9) 著者らは、ポリマー主鎖とメソゲン間のスペーサーの長さが異なるP2CB、P6CB 2種のポリマーを合成した。

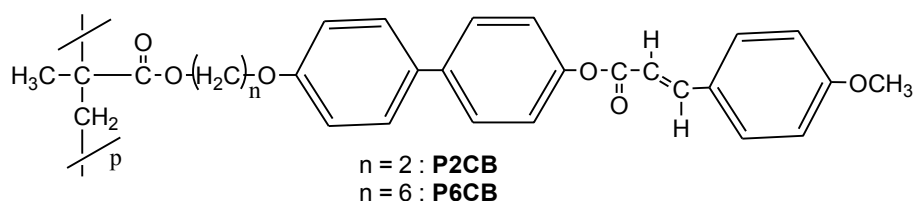


Fig. 9 Photoreactive liquid crystal polymers (P2CB, P6CB)

この液晶ポリマーの薄膜に対し、直線偏光UV照射および加熱によるアニーリングを行い、偏光吸収の角度依存について評価を行った。Fig. 10に、P2CBおよびP6CBにおける、平行方向(A_p)と垂直方向(A_s)の吸光度の偏光に対する吸収スペクトルを示す。

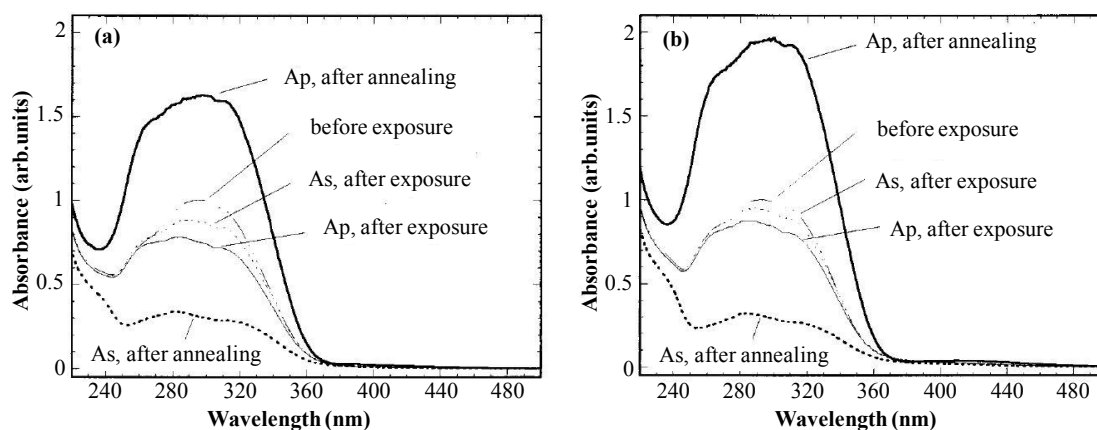


Fig. 10 UV polarization spectra of cinnamoyl-modified liquid crystal polymer films before photoirradiation, after irradiation with 450 mJ cm^{-2} doses (thin lines), and after subsequent annealing (thick lines). A_p is shown as the solid lines, and A_s is shown as the dotted lines. (a) P2CB film, annealed at $180 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min. (b) P6CB film, annealed at $155 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 min.

Fig. 10より、P2CBおよびP6CBともに偏光照射前および照射後では平行方向および垂直方向での吸光度に大きな変化はないが、アニーリング処理を行うことで平行方向では吸光度が大きく増加し、垂直方向では吸光度が大きく減少しており、熱によりメソゲン分子がシナモイルの二量化の方向に誘導され、分子配向が起こったことが示された。しかし、このようなメソゲン基を用いた液晶材料上での細胞培養の報告例はない。

次に、液晶材料と細胞培養を組み合わせた例として、2002年にHwangら⁴²⁾は、ポリ乳酸(PLA)とコレステロールを結合した分子(C-LA_n)を作製し、その薄膜上で3T6線維芽細胞を培養し、細胞適合性の調査を報告した。(Fig. 11)

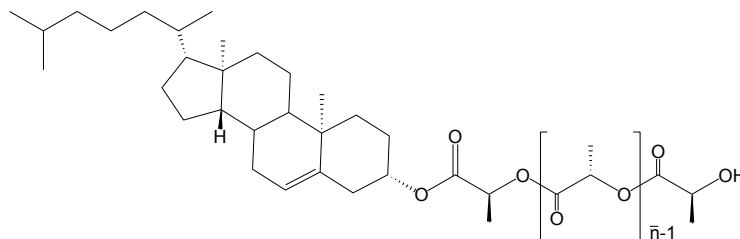


Fig. 11 Structure of C-LA_n.

PLAおよびC-LA₂₈薄膜上における細胞観察結果をFig. 12に示す。C-LA_nにおいて、偏光顕微鏡より液晶性を示した。Fig. 12より、PLA単体の薄膜上では細胞が接着しづらく凝集して接着しているのに対し、C-LA₂₈薄膜上では全体的な細胞接着により良好な細胞適合性を示した。これは、液晶の自己組織化による表面の凹凸とPLAの疎水的な表面が影響しているのではないかと報告されている。

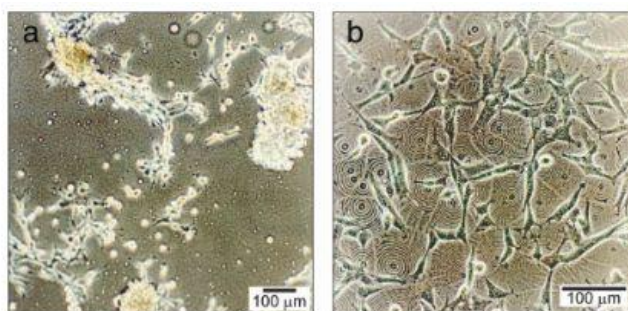


Fig. 12 (a) 3T6 fibroblasts on a PLA surface 72 h after cell seeding. The fibroblasts aggregate and do not spread on these surfaces. (b) 3T6 fibroblasts on C-LA₂₈ 72 h after seeding. The cells spread preferentially along the boundaries of focal conic domains.

このように、コレステリック液晶性を示すコレステロール誘導体の細胞適合性は知られているが、それ以外のメソゲン基に関してはまだ不明な点が多い。

さらに、一つの糖分子に対して多くの官能基を結合して機能を持たせる材料として、2009年にTianら⁴³⁾は、天然物由来の三糖であるメリトースをメソゲン基(液晶分子)と反応し、生成物の液晶性について報告した(Fig. 13)。メリトース誘導体c1~c3はそれぞれメソゲン基の末端のRが異なり、c1は末端がH、c2はCH₃O、c3はCH₃CH₂Oとなっており、それぞれ側鎖の変化による液晶形態の違いが報告された。

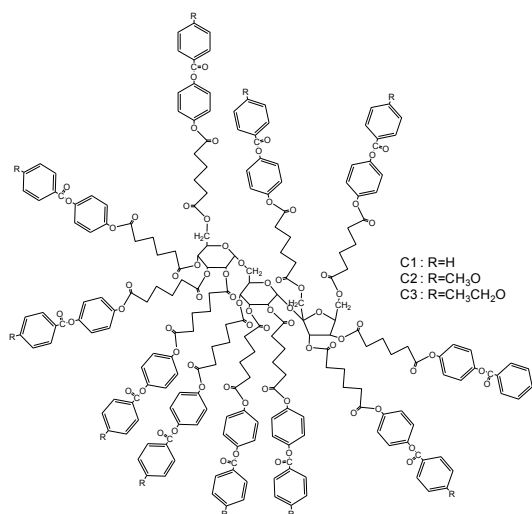


Fig. 13 Structure of star-shaped compounds with mesogenic groups.

Fig. 14にDSC測定、Fig. 15に液晶観察の結果を示す。Fig. 9より、c2およびc3では結晶/ネマティック(Cr \leftrightarrow N)のピークの外にネマティック/アイソトロピック(N \leftrightarrow I)のピークが確認された。また、Fig. 10より、c2およびc3でCr \leftrightarrow NのピークとN \leftrightarrow Iのピーク間の温度範囲でネマティック液晶が観察された。液晶性はメソゲン基の特性に依存し、メリトース誘導体が特殊なモルフォロジーを有するネマティック液晶相を示した。

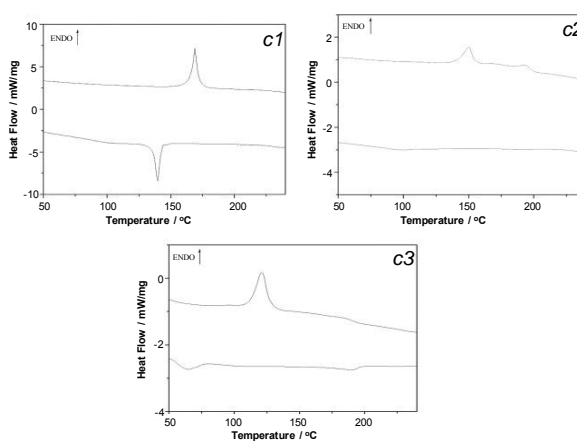


Fig. 14 DSC thermograms of star-shaped compounds c1–c3

本材料もまた、細胞に対する影響については調べられていない。

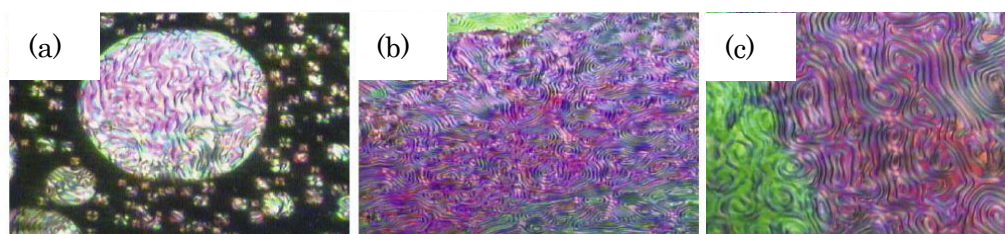


Fig. 15 Optical polarizing micrographs for c2 and c3: (a) fingerprint texture of c3 on cooling to 156.0 °C (200 \times), (b) droplet texture of c3 on cooling to 187.0 °C (500 \times), (c) fingerprint texture of c2 on cooling to 145.0 °C (500 \times).

7. 本研究の目的

近年、材料の最表面層の物性制御と、これを利用した新しいデバイスの作製が課題とされている。特に生体材料においては、材料表面の性質が重要であり、材料表面をコーティングするための新規素材の開発が進められている。先に述べたように、以前当研究室で、トレハロースの桂皮酸エステルを合成し、その光重合による薄膜の作製について報告した。⁴⁰⁾シナモイル基を有する桂皮酸誘導体は、紫外光(UV)照射により二量化し、分子間で結合することが知られている。この性質により、材料表面上で安定な架橋薄膜を容易に作製できるという利点があるが、一方で桂皮酸誘導体の光架橋生成物に関してはその毒性や細胞適合性があまり研究されていない。³⁸⁾⁻³⁹⁾さらに、桂皮酸誘導体と液晶を組み合わせた材料が、近年、光配向性材料として注目されているが、このような材料の細胞適合性に関しても、これまでほとんど研究がなされていない。⁴¹⁾⁻⁴⁶⁾そこで、本論文では、光反応性基、および、液晶性を発現するメソゲン基を結合した糖誘導体を合成し、生体材料に応用できる新規材料の開発について研究を行った。

第1章では、まず、トレハロースと桂皮酸クロリドの、モル比を 1:4、1:8 として混合し、トレハロース桂皮酸エステル(TC)を合成した。その薄膜に対し、紫外光照射による光二量化の調査、および、細胞培養試験による細胞適合性の評価を行った。特に、トレハロース桂皮酸エステルの光架橋薄膜において、トレハロースに結合したシナモイル基の数(置換度)により、細胞の増殖がどのように変化するかを調査した。

第2章では、TCにおいて見られた細胞適合性がシナモイル基に関連するのかを調査するため、トレハロースと異なる糖類であるヒドロキシプロピルセルロース(HPC)を用いて桂皮酸エステルを合成し、UV架橋薄膜上での細胞培養を行った。まず、仕込み比を変えてHPCと桂皮酸クロリドを反応し、異なる置換度を有するHPC桂皮酸エステル(HPC-C)を合成した。その薄膜に対し、UV照射による光二量化の調査、および、細胞培養試験による細胞適合性の評価を行った。

第3章では、自己組織化しやすい液晶分子を用いた材料表面の制御を意図し、部分的にシナモイル基を結合したトレハロース誘導体に 4-(4-ヘキシルオキシベンゾイルオキシ)フェノキシ-6-オキソヘキサン酸(HBPHA)を反応させ、メソゲン基含有光反応性トレハロース誘導体(TC-HBPHA)を合成した。TC-HBPHAでは、シナモイル基とメソゲン基はそれぞれ異なる位置に結合している。TC-HBPHA薄膜を作製し、所定時間UVを照射して、光二量化の調査を行った。さらに偏光顕微鏡を用いてUV照射前、照射後の液晶相の観察およびドメインの観察を行った。その後、線維芽細胞を用いて細胞培養試験を行い、細胞適合性の評価および細胞形態の観察を行った。

第4章では、トレハロースに光反応性のメソゲン基である 8-(4-(シナモイルオキシ)-1,1'-ビフェニル-4-イル)オキシ-8-オキソオクタン酸(CBOA)を反応させ、メソゲン基含有光反応性トレハロース誘導体(T-CBOA)を合成した。第3章のTC-HBPHAと異なり、メソゲン基にシナモイル基が結合しているため、これらがトレハロース1分子に結合している数(置換度)は互いに等しい。T-CBOA薄膜を作製し、所定時間UVを照射して、光二量化の調査を行った。さらに偏光顕微鏡を用いて液晶相の観察およびドメインの観察を行った。その後、線維芽細胞を用いて細胞培養試験を行い、細胞適合性の評価および細胞形態の観察を行った。

8. 参考文献

- 1) 筏義人, 再生医学 – 失った体はとりもどせるか, 羊土社, 3-6・12-13・60-68 (1998)
- 2) 岡野光夫, 再生医療の技術の最前線, シーエムシー出版, 1-3 (2007)
- 3) 岩田博夫, バイオマテリアル, 共立出版, 6・23 (2005)
- 4) 田畑泰彦, 再生医療のためのバイオマテリアル, コロナ社, 135 (2006)
- 5) 筏義人, 再生医療工学の技術, シーエムシー出版, 16 (2007)
- 6) 大和雅之, 組織工学の立場から, 再生医療の現状と課題, 39-40 (2009)
- 7) 中村宣男, 医療用高分子材料の展開, シーエムシー出版, 215-228 (2003)
- 8) 筏義人, 生分解性高分子, 高分子刊行会, 165-180 (2001)
- 9) 筏義人, バイオマテリアルの開発, シーエムシー出版, 253-266 (2001)
- 10) 独立行政法人産業技術総合研究所ナノシステム研究部門スマートマテリアル
http://unit.aist.go.jp/nri/smartmg/kenkyunaiyou_kihara.html
- 11) 杉山邦夫ほか, 日本大学生産工学部研究報告A, 36, 49-60 (2003)
- 12) 関隆広ほか, ゼオライト, **21**, 73-79 (2004)
- 13) Nutley, BP et al., *Food. Chem. Toxicol.*, **32**, 877-886 (1994)
- 14) Belsito, D et al., *Food. Chem. Toxicol.*, **45**, S1-S23 (2007)
- 15) Iliefski, T et al., *Tetrahedron Letters*, **39**, 2413-2416 (1998)
- 16) Zhang, J et al., *European Food Research and Technology*, **228(1)**, 123-131 (2008)
- 17) 木の情報発信基地 <http://www.wood.co.jp/index.html>
- 18) 村橋俊介ほか, 高分子化学 第4版, 共立出版, 114-125 (1993)
- 19) Matsusaki, M et al., *J. Appl. Polym. Sci.*, **82**, 2357-2364 (2001)
- 20) Nagata, M et al., *Eur. Polym. J.*, **245**, 1111-1117 (2009)
- 21) Rochette, JM et al., *Macromolecules*, **46**, 2134-2140 (2013)
- 22) Shindo, Y et al., *Eur. Polym. J.*, **25**, 1033-1037 (1989)
- 23) Kawatsuki, N, et al., *Chem. Mater.*, **12**, 1549-1555 (2000)
- 24) Sapich, B et al., *Macromolecules*, **34**, 5694-5701 (2001)
- 25) 伊原博隆, 配向性分子材料の機能設計と用途新展開, アイピーシー, 1-2・11-12・249-250 (1995)
- 26) 南広祐, 人工材料, 38, 159-161 (2009)
- 27) 竹添秀男, 液晶・高分子入門, 裳華房, 2-3 (2004)
- 28) Martin, S et al., *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **27**, 305-379 (1997)
- 29) Richards, AB et al., *Food. Chem. Toxicol.*, **40**, 871-898 (2002)
- 30) Patist, A et al., *Colloids. Surf. B:Biointerfaces*, **40**, 107-113 (2005)
- 31) Teramoto, N et al., *Molecules*, **13**, 1773-1816 (2008)
- 32) Gil, AM et al., *Spectrochimica Acta Part A*, **52**, 1649-1659 (1996)
- 33) 塩坂誠, トレハ糖(トレハロース)の利用, 食品・食品添加物研究誌, **172**, 97-102 (1997)

- 34) 清末和之ほか, 機能診断をもとにした神経細胞の高度保存・培養法の研究開発, 特許生物寄託センター技術報告集 No. 5, 9-15 (2006)
- 35) Mancini, RJ et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 8474-8479 (2012)
- 36) Reineke, TM et al., *Bioconjugate Chem.*, **14**, 247-254 (2003)
- 37) Yoshizane, C et al., *Nutrition Research*, **20**, 1485-1491 (2000)
- 38) Zhu, C et al., *Acta Biomater.*, **9**, 7362-7370 (2013)
- 39) Miyamoto, K et al., *J. Biomed. Mater. Res. A*, **70**, 550-559 (2004)
- 40) Teramoto, N et al., *Polym. Adv. Technol.*, **18**, 971-977 (2007)
- 41) Kawatsuki, N et al., *Macromolecules*, **35**, 706-713 (2002)
- 42) Hwang, JJ et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 9662-9667 (2002)
- 43) Tian, M et al., *Journal of Molecular Structure*, **937**, 131-135 (2009)
- 44) Zhou, C et al., *Biomaterials*, **20**, 2093-2099 (1999)
- 45) Li, L et al., *Biomaterials*, **22**, 2595-2599 (2001)
- 46) Shih, M-F, *Int. J. Pharm.*, **327**, 117-125 (2006)

本論

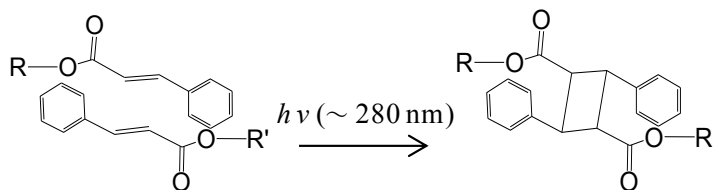
第 1 章

トレハロース桂皮酸エステル之光架橋により得られる薄膜上での細胞培養

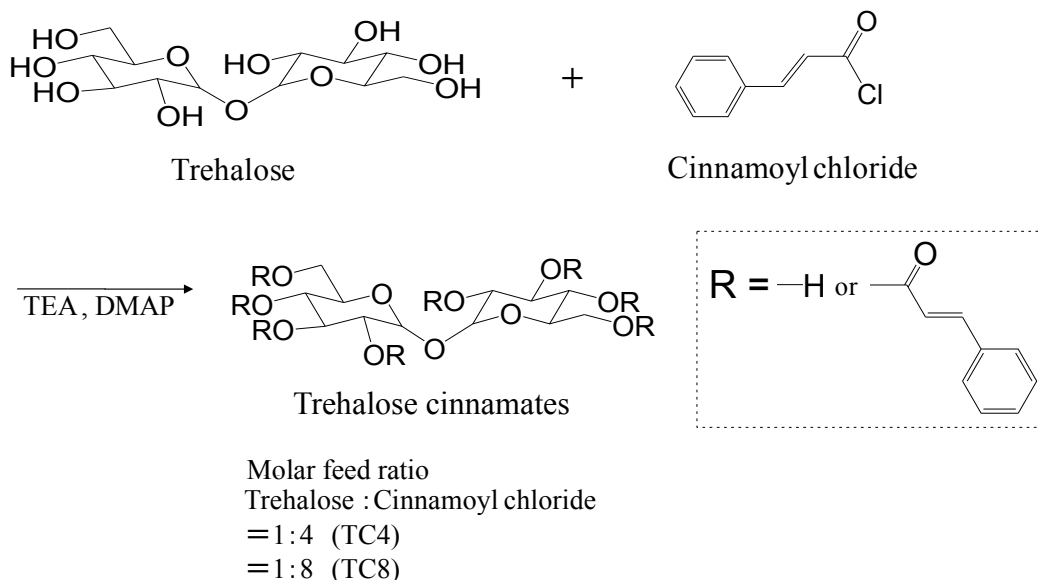
1.1 緒言

近年、生体材料の最表面層の物性制御と、これを利用した新しいデバイスの作製が研究されている。その中でも、材料の最表面層の物性制御として、光反応性基が注目されている。¹⁾⁴⁾この光反応性基の光架橋生成物に関してはその毒性や細胞適合性があまり研究されていない。また、分子内に多数のヒドロキシ基を有していることから、一つの分子に多数の官能基を持つ化合物の合成で糖が注目されている。本研究では生体組織の保存等で有用なトレハロース、および、一部の樹木等の成分として含まれる桂皮酸を用いて光架橋性材料を作製し、生体材料に応用することを目的としている。桂皮酸エステルにおけるシンナモイル基は、紫外光(UV)の照射により二量化し、結合することが知られている。(Scheme 1.1.1)以前当研究室で、トレハロースの桂皮酸エステルを合成し、その光重合による薄膜の作製について報告した。⁵⁾このような疎水的な薄膜表面においても細胞適合性があるかどうかを調査する。

具体的には、トレハロースおよび桂皮酸クロリドを反応させ、置換度の異なるトレハロース桂皮酸エステルを合成し、薄膜を作製した。トレハロース桂皮酸エステルの合成反応式を Scheme 1.1.2 に示す。作製した薄膜に対し、紫外光照射による光二量化の調査および細胞培養試験による細胞適合性の評価を行った。



Scheme 1.1.1 Dimerization reaction of cinnamate esters by UV irradiation.



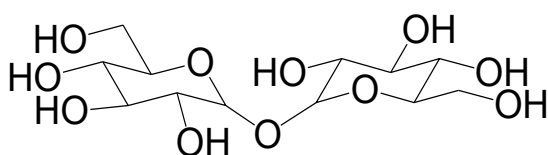
Scheme 1.1.2 Synthesis of trehalose cinnamate synthesized from trehalose and cinnamoyl chloride.

1.2 実験

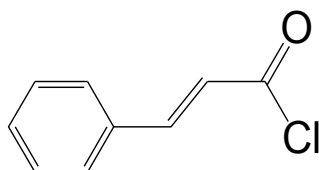
1.2.1 本研究に用いた試薬

Trehalose cinnamoyl esters(TC)の合成に用いた試薬として、桂皮酸クロリド(Fw:166.6, m.p. 36 °C)は東京化成工業(株)より購入した。トレハロース(Fw:342.30, m.p. 210.5 °C)は(株)林原より提供いただき、本研究ではそれを加熱乾燥させ無水物にしたものを使用した。TC の合成に用いた試薬の構造を以下に示す。

•Trehalose



•Cinnamoyl chloride



TC の合成に用いた有機溶媒として、SIGMA-ALDRICH 製の脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) (Fw:73.9, m.p. -61.0 °C)、関東化学(株)製のトリエチルアミン(TEA) (Fw:101.19, m.p. -115 °C)、東京化成工業(株)製のジメチルアミノピリジン(DMAP) (Fw:122.17, m.p. -110 °C)、関東化学(株)製の *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF, 特級)を使用した。

FT-IR 測定用試薬および NMR 測定用重水素溶媒として、和光純薬工業(株)製の臭化カリウム(KBr) (Fw:119 m.p. 734 °C)、関東化学(株)製のジメチルスルホキシド-*d*₆(DMSO-*d*₆) (99.9atom%D, 0.03%TMS 含有, Fw:84.18)、関東化学(株)製のクロロホルム-*d* (CDCl₃) (99.8atom%D, 0.03%TMS 含有, Fw:120.39)をそれぞれ使用した。

TCの光架橋および細胞培養用薄膜の作製に用いた有機溶媒として、関東化学(株)製のクロロホルム(CHCl_3) (Fw 119.38, m.p. -64°C)、関東化学(株)製の硝酸(Fw 63.01, m.p. -41.6°C , concentration: 69~70%)、関東化学(株)製の硫酸(Fw 98.08, m.p. 10°C , concentration: 96.0%)を使用して、超純水は Direct-Q UV(Millipore 社製)から得られる、電気抵抗率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ のものを使用した。

線維芽細胞の *in vitro* 細胞試験には、RIKEN BRC Cell Bank, Riken, Japan(Cell No. RCB1642)より入手したマウス胎児由来の線維芽細胞である 3T3 Swiss Albino 細胞、和光純薬工業(株)製の Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)培地、和光純薬工業(株)製の Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS(-))および和光純薬工業(株)製の Penicillin-Streptomycin solution (10,000 U/ml Penicillin, 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin)を使用した。培地に Penicillin-Streptomycin solution を加え、最終的に 100 倍希釈となるように調製した。Penicillin-Streptomycin solution を加えた培地に J R Scientific, Inc 製(Lot No. 168904)の fetal bovine serum (FBS) を加え、15%となるように調製した。25 %Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)は GIBCO 製、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) は和光純薬工業(株)製、Tripan Blue Stain 0.4% (TB)は GIBCO 製のものを使用した。また、セルライシスとして、和光純薬工業(株)製の NP-40 Substitute 細胞生物学用(非イオン性界面活性剤)を D-PBS で 10%となるように調整した。10% NP-40 セルライシス溶液の組成を Table 1.2.1 に示す。

薄膜のタンパク質吸着試験に用いた細胞および試薬として、Cytoskeleton 製の HiLyte 488-modified fibronectin、和光純薬工業(株)製の 0.5w/v% Trypsin-5.3mmol/l EDTA \cdot 4Na Solution without Phenol Red ($\times 10$)、関東化学(株)製の水酸化ナトリウムを使用した。

Table 1.2.1 Composition of Cell lysis.

Normal saline	3.6 ml
NP-40 (polyoxyethylene (9) octylphenyl ether) 400 μl	
Total	4 ml

1.2.2 Trehalose cinnamoyl esters(TC)の合成⁵⁾

本研究では trehalose:cinnamoyl chloride の仕込み mol 比を 1:4、1:8 とし、それぞれの生成物を TC4、TC8 とした。

まず、trehalose (3.42 g , 10 mmol)を秤りとり、脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)15 ml 中に 60 °C で加熱して溶解させた。この溶液に、反応で生じる酸の中和試薬としてトリエチルアミン (TEA)を TC4 は 5.6 ml(40 mmol)、TC8 は 11.2 ml(80 mmol)、触媒としてジメチルアミノピリジン (DMAP)(0.61 g , 5 mmol)を加えた。さらに cinnamoyl chloride を TC4 は 6.66 g(40 mmol)、TC8 は 13.33 g(80 mmol)秤りとり、脱水 DMF 5 ml 中に溶解させ、それを先の溶液に加えて、窒素下、室温で 24 h 攪拌した。次にこの溶液を多量の純水中に滴下して、生成物を析出させ、ろ過し、回収した沈殿物を DMF 20 ml に溶解させ、さらに 500 ml の純水中に滴下した後、室温で 24 h 攪拌した。攪拌後、ろ過して得られた固体を、室温で 48 h 真空乾燥させ、TC4 は白色固体の生成物 (4.70 g , 収率:55%)、TC8 は乳白色固体の生成物(9.00 g , 収率:65%)を得た。得られた生成物について FT-IR および ¹H-NMR スペクトル測定により構造解析し、溶解性試験について評価した。実験方法をフローチャートとして Fig. 1.2.1 に示す。

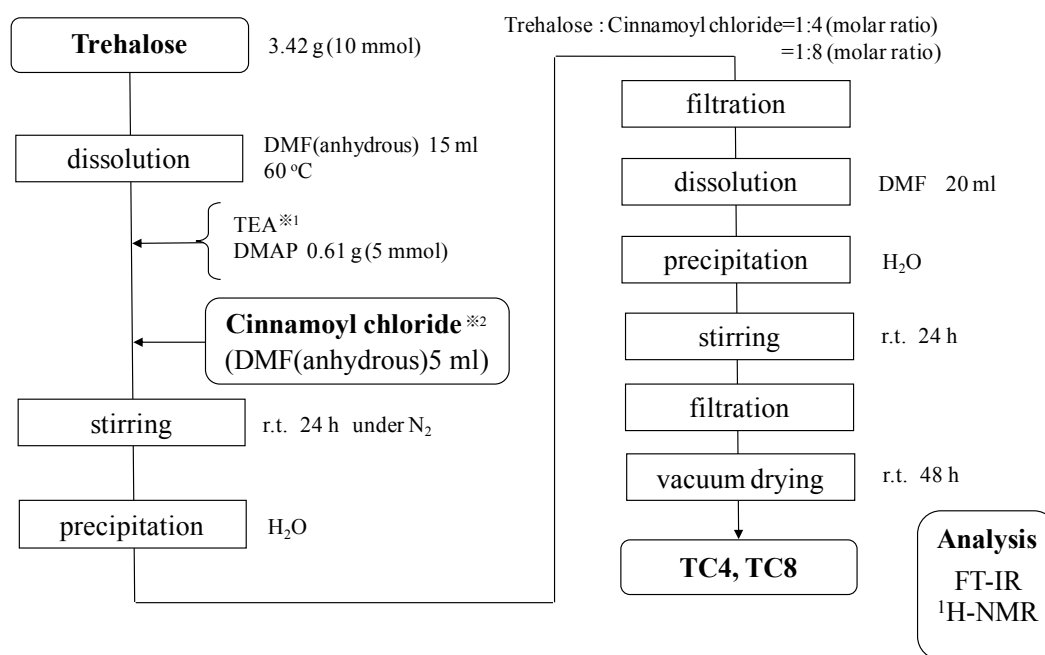


Fig. 1.2.1 Preparation of TC4 and TC8.

※1 Amount of TEA : TC4 5.6 ml(40 mmol)、TC8 11.2 ml(80 mmol)

※2 Amount of cinnamoyl chloride: TC4 6.66 g(40 mmol)、TC8 13.33 g(80 mmol)

1.2.3 TC の光架橋

TC4、TC8 に UV を照射したときの吸収スペクトルの時間変化の測定を行い光二量化的調査を行った。TC4、TC8 それぞれ 0.080 g を 4.0 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 20 mg / ml)を調製し、その 2 ml を石英セル(3 cm×2 cm×5 mm)に加えた。次に、容易に均一な薄膜を作製できるディップコーター(アイデン(株)製)を用いて、降下速度 1 mm / s、浸漬時間 1 min、上昇速度 0.5 mm / s、乾燥時間 1 h の条件で石英板(6 cm×1.5 cm×2 mm)上に薄膜を作製した。ディップコート条件を Fig. 1.2.2 に示す。

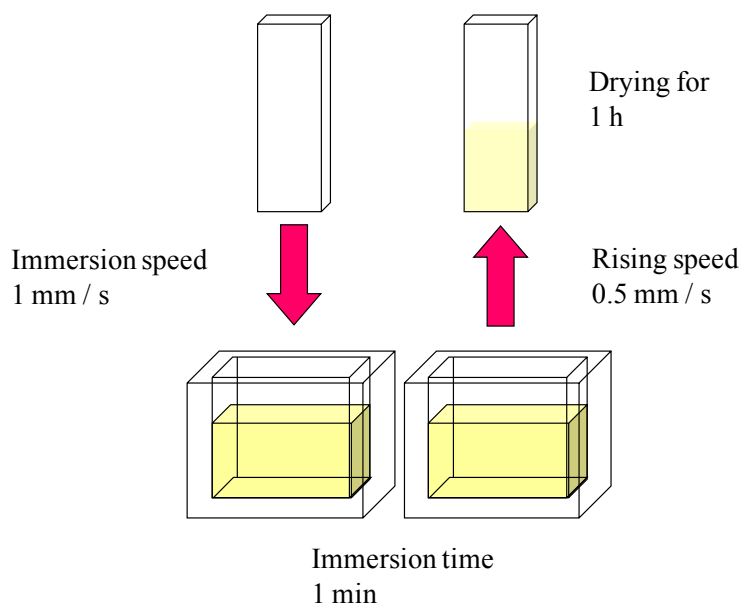


Fig. 1.2.2 Condition of dip coating.

薄膜作製後、UV 照射装置 Spot Cure SP-7(ウシオ電機社製)を用いて UV 光照射を行った。UV 照射装置には均一照射ユニットライトガイドを取り付けてあり、均一照射ユニットライトガイドの先端から 12 cm の位置に PMMA フィルター($\lambda < 280 \text{ nm}$ をカット)を設置し、17 cm の位置に石英板上に作製した薄膜を設置した。UV の照射強度は 100% (60.6 mW/cm^2) で行った。UV 光を所定時間照射した後、解析として紫外可視吸収スペクトル測定よりスペクトルの時間変化を測定した。

1.2.4 細胞培養用薄膜の作製

ガラス基板としてφ15 mm 丸カバーガラス(No.1 松浪硝子工業(株)製)を用いて TC4 および TC8 の薄膜を作製した。TC4 または TC8 1 g を 50 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 20 mg / ml)をそれぞれ調製し、その後、100 ml ビーカーに移した。

ガラス基板は殺菌線消毒保管庫 DM-90(大信工業(株)製)にて 2 日間 UV 処理した後、硝酸:硫酸:純水の体積比が 1:3:6 になるように調製した混合溶液に 1 日浸漬させることで表面洗浄を行い、純水ですすいで乾燥させた。⁶⁾ 清浄したガラス基板に対して、1.2.3 と同じ条件(Fig. 1.2.2)でディップコートを行い乾燥させた。その後、UV 照射($\lambda \geq 280$ nm)を行い薄膜を作製した。薄膜はエチレンオキサイドガス(EOG)処理((株)ステリテック社依頼)にて滅菌を行った。UV 照射条件として、均一照射ユニットライトガイドの先端から 12 cm の位置に PMMA フィルターを設置し、17 cm の位置にディップコートを行ったガラス基板を設置した。UV の照射強度は 100% (60.6 mW / cm²) とした。UV の照射時間は TC4 で 60 s、TC8 で 300 s とした。作製した薄膜は表面の分析として FE-SEM による観察および接触角測定を行った。細胞培養時に用いたサンプルの種類を Table 1.2.2 に示す。また、薄膜を作製した際の手順をフローチャートとして Fig. 1.2.3 に示す。

Table 1.2.2 Samples for cell culture.

Sample	Description
PS well glass	Polystyrene culture plate used as purchased UV-treated and acid-washed glass coverslip
TC4-UV	UV-irradiated TC4 coated on washed glass coverslip
TC8-UV	UV-irradiated TC8 coated on washed glass coverslip

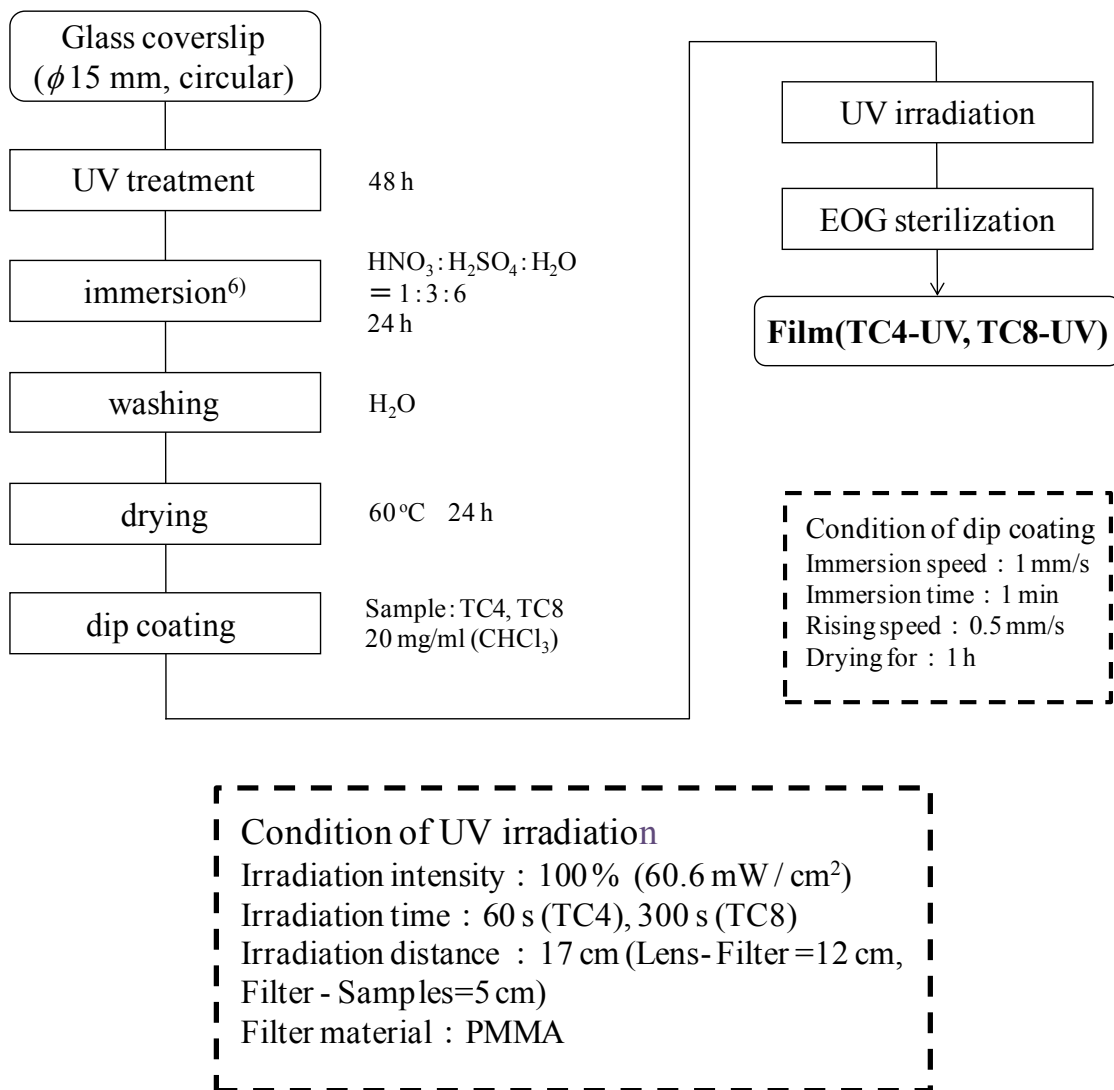


Fig. 1.2.3 Preparation of UV-irradiated thin films for cell culture.

1.2.5 線維芽細胞の *in vitro* 細胞試験

(1) 細胞培養

細胞は、体中の真皮や表皮になりうる細胞で、再生医療の基本的な細胞とされている線維芽細胞に注目し、今回はマウス胚細胞由来線維芽細胞 3T3 Swiss Albino 細胞を用いた。試験に必要な細胞数になるまで $\phi 10$ cm dish を利用し、D-MEM に 15% FBS と 1% Penicillin / Streptomycin とを加えた溶液を基本培地とし、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 雰囲気下で培養を行った。 $\phi 10$ cm dish で増殖させた線維芽細胞を Fig. 1.2.4 に示す。

60-70% Confluence(細胞を増殖させて、まだ過度な密集に至っていない状態)になった 3T3 Swiss Albino をトリプシン(0.25%trypsin + EDTA)により剥離し、回収した。24 well plate((株)グライナージャパン製)の各 well に評価したいサンプルを設置し、その上に 3×10^3 cells/ml 播種した。播種 3 時間、1、3、5、7 日後に細胞試験を行った。細胞の接着は、位相差顕微鏡 CKX41 (オリンパス(株)製)を用いて観察した。

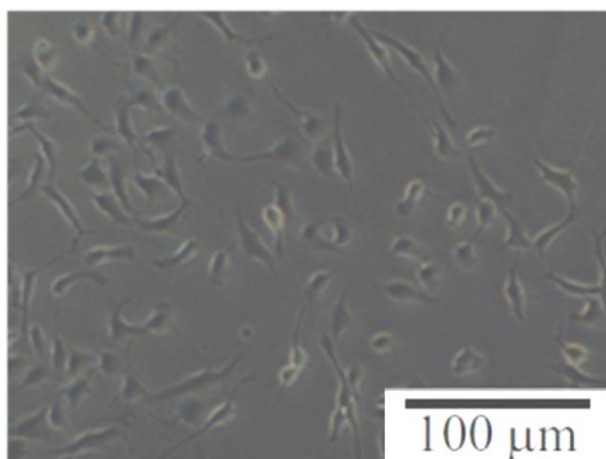


Fig. 1.2.4 3T3 Swiss Albino cells ($\phi 10$ cm dish)

(2) 細胞数測定および細胞増殖評価⁷⁾⁻⁹⁾

細胞数測定には血球計算盤を用い、細胞増殖の評価には MTT 試験を用いた。血球計算盤による細胞数測定では、トリパンブルー色素を用いることにより生細胞では色素が細胞膜を透過しないが、死細胞は染色されることを利用して、細胞の生死細胞数を測定することができる。

培養後の試料に $250 \mu\text{l}$ のトリプシンを加え 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 雰囲気下で 3 分間静置することで加水分解により細胞を剥離し、過度な加水分解を抑制するために $250 \mu\text{l}$ 基本培地を加えて中和した。その後、 $500 \mu\text{l}$ トリパンブルーを加え、死細胞を染色し、血球計算盤と位相差顕微鏡を用いて生死細胞数を計数した。

MTT 試験は、テトラブリウム塩の一種である MTT により生細胞のミトコンドリア中の呼吸鎖を利用して染色し、相対的な細胞量を測定する方法である。MTT はミトコンドリア内に存在する酵素により還元され、発色する。所定時間培養後の試料に 300 μ l の 1.0 mg / ml MTT 溶液を加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 雰囲気下で 90 分間静置した後、300 μ l 細胞溶解液(セルライシス)を加え、細胞を溶解した。溶解して得られた溶液を 300 μ l ずつ 96 well plate((株)グライナーージャパン製)に移し、マイクロプレートリーダー MTP-300 Lab (コロナ電気(株)製)を用いて波長 570 nm で吸光度を測定した。

(3)検定方法¹⁰⁾

二標本 t 検定により統計解析を行った。二標本 t 検定とは、ある二群の間に差があるか否かを求める方法であり、差がないという証明を棄却することにより証明する。ある二つの集団に差があることを証明する場合、まず差がないという仮説(帰無仮説 H₀: 二群は同一の正規母集団から得られた標本である)を提起し、差があるという仮説(対立仮説 H₁)は保留する。それぞれの平均値を x₁、x₂ とすると、二群の差が平均値の差 x₁-x₂ に要約されると考えられる。この差は H₀ の場合、差がないので期待値は 0 である。差の有意差を判定するために H₀ のもとで x₁-x₂ の生じる確率を、その標準誤差で標準化すると自由度(df=n₁+n₂)の t 分布にしたがうことを利用して求める。

$$t = \frac{x_1 - x_2}{s \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} \quad (1.2.1)$$

ここで s は両群の分散 s₁²、s₂² から求めた合成部分 s² の平方根として

$$s = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1-1) + s_2^2(n_2-1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (1.2.2)$$

で求めることができる。また

$$s \sqrt{1/n_1 + 1/n_2} \quad (1.2.3)$$

が x₁-x₂ の標準偏差にあたる。t 分布表により、自由度 df、有意水準 α の t 値(t _{α})を調べ、標本の t を比較すると t \geq t _{α} のとき有意差があり、t \leq t _{α} のとき有意差がないとなる。

1.2.6 薄膜に対するタンパク質の吸着試験

(1) 蛍光観察

蛍光観察では、カバーガラス上に作製した TC 薄膜を EOG 滅菌したものに対し、細胞外マトリックスに存在する糖タンパク質で細胞接着因子であるフィブロネクチンに蛍光因子である HiLyte 488 を結合したものをを用いて行った。D-MEM に 15%FBS と 1% Penicillin / Streptomycin とを加えた溶液に対し、HiLyte 488-modified fibronectin が 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように調整し、TC 薄膜上に 300 μl 加え、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 24 h インキュベーションした。その後、上澄みの溶液を除き、D-PBS で 2 回洗浄後、D-PBS を 400 μl 加え、倒立顕微鏡 Axio Vert.A1(カールツァイスマイクロスコピー(株)製)を用いて蛍光観察を行った。

(2) 蛍光測定

蛍光測定では、蛍光観察で用いた試料の上澄みの D-PBS を回収し、D-PBS で 1 mg/ml に調整したトリプシンを 250 μl 加え 1 h インキュベーションした。その後、ピペッティングし、上澄みを回収後、250 μl 細胞溶解液を加え 1 h インキュベーションした。さらにピペッティング後上澄みを回収し、1 M に調整した水酸化ナトリウム水溶液を 300 μl 加え 1 h インキュベーションした。その後、ピペッティングし、上澄みを回収後、D-PBS で洗浄し、洗浄溶液も回収した。得られた試料は、F-2500 蛍光分光光度計((株)日立ハイテクサイエンス製)を用いて測定した。

1.2.7 装置

•フーリエ変換赤外吸収(FT-IR)スペクトル測定

フーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-8400S(島津製作所社製)を用いて FT-IR スペクトル測定を行った。各種試料を KBr 錠剤法で、測定範囲 $4000-700\text{ cm}^{-1}$ 、積算回数 50 回で測定した。

•核磁気共鳴($^1\text{H-NMR}$)スペクトル測定

核磁気共鳴装置 AV400(Bruker 社製)を用いて $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。試料 20 mg を各種重水素化溶媒(DMSO- d_6 、クロロホルム- d)500-550 μl に溶解させ、NMR 用細管に移し、積算回数 32 回で測定した。

•紫外可視吸収スペクトル測定

紫外可視分光光度計 V-650(日本分光社製)を用いて紫外可視(UV-Vis)吸収スペクトル測定を行った。測定条件を以下に示す。

測光モード	Abs
測定範囲	800 - 200 nm
レスポンス	Medium
バンド幅	L 5.0 nm
走査速度	400 nm / min
読込間隔	1.0 nm
積算回数	1

•電界放射型走査電子顕微鏡観察(FE-SEM)

電界放射型走査電子顕微 S-4700 Type 1(日立製作所社製)を用いて電界放射型走査電子顕微鏡観察を行った。試験用サンプルとして偏光顕微鏡観察で用いたサンプルを使用した。サンプルを導電性カーボンテープで SEM 観察用試料台に固定し、観察前に E-1030 イオンスパッター(日立製作所社製)を用いて金メッキ蒸着を 30 s 行った。測定条件を以下に示す。

加速電圧	2 or 3 kV
撮影倍率	500or 5000 倍

•接触角測定¹¹⁾

接触角計 SImage02V((株)エキシマ社製)を用いて接触角測定を行った。フィルムに超純水を一滴(5 μl)垂らし、PC 画像解析による計測ソフトで ATAN $\theta/2$ 法より接触角を測定した。一つのサンプルにつき 5 回の測定を行い、平均値を採用した。

1.3 結果および考察

1.3.1 FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定による構造解析および溶解性試験

TC をトレハロースおよび桂皮酸クロリドを用いて合成した。このときトレハロースと桂皮酸クロリドの仕込みモル比を 1:4 として置換度の小さい TC4、および、1:8 として置換度の大きい TC8 を合成した。

Fig. 1.3.1 に(a)トレハロース、(b)桂皮酸クロリドおよびこれらの反応によって得られた生成物(c)TC4、(d)TC8 の FT-IR スペクトルを示す。

Fig. 1.3.1 より TC4、TC8 のスペクトル(c)(d)において 1700 cm^{-1} 付近に見られるピークはエステルの $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に由来する吸収である。さらに、 1640 cm^{-1} 付近のピークは桂皮酸ユニットの $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動に由来し、 $1500\text{ cm}^{-1}\sim 1440\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークはベンゼン環の $\text{C}-\text{C}$ 伸縮振動に由来すると考えられる。 1160 cm^{-1} 付近のピークはエステルの $\text{C}-\text{O}$ 伸縮振動に由来すると考えられる。 1000 cm^{-1} 付近のピークはトレハロースの $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 伸縮振動に由来するものと考えられる。

また、Scheme 1.1.2 の反応式より反応前後の化学構造に着目すると、トレハロースのヒドロキシ基が変化している。Fig. 1.3.1 よりトレハロースのスペクトル(a)において 3400 cm^{-1} 付近に顕著なヒドロキシ基の $\text{O}-\text{H}$ 伸縮振動による吸収ピークが見られた。TC4 ではこのピークが減少していた。これは一部のヒドロキシ基に桂皮酸クロリドが理論値では半分置換しているため減少したと考えられる。TC8 ではヒドロキシ基に桂皮酸クロリドがほぼ完全に置換しているためヒドロキシ基に由来するピークがほぼ消失していることが分かる。

これらのことから、TC4 および TC8 の合成反応が進行していることが示唆される。

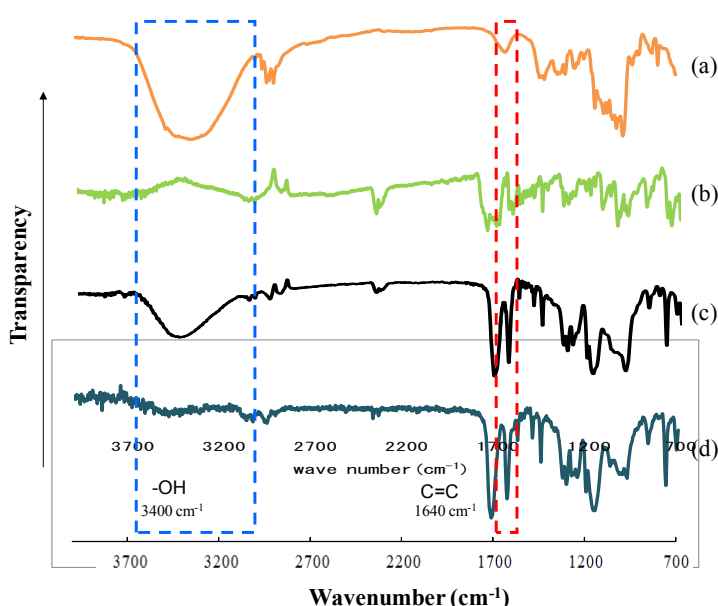


Fig. 1.3.1 FT-IR spectra of (a)trehalose, (b)cinnamoyl chloride, (c)TC4 and (d)TC8.

(a)トレハロース、(b)桂皮酸クロリドおよびこれらの合成によって得られた生成物(c)TC4 の¹H-NMR スペクトルを Fig. 1.3.2 に示す。なお、(c)TC4 のシグナルがブロード化しているのは置換度の異なるもの、および、同じ置換度でも異なる位置、異なるヒドロキシ基に置換が起きているものが混在しており、それぞれ異なる化学シフトを有することから様々なところにシグナルが出現し、シグナルが重なってブロード化しているためである。

Fig. 1.3.2 より(a)トレハロースのスペクトルにおいて骨格の C-H に由来するシグナル(3.0-3.7 ppm)および O-H に由来するシグナル(4.3-4.8 ppm)が(c)TC4 で少しシフトしていることが分かる。また、(b)桂皮酸クロリドのスペクトルにおいてアルケンおよびベンゼン環由来のシグナル(6.3-6.6 ppm、7.2-8.0 ppm)が(c)TC4 にも見られた。このことにより、TC4 の合成反応が進行していることが示唆される。

生成物(c)TC4 のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 1.3.1 に示す。

Table 1.3.1 Measured integral value of each signal in the spectrum of TC4.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical number of proton(DS=4.0)
a	3.5-4.5	14.52	12.00
b	4.9-5.6	6.17	6.00
c	6.0-6.6	4.00	4.00
d	7.1-7.6	21.36	20.00
e	7.6-7.9	3.91	4.00

Table 1.3.1 より、シグナル積分値とその理論存在比がほぼ一致していることが分かる。さらに(c)TC4 のシグナル積分値よりトレハロースと桂皮酸クロリドの比率は 1:3.8 と計算され、理論値に近い値であった。したがって、これらの結果より TC4 の合成が認められた。なお、シナモイル基の置換位置を NMR スペクトルから解析することはできないが、トレハロースの 6, 6'位のヒドロキシ基は反応性が比較的良好いため置換していると考えられる。その他のヒドロキシ基に関しては不明である。

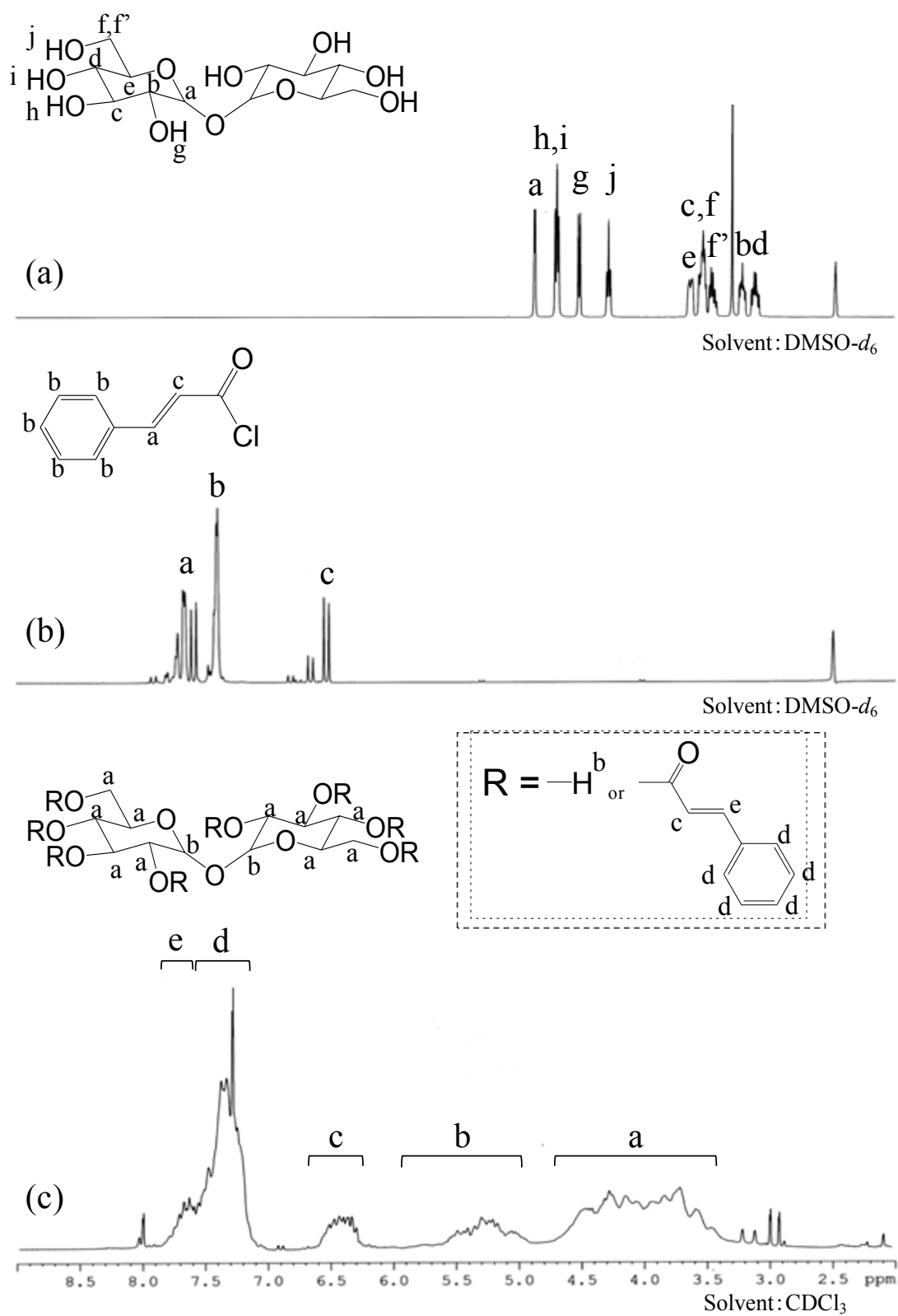


Fig. 1.3.2 $^1\text{H-NMR}$ spectra of (a)trehalose, (b)cinnamoyl chloride and (c)TC4.

次に、(a)トレハロース、(b)桂皮酸クロリドおよびこれらの合成によって得られた生成物(c)TC8の¹H-NMR スペクトルを Fig. 1.3.3 に示す。

Fig. 1.3.3 より(a)トレハロースのスペクトルにおいて骨格の C-H の 2~6 位に由来するシグナル(3.0-3.2 ppm、3.3 ppm、3.4-3.7 ppm)と C-H の 1 位に由来するシグナル(4.9 ppm)が(c)TC8 でかなりシフトしていて、O-H に由来するシグナル(4.2-4.8 ppm)が(d)TC8 では消失していることが分かる。また(b)桂皮酸クロリドのスペクトルにおいてアルケンおよびベンゼン環由来のシグナル(6.3-6.6 ppm、7.2-8.0 ppm)が(c)TC8 にも見られた。このことにより、TC8 の合成反応が進行していると考えられる。

生成物(c)TC8 のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 1.3.2 に示す。

Table 1.3.2 Measured integral value of each signal in the spectrum of TC8.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical number of proton(DS=8.0)
a	4.2-4.3	4.21	4.00
b	4.4	2.26	2.00
c	5.4	3.15	2.00
d	5.7	2.00	2.00
e	6.1	1.85	2.00
f	6.2-6.6	7.78	8.00
g	7.2-7.6	44.77	40.00
h	7.6-7.9	8.14	8.00

Table 1.3.2 より、g のシグナル積分値にずれがあるが、これは重水素溶媒であるクロロホルム-*d* と重なっているためと考えられる。その他のシグナル積分値と理論存在比はほぼ一致していることが分かる。さらに(c)TC8 のシグナル積分値よりトレハロースと桂皮酸クロリドの比率は 1:8.0 と計算され、理論値に近い値であった。したがって、これらの結果より TC8 の合成が認められた。

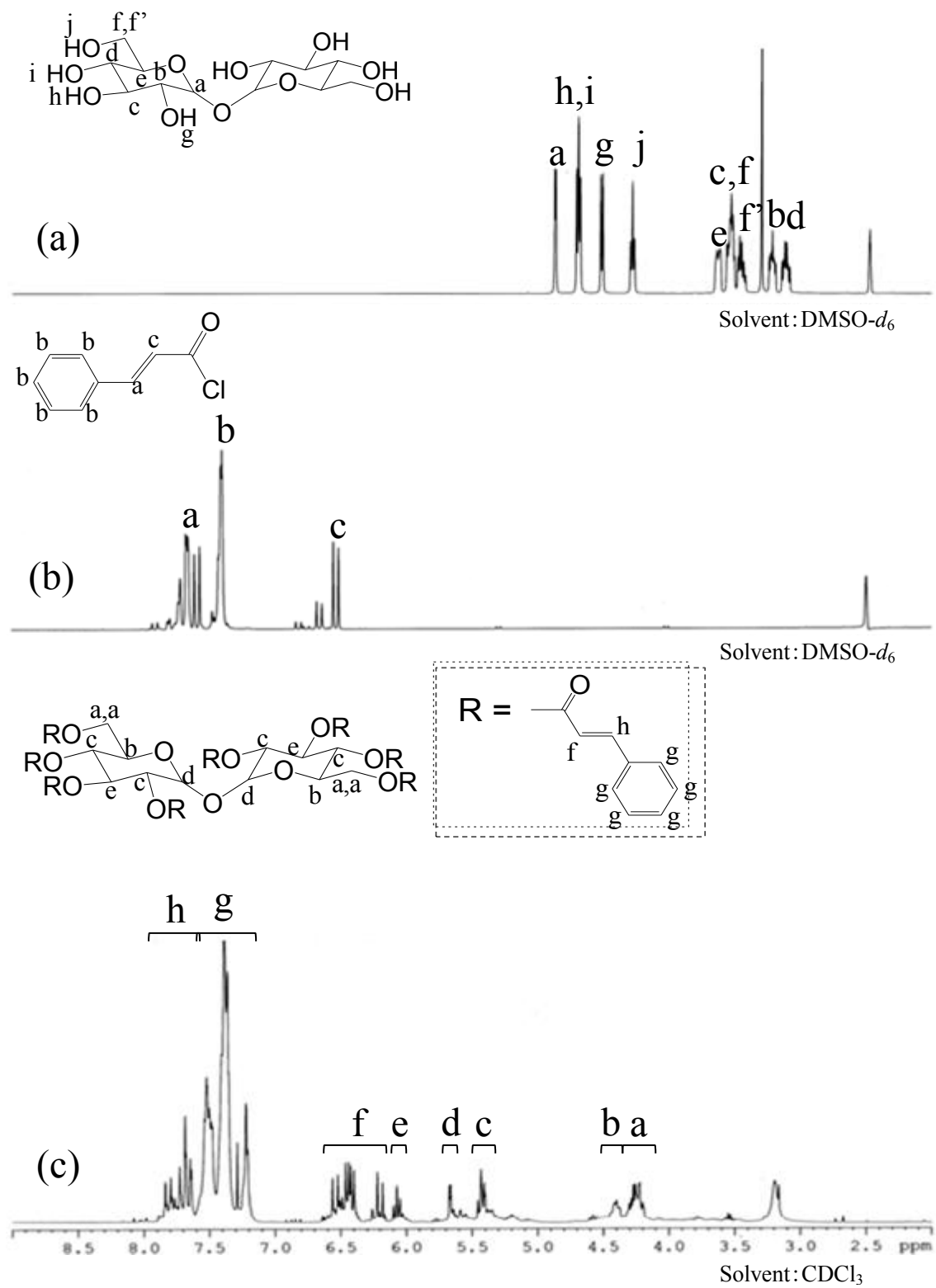


Fig. 1.3.3 ¹H-NMR spectra of (a)trehalose, (b)cinnamoyl chloride and (c)TC8.

トレハロース、桂皮酸クロリドおよび TC4、TC8 について溶解性試験を行った。用いた溶媒は純水、エタノール、メタノール、DMF、DMSO、THF、アセトン、クロロホルム、ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトニトリル、酢酸エチル、トルエンの 13 種類である。試料を 20 mg 秤りとり溶媒を 500 μ l 加え、目視で観察することで溶解性試験を行った。この結果を Table 1.3.3 に示す。

Table 1.3.3 Solubility of trehalose, cinnamoyl chloride, TC4 and TC8.

solvent	samples			
	Trehalose	Cinnamoyl chloride	TC4	TC8
water	○	×	×	×
ethanol	○	○	△	×
methanol	○	○	△	×
DMF	○	○	○	○
DMSO	○	○	○	○
THF	×	○	○	○
acetone	×	○	○	○
chloroform	×	○	○	○
hexane	×	○	×	○
diethyl ether	×	○	×	○
acetonitrile	×	○	×	○
acetic ether	×	○	×	×
toluene	×	○	×	○

(○) soluble
(×) insoluble
(△) partially soluble

Table 1.3.3 より、トレハロースは親水性であるため、純水、エタノール、メタノール、DMF および DMSO には可溶であり、その他の溶媒には不溶であった。また桂皮酸クロリドは疎水性であるため純水には不溶であったが、その他の有機溶媒には可溶であった。

TC4 はエタノールおよびメタノールには部分溶解し、DMF、DMSO、THF、アセトンおよびクロロホルムには可溶であり、その他の溶媒には不溶であった。これはトレハロースの水酸基にシンナモイル基が置換したためトレハロースの親水性が低下し、トレハロースが可溶であった極性の非常に高い溶媒である純水、エタノールおよびメタノールに溶けにくくなり、桂皮酸クロリドが可溶であった極性溶媒である THF、アセトンおよび疎水性溶媒であるクロロホルムに可溶になったと考える。さらに TC8 では極性の非常に高い溶媒および酢酸エチルに不溶であり、その他の有機溶媒には可溶であった。これは TC4 より置換度が高くなったため親水性がさらに低下し、極性の非常に高い溶媒には不溶になり極性の低い溶媒に可溶になったと考えられる。

1.3.2 TC の光架橋

トレハロースおよび桂皮酸クロリドより合成した TC4、TC8 を用いて石英板上に薄膜を作製し、紫外(UV)光照射時間による紫外可視吸収スペクトル変化を調査した。

ディップコーターで石英板上に作製した薄膜に対し、PMMA フィルム($\lambda < 280 \text{ nm}$ をカット)のみを通して UV を照射し、薄膜の紫外可視吸収スペクトルの時間変化を確認した。薄膜に対し、吸光度の変化がほぼ見られなくなるまで照射し、この間、所定の累積照射時間(TC4:0 s、5 s、10 s、20 s、30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s) (TC8:0 s、5 s、10 s、20 s、30 s、60 s、90 s、120 s、180 s、210 s、240 s、270 s、300 s)ごとにスペクトルを測定した。TC4、TC8 の紫外可視吸収スペクトルの時間変化を Fig. 1.3.4、Fig. 1.3.5 に示す。

Fig. 1.3.4、Fig. 1.3.5 より、照射前の TC4、TC8 において 283 nm に最も強い吸収がみられた。これはベンゼン環とそれに結合する C=C 結合およびカルボニル基の π 共役によるものである。UV 照射により TC が二量化反応を行いシクロブタン環が生じると π 共役系が変化する。これにより、二量化反応が起こると、この強い吸収がシフトし、吸収スペクトルが変化する。また、照射時間が増加するにつれて 283 nm の吸収の減少が見られた。これにより、UV 照射による TC の光反応の進行が示唆される。次に TC4 と TC8 を比較してみると TC4 より TC8 が多く光を吸収しており、吸光度の変化がなくなるまでの UV 照射時間も TC4 は 180 s、TC8 は 300 s と TC8 の方が長かった。これは TC8 の官能基が TC4 より多いため、反応の完了により多くの光を吸収する必要があり反応時間も長くなったと考えられる。

TC の二量化において、光照射した薄膜は溶媒に溶解しづらくなるため分子間での結合が起こっていることが分かる。分子内での二量化に関して、TC8 は分子モデルにおいて官能基間の距離が近かったため⁵⁾、起こっている可能性は考えられる。TC4 のモデルでは官能基の密集がなく不明だったが、光照射後の薄膜について可溶成分を抽出したところ、約 35%の重量減少がみられた。TC4 は置換度が異なる成分を含んでおり、置換度が二つのものだと分子間で結合が生じても可溶なままであるが、一方で置換度の高いものの存在も考慮すると、分子内の二量化が起こっている可能性は考えられる。

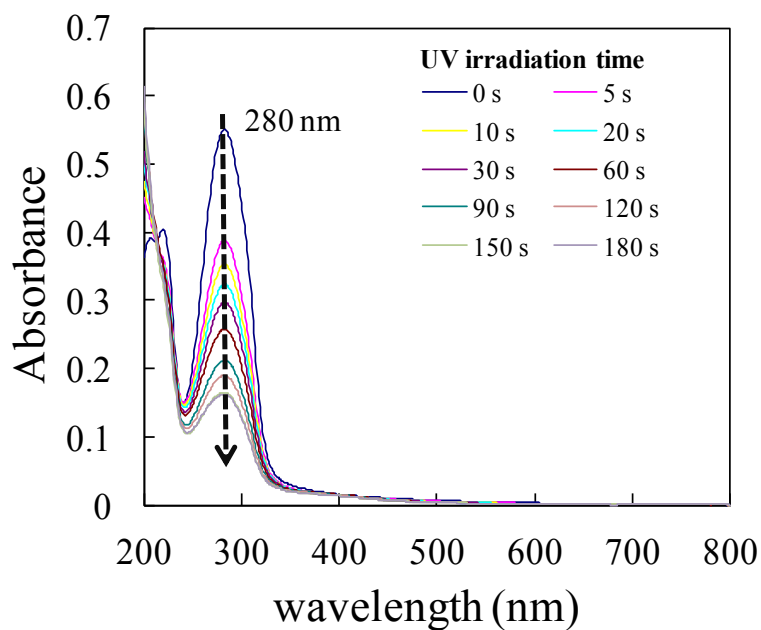


Fig. 1.3.4 Spectral changes of TC4 induced by UV irradiation.

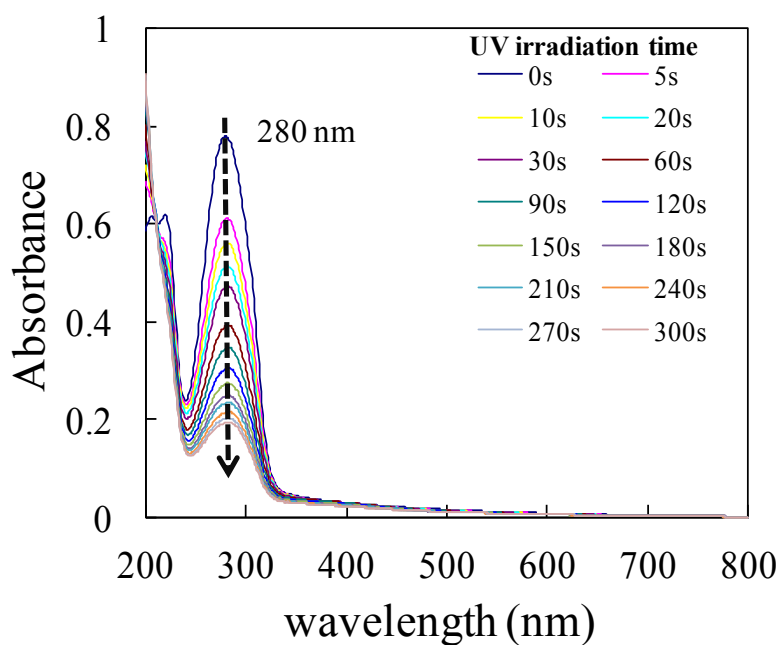


Fig. 1.3.5 Spectral changes of TC8 induced by UV irradiation.

1.3.3 TC 薄膜の表面観察

前述した 1.2.3 と同様の条件でカバーガラス上にディップコートを行い、作製した TC 薄膜(TC4、TC8)の UV 照射前、照射後(TC4:60 s, TC8:300 s)の表面および UV 照射後の TC 薄膜断面の FE-SEM 観察を行った。TC4 および TC8 の表面の観察結果を Fig. 1.3.6、Fig. 1.3.7 に、断面の観察結果を Fig. 1.3.8、Fig. 1.3.9 に示す。

Fig. 1.3.6、Fig. 1.3.7 より、UV 照射前、照射後の TC4 および TC8 の薄膜ではともに滑らかで均一な薄膜となっていた。Fig. 1.3.8、Fig. 1.3.9 より、薄膜断面の観察において薄膜の膜厚は 30-40 nm となっていることが分かった。ディップコートを行う際、膜厚は溶液の粘度と引き上げ速度に依存し、単分子膜ではなく多層になっていることが考えられる。また、粘性をもとにした理論式より薄膜の膜厚を算出した。

$$h = \sqrt{\frac{\eta U}{\rho g}} \quad (1.3.1)$$

ここで、 h は膜厚、 η は粘性率、 U は引き上げ速度、 ρ は塗工液密度、 g は重力加速度である。希薄溶液であることを考慮して、 η はクロロホルムの粘性率(0.57 cp)、 ρ はクロロホルムの密度(1.48 g/cm³)を用いた。さらに化合物の比重を 1 と仮定したときの溶液中の体積分率を用いて計算すると、膜厚は 70 nm となり、SEM の観察像から測定したデータと比べ、近い値となった。TC4 と TC8 の膜厚を比較し、SEM の観察像から測定したデータでは大きな差はなく、ディップコートによる粘度、引き上げ速度では大きな差は出ないと考えられる。

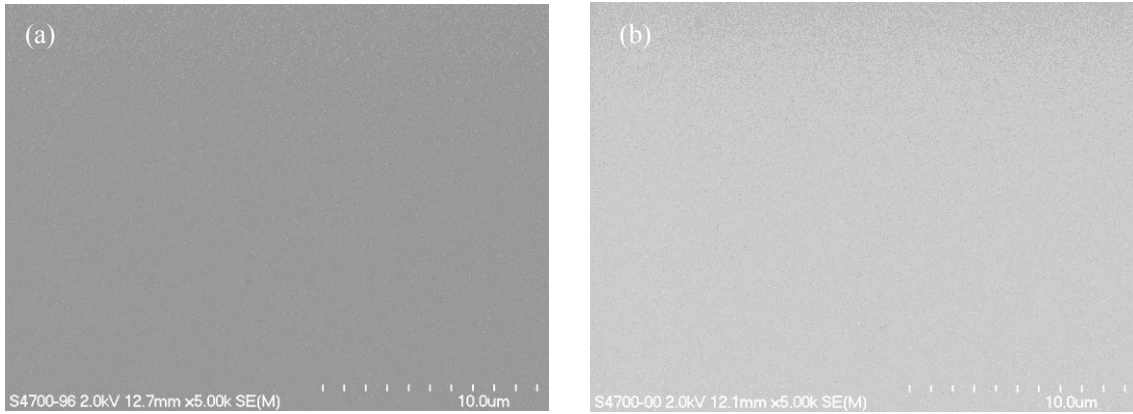


Fig. 1.3.6 FE-SEM observation of surface morphologies of (a) TC4 before UV irradiation and (b) UV-irradiated TC4.

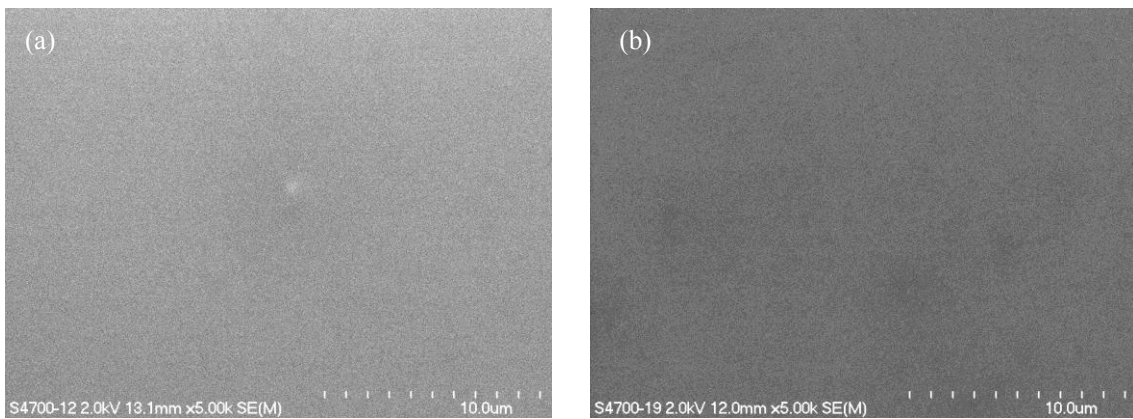


Fig. 1.3.7 FE-SEM observation of surface morphologies of (a) TC8 before UV irradiation and (b) UV-irradiated TC8.

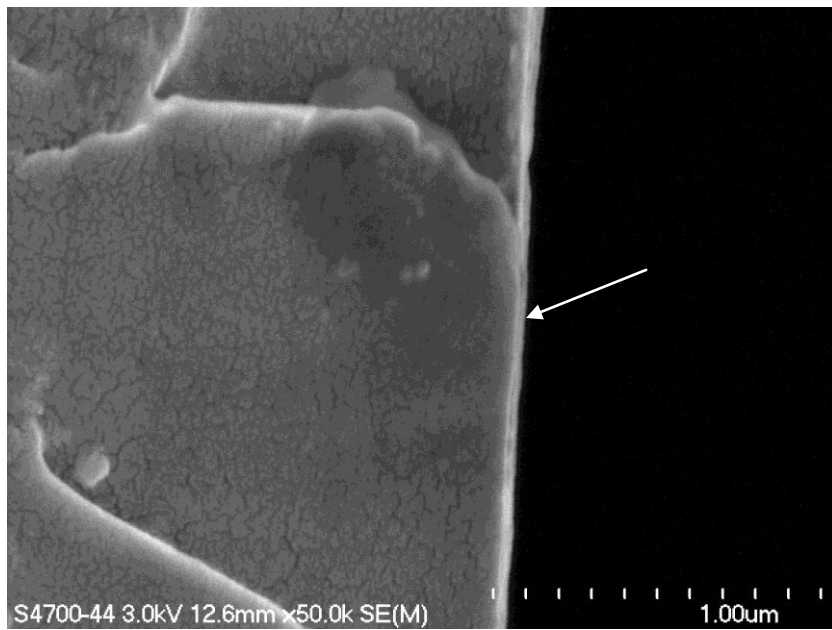


Fig. 1.3.8 The cross section of the sample-coated cover glasses was observed for determination of the TC4 film thickness.

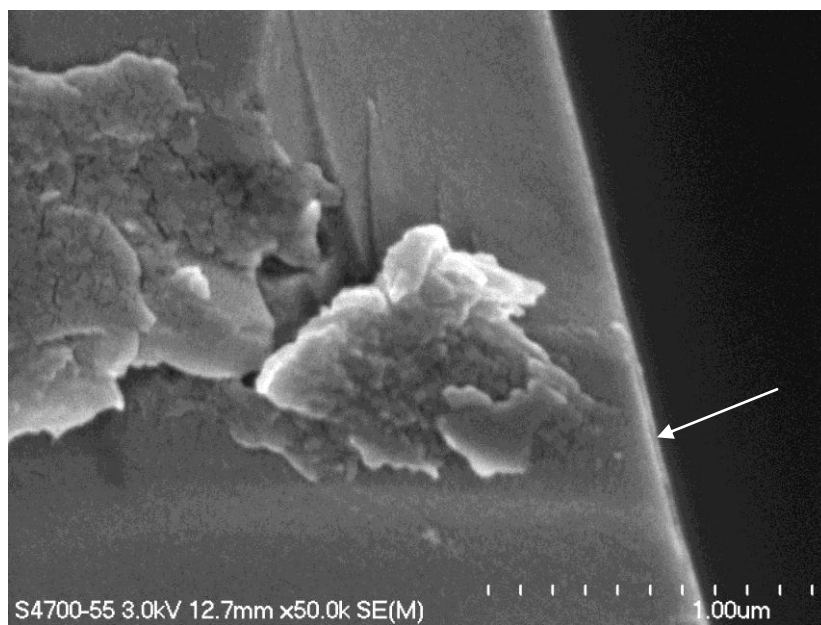


Fig. 1.3.9 The cross section of the sample-coated cover glasses was observed for determination of the TC8 film thickness.

1.3.4 TC 薄膜の接触角測定

ガラス基板上に TC4、TC8 薄膜を作製し、薄膜表面の濡れ性(親水性、疎水性)を接触角測定により調査した。

細胞培養用ポリスチレン(PS) well plate、購入したガラス基板そのまま、洗浄処理を行ったガラス基板、UV 照射前、UV 照射後の TC4 薄膜、UV 照射前、UV 照射後の TC8 薄膜について、Fig. 1.3.10 に接触角値を示し、Fig. 1.3.11 に接触角測定における各試料上での水滴の様子を写真で示す。

Fig. 1.3.10、Fig. 1.3.11 において接触角の値は PS well plate 上で 46.0° ($\pm 0.6^{\circ}$)、購入したそのままのガラス基板で 57.9° ($\pm 3.1^{\circ}$)、洗浄処理を行ったガラス基板で 14.7° ($\pm 1.1^{\circ}$)、UV 照射前の TC4 で 14.7° ($\pm 1.4^{\circ}$)、UV 照射後の TC4 で 46.1° ($\pm 1.5^{\circ}$)、UV 照射前の TC8 で 85.3° ($\pm 2.6^{\circ}$)、UV 照射後の TC8 で 101.0° ($\pm 1.6^{\circ}$)であった。

購入したガラスは洗浄することにより表面が親水性になり接触角の値が大きく減少している。これにより購入時の表面に付着していた有機物が除去されていることが分かった。また、UV 照射前の TC4 において接触角は親水性に近い値だったのに対し、UV 照射前の TC8 では TC4 に比べ接触角の値は大きく、疎水性になっていた。TC4 ではトレハロースのヒドロキシ基が残存しているため、親水性であるが、TC8 ではそのヒドロキシル基がシナモイル基に置換されるため疎水性が高くなったものと考えられる。また、UV 照射後の TC4、TC8 では照射前より表面の疎水性が増加している。これは、UV 照射による二量化反応時に、分子の可動性が高まり、空気に接触する側に疎水性基が集まった可能性が考えられる。

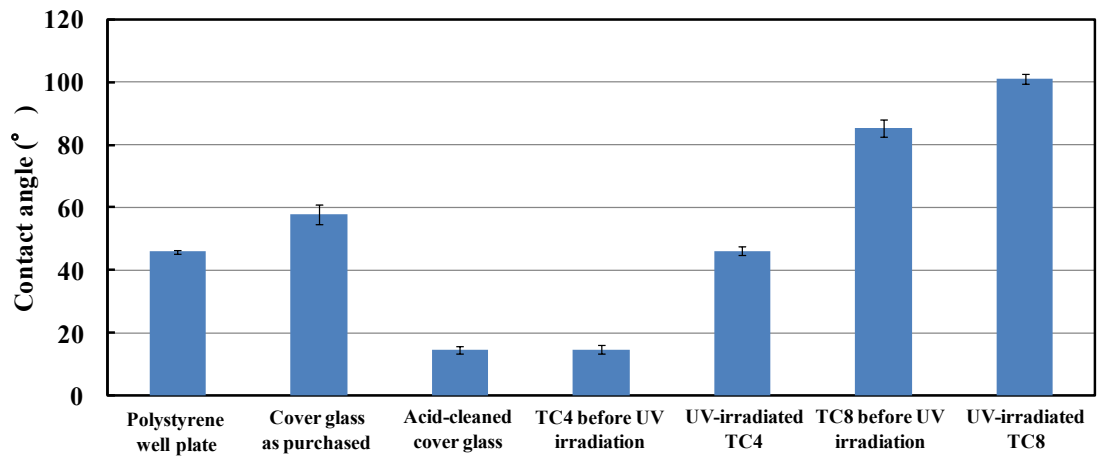


Fig. 1.3.10 Contact angles of the UV irradiated TC4 film and TC8 film.

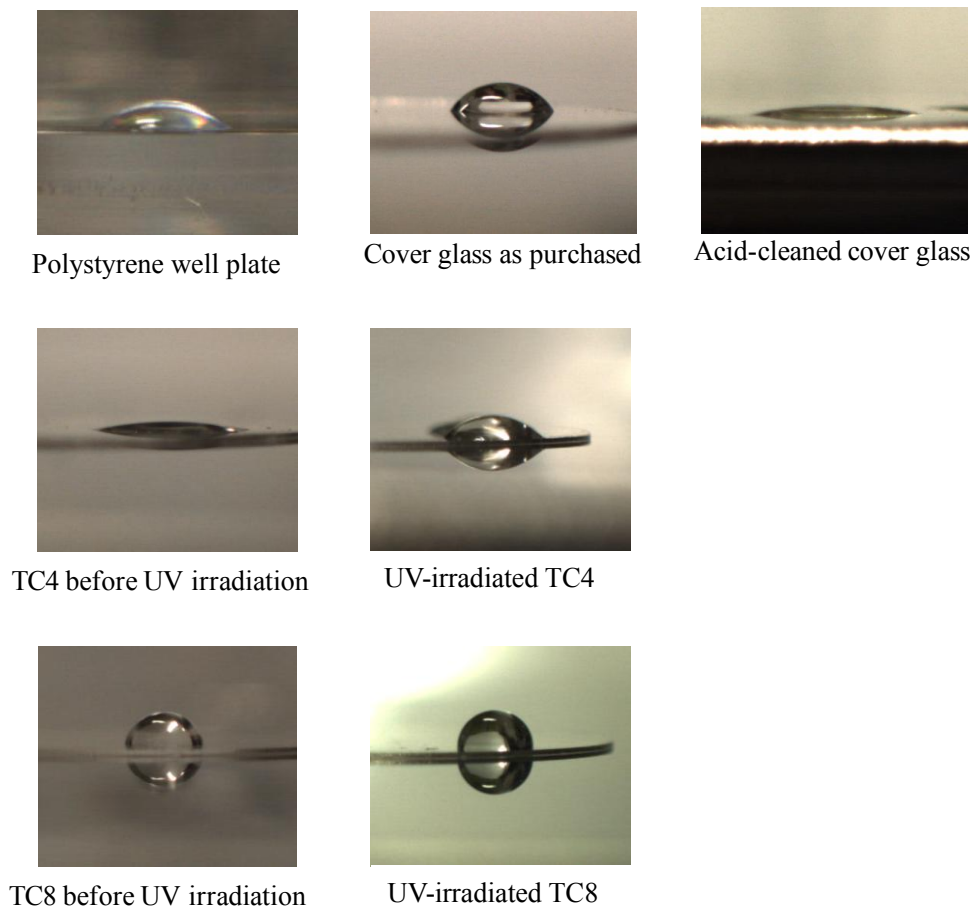


Fig. 1.3.11 Photographs of water droplets on the UV-irradiated TC4 films and TC8 films.

1.3.5 TC 薄膜を用いた細胞適合性評価

Polystyrene well plate 上(PS well)、洗浄処理を行ったガラス基板(glass)および作製した薄膜(UV 照射後の TC4(TC4-UV)、UV 照射後の TC8(TC8-UV))を用いて線維芽細胞の *in vitro* 細胞増殖試験を行った。

位相差顕微鏡による細胞の観察結果として、細胞培養 3 時間後のものを Fig. 1.3.12 に、5 日後のものを Fig. 1.3.13 に、7 日後のものを Fig. 1.3.14 にそれぞれ示す。

Fig.1.3.12 において細胞培養 3 時間後ではいずれの試料においても接着した細胞に差は見られなかった。Fig. 1.3.13 において培養 5 日後では (b)glass の細胞接着数が少なく、(a)PS well および(c)TC4-UV はほぼ同じであり、(d)TC8-UV では他の試料よりも多くの接着細胞が見られた。また、Fig. 1.3.14 において培養 7 日後では(b)glass 以外の試料でほぼ 100% confluence(試料表面を完全に細胞が覆い尽くしている状態)になっていた。

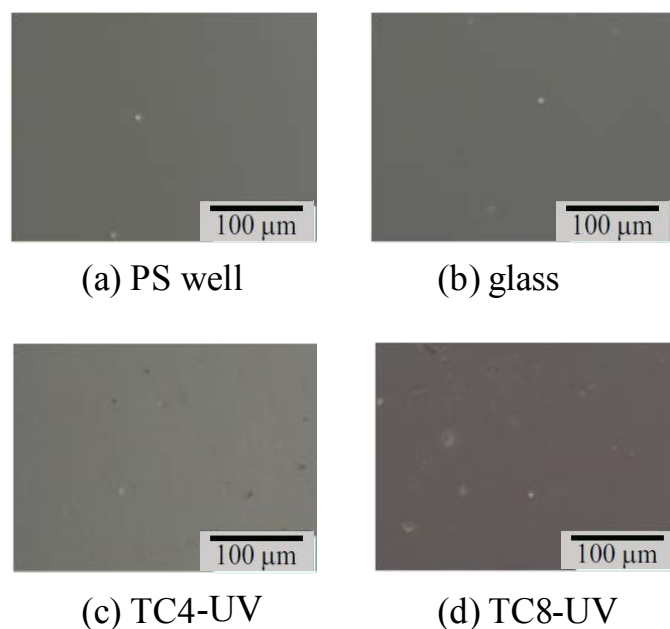


Fig. 1.3.12 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 3 h culture on (a)PS well, (b)glass, (c) TC4 after UV irradiation and (d) TC8 after UV irradiation.

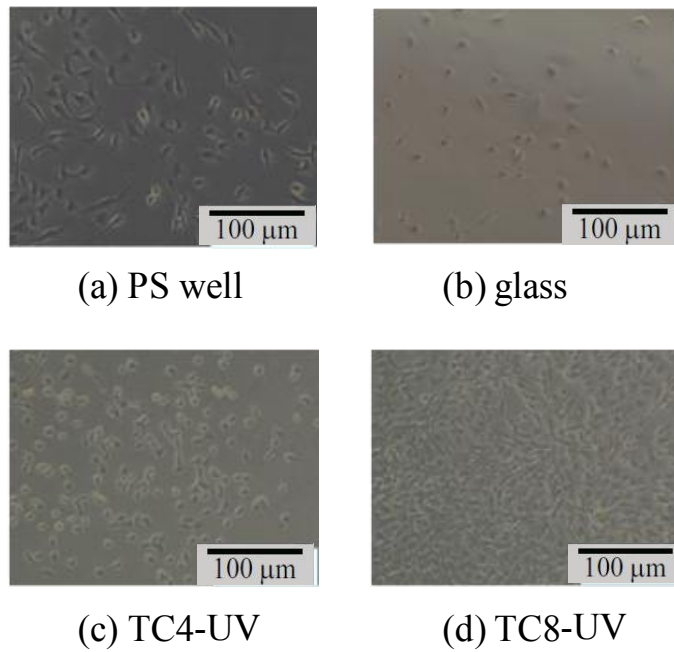


Fig. 1.3.13 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 5 d culture on (a)PS well, (b)glass, (c) TC4 after UV irradiation and (d) TC8 after UV irradiation.

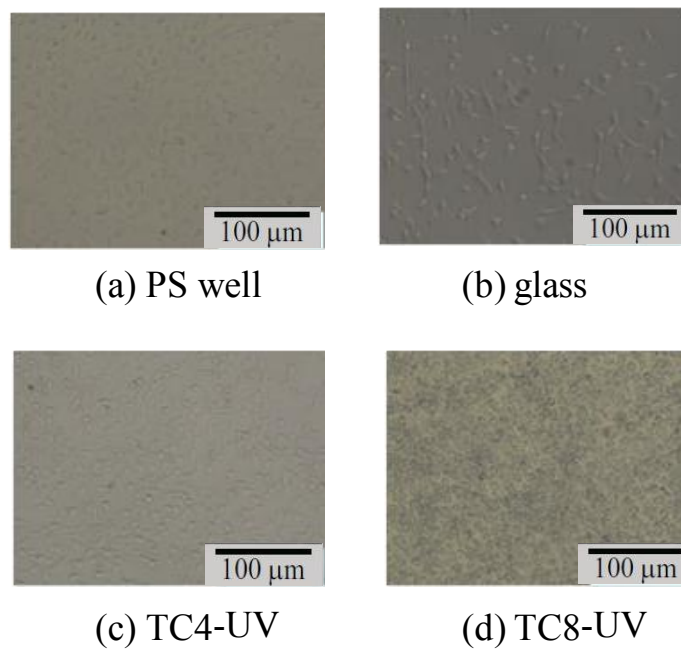


Fig. 1.3.14 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 7 d culture on (a)PS well, (b)glass, (c) TC4 after UV irradiation and (d) TC8 after UV irradiation.

PS well plate 上および各試料上で細胞培養を行い、血球計算板を用いて接着細胞数の測定を行った。その結果を Fig. 1.3.15 に示す。また、接着した細胞のうち死細胞の数を Fig. 1.3.16 に示す。

Fig. 1.3.15 において PS well plate 上およびすべての試料上で培養日数の増加とともに細胞の増殖が観察された。それぞれを比較してみると、細胞培養 3 時間、1 日後では well および各試料において接着した細胞に差はなかったが、培養 3 日、5 日後では glass の接着細胞数が若干少なく、well および TC4-UV はほぼ同じであり、TC8-UV では最も高い細胞数となった。接触角測定 (1.3.3) の結果と関連させて考察すると、洗浄処理を行ったガラス基板の表面が高い親水性を有しているのに対し、PS well plate 上および TC4-UV の薄膜表面の濡れ性がほぼ同じで、TC8-UV の薄膜表面は比較的疎水性が高く、細胞が接着しやすい環境にあったためであると考えられる。ただ、一般的に、細胞培養に適している接触角はもう少し低い値 (60° ~ 80° 付近) であることが知られており¹²⁾、これより高い疎水性であるにもかかわらず、接着性が高かったことを考慮すると、他の理由が存在する可能性も考えられる。培養 7 日後では glass 以外の試料がほぼ同じ値になっていた。これは glass 以外の試料で細胞がほぼ 100% confluence になっていたためであると考えられる。

Fig. 1.3.16 において死細胞に関しては培養期間によらず、ほとんど確認されなかった。このことから各試料に細胞毒性がないことが示された。

なお、培養 7 日後の細胞の生存率の平均値は well で $98 \pm 4.1\%$ 、glass、TC4-UV、TC8-UV で $100 \pm 0\%$ である。

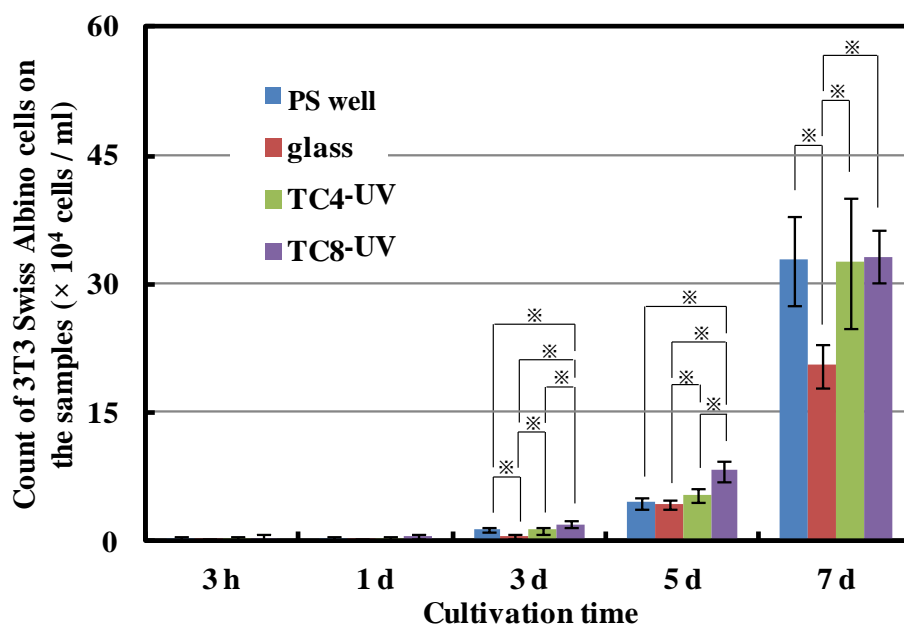


Fig. 1.3.15 Cell proliferation determined by counting of live cells adhered on PS well, glass, UV-irradiated TC4, and UV-irradiated TC8.

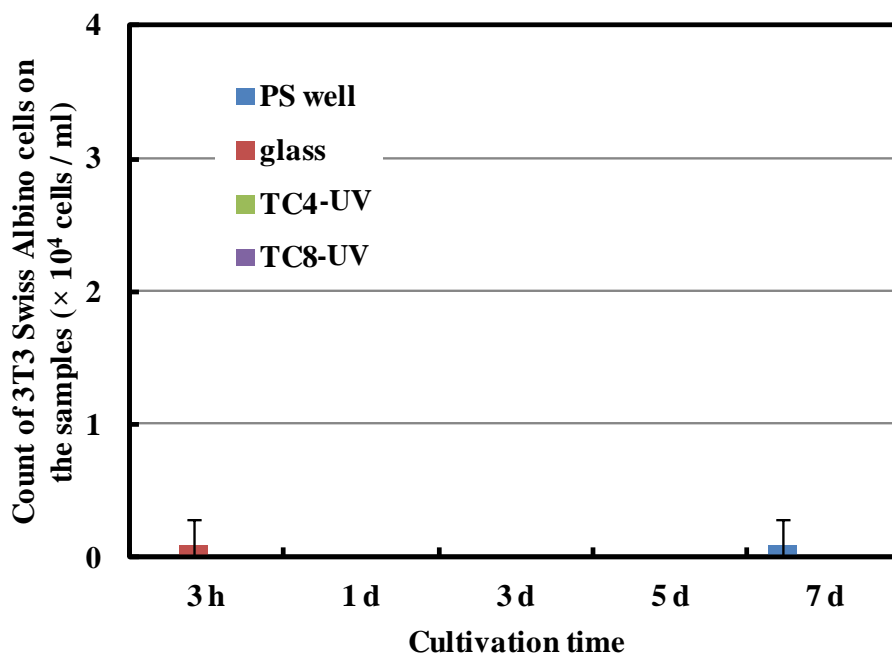


Fig. 1.3.16 Cell proliferation determined by counting of dead cells on PS well, glass, UV-irradiated TC4, and UV-irradiated TC8.

PS well plate 上および各試料上で行った細胞試験における MTT test の結果を Fig. 1.3.17 に示す。

Fig. 1.3.17 において PS well plate 上およびすべての試料上で日数の増加とともに細胞の増殖が見られた。血球計算板による細胞数測定と同様に細胞培養 3 時間、1 日後では well および各試料において接着した細胞に差はなかったが、培養 3 日、5 日後では glass の接着細胞数がわずかに少なく、well および TC4-UV はほぼ同じであり、TC8-UV では最も細胞数が増加していた。

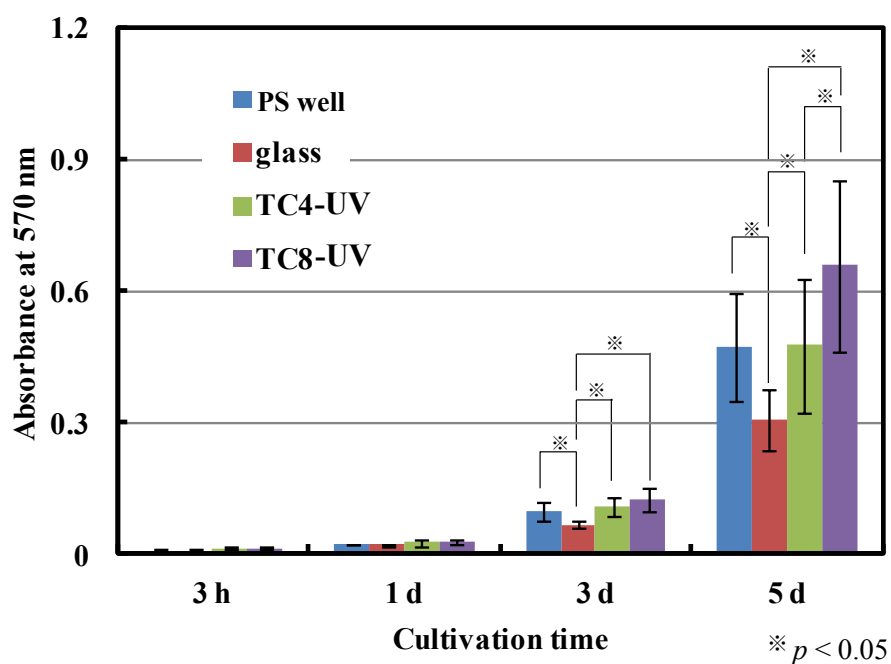


Fig. 1.3.17 Cell proliferation measured by MTT test on PS well, glass, UV-irradiated TC4 and UV-irradiated TC8.

1.3.6 TC 薄膜のタンパク質吸着試験

PS well plate、カバーガラス、および各 TC 架橋薄膜に対し、蛍光因子である HiLyte 488 を結合したフィブロネクチンを用いて吸着試験を行った。蛍光観察および蛍光測定により得られた蛍光スペクトルの結果を Fig. 1.3.18、Fig. 1.3.19 に示す。

Fig. 1.3.18 より、PS well plate、カバーガラスに比べ、TC4 と TC8 の架橋薄膜上ではフィブロネクチンの吸着の増加が見られた。また、Fig. 1.3.19 より、蛍光スペクトルにおいても PS well plate、カバーガラスに比べ、TC4 と TC8 の架橋薄膜上で吸収が増加していた。TC8 の細胞増殖の結果と併せ、何らかの分子認識が起こり、特異的な結合が起こっている可能性も考えている。一方で、この方法では、フィブロネクチンが機能を有する構造を保ったまま結合しているかどうかは不明であり、さらなる解析が必要である。

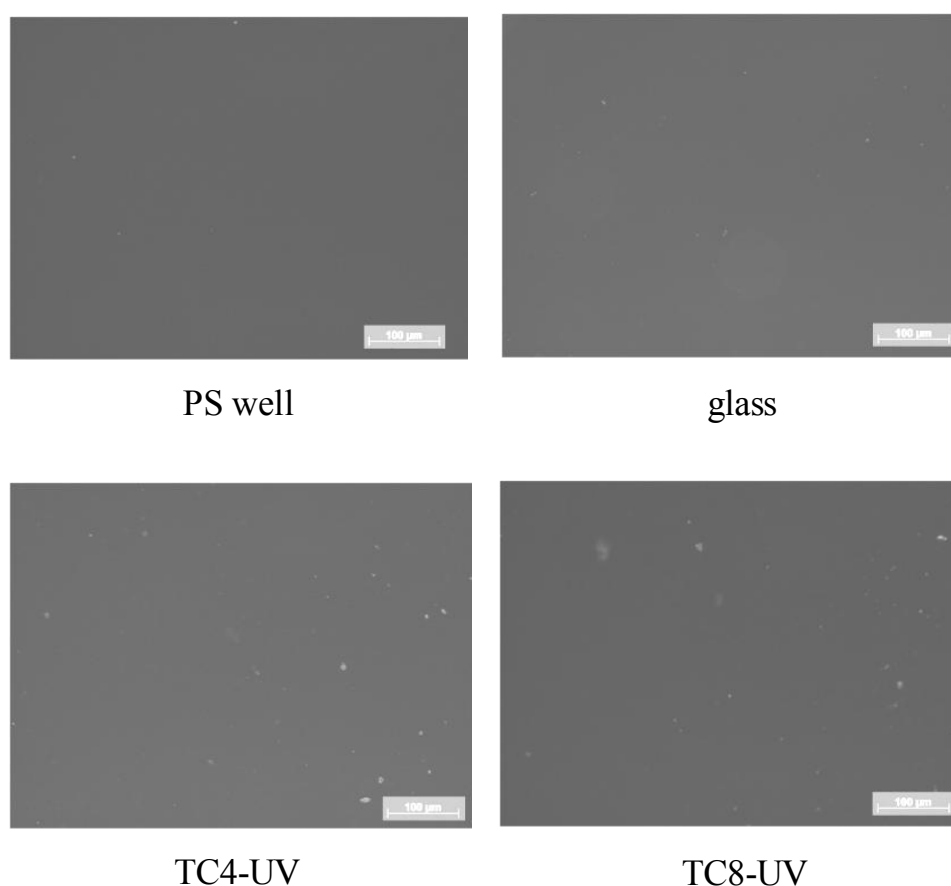


Fig. 1.3.18 Fibronectin binding assay by fluorescence observation on a PS culture plate, glass, UV-irradiated TC4, and UV-irradiated TC8 using fibronectin modified with fluorescent probes (HiLyte 488) in the presence of 10% serum and in the absence of cells.

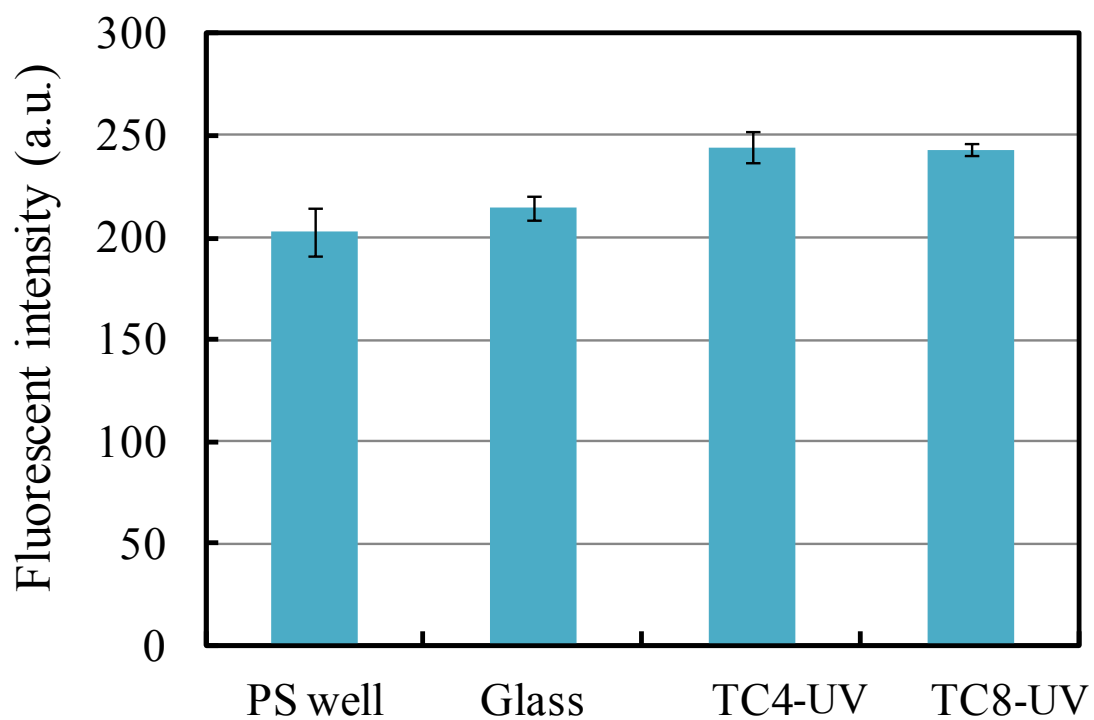


Fig. 1.3.19 Fibronectin binding assay by fluorescence spectra on a PS culture plate, an acid-washed cover glass, photo-cured TC4, and photo-cured TC8 using fibronectin modified with fluorescent probes (HiLyte 488) in the presence of 10% serum and in the absence of cells.

1.4 結論

本研究では生体組織の保存等で有用なトレハロース、および光照射により二量化して結合する桂皮酸クロリドを用いて置換度の異なるトレハロース桂皮酸エステル(TC)を合成した。そして合成により得られたTCを用いて薄膜を作製し、光二量化の調査および、細胞培養試験による細胞適合性の評価を行った。

まずトレハロースおよび桂皮酸クロリドを用いて TC を合成した。このときトレハロース:桂皮酸クロリドの仕込みモル比を1:4としてTC4と1:8としてTC8をそれぞれ合成した。FT-IR および¹H-NMR スペクトル測定により構造解析を行った。その結果 TC4 および TC8 の合成を確認した。

TC4、TC8 をクロロホルムに溶解させ、試料溶液を用いて、ディップコーティングにより石英板上に薄膜を作製した。所定時間 UV 照射を行い、紫外可視吸収スペクトル測定より吸収スペクトルの時間変化を調査した。TC4 および TC8 の吸収スペクトルでは 283 nm に最も高い吸収がみられ、これはベンゼン環とそれに結合する C=C 結合およびカルボニル基のπ共役によるものである。照射時間の減少とともに 283 nm の吸収が減少した。二量化反応によってπ共役系が変化し 283 nm の吸収が減少したものと考えられる。また、照射前では TC4 より TC8 の方が 283 nm の吸光度が大きく、照射によって平衡に達するまでの時間も TC8 の方が長かった。これは TC8 のシナモイル基含量が TC4 より多いため、吸光度および必要な照射時間が増加したと考えられる。

TC4、TC8 をディップコーターを用いてカバーガラス上にディップコートし、UV 照射前と TC4 は 60 s、TC8 は 300 s 間 UV 照射を行い作製した薄膜の表面および断面の FE-SEM 観察を行った。薄膜表面は TC4、TC8 ともに滑らかで均一な薄膜となっていた。また、薄膜断面の観察において TC 薄膜の膜厚は 30-40 nm となっていることが分かった。

TC4、TC8 をディップコーターを用いてカバーガラス上にディップコートし、TC4 は 60 s、TC8 は 300 s UV 照射を行い薄膜を作製した。PS well plate、洗浄処理を行ったカバーガラスおよび作製したTC4-UV、TC8-UVの薄膜を用いて線維芽細胞の細胞増殖試験を行った。細胞観察、血球計算板を用いた細胞数測定、MTT test により細胞の増殖が確認できた。カバーガラス上では接着細胞数が少なく、PS well plate 上と TC4-UV の薄膜上ではほぼ同じ値になり、TC8-UV 上では最も細胞数が増加していた。また死細胞はほとんど確認されなかった。これらの結果より TC に細胞毒性はなく細胞適合性があることが分かった。

PS well plate、カバーガラス、および各 TC 架橋薄膜に対し、蛍光因子である HiLyte 488 を結合したフィブロネクチンを用いて蛍光観察および蛍光スペクトル測定を行った。蛍光観察より、PS well plate、カバーガラスに比べ、TC4 と TC8 の架橋薄膜上ではフィブロネクチンの吸着の増加が見られた。また、蛍光スペクトルにおいても PS well plate、カバーガラスに比べ、TC4 と TC8 の架橋薄膜上で吸収が増加していた。これより、TC 薄膜上にて細胞が増殖しやすい環境になっていることが考えられる。

1.5 参考文献

- 1) 関隆広ほか, ゼオライト, **21**, 73-79 (2004)
- 2) Nutley, BP et al., *Food. Chem. Toxicol.*, **32**, 877-886 (1994)
- 3) Belsito, D et al., *Food. Chem. Toxicol.*, **45**, S1-S23 (2007)
- 4) Zhang, J et al., *European Food Research and Technology*, **228(1)**, 123-131 (2008)
- 5) Teramoto, N et al., *Polym. Adv. Technol.*, **18**, 971-977 (2007)
- 6) Penner, TL et al, *Macromolecules*, **24**, 1041-1049 (1991)
- 7) 堀尾武一, 分子細胞生物学基礎実験法(改訂第2版), 南江堂 (2004)
- 8) 豊島久眞男, 山本雅、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール, 秀潤社 (1991)
- 9) 井出利憲, 細胞培養入門ノート, 羊土社, 54 (1999)
- 10) 柳井久江, エクセル統計, オーエムエス出版, 84-93 (2008)
- 11) 株式会社エキシマ <http://excimer.co.jp>
- 12) Tamada, Y et al., *Jurnal of Biomedical Materials Research*, **28(7)**, 783-789 (1994)

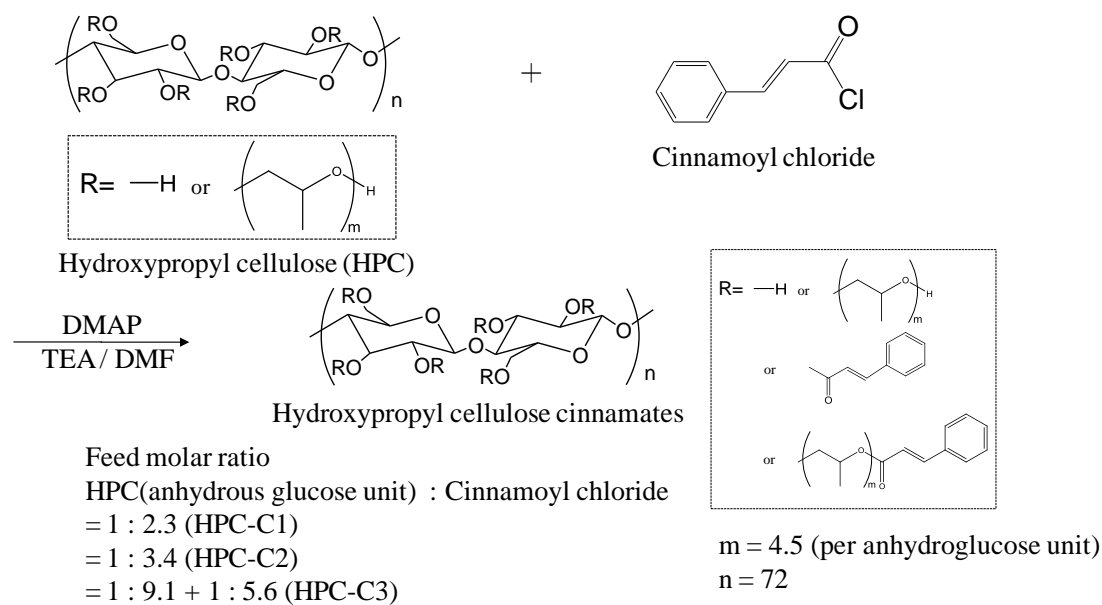
第 2 章

シナモイル基修飾ヒドロキシプロピルセルロースの合成と光架橋

2.1 緒言

近年、細胞の足場となる生体材料の開発が盛んであり、材料表面の特性の制御による生体適合性の付与が注目されている。第 1 章において、天然物由来であり多数のヒドロキシ基を有するトレハロースおよび、桂皮酸クロリドを用い、光反応性トレハロース桂皮酸エステルを合成し、その光架橋薄膜上で細胞培養を行った。細胞培養の評価を行ったところ、光架橋薄膜は良好な細胞適合性を有していることが分かった。一方で、シナモイル基あるいはその二量体はその細胞適合性に影響しているのかどうかは、まだ不明な点が多い。

本研究では、第 1 章で用いたトレハロースとは異なる糖類由来であり、グルコースユニットに修飾が加えられたヒドロキシプロピルセルロース(HPC)と桂皮酸クロリドを反応させ、置換度の異なる HPC 桂皮酸エステルを合成し、薄膜を作製した。HPC を用いることで架橋なしでも薄膜を形成できる。HPC 桂皮酸エステルの合成反応式を Scheme 2.1.1 に示す。作製した薄膜に対し、紫外光照射による光二量化の調査、および、架橋前、架橋後の薄膜を用いて細胞培養試験による細胞適合性の評価を行った。



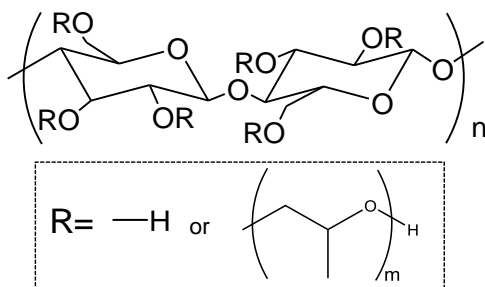
Scheme 2.1.1 Synthesis of hydroxypropyl cellulose cinnamates synthesized from hydroxypropyl cellulose and cinnamoyl chloride

2.2 実験

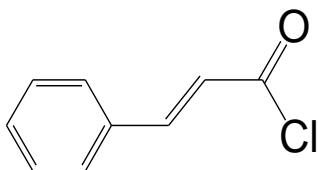
2.2.1 本研究に用いた試薬

Hydroxypropyl cellulose cinnamates (HPC-C)の合成に用いた試薬として、桂皮酸クロリド (Fw:166.6, m.p. 36 °C)およびヒドロキシプロピルセルロース(M_w :88000, M_n :31000)は東京化成工業(株)より購入した。HPC-Cの合成に用いた試薬の構造を以下に示す。

•Hydroxypropyl cellulose



•Cinnamoyl chloride



HPC-Cの合成に用いた有機溶媒として、SIGMA-ALDRICH製の脱水*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF) (Fw:73.9, m.p. -61.0 °C)、関東化学(株)製のトリエチルアミン(TEA) (Fw:101.19, m.p. -115 °C)、東京化成工業(株)製のジメチルアミノピリジン(DMAP) (Fw:122.17, m.p. -110 °C)、関東化学(株)製の*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF, 特級)、関東化学(株)製のメタノール(MeOH)(Fw:122.17, m.p. -110 °C)、関東化学(株)製のクロロホルム(CHCl_3) (Fw 119.38, m.p. -64 °C)を使用した。

FT-IR測定用試薬およびNMR測定用重水素溶媒として、臭化カリウム(KBr) (Fw:119 m.p. 734 °C)(和光純薬工業(株)製)、クロロホルム-*d* (CDCl_3) (99.8atom%D, 0.03%TMS含有, Fw:120.39)(関東化学(株)製)、重水(D_2O) (99.8atom%D, 0.03%TMS含有, Fw:20.03)(関東化学(株)製)をそれぞれ使用した。

TC の光架橋および細胞培養用薄膜の作製に用いた有機溶媒として、硝酸(Fw 63.01, m.p. -41.6 °C, concentration: 69~70%)(関東化学(株)製)、硫酸(Fw 98.08, m.p. 10 °C, concentration: 96.0%)(関東化学(株)製)を使用して、超純水は Direct-Q UV(Millipore 社製)から得られる、電気抵抗率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ のものを使用した。

線維芽細胞の *in vitro* 細胞試験には、RIKEN BRC Cell Bank, Riken, Japan(Cell No. RCB1642)より入手したマウス胎児由来の線維芽細胞である 3T3 Swiss Albino 細胞、和光純薬工業(株)製の Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)培地、和光純薬工業(株)製の Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS(-))および和光純薬工業(株)製の Penicillin-Streptomycin solution (10,000 U/ml Penicillin, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin)を使用した。培地に Penicillin-Streptomycin solution を加え、最終的に 100 倍希釈となるように調製した。Penicillin-Streptomycin solution を加えた培地に J R Scientific, Inc 製(Lot No. 168904)の fetal bovine serum (FBS) を加え、15%となるように調製した。25 %Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)は GIBCO 製、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) は和光純薬工業(株)製、Tripan Blue Stain 0.4% (TB)は GIBCO 製のものを使用した。また、セルライシスとして、和光純薬工業(株)製の NP-40 Substitute 細胞生物学用(非イオン性界面活性剤)を D-PBS で 10%となるように調整した。10% NP-40 セルライシス溶液の組成を Table 2.2.1 に示す。

Table 2.2.1 Composition of Cell lysis.

Normal saline	3.6 ml
NP-40 (polyoxyethylene (9) octylphenyl ether)	400 μl
Total	4 ml

2.2.2 Hydroxypropyl cellulose cinnamates (HPC-C)の合成

HPCの無水グルコースユニットと cinnamoyl chloride の仕込みモル比を 1:2.3、1:3.4 になるように反応させ、それぞれの生成物を HPC-C1、HPC-C2 とする。また HPC の無水グルコースユニットと cinnamoyl chloride の仕込みモル比を 1:9.1 になるように反応させ、得られた生成物に対して、完全な桂皮酸によるエステル化のため、さらに cinnamoyl chloride を 1:5.6 のモル比で反応させた生成物を HPC-C3 とする。

HPC(3.00 g, 無水グルコースユニットとして 6.83 mmol)を秤り取り、脱水 *N,N'*-ジメチルホルムアミド (DMF) 15 ml 中に 60°C で加熱して溶解させた。この溶液に、反応で生じる酸の中和試薬としてトリエチルアミン (TEA) を HPC-C1 は 2.8 ml (20 mmol)、HPC-C2 は 4.2 ml (30 mmol) 加え、触媒としてジメチルアミノピリジン (DMAP) 0.61 g (5 mmol) を加えた。さらに cinnamoyl chloride を HPC-C1 は 2.61 g (15.7 mmol)、HPC-C2 は 3.92 g (23.55 mmol) 秤りとり、脱水 DMF 5 ml 中に溶解させ、それを先の溶液に加えて、窒素下、室温で 24 h 攪拌した。その後、純水 1 L に沈殿させ、ろ過し、クロロホルムに溶解させ、メタノール 1 L 中に滴下した後、室温、24 h で攪拌した。攪拌後、デカンテーションし、得られた生成物を室温で 24 h 真空乾燥させ、淡黄色固体の生成物 HPC-C1 (1.5393 g, 収率 35%)、HPC-C2 (4.0154 g, 収率 75%) を得た。得られた生成物について FT-IR および ¹H-NMR スペクトル測定により構造解析し、溶解性試験を行った。実験方法をフローチャートとして Fig. 2.2.1 に示す。

また、HPC(3.00 g, 無水グルコースユニットとして 6.83 mmol)を秤り取り、脱水 DMF 15 ml 中に 60°C で加熱して溶解させた。この溶液に反応で生じる酸の中和試薬として TEA を 11.2 ml (80 mmol) 加え、触媒として DMAP 0.61 g (5 mmol) を加えた。さらに cinnamoyl chloride を 10.50 g (62.80 mmol) 秤りとり、脱水 DMF 5 ml 中に溶解させ、それを先の溶液に加えて、窒素下、室温で 24 h 攪拌した。その後、純水 1 L に沈殿させ、ろ過し、クロロホルムに溶解させ、メタノール 1 L 中に滴下した後、室温、24 h で攪拌した。攪拌後、デカンテーションし、得られた生成物を室温で 24 h 真空乾燥させた。さらに得られた生成物を脱水 DMF 15 ml 中に 60°C で加熱して溶解させた。そこに TEA を 7 ml (50 mmol) 加え、DMAP 0.61 g (5 mmol) を加えた後、桂皮酸クロリドを 6.53 g (39.25 mmol) 加え、窒素下、室温で 24 h 反応させた。その後、前述と同様の精製を行い、淡黄色固体の生成物 HPC-C3 (0.35 g, 収率 5%) を得た。得られた生成物について FT-IR および ¹H-NMR スペクトル測定により構造解析し、溶解性試験について評価した。実験方法をフローチャートとして Fig. 2.2.2 に示す。

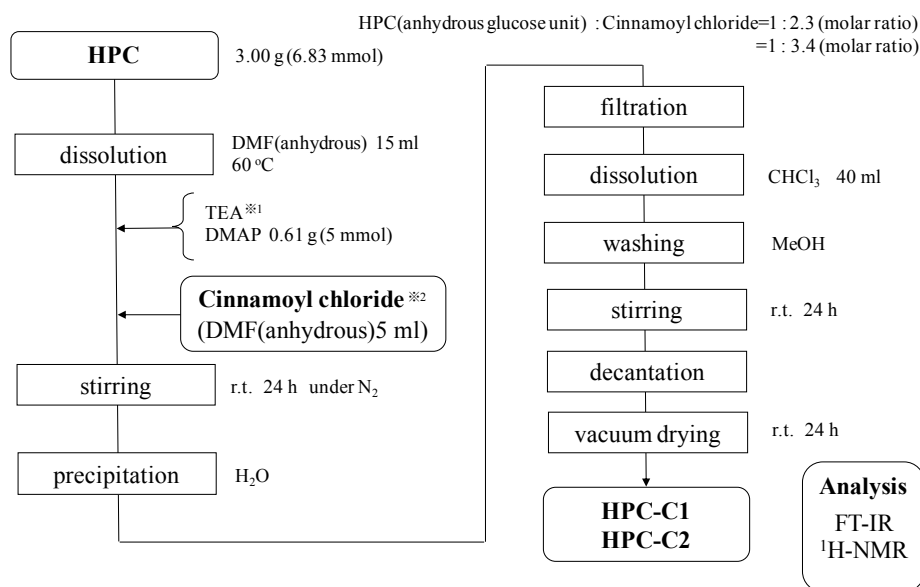


Fig. 2.2.1 Preparation of HPC-C1 and HPC-C2.

※1 Amount of TEA : HPC-C1 2.8 ml(20 mmol), HPC-C2 4.2 ml(30 mmol)

※2 Amount of cinnamoyl chloride : HPC-C1 2.61g(15.7 mmol), HPC-C2 3.92 g(23.55 mmol)

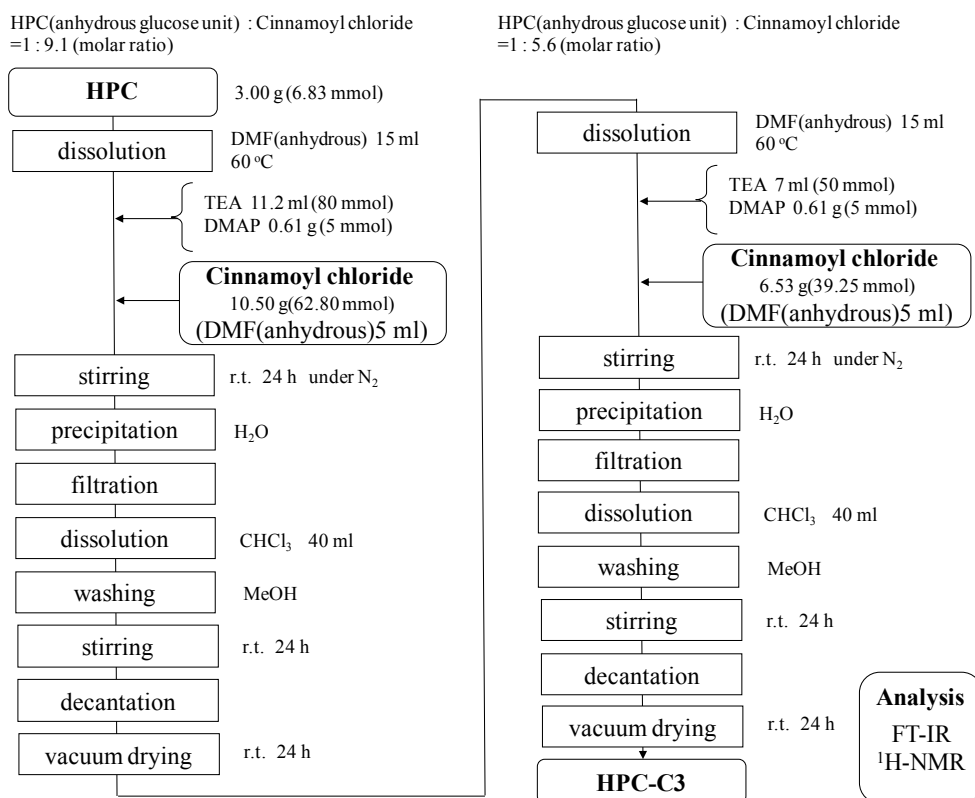


Fig. 2.2.2 Preparation of HPC-C3.

2.2.3 HPC-C の光架橋

HPC-C1、HPC-C2、HPC-C3 に UV 光を照射したときの吸収スペクトルの時間変化の測定を行い光二量化的調査を行った。各 HPC-C0.080 g を 4.0 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 20 mg / ml)を調製し、その 2 ml を石英セル(3 cm×2 cm×5 mm)に加えた。次にディップコーター(アイデン(株)製)を用いて、降下速度 1 mm / s、浸漬時間 1 min、上昇速度 0.5 mm / s、乾燥時間 1 h の条件で石英板(6 cm×1.5 cm×2 mm)上に薄膜を作製した。ディップコート条件を Fig. 1.2.2 に示す。

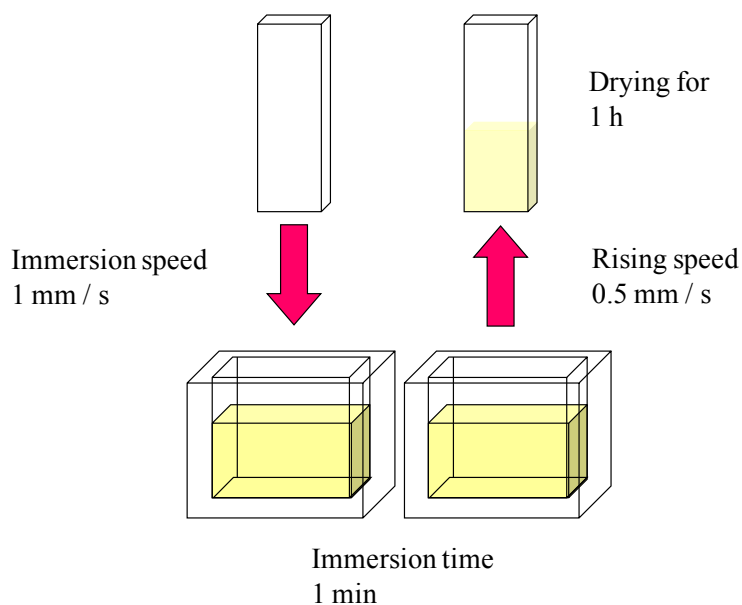


Fig. 2.2.3 Condition of dip coating.

薄膜作製後、UV 照射装置 Spot Cure SP-7(ウシオ電機社製)を用いて紫外光照射を行った。UV 照射装置には均一照射ユニットライトガイドを取り付けてあり、均一照射ユニットライトガイドの先端から 12 cm の位置に PMMA フィルター($\lambda < 280 \text{ nm}$ をカット)を設置し、17 cm の位置に石英板上に作製した薄膜を設置した。UV の照射強度は 100% (60.6 mW/cm^2) で行った。UV 光を所定時間照射した後、解析として紫外可視吸収スペクトル測定よりスペクトルの時間変化を測定した。

2.2.4 細胞培養用薄膜の作製

ガラス基板としてφ15 mm 丸カバーガラス(No.1 松浪硝子工業(株)製)を用いて HPC-C1、HPC-C2 および HPC-C3 の薄膜を作製した。各 HPC-C0.080 g を 4.0 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 20 mg / ml)をそれぞれ調製し、その 2 ml を石英セル(3 cm×2 cm×5 mm)に加えた。

ガラス基板は殺菌線消毒保管庫 DM-90(大信工業(株)製)にて 2 日間 UV 処理した後、硝酸:硫酸:純水の体積比が 1:3:6 になるように調製した混合溶液に 1 日浸漬させることで表面洗浄を行い、水ですすいで乾燥させた。¹⁾ 清浄したガラス基板に対して、2.2.3 と同じ条件(Fig. 2.2.3)でディップコートを行い乾燥させた。その後 UV 照射($\lambda \geq 280$ nm)を行い薄膜を作製した。薄膜はエチレンオキサイドガス(EOG)処理((株)ステリテック社依頼)にて滅菌を行った。無偏光 UV 照射条件として、均一照射ユニットライトガイドの先端から 12 cm の位置に PMMA フィルターを設置し、17 cm の位置にディップコートを行ったガラス基板を設置した。UV の照射強度は 100% (60.6 mW / cm²) とした。UV の照射時間は HPC-C1 で 180 s、HPC-C2 で 180 s、HPC-C3 で 300 s)とした。作製した薄膜は表面の分析として接触角測定を行った。細胞培養時に用いたサンプルの種類を Table 2.2.2 に示す。また、薄膜を作製した際の手順をフローチャートとして Fig. 2.2.4 に示す。

Table 2.2.2 Samples for cell culture.

Sample	Description
PS well	Polystyrene culture plate used as purchased
glass	UV-treated and acid-washed glass coverslip
HPC-C1	Before UV irradiation HPC-C1 coated on washed glass coverslip
HPC-C1-UV	UV-irradiated HPC-C1 coated on washed glass coverslip
HPC-C2	Before UV irradiation HPC-C2 coated on washed glass coverslip
HPC-C2-UV	UV-irradiated HPC-C2 coated on washed glass coverslip
HPC-C3	Before UV irradiation HPC-C3 coated on washed glass coverslip
HPC-C3-UV	UV-irradiated HPC-C3 coated on washed glass coverslip

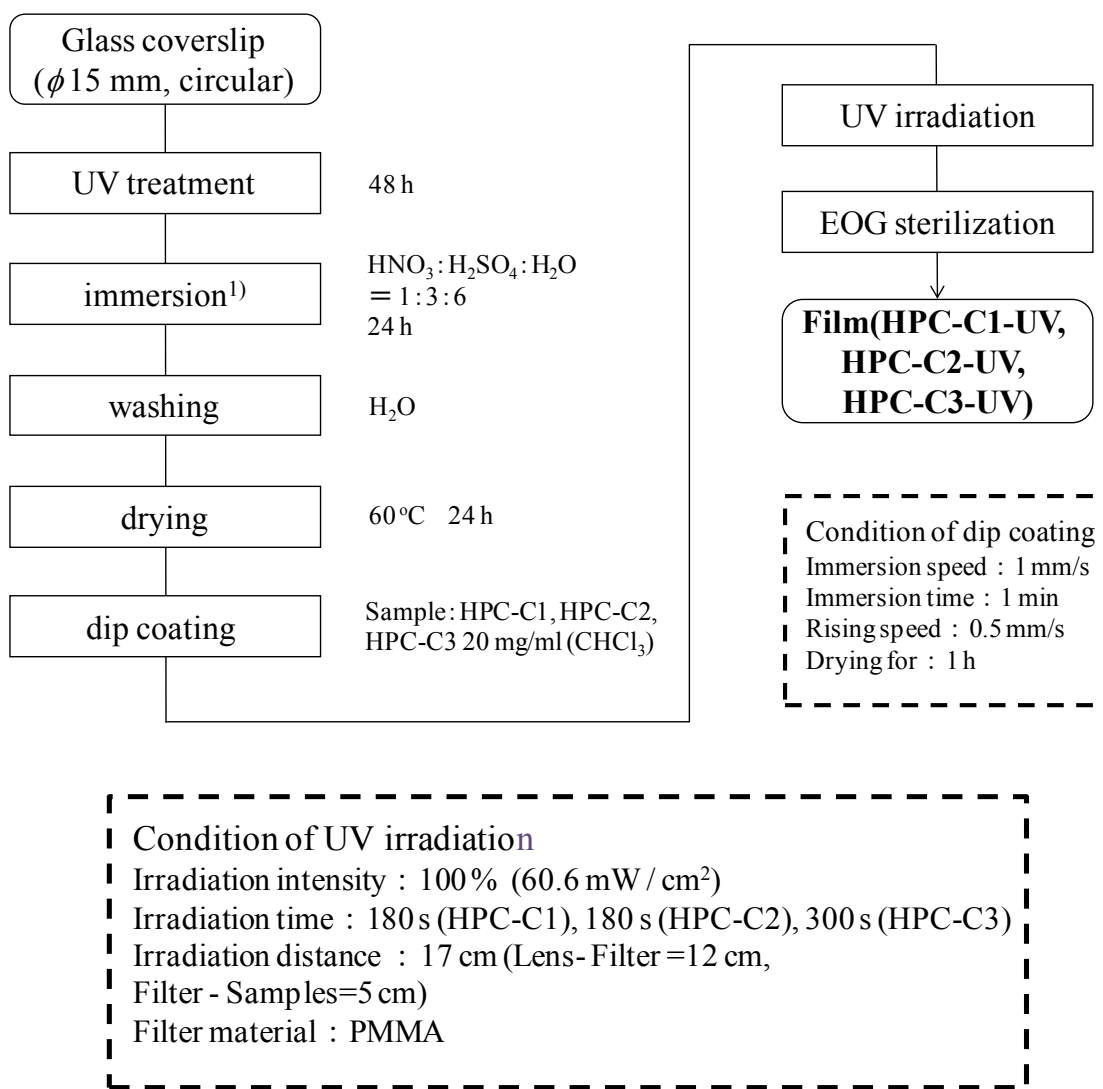


Fig. 2.2.4 Preparation of UV-irradiated thin films for cell culture.

2.2.5 線維芽細胞の *in vitro* 細胞試験

(1) 細胞培養

細胞はマウス胚細胞由来線維芽細胞 3T3 Swiss Albino 細胞を用いた。試験に必要な細胞数になるまで ϕ 10 cm dish を利用し、D-MEM に 10%FBS と 1% Penicillin / Streptomycin とを加えた溶液を基本培地とし、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養を行った。 ϕ 10 cm dish で増殖させた線維芽細胞を Fig. 2.2.5 に示す。

60-70% Confluence(細胞を増殖させて、まだ過度な密集に至っていない状態)になった 3T3 Swiss Albino をトリプシン(0.25%trypsin+EDTA)により剥離し、回収した。24 well plate(TrueLine 製)の各 well に評価したいサンプルを設置し、その上に 3×10^3 cells/ml 播種した。播種 3 時間、1、3、5、7 日後に細胞試験を行った。細胞の接着は、倒立顕微鏡 Axio Vert.A1(カールツァイスマイクロコピー(株)製)を用いて観察した。

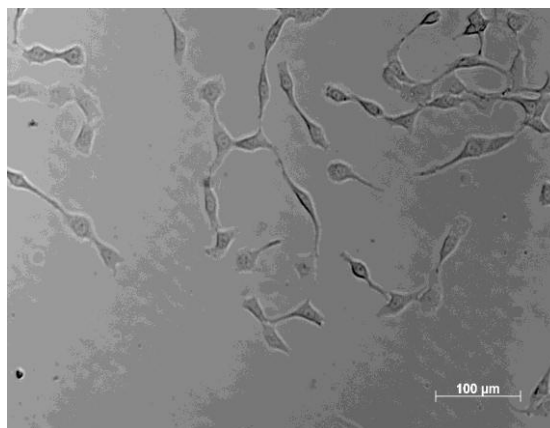


Fig. 2.2.5 3T3 Swiss Albino cells (ϕ 10 cm dish)

(2) 細胞数測定および細胞増殖評価²⁾⁻⁴⁾

細胞数測定には血球計算盤を用い、細胞増殖の評価には MTT test を用いた。血球計算盤による細胞数測定では、トリパンプルー色素を用いることにより生細胞では色素が細胞膜を透過しないが、死細胞は染色されることを利用して、細胞の生死細胞数を測定することができる。

培養後の試料に 250 μ l のトリプシンを加え 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 3 分間静置することで加水分解により細胞を剥離し、過度な加水分解を抑制するために 250 μ l 基本培地を加えて中和した。その後、500 μ l トリパンプルーを加え、死細胞を染色し、血球計算盤と位相差顕微鏡を用いて生死細胞数を計数した。

MTT 試験は、テトラブリウム塩の一種である MTT により生細胞のミトコンドリア中の呼吸鎖を利用して染色し、相対的な細胞量を測定する方法である。MTT はミトコンドリア内に存在する酵素により還元され、発色する。所定時間培養後の試料に 300 μ l の 1.0 mg / ml MTT 溶液を加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 雰囲気下で 90 分間静置した後、300 μ l 細胞溶解液(セルライシス)を加え、細胞を溶解した。溶解して得られた溶液を 300 μ l ずつ 96 well plate (TrueLine 製)に移し、マイクロプレートリーダー iMark (バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製)を用いて波長 570 nm で吸光度を測定した。

(3)検定方法

検定方法は t 検定を行い⁵⁾、第 1 章の記載に従って統計解析を行った。

2.2.6 装置

•フーリエ変換赤外吸収(FT-IR)スペクトル測定

フーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-8400S(島津製作所社製)を用いて FT-IR スペクトル測定を行った。各種試料を KBr 錠剤法で、測定範囲 $4000-400\text{ cm}^{-1}$ 、積算回数 50 回で測定した。

•核磁気共鳴($^1\text{H-NMR}$)スペクトル測定

核磁気共鳴装置 AV400(Bruker 社製)を用いて $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。試料 20 mg を各種重水素化溶媒(DMSO- d_6 、クロロホルム- d)500-550 μl に溶解させ、NMR 用細管に移し、積算回数 32 回で測定した。

•紫外可視吸収スペクトル測定

紫外可視分光光度計 V-650(日本分光社製)を用いて紫外可視(UV-Vis)吸収スペクトル測定を行った。測定条件を以下に示す。

測光モード	Abs
測定範囲	800 - 200 nm
レスポンス	Medium
バンド幅	L 5.0 nm
走査速度	400 nm / min
読込間隔	1.0 nm
積算回数	1

•接触角測定⁶⁾

接触角計 SImage02V((株)エキシマ社製)を用いて接触角測定を行った。フィルムに超純水を一滴(5 μl)垂らし、PC 画像解析による計測ソフトで ATAN $\theta/2$ 法より接触角を測定した。一つのサンプルにつき 5 回の測定を行い、平均値を採用した。

2.3 結果および考察

2.3.1 FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定による構造解析

HPC の無水グルコースユニットと桂皮酸クロリドを 1:2、1:3 の仕込みモル比になるように加えて反応した。また HPC の無水グルコースユニットと桂皮酸クロリドを 1:8 の仕込みモル比で反応させ、得られた生成物に対して、さらに桂皮酸クロリドを 1:5 のモル比になるように加えて反応した。これにより、桂皮酸の置換度の異なる 3 種類のヒドロキシプロピルセルローズ桂皮酸エステル (HPC-C) を合成した。

Fig. 2.3.1 に(a)HPC、(b)桂皮酸クロリドおよびこれらの反応によって得られた生成物(c)HPC-C1、(d)HPC-C2、(e)HPC-C3 の FT-IR スペクトルを示す。

Fig. 2.3.1 より、HPC-C のスペクトル(c) (d) (e) において、 1700 cm^{-1} 付近に見られるピークはエステルの $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に由来する吸収である。さらに、 1640 cm^{-1} 付近のピークは桂皮酸ユニットの $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動に由来し、 $1500\text{ cm}^{-1}\sim 1440\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークはベンゼン環の $\text{C}-\text{C}$ 伸縮振動に由来すると考えられる。 1160 cm^{-1} 付近のピークはエステルの $\text{C}-\text{O}$ 伸縮振動に由来すると考えられる。 1000 cm^{-1} 付近のピークは HPC の $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 伸縮振動に由来するものと考えられる。

また、Scheme 2.1.1 の反応式より反応前後の化学構造に着目すると、HPC のヒドロキシ基が変化している。Fig. 2.3.1 より HPC のスペクトル(a)において 3400 cm^{-1} 付近に顕著なヒドロキシ基の $\text{O}-\text{H}$ 伸縮振動による吸収ピークが見られた。(c)HPC-C1、(d)HPC-C2、(e)HPC-C3 において、桂皮酸クロリドの仕込みモル比の増加とともに減少していた。これより、仕込みモル比の増加とともにそれぞれシナモイル基が増加していることが分かる。

これらのことから、HPC-C1、HPC-C2 および HPC-C3 の合成反応が進行していることが示唆される。

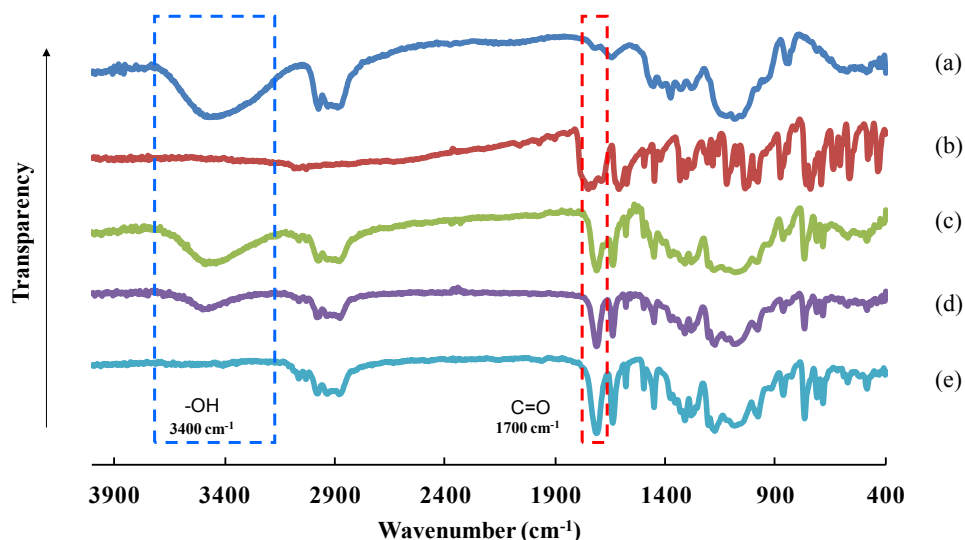


Fig. 2.3.1 FT-IR spectra of (a)HPC, (b)cinnamoyl chloride, (c)HPC-C1, (d)HPC-C2 and (e)HPC-C3.

(a)HPC、(b)桂皮酸クロリド、およびこれらの反応によって得られた生成物(c)HPC-C1 の¹H-NMR スペクトルを Fig. 2.3.2 に示す。

Fig. 2.3.2 より、(a) HPC のスペクトルにおいて-CH₃に由来するシグナル(0.7-1.6 ppm)およびセルロース骨格の2~6位のC-Hに由来するシグナル(2.6-4.6 ppm)が(c)HPC-C1で少し低磁場側にシフトしていることが分かる。また、(b) 桂皮酸クロリドのスペクトルにおいてアルケンおよびベンゼン環由来のシグナル(6.2-6.6 ppm、7.3-7.7 ppm)が(c)HPC-C1にも確認できた。このことにより、HPC-C1の合成反応が進行していることが示唆される。

生成物(c)HPC-C1のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 2.3.1 に示す。

Table 2.3.1 Measured integral value of each signal in the spectrum of HPC-C1.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical integral value (DS=1.0)*
a	0.7-1.6	8.72	12.00
b	2.6-4.6	13.76	22.00
c	4.9-5.3	1.33	2.00
d	6.2-6.6	1.00	1.00
e	7.3	3.35	3.00
f	7.5	1.83	2.00
g	7.7	0.99	1.00

* The value was calculated under the assumption that DS were 1.0.

Table 2.3.1 より、(c)HPC-C1 のシグナル積分値においてヒドロキシプロピル基に含まれる-CH₃のaのシグナルおよびシナモイル基由来のdのシグナルを用いて積分値の計算を行った結果、1:1.3と計算された。

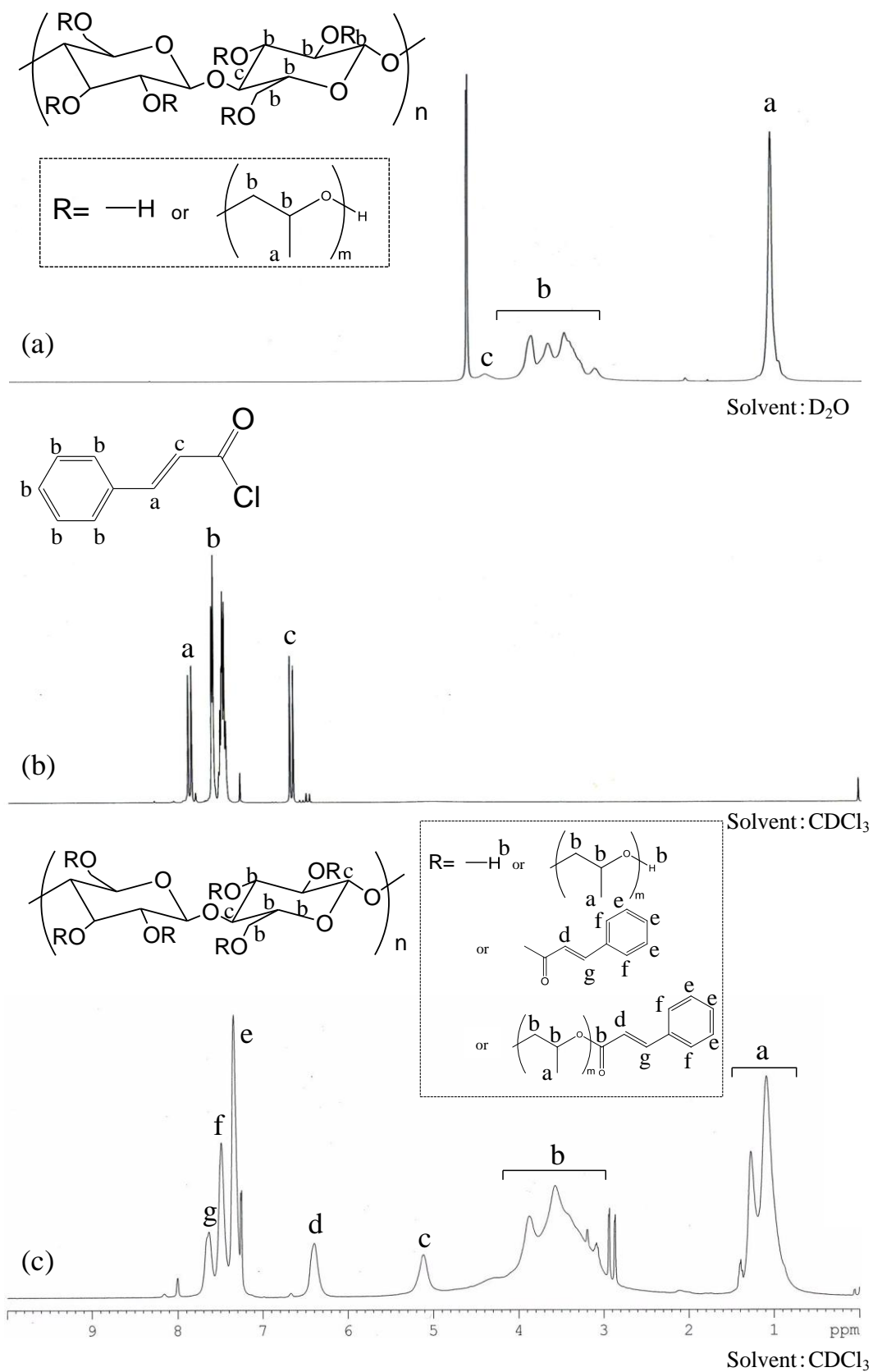


Fig. 2.3.2 $^1\text{H-NMR}$ spectra of (a)HPC, (b)cinnamoyl chloride and (c)HPC-C1.

(a)HPC、(b)桂皮酸クロリド、およびこれらの反応によって得られた生成物(d)HPC-C2 の¹H-NMR スペクトルを Fig. 2.3.3 に示す。

Fig. 2.3.3 より、(a) HPC のスペクトルにおいて-CH₃に由来するシグナル(0.8-1.5 ppm)およびセルロース骨格の2~6位のC-Hに由来するシグナル(2.8-4.6 ppm)が(d)HPC-C2で少し低磁場側にシフトしていることが分かる。また、(b) 桂皮酸クロリドのスペクトルにおいてアルケンおよびベンゼン環由来のシグナル(6.2-6.6 ppm、7.3-7.7 ppm)が(d)HPC-C2にも確認できた。このことにより、HPC-C2の合成反応が進行していることが示唆される。

生成物(d)HPC-C2のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 2.3.2 に示す。

Table 2.3.2 Measured integral value of each signal in the spectrum of HPC-C2.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical integral value(DS=2.0)*
a	0.8-1.5	11.70	12.00
b	2.8-4.6	17.51	22.00
c	5.0-5.3	2.17	2.00
d	6.2-6.6	2.00	2.00
e	7.3	5.93	6.00
f	7.5	3.26	4.00
g	7.7	2.00	2.00

* The value was calculated under the assumption that DS were 2.0.

Table 2.3.2 より、(d)HPC-C2のシグナル積分値においてヒドロキシプロピル基に含まれる-CH₃のaのシグナルおよびシナモイル基由来のdのシグナルを用いて積分値の計算を行った結果、1:2.0と計算された。

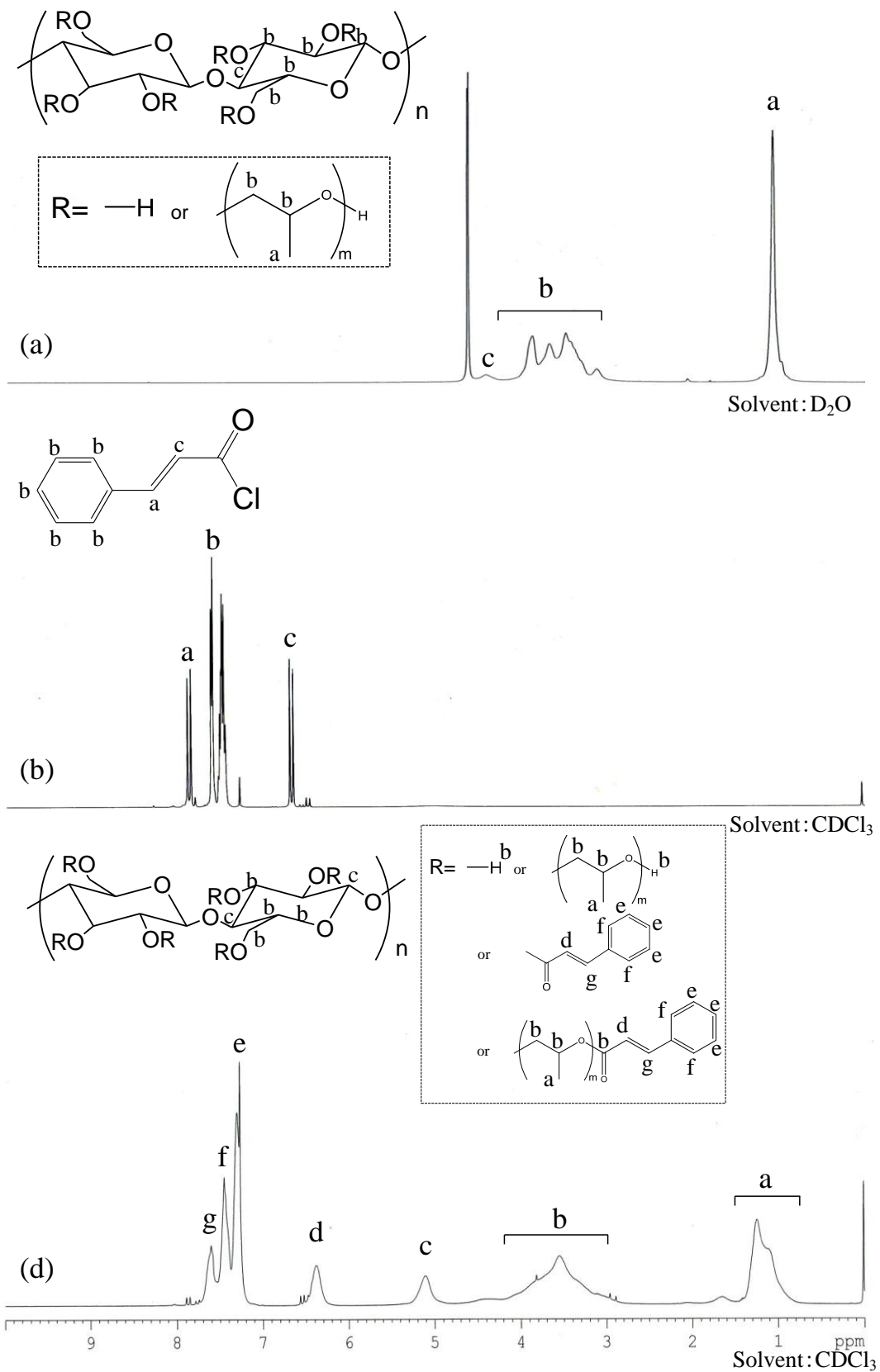


Fig. 2.3.3 $^1\text{H-NMR}$ spectra of (a)HPC, (b)cinnamoyl chloride and (d)HPC-C2.

(a)HPC、(b)桂皮酸クロリド、およびこれらの反応によって得られた生成物(e)HPC-C3 の¹H-NMR スペクトルを Fig. 2.3.4 に示す。

Fig. 2.3.4 より、(a) HPC のスペクトルにおいて-CH₃に由来するシグナル(0.8-1.5 ppm)およびセルロース骨格の2~6位のC-Hに由来するシグナル(2.8-4.6 ppm)が(e)HPC-C3で少し低磁場側にシフトしていることが分かる。また、(b) 桂皮酸クロリドのスペクトルにおいてアルケンおよびベンゼン環由来のシグナル(6.2-6.6 ppm、7.3-7.7 ppm)が(e)HPC-C3にも確認できた。このことにより、HPC-C3の合成反応が進行していることが示唆される。

生成物(e)HPC-C3のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 2.3.3 に示す。

Table 2.3.3 Measured integral value of each signal in the spectrum of HPC-C3.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical integral value(DS=3.0)*
a	0.8-1.5	11.38	12.00
b	2.8-4.6	14.12	22.00
c	4.8-5.3	3.07	2.00
d	6.2-6.6	3.00	3.00
e	7.3	10.14	9.00
f	7.5	5.66	6.00
g	7.7	3.20	3.00

* The value was calculated under the assumption that DS were 3.0.

Table 2.3.3 より、(e)HPC-C3 のシグナル積分値においてヒドロキシプロピル基に含まれる-CH₃のaのシグナルおよびシナモイル基由来のdのシグナルを用いて積分値の計算を行った結果、1:3.0と計算された。

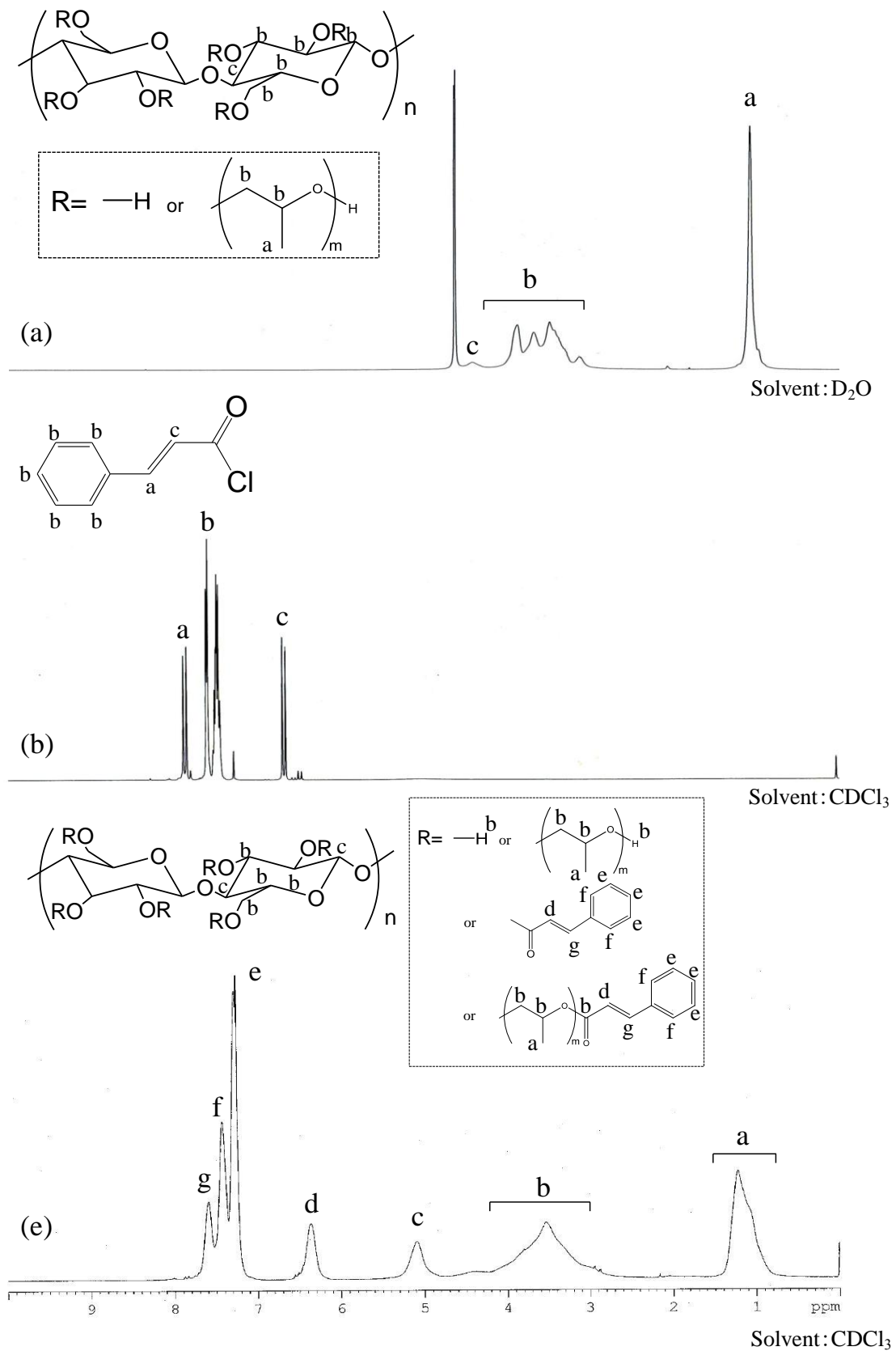


Fig. 2.3.4 $^1\text{H-NMR}$ spectra of (a)HPC, (b)cinnamoyl chloride and (e)HPC-C3.

HPC、桂皮酸クロリドおよび各 HPC-C について溶解性試験を行った。用いた溶媒は純水、エタノール、メタノール、DMF、DMSO、THF、アセトン、クロロホルム、ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトニトリル、酢酸エチル、トルエンの 13 種類である。試料を 20 mg 秤りとり溶媒を 500 μ l 加え、目視で観察することで溶解性試験を行った。この結果を Table 2.3.4 に示す。

Table 2.3.4 Solubility of HPC, cinnamoyl chloride, HPC-C1, HPC-C2 and HPC-C3.

Solvent	Sample				
	HPC	Cinnamoyl chloride	HPC-C1	HPC-C2	HPC-C3
water	○	×	×	×	×
ethanol	○	○	△	△	△
methanol	○	○	△	△	△
DMF	○	○	○	○	○
DMSO	○	○	○	○	△
THF	○	○	○	○	△
acetone	○	○	○	○	○
chloroform	○	○	○	○	○
hexane	×	○	×	×	×
diethyl ether	×	○	△	△	△
acetonitrile	△	○	△	△	△
ethyl acetate	×	○	○	○	○
toluene	×	○	○	○	△

(○) soluble
(×) insoluble
(△) partially soluble

Table 2.3.4 より、HPC は水、エタノール、メタノール、DMF、DMSO、THF、アセトン、クロロホルムには可溶であり、アセトニトリルに部分溶解でその他の溶媒には不溶であった。また桂皮酸クロリドは疎水性であるため純水には不溶であったが、その他の有機溶媒には可溶であった。

HPC-C1、HPC-C2 はエタノールおよびメタノールには部分溶解し、DMF、DMSO、THF、アセトンおよびクロロホルムには可溶であり、その他の溶媒には不溶であった。これは HPC の置換基にシンナモイル基が置換したため疎水性が高くなり、極性の高い溶媒である水、エタノール、メタノールに不溶となり、HPC が不溶であった疎水性溶媒であるジエチルエーテル、酢酸エチルおよびトルエンに可溶になったと考える。さらに HPC-C3 では DMSO、THF、トルエンが部分溶解となっていた。これは HPC-C1、HPC-C2 より置換度が高くなり、疎水性が高くなったことに加え、分子量が増加して溶解性が低下したためと考えられる。

2.3.2 HPC-C の光架橋

HPC および桂皮酸クロリドより合成した置換度の異なる HPC-C を用いて石英板上に薄膜を作製し、UV 光を照射したときの紫外可視吸収スペクトルの時間変化を調査した。

ディップコーターで石英板上に作製した薄膜に対し、PMMA フィルム($\lambda < 280 \text{ nm}$ をカット)を通して UV を照射した。薄膜に対し、吸光度の変化がほぼ見られなくなるまで照射し、この間、所定の累積照射時間(HPC-C1 : 0 s, 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s, 180 s) (HPC-C2 : 0 s, 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s, 180 s) (HPC-C3 : 0 s, 5 s, 10 s, 20 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 180 s, 210 s, 240 s, 270 s, 300 s)ごとにスペクトルを測定した。HPC-C1、HPC-C2 および HPC-C3 の紫外可視吸収スペクトルの時間変化を、それぞれ、Fig. 2.3.5、Fig. 2.3.6、Fig. 2.3.7 に示す。

Fig. 2.3.5、Fig. 2.3.6、Fig. 2.3.7 より、照射前の HPC-C において 283 nm に最も強い吸収がみられた。これはベンゼン環とそれに結合する C=C 結合およびカルボニル基の π 共役によるものである。UV 照射により TC が二量化反応を行いシクロブタン環が生じると π 共役系が変化する。これにより、二量化反応が起こると、この強い吸収がシフトし、吸収スペクトルが変化する。実際に、照射時間が増加するにつれて 283 nm の吸収の減少が見られた。これにより、UV 照射による HPC-C の光反応の進行が示唆される。次に各 HPC-C を比較してみると置換度が大きいほど吸光度が高くなっていた。吸光度の変化がなくなるまでの UV 照射時間に大きな差は見られなかった。

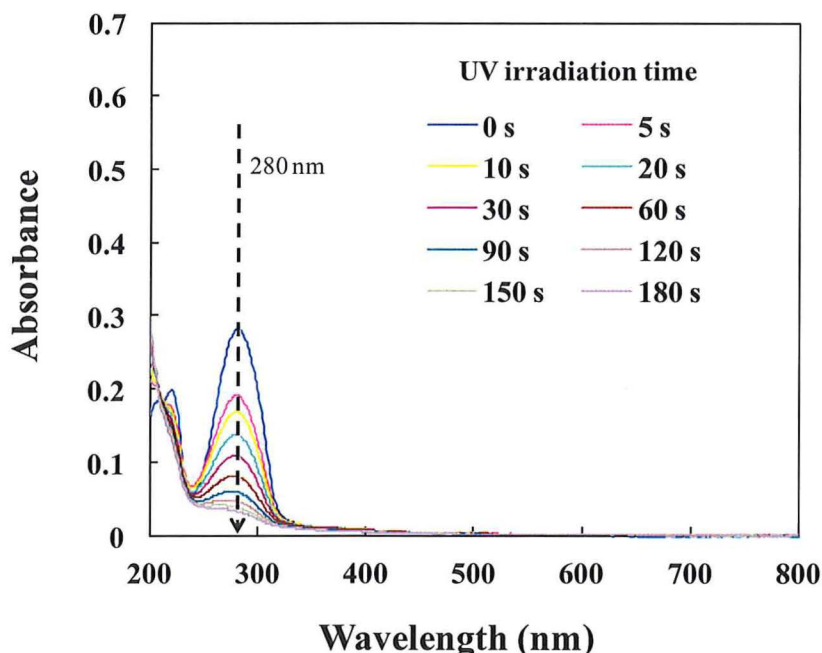


Fig. 2.3.5 Spectral changes of HPC-C1 induced by UV irradiation.

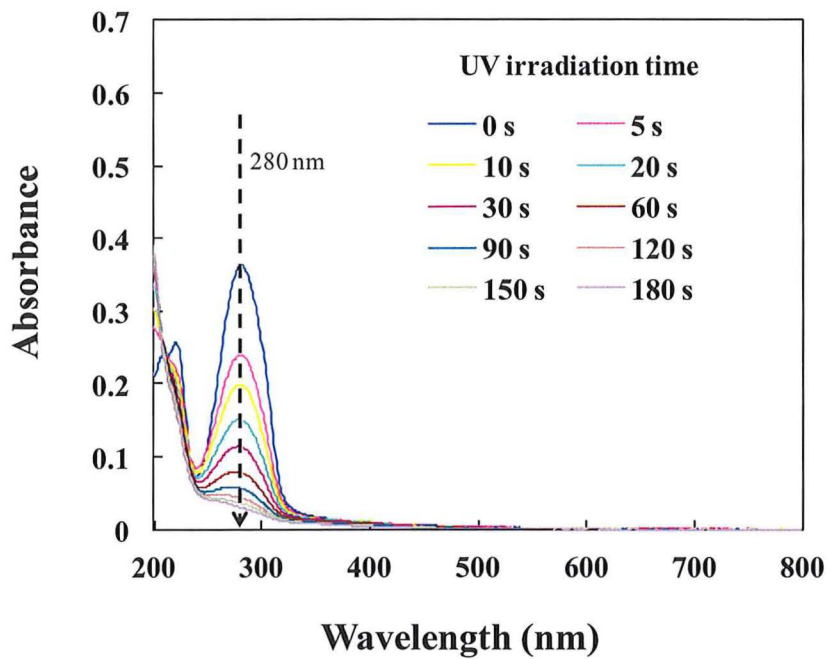


Fig. 2.3.6 Spectral changes of HPC-C2 induced by UV irradiation.

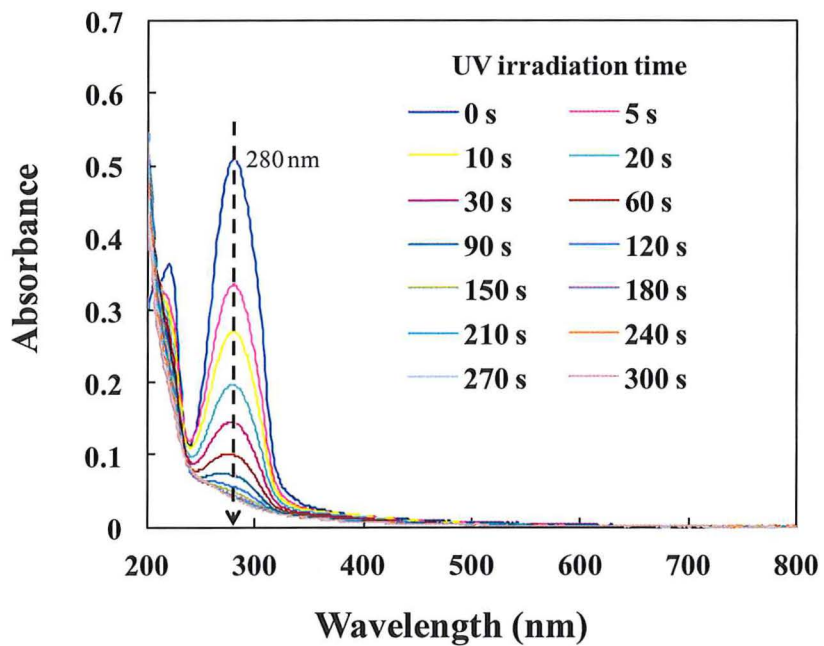


Fig. 2.3.7 Spectral changes of HPC-C3 induced by UV irradiation.

2.3.3 HPC-C 薄膜の接触角測定

ガラス基板上に HPC-C1、HPC-C2、HPC-C3 薄膜を作製し、薄膜表面の濡れ性(親水性、疎水性)を接触角測定により調査した。

細胞培養用ポリスチレンプレート(PS well)、購入したガラス基板そのまま、洗浄処理を行ったガラス基板、UV 照射前、UV 照射後の HPC-C1 薄膜、UV 照射前、UV 照射後の HPC-C2 薄膜、UV 照射前、UV 照射後の HPC-C3 薄膜について、Fig. 2.3.8 に接触角値を示し、Fig. 2.3.9 に接触角測定における各試料上での水滴の様子を写真で示す。

Fig. 2.3.8、Fig. 2.3.9 において接触角の値は PS well plate 上で 46.0° ($\pm 0.6^{\circ}$)、購入したそのままのガラス基板で 57.9° ($\pm 3.1^{\circ}$)、洗浄処理を行ったガラス基板で 14.7° ($\pm 1.1^{\circ}$)、照射前の HPC-C1 で 73.2° ($\pm 5.0^{\circ}$)、UV 照射後の HPC-C1 で 79.0° ($\pm 2.7^{\circ}$)、照射前の HPC-C2 で 70.7° ($\pm 1.4^{\circ}$)、UV 照射後の HPC-C2 で 76.8° ($\pm 6.0^{\circ}$)、UV 照射前の HPC-C3 で 72.6° ($\pm 4.4^{\circ}$)、UV 照射後の HPC-C3 で 73.6° ($\pm 1.8^{\circ}$)であった。

購入したガラスは洗浄することにより表面が非常に高い親水性になり接触角の値が大きく減少している。これにより購入時の表面に付着していた有機物が洗浄されていることが分かった。また、UV 照射前の HPC-C1、HPC-C2、HPC-C3 の接触角の値はほぼ同じ値を示し、UV 照射後の HPC-C1、HPC-C2、HPC-C3 では照射前より表面の疎水性が若干増加しているが、UV 照射前と UV 照射後、およびシナモイル基の置換度での接触角の大きな違いは見られなかった。このことからシナモイル基の置換度の違いによって、接触角の変化にあまり影響がないことが示唆された。

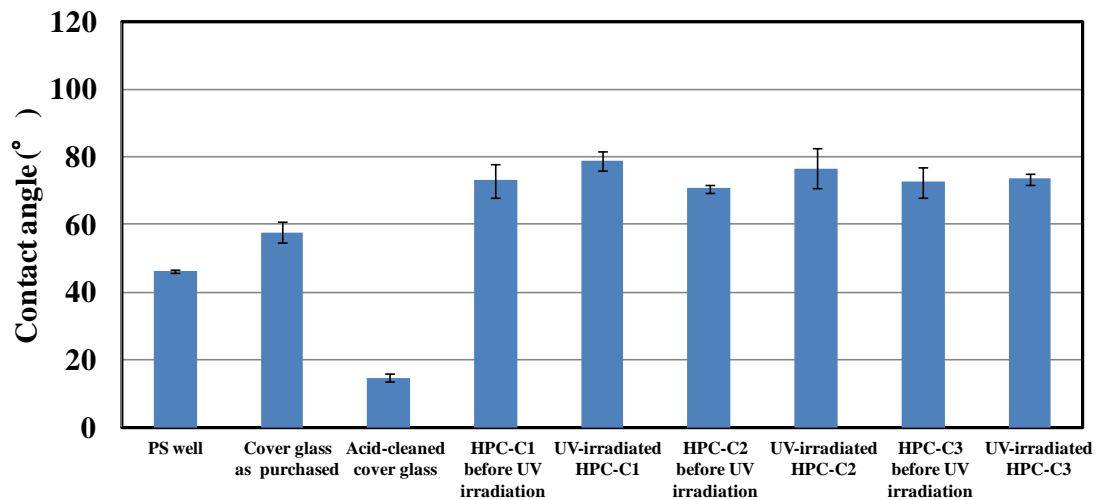


Fig. 2.3.8 Contact angles of PS well, cover glass before and after acid wash, HPC-C1, HPC-C2 and HPC-C3 before and after UV irradiation.

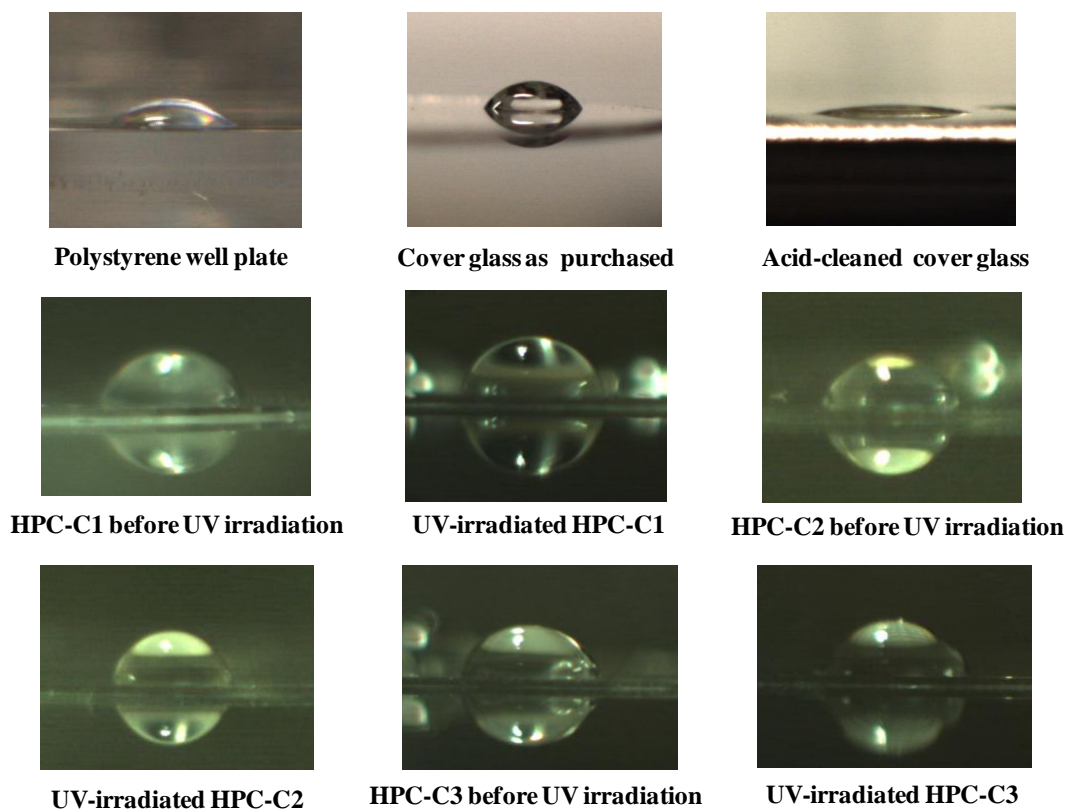


Fig. 2.3.9 Photographs of a water droplets on PS well, cover glass before and after acid wash, HPC-C1, HPC-C2 and HPC-C3 before and after UV irradiation.

2.3.4 HPC-C 薄膜を用いた細胞適合性評価

24 well polystyrene culture plate (PS well)、洗浄処理を行ったガラス基板(glass)および HPC-C 薄膜(UV 照射後 HPC-C1 (HPC-C1)、UV 照射後 HPC-C2 (HPC-C2)、UV 照射後 HPC-C3 (HPC-C3))を用いて線維芽細胞の *in vitro* 細胞増殖試験を行った。

位相差顕微鏡による細胞の観察結果として、細胞培養 3 時間後のものを Fig. 2.3.10、5 日後のものを Fig. 2.3.11、7 日後のものを Fig. 2.3.12 に示す。

Fig.2.3.10 において細胞培養 3 時間後ではいずれの試料においても接着した細胞に差は見られなかった。Fig. 2.3.11 において培養 5 日後では (a)PS well に比べ、(d)HPC-C1、(f)HPC-C2、(h)HPC-C3 の薄膜上で細胞の接着数が増加しており、HPC-C のシナモイル基による置換度が高いほど接着細胞数が多く見られた。Fig. 2.3.12 において培養 7 日後ではいずれの試料上においても多くの接着細胞が見られた。

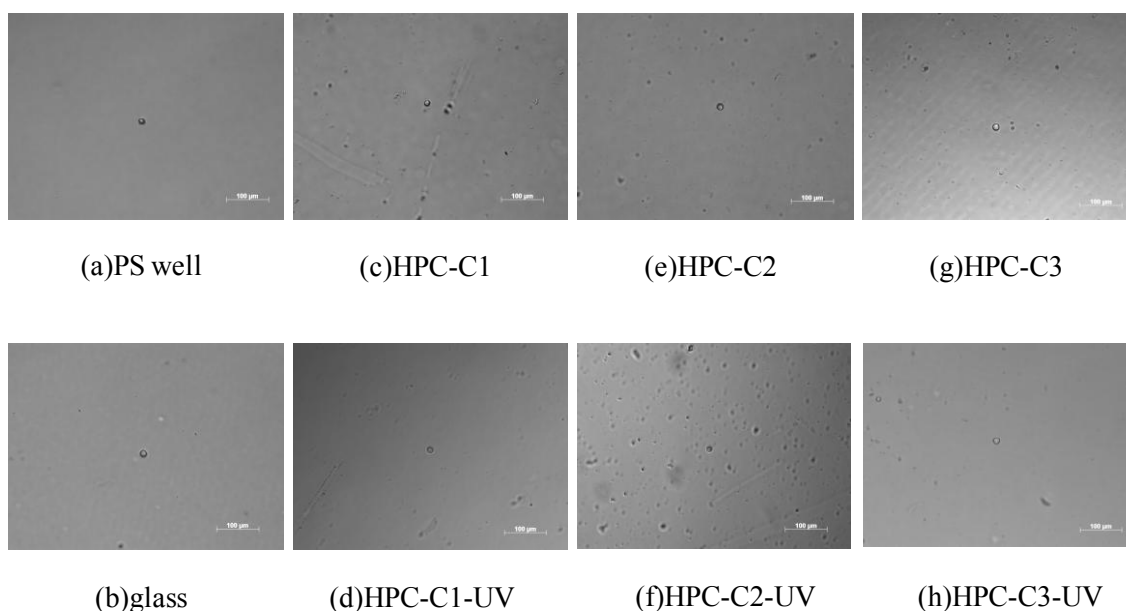


Fig. 2.3.10 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 3 h culture on (a)PS well, (b)glass, (c)HPC-C1 before UV irradiation, (d)HPC-C1 after UV irradiation, (e)HPC-C2 before UV irradiation, (f)HPC-C2 after UV irradiation, (g)HPC-C3 before UV irradiation and (h)HPC-C3 after UV irradiation.

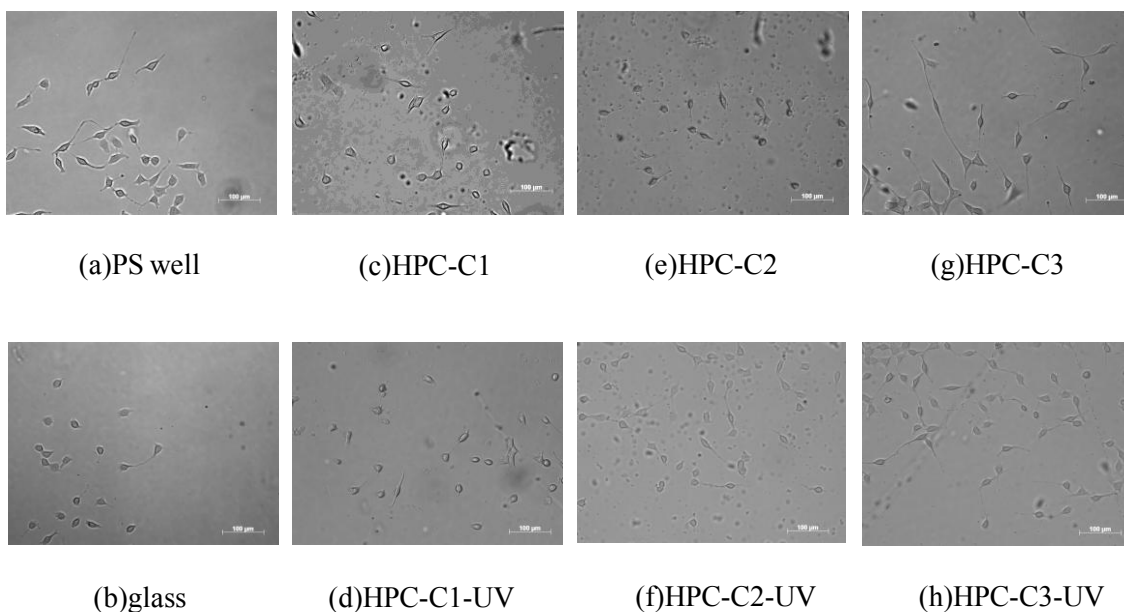


Fig. 2.3.11 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 5 d culture on (a)PS well, (b)glass, (c)HPC-C1 before UV irradiation, (d)HPC-C1 after UV irradiation, (e)HPC-C2 before UV irradiation, (f)HPC-C2 after UV irradiation, (g)HPC-C3 before UV irradiation and (h)HPC-C3 after UV irradiation.

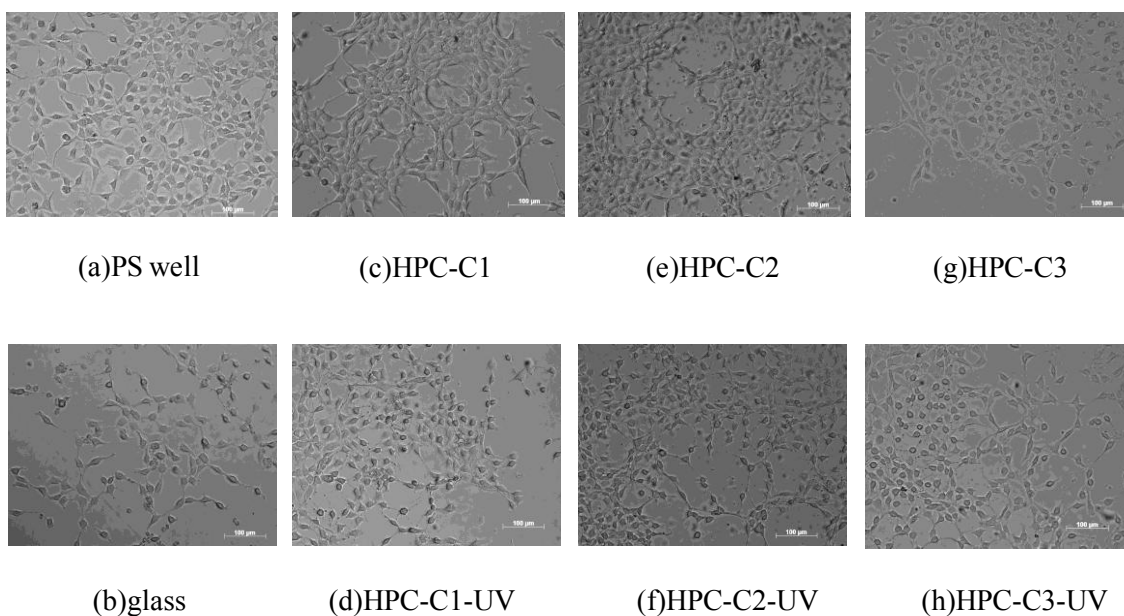


Fig. 2.3.12 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 7 d culture on (a)PS well, (b)glass, (c)HPC-C1 before UV irradiation, (d)HPC-C1 after UV irradiation, (e)HPC-C2 before UV irradiation, (f)HPC-C2 after UV irradiation, (g)HPC-C3 before UV irradiation and (h)HPC-C3 after UV irradiation.

各試料上で細胞培養を行い、血球計算盤を用いて接着細胞数の測定を行った。その結果を Fig. 2.3.13 に示す。

Fig. 2.3.13 より、培養時間につれて、サンプルにおいても接着細胞の増加が確認された。またそれぞれを比較すると、細胞培養 3 時間、1 日、3 日後では各サンプルにおいて接着した細胞に差は見られなかったが、培養 5 日後では UV 照射前の HPC-C1 の細胞数が若干少なく、培養 7 日後では照射前の HPC-C1、HPC-C2 の細胞数がわずかに少なく、HPC-C3 が次に多く、UV 照射後の試料では接着細胞数が多い順に HPC-C3-UV、HPC-C2-UV、HPC-C1-UV、となった。これらの結果から最も多く細胞の増殖が見られたサンプルは UV 照射後の HPC-C3 となった。HPC-C の接触角がそれほど変化していないにもかかわらず、HPC-C3 の細胞接着性が高いことを考慮すると、細胞の接着に対してシナモイル基の含有量が起因していると推測される。さらに、UV 照射前後を比較してみると、それぞれ UV 照射後の HPC-C において接着細胞数が増加している。これより、シナモイル基が二量体となることで細胞の増殖活性が増加する可能性があると考えられる。なお、培養 7 日後の glass で細胞増殖が活発であったのは、洗浄後の操作における何らかの汚れの付着が原因である可能性が考えられる。

また、死細胞に関しては培養期間によらず、ほぼ確認されなかった。このことから各試料に細胞毒性がないことが示された。

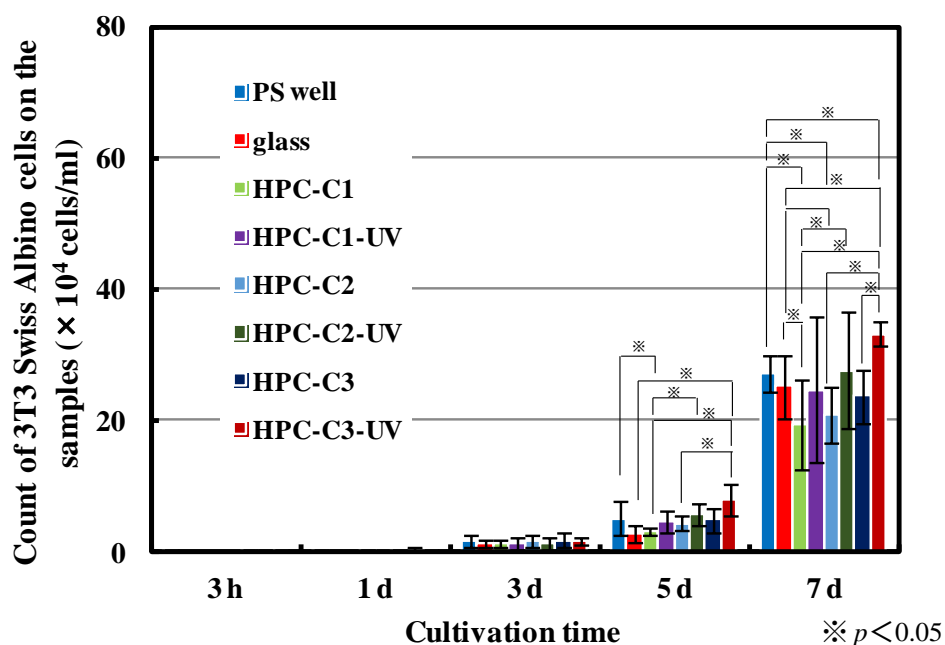


Fig. 2.3.13 Cell proliferation assay by counting of live cells adhered on PS well, glass, HPC-C1 before UV irradiation, HPC-C1 after UV irradiation, HPC-C2 before UV irradiation, HPC-C2 after UV irradiation, HPC-C3 before UV irradiation and HPC-C3 after UV irradiation.

各試料上で行った細胞培養試験における MTT 試験の結果を Fig. 2.3.14 に示す。

Fig. 2.3.14 より、培養時間に応じて、各サンプルにおける細胞の増殖が見られた。細胞培養 3 時間、1 日、3 日後では各サンプルにおいて接着した細胞に差は見られなかったが、培養 5 日後では UV 照射前の HPC-C1 の細胞数がわずかに少なく、培養 7 日後では照射前の HPC-C1、HPC-C2 の細胞数が若干少なく、HPC-C3 が次に多く、UV 照射後の試料では HPC-C3-UV で最も多く細胞の増殖が見られたことから、細胞親和性にはシナモイル基またはその二量体は何らかの作用を及ぼしていることが示唆される。なお、培養 5 日後以降の glass で細胞増殖が活発であったのは、前述の血球計算盤による細胞数測定のとときと同様に、洗浄後の操作における何らかの汚れの付着が原因である可能性が考えられる。

これらの結果より、シナモイル基の多く置換した HPC において、より高い細胞増殖性が見られ、細胞の接着または細胞増殖にはシナモイル基が影響していることが示唆された。

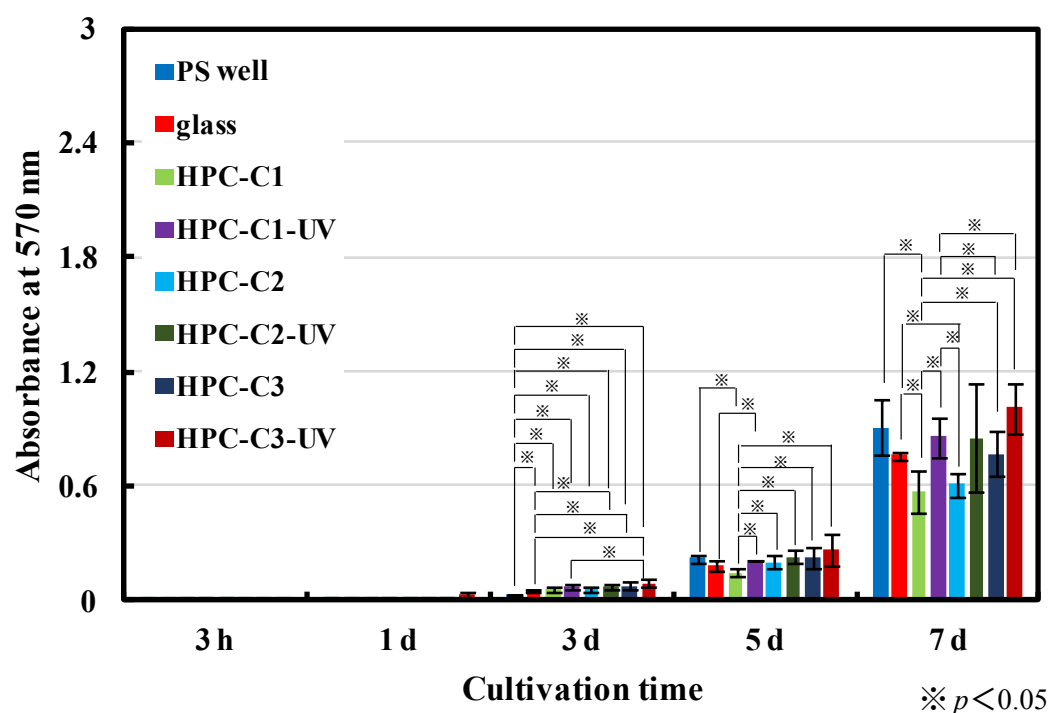


Fig. 2.3.14 Cell proliferation assay by the MTT test of live cells adhered on PS well, glass, HPC-C1 before UV irradiation, HPC-C1 after UV irradiation, HPC-C2 before UV irradiation, HPC-C2 after UV irradiation, HPC-C3 before UV irradiation and HPC-C3 after UV irradiation.

2.4 結論

本研究では多糖類である HPC および桂皮酸クロリドを用いてシナモイル基の置換度の異なるヒドロキシプロピルセルロース桂皮酸エステル(HPC-C)を合成した。シナモイル基は、光照射により、二量化反応を起こすことが知られている。合成して得られた HPC-C の薄膜に対し、UV 光を照射し、紫外可視吸収スペクトルの時間変化の調査および、細胞培養試験による細胞適合性の評価を行い、シナモイル基またはその二量体が細胞増殖に与える影響について調べた。

まず HPC および桂皮酸クロリドを用いて HPC-C を合成した。このとき異なる仕込みモル比で反応し、生成物に対し、FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定により構造解析を行った。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定より、HPC の無水グルコースユニットに対するシナモイル基の置換度(DS)は、HPC-C1 で 1.3、HPC-C2 で 2.0、HPC-C3 で 3.0 となった。

異なる置換度の HPC-C をクロロホルムに溶解させた試料溶液を用いて、ディップコーティングにより石英板上に薄膜を作製した。この薄膜に所定時間 UV 照射を行い、紫外可視吸収スペクトルの時間変化を調査した。UV 照射前は、すべての HPC-C のスペクトルにおいて 283 nm に最も高い吸収がみられた。照射時間の増加とともに 283 nm の吸収が減少した。

細胞培養試験用に HPC-C1、HPC-C2、HPC-C3 をクロロホルムに溶解させた試料溶液を用いて、ディップコーティングによりカバーガラス上にディップコートし、HPC-C1、HPC-C2 は 180 s、HPC-C3 は 300 s 間 UV 照射を行い薄膜を作製した。PS culture plate 上、カバーガラスおよび作製した各 HPC-C の薄膜を用いて線維芽細胞の細胞増殖試験を行った。細胞観察、血球計算盤を用いた接着細胞数の測定、MTT 試験により各サンプルにおいて細胞の増殖が見られ、細胞毒性はなく、培養 5 日後、7 日後では HPC-C3 が最も接着細胞数が増加することが分かった。

したがって、これらの結果より、細胞の接着または細胞増殖にはシナモイル基またはその二量体が作用していることが示唆された。

2.5 参考文献

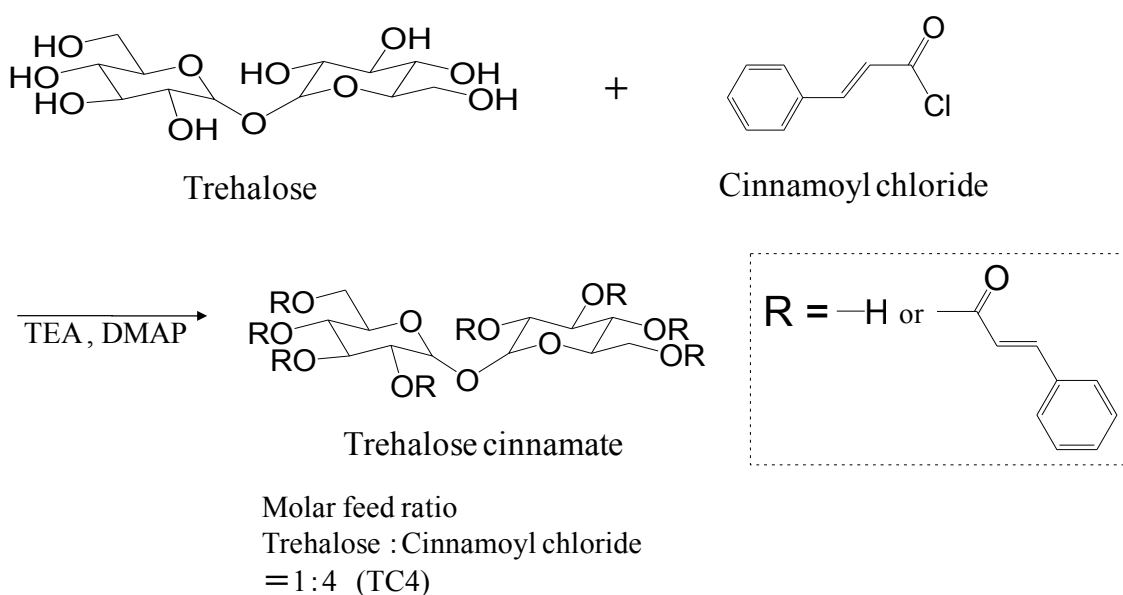
- 1) Penner, TL, et al., *Macromolecules*, **24**, 1041-1049 (1991)
- 2) 堀尾武一, 分子細胞生物学基礎実験法(改訂第2版), 南江堂 (2004)
- 3) 豊島久眞男, 山本雅、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール, 秀潤社 (1991)
- 4) 井出利憲, 細胞培養入門ノート, 羊土社, 54 (1999)
- 5) 柳井久江, エクセル統計, オーエムエス出版, 84-93 (2008)
- 6) 株式会社エキシマ <http://excimer.co.jp>

第 3 章

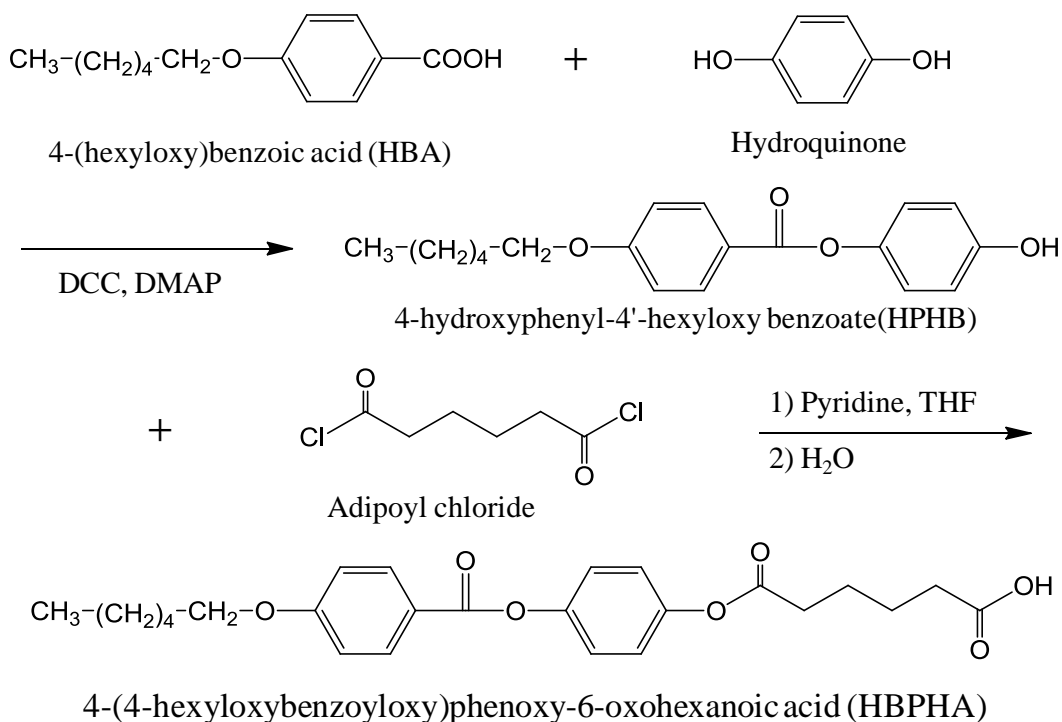
メソゲン基とシンナモイル基が異なる位置に置換したトレハロース誘導体の合成と
光架橋および細胞適合性

3.1 緒言

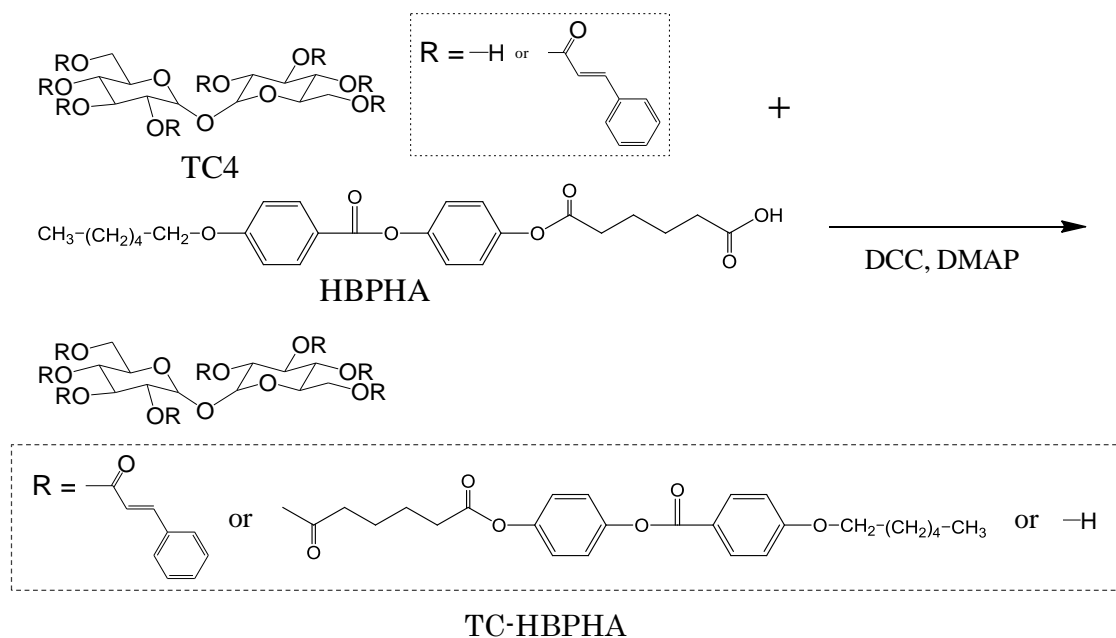
近年、桂皮酸誘導体と液晶を組み合わせた材料が光配向性材料として注目されている。¹⁾⁻⁵⁾この液晶は自己組織化し、ドメインを形成することが知られている。第3章では、天然物由来であるトレハロースをもとに、液晶性を有する光架橋材料および光配向性材料を作製する方法を考案し、細胞適合性があるかを調査する。第1章において、トレハロースの桂皮酸エステルの薄膜上にて線維芽細胞が良好な接着性を有することを示し、第2章において、細胞の接着・増殖にはシナモイル基またはその二量体が影響を及ぼしていることが分かった。本研究では、トレハロースに桂皮酸クロリドおよび4-(4-ヘキシルオキシベンゾイルオキシ)フェノキシ-6-オキソヘキサン酸(HBPHA)をそれぞれ段階的に反応させることで、メソゲン基とシナモイル基を有するトレハロース誘導体(TC-HBPHA)を合成し、薄膜を作製した。トレハロース桂皮酸エステル(TC4)の合成反応式をScheme 3.1.1に、HBPHAの合成反応式をScheme 3.1.2に、TC-HBPHAの合成反応式をScheme 3.1.3に示す。作製した薄膜に対し、偏光顕微鏡による液晶性の観察およびUV光の照射によるフィルム特性の変化について調べ、さらに細胞親和性の評価および接着細胞の形態観察を行った。



Scheme 3.1.1 Synthesis of trehalose cinnamate from trehalose and cinnamoyl chloride.



Scheme 3.1.2 Synthesis of HBPHA synthesized from HBA, hydroquinone and adipoyl chloride.



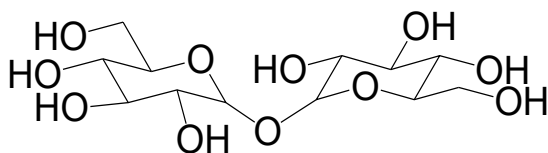
Scheme 3.1.3 Structure of TC-HBPHA from trehalose cinnamate and 4-(4-hexyloxybenzoyloxy)phenoxy-6-oxohexanoic acid.

3.2 実験

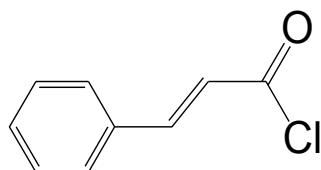
3.2.1 本研究に用いた試薬

TC-HBPHA の合成に用いた試薬として、桂皮酸クロリド(Fw:166.6, m.p. 36 °C)、4-ヘキシルオキシ安息香酸(Fw:222.3, m.p. 105.0-153.0 °C)およびアジピン酸クロリド(Fw:206.3, m.p. 35.0 °C)は東京化成工業 (株)より購入した。ヒドロキノン(Fw:110.1, m.p. 172.0 °C)は関東化学(株)より購入した。トレハロース(Fw:342.30, m.p. 210.5 °C)は(株)林原より提供いただき、本研究では市販のトレハロースを加熱乾燥させ無水物にしたものを使用した。TC-HBPHA の合成に用いた試薬の構造を以下に示す。

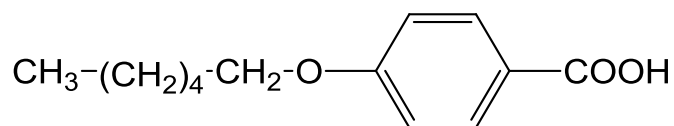
•Trehalose



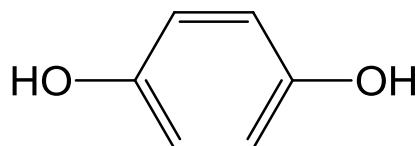
•Cinnamoyl chloride



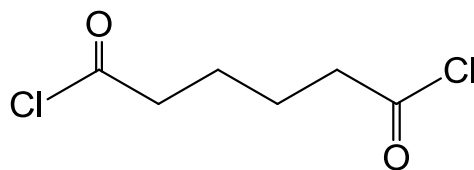
•4-(Hexyloxy)benzoic Acid



•Hydroquinone



• Adipoyl chloride



TC-HBPHA の合成には SIGMA-ALDRICH 製の縮合剤 *N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(Fw:206.3, m.p. 35.0 °C)を使用した。TC-HBPHA の合成後の精製に用いた試薬として、関東化学(株)製の炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3) (Fw: 84.0, m.p. 50.0 °C (分解))、関東化学(株)製の硫酸ナトリウム(Fw: 124.0, m.p. 884.0 °C)、関東化学(株)製のシュウ酸(Fw: 126.1, m.p. 101.5 °C)を使用した。カラムクロマトグラフィーで用いたシリカゲル 60(spherical, 40 – 100 μm)は関東化学(株)製のものを使用した。また、TC-HBPHA の合成に用いた有機溶媒および反応試薬として、SIGMA-ALDRICH 製の脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF) (Fw:73.9, m.p. -61.0 °C)、関東化学(株)製のトリエチルアミン(TEA) (Fw:101.19, m.p. -115 °C)、東京化成工業(株)製のジメチルアミノピリジン(DMAP) (Fw:122.17, m.p. -110 °C)、関東化学(株)製の *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF, 特級)、関東化学(株)製のジクロロメタン(CH_2Cl_2) (Fw:84.9, m.p. -96.7 °C)、関東化学(株)製の脱水テトラヒドロフラン(THF) (Fw:72.1, m.p. -108.4 °C)、関東化学(株)製の脱水ピリジン(Fw:79.1, m.p. -41.6 °C)、関東化学(株)製のアセトン(Fw:58.1, m.p. -95.0 °C)、関東化学(株)製のエタノール(Fw: 46.1, m.p. -114.3 °C)、関東化学(株)製のメタノール(Fw: 32.0, m.p. -97.0 °C)および関東化学(株)製のヘキサン(Fw: 86.2, m.p. -95.0 °C)を使用した。

FT-IR 測定用試薬および NMR 測定用重水素溶媒として、和光純薬工業(株)製の臭化カリウム(KBr) (Fw:119 m.p. 734 °C)、関東化学(株)製のジメチルスルホキシド- d_6 (DMSO- d_6) (99.9atom%D, 0.03%TMS 含有, Fw:84.18)、関東化学(株)製のクロロホルム- d (CDCl_3) (99.8atom%D, 0.03%TMS 含有, Fw:120.39)を使用した。

TC-HBPHA の熱分析、光架橋および細胞培養用薄膜の作製に用いた有機溶媒として、関東化学(株)製のクロロホルム(CHCl_3) (Fw 119.38, m.p. -64 °C)、関東化学(株)製の硝酸(Fw 63.01, m.p. -41.6 °C, concentration: 69~70%)、関東化学(株)製の硫酸(Fw 98.08, m.p. 10 °C, concentration: 96.0%)を使用し、超純水は Direct-Q UV(Millipore 社製)から得られる、電気抵抗率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ のものを使用した。

線維芽細胞の *in vitro* 細胞試験では、RIKEN BRC Cell Bank, Riken, Japan(Cell No. RCB1642)より入手したマウス胎児由来の線維芽細胞である 3T3 Swiss Albino 細胞、和光純薬工業(株)製の Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)培地、和光純薬工業(株)製の Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS(-))および和光純薬工業(株)製の Penicillin-Streptomycin solution (10,000 U/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin)を使用した。培地に Penicillin-Streptomycin solution を加え、最終的に 100 倍希釈となるように調製し使用した。Penicillin-Streptomycin solution を加えた培地に J R Scientific, Inc 製(Lot No. 168904)の fetal bovine serum (FBS) を加え、15%となるように調製し使用した。25 %Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)は GIBCO 製、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)は和光純薬工業(株)製、Tripan Blue Stain 0.4% (TB)は GIBCO 製のものを使用した。また、セルライシスとして、和光純薬工業(株)製の NP-40 Substitute 細胞生物学用(非イオン性界面活性剤)をD-PBSで10%となるように調整して使用した。10% NP-40 セルライシス溶液の組成を Table 3.2.1 に示す。

Table 3.2.1 Composition of Cell lysis.

Normal saline	3.6 ml
NP-40 (polyoxyethylene (9) octylphenyl ether) 400 µl	
Total	4 ml

3.2.2 TC4 の合成⁶⁾

本研究では一段階目の反応で、トレハロースのヒドロキシ基に対しメソゲン基の置換する部分を残すため、trehalose:cinnamoyl chloride の仕込み mol 比を 1:4 とした。

まず、trehalose (3.42 g, 10 mmol)を秤とり、脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)15 ml 中に 60°C で加熱して溶解させた。この溶液に、反応で生じる酸の中和試薬としてトリエチルアミン (TEA)(5.6 ml, 40 mmol)、触媒としてジメチルアミノピリジン(DMAP)(0.61 g, 5 mmol)を加えた。さらに cinnamoyl chloride(6.66 g, 40 mmol)を秤とり、脱水 DMF 5 ml 中に溶解させ、それを先の溶液に加えて、窒素下、室温で 24 h 攪拌した。次に、この溶液を多量の純水中に滴下して、生成物を析出させ、ろ過し、回収した沈殿物を DMF 20 ml に溶解させ、さらに 500 ml の純水中に滴下した後、室温で 24 h 攪拌した。攪拌後、ろ過して得られた固体を、室温で 48 h 真空乾燥させ、白色固体の生成物(4.70 g, 収率:55%)を得た。得られた生成物について FT-IR および ¹H-NMR によって構造解析し、溶解性試験を行った。実験方法をフローチャートとして Fig. 3.2.1 に示す。

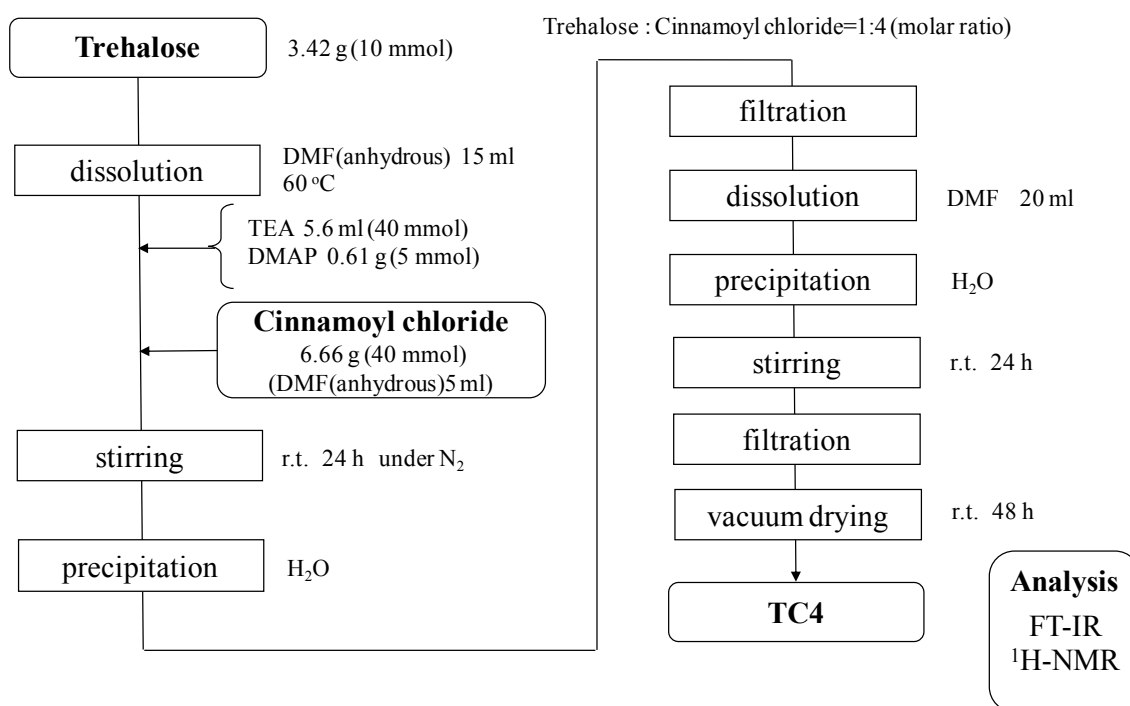


Fig. 3.2.1 Preparation of TC4.

3.2.3 4-Hydroxyphenyl-4'-hexyloxy benzoate(HPHB)の合成

4-(4-hexyloxybenzoyloxy)phenoxy-6-oxohexanoic acid(HBPHA)の前駆体として、4-hydroxyphenyl-4'-hexyloxy benzoate(HPHB)の合成を行った。

まず、4-(hexyloxy)benzoic acid (HBA)(3.33 g, 15 mmol)を秤りとり、ジクロロメタン 30 ml、DMF 20 ml 中に室温で溶解させた。そこに hydroquinone(6.61 g, 60 mmol)と触媒として DMAP(0.19 g, 1.5 mmol)を加えた。さらに脱水縮合剤として *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide(DCC)(4.65 g, 22.5 mmol)を秤りとり、ジクロロメタン 15 ml、DMF 10 ml に溶解させ、それを先の溶液に加えて、窒素下、30 °C で 24 h 攪拌した。次に、この溶液をろ過し、回収したろ液を減圧濃縮して、そこにジクロロメタンを十分量加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および純水を用いて分液にて洗浄し、硫酸ナトリウムを加え室温で 24 h 乾燥させた。乾燥後、減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液:CH₂Cl₂)により精製後、得られた固体を、室温で 24 h 真空乾燥させ、白色固体の生成物(2.43 g, 収率:58%)を得た。得られた生成物について FT-IR および ¹H-NMR スペクトル測定によって構造解析し、溶解性試験について評価した。実験方法をフローチャートとして Fig. 3.2.2 に示す。

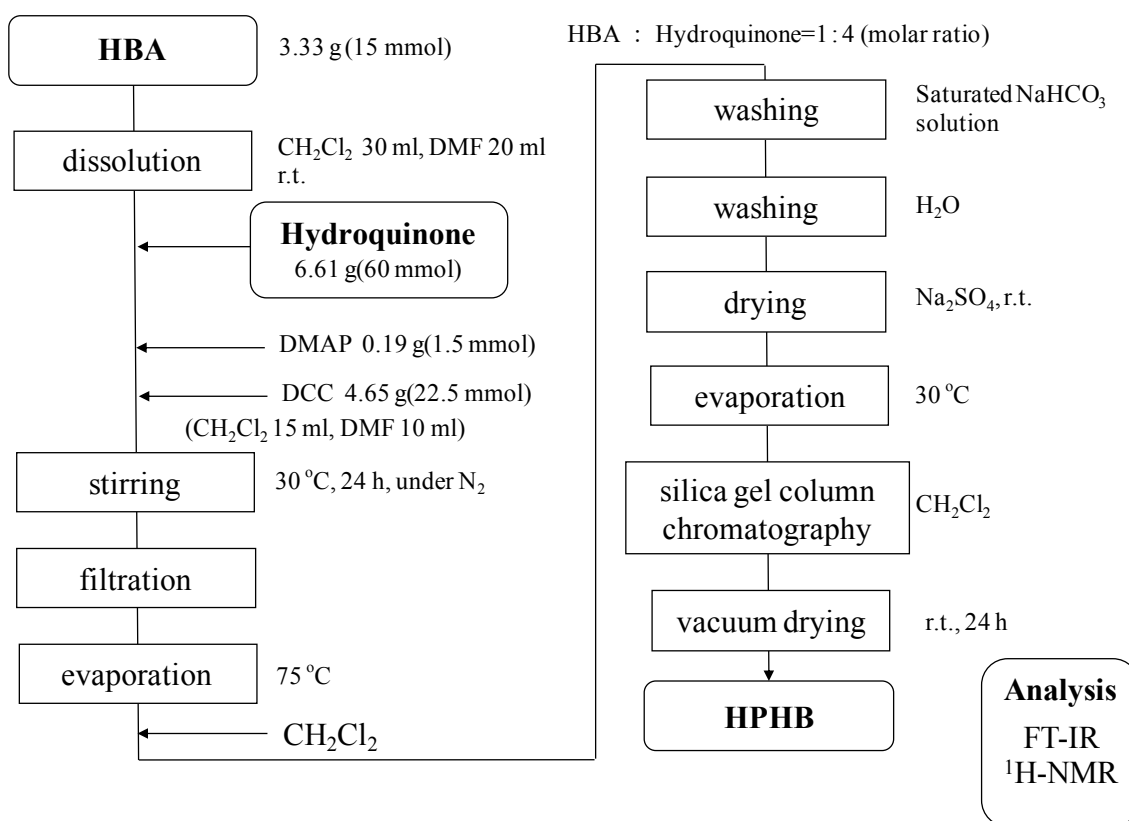


Fig. 3.2.2 Preparation of HPHB.

3.2.4 4-(4-Hexyloxybenzoyloxy)phenoxy-6-oxohexanoic acid(HBPHA)の合成⁷⁾

3.2.3 で得られた HPHB と adipoyl chloride を用いて 4-(4-hexyloxybenzoyloxy)phenoxy-6-oxohexanoic acid(HBPHA)の合成を行った。

まず、HPHB(5.00 g, 18 mmol)を秤りとり、脱水テトラヒドロフラン(THF)16 ml、脱水ピリジン 2 ml 中に室温で溶解させた。そこに adipoyl chloride(6.59 g, 36 mmol)を秤りとり、脱水 THF 9 ml 中に溶解させ、それを先の溶液に滴下し、窒素下、室温で 15 h 攪拌した。次に、この溶液を多量の純水中に滴下して、生成物を析出させ、ろ過し、回収した沈殿物をさらに 500 ml の純水中で洗浄した後、室温で 24 h 真空乾燥した。乾燥後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂: acetone=30 : 1)により精製した後、得られた固体を、室温で 24 h 真空乾燥させ、白色固体の生成物(3.30 g, 収率:47%)を得た。得られた生成物について FT-IR、¹H-NMR、¹³C-NMR および 2D-NMR スペクトル測定によって構造解析し、溶解性試験について評価した。実験方法をフローチャートとして Fig. 3.2.3 に示す。

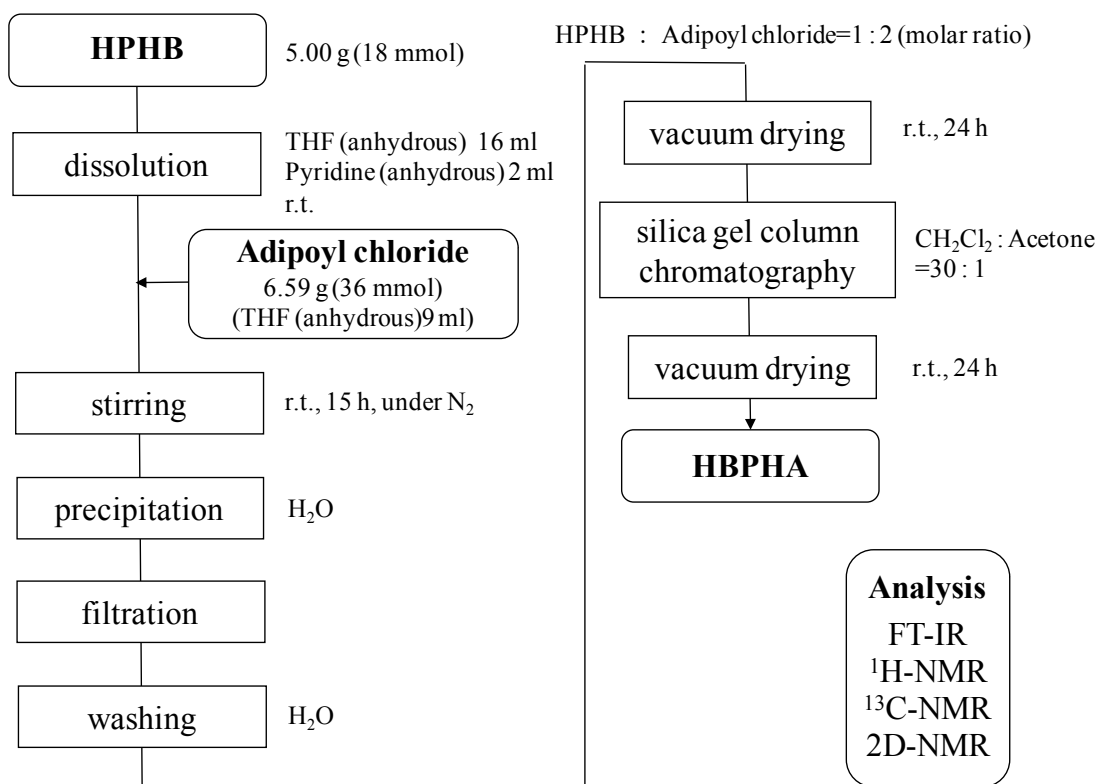


Fig. 3.2.3 Preparation of HBPCHA.

3.2.5 TC-HBPHA の合成⁷⁾

3.2.2 で得られた TC4 と 3.2.4 で得られた HBPHA とを用いて TC-HBPHA の合成を行った。

まず、TC4 (0.84 g, 0.97 mmol) と HBPHA (2.00 g, 4.86 mmol) を秤りとり、脱水ピリジン 11 ml 中に室温で溶解させた。さらに触媒として DMAP (0.35 g, 2.92 mmol) と脱水縮合剤として DCC (1.20 g, 5.83 mmol) を秤りとり、脱水ピリジン 30 ml 中に溶解させ、それを先の溶液に加えて、窒素下、室温で 72 h 攪拌した。次に、この溶液をろ過し、回収したろ液を体積が始めの 5 分の 1 になる程度まで減圧濃縮した後、多量の純水中に滴下して、生成物を析出させ、ろ過し、回収した沈殿物をさらに 500 ml の純水中で洗浄した。洗浄後、ジクロロメタンを用いて抽出し、硫酸ナトリウムを加え室温で 24 h 乾燥させた。乾燥後、減圧濃縮し、50 ml のエタノール中で洗浄した後、過剰の DCC を失活させるため、シュウ酸 (0.73 g, 5.83 mmol) をメタノール 10 ml に溶解させた混合溶液に加え洗浄した。洗浄後、十分量のジクロロメタンに溶解させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および純水を用いて分液にて洗浄し、硫酸ナトリウムを加え室温で 24 h 乾燥させた。その後、減圧濃縮し、500 ml のヘキサン中で洗浄して得られた固体を、室温で 48 h 真空乾燥させ、白色固体の生成物 (0.19 g, 収率: 8%) を得た。得られた生成物について FT-IR および ¹H-NMR スペクトル測定、元素分析 ((株) システムズエンジニアリング 依頼) によって構造解析し、溶解性試験を行い、熱分析として TGA、DSC を行った。実験方法をフローチャートとして Fig. 3.2.4 に示す。

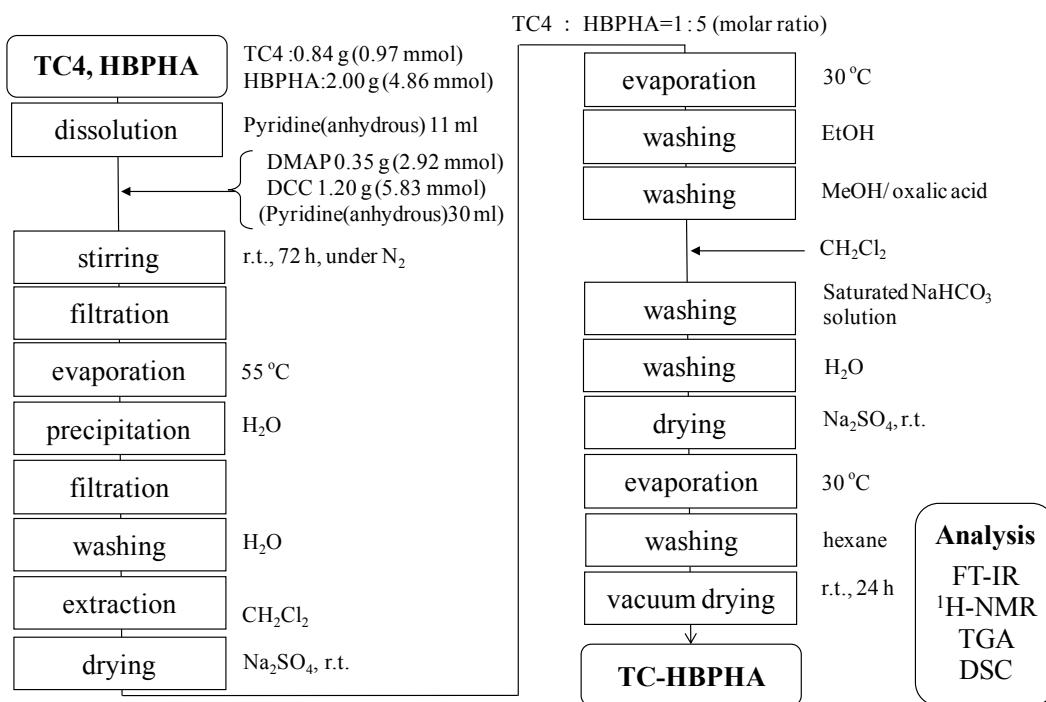


Fig. 3.2.4 Preparation of TC-HBPHA.

3.2.6 TC-HBPHA の光架橋

TC-HBPHA に UV 光を照射して吸収スペクトルの時間変化測定を行い、光二量化的調査を行った。まず、吸収スペクトルの時間変化では TC-HBPHA 0.040 g を 2.0 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 20 mg / ml)を調製し、石英セル(3 cm×2 cm×5 mm)に加えた。次にディップコーター(アイデン(株)製)を用いて、降下速度 1 mm / s、浸漬時間 1 min、上昇速度 0.5 mm / s、乾燥時間 1 h の条件で石英板(6 cm×1.5 cm×2 mm)上に薄膜を作製した。ディップコート条件を Fig. 3.2.5 に示す。

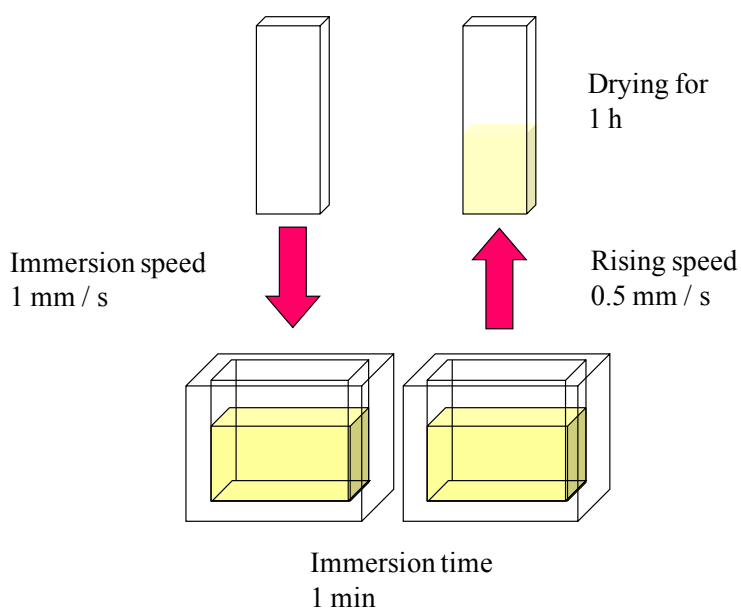


Fig. 3.2.5 Condition of dip coating.

薄膜作製後、アセトンを用いて片面のみをキムワイプで拭き取った後 UV 照射装置 Spot Cure SP-7(ウシオ電機社製)を用いて紫外光照射を行った。UV 照射装置には均一ユニットライトガイドを取り付けてあり、均一照射ユニットライトガイドの先端から 12 cm の位置に $\lambda \geq 280$ nm 透過ロングパスフィルター($\lambda < 280$ nm をカット)(ソーラボジャパン(株)製)を設置し、17 cm の位置に石英板上に作製した薄膜を設置した。UV の照射強度は 100% (60.6 mW/cm^2)とした。試料の薄膜は石英板の片面にのみ付着しているため、付着していない面をホットプレートに接触させ、まず 180°C まで加熱し、その後 145 °C まで冷却して紫外光照射を行った。この温度は並行して行った偏光顕微鏡観察により最も明確に液晶の見られた温度である。UV を所定時間照射した後、解析として V-650 紫外可視分光光度計(日本分光社製)によりスペクトルの時間変化を測定した。

また、フーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-8400S(島津製作所社製)を用いて KBr 法により FT-IR 吸収スペクトルの時間変化を測定した。TC-HBPHA 0.040 g を 2.0 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 20 mg / ml)を調製し、プレス形成した KBr の膜に 10 μl 滴下し、乾燥させ、同様の条件で所定時間 UV 照射を行い測定を行った。

3.2.7 細胞培養用薄膜の作製

ガラス基板として、 $\phi 15$ mm 丸カバーガラス(No.1 松浪硝子工業(株)製)を用いて TC-HBPHA の薄膜を作製した。TC-HBPHA 0.040 g を 2 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 20 mg/ml)を調製し、石英セル(3 cm \times 2 cm \times 5 mm)に加えた。

ガラス基板は殺菌線消毒保管庫 DM-90(大信工業(株)製)にて 2 日間 UV 処理した後、硝酸:硫酸:純水の体積比が 1:3:6 になるように調製した混合溶液に 1 日浸漬させることで表面洗浄を行い、水ですすいで乾燥させた。⁸⁾ 清浄したガラス基板に対して、3.2.6 と同じ条件(Fig. 3.2.5)でディップコートを行い乾燥させた。その後 UV 照射($\lambda \geq 280$ nm)を行い薄膜を作製した。薄膜はエチレンオキシドガス(EOG)処理((株)ステリテック社依頼)にて滅菌を行った。UV 照射条件として、均一照射ユニットライトガイドの先端から 12 cm の位置に $\lambda \geq 280$ nm 透過ロングパスフィルターを設置し、17 cm の位置にディップコートを行ったガラス基板を設置した。UV の照射強度は 100% (60.6 mW/cm²) とした。UV 光の照射時間は 3.2.6 の実験における紫外可視吸収スペクトル測定にて、これ以上照射してもほとんど吸光度の変化が見られなくなる時間(180 s)照射し、照射温度は偏光顕微鏡にて液晶相が最も多く見られた温度(180°C まで温度を上げた後、145 °C まで温度を下げた)で行った。

また、比較のため同様の条件で TC4 の薄膜も作製した。UV 照射条件として、照射距離、照射強度、照射時間は TC-HBPHA の薄膜と同様であるが、照射は室温で行った。

作製した薄膜は表面の分析として接触角測定を行った。本実験の細胞培養時に用いたサンプルの種類を Table 3.2.2 に示す。また薄膜を作製した際の手順をフローチャートとして Fig. 3.2.6 および Fig. 3.2.7 に示す。

Table 3.2.2 Sample for cell culture.

Sample	Description
PS well	Polystyrene culture plate used as purchased
glass	UV-treated and acid-washed glass coverslip
TC4-UV	UV-irradiated TC4 coated on washed glass coverslip
TC-HBPHA	TC-HBPHA coated on washed glass coverslip
TC-HBPHA-UV	UV-irradiated TC-HBPHA coated on washed glass coverslip

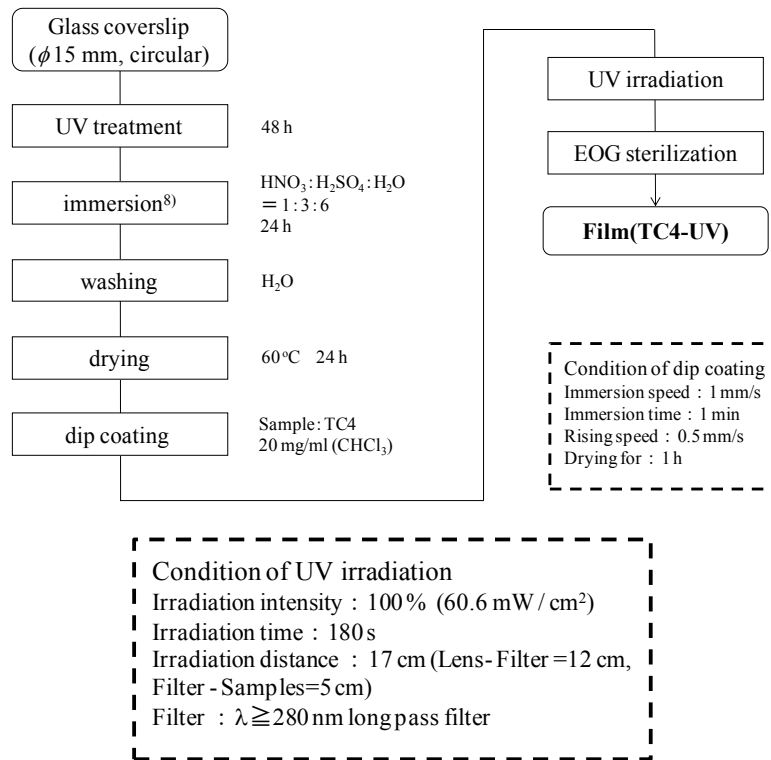


Fig. 3.2.6 Preparation of UV-irradiated TC4 thin film for cell culture.

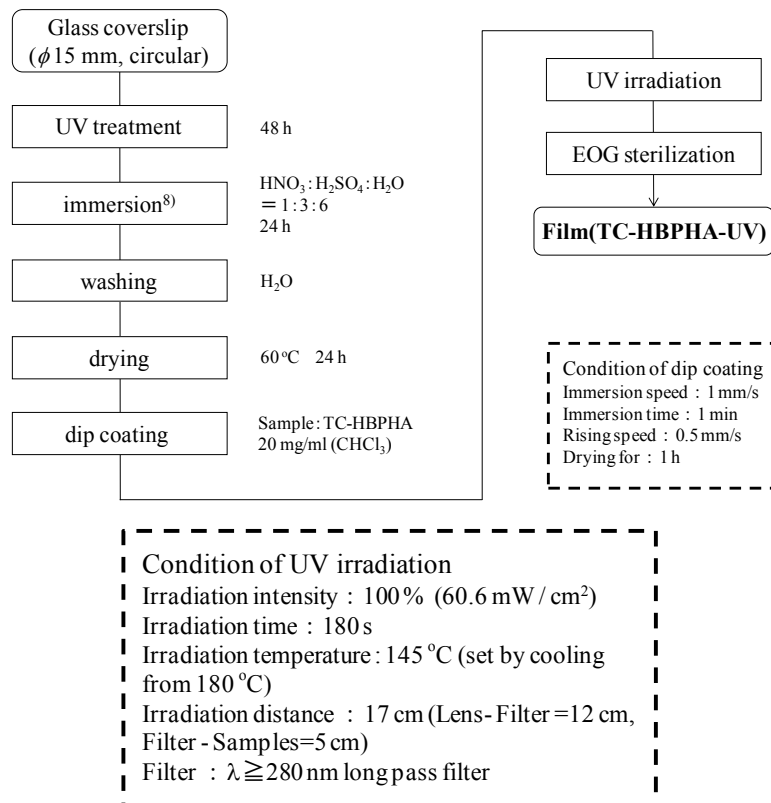


Fig. 3.2.7 Preparation of UV-irradiated TC-HBPHA thin film for cell culture.

3.2.8 線維芽細胞の *in vitro* 細胞試験

(1) 細胞培養

細胞はマウス胚細胞由来線維芽細胞 3T3 Swiss Albino 細胞を用いた。試験に必要な細胞数になるまで ϕ 10 cm dish を利用し、D-MEM に 15%FBS と 1% Penicillin / Streptomycin とを加えた溶液を基本培地とし、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養を行った。 ϕ 10 cm dish で増殖させた線維芽細胞を Fig. 3.2.8 に示す。

60-70% Confluence(細胞を増殖させて、まだ過度な密集に至っていない状態)になった 3T3 Swiss Albino をトリプシン(0.25%trypsin + EDTA)により剥離し、24 well polystyrene culture plate(TrueLine 製)中の評価したいサンプル上に 3×10^3 cells/ml 播種した。播種 3 時間、1、3、5、7 日後に細胞試験を行った。細胞の接着は、倒立顕微鏡 Axio Vert.A1(カールツァイスマイクロコピー(株)製)を用いて観察した。

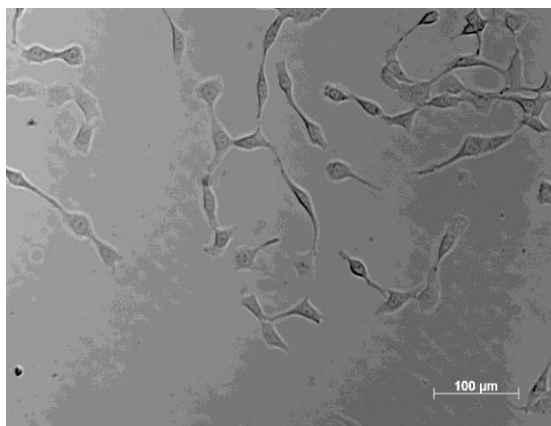


Fig. 3.2.8 3T3 Swiss Albino cells (ϕ 10 cm dish)

(2) 細胞数測定および細胞増殖の評価⁹⁾⁻¹¹⁾

細胞数測定には血球計算板による細胞数測定、細胞増殖の評価には MTT 試験を用いた。血球計算板による細胞数測定では、トリパンプルー色素を用いることにより生細胞では色素が細胞膜を透過しないが、死細胞は染色されることを利用して、細胞の生死細胞数を測定することができる。

培養後の試料に 250 μ l のトリプシンを加え 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 3 分間静置することで加水分解により細胞を剥離し、過度な加水分解を抑制するために 250 μ l 基本培地を加え中和した。その後、500 μ l トリパンプルーを加え、死細胞を染色し、血球計算板と位相差顕微鏡を用いて生死細胞数を計数した。

MTT 試験は、テトラゾリウム塩の一種である MTT により生細胞のミトコンドリア中の呼吸鎖を染色し、相対的な細胞量を測定する方法である。MTT はミトコンドリア内に存在する酵素により還元され、発色する。所定時間培養後の試料に 300 μ l の 1.0 mg / ml MTT 溶液を加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 雰囲気下で 90 分間静置した後、300 μ l 細胞溶解液を加え、細胞を溶解した。溶解して得られた溶液を 300 μ l ずつ 96 well polystyrene culture plate(TrueLine 製)に移し、マイクロプレートリーダー iMark (バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製)を用いて波長 570 nm で吸光度を測定した。

(3)検定方法

検定方法は t 検定を行い¹²⁾、第 1 章の記載に従って統計解析を行った。

3.2.9 装置

・フーリエ変換赤外吸収(FT-IR)スペクトル測定

フーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-8400S(島津製作所社製)および IR Affinity-1S(島津製作所社製)を用いて KBr 錠剤法と全反射型測定(ATR)法にて FT-IR 測定を行った。KBr 錠剤法では測定範囲 $4000-400\text{ cm}^{-1}$ 、積算回数 50 回で測定した。ATR 法では首振り機能付きフラットアンビル(P/N GS10820)およびダイヤモンド結晶ディスク(P/N GS10810)を用いて測定範囲 $4000-400\text{ cm}^{-1}$ 、積算回数 50 回で測定した。

・核磁気共鳴($^1\text{H-NMR}$)スペクトル測定

核磁気共鳴装置 AV400(Bruker 社製)を用いて $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。試料 20 mg を各種重水素化溶媒(DMSO- d_6 、クロロホルム- d)500-550 μl に溶解させ、NMR 用細管に移し、積算回数 32 回で測定した。

・核磁気共鳴($^{13}\text{C-NMR}$)スペクトル測定

核磁気共鳴装置 AV400(Bruker 社製)を用いて $^{13}\text{C-NMR}$ 測定を行った。試料 20 mg を各種重水素化溶媒(クロロホルム- d)500-550 μl に溶解させ、NMR 用細管に移し、積算回数 1000 回で測定した。

・2D-NMR 測定

核磁気共鳴装置 AV400(Bruker 社製)を用いて、2D-NMR 測定を行った。試料 20 mg を各種重水素化溶媒(クロロホルム- d) 500-550 μl に溶解させ、NMR 用細管に移し、HHCOSY、CHCOSY は積算回数 40 回、HMBC は積算回数 48 回で行った。

HHCOSY は α 位の炭素について水素と、 β 位について水素間における水素-水素の相関を表す。CHCOSY は炭素とその炭素について水素間における炭素-水素の相関を示す。HMBC は α 位の炭素について水素と、 β 位もしくは γ 位の炭素間における炭素-水素の相関を示す。

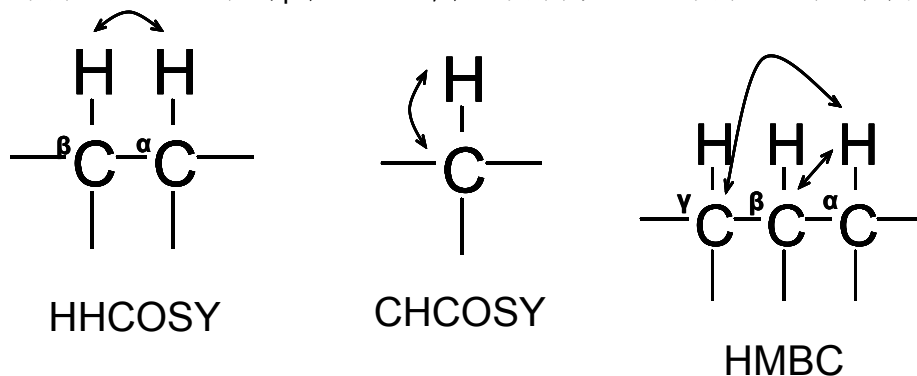


Fig. 3.2.9 Correlation of various 2D-NMR

・熱重量分析(TGA)

熱重量分析装置 TGA-50(島津製作所社製)を用いて TGA 測定を行った。測定条件を以下に示す。

昇温速度: 10°C/min
温度範囲: r.t.(25±5°C)~500°C

アルミパン(Mac Science 社製)に固体試料を 3~5 mg の範囲内で秤りとり、窒素雰囲気中にて測定した。分解温度(T_d)は試料の重量が 5 wt%減少したときの温度とした。また、光架橋後の測定は、アルミパン(Mac Science 社製)に固体試料を 3~5 mg の範囲内で秤りとり、クロロホルム 10 μ l に溶解させ、乾燥してフィルムとし、無偏向の UV 照射($\lambda \geq 280$ nm)を 2.2.5 と同様の条件で行い、窒素雰囲気中にて重量変化を測定した。

・示差走査熱量分析(DSC)

示差走査熱量分析装置 Pyris 1(Perkin Elmer 社製)を用いて DSC 測定を行った。測定条件を以下に示す。

	状態	温度	昇・降温速度
第 1 過程	昇温	-10°C~200°C	10°C/min
第 2 過程	3 min.保持	200°C	—
第 3 過程	降温	200°C~-10°C	10°C/min
第 4 過程	3 min.保持	-10°C	—
第 5 過程	昇温	-10°C~200°C	10°C/min

固体試料をアルミパン(Perkin Elmer 社製)に 5~10 mg の範囲内で秤りとり、アルミの蓋でシールしたものを測定試料とした。冷却ユニットには cryofill を使用し、窒素雰囲気中にて測定した。また、光架橋後の測定は、アルミパン(Perkin Elmer 社製)に固体試料を 3~5 mg の範囲内で秤りとり、クロロホルム 10 μ l に溶解させ、乾燥し、無偏向の UV 照射($\lambda \geq 280$ nm)を 2.2.5 と同様の条件で行い、窒素雰囲気中にて測定した。

・紫外可視吸収スペクトル測定

紫外可視分光光度計 V-650(日本分光社製)を用いて紫外可視(UV-Vis)吸収スペクトル測定を行った。測定条件を以下に示す。

測光モード	Abs
測定範囲	800 - 200 nm
レスポンス	Medium
バンド幅	L 5.0 nm
走査速度	400 nm / min
読込間隔	1.0 nm
積算回数	1

・偏光顕微鏡観察

偏光顕微鏡 OLYMPUS BX50(OLYMPUS 社製)および光源 OLYMPUS TH3(OLYMPUS 社製)を用いて偏光顕微鏡観察を行った。観察倍率は 200 倍、室温(25±5 °C)から 200 °C の温度範囲で直交ニコル下にて液晶相の観察を行った。

・電界放射型走査電子顕微鏡観察(FE-SEM)

電界放射型走査電子顕微鏡 S-4700 Type 1(日立製作所社製)を用いて電界放射型走査電子顕微鏡観察を行った。試験用サンプルとして偏光顕微鏡観察で用いたサンプルを使用した。サンプルを導電性カーボンテープで SEM 観察用試料台に固定し、観察前に E-1030 イオンスパッター(日立製作所社製)を用いて金メッキ蒸着を 30 s 行った。測定条件を以下に示す。

加速電圧	2 kV
撮影倍率	500 倍

・接触角測定¹³⁾

接触角計 SImage02V((株)エキシマ社製)を用いて接触角測定を行った。フィルムに超純水を一滴(5 μl)垂らし、PC 画像解析による計測ソフトで ATAN θ/2 法より接触角を測定した。

3.3 結果および考察

3.3.1 FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定による構造解析

トレハロースおよび桂皮酸クロリドを反応し、このときトレハロースと桂皮酸クロリドの仕込みモル比を 1:4 として、TC4 を合成した。

Fig. 3.3.1 に(a)トレハロース、(b)桂皮酸クロリドおよびこれらの反応によって得られた生成物(c)TC4 の FT-IR スペクトルを示す。

Fig. 3.3.1 より TC4 のスペクトル(c)において 1700 cm^{-1} 付近に見られるピークはエステル $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に由来する吸収である。さらに、 1640 cm^{-1} 付近のピークは桂皮酸ユニットの $\text{C}=\text{C}$ 伸縮振動に由来し、 $1440\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークはベンゼン環の $\text{C}-\text{C}$ 伸縮振動に由来すると考えられる。 1160 cm^{-1} 付近のピークはエステルの $\text{C}-\text{O}$ 伸縮振動に由来すると考えられる。 1000 cm^{-1} 付近のピークはトレハロースの $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 伸縮振動に由来するものと考えられる。

また Scheme 3.1.1 の反応式より反応前後の化学構造に着目すると、トレハロースのヒドロキシ基が変化している。Fig. 3.3.1 よりトレハロースのスペクトル(a)において 3500 cm^{-1} 付近に顕著なヒドロキシ基の $\text{O}-\text{H}$ 伸縮振動による吸収ピークが見られた。TC(c)ではこのピークが減少していた。これは一部のヒドロキシ基にシナモイル基が置換しているため減少したと考えられる。

これらのことから、TC4 の合成反応が進行していることが示唆される。

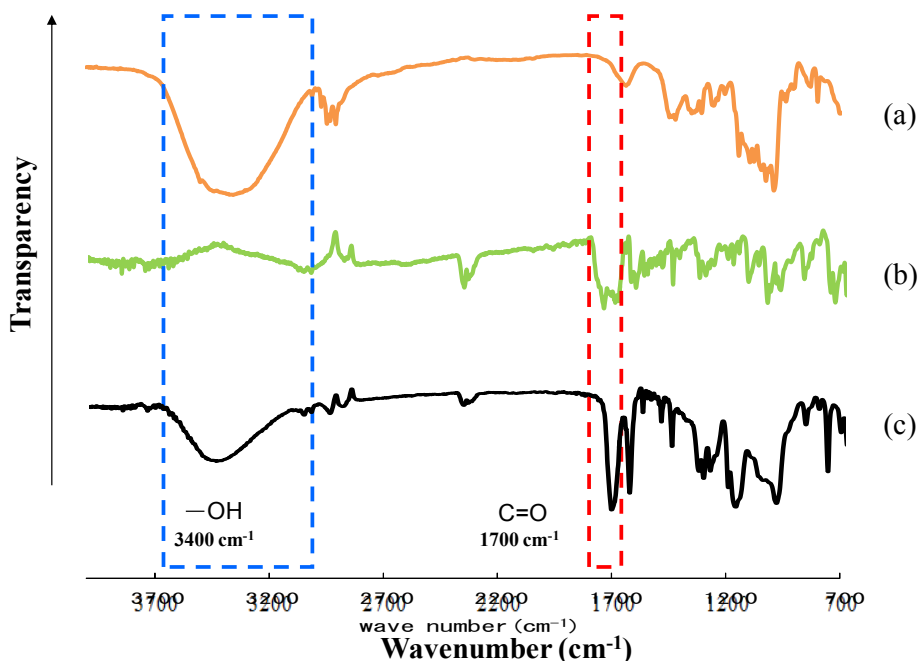


Fig. 3.3.1 FT-IR spectra of (a)trehalose, (b)cinnamoyl chloride and (c)TC4

(a)トレハロース、(b)桂皮酸クロリドおよびこれらの合成によって得られた生成物(c)TC4 の¹H-NMR スペクトルを Fig. 3.3.2 に示す。

Fig. 3.3.2 より(a)トレハロースのスペクトルにおいて骨格の C-H に由来するシグナル(3.0-3.7 ppm)および O-H に由来するシグナル(4.3-4.8 ppm)が(c)TC で少しシフトしていることが分かる。また(b)桂皮酸クロリドのスペクトルにおいてアルケンおよびベンゼン環由来のシグナル(6.3-6.6 ppm、7.2-8.0 ppm)が(c)TC4 にも確認できた。このことにより、TC4 の合成反応が進行していることが示唆される。

生成物(c)TC4 のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 3.3.1 に示す。

Table 3.3.1 Measured integral value of each signal in the spectrum of TC4.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical number of protons(DS=4.0)
a	3.5-4.5	14.52	12.00
b	4.9-6.0	6.17	6.00
c	6.3-6.6	4.00	4.00
d	7.1-7.6	21.36	20.00
e	7.6-8.0	3.91	4.00

Table 3.3.1 より、シグナル積分値とその理論存在比がほぼ一致していることが分かる。さらに(c)TC4 のシグナル積分値よりトレハロースと桂皮酸クロリドの比率は 1:3.8 と計算され、理論値に近い値であった。したがって、これらの結果より TC4 の合成が認められた。

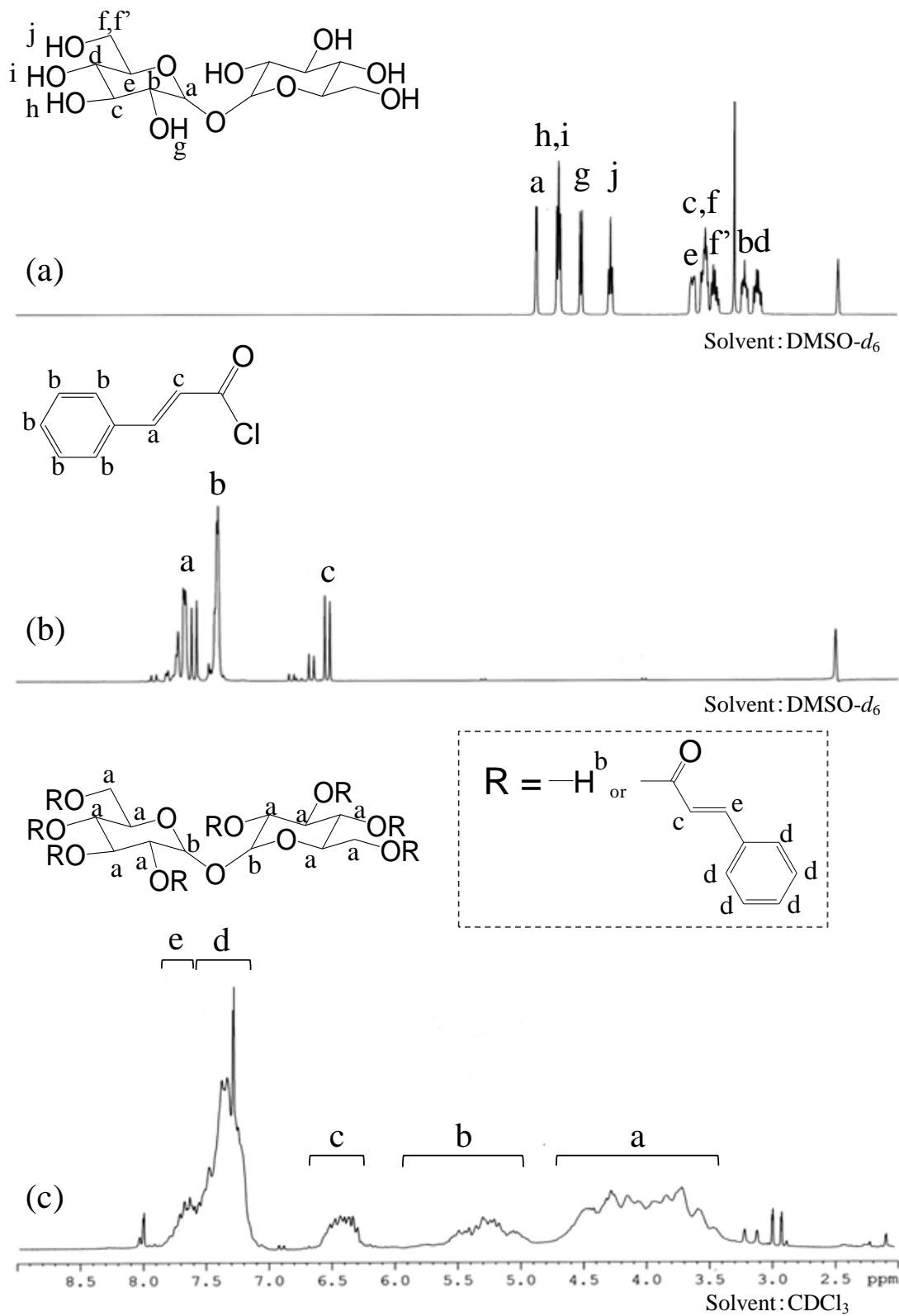


Fig. 3.3.2 ¹H-NMR spectra of (a)trehalose, (b)cinnamoyl chloride and (c)TC4.

トレハロース、桂皮酸クロリドおよび TC4 について溶解性試験を行った。用いた溶媒は純水、エタノール、メタノール、DMF、DMSO、THF、アセトン、クロロホルム、ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトニトリル、酢酸エチル、トルエンの 13 種類である。試料を 20 mg 秤りとり溶媒を 500 μ l 加え、目視で観察することで溶解性試験を行った。この結果を Table 3.3.2 に示す。

Table 3.3.2 Solubility of trehalose, cinnamoyl chloride and TC4.

Solvent	Sample		
	Trehalose	Cinnamoyl chloride	TC4
water	○	×	×
ethanol	○	○	△
methanol	○	○	△
DMF	○	○	○
DMSO	○	○	○
THF	×	○	○
acetone	×	○	○
chloroform	×	○	○
hexane	×	○	×
diethyl ether	×	○	×
acetonitrile	×	○	×
ethyl acetate	×	○	×
toluene	×	○	×

(○) soluble
(×) insoluble
(△) partially soluble

Table 3.3.2 より、第一章と同様に、トレハロースは親水性であるため、純水、エタノール、メタノール、DMF および DMSO には可溶であり、その他の溶媒には不溶であった。また桂皮酸クロリドは疎水性であるため純水には不溶であったが、その他の有機溶媒には可溶であった。

そして、TC4 はエタノールおよびメタノールには部分溶解し、DMF、DMSO、THF、アセトンおよびクロロホルムには可溶であり、その他の溶媒には不溶であった。これはトレハロースの水酸基にシンナモイル基が置換したためトレハロースの親水性が低下し、トレハロースが可溶であった極性の非常に高い溶媒である純水、エタノールおよびメタノールに溶けにくくなり、桂皮酸クロリドが可溶であった極性溶媒である THF、アセトンおよび極性の低い溶媒であるクロロホルムに可溶になったと考える。

次に、HBA およびヒドロキノンを用いて HPHB を合成した。

Fig. 3.3.3 に(a)HBA、(b)ヒドロキノンおよびこれらの反応によって得られた生成物(c)HPHB の FT-IR スペクトルを示す。

Fig. 3.3.3 より HPHB のスペクトル(c)において 1200 cm^{-1} 付近に見られるピークは HBA とヒドロキノンの結合により得られるエステル C-O 伸縮振動に由来する吸収である。さらに、 2960 cm^{-1} 付近のピークは HBA のメチル基およびメチレン基由来の C-H 伸縮振動に由来するものと考えられる。

また、Scheme 3.1.2 の反応式より反応前後の化学構造に着目すると、HBA のカルボキシル基が変化している。Fig. 3.3.3 より HBA のスペクトル(a)において $3400\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$ 付近に顕著なカルボキシル基の -COOH 伸縮振動による吸収ピークが見られた。HPHB(c)ではこのピークが消失していた。これは HBA のカルボキシル基にヒドロキノンが置換しているため消失したと考えられる。HPHB のスペクトル(c)において 1700 cm^{-1} 付近に見られるピークは、HBA のスペクトル(a)における 1720 cm^{-1} 付近にあるカルボン酸の C=O 伸縮振動の吸収と同じ吸収帯であるため比較できないが、カルボン酸の C=O 伸縮振動の吸収がエステルの C=O 伸縮振動に由来する吸収に変わっていると考えられる。

これらのことから、HBHP の合成反応が進行していることが示唆される。

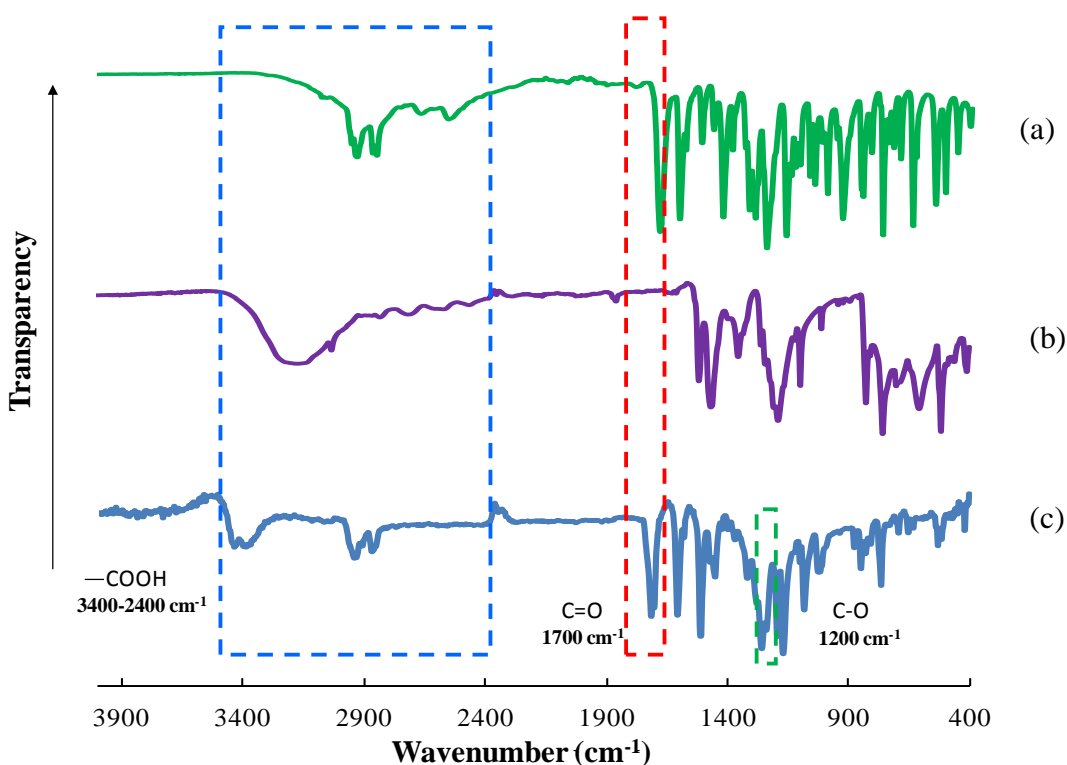


Fig. 3.3.3 FT-IR spectra of (a)HBA, (b)Hydroquinone and (c)HPHB

(a)HBA、(b)ヒドロキノンおよびこれらの合成によって得られた生成物(c)HPHBの¹H-NMRスペクトルを Fig. 3.3.4 に示す。

Fig. 3.3.4 より(a)HBA のスペクトルにおいてメチル基に由来するシグナル(0.95 ppm)、アルキル鎖の水素に由来するシグナル(1.2-1.9 ppm)、酸素に隣接したアルキル鎖の水素に由来するシグナル(4.0 ppm)およびベンゼン環の水素に由来するシグナル(6.8 ppm, 8.2 ppm)が(c)HPHB で見られた。また(b)ヒドロキノンのスペクトルにおいてベンゼン環の水素に由来したシグナル(6.6 ppm)が(c)HPHB でシフトしており、ヒドロキノンのフェノール性 O-H のシグナル(8.6 ppm)が(c)HPHB で減少し、また、大きくシフトして(5.7-5.9 ppm)が出現した。このことにより、HPHB の反応が進行していることが示唆される。

生成物(c)HPHB のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 3.3.3 に示す。

Table 3.3.3 Measured integral value of each signal in the spectrum of HPHB.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical number of protons
a	0.95	3.22	3.00
b	1.2-1.9	8.85	8.00
c	4.0	2.09	2.00
d	6.8	2.03	2.00
e	8.2	2.00	2.00
f	6.9-7.1	4.09	4.00
g	5.7-5.9	0.96	1.00

Table 3.3.3 より、シグナル積分値とその理論存在比がほぼ一致していることが分かる。したがってこれらの結果より HPHB の合成が認められた。

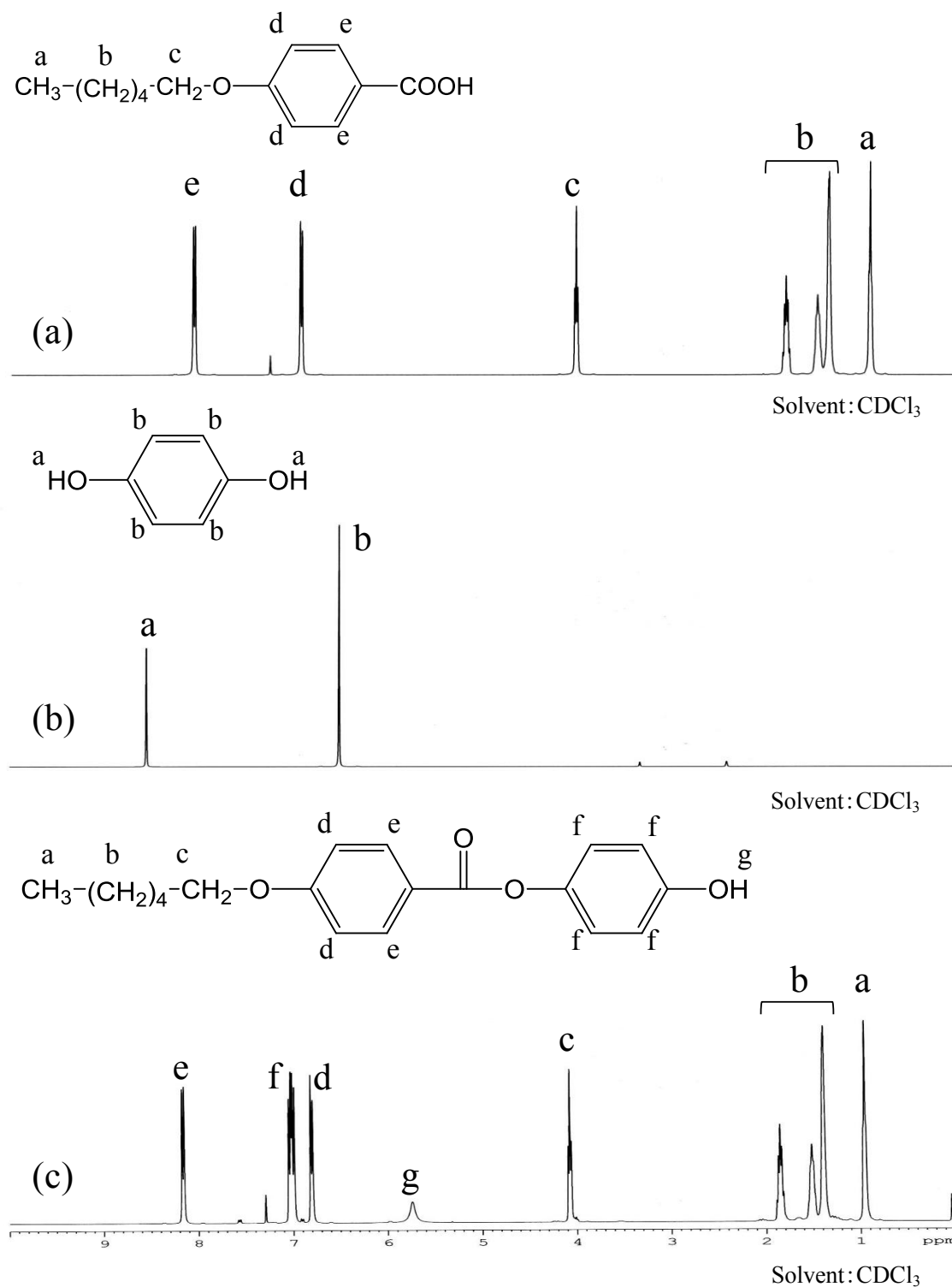


Fig. 3.3.4 ¹H-NMR spectra of (a)HBA, (b)hydroquinone and (c)HPHB.

次に、HPHB およびアジピン酸クロリドを用いて HBPFA を合成した。

Fig. 3.3.5 に(a)HPHB、(b)アジピン酸クロリドおよびこれらの反応によって得られた生成物(c)HBPFA の FT-IR スペクトルを示す。

Fig. 3.3.5 より HBPFA のスペクトル(c)において 2960 cm^{-1} 付近のピークは HBPFA のメチル基及びメチレン基由来の C-H 伸縮振動に由来するものと考えられる。

また、Scheme 3.1.2 の反応式より反応前後の化学構造に着目すると、HPHB のフェノールの末端が変化している。Fig. 3.3.5 より HBPFA のスペクトル(c)において $2400\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ 付近のカルボキシル基の -COOH 伸縮振動に由来する幅広い吸収ピークが出現した。さらに HBPFA のスペクトル(c)において 1720 cm^{-1} 付近に見られるピークは、HPHB のスペクトル(a)における 1700 cm^{-1} 付近にあるエステルの C=O 伸縮振動と重なっており明確ではないが、カルボキシル基の C=O 伸縮振動に由来する吸収も含まれていると考えられる。これらは HPHB のフェノールの O-H にアジピン酸クロリドが反応し、精製段階で酸クロリドが分解したためにも出現したと考えられる。

これらのことから、HBPFA の合成反応が進行していることが示唆される。

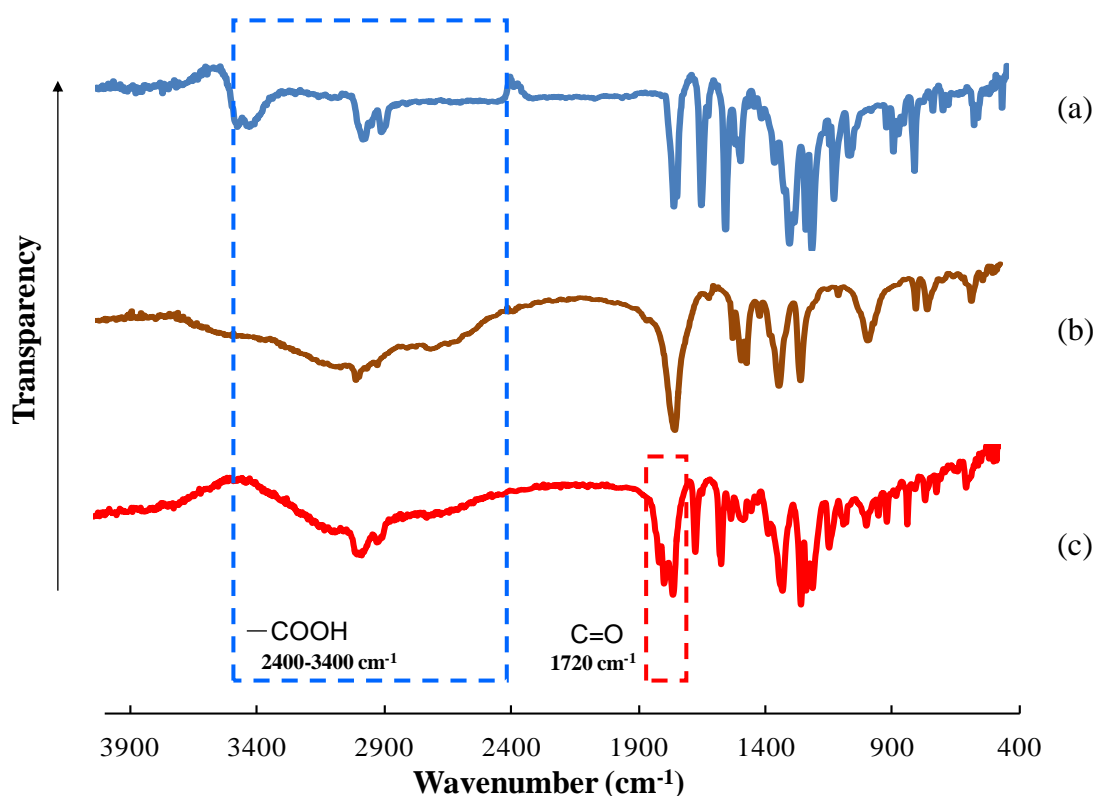


Fig. 3.3.5 FT-IR spectra of (a)HPHB, (b)adipoyl chloride and (c)HBPFA

(a)HPHB、(b)アジピン酸クロリドおよびこれらの合成によって得られた生成物(c)HBPHA の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Fig. 3.3.6 に示す。

Fig. 3.3.6 より(a)HPHB のスペクトルにおいて見られた、メチル基に由来するシグナル(0.95 ppm)、アルキル鎖の水素に由来するシグナル(1.2-1.8 ppm)、酸素に隣接したアルキル鎖の水素に由来するシグナル(4.0 ppm) が(c)HBPHA で見られた。さらにベンゼン環の水素に由来するシグナル(6.9-8.2 ppm)が(c)HBPHA でわずかなシフトが見られた。また(b)アジピン酸クロリドのスペクトルにおいて見られたアルキル鎖のメチレン基に由来するシグナル(1.9 ppm, 2.9 ppm)が(c)HBPHA では、それぞれ 1.9 ppm および 2.3-2.6 ppm にて見られた。さらに前述の HPHB で出現したフェノールの-OH に由来するシグナル(5.7-5.9 ppm)の消失を確認した。このことにより、HBPHA の合成反応が進行していることが示唆される。

生成物(c)HBPHA のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 3.3.4 に示す。

Table 3.3.4 Measured integral value of each signal in the spectrum of HBPHA.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical number of protons
a	0.95	3.00	3.00
b	1.2-1.8	8.18	8.00
c	4.0	1.97	2.00
d	7.0	1.94	2.00
e	8.2	1.88	2.00
f	7.1-7.3	4.25	4.00
g	1.9	4.05	4.00
h	2.3-2.7	4.40	4.00

Table 3.3.4 より、シグナル積分値とその理論存在比がほぼ一致していることが分かる。したがって、これらの結果より HBPHA の合成反応が進行していることが示唆される。

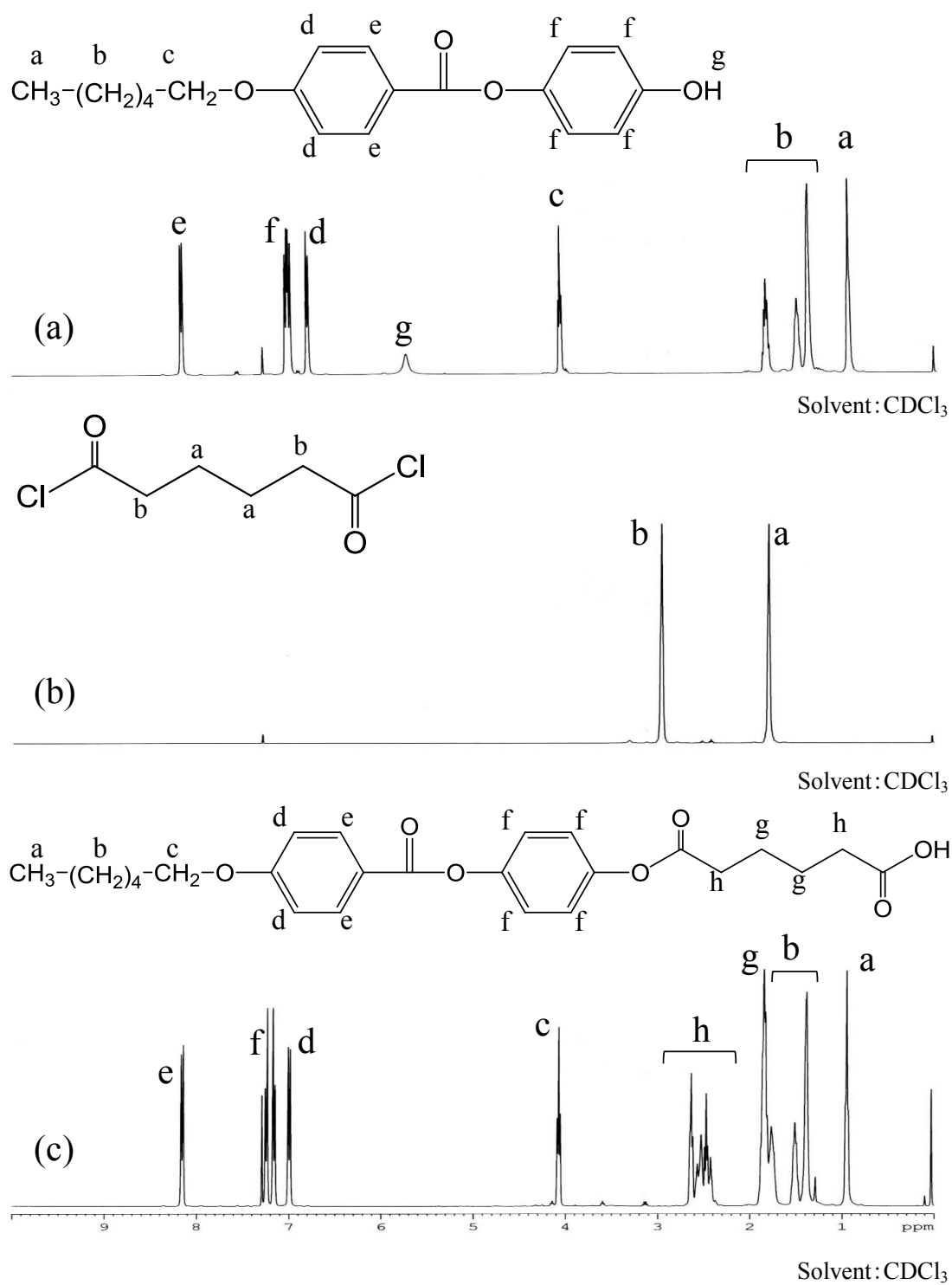


Fig. 3.3.6 $^1\text{H-NMR}$ spectra of (a)HPHB, (b)adipoyl chloride and (c)HBPFA.

生成物 HBPFA の ^{13}C -NMR スペクトルを Fig. 3.3.7 に示す。

Fig. 3.3.7 より HBA のメチル基に由来するシグナル(13 ppm)、アルキル鎖の炭素に由来するシグナル(22 ppm, 26-32 ppm)、酸素に隣接したアルキル鎖の炭素に由来するシグナル(68 ppm)、HBA のベンゼン環の炭素に由来するシグナル(114 ppm, 121 ppm, 132 ppm, 163 ppm)、ヒドロキシンのベンゼン環の炭素に由来するシグナル(122 ppm, 148-149 ppm)およびエステルに由来するシグナル(164 ppm)が HBPFA で見られた。またアジピン酸クロリドのアルキル鎖の炭素に由来するシグナル(23-24 ppm, 33-34 ppm)、エステルに由来するシグナル(171 ppm)カルボン酸の炭素に由来するシグナル(178 ppm) が HBPFA で見られた。したがって、これらの結果より HBPFA 合成反応が進行していることが示唆される。

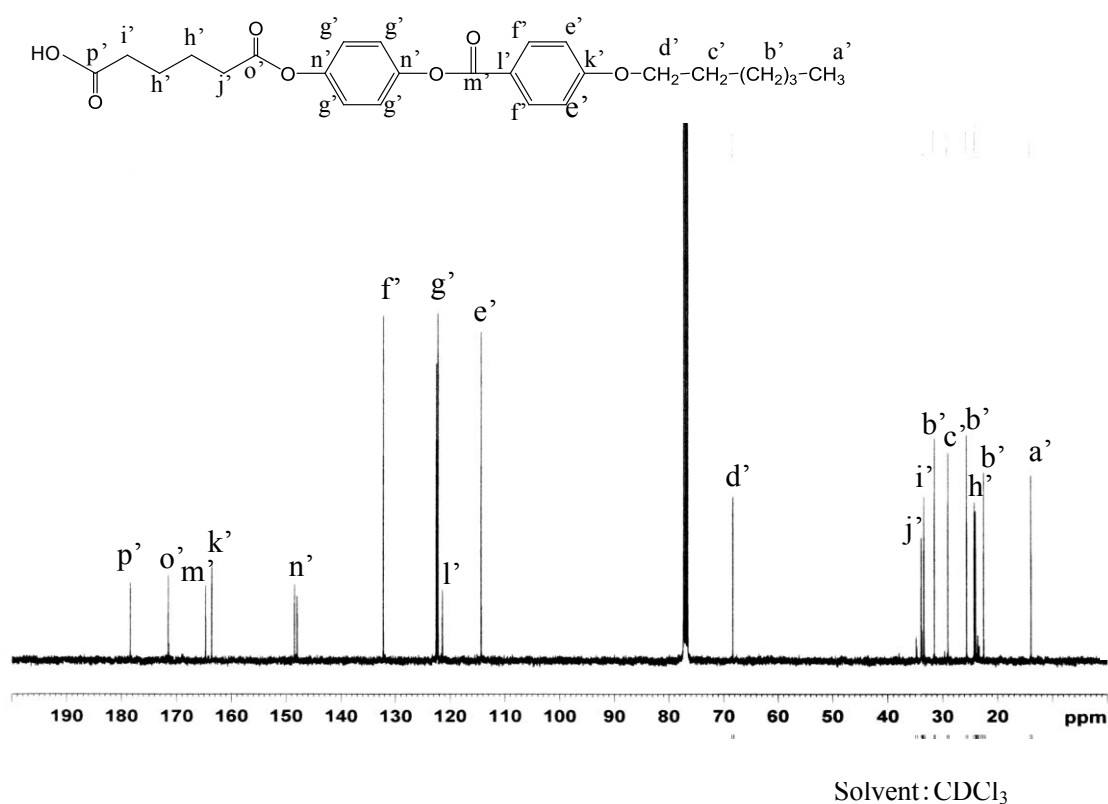


Fig. 3.3.7 ^{13}C -NMR spectrum of HBPFA.

生成物 HBPFA に対する 2D-NMR 測定のうちの HHCOSY スペクトルを Fig. 3.3.8 に示す。

Fig. 3.3.8 より、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中の 0.95 ppm のシグナルを構造式における a のプロトンと仮定すると、1.2 ppm のシグナルは b のプロトンと帰属することができる。1.2-1.5 ppm のシグナルが b のプロトンに帰属されると、1.8 ppm のシグナルは c のプロトンと帰属できる。1.8 ppm のシグナルが c のプロトンに帰属されると、4.0 ppm のシグナルは d のプロトンと帰属できる。また、7.0 ppm のシグナルを構造式における e のプロトンと仮定すると、8.2 ppm のシグナルは f のプロトンと帰属できる。8.2 ppm のシグナルが f のプロトンと帰属されると、7.1-7.3 ppm のシグナルは g のプロトンと帰属できる。さらに、1.9 ppm のシグナルを構造式における h のプロトンと仮定すると、2.3-2.6 ppm のシグナルは i, j のプロトンと帰属できる。これらの帰属を検証するために CHCOSY スペクトルの帰属を行った。

生成物 HBPFA の CHCOSY スペクトルを Fig. 3.3.9 に示す。

Fig. 3.3.9 より、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル中の 13 ppm のシグナルは構造式における a' のカーボン、22 ppm、26 ppm、32 ppm のシグナルは b' のカーボン、29 ppm のシグナルは c' のカーボン、68 ppm のシグナルは d' のカーボン、114 ppm のシグナルは e' のカーボン、132 ppm のシグナルは f' のカーボン、121 ppm のシグナルは g' のカーボン、23-24 ppm のシグナルは h' のカーボン、33 ppm のシグナルは i' のカーボン、34 ppm のシグナルは j' のカーボンに対応する。さらにこれらの帰属を検証するために HMBC スペクトルの帰属を行った。

生成物 HBPFA の HMBC スペクトルを Fig. 3.3.10 に示す。

Fig. 3.3.10 より、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中の 1.8 ppm のシグナル(c)は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル中の 68 ppm のシグナル(d')との相関が確認される。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中の 4.0 ppm のシグナル(d)は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル中の 164 ppm のシグナル(k')との相関が確認される。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中の 7.0 ppm のシグナル(e)は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル中の 119 ppm のシグナル(l')との相関が確認される。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中の 7.0 ppm のシグナル(e)は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル中の 119 ppm のシグナル(l')との相関が確認される。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中の 8.2 ppm のシグナル(e)は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル中の 165 ppm のシグナル(m')との相関が確認される。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中の 7.1-7.3 ppm のシグナル(g)は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル中の 149 ppm のシグナル(n')との相関が確認される。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中の 2.3 ppm のシグナル(i)は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル中の 179 ppm のシグナル(p')との相関が確認される。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル中の 2.6 ppm のシグナル(j)は $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル中の 171 ppm のシグナル(o')との相関が確認される。

したがって、これらの結果より HPHB の合成が認められた。

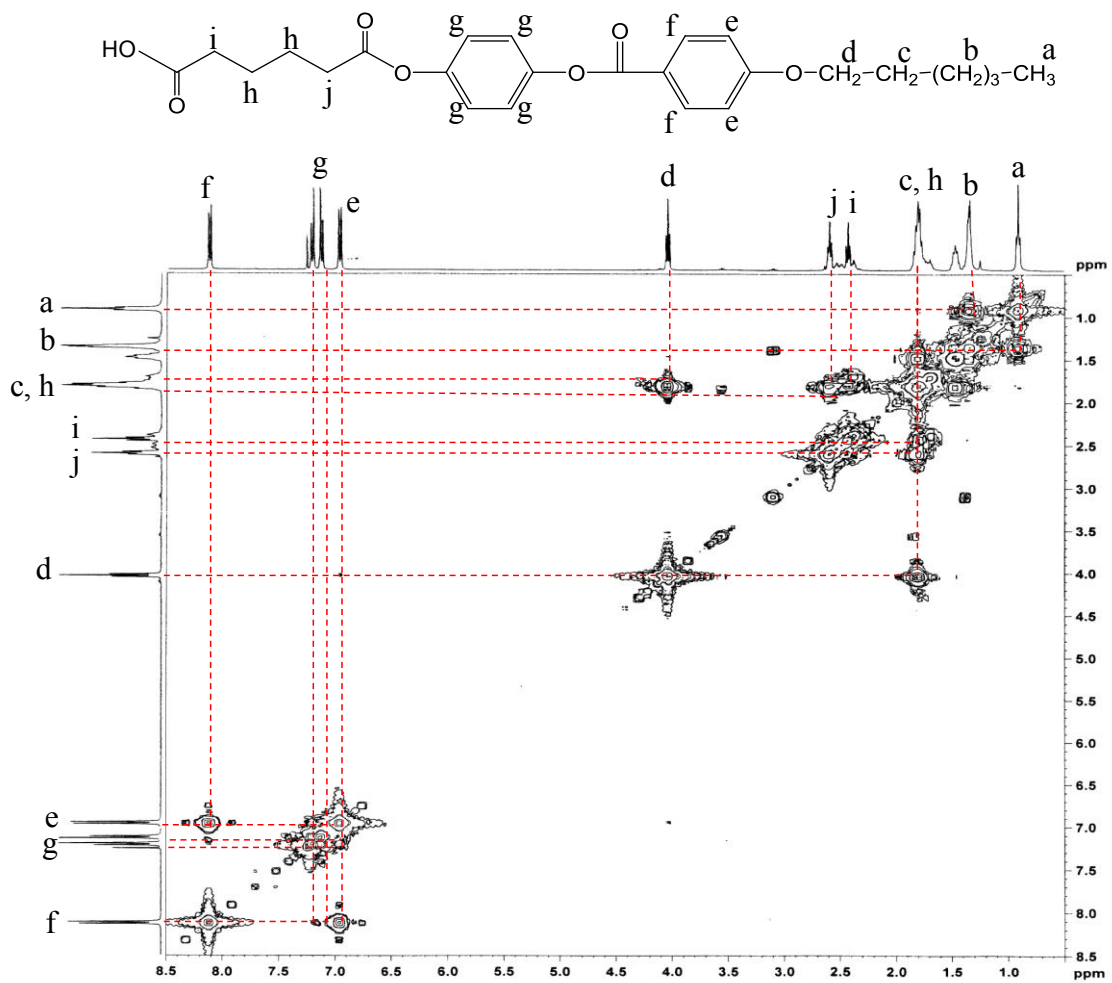


Fig. 3.3.8 HHCOSY spectrum of HBPHA (solvent CDCl₃).

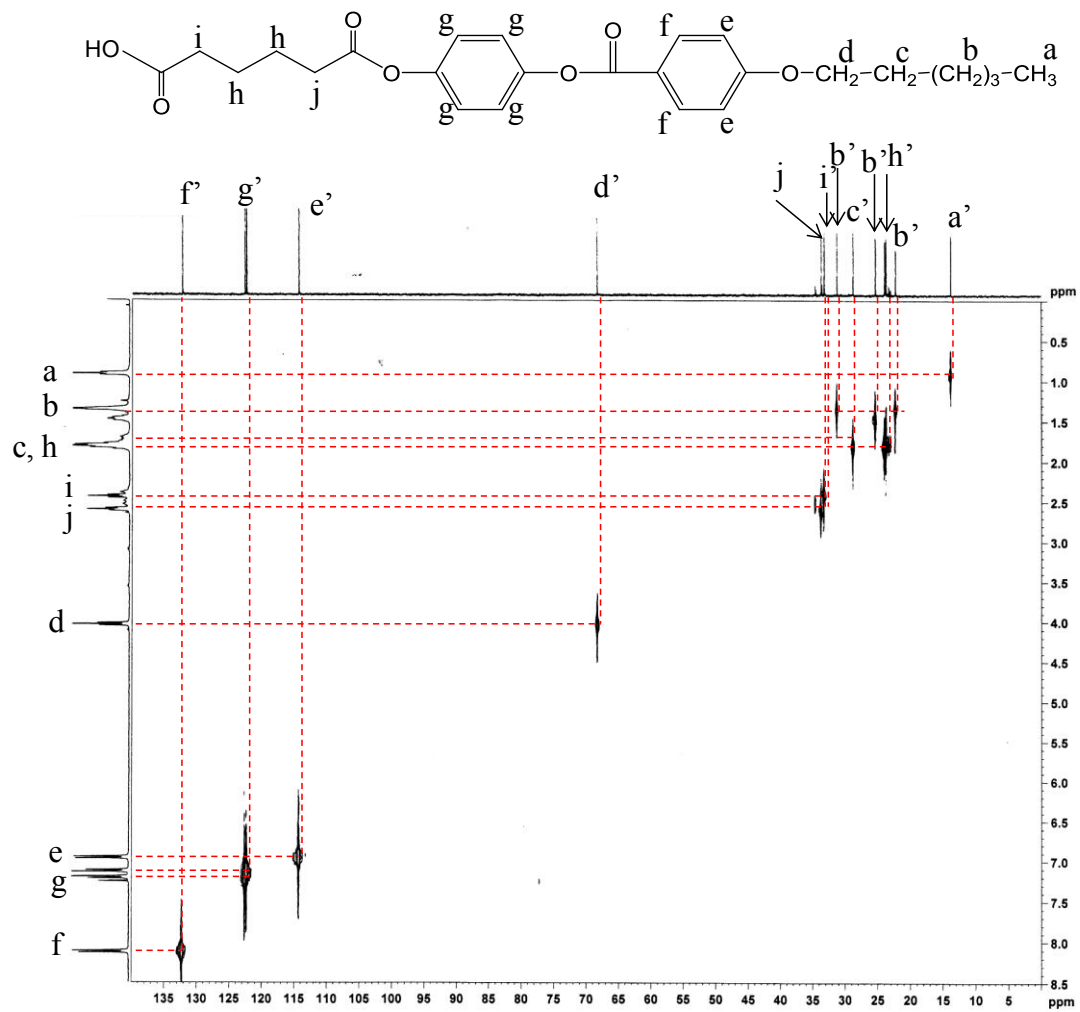


Fig. 3.3.9 CHCOSY spectrum of HBPHA (solvent CDCl_3).

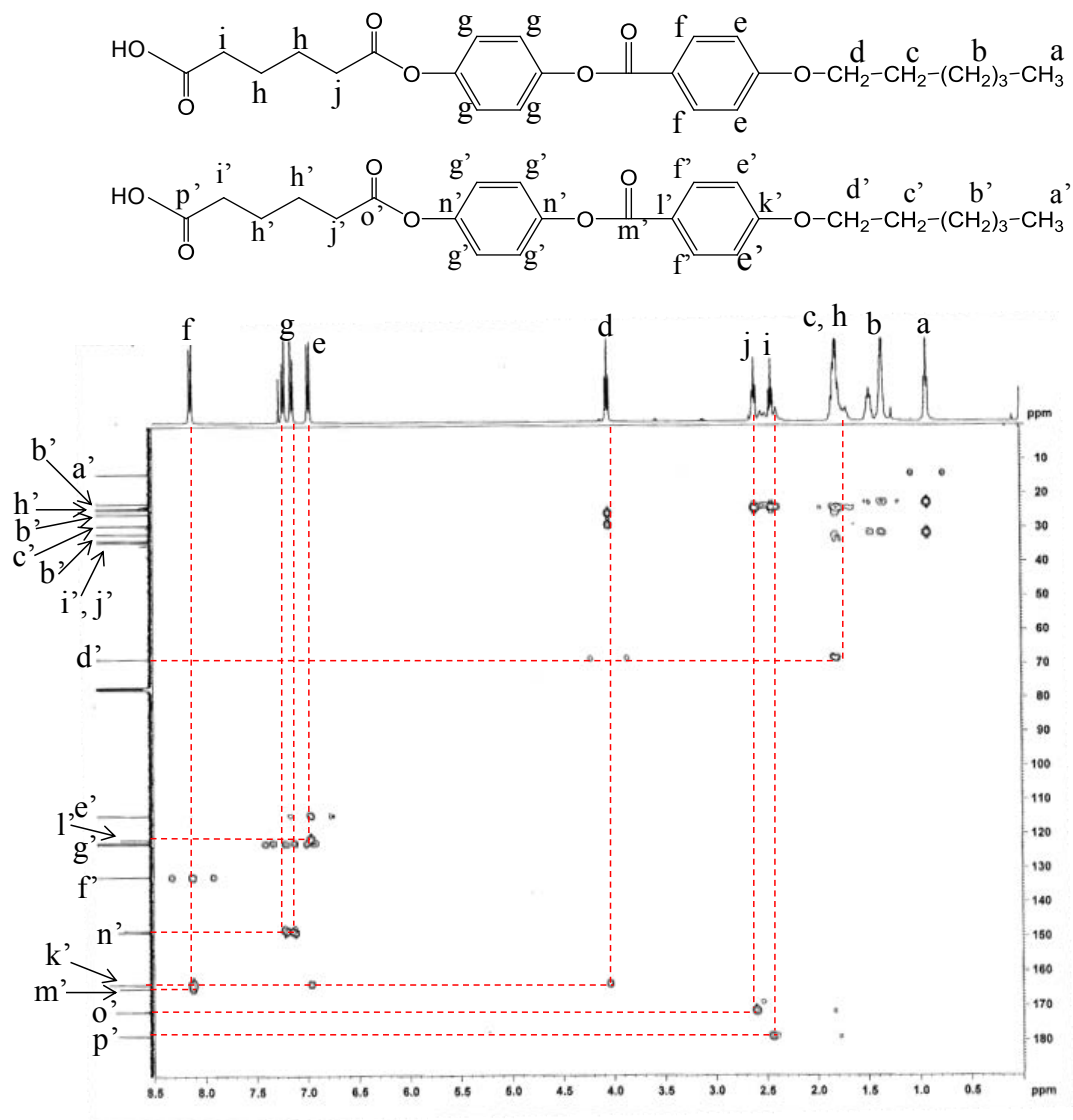


Fig. 3.3.10 HMBC spectrum of HBPBA (solvent CDCl₃).

HBA、ヒドロキノン、HPHB および HBPHA について溶解性試験を行った。用いた溶媒は水、エタノール、メタノール、DMF、DMSO、THF、アセトン、クロロホルム、ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトニトリル、酢酸エチル、トルエンの 13 種類である。試料を 20 mg 秤りとり溶媒を 500 μ l 加え、目視で観察することで溶解性試験を行った。この結果を Table 3.3.5 に示す。

Table 3.3.5 Solubility of HBA, hydroquinone, HPHB and HBPHA.

Solvent	Samples			
	HBA	Hydroquinone	HPHB	HBPHA
water	×	○	×	×
ethanol	○	○	○	○
methanol	○	○	○	○
DMF	○	○	○	○
DMSO	○	○	○	○
THF	○	○	○	○
acetone	○	○	○	○
chloroform	○	×	○	○
hexane	×	×	×	×
diethyl ether	○	○	○	○
acetonitrile	×	○	○	○
ethyl acetate	○	○	○	○
toluene	○	×	○	○

(○) soluble
(×) insoluble

Table 3.3.5 より、HBA は、水、ヘキサン、アセトニトリルに不溶であり、その他の溶媒には可溶であった。ヒドロキノンはヒドロキシ基が二つあるためクロロホルム、ヘキサン、トルエンに不溶であったがその他の溶媒には可溶であった。

HPHB は HBA で不溶であったアセトニトリルに溶解した。これは HBA のカルボキシル基にヒドロキノンが置換して、より両親媒性となり、ヒドロキノンが可溶であるアセトニトリルに溶解したと考えられる。また HPHB とアジピン酸クロリドを反応させて合成した HBPHA は HPHB と同様の溶解性であった。

最後に、得られた TC4 および HBPHA を用いて TC-HBPHA を合成した。

Fig. 3.3.11 に(a)TC4、(b)HBPHA およびこれらの反応によって得られた生成物(c)TC-HBPHA の FT-IR スペクトルを示す。

Fig. 3.3.11 より TC-HBPHA のスペクトル(c)において 2960 cm^{-1} 付近のピークは HBPHA のメチル基由来の -CH_3 伸縮振動に由来する吸収である。 1700 cm^{-1} 付近に見られるピークはエステルの C=O 伸縮振動に由来する吸収である。さらに、 1640 cm^{-1} 付近のピークは桂皮酸ユニットの C=C 伸縮振動に由来し、 $1500\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークはベンゼン環の C-C 伸縮振動に由来すると考えられる。 1160 cm^{-1} 付近のピークはエステルの C-O 伸縮振動に由来すると考えられる。 1000 cm^{-1} 付近のピークはトレハロースの C-O-C 伸縮振動に由来するものと考えられる。

また、Scheme 3.1.3 の反応式より反応前後の化学構造に着目すると、TC4 のヒドロキシ基が変化している。Fig. 3.3.11 より TC4 のスペクトル(a)において 3500 cm^{-1} 付近に骨格であるトレハロースにシナモイル基が置換していないヒドロキシ基の O-H 伸縮振動による吸収ピークおよび HBPHA のスペクトル(b)において $2400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ 付近にカルボキシル基の -COOH 伸縮振動による吸収ピークが見られた。TC-HBPHA(c)ではこのピークがほぼ消失していた。これは残りのヒドロキシ基にメソゲン基である HBPHA が置換しているため消失したと考えられる。さらに TC-HBPHA のスペクトル(c)において 1700 cm^{-1} 付近に見られるピークは、TC4 のスペクトル(a)における 1720 cm^{-1} 付近にあるエステルの C=O 伸縮振動の吸収と位置が重なり比較できないが、カルボキシル基の C=O 伸縮振動に由来する吸収がエステルの C=O 伸縮振動に変わっていると考える。

これらのことから、TC-HBPHA の合成反応が進行していることが示唆される。

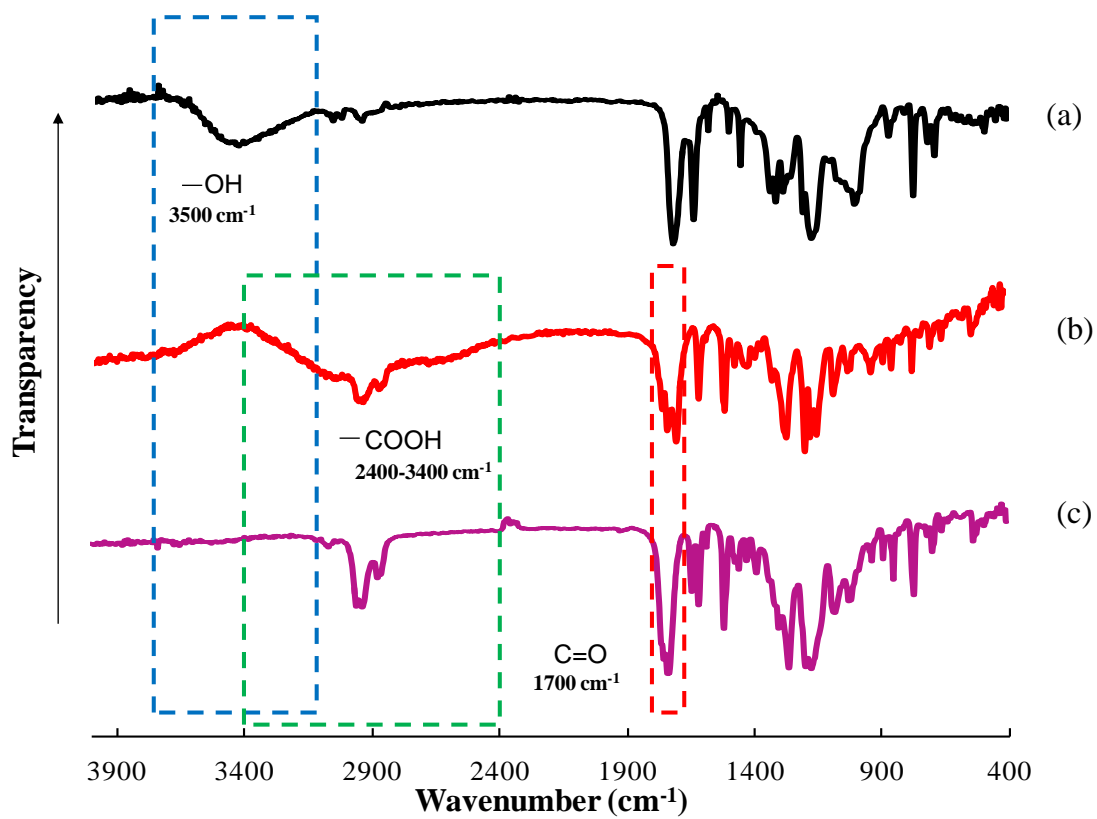


Fig. 3.3.11 FT-IR spectra of (a)TC4, (b)HBPHA and (c)TC-HBPHA

(a)TC4、(b)HBPFA およびこれらの合成によって得られた生成物(c)TC-HBPFA の ¹H-NMR スペクトルを Fig. 3.3.12 に示す。

Fig. 3.3.12 より(a)TC4 のスペクトルにおいて骨格の C-H に由来するシグナル(3.5-4.5 ppm)が(c)TC-HBPFA で確認できた。(a)TCに見られた O-H 由来のシグナルは、同じ場所にトレハロース骨格の C-H のシグナルがシフトして現れていることから、消失したかどうかの判別がつきにくい。FT-IR の結果から考えて、ほぼ消失したものと考えている。また、シナモイル基のアルケンおよびベンゼン環由来のシグナル(6.3-6.6 ppm、7.2-8.0 ppm)が(c)TC-HBPFA にも確認できた。さらに、(b)HBPFA のスペクトルにおいてメチル基に由来するシグナル(0.95 ppm)、アルキル鎖の水素に由来するシグナル(1.2-1.8 ppm)、酸素に隣接したアルキル鎖の水素に由来するシグナル(4.0 ppm)、ベンゼン環の水素に由来するシグナル(7.0-8.2 ppm)が(c)TC-HBPFA で確認された。また HBPFA のスペクトルにおいてみられたアジピン酸由来のアルキル鎖の水素のシグナル(1.9 ppm、2.3-2.9 ppm)が(c)TC-HBPFA においてはシフトしていることが見られた。このことにより、TC-HBPFA の反応が進行していることが示唆される。

生成物(c)TC-HBPFA のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 3.3.6 に示す。

Table 3.3.6 Measured integral Value of each signal in the spectrum of TC-HBPFA.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical number of protons
a, i	3.5-4.5	15.83	18.00
b	4.9-5.6	6.68	8.00
c	6.3-6.6	4.00	4.00
d, e, l	7.0-8.2	31.45	36.00
f	0.95	11.43	12.00
g	1.2-1.6	20.19	24.00
h, m	1.6-1.9	32.57	24.00
j	7.0	5.94	8.00
k	8.2	4.92	8.00
n	2.2-2.6	18.95	16.00

※トレハロース一分子に対して、シナモイル基の置換度が 4.0、メソゲン基の置換度が 4.0 を想定している

Table 3.3.6 より、シグナル積分値とその理論存在比に少しずれが生じている。これは、シグナルがブロードし、正確な積分値が得られなかったためである。このため、元素分析により C, H, O の含量を測定し、その値からトレハロースに結合しているシナモイル基およびメソゲン基の数を求めた。元素分析では、C:67.53%, H:6.21%, O: 25.84%であり、この値より、トレハロースユニットとシナモイル基とメソゲン基の比率は 1:3.0:2.1 と計算された。

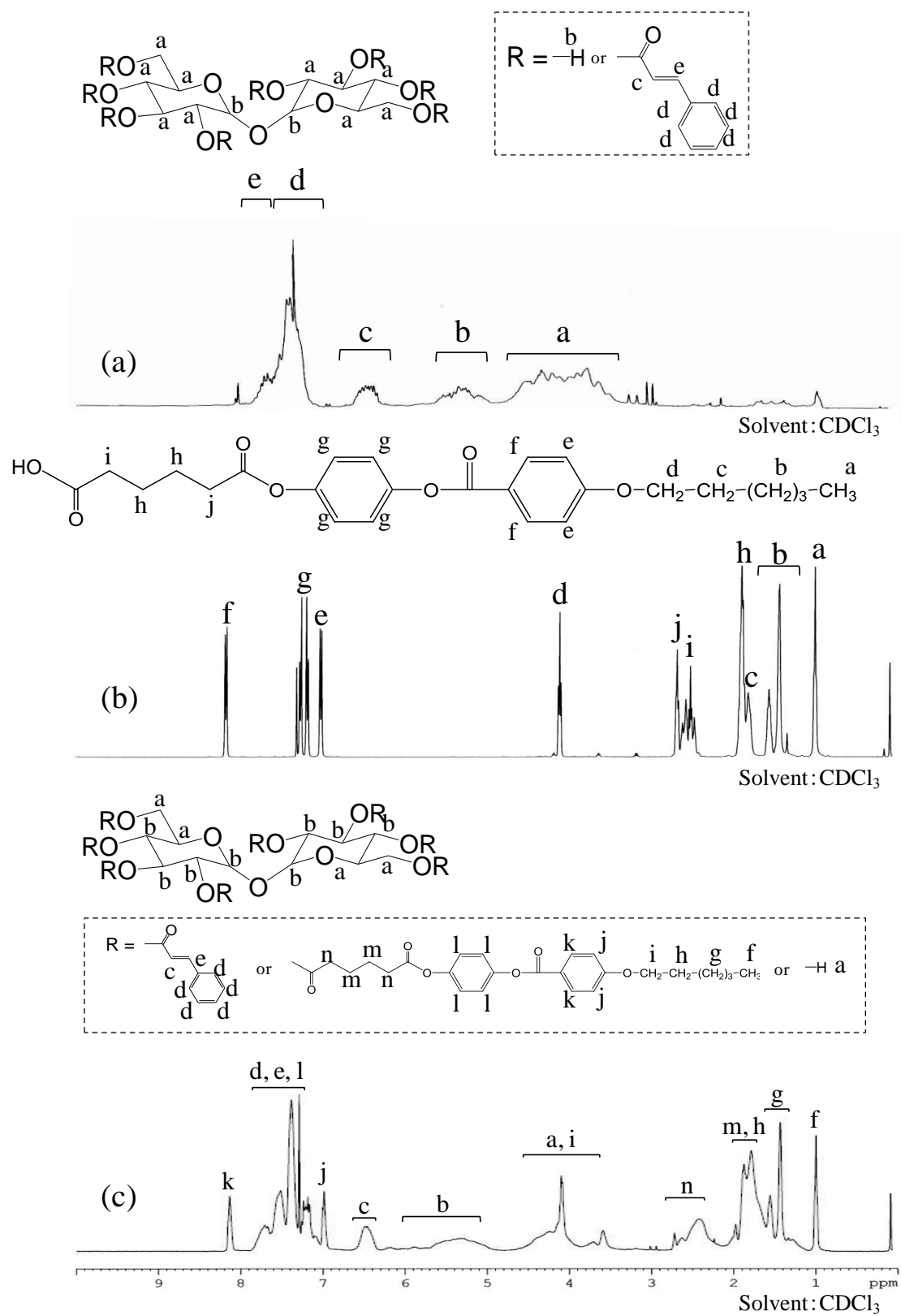


Fig. 3.3.12 ^1H -NMR spectra of (a)TC4, (b)HBPFA and (c)TC-HBPFA.

TC4、HBPHA および TC-HBPHA について溶解性試験を行った。用いた溶媒は水、エタノール、メタノール、DMF、DMSO、THF、アセトン、クロロホルム、ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトニトリル、酢酸エチル、トルエンの 13 種類である。試料を 20 mg 秤りとり溶媒を 500 μ l 加え、目視で観察することで溶解性試験を行った。この結果を Table 3.3.7 に示す。

Table 3.3.7 Solubility of TC4, HBPHA and TC-HBPHA.

Solvent	Samples		
	TC4	HBPHA	TC-HBPHA
water	×	×	×
ethanol	△	○	×
methanol	△	○	×
DMF	○	○	○
DMSO	○	○	○
THF	○	○	○
acetone	○	○	○
chloroform	○	○	○
hexane	×	×	×
diethyl ether	×	○	○
acetonitrile	×	○	○
ethyl acetate	×	○	○
toluene	×	○	○

(○) soluble
(×) insoluble
(△) partially soluble

Table 3.3.7より、TC4はエタノール、メタノールには部分溶解、DMF、DMSO、THF、アセトン、クロロホルムには可溶で、その他の溶媒には不溶であった。また HBPHA は水とヘキサン以外の有機溶媒には可溶であった。

TC-HBPHA は非常に極性の高い溶媒には不溶であり、他にヘキサンに不溶であったが、それ以外の有機溶媒には概ね溶解した。これは TC4 の水酸基が HBPHA に置換したため TC4 の親水性が低下し、TC4 が部分溶解であった極性溶媒であるエタノールおよびメタノールに対して完全に不溶となり、TC4 が不溶であった極性の低い溶媒であるジエチルエーテル、アセトニトリル、酢酸エチルおよびトルエンに可溶になったと考えられる。

3.3.2 TC-HBPHA の光架橋

TC4 と HBPHA より合成した TC-HBPHA を用いて薄膜を作製し、紫外(UV)光照射による時間変化を紫外可視吸収スペクトル測定および FT-IR スペクトル測定により調査した。

ディップコーターで石英板上に作製した薄膜に対し、 $\lambda \geq 280 \text{ nm}$ 透過ロングパスフィルターを通して UV を照射し、薄膜の紫外可視吸収スペクトルの時間変化を確認した。薄膜に対し、吸光度の変化がほぼ見られなくなるまで照射し、所定の累積照射時間(0 s、5 s、10 s、20 s、30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s)ごとにスペクトルを測定した。TC-HBPHA の紫外可視吸収スペクトルの時間変化を Fig. 3.3.13 に示す。

照射前の TC-HBPHA において 283 nm に最も強い吸収がみられた。これはシナモイル基のベンゼン環とそれに結合する C=C 結合およびカルボニル基の π 共役に由来する吸収帯である。Fig. 3.3.13 より、照射時間が増加するにつれて 283 nm の吸収が減少することが認められた。これより、UV 照射による TC-HBPHA の光反応の進行が示唆される。さらに、照射時間が増加するにつれて 340 nm の吸収がわずかに増加していることが認められた。これは *trans* 桂皮酸が UV 照射により *cis* 体になる *trans-cis* 異性化反応が起こっているものと考えられる。

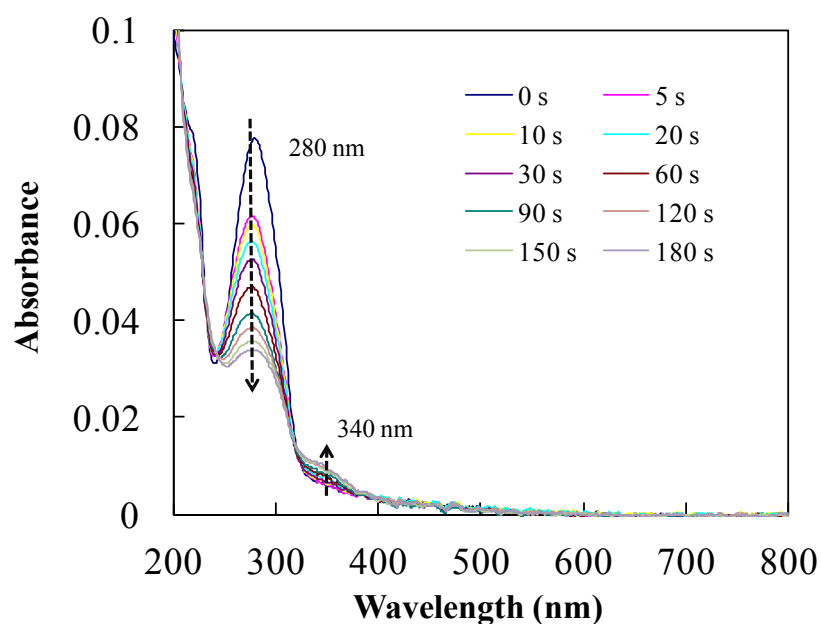


Fig. 3.3.13 Spectral changes of TC-HBPHA induced by UV irradiation.

KBr の薄膜に対し TC-HBPHA のキャストを行い、 $\lambda \geq 280$ nm 透過ロングパスフィルターを通して UV を照射し、その薄膜の FT-IR スペクトルの時間変化を調べた。試料に対し、所定の累積照射時間(0 s, 5 s, 90 s, 180 s)ごとにスペクトルを測定した。TC-HBPHA の FT-IR スペクトルの時間変化を Fig. 3.3.14 に示す。

Fig. 3.3.14 より、照射前の TC-HBPHA で見られた、trans 体の桂皮酸ユニットの=C-H 面内変角振動($1305, 1320$ cm^{-1})、C=C 伸縮振動(1630 cm^{-1})の吸収が UV を照射するごとに大きく減少している。なお、エステルの C=O 伸縮振動(1730 cm^{-1})の吸収はシフトして、 1750 cm^{-1} 付近に現れている。C=C 伸縮振動に伴う吸収の減少が顕著であることから、異性化よりは光二量化反応がおもに起こっていると考えられる。

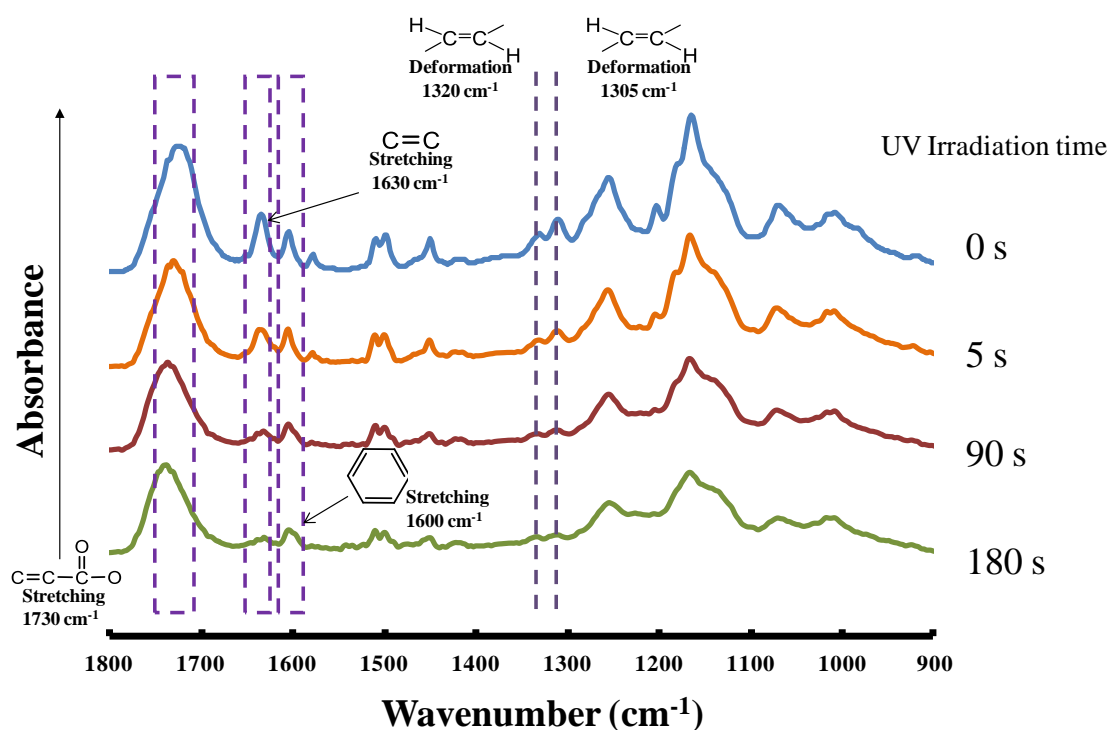


Fig. 3.3.14 Changes of the FT-IR spectrum of TC-HBPHA induced by UV irradiation.

3.3.3 TC-HBPHA 薄膜の温度変化による液晶形態観察

TC-HBPHA を用いてキャスト法により薄膜を作製し、偏光顕微鏡観察、目視による薄膜表面の観察を行い、ディップコート法により薄膜を作製し、FE-SEM 観察を行った。またそれらの薄膜に対し 180°C まで温度を上げた後、145°C まで温度を下げた状態(UV 照射前にて最も液晶相が観察された温度)で UV 照射を 180 s 行い、偏光顕微鏡観察、薄膜表面の目視観察および FE-SEM 観察により照射前との比較を行った。

10 mg/ml の濃度でクロロホルムに溶解させた TC-HBPHA 溶液をガラス基板上に 10 μ l 滴下し、キャスト法により TC-HBPHA 薄膜を作製した。薄膜に対し、 $\lambda \geq 280$ nm 透過ロングパスフィルターを通して 180°C まで温度を上げた後、145°C まで温度を下げた状態で 180 s UV 照射を行い、偏光顕微鏡による温度変化の観察を行った。UV 照射を行わないものと比較して、偏光顕微鏡による温度変化の観察結果をそれぞれ Fig. 3.3.15(照射前)、および Fig. 3.3.16(照射後)に示す。

Fig. 3.3.15 より、まず昇温時では室温から 149°C までは結晶であり、150-153°C の温度範囲でネマティック液晶のシュリーレン構造の一部であるような模様が偏在的に見られるようになった。しばらくその模様が観察された後、175-180°C の温度範囲で等方液体になり、その後変化はなかった。次に、降温時では 174°C まで等方液体であり、173-170°C の範囲でネマティック液晶に特有の模様が見られるようになった。しばらくその模様が観察された後、122-120°C 付近で結晶化が始まり 90°C で完全な結晶になって、その後変化はなかった。転移する温度範囲が明確でない理由として TC-HBPHA では置換度の異なるものが混在しているためと考えられる。

また、Fig. 3.3.16 より、光架橋後の薄膜では、部分的な液晶ドメインが観察され、昇温時、室温から 149°C までは結晶であり、150-153°C の温度範囲でネマティック液晶のシュリーレン構造の一部であるような模様が偏在的に見られるようになった。しばらくその模様が観察された後、178-185°C の温度範囲で等方液体に変化した。次に降温時では 181°C まで等方液体であり、180-175°C の範囲でネマティック液晶に特有の模様が見られるようになった。しばらくその模様が観察された後、122-120°C 付近で結晶化が始まり 90°C で完全な結晶になって、その後変化はなかった。これより光架橋後も液晶が観察されることが分かった。これはシナモイル基の置換が部分的なものであり、二量化によっても完全に分子運動が停止するのではなく、部分的に分子運動が可能な部分があるためと考えられる。

また、ディップコートを行った後はまだ相分離が顕著に見られなかったが、熱をかけて液晶状態にすると、部分部分で液晶の形態が見え始め、この段階でメソゲンの自己集積・相分離が起こっていることが考えられる。液晶状態における UV 照射では、シナモイル基の二量化によって一部の配向が崩れた状態で架橋するが、偏光顕微鏡で液晶が観察されることから、架橋度の低いところでメソゲンの自己集積は保たれているものと考えられる。また、光架橋前と光架橋後とを比較してみると、光架橋後で液晶が観察される温度領域がわずかに拡大した。これは TC-HBPHA が光架橋したことにより液晶構造が安定化し、より高温においても分子配向しやすくなったものと考えられる。なお、光架橋前および光架橋後のいずれにおいても、最も液晶が多く観察できたのは降温時の 145°C であった。

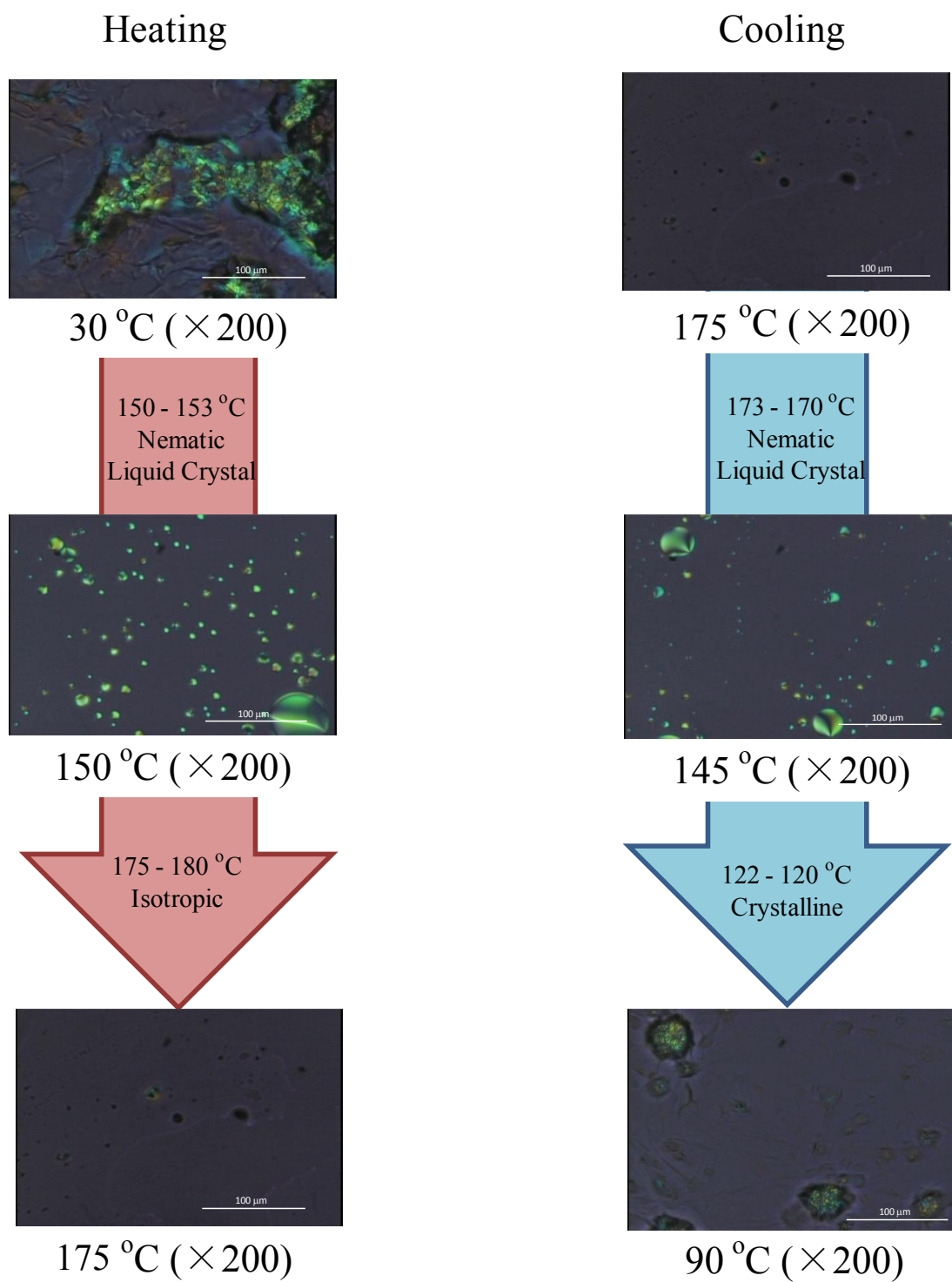


Fig. 3.3.15 Polarization microscope images of TC-HBPHA before photocrosslinking.

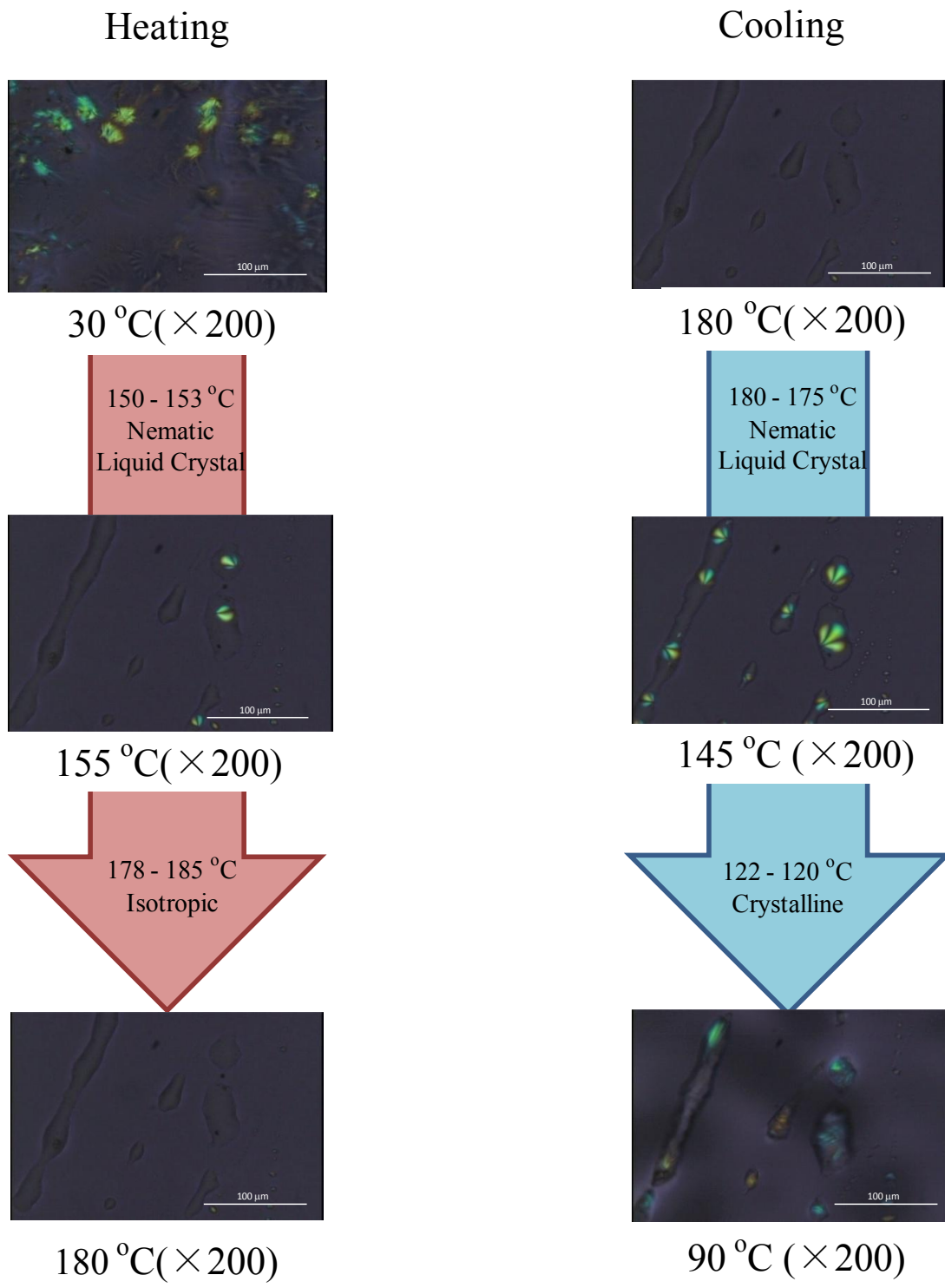


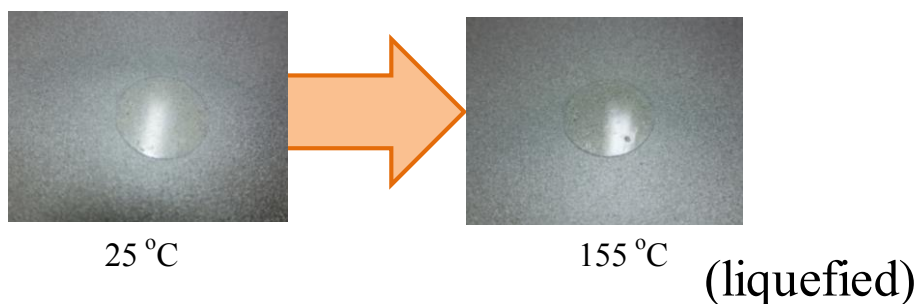
Fig. 3.3.16 Polarization microscope images of TC-HBPHA after photocrosslinking.

3.3.4 TC-HBPBA 薄膜の表面観察

10 mg/ml の濃度でクロロホルムに溶解させた TC-HBPBA 溶液をガラス基板上に 10 μ l 滴下し、キャスト法により作製した TC-HBPBA 薄膜(光架橋前、光架橋後)について、加温時における表面の目視観察を行った。光架橋前、光架橋後における TC-HBPBA フィルムを加温したときの、見た目の変化を Fig. 3.3.17 に示す。

Fig. 3.3.17 より、光架橋前は、薄膜の室温では透明な固体の状態であり、液晶相の観察された温度まで加温したところ、薄膜が液状に変化していた。また、温度を下げたところ元の状態に戻った。しかし光架橋後の薄膜は、室温では透明であるが光架橋により、ひびの入ったような固体になっており、液晶の観察された温度まで加温しても、薄膜は液状にならずそのままの状態であった。また温度を下げても変化はなかった。これは UV 照射により桂皮酸ユニットが光架橋し光架橋膜となったため、加温による液化が起こらなくなったものと考えられる。一方で、光架橋後も液晶相が観察されたことから、その架橋は限定的なものであり、分子の運動にはそれほど影響をあたえていないものと考えられる。なお、ディップコートで作製した TC-HBPBA の薄膜に UV を照射して架橋を施しても、ひびが入ったような状態にはならなかった。ひびが入るかどうかは、薄膜の厚みによるものと考えられる。

(a) Before photocrosslinking



(b) After photocrosslinking



Fig. 3.3.17 Photographs of TC-HBPBA film
(a) before photocrosslinking and (b) after photocrosslinking.

前述した3.2.6と同様の条件でカバーガラス上にディップコートを行い、作製したTC-HBPHA薄膜(光架橋前、光架橋後)の表面のFE-SEM観察を行った。光架橋前および光架橋後の観察結果をFig. 3.3.18、Fig. 3.3.19にそれぞれ示す。

Fig. 3.3.18、Fig. 3.3.19より、光架橋前では滑らかで均一な薄膜となっていた。しかし、光架橋後の薄膜では表面に直径1 μm 程度の粒子状のものが点在していた。理由は不明であるが、光照射による部分的な分子間の架橋が局所的な凝集または収縮を引き起こしている可能性を考えている。

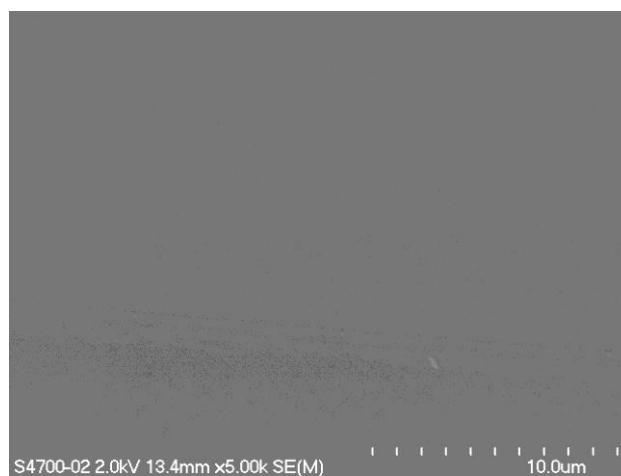


Fig. 3.3.21 FE-SEM observation of TC-HBPHA film before photocrosslinking.

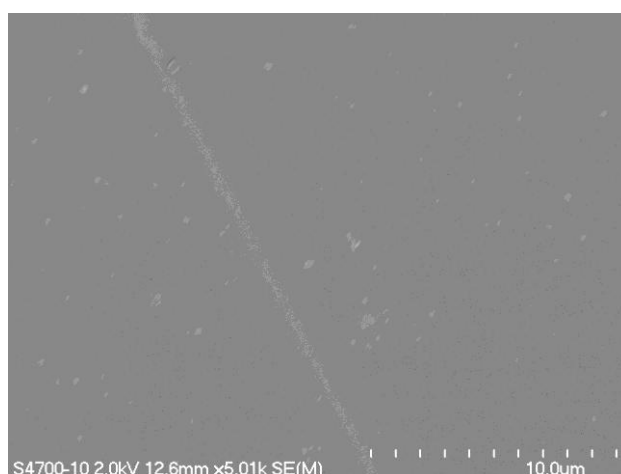


Fig. 3.3.22 FE-SEM observation of TC-HBPHA film after photocrosslinking.

3.3.5 TC-HBPHA の熱物性評価

TC4、HBPHA、UV 照射前の TC-HBPHA および十分に (180 s) UV 照射を行った後の TC-HBPHA(TC-HBPHA-UV)に対して、TGA 測定を行った。TGA 測定によって得られた温度と重量変化の関係を Fig. 3.3.20 に示し、重量 5% 減少における分解温度(T_d)を Table 3.3.8 に示す。

Fig. 3.3.20 および Table 3.3.8 より、TC-HBPHA の UV 照射前を反応前のものと比較すると、ほぼ同様の T_d となっている。架橋反応が進むと T_d が高くなることが考えられるが、そのような結果にはならなかった。TC-HBPHA ではシナモイル基の置換度がそれほど高くないことに加え、TGA 用に用意したサンプルは厚みがあり UV 光が下部まで浸透しなかった可能性が考えられる。

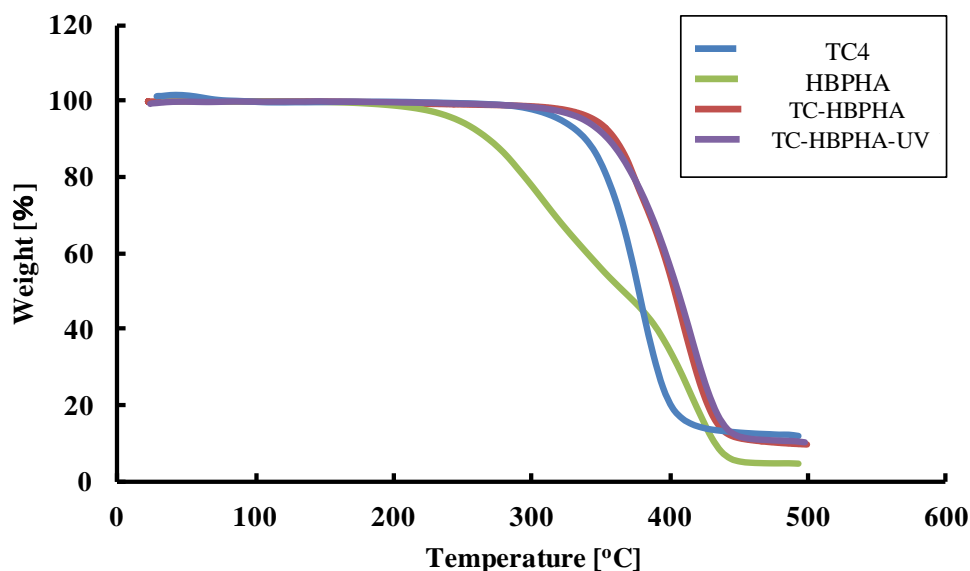


Fig. 3.3.20 TGA curves of TC4, HBPHA, TC-HBPHA before photocrosslinking and TC-HBPHA after photocrosslinking.

Table 3.3.8 Decomposition temperature of TC4, HBPHA, TC-HBPHA before photocrosslinking and TC-HBPHA after photocrosslinking.

Sample	T_d [°C] ^{*1}
TC4	322 °C
HBPHA	247 °C
TC-HBPHA	346 °C
TC-HBPHA-UV	338 °C

*1 T_d , 5% weight loss temperature

UV 照射前の TC-HBPHA および 180 s UV 照射後の TC-HBPHA に対して、DSC 測定を行った。UV 照射前の TC-HBPHA および UV 照射後の TC-HBPHA の第一降温および第二昇温での DSC 測定結果を Fig. 3.3.21 および Fig. 3.3.22 に示す。

Fig. 3.3.21 より、UV 照射前のグラフを見てみると各ピークがブロードであった。また、偏光顕微鏡で見られた相転移の温度領域では、特に明確な熱の出入りによるピークは観察されなかった。これは TC-HBPHA では置換度の違うものが混在しており、転移の温度領域が明確でないためと考えられる。しかし、いくつかのピークは結晶-ネマティック相とネマティック相-等方液体の転移が観察された温度より少し低い温度から見られていた。Fig. 3.3.22 より、UV 照射後ではさらにピークが複雑な形となったものの、照射前同様に、偏光顕微鏡で転移の見られた温度領域には、ピークが観察されなかった。これは TC-HBPHA が光架橋して重合したため構造の多様性が増し、複雑になったものと考えられる。ただし、昇温過程における 80-110°C 付近、および、降温過程における 80-90°C 付近に観測される熱の出入りに関しては原因が不明である。

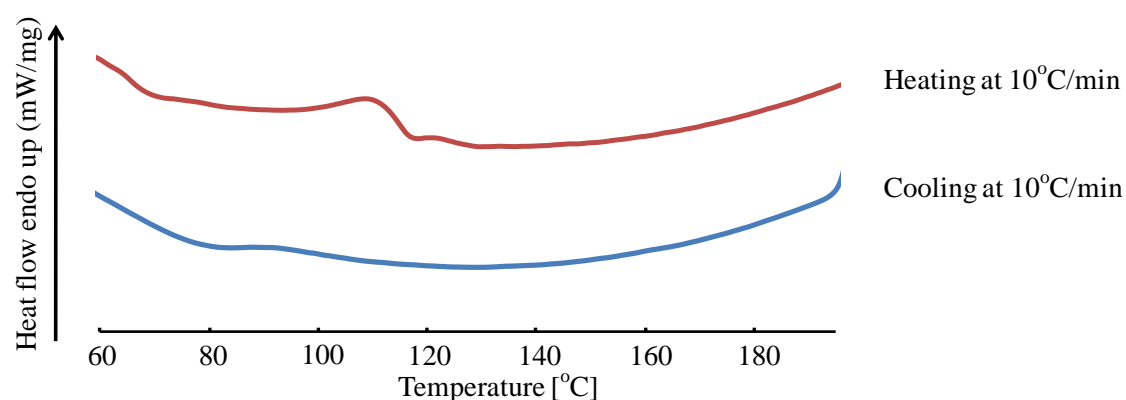


Fig. 3.3.21 DSC curves of TC-HBPHA before photocrosslinking.

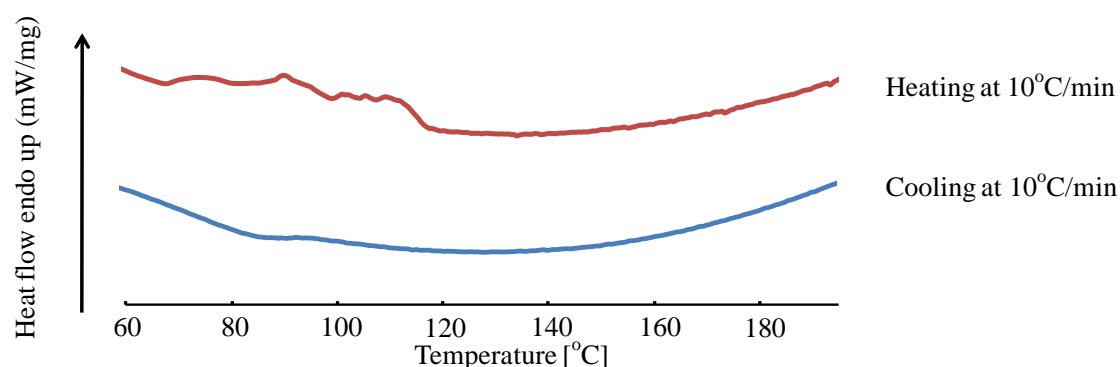


Fig. 3.3.22 DSC curves of TC-HBPHA after photocrosslinking.

3.3.6 TC-HBPHA 薄膜の接触角測定

ガラス基板上に TC-HBPHA 薄膜を作製し、薄膜表面の濡れ性(親水性、疎水性)を接触角測定により調査した。

細胞培養用ポリスチレン(PS) well plate、購入したガラス基板そのまま、洗浄処理を行ったガラス基板、UV 照射後の TC4 薄膜、UV 照射前の TC-HBPHA 薄膜および UV 照射後の TC-HBPHA 薄膜について、Fig. 3.3.23 に接触角値を示し、Fig. 3.3.24 に接触角測定における各試料上での水滴の様子を写真で示す。

Fig. 3.3.23、Fig. 3.3.24 において接触角の値は PS well plate 上で 46.0° ($\pm 0.6^{\circ}$)、購入したそのままのガラス基板で 57.9° ($\pm 3.1^{\circ}$)、洗浄処理を行ったガラス基板で 14.7° ($\pm 1.1^{\circ}$)、UV 照射後の TC4 で 46.1° ($\pm 1.5^{\circ}$)、UV 照射前の TC-HBPHA で 43.0° ($\pm 2.5^{\circ}$)、UV 照射後の TC-HBPHA で 85.8° ($\pm 2.7^{\circ}$)であった。

購入したガラスは洗浄することにより表面が親水性になり接触角の値が大きく減少している。これにより購入時の表面に付着していた有機物が洗浄されていることが分かった。また UV 照射後の TC-HBPHA では照射前より表面の疎水性が増加している。これは、UV 照射による二量化反応時に、分子の可動性が高まり、ガラス側に親水性が集まり、空気に接触する側に疎水性基が集まった可能性が考えられる。さらに、UV 照射後の TC4 と UV 照射後の TC-HBPHA を比較してみると UV 照射後の TC-HBPHA の方が表面の疎水性が増加している。これは TC4 にメソゲン基を置換させたことによりヒドロキシ基が減少し、疎水性が増加したためと考えられる。

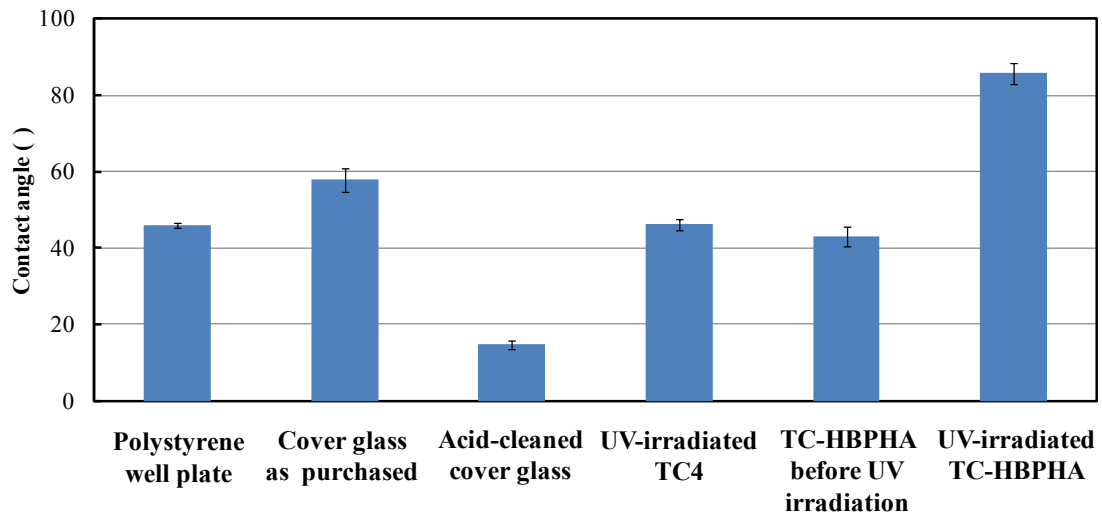


Fig. 3.3.23 Contact angles of the UV irradiated TC4 film and TC-HBPHA films.

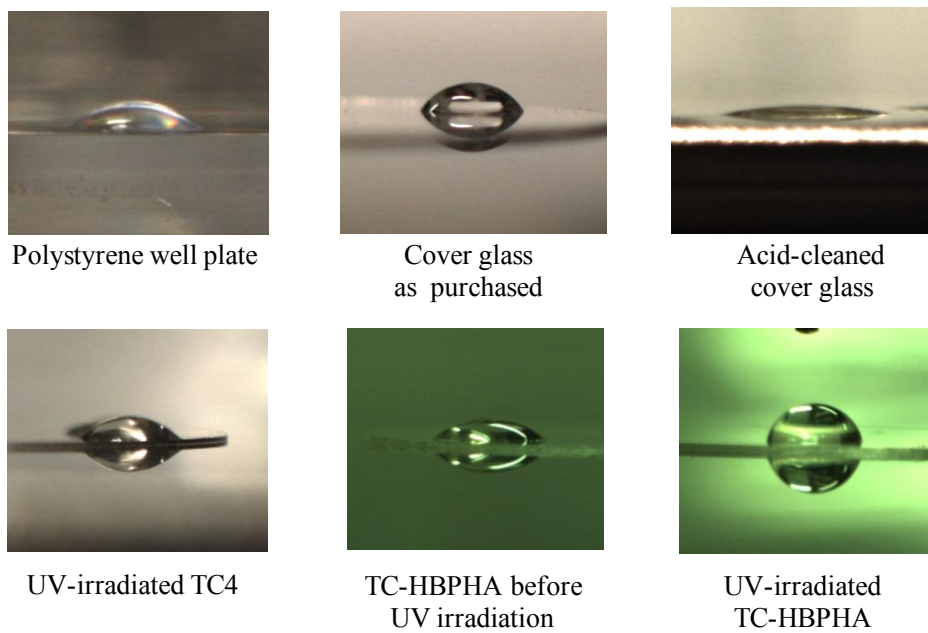


Fig. 3.3.24 Photographs of water droplets on the UV-irradiated TC4 film and TC-HBPHA films.

3.3.7 TC-HBPHA 薄膜を用いた細胞適合性評価

Polystyrene well plate 上(PS well)、洗浄処理を行ったガラス基板(glass)および今回作製した薄膜(UV 照射後 TC4 (TC4-UV)、UV 照射前 TC-HBPHA (TC-HBPHA)、UV 照射後 TC-HBPHA (TC-HBPHA-UV))を用いて線維芽細胞の *in vitro* 細胞増殖試験を行った。

位相差顕微鏡による細胞の観察結果として、細胞培養 3 時間後のものを Fig. 3.3.25、5 日後のものを Fig. 3.3.26、7 日後のものを Fig. 3.3.27 に示す。

Fig. 3.3.25 において細胞培養 3 時間後ではいずれの試料においても接着した細胞に差は見られなかった。Fig. 3.3.26 において培養 5 日後では (b)glass の細胞接着数が少なく、(a)PS well、(c)TC4-UV、(d)TC-HBPHA および (e)TC-HBPHA-UV ではほぼ同じであり、また、(e)TC-HBPHA-UV において線維芽細胞が部分的に他のサンプルとは異なる形態に変化しており、ある方向に連なって接着していた。これは、Fig. 3.3.16 に見られるような液晶分子が自己集積している領域と、その周りの領域が存在し、主に光架橋は周辺部で生じているものと考えられる。このような不均質な構造が原因で、細胞が方向性をもって伸展したためと考えられる。Fig. 3.3.27 において培養 7 日後では(b)glass 以外の試料でほぼ 100% confluence(試料表面を完全に細胞が覆い尽くしている状態)になっていた。

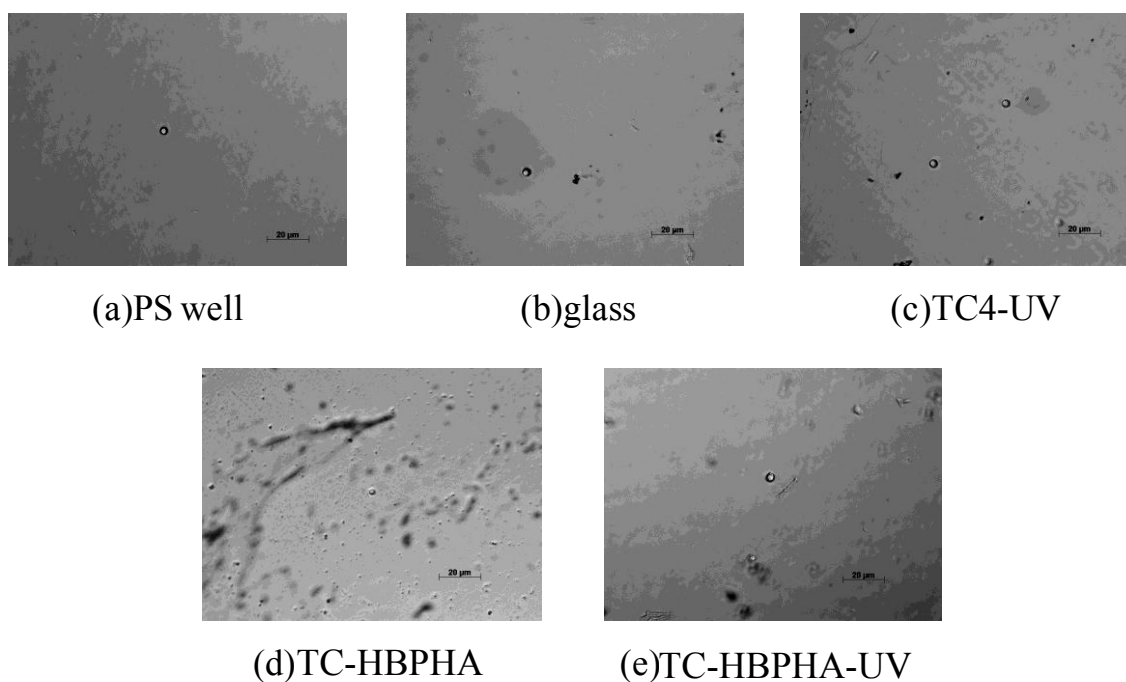


Fig. 3.3.25 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 3 h culture on (a)PS well, (b)glass, (c) TC4 after UV irradiation, (d) TC-HBPHA before UV irradiation, and (e)TC-HBPHA after UV irradiation.

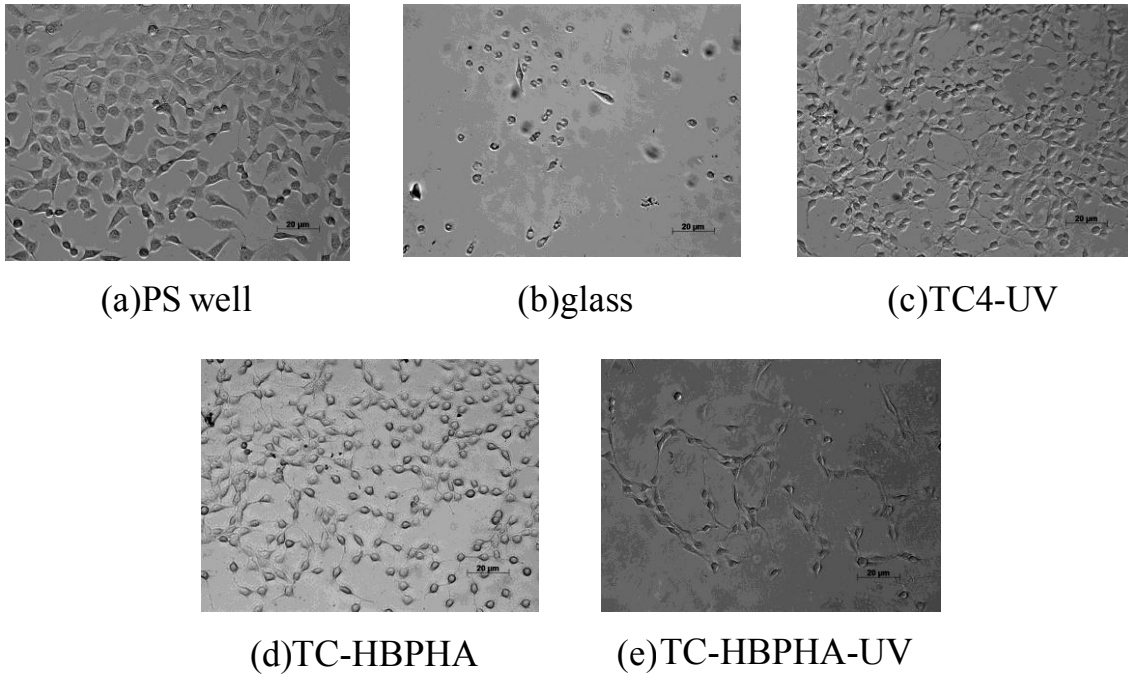


Fig. 3.3.26 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 5 d culture on (a)PS well, (b)glass, (c) TC4 after UV irradiation, (d) TC-HBPHA before UV irradiation and (e)TC-HBPHA after UV irradiation.

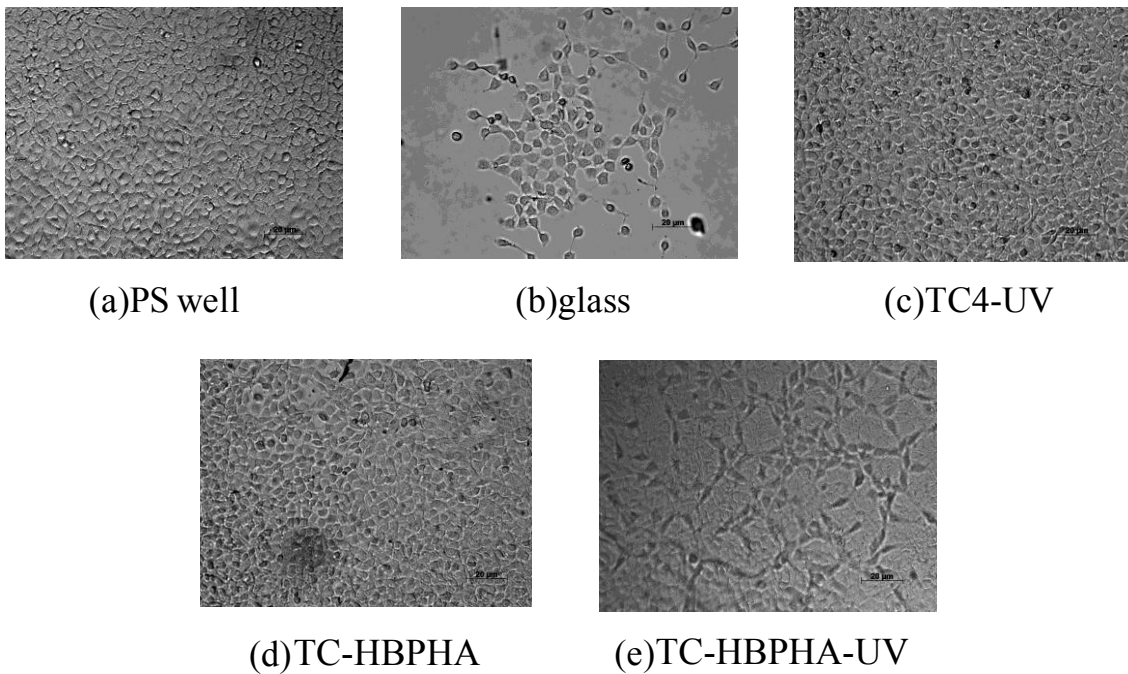


Fig. 3.3.27 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 7 d culture on (a)PS well, (b)glass, (c) TC4 after UV irradiation, (d) TC-HBPHA before UV irradiation and (e)TC-HBPHA after UV irradiation.

PS well plate 上および各試料上で細胞培養を行い、血球計算板を用いて接着細胞数の測定を行った。その結果を Fig. 3.3.28 に示す。また、接着した細胞のうち死細胞の数を Fig. 3.3.29 に示す。

Fig. 3.3.28 において PS well plate 上およびすべての試料上で培養日数の増加とともに細胞の増殖が確認された。それぞれを比較してみると、細胞培養 3 時間、1 日後では PS well plate および各試料において接着した細胞に差はなかったが、培養 3 日、5 日後では glass の接着細胞数がわずかに少なく、PS well plate、TC4-UV および TC-HBPHA 上はほぼ同じであり、TC-HBPHA-UV 上では若干接着細胞数が多くなった。また培養 7 日後では glass 以外の試料がほぼ同じ値になっていた。これは glass 以外の試料で細胞がほぼ 100% confluence になっているためだと考える。

Fig. 3.3.29 において死細胞に関しては培養期間によらず、ほとんど確認されなかった。このことから各試料に細胞毒性がないことが示唆される。

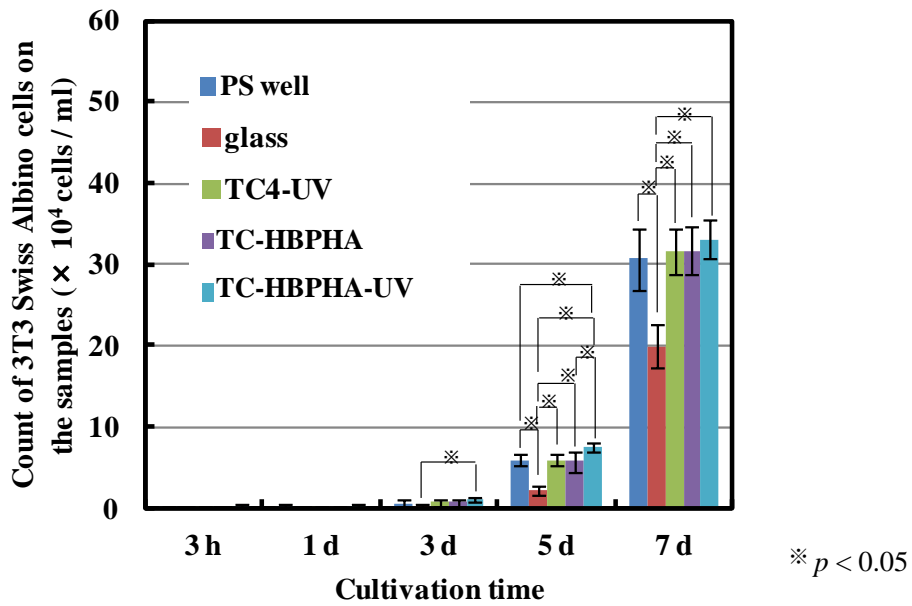


Fig. 3.3.28 Cell proliferation determined by counting of live cells adhered on PS well, glass, UV-irradiated TC4, TC-HBPHA before UV irradiation, and UV-irradiated TC-HBPHA.

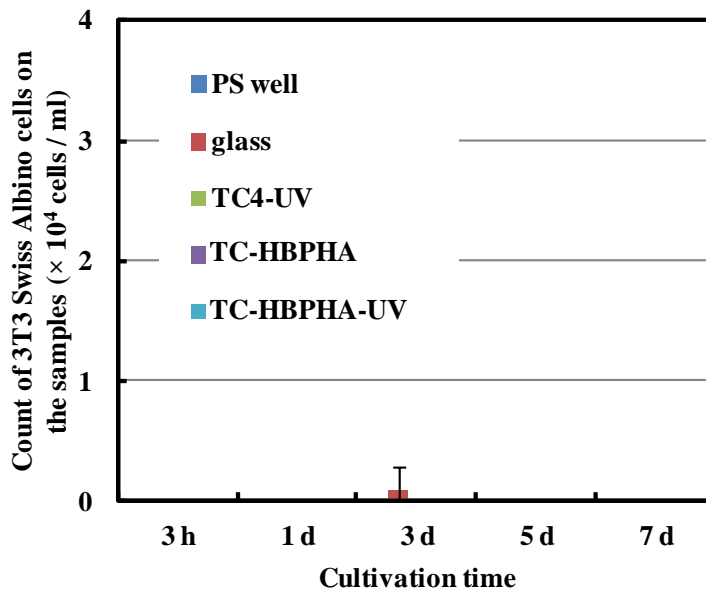


Fig. 3.3.29 Cell proliferation determined by counting of dead cells on PS well, glass, UV-irradiated TC4, TC-HBPHA before UV irradiation, and UV-irradiated TC-HBPHA.

PS well plate 上および各試料上で行った細胞試験における MTT 試験の結果を Fig. 3.3.30 に示す。

Fig. 3.3.30 において PS well plate 上およびすべての試料上で日数の増加とともに細胞の増殖が確認された。血球計算板による細胞数測定と同様に細胞培養 3 時間、1 日後では PS well plate および各試料において接着した細胞に差はなかったが、培養 3 日、5 日後では glass の接着細胞数がわずかに少なく、PS well plate、TC4-UV および TC-HBPCHA はほぼ同じであり、TC-HBPCHA-UV では若干接着細胞数が増加していた。培養 7 日後では glass 以外の試料がほぼ同じ値になっていた。これは前述の細胞数測定と同様で、glass 以外の試料で細胞がほぼ 100% confluence になっていたためであると考えられる。

これらの結果より各試料に細胞毒性はなく、TC4 および TC-HBPCHA は細胞に対して適合性があると考えられる。

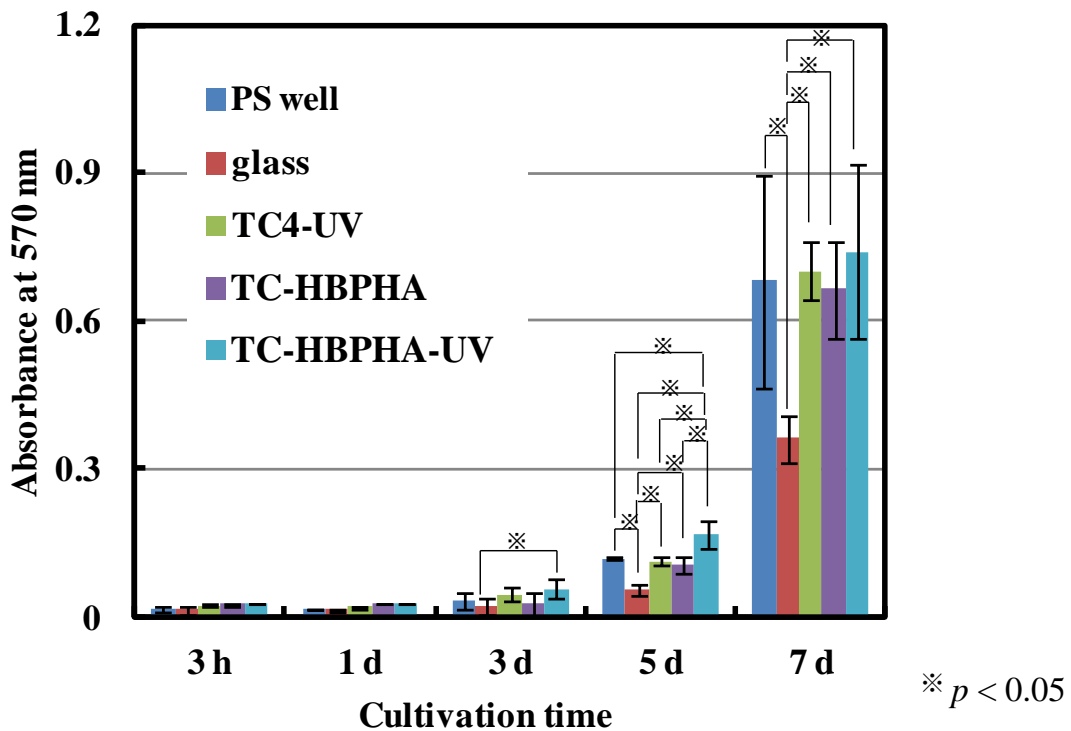


Fig. 3.3.30 Cell proliferation measured by MTT test on PS well, glass, UV-irradiated TC4, TC-HBPCHA before UV irradiation and UV-irradiated TC-HBPCHA.

3.4 結論

本研究では、トレハロースに桂皮酸クロリドおよび 4-(4-ヘキシルオキシベンゾイルオキシ)フェノキシ-6-オキソヘキサン酸(HBPHA)をそれぞれ反応させることで、メソゲン基とシナモイル基を有するトレハロース誘導体を合成し、薄膜を作製した。その薄膜に対し、偏光顕微鏡による液晶性の観察および UV 光の照射によるフィルム特性の変化について調べ、さらに細胞適合性の評価および細胞挙動の観察を行った。

まず、第 1 章と同様に TC4 を合成した。次に HBPHA の前駆体として HBA およびヒドロキノンを反応し HPHB を合成した。FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ 測定により構造解析を行った。その後 HPHB およびアジピン酸クロリドを反応し HBPHA を合成した。FT-IR、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ および 2D-NMR 測定により構造解析を行った。その結果 HBPHA の合成を確認した。そして TC4 および HBPHA を反応し TC-HBPHA を合成した。FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ 測定により構造解析を行った。その結果 TC-HBPHA の合成を確認し、置換度はトレハロース:シナモイル基:メソゲン基で 1:3.0:2.1 となった。また、熱分析として TGA および DSC を行った。

TC-HBPHA をクロロホルムに溶解させた試料溶液を用いて、ディップコーティングを行い石英板上に薄膜を作製した。この薄膜に所定時間 UV 照射を行い、紫外可視吸収スペクトル測定より吸収スペクトルの時間変化を調査した。吸収スペクトルの時間変化では 283 nm に最も強い吸収がみられ、UV 照射時間の増加とともに吸光度が減少した。また、340 nm の吸収の増加が若干確認され、*trans* 桂皮酸が UV 照射により *cis* 体になる *trans-cis* 異性化反応も起こっていることが分かった。さらに、UV 照射による FT-IR スペクトルの変化を調査した。これより異性化反応と比較して光二量化反応が主に起こっていることが分かった。

TC-HBPHA をクロロホルムに溶解させた試料溶液を用いて、ガラス基板上にキャスト法により薄膜を作製した。偏光顕微鏡観察により UV 照射前後の比較を行ったところ、UV 照射前、UV 照射後ともに部分的な液晶相ドメインが確認された。

細胞培養試験用に、TC4 および TC-HBPHA をクロロホルムに溶解させた試料溶液を用いて、ディップコーティングによりカバーガラス上にディップコートし、180 s 間 UV 照射を行い薄膜を作製した。PS well plate 上、カバーガラスおよび作製した UV 照射後の TC4、UV 照射前の TC-HBPHA および UV 照射後の TC-HBPHA の薄膜を用いて線維芽細胞の細胞増殖試験を行った。細胞観察では、接着 5 日後の UV 照射後の TC-HBPHA 上で線維芽細胞が他のサンプルとは異なり伸展した形となっていた。これは液晶分子が自己集積している領域と、その周りの領域が存在し、主に光架橋は周辺部で生じており、不均質な構造により細胞が方向性をもって伸展したためと考えている。また、血球計算板を用いた細胞数測定、MTT 試験により細胞の増殖が確認できた。カバーガラス上では接着細胞数が少なく、PS well plate 上、UV 照射後の TC4 および UV 照射前の TC-HBPHA の薄膜上ではほぼ同じ値になり、UV 照射後の TC-HBPHA ではわずかに細胞数が増加していた。また死細胞はほとんど確認されなかったため各試料に細胞毒性はなく、TC-HBPHA は細胞に対して適合性があることが分かった。

3.5 参考文献

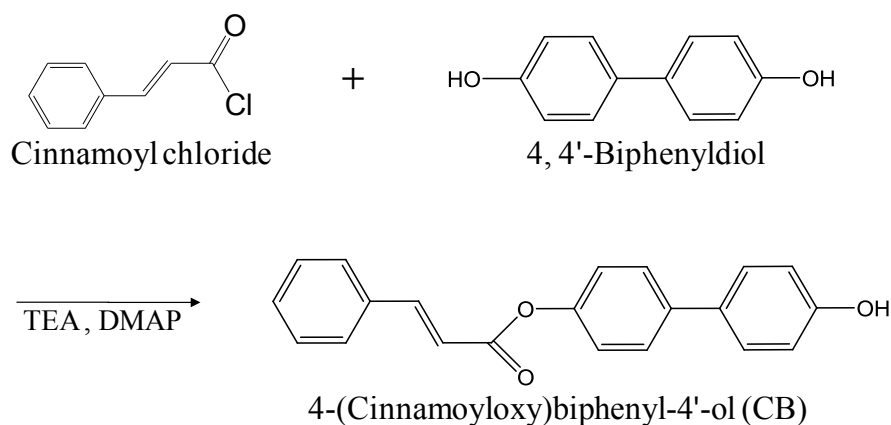
- 1) Kawatsuki, N et al., *Macromolecules*, **35**, 706-713 (2002)
- 2) Zhou, C et al., *Biomaterials*, **20**, 2093-2099 (1999)
- 3) Li, L et al., *Biomaterials*, **22**, 2595-2599 (2001)
- 4) Shih, M-F *Int. J. Pharm.*, **327**, 117-125 (2006)
- 5) Hwang, JJ et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 9662-9667 (2002)
- 6) Teramoto, N et al., *Polym. Adv. Technol.*, **18**, 971-977 (2007)
- 7) Tian, M et al, *Journal of Molecular Structure*, **937**, 131-135 (2009)
- 8) Penner, TL et al, *Macromolecules*, **24**, 1041-1049 (1991)
- 9) 堀尾武一, 分子細胞生物学基礎実験法(改訂第2版), 南江堂 (2004)
- 10) 豊島久眞男, 山本雅、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール, 秀潤社 (1991)
- 11) 井出利憲, 細胞培養入門ノート, 羊土社, 54 (1999)
- 12) 柳井久江, エクセル統計, オーエムエス出版, 84-93 (2008)
- 13) 株式会社エキシマ <http://excimer.co.jp>

第 4 章

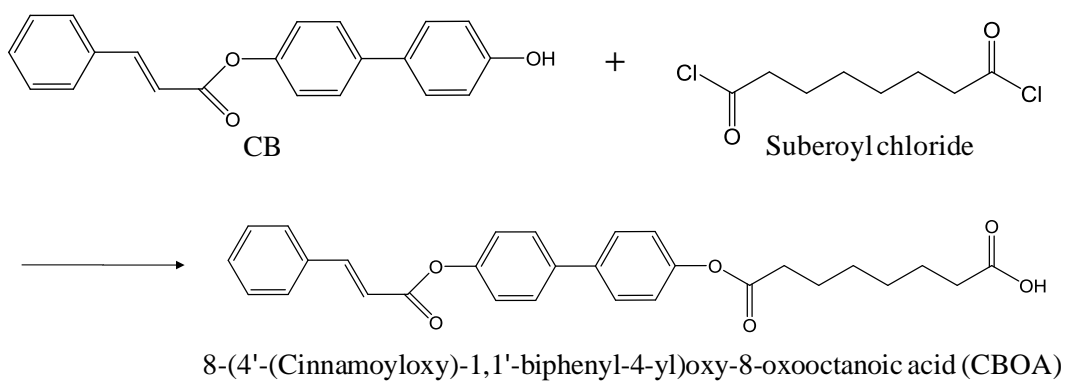
シナモイル基の結合したメソゲン基が結合したトレハロース誘導体の合成
と光架橋および細胞適合性

4.1 緒言

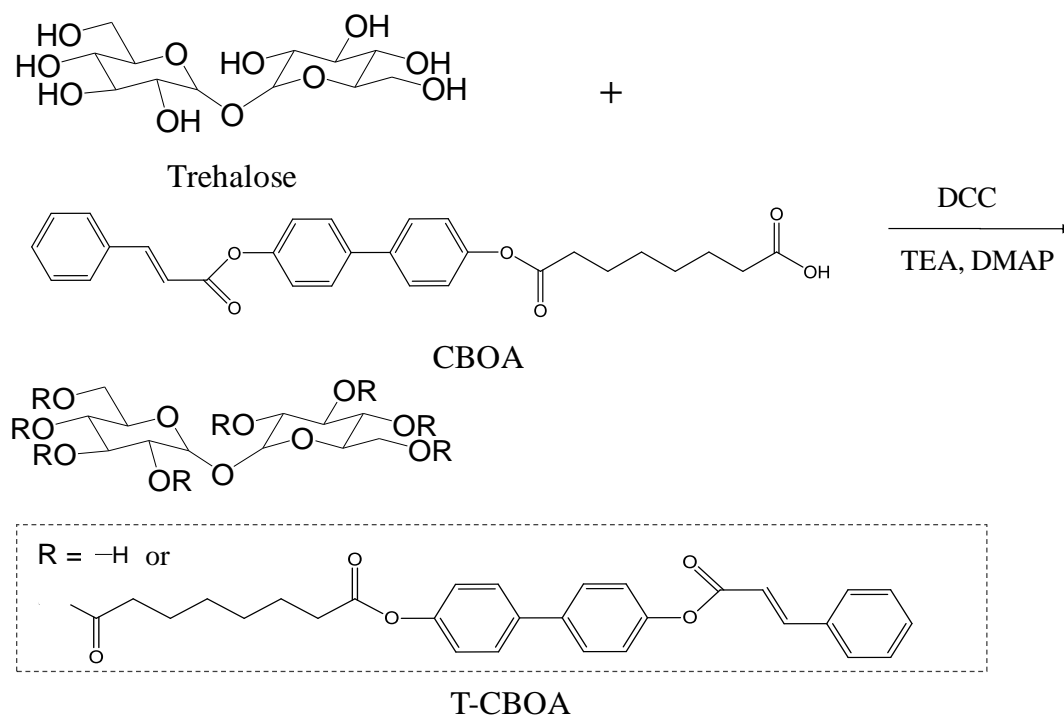
近年、材料の最表面層の物性制御の研究が行われており、光配向性材料として桂皮酸誘導体と液晶を組み合わせた材料が注目されている。¹⁾⁻⁵⁾しかし、このような材料の細胞適合性に関してほとんど研究されていない中、第 3 章において、桂皮酸誘導体と液晶を組み合わせた材料として天然物由来であるトレハロースをもとに、液晶性を有する光架橋材料を作製し、細胞培養を行ったところ、細胞適合性を示した。また、その細胞観察において、メソゲン基の自己集積化により、マクロな領域でメソゲン基が高い密度で存在し、その領域を避けるように細胞が接着し、異方性を持つことが分かった。第 3 章で合成したメソゲン基含有光反応性トレハロース誘導体は、トレハロースのヒドロキシ基に対し、光架橋性を持たせるためのシナモイル基と、液晶性を持たせるためのメソゲン基が異なる位置になるよう置換したものであった。第 4 章では光架橋性を有するシナモイル基をメソゲン基と結合させてからトレハロースと反応させることにより、これらの存在する位置および個数を同一になるように設計することを考えた。そこで、本章では、トレハロースに光反応性のメソゲン基である 8-(4'-(シナモイルオキシ)-1,1'-ビフェニル-4-イル)オキシ-8-オキソオクタン酸(CBOA)を反応させたトレハロース誘導体(T-CBOA)を合成した。CBOA の前駆体である 4-(シナモイルオキシ)ビフェニル-4'-オール(CB)の合成反応式を Scheme 4.1.1 に、CBOA の合成反応式を Scheme 4.1.2 に、T-CBOA の合成反応式を Scheme 4.1.3 に示す。T-CBOA の薄膜に対し、偏光顕微鏡による液晶性の観察および UV 光の照射によるフィルム特性の変化について調べ、さらに細胞親和性の評価および細胞挙動の観察を行った。



Scheme 4.1.1 Synthesis of CB synthesized from cinnamoyl chloride and 4,4'-biphenyldiol.



Scheme 4.1.2 Synthesis of CBOA synthesized from CB and suberoyl chloride.



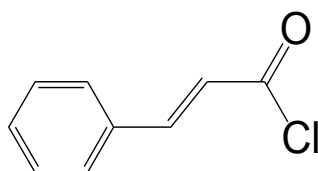
Scheme 4.1.3 Structure of T-CBOA synthesized from trehalose and CBOA.

4.2 実験

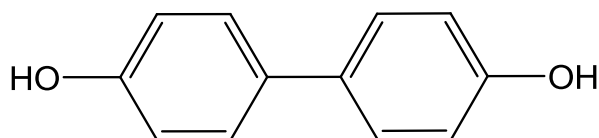
4.2.1 本研究に用いた試薬

T-CBOA の合成に用いた試薬として、桂皮酸クロリド(Fw:166.6, m.p. 36 °C)は東京化成工業(株)、4, 4'-ビフェニルジオール(Fw: 186.2, m.p. 283 °C)は和光純薬工業(株) 、スベリン酸クロリド(Fw: 211.1, m.p. 163.0 °C)は東京化成工業 (株)より購入した。トレハロース(Fw:342.30, m.p. 210.5 °C)は(株)林原より提供いただき、本研究では市販のトレハロースを加熱乾燥させ無水物にしたものを使用した。T-CBOA の合成に用いた試薬の構造を以下に示す。

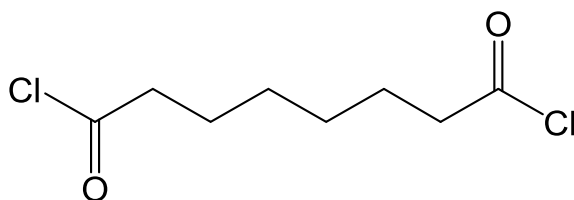
•Cinnamoyl chloride



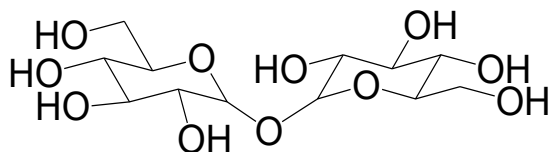
•4, 4'-Biphenyldiol



•Suberoyl chloride



•Trehalose



T-CBOA の合成に用いた縮合剤 *N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(Fw:206.3, m.p. 35.0 °C)は SIGMA-ALDRICH 製のものを使用した。T-CBOA の合成後の精製に、関東化学(株)製の炭酸水素ナトリウム(NaHCO_3) (Fw: 84.0, m.p. 50.0 °C (分解))および関東化学(株)製の硫酸ナトリウム(Fw: 124.0, m.p. 884.0 °C)を使用した。また、有機溶媒として、SIGMA-ALDRICH 製の脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF) (Fw:73.9, m.p. -61.0 °C)、関東化学(株)製のトリエチルアミン(TEA) (Fw:101.19, m.p. -115 °C)、東京化成工業(株)製のジメチルアミノピリジン(DMAP) (Fw:122.17, m.p. -110 °C)、関東化学(株)製のアセトン(Fw:58.1, m.p. -95.0 °C)、関東化学(株)製のクロロホルム(CHCl_3) (Fw 119.38, m.p. -64 °C)、関東化学(株)製の *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF, 特級)、関東化学(株) 製のジエチルエーテル(Et_2O) (Fw: 74.1, m.p. -116.0 °C)、関東化学(株)製の脱水ピリジン(Fw:79.1, m.p. -41.6 °C) 、関東化学(株)製のメタノール(Fw: 32.0, m.p. -97.0 °C)、関東化学(株)製のトルエン(Fw: 92.1, m.p. -95.0 °C)および関東化学(株)製のヘキサン(Fw: 86.2, m.p. -95.0 °C)を使用した。

FT-IR 測定用試薬および NMR 測定用重水素溶媒として、和光純薬工業(株)製の臭化カリウム(KBr) (Fw:119 m.p. 734 °C)、関東化学(株)製のジメチルスルホキシド- d_6 (DMSO- d_6) (99.9atom%D, 0.03%TMS 含有, Fw:84.18)および関東化学(株)製のクロロホルム- d (CDCl_3) (99.8atom%D, 0.03%TMS 含有, Fw:120.39)を使用した。

T-CBOA の熱分析、光架橋および細胞培養用薄膜の作製に、関東化学(株)製の硝酸(Fw 63.01, m.p. -41.6 °C, concentration: 69~70%)、関東化学(株)製の硫酸(Fw 98.08, m.p. 10 °C, concentration: 96.0%)を使用し、超純水は Direct-Q UV(Millipore 社製)から得られる、電気抵抗率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ のものを使用した。

線維芽細胞の *in vitro* 細胞試験には、RIKEN BRC Cell Bank, Riken, Japan(Cell No. RCB1642)より入手したマウス胎児由来の線維芽細胞である 3T3 Swiss Albino 細胞、和光純薬工業(株)製の Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)培地、和光純薬工業(株)製の Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS(-))および和光純薬工業(株)製の Penicillin-Streptomycin solution (10,000 U/ml Penicillin, 10,000 µg/ml Streptomycin)を使用した。培地に Penicillin-Streptomycin solution を加え、最終的に 100 倍希釈となるように調製した。Penicillin-Streptomycin solution を加えた培地に J R Scientific, Inc 製(Lot No. 168904)の fetal bovine serum (FBS) を加え、15%となるように調製した。25 %Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)は GIBCO 製、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) は和光純薬工業(株)製、Tripan Blue Stain 0.4% (TB)は GIBCO 製のものを使用した。また、セルライシスとして、和光純薬工業(株)製の NP-40 Substitute 細胞生物学用(非イオン性界面活性剤)を D-PBS で 10%となるように調製した。10% NP-40 セルライシス溶液の組成を Table 4.2.1 に示す。

Table 4.2.1 Composition of Cell lysis.

Normal saline	3.6 ml
NP-40 (polyoxyethylene (9) octylphenyl ether) 400 µl	
Total	4 ml

4.2.2 4-(Cinnamoyloxy)biphenyl-4'-ol (CB)の合成

8-(4'-(Cinnamoyloxy)-1,1'-biphenyl-4-yl)oxy-8-oxooctanoic acid (CBOA)の前駆体として、4-(cinnamoyloxy)biphenyl-4'-ol (CB)の合成を行った。

まず、4, 4'-biphenyldiol (7.45 g, 40 mmol)を秤りとり、脱水 *N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)20 ml 中に室温で溶解させた。この溶液に、反応で生じる酸の中和試薬としてトリエチルアミン (TEA)(5.6 ml, 40 mmol)、触媒としてジメチルアミノピリジン(DMAP)(0.61 g, 5 mmol)を加えた。さらに cinnamoyl chloride(1.67 g, 10 mmol)を秤りとり、脱水した DMF 10 ml 中に溶解させ、それを先の溶液に加えて、窒素下、室温で 24 h 攪拌した。次にこの溶液を多量の純水中に滴下して、生成物を析出させ、ろ過し、回収した沈殿物をアセトン 50 ml に溶解させ、さらに 500 ml のクロロホルム中に滴下した。その後、ろ過、減圧濃縮し、再度多量のクロロホルムに溶解した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と純水で分液を行い、硫酸ナトリウムで一晩乾燥した。乾燥後、ろ過、減圧濃縮し、得られた固体を DMF に溶解させ、ジエチルエーテル中に滴下し、抽出した。その後、ろ過、減圧濃縮し、得られた固体を室温で 24 h 真空乾燥させ、黄色固体の生成物(2.88 g, 収率: 91%)を得た。得られた生成物について FT-IR および ¹H-NMR スペクトル測定によって構造解析し、溶解性試験について評価した。実験方法をフローチャートとして Fig. 4.2.1 に示す。

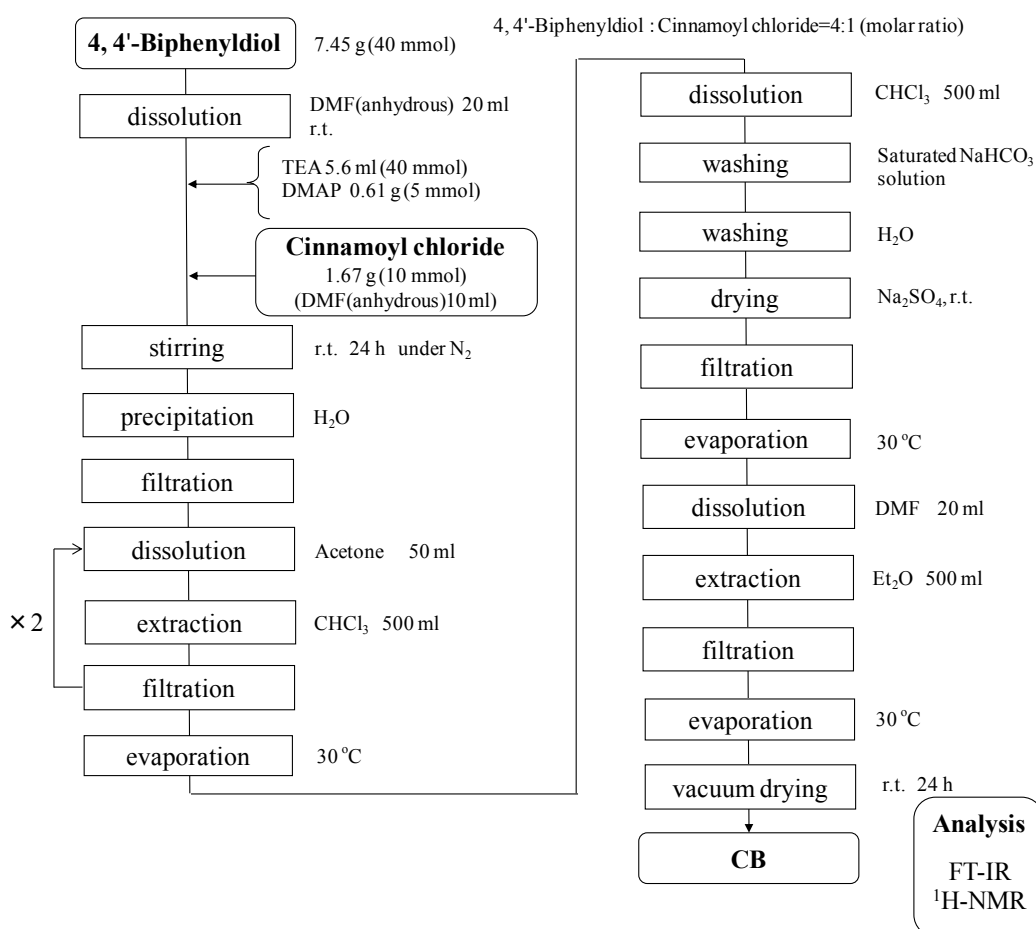


Fig. 4.2.1 Preparation of CB.

4.2.3 8-(4'-(Cinnamoyloxy)-1,1'-biphenyl-4-yl)oxy-8-oxooctanoic acid (CBOA)の合成

4.2.2 で得られた CB と suberoyl chloride とを用いて 8-(4'-(cinnamoyloxy)-1,1'-biphenyl-4-yl)oxy-8-oxooctanoic acid (CBOA)の合成を行った。

まず、CB(0.61 g, 1.93 mmol)を秤りとり、脱水 DMF 3 ml、脱水ピリジン 2 ml 中に室温で溶解させた。そこに suberoyl chloride(1.85 g, 7.72 mmol)を秤りとり、脱水 DMF 10 ml 中に溶解させ、それを先の溶液に滴下し、窒素下、室温で 15 h 攪拌した。次にこの溶液を多量の純水中に滴下して、生成物を析出させ、遠心分離し、回収した沈殿物をさらに DMF 20 ml 中に溶解させ、500 ml の純水中で洗浄した後、遠心分離し、室温で 24 h 真空乾燥した。乾燥後、アセトンに分散させ、メタノールで抽出し、遠心分離を行い上澄み溶液を減圧濃縮した。さらに多量のクロロホルムに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と純水で分液を行い、硫酸ナトリウムで一晩乾燥した。乾燥後、ろ過、減圧濃縮し、得られた固体を、室温で 24 h 真空乾燥させ、白色固体の生成物(0.60 g, 収率: 65%)を得た。得られた生成物について FT-IR、¹H-NMR スペクトル測定によって構造解析し、溶解性試験について評価した。実験方法をフローチャートとして Fig. 4.2.2 に示す。

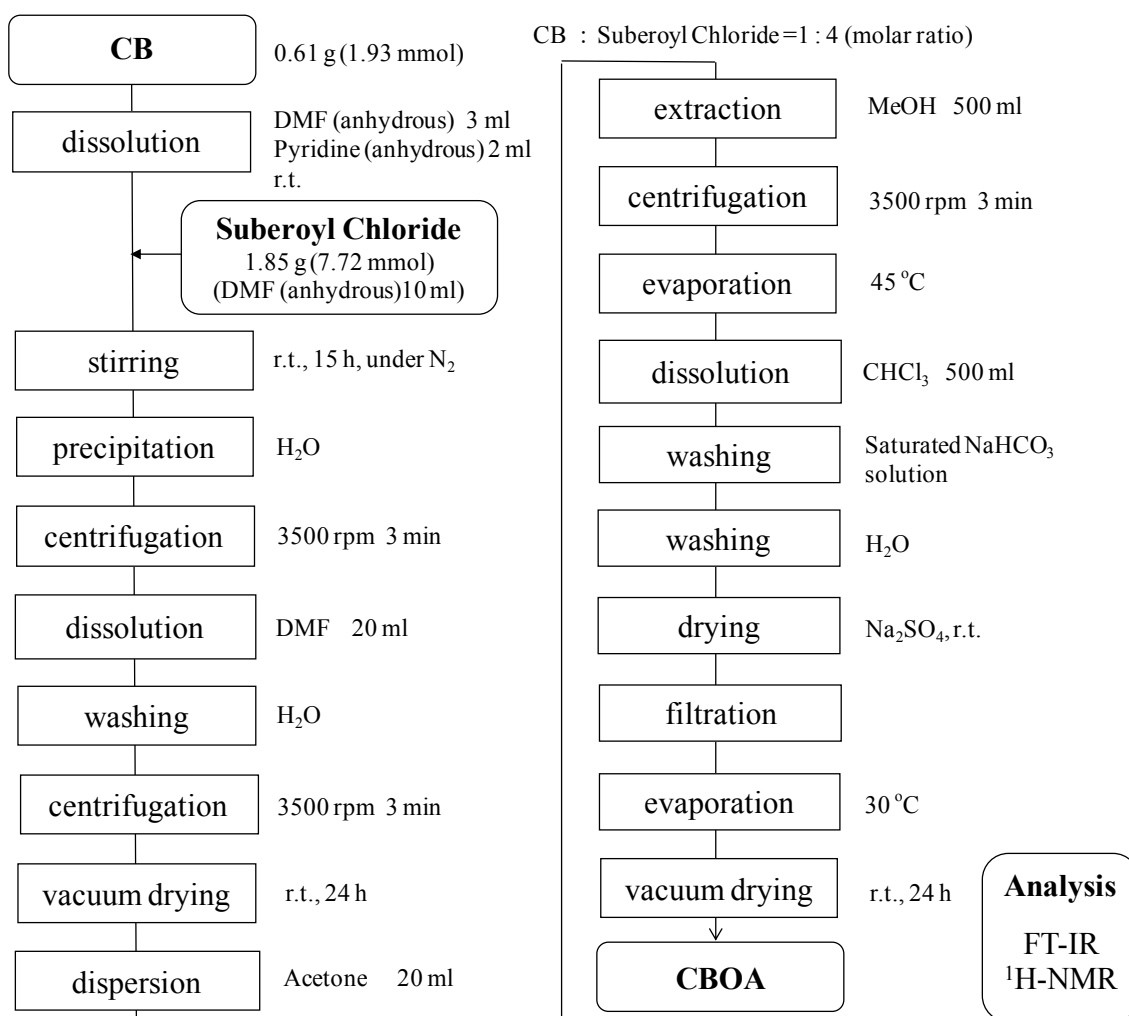


Fig. 4.2.2 Preparation of CBOA.

4.2.4 T-CBOA の合成

4.2.3 で得られた CBOA と trehalose を用いて T-CBOA の合成を行った。

まず、trehalose (0.04 g, 0.12 mmol)を秤りとり、脱水 DMF 1.3 ml 中に 60°C で溶解させた。反応で生じる酸の中和試薬としてトリエチルアミン(TEA)(5.6 ml, 40 mmol)、触媒としてジメチルアミノピリジン(DMAP)(0.61 g, 5 mmol)、脱水縮合剤として DCC(1.20 g, 5.83 mmol)を秤りとり、それを先の溶液に加えて、窒素下、60°C で 72 h 攪拌した。次にこの溶液を遠心分離し、回収したろ液を体積が初めの 5 分の 1 程度になるまで減圧濃縮した後、多量の純水中に滴下して、生成物を析出させ、遠心分離、デカンテーションを行い、40°C、24 h 真空乾燥した。乾燥後、アセトン 20 ml 中に溶解し、沈殿物をメタノール 100 ml 中に加え、抽出した後、遠心分離し、上澄みを減圧濃縮して、40°C、24 h 真空乾燥した。その後、少量のメタノールで 6 回洗浄し、得られた固体を、80°C で 48 h 真空乾燥させ、白色固体の生成物(0.01 g, 収率:4%)を得た。得られた生成物について FT-IR および ¹H-NMR によって構造解析し、溶解性試験を行い、熱分析として TGA、DSC を行った。実験方法をフローチャートとして Fig. 4.2.3 に示す。

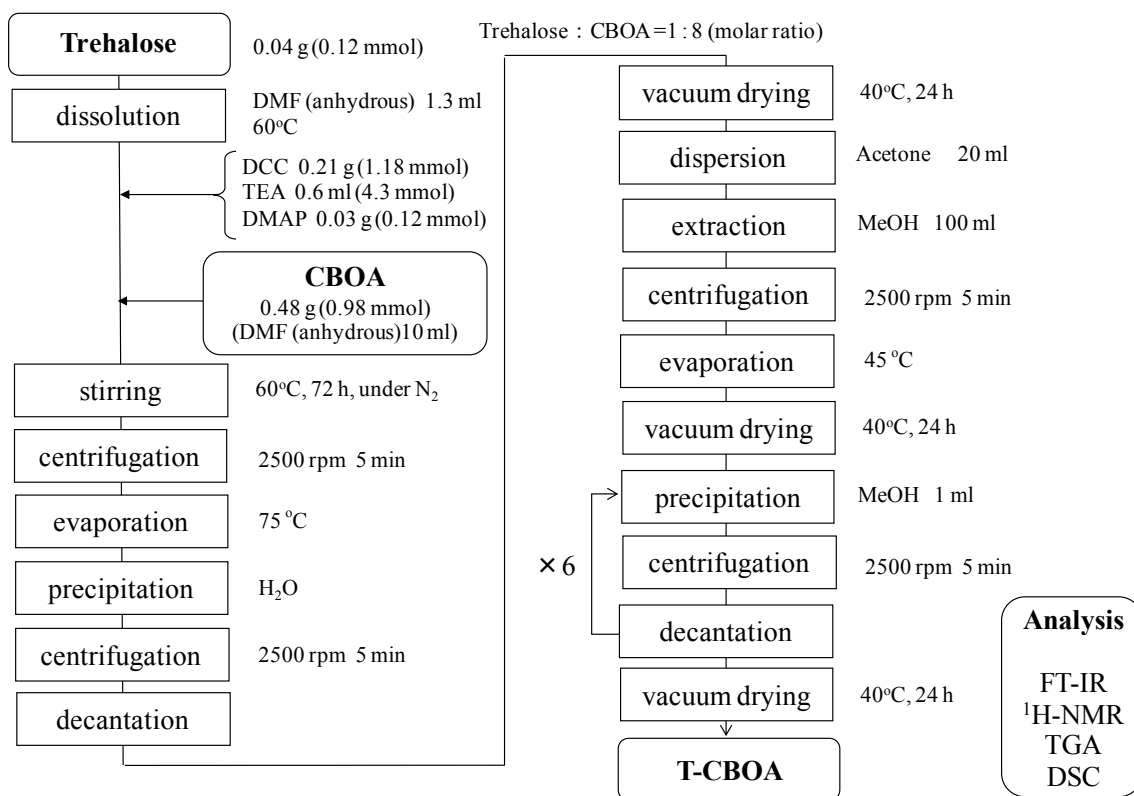


Fig. 4.2.3 Preparation of T-CBOA.

4.2.5 T-CBOA の光架橋

T-CBOA に UV 光を照射したときの吸収スペクトルの時間変化の測定により、光二量化の調査を行った。まず、吸収スペクトルの時間変化では T-CBOA 0.040 g を 4.0 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 10 mg / ml)を調製し、石英板(6 cm×1.5 cm×2 mm)上に 10 μ l 滴下し、薄膜を作製した。

薄膜作製後、UV 照射装置 Spot Cure SP-7(ウシオ電機社製)を用いて紫外光照射を行った。UV 照射装置には均一光照射ユニットライトガイドを取り付けてあり、均一光照射ユニットライトガイドの先端から 12 cm の位置に $\lambda \geq 280$ nm 透過ロングパスフィルター($\lambda < 280$ nm をカット)(ソーラボジャパン(株)製)を設置し、17 cm の位置に石英板上に作製した薄膜を設置した。UV の照射強度は 100% (60.6 mW/cm²)とした。試料の薄膜は石英板の片面にのみ付着しているため、付着していない面をホットプレートに接触させ 190°C まで加熱し、紫外光照射を行った。この温度は並行して行った偏光顕微鏡観察により最も明確に液晶の見られた温度である。UV を所定時間照射した後、解析として紫外可視吸収スペクトル測定よりスペクトルの時間変化を測定した。

また、フーリエ変換赤外分光光度計 IR Affinity-1S (島津製作所社製)を用いて KBr 法により FT-IR 吸収スペクトルの時間変化も測定した。T-CBOA 0.040 g を 2.0 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 20 mg / ml)を調製し、プレス形成した KBr の膜に 10 μ l 滴下し、乾燥させ、同様の条件で所定時間 UV 照射を行い測定を行った。

4.2.6 細胞培養用薄膜の作製

ガラス基板として、 $\phi 15$ mm 丸カバーガラス(No.1 松浪硝子工業(株)製) を用いて T-CBOA の薄膜を作製した。T-CBOA 0.040 g を 2 ml のクロロホルムに溶解させた試料溶液(試料濃度 20 mg/ml)を調製し、石英セル(3 cm \times 2 cm \times 5 mm)に加えた。

ガラス基板は殺菌線消毒保管庫 DM-90(大信工業(株)製)にて 2 日間 UV 処理した後、硝酸:硫酸:純水の体積比が 1:3:6 になるように調製した混合溶液に 1 日浸漬させることで表面洗浄を行い、水ですすいで乾燥させた。⁶⁾ 次にディップコーター(アイデン(株)製)を用いて、降下速度 1 mm/s、浸漬時間 1 min、上昇速度 0.5 mm/s、乾燥時間 1 h の条件でガラス基板上にフィルムを作製した。ディップコート条件を Fig. 4.2.4 に示す。その後 UV 照射($\lambda \geq 280$ nm)を行い薄膜を作製した。薄膜はエチレンオキサイドガス(EOG)処理((株)ステリテック社依頼)にて滅菌を行った。UV 照射条件として均一照射ユニットライトガイドの先端から 12 cm の位置に $\lambda \geq 280$ nm 透過ロングパスフィルターを設置し、17 cm の位置にディップコートを行ったガラス基板を設置した。UV の照射強度は 100% (60.6 mW/cm²) とした。UV 光は第 3 章の試料と同様の時間(180 s)照射し、照射時の温度は偏光顕微鏡にて液晶相が最も見られた 190°C で行った。

作製した薄膜は表面の分析として接触角測定を行った。本実験の細胞培養時に用いたサンプルの種類を Table 4.2.2 に示す。また薄膜を作製した際の手順をフローチャートとして Fig. 4.2.5 に示す。

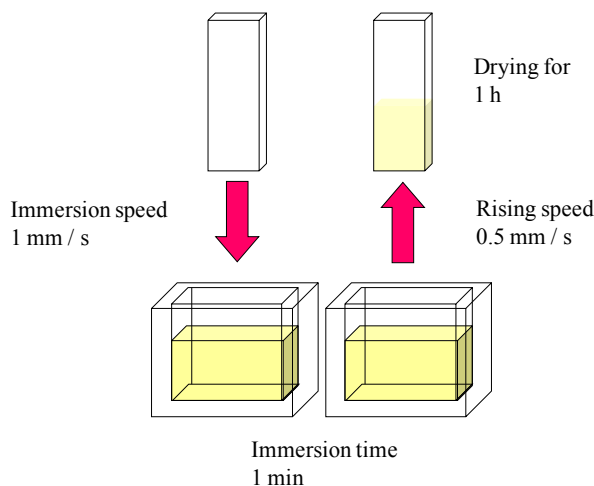


Fig. 4.2.4 Condition of dip coating.

Table 4.2.2 Sample for cell culture.

Sample	Description
PS well	Polystyrene culture plate used as purchased
glass	UV-treated and acid-washed glass coverslip
T-CBOA-UV	UV-irradiated T-CBOA coated on washed glass coverslip

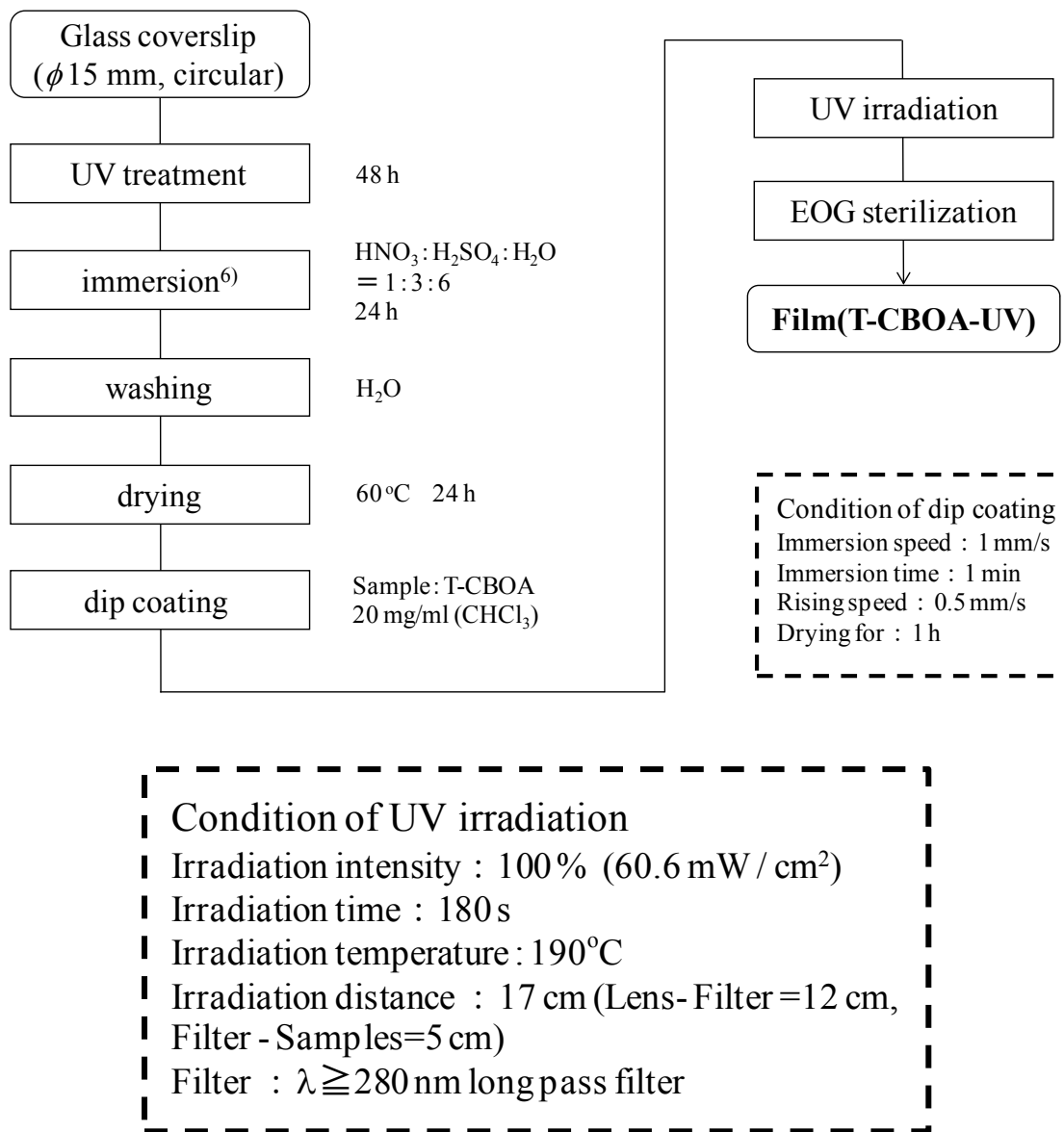


Fig. 4.2.5 Preparation of UV-irradiated T-CBOA thin films for cell culture.

4.2.7 線維芽細胞の *in vitro* 細胞試験

(1) 細胞培養

細胞はマウス胚細胞由来線維芽細胞 3T3 Swiss Albino 細胞を用いた。試験に必要な細胞数になるまで ϕ 10 cm dish を利用し、D-MEM に 15%FBS と 1% Penicillin / Streptomycin とを加えた溶液を基本培地とし、37°C、5%CO₂ 雰囲気下で培養を行った。 ϕ 10 cm dish で増殖させた線維芽細胞を Fig. 4.2.6 に示す。

60-70% Confluence(細胞を増殖させて、まだ過度な密集に至っていない状態)になった 3T3 Swiss Albino をトリプシン(0.25%trypsin + EDTA)により剥離し、24 well plate(TrueLine 製)中の評価したいサンプル上に 3×10^3 cells/ml 播種した。播種 3 時間、1、3、5、7 日後に細胞試験を行った。細胞の接着は、倒立顕微鏡 Axio Vert.A1(カールツァイスマイクロスコーピー(株)製)を用いて観察した。

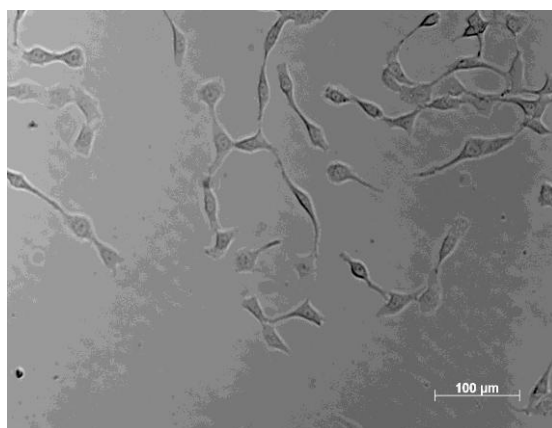


Fig. 4.2.6 3T3 Swiss Albino cells (ϕ 10 cm dish)

(2) 細胞数測定および細胞増殖の評価⁷⁾⁻⁹⁾

細胞数測定には血球計算板による細胞数測定、細胞増殖の評価には MTT 試験を用いた。血球計算板による細胞数測定では、トリパンブルー色素を用いることにより生細胞では色素が細胞膜を透過しないが、死細胞は染色されることを利用して、細胞の生死細胞数を測定することができる。

培養後の試料に 250 μ l のトリプシンを加え 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 3 分間静置することで加水分解により細胞を剥離し、過度な加水分解を抑制するために 250 μ l 基本培地を加え中和した。その後、500 μ l トリパンブルーを加え、死細胞を染色し、血球計算板と位相差顕微鏡を用いて生死細胞数を計数した。

MTT 試験は、テトラゾリウム塩の一種である MTT により生細胞のミトコンドリア中の呼吸鎖を利用して染色し、相対的な細胞量を測定する方法である。MTT はミトコンドリア内に存在する酵素により還元され、発色する。所定時間培養後の試料に 300 μ l の 1.0 mg / ml MTT 溶液を加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 雰囲気下で 90 分間静置した後、300 μ l 細胞溶解液を加え、細胞を溶解した。溶解して得られた溶液を 300 μ l ずつ 96 well plate(TrueLine 製)に移し、マイクロプレートリーダー iMark (バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製)を用いて波長 570 nm で吸光度を測定した。

(3)検定方法

検定方法は t 検定を行い¹⁰⁾、第 1 章の記載に従って統計解析を行った。

4.2.8 装置

・フーリエ変換赤外吸収(FT-IR)スペクトル測定

フーリエ変換赤外分光光度計 FTIR-8400S(島津製作所社製)および IR Affinity-1S(島津製作所社製)を用いて FT-IR を行った。各種試料を KBr 錠剤法で、測定範囲 4000-400 cm^{-1} 、積算回数 50 回で測定した。

・核磁気共鳴($^1\text{H-NMR}$)スペクトル測定

核磁気共鳴装置 AV400(Bruker 社製)を用いて $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。試料 20 mg を各種重水素化溶媒(DMSO- d_6 、クロロホルム- d)500-550 μl に溶解させ、NMR 用細管に移し、積算回数 32 回で測定した。

・熱重量分析(TGA)

熱重量分析装置 TGA-50(島津製作所社製)を用いて TGA 測定を行った。測定条件を以下に示す。

昇温速度: 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
温度範囲: r.t.(25 \pm 5 $^{\circ}\text{C}$)~500 $^{\circ}\text{C}$

アルミパン(Mac Science 社製)に固体試料を 3~5 mg の範囲内で秤りとり、窒素雰囲気中にて測定した。分解温度(T_d)は試料の重量が 5 wt%減少したときの温度とした。また、光架橋後の測定は、アルミパン(Mac Science 社製)に固体試料を 3~5 mg の範囲内で秤りとり、クロロホルム 10 μl に溶解させ、乾燥してフィルムとし、無偏向の UV 照射($\lambda \geq 280 \text{ nm}$)を 2.2.5 と同様の条件で行い、窒素雰囲気中にて重量変化を測定した。

・示差走査熱量分析(DSC)

示差走査熱量分析装置 Pyris 1(Perkin Elmer 社製)を用いて DSC 測定を行った。測定条件を以下に示す。

	状態	温度範囲	昇・降温速度
第 1 過程	昇温	-10 $^{\circ}\text{C}$ ~230 $^{\circ}\text{C}$	10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
第 2 過程	3 min.保持	230 $^{\circ}\text{C}$	—
第 3 過程	降温	230 $^{\circ}\text{C}$ ~-10 $^{\circ}\text{C}$	10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
第 4 過程	3 min.保持	-10 $^{\circ}\text{C}$	—
第 5 過程	昇温	-10 $^{\circ}\text{C}$ ~230 $^{\circ}\text{C}$	10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

固体試料をアルミパン(Perkin Elmer 社製)に 5~10 mg の範囲内で秤りとり、アルミの蓋でシールしたものを測定試料とした。冷却ユニットには cryofill を使用し、窒素雰囲気中にて測定した。また、光架橋後の測定は、アルミパン(Perkin Elmer 社製)に固体試料を 3~5 mg の範囲内で秤りとり、クロロホルム 10 μ l に溶解させ、乾燥し、無偏向の UV 照射($\lambda \geq 280$ nm)を 2.2.5 と同様の条件で行い、窒素雰囲気中にて重量変化を測定した。

・紫外可視吸収スペクトル測定

紫外可視分光光度計 V-650(日本分光社製)を用いて紫外可視(UV-Vis)吸収スペクトル測定を行った。測定条件を以下に示す。

測光モード	Abs
測定範囲	800 - 200 nm
レスポンス	Medium
バンド幅	L 5.0 nm
走査速度	400 nm / min
読込間隔	1.0 nm
積算回数	1

・偏光顕微鏡観察

偏光顕微鏡 OLYMPUS BX50(OLYMPUS 社製)および光源 OLYMPUS TH3(OLYMPUS 社製)を用いて偏光顕微鏡観察を行った。観察倍率は 200 倍、室温(25 ± 5 °C)から 200 °C の温度範囲で直交ニコル下にて液晶相の観察を行った。

・電界放射型走査電子顕微鏡観察(FE-SEM)

電界放射型走査電子顕微鏡 S-4700 Type 1(日立製作所社製)を用いて電界放射型走査電子顕微鏡観察を行った。試験用サンプルとして偏光顕微鏡観察で用いたサンプルを使用した。サンプルを導電性カーボンテープで SEM 観察用試料台に固定し、観察前に E-1030 イオンスパッター(日立製作所社製)を用いて金メッキ蒸着を 30 s 行った。測定条件を以下に示す。

加速電圧	2 kV
撮影倍率	500 倍

・接触角測定¹¹⁾

接触角計 SImage02V((株)エキシマ社製)を用いて接触角測定を行った。フィルムに超純水を一滴(5 μ l)垂らし、PC 画像解析による計測ソフトで ATAN $\theta/2$ 法より接触角を測定した。

4.3 結果および考察

4.3.1 FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定による構造解析

桂皮酸クロリドおよび 4, 4'-ビフェニルジオールを用いて、CB を合成した。

Fig. 4.3.1 に(a)桂皮酸クロリド、(b) 4, 4'-ビフェニルジオールおよびこれらの反応によって得られた生成物(c)CB の FT-IR スペクトルを示す。

Fig. 4.3.1 より CB のスペクトル(c)において 1700 cm^{-1} 付近に見られるピークはエステル C=O 伸縮振動に由来する吸収である。さらに、 1640 cm^{-1} 付近のピークは桂皮酸ユニットの C=C 伸縮振動に由来し、 $1440\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークはベンゼン環の C-C 伸縮振動に由来すると考えられる。 1160 cm^{-1} 付近のピークはエステルの C-O 伸縮振動に由来すると考えられる。

また、Scheme 4.1.1 の反応式より反応前後の化学構造に着目すると、4, 4'-ビフェニルジオールのヒドロキシ基が変化している。Fig. 4.4.1 より 4, 4'-ビフェニルジオールのスペクトル(b)において 3400 cm^{-1} 付近に顕著なヒドロキシ基の O-H 伸縮振動による吸収ピークが見られた。CB(c)ではこのピークが減少していた。これは片方のヒドロキシ基にシナモイル基が置換しているため減少したと考えられる。

これらのことから、CB の合成反応が進行していることが示唆される。

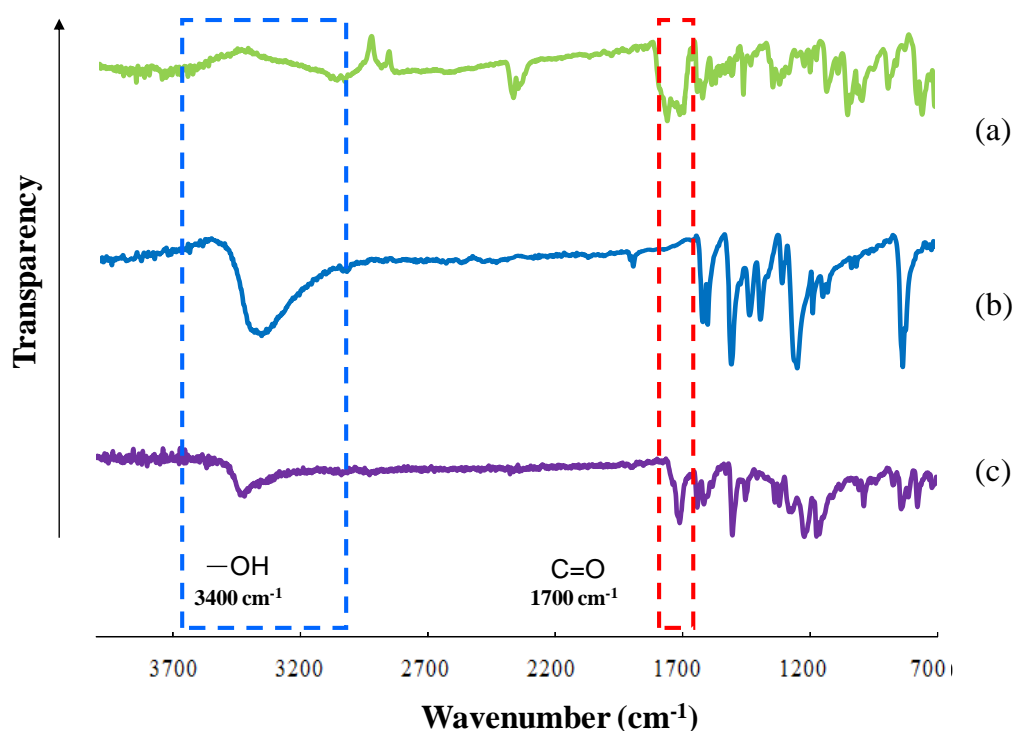


Fig. 4.3.1 FT-IR spectra of (a) cinnamoyl chloride, (b) 4, 4'-biphenyldiol and (c)CB.

(a)桂皮酸クロリド、(b)4, 4'-ビフェニルジオールおよびこれらの合成によって得られた生成物(c)CBの¹H-NMRスペクトルをFig. 4.3.2に示す。

Fig. 4.3.2より(a)桂皮酸クロリドのスペクトルにおいてアルケンのC=Cに由来するシグナル(6.3-6.6 ppm)が(c)CBでシフトしていることが分かる。また(b) 4, 4'-ビフェニルジオールのスペクトルにおいてベンゼン環由来のシグナル(6.8 ppm、7.4 ppm)が(c)CBにも確認され、-OHに由来するシグナル(9.4 ppm)が(c)CBにおいてシフトしていた。このことにより、CBの合成反応が進行していることが示唆される。

生成物(c)CBのスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比をTable 4.3.1に示す。

Table 4.3.1 Measured integral value of each signal in the spectrum of CB.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical number of protons
a, e	7.8-8.0	3.17	3.00
b	7.5	5.16	5.00
c, g	6.8-7.0	3.04	3.00
d	7.3	1.99	2.00
f	7.6	2.05	2.00
h	9.6	1.00	1.00

Table 4.3.1より、シグナル積分値とその理論存在比がほぼ一致していることが分かる。したがって、これらの結果よりCBの合成が認められた。

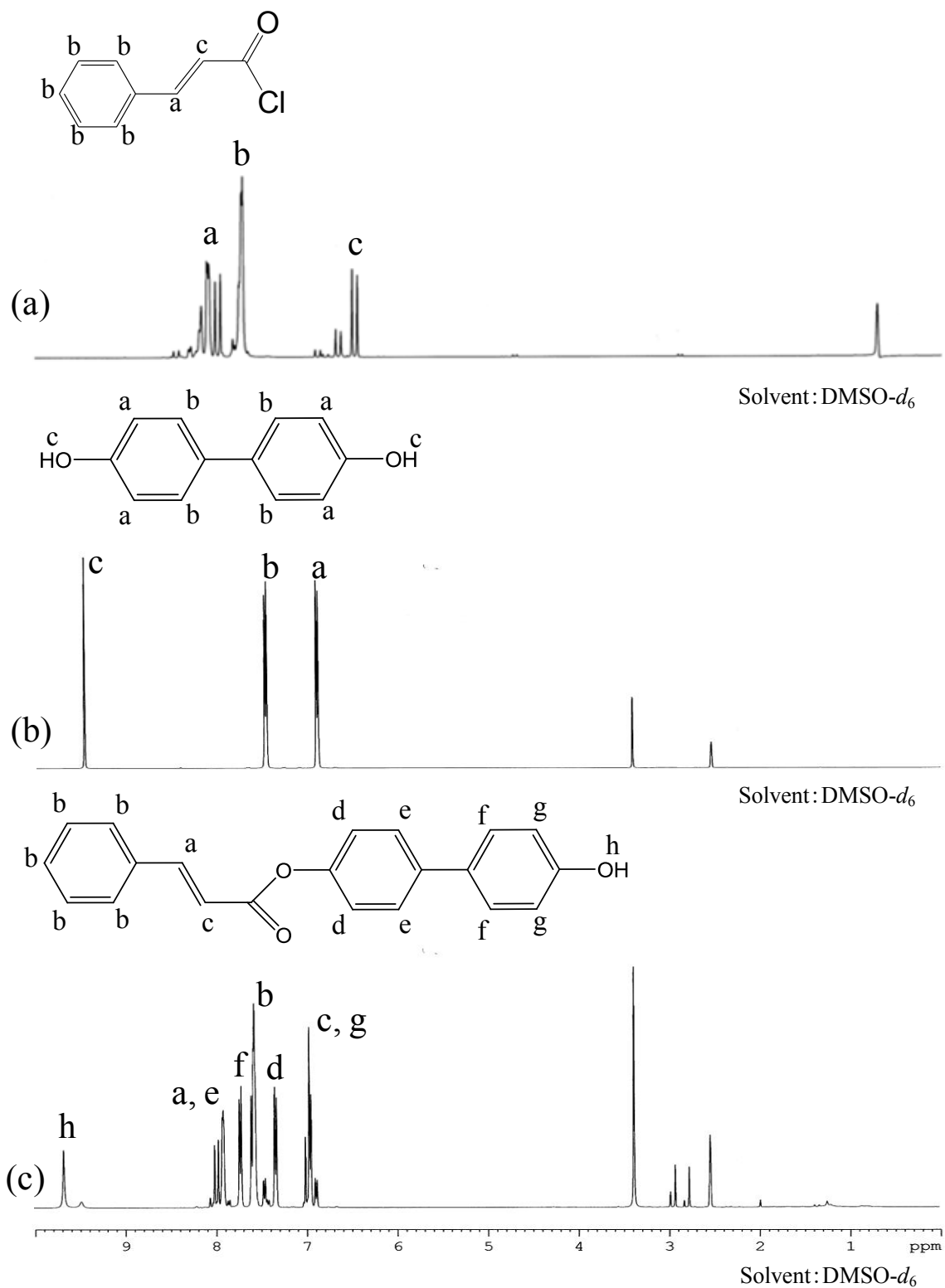


Fig. 4.3.2 ¹H-NMR spectra of (a) cinnamoyl chloride, (b) 4,4'-biphenyldiol and (c) CB.

次に、CB およびスベリン酸クロリドを用いて CBOA を合成した。

Fig. 4.3.3 に(a)CB、(b)スベリン酸クロリドおよびこれらの反応によって得られた生成物(c)CBOA の FT-IR スペクトルを示す。

Fig. 4.3.3 より CBOA のスペクトル(c)において 1700 cm^{-1} 付近に見られるピークは CB とスベリン酸クロリドの結合により得られるエステルの $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に由来する吸収である。さらに、 2960 cm^{-1} 付近のピークはスベリン酸クロリドのメチレン基由来の $\text{C}-\text{H}$ 伸縮振動に由来するものと考えられる。

また、Scheme 4.1.2 の反応式より反応前後の化学構造に着目すると、CB のヒドロキシ基が変化している。Fig. 4.3.3 より CB のスペクトル(a)において 3500 cm^{-1} 付近に顕著なヒドロキシ基の $\text{O}-\text{H}$ 伸縮振動による吸収ピークが見られた。CBOA(c)ではこのピークが消失していた。これは CB のヒドロキシ基にスベリン酸クロリドが置換しているため消失したと考えられる。CBOA のスペクトル(c)において $2400\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ 付近に見られるピークは、スベリン酸クロリドが結合し、精製過程で塩素が $-\text{OH}$ に置き換わったことによるカルボン酸に由来する吸収と考えられる。

これらのことから、CBOA の合成反応が進行していることが示唆される。

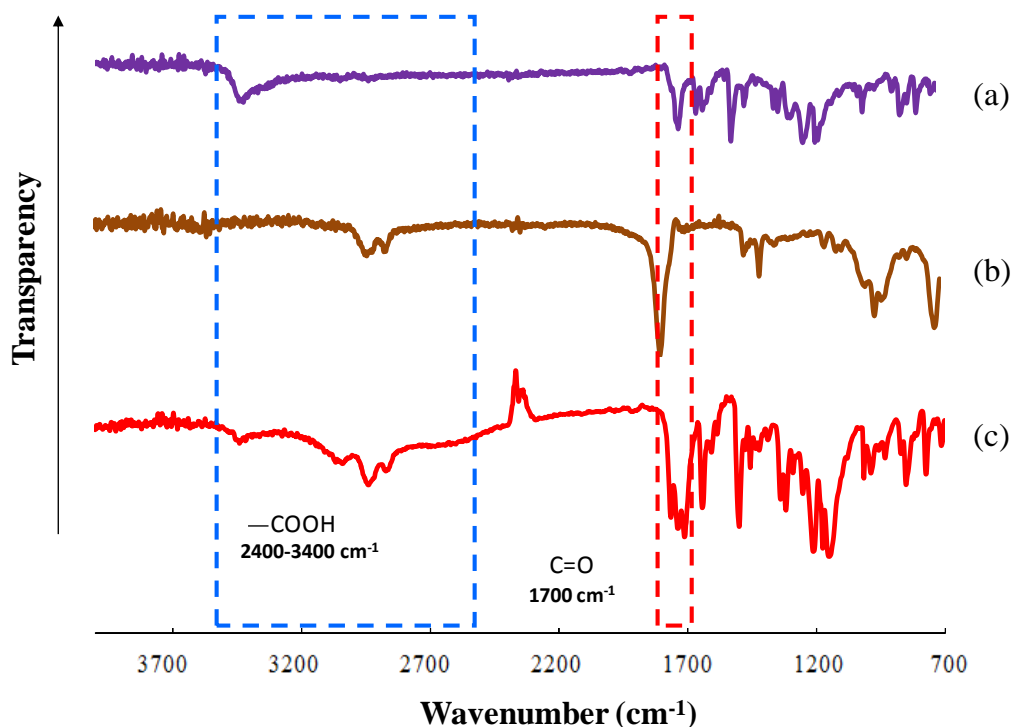


Fig. 4.3.3 FT-IR spectra of (a)CB, (b)suberoyl chloride and (c)CBOA

(a)CB、(b)スベリン酸クロリドおよびこれらの合成によって得られた生成物(c)CBOA の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Fig. 4.3.4 に示す。

Fig. 4.3.4 より(a)CB のスペクトルにおいてベンゼン環に由来するシグナル(6.8-7.0 ppm)が(c)CBOA でシフトしていた。また、(a)CB のフェノール性の O-H に由来するシグナル(9.6 ppm)が(c)CBOA で消失していた。さらに、(b)スベリン酸クロリドのメチレン基に由来する一部のシグナル(1.5 ppm, 2.3 ppm)が(c)CBOA でシフトしていた。このことにより、CBOA の合成反応が進行していることが示唆される。

生成物(c)CBOA のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 4.3.2 に示す。

Table 4.3.2 Measured integral value of each signal in the spectrum of CBOA.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical number of protons
a	7.9	1.40	1.00
b	7.4-7.5	4.40	3.00
c	6.9	1.00	1.00
d	7.3	2.35	2.00
e	7.8	2.63	2.00
f, h	7.7	4.52	4.00
g	7.2	2.43	2.00
i	2.6	2.22	2.00
j	1.5	2.16	2.00
k	1.7	2.28	2.00
l	1.3-1.4	4.34	4.00
m	2.2	2.05	2.00

Table 4.3.3 より、シグナル積分値とその理論存在比がほぼ一致していることが分かる。したがってこれらの結果より CBOA の合成が認められた。

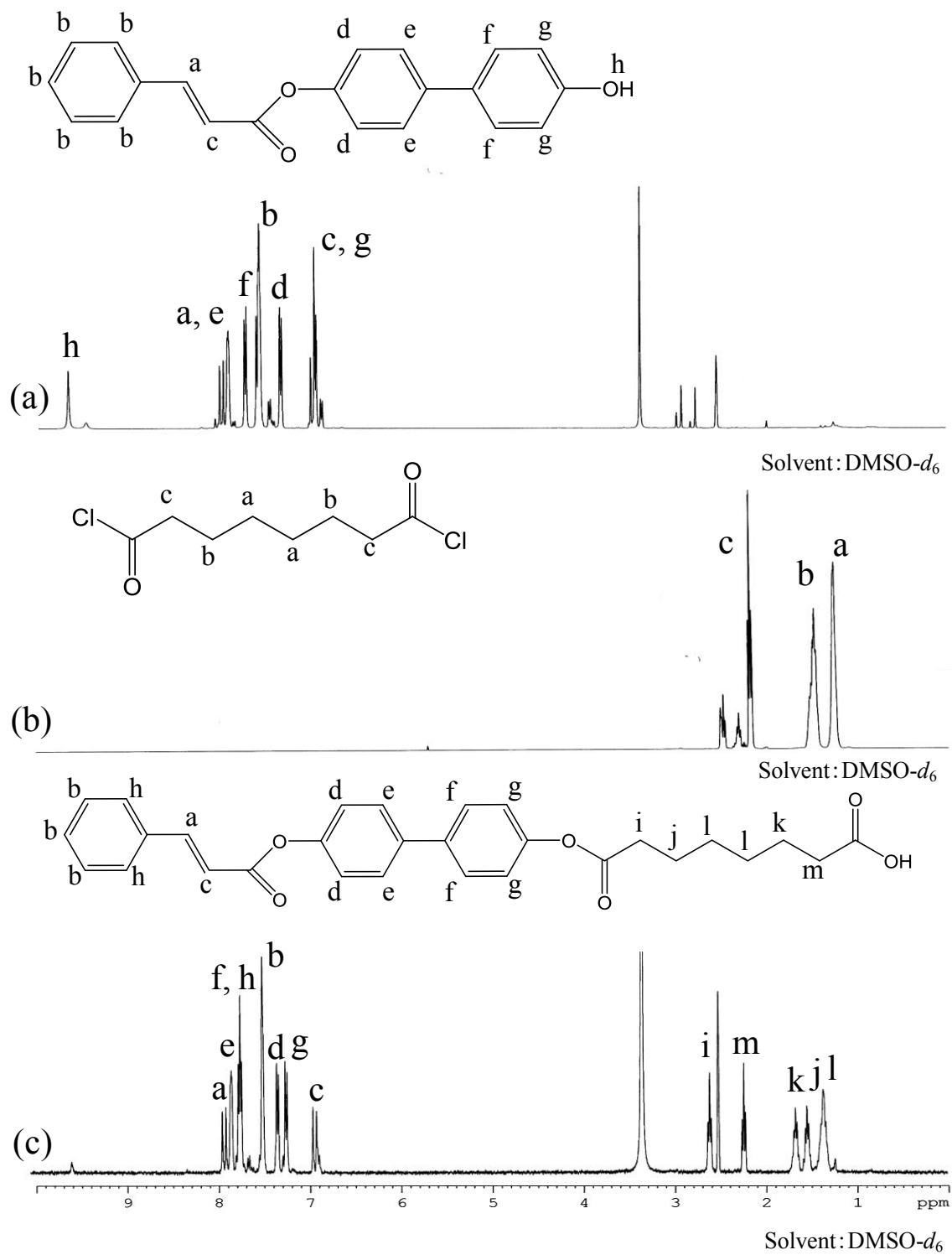


Fig. 4.3.4 ¹H-NMR spectra of (a)CB, (b)suberoyl chloride and (c)CBOA.

桂皮酸クロリド、4,4'-ビフェニルジオール、CB および CBOA について溶解性試験を行った。用いた溶媒は水、エタノール、メタノール、DMF、DMSO、THF、アセトン、クロロホルム、ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトニトリル、酢酸エチル、トルエンの 13 種類である。試料を 20 mg 秤りとり溶媒を 500 μ l 加え、目視で観察することで溶解性試験を行った。この結果を Table 4.3.3 に示す。

Table 4.3.3 Solubility of cinnamoyl chloride, 4,4'-biphenyldiol, CB and CBOA.

Solvent	Samples			
	Cinnamoyl chloride	4,4'-Biphenyldiol	CB	CBOA
water	×	×	×	×
ethanol	○	○	×	○
methanol	○	○	×	○
DMF	○	○	○	○
DMSO	○	○	○	○
THF	○	○	△	○
acetone	○	○	○	○
chloroform	○	×	○	○
hexane	○	×	×	×
diethyl ether	○	×	○	○
acetonitrile	○	×	○	○
ethyl acetate	○	○	○	○
toluene	○	×	×	×

(○) soluble
(×) insoluble
(△) partially soluble

Table 4.3.3 より、桂皮酸クロリドは疎水性であるため水には不溶であったが、その他の有機溶媒には可溶であった。また、4,4'-ビフェニルジオールはエタノール、メタノール、DMF、DMSO、THF、アセトン、酢酸エチルには可溶であり、その他の溶媒には不溶であった。

そして、CB は DMF、DMSO、アセトン、酢酸エチルおよびクロロホルムには可溶であり、THF には部分妖怪し、その他の溶媒には不溶であった。これは 4,4'-ビフェニルジオールのヒドロキシ基にシンナモイル基が置換したため 4,4'-ビフェニルジオールの親水性が低下し、4,4'-ビフェニルジオールが可溶であったエタノールおよびメタノールに溶けにくくなり、桂皮酸クロリドが可溶であった極性の低い溶媒であるクロロホルムに可溶になったと考える。

また、CBOA はスベリン酸クロリドを結合し、アルキル鎖を導入したことにより、エタノール、メタノールおよび THF に可溶となったと考える。

最後に、得られた CBOA を用いて T-CBOA を合成した。

Fig. 4.3.5 に(a)トレハロース、(b)CBOA およびこれらの反応によって得られた生成物(c)T-CBOA の FT-IR スペクトルを示す。

Fig. 4.3.5 より T-CBOA のスペクトル(c)において 1700 cm^{-1} 付近に見られるピークはエステル C=O 伸縮振動に由来する吸収である。さらに、 1640 cm^{-1} 付近のピークは桂皮酸ユニットの C=C 伸縮振動に由来し、 $1500\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$ 付近のピークはベンゼン環の C-C 伸縮振動に由来すると考えられる。 1160 cm^{-1} 付近のピークはエステル C-O 伸縮振動に由来すると考えられる。

また、Scheme 4.1.3 の反応式より反応前後の化学構造に着目すると、トレハロースのヒドロキシ基が変化している。Fig. 4.3.5 より、トレハロースのスペクトル(a)において 3400 cm^{-1} 付近に骨格であるトレハロースのヒドロキシ基の O-H 伸縮振動による吸収ピークが T-CBOA のスペクトル(c)において減少している。また、CBOA のスペクトル(b)において見られていた $2400\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ 付近のカルボキシル基に由来する -COOH 伸縮振動による吸収ピークが T-CBOA(c)の吸収ピークにおいてほぼ消失していた。これはトレハロースのヒドロキシ基にメソゲン基である CBOA が置換しているためと考えられる。

これらのことから、T-CBOA の合成反応が進行していることが示唆される。

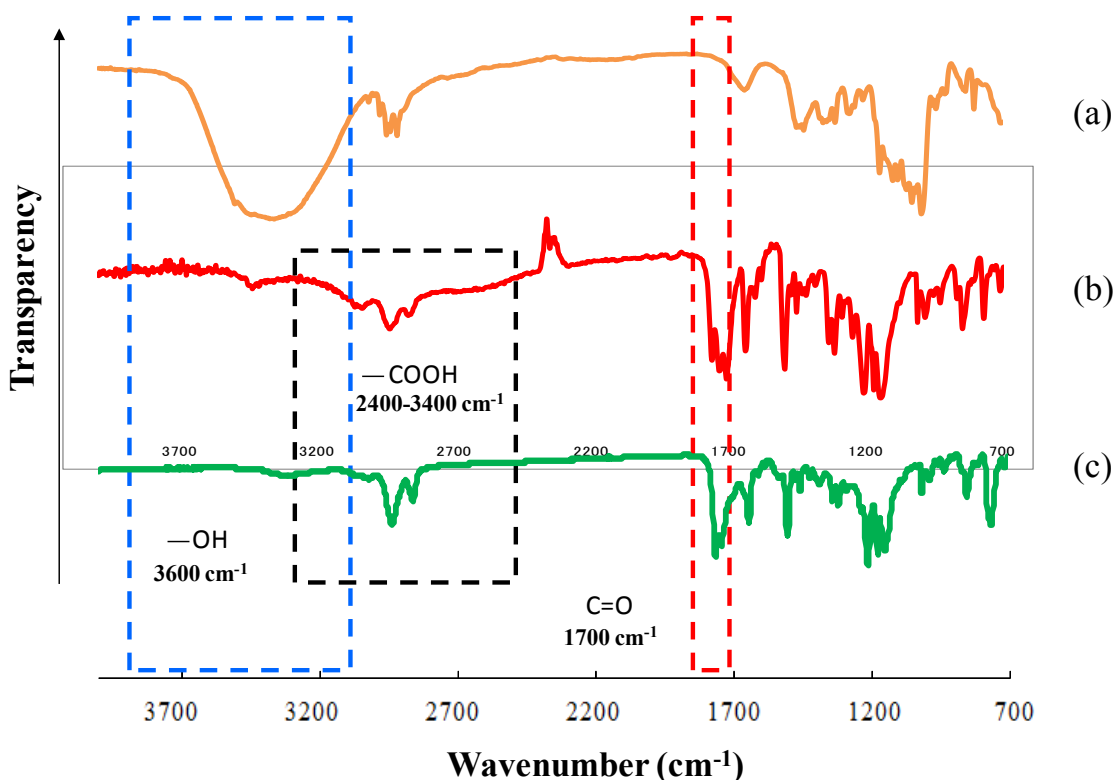


Fig. 4.3.5 FT-IR spectra of (a)trehalose, (b)CBOA and (c)T-CBOA

(a)トレハロース、(b)CBOA およびこれらの合成によって得られた生成物(c)T-CBOA の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを Fig. 4.3.6 に示す。

Fig. 4.3.6 より、(a)トレハロースのスペクトルにおいて骨格の C-H に由来するシグナル(3.5-4.5 ppm)が(c)T-CBOA で確認できた。さらに、(a)トレハロースに見られた O-H 由来のシグナル(5.0-5.5 ppm)は、シグナルがブロードして現れていることから、消失したかどうかの判別がつきにくい。FT-IR の結果から考えて、ほぼ消失したものと考えている。また、シナモイル基のアルケンおよびベンゼン環由来のシグナル(6.3-6.6 ppm、7.2-8.0 ppm)が(c)T-CBOA にも確認できた。さらに、(b)CBOA のスペクトルにおいて、アルキル鎖の水素に由来するシグナル(1.7-2.6 ppm)が(c)T-CBOA においてシフトして確認された。しかし、1.0-2.0 ppm 付近にジシクロヘキシルウレア由来のシグナルが見られているため完全に精製しきれていないと考えられる。これらより、T-CBOA の反応が進行していることが示唆される。

生成物(c)T-CBOA のスペクトルにおける各シグナルの化学シフト、積分値、理論存在比を Table 4.3.4 に示す。

Table 4.3.4 Measured integral value of each signal in the spectrum of T-CBOA.

Signal	Chemical shift (ppm)	Measured integral value	Theoretical number of protons(DS=6.9)
a	4.8-5.5	11.94	12.00
b	3.4-3.9	1.30	1.20
c	7.9	6.90	6.90
d, e, h	7.5-7.7	46.40	48.30
f	6.6	7.55	6.90
g, j	7.1-7.2	25.81	27.60
i	7.5	13.99	13.80
k, o	2.6	27.79	27.60
l, n	1.7	31.47	27.60
m	1.4	45.26	27.60

Table 4.3.4 より、シグナル積分値とその理論存在比が一致している箇所もあるが、1.0-2.0 ppm 付近に H_2O 由来のシグナルが見られることから積分値にずれが生じている。また、(c)T-CBOA のトレハロースユニット a, b とメソゲン基の c より求めたトレハロースユニットとメソゲン基の比率は 1:6.9 となっていた。したがって、これらの結果より T-CBOA の合成が示唆された。

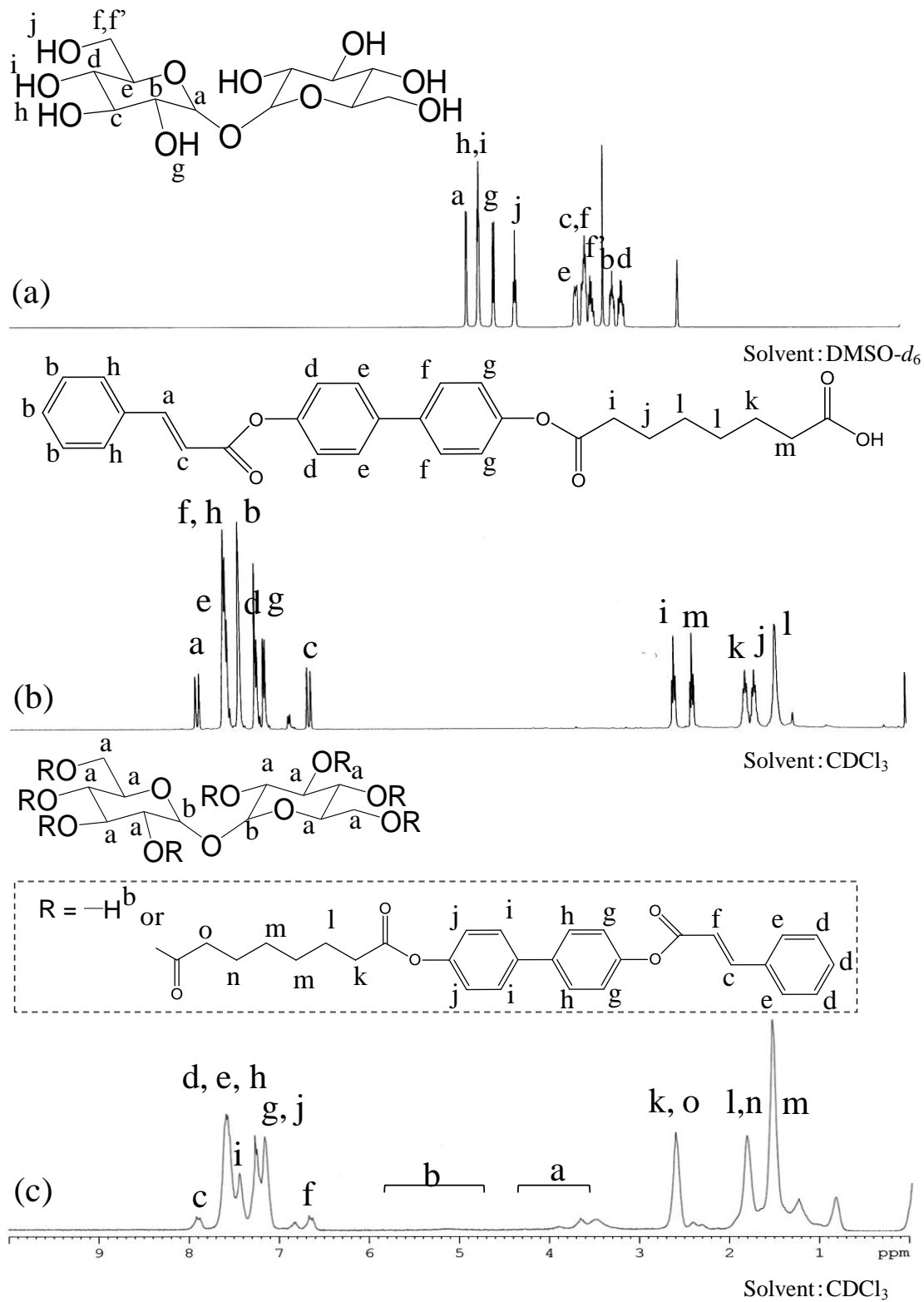


Fig. 4.3.6 $^1\text{H-NMR}$ spectra of (a)trehalose, (b)CBOA and (c)T-CBOA.

トレハロース、CBOA および T-CBOA について溶解性試験を行った。用いた溶媒は水、エタノール、メタノール、DMF、DMSO、THF、アセトン、クロロホルム、ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトニトリル、酢酸エチル、トルエンの 13 種類である。試料を 20 mg 秤りとり溶媒を 500 μ l 加え、目視で観察することで溶解性試験を行った。この結果を Table 4.3.5 に示す。

Table 4.3.5 Solubility of trehalose, CBOA and T-CBOA.

Solvent	Samples		
	Trehalose	CBOA	T-CBOA
water	○	×	×
ethanol	○	○	○
methanol	○	○	○
DMF	○	○	○
DMSO	○	○	○
THF	×	○	○
acetone	×	○	○
chloroform	×	○	○
hexane	×	×	×
diethyl ether	×	○	○
acetonitrile	×	○	○
ethyl acetate	×	○	○
toluene	×	×	×

(○) soluble
(×) insoluble

Table 4.3.5 より、トレハロースは親水性であるため、水、エタノール、メタノール、DMF および DMSO には可溶であり、その他の溶媒には不溶であった。また、CBOA は純水、ヘキサン、トルエンには不溶だったが、その他の溶媒には全て可溶となっている。

T-CBOA は CBOA と同様の溶解性となっていた。これはトレハロースの水酸基に CBOA がほぼ置換したためトレハロースの親水性が低下し、CBOA と同様の溶解性になり、極性の低い有機溶媒にも溶解しやすくなったと考えられる。

4.3.2 T-CBOA の光架橋

トレハロースと CBOA より合成した T-CBOA を用いて薄膜を作製し、紫外(UV)光照射による時間変化を紫外可視吸収スペクトル測定および FT-IR スペクトル測定により調査した。

ディップコーターで石英板上に作製した薄膜に対し、 $\lambda \geq 280$ nm 透過ロングパスフィルターを通して UV を照射し、薄膜の紫外可視吸収スペクトルの時間変化を確認した。薄膜に対し、吸光度の変化がほぼ見られなくなるまで照射し、所定の累積照射時間(0 s、5 s、10 s、20 s、30 s、60 s、90 s、120 s、150 s、180 s、240 s、300 s)ごとにスペクトルを測定した。T-CBOA の紫外可視吸収スペクトルの時間変化を Fig. 4.3.7 に示す。

照射前の T-CBOA の薄膜において透明な薄膜になっておらず吸収ピークがブロードであったが、加熱しながら UV 光を照射していくと徐々に透明な薄膜となっていく、20 s 照射後より、260 nm に強い吸収がみられた。これはシナモイル基のベンゼン環とそれに結合する C=C 結合とカルボニル基の π 共役および 4, 4'-ビフェニルジオール由来のベンゼン環によるものである。Fig. 4.3.7 より、20 s 以降、照射時間が増加するにつれて 280 nm 付近の吸収が減少することが認められた。これより、UV 照射による T-CBOA の光反応の進行が示唆される。

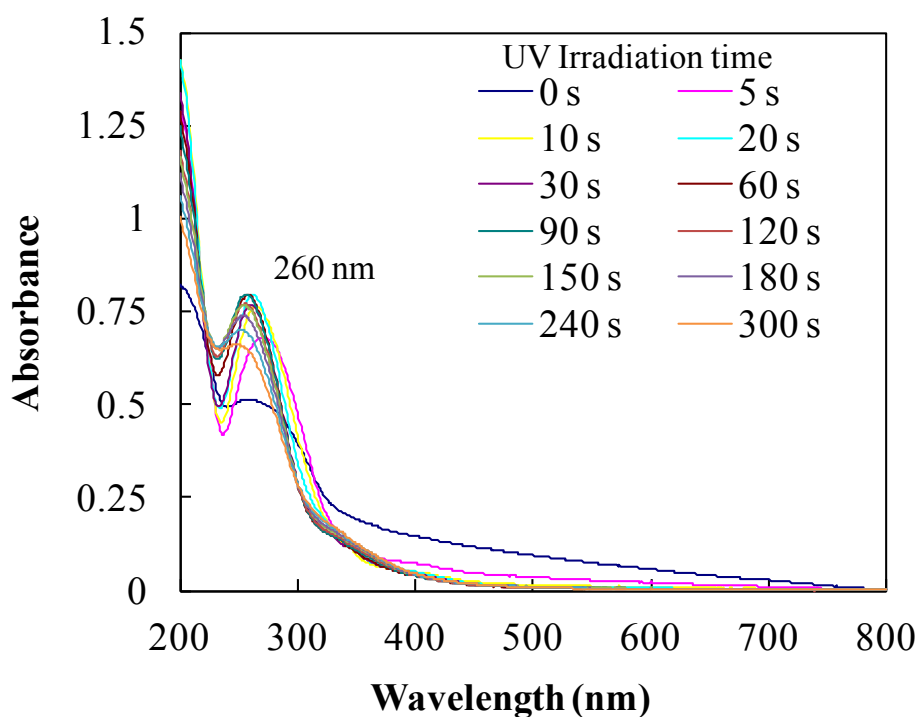


Fig. 4.3.7 Spectral changes of T-CBOA induced by UV irradiation.

KBr の薄膜に対し T-CBOA のキャストを行い、 $\lambda \geq 280 \text{ nm}$ 透過ロングパスフィルターを通して UV を照射し、その薄膜の FT-IR スペクトルの時間変化を調べた。試料に対し、所定の累積照射時間(0 s, 5 s, 180 s, 300 s)ごとにスペクトルを測定した。T-CBOA の FT-IR スペクトルの時間変化を Fig. 4.3.8 に示す。

Fig. 4.3.8より、照射前の T-CBOA で見られた、trans 体の桂皮酸ユニットの=C-H 面外変角振動(967 cm^{-1})、=C-H 面内変角振動($1305, 1320 \text{ cm}^{-1}$)、C=C 伸縮振動(1630 cm^{-1})の吸収が UV を照射するごとに大きく減少している。なお、エステルの C=O 伸縮振動(1730 cm^{-1})の吸収はシフトして、 1750 cm^{-1} 付近に現れていると考えられるが、分子内に存在する他のエステルの吸収帯と重なっているため、顕著には見られなかった。これより、C=C 伸縮振動および=C-H 変角振動の減少が見られたことから、光二量化反応が起こっていると考えられる。

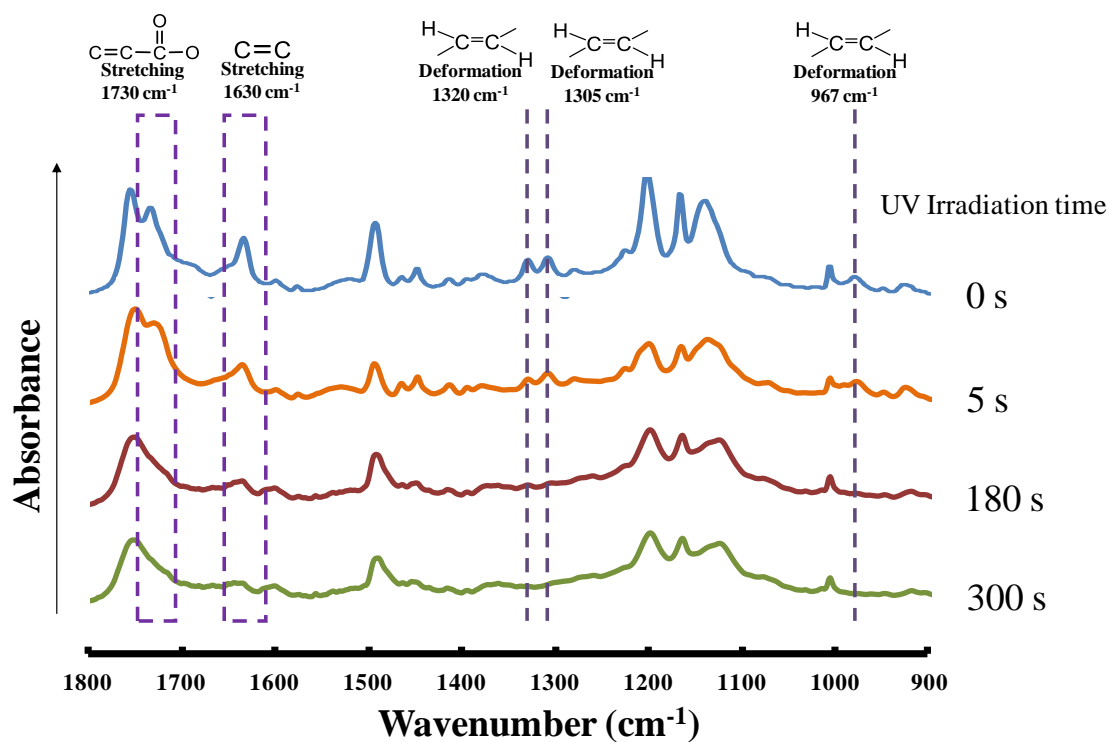


Fig. 4.3.8 Changes in FT-IR spectra of T-CBOA induced by UV irradiation.

4.3.3 T-CBOA 薄膜の温度変化による液晶形態観察

T-CBOA を用いてキャスト法により薄膜を作製し、偏光顕微鏡観察を行った。またそれらの薄膜に対し 190°C(UV 照射前にて最も液晶相が観察された温度)で UV 照射を 180 s(第 3 章での試料と同様の時間)行い、偏光顕微鏡観察により照射前との比較を行った。

10 mg/ml の濃度でクロロホルムに溶解させた T-CBOA 溶液をガラス基板上に 10 μ l 滴下し、キャスト法により T-CBOA 薄膜を作製した。薄膜に対し、 $\lambda \geq 280$ nm 透過ロングパスフィルターを通して 190°C で 180 s UV 照射を行い、偏光顕微鏡による温度変化の観察を行った。UV 照射を行わないものと比較して、偏光顕微鏡による温度変化の観察結果をそれぞれ Fig. 4.3.9(照射前)、および Fig. 4.3.10(照射後)に示す。

Fig. 4.3.9 より、まず昇温時では室温から 179°C までは結晶であり、180°C でネマティック液晶のシュリーレン構造の一部であるような模様が全体的に見られるようになった。しばらくその模様が観察された後、230°C で等方液体になり、その後変化はなかった。次に降温時では 181°C まで等方液体であり、180°C でネマティック液晶に特有の模様が見られるようになった。しばらくその模様が観察された後、130°C で完全な結晶になって、その後変化はなかった。なお、光架橋前において、最も液晶が多く観察できたのは昇温時の 190°C であった。

また、Fig. 4.3.10 より、光架橋後の薄膜では、昇温時、降温時ともに温度変化において液晶相は見られず、昇温時の 190°C で等方性を示し、降温時の 170°C で結晶のようなものが出現した。これより光架橋後は液晶性が失われることが分かった。これは、メソゲン基に結合したシンナモイル基が二量化したため分子運動がしづらくなつたと考えられる。しかし、光架橋後は全体的なマイクロスケールのドメインが観察された。

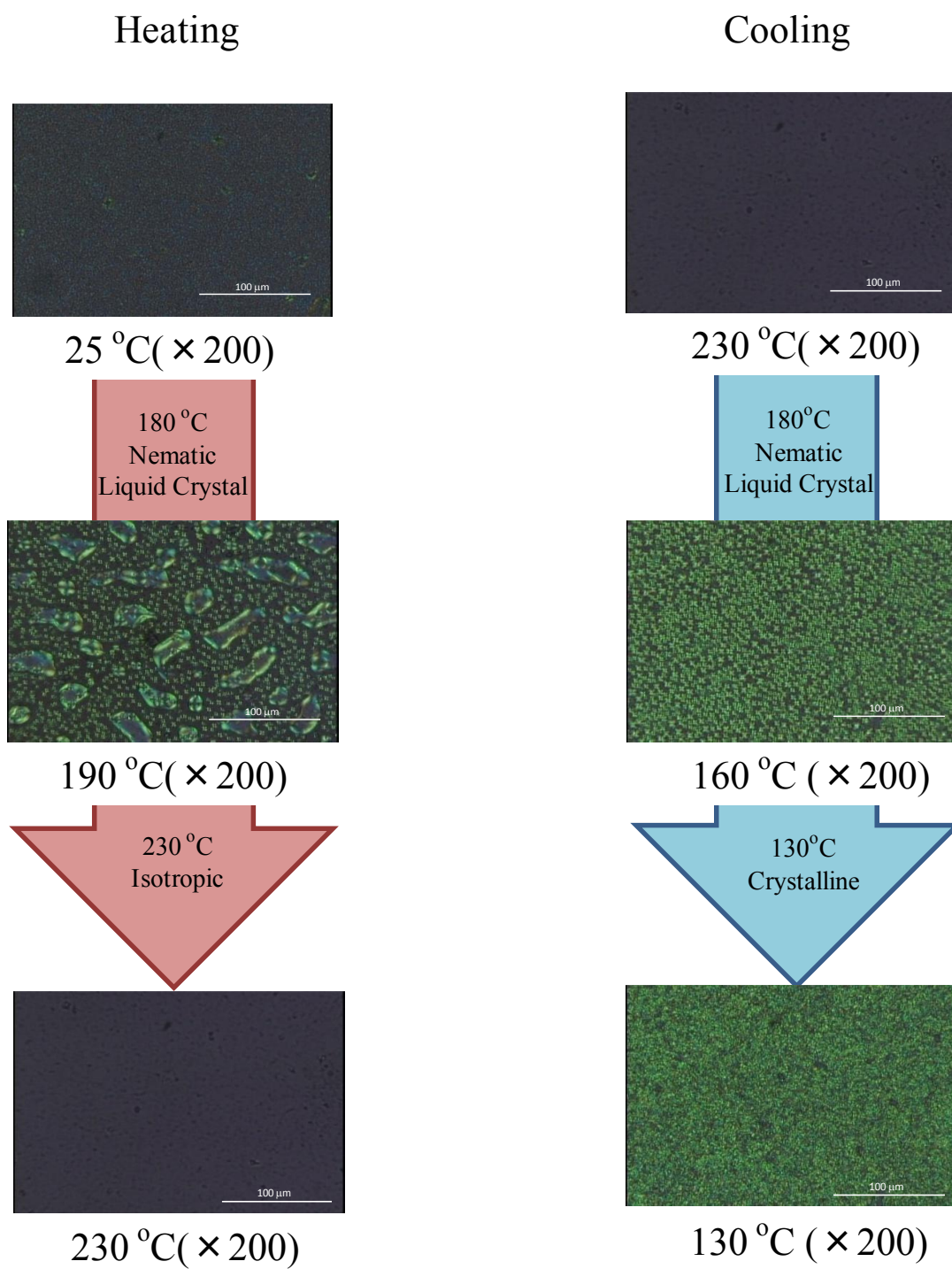
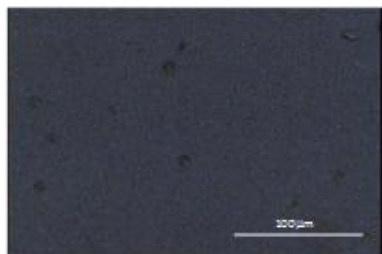
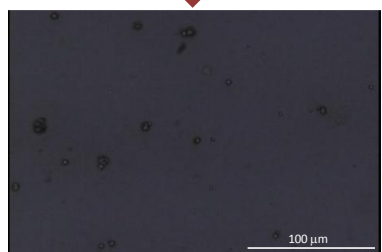
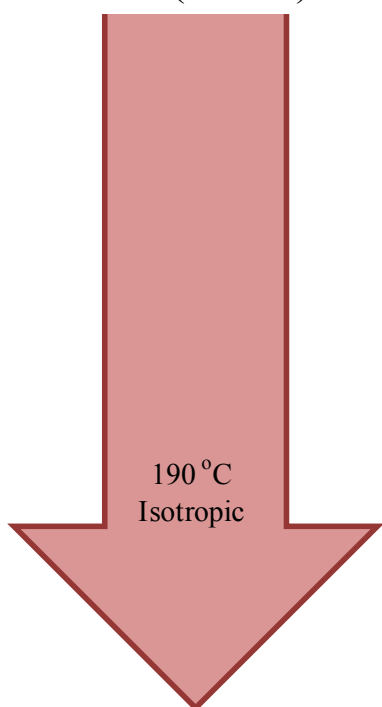


Fig. 4.3.9 Polarization microscope images of T-CBOA before photocrosslinking.

Heating

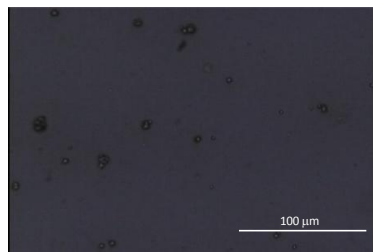


25 °C (× 200)

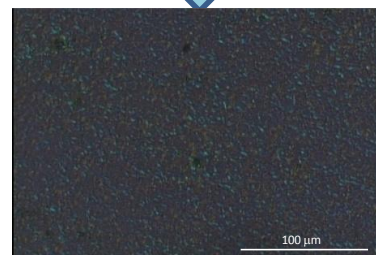
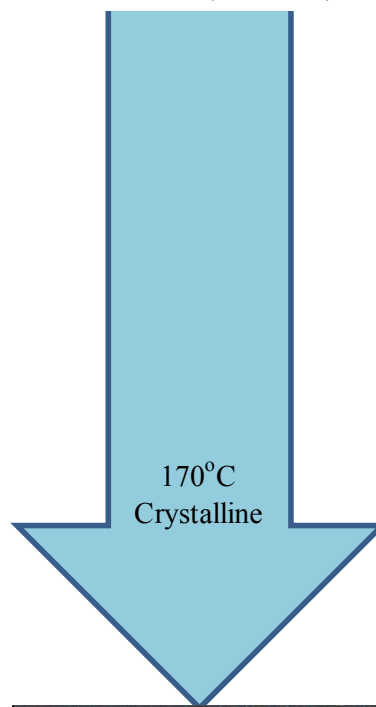


190 °C (× 200)

Cooling



190 °C (× 200)



170 °C (× 200)

Fig. 4.3.10 Polarization microscope images of T-CBOA after photocrosslinking.

4.3.4 T-CBOA の熱物性評価

トレハロース、CBOA、UV 照射前の T-CBOA、UV 照射後の T-CBOA に対して、TGA 測定を行った。TGA 測定によって得られた温度と重量変化の関係を Fig. 4.3.11 に示し、重量 5% 減少における分解温度(T_d)を Table 4.3.6 に示す。

Fig. 4.3.7 および Table 4.3.6 より、T-CBOA を反応前のものと比較すると、 T_d が増加している。これは、トレハロースの分解にヒドロキシ基が関与しており、これが保護されることにより T_d が高くなったものと考えられる。また、T-CBOA の光架橋前後を比較してみると、光架橋後で T_d が増加している。これは試料に対し UV 照射を行ったことで架橋し、高分子網目構造となることで分解しづらくなった可能性が考えられる。

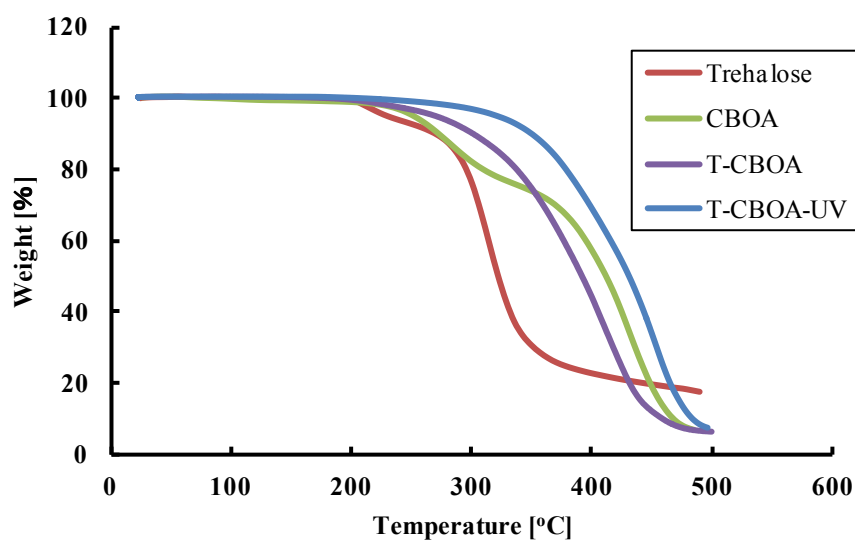






Fig. 4.3.11 TGA curves of trehalose, CBOA, T-CBOA before photocrosslinking and T-CBOA after photocrosslinking.

Table 4.3.6 Decomposition temperature of trehalose, CBOA, T-CBOA before photocrosslinking and T-CBOA after photocrosslinking.

	Sample	T_d [°C]* ¹
	Trehalose, 2H ₂ O	229 °C
	CBOA	253 °C
	T-CBOA	267 °C
	T-CBOA-UV	319 °C

*¹ T_d , 5% weight loss temperature

UV 照射前の T-CBOA および 180 s UV 照射後の T-CBOA(T-CBOA-UV)に対して、DSC 測定を行った。UV 照射前の T-CBOA および UV 照射後の T-CBOA の第一降温および第二昇温での DSC 測定結果を Fig. 4.3.12 および Fig. 4.3.13 に示し、DSC 測定より求めた T-CBOA および UV 照射後の T-CBOA の結晶 \leftrightarrow ネマティック液晶転移温度($T_{C\leftrightarrow N}$)およびネマティック液晶 \leftrightarrow 等方液体転移温度($T_{N\leftrightarrow I}$)を Table 4.3.7 および Table 4.3.8 にそれぞれ示す。

Fig. 4.3.12、Fig. 4.3.13 より、UV 照射前のグラフを見てみると各ピークが若干ブロードであった。これは T-CBOA では置換度の異なるものが混在しており、転移の温度領域が明確でないためと考えられる。

次に Table 4.3.7 より、まず UV 照射前の T-CBOA の $T_{C\leftrightarrow N}$ は、昇温時では 130-140°C であり、降温時では 113-119°C であった。また $T_{N\leftrightarrow I}$ は、昇温時では 188-202°C であり、降温時では 148-160°C であった。また Table 4.3.8 より、UV 照射後の T-CBOA の $T_{C\leftrightarrow N}$ は、昇温時では 126-142°C であり、降温時では 114-120°C であった。また $T_{N\leftrightarrow I}$ は、昇温時では 187-205°C であり、降温時では 114-120°C であった。ピークが UV 照射前とほぼ同じ温度で見られているのは、DSC 用に用意したサンプルは厚みがあり、UV 光が下部まで十分に透過しなかった可能性も考えられる。

また、前述の 4.3.3 の偏光顕微鏡観察の結果と比べてみると、UV 照射前の T-CBOA では、昇温時、降温時ともに結晶-ネマティック相とネマティック相-等方液体が観察された転移温度より 20-30°C 程低い温度領域でピークが観察された。理由は不明であるが、DSC では密封された空間で熱がより伝わりやすいのに対し、偏光顕微鏡上ではサンプルが空気と接しており、また、熱源とはカバーガラスを介して接触しているため、温度勾配が生じ、サンプル温度と熱源の温度に差が生じた可能性が考えられる。UV 照射後の T-CBOA では、偏光顕微鏡で見られなかった転移が、DSC では照射前同様に観察された。前述のとおり、光照射が完全でなかったか、あるいは、顕微鏡で観察できないマイクロな領域で分子が液晶同様の挙動を取っている可能性が考えられる。

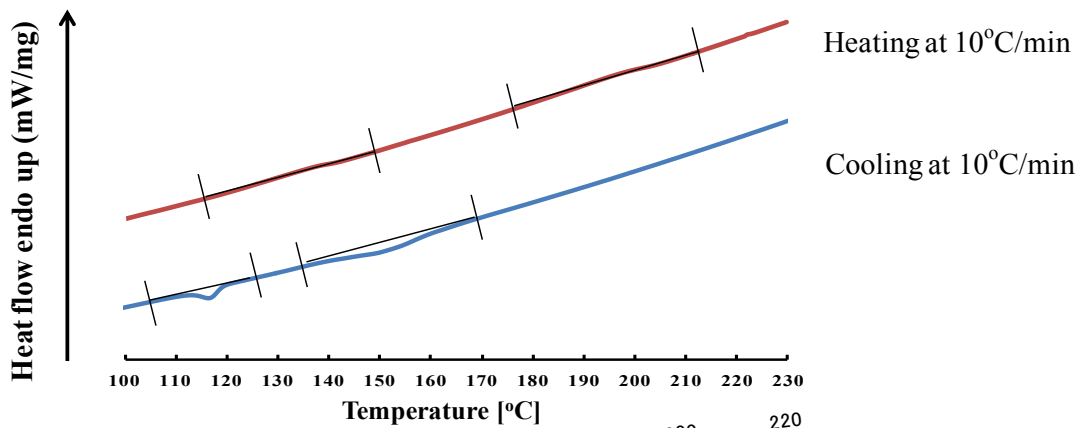


Fig. 4.3.12 DSC curves of T-CBOA before photocrosslinking.

Table 4.3.7 Transition temperature of T-CBOA before photocrosslinking.

Sample	$T_{C \leftrightarrow N}$ [°C]	$T_{N \leftrightarrow I}$ [°C]
T-CBOA on heating	130-140	188-202
T-CBOA on cooling	113-119	148 -160

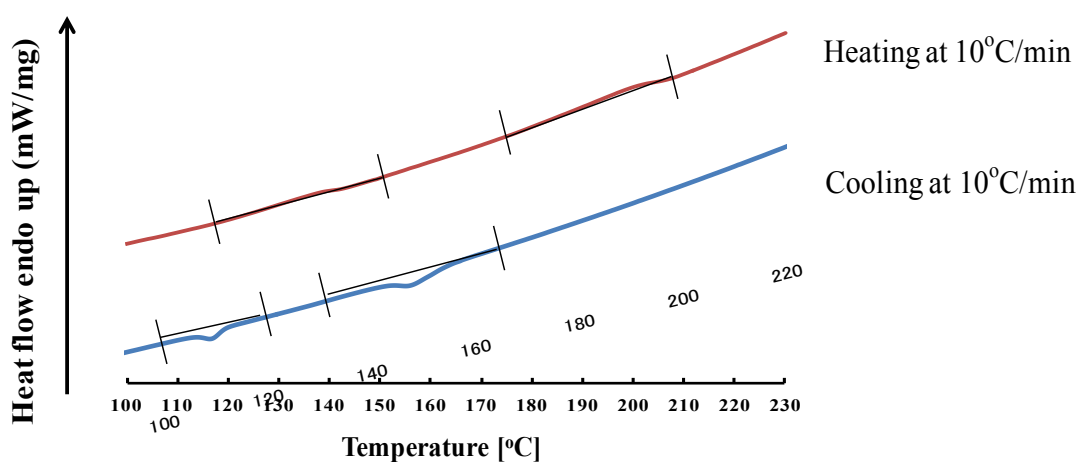


Fig. 4.3.13 DSC curves of T-CBOA after photocrosslinking.

Table 4.3.8 Transition temperature of T-CBOA after photocrosslinking.

Sample	$T_{C \leftrightarrow N}$ [°C]	$T_{N \leftrightarrow I}$ [°C]
T-CBOA-UV on heating	126-142	187-205
T-CBOA-UV on cooling	114-120	151-165

4.3.5 FE-SEMによるT-CBOA薄膜の観察

前述した4.2.6と同様の条件でカバーガラス上にディップコートを行い、作製したT-CBOA薄膜(光架橋前、光架橋後)の表面のFE-SEM観察を行った。光架橋前、および光架橋後の観察結果をFig. 4.3.14、Fig. 4.3.15に示す。

Fig. 4.3.14、Fig. 4.3.15より、光架橋前では滑らかで均一な薄膜となっていた。しかし、光架橋後の薄膜では表面に5 μm 程度の筋のようなものが存在していた。これは、加熱時の光架橋によって液晶ドメインが固定され、冷却時にそのドメインと他のドメインの間で収縮率の差が生じ、発生したクラックではないかと考えている。

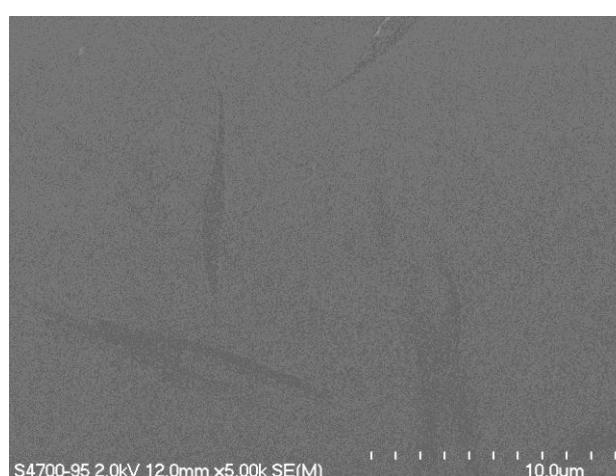


Fig. 4.3.14 FE-SEM observation of T-CBOA film before photocrosslinking.

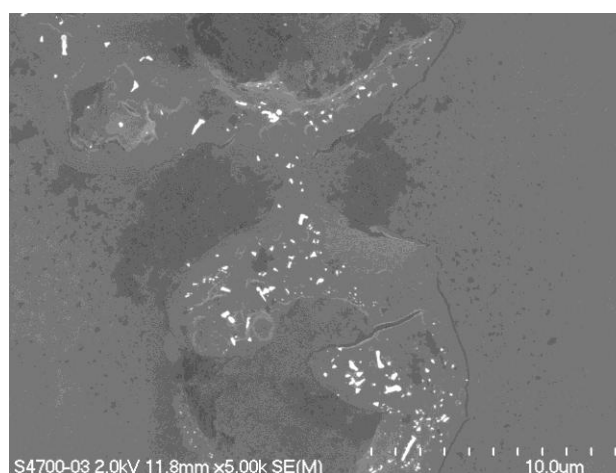


Fig. 4.3.15 FE-SEM observation of T-CBOA film after photocrosslinking.

4.3.5 T-CBOA 薄膜の接触角測定

ガラス基板上に T-CBOA 薄膜を作製し、薄膜表面の濡れ性(親水性、疎水性)を接触角測定により調査した。

細胞培養用ポリスチレン(PS) well plate、購入したままの未洗浄ガラス基板、洗浄処理を行ったガラス基板、UV 照射前の T-CBOA 薄膜および UV 照射後の T-CBOA 薄膜について、Fig. 4.3.16 に接触角値を示し、Fig. 4.3.17 に接触角測定における各試料上での水滴の様子を写真で示す。

Fig. 4.3.16、Fig. 4.3.17 において接触角の値は PS well plate 上で 46.0° ($\pm 0.6^{\circ}$)、購入したそのままのガラス基板で 57.9° ($\pm 3.1^{\circ}$)、洗浄処理を行ったガラス基板で 14.7° ($\pm 1.1^{\circ}$)、UV 照射前の T-CBOA で 69.9° ($\pm 9.4^{\circ}$)、UV 照射後の T-CBOA で 87.4° ($\pm 2.2^{\circ}$)であった。

購入したガラスは洗浄することにより表面が親水性になり接触角の値が大きく減少している。これにより購入時の表面に付着していた有機物が洗浄されていることが分かった。また T-CBOA の UV 照射後では照射前より表面の疎水性が増加している。これは、UV 照射による二量化反応時に、分子の可動性が高まり、ガラス側に親水性基が集まり、空気に接触する側に疎水性基が集まった可能性が考えられる。

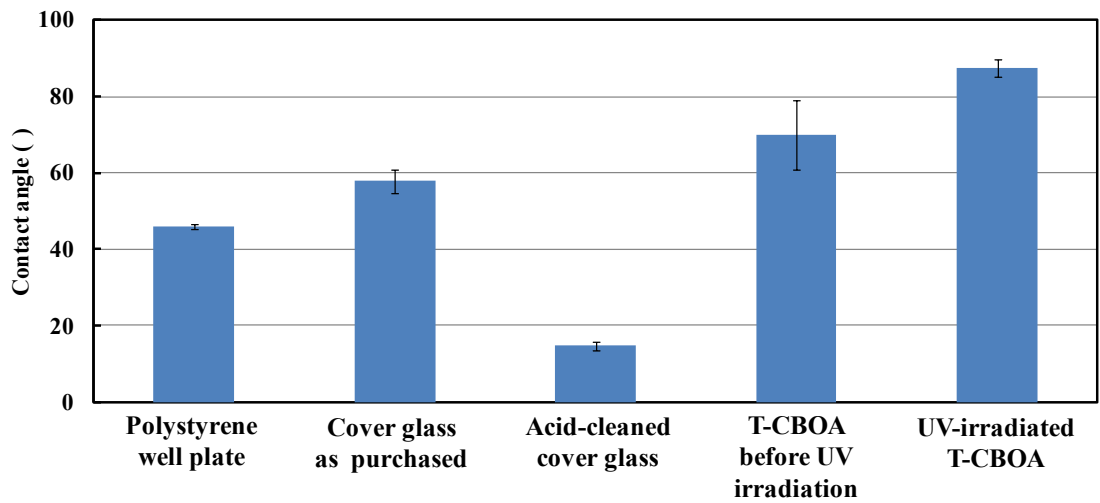


Fig. 4.3.16 Contact angles of the T-CBOA films.

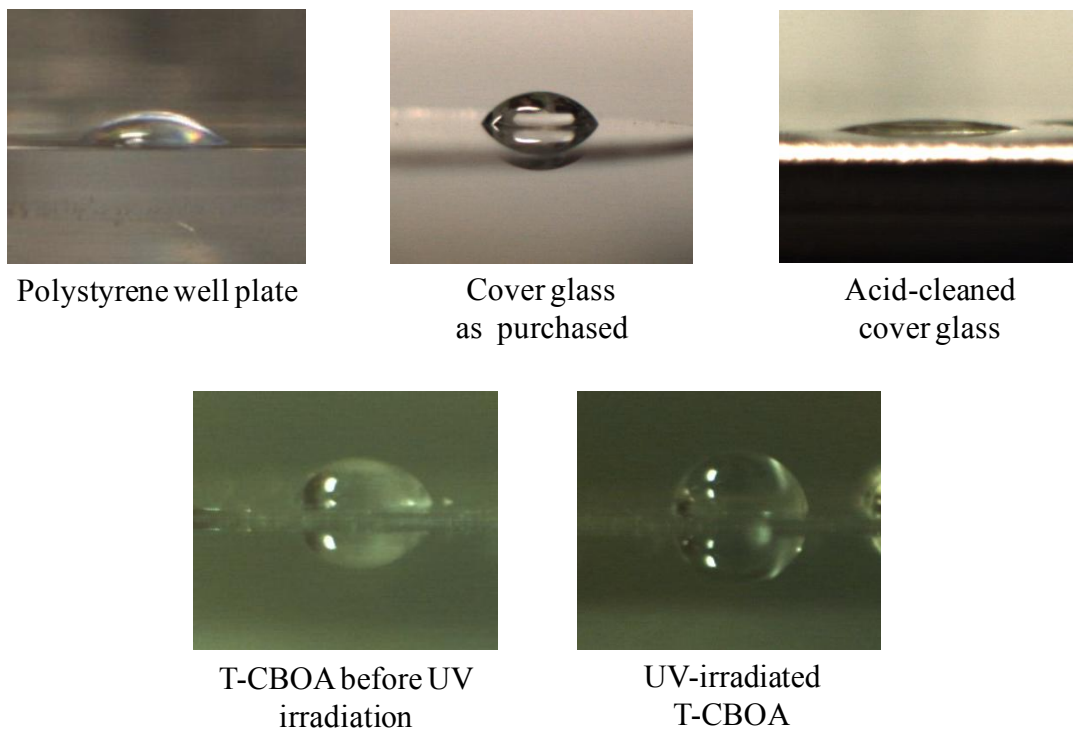


Fig. 4.3.17 Photographs of water droplets on the T-CBOA films.

4.3.6 T-CBOA 薄膜を用いた細胞適合性評価

Polystyrene well plate 上(PS well)、洗浄処理を行ったガラス基板(glass)および UV 照射後の T-CBOA 薄膜(T-CBOA-UV)を用いて線維芽細胞の *in vitro* 細胞増殖試験を行った。

位相差顕微鏡による細胞の観察結果として、細胞培養 3 時間後のものを Fig. 4.3.18、5 日後のものを Fig. 4.3.19、7 日後のものを Fig. 4.3.20 に示す。

Fig. 4.3.18 において細胞培養 3 時間後ではいずれの試料においても接着した細胞に差は見られなかった。Fig. 4.3.19 において培養 5 日後では (b)glass の細胞接着数が少なく、(a)well、(c)T-CBOA-UV では多くの接着細胞が見られた。また、(c)T-CBOA-UV において線維芽細胞が部分的に他のサンプルとは異なる形態に変化しており、より細長く伸展した形となって接着していた。第 3 章での結果と関連させて考察すると、Fig. 4.3.13 で見られるように、マイクロスケールの液晶分子が自己集積している領域が全面に存在しており、細胞が好んで接着する領域が限定されることで、このような形態になったと考えられる。また、この細胞増殖の異方性は FE-SEM で観察された薄膜表面上のクラックが関与している可能性もある。Fig. 4.3.20 において培養 7 日後においても(b)glass 以外の試料で高い細胞増殖性が見られた。一方で細胞数が非常に多くなり、(a)PS well と(c)T-CBOA-UV の差があまり見られなくなった。

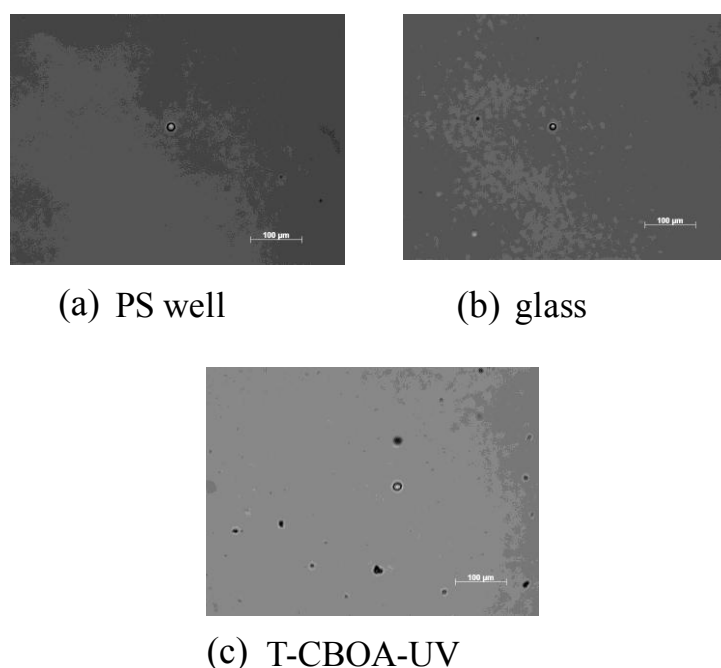
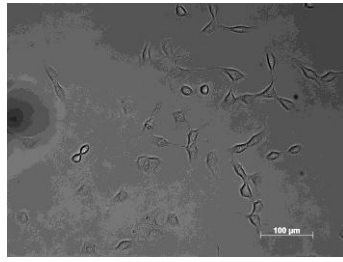
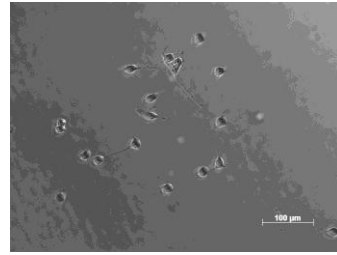


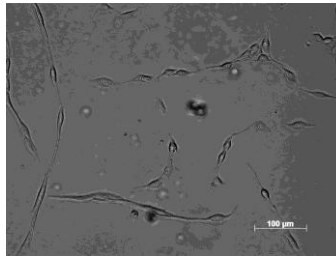
Fig. 4.3.18 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 3 h culture on (a)PS well, (b)glass, (c) T-CBOA after UV irradiation.



(a) PS well

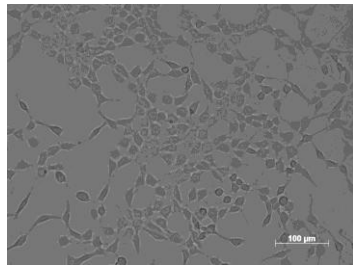


(b) glass

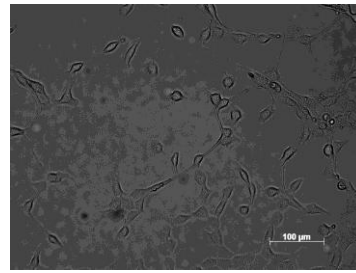


(c) T-CBOA-UV

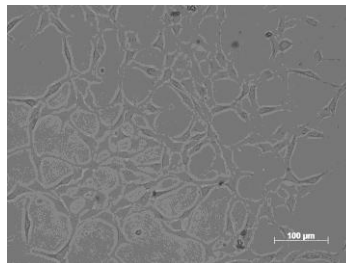
Fig. 4.3.19 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 5 d culture on (a)PS well, (b)glass, (c) T-CBOA after UV irradiation.



(a) PS well



(b) glass



(c) T-CBOA-UV

Fig. 4.3.20 Phase contrast microscope images of 3T3 Swiss Albino cells after 7 d culture on (a)PS well, (b)glass, (c) T-CBOA after UV irradiation.

各試料上で細胞培養を行い、血球計算板を用いて接着細胞数の測定を行った。その結果を Fig. 4.3.21 に示す。また接着した細胞のうち死細胞の数を Fig. 4.3.22 に示す。

Fig. 4.3.21 においてすべての試料上で培養日数の増加とともに細胞の増殖が確認された。それぞれを比較してみると、細胞培養 3 時間、1 日後では PS well plate および各試料において接着した細胞に差はなかったが、培養 3 日、5 日後では glass の細胞接着数がわずかに少なく、PS well plate、T-CBOA-UV 上はほぼ同じ値の接着数となった。また、培養 7 日後においても同様の傾向になっていた。

Fig. 4.3.22 において死細胞に関しては培養期間によらず、ほとんど確認されなかった。このことから各試料に細胞毒性がないことが示唆される。

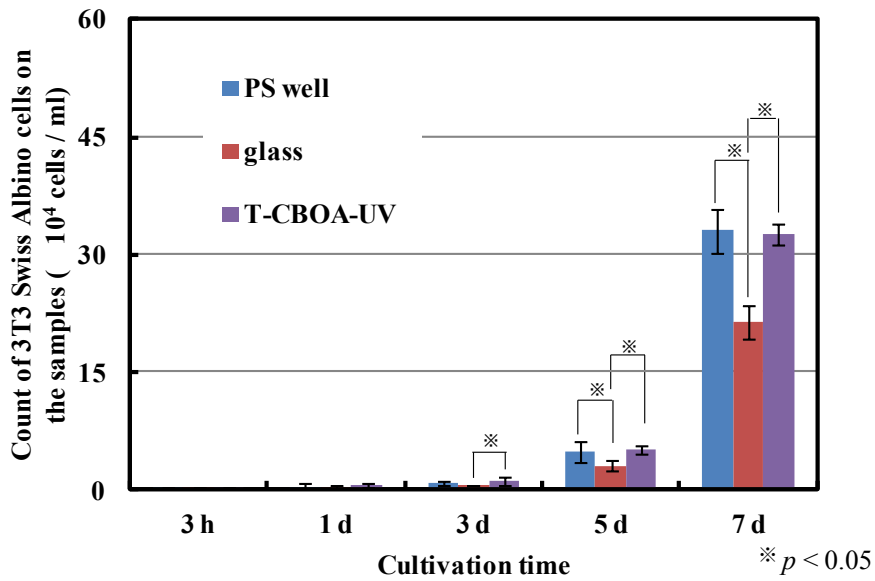


Fig. 4.3.21 Cell proliferation determined by counting of live cells adhered on PS well, glass and UV-irradiated T-CBOA.

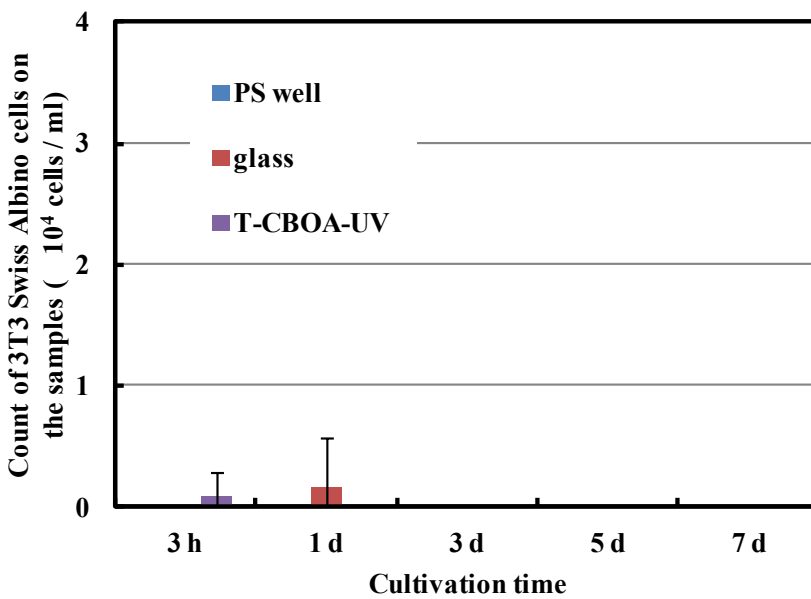


Fig. 4.3.22 Cell proliferation determined by counting of dead cells on PS well, glass and UV-irradiated T-CBOA.

PS well plate 上および各試料上で行った MTT 試験の結果を Fig. 4.3.23 に示す。

Fig. 4.3.23 において PS well 上およびすべての試料上で日数の増加とともに細胞の増殖が確認された。血球計算板による細胞数測定と同様に細胞培養 3 時間、1 日後では PS well plate および各試料において接着した細胞に差はなかったが、培養 3 日、5 日後では glass の接着細胞数がわずかに少なく、PS well、TC-HBPHA-UV 上はほぼ同様に細胞増殖していた。培養 7 日後において T-CBOA-UV より、PS well 上の細胞数がわずかに多くなっていた。これは T-CBOA-UV 上では、ほぼ全面に存在する液晶ドメインの影響で細胞が好んで接着できる箇所が限定されるため接着細胞数が少なくなっているものと考えられる。

これらの結果より、T-CBOA に細胞毒性はなく、細胞に対してある程度の適合性を有すると考えられる。

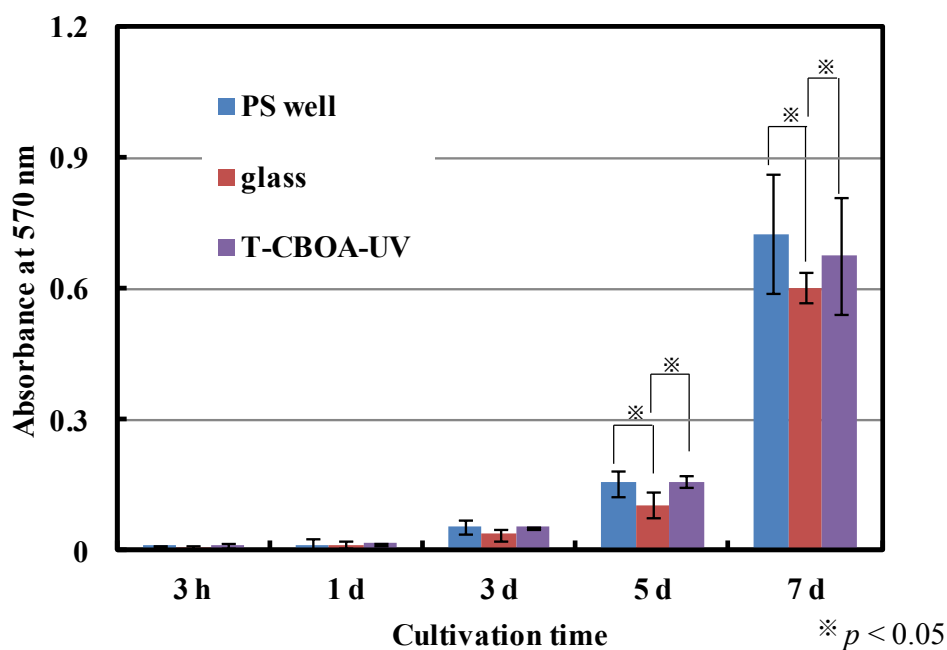


Fig. 4.3.23 Cell proliferation measured by MTT test on PS well, glass and UV-irradiated T-CBOA.

4.4 結論

本研究では、トレハロースに 8-(4'-(シナモイルオキシ)-1,1'-ビフェニル-4-イル)オキシ-8-オキソオクタン酸(CBOA)を反応させることで、光反応性メソゲン基を有するトレハロース誘導体を合成し、薄膜を作製した。その薄膜に対し、偏光顕微鏡による液晶性の観察および UV 光の照射によるフィルム特性の変化について調べ、さらに細胞親和性の評価および細胞挙動の観察を行った。

まず、CBOA の前駆体として桂皮酸クロリドおよび 4,4'-ビフェニルジオールを反応し 4-(シナモイルオキシ)ビフェニル-4'-オール(CB)を合成した。FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ 測定により構造解析を行った。その後 CB およびスベリン酸クロリドを反応し CBOA を合成した。FT-IR、 $^1\text{H-NMR}$ 測定により構造解析を行った。その結果 CBOA の合成を確認した。そしてトレハロースおよび CBOA を反応し T-CBOA を合成した。FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ 測定により構造解析を行った。その結果 T-CBOA における CBOA の置換度は 6.9 となった。また、熱分析として TGA および DSC を行った。

T-CBOA をクロロホルムに溶解させた試料溶液を用いて、キャスト法により石英板上に薄膜を作製した。この薄膜に所定時間 UV 照射を行い、紫外可視吸収スペクトル測定より吸収スペクトルの時間変化を調査した。吸収スペクトルでは 260 nm に最も強い吸収がみられ、UV 光を照射すると、薄膜の透明性が増し、さらに照射を続けると 280 nm 付近の吸収の減少が見られた。さらに、UV 照射による FT-IR スペクトルの変化を調査した。これらの結果より光二量化反応が進行していることが分かった。

T-CBOA をクロロホルムに溶解させた試料溶液を用いて、ガラス基板上にキャスト法により薄膜を作製した。偏光顕微鏡観察により UV 照射前後の比較を行った。偏光顕微鏡観察では UV 照射前において全体的に液晶相が見られたが、UV 照射後では温度変化による液晶相は確認できなかった。しかし、UV 照射後において、おそらく液晶分子が集積してそのまま固定されたと考えられるマイクロスケールのドメインが多数観察された。

細胞培養試験用に T-CBOA をクロロホルムに溶解させた試料溶液を用いて、ディップコーターによりカバーガラス上に T-CBOA を塗布し、180 s 間 UV 照射を行い薄膜を作製した。PS well plate 上、カバーガラスおよび作製した UV 照射後の T-CBOA の薄膜を用いて線維芽細胞の細胞増殖試験を行った。細胞観察では接着 5 日目の UV 照射後の T-CBOA 薄膜上で線維芽細胞が他のサンプルとは異なり細長く伸展した形態となっていた。これはメソゲン基が自己集積しているマイクロスケールのドメインが全面に存在しているため、細胞が好んで接着する領域が限定されることでこのような形態になったと考えている。また、血球計算板を用いた細胞数測定、MTT 試験により細胞の増殖が確認できた。PS well 上、UV 照射後の T-CBOA 上において細胞数が増加していた。また死細胞はほとんど確認されなかったため各試料に細胞毒性はなく、T-CBOA は細胞に対して適合性があると考えられる。

4.5 参考文献

- 1) Kawatsuki, N et al., *Macromolecules*, **35**, 706-713 (2002)
- 2) Zhou, C et al., *Biomaterials*, **20**, 2093-2099 (1999)
- 3) Li, L et al., *Biomaterials*, **22**, 2595–2599 (2001)
- 4) Shih, M-F *Int. J. Pharm.*, **327**, 117–125 (2006)
- 5) Hwang, JJ et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 9662–9667 (2002)
- 6) Penner, TL et al, *Macromolecules*, **24**, 1041-1049 (1991)
- 7) 堀尾武一, 分子細胞生物学基礎実験法(改訂第2版), 南江堂 (2004)
- 8) 豊島久眞男, 山本雅、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール, 秀潤社 (1991)
- 9) 井出利憲, 細胞培養入門ノート, 羊土社, 54 (1999)
- 10) 柳井久江, エクセル統計, オーエムエス出版, 84-93 (2008)
- 11) 株式会社エキシマ <http://excimer.co.jp>

総括

近年、病気や事故により機能不全に陥った組織や、その機能を再生する再生医療が考えられている。再生医療に用いられる生体材料において、材料表面の性質が重要であり、材料表面をコーティングするための新規素材の開発が進められている。そこで、光反応性基が材料の最表面層の物性制御および架橋による材料の安定化により注目されている。中でも天然物由来である桂皮酸およびその誘導体は、紫外光(UV)照射により二量化し、分子間で結合することが知られている。この性質により、材料表面上で安定な架橋薄膜を容易に作製できるという利点があるが、一方で桂皮酸誘導体の光架橋生成物に関しては表面にシンナモイル基が高密度で存在する状態での毒性や細胞適合性がこれまで研究されていない。さらに、桂皮酸誘導体と液晶を組み合わせた材料が光配向性材料として注目されているが、このような材料の細胞適合性に関しても、これまでほとんど研究がなされていない。本研究では、多数のヒドロキシ基を有し、一つの分子に多数の官能基を持つ化合物の原料として注目されている糖類を用いて、シンナモイル基およびメソゲン基を結合した新規化合物を合成した。そして、その架橋薄膜を用いて細胞試験を行った。

第1章では、細胞や臓器の保存溶液として用いられるトレハロースと桂皮酸クロリドを、異なるモル比で混合しトレハロース桂皮酸エステル(TC)を合成し、薄膜を作製した。その薄膜に対して所定時間 UV の照射($\lambda \geq 280 \text{ nm}$)を行い、UV-Vis により UV 吸収スペクトルの時間依存性の測定を行った。照射時間が増加するにつれて 283 nm に極大を有する吸収が減少したことから、UV 照射によるシンナモイル基の光反応が進行していることが確認できた。置換度の異なる二種 TC の架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、細胞数計測および MTT 試験より、いずれの薄膜上においても接着細胞数の経時的な増加が見られ、置換度の高い TC において、接着細胞数が多いことが分かった。これより、TC 薄膜に毒性はなく、シンナモイル基が多く置換している薄膜上でより増殖しやすい傾向にあることを明らかにした。

第2章では、TC において見られた良好な細胞適合性がシンナモイル基かその二量体に起因するのかを調査するため、グルコースユニットを含む糖類で架橋無しでも薄膜が作製できる HPC を用いて桂皮酸エステルを合成し、UV 照射前、照射後の薄膜上での細胞培養を行った。まず、仕込み比を変えて HPC と桂皮酸クロリドを反応し、異なる置換度を有する HPC 桂皮酸エステル(HPC-C)を合成した後、薄膜をそれぞれ作製した。その薄膜に対して所定時間 UV を照射し、UV 吸収スペクトルより、283 nm に極大を有する吸収の減少を確認したことから、HPC-C の光反応が進行していることが分かった。また、置換度の異なる各 HPC-C の薄膜およびその架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、細胞数計測および MTT 試験より、いずれの薄膜上においても接着細胞数の経時的な増加が見られた。HPC-C においても TC と同様に、置換度が最も高い HPC-C において、接着細胞数が多く、UV 照射後においてより増殖しやすい傾向にあることが分かった。これより、接着細胞数の増加はシンナモイル基の二量体が起因する可能性があることが分かった。

第 3 章では、シンナモイル基とメソゲン基を異なる位置に結合したトレハロース誘導体を合成して、その薄膜上での細胞挙動の観察を行った。部分的にシンナモイル基を結合したトレハロース誘導体とメソゲン基として 4-(4-ヘキシルオキシベンゾイルオキシ)フェノキシ-6-オキソヘキサン酸(HBPHA)を反応し、メソゲン基含有光反応性トレハロース誘導体(TC-HBPHA)を合成した後、薄膜を作製した。その薄膜に対して所定時間 UV を照射し、UV-Vis より、シンナモイル基の二量化と同時にわずかに異性化が起こっていることが示唆された。UV 照射前の TC-HBPHA について、温度を変化させて偏光顕微鏡による観察を行ったところ、部分的な液晶相が確認された。UV 照射後の TC-HBPHA-UV では、液晶の流動性が減少しているものの、UV 照射前と近い温度範囲で部分的な液晶相が確認された。TC-HBPHA の架橋薄膜上で細胞培養を行った結果、接着 5 日目において、部分的に細胞が分布し、少し細長く揃って並ぶ傾向が観察された。

第 4 章では、トレハロースに光反応性のメソゲン基である 8-(4'-(シンナモイルオキシ)-1,1'-ビフェニル-4-イル)オキシ-8-オキソオクタン酸(CBOA)を反応させたトレハロース誘導体(T-CBOA)を合成し、薄膜を作製した。その薄膜に対して所定時間 UV を照射し、UV 吸収スペクトルの変化より、光二量化が進行していることを確認した。偏光顕微鏡にて温度変化の観察を行ったところ、UV 照射前は全体的な液晶相が確認された。UV 照射後の T-CBOA-UV では、流動性がなくなり、液晶相が見られなかった。T-CBOA の架橋薄膜上で細胞培養を行ったところ、細胞が細長く伸展し接着しているのが観察された。このような細胞の細長い伸展は、繊維上の材料や微細パターン化された材料で見られることが多いが、本研究のように、均一な塗布と均一な光照射によって得られる材料を用いた例では、報告例がなく、新しい発見である。

第 1 章から第 4 章までを通して考察すると、第 1 章、第 2 章においてシンナモイル基が一つの分子に密集している光架橋薄膜においてより細胞の接着・増殖が見られた。光架橋トレハロース誘導体の接触角測定より、最も疎水性の高かった薄膜は TC8-UV であり、次にメソゲンの含まれている T-CBOA-UV、TC-HBPHA-UV となっている。細胞の増殖が最も増えているのは TC8-UV、次に TC-HBPHA-UV、そして T-CBOA-UV である。TC8-UV の接触角は 101° であり、一般に細胞接着が起こりやすい接触角の範囲($53^\circ \sim 91^\circ$)を超えている。TC8-UV 薄膜の接触角が非常に大きいにもかかわらず、細胞が最も増加した要因として二つの可能性を考えている。一つ目はシンナモイル基に対し、何らかの分子認識が起こり、接着に関わる何らかのタンパク質が特異的に結合して細胞接着しやすい環境になっていること、二つ目は薄膜表面の接触角は高くなっていたが、それが SEM のスケールでは観察されない凹凸によるもので本来の疎水性を示すものではないということである。次に、メソゲンが含まれているものに関して、第 3 章の結果より、ベンゼン環の連なった構造を有するメソゲン基は細胞が接着しづらく、TC-HBPHA-UV において見られた接着もシンナモイル基の要因が大きいのではないかと考えられる。T-CBOA-UV ではシンナモイル基とメソゲン基が結合したものだが、シンナモイルの効果よりメソゲン基の特性が強く、接着しづらい環境になっている可能性を考

えている。また、T-CBOA-UV における細胞の接着および伸展に関しては、高い密度で存在するメソゲンの自己集積ドメインにより SEM でも観察された凹凸が発生し、その凹凸を細胞が認識して、少ない吸着タンパク質で接着した可能性を考えている。これらの問題を調査するにあたり、将来的に各薄膜上で培養した細胞に対して逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により細胞のメッセンジャーRNA(mRNA)の発現量の定量を行う方法を考えている。これより薄膜表面のシンナモイル基およびその二量体に対して特定のタンパク質が合成されるかどうかを調査することで、何らかの分子認識が起こっているのか、もしくはそれ以外の要因なのかを明らかにしていきたい。

以上、シンナモイル基を有するトレハロース、HPC 誘導体の架橋薄膜を用いた細胞培養より、シンナモイル基の二量体が多く存在する表面において良好な細胞接着性が見られ、トレハロース骨格の誘導体にメソゲン基を導入した場合には、架橋薄膜上にて細胞の形態が変化することが明らかとなった。本材料はいずれも細胞毒性を示さず、新規な生体材料への応用が期待される。将来的に、シンナモイル基への接着・増殖の要因を調査し、液晶と組み合わせた光配向材料の作製および、それを利用した細胞の配向性を目指して行くことで、筋肉や神経組織の足場材料に利用できるような材料になることが期待される。

研究業績

[学位論文を構成する有審査論文]

(1) Shinya Yano, Naozumi Teramoto, Rikako Miyamoto, Eiichi Nakajima, Kazuaki Hashimoto and Mitsuhiro Shibata; “Fibroblast cell proliferation on photo-cured trehalose cinnamoyl ester thin films”, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **30(1)**, 87-98 (2015.1)

(2) Shinya Yano, Naozumi Teramoto, Toshiaki Shimasaki and Mitsuhiro Shibata; “Photocrosslinkable Trehalose Derivatives Carrying Mesogenic Groups: Synthesis, Characterization, and in Vitro Evaluation for Fibroblast Attachment”, *Journal of Functional Biomaterials*, **7(3)**, No. 24 (2016.9)

[副論文]

(1) Shinya Yano, Megumi Mori, Naozumi Teramoto, Makoto Iisaka, Natsumi Suzuki, Masanari Noto, Yasuko Kaimoto, Masashi Kakimoto, Michio Yamada, Eri Shiratsuchi, Toshiaki Shimasaki and Mitsuhiro Shibata; “Preparation of Photocrosslinked Fish Elastin Polypeptide/Microfibrillated Cellulose Composite Gels with Elastic Properties for Biomaterial Applications”, *Marine Drugs*, **13(1)**, 338-353 (2015.1)

[国際会議発表(3件)]

(1) Shinya Yano, Naozumi Teramoto, Toshiaki Shimasaki and Mitsuhiro Shibata, “Cell culture study on photocrosslinked trehalose derivatives containing mesogenic groups”, The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, JAPAN (2016.12).

(2) Takumi Iwase, Shinya Yano, Naozumi Teramoto, Toshiaki Shimasaki and Mitsuhiro Shibata, “Synthesis and cell compatibility of photocrosslinked hydroxypropyl cellulose cinnamates”, The 11th SPSJ International Polymer Conference (IPC2016), Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, JAPAN (2016.12).

(3) Shinya Yano, Naozumi Teramoto, Toshiaki Shimasaki and Mitsuhiro Shibata, “Preparation and biocompatibility of photocrosslinked trehalose derivatives containing mesogenic groups”, 11th International Gel Symposium (GEL SYMPO 2017), Nihon University, Chiba, JAPAN (2017.3).

[国内学会発表(8件)]

(1) 矢野慎也, 中島栄一, 寺本直純, 宮本吏佳子, 島崎俊明, 橋本和明, 柴田充弘, 「トレハロース桂皮酸エステルの光架橋により得られる薄膜上での細胞培養」, 公益社団法人 高分子学会 第21回ポリマー材料フォーラム, 福岡 (2012.11)

(2) 矢野慎也, 寺本直純, 松本純一, 島崎俊明, 柴田充弘, 「メソゲン基とシンナモイル基を有するトレハロース誘導体の合成および光架橋」, 公益社団法人 高分子学会 第22回ポリマー材料フォーラム, 東京 (2013.11)

(3) 矢野慎也, 寺本直純, 島崎俊明, 柴田充弘, 「液晶性メソゲンとシンナモイル基を有するトレハロース誘導体の光架橋および細胞適合性」, 公益社団法人 高分子学会 第23回ポリマー材料フォーラム, 奈良 (2014.11)

(4) 矢野慎也, 寺本直純, 島崎俊明, 柴田充弘, 「光架橋性メソゲン含有トレハロース誘導体の合成および光配向」, 公益社団法人 高分子学会 関東支部千葉支部 高分子若手会 第32回千葉地域活動若手セミナー, 千葉 (2015.3)

- (5) 矢野慎也, 寺本直純, 島崎俊明, 柴田充弘,「液晶性を有する光反応性トレハロース誘導体の光架橋および細胞適合性」, 公益社団法人 高分子学会 第 64 回高分子討論会、宮城 (2015.9)
- (6) 渡辺宇, 矢野慎也, 寺本直純, 島崎俊明, 柴田充弘,「多価アクリレート化合物とジアミノトレハロースの反応によるポリアミン化合物の合成」, 公益社団法人 高分子学会 第 64 回高分子討論会、宮城 (2015.9)
- (7) 岩瀬巧, 矢野慎也, 寺本直純, 島崎俊明, 柴田充弘,「シナモイル基修飾ヒドロキシプロピルセルロースの合成と光架橋および細胞適合性」, 公益社団法人 高分子学会 第 64 回高分子討論会、宮城 (2015.9)
- (8) 矢野慎也, 寺本直純, 島崎俊明, 柴田充弘,「シナモイル基を有するトレハロース誘導体の光機能性材料への応用」, 公益社団法人 高分子学会 第 24 回ポリマー材料フォーラム、東京 (2015.11)

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始適切なご指導、ご鞭撻を賜りました寺本直純准教授、柴田充弘教授、島崎俊明准教授に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。本論文をまとめるにあたり、ご指導いただいた橋本和明教授、筑紫格教授、柴田裕史准教授に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、本研究にご協力いただきました、朝倉剛氏、中島栄一氏、板倉慧氏、古橋侑奈氏、松本純一氏、三浦颯太氏、渡辺宇氏、飯坂真氏、岩瀬巧氏、野戸優成氏ほか、環境有機材料化学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

FE-SEMにご協力いただきました千葉工業大学材料解析センター長の長田龍介氏に深く感謝いたします。

細胞培養にご協力いただきました千葉工業大学工学部生命環境科学科生体機能材料化学研究室の橋本和明教授、柴田裕史准教授、宮本吏佳子氏、花澤沙織氏に深く感謝いたします。