

Title	第9章 コアコロナ型ペプチドナノスフェアの機能
Author(s)	和久, 友則; 松本, 匡広; 松崎, 典弥 他
Citation	
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/50629">https://hdl.handle.net/11094/50629</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 第9章 コアコロナ型ペプチドナノスフェアの機能

和久友則\*<sup>1</sup>, 松本匡広\*<sup>2</sup>, 松崎典弥\*<sup>3</sup>, 明石 満\*<sup>4</sup>

### 1 はじめに

高分子ナノスフェアは、高い比表面積を有し、そのサイズや構造を容易に制御可能であることから、塗料や接着剤などとして一般工業分野で広く利用されてきた。特に最近では、ドラッグデリバリーシステム (DDS) 担体、医療診断薬、分離担体といった医療材料への応用が注目されている<sup>1)</sup>。このような用途に用いるためのナノスフェアを開発する上で、表面と血中や検体中に含まれるタンパク質との相互作用の制御は重要な課題のひとつである。タンパク質の材料表面への非特異的な吸着は、機能的に設計された表面の構造を損なわせるだけでなく、生体中においては免疫反応や血液凝固反応といった生体反応を引き起こし、デバイスの機能・性能の低下の原因となる。そのため、デバイスの高機能化・高性能化のために、タンパク質との相互作用が極めて小さな表面、すなわちバイオイナータな表面を持つ生分解性高分子ナノスフェアの開発が求められている。

バイオイナータな性質を材料表面に付与するための方法のひとつとして、表面をポリマーブラシにより修飾する手法が知られている<sup>2)</sup>。ポリマーブラシとは、固体表面にその一端を固定化されたグラフト鎖が、互いの重なり合いを避けるべく高さ方向に延伸した状態の分子組織を指す。中でも、 $0.05 \text{ chains/nm}^2$  以上の密度を有する『高密度ポリマーブラシ』は、非特異的なタンパク質吸着を顕著に抑制するなどの、その構造に由来した興味深い性質を有するため、幅広い分野から注目されている<sup>2a)</sup>。通常、高密度ポリマーブラシは、開始基が固定化された表面からのリビング重合により合成される。近年、この技術をシリカやポリスチレンなどのナノスフェア表面に応用することでポリマーブラシ構造を有するナノスフェアが合成されている。しかしながら、この手法により合成されるポリマーブラシは非分解性であるために、医療材料としての応用には適さない。これまでに生分解性のコアと生体適合性を有するブラシからなるナノスフェアに関する

---

\*1 Tomonori Waku 京都工芸繊維大学 大学院工芸科学研究科 生体分子工学部門 助教

\*2 Masahiro Matsumoto 大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻

\*3 Michiya Matsusaki 大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 助教

\*4 Mitsuru Akashi 大阪大学 大学院工学研究科 応用化学専攻 教授

報告例はない。

近年、著者らはポリアミノ酸の合成法である *N*-カルボキシアミノ酸無水物 (NCA) の開環重合をナノスフェア合成に用いることで、ペプチドを主成分とするコアとポリエチレングリコール (PEG) から成るコロナ層を持つ新規なコアコロナ型ペプチドナノスフェアの合成に成功した<sup>3, 4)</sup>。また、その詳細な構造解析により、コロナ層の PEG 鎖が高密度ブラシを形成していることを見出すとともに、ブラシ構造に由来するバイオ機能を明らかとした<sup>5, 6)</sup>。さらに、このブラシに外部環境応答性を付与することで、ナノスフェア表面特性のスイッチングにも成功した。本稿では、これら一連の研究についてまとめる。

### 2 コアコロナ型ペプチドナノスフェアの合成

著者らのグループでは、末端に重合性官能基を持つ親水性マクロモノマーと疎水性ビニルモノマーとを極性溶媒中で分散共重合すると、数百 nm から 1  $\mu$ m 程度の粒子径を持つコアコロナ型高分子ナノスフェアが生成することを報告している<sup>7, 8)</sup>。このコアコロナ型ナノスフェアは、重合の進行とともに生成する両親媒性グラフトコポリマーの自己秩序化により形成すると考えられている。すなわち、疎水性鎖の伸長に伴い生成ポリマーが不溶化する際、極性溶媒と親和性の高い親水性鎖を外側に向けつつ疎水性ポリマー同士が自己集合することで形成するとされている。このような形成機構のため、本法により得られるナノスフェアは、マクロモノマー由来のポリマー鎖がナノスフェア表面に集積化されたコロナ層と、重合により生成した疎水性ポリマー鎖からなるコアを持つコアコロナ型構造を有する。1985年に初めての報告を行って以来、PEG、ポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド)、ポリメタクリル酸、ポリビニルアミンなど種々の親水性ポリマー鎖がコロナ層に導入された様々なナノスフェアの合成に成功するとともに、触媒担体、集積材料素材、ウイルス捕捉担体としての機能を見出してきた<sup>9, 10)</sup>。

しかしながら、DDS 担体やイメージング材料など、特に生体内で用いるためのバイオメディカル材料へと応用するためには、生分解性および生体適合性を持つことが重要であり、ポリスチレンを基盤としたナノスフェアでは限界があった。そこで、著者らはポリアミノ酸の合成法の一つである NCA 重合法に、上述のマクロモノマー法の自己秩序化の概念を応用することで、新規な生分解性コアコロナ型ナノスフェアを開発しようと考えた。NCA 重合には、種々の第1級アミンが開始剤として用いられ、そのアミン由来の構造を末端に持つポリアミノ酸が得られる。このことを踏まえて著者らは、末端にアミノ基を有する PEG を親水性マクロイニシエーターとして用いた疎水性アミノ酸 NCA の重合により、ナノスフェアを一段階で合成できるのではないかと考えた。すなわち、マクロモノマー法の場合と同様に、この重合により生成する PEG とペプ

チドのブロックコポリマーが、疎水性ペプチド鎖の伸長に伴って溶媒に不溶化する際に、溶媒中自己秩序化し、ナノスフェアを形成するのではないかと期待した。

重合開始剤として末端にアミノ基を有する PEG 誘導体 ( $\text{H}_3\text{CO-PEG-NH}_2$ ,  $M_w=2,000$ ), 疎水性モノマーとしてフェニルアラニン NCA (Phe-NCA) をそれぞれ選択した。これらの開始剤とモノマーを混合し、水/ジメチルスルフォキシド (DMSO) 混合溶媒中  $4^\circ\text{C}$  で 24 時間重合した。反応終了後には乳白色の分散液が得られ、動的光散乱 (DLS) 測定よりナノスフェアの形成が示唆された。しかしながら、走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察したところ、凝集物が観察されたのみでナノスフェアの形成は認められなかった。以上の結果は、本法により何らかのナノスフェアは形成しているが、そのナノスフェアは SEM 観察時の乾燥状態では形態を維持することが困難な安定性の低いものであったことを示唆している。安定な疎水性コアを形成することができなかつたのは、得られたポリフェニルアラニンセグメントの重合度が低く、疎水性成分が不十分であったことが原因であると考え、重合度を上げることによる疎水性コアの安定化を検討した。しかしながら Phe-NCA の重合は不均一系であり、開始剤とモノマーの仕込み比率による分子量制御には限界があった。そこで、第 2 の開始剤として *n*-ブチルアミン (BA) を併用することで疎水性ホモポリマー (PPhe) を同時に合成し、疎水性コアを積極的に形成させることで、安定なナノスフェアを合成することができるのではないかと考えた (図 1, 図 2)。2 種類の開始剤の比率を種々変化させて Phe-NCA の重合を検討した結果、NCA : PEG : BA の比率が 12 : 1 : 1 のときに粒子径 300nm の単分散な安定なナノスフェアを形成することが明らかとなった (図 3a)。

以上の結果から、2 種類の開始剤の仕込み比により、得られるポリマーの親疎水バランスを制御することで、ペプチドナノスフェアを一段階で合成することが明らかとなった。これは、NCA 重合法を利用してナノスフェアを一段階で合成した初めての報告例である。本ペプチドナ

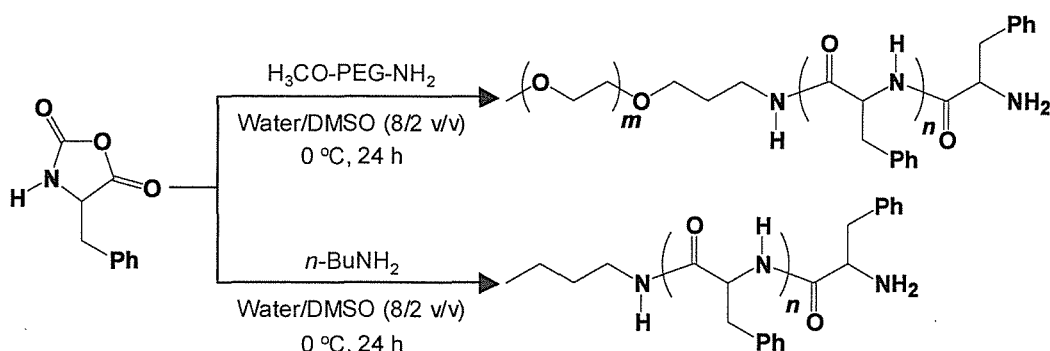


図 1 2 種類の開始剤を同時に用いたフェニルアラニン NCA の重合によるコアコロナ型ペプチドナノスフェアの合成

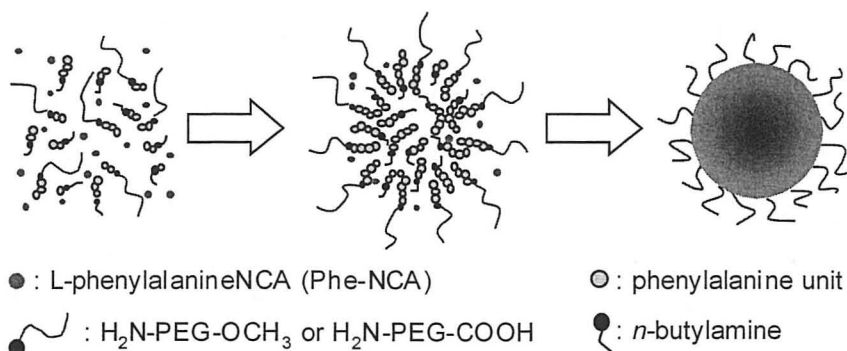


図2 重合に伴う自己秩序化によるコアコロナ型ペプチドナノスフェア形成の模式図

ノスフェアは、同じく PEG とペプチドのブロック共重合体から成る高分子ミセルとは次の点で異なっている。ペプチドナノスフェアが NCA 重合の一段階で調製されるのに対して、高分子ミセルは高分子合成とミセル形成の 2 段階により調製される。また高分子ミセルは高度希釈に対する安定性が一般的に低いのに対して、ペプチドナノスフェアのコアは固体であるため安定である。

次に、他の種類の高分子を開始剤として用いた場合にもナノスフェアの合成が可能であるかどうかについて調べた。まず、分子量が異なる種々の PEG 誘導体 (PEG-OMe :  $M_w = 5,000, 10,000, 20,000$ ) と BA を開始剤として用いて、Phe-NCA の重合を行った。いずれの場合にもナノスフェアの形成が SEM 観察および DLS 測定により確認された (図 3b)。また末端にカルボキシル基を持つ PEG 誘導体 (HOOC-PEG-NH<sub>2</sub>,  $M_w = 2,000$ ) を用いた場合も、同様にナノスフェアの合成が可能であり、得られたナノスフェアは表面に PEG 鎖末端由来のカルボキシル基を持つことを ζ-電位測定より確認した (図 3c)。さらに生成ポリマーとしてグラフト型共重合体を与えるキトサン (CT) を開始剤に用いた Phe-NCA の重合について検討したところ、290nm の粒子径を有する表面カチオン性のナノスフェアが合成可能であることが確認された (図 3d)。以上の結果から、NCA 重合を利用した本手法では、開始剤の種類を変えることで、表面グラフト鎖長、表面電荷、組成などの表面構造が異なる種々のナノスフェアを合成可能であることが明らかとなった。

### 3 コアコロナ型ペプチドナノスフェアの PEG ブラシ構造解析とそのバイオ機能

上述のペプチドナノスフェアは、親水性マクロイニシエーターを用いた NCA 重合の重合過程

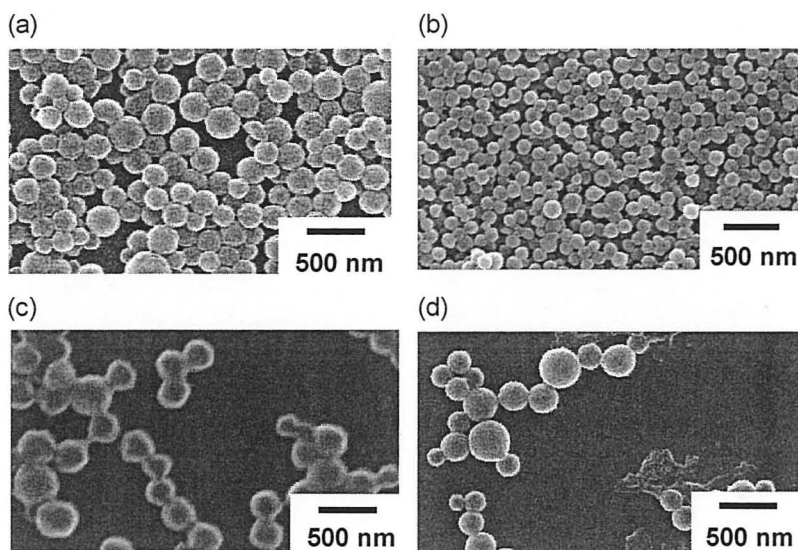


図3 NCA法により得られた種々のペプチドナノスフェアの走査型電子顕微鏡写真 (a)-(c) PEG-*b*-PPhe と PPhe から成るコアコロナ型ペプチドナノスフェア；重合に用いた PEG-NH<sub>2</sub> の構造と分子量：(a) H<sub>3</sub>CO-PEG-NH<sub>2</sub>,  $M_w=2,000$ ；(b) H<sub>3</sub>CO-PEG-NH<sub>2</sub>,  $M_w=20,000$ ；(c) HOOC-PEG-NH<sub>2</sub>,  $M_w=2,000$ . (d) CT-*g*-PPhe から成るペプチドナノスフェア

において形成した。一方、一度形成したナノスフェアを有機溶媒に溶解させた後、この溶液を水中に滴下した場合にはナノスフェアは形成しなかった。従って、ペプチドナノスフェアは重合に伴う自己秩序化に由来した特徴的な構造を持っていると考えられ、大変興味深い。そこで、著者らはこのペプチドナノスフェアの詳細な構造解析を行った<sup>5)</sup>。

まず PEG 鎖の表面局在化を、表面から深さ方向およそ 10nm の領域の元素組成を得ることができる X 線光電子分光 (XPS) 測定により確認した。次に、ナノスフェア重水分散液の <sup>1</sup>H NMR 測定を行うことにより、表面 PEG 鎖のグラフト密度を計算した。重水中での <sup>1</sup>H NMR 測定では、溶媒和された表面に存在する PEG 鎖のみが検出されるので、濃度既知の内部標準存在下での測定により、ナノスフェア単位重量あたりの表面 PEG 鎖量を定量することが可能である<sup>11)</sup>。この手法により、分子量が 2,000 の PEG マクロイニシエーターを用いて合成したナノスフェアの単位重量あたりの表面 PEG 鎖量を算出した。さらに、この結果と DLS 測定から求めたナノスフェアの粒子径および固体密度 (1.05g/cm<sup>3</sup> と仮定) を用いて、表面 PEG 鎖密度を計算した。その結果、PEG 鎖密度は 1.8chains/nm<sup>2</sup> であり、極めて高密度に表面に集積化されていることが分かった。同様に、分子量 3,500 または 4,500 の PEG を用いて合成したナノスフェアの PEG 鎖密度を求めたところ、それぞれ 0.91, 0.21 chains/nm<sup>2</sup> であった。さらに、平均 PEG 鎖間距離 ( $D_{\text{PEG}}$ ) と各分子量の PEG の回転二乗半径 ( $R_g$ ) を比較することで、表面 PEG 鎖のコンフォ

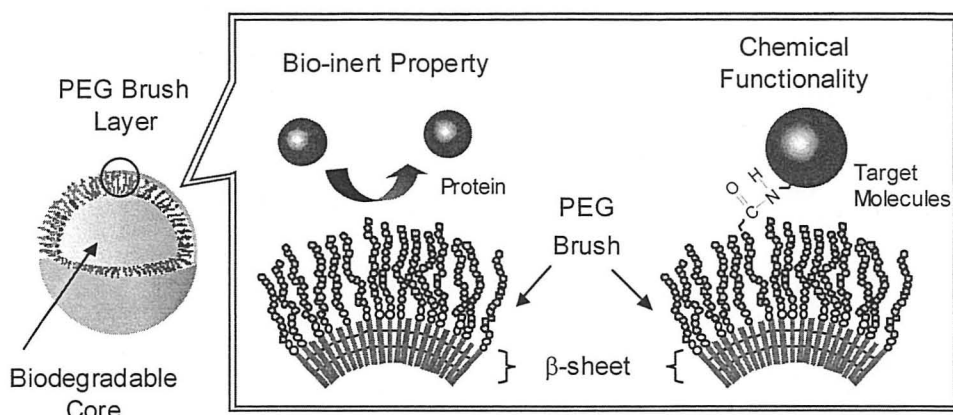


図4  $\beta$ -sheet 構造形成を駆動力として形成した表面 PEG ブラシ構造の模式図  
PEG ブラシによるタンパク質の非特異的吸着抑制と表面官能基を用いたターゲット分子の固定化

メーションを推定した。一般に、PEG 鎖間の平均距離がその回転二乗半径の 2 倍より小さい場合、すなわち  $D_{\text{PEG}}/2R_g$  の値が 1 以下となる場合に、その PEG 鎖はブラシ型コンフォメーションをとることが知られている。<sup>1</sup>H NMR 測定の結果と水中での回転二乗半径を与える理論式 ( $R_g = 0.181N^{0.58}$  (nm)<sup>12)</sup>) に基づき、 $D_{\text{PEG}}/2R_g$  の値を計算したところ、その値は合成に用いた PEG の分子量に関わらず 1 以下であった。このことからマクロイニシエーターとして用いた PEG は、ブラシ型のコンフォメーションでナノスフェア表面に高密度に集積されていることが明らかとなった (図 4)。

次に、この PEG 鎖の高密度集積化のメカニズムを考察するために、ナノスフェアのコアを主に構成するポリフェニルアラニン (PPhe) の 2 次構造を FT-IR および広角 X 線回折 (WAXD) 測定により評価した。その結果、コアの PPhe は  $\beta$ -sheet 構造を有していることが分かった。これより、コアを形成する PPhe 鎖の  $\beta$ -sheet 構造に由来する密なパッキングが、ブロックコポリマーを構成するもうひとつのセグメントである PEG 鎖の高密度集積化を誘起し、その結果としてブラシ層を形成していることが示唆された (図 4)。

高分子ナノスフェアを DDS キャリアや医療診断薬として応用するためには、ナノスフェア表面がバイオイナータな性質を持つことに加えて、運搬対象である薬物やタンパク質を固定化、もしくは機能性ユニットを化学修飾するための表面反応性を有することが重要である。片末端にカルボキシル基を有する PEG アミン (HOOC-PEG-NH<sub>2</sub>,  $M_w = 2,000$ ) を用いて合成したナノスフェアは、表面カルボキシル基と PEG ブラシ層を有していることから、これら 2 つの性質を合わせ持つことが期待される。そこでペプチドナノスフェアの表面特性の評価として、タンパク質の吸着試験および化学固定化について検討した。モデルタンパク質として卵白アルブミン

(OVA) を用い、縮合剤である 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (WSC) 存在下での化学固定化を行ったところ、 $15\text{ng}/\text{cm}^2$  の固定化が認められた。一方、WSC 非存在下では OVA を含む種々のタンパク質のナノスフェア表面への吸着は認められなかった。以上の結果からナノスフェア表面へのタンパク質の非特異的な物理吸着は PEG ブラシにより抑制されるが、一方で、その末端カルボキシル基を利用したタンパク質の化学固定化が可能であることが明らかとなった (図 4)。

ナノスフェアの生体への応用を実際に考えた場合、滅菌処理に対する耐性を有することが必要条件のひとつとなる。しかしながら、オートクレーブ処理、エタノール処理、UV 照射などの滅菌操作はしばしばナノキャリアの形態や特性を喪失させる。従って、滅菌処理耐性を有する生分解性キャリアの開発は、実用化の観点から極めて重要である。そこで、著者らはオートクレーブ処理がペプチドナノスフェアの形態や性質に及ぼす影響について調査した<sup>6)</sup>。その結果、ペプチドナノスフェアはオートクレーブ処理後も、水分散安定性、サイズ、形態を維持していることが確認された。この安定性は主に、コアを形成する PPhe の  $\beta$ -sheet 構造に由来していると考えられる。更に、処理後のナノスフェアは 10%FBS を含む培地中においても 1 週間凝集することなく分散安定であることが認められ、オートクレーブ処理後もバイオイナートな性質を有することが確認された。

#### 4 環境応答性ユニットの導入による PEG ブラシ構造制御

次に著者らは、外部環境に応答して可逆的に結合開裂/形成するユニットをブラシ層に導入したペプチドナノスフェアを合成し、ブラシ層の脱着に基づいた表面制御について検討した。具体的には、コアとブラシの連結点にジスルフィド結合を導入し、酸化還元反応による表面制御について検討した。得られたナノスフェアは、還元環境下においてバイオイナートな PEG ブラシ表面から疎水性表面へと、劇的な表面特性変化を示した。また、ナノスフェアのブラシ層は、チオール-ジスルフィドの交換反応により自在に『付け替え』が可能であることを明らかとした (図 5)。

末端にジスルフィド基を有するマクロイニシエーター (MeO-PEG-SS-NH<sub>2</sub>) と 2-エチル (チオエチルアミン) の 2 種類の開始剤を用いた Phe-NCA の重合により目的とする SS-ペプチドナノスフェア (粒子径; およそ 430nm) を合成した。得られたペプチドナノスフェアの表面 PEG 鎖密度は、従来のペプチドナノスフェアと同程度の  $1.8\text{chain}/\text{cm}^2$  であった。これより、当初の設計通り、ジスルフィド基がコアとブラシ層の界面に集積化した構造をもつナノスフェアが形成していることが示唆された。

まず、還元剤としてジチオスレイトール (DTT) を用いて、PEG 鎖のナノスフェア表面から



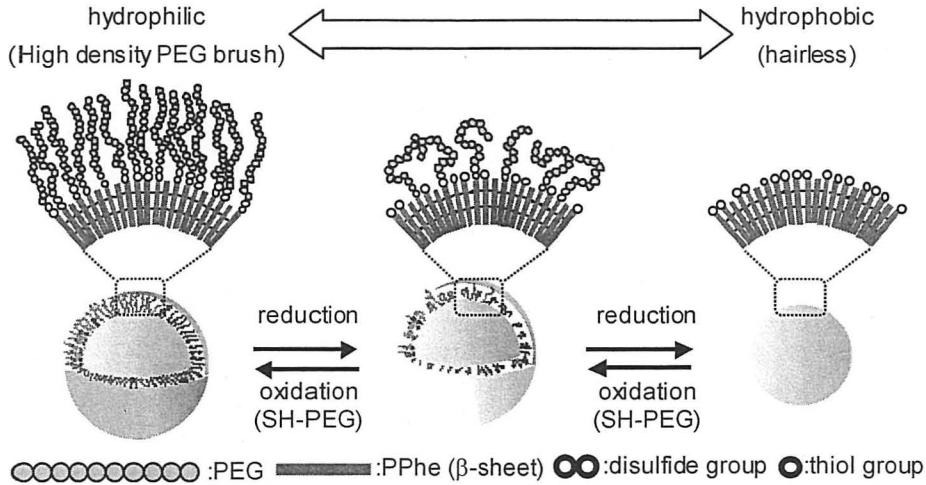


図5 コアとブラシの間にジスルフィド結合を導入したSS-ペプチドナノスフェアの模式図  
チオール-ジスルフィド交換に基づく表面構造制御

の解離を検討した。SS-ペプチドナノスフェアの分散液に、PEG鎖に対して100等量のDTTを添加し、室温で6時間攪拌した。DTT添加後、即座にナノスフェアの凝集が観察された(図6b)。得られた凝集物を水で十分に洗浄することで、解離したPEGおよびDTTを除去した後、SEM、DLS、 $^1\text{H}$  NMRにより分析した。興味深いことに、ナノスフェアは還元反応後も、その形態およびサイズを保持していることが明らかとなった。また、 $^1\text{H}$  NMRより、還元反応前のナノスフェアに含まれるPEG鎖量を100としたときの相対PEG鎖量を評価したところ、72%まで減少していることが分かった(図6g, h)。さらにこの状態では、ほとんど表面にはPEG鎖が存在しないことをNMRなどの分光法により確認した。次に、このときのPEG鎖量を0、還元前のPEG鎖量を100としたときの相対量を『表面PEG比率』として定義し、還元反応時のDTT濃度が表面PEG比率に与える効果について検討した。その結果、DTT濃度の増加に伴って、PEG鎖の解離量が増加することが確認された(図7a)。以上より、還元剤の量によりPEG鎖の解離量を調節することで、SS-ペプチドナノスフェアの形態を損なうことなく、表面PEG鎖密度を制御できることが明らかとなった。

もし、ジスルフィド結合の開裂に伴って生成した表面チオール基を利用して、ナノスフェアにポリマーを固定化することが出来れば、ブラシ層の成分を自在に交換することが可能な“着せ替え”ブラシナノスフェアとして有用であると期待できる。そこで、過剰のDTTと反応させることで表面PEG鎖を解離させたペプチドナノスフェア(“hairless”ナノスフェア)の表面再化学修飾について検討した。“hairless”ナノスフェア分散液に、チオール基を持つPEG誘導体(MeO-PEG-SH,  $M_w=2,000$ )を添加し、種々の濃度の酸化剤存在下、室温で24時間攪拌した。面白い

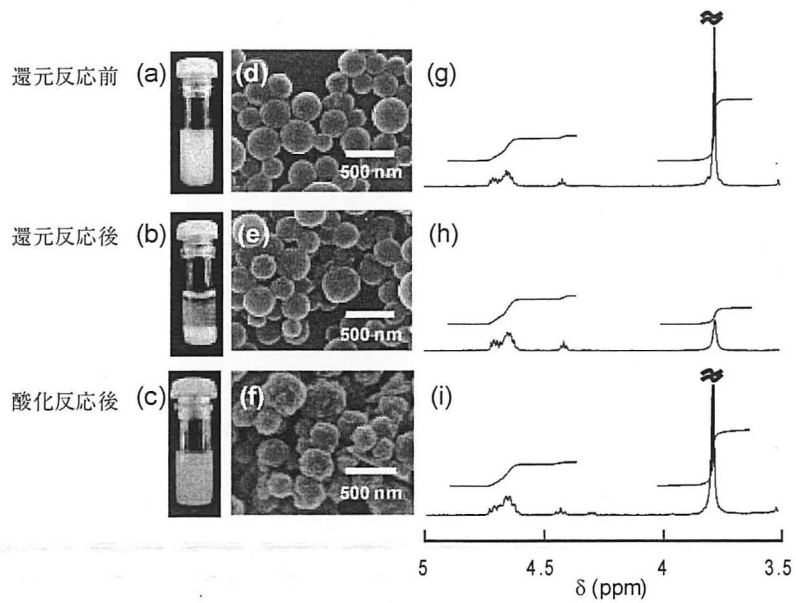


図6 還元による PEG ブラシ層の解離と酸化による PEG ブラシの再形成  
 (a, b, c) SS-ペプチドナノスフェアの写真, (d, e, f) SS-ペプチドナノスフェアの走査型電子顕微鏡写真, (g, h, i) SS-ペプチドナノスフェアの<sup>1</sup>H NMR スペクトル (トリフルオロ酢酸-d/クロロホルム-d 混合溶媒中, 25°C)

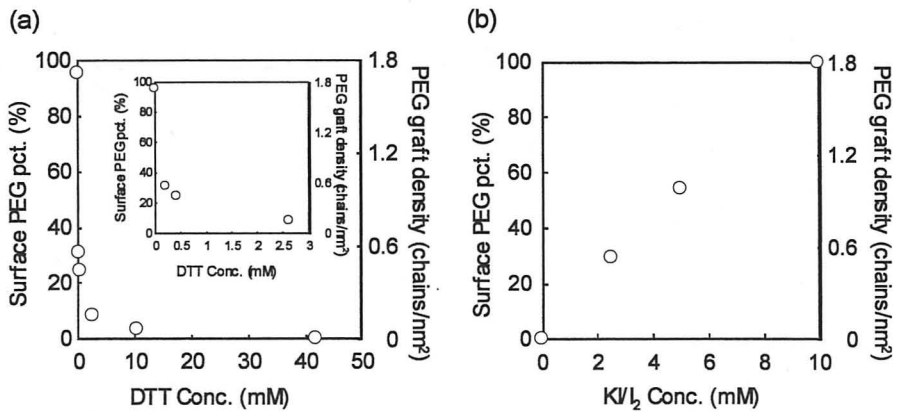


図7 酸化還元反応に基づく表面 PEG グラフト鎖密度制御  
 (a) 還元反応に伴う PEG 鎖の解離；反応後の表面 PEG 比率に与える還元剤濃度の効果,  
 (b) 酸化反応を利用した PEG-SH の表面固定化；表面 PEG 比率に与える酸化剤濃度の効果

ことに、反応開始時にはナノスフェアは水中に分散せずに凝集していたが、時間の経過に従い水に分散する様子が確認され、PEG 鎖の固定化が示唆された (図 6c)。PEG 鎖の固定化量を<sup>1</sup>H NMR により算出したところ、適切な PEG-SH 濃度の場合に、還元反応前と同程度まで固定化できることが明らかとなった (図 7b)。以上より、ジチオール-ジスルフィドの交換反応により、

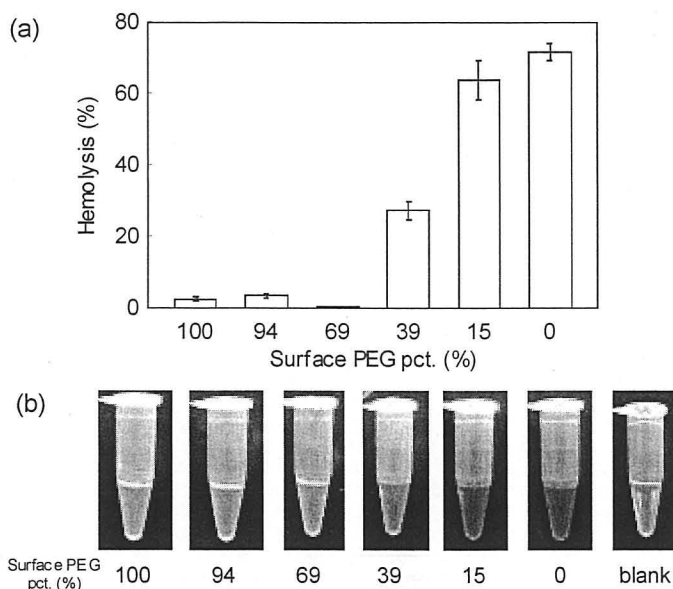


図8 PEG グラフト密度の異なる種々のペプチドナノスフェアを用いた赤血球膜破壊活性試験

- (a) 赤血球膜破壊活性に与える PEG グラフト密度の影響  
 (b) 試験終了後サンプルの上清の写真

表面ブラシ層を可逆的に脱着させることが可能な新規な機能性ナノスフェアとしての有用性が示唆された。

DDS 担体やイメージング材料への応用を考えた場合、細胞膜とナノスフェア表面とのアフィニティはキャリアの生体内動態に大きく影響を及ぼすことから、これを制御することは大変重要である。そこで次に、表面 PEG 鎖密度の違いが、ナノスフェア表面と細胞膜との間の相互作用に及ぼす影響について検討することを目的として、上述の方法により作製した異なるグラフト密度を持つ種々のペプチドナノスフェアを用いて、赤血球膜を細胞膜のモデルとした赤血球膜破壊活性試験を行った。その結果、表面 PEG 比率が 100-69% のナノスフェアでは、ほとんど膜破壊活性を示さなかったことよりバイオイナータな性質を有することが示唆された。一方で、表面 PEG 比率が 39-0 % のナノスフェアは、高い溶血活性を示した (図 8)。これは、表面 PEG 鎖がかなりな程度解離したナノスフェア表面は、その疎水性のために、赤血球膜とより強い相互作用をしたことを示している。以上の結果から、ブラシ密度を制御することで、ナノスフェア表面と細胞膜との相互作用を制御できることが示された。この結果は、エンドソーム内でジスルフィド結合が開裂することを考え併せると<sup>13)</sup>、SS-ペプチドナノスフェアはエンドサイトーシス経路で細胞に取り込まれた後、エンドソーム内で、PEG 鎖の解離に伴って表面特性を切り替えること

で、効率よくエンドソームから脱出する可能性を示唆している。

## 5 まとめ

著者らは、ポリアミノ酸の合成法である NCA 法をナノスフェアの合成に応用することで、高密度 PEG ブラシを有するペプチドナノスフェアの合成に成功した。得られたナノスフェアの表面は、PEG ブラシ構造に由来してバイオイナータな性質を持つとともに、薬物や標的指向性分子を固定化するための化学反応性を持つことを明らかとした。さらに環境応答性ユニットをブラシ層に導入することで、外部環境に応答して表面特性を大きく切り替えることのできるスイッチング能を賦与することにも成功した。本研究で開発した PEG ブラシペプチドナノスフェアは、新規な機能性生分解性ナノスフェアとして、DDS 担体、イメージング材料、分離担体などの医療材料分野において有用であることが期待される。

## 文 献

- 1) a) Y. Bae *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 768 (2009) ; b) M. Matsusaki *et al.*, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **6**, 1207 (2009)
- 2) a) Y. Tsujii *et al.*, *Adv. Polym. Sci.*, **197**, 1 (2006) ; b) M. Motornov *et al.*, *Prog. Polym. Sci.*, **35**, 174 (2010)
- 3) M. Matsusaki *et al.*, *Langmuir*, **22**, 1396 (2006)
- 4) T. Waku *et al.*, *Chem. Lett.*, **37**, 1262 (2008)
- 5) T. Waku *et al.*, *Macromolecules*, **40**, 6385 (2007)
- 6) M. Matsusaki *et al.*, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, in press
- 7) M. Akashi *et al.*, *Angew. Makromol. Chem.*, **132**, 81 (1985)
- 8) T. Serizawa *et al.*, *Macromolecules*, **33**, 1759 (2000)
- 9) M. Akashi *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **7**, 393 (1996)
- 10) C.-W. Chen *et al.*, *Chem. Commun.*, 831 (1998)
- 11) S. Kawaguchi *et al.*, *Macromolecules*, **29**, 4465 (1996)
- 12) S. Kawaguchi *et al.*, *Polymer*, **38**, 2885 (1997)
- 13) a) S. Takae *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 6001 (2008) ; b) J. Yang *et al.*, *Pro. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 13872 (2006)