

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ポリ(ヒドロキシアルカン酸)の合成と生分解性評価に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	阿部英喜
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:乙第2924号, 授与年月日:1996年7月31日, 学位の種別:論文博士, 審査員:井上 義夫
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:乙第2924号, Conferred date:1996/7/31, Degree Type:Thesis doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

ポリ(ヒドロキシアリカン酸)の合成と
生分解性評価に関する研究

平成8年7月

阿部 英喜

目次

	頁
第一章 序論	・・・ 1
はじめに	・・・ 2
1-1 社会的背景	・・・ 3
1-2 生分解プラスチック	・・・ 3
1-3 生分解性ポリエステルの物性改善	・・・ 8
1-4 ドラッグデリバリーシステム	・・・ 10
1-5 環境中における高分子材料の微生物分解	・・・ 10
1-6 本研究の目的	・・・ 11
References	・・・ 14
第二章 ポリ[(<i>R,S</i>)-3-ヒドロキシブタン酸]の化学合成と生分解性によ およぼす立体構造効果	・・・ 17
2-1 緒言	・・・ 18
2-2 実験	・・・ 20
2-3 結果と考察	・・・ 27
2-3-1 (<i>R</i>)-, (<i>S</i>)-3-ヒドロキシブタン酸の立体共重合体の物 性と酵素分解性	・・・ 27
2-3-2 ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)の生分解性によよぼす 立体規則性の効果	・・・ 59
2-4 結論	・・・ 70
References	・・・ 72
第三章 ポリ[(<i>R</i>)-3-ヒドロキシブタン酸]とポリ[(<i>R,S</i>)-3-ヒドロキシ ブタン酸]との二成分ブレンドの固体構造と性質	・・・ 74
3-1 緒言	・・・ 75
3-2 実験	・・・ 77
3-3 結果と考察	・・・ 81

3-3-1	ポリ[(<i>R</i>)-3-ヒドロキシブタン酸]とポリ[(<i>R,S</i>)-3-ヒドロキシブタン酸]との二成分ブレンドの結晶化過程とモルホロジー	・ ・ ・ 81
3-3-2	ポリ[(<i>R</i>)-3-ヒドロキシブタン酸]とポリ[(<i>R,S</i>)-3-ヒドロキシブタン酸]との混合系の物性と酵素分解性	・ ・ ・ 91
3-4	結論	・ ・ ・ 110
References		・ ・ ・ 111
第四章 (<i>R</i>)-3-ヒドロキシブタン酸と(<i>R</i>)-3-ヒドロキシヘキサン酸とのランダム共重合体の微生物合成と性質		
4-1	緒言	・ ・ ・ 112
4-2	実験	・ ・ ・ 113
4-3	結果と考察	・ ・ ・ 116
4-4	結論	・ ・ ・ 118
References		・ ・ ・ 140
第五章 (<i>R</i>)-3-ヒドロキシブタン酸と6-ヒドロキシヘキサン酸とのランダム共重合体の化学合成と性質		
5-1	緒言	・ ・ ・ 142
5-2	実験	・ ・ ・ 143
5-3	結果と考察	・ ・ ・ 145
5-4	結論	・ ・ ・ 147
References		・ ・ ・ 176
第六章 ポリ[(<i>R,S</i>)-3-ヒドロキシブタン酸]-ポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸)ブロック共重合体の合成と相溶化剤への応用		
6-1	緒言	・ ・ ・ 178
6-2	実験	・ ・ ・ 179
6-3	結果と考察	・ ・ ・ 182
References		・ ・ ・ 185

6－4 結論	・ ・ ・ 196
References	・ ・ ・ 197

第七章 ポリ[(<i>R</i>)-3-ヒドロキシブタン酸]のドラッグデリバリーシス テムへの応用	・ ・ ・ 198
7－1 緒言	・ ・ ・ 199
7－2 実験	・ ・ ・ 201
7－3 結果と考察	・ ・ ・ 204
7－4 結論	・ ・ ・ 225
References	・ ・ ・ 226

第八章 総括	・ ・ ・ 227
8－1 本研究の結論	・ ・ ・ 228
8－2 今後の研究課題	・ ・ ・ 231

第一章

序 論

はじめに

高分子の存在についての認識が始まったのが1920年とすれば、それからまさに70年。今日では、高分子に関する物理学や化学の知見も広くかつ深くなり、その生成反応、構造と物性、取り扱いや利用の方法論、さらには動植物の体内に存在する高分子についてまでも、その成因や役割がよく知られるようになってきた。それにともなった、高分子工業の著しい発展は高分子の科学が我々の社会や生活と密接していることを教えてくれるようになった。

高分子工業の生み出した多種多様のプラスチック材料は、軽くて強くて安定な素材であり、現代社会の中で欠くことのできないものとなっている。しかしながら、合成高分子のほとんどが自然環境中で分解されないために、プラスチック廃棄物による環境汚染が世界的な問題となっている。そのような状況下、地球環境保全の観点から、自然界で微生物によって分解する生分解性プラスチックの開発が世界各国で活発に進められている。

現在、生分解性プラスチックとして開発の対象となっている高分子は、微生物が生産する生体高分子、植物や動物由来の天然高分子および生分解可能な合成高分子などがある。しかしながら、生分解性高分子材料の応用範囲は広く、多種多様な物性の発現が要求される。

本研究で取り上げた、微生物によってつくられるポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB]) は、自然界で微生物によって分解され、最終的に無機化され自然界の炭素サイクルに組み込まれる生分解性ポリエステルである。また、P[(R)-3HB] は生体適合性をも兼ね備えていることから、医療や製薬材料としての利用も期待されている。本研究では、微生物産生P[(R)-3HB] に注目し、生分解性高分子材料の分子設計法および材料設計法の構築するための一連の基礎的研究を行った。

第一章では、生分解性ポリエステルの材料設計に関する本研究の目的と意義について述べる。

1-1 社会的背景

プラスチックは軽くて強い材料であり、適度な柔軟性を持っている。プラスチックを生産する高分子工業は、1960年代以降の大量かつ低価格の原油の供給に支えられた石油化学工業の急速な発展とともに拡大し、世の中に安価でかつ多種多様のプラスチック素材を供給し、製品は産業および現代社会にとって必要不可欠なものとなっている。

わが国の1992年のプラスチック生産量は約1260万トンで、発生する廃プラスチックは一般、産業廃棄物を合わせて690万トン、このうち約11%、75万トンは再生加工（マテリアルリサイクル）に、約52%、360万トンが焼却処分され、このなかで発電等により熱回収されたものは120万トンであり、残りの35%、240万トンは埋め立て処分された。プラスチックの焼却処分の場合、焼却の排ガスによる大気汚染の誘発や焼却場不足といった問題点、また、埋め立て処分の場合、埋め立て地の不足といった問題点が挙げられ、これらの問題点を解決するために、廃プラスチックの処理・処分方法の見直しが緊急の課題となっている。また、地球環境保全の観点から、海洋などの自然環境中に流出するプラスチック廃棄物が大きな問題となっている。

このような状況下、プラスチック廃棄物のリサイクリング技術の開発とともに、自然界の物質循環に組み込まれる生分解性プラスチックの開発への関心が高まってきた。

理想的な生分解性高分子材料とは、使用している間は優れた性能を持続的に発揮し、廃棄後は微生物によって完全に分解され自然界の炭素循環に組み込まれる素材である。高分子材料の物理的性質と生分解性を同時にコントロールできる方法論を確立するために、世界各国で基礎と応用の両面から活発な研究が行われている。

本研究は、高分子材料の物理的性質と生分解性を同時にコントロールできる方法論を確立するための基礎的知見を得ることを目的として始められたものである。

1-2 生分解性ポリエステル

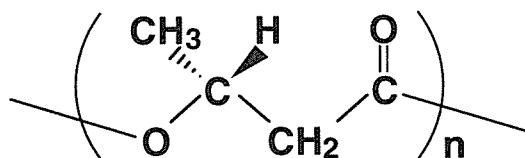
高分子物質は、天然高分子と合成高分子とに大別される。天然高分子は、微生物のつくる高分子と植物および動物由来の高分子に分類される。微生物のつくる高分

子には、多糖類（セルロース、プルラン、カードラン、ザンタンガムなど）、ポリアミノ酸（ポリグルタミン酸、ポリリジンなど）、ポリエステル（ポリヒドロキシアルカン酸）などがある。また、植物由来の高分子には、セルロース、アミロースなどがあり、一方、動物由来の高分子には、キチン、キトサン、ゼラチンなどがある。天然高分子の中で融解温度を持つのは微生物のつくるポリエステルだけであり、熱成形可能な生分解性天然高分子材料として利用が検討されてきた。

合成高分子の中にも直鎖脂肪族ポリエステルのポリカプロラクトンやポリプロピオラクトン、ビニル系高分子のポリビニルアルコール、ポリエーテルのポリエチレングリコールなどの一部のものについては、微生物分解および酵素分解されることが明らかとなっている。しかし、大部分の汎用合成高分子は環境中で分解されずに残存する。

1-2-1 微生物のつくるポリエステル

数多くの微生物は、エネルギー貯蔵物質であるポリエステルの一種を生合成する^{1,2)}。微生物はこのポリエステルを菌体内に顆粒状で蓄積している。そして、栄養の欠乏下でポリエステルをアセチルCoAに分解してエネルギー源として利用する。微生物がつくる最も典型的なポリエステルは、(R)体の3-ヒドロキシブタン酸 ((R)-3HB) ユニットからなる高分子量の光学活性ポリエステル、ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB]) である。



Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] (P[(R)-3HB])

微生物が自然界でつくるポリエステルP[(R)-3HB]は、すべて(R)-3HBユニットからなる高分子であり、固体状態では、左巻きの2₁ヘリックス構造（繊維周期0.596nm）をとる³⁾。そのため、P[(R)-3HB]は高結晶性の光学活性ポリエステルとなる。

P[(R)-3HB]は、熱可塑性樹脂であり、その物理的性質は密度が1.25g/cm³、ガラス転移温度 (T_g) が4℃、融点 (T_m) が180℃である⁴⁾。また、P[(R)-3HB]の引っ張り強さは40MPa (23℃) とポリプロピレンの引っ張り強さ (38MPa) と同程度の強さを持

っている。しかし、P[(R)-3HB]の破壊伸びは6%であり、ポリプロピレンの破壊伸び400%に較べて極めて小さく、P[(R)-3HB]が堅くて脆い結晶性高分子材料であることがわかる。

1-2-2 化学合成より得られるポリエステル

エステル結合を切断する酵素である各種のリパーゼやエステラーゼは、生物界に広く分布していることが知られている。そのため、化学合成より得られたポリエステルの生分解性について多くの研究がなされてきた。

Darbyら⁹⁾は、低分子量の脂肪族ポリエステルに、ある種の糸状菌が育成することを報告した。その後、カビ類などを用いてポリカプロラク톤の分解性が試験・評価されてきた⁶⁻⁸⁾。Tokiwaらは、土壌から単離した *Penicillium* sp.14-3⁹⁾ , *Penicillium* sp.26-1¹⁰⁾ およびこれらの微生物から精製した分解酵素を用いてポリエステルの構造と分解性の関係を調べた。この他にも、細菌、酵母、糸状菌、豚すい臓起源のリパーゼや豚肝臓起源のエステラーゼによるポリエステルの分解性が試験・評価されてきた。その結果、いずれの場合においても脂肪族ポリエステルは生物界に広く分布しているリパーゼおよびエステラーゼによって分解される生分解性の合成高分子の一つであることが明らかにされた。したがって、化学合成法による生分解性ポリエステルの設計を検討する際には、脂肪族ポリエステルがターゲットとされる。

脂肪族ポリエステルの合成には、ラクトン類の開環重合が数多く行われてきた。 β -プロピオラクトン (β -PL) や ϵ -カプロラクトン (ϵ -CL) の重合は、様々な触媒によって進行する。特に、アニオン重合触媒による重合では、リビング重合で反応が進み、高分子量のポリマーを生成する^{11,12)}。

生成するポリマーがP[(R)-3HB]と同じ化学構造を持つことから、 β -ブチロラクトン (β -BL) の開環重合についてもよく研究されてきた。 β -BLは、 β -PLと同じ四員環のラクトンであるが、主なアニオン重合触媒では重合反応が進行しない。また、カチオン重合触媒を用いた重合反応においても、 β -BLのオリゴメリゼーションが進行するために高分子量のポリマーは得られない。 β -BLの高分子量のポリマーを生成するために、Al系およびZn系の配位重合触媒が検討されてきた。

Yamashitaら¹³⁾は、KOHやSnCl₄などの酸塩基触媒やAlEt₃/H₂Oの有機金属触媒を用いて、 β -BLや β -PL、 α -メチル- β -プロピオラクトン等の重合を試みた。その結果、

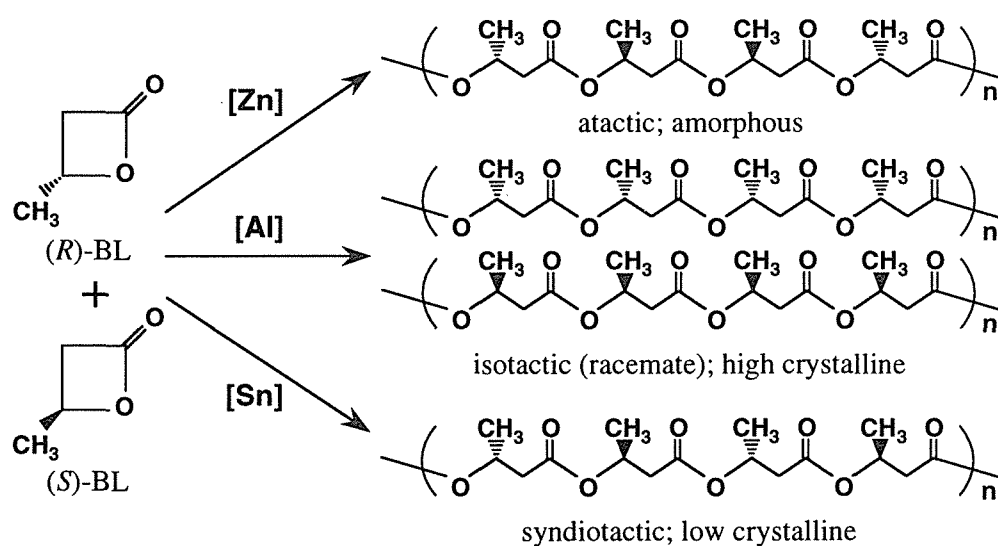
AlEt₃/H₂O触媒を用いたときのみβ-BLの高結晶性の高重合物が得られたことを報告している。また、Inoueら^{14,15)}は、テトラフェニルポルフィナートアルミニウムクロライドを用いてβ-BLの開環重合を行ったところ、非常に分子量分布の狭いポリマーが得られたことを報告している。Marchessaultら¹⁶⁾は、AlEt₃/H₂O触媒のAl/H₂O比を変化させてβ-BLの重合を行い、得られたポリマーの立体規則性、分子量および収率におよぼす影響について調べている。また、Lenzら¹⁷⁾は、エチルアルミノキサン (EAO) およびメチルアルミノキサン (MAO) を用いてβ-BLの重合を行い、高結晶性のポリマーを合成した¹⁸⁾。

Al系とともにβ-BLの開環重合に用いられる触媒として、Zn系触媒がある。ZnEt₂/H₂O触媒を用いたβ-BLの開環重合では、非晶質のポリマーが生成することが報告されている。

Al系触媒によって重合を行った場合は、高結晶性のポリマーが得られることを示したが、このポリマーは微生物産生のP[(R)-3HB]とは異なる立体構造を有している。微生物のつくるP[(R)-3HB]は、(R)体の3HBユニットのみで構成されるポリエナンチオマーである。これに対して、Al系触媒でラセミ体のβ-BLを重合した場合に得られる高結晶性のポリマーは、(R)体の3HBユニットで構成されるP[(R)-3HB]と(S)体の3HBユニットで構成されるP[(S)-3HB]との混合物である。また、Zn系触媒でラセミのβ-BLを重合した場合に得られる非晶質なポリマーは、ポリマー鎖中に(R)体と(S)体の3HBユニットがランダムに連結したアタクチック構造のポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸]である。

最近、Marchessaultら¹⁹⁾は、MAOを用いてラセミ体のβ-BLを重合して得られるポリマーのメタノール可溶部から低分子量 ($M_w=500\sim900$) のシンジオタクチック構造のP[(R,S)-3HB] (シンジオタクチックダイアッド分率[s]=0.68) を回収できたことを報告した。また、Grossら^{20,21)}は、Sn触媒を用いてラセミ体のβ-BLを重合したところ、シンジオタクチックP[(R,S)-3HB] (シンジオタクチックダイアッド分率[s]=0.55～0.73) が得られたことを報告している。

以下にラセミ体のβ-BLの開環重合における、触媒の種類と生成するP(3HB)の立体構造との関係をまとめた。



微生物産生のP[(R)-3HB]と同じ立体構造のポリマーを化学合成するには、次の二つの方法が考えられる。第一の方法は、ラセミ体の β -BL不斉選択性触媒を用いて重合し、P[(R)-3HB]を得る方法である。Spasskyら²²⁾は、ZnEt₂/[(R)-3,3-ジメチル-1,2-ブタンジオール] (1.0/0.6)触媒を用いて、不斉選択比 $r=1.6$ の(R)体のポリエナンチオマーを合成した。第二の方法は、(R)体の β -BLを合成してそれをZn系触媒で重合しP[(R)-3HB]を合成する方法である。Lenzら²³⁾は、P[(R)-3HB]をメタノリシスして得られた(R)-3-ヒドロキシブタン酸メチルエステルより光学純度97%の(S)体の β -BLを合成し、これをZnEt₂/H₂O (1.0/0.6)触媒で重合したところ、(S)-3HBユニットのみで構成されたP[(S)-3HB]が得られたことを報告している。

これまで、化学合成法によるP[(R)-3HB]生産における大きな問題点は次の2つであった。1つは光学活性な β -BLの合成に大変な手間とコストがかかること、もう1つは得られるポリマーの分子量が上がらず、機械的な強度を保持できる高分子量($M_n > 100000$)ポリマーが得られなかったことにある。

しかしながら、近年、Ru-(S)-binap錯体を用いてジケテンの不斉水素化によって光学活性な β -BLを比較的簡便に調製できることが報告された²⁴⁾。また、Horiら²⁵⁾は、この方法によって調製した光学活性 β -BLをジスタノキサン触媒で重合することによって高分子量のP[(R)-3HB] ($M_n > 100000$)を合成することに成功した。

1-3 生分解性ポリエステル物の物性改善

将来的に生分解性プラスチックの実用化が進むと多種多様な性質の発現が要求される。しかし、単一の素材ではその要求を満たすことは困難であり、その解決策が必要とされる。

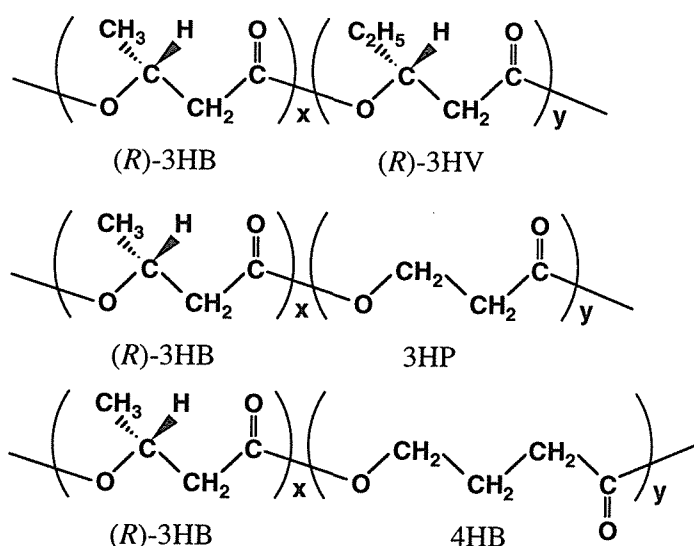
P[(R)-3HB]は堅くて脆いという物性上の欠点を持っているために実用化されていない。その物性上の欠点を改善するために、様々な手法が検討されてきた。一つは、微生物産生のP[(R)-3HB]に異なるモノマーユニットを導入した共重合ポリエステルの合成である。もう一つの手法は、P[(R)-3HB]に性質の異なるポリマーを加えた高分子多成分系（ポリマーアロイ）の開発である。

1-3-1 微生物のつくる共重合ポリエステル

水素細菌*Alcaligenes eutrophus*に炭素源としてプロピオン酸やペンタン酸を与えることによって、(R)-3HBユニットと(R)-3-ヒドロキシペンタン酸 ((R)-3HV) ユニットからなる共重合ポリエステル、ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-(R)-3-ヒドロキシペンタン酸] (P[(R)-3HB-co-(R)-3HV]) を発酵合成できることが報告された²⁶⁾。

微生物がつくる(R)-3HBユニットを含む共重合ポリエステルには、P[(R)-3HB-co-(R)-3HV]以外にも、4-ヒドロキシブタン酸 (4HB) ユニットとの共重合体ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-4-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB-co-4HB])^{27,28)} や3-ヒドロキシプロピオン酸 (3HP) ユニットとの共重合体ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシプロピオン酸] (P[(R)-3HB-co-3HP])²⁹⁾が存在する。また、*Pseudomonas* 属の微生物からは、長鎖長の側鎖を持つポリ(3-ヒドロキシアルカン酸) (P(3HA)) が合成されることが報告されている³⁰⁻³³⁾。

微生物の種類と与える炭素源を選択することによって、現在までに、微生物のつくるポリエステルを構成するモノマーユニットとして約80種以上の異なる化学構造のモノマーが確認されている³⁴⁾。微生物のつくる共重合ポリエステル中のモノマーユニットの化学構造および共重合組成を変化させることによって、堅くて強い材料から柔らかくしなやかな材料まで幅広い物理的性質を持つ生分解性ポリエステルが得られるようになった。



1-3-2 ポリマーアロイの開発

従来、異なる構造のポリマー分子を混合すると異なるポリマー分子は分子状に混合せずに相分離を生じ、各ポリマー成分相の界面での接着が悪く、強度的に良質な高分子素材が得られないと信じられてきた。しかし、近年、種々のポリマー分子間の相溶性に関する研究成果が蓄積され、高分子の相平衡に関する理論（状態方程式理論、格子理論）の確立や高分子の相溶性－非相溶性に関する理論が進んだ結果、ポリマーブレンドによる新しい材料の開発が活発に行われるようになった。

ポリマーアロイの材料設計法としては、相分離を起こさない相溶性のポリマー同士のポリマーアロイの開発と、多相構造を持たせた系に化学結合を導入することによって各成分相間の接着性を高める方法がある。

Martuscelliらは、P[(R)-3HB]の堅くて脆いという物性上の欠点を改善するために、P[(R)-3HB]にポリエチレンオキサイド³⁵⁾やポリビニルアセタート³⁶⁾をブレンドして、そのブレンドフィルムの物性と構造を調べている。また、Doiら³⁷⁻⁴⁰⁾は、P[(R)-3HB]にポリカプロラクトンやポリプロピオラクトンなどの各種脂肪族ポリエステルをブレンドし、そのブレンドフィルムの物性および酵素分解性について調べている。

1-4 ドラッグデリバリーシステム

微生物がつくるP[(R)-3HB]は加水分解や酵素分解といった生分解性に加えて、生体適合性をも兼ね備えていることが明らかにされている。Millerら⁴¹⁾は、P[(R)-3HB]のフィラメントを作製し、ラットの皮下に埋め込んだ場合 (*in vivo*) およびリン酸緩

衝溶液（pH7.4, 37℃）に浸した場合（*in vitro*）のP[(R)-3HB]の分解性の比較と生体内での拒絶反応の有無を調べた。また、Korsatokoら⁴²⁻⁴⁴⁾は、P[(R)-3HB]のタブレットを用いて、マウスの繊維芽細胞内（*in vivo*）における生体適合性を調べている。

このようなP[(R)-3HB]の特性を活用して、手術用縫合糸や骨折固定材などの医用材料としての応用や薬物の徐放性を持たせたドラッグキャリアーとして利用するドラッグデリバリーシステム（DDS）への応用が期待されている。

1-5 環境中における高分子材料の微生物分解

一般に、P[(R)-3HB]などの高分子材料の微生物分解は、Figure 1-1に示すような分解過程で進行すると考えられる。まずはじめに、微生物が菌体外に分泌する分解酵素が高分子材料表面に吸着する。吸着した分解酵素は、高分子鎖のエステル結合、グリコシル結合、ペプチド結合などを加水分解反応によって切断する。その結果、一量体や二量体などの低分子量分解生成物が生成する。このように、菌体外分泌酵素によって高分子の主鎖が切断され低分子量化する過程を一次分解過程と称している。さらに、低分子量化された分解生成物は微生物体内に取り込まれ、菌体内で様々な代謝経路を経て、各種生体高分子を合成するために用いられったり、エネルギー生産のために用いられて、最終的に水と二酸化炭素に変換される。この過程を完全分解過程と称している。したがって、高分子素材が微生物によって分解される条件として、まず微生物の分泌する酵素によって高分子鎖が切断されることが必要である。

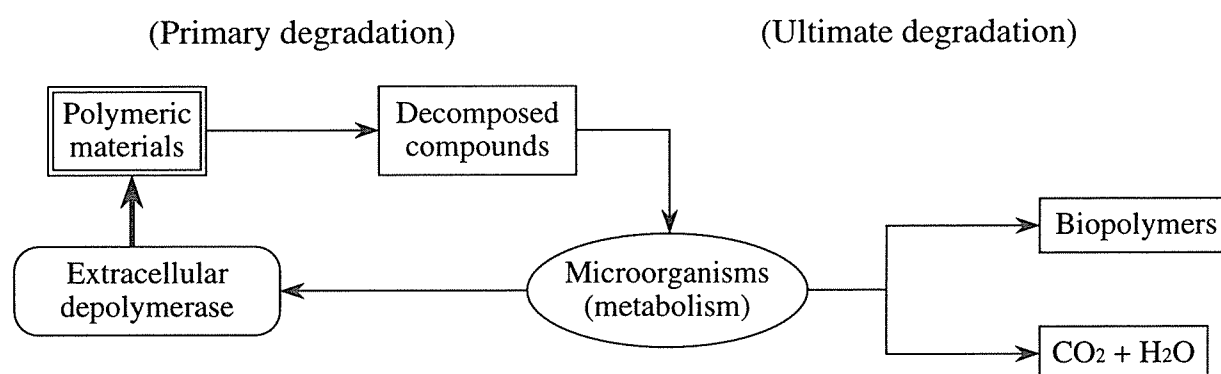


Figure 1-1 A schematic model of biodegradation of polymeric materials in natural environment.

微生物産生P[(R)-3HB]を分解する酵素を菌体外に分泌する微生物は、土壤中、汚泥中および海水中などの様々な自然環境中から単離されている⁴⁵⁻⁵⁵⁾。さらに、それらの微生物が分泌するPHB分解酵素（PHBデポリメラーゼ）は、*Pseudomonas lemoignei*⁵⁶⁾、*Pseudomonas pickettii*⁵³⁾、*Pseudomonas fluorescens*⁵²⁾、*Pseudomonas stutzeri*⁵⁵⁾、*Alcaligenes faecalis*⁴⁷⁾、*Comamonas teststeroni*⁵⁴⁾、*Comamonas* sp.⁵¹⁾、*Penicillium pinophilum*⁵⁷⁾などから精製され、その性質も調べられている。

環境中での高分子材料の分解反応は、微生物の分泌する酵素の触媒作用によって引き起こされる。一般に、酵素の触媒作用は、高い基質特異性を示すという点に大きな特徴がある。すなわち、特定の分子構造を持つ反応物に対して高い反応性を示す。したがって、高分子材料の酵素分解性は、高分子材料の分子構造によって大きく変化すると予測される。高分子材料の分子構造と酵素分解性との相関性を明らかにし、酵素反応メカニズムを解明することは、高分子材料の生分解性を制御する上で重要である。

1-6 本研究の目的

地球環境保全の観点から、自然界で微生物によって分解する生分解性プラスチックの開発がますます重要な研究課題になっている。それと同時に、生分解性プラスチックの様々な分野での利用が期待されており、幅広い物性の発現と生分解速度のコントロールが要求されている。

本研究で取り上げる微生物産生P[(R)-3HB]は、生分解性、生体適合性、熱可塑性という優れた特性を保持しているにも関わらず、その堅くて脆いという物性上の欠点より実用化には至っていない。その物性改善の方法として、P[(R)-3HB]に異なる構造のモノマーユニットを導入した共重合ポリエステルの合成やP[(R)-3HB]に異なる性質のポリマーを混合させるポリマーブレンドによる手法が考えられている。

われわれが理想とする生分解性高分子材料とは、使用している間は優れた性能を持続的に発揮し、廃棄後は微生物によって完全に分解され自然界の炭素循環に組み込まれる素材である。したがって、共重合ポリマーの合成あるいはポリマーブレンドによって生分解性高分子材料を材料設計する場合、材料を構成するポリマーは微生物によって完全に分解され、自然界の炭素循環に組み込まれるものでなければな

らない。つまり、材料設計を考える上で高分子の分子設計を思慮する必要がある。本研究では、多様な分子構造のポリ(ヒドロキシアリカン酸)を微生物合成あるいは化学合成し、それらポリエステルの物性と生分解性を調べた。得られた結果をもとに、生分解性ポリエステルの材料設計法について考察した。

第二章では、微生物産生P[(R)-3HB]に(S)-3HBユニットを導入した様々な立体構造を有するポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R,S)-3HB]) を化学合成し、その物理的性質および生分解性を調べる。P[(R,S)-3HB]の物理的性質および生分解性には、その立体構造が強く影響することが予想される。そこで、P[(R,S)-3HB]の立体構造と物理的性質および生分解性との関係を明らかにする。

第三章では、微生物産生P[(R)-3HB]と化学合成P[(R,S)-3HB]とのポリマーブレンドを調製し、その構造と物理的性質および生分解性について調べる。ポリエステルフィルムの生分解性には、フィルムの表面構造や固体構造が関与していることが予想される。P[(R)-3HB]とP[(R,S)-3HB]とのポリマーブレンドのモルホロジーが、ブレンドフィルムの物理的性質および酵素分解性にどのような影響を与えているのかを明らかにする。

第四章では、(R)-3HBユニットと(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸 ((R)-3HH) ユニットとの共重合ポリエステルを微生物合成し、その物理的性質と生分解性について調べる。(R)-3HHユニットは(R)-3HBユニットの側鎖メチル基がプロピル基に代わった構造を有しており、そのモノマーユニットの構造の変化が物理的性質および生分解性に強く影響を与えることが予想される。そこで、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の物理的性質および生分解性におよぼすモノマーユニットの側鎖の構造の効果を明らかにする。

第五章では、(R)-3HBユニットと6-ヒドロキシヘキサン酸 (6HH) ユニットとの共重合ポリエステルを化学合成し、その物理的性質と生分解性について調べる。6HHユニットは(R)-3HBユニットと主鎖炭素数が異なっており、そのモノマーユニットの構造の変化が物理的性質および生分解性に強く影響を与えることが予想される。そこで、P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の物理的性質および生分解性におよぼすモノマーユニットの主鎖の構造の効果を明らかにする。

第六章では、P[(R,S)-3HB]とP(6HH)とのブロック共重合体P[(R,S)-3HB-b-6HH]を化学合成し、非相溶なブレンド系である微生物産生P[(R)-3HB]とP(6HH)とのポリマ

ーブレンドの相溶化剤としてのブロック共重合体の効果について調べる。P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブロック共重合体が相溶化剤としての効果を示した場合、ポリマーアロイの物理的性質および酵素分解性に何らかの変化が生じることが予想される。ブロック共重合体の添加による物理的性質および酵素分解性への効果とその要因を明らかにする。

第七章では、P[(R)-3HB]をドラッグキャリアーとして用いるドラッグデリバリーシステム（DDS）の構築を目的として、制癌剤ラステットを含有したP[(R)-3HB]微粒子（ミクロスフェア）を調製し、薬物の放出挙動を生体外（*in vitro*）および生体内（*in vivo*）で調べる。P[(R)-3HB]ミクロスフェアの粒子径をコントロールできる調製条件と薬物の放出速度をコントロールできる方法論について検討した。

第八章では、各章の研究成果を総括し、今後の研究課題について論じる。

References

- (1) Doi, Y. *Microbial Polyesters*; VCH Publishers: New York, **1990**.
- (2) Anderson, A. J.; Dawes, E. A. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450.
- (3) Marchessault, R. H.; Coulombe, S.; Morikawa, H.; Okamura, K.; Revol, J. F. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 38.
- (4) Barham, P. J.; Keller, A.; Otun, E. I.; Holmes, P. A. *J. Mater. Sci.* **1984**, *19*, 2781.
- (5) Darby, R. T.; Kaplan, A. M. *Appl. Microbiol.* **1968**, *16*, 900.
- (6) Fields, R. D.; Rodriguez, F.; Finn, R. K. *J. Appl. Polym. Sci.* **1974**, *18*, 3571.
- (7) Potts, J. E.; Clendinning, R. A.; Ackart, W. B.; Niegisch, W. D. *American Chem. Soc. Polymer Preprints*, **1972**, *13*, 629.
- (8) Diamond, M. J.; Freedman, B.; Garibalidi, J. A. *Int. Biodetin. Bull.* **1975**, *11*, 127.
- (9) Tokiwa, Y.; Suzuki, T. *J. Ferment. Technol.* **1974**, *52*, 393.
- (10) Tokiwa, Y.; Ando, T.; Suzuki, T. *J. Ferment. Technol.* **1976**, *54*, 603.
- (11) Hamitou, A.; Ouhada, T.; Jerome, R.; Teyssie, Ph. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1977**, *15*, 865.
- (12) Hamitou, A.; Jerome, R.; Teyssie, Ph. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1977**, *15*, 1035.
- (13) 山下雄也, 津田鉄雄, 石川義男, 三浦定実, 工化 **1963**, *66*, 110.
- (14) Yasuda, T.; Aida, T.; Inoue, S. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1982**, *3*, 585.
- (15) Yasuda, T.; Aida, T.; Inoue, S. *Macromolecules* **1983**, *16*, 1792.
- (16) Bloembergen, S.; Holden, D. A.; Bluhm, T. L.; Hamer, G. K.; Marchessault, R. H. *Macromolecules* **1989**, *22*, 1656.
- (17) Gross, R. A.; Zhang, Y.; Konrad, G.; Lenz, R. W. *Macromolecules* **1988**, *211*, 2657.
- (18) Iida, M.; Araki, T.; Teranishi, K.; Tani, H. *Macromolecules* **1977**, *10*, 275.
- (19) Hocking, P. J.; Marchessault, R. H. *Polym. Bull.* **1993**, *30*, 163.
- (20) Kemnitzer, J. E.; McCarthy, S. P.; Gross, R. A. *Macromolecules* **1993**, *26*, 1221.
- (21) Kemnitzer, J. E.; McCarthy, S. P.; Gross, R. A. *Macromolecules* **1993**, *26*, 6143.
- (22) Le Borgne, A.; Spassky, N. *Polymer* **1989**, *30*, 2312.
- (23) Zhang, Y.; Gross, R. A.; Lenz, R. W. *Macromolecules* **1990**, *23*, 3206.

- (24) Ohta, T.; Miyake, T.; Takaya, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1725.
- (25) Hori, Y.; Suzuki, M.; Yamaguchi, A.; Nishishita, T. *Macromolecules* **1993**, 26, 5533.
- (26) Byrom, D. In *Biomaterials*; Byrom, D., Ed.; Macmillan Publishers: Basingstoke, 1991; p335.
- (27) Kunioka, M.; Nakamura, Y.; Doi, Y. *Polym. Commun.* **1988**, 29, 174.
- (28) Nakamura, S.; Doi, Y.; Scandola, M. *Macromolecules* **1992**, 25, 4237.
- (29) Shimamura, E.; Scandola, M.; Doi, Y. *Macromolecules* **1994**, 27, 4429.
- (30) Timm, A.; Steinbüchel, A. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, 56, 3360.
- (31) de Smet, M. J.; Eggink, G.; Witholt, B.; Kingma, J.; Wynberg, H. *J. Bacteriology* **1983**, 154, 870.
- (32) Lageveen, R. G.; Huisman, G. W.; Preustihg, H.; Ketelaar, P.; Eggink, G.; Witholt, B. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, 54, 2924.
- (33) Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R. W.; Fuller, R. C. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, 54, 1977.
- (34) Steinbüchel, A.; Valentin, H. E. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 128, 219.
- (35) Avella, M.; Martuscelli, E. *Polymer* **1988**, 29, 1731.
- (36) Greco, P.; Martuscelli, E. *Polymer* **1989**, 30, 1475.
- (37) Kumagai, Y.; Doi, Y. *Polym. Degrad. Stab.* **1992**, 35, 87.
- (38) Kumagai, Y.; Doi, Y. *Polym. Degrad. Stab.* **1992**, 36, 241.
- (39) Kumagai, Y.; Doi, Y. *Polym. Degrad. Stab.* **1992**, 37, 253.
- (40) Kumagai, Y.; Doi, Y. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1992**, 13, 179.
- (41) Miller, N. D.; Williams, D. F. *Biomaterials*, **1987**, 8, 129.
- (42) Korsatoko, W.; Wabnegg, H. M.; Braunegg, G.; Lafferty, R. M.; Strempfl, F. *Pharm. Ind.* **1983**, 45, 525.
- (43) Korsatoko, W.; Wabnegg, B.; Tillian, H. M.; Braunegg, G.; Lafferty, R. M. *Pharm. Ind.* **1983**, 45, 1004.
- (44) Korsatoko, W.; Wabnegg, B.; Tillian, H. M.; Braunegg, G.; Pfrner, G.; Walser, V. *Pharm. Ind.* **1984**, 46, 952.
- (45) Chowdhury, A. A. *Arch. Microbiol.* **1963**, 47, 167.

- (46) Delafield, F. P.; Doudoroff, M.; Pallerroni, N. J.; Lusty, C. J.; Contopoulos, R. *J. Bacteriol.* **1965**, *90*, 1455.
- (47) Tanio, T.; Fukui, T.; Shirakura, Y.; Saito, T.; Tomita, K.; Kaiho, T.; Masamune, S. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *124*, 71.
- (48) Jansen, P. H.; Harfoot, C. G. *Arch. Microbiol.* **1990**, *154*, 253.
- (49) Mergaert, J.; Anderson, C.; Wouters, A.; Swings, J.; Kersters, K. *FEMS Microbiol. Rev.* **1992**, *103*, 317.
- (50) Mergaert, J.; Webb, A.; Anderson, C.; Wouters, A.; Swings, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3233.
- (51) Jendrosseck, D.; Knode, I.; Habibian, R. B.; Steinbüchel, A.; Schlegel, H. G. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1993**, *1*, 53.
- (52) Schirmer, A.; Jendrosseck, D.; Schlegel, H. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 1220.
- (53) Yamada, K.; Mukai, K.; Doi, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 215.
- (54) Mukai, K.; Yamada, K.; Doi, Y. *Polym. Degrad. Stabil.* **1993**, *41*, 85.
- (55) Mukai, K.; Yamada, K.; Doi, Y. *Polym. Degrad. Stabil.* **1994**, *43*, 319.
- (56) Lusty, C. J.; Doudoroff, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, *56*, 960.
- (57) Brucato, C. L.; Wong, S. S. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *290*, 497.

第二章

ポリ[(*R,S*)-3-ヒドロキシブタン酸]の化学
合成と生分解性におよぼす立体構造効果

2-1 緒言

数多くの微生物は、(R)体の3-ヒドロキシブタン酸を構成単位とする高分子量体のポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB]) を生合成し、それをエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積している^{1,2)}。この光学活性ポリエステルは、生分解性や生体適合性といった優れた特性を有する熱可塑性高分子材料である^{3,4)}。そのため、農業、漁業、環境保全あるいは医療など幅広い分野での利用が検討されている⁵⁾。微生物のつくるP[(R)-3HB]は100%イソタクチック規則性を有し、固体状態において左巻きの2₁ヘリックス構造（繊維周期0.596nm）をとることが知られている⁶⁾。そのため、P[(R)-3HB]は高い結晶性（>60%）を示し、その機械的物性において堅くて脆いという欠点を有している。このP[(R)-3HB]の物性上の欠点を改善するために、P[(R)-3HB]に構造の異なるモノマーユニットを導入した共重合ポリエステルの微生物合成および化学合成、P[(R)-3HB]に性質の異なるポリマーを加えたポリマーブレンドの開発等の研究が数多くなされている。

微生物産生P[(R)-3HB]の特徴的な性質は、自然環境中の微生物が分泌する酵素の触媒作用によって容易に加水分解されることである⁷⁾。P[(R)-3HB]の分解微生物はこれまで様々な環境下から単離され、また、その分解酵素（PHBデポリメラーゼ）も単離・精製されている。このPHBデポリメラーゼは、微生物産生P[(R)-3HB]の構成モノマーユニットである(R)-3HBユニットを認識し、ポリマー鎖を加水分解する。酵素によって低分子量にまで分解されたP[(R)-3HB]の分解生成物は、微生物体内に取り込まれ、菌体内で様々な代謝経路を経て、各種生体高分子の合成あるいはエネルギー生産のために用いられ、最終的に水と二酸化炭素に変換される。

本研究の目的は、生分解性という新しい機能を持つ高分子材料の分子設計法を構築することである。そのためには、材料を作り出す上で材料の物理的性質と生分解速度という性能を同時にコントロールする方法論および材料の環境中での安全性を評価する方法論を開拓する必要がある。

前述したように、環境中での高分子材料の分解反応は、微生物の分泌する酵素の触媒作用によって引き起こされる。一般に、酵素の触媒作用は、高い基質特異性を示すという点に大きな特徴がある。すなわち、特定の分子構造を持つ反応物に対して高い反応性を示す。したがって、高分子材料の酵素分解性は、高分子材料の分子

構造によって大きく変化することが予測される。高分子材料の分子構造と酵素分解性との相関性を明らかにし、酵素反応メカニズムを解明することは、高分子材料の生分解性を制御する上で重要である。

第一章で述べたように、 β -ブチロラクトンの開環重合は、生成するポリマーの化学構造が微生物産生P[(*R*)-3HB]と同じことから様々な研究がなされてきた。微生物より生合成されたP[(*R*)-3HB]は、モノマーユニットが100%(*R*)体の3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) から構成されているポリエナンチオマーである。一方、化学合成法によって同じ化学構造のポリマーを調製した場合、(*R*)体と(*S*)体モノマーの立体組成、あるいは触媒の種類を変えることによって、ポリマー鎖中の(*R*)体と(*S*)体モノマーユニットの立体組成あるいはポリマーの立体規則性が異なる様々な立体構造のポリ(3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) が得られる。

本章では、化学合成法によって立体構造の異なるP(3HB)を調製し、その物理的性質および生分解性におよぼす立体構造効果を調べた。なぜならば、化学合成によって得られるP(3HB)は、その立体構造の違いによって幅広い物性を示す材料となることが予測されるからである。また、自然界に存在しない(*S*)体の3HBユニットを含むポリマーの酵素分解性を調べることは、高分子材料の分子構造と酵素分解性との相関性および酵素分解反応のメカニズムを明らかにする上で非常に有用であると考えられるからである。本研究では、立体構造の異なるP(3HB)の生分解性の評価として、酵素を用いた分解試験と環境水を用いた分解試験の2種類の方法を採用した。酵素を用いた分解試験では、再現性および定量性に優れており、かつ簡便な方法である。さらに、材料分解後の分解生成物が回収可能であるため、分解生成物の分析から酵素分解のメカニズムについての知見が得られる。一方、環境水を用いた分解試験では実際の自然環境中での材料の分解性を反映しており、環境中での材料の安全性についての知見も得られるからである。

2-2 実験

2-2-1 試薬

(1) ラセミ(*R,S*)- β -ブチロラクトン ((*R,S*)- β -BL)

東京化成(株)製、特級品を水素化カルシウム(和光純薬工業(株)製、特級品)で1日乾燥後、窒素雰囲気下で減圧蒸留(9mHg, 49–50 °C)を行って使用した。

(2) メチルアルミノキサン

東ソー・アクゾー社製のものをそのまま使用した。

(3) トルエン

和光純薬工業(株)製、特級品を、水素化カルシウム存在下1日窒素雰囲気中で還流後、蒸留を行って使用した。

(4) (*R*)- β -ブチロラクトン (92% e.e.) ((*R*)- β -BL)

Ohtaら⁷⁾の方法にしたがい、Ru-(*S*)-2,2-bis(diphenylphosphino)-1,1-binaphthyl錯体を用いて、ジケテンを不斉水素化することにより光学純度92%の(*R*)- β -BLを調製した。

(5) 1-エトキシ-3-クロロテトラブチルジスタノキサン

Okawaraら⁸⁾の方法にしたがって調製した。Bu₂SnO: 76.1gとBu₂SnCl₂: 31.0gを95.0%エタノール1.0L中で6時間還流した後、溶液を濃縮することによって白色粉末を得た。白色粉末をさらに99.5%エタノール中で12時間還流した。その後、ヘキサン中、0°Cにて再結晶させることにより1-エトキシ-3-クロロテトラブチルジスタノキサンを得た。得られた化合物は、100°Cで20時間減圧乾燥して使用した。

2-2-2 ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)の合成

(1) 微生物産生ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(*R*)-3HB]) の生合成

菌体には、好気性グラム陰性菌である *Alcaligenes eutrophus* H16 (ATCC 17699)を用いた。この菌株はAmerican Type Culture Collection (ATCC)より入手した。菌株の保存には、凍結保存法を採用し、凍結保存チップ(培養液1mLを分注)中、-20°Cで凍結保存し、実験に際して室温で解凍し、使用した。

本研究では、まず窒素源の豊富な培地(完全培地)であらかじめ菌体を増殖させた後、窒素源を含まない培地(ミネラル・リン酸培地)にてポリエステル蓄積のための培養を行う2段階培養法を採用した⁹⁾。

完全培地100mLを500mL坂口フラスコ（綿栓使用）に入れ、滅菌後（120℃, 15min）、凍結保存チップ（培養液 1mL）1個を植菌し、24時間、30℃で振とう培養した。培養後、遠心分離（6000rpm, 10min）により集菌した。完全培地で増殖させた菌体にP[(R)-3HB]を蓄積させるために、炭素源としてフルクトース20g/Lを含むミネラル・リン酸培地1Lに移し替え、ジャー・ファーマンター（丸菱MD250、内容積；2.6L）中、30℃で24時間培養を行った。空気は、流速1.0L/minで通気し、攪拌羽根回転数500rpmで行い、培養液のpHを7.0に保つために、培養中はpHの変動に応じて10%硫酸あるいは5%水酸化ナトリウム水溶液が滴下するよう自動制御した。培養後、菌体を遠心分離（8000rpm, 10min）により集菌し、蒸留水で洗浄後、凍結乾燥した。

乾燥菌体内に蓄積されたP[(R)-3HB]は、ソックスレー抽出器を用いて熱クロロホルムにより5時間抽出した。抽出液をエバポレータにより濃縮後、ヘキサン中に再沈し、室温で減圧乾燥することによりP[(R)-3HB]を得た。

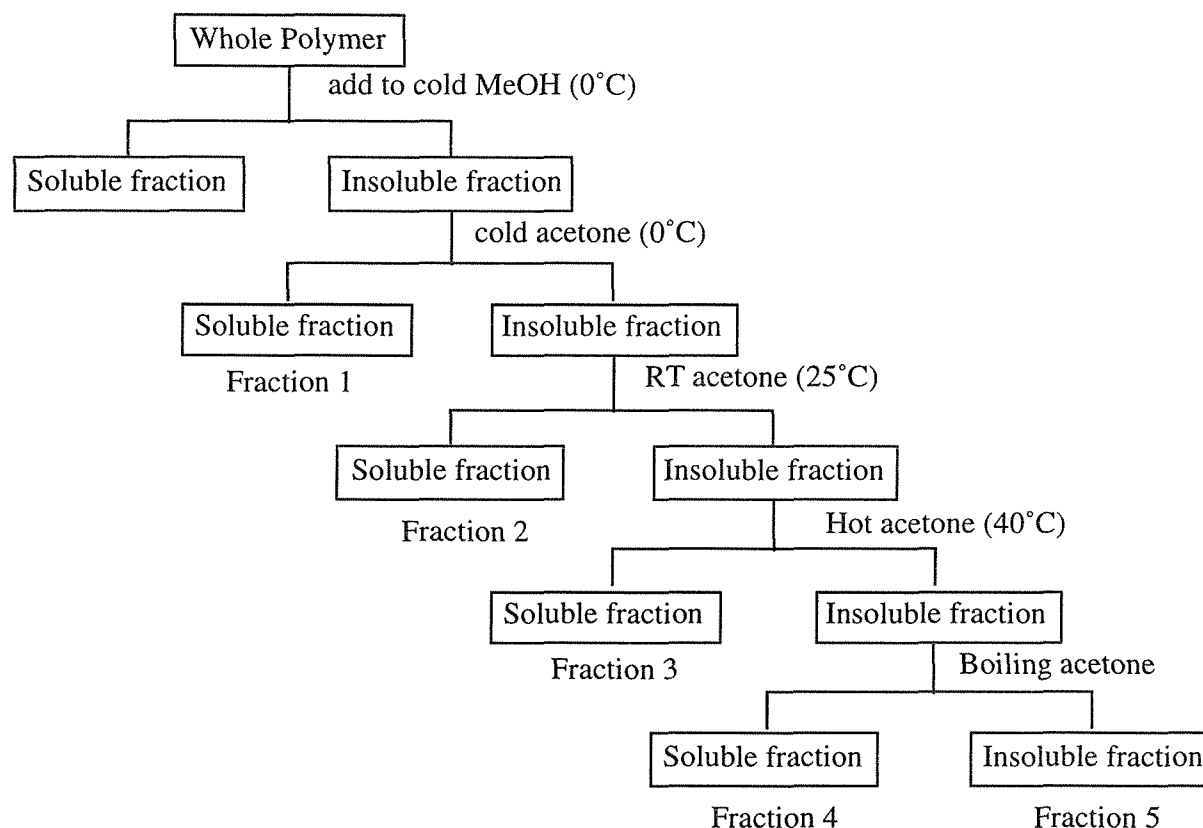
（2）(R)-, (S)-3-ヒドロキシブタン酸の立体組成の異なるポリ(3-ヒドロキシブタン酸)の化学合成

所定量の(R)- β -BL（92% e.e.）とラセミ(R,S)- β -BLおよび所定量の1-エトキシ-3-クロロテトラブチルジスタノキサンを20mLのシュレンクフラスコに入れ、100℃で4時間反応させた。生成物をクロロホルムに溶解し、ジエチルエーテル/ヘキサン（1/3 (v/v)）混合溶液中で沈殿させて立体組成の異なるP(3HB)を得た¹⁰⁾。

（3）タクチシチーの異なるポリ(3-ヒドロキシブタン酸)の化学合成

窒素置換した50mLシュレンクフラスコに、窒素雰囲気下でトルエン10mLおよびメチルアルミノキサン5mLを仕込み0℃に冷却し、窒素気流下でラセミの(R,S)- β -ブチロラクトン20mLを加え、60℃で7日間攪拌を行った。冷却後、少量のメタノールで反応を停止させた後、クロロホルムを加えて生成物を溶解し、約10倍量の冷メタノール（0℃）中に注いだ。沈殿物を回収し、冷アセトン（0℃）中（ポリマー/溶媒=500mg/100mL）で一日攪拌することによって、冷アセトン可溶部（Fraction 1）と不溶部とに分別した。次に、冷アセトン不溶部を室温アセトン（25℃）中（ポリマー/溶媒=500mg/100mL）で1日攪拌することによって、室温アセトン可溶部（Fraction 2）と不溶部とに分別した。室温アセトン不溶部を温アセトン（40℃）中（ポリマー/溶媒=500mg/100mL）で10時間攪拌することによって、温アセトン可溶部（Fraction 3）と不溶部とに分別した。さらに、温アセトン不溶部をソックスレー抽出器を用いて、

熱アセトン（56.5℃）中（ポリマー/溶媒=500mg/100mL）で10時間分別を行い、熱アセトン可溶部（Fraction 4）と不溶部（Fraction 5）とに分別した（Scheme 2-1参照）¹¹⁾。



Scheme 2-1 Fractionation of P(3HB) synthesized by ring-opening polymerization of racemic β -BL with MAO as a catalyst.

2-2-3 P(3HB)フィルムの作製

サンプルフィルムは、所定量のP(3HB)をクロロホルムに溶解し、2%(w/v)の溶液にし、ガラス製のシャーレを用いて、ソルベント-キャスト法により作製した。作製したフィルムを室温下で恒量になるまで減圧乾燥を行い、安定した結晶状態にするために3週間室温で放置した¹²⁾。

2-2-4 フィルムの酵素分解実験

P(3HB)フィルムの酵素分解試験は、0.1Mリン酸緩衝溶液（pH 7.4）中、37℃で行った。分解酵素としては、*Alcaligenes faecalis*¹³⁾および*Pseudomonas pickettii*¹⁴⁾が菌体外に分泌するPHBデポリメラーゼを用いた。P(3HB)フィルムの分解速度は、以下の二種類の方法によって評価した。

(1) UV法

1mLのリン酸緩衝溶液 (0.1M, pH7.4) を入れた光路長1cmの石英セルに所定量の分解酵素を添加し、37℃になるまで保持した。そこに1×1cmのP(3HB)フィルムを静かに入れて分解反応を開始した。反応は分光光度計 (日立U-2000ダブルビーム型分光光度計) を用いて210nmの吸光度 A_{210} の変化を調べることによって分析した¹⁵⁾。

(2) 重量減少法

予め重量を測った1×1cmのP(3HB)フィルムを、1mLのリン酸緩衝溶液 (0.1M, pH7.4) が入ったサンプル瓶に入れ、所定量の分解酵素を添加して分解反応を開始した。反応中は、サンプル瓶を37℃で振とうした。所定時間後、フィルムを採り出し、蒸留水で洗浄して乾燥し、反応後のフィルム重量を測定した。反応前後でのフィルム重量の差を重量減少量とした。

2-2-5 フィルムの環境水 (河川水) 中での分解試験

環境水中でのP(3HB)の分解試験は、温度制御可能なBOD試験装置 (タイテック BOD Tester) を用いて行った¹⁶⁾。試験水としては、荒川 (埼玉県和光市笹目橋付近) から採取した自然環境水を孔径125 μ mのフィルターで濾過したものを用いた。

ソルベント-キャスト法で作製したP(3HB)フィルム (10×10×0.1mm) を300mLBODリアクター中に入れ、そこに200mLの荒川水を加え、さらに、無機塩溶液0.2mL (水1L中; KH_2PO_4 : 8.50g, K_2HPO_4 : 21.75g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 33.30g, NH_4Cl : 1.70g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 22.50g, CaCl_2 : 27.50g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.25g) を添加した。分解試験は、好気条件下、25℃で28日間行い、生物化学的酸素消費量 (BOD) (微生物の活動によって消費される酸素量) の変化を経時的に測定した。コントロールとして、P(3HB)フィルムを入れない試験水を用意し、分解試験のブランクとした。また、試験終了後の試験水のpHおよび溶存有機炭素濃度 (DOC) の測定およびサンプルフィルムの重量減少量を測定した。DOCの測定は、Shimadzu TOC-5000を用いて行った。

BODデータは、以下の取り扱いによってBOD生分解度とした。

BOD_s : 試料溶液のBOD値

BOD_b : ブランク溶液のBOD

ThOD : 試験サンプルの理論的酸素消費量 (試験物質がすべて CO_2 と H_2O に変換され完全に無機化されたと考えた場合の酸素消費量)

$$\text{BOD生分解度(\%)} = (\text{BOD}_s - \text{BOD}_b) \times 100 / \text{ThOD}$$

2-2-6 分析方法

(1) NMR測定

JEOL α -400を用いて、合成したポリマーの400MHz ^1H -NMRスペクトルおよび100MHz ^{13}C -NMRスペクトルを得た。溶媒は重クロロホルム、基準物質としてテトラメチルシラン (TMS) を用い、測定は室温で行った。

酵素分解反応によって生成した水溶性の分解生成物の400MHz ^1H -NMR解析は、同装置を用いて行った。溶媒は重水、基準物質としてジメチルシランペンタスルホン酸 (DSS) を用いて測定した。

(2) 分子量測定

ポリマーの分子量および多分散度は、gel-permeation chromatography (GPC) により決定した。GPC測定には、検出器として示差屈折計を備えた島津6A GPCシステムを用いた。カラムとして、直列に接続したShodex K-80MおよびK-802を使用した。カラム温度40℃で測定した。溶媒としてクロロホルムを用い、0.8mL/minの流速で分析を行った。また、サンプルは1mg/mLの濃度になるようにクロロホルムに溶解した。分子量は、ポリスチレン換算で計算した。

(3) DSC測定

冷却装置を備えた島津DSC-50を用い、ソルベント-キャスト法で作製したP(3HB)フィルムの融点 (T_m)、融解熱 (ΔH_m) およびガラス転移点 (T_g) の分析を行った。 T_m および ΔH_m の測定は、約2mgのサンプルを正確に計りとり、アルミニウムパンに入れ、窒素雰囲気下 (流速30mL/min)、昇温速度10℃/minで室温から200℃まで昇温する1st runによって行った。 T_g の測定は、1st runで200℃まで昇温した後、200℃で1分間保持し、サンプルが入っているアルミニウムパンを液体窒素中でクエンチし、昇温速度20℃/minで-100℃から200℃まで昇温することにより行った。 T_g の値としては、熱容量変化の midpoint 温度を採用した。

(4) X線回折測定

ポリマーの広角X線回折図は、理学RAD-3Bシステムを用いて室温で測定することによって得た。X線源としてCuK α 線 ($\lambda=0.1542\text{nm}$) を用いた。X線の発生条件は、流加電圧40kV、電流30mAとした。測定はスキャン範囲 $2\theta=6\sim 60^\circ$ をスキャン速度

2°/minで行った。サンプルとしてクロロホルム溶液からソルベント-キャスト法で調製したフィルムを用いた。フィルムの結晶化度は、X線回折図の非晶部のハロー領域の面積と結晶部に由来するピーク領域の面積との面積比より決定するVonkの手法¹⁷⁾を用いた。

(5) 引っ張り試験

P(3HB)フィルムの機械的物性の測定は、今田製作所製型引っ張り試験器 (Model SV-50) を用いて行った。試験片として、ソルベント-キャスト法で調製したフィルム (厚さ40~100 μ m) をJIS K-6301のサイズ4のダンベル型に打ち抜き使用した。測定は、引っ張り速度20mm/minで室温 (23℃) で行った。試験片の数は5個とし、その試験結果のうち3個の平均値を採用した。

(6) 球晶形成の観察

P(3HB)の球晶は、ホットステージと簡易偏光板を備えた光学顕微鏡を用いて観察した。ホットステージに約2mgのサンプルフィルムを置き、昇温速度30℃/minで室温から200℃まで昇温した。200℃で30秒間保持し、その後所定の結晶化温度まで80℃/minで急冷した。球晶の観察中は結晶化温度を一定に保ち、CCDカメラを用いてビデオ撮影を行った。P(3HB)の球晶成長速度は、一定時間ごとに球晶半径を測定し、時間と球晶半径のプロットの傾きから算出した。

(7) 走査型電子顕微鏡観察

フィルムの表面および断面の様子は、走査型電子顕微鏡 (JEOL JSM-5300) を用いて調べた。サンプルは、イオンスパッタリング装置を用いてAuコーティングして用いた。

(8) 高速液体クロマトグラフィーによる分解生成物の分析

1×1cmのP(3HB)フィルムを、1mLのリン酸緩衝溶液 (0.1M, pH7.4) 中に入れ、所定量の分解酵素を添加することによって分解反応を開始した。所定時間後、反応溶液を採取し、0.45 μ mのフィルターで濾過した。その濾液50 μ Lを採取し、希塩酸 (pH2.5) により1mLとし、HPLC用のサンプルとした。HPLC装置は島津社製、カラムはLichrospher 100RP-8 (C8, Merk) ; 長さ25cm, 直径4mmのものをを用いた。サンプルの注入には、島津社製のオートインジェクター (SIL-6B) を用いて、注入量は50 μ Lとした。溶出は、流量1mL/minとし、40分間で水(pH2.5)/アセトニトリル; 100/0~0/100まで直線濃度勾配をかけて行った。検出は島津社製のSPD-10Aを用いて

210nmの吸光度より調べた。

(9) 旋光度測定

分解生成物の旋光度は、日本分光DIP-360を用いて行った。光源としてNaランプ(589nm)を用い、ガラスセル(直径3.5mm, 長さ100mm)に精秤した分解生成物の水溶液を注入し、室温(23℃)で測定を行った。サンプルの濃度は、0.4～0.8g/100mLの範囲とした。

2-3 結果と考察

2-3-1 (R)-, (S)-3-ヒドロキシブタン酸の立体共重合体の物性と酵素分解性

前述したように、(R)体と(S)体モノマーの組成比、あるいは触媒の種類を変えて β -BLの開環重合を行うことによって、ポリマー鎖中の(R)体と(S)体モノマーユニットの立体組成あるいはポリマーの立体規則性が異なる様々な立体構造のポリ(3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) が得られる。本節ではまず、P(3HB)ポリマー鎖中のモノマーユニットの立体組成 ((R)体と(S)体の組成比) が、ポリマーの物理的性質および生分解性にどのような効果を与えるのかを明らかにする。

近年、Horiら¹⁰⁾により、 β -BLをジスタノキサン触媒で開環重合することにより、分子量が10万以上の高分子量のポリマーを合成できることが報告された。そこで本研究では、ジスタノキサン触媒を用いて、(R)体と(S)体の β -BLの混合比を変えて開環重合することによって立体組成の異なるP(3HB)を調製した。得られたポリマーの物理的性質として熱的性質、結晶構造および機械的強度を様々な分析手法によって評価した。また、立体組成の異なるP(3HB)の酵素分解性の評価法として*Pseudomonas pickettii*および*Alcaligenes faecalis*のPHBデポリメラーゼを用いた酵素分解試験を行い、分解生成物の解析を行った。さらに、環境水（河川水）中での分解試験法としてBOD試験装置を用いた分解反応を行い、(S)体の3HBユニットを含むP(3HB)の生分解性と安全性を調べた。

(1) ジスタノキサン触媒で合成したP(3HB)の立体構造

ジスタノキサン触媒を用いて、(R)体と(S)体の β -BLの混合比を96/4～50/50(mol/mol)まで変えて、 β -BLを開環重合することによってP(3HB)を重合した。得られたポリマーの分子量をGPCによって測定した。Table 2-1には、ポリマーの重合条件と収率および分子量を示してある。いずれの条件においても、高収率で分子量の高い（数平均分子量が10万以上）ポリマーが得られた。

Table 2-1. Ring-opening polymerization of (*R*)- β -BL and (*R,S*)- β -BL with distannoxane catalyst.^a

sample no.	monomer, mmol		monomer feed ratio, <i>R/S</i>	yield, %	molecular weight	
	(<i>R</i>)- β -BL ^b	(<i>R,S</i>)- β -BL ^c			$M_n \times 10^{-3}$	M_w/M_n
1	40.0	0	96/ 4	95	121	1.8
2	34.7	5.2	90/10	97	112	1.8
3	30.4	9.5	85/15	94	115	1.7
4	26.0	13.9	80/20	94	107	1.8
5	17.4	22.5	70/30	90	105	1.8
6	0	40.0	50/50	99	145	1.8

a) Polymerization conditions of β -BL: mole ratio of catalyst (1-ethoxy-3-chlorotetrabutyl-distannoxane) / monomer = 1/4000, reaction temperature = 100°C, reaction time = 4 h., without solvent.

b) Dried by CaH₂ and distilled under reduced pressure before use (e.e. 92 %).

c) Dried by CaH₂ and distilled under reduced pressure before use (e.e. 0 %).

ジスタノキサン触媒で合成したP(3HB)の立体規則性を調べるために、¹³C-NMRによる解析を行った。Figure 2-1 (a)には、 β -BL ((*R*)-体/(*S*)-体=50/50(mol/mol)) をジスタノキサン触媒で重合して得られたP(3HB)の¹³C-NMRスペクトルを示してある。メチル炭素に由来する2本のピーク (20ppm付近)、メチレン炭素に由来する4本のピーク (41ppm付近)、メチン炭素に由来する3本のピーク (77ppm付近) およびカルボニル炭素に由来する2本のピーク (169ppm付近) が確認された。Figure 2-1 (b)には、¹³C-NMRスペクトルのカルボニル炭素とメチレン炭素に由来するピークの拡大図を示してある。イソタクチックダイアッド(*ii*)とシンジオタクチックダイアッド(*ss*)連鎖の違いによって分かれた2本のカルボニルピークの面積比よりダイアッド分率を、また、イソタクチックトリアッド(*iii*)、シンジオタクチックトリアッド(*sss*)およびヘテロタクチックトリアッド(*iss*および*ssi*)連鎖の違いによって分かれた4本のメチレンピークの面積比よりトリアッド分率を算出した⁶⁾。Table 2-2には、各サンプルのダイアッドおよびトリアッド分率の値をまとめて示してある。

Horiら¹⁰⁾の報告により、ジスタノキサン触媒による β -BLの開環重合は、アシルーオキシゲン開裂によって重合反応が進行することが知られている。したがって、仕込みモノマーユニットの立体配置が保持された状態でポリマーが生成する。本研究で調製した(*R*)-体/(*S*)-体モノマーの混合比が異なるP(3HB)ポリマー鎖中のモノマーユニットの立体組成は、仕込みモノマーの立体組成を保持している。

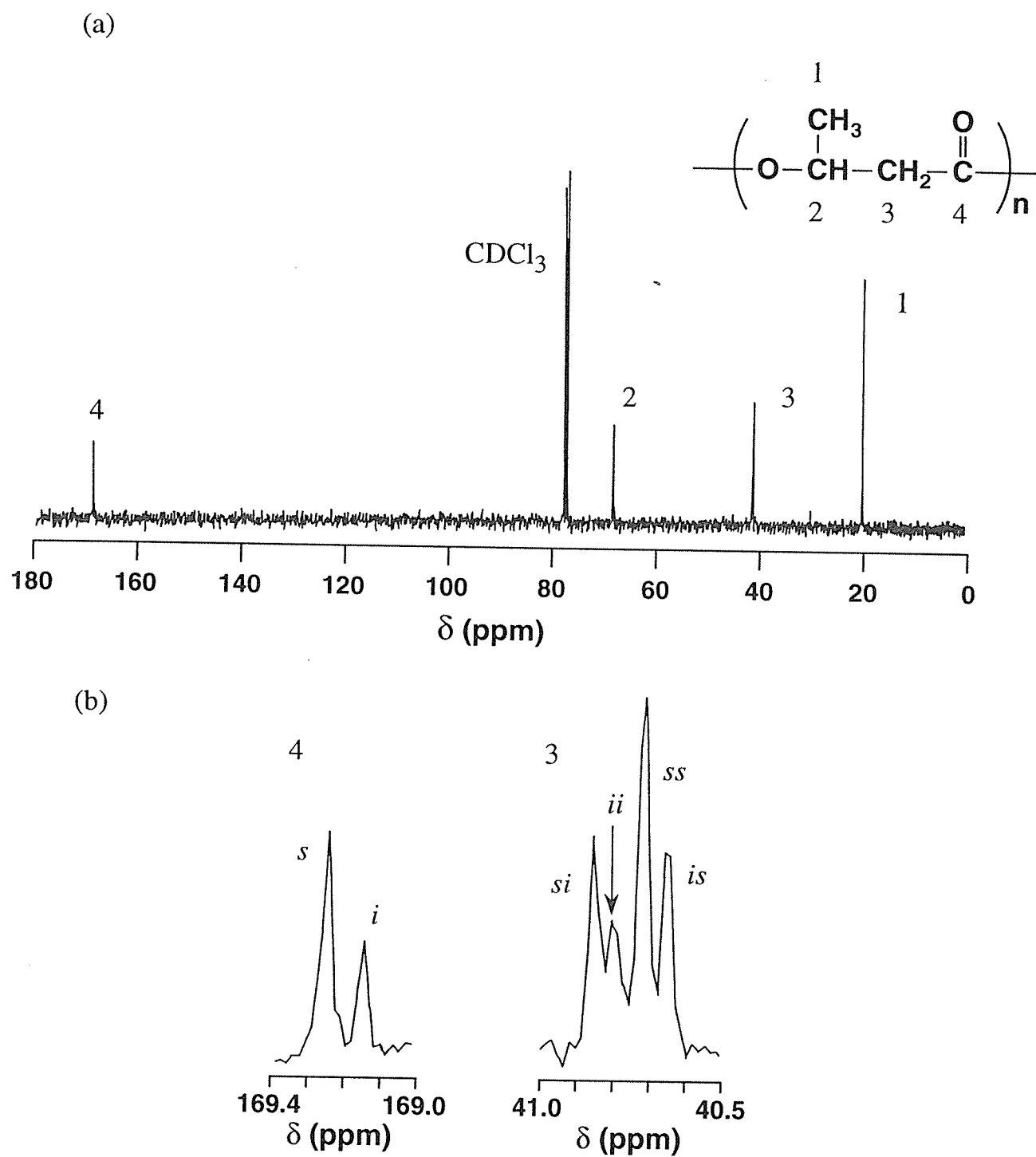


Figure 2-1 100-MHz ^{13}C -NMR spectrum of P[(*R,S*)-3HB] (sample no.6 in Table 2-1) in CDCl_3 (a), together with expanded carbonyl carbon resonances (b).

Table 2-2. Diad and triad stereosequence distributions of P(3HB) samples.

sample no.	(R)-3HB/ (S)-3HB, mol/mol	isotactic diad fraction, ^a [i] (RR + SS)	triad fraction ^b			
			[ii] (RRR + SSS)	[ss] (RSR + SRS)	[is] (RRS + SSR)	[si] (RSS + SRR)
1	96/4	0.92	0.95	0.03	0.01	0.01
2	90/10	0.84	0.78	0.07	0.07	0.08
3	85/15	0.76	0.63	0.15	0.11	0.11
4	80/20	0.68	0.56	0.20	0.17	0.07
5	70/30	0.46	0.38	0.27	0.20	0.15
6	50/50	0.30	0.13	0.42	0.21	0.24

a) Determined from the carbonyl carbon resonance in ^{13}C NMR spectra.

b) Determined from the methylene carbon resonance in ^{13}C NMR spectra.

(R)体/(S)体=50/50の β -BLを重合して得られたポリマーのイソタクチックダイアッド分率[i]およびシンジオタクチックダイアッド分率[s]は、それぞれ[i]=0.30, [s]=0.70であった。すなわち、このP(3HB)は(R)体と(S)体の3HBユニットが交互に配列する規則性（シンジオタクチック規則性）が高いポリマーであることがわかった。

(2) 立体組成の異なるP(3HB)の熱的性質

P(3HB)の熱的性質におよぼすポリマー鎖中のモノマーユニットの立体組成の効果を調べるために、Sn触媒を用いて化学合成したP(3HB)および微生物産生P[(R)-3HB]のガラス転移点 (T_g)、融点 (T_m) および融解熱 (ΔH_m) をDSCを用いて測定した。 T_m と ΔH_m はサンプルを窒素雰囲気下で、室温から200℃まで昇温速度10℃/minで加熱すること (1st run) によって求めた。また、 T_g は、1st runで200℃で融解したサンプルを液体窒素で急冷し、窒素雰囲気下で-100℃から200℃まで昇温速度20℃/minで測定すること (2nd run) によって求めた。Table 2-3にその結果をまとめて示してある。

Table 2-3に示すように、 T_g の値は、(S)-3HB組成によらず、5℃前後でほぼ一定であった。一方、 T_m の値は、(S)-3HB組成が0から20mol%まで増加するにしたがって、177℃から92℃まで低下した。ポリマー鎖中の(R)体/(S)体モノマー組成の異なるP(3HB)サンプルの ΔH_m は、(S)-3HB組成が0から20mol%まで増加するにしたがって、90J/gから43J/gまで低下することがわかった。(S)-3HB=30mol%のP[70%(R)-3HB] ([i]=0.46) サンプルは、非晶質なポリマーであり融解ピークは認められなかった。(R)体/(S)体=50/50のシンジオタクチック構造のP[50%(R)-3HB] ([i]=0.30) のDSC曲線に

は、52℃と62℃付近に二つの T_m が観測された。また、シンジオタクチックP[50%(R)-3HB] ($[i]=0.30$) の ΔH_m は27J/gであった。

Table 2-3. Thermal properties and X-ray crystallinities of solvent-cast P(3HB) films.

sample no.	(R)-3HB/(S)-3HB, mol/mol	isotactic diad fraction, $[i]$	T_g , ^a °C	T_m , ^b °C	ΔH_m , ^c J/g	X_c , ^d %
1	96/ 4	0.92	3	156	80	56±5
2	90/10	0.84	6	132	61	49±5
3	85/15	0.76	6	107	56	45±5
4	80/20	0.68	5	92	43	40±5
5	70/30	0.46	5	-	0	0
6	50/50	0.30	6	52, 62	27	26±5
7 ^e	100/0	1.00	5	177	90	62±5

a) Glass-transition temperature; measured by DSC (second scan), from -150 to 200°C at a rate of 20°C/min.

b) Melting temperature; measured by DSC (first scan), from 0 to 200°C at a rate of 10°C/min.

c) Enthalpy of fusion; measured by DSC (first scan).

d) Degree of crystallinity; determined by X-ray diffraction patterns.

e) Microbial P[(R)-3HB]; $M_n=281\ 000$, $M_w/M_n=2.3$.

(3) 立体組成の異なるP(3HB)の結晶構造

(S)-3HB組成が0から50mol%までのP(3HB)の結晶構造を、広角X線回折法により調べた。ソルベント-キャスト法で調製したP(3HB)フィルムのX線回折パターンを、Figure 2-2に示してある。微生物産生P[100%(R)-3HB]、P[96%(R)-3HB] ($[i]=0.92$) およびP[50%(R)-3HB] ($[i]=0.30$) のそれぞれのX線回折パターンから算出した格子面間隔 (d-spacing) の値をTable 2-4に示してある。微生物産生P[(R)-3HB]の結晶構造は、 2_1 ヘリックス構造を取りながら斜方晶系 $P2_12_12_1$ (D_2^4) の結晶単位胞 ($a=0.576\text{nm}$, $b=1.320\text{nm}$, $c=0.596\text{nm}$ (繊維周期)) を形成する⁶⁾。回折パターンおよび格子面間隔の比較から明らかなように、P[96%(R)-3HB] ($[i]=0.92$) は、微生物産生P[100%(R)-3HB]と同一の結晶構造を形成していることがわかる。一方、シンジオタクチック性の高いP[50%(R)-3HB] ($[i]=0.30$) の回折パターンおよび格子面間隔は、微生物産生P[100%(R)-3HB]のものと明らかに異なることがわかる。つまり、シンジオタクチックP[50%(R)-3HB] ($[i]=0.30$) は、イソタクチックP[(R)-3HB]とは異なる結晶構造を形成していることがわかった。

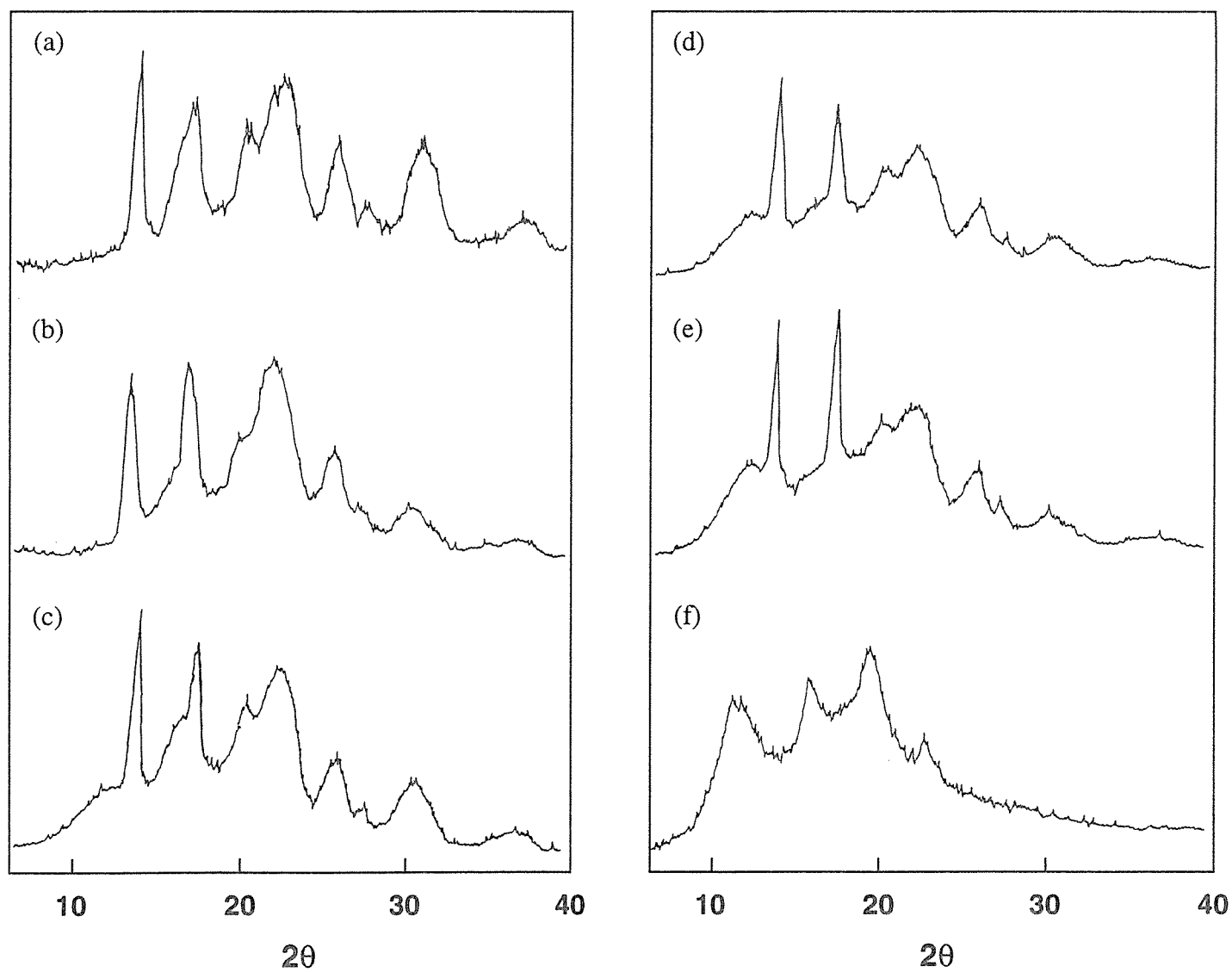


Figure 2-2 X-ray diffraction patterns of P(3HB) films; (a) P[100%(*R*)-3HB] ($[i]=1.00$), (b) P[96%(*R*)-3HB] ($[i]=0.92$), (c) P[90%(*R*)-3HB] ($[i]=0.84$), (d) P[85%(*R*)-3HB] ($[i]=0.76$), (e) P[80%(*R*)-3HB] ($[i]=0.68$), (f) P[50%(*R*)-3HB] ($[i]=0.30$).

Table 2-4. Interplanar d-spacing measurement from X-ray diffraction patterns of P(3HB) samples. ^a

P[100%(R)-3HB] ([i]=1.00)		P[96%(R)-3HB] ([i]=0.92)		P[50%(R)-3HB] ([i]=0.30)	
d-spacing, nm	intensity ^b	d-spacing, nm	intensity	d-spacing, nm	intensity
0.655 ± 0.003	s	0.654 ± 0.004	s	0.762 ± 0.005	s
0.531 ± 0.003	s	0.523 ± 0.004	s	0.554 ± 0.004	s
0.453 ± 0.003	m	0.447 ± 0.003	m	0.449 ± 0.005	s
0.397 ± 0.002	s	0.404 ± 0.005	s	0.389 ± 0.006	m
0.346 ± 0.005	m	0.347 ± 0.002	m		
0.326 ± 0.003	w	0.329 ± 0.003	w		
0.293 ± 0.002	w	0.297 ± 0.003	w		
0.244 ± 0.006	w				

a) Solvent-cast films. b) Peak intensity; s=strong, m=medium, w=weak.

Table 2-3には、各サンプルの回折パターンより求めたP(3HB)の結晶化度 (X_c) を示してある。(S)-3HB組成が0から20mol%までのP(3HB)フィルムの結晶化度は(S)-3HB組成の増加とともに徐々に低下していることがわかる。これは、ポリマー鎖中の(S)-3HBユニットがイソタクチックP[(R)-3HB]連鎖の結晶相に取り込まれず、結晶化を妨げる働きをするためである。また、シンジオタクチックP[50%(R)-3HB] ([i]=0.30) フィルムの結晶化度は26%であった。

(4) 立体組成の異なるP(3HB)の球晶成長速度と球晶形態

P(3HB)の溶融－結晶時の挙動におよぼす立体規則性の影響についての知見を得るために、P(3HB)の球晶形態および球晶の成長速度を調べた。一つの結晶核を中心として球対称の成長様式で成長した結晶組織を球晶と呼ぶ。結晶性高分子では、溶融あるいは濃厚溶液から結晶化させたときに現れ、高分子固体構造のなかでも重要な形態である。ポリマー鎖は、規則正しい折りたたみ配列によって、ラメラ（薄板状の結晶構造）を形成する。ラメラの厚さは、ポリマーの種類や形成時の結晶化温度などによって異なるが、数nm～数十nm程度である。このラメラが積層し、球晶の半径方向に捻れながら棒状の結晶構造（ロッド）をつくる。このロッドが結晶核を中心として放射状に配列したものが球晶である。ポリマー表面は、このような球晶で一様に覆われ、ポリマーの非晶部は、球晶内のラメラ間およびロッド間に存在する（Figure 2-3参照）。

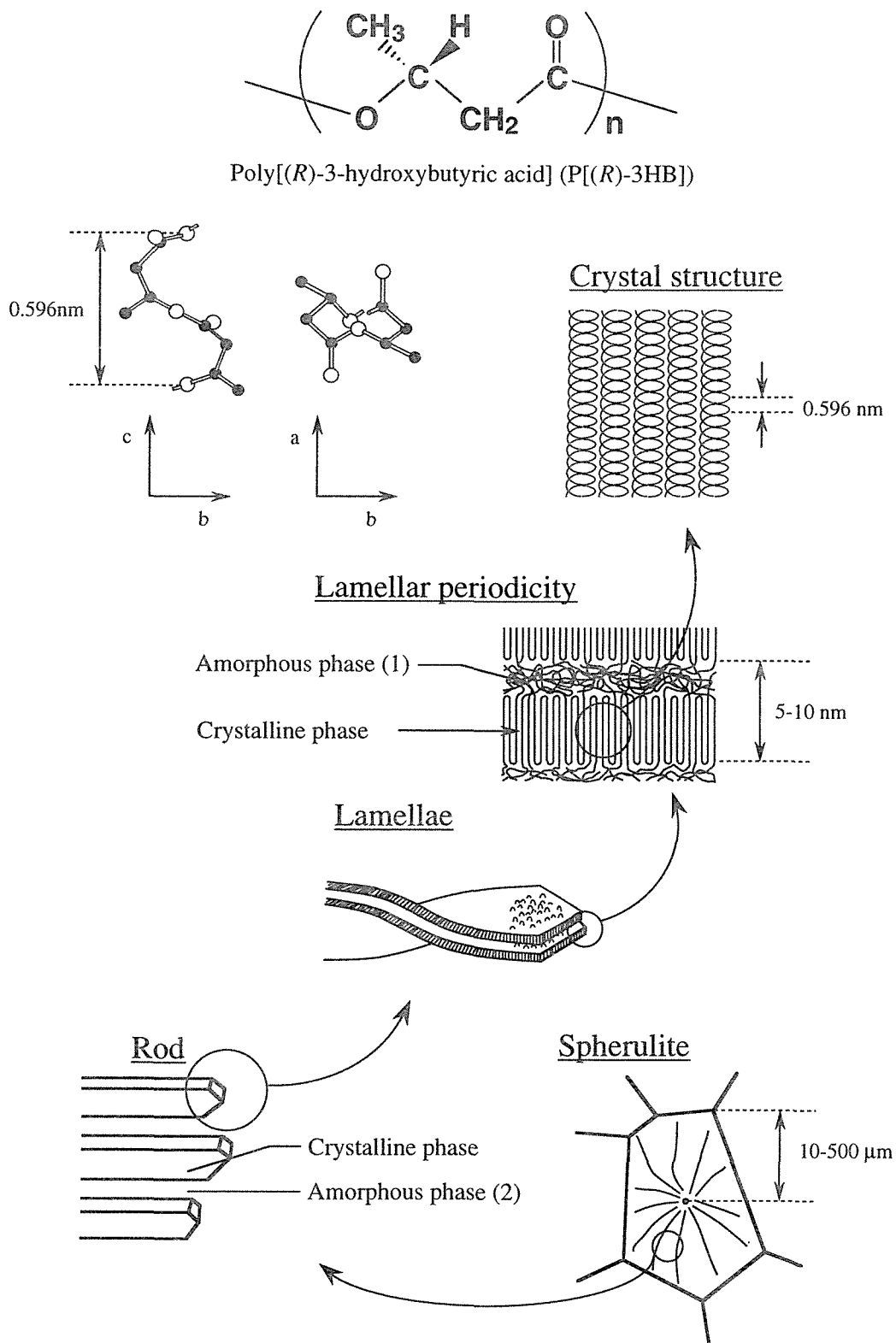


Figure 2-3 A schematic solid-state structures of semi-crystalline P[(*R*)-3HB] at various scales.

球晶観察は、ホットステージと簡易偏光板を備えた光学顕微鏡を用いて行った。室温から200℃まで昇温速度30℃/minで加熱した後、200℃で30秒間保持してポリマーを完全に熔融させ、その後80℃/minで降温し、所定の結晶化温度でポリマーを結晶化させた。P(3HB)の球晶成長速度は、時間に対して球晶半径をプロットして、そのときの傾きより算出した。球晶観察は、微生物産生P[100%(R)-3HB]と(S)-3HB組成が4, 10, 15mol%の三種類のP(3HB)について行った。

Figure 2-4には、微生物産生P[100%(R)-3HB]を80, 85, 95, 100℃のそれぞれの結晶化温度 (T_c)で結晶化させたときの球晶の写真を示してある。微生物産生P[100%(R)-3HB]の球晶形成において、結晶化温度 (T_c)を60℃から120℃まで上昇させるにしたがい、結晶核形成速度が減少し、その結果、球晶半径は増大した。また、 T_c が70℃から90℃の間において、P[(R)-3HB]は明瞭なバンド型の球晶を形成した。球晶のバンド幅は T_c が70℃から90℃まで増大するとともに約7μmから12μmまで広がる傾向が確認された。

Figure 2-5には、P[96%(R)-3HB] ($[i]=0.92$)を60, 70, 90℃の各結晶化温度で結晶化させたときの球晶の光学顕微鏡写真を示してある。 T_c の上昇とともに、結晶核形成速度が低下し、その結果、球晶半径が増大していることがわかる。 T_c が60から80℃の範囲では、微生物産生P[100%(R)-3HB]の球晶と同様に、明瞭なバンド型の球晶が形成された。また、バンド幅は、 T_c が60から80℃に上昇するにしたがって、広がる傾向が確認された。

Figure 2-6には、P[85%(R)-3HB] ($[i]=0.76$)を40, 60, 75℃の結晶化温度で結晶化させたときの球晶写真を示してある。球晶の写真から見受けられるように、P(3HB)はバンド型の球晶を形成することが確認された。しかし、その形状は、P[100%(R)-3HB]やP[96%(R)-3HB]の場合と比較して明瞭なものではなかった。

Figure 2-7には、結晶化温度 (T_c)を変化させてP(3HB)の球晶を成長させたときの球晶成長速度 (G)を T_c に対してプロットした結果を示してある。微生物産生P[(R)-3HB]では、 T_c が90℃付近で球晶成長速度の最大値 (G_{max})を示し、その値は約3.4μm/sであった。球晶成長速度は、(S)-3HB組成の増加にしたがって急速に低下し、P[85%(R)-3HB] ($[i]=0.76$)では、 G_{max} が微生物産生P[100%(R)-3HB]の G_{max} の約1/100にまで下がった。また、(S)-3HB組成が0から15mol%まで増加するにつれ、球晶成長速度の最大値を示す結晶化温度は90℃から65℃まで低温側にシフトすることがわか

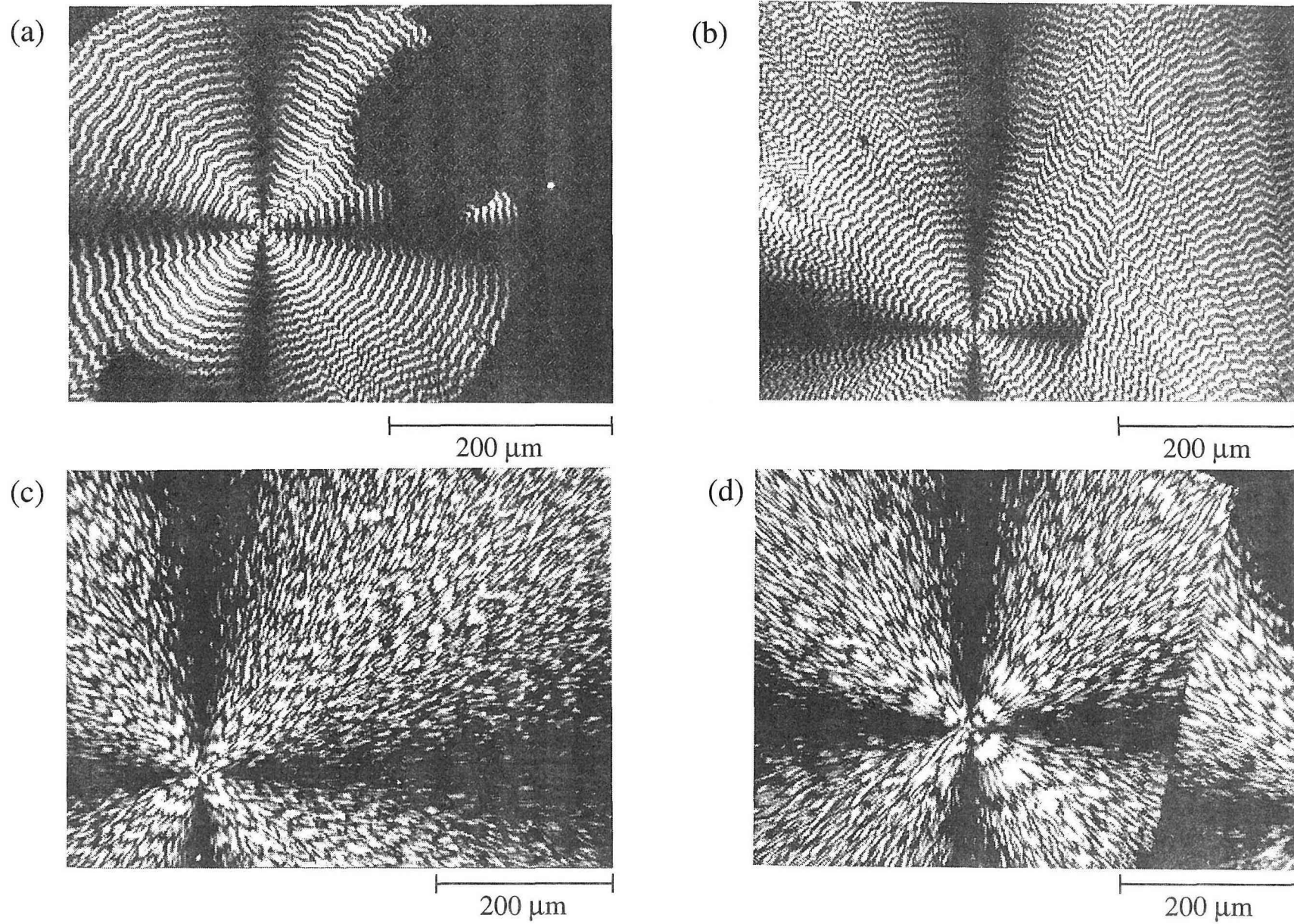


Figure 2-4 Optical micrographs of P(3HB) spherulites for bacterial P[100%(R)-3HB] ([i]=1.00) grown isothermally at (a) $T_c=80^\circ\text{C}$, (b) $T_c=85^\circ\text{C}$, (c) $T_c=95^\circ\text{C}$, and (d) $T_c=100^\circ\text{C}$.

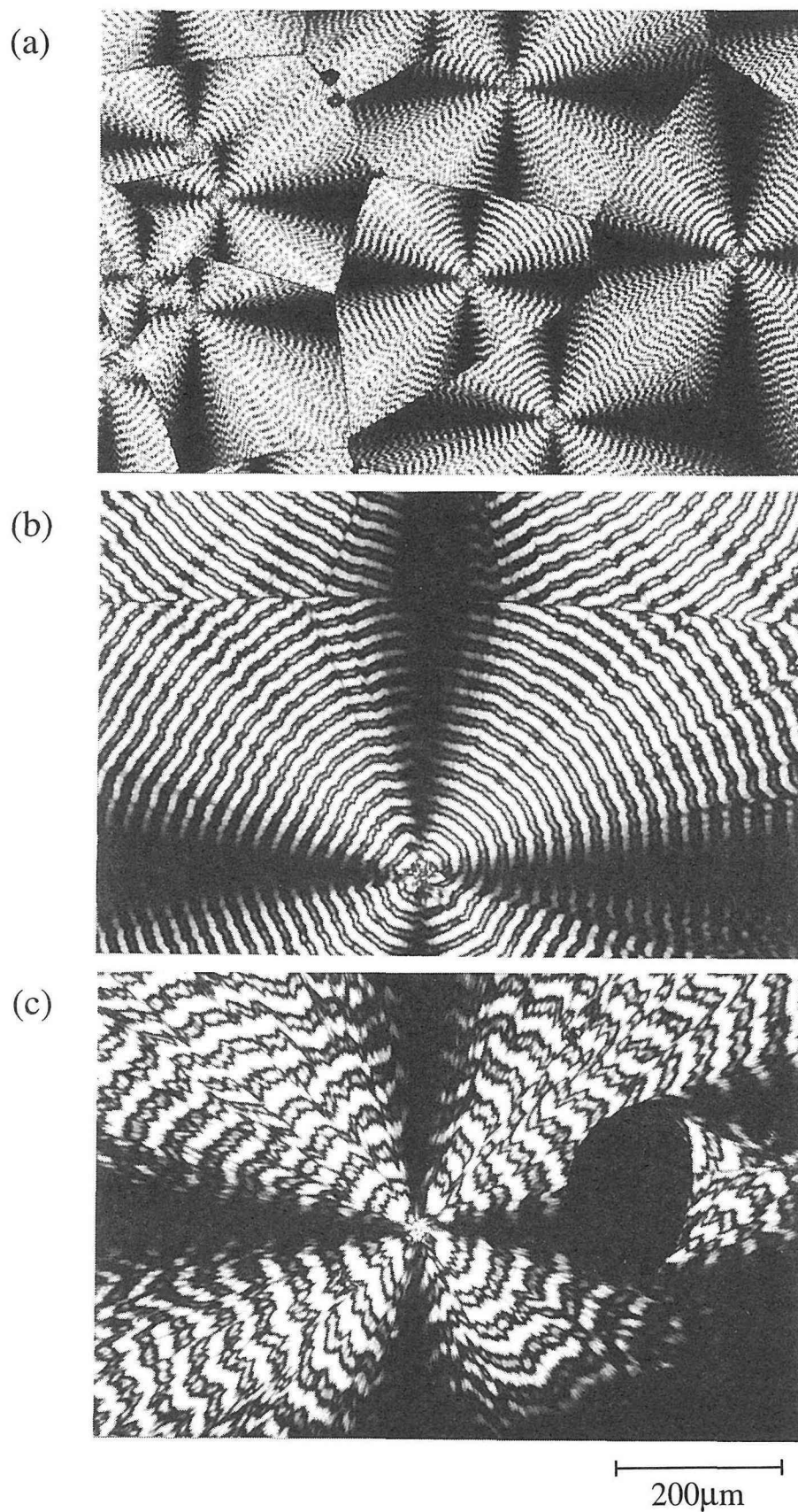


Figure 2-5 Optical micrographs of P(3HB) spherulites for P[96%(*R*)-3HB] ($[i]=0.92$) grown isothermally at (a) $T_c=60^\circ\text{C}$, (b) $T_c=70^\circ\text{C}$, and (c) $T_c=90^\circ\text{C}$.

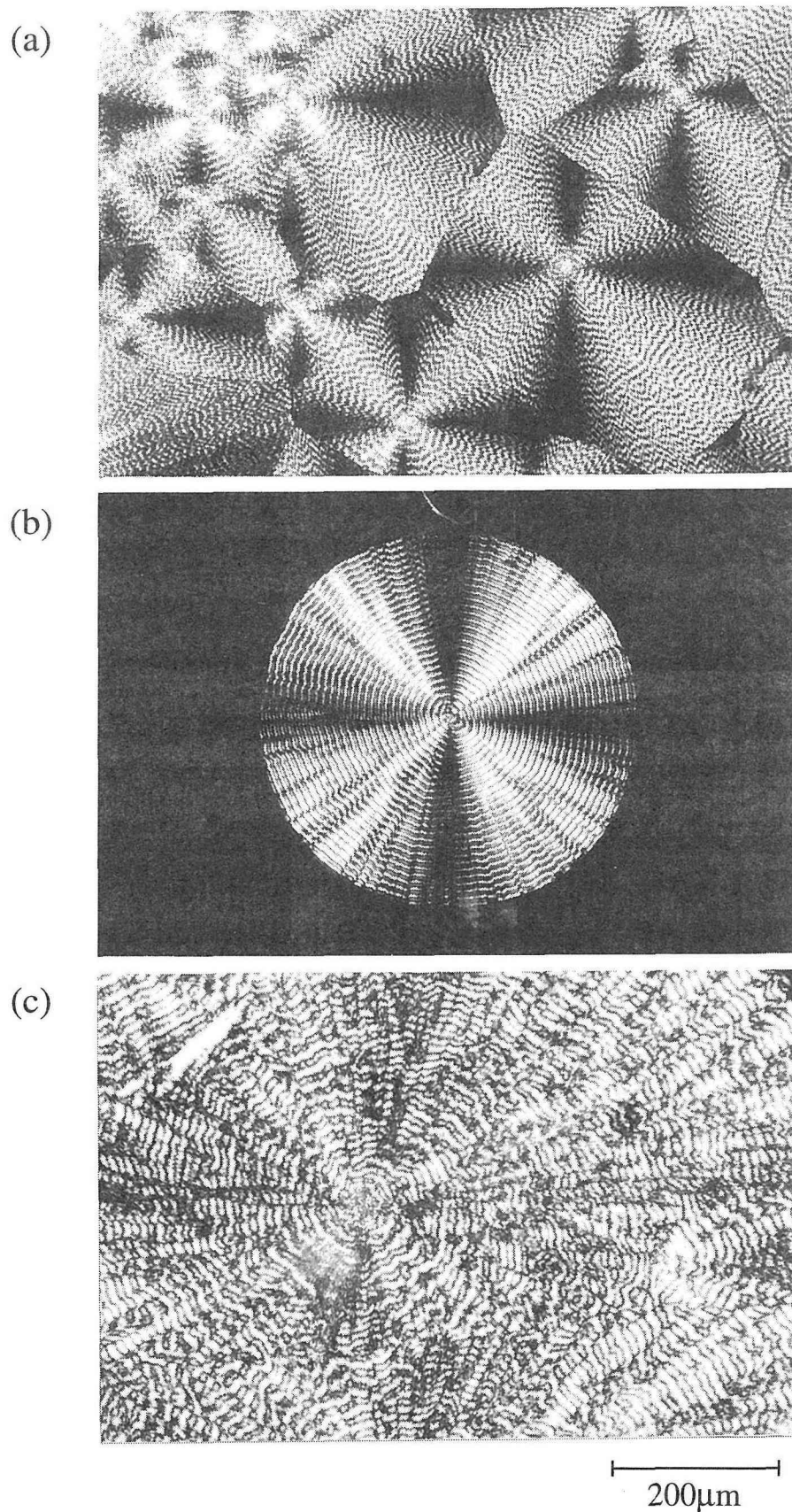


Figure 2-6 Optical micrographs of P(3HB) spherulites for P[85%(R)-3HB] ($[i]=0.76$) grown isothermally at (a) $T_c=40^\circ\text{C}$, (b) $T_c=60^\circ\text{C}$, and (c) $T_c=75^\circ\text{C}$.

った。これは、ポリマー鎖中の(S)体の3HBユニットが、イソタクチックP[(R)-3HB]連鎖の結晶形成を妨げる働きをするためであると結論できる。

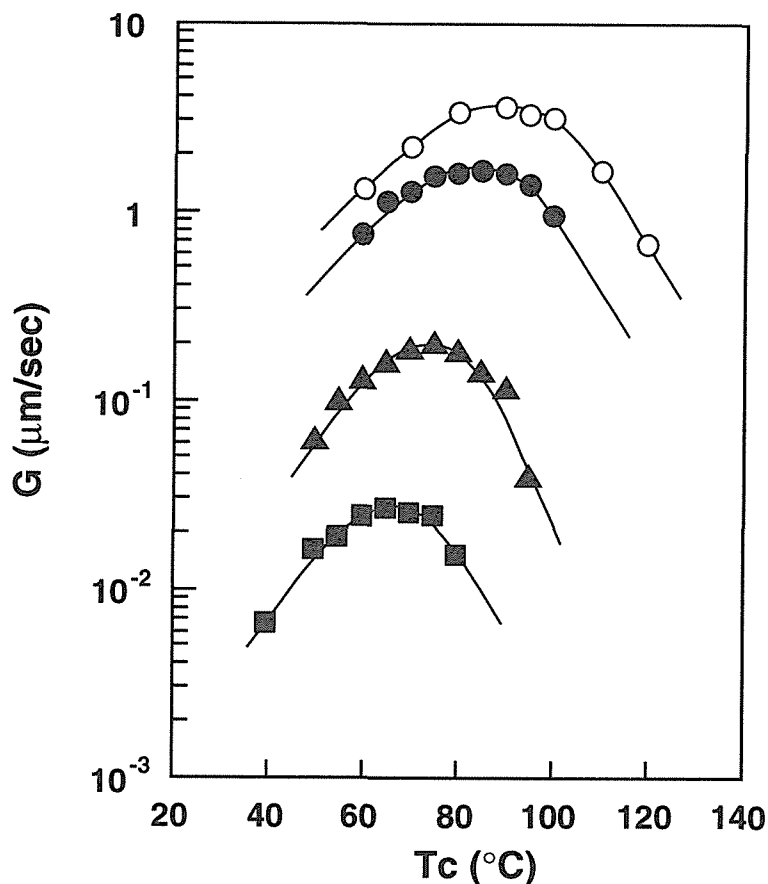


Figure 2-7 Radial growth rate (G) of P(3HB) spherulites at various crystallization temperatures (T_c) for P[100%(R)-3HB] (O), P[96%(R)-3HB] (●), P[90%(R)-3HB] (▲), and P[85%(R)-3HB] (■).

(5) 立体組成の異なるP(3HB)の機械的強度

ソルベント-キャスト法で調製したP(3HB)フィルムの機械的強度を引っ張り試験器を用いて測定した。Table 2-5に、各P(3HB)フィルムのヤング率、破壊強度および破壊伸びを示してある。ポリマー鎖中に(S)体の3HBユニットが0から20mol%まで導入されることによって、フィルムのヤング率は1560MPaから90MPaまで低下した。一方、フィルムの破壊伸びは、(S)-3HBの増加にともなって、5%から740%まで増加した。

X線解析の結果より、(S)-3HB=4~20mol%のP(3HB)フィルムは、微生物産生P[(R)-3HB]と同一の結晶構造を形成していることを明らかにした。そして、P(3HB)フィルムの結晶化度はポリマー鎖中の(S)-3HB分率が増加するにしたがって低下することを

示した。また、DSC解析の結果より、P(3HB)の融点は(S)-3HB分率が0から20mol%まで増加するにしたがって低下することを示した。一般に、高分子結晶の融点は結晶サイズに影響され、特に分子鎖方向の結晶厚に大きく依存する。高分子の融点は結晶厚の増大とともに上昇する。したがって、P(3HB)のラメラ結晶の厚さは、ポリマー鎖中の(S)-3HB分率が0から20mol%まで増大するにしたがって薄くなっていると考えられる。P(3HB)フィルムの伸び率の増大は、P(3HB)の非晶相の増大によるものであると結論できる。一方、P(3HB)フィルムの強度の低下は、P(3HB)のラメラ結晶の厚さが低下したためである。

シンジオタクチックP[50%(R)-3HB] ($[i]=0.30$) のフィルムのヤング率は20MPa、破壊伸びは1020%であり、このフィルムはエラストマー的な性質を持つことがわかった。

Table 2-5. Mechanical properties at 23°C for solvent-cast films of P(3HB) .

sample no.	(R)-3HB/(S)-3HB, mol/mol	isotactic diad fraction, $[i]$	Young's modulus, MPa	tensile strength, MPa	elongation to break, %
7	100/0	1.00	1560	38	5
2	90/10	0.84	1190	15	7
3	85/15	0.76	310	11	10
4	80/20	0.68	90	11	740
6	50/50	0.30	20	13	1020

(6) 立体組成の異なるP(3HB)の酵素分解性

まず、ポリマー鎖中の(R)体と(S)体のモノマーユニットの組成が異なるP(3HB)の生分解性をPHBデポリメラーゼを用いた酵素分解試験によって評価した。P(3HB)の酵素分解性はUV法と重量減少法の二通りの評価法で調べた。

UV法は紫外光を用いた電子スペクトル解析方法である。P(3HB)の加水分解によって生じる3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) のモノマーやオリゴマーのカルボニル基は、波長210nm付近の紫外光を強く吸収する。

一般に、Lambert-Beerの法則より、吸光度と物質の濃度との間に次の関係式が成り立つ。

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{eq. 2-1})$$

ここで、Aは吸光度、 ϵ は温度に依存するモル吸光係数、cは吸収する物質の濃度、lは吸収層の厚さである。3HBの37°Cにおける210nmの紫外光に対するモル吸光係数 ϵ_{210}

は、 $95\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ である¹⁵⁾。 l に光路長（セル幅）を代入すれば、eq. 2-1より3HBの濃度がわかる。UV法はこのように吸光度と反応溶液中の3HB濃度の関係を利用し、酵素分解反応液の210nmの紫外光の吸光度 A_{210} の変化を電子スペクトルで追跡し、酵素分解速度を測定する方法である。

一方、重量減少法は、P(3HB)フィルムの酵素分解による重量減少量を測定することによって酵素分解速度を評価する方法である。

酵素分解反応は、*Pseudomonas pickettii*¹⁴⁾が菌体外に分泌するPHBデポリメラーゼ（ $2.0\mu\text{g}$ ）を用いて、 0.1M リン酸緩衝溶液（ $\text{pH}7.4$ ）中、 37°C で行った。サンプルは、溶ベント-キャスト法で作製した $1\times 1\text{cm}$ のフィルム（厚さ $0.06\sim 0.1\text{mm}$ ，重さ $8\sim 14\text{mg}$ ）を利用した。非晶質なP[70%(R)-3HB]（ $[\eta]=0.46$ ）は、フィルムを形成できなかったため、 $1\times 1\text{cm}$ のテフロンシート表面にポリマーのクロロホルム溶液を塗り、非晶質ポリマーを均一に付着させたシートを調製し、酵素分解実験に使用した。

Figure 2-8には、各P(3HB)フィルムの酵素分解によって生成した水溶性の3HBモノマーユニットのモル量の経時変化をUV法で測定した結果を示してある。各曲線に添えた値は、それぞれのP(3HB)ポリマー鎖中の(R)-3HBのモル分率である。酵素分解の認められたサンプルには、分解実験開始初期において約30～60分間の誘導期が存在していることがわかった。これは、フィルム表面への酵素の吸着が飽和するまでの時間と考えられる。(S)-3HB=4～20mol%までのP(3HB)フィルムの分解における誘導時間は、微生物産生P[100%(R)-3HB]の誘導時間に較べて短いものであった。誘導期を経た後の3HBユニットの溶出量は、時間とともに直線的に増加している。誘導期を経た後の直線的に増加している部分の傾きより、水溶性の3HBユニットの生成速度を算出した。

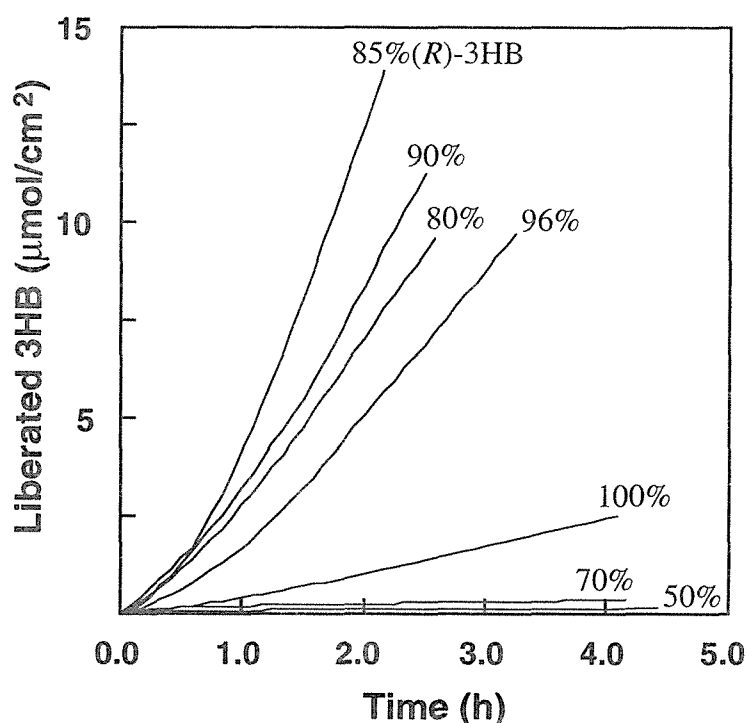


Figure 2-8 Amounts of 3HB units liberated as water-soluble products during the enzymatic degradation of P(3HB) films in 0.1M potassium phosphate solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (2.0μg/mL) from *P.pickettii* at 37°C.

Figure 2-9には、P(3HB)ポリマー鎖中の(S)-3HB分率と各フィルムの酵素分解時における水溶性の3HBユニットの生成速度との関係を示してある。また、比較として、重量減少法によるP(3HB)フィルムの酵素分解実験の結果も一緒に示してある。ポリマー鎖中の(S)-3HB組成が4~20mol%のP(3HB)フィルムの酵素分解速度は、微生物産生P[100%(R)-3HB]フィルムの分解速度よりも速いものであった。P[85%(R)-3HB] ([i]=0.76) フィルムの分解速度が最も速く、微生物産生P[100%(R)-3HB]フィルムの分解速度の約7倍の速さであった。一方、非晶質なP[70%(R)-3HB] ([i]=0.46) およびシンジオタクチック構造のP[50%(R)-3HB] ([i]=0.30) の2種類のフィルムは、*P.pickettii*のPHBデポリメラーゼによってほとんど分解されなかった。また、UV法および重量減少法により求めたP(3HB)フィルムの酵素分解速度は、ポリマー鎖中の(S)-3HB組成に対して、同様の傾向を示していることがわかった。

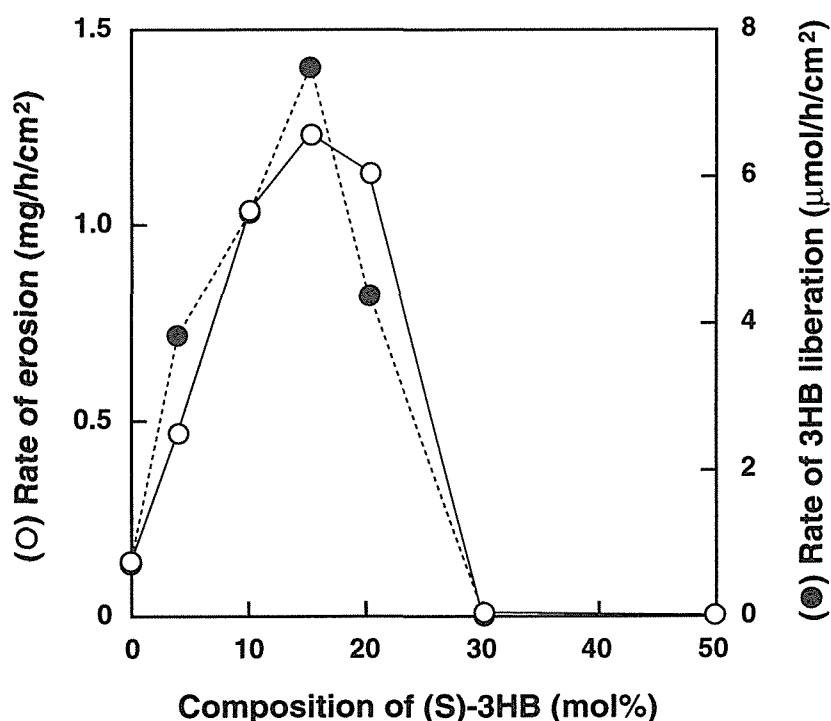


Figure 2-9 Effect of stereocomposition on the rate of weight loss (○) of P(3HB) films and on the rate of 3HB liberation as water-soluble products (●) during enzymatic degradation with PHB depolymerase (2.0μg/mL) from *P.pickettii*.

次に、それぞれのP(3HB)フィルムについて、*Alcaligenes faecalis*¹³⁾が菌体外に分泌するPHBデポリメラーゼ (2.0μg) による酵素分解実験を0.1Mリン酸緩衝溶液 (pH7.4) 中、37℃で行った。Figure 2-10には、重量減少法より求めたP(3HB)フィルムの分解速度と(S)-3HB組成との関係を示した。(S)-3HB=4~20mol%のP(3HB)フィルムの酵素分解速度は、微生物産生P[100%(R)-3HB]フィルムの分解速度よりも速いものであった。また、分解速度の最大値は、P[85%(R)-3HB] ([i]=0.76) フィルムの分解時に認められた。一方、非晶質なP[70%(R)-3HB] ([i]=0.46) およびシンジオタクチック構造のP[50%(R)-3HB] ([i]=0.30) の2種類のフィルムは、*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼによってもほとんど分解されなかった。このような結果は、*P. pickettii*のPHBデポリメラーゼによる酵素分解実験の結果とよく一致している。したがって、*A. faecalis*と*P. pickettii*とのPHBデポリメラーゼは、基質に対する特異性が非常に似かよった酵素であると考えられる。

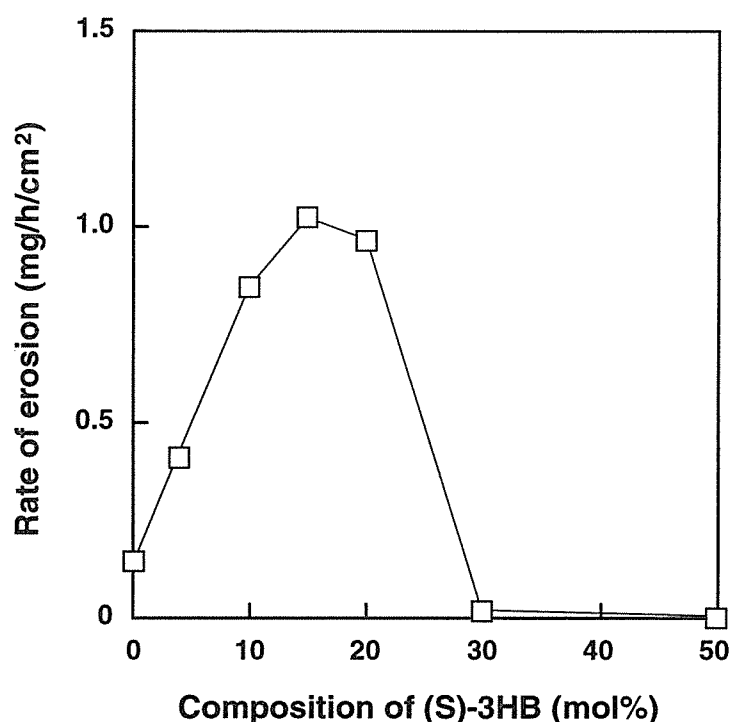


Figure 2-10 Effect of stereocomposition on the rate of weight loss of P(3HB) films during enzymatic degradation with PHB depolymerase (2.0 μ g/mL) from *A. faecalis*

次に、酵素分解試験前後のP(3HB)フィルムの表面形態の変化を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。Figure 2-11には、*P. pickettii*のPHBデポリメラーゼを用いた酵素分解実験後のP(3HB)フィルムのSEM写真を示してある。(S)-3HB分率が4mol%と15mol%のP(3HB)フィルムを3時間酵素分解した後のフィルム表面は、酵素による分解によって粗雑になっている。一方、シンジオタクチックP[50%(R)-3HB] ($[\eta]=0.30$) フィルムの表面は、24時間の酵素分解後においても滑らかなままである。

P(3HB)フィルムのPHBデポリメラーゼによる酵素分解反応は、基質であるP(3HB)フィルムが水に不溶であるために、不均一系の反応となっている。このような反応は、酵素がP(3HB)フィルムの表面に吸着する反応と、吸着した酵素がP(3HB)鎖を切断する (エステル結合の加水分解) 反応との2つの素反応より成り立っている。

本研究で用いた*A. faecalis*が分泌するPHBデポリメラーゼの性質はこれまでも調べられており、この酵素の分子量は47000であると報告されている¹⁸⁾。この酵素は、ジイソプロピルフルオロリン酸やフェニルメチルスルフォニルフルオリドでP[(R)-3HB]分解活性が阻害された¹⁹⁾。また、この酵素は水溶性の(R)-3HBオリゴマーと水不溶性のP[(R)-3HB]をともに分解することができた²⁰⁾。これらの結果より、この酵素の

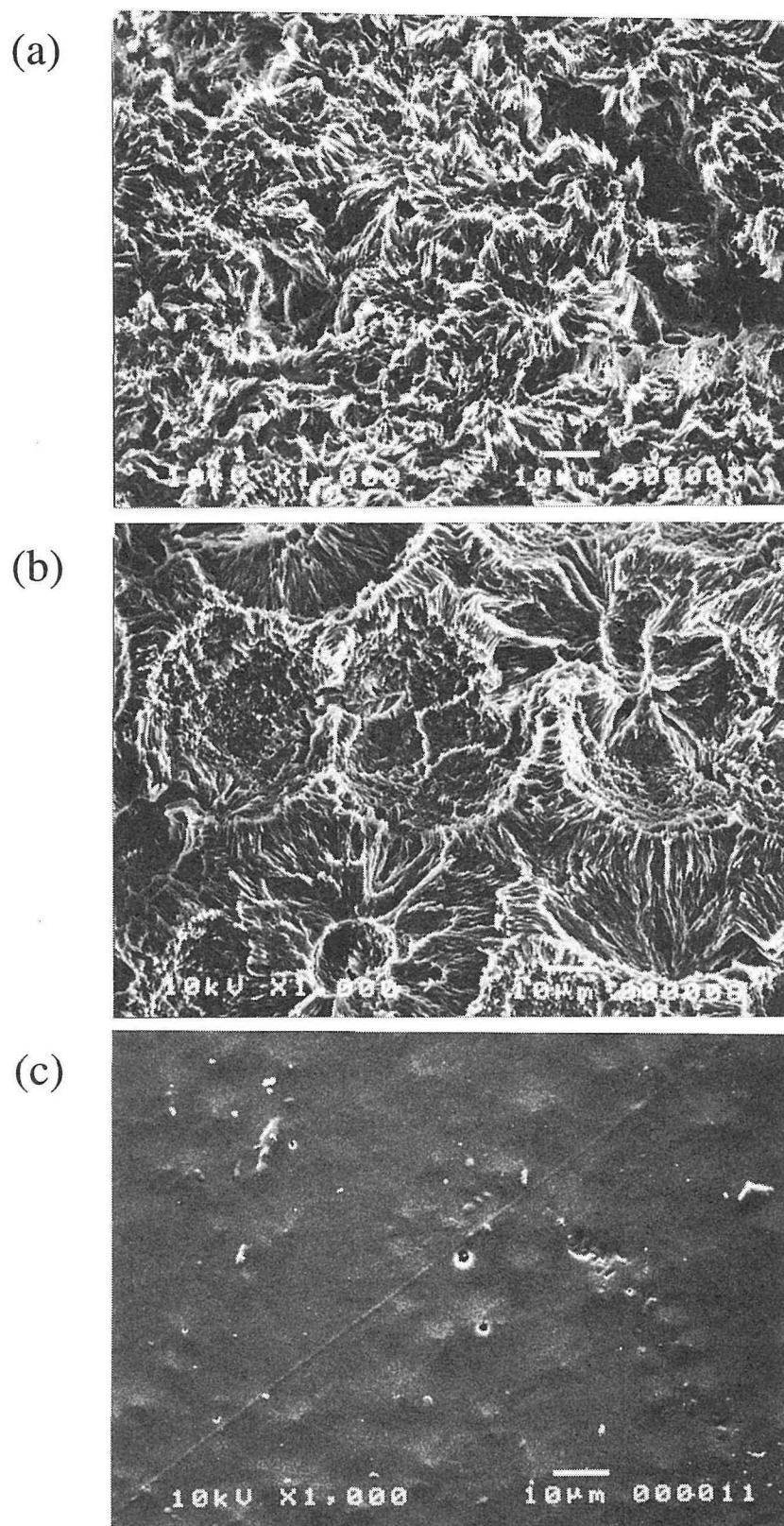


Figure 2-11 Scanning electron micrographs (SEMs) of the surfaces of P(3HB) films after enzymatic degradation with PHB depolymerase from *P. pickettii* at 37°C: (a) P[96%(R)-3HB] ($[i]=0.92$) film degraded for 3 h; (b) P[85%(R)-3HB] ($[i]=0.76$) film degraded for 3 h; (c) P[50%(R)-3HB] ($[i]=0.30$) film degraded for 24 h.

活性中心にはセリン残基が存在し、またこの酵素には基質であるP[(R)-3HB]表面に吸着する吸着部位（分子量5000程度）が存在することが推定された^{20,21)}。

最近、*A. faecalis*^{19,22)}, *Pseudomonas lemoigeni*²³⁻²⁵⁾, *Comamonas* sp.²⁴⁾, *P. pickettii*²⁶⁾のPHBデポリメラーゼの遺伝子がクローニングされ、それぞれの酵素の一次構造（アミノ酸配列）が明らかにされた。その結果、いずれの酵素も25～30残基のシグナルペプチド配列を持ち、触媒作用を示す活性部位と疎水性のP[(R)-3HB]表面に吸着するための吸着部位から構成されていることが明らかになった。また、活性中心にはセリンエステラーゼと同様の触媒トリアッド残基（セリン，アスパラギン酸，ヒスチジン残基）から成り、活性セリン残基周辺にはリパーゼボックス（ペンタペプチド）も存在することが報告されている²⁴⁾。

Kumagaiら²⁷⁾は、結晶化度および球晶の大きさが異なるP[(R)-3HB]フィルムを調製し、*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼを用いて、酵素分解速度におよぼすP[(R)-3HB]の固体構造の効果を調べた。その結果、微生物産生P[(R)-3HB]フィルムの酵素分解速度はP[(R)-3HB]の結晶化度に大きく依存し、フィルムの結晶化度の低下にしたがって増加することを明らかにした。また、PHBデポリメラーゼはフィルム表面の非晶領域に存在するポリマー鎖を優先的に切断し、続いて結晶領域のポリマー鎖を切断する。非晶領域に存在するP[(R)-3HB]ポリマー鎖の酵素分解速度は、結晶領域に存在するポリマー鎖の酵素分解速度の約20倍速いことがわかった。しかしながら、P[(R)-3HB]の球晶の大きさは、P[(R)-3HB]フィルムの酵素分解速度に影響を示さなかった。

X線解析の結果より、(S)-3HB=4～20mol%のP(3HB)フィルムの結晶化度は、(S)-3HB分率が増加するにしたがって低下することを示した（Table 2-3）。したがって、(S)-3HB=4～20mol%のP(3HB)フィルムの酵素分解速度の増大は、P(3HB)フィルムの結晶化度が低下したためと考えられる。また、酵素分解後のP(3HB)フィルムのSEM観察より（Figure 2-11）、(S)-3HBユニットを0から20mol%含むP(3HB)フィルムの酵素分解反応も、P(3HB)フィルムの表面の非晶領域から分解が進行し、続いて結晶領域が分解されることが明らかとなった。

ところで、(R)-3HB=70mol%の完全非晶質なP(3HB)[*i*]=0.46と(R)-3HB=50mol%のシンジオタクチック性の高いP(3HB)（[*i*]=0.30）のフィルムの結晶化度は、(S)-3HB=4～20mol%のP(3HB)フィルムの結晶化度よりも低い。しかしながら、この2種類の

P(3HB)サンプルはPHBデポリメラーゼによってほとんど分解されなかった。この結果を説明できる要因として次の3つのことが考えられる。第一に、ポリマー鎖中の(S)-3HB分率が増大したことによって、PHBデポリメラーゼがポリマー鎖を分解できなくなったためということである。第二に、P(3HB)ポリマー鎖中の(R)体と(S)体との連鎖構造つまりタクチシチーが、PHBデポリメラーゼによる分解反応に大きく影響を与えているためということである。第三に、P(3HB)のモルホロジーや結晶構造といった固体構造が、PHBデポリメラーゼによる分解反応に大きく影響を与えているためということである。

まず、一つ目の要因について検証してみる。P[70%(R)-3HB]およびP[50%(R)-3HB]ポリマー鎖中の(S)-3HB分率はそれぞれ30mol%と50mol%であり、本研究で酵素分解が認められたP(3HB)サンプル ((S)-3HB=4~20mol%) よりも(S)-3HB分率が高い。実際、(S)-3HBユニットのみからなるP[(S)-3HB]はPHBデポリメラーゼによって全く分解されないことが報告されている²⁸⁾。しかしながら、(S)-3HB分率が30~50mol%までのP(3HB)サンプルもPHBデポリメラーゼによって分解されることが報告されている。Kemnitzer^ら²⁸⁾は、(R)- β -BLと(S)- β -BLの混合比を変えて、ZnEt₂/H₂O触媒を用いて(R)体/(S)体の組成比の異なるP(3HB)を合成した。ZnEt₂/H₂O触媒を用いた β -BLの開環重合では、(R)体ユニットと(S)体ユニットが統計的にランダムに結合したP(3HB)が得られる。得られたP(3HB)を*Penicillium funiculosum*のPHBデポリメラーゼを用いて酵素分解実験を行った。その結果、(R)-3HB分率が67mol%および77mol%のP(3HB)の分解速度は、P[(R)-3HB]の分解速度に比べて著しく増大することを報告した。したがって、P[70%(R)-3HB]とP[50%(R)-3HB]が酵素分解されないのは、ポリマー鎖中の(S)-3HB分率が増大したためという理由からだけでは説明できない。

第二の要因については、次節において立体規則性（タクチシチー）の異なるラセミ体のP(3HB)を調製し、そのP(3HB)の酵素分解試験を行うことによって検証する。また、第三の要因については、第三章において微生物産生P[(R)-3HB]と化学合成P(3HB)とのポリマーブレンドを調製し、その固体構造と酵素分解性を調べることによって詳しく議論する。

(7) 立体組成の異なるP(3HB)の酵素分解生成物の解析

(S)体の3HBユニットを含むP(3HB)をPHBデポリメラーゼによって酵素分解したときにどのような分解生成物が生成するのかを明らかにするために、各P(3HB)の酵素分解によって生成する水溶性の分解生成物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析した。P(3HB)フィルムを *P. pickettii* の分泌する酵素で3時間分解した。1, 2および3時間後、緩衝溶液を回収し、水溶性の分解生成物をHPLCによって調べた。Figure 2-12には、P[85%(R)-3HB] ($[i]=0.76$) および微生物産生P[100%(R)-3HB] ($[i]=1.00$) を3時間分解したときの分解生成物のHPLCの溶出曲線を示してある。モノマーのピークの帰属は、市販の3HBを精製したものをを用いて行った。また、ダイマーおよびトリマーは、それぞれHPLCの溶出液を分取し、各成分の¹H-NMRスペクトルより帰属した。Figure 2-13および2-15には、HPLCで分取したダイマーおよびトリマーの¹H-NMRスペクトルを示してある。Figure 2-12から明らかなように、P[100%(R)-3HB]フィルムを分解したときの分解生成物のHPLC曲線からは、(R)-3HBユニットからなるモノマー ($t_r=6.2\text{min}$) およびダイマー ($t_r=13.3\text{min}$) に由来する2本のピークだけが観測された。一方、P[85%(R)-3HB]フィルムからの分解生成物のHPLC曲線には、(R)-3HBおよび(S)-3HBユニットからなるモノマー ($t_r=6.2\text{min}$)、ダイマー ($t_r=13.3, 13.5\text{min}$)、トリマー ($t_r=17.2\text{min}$) およびテトラマー ($t_r=19.4$) に由来する5本のピークが観測された。P[85%(R)-3HB]の分解生成物のHPLC曲線において、ダイマーに由来する2本のピークはそれぞれ(R-R)ダイマー ($t_r=13.3\text{min}$) と(R-S)ダイマー ($t_r=13.5\text{min}$) に帰属されることが、¹H-NMRスペクトル (Figure 2-14) よりわかった。

Figure 2-16には、ポリマー鎖中の(S)-3HB分率が0から20mol%までのP(3HB)フィルムを1, 2および3時間酵素分解したときに生成した分解生成物の重量分布を示してある。どの時間においても微生物産生P[100%(R)-3HB]の分解生成物は、(R)-3HBモノマーと(R)-3HB-(R)-3HBダイマーしか認められなかった。一方、化学合成によって得られた(S)体の3HBユニットを含むP(3HB)フィルムの分解生成物には、3HBのモノマー、ダイマーに加えて、トリマーおよびテトラマーが認められた。また、トリマーとテトラマーの存在割合は、(S)-3HB分率の増加にしたがって増加していることがわかった。しかし、分解生成物中のモノマー、ダイマー、トリマー、およびテトラマーの割合は時間変化に依存せず、各成分の生成量は分解時間とともに直線的に増加する

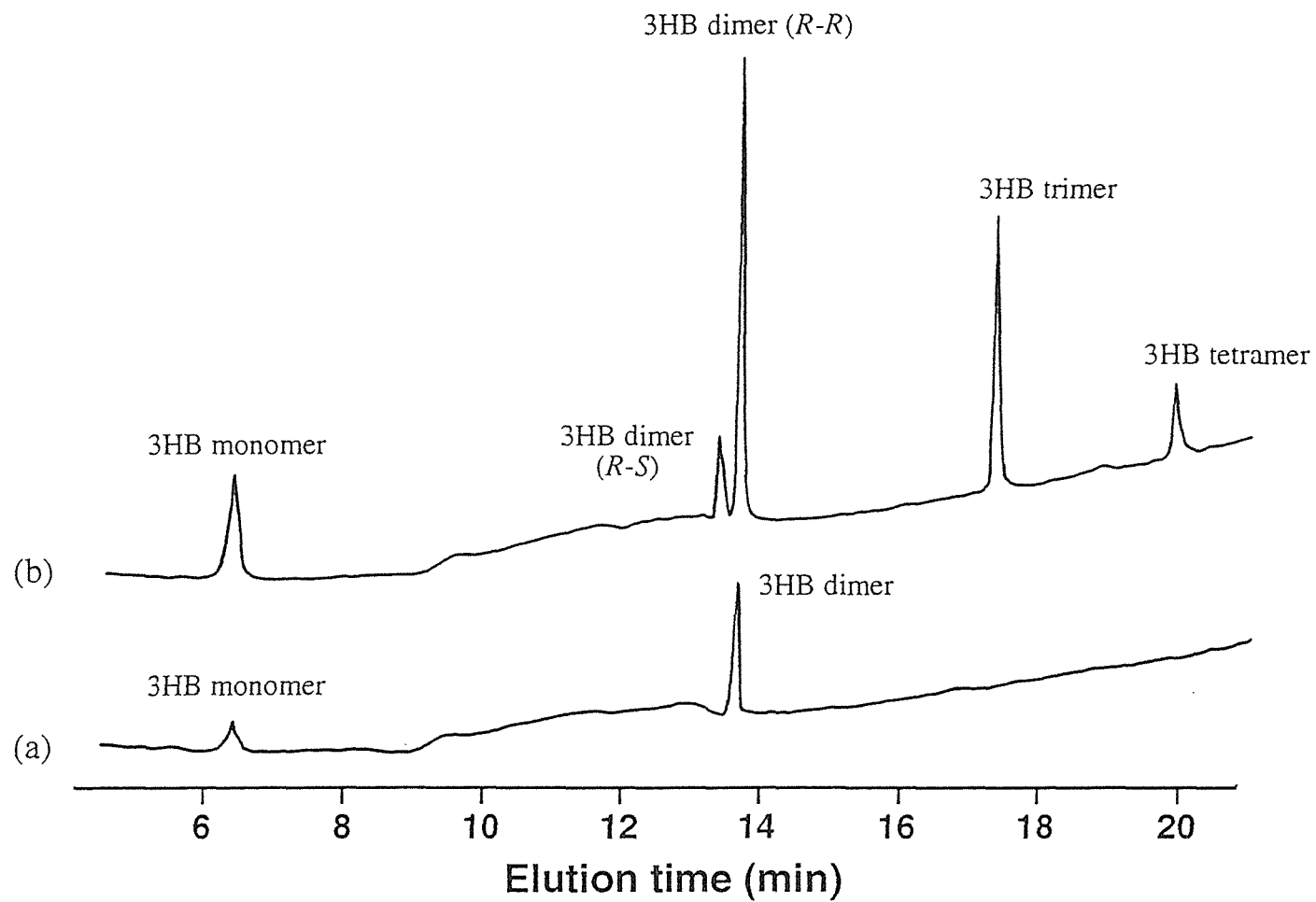


Figure 2-12 HPLC curves of the water-soluble products from (a) bacterial P[100%(R)-3HB] ([i]=1.00) and from (b) chemosynthetic P[85%(R)-3HB] ([i]=0.76) after enzymatic degradation for 3 h at 37°C.

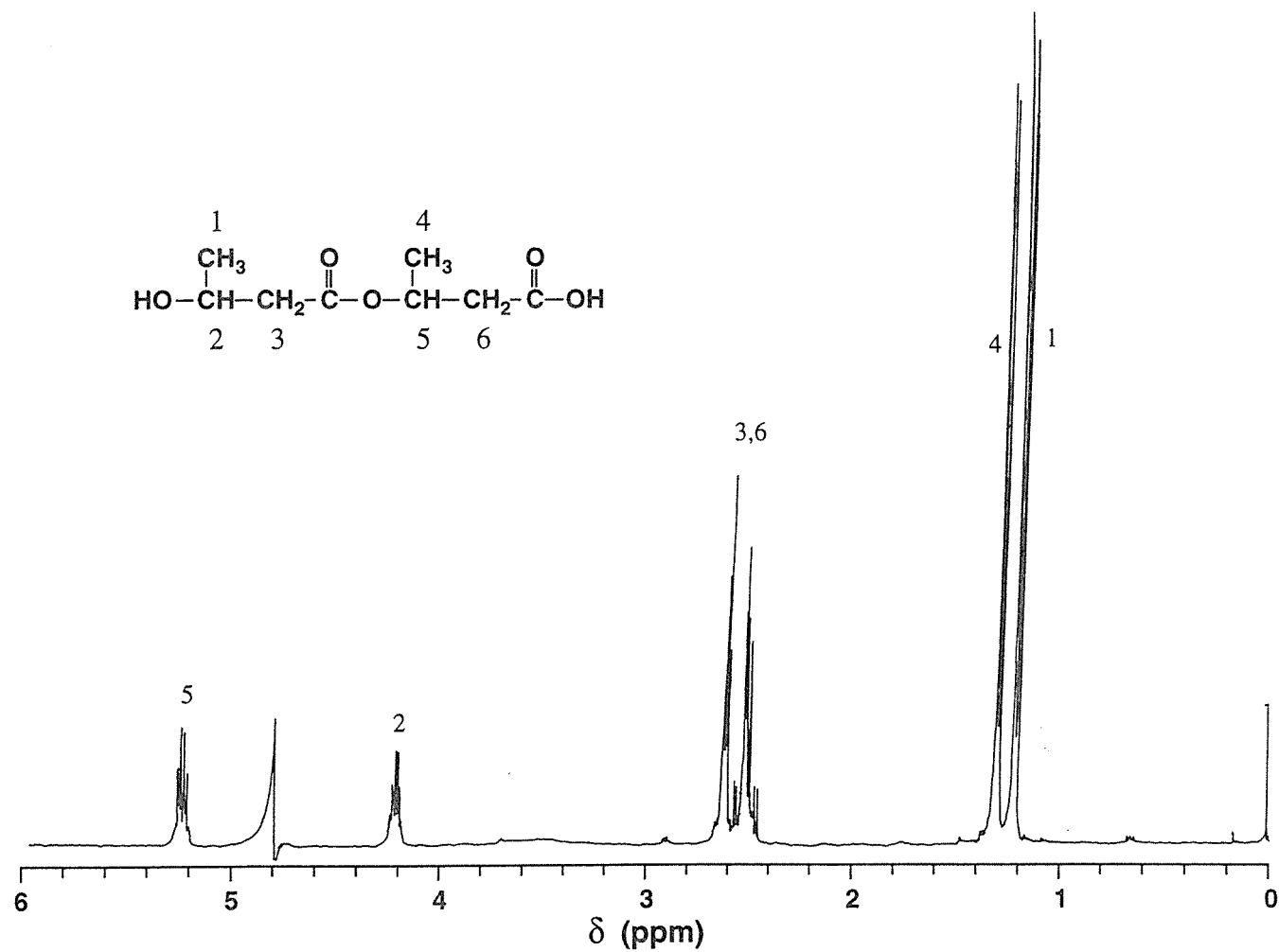


Figure 2-13 400-MHz ¹H-NMR spectrum in D₂O of 3HB-3HB dimer obtained by HPLC separation of water-soluble products after enzymatic degradation of P[85%(*R*)-3HB] ([*i*]=0.76) film.

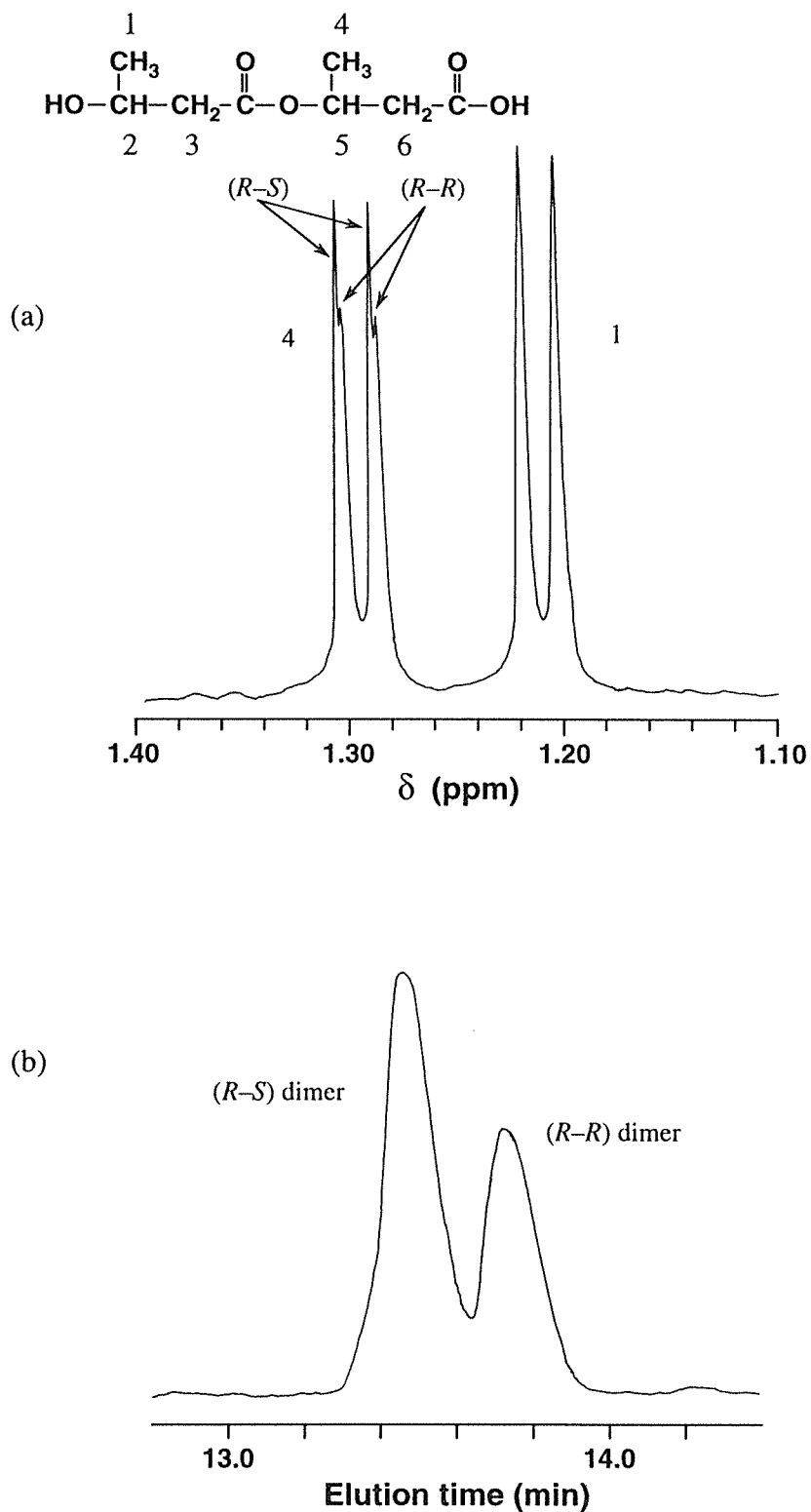


Figure 2-14 Characterization of (*R-R*) dimer and (*R-S*) dimer in water-soluble products after enzymatic degradation of P[85%(*R*)-3HB] ($[\alpha]_D^{25} = 0.76$) film. (a) Expanded ¹H NMR spectrum of methyl proton resonance in 3HB dimer, (b) HPLC curve of 3HB dimer.

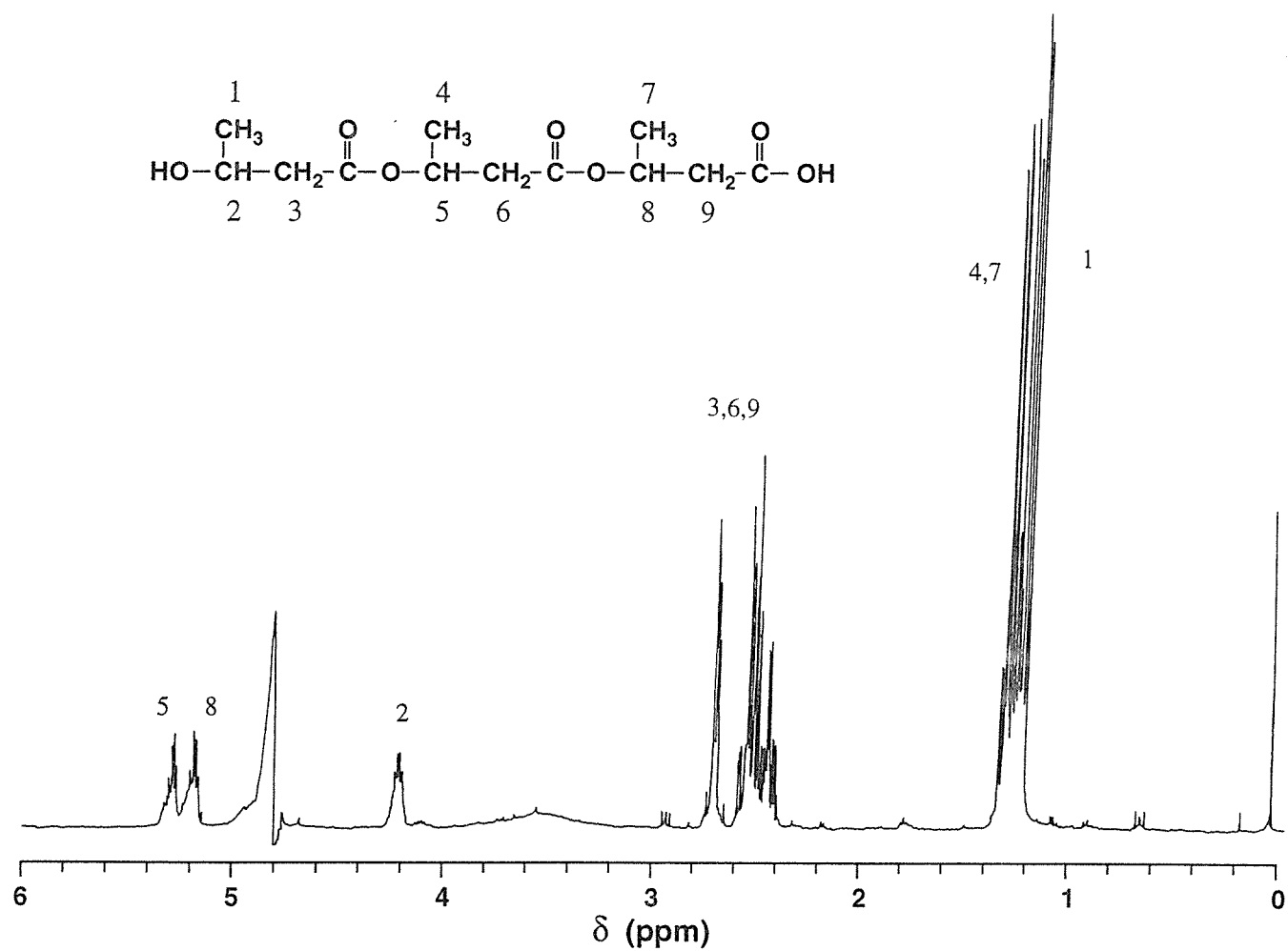


Figure 2-15 400-MHz ¹H-NMR spectrum in D₂O of 3HB trimer obtained by HPLC separation of water-soluble products after enzymatic degradation of P[85%(*R*)-3HB] ([*i*]=0.76) film.

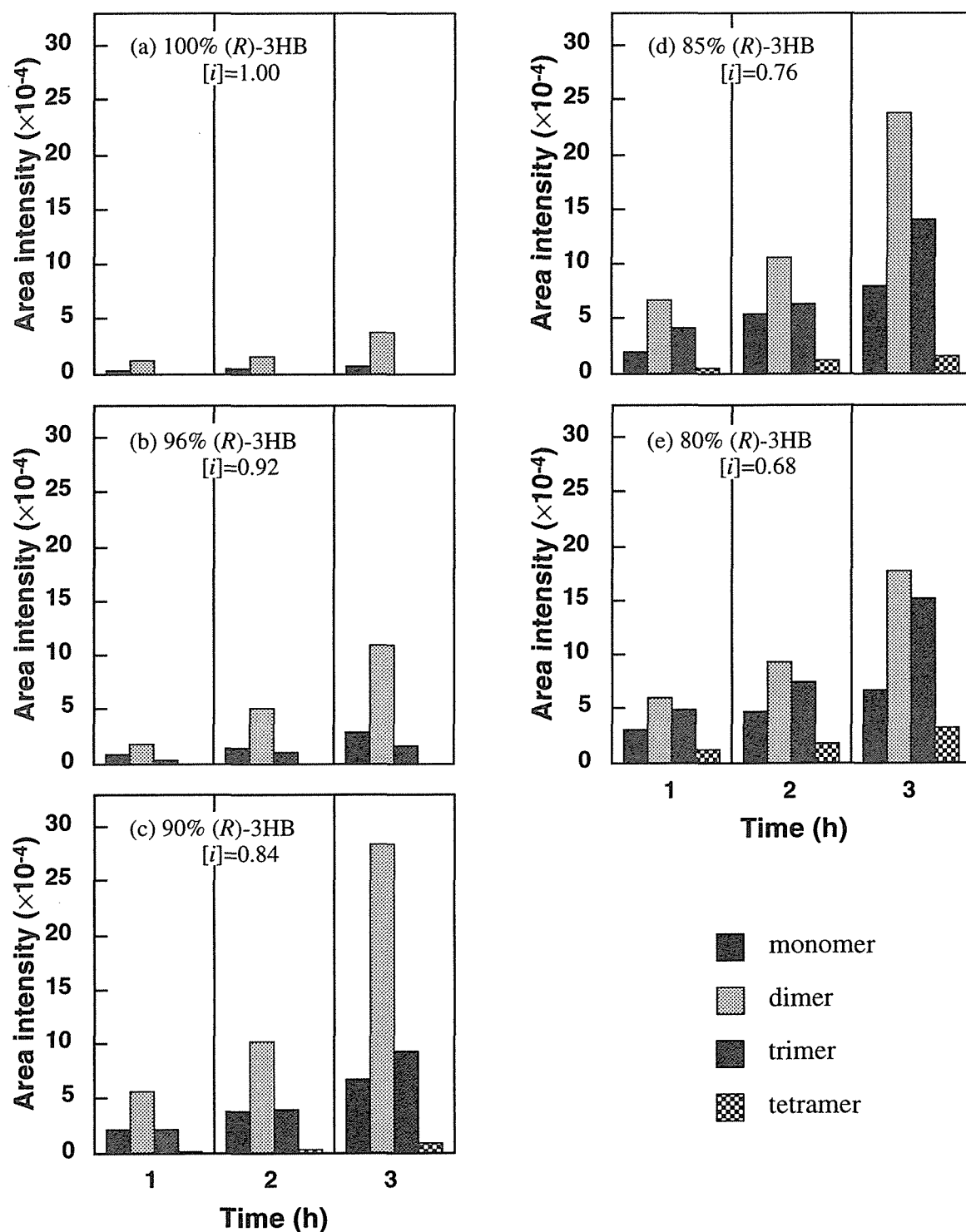


Figure 2-16 Time-dependent changes in relative amounts and weight distributions of water-soluble products during the enzymatic degradation of P(3HB) films with different stereocompositions at 37°C in aqueous solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (2.0 μ g/mL) from *P. pickettii*.

ことがわかった。

(*S*)-3HB分率が4から20mol%の各P(3HB)フィルムを酵素分解した時の分解生成物のHPLC分析の結果では、ダイマーのピークとして(*R-R*)ダイマーおよび(*R-S*)ダイマーに由来する2本のピークが観測された。Figure 2-17には、(*S*)-3HB=0~20mol%の各P(3HB)を3時間酵素分解したときに生成した2種類の3HBダイマーの分布を示してある。(*S*)-3HB組成が増大するにしたがって、ダイマー中の(*R-S*)ダイマーの割合が増加していることがわかる。

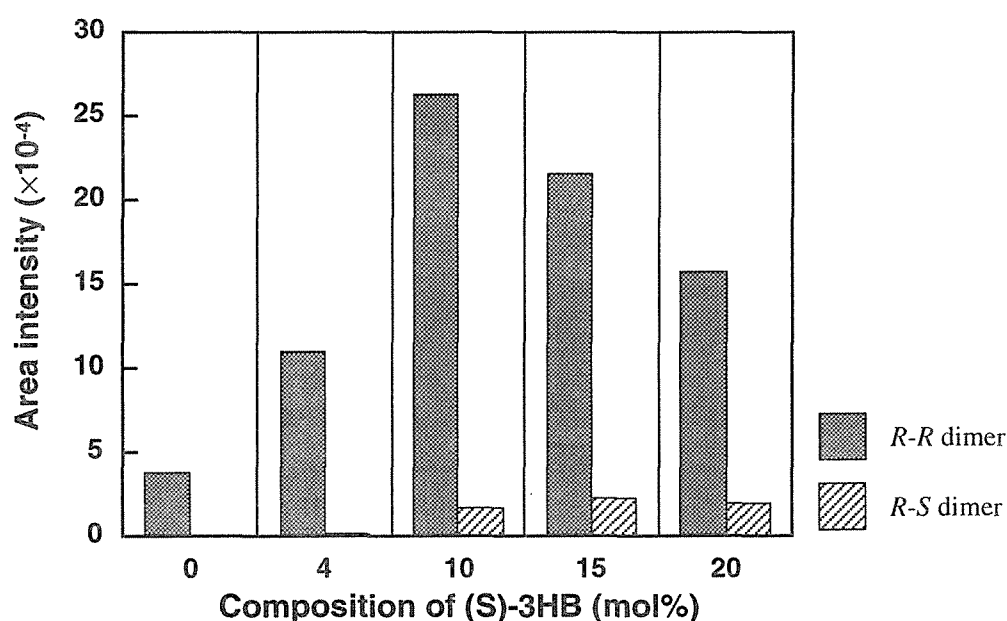


Figure 2-17 Weight distributions of 3HB-3HB dimers after the enzymatic degradation for 3 h at 37°C in aqueous solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (2.0μg/mL) from *P. pickettii*.

(*S*)-3HBユニットのみからなるP[(*S*)-3HB]は、PHBデポリメラーゼによって全く分解されない。つまり、PHBデポリメラーゼは、(*S*)-3HB-(*S*)-3HB連鎖のエステル結合を加水分解できないことを示している。しかしながら、本研究において(*S*)-3HBユニットを含むP(3HB)の分解生成物中のダイマーには、(*R-S*)のダイマーが存在することを明らかにした。これは、PHBデポリメラーゼが(*R*)-3HB-(*S*)-3HB連鎖あるいは(*S*)-3HB-(*R*)-3HB連鎖のエステル結合を加水分解していることを示している。次節で詳しく議論するが、PHBデポリメラーゼは、P(3HB)ポリマー鎖中の(*R*)体の3HBユニットを認識し、(*R*)体ユニットのメチン炭素に連結したエステル結合を選択的に切断す

る。(S)-3HBユニットを含むP(3HB)の分解生成物中のトリマーやテトラマーのオリゴマーは、PHBデポリメラーゼによって分解されない(S)-3HBユニットに連結したエステル結合が存在しているために生成したものと結論できる。

Figure 2-18には、各P(3HB)フィルムを3時間酵素分解したときに得られる分解生成物の生成量と分布を示してある。水溶性分解生成物の生成量とポリマー鎖中のモノマーユニットの立体組成との相関性は、UV法で解析したフィルムの分解速度とモノマーユニットの立体組成との相関性とよく一致していることがわかった。

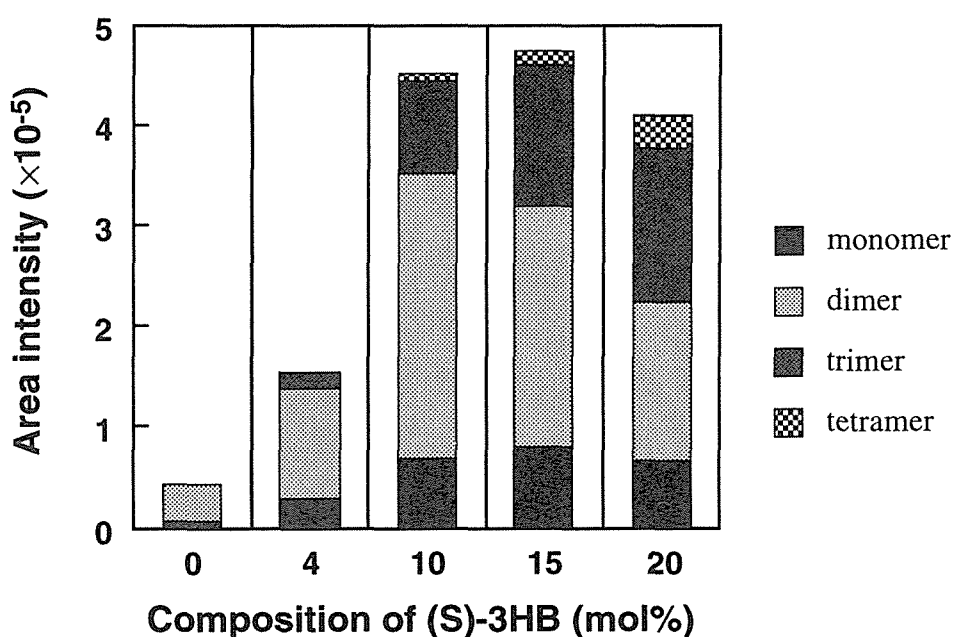


Figure 2-18 Weight distributions of water-soluble products after the enzymatic degradation for 3 h of P(3HB) films with different stereocompositions at 37°C in aqueous solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (2.0μg/mL) from *P. pickettii*.

*Alcaligenes faecalis*のPHBデポリメラーゼは、(R)-3HBユニットのペンタマー以上のオリゴマーに対して、*exo*型の加水分解酵素として強く作用し、分解生成物中の主成分は、(R)-3HBのダイマーとなる。そして、PHBデポリメラーゼによる(R)-3HBダイマーの加水分解反応は、(R)-3HBのオリゴマーやポリマーの加水分解反応に比べて非常に遅いことが報告されている¹³⁾。本研究で、(S)-3HBユニットを導入したP(3HB)フィルムの酵素分解は、フィルム表面から均一に進行することがわかった。また、分解生成物として、(R)体および(S)体の3HBユニットからなるオリゴマーが生成することがわかった。これらの結果より、PHBデポリメラーゼは、*exo*型だけでなく*endo*型

の加水分解酵素としてもP(3HB)ポリマー鎖を切断できると結論できる。

(8) 立体組成の異なるP(3HB)の河川水中での分解性

酵素分解試験の結果、(S)体の3HBユニットを4から20mol%まで含むP(3HB)は、PHBデポリメラーゼによって酵素分解されることがわかった。そして、酵素分解生成物として(S)-3HBユニットを含む3HBのオリゴマーが生成することが明らかとなった。しかしながら、酵素によるP(3HB)の分解性が必ずしも、自然界での生分解性を反映しているとは限らない。また、P(3HB)の酵素分解生成物である(S)-3HBユニットを含むオリゴマーが微生物によって代謝されるかどうか明らかでない。そのため、立体組成の異なるP(3HB)の環境中での生分解性を評価する必要がある。そこで、立体組成の異なるP(3HB)の自然環境水中での分解性の評価をBOD試験装置を用いて行った¹⁶⁾。試験水として荒川から採取した河川水を使用し、好氣的条件下、25℃で分解試験を行った。

Figure 2-19には、P[100%(R)-3HB] ($[\alpha]=1.00$) フィルム、P[85%(R)-3HB] ($[\alpha]=0.76$) フィルムおよびP[50%(R)-3HB] ($[\alpha]=0.30$) フィルムを荒川水を用いて分解試験を行ったときのBOD生分解度の経時変化を示してある。微生物産生P[100%(R)-3HB]フィルムのBOD生分解度は時間とともに増加し、28日間で約80%のBOD生分解度が認められた。また、P[85%(R)-3HB] ($[\alpha]=0.76$) フィルムのBOD生分解度の増加は、P[100%(R)-3HB]フィルムのBOD生分解度の増加よりも速く、14日間で約80%のBOD生分解度に達した。しかしながら、シンジオタクチック性の高いP[50%(R)-3HB] ($[\alpha]=0.30$) フィルムは28日間の分解試験においてほとんど分解されていないことがわかった。これらの結果より、BOD生分解試験による各P(3HB)フィルムの生分解性の傾向は、酵素分解試験による各P(3HB)フィルムの分解速度の傾向とよく一致していることがわかった。

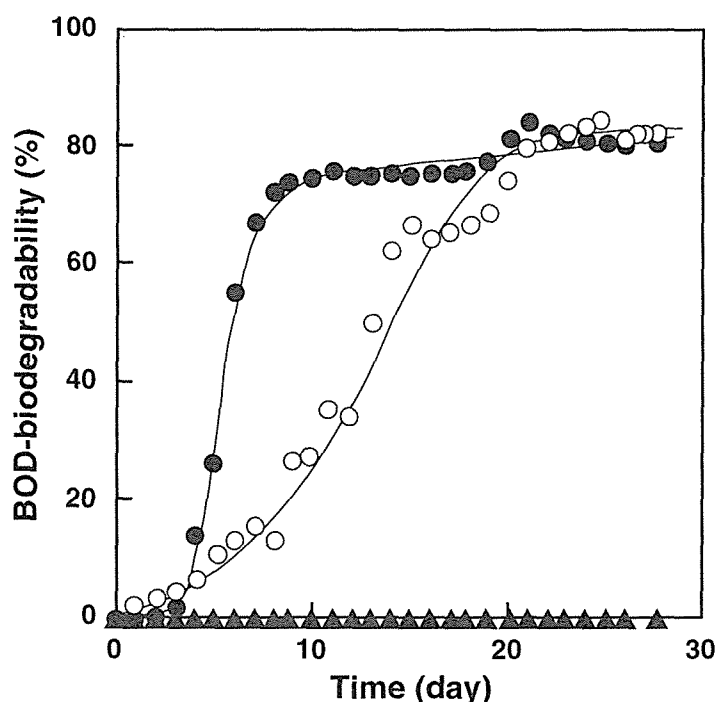


Figure 2-19 BOD-biodegradation curves of P(3HB) films in the river water at 25°C. (○) P[100%(R)-3HB] ($[i]=1.00$), (●) P[85%(R)-3HB] ($[i]=0.76$), (▲) P[50%(R)-3HB] ($[i]=0.30$).

Table 2-6には、分解試験28日後におけるP(3HB)フィルムの重量生分解度、BOD生分解度および分解試験前後の試験水中の溶存有機炭素濃度 (DOC) を示してある。微生物産生P[100%(R)-3HB]フィルムおよびP[85%(R)-3HB] ($[i]=0.76$) フィルムの重量生分解度は28日間の分解試験でともに100%に達した。一方、重量生分解度の結果からも、P[50%(R)-3HB] ($[i]=0.30$) フィルムはほとんど分解されていないことがわかる。試験水中のDOCの値は、28日間の分解試験中に10.4から3.9–6.7mgC/Lまで低下することがわかった。この結果は、P(3HB)ポリマー鎖が河川水中に存在する微生物の分泌するPHBデポリメラーゼによって水溶性の分解生成物まで分解され、その分解生成物の大半が微生物の活動エネルギーや菌体成分合成に利用され河川水中には存在していないことを示している。したがって、(S)-3HBユニットを含むP(3HB)が微生物の酵素によって分解され生成した(S)-3HBユニットを含む3HBオリゴマーは、環境中の微生物によって代謝され、環境中に残存しないことが証明された。また、P[100%(R)-3HB]フィルムおよびP[85%(R)-3HB]フィルムの重量生分解度とBOD生分解度との間には、20–30%の違いが認められる。これは、P(3HB)の分解生成物が微生物の活動エネルギーとして利用されるだけでなく、微生物の増殖によるバイオマス

形成としても利用されていることを示している。

Table 2-6. Weight-loss-biodegradabilities and BOD-biodegradabilities of P(3HB) films and changes in DOC values of test solution (the river Arakawa water) for 28 days at 25°C.

sample	number of runs	weight-loss- biodegradability, %	BOD- biodegradability, %	DOC, mgC/L	
				initial	final
P[100%(R)-3HB] ([<i>i</i>]=1.00)	6	100±0	75±8	10.5	5.2±1.2
P[85%(R)-3HB] ([<i>i</i>]=0.76)	2	100±0	78±3	10.4	6.7±0.2
P[50%(R)-3HB] ([<i>i</i>]=0.30)	2	1±1	1±1	10.4	3.9±0.2

2-3-2 ポリ(3-ヒドロキシブタン酸)の生分解性におよぼす立体規則性の効果

前節では、P(3HB)ポリマー鎖中のモノマーユニットの立体組成 ((*R*)体と(*S*)体の組成比) が、ポリマーの物理的性質および生分解性にどのような効果を与えるのかを調べた。そこで本節では、(*R*)体と(*S*)体の組成比が同じ ((*R*)体/(*S*)体=50/50) でポリマーの立体規則性 (タクチシティー) が異なるP(3HB)を調製し、ポリマーの生分解性におよぼす立体規則性の効果を明らかにする。

タクチシティーの異なるP(3HB)は、メチルアルミノキサン触媒を用いてラセミ体の β -BLを開環重合し、生成物を溶媒分別することによって調製した。前節で用いたジスタノキサン触媒は、重合活性点種が均質であり、 β -BLの開環重合によって得られるポリマーは均質なものである。一方、本節で用いたメチルアルミノキサン触媒はオリゴマー触媒であり、その重合活性点種は複数存在し不均質であることが知られている¹¹⁾。そのため、メチルアルミノキサン触媒を用いた β -BLの開環重合では、生成物が様々な立体規則性 (タクチシティー) を持つポリマーの混合物として得られる。立体規則性の異なるポリマーの混合物は、分別溶媒の条件を選択することにより、そのタクチシティーの違いによって分別が可能である。タクチシティーの異なるP(3HB)の固体状態での性質を明らかにするために熱的性質および結晶構造を調べた。また、タクチシティーの異なるP(3HB)の酵素分解性を調べるために*Alcaligenes faecalis*のPHBデポリメラーゼを用いた酵素分解試験を行い、分解生成物の解析を行った。さらに、環境水 (河川水) 中での分解試験法としてBOD測定装置を用いた分解反応を行い、タクチシティー異なるP(3HB)の生分解性と安全性を調べた。

(1) タクチシティーの異なるP(3HB)の合成

メチルアルミノキサン触媒を用いて、ラセミ体の β -BLの開環重合を行った。得られたポリマーを、冷アセトン (0℃) 中で攪拌することによって、冷アセトン可溶部 (Fraction 1) と不溶部とに分別した。次に、冷アセトン不溶部を室温アセトン (25℃) 中で攪拌することによって、室温アセトン可溶部 (Fraction 2) と不溶部とに分別した。室温アセトン不溶部を温アセトン (40℃) 中で攪拌することによって、温アセトン可溶部 (Fraction 3) と不溶部とに分別した。さらに、温アセトン不溶部を熱アセトン (56.5℃) で分別し、熱アセトン可溶部 (Fraction 4) と不溶部 (Fraction 5) とに分別した。以上のような溶媒分別によって5種類の成分に分別できた。各成

分ポリマーの立体規則性を ^{13}C -NMR解析によって調べた。また、それぞれのポリマーの分子量および多分散度は、GPCを用いて調べた。Table 2-7に、溶媒分別の条件と得られたポリマーのイソタクチックダイアッド分率 $[i]$ および分子量をまとめて示してある。溶媒分別時の条件を変えることによって、 $[i]$ が0.88から0.54までの立体規則性の異なる5種類のP(3HB)が得られた。

Table 2-7. Molecular weights and isotactic diad fractions of P(3HB) samples.

fraction no.		molecular weight ^a		isotactic diad fraction ^b , $[i]$
		$M_n \times 10^{-3}$	M_w/M_n	
1	soluble on acetone at 0°C	5.6	7.3	0.54
2	soluble on acetone at 25°C	2.8	13.7	0.58
3	soluble on acetone at 40°C	14.9	11.0	0.63
4	soluble on boiling acetone	21.6	12.8	0.74
5	insoluble on boiling acetone	57.8	8.3	0.88

a) Determined by GPC.

b) Determined from ^{13}C NMR spectra.

(2) 立体規則性の異なるP(3HB)の熱的性質

Al触媒を用いて化学合成したP(3HB)の熱的性質をDSCを用いて測定した。Table 2-8には、5種類のP(3HB)サンプルのガラス転移点 (T_g)、融点 (T_m) および融解熱 (ΔH_m) の値をまとめてある。

Table 2-8. Thermal properties and X-ray crystallinities of P(3HB) samples.

fraction no.	isotactic diad fraction, $[i]$	T_g ^a , °C	T_m ^a , °C	ΔH_m ^a , J/g	X_c ^b , %
1	0.54	0	51	3	8±5
2	0.58	3	50	5	10±5
3	0.63	4	64	10	12±5
4	0.74	2	110	22	18±5
5	0.88	5	166	42	33±5

a) Determined from DSC measurement.

b) X-ray crystallinity.

P(3HB)の T_g の値は、ポリマーの立体規則性（イソタクチックダイアッド分率 $[i]$ ）によらず、3°C前後ではほぼ一定であった。一方、 T_m の値は、 $[i]$ が0.88から0.58まで減少するにしたがって、166°Cから50°Cまで低下した。立体規則性の異なるP(3HB)の ΔH_m は、 $[i]$ が0.88から0.58まで減少するにしたがって、42J/gから5J/gまで低下するこ

とがわかった。

(3) 立体規則性の異なるP(3HB)の結晶構造

イソタクチックダイアッド分率 $[i]$ が0.58から0.88までのP(3HB)の結晶構造を、広角X線回折法により調べた。X線回折パターンより、 $[i]=0.58\sim0.88$ までのP(3HB)は、微生物産生P[(R)-3HB]と同一の結晶構造を形成していることがわかった。

Table 2-8には、各サンプルの回折パターンより求めたP(3HB)の結晶化度 X_c を示してある。 $[i]$ が0.88から0.58の範囲において、P(3HB)フィルムの結晶化度は、 $[i]$ の減少とともに、33%から10%まで徐々に低下していることがわかる。

(4) 立体規則性の異なるP(3HB)の酵素分解性

*Alcaligenes faecalis*¹³⁾が菌体外に分泌するPHBデポリメラーゼ (1.0 μ g) を用いて、0.1Mリン酸緩衝溶液 (pH7.4) 中、37℃で分解反応を行った。サンプルは、ソルベント-キャスト法で作製した1×1cmのフィルム (厚さ0.06~0.1mm, 重さ8~14mg) を利用した。結晶化度が非常に低い $[i]=0.54$ のP(3HB)は、フィルムの形成が困難であったため、1×1cmのテフロンシート上にポリマーを付着させて実験を行った。

Figure 2-20には、立体規則性の異なるP(3HB)フィルムを酵素分解したときのフィルムの重量減少量の経時変化を示してある。比較として、微生物産生P[(R)-3HB]フィルムを酵素分解したときの重量減少量の経時変化もFigure2-20に一緒に示してある。微生物産生P[(R)-3HB]フィルムの重量減少量は時間とともに直線的に増加し、12時間で約0.5mg/cm²の重量減少が認められた。 $[i]=0.74\sim0.54$ のP(3HB)フィルムの酵素分解による重量減少は、時間とともにほぼ直線的に増加することがわかった。また、 $[i]=0.74, 0.63$ のP(3HB)フィルムの重量減少速度は、微生物産生P[(R)-3HB]フィルムの重量減少速度よりも速いものであった。しかしながら、 $[i]=0.88$ のP(3HB)フィルムの酵素分解による重量減少は、分解実験開始後5時間まで直線的に増加し、その後の重量減少量はごくわずかであった。

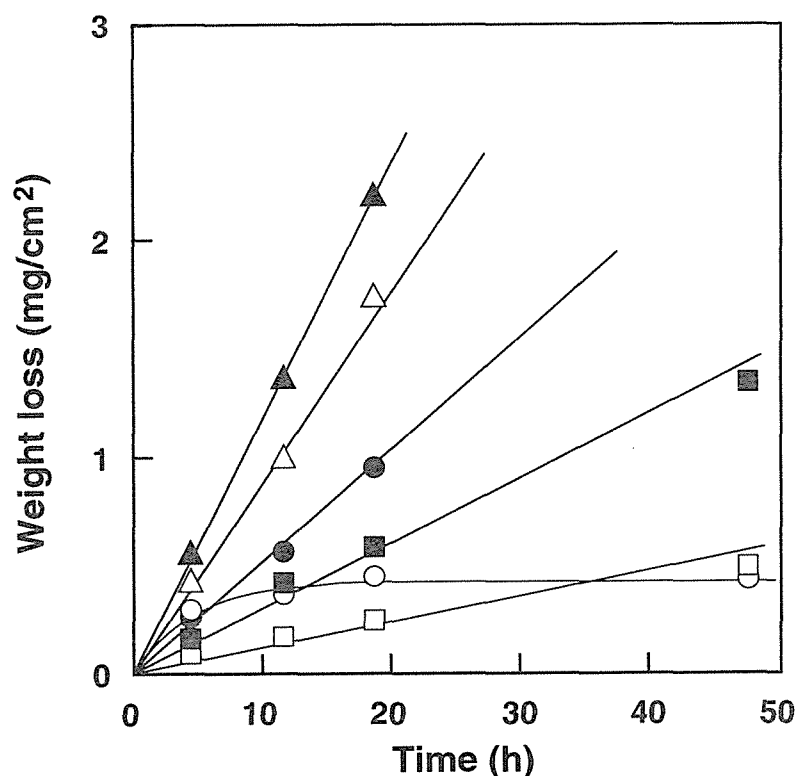


Figure 2-20 Enzymatic erosion profiles of P(3HB) films with different tacticities at 37°C in aqueous solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (1.0μg/mL) from *A. faecalis*. P(3HB) samples with $[i]=0.88$ (○), $[i]=0.74$ (▲), $[i]=0.63$ (△), $[i]=0.58$ (■), $[i]=0.54$ (□), and bacterial P[(R)-3HB] (●).

ここで、PHBデポリメラーゼによるP(3HB)フィルムの酵素分解反応は、フィルム表面から進行する。また、3HBユニットのオリゴマーは約8量体までが水溶性となる。 $[i]=0.88$ のP(3HB)ポリマー鎖において、(R)-3HBユニットが連続して結合したイソタクチックブロックおよび(S)-3HBユニットが連続して結合したイソタクチックブロックの鎖長は、他のラセミ体のP(3HB)のイソタクチックブロック鎖長よりも長いものである。 $[i]=0.88$ のP(3HB)フィルム表面の(R)-3HBのイソタクチックブロックはPHBデポリメラーゼによって速やかに分解され、水溶性のオリゴマーになる。しかしながら、(S)-3HBのイソタクチックブロックはPHBデポリメラーゼによって分解されず、フィルム表面に残存する。酵素分解反応初期において、P(3HB) ($[i]=0.88$) フィルム表面の(R)-3HBユニットのイソタクチックブロックのみが酵素によって分解されるために、反応時間の経過とともにフィルム表面は(S)-3HBユニットのイソタクチックブロックに覆われ、その結果、P(3HB) ($[i]=0.88$) フィルムの酵素分解反応が途中で停止するものと考えられる。

Figure 2-21には、立体規則性の異なるP(3HB)フィルムの重量減少速度と立体規則性（イソタクチックダイアド分率 $[i]$ ）との相関性を示してある。比較として、微生物産生P[(R)-3HB]の重量減少速度も同時に示した。ポリマーのイソタクチックダイアド分率 $[i]$ が0.54から0.74まで増加するにしたがって、フィルムの重量減少速度は増大することがわかった。しかし、 $[i]=0.88$ のP(3HB)フィルムの重量減少速度は、 $[i]=0.74$ のP(3HB)フィルムの重量減少速度よりも遅くなることがわかった。

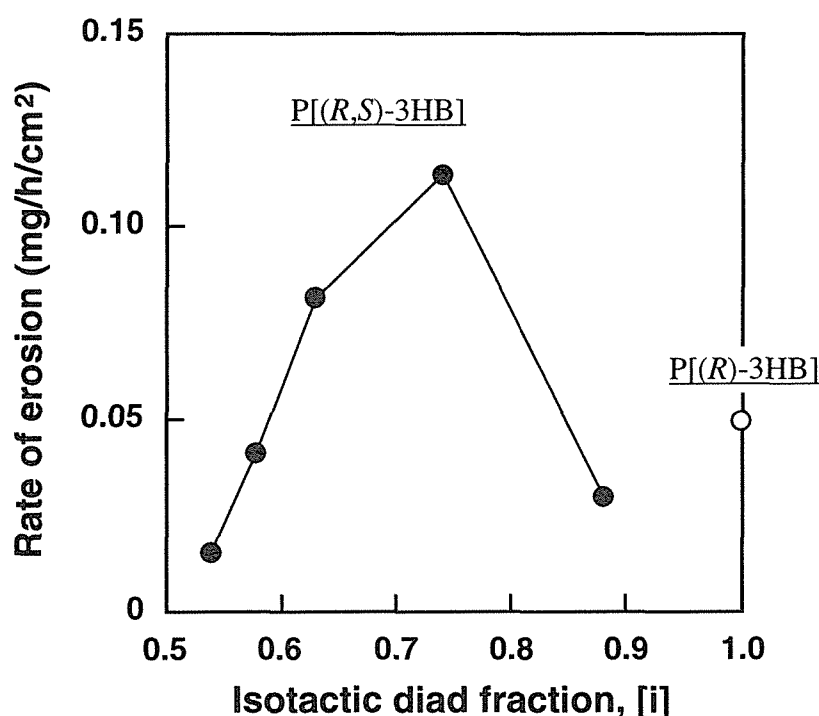


Figure 2-21 Effect of tacticity on the rate of weight loss of P(3HB) films after enzymatic degradation with PHB depolymerase (1.0 μ g/mL) from *A. faecalis*

(5) 立体規則性の異なるP(3HB)の分解生成物の解析

立体規則性の異なるP(3HB)フィルムを酵素分解した時の分解生成物をHPLCにより解析した。Figure 2-22には、 $[i]=0.88\sim0.54$ までのP(3HB)フィルムを12時間酵素分解したときに得られた分解生成物の重量分布を示してある。比較として、微生物産生P[(R)-3HB]フィルムを12時間分解したときの分解生成物もFigure 2-22に示してある。前述したように、P[(R)-3HB]フィルムを*Alcaligenes faecalis*のPHBデポリメラーゼで分解した場合、分解生成物として(R)-3HBのモノマーとダイマーが生成する。一方、化学合成したP(3HB)フィルムを*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼで分解した場合、3HBのモノマー、ダイマーに加えてトリマーおよびテトラマーが生成した。また、分解

生成物中におけるトリマーおよびテトラマーの存在割合は、 $[\alpha]$ が低下するにしたがって増加することがわかった。

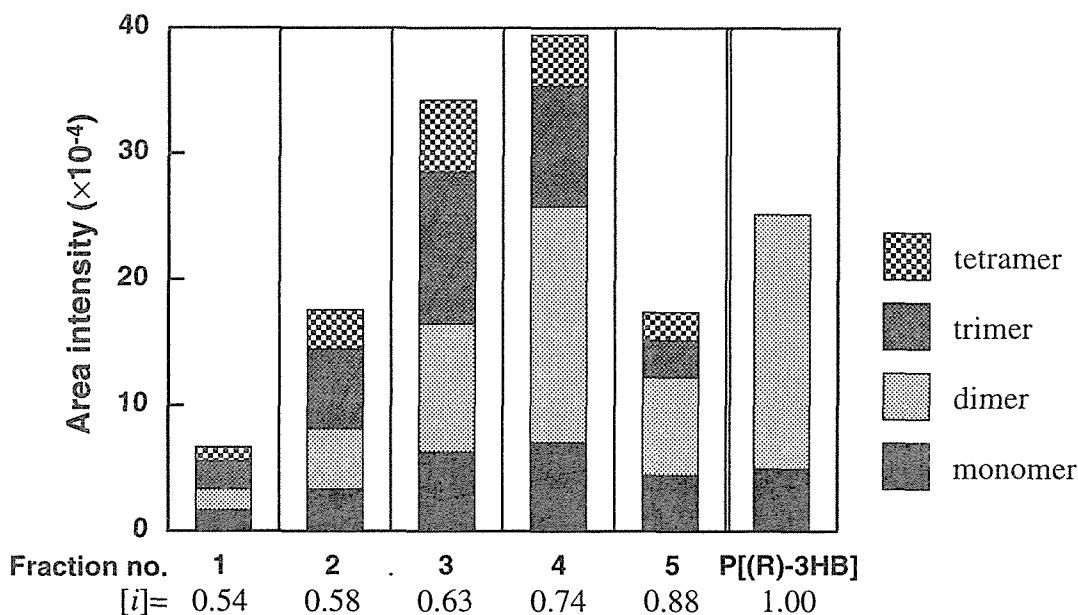


Figure 2-22 Weight distributions of water-soluble products after the enzymatic degradation for 12 h of P(3HB) films with different tacticities at 37°C in aqueous solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (1.0μg/mL) from *A. faecalis*.

Figure 2-23には、分解生成物中のダイマーにおける(*R-R*)ダイマーと(*R-S*)ダイマーの分布を示してある。P(3HB)の $[\alpha]$ が低下するにしたがって(*R-S*)ダイマーの分率が増加していることがわかる。

以上の結果より、PHBデポリメラーゼは(*R*)-3HB-(*R*)-3HB連鎖のエステル結合を加水分解するだけでなく、(*R*)-3HB-(*S*)-3HB連鎖あるいは(*S*)-3HB-(*R*)-3HB連鎖のエステル結合をも加水分解できることが明かとなった。そこで、PHBデポリメラーゼが(*R*)-3HB-(*S*)-3HB連鎖のエステル結合と(*S*)-3HB-(*R*)-3HB連鎖のエステル結合のどちらを、あるいは、両方を加水分解するのかを調べるために、ラセミ体のP(3HB)の分解生成物の旋光度を測定した。Table2-9に、それぞれのP(3HB)フィルムを12時間酵素分解したときに得られた分解生成物の比旋光度 ($[\alpha]^{23}_D$) を示してある。

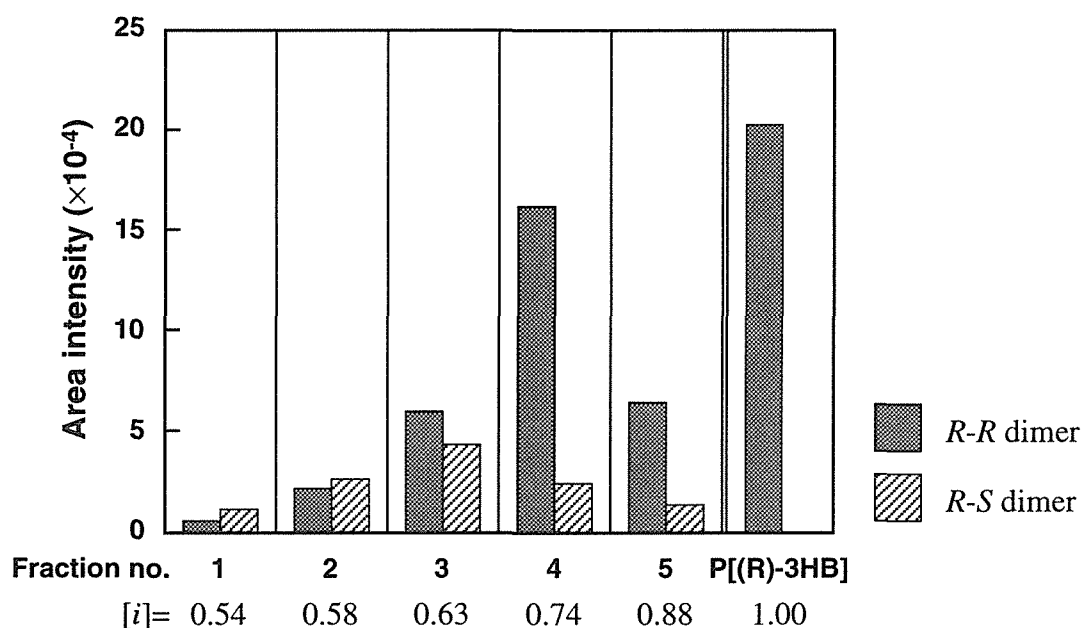


Figure 2-23 Weight distributions of 3HB-3HB dimers after the enzymatic degradation for 12 h at 37°C in aqueous solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (1.0μg/mL) from *A. faecalis*.

Table 2-9. Specific rotation values of water-soluble degradation products.

sample	isotactic diad fraction, [i]	DP ^a	specific rotation [α] _D ²³ ^b , degree
Fraction 1	0.54	1.93	n.d.
Fraction 2	0.58	2.05	-11.4
Fraction 3	0.63	2.04	-10.2
Fraction 4	0.74	1.92	-11.0
Fraction 5	0.88	1.76	-14.1
P[(R)-3HB]	1.00	1.68	-16.1
(R)-3HB ^c	—	1.00	-24.5

a) Average of oligomer chain-length for degraded products.

b) Water was used as a solvent, and the concentration was applied in the range of 0.4–0.8 g/100mL.

c) (R)-3-hydroxybutyric acid

Table 2-9から明らかなように、すべてのラセミ体のP(3HB)フィルムの分解生成物は、負の旋光度を示すことがわかった。また、分解生成物の平均鎖長が増加するにしたがって、分解生成物の比旋光度の絶対値は低下する傾向が認められた。ここで、P(3HB)の分解生成物の旋光度は、3HBのモノマーおよびオリゴマーのヒドロキシル

基末端ユニットから現れると考えられる。したがって、P(3HB)の分解生成物中の3HBモノマーおよび3HBオリゴマーのヒドロキシル末端ユニットの立体配置は、(R)体であると考えられる。PHBデポリメラーゼは、(R)体の3HBユニットのメチン炭素に結合しているエステル基のみを選択的に切断し、(S)体ユニットのメチン炭素に結合したエステル基は切断しない。Figure 2-24に示すような分解メカニズムでP(3HB)フィルムの酵素分解反応が進行していくものと考えられる。(S)体の3HBユニットのメチン炭素に結合したエステル基が切断されないために、ポリマー鎖中に(S)-3HBユニットを導入したP(3HB)の水溶性分解生成物として、(S)-3HBユニットを含んだオリゴマーが生成されるものと結論できる。

ところで、イソタクチシチーの異なるラセミ体のP(3HB)フィルムの結晶化度は、 $[\eta]$ が0.54から0.74まで増加するにしたがって増大した。一方、P(3HB)フィルムの酵素分解速度は、 $[\eta]$ が0.54から0.74まで増加するにしたがって増大した。これまで、P(3HB)の酵素分解速度は、フィルムの結晶化度とポリマー鎖中の(R)-3HB分率から、議論されてきた。しかしながら、本研究で得られたラセミ体のP(3HB)の酵素分解試験結果は、これら2つの要因からだけでは説明できない。

ラセミ体のP(3HB)ポリマー鎖中には(R)-3HBと(S)-3HBユニットが存在するために、イソタクチック、シンジオタクチック、ヘテロタクチックの異なる連鎖構造が存在している。これらの異なる連鎖構造の相違がPHBデポリメラーゼによるエステル加水分解速度に影響を与えていることが考えられる。この要因を検証する方法として、連鎖構造の異なる各種3HBオリゴマーを調製し、そのオリゴマーの酵素分解速度を評価することが考えられるが、現時点では解決できていない。その他の要因としては、P(3HB)のモルホロジーや結晶構造といった固体構造の影響が考えられる。P(3HB)の酵素分解反応によらずP(3HB)の固体構造の効果については、第三章において、微生物産生P[(R)-3HB]と化学合成P(3HB)とのポリマーブレンドの固体構造と酵素分解性を調べ詳しく議論する。

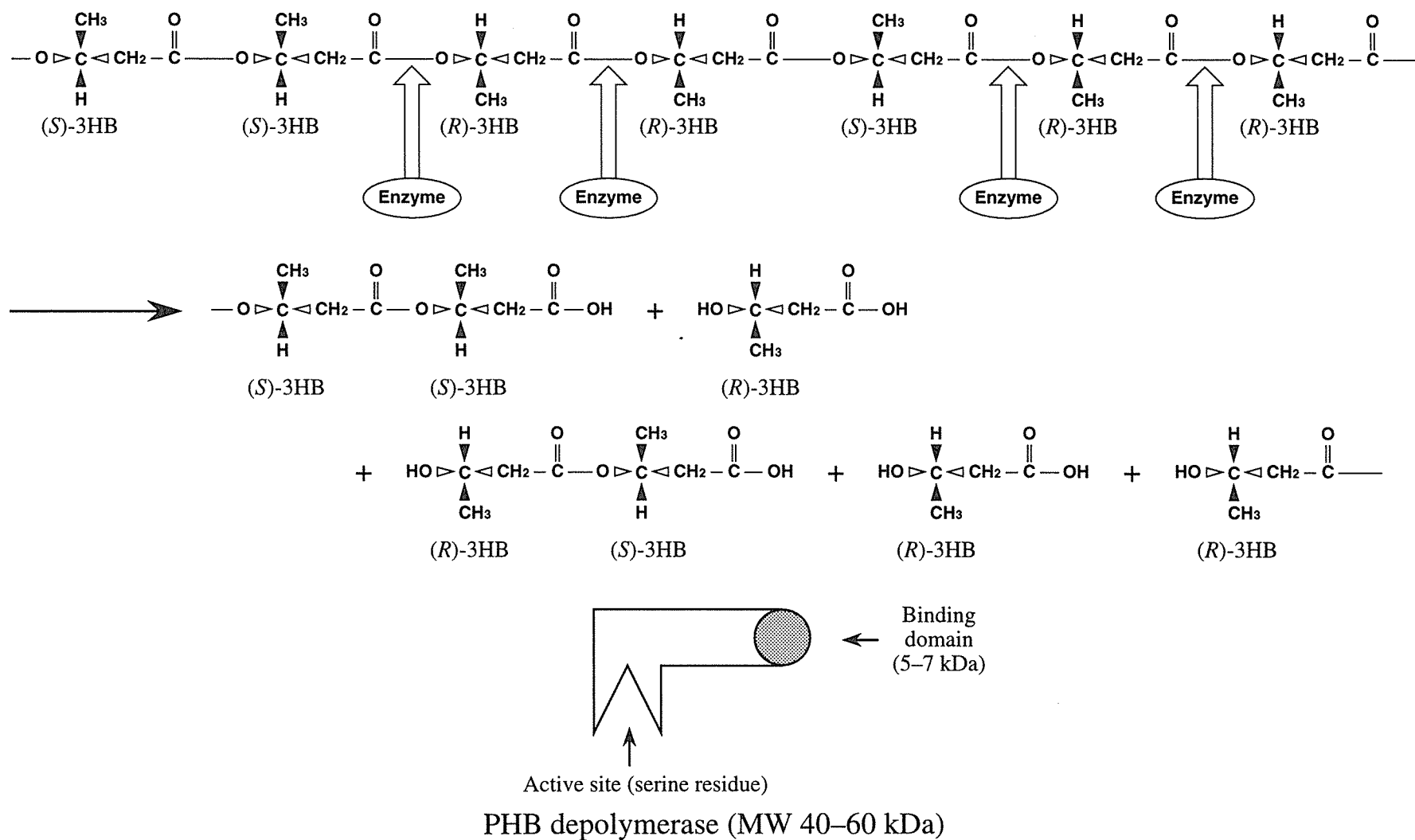


Figure 2-24 A schematic model on the enzymatic hydrolysis of chemosynthetic P[(R,S)-3HB] chain by PHB depolymerase.

(6) 立体規則性の異なるP(3HB)の河川水中での分解性

立体規則性の異なるP(3HB)の自然環境水中での分解性の評価をBOD試験装置を用いて行った¹⁶⁾。試験水として荒川から採取した河川水を使用し、好氣的条件下、25℃で分解試験を行った。

Figure 2-25には、微生物産生P[(R)-3HB] ($[i]=1.00$) フィルム, $[i]=0.88$ のP(3HB)フィルムおよび $[i]=0.63$ のP(3HB)フィルムを荒川水を用いて分解試験を行ったときのBOD生分解度の経時変化を示してある。微生物産生P[(R)-3HB]フィルムのBOD生分解度は時間とともに増加し、28日間で約80%のBOD生分解度が認められた。また、 $[i]=0.63$ のP(3HB)フィルムのBOD生分解度の増加は、P[(R)-3HB]フィルムのBOD生分解度の増加よりも速く、14日間で約60%のBOD生分解度に達した。しかしながら、イソタクチシチック性の高い $[i]=0.88$ のP(3HB)フィルムは28日間の分解試験において約40%のBOD生分解度にとどまる結果となった。これらの結果より、BOD生分解試験による各P(3HB)フィルムの生分解性の傾向は、酵素分解試験による各P(3HB)フィルムの分解速度の傾向とよく一致していることがわかった。

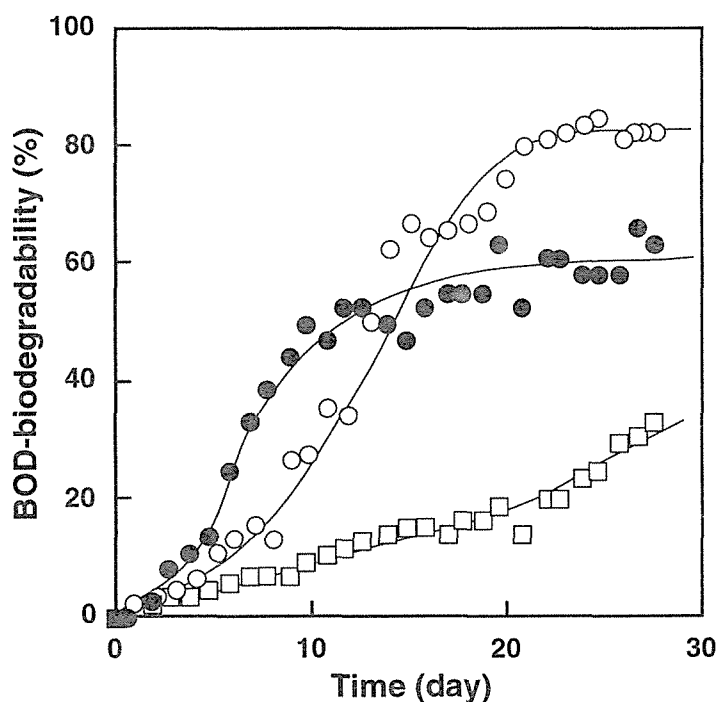


Figure 2-25 BOD-biodegradation curves of P(3HB) films in the river water at 25°C. (O) P[100%(R)-3HB] ($[i]=1.00$), (●) P[50%(R)-3HB] ($[i]=0.63$), (□) P[50%(R)-3HB] ($[i]=0.88$).

Table 2-10には、分解試験28日後におけるP(3HB)フィルムの重量生分解度、BOD生分解度および分解試験前後の試験水中の溶存有機炭素濃度（DOC）を示してある。微生物産生P[(R)-3HB]フィルムおよび*[i]*=0.63のP(3HB)フィルムの重量生分解度は28日間の分解試験でともに100%に達した。一方、重量生分解度の結果からも、*[i]*=0.88のP(3HB)フィルムはフィルム重量の約半分しか分解されていないことがわかる。試験水中のDOCの値は、28日間の分解試験中に2.8から1.6–1.7mgC/Lまで低下することがわかった。この結果は、P(3HB)ポリマー鎖が河川水中に存在する微生物の分泌するPHBデポリメラーゼによって水溶性の分解生成物まで分解され、その分解生成物の大半が微生物の活動エネルギーや菌体成分合成に利用され河川水中には存在していないことを示している。また、P[(R)-3HB]フィルムおよびP(3HB)（*[i]*=0.63）フィルムの重量生分解度とBOD生分解度との間には、20–30%の違いが認められる。これは、P(3HB)の分解生成物が微生物の活動エネルギーとして利用されるだけでなく、微生物の増殖によるバイオマス形成としても利用されていることを示している。

Table 2-10. Weight-loss-biodegradabilities and BOD-biodegradabilities of P(3HB) films and changes in DOC values of test solution (the river Arakawa water) for 28 days at 25°C.

sample	isotactic diad fraction, <i>[i]</i>	weight-loss-biodegradability, %	BOD-biodegradability, %	DOC, mgC/L	
				initial	final
Fraction 3	0.63	100±0	61±2	2.8	1.6±0.1
Fraction 5	0.88	48	31	2.8	1.7±0.3
P[(R)-3HB]	1.00	100±0	75±8	10.4	5.2±1.2

2-4 結論

本章では、生分解性ポリエステル分子設計法の指針となる基礎的知見を得るために、微生物産生P[(R)-3HB]と同じ化学構造を持ちつつ立体構造の異なるP(3HB)を化学合成し、その物理的性質および生分解性におよぼす立体構造効果を調べた。得られた結果より、本章の結論を以下にまとめる。

本章前半では、ポリマー鎖中の(R)体と(S)体のモノマー組成比が異なるP(3HB) ((R)-/(S)-3HB=96/4~50/50) を調製し、その物理的性質と生分解性を調べた。

(1) ポリマー鎖中の(S)-3HBユニットは、P[(R)-3HB]連鎖の結晶構造中に取り込まれず、結晶欠陥となっていることがわかった。そのため、ポリマー鎖中に(S)-3HBユニットが導入されるとP(3HB)の結晶化度が低下し、P(3HB)フィルムは非常に柔軟な材料となる。しかしながら、(S)-3HBユニットの導入によって、P(3HB)フィルムの強度は著しく低下し、機械的性質の向上には至らなかった。

(2) (S)-3HBユニットを含むP(3HB)フィルムのPHBデポリメラーゼによる酵素分解速度は、ポリマー鎖中の(S)-3HB分率に大きく依存し、(S)-3HB分率=4~20mol%のP(3HB)フィルムの酵素分解速度はP[(R)-3HB]フィルムの分解速度よりも大きくなった。しかしながら、完全非晶質なP[70%(R)-3HB]とシンジオタクチックP[50%(R)-3HB]は、PHBデポリメラーゼによってほとんど分解されないことがわかった。これは、P(3HB)の固体構造（モルホロジーや結晶構造）が酵素分解反応に大きく影響しているためであることがわかった。

(3) (S)-3HBを含むP(3HB)の酵素分解生成物は、(R)-3HBと(S)-3HBユニットからなるオリゴマーであることを明らかにした。

(4) (S)-3HBユニットを含むP(3HB)フィルムの自然環境水中での生分解試験の結果より、(S)-3HBユニットを含むP(3HB)フィルムは環境中の微生物の酵素によって分解され、分解生成物である3HBのオリゴマーは微生物によって資化され、環境水中には残存しないことが明らかとなった。

本章後半では、ポリマーの立体規則性（タクチシティー）が異なるP(3HB) ((R)-/(S)-3HB=50/50, $[i]=0.88\sim0.54$) を調製し、その生分解性を調べた。

(5) タクチシティーの異なるラセミ体のP(3HB)のPHBデポリメラーゼによる酵素分解速度はP(3HB)のタクチシティーに大きく依存し、 $[i]=0.74$ のとき最大の分解速度を示

した。

(6) PHBデポリメラーゼによる分解によって生成した分解生成物は(*R*)-3HBと(*S*)-3HBユニットからなるオリゴマーであった。また、分解生成物である3HBのオリゴマーのヒドロキシル基末端ユニットは、(*R*)-3HBユニットであることがわかった。したがって、PHBデポリメラーゼはポリマー鎖中の(*R*)-3HBユニットのメチン炭素に結合したエステル結合を選択的に切断すると結論できる。

(7) ラセミ体のP(3HB)フィルムの自然環境水中での生分解試験の結果より、ラセミ体のP(3HB)フィルムは環境中の微生物の酵素によって分解され、分解生成物である3HBのオリゴマーは微生物によって資化され、環境水中には残存しないことが明らかとなった。

(8) 以上の結果より、(*S*)-3HBユニットを含む化学合成P(3HB)は、その立体構造を制御することにより、自然環境中で完全に生分解される高分子材料として利用できることが証明された。

References

- (1) Doi, Y. *Microbial Polyesters*; VCH Publishers: New York, **1990**.
- (2) Anderson, A. J.; Dawes, E. A. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450.
- (3) Marchessault, R. H.; Coulombe, S.; Morikawa, H.; Okamura, K.; Revol, J. F. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 38.
- (4) Barham, P. J.; Keller, A.; Otun, E. I.; Holmes, P. A. *J. Mater. Sci.* **1984**, *19*, 2781.
- (5) Holmes, P. A. In *Developements in Crystalline Polymers—2*; Bassett, D. C., Ed.; Elsevier: London, **1988**; p1.
- (6) Tal, S.; Okon, Y. *Can. J. Microbiol.* **1968**, *16*, 900.
- (7) Ohta, T.; Miyake, T.; Takaya, H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1725.
- (8) Okawara, R.; Wada, M. *J. Organomet. Chem.* **1963**, *1*, 81.
- (9) Doi, Y.; Tamaki, A.; Kunioka, M.; Soga, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, *28*, 330.
- (10) Hori, Y.; Suzuki, M.; Yamaguchi, A.; Nishishita, T. *Macromolecules* **1993**, *26*, 5533.
- (11) Hocking, P. J.; Marchessault, R. H. *Polym. Bull.* **1993**, *30*, 163.
- (12) Bloembergen, S.; Holden, D. A.; Hamer, G. K.; Bluhm, T. L.; Marchessault, R. H. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2865.
- (13) Shirakura, Y.; Fukui, T.; Saito, T.; Okamoto, Y.; Narikawa, T.; Koide, K.; Tomita, K.; Takemasa, T.; Masamune, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *880*, 46.
- (14) Yamada, K.; Mukai, K.; Doi, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 215.
- (15) Mukai, K.; Yamada, K.; Doi, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 361.
- (16) Yakabe, Y.; Kitano, M. *Biodegradable Plastics and Polymers*; Vert, M., et al. Eds.; Royal Society of Chemistry: London, **1992**; p331.
- (17) Vonk, C. G. *J. Appl. Crystallogr.* **1973**, *6*, 148.
- (18) Tanio, T.; Fukui, T.; Shirakura, Y.; Saito, T.; Tomita, K.; Masamune, S. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *124*, 71.
- (19) Saito, T.; Iwata, A.; Watanabe, T. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1993**, *1*, 99.
- (20) Fukui, T.; Narikawa, T.; Miwa, K.; Shirakura, Y.; Saito, T.; Tomita, K. *Biochem. Biophys. Acta* **1988**, *952*, 164.

- (21) Shirakura, Y.; Fukui, T.; Tanio, T.; Nakayama, K.; Matsuno, R.; Tomita, K. *Biochem. Biophys. Acta* **1983**, 748, 331.
- (22) Saito, T.; Suzuki, K.; Yamamoto, J.; Fukui, T.; Miwa, K.; Tomita, K.; Nakanishi, S.; Odani, S.; Suzuki, J.; Ishikawa, K. *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 184.
- (23) Briesse, B. H.; Schmidt, B.; Jendrossek, D. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1994**, 2, 75.
- (24) Jendrossek, D.; Backhaus, M.; Andermann, M. *Can. J. Microbiol.* **1995**.
- (25) Jendrossek, D.; Müller, B.; Schlegel, G. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 701.
- (26) Kurusu, Y.; Kohama, K.; Uchida, Y.; Saito, T.; Yukawa, H. *Biodegradable Plastics and Polymers*; Doi, Y., et al. Eds.; Elsevier: Amsterdam, **1994**; p.357.
- (27) Kumagai, Y.; Kanesawa, Y.; Doi, Y. *Makromol. Chem.* **1992**, 193, 53.
- (28) Kemnitzer, J. E.; McCarthy, S. P.; Gross, R. A. *Macromolecules* **1992**, 25, 5927.

第三章

ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸]と
ポリ[(*R,S*)-3-ヒドロキシブタン酸]との
二成分ブレンドの固体構造と性質

3-1 緒言

第一章でも説明したように、ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB]) は数多くの微生物によって生合成され、エネルギー貯蔵物質としてその菌体内に蓄積されている^{1,2)}。このP[(R)-3HB]は、従来汎用ポリマーとして使用されてきた合成ポリマーにはない生分解性という特性を持つ熱可塑性樹脂である。そのため、使用後環境中で分解されるポリマーとして期待されており、その実用化を目指して多くの研究が実施されている。

P[(R)-3HB]は、自然環境中にすむ多種類の微生物によって容易に加水分解される^{1,3,4)}。P[(R)-3HB]を分解する微生物は、菌体外に分解酵素 (PHB デポリメラーゼ) を分泌し、そのPHBデポリメラーゼがP[(R)-3HB]材料の表面に吸着して、ポリマー鎖をモノマーユニットである3-ヒドロキシブタン酸まで加水分解する。分解生成物は、微生物の体内に取り込まれ、様々な代謝経路を経て、各種の生体高分子の合成に使われたり、あるいはエネルギー生産のために用いられて最終的には水と二酸化炭素に変換される。

本研究の目的の一つは、生分解性高分子材料の分子設計法の構築を目指し、ポリエステル構造と酵素分解性の相関性を明らかにし、酵素分解反応のメカニズムを解明することである。第二章では微生物産生P[(R)-3HB]の機械的物性の改善を目的として、微生物産生P[(R)-3HB]と立体構造の異なる様々なポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R,S)-3HB]) を化学合成し、その物理的性質におよぼす立体構造の効果について調べた。その結果、ポリマー鎖中に(S)-3HBユニットが導入されることにより、P(3HB)フィルムの結晶化度が低下し、P(3HB)フィルムは柔軟な材料になることがわかった。しかし、P(3HB)フィルムの機械的強度は(S)-3HBユニットが入ることによって著しく低下するために、根本的な機械的物性の改善には至らなかった。また第二章では、化学合成P(3HB)の生分解性におよぼすP(3HB)の立体構造の効果についても調べた。その結果、P(3HB)フィルムの酵素分解速度は立体構造に依存することがわかった。しかしながら、PHBデポリメラーゼによるP(3HB)フィルムの酵素分解反応には、P(3HB)の立体規則性だけでなくP(3HB)のモルホロジーも強く影響をしていることがわかった。

物理的性質の多様発現の手法としては、ポリマー鎖中に構造の異なるモノマーユ

ニットを導入する共重合体の合成と異なる性質を有するポリマーをブレンドするポリマーブレンドの手法が考えられる。そこで本章では、 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ をベースとしたポリマーブレンドによる機械的物性の改善について検討する。ブレンドするポリマーとしては、化学合成法によって調製した $P(3\text{HB})$ の立体異性体を選択した。

本章では、微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ と化学合成 $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ との二成分ブレンドを調製し、その固体構造と性質を調べた。まず、微生物産生のイソタクチック構造の $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ と化学合成より得たアタクチック構造の $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ との二成分ブレンドの結晶化過程とモルホロジーを調べた。さらに、微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ と3種類の立体構造の異なる $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ の二成分混合系の物理的性質とその酵素分解性を調べた。それらの結果をもとに、 $P(3\text{HB})$ フィルムの酵素分解性におよぼす $P(3\text{HB})$ のモルホロジーの効果について検討した。

3-2 実験

3-2-1 試薬

(1) ジエチル亜鉛 (ZnEt_2)

東ソー・アクゾー (株) 製を1,4-ジオキサンで亜鉛量で1Mになるように希釈して使用した。

(2) ジクロロメタン

和光純薬工業 (株) 製、特級品に水素化カルシウムを加えて、1日窒素雰囲気下で還流した後に、蒸留して使用した。

(3) 1,4-ジオキサン

和光純薬工業 (株) 製、特級品1Lに濃塩酸14mLと蒸留水100mLを加えて、窒素を流しながら10時間還流した。冷却後、分液ロートに移し、ゆっくり水酸化カリウムを加えて水酸化カリウムが溶けなくなるまで振り、水相を分けた後にデカンテーションでジオキサンを取り出した。更に、新しい水酸化カリウムを加えて脱水した後に、別のフラスコに移し、金属ナトリウムとベンゾフェノンの存在下で青色になるまで還流した後、蒸留して使用した。

(4) $\text{ZnEt}_2/\text{H}_2\text{O}$ 触媒の調製

窒素置換した100mLシュレンクフラスコに窒素気流下で1Mの ZnEt_2 /1,4-ジオキサン50mLを入れ、5℃に冷却した。次に、窒素置換した均圧ライン付きの滴下ロートに、1,4-ジオキサン30mLおよび脱気した蒸留水0.54mLを入れ、シュレンクフラスコに攪拌しながら5℃で1時間かけて加えた。更に5時間室温で攪拌して反応を完結させた。反応終了後、反応液を凍結乾燥し、その後、室温で10時間減圧乾燥を行って $\text{ZnEt}_2/\text{H}_2\text{O}$ 触媒を調製した。調製した触媒のZn量を原子吸光法で分析したところ、Zn量は $6.7 \times 10^{-3} \text{ mol/g}$ であった。

3-2-2 ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB]) の合成

第二章と同じ方法によって微生物合成した。

3-2-3 アタクチック構造のポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R,S)-3HB]) の合成

アタクチックP[(R,S)-3HB]は、ZnEt₂/H₂O触媒を用いたラセミ体の(R,S)-β-ブチロラクトン (β-BL) の開環重合により得た⁹⁾。窒素置換した50mLのシュレンクフラスコに窒素気流下で所定量のZnEt₂/H₂O触媒及び所定量のジクロロメタンを仕込み0℃に冷却し、窒素気流下で所定量の(R,S)-β-BLを加え、60℃で5日間攪拌を行った。冷却後、少量のメタノールを入れて反応を停止させた後、クロロホルムを加えて生成物を溶かし、約10倍量のジエチルエーテル/蒸留水 (100/1 (v/v)) で再沈させた後、恒量になるまで室温で減圧乾燥しポリマーを得た。

3-2-4 立体規則性の異なるポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R,S)-3HB]) の合成

立体規則性の異なるP[(R,S)-3HB]は、ジスタノキサン触媒を用いたβ-BLの開環重合により得た (第二章参照)。

まず、(R)体/(S)体=70/30(mol/mol)になるように(R)-β-BL (92%e.e.) とラセミ(R,S)-β-BLを混合し、所定量の1-エトキシ-3-クロロテトラブチルジスタノキサンを20mLのシュレンクフラスコに入れ、100℃で4時間反応させた。生成物をクロロホルムに溶解し、ジエチルエーテル/ヘキサン (1/3 (v/v)) 混合溶液中で沈殿させて、70mol%(R)-3HBユニットからなるP[(R,S)-3HB]ポリマーを得た。

次に、ラセミ(R,S)-β-BLと所定量の1-エトキシ-3-クロロテトラブチルジスタノキサンを20mLのシュレンクフラスコに入れ、100℃で4時間反応させた。生成物をクロロホルムに溶解し、ジエチルエーテル/ヘキサン (1/3 (v/v)) 混合溶液中で沈殿させて、シンジオタクチック性の高いP[(R,S)-3HB]ポリマーを得た。

3-2-5 P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンドフィルムの作製

ブレンドフィルムは、所定量の混合比で微生物産生P[(R)-3HB]と化学合成P[(R,S)-3HB]とをクロロホルムに溶解し、2%(w/v)の溶液にし、ガラス製のシャーレを用いて、

ソルベント-キャスト法により作製した。作製したブレンドフィルムを室温下で恒量になるまで減圧乾燥を行い、安定した結晶状態にするために3週間室温で放置した。

3-3-6 P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンドフィルムの酵素分解実験

第二章と同じく、UV法と重量減少法によって試験した。

3-3-7 P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンドフィルムの環境水（河川水）中での分解試験

第二章と同じく、BOD試験装置を用いて行った。

3-2-8 分析方法

- (1) NMR測定
- (2) 分子量測定
- (3) DSC測定
- (4) X線回折測定
- (5) 引っ張り試験
- (6) 球晶形態の観察
- (7) 走査型電子顕微鏡観察
- (8) 高速液体クロマトグラフィーによる分解生成物の分析

(1) から (8) までの分析操作は、第二章と同じ方法で行った。

(9) ポリマーの恒温結晶化

ポリマー約3.5mgを計り採り、DSC用のアルミニウムパンにいれ、ホットステージ上に置き、窒素を流しながら、昇温速度30℃/minで室温から200℃まで昇温した。200℃で30秒間保持し、その後所定の結晶化温度まで80℃/minで急冷し、それぞれの結晶化温度で一晩保持した。その後、サンプルの入ったアルミニウムパンを取り出し、DSC装置を用いて昇温速度10℃/minで200℃まで加熱して、 T_m を測定した。

(10) 小角X線散乱測定

P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ポリマーブレンドのラメラ単位は、小角X線散乱法(SAXS)により測定した。ソルベント-キャスト法により作製したポリマーフィルムをSAXS専用のサンプルホルダーに入れ、ホットプレート上で190℃、2分間溶融さ

せた後、各結晶化温度に保持したホットプレート上に移し一晩結晶化させ、厚さ約3mmのポリマーサンプルを作製した。X線源としてCuK α 線 ($\lambda=0.1542\text{nm}$) を利用した。X線の発生条件は、流加電圧40kV、電流60mAとし、サンプルへのX線の照射時間は、1～4時間とした。

3-3 結果と考察

3-3-1 ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸]とポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸]との二成分ブレンドの結晶化過程とモルホロジー

(1) イソタクチックP[(R)-3HB]およびアタクチックP[(R,S)-3HB]の合成

イソタクチックP[(R)-3HB]は、*Alcaligenes eutrophus* H16に炭素源としてフルクトースを与えることによって生合成した。アタクチックP[(R,S)-3HB]は、ZnEt₂/H₂O触媒を用いて、ラセミ体の(R,S)-β-BLの開環重合により得た。得られたP[(R,S)-3HB]のイソタクチックダイアッドの分率は、0.51 (125MHzの¹³C-NMRスペクトルより算出した)であった。

Table 3-1には、本研究で利用したポリマーの数平均分子量 (M_n) および多分散度 (M_w/M_n) をまとめて示してある。

Table 3-1. Molecular weights of isotactic and atactic P(3HB) samples.

sample	molecular weight	
	$M_n \times 10^{-3}$	M_w/M_n
Isotactic P[(R)-3HB] ^a	650	1.8
Atactic P[(R,S)-3HB](56000) ^b	56	1.3
Atactic P[(R,S)-3HB](3400) ^b	3.4	2.5

a) Bacterial P[(R)-3HB]

b) Atactic P[(R,S)-3HB] was synthesized by polymerization of racemic β-BL with Zn(C₂H₅)₂/H₂O as a catalyst. Polymerization conditions; reaction temperature=60°C, reaction time=5 days, in CH₂Cl₂.

(2) P[(R)-3HB]とP[(R,S)-3HB]との二成分ブレンドの球晶形態と球晶成長速度

P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンド系における、溶融-結晶時の両成分の挙動についての情報を得るために、ポリマーブレンドの球晶形態および球晶成長速度を調べた。P[(R)-3HB]の球晶は、ホットステージと簡易偏光板を備えた光学顕微鏡を用いて観察した。昇温速度30°C/minで室温から190°Cまで昇温した後、190°Cで2分間保持することによりポリマーを溶解し、その後所定の結晶化温度まで急冷することによりポリマーを結晶化させた。P[(R)-3HB]の球晶成長速度は、時間に対する球晶半径をプロットして、その傾きより算出した。P[(R)-3HB]の球晶は、P[(R)-3HB]およびP[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系（重量比75/25および50/50）のそれぞれのサンプルに

ついて観察した。

Figure 3-1には、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)二成分ブレンドの球晶写真を示してある。二成分混合系の球晶もP[(R)-3HB]の場合と同様に、 T_c の上昇とともに結晶核形成速度が低下し、その結果、球晶半径は増大した。球晶成長の終了後において、球晶形成はフィルム全表面で一様に観察され、P[(R)-3HB]成分とP[(R,S)-3HB](56000)成分との成分分離は確認されなかった。これは、P[(R,S)-3HB](56000)がP[(R)-3HB]の球晶内で混ざりあっていることを示している。また、バンド型の球晶の形成が確認されたが、バンドの形状はP[(R)-3HB]ホモポリマーの球晶のように明瞭なものではなかった。これは、アタクチック構造のP[(R,S)-3HB](56000)がP[(R)-3HB]の球晶内で混ざり合うために、P[(R)-3HB]の板状結晶構造がねじれ易くなり、その結果、バンドの形状がはっきりしない球晶が形成されるためと考えられる。また、低い分子量 ($M_n=3400$) のP[(R,S)-3HB](3400)をP[(R)-3HB]にブレンドしたサンプルについても球晶形態を観察したところ、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)の場合と同様の挙動が観察され、球晶形態に与えるアタクチックP[(R,S)-3HB]の分子量の影響は認められなかった。

Figure 3-2 (a)に、60℃から120℃まで結晶化温度 (T_c) を変化させて観測したP[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンドのP[(R)-3HB]の球晶成長速度 (G) を示す。P[(R)-3HB]ホモポリマーは、 T_c が90℃前後で球晶の最大成長速度 (G_{max}) を示しており、その値は約4.3 $\mu\text{m/s}$ である。また、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)ポリマーブレンドでは、P[(R,S)-3HB](56000)の添加量の増加にともなって G の値が低下していることがわかる。その効果は、P[(R,S)-3HB](56000)の添加量が25wt%から50wt%と増加することによって、 $T_c=90^\circ\text{C}$ において、 G は1.74 $\mu\text{m/s}$ から1.32 $\mu\text{m/s}$ まで低下している。しかし、 G_{max} は T_c が90℃前後に現われており、最大成長速度が見られる結晶化温度(90℃)には、P[(R,S)-3HB](56000)の添加による効果は認められなかった。また、P[(R)-3HB]に低分子量のP[(R,S)-3HB](3400)をブレンドしたサンプルにおいても同様の結果が得られ (Figure 3-2 (b))、P[(R)-3HB]の球晶成長速度に与えるP[(R,S)-3HB]の分子量の影響は認められなかった。

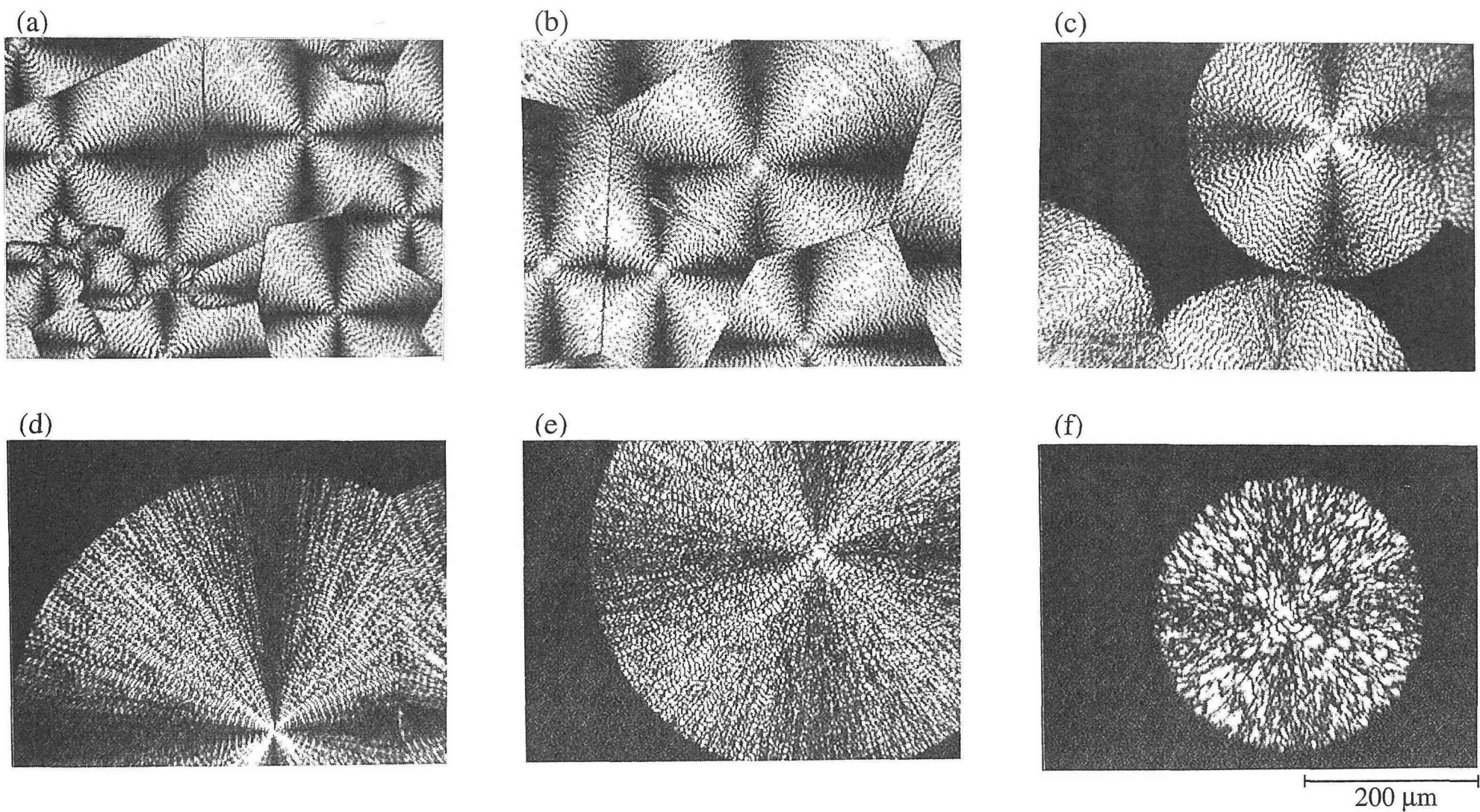


Figure 3-1 Optical micrographs of P[(*R*)-3HB] spherulites of P[(*R*)-3HB]/P[(*R,S*)-3HB] blends with P[(*R,S*)-3HB] component molecular weight 56000. (a) P[(*R*)-3HB]/P[(*R,S*)-3HB] (75/25) after completion of crystallized at $T_c=85^\circ\text{C}$, (b) (75/25) after completion of crystallization at $T_c=110^\circ\text{C}$, (c) (75/25) during growth at $T_c=120^\circ\text{C}$, (d) (50/50) during growth at $T_c=85^\circ\text{C}$, (e) (50/50) during growth at $T_c=95^\circ\text{C}$, and (f) (50/50) during growth at $T_c=120^\circ\text{C}$.

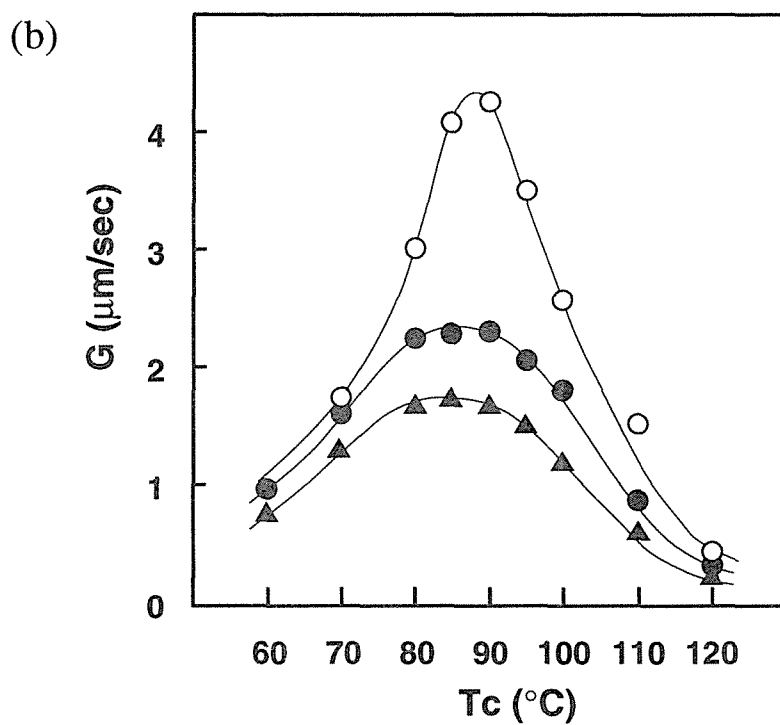
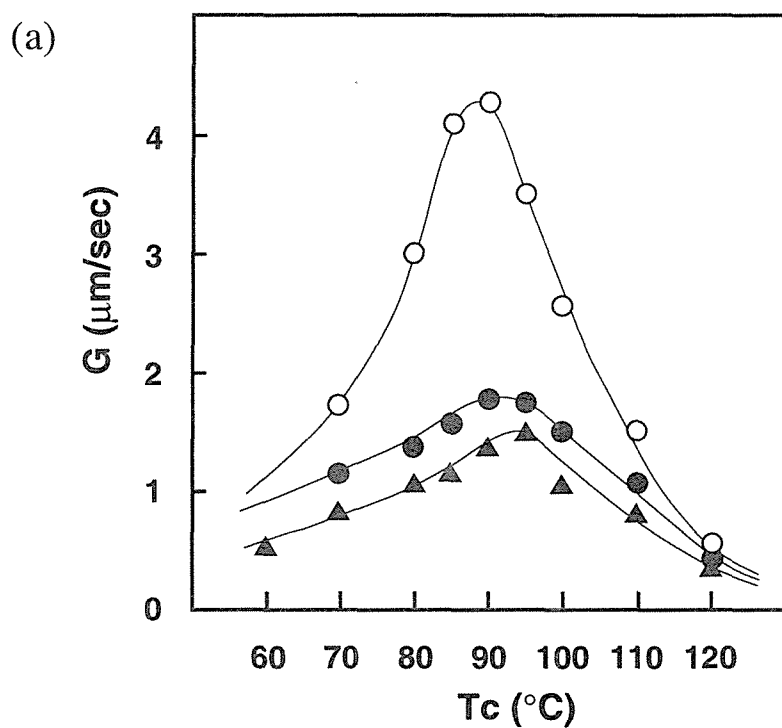


Figure 3-2 Radial growth rate (G) of P[(*R*)-3HB] spherulites at various crystallization temperatures (T_c) for (a) P[(*R*)-3HB]/P[(*R,S*)-3HB](56000) blends and (b) P[(*R*)-3HB]/P[(*R,S*)-3HB](3400) blends of different compositions (wt/wt): 100/0 (○), 75/25 (●), 50/50 (▲).

(3) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ポリマーブレンドのラメラ構造

次に、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系の結晶ラメラのモルホロジーについての知見を得るために、小角X線散乱法を用いて結晶性P[(R)-3HB]の結晶ラメラの厚さ(ラメラ単位)を測定した。測定には、190℃で融解したブレンドフィルムを結晶化温度(T_c) 30℃, 90℃, 120℃のそれぞれの温度で1日～3日間結晶化させたサンプルを用いた。イソタクチックP[(R)-3HB]のラメラ単位は、X線の散乱角(2θ)で表わされる散乱ベクトル： q ($q=4\pi\sin\theta/\lambda$; λ : X線の波長。本研究では、X線源としてCuK α 線を用い、 $\lambda=0.1542\text{nm}$ である。)と検出されたX線の強度(I)とのプロットから解析した。

一様なラメラ構造を持つポリマーにX線を照射した場合、散乱を起こしたX線はラメラ単位に対応して干渉を起こす。その結果、散乱ベクトル： q と検出されるX線強度(I)とのプロットにはピーク頂点が現われる (Figure 3-3 参照)。

ピーク頂点を示す q の値を $q_{\max}$ と表わすとポリマーのラメラ単位(L_p)は、次式で表すことができる。

$$L_p = 2\pi/q_{\max} \quad (\text{eq. 3-1})$$

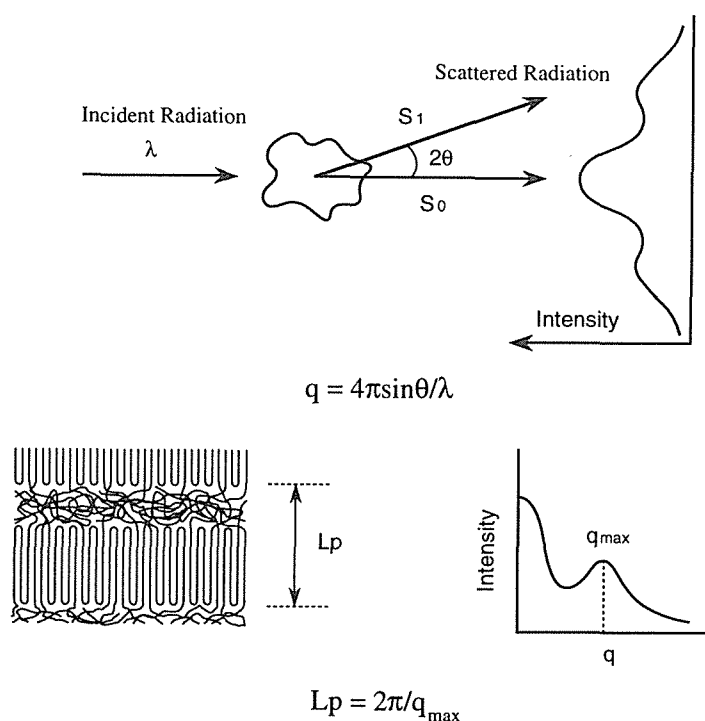


Figure 3-3 Schematic representation of the small-angle X-ray scattering (SAXS) conception.

Figure 3-4には、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンド系を90℃で1日結晶化したサンプルの小角X線散乱パターンを示してある。イソタクチックP[(R)-3HB]を90℃で結晶化した場合、 $q=0.82(\text{nm}^{-1})$ に q_{max} が現われており、eq.3-1よりラメラ単位 (L_p) は7.6nmと算出される (Figure 3-4 (a))。これに対して、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)=75/25(wt/wt)ブレンドを90℃で結晶化した場合 (Figure 3-4 (b))、 $q_{\text{max}}=0.53(\text{nm}^{-1})$ であり、このときのラメラ単位は $L_p=11.9\text{nm}$ と算出される。一方、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)=50/50(wt/wt)ブレンドにおいては、ピークはブロードになり q_{max} を判別することができなかった (Figure 3-4 (c))。これは、ラメラ単位に対応するX線の干渉に加えて、P(3HB)の非晶部でのX線の散乱が強く影響しているためと考えられる。非晶部でのX線の散乱を差し引いて、ブレンドのラメラ単位を算出した場合 $L_p=10.5\text{nm}$ であった。以上の結果より、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系を90℃で結晶化した場合、アタクチック構造のP[(R,S)-3HB]を添加することによってイソタクチック構造のP[(R)-3HB]のラメラ単位は広がることがわかった。これは、非晶質のP[(R,S)-3HB]がP[(R)-3HB]のロッド間の非晶質領域だけでなく、結晶ラメラ間の非晶質領域でもP[(R)-3HB]と混ざり合っているためと結論できる。また、P[(R)-3HB]に低分子量のP[(R,S)-3HB](3400)をブレンドしたサンプルにおいても同様の結果が得られ (Figure 3-4 (d)および(e))、P[(R)-3HB]のラメラ単位に与えるP[(R,S)-3HB]の分子量の影響は認められなかった。

Figure 3-5には、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)混合系を30℃で3日間結晶化したサンプルの小角X線散乱パターンを示してある。アタクチックP[(R,S)-3HB]の添加量を0から50wt%まで増加するにしたがって、イソタクチックP[(R)-3HB]のラメラ単位は6.4から8.1nmまで広がることがわかった。したがって、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)混合系を30℃で結晶化した場合においても、非晶質のP[(R,S)-3HB]はP[(R)-3HB]のロッド間の非晶質領域だけでなく、結晶ラメラ間の非晶質領域でもP[(R)-3HB]と混ざり合っていると結論できる。

Figure 3-6には、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)混合系を120℃で1日間結晶化したサンプルの小角X線散乱パターンを示してある。120℃で結晶化したP[(R)-3HB]のラメラ単位は10.8nmであった。P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)混合系を120℃で結晶化したときのラメラ単位は11.0nm程度ではほぼ一定であり、P[(R,S)-3HB]の添加によるP[(R)-3HB]のラメラ単位の増大は認められなかった。したがって、P[(R)-

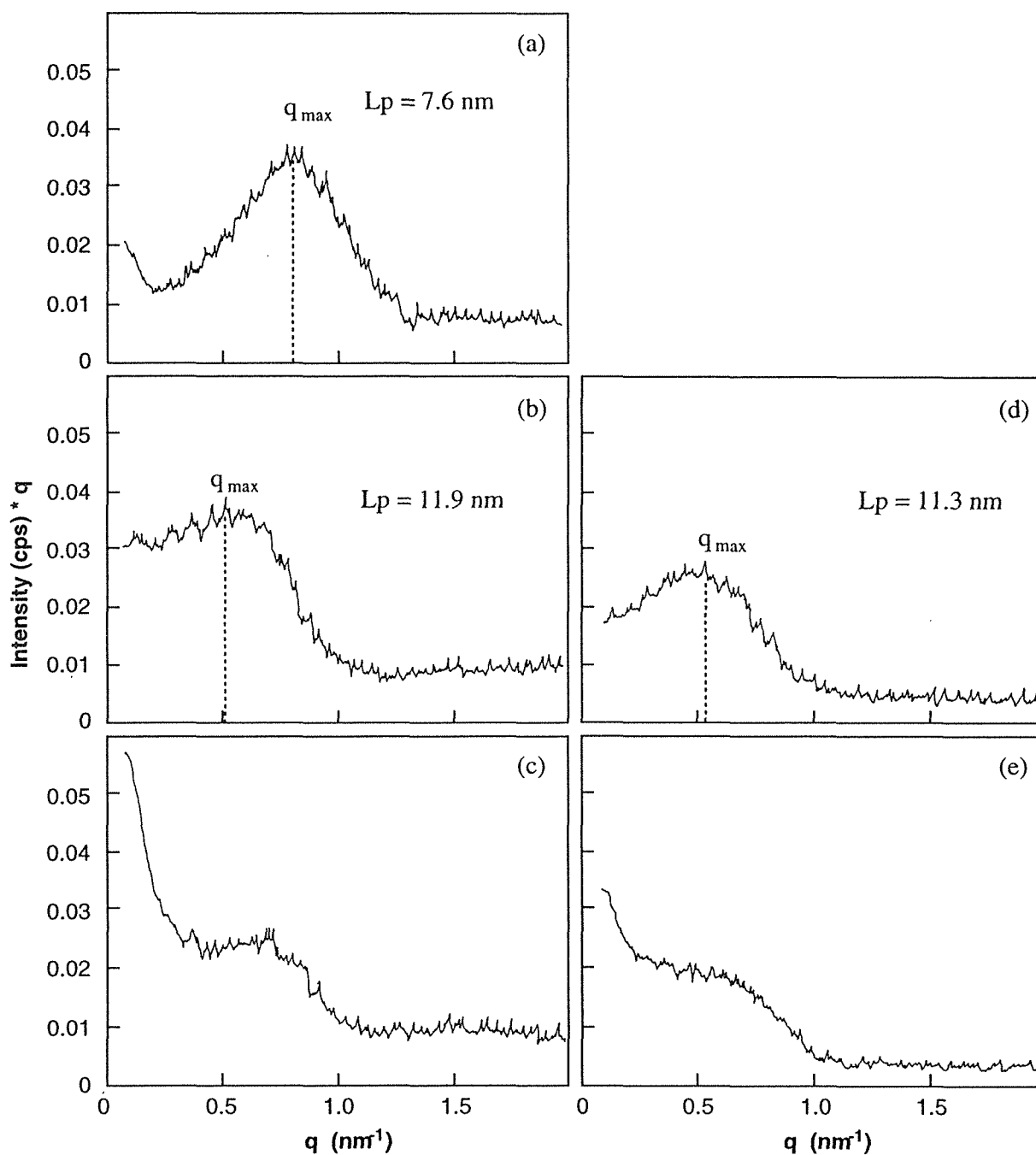


Figure 3-4 Variation in relative SAXS intensities with q : (a) pure P[(R)-3HB], (b) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000) (75/25) blend, (c) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000) (50/50) blend, (d) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](3400) (75/25) blend, and (e) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](3400) (50/50) blend. Samples were crystallized at $T_c=90^\circ\text{C}$ for 1 day after melting at 190°C for 2 min.

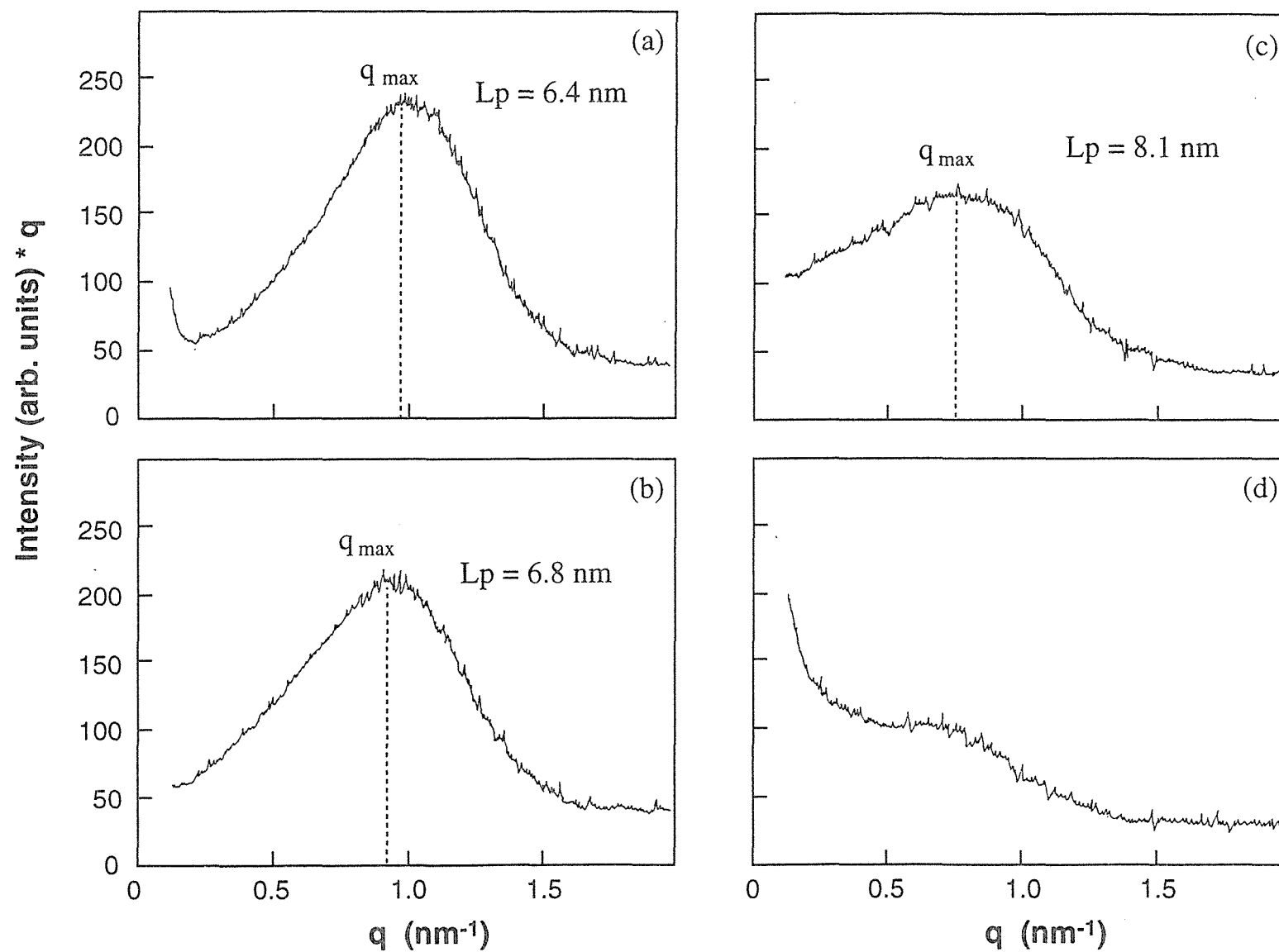


Figure 3-5 Variation in relative SAXS intensities with q : (a) pure P[(R)-3HB], (b) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000) (75/25) blend, and (c) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000) (50/50) blend. Samples were crystallized at $T_c=30^\circ\text{C}$ for 3 day after melting at 190°C for 2 min.

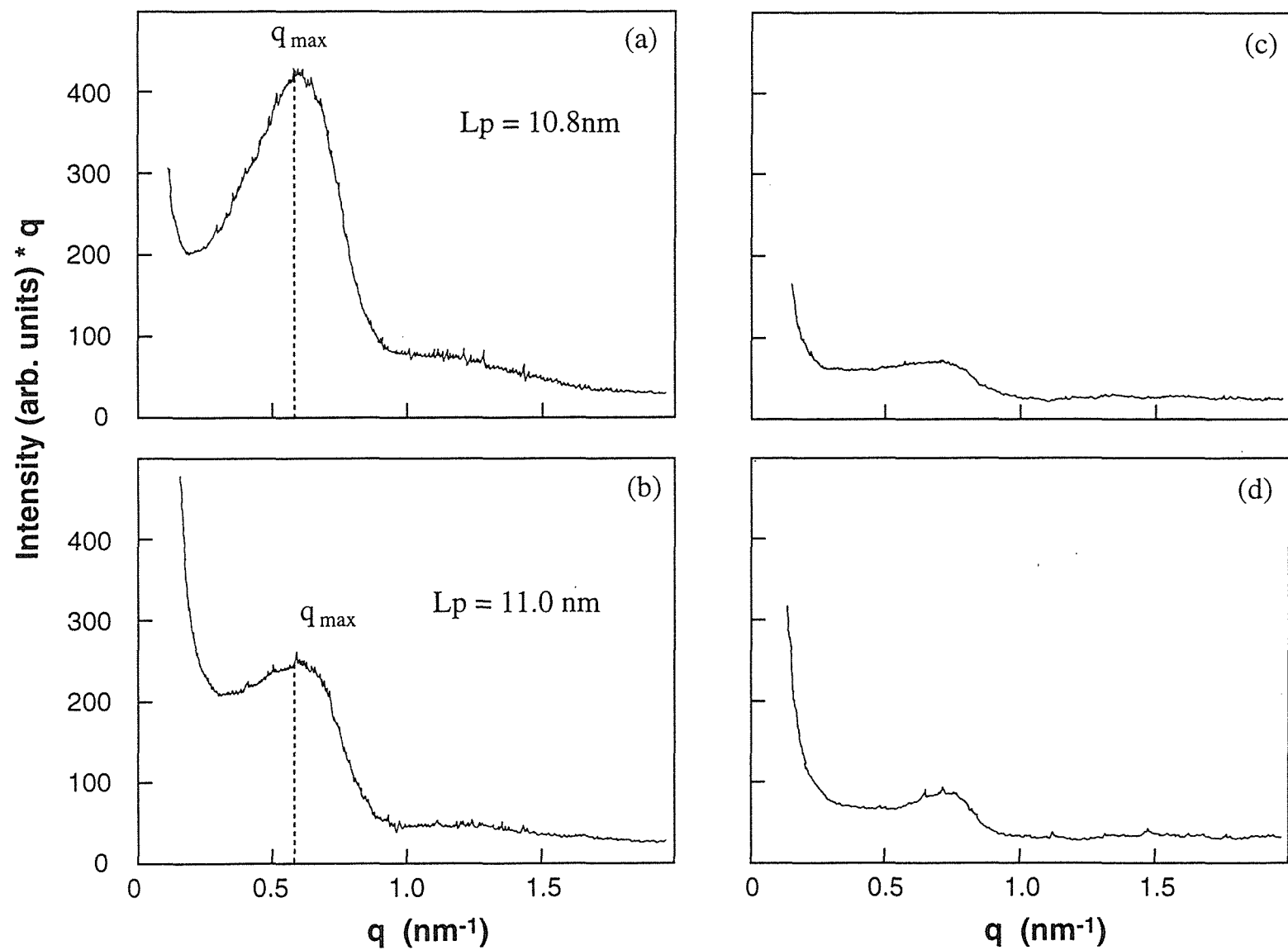


Figure 3-6 Variation in relative SAXS intensities with q : (a) pure P[(R)-3HB], (b) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000) (75/25) blend, and (c) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB](56000) (50/50) blend. Samples were crystallized at $T_c=120^\circ\text{C}$ for 1 day after melting at 190°C for 2 min.

3HB]/P[(R,S)-3HB](56000)混合系を120℃で結晶化した場合、非晶質のP[(R,S)-3HB]はP[(R)-3HB]の結晶ラメラ間の非晶質領域よりも、P[(R)-3HB]のロッド間の非晶質領域により多く存在していると結論できる。

以上の結果より、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系を溶融－結晶化した場合の結晶ラメラのモルホロジーはその結晶化温度に大きく依存することがわかった。結晶化温度が30℃の場合、P[(R,S)-3HB]の分率が0から50wt%まで増加するにしたがって、ラメラ単位は6.4から8.1nmまで増大した。また、結晶化温度が90℃の場合、P[(R,S)-3HB]が0から25wt%添加することによってラメラ単位は7.6から11.9nmまで増加したが、それ以上P[(R,S)-3HB]を添加してもラメラ単位の増大は認められなかった。これは、P[(R)-3HB]結晶ラメラ間に取り込まれるP[(R,S)-3HB]成分量に上限が存在することを示している。さらに、結晶化温度が120℃の場合、P[(R,S)-3HB]の添加によるラメラ単位の増大はほとんど認められなかった。この結果からも、P[(R)-3HB]結晶ラメラ間に取り込まれるP[(R,S)-3HB]成分量に上限が存在することが予想される。また、P[(R)-3HB]結晶ラメラ間に取り込まれるP[(R,S)-3HB]成分量の上限は、P[(R)-3HB]とP[(R,S)-3HB]の混合比と結晶化する温度とに依存している。これは、結晶化過程における高分子鎖の運動性とP[(R)-3HB]の結晶化速度の違いによるものと考えられる。結晶化過程のP(3HB)鎖の運動性はその結晶化温度に依存し、高分子鎖はより高い結晶化温度において高い運動性を示すことが予想される。結晶化温度が120℃の場合、P(3HB)鎖の運動性は高いが、P[(R)-3HB]の結晶成長速度は遅い。そのため、P[(R)-3HB]の結晶ラメラの成長時において、P[(R,S)-3HB]成分はP[(R)-3HB]のロッド間の非晶領域へと流動し易いのであろう。結晶化温度が90℃の場合、P[(R)-3HB]の結晶成長速度が非常に速く、その結果、P[(R,S)-3HB]成分はロッド間の非晶領域に移動するよりも速くラメラ間の非晶領域に取り込まれるものと考えられる。また、結晶化温度が30℃の場合、高分子鎖の運動性は低く、P[(R)-3HB]の球晶成長速度もかなり遅いものである。しかし、P[(R)-3HB]の結晶核形成速度が非常に速くなるため、P[(R,S)-3HB]成分はP[(R)-3HB]のラメラ間の非晶領域に取り込まれ易くなるのであろう。また、それぞれの結晶化温度において、P[(R,S)-3HB]分率の増加とともに結晶化速度は低下する。そのため、P[(R,S)-3HB]分率が高いサンプルを結晶化した場合、P[(R,S)-3HB]成分はより多くP[(R)-3HB]ロッド間の非晶領域に流動し易いものと予想される。

3-3-2 ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸]とポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸]との混合系の物性と生分解性

(1) 使用したP(3HB)の合成結果

微生物産生P[(R)-3HB]は、*Alcaligenes eutrophus* H16に炭素源としてフルクトースを与えることによって生合成した。P[(R,S)-3HB]立体異性体は、β-BLをジスタノキサン触媒あるいはZnEt₂/H₂O触媒を用いて開環重合することにより得た。Table 3-2に、各P(3HB)サンプルの合成条件、分子量、およびイソタクチックダイアッド分率[i]をまとめて示してある。

Table 3-2. Molecular weights and isotactic fractions of P(3HB) samples.

sample	monomer feed ratio, R/S	polymer yield, %	molecular weight		isotactic diad fraction, ^e [i]
			Mn×10 ⁻³	Mw/Mn	
P[100%(R)-3HB] ^a	—	—	281	2.3	1.00
P[70%(R)-3HB] ^b	70 / 30	90	105	1.8	0.46
syn-P[50%(R)-3HB] ^c	50 / 50	99	145	1.8	0.30
ata-P[50%(R)-3HB] ^d	50 / 50	97	20	1.2	0.51

a) Bacterial P[(R)-3HB]

b) Atactic P[(R,S)-3HB] with 70% (R)-3HB was synthesized by polymerization of (R)- and (S)-β-BL (R/S=70/30) with 1-ethoxy-3-chlorotetrabutylidistannoxane as a catalyst. Polymerization conditions; mole ratio of catalyst/monomer=1/4000, reaction temperature=100°C, reaction time=4 h, without solvent.

c) Syndiotactic P[(R,S)-3HB] with 50% (R)-3HB was synthesized by polymerization of racemic β-BL with 1-ethoxy-3-chlorotetrabutylidistannoxane as a catalyst. Polymerization conditions; mole ratio of catalyst/monomer=1/4000, reaction temperature=100°C, reaction time=4 h, without solvent.

d) Atactic P[(R,S)-3HB] with 50% (R)-3HB was synthesized by polymerization of racemic β-BL with Zn(C₂H₅)₂/H₂O as a catalyst. Polymerization conditions; mole ratio of catalyst/monomer=1/25, reaction temperature=60°C, reaction time=5 days, in CH₂Cl₂.

e) Determined from carbonyl carbon resonance in ¹³C NMR spectra.

ジスタノキサン触媒⁶⁾およびZnEt₂/H₂O触媒⁷⁾によるβ-BLの開環重合では、アシルーオキシゲン開裂によって重合反応が進行することが報告されている。したがって、ポリマー鎖中のモノマーユニットの立体配置は、仕込みモノマーの立体配置を保持している。以下、化学合成法によって得られた3種類のP[(R,S)-3HB]サンプルを便宜上、次のように表記する。(R)-/(S)-β-BL=70/30をジスタノキサン触媒で重合した[i]=0.46のP[(R,S)-3HB]；P[70%(R)-3HB]，(R)-/(S)-β-BL=50/50をジスタノキサン触媒で重合した[i]=0.30のシンジオタクチック性の高いP[(R,S)-3HB]；syn-P[50%(R)-3HB]，(R)-/(S)-β-BL=50/50をZnEt₂/H₂O触媒で重合した[i]=0.51のアタクチック構造のP[(R,S)-3HB]；ata-P[50%(R)-3HB]。

化学合成法により得られた3種類のP[(R,S)-3HB]サンプルそれぞれを、微生物産生P[(R)-3HB]と所定の混合比でブレンドし、ソルベント-キャスト法でフィルムを調製し、物理的性質および生分解性の解析に使用した。

(2) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系の熱的性質

P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]、P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]およびP[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]混合系のガラス転移点 (T_g)、融点 (T_m) および融解熱 (ΔH_m) をDSCを用いて測定した。 T_m と ΔH_m は、サンプルを窒素雰囲気下で室温から200℃まで昇温速度10℃/minで加熱することによって求めた。また、 T_g は、200℃で融解させたサンプルを液体窒素で急冷し、窒素雰囲気下、-100℃から200℃まで昇温速度20℃/minで測定することによって求めた。Table 3-3に各混合系の T_g 、 T_m および ΔH_m の値をまとめて示してある。

T_g は、どのサンプルにおいてもただ1つだけ観測され、その値は5℃付近で一定であった。P[70%(R)-3HB]とata-P[50%(R)-3HB]はともに非晶質なポリマーであり、それぞれのDSC曲線には融解ピークは認められなかった。シンジオタクチック性の高いsyn-P[50%(R)-3HB]は、52℃と62℃付近に2つの T_m を持つことがわかった。すべての二成分混合系のDSC曲線には、150℃から180℃の間で2つの融解ピークが存在することがわかった。両方の T_m の値は、化学合成P(3HB)の重量分率が増加するにしたがって、ゆるやかに低下していることがわかる。DSC曲線中の2つの融解ピークがDSCスキャン中における、P[(R)-3HB]成分の再結晶化の影響によるものか否かを明らかにするために、昇温速度を5℃/minから40℃/minまで変化させてDSC測定を行った。低温側の吸熱ピークは昇温速度によらずほぼ同一のピークとして観測されたが、高温側の吸熱ピークは昇温速度が増加するにしたがって小さくなった。この結果は、高温側の吸熱ピークが、P[(R)-3HB]の結晶形態の溶融-再結晶化によって現れたものであることを示している。二成分混合系の ΔH_m の値は、P[(R,S)-3HB]成分が増加するにしたがって、90J/gから30±5J/gまで低下した。

Table 3-3. Thermal properties and X-ray crystallinities of solvent-cast P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB] blend films.

sample	blend composition, wt. ratio	T_g , ^a °C	T_m , ^b °C	ΔH_m , ^c J/g	T_m^0 , ^d °C	X_c , ^e %
P[(R)-3HB]	—	5	177	90	191	62±5
P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]	75/25	5	176	44	186	45±5
			160	8		
	50/50	5	174	37	182	25±5
			158	8		
	25/75	6	172	27	174	14±5
			154	5		
	0/100	6	—	0		0
P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]	75/25	5	176	75	187	48±5
			161	7		
	50/50	5	175	32	183	35±5
			159	9		
	25/75	5	173	22	180	22±5
			157	6		
			50	3		
	0/100	6	52	26		26±5
			62			
P[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]	75/25	4	174	50		49±5
			160	6		
	50/50	4	173	44		30±5
			157	7		
	25/75	4	173	22		13±5
			157	3		
	0/100	7	—	0		0

a) Glass-transition temperature; measured by DSC (second scan) from -150 to 200°C at a rate of 20°C/min.

b) Melting temperature; measured by DSC (first scan) from 0 to 200°C at a rate of 10°C/min.

c) Enthalpy of fusion; measured by DSC (first scan).

d) Equilibrium melting temperature; determined from Hoffman-Weeks plots.

e) Degree of crystallinity; determined from X-ray diffraction patterns.

つぎに、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系の平衡融点 (T_m^0) をHoffman-Weeksの方法⁸⁾にしたがって測定した。その結果をTable 3-3にまとめてある。どの混合系においても二成分系ブレンドの T_m^0 はP[(R,S)-3HB]分率が0から75wt%まで増加するとともに191から174°Cまで低下した。このことは、それぞれの混合系のP[(R)-3HB]とP[(R,S)-3HB]とが熔融状態で相溶であることを示している。

(3) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系の結晶化度

P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]、P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]およびP[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]混合系フィルムの結晶化度をX線回折パターンから決定した。その結果をTable 3-3に示した。

P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]混合系およびP[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]混合系の結晶化度 (X_c) は、非晶質なP[(R,S)-3HB]成分が0から75wt%まで増加するにつれて62から14%まで低下した。P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]混合系の場合も、ブレンドフ

フィルム中のP[(R)-3HB]成分の増加につれて T_c が低下することがわかった。

(4) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系の球晶形態と球晶成長速度

P[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]混合系の球晶形態と球晶成長速度については3-2節で既に議論した。そこで、本節では、P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]およびP[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]混合系の球晶形態と球晶成長速度について述べる。球晶観察は、前述の通りホットステージと簡易偏光板を備えた光学顕微鏡を用いて行った。

Figure 3-7には、P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]=50/50(wt/wt)ブレンドを70℃と110℃で結晶化させたときの球晶およびP[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]=50/50(wt/wt)ブレンドを70℃と110℃で結晶化させたときの球晶の顕微鏡写真を示してある。成長過程のP[(R)-3HB]球晶の球晶半径は、結晶化時間の経過とともに直線的に増加した。球晶成長が終了したとき、フィルムの全表面で一様なP[(R)-3HB]球晶が観察され、P[(R)-3HB]成分とP[(R,S)-3HB]成分との成分分離は認められなかった。このことより、P[(R,S)-3HB]成分は、P[(R)-3HB]の球晶内に混和していることがわかった。

Figure 3-8 (a)および(b)には、それぞれP[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]混合系とP[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]混合系を60℃から120℃まで結晶化温度を変化させて観察したP[(R)-3HB]の球晶成長速度(G)を示してある。微生物産生P[(R)-3HB]の場合、 T_c が90℃付近で球晶成長速度は最大値(G_{max})を示し、その値は、約3.4 $\mu\text{m/s}$ であった。P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]二成分混合系の球晶成長速度は、結晶化温度とブレンド組成の両方に大きく依存することがわかる。球晶成長速度は、ポリマーブレンド中のP[(R,S)-3HB]の重量含率の増加とともに低下し、P[(R,S)-3HB]含率25wt%で G_{max} はP[(R)-3HB]の約1/2、P[(R,S)-3HB]含率75wt%で G_{max} はP[(R)-3HB]の約1/10まで低下した。 G_{max} を示す T_c は、P[(R,S)-3HB]の含率によらず90℃付近ではほぼ一定であった。前章で述べたように、相溶なP[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]の球晶成長時にも同様な挙動が認められている。

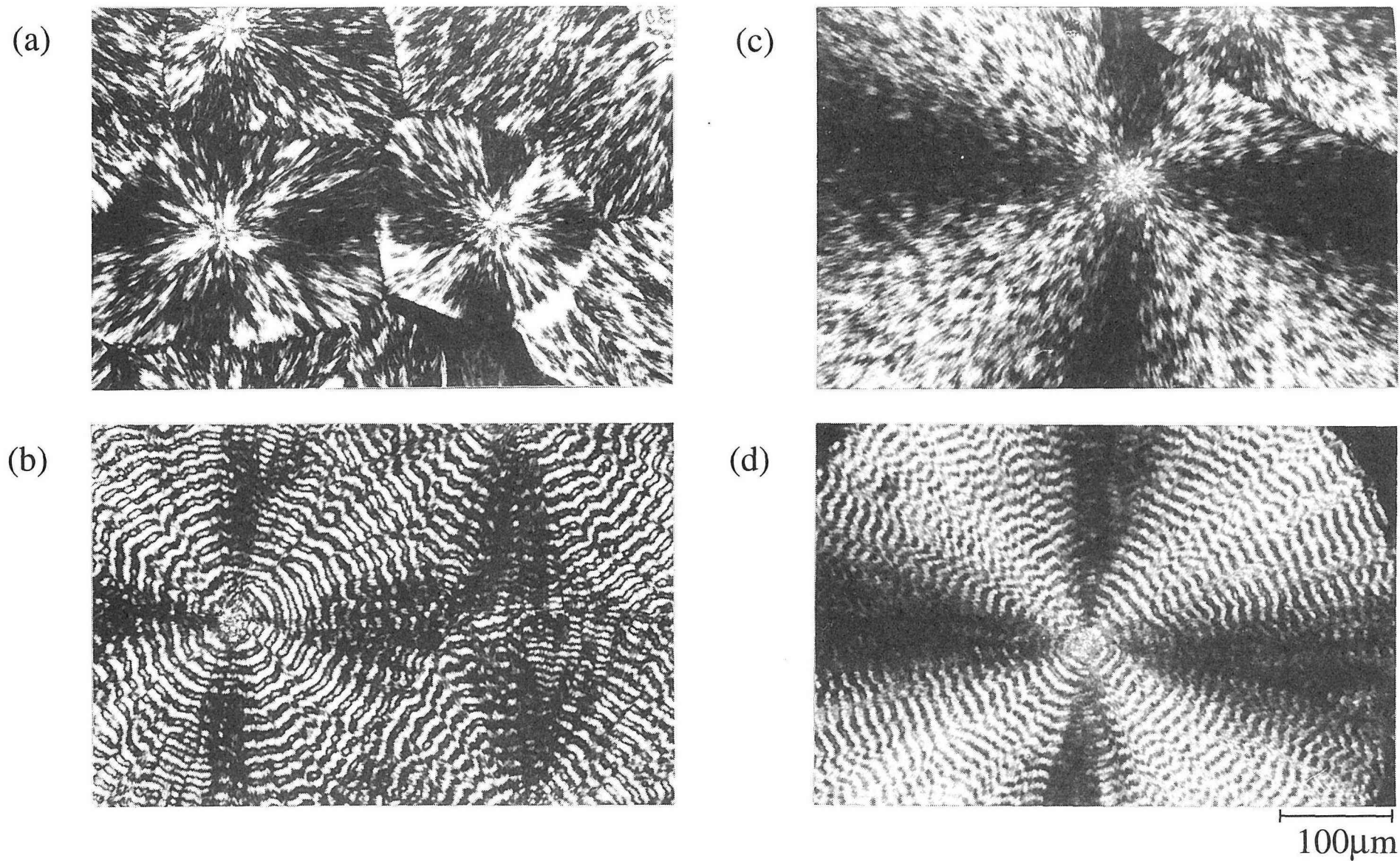


Figure 3-7 Optical micrographs of P[(R)-3HB] spherulites for P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]=50/50 (wt/wt) blend film grown isothermally at (a) $T_c=70^\circ\text{C}$ and (b) $T_c=110^\circ\text{C}$, and for P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]=50/50 (wt/wt) blend film grown isothermally at (c) $T_c=70^\circ\text{C}$ and (d) $T_c=110^\circ\text{C}$.

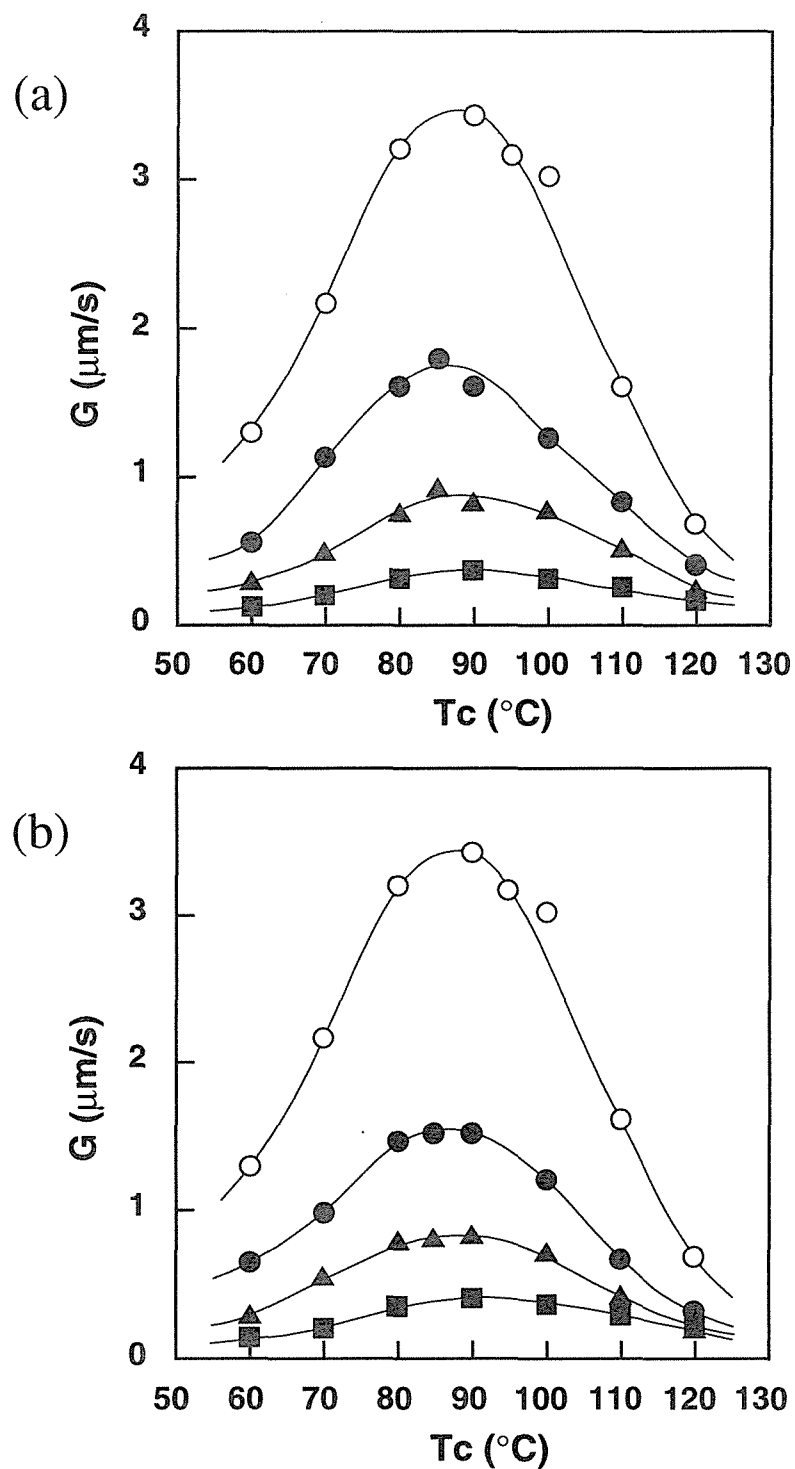


Figure 3-8 Radial growth rate (G) of P[(R)-3HB] spherulites at various crystallization temperatures (T_c) for (a) P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB] blend and (b) P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB] blend: 100/0 (O), 75/25 (●), 50/50 (▲); 25/75 (■).

(5) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系の機械的強度

ソルベント-キャスト法で調製したP[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンドフィルムのヤング率、破壊強度および破壊伸びを引っ張り試験器を用いて測定した。Table 3-4にその結果を示してある。ヤング率および破壊強度は、ブレンドフィルム中のP[(R,S)-3HB]成分の増加にしたがって低下した。一方、ブレンドフィルムの伸び率は、P[(R,S)-3HB]成分が0から75wt%まで増加するにしたがって、5%から500%以上まで増加することがわかった。

Table 3-4. Mechanical properties at 23°C for solvent-cast films of P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB] blends.

sample	blend composition, wt. ratio	Young's modulus, MPa	tensile strength, MPa	elongation to break, %
P[(R)-3HB]	—	1560 ± 100	38 ± 3	5 ± 1
P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]	75/25	350 ± 20	26 ± 3	150 ± 10
	50/50	210 ± 10	14 ± 1	320 ± 30
	25/75	32 ± 5	6 ± 1	580 ± 50
P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]	75/25	540 ± 30	30 ± 3	30 ± 5
	50/50	340 ± 20	8 ± 1	67 ± 10
	25/75	25 ± 5	15 ± 1	680 ± 50
	0/100	20 ± 5	13 ± 1	1020 ± 70
P[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]	75/25	260 ± 15	20 ± 2	210 ± 20
	50/50	180 ± 10	10 ± 1	380 ± 30
	25/75	25 ± 5	3 ± 1	620 ± 60

(6) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]混合系フィルムの酵素分解性

各ブレンドフィルムの酵素分解実験は、*Pseudomonas pickettii*⁹⁾が菌体外に分泌するPHBデポリメラーゼ (2.0μg) を用いて、0.1Mリン酸緩衝溶液中、37°Cで行った。サンプルとして、ソルベント-キャスト法で作製した1×1cmのフィルムを使用した。酵素分解速度はUV法¹⁰⁾と重量減少法の2通りの方法で調べた。

まず、ブレンドフィルムの酵素分解によって生じる水溶性の3HBユニットのモル量の経時変化をUV法で測定した。P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]、P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]およびP[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]混合系の結果をFigure 3-9に示してある。各曲線に添えた値は、ブレンドフィルム中のP[(R)-3HB]の重量含率である。分解の認められたサンプルには、分解実験開始初期に約30から120分間の誘導期間が存在していることがわかる。これは、フィルム表面への酵素の吸着が飽和するまでの時間と考えられる。誘導期を経た後、水溶性の3HBユニット量が直線的に増加す

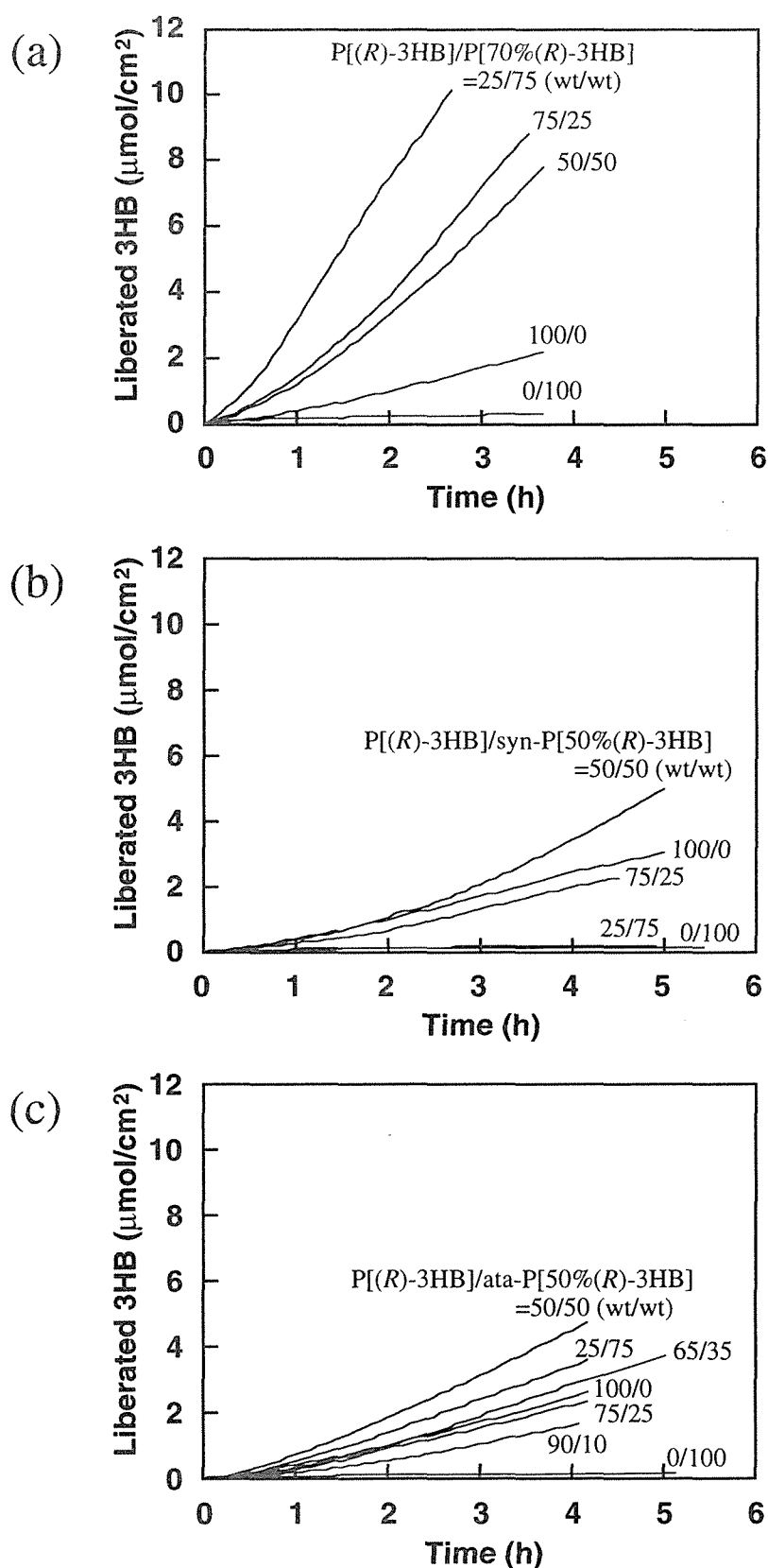


Figure 3-9 Amounts of 3HB units liberated as water-soluble products during the enzymatic degradation of $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ blend films in 0.1M potassium phosphate solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase ($2.0\mu\text{g/mL}$) from *P.pickettii* at 37°C : (a) $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[70\%(R)\text{-}3\text{HB}]$ blend, (b) $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/\text{syn-}P[50\%(R)\text{-}3\text{HB}]$ blend, and (c) $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/\text{ata-}P[50\%(R)\text{-}3\text{HB}]$ blend.

る部分の傾きより、水溶性3HBの生成速度を算出した。

Figure 3-10には、各混合系の組成と酵素分解による3HBの生成速度との関係を示している。比較として、酵素分解によるブレンドフィルムの重量減少量を一緒に示した。UV法より求めた $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ 二成分系ブレンドフィルムの分解速度のブレンド組成依存性は、重量減少法より求めた分解速度のブレンド組成依存性とよく一致していることがわかった。 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[70\%(R)\text{-}3\text{HB}]$ ブレンドフィルムの酵素分解は、微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ フィルムの分解よりも速かった。そして、ブレンド比が $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[70\%(R)\text{-}3\text{HB}]=25/75(\text{wt/wt})$ のとき分解速度は最大値を示し、その速度は微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ フィルムの分解速度の約5倍であった (Figure 3-10 (a))。 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/\text{syn-}P[50\%(R)\text{-}3\text{HB}]$ ブレンドの場合 (Figure 3-10 (b))、ブレンドフィルムの酵素分解速度は、フィルム中の $\text{syn-}P[50\%(R)\text{-}3\text{HB}]$ 組成が0から50wt%まで増加するにしたがって増大することがわかった。しかしながら、 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/\text{syn-}P[50\%(R)\text{-}3\text{HB}]=25/75(\text{wt/wt})$ のフィルムは、PHBデポリメラーゼによってほとんど分解されなかった。 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/\text{ata-}P[50\%(R)\text{-}3\text{HB}]$ ブレンドフィルムの酵素分解もまた、微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ フィルムの分解よりも速かった。そして、 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/\text{ata-}P[50\%(R)\text{-}3\text{HB}]=50/50(\text{wt/wt})$ のとき分解速度は最大値を示し、その速度は微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ フィルムの分解速度の約2倍の速さであった (Figure 3-10 (c))。

Figure 3-11および3-12に、 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[70\%(R)\text{-}3\text{HB}]$ および $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/\text{syn-}P[50\%(R)\text{-}3\text{HB}]$ の各ブレンドフィルムの表面と断面の酵素分解前後のSEM写真を示している。分解後のブレンドフィルムの表面は、PHBデポリメラーゼの分解作用が進行し粗雑になっている。一方、酵素分解後のフィルムの断面は、酵素によって浸食されていないことがわかる。また、ブレンドフィルムの断面の電子顕微鏡観察からは、 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ 成分と $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ 成分の成分分離は認められなかった。これらの結果は、PHBデポリメラーゼによる $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ 二成分系ブレンドフィルムの酵素分解反応が、ブレンドフィルムの表面から均一に起こっていることを示している。

微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ フィルムの酵素分解速度は、フィルムの結晶化度の低下にしたがって増加し、PHBデポリメラーゼはフィルム表面の非晶部にあるポリマー鎖を優先的に切断する¹¹⁾。PHBデポリメラーゼによる $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ の非晶部の分解速度は、結晶部の約20倍である。Table 3-3に示すように、 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ ブレンドフ

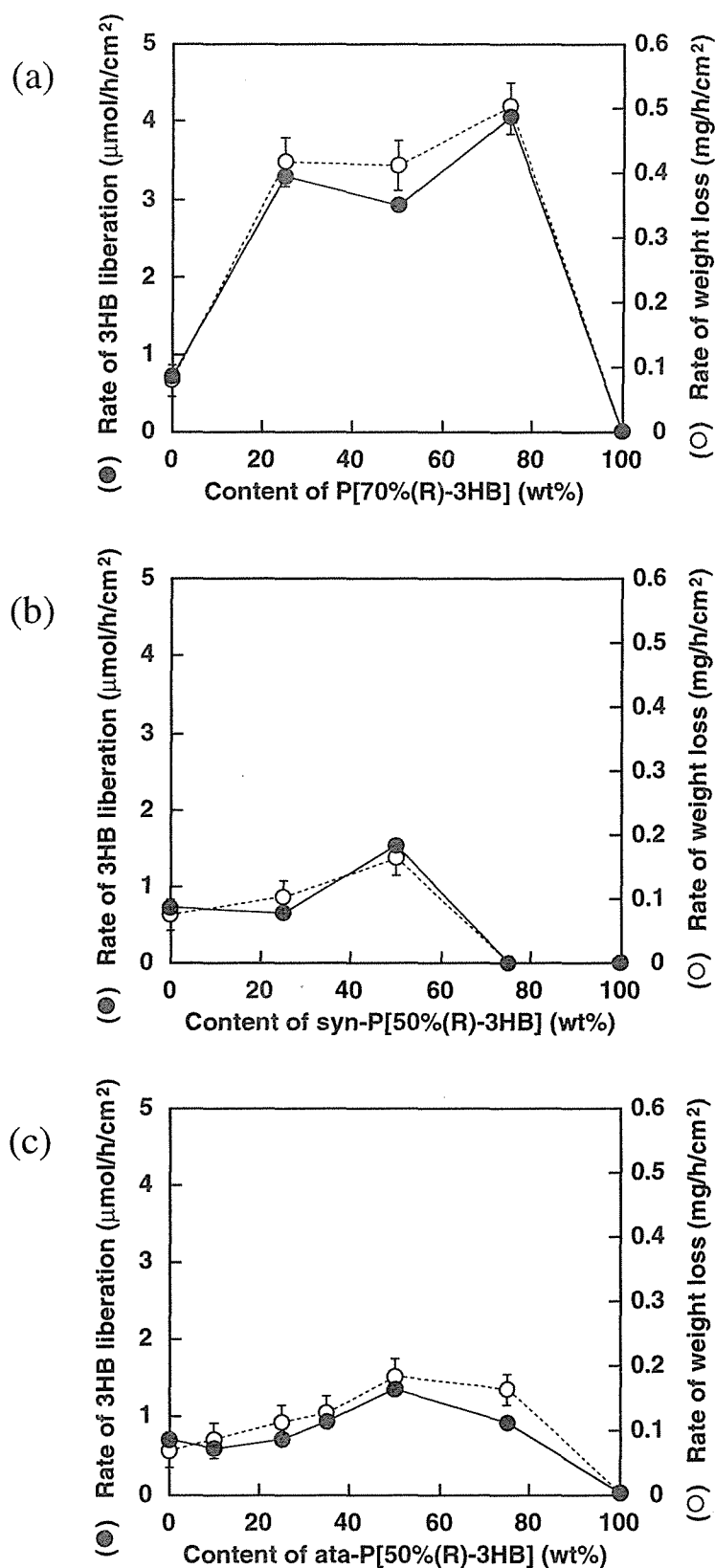


Figure 3-10 The rate of 3HB liberation as water-soluble products (●) and on the rate of weight loss (○) of P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB] blend films after enzymatic degradation with PHB depolymerase (2.0 μg/mL) from *P. pickettii*: (a) P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB] blend, (b) P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB] blend, and (c) P[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB] blend.

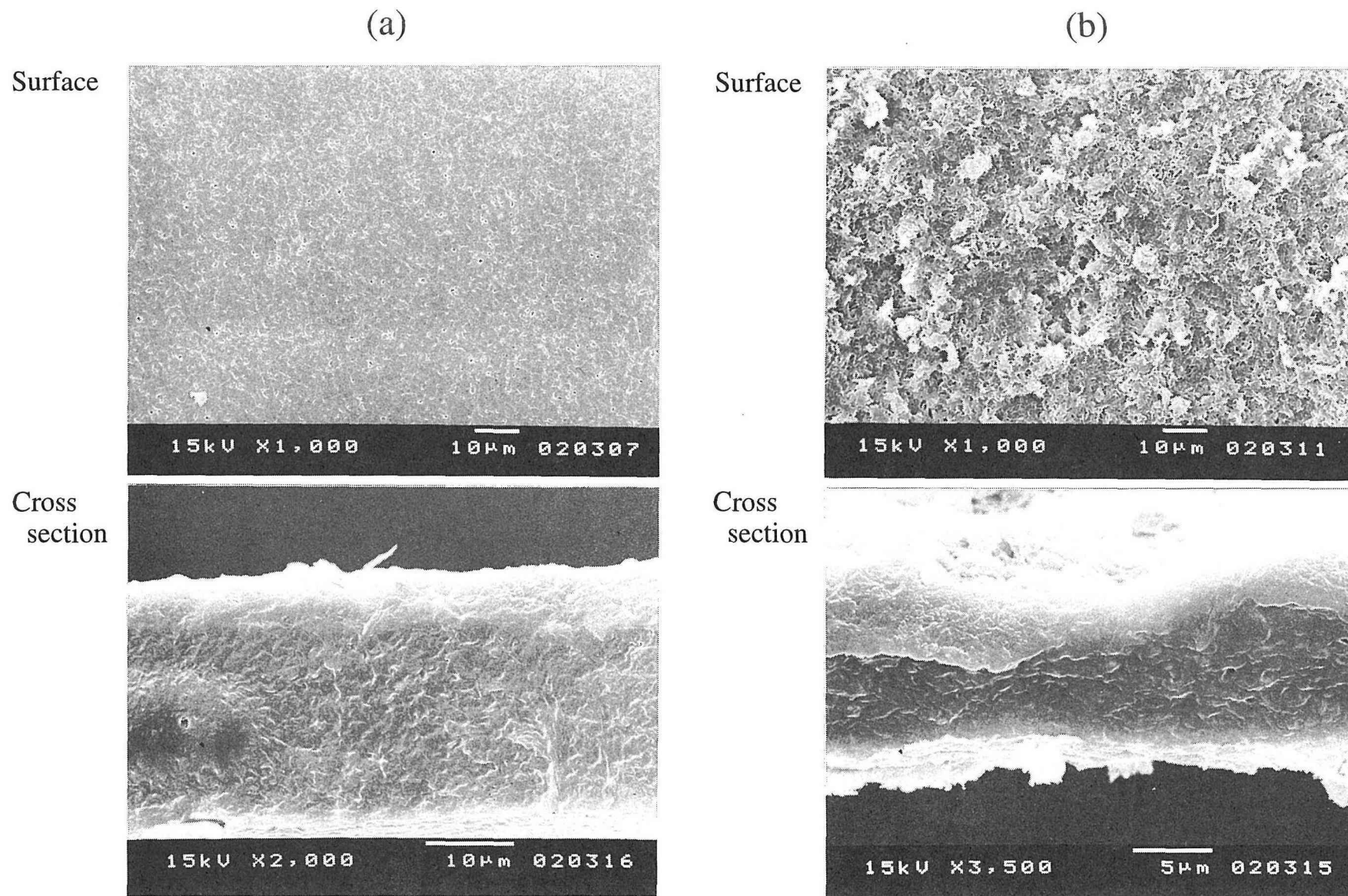


Figure 3-11 Scanning electron micrographs (SEMs) of the surfaces and cross sections of P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]=50/50 (wt/wt) blend film (a) before and (b) after enzymatic degradation for 5 h with PHB depolymerase from *P. pickettii* at 37°C.

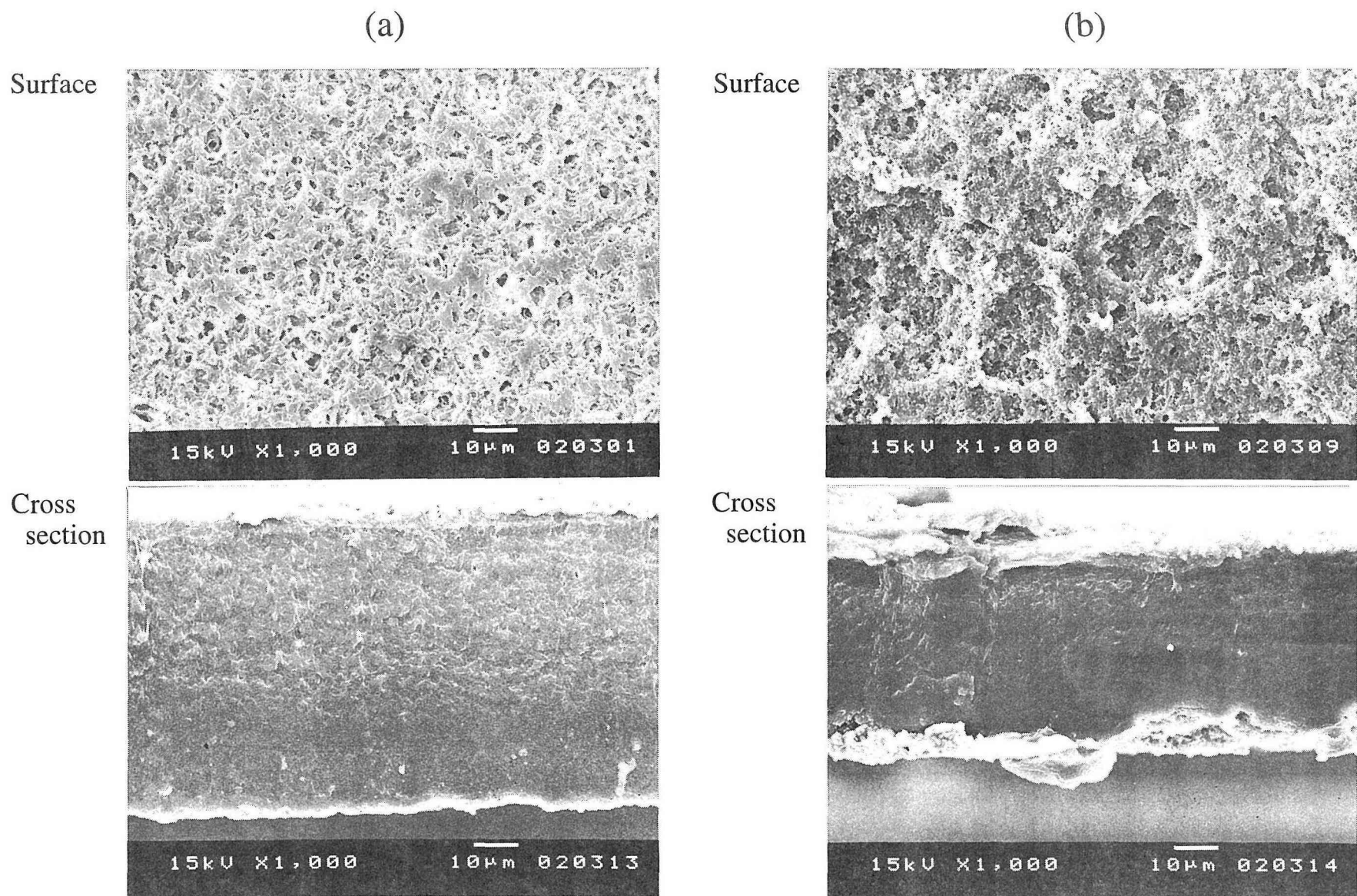


Figure 3-12 Scanning electron micrographs (SEMs) of the surfaces and cross sections of P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]=50/50 (wt/wt) blend film (a) before and (b) after enzymatic degradation for 12 h with PHB depolymerase from *P. pickettii* at 37°C.

フィルムの結晶化度は、 $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ 分率が増加するにしたがって低下する。したがって、 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ ブレンドフィルムの酵素分解速度の増大は、ブレンドフィルムの結晶化度が低下したためと考えられる。

(7) $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ ブレンドフィルムの酵素分解生成物の分析

ポリマーブレンドの酵素分解反応によって生成した水溶性の分解生成物をHPLCを用いて分析した。Figure 3-13には、 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ 二成分系ブレンドフィルムを *P. pickettii* のPHBデポリメラーゼで3時間分解したときに得られた水溶性の分解生成物の重量分布を示してある。微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ フィルムを酵素分解したときの分解生成物は、 $(R)\text{-}3\text{HB}$ ユニットのモノマーとダイマーだけであった。一方、化学合成によって得られた $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ を含む $P[(R)\text{-}3\text{HB}]/P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ 二成分系ブレンドフィルムの酵素分解生成物には、 3HB ユニットのモノマー、ダイマーに加えてトリマーおよびテトラマーが認められた。また、分解生成物中のトリマーおよびテトラマーの存在割合は、ブレンドフィルム中の化学合成 $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ 分率が増加するにしたがって増大することがわかった。

第二章において、 (R) 体と (S) 体の 3HB ユニットからなる $P(3\text{HB})$ フィルムの酵素分解実験を行い、その分解生成物をHPLCを用いて分析した。その結果、 (S) 体の 3HB ユニットを含む $P(3\text{HB})$ フィルムの水溶性の分解生成物には、 3HB ユニットのモノマー、ダイマー、トリマーおよびテトラマーが認められた。本研究で用いた3種類の化学合成 $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ ポリマーは、それぞれ単独では *P. pickettii* のPHBデポリメラーゼによってほとんど分解されなかった (Figure 3-9および3-10)。しかしながら、それらの化学合成 $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ を微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ と混合したブレンドフィルムの酵素分解は、微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ フィルムの分解よりも速く、水溶性の分解生成物中には、 3HB ユニットのモノマー、ダイマーに加えてトリマーおよびテトラマーが認められた。本研究で調製した微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ と化学合成 $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ との二成分混合系は、熔融状態および非晶部において各成分が均一に混和した相溶なブレンドであることがわかった。これらの結果より、本研究で用いた3種類の化学合成 $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ ポリマー鎖は、微生物産生 $P[(R)\text{-}3\text{HB}]$ とのブレンドによりPHBデポリメラーゼによって酵素加水分解されることが明らかとなった。また、 $P[(R,S)\text{-}3\text{HB}]$ ポリマー鎖の分解によって、ブレンドフィルムの分解生成物として 3HB ユニットのトリ

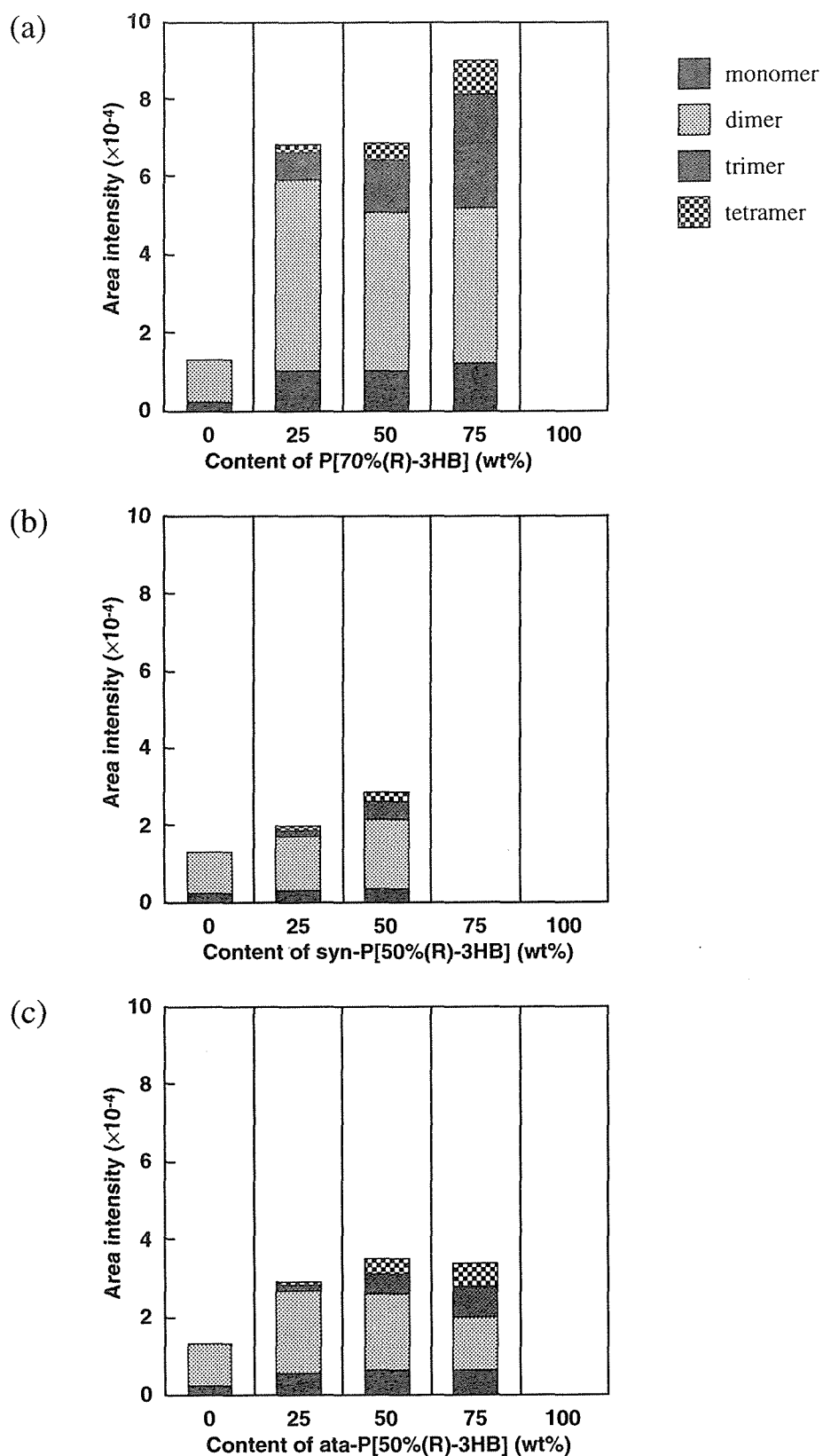


Figure 3-13 The composition and weight distributions of water-soluble products after enzymatic degradation of P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB] blend films for 3 h at 37°C in an aqueous solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (2.0μg/mL) from *P. pickettii*: (a) P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB] blend, (b) P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB] blend, and (c) P[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB] blend.

マーおよびテトラマーが生成されるものと考えられる。

Saitoら¹²⁻¹⁴⁾は、*Alcaligenes faecalis*のPHBデポリメラーゼ (MW 47kDa) には、P[(R)-3HB]フィルム表面に吸着するための働きを持つ吸着部位とポリマー鎖を切断するための働きを持つ触媒部位が存在することを報告している。吸着部位と触媒部位の存在は、P[(R)-3HB]フィルム表面での酵素分解反応が次のような2段階の反応で進行することを示唆している¹⁰⁾。まず、PHBデポリメラーゼの吸着部位によってP[(R)-3HB]フィルムの表面への酵素の吸着反応が起こり、その後、PHBデポリメラーゼの触媒部位の作用により、ポリマー鎖が加水分解され水溶性の分解生成物まで分解される。

第二章で述べたように、*A. faecalis*および*Pseudomonas pickettii*のPHBデポリメラーゼによるP[(R)-3HB]フィルムの酵素分解を行った場合、その分解生成物は(R)-3HBユニットのモノマーとダイマーであった。このことは、これらのPHBデポリメラーゼが、P[(R)-3HB]のポリマー鎖の末端から分解する*exo*型の分解酵素として強く作用していることを示している。しかしながら、(S)-3HBユニットを4~20mol%含むP(3HB) ($[\eta]=0.92\sim0.68$) のフィルムの分解速度は、P[(R)-3HB]の分解速度よりも大きく、それらの分解生成物には、3HBユニットのトリマーおよびテトラマーの存在が確認された。この結果は、PHBデポリメラーゼが*exo*型の切断だけでなく*endo*型 (ランダム) の切断によってもP(3HB)のポリマー鎖を加水分解できることを示している。

ここで、PHBデポリメラーゼによるP(3HB)フィルムの酵素分解反応のモデルを提起する (Figure 3-14)。このモデルにおいて、酵素の吸着部位は、P(3HB)フィルム表面のP[(R)-3HB]結晶部に選択的に吸着し、酵素の触媒部位は表面の非晶部に存在するポリマー鎖から優先的に分解し、続いて結晶部に存在するポリマー鎖を切断し、ゆくものと考えている。非晶部に存在するポリマー鎖は、 T_g (4℃) 以上の温度において、分子運動性を保持している。一方、結晶部に存在するポリマー鎖は、規則正しい 2_1 ヘリックス構造を形成し、構造的に安定な状態にある¹⁵⁾。PHBデポリメラーゼの吸着部位は、構造的に安定なP[(R)-3HB]の結晶ラメラの表面に吸着し易く、分子運動性を持ったP(3HB)の非晶部には吸着し難いものと思われる。非晶質なポリマーであるP[70%(R)-3HB]やata-P[50%(R)-3HB]には、PHBデポリメラーゼが吸着できず、その結果、これらのポリマーはPHBデポリメラーゼによって分解されないものと考えられる。しかしながら、非晶質なP[(R,S)-3HB]と結晶性のP[(R)-3HB]をブレンドすることによって、PHBデポリメラーゼはフィルム表面の結晶部に吸着可能となり、

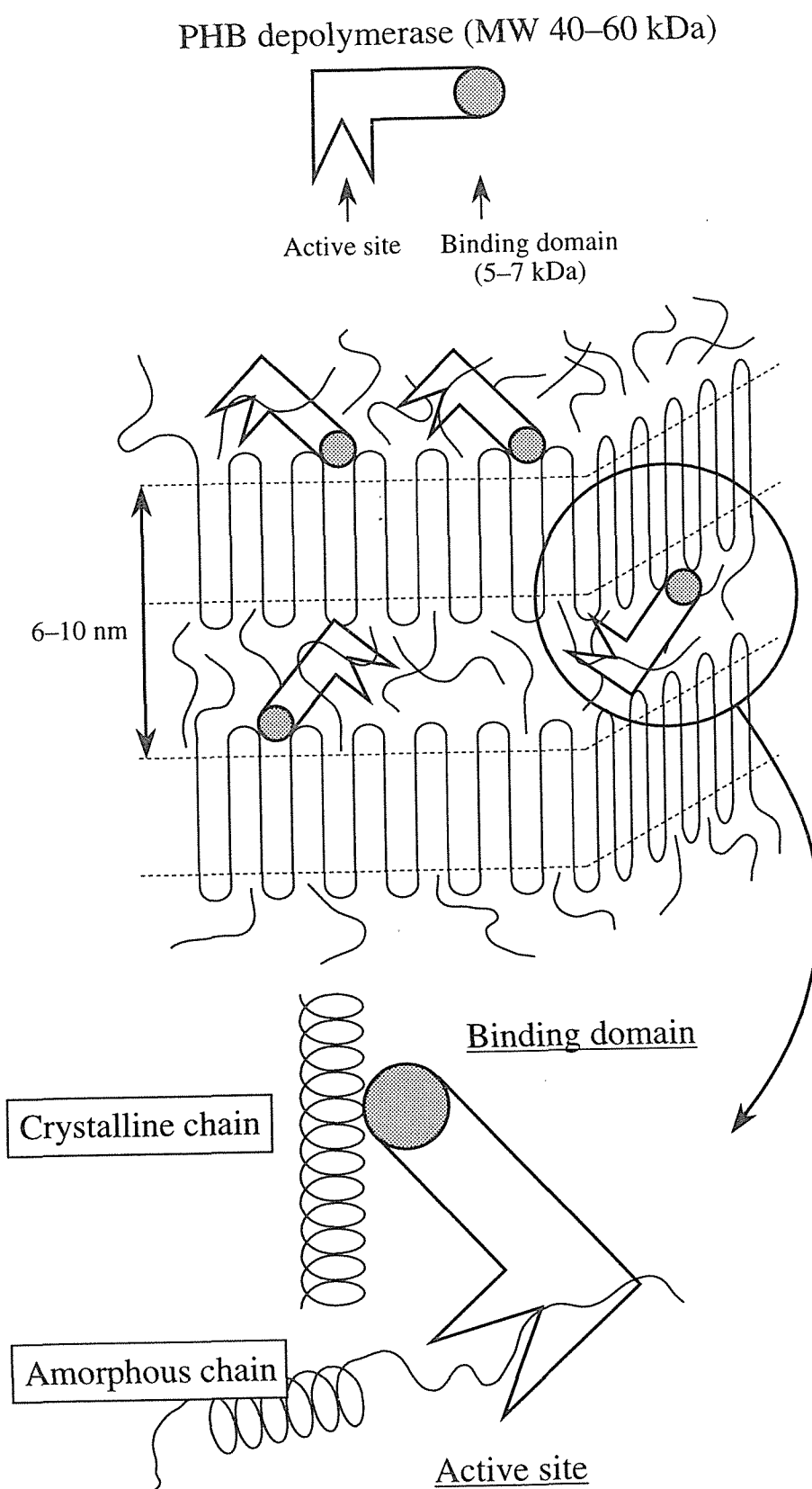


Figure 3-14 A model of enzymatic hydrolysis of P(3HB) chains by PHB depolymerase consisting of binding and catalytic domains.

非晶部のP[(R,S)-3HB]ポリマー鎖を分解することができるようになるのであろう。

本研究において、結晶化度の低いsyn-P[50%(R)-3HB]フィルムもまた、PHBデポリメラーゼによってほとんど分解されなかった。シンジオタクチックダイアッド分率 $[s]=0.70$ のsyn-P[50%(R)-3HB]の結晶ラメラおよび結晶相－非晶相の相境界領域には多くの結晶欠陥部が存在している。このような結晶欠陥は、syn-P[50%(R)-3HB]の結晶部へのPHBデポリメラーゼの吸着を弱める働きをするものと考えられる。そのため、syn-P[50%(R)-3HB]単独では、PHBデポリメラーゼによって分解されにくいものと予想される。

第二章で結論したように、PHBデポリメラーゼは、P(3HB)ポリマー鎖中の(R)-3HBユニットを認識してポリマー鎖を加水分解し、(S)-3HBユニット連鎖を切断できない。P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]ブレンドフィルムのフィルム表面に存在する(R)-3HBユニットの割合は、他の2種類のP[(R)-3HB]/P[50%(R)-3HB]ブレンドフィルムの表面に存在する(R)-3HBユニットの割合に較べて高いものである。そのため、P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]ブレンドフィルムの酵素分解速度は、その他の2種類のP[(R)-3HB]/P[50%(R)-3HB]ブレンドフィルムの分解速度よりも大きいと結論できる。

(8) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンドフィルムの環境水中での分解性

P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]二成分混合系フィルムの自然環境水中での分解性の評価をBOD試験装置を用いて行った¹⁶⁾。試験水として荒川から採取した河川水を使用し、好氣的条件下、25℃で分解試験を行った。

Figure 3-15には、P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]=50/50(wt/wt)ブレンドフィルム、P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]=50/50(wt/wt)ブレンドフィルムおよびP[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]=50/50(wt/wt)ブレンドフィルムを荒川水を用いて分解試験を行ったときのBOD生分解度の経時変化を示してある。第二章で述べたように、微生物産生P[(R)-3HB]フィルムのBOD生分解度は時間とともに増加し、28日間で約80%のBOD生分解度が認められた。P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]ブレンドフィルムのBOD生分解度は、14日間で約80%のBOD生分解度に達した。これは、微生物産生P[(R)-3HB]フィルムのBOD生分解度の増加よりも速いものであった。P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]ブレンドフィルムのBOD生分解度は時間とともに増加し、28日間で75%のBOD生分解度が認められた。また、P[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]ブレンドフィルムのBOD生分解度

も時間とともに増加し、28日間で60%のBOD生分解度が認められた。

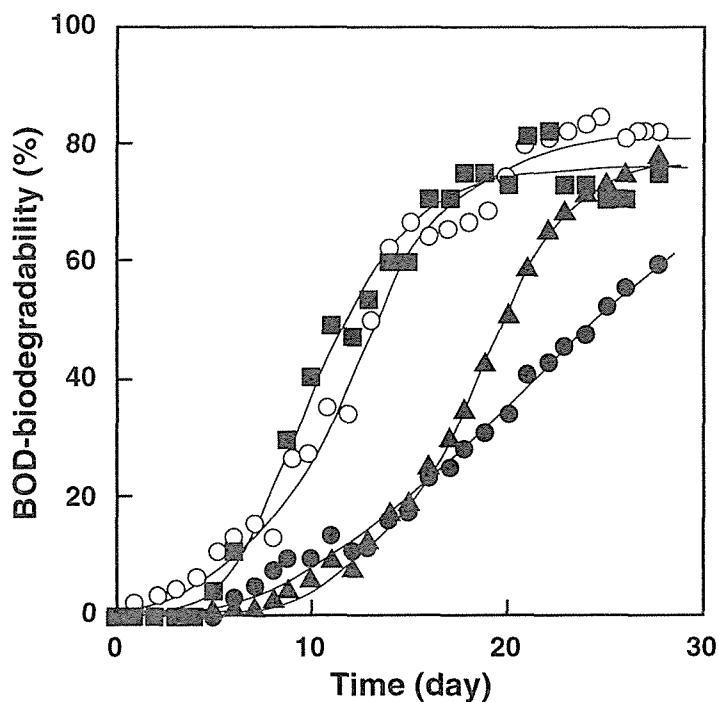


Figure 3-15 BOD-biodegradation curves of P(3HB) films in the river water at 25°C. (O) P[(R)-3HB] film, (■) P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]=50/50 (wt/wt) blend film, (▲) P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]=50/50 (wt/wt) blend film, (●) P[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]=50/50 (wt/wt) blend film.

Table 3-5には、分解試験28日後におけるブレンドフィルムの重量生分解度、BOD生分解度および分解試験前後の試験水中の溶存有機炭素濃度（DOC）を示してある。P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB]ブレンドフィルムおよびP[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]ブレンドフィルムの重量生分解度は28日間の分解試験とともに100%に達した。一方、P[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB]ブレンドフィルムの重量生分解度は28日間の分解試験で89%であった。試験水中のDOCの値は、28日間の分解試験中に10.4から4.5–5.2mgC/Lまで低下した。また、各ブレンドフィルムの重量生分解度とBOD生分解度との間には、20–30%の違いが認められる。これら結果は、P(3HB)ポリマー鎖が河川水中に存在する微生物の分泌するPHBデポリメラーゼによって水溶性の分解生成物まで分解され、その分解生成物が微生物の活動エネルギーおよび微生物の増殖によるバイオマス形成として利用されていることを示している。

Table 3-5. Weight-loss-biodegradabilities and BOD-biodegradabilities of P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB] blend films and changes in DOC values of test solution (the river Arakawa water) for 28 days at 25°C.

sample	weight-loss- biodegradability, %	BOD- biodegradability, %	DOC, mgC/L	
			initial	final
P[(R)-3HB]/P[70%(R)-3HB] (50/50)	100	79	10.4	4.5
P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB] (50/50)	100	75	10.4	4.6
P[(R)-3HB]/ata-P[50%(R)-3HB] (50/50)	89	60	10.4	5.2
P[(R)-3HB]	100	75	10.5	5.2
syn-P[50%(R)-3HB]	1	1	10.4	3.9

ここで興味深い結果として、P[(R)-3HB]/syn-P[50%(R)-3HB]ブレンドフィルムの分解試験の結果が挙げられる。第二章で示したように、syn-P[50%(R)-3HB]フィルムは、酵素分解試験においても、また、環境水中での分解においてもほとんど分解性が認められなかった。しかしながら、微生物産生P[(R)-3HB]とブレンドすることによって、酵素分解試験においても、また、環境水中での分解試験においても分解されることが明らかとなった。これらの結果は、自然環境水中でのP(3HB)の分解反応においても、P(3HB)の固体構造の影響が存在していることを示唆している。また、PHBデポリメラーゼを用いたP(3HB)フィルムの酵素分解試験より得られる分解性の知見が、自然環境水中でのP(3HB)フィルムの分解性をよく反映していることがわかった。

3-4 結論

本章では、P[(R)-3HB]の物性向上と生分解性ポリエステルの生分解速度を制御するための基礎的知見を得るために、微生物産生P[(R)-3HB]と化学合成P(3HB)立体異性体とのポリマーブレンドを調製し、その固体構造と生分解性について調べた。得られた結果より、本章の結論を以下にまとめて示す。

(1) 微生物産生P[(R)-3HB]と化学合成法によって調製した3種類のP(3HB)立体異性体は、熔融状態および非晶領域においてそれぞれ分子レベルで均一に混和した相溶性なポリマーブレンドであることを明らかにした。

(2) 3種類のポリマーブレンドの物理的性質は、化学合成P(3HB)立体異性体の種類とブレンド組成によって大きく変化することがわかった。また、微生物産生P[(R)-3HB]に化学合成P(3HB)立体異性体を添加することによって、柔軟な材料に変化することを明らかにした。

(3) P[(R)-3HB]とP(3HB)とのポリマーブレンドの酵素分解速度は、P(3HB)立体異性体の種類と共重合組成に依存し、P(3HB)の添加によってブレンドフィルムの酵素分解速度はP[(R)-3HB]フィルムの分解速度よりも速くなることがわかった。

(4) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンドフィルムをPHBデポリメラーゼによって分解した場合、酵素分解生成物には(R)体と(S)体の3HBユニットからなるオリゴマーが生成していることがわかった。このことより、化学合成法によって得られた3種類のP(3HB)は、それ単体ではPHBデポリメラーゼによって分解されないが、微生物産生P[(R)-3HB]とブレンドすることによって酵素分解されることが明らかとなった。

(5) PHBデポリメラーゼは、P(3HB)フィルム表面の結晶部に選択的に吸着し、非晶部のポリマー鎖から優先的に加水分解するという酵素分解反応のモデルを提起するに至った。

(6) P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンドフィルムの環境水中での分解試験の結果、3種類のブレンドフィルムはいずれも環境水中の微生物の分泌する酵素によって分解され、その分解生成物は微生物によって資化され環境水中には残存していないことを明らかにした。

References

- (1) Doi, Y. *Microbial Polyesters*; VCH Publishers: New York, **1990**.
- (2) Anderson, A. J.; Dawes, E. A. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450.
- (3) Chowdhury, A. A. *Arch. Microbiol.* **1963**, *47*, 167.
- (4) Delafield, F. P.; Doudoroff, M.; Pallerroni, N. J.; Lusty, C. J.; Contopoulos, R. J. *Bacteriol.* **1965**, *90*, 1455.
- (5) Teranishi, K.; Iida, M.; Araki, T.; Yamashita, S.; Tani, H. *Macromolecules* **1974**, *7*, 421.
- (6) Hori, Y.; Suzuki, M.; Yamaguchi, A.; Nishishita, T. *Macromolecules* **1993**, *26*, 5533.
- (7) Tanahashi, N.; Doi, Y. *Macromolecules* **1991**, *24*, 5732.
- (8) Hoffman, J. D.; Weeks, J. J. *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 4301.
- (9) Yamada, K.; Mukai, K.; Doi, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 215.
- (10) Mukai, K.; Yamada, K.; Doi, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 361.
- (11) Kumagai, Y.; Kanesawa, Y.; Doi, Y. *Makromol. Chem.* **1992**, *193*, 53.
- (12) Fukui, T.; Narikawa, T.; Miwa, K.; Shirakura, Y.; Saito, T.; Tomita, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *952*, 164.
- (13) Saito, T.; Suzuki, K.; Yamamoto, J.; Fukui, T.; Miwa, K.; Tomita, K.; Nakanishi, S.; Odani, S.; Suzuki, J.; Ishikawa, K. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 184.
- (14) Saito, T.; Iwata, A.; Watanabe, T. *J. Environ. Polym. Degr.* **1993**, *1*, 99.
- (15) Cornibert, J.; Marchessault, R. H. *J. Mol. Biol.* **1972**, *71*, 735.
- (16) Yakabe, Y.; Kitano, M. *Biodegradable Plastics and Polymers*; Vert, M., et al. Eds.; Royal Society of Chemistry: London, 1992; p331.

第四章

(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸と(*R*)-3-ヒドロ
キシヘキサン酸とのランダム共重合体の
微生物合成と性質

4-1 緒言

前述したように、数多くの微生物は、(R)体の3-ヒドロキシブタン酸を構成単位とする光学活性なポリエステルを生合成し、菌体内に蓄積している¹⁾。このP[(R)-3HB]は、生分解性や生体適合性といった優れた性質を有する熱可塑性樹脂である^{2,3)}。P[(R)-3HB]の分子鎖は、すべて(R)体の3HBユニットからなる高分子で、左巻きの2₁ヘリックス構造をとる⁴⁾。そのため、P[(R)-3HB]は固体状態において、高結晶性のポリエステルとなる。しかしながら、この規則正しい分子構造のために、堅くて脆いという欠点が生じ、構造材料としての実用化には至っていない。

第二章では、(R)体の3HBと(S)体の3HBをモノマーユニットとする立体構造の異なるP(3HB)を化学合成し、その物理的性質と生分解性の評価を行った。その結果、P(3HB)の立体構造を変化させることによって、様々な物理的性質の発現に成功した。また、自然界の微生物が分泌する酵素によって(S)-3HBユニットを含むP(3HB)も生分解され、その分解生成物は微生物によってエネルギー源あるいはバイオマス生成に利用され、自然界には残存しないことを明らかにした。第三章では、P[(R)-3HB]の物性向上と生分解性の制御を目的として、P[(R)-3HB]と化学合成P[(R,S)-3HB]とのポリマーブレンドの物理的性質と生分解性を評価した。その結果、化学合成P[(R,S)-3HB]の立体構造と添加量を変化させることによって、ポリマーブレンドの物理的性質は様々に変化し、強くて堅い材料から柔らかくしなやかな材料にまでコントロールできることがわかった。また、P[(R)-3HB]/P[(R,S)-3HB]ブレンドフィルムは環境中の微生物によって完全に分解されることを明らかにした。

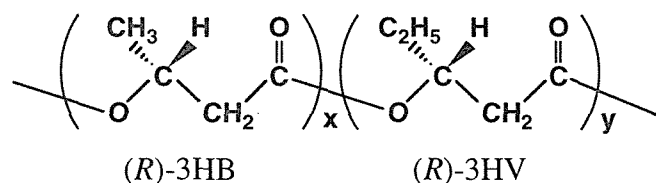
これらの結果より、化学合成法によっても微生物産生P[(R)-3HB]に類似した生分解性ポリエステルを合成でき、微生物では作り得ない新しいタイプの生分解性ポリエステルの化学合成法の開拓が期待される。また、ポリマーブレンドという手法によって、さらに幅広い機能を有した生分解性高分子材料の開発が可能となることが予想される。

ところで、理想的な生分解性高分子材料とは、使用している間は優れた性能を持続的に発揮し、廃棄後は微生物によって完全に分解され自然界の炭素サイクルに組み込まれる素材である。今後、生分解性高分子材料の開発を考える上で、モノマーユニットとしてどのような化学構造を選択すれば優れた性能と生分解性を保持でき

るのかを思慮する必要がある。つまり、生分解性高分子の材料設計において、高分子の分子設計法を構築する必要がある。

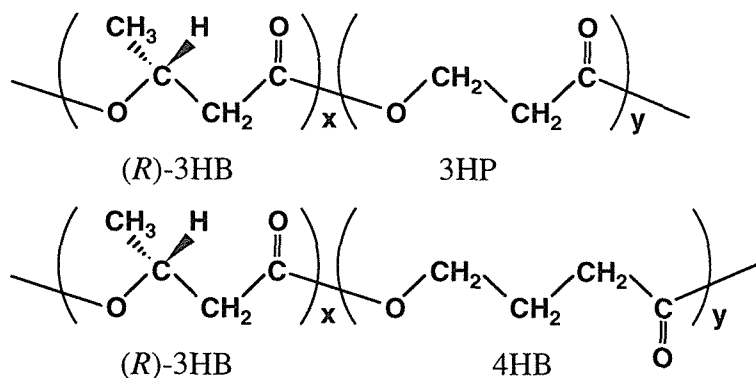
モノマーユニットの(*R*)体と(*S*)体という立体構造（コンフィグレーション）の違いによるポリエステルの物理的性質と生分解性への効果については、第二章と第三章で明らかにした。それでは、モノマーユニットの主鎖や側鎖の構造は、ポリエステルの物理的性質や生分解性にどのような効果を示すのであろうか。物理的性質や生分解性におよぼすモノマーユニットの化学構造の効果についての基礎的知見を得るために、(*R*)-3HBユニットを含む共重合ポリエステルの物理的性質と生分解性を調べる必要がある。

3HBユニットの側鎖がメチル基からエチル基に変わった(*R*)-3-ヒドロキシペンタン酸 ((*R*)-3HV) ユニットを含む共重合体、ポリ[*(R*)-3-ヒドロキシブタン酸-co-(*R*)-3-ヒドロキシペンタン酸] (P[*(R*)-3HB-co-(*R*)-3HV]) が微生物によって合成される^{5,6)}。このP[*(R*)-3HB-co-(*R*)-3HV]共重合体の融点は、P[*(R*)-3HB]の177℃から3HV分率の増加とともに徐々に低下し、3HV分率が40mol%前後で約76℃となる。3HV分率が40mol%を越えると、融点はまた徐々に上昇し、3HV分率95mol%で107℃となった⁷⁾。P[*(R*)-3HB-co-(*R*)-3HV]共重合体の固体構造は、X線回折や固体NMR解析によって調べられており、広い組成範囲で高い結晶性を示した。また、3HV分率40mol%付近でその結晶構造がP[*(R*)-3HB]型からP[*(R*)-3HV]型へ不連続的に変化することが明らかにされている。

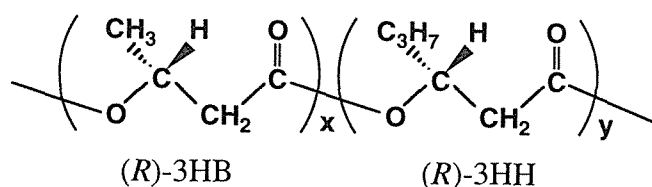


P[*(R*)-3HB-co-(*R*)-3HV]共重合体の他に、現在までに知られている3HBユニットを含む二元共重合体には、一体どのようなものがあるのであろうか。まず、最近その性質についてよく研究されているもので、P[*(R*)-3HB]の主鎖の炭素数が一つ多く側鎖メチル基のない4-ヒドロキシブタン酸(4HB)ユニットとの共重合体であるポリ[*(R*)-3-ヒドロキシブタン酸-co-4-ヒドロキシブタン酸] (P[*(R*)-3HB-co-4HB])^{8,9)}がある。また、主鎖の炭素数が同じで側鎖のない3-ヒドロキシプロピオン酸 (3HP) ユニットとの共重合体ポリ[*(R*)-3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシプロピオン酸] (P[*(R*)-

3HB-*co*-3HP])¹⁰⁾も微生物合成されることが報告されている。



さらに最近、微生物として *Aeromonas caviae* に炭素源として脂肪酸や植物油を与えることによって (R)-3HB ユニットと (R)-3-ヒドロキシヘキサン酸 ((R)-3HH) ユニットからなる共重合体ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸] (P[(R)-3HB-*co*-(R)-3HH]) が合成されることが見いだされた¹¹⁾。



そこで本章では、P[(R)-3HB-*co*-(R)-3HH] 共重合体を微生物合成し、その物理的性質と生分解性を調べ、(R)-3HB ユニットを含む共重合ポリエステルの物理的性質および生分解性におよぼす、第二モノマーユニットの側鎖の構造の効果について明らかにする。

4-2 実験

4-2-1 ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-*co*-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸] (P[(*R*)-3HB-*co*-(*R*)-3HH]) 共重合体の微生物合成

菌体には、*Aeromonas caviae* 440を用いた。この菌株は、鐘淵化学(株)によって、土壌より単離されたものである。本研究では、まず窒素源の豊富な培地であらかじめ菌体を増殖させた後、窒素源を含まない培地にてポリエステル蓄積のための培養を行う2段培養法を採用した。

まず、一段目の培養として、蒸留水1L中にポリペプトン 10g, 肉エキス 10g, Yeast extract 2gを含む培地100mLを500mL坂口フラスコ(スーパーシリコン栓使用)に入れ、滅菌後(120℃, 15min)、凍結保存チップ(培養液 1mL) 1個を植菌し、14時間、30℃で振とう培養した。培養後、遠心分離(5000g, 15min)により集菌した。二段目の培養で菌体にポリエステルを蓄積させるために、炭素源として植物油(オリーブ油)あるいは有機酸(炭素数11~18までのアルカン酸)を10g/Lを含んだミネラル・リン酸培地100mL(蒸留水1L中, KH₂PO₄; 2.8g, Na₂HPO₄; 3.32g, MgSO₄·7H₂O; 0.25g および1mLミネラル溶液(0.5N HCl溶液1L中, FeCl₃·6H₂O; 20g, CaCl₂·H₂O; 10g, CuSO₄·5H₂O; 0.03g, MnCl₂·4H₂O; 0.05g, ZnSO₄·7H₂O; 0.1g))に移し替え、48時間、30℃で培養を行った。培養後、菌体を遠心分離(5000g, 15min)により集菌し、蒸留水で洗浄後、凍結乾燥した。

乾燥菌体内に蓄積されたポリエステルは、ソックスレー抽出器を用いて熱クロロホルムにより5時間抽出した。抽出液をエバポレーションで濃縮後、ヘキサン中に再沈し、室温で減圧乾燥することによりポリエステルを得た。

4-2-2 P[(*R*)-3HB-*co*-(*R*)-3HH]フィルムの作製

第二章と同じく、ソルベント-キャスト法によって作製した。

4-2-3 P[(*R*)-3HB-*co*-(*R*)-3HH]フィルムの酵素分解実験

第二章と同じく、重量減少法によって試験した。

4-2-4 P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]フィルムの環境水（河川水）中での分解試験
第二章と同じく、BOD試験装置を用いて試験した。

4-2-5 分析方法

- (1) NMR測定
- (2) 分子量測定
- (3) DSC測定
- (4) X線回折測定
- (5) 引っ張り試験
- (6) 球晶形態の観察
- (7) 走査型電子顕微鏡観察
- (8) 高速液体クロマトグラフィーによる分解生成物の分析

(1) から (8) までの分析操作は、第二章と同じ方法で行った。

4-3 結果と考察

4-3-1 微生物合成したP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の構造

*Aeromonas caviae*を菌株として用い、脂肪酸および油脂酸からポリマーを微生物合成した¹¹⁾。得られたポリマーは、3-ヒドロキシブタン酸 ((R)-3HB) と3-ヒドロキシヘキサン酸 ((R)-3HH) とのモノマーユニットからなる共重合体であることがわかった。Figure 4-1には、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の¹H-NMRスペクトルを各ピークの帰属とともに示してある。得られたポリマーの共重合組成を¹H-NMRの解析より決定した。また、GPC測定により、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の分子量を調べた。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の共重合組成と分子量をTable 4-1にまとめて示してある。調製条件を変化させることによって、(R)-3HH分率が0～25mol%までの共重合体を得られた。また、共重合体の重量平均分子量 (M_w) は、数10万～数100万と高分子量であることがわかった。

Table 4-1. Monomer composition and molecular weight data of P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] samples

no.	composition, ^a mol%		molecular weight ^b	
	3HB	3HH	10 ⁻³ M_w	M_w/M_n
1	100	0	1020	2.0
2	95	5	190	1.9
3	90	10	304	2.6
4	85	15	792	3.7
5	83	17	1122	2.2
6	81	19	332	8.3
7	75	25	742	3.5

a) Determined from ¹H NMR spectra.

b) Determined by GPC.

微生物合成されたP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の連鎖分布を調べるために、¹³C-NMRによる解析を行った。Figure 4-2には、P[(R)-3HB-co-25mol%(R)-3HH]共重合体の¹³C-NMRスペクトルを各ピークの帰属とともに示してある。また、Figure 4-2 (b)には、カルボニル炭素に由来するピークの拡大図を示してある。カルボニル炭素に由来するピークは、(R)-3HBユニットと(R)-3HHユニットとの連鎖の違いによって3つのピークに分裂し、それぞれ3HB*-3HB (169.1ppm)、3HB*-3HHと3HH*-3HB

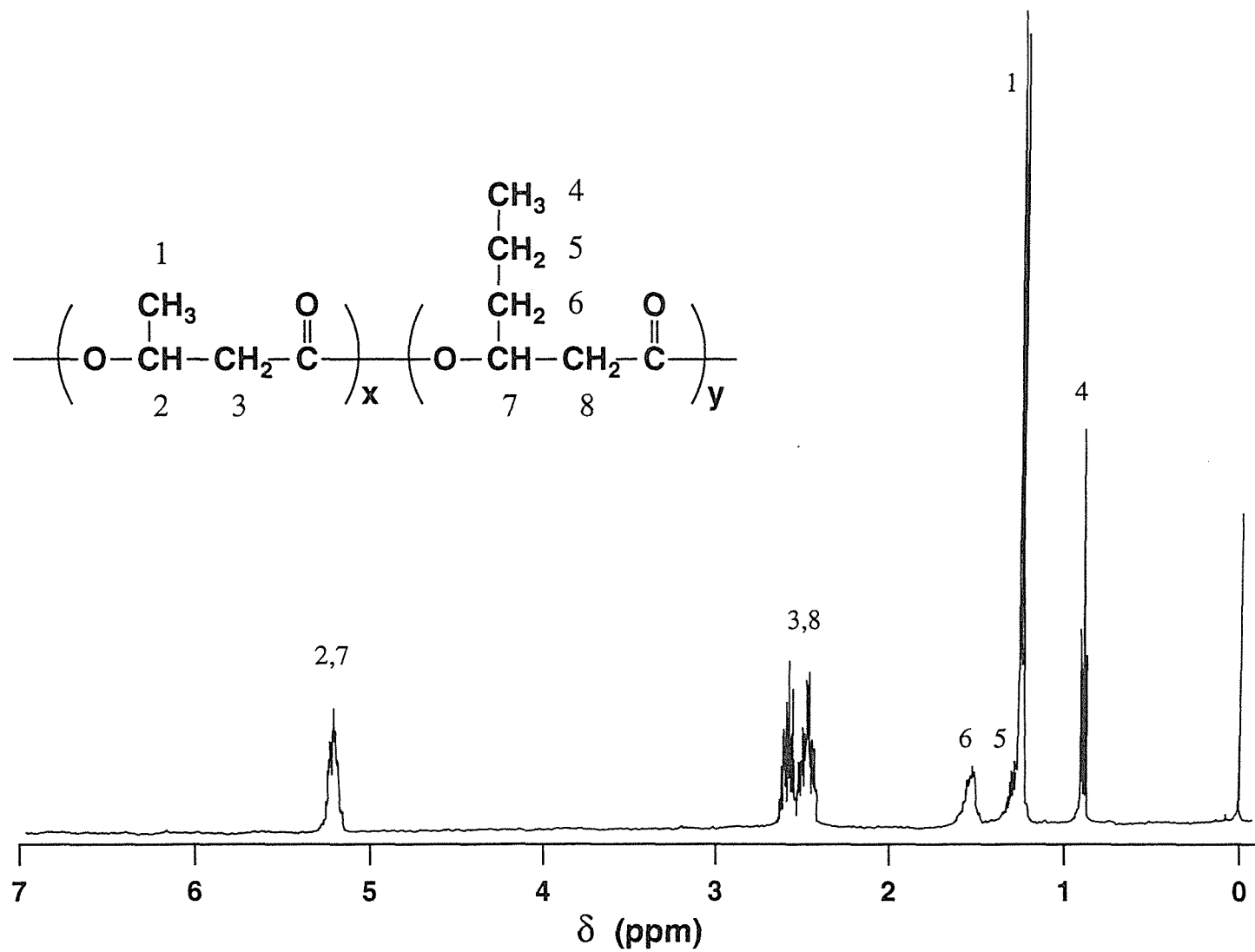
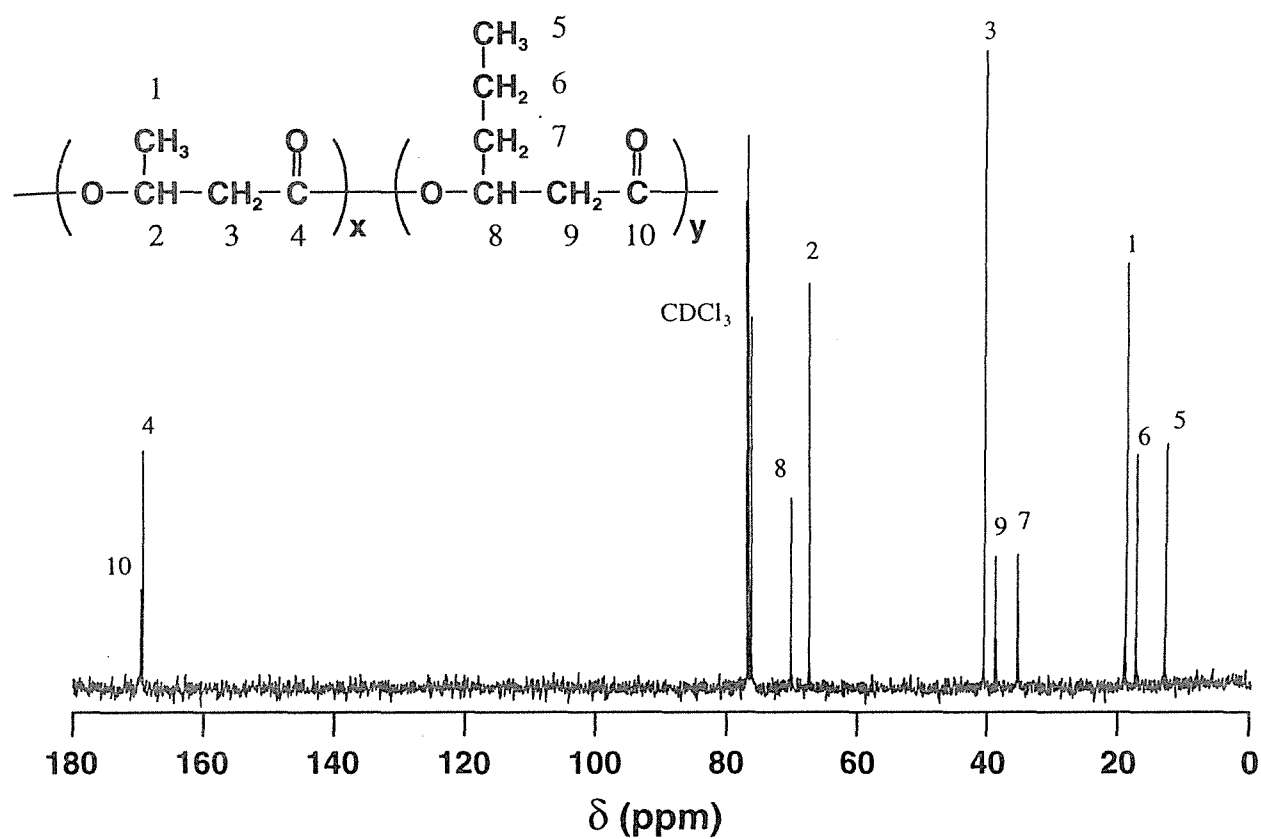


Figure 4-1 400-MHz ^1H -NMR spectrum of P[(*R*)-3HB-*co*-25mol%(*R*)-3HH] copolymer in CDCl_3 at 23°C.

(a)



(b)

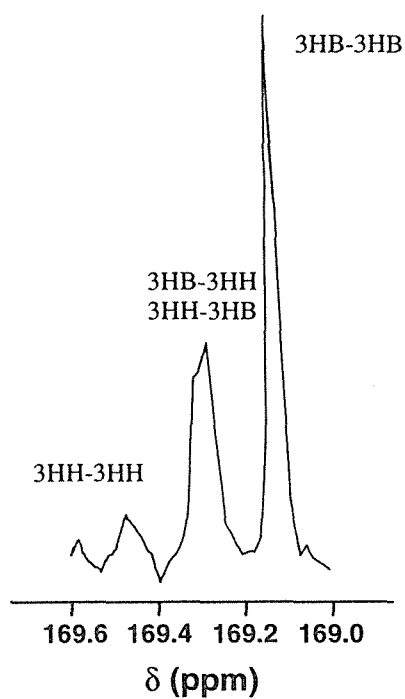


Figure 4-2 100-MHz ¹³C NMR spectrum of P[(*R*)-3HB-*co*-25mol%(*R*)-3HH] copolymer in CDCl₃ (a), together with expanded carbonyl carbon resonances (b).

(169.3ppm)、および3HH*-3HH (169.5ppm) の各ダイアッド連鎖に由来するピークと帰属できた。この3本のダイアッド連鎖に由来するピークの面積比よりP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体のダイアッド連鎖の分率 (F_{ij}) を算出した。その結果をTable 4-2に実測値として示してある。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体が理想的なランダム共重合体であると仮定すれば、Bernoullian統計から下の式を用いてダイアッド連鎖分布を算出できる。

$$F_{B*B}=F_B^2, F_{B*H}=F_{H*B}=F_B F_H, F_{H*H}=F_H^2$$

ここで F_B および F_H はそれぞれ(R)-3HBおよび(R)-3HHユニットのモル分率であり、¹H-NMRスペクトルから求めた値を用いた。この式より求めたダイアッド連鎖の分率をTable 4-2に計算値として示した。

Table 4-2. Diad sequence distribution of P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] samples.

no.	composition, ^a mol%		diad fraction, ^b mol%		
	F_B	F_H	F_{B*B}	$F_{B*H} + F_{H*B}$	F_{H*H}
1	100	0	100	0	0
2	95	5	90 (90)	10 (10)	0 (0)
3	90	10	80 (81)	20 (18)	0 (1)
4	85	15	73 (72)	27 (26)	0 (2)
5	83	17	65 (69)	34 (28)	1 (3)
6	81	19	64 (65)	33 (31)	3 (4)
7	75	25	53 (56)	40 (38)	7 (6)

a) Determined from ¹H NMR spectra.

b) Determined from relative intensities of carbonyl resonances in ¹³C NMR spectra. The values in parentheses were calculated by the Bernoullian statistics with the mole fraction of 3HH unit.

Table 4-2において、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体のダイアッド連鎖の実測値は、計算値とよく一致していることがわかる。この結果より、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体は(R)-3HBユニットと(R)-3HHユニットが統計的にランダム分布で結合したランダム共重合体であることがわかった。

4-3-2 P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の熱的性質

(R)-3HH分率が5～25mol%の6種類のP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の融点 (T_m)、融解熱 (ΔH_m) およびガラス転移点 (T_g) をDSCを用いて測定した。 T_m と ΔH_m は、サンプルを窒素雰囲気下で、室温から200℃まで昇温速度10℃/minで加熱すること (1st run) により求めた。また T_g は、1st runで200℃で融解したサンプルを液体窒素で急冷して、窒素雰囲気下で-100℃から200℃まで昇温速度20℃/minで測定すること (2nd run) により求めた。Table 4-3にその結果をまとめて示してある。比較としてP[(R)-3HB]ホモポリマーの値も示した。

Table 4-3. Thermal and mechanical properties of solvent-cast films of P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] samples.

sample	thermal properties ^a			mechanical properties ^b	
	T_g , °C	T_m , °C	ΔH_m , J/g	tensile strength, MPa	elongation to break, %
1. P[(R)-3HB]	4	177	97	43	5
2. P[(R)-3HB-co-5mol%(R)-3HH]	0	151	69		
3. P[(R)-3HB-co-10mol%(R)-3HH]	-1	127	77	21	400
4. P[(R)-3HB-co-15mol%(R)-3HH]	0	115	54	23	760
5. P[(R)-3HB-co-17mol%(R)-3HH]	-2	120	34	20	850
6. P[(R)-3HB-co-19mol%(R)-3HH]	-4	111	34		
7. P[(R)-3HB-co-25mol%(R)-3HH]	-4	52	19		

a) Measured by DSC.

b) Measured at 23°C.

P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の T_g の値は(R)-3HH分率が0から25mol%まで増加するにしたがって、4℃から-4℃まで徐々に低下した。一方、 T_m の値は、(R)-3HH分率が0から25mol%まで増加するにしたがって、174℃から99℃まで著しく低下した。また、 ΔH_m の値は、(R)-3HH分率の増加とともに小さくなった。この結果は、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の結晶化度がポリマー鎖中の(R)-3HHユニットの増加とともに低下することを示している。

4-3-3 P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の結晶構造

(R)-3HH分率が5～25mol%のP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の結晶構造を、広角X線回折法により調べた。各サンプルのX線回折パターンを、Figure 4-3に示してある。また、比較としてP[(R)-3HB]ホモポリマーのX線回折パターンも示してある。Table 4-4には、それぞれの回折パターンから決定した、各サンプルの結晶格子パラメーターをまとめて示してある。P[(R)-3HB]ホモポリマーの回折パターンには、P[(R)-3HB]ホモポリマーの斜方晶系 $P2_12_12_1$ (D_2^4) ($a=0.576\text{nm}$, $b=1.320\text{nm}$, $c=0.596\text{nm}$)の結晶単位胞による回折ピークが認められた ($2\theta=13.3^\circ$ に(020)面、 16.9° に(110)面、 20.1° に(021)面、 30.2° に(002)面)。(R)-3HH分率が5から25mol%のP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体のX線回折パターンは、P[(R)-3HB]ホモポリマーのX線回折パターンと同一であった (Figure 4-3)。また、(R)-3HH分率が5～25mol%のP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体のa軸、b軸、c軸方向の各単位格子間隔は、P[(R)-3HB]の格子間隔と同一であることがわかる (Table 4-4)。したがって、(R)-3HH分率が5～25mol%のP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体は、P[(R)-3HB]ホモポリマーと同一の結晶構造を形成していると結論できる。

Table 4-4. Degrees of crystallinity and crystallographic parameters of P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] samples from X-ray diffraction

no.	composition, ^a mol%		crystallographic parameters ^b			
	3HB	3HH	a, nm	b, nm	c, nm	crystallinity, %
1	100	0	0.572	1.318	0.592	60±5
2	95	5	0.571	1.317	0.594	42±5
3	90	10	0.584	1.310	0.593	34±5
4	85	15	0.573	1.313	0.592	26±5
5	83	17	0.575	1.322	0.594	26±5
6	81	19	0.578	1.328	0.596	22±5
7	75	25	0.575	1.326	0.596	18±5

a) Determined from ^1H NMR spectra.

b) Determined from X-ray diffraction spectra.

Table 4-4には、それぞれの回折パターンから決定した、各サンプルの結晶化度(X_c)を示してある。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の結晶化度は、(R)-3HH分率が0から25mol%まで増加するとともに60から18%まで低下した。

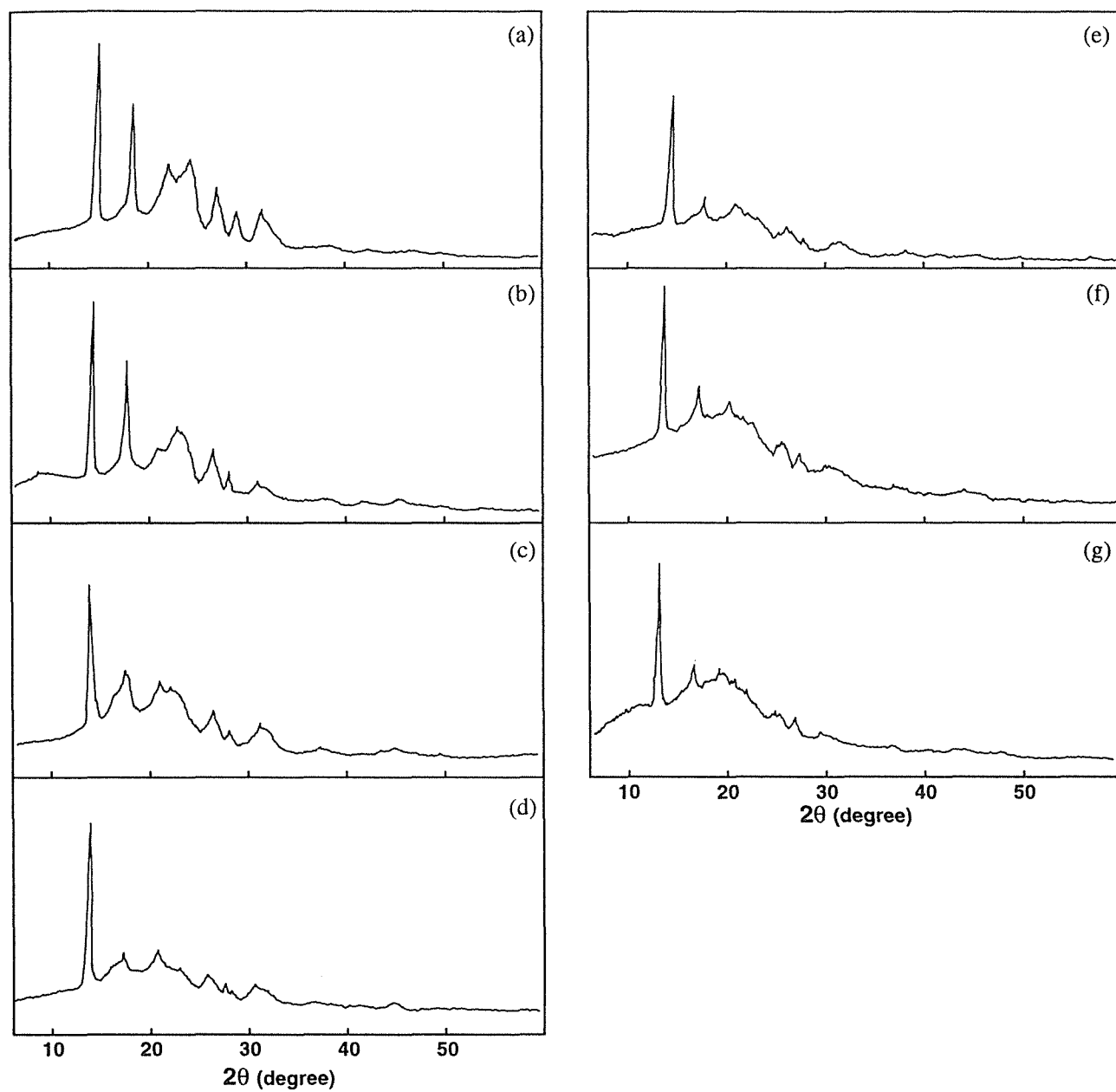


Figure 4-3 X-ray diffraction patterns of P[(*R*)-3HB-*co*-(*R*)-3HH] films; (a) P[(*R*)-3HB, (b) P[(*R*)-3HB-*co*-5mol%(*R*)-3HH], (c) P[(*R*)-3HB-*co*-10mol%(*R*)-3HH], (d) P[(*R*)-3HB-*co*-15mol%(*R*)-3HH], (e) P[(*R*)-3HB-*co*-17mol%(*R*)-3HH], (f) P[(*R*)-3HB-*co*-19mol%(*R*)-3HH], P[(*R*)-3HB-*co*-25mol%(*R*)-3HH].

P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の結晶化度と共重合組成との相関性を、P[(R)-3HB-co-(R)-3HV]⁷⁾およびP[(R)-3HB-co-3HP]¹⁰⁾共重合体の場合と比較するために、共重合ポリエステル結晶化度を共重合組成に対してプロットしたものをFigure 4-4に示してある。

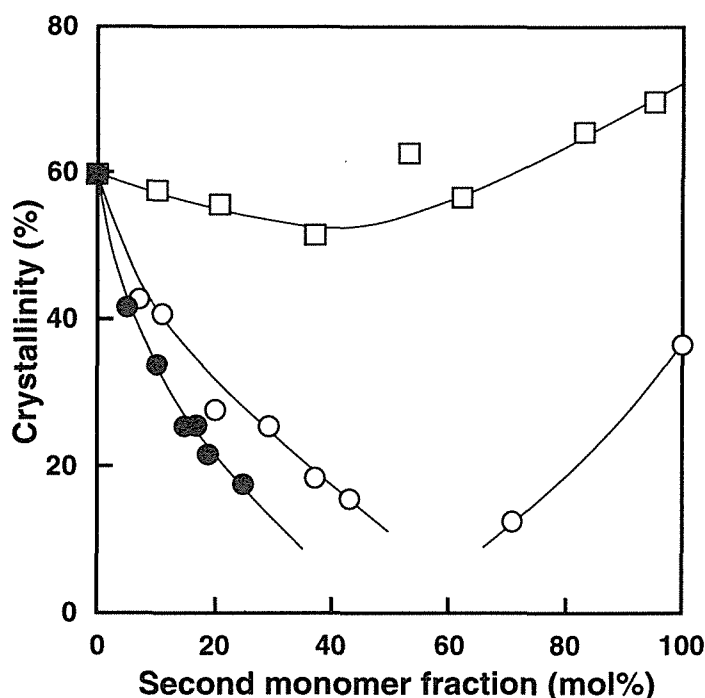


Figure 4-4 Effect of copolyester composition on the degrees of crystallinity of different microbial copolyesters: (●) P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]; (○) P[(R)-3HB-co-3HP]; (□) P[(R)-3HB-co-(R)-3HV].

P[(R)-3HB-co-(R)-3HV]共重合体の場合、(R)-3HV分率=40mol%前後を境にしてP[(R)-3HB]型とP[(R)-3HV]型の結晶構造が不連続的に変化する。しかしながら、(R)-3HVユニットはP[(R)-3HB]型の結晶構造に、また、(R)-3HBユニットはP[(R)-3HV]型の結晶構造に取り込まれ、それぞれのユニットは共結晶 (cocrystallization) 構造を形成する。そのため、P[(R)-3HB-co-(R)-3HV]共重合体は、広い組成範囲において高い結晶化度を示すことが知られている。一方、P[(R)-3HB-co-3HP]共重合体の場合、共重合体の結晶化度は共重合組成に依存して劇的に変化する。これは、ポリマー鎖中の3HPユニットあるいは(R)-3HBユニットがP[(R)-3HB]型の結晶構造あるいはP(3HP)型の結晶構造内で共結晶構造を形成せず、結晶欠陥因子として作用しているためである。本研究で対象としたP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の場合、共重合体の結晶化度は(R)-3HH分率が増加するにしたがって著しく低下した。また、共重合体の結晶構造は

P[(R)-3HB]ホモポリマーと同一であり、(R)-3HHユニットの導入による結晶格子パラメーターの変化は認められなかった。これらの結果より、(R)-3HHユニットはP[(R)-3HB]型の結晶構造内で共結晶していないことがわかった。(R)-3HHユニットの側鎖は、(R)-3HBユニットの側鎖メチル基よりも炭素数が2つ多いプロピル基である。(R)-3HHユニットは、その側鎖のかさ高さのためにP[(R)-3HB]型の結晶構造中に取り込まれず、結晶欠陥因子として働いているものと考えられる。そのため、ポリマー鎖中の(R)-3HHユニットが増加するとともにP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の結晶化度は低下するものと解釈できる。

4-3-4 P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の機械的特性

ソルベント-キャスト法で調製したP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]フィルムの機械的強度を引っ張り試験器を用いて測定した。Table 4-3に、各共重合体フィルムのヤング率、破壊強度および破壊伸びを示してある。ポリマー鎖中に(R)-3HHユニットが0から17mol%まで導入されることによって、フィルムの破壊強度は43MPaから20MPaまで低下した。一方、フィルムの破壊伸びは、(R)-3HH分率の増加にともなって、5%から850%まで増加した。この結果より、P[(R)-3HB]ポリマー鎖中に(R)-3HHユニットが導入されることによって、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体は非常に柔らかくて柔軟な材料になることがわかった。

4-3-5 P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の球晶成長速度と球晶形態

P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の溶融-結晶時の挙動におよぼす共重合組成の影響を調べるために、このポリマーの球晶形態および球晶の成長速度について調べた。

球晶観察は、ホットステージと簡易偏光板を備えた光学顕微鏡を用いて行った。室温から200℃まで昇温速度30℃/minで加熱した後、200℃で30秒間保持してポリマーを完全に溶融させ、その後60℃/minで降温し、所定の結晶化温度でポリマーを結晶化させた。球晶観察は、(R)-3HH分率が5～19mol%までの共重合体について、結晶化温度を50から120℃まで変化させて行った。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の球晶半径は結晶化時間とともに直線的に増加し、球晶成長終了後において、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]フィルム表面は一様な球晶で覆われた。球晶成長速度は、一定時間ごと球晶半径をプロットして、そのときの直線の傾きより算出した。

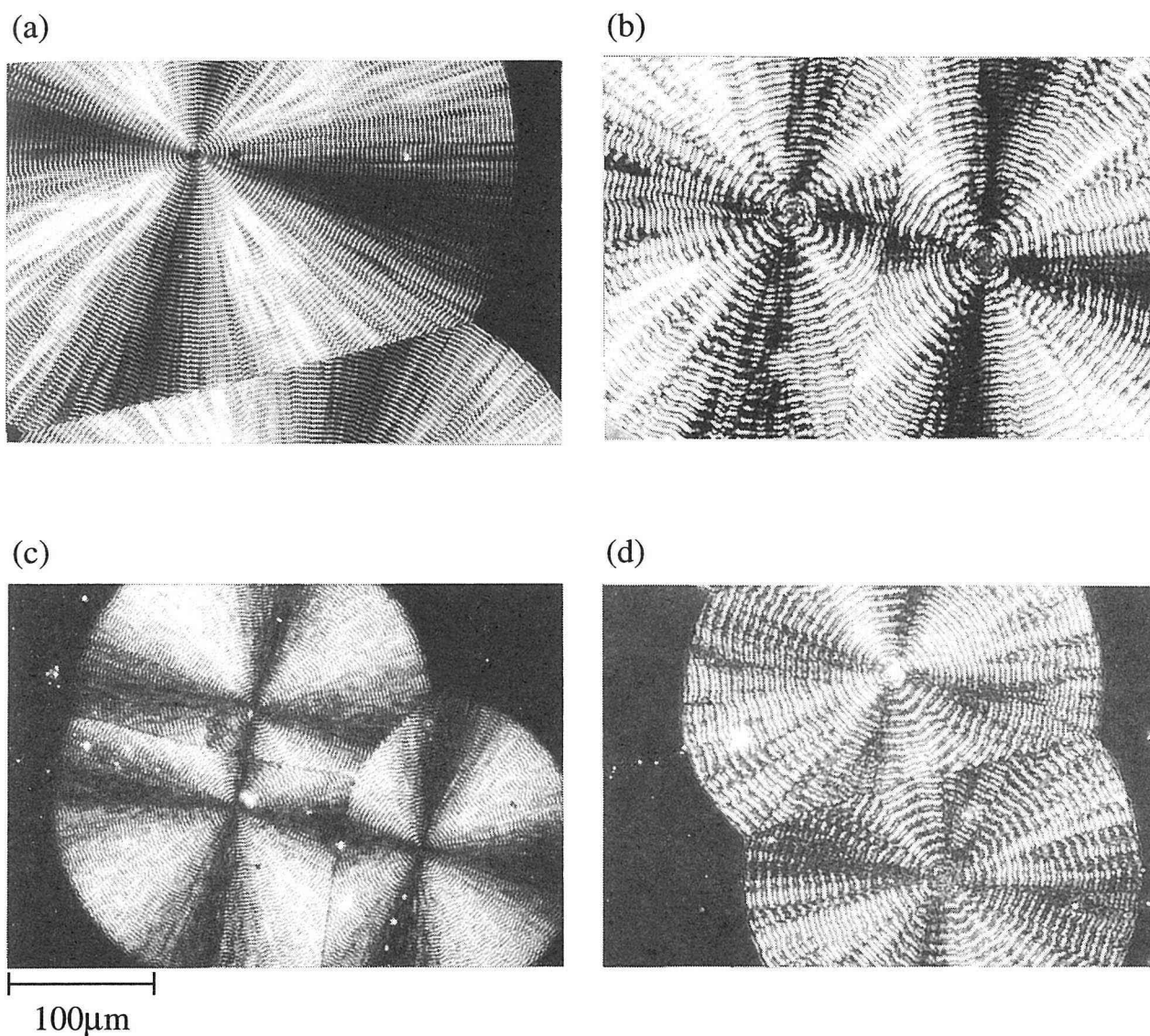


Figure 4-5 Optical micrographs of P[(*R*)-3HB-*co*-(*R*)-3HH] spherulites for P[(*R*)-3HB-*co*-10mol%(*R*)-3HH] crystallized at (a) $T_c=70^\circ\text{C}$, (b) $T_c=90^\circ\text{C}$, and for P[(*R*)-3HB-*co*-17mol%(*R*)-3HH] crystallized at (c) $T_c=70^\circ\text{C}$, (d) $T_c=90^\circ\text{C}$.

Figure 4-5には、(R)-3HH分率が10mol%と17mol%のP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体を70℃と90℃の結晶化温度でそれぞれ結晶化した時に形成した球晶の光学顕微鏡写真を示してある。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の球晶形成において、結晶化温度(T_c)を上昇させるにしたがい、結晶核形成速度が減少し、その結果、球晶半径は増大した。また、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体は、明瞭なバンド型の球晶を形成した。このような球晶形成挙動は、P[(R)-3HB]ホモポリマーの場合とよく一致している。

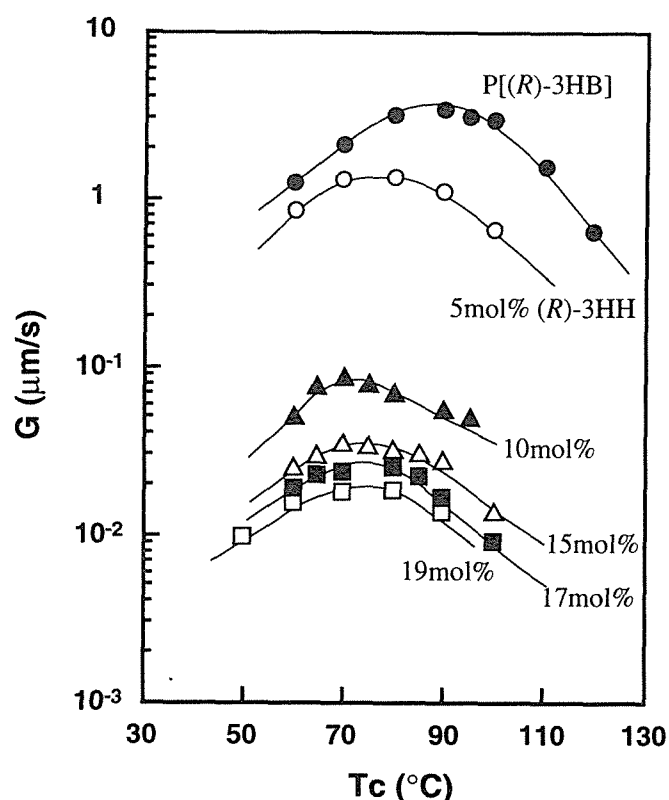


Figure 4-6 Radial growth rate (G) of spherulites as a function of crystallization temperature (T_c) for P[(R)-3HB] and P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] with different (R)-3HH fractions.

Figure 4-6には、結晶化温度 (T_c) を変化させて観測した各サンプルの球晶成長速度 (G) を T_c に対してプロットしたものを示してある。比較として、P[(R)-3HB]の球晶成長速度も示した。P[(R)-3HB]ホモポリマーは、 T_c が90℃前後で球晶の最大成長速度 (G_{max}) を示しており、その値は約3.7μm/sであった。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の球晶成長速度は、(R)-3HH分率が増加するにしたがって急速に低下し、P[(R)-

3HB-co-19mol%(R)-3HH]共重合体の球晶成長速度は、 $G_{\max}$ がP[(R)-3HB]ホモポリマーの約1/200まで下がった。また、(R)-3HH分率が0から19mol%まで増加するにしたがって、最大成長速度を示す T_c は90℃から75℃と低温側にシフトすることがわかった。

4-3-6 P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の酵素分解性

P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の酵素分解性におよぼす共重合組成の効果を調べるために、*Alcaligenes faecalis*¹²⁾が菌体外に分泌するPHBデポリメラーゼを用いて、(R)-3HH分率=5~25mol%までのP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]フィルムの酵素分解試験を行った。酵素分解反応は、*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼ (1.0μg) を使用し、0.1Mリン酸緩衝溶液 (pH7.4) 中、37.0±0.1℃で行った。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の各サンプルは、ソルベント-キャスト法により1×1cmのフィルム (厚さ0.06~0.1mm, 重さ4~8mg) とし、使用した。

Figure 4-7には、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]フィルムを酵素分解したときの重量減少量の経時変化を示してある。Figure 4-7に示すように、各サンプルフィルムの分解量は、時間とともに直線的に増加した。Figure 4-7の各直線の傾きより、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]フィルムの重量減少速度を算出した。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の共重合組成と重量減少速度との関係をFigure 4-8に示してある。

Figure 4-8に示すように、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の酵素分解性は共重合組成に大きく依存することがわかった。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]フィルムの酵素分解速度は、ポリマー鎖中の(R)-3HHユニットが増加するにしたがって増大し、(R)-3HH分率が15mol%のとき最大値を示した。最大となったP[(R)-3HB-co-15mol%(R)-3HH]フィルムの分解速度は、P[(R)-3HB]フィルムの分解速度の約6倍にも達していた。さらに(R)-3HH分率が増加すると、サンプルフィルムの分解速度は徐々に低下し、P[(R)-3HB-co-25mol%(R)-3HH]フィルムの分解速度は、P[(R)-3HB]フィルムの分解速度とほぼ同等となった。

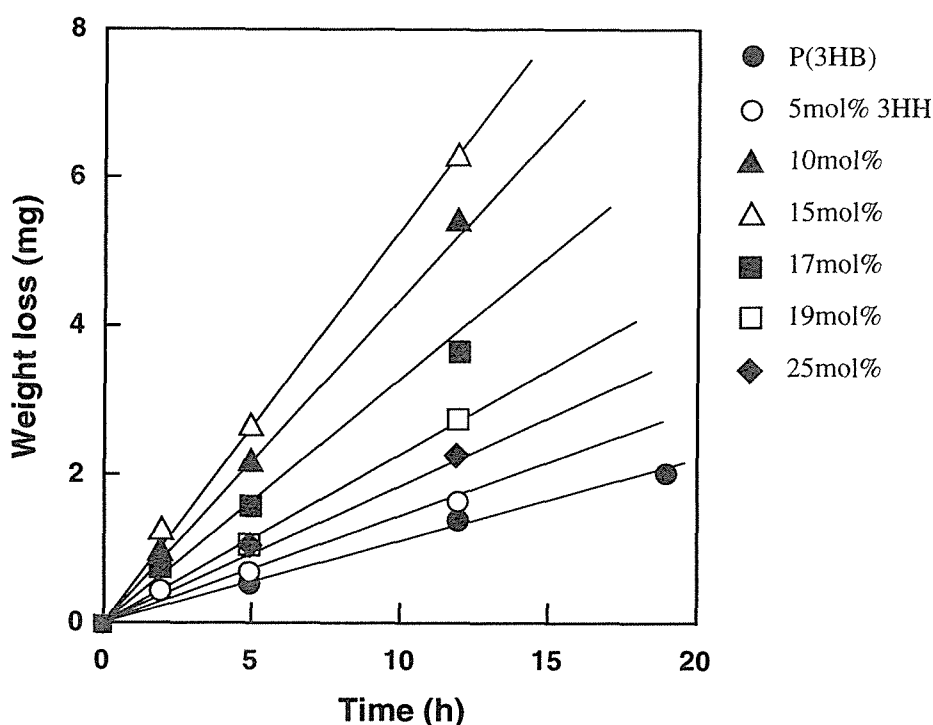


Figure 4-7 Enzymatic erosion profiles of P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] films with different (R)-3HH fractions at 37°C in aqueous solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (1.0 µg/mL) from *A. faecalis*. (●) P[(R)-3HB]; (○) P[(R)-3HB-co-5mol%(R)-3HH]; (▲) P[(R)-3HB-co-10mol%(R)-3HH]; (△) P[(R)-3HB-co-15mol%(R)-3HH]; (■) P[(R)-3HB-co-17mol%(R)-3HH]; (□) P[(R)-3HB-co-19mol%(R)-3HH]; (◆) P[(R)-3HB-co-25mol%(R)-3HH].

ここで、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の酵素分解性とP[(R)-3HB-co-(R)-3HV]¹³⁾共重合体およびP[(R)-3HB-co-3HP]¹⁰⁾共重合体の酵素分解性とを比較するために、P[(R)-3HB-co-(R)-3HV]フィルムおよびP[(R)-3HB-co-3HP]フィルムの酵素分解速度の共重合組成依存性もFigure 4-8にまとめて示した。P[(R)-3HB-co-3HP]共重合体の酵素分解性も、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]と同様に共重合組成に大きく依存している。P[(R)-3HB-co-3HP]フィルムの酵素分解速度は、3HPユニットが増加するにしたがって増大し、3HP分率が約20mol%のとき最大値を示した。さらに3HP分率が増加すると、P[(R)-3HB-co-3HP]フィルムの分解速度は徐々に低下した。一方、P[(R)-3HB-co-(R)-3HV]共重合体の酵素分解性は共重合組成に依存することなく、その分解速度はP[(R)-3HB]フィルムの分解速度よりも遅い。

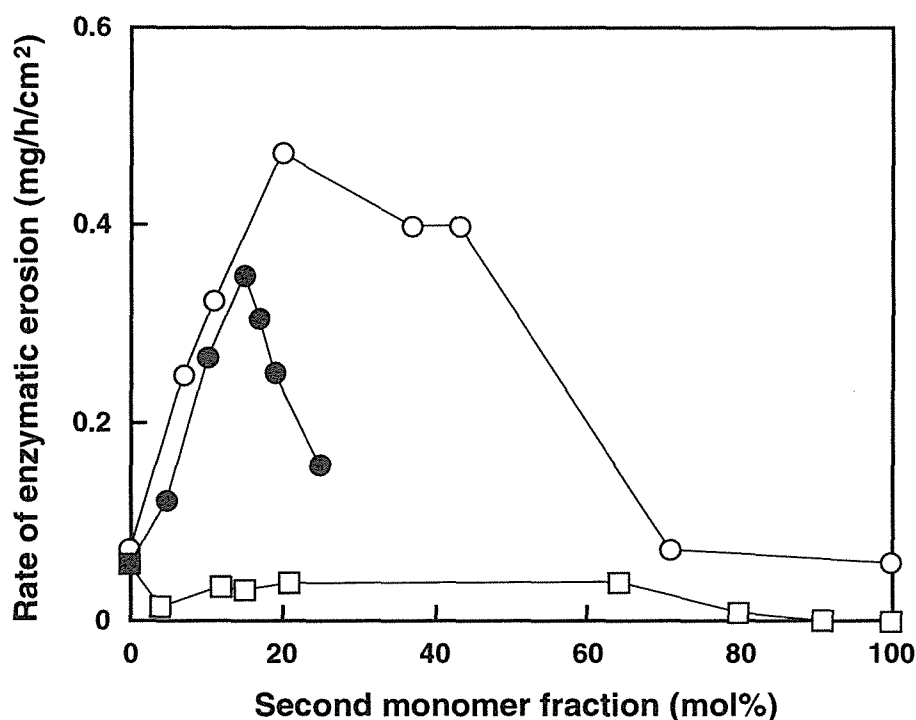


Figure 4-8 Effect of copolymer composition on the rate of enzymatic erosion of solvent-cast copolyester films in the aqueous solution of PHB depolymerase from *A. faecalis* at 37°C and pH 7.4: (●) P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]; (○) P[(R)-3HB-co-3HP]; (□) P[(R)-3HB-co-(R)-3HV].

Figure 4-9には、酵素分解前と酵素分解2時間後のP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]フィルムの表面のSEM写真を示してある。2時間の分解反応によって、サンプルフィルムの表面は粗雑になっていることがわかった。これは、酵素による分解反応がサンプルフィルムの表面から進行していることを示している。

Kumagaiら¹⁴⁾によって、PHBデポリメラーゼによるP[(R)-3HB]の酵素分解速度は、サンプルの結晶化度に大きく依存し、結晶化度の増加とともに低下することが明らかにされている。また、酵素分解反応はP[(R)-3HB]フィルム表面の非晶部から優先的に進行し、非晶部のポリマー鎖の分解速度は結晶部のポリマー鎖の分解速度の約20倍にもなることがわかっている。Figure 4-4で示したように、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]およびP[(R)-3HB-co-3HP]共重合体の結晶化度は、第二モノマーユニットすなわち(R)-3HHユニットおよび3HPユニットの組成が増加するにしたがって著しく低下する。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] ((R)-3HH分率=0~15mol%) およびP[(R)-3HB-co-3HP] (3HP分率=0~20mol%) のフィルムにおける第二モノマーユニット組成の増加にともなう酵素分解速度の増加は、サンプルフィルムの結晶化度が低下したためと考え

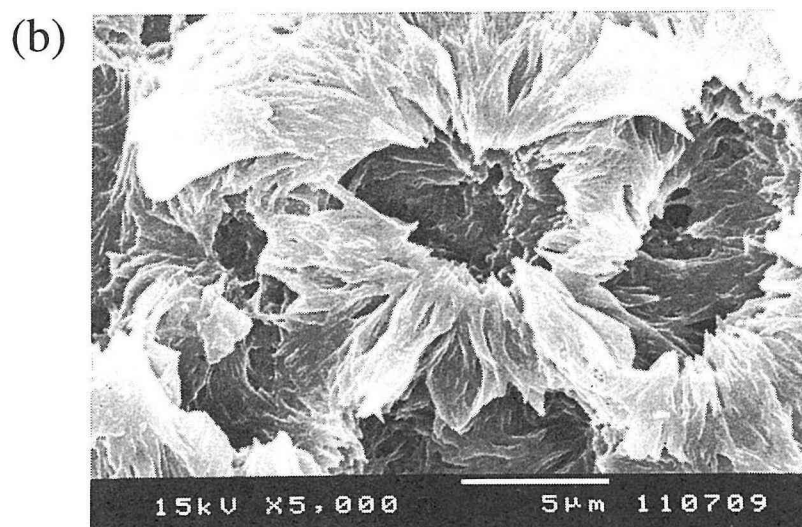
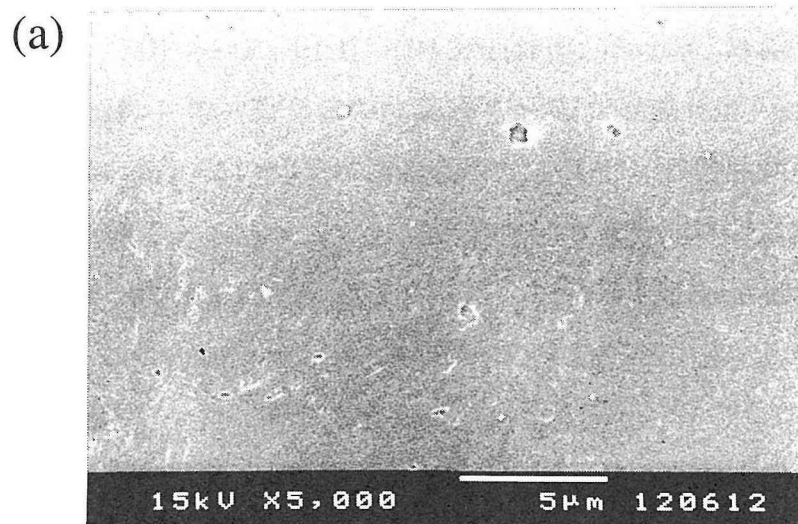


Figure 4-9 Scanning electron micrographs (SEMs) of surfaces of P[(R)-3HB-co-10mol%(R)-3HH] films (a) undegraded and (b) degraded for 2 h.

られる。一方、P[(R)-3HB-co-(R)-3HV]共重合体は、広い組成範囲で高い結晶化度を示している。そのため、PHBデポリメラーゼによるP[(R)-3HB-co-(R)-3HV]フィルムの酵素分解速度は、(R)-3HV分率にほとんど依存しないものと考えられる。

しかし、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] ((R)-3HH分率>15mol%)およびP[(R)-3HB-co-3HP] (3HP分率>20mol%)の共重合体の酵素分解速度は、結晶化度の低下に関わらず、徐々に小さくなっている。この結果は共重合ポリエステルの結晶化度の効果だけで説明することは不可能である。つまり、共重合体の酵素分解性には結晶化度だけでなくモノマーユニットの分子構造も大きく関与していることを示している。実際、側鎖にエチル基を持つ(R)-3HVユニットの二量体の*A. faecalis*由来のPHBデポリメラーゼによる加水分解反応は非常に遅いことが報告されている¹⁵⁾。これは、(R)-3HBユニットの側鎖メチル基に較べて、(R)-3HVユニットの側鎖エチル基の方が立体的にかさ高いため、PHBデポリメラーゼがエステル結合部を攻撃し難くなったためと考えられている。この結果は、*A. faecalis*由来のPHBデポリメラーゼと側鎖がさらにかさ高くなった(R)-3HHユニットとの反応が非常に起こりにくいことを予測させるものである。ポリマー鎖中に酵素によって切断され難い(R)-3HHユニットの割合が増加するために、(R)-3HH分率が15mol%以上の共重合体フィルムの酵素分解速度は減少するものと考えられる。

4-3-7 P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の酵素分解生成物の解析

次に、酵素分解反応によって生成する水溶性の分解生成物を、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析した。*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼを用いて5時間分解反応を行ったサンプルについて調べた。Figure 4-10には、P[(R)-3HB-co-15mol%(R)-3HH]共重合体を5時間酵素分解したときに得られた水溶性の分解生成物のHPLCの溶出曲線をピークの帰属とともに示してある。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の分解生成物のHPLCの溶出曲線には、4本のピークが観測された。各生成物を分取し、¹H-NMRによって分析した結果、それぞれ(R)-3HBモノマー ($t_r=6.5\text{min}$)、(R)-3HB-(R)-3HBダイマー ($t_r=13.3\text{min}$)、(R)-3HB-(R)-3HHダイマー ($t_r=18.2\text{min}$)、および(R)-3HB-(R)-3HB-(R)-3HHトリマー ($t_r=21.3\text{min}$)であることがわかった。(R)-3HH分率が0から25mol%の共重合体の分解生成物中には(R)-3HHモノマー、(R)-3HH-(R)-3HBダイマーおよび(R)-3HH-(R)-3HHダイマーのピークは観測されなかつ

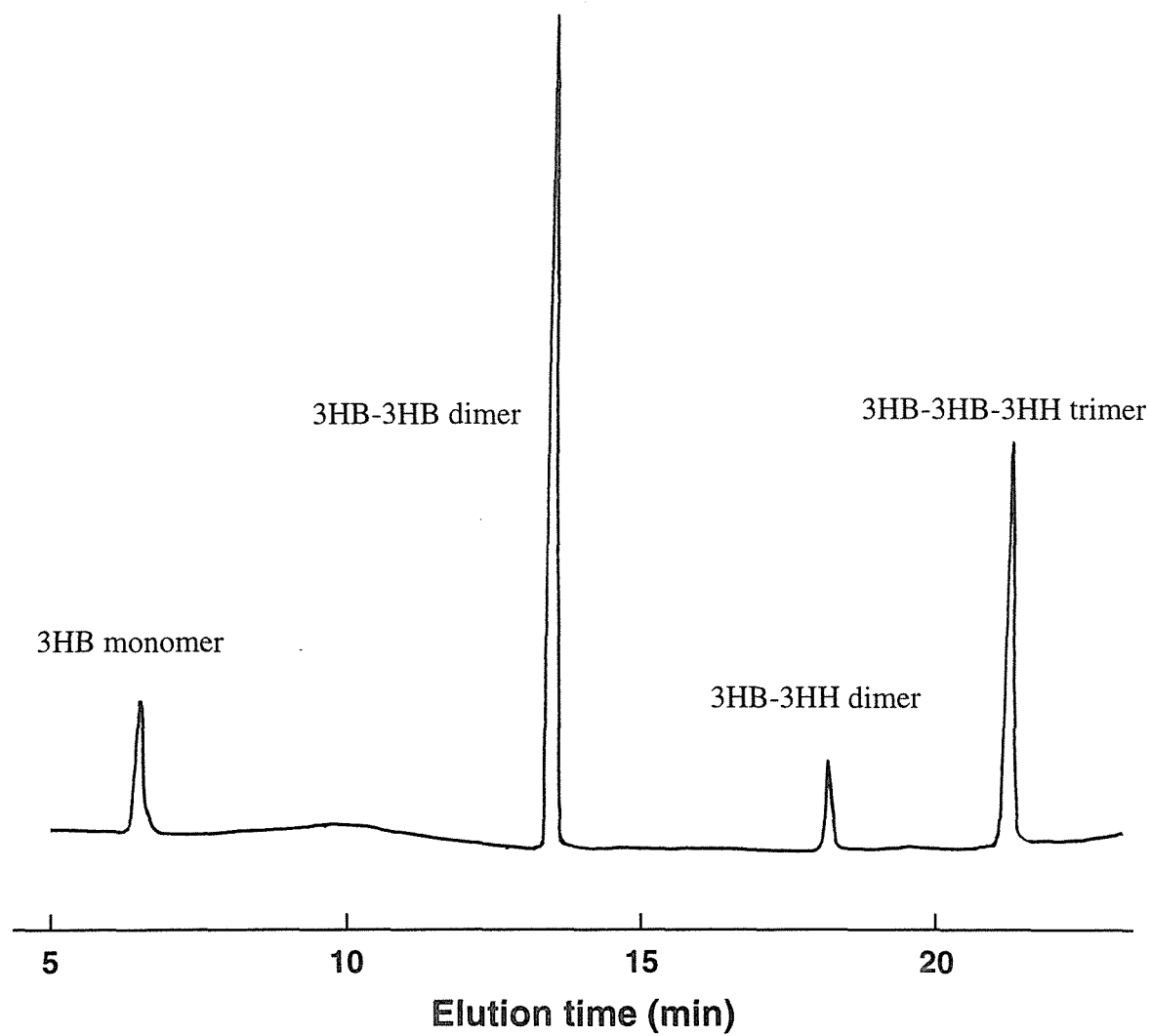


Figure 4-10 HPLC separation of water-soluble products after enzymatic degradation of P[(*R*)-3HB-*co*-15mol%(*R*)-3HH] film by PHB depolymerase from *A. faecalis*.

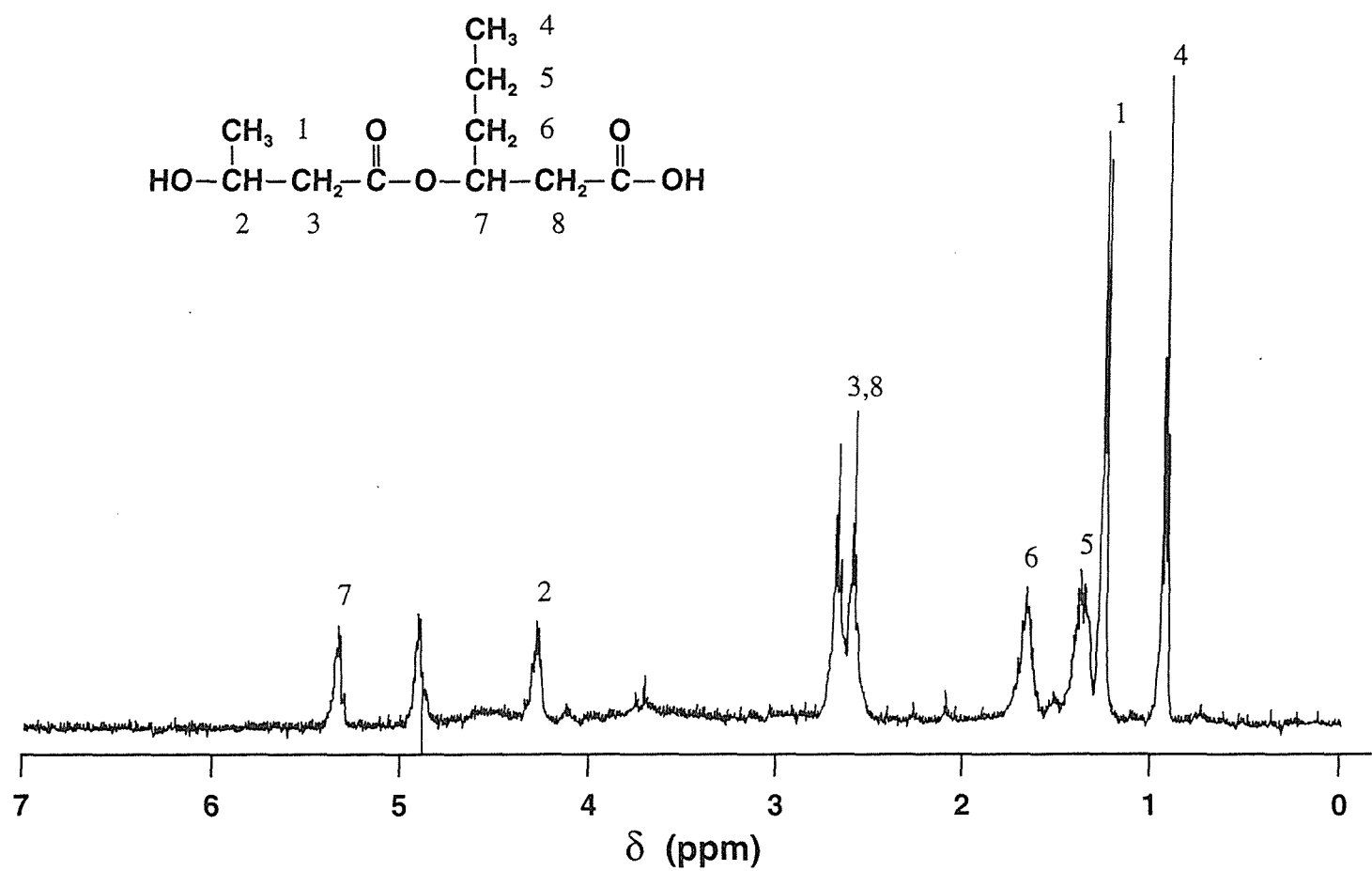


Figure 4-11 400-MHz ^1H -NMR spectrum in D_2O of (R) -3HB- (R) -3HH dimer obtained by HPLC separation of water-soluble products after enzymatic degradation of $\text{P}[(R)$ -3HB-*co*-15mol% (R) -3HH] film.

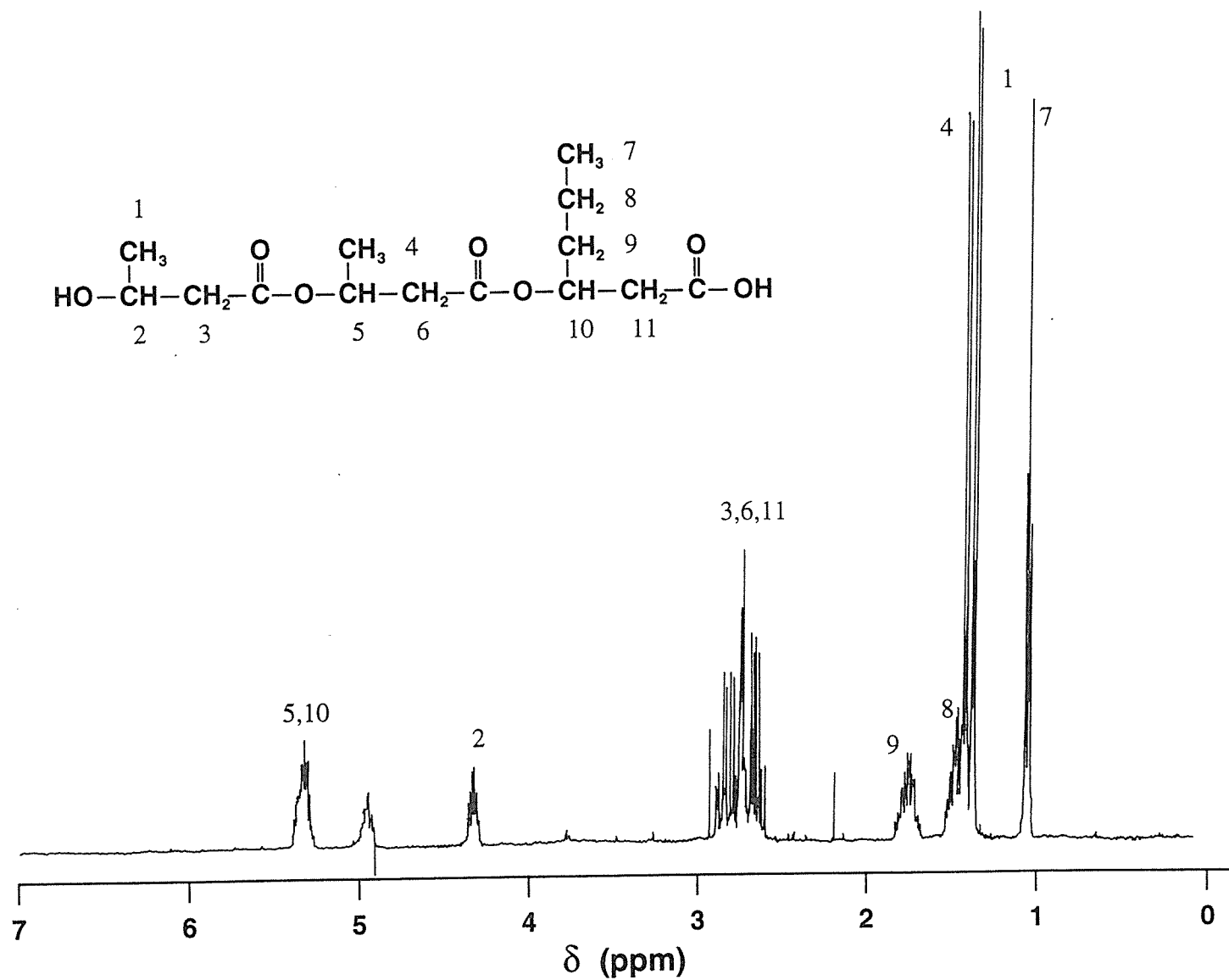


Figure 4-12 400-MHz ¹H-NMR spectrum in D₂O of *(R)*-3HB-*(R)*-3HB-*(R)*-3HH trimer obtained by HPLC separation of water-soluble products after enzymatic degradation of P[*(R)*-3HB-co-15mol%*(R)*-3HH] film.

た。また、テトラマー以上のオリゴマーのピークは帰属するまでに至らなかった。Figure 4-11および4-12には、(R)-3HB-(R)-3HHダイマーおよび(R)-3HB-(R)-3HB-(R)-3HHトリマーの¹H-NMRスペクトルを示してある。

Figure 4-13には、各P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]サンプルを5時間酵素分解して得られた分解生成物の分布をHPLCチャートのピーク面積値で比較したものを示してある。ポリマー鎖中の(R)-3HH分率が増加するにしたがって、(R)-3HB-(R)-3HHダイマーおよび(R)-3HB-(R)-3HB-(R)-3HHトリマーの割合が増大していることがわかった。

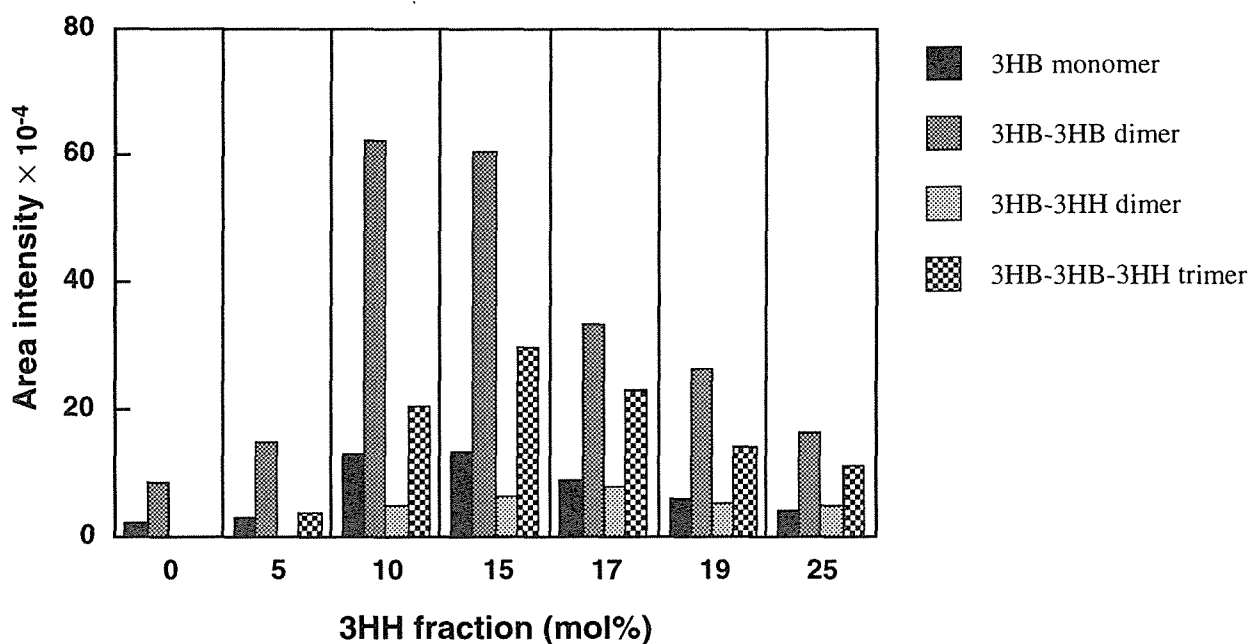


Figure 4-13 Distributions of water-soluble products after enzymatic degradation of P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] films for 5 h at 37°C.

前述したように、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の酵素分解生成物中には、(R)-3HHモノマー、(R)-3HH-(R)-3HBダイマーおよび(R)-3HH-(R)-3HHダイマーは認められなかった。また、分解生成物の¹H-NMRスペクトルから、分解生成物のヒドロキシル基末端のモノマーユニットは(R)-3HBユニットであることがわかった。つまり、PHBデポリメラーゼは、かさ高い側鎖（プロピル基）を持つ(R)-3HHユニットのメチン炭素に連結したエステル結合を切断できず、(R)-3HBユニットのメチン炭素に連結したエステル結合のみを切断していることを示している。

4-3-8 P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の環境水中での生分解性

P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の自然環境水中での分解性をBOD試験装置を用いて評価した。試験水として荒川から採取した河川水を使用し、好氣的条件下、25℃で分解試験を行った。

Figure 4-14には、P[(R)-3HB]フィルム、P[(R)-3HB-co-10mol%(R)-3HH]フィルムおよびP[(R)-3HB-co-17mol%(R)-3HH]フィルムを荒川水を用いて分解試験を行ったときのBOD生分解度の経時変化を示してある。P[(R)-3HB]ホモポリマーフィルムのBOD生分解度は時間とともに増加し、28日間で約80%のBOD生分解度が認められた。また、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体フィルムのBOD生分解度の増加速度は、P[(R)-3HB]フィルムのBOD生分解度と同程度であり、28日間で約80%のBOD生分解度に達した。

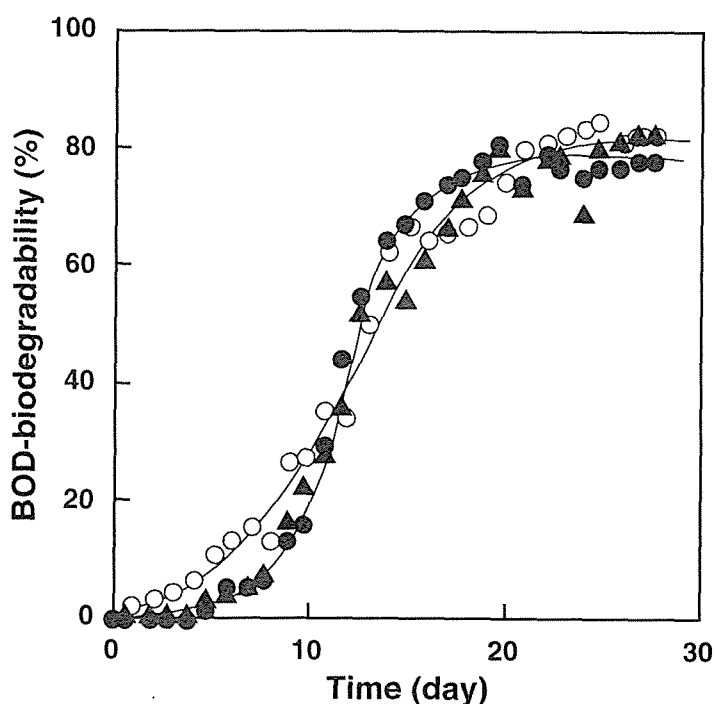


Figure 4-14 BOD-biodegradation curves of P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] films in the river water at 25°C. (O) P[(R)-3HB], (▲) P[(R)-3HB-co-10mol%(R)-3HH], (■) P[(R)-3HB-co-17mol%(R)-3HH].

Table 4-5には、分解試験28日後におけるP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体フィルムの重量生分解度、BOD生分解度および分解試験前後の試験水中の溶存有機炭素濃度(DOC)を示してある。P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体フィルムの重量生分解度は

28日間の分解試験ですべて100%に達した。また、試験水中のDOCの値は、28日間の分解試験中に10.4から3.9–6.7mgC/Lまで低下することがわかった。この結果は、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]ポリマー鎖が河川水中に存在する微生物の分泌するPHBデポリメラーゼによって水溶性の分解生成物まで分解され、その分解生成物の大半が微生物の活動エネルギーや菌体成分合成に利用され河川水中には存在していないことを示している。また、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体フィルムの重量生分解度とBOD生分解度との間には、20–30%の違いが認められる。これは、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]の分解生成物が微生物の活動エネルギーとして利用されるだけでなく、微生物の増殖によるバイオマス形成としても利用されていることを示している。

Table 4-5. Weight-loss-biodegradabilities and BOD-biodegradabilities of P[(R)-3HB-co-(R)-3HH] copolymer films and changes in DOC values of test solution (the river Arakawa water) for 28 days at 25°C.

sample	weight-loss-biodegradability, %	BOD-biodegradability, %	DOC, mgC/L	
			initial	final
P[(R)-3HB]	100±0	75±8	10.5	5.2±1.2
P[(R)-3HB-co-10mol%(R)-3HH]	100±0	77±2	10.4	3.1±0.8
P[(R)-3HB-co-17mol%(R)-3HH]	100±0	78±5	10.4	2.4

4-4 結論

本章で対象としたP[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体は、これまで報告されているP[(R)-3HB-co-(R)-3HV]およびP[(R)-3HB-co-3HP]共重合体と側鎖の構造が異なっており、その側鎖の構造が共重合体の物理的性質および生分解性にどのような影響を与えるのか非常に興味深い。また、新規共重合ポリエステルを分子設計するにあたって、そのモノマーユニットの側鎖の構造を決定するのに有効な結果が得られることが期待できる。本章では、(R)-3HBユニットと(R)-3HHユニットとの共重合ポリエステルを調製し、その物理的性質と生分解性について調べ、以下の結論を得た。

(1) *A. caviae*に炭素源として脂肪酸や油脂を与えることにより、(R)-3HBユニットと(R)-3HHユニットとの共重合体が合成された。構造解析の結果、得られた共重合体は(R)-3HBと(R)-3HHとが統計的にランダムに結合したランダム共重合体であることを明らかにした。

(2) P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の物理的性質および酵素分解性は、共重合組成に依存して大きく変化することを明らかにした。

(3) 酵素分解によって生成した分解生成物の解析より、PHBデポリメラーゼはポリマー鎖中の(R)-3HBユニットのメチン炭素に結合したエステル結合を選択的に切断することを明らかにした。

(4) P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]フィルムを自然環境水中で分解した場合、共重合体フィルムは、P[(R)-3HB]フィルムよりも速く分解された。また、28日間の分解試験後において、分解生成物は環境中の微生物によって資化され環境水中には残存していないことを明らかにした。

References

- (1) Doi, Y. *Microbial Polyesters*; VCH Publishers: New York, **1990**.
- (2) Chowdhury, A. A. *Arch. Microbiol.* **1963**, *47*, 167.
- (3) Delafield, F. P.; Doudoroff, M.; Pallerroni, N. J.; Lusty, C. J.; Contopoulos, R. *J. Bacteriol.* **1965**, *90*, 1455.
- (4) Tal, S.; Okon, Y. *Can. J. Microbiol.* **1968**, *16*, 900.
- (5) Bluhm, T.L.; Hamer, G.K.; Marchessault, R.H.; Fyfe, C.A.; Veregin, R.P. *Macromolecules* **1986**, *19*, 2871.
- (6) Byrom, D. In *Biomaterials*; Byrom, D., Ed.; Macmillan Publishers: Basingstoke, **1991**; p335.
- (7) Kunioka, M.; Tamaki, A.; Doi, Y. *Macromolecules* **1989**, *22*, 694.
- (8) Doi, Y.; Kanesawa, Y.; Kunioka, M.; Saito, T. *Macromolecules* **1990**, *23*, 26.
- (9) Nakamura, S.; Doi, Y.; Scandola, M. *Macromolecules* **1992**, *25*, 4237.
- (10) Shimamura, E.; Scandola, M.; Doi, Y. *Macromolecules* **1994**, *27*, 4429.
- (11) Shimamura, E.; Kasuya, K.; Kobayashi, G.; Shiotani, T.; Shima, Y.; Doi, Y. *Macromolecules* **1994**, *27*, 878.
- (12) Shirakura, Y.; Fukui, T.; Saito, T.; Okamoto, Y.; Narikawa, T.; Koide, K.; Tomita, K.; Takemasa, T.; Masamune, S. *Biochem. Biophys. Acta* **1986**, *880*, 46.
- (13) Mukai, K.; Yamada, K.; Doi, Y. *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**, *14*, 235.
- (14) Kumagai, Y.; Kanesawa, Y.; Doi, Y. *Makromol. Chem.* **1992**, *193*, 53.
- (15) Kanesawa, Y.; Tanahashi, N.; Doi, Y.; Saito, T. *Polym. Degrad. Stab.*, **1994**, *45*, 179.

第五章

(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸と6-ヒドロキシ ヘキサン酸とのランダム共重合体の 化学合成と性質

5-1 緒言

微生物のつくるポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(*R*)-3HB]) は、180℃に融点をもつ熱可塑性高分子であり、生分解性や生体適合性といった優れた性質を兼ね備えている¹⁾。しかしながら、P[(*R*)-3HB]はその堅くて脆いという物性上の欠点より構造材料としての実用化には至っていない。

このP[(*R*)-3HB]の堅くて脆いという欠点を改善するために、(*R*)-3HBユニットと化学構造の異なるモノマーユニットからなる共重合ポリエステル²⁾の合成が数多く研究されてきた。ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-co-(*R*)-3-ヒドロキシペンタン酸] (P[(*R*)-3HB-co-(*R*)-3HV])²⁾、ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-co-3-ヒドロキシプロピオン酸] (P[(*R*)-3HB-co-3HP])³⁾、ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-co-4-ヒドロキシブタン酸] (P[(*R*)-3HB-co-4HB])^{3,4)}等の共重合ポリエステルが微生物合成され、その物理的性質および生分解性の研究が報告されている。

前述したように、理想的な生分解性高分子材料とは、使用している間は優れた性能を持続的に発揮し、廃棄後は微生物によって完全に分解され自然界の炭素サイクルに組み込まれる素材である。今後、生分解性高分子材料の開発を考える上で、モノマーユニットとしてどのような化学構造を選択すれば優れた性能と生分解性を保持できるのかを思慮する必要がある。つまり、生分解性高分子の材料設計において、高分子の分子設計法を構築する必要がある。

第四章では、ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸-co-(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸] (P[(*R*)-3HB-co-(*R*)-3HH]) 共重合体を微生物合成し、その物理的性質や生分解性について調べた。特に、(*R*)-3HBユニットの側鎖メチル基から(*R*)-3HHユニットのプロピル基に代わったことが、共重合ポリエステルの物理的性質および生分解性におよぼす影響について明らかにした。そこで、次の目的として、共重合ポリエステルの物理的性質と生分解性におよぼすモノマーユニットの主鎖の構造の影響を明らかにしたい。

ε-カプロラクトン (ε-CL) を開環重合して得られるポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸) (P(6HH)) は自然界の微生物が分泌するリパーゼやエステラーゼといった酵素によって酵素分解される生分解性の合成高分子である⁵⁾。このP(6HH)の構成単位である6-ヒドロキシヘキサン酸 (6HH) ユニットの主鎖炭素数は6であり、3HPユニット、

本章では、(R)-β-ブチロラクトン ((R)-β-BL) とε-CLとの混合比を変えてラクトンの開環重合を行うことによって、ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-6-ヒドロキシヘキサン酸] (P[(R)-3HB-co-6HH]) 共重合体を化学合成し、その物理的性質および生分解性を調べる。得られた結果をこれまで報告されているP[(R)-3HB-co-3HP]やP[(R)-3HB-co-4HB]共重合体の諸性質と比較することにより、(R)-3HBユニットを含む共重合ポリエステルの物理的性質と生分解性におよぼす第二モノマーユニットの主鎖構造の効果を明らかにする。



5-2 実験

5-2-1 試薬

(1) ϵ -カプロラクトン (ϵ -CL)

東京化成(株)製、特級品を水素化カルシウム(和光純薬工業(株)製、特級品)で1日乾燥し、窒素雰囲気下で減圧蒸留(10mmHg、96-98℃)を行って使用した。

(2) ポリメチルアルミノキサン

東ソー・アクゾー(株)製のものをそのまま使用した。

(3) トルエン

和光純薬工業(株)製、特級品に水素化カルシウムを加えて、1日窒素雰囲気下で還流した後に、蒸留して使用した。

5-2-2 ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB]) の合成

第二章と同じ手法で微生物合成した。

5-2-3 ポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸) (P(6HH)) の合成

窒素置換した50mLのシュレンクフラスコに、窒素気流下でトルエン18mLおよびポリメチルアルミノキサン0.5mLを仕込み0℃に冷却し、窒素気流下で ϵ -カプロラクトン(ϵ -CL) 19mLを加え、60℃で5日間攪拌を行った。冷却後、少量のメタノールで反応を停止させた後、クロロホルムを加えて生成物を溶かし、約10倍量のメタノール中に再沈させた後、恒量になるまで室温で減圧乾燥してポリマーを得た。得られたP(6HH)の分子量をGPC測定により調べたところ、 $M_n=59000$, $M_w/M_n=1.7$ であった。

5-2-4 ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-6-ヒドロキシヘキサン酸] (P[(R)-3HB-co-6HH]) 共重合体の合成

所定量の(R)- β -BL (92%e.e.) と ϵ -CLおよび所定量の1-エトキシ-3-クロロテトラブチルジスタノキサンを20mLのシュレンクフラスコに入れ、100℃で4時間反応させた。生成物をクロロホルムに溶解し、ジエチルエーテル/ヘキサン(1/3 (v/v)) 混合溶液中で沈殿させて共重合組成の異なるP[(R)-3HB-co-6HH]を得た。

5-2-5 P[(R)-3HB-co-6HH]フィルムの作製

第二章と同じく、ソルベント-キャスト法によって作製した。

5-2-6 P[(R)-3HB-co-6HH]フィルムの酵素分解実験

第二章と同じく、フィルムの重量減少法によって試験した。

5-2-7 P[(R)-3HB-co-6HH]フィルムの環境水（河川水）中での分解試験

第二章と同じく、BOD試験装置を用いて試験した。

5-2-8 分析方法

(1) NMR測定

(2) 分子量測定

(3) DSC測定

(4) X線回折測定

(5) 引っ張り試験

(6) 球晶形態の観察

(7) 走査型電子顕微鏡観察

(8) 高速液体クロマトグラフィーによる分解生成物の分析

(1) から (8) までの分析操作は、第二章と同じ方法で行った。

5-3 結果および考察

5-3-1 ジスタノキサン触媒を用いたP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の合成とその構造

ジスタノキサン触媒を用いて、(R)- β -BLと ϵ -CLの混合比を90/10~10/90(mol/mol)まで変えて、ラクトンの開環重合を行うことによってポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸-co-6-ヒドロキシヘキサン酸] (P[(R)-3HB-co-6HH]) 共重合体を合成した。得られたポリマーの構造はNMRによって、また、分子量はGPCによって解析した。Figure 5-1には、P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の¹H-NMRスペクトルを示してある。各共重合体の共重合組成は、¹H-NMRのピーク面積比より算出した。Table 5-1には、共重合体の重合条件と収率、共重合組成および分子量を示してある。重合時の(R)- β -BLと ϵ -CLの混合比を変えることによって、幅広い共重合組成を有するP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体が合成できた。また、いずれの重合条件においても、高分子量のポリマー（数平均分子量 $M_n > 100,000$ ）が得られた。

Table 5-1. Compositions and molecular weights of P[(R)-3HB-co-6HH] copolymers.

sample no.	monomer feed ratio, mol%		yield, %	composition, ^a mol%		molecular weight ^b	
	(R)- β -BL	ϵ -CL		(R)-3HB	6HH	$M_n \times 10^{-3}$	M_w/M_n
1 ^c	—	—	—	100	0	281	2.3
2 ^d	90	10	89	89	11	117	1.8
3	80	20	96	78	22	124	1.8
4	70	30	91	69	31	127	1.8
5	60	40	92	57	43	127	1.8
6	50	50	93	47	53	121	1.9
7	40	60	89	35	65	118	1.8
8	30	70	97	30	70	116	1.7
9	20	80	98	19	81	190	1.7
10	10	90	95	9	91	166	1.7
11 ^e	0	100	—	0	100	59	1.5

a) Determined from ¹H NMR spectra.

b) Determined by GPC analysis.

c) Bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyric acid].

d) Samples 2—10 were synthesized by polymerizations of mixture of (R)- β -BL and ϵ -CL with distannoxane catalyst.

e) Poly(6-hydroxyhexanoic acid) was synthesized by ring-opening polymerization of ϵ -CL with Al-based catalyst.

ジスタノキサン触媒で合成したP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の連鎖分布を調べるために、¹³C-NMRによる解析を行った。Figure 5-2 (a)には、P[(R)-3HB-co-53mol%6HH]共重合体の¹³C-NMRスペクトルを各ピークの帰属とともに示してある。また、Figure 5-2 (b)にはカルボニル炭素に由来するピークの拡大図を示してある。カルボニル炭素

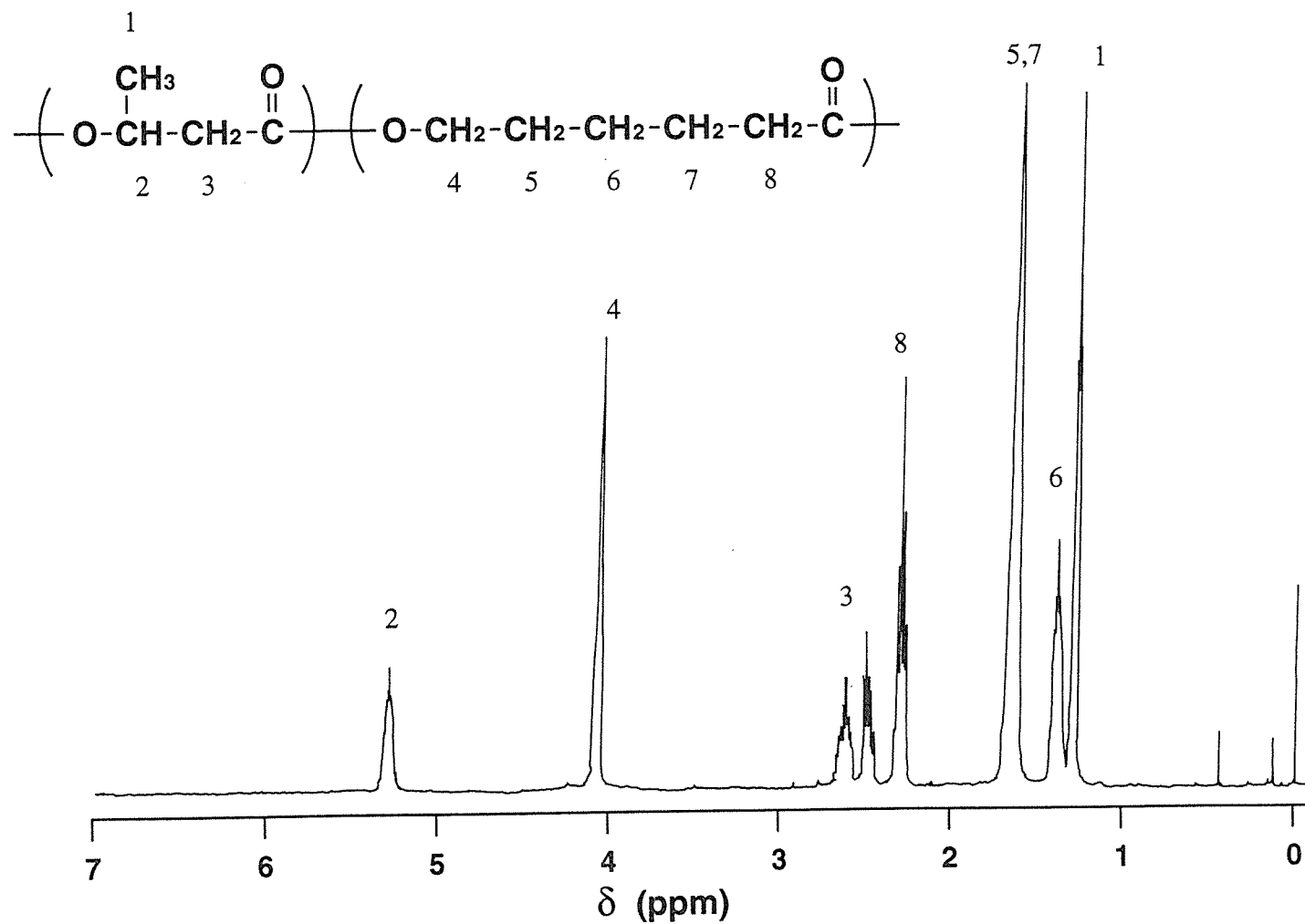


Figure 5-1 400-MHz ¹H-NMR spectrum of P[(R)-3HB-co-53mol%6HH] copolymer in CDCl₃ at 23°C.

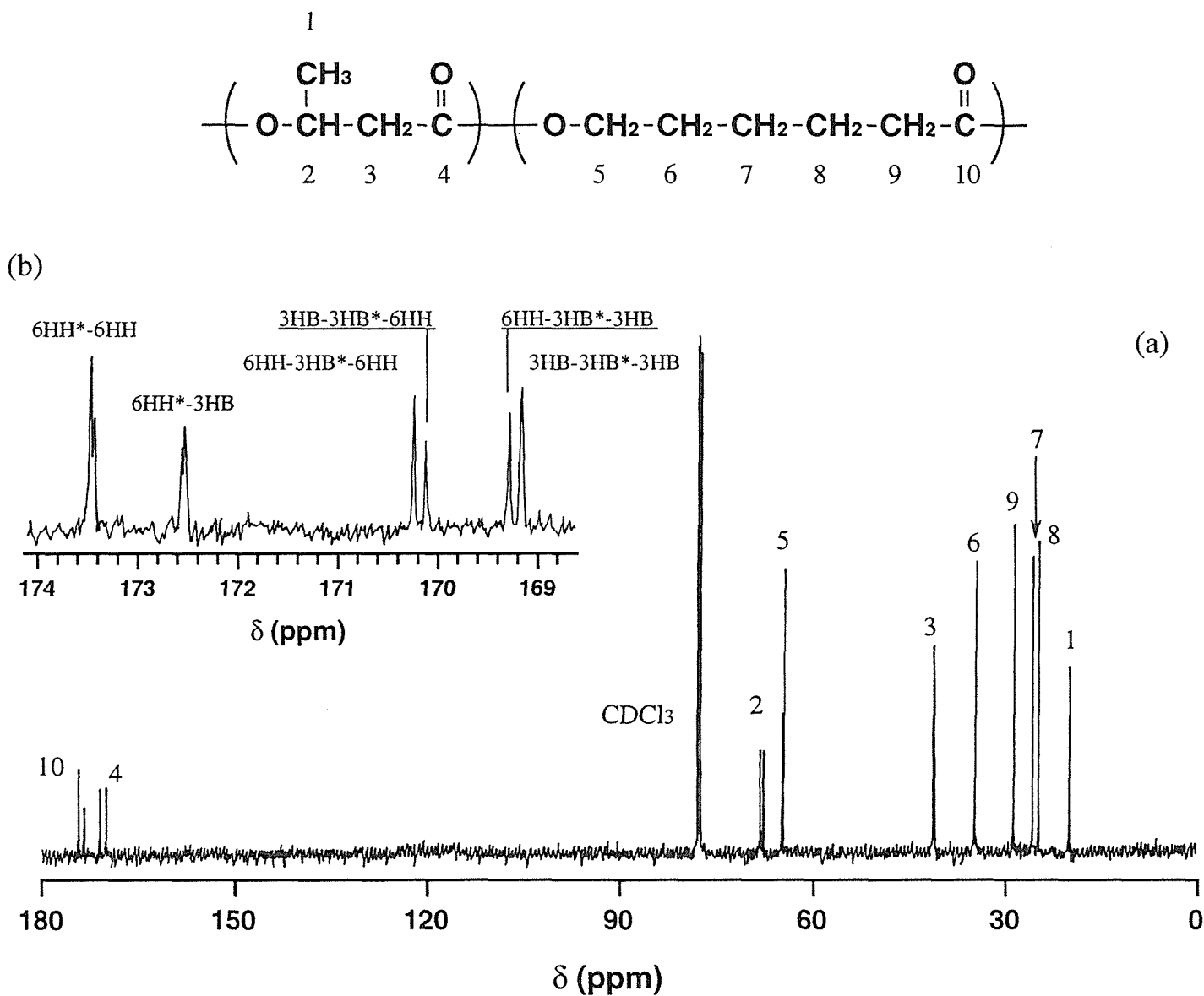


Figure 5-2 100-MHz ^{13}C -NMR spectrum of P[(*R*)-3HB-*co*-53mol%6HH] copolymer in CDCl_3 at 23°C (a), together with expanded carbonyl carbon resonances (b).

に由来するピークは、(R)-3HBユニットと6HHユニットとの連鎖の違いによって6本のピークに分裂し、それぞれ3HB-3HB*-3HB (169.1ppm)、6HH-3HB*-3HB (169.2ppm)、3HB-3HB*-6HH (170.1ppm)、6HH-3HB*-6HH (170.2ppm)、6HH*-3HB (172.6ppm付近)、6HH*-6HH (173.5ppm付近)の各ダイアッドおよびトリアッド連鎖に由来するピークと帰属できた。この6本のカルボニル炭素のピークの面積比より、P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体のダイアッドおよびトリアッド連鎖の分率を算出した。Table 5-2には、各共重合体のダイアッドおよびトリアッド分率の値をまとめて示してある。

Table 5-2. Chemical shifts and relative intensities of ^{13}C resonances in P[(R)-3HB-co-6HH] copolymers.

chemical shift, ppm	sequence	relative intensities ^a									
		sample no.	2	3	4	5	6	7	8	9	10
169.13	33*3		0.69 (0.70)	0.55 (0.48)	0.38 (0.34)	0.22 (0.19)	0.17 (0.10)	0.08 (0.04)	0.06 (0.03)	0.00 (0.01)	0.00 (0.00)
169.24	63*3		0.12 (0.09)	0.13 (0.13)	0.16 (0.14)	0.14 (0.13)	0.13 (0.12)	0.10 (0.08)	0.07 (0.06)	0.00 (0.03)	0.00 (0.01)
170.08	33*6		0.07 (0.09)	0.10 (0.13)	0.10 (0.14)	0.12 (0.13)	0.11 (0.12)	0.07 (0.08)	0.06 (0.06)	0.00 (0.03)	0.00 (0.01)
170.21	63*6		0.02 (0.01)	0.03 (0.04)	0.08 (0.07)	0.13 (0.11)	0.13 (0.13)	0.14 (0.15)	0.12 (0.15)	0.09 (0.12)	0.05 (0.07)
172.57 172.60	6*3		0.10 (0.10)	0.13 (0.17)	0.17 (0.21)	0.20 (0.25)	0.19 (0.25)	0.21 (0.23)	0.23 (0.21)	0.12 (0.15)	0.15 (0.08)
173.49 173.52	6*6		0.00 (0.01)	0.06 (0.05)	0.11 (0.10)	0.19 (0.19)	0.27 (0.28)	0.40 (0.42)	0.46 (0.49)	0.79 (0.66)	0.80 (0.83)

a) The values in parentheses were calculated by the Bernoullian statistics with the mole fraction of 6HH unit.

また、この共重合体の連鎖分布の評価を理想的なランダム共重合体を仮定したBernoullian統計に対応させて行った。Bernoullianモデルにおいて、ダイアッド連鎖のモル分率 (F_{ij}) は*i*および*j*モノマーユニットのモル分率 F_i および F_j から次式のように表される。

$$F_{ij}=F_i \cdot F_j$$

また、トリアッド連鎖のモル分率 (F_{ijj}) も同様に次式で表される。

$$F_{ijj}=F_i^2 \cdot F_j$$

これらの式で求めたダイアッド、トリアッド連鎖の分率を計算値として示してある。

Table 5-2において実測値とBernoullian統計解析からの計算値とがよく一致している。このことから、このP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体は、全ての共重合組成において(R)-3HBユニットと6HHユニットが統計的にランダム分布で結合したランダム共重合体であることが分かった。

5-3-2 P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の熱的特性

6HH分率が0～100mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体のガラス転移点 (T_g)、融点 (T_m) および融解熱 (ΔH_m) をDSCを用いて測定した。 T_m および ΔH_m は、サンプルを窒素雰囲気下で、0から200℃まで昇温速度10℃/minで加熱すること (1st run) によって測定した。また T_g は、1st runで200℃まで昇温したサンプルを液体窒素供給により急冷し、窒素雰囲気下で、-150℃から200℃まで昇温速度20℃/minで加熱すること (2nd run) によって測定した。Table 5-3にその結果をまとめて示してある。

Table 5-3. Physical properties of P[(R)-3HB-co-6HH] copolymers.

sample no.	6HH fraction, mol%	T_g , ^a °C	T_m , ^b °C	ΔH_m , ^c J/g	X_c , ^d %
1	0	4	179	91	62±5
2	11	-6	130	50	50±5
3	22	-18	110	30	41±5
4	31	-26	66	17	30±5
5	43	-35	48	4	18±5
6	53	-40	n.d.	0	0
7	65	-49	n.d.	0	0
8	70	-53	n.d.	0	0
9	81	-58	36	27	31±5
10	91	n.d. ^e	47	55	36±5
11	100	-67	60	60	55±5

a) Glass-transition temperature; measured by DSC (second scan), from -150 to +200 °C at a rate of 20 °C/min.

b) Melting temperature; measured by DSC (first scan), from 0 to +200 °C at a rate of 10 °C/min.

c) Enthalpy of fusion; measured by DSC (first scan).

d) Degree of crystallinity; determined by X-ray diffraction patterns.

e) Not detected.

P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の T_g は、6HH分率が0から100mol%まで増加するにしたがって4℃から-67℃まで直線的に低下することがわかった。6HH分率が0～43mol%までのP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の T_m は、6HH分率の増加にともなって179℃から48℃まで低下した。6HH分率が53から70mol%までの共重合体は非晶質なポリマーであり、 T_m は観測されなかった。また、6HH分率が83から100mol%の共重合体の T_m は、6HH分率の増加にともなって36℃から60℃まで上昇した。

5-3-3 P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の結晶構造

6HH分率が11～43, 81, 91mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の結晶構造を広角X線回折法により調べた。各サンプルのX線回折パターンをFigure 5-3に示してある。比較として、P[(R)-3HB]、P(6HH)ホモポリマーのX線回折パターンも示してある。また、P[(R)-3HB]、P[(R)-3HB-co-22mol%6HH]、P[(R)-3HB-co-81mol%6HH]、およびP(6HH)のそれぞれのX線回折パターンから求めた格子面間隔 (d-spacing) の値をTable 5-4に示してある。Figure 5-3に示すように、P[(R)-3HB]ホモポリマーの回折パターンには、P[(R)-3HB]ホモポリマーの斜方晶系 $P2_12_12_1$ (D_2^4) の結晶単位胞による回折パターンが見られた。 $2\theta=13.3^\circ$ に(020)面、 16.9° に(110)面、 20.1° に(021)面、 30.2° に(002)面の回折が観測された。6HH分率11～43mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の回折パターンには、P[(R)-3HB]ホモポリマーと同一の回折面が認められた。したがって、6HH分率11～43mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体は、P[(R)-3HB]と同一の結晶構造を形成していると結論できる。

Table 5-4. Interplanar *d*-spacing measured from X-ray diffraction patterns of P[(R)-3HB-co-6HH] samples^a

P[(R)-3HB] ^c		P[(R)-3HB-co-22mol%6HH]		P[(R)-3HB-co-81mol%6HH]		P(6HH) ^d	
<i>d</i> -spacing (nm)	intensity ^b	<i>d</i> -spacing (nm)	intensity	<i>d</i> -spacing (nm)	intensity	<i>d</i> -spacing (nm)	intensity
0.655 (±0.03)	s	0.658 (±0.05)	s				
0.531 (±0.03)	s	0.521 (±0.04)	s				
0.453 (±0.03)	m	0.444 (±0.04)	m				
				0.417 (±0.04)	s	0.416 (±0.05)	s
				0.405 (±0.05)	m		
0.397 (±0.02)	s						
				0.376 (±0.04)	m	0.375 (±0.05)	m
0.346 (±0.05)	m	0.345 (±0.04)	m				
0.326 (±0.03)	w	0.328 (±0.03)	w				
0.293 (±0.02)	w						
0.244 (±0.06)	w						

a) Solvent-castad films.

b) s=strong, m=medium, w=weak.

c) Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid].

d) Poly(6-hydroxyhexanoic acid).

P(6HH)ホモポリマーの回折パターンには、P(6HH)の斜方晶系 $P2_12_12_1$ (D_2^4) の結晶単位胞による回折パターンが見られた。6HH分率81, 91mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の回折パターンは、P(6HH)ホモポリマーの回折パターンと同一であった。したがって、6HH分率81, 91mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体は、P(6HH)と同一の結晶構造をとっていると言える。

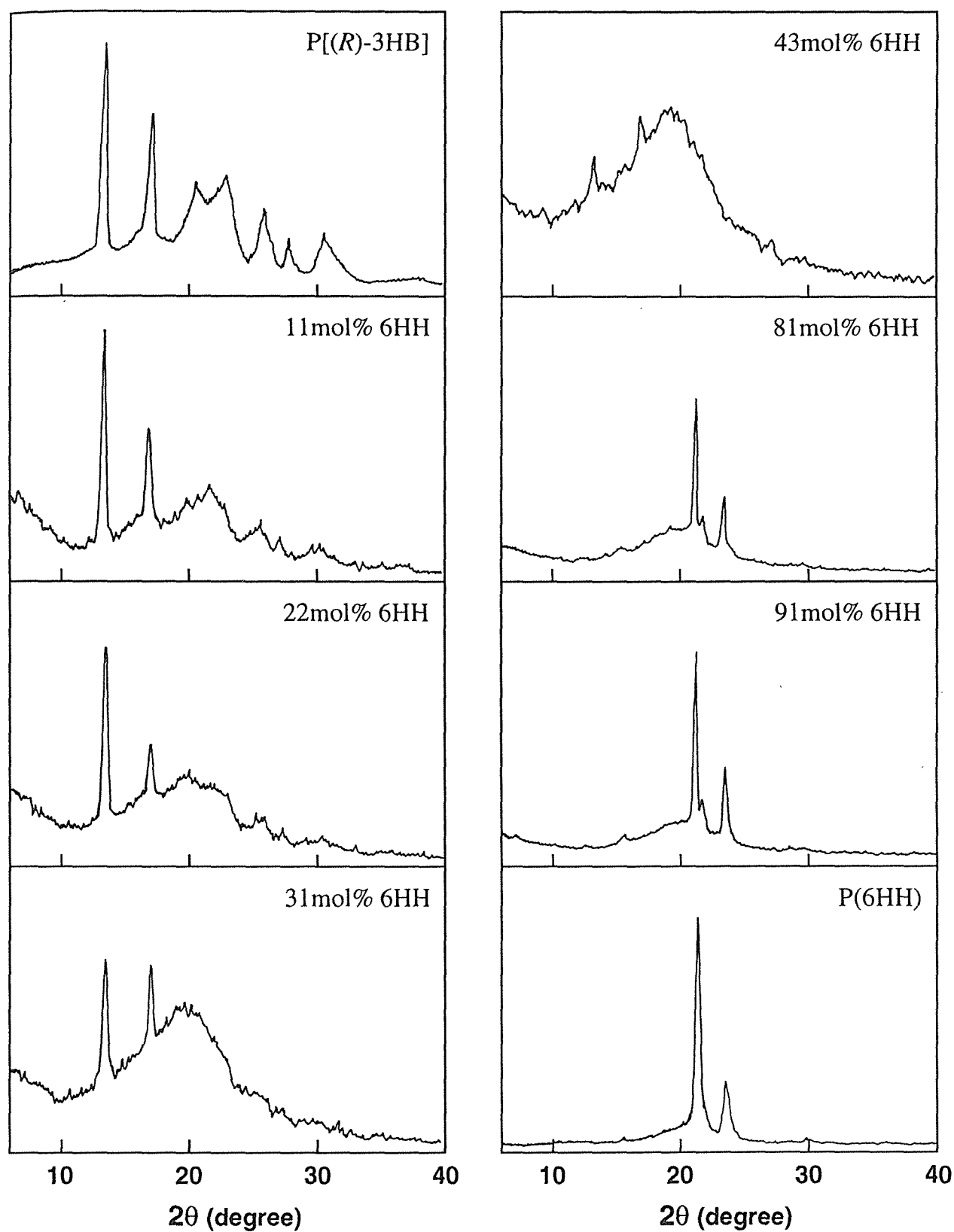


Figure 5-3 X-ray diffraction patterns of P[(R)-3HB-co-6HH] films with different 6HH fractions.

Table 5-3には、それぞれの回折パターンから決定した各サンプルの結晶化度を示してある。6HH分率0～43mol%の範囲において、共重合体の結晶化度は6HH分率の増加とともに62から18%まで低下した。6HH分率53～70mol%のサンプルについては、DSCによる熱分析で融点が観測されなかったことにより、結晶化度を0とした。さらに、6HH分率が81mol%から100mol%まで増加するにしたがって共重合体の結晶化度は31%から55%まで増大することがわかった。

5-3-4 P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の球晶成長速度と球晶形態

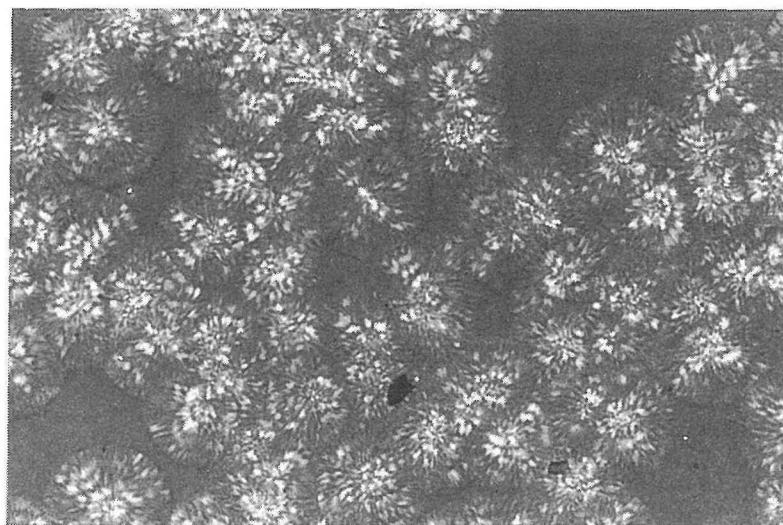
P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の溶融－結晶時の挙動によぼす共重合組成の影響を調べるために、このポリマーの球晶形態および球晶の成長速度について調べた。

球晶の観察は、ホットステージと簡易偏光板を備えた光学顕微鏡を用いて行った。室温から200℃まで昇温速度30℃/minで加熱した後、200℃で30秒間保持してポリマーを完全に溶融させ、その後80℃/minで所定の結晶化温度まで降温し、ポリマーを結晶化させた。球晶成長速度は、一定時間ごとの球晶半径をプロットして、その傾きより算出した。球晶観察は、6HHユニット分率が0, 11, 22mol%のサンプルについて結晶化温度を変化させて行った。

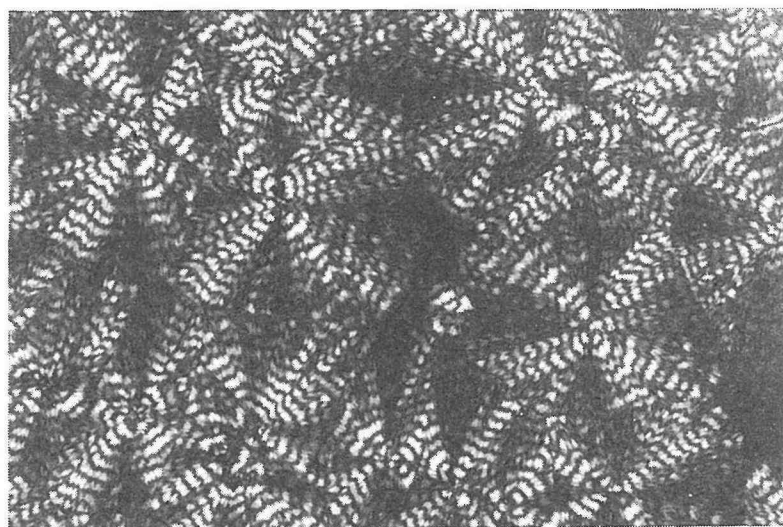
Figure 5-4には、6HHユニット分率22mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体を60℃, 80℃, 90℃の結晶化温度でそれぞれ結晶化させたときに形成した球晶の光学顕微鏡写真を示してある。P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の球晶形成において、結晶化温度(T_c)を上昇させるにしたがい、結晶核形成速度が減少して結晶核の数が減少し、その結果球晶半径が増大することが明らかになった。また、P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体は、バンド型の球晶を形成した。このような球晶形成挙動は、P[(R)-3HB]ホモポリマーの場合とよく一致している。

Figure 5-5には、結晶化温度(T_c)を変化させて測定した各サンプルの球晶成長速度(G)を T_c に対してプロットしたものを示してある。比較として、P[(R)-3HB]ホモポリマーの球晶成長速度も示した。P[(R)-3HB]ホモポリマーは、 T_c が90℃前後で球晶の最大成長速度を示しており、その値は約3.7 $\mu\text{m/s}$ であった。P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の球晶成長速度は、6HHユニット分率が増加するにしたがって急速に低下し、6HHユニット組成が11mol%で1/100、22mol%で1/1000にまで低下した。また、6HH分率が0から22mol%まで増加するにしたがって、最大成長速度を示す結晶化温度は90℃

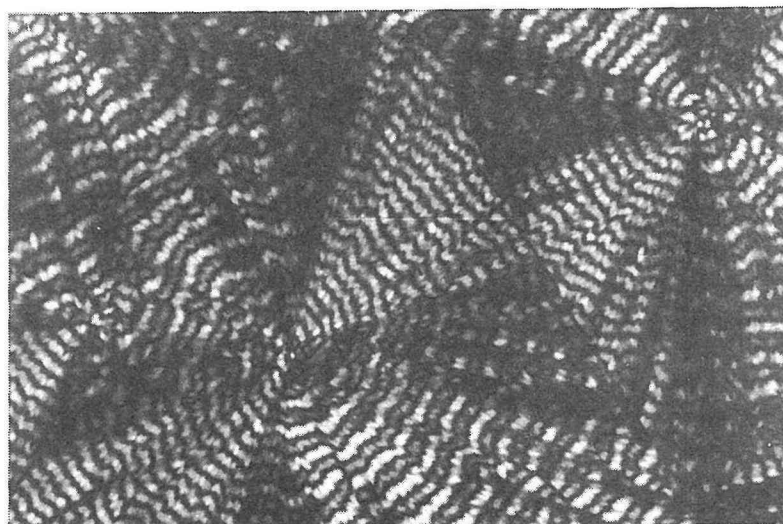
(a) $T_c=60^\circ\text{C}$



(b) $T_c=70^\circ\text{C}$



(c) $T_c=90^\circ\text{C}$



100 μm

Figure 5-4 Optical micrographs of P[(*R*)-3HB-*co*-6HH] spherulites crystallized at (a) $T_c=60^\circ\text{C}$, (b) $T_c=70^\circ\text{C}$, and (c) $T_c=90^\circ\text{C}$.

(0mol%) から 70℃ (11mol%) , 60℃ (22mol%) へと低温側にシフトすることがわかった。

その他の組成を有する P[(R)-3HB-co-6HH] 共重合体の結晶性サンプルについても同様の測定を行ったが、6HH ユニット分率 31mol% 以上のサンプルの球晶成長速度は数 $\mu\text{m/h}$ と非常に遅く、また、6HH ユニット分率 81, 91mol% のサンプルでは形成される球晶のサイズが非常に小さいため結果を得るには至らなかった。

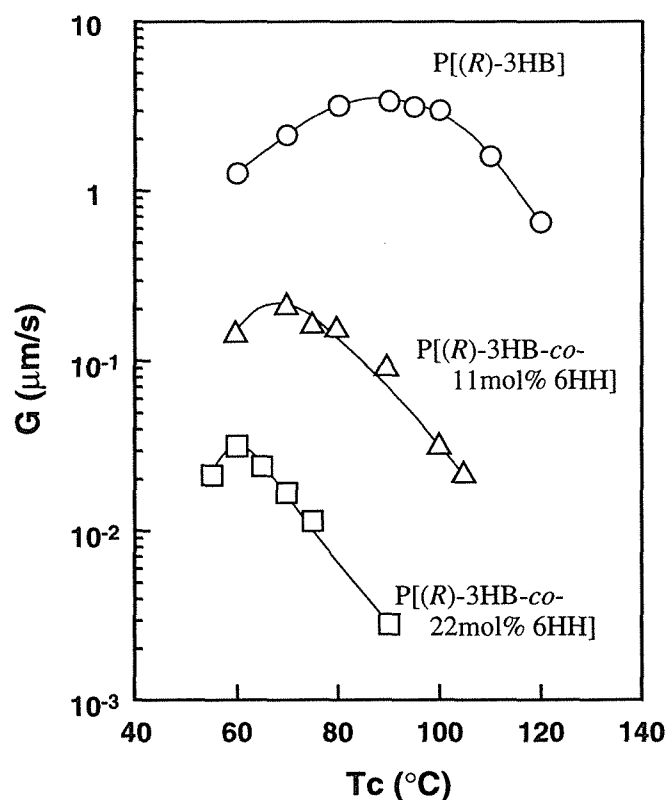


Figure 5-5 Radial growth rate (G) of spherulites as a function of crystallization temperatures (T_c) for P[(R)-3HB-co-6HH] with different 6HH fractions.

5-3-5 P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の酵素分解性

P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の酵素分解性を、2種類の分解酵素を用いて重量減少法により評価した。重量減少法とは、分解前後のポリマーサンプルの重量を測定し、その減少量から酵素分解性を評価する手法である。酵素分解試験は、リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) 中にポリマーサンプルと所定量の分解酵素を加え、 $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、90rpmで振とうすることにより行った。各ポリマーサンプルは、 $1 \times 1\text{cm}$ のフィルム (厚さ $0.06 \sim 0.1\text{mm}$ 、重さ $4 \sim 10\text{mg}$) サイズにして使用した。

(1) *Alcaligenes faecalis*[®]の菌体外分泌PHBデポリメラーゼによる酵素分解試験

*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼを用いた酵素分解試験では、酵素量を $1.0\mu\text{g}$ とした。

Figure 5-6に、6HHユニット分率0, 11, 31, 43, 65, 81, 100mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]サンプルフィルムの酵素分解による重量減少量の経時変化を示した。Figure 5-6から、各サンプルフィルムの分解量は、時間とともにほぼ直線的に増加していることがわかる。

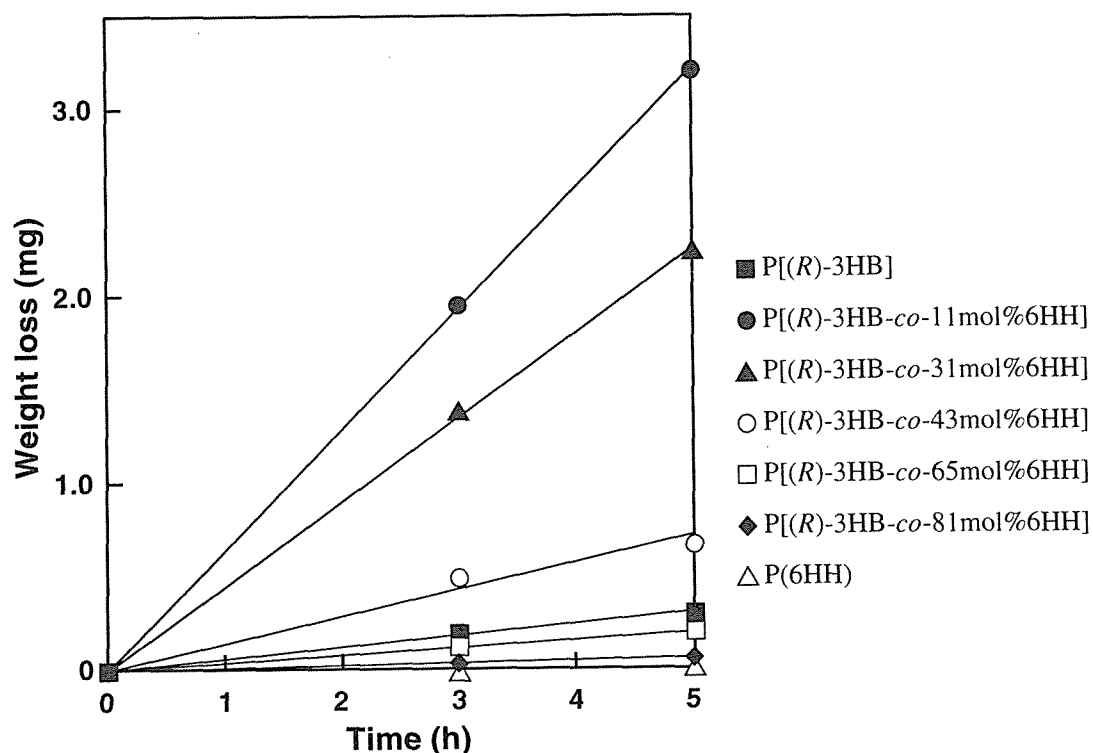


Figure 5-6 Enzymatic erosion profiles of P[(R)-3HB-co-6HH] films with different 6HH fractions at 25°C in aqueous solution (pH 7.4) containing PHB depolymerase (1.0 mg/mL) from *A. faecalis*.

Figure 5-6の直線の傾きから、*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼによる各P[(R)-3HB-co-6HH]フィルムの酵素分解速度を求めた。共重合組成に対する酵素分解速度を、Figure 5-7に示した。P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の酵素分解速度は、その共重合組成に大きく依存していることがわかった。P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の酵素分解速度は、6HH分率の増加とともに増大し、6HH分率11mol%で最大値を示した。このときの分解速度は、P[(R)-3HB]フィルムの分解速度の約10倍であった。さらに6HH分率が増加すると分解速度は徐々に低下し、6HH分率53mol%以上のサンプルではP[(R)-3HB]の分解反応よりも遅くなり、P(6HH) (6HH分率100mol%) フィルムはPHBデポリメラーゼによってまったく分解されなかった。

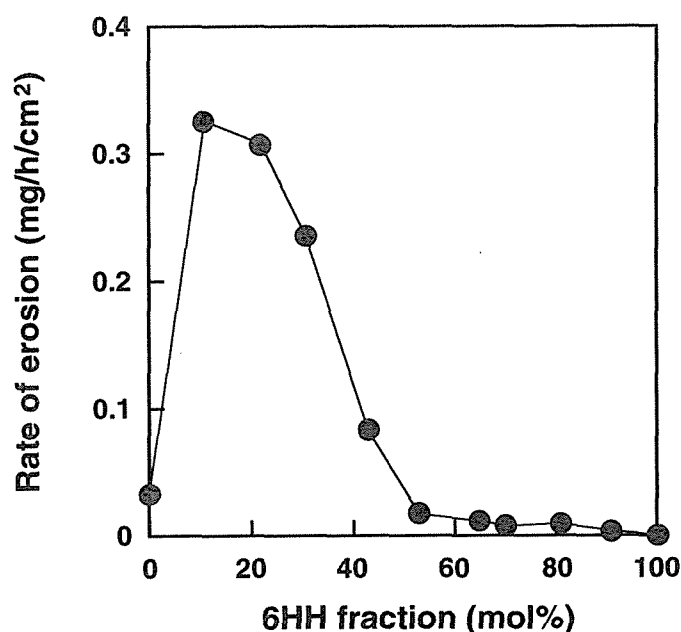
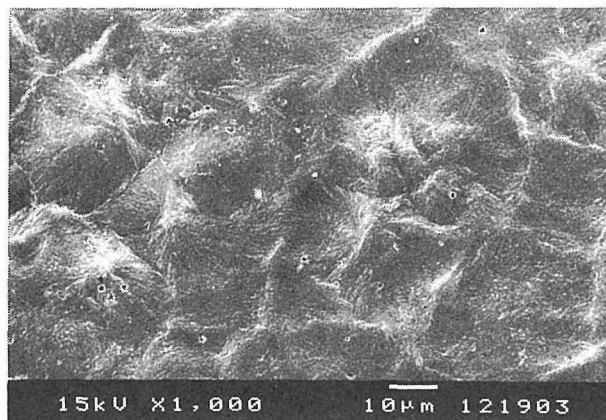


Figure 5-7 Effect of copolymer composition on the rate of enzymatic erosion of P[(R)-3HB-co-6HH] films in the aqueous solution of PHB depolymerase from *A. faecalis* at 25°C and pH 7.4.

Figure 5-8には、6HHユニット分率11, 31, 81mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]フィルムの酵素分解前と酵素分解 (3時間) 後のフィルム表面のSEM写真を示してある。3時間の酵素分解後、P[(R)-3HB-co-6HH]サンプルフィルム表面は、分解前のフィルム表面と比べ明らかに粗雑になっていることがわかる。これは、サンプルフィルムの酵素分解反応が、フィルムの表面から進行していくことを示している。

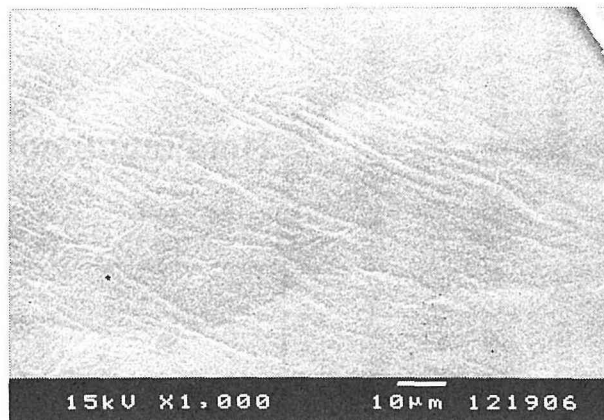
P[(R)-3HB-co-11 mol% 6HH]

(a) Undegraded



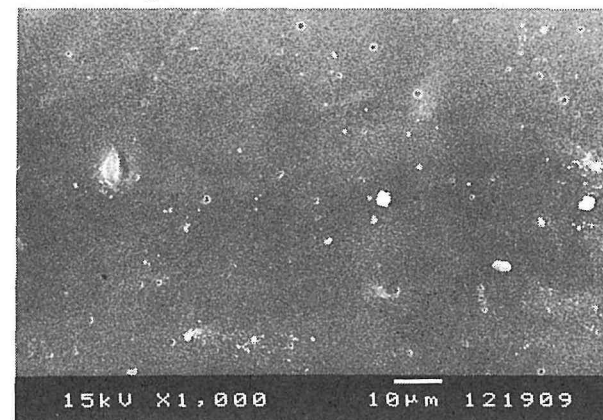
P[(R)-3HB-co-31 mol% 6HH]

(c) Undegraded

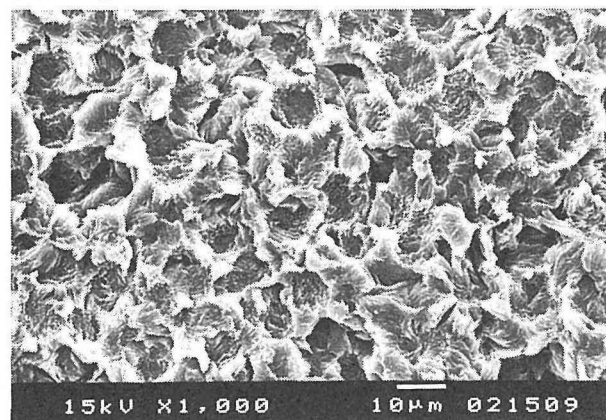


P[(R)-3HB-co-81 mol% 6HH]

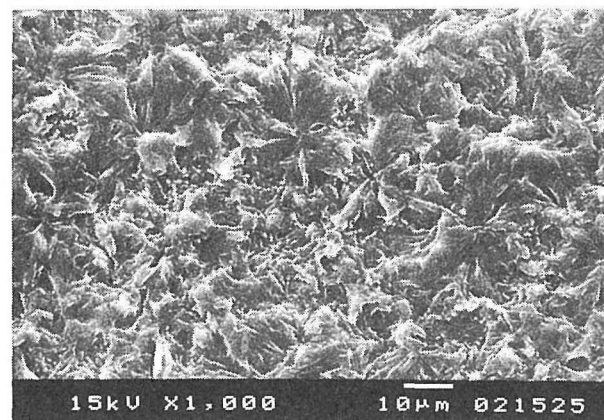
(e) Undegraded



(b) Degraded for 3h



(d) Degraded for 3 h



(f) Degraded for 3 h

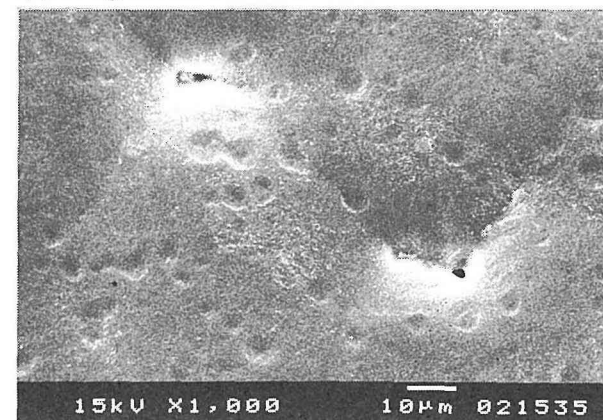


Figure 5-8 Scanning electron micrographs (SEMs) of surfaces of P[(R)-3HB-co-6HH] films undegraded and degraded for 3 h at 25°C with PHB depolymerase from *A. faecalis*.

Kumagaiら⁸⁾は、PHBデポリメラーゼによるP[(R)-3HB]フィルムの酵素分解速度は、サンプルの結晶化度に大きく依存し、結晶化度の低下とともに分解速度が増大することを報告している。さらに、酵素分解反応はP[(R)-3HB]フィルム表面の非晶部から優先的に進行し、非晶部のポリマー鎖の分解速度は結晶部のポリマー鎖の分解速度の約20倍になることを示した。6HH分率=11~43mol%のP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の結晶化度は6HH分率の増加にしたがって著しく低下している。6HHユニットが入ってくることによりポリマー中の非晶部が増え、その結果、P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体フィルムの酵素分解速度はP[(R)-3HB]の分解速度に較べて増大するものと結論できる。しかしながら、さらに6HHユニットが増加すると、酵素の基質特異性により分解速度が減少したと考えられる。

A. *faecalis*のPHBデポリメラーゼによるP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の酵素分解性を、他の共重合体の場合と比較するために、反応温度37℃における分解試験を行った。

Figure 5-9には、37℃における酵素分解速度の共重合組成に対する変化を、P[(R)-3HB-co-3HP]³⁾, P[(R)-3HB-co-4HB]^{3,4)}各共重合体の結果とともに示してある。

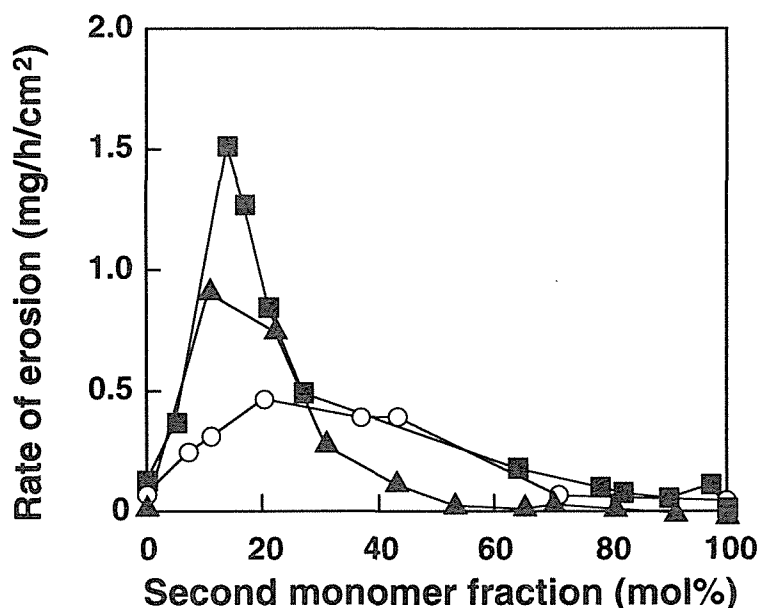


Figure 5-9 Effect of copolymer compositions on the rate of enzymatic erosion of solvent-cast copolyester films in the aqueous solution of PHB depolymerase from A. *faecalis* at 37°C and pH 7.4: (▲) P[(R)-3HB-co-6HH]; (○) P[(R)-3HB-co-3HP]; (■) P[(R)-3HB-co-4HB].

37℃におけるP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の酵素分解速度は、25℃の場合と同様に共重合組成に依存して変化した。そして6HH分率が53mol%以上の共重合フィルムはPHBデポリメラーゼによってほとんど分解されなかった。一方、P[(R)-3HB-co-3HP], P[(R)-3HB-co-4HB]共重合体の場合、第二モノマーユニットが40～60mol%あたりにおいても分解が進んでいることがわかる。3HPユニットおよび4HBユニットはPHBデポリメラーゼによって分解されるため、第二モノマーユニット分率が比較的高い共重合体においても分解反応が進行するものと考えられる。

(2) *Rhizopus delemar*のリパーゼによる酵素分解試験

*R. delemar*のリパーゼによる酵素分解試験では、酵素量を190μgとした。*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼによる分解試験の場合と同様に、フィルムの重量減少量の経時変化の傾きから、酵素分解速度を算出した。Figure 5-10には、分解速度を共重合組成変化に対してプロットしたものを示してある。Figure 5-10に示すように、P(6HH)ホモポリマーの分解速度が非常に遅い ($5.0 \times 10^{-4} \text{ mg/h/cm}^2$) のに対し、(R)-3HBユニットが9mol%入ると分解速度は約300倍にまで上昇した。

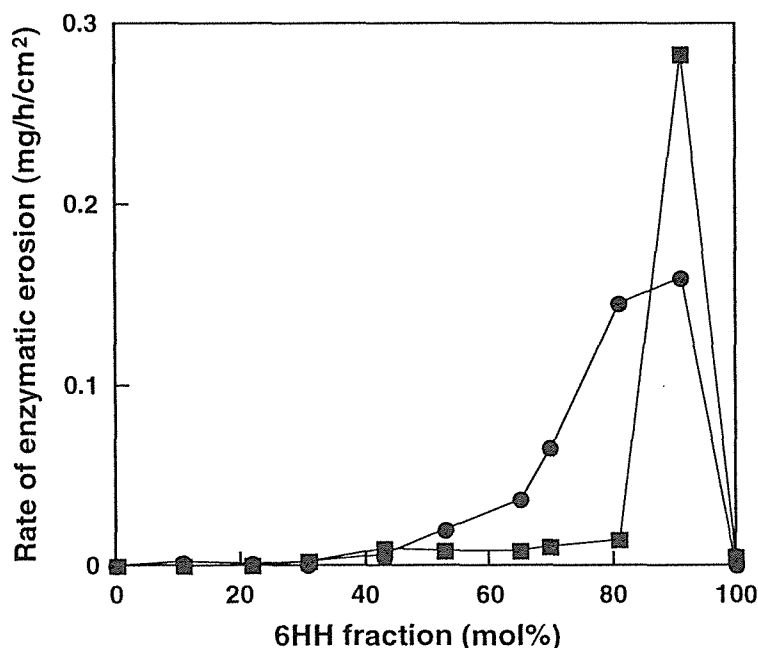
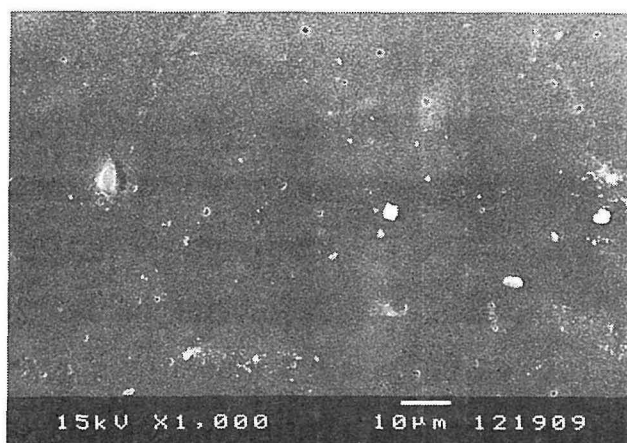


Figure 5-10 Effect of copolymer composition on the rate of enzymatic erosion of P[(R)-3HB-co-6HH] films in the aqueous solution of lipase (190μg/mL) from *R. delemar* at 25°C (●) and at 37°C (■).

(a) Undegraded



(b) Degraded for 19h

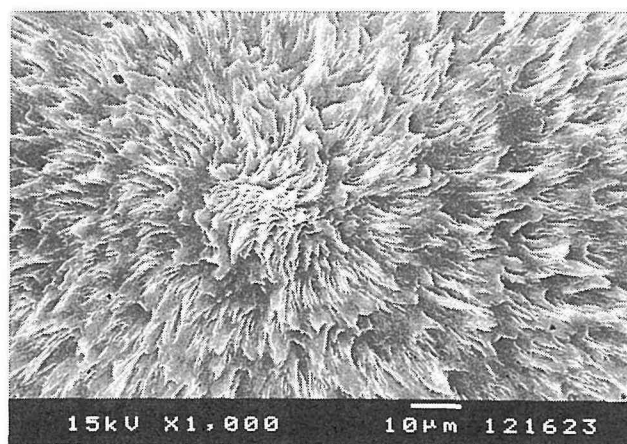


Figure 5-11 Scanning electron micrographs (SEMs) of surfaces of P[(R)-3HB-co-6HH] films undegraded and degraded for 19 h at 25°C with lipase from *R. delemar*.

また、さらに(R)-3HBユニット分率が増加すると、徐々に分解速度は減少し、P[(R)-3HB]は全く分解されなかった。この共重合組成に対する分解速度の変化を、*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼによる分解実験の結果 (Figure 5-7) と比較すると、共重合組成に対して全く対照的な分解速度の変化を示している。

Figure 5-11には、P[(R)-3HB-co-91mol%6HH]共重合体の酵素分解前と19時間分解後のフィルム表面のSEM写真が示してある。*R. delemar*のリパーゼにおいても、分解反応はフィルムの表面から進行していることがわかる。

*R. delemar*のリパーゼによる酵素分解試験についても、37℃でも行った。その結果をFigure 5-10に、25℃での結果とともに示した。37℃での分解実験において、著しい分解反応が認められたのはP[(R)-3HB-co-91mol%6HH]フィルムのみであった。P[(R)-3HB-co-81mol%6HH]フィルムの分解速度は、25℃において約0.15mg/h/cm²から、37℃において約0.02mg/h/cm²まで低下した。これは、P[(R)-3HB-co-81mol%6HH]の融点 (T_m) が36℃であり、 T_m 以上の温度で分解試験を行ったためと考えられる。フィルムの結晶化度が低下とともに高分子鎖の酵素分解性は一端上昇するが、完全非晶質の高分子になると酵素分解性は急激に低下するものと思われる。

5-3-6 酵素分解後の分解生成物の分析

(1) *A. faecalis*のPHBデポリメラーゼを用いた場合の分解生成物

*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼを用いたP[(R)-3HB-co-6HH]フィルムの酵素分解反応によって生成する水溶性の分解生成物を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析した。Figure 5-12(a)には、P[(R)-3HB-co-31mol%6HH]共重合体を5時間酵素分解した際に得られる分解生成物のHPLCの溶出曲線をピークの帰属とともに示してある。各生成物を分取して、¹H-NMRによって分析した結果、それぞれ3HBモノマー ($t_R=6.3\text{min}$)、3HB-3HBダイマー ($t_R=13.4\text{min}$)、6HH-3HBダイマー ($t_R=16.3\text{min}$)、3HB-6HH-3HBトライマー ($t_R=19.7\text{min}$) であることがわかった。テトラマー以上のオリゴマー由来のピークは帰属するまでには至らなかった。Figure 5-13には6HH-3HBダイマー、Figure 5-14には3HB-6HH-3HBトライマーの¹H-NMRスペクトルを示してある。この2つの¹H-NMRスペクトルから、3HBユニット、6HHユニットともに、分解生成物のヒドロキシル基末端側のモノマーユニットになり得ることがわかった。つまり、*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼは、3HBユニットのメチ

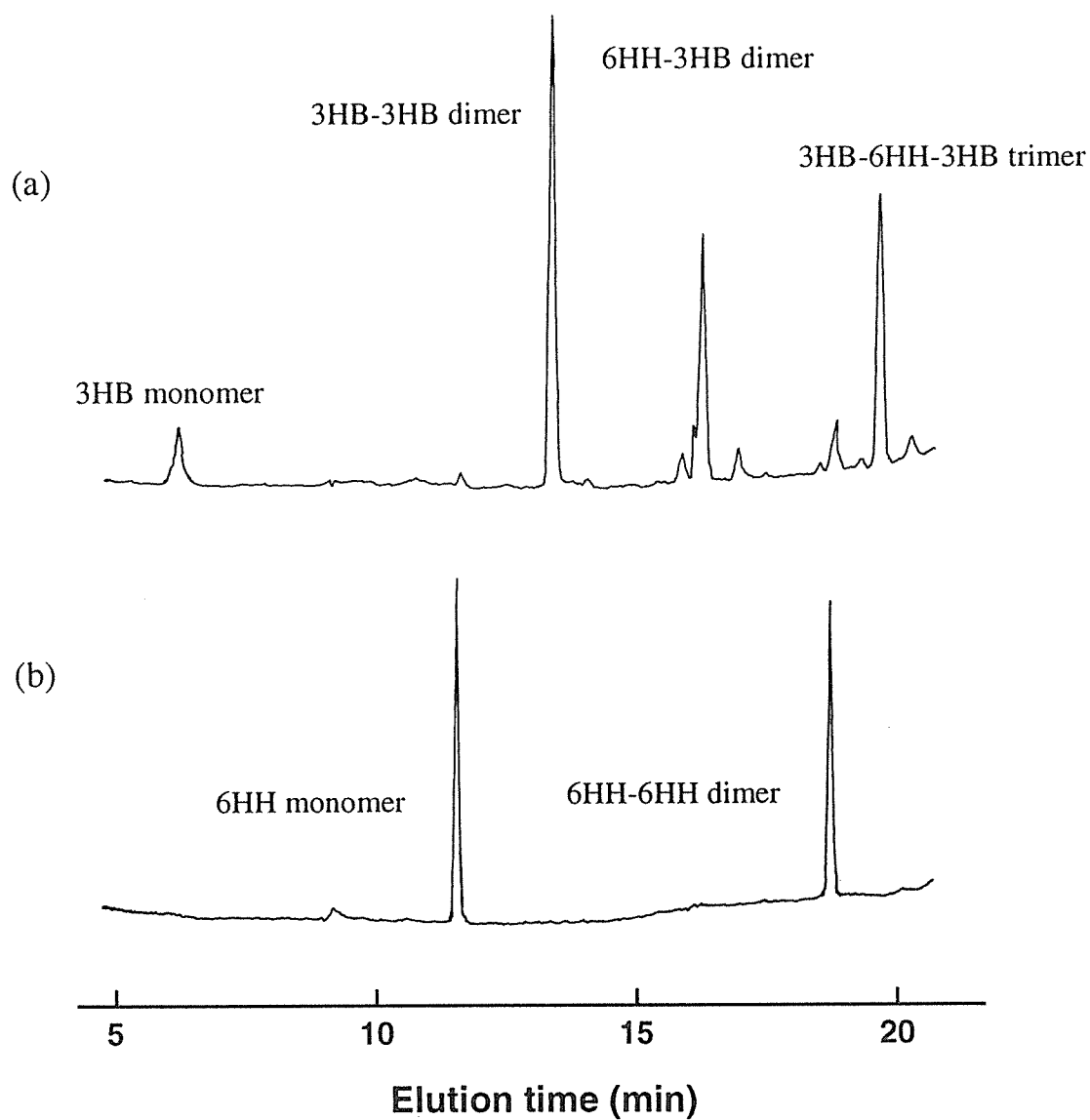


Figure 5-12 HPLC separations of water-soluble products after enzymatic degradations of (a) P[(*R*)-3HB-*co*-31mol%6HH] film with PHB depolymerase and (b) P[(*R*)-3HB-*co*-81mol%6HH] film with lipase at 25°C.

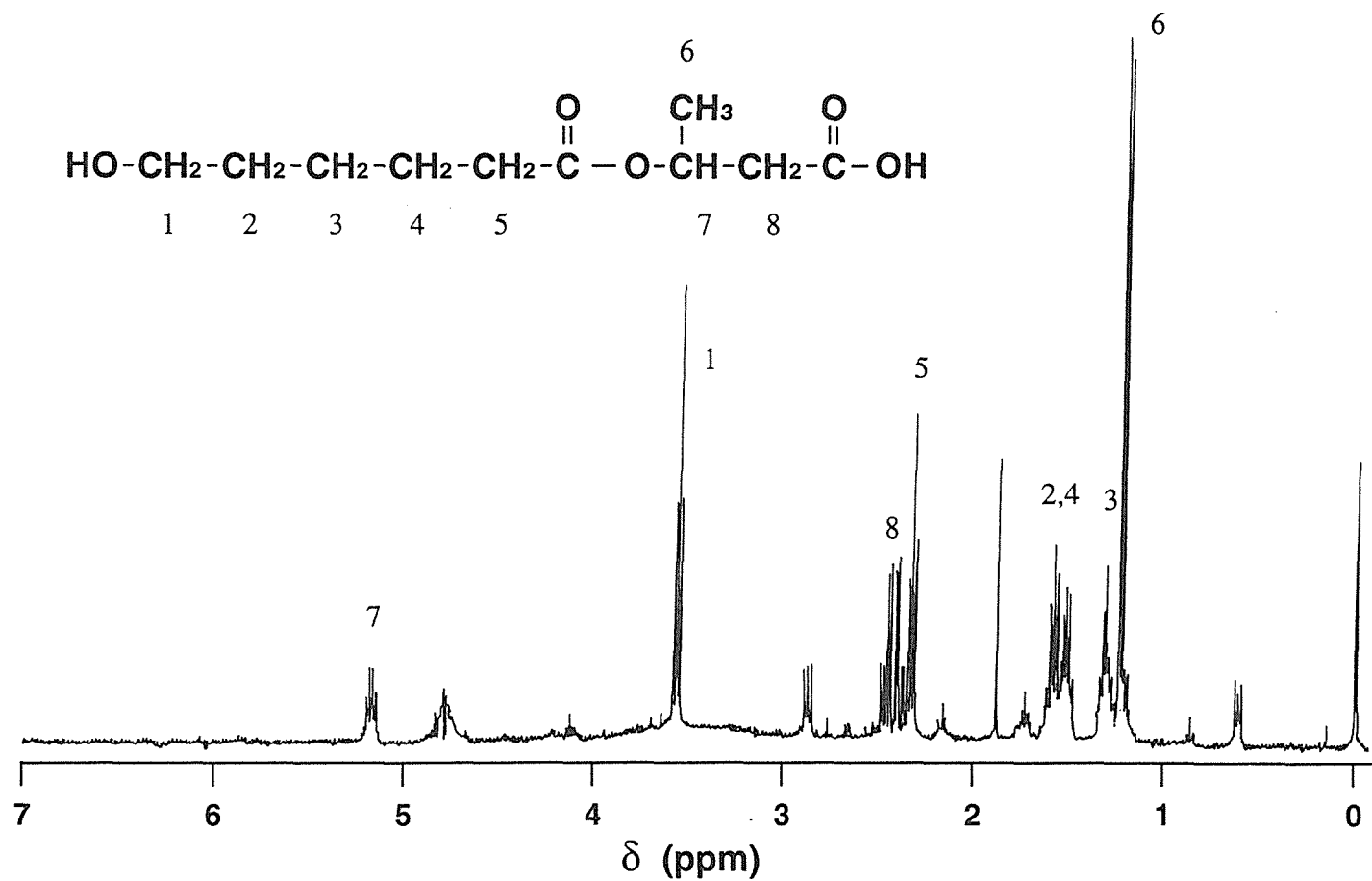


Figure 5-13 400-MHz ^1H -NMR spectrum in D_2O of 6HH-(*R*)-3HB dimer obtained by HPLC separation of water-soluble products after enzymatic degradation of P[(*R*)-3HB-*co*-31mol%6HH] film.

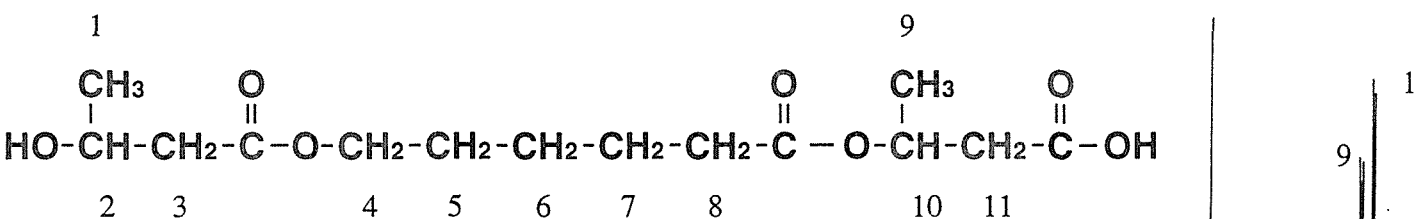


Figure 5-14

ン炭素に結合したエステル結合を切断するだけでなく、6HHユニットのメチレン炭素に結合したエステル結合も切断することが明らかとなった。Figure 5-12(a)において、6HHモノマーと6HH-6HHダイマーに由来するピークは認められなかった。したがって、6HH-6HH連鎖のエステル結合はPHBデポリメラーゼによって切断されないと考えられる。

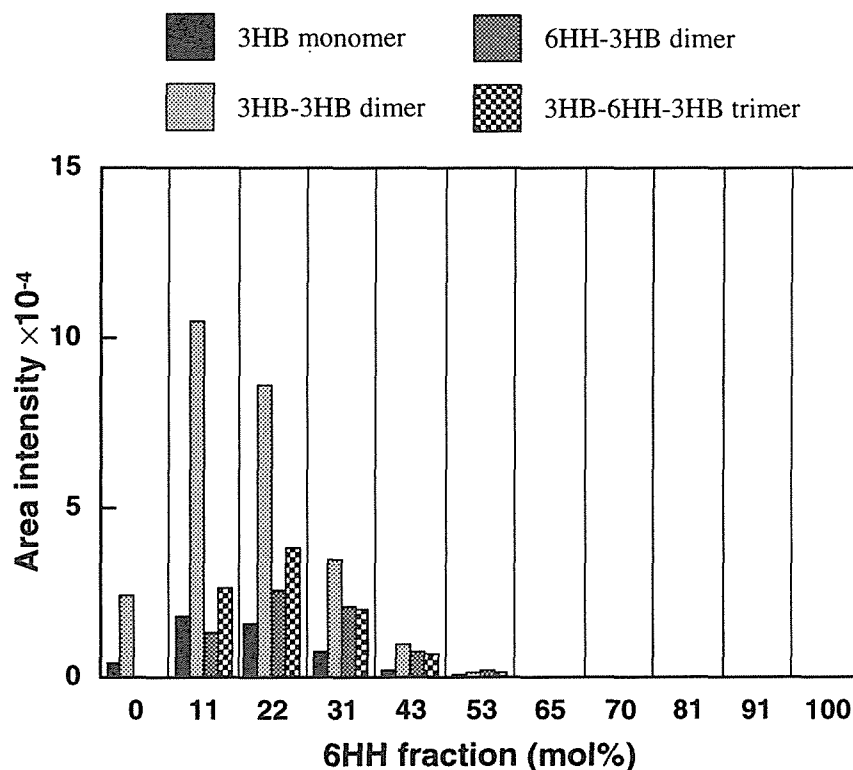


Figure 5-15 Distributions of water-soluble products after enzymatic degradation of P[(R)-3HB-co-6HH] films by PHB depolymerase from *A. faecalis* for 5 h at 25°C.

また、Figure 5-12(a)において3HB-6HHダイマーに由来するピークも観測されなかった。つまり、PHBデポリメラーゼは3HB-6HH連鎖のエステル結合を加水分解できることを示している。

Figure 5-15には、各P[(R)-3HB-co-6HH]サンプルを3時間酵素分解して得られた分解生成物の分布を、HPLCチャートのピーク面積値で比較したものを示してある。Figure 5-15から、ポリマー鎖中の6HHユニット分率が増加するにしたがって、分解生成物中の6HH-3HBダイマーおよび3HB-6HH-3HBトライマーの割合が増加することがわかった。

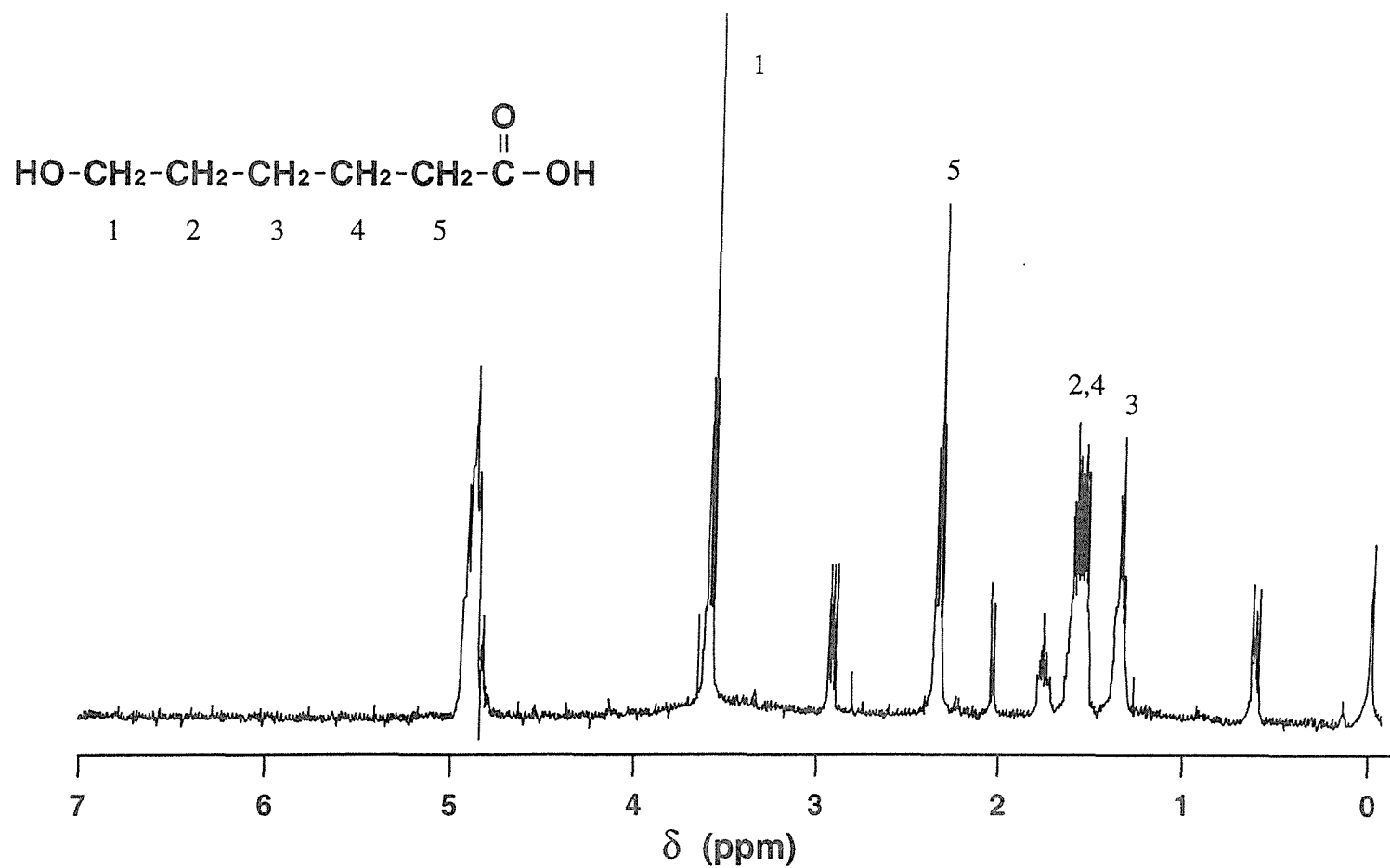


Figure 5-16 400-MHz ^1H -NMR spectrum in D_2O of 6HH monomer obtained by HPLC separation of water-soluble products after enzymatic degradation of $\text{P}[(R)\text{-3HB-co-81mol\%6HH}]$ film.

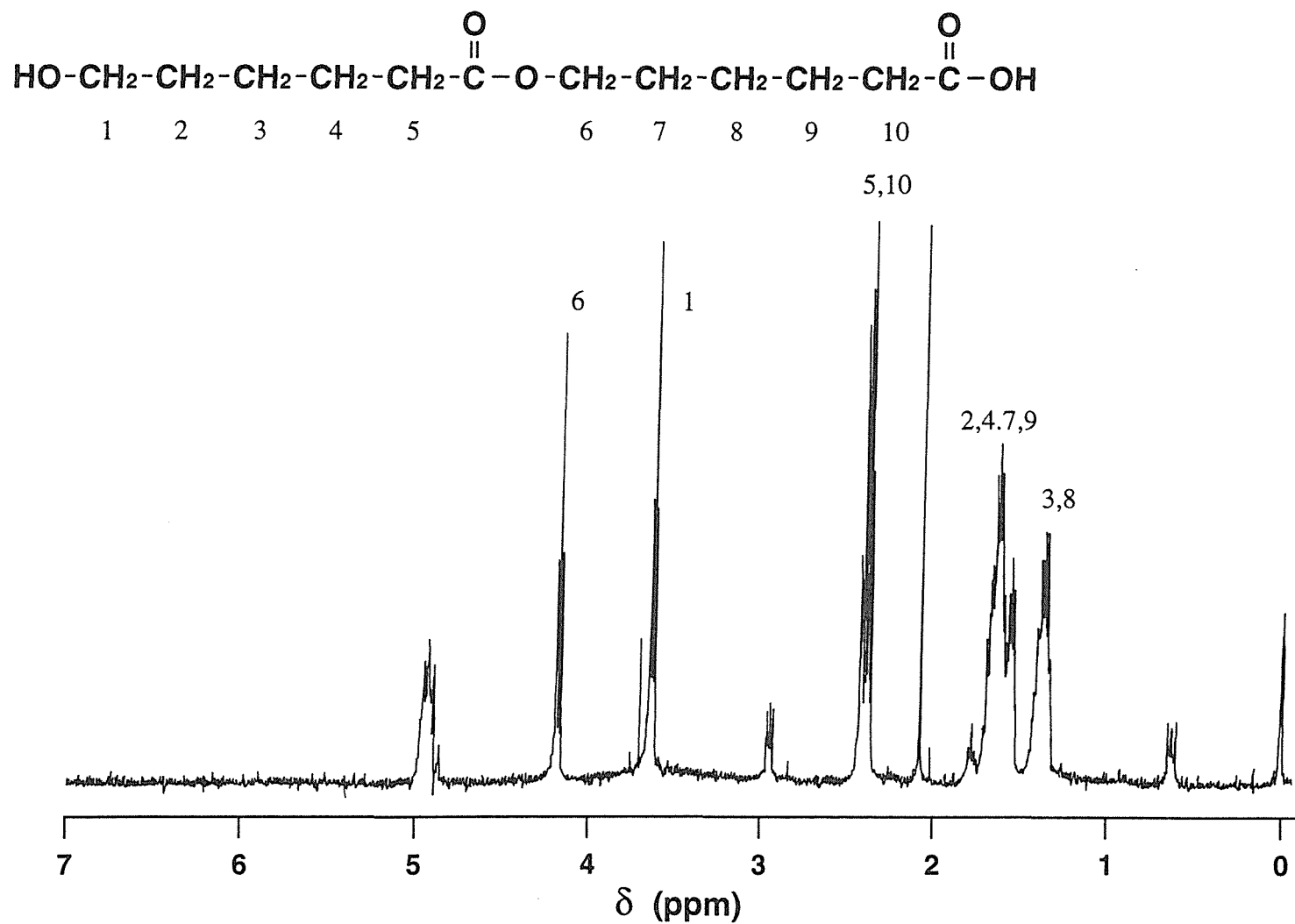


Figure 5-17 400-MHz ^1H -NMR spectrum in D_2O of 6HH-6HH dimer obtained by HPLC separation of water-soluble products after enzymatic degradation of $\text{P}[(R)\text{-}3\text{HB-co-}81\text{mol}\%6\text{HH}]$ film.

(2) *R. delemar*のリパーゼを用いた場合の分解生成物

*R. delemar*のリパーゼを用いたP[(*R*)-3HB-co-6HH]フィルムの酵素分解反応によって生成する水溶性の分解生成物をHPLCを用いて分析した。

Figure 5-12(b)には、P[(*R*)-3HB-co-91mol%6HH]共重合体を19時間酵素分解した際に得られる分解生成物のHPLCの溶出曲線をピークの帰属とともに示してある。各分解生成物を分取し¹H-NMRによって分析した結果、それぞれ6HHモノマー ($t_r=11.7\text{min}$)、6HH-6HHダイマー ($t_r=18.9\text{min}$) であることがわかった。トライマー以上のオリゴマー由来のピークは帰属するまでには至らなかった。Figure 5-16には6HHモノマー、Figure 5-17には6HH-6HHダイマーの¹H-NMRスペクトルを示してある。Figure 5-12(b), 5-16および5-17から、分解生成物のヒドロキシル基末端側のモノマーユニットは6HHユニットのみであることが確認された。つまり、*R. delemar*のリパーゼは、6HHユニットのメチン炭素に結合したエステル基のみを切断することがわかった。Figure 5-18には、各P[(*R*)-3HB-co-6HH]サンプルを19時間酵素分解して得られた分解生成物の分布を、HPLCチャートのピーク面積値で比較したものを示してある。共重合組成と酵素分解速度との相関性 (Figure 5-10) と共重合組成と分解生成物の生成量との相関性との間には、同じ傾向が認められた。

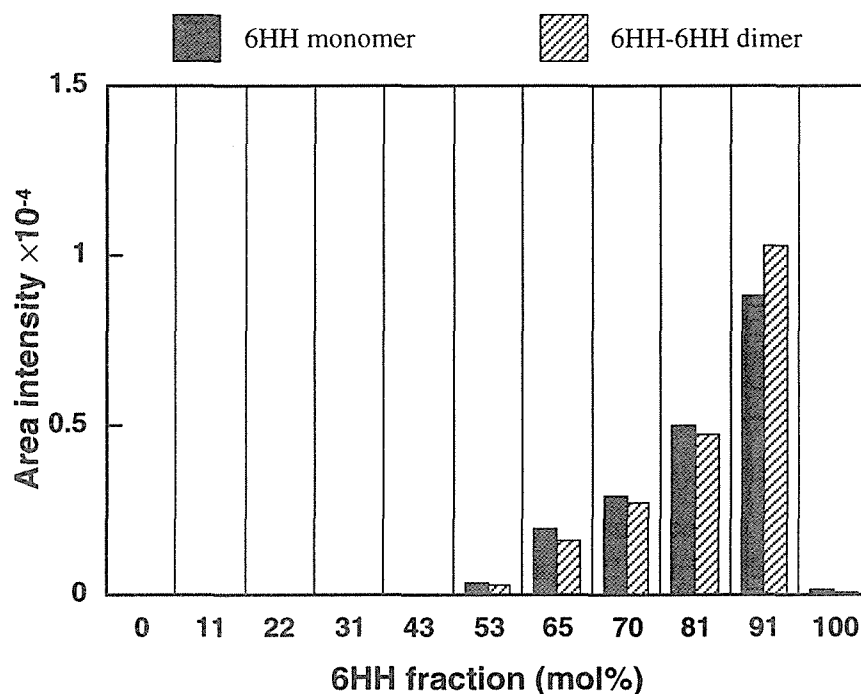


Figure 5-18 Distributions of water-soluble products after enzymatic degradation of P[(*R*)-3HB-co-6HH] films by lipase from *R. delemar* for 19 h at 25°C.

5-3-7 PHBデポリメラーゼによるポリマー鎖中のエステル結合の加水分解反応のメカニズム

ここでPHBデポリメラーゼによる共重合ポリエステルのエステル結合の加水分解反応のメカニズムについて考察する。前にも述べたように、PHBデポリメラーゼは、ポリエステルのポリマー鎖を*endo*型の切断様式で加水分解する。しかしながら、P[(R)-3HB]ホモポリマーを酵素加水分解した場合、生成する水溶性の分解生成物は、3HBのダイマーが大部分を占め、残りは3HBモノマーのみであった。このことは、PHBデポリメラーゼがポリマー鎖中のエステル結合を切断するにあたって、少なくとも3つのモノマーユニットを基質として認識していることを意味している。

Kanesawaら⁸⁾は、P[(R)-3HB-co-(R)-3HV]共重合体を*A. faecalis*由来のPHBデポリメラーゼを用いて分解したときの酵素分解生成物の解析を行った。その結果、分解生成物として3HBモノマー、3HVモノマー、3HB-3HBダイマー、3HB-3HVダイマー、3HV-3HBダイマー、3HV-3HVダイマーが確認された。しかしながら、3HV-3HV連鎖のエステル結合を酵素加水分解する速度は、3HB-3HB連鎖のエステル結合を加水分解する速度に較べて非常に遅いものであった。

第四章では、*A. faecalis*のPHBデポリメラーゼを用いて、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の酵素分解試験を行い、その酵素分解生成物をHPLCおよびNMRで解析した。その結果、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の分解生成物には、3HBモノマー、3HB-3HBダイマー、3HB-3HHダイマー、および3HB-3HB-3HHトリマーが確認された。しかしながら、3HHモノマー、3HH-3HBダイマー、および3HH-3HHダイマーは生成されなかった。この結果より、PHBデポリメラーゼは3HB-3HH連鎖および3HH-3HH連鎖のエステル結合を加水分解できないことがわかった。

Doiら⁹⁾は、4種類の直鎖脂肪族ホモポリエステル、ポリ(3-ヒドロキシプロピオン酸) (P(3HP))、ポリ(4-ヒドロキシブタン酸) (P(4HB))、ポリ(5-ヒドロキシペンタン酸) (P(5HV))、およびポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸) (P(6HH))の酵素分解性を数種のPHBデポリメラーゼを用いて評価した。その結果、P(3HP)およびP(4HB)フィルムはすべてのPHBデポリメラーゼによって分解されたが、P(5HV)およびP(6HH)フィルムはすべてのPHBデポリメラーゼでまったく分解されないことがわかった。つまり、PHBデポリメラーゼは3HP-3HP連鎖および4HB-4HB連鎖のエステル結合は切断できるが、5HV-5HV連鎖および6HH-6HH連鎖のエステル結合は切断できないことを

示している。

本章では、P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の酵素分解性を調べ、その酵素分解生成物を解析した。その結果、PHBデポリメラーゼによる酵素分解反応では、分解生成物として3HBモノマー、3HB-3HBダイマー、6HH-3HBダイマー、および3HB-6HH-3HBトリマーが生成されることを明らかにした。しかし、6HHモノマー、3HB-6HHダイマー、および6HH-6HHダイマーは認められなかった。ここで興味深いことに、分解生成物中のカルボキシル基末端のモノマーユニットはすべて3HBユニットであり、ヒドロキシル基末端ユニットは3HBと6HHの両ユニットが確認された。つまり、PHBデポリメラーゼは3HB-6HH連鎖のエステル結合を切断できるが、6HH-3HB連鎖および6HH-6HH連鎖のエステル結合を切断できないことを示している。

これらの結果より、PHBデポリメラーゼによる共重合ポリエステルのエステル結合の酵素加水分解反応のモデルを提起する (Figure 5-19)。このモデルでは、PHBデポリメラーゼは基質として連続する少なくとも3つのモノマーユニットの構造を認識し、ヒドロキシル末端寄りのユニット (R_1) から二番目 (R_2) と三番目 (R_3) のユニットを連結するエステル結合を切断していると考えている。エステル結合の酵素加水分解速度は、この二番目 (R_2) と三番目 (R_3) のモノマーユニットの化学構造に強く依存する。PHBデポリメラーゼがヒドロキシル末端寄りのモノマーユニット (R_1) のカルボキシル基と作用することにより、酵素の活性部位が二番目 (R_2) と三番目 (R_3) のモノマーユニットを連結するエステル結合と反応 (加水分解反応) し易くするものと考えられる。つまり、PHBデポリメラーゼはポリマー鎖中の2つの隣り合ったエステル結合部分を認識して加水分解反応を行っているのであろう。そのため、隣り合うエステル結合間の距離、つまり、二番目のモノマーユニット (R_2) の主鎖炭素数がエステル結合の加水分解速度に大きく影響するのであろう。二番目のユニット (R_2) の主鎖炭素数は、3あるいは4に限られ、これより大きい場合 (例えば6HHユニット) には、酵素が2つのエステル結合を認識できず、その結果、加水分解反応が進行しないものと考えられる。一方、三番目のモノマーユニット (R_3) の化学構造は、PHBデポリメラーゼの活性部位のエステル結合部への接近し易さに大きく影響を与えていると考えられる。つまり、立体的にかさ高い側鎖を持つモノマーユニット (例えば(R)-3HHユニット) の場合、酵素の活性部位がエステル結合部に近づけず、その結果、エステル結合の酵素加水分解速度が低下するものと考えら

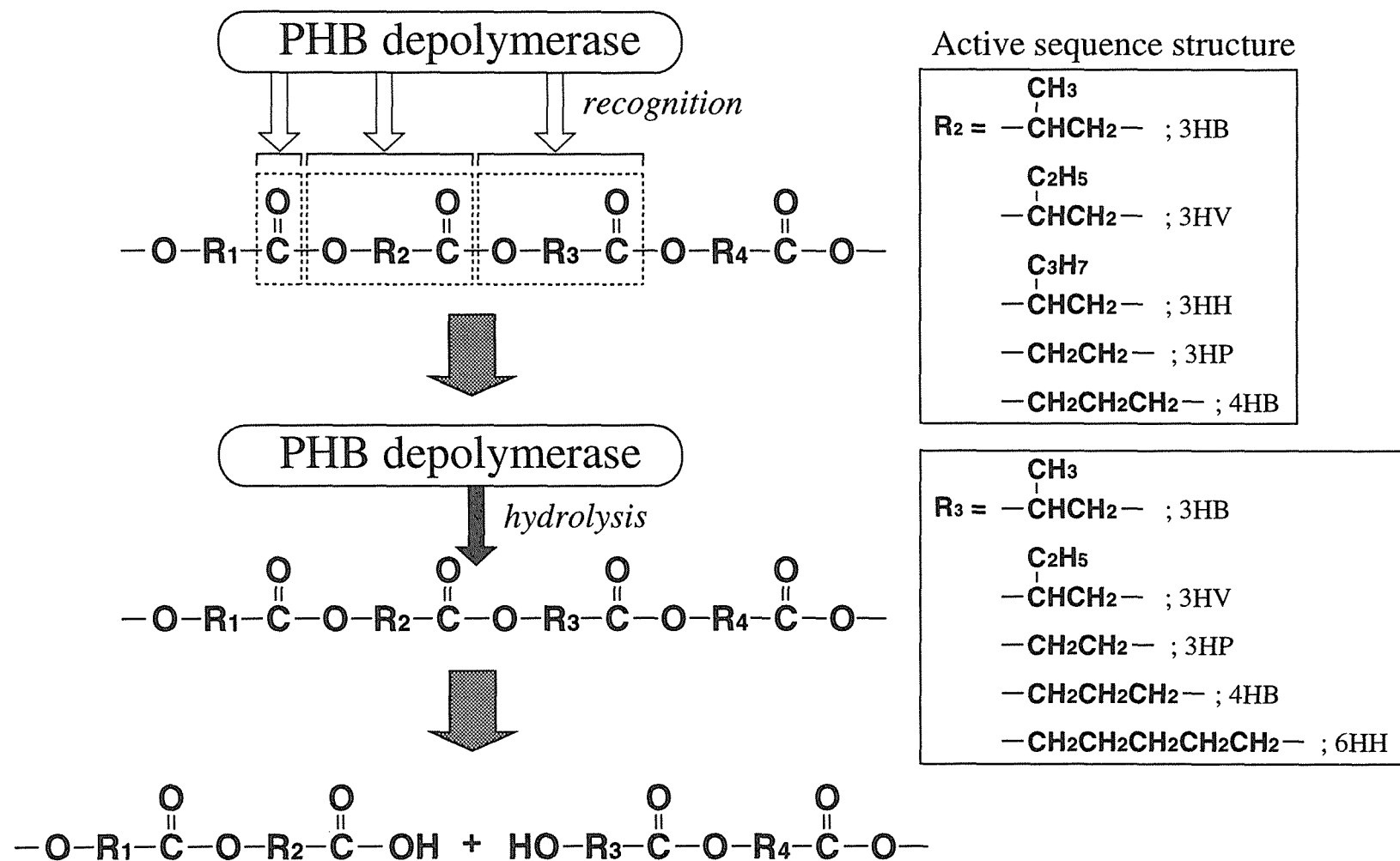


Figure 5-19 Schematic model for the enzymatic hydrolysis of an ester bond in various sequences by PHB depolymerase.

れる。また、微生物の合成する(R)体の3-ヒドロキシアルカン酸モノマーユニットと立体構造の異なる(S)体の3-ヒドロキシアルカン酸（例えば(S)-3HBユニット）の場合も同じく、その立体構造の違いによって酵素の活性部位がエステル結合部に接近できず、その結果、エステル結合部を切断できないものと考えられる。

5-3-8 P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の環境水中での生分解性

P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の自然環境水中での分解性の評価をBOD試験装置を用いて行った。試験水として荒川から採取した河川水を使用し、好氣的条件下、25℃で分解試験を行った。

Figure 5-20には、P[(R)-3HB]フィルム、P[(R)-3HB-co-31mol%6HH]フィルム、P[(R)-3HB-co-81mol%6HH]フィルムおよびP(6HH)フィルムを荒川水を用いて分解試験を行ったときのBOD生分解度の経時変化を示してある。P[(R)-3HB]ホモポリマーフィルムおよびP(6HH)ホモポリマーフィルムのBOD生分解度は時間とともに増加し、28日間で約80%のBOD生分解度が認められた。P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体フィルムのBOD生分解度の増加速度は、P[(R)-3HB]ホモポリマーおよびP(6HH)ホモポリマーのフィルムのBOD生分解度の増加速度よりも大きく、14日間で約80%のBOD生分解度に達した。これらの結果より、BOD生分解試験によるP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体フィルムの生分解性の傾向は、PHBデポリメラーゼあるいはリパーゼを用いた酵素分解試験によるP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体フィルムの分解速度の傾向とよく一致していることがわかった。

Table 5-5には、分解試験28日後におけるP[(R)-3HB-co-6HH]共重合体フィルムの重量生分解度、BOD生分解度および分解試験前後の試験水中の溶存有機炭素濃度(DOC)を示してある。P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体フィルムの重量生分解度は28日間の分解試験ですべて100%に達した。また、試験水中のDOCの値は、28日間の分解試験中に10.4から3.9-6.7mgC/Lまで低下することがわかった。この結果は、P[(R)-3HB-co-6HH]ポリマー鎖が河川水中に存在する微生物の分泌するPHBデポリメラーゼおよびリパーゼによって水溶性の分解生成物まで分解され、その分解生成物の大半が微生物の活動エネルギーや菌体成分合成に利用され河川水中には存在していないことを示している。また、P[(R)-3HB-co-6HH]フィルムの重量生分解度とBOD生分解度との間には、20-30%の違いが認められる。これは、P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体

の分解生成物が微生物の活動エネルギーとして利用されるだけでなく、微生物の増殖によるバイオマス形成としても利用されていることを示している。

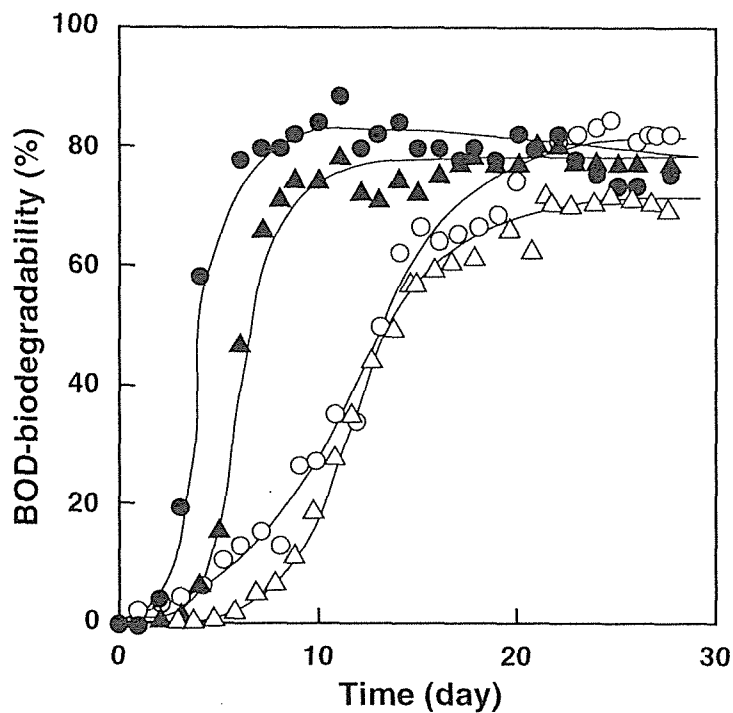


Figure 5-20 BOD-biodegradation curves of P[(R)-3HB-co-6HH] films in the river water at 25°C. (○) P[(R)-3HB], (●) P[(R)-3HB-co-31mol%6HH], (▲) P[(R)-3HB-co-81mol%6HH], (△) P(6HH).

Table 5-5. Weight-loss-biodegradabilities and BOD-biodegradabilities of P[(R)-3HB-co-6HH] copolymer films and changes in DOC values of test solution (the river Arakawa water) for 28 days at 25°C.

sample	weight-loss-biodegradability, %	BOD-biodegradability, %	DOC, mgC/L	
			initial	final
P[(R)-3HB]	100±0	75±8	10.5	5.2±1.2
P[(R)-3HB-co-31mol%6HH]	100	76	10.4	4.0
P[(R)-3HB-co-81mol%6HH]	100±0	74±6	10.4	4.1±0.1
P(6HH)	100±0	72±5	10.4	4.9±0.2

5-4 結論

本章では、(R)-3HBユニットと6HHユニットとの共重合ポリエステルを化学合成法により調製し、その物理的性質と生分解性について調べた。その結果をもとに、本章の結論を以下にまとめて示す。

(1) Sn触媒を用いて β -BLと ϵ -CLとの混合比を変化させて開環重合を行うことによって、(R)-3HBユニットと6HHユニットとが統計的にランダムに結合したランダム共重合体の調製に成功した。

(2) P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の物理的性質は、共重合組成に依存して大きく変化することがわかった。

(3) P[(R)-3HB-co-6HH]共重合体の酵素分解性は、共重合組成と酵素の種類によって大きく変化することがわかった。PHBデポリメラーゼによる分解試験の場合、少量の6HHユニットが導入されることによって分解速度はP[(R)-3HB]ホモポリマーに較べて著しく増加した。一方、リパーゼによる分解試験の場合、少量の(R)-3HBユニットが導入されることによって分解速度はP(6HH)ホモポリマーに較べて著しく増加することがわかった。

(4) 酵素分解によって生成した分解生成物の解析より、PHBデポリメラーゼはポリマー鎖中の少なくとも3つの連続するモノマーユニットを認識し、ヒドロキシル末端よりのモノマーユニットから数えて2番目と3番目のモノマーユニットを連結するエステル結合を切断することが明らかになった。また、PHBデポリメラーゼの基質認識には、2番目のモノマーユニットの主鎖構造と3番目のモノマーユニットの側鎖構造が強く影響を与えていることがわかった。

(5) P[(R)-3HB-co-6HH]フィルムを自然環境水中で分解した場合、共重合体フィルムは、P[(R)-3HB]フィルムならびにP(6HH)フィルムよりも速く分解された。また、28日間の分解試験後において、分解生成物は環境中の微生物によって資化され環境水中には残存していないことを明らかにした。

References

- (1) Doi, Y. *Microbial Polyesters*; VCH Publishers: New York, **1990**.
- (2) Doi, Y.; Kanesawa, Y.; Kunioka, M.; Saito, T. *Macromolecules* **1990**, *23*, 26.
- (3) Shimamura, E.; Scandola, M.; Doi, Y. *Macromolecules* **1994**, *27*, 4429.
- (4) Nakamura, S.; Doi, Y.; Scandola, M. *Macromolecules* **1992**, *25*, 4237.
- (5) Tokiwa, Y.; Suzuki, T. *Nature* **1977**, *270*, 76.
- (6) Shirakura, Y.; Fukui, T.; Saito, T.; Okamoto, Y.; Narikawa, T.; Koide, K.; Tomita, K.; Takemasa, T.; Masamune, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *880*, 46.
- (7) Kumagai, Y.; Kanesawa, Y.; Doi, Y. *Makromol. Chem.* **1992**, *193*, 53.
- (8) Kanesawa, Y.; Tanahashi, N.; Doi, Y.; Saito, T. *Polym. Degrad. Stab.*, **1994**, *45*, 179.
- (9) Doi, Y.; Mukai, K.; Kasuya, K.; Yamada, K. *Biodegradable Plastics and Polymers*; Doi, Y., et al. Eds.; Elsevier: Amsterdam, **1994**; p39.

第六章

ポリ[(*R,S*)-3-ヒドロキシブタン酸]—
ポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸)ブロック
共重合体の合成と相溶化剤への応用

6-1 緒言

多くの微生物は、(R)体の3-ヒドロキシブタン酸を構成単位とする高分子量のポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB]) を生合成し、それをエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積している^{1,2)}。P[(R)-3HB]は、生分解性という特性を持つ高結晶性の熱可塑性樹脂であり^{3,4)}、農業、漁業、環境保全あるいは医療など多くの分野でその応用が期待されている⁵⁾。しかし、P[(R)-3HB]の成形品は、機械的物性において堅くて脆いという欠点を有しているために、実用化には至っていない。P[(R)-3HB]の堅くて脆いという物性上の欠点を改善する試みとして、P[(R)-3HB]に異なる化学構造のモノマーユニットを導入した共重合ポリエステルの合成やP[(R)-3HB]に異なる性質を持つポリマーをブレンドする手法が検討されている。

第二章、第四章および第五章では、(R)-3HBユニットと異なる構造を持つモノマーユニットを導入したポリエステルを合成し、その構造と物理的性質および生分解性について調べた。その結果、(R)-3HBユニットを含むポリエステルの物理的性質および生分解性におよぼす第二モノマーユニットの構造効果を明らかにし、生分解性ポリエステルの分子設計法を構築する上で有用な情報を得ることに成功した。

また、第三章では、微生物産生P[(R)-3HB]と化学合成P[(R,S)-3HB]との二成分混合系を調製し、その固体構造と物理的性質および生分解性について調べた。その結果、微生物産生P[(R)-3HB]と化学合成P[(R,S)-3HB]とのポリマーブレンドは、二成分ポリマーが分子レベルで均一に混和する相溶なブレンド系であることが明らかになった。また、ポリエステルフィルムの酵素分解反応には、フィルム表面のモルホロジーが大きく影響しており、完全非晶質なアタクチック構造のP[(R,S)-3HB]はそれ単体では酵素によって加水分解されないが、微生物産生P[(R)-3HB]に混和させることによって酵素分解されることを明らかにした。

将来的に、生分解性高分子材料の開発が進むにつれて様々な分野での利用が検討され、多種にわたる機能を有した材料が必要とされるであろう。ポリマーブレンドによる材料設計法は、その要求を解決できる一つの手法であると考えられる。ポリマーブレンドにおいて、その物理的性質の制御には、ポリマーブレンドの相溶性 (miscibility) あるいは相容性 (compatibility) が大きく寄与している。つまり、ポリマーブレンドの物理的性質の多様化には、各ポリマー成分間で良い混和性が存在す

る必要がある。

われわれが考える理想的な生分解性高分子材料とは、使用している間は優れた性能を持続的に発揮し、廃棄後は微生物によって完全に分解され自然界の炭素サイクルに組み込まれる素材である。つまり、理想的な生分解性ポリマーブレンドの条件として、各成分ポリマーが生分解性を持つことが必要とされる。しかしながら、生分解性を有するポリマー同士で良い混和性を保持する組み合わせは、非常に限られているのが現状である。そこで、本章では、各ポリマー成分間の混和性が乏しい生分解性ポリマーの混合系を生分解性高分子材料として利用するための材料設計法について検討する。

Kumagaiら⁶⁾は、微生物産生P[(R)-3HB]と生分解性の汎用高分子であるポリ(6-ヒドロキシヘキサノ酸) (P(6HH)) を混ぜたポリマーブレンドを作製し、その物性および酵素分解速度について調べた。P[(R)-3HB]とP(6HH)のポリマーブレンドは、各ポリマーが分子レベルで混和しないため、ポリマー成分間での相互作用が働かない、いわゆる非相溶 (immiscible) なポリマーブレンドであることを明らかにし、単にP[(R)-3HB]とP(6HH)をブレンドしただけでは、P[(R)-3HB]の物性上の欠点を改善することはできないことを示した。

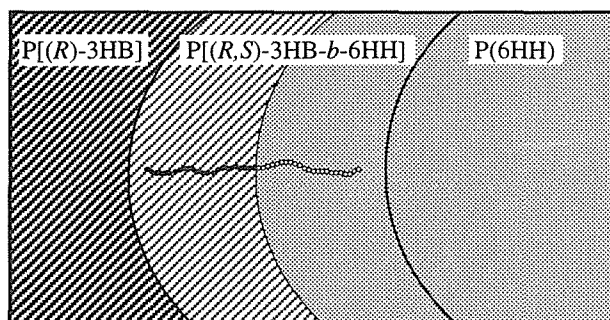
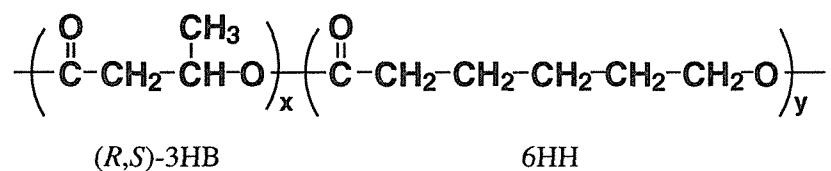
非相溶なブレンド系において、相溶化剤を添加することによって物性を改善する方法がある。この手法は、相溶化剤を混和させることによって、非相溶なポリマー両成分間の接着力を高めようとするものである。相溶化剤としては、それぞれのポリマー成分そのもののブロック共重合体やグラフト共重合体、あるいはそれぞれのポリマー成分と強い親和力を持つポリマーによるブロック共重合体やグラフト共重合体が用いられる。

本章では、混和性が乏しい生分解性高分子の混合系を生分解性高分子素材として利用するための材料設計法の一つとして相溶化剤の利用を検討し、非相溶なP[(R)-3HB]/P(6HH)ポリマーブレンドの相溶化剤を分子設計し、合成することを試みた。

前述したように、微生物産生P[(R)-3HB]とラセミ体の(R,S)-β-ブチロラク톤の開環重合より得られるアタクチック構造のP[(R,S)-3HB]とのポリマーブレンドは相溶なブレンド系であり、P[(R)-3HB]の非晶部においてP[(R)-3HB]とP[(R,S)-3HB]が分子レベルで混和する。本研究では、非相溶なブレンド系であるP[(R)-3HB]/P(6HH)ポリマーブレンドの相溶化剤として、アタクチック構造のP[(R,S)-3HB]とP(6HH)のブロッ

ク共重合体を選択し、まず、このブロック共重合体を化学合成する。得られたブロック共重合体を、非相溶なブレンド系であるP[(R)-3HB]/P(6HH)ポリマーブレンドに種々の割合で添加し、その相溶化剤としての効果を調べる。また、ブロック共重合体を添加したブレンドフィルムの酵素分解性をPHBデポリメラーゼを用いた酵素分解試験により調べ、酵素分解性におよぼすブロック共重合体の添加効果を調べる。

Poly[(*R,S*)-3-hydroxybutyric acid-*b*-6-hydroxyhexanoic acid]



6-2 実験

6-2-1 試薬

(1) (R,S)- β -ブチロラクトン ((R,S)- β -BL)

東京化成(株)製、特級品を水素化カルシウム(和光純薬工業(株)製、特級品)で1日乾燥し、窒素雰囲気下で減圧蒸留(9mmHg、49-50℃)を行って使用した。

(2) ϵ -カプロラクトン (ϵ -CL)

東京化成(株)製、特級品を水素化カルシウム(和光純薬工業(株)製、特級品)で1日乾燥し、窒素雰囲気下で減圧蒸留(10mmHg、96-98℃)を行って使用した。

(3) ジエチル亜鉛 (ZnEt_2)

東ソー・アクゾー(株)製を1,4-ジオキサンにて亜鉛量で1Mになるように希釈して使用した。

(4) ポリメチルアルミノキサン

東ソー・アクゾー(株)製のものをそのまま使用した。

(5) ジクロロメタン

和光純薬工業(株)製、特級品に水素化カルシウムを加えて、1日窒素雰囲気下で還流した後に、蒸留して使用した。

(6) 1,4-ジオキサン

和光純薬工業(株)製、特級品1Lに濃塩酸14mLと蒸留水100mLを加えて、窒素を流しながら10時間還流した。冷却後、分液ロートに移し、ゆっくり水酸化カリウムを加えて水酸化カリウムが溶けなくなるまで振り、水相を分けた後にデカンテーションでジオキサンを取り出した。更に、新しい水酸化カリウムを加えて脱水した後に、別のフラスコに移し、金属ナトリウムとベンゾフェノンの存在下で青色になるまで還流した後、蒸留して使用した。

(7) トルエン

和光純薬工業(株)製、特級品に水素化カルシウムを加えて、1日窒素雰囲気下で還流した後に、蒸留して使用した。

(8) $\text{ZnEt}_2/\text{H}_2\text{O}$ 触媒の調製

窒素置換した100mLシュレンクフラスコに窒素気流下で1Mの ZnEt_2 /1,4-ジオキサン50mLを入れ、5℃に冷却した。次に、窒素置換した均圧ライン付きの滴下ロートに、

1,4-ジオキサン30mLおよび脱気した蒸留水0.54mLを入れ、シュレンクフラスコに攪拌しながら5℃で1時間かけて加えた。更に5時間室温で攪拌して反応を完結させた。反応終了後、反応液を凍結乾燥し、その後、室温で10時間減圧乾燥を行ってZnEt₂/H₂O触媒を調製した。調製した触媒のZn量を原子吸光で分析したところ、Zn量は 6.7×10^{-3} mol/gであった。

6-2-2 ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB]) の合成

第二章と同様の手法により微生物合成した。

6-2-3 ポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸) (P(6HH)) の合成

第五章と同様の手法により化学合成した。

6-2-4 ポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸]-ポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸)ブロック共重合体 (P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]) の合成

P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]の合成は、ZnEt₂/H₂O触媒を用いて(R,S)-β-ブチロラクトン((R,S)-β-BL)の開環重合を行った後に、ε-カプロラクトン(ε-CL)を加え重合を継続する、逐次添加開環リビング重合法によって行った。窒素置換した50mLのシュレンクフラスコに窒素気流下で所定量のZnEt₂/H₂O触媒および所定量のジクロロメタンを仕込み0℃に冷却し、窒素気流下で所定量の(R,S)-β-BLを加え、60℃で5日間攪拌した。β-BLの反応が終了した後、ε-CLを加えて、40℃でさらに5日間重合を行った。冷却後、少量のメタノールを入れて反応を停止させた後、クロロホルムを加えて生成物を溶かし、約10倍量のメタノールで再沈させた後、恒量になるまで室温で減圧乾燥し、ポリマーを得た。

6-2-5 P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブレンドフィルムの作製

ブレンドフィルムは、所定量のP[(R)-3HB]、P(6HH)およびP[(R,S)-3HB-*b*-6HH]をクロロホルムに溶かし、2%(w/v)の溶液にし、ガラス製のシャーレを用いて、ソルベント-キャスト法により作製した。作製したフィルムを室温で恒量になるまで減圧乾燥し、安定した結晶状態にするために3週間室温で放置した。

6-2-6 ポリエステルの酵素分解実験

第二章と同じく、重量減少法によって試験した。

6-2-7 分析方法

(1) NMR測定

(2) GPC測定

(3) DSC測定

(4) 機械的特性の測定

(5) 走査型電子顕微鏡観察

(1) から (5) までの分析操作は、第二章と同じ方法で行った。

(6) 位相差光学顕微鏡観察

位相差用対物レンズおよび写真撮影装置付きの光学顕微鏡 (Nikon OPTIPHOTO-2、Nikon MICROFLEX AFX-DX) によりブレンドフィルムの撮影を行った。

6-3 結果および考察

6-3-1 ポリ[(*R,S*)-3-ヒドロキシブタン酸]–ポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸)ブロック共重合体 (P[(*R,S*)-3HB-*b*-6HH]) の合成

まず、ZnEt₂/H₂O触媒を用いて、60℃で5日間、(*R,S*)-β-ブチロラクトン ((*R,S*)-β-BL) の開環重合を行った。(*R,S*)-β-BLの反応が完全に終了した後、ε-カプロラクトン (ε-CL) を加えて40℃で5日間重合を行うことにより、P[(*R,S*)-3HB-*b*-6HH]を合成した。Table 6-1には、P[(*R,S*)-3HB-*b*-6HH]の重合結果を示してある。ポリマーの数平均分子量 (*M_n*) および多分散度 (*M_w*/*M_n*) は、GPC測定より算出した値である。また、Figure 6-1には、P[(*R,S*)-3HB]およびP[(*R,S*)-3HB-*b*-6HH]のGPC曲線を示してある。

Table 6-1. Molecular weights and polydispersities of P[(*R,S*)-3HB-*b*-6HH] block copolymers and P[(*R,S*)-3HB] prepolymers.

sample no.	P[(<i>R,S</i>)-3HB] ^a			P[(<i>R,S</i>)-3HB- <i>b</i> -6HH] ^b			polymer yield, %
	β-BL/Zn,	molecular weight ^c		ε-CL/Zn,	molecular weight ^c		
	mol/mol	<i>M</i> _n ×10 ⁻³	<i>M</i> _w / <i>M</i> _n	mol/mol	<i>M</i> _n ×10 ⁻³	<i>M</i> _w / <i>M</i> _n	
1	50	19.7	1.15	50	42.8	1.43	98
2	50	21.0	1.18	100	69.5	1.50	97
3	100	44.8	1.22	100	81.2	1.54	98

a) Polymerization conditions of (*R,S*)-β-BL: Zn(C₂H₅)₂/H₂O (1/0.6) = 0.09 g, (*R,S*)-β-BL/solvent (1,2-dichloroethane) = 0.05 (v/v), reaction temperature = 60℃, reaction time = 5 days.

b) Polymerization conditions of ε-CL: reaction temperature = 40℃, reaction time = 5 days.

c) Determined by GPC using polystyrene standards.

Figure 6-1より明らかなように、仕込条件の異なる逐次添加開環リビング重合法で得られた共重合体 (Sample 1,2) のGPC曲線は、第一段重合5日間で得られたP[(*R,S*)-3HB]に較べて高分子側にシフトしていることがわかる。さらに、得られた共重合体の*M_w*/*M_n*は1.4から1.5の間と、比較的狭い分子量分布を示すことより、このポリマーは(*R,S*)-3HB連鎖と6HH連鎖からなるブロック共重合体であることがわかる。

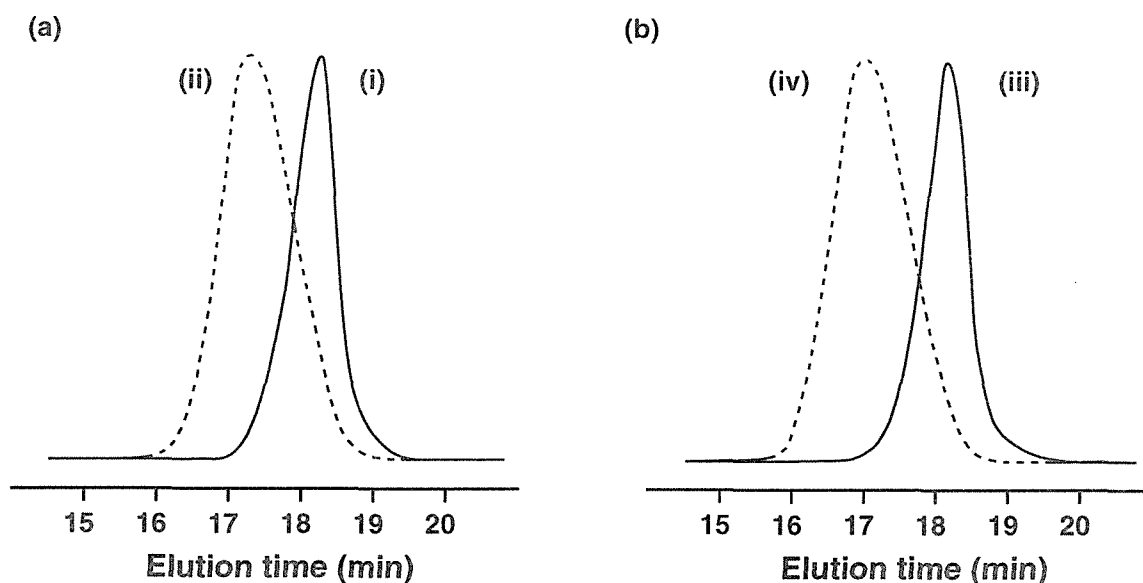


Figure 6-1 The GPC curves of P[(R,S)-3HB] prepolymers and P[(R,S)-3HB-*b*-6HH] block copolymers: (a) [sample 1] (i) P[(R,S)-3HB] ($M_n=19700$, $M_w/M_n=1.15$), (ii) P[(R,S)-3HB-*b*-6HH] ($M_n=42800$, $M_w/M_n=1.43$); (b) [sample 2] (iii) P[(R,S)-3HB] ($M_n=21000$, $M_w/M_n=1.18$), (iv) P[(R,S)-3HB-*b*-6HH] ($M_n=69500$, $M_w/M_n=1.50$).

Figure 6-2には、Sample 1より得られたブロック共重合体の ^{13}C -NMRスペクトル(a)とそのカルボニル炭素領域の拡大図(b)を示してある。Figure 6-2(a)の173.5ppmに観測されるピークは、6HH-6HHホモダイアッド連鎖に由来するピークである。また、169.1ppmと169.2ppmに観測されるピークは、それぞれ3HB-3HBホモダイアッド連鎖のイソタクチックダイアッド(*i*)とシンジオタクチックダイアッド(*s*)に由来するものである。さらに、Figure 6-2(a)には、3HB-6HHヘテロダイアッド連鎖に由来するピークは観測されなかった。このことは、ブロック共重合体合成中に、エステル交換反応が起こっていないことを示している。本研究で得られた共重合体は、P[(R,S)-3HB]とP(6HH)とのジブロック共重合体であることが実証できた。

次に、合成したブロック共重合体の熱的性質をDSC測定により調べた。P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブロック共重合体のDSC曲線をFigure 6-3に、また、DSC曲線より求めたガラス転移温度 (T_g)、融点 (T_m) および融解熱 (ΔH_m) をTable 6-2にまとめて示してある。

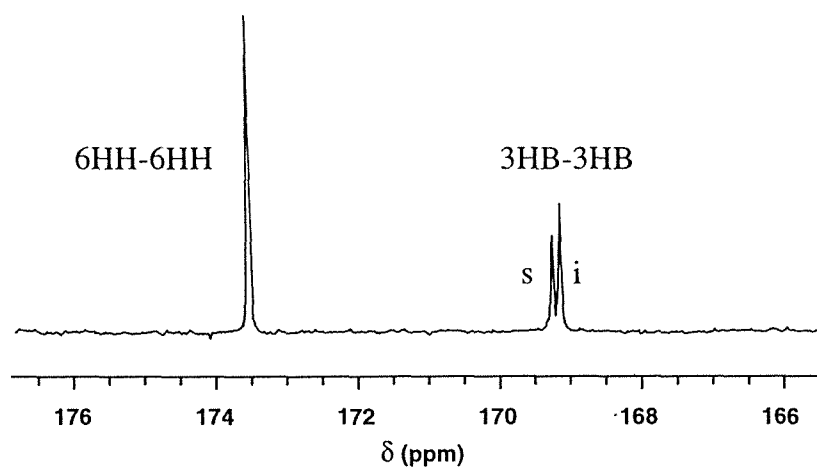
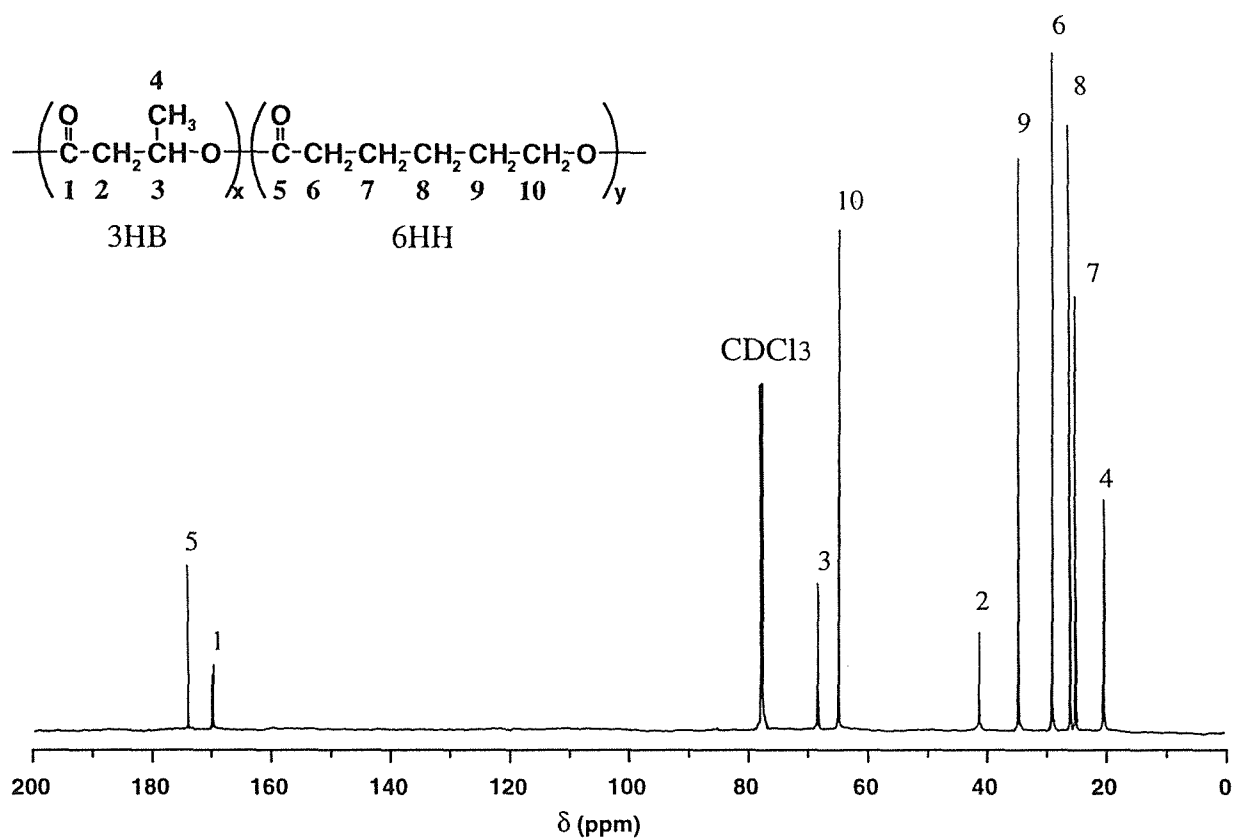


Figure 6-2 125-MHz ^{13}C -NMR spectrum of P[(R,S)-3HB-*b*-6HH] block copolymer (sample 1) and the carbonyl carbon resonance in ^{13}C -NMR spectrum.

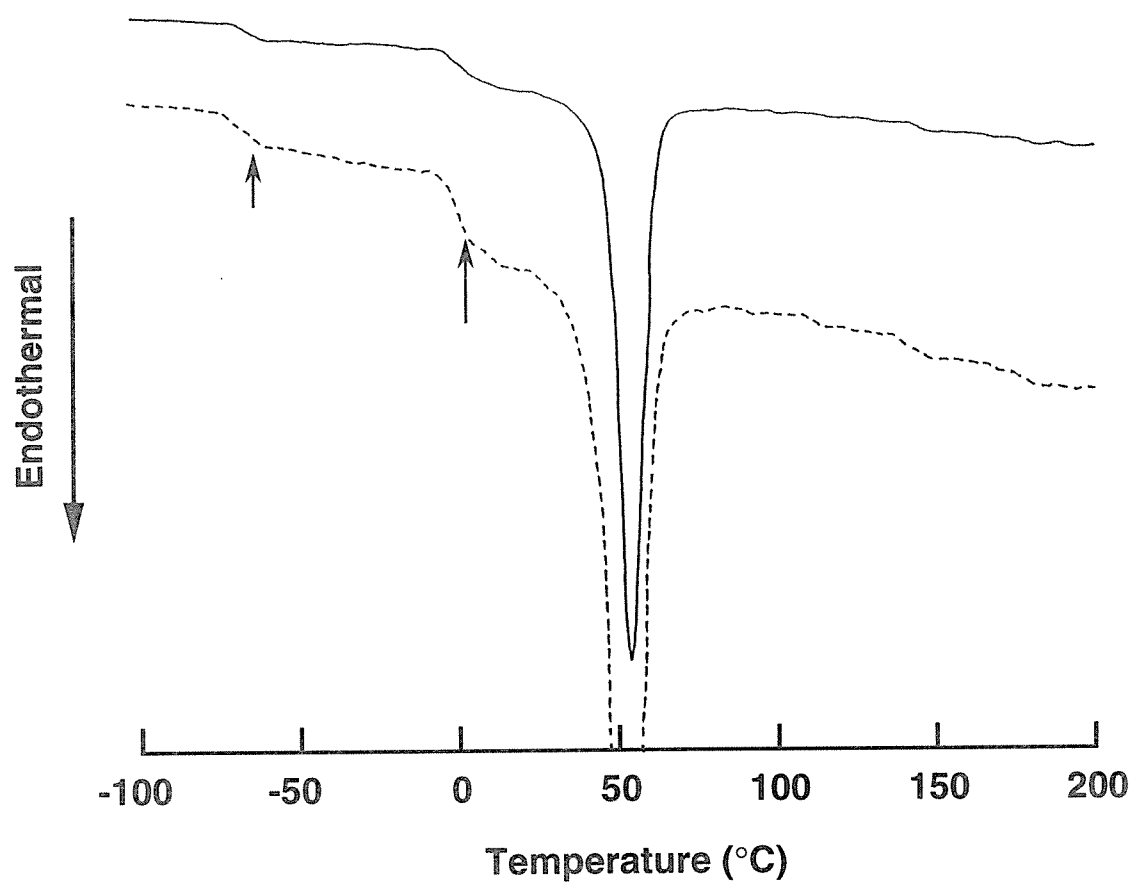


Figure 6-3 DSC curve of P[(*R,S*)-3HB-*b*-6HH] block copolymer (sample 1).

Table 6-2. Thermal properties of films of homopolymers, block copolymers, and their blends

sample	blend composition, wt. ratio	T_g , °C		P(3HB)		P(6HH)	
		P(3HB)	P(6HH)	T_m , °C	ΔH_m , J/g of P(3HB)	T_m , °C	ΔH_m , J/g of P(6HH)
P[(R)-3HB] ($M_n=650,000$, $M_w/M_n=1.8$)	-	4		178	91	-	-
P[(R,S)-3HB] ($M_n=20,000$, $M_w/M_n=1.1$)	-	3		-	0	-	-
P(6HH) ($M_n=59,000$, $M_w/M_n=1.5$)	-		-70	-	-	57	68
P[(R,S)-3HB- <i>b</i> -6HH] (sample 1)	-	2	-67	-	0	60	63
P[(R,S)-3HB- <i>b</i> -6HH] (sample 2)	-	4	n.d. ^b	-	0	61	73
P[(R,S)-3HB- <i>b</i> -6HH] (sample 3)	-	3	n.d.	-	0	61	65
P[(R)-3HB]/P(6HH)	75/25	4	n.d.	178	96	57	64
P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB- <i>b</i> -6HH] ^a	81/14/5	4	n.d.	178	94	57	60
	71/24/5	5	n.d.	178	98	57	53
	68/23/9	3	n.d.	177	96	57	55

a) Sample 1 in Table 1.

b) Not detected.

微生物産生P[(R)-3HB]は半結晶性のポリマーであり、融点 (T_m) とガラス転移温度 (T_g) はそれぞれ178°Cと4°Cである。一方、アタクチックP[(R,S)-3HB]は完全非晶質なポリマーであり、3°Cに T_g が存在する。また、P(6HH)ホモポリマーは、57°Cと-70°Cにそれぞれ T_m と T_g を示す。P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブロック共重合体のDSC曲線には、60°CにP(6HH)連鎖部分の融点 (T_m) のみが観測された。一方、ガラス転移温度 (T_g) は、-67°Cと2°CにそれぞれP(6HH)およびP[(R,S)-3HB]連鎖に由来する熱容量変化の中点がみられた。ブロック共重合体が2つの明瞭な T_g を示すことから、P(6HH)とP[(R,S)-3HB]はミクロ相分離をしていることがわかった。

6-3-2 ブレンドフィルムの表面および内部構造

得られたP[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブロック共重合体 (Sample 1) を用いて、P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブレンドフィルムをソルベント-キャスト法で作製した。そのブレンドフィルムの表面および内部構造を位相差光学顕微鏡を用いて観察した。Figure 6-4には、P[(R)-3HB]/P(6HH)=75/25(wt. ratio)およびP[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]=71/24/5(wt. ratio)ブレンドフィルムとP[(R)-3HB]ホモポリマーフィルムの光学顕微鏡写真を示してある。

Figure 6-4(a)に見られるように、P[(R)-3HB]/P(6HH)ブレンドフィルムがエマルジョン構造 (海島構造) を形成しており、主成分であるP[(R)-3HB]の連続相 (海) に、少量成分であるP(6HH)の分散相 (島) が分散している様子がよくわかる。この

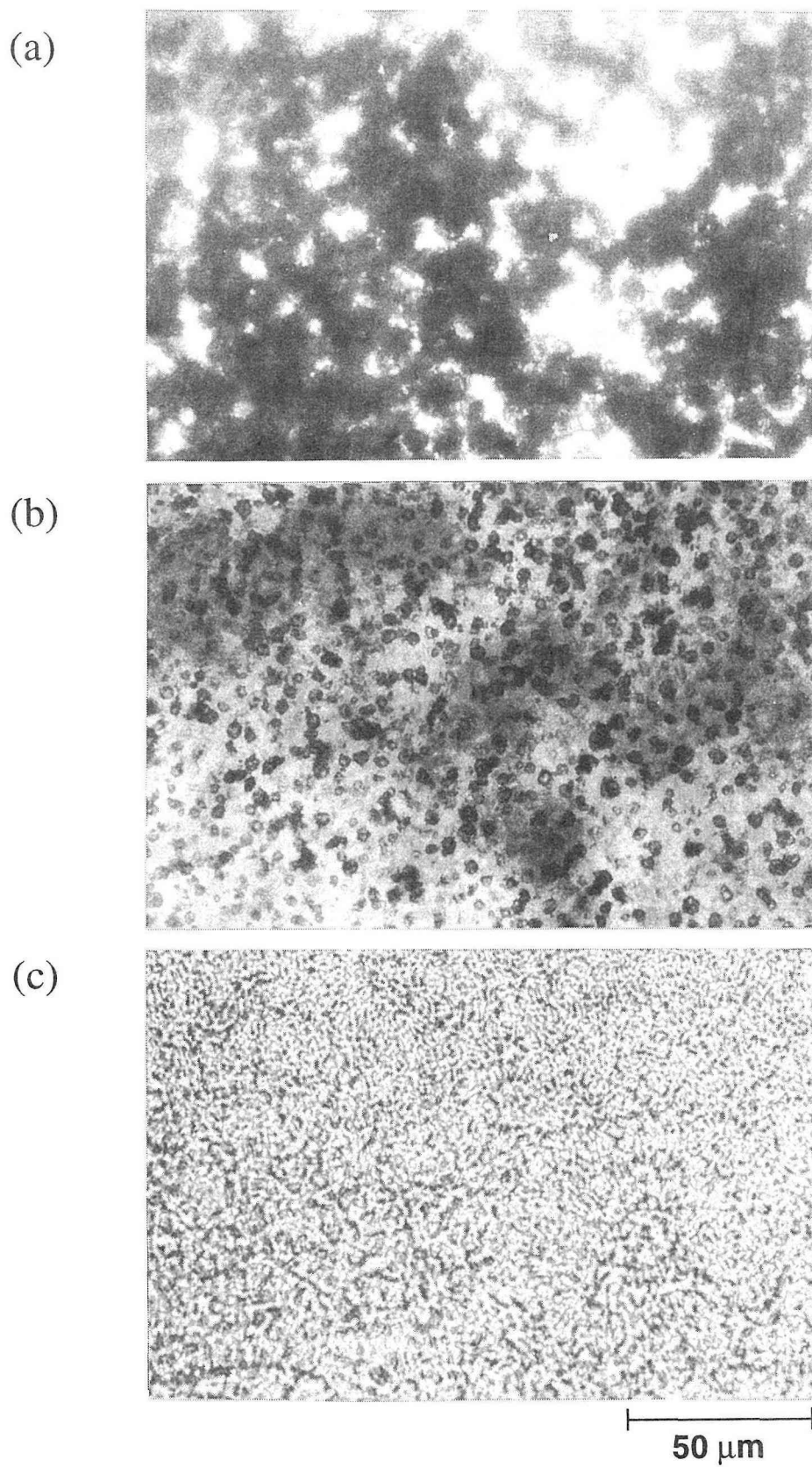


Figure 6-4 Phase-contrast optical micrographs of the solvent-cast blend films: (a) P[(*R*)-3HB]/P(6HH)=75/25 (wt ratio); (b) P[(*R*)-3HB]/P(6HH)/P[(*R,S*)-3HB-*b*-6HH]=71/24/5 (wt ratio); (c) P[(*R*)-3HB] homopolymer.

P(6HH)の分散相の大きさは、5～10 μ mであった。このような海島構造を形成するのは、P[(R)-3HB]とP(6HH)が分子レベルで混和せず2相に分離し、かつ、各ポリマー成分間で相互作用がほとんどないためである。

しかし、P[(R)-3HB]/P(6HH)ポリマーブレンドに少量のP[(R,S)-3HB-*b*-6HH]をブレンドしたフィルムの場合 (Figure 6-4(b))、P(6HH)の分散相の大きさは1～2 μ mであり、P[(R)-3HB]/P(6HH)ブレンドフィルムの場合に較べて明らかに小さくなっていることがわかる。これは、P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]を添加することによって、非相溶なP[(R)-3HB]/P(6HH)ブレンドの界面で、ブロック共重合体のP[(R,S)-3HB]成分およびP(6HH)成分がそれぞれP[(R)-3HB]およびP(6HH)の各ポリマーと相溶しているためと考えられる。

6-3-3 ブレンドフィルムの機械的性質

ブレンドフィルムの機械的特性を、引っ張り試験機を用いて測定した。Table 6-3には、様々な組成比で作製したP[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブレンドフィルムのヤング率、引っ張り強度および伸び率を示してある。

Table 6-3. Mechanical properties of blend films at 23°C

sample	blend composition, wt. ratio	Young's modulus, MPa	tensile strength, MPa	elongation to break, %
P[(R)-3HB]	-	1560	38	5
P[(R)-3HB]/P(6HH)	75/25	740	22	10
P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB- <i>b</i> -6HH] ^a	81/14/5	530	22	38
	71/24/5	340	17	62
	68/23/9	320	15	68

a) Sample 1 in Table 1.

P[(R)-3HB]/P(6HH)=(75/25)ブレンドフィルムの引っ張り強度および伸び率は、22MPaおよび10%であった。これは、P[(R)-3HB]とP(6HH)が非相溶なブレンド系であり、ブレンドフィルムが海島構造を形成し、かつ両ポリマー成分間に相互作用がほとんど存在しないためである。

しかし、5wt%のブロック共重合体 (Sample 1)をP[(R)-3HB]/P(6HH)=75/25(wt ratio)ポリマーブレンドに添加することによって、ブレンドフィルムの引っ張り強度は17MPaと余り低下せず、伸び率は62%と大幅に増大した。これは、P[(R,S)-3HB-*b*-

6HH]を加えることによって、非相溶なP[(R)-3HB]/P(6HH)ブレンドの界面で相互作用を生じ、その結果、P[(R)-3HB]とP(6HH)のポリマー成分間の接着性が増加したためであると考えられる。

以上の結果より、非相溶なP[(R)-3HB]/P(6HH)ポリマーブレンドに少量のP[(R,S)-3HB-*b*-6HH]を加えることによって、ブレンドフィルムの機械的性質が改善され、ブレンド組成を変化させることによって、様々な物性を持つブレンドフィルムを調製できることが明らかになった。

6-3-4 ブレンドフィルムの酵素分解速度

つぎに、ブレンドフィルムの酵素分解性におよぼすP[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブロック共重合体の添加効果を調べるために、PHBデポリメラーゼによる酵素分解試験を行った。P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブレンドフィルムの酵素分解実験は、*Alcaligenes faecalis*⁷⁾が菌体外に放出するPHBデポリメラーゼを用いて、0.1Mリン酸緩衝溶液 (pH7.4) 中、37.0±0.1℃で行った。Figure 6-5には、P[(R)-3HB]、P(6HH)、P[(R)-3HB]/P(6HH)=75/25(wt. ratio)ポリマーブレンドおよびP[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]=71/24/5(wt ratio)ポリマーブレンドのフィルムの酵素分解による重量減少量の経時変化を示してある。

P[(R)-3HB]フィルムの重量減少は、時間に対して直線的に増加し、12時間後で2.27mgの重量減少がみられた。また、P(6HH)フィルムは、PHBデポリメラーゼによって分解されず、重量減少は認められなかった。一方、P[(R)-3HB]/P(6HH)=75/25(wt ratio)ブレンドフィルムの重量減少は、時間に対して直線的に増加していることがわかる。その分解速度はP[(R)-3HB]フィルムよりかなり速く、12時間後で4.39mgの重量減少が認められた。P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]=71/24/5(wt ratio)ブレンドフィルムの場合、実験開始後4時間までのフィルムの重量減少は、時間に対して直線的に増加し、その分解速度はP[(R)-3HB]フィルムの分解速度とほぼ同等であることがわかる。しかし、その後のフィルムの重量減少は著しく増加し、12時間後で3.56mgの重量減少が認められた。

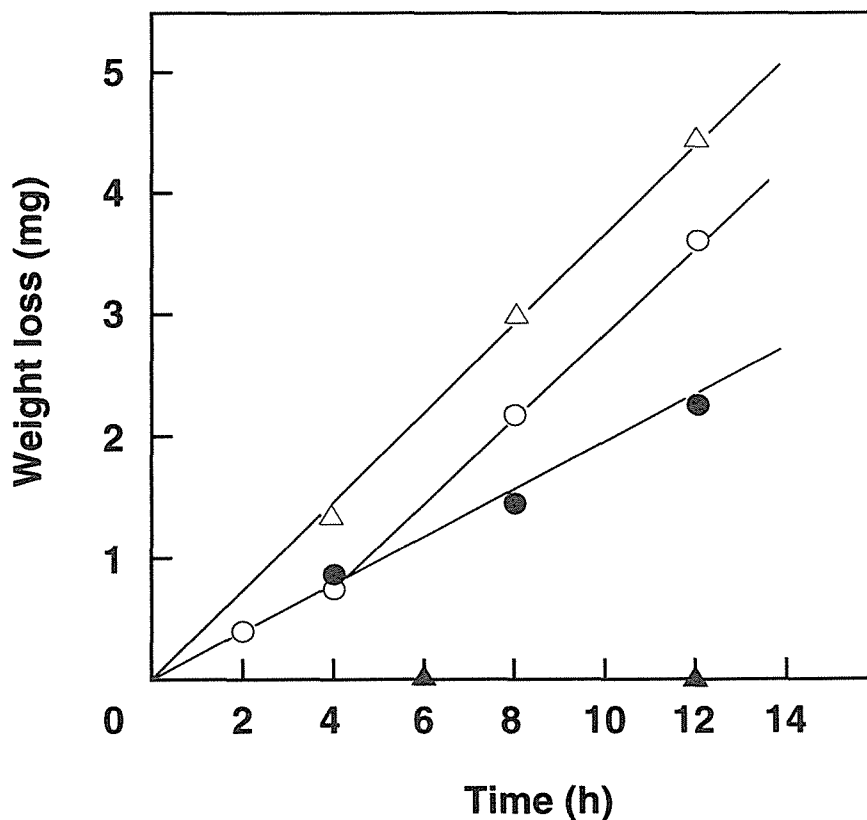


Figure 6-5 Enzymatic degradation (erosion) profiles of the blend films in the aqueous solution of PHB depolymerase ($8\mu\text{g}$) at 37°C and $\text{pH}7.4$: (●) P[(R)-3HB]; (▲) P(6HH); (Δ) P[(R)-3HB]/P(6HH)=75/25 (wt ratio); (○) P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]=71/24/5 (wt ratio).

ポリエステルフィルムの酵素分解反応は、ポリマーフィルムの表面から進行する。P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブロック共重合体を添加したブレンドフィルムの酵素分解速度がなぜ変化するのかを明らかにするために、酵素分解試験前後のフィルム表面の様子を電子顕微鏡を用いて観察した。Figure 6-6には、P[(R)-3HB]/P(6HH)=75/25、P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]=71/24/5およびP[(R)-3HB]フィルムの酵素分解前と2時間酵素分解したときのフィルム表面のSEM写真を示してある。P[(R)-3HB]/P(6HH)ブレンドフィルムを2時間酵素分解したときのフィルム表面には (Figure 6-6 (a))、 $5\sim 10\mu\text{m}$ のP(6HH)成分の分散相とその分散相が表面から脱離したために形成したと考えられる大きな穴が認められる。一方、P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]=71/24/5(wt ratio)ブレンドフィルムを2時間酵素分解したときのフィルム表面には (Figure 6-6 (b))、 $2\mu\text{m}$ 程度のP(6HH)成分の分散相とその分散相が表面から脱離したために生成した小さな穴が認められる。

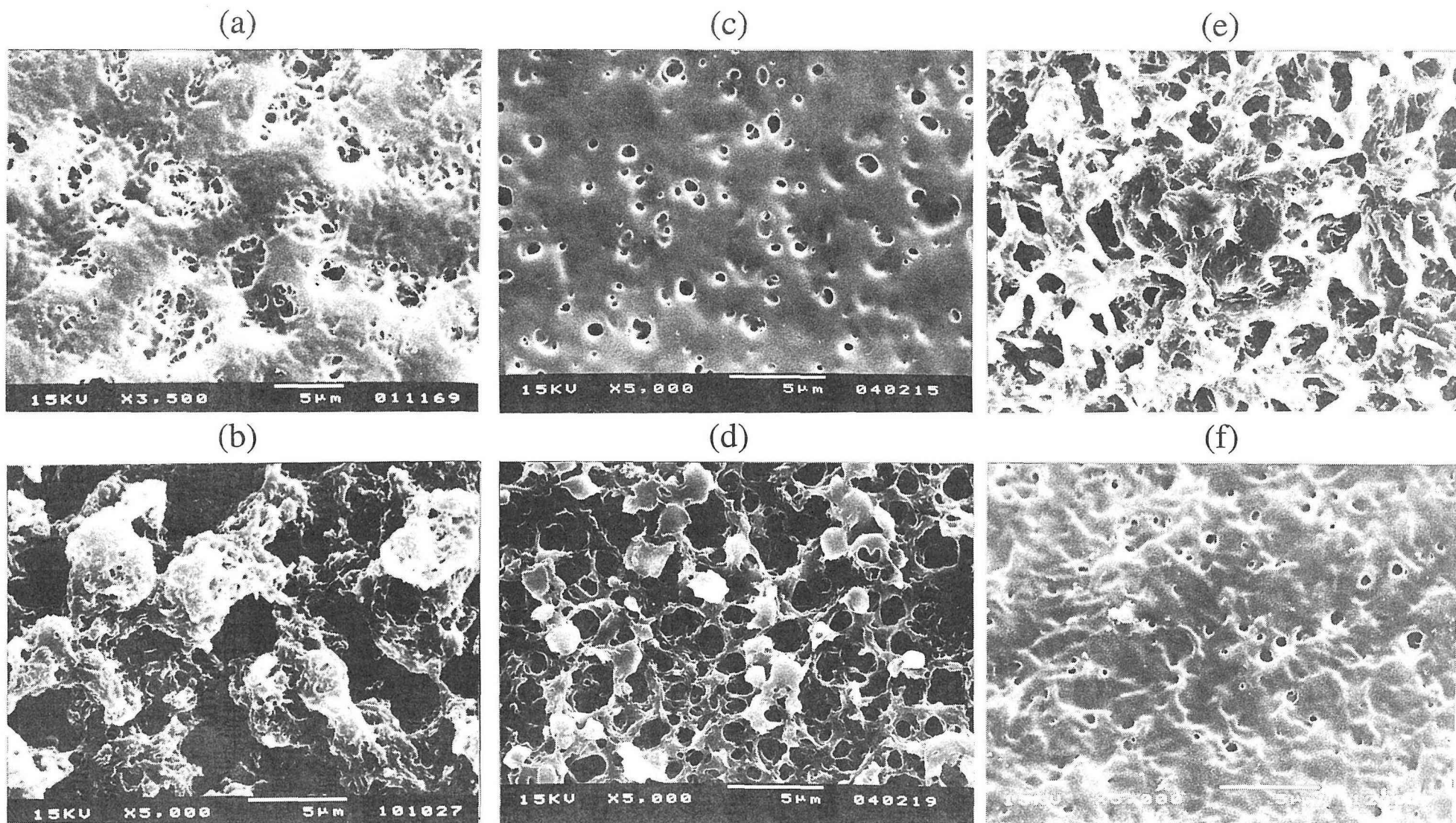


Figure 6-6 Scanning electron micrographs (SEMs) of surfaces of the blend films: P[(R)-3HB]/P(6HH) [75/25 (wt ratio)] (a) before and (b) after enzymatic degradation for 2h; P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH] [71/24/5 (wt ratio)] (c) before and (d) after enzymatic degradation for 2h; P[(R)-3HB] homopolymer (e) before and (f) after enzymatic degradation for 2h.

前述したように、 $P[(R)\text{-}3HB]/P(6HH)$ ポリマーブレンドは非相溶であり、そのブレンドフィルムはエマルジョン構造（海島構造）を形成している。そのためブレンドフィルムの表面は不均質になっている。 $P[(R)\text{-}3HB]/P(6HH)=75/25$ (wt ratio)ブレンドフィルムの場合、主成分となる $P[(R)\text{-}3HB]$ 連続相（海）に、少量成分である $P(6HH)$ の分散相（島）が分散している。このようなフィルムが PHB デポリメラーゼによって分解される場合、酵素分解性の $P[(R)\text{-}3HB]$ 相が分解され、酵素分解性を示さない $P(6HH)$ 相がフィルム表面に残ることになる。しかし、 $P[(R)\text{-}3HB]$ と $P(6HH)$ は非相溶なブレンド系であるために、両ポリマー成分の界面に相互作用がほとんど存在しない。そのため、主成分である $P[(R)\text{-}3HB]$ 相の分解にともなって、表面に残された $P(6HH)$ 相は直ちにフィルムより脱離する。 $P(6HH)$ の脱離により、フィルム表面には新たな $P[(R)\text{-}3HB]$ 相が現れ、酵素分解が進行する。その結果、 $P[(R)\text{-}3HB]/P(6HH)=75/25$ (wt ratio)ブレンドフィルムの酵素分解速度は、 $P[(R)\text{-}3HB]$ フィルムの酵素分解速度よりも速くなるものと考えられる。

$P[(R)\text{-}3HB]/P(6HH)/P[(R,S)\text{-}3HB\text{-}b\text{-}6HH]$ ブレンドフィルムの場合、ブロック共重合体の添加効果によって、 $P(6HH)$ の分散相の大きさが $P[(R)\text{-}3HB]/P(6HH)$ ブレンドフィルムの場合に較べて小さくなり、フィルム表面は比較的均質になっている。そのため、酵素分解実験開始後4時間までは、主成分である $P[(R)\text{-}3HB]$ 相の分解が $P[(R)\text{-}3HB]$ フィルムの分解と同等の速度で進行するものと思われる。しかし、 $P[(R)\text{-}3HB]$ 相の分解にともなって、ブロック共重合体による相溶化剤としての機能がなくなり、その後の分解機構は、 $P[(R)\text{-}3HB]/P(6HH)$ ブレンドフィルムの場合と同様になる。その結果、分解速度が著しく増大したものと考えられる。

6-4 結論

本章では、混和性が乏しい生分解性ポリマーの混合系を生分解性高分子材料として利用するための材料設計法の一つとして相溶化剤の利用を検討し、非相溶なP[(R)-3HB]/P(6HH)ポリマーブレンドの相溶化剤としてアタクチック構造のP[(R,S)-3HB]とP(6HH)のブロック共重合体を合成し、ブレンドフィルムの物理的性質および酵素分解性におよぼす相溶化剤の添加効果を調べた。得られた結果より、本章の結論を以下に示す。

(1) $\text{ZnEt}_2/\text{H}_2\text{O}$ 触媒を用いた β -BLと ϵ -CLとの逐次添加開環リビング重合法によって、アタクチックP[(R,S)-3HB]とP(6HH)とのブロック共重合体を合成した。

(2) 非相溶なP[(R)-3HB]/P(6HH)ポリマーブレンドに少量のブロック共重合体を添加することによって、ブレンドフィルムの伸び率が大幅に改善された。また、ブレンド組成を変化させることによって、幅広い機械的性質の発現が可能となった。

(3) P[(R)-3HB]/P(6HH)/P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブレンドフィルムのPHBデポリメラーゼによる酵素分解速度は反応時間とともに変化し、反応初期においてはP[(R)-3HB]フィルムの分解速度と同程度であり、反応が進むにつれてP[(R)-3HB]/P(6HH)ブレンドフィルムの分解速度とほぼ同じになった。これは、ブロック共重合体の添加によってブレンドフィルムの表面構造が変化したためであることを明らかにした。

References

- (1) Doi, Y. *Microbial Polyesters*; VCH Publishers: New York, **1990**.
- (2) Anderson, A. J.; Dawes, E. A. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450.
- (3) Marchessault, R. H.; Coulombe, S.; Morikawa, H.; Okamura, K.; Revol, J. F. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 38.
- (4) Barham, P. J.; Keller, A.; Otun, E. I.; Holmes, P. A. *J. Mater. Sci.* **1984**, *19*, 2781.
- (5) Holmes, P. A. In *Developements in Crystalline Polymers—2*; Bassett, D. C., Ed.; Elsevier: London, **1988**: p1.
- (6) Kumagai, Y.; Doi, Y. *Polym. Degrad. Stab.* **1992**, *36*, 241.
- (7) Tani, T.; Fukui, T.; Shirakura, Y.; Saito, T.; Tomita, K.; Kaho, K.; Masamune, S. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *124*, 71.

第七章

ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸]のドラッグ
デリバリーシステムへの応用

7-1 緒言

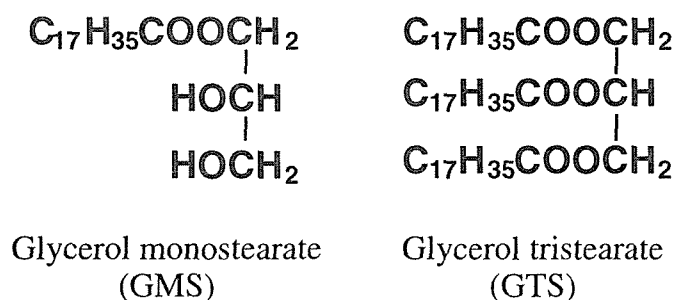
多くの微生物は、ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R)-3HB]) を生合成し、このポリマーをエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積している^{1,2)}。このP[(R)-3HB]は生分解性という優れた特性を持つ熱可塑性高分子であり^{3,4)}、幅広い分野での利用が検討されている⁵⁾。P[(R)-3HB]は生体適合性をも兼ね備えていることが報告されている⁶⁻⁹⁾。そのため、P[(R)-3HB]をドラッグキャリアーとして用いるドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用が期待されている。

第三章および第六章において、この微生物産生P[(R)-3HB]を構造材料として利用するための材料設計法の構築を目的として、P[(R)-3HB]をベースとしたポリマー混合系の物理的性質と生分解性を調べた。

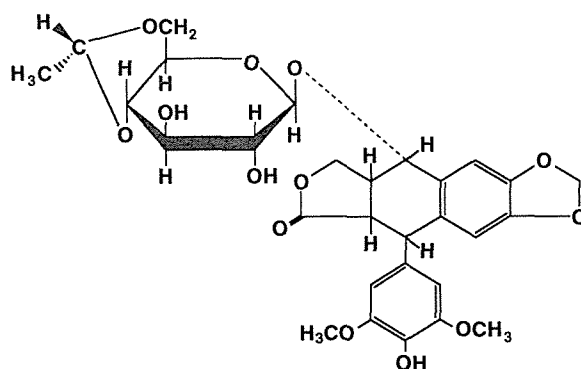
本章では、P[(R)-3HB]の生分解性、生体適合性という優れた性質を利用した医療材料への応用を検討し、P[(R)-3HB]をドラッグキャリアーとして用いるDDSの構築を目的とした。

薬物の投与形態を最適のかたちに設計することにより、薬物を効果的に病巣部に送り込む様々なドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が試みられている。生体内注入型のDDSの一つに、制癌剤を含有させたミクロスフェアを用いる化学塞栓療法がある^{10,11)}。生体内注入型のDDSにおいては、生分解性ポリマーが、薬物放出後に生体内で分解されて残存しないためにドラッグキャリアーとして非分解性ポリマーよりも優れている。たとえば、ゼラチン¹²⁾、アルブミン^{13,14)}、ポリ乳酸¹⁵⁻¹⁷⁾、ポリグリコール酸¹⁸⁾、ポリ脂肪酸¹⁹⁾などの生分解性ポリマーがドラッグキャリアーの素材として研究されてきた。

本研究では、制癌剤ラステットを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアを調製し、薬物の放出挙動を調べる。目的にあったDDSを設計するためには、次の二つの因子を制御する必要がある。一つは、ミクロスフェアの平均粒子径のコントロールであり、もう一つは、薬物の放出速度のコントロールである。本章では、まず、ミクロスフェアの平均粒子径をコントロールできる調製条件を検討した。次に、薬物放出速度をコントロールするために、脂質のグリセロールモノステアレート (GMS) およびグリセロールトリステアレート (GTS) を添加したミクロスフェアを調製し、薬物放出速度におよぼす脂質の効果を調べる。



制癌剤ラストットを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアは、胃癌手術後の癌再発を防ぐことを目的として研究を進めてきた。胃癌手術後の癌再発は、微小リンパ節転移巣や腹腔内遊離癌細胞が残存するためと考えられている。これらの再発を防ぐためには腹膜あるいはリンパ節へ選択的に高濃度の制癌剤を集中させることが必要である。腹膜およびリンパ節へミクロスフェアを集中させるためには、20μmから100μmの平均粒子径が効果的であるとされている。そのため、制癌剤ラストットを含有した、20μmから100μmの平均粒子径のP[(R)-3HB]ミクロスフェアを調製し、*in vitro*（リン酸緩衝溶液中）および*in vivo*（ラット体内）におけるラストットの放出挙動について調べる。



Structure of Lastet
(Anticancer Drug)

7-2 実験

7-2-1 試薬

(1) ポリビニルアルコール

和光純薬工業（株）製、特級品の重合度 $n=1500$ のものをそのまま使用した。

(2) 制癌剤ラステット

日本化薬（株）のラステット原末をそのまま使用した。

(3) グリセロールモノステアラート

東京化成（株）製、特級品をそのまま使用した。

(4) グリセロールトリステアラート

東京化成（株）製、特級品をそのまま使用した。

7-2-2 ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸]の合成

第二章と同じ手法によって、微生物合成した。

7-2-3 ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸]ミクロスフェアの調製

P[(R)-3HB]ミクロスフェアは、いわゆる液中乾燥法により調製した。精秤したラステットおよびP[(R)-3HB]を塩化メチレンに溶解させた。また、放出速度のコントロールのために添加物として脂質を含有したミクロスフェアを調製する場合も、この溶液に溶かした。この溶液を表面安定化剤となるポリビニルアルコールを含む水溶液中に滴下した。メカニカルスターラーで攪拌することにより混合溶液は乳化した。室温下で攪拌を続けることにより塩化メチレンを蒸発させた。塩化メチレンが完全に蒸発した後、濾過し、蒸留水で洗浄後、減圧下で乾燥することによりP[(R)-3HB]ミクロスフェアを作製した。

7-2-4 *In vitro*におけるP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステットの放出実験

*In vitro*におけるP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステットの放出実験は、0.01M リン酸緩衝溶液（pH7.4）中において37℃で行った。10mgのP[(R)-3HB]ミクロスフェアを精秤し、30mLのリン酸緩衝溶液の入ったバイアル瓶に入れ、インキュベーターを用いて37.0±0.1℃でバイアル瓶を振とうした。各サンプルを一定時間後に取り出し、

P[(R)-3HB]ミクロスフェアを濾過し、リン酸緩衝溶液の284nmにおける吸光度をUV検出器を用いて測定した。検量線よりラステットの放出量を算出した。残留のP[(R)-3HB]ミクロスフェアについては、蒸留水で洗浄後、減圧下で乾燥し、重量変化を測定した。また、ミクロスフェアの表面の様子の変化は、電子顕微鏡により調べた。

7-2-5 *In vivo*におけるP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステットの放出実験

*In vivo*におけるP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステットの放出実験は、ラットを用いた動物実験により調べた。ラットの体重に対して、ラステット4mg/kg相当量から20mg/kg相当量のP[(R)-3HB]ミクロスフェアを体重約200g前後のラットの腹腔内に注入した。所定時間後、ラットより採血および組織を採取し、血清中のラステット濃度および組織内のラステット濃度を測定した。また、組織の一部は、ホルマリン固定およびグルタルアルデヒド固定して、それぞれ光学顕微鏡、電子顕微鏡によって観察した。

7-2-6 ラステットを含有するP[(R)-3HB]ミクロスフェアの抗腫瘍効果の評価

制癌剤ラステットを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアの抗腫瘍効果は、マウスを用いた動物実験により調べた。まず、CDF1マウスの腹腔内に 10^7 個のP-388マウス白血病細胞を注入し、癌性腹膜炎モデルを作製した。P-388癌細胞注入2日後、マウスの体重に対してラステット20mg/kg相当量のP[(R)-3HB]ミクロスフェアをマウスの腹腔内に投与した。マウス献体数は10匹とし、抗腫瘍効果はマウスの生存日数から評価した。また、対照実験として、ラステットを投与しないマウス献体群、およびマウスの体重に対して20mg/kg相当量のラステットを腹腔内に単独投与したマウス献体群の生存日数を調べた。

7-2-7 分析方法

(1) 光学顕微鏡観察

P[(R)-3HB]ミクロスフェアの平均粒子径は、写真撮影装置付きの光学顕微鏡(Nikon OPTIPHOTO-2、Nikon MICROFLEX AFX-DX)により調べた。

(2) 走査型電子顕微鏡観察

放出実験前後のP[(R)-3HB]ミクロスフェアの表面の様子については、走査型電子

顕微鏡 (JEOL JMST 220) を用いて、Auコーティングして調べた。

(3) UV測定

P[(R)-3HB]ミクロスフェア中のラステットの含有量の決定には、まず、ミクロスフェアをクロロホルムに溶解させ、その溶液の284nmの吸光度をUV検出器 (HITACHI U-2000 Spectrophotometer) を用いて測定し、ラステットの含有量を検量線より算出した。

ミクロスフェアからのラステットの放出量の決定には、リン酸緩衝溶液の284nmにおける吸光度をUV検出器を用いて測定し、ラステットの放出量を検量線より算出した。

(4) 分子量測定

ラステットの放出実験前後におけるP[(R)-3HB]の数平均分子量 (M_n) および多分散度 (M_w/M_n) については、gel-permeation chromatography(GPC)より決定した。GPC測定には、検出器として示差屈折計を備えた島津6A GPC Systemを用いた。カラムは、Shodex K-80MおよびK-802を直列に接続して、カラム温度40℃で測定した。溶媒としてクロロホルムを用い、0.8mL/minの流速で分析を行った。また、サンプルは1mg/mLの濃度になるようにクロロホルムに溶解して分析した。分子量は、ポリスチレン換算で計算した。

(5) LC測定

添加物として脂質のグリセロールモノステアレート (GMS) およびグリセロールトリステアレート (GTS) を含有させたミクロスフェアについては、放出実験前後のミクロスフェア中の脂質の含有量を液体クロマトグラフィー (LC) を用いて測定した。Shimadzu 6A GPC System、6A refractive index検出器、Shodex KF802カラムを用い、溶媒はクロロホルムを用いて、流速0.5mL/min、カラム温度40℃で測定を行い、内部標準物質としてポリプロピレングリコール ($M_n=2000$) を用いて、脂質と内標とのピーク面積比より脂質の含有量を算出した。

7-3 結果および考察

7-3-1 P[(R)-3HB]ミクロスフェアの平均粒子径のコントロール

薬を目的の病巣部へ送り込むためには、P[(R)-3HB]ミクロスフェアを望ましい平均粒子径で調製する必要がある。本研究では、20~100 μ mの平均粒子径をもつP[(R)-3HB]ミクロスフェアを調製することを目的として、ミクロスフェアの平均粒子径をコントロールできる調製条件を見つけるために、下記の実験を行った。次の三つの調製条件、

塩化メチレン中のP[(R)-3HB]の濃度、

ポリビニルアルコール (PVA) の水溶液濃度、

攪拌速度

をそれぞれ変化させて、形成されるP[(R)-3HB]ミクロスフェアの平均粒子径に与える各条件の効果を調べた。

液中乾燥法により調製したP[(R)-3HB]ミクロスフェアの100~150個の粒子を取り出し、光学顕微鏡でその粒子径を測定した。Figure 7-1には、塩化メチレン中のP[(R)-3HB]濃度を6.5~29.6g/Lの範囲で、またPVAの水溶液濃度を0.375~1.5wt%の範囲で変化させて得たP[(R)-3HB]ミクロスフェアの粒子径に対する累積個数頻度を示してある。それぞれの条件で調製したミクロスフェアは、比較的狭い粒子径分布を持っていることがわかる。Figure 7-1から明らかなように、P[(R)-3HB]ミクロスフェアの粒子径は塩化メチレン中のP[(R)-3HB]濃度によって大きく変化している。一方、PVAの水溶液濃度はミクロスフェアの粒子径にほとんど影響を与えていないことがわかる。

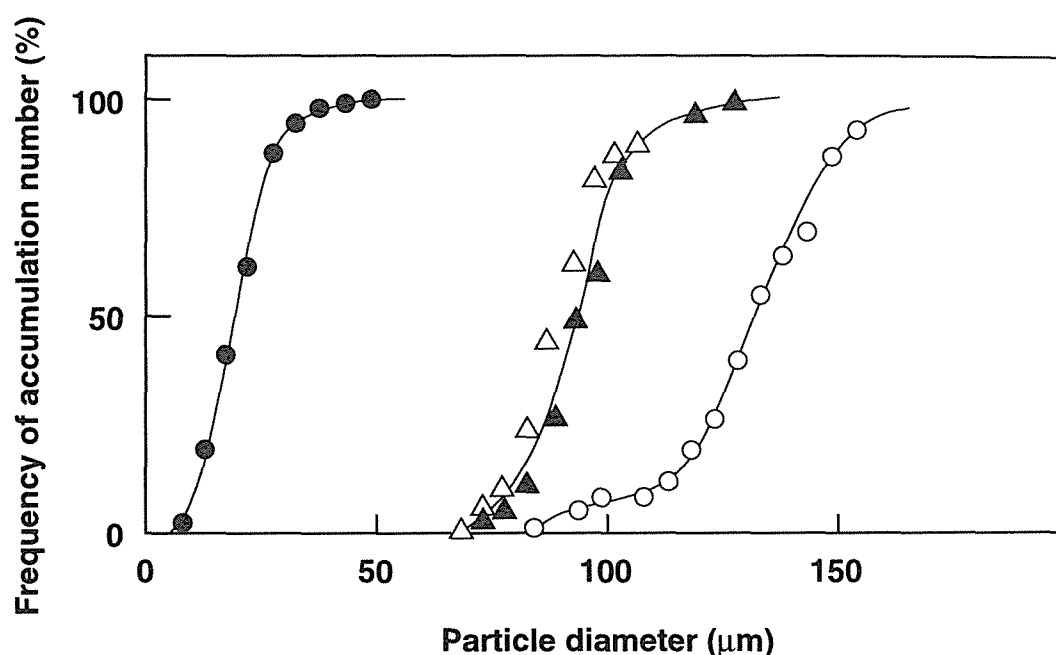


Figure 7-1 Particle size distribution of P[(R)-3HB] microspheres produced under different conditions at room temperature; (●): P[(R)-3HB] concentration in $\text{CH}_2\text{Cl}_2=6.5\text{g/L}$, PVA concentration in $\text{H}_2\text{O}=0.5\text{wt}\%$, agitation speed=1200rpm, (Δ): P[(R)-3HB] concentration in $\text{CH}_2\text{Cl}_2=20.0\text{g/L}$, PVA concentration in $\text{H}_2\text{O}=0.375\text{wt}\%$, agitation speed=1200rpm, (▲): P[(R)-3HB] concentration in $\text{CH}_2\text{Cl}_2=20.0\text{g/L}$, PVA concentration in $\text{H}_2\text{O}=1.5\text{wt}\%$, agitation speed=1200rpm, (○): P[(R)-3HB] concentration in $\text{CH}_2\text{Cl}_2=29.6\text{g/L}$, PVA concentration in $\text{H}_2\text{O}=0.5\text{wt}\%$, agitation speed=1200rpm.

Figure 7-2には、調製時の塩化メチレン中のP[(R)-3HB]濃度と形成されたミクロスフェアの平均粒子径との関係を示してある。P[(R)-3HB]ミクロスフェアは、塩化メチレン中のP[(R)-3HB]濃度を6.5～29.6g/Lまで変化させ、PVAの水溶液濃度を0.5wt%および攪拌速度を1200rpmで調製した。ミクロスフェアの平均粒子径は、塩化メチレン中のP[(R)-3HB]濃度を増加させると増大し、本条件では、平均粒子径が20～150μmまでのP[(R)-3HB]ミクロスフェアが調製できた。このように、塩化メチレン中のP[(R)-3HB]濃度が6.5～29.6g/Lの範囲では、平均粒子径はP[(R)-3HB]濃度に対して直線的に増大することがわかった。一方、PVAの水溶液濃度を0.375～1.5wt%の範囲で、また攪拌速度を700～1500rpmの範囲で変化させて調製したミクロスフェアの平均粒子径を調べたが、これらの調製条件の違いによる平均粒子径への影響はほとんど認められなかった。

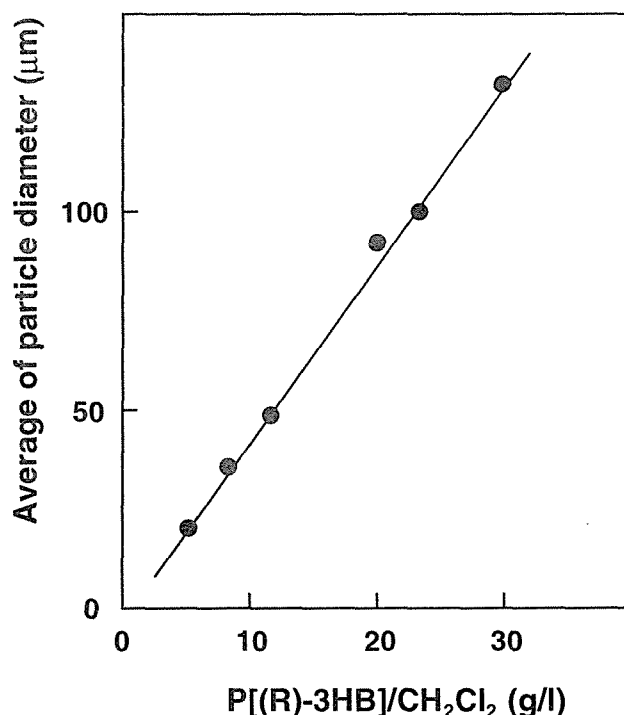


Figure 7-2 Relationship between average of particle diameter of P[(R)-3HB] microspheres with P[(R)-3HB] concentration in CH₂Cl₂ during the microspheres preparation.

Figure 7-3には、このようにして調製したP[(R)-3HB]ミクロスフェアの走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真が示してある。平均粒子径100μmのミクロスフェアも平均粒子径20μmのミクロスフェアも粒子の表面の様子には、大きな違いは認められなかった。粒子の表面には、乾燥時に溶媒の塩化メチレンが内部から放出される際に形成されたと思われる1μm以下の小さな穴が多数観察される。

7-3-2 *In vitro*におけるP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステットの放出挙動

まず、液中乾燥法により制癌剤ラステットを5wt%と10wt%を含有した平均粒子径25μmのP[(R)-3HB]ミクロスフェアを調製した。これらのP[(R)-3HB]ミクロスフェアを用いて、0.01Mリン酸緩衝溶液 (pH7.4) 30mL中 (*in vitro*) で、 $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ においてラステットの放出実験を行った。その結果をFigure 7-4に示してある。Figure 7-4 (a)に示すように、ラステットの含有率に無関係に、ラステットは実験開始後20日間で含有量の約25%が放出され、その後のラステットの放出量はごく少量であった。実験開始60日後においても60%程度のラステットは放出されずにP[(R)-3HB]ミクロスフェア中に残存することがわかった。

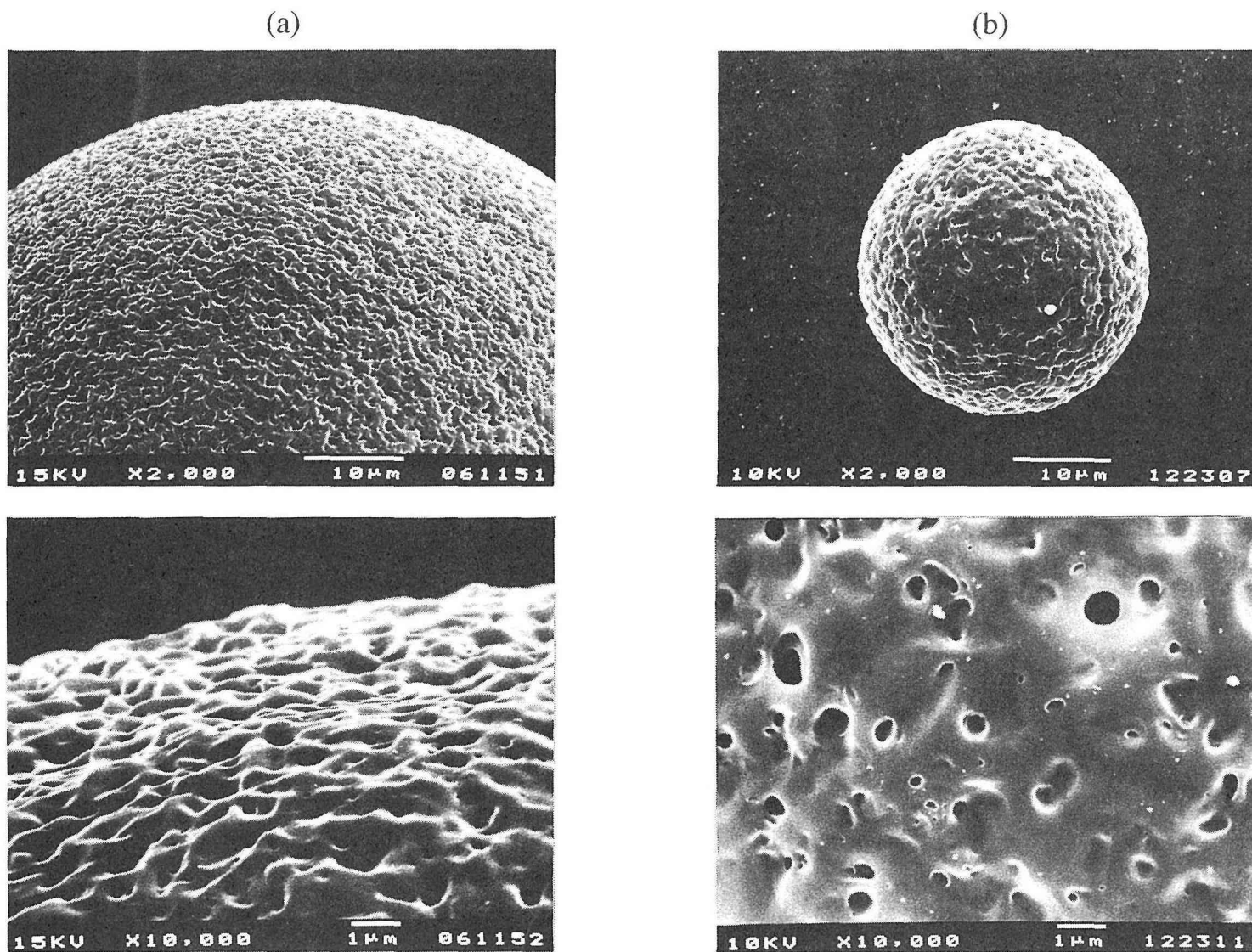


Figure 7-3 Scanning electron micrographs (SEMs) of P[(*R*)-3HB] microspheres of average diameters 100µm (a) and 20µm (b) containing 10wt% of lastet.

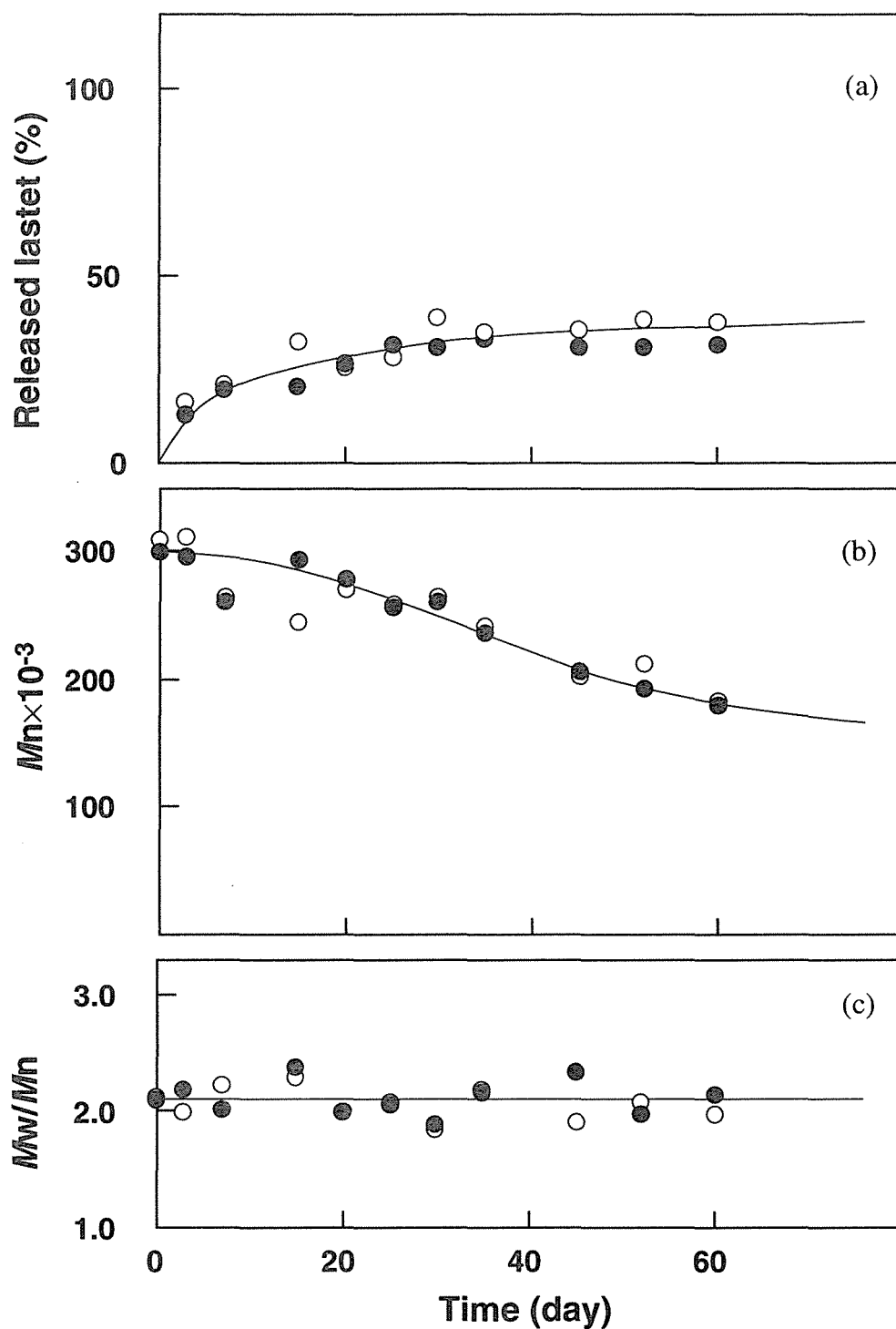


Figure 7-4 *In vitro* result of lastet release in 0.01M phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C from P[(R)-3HB] microspheres of average diameters 25 μ m, containing 5wt% (O) and 10wt% (●) of lastet; (a): Release profiles of lastet from P[(R)-3HB] microspheres, (b): Number-average molecular weights (M_n) of P[(R)-3HB] in microspheres, (c) Polydispersities (M_w/M_n) of P[(R)-3HB] in microspheres.

Figure 7-4 (b)には、放出実験中におけるP[(R)-3HB]の数平均分子量 (M_n) の経時変化が示してある。P[(R)-3HB]の M_n は、37℃の0.01Mリン酸緩衝溶液中で300000から徐々に低下して、60日後には180000程度となった。このように、60日間の加水分解反応によってP[(R)-3HB]の分子量は約60%まで低下した。P[(R)-3HB]の多分散度 (M_w/M_n) は、 2.2 ± 0.2 の範囲内にあり、実験中はほぼ一定であった (Figure 5-4 (c))。対照実験として、ラステットを含まないP[(R)-3HB]ミクロスフェアを0.01Mリン酸緩衝溶液中に37℃で60日間放置した。P[(R)-3HB]の分子量は約60%まで低下したが、ミクロスフェアの重量減少は観測されなかった。既に報告されているように、P[(R)-3HB]の M_n が加水分解によって15000以下になると、P[(R)-3HB]の糸やフィルムは重量減少を開始する。このP[(R)-3HB]ミクロスフェアにも、同様の現象が予想される。

放出実験開始10、30、60日後のP[(R)-3HB]ミクロスフェアの表面の様子をSEM写真によって観察したところ、ミクロスフェア表面は、実験開始前の表面 (Figure 7-3) をほぼ維持し続け、60日間の加水分解反応の途中においてもほとんど変化は認められなかった。

以上示したように、ラステットのみを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステット放出率は、実験開始後20日間で含有量の約25%が急速に放出され、その後の放出量はごく少量であった。このようなラステットの放出挙動は、DDSにおいて決して望ましいものではない。そこで、放出速度をコントロールするために、ラステットとともに脂質のグリセロールモノステアラート (GMS) およびグリセロールトリステアラート (GTS) を含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアを調製し、放出実験を行った。

7-3-3 *In vitro*における脂質を含有したミクロスフェアからのラステットの放出挙動

液中乾燥法により、制癌剤ラステット10wt%と脂質25wt%とを含有した平均粒子径50 μ mのP[(R)-3HB]ミクロスフェアを調製した。これらのP[(R)-3HB]ミクロスフェアを用いて、0.01Mリン酸緩衝溶液 (pH7.4) 30mL中 (*in vitro*) で 37.0 ± 0.1 ℃においてラステットの放出実験を行った。その結果をFigure 7-5に示してある。Figure 7-5 (a)に示すように、グリセロールモノステアラート (GMS) を含有したミクロスフェアの場合、実験開始後10日間で含有量の約60%のラステットが放出され、その後、ゆる

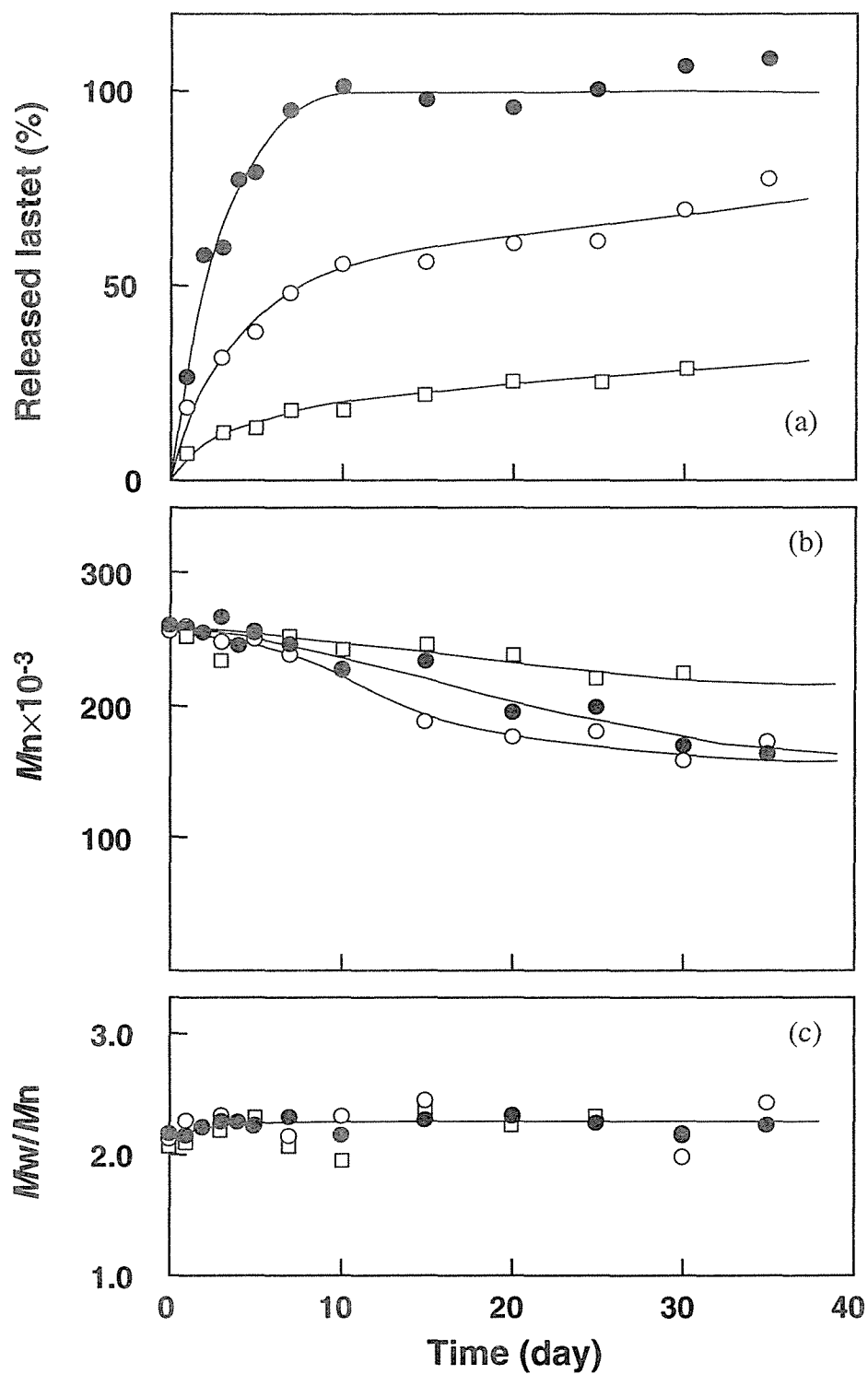


Figure 7-5 *In vitro* result of lastet release in 0.01M phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C from P[(R)-3HB] microspheres of average diameters 50 μ m, containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol monostearate (○), 25wt% of glycerol tristearate (●), and without acylglycerol (□); (a): Release profiles of lastet from P[(R)-3HB] microspheres, (b): Number-average molecular weights (M_n) of P[(R)-3HB] in microspheres, (c) Polydispersities (M_w/M_n) of P[(R)-3HB] in microspheres.

やかなラステットの放出量の増加がみられ、40日後には含有量の約80%のラステットが放出された。また、グリセロールトリステアレート (GTS) を含有したミクロスフェアでは、実験開始後10日間で含有量全てのラステットが放出された。60日間にわたる放出実験の間にP[(R)-3HB]ミクロスフェアに含有されている各脂質が水溶液中に溶出するかどうかを調べたところ、ミクロスフェアから水溶液側への各脂質の溶出は全く認められなかった。このように脂質を添加することによってP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステットの放出速度は、顕著に増加することがわかった。

Figure 7-5 (b)には、このラステット放出実験中におけるP[(R)-3HB]の数平均分子量 (M_n) の経時変化を示してある。各脂質を含有したミクロスフェアの場合、P[(R)-3HB]の M_n は、37℃の0.01Mリン酸緩衝溶液中で260000から徐々に低下して、30日後には160000程度となった。このように脂質を添加することにより、P[(R)-3HB]の分解速度はわずかに速くなることがわかった。

また、Figure 7-5 (c)に示すように、P[(R)-3HB]の多分散度 (M_w/M_n) は 2.2 ± 0.2 の範囲内で実験中はほぼ一定であり、脂質の添加による影響は認められなかった。

Figure 7-6には、脂質を25wt%とラステットを10wt%含有した平均粒子径20 μm のミクロスフェアの放出実験前における表面の様子を観察したSEM写真を示してある。GMSを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアの表面には、1 μm 程度の小さな穴が観察されるだけであり、脂質を含まないミクロスフェアの表面と余り違いがみられない。これに対して、GTSを含有したミクロスフェアの表面には、1 μm 程度の小さな穴と共に5 μm 程度の大きな穴が観察される。これは、他の2つのミクロスフェアとの大きな違いである。

なぜ2種類の脂質を添加したP[(R)-3HB]ミクロスフェアに構造の違いが現れるかを明らかにするために、脂質を添加したときのP[(R)-3HB]の融点 (T_m)、融解熱 (ΔH_m) およびガラス転移温度 (T_g) をDSCを用いて測定した。その結果をTable 7-1に示してある。 T_m および ΔH_m は、サンプルを室温から200℃まで昇温 (10℃/min) する1st runによって得られた値である。また、 T_g は200℃で融解した後液体窒素で急冷したサンプルを昇温速度20℃/minで昇温することによって測定する2nd runで得られた値である。

高分子のガラス転移は、非晶部の高分子鎖運動の凍結・開放に関する緩和現象であり、分子鎖セグメントの運動状態を反映し、ガラス転移温度で熱膨張係数や熱容

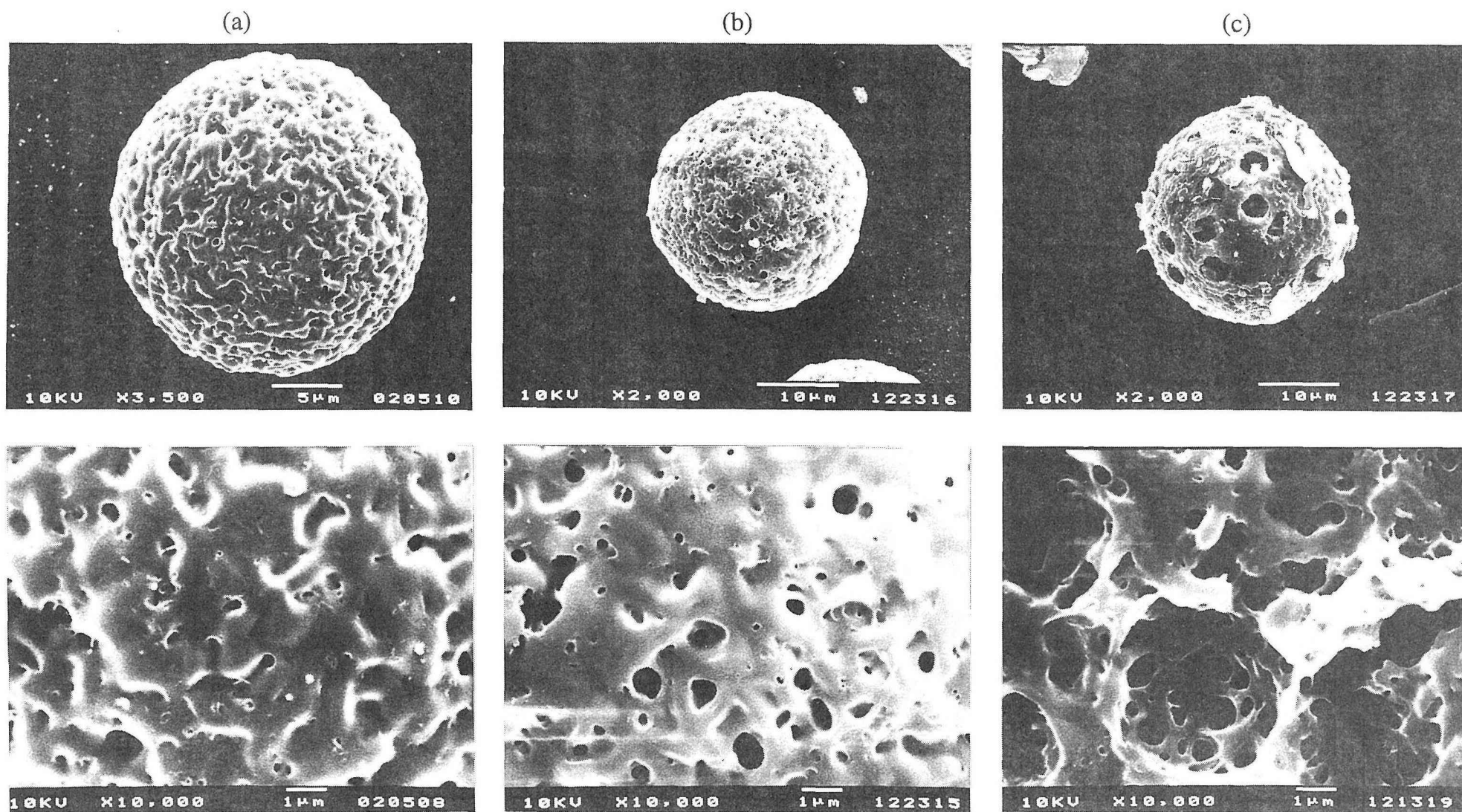


Figure 7-6 Scanning electron micrographs (SEMs) of P[(R)-3HB] microspheres of average diameters 20μm, containing 10wt% of lastet (a), 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol monostearate (b), and 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol tristearate (c).

量などの不連続変化を示す。あるポリマーに異種成分の添加物を加えたブレンド系が非晶質領域で相溶（分子レベルで混和する）の場合、異種成分の混和物がセグメントの運動を干渉し、分子環境が変化するためにセグメントの緩和挙動が影響を受ける。一方、あるポリマーと異種成分の添加物とのブレンド系が非晶質領域で非相溶（相分離を伴う）の場合、このような分子環境の変化がないために緩和挙動は変化しない。

Table 7-1. DSC data of P[(R)-3HB] samples containing acylglycerols.

Sample	T_g , °C	T_m , °C	ΔH_m , J/g
P[(R)-3HB]	4	177	111
P[(R)-3HB] with GMS (10 wt%)	-10	169	81
(25 wt%)	-24	156	78
(35 wt%)	-43	145	88
P[(R)-3HB] with GTS (10 wt%)	2	173	91
(25 wt%)	3	175	96
(35 wt%)	4	176	78

GMSを10wt%から35wt%まで加えたときのP[(R)-3HB]の T_g は、脂質を添加していないP[(R)-3HB]の T_g に較べ低下していることわかる。これは、P[(R)-3HB]の非晶部でGMSとP[(R)-3HB]が相溶である、つまり、GMSとP[(R)-3HB]が分子レベルで混和していることを示している。これに対して、GTSを10wt%から35wt%まで加えたときのP[(R)-3HB]の T_g は、いずれも3℃前後に現れており、脂質を添加していないP[(R)-3HB]の T_g と余り違いがみられない。これは、GTSとP[(R)-3HB]が非相溶である、つまり、GTSとP[(R)-3HB]がP[(R)-3HB]の非晶質領域において分子レベルで混ざり合っていないことを示している。

また、GMSを添加したP[(R)-3HB]の T_m は、脂質の添加量の増加とともに低下している。このことから、P[(R)-3HB]の非晶部でGMSとP[(R)-3HB]は相溶であるといえる。一方、GTSを添加したP[(R)-3HB]の T_m は、添加量に依存せず175℃前後ではほぼ一定であった。したがって、GTSとP[(R)-3HB]は非相溶であることがわかる。

P[(R)-3HB]と相溶性を示すGMSを添加した場合、GMSとP[(R)-3HB]が分子レベルで混和されているため、GMSを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアの表面の様子には、脂質を含まないミクロスフェアの表面と余り違いが現れなかったと推定される。

一方、P[(R)-3HB]と非相溶なGTSを添加した場合、GTSとP[(R)-3HB]は分子レベルで混和されず、P[(R)-3HB]相中に相分離を起こしたGTS相が点在するものと考えられる。GTSを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアの表面に見られる大きな穴は、表面近くで相分離を起こしたGTS相がミクロスフェアの調製時に抜け出したために形成されたものと推定される。

また、放出実験開始15日後の各ミクロスフェアの表面の様子には、実験前のミクロスフェアの表面とほとんど変化が認められなかった (Figure 7-7)。このことより、ラステットはP[(R)-3HB]ミクロスフェアの表面および内部に形成された小さな穴を通じて放出されるものと推定される。GTSを含有したミクロスフェアは、表面の大きな穴が内部の小さな穴に通じているために、ラステットの放出が容易となり、その結果、ラステットの放出速度が増大すると共にミクロスフェアに含有されている全てのラステットが放出されるものと考えられる。

7-3-4 放出速度のコントロール

Figure 7-8には、GTSを0、10、25wt%とラステット10wt%とを含有する3種の平均粒子径50 μ mのP[(R)-3HB]ミクロスフェアを用いて、0.01Mリン酸緩衝溶液 (pH7.4) 中、37.0 $\pm$ 0.1 $^{\circ}$ Cで行ったラステットの水溶液中への放出挙動を示してある。GTS10wt%を含有したミクロスフェアは、実験開始後20日間で含有していたほぼ全てのラステットを放出した。一方、GTS25wt%を含有したミクロスフェアは、実験開始10日後には、含有量全てのラステットを放出した。このように、ラステットの放出速度は、GTSの含有量を調節することによってコントロールできることがわかった。

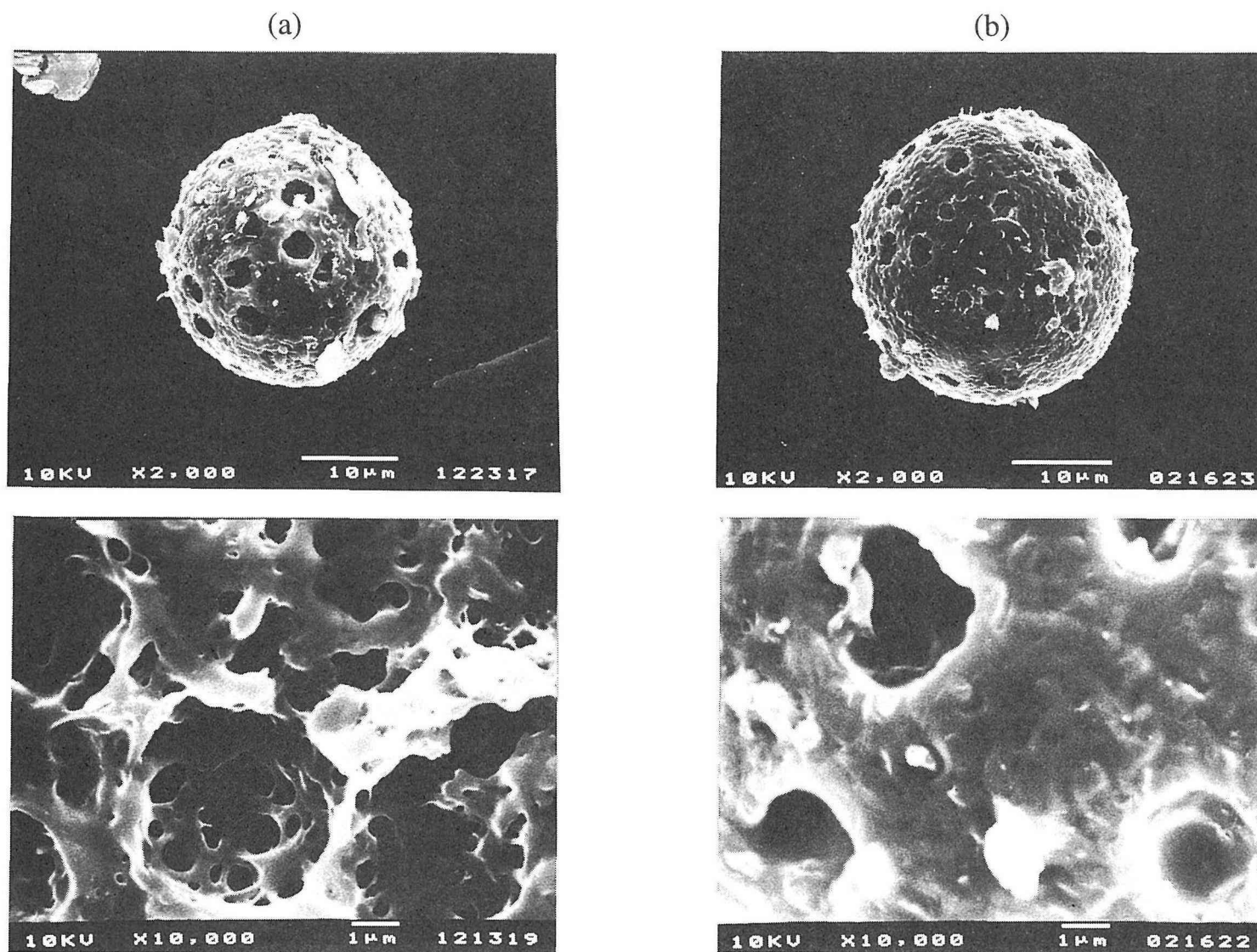


Figure 7-7 Scanning electron micrographs (SEMs) of P[(R)-3HB] microspheres of average diameters 20μm, containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol tristearate, before (a) and after 15days (b) of *in vitro* release experiment.

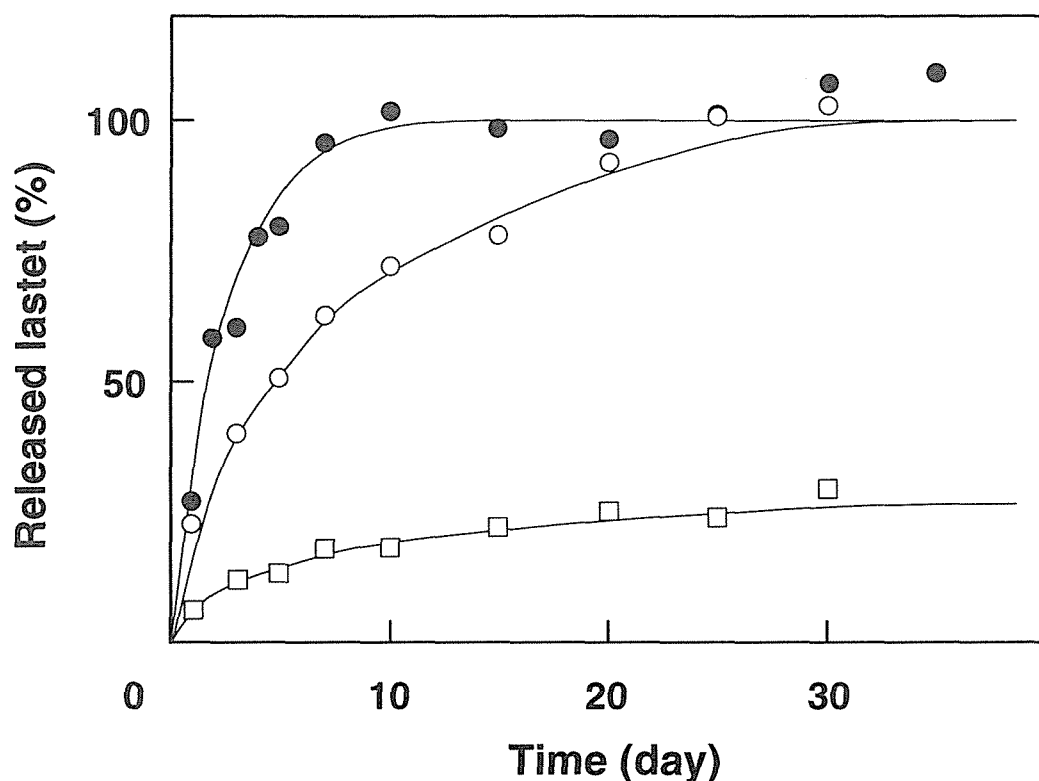


Figure 7-8 Release profiles of lastet in 0.01M phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C from P[(R)-3HB] microspheres of average diameters 50 μ m, containing 10wt% of lastet and 0wt% ($\square$) of, 10wt% (O) of, and 25wt% ($\bullet$) of glycerol tristearate.

Figure 7-9 (a)には、GTS25wt%とラストेट10wt%とを含有した平均粒子径20、50、100 μ mのP[(R)-3HB]ミクロスフェアを用いて、ラストेटの放出速度におよぼすミクロスフェアの粒子径の影響を調べた結果を示してある。平均粒子径20 μ mのミクロスフェアは、実験開始後7日間で含有量全てのラストेटを放出した。一方、平均粒子径100 μ mの大きなミクロスフェアでは、ラストेटを全て放出するのに40日以上も要した。このように、ラストेटの放出速度は、P[(R)-3HB]ミクロスフェアの粒子径が増大するにしたがって低下することが明らかとなった。30日間にわたるラストेटの放出実験の間に、P[(R)-3HB]ミクロスフェアに含有されているGTSが水溶液中に溶出するかどうかを調べた。しかしながら、ミクロスフェアから水溶液側へのGTSの溶出は、まったく認められなかった。

Figure 7-9 (b)には、このラストेट放出実験中におけるP[(R)-3HB]の数平均分子量 (M_n) の経時変化を示してある。P[(R)-3HB]の M_n は、平均粒子径に依存せず、30日間で260000から180000程度まで低下した。また、P[(R)-3HB]の多分散度 (M_w/M_n) も、平均粒子径に依存せず、 2.2 ± 0.2 の範囲内で、実験中はほぼ一定であった (Figure 7-9 (c))。

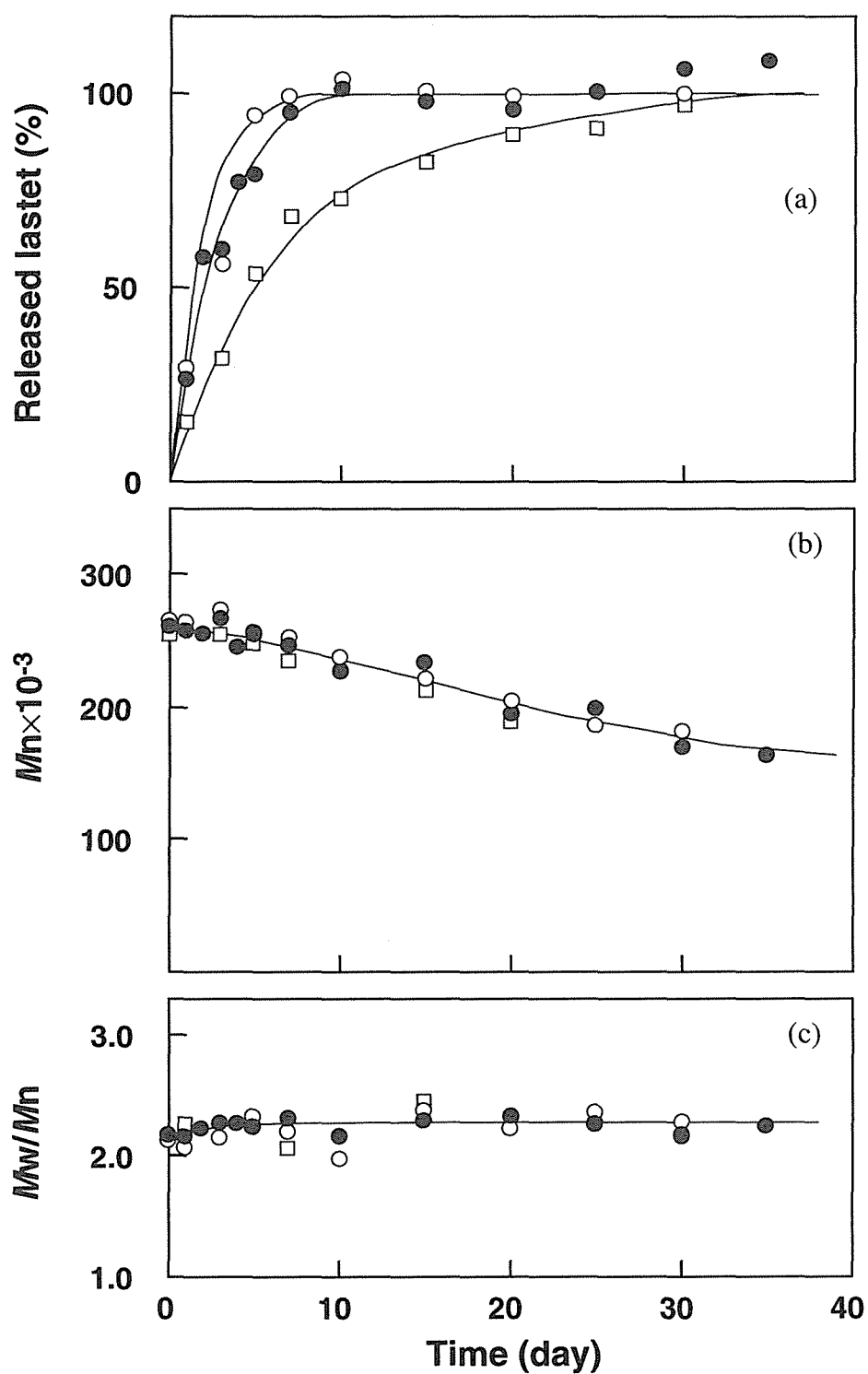


Figure 7-9 *In vitro* result of lastet release in 0.01M phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C from P[(R)-3HB] microspheres of average diameters 20μm (□), 50μm (●), and 100μm (○), containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol tristearate; (a): Release profiles of lastet from P[(R)-3HB] microspheres, (b): Number-average molecular weights (M_n) of P[(R)-3HB] in microspheres, (c) Polydispersities (M_w/M_n) of P[(R)-3HB] in microspheres.

7-3-5 *In vivo*におけるP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステットの放出挙動

*In vivo*におけるP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステットの放出実験は、ラットを用いた動物実験により調べた。P[(R)-3HB]と相溶なグリセロールモノステアラート (GMS) を含有したミクロスフェアはラステット20mg/kg相当量、P[(R)-3HB]と非相溶なグリセロールトリステアラート (GTS) を含有したミクロスフェアはラステット4mg/kg相当量を体重約200g前後のラットの腹腔内に注入した。所定時間後、ラットより採血および組織を採取し、血清中のラステット濃度および組織内のラステット濃度を測定した。また、組織の一部は、ホルマリン固定およびグルタルアルデヒド固定して、それぞれ光学顕微鏡、電子顕微鏡によって観察した。

Figure 7-10には、GMSおよびGTSを25wt%とラステット10wt%を含有した平均粒子径が50 μ mのミクロスフェアをラットに投与した場合のラット血清中のラステット濃度の経時変化を示してある。対照実験として、ラステット4mg/kg相当量を単独投与した場合の結果も同時に示してある。ラステットを単独投与した場合、ラステットはラットの血中に溶出し、投与後1時間で約15 μ g/mLと高濃度のラステットが血清中より検出された。これに対し、P[(R)-3HB]ミクロスフェアによるラステット投与の場合、ラステットの血中濃度はラステット単独投与の場合と比較して最高値で約1/10と低値であった。また、GMSを含有したミクロスフェアの場合では、GTSを含有したミクロスフェアに含まれるラステット量 (4mg/kg相当量) の5倍量のラステット (20mg/kg相当量) を投与したにも関わらずラステットの血中濃度は低い値を示した。

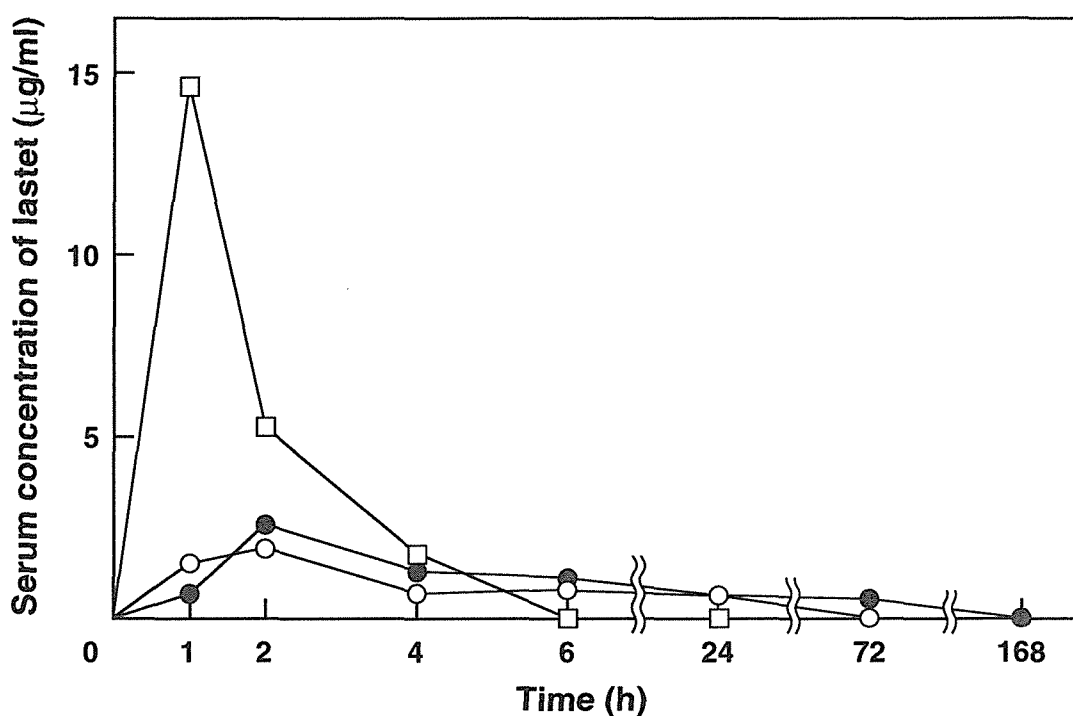


Figure 7-10 The profiles of the serum concentration of lastet; (O): P[(R)-3HB] microspheres (50μm) containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol monostearate; 20mg of lastet/1kg of rat, (●): P[(R)-3HB] microspheres (50μm) containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol tristearate; 4mg of lastet/1kg of rat, (□): injecter lastet directly; 4mg of lastet/1kg of rat.

Table 7-2に、GTSを25wt%とラストット10wt%を含有した平均粒子径が50μmのミクロスフェアをラットに投与した場合のラット組織内のラストット濃度の経時変化を示してある。投与後3日目までは、肝臓、腎臓、後腹膜、縦隔組織のそれぞれに血中濃度と比較してかなり高濃度のラストットが検出された。しかし、7日後には、どの組織からもラストットは検出されなかった。

Table 7-2. The profiles of the tissue concentration of lastet in rat from P[(R)-3HB] microspheres (50μm) containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol tristearate; 20mg of lastet /1kg of rat.

Tissue	Concentration of lastet, μg/g		
	6 h	72 h	168 h
Liver	5.93	0.41	0
Kidney	3.49	0.51	0
Retroperitoneum	7.64	18.3	0
Mediastinum	2.12	0.46	0

Figure 7-11には、GMSおよびGTSを25wt%とラストेट10wt%を含有した平均粒子径が50 μ mのミクロスフェアをラットに投与した場合のラットの縦隔組織内におけるラストेट濃度の変化を示してある。GTSを含有したミクロスフェアでは、投与後7日目ですでにラストेटが検出されなかったのに対し、GMSを含有したミクロスフェアでは、投与後7日目においても薬用効果に十分な濃度のラストेटが検出された。このように、*in vivo*における薬物放出は、*in vitro*における放出よりも速かった。

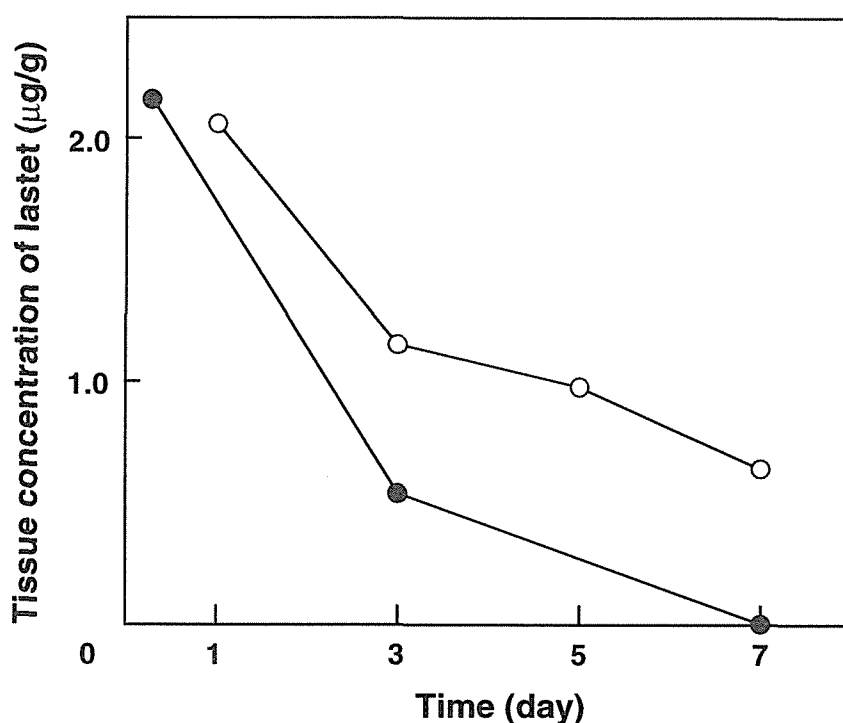


Figure 7-11 The profiles of the tissue concentration of lastet in mediastinum of rat; (O): P[(R)-3HB] microspheres (50 μ m) containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol monostearate; 20mg of lastet/1kg of rat, (●): P[(R)-3HB] microspheres (50 μ m) containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol tristearate; 4mg of lastet/1kg of rat.

Figure 7-12に、生体内投与後のGTSを含有したミクロスフェアのSEM写真を示してある。3日目、7日目と進むにつれてミクロスフェアの表面が粗雑になってきていることがわかる。

Figure 7-13は、生体内投与後のGMSを含有したミクロスフェアのSEM写真である。投与後1日目のミクロスフェアの表面は、滑らかさを保っているが、3日目、5日目と経つにつれて表面が粗雑になっていく様子がよくわかる。さらに、7日目においては、崩壊したミクロスフェアも観察された。

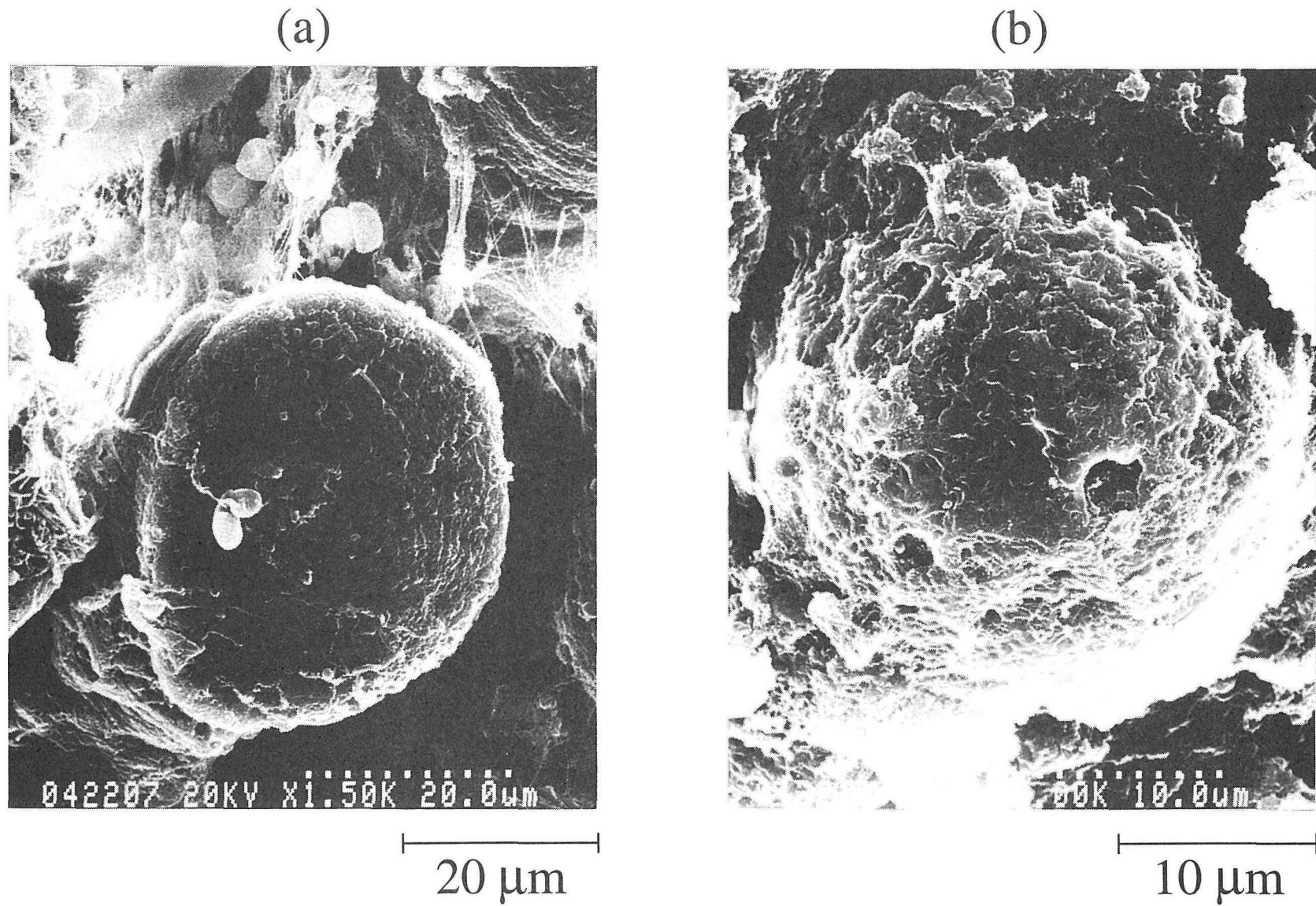


Figure 7-12 Scanning electron micrographs (SEMs) of P[(R)-3HB] microspheres of average diameters 50 μm , containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol tristearate, after 3days (a) and 7days (b) of *in vivo* release experiment.

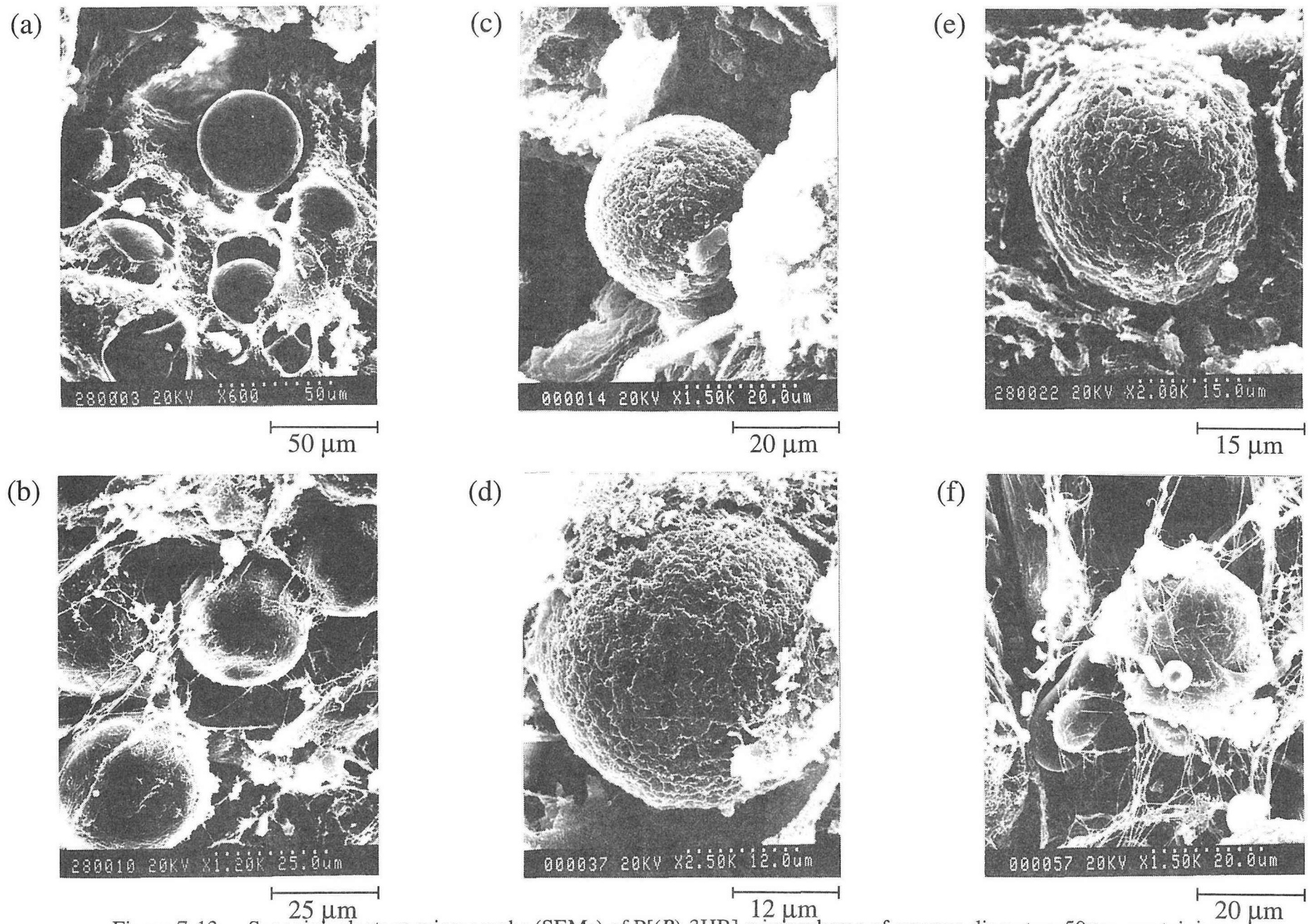


Figure 7-13 Scanning electron micrographs (SEMs) of P[(R)-3HB] microspheres of average diameters 50 μm , containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol monostearate, after (a) and (b) 1day, (c) 3days, (d) 5days, and (e) and (f) 7 days of *in vitro* release experiment.

このようなミクロスフェアの表面の様子の変化は、*in vitro*における放出実験ではみられなかったものである。この結果より、*in vivo*において、P[(R)-3HB]が加水分解されるだけでなく、ラット体内のある種の酵素（エステラーゼなど）によってP[(R)-3HB]が酵素分解されているということが予想される。つまり、*in vivo*ではP[(R)-3HB]の加水分解反応だけでなく酵素分解反応も進行し、その結果、*in vivo*におけるラステットの放出速度が*in vitro*における放出速度よりも増加したものと考えられる。

7-3-6 ラステットを含有するP[(R)-3HB]ミクロスフェアの抗腫瘍効果

制癌剤ラステットを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアの抗腫瘍効果を、マウスを用いた動物実験により調べた。まず、マウスの腹腔内にP-388マウス白血病細胞を注入し、癌性腹膜炎モデルを作製した。ラステット10wt%とGMS25wt%を含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアを、癌性腹膜炎を作製したマウスの腹腔内に投与した。マウス献体数は10匹とし、抗腫瘍効果はマウスの生存日数から評価した。

Figure 7-14には、ラステット10wt%とGMS25wt%を含有した平均粒子径50 μ mのP[(R)-3HB]ミクロスフェア（20mg/kg相当量）を癌性腹膜炎を作製したマウスに投与した場合のマウスの生存曲線を示してある。対照実験として、ラステットを投与しない場合およびラステット20mg/kg相当量を単独投与した場合のマウスの生存曲線も同時に示してある。ラステットを投与しない場合、試験開始後14日間で生存献体数は0となり、平均生存日数は11.3 $\pm$ 0.58日であった。また、ラステット20mg/kg相当量を単独投与した場合の平均生存日数は17.6 $\pm$ 1.21日であり、ラステットを投与しない場合に較べて生存期間の延長が認められた。しかしながら、ラステット投与後23日間で生存献体数は0となった。これに対して、P[(R)-3HB]ミクロスフェアによるラステット投与の場合、平均生存日数が23.9 $\pm$ 1.75日とさらに生存期間の延長が認められた。また、ミクロスフェアによってラステット投与した献体群では、30日生存率が50%と非常に良好な成績が得られた。以上の結果より、制癌剤ラステットを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアの抗腫瘍効果が認められた。

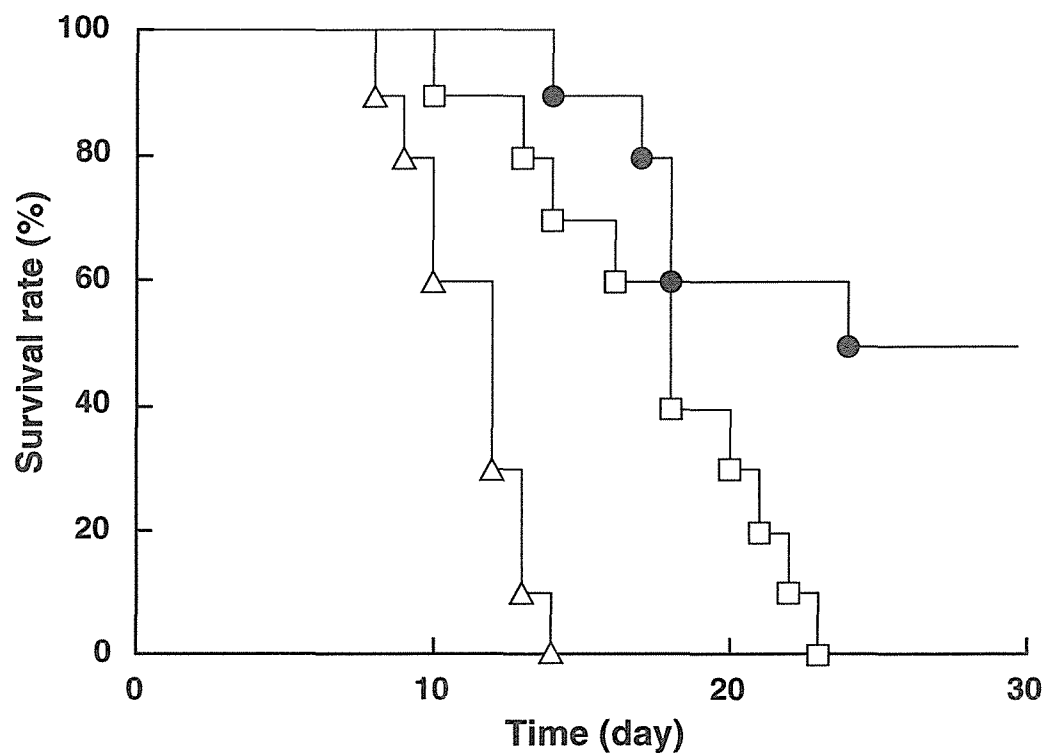


Figure 7-14 The survival rate of mouse after inoculation of P-388 leukemia ; (Δ): without the intraperitoneal administration of lastet, (□): with the intraperitoneal administration of lastet (20mg of lastet / 1kg of mouse), (●): with the intraperitoneal administration of P[(R)-3HB] microspheres (50μm) containing 10wt% of lastet and 25wt% of glycerol monostearate (20mg of lastet / 1kg of mouse).

7-4 結論

本章では、P[(R)-3HB]をドラッグキャリアーとして用いるドラッグデリバリーシステム（DDS）の構築を目的として、制癌剤ラステットを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアを調製し、薬物の放出挙動を調べた。本章の結論を以下に示す。

（１）P[(R)-3HB]ミクロスフェアを液中乾燥法によって調製した。調製時の塩化メチレン中のP[(R)-3HB]濃度を変化させることによって、平均粒子径が20～150μmまでのP[(R)-3HB]ミクロスフェアを調製できる方法を確立した。

（２）P[(R)-3HB]ミクロスフェアからの制癌剤ラステットの放出速度は、添加物として脂質のGMSおよびGTSを混和させることによって増大することを見いだした。また、脂質の種類と添加量を調節することによって薬物の放出速度をコントロールできることがわかった。

（３）ラット体内（*in vivo*）における薬物の放出実験結果より、P[(R)-3HB]ミクロスフェアを用いた薬物投与は、薬物単独投与の場合に較べて効果的であることが明らかとなった。

（４）ラット体内（*in vivo*）における、脂質を含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアからのラステット放出は、*in vitro*での放出よりも速くなることがわかった。これは、P[(R)-3HB]が非酵素的加水分解反応だけでなく、生体内のある種の酵素による酵素的加水分解反応によって分解されるためであると考えられる。

（５）癌性腹膜炎モデルを作製したマウスにラステットを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアを投与したところ、投与後30日におけるマウスの生存率は50%であった。この結果より、ラステットを含有したP[(R)-3HB]ミクロスフェアの抗腫瘍効果が確認された。

References

- (1) Doi, Y. *Microbial Polyesters*; VCH Publishers: New York, **1990**.
- (2) Anderson, A. J.; Dawes, E. A. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450.
- (3) Marchessault, R. H.; Coulombe, S.; Morikawa, H.; Okamura, K.; Revol, J. F. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 38.
- (4) Barham, P. J.; Keller, A.; Otun, E. I.; Holmes, P. A. *J. Mater. Sci.* **1984**, *19*, 2781.
- (5) Holmes, P. A. In *Developements in Crystalline Polymers—2*; Bassett, D. C., Ed.; Elsevier: London, **1988**; p1.
- (6) Miller, N. D.; Williams, D. F. *Biomaterials*, **1987**, *8*, 129.
- (7) Korsatoko, W.; Wabnegg, H. M.; Braunegg, G.; Lafferty, R. M.; Strempfl, F. *Pharm. Ind.* **1983**, *45*, 525.
- (8) Korsatoko, W.; Wabnegg, B.; Tillian, H. M.; Braunegg, G.; Lafferty, R. M. *Pharm. Ind.* **1983**, *45*, 1004.
- (9) Korsatoko, W.; Wabnegg, B.; Tillian, H. M.; Braunegg, G.; Pfrner, G.; Walser, V. *Pharm. Ind.* **1984**, *46*, 952.
- (10) Kato, T.; Nemoto, R.; Mori, H.; Kumagai, I. *Cancer*, **1980**, *46*, 14.
- (11) Kato, T.; Nemoto, R.; Mori, H.; Takahashi, M.; Tamakawa, Y. *J. Urol.* **1981**, *125*, 19.
- (12) Yoshioka, T.; Hashida, M.; Muranishi, S.; Sezaki, H. *Int. J. Pharmaceut.* **1981**, *81*, 131.
- (13) Kramer, P. A. *J. Pharm. Sci.* **1974**, *63*, 1646.
- (14) Morimoto, Y.; Sugibayashi, K.; Kato, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 1433.
- (15) Mason, N.; Thies, C.; Cicero, T. J. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 847.
- (16) Juni, K.; Ogata, J.; Nakano, M.; Ichihara, T.; Mori, K.; Akagi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 313.
- (17) Cha, Y.; Pitt, C. G. *J. Controlled Release* **1989**, *8*, 259.
- (18) Iwa, T.; Ohira, M.; Yamada, T.; Yamashita, R.; Sakatoku, M. *Igaku No Ayumi* **1985**, *135*, 1095.
- (19) Kojima, T.; Nakano, M.; Juni, K.; Inoue, S.; Yoshida, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 2795.

第八章

総括

8-1 本研究の結論

高分子工業が生み出した、多種多様のプラスチック材料は、軽くて強くて安定な素材であり、現代社会の中で欠くことのできないものとなっている。しかしながら、合成高分子のほとんどが、自然環境中で分解されないために、プラスチック廃棄物による環境汚染が世界的な問題となっている。そのような状況下、地球環境保全の観点から、自然界で微生物によって分解する生分解性プラスチックの開発がますます重要な研究課題になっている。それと同時に、生分解性プラスチックの様々な分野での利用が期待されており、幅広い物性の発現と生分解速度のコントロールが要求されている。

本研究で取り上げた微生物産生P[(R)-3HB]は、生分解性、生体適合性、熱可塑性という優れた特性を保持しているにも関わらず、その堅くて脆いという物性上の欠点のために実用化には至っていない。その物性を改善する方法として、P[(R)-3HB]に異なる構造のモノマーユニットを導入した共重合ポリエステルの合成やP[(R)-3HB]に異なる性質のポリマーを混合させるポリマーブレンドによる手法が考えられている。

われわれが理想とする生分解性高分子材料とは、使用している間は優れた性能を持続的に発揮し、廃棄後は微生物によって完全に分解され自然界の炭素循環に組み込まれる素材である。したがって、共重合ポリマーの合成あるいはポリマーブレンドによって生分解性高分子を材料設計する場合、材料を構成する高分子は微生物によって完全に分解され、自然界の炭素循環に組み込まれるものでなければならない。つまり、材料設計を考える上で高分子の分子設計を思慮する必要がある。本研究では、生分解性高分子の材料設計法を構築するために必要な基礎的知見を得ることを目的として、生分解性ポリエステルを合成し、その性質を調べた。得られた結果をもとに生分解性ポリエステルの分子設計法および合理的な材料設計法について考察した。

以下に、本研究で得られた結論をまとめて示す。

第二章【ポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸]の化学合成と生分解性におよぼす立体構造効果】では、微生物産生P[(R)-3HB]に(S)-3HBユニットを導入した様々な立体構造を有するポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸] (P[(R,S)-3HB]) を化学合成し、その

物理的性質および生分解性を調べた。その結果、P[(R,S)-3HB]の物理的性質および生分解速度は、その立体構造によって大きく変化することがわかった。また、PHB分解酵素を用いたP[(R,S)-3HB]の酵素分解反応によって生成する分解生成物は、(R)体と(S)体の3HBユニットからなるオリゴマーであり、オリゴマーのヒドロキシル基末端のモノマーユニットはすべて(R)体の3HBユニットであることを見いだした。これは、PHB分解酵素がポリマー鎖中の(R)-3HBユニットを認識し、(R)-3HBユニットのメチン炭素に連結しているエステル結合を選択的に加水分解するためであるであることを明らかにした。また、P[(R,S)-3HB]の分解生成物である3HBのオリゴマーは自然環境中の微生物に取り込まれ代謝されるために、自然環境中に残存しないことを環境水を用いた生分解試験結果より確認した。

第三章【ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸]とポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸]との二成分ブレンドの固体構造と性質】では、微生物産生P[(R)-3HB]と化学合成P[(R,S)-3HB]とのポリマーブレンドを調製し、その構造と物理的性質および生分解性を調べた。その結果、化学合成により調製した3種類のP[(R,S)-3HB]はすべてP[(R)-3HB]と非晶領域において一相構造を取り、この3種類のブレンドは相溶なブレンド系であることを明らかにした。また、P[(R)-3HB]に完全非晶質あるいは低結晶性のP[(R,S)-3HB]を混和させることによって、P[(R)-3HB]の堅くて脆いという機械的性質が改善された。また、それ単体では、酵素によって分解されない完全非晶質のP[(R,S)-3HB]もP[(R)-3HB]とブレンドすることによって、3HBのオリゴマーまで分解されることを明らかにした。この結果より、PHB分解酵素は高分子材料表面の結晶部に選択的に吸着し、非晶領域の高分子鎖を優先的に加水分解するという酵素分解反応のメカニズムを提案した。

第四章【(R)-3-ヒドロキシブタン酸と(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸とのランダム共重合体の微生物合成と性質】では、(R)-3HBユニットと(R)-3-ヒドロキシヘキサン酸((R)-3HH)ユニットとのランダム共重合体を微生物合成し、その物理的性質と生分解性について調べた。ポリマー鎖中の(R)-3HHユニットは(R)-3HB連鎖の結晶部の欠陥として働くために、共重合体の結晶化度は(R)-3HH分率の増加とともに低下することがわかった。また、結晶化度の低下のために、P[(R)-3HB-co-(R)-3HH]共重合体の酵素分解速度は著しく増大することを明らかにした。さらに、酵素分解生成物の解析より、PHB分解酵素は(R)-3HHユニットのメチン炭素に連結したエステル結合を加

水分解できないことを明らかにした。

第五章【(R)-3-ヒドロキシブタン酸と6-ヒドロキシヘキサン酸とのランダム共重合体の化学合成と性質】では、(R)-3HBユニットと6-ヒドロキシヘキサン酸(6HH)ユニットとの共重合ポリエステルを化学合成し、その物理的性質と生分解性について調べた。スズ触媒を用いた β -ブチロラクトンと ϵ -カプロラクトンとの開環重合によって、広い共重合組成範囲のランダム共重合体を合成した。共重合体の物理的性質は、共重合組成に依存して大きく変化することを明らかにした。また、P[(R)-3HB-co-6HH]は、その共重合組成の違いによって、PHB分解酵素あるいはリパーゼで酵素分解されることがわかった。さらに、PHB分解酵素を用いた酵素分解によって生成した分解生成物の解析結果より、PHB分解酵素による高分子鎖切断(加水分解)の反応機構のモデルを提案した。

第六章【ポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸]-ポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸)ブロック共重合体の合成と相溶化剤への応用】では、P[(R,S)-3HB]とP(6HH)とのブロック共重合体P[(R,S)-3HB-*b*-6HH]を化学合成し、そのブロック共重合体を非相溶なブレンド系である微生物産生P[(R)-3HB]とP(6HH)とのポリマーブレンドの相溶化剤としての効果について調べた。亜鉛触媒を用いた β -ブチロラクトンと ϵ -カプロラクトンとの逐次添加開環リビング重合法により、分子量分布の狭いP[(R,S)-3HB-*b*-6HH]ブロック共重合体を合成した。また、P[(R)-3HB]とP(6HH)とのポリマーブレンドにそのブロック共重合体を少量添加することによって、ブレンドフィルムの機械的物性が大幅に改善されることがわかった。さらに、PHB分解酵素による酵素分解試験の結果、ブロック共重合体を添加したブレンドフィルムの酵素分解速度は、反応時間の経過とともに変化することがわかった。これは、ブロック共重合体を添加したブレンドフィルムの表面構造が、反応時間とともに変化するためであることを明らかにした。

第七章【ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸]のドラッグデリバリーシステムへの応用】では、P[(R)-3HB]をドラッグキャリアーとして用いるドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築を目的として、制癌剤ラステットを含有したP[(R)-3HB]微粒子(ミクロスフェア)を調製し、薬物の放出挙動を生体外(*in vitro*)および生体内(*in vivo*)で調べた。その結果、P[(R)-3HB]ミクロスフェアの粒子径を20~150 μ mの範囲で制御できる方法確立した。また、P[(R)-3HB]ミクロスフェアに添加物として脂質を添

加すると、脂質の種類と添加量を調節することによって薬物の放出速度をコントロールできることを見いだした。

以上のように、(*R*)-3HBユニットを含むポリエステルを合成し、その構造と性質について調べた。また、そのポリエステルの生分解性を分解酵素を用いた試験法と自然環境水を用いた試験法によって評価した。その結果より、ポリエステルの生分解性を制御する分子構造因子を明らかにした。また、生分解性高分子材料の材料設計法の一つとして、P[(*R*)-3HB]をベースとしたポリマーブレンドに着目し、ブレンドフィルムの生分解性におよぼす固体構造の効果を調べた。その結果、ポリマーブレンドの生分解性を制御する固体構造因子を明らかにした。

8-2 今後の研究課題

本研究では、生分解性高分子材料の分子設計法および材料設計法を構築するための基礎的知見を得ることを目的として、ポリエステルという材料に着目し、その分子構造および固体構造と生分解性との相関性を調べた。

これまで、ポリエステルの構造と生分解性の関係は、ポリエステルを構成するモノマーユニットの分子構造（一次構造）に対する酵素の反応性のみから議論されてきた。しかしながら、本研究結果より、ポリエステルの生分解性は、ポリエステルの高次（固体）構造によっても大きく影響を受けることを明らかにした。ポリエステルの固体構造には、ラメラ結晶構造（nmオーダー）から球晶構造（ μm オーダー）までの様々な高次構造（モルホロジー）が存在する。これまでの研究報告より、 μm オーダーの球晶構造は、ポリエステルの生分解性に大きな効果を示さないことがわかっている。したがって、ポリエステルの生分解反応には、ラメラ構造のようなnmオーダーの高次構造による制御因子が働いているものと考えられる。

また、本研究において、PHB分解酵素は、ポリエステルのポリマー鎖中の複数のモノマーユニットを同時に認識し、ポリマー鎖を加水分解することを明らかにした。このことは、ポリマー鎖中のモノマーユニットの連鎖構造が酵素分解速度に大きく影響を与えていることを予想させる。

そして、ポリエステルの生分解反応には、これら複数の制御因子が同時に関与している。今後、ポリエステルの生分解性を評価する上で、これらの制御因子をそれ

それ独立に評価する方法を見いだす必要がある。

さらに、ポリエステル以外のポリマーについても同様の研究を行っていくことによって、より優れた性能をもつ生分解性高分子を材料設計することが可能となるであろう。

発表論文

第二章 【ポリ[(*R,S*)-3-ヒドロキシブタン酸]の化学合成と生分解性におよぼす立体構造効果】

H. Abe, I. Matsubara, Y. Doi, Y. Hori, and A. Yamaguchi:

Physical Properties and Enzymatic Degradability of Poly(3-hydroxybutyrate)

Stereoisomers with Different Stereoregularities; *Macromolecules*, **27** 6018-6025

(1994).

第三章 【ポリ[(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸]とポリ[(*R,S*)-3-ヒドロキシブタン酸]との二成分ブレンドの固体構造と性質】

H. Abe, Y. Doi, M. M. Satkowski, and I. Noda:

Miscibility and Morphology of Blends of Isotactic and Atactic Poly(3-hydroxybutyrate);

Macromolecules, **27** 50-54 (1994).

H. Abe, I. Matsubara, and Y. Doi:

Physical Properties and Enzymatic Degradability of Polymer Blends of Bacterial

Poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] and Poly[(*R,S*)-3-hydroxybutyrate] Stereoisomers;

Macromolecules, **28** 844-853 (1995).

第四章 【(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸と(*R*)-3-ヒドロキシヘキサン酸とのランダム共重合体の微生物合成と性質】

Y. Doi, S. Kitamura, and H. Abe:

Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-

3-hydroxyhexanoate); *Macromolecules*, **28** 4822-4828 (1995).

第五章 【(R)-3-ヒドロキシブタン酸と6-ヒドロキシヘキサン酸とのランダム共重合体の化学合成と性質】

H. Abe, Y. Doi, H. Aoki, T. Akehata, Y. Hori, and A. Yamaguchi:

Physical Properties and Enzymatic Degradability of Copolymers of (R)-3-Hydroxybutyric and 6-Hydroxyhexanoic Acids; *Macromolecules*, **28** 7630-7637 (1995).

第六章 【ポリ[(R,S)-3-ヒドロキシブタン酸]-ポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸)ブロック共重合体の合成と相溶化剤への応用】

H. Abe, Y. Doi, and Y. Kumagai:

Synthesis and Characterization of Poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate-*b*-6-hydroxyhexanoate] as a Compatibilizer for Biodegradable Blend of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and Poly(6-hydroxyhexanoate); *Macromolecules*, **27** 6012-6017 (1994).

第七章 【ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸]のドラッグデリバリーシステムへの応用】

阿部英喜, 山本裕司, 土肥義治:

制癌剤ラステットを含有したポリ(3-ヒドロキシブチレート)微粒子のドラッグデリバリーシステムへの応用; *高分子論文集*, **49** 61-67 (1992).

H. Abe, Y. Doi, and Y. Yamamoto:

Controlled Release of Lastet, an Anticancer Drug, from Poly(3-hydroxybutyrate) Microspheres Containing Acylglycerols; *Macromolecular Reports*, **A29** 229-236 (1992).

山本裕司, 阿部英喜, 土肥義治, 久保秋夫, 松本昭彦:

ポリ(3-ヒドロキシブチレート)を用いたミクロスフェアの薬物放出速度に関する実験的研究 (第1報); *日本DDS学会誌*, **7** 367-371 (1992).

山本裕司, 阿部英喜, 土肥義治, 小川伸郎, 松本昭彦:

ポリ(3-ヒドロキシブチレート)を用いたミクロスフェアの薬物放出速度に関する実験的研究 (第2報); *日本DDS学会誌*, **8** 131-136 (1993).

関連論文

H. Abe, Y. Doi, T. Fukushima, and H. Eya:

Biosynthesis from Gluconate of a Random Copolyester Consisting of 3-Hydroxybutyrate and Medium-chain-length 3-Hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3; *Int. J. Biol. Macromol.*, **16** 115-119 (1994).

F. Koizumi, H. Abe, and Y. Doi:

Molecular Weight of Poly(3-hydroxybutyrate) during the Biological Polymerization in *Alcaligenes eutrophus*; *J. Macromol. Sci., Pure and Appl. Chem.*, **A32(4)** 759-774 (1995).

Y. Doi, K. Kasuya, H. Abe, N. Koyama, S. Ishiwatari, K. Takagi, and Y. Yoshida:

Evaluation of Biodegradabilities of Biosynthetic and Chemosynthetic Polyesters in the River Water; *Polym. Degrad. Stab.*, in press.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、数多くの御助言と暖かい激励を頂きました、東京工業大学生命理工学研究科バイオテクノロジー専攻、井上義夫教授に心より御礼申し上げます。本論文の審査の労を賜るとともに御指導頂きました、東京工業大学生命理工学研究科バイオテクノロジー専攻、大倉一郎教授、同、永井和夫教授、同、櫻井 実助教授、同、畑中研一助教授に心より御礼申し上げます。

東京工業大学在学中、研究の御指導のみならず、公私にわたり常に暖かい激励と御指導をして頂いた、北陸先端科学技術大学院大学、曾我和雄教授、東京工業大学総合理工学研究科化学環境工学専攻、塩野 毅助教授に深く感謝いたします。また、公私にわたりお世話になった、曾我・土肥研究室の皆様にも御礼申し上げます。

実験を実施するにあたり、的確な御助言や御協力を頂いた、理化学研究所高分子化学研究室内の皆様に深く御礼申し上げるとともに、今後とも宜しくお願い申し上げます。

本研究において貴重なデータとなる小角X線散乱による解析を御教授下さった、P & G 社、Dr. Isao Noda、同、Dr. Michael M. Satkowskiに心より感謝いたします。

本研究における重要な高分子サンプルを提供して下さい、高砂香料株式会社、堀 容嗣博士に感謝致します。

横浜市立大学医学部、山本裕司先生には、動物実験を行って頂いただけでなく、終始適切な御助言を頂き深く感謝しております。

最後に、本研究を実施するにあたり、実験および論文作成のみならず、研究に対する姿勢にいたるまで、適切な御指導、御教授および御助言をしていただいた理化学研究所高分子化学研究室、土肥義治主任研究員に心より感謝の意を表します。