

## シルクフィブロイン-生分解性ポリウレタンの複合化による組織工学材料の創製

中 澤 靖 元\*<sup>1</sup>  
本 多 惟 克\*<sup>2</sup>  
井 邊 裕 介\*<sup>3</sup>  
城 野 孝 喜\*<sup>3</sup>

### Development of Tissue Engineering Materials by Silk Fibroin-Biodegradable Polyurethane Composites

Yasumoto NAKAZAWA  
Tadakatsu HONDA  
Yusuke IBE  
Takaki JONO

In this study, a composite nonwoven fabric blended with silk fibroin and biodegradable polyurethane was prepared for application to tissue engineering materials for the cardiovascular systems. Solid-state NMR structural analysis indicated that silk fibroin and polyurethane are miscible in nonwoven fibers with dispersed fine domains, and that mixing SF and PU changes the local structure and kinetics.

In addition, material degradation and tissue regeneration were confirmed from implantation of SF/PU composite nonwoven fabrics into rat abdominal aorta. We initially assumed that material degradation and tissue regeneration would be PU mixing ratio dependent, but the SF7PU3 nonwoven fabrics with the lowest PU mixing ratio showed the most degradation and regeneration. Local structure analysis showed that the percentage of SF amorphous regions increased by about 10% in SF7PU3 nonwoven fabrics. This result also suggests a relationship with *in vivo* degradability.

In the future, the correlation between the structural properties of SF/PU composite nonwoven fabrics and the improvement of tissue infiltration capacity will be investigated by *in vivo* evaluation and used for the molecular design of novel tissue engineering materials that can be applied in the field of regenerative medicine of the circulatory system.

#### 1. はじめに

シルクフィブロイン (SF) は、カイコやクモ、スズメバチなどの生物が産生する繊維タンパク質である [1]。特にカイコの一つであり人工的に屋内で飼育

される家蚕 (学名: *Bombyx mori*) が生産する SF は、細胞親和性と生体吸収性、低炎症性等の特徴を有しているため、組織工学材料としての応用研究が積極的に行われている [1-5]。

家蚕 SF 分子 (GAGAGS) の反復構造から構成される結晶領域、GA の繰り返し配列中、Tyr 残基や Val 残基などの嵩高い側鎖の存在により、結晶構造が比較的乱れた半結晶領域、また、SF 中に 10 領域存在する

\* 1 東京農工大学大学院工学研究院  
\* 2 ウレタン研究所 エラストマーグループ  
\* 3 ウレタン研究所 コーティング第2グループ

非晶領域から構成される [6, 7] (Fig. 1)。この反復配列が強固な  $\beta$ -sheet 構造による結晶を形成することで、絹糸に特有の力学的特徴を発現する [8, 9]。

また、SF は、この結晶構造を制御することで、さまざまな形態へと成形することを可能とする。SF 繊維は、高濃度の中性塩水溶液に浸漬すると、分子間水素結合が切断され溶解する。得られた溶液を脱塩処理することにより SF 水溶液を得ることができる。その SF 水溶液は、キャストフィルムやスポンジ、ナノファイバーシート等、様々な形態への加工が可能となる [10-12] (Fig. 2)。以上のように、SF は、その生体適合性や吸収性、力学特性、形態加工性などの特徴から、医療分野において、組織工学材料の有用な素材として広く研究が行われている [13-15]。

しかしながら SF は、上述した分子凝集能により、成形加工法によっては、剛直で脆い物性を示すため、血管や心臓などの軟組織への組織工学材料として利用するためには、剛直性、脆性の改善が必要不可欠である。

そこで本研究では、SF とポリウレタン (PU) をブレンドしたデバイスを作製し、これまで課題であった、SF 特有の物性改善を試みる。さらに PU 分子鎖には、生分解性を有し、医療用途での実績がある [16-19] ポリカプロラクトン (PCL) を導入することで、生体内での吸収を促し、自己組織との置換が可能な新

規 SF 基盤組織工学材料を創製する。

通常相溶せず相分離を引き起こす SF と PU を複合化させるため、本研究では、エレクトロスピニング (ESP) 法を用いる。ESP 法による繊維形成は、紡糸過程での延伸と急速な溶媒の揮発によって、急激な脱溶媒が生じるため、分子鎖の移動の阻害による結晶構造の変化や、繊維内部における結晶分布の偏り、繊維方向へ沿った分子鎖の配向、分子運動の変化を引き起こすことが報告されている [20-22]。また、ESP 法を用いたポリマーブレンドでは、一般に非相溶を示すポリマーの組み合わせを用いても、両ポリマーのドメイン凝集の抑制により分散相の微細化が生じ、相溶化を促す例が報告されている [20, 23, 24]。例えば製剤技術分野においては、ESP 法による相溶化と構造転移を利用して、難溶解性を示す医薬品の吸収性改善を目的とした、非晶質固体分散体加工技術の一つとして注目を集めている。医薬品中の有効成分と賦形剤の相溶/非相溶状態、またそれに伴う微細構造の変化、有効成分の放出や材料の分解挙動とを相関づけた研究が報告されている [20, 24-26]。

以上を背景とし、本稿では、組織再生を指向した人工血管や心臓などの循環器系組織に対する組織工学材料を指向した SF-生分解性 PU 複合化不織布に対する基礎的知見を得たので報告する。ESP 法をキーテクノロジーとし、ナノファイバー形成という特殊な環境下

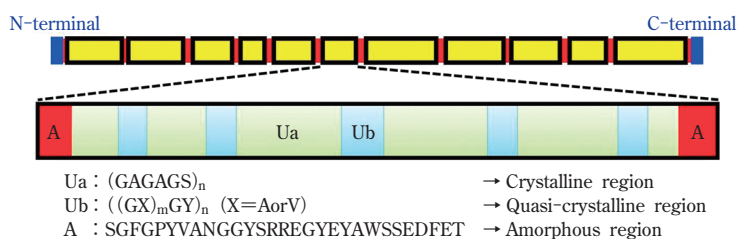


Fig. 1 The primary structure of *Bombyx mori* SF

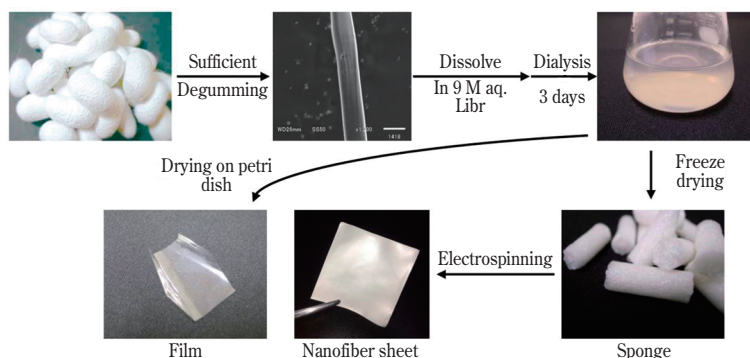


Fig. 2 Processing of SF into various forms

における、SFとPUの相溶性および微細構造、分子運動性について、固体<sup>13</sup>C NMR法により詳細に解析した。また、ESP法による2分子間の相溶性と結晶構造の変化が、生体内での分解に及ぼす影響について考察した。

## 2. 実験

### [1] シルクフィブロインスポンジの作製

シルク繊維は、95℃の0.02 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液中で攪拌・洗浄することでセリシンを除去し、SF繊維を得た[27]。SF繊維を9 M LiBr水溶液に溶解し、10% w/v SF溶液を調整し、透析によりSF水溶液とした。得られたSF水溶液の濃度を1% w/vになるように精製水で希釈し、凍結乾燥することでSFスポンジを作製した。

### [2] シルクフィブロイン/ポリウレタン混合不織布の作製

PCLを含む生分解性PUを合成し、SFスポンジとTable 1に示した重量比で混合し、1,1,1,3,3,3,-ヘキサフルオロ-2-イソプロパノール(HFIP)で溶解した。得られた混合溶液をESP法により紡糸し、SF、PU、および、SF/PU不織布を得た。各不織布は、重量が70-75 mg、膜厚が100 μmとなるよう、射出時間を調整した。得られた不織布は風乾後、相対湿度100%、37℃の環境下に24時間静置することで、不織布の不溶化処理を施した。

また、対照サンプルとしてSF/PU混合キャストフィルムを作製した。5 w/v%に調整した各SF/PU HFIP溶液を、ポリスチレンシャーレにキャストし、風乾することでキャストフィルムを作製した。不織布と同様、相対湿度100%、37℃の環境下に24時間静置することで、不溶化処理を行った。

### [3] 走査型電子顕微鏡(SEM)による形態観察

不織布の一部を切り取り、両面カーボンテープを

用いて試料台に固定した。スパッタリング装置(JFC-1200\_JEOL)を用いて試料表面を金で薄膜コーティングし、走査型電子顕微鏡(JSM-6510\_JEOL)を用いて形態観察を行った。得られた画像に対し、画像解析ソフトImageJ(NIH)を用いてランダムに繊維径を50本計測し、不織布の平均繊維径を求めた。キャストフィルムにおいては光学顕微鏡(BZ-90000\_KEYENCE)を用いて、フィルム表面を観察した。

### [4] 水中条件下での引張試験

DEBEN社製小型引張試験機(MTEST-200N)を用いて、測定温度:37℃、試料長(掴み間長×幅):5×5 mm、引張速度:0.5 mm/min、n=6の条件で引張測定を行った。測定する不織布は、24時間37℃の水に浸漬させて使用し、測定は水中にて実施した。ヤング率は応力-ひずみ曲線の1-4%歪みの傾きから算出した。

### [5] 固体NMRによる微細構造解析

パルス系列は交差分極(CP)/マジック角回転(MAS)法を用いた[30, 31]。測定条件はMAS:8.5 kHz、CP接触時間:2 ms、繰り返し待ち時間:5 s、積算回数:4096回の条件で測定を行った。波形分離はORIGIN2018b(OriginLab)を用いて行った。SF成分由来のAla C<sub>β</sub>のピークから、結晶成分である二種類のβ-sheet構造(19.6 ppm, 21.9 ppm)とrandom coil(16.5 ppm)へ波形分離処理し、ピーク面積比から結晶化度を算出した[32]。既報に基づき、SF由来のピークはgaussian関数、PU由来のピークはLorentz関数を用いて波形分離処理を行った[8, 33, 34]。

### [6] 固体<sup>13</sup>C核スピン-格子緩和時間(T<sub>1</sub><sup>C</sup>)測定による分子運動性解析

T<sub>1</sub><sup>C</sup>測定は、Torchiaのパルスシーケンスで測定した[35]。測定条件はMAS:8.5 kHz、CP接触時間:2 ms、繰り返し待ち時間:5 s、積算回数:4096回、待ち時間(τ):0.01-45 sの間の9-10点で測定した。T<sub>1</sub><sup>C</sup>値の算出には、PCL結晶のエチレンピーク(-O-CH<sub>2</sub>-基;65.2 ppm)を用いた[36]。待ち時刻(τ)に対し、信号強度比(M<sub>(τ)</sub>/M<sub>(0)</sub>)をプロット、二項の合成指数減少関数( $\frac{M_{(\tau)}}{M_{(0)}} = Ae^{-\frac{\tau}{T_1^C(A)}} + Be^{-\frac{\tau}{T_1^C(B)}}$ )へカーブフィットすることで、PCL結晶由来の運動性の異なる2成分のT<sub>1</sub><sup>C</sup>値を求めた。なお、カーブフィッティングは、ORIGIN2018b(OriginLab)を用いて行った。

Table 1 Mixing ratio of each composite nonwoven fabrics

Sample name	SF [%]	PU [%]
SF	100	0
SF7PU3	70	30
SF5PU5	50	50
SF3PU7	30	70
PU	0	100

### [7] $^1\text{H}$ 核 スピン-格子緩和時間 ( $T_1^H$ ) 測定による相溶性解析

固体核磁気共鳴 (NMR) 装置による測定はすべて Bruker 社製・AVANCE-400 分光計を用い、4 mm MAS 二重共鳴プローブ (PH MAS DVT 400 WB BL4 probe) により、 $^1\text{H}$  核の共鳴周波数 400 MHz、 $^{13}\text{C}$  核の共鳴周波数 100.4 MHz の下で実施した。 $^{13}\text{C}$  核の化学シフト値については、外部基準としてアダマンタンのメチン基ピークを 28.8 ppm として TMS 基準 (0 ppm) に換算した。

$T_1^H$  測定には、 $^1\text{H}$  核飽和回復のパルス系列を用いた [28]。測定条件は、MAS: 8.5 kHz、CP 接触時間: 2 ms、積算回数: 6144 回、飽和パルス間隔: 20 ms、飽和パルス繰り返し回数: 10 回、繰り返し待ち時間: 1 s、回復時刻 ( $\tau$ ): 0.001, 0.01, 0.022, 0.045, 0.1, 0.22, 0.33, 0.45, 0.75, 1, 1.45, 2.2, 4.5, 7 s として測定を行った。また、 $^1\text{H}$  デカップリングには TPPM 法 [29] を用い、温度可変装置を用いて、測定時の温度を 25 °C に維持した。 $T_1^H$  値の算出には、SF 成分: Gly C $_{\alpha}$  (43 ppm), Ala C $_{\alpha}$  (49 ppm), Ser C $_{\alpha}$  (54.6 ppm), Gly C=O 基 (170 ppm), PU (PCL) 成分:  $-\text{CH}_2-$  基 (25, 28, 34 ppm),  $-\text{CH}_2-\text{O}-$  基 (64 ppm) 由来のピークを用いた。回復時刻 ( $\tau$ ) に対し、信号強度比 ( $M(\tau)/M(0)$ ) をプロット、指数関数 ( $\frac{M(\tau)}{M(0)} = 1 - e^{-\frac{\tau}{T_1^H}}$ ) へカーブフィットすることで  $T_1^H$  値を求めた。また、カーブフィッティングは、は ORIGIN2018b (OriginLab) を用いて行った。

### [8] 動物埋植試験

SF、SF7PU3、SF3PU7、PU の各不織布は、 $\gamma$  線滅菌を施した後、ラット腹部大動脈へ埋植した。ラットは生後 3~4 ヶ月、体重 250~350g の健康なオスの Sprague-Dawley ラット (Charles River Laboratories) を使用した。上記 4 種の不織布を、幅 3 mm、長さ 6 mm の楕円形とし、実顕微鏡下で各群  $n = 6$ 、合計 24 匹のラットの腹部大動脈へ埋植した。

埋植 3 ヶ月目に犠牲死の上、組織切片を摘出し、マッソントリクローム (MTC) 染色により不織布及び不織布周辺組織について形態観察を行った。

なお、動物実験に関する実験プロトコルおよび手術を含むすべての手順は、東京農工大学動物実験委員会によって承認され (承認番号: 28-79)、「東京農工大学動物実験指針」に従い実施した。

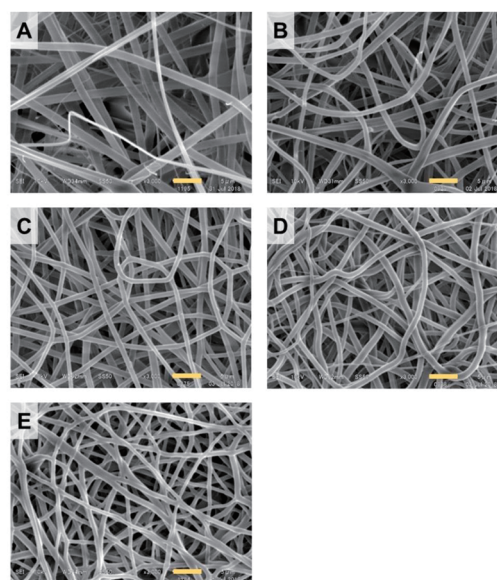
## 3. 結果・考察

### [1] 形態・物性評価

通常、SF と PU のような生体高分子と合成高分子は相溶せず相分離する。溶媒キャスト法により作製した SF/PU 混合フィルムにおいては、全ての混合比において相分離を生じ、SF7PU3 と SF5PU5 は海島構造、SF3PU7 は相互連結構造状に分離した。しかしながら、ESP 法により作製した SF/PU 複合化不織布においては、明確な相分離構造を認めず、全ての混合比の不織布において、平均 1  $\mu\text{m}$  程度の均一な繊維構造を形成している。(Fig. 3)

また、PU を添加した SF/PU 複合化不織布の物性は、SF のみからなる不織布と比較し、有意な応力や歪み値の増加 (Fig. 4) およびヤング率 (Fig. 5) の低下を示した。特に破断歪みに関しては、SF のみからなる不織布において 30% 程度であるが、PU 複合化不織布では 250% 以上と大幅な増加を示した。SF 不織布の剛直な性質は、軟組織に用いる組織工學材料としての課題点であったが、適切な PU の混合は、SF の脆性の改善に寄与する。

本稿では、得られた SF/PU 複合化不織布の微細構造やダイナミクス、また、SF 分子と PU 分子の相溶性について、固体 NMR 法による詳細な解析を実施した。



A) SF, B) SF7PU3, C) SF5PU5, D) SF3PU7, E) PU, scale bar: 5  $\mu\text{m}$

Fig. 3 SEM images of SF/PU composite nonwoven fabric



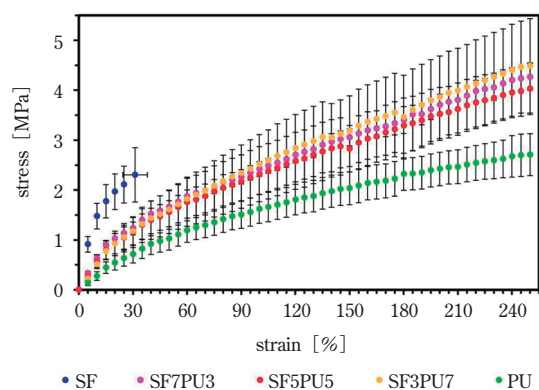


Fig. 4 Stress-strain curves of SF/PU composite nonwoven fabric in wet state

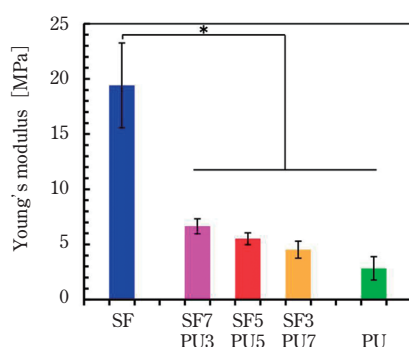


Fig. 5 The Young's modulus of SF/PU composite nonwoven fabric calculated from stress-strain curves in wet state (\*:  $p < 0.05$ )

## [2] 固体 NMR 法による構造・ダイナミクス解析

### (1) SF/PU 複合化不織布の微細構造解析

まず、SF と PU の混合比に伴う結晶構造の定量的な解析を実施するため、固体  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR 測定を行った。得られたスペクトルより、SF 分子中の結晶領域に存在する Ala 残基の二次構造を追跡することで、SF ドメインの結晶構造の推移を検証した。Fig. 6 には、SF と PU の混合比の違いによる、SF 分子中の非晶成分(Random coil)と、結晶成分 ( $\beta$ -sheet 構造) の割合を、二次構造依存的な化学シフト変化を示す Ala  $\text{C}_\beta$  ピークの成分比から算出した結果を示す。SF のみから作製した不織布と、SF/PU 複合化不織布と比較すると、SF7PU3 において、非晶領域が 10% 程度増加しているものの、全ての混合比で概ね同等の値を示しており、PU 添加に伴う SF の局所構造の影響は低いものと考えられる。SEM 観察の結果より、SF と PU は明確な相分離構造を認めず、均一な繊維形成をしていると結論づけているが、 $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR スペクトルの結果から、SF 分子と PU 分子は、完全な

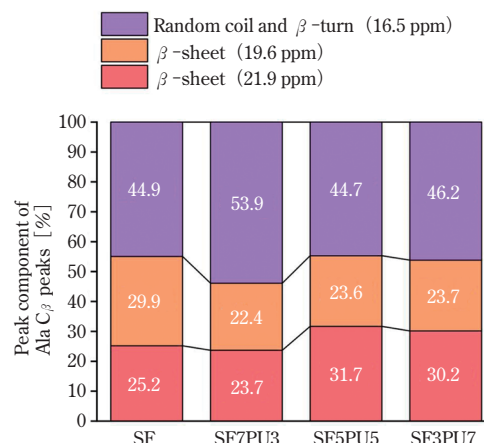


Fig. 6 Secondary structure ratios of Ala residues in the composite nonwoven fabric obtained from  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectra

相溶状態ではなく、各々の分子が微細なドメイン形成をしているものと推測することができる。

SF 分子と PU 分子の混和状態は、生体内における分解性に大きく関係する。本研究では、SF/PU 複合化不織布の詳細な構造を理解するため、固体 NMR 法による各種緩和時間測定を実施した。

### (2) $^{13}\text{C}$ 核 スピン-格子緩和時間 ( $T_1^C$ ) 測定による SF/PU 複合化不織布の分子運動性解析

固体 NMR 法により観測することができる  $^{13}\text{C}$  核スピンの緩和現象は、近接する核スピンの分子運動に起因する局所磁場の揺らぎの影響を受けるため、分子運動と密接に関係している。固体 NMR 法による  $T_1^C$  測定は、官能基ごとの運動性を解析することが可能であるため、混合系での局所的な分子運動性を解析する有用なツールである [37]。

本研究では、SF/PU 複合化不織布の PU 分子中に存在する、PCL 結晶中の分子運動を解析するため、結晶由来の  $\text{CH}_2$  成分 (65.2 ppm) に注目し、 $T_1^C$  値の推移を追跡した。その結果、SF/PU 複合化不織布においては SF 混合比依存的な  $T_1^C$  値の減少を示した (Fig. 7)。これは、SF 分子の添加によって、PCL 結晶の格子構造の乱れや微細化が生じ、局所的な運動性の変化が生じたものと推測される。一方、明確な相分離を引き起こした SF/PU キャストフィルムにおいては、 $T_1^C$  値に変化がない。以上より、ESP 法により生成した SF/PU のナノファイバーは、分子レベルでの相分離構造を形成しているとは言い難いが、局所的に互いの分子の影響を受けていることが示唆される。

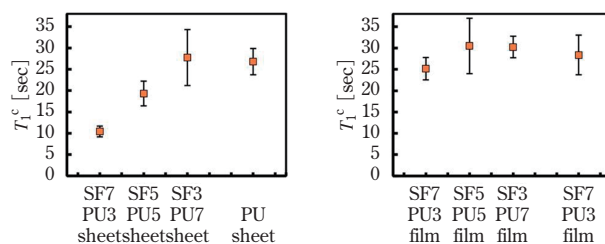


Fig. 7  $T_1^C$  values of methylene peaks derived from PCL crystals in composite nonwoven fabrics(left) and films(right)

### (3) $^1\text{H}$ 核 スピン-格子緩和時間 ( $T_1^H$ ) 測定による SF/PU 複合化不織布の相溶性解析

SF/PU 複合化不織布における各分子の相溶性を解析するため、試料中の  $^1\text{H}$  核スピン拡散の傾向から、各々の分子相溶性について検討した。Fig. 8 には、SF/PU 複合化不織布の  $T_1^H$  測定結果を示す。ブレンド前の不織布では、SF と PU の  $T_1^H$  値は、各々 0.9 s と 0.6 s と異なる値であるが、ブレンド後では近似する傾向が見られた。これは、ブレンド後の SF と PU の  $^1\text{H}$  核スピン間においてエネルギー交換が生じスピン拡散が生じることにより、SF と PU 間に存在する緩和時間の差が平均化したと考えられる。

このスピン拡散現象に関して、スピン有効拡散距離を見積もることで、ドメイン間距離を算出した。スピン有効拡散距離  $L$  は、拡散定数を  $D$ 、 $^1\text{H}$  核スピン-格子緩和時間 ( $T_1^H, T_{1\rho}^H$ ) をとすると、拡散方程式から、 $L = \sqrt{6Dt}$  と表すことができる [38]。  $^1\text{H}$  核のスピン-格子緩和時間は、測定法によって二種類求められ、実験室系での  $^1\text{H}$  核スピン-格子緩和時間 ( $T_1^H$ ) では数百~数千ミリ秒のスケールを、回転座標系での  $^1\text{H}$  核スピン-格子緩和時間 ( $T_{1\rho}^H$ ) では数ミリ秒から数十ミリ秒のスケールを算出できる。この異なるスケールの緩和時間を測定できる手法を用いて、拡散方程式に導入することで、相溶/非相溶時のおおよそのドメインサイズを見積もることができる。(本稿では、 $T_1^H$

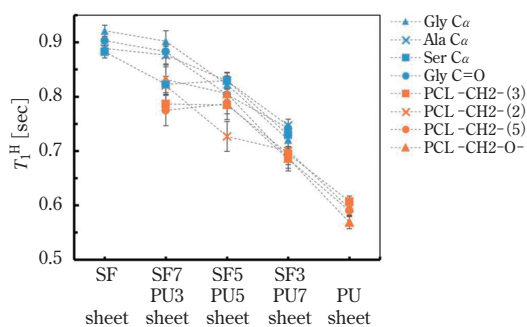


Fig. 8  $T_1^H$  plot of SF/PU composite nonwoven fabrics

測定結果については割愛させていただく)

SF/PU 複合化不織布では、スピン拡散によりシフトした  $T_1^H$  値は約 0.7 ~ 0.9s を示したため、拡散定数:  $0.5 \sim 8.0 \times 10^{-16} \text{ m}^2/\text{s}$  と仮定すると、[39, 40]、スピン有効拡散距離は 15 ~ 65 nm と見積もられる。この結果より、SF/PU 複合化不織布中の SF と PU は、約 15 ~ 65 nm の範囲にあることが示唆される。

### [3] 動物埋植試験

得られた SF/PU 複合化不織布をラット腹部大動脈に移植した。埋植後 3 ヶ月における、SF7PU3 不織布断面をマッソントリクローム (MTC) 染色像を Fig. 9 に示す。PU 分子中に存在する PCL が一部分解することにより、不織布に空隙が生じ、不織布の中心部に及ぶコラーゼン組織の浸潤が認められる。埋植した血管周囲に、漏血や破綻は認められておらず、不織布は適切な分解速度で組織との置換が生じているものと推測される。

以上の結果より、SF/PU 複合化不織布では、ESP 法という限定的な作製条件により、SF と PU の相分離が抑制され、微細な混和状態が互いの結晶構造に影響を及ぼすことが示された。特に SF7PU3 不織布では、

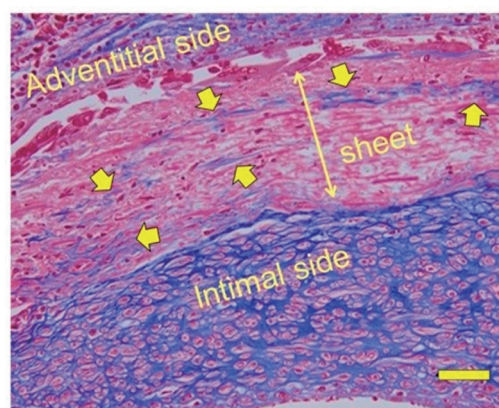


Fig. 9 Masson's trichrome stain findings of rat abdominal aorta for 3 months Arrows indicate collagen tissue infiltration

SF中の結晶化度が低く、PUの分解を担うPCL結晶中の分子運動も大きいため、最も早く分解と組織再生が生じたことが示唆されるが、継続的な検討が必要である。

#### 4. おわりに

本稿では、高強度・高弾性、且つ各種生体適合性を有し、バイオマテリアルとして有用な素材であるSFと、分解性を付与したPUをブレンドし、ESP法により細胞外マトリクスを模した繊維加工を施すことで、軟組織への組織工学材料を指向した不織布を作製した。作製したSF/PU複合化不織布に対し、動物埋植試験及び固体NMR法による構造および分子運動解析を行い、ESP法の紡糸に伴う相溶性と結晶構造の変化が、生体内での分解に及ぼす影響の解明を試みた。

得られたSF/PU複合化不織布の、ラット腹部大動脈埋植後3ヶ月のコラーゲン染色像より、適切な材料の分解および組織再生の兆候を確認することができた。我々は当初、PUの混合比依存的な組織再生を想定していたが、SF7PU3組織の浸潤が不織布内部まで及び、最も再生が進行していた。局所構造解析では、SF7PU3不織布のSF非晶領域が10%程度増加している傾向を認めており、生体内での分解性との関係も示唆される。今後、SF/PU複合化不織布の構造的特徴と*in vivo*評価による組織浸潤能の亢進の相関性について継続的に検討し、循環器系の再生医療分野に応用可能な新規組織工学材料の創製を目指す。

#### 参考文献

- [1] B. Kundu, R. Rajkhowa, S. C. Kundu, and X. Wang, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 457 (2013)
- [2] M. Santin, A. Motta, G. Freddi, and M. Cannas, *J. Biomed. Mater. Res.* **46**, 382 (1999)
- [3] G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials* **24**, 401 (2003)
- [4] S. Sofia, M. B. McCarthy, G. Gronowicz, and D. L. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res.* **54**, 139 (2001)
- [5] N. Minoura, M. Tsukada, and M. Nagura, *Biomaterials* **11**, 430 (1990)
- [6] K. Mita, S. Ichimura, and T. C. James, *J. Mol. Evol.* **38**, 583 (1994)
- [7] C. Z. Zhou, F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, T. Yang, M. Jacquet, J. Janin, M. Duguet, R. Perasso and Z. G. Li, *Nucleic Acids Res.* **28**, 2413 (2000)
- [8] T. Asakura, J. Yao, T. Yamane, K. Umemura, and A. S. Ulrich, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8794 (2002)
- [9] K. Zhang, F. W. Si, H. L. Duan, and J. Wang, *Acta Biomater.* **6**, 2165 (2010)
- [10] M. Fini, A. Motta, P. Torricelli, G. Giavaresi, N. Nicoli Aldini, M. Tschon, R. Giardino, and C. Migliaresi, *Biomaterials* **26**, 3527 (2005)
- [11] C. Y. Wang, K. H. Zhang, C. Y. Fan, X. M. Mo, H. J. Ruan, and F. F. Li, *Acta Biomater.* **7**, 634 (2011)
- [12] D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett, and D. L. Kaplan, *Nat. Protoc.* **6**, 1612 (2011)
- [13] B. Panilaitis, G. H. Altman, J. Chen, H.-J. Jin, V. Karageorgiou, and D. L. Kaplan, *Biomaterials* **24**, 3079 (2003)
- [14] C. Vepari, D. L. Kaplan, V. Charu, *Prog. Polym. Sci.* **32**, 991 (2007)
- [15] Y. Qi, H. Wang, K. Wei, Y. Yang, R.-Y. Zheng, I. S. Kim, and K.-Q. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 237 (2017)
- [16] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, *J. Control. Release* **158**, 15 (2012)
- [17] E. J. Chong, T. T. Phan, I. J. Lim, Y. Z. Zhang, B. H. Bay, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, *Acta Biomater.* **3**, 321 (2007)
- [18] S. Pok, J. D. Myers, S. V. Madihally, J. G. Jacot, *Acta Biomater.* **9**, 5630 (2013)
- [19] M. Borjigin, C. Eskridge, R. Niamat, B. Strouse, P. Bialk, and E. B. Kmiec, *Int. J. Nanomedicine* **8**, 855 (2013)
- [20] Z. K. Nagy, A. Balogh, B. Démuth, H. Pataki, T. Vigh, B. Szabó, K. Molnár, B. T. Schmidt, P. Horák, G. Marosi, G. Verreck, I. Van Assche, and M. E. Brewster, *Int. J. Pharm.* **480**, 137 (2015)
- [21] L. Gong, D. B. Chase, I. Noda, J. Liu, D. C. Martin, C. Ni, and J. F. Rabolt, *Macromolecules* **48**, 6197 (2015)
- [22] L. Gong, D. B. Chase, I. Noda, C. A. Marcott, J. Liu, D. C. Martin, C. Ni, and J. F. Rabolt, *Macromolecules* **50**, 5510 (2017)
- [23] B. Brettmann, E. Bell, A. Myerson, and B. Trout, *J. Pharm. Sci.* **101**, 1538 (2012)
- [24] P. Tipduangta, P. Belton, L. Fábíán, L. Y. Wang, H. Tang, M. Eddleston, and S. Qi, *Mol. Pharm.* **13**, 25

(2016)

- [25] X. Y. Li, X. Wang, D. G. Yu, S. Ye, Q. K. Kuang, Q. W. Yi, and X. Z. Yao, *J. Nanomater.* **2012**, (2012)
- [26] D. G. Yu, J. J. Li, G. R. Williams, and M. Zhao, *J. Control. Release* **292**, 91 (2018)
- [27] U.-J. Kim, Jaehyung Park, C. Li, H.-J. Jin, R. Valluzzi, D. L. Kaplan, and Departments, *Biomolecules* **5**, 786 (2004)
- [28] P. Mark Henrichs, J. Tribone, D. J. Massa, and J. M. Hewitt, *Macromolecules* **21**, 1282 (1988)
- [29] A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, and R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **103**, 6951 (1995)
- [30] A. Pines, M. G. Gibby, and J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **569**, 569 (1973)
- [31] J. Schaefer, E. O. Stejskal, and R. Buchdahl, *Macromolecules* **8**, 291 (1975)
- [32] T. Asakura and J. Yao, *Protein Sci.* **11**, 2706 (2009)
- [33] K. Schäler, A. Achilles, R. Bärenwald, C. Hackel, and K. Saalwächter, *Macromolecules* **46**, 7818 (2013)
- [34] J. Spěváček, J. Brus, T. Divers, and Y. Grohens, *Eur. Polym. J.* **43**, 1866 (2007)
- [35] D. A. Torchia, *J. Magn. Reson.* **33**, 481 (1979)
- [36] H. Kaji and F. Horii, *Macromolecules* **30**, 5791 (1997)
- [37] 安藤勲, 高分子の固体 NMR (講談社, 1994)
- [38] A. Abragam, *The Principles of Nuclear Magnetism* (Clarendon Press Publication, 1961)
- [39] F. Mellinger, M. Wilhelm, and H. W. Spiess, *Macromolecules* **32**, 4686 (1999)
- [40] J. Clauss, K. Schmidt - Rohr, and H. W. Spiess, *Acta Polym.* **44**, 1 (1993)