[ノ ー ト]

ポリカチオン化ホスファチジン酸コンジュゲートの合成と 遺伝子導入キャリアーとしての機能評価

出羽 毅久^{*1,†}・家田 由佳利^{*1}・森田 一行^{*1}・吉田 清貴^{*1}

Li WANG^{*2}・Robert C. MACDONALD^{*2}・飯田 浩史^{*3}

山下 啓司^{*1}・奥 直人^{*4}・南後 守^{*1}

(受付 2004 年 5 月 31 日・審査終了 2004 年 8 月 20 日)

要 旨 非ウイルス系遺伝子導入キャリアーとして、スベルミジン、スベルミン、およびポリエチレンイミン(平均分子量 1800)をカチオン部位にもつジパルミトイルホスファチジン酸誘導体を新規に合成した。β-ガラクトシダーゼアッセイにより、これらが遺伝子導入効果を有することがわかった。これらのポリカチオン化リン脂質は水溶液中では 90~200 nm 程度の集合体を形成しており、これらが DNA との複合体を形成することを原子間力顕微鏡により直接観察した。遺伝子導入効果は、その複合体サイズが小さいものほど高いことが認められた。

1 緒 言

遺伝子治療では、より高効率で安全性の高い遺伝子導入システムの開発が重要となっている¹⁾。遺伝子導入のためのキャリアーとして、アデノウイルスなどに代表されるウイルス系、およびカチオン性脂質などによる非ウイルス系に大別される。導入効率では前者が勝っているものの、安全性、簡便性、さらに大量生産という点では後者に大きな利点があり、多くの非ウイルス系キャリアーに関する報告がなされている^{2)~11)}。

カチオン性キャリアーによる遺伝子輸送は、エンドソーム経由の機構が考えられているが¹²⁾、その詳細は明らかではない。遺伝子導入のために有効なポリカチオン-DNA 複合体の多形現象(ラメラ構造やヘキサゴナル構造)についてもこれまでに多く研究されてきた^{13)~18)}。また、吉川らは、蛍光および電子顕微鏡による観察から、ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン(DOGS)の集合体が DNA で覆われたスクレオソーム状の構造を形成し、これらがネットワーク状に集合することを示した。そして、この集合体が効果的な遺伝子導入に寄与し

ていると考察している¹³⁾。しかし、現時点ではポリカチオン-DNA の集合形態と遺伝子導入効率との関係はまだほとんど明らかではない。

筆者らはこれまでに、セチル化ポリエチレンイミン(cetyl-PEI)で修飾したポリカチオン化リポソーム(PCL)が高い遺伝子導入活性をもつことを報告してきた^{19)~22)}。その中で、蛍光標識した脂質、cetyl-PEI、DNA を共焦点レーザー顕微鏡で細胞内追跡することにより、cetyl-PEI が DNA との複合体となって核まで到達していることを明らかにした²²⁾。これは、エンドソームに取込まれた DNA-PCL 複合体がサイトゾル中を移動し、cetyl-PEI と DNA との複合体となって核に輸送されていると考えられる。カチオン性リポソームによる遺伝子輸送の鍵となるプロセスは核内への進入プロセスであると考えられており²³⁾、カチオン性キャリアーの DNA 凝集力およびポリカチオン-DNA 複合体のサイズが遺伝子導入効率に深く関与していると予想される²⁴⁾。

PEI はそれ自体で遺伝子導入キャリアーとして用いられているが、少なからず細胞毒性があり、また分子量分布をもつため、薬物として認可を得ることが困難である。筆者らは前報において、新規なポリカチオン-ジアルキルリン酸エステルを簡便な手法で合成し、これらが遺伝子導入効果を有することを示した²⁴⁾。本報では、天然に存在するリン脂質である 1,2-ジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA)の極性部位にポリカチオン部位(スベルミジン、スベルミン、PEI(1800))を有する新規なポリカチオン化リン脂質を簡便な方法で合成した

^{*1} 名古屋工業大学大学院物質工学専攻(☎466-8555 名古屋市昭和区御器所町)

^{*2} Department of Biochemistry, Molecular Biology, and Cell Biology, Northwestern University (Evanston, Illinois 60208 U.S.A.)

^{*3} 名古屋市工業研究所(☎456-0058 名古屋市熱田区六番町三丁目 4-41)

^{*4} 静岡県立大学薬学部(☎422-8526 静岡市谷田 52-1)

Scheme 1. Synthetic strategy for polycationic lipid conjugates via synthetic intermediate, 1.

(Scheme 1). 本手法を用いることで、疎水部位およびカチオン性部位の異なる誘導体を容易に合成でき、疎水性-親水性のバランスを細かく制御することが可能である。合成された3種類のポリカチオン化リン脂質の遺伝子導入効率を β -ガラクトシダーゼアッセイによって評価した。さらに、ポリカチオン化リン脂質-DNA複合体の形態観察を原子間力顕微鏡(AFM)により行い、導入効率と形態との相関性について考察した。

2 実験

2.1 諸種のポリカチオン化リン脂質合成

2.1.1 1,2ジパルミトイルグリセロリン酸プロモエチルエステル(化合物1)の合成

15 mg の DPPA (22 μmol) を無水ピリジン(0.5 mL)中に溶かし、2-プロモエタノール 10 μL (127 μmol) と 1,3,5-トリイソプロピルベンゼンスルホンクロライド (TPSCI)^{25),26)} 30 mg (100 μmol) を加えた。窒素雰囲気下室温で5時間かくはんした後、0.15 mL の水を加え反応を停止させた。溶媒を減圧留去後、薄層クロマトグラフィー(展開溶媒: クロロホルム/メタノール=3/1)により R_f 値 0.5~0.6 の区分を回収し、目的化合物 1 を 13 mg (17.6 μmol) 得た。収率は 80% であった。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.89 (t, 6 H), 1.26 (br s, 48 H), 1.57 (m, 4 H), 2.28 (m, 4 H), 3.50 (m, 2 H), 3.8~4.5 (br, 6 H), 5.25 (m, 1 H). ($\text{C}_{37}\text{H}_{71}\text{O}_8\text{PBr}^{79}\text{Na}_2$)⁺ に対する

SIMS: 理論値 799.4, 実測値 799.3.

2.1.2 化合物2の合成

反応容器中で無水ピリジン(0.5 mL)中にスperlミジン 8.5 mg (58.5 μmol) を溶かし、無水ピリジン(0.5 mL)中に溶解させた化合物 1 (16.4 mg; 21.1 μmol) を室温で滴下した。窒素雰囲気下室温で24時間かくはんし、溶媒留去後、アミノ化シリカゲル(富士シリシア化学(株)製: 100~200 mesh NH Chromatorex)を用いたカラムクロマトグラフィー(溶離液: クロロホルム/メタノール=3/1)で目的化合物 2 を 7.7 mg 得た。収率は 45% であった。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 6 H), 1.25 (s, 48 H), 1.5~1.9 (br, 14 H), 2.30 (br, 4 H), 2.5~3.0 (br, 10 H), 3.69 (br, 2 H), 3.99 (br, 2 H), 4.41 (m, 2 H), 5.25 (br, 1 H). FT-IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3299, 2956, 2918, 2851, 1729, 1637, 1558, 1466, 1217, 1070. ($\text{C}_{44}\text{H}_{91}\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$)⁺ に対する SIMS: 理論値: 820.6, 分析値: 820.6.

2.1.3 化合物3の合成

反応容器中で無水ピリジン(0.25 mL)中にスperlミン 10.3 mg (51 μmol) を溶かし、無水ピリジン(0.75 mL)中に溶解させた化合物 1 (16.4 mg; 21.1 μmol) を室温で滴下した。窒素雰囲気下室温で24時間かくはんし、溶媒留去後、中性アルミナを用いたカラムクロマトグラフィー(溶離液: クロロホルム/メタノール=3/1)で目的化合物 3 を 9.4 mg 得た。収率は 51% であった。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 6 H), 1.25 (s, 48 H), 1.4~

1.9 (br, 16 H), 2.30 (br, 4 H), 2.5–3.0 (br, 16 H), 3.95 (br, 2 H), 4.15 (br, 2 H), 4.45 (m, 2 H), 5.25 (br, 1 H). FT-IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3400, 3308, 2947, 2918, 2850, 1737, 1640, 1563, 1468, 1219, 1063. (C₄₇H₉₈N₄O₈P)⁺ に対する SIMS: 理論値: 877.7, 分析値: 877.7.

2.1.4 化合物 4 の合成

数平均分子量 1800 のポリエチレンジイミン((株)日本触媒製: PEI(1800))はあらかじめ限外ろ過(Amicon: 分子量カット 500)により精製したものを用いた. 反応容器中で無水ピリジン(0.5 mL)中に PEI(1800) 11.6 mg (6.4 μ mol)を溶かし, 無水ピリジン(0.3 mL)中に溶解させた化合物 1 (5 mg; 6.4 μ mol)を室温で滴下した. 窒素雰囲気下室温で 24 時間かくはんし, 溶媒留去後, 中性アルミナを用いたカラムクロマトグラフィー(溶離液: クロロホルム/メタノール=3/1)で目的化合物 4 を 5.3 mg 得た. 収率は 32%であった. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0.86 (t, 6 H), 1.24 (s, 48 H), 1.60 (m, 4 H), 2.32 (br, 4 H), 2.35–3.1 (br, 184 H), 3.25–4.58 (br, 37 H), 5.19 (br, 1 H). FT-IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3407, 3306, 2950, 2923, 2850, 1737, 1640, 1562, 1468, 1219, 1063.

2.2 測定

β -ガラクトシダーゼアッセイによる遺伝子導入効果の評価, ColE1 プラスミドへのエチジウムブロミド(EtBr)のインターカレーションによる蛍光測定, ポリカチオン化リン脂質と ColE1 プラスミドとの複合体の動的光散乱測定, および原子間力顕微鏡観察は既報の方法により行った²⁴⁾.

3 結果と考察

3.1 ポリカチオン化リン脂質(2-4)の合成

Scheme 1 で示すように, リン酸エステル部位をプロモエチル化した中間体 1 と, 諸種のポリカチオンの 1 級アミンを反応させることにより得た^{*1}. この中間体 1 は, 縮合剤として TPSCI を用いることにより容易に得ることができる. 前報では, ジセチルリン酸エステルとの 2-プロモエタノールの付加物は得られず, 代わりにジセチルリン酸エステルの酸無水物が生成することを示した²⁴⁾. DPPA では酸無水物の生成は確認されなかった.

3.2 遺伝子導入効果

Figure 1 に β -ガラクトシダーゼアッセイによって調べられた化合物 2-4 の遺伝子導入効果を示した. 参照化合物として, 市販の遺伝子導入試剤である O-ethyl DOPC (E-DOPC)²⁾を用いたところ 0.1 mU/well の活性を示した. E-DOPC と比較して, 約 20~40%程度の遺

Figure 1. Transfection efficacy of polycationic lipid conjugates 2-4 on vascular smooth muscle cells in the absence of serum. The ratios of compound/ β -galactosidase plasmid DNA (w/w) were 1.5/1, 3/1, and 6/1, respectively.

伝子導入効果が認められた. 化合物 2-4 の構成成分(DPPA, スペルミジン, スペルミン, PEI(1800))単独では遺伝子導入効果は極めて低い(0.1~1%)ことから, ポリカチオン部位と脂質部位のコンジュゲートにより遺伝子導入効果が発現していると考えられた. 化合物/DNA 比 1.5/1~6/1 (w/w)において, 導入効率は誤差範囲内で差異は認められなかった. 化合物 2-4 において, わずかではあるが活性の違いが見られ, 2>3>4 であった.

3.3 ColE1 DNA とポリカチオン化リン脂質との複合体形成

ColE1 DNA (6646 bp)にインターカレートしたエチジウムブロミド(EtBr)の蛍光強度が, ポリアミンとの複合体形成により減少していく様子を Figure 2 に示した. ポリアミン類(スペルミジン, スペルミン, PEI(1800))単独では, 電荷比 N/P (N はポリアミン中の窒素原子数, P は DNA 中のリン酸基数)が増加するに従って, EtBr の蛍光強度が減少した(Figure 2A). その傾向は 1 分子あたりの窒素原子数の多いものほど顕著である(PEI(1800)>スペルミン>スペルミジン)ことから, カチオンの電荷密度が高いものほど DNA との相互作用が強いことがわかった. 一方, 化合物 2-4 では, 2>3>4 となり, DPPA とのコンジュゲート化により複合体形成能が, それぞれのポリアミン単独系とは逆の傾向を示した(Figure 2B).

Table 1 に動的光散乱(DLS)により求められた化合物 2-4 の粒子径を示し, Figure 3 (A-C)にこれら粒子の AFM 像を示した. DLS 測定から見積もられた粒子径と AFM によって観察された粒子サイズはほぼ一致することがわかった. Figure 3 から, 2 および 3 では約 100 nm 程度, 4 では約 200 nm 程度の集合体が見られた. 分子

*1 スペルミジンは非対称な分子であり, 二つの一級アミンは非等価であるため, スペクトル的に 2 種類のスペルミジン付加物を区別することは困難である.

の形状は逆コーン型であるので、これらはおそらくミセル状の集合体であると考えられる。

Figure 3D に ColE1 DNA の AFM 像を示した。部分的にコイル状の、直径 300~400 nm の環状構造が観測された。ColE1 DNA と化合物 2-4 との複合体の AFM 像を Figure 3 (G-I) にそれぞれ示した。球状~楕円状の集合体がそれぞれ観察され、これらのサイズは 2 (129 nm) < 3 (172 nm) < 4 (201 nm) であった。より小さな複

合体サイズとなるポリカチオン性脂質ほどより DNA を凝縮する効果があると考えられ、この複合体サイズ順序は EtBr の蛍光強度から調べた ColE1 DNA との複合体形成能をおおよそ反映している。観測された複合体サイズと遺伝子導入効率との相関を見ると、より小さな複合体サイズとなるポリカチオン化脂質ほど高い遺伝子導入効率を示している。この傾向は前報での結果²⁴⁾と一致している。

Figure 3E と 3F はそれぞれ ColE1 DNA とスperlミンおよび PEI(1800)との複合体の AFM 像である。スperlミン(3E)では DNA の凝縮が不完全な構造物(~3 μm)となった。PEI(1800) (3F)では、416 × 218 nm (高さ ~22 nm) の集合体が見られた。化合物(3 および 4)と DNA の方がより凝縮能が明らかに高いことから、疎水性部位が DNA の凝縮に必要であることがわかった。

前報では、ジセチルリン酸エステル(DCP)と P-N 結合を介して結合したスperlミジン、スperlミン、PEI (1800)について同様の検討を行い、DNA の凝縮能および遺伝子導入効率は PEI(1800)-DCP コンジュゲートがもっと高いことがわかった²⁴⁾。本報の DPPA と結合したポリアミン類は、これとは逆の結果となった。その理由は現在明らかではないが、DCP と DPPA での微妙な疎水性-親水性バランス、カチオン部位と疎水性部位の間のわずかなスパーサーの効果などが、DNA の凝縮能に寄与していることが考えられる。以上の結果から、DNA の凝縮能が高いものほど高い遺伝子導入効果があることが明らかとなった。本報で高い遺伝子導入効率を示したものはすべて生体が本来有しているもの(DPPA、スperlミジン、スperlミン)で構成されており、低毒性を示すことが期待される。また、アシル鎖長の異なるものを容易に合成可能であることから、疎水性-親水性バランスを変化させることにより、DNA との複合形態を系統的に調べることも可能である。ポリカチオン化リン脂質-DNA 複合体の形態が遺伝子導入に及ぼす影響について、さらなる知見が得られると期待される。

Figure 2. Changes in fluorescence intensity of ethidium bromide intercalated into Col E1 plasmid DNA/polyamine compounds: (A), spermidine (●), spermine (▲), and PEI (1800) (■); (B), 2 (○), 3 (△), and 4 (□). Displacement of ethidium bromide, EtBr, intercalated into DNA was measured at EtBr/nucleotide = 50/1 (mol/mol) with varying polyamine contents. EtBr fluorescence at 590 nm (excitation wavelength: 260 nm) was recorded to obtain the relative fluorescence intensity, I/I_0 , where I and I_0 are fluorescence intensities in the presence and the absence of polyamine derivatives, respectively.

Table 1. Estimated size and shape of 2-4 and complexes with ColE1 DNA suspended in aqueous solution^{a)}

Compound	DLS(nm)		AFM/width(nm)and height(nm) ^{b)}			
	Conjugate alone	Complex with DNA	Conjugate alone		Complex with DNA	
2	90 ± 8	140 ± 40	96	24	129	21
3	106 ± 41	109 ± 40	112	16	172	37
4	218 ± 35	205 ± 39	201	12	201	17

^{a)} The ratio of polyamine conjugate/DNA was 3/1 (w/w). Complexation of polyamine conjugate with DNA was carried out in water.

^{b)} Sample solution was spreaded on a mica surface and dried. AFM images were obtained under dry condition. Width and height of the complexes were estimated from the AFM images in Figure 3.

Figure 3. AFM images of arrays of compounds: **2** (A), **3** (B), **4** (C), ColE1 DNA alone (D), spermine-ColE1 DNA (E), PEI(1800)-ColE1 DNA (F), 2-ColE1 DNA (G), 3-ColE1 DNA (H), 4-ColE1 DNA (I). The compound was suspended in distilled water and then dropped onto a mica surface by spin coating. The polyamine/DNA ratio was 3/1 (w/w). All scale bars represent (A) 200, (B) 200, (C) 200, (D) 200, (E) 1000, (F) 200, (G) 500, (H) 500, and (I) 200 nm, respectively. The object indicated by the arrow is discussed in the text. These AFM images of the conjugate-DNA complexes were acquired with a JEOL JSPM-4210 equipped with a cantilever (MikroMasch, type A: 110 nm, 7.5 N/m), using the discrete contact mode (AC mode).

謝 辞 科学技術振興機構さきがけタイプ(組織化と機能領域)および竹本油脂(株)からの部分的資金援助に感謝いたします。

文 献

- 1) M. A. Kay, M. D. Liu, and P. M. Hoogerbrugge, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 12744 (1997).
- 2) D. D. Lasic, "Liposomes in Gene Delivery", CRC Press, Boca Raton, FL (1997).
- 3) A. D. Miller, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, 1768 (1998).
- 4) O. Meyer, D. Kirpotin, K. Hong, B. Sternberg, J. W. Park, M. C. Woodle, and D. Papahadjopoulos, *J. Biol. Chem.*, **273**, 15621 (1998).
- 5) R. C. MacDonald, G. W. Ashley, M. M. Shida, V. A. Rakhmanova, Y. S. Tarahovsky, D. P. Pantazatos, M. T. Kennedy, E. V. Pozharski, K. A. Baker, R. D. Jones, H. S. Rosenzweig, K. L. Choi, R. Qiu, and T. J. McIntosh, *Biophys. J.*, **77**, 2612 (1999).
- 6) M. Nakanishi and A. Noguchi, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **52**, 197 (2001).
- 7) J.-P. Behr, *Bioconjugate Chem.*, **5**, 382 (1994).
- 8) A. Kichler, K. Mechtler, J.-P. Behr, and E. Wagner, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 213 (1997).
- 9) S. Bhattacharya and P. V. Dileep, *Bioconjugate Chem.*, **15**, 508 (2004).
- 10) T. Nagasaki, M. Hojo, A. Uno, T. Satoh, K. Koumoto, M. Mizu, K. Sakurai, and S. Shinkai, *Bioconjugate Chem.*, **15**, 249 (2004).
- 11) T. Nakai, T. Kanamori, S. Sando, and Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8465 (2003).

- 12) I. Wrobel and D. Collins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**, 296 (1995).
- 13) Y. Yoshikawa, N. Emi, T. Kanbe, K. Yoshikawa, and H. Saito, *FEBS Lett.*, **396**, 71 (1996).
- 14) J. O. Rädler, I. Koltover, A. Jamieson, T. Salditt, and C. R. Safinya, *Langmuir*, **14**, 4272 (1998).
- 15) A. Martin-Herranz, A. Ahmad, H. M. Evans, K. Ewert, U. Schulze, and C. R. Safinya, *Biophys. J.*, **86**, 1160 (2004).
- 16) M. T. Kennedy, E. V. Pozharski, V. A. Rakhmanova, and R. C. MacDonald, *Biophys. J.*, **78**, 1620 (2000).
- 17) R. Koynova and R. C. MacDonald, *Biophys. J.*, **85**, 2449 (2003).
- 18) E. Raspaud, B. Pitard, D. Durand, O. Aguerre-Chariol, J. Pelta, G. Byk, D. Scherman, and F. Livolant, *J. Phys. Chem. B.*, **105**, 5291 (2001).
- 19) Y. Yamazaki, M. Nango, M. Matsuura, Y. Hasegawa, M. Hasegawa, and N. Oku, *Gene Therapy*, **7**, 1148 (2000).
- 20) N. Oku, Y. Yamazaki, M. Matsuura, M. Sugiyama, M. Hasegawa, and M. Nango, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **52**, 209 (2001).
- 21) M. Matsuura, Y. Yamazaki, M. Sugiyama, M. Kondo, H. Ori, M. Nango, and N. Oku, *Biochim. Biophys. Acta*, **1612**, 136 (2003).
- 22) M. Sugiyama, M. Matsuura, Y. Takeuchi, J. Kosaka, M. Nango, and N. Oku, *Biochim. Biophys. Acta*, **1660**, 24 (2004).
- 23) H. Harashima, Y. Shinohara, and H. Kiwada, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 85 (2001).
- 24) T. Dewa, K. Ieda, K. Morita, Li Wang, R. C. MacDonald, K. Iida, K. Yamashita, M. Oku, and M. Nango, *Bioconjugate Chem.*, **15**, 824 (2004).
- 25) M. Uragami, Y. Miyake, and S. L. Regen, *Langmuir*, **16**, 3491 (2000).
- 26) T. Tanaka, T. Sakata, K. Fujimoto, and M. Ikehara, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 6209 (1987).

[Notes]

Novel Polycationic Phospholipid Conjugates for Gene Carriers

Takehisa DEWA,^{*1,†} Yukari IEDA,^{*1} Kazuyuki MORITA,^{*1} Kiyotaka YOSHIDA,^{*1} Li WANG,^{*2} Robert C. MacDonald,^{*2} Kouji IIDA,^{*3} Keiji YAMASHITA,^{*1} Naoto OKU,^{*4} and Mamoru NANGO^{*1}

^{*1}Materials Science and Engineering, Nagoya Institute of Technology (Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8555, Japan)

^{*2}Department of Biochemistry, Molecular Biology, and Cell Biology, Northwestern University, (Evanston, Illinois 60208, USA)

^{*3}Nagoya Municipal Industrial Research Institute (3-4-41 Rokuban-cho, Atsuta-ku, Nagoya 456-0058, Japan)

^{*4}University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Science (52-1 Yoda, Shizuoka 422-8526, Japan)

Three types of polycationic phospholipids conjugates were synthesized to develop a novel nonviral gene carrier. The conjugates composed of a polyamine portion: spermidine, spermine or polyethylenimine (PEI), and a phospholipid portion: dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA) were synthesized via a synthetic intermediate, ethylbrominated DPPA. The polycationic lipids exhibited moderate transfection efficacy evaluated by β -galactosidase assay. These conjugates form a micelle-like assembly in aqueous solution, whose sizes are in the range of 90~220 nm. The formation of the conjugate-DNA complex was observed by using atomic force microscopy (AFM). The AFM images revealed that the conjugate-bearing spermidine, which showed the most efficient transfection, enables one to form a compact complex (~130 nm in width) with DNA, while the conjugate-bearing PEI, which showed a less efficient transfection, forms a large complex (~200 nm) with DNA.

KEY WORDS Polycationic Lipid / Polyamine / Gene Transfer / Compaction / AFM /

(Received May 31, 2004; Accepted August 20, 2004)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **61**(12), 634—639 (2004)]

† PRESTO, JST