

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16990

研究課題名(和文)小口径人工血管への応用を目指した新規抗血栓性星型ポリマーコート材料の開発

研究課題名(英文)Development of a new antithrombogenic coating material based on star polymer for a small diameter artificial blood vessel

研究代表者

戸谷 匡康(TOTANI, MASAYAUS)

九州大学・工学研究院・特任助教

研究者番号：20773500

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): 高密度親水性ポリエチレンオキシド(EO)鎖を修飾した星型多分岐高分子膜の分子鎖凝集状態が、生体適合性(バイオイナー特性)に及ぼす影響について検討した。水中におけるEO鎖が形成する膨潤層は、優れたタンパク質吸着抑制、血小板粘着抑制、細胞接着抑制を有することが明らかとなった。また、バイオイナー特性の発現に必要な水-高分子界面の分子鎖凝集状態をより明確にするため、光架橋性官能基を導入し多分岐高分子膜に高密度親水性鎖を修飾したモデル界面を評価した。最界面領域に存在するEO鎖は高い密度に従い、水中では拡散した分子鎖凝集構造が形成されバイオイナー特性の発現に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題では、高密度親水性ポリエチレンオキシド鎖を有する星型多分岐高分子(HB-PEO9A)を精密重合法により合成した。このHB-PEO9A膜のタンパク質吸着試験、血小板粘着試験、細胞接着試験を行った結果、優れたバイオイナー特性を示すことが明らかとなった。この高密度ポリエチレンオキシド鎖を導入した星型多分岐高分子は、これまでに開発してきたポリヒドロキシエチルメタクリレート(PHEMA)鎖を有する星型多分岐高分子に比べ高い血小板粘着抑制、細胞接着抑制を示した。PET基板表面上において高い接着性を有する星型多分岐高分子膜が得られたことから被覆材料として応用可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): A star-like hyperbranched polymer having hydrophilic poly(ethyleneoxide acrylate) arms (HB-PEO9A) was prepared by a core-first method based on atom transfer radical polymerization. The PEO9A layer coated on a solid substrate was dissolved by water, and effectively inhibited protein adsorption and cell adhesion.

To clear the bioinert property on water-interface, a novel photo-crosslinkable hyperbranched polymer having multi-benzophenone groups (HB-BP) was synthesized. This system was used to photograft the water-soluble and bioinert bottle-brush polymer, poly(ethylene oxide methacrylate) with 9 ethylene oxide units (PEO9MA) and its derivatives on HB-BP coating layer. The physical surface properties of PEO9MA derivatives on HB-BP indicated different elastic modulus values and defused polymer interface with water depend on PEO side-chain density, and controlled NIH3T3 fibroblasts attachment.

研究分野：高分子化学

キーワード：高分子界面 精密重合 多分岐高分子 星型高分子 生体適合性 防汚特性 抗血栓性材料 細胞接着抑制

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

次世代型医療デバイスに資する高分子材料には、生体成分に対する極めて高い付着抑制能が要求される。これまで、表面開始ラジカル重合法により基板表面に親水性鎖を高密度にグラフトした「濃厚ポリマーブラシ」は、優れたバイオイナー特性を示すことが報告されている。一方、その作製方法は煩雑であり、近年は複雑に小型化する医療用デバイスには、よりシンプルな界面構築法が求められている。また、水和した高分子膜の分子鎖凝集構造とバイオイナー特性の発現メカニズムの関係は未だ明らかではない。研究代表者らは、新たな分子設計指針に基づいた高いバイオイナー特性を示す高分子膜の構築と水-高分子界面に分子鎖凝集構造を下記の実験方法により評価した。

2. 研究の目的

本研究では、多分岐高分子を基盤とするバイオイナー界面の構築に着目した。多分岐高分子は、分岐構造を積極的に導入した球状高分子であり末端基数の多さが特徴である。本研究では2つのモデル界面を設計し、高密度な親水性鎖を導入した多分岐高分子膜の分子鎖凝集状態が、バイオイナー特性に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 精密重合に基づく高密度親水性鎖を導入した星型多分岐高分子を設計した。Fig. 1 は、精密重合に基づく高密度親水性鎖(PEO9A)導入星型多分岐高分子(HB-PEO9A)の調製、および、これを用いたバイオイナー界面構築の概念図である。出発原料として、ジビニルベンゼン骨格および末端カルボキシ基を有する多分岐高分子(HB)を用いた。星型多分岐高分子(HB-PEO9A)は、HBに開始剤を導入した HB-EBiB を合成した後、オリゴエチレンオキシドアクリレート(EO9A)を原子移動ラジカル重合することで調製した。HB-PEO9A 薄膜は、スピコート法に基づきシリコン基板もしくはポリエチレンテレフタレート(PET)上に調製した。膜表面の化学組成および形態は、それぞれ、X線光電子分光(XPS)測定および原子間力顕微鏡(AFM)観察に基づき評価した。水界面における膜の分子鎖凝集状態は、気泡をプローブに用いた静的接触角測定に基づき評価した。タンパク質吸着量は、アルブミン/フィブリノーゲン混合溶液を用い、Micro-bicinchoninic acid 法に基づき評価した。血小板粘着特性は、多血小板血漿を用い、粘着した血小板を固定化後、走査型電子顕微鏡(SEM)観察に基づき評価した。細胞接着試験には、マウス線維芽細胞 NIH3T3 用いた標準条件下で培養後、固定化および染色後、光学顕微鏡観察に基づき評価した。参照試料として、HB 薄膜および PET 基板を評価した。

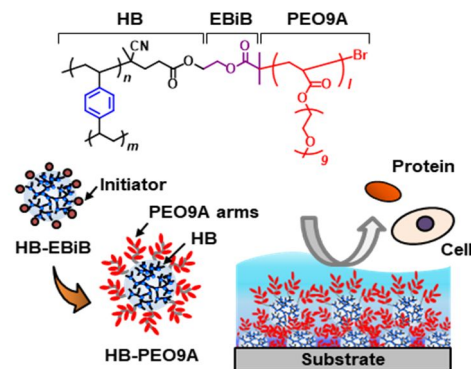


Fig. 1. A schematic illustration of the anti-biofouling coating strategy using a star-like hyper-branched polymer. HB-PEO9A was composed of a hydrophobic core and bottle brush-type hydrophilic PEO9A arms.

(2) バイオイナー特性の発現に必要な水高分子界面の構造を明確にするため、光架橋性官能基を導入した多分岐高分子(HB-BP)を用いて高密度親水性鎖が高分子最表面領域のみに存在するモデル界面の構築を検討した。Fig. 2 は、HB-BP と水溶性高分子からなる防汚界面の設計概念である。HB-BP は、紫外線(UV)照射によりベンゾフェノン基が α -水素基を有する高分子との間に架橋構造を形成し基材上に強固な固定が可能と考えられる。研究代表者らは、HB-BP 膜上

に水溶性ポトルブラシポリマーであるポリ(エチレンオキシドアクリレート)(PEO9MA)を光修飾により固定しモデル界面(HB-EO100)を作製した。バイオナート特性は上述した方法で評価した。また、PEO9MAを修飾した水-高分子界面の分子鎖凝集構造を明確にするため、PEO9MAにメチルメタクリレート(MMA)を導入したランダムコポリマーP(EO9MA-*r*-MMA)(EO 74% and 56%)を同様の方法で光修飾した界面(HB-EO74とHB-EO56)の評価も行った。これらのモデル界面に対し、膜表面の化学組成と水中における膜の膨潤率は上述した構造解析により明らかにした。また、原子間力顕微鏡(AFM)によるフォースカーブ測定により水中における膜弾性率を評価した。

4. 研究成果

(1) 高密度親水性鎖を修飾した多分岐高分子膜が示すバイオナート特性

Fig.3は、HB膜およびHB-PEO9A膜のXPS (a) N_{1s}および(b) C_{1s} コアスペクトルである。光電子放出角(ϕ_e)は15°であり、分析深さは3 nm程度である。N_{1s} スペクトルにおいて、HB膜では、シアノ窒素に帰属されるピークが400 eV付近に観測されたのに対し、HB-PEO9A膜では、観測されていない。C_{1s} スペクトルには、中性炭素、エーテル(もしくは、シアノ)炭素、およびカルボニル炭素に帰属されるピークが、それぞれ、285、286.5、および、289.0 eV付近に観測される。HB-PEO9A膜の場合、エーテル(もしくはシアノ)炭素由来のピーク強度が強いことから、膜最表面領域にPEO9A鎖が存在することが明らかである。

HB-PEO9A膜に対する気泡接触角は153°であり、参照PET基板に対する接触角131°と比較して高く、親水性であることを確認した。Fig. 4は、AFMに基づき評価した大気中および水中におけるHB膜とHB-PEO9A膜の断面プロファイルである。膜の一部を削除してあり、その段差が膜厚に対応する。HB膜の場合、水中浸漬前後で膜厚はほとんど変化しなかった。一方、HB-PEO9A膜の場合、膜厚は、約1.3倍に増加したことから、水による膨潤層が形成されることがわかった。Fig. 5はHBおよびHB-PEO9A膜表面上のタンパク質吸着量で

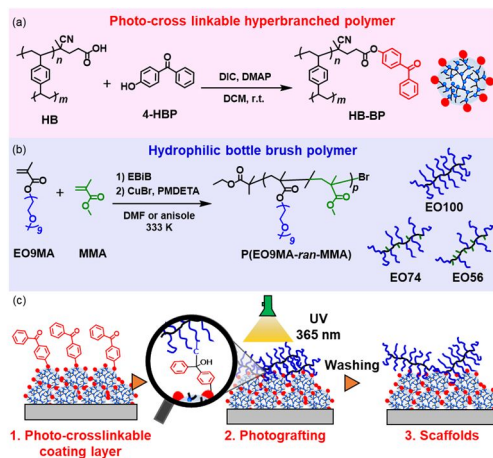


Fig. 2. a) Synthesis of photo-cross linkable HB-BP. b) Synthesis of bottle brush polymer of PEO9MA derivatives. c) A schematic illustration for construction of anti-biofouling and spheroid formation-controllable surfaces based on photo-crosslinkable HB-BP and linear bottle-brush polymers with different EO9MA fractions.

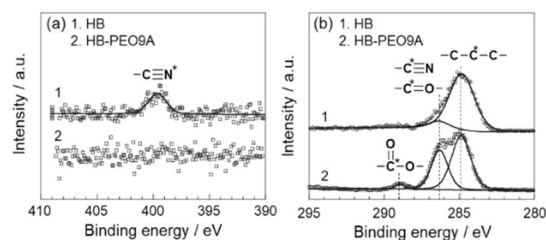


Fig. 3. XPS (a) N_{1s} and (b) C_{1s} core level spectra for HB and HB-PEO9A layers acquired at ϕ_e of 15°.

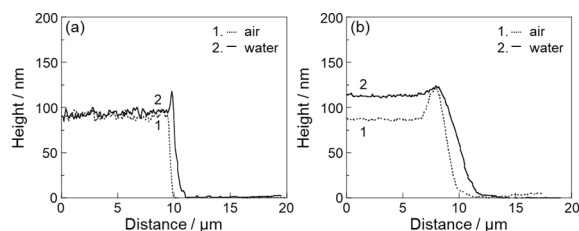


Fig. 4. Cross-sectional height-profiles for (a) HB and (b) HB-PEO9A films, in which a part was cut by a blade, in contact with air and water, as shown by dotted and solid lines.

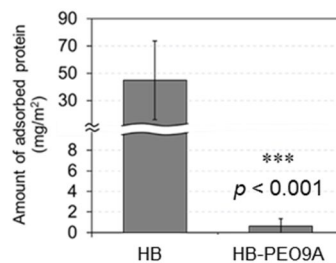


Fig. 5. Total amount of adsorbed proteins on HB and HB-PEO9A films. Values with S.D. are averaged over 6 samples. Concentrations of albumin and fibrinogen were 0.45 and 0.3 g·L⁻¹, respectively.

ある。HB-PEO9A 膜では、タンパク質吸着量が顕著に減少し、高いタンパク質吸着抑制能を有することがわかった。Fig. 6 は膜表面上に粘着した血小板の SEM 像である。HB-PEO9A 膜表面上の血小板粘着数は、HB 膜の場合と比較して著しく減少した。また、HB-PEO9A 膜上の僅かに粘着した血小板は、その形態が変化しておらず、活性化が抑制されることがわかった。Fig. 7 は、NIH3T3 細胞の光学顕微鏡像である。血小板粘着試験結果と同様に、HB-PEO9A 膜表面では、HB 膜表面と比較して、接着細胞数が著しく減少した。本研究では、ブラシ状親水性鎖を導入した HB-PEO9A 膜が種々の生体成分の付着に対し高い抑制能を示すことを明らかにした。これは HB-PEO9A 膜が高密度ブラシと類似した水界面の構造を有することに起因していると考えられる。

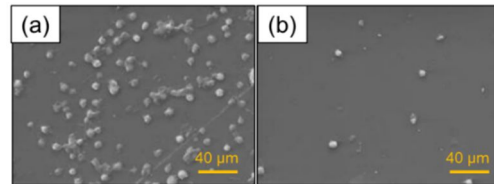


Fig. 6. SEM images of platelets on (a) HB and (b) HB-PEO9A films, respectively.

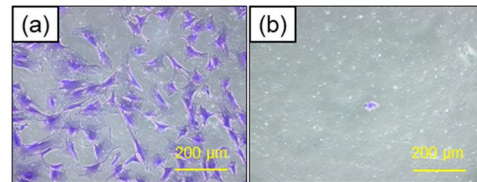


Fig. 7. Microscopic images of NIH3T3 on (a) HB and (b) HB-PEO9A films, respectively.

(2) 光架橋性高分子に修飾した高密度親水性鎖が与える細胞接着挙動

上述のとおり HB-PEO9A 膜は、バイオナート特性に優れていた。この知見をもとに以下では高密度エチレンオキシド鎖の構造と結合条件を制御することにより、膜界面が細胞接着に与える影響を HB-EO100, HB-EO74 および HB-EO56 を用いて評価した。XPS 測定から得られた N_{1s} および C_{1s} コアスペクトルからそれぞれ作製した HB-EO 膜の最表面領域は密度の異なる EO 鎖由来のピークが観測された。Fig. 2 に示す HB-BP と EO 鎖から構成される二層膜が得られたことが分かった。これらの表面の水接触角は HB-EO100, HB-EO74, HB-EO56 の順で高い親水性を示した。Fig. 8 は HB-BP, HB-EO100, HB-EO74 および HB-EO56 の空気下/水中における膜厚の変化と水中におけるフォースカーブである。空気下および水中における HB-BP 膜は膜厚に変化が無く膨潤を示さないことが分かった。一方で、密度の異なる EO 鎖を光修飾した HB-EO 膜では、HB-EO100, HB-EO74, HB-EO56 の順に高い膨潤率を示した。AFM を用いた水中のフォースカーブ測定では、HB-BP, HB-EO56, HB-EO74, HB-EO100 の順に弾性率が顕著に低下した。よって、HB-BP 膜上に光修飾された EO 鎖誘導体は EO 鎖の密度が高いほど、水中ではより親水性であり膨潤率が高く、低い弾性率を示す分子鎖凝集状態であることが明確になった。

Fig. 9 は、HB-BP 膜および HB-EO 膜の細胞接着試験およびタンパク質吸着試験の結果である。HB-EO100 膜は優れた細胞接着抑制能を示すことが明らかとなった。一方で、HB-EO74 および HB-EO56 膜で EO 鎖の密度が低下すると共にバイオナート特性は僅かに低下し、細胞スフェロイドの接着が観察された。

これらの結果から、材料表面のバイオナ

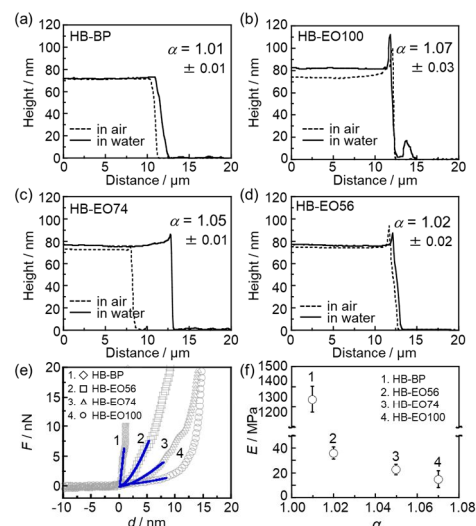


Fig. 8. Sectional views for (a) HB-BP, (b) HB-EO100, (c) HB-EO74, and (d) HB-EO56 films across the boundary between the scratched and unscratched areas measured in air (broken) and water (solid). (e) Depth dependence of repulsive force (F), and (f) Relations of Young's modulus (E) and the swelling rate (α) for HB-BP, HB-EO100, HB-EO74, and HB-EO56 films.

ト特性示す高密度親水性鎖の構造および分子鎖凝集状態の条件が明らかとなった。この光架橋による親水性鎖は幅広い水溶性高分子に適用可能であり、新たな高分子界面と生体成分との相互作用を明らかにするために有用であることが示唆された。

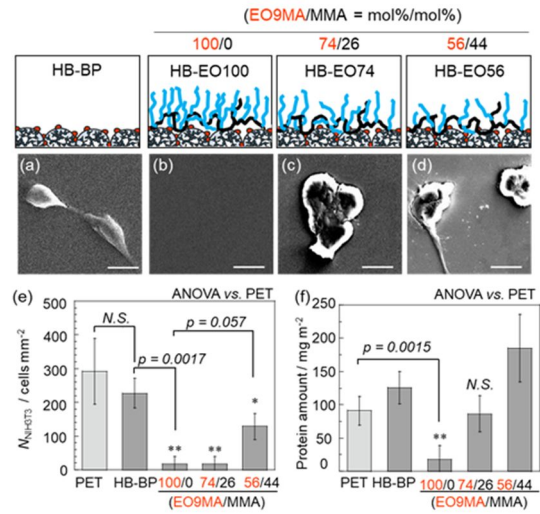


Fig. 9. (a) Illustration and enlarged (scale bar: 20 μm) SEM images of adherent NIH3T3 cells on (a) HB-BP, (b) HB-EO100, (c) HB-EO74 and (d) HB-EO56 surfaces, (e) The number of adherent NIH3T3 cells (NCELL). The values are expressed as mean \pm S.D. from $n = 3$. (f) Total amounts of adsorbed serum proteins. Data represent means \pm SD ($n = 6$). ANOVA: ** $p < 0.01$ vs. PET.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Totani Masayasu, Liu Ling, Matsuno Hisao, Tanaka Keiji	4. 巻 7
2. 論文標題 Design of a star-like hyperbranched polymer having hydrophilic arms for anti-biofouling coating	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1045 ~ 1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8TB03104E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hisao Matsuno, Masayasu Totani, Arisa Yamamoto, Masayuki Haraguchi, Masaaki Ozawa, Keiji Tanaka	4. 巻 51
2. 論文標題 Water-induced surface reorganization of bioscaffolds composed of an amphiphilic hyperbranched polymer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 1045-1053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-019-0212-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oda Yukari, Inutsuka Manabu, Awane Ryo, Totani Masayasu, Yamada L. Norifumi, Haraguchi Masayuki, Ozawa Masaaki, Matsuno Hisao, Tanaka Keiji	4. 巻 53
2. 論文標題 A Dynamic Interface Based on Segregation of an Amphiphilic Hyperbranched Polymer Containing Fluoroalkyl and Oligo(ethylene oxide) Moieties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 2380 ~ 2387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.macromol.9b02064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 戸谷匡康、原口将幸、松野寿生、水流添暢智、田中敬二
2. 発表標題 星型多分岐高分子を応用した 生体適合性界面の構築
3. 学会等名 九州地区高分子若手研究会・夏の後援会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸谷匡康、原口将幸、松野寿生、水流添暢智、田中敬二
2. 発表標題 星型多分岐高分子を応用した生体適合性界面の構築
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸谷匡康、松野寿生、田中敬二
2. 発表標題 防汚性コート材料のための親水性鎖を有する多分岐高分子の設計
3. 学会等名 平成30年度 九州支部高分子若手研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ling Liu, Masayasu Totani, Hisao Matsuno, Keiji Tanaka
2. 発表標題 BiomertCoatingUsingaPhotocrosslinkableHyperbranchedPolymer
3. 学会等名 平成30年度 九州支部高分子若手研究会・冬の後援会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ling Liu, Masayasu Totani, Hisao Matsuno, Keiji Tanaka
2. 発表標題 Aggregation States of Bio-inert Interface Using a Photo-Cross-Linkable Hyperbranched Polymer
3. 学会等名 第68回 高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ling Liu, Masayasu Totani, Hisao Matsuno, Keiji Tanaka
2. 発表標題 Design of a Photo-crosslinkable Bioinert Coating Based on a Hyperbranched Polymer
3. 学会等名 第57回日本接着学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸谷 匡康, Ling Liu, 松野 寿生, 田中 敬二
2. 発表標題 生体成分の接着を制御した界面の構築
3. 学会等名 第57回日本接着学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ling Liu, Masayasu Totani, Hisao Matsuno, Keiji Tanaka
2. 発表標題 Control of Cellular Behaviors on Bottle-brush Copolymers Grafted to Hyperbranched Polymers
3. 学会等名 Tentative Schedule of 2019 Japan-Taiwan Bilateral Polymer Symposium (JTBPS2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ling Liu, Masayasu Totani, Hisao Matsuno, Keiji Tanaka
2. 発表標題 Control of Fibroblast Adhesion Based on Mechanical Properties of Bottle-brush Polymers at Water Interface
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸谷 匡康、Ling Liu、松野寿生、田中敬二
2. 発表標題 生体成分の接着を制御した多分岐高分子界面の構築
3. 学会等名 第18回高分子表面研究討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸谷匡康、片山淳子、小澤雅昭、水流添暢智、松野寿生、田中敬二
2. 発表標題 エポキシ/ベタイン含有生体適合性接着剤の力学特性
3. 学会等名 高分子若手研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸谷匡康、片山淳子、小澤雅昭、水流添暢智、松野寿生、田中敬二
2. 発表標題 エポキシ/ベタインを含有した生体適合性接着剤の構築
3. 学会等名 繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayasu Totani, Junko Katayama, Masaaki Ozawa, Nobutomo Tsuruzoe, Hisao Matsuno and Keiji Tanaka
2. 発表標題 Bioinert Properties of Epoxy/Betaine Based Polymer Adhesive
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸谷匡康、片山淳子、小澤雅昭、水流添暢智、松野寿生、田中敬二
2. 発表標題 光架橋性官能基を導入した生体適合性接着剤の分子設計と機能
3. 学会等名 第58回日本接着学会年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 生体適合性接着剤	発明者 戸谷匡康、片山淳子、小澤雅昭、水流添暢智、松野寿生、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-194425	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----