

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19750095

研究課題名 (和文) 濃厚ポリマーブラシを利用した生体適合性表面の創製

研究課題名 (英文) Biocompatible Surface with Well-Defined “Concentrated” Polymer Brushes

研究代表者

吉川 千晶 (YOSHIKAWA CHIAKI)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・独立研究者

研究者番号：10447930

研究成果の概要：

表面開始リビングラジカル重合法で得られる新規な分子組織体、「濃厚ポリマーブラシ」層では、タンパクの非特異的吸着や細胞接着が大幅に抑制されることを見出し、それらがブラシの高密度化によって実現されることを実験的に明らかにした。また、濃厚ポリマーブラシ構造にすることで、化学組成によらずタンパクや細胞接着が抑制されることも明らかにしている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：リビングラジカル重合、グラフト重合、濃厚ポリマーブラシ、生体適合性

1. 研究開始当初の背景

近年、リビングラジカル重合法を表面グラフト重合に応用することで、鎖長・鎖長分布の制御された高分子を従来にない高い密度 (~0.8 chains/nm²) でグラフトすることが可能となり、従来法では実験的に合成することが困難であったためにこれまで未知・未開拓であった**濃厚ポリマーブラシ状態**を実現できるようになった。以来、この濃厚ブラシの新規で特異な構造・物性が明らかになっている。例えば、濃厚ブラシは隣接グラフト鎖間の立体反発により、良溶媒中で高度に伸張している (**高伸張ポリマーブラシの形成**)。また、その特異な高伸長構造を反映して、濃厚ポリ

マーブラシは良溶媒中において圧縮に対する強い反発力、超潤滑特性、グラフト点間の平均距離に相当するサイズの物質を選択的に吸着/排除する (**ブラシ層によるサイズ排除効果**) など、従来法で得られる低密度ブラシ (準希薄ブラシ) に見られなかった新しい物性を発現することがわかっている。

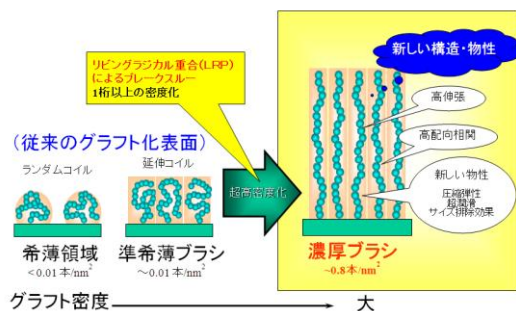
申請者はこれまでに、**リビングラジカル重合法の分子設計における多様性 (自在な機能設計が可能)** と **濃厚ブラシの構造・物性における新規性に着目した次世代バイオインターフェースへの応用に注力してきた**。研究開始当時までに、親水性ポリヒドロキシエチルメタクリレート (PEHMA) ブラシの密度 (グラ

フト密度 $0.007 \sim 0.7 \text{ chains/nm}^2$ や鎖長（グラフト膜厚にして $2 \sim 10 \text{ nm}$ ）、タンパクの大きさを変えて系統的な実験を行い、タンパクの吸着挙動がグラフト密度とタンパクの大きさの相対的な関係に依存すること、すなわち、ブラシ膜はその隣接グラフト点間距離に比べて小さいサイズのタンパクを（PHEMA キャスト膜と同様に）著しく吸着するのに対し、相対的に十分大きいサイズのタンパクをグラフト層から完全に排除し、その非特異的吸着を阻害すること（サイズ排除効果）を明らかにしている、

2. 研究の目的

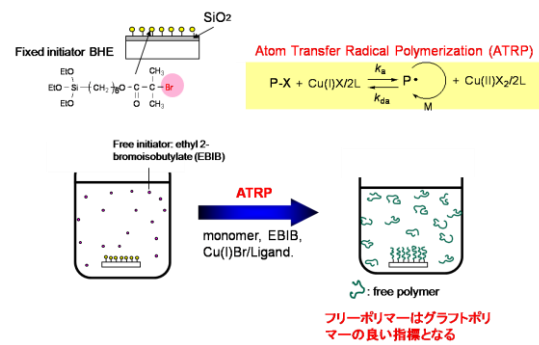
申請者は、親水性高分子である PHEMA の濃厚ブラシ層では、タンパクの吸着が大幅に抑制されること（非特異的相互作用の抑制）を見出し、それがブラシの高密度化によって実現されることを実験的に明らかにしてきた。また、濃厚ポリマーブラシは、圧縮に対する強い反発力や低摩擦特性を示すなど、新規で特異な物性・機能を発現することがわかっている。加えて、リビングラジカル重合法は構造制御の多様性に富み、末端基変換による機能団の導入も可能である。そこで、本研究では、濃厚ブラシの低摩擦特性や機能設計の自由度に因み、既述の研究成果を拡張・発展させ、濃厚ブラシを利用した新しい生体適合性表面の創製を目指した。

3. 研究の方法



本研究では、リビングラジカル重合法の分子設計における多様性と、濃厚ブラシ表面に特有の非特異的相互作用の抑制に着目して、濃厚ブラシを利用した生体適合性表面の創製を目指した。具体的には、表面開始原子移動ラジカル（ATRP）重合法を用いて濃厚ブラシを作成し、(1)ブラシ表面の末端官能基と生体適合性、(2)親水性ポリマーの種類と生体適合性、(3)濃厚ブラシの非血栓性について検討することを企図した。

濃厚ポリマーブラシの調製



4. 研究成果

(1) ブラシ表面の末端機能化と生体適合性

表面開始LRPではグラフト鎖はキャッピング剤（ATRPの場合はBr）で末端が保護されている。ここでは末端にBrを有するPHEMAブラシとBrを有さないPHEMAブラシを調製し、末端の違いによるタンパク吸着特性について水晶振動子（QCM）法により検討した。その結果、ブラシ表面でのタンパク吸着特性は末端Brの有無に影響されないことがわかった。

(2) 親水性ポリマーの種類と生体適合性

化学組成の異なる濃厚ポリマーブラシ表面の生体適合性について検討するため、密度や鎖長の異なる PHEMA、poly(hydroxyethyl acrylate) (PHEA)、poly(poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate) (PPEGMA) ブラシを作成し、マウス由来 L929 繊維芽細胞の接着特性について調べた。ポリマーブラシの化学組成や表面接触角（新水性）が異なるにも関わらず、いずれのポリマ

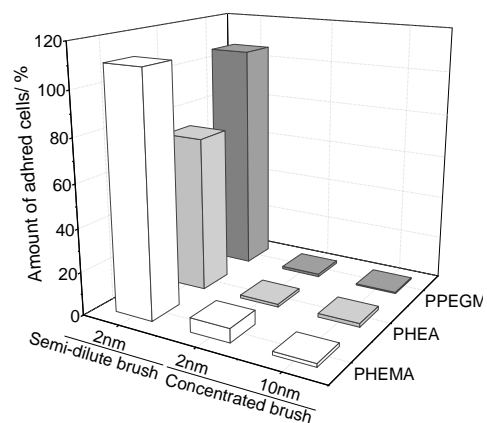


Figure 1. Amount of adhered cells on polymer brushes. Culture time = 24h. Cell density = $5.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$. The vertical axis was normalized by the number of seeded cells.

ーを用いても、準希薄ブラシに比べて濃厚ブラシでは細胞接着が飛躍的にかつ同程度抑制されることが確認された (Figure 1)。

表面の物理構造の制御、すなわち濃厚ブラシ構造にすることで化学組成によらずタンパクや細胞接着が抑制されるという特筆すべきこの結果が関連分野へ与える影響は非常に大きい。今回は中性の新水性ポリマーを用いているが、電荷をもつポリマーなど、その他のポリマーについて今後検討する必要がある。

(3) 濃厚ブラシの非血栓性

濃厚 PHEMA ブラシ表面への細胞接着について検討することを目的として、まず、細胞接着性糖タンパクの一つフィブロネクチンおよび細胞培養で使用される血清中の夾雑タンパク (FBS) の吸着について QCM 測定を行った。いずれの場合も準希薄ブラシ ($\sigma = 0.1$ chains/nm², $L = 2$ nm)にはタンパクが吸着するのに対し、濃厚 PHEMA ブラシ表面 ($\sigma = 0.7$ chains/nm², $L = 2, 10$ nm)にはほとんど吸着しないことが確認された。次に、血管内皮細胞の接着について顕微鏡観察を行ったところ、期待通り、濃厚ブラシ表面 ($\sigma = 0.7$, $L = 2, 10$)では準希薄ブラシ ($\sigma = 0.1$, $L = 2$)や他の表面に比べて細胞接着が抑制されることがわかった (Figure 2)。更に、長期安定性について検討するため、濃厚ブラシを FBS に1週間浸漬したのち、HUVEC の接着実験を行ったところ、24時間の接着においても、濃厚ブラシ表面には HUVEC がほとんど接着していないことが確認された。血小板の接着についても検討したところ、濃厚ブラシ表面では血小板がほとんど活性化しないことが明らか

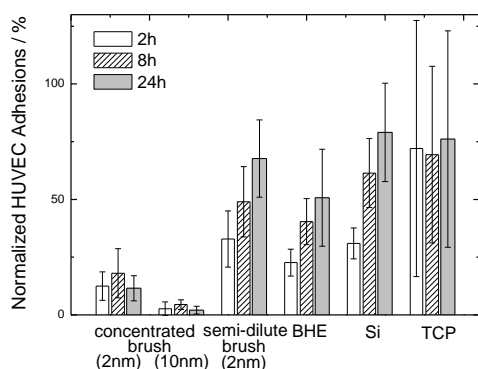


Figure 2. Amount of adhered HUVEC on surfaces. 7×10^4 cells/well were seeded. The vertical axis shows amount of adhered HUVEC normalized by the number of seeded cells. Incubation time = 2, 8, and 24 h.

かとなった (Figure 3)。以上の結果から、濃

厚 PHEMA ブラシは長期安定性に優れた血液適合性表面に成り得ると期待できる。

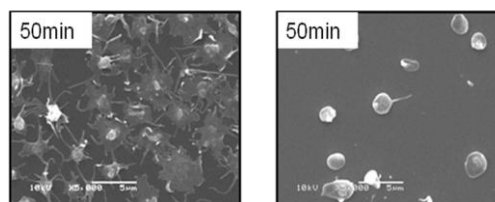


Figure 3. SEM images of platelet adhesions at 50 min on PET film (left) and concentrated PHEMA brush with 2 nm (right).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Y. Yokoyama, S. Hattori, C. Yoshikawa, Y. Yasuda, H. Koyama, T. Takato, H. Kobayashi “Novel wet electrospinning system for fabrication of spongiform nanofiber 3-dimensional fabric” *MATERIALS LETTERS* **2009**, *63*, 754-756. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① 吉川千晶 他、“新水性濃厚ポリマーブラシの生体適合性”、特別推進研究「濃厚ポリマーブラシの科学と技術」公開シンポジウム、2009/03/27、京都
- ② 吉川千晶、“新規バイオインターフェース：濃厚ポリマーブラシのサイズ排除特性と生体適合性”、特別推進研究「濃厚ポリマーブラシの科学と技術」公開シンポジウム、2009/03/27、京都
- ③ 吉川千晶 他、“濃厚ポリマーブラシの生体適合性”、第13回高分子表面研究討論会、2009/01/30、東京
- ④ 橋本良秀、吉川千晶 他、“濃厚ポリマーブラシの生体適合性：[2] 細胞接着特性”、つくば医工連携フォーラム2009、2009/01/14、つくば
- ⑤ 吉川千晶 他、“濃厚ポリマーブラシの生体適合性：[1] タンパクの非特異的吸着の抑制”、つくば医工連携フォーラム2009、2009/01/14、つくば
- ⑥ 吉川千晶 他、“各種親水性濃厚ポリマーブラシ表面のタンパク・細胞接着特性”、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008、2008/11/17、東京
- ⑦ C. Yoshikawa, “Densely Packed Surface Polymer Brush”, 2nd. ISATBMS-2008, 2008/07/16 - 2008/07/16, つくば

- ⑧ 吉川千晶、 “精密に制御された高分子界面の創製技術とその生体適合性 “、バイオ高分子若手研究会、2008/11/28 - 2008/11/29、八王子
- ⑨ C. Yoshikawa et al. “Novel Biocompatible Surface with Concentrated Polymer Brushes Prepared by Surface-Initiated Living Radical Polymerization”, WBC, 2008/05/27-2008/06/04, アムステルダム
- ⑩ 吉川千晶、服部晋也、小林尚俊 “HUVEC and Platelet Adhesions on Concentrated Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Brushes”, The 6th NIMS - MPI Workshop, 2008/05/04 - 2008/05/07, 相生市
- ⑪ C. Yoshikawa et al. “Novel Biocompatible Surface with Concentrated Polymer Brushes”, ISIMS-2008 (第1回学際物質科学国際シンポジウム), 2008/03/13, つくば
- ⑫ C. Yoshikawa et al. “Novel Biointerface with Well-defined Concentrated Polymer Brushes Obtainable by Surface-initiated Living Radical Polymerization”, MANA International Symposium 2008, 2008/03/10-13, つくば
- ⑬ C. Yoshikawa et al. “Protein and Cell Adhesions on Well-defined Concentrated Polymer Brushes Prepared by Surface-initiated Living Radical Polymerization”, 1st Asian Biomaterials Congress, ABMC, 2007/12/06, つくば
- ⑭ C. Yoshikawa et al. “Novel Biointerface with Well-defined Concentrated Polymer Brushes Obtained by Surface-initiated Living Radical Polymerization”、TERMIS-AP 2007、2007/12/03-05、東京
- ⑮ 吉川千晶 他 “濃厚ポリマーブラシのタンパク・細胞接着特性” 第29回バイオマテリアル学会大会、2007/11/27、大阪

[図書] (計2件)

- ① 吉川千晶・小林尚俊、「ナノファイバー界面」、新材料・新素材シリーズ 次世代医療のための高分子材料工学(シーエムシー出版)、2008、P. 75-83
- ② H. Kobayashi, Y. Yokoyama, C. Yoshikawa, S. Igarashi, S. Hattori, T. Honda, H. Koyama, and T. Takato “Nanofiber-based scaffolds for tissue engineering”, World Scientific Publishing Co.. Ltd. 2008, P. 182-193

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：高分子ブラシー固体複合材料及びその製造方法

発明者：埴隆夫、堤祐介、南広祐、岸田晶夫、小林尚俊、吉川千晶

権利者：東京医科歯科大学、物質・材料研究機構

種類：特許

番号：2008-247361

出願年月日：2008/09/26

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 千晶 (YOSHIKAWA CHIAKI)

独立行政法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点・独立研究者

研究者番号：10447930

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし