

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02037

研究課題名(和文) 高分子/水界面の動的構造制御とバイオナート材料への展開

研究課題名(英文) Regulation of dynamic aggregation states of polymer/water interfaces and their application to bioinert materials

研究代表者

松野 寿生 (Matsuno, Hisao)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：50376696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：高分子膜最外領域における凝集状態や熱運動性を理解し制御することを目的に、精密重合に基づき種々の高分子を合成、その薄膜を作製し、表面・界面選択的顕微鏡および分光学的手法に基づき評価した。その結果、生体付着抑制能を発現する水界面領域では、その層厚が厚く散漫であるほど、また、分子鎖熱運動性が高いまま維持されているほど、生体不活性が高いことを明らかにした。また、これらは、シリカ微粒子を用いることで、その程度を容易にチューニングすることが可能であり、ひいては、線維芽細胞の接着や伸展挙動を任意に制御できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体不活性を示す高分子材料は、医療デバイスや建築資材の表面材料、コーティング剤として極めて重要である。本研究の実施により、より高い生体不活性、また、安定にその作用を発現するための材料作製の設計指針を提案した。これらの成果は、より安全安心な医療デバイスや公共施設の提供に繋がり、社会全体のQOL向上役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of understanding and controlling the aggregation states and thermal molecular motion in the outermost region of the polymer film, various polymers were synthesized based on precision polymerization and thin films of them were prepared. Surface and interface were characterized by various microscopy and spectroscopy techniques. As a result, it was found that the thicker and more diffused layer at the outermost interface expressed the higher bio-inert property. In addition, it was clarified that the degree of these factors could be easily tuned by using silica nano particles, and that the adhesion and extension behaviors of fibroblasts could be arbitrarily controlled.

研究分野：高分子材料

キーワード：界面 分子鎖凝集状態 水 動的構造 バイオナート

1. 研究開始当初の背景

高分子膜最外領域における凝集状態や熱運動性の理解と制御は、学術的な興味に加え、材料や各種デバイスの設計という観点においても極めて重要である。従来の研究により、高分子薄膜の固体界面近傍における熱運動性が、膜内部と比較して抑制されることが明らかにされている。また、非溶媒である水との接触により、高分子鎖が部分的に溶解もしくは膨潤する界面における高分子鎖の密度分布、局所コンフォメーション、熱運動性や高分子と連動した水の凝集状態、さらには、これら因子と生体成分の付着抑制能（生体不活性）との関係まで明らかにされているが、その例は限定的であり、一般性を確立することなどが課題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、高分子のセグメント運動に加え、種々の時空間スケールにおける界面の動的構造について検討することで、バイオイナート特性の発現メカニズムを明らかにし、また、動的構造の制御に基づき種々のバイオデバイスに資する高度イナート材料の設計指針を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 温度応答性高分子は、外部刺激である温度変化に応じてその凝集状態が変化することから、細胞シート作製用スキャホールドなど水界面の制御法として注目されている。水界面における温度応答性高分子の膨潤挙動を界面張力波に着目し、その特性長の温度依存性を評価した。具体的には、モデル高分子として、市販の感温性ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド-*r*-ブチルアクリレート) (P(NIPAM-*r*-BA))、その非溶媒として、水を用いた。P(NIPAM-*r*-BA) 薄膜は、シリコンウェハ上にスピコート法に基づき製膜した後、真空下、426 Kにおいて、12 時間熱処理を施した。水中での降温過程における表面形態は、原子間力顕微鏡 (AFM) 観察に基づき評価した。

(2) 高分子膜内にシリカ微粒子 (SiNP) を配列させることで、水界面における高分子の熱運動性を制御し、ひいては、細胞接着特性のパターニング制御を試みた。試料として、リビングカチオン重合に基づき 2-メトキシエチルビニルエーテル (MOVE) および 2-ビニルオキシメタクリル酸エチル (VEM) のランダム共重合体 (MrV) を合成した。MrV 溶液を基板上にスピコートした後、光照射することで架橋型水ゲル薄膜 (c-MrV) を調製した (図 1)。続いて、インクジェット法により SiNP 微粒子 (粒径 22 nm) を水分散液から c-MrV 上に配置させた。c-MrV 上の生体付着特性は、細胞接着試験に基づき評価した。試験には NIH3T3 線維芽細胞を用い、310 K、5 % CO₂ 下で所定時間、培養を行った。SiNP 微粒子の配列パターンおよび接着細胞の形態は、位相差顕微鏡観察に基づき評価した。

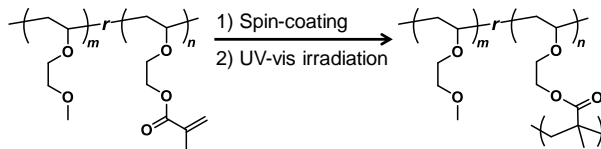


図 1. 架橋 c-MrV 薄膜の作製スキーム。

さらには、原子移動ラジカル重合に

基づき調製したポリ(メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル) (PHEMA) を用いた。SiNP ラインを配列した基板に、スピコート法に基づき PHEMA 薄膜を作製した。薄膜の表面形態および力学特性は、AFM 観察、また、AFM を用いたフォースカーブ測定に基づき評価した。

(3) pseudo peptide 骨格を有するポリオキサゾリン誘導体はモノマーの選択により多様な分子設計が可能であることから、バイオマテリアルとしても期待されている。ここでは、オリゴ(2-ethyl-2-oxazoline) 部位を側鎖に有し、また、種々の基板へのコーティングが可能になるよう疎水性部位としてポリメタクリル酸 (PMMA) を導入したボトルブラシ型ブロック共重合体 PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] を設計した (図 2)。最初に、開始剤として methyl trifluoromethanesulfonate (MeOTf) を用いた 2-ethyl-2-oxazoline のリビングカチオン開環重合 (LCROP) に基づき oligo(2-ethyl-2-oxazoline) methacrylate (O(Ox)MA) マクロモノマーを調製した。続いて、開始剤として末端に Br 基を有する poly(methyl methacrylate) (PMMA) を用いた O(Ox)MA の原子移動ラジカル重合 (ATRP) に基づき PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] を調製した。目的物の化学構造および分子量特性は、プロトン核磁気共鳴分光 (¹H NMR) 測定およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に基づき評価した。ガラス転移温度 (*T*_g) は、

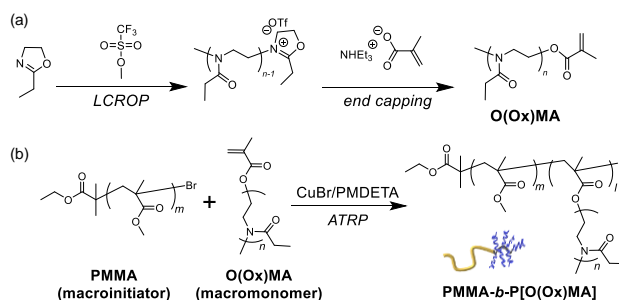


図 2. PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] の合成。

示差走査熱量測定 (DSC) に基づき評価した。PMMA-*b*-P[0(Ox)MA] 薄膜は、各種基板上にスピニング法に基づき作製した。薄膜は、413 K において 12 h 熱処理を施した後、各測定に供した。薄膜の分子鎖凝集状態は、AFM 観察に基づき評価した。薄膜の表面組成は、角度分解 X 線光電子分光 (AD-XPS) 法に基づき評価した。PMMA-*b*-P[0(Ox)MA] 薄膜のバイオイナート特性は、線維芽細胞 NIH3T3 を用いた細胞接着試験、および、牛胎児血清 (FBS) を用いたタンパク質吸着試験に基づき評価した。参照試料として、PMMA 薄膜も同様に作製し各種測定に供した。

また、PMMA ブロックのないポトルブラシ型ホモポリマー (P[0(Ox)_nMA]) (_n = 7, 19) を水溶性開始剤を用いたリビングカチオン開環重合に基づき合わせて合成した。

4. 研究成果

(1) 図 3 は、(a-c) P(NIPAM-*r*-BA) および (d-f) PMMA 薄膜の AFM 形状像である。測定温度は (a, d) 310.0 K、(b, e) 299.0 K、および、(c, f) 298.0 K である。P(NIPAM-*r*-BA) 薄膜表面は、降温に伴い顕著に粗くなる様子が観察された。一方、PMMA 薄膜表面は、温度によらず粗さに変化は観察されなかった。

膨潤に伴う表面形態の変化を定量的に議論するため、界面張力波の解析を行った。図 4 は、(a) P(NIPAM-*r*-BA)、および、(b) PMMA 薄膜の Kratky プロットの温度依存性である。PMMA 薄膜の場合、測定温度によらず明瞭なピークは確認されなかった。PMMA 薄膜は非溶媒である水中においてわずかに膨潤することがわかっているが、測定温度範囲においては、界面張力波は観測されなかった。一方、P(NIPAM-*r*-BA) 薄膜では、波数 $\lambda^{-1} = 0.0037$ 、および、 $\lambda^{-1} = 0.0101$ nm⁻¹ 付近に 2 つのピークが確認された。以下、これらを低波数側から、それぞれピーク 1 および 2 とする。降温に伴い、両ピークともシフトした。ピーク位置から界面張力波の特性長を求めた。

図 5 は P(NIPAM-*r*-BA) 薄膜の水界面における λ の温度依存性である。測定温度 310.0–299.0 K の範囲において、ピーク 1 および 2 の λ は、それぞれ、300 および 90 nm 程度でほぼ一定の値を示した。一方、より低温である 299.0–298.0 K においては、 λ がそれぞれ最大 620 および 120 nm まで急激に増加することがわかった。これらの λ の変化は、水界面における P(NIPAM-*r*-BA) 薄膜の界面自由エネルギーの変化に起因すると考えられる。また、 λ が変化し始める温度は約 299 K であった。透過光強度測定に基づき評価したバルク試料の相転移の開始温度は約 305 K であることから、水界面における界面張力波の変化と相転移は異なることがわかった。

(2) 図 6 (a) は、数平均分子量 19k、分子量分布指標 1.10、VEM 含量 33 mol% の MrV を用いて作製した c-MrV 上に SiNP 微

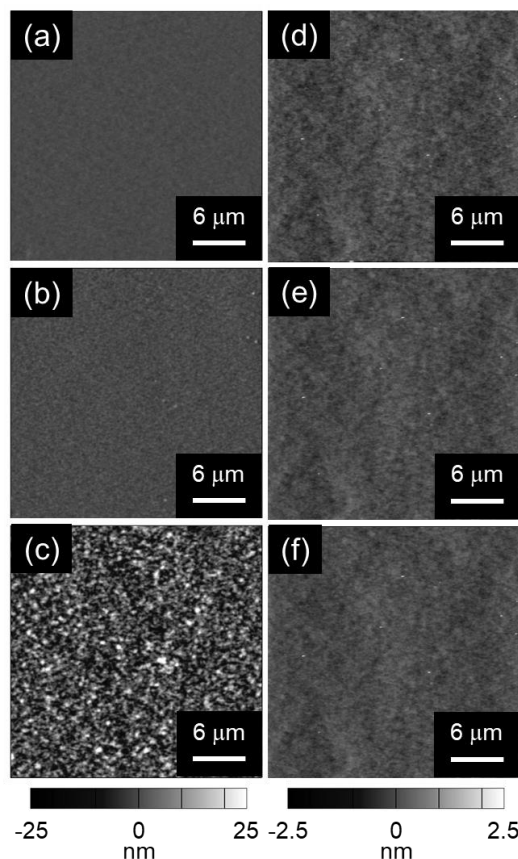


図 3. (a-c) P(NIPAM-*r*-BA) および (d-f) PMMA 薄膜の水中における AFM 高さ像. (a, d) 310.0 K, (b, e) 299.0 K, and (c, f) 298.0 K.

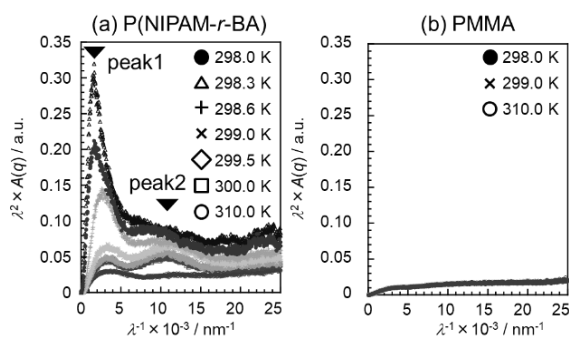


図 4. (a) P(NIPAM-*r*-BA) および (b) PMMA 薄膜の Kratky プロットの温度依存性.

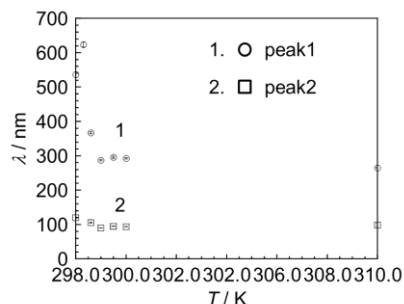


図 5. 水界面における P(NIPAM-*r*-BA) 薄膜の特性長の温度依存性.

粒子をパターンニングしたハイドロゲル薄膜の空気中における位相差顕微鏡像である。挿入図は SiNP 微粒子近傍の拡大図である。SiNP 微粒子は直径 10 μm 程度の円形状に凝集し、規則的に配列されていることがわかる。

図 6 (b) は、SiNP 微粒子パターンニング c-MrV 上に接着した細胞の培地中における位相差顕微鏡像、挿入図は SiNP 微粒子近傍の拡大図である。培地中では、SiNP 微粒子周辺数十 μm の範囲に、しわ状模様が観察された。これは、c-MrV は水環境下において膨潤するが、その程度が Si 微粒子近傍では異なる可能性を示唆している。膜に接着した細胞の多くは伸展することなく、互いに凝集したスフェロイドを形成した。また、スフェロイドは SiNP 微粒子導入部周辺に集まる傾向が確認された。このことは、SiNP 微粒子近傍では、c-MrV 鎖が拘束されることで熱運動性が低下するため、細胞接着およびスフェロイド形成が促進されたと考えることで説明できる

図 7 (a) は、水中において観察した PHEMA 膜の AFM 高さ像である。図中、破線で囲われた部分は、膜直下に SiNP が存在する領域を示している。PHEMA 膜の表面形態は、SiNP 配列の有無には依存しないことがわかった。図 7 (b) は、図 7 (a) 中に白丸でマークしたポイント (A および B) において測定したフォースカーブである。これらカーブより見積もった弾性率は、それぞれ、4.9 および 0.9 MPa であった。これは SiNP 近傍の PHEMA 鎖の熱運動性が抑制されるためと考えられる。

図 8 (a) は、培養 24 h 後における PHEMA 膜の接着細胞の位相差顕微鏡像である。細胞は、破線で示した PHEMA 膜直下の SiNP ラインに沿って接着、伸展する様子が観察された。

図 8 (b) は、顕微鏡像に基づき算出した単位面積あたりの細胞接着数である。細胞は、直下に SiNP が存在する領域 (A) に選択的に接着することがわかった。以上、SiNP を配列することで、水界面における PHEMA 分子鎖の熱運動性を制御し、これを用いた細胞接着特性の二次元パターンニングを実現した。

(2) 表 1 は、合成した高分子の分子量特性および T_g のまとめである。ブロック共重合体は、P[O(Ox)MA] リッチおよび PMMA リッチ相からなる 2 つのガラス転移温度を有することを確認した。

空気中で観察した AFM 形状像に基づき評価した PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] 薄膜の自乗平均面粗さ (R_{RMS}) は 0.39 nm であり、PMMA 薄膜のそれ (0.30 nm) と同程度であった。また、両薄膜の位相像はともに均一であったことから、PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] 薄膜表面は、ナノレベルで十分に平滑であるとともに、一成分で覆われていることが示唆された。一方、水界面における PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] 薄膜の R_{RMS} は、1.39 nm と増加し、PMMA 薄膜と比較して大きかった。

図 9 (a) は、PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] 薄膜の XPS N1s および C1s スペクトルのピーク強度比 ($I_{\text{N1s}}/I_{\text{C1s}}$)

表 1. 合成したポリマーの分子特性

Polymer	M_n^a	M_w/M_n^a	M_n^b	Polymerization degree ^b			T_g^c / K
				<i>m</i>	<i>l</i>	<i>n</i>	
PMMA- <i>b</i> -P[O(Ox)MA]	28,700	1.36	30,100	212	9	9	303, 365
PMMA	23,700	1.28	21,500	212	-	-	389

^a 数平均分子量 (M_n)、重量平均分子量 (M_w) および分子量分布指標 (M_w/M_n)。

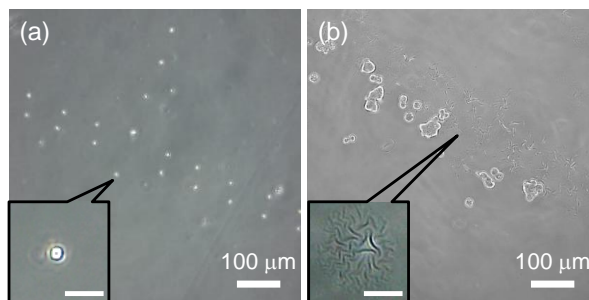


図 6. (a) SiNP 微粒子を配した cMrV 薄膜の位相差顕微鏡像。(b) (b) cMrV 薄膜に接着した NIH3T3 細胞の位相差顕微鏡像。挿入図は、SiNP 微粒子近傍の像で scale bars は 20 μm 。

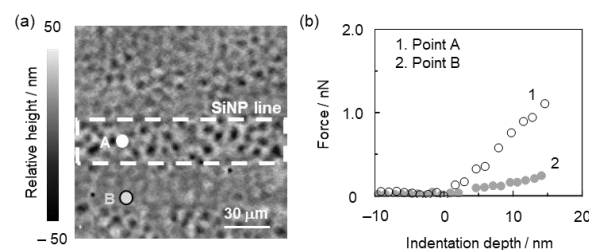


図 7. (a) SiNP 微粒子を配した PHEMA 薄膜の水中における AFM 高さ像。(b) (a) 中に示したポイント (A および B) におけるフォースディスタンスカーブ。

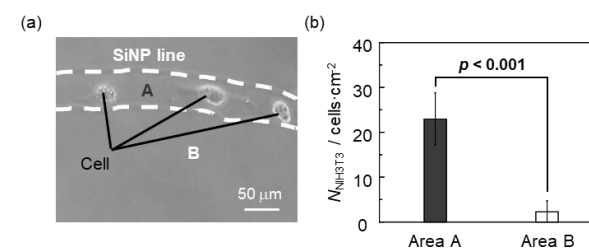


図 8. (a) 培養 24 h 後に取得した SiNP 微粒子を配した PHEMA 薄膜に接着した NIH3T3 細胞の位相差顕微鏡像。(b) (a) 中に示した Area A および B に接着した細胞の単位面積当たりの接着数。

と光電子取り出し角度(ϕ_e)の関係である。413 K で熱処理を施した試料(乾燥試料)において、 I_{N1s}/I_{C1s} は、 ϕ_e の減少に伴い減少した。このことは、薄膜最表面領域では、N 原子を含まない成分がリッチになっていることを示している。

図 9 (a) の実線は、図 9 (b) に示したモデル深さプロファイルに基づくフィッティング曲線である。薄膜最表面には、厚さ 5.7 nm 程度の PMMA 層が形成されていることがわかった。一方、水中浸漬後、凍結乾燥を施した試料において、 I_{N1s}/I_{C1s} は $\sin \phi_e$ の小さい領域で若干増加した。このことは、水との接触に伴い、薄膜最外領域に N 原子を含む P[O(Ox)MA] ブロックが偏析したことを示している。

図 10 は、(a-c) PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] および (d-f) PMMA 膜上で観察した NIH3T3 細胞の位相差顕微鏡像の培養時間依存性である。PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] 膜上では、細胞の接着挙動が弱く、伸展が観察されなかった。

図 10(g, h) は、固定染色後の細胞像、(i) はその定量結果である。PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] 膜上では、顕著に細胞接着が抑制されることがわかった。

汎用性材料である PMMA に、表面修飾剤として (P[O(Ox)_nMA]) を添加した PMMA/P[O(Ox)_nMA] 混合膜を作製し、上述と同様の検討を実施した。さらには、準大気圧 XPS 測定を適用することで、オキサゾリンユニット鎖長が、薄膜の凝集状態に及ぼす効果について評価した。その結果、水環境下において、P[O(Ox)_nMA] 成分は薄膜最外領域に偏析すること、また、形成される水界面は、オキサゾリンユニットが短いほど、より厚くなることを見出した。さらには、この界面厚の差異に依存して血小板粘着抑制能が変わることを明らかにした。

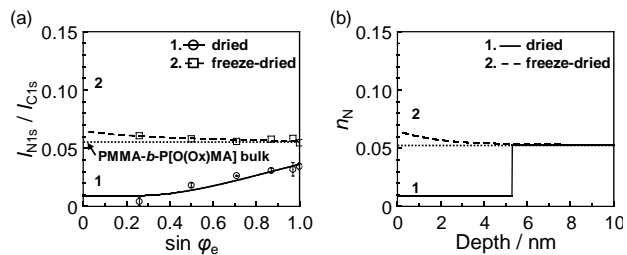


図 9. (a) 乾燥処理、および、凍結乾燥処理を施した PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] 薄膜の $\sin \phi_e$ 依存性. プロットが実験値を示す. 実線および破線は、(b) に示したモデルプロファイルに基づくベストフィット曲線. 点線は化学構造式に基づき算出したバルク試料の理論値を示す.

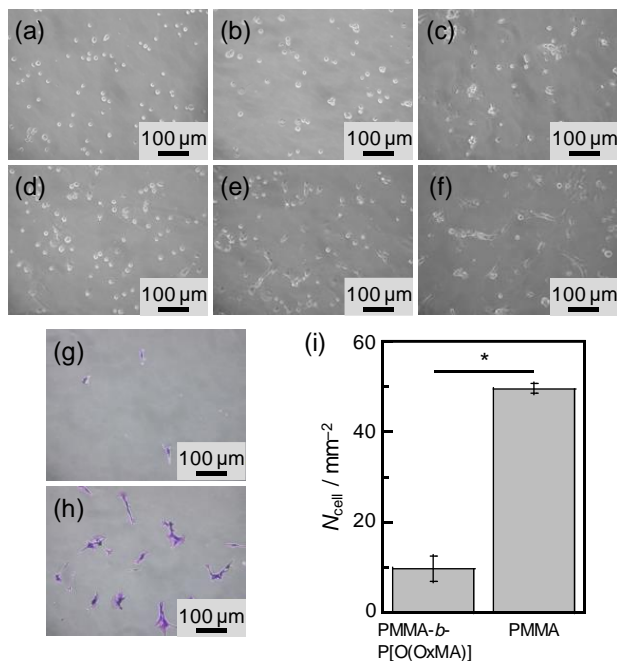


図 10. (a) (a-c) PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] および (d-f) PMMA 膜上で観察した NIH3T3 細胞の位相差顕微鏡像の培養時間依存性. (a, d) 3 h, (b, e) 6 h, (c, f) 12 h. 培養条件: 10% 牛血清含有 Dulbecco's modified Eagle's 培地. (g, h) 洗浄および固定化後に観察した PMMA-*b*-P[O(Ox)MA] および (d-f) PMMA 膜上の NIH3T3 細胞の位相差顕微鏡像. (i) 各膜に接着した細胞の単位面積当たりの接着数. ANOVA: * $p < 0.01$.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Hisao Matsuno, Keiji Tanaka	4. 巻 76
2. 論文標題 Aggregation State and Thermal Molecular Motion of a Bioinert Polymer at the Water Interface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kobunshi Ronbunshu	6. 最初と最後の頁 185-195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1295/koron.2019-0013	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 Polym. J.	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 Yuma Morimitsu, Hisao Matsuno, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Atsushi Takahara, Keiji Tanaka	4. 巻 21
2. 論文標題 Mechanical Stabilization of Deoxyribonucleic Acid Solid Films Based on Hydrated Ionic Liquid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 464-471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biomac.9b01207	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 Yukari Oda, Manabu Inutsuka, Ryo Awane, Masayasu Totani, Norifumi L. Yamada, Masayuki Haraguchi, Masaaki Ozawa, Hisao Matsuno, and Keiji Tanaka	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 -

1. 著者名 Masayasu Totani, Ling Liu, Hisao Matsuno, Keiji Tanaka	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 Shinichiro Shimomura, Hisao Matsuno, Yohei Kinoshita, Satoshi Fujimura, Keiji Tanaka	4. 巻 50
2. 論文標題 1)Cellular Behaviors on Polymeric Scaffolds with 2D-patterned Mechanical Properties	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 737-743
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-018-0043-9	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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hisao MATSUNO
2. 発表標題 Mechanical properties of deoxyribonucleic acid-based structural materials
3. 学会等名 Seoul National University -Kyushu University Joint Symposium on Materials Chemistry and Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松野 寿生, 盛満 裕真, 田中 敬二
2. 発表標題 溶媒下における高分子/固体界面の形成機構
3. 学会等名 2019年度高分子基礎物性研究会・高分子計算機科学研究会 合同討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisao MATSUNO, Yuki OGUSA, Kento KAWABATA, Masayasu TOTANI, Keiji TANAKA
2. 発表標題 Control of Surface Function of Hydrogel Thin Films Based on Si-nanoparticle Patterning
3. 学会等名 68th Symposium on Macromolecules
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小草優希
2. 発表標題 シリカ微粒子パターニングに基づくハイドロゲル薄膜の機能制御
3. 学会等名 繊維学会秋季研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川崎浩輝
2. 発表標題 感温性ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)誘導体薄膜の膨潤挙動
3. 学会等名 レオロジー討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松野寿生
2. 発表標題 非溶媒を用いる高分子最界面の凝集状態制御と機能化
3. 学会等名 繊維学会秋季研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松野寿生
2. 発表標題 生体成分の付着制御に寄与する高分子/水界面の凝集状態と熱運動特性
3. 学会等名 高分子懇話会（岡山地区）（招待講演）
4. 発表年 2018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, 田中敬二, 松野寿生, 小澤雅昭, 片山 淳子	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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関