

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05606

研究課題名(和文) 光活性化二酸化塩素改質法によるPLA成形体への細胞親和性付与

研究課題名(英文) Improving the cell affinity of poly(lactic acid) molding modified by photoactivated chlorine dioxide

研究代表者

浅原 時泰 (Haruyasu, Asahara)

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：20632318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：PLAに対する二酸化塩素光酸化処理による表面改質(酸化)を行った。導入官能基の同定によりカルボキシ基が有意に増加することを見出すとともに、その定量法として染色法を活用し酸化度の評価手法を確立した。既存手法との比較により、導入官能基の差異やバルク物性への影響が小さいという利点などが明らかとなり、本改質法に特徴的な新たな用途の開発も期待された。当初想定通り、細胞親和性が向上することも明らかとなり、改質PLAを基材とした培養において細胞数の有意な増大と細胞の伸長が見られた。3Dプリンタを用いた三次元構造体の作製と改質も行い、内部にまで均一に処理できることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞足場材料は再生医療において重要な要素の一つである。本研究では、生分解性プラスチックであるポリ乳酸(PLA)に対し、二酸化光塩素改質法を適用することで細胞親和性の付与を試みた。本法は反応性のガスを用いた表面改質法であり、既存手法と比較してバルク物性を維持したままに官能基を導入できる、複雑形状にも処理可能などのメリットがあることがわかった。また細胞親和性の向上も認められたことから、再生医療の発展に貢献できる新たな基盤技術を開発できたと言える。表面改質法として多様な応用展開も期待される。

研究成果の概要(英文)：Surface modification (oxidation) of polylactic acid (PLA) by chlorine dioxide under photo-irradiation was performed. After oxidation, the carboxy groups were found to be significantly increased, and a staining method was utilized to quantify the carboxy groups and establish a method for evaluating the degree of oxidation. In comparison with existing methods, the differences in the functional groups introduced and the advantages of the small effect on bulk properties were revealed. Therefore, it was expected that new applications characteristic to this modification method would be developed.

As initially expected, cell affinity was found to be improved. A significant increase in cell number and cell elongation were observed in cultures using modified PLA as the scaffolds.

The fabrication and modification of 3D structures using a 3D printer was also performed, and it was found that the modification can be applied uniformly to the interior of the structure.

研究分野：高分子化学

キーワード：表面改質 ポリ乳酸 細胞足場材料

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療に関連する研究が大きく発展を遂げ、組織や臓器の欠損を治療可能な世界が現実のものとなってきている。再生医療は、自家由来の細胞を用いて様々な組織・臓器を再生できることから免疫反応を避けることができ、患者の生活の質 (QOL: Quality of Life) を維持可能な画期的な治療法と言える。再生医療においては、人工的な足場 (足場材料:Scaffold) を提供することで安定な組織再生と三次元的な組織の構築が可能となる。足場材料は臓器のような三次元構造を形成するのに極めて重要な要素であり、細胞の分化を制御しつつ、望みの組織形状を維持する必要がある。さらに、適切な機械的強度を保つとともに、組織形成後には分解・吸収される生体吸収性が望ましく、これらの要求を満たす材料の開発が大きな課題となっている。

上述のように、足場材料としては生体吸収性が求められることから、一般に生体適合性に優れた高分子が用いられる。その中でポリ乳酸 (PLA) は生体適合性と生分解性に優れることから有望な材料となっている。このように、PLA は足場材料として期待されているものの、高分子樹脂材料特有の疎水性という性質を有しており細胞との親和性 (接着性・伸展性・分化誘導性) が必ずしも高くないという問題があった。PLA の疎水性を改善するために、親水性に優れた樹脂との共重合といった手法も開発されているものの、組織構造を維持するためにバルク強度は担保されなければならない。ここで、疎水性の改善とバルク強度の維持はトレードオフの関係であり、親水性樹脂比率があがると強度は低下する。そのため、材料と細胞が接する表面の物性のみを変える表面改質が重要な技術となっている。実際に、官能基種・量などの化学構造や表面凹凸などのモルフォロジーを適切に改質する試みが数多く行われてきた。しかし多くの努力にもかかわらず、足場材料においては三次元の複雑な成型体に対してこれらの表面物性改質を行わなければならない。既存の表面改質法は一般に三次元構造の処理に不向きであり未だ効果的な手法が提案されていない現状がある。

したがって、バルク物性を維持したままで、簡便に三次元成型体の樹脂表面のみの物性をチューニング可能な新たな手法の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

本提案研究では高分子樹脂の細胞親和性向上を志向した PLA 樹脂表面改質法の開発、および細胞親和性の高い新たな足場材料の開発を目的とする。

ここで、二酸化塩素ラジカル ($\text{ClO}_2\cdot$) に対する光照射によって生じる活性種が、安定で強固な C-H 結合をも酸化するという、独自の光酸化反応を適用した。本法は常温で気体の $\text{ClO}_2\cdot$ を用いた改質法であり、樹脂表面への光照射は必要としない。このため、三次元の複雑な構造体であっても光活性化 $\text{ClO}_2\cdot$ ガス分子が内部にまで入り込み改質することができる。

そこで本研究では、この独自の光活性化 $\text{ClO}_2\cdot$ 樹脂表面改質法を用いて PLA 足場材料の表面親水化および、細胞親和性 (接着性) 付与を達成することとした。

3. 研究の方法

(1) PLA樹脂の酸化度制御

PLA のフィルムに対し光活性化 ClO_2 改質処理を行い、任意の酸化度（官能基量）の改質 PLA を作製することを目的とする。ここで酸化度の評価として、導入されたカルボキシ基の定量を行う。カルボキシ基の定量法としてはアルカリ滴定が一般に用いられるが、PLA は塩基性条件下で加水分解が進行するため適用できない。そこで、酸化 PLA 中のカルボキシ基定量法として、トルイジンブルー染色法（P. Schierack *et al. Anal. Chem.* 2011, 3379）を用いる。また、X 線光電子分光法（XPS）も併せて検討することで、より詳細な官能基種・量の同定を行い、反応条件（時間、温度、ガス濃度、光量など）と酸化度の相関を明らかにし、本改質法を確立する。

(2) 酸化PLA樹脂に対する細胞親和性の評価

表面改質を行ったフィルム状の足場材料を用いた細胞培養（モデル細胞として、ヒト臍帯静脈内皮細胞、線維芽細胞などを用いる）を行う。評価は既報に従い（A. Gregor *et al. J. Biol. Eng.* 2017, 31 など）フィルム上での増殖や付着状態といった細胞親和性を走査型電子顕微鏡（SEM）や共焦点レーザー顕微鏡などによる直接観察にて行う。細胞親和性を酸化度で定量評価し相関を明らかにする。酸化度（官能基量）と細胞親和性を定量的に評価した研究例はなく、足場材料表面の設計指針として重要な知見となる。

(3) 酸化PLAの分解性試験

足場材料自身の生体吸収性（生分解性）評価を行う。酸化度を変えた PLA を用いて、分解性を調べるとともに酸化度との相関を明らかにする。ここで、PLA の分解の律速段階は加水分解であることからまず簡易な評価として加水分解評価を行う。

(4) 三次元PLA樹脂の酸化と細胞接着試験

PLA の形状が細胞の分化、安定性に与える影響について検討する。3D プリンターで構築したマクロな構造体に対し、本改質処理と細胞培養を行う。

4. 研究成果

PLA 樹脂の酸化度制御: PLA のフィルムに対し光活性化 ClO_2 改質処理を行い、改質 PLA を作製した。ここで、X 線光電子分光法（XPS）及び化学修飾 XPS 法により、改質により導入された官能基種・量の詳細な同定を行った。その結果、本光酸化法では一般的なプラズマ処理と比較してカルボキシ基が有意に導入されることが明らかとなった。そこでより簡便な酸化度の評価法として、導入されたカルボキシ基に対するトルイジンブルー染色による定量評価法を採用した。種々条件を検討し、改質処理 PLA を染色液（トルイジンブルー溶液）に浸漬し、純水洗浄後、界面活性剤を用いて脱離させたトルイジンブルーの濃度を測定することで PLA 表面のカルボキシ基量を見積もることが可能となった。本評価法から、反応温度を上げることで酸化度が大きく向上することが明らかとなり、処理時間は 10 分程度が最適であった。また任意の酸化度（官能基量）の PLA フィルムを作製することが可能となった。一方、表面親水性の評価として水の接触角試験を行った所、接触角は最も低下した場合でも 50° 程度であり、 20° 程度まで低下するプラズマ処理と比較すると、親水性は低いことが示唆された。細胞との親和性と親水性は相関が見られることが一般に知られているが、細胞親和性に優れるのは $60\text{-}70^\circ$ 程度であることが知られているため、光酸化処理においても十分な親水化効果が得られるものと考えられる。また、PLA フィルムサンプル

に対して引張試験を行った所、未処理品と同程度の強度を維持していることが明らかとなった。PLA の改質処理として用いられる加水分解処理により作製したサンプルでは強度が6割程度に低下したことから、本処理法の優位性が示された。

酸化 PLA 樹脂に対する細胞親和性の評価:表面改質 PLA の細胞親和性を評価する目的で、フィルム状の二酸化塩素光酸化改質 PLA 材料を用いた細胞培養を行った。マウス線維芽細胞を用いて、細胞播種から一定時間後の細胞を化学固定化し位相差顕微鏡を用いた観察および、生細胞数測定試薬 WST-8 を用いた細胞数カウントを行ったところ、改質処理により細胞数が有意に増加することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 3件）

1. 著者名 Keita Yamamoto, Haruyasu Asahara, Maiko Moriguchi, Tsuyoshi Inoue	4. 巻 -
2. 論文標題 Surface Functionalization of Polypropylene Nonwoven Fabric for Introducing Repeatable Controlled Drug Release Property	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26434/chemrxiv-2022-j8hjs	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Haruyasu Asahara, Nozomi Takao, Maiko Moriguchi, Tsuyoshi Inoue, Kei Ohkubo	4. 巻 58
2. 論文標題 Visible-light-Induced phosgenation of amines by chloroform oxygenation using chlorine dioxide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 6176-6179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2CC01336C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Keita Yamamoto, Haruyasu Asahara, Maiko Moriguchi, Tsuyoshi Inoue	4. 巻 55
2. 論文標題 Immobilization of α -cyclodextrin onto polypropylene nonwoven fabric based on photooxidative surface modification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 599-605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-022-00751-8	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 Keita Yamamoto, Haruyasu Asahara, Kazuo Harada, Yuki Itabashi, Kei Ohkubo, Tsuyoshi Inoue	4. 巻 -
2. 論文標題 One-step antibacterial modification of polypropylene nonwoven fabrics via oxidation using photo-activated chlorine dioxide radical	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Material Chemistry B	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D3TB00586K	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Haruyasu Asahara
2. 発表標題 Polymer Surface Oxidation by Light-Activated Chlorine Dioxide Radical
3. 学会等名 Pacifichem 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本敬太、浅原時泰、井上豪
2. 発表標題 新規光酸化法により作製した -CD固定化PP不織布に対するゲスト包接能と薬剤徐放性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅原時泰
2. 発表標題 光活性化二酸化塩素を用いた酸化反応による有用化成品の製造
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruyasu Asahara
2. 発表標題 Surface Functionalization of Polyolefin by C-H Oxygenation with Chlorine Dioxide
3. 学会等名 The 101th CSJ Annual Meeting（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 敬太・浅原 時泰・井上 豪
2. 発表標題 光活性化二酸化塩素による高分子表面改質における酸化機構
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 敬太・浅原 時泰・井上 豪
2. 発表標題 光活性化二酸化塩素による高分子表面改質における酸化機構
3. 学会等名 第68回高分子研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 敬太・浅原 時泰・井上 豪
2. 発表標題 -CD 複合化 PP 不織布の薬剤徐放性評価
3. 学会等名 第32回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maiko Moriguchi、Haruyasu Asahara、Tsuyoshi Inoue
2. 発表標題 Surface modification of Graphene Oxide using photo-oxidation reaction
3. 学会等名 2nd World Congress on Oleo Science (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 敬太・浅原 時泰・井上 豪
2. 発表標題 光活性化二酸化塩素を用いた高分子表面改質法の機構研究
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 敬太・浅原 時泰・井上 豪
2. 発表標題 -CD 複合化 PP不織布の薬剤徐放性評価
3. 学会等名 第38回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅原 時泰
2. 発表標題 マテリアルサイエンスのブレイクスルー
3. 学会等名 MA-T 学会設立特別シンポジウム『MA-Tが拓く地球の未来』（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚 奈々、浅原 時泰、西口 昭広、田口 哲志、井上 豪
2. 発表標題 二酸化塩素光改質法を利用したポリ乳酸（PLA）樹脂表面への細胞親和性付与
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------