

分化できる能力をもったまま未分化の状態<sup>で</sup>自己複製できる細胞であり、受精卵からつくる上述の ES 細胞と成人にも存在する体性幹細胞の二つに分類される(図 2)。前者は、今や世界各国で樹立されてきてはいるものの、まだ倫理的問題や多くの技術的な問題があり、医療への応用実現には多くの年月が必要と思われている。一方、後者については着実に医療として定着しはじめている。

臓器や細胞を用いる移植医療には、自家移植と同種(他家)移植がある。自家移植とは、患者自身の組織を移植するものであり、形成外科や整形外科の医療機関内で皮膚や骨の異所への移植は比較的古くから行われている。再生医療では、患者自身の幹細胞を本来のものとは異なる臓器部位に移植する。たとえば、骨髄中の間葉系幹細胞がさまざまな細胞に分化できることがわかり、さまざまな臓器の再生に用いられるようになってきた。日本では、閉塞性動脈硬化症やパーキンソン病など虚血下肢治療のために患者自身の骨髄細胞を用いる方法がはじめて一部保険適用できる「(高度)先進医療」として 2003 年に認可を受けた。現在、骨髄細胞を歯周病治療、心疾患、脳疾患(脳梗塞)、脊髄損傷などへ治療応用する研究がさかんに行われている。骨髄細胞以外にも、血液からの幹細胞で急性心筋梗塞患者の治療を行った例や、患者自身の口の粘膜の細胞を使って目の角膜を再生する臨床試験の成功が報告されている。そのほか成人の鼻粘膜細胞を用いた脊髄損傷治療や、

患者の太ももから筋肉の一部を用いた疾患治療が行われている。また、脂肪吸引でとった脂肪組織中の幹細胞も細胞ソースとして有用であり、臨床応用が試みられている。

一方、同種移植では、ドナーからの直接の臓器移植に加えて、冷凍保存した臍帯血(臍の緒のなかに含まれる血液)のなかにある造血幹細胞を用いた治療も一般的治療として行われている。臍帯血は、これまで廃棄されていたものを使用できるうえにドナーへの負担がなく、組織適合性が寛容で冷凍保存も可能という利点がある。現在、日本には全国に 11 の公的な臍帯血バンクがあり、白血病などの血液疾患の治療に用いられている。同種移植が広く可能になれば、大きな福音となることは確かである。

### 幹細胞の体外増幅のためのバイオリクター

このように再生医療は着実に進展している。しかし、再生医療の大きな進展を阻むものの一つとして、幹細胞の存在量の少なさがある。そこで、これを補うために幹細胞を体外増幅する培養用バイオリクターが研究されてきている。免疫療法では、がんを攻撃する免疫細胞を患者自身から採取し、体外増幅して体内へもどす治療が行われている。もし、さまざまな細胞を安全に体外増幅させる技術が確立できれば、再生医療をはじめさまざまな医療への応用展開が可能となる。

とくに、さかんに研究されているのが、臍帯血の造血幹細胞

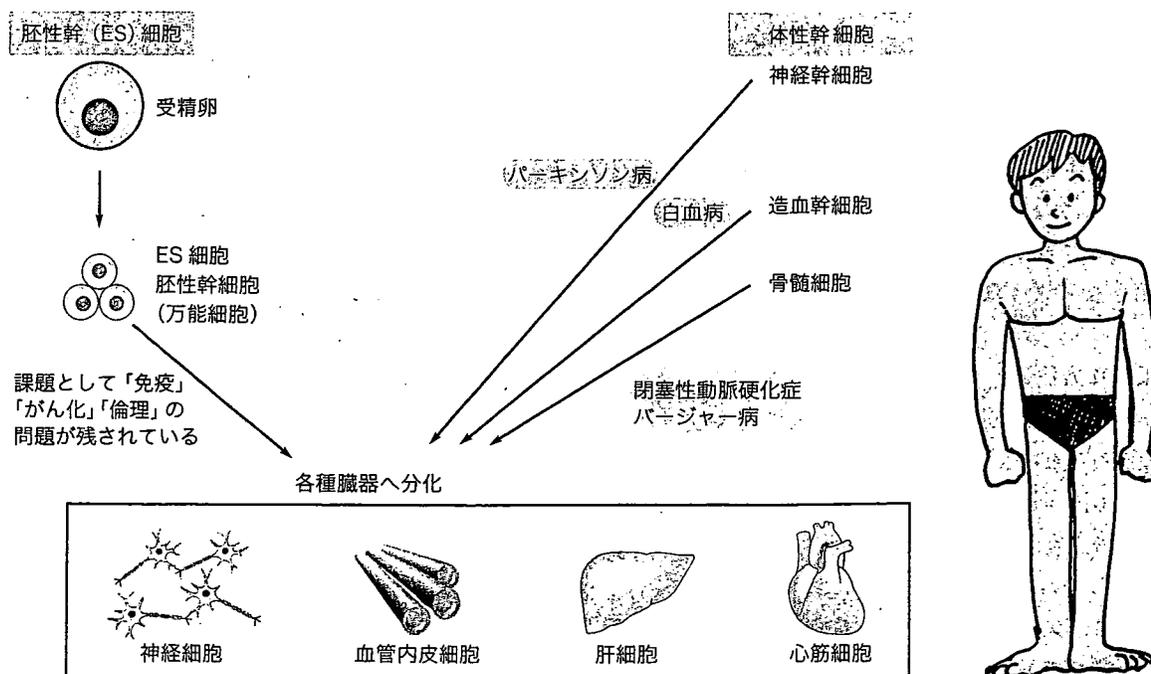


図 2 再生医療のための ES 細胞と体性幹細胞

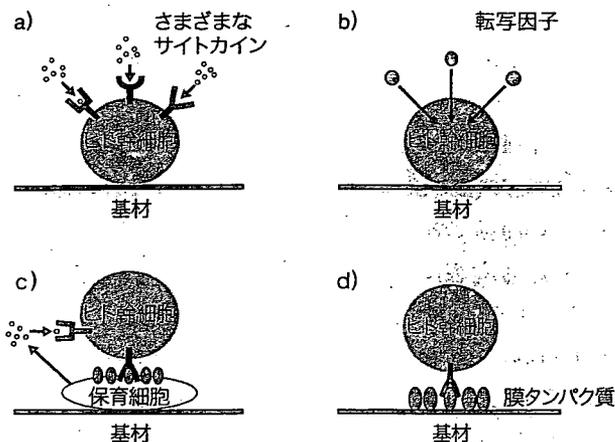


図3 幹細胞培養のためのバイオリアクター設計

a) さまざまなサイトカインを組み合わせる培養液に添加, b) 細胞内移行性の転写因子タンパク質を培養液に添加, c) 保育細胞をあらかじめ培養して, そのうえで培養, d) 保育細胞の発現する膜タンパク質を固定化したうえで培養.

胞培養用のバイオリアクターである。造血幹細胞はもともと血液細胞の源となるもので、成人では骨髄のなかでつくられる。そこで、骨髄中の環境を再現しようとさまざまな試みが行われ、これまでさまざまなタイプのバイオリアクターが開発されてきている<sup>2)</sup>。近年では、とくに骨髄内部の環境(ニッチ)が重要な役割を果たしていることから、ナノスケールでその環境を再現することが必要と考えられ、三次元構造のマトリックスのなかで細胞を培養するバイオリアクターがいろいろと考案されている<sup>3)</sup>(図3)。培養液に添加する物質についても、サイトカインだけでなく、造血幹細胞の成長を促進するような転写因子タンパク質に細胞内移行ペプチドをつけたナノデバイスを作用させるような試みも行われている。

最も効果的な方法に、ナース(保育)細胞やフィーダー(供給)細胞と呼ばれる細胞と共培養することによりニッチを調製することがある。当初は生物学的な研究が主で、マウスのような実験動物由来の細胞を保育細胞としていたが、不死化させたヒト由来の骨髄ストローマ細胞が造血幹細胞増幅支持能をもつことが明らかになり、造血幹細胞を定常的に培養することが可能に

なった。最近では、この増幅支持能が培地に栄養分や増殖因子を補給するフィーダー作用としてだけでなく、直接の細胞間の接触によってその機能を発揮していることがグルタルアルデヒドのような物質で骨髄ストローマ細胞を化学的に固定化しても活性を保持することから明らかにされた<sup>4)</sup>。ES細胞培養にも一般的に保育細胞が必要であることが知られているが、この場合にも同様な処理が有効であることがわかってきた。

### 課題となるバイオリアクターナノ界面の開発

このように骨髄の環境を再現するためには必ずしも生きた細胞でなくてもよいことがわかってきたが、細胞を使って基材をつくるのは、大量生産が困難なうえに、病原体の混入の危険は避けられない。もし完全に人工的な素材で幹細胞保育基材をつくることができれば、再生医療の本格的な実現のための大きな一歩となる。今まで人工的に保育細胞を模倣するような基材の開発は行われてこなかった。これは今後解決していかなければならない重要な課題となっている。

数少ない解決策として現在取り組まれているものの一つが、成長因子やサイトカインのようなタンパク質や、新たに保育細胞から増幅支持能に関与する膜タンパク質を探しだ

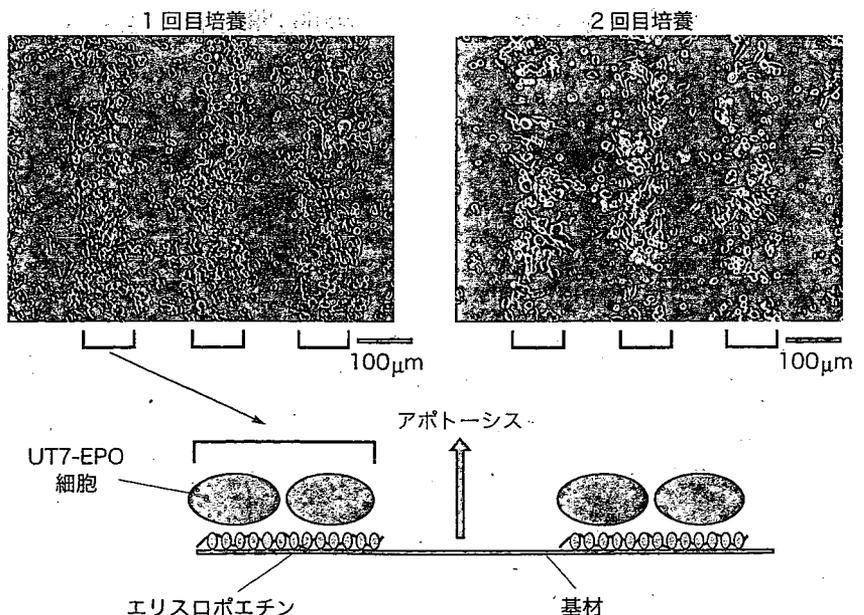


図4 エリスロポエチン固定化基板上でのエリスロポエチン依存性ヒト白血病由来細胞の培養

ストライプ状にエリスロポエチンが固定化されており、固定化領域でのみ細胞増殖が観測されている。また、1回目培養に用いた固定化エリスロポエチンを2回目の培養に用いることも可能であった。

し、これらを固定化した材料を開発することである。これまでに、インスリン、上皮細胞成長因子、神経成長因子、腫瘍壊死因子、血管内皮細胞成長因子、肝細胞成長因子、骨形成タンパク質などを固定化して細胞機能を制御できることが多くの研究者により明らかにされてきた<sup>5)</sup>。図4には、モデル細胞としてエリスロポエチン(EPO)依存性のヒト白血病由来細胞を選び、サイトカインのEPOをマイクロパターン状に固定化したうえで培養した結果を示す。3日間経過するとEPOが固定化されていない表面では細胞はアポトーシスを誘起され死滅したが、固定化されている領域では、増殖が観測された。これは固定化EPOがこの細胞に特異的に働き、アポトーシスを抑制したものと考えられる。また、培養した細胞をいったん剥離し、再度新しい細胞を播種して培養しても、EPO固定化領域でのみ増幅が観測された。酵素を固定化したバイオリクターと同じような使い方ができることが明らかになった。

また、膜タンパク質として知られるNotchリガンドを固定化した場合でも、固定化領域でだけ依存性細胞の接着、増殖が観測されている。このほか、マウスES細胞培養では、通常の培養で必要となる白血病阻害因子(leukemia inhibitory factor; LIF)を固定化し、その上でマウスES細胞を培養すると未分化を維持したまま増幅できることも報告されている。また、細胞間接着タンパク質のカドヘリン固定化材料は新しい機能を発揮することが見いだされている<sup>6)</sup>。

ただ残念ながら、まだ実用的に臍帯血造血幹細胞や、そのほかの有用な細胞を効果的に体外増幅できるところまでには至っていない。現在知られているサイトカインや膜タンパク質を組み合わせ、幹細胞培養用の人工ニッチを構築することは不可能なようである。どのようなタンパク質を、何種類、どのくらい、どのような組合せで基材上にナノテクノロジーで再構築したらよいのか(図5)? 生命科学の分野では未知の(膜)タンパク質の探索が精力的に行われている。文部科学省「再生医療の実現化プロジェクト」の一環で、臍帯血造血幹細胞の体外増幅に役立つ方策の募集も行われている。細胞培養には幹細胞に限らず、保育細胞が必要な場合が多く、この課題解決への期待は大きい<sup>7)</sup>。

これまで細胞培養基材については接着抑制や促進の制御が限界であり、それ以上の細胞の高次機能(成長や分化など)を制御するような基材の開発にはなす術もなかった。今後明らかになることが期待されるタンパク質を用いて、細胞機能を制御できるナノ界面を基材上に生みだせるようにすること

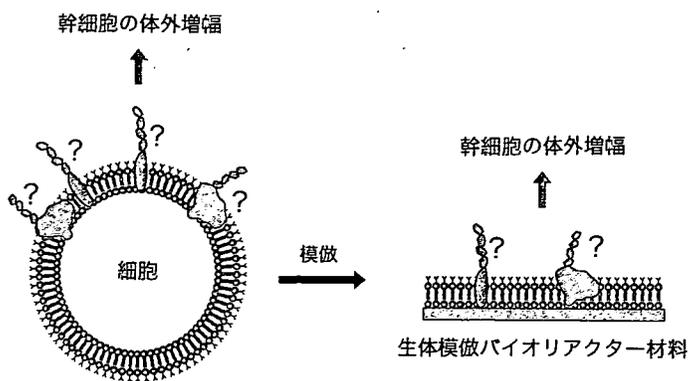


図5 実現が望まれる幹細胞体外増幅用のナース細胞を模倣したナノ界面をもつ人工基材

が、バイオマテリアル研究の大きな課題といえる。

●  
日本の幹細胞の生物学的研究は世界をリードする状況にある。体性幹細胞を用いた再生医療は着実に発展してきている。日本でも基礎研究に根ざすさまざまな可能性を生かした臨床応用への展開研究であるトランスレーショナル研究が重要視されるようになってきている。本誌『化学』の若い読者が基礎的な化学のトレーニングを受けたあと、この特集で取りあげられているナノメディシンのような新しい研究分野でぜひ力を発揮してもらいたい。

#### 謝辞

筆者らの幹細胞培養用のバイオリクターの研究は、財団法人神奈川科学技術アカデミーの伊藤「再生バイオリクター」プロジェクトとして平成14～18年度行われた。ご支援いただいた財団ならびに関係各位に感謝する。

#### 参考文献

- 1) 再生医療一般に関する書籍は2000年前後から非常に多く出版されている。ごく最近のもので初学者向きには、a) 日経サイエンス編集部編、『別冊日経サイエンス152 人体再生——幹細胞がひらく未来の医療』、日経サイエンス(2006); b) 八代嘉美, 中内啓光著、『エスカルゴ・サイエンス再生医療のしくみ』、日本実業出版社(2006); c) C. T. スコット著, 矢野真千子訳、『ES細胞の最前線』、河出書房新社(2006)などがある。専門的な書籍としては、a) 赤池敏宏, 浅島誠, 関口清俊, 田畑泰彦, 仲野徹編、『再生医療の基礎シリーズ』、全5巻, コロナ社(2006); b) 田賀哲也, 中畑龍俊編、『実験医学増刊 ここまで進んだ幹細胞研究と再生医療2006』、羊土社(2006)がある。2) G. J. M. Cabrita, B. S. Ferreira, C. L. da Silve, R. Concalves, G. Almeida-Porada, J. M. S. Cabral, *Trends Biotechnol.*, **21**, 233 (2003). 3) N. Panoskaltzis, A. Mantalaris, J. H. D. Wu, *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 28 (2005). 4) 伊藤嘉浩, 膜, 印刷中(2007). 5) Y. Ito, *Soft Matter*, in press (2007). 6) M. Nagaoka, U. Koshimizu, S. Yuasa, F. Hattori, H. Chen, T. Tanaka, M. Okabe, K. Fukuda, T. Akaike, *PLoS ONE*, **1**, e15 (2006). 7) H. Hatakeyama, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, *Inflam. Regen.*, **26**, 437 (2006).

〔総合論文〕

ナノ界面テクノロジーによる機能表面創出

伊藤 嘉浩\*1

(受付 2007 年 8 月 22 日・審査終了 2007 年 10 月 22 日)

**要 旨** ナノ・レベルで材料表面を修飾するナノ界面テクノロジーによって、機能性表面の創出を行った。第一は、親水・疎水性の傾斜表面を光分解反応により、定量的に再現性高く創り出し、水滴移動を評価し、考察した。第二には、自励振動高分子を固体表面に固定化し、その振動現象を走査プローブ顕微鏡で観察することができた。第三には、天然あるいは合成の光反応性高分子を新たに合成し、生体成分との相互作用を減じる新しい生体適合性材料の合成に成功した。

1 緒 言

表面の性質はナノメートル・レベルの修飾で顕著に制御することが可能である。これまでに私の研究グループではさまざまな表面修飾により、材料の機能化を図ってきた<sup>1)~3)</sup>が、ここでは、定量的に再現性高く表面に親水・疎水の傾斜を作成することにより水滴移動表面の創出を行った例、自励振動高分子を固定化することにより振動表面を創出した例、そしてタンパク質や細胞との相互作用を抑制するいくつかの高分子を新たに合成し、生体不活性表面の創出を行った例について述べる。

2 水滴移動のためのナノ修飾表面

傾斜表面はその応用、材料科学において非常に有用である<sup>4)~23)</sup>。たとえば、化学物質の濃度傾斜を作成すれば、その傾斜に従ってマイクロ流体の物質輸送が可能となり、細胞の走化性を調べることも可能である。そのため、これまで温度制御<sup>24)</sup>、蒸気拡散<sup>4),7)~12),14),15)</sup>、電気化学<sup>25)~27)</sup>、光リソグラフィ<sup>19),20)</sup>、傾斜浸漬<sup>16),17)</sup>、光開始媒介光重合<sup>28)</sup>、コロナ放電<sup>29)</sup>、コンタクト・プリンティング<sup>30)</sup>、マイクロ流路デバイス<sup>31)</sup>、そしてマイクロ構造<sup>32)</sup>などさまざまな傾斜表面調製法が報告されてきた。表面性質の傾斜化だけでなく、タンパク質の濃度傾斜化も行われてきた<sup>33)~39)</sup>。しかし、従来の方法は物質の拡散を使った傾斜作成のため、再現性よく定量的に傾斜表面を作成するには困難を要した。そこで、本研究では、この困難を克服するために、新しい調製法の開発を行い、親水・疎水の傾斜表面を調製し、その上での水滴の移動を定量的に評価することに成功した<sup>40)</sup>。

2.1 傾斜表面の調製

Figure 1 に示すように、ガラス板の上にアルキルシランカップリング処理を行った後、真空 UV (VUV, 波長; 172 nm, ウシオ電機(株)製, モデル UER20-172V) を照射して光分解を行った<sup>41)</sup>。具体的には、まず購入したガラス板(カバーガラス, 18×18 mm<sup>2</sup>)にあらかじめ VUV を照射し、光洗浄した後、*n*-オクタデシルメトキシシラン [ODS, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] の脱水トルエン溶液に 80°C で 5 時間浸漬してシランカップリング処理を行い、最後に 4 時間、80°C で真空乾燥した。照射時間中にサンプルを移動できるような装置 (Figure 2) を開発し、得られたシランカップリング・ガラスを Figure 2 に示すような場所に装填した。そして、半分の面をクロムで不透明にした光マスクで覆い、試料台を移動 (50~100 μm/s) することにより、VUV の照射量を傾斜的に変化できるようにした。

VUV 照射による表面性質の変化を接触角により評価した (Figure 3)。照射強度、照射時間とともに単調に接触角が減少することがわかった。Figure 3b には、Figure 3a から得られたデータを元に親水・疎水の傾斜を照射時間を移動速度へ置き換えて計算した結果を示す。距離 6 mm にわたり、100° から約 25° までの疎水・親水傾斜が形成できたと考えた。

実際の傾斜表面の形成は、蛍光染色剤のフルオレセミン (FA) のカップリング反応によって定性的に確認した。クロロメチルフェニル自己集積単分子 (SAM) と COOH 末端 SAM の光化学についてはいくつかの報告がある<sup>41)~43)</sup>。これらの場合、-CH<sub>2</sub>Cl 基が UV 光を吸収し、酸素による酸化が起こる。一方、アルキルシラン基の VUV 分解では、軟 X 照射の場合のように、C-C、C-H、や C-Si 結合の分解が起こり、ラジカルが形成さ

\*1 (独)理化学研究所(☎351-0198 和光市広沢 2-1)

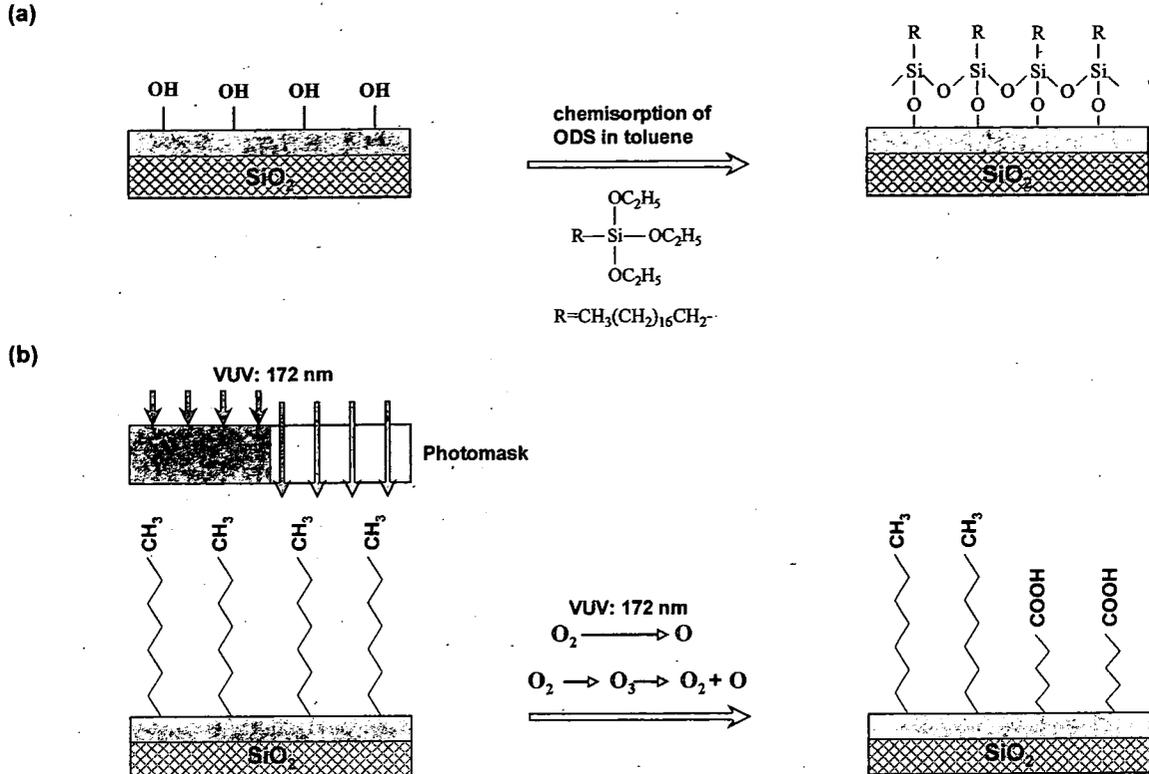


Figure 1. Preparation of a surface hydrophilicity gradient by photodegradation. (a) Surface treatment of glass plates with a silane coupling reagent. (b) Excitation of the surface molecules and oxygen by VUV irradiation and subsequent oxydation. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

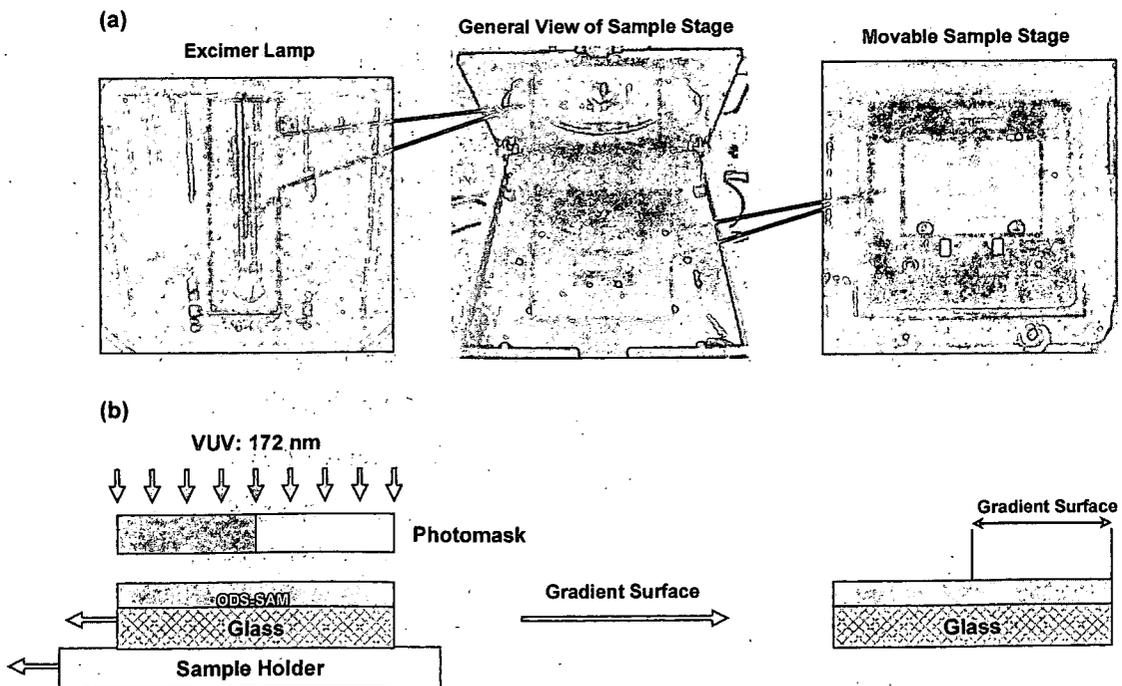
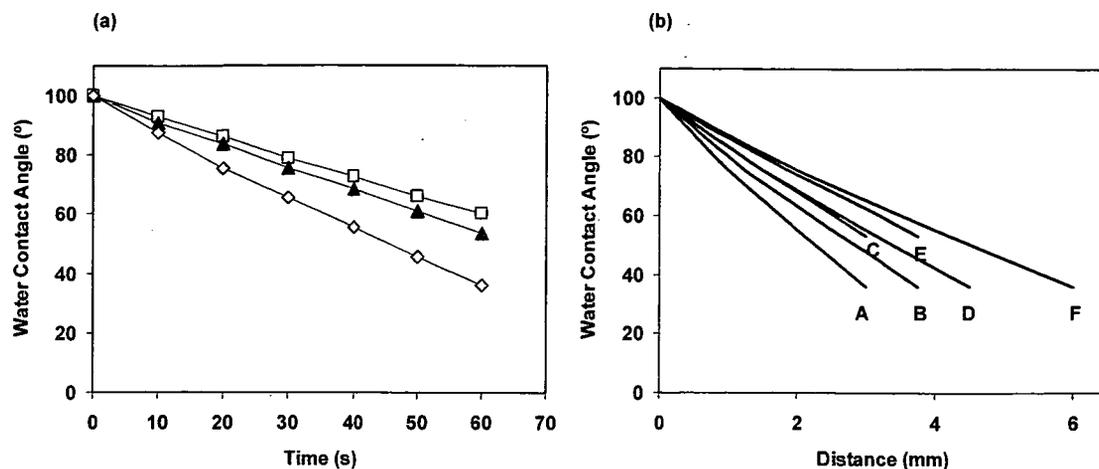


Figure 2. The photoirradiation apparatus used to prepare gradient surface. (a) A general view of the excimer device, (b) preparation of a gradient surface on an ODS-SAM surface using the VUV excimer device. The hydrophobicity and hydrophilicity of the SAM surface is shown by the gray and white colors. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.



**Figure 3.** Water contact angle measurements. (a) Static water contact angles at different irradiation light intensities:  $\diamond$ ; 3.3 mW/cm<sup>2</sup>,  $\blacktriangle$ ; 1.2 mW/cm<sup>2</sup>, and  $\square$ ; 0.6 mW/cm<sup>2</sup>. (b) The distance-dependent water contact angle is calculated using data from Figure 3(a). The irradiation energy and sliding rate were (A) 3.3 mW/cm<sup>2</sup> and 0.05 mm/s, (B) 3.3 mW/cm<sup>2</sup> and 0.0625 mm/s, (C) 1.2 mW/cm<sup>2</sup> and 0.05 mm/s, (D) 3.3 mW/cm<sup>2</sup> and 0.075 mm/s, (E) 1.2 mW/cm<sup>2</sup> and 0.0625 mm/s, and (F) 3.3 mW/cm<sup>2</sup> and 0.1 mm/s. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

れると考えられる<sup>41)</sup>。生成されたラジカルはさらに空気中の酸素や水分子と反応する。また同時に、VUVは酸素に吸収されて原子酸素も生み出す。これら活性酸素原子は非常に強い酸化作用があるため、VUVで励起・光分解された ODS-SAM から形成された有機ラジカル(過酸化ラジカル)は水分子と反応して -COOH 基となる。VUVの照射時間が長くなると ODS-SAM は揮発性の水や一酸化炭素、二酸化炭素になり、基材から消失する。VUV照射によって形成されたカルボキシル基への FA を反応させ、蛍光顕微鏡で観察すると Figure 4 のような像が得られ、確かに傾斜表面が形成されていることがわかった。

## 2.2 水滴の移動

調製した親水・疎水傾斜表面に 2  $\mu$ L の水滴を滴下し、既に報告した方法で水滴の移動を観察した。すると、疎水領域から親水領域への移動が観測された (Figure 5)。VUV の照射時間や強度を変えることによりぬれ勾配を変化させると、ぬれ勾配が高いほど、水滴の移動速度が高いことがわかった。再現性高くぬれ勾配のある表面を作成できたことから、この勾配に依存した水滴移動について、いくつかの観点から考察した。

まず、異なった条件下での水滴移動速度を中島らの開発した装置<sup>44)</sup>を用いて定量的に測定した (Figure 6)。そして、傾斜勾配との関係を求めたところ、Figure 7 に示すように、傾斜勾配に依存して平均速度 0.5~6 mm/s の範囲で傾斜表面上を移動することがわかった。より傾斜の高い表面で、水滴移動速度が速くなることが定量的にわかった。

水滴移動は、傾斜表面の接触角ヒステリシスに起因すると報告されている。Figure 8 は、移動中の水滴の前身接触角と後退接触角を示しており、ヒステリシスが存在していることがわかる。最近、Moumen ら<sup>14)</sup>は、「急な」勾配と「緩やかな」勾配を調製し、彼ら自身が作ったモデル<sup>12)</sup>に従って解析を報告している。

ここで筆者らは、水滴移動の原因にこのようなヒステリシス効果に加えて、新しくパーコレーション理論を加えることを提案する。Semal ら<sup>45)</sup>は、アルカンチオール混合単分子層の上を広がる有機物(スクアレン)の動力学を研究し、チオールの親水性と疎水性比を変え、スクアレンのぬれ転移が表面の水酸化が 70% 以上になって起こることを報告した。しかしながら、その表面は傾斜化されておらず、水滴移動に関してはこの種の研究はなかった。二次元表面でのパーコレーション閾値は約 0.45<sup>46)</sup>であることが知られている。一方、Cassie の式<sup>47)</sup>によると、複合固体表面の接触角は次式で表される。

$$\cos \theta = f_1 \cos \theta_1 + f_2 \cos \theta_2$$

ここで  $f_1$  と  $f_2$  は各々親水性と疎水性の比である。本研究では、最も親水性の VUV 照射表面は  $\theta_1 = 0^\circ$  で、最も疎水性の ODS 修飾表面が  $\theta_2 = 100^\circ$ 。  $f_1 = 0.45$  のとき、パーコレーション閾値の接触角  $\theta$  は、 $69^\circ$  と計算できる。Figure 9 は、水滴が動き始める地点の接触角を示す。図から明らかなように、前進接触角が  $69^\circ$  になる地点に水滴が接すると広がり始め動きが急速に増すことがわかる。このように、本研究では、親水性領域のパーコレーション構造の形成によるキャピラリーが水滴移動を

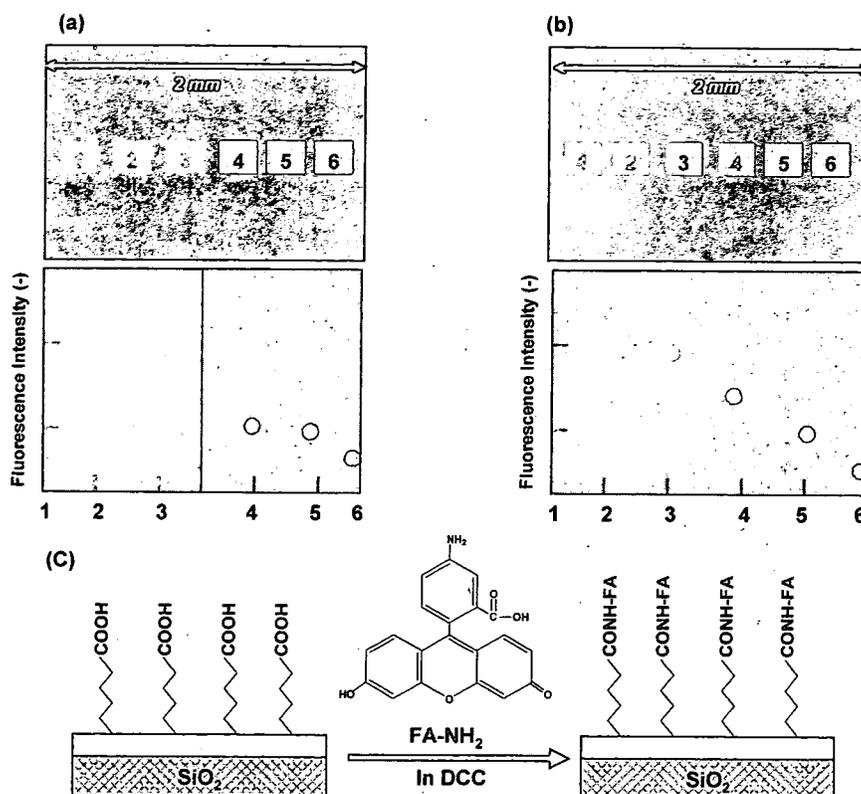


Figure 4. (a) Fluorescence microscopy of a patterned surface, and (b) a gradient surface. The surface was labeled with 5-aminofluorescein (FA-NH<sub>2</sub>), which targeted the VUV irradiated regions on the surface. Luminance = 1 mW/cm<sup>2</sup> and exposure time = 20 s. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

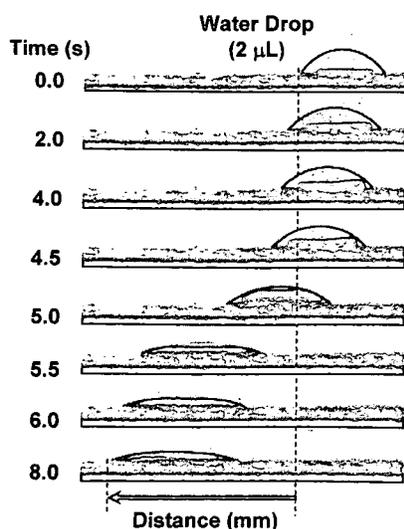


Figure 5. The movement of a water drop with a volume of 2 μL. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

大きく支配していることが示唆された。

ここでは光分解により再現性高く親水性・疎水性傾斜表面を調製でき、水滴移動を定量的に検証できることを示した。

### 3 振動ナノ表面

さまざまなナノサイズのデバイスや分子マシンが高分子、タンパク質、DNAを基盤に考案されている<sup>48)~52)</sup>。最近では、Hugelら<sup>53)</sup>が光応答性高分子を用いて一分子の光駆動サイクルを実現した。刺激応答性高分子ブラシの原子間力顕微鏡を用いた観察も筆者らを含めたいくつかの研究グループで行われてきた<sup>54)~57)</sup>。しかしながら、ナノデバイスの自動運動を観察は報告されていない。そこで本研究では初めてナノスケールの Belousov-Zhabotinsky (BZ) 反応ポリマー(化学時計)の自動振動の観察を試みた。BZ 反応は、Ru(bpy)<sub>3</sub> が触媒する自動振動現象である<sup>58),59)</sup>。マロン酸のような有機酸の酸化が酸性条件下金属イオンの存在下で起こるプロセスで、反応の過程で中間体の反応サイクル・ネットワークが形成される。触媒イオンが周期的に還元状態と酸化状態を

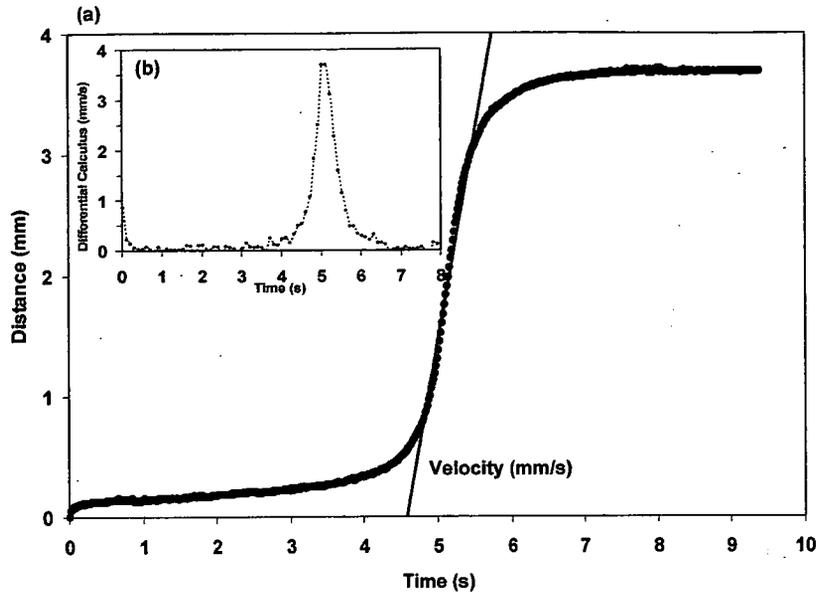


Figure 6. (a) Position of a droplet with a nominal volume of  $2 \mu\text{L}$  plotted against the transverse time, on a surface prepared with an irradiation energy of  $1.2 \text{ mW}/\text{cm}^2$  and a slide movement rate of  $0.05 \text{ mm}/\text{s}$ , respectively. The velocity of the water droplet was determined by the tangent of the curve. (b) Time dependence of the differential of (a). Reproduced with permission from *Langmuir*, **23**, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

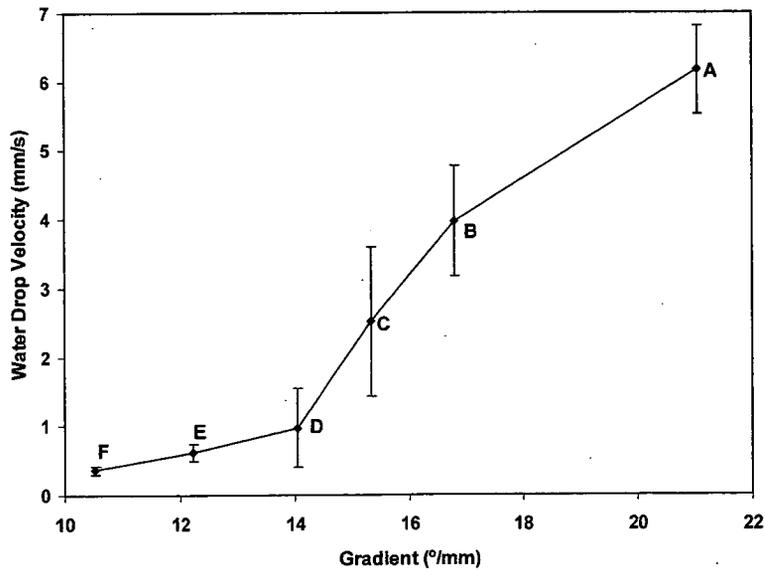


Figure 7. Relationship between the movement of a water droplet and the gradient of the contact angle with distance. A-F correspond to the data obtained from Figure 3b. Reproduced with permission from *Langmuir*, **23**, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

変化するため振動が起こる。

吉田と筆者らのグループでは、これまでこの自励振動系を温度応答性高分子に導入し、その挙動を解析してきた<sup>60)~63)</sup>。ここでは、その高分子を表面に共有結合固

定化し、その振動を走査プローブ顕微鏡(SPM)で分子レベルの直接観察を行った<sup>64)</sup>。振動化学反応を力学的な分子運動に変換し、これを観察しようとするものである。この自励振動デバイスは新しいナノマシンのコン

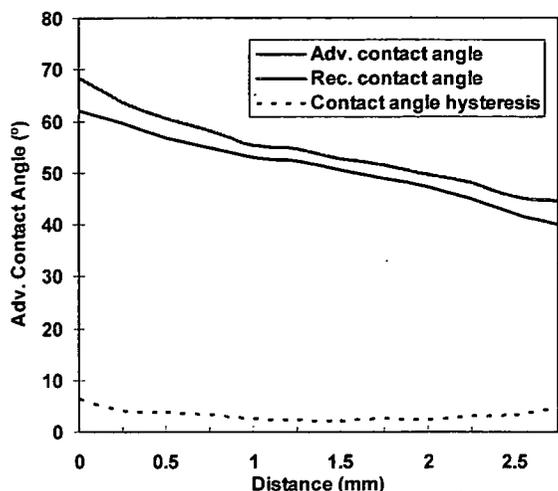


Figure 8. The time course of the movement of a water droplet on the surface (line A in Figure 3b). Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

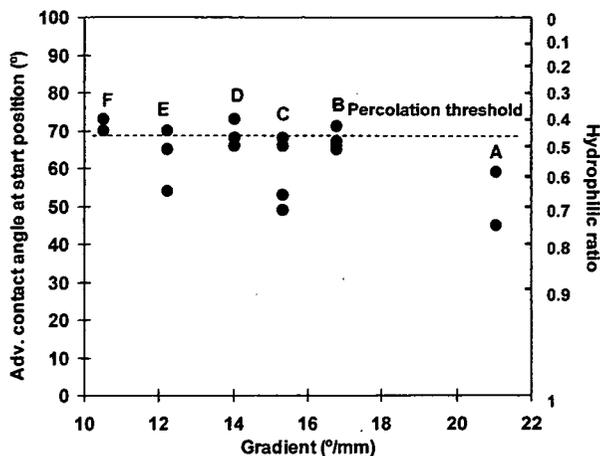


Figure 9. The relationship between the advancing contact angle of a water droplet at the position where it began to move (the hydrophilic ratio deduced from Cassie's equation) and the surface gradient. A-F correspond to the data in Figure 3b. Reproduced with permission from *Langmuir*, 23, 1845 (2007). Copyright 2007 American Chemical Society.

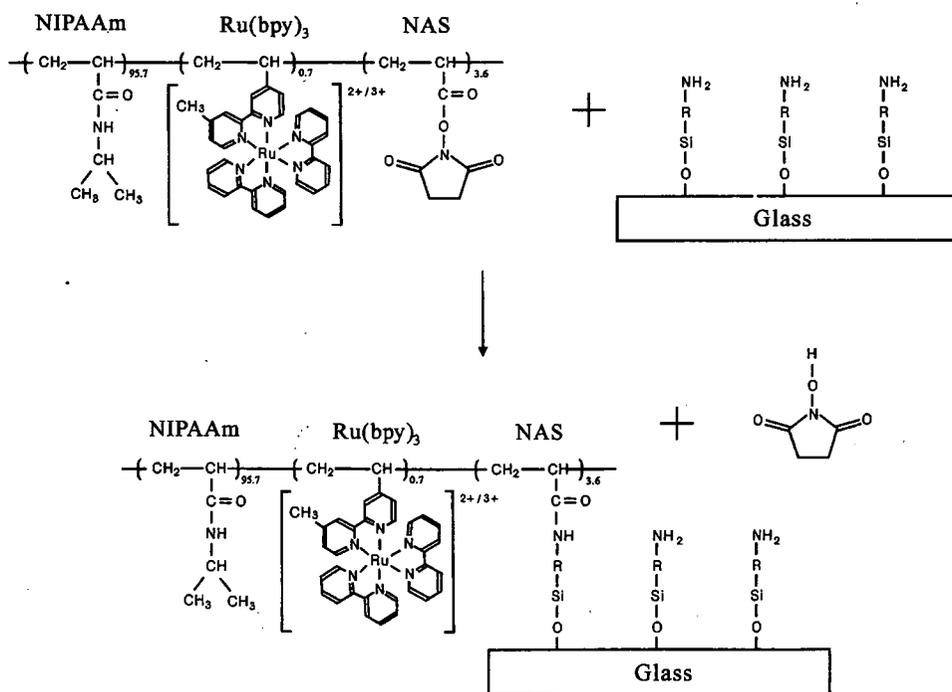


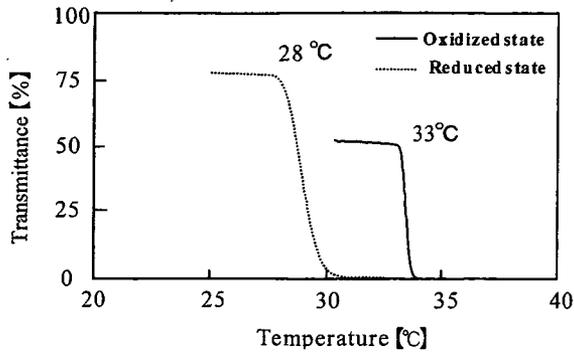
Figure 10. Preparation of self-oscillating polymer and its immobilization on a aminosilane-coupled glass surface. Reproduced with permission from *J. Phys. Chem. B*, 110, 5170 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

ポーネントとなると期待される。

### 3.1 自励振動高分子の合成

自励振動高分子は、Figure 10に示すようなBZ反応の触媒であるルテニウム錯体( $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ )と、温度応答性高分子のモノマーとなる*N*-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)、そしてカップリング用の*N*-スクシニミ

ジル基(NAS)からなる。4-ビニル-4'-メチル-2,2'-ビスピリジンビス(2,2'-ピピリジン)ビス(ヘキサフルオロホスフェート)( $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ ), *N*-イソプロピルアクリルアミド, *N*-スクシニミジルアクリル酸をメタノール中で、2,2'-アゾビスイソブチルニトリルを開始剤として共重合した。共重合は真空中60°Cで1日行った。反応物



**Figure 11.** Optical property of the prepared polymer in solution. The concentration of polymer,  $\text{HNO}_3$ , and  $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$  or  $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_2$ , was 0.5 wt%, 0.3 M, and 1 mM, respectively. The temperature was raised at a rate of  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ . The solution was stirred with a magnetic stirrer. Reproduced with permission from *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5170 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

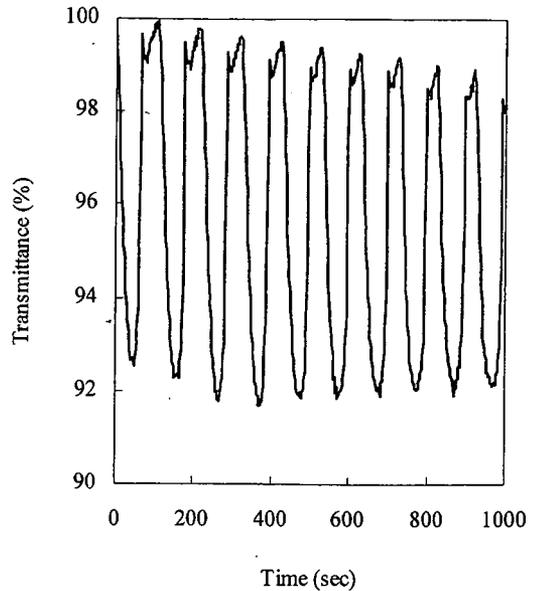
は水とメタノールで各々4日間と3日間透析し、最後に凍結乾燥した。光散乱法で分子量を求めると、約31万であった。

振動高分子の固定化のためにアミノシラン処理したガラス板を用いた。板を振動高分子の5%水溶液中に浸漬し、18時間室温で反応させ、最後に純水で洗浄し、以降の実験に供した。

### 3.2 自励振動の観察

高分子溶液の濁度変化を測定したところ、下限臨界溶液温度(LCST)が観測された(Figure 11)。還元状態と酸化状態の最大吸収が各々453 nmと421 nmに観測されるため、濁度測定は、574 nmで行った。 $\text{Ce}^{3+}$ と $\text{Ce}^{4+}$ を添加することにより還元、酸化を行った。還元状態でのLCSTは $28^\circ\text{C}$ で、NIPAAmのホモポリマーより低かった。疎水性のモノマー  $\text{Ru}(\text{bpy})_3$  との共重合によりLCSTが低下した。筆者らは、これまでNIPAAmポリマーにフェニル基を導入することにより、LCSTが低下することを報告した<sup>60)</sup>。一方、酸化状態でのLCSTは $33^\circ\text{C}$ で、NIPAAmホモポリマーのそれより少し高かった。この結果は、共重合体中の $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ 部分の酸化によりカチオンの増加が水分子の吸着の促進を招いたことを示唆する。

Figure 12は、高分子溶液の振動を示す。BZ反応中、還元状態( $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ )と酸化状態( $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ )で色、濁度ともに周期的に変化した。これはBZ反応によりこの酸化還元状態が周期的に変化し、このことにより、上述の高分子のLCSTの変化、すなわちコンホメーション変化を周期的に招いたものと考えられる。振動の振幅と周期は、*N*-スクニンイミド(NAS)の含まない高分子で報告<sup>61)</sup>されたように、反応物濃度、温度によって



**Figure 12.** Self-oscillating behaviour in solution. The concentration of polymer, malonic acid,  $\text{NaBrO}_3$ , and  $\text{HNO}_3$  was 0.25 wt%, 0.1 M, 0.2 M and 0.3 M, respectively. The solution was stirred with a magnetic stirrer at  $20^\circ\text{C}$ . Reproduced with permission from *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5170 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

制御できた。

$\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ と $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ を含む硝酸の高分子希薄水溶液の動的光散乱を測定すると分子直径は各々23.9 nmと59.6 nmであった。これは、還元状態と酸化状態で一分子のコンホメーション変化が起きていることを示している。合成した高分子をアミノシラン結合ガラス板へ固定化し、表面をXPSとTOF-SIMSを測定した。XPSでは、280.5 eVにRuの弱いピークが観測された。一方、TOF-SIMSではRuの二次陽性イオンが観測された。これらのことより、ガラス板上にRuを含む高分子が存在することが確認された。固定化された共重合体をSPMでタッピング・モードで測定した。板をマロン酸水溶液に浸漬し、臭素酸と硝酸を加え、SPMのカンチレバーを板の上におき、カンチレバーのz軸の動きをモニターし、その結果をFigure 13に示す。

純水中では振動は観測されなかったが、マロン酸、臭素酸、硝酸からなるBZ反応液に浸漬するとナノスケールの振動が観測された。不規則な挙動があるものの、振幅は、10~15 nmで、周期は70秒であった。高分子水溶液ではFigure 12のような規則的な振動挙動を観測するためには、かくはんが重要である。かくはんがないと規則的な振動は観測されない。しかしながら、SPM測定ではカンチレバーに影響を与えないようにかくはんはできない。かくはんしない状態でのBZ反応は非常に複雑になることが予測される。しかしかくはんがなくても

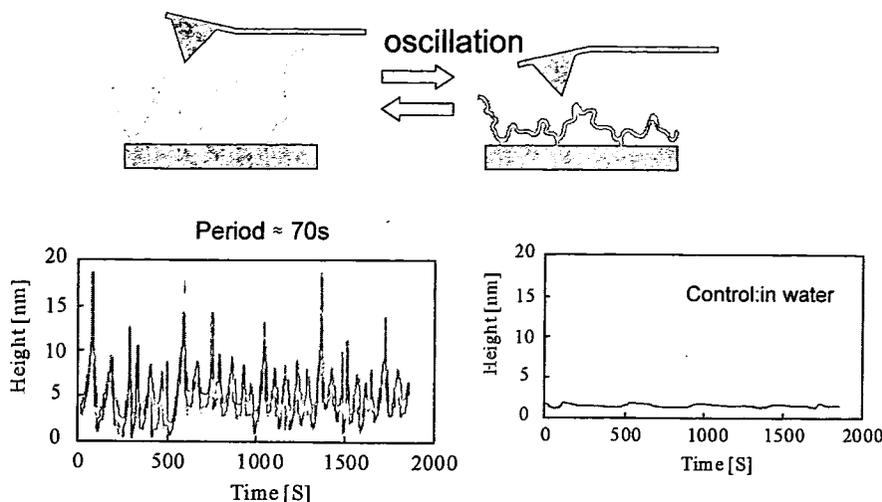


Figure 13. Self-oscillating behaviour of the immobilized polymer in a BZ reaction solution. The concentration of malonic acid,  $\text{NaBrO}_3$ , and  $\text{HNO}_3$  was 0.1 M, 0.3 M and 0.3 M, respectively. Reproduced with permission from *J. Phys. Chem. B*, 110, 5170 (2006). Copyright 2006 American Chemical Society.

板上の高分子は再現性高く振動した。周期70秒は、均一系の水溶液の場合とほとんど同じであった。ただ、固定化高分子の振動振幅は10~15 nmと動的光散乱の結果(23.9と59.6 nm)より小さかった。これは、固定化高分子がガラス板表面に末端だけで結合しているわけではなく、Figure 13下に示すようにループ状になっている領域もあるためと考えられる。加えて、カンチレバーによって付加される力も振幅を減らす効果をもつものと思われる。この振幅や周期は、反応物濃度によっても制御できた。

振動反応は、時間経過とともに分子間の凝集が起これ、長時間は継続しない<sup>65)</sup>。これに対し、固定化高分子では際立った減衰もなく2,000秒以上の長期化が可能であった。これは、固定化されることにより分子間の凝集が抑制されるためと考えられる。ここでは、初めてナノレベルでの振動観察に成功した。振動高分子は、今後さまざまなナノ時計やナノセンサーへの応用が期待される。

#### 4 生体不活性表面

人工臓器や医療器具の材料には生体適合性が求められる。その生体適合性には、生体活性化型と生体不活性化型がある<sup>66),67)</sup>。前者は、組織や細胞との接着性や増殖性を促進できるもので、筆者らはこれまでさまざまな生理活性材料をサイトカインや成長因子タンパク質の固定化によって開発してきた<sup>68)</sup>。これに対し、後者の生体不活性化型は、できるだけ組織や細胞との相互作用を少なくして、異物認識されずに材料としての機能を発揮するものである。ここでは、これら生体不活性化型高分子材料に光反応性を付与し、金属、無機材料も含むさまざまな基材

表面を修飾可能にした。

生体不活性化型高分子の素材として、両性イオン型のホスファチジルコリン基(PC)<sup>69)</sup>およびノニオン型のポリエチレングリコール(PEG)<sup>70)</sup>を側鎖にもつ高分子と、ノニオン型の多糖であるプルラン<sup>71)</sup>を用いた。これらの高分子を光固定化した表面は、タンパク質吸着の抑制や細胞接着の阻害をすることが可能となった。

##### 4.1 PC修飾生体不活性表面

###### 4.1.1 PCをもつ光反応性高分子(Az-PMAC)の合成

光反応性ホスファチジルコリンメタクリレート90%とメタクリル酸10%からなる高分子(PMAC)の合成方法をFigure 14に示す。PMACとアジドアニリンを、水溶性カルボジイミドを縮合剤として加えて反応させた。反応後、透析により未反応のアジドアニリンを除去した。その後、凍結乾燥して目的のAz-PMACを得た。PMACに導入されたアジドフェニル基の吸収は長波長にシフトすることがわかった。また、紫外吸収スペクトルの測定結果から、アジドフェニル基の導入率は6 mol%と算出された。

###### 4.1.2 Az-PMACの評価

調製したAz-PMAC水溶液を細胞培養用基材上に塗布した後、乾燥し、光マスクの存在下で紫外線照射を行い固定化した。光マスクと固定化されたAz-PMACをFigure 15に示す。光マスクのパターンに従って固定化されていることが確認された。

Figure 16には、Az-PMACをマイクロパターン状に固定化した基材上でタンパク質吸着評価を行った結果を示す。血液中の主要なタンパク質であるアルブミン、免疫グロブリン、フィブリノーゲンをAz-PMAC固定化基材

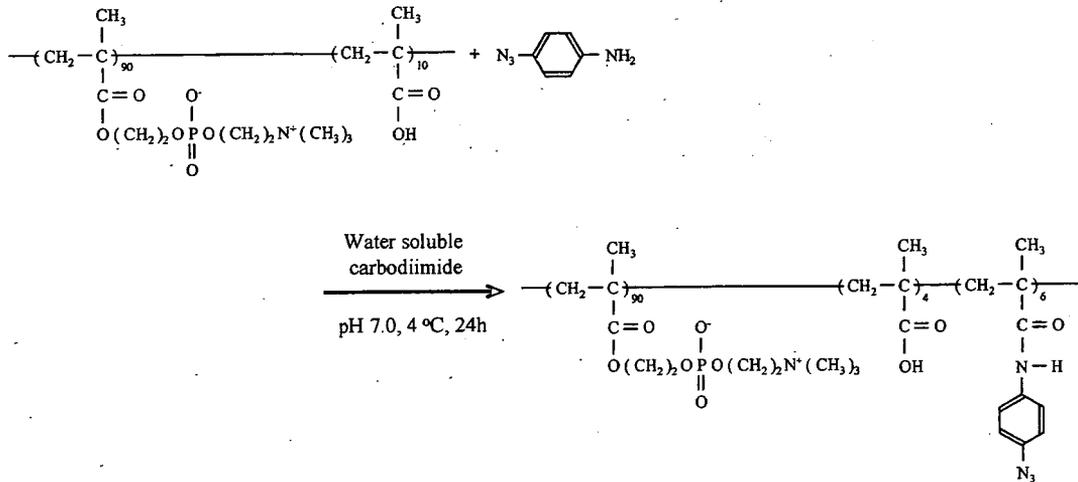


Figure 14. Synthesis of a photo-reactive phosphatidylcholine-containing polymer (Az-PMAC). Reproduced with permission from *Biomaterials*, 26, 1381 (2005). Copyright 2005 Elsevier.

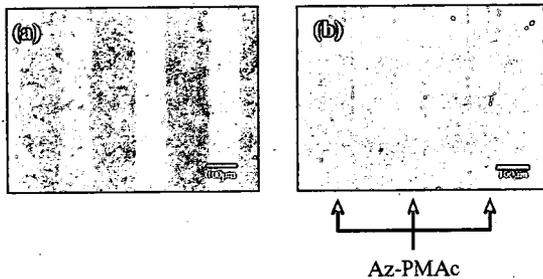


Figure 15. Microscopic image of (a) photo-mask and (b) immobilized Az-PMAC. Reproduced with permission from *Biomaterials*, 26, 1381 (2005). Copyright 2005 Elsevier.

に吸着させてから洗浄して観察を行った。吸着に用いたタンパク質は蛍光標識されており、吸着したタンパク質を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Az-PMAC 固定化領域ではタンパク質の吸着が抑制されており、Az-PMAC 非固定化領域でのみタンパク質の吸着が観察された。

RAW 264 細胞(マウス白血病単球細胞)の接着評価を行った結果を Figure 17 に示す。細胞を播種した直後は、Az-PMAC 固定化領域が明瞭ではないが、時間経過に従い Az-PMAC 固定化領域には細胞がほとんど接着しておらず、接着できない細胞どうしで凝集しており、培養皿を軽くふるだけで容易にはがすことができた。Az-PMAC は、細胞培養用基材に固定化でき、細胞接着やタンパク質吸着の抑制効果をもち、生体適合性の高い表面改質剤として機能した。

## 4.2 プルラン修飾生体不活性表面

### 4.2.1 光反応性プルランの合成

Figure 14 と同様の反応で、プルランに *N*-(4-アジドベンゾイルオキシ)スクシンイミドを反応させ、アジドフェニル化プルラン(Az-pullulan)を得た。Az-pullulan

はゲルろ過カラムクロマトグラフィー(GPC)および紫外吸収スペクトル測定を行った。Az-pullulan へのアジドフェニル基の導入率は、アジドアニリン塩酸塩の吸収から算出した結果は 1.1 wt% であった。トリス緩衝液(pH 8.2)での測定の結果、Az-pullulan とプルランの溶出挙動が同じパターンを示したが、純水(pH 7.3)での溶出パターンは Az-pullulan とプルランでは溶出挙動がかなり変化した。

### 4.2.2 光固定化プルランの評価

Table 1 には、Az-pullulan 固定化前後の静的接触角変化を示す。固定化前は、基材表面の固有の接触角であったが、Az-pullulan 固定化により表面の接触角がほぼ同一の結果となった。この結果、Az-pullulan によって基材表面が被覆されることがわかった。

Figure 18 には、マイクロパターン状固定化した上で RAW 264 細胞を培養した結果を示す。Az-pullulan 固定化領域では細胞はほとんど接着が観察されず、Az-pullulan 非固定化領域に細胞の接着が観察された。

## 4.3 PEG 修飾生体不活性表面

### 4.3.1 光反応性 PEG (Az-PEG) の合成

光反応性 PEG は、光反応性基をもつモノマーと、PEG 基をもつモノマーとの共重合によって得た。光反応性のモノマーは、次のように得た。アジドアニリン塩酸塩を純水に溶解した後、炭酸ナトリウムを加えて pH 10.0 に調整した。塩化メタクリロイルの 1,4-ジオキサン希釈溶液をアジドアニリン水溶液にゆっくりと滴下してかくはんしながら反応を開始した。反応終了後、目的の光反応性基をもつモノマー、4-アジドフェニルメタクリルアミドを得た。

次に、(ポリエチレングリコール)メタクリレートと 4-アジドフェニルメタクリルアミド共重合体(Az-PEG)



Figure 16. Protein (albumin, immunoglobulin, and fibrinogen) adsorption on a micropattern of immobilized Az-PMac. Reproduced with permission from *Biomaterials*, 26, 1381 (2005). Copyright 2005 Elsevir.

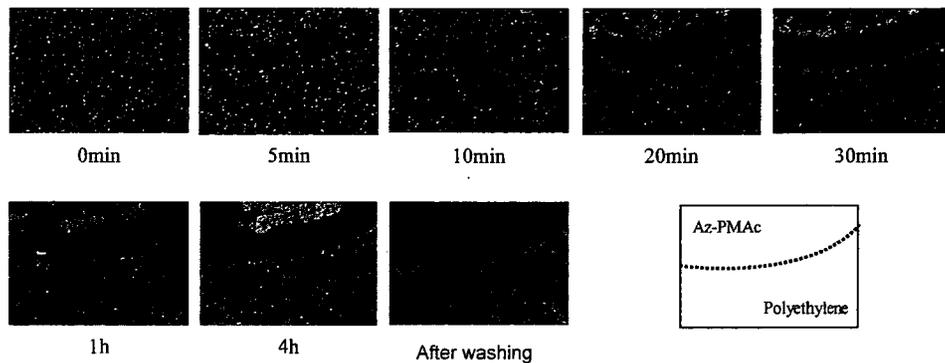


Figure 17. Time course of cell adhesion on polyethylene partially covered with immobilized with Az-PMac. Reproduced with permission from *Biomaterials*, 26, 1381 (2005). Copyright 2005 Elsevir.

Table 1. Contact Angles of Az-pullulan-modified surfaces

Surface	Contact angle (°)
Polystyrene	90.3 ± 0.4
Polystyrene modified Az-pullulan	73.0 ± 1.6
Polyethylene	66.7 ± 1.3
Polyethylene modified Az-pullulan	72.2 ± 1.9
Aminosilane-coupled glass	50.8 ± 1.0
Aminosilane-coupled glass modified Az-pullulan	72.4 ± 2.0

の合成方法を Figure 19 に示す。(ポリエチレングリコール)メタクリレート, 4-アジドフェニルメタクリルアミド, 2,2'-アソビス(イソブチロニトリル)のエタノール溶液を窒素雰囲気下, 60°C で反応した。反応後, 透析により精製を行い目的の Az-PEG を得た。

Az-PEG の分子量は GPC を用いて測定を行った。その結果, ポリエチレンオキシド換算で分子量約 8100 であり, (ポリエチレングリコール)メタクリレートの分子量と比較して高分子化されていることが確認された。また, 紫外吸収スペクトルを測定した結果, 光反応性ユニットは 5 mol% 導入された Az-PEG が合成された。

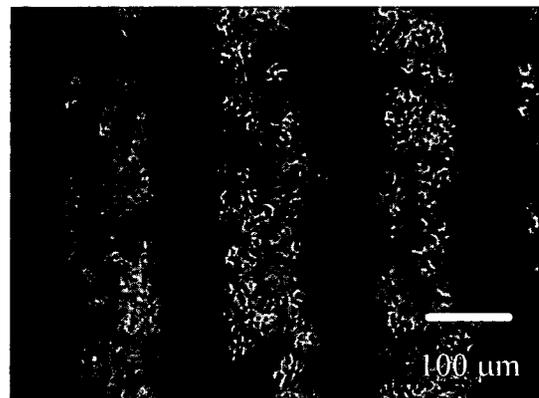


Figure 18. Cell adhesion on a micropattern of immobilized Az-pullulan. Reproduced with permission from *Biomaterials*, 26, 2401 (2005). Copyright 2005 Elsevir.

#### 4.3.2 Az-PEG の評価

合成した Az-PEG を光リソグラフィー法を用いてチタン蒸着ガラス, ガラス, サーマノックス™(細胞培養用プラスチック)表面上に固定化を行い, 位相差顕微鏡で観察した(Figure 20)。Az-PEG 固定化表面を TOF-SIMS, AFM 解析および静的接触角の測定を行うことで固定化表面を評価した。

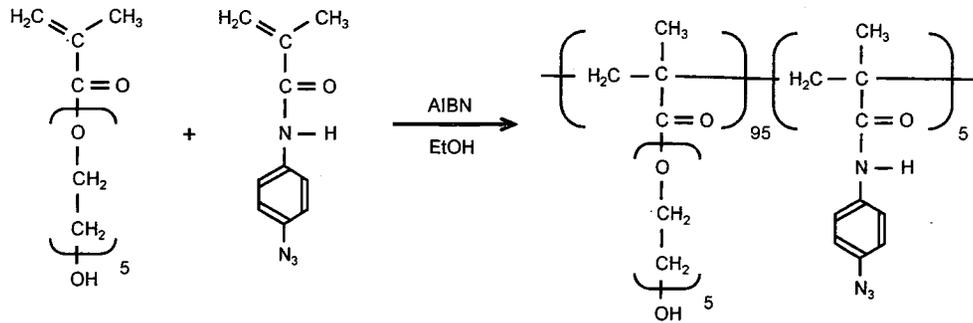


Figure 19. Synthesis of a photo-reactive polyethylene glycol-containing polymer (Az-PEG). Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

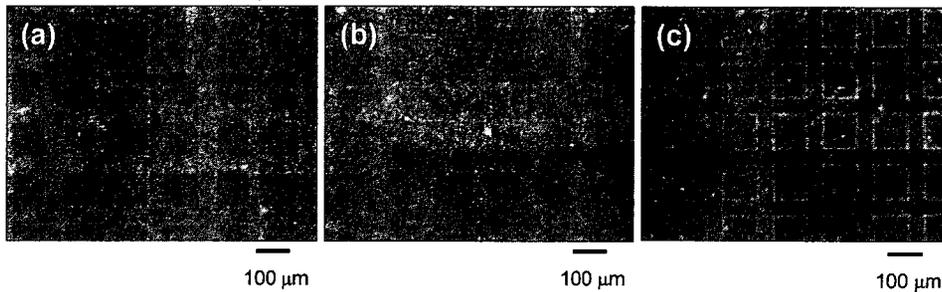


Figure 20. Phase contrast microscopic image of a micropattern of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

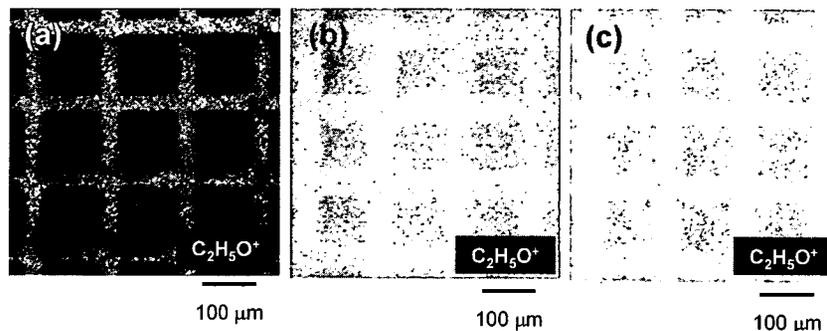
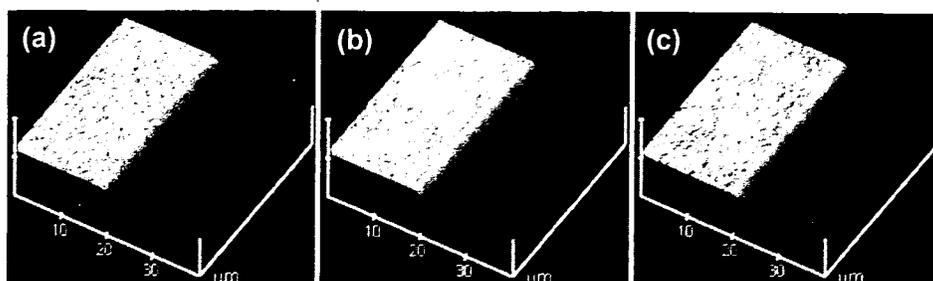


Figure 21. Secondary ion image (TOF-SIMS) of a micropattern of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

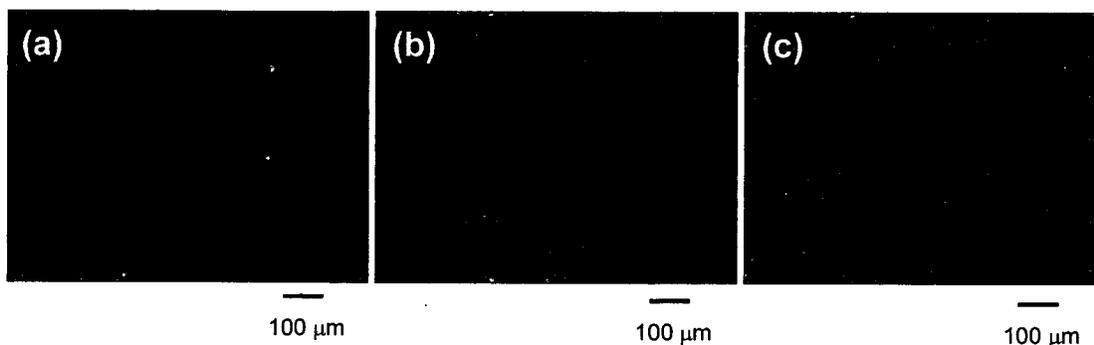
各種表面に固定化した Az-PEG の TOF-SIMS による分析では、Az-PEG の固定化領域からポリエチレングリコールに由来する  $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}^+$  の二次イオン像が観察され、非固定化領域からは Az-PEG に由来するイオンピークは観測されなかった (Figure 21). 次に AFM の測定を行った結果、Az-PEG 固定化領域の厚みは約 300 nm であり、基材の違いによる Az-PEG 固定化層の厚みは特に違いがなかった (Figure 22). 静的接触角の測定は、各種表面の全面に Az-PEG を固定化した表面を用いて行った。その結果、Az-PEG 固定化後の各種表面は接触

角が約  $40^\circ$  となり基材を選ばずに表面の改質に成功した (Table 2).

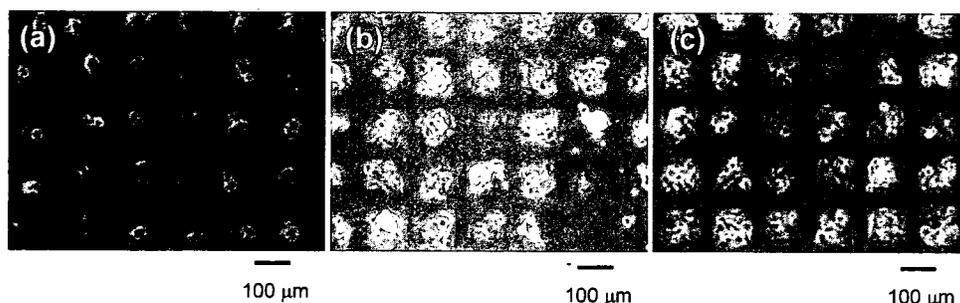
次にタンパク質の吸着と細胞の接着について評価した。タンパク質の吸着は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリンを吸着させた後、TMB 染色を行い評価した (Figure 23). その結果、Az-PEG 固定化領域にはタンパク質が吸着せずに非固定化領域のみでタンパク質の吸着が見られた。また、COS 7 細胞を用いた細胞接着評価でも、Az-PEG の固定化領域には細胞が接着せず、非固定化領域でのみ細胞の接着が



**Figure 22.** Atomic force microscopic image of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.



**Figure 23.** Protein adsorption on a micropattern of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.



**Figure 24.** Cell adhesion on a micropattern of immobilized Az-PEG on (a) titanium, (b) glass, and (c) Thermanox™. Reproduced with permission from *Acta Biomaterialia*, 3, 1024 (2007). Copyright 2007 Elsevir.

**Table 2.** Contact angle of Az-PEG-modified surfaces

Surface	Contact angle (°)
Titanium	40.3 ± 1.5
Titanium modified with PEG	39.2 ± 1.3
Glass	6.4 ± 1.2
Glass modified with PEG	40.9 ± 0.7
Thermanox	78.8 ± 0.7
Thermanox modified with PEG	41.0 ± 2.7

観察された (Figure 24).

本研究では、光反応性で生体との相互作用が少ない新しい表面修飾高分子の合成とその評価を行った。Az-PMac および Az-PEG は有機合成高分子で、Az-pullulan は天然物高分子であり、これらに光反応性を導入することにより表面の改質を簡便に行える光反応性高分子を得ることができた。この技術を用いると、これまでの吸着による表面改質と比較して、共有結合により高分子を固定化することになり、構造的に安定で強固な表面改質が行われることが期待できる。実際に、合成された高

分子によっていずれもタンパク質や細胞とほとんど相互作用しない表面を得ることができたことから、長期間安定に生体不活性を保つには、非常に優れているものと考えられる。また、金属材料や無機材料の表面も生体機能化することができた。金属や無機材料への安定的な結合の理由は、表面ヒドロキシル基などへの化学的反応あるいは表面凹凸への物理的アンカーリング効果と考えられるが、詳細は明らかでない。これについては、今後、表面のさらに詳細な解析を行うことが必要である。

## 5 おわりに

本報では、単分子層レベルあるいはナノレベルでの表面修飾によりさまざまな材料の機能化の付与(水滴移動, 自励振動, 生体適合性)が可能であることを示した。今後、さらにこれらの機能や、これまでに生み出されてきた機能性<sup>72)~76)</sup>を複合化することにより、新しい界面ナノテクノロジーが発展してゆくものと期待される。

謝辞 本研究は、財団法人神奈川科学技術アカデミーのプロジェクト(平成14~18年度)で行われた。財団ならびに共同研究者の方々に感謝します。

## 文 献

- 1) 伊藤嘉浩, 高分子論文集, **54**, 596 (1997).
- 2) 伊藤嘉浩, 高分子論文集, **55**, 171 (1998).
- 3) 伊藤嘉浩, 高分子論文集, **56**, 617 (1999).
- 4) M. K. Chaudhury and G. M. Whitesides, *Science*, **256**, 1539 (1992).
- 5) K. Ichimura, S.-K. Oh, and M. Nakagawa, *Science*, **288**, 1624 (2000).
- 6) R. Rosario, D. Gust, A. A. Garcia, M. Hayes, J. L. Taraci, T. Clement, J. W. Dailey, and S. T. Picraux, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 12640 (2004).
- 7) S. Daniel and M. J. Chaudhury, *Langmuir*, **18**, 3404 (2002).
- 8) S. Daniel, M. J. Chaudhury, and J. C. Chen, *Science*, **291**, 633 (2003).
- 9) H. Suda and S. Yamada, *Langmuir*, **19**, 529 (2003).
- 10) S. Daniel, S. Sircar, J. Gliem, and M. K. Chaudhury, *Langmuir*, **20**, 4085 (2004).
- 11) R. J. Petrie, T. Bailey, C. B. Gorman, and J. Genzer, *Langmuir*, **20**, 9893 (2004).
- 12) R. S. Subramanian, N. Moumen, and J. B. McLaughlin, *Langmuir*, **21**, 11844 (2005).
- 13) K. A. Wier, L. Gao, and T. J. McCarthy, *Langmuir*, **22**, 4914 (2006).
- 14) N. Moumen, R. S. Subramanian, and J. B. McLaughlin, *Langmuir*, **22**, 2682 (2006).
- 15) B. H. Clare, K. Efimenko, D. A. Fischer, J. Genzer, and N. L. Abbott, *Chem. Mater.*, **18**, 2357 (2006).
- 16) T. Ueda-Yukoshi and T. Matsuda, *Langmuir*, **11**, 4135 (1995).
- 17) X. Yu, Z. Wang, Y. Jiang, and X. Zhang, *Langmuir*, **22**, 4483 (2006).
- 18) G. Chen and Y. Ito, *Biomaterials*, **22**, 24583 (2000).
- 19) Y. Ito, M. Hayashi, and Y. Imanishi, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **12**, 367 (2001).
- 20) H. Liu and Y. Ito, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67A**, 1424 (2003).
- 21) J. Y. Wong, A. Velasco, P. Rajagopalan, and Q. Pham, *Langmuir*, **19**, 1908 (2003).
- 22) B. P. Harris, J. K. Kutty, E. W. Fritz, C. K. Webb, K. J. L. Burg, and A. T. Metters, *Langmuir*, **22**, 4467 (2006).
- 23) R. C. Gunawan, J. Silvestre, H. R. Gaskins, P. J. A. Kenis, and D. E. Leckband, *Langmuir*, **22**, 4250 (2006).
- 24) A. M. Cazabat, F. Heslot, S. M. Troian, and P. Carles, *Nature*, **346**, 824 (1990).
- 25) B. S. Gallardo, V. K. Gupta, F. D. Egerton, L. I. Jong, V. S. Craig, R. R. Shah, and N. L. Abbott, *Science*, **283**, 57 (1999).
- 26) R. H. Terrill, K. M. Z. Y. Balss, and P. W. Bohn, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 988 (2000).
- 27) T. Sehayek, A. Vaskevich, and I. Rubinstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4718 (2003).
- 28) B. P. Harris and A. T. Metters, *Macromolecules*, **39**, 2764 (2006).
- 29) M. S. Kim, K. S. Seo, G. Khang, and H. B. Lee, *Bioconj. Chem.*, **16**, 245 (2005).
- 30) S.-H. Choi and B. Z. Newby, *Langmuir*, **19**, 7427 (2003).
- 31) X. Jiang, Q. Xu, S. K. W. Dertinger, A. D. Stroock, T. Fu, and G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, **77**, 2338 (2005).
- 32) A. Shastry, M. J. Case, and K. F. Bohringer, *Langmuir*, **22**, 6161 (2006).
- 33) C. Chen, D. Hirdes, and A. Folch, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **100**, 1499 (2003).
- 34) M.-H. Wu, C. Park, and G. M. Whitesides, *Langmuir*, **18**, 9312 (2002).
- 35) C. L. Hypolite, T. L. McLernon, D. N. Adams, K. E. Chapman, C. B. Herbert, C. C. Huang, M. D. Distefano, and W.-S. Hu, *Bioconj. Chem.*, **8**, 658 (1997).
- 36) M. B. J. Wijesundara, E. Fuoco, and L. Hanley, *Langmuir*, **17**, 5721 (2001).
- 37) N. L. Jeon, S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, I. S. Choi, A. D. Stroock, and G. M. Whitesides, *Langmuir*, **16**, 8311 (2000).
- 38) I. Caelen, A. Bernand, D. Juncker, B. Michel, H. Heinzelmann, and E. Delamarche, *Langmuir*, **16**, 9125 (2000).
- 39) I. Caelen, H. Gao, and H. Sigrüst, *Langmuir*, **18**, 2463 (2002).
- 40) Y. Ito, M. Heydari, A. Hashimoto, T. Konno, A. Hirasawa, S. Hori, K. Kurita, and A. Nakajima, *Langmuir*, **23**, 1845 (2007).
- 41) H. Sugimura, K. Ushiyama, A. Hozumi, and O. Takai, *Langmuir*, **16**, 885 (2000).
- 42) L. Hong, H. Sugimura, T. Furukawa, and O. Takai, *Langmuir*, **19**, 1966 (2003).
- 43) Y. Ito, M. Nogawa, H. Sugimura, and O. Takai, *Langmuir*, **21**, 4299 (2004).
- 44) M. Sakai, J.-H. Song, N. Yoshida, S. Suzuki, Y. Kameshima, and A. Nakajima, *Langmuir*, **22**, 4906 (2006).
- 45) S. Semal, C. Bauthier, M. Voue, J. J. Vanden Eynde, R. Gouttebaron, and J. De Coninck, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 6225 (2000).
- 46) R. Zallen, *The Physics of Amorphous Solids*, John Wiley & Sons, New York (1983) pp. 135-204.
- 47) A. B. D. Cassie, S. Baxtor, *Trans. Faraday Soc.*, **40**, 546 (1944).
- 48) J. D. Badjic, V. Balzani, A. Credi, S. Silvi, and J. F. Stoddart, *Science*, **303**, 1845 (2004).

- 49) B. C. Regan, S. Aloni, R. O. Ritchie, U. Dahmen, and A. Zettl, *Nature*, **428**, 924 (2004).
- 50) R. K. Soong, G. D. Bachand, H. P. Neves, A. G. Olkhovets, H. G. Craighead, and C. D. Montemagno, *Science*, **290**, 1555 (2000).
- 51) B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. Mills, Jr., F. C. Simmel, and J. L. Neumann, *Nature*, **406**, 605 (2000).
- 52) J. J. Li and W. Tan, *Nano Lett.*, **2**, 315 (2002).
- 53) T. Hugel, N. B. Holland, A. Cattani, L. Moroder, M. Seitz, and H. E. Gaub, *Science*, **296**, 1103 (2002).
- 54) Y. Ito, Y. S. Park, and Y. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2739 (1997).
- 55) G. Chen, Y. Imanishi, and Y. Ito, *Langmuir*, **14**, 6610 (1998).
- 56) Y. Ito, Y. S. Park, and Y. Imanishi, *Langmuir*, **16**, 5376 (2000).
- 57) A. J. Ryan, C. J. Crook, J. R. Howes, P. Topham, R. A. L. Jones, M. Geoghegan, A. J. Parnell, L. Ruiz-Perez, S. J. Martin, A. Cadby, A. Menelle, J. R. P. Webster, A. J. Gleeson, and W. Bras, *Faraday Discuss.*, **128**, 55 (2005).
- 58) A. N. Zaikin and A. M. Zhabotinsky, *Nature*, **225**, 535 (1979).
- 59) R. J. Field and M. Burger, Eds., *Oscillations and Traveling Waves in Chemical Systems*, John Wiley & Sons, New York (1985).
- 60) Y. Ito, G. Chen, Y. Guan, and Y. Imanishi, *Langmuir*, **13**, 2756 (1997).
- 61) Y. Ito, M. Nogawa, and R. Yoshida, *Langmuir*, **19**, 9577 (2003).
- 62) R. Yoshida, T. Sakai, S. Ito, and T. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8095 (2002).
- 63) R. Yoshida, T. Takahashi, T. Yamaguchi, and H. Ichijo, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5134 (1996).
- 64) Y. Ito, Y. Hara, H. Uetsuka, H. Hasuda, H. Onishi, H. Arakawa, A. Ikai, and R. Yoshida, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5170 (2006).
- 65) M. Ueda, Y. Hara, T. Sakai, R. Yoshida, M. Takai, and Y. Ito, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **45**, 1578 (2007).
- 66) Y. Ito, H. Hasuda, N. Yamauchi, N. Komatsu, and K. Ikebuchi, *Biomaterials*, **25**, 2293 (2004).
- 67) 伊藤嘉浩, *繊維と工業*, **45**, 432 (1989).
- 68) Y. Ito, *Soft Matter*, **4**, 46 (2008).
- 69) T. Konno, H. Hasuda, K. Ishihara, and Y. Ito, *Biomaterials*, **26**, 1381 (2005).
- 70) Y. Ito, H. Hasuda, M. Sakuragi, and S. Tsuzuki, *Acta Biomater.*, **3**, 1024 (2007).
- 71) H. Hasuda, O. H. Kwon, I.-K. Kang, and Y. Ito, *Biomaterials*, **26**, 2401 (2005).
- 72) Y. Ito, *J. Biomat. Sci., Polym. Ed.*, **10**, 1237 (1999).
- 73) Y. Ito and E. Fukusaki, *J. Mol. Catal. Enz.*, **B28**, 155 (2004).
- 74) Y. Ito and Y. S. Park, *Polym. Adv. Technol.*, **11**, 136 (2000).
- 75) G. Chen, N. Kawazoe, Y. Fan, Y. Ito, and T. Tateishi, *Langmuir*, **23**, 5864 (2007).
- 76) H. Zhang and Y. Ito, *Langmuir*, **17**, 8336 (2001).

[Comprehensive Papers]

Creation of Functional Surfaces by Nano Interface Technology

Yoshihiro Ito\*1

\*1RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research) (2-1 Hirosawa, Wako 351-0198, Japan)

Some types of functional surfaces were created by surface modification at the nano-scale level; that is called nano interface technology. First, a surface with a hydrophilicity gradient was reproducibly prepared and the movement of a water droplet on such a surface was observed. Secondly, a self-oscillating polymer was immobilized on a solid surface and the oscillation phenomenon was observed by scanning probe microscopy. Thirdly, biononfouling surfaces were prepared by immobilization of newly developed photo-reactive natural or synthetic polymers.

KEY WORDS Gradient Surface / Droplet Movement / Self-oscillation / Scanning Probe Microscope / Biononfouling Surface /

(Received August 22, 2007; Accepted October 22, 2007)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **65**, 6-19 (2008)]

## A New Murine Model to Define the Critical Pathologic and Therapeutic Mediators of Polymyositis

Takahiko Sugihara,<sup>1</sup> Chiyoko Sekine,<sup>2</sup> Takashi Nakae,<sup>3</sup> Kuniko Kohyama,<sup>4</sup> Masayoshi Harigai,<sup>5</sup> Yoichiro Iwakura,<sup>6</sup> Yoh Matsumoto,<sup>4</sup> Nobuyuki Miyasaka,<sup>5</sup> and Hitoshi Kohsaka<sup>1</sup>

**Objective.** To establish a new murine model of polymyositis (PM) for the understanding of its pathologic mechanisms and the development of new treatment strategies.

**Methods.** C protein–induced myositis (CIM) was induced by a single immunization of recombinant human skeletal C protein in C57BL/6 mice, as well as in CD4-depleted, CD8-depleted, and mutant mice as controls. Some mice were treated with high-dose intravenous immunoglobulin (IVIG) after disease induction. Muscle tissues were examined histologically.

**Results.** In mice with CIM, inflammation was confined to the skeletal muscles. Histologic examination revealed a common pathologic feature of CIM and PM, involving abundant infiltration of CD8 and perforin-expressing cells in the endomysial site of the injured muscle. Suppression of myositis was achieved by depletion of both CD4 and CD8 T cells. Despite the development of serum anti-C protein antibodies in wild-type mice, severe myositis was induced in mice deficient in B cells. Induction of myositis was suppressed in interleukin-1 $\alpha/\beta$  (IL-1 $\alpha/\beta$ )–null mutant mice, but not

in tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )–null mutant mice. Use of IVIG, a treatment with proven efficacy in PM, suppressed CIM in the subgroup of treated mice.

**Conclusion.** CIM mimics PM pathologically and clinically. Infiltration of CD8 T cells is the most likely mechanism of muscle injury, and IL-1, but not B cells or TNF $\alpha$ , is crucial in the development of CIM. IVIG has therapeutic effects in CIM, suggesting that the effects of IVIG are not mediated by suppression of antibody-mediated tissue injury. This murine model provides a useful tool for understanding the pathologic mechanisms of PM and for developing new treatment strategies.

Polymyositis (PM) is a chronic autoimmune inflammatory myopathy affecting striated muscles (1). Damage of muscles results in varying degrees of muscle weakness. Dysphagia with choking episodes and respiratory muscle weakness can occur in acute cases of PM. Currently, the pathogenesis of PM is unknown, and patients are therefore treated with nonspecific immunosuppressants. High-dose corticosteroids are the first-line treatment but are not effective in all patients. Improvement of disease often depends on the dosage of corticosteroids, making a dosage reduction difficult and thus, in many cases, necessitating administration of methotrexate or other immunosuppressants as adjunctive treatment. Because these medications can elicit a wide variety of adverse drug reactions, new therapies to address the specific pathologic features of PM are needed.

In affected muscles of patients with PM, infiltration of mononuclear cells leads to muscle fiber necrosis. These cells are found in the endomysial site, where non-necrotic muscle fibers are damaged, and also in the perimysial and perivascular sites of the muscles. Immunohistochemical studies have disclosed that CD8 T cells are most abundant in the endomysial site and invade

Supported by grants-in-aid from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology and from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare.

<sup>1</sup>Takahiko Sugihara, MD, Hitoshi Kohsaka, MD, PhD: Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, and Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN, Yokohama, Japan; <sup>2</sup>Chiyoko Sekine, PhD: Research Center for Allergy and Immunology, RIKEN, Yokohama, Japan; <sup>3</sup>Takashi Nakae: Benesis Corporation, Osaka, Japan; <sup>4</sup>Kuniko Kohyama, MS, Yoh Matsumoto, MD, PhD: Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Tokyo, Japan; <sup>5</sup>Masayoshi Harigai, MD, PhD, Nobuyuki Miyasaka, MD, PhD: Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; <sup>6</sup>Yoichiro Iwakura, DSc: University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Address correspondence and reprint requests to Hitoshi Kohsaka, MD, PhD, Department of Medicine and Rheumatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan. E-mail: kohsaka.rheu@tmd.ac.jp.

Submitted for publication March 31, 2006; accepted in revised form January 16, 2007.

non-necrotic muscle fibers (2,3). These CD8 T cells express cytotoxic effector molecules, known as perforins, that are oriented toward target muscle fibers (4). Surface expression of class I major histocompatibility complex (MHC) molecules on muscle fibers is up-regulated (5). In a study of T cells from patients with PM compared with normal donors, CD8 T cell clones expanded more frequently in the peripheral blood of patients with PM (6,7). Moreover, some of these clones could be found in muscle biopsy samples from the same patients (6,7). All of these observations support the view that PM is driven by cytotoxic CD8 T cells.

In rheumatoid arthritis (RA), another autoimmune disease, biologic agents that block tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) have been introduced into clinical use. TNF $\alpha$  blockade has an enormous effect in modulating the clinical course of RA (8). Animal models of arthritis serve to help identify therapeutic targets and to test the effect of these therapeutic reagents (9–11). In contrast, in PM, the lack of appropriate animal models has hampered basic research studies and delayed the development of new treatments.

Experimental autoimmune myositis (EAM), established previously as an animal model of PM, is inducible specifically in SJL/J mice by repeated administration of muscle homogenate or partially purified myosin (12,13). This model is a complex representation of disease, because SJL/J mice have a dysferlin gene mutation that causes spontaneous muscle necrosis and secondary muscle inflammation (14). Immunohistochemical studies have shown that infiltrating T cells in the muscle are dominated by CD4 T cells, suggesting that the EAM disease model is mediated by CD4 T cells (15).

We established a new murine model that can be induced with a single injection of a recombinant skeletal muscle fast-type C protein. This myosin-binding protein is in the cross-bridge-bearing zone of A bands of myofibrils (16,17). Biochemical purification studies showed that C protein appears to be the main immunopathogenic component of the crude skeletal-muscle myosin preparation used for the induction of experimental myositis in Lewis rats (18,19). In this study, we used recombinant protein fragments to confirm the immunogenicity of the C protein. This myositis, designated as C protein-induced myositis (CIM), can be induced in C57BL/6 (B6) mice and in other strains of mice. Its histologic and immunohistochemical features mimic those of PM. Functional studies have indicated that cytotoxic CD8 T cells are primarily responsible for the pathologic mechanisms of this disease.

Susceptibility to CIM in B6 mice has facilitated studies of the immunologic components required to induce myositis. In the present study, we were able to show that the effects of immunoglobulins are not necessary for the development of CIM, despite the presence of B cells in the affected muscles and anti-C protein antibodies in the sera. Although both interleukin-1 (IL-1)-positive and TNF $\alpha$ -positive cells infiltrated the muscles of affected mice, only IL-1, not TNF $\alpha$ , was crucial in the development of CIM. Interestingly, CIM was suppressed by infusion of intravenous immunoglobulins (IVIGs), which has been used as a last resort for treatment of patients with PM who do not respond to or tolerate immunosuppressive reagents. Thus, we show that our new model is useful in investigating the pathologic mechanisms of autoimmune myositis and in developing new treatment strategies for this disease.

## MATERIALS AND METHODS

**Mice.** B6, SJL/J, BALB/c, DBA/1, and C3H/He mice were purchased from Charles River (Yokohama, Japan). NZB and MRL/Mp+/+ mice were purchased from SLC (Shizuoka, Japan). Mutant B6 mice rendered double-null for IL-1 $\alpha$ / $\beta$  were established previously (20), while Ig $\mu$ -null mutant B6 mice (21) and TNF $\alpha$ -null mutant mice (22) were kindly provided by Drs. Karasuyama (Tokyo Medical and Dental University) and Sekikawa (formerly at the National Institute of Agrobiological Science), respectively. All experiments were done under specific pathogen-free conditions in accordance with the ethics and safety guidelines for animal experiments of Tokyo Medical and Dental University and RIKEN.

**Recombinant human skeletal C protein.** Four complementary DNA (cDNA) fragments encoding overlapping cDNA fragments 1, 2, 3, and 4 of human fast-type skeletal muscle C protein were amplified from human skeletal muscle cDNA using polymerase chain reaction. Primers used were 5'-GAGAGGTACCATGCCTGAGGCAAAACCAGCG-3' and 5'-GAGAGTCGACTCAGAACCCTTGAGGGTCAGGTC-3' for fragment 1, 5'-GAGAGGATCCGACCTGACCTCAAGTGGTTC-3' and 5'-GAGAAAGCTTTCACAGC-CAGGTAGCGACGGGAGG-3' for fragment 2, 5'-AGAGGATCCCCTCCCGTCGCTACCTGGCTG-3' and 5'-GAGAAAGCTTTCACCCGGGGCTTTCCTGGAAGGG-3' for fragment 3, and 5'-AGAGGATCCCCTTCAGGGAAAGC-CCCGG-3' and 5'-GAGAAAGCTTTCACCTGCGGCACTC-GGACCTC-3' for fragment 4 (Qiagen, Hilden, Germany) (underlining indicates the restriction enzyme recognition sites for subcloning into the pQE30 expression vector). These primers were introduced into the TOP10F' bacterial host (Invitrogen, Carlsbad, CA) and were used to prepare recombinant C protein fragments according to the manufacturer's protocol. Soluble recombinant C proteins were dialyzed against 0.5M arginine, 2 mM reduced glutathione, 0.2 mM oxidized glutathione in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 (fragments 1 and 2) or 25 mM glycine HCl, pH 3.0

(fragments 3 and 4). Endotoxin was removed using Detoxi-Gel Endotoxin Removal Gel (Pierce, Rockford, IL).

**Induction of CIM.** Female mice, ages 8–10 weeks, were immunized intradermally with 200  $\mu$ g of the C protein fragments emulsified in Freund's complete adjuvant (CFA) containing 100  $\mu$ g of heat-killed *Mycobacterium butyricum* (Difco, Detroit, MI). The immunogens were injected at multiple sites of the back and foot pads, and 2  $\mu$ g of pertussis toxin (PT) (Seikagaku Kogyo, Tokyo, Japan) in PBS was injected intraperitoneally at the same time. Hematoxylin and eosin-stained 10- $\mu$ m sections of the proximal muscles (hamstrings and quadriceps) were examined histologically for the presence of mononuclear cell infiltration and necrosis of muscle fibers. The histologic severity of inflammation in each muscle block was graded as follows (18,19): grade 1 = involvement of a single muscle fiber or <5 muscle fibers; grade 2 = a lesion involving 5–30 muscle fibers; grade 3 = a lesion involving a muscle fasciculus; and grade 4 = diffuse, extensive lesions. When multiple lesions with the same grade were found in a single muscle block, 0.5 point was added to the grade.

**Immunohistochemical analysis.** Cryostat-frozen sections (6  $\mu$ m) fixed in cold acetone were stained with anti-CD8a (53-6.7; BD Biosciences PharMingen, San Diego, CA), anti-CD4 (H129.19; BD Biosciences PharMingen), anti-B220 (RA3-6B2; BD Biosciences PharMingen), anti-CD11b (M1/70; BD Biosciences PharMingen), anti-CD68 (FA-11; Serotec, Oxford, UK), anti-IL-1 $\alpha$  (40508; Genzyme/Techne, Minneapolis, MN), or anti-TNF $\alpha$  (MP6-XT22; BioLegend, San Diego, CA) monoclonal antibodies (mAb). To stain perforin molecules, air-dried sections were treated with 0.5% periodic acid solution and then stained with antiperforin mAb (CB5.4; Alexis Biochemicals, San Diego, CA). Nonspecific staining was blocked with 4% Blockace (Dainippon, Osaka, Japan).

Bound antibodies were visualized with peroxidase-labeled anti-rat IgG antibodies and associated substrates (Histofine Simple Stain Max PO; Nichirei, Tokyo, Japan). The sections were also stained with biotinylated mouse anti-mouse H-2K<sup>b</sup> mAb (AF6-88.5; BD Biosciences PharMingen) and with biotinylated mouse anti-mouse I-A<sup>b</sup> mAb (AF6-120.1; BD Biosciences PharMingen). They were then incubated with peroxidase-conjugated streptavidin and its substrates (Chemicon, Temecula, CA). For double immunofluorescence staining, the sections were preincubated with 5% heat-inactivated rat serum and 1% bovine serum albumin, and were stained with Alexa Fluor 647-conjugated anti-CD8a mAb (53-6.7; BD Biosciences PharMingen) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD4 mAb (RM4-5; BD Biosciences PharMingen).

The bound antibodies were visualized using SP2AObS confocal laser microscopy (Leica, Heidelberg, Germany). Spleens or popliteal lymph nodes were stained as positive controls. Isotype controls were used as negative control. The stained sections were evaluated by 2 independent observers, who reported results that were comparable.

**Quantification of mononuclear cell subsets.** The method used to quantify stained cells in the immunohistochemical analysis was based on a previously published method (2). Briefly, 5 inflammatory mononuclear cell foci in the serial sections from 4 mice with CIM were studied. At least 1 focus from each mouse was evaluated. Stained mononuclear cells infiltrating into the endomyrial, perimysial, and perivascular

sites of the foci were enumerated separately. The frequency of each subset was calculated in relation to the sum of all subsets. The CD4:CD8 ratios were calculated on the basis of these calculations. The CD4:CD8 ratios in double immunofluorescence staining were calculated in the same manner as in the immunohistochemical analyses. CD68-positive and CD11b-positive cells in the serial sections were also enumerated in the same manner, and the frequencies of CD68-positive cells were calculated in relation to the number of CD11b-positive cells.

**Rotarod test.** Muscle function was evaluated with a MK-630 rotarod device (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) as described previously (23). The rotarod test was performed on each mouse by measuring the running time until the mouse fell off the rod while the rod was turning at 20 revolutions per minute for 200 seconds. The running ability of each mouse was scored in 5 categories of running time: score 1 = 0–49 seconds, score 2 = 50–99 seconds, score 3 = 100–149 seconds, score 4 = 150–200 seconds, score 5 = >200 seconds. Mice were initially trained to accommodate them to the task, and then tested 2 days thereafter.

**In vivo depletion of CD8 or CD4 T cells.** For the depletion of CD8 or CD4 T cells in B6 mice, the mice were injected intraperitoneally with 1 mg of purified anti-CD8 (53.67.2) mAb (24), anti-CD4 (GK1.5) mAb (24), or purified rat IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as a control, for 3 consecutive days. This treatment started 10 days before the immunization. Injection of 500  $\mu$ g of the same mAb was repeated every other day for 14 days. Splenocytes and lymph node cells from the treated mice were stained with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD8 mAb (53.67; BD Biosciences PharMingen) or PE-conjugated anti-CD4 mAb (H129.19; BD Biosciences PharMingen), together with FITC-conjugated anti-CD3 mAb (145-2C11; BD Biosciences PharMingen). The cells were then analyzed with FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

**IVIG treatment.** A subgroup of the mice were treated with IVIG. Human gamma immunoglobulins (Venoglobulin-IH; Benesis, Osaka, Japan) (400 mg/kg/day) were injected intravenously into the tail vein for 5 consecutive days, beginning 3 days after immunization.

**Statistical analysis.** Histologic scores were compared with the Mann-Whitney U test. *P* values less than or equal to 0.05 were considered significant.

## RESULTS

**Histologic features of CIM in immunized mice.** Recombinant human fast-type skeletal C protein fragments were prepared using a prokaryotic expression system. Because of the size of the C protein, 4 overlapping protein fragments were generated: fragment 1 (amino acids 1–290), fragment 2 (amino acids 284–580), fragment 3 (amino acids 567–877), and fragment 4 (amino acids 864–1142). B6 mice were immunized at multiple sites of the back and foot pads with each fragment emulsified in CFA. PT was also injected intraperitoneally. To compare the immunogenicity of the 4 fragments, 5 mice per group were immunized with each