

ガンマ線照射線量の増加にともない、インサートの摩耗が抑制されることが示された。また、いずれのCLPEにおいても、層状剥層やひび割れなどの破損は認められなかった。50 kGy以上のガンマ線を照射したCLPEは、PMPC処理人工膝関節インサートの基材に適した材料であることが示された。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Hashimoto M, Ito H, Kawaguchi H, Takatori Y, Ishihara K: Biomimetic hydration lubrication with various polyelectrolyte layers on cross-linked polyethylene orthopedic bearing materials. *Biomaterials* 33: 4451-4459, 2012.

2.学会発表

① 国内学会

- 1) 茂呂徹, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦, 京本政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 雑賀健一, 川口浩: MPCポリマーの表面処理による人工関節金属表面の細菌付着抑制効果. 第34回日本骨・感染症学会. 淡路島, 7.8-9, 2011.
- 2) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤

英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 中村耕三, 川口浩: 人工関節金属インプラント表面のMPC処理による細菌付着抑制効果の検討. 第36回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.

3) 雑賀健一, 茂呂徹, 京本政之, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 中村耕三, 石原一彦, 高取吉雄: MPC処理による摩耗低減効果に対するポリエチレン厚さの影響 —繰返し衝撃—摺動試験での検討—. 第36回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.

4) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 雑賀健一, 川口浩: MPCポリマーナノグラフトを基盤にした新しい人工関節の開発. 第33回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.

5) 雑賀健一, 京本政之, 茂呂徹, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 石原一彦, 高取吉雄: ポリエチレン厚さがMPC処理ポリエチレンの耐久性に及ぼす影響 —多方向摺動試験による検討—. 第42回人工関節学会. 沖縄, 2.24-25, 2012.

② 国際学会

- 1) Saiga KI, Moro T, Kyomoto M, Ito H, Kadota T, Tanaka T, Oshima H, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K, Takatori Y: Effect of MPC-grafting and PE thickness on

wear and fracture in multi-mode
pin-on-disk wear test. 6th
International Biotribology Forum
Biotribology Fukuoka 2001. Fukuoka,
Japan, 11.5, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。G. 研究発表

分担研究報告書

抗感染性の検討

分担研究者 茂呂 徹 (東京大学大学院工学系研究科 教授)

宮本比呂志 (佐賀大学医学部 教授)

研究要旨：抗感染性の検討の前提として、金属表面のポリ MPC (PMPC)処理について、ディップコーティング法およびグラフトコーティング法を用いて検討した。また、グラフトコーティング法では、MPC 水溶液濃度・紫外線照射時間(重合時間)の至適条件 (0.5 mol/L、90 分)を確立した。また、次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着を評価する実験系として、低濃度のタンパク質濃度測定に適したビシンコニン酸 Protein Assay 試薬について検討し、その手法を確立した。

A. 研究目的

疾患や外傷による膝関節の機能障害は、中高年者の健康寿命を短縮し、生活の質 (QOL)を低下させる重大な病態である。高齢化が急速に進むわが国において膝関節障害の患者数は今後も増え続けることは確実であり、その治療法を確立することは、重要な課題といえる。

人工膝関節手術は、高度の膝関節障害に対する治療法である。実用化から約半世紀が経過し、優れた治療法として健康寿命の延伸と QOL の獲得に貢献をしている。一方、人工関節表面へのバイオフィーム形成に続発する感染、は一度生じると入れ換えを余儀なくされる深刻な合

併症である。手術成績の向上のため、これらの合併症を克服する画期的な人工膝関節のニーズは高い。

申請者らは平成 15 年度長寿科学総合研究事業を通じて、親水性と生体親和性に優れた合成リン脂質、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)を用いて、ポリエチレン表面を修飾する技術を開発した。MPC ポリマーは、細胞やタンパク質の吸着を抑制することから、感染の誘因となるバイオフィームの形成を抑制する効果も期待できる。

本研究の目的は、金属コンポーネント表面に MPC ポリマーのナノ表面処理技術を応用し、タンパク質吸着抑制作用による、細菌接着・バイ

オフيلم形成の抑制効果について検討することである。本年度は、金属表面における至適な MPC ポリマー処理方法の確立を試みた。また、次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着を評価する実験系の検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料

本研究では、人工関節に用いられているコバルトクロムモリブデン (Co-Cr-Mo)合金および純チタン (以下純 Ti)を用いた。

Co-Cr-Mo 合金および純 Ti の表面を、表面粗さ 0.01~0.02 μm になるよう研磨した後、米国材料試験協会 (ASTM)の基準に従って、不純物の除去と酸化被膜の形成のために 35 vol%の硝酸に 35 分浸漬した。硝酸処理した金属片を洗浄した後、速や

かに 500 W の酸素プラズマ処理を 5 分間行った。

2. MPC 処理方法の検討

得られた Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 試験体表面を、MPC ポリマーを用いたディップコーティング法、ポリ(MPC) (PMPC)を用いたグラフトコーティング法により処理した (図 1)。

① PMB30 ポリマーを用いたディップコーティング法 (PMB30 処理)

MPC と *n*-ブチルメタクリレート (以下、BMA)を予め共重合した PMB30 ポリマー (30 mol%の MPC を含有)を用いて、0.5 mass%となるように調整した PMB30 エタノール溶液を準備した。B-1 項において、洗浄した Co-Cr-Mo 金属試料を、PMB30 エタノール溶液に浸漬する

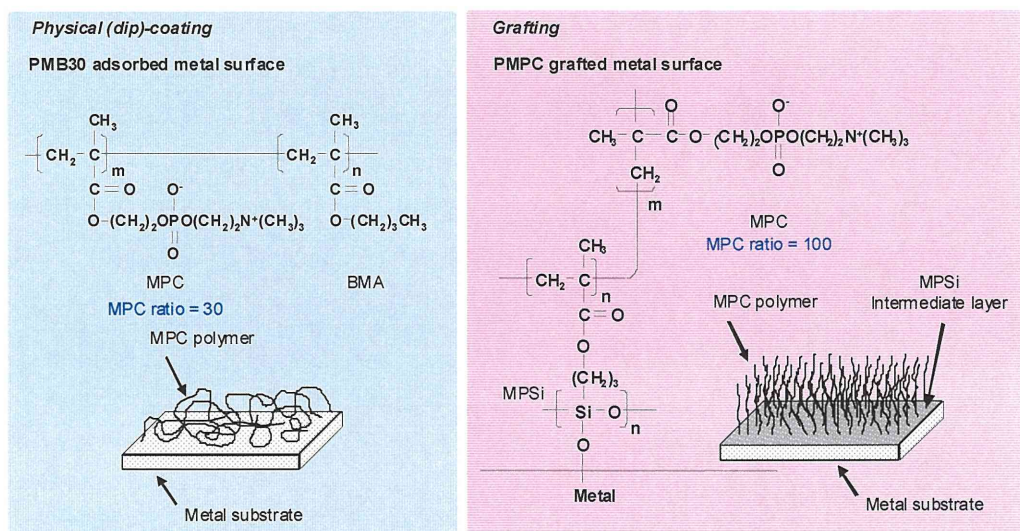


図 1. PMB30 を用いたディップコーティング、PMPC を用いたグラフトコーティングによる金属表面処理

ことで、ディップコーティングを行った (PMB30 処理)。

② PMPC グラフトコーティング法

B-1 項において、洗浄した Co-Cr-Mo 金属試料を、5 mass% トリメタクリロイルオキシプロピルトリメトキシシラン (MPSi)、1 mass% コハク酸、0.1 mass% イルガキュア (D2959) を含むエタノール溶液に 12 時間浸漬した。Co-Cr-Mo 試験体を取り出し、エタノールで洗浄した後、70°C で 3 時間アニール処理した。

続いて 0.5 mol/L に調製した MPC の水溶液にシラン処理した Co-Cr-Mo 試験体を浸し、5 mW/cm² の強度をもつ紫外線を 90 分間照射して、光開始グラフト重合を行った。照射後、試験体を水およびエタノールで洗浄し、未重合の MPC および遊離のポリマーを除去した。

3. PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の解析

得られた PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 試験体について、X 線光電子分光 (XPS) 分析、フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 分析、水による静的接触角の測定、蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察および透過電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着試験を行った。

① XPS 分析

PMB30 処理および PMPC 処理前後の Co-Cr-Mo 試験体の表面元素状態について、XPS 分析を行った。XPS 分析には、KRATOS ANALYTICAL 社製 XPS 分析装置 AXIS-HSi165 型を用い、X 線源は Mg-K α 線、印加電圧を 15kV、光電子の放出角度を 90° とした。

② FT-IR 分析

PMB30 処理および PMPC 処理前後の Co-Cr-Mo 試験体の官能基振動について、FT-IR 分析を行った。FT-IR 分析には、日本分光製 FT-IR 分析装置 FT/IR615 型を用い、全反射 (ATR) 法により行った。波数 800~2000 cm⁻¹、分解能 4 cm⁻¹、積算回数 100 回とした。

③ 水の静的接触角測定

試験体表面の静的なぬれ性 (静的表面接触角) について、協和界面科学社製表面接触角測定装置 DM300 を用い、液滴法により評価した。静的表面接触角は ISO 15989 規格に準拠し、液滴量 1 μ L の純水を液滴後、60 秒間経過時点において測定した。

④ 蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察

200 ppm に調製したローダミン 6G 水溶液を染色に用いた。蛍光発光イメージングには、カールツァイス社製蛍光顕微鏡モデル Axioskop 2 plus が使用された。レンズ倍率は、5 倍

で、サンプルによって、適切な感光時間にて撮影した。

⑤ TEM 観察

PMB30 処理および PMPC 処理前後の Co-Cr-Mo 試験体を所定の大きさに切削し、表面を Al 保護した後、Ga イオンビームを照射して断面を薄膜化 (FIB 加工) した。透過型電子顕微鏡 (TEM、FB-2000A: 日立ハイテクノロジーズ) を用い、試料縦断面を観察した。

4. PMPC 処理の至適条件の検討

一般に浸漬する溶液の濃度を変化させるだけのディップコーティングの制御に比べ、グラフトコーティングの制御は複雑である。したがって、ここでは、溶液濃度・処理時間を変化させて、その至適条件を検討した。

2-②に記載の方法のうち、MPC 水溶液の濃度を 0.25~1.00 mol/L の範囲で、紫外線照射時間 (重合時間) を 23~180 分の範囲で変化させて、グ

ラフト重合を行った。種々の条件で作製された PMPC 処理 Co-Cr-Mo の表面について、3 項で示される方法にて解析した。

5. タンパク質吸着試験

次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着を評価する実験系を確立するため、低濃度のタンパク質濃度測定に適したビスニコニン酸 (BCA) Protein Assay 試薬について、検討した。PMB30 処理および PMPC 処理前後の Co-Cr-Mo 試験体を、アルブミン溶液に浸漬させた後、BCA Protein Assay 試薬を用いて評価した。

C. 研究結果

1. PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の解析

① XPS 分析

表 1 に、XPS スペクトルより求めた PMB30 処理および PMPC 処理

表 1. PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度と水による静的接触角

Sample	Surface elemental composition (atom%)								Contact angle (deg)
	C _{1s}	O _{1s}	N _{1s}	P _{2p}	Si _{2p}	Co _{2p}	Cr _{2p}	Mo _{3d}	
Co-Cr-Mo (untreated)	14.6 (1.3)*	52.9 (2.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	26.7 (1.5)	5.4 (0.4)	0.4 (0.0)	81.6 (4.8)
PMB30-adsorbtd Co-Cr-Mo	70.6 (1.4)	24.1 (1.3)	2.3 (0.4)	3.0 (0.3)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	95.8** (3.5)
PMPC-grafted Co-Cr-Mo	61.7 (0.7)	28.0 (0.6)	5.0 (0.3)	5.3 (0.1)	0.1 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	23.5** (8.4)

* The standard deviations are shown in parentheses.

** Significant difference ($p < 0.001$) as compared to the untreated Co-Cr-Mo.

Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度を示す。PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面には、MPC 由来の窒素、リンが検出された。また、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の窒素、リンの原子濃度は、PMPC の理論値 (各々、5.3 atom%) に近い値にまで達していた。これに対し、MPC 含有量が 30 mol% である PMB30 を用いて処理した表面でのそれらは、2.3 ~ 3.0 atom% に留まった。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の結果であった (表省略)。

② FT-IR 分析

図 2 に、PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の FT-IR/ATR スペクトルを示す。

未処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、赤外吸収ピークの存在が認められなかったのに対し、PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、 1460cm^{-1} 付近にメチレンに帰属されるピーク、 1240 、 1080 および 970cm^{-1} にリン酸基に帰属されるピークが、 1720cm^{-1} にケトン基に帰属されるピークが観察された。また、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面では、Si-O 基に帰属されるピークが観察された。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様のピークが認められた (図省略)。

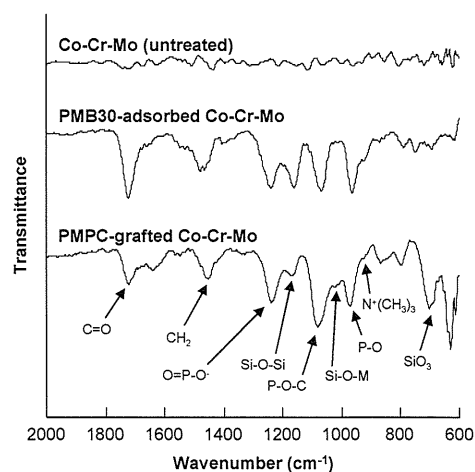


図 2. PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の FT-IR/ATR スペクトル

③ 水による静的接触角の測定

表 1 に、PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の水による静的接触角を示す。

未処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の静的接触角は、それぞれ 81.6° 、 77.2° だった。PMB30 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面の静的接触角は 95.8° 、 95.6° であった。これに対し、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金および純 Ti 表面のそれらは、それぞれ 23.5° 、 20.1° と高い親水性を示した (PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti の表省略)。

④ 蛍光物質ローダミン 6G を用いた染色による顕微鏡観察

図 3 に、PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の蛍光顕微鏡写真を示す。

未処理 Co-Cr-Mo 合金では、ほと

んど蛍光発光が見られないのに対し、PMB30 処理および PMPC 処理した Co-Cr-Mo 合金はいずれも、表面全域において発光が認められ、その状態は均一であった。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の蛍光発光状態が認められた (図省略)。

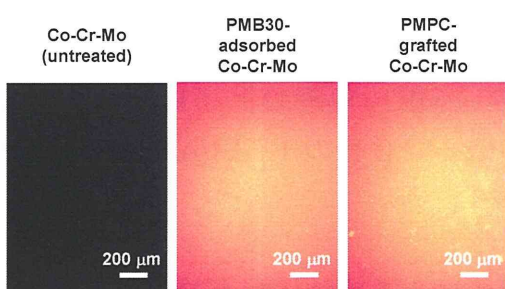


図 3. PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の蛍光顕微鏡写真

⑤ TEM 観察

図 4 に、PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の断面 TEM 写真を示す。PMB30 処理 Co-Cr-Mo 表面には、約 50 nm の PMB30 処理層の形成が認められた。また、その層中には幾らかの気孔の形成も認められ

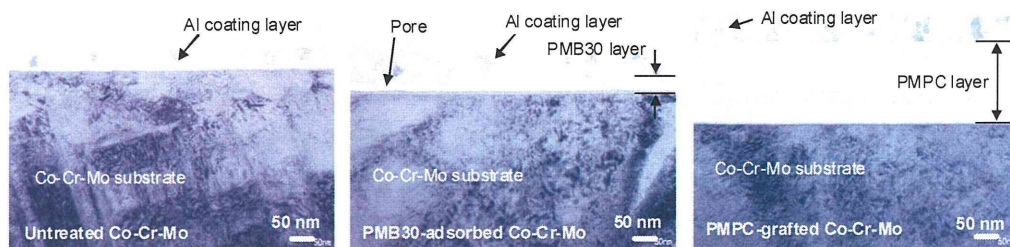


図 4. PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の断面 TEM 写真

た。これに対し、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 表面には、約 200 nm の均一な処理層の形成が認められた。また、PMB30 処理および PMPC 処理純 Ti 表面においても、同様の処理層形成が認められた (図省略)。

2. PMPC 処理の至適条件の検討

① XPS 分析

図 5 に、XPS スペクトルより求めた種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度を示す。いずれの MPC 水溶液濃度においても、重合時間が延長するに伴って、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面のケイ素濃度は減少する一方で、窒素、リンの濃度は増加した。0.50 mol/L の MPC 水溶液濃度のとき、90 分以上の紫外線照射時間にて、窒素、リンの濃度が、MPC 原子濃度の理論値に到達した。1.00 mol/L の MPC 水溶液濃度のとき、45 分以上の紫外線照射時間にて、窒素、リンの濃度が、理論値に到達した。

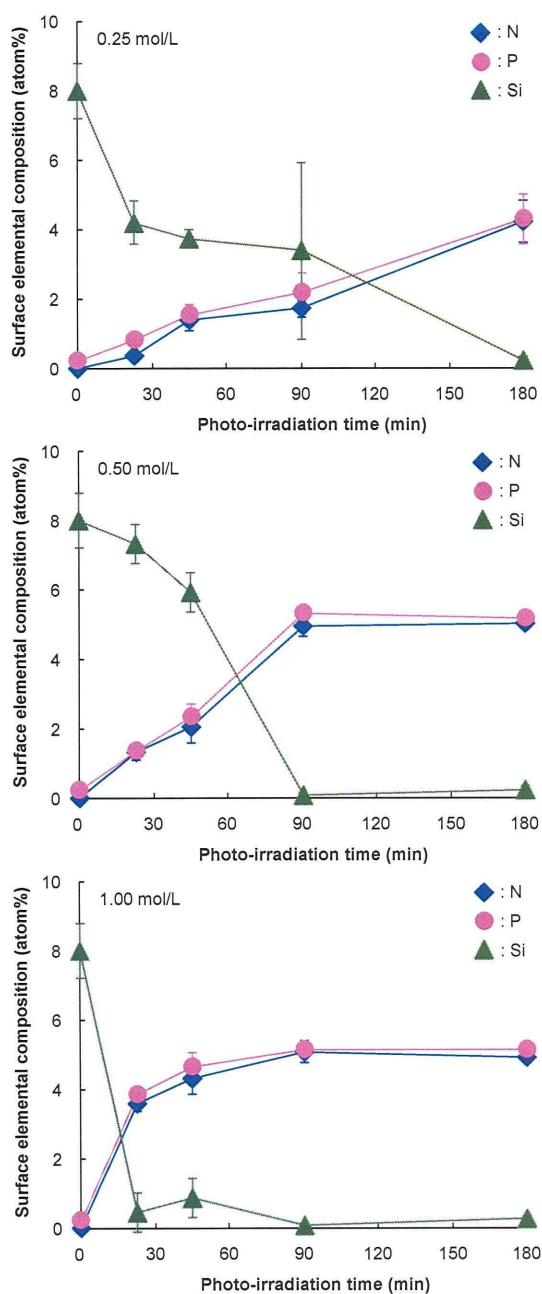


図 5. 種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の表面原子濃度

② 水による静的接触角の測定

図 6 に、種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の水による静的接触角を示す。いずれの MPC 水溶液濃度においても、重合時間が

延長するに伴って、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の接触角は低下した。0.50 mol/L 以上の MPC 水溶液濃度の場合、90 分以上の紫外線照射時間にて、PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の接触角は約 20° で安定した。

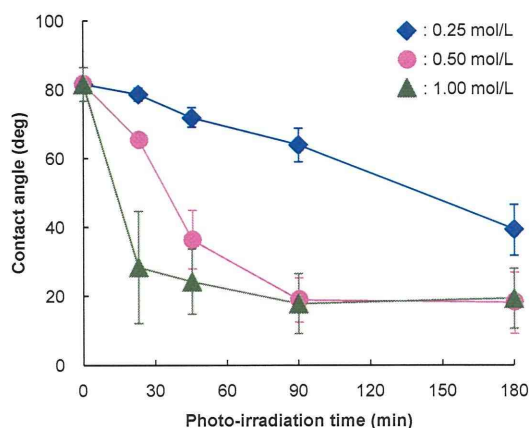


図 6. 種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の水による静的接触角

③ TEM 観察

図 7 に、種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金 (90 分の紫外線照射時間)の断面 TEM 写真を示す。

MPC 水溶液濃度を増やすことにより、Co-Cr-Mo 合金表面に形成する PMPC 層の厚さは増加した。1.00 mol/L の MPC 水溶液濃度の場合、その層厚は約 360 nm に達した。

3. タンパク質吸着試験

図 8 に、BCA 法により評価した PMB30 処理および PMPC 処理

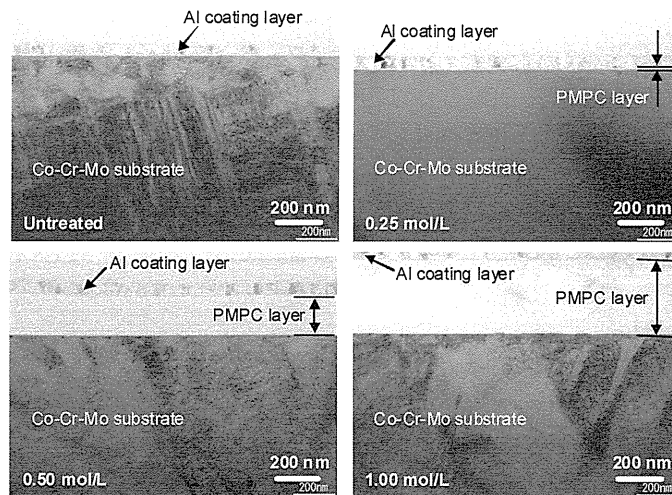


図 7. 種々の条件で作製した PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金の断面 TEM 写真

Co-Cr-Mo 合金のアルブミン吸着量を示す。

PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着したアルブミン量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のその 1/5~2/5 程度であった。また、これらの群間における差は、統計学的に有意であった。

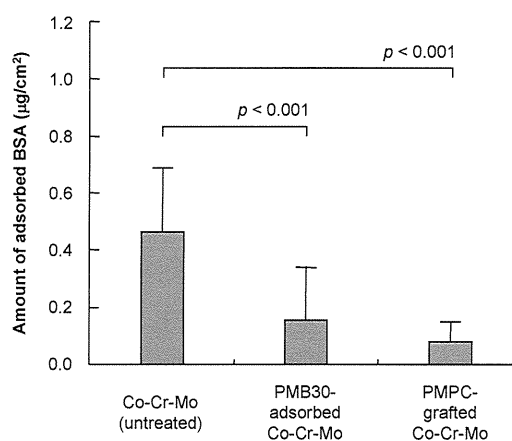


図 8. BCA 法により評価した PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金のアルブミン吸着量

D. 考察

本研究の目的は、金属コンポーネント表面に MPC ポリマーのナノ表面処理技術を応用し、タンパク質吸着抑制作用による、細菌接着・バイオフィーム形成の抑制効果について検討することである。本年度は、金属表面の MPC ポリマー処理について、ディップコーティング法およびグラフトコーティング法を用いて検討した。いずれの方法においても、Co-Cr-Mo 合金表面に均一な MPC ポリマー層が形成することが確認された。

ディップコーティング法に用いた PMB30 は、30 mol% の MPC しか含まれておらず、水に不溶性のポリマーである。従って、PMB30 処理 Co-Cr-Mo 合金表面の静的接触角は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のそれよりも高い値を示した。しかしながら、既報において、動的な接触角は低い

値を示しており、十分な湿潤環境にある生体内においては、親水性表面を形成すると考えられた。

グラフトコーティング法では、シラン処理と MPC の表面グラフト重合の二段階処理を行った。シラン処理により、重合性基を Co-Cr-Mo 合金表面に導入した表面では、その表面接触角が約 80°と比較的高い値を示したが、PMPC 処理することにより、その接触角は顕著に低下した。

MPC 水溶液濃度や紫外線照射時間 (重合時間)が増すにつれ接触角の低下は早まり、また、水溶液濃度によって Co-Cr-Mo 合金表面の PMPC 層の厚みも制御できた。MPSi 中間層には、光重合開始剤 (D2959) が含有されているため、ラジカル重合は Co-Cr-Mo 合金表面から開始されると考えられた。その結果、比較的高密度の PMPC 層が形成されていると思われた。XPS 分析および TEM 観察の結果からも、比較的厚い PMPC 層で、Co-Cr-Mo 合金表面が完全に覆われていることも確認できた。これらの結果により、PMPC 処理における MPC 水溶液濃度と紫外線照射時間 (重合時間)の至適条件は、0.5 mol/L、90 分であると判断した。

次年度以降の検討に備え、低濃度のタンパク質濃度測定に適した BCA 法により、Co-Cr-Mo 合金のアルブミン吸着量を評価したところ、PMB30 処理および PMPC 処理 Co-Cr-Mo 合金表面に吸着したアル

ブミン量は、未処理 Co-Cr-Mo 合金表面のその 1/5~2/5 程度であり、MPC ポリマー処理のタンパク質吸着抑制作用による、細菌接着・バイオフィーム形成の抑制を期待させた。また、これらの群間における差は、統計学的に有意であり、金属表面へのタンパク質吸着を評価する実験系として適していると考えられた。

E. 結論

抗感染性の検討の前提として、金属表面の MPC ポリマー処理について、ディップコーティング法およびグラフトコーティング法を用いて検討した。また、PMPC 処理では、溶液濃度・処理時間の至適条件 (0.5 mol/L、90 分)を確立した。また、次年度以降の検討に備え、金属表面へのタンパク質吸着を評価する実験系として、低濃度のタンパク質濃度測定に適した BCA 法について検討し、その手法を確立した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Hashimoto M, Ito H, Kawaguchi H, Takatori Y, Ishihara K: Biomimetic hydration lubrication with various polyelectrolyte layers on cross-linked polyethylene orthopedic bearing materials. *Biomaterials* 33:

4451-4459, 2012.

2.学会発表

① 国内学会

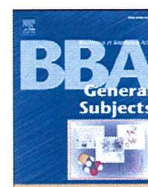
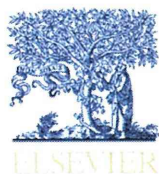
- 1) 茂呂徹: MPC ポリマーによるナノ表面処理を応用した新しい人工関節摺動面の開発. 第31回バイオトライボロジシンポジウム. 東京, 5.14, 2011.
- 2) 茂呂徹: ナノテクノロジーを応用した新しい人工関節摺動面の開発. 第16回ひむか運動器セミナー. 宮崎, 7.4, 2011.
- 3) 茂呂徹: MPC ポリマーによるナノ表面処理の基礎. 宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科先端的医学獣医学特論(大学院特別セミナー). 宮崎, 7.4, 2011.
- 4) 茂呂徹, 高取吉雄, 中村耕三, 石原一彦, 京本政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 雑賀健一, 川口浩: MPC ポリマーの表面処理による人工関節金属表面の細菌付着抑制効果. 第34回日本骨・感染症学会. 淡路島, 7.8-9, 2011.
- 5) 茂呂徹, 高取吉雄, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 伊藤英也: シンポジウム「人工股関節摺動面の特性と問題点」 MPC ポリマーをグラフトした人工股関節摺動面の特性. 第38回日本股関節学会学術集会. 鹿児島, 10.7-8, 2011.
- 6) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 安藤嘉基, 宮本比呂志, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 中村耕三, 川口浩: 人工関節金属インプラント表面の MPC 処理による細菌付着抑制効果の検討. 第36回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.
- 7) 雑賀健一, 茂呂徹, 京本政之, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 中村耕三, 石原一彦, 高取吉雄: MPC 処理による摩耗低減効果に対するポリエチレン厚さの影響 —繰り返し衝撃—摺動試験での検討—. 第36回日本整形外科学会基礎学術集会. 前橋, 10.20-21, 2011.
- 8) 雑賀健一, 京本政之, 茂呂徹, 石原一彦: 繰り返し衝撃-摩耗環境におけるポリエチレン厚さが背面摩耗に及ぼす影響. 第38回日本臨床バイオメカニクス学会. 神戸, 11.18-19, 2011.
- 9) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 京本政之, 雑賀健一, 川口浩: MPC ポリマーナノグラフトを基盤にした新しい人工膝関節の開発. 第33回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.
- 10) 京本政之, 茂呂徹, 雑賀健一, 立石崇晴, 高取吉雄, 石原一彦: 対向する摺動面を保護する生体軟骨模倣 CFR-PEEK 表面の創製. 第33回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 11.21-22, 2011.
- 11) 雑賀健一, 京本政之, 茂呂徹, 伊藤英也, 角田俊治, 田中健之, 大嶋浩文, 川口浩, 石原一彦, 高取吉雄: ポリエチレン厚さが MPC 処理ポ

- リエチレンの耐久性に及ぼす影響—多方向摺動試験による検討. 第42回人工関節学会. 沖縄, 2.24-25, 2012.
- 12) 茂呂徹: 生体親和性材料 MPC ポリマーの表面処理による新しい人工股関節 —長寿命化を目指して. 第42回人工関節学会. 沖縄, 2.24-25, 2012.
- ② 国際学会
- 1) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Takatori Y, Ishihara K: High oxidation- and wear-resistance of PMPC-grafted polyethylene arisen by extra plasma irradiation. 2011 Annual Meeting & Exposition of the Society for Biomaterials (SFB). Orlando, USA, 4.13-16, 2011.
- 2) Ishihara K, Kyomoto M, Moro T, Inoue Y: Surface modification with phospholipid polymers for long-term implantable medical devices. THERMEC'2011. Quebec, Canada, 8.1-5, 2011.
- 3) Inoue K, Inoue Y, Ishihara K: Importance of dynamics of water molecules on protein adsorption at polymer brush surfaces. The 3rd Asian Biomaterials Congress. Busan, Korea, 9.15-17, 2011.
- 4) Ishihara K: Highly biocompatible surface for implantable artificial organ. The 3rd Asian Biomaterials Congress. Busan, Korea, 9.15-17, 2011.
- 5) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Takatori Y, Ishihara K: High Oxidation- and Wear-resistances of Polyethylene Arisen by Vitamin E-blending and Poly(MPC) Grafting. 5th UHMWPE meeting. Philadelphia, USA, 9.22-23, 2011.
- 6) Ishihara K, Kyomoto M, Moro T, Takatori Y: Biomimetic surface modification on artificial hip joint for elongation of implantation life. European Society for Artificial Organs (ESAO). Porto, Portugal, 10.9-12, 2011.
- 7) Saiga KI, Moro T, Kyomoto M, Ito H, Kadota T, Tanaka T, Oshima H, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K, Takatori Y: Effect of MPC-grafting and PE thickness on wear and fracture in multi-mode pin-on-disk wear test. 6th International Biotribology Forum Biotribology Fukuoka 2011. Fukuoka, Japan, 11.5, 2011.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishihara K, Goto Y, Matsuno R, Inoue Y, Konno T	Novel polymer biomaterials and interfaces inspired from cell membrane functions.	<i>Biochim Biophys Acta-General</i>	1810(3)	268-75	2011
Inoue Y, Nakanishi T, Ishihara K	Adsorption force of proteins against hydrophilic polymer brush surfaces.	<i>React Funct Polym</i>	71(3)	350-5	2011
Matsuno R, Ishihara K	Integrated functional nanocolloids covered with artificial cell membranes for biomedical applications.	<i>Nano Today</i>	6(1)	61-74	2011
Ye Y, Fukazawa K, Huang N, Ishihara K	Effects of 3,4-dihydrophenyl groups in water-soluble phospholipid polymer on stable surface modification of titanium alloy.	<i>Colloid and Surfaces B: Biointerface</i>	88(1)	215-20	2011
Sakai N, Hagihara Y, Furusawa T, Hosoda N, Sawae Y, Murakami T	Analysis of biphasic lubrication of articular cartilage loaded by cylindrical indenter.	<i>Tribology International</i>	46	225-36	2012
Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Hashimoto M, Ito H, Kawaguchi H, Takatori Y, Ishihara K	Biomimetic hydration lubrication with various polyelectrolyte layers on cross-linked polyethylene orthopedic bearing materials.	<i>Biomaterials</i>	33	4451-9	2012
Byambaa B, Konno T, Ishihara K	Cell adhesion control on photoreactive phospholipid polymer surfaces.	<i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i>			in press



Review

Novel polymer biomaterials and interfaces inspired from cell membrane functions[☆]

Kazuhiko Ishihara^{a,b,c,d,*}, Yusuke Goto^{a,c}, Madoka Takai^{a,c}, Ryosuke Matsuno^{a,c},
Yuuki Inoue^{a,d}, Tomohiro Konno^{b,c,d}

^a Department of Materials Engineering, School of Engineering, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

^b Department of Bioengineering, School of Engineering, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

^c Center for NanoBio Integration (CNBI), The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

^d Core Research Evolution of Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency, Sanban-cho 5, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2009

Received in revised form 6 April 2010

Accepted 16 April 2010

Available online 8 May 2010

Keywords:

Cell membrane

Phospholipid polymer

Biomaterial

Biointerface

Biocompatibility

ABSTRACT

Background: Materials with excellent biocompatibility on interfaces between artificial system and biological system are needed to develop any equipments and devices in bioscience, bioengineering and medicinal science. Suppression of unfavorable biological response on the interface is most important for understanding real functions of biomolecules on the surface. So, we should design and prepare such biomaterials.

Scoop of review: One of the best ways to design the biomaterials is generated from mimicking a cell membrane structure. It is composed of a phospholipid bilayered membrane and embedded proteins and polysaccharides. The surface of the cell membrane-like structure is constructed artificially by molecular integration of phospholipid polymer as platform and conjugated biomolecules. Here, it is introduced as the effectiveness of biointerface with highly biological functions observed on artificial cell membrane structure.

Major conclusions: Reduction of nonspecific protein adsorption is essential for suppression of unfavorable bioresponse and achievement of versatile biomedical applications. Simultaneously, bioconjugation of biomolecules on the phospholipid polymer platform is crucial for a high-performance interface.

General significance: The biointerfaces with both biocompatibility and biofunctionality based on biomolecules must be installed on advanced devices, which are applied in the fields of nanobioscience and nanomedicine. This article is part of a Special Issue entitled Nanotechnologies - Emerging Applications in Biomedicine.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The cells are surrounded by a cell membrane that helps them adapt to the versatile physiological environment [1,2]. Therefore, the cell membrane is a good candidate for constructing a biointerface platform [3]. Understanding the cell membrane facilitates the engineering of an advanced biointerface with highly controlled properties and functions. Cell membrane formation in nature is highly regulated and finely tuned at the molecular level. Many researches have been reported to construct artificial cells and cell membranes by molecular assembly method. Phospholipid bilayered membrane is used as a platform and some proteins and other biomolecules are embedded in the membrane. Also, the structure has been constructed by Langmuir–Blodgett method with various phospholipid molecules. These researches provide suitable model to understand cell membrane functions [4–7].

Preparation of artificial cell membrane structure composed of phospholipid polymer and biomolecules has been paid much attention to obtain excellent biofunctions [8–12]. Basically, the polymers having phospholipid polar group and phosphorylcholine group, were synthesized and functionalized by changing the molecular structure of the polymer [13,14]. Fundamental researches have been carried out to clarify the potential of biocompatibility of the phospholipid polymers [15–17]. For example, many implantable medical devices coated with phospholipid polymer are applied clinically and in the stage of clinical trials [18–21]. We also prepared nanobiodevices covered with the artificial cell membrane composed of phospholipid polymer platform and immobilized biomolecules on it [22,23]. In this review, design of biomaterials with artificial cell membrane structure and the importance of interface between materials and biological system will be represented.

2. Polymers bearing phospholipid polar group as biomaterials

2.1. Molecular design of phospholipid polymers

The fundamental strategy of a bioinspired approach is to clearly understand the principles of the cell membrane functions. Fig. 1 shows the typical illustration of a cell membrane along with some

[☆] This article is part of a Special Issue entitled Nanotechnologies - Emerging Applications in Biomedicine.

* Corresponding author. Department of Materials Engineering, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan. Tel.: +81 3 5841 7124; fax: +81 3 5841 8647.

E-mail address: ishihara@mpe.t.u-tokyo.ac.jp (K. Ishihara).

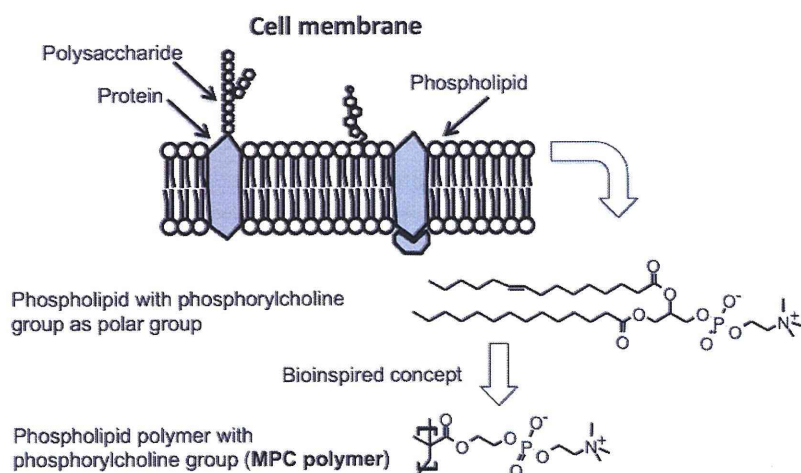


Fig. 1. Schematic representation of cell membrane.

functions. Numerous biomolecules are embedded in the phospholipid bilayer, e.g., antibodies, glycoproteins, enzymes, and receptors. The favorable biofunctions are inertness of the capsule, biological affinity, enzymatic reaction, etc. These are fundamental biomolecules that play important roles. In the bioinspired approach, molecular components were assembled to perform these selected biofunctions. For example, phospholipids comprise a polar head group and alkyl tail groups. However, surface enrichment of phospholipid polar groups is essential for preparing the biointerface. In other words, the entire phospholipid molecules are not necessary for formation of the biointerface. This is the concept of a fundamental bioinspired approach; we introduce polymer materials to prepare the stable biointerface.

The requirements of establishing ultimate biointerfaces are (i) bioinertness, (ii) easy fabrication, (iii) immobilization of biomolecules under mild condition, (iv) retention of higher biofunctions, and (v) easy accessibility of target molecules without any barrier. We have been utilizing polymers composed of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), which has phosphorylcholine group in the side chain, as a key material for constructing a biointerface platform. Very recently, some researchers utilized other methacrylates with zwitter ionic polar groups or oligo(ethylene glycol) monomethacrylate for preparing biointerfaces to obtain low fouling surfaces [24–29].

2.2. Biointerfaces composed of the MPC polymers

The biointerface researches with MPC polymers have been conducted worldwide [30–33]. It has opened up new avenues for investigation, particularly in the field of life science research. The MPC allows versatile polymerization techniques with appropriate comonomers: conventional radical, living radical and atom transfer radical polymerizations. Therefore, precisely designed MPC polymers have been easily synthesized; herein, the ultimate biointerfaces by the MPC polymer is introduced along with recent excellent results. The synthesized MPC polymers are used in various forms such as polymer solution, hydrogel, polymer-coated surface, polymer-grafted surface, and nanoparticles. In particular, hydrophilic MPC unit and hydrophobic *n*-butyl methacrylate (BMA) unit are of great importance for the fabrication of high-performance biointerfaces. The best monomer unit fraction in the copolymer for coating on the medical devices was reported to be 0.3 of the MPC unit and 0.7 of the BMA unit; moreover, the molecular weight of the copolymer should be controlled to above 5×10^5 [9,11]. The MPC polymer-coated surface serves double functions—suppression of nonspecific protein adsorption from the living organism and processing of robust polymer coating. On the

surface treated with the MPC polymer, the phosphorylcholine groups in the MPC unit were enriched in the outermost surface of the substrate relative to the inner side of the substrate [34,35]. The plausible mechanism for the suppression of nonspecific protein adsorption was discussed in terms of water structure on the surface. Enrichment of the phosphorylcholine groups provided a higher free water fraction on the polymer-coated surface, and it strongly suppressed protein adsorption by release of bound water molecules on the protein surface. [36–39].

Based on the chemical structure of the poly(MPC-co-BMA), which provides excellent anti-biofouling surface, the new polymers are designed to conjugate biomolecules on the surface under mild conditions. The reaction for conjugation of biomolecules must be carried out in an aqueous medium with physiological pH range and temperature due to low stability of biomolecules. So, active ester groups and phenylboronic acid group are useful for reacting with amino group and sugar units in the biomolecules, respectively.

As shown in Fig. 2, a polymer composed of MPC, BMA, and *p*-nitrophenyloxycarbonyl poly(oxyethylene)methacrylate (MEONP) units (the polymer is named as PMBN) was designed and prepared for obtaining excellent biointerfaces [40,41]. These three monomer units show unique chemical and biological functions. One of the bioconjugate functions was the incorporation of an active ester group on MEONP. The active ester group was connected to the methacrylate via the oxyethylene spacer [42]. The length of the oxyethylene spacer can be changed with the use of appropriate precursors. The spacer length was changed from 0.5 to 2 nm, and the location of the immobilized biomolecules was also changed. The phosphorylcholine groups were at the position of 0.4 nm from the substrate, which was calculated by the molecular structure of the MPC unit. We found that the durability of the immobilized biomolecules depended on the spacer length, by changing the number of repeating units of the oxyethylene group in MEONP. The spacer length played a key role in reducing background signals in γ -globulin (IgG)-immobilized biosensing. Biomolecules containing amino groups could couple to the ester groups on the polymer backbone under physiological conditions, producing *p*-nitrophenol as a leaving group. The bioconjugate reaction is accelerated under neutral or weak alkaline conditions (pH 7.4–8.0). By this polymer, PMBN, the biomolecules could immobilize in the platform of phosphorylcholine group-enriched surface the same as cell membrane surfaces. Also, it could be prepared from nano-scaled structure using PMBN on the surface of electrode by electrospray deposition (ESD) method to enlarge surface area for conjugation of biomolecules. Much amount of biomolecules could be immobilized on the ESD-surface compared with that on plane spin-coated surface [43].

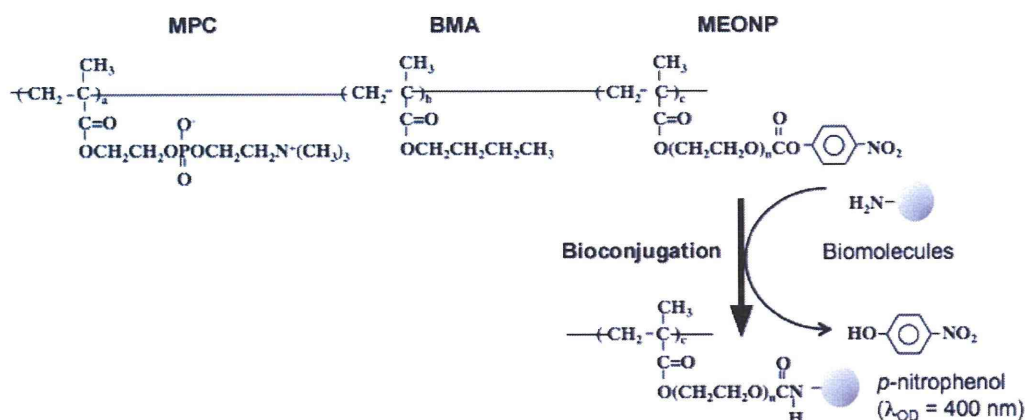


Fig. 2. Chemical structure of phospholipid polymer, poly(MPC-co-BMA-co-MEONP) (PMBN) for bioconjugation based on artificial membrane structure.

3. Polymer nanoparticles with artificial cell membrane surface

3.1. Preparation of polymer nanoparticles

We focus on monodispersed nanoparticles as one of the biointerfaces, and introduce affinity separation, sensing, and diagnosis. The PMBN was easily enriched onto the nanoparticle surface by the solvent evaporation method. We first succeeded in preparing monodispersed nanoparticles covered with water-soluble and amphiphilic poly(MPC-co-BMA) (PMB30W: mole fraction of MPC unit in the polymer is 0.30). The PMB30W aqueous solution provided hydrophobic domains by aggregation of the polymer chain [44]. This is the fundamental driving force for the reduction of surface free energy (water–methylene chloride interface) to stabilize methylene chloride droplets involved in the formation of other polymers such as poly(lactic acid) (PLA) and polystyrene. Moreover, Konno et al. first developed monodispersed PLA nanoparticles covered with PMBN (PMBN/PLA-NP) [45]. The phosphorylcholine groups in the MPC unit and active ester groups in the MEONP groups were enriched in the outermost surface; evidence for this was obtained by X-ray photoelectron spectroscopy. The average diameters of the PMBN/PLA-NP ranged from 250 nm to 300 nm as shown in Fig. 3. The zeta-potential of the PLA surface was a large negative value about -60 mV, however, that of the PMBN/PLA-NP became to ranged from -6.8 mV to -2.0 mV. This is because of the electrical neutrality of the phosphorylcholine groups due to the formation of an inner salt between

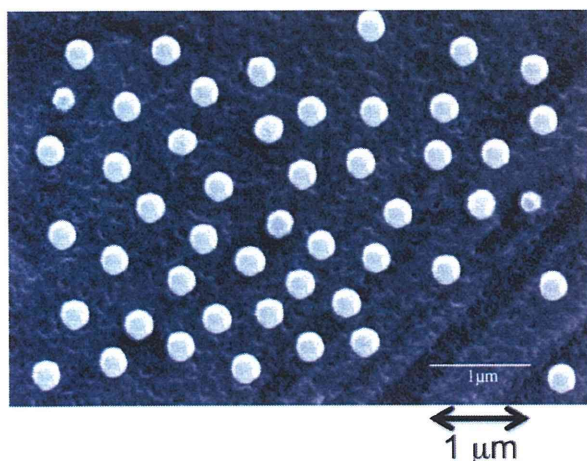


Fig. 3. Electron microscopic picture of polymer nanoparticles covered with artificial cell membrane.

phosphate anions and trimethylammonium cations. The appropriate materials that can be used as nanoparticle cores are polymers, metals, and ceramic. In particular, PMBN enables coating of the particle surface; thus, titanium oxide and silica nanoparticles are easily coated by PMBN. Active ester groups were located on the nanoparticles, and the typical surface concentration was evaluated to be 1.0 nmol per mg of polystyrene nanoparticles (PS-NP). The bioconjugation was achieved simultaneously as well as continuously. Moreover, multiple biomolecules could be immobilized via the active ester groups [46–48]. We observed that multiple immobilizations of proteins on the PMBN-coated nanoparticles were achieved. Considering this, PMBN comprising phosphorylcholine and active ester groups is of great importance as a platform for a high-performance biointerface facilitating affinity separation, sequential reaction, and biomolecular detection.

3.2. Binding of target biomolecules on nanoparticles based on bioreaction

Nonselective adsorption of biomolecules on the surface makes noise for sensing of target molecules. The MPC polymer can suppress protein adsorption significantly. The effects of the phosphorylcholine groups on the adsorption of bovine serum albumin (BSA) to the nanoparticles were evaluated [49]. To avoid chemical reaction with BSA, the active ester groups on PMBN/PLA-NP were reacted with glycine for blocking the active ester groups in this experiment. Fig. 4

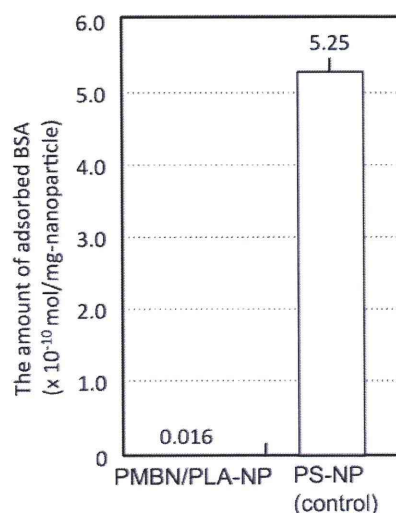


Fig. 4. Amount of BSA adsorbed on polymer nanoparticles without and with artificial cell membrane surface.

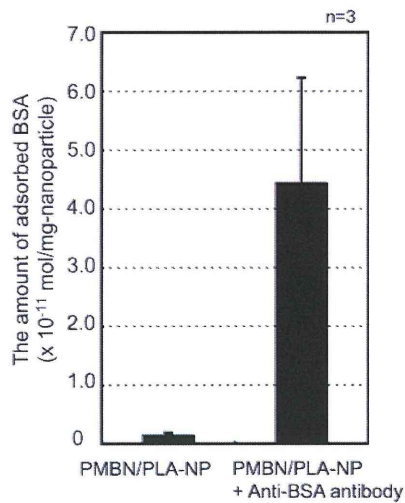


Fig. 5. Amount of BSA captured on polymer nanoparticles immobilized anti-BSA antibody based on antigen–antibody reaction.

shows the amount of BSA adsorbed on various nanoparticles. Numerous BSA molecules were adsorbed on the commercially available PS-NP whereas these molecules were hardly adsorbed on the glycine-reacted PMBN/PLA-NP; the value was approximately 1/300 as compared with that on PS-NP. The surface of PS-NP was hydrophobic and adsorbed proteins. PMBN/PLA-NP was suitable for developing affinity nanoparticles because of their considerable ability to prevent nonspecific adsorption.

The activity and function of the antibody immobilized on the PMBN/PLA-NP were evaluated by observing the antigen–antibody reaction (Fig. 5). The amount of BSA on the anti-BSA antibody-immobilized PMBN/PLA-NP was higher than that on PMBN/PLA-NP without antibody immobilization. This result indicates that the amount of BSA increased by reacting with the antibody immobilized on the surface of PMBN/PLA-NP. Based on this result, the antibody-immobilized PMBN/PLA-NP could function as affinity nanoparticles. The dissociation constant (K_d) of the antigen/antibody complex substantially defines the performance of affinity-based separation, diagnosis, and detection systems. To evaluate the performance of PMBN/PLA-NP as an affinity nanoparticle, the dissociation constant of the antigen/antibody complex on PMBN/PLA-NP was measured [49]. The dissociation constant could be calculated from these plots, and it was observed to be 2.7×10^{-7} M for the anti-BSA antibody-immobilized PMBN/PLA-NP (PMBN/PLA/anti-BSA-NP) and 1.3×10^{-5} M for the anti-BSA antibody-immobilized PS-NP modified with succinimide moiety (PS-suc-NP) on the surface (PS/anti-BSA-NP). Thus, the affinity of the anti-BSA antibody to BSA observed on the PMBN/PLA/

anti-BSA-NP was approximately 200-fold higher than that on the PS/anti-BSA-NP. The K_d value generally ranges from 10^{-7} to 10^{-10} for an antigen–antibody complex [50]. The K_d value of the anti-BSA antibody immobilized on PMBN/PLA-NP for BSA is considered valid while that for the anti-BSA antibody immobilized on PS-suc-NP is higher than the reported value. This indicates that the antibody immobilized on the PMBN/PLA-NP had a strong affinity toward the antigen, maintaining the activity of the antibody even when immobilized on the nanoparticles. However, in the case of antibodies immobilized on the PS-suc-NP, a large K_d value was observed; this was due to a weakening in the affinity for the antigen by denaturation of the antibody during immobilization. These results indicate the effects of the phosphorylcholine groups in preventing the denaturation of the antibody.

4. Specific cellular uptake of nanoparticles covered with artificial cell membrane conjugated with specific biomolecules

4.1. Preparation of polymer nanoparticles embedding fluorescence marker

Semiconductor nanocrystalites (quantum dots or QDs) have gained much interest as a promising alternative to organic dyes for biological imaging. QDs ranging in size between 2 nm and 6 nm have unique optical properties: material- and size-dependent emission spectra, a wide absorption spectrum, high quantum yields, simultaneous multicolor emissions, and especially excellent resistance to photobleaching. This photostability is a critical feature in most fluorescence applications, particularly for long-term monitoring of labeled substances, and is an area in which QDs have a singular advantage over organic dyes. As QDs themselves are hydrophobic, the key to developing QDs as a tool in biological systems is to achieve good dispersion ability in an aqueous medium, and compatibility with biological components including cells [51–53].

Polymer nanoparticles embedding QDs covered with PMBN (PMBN/PLA/QD) were designed by making an assembly of phosphorylcholine groups as platform and biomolecules immobilized on the surface of nanoparticles (Fig. 6) [54]. In spite of numerous efforts [55,56], the problems of cytotoxicity and the nonselective cellular uptake of QDs remain. As mentioned above, the PMBN/PLA-NPs show the bioinert abilities and they may avoid phagocytosis from macrophage-like cells [57]. That is, the phosphorylcholine group coverings suppress nonspecific interactions between bulk materials and cell, and create a specific affinity by ligand molecules immobilized on the surface.

4.2. Cellular uptake of the PMBN/PLA/QD

We observed that PMBN/PLA/QD had the abilities to highly resist nonselective cellular uptake from HeLa cells and to permeate the membrane of HeLa cells effectively when arginine octapeptide (R8)

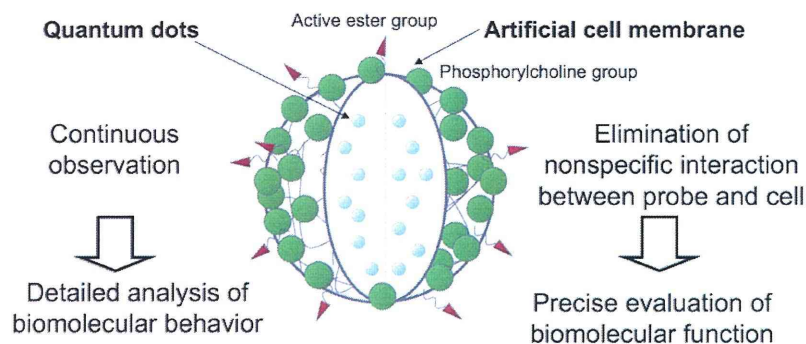


Fig. 6. Schematic representation of polymer nanoparticles embedding QD with artificial cell membrane surface.

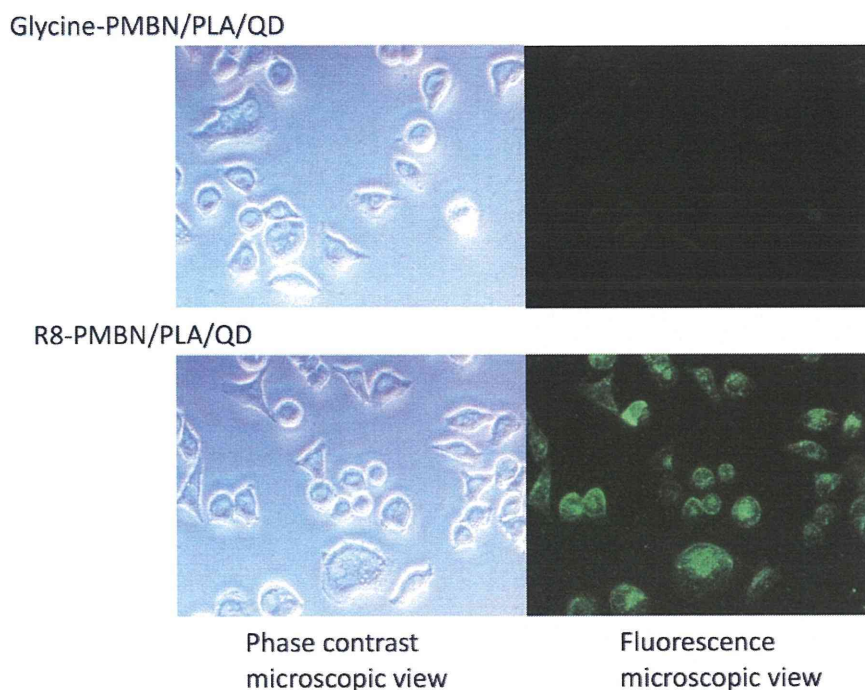


Fig. 7. Uptake of polymer nanoparticles covered with artificial cell membrane without and with R8 immobilization.

was immobilized on the surface of the nanoparticles as shown in Fig. 7 [54]. The R8 is well known as cell membrane penetrating peptide (CPP), so its specific functions are observed with the polymer nanoparticles. In Fig. 8, a plot of the intensity of each PMBN/PLA/QD in cells versus incubation time shows that glycine-masked PMBN/PLA/QD (glycine-PMBN/PLA/QD) completely suppresses the nonselective uptake from HeLa cells. We also confirmed that no glycine-PMBN/PLA/QD was uptaken by HeLa cell even after incubation for 24 h. In general, conventional nanoparticles can be uptaken by the

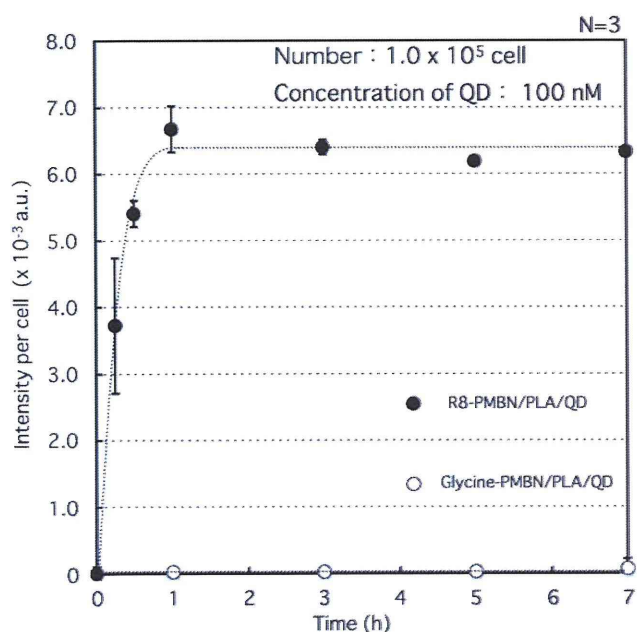


Fig. 8. Time dependence of cellular uptake of polymer nanoparticles. Closed plots: glycine-PMBN/PLA/QD, open plots: R8-PMBN/PLA/QD.

cells without any selectively [57]. Thus, this result indicated that our PMBN/PLA/QD can obtain high signal to noise ratio compared with other imaging probes because there is no background fluorescence caused by nonselective uptake of imaging probes. On the other hand, R8-conjugated PMBN/PLA/QD internalized effectively into cells. The uptake of R8-PMBN/PLA/QD significantly increased within first 15 min, but the uptake rate gradually slowed and reached a plateau at 1 h. However, we cannot obtain from only this information where R8-PMBN/PLA/QD located in the cell at each time. Thus, further research about the location of R8-PMBN/PLA/QD was required.

For determining the location of R8-PMBN/PLA/QD at each time, HeLa cells incubated with R8-PMBN/PLA/QD was observed by a confocal laser scanning microscopy (CLSM). Fig. 9 shows that R8-PMBN/PLA/QD attached immediately to the cell membrane within first 5 min and began to internalize into endosome at 15–30 min. The amount of internalized R8-PMBN/PLA/QD increased at 1–3 h and whole R8-PMBN/PLA/QD which attached to cell membrane entered into endosome in 5 h. These results revealed the kinetic behavior of R8-mediated internalization into the cell. Several lines of evidences demonstrated that the PMBN/PLA/QD is a most suitable analytic tool for kinetic analysis of biomolecules.

4.3. The evaluation of the inflammatory response induced by PMBN/PLA/QD

It was reported that PMBN/PLA/QD have no cytotoxicity for 3 days even after internalization in HeLa cells [51]. However, there are some possibilities of the induction of inflammation reaction even when no cytotoxicity appears. Thus, more studies are required with respect to the inflammatory response.

Mouse macrophage RAW264.7 cell, known for its sensitivity to inflammatory response, was used as a model system. RAW264.7 cell was incubated with PMBN/PLA/QD for 24 h. After incubation, the inflammatory response was measured by using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Oligonucleotides TNF- α -F (5'-GAGCAGCTGGAGTGGCTGCTGAG-3') and TNF- α -R (5'-

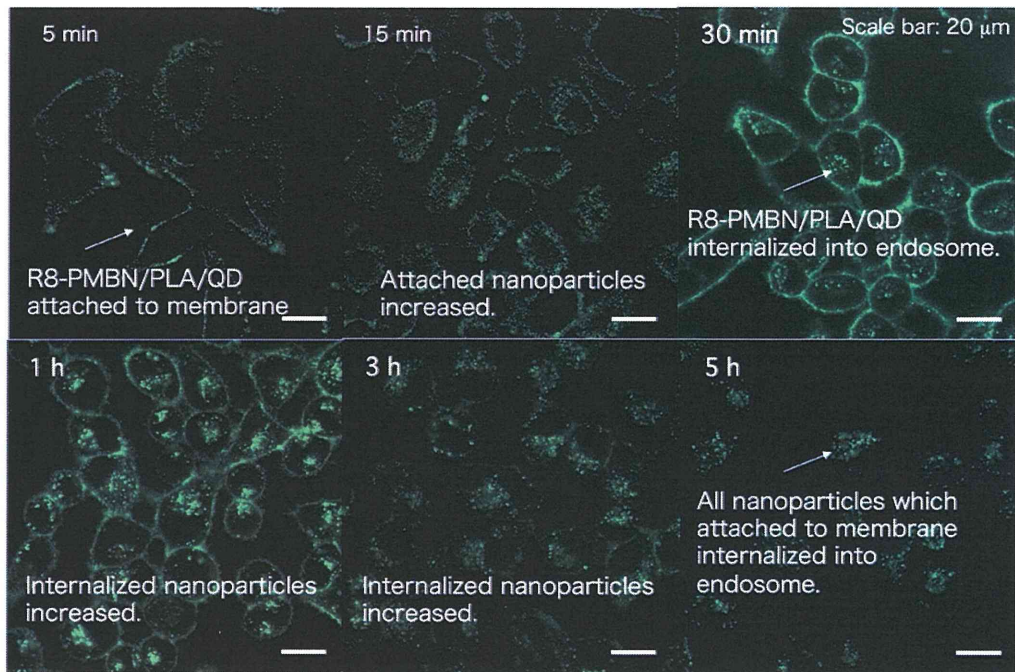


Fig. 9. LCMS analysis of internalization of R8-PMBN/PLA/QD.

TAGACCTGCCCGACTCCGC-3') were used for detection of tumor necrosis factor- α (TNF- α); GAPDH-F (5'-AATGTGTCGTCGGATCT-3') and GAPDH-R (5'-CCCTGTTGCTGTAGCCG TAT-3') were used for glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The expression of TNF- α mRNA was standardized as the relative value to that obtained for GAPDH mRNA. As negative and positive controls, a normal cell and the cell with 100 ng/mL lipopolysaccharide were used respectively. Fig. 10 shows the relative expression of TNF- α mRNA to GAPDH mRNA in RAW264.7 cells incubated with R8 or glycine-PMBN/PLA/QD for a day. No significant difference between negative control and PMBN/PLA/QDs in the expression of TNF- α mRNA was observed. This indicated that phosphorylcholine groups on the surface of PMBN/PLA/QD suppress the inflammatory reaction in RAW264.7

cells even when internalizing into cells due to the ologopeptide. From these findings, our PMBN/PLA/QD can eliminate the unwished interactions between probes themselves and cell, such as a nonselective cellular uptake, cytotoxicity and inflammation response.

4.4. The assessment of the abilities of various octapeptides as a cell membrane penetration peptide

Many research groups reported that arginine-rich peptide is useful as a CPP [58,59]. However, the abilities of other oligopeptides to penetrate the cell membrane have not been well characterized. Thus, we evaluated the function of various octapeptides as a CPP by using our PMBN/PLA/QD as an analyzing tool. To assess the main factor

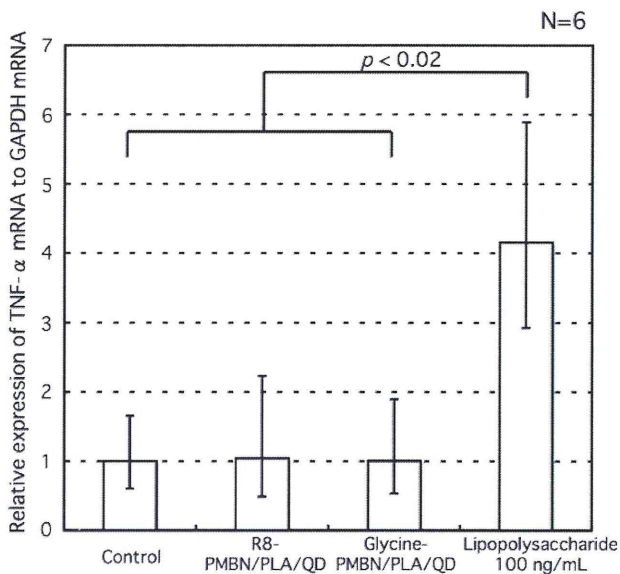


Fig. 10. Relative expression of TNF- α mRNA to GAPDH mRNA in RAW264.7 cells incubated with polymer nanoparticles.

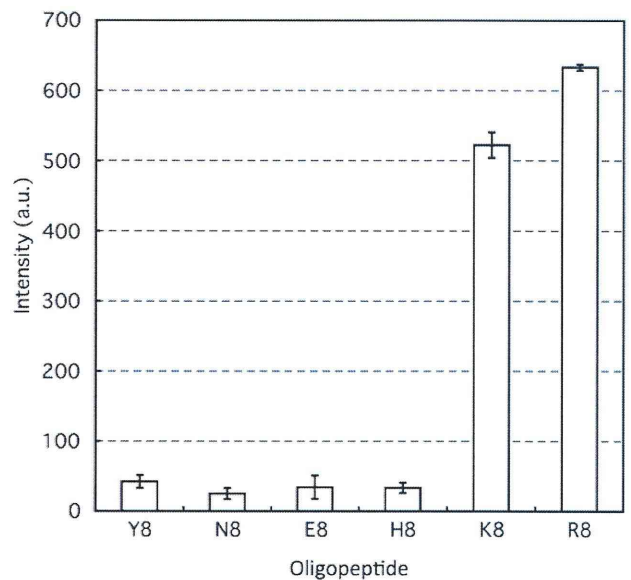


Fig. 11. Effect of amino acid residue of immobilized oligopeptide on cellular uptake.