

表3 MPCポリマーコートプレート上におけるCHL細胞及びA549細胞の小核試験の比較

Cell line				micronucleus (%)				MP	Multi-N	TF-N
				MN-2	MN-3	Multi-MN	MN-total			
CHL	Control	48 h		0.4	0.5	0.0	0.9	2.8	0	0.1
		48 h	MMC 0.02	1.9	0.5	0.3	2.7	1.3	0.1	0.3
		48 h	MMC 0.1	4.5	1.4	4.5	10.4	2.1	1.3	1.2
	MPC	48 h		0.4	0.8	0.2	1.4	1.9	0.1	0.4
		48 h	MMC 0.02	1.6	1.4	0.3	3.3	1.6	0.3	0.2
		48 h	MMC 0.1	5.0	1.0	4.1	10.1	1.6	0.9	1.6
A549	Control	48 h		0.9	0.5	1.2	2.6	1.6	0.4	1.2
		48 h	MMC 0.02	1.8	1.3	1.0	4.1	0.5	0.4	1.3
		48 h	MMC 0.1	1.6	0.7	3.3	5.6	0.4	0.6	1.6
	MPC	48 h		0.7	1.2	1.4	3.3	1.2	0.5	0.5
		48 h	MMC 0.02	1.3	1.1	2.9	5.3	0.5	0.3	2.6
		48 h	MMC 0.1	1.8	1.8	4.9	8.5	0.3	1.5	6.0

MN-2; 1/10-1/3 micronucleus, MN-3; 1/3-1/2 micronucleus, Multi-MN; multi micronucleus, MP; metaphase, Multi-N; multi nucleus, TF-N; transformed nucleus

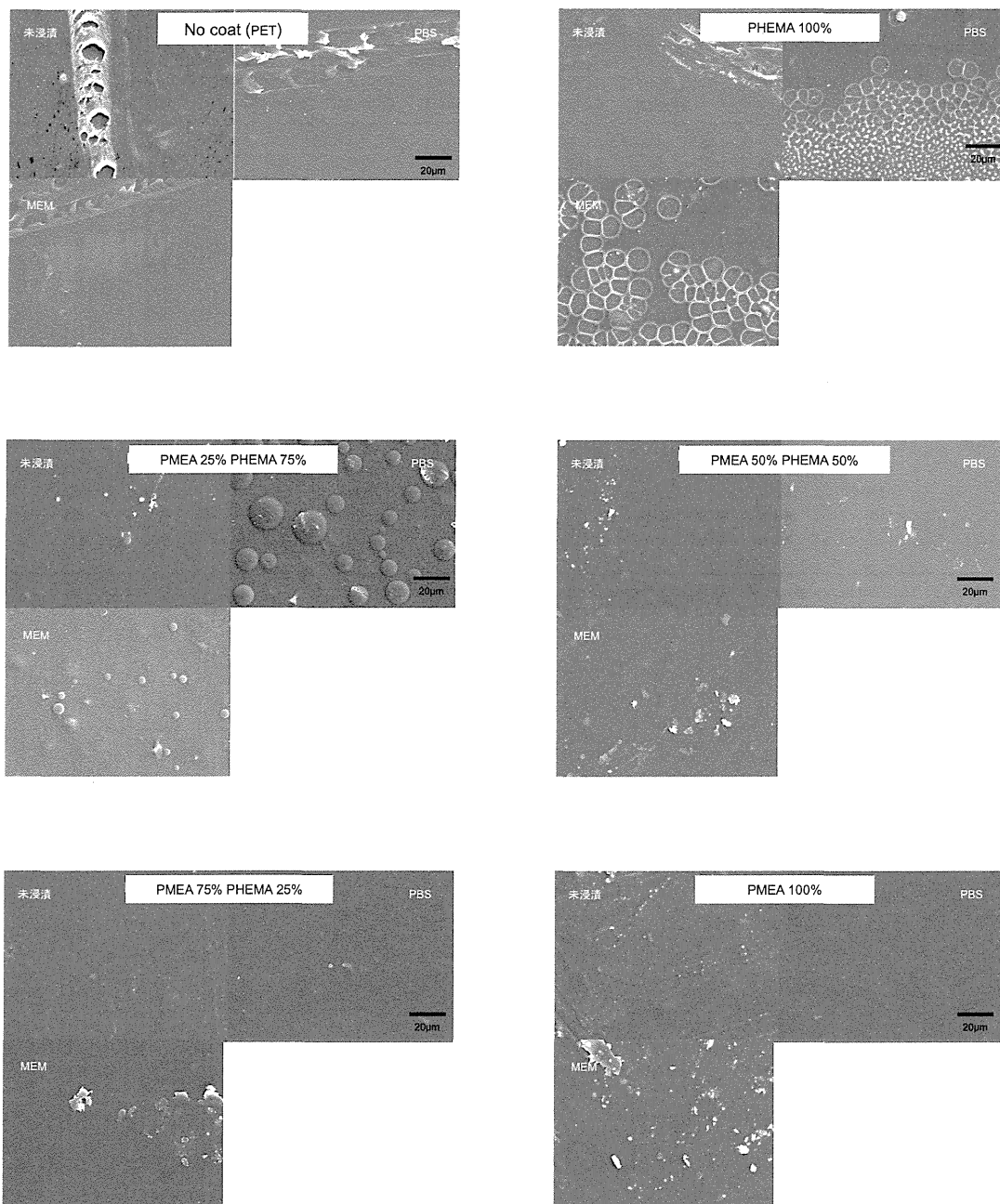


図14 PMEA/PHEMAコートPETシートの培地浸漬試験(一晚)

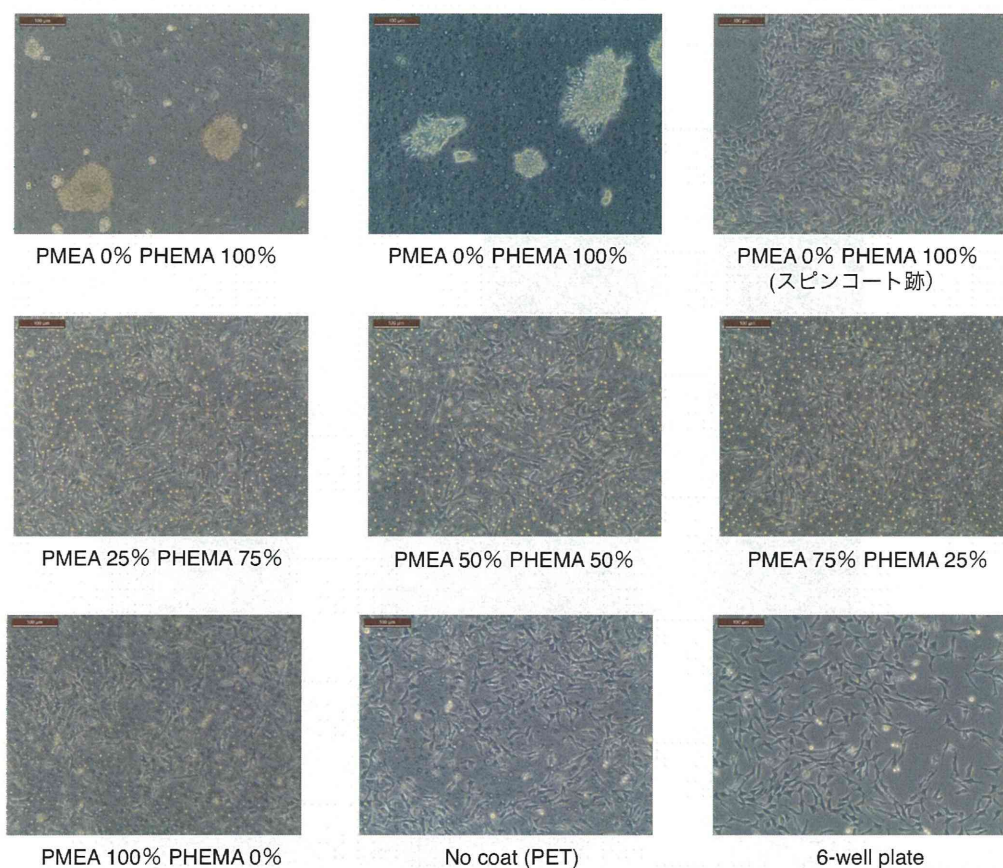


図15 PMEA/PHEMAコートPETシートのCHL細胞播種試験(一晚)

表4 PMEA/PHEMAコートPETシート上における播種一日後のCHL細胞数の比較

	シート上 ( $\times 10^5$ cells)	6 well plate 上 ( $\times 10^5$ cells)	培養上清 ( $\times 10^5$ cells)	total cells ( $\times 10^5$ cells)
PMEA 0% PHEMA 100%	6.34	1.52	0.27	8.13
PMEA 25% PHEMA 75%	6.86	1.63	0.19	8.67
PMEA 50% PHEMA 50%	6.35	2.34	0.26	8.94
PMEA 75% PHEMA 25%	6.00	1.38	0.68	8.06
PMEA 100% PHEMA 0%	5.88	2.36	0.16	8.40
no coat (PET)	7.40	1.13	0.14	8.67
6 well plate	(-)	7.49	0.03	7.52

播種細胞数  $3 \times 10^5$  cells/3mL

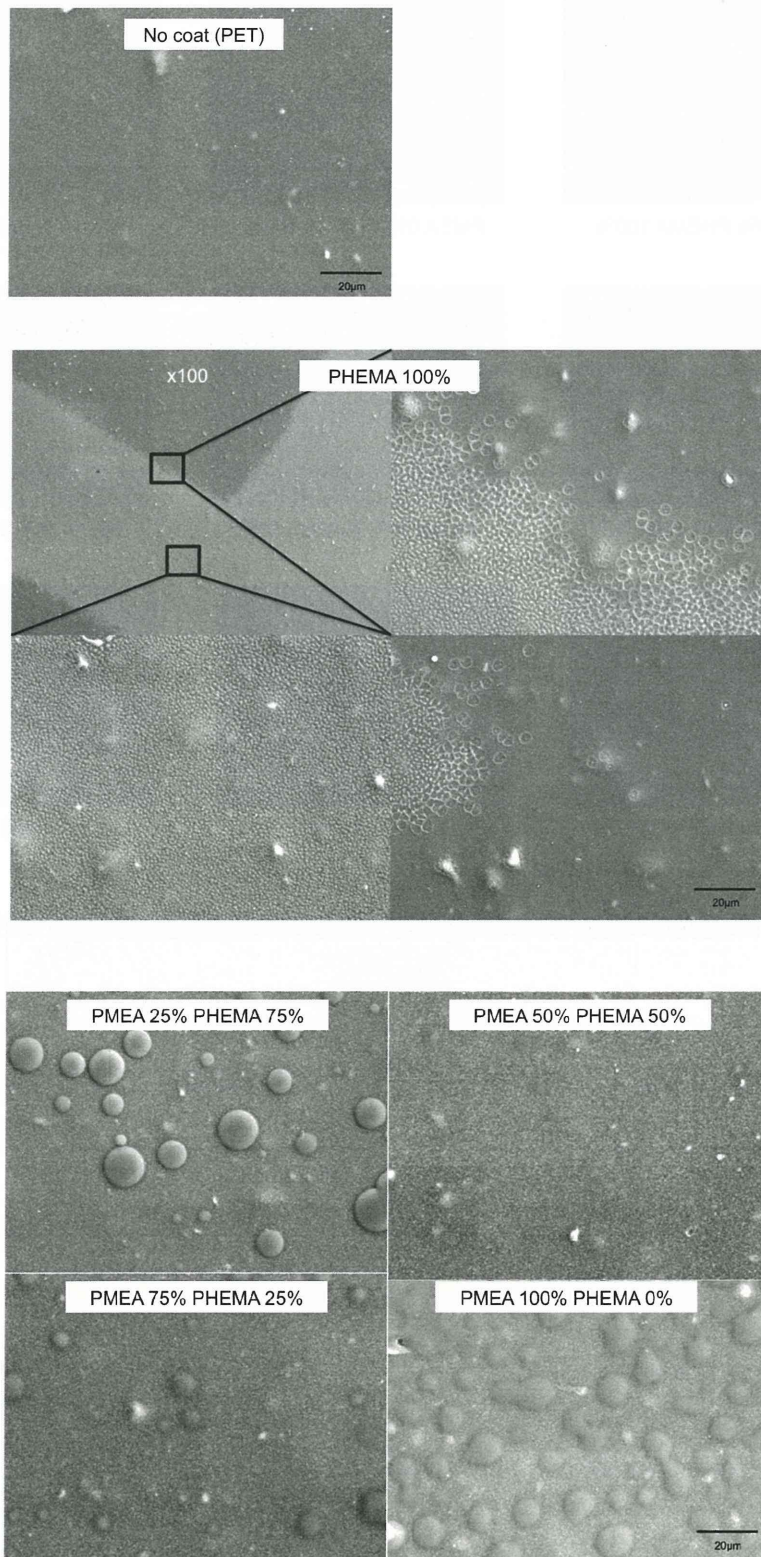
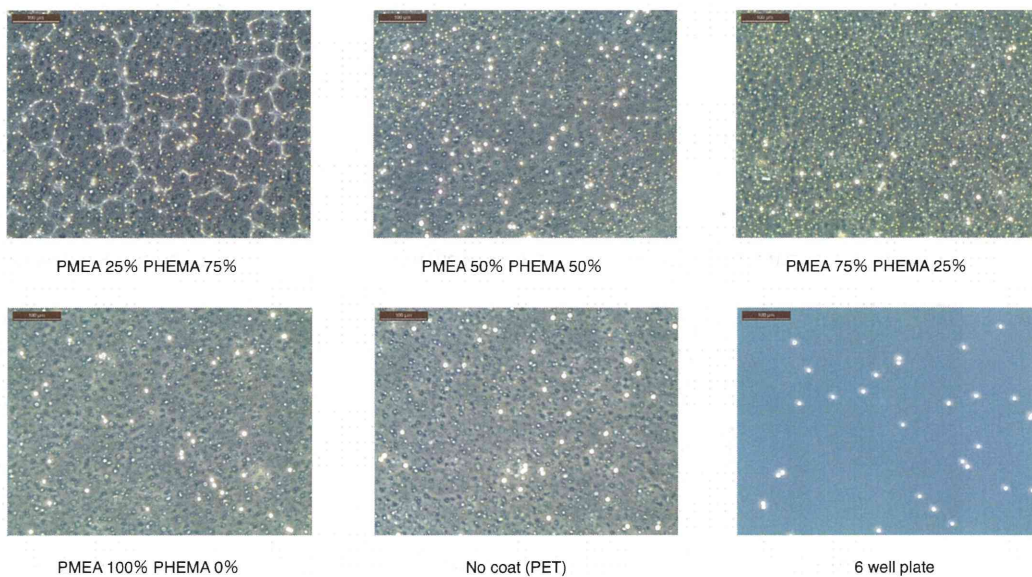


図16 PMEA/PHEMAコートPETシートのCHL細胞播種試験(一晚)

播種30分後



播種3時間後

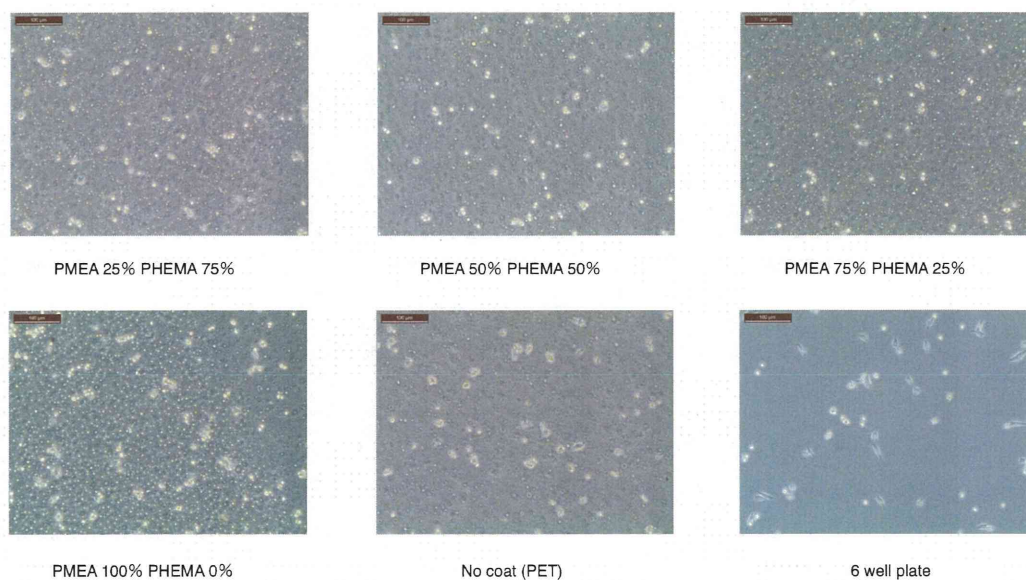


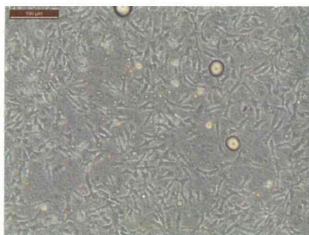
図17-1 PMEA/PHEMAコートPETシート上でのCHL細胞増殖試験

培養1日後

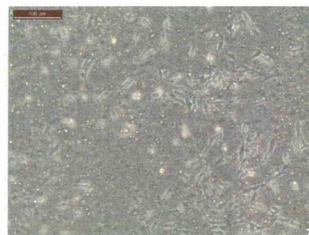
CHL細胞増殖試験



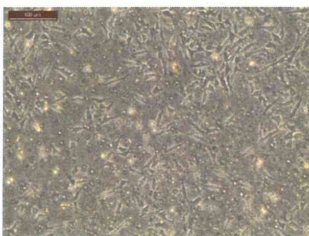
PMEA 25% PHEMA 75%



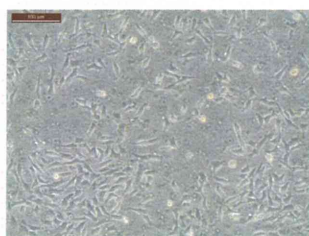
PMEA 50% PHEMA 50%



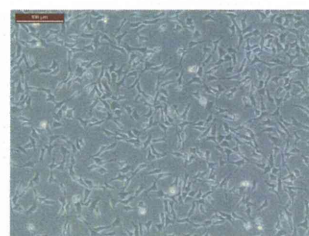
PMEA 75% PHEMA 25%



PMEA 100% PHEMA 0%



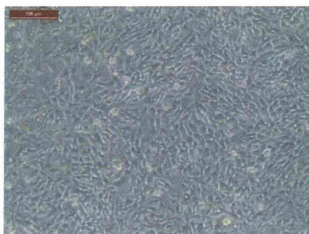
No coat (PET)



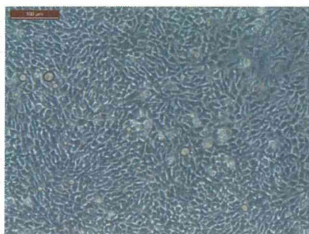
6 well plate

培養3日後

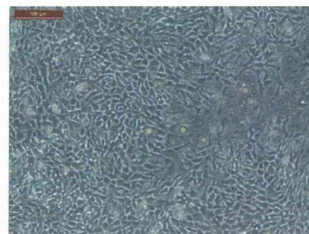
CHL細胞増殖試験



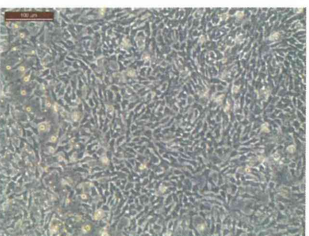
PMEA 25% PHEMA 75%



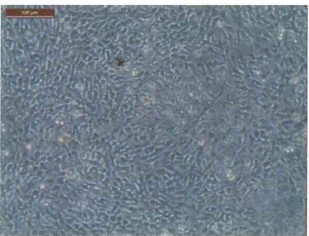
PMEA 50% PHEMA 50%



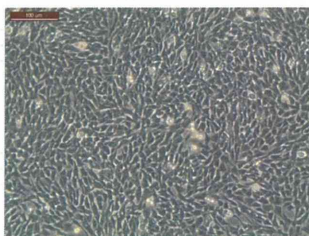
PMEA 75% PHEMA 25%



PMEA 100% PHEMA 0%



No coat (PET)



6 well plate

図17-2 PMEA/PHEMAコートPETシート上でのCHL細胞増殖試験

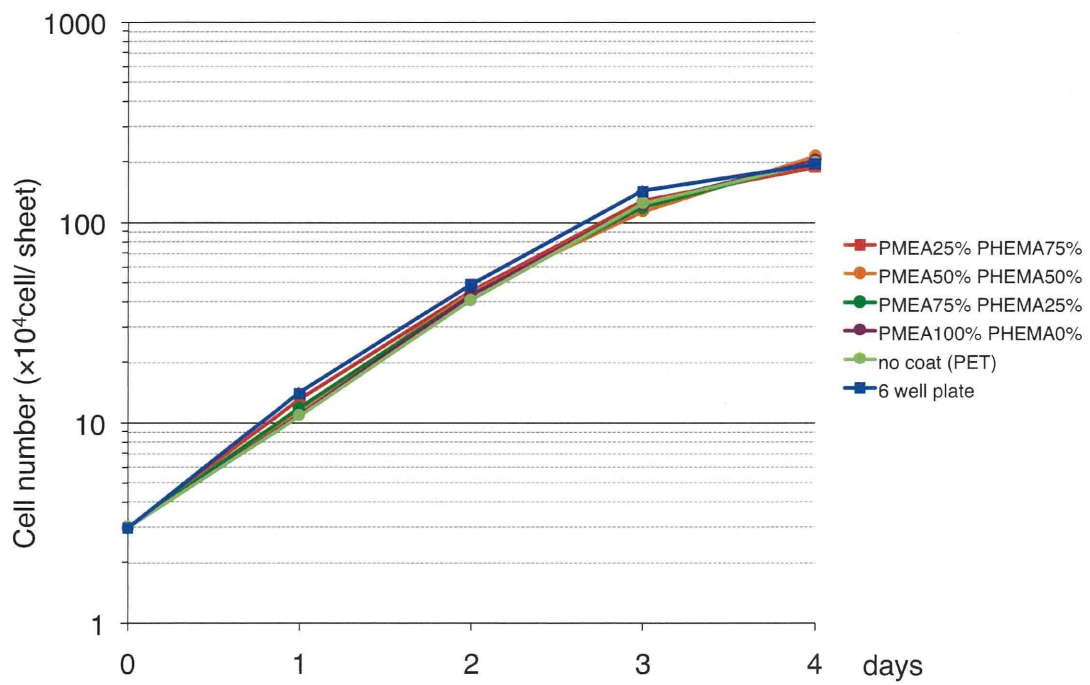


図18 PMEA/PHEMAコートPETシート上でのCHL細胞増殖曲線

分担研究報告書  
厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業  
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名

自己組織化膜を利用したモデル表面材料調製と細胞機能を利用した細胞挙動解析

研究分担者 中岡 竜介 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
研究協力者 薮島 由二 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部  
比留間 瞳 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部  
田中 賢 山形大学大学院 理工学研究科バイオ化学工学専攻

研究要旨

本研究では、医用材料の生体適合性と材料特性との関連性を明らかにすることを目的とし、材料表面特性が細胞に与える影響について *in vitro* での材料/細胞相互作用解析を通じた検討を行う。今年度は、血液適合性をもつことが報告されている poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) を中心とした類似ポリマーをコーティングした細胞培養用試料の作製を行った。さらに、同じく血液適合性が報告されているベタイン系ポリマーと類似した構造表面を自己組織化単分子膜 (SAM) により調製することを試みた。前者においては、検討の結果、使用したポリマー全てに適用できる 34 mm 径 PET フィルムへのコーティング条件を設定することができた。後者においては、反応時に用いる溶媒の種類によっては想定していた構造の単分子膜が調製されず、結果としてベタイン構造特有の細胞接着抑制効果が発揮されていない可能性を示唆する結果を得た。

A. 研究目的

医療機器及び医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、材料表面の物理化学的特性に大きく影響されることが分かっている。医用材料と生体との界面においては、水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体蛋白質の吸着が起こる。その後、

細胞が材料表面に接着することになるため、医用材料と細胞は吸着蛋白質層を介して相互作用することになる。よって、このメカニズムを明らかにすることは、材料の機能発現や生体適合性に関して大きな情報を得ることになり、材料の設計・開発のみならず安全性・有効性評価にも大きく寄与すると考えられる。



材料表面の水和状態は血液適合性（抗血栓性）の要因である蛋白質吸着能や細胞接着能に深く関与することが示唆されている。そこで、本研究では、優れた血液適合性が報告されている poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) に着目し、そのホモポリマー、既に医用材料として使用されている poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA)、さらにそれぞれのモノマーである MEA と HEMA との共重合体を対象として、網羅的遺伝子発現解析、網羅的蛋白質吸着解析、細胞挙動変化等の評価を行い、そのポリマーの特性、とりわけ物理化学的特性や水和状態との関連性を考察することにより、医用材料の生体適合性、特に本研究では血液適合性に関して重要な因子となりうるバイオマーカー及び材料特性を明らかにすることを試みる。

これらの研究を行うためには対象ポリマーからなるフィルム材料が必要となるが、PMEA が粘着性を示し基材へのコーティングが容易であること、コーティングの場合は実験に必要なポリマーが少量で済むことから、本研究では polyethyleneterephthalate (PET) フィルムに各種ポリマーをコーティングして使用することとした。研究協力者の田中らが既に 14 mm 径 PET フィルムに対するコーティング条件を最適化していたが、本研究事業では PET フィルム径が 34 mm のものを必要としたため、新たなコーティング条件を見いだす必要が生じた。よって、今年度は、34 mm 径 PET フィルムに最適なコーティング条件検討を行った。

一方、我々はこれまで汎用性の高い種々の医用材料を使用して行われてきた従来研究では困難であった化学的及び物理化学的

特性が制御された表面を、自己組織化単分子膜 (SAM) を用いて調製することを検討してきた。この技術を応用すれば、PMEA とは別に、優れた血液適合性が報告されているベタイン様構造を模倣することが可能ではないかと考えられたため、本研究では、正イオン及び負イオンを末端官能基にもつ 2 種類の SAM 用試薬を用い、双性イオンをもつベタイン構造を模倣した表面の調製検討も行った。調製した表面の特性解析を行うと同時に、それら表面上における細胞接着挙動変化についても検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. PMEA 及び類似ポリマーの PET フィルムへのコーティング

今回研究に使用したポリマー類の組成及び分子量を表 1 に示す。いずれのポリマーもメタノールには可溶であるため、これらのポリマーを様々な濃度で溶解させたメタノール溶液を調製しコーティングに用いた。基材となる PET フィルムには、ポリマーコーティングが可能となるように予め両面が特殊表面処理されたものを用いた（三菱樹脂株式会社製：TE100E W07-75）。この表面処理により表面層に窒素元素が含まれるようになるため、この窒素元素に起因したスペクトル強度をポリマーコーティング処理時の評価指標として用いた。

34 mm 径に切り抜いた PET フィルムをスピコーター（共和理研 K359SD-1）の試料台に静置後、ポリマー溶液をキャストし、室温下でスピコート処理を行った。この際の運転条件は、研究協力者である田中らが 14 mm 径 PET フィルムに用いているものとほぼ同じものを用いた。具体的な回転数

と時間を以下に示す。

500 rpm、5 sec → 2000 rpm、10 sec →  
4000 rpm、10 sec → 室温下で乾燥

上記コーティング条件を1サイクルとして基本2サイクルの処理を行い、一晚室温下で乾燥することで試料を調製した。調製した試料のポリマーコーティング状態は、まず、エルマ社製 G-1-1000 を用いた液滴法による静的接触角測定で確認した。具体的には、試料上に MilliQ 水を 2  $\mu\text{l}$  滴下した 30 秒後の接触角を測定した。また、必要に応じて、水中気泡法による接触角測定も行った。水中気泡法では、MilliQ 水を入れた透明なプラスチック容器に試料を浮かべ、その下側にマイクロシリンジ用針とマイクロピペットにより 2  $\mu\text{l}$  相当の空気を入れることで試料と接する気泡を形成させ、その接触角を測定した。なお、通常水中気泡法で測定した値は水で飽和した試料界面における気泡の接触角として表記するが、今回は液滴法の結果との比較を容易にするため、測定結果は水に対する接触角 ( $180^\circ -$  気泡の接触角) として示した。いずれの方法を用いた場合でも、5 点以上の接触角を測定し、その平均で評価を行った。次に、Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA : 島津製作所製 ESCA-3200) で PET 基材の特殊表面処理層に由来する窒素元素スペクトルの強度を測定し、表面が完全にポリマーで覆われているかどうかを確認した。

## 2. SAM を利用したベタイン構造模倣表面の試作

本研究では、金蒸着表面へ2種類の末端

官能基をもつ SAM を形成させて、ベタイン構造を模倣したモデル表面を調製することを試みた。基材は、マツナミ社製の円形カバーガラス (15 mm 径、厚さ 0.2 mm) の片面に 3 nm のチタン層、続いて 25 nm の金層を蒸着したものをを用いた (村中医療器製)。

この基材を、Pirahna 溶液 (濃硫酸と過酸化水素水を 3 対 1 で混合した溶液) 及び純水で洗浄、乾燥後、片末端にチオール基、もう片末端に正イオン、あるいは負イオンとなる官能基を持つ市販の decanethiol 類とエタノール中で反応させて表面の調製を試みた。今年度は、優れた血液適合性が報告されている 2-metacryloyloxyethyl phosphoryl choline (MPC) を模倣した表面の調製を試みたため、末端の正イオン官能基としてはアミノ基、あるいは4級アミン、負イオン官能基としてはリン酸エステル基を選んで反応を行った。具体的には、2種類の試薬を含むエタノール溶液に基材を 12 時間以上浸漬、その後洗浄、真空乾燥を行うことで試料を調製した。調製した試料の表面特性は、試料表面の接触角及び ESCA 解析により評価した。

ベタイン構造をもつ表面の最大の特徴は、その表面への細胞接着抑制である。そこで、Chinese hamster 由来の繊維芽細胞である V79 細胞を用いて、その初期接着と細胞占有面積 (接着後の伸展状態) との評価を行い、調製したベタイン構造模倣試料が細胞接着抑制挙動を示すか検討した。V79 の維持継代、細胞接着実験には 10% の牛胎児血清を含む Eagle MEM を用いた。調製した試料を 24 ウェルプレートのウェルに静置後 70% エタノール溶液に一晚浸漬、phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後、V79 細胞を

25000 個播種した。一日後、calcein-AM で細胞を染色後、蛍光顕微鏡 (Keyence 社製 HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000) で観察を行い、付属ソフトの BZ-II 画像解析アプリケーションを用いて細胞占有面積を算出した。その後、trypsin 処理により細胞を剥がし、ハンディ型自動セルカウンター Scepter 2.0 (Millipore 社製) を用いて試料上に接着していた細胞数を測定した。

### C. 研究結果

#### 1. PMEА 及び類似ポリマーの PET フィルムへのコーティング

今回、試料には片面及び両面にポリマーをコーティングしたものの両者が求められるため、コーティング条件検討用基材には両面に特殊処理が行われている PET を用いた。

研究協力者の田中らにより 14 mm 径 PET へのポリマーコーティング条件は最適化されていたため、そのスピコート運転条件を用い、ポリマー溶液キャスト量や溶液濃度を変えて 34 mm 径 PET に最適なコーティング条件を検討した。初めに、溶液キャスト量の検討を行った。0.2 wt/v% のメタノール溶液を用いた予備的検討で、キャスト量 30  $\mu\text{l}$  でも溶液は瞬間的に広がりフィルム全面を覆うことが確認されたが、少量でのスピコート処理では溶媒の蒸発等が原因でコーティングの偏りが生じることが予想され、100  $\mu\text{l}$  未満の量をキャストするのは現実的でないかと判断した。そこで、0.2 wt/v% の PMEА 及び PHEMA メタノール溶液キャスト量を 100、125、150、200  $\mu\text{l}$  として調製した試料の接触角を測定した。その結果、PMEА、PHEMA いずれの場合でもキャスト量に依存した接触角変化は認められ

なかった。なお、試料ステージとの密着によるコーティングの剥離は認められなかった。また、150  $\mu\text{l}$  以上をキャストした場合には、スピコート時に裏面まで溶液が回り込んでしまうことが確認された。

過度のキャスト量はかえってコーティングの均一性を損なう可能性が示唆されたことから、キャスト量として 100  $\mu\text{l}$ 、125  $\mu\text{l}$  のいずれかが望ましいと想定し、これらのキャスト量で 2 回スピコーティングを行った試料の接触角を液滴法と水中気泡法とで測定したが、いずれの測定法でもキャスト量による接触角の影響は認められなかった。しかしながら、これらの表面を ESCA により解析したところ、いずれのキャスト量でも N 1s スペクトルが検出された。特に、PHEMA では未処理のものと比較しても 7 割以上の強度で N 1s スペクトルが確認されたことから、0.2 wt/v% 溶液でのスピコート処理では表面を完全に覆うことは出来ず、溶液濃度を高くする必要性が示唆された。なお、N 1s スペクトルは 125  $\mu\text{l}$  キャストのほうが小さくなっていたことから、キャスト量を 125  $\mu\text{l}$  とすることにした。

次に、溶液のポリマー濃度がコーティングに与える影響を検討した。0.5、0.75、1 wt/v% の PMEА、あるいは PHEMA メタノール溶液を用いてスピコート処理を行い、接触角測定及び ESCA による N 1s スペクトル測定を行った。接触角測定の結果、PMEА では濃度が増大するに従って水中気泡法による接触角の値が液滴法の値に近づいていくこと、濃度に関わらずバラツキが小さいことが明らかになった (図 1)。PHEMA の場合には 2 種類の測定法で得られた接触角の差が濃度の上昇とともに広がり、液滴法

により得られた接触角の値が増大する一方、バツキは小さくなる傾向が認められた(図2)。ESCAによるN 1sスペクトル測定では、いずれのポリマーでも1 wt/v%メタノール溶液を用いるとスペクトルがほぼ検出されなくなることが認められた(図3)。なお、調製したフィルムの中心部及び末端部のN 1sスペクトルも観察し、いずれの部位においても当該スペクトルは観察されることが確認された。以上の結果から、コーティングの条件を以下のように設定し、MEA:HEMA共重合ポリマーでのコーティングでもフィルム全体がポリマーで覆われた試料が作製可能かを確認した。

- ・溶媒：メタノール
- ・ポリマー濃度：1 wt%
- ・溶液キャスト量：125  $\mu$ l
- ・コーティング回数：2回

図4に各種ポリマーをコーティングした表面における接触角を2種類の方法で測定した結果を示す。共重合体におけるHEMA比率が上昇するにつれ、2種類の測定法で得られた接触角の差が大きくなることが認められたが、上記条件でコートした場合においてはいずれのポリマーでもN 1sスペクトルは検出できなかったため、基本的には試料調製条件として、上記条件を採用することにした。

## 2. SAMを利用したベタイン構造模倣表面の試作

まず、リン酸エステル基とアミノ基とからなる2官能基表面の調製を行った。調製した表面の接触角を液滴法で測定したとこ

ろ、反応時のリン酸エステル基用試薬混合比が増大するに従って、緩やかながら接触角が減少していくことが認められた。さらに、ESCAによる表面元素解析から、今回調製した混合比(リン酸エステル基25%、50%、75%)での炭素に対する窒素元素スペクトルの比は減少し、酸素及びリン元素スペクトルの比は増大する傾向が認められた(図5)。これらの表面上でV79細胞を播種し、24時間後の接着数及び細胞占有面積を測定したところ、正負イオンが存在すると考えられる表面上において細胞接着数に影響は認められなかった。一方、リン酸エステル基の仕込み比が増大するに従って、細胞接着後の占有面積は低下する傾向が認められた(図6)。

細胞挙動に変化が見られなかったのは、pH中性域における正イオンであるアミノ基の電離が不十分である可能性が考えられたため、強塩基性官能基の4級アミンを末端にもつ試薬を使用して同様の検討を行った。その結果、正負イオンが同時に存在することで、接触角が大きくなる可能性が示唆される結果を得た。また、ESCA解析からは、混合比50%におけるリン元素スペクトルが極大を示すことが認められた(図7)。酸素及び窒素元素に関しては、リン酸エステル基の比率が増大するにつれ前者は増大、後者は減少する傾向があることが認められた。これらの表面上におけるV79細胞の接着挙動を確認したが、正負イオンが共存することによる影響は見られなかった(図8)。

反応時にこれらの正負イオンを含む2種類の試薬を混合した場合、表面にそれら2つの官能基が存在することがESCA解析から示唆されている。しかしながら、2官能

基が共存した状態での接触角が単独官能基表面のそれと比較して疎水性となっていることから、それらイオンが電離していない、あるいは表面構造が期待されたものと大きく異なることが考えられ、その結果、細胞接着挙動への影響が見られていないことが予想される。そこで、反応時の溶媒を水、あるいはエタノール：水（1:1）混合溶媒に変えて反応を行い、その表面解析を行った。液滴法による接触角測定の結果、反応時に水が存在すると、リン酸エステル基と4級アミンとの混合溶液により調製した表面の接触角はエタノール調製したものと比べて低い値を示すことが認められた（図 9a）。また、液中気泡法で測定した場合、液滴法の結果とは異なり、いずれの溶媒で調製した表面においても反応条件が同じであれば同程度の接触角を示すことが認められ（図 9b）、表面上に形成されている分子構造が溶媒、特に水分子による影響を受けていることが示唆された。

#### D. 考察

本研究事業では、研究協力者である田中らが調製した PMEA、PHEMA ポリマー及び両者の共重合体を PET 上にコーティングしたフィルムを調製する必要があったため、その適切な条件を設定するための検討を行った。その結果、スピンコーターを用いて 34 mm 径の PET フィルム表面を完全にポリマーで覆うコーティング条件を設定することができた。しかしながら、このようにして調製したフィルムの水中での安定性を確認するために PBS に 1 日浸漬後、接触角変化と N 1s スペクトル強度変化を測定したところ、PHEMA 及び HEMA : MEA 共重合体

の PMEA 25 では浸漬 1 日後の N 1s スペクトルが検出されることが明らかとなった。前者においては未処理の 1/3 程度、後者においては未処理の 1/5 程度のスペクトルが観察された。そこで、コーティング回数を 4 回にして調製した試料に関する同様の検討を行ったが、浸漬 1 日後の共重合体でのスペクトル強度が未処理の 1/8 程度になったものの、N 1s スペクトルは検出された。また、PHEMA 表面のみ、PBS 浸漬後の接触角増大が認められた。これらのことは、PMEA 及び PMEA 25 をコーティングした表面では、PBS 浸漬によりポリマーが剥がれていることを示唆している。そこで、これらの表面を SEM (JEOL 社製 JSM-1800LV) で観察したところ、PHEMA では浸漬によるフィルムの剥離が、PMEA 25 ではフィルムの膨潤と考えられる表面変化が観察された（図 10）。PMEA 25 で観察された膨潤像は、HEMA リッチな部分が島状に点在しその部分が水により膨潤したこと、すなわちこの共重合体中に存在する HEMA ユニットと MEA ユニットとが相分離を生じていることを示唆するものと思われる。PMEA 25 では、明確なコーティングの剥離像は観察できなかったが、ESCA 解析による N 1s スペクトルが観察されたことはこの HEMA リッチな部分がコーティング時より薄くなっていることが予想される。これらのことから、PHEMA ホモポリマー及び PMEA 25 では水中でのコーティング安定性が悪いことが示唆された。特に、ホモポリマーの場合には、一日水に浸漬することでフィルムの部分的な剥離が数多く起こっていることが SEM 観察により明らかになった。しかしながら、剥離部分全てで PET が露出している

と考えると、ESCA による N 1s スペクトルが未処理の 1/2 程度検出されてもおかしくないのだが、実際にはそれよりも低い 1/3 以下の強度しか検出されていない。よって、現時点では剥離部分にポリマーが全く存在していないとまで結論づけることはできない。これら 2 種類のポリマー、特に PHEMA ホモポリマーに関しては、長期間水中に浸漬しても安定となる、より最適なコーティング条件の検討を溶液濃度やキャスト量を変えて行う必要がある。

今年度は、正負それぞれ逆の電荷をもちうる 2 種類の官能基からなるベタイン様モデル表面の SAM を用いた調製を試みた。その目的は、単純な手法で細胞接着抑制作用をもつモデル表面を調製することであり、調製することができれば細胞接着抑制表面の開発及び評価に大きく役立つはずである。本研究では、細胞接着抑制が認められるホスホベタインポリマーで血液適合性の優れた MPC の構造を参考に、リン酸エステル基を含む 2 官能基表面の調製を試みた。まず、弱い塩基性を示すアミノ基との 2 官能基表面の調製を試みたところ、接触角測定及び ESCA 分析により異なる組成をもつ 2 官能基表面の調製が可能であることが示唆された。細胞接着挙動を観察した結果、これらの表面上における細胞占有面積がリン酸エステル基仕込み比の増大に従って低下していることもそのことを示唆している。一方、2 官能基共存による細胞接着抑制効果は認められなかった。よって、アミノ基を用いた場合は、細胞接着抑制に必要な表面電荷状態が得られないことを示唆している。

そこで、強塩基性官能基で MPC 構造中にも存在している 4 級アミンとリン酸エステ

ル基とからなる 2 官能基表面の調製を試みた。その結果、これらの官能基用試薬を混合して反応させた場合、それぞれの単一官能基表面よりも接触角が大きくなること、リン酸エステル基由来の酸素及びリン元素スペクトルがその単一官能基表面より大きい値を示すこと、さらには 2 官能基共存による細胞接着挙動への影響がないことが認められた。これらのことから、従来の調製方法ではこれらの 2 官能基からなる SAM 表面が調製できないことを示唆している。その原因として、試薬末端官能基に起因した静電的相互作用と両試薬に存在するメチレン鎖に起因した疎水性相互作用とのバランスが、エタノール中での SAM 形成を阻害していることが考えられる。そこで、末端官能基の電離状態が反応に与える影響を検討するため、反応溶媒を水及び水：エタノール (1:1) 混合溶液に変えて 2 官能基表面の調製を試みた。それらの接触角を測定した結果、2 種類の官能基試薬を混合させて調製した表面の接触角は水が反応系に加わることで大きく低下すること、水中気泡法で接触角を測定した場合にはその値は溶媒の種類に関わらず水が存在した反応での液滴法で得られた接触角と同程度になることが認められた (図 9)。水中気泡法は水和した状態の表面接触角を測定することになるので、親水性をもつ構造を含む場合にはその構造が水との界面近くに再配向する。逆に疎水性構造は界面から離れるように再配向することになるため、結果として水中気泡法で測定した接触角は液滴法よりも小さくなることが知られている。今回の測定で、水及び水：エタノール混合溶媒中で調製した SAM の接触角が 2 種類の方法で測定し

でも大きな差が見られなかったことは、その表面が空気中においても水中においても安定な構造を保っていることを示唆している。一方、エタノール中で2官能基を含むように調製した試料において接触角の値が測定方法に応じて異なっていたことは、その表面上の分子が水中で再配向を起こしていることを示唆している。つまり、この表面上の分子がSAMのような安定構造を取っていないことを示唆している。

正反射 FT-IR 分析により、2官能基を含む反応をエタノール中で行った試料のみで強いメチレン鎖伸縮由来の吸収が観察された(図 11、点線部分)。一方、hexadodecanethiol (C16) 及び decanethiol (C10) で調製した SAM で同様の分析を行ったところ、観察できたメチレン鎖伸縮由来の吸収は非常に弱いこと、C16 よりも C10 での当該吸収が弱く観察が困難になっていることが認められた。また、C16 で観察された吸収は、図 11 で観察された吸収と比較して非常に弱いものであることが予想された(図 12、点線部分)。なお、反応容器として用いた polystyrene による SAM 形成への影響も考慮したが、ガラス容器中で調製した C16 SAM のメチレン鎖伸縮由来吸収との差は認められなかったため、反応容器による影響は無いと考えられる。形成された SAM のメチレン鎖が長くなるに従ってこの吸収は強くなることが報告されているため、今回の結果は、4級アミン及びリン酸エステル基 SAM 用試薬をエタノール中で同時に反応させた試料表面上には少なくとも C16 以上のメチレン鎖が存在することを示唆している。さらに、塩酸を加えたエタノール溶液で当該試料を洗浄すると、メチレン鎖伸縮由来の

吸収が弱くなることが認められた。このことは、酸性条件下で当該試料表面構造が変化したことを示唆している。これらのことから、当該試料表面では静電的相互作用による一部試薬の積層化が生じ、表面に疎水性の高いメチレン鎖、あるいは末端のチオール基がジスルフィドとなって露出しており、当初想定した表面構造を取っていないと考えられる。

実際、水：エタノール混合溶媒を用いて調製した2官能基表面においては、細胞の接着数及び伸展が、細胞培養用ディッシュと比較していずれも7割程度に抑制されることが認められた(図 13)。しかしながら、MPC と比較すればその抑制が弱いことは明らかである。この原因を明らかにするためには、実際にこれらの条件で調製した表面の構造を明らかにするための更なる分析が必要である。今後、高感度 FT-IR やエリプソメトリー等による表面構造解析を追加検討してホスホベタイン模倣 SAM 表面調製に必要な条件を明らかにした後、その表面上における細胞挙動変化を検討したい。

## E. 結論

高分子材料の生体適合性、特に血液適合性に関連した各種バイオマーカーと材料に必要な特性を明らかにするための研究材料として、血液適合性に優れた材料である PMEА を選び、そのホモポリマー及び HEMA との共重合体を PET にコーティングした試料を調製するための条件を検討した。その結果、以下に示す条件で、用いたポリマー全てで PET 基材上をコーティングできることを確認した。

- ・溶媒：メタノール
- ・試薬濃度：1 wt/v%
- ・キャスト量：125  $\mu$ l
- ・スピコート処理条件：500 rpm、5 sec→2000 rpm、10 sec→4000 rpm、10 sec→室温下で乾燥
- ・コーティング回数：2回

しかしながら、上記条件で調製した試料ではHEMA含量が多くなると水に対する安定性が悪くなることが確認された。HEMA含量の多いポリマー層の水に対する安定性を高めるため、今後、コーティング条件をさらに検討する必要がある。

SAM を利用して正負イオンを含むペタイン構造モデル表面を調製することを試みた。4級アミンとリン酸エステル基との組合せでSAMの調製を試みたところ、反応溶媒としてエタノールを用いた場合には、末端官能基の静電的相互作用が生じSAM形成が阻害されることが示唆された。水：エタノール混合溶媒を用いた場合、調製された表面では弱いながらも細胞接着抑制が認められたが、ホスホペタインを完全に模倣した表面をSAMで調製するためには高感度FT-IR等による解析も利用した表面構造解析結果を元にした反応条件の詳細な検討が必要であることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakaoka, R., Hirano, Y., Mooney, D. J., Tsuchiya, T., and Matsuoka, R. Study on the potential of RGD- and PHSRN-modified alginates as artificial extracellular matrices for engineering

bone. *J. Artif. Organs*, accepted.

### 2. 学会発表

- 1) Nakaoka, R., and Matsuoka, A. Effects of Surface Functional Groups on Interacted-cell Behavior: Effect on Gap-junctional Intercellular Communication of Cells, 9th World Biomaterials Congress (2012.6, Chengdu, China).
- 2) 中岡竜介、河野健、澤田留美、平野義明、松岡厚子「細胞接着性ペプチド修飾アルギン酸ゲル中で3次元培養したヒト細胞の分化挙動に関する研究」、第11回日本再生医療学会総会、横浜(2012年6月)
- 3) 植松美幸、中野達也、瀬川勝智、薮島由二、中岡竜介、松岡厚子「医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析(第1報)」、第41回医用高分子シンポジウム、東京(2012年6月)
- 4) 植松美幸、薮島由二、中岡竜介、松岡厚子、瀬川勝智、中野達也「医用高分子材料の生体適合性評価指標開発に向けた分子動力的シミュレーション」、第50回日本人工臓器学会、福岡(2012年11月)
- 5) 中岡竜介、比留間瞳、松岡厚子「ペタイン構造を模倣・単純化したモデル表面の調製に関する研究」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、仙台(2012年11月)
- 6) 植松美幸、薮島由二、中岡竜介、松岡厚子、瀬川勝智、中野達也「医用高分子材料の表面近傍における水和状態のシミュレーション的評価」、日本バイ



表 1. コーティングに用いた各種ポリマーの組成及び分子量

Sample	Feed composition		Copolymer composition		Molecular weight measured in DMF		
	HEMA (mol %)	MEA content (mol %)	HEMA content (mol %)		Mw	Mn	Mw/Mn
PMEA	0	100	0		75,068	12,302	6.102
PMEA 75	25	74.9	25.1		116,514	18,412	6.328
PMEA 50	50	51.3	48.7		219,846	53,580	4.103
PMEA 25	75	17.3	82.7		255,976	101,610	2.519
PHEMA	100	0	100		379,012	153,872	2.463

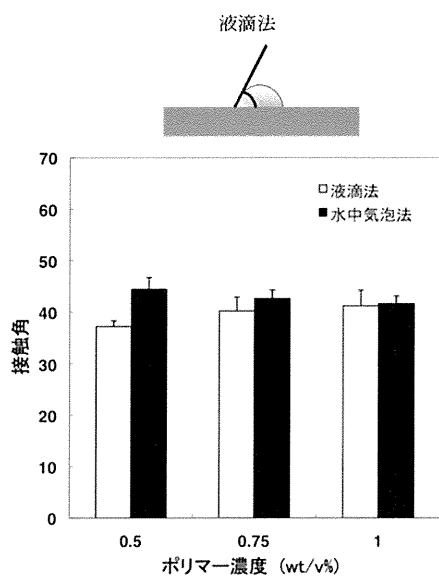


図 1. PMEa コーティング表面接触角のコーティング溶液濃度による影響 (2 種類の方法で測定)

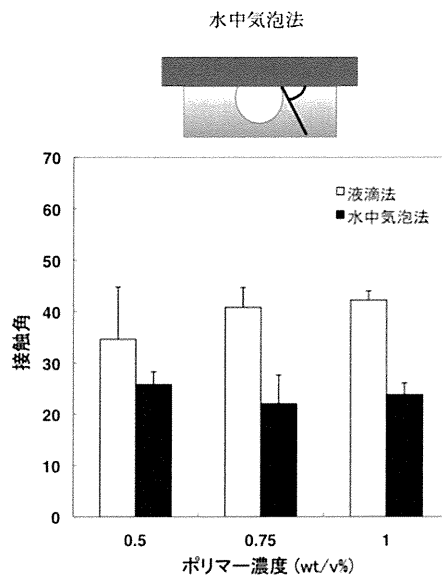


図 2. PHEMA コーティング表面接触角のコーティング溶液濃度による影響 (2 種類の方法で測定)

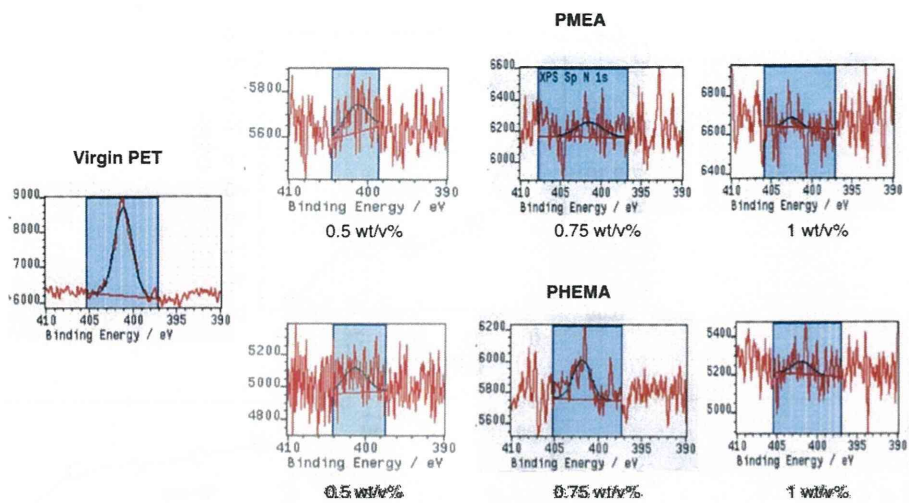


図3. 溶液濃度を変えて調製した PMEAs 及び PHEMAs コーティング表面における N 1s スペクトル

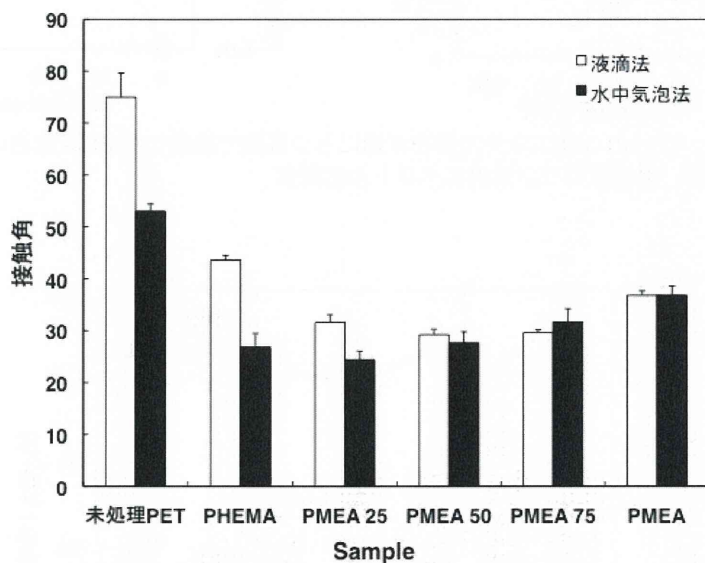


図4. 種々の MEA : HEMA 共重合体コーティング表面における接触角

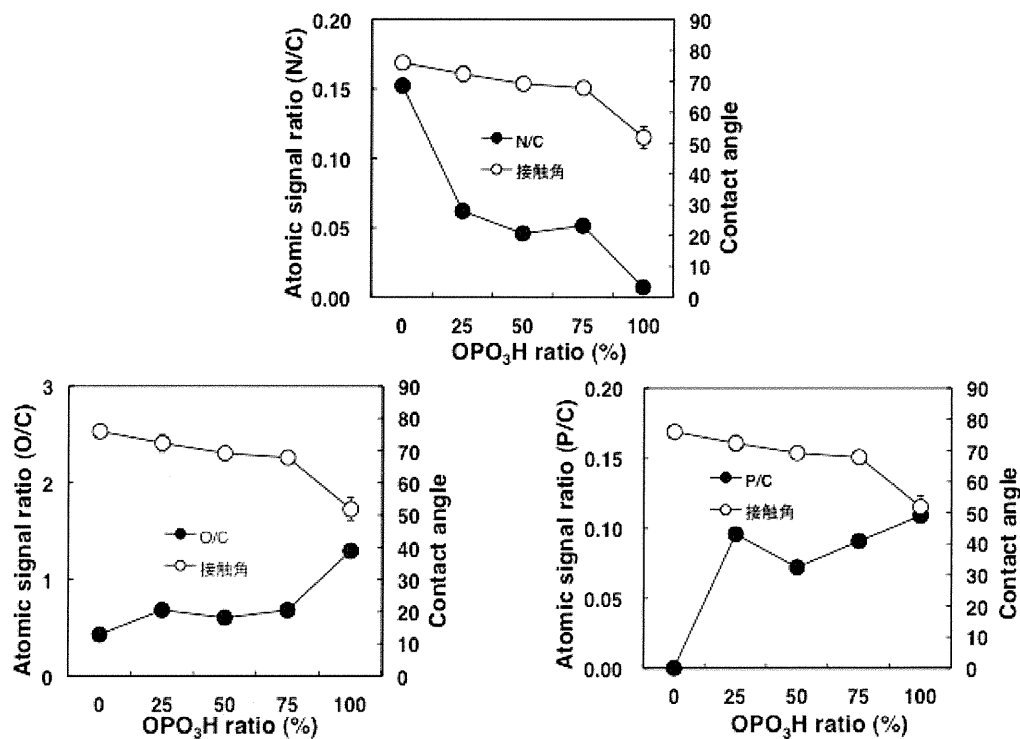


図5. アミノ基とリン酸エステル基を末端にもつ試薬で調製した SAM 表面の接触角変化と窒素、酸素及びリン元素スペクトル比変化

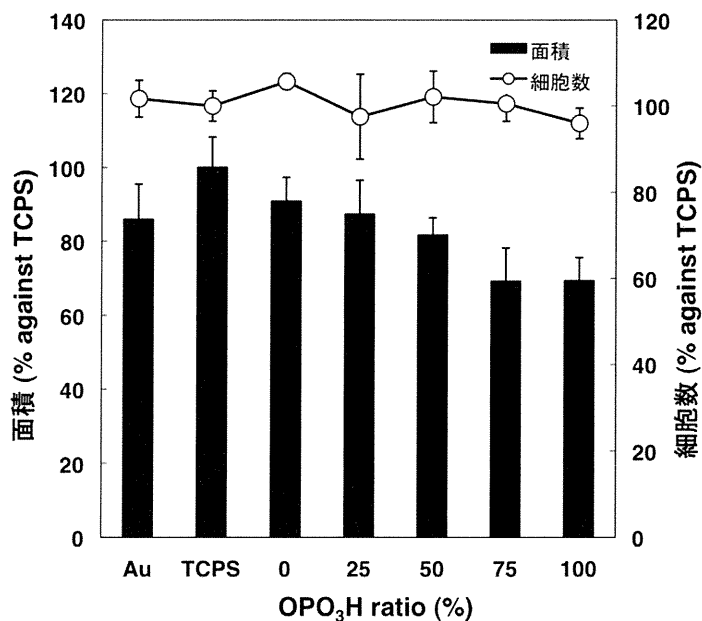


図6. アミノ基とリン酸エステル基からなる SAM 表面に播種 1 日後の V79 細胞接着数と細胞占有面積

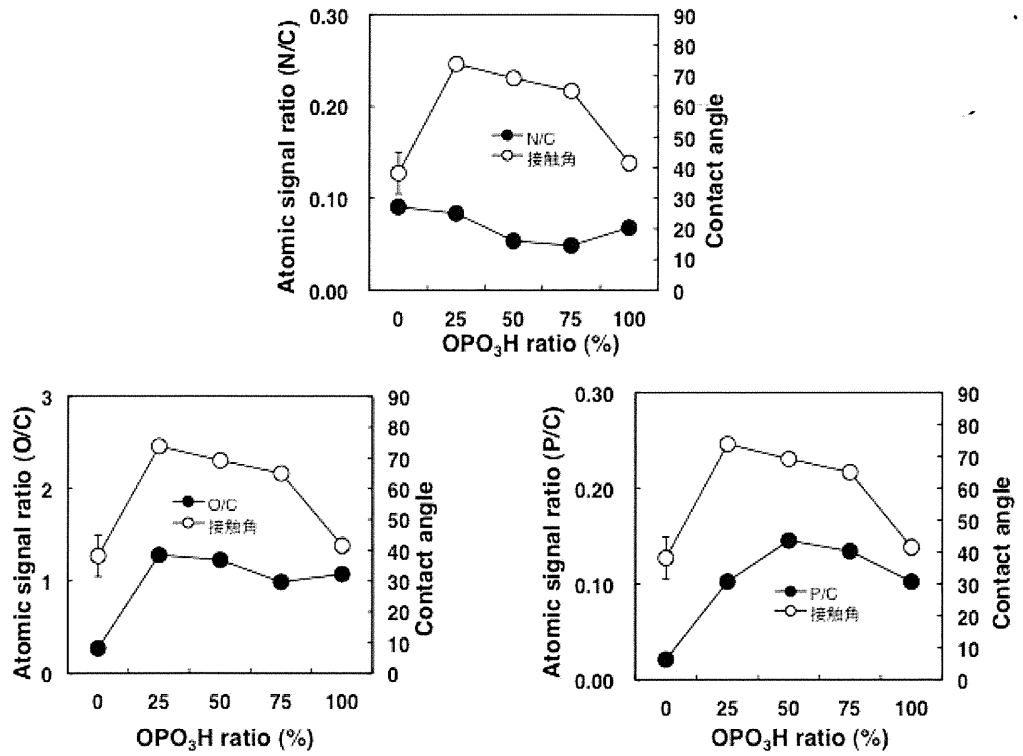


図7. 4級アミンとリン酸エステル基を末端にもつ試薬で調製した表面の接触角変化と窒素、酸素及びリン元素スペクトル比変化

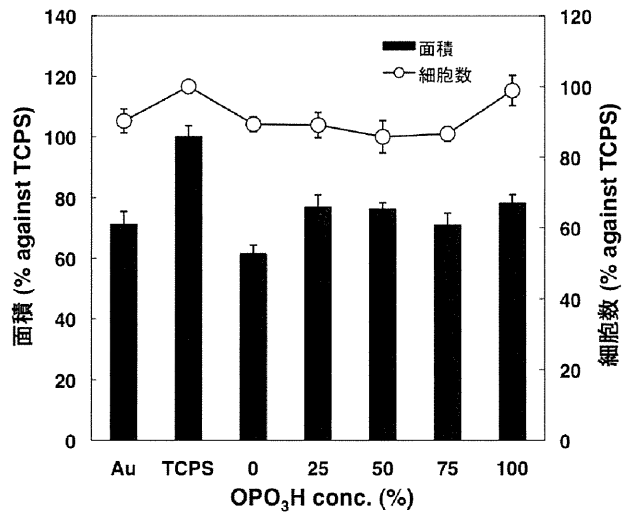


図8. 4級アミンとリン酸エステル基からなる表面に播種1日後のV79細胞接着数と細胞占有面積