

血液適合性高分子／水界面における高分子密度が機能に与える影響

上田, 智也

<https://hdl.handle.net/2324/4784569>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

令和3年度 学位論文

血液適合性高分子／水界面における
高分子密度が機能に与える影響

九州大学大学院工学府
物質創造工学専攻

上田 智也

目次

第一章 序論	1
1.1 緒言.....	2
1.2 抗血栓性表面の構築と既存の抗血栓性材料.....	3
1.2.1 血栓形成抑制型表面.....	3
1.3 特異な水和構造を有する高分子と抗血栓性.....	6
1.4 PMEA 類似高分子の界面構造と抗血栓性に関する研究.....	9
1.5 パッキング密度とタンパク質吸着に関する研究.....	11
1.6 高分子ブラシのグラフト密度に関する研究.....	12
1.7 本研究の目的.....	13
1.8 引用文献.....	14
第二章 グラフト密度を制御した PMEA の作製と基礎物性の評価	18
2.1 緒言.....	19
2.1.1 密度の制御手法.....	19
2.1.1.1 SAM.....	19
2.1.1.2 高分子ブラシ.....	19
2.1.2 高分子グラフト手法.....	20
2.2 グラフト用 PMEA (Thiol-terminated PMEA; PMEA-SH) の合成.....	22
2.2.1 MEA の可逆的付加-開裂連鎖移動重合 (PMEA-CTA の合成)	22
2.2.1.1 可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 重合.....	22
2.2.1.2 メトキシエチル基を有する RAFT 剤 (RAFT-ME) の合成.....	23
2.2.1.3 RAFT 重合による PMEA-CTA の合成.....	25
2.2.2 PMEA-CTA の主鎖末端還元 (PMEA-SH の合成)	26
2.3 合成した PMEA-SH の DSC 測定.....	28
2.3.1 DSC の原理.....	28
2.3.2 測定手法.....	28
2.3.3 水和構造の分類と定量方法.....	29
2.3.4 測定結果.....	29
2.4 密度を制御したグラフト PMEA 基板 (gPMEA) の作製.....	31
2.4.1 金基板の作製.....	31
2.4.1.1 AFM 観察・ELISA・血小板粘着試験用金基板.....	31
2.4.1.2 gPMEA のグラフト密度/水和量/運動性評価・タンパク質吸着挙動評価用金基板.....	32
2.4.2 PMEA の金基板へのグラフト条件の検討.....	32
2.4.2.1 PMEA-SH 溶液の調製.....	32
2.4.2.2 PMEA のグラフト反応 (濃度・時間の影響)	32
2.4.2.3 PMEA のグラフト反応 (濃度一定での反応時間の影響)	32

目次

2.4.3 gPMEA の σ の評価.....	33
2.4.3.1 QCM.....	33
2.4.3.2 gPMEA の σ の算出.....	33
2.4.3.3 測定結果および考察.....	34
2.4.4 gPMEA 表面の XPS による元素分析.....	36
2.5 gPMEA の基礎物性評価.....	38
2.5.1 接触角測定.....	38
2.5.2 gPMEA の水和量および運動性の評価.....	39
2.5.2.1 アドミッタンスシステムを導入した QCM (QCM-A) について.....	39
2.5.2.2 実験手法.....	41
2.5.2.3 結果および考察.....	42
2.5.3 gPMEA 表面の観察.....	45
2.5.3.1 AFM について.....	45
2.5.3.2 実験手法.....	47
2.5.3.2 結果および考察.....	48
2.6 結論.....	52
2.7 引用文献.....	53
第三章 密度の異なる gPMEA 表面の抗血栓性評価.....	57
3.1 緒言.....	58
3.1.1 血小板血栓形成.....	58
3.1.2 血液凝固.....	58
3.1.2.1 内因系凝固.....	59
3.1.2.2 外因系凝固.....	59
3.1.2.3 共通凝固因子.....	59
3.2 評価方法.....	61
3.2.1 QCM-A によるフィブリノーゲンの吸着量および変性度の評価.....	61
3.2.2 ELISA による gPMEA 上の吸着フィブリノーゲン中の γ 鎖露出度評価.....	63
3.2.3 血小板粘着試験.....	64
3.3 結果と考察.....	65
3.3.1 PMEA グラフト密度 (σ) とフィブリノーゲンの吸着量の関係.....	65
3.3.2 PMEA グラフト密度とフィブリノーゲンの吸着状態との関係.....	66
3.3.3 PMEA グラフト密度と血小板粘着数との関係.....	68
3.3.4 gPMEA の水和状態とフィブリノーゲンの吸着状態および血小板粘着との相関.....	69
3.4 結論.....	71
3.5 引用文献.....	74

目次

第四章	PMEA の密度と水和構造との関係	77
4.1	緒言.....	78
4.2	PMEA 類似高分子とグラフト用の溶液調製.....	79
4.3	グラフト高分子の水和量および運動性の評価.....	80
4.3.1	実験手法.....	80
4.3.2	結果及び考察.....	81
4.4	湿度変化に対するグラフト高分子への水和挙動の評価.....	84
4.4.1	実験手法.....	84
4.4.2	結果および考察.....	85
4.5	軟 X 線発光分光測手による水和状態の評価.....	91
4.6	結論.....	93
4.7	引用文献.....	94
第五章	gPMEA 表面上の血管内皮細胞の接着挙動の評価	96
5.1	緒言.....	97
5.1.1	血管内皮細胞 (HUVEC) の接着を制御する表面.....	97
5.1.1-1	HUVEC 接着リガンドを用いた研究.....	97
5.1.1-2	基板の弾性率による HUVEC の接着制御.....	98
5.1.2	本章の内容.....	98
5.2	実験.....	99
5.2.1	グラフト基板の作製.....	99
5.2.2	HUVEC の接着試験 (蛍光免疫染色)	99
5.2.3	ELISA による gPMEA 上の吸着タンパク質中の細胞接着部位の露出度の評価.....	100
5.3	結果および考察.....	101
5.3.1	蛍光免疫染色による gPMEA 上の HUVEC の接着数・接着形態の評価.....	101
5.3.2	gPMEA 上に吸着したタンパク質の細胞接着部位の露出度.....	103
5.3.3	gPMEA の水和量・運動性と HUVEC の接着挙動.....	106
5.4	結論.....	108
5.5	引用文献.....	109
第六章	総括	111

第一章

序論

第一章

1.1 緒言

少子高齢化社会にある我が国では、人々の健康や暮らしの質（Quality of Life :QOL）の向上に向けて医療技術が飛躍的に進歩している。特に、生体と接触した際に生体に悪影響を及ぼさない性質、「生体適合性」¹を有する材料は多くの医療製品開発に必要不可欠である。例えば、臓器の欠損や障害によって生命活動の支障がある場合、その臓器を人工的に代替する必要がある。代替するための医療機器には、血液透析膜や人工臓器、人工血管、人工関節などが挙げられ、多くの患者の治療や QOL の向上に欠かせない製品である。また、開胸・開腹手術に代わり、内視鏡やカテーテルを用いた患者の身体への負担が少ない、低侵襲型の治療法の開発により、早期回復が可能となり、経済的負担の軽減に貢献している。

一方、2020 年に大流行した新型コロナウイルス感染症（Coronavirus disease 2019; COVID-19）により、世界的に医療業界が危機に陥った。COVID-19 感染者の多くは呼吸器系に関する症状がある^{2,3}ことから、体外式膜型人工肺（Extracorporeal membrane oxygenation; ECMO）により処置される様子が頻繁に報道された。しかし、COVID-19 の世界的な感染拡大に伴い、ECMO が不足し、感染者に必要な処置が行えない事態が発生した。ECMO は血液からガス交換を行い血液中に酸素を取り込むため、多量の血液と接触する。血液は体内に異物が混入したときに素早く排除するための防御機構が備わっている。したがって、血液に材料を接触させると、連鎖的・共同的に様々な生化学反応が進行して血液が凝固し、血栓が形成される。この血栓形成反応は、生体防御反応の一種であり、我々が怪我をした際の止血などの役割を担う重要な生体機能である。しかし、材料表面に形成された血栓が脱離・循環し、細い血管で塞栓すると心筋梗塞や脳梗塞など極めて危険な副作用をもたらす可能性がある。そのため、ECMO のような血液接触型医療機器の表面には血栓を形成させない性質である抗血栓性の構築が求められており、現在も盛んに研究が行われている⁴。

医療機器に使用される材料には、コラーゲンやゼラチンのような天然由来のものも存在するが、その大半は高分子、セラミックス、金属が使用されている。中でも、高分子は成型加工の容易さや耐久性などの物理的性質や化学的安定性から工業的に汎用されている。実際に人工心肺や ECMO のような医療機器もその本体には高分子が使用されているが、その高分子自身では血栓の形成が惹起されるため、その表面を化学的・物理的に処理することで表面の機能を改善する必要がある。しかし、長期間の使用に耐え得る抗血栓性材料はなく既存の表面処理技術よりも優れた抗血栓材料の開発が求められている。本章ではまず既存の抗血栓性材料について述べる。次いで、抗血栓性発現の鍵となる高分子に水和した水の状態について述べた後、高分子/水界面での最近の研究をまとめ、本研究の目的を述べる。

第一章

1.2 抗血栓性表面 of 構築と既存 of 抗血栓性材料

血液が材料表面と接触すると、血栓形成に向けて様々な物理的・化学的反應が進行する。材料表面上での血栓形成に要する時間は、血液の流れなどの物理的條件にも影響されるが、大きくは材料表面の特性によって左右される。抗血栓性材料表面の分類としては、(1) 偽内膜形成型表面、(2) 血栓形成抑制型表面 (i: 凝固因子活性抑制表面、ii: 血小板活性化抑制表面、iii: i と ii の複合表面)、(3) 血栓溶解型表面などが挙げられる⁵が、本章では血栓形成抑制型表面に絞って説明する。

1.2.1 血栓形成抑制型表面

血栓形成抑制型表面は、材料設計という立場から主に「生理活性物質を利用した表面」と「生理活性物質を利用しない表面」の2つに大別される。

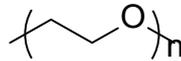
一つ目の生理活性物質を利用した表面は、生理活性物質を材料表面に固定化または表面から徐々に放出させることによって抗血栓性を獲得するものである⁶。生理活性物質としては、抗トロンビン作用を有する多糖類であるヘパリンや血小板活性化抑制剤であるプロスタグランジンなどが挙げられ、一部は実用化されている。

二つ目の生理活性物質を利用しない表面は、材料表面の特性を制御することによって抗血栓性を獲得する手法である。特に、血液中の多種多様な成分との相互作用が極めて小さい表面を構築することによって抗血栓性を向上する試みが数多く為されている。次にこれまでに報告されている抗血栓性材料の例について述べる。

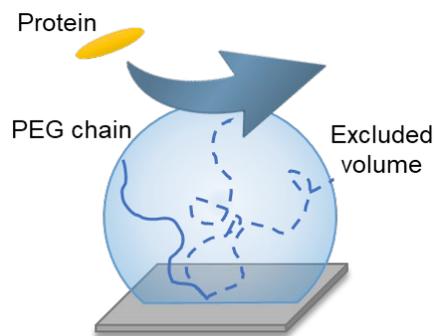
まず界面のマイクロ相分離の観点から抗血栓性材料の開発を行っている研究について述べる。ブロック共重合体やグラフト共重合体は各々のモノマーの組成により、様々なマイクロ相分離構造を示すことが報告されている⁷。また材料表面のナノ-マイクロスケールの不均質性が抗血栓性に重要な役割を果たしていることが指摘され、親水・疎水⁸、結晶・非晶⁹、表面の凹凸^{10,11}などの不均質構造を有するマテリアルの開発を通して、抗血栓性発現機構の解明や新規医療デバイスの開発が活発に行われてきた。Okanoらは親水性ユニットのポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート); PHEMA と疎水性ユニットのポリスチレン; PSt とのブロック共重合体 (HEMA-St) のマイクロドメイン構造と抗血栓性との関連について報告した¹²⁻¹⁴。HEMA-St ブロック共重合体表面に形成される 30-50 nm 程度の幅を有するラメラ型のマイクロ相分離構造表面において、血小板の粘着数が著しく減少し活性化も軽微であることを報告した。この血小板の粘着・活性化の抑制現象は HEMA および St の単一高分子とランダム共重合体では発現しなかったことから、ドメイン間での表面自由エネルギー差が重要であると推察されている。このように表面の不均質性が抗血栓性の発現の一つの因子であることが提唱されている一方で、高分子の官能基や主鎖骨格といった一次構造を制御することで抗血栓性を発現する高分子も存在する。次に、一次構造は異なるが抗血栓性を発現する高分子についての研究を述べる。

第一章

ポリエチレングリコール (PEG) (**Figure 1-1**) はエチレンオキシドの開環重合により合成された水溶性高分子であり、有機溶媒にもよく溶解することに加えて、低毒性、安定性、潤滑性を有している。



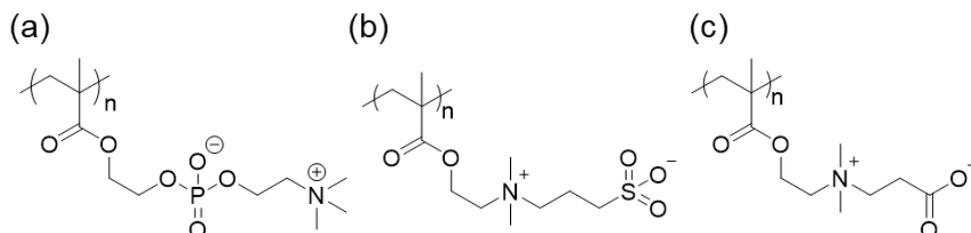
PEG はタンパク質の吸着や細胞の接着を抑制すること、また水中で安定に分散することから幅広い分野で使用されている。PEG が固定された表面は、水との親和性が高いため水環境下で高含水の層を形成し、この層の存在がタンパク質吸着に伴うエネルギー障壁を生み出し、非特異的なタンパク質吸着を抑制することが知られている^{15,16}。さらに、PEG 鎖は、柔軟性に富んでいるため、PEG 鎖 1 本が占める空間体積である排除体積は非常に大きく、タンパク質の吸着に伴うエントロピー減少による不安定化が大きいため、タンパク質の吸着を抑制する (排除体積効果) と考えられている (**Fig. 1-2**)^{15,16}。



また PEG は前述したように水溶性高分子であるため、抗血栓性材料として用いる場合は材料表面に共有結合または非水溶性高分子と共重合させることによって表面に固定化する手法が用いられている。Nagasaki らのグループは、PEG の鎖長やグラフト密度 (高分子鎖が固定された時の密度) を変えた際の各種タンパク質の吸着について報告している^{17,18}。PEG 鎖の密度が低い場合、PEG 鎖間に入り込めるようなサイズの小さいタンパク質の吸着が起こる。5,000 g/mol と分子量の大きい PEG ブラシでは、PEG 鎖自身の排除体積によりグラフトできる密度が低下し、PEG 鎖間にアルブミンのようなサイズの小さいタンパク質が吸着することが明らかにされた。そこで Uchida らは、異なる分子量の PEG (2,000、5,000 g/mol) を混合して高分子量成分の隙間を低分子量成分で埋めるような PEG ブラシを作製したところ、サイズの小さいタンパク質の吸着もほぼ完全に抑制したことを報告している¹⁹。次に PEG と同等な抗血栓性を有する親水性高分子である双性イオン型高分子について述べる。

第一章

双性イオン型高分子とは、正電荷と負電荷の両電荷を有するベタイン構造からなるモノマーを重合して合成された高分子である。双性イオン型高分子は水との静電相互作用により安定な水和層を形成でき、タンパク質の吸着を抑制すると提唱されている^{20,21}。代表的な双性イオン型高分子として、ポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン); PMPC、ポリ(スルホベタインメタクリレート); PSBMA、ポリ(カルボキシメタクリレート); PCBMAなどが挙げられる (Figure 1-3)。



PMPCは、生体膜の構成成分であるリン脂質に含まれるホスホリルコリン基を側鎖に有した高分子であり、Kadomaらのグループによって初めて合成された²²。またNakabayashiおよびIshiharaらによって大量合成の経路が確立され、現在は抗血栓性をはじめとする生体親和性を有する高分子として広く知られている^{23,24}。PMPCは補助人工心臓や血管拡張ステント、コンタクトレンズなど様々な医療デバイスに用いられている。PMPCを固定化した表面では、水環境下での潤滑性が上昇し、摩擦係数が減少することから、人工関節にも用いられている²⁵。PMPCがタンパク質との相互作用を小さくし、さらに細胞の粘着や活性化および凝集も抑制する要因として、含水時にPMPC表面に存在する水分子が疎水性水和によって水のクラスターを形成する働きを促し、PMPC表面が自由水様の運動性の高い水分子 (free-water) で覆われることで材料と水との界面を不確かにし、生体から材料として認識されないためだと提唱されている²⁶。一方、Nagasawaらは和周波発生分光装置を用いて水和状態について解析したところ、自由水とは異なり高分子と強く相互作用する水分子がタンパク質の吸着抑制に重要であると結論付けている²⁷。このように水中での高分子の動きやすさや高分子と水との相互作用がタンパク質の吸着抑制に寄与するとの報告は多く存在している。

Whitesidesらは、生体成分の吸着を抑制するための表面の特性として次の4つの条件を提唱している²⁸。

- (i) 親水性であること
- (ii) 電氣的に中性であること
- (iii) 水素結合受容性であること
- (iv) 水素結合供与性ではないこと

である。前述したPEGやPMPCはこの条件に当てはまっており、他にもこの条件を満たす表面の場合、概ねタンパク質の吸着を抑制する。以上の4つの条件を満たさない表面の場合

第一章

合、静電相互作用や疎水性相互作用によって、非特異的な吸着が生じる。しかし、これらの条件は経験則から導き出されたものであり、実際に条件を満たしても必ずしも生体成分の非特異的な吸着を抑制する表面を構築できるとは限らない。以上のように抗血栓性や非タンパク質吸着に関与する要因として様々な仮説が存在するが相違する事例^{29,30}も存在しており、抗血栓性発現機構についての明確な見解は未だに得られていない。

高分子が生体成分と接触した際、初めに生体成分の大部分を占める水分子が高分子表面に吸着し、その後タンパク質の吸着・変性、次いで細胞などが接着・伸展が起こる^{31,32}ことから、抗血栓性高分子がその機能を発現する機構について、高分子中の水和構造に着目した研究が盛んに行われている³³⁻³⁵。Tanakaらは高分子中の水和構造について示差走査熱量計 (Differential Scanning Calorimetry; DSC) によって解析し、優れた抗血栓性を有するポリ(2-メトキシエチルアクリレート) ; PMEALには特殊な水分子の相転移挙動が観測されたことを報告した³⁶。PMEAは2000年にTanakaらによって開発された高分子であり、合成が比較的容易であり、非水溶性、タンパク質吸着・変性の抑制、血小板の粘着・活性化の抑制、低毒性などの特徴を有しており、優れた抗血栓性塗布材として世界的に注目を集めている³⁷。次節にPMEAおよび類似高分子の水和構造についてこれまでに明らかにされたことを述べる。

1.3 特有な水和構造を有する高分子と抗血栓性

含水高分子中の水和構造を解析する手法として、DSC、核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) 分光法、振動分光法 (赤外 (Infrared spectroscopy; IR) ・和周波発生など)、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy; AFM)、誘電緩和法、X線・中性子散乱法などが知られている。PMEAの抗血栓性発現機構の解明を目指して、特にDSCや*in situ* ATR-IR、固体NMR (²H NMR、¹³C NMR) などを用いた研究が盛んに行われた。Tanakaらは含水したPMEAをDSCで測定したところ-40°C付近に低温結晶形成する水が観測された。またDSC測定の結果から、PMEAと相互作用する水は次の3種類に分類された。低温結晶形成した水を「中間水 (Intermediate water; IW)」、純水と同様の凍結・融解挙動を示す水を「自由水 (Freezing water; FW)」、0°C以下でも凍結しない水を「不凍水 (Non-Freezing water; NFW)」と定義した。またこれらの各種水の量は含水率の増加に伴いNFW、IW、FWの順に形成され、NFWおよびIWは一定の含水率で飽和することが明らかになっている³⁶。さらに、Hatakeyamaらによって前述したPEG³⁸やPMPC³⁹などの既存の抗血栓性高分子にもIWを含む各種水が存在することが報告されている。Tanakaらは、高分子中の水和構造と抗血栓性との関係性を解明するため、MEAとHEMAの共重合体 poly(MEA-co-HEMA)を合成し、共重合比を変更した高分子について、DSCによる水和構造の解析と血小板粘着数の評価を行った。その結果、HEMAの比率が高くなるほどIWの量は減少し、血小板の粘着数も増加した⁴⁰。さらにPMEAとPMEA類似高分子であるPHEMA、ポリエチルアクリレート; PEA、ポリ(ヒドロキシエチルアクリレート); PHEA、ポリ(2-メトキシエチルメタクリレート); PMEMA、ポリ(*n*-ブチルアクリレート); PBA、ポリ(2-フェノキシエチルアクリレート);

第一章

PPhEA、ポリ(2-エチルヘキシルアクリレート) ; PEHA では、PMEA 類似高分子は血小板が粘着したのに対して、*IW* が観測された PMEA は血小板の粘着を顕著に抑制した⁴⁰。このことから、*IW* の存在が抗血栓性の発現に重要な要因であると言える。また、*FW* や *NFW*、*IW* は DSC だけでなく他の分析手法によっても観測されており、次に各分析法の研究について述べる。

Morita らは、各種水がどのように PMEA と相互作用しているかを官能基レベルの分解能を有する *in situ* ATR-IR により解析を行った⁴¹。その結果、含水率を増減させると、O-H 伸縮振動の領域に 3 種の異なるピークトップ (3600 cm^{-1} 、 3400 cm^{-1} 、 3200 cm^{-1}) が観測された。 3600 cm^{-1} の水はカルボニル基と、 3400 cm^{-1} の水はメトキシ基由来のピークシフトと連動しており、DSC の解析結果と対応させると *NFW* はカルボニル基 (3600 cm^{-1}) と、*IW* はメトキシ基 (3400 cm^{-1}) の酸素原子と相互作用した水だと推察されている。さらに、Morita らは、PMEA モノマーユニットのモデル化合物として 2-メトキシエチルアセテート (MEAc) の水溶液の IR 測定を行った結果、含水率 9.0 wt% の PMEA のスペクトルと 40 wt% の MEAc 水溶液のスペクトル形状が一致した。これは MEAc ユニット当たり 2.8-4.4 分子の水分子が存在すると計算でき、MEAc モノマーユニット当たり 2.85 分子の水分子が存在しうることになる。しかし、PMEA の飽和含水率は 9 wt% であり、また乾燥時には無色透明の PMEA が含水時には白濁することから PMEA 中の水和状態は不均一であり、相分離して微小な水のクラスターを形成して、水が濃縮された相が存在していると推察される。Tsuruta はこの含水 PMEA の不均一性についてナノプレートモデルを用いた議論について報告している (Fig. 1-4)⁴²。

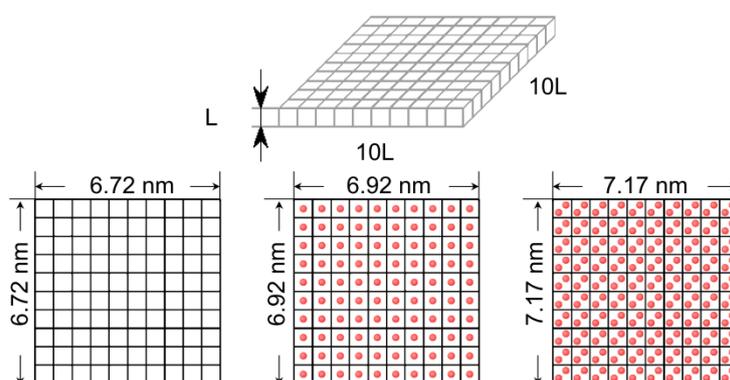


Figure 1-4. Nano-plate model for hydrated PMEA. This figure sited from Ref. 39.

Miwa らは抗血栓性を発現する合成高分子中の水の動力的挙動を調べるために、固体 ^2H NMR 測定による含水 PMEA の水分子の運動性を解析した⁴³⁻⁴⁵。 ^2H NMR のスピン-スピン緩和時間測定により、 37°C での緩和時間は含水率が高くなるにつれて増加し、水の運動性が向上していることが分かった。また -5°C における緩和時間測定の結果、含水 PMEA 中の *FW* は凍結するため、*NFW* と *IW* のみの交換反応が起きていると推察された。また 37°C での水

第一章

分子の運動性と血液凝固系の活性化指数である TAT : Thrombin-AntiThrombin complex 生産量の相関性を検討した結果、水分子の運動性が高いと TAT 生産量が減少することが明らかとなった。また -5°C での緩和時間でも同様な傾向が得られたことから、TAT 生産量には *FW* ではなく *IW* や *NFW* などの高分子鎖に束縛された水の分子運動性や量が大きく影響を及ぼすことが示唆された⁴³。さらに、水分子の運動性は水分子が相互作用している高分子鎖の運動性に大きく依存すると考え、高分子鎖の運動性を ^{13}C NMR により評価した。その結果、PMEA 鎖は、主鎖・側鎖ともに 10^8 Hz と非常に高い運動性を有することが明らかとなった。上述した分析手法による結果を踏まえ、Tsuruta は各種水 (*FW*、*IW*、*NFW*) の定義を次のように行っている⁴²。

- 1) *FW* : 0°C で凍結する水で相関時間は $10^{-12} \sim 10^{-11}$ s
- 2) *IW* : 0°C 以下で凍結する水で相関時間は $10^{-10} \sim 10^{-9}$ s
- 3) *NFW* : -100°C 以下でも凍結しない水で相関時間は $10^{-8} \sim 10^{-7}$ s

以上のように含水時における PMEA 中の水分子の水和構造や運動性が抗血栓性発現に関与しており、特に *IW* と呼ばれる特徴的な水の存在は、材料の抗血栓性発現に極めて重要な因子であると考えられる (Fig. 1-5)

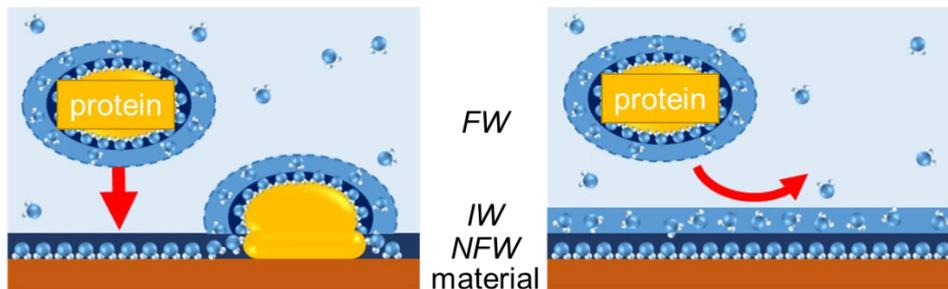


Figure 1-5. Schematic image of the role of water at the material/water interface.

ここまで含水時の PMEA 中の *IW* が抗血栓性と密接に関係していることを述べてきた。しかし、PEG や PMPC はタンパク質や細胞の吸着・接着を抑制することが知られている一方で、PMEA は血小板や赤血球などの血球系細胞の粘着を抑制し、正常細胞やがん細胞の接着を促すという、これまでの既存の高分子にはない特徴的な性質を有することが報告された⁴⁶。Sato らは、PMEA と PMEA 類似高分子である poly(tetrahydrofurfuryl acrylate); PTHFA、polyethylene terephthalate; PET 上で血小板、正常細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells :HUVECs)、大動脈平滑筋細胞 (Aortic Smooth Muscle Cells :AoSMCs) の接着数を比較し、血小板粘着を抑制する高分子上においても HUVECs、AoSMCs は接着することを報告している⁴⁷。人工血管のように、抗血栓性という血小板の粘着を抑制する性質が必要な一方で HUVEC のような内皮細胞は接着する表面が必要な医療機器には、細胞選択性の付与が必要不可欠である。これまで細胞の選択性を発現するためには、非特異的な吸着を抑制する高分子 (PEG や PMPC など) に目的とする細胞のリガンド

第一章

となるような抗体やペプチドを修飾する手法が用いられており、現在も盛んに研究が行われている。例えば、Liu らはタンパク質などの生体成分の非特異的吸着を抑制するポリエチレングリコールモノメタクリレート; PEGMA に HUVEC の接着リガンドである [Arg-Glu-Asp-Val (REDV)] ペプチドを導入し、HUVEC の選択的な接着性を達成したことを報告している⁴⁸。PMEA 類似高分子のように、抗体やペプチドなどの細胞表面のレセプターに対するリガンドを用いずに、合成高分子のみで細胞選択性を発現する機構を解明することができれば、血小板は粘着させず血管内皮細胞を接着させるという 2 つの機能を併せ持つ高分子材料の設計指針を確立することができ、現在難題とされている内径 4 mm 以下の小口径人工血管の開発に革新的な発展をもたらすことが期待できる。

これまで PMEA や PMEA 類似高分子にて血小板の粘着を抑制し、血管内皮細胞は接着する機構については、*IW* の量が重要であることが報告されてきた⁴⁹。しかし、*IW* の直接的な役割は未だに明らかになっておらず、PMEA をはじめとする PMEA 類似高分子の選択的な細胞接着性の発現機構は不明瞭な部分も多く残されている。この機構の解明のためには、高分子と生体成分が接触するバイオ界面での現象をマイクロ・ナノレベルで理解することが重要であると考えられる。

1.4 PMEA 類似高分子の界面構造と抗血栓性に関する研究

1.3 節で述べたように、これまで PMEA や PMEA 類似高分子の抗血栓性発現機構の解明を目指し、水和構造に着目した様々な解析が行われてきた。しかし、PMEA 類似高分子は抗血栓性を有しながら血管内皮細胞は接着する選択的な細胞接着性を有しており、その発現機構の解明には至っていない。また、高分子と生体成分との相互作用のほとんどはそれらの界面で起こるため、高分子の優れた機能を発現するためには表面の構造や物性制御が極めて重要な要素となり、バルク特性が優れていたとしても、界面特性が劣ればバイオマテリアルとして応用することはできないと言える。そこで選択的な細胞接着性の発現機構の解明とともに、既存のものより優れた高分子材料を設計するためにも、バルク全体の水和構造を解析するだけでなく、高分子に水分子やタンパク質・細胞などが接した際の界面、バイオ界面での詳細な解析が求められている。

最近、Murakami らによって PMEA やその類似高分子とリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Salts; PBS) との界面の観察が行われた⁵⁰。スピコーティング法により、PET 基板上に PMEA や PMEA 類似高分子を製膜した高分子表面の観察を AFM で行ったところ、乾燥時には全ての高分子薄膜表面はほぼ平滑であった一方で、水や PBS などの水環境下では、*IW* を有する合成高分子と *IW* をほぼ有さない合成高分子では、界面構造の形状が大きく異なっていた。特に、*IW* を有する PMEA では、微細構造の凸部のサイズや配列が比較的規則的な形状を自発的に形成していることが確認された。一方、*IW* をほとんど有さない PBA では、微細構造の凸部のサイズや配列が不規則な形状を形成していることが確認された。

さらに、Murakami らは、PMEA 類似高分子で室温付近に下限臨界温度 (Lower Critical

第一章

Solution Temperature; LCST) を有する温度応答性高分子、poly[2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate]:PMe2MA と PBS との界面を AFM により観察した⁵¹。その結果、LCST 付近で微細構造が可逆的に変化した。また、ポリスチレンブラシ/シクロヘキサン界面の温度変化を AFM により観察した結果、高分子ブラシ/溶媒界面においてバルクでの高分子が有する相転移温度付近で高分子ブラシと溶媒との間で相分離が起きることを発見した⁵²。Murakami らは、この高分子ブラシ/溶媒界面の相分離現象を面内相分離と定義し、この面内相分離は高分子ブラシが基板に固定されていることによる自由度の制限から、面内方向での相分離により分子鎖スケールでのドメインを形成すると推察している。この現象は Norizoe らのシミュレーションの研究による結果からも明らかとなっている⁵³。以上のことから、PMEA や PMEA 類似高分子と水との界面で発現する微細構造は、高分子と水の相分離によって形成した Polymer-rich 相と Water-rich 相から成っていると推察されている (Fig. 1-6)。さらに、Murakami らは高分子/水界面で形成される微細構造 (Polymer-rich 相と Water-rich 相) と抗血栓性との相関を解明するために、吸着フィブリノーゲンの分布観察^{50,54} および PMe2MA の温度変化に伴うタンパク質吸着・血小板粘着の評価⁵¹ を行っており、吸着フィブリノーゲンは高分子密な領域またはその境界部分に観察され、PMe2MA の界面が一面に Water-rich 相で覆われたことによってタンパク質吸着および血小板粘着を顕著に抑制したことを報告している。このことから、高分子/水界面の微細構造 (Polymer-rich 相、Water-rich 相) は抗血栓性に大きく関与しており、特に *IW* を有する PMEA 系高分子の Water-rich 相は *IW* に相当する水を多く有し、タンパク質吸着を抑制していると推察できる。実際に、PMEA/PBS 界面で形成される Polymer-rich 相・Water-rich 相と血栓形成の足場タンパク質であるフィブリノーゲンとの相互作用力を AFM により測定した結果、Water-rich 相で、PMEA とフィブリノーゲン間での引力は観察されず緩やかな斥力のみが観察され、フィブリノーゲンの吸着を抑制することが明らかとなった⁵⁴。

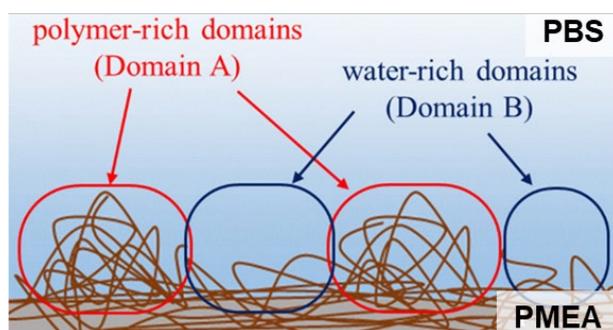


Figure 1-6. Schematic image of the nanostructure formed by phase separation of polymer and water at the interface. This figure sited from Ref. 54.

第一章

以上のように Polymer-rich 相と Water-rich 相で、フィブリノーゲンの吸着挙動が異なった要因について、各領域の水分子が重要な役割を担っていると推察している。しかし、この Water-rich 相がなぜフィブリノーゲンの吸着を抑制するかについては明らかにされていない。ここで、PMEA の微細構造が PMEA と水の相分離によって生じているのであれば、Polymer-rich 相と Water-rich 相では、1 体積あたりに占める高分子鎖の数 (PMEA の密度) が異なり、Polymer-rich 相は水和されにくく、Water-rich 相は水和されやすい状態であると推察した。さらに、PMEA の IW の量は、飽和に達するまで含水率の増加に伴って増加することから³⁶、水和されにくい Polymer-rich 相での IW の量は Water-rich 相よりも少ないと考えられる。以上のことから、高分子への水和のしやすさには高分子鎖自身の極性の他にも高分子鎖の密度も関与することが考えられ、水和量や IW などの水和構造が高分子鎖の密度によって変化し、抗血栓性や細胞の接着性に影響すると推察した。次に分子のパッキング密度とタンパク質吸着との関係性についての既存の研究について述べる。

1.5 パッキング密度とタンパク質吸着に関する研究

Whitesides らのグループは、Au と Ag 上に異なる分子密度のオリゴエチレングリコール自己組織化単分子膜 (OEG-SAM) を作成し、フィブリノーゲンの吸着挙動と各 OEG-SAM の特性との関係性を評価した⁵⁵。その結果、Au では主に螺旋形の OEG 鎖が存在しており、フィブリノーゲンの吸着を抑制していた。一方、Ag では OEG 鎖は高密度に充填されており、すべての OEG 鎖が「トランス型」であり、フィブリノーゲンは吸着していた。以上のことから、彼らはフィブリノーゲンの吸着の抑制には OEG 部分のコンホメーションが重要であることを明らかとした。また彼らは界面に存在する水分子の結合数がタンパク質吸着抑制に影響することも示唆していた。Hayashi らのグループは前述の結果をより詳細に解析するため、パッキング密度 (PD molecules/nm²) の異なる SAM に対して表面間力測定と表面増強赤外吸収 (Surface-Enhanced Infrared Absorption; SEIRA) 分光測定を行った²⁹。Au 上に形成した OEG-SAM (PD = 3.5±0.10 molecules/nm²) 間の表面間同士には約 10 nm から斥力が働いており、水素結合ネットワークを破壊するエタノールを加えた際にはこの斥力が確認できなかったことから、界面近傍には約 5 nm の界面水が存在し、斥力が生じた理由として界面水同士によって物理障壁によるものであると考察している。一方、Au よりも SAM のパッキング密度が高い Ag 上に形成した OEG-SAM (PD = 4.6±0.10) 上では界面水による斥力は観察されなかった (Fig. 1-7)。また、SEIRA 測定の結果から各 SAM で水和構造の状態が異なっていることが明らかとなっており、金表面上の OEG-SAM は他の SAM に比べて、弱い水素結合状態にあり、 IW のような水和構造を形成していることが明らかとなった。このことから、SAM のパッキング密度によって界面に存在する水分子の水素結合状態は変化し、SAM と生体成分との相互作用を決定する重要な役割を果たすことが示唆されている。以上のように分子の密度は界面の水分子の状態を変化させ、タンパク質の吸着挙動に影響を与える。同様に高分子の場合でも密度に関する研究は多数存在する。1.6 節にグラフト高

第一章

分子の特徴を述べた後、高分子の密度とタンパク質の吸着挙動や細胞の接着に関する研究について述べる。

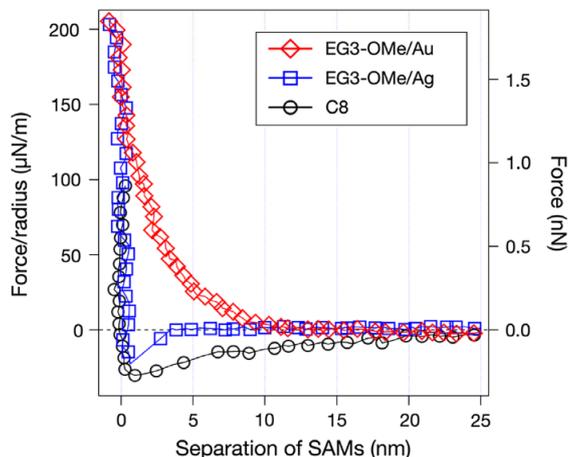


Figure 1-7. Force separation curves recorded for symmetric systems of the SAMs in PBS solution. This figure sited from Ref. 26.

1.6 高分子ブラシのグラフト密度に関する研究

材料表面に高分子を化学的または物理的に固定化する表面グラフト法は、材料表面の濡れ、接着、摩擦、防汚性などの表面特性を改質する手法として知られている。グラフト法を用いることで下地の材質はそのままにして表面特性だけグラフトした高分子鎖の性質を反映することができる。

Taylor らは、分子量とグラフト密度を制御した PEG ブラシを用いてタンパク質吸着の挙動について調査した⁵⁶。その結果、PEG 分子量を 2000 から 20000 g/mol へと増加させると、タンパク質の吸着量は減少した。この要因について筆者らは PEG ブラシによる表面被覆率の増加に伴い、基材表面へタンパク質が吸着するのを妨げる効果が増加するためだと結論付けた。また PEG 鎖のグラフト密度の増加に伴ってタンパク質の吸着を抑制することを報告している。

Nagasaki らは、異なる分子量の PEG と PMPC を用いてグラフト密度を制御した高分子ブラシを作製し、タンパク質の吸着挙動の解析を行った¹⁸。PEG では、分子量の増加とともにグラフト密度は低下 (0.43 から 0.15 chains/nm²) し、タンパク質の吸着量は分子量 5,000 g/mol, PEG 5 k (グラフト密度 0.3 chains/nm²) で最小値を示した。この要因として、PEG 5 k では PEG 鎖自身の高い排除体積と、表面の PEG 鎖密度とのバランスが最適であるため、タンパク質吸着を抑制すると考えられている。一方 PMPC では、グラフト密度は分子量に依存せずほぼ一定の値 (0.1 chains/nm²) を示し、タンパク質の吸着量は分子量の増加に伴って減少することを明らかとした。

このように高分子の密度は、タンパク質の吸着や細胞の接着に大きく影響を与えるため、

第一章

PMEA/水界面で発現する Polymer-rich 相と Water-rich 相などの密度の違いによる影響を解明することで、PMEA の抗血栓性と細胞選択性の発現機構の解明に繋がるとともに、従来の 1 次構造の制御による水和構造の制御ではなく、新しい材料設計指針への展開に期待できる。

1.7 本研究の目的

PMEA/水界面では自発的に密度の異なる領域 (Polymer-rich 相・Water-rich 相) が形成され、その密度の違いによってタンパク質の吸着や血小板などの細胞の接着が異なることが予想されている。本博士論文では PMEA の Water-rich 相でなぜフィブリノーゲンなどのタンパク質の吸着を抑制するのかを解明するとともに、PMEA の密度と抗血栓性・内皮細胞接着性との関係を明らかにすることを目的としている。このとき、PMEA の特性を保持したまま密度を制御することが重要であるため、本博士論文では高分子を基板上にグラフトして PMEA の密度を制御したモデル基板を用いた。また、密度を制御した PMEA を用いることで、PMEA/水界面で自発的に形成する微細構造が PMEA と水の相分離によって生じる仮説を証明できると考えた。また、Polymer-rich 相・Water-rich 相と各種水和水、特に *IW* との関係性についてはこれまで明らかにされていないため、密度を制御した PMEA および *IW* の量が異なる PMEA 類似高分子を用いて評価することで、PMEA の密度と *IW* との関係性について明らかにすることを目的とした。さらに、密度の異なる PMEA 上での HUVEC の接着挙動を評価することで、血小板は粘着させず HUVEC は接着する界面の提案と PMEA の細胞選択性の発現機構の解明を目指した (Fig. 1-8)。

以下に本博士論文の構成を述べる。

第二章では、密度を制御したグラフト PMEA の作製と基礎物性の評価について述べた。

第三章では、作製したグラフト PMEA の抗血栓性の評価について述べた。

第四章では、PMEA 類似高分子及び PMEA の密度と水和構造との関係について述べた。

第五章では、密度の異なる PMEA 上での血管内皮細胞の接着挙動について述べた。

第六章では、各章で得られた結論についてまとめ、総括した。

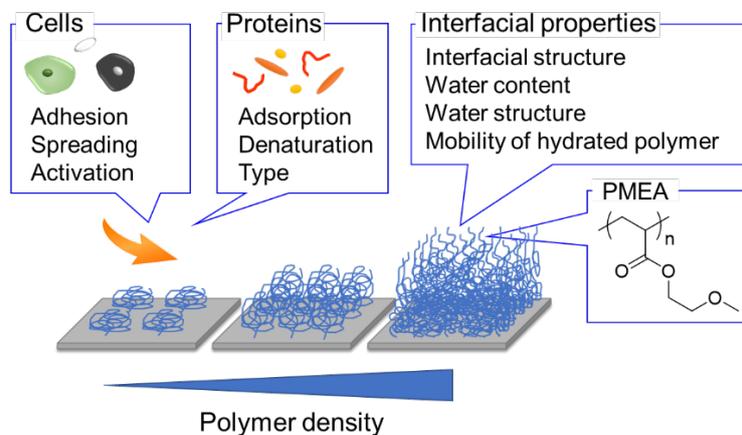


Figure 1-8. Concept image of this doctoral research.

1.8 引用文献

1. Vert, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* **84**, 377–410 (2012).
2. Huang, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **395**, 497–506 (2020).
3. Wang, D. *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **323**, 1061–1069 (2020).
4. Bikdeli, B. *et al.* COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up. *J. Am. Coll. Cardiol.* **75**, 2950–2973 (2020).
5. Ratner, B. D., Horbett, T. A. & Wagner, W. R. *Evaluation of Blood–Materials Interactions. Biomaterials Science* (Elsevier, 2020). doi:10.1016/b978-0-12-816137-1.00059-3
6. Byun, S. M. *et al.* The Biological Activity of Antithrombotic Agents Immobilized on Polymer Surfaces. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **416**, 513–524 (1983).
7. Darling, S. B. Directing the self-assembly of block copolymers. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 1152–1204 (2007).
8. Kataoka, K., Sakurai, Y. & Tsuruta, T. Microphase separated polymer surfaces for separation of B and T lymphocytes. *Die Makromol. Chemie* **9**, 53–67 (1985).
9. Ikeda, Y., Kohjiya, S., Yamashita, S., Hayashi, H. & Okuno, T. Separated Microphase Structure and Mechanical Properties of Blood-compatible Polyurethaneureas. *Nihon Reoroji Gakkaishi* **18**, 12–17 (1990).
10. Rechendorff, K., Hovgaard, M. B., Foss, M., Zhdanov, V. P. & Besenbacher, F. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir* **22**, 10885–10888 (2006).
11. Linneweber, J. *et al.* The effect of surface roughness on activation of the coagulation system and platelet adhesion in rotary blood pumps. *Artif. Organs* **31**, 345–351 (2007).
12. Okano, T. *et al.* Effect of hydrophilic and hydrophobic microdomains on mode of interaction between block polymer and blood platelets. *J. Biomed. Mater. Res.* **15**, 393–402 (1981).
13. Abe, K., Suzuki, K., Okano, T., Sakurai, Y. & Horie, T. Good Preservation of Ultrastructure of Plasma Membrane Glycocalyx of Platelet Adhered onto HEMA-St ABA Type Block Copolymer Surface. *Japanese J. Artif. Organs* **24**, 52–58 (1995).
14. Ito, E. *et al.* Active platelet movements on hydrophobic/hydrophilic microdomain-structured surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 148–155 (1998).
15. Jeon, S. I., Lee, J. H., Andrade, J. D. & De Gennes, P. G. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. *J. Colloid Interface Sci.* **142**, 149–158 (1991).

第一章

16. Ngo, B. K. D. & Grunlan, M. A. Protein Resistant Polymeric Biomaterials. *ACS Macro Letters* **6**, 992–1000 (2017).
17. Nagasaki, Y. Construction of a densely poly(ethylene glycol)-chain-tethered surface and its performance. *Polym. J.* **43**, 949–958 (2011).
18. Yoshimoto, K., Hirase, T., Madsen, J., Armes, S. P. & Nagasaki, Y. Non-fouling character of Poly[2-(methacryloyloxy)ethyl Phosphorylcholine]- modified gold surfaces fabricated by the ‘grafting to’ method: Comparison of its protein resistance with Poly(ethylene glycol)-modified gold surfaces. *Macromol. Rapid Commun.* **30**, 2136–2140 (2009).
19. Uchida, K. *et al.* Creation of a mixed poly(ethylene glycol) tethered-chain surface for preventing the nonspecific adsorption of proteins and peptides. *Biointerphases* **2**, 126–130 (2010).
20. Ishihara, K., Nomura, H., Mihara, T., Kurita, K. & Iwasaki, Y. Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 323–330 (1998).
21. Shao, Q. & Jiang, S. Molecular understanding and design of zwitterionic materials. *Adv. Mater.* **27**, 15–26 (2015).
22. Kadoma, Y., Nakabayashi, N., Masuhara, E. & Yamauchi, J. Synthesis and hemolysis test of the polymer containing phosphorylcholine groups. *Kobunshi Ronbunshu* **35**, 423–427 (1978).
23. Ishihara, K., Ueda, T. & Nakabayashi, N. Preparation of Phospholipid Polymers and Their Properties as Polymer Hydrogel Membranes. *Polym. J.* **22**, 355–360 (1990).
24. Iwasaki, Y. & Ishihara, K. Phosphorylcholine-containing polymers for biomedical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **381**, 534–546 (2005).
25. Moro, T. *et al.* Surface grafting of artificial joints with a biocompatible polymer for preventing periprosthetic osteolysis. *Nat. Mater.* **3**, 829–836 (2004).
26. Ishihara, K. Revolutionary advances in 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers as biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **107**, 933–943 (2019).
27. Nagasawa, D., Azuma, T., Noguchi, H., Uosaki, K. & Takai, M. Role of Interfacial Water in Protein Adsorption onto Polymer Brushes as Studied by SFG Spectroscopy and QCM. *J. Phys. Chem. C* **119**, 17193–17201 (2015).
28. Ostuni, E., Chapman, R. G., Holmlin, R. E., Takayama, S. & Whitesides, G. M. A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir* **17**, 5605–5620 (2001).
29. Sekine, T. *et al.* Surface force and vibrational spectroscopic analyses of interfacial water molecules in the vicinity of methoxy-tri(ethylene glycol)-terminated monolayers: mechanisms underlying the effect of lateral packing density on bioinertness. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **28**, 1231–1243 (2017).
30. Wei, Q. *et al.* Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 8004–8031 (2014).

31. Roach, P., Eglin, D., Rohde, K. & Perry, C. C. Modern biomaterials: A review - Bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **18**, 1263–1277 (2007).
32. Tagaya, M., Ikoma, T., Hanagata, N. & Tanaka, J. Analytical investigation of protein mediation between biomaterials and cells. *Mater. Express* **2**, 1–22 (2012).
33. Okano, T. *et al.* Effect of hydrophilic and hydrophobic microdomains on mode of interaction between block polymer and blood platelets. *J. Biomed. Mater. Res.* **15**, 393–402 (1981).
34. Harris, J. M. *Poly(ethylene glycol) chemistry. Biotechnical and Biomedical Applications* (1992). doi:10.1007/bf02916424
35. Tsuruta, T. Contemporary Topics in Polymeric Materials for Biomedical Applications. *Adv. Polym. Sci.* **126**, 1–3 (1996).
36. Tanaka, M. *et al.* Cold crystallization of water in hydrated poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA). *Polym. Int.* **49**, 1709–1713 (2000).
37. Tanaka, M. *et al.* Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA)-relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface. *Biomaterials* **21**, 1471–1481 (2000).
38. Hatakeyma, T., Kasuga, H., Tanaka, M. & Hatakeyama, H. Cold crystallization of poly(ethylene glycol)-water systems. *Thermochim. Acta* **465**, 59–66 (2007).
39. Hatakeyama, T., Tanaka, M. & Hatakeyama, H. Studies on bound water restrained by poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine): Comparison with polysaccharide-water systems. *Acta Biomater.* **6**, 2077–2082 (2010).
40. Tanaka, M. & Mochizuki, A. Effect of water structure on blood compatibility--thermal analysis of water in poly(meth)acrylate. *J. Biomed. Mater. Res. A* **68**, 684–695 (2004).
41. Morita, S., Tanaka, M. & Ozaki, Y. Time-resolved in situ ATR-IR observations of the process of sorption of water into a poly(2-methoxyethyl acrylate) film. *Langmuir* **23**, 3750–3761 (2007).
42. Tsuruta, T. On the role of water molecules in the interface between biological systems and polymers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **21**, 1831–1848 (2010).
43. Miwa, Y., Ishida, H., Saitô, H., Tanaka, M. & Mochizuki, A. Network structures and dynamics of dry and swollen poly(acrylate)s. Characterization of high- and low-frequency motions as revealed by suppressed or recovered intensities (SRI) analysis of ^{13}C NMR. *Polymer (Guildf)*. **50**, 6091–6099 (2009).
44. Miwa, Y., Ishida, H., Tanaka, M. & Mochizuki, A. ^2H -NMR and ^{13}C -NMR Study of the Hydration Behavior of Poly(2-methoxyethyl acrylate), Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and Poly(tetrahydrofurfuryl acrylate) in Relation to Their Blood Compatibility as Biomaterials. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **21**, 1911–1924 (2010).

第一章

45. Miwa, Y., Tanaka, M. & Mochizuki, A. Water Structure and Polymer Dynamics in Hydrated Blood Compatible Polymers. *Kobunshi Ronbunshu* **68**, 133–146 (2011).
46. 田中賢 *et al.* 溶液から細胞を分離する細胞分離方法、細胞吸着用水和性組成物、および細胞分離システム. 特許第6474540号 (2019).
47. Sato, C., Aoki, M. & Tanaka, M. Blood-compatible poly(2-methoxyethyl acrylate) for the adhesion and proliferation of endothelial and smooth muscle cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **145**, 586–596 (2016).
48. Liu, Y., Yang Tan, T. T., Yuan, S. & Choong, C. Multifunctional P(PEGMA)-REDV conjugated titanium surfaces for improved endothelial cell selectivity and hemocompatibility. *J. Mater. Chem. B* **1**, 157–167 (2013).
49. Kitakami, E., Aoki, M., Sato, C., Ishihata, H. & Tanaka, M. Adhesion and proliferation of human periodontal ligament cells on poly(2-methoxyethyl acrylate). *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
50. Murakami, D., Kobayashi, S. & Tanaka, M. Interfacial Structures and Fibrinogen Adsorption at Blood-Compatible Polymer/Water Interfaces. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2**, 2122–2126 (2016).
51. Murakami, D., Kitahara, Y., Kobayashi, S. & Tanaka, M. Thermosensitive Polymer Biocompatibility Based on Interfacial Structure at Biointerface. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **4**, 1591–1597 (2018).
52. Murakami, D., Norizoe, Y., Higaki, Y., Takahara, A. & Jinnai, H. Direct Characterization of In-Plane Phase Separation in Polystyrene Brush/Cyclohexane System. *Macromolecules* **49**, 4862–4866 (2016).
53. Norizoe, Y., Jinnai, H. & Takahara, A. Molecular simulation of 2-dimensional microphase separation of single-component homopolymers grafted onto a planar substrate. *Epl* **101**, (2013).
54. Ueda, T., Murakami, D. & Tanaka, M. Analysis of Interaction Between Interfacial Structure and Fibrinogen at Blood-Compatible Polymer/Water Interface. *Front. Chem.* **6**, 542 (2018).
55. Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G. M. & Laibinis, P. E. Molecular conformation in oligo (ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein. *J. Phys. Chem. B* **102**, 426–436 (1998).
56. Taylor, W. & Jones, R. A. L. Protein adsorption on well-characterized polyethylene oxide brushes on gold: Dependence on molecular weight and grafting density. *Langmuir* **29**, 6116–6122 (2013).

第二章

グラフト密度を制御した PMEA の作製と基礎物性の評価

第二章

2.1 緒言

本博士論文での主目的である「PMEA の密度が抗血栓性や血液適合性などの機能にどのような影響を及ぼすかを明らかにする」ためには、PMEA の密度を制御することが重要である。そこで **2.1.1 節** に基板表面の密度を制御する手法として自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayer; SAM) と高分子ブラシについて述べる。

2.1.1 密度の制御手法

2.1.1.1 SAM

SAM とは、基材を目的分子の溶液に浸すことで、目的分子が基材表面に自発的に結合・集積し、自己組織化した分子スケールの膜を指す。SAM を形成する分子の条件としては、基板表面の原子と反応するチオールやジスルフィドなど官能基を有すること、自己組織的に集合し、高密度な薄膜を形成する分子間相互作用 (アルキル鎖間の van der Waals 力や芳香環間の π - π スタッキングなど) を有することである。例えばアルカンチオールの溶液に金基板を浸漬すると、Au-S 結合によりアルカンチオールが金基板表面上に結合する。その後反応が進み密度が高くなると、分子間相互作用により、高密度に集積し、最終的に高配向な単分子膜が形成される。また SAM は、作製の簡便さと用途の幅広さから盛んに研究されている。中でも前述したアルカンチオールなどの有機硫黄を用いた有機硫黄 SAM は、金・銀・銅・パラジウム・白金などの貴金属表面に高密度な薄膜を形成することが知られており、その金属の格子間距離から密度や配向の異なる SAM を形成することが可能である¹。また金基板上に形成された SAM はバイオセンサーや金ナノ粒子の機能化、電子材料への応用など様々な用途で使用されている^{2,4}。SAM を修飾した表面に対するタンパク質吸着や細胞接着などの研究は非常に多く、Whitesides らは Oligo Ethylene Glycol (OEG) を有するアルカンチオールを用いて、タンパク質や細胞の非特異的吸着を抑制する界面の構築を行った^{5,6}。

2.1.1.2 高分子ブラシ

材料表面に高分子鎖が固定された、ブラシのような分子集合体を高分子ブラシと呼ぶ。高分子ブラシ中の高分子は、末端が基板表面に固定されているため、分子運動性が大きく制限されている。また高分子ブラシの構造や物性は、表面に固定化 (グラフト) した高分子鎖のグラフト密度に強く依存する。グラフト密度 (σ) とは、単位面積あたりに高分子鎖の占める割合 (単位: chains/nm²) で示される。**Figure 2-1** に σ と高分子ブラシの構造の一般的な関係を示した。 σ が低い場合、隣接する高分子鎖同士は相互作用をしないため、高分子鎖は 3 次元的に広がり、固定されていない高分子鎖自体の $2R_g$ (R_g : 回転半径) と類似したマッシュルーム構造を示す。一方、準希薄溶液 (高分子鎖の絡み合いが適度に存在) の状態まで σ が高くなると、高分子鎖同士は相互作用を示し始め、基板から垂直方向に延伸し始める構造を形成する (準希薄ブラシ構造)。さらに σ が高くなると、高分子鎖同士の排除体積効果により高分子鎖は垂直方向に延伸した構造体を形成する (濃厚ブラシ構造)。この濃厚ブラシ

第二章

構造のブラシ長は高分子鎖の伸びきり鎖長に匹敵すると言われている⁷。また、高分子ブラシは、従来の高分子コーティング膜にはない優れた耐久性や安定性、特徴的な表面機能を有するため、第一章で述べたような研究をはじめとして様々な研究が盛んに行われている^{8,9}。次に、高分子をグラフトする際の手法について述べる。

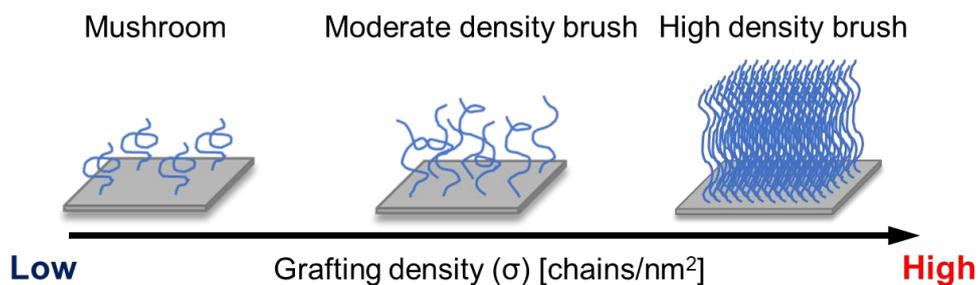


Figure 2-1. Schematic illustration of the structure of grafted polymer chains with increasing grafting density, from ‘mushrooms’ via ‘moderate density’ to ‘high density brushes’.

2.1.2 高分子グラフト手法

高分子をグラフトする手法として、高分子と基材表面の官能基の反応により基材上に高分子を固定する *grafting to* 法と、基材表面に化学的に固定された開始剤から重合反応によって高分子ブラシを形成する *grafting from* 法がある (Fig. 2-2(a))。一般的に *grafting to* 法では低密度側に、*grafting from* 法では低密度から高密度に高分子鎖を基材上に固定することが可能である (Fig. 2-2(b))。

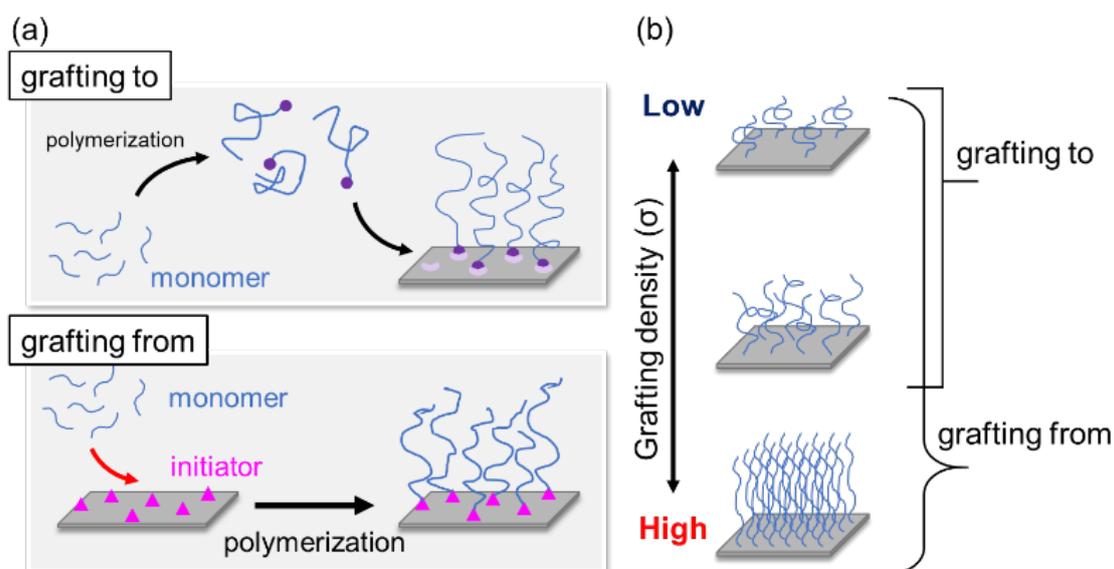


Figure 2-2. (a) Schematic illustration of the two types of grafting methods. (b) Correlation between the grafting methods and grafting densities.

第二章

本博士論文では、グラフトする高分子の分子量を統一し、低密度領域で密度の制御を行うために **grafting to** 法によってグラフト PMEА 基板 (gPMEА) の作製を行った。また **grafting to** 法には、Au-S 反応によって gPMEА の作製を行うため、主鎖末端にチオール基を有する PMEА (PMEА-SH) を合成する必要がある。この PMEА-SH は、RAFT 重合によって合成した PMEА (PMEА-CTA) のトリチオカーボネート部位をアミノリシス反応することで得ることができる。実際に **grafting to** 法で得られる密度についての先行研究を以下に示す。

Taylor らの研究によると、高分子溶液中の高分子の濃度や分子量を制御することによって、PEG などの水溶性高分子でも水中で、最大 0.3 chains/nm^2 の高密度ブラシを **grafting to** 法によって達成したことを報告している¹⁰。Unsworth らは、主鎖末端にチオール基を有する PEG を金基板上にグラフトさせる際に、その分子量や反応時間、反応温度、さらに PEG 水溶液中に添加したイオンのイオン強度を調整することによって、分子量 $2,000 \text{ g/mol}$ (45 量体) の PEG においても最大 0.98 chains/nm^2 のグラフト密度を **grafting to** 法でも達成できることを報告している¹¹。以上のことから、本研究で使用する PMEА においても **grafting to** 反応の反応濃度や反応時間、溶媒を調整することで低密度から約 0.1 chains/nm^2 以上の密度の gPMEА の作製が行えると考えられる。次に、PMEА-SH の合成について示す。

第二章

2.2 グラフト用 PMEА (Thiol-terminated PMEА; PMEА-SH) の合成

2.2.1 MEА の可逆的付加-開裂連鎖移動重合 (PMEА-CTA の合成)

2.2.1.1 可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 重合^{12,13}

可逆的付加-開裂連鎖移動 (Reversible Addition/Fragmentation chain Transfer; RAFT) 重合の反応機構を **Figure 2-3** に示した。RAFT 重合は、まず初めに開始活性種の開裂により発生したラジカルが生長反応を行うことで、生長ラジカル種 (P_m^\cdot) を発生する (**Step 1**)。次に、生長ラジカル種 (P_m^\cdot) は、チオエステル化合物あるいは生成した高分子末端の C=S 結合へ付加したのち、中間ラジカルを経由しもう一方の C-S 結合が開裂する。これにより炭素ラジカル種 (R^\cdot) が生成 (**Step 2**) し、高分子鎖はモノマーの存在によって成長し (**Step 3**)、**Step 1** のラジカル活性種はチオエステル型のドーマント種へ変わる (**Step 4**)。また、終了反応は、再結合停止と不均化停止が存在する (**Step 5**)。このように、RAFT 重合の特徴はラジカル種がチオエステルへ付加と開裂を可逆的に繰り返す交換連鎖移動 (**Step 2, 4**) である。この交換連鎖移動反応がラジカル種による生長反応に比べて迅速に起こるため、高分子の分子量はモノマーとチオエステル化合物の仕込み比によってほぼ決定することが可能である。さらに、分子量の制御に重要な交換連鎖移動反応速度は、生長ラジカルの付加速度や中間ラジカルの開裂速度、さらには R^\cdot の生成速度によって決定されるため、RAFT 剤のラジカル部分 (R) と中間体ラジカルの安定性に影響を与える部分 (Z) の考慮が必須である。MEА はアクリレート類であるため、本章ではトリチオカルボネートを基本骨格とする RAFT 剤を使用した。

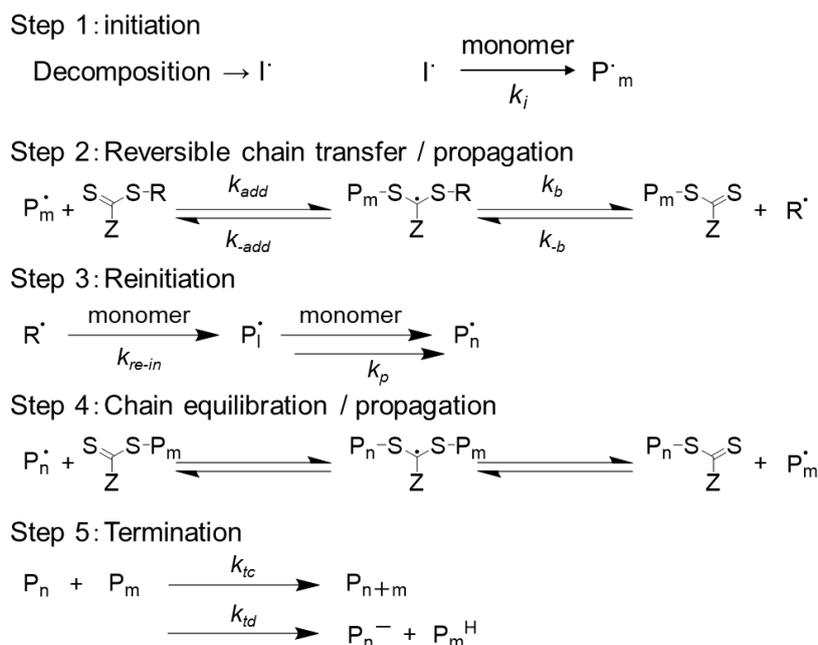


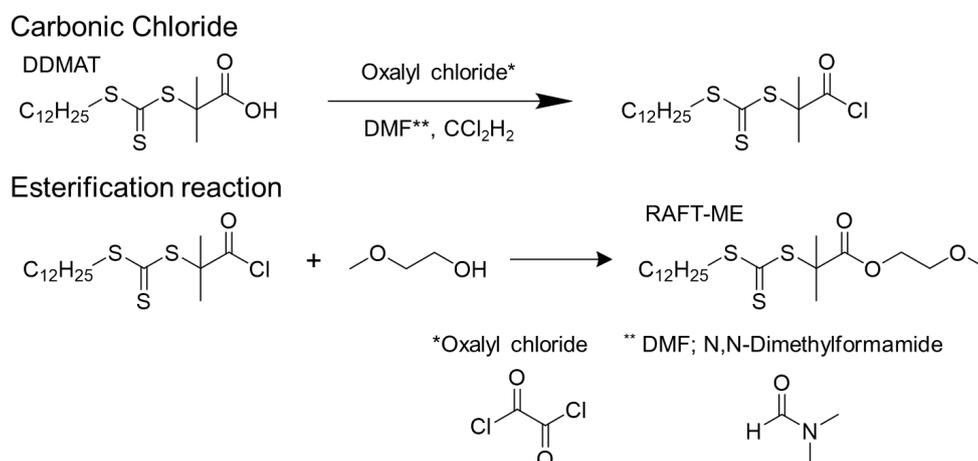
Figure 2-3. Generally accepted mechanism for a RAFT polymerization.

第二章

2.2.1.2 メトキシエチル基を有する RAFT 剤 (RAFT-ME) の合成

RAFT 重合により合成した PMEА を用いてグラフト基板を作製したとき、PMEА 主鎖末端の RAFT 剤由来官能基がグラフト膜最表面に位置することになる。そのため、グラフト膜最表となる主鎖末端の影響を考慮し PMEА と同様にするため、RAFT 剤には MEА の骨格であるメトキシエチル基を有し、MEА などのアクリレート系に対して RAFT 重合が進行しやすい RAFT 剤 (RAFT-ME) を用いた。RAFT-ME は販売されていないため、購入可能な 2-(dodecylthioncarbonothioylthio)-2-methylpropionic acid (DDMAT) から RAFT-ME の合成を行った (Scheme 2-1)。

Scheme 2-1 Synthesis of 2-methoxyethyl-2-(dodecylthioncarbonothioylthio)-2-methylpropanoate (RAFT-ME).



RAFT-ME の合成手順

100 mL ナスフラスコに 2.0 g DDMAT (Sigma-Aldrich) を量り取り、ジクロロメタン (関東化学株式会社、特級) を 2.0 mL 加え、攪拌して DDMAT をよく溶解させた。次に、塩化オキサリル (Sigma-Aldrich、禁水) を 10 mL (DDMAT の 3~4 倍のモル量) 加えたのち、触媒として *N,N*-dimethyl formamide (DMF, 関東化学株式会社、特級) をパスツールで数滴滴下し、30 分間攪拌した。その後、ナスフラスコにコック、トラップ、真空ポンプを順に取り付け、系内の圧力を徐々に下げることで、未反応物質として考えられるジクロロメタン、DMF、塩化オキサリル等を除去した。前述の反応容器に 2-methoxyethanol (東京化成工業株式会社) を 10 mL 加え、1.5 時間攪拌を行った。

RAFT-ME の精製

2-methoxyethanol の反応が終了した反応溶液に水を過剰に加え攪拌したのち、水/ヘキサン（関東化学株式会社）系で分液操作を 5 回行った。その後回収したヘキサン相に硫酸マグネシウム無水和物（富士フイルム和光純薬工業株式会社）を加え、ヘキサン相の脱水を行った。脱水後、ろ過により硫酸マグネシウムを除去し、濾液をエバポレーター（EYELA, N-1200B）により濃縮した（粗収量：2.1 g, 収率：90 %）。この濃縮相に副生成物や未反応物が残存していたことを $^1\text{H NMR}$ により確認したため、シリカカラムによる精製を行った。最初に、濃縮した溶液に対して薄層クロマトグラフィー（Thin-Layer Chromatography; TLC）を行った。展開溶媒として、ヘキサンおよび酢酸エチル（関東化学株式会社）を使用した。TLC の結果、ヘキサンは開始スポットに生成物が残存していることからカラム精製の展開溶媒に使用し、酢酸エチルは生成物がスポット位置からほとんど移動したことから生成物を取り出すのに用いた。シリカカラム精製によって回収した溶液をエバポレーターにより濃縮し、一晚真空下で乾燥（真空乾燥器：Environment Testing Tools by Asona (ATTAS), AVO-250NS）を行った後、 $^1\text{H NMR}$ 測定を行った（Fig. 2-4）。 $^1\text{H NMR}$ の結果から、2-methoxyethyl-2-(Dodecylthioncarbonothioylthio)-2-methylpropanoate（MEA 骨格を有する RAFT 剤、RAFT-ME）が合成できたことを確認した。また、DDMAT は黄色の結晶体であったのに対して、RAFT-ME は橙色の粘稠体であった。

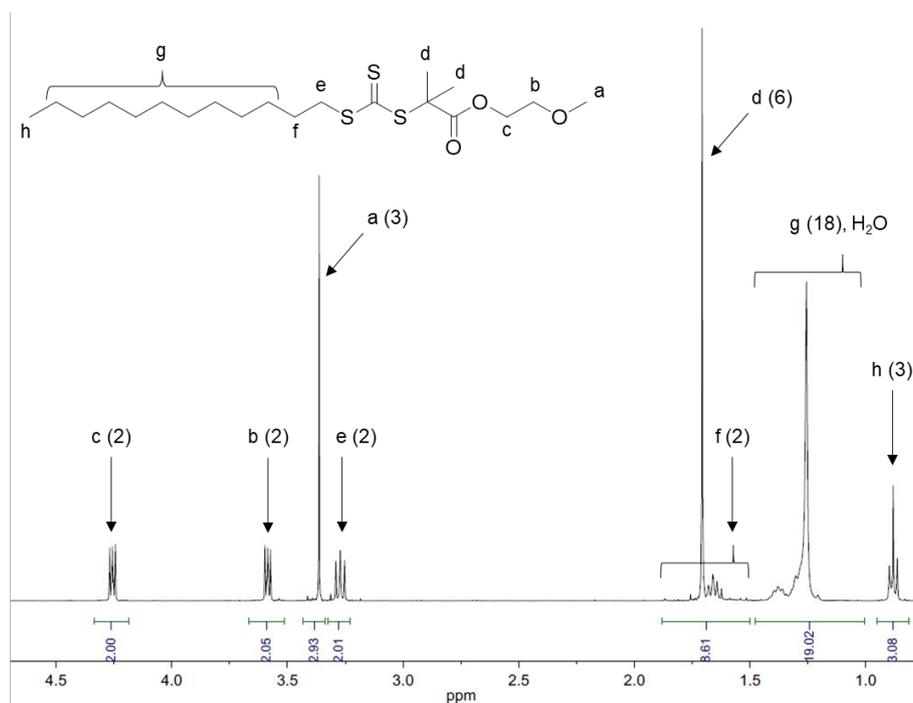


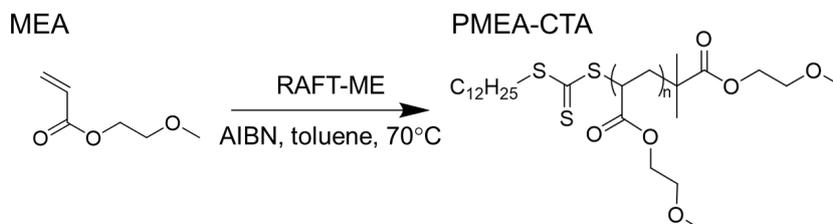
Figure 2-4. $^1\text{H NMR}$ spectrum of RAFT-ME.

第二章

2.2.1.3 RAFT 重合による PMEAC-CTA の合成

合成した RAFT-ME を用いて RAFT 重合を行った (Scheme 2-2)。以下にモノマーである MEA の精製手順、MEA から PMEAC-CTA の合成手順を示す。

Scheme 2-2. Synthesis of PMEAC-CTA.



モノマー (MEA) の精製手順

市販の MEA (東京化成工業株式会社) には、重合禁止剤の 1 種である 4-メトキシフェノール (MEHQ) が含有している。RAFT 重合などのリビングラジカル重合を行う際、MEHQ が存在すると分子量分布の狭い高分子を得ることができないため、初めに MEA 中に含まれる MEHQ の除去を行い、その後 MEA の精製を行った。

分液ロートに 50 mL 程の MEA を入れ、5%に調製した NaOH aq を 30 mL 加えた。攪拌した後、水相・MEA 相の分液操作を 3 回行った。回収した MEA 相に硫酸マグネシウム無水和物を加え、一晚脱水を行った。その後、ろ過により硫酸マグネシウムを除去し、MEA の減圧蒸留を行った。減圧蒸留は、初めに水素化カルシウム (Sigma-Aldrich) により MEA の脱水を行ったのち、60°C のオイルバス、レギュレーターで 10 torr に減圧して行った。その後、回収した MEA (収量: 26.56 g、収率: 約 50%) の ^1H NMR を測定し、MEA が精製できていることを確認した。

MEA の重合手順

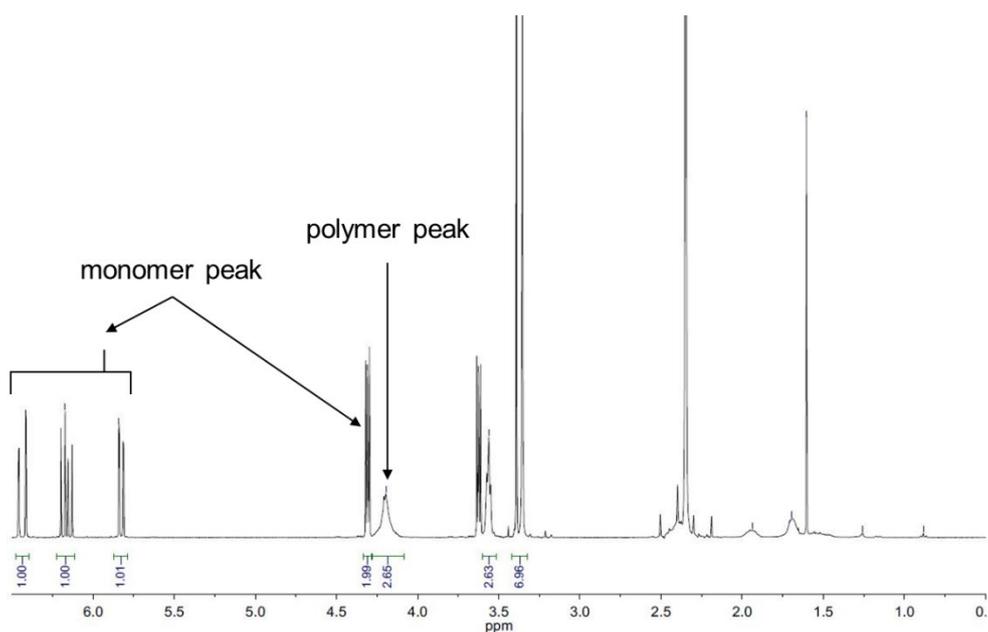
100 mL メスシリンダーに精製した MEA を 23.48 g (0.18 mol) 量り取り、事前にトルエン (関東化学株式会社、有機合成用試薬) で溶かした RAFT-ME (123.65 mg、0.29 mmol) と 2,2'-アゾビスイソブチロニトリル (AIBN、東京化成工業株式会社) (10.30 mg、0.063 mmol) を加えた。その後、90 mL の標線までトルエンでメスアップし、MEA 濃度が 2 mol/L になるように反応溶液 (MEA : MEDDMAT : AIBN = 2857 : 4.6 : 1 mol) を調製した。

シュレンク管に調製した反応溶液を入れ、3 回凍結脱気を行うことで系内を脱気し、減圧下、70°C で重合反応を 3.5 時間行った。反応後、 ^1H NMR を測定した結果 (Fig. 2-5)、モノマーから高分子に重合した転化率は、

$$\text{Conversion} = \frac{\text{polymer}}{\text{monomer} + \text{polymer}} = \frac{2.65/2}{2.65/2 + 1.00} \times 100 \approx 57.0\%$$

であった。

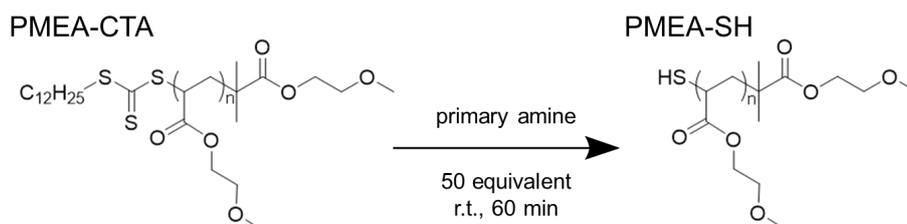
第二章



2.2.2 PMEА-CTAのアミノリシス反応 (PMEA-SHの合成)

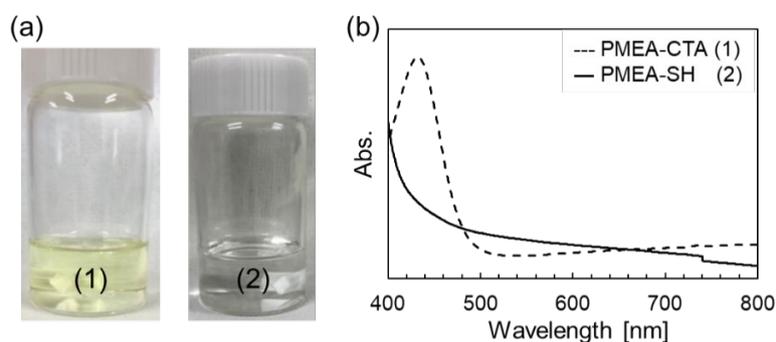
合成した PMEА-CTA の主鎖末端のトリチオカルボネートにアミンを反応させる (アミノリシス反応) ことによって、主鎖末端をチオール基へと変換することができる^{14,15}。ここでは第 1 級アミンであるイソブチルアミンを用いてトリチオカルボネートの還元を行った (Scheme 2-3)。

Scheme 2-3. Reduction of trithiocarbonate in PMEА-CTA.



バイアルに PMEА-CTA を 0.95 g (2.5×10^{-5} mol) 量り取り、ジクロロメタンを 5.0 mL 加え、5.0 mM の PMEА-CTA/ジクロロメタン溶液を調製した。溶液をスターラーで攪拌しながら、第 1 級アミンであるイソブチルアミンを滴下し、アミノリシス反応を行った。反応が開始されると溶液の色は徐々に薄くなっていき、最終的には黄色透明から無色透明へと変化した (Fig. 2-6 (a) (1)→(2))。さらに反応前後の反応溶液を紫外可視光 (UV-vis) 測定した結果 (Fig. 2-6(b))、反応前には確認できた PMEА-CTA のトリチオカーボネート基由来の吸収波長 420-480 nm のピークが反応後には減少したことが確認できたため、PMEА-CTA から PMEА-SH へのアミノリシス反応が進行したことを確認した。

第二章



その後、反応溶液をヘキサンに滴下し、THF/ヘキサン系で再沈殿操作を 2 回行い、一晩水にさらすことで精製した。精製した高分子は、THF に溶解させて回収し、エバポレーターによって濃縮したのち、室温下で真空乾燥を 1 日以上行った。最終生成物である PME-SH (収量 : 0.94 g、収率 : 98%) は無色透明な粘稠体であった。得られた高分子の $^1\text{H NMR}$ 測定を行った結果、PMEA 由来のピークが存在していたこと、RAFT-ME のドデシル基末端の CH_3 由来のピークが確認されなかったことから、PMEA-CTA の主鎖末端の還元成功し、PME-SH が合成できたことを確認した。また GPC 測定を行った結果、PME-SH の分子量は 38,000 g/mol、分子量分布は 1.14 であった (Fig. 2-7)。

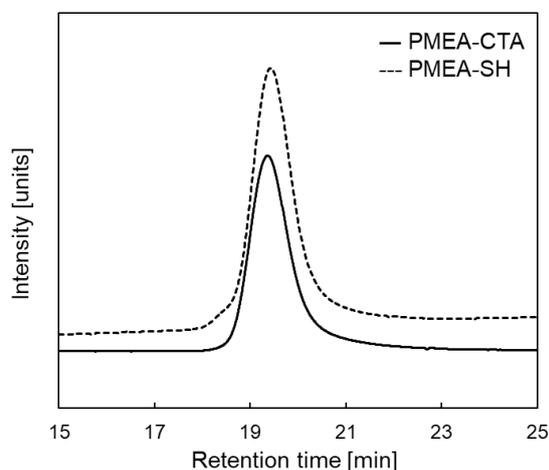
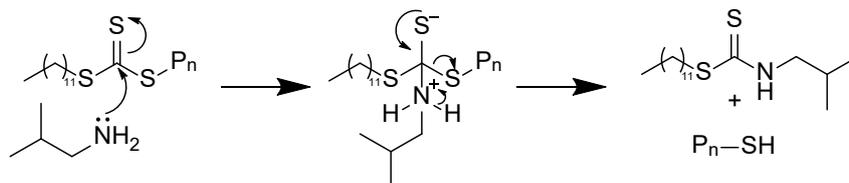


Figure 2-7. GPC chart of PME-CTA and PME-SH

最終生成物が無色透明の粘稠体に変化した要因として、PME-CTA はトリチオカルボネート基由来の黄色粘稠体であるが、第 1 級アミンの求核置換反応 (Scheme 2-4) によりトリチオカルボネートからチオール基が脱離し、アミンに置換されるため、トリチオカルボネート基由来の色が消失したと考えられる¹⁵。

Scheme 2-4. Mechanism of reduction reaction of trithiocarbonate.



第二章

2.3 合成した PMEА-SH の DSC 測定

次に本博士論文で使用した PMEА-SH の含水時におけるバルク中の水和構造の解析および定量を行うため、PMEА-SH の乾燥試料および含水試料について DSC 測定を行った。次に DSC の原理について述べる。

2.3.1 DSC の原理

示差走査熱量測定 (Differential Scanning Calorimetry; DSC) は、物質に対しての熱の出入に着目した分析手法であり、試料の結晶化や融解、ガラス転移といった相転移現象や、樹脂やタンパク質の熱変性に伴う熱エネルギーの変化を観測する。DSC には、「入力補償 (熱補償) 型」と「熱流束型」の測定原理の異なる 2 種類の測定手法がある。「入力補償型」は、試料とリファレンス、両者の温度を変化させながら、温度が等しくなるように、両者に加えた単位時間当たりの熱エネルギーの入力差を記録する測定手法である。「熱流束型」は、一定速度で温度を変化させるように温度制御されたヒートシンクを持ち、ヒートシンクの熱を試料やリファレンス容器内に熱抵抗体を介して伝え、容器内の温度を一定のプログラムによって変化させながら、試料とリファレンスの温度差を記録する測定手法である。この温度差は、単位時間当たりの熱エネルギーの入力差に比例する¹⁶。本章では、ベースラインの安定性が高いとされる「熱流束型」で測定を行った。また DSC 装置には、株式会社日立ハイテクサイエンス 高感度示差走査熱量計 (EXSTAR X-DSC7000) を使用した。

2.3.2 測定手法

合成した PMEА-SH 約 100 mg をイオン交換水 (PURELAB Option-S 7/15, ELGA Labwater, UK、抵抗率 18.2 M Ω · cm) 中に 3 日以上浸漬することで、含水 PMEА-SH を調製した。アルミニウム製の測定用セル (簡易密封容器) に乾燥 PMEА-SH または含水 PMEА-SH を 3~5 mg 量り取り、電動サンプルシーラ (SII) により簡易密封した。測定用試料は密封後 1 週間室温で静置したあと、電子天秤 (METTKER TOLEDO、XSE105 DualRange、精度 0.01 mg) で秤量した。DSC 測定は、窒素ガス流量 150 mL/min、測定開始温度 30°C、走温速度 -5°C/min で -100°C まで降温させた後、-100°C で 5 min 保持し、走温速度 5°C/min で 50°C まで昇温させる条件で行った。含水 PMEА-SH の含水量を定量するため、DSC 測定後に測定用セルのふたに小さな穴をカッターまたは注射針を用いて開け、110°C で 3 日以上真空乾燥 (VACUUM OVEN VOS-201SD, EYELA, TOKYO RIKAKIKAI Co.) を行い、乾燥後試料の質量を測定した。

第二章

2.3.3 水和構造の分類と定量方法

DSC のチャートから各種水を定量する際、昇温過程で 0~40°C 付近で観察されるシャープな発熱ピークを「自由水 (FW)」、昇温過程で -40°C 付近で観察される水由来の発熱ピークを「中間水 (IW)」によるものとしてピーク面積を算出した。自由水および中間水の融解に由来する熱量 (融解熱量 ΔH_m) は、昇温過程の 0~20°C のベースラインを融解ピーク側へ引くことで算出した。測定によって得られた、熱量や各質量の測定値を用いて各種水 (FW、IW、NFW) の量を以下の式から算出した^{17,18}。

$$W_{IW} = \frac{\Delta H_{cc}}{\Delta H_m^0} \cdot \frac{1}{w_{dry}} \text{ g/g}$$

$$W_{FW} = \frac{\Delta H_m - \Delta H_{cc}}{\Delta H_m^0} \cdot \frac{1}{w_{dry}} \text{ g/g}$$

$$W_{NFW} = W_{water} - (W_{FW} + W_{IW}) \text{ g/g}$$

ここで、 W_x は算出された各種水和水 (FW、IW、NFW) の量 g/g であり、 w_{dry} は乾燥高分子の質量 g、 W_{water} は全水和水量 g、 ΔH_{cc} は低温結晶形成の熱量 J、 ΔH_m は融解の熱量 J、 ΔH_m^0 は水の標準融解エンタルピー (333.6 J/g) である。

2.3.4 測定結果

PMEA-SH の DSC 測定結果を **Figure 2-8** に示した。水の凍結・融解に着目するため、-80~20°C の範囲を拡大して示している。**Figure 2-8** 中の W_c は含水率 wt% を示す。また **Figure 2-9** に PMEA-SH の含水率に対する各種水の量をプロットした結果を示した。

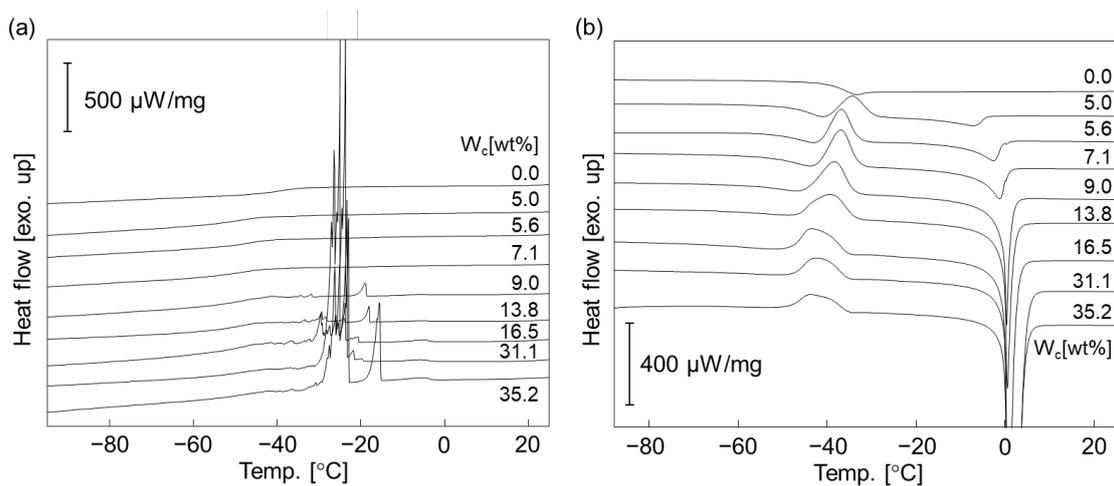


Figure 2-8. Water content (W_c) dependence of DSC thermograms for PMEA-SH samples swollen in pure water. (a) Cooling scan, (b) Heating scan.

第二章

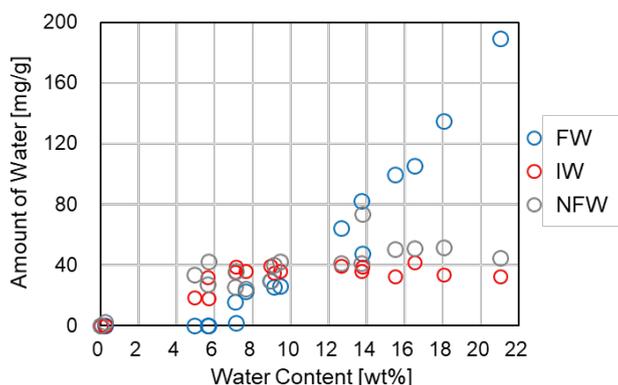


Figure 2-9. Water content dependence of hydration water composition quantified from DSC thermograms for PMEASh samples swollen in pure water.

乾燥時（含水率 0 wt%）では、 -38°C 付近に PMEASh のガラス転移が観測された。一方で含水状態になるとガラス転移温度 (T_g) は -50°C 付近にシフトしていた。Lourdin らは低分子や高分子に湿度や可塑剤の濃度が水和量や T_g に与える影響について調査した結果、低分子や高分子中の可塑剤濃度や含水率の上昇に伴って T_g は低下することを報告した¹⁹。以上のように、含水状態の PMEASh 中の水分子が可塑剤としてふるまうことで T_g が乾燥状態の時より下がったと推察される。また今回合成した PMEASh にて -40°C 付近に水の低温結晶に由来するピークと 0°C 以下に水の融解に由来するブロードなピークが観測された。これは、フリーラジカル重合で合成した PMEASh ($\text{PMEASh}_{\text{free}}$) の DSC 測定の結果と同様の挙動であることから中間水の凍結・融解に由来するピークである。

Figure 2-9 の結果から、含水率の増加に伴い、まず NFW が増加し、次いで IW が増加、最後に FW が徐々に増加し、NFW と IW はある含水率以上ではほぼ一定量を示し、FW のみ増加し続けた。このことから、PMEASh の分子鎖と強く相互作用する NFW が初めに吸着し、次いで IW、FW の順に高分子鎖と相互作用すると推察される。

次に、PMEASh と $\text{PMEASh}_{\text{free}}$ の飽和含水時における各種水の量の比較について議論する。 $\text{PMEASh}_{\text{free}}$ の飽和含水時 ($W_c = 9.48 \text{ wt\%}$) での FW、IW、NFW はそれぞれ 29.8、42.7、32.2 mg/g であった。また PMEASh の飽和含水時 ($W_c = 9.1 \text{ wt\%}$) での各種水は 25.7、35.0、40.0 mg/g であった。DSC を用いた各種水の量の測定誤差は経験的に 2.0 mg/g であることから²⁰、PMEASh と $\text{PMEASh}_{\text{free}}$ の各種水の量は有意な差がある。 $\text{PMEASh}_{\text{free}}$ の場合では、不凍水よりも中間水の方が約 10 mg/g 多かったのに対して、PMEASh では不凍水の方が中間水よりも 5 mg/g 多かった。 $\text{PMEASh}_{\text{free}}$ は $M_n = 31 \text{ kg/mol}$ 、 $M_w/M_n = 3.33$ であるのに対して、PMEASh では $M_n = 38.0 \text{ kg/mol}$ 、 $M_w/M_n = 1.14$ である。さらに、末端基は $\text{PMEASh}_{\text{free}}$ の場合開始剤である AIBN 由来のニトリル基を有しており、PMEASh はチオール基と MEA 骨格となる。以上のように、PMEASh および $\text{PMEASh}_{\text{free}}$ では分子量 (M_n)、分子量分布 (M_w/M_n)、末端基などが異なるため、PMEASh と $\text{PMEASh}_{\text{free}}$ では各種水の量は異なると推察される。

第二章

2.4 密度を制御したグラフトPMEA基板 (gPMEA) の作製

本博士論文では、PMEA の密度が抗血栓性の発現や細胞の接着などの生体応答に与える影響について詳しく議論するため、PMEA の密度の制御が重要である。ここでは 2.2 で合成した PMEA-SH を金基板上にグラフトする際の条件 (濃度、時間、溶媒など) によって PMEA の密度 (本博士論文では PMEA のグラフト密度 (σ) で定義する) の制御を行った。また作製したグラフト PMEA (gPMEA) の σ は水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance; QCM) によって評価した。また X 線光電子分光法 (X-ray photoelectron spectroscopy; XPS) を用いて gPMEA 表面の元素分析を行うことで、gPMEA の作製に成功したことを確認した。

2.4.1 金基板の作製

本博士論文では、PMEA のグラフトには全て金基板を使用した。また金基板には試験対象によって下地が異なる (血小板粘着試験や AFM 観察にはシリコンウエハまたはガラス基板に金をスパッタした基板、タンパク質吸着実験には QCM 測定用の基板) ため、以下にそれぞれの金基板の作製手順を示す。

2.4.1.1 AFM 観察・ELISA・血小板粘着試験用金基板

シリコンウエハ (4-P-LOW2、AS ONE) をダイヤモンドカッター (D-PEN、ORUGAJEWEL INDUSTRY Co., LTD.) を用いて約 1 cm 角に切り取り、ほこりや切りくずなどをブローアールで取り除いた。切り取ったシリコンウエハまたは Φ 14mm のガラス基板 (厚さ: 0.13-0.17 mm、松浪硝子工業株式会社) をテトラヒドロフラン (THF、関東化学株式会社)、アセトン (関東化学株式会社)、水、エタノール (関東化学株式会社、99.5%) で 2 回ずつ洗浄後、室温でブローアールを用いて乾燥させた。乾燥後、抵抗加熱式真空蒸着装置 (SVC-700TMSG/7PS100、サンヨー電子株式会社) を用いて初めにチタン (Ti) の蒸着を行い (Ti 線、約 3 mg、電流値 75A)、そのあと金 (Au) の蒸着を行った (Au 線、約 6 mg、電流値 40-50 A)。蒸着後の金/チタン薄膜をメスでスクラッチした後、その断面像を AFM により測定した。断面像の結果 (Fig. 2-10)、チタンおよび金の膜厚はそれぞれ約 5、10 nm であった。

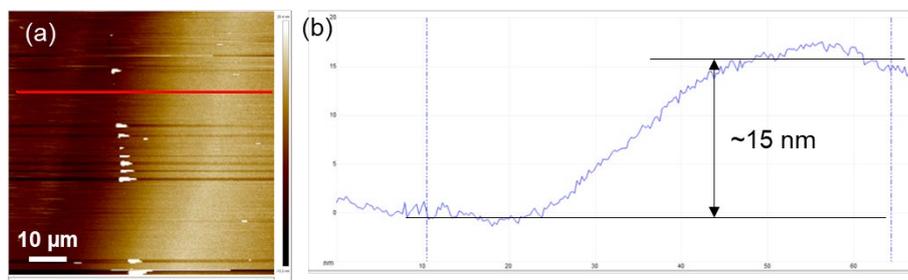


Figure 2-10. (a) AFM image of Au/Ti/glass. (b) x-z cross section of red line in (a).

第二章

2.4.1.2 gPMEA のグラフト密度/水和量/運動性評価・タンパク質吸着挙動評価用金基板

QCM 基板 (QA-A9M-AU(M)、SEIKO EG&G Co., LTD., Au コート, 一体型) をエタノールで洗浄しブローアード乾燥させた。乾燥後、UV オゾンクリーナー (UV253E(R)、Filgen Inc.) を用いて QCM 基板の両面を 30 min UV O₃/O₂ 処理し、QCM 基板の金表面に付着している有機物を取り除いた。UV O₃/O₂ 処理後は PMEА のグラフトを行う基板は直ちにグラフト反応を行い、グラフトを行わない基板 (金基板) はメタノールに 30 分浸漬させた後、ブローアードで軽く乾燥させ、室温・低湿度 (RH < 10%) 下での乾燥を 3 時間以上行った。

用いた QA-A9M-AU(M) は、電極直径 5 mm (面積 19.6 mm²)、Au 厚さ (Ti 100 nm 上) 約 300 nm、鏡面仕上げ、共振周波数 9 MHz である。

2.4.2 PMEА の金基板へのグラフト条件の検討

2.4.2.1 PMEА-SH 溶液の調製

バイアルに PMEА-SH を 39.66 mg 量り取り、そこに 10 mL のメタノールを加えることで 100 μM PMEА-SH / MeOH を調製し、これを母液とした。次に母液 : メタノール = 1 : 9、0.5 : 9.5、0.1 : 9.9 で混合することによって、10, 5, 1 μM の PMEА-SH 溶液を調製した。調製した各溶液をシリンジフィルター (ADVANTEC® Toyo Roshi Kaisha, PORE SIZE 0.20 μm) でろ過することで、溶液中のほこりなどの不純物を取り除いた。

2.4.2.2 PMEА のグラフト反応 (濃度・時間の影響)

2.4.2.1 節で調製した各濃度の PMEА-SH 溶液に、2.4.1 節で作製した各金基板を浸漬させ、25°C で 15 分または 60 分間反応を行うことで、金表面に PMEА をグラフトした。反応後、メタノール (99.5%) で 5 回以上洗浄し、ブローアードを用いて軽く乾燥させた後、室温・低湿度 (RH < 10%) 下で 10 時間以上乾燥させた。

2.4.2.3 PMEА のグラフト反応 (濃度一定での反応時間の影響)

2.4.2.1 節で調製した 1.0 μM の PMEА-SH 溶液に、2.4.1 節で作製した各金基板を浸漬させ、25°C で 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 240 分間反応を行うことで、金表面に PMEА をグラフトした。反応後、メタノール (99.5%) で 5 回以上洗浄し、ブローアードを用いて軽く乾燥させた後、室温・低湿度 (RH < 10%) 下で 10 時間以上乾燥させた。

第二章

2.4.3 gPMEA の σ の評価

ここでは、2.4.2 節で作製した gPMEA の σ を QCM によって評価した。

2.4.3.1 QCM

QCM は、ナノグラムオーダーの微小な質量変化を測定できる分析手法である。QCM は水晶の対称中心を持たない六方晶構造に由来する圧電効果を利用している。厚み方向に微小の交流電圧を印加すると、水晶の圧電効果により水晶板が一定の周波数（共振周波数）でせん断方向に厚みすべりを起こす。この水晶板の共振周波数が、電極上の物質の質量の変化に伴って変化することが 1950 年代に報告され²¹、Sauerbrey は周波数の変化と物質の質量変化の関係を次式で表した²²。

$$\Delta F = -\frac{2F_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{A}$$

ここで ΔF : 周波数の変化量 Hz、 F_0 : 基本共振周波数 Hz、 μ_q : 水晶の弾性率 $\text{g}/(\text{cm S}^2)$ 、 ρ_q : 水晶の密度 g/cm^3 、 A : 金薄膜電極の面積 cm^2 、 Δm : 電極表面に吸着した物質の質量変化 g である。本博士論文で使用した QCM 基板の各定数は、 $F_0 = 8.94 \times 10^6$ Hz、 $\mu_q = 2.95 \times 10^{11}$ $\text{g}/(\text{cm S}^2)$ 、 $\rho_q = 2.65$ g/cm^3 、 $A = 0.196$ cm^2 である

QCM 基板の金表面に PMEА がグラフトすることで QCM の共振周波数は変化 (ΔF) するため、この ΔF から PMEА のグラフト密度 (σ) を評価することが可能である。

2.4.3.2 gPMEA の σ の算出

QCM により PMEА のグラフト前後の周波数変化 (ΔF) を測定し、次式から PMEА の σ chains/nm² を算出した。

$$\sigma = 10^{-14} \Delta m N_A / M_n A = -\frac{10^{-14} \Delta F \sqrt{\rho_q \mu_q} N_A}{2F_0^2} \frac{N_A}{M_n}$$

ここで、 N_A : アボガドロ定数 (6.02×10^{23} mol⁻¹)、 M_n : PMEА-SH の数平均分子量 ($M_n = 38,000$ g/mol) である。QCM の測定には、QCM 装置 (QCA922A、SEIKO EG&G Co., LTD.) を使用した。初めにグラフト前の QCM 用基板 (洗浄済み) の共振周波数を 25°C、大気・低湿度 (RH < 10%) 下で測定した。グラフト前の共振周波数を測定後、2.4.2 で記述したように PMEА を QCM 用基板の金表面にグラフトしたのち、メタノールによって洗浄を行った。洗浄後、ブローアおよび低湿度 (RH < 10%) 下で基板の乾燥を行った後、QCM により共振周波数を 25°C、大気・低湿度 (RH < 10%) 下でグラフト後の共振周波数を測定した。この、グラフト前後の共振周波数の変化量 (ΔF) を上記の式に代入することでグラフトした PMEА の σ を算出した。

第二章

2.4.3.3 測定結果および考察

まず初めに QCM 測定における、基板の差し込み方などによる周波数変化などの測定誤差は $0.001 \text{ chains/nm}^2$ 未満であったため、本博士論文で議論するのに問題ない誤差であった。

各グラフト条件で PME A をグラフトした基板の σ の算出結果を、**Figure 2-11** に示した。

Figure 2-11(a)の横軸は PME A 反応溶液の濃度の対数で示した。

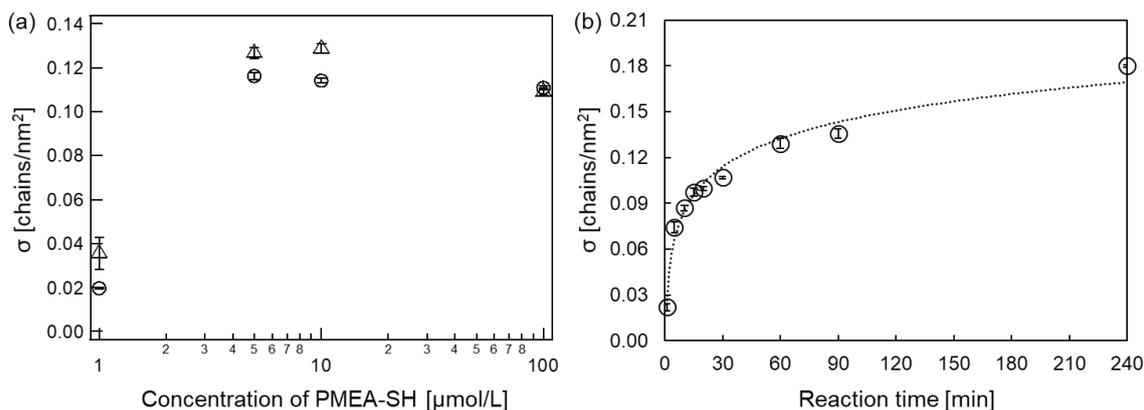


Figure 2-11. (a) Relationship between the PME A grafting density and the concentration of PME A-SH/methanol solution. The reaction times are indicated by circles (15 min) and triangles (60 min) (mean \pm SD, $N = 3$). (b) Relationship between the reaction time and the grafting density (σ) of PME A (mean \pm SD, $N = 3$).

まず初めに **Figure 2-11(a)**の結果に着目すると、反応時間を 15 分から 60 分へと長くすることで、どの反応濃度においても σ は高くなる傾向を示した。また反応溶液中の PME A-SH の濃度が 1-10 μM の範囲では濃度の増加に伴い σ が 0.020 から 0.129 へと高くなる傾向を示した。これは、反応時間や反応濃度を増加させることで、PME A-SH が金基板と接触する割合が高くなり、 σ が増加したと考えられる。同様に、反応濃度 1.0 μM 一定で反応時間を増加させた場合は、 σ は対数関数的に増加した (**Fig. 2-11(b)**)。これは、反応初期にはグラフト反応が進行しやすいが、反応が進むにつれてグラフトされた PME A の表面被覆率が増加し、グラフト反応が起こりにくくなったためだと考えられる。また、反応濃度が 10 μM 以上 (100 μM) では σ は減少する傾向を示した。これは、PME A-SH の濃度が増加すると、金-チオール反応の進行とともに金基板に物理吸着する PME A の割合も増加し、反応後の洗浄で物理吸着した PME A が脱離したことで、 σ が低くなったと考えられる (**Fig. 2-12**)。

第二章

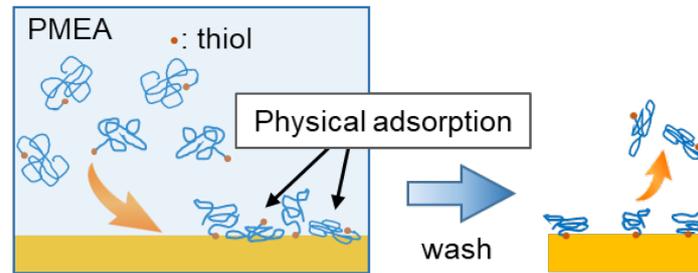


Figure 2-12. The image of competition between physical adsorption and Au-thiol reaction.

また得られた σ から大気下での gPMEA の膜厚を次式により算出した。

$$h = \frac{10^{21} \sigma M_n}{d N_A}$$

ここで、 h : gPMEA の膜厚 nm、 d : 高分子の密度 (1.1 g/cm^3)、 M_n : PMEAS-SH の数平均分子量 ($38,000 \text{ g/mol}$)、 N_A : アボガドロ定数 ($6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) である。本章で作製した gPMEA の σ の範囲が $0.02 \sim 0.18$ であることから、gPMEA の膜厚は $1.1 \sim 10.3 \text{ nm}$ であり、薄膜であることがわかる。今回用いた PMEAS の分子量が 38.0 kg/mol であることから、PMEA 鎖が完全伸びきり鎖の場合、膜厚は約 80 nm 程度となる。一方、今回作製した gPMEA の膜厚は数～nm 程度であることから、実際に得られるグラフト鎖は **Fig. 2-1** や **Fig. 2-2** に示したブラシ状ではなく **Fig. 2-13(a)** に示すような状態にあり、水和した場合も Z 軸方向に分布が生じるような形態 (**Fig. 2-13(b)**) をとると考えられる。

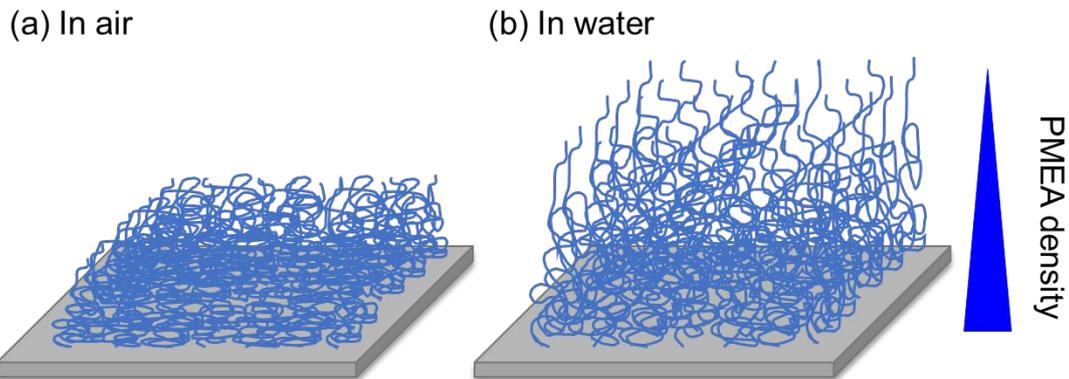


Figure 2-13. The schematic image of gPMEA (a) in air, (b) in water.

第二章

2.4.4 gPMEA 表面の XPS による元素分析

金基板および gPMEA の表面元素の分析は、X 線光電子分光器 (APEX ESCA instrument, ULVAC-PHI, Kanagawa, Japan) を用い、単色化された Al-K α 線を X 線源として 2.0×10^{-7} Pa 以下の真空度で行った。グラフト前の金基板と gPMEA ($\sigma = 0.113$) の XPS 測定の結果を **Figure 2-14** に示した。0-1000 eV のエネルギー範囲の測定 (wide scan) では、gPMEA のスペクトルが金表面のスペクトルと比較して、炭素 (C 1s) および酸素 (O 1s) 元素に起因する 284.9 eV および 534.5 eV のピーク強度が大きく増加しており (**Fig. 2-14(a)**)、各元素 (C、O) 比が PMEAs の C : O = 2 : 1 で同等であった。さらに、gPMEA のスペクトルでの C1s に由来する 280-290 eV のエネルギー範囲の結果を **Figure 2-14(b)** に示した。炭素元素に対する 3 つの異なる結合 (C=O、C-O、C-C) を実際に得られた測定結果 (○プロット) に一致するようにフィッティングを行った (OriginPro 2021)。287.4 eV (赤線、C=O、15.5%)、284.9 eV (青線、CO、51.6%)、および 283.6 eV (緑線、CC、32.9%) のフィッティング曲線に対する積分値は、PMEA の C=O、C-O、C-C 結合の比率とほぼ同等であった。また、 σ の異なる gPMEA 表面に対する XPS の結果から算出した各元素比の結果 (**Table 2-1**)、下地の金基板に由来する Au の比率が σ の増加とともに減少していたことから、金基板上への PMEAs のグラフトが正常に進行したことが示された。

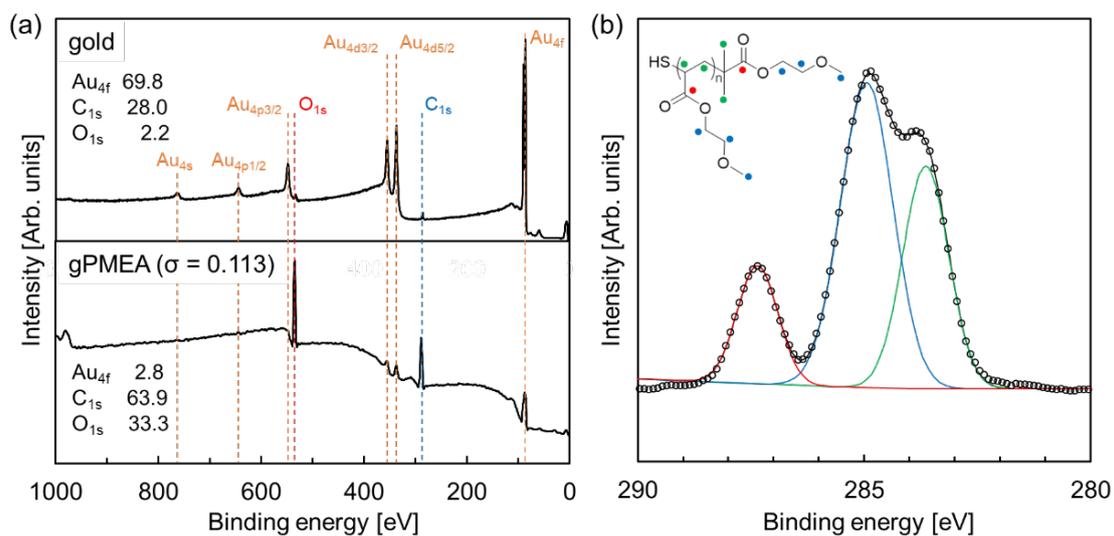


Figure 2-14. XPS charts of (a) gold surface and gPMEA ($\sigma = 0.113$) at wide scan, (b) the C_{1s} peak of gPMEA ($\sigma = 0.113$) at narrow scan (circle; experimental data, black line; fitting line, red line; O=C-O bound, blue line; C-O bound, green line; C-C bound).

Table 2-1. XPS elemental composition of gold surface and gPMEA surface with different grafting density (σ) chains/nm².

Samp.	Elemental Compositions [%]		
	C 1s	O 1s	Au 4f
gold	28.2	2.2	69.8
σ	0.020	27.5	13.5
	0.042	28.3	12.7
	0.113	63.9	33.3
	0.118	63.8	33.7
	0.124	65.6	32.1
	0.131	65.4	32.6

第二章

2.5 gPMEA の基礎物性評価

本節では、2.4 節で作製した密度の異なる gPMEA について、接触角測定、水和量および運動性の評価、界面構造の観察を行うことで、PMEA の密度によって各種パラメータがどのように変化するかを明らかにし、PMEA の密度と水和状態に関して議論する。

2.5.1 接触角測定

金基板と作製した gPMEA の水静的接触角を接触角計 (Drop Master, DMo-501SA, KYOWA) を用いて測定することで濡れ性の評価を行った。液滴法では、プローブとして浄水装置 (PURELAB Option-S 7/15, ELGA) から採水した脱イオン水を用い、滴下する水量は $2\ \mu\text{L}$ とした。接触角は着滴してから 30 秒後の値を $\theta/2$ 法により測定した。1 基板 3 点測定し、3 基板の平均値を各 σ における gPMEA の接触角とした (Table 2-2)。各 gPMEA の接触角は、下地である金基板の接触角よりも小さく、 $\sigma=0.118$ のときに最も接触角は低かった ($36.3 \pm 1.1^\circ$)。 σ の変化に伴う接触角の値が変化することについて、Brittain らの報告²³ から次のように推察した。(i) σ が低い範囲 ($\sigma < 0.042$) では、金基板の表面が露出しているため、下地の影響を受けて接触角は高くなる。さらに、親水性の高分子の σ が増加する (金表面の被覆率) と、接触角は減少する。一方、(ii) 更に σ が増加すると接触角は増加し、これはグラフトされた高分子が高密度であると高分子鎖間への水分子の浸透スペースが減少し、高分子と水の間の混和性が低くなったためだと推察できる。以上のことから、 $\sigma=0.118$ の gPMEA は他の σ の gPMEA 表面よりも水に対しての親和性をもっとも高いと推察される。

Table 2-2. Static contact angle of the sessile water droplet on gold thin film and gPMEA surfaces. The data are presented as the means (SD) (n = 9, 3 points \times 3 substrates).

Sample	gold	Grafting density of gPMEAs (σ) [chains/nm ²]					
		0.020	0.042	0.113	0.118	0.124	0.131
Contact angle [°]	83.4 (0.9)	65.8 (0.6)	66.8 (0.4)	57.0 (1.0)	36.3 (1.1)	65.7 (0.3)	67.0 (0.4)

第二章

2.5.2 gPMEA の水和量および運動性の評価

第一章で述べたように抗血栓性や血液適合性の発現には、高分子/水界面の水和状態が大きく関与することが報告されている。Hirata らは PMEА の分子量が減少すると、水界面での PMEА の局所的な運動性が速いため、水のネットワーク構造が乱され、タンパク質の吸着や血小板の粘着が抑制されたことを報告した²⁴。また、Bag らは抗血栓性の発現に関与する中間水を 3 wt% (0.031g/g) 以上含む材料は血液適合性に優れると結論付けている²⁵。このように、タンパク質の吸着や血小板の粘着などに高分子/水界面の水和した高分子鎖の運動性や水和水の量の役割を定量的に議論するために、本節では密度を制御した gPMEA 中の水和量や水和した PMEА 鎖の運動性について QCM を用いて定量的に解析した。

2.5.2.1 アドミッタンスシステムを導入した QCM (QCM-A) について

QCM は、2.4.3.1 節で述べたように超高感度の質量測定装置であることから、化学、生化学、微生物学などのさまざまな分野で使用されている²⁶⁻²⁸。大気下および溶液中で測定可能な QCM は、大気下での振動数変化と溶液中での振動数変化から試料への溶媒和の量を定量的に評価することが可能であることが報告されている²⁹⁻³¹。また QCM は水晶の共振のしやすさを表す「 Q 」値やその Q の逆数であるエネルギー散逸を表す「 D 」値を得ることができ、この D 値は QCM 基板表面に付着した試料の粘弾性的特性と関連付けられることが知られている（例えば $D=0$ の時、その試料は完全弾性体であり、 D の値が大きくなるほど試料は粘弾性的である）。本博士論文では、アドミッタンスシステムを備えた QCM (QCM-A) を使用した。

ネットワークアナライザーを用いて水晶振動子の共振周波数近傍の周波数を掃引することで水晶振動子の特性（振幅・位相・挿入損失・インピーダンス・アドミッタンスなど）を測定することが可能である。特に QCM-A では、アドミッタンスを主に測定することで、基板表面に吸着した物質や溶液の粘弾性解析や物性評価が可能である。アドミッタンスとはインピーダンスの逆数で、実数部のコンダクタンス G と虚数部のサセプタンス B に分けることができる。掃引周波数とコンダクタンスとの関係を **Figure 2-15** に示した。

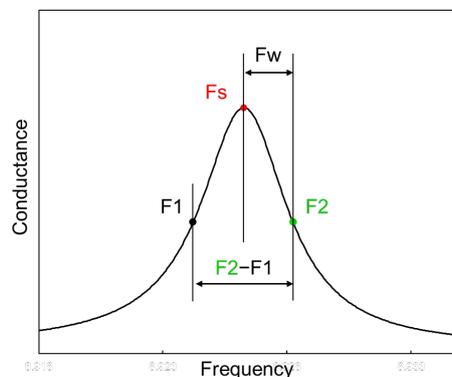


Figure 2-15. Conductance curve of quartz crystal resonator.

第二章

F_s は水量振動子の共振周波数、 F_2 は溶液の粘性負荷をキャンセルできる周波数、 F_w は振動エネルギーの損失を表す周波数であり、

$$D = \frac{F_2 - F_1}{F_s}$$

で表される D は振動エネルギーの損失を表す。そのため、QCM-A により D 値を求め、基板表面に付着している試料の粘弾性を測定することが可能である。

Furusawa らは、QCM-A を使用してポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM) などの LCST を有する高分子を基板表面にグラフトし、温度変化に対する水和量および粘弾性的パラメータについて評価した結果、低密度の PNIPAM は LCST より高温になると高分子は凝集するため、QCM から評価された水和量および粘弾性パラメータは減少したことを報告している³¹。さらに、ウシ血清アルブミン (BSA) などの生体分子の天然状態および変性状態での水和率およびエネルギー損失についても評価が行われており、生体分子の変性状態や分子量構造に応じて水和率やエネルギー損失が変化することを報告している³²。このように QCM-A は、高分子中の水和量や水和した高分子鎖の運動性を定量的に評価するための分析手法として強力なツールであるため、本博士論文で測定対象である密度を制御した gPMEA の水和状態の分析に用いた。また QCM 測定では、QCM 基板上の物質層についてモデルを立てることで粘性・弾性率・密度などを解析することが可能ではある³³⁻³⁵が、本博士論文では QCM で得られる情報を全て均一なものと仮定して、上記で記載した散逸値 D から得られる D/F の値を水和した高分子鎖の運動性と定義して議論を行う。

第二章

2.5.2.2 実験手法

QCM 用基板 (QA-A9M-AU(M)、SEIKO EG&G Co., LTD., Au コート, 一体型) をエタノールで洗浄しブローアード乾燥した後、UV オゾンクリーナー (UV253E(R)、Filgen Inc.) を用いて QCM 基板のグラフトする面を 30 min UV O₃/O₂ 処理し、QCM 基板の金表面に付着している有機物を取り除き、QCM 基板を QCM 用の透明ウェル型セル (QA-CL5) に取り付けた。その後、グラフト前の QCM 基板 (bare) の大気下および純水中での共振周波数 ($F_{\text{bare, air}}$, $F_{\text{bare, water}}$) および水中での散逸値 (D_{bare}) をアドミッタンス法により測定した。水中での測定後はメタノールを用いて金表面を洗浄し、ブローアードで風乾、その後シリカゲルを用いて低湿度 (RH < 10%) 下で乾燥を 3 時間以上行った。その後、1.0 μM に調製した PMEAS-H/メタノール溶液をウェル内に 200 μL 加え、所定の時間でグラフト反応を行った。グラフト後、メタノールで 5 回以上基板表面を洗浄し、低湿度 (RH < 10%) 下での乾燥を 12 時間以上行った。乾燥後、PMEA をグラフトした後の QCM 基板 (gPMEA) の大気下および純水中での共振周波数 ($F_{\text{PMEA, air}}$, $F_{\text{PMEA, water}}$) および水中での散逸値 (D_{PMEA}) を測定した。大気下および水中でのグラフト前後の周波数変化 ($\Delta F_{\text{PMEA, air}}$, $\Delta F_{\text{PMEA, water}}$) および散逸値変化 (ΔD_{PMEA}) を上記の測定値および次式から算出した (Fig. 2-16)。

$$\Delta F_{\text{PMEA, air}} = F_{\text{PMEA, air}} - F_{\text{bare, air}}$$

$$\Delta F_{\text{PMEA, water}} = F_{\text{PMEA, water}} - F_{\text{bare, water}}$$

$$\Delta D_{\text{PMEA}} = D_{\text{PMEA}} - D_{\text{bare}}$$

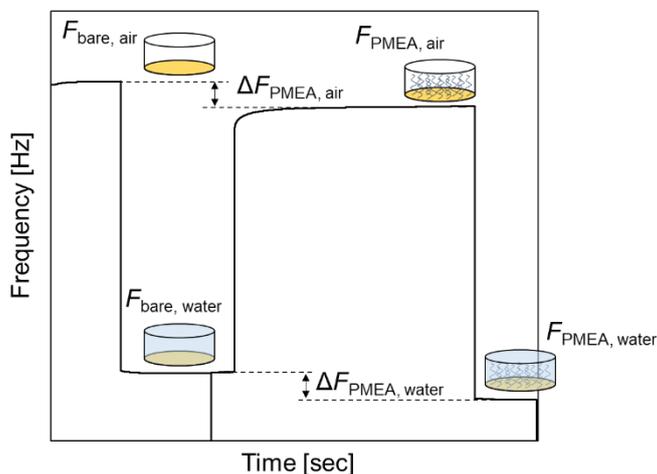


Figure 2-16. Scheme of QCM-A method. The resonance frequency of the bare substrate without PMEAS immobilization was measured in air ($F_{\text{bare, air}}$) and water ($F_{\text{bare, water}}$), respectively. Subsequently, the resonance frequency of the substrate after PMEAS immobilization was measured in air ($F_{\text{PMEA, air}}$) and water ($F_{\text{PMEA, water}}$), respectively.

2.5.2.3 結果および考察

Figure 2-17 に PMEА グラフト前後の共振周波数変化の大気中 ($-\Delta F_{\text{PMEА, air}}$) と純水中 ($-\Delta F_{\text{PMEА, water}}$) との関係を示した。 $-\Delta F_{\text{PMEА, air}}$ はグラフトした PMEА 鎖の質量による周波数変化を、 $-\Delta F_{\text{PMEА, water}}$ はグラフトした PMEА 鎖の質量に合わせて、PMEА 鎖とともに振動する水分子の質量による周波数変化を示している。 $(-\Delta F_{\text{PMEА, water}})/(-\Delta F_{\text{PMEА, air}})$ が 1.0 に近くなるほど (Fig. 2-17 中の破線)、水和した水分子の質量はなくなり、PMEА 鎖とともに振動する水分子がないことを示す。PMEА の σ は $-\Delta F_{\text{PMEА, air}}$ の増加に伴って増加しており、 $-\Delta F_{\text{PMEА, air}}$ と $-\Delta F_{\text{PMEА, water}}$ との関係が直線関係にないことから、PMEА 中の水和量は一定ではなく、 $-\Delta F_{\text{PMEА, air}}$ の変化に伴い水和量も変化した。特に $-\Delta F_{\text{PMEА, air}}$ の増加に伴って $(-\Delta F_{\text{PMEА, water}}) = (-\Delta F_{\text{PMEА, air}})$ 付近に近づく傾向を示した。

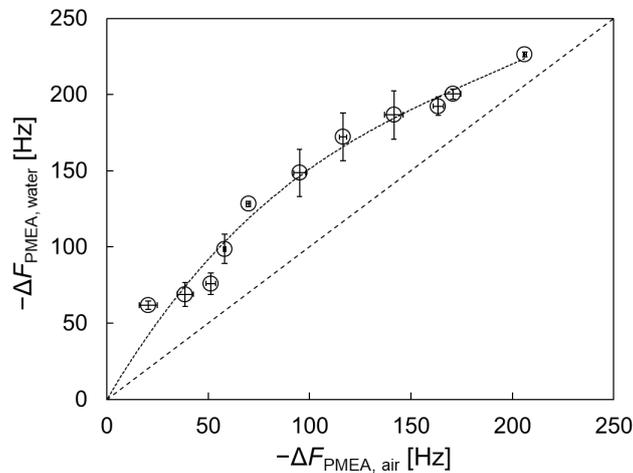


Figure 2-17. $-\Delta F_{\text{PMEА, water}}$ with $-\Delta F_{\text{PMEА, air}}$ values for gPMEА on a QCM plate in water.

次に、 $[(\Delta F_{\text{PMEА, water}})/(\Delta F_{\text{PMEА, air}})-1]$ 値を計算し、PMEА の σ と PMEА の単位質量あたりの水和量 g/g との関係を Figure 2-18 に示した。gPMEА 中の水和量 $[(\Delta F_{\text{PMEА, water}})/(\Delta F_{\text{PMEА, air}})-1]$ は $\sigma=0.02$ で 2.2 と最大であり $\sigma=0.180$ で 0.1 と最小を示すように、 σ の増加に伴って減少した (Fig. 2-18(a))。ここで、 $\sigma < 0.10$ の領域ではタンパク質の吸着の際に基板の影響を受けるため、これからの議論では $\sigma > 0.10$ の範囲の結果 (Fig. 2-18(b)) についての議論を行う。gPMEА 中の水和量 $[(\Delta F_{\text{PMEА, water}})/(\Delta F_{\text{PMEА, air}})-1]$ は PMEА の σ の増加に伴って減少した (Fig. 2-18(b))。これは σ の増加に伴い PMEА 鎖間の隙間が減少し、PMEА 鎖間に水分子が水和しにくくなったためだと推察される。しかし、本博士論文における PMEА の最大グラフト密度 ($\sigma=0.18$) での PMEА 中の水和量は 0.10 g/g であり、DSC 解析から求められるバルク PMEА の飽和含水量 (0.099 g/g)^{17,36} と同等であった。Hirata らは、PMEА は室温で水不溶性であるのに対して、PMEА/PMMA ブレンド膜における PMEА/水界面では約 50 vol% で PMEА 中に水が含まれており、バルクの含水量よりも約 5 倍水和していることを報告している³⁷。このことから、本博士論文で作製した PMEА/水界面のモデル基板である

第二章

gPMEA は含水率が高いと推察できる。さらに、グラフト高分子は高分子鎖間の絡み合いがバルク高分子より少ないため、水和が容易だと推察できる。以上のことから、gPMEA 中への水分子の拡散および水和はバルク PMEА に比べて容易に起こったと考えられる。

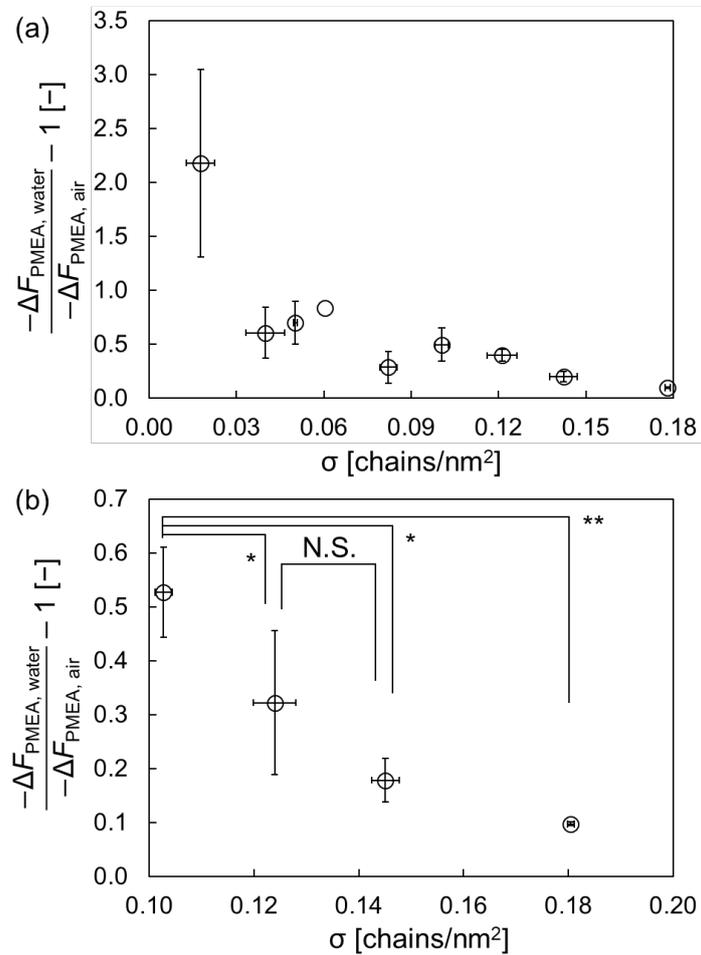


Figure 2-18. $[(\Delta F_{\text{PMEA, water}})/(\Delta F_{\text{PMEA, air}})-1]$ with grafting density (σ) chains/nm² for grafted PMEА in (a) $0 < \sigma < 0.18$ and (b) $0.10 < \sigma < 0.20$. $[(\Delta F_{\text{PMEA, water}})/(\Delta F_{\text{PMEA, air}})-1]$ indicates the amount of hydrated water in gPMEA per unit mass of PMEА chains g/g. Data are presented as the mean \pm SD ($N=4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

第二章

次に水中のグラフト PME A の $[\Delta D_{\text{PME A}}/(-\Delta F_{\text{PME A, air}})]$ の値を水和した PME A 鎖の運動性パラメータとして定義し評価した (Fig. 2-19)。一般的に σ が増加すると高分子鎖の自由体積が減少するため、高分子鎖の運動性は σ の増加に伴い減少する^{38,39}。しかし、水和した PME A 鎖の運動性は $\sigma > 0.10$ の範囲では、 $\sigma = 0.12$ の時に最大値 ($\Delta D_{\text{PME A}}/(-\Delta F_{\text{PME A, air}}) = 2.77 \pm 0.48 \times 10^{-8} \text{ Hz}^{-1}$) を示し、他の σ の PME A 鎖の運動性がほとんど変わらなかった。水中の QCM-A によって得られるエネルギー散逸には、高分子鎖 (溶質) の運動性だけでなく、高分子鎖とともに振動する水分子の状態も影響されることが知られている^{30,31}。さらに、水分子の運動性は、高分子鎖との相互作用の強さによって変化することが報告されている^{20,40,41}。以上のことより、 $\sigma \approx 0.12$ で水和した PME A 鎖の運動性が他の σ よりも高かった理由として、運動性の高い水分子が他の σ よりも多いと推察した。

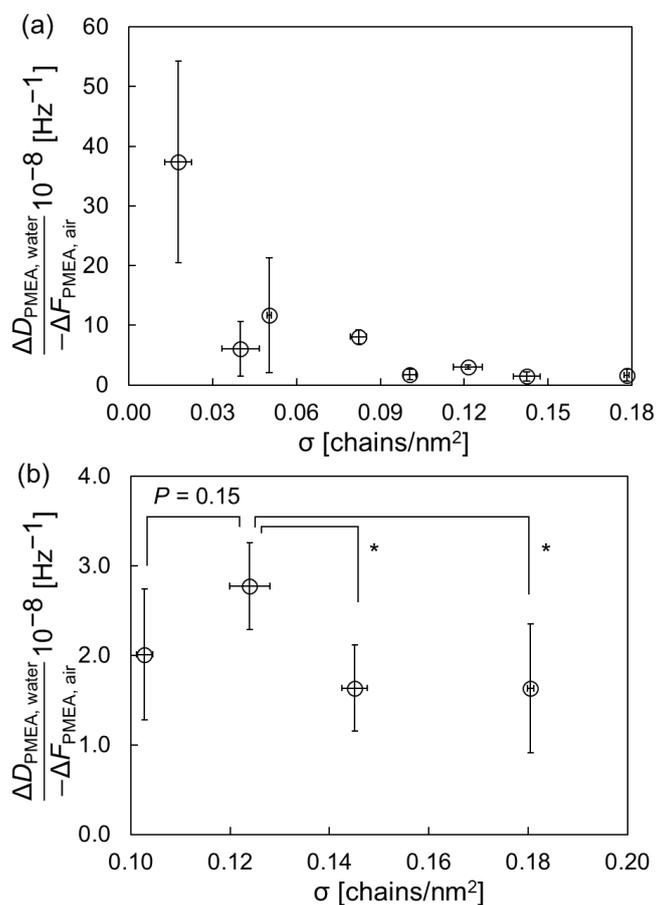


Figure 2-19. $\Delta D_{\text{PME A}}/(-\Delta F_{\text{PME A, air}})$ with grafting density (σ) chains/nm² for grafted PME A in (a) $0 < \sigma < 0.18$ and (b) $0.10 < \sigma$. $\Delta D_{\text{PME A}}/(-\Delta F_{\text{PME A, air}})$ indicates the mobility of hydrated PME A Hz⁻¹. Data are presented as the mean \pm SD ($N = 4$). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

第二章

2.5.3 gPMEA 表面の観察

本節では、gPMEA の界面構造が水和状態や抗血栓性とどのように関係するかを明らかにするために、本博士論文で評価対象であるモデル基板の gPMEA と水との界面の構造を AFM により観察した。また PMEA 密度の変化に伴い、gPMEA/水界面の微細構造が変化するのであれば、第一章で述べた「PMEA 類似高分子の微細構造は高分子と水との相分離によって形成される」ことを裏付けることができると考え、 σ と PMEA/水界面の微細構造のサイズ、割合との関係についても議論する。

2.5.3.1 AFM について

AFM は試料表面とカンチレバー（小さな片持ち梁）との間に働く力を検出することによって、試料表面の形状を初め⁴²、表面の諸物性⁴³、物質間の相互作用力⁴⁴などを定量的に測定可能な装置である。AFM は試料表面を高分解能で観察可能な電子顕微鏡とは異なり、高真空下での測定に限らず、大気下や水中など様々な環境での測定が可能であることが特徴的である。近年では、ラマン分光法⁴⁵や赤外分光法⁴⁶などの分析技術との融合によって試料表面近傍の局所的な官能基の分布などを検出した報告もある。このように AFM に関連する装置は、他の分析手法では得ることのできなかつた試料表面のナノレベルの物性を詳細に解析することができる強力なツールとして今後の発展が期待されている^{47,48}。

次に、AFM の原理について述べる。AFM はカンチレバーの探針と試料との間に働く微弱な力をカンチレバーのそりや振動の変化として、カンチレバーの背面に照射したレーザー光の反射光により感度よく検出する。このレーザー光の反射光は 2 分割または 4 分割されたフォトディレクターへ入射され、カンチレバーがたわむことによる反射光の角度を入射光の相対値として検出（光てこ法）し、カンチレバーのそりや振動の変化が一定になるようにフィードバック制御し、フィードバック量から三次元の表面形状を見積もるという仕組みである（Fig. 2-20）。

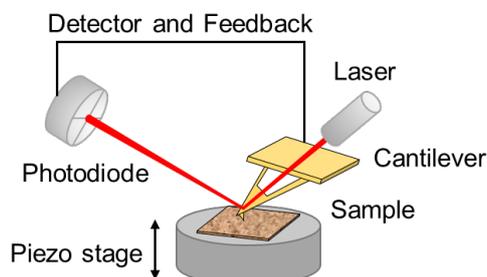


Figure 2-20. Schematic diagram of AFM.

第二章

AFM にはいくつかの測定モードがある (Fig. 2-21) ⁴⁹。AFM の原点でもあり初期から使用されているコンタクトモードは、探針と試料との接触によるカンチレバーのたわみを一定になるように掃引するモードである。これは常に探針と試料が接触することになるため、カンチレバーと試料間の摩擦によって試料にダメージが生じる恐れがあること、ドリフトの影響を受けやすいなどという欠点がある。このコンタクトモードの欠点を改善するために開発されたタッピングモードは、カンチレバーを共振周波数近傍で振動させ、探針と試料間の相互作用力を振動振幅の変化として検出することで、柔らかい試料へのダメージを低減し観察が可能になった測定モードである。このタッピングモードでは、カンチレバーが常に振動し続けていることから、凝着力がバネの復元力を上回らない限り、探針への試料への凝着を避けることができる。これにより、AFM の最大の利点である水中の試料観察にも適している。最近では、試料にかかる力を直接的に制御するコンタクトモードの利点と試料へのダメージが少ないタッピングモードの利点を併せたピークフォースタッピング (PFT) モード (フォーススペクトルモード) が開発されている。PFT モードはカンチレバーとサンプル間の各点においてフォースカーブを測定し、得られたフォースカーブから形状像だけでなく多くの機械的特性 (弾性率、凝着力、散逸エネルギー、変形量など) を定量的に測定し、各機械的特性をナノメートルスケールでマッピングすることができる点が最大の利点である。

本節ではこの PFT モードにより試料表面の形状像だけでなく、試料最表面の弾性率も測定した。

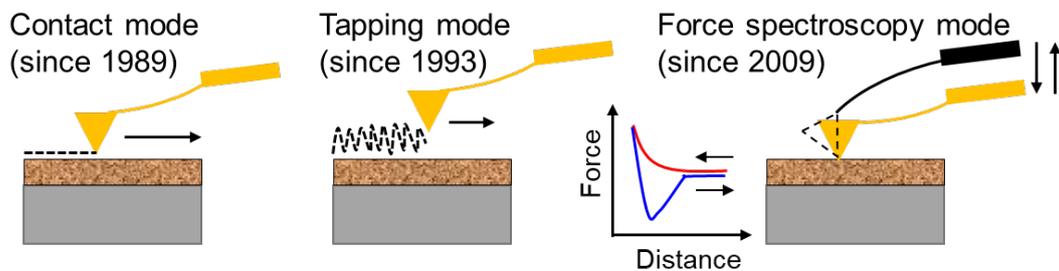


Figure 2-21. Diagrams of different AFM operating modes.

第二章

2.5.3.2 実験手法

作製した金基板および gPMEA の表面を大気下および PBS(-)中にて AFM を用いて観察した。AFM 測定には、BioScope Resolve (本体、コントローラー: Resolve KT1804-ST、Bruker)、研究用倒立顕微鏡 (ECLIPSE Ti2-U、Nikon)、デジタル CMOS カメラ (C11440-36U、浜松ホトニクス株式会社) を一式とした装置 (以下、AFM 装置) を使用した。また測定のソフトには NanoScope 9.4R1Sr3 を使用し、画像解析には NanoScope Analysis 1.9 を使用した。

2.4 節で作製した金基板および gPMEA を高性能エポキシ系急速硬化接着剤 (アラルダイト® ラピッド、ハンツマン・ジャパン株式会社) により AFM 測定用のディッシュ (35 mm ディッシュ、Non-treated Dish、IWAKI brand、Asahi glass Co., LTD.) に貼り付けた。その後 AFM 測定用ステージ (x-y スキャナ搭載) に設置した。

カンチレバーをカンチレバーホルダー (大気下では air 用、窓なしを、PBS(-)中では水中用、窓ありを用いた) に取り付け、AFM スキャナヘッドに設置した。用いたカンチレバーは、大気下での測定には Bruker 社製の RTESPA-150 (バネ定数 $k=6.0$ N/m、チップ先端の曲率半径 < 12 nm) を、PBS(-)中での測定には Bruker 社製の MSNL-10 (F) (バネ定数 $k=0.6$ N/m、チップ先端の曲率半径 < 12 nm) を用いた。レーザー光の検出が最大になるように、レーザー光の位置を合わせた。その後、AFM スキャナヘッドをステージに設置し、大気下または水中でカンチレバーのキャリブレーションを行うことで、バネ定数 k N/m、Deflection Sensitivity nm/V を定めた。測定モードとして PFT モードを選択した。カンチレバーを試料表面付近に目視で近づけた後、自動でカンチレバーを試料表面に近づけた (Engage)。測定条件 (PFT gain; 1.0~3.0, scan rate; 0.5~1.0 Hz, scan area; 2.0 μ m, peak force set point; 1.0 nN, peak force amplitude; 200 nm, peak force frequency; 1.0 kHz) を設定し、大気下では室温下 (25°C) で、PBS(-)中は 37°C で測定した。測定後、カンチレバーを試料表面から遠ざけた (Withdraw)。

第二章

2.5.3.3 結果および考察

大気下における gPMEA 表面の AFM 像 (Fig. 2-22) は、すべての σ の gPMEA でほとんど平滑であった。さらに、弾性率は下地である金表面の弾性率 (約 1.3GPa) から約 600MPa に低下したことから、すべての σ で PMEA は金の表面に均一にグラフトされたと推察される。

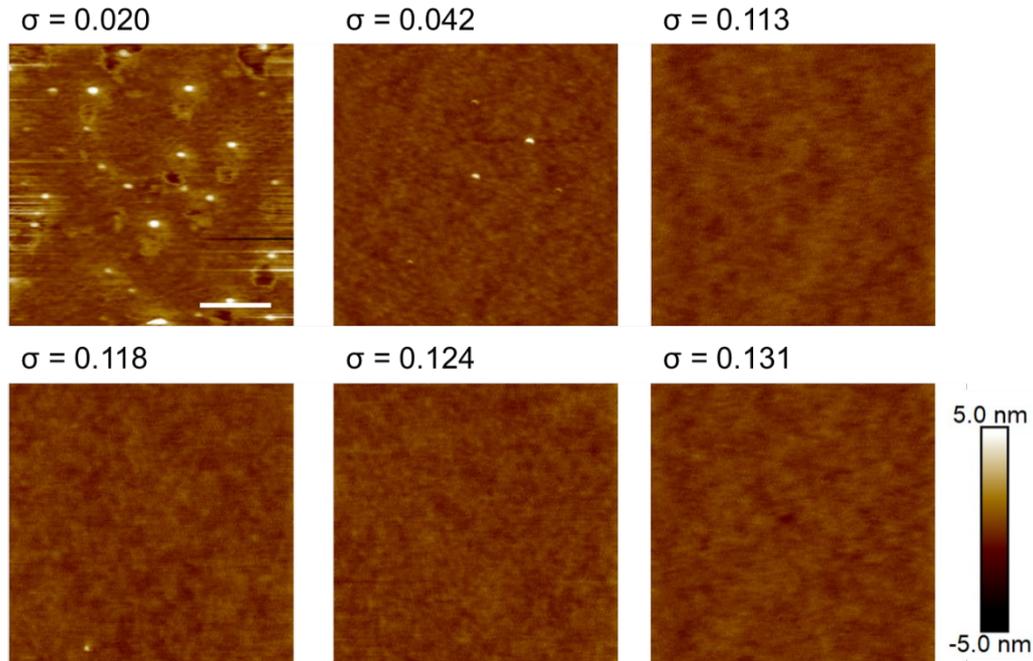


Figure 2-22. AFM topographic images of gPMEA surfaces with different grafting density (σ) under dry condition. The scale bar is 500 nm.

PBS(-)中における gPMEA 表面の AFM 観察の結果 (Fig. 2-23)、gPMEA/水界面は平滑ではなく微細構造 (山谷) が存在し、その微細構造は σ に依存しており、弾性率マッピングの結果も同一画像内で分布があった。gPMEA 表面ではどの時点においても 300 MPa 未満であり、下地である金表面の弾性率 (~数 GPa) よりも大幅に低いため、谷部では金が露出しているわけではなく、PMEA 鎖は存在すると推察される。

第二章

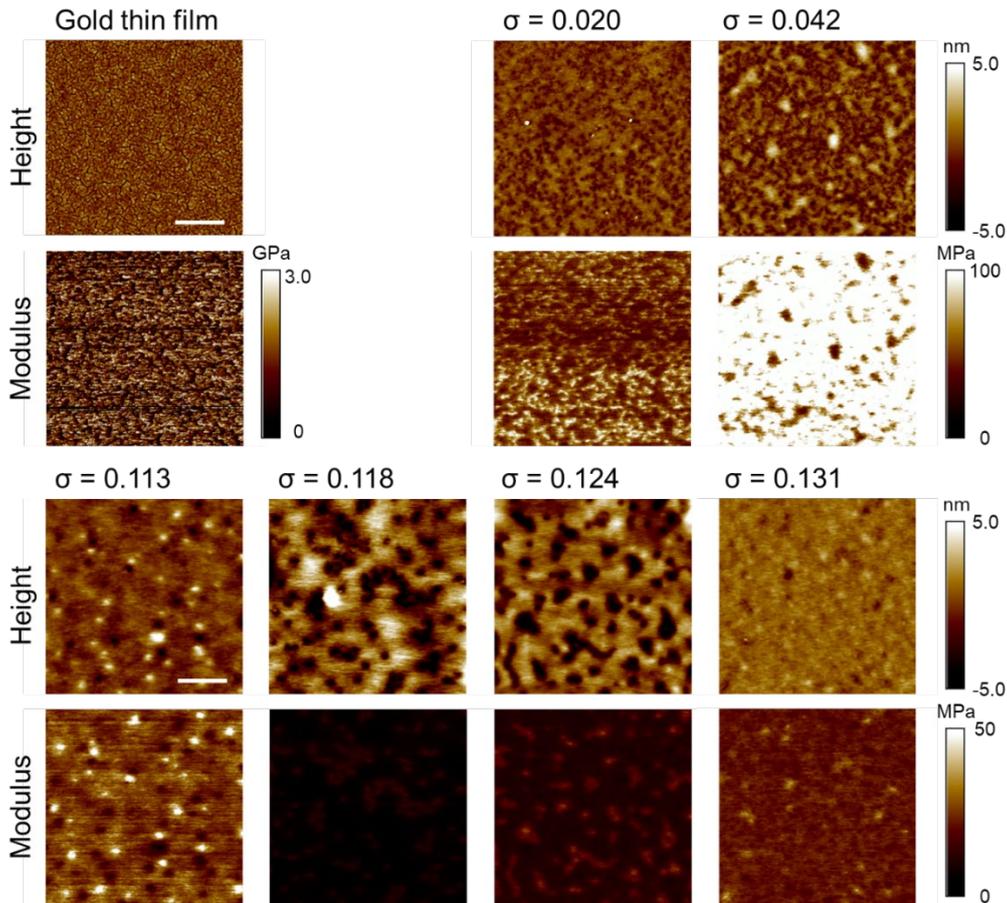


Figure 2-23. AFM topographic and elastic modulus mapping images of gold surface and gPMEA surfaces with different grafting density (σ) in PBS. The scale bar is 500 nm.

次に、PMEA 密度と gPMEA の界面構造との関係について考察する。まず、PMEA 鎖を単純なポリエチレン骨格である理想鎖として考えた場合の σ に対する PMEA 鎖の形態について議論を行う。高分子鎖がすべて C-C 結合の一本鎖から構成されている自由回転鎖モデルと仮定すると、C-C 結合長 (b) とその数 N (重合度の 2 倍、 $2n$)、C-C-C の結合角 θ より高分子鎖の両末端距離の二乗の平均 (平均二乗末端間距離 $\langle R_0^2 \rangle$) は次式で与えられる。

$$\langle R_0^2 \rangle = Nb^2 \frac{1 - \cos \theta}{1 + \cos \theta}$$

本博士論文で使用した PMEA-SH は数平均分子量 38,000 g/mol であり、モノマーである MEA は分子量 130 g/mol であることから、重合度 (n) は $38,000/130 \approx 292$ である。また $b=0.15$ nm、 $\theta=112.6^\circ$ とすると、 $\langle R_0^2 \rangle = 29.5$ となる。また高分子鎖の重心からの広がりである回転半径の二乗の平均 $\langle R_{g,0}^2 \rangle$ と $\langle R_0^2 \rangle$ の関係は、

$$\langle R_0^2 \rangle = 6 \langle R_{g,0}^2 \rangle$$

で表される。よって PMEA-SH の回転半径 ($R_{g,0}$) は 2.22 nm となり、グラフトした PMEA 鎖がマッシュルーム構造で六方最密充填構造に配置されたと仮定すると、 $\sigma > 0.059$ 以上の時、

第二章

PMEA 鎖が金表面を覆うこととなる。そのため、水中において gPMEA の $\sigma=0.020, 0.042$ ではマッシュルーム構造、 $\sigma=0.113-0.131$ では1本の高分子鎖が占めうる面積は狭くなるため、高分子鎖は高さ方向に伸びた形態になると考えられる。

$\sigma=0.020$ および 0.042 では、主に島型の構造が確認された。グラフトポリマーがヘキサゴナル配列に配置されていると仮定すると、隣接するポリマー鎖間の平均距離 (l) は 4.40 nm ($\sigma=0.020$) および 3.03 nm ($\sigma=0.042$) であり、 l は PMEA 鎖の回転半径 R_g よりも非常に長いため、隣接するポリマー鎖同士は互いに相互作用できず、AFM 像の島として観察されたのは、グラフトされた PMEA 鎖がマッシュルーム構造を形成したものと推察される⁵⁰。

$\sigma=0.113$ および 0.131 では、gPMEA/PBS(-)界面は比較的平滑であった。一方、 $\sigma=0.118-0.124$ では、ホール型の微細構造が確認された。Moeller らのグループが報告した、PMEA とポリ(2-ヒドロキシエチルアクリレート)との共重合体の LCST 測定の結果^{51,52} から、PMEA はおおよそ 4°C 付近に LCST を有すると推察され、**2.5.2 節** で述べたように gPMEA はバルクとは異なり水界面で多くの水を含んでいると考えられる。さらに、高分子ブラシは、主鎖末端が基板に固定され自由度が制限されていることから、バルク高分子とは異なり面内方向でナノメートルスケールの相分離を起こすことが Takahara らのグループにより実験的⁵³・理論的⁵⁴ アプローチから明らかにされている。以上のことから、gPMEA の密度によって微細構造が変化したことについて PMEA-水系の相分離の観点から考察する。 $\sigma=0.113-0.131$ の範囲では PMEA-水系の相分離領域内に位置するため、PMEA 鎖が水と面内方向で相分離することによって Polymer-rich 相・Water-rich 相がそれぞれ出現し、微細構造を形成したと推察できる。実際に、Murakami らは Water-rich 相を周波数変調原子間力顕微鏡 (Frequency Modulation Atomic Force Microscopy; FM-AFM) を用いて観察したことを報告している⁵⁵。また PMEA が金基板表面を完全に被覆した中で、 $\sigma=0.113$ は Water-rich 相の割合が一番高いと推察される。一方、 $\sigma > 0.131$ では、PMEA-水間でほとんど相分離を起こさず、界面が均一に Polymer-rich 相で覆われたため、ほぼ平滑な界面構造になったと推察される。

次に PMEA 密度と gPMEA/水界面に形成した Polymer-rich 相・Water-rich 相との関係について考察する。金基板表面の PMEA の被覆率と、gPMEA/水界面の Polymer-rich 相・Water-rich 相の割合は、画像解析ソフトウェア (NanoScope Analysis 1.9) を使用して各 σ の AFM 形状像 (**Fig. 2-23**) から算出した。グラフトした PMEA 鎖がマッシュルーム構造で六方最密充填構造に配置されたと仮定すると、金基板表面を PMEA で完全に覆うための理論的な PMEA グラフト密度 (σ) は、 0.059 である。 $\sigma > 0.059$ では PMEA の表面被覆率を評価し、 $\sigma > 0.059$ では Polymer-rich 相・Water-rich 相の割合を評価した。また各相は、AFM 画像の相対的位置ヒストグラムの変曲点 (**Fig. 2-24**) を閾値とした。画像解析から得られた表面被覆率の値 (**Fig. 2-25**) は、理論値とよく一致していた。 $\sigma > 0.059$ の場合に Polymer-rich 相・Water-rich 相の割合を評価した結果 (**Fig. 2-25**)、画像内の Polymer-rich 相および Water-rich 相は σ に応じて異なっていた。**Figure 2-26** に各 σ に対する Polymer-rich 相の割合をプロットした結果を示した。

第二章

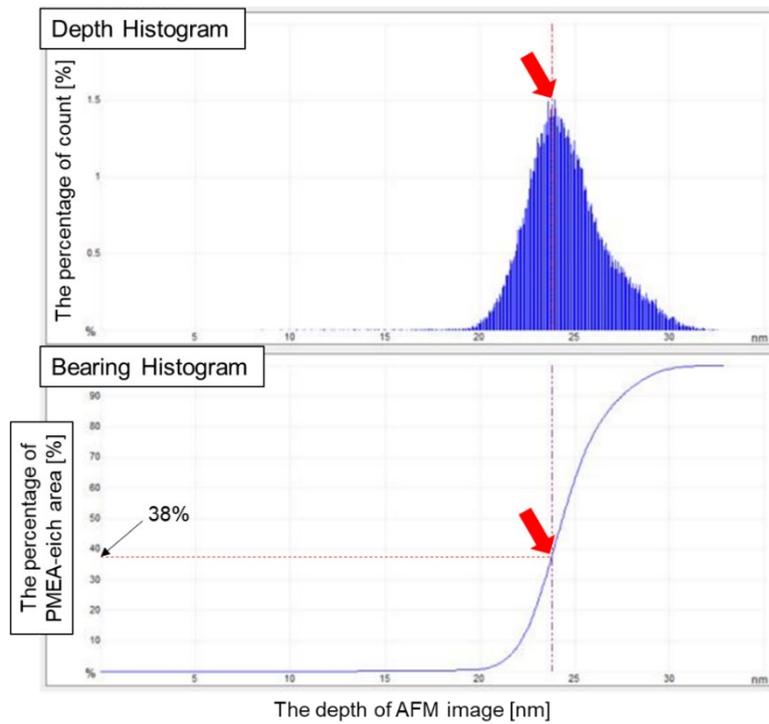


Figure 2-24. The depth histogram and bearing histogram of AFM image ($\sigma = 0.118$).

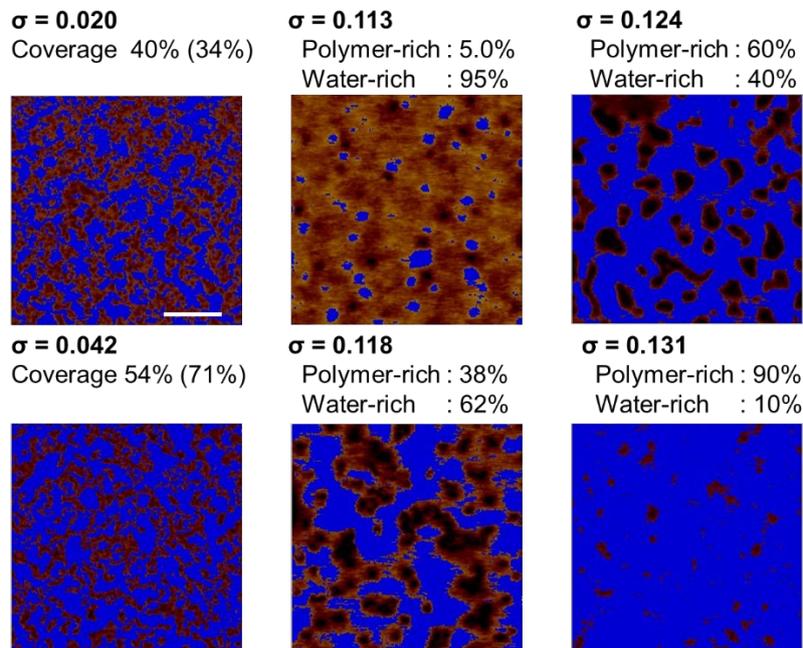


Figure 2-25. The surface coverage and percentage of Polymer-rich and Water-rich regions analyzed from AFM images (blue color shows Polymer-rich region). The values in brackets ($\sigma = 0.020, 0.042$) are theoretically estimated from $\sigma/0.059$ when the surface coverage is defined as 100% at $\sigma = 0.059$.

第二章

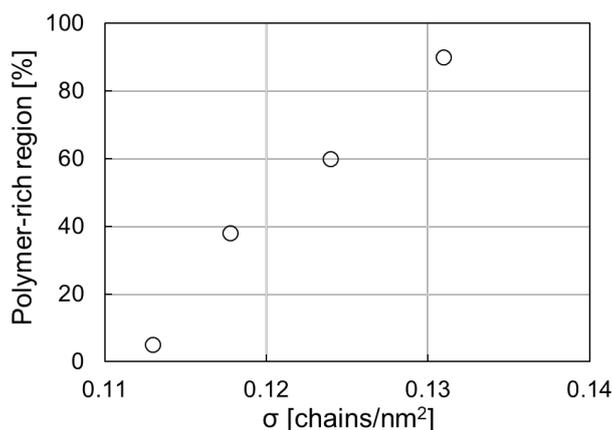


Figure 2-26. Relationship between Polymer-rich region % and grafting density (σ) chains/nm².

Polymer-rich 相の割合は、 $\sigma=0.113$ の時に最少 (5.0%) であり、 σ の増加に伴って増加し、 $\sigma=0.131$ の時に最大 (90%) となった。このように PMEА の σ が 0.11~0.13 の範囲で gPMEА は水との界面で面内相分離し、 σ の増加に伴って Polymer-rich 相は増加することを明らかにした。

2.6 結論

本章では PMEА の密度の変化に伴って、水和量や運動性、界面構造などの PMEА/水界面の物性がどのように変化するかを明らかにするために、PMEА の密度の制御を行った。密度が制御された PMEА を作製するために RAFT 重合とアミノリシス反応によって主鎖末端にチオール基を有する PMEА (PMEА-SH) の合成を行い、PMEА を金-チオール反応で金基板上にグラフトした。このグラフトの際の PMEА-SH の反応濃度・反応時間を変化させることで密度の制御を行った。またグラフトに使用した PMEА-SH は、DSC 測定によって従来のフリーラジカル重合で合成された PMEА と同様に中間水が観測された。

gPMEА は $\sigma = 0.118$ で一番対水接触角の値が小さく、水和しやすい表面であることを明らかにした。さらに QCM-A 測定によって gPMEА の水和量および水和した PMEА 鎖の運動性を評価した。水和量は PMEА の σ の増加に伴って減少する一方で、水和した PMEА の運動性が $\sigma=0.12$ 付近で最大となった。これは $\sigma=0.12$ 付近では運動性の高い水分子、特に自由水や中間水が多いことを推察した。

作製した gPMEА 表面を AFM により観察した。大気下では全ての σ で平滑であった。一方、水中では σ に応じて界面構造は変化した。 $\sigma = 0.02, 0.04$ では PMEА 鎖がマッシュルーム構造をとっており、 $0.11 < \sigma < 0.13$ では微細構造が確認でき、この構造は PMEА と水の面内相分離によるものだと結論付けた。また Polymer-rich 相の割合は $\sigma=0.113$ で一番少なく、 σ の増加に伴って増加した。以上のことから $\sigma = 0.11\sim 0.12$ 付近の密度で中間水に由来する水分子が gPMEА/水界面で多く存在していると推察される。

2.7 引用文献

1. Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G. M. & Laibinis, P. E. Molecular conformation in oligo (ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein. *J. Phys. Chem. B* **102**, 426–436 (1998).
2. Mrksich, M. & Whitesides, G. M. Using Self-assembled monolayers to understand the interactions of surfaces with cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, 55–78 (1996).
3. Wink, T., Van Zuilen, S. J., Bult, A. & Van Bennekom, W. P. Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst* **122**, 43–50 (1997).
4. Gooding, J. J., Mearns, F., Yang, W. & Liu, J. Self-assembled monolayers into the 21st century: Recent advances and applications. *Electroanalysis* **15**, 81–96 (2003).
5. Whitesides, G. M. & Prime, K. L. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science (80-.)*. **252**, 1164–1167 (1991).
6. Mrksich, M. *et al.* Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10775–10778 (1996).
7. Advincula, R. C., Brittain, W. J., Caster, K. C. & R  he, J. *Polymer Brushes*. Wiley Online Library (2004).
8. Ikada, Y. Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials* **15**, 725–736 (1994).
9. Chen, L., Yan, C. & Zheng, Z. Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors. *Mater. Today* **21**, 38–59 (2018).
10. Taylor, W. & Jones, R. A. L. Producing high-density high-molecular-weight polymer brushes by a ‘grafting to’ method from a concentrated homopolymer solution. *Langmuir* **26**, 13954–13958 (2010).
11. Unsworth, L. D., Sheardown, H. & Brash, J. L. Protein-Resistant Poly(ethylene oxide)-Grafted Surfaces: Chain Density-Dependent Multiple Mechanisms of Action. (2008). doi:10.1021/la702310t
12. Boyer, C. *et al.* Bioapplications of RAFT polymerization. *Chem. Rev.* **109**, 5402–5436 (2009).
13. Perrier, S. 50th Anniversary Perspective:RAFT Polymerization-A User Guide. *Macromolecules* **50**, 7433–7447 (2017).
14. Roth, P. J., Boyer, C., Lowe, A. B. & Davis, T. P. RAFT Polymerization and Thiol Chemistry : A Complementary Pairing for Implementing Modern Macromolecular Design. 1123–1143 doi:10.1002/marc.201100127
15. Zhang, Q., Voorhaar, L., Hoogenboom, R. & De, G. B. G. One-Pot Preparation of Inert Well-Defined Polymers by RAFT Polymerization and In Situ End Group Transformation. *Macromol. Rapid Commun.* **36**, 1177–1183 (2015).

第二章

16. Höhne, G., McNaughton, J. L., Hemminger, W., Flammersheim, H.-J. & Flammersheim, H.-J. *Differential Scanning Calorimetry*. (Springer Science & Business Media, 2003).
17. Tanaka, M. *et al.* Cold crystallization of water in hydrated poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA). *Polym. Int.* **49**, 1709–1713 (2000).
18. Tanaka, M. *et al.* Design of Polymeric Biomaterials: The ‘Intermediate Water Concept’. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **92**, 2043–2057 (2019).
19. Lourdin, D., Coignard, L., Bizot, H. & Colonna, P. Influence of equilibrium relative humidity and plasticizer concentration on the water content and glass transition of starch materials. *Polymer (Guildf)*. **38**, 5401–5406 (1997).
20. Tanaka, M. & Mochizuki, A. Effect of water structure on blood compatibility--thermal analysis of water in poly(meth)acrylate. *J. Biomed. Mater. Res. A* **68**, 684–695 (2004).
21. Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Phys.* **155**, 206–222 (1959).
22. www.thinkSRS.com. QCM100- Quartz Crystal Microbalance Theory and Calibration The QCM oscillator. *Appl. Note* **9040**, (2010).
23. Brittain, W. J. & Minko, S. A structural definition of polymer brushes. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **45**, 3505–3512 (2007).
24. Hirata, T. *et al.* Effect of local chain dynamics on a bioinert interface. *Langmuir* **31**, 3661–3667 (2015).
25. Bag, M. A. & Valenzuela, L. M. Impact of the hydration states of polymers on their hemocompatibility for medical applications: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
26. Buttry, D. A. & Ward, M. D. Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Chem. Rev.* **92**, 1355–1379 (1992).
27. Janshoff, A., Galla, H. J. & Steinem, C. Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors? *Angew. Chemie - Int. Ed.* **39**, 4004–4032 (2000).
28. Shen, Z., Yan, H., Parl, F. F., Mernaugh, R. L. & Zeng, X. Recombinant antibody piezoimmunosensors for the detection of cytochrome P450 1B1. *Anal. Chem.* **79**, 1283–1289 (2007).
29. Furusawa, H., Komatsu, M. & Okahata, Y. In Situ Monitoring of conformational changes of and peptide bindings to calmodulin on a 27 MHz quartz-crystal microbalance. *Anal. Chem.* **81**, 1841–1847 (2009).
30. Furusawa, H., Ozeki, T., Morita, M. & Okahata, Y. Added mass effect on immobilizations of proteins on a 27 MHz quartz crystal microbalance in aqueous solution. *Anal. Chem.* **81**, 2268–2273 (2009).

第二章

31. Furusawa, H., Sekine, T. & Ozeki, T. Hydration and Viscoelastic Properties of High- and Low-Density Polymer Brushes Using a Quartz-Crystal Microbalance Based on Admittance Analysis (QCM-A). *Macromolecules* **49**, 3463–3470 (2016).
32. Ozeki, T., Morita, M., Yoshimine, H., Furusawa, H. & Okahata, Y. Hydration and energy dissipation measurements of biomolecules on a piezoelectric quartz oscillator by admittance analyses. *Anal. Chem.* **79**, 79–88 (2007).
33. Höök, F. *et al.* Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study. *Anal. Chem.* **73**, 5796–5804 (2001).
34. Johannsmann, D., Reviakine, I., Rojas, E. & Gallego, M. Effect of sample heterogeneity on the interpretation of QCM(-D) data: Comparison of combined quartz crystal microbalance/atomic force microscopy measurements with finite element method modeling. *Anal. Chem.* **80**, 8891–8899 (2008).
35. Tanoue, H., Yamada, N. L., Ito, K. & Yokoyama, H. Quantitative Analysis of Polymer Brush Formation Kinetics Using Quartz Crystal Microbalance: Viscoelasticity of Polymer Brush. *Langmuir* **33**, 5166–5172 (2017).
36. Murakami, D., Segami, Y., Ueda, T. & Tanaka, M. Control of interfacial structures and anti-platelet adhesion property of blood-compatible random copolymers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **31**, 207–218 (2019).
37. Hirata, T. *et al.* Effect of interfacial structure on bioinert properties of poly(2-methoxyethyl acrylate)/poly(methyl methacrylate) blend films in water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 17399–17405 (2015).
38. He, G. L., Merlitz, H., Sommer, J. U. & Wu, C. X. Static and dynamic properties of polymer brushes at moderate and high grafting densities: A molecular dynamics study. *Macromolecules* **40**, 6721–6730 (2007).
39. Landherr, L. J. T., Cohen, C., Agarwal, P. & Archer, L. A. Interfacial friction and adhesion of polymer brushes. *Langmuir* **27**, 9387–9395 (2011).
40. Tamai, Y., Tanaka, H. & Nakanishi, K. Molecular Dynamics Study of Polymer - Water Interaction in Hydrogels. 2. Hydrogen-Bond Dynamics. **29**, 6761–6769 (1996).
41. Miwa, Y., Ishida, H., Saitô, H., Tanaka, M. & Mochizuki, A. Network structures and dynamics of dry and swollen poly(acrylate)s. Characterization of high- and low-frequency motions as revealed by suppressed or recovered intensities (SRI) analysis of ¹³C NMR. *Polymer (Guildf)*. **50**, 6091–6099 (2009).
42. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).

第二章

43. Young, T. J. *et al.* The use of the PeakForce™ quantitative nanomechanical mapping AFM-based method for high-resolution Young's modulus measurement of polymers. *Meas. Sci. Technol.* **22**, (2011).
44. Fang, H. H. P., Chan, K. Y. & Xu, L. C. Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *J. Microbiol. Methods* **40**, 89–97 (2000).
45. Anderson, M. S. Locally enhanced Raman spectroscopy with an atomic force microscope. *Appl. Phys. Lett.* **76**, 3130–3132 (2000).
46. Dazzi, A. & Prater, C. B. AFM-IR: Technology and applications in nanoscale infrared spectroscopy and chemical imaging. *Chem. Rev.* **117**, 5146–5173 (2017).
47. Dufrêne, Y. F. *et al.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nat. Nanotechnol.* **12**, 295–307 (2017).
48. Nguyen-Tri, P. *et al.* Recent applications of advanced atomic force microscopy in polymer science: A review. *Polymers (Basel)*. **12**, 1–28 (2020).
49. Liu, S. & Wang, Y. Application of AFM in microbiology: A review. *Scanning* **32**, 61–73 (2010).
50. Unsworth, L. D., Tun, Z., Sheardown, H. & Brash, J. L. Chemisorption of thiolated poly(ethylene oxide) to gold: surface chain densities measured by ellipsometry and neutron reflectometry. *J. Colloid Interface Sci.* **281**, 112–121 (2005).
51. Steinhauer, W., Hoogenboom, R., Keul, H. & Moeller, M. Copolymerization of 2-hydroxyethyl acrylate and 2-methoxyethyl acrylate via RAFT: Kinetics and thermoresponsive properties. *Macromolecules* **43**, 7041–7047 (2010).
52. Hoogenboom, R., Zorn, A. M., Keul, H., Barner-Kowollik, C. & Moeller, M. Copolymers of 2-hydroxyethylacrylate and 2-methoxyethyl acrylate by nitroxide mediated polymerization: Kinetics, SEC-ESI-MS analysis and thermoresponsive properties. *Polym. Chem.* **3**, 335–342 (2012).
53. Murakami, D., Norizoe, Y., Higaki, Y., Takahara, A. & Jinnai, H. Direct Characterization of In-Plane Phase Separation in Polystyrene Brush/Cyclohexane System. *Macromolecules* **49**, 4862–4866 (2016).
54. Norizoe, Y., Jinnai, H. & Takahara, A. Molecular simulation of 2-dimensional microphase separation of single-component homopolymers grafted onto a planar substrate. *Epl* **101**, (2013).
55. Murakami, D., Nishimura, S., Tanaka, Y. & Tanaka, M. Observing the repulsion layers on blood-compatible polymer-grafted interfaces by frequency modulation atomic force microscopy. *Mater. Sci. Eng. C* 112596 (2021). doi:10.1016/j.msec.2021.112596

第三章

密度の異なる gPMEA 表面の 抗血栓性評価

第三章

3.1 緒言

材料表面で抗血栓性を発現するためには、血栓の形成過程の機序を十分に把握する必要がある。次に血栓形成の機序について述べる¹⁾。

血栓形成反応は血液中に存在する多数の成分が関与する複雑な階層反応である。その概要は、血小板が粘着・結合し凝集塊を形成することによる「血小板血栓形成」と凝固因子の段階的反応による「血液凝固」の主要な二つの過程からなる。

3.1.1. 血小板血栓形成

血小板は大きさ 2-3 μm と赤血球の約 1/3 程度であり、血液中に 10 - 40 万個/ mm^3 存在する。また核を持たないが多量の酸素を消費する活発な細胞である。血液が異物表面に接触すると血液中に存在するフォンビルブランド因子 (von Willebrand factor :vWF) がコラーゲンまたは試料表面に吸着し、この vWF を介して血小板が粘着する。その後、血小板は活性化され、血小板顆粒のアデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate :ADP) などが放出され、この作用により近傍の多くの血小板を凝集させる。血小板表面に存在する膜糖タンパク質 GPIb/IX が vWF と相互作用して粘着し、血小板膜糖タンパク質である GPIIb/IIIa が vWF またはフィブリノーゲンと相互作用して凝集する。この連鎖的な工程により血小板血栓ができる²⁾。

3.1.2. 血液凝固

血漿中には多くの凝固系因子が含まれている。血液が異物表面に接触することによって活性化される内因系凝固と、組織損傷部位から分泌される組織トロンボプラスチンが血液に流入して活性化される外因系凝固の二つの活性化工程がある (Fig. 3-1)³⁻⁶⁾。

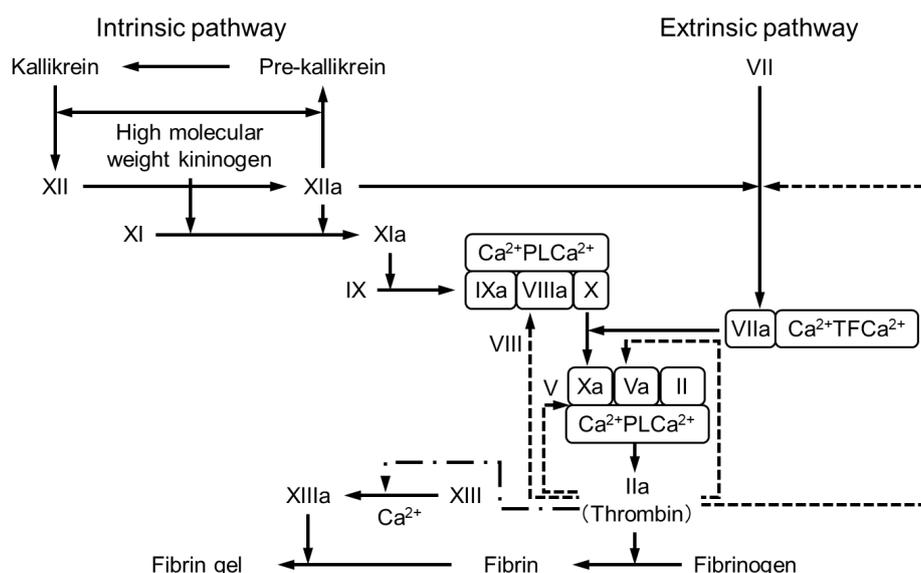


Figure 3-1. Cascade of the blood coagulation system and fibrinolytic system.

第三章

3.1.2.1. 内因系凝固

血液が負に荷電した異物表面と接触すると XII 因子、XI 因子、プレカリクレイン、高分子量キニノーゲンの四つの因子が関与して血液凝固反応が始まるが、 Ca^{2+} は必須ではない。次いで、活性化 XI 因子 (XIa 因子) は Ca^{2+} 存在下で IX 因子を分解して活性化 IXa 因子を生成する。 Ca^{2+} 存在下に IXa 因子は血小板由来のリン脂質二重層、VIII 因子、X 因子と複合体を形成し、X 因子を分解して活性化 Xa 因子を生成する。Xa 因子は VIII 因子を活性化する。VIII 因子は vWF と複合体を形成するが、活性化し VIIIa 因子になると vWF から離れ、XIa 因子の補助因子として働き Xa 因子の生成速度を増強させる。

3.1.2.2. 外因系凝固

血液が組織と接触すると血液の凝固が起こる。この時の凝固過程は次のようになる。血液凝固を促進する組織トロンボプラスチンはタンパク質の組織因子 (tissue factor :TF) とリン脂質 (phospholipid :PL) との複合体である。組織損傷部位から TF が血液に流れ、TF と Ca^{2+} 存在下で VII 因子が活性化 VIIa 因子に変換された活性 TF · Ca^{2+} · VIIa 因子複合体が形成され、この複合体が X 因子に作用して Xa 因子を生成する。

3.1.2.3. 共通凝固因子

内因系と外因系の活性化で生成した Xa 因子は Ca^{2+} 存在下で血小板由来のリン脂質二重層に結合し V 因子複合体を形成して、プロトロンビン (II 因子) をトロンビン (IIa 因子) へと活性化する。次にトロンビンは複合体から遊離し液相のフィブリノーゲンに作用し、フィブリンネットワークを形成させる。さらにトロンビンは VIII 因子に作用して活性化 XIIIa 因子を生成させ、不安定なフィブリンネットワークに働き、安定化されたフィブリンネットワークを形成させる。このフィブリンネットワークに血球細胞などが取り込まれることで、血栓が形成される。またこれらの血液凝固のカスケード反応は、数か所にフィードバック機構が存在し、活性化速度の増大、内因系と外因系の協調など血液凝固の調節で重要な働きをしている。

以上のように、どの血栓形成過程においても血小板の粘着・活性化が重要となる。この血小板の粘着・活性化には血漿中のタンパク質などが重要な役割を果たしている。特に凝固系第 I 因子であるフィブリノーゲンは、サブユニット内に血小板粘着を媒介する RGD 配列 (Arg-Gly-Asp) を 2 つ有するだけでなく、血小板活性化配列 (γ '鎖、400-411 C 末端の HHLGGAKQAGDV) を有する^{7,8}。そのため、血小板の粘着・活性化を抑制するためにはフィブリノーゲンの吸着や構造変化を抑制することが重要である。実際に、多くの研究でフィブリノーゲンの吸着量やフィブリノーゲン中の γ 鎖の露出度が小さいとき、血小板の粘着や活性化が抑制されることが報告されている⁹⁻¹¹。

第三章

本博士論文では医療製品として実際に使用されている PME A の密度が抗血栓性発現にどのような影響を与えるかについてより詳細に議論するため、第二章で作製した gPME A に対してヒト全血を用いた血小板粘着試験と血小板の粘着・活性化に関与するフィブリノーゲンの吸着試験を行った。基板表面へのタンパク質の吸着量の定量的な評価には、QCM 法¹²、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance; SPR) 法¹³、二重偏光干渉 (Dual-Polarization interferometry; DPI) 法¹⁴、ビスニコニン酸 (Bicinchoninic acid; BCA) 法¹⁵、酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)¹⁶などが用いられている。

本研究では、第二章でも述べたように QCM はナノグラム単位の分解能で質量変化を検知できタンパク質吸着の解析を得意とする点、グラフト密度 (σ) 算出の際に QCM を使用している点、またアドミッタンスシステムを導入した QCM (QCM-A) を用いることで吸着量の測定と同時に吸着したタンパク質の変性の指標となる粘弾性パラメータを測定できるという点 (第二章、2.5.2.1 節参照) から、QCM-A によってフィブリノーゲンの吸着量および変性度の評価を行った。さらに、gPME A 上に吸着したフィブリノーゲン中の血小板活性化部位である γ 鎖の露出量を ELISA により評価し、QCM 測定の結果と比較することで gPME A に吸着したフィブリノーゲンの吸着状態についても詳しく議論を行う。

3.2 評価方法

3.2.1 QCM-A によるフィブリノーゲンの吸着量および変性度の評価

本研究ではアドミッタンスシステムを導入した QCM (QCM-A) により、共振周波数変化 ($\Delta F_{\text{fibrinogen}}$) からフィブリノーゲンの吸着量を、散逸値変化 ($\Delta D_{\text{fibrinogen}}$) から吸着したフィブリノーゲンの変性度 ($\Delta D_{\text{fibrinogen}} / -\Delta F_{\text{fibrinogen}}$) を相対的に評価した (Fig. 3-2)。($\Delta D / -\Delta F$) 値についての解釈については第二章の 2.5.2.1 節を参照されたい。さらに、大気下および水中それぞれの共振周波数変化 ($\Delta F_{\text{fibrinogen, air}}$, $\Delta F_{\text{fibrinogen, water}}$) を測定することで、フィブリノーゲンの含水量を評価し、吸着および変性に伴う含水量の変化について議論する。実験手順を次に示す。

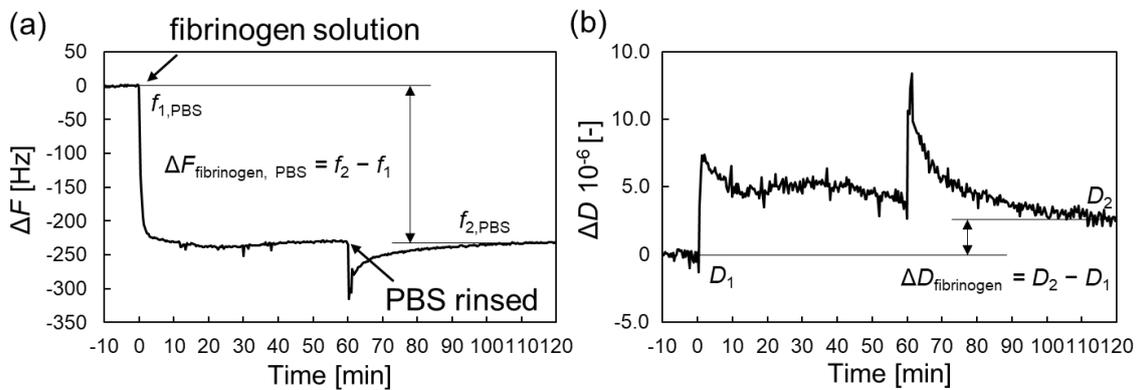


Figure 3-2. Evaluation of fibrinogen adsorption behavior about amount and state of adsorbed fibrinogen using QCM-A system. The QCM (a) frequency chart and (b) dissipation chart of associated with fibrinogen adsorption on gold surface (bare QCM plate). Fibrinogen solution indicates the add fibrinogen solution in QCM well. PBS rinsed indicates the removing fibrinogen solution and washing with PBS(-).

QCM 基板にグラフトした PMEAA 基板 (gPMEAA) および未修飾の QCM 基板を QCM 用の透明ウェル型セル (QA-CL5) に取り付けた。その後、大気下での共振周波数が安定するまで静置し、安定したときの共振周波数 (F_{air}) を測定した。次にウェル内に脱気した PBS(-) を 200 μL 加え、共振周波数が安定するまで静置した。共振周波数の安定後、測定モードを共振周波数と散逸値を同時に測定できるアドミッタンスモードに変更し、測定を開始した (Fig. 3-2(a) f_1)。約 10 分後、PBS(-)をマイクロピペットで 100 μL 取り除き、そこに 200 $\mu\text{g/mL}$ に調製したフィブリノーゲン溶液を 100 μL 滴下し (ウェル内のフィブリノーゲンの濃度は 100 $\mu\text{g/mL}$)、1 時間吸着させた。吸着後、PBS(-)で洗浄を 3 回行い、PBS(-)環境下で共振周波数が安定するまで静置した。PBS(-)環境下で共振周波数を測定後 (Fig. 3-2(a) f_2)、ウェル内のすべての溶液を除去し、純水での洗浄を 5 回行った後に、サンプルをブローアおよび低湿度環境下 ($\text{RH} < 10\%$) で 3 時間以上乾燥させた。乾燥後の共振周波数 ($F_{\text{fibrinogen, air}}$)

3.2.2 ELISA による gPMEA 上の吸着フィブリノーゲン中の γ 鎖露出度評価

ELISA は抗原抗体反応の組み合わせによって、直接法、間接法、サンドイッチ法、競合法などと呼ばれる方法が存在する。本研究では間接 ELISA 法によって密度の異なる gPMEA 上に吸着したフィブリノーゲン中の γ 鎖の露出度を評価した (Fig. 3-3)。

金基板および密度の異なる PMEA (gPMEA) に PBS(-)を滴下し、1 時間プライミング処理した。その後、PBS(-)で 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したフィブリノーゲン (from human plasma, 富士フィルム和光純薬) 溶液を 200 μL 滴下し、37°C で 1 時間吸着させた。その後、PBS(-)で洗浄を 3 回行い、一次抗体の非特異的吸着を抑制するために PBS(-)で 5 倍希釈したブロッキングワン (Blocking One, ナカライテスク株式会社) を滴下し、37°C で 1.5 時間インキュベートした。その後、PBS(-)で洗浄を 3 回行い、PBS(-)で 50 倍希釈したブロッキングワンで 2000 倍希釈した一次抗体 (mouse monoclonal antibody to fibrinogen γ (B-1), Santa Cruz Biotechnology, Inc) を滴下し、37°C で 1.5 時間インキュベートした。その後、PBS(-)で洗浄を 3 回行い、50 倍希釈のブロッキングワンで 5000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase, HRP) で標識された二次抗体 (goat anti-mouse IgG(H/L), HRP, Bio Rad) を滴下し、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、PBS(-)で洗浄を 3 回行い、1 mg/mL の 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 溶液を 200 μL ずつ滴下し、室温 (25°C) で 30 分間反応させた。呈色後、溶液を 96 well plate に 100 μL ずつ移し、マイクロプレートリーダー (Infinite 200PRO M Plex, NanoQuantPlate, TECAN) で波長 405 nm の吸光度を測定した。

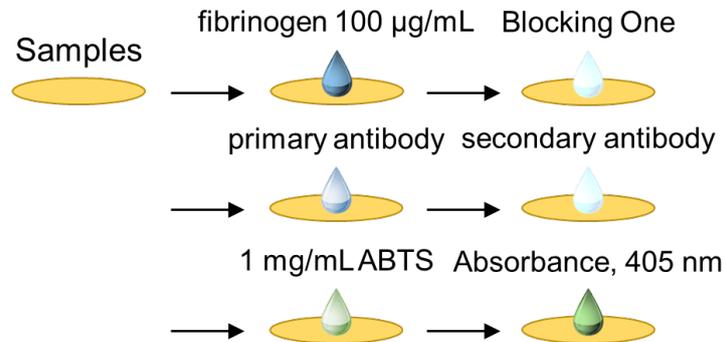


Figure 3-3. Procedure of ELISA to evaluate the γ chain exposure degree of adsorbed fibrinogen on the bare gold and gPMEA with different grafting densities.

3.2.3 血小板粘着試験

Figure 3-4 に血小板粘着試験の実験手順チャートを示した。血小板粘着試験対象である、高分子をPET基板上にスピコートしたサンプルは8×8mm角に切り取ったものを、Φ14mmのガラス基板にスパッタした金基板を使用したサンプルはそのままの状態カーボンテープを用いて事前にステージに貼り付けた。サンプルに血小板懸濁液を滴下する前に PBS(-)で1時間プライミング処理した。

ヒト全血（採血されたヒト全血, Tennessee Blood Service）は、採血後5日以内に用いた。冷蔵状態（4°C）にあったヒト全血を室温下で30分程度静置し常温に戻した。その後、転倒混和をゆっくりと3回行い、遠心分離機（テーブルトップ遠心機 2420、久保田商事株式会社）により400×g（1600 rpm）で5分間ヒト全血を遠心分離した。この時の上澄み（淡黄色半透明）を多血小板血漿（Platelet Rich Plasma; PRP）として約500 μL/1採血管で採取した。採取後、残った血液をさらに2500×g（4000 rpm）で10分間遠心分離した。この時の上澄み（淡黄色透明）を少血小板血漿（Platelet Poor Plasma; PPP）として約2 mL/1採血管で採取した。PRPをPBS(-)で800倍（20倍×20倍×2倍）薄め、血球計算盤により血小板をカウントすることでPRP中の血小板濃度を算出した。播種濃度が 4.0×10^7 cells/cm²になるようにPRPをPPPで希釈して血小板懸濁液を調製した。

サンプル上に上記で調製した血小板懸濁液を312.5 μL/cm²のせることで 4.0×10^7 cells/cm²の密度の血小板を播種した。37°Cで1時間インキュベート後、懸濁液を除去し、PBS(-)での洗浄を2回行った後、1%グルタルアルデヒド溶液（25%グルタルアルデヒド in water, ナカライテスク株式会社、をPBS(-)で希釈）に浸漬して37°Cで2時間静置することで粘着した血小板を固定化した。固定化後、PBS(-)（10分）、PBS(-):水=1:1（8分）、水（8分）に各1回ずつ浸漬することで洗浄を行い、3時間風乾させシリカゲルを入れた容器内で1日以上乾燥を行った。乾燥後、走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope; SEM, KEYENCE, RealSurfaceView VE-7800）で基板表面を観察することで血小板の粘着数をカウントし、形態から血小板の活性化度を評価した。

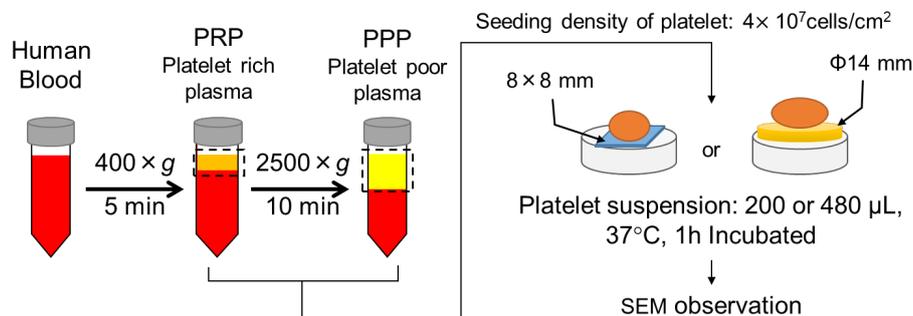


Figure 3-4. Procedure of platelet adhesion test using human whole blood.

3.3 結果と考察

3.3.1 PME A グラフト密度 (σ) とフィブリノーゲンの吸着量の関係

Figure 3-5 に PME A の σ に対するフィブリノーゲンの吸着量の結果を示した。実験のコントロールとしてフリーラジカル重合で合成した PME A を用いた。PME A は金基板には安定してコートできない^{17,18}ため、グラフトした PME A で製膜した PME A の安定性を向上させるために、gPME A ($\sigma = 0.1$) の基板上にキャストして QCM 基板上に PME A 膜を作製した。作製した PME A 膜上のフィブリノーゲン吸着量は $0.54 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、これまでに報告されている QCM¹⁹ や MicroBCA²⁰ で評価されたフィブリノーゲンの吸着量とほぼ同等の値を示した。水中で算出されるフィブリノーゲン質量はフィブリノーゲンに水和した水分子の質量も含めるため、大気下でのフィブリノーゲンの質量に比べて約 3 倍高いことが Adamczyk らの研究で報告されている²¹。そのため、水中で測定したフィブリノーゲンの実際の吸着量は QCM から算出される質量の約 1/3 である。またフィブリノーゲンは $6.5 \times 6.5 \times 47.5 \pm 2.5 \text{ nm}$ で棒状のタンパク質²²であり、end on および side on での吸着があると仮定すると、フィブリノーゲンのサイズから見積もられる単層で吸着した場合の吸着量は $0.2 \sim 2.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となる。本研究での QCM で評価した吸着したフィブリノーゲンの質量は $0.3 \sim 1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、この質量から考える乾燥質量は $0.1 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であることから、本研究に用いた全てのグラフト密度の gPME A 上のフィブリノーゲンの吸着量は単層レベルであることが予想される。次に各グラフト密度に対する結果について考察した。

$\sigma < 0.04$ の範囲では PME A の σ の増加に伴って、フィブリノーゲンの吸着量は減少した。更に σ が増加すると、 $\sigma = 0.12$ 付近までフィブリノーゲンの吸着量は減少し、PME A のキャスト膜よりもフィブリノーゲンの吸着量は小さく、フィブリノーゲンの吸着を抑制することが明らかとなった。また σ が増加 ($\sigma = 0.13$) すると、フィブリノーゲンの吸着量は $\sigma = 0.12$ の gPME A よりも有意に増加し、PME A のキャスト膜とほぼ同等であった。

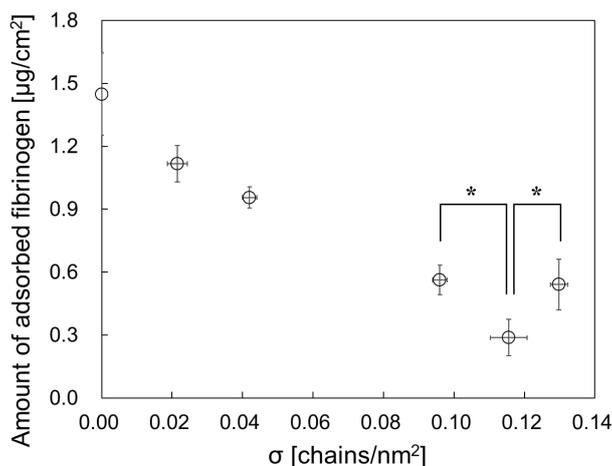


Figure 3-5. Amount of adsorbed fibrinogen onto gPME A surfaces with different grafting densities. The data are presented as the means \pm SD ($N = 3$), $*P < 0.01$.

3.3.2 PMEА グラフト密度とフィブリノーゲンの吸着状態との関係

Figure 3-6 に PMEА の σ に対する QCM-A で測定した (a) フィブリノーゲンの吸着量 (大気下および PBS(-)中) および (b) 吸着したフィブリノーゲンの含水率 ($W_{\text{fibrinogen}}$) と変性の指標の一つである粘弾性パラメータ [$\Delta D_{\text{fibrinogen}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}})$] を示した。また、この時の σ に対するフィブリノーゲンの吸着量や粘弾性パラメータは密度が低いことによって基材である金基板の影響を受けない $\sigma > 0.1$ 以上の結果を示した。フィブリノーゲンの吸着量 (含水状態) は 3.3.1 節で示した σ に対するフィブリノーゲンの吸着量の傾向と同様であり、 σ の増加とともに減少し $\sigma = 0.12$ 付近で最小となった後は σ の増加とともに増加した。特に $\sigma = 0.18$ ではフィブリノーゲンの吸着量は約 700 ng/cm^2 と他の密度 ($0.1 < \sigma < 0.18$) と比較して有意に高い値を示した。吸着したフィブリノーゲンを乾燥させた後の質量は、 $\sigma = 0.12$ 付近まで σ の増加とともに減少し、その後は σ の増加とともに吸着量は増加しており、その質量は水中の時と比べて約 4-5 分の 1 であった (Fig. 3-6(b))。gPMEА 表面に吸着したフィブリノーゲンの含水率 ($W_{\text{fibrinogen}}$) は σ の増加に伴って減少した。材料表面にフィブリノーゲンなどのタンパク質が吸着・変性するとき、材料表面とタンパク質は脱水和されることが報告されている²³。このことから σ の増加に伴ってフィブリノーゲンの吸着量が増えると同時に、その吸着したフィブリノーゲンが脱水和し構造変化することが予想される。 $\sigma = 0.12$ まではフィブリノーゲンの含水率は一定であるため、フィブリノーゲンは脱水和されず、吸着量は減少した。さらに QCM-A で得られる散逸値変化 (ΔD) から見積もられる粘弾性パラメータ [$\Delta D/(-\Delta F)$] も吸着したタンパク質の構造変化の指標となることが知られている。フィブリノーゲンの場合、 $\Delta D_{\text{fibrinogen}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}})$ の値が小さいほど基板表面に吸着したフィブリノーゲンは強固に基板表面に吸着し、構造変化していることが報告されている^{24,25}。 σ の増加に伴って gPMEА 上のフィブリノーゲンの [$\Delta D_{\text{fibrinogen}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}})$] は減少したことから、PMEА の σ が増加すると gPMEА 表面に吸着したフィブリノーゲンは吸着し構造変化していると推察できる。この QCM-A の結果から推察したフィブリノーゲンの構造変化について詳細に調査するために、フィブリノーゲンの特定の部位の露出程度を評価することが可能な ELISA 法によって、gPMEА 上に吸着したフィブリノーゲン中の血小板の活性化に関与する γ 鎖の露出量を評価した (Fig. 3-7)。

第三章

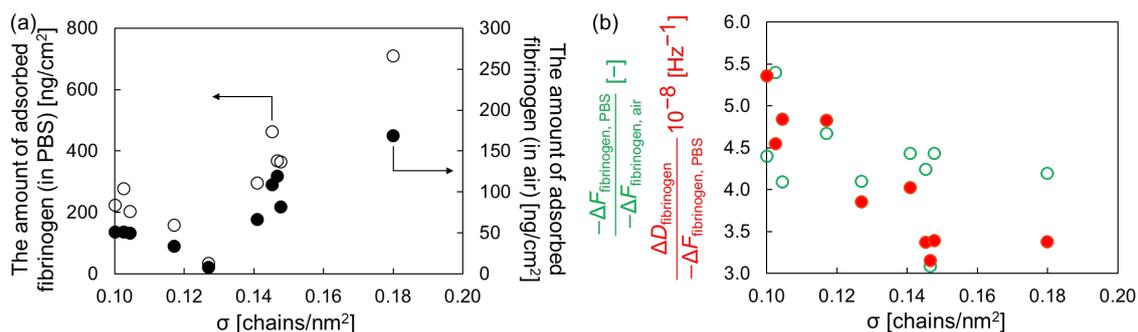


Figure 3-6. (a) The amount of adsorbed fibrinogen (○ in water, ● in air) and (b) the degree of denaturation of adsorbed fibrinogen (○ $-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, air}})$ indicates hydration degree of adsorbed fibrinogen, ● $-\Delta D_{\text{fibrinogen}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}}$ indicates viscoelasticity of adsorbed fibrinogen) with σ for gPMEA.

Figure 3-7(a)に金基板と異なる σ の gPMEA に吸着したフィブリノーゲン中の γ 鎖露出量の相対比較 (波長 405 nm の吸光度: OD405) を示した。基板表面上の γ 鎖露出量は σ の増加に伴って増加しており、 $\sigma=0.180$ では下地である金基板とほぼ同等の値を示し、 $\sigma=0.107$ の γ 鎖露出量は他の σ よりも有意に小さく、フィブリノーゲンの変性を抑制することが示された。また ELISA によって得られた OD405 (γ 鎖露出量) と QCM-A から得られた吸着したフィブリノーゲンの含水率および粘弾性パラメータとのプロット (Figure 3-7(b)) から、含水率および粘弾性パラメータの値が低くなるほど、OD405 の値は高く、すなわち表面上のフィブリノーゲンの γ 鎖の露出量が高いことが示された。以上のことから QCM-A で得られたフィブリノーゲンの構造変化の指標値と ELISA で得られた吸着したフィブリノーゲンの γ 鎖の露出量には相関があることが示された。

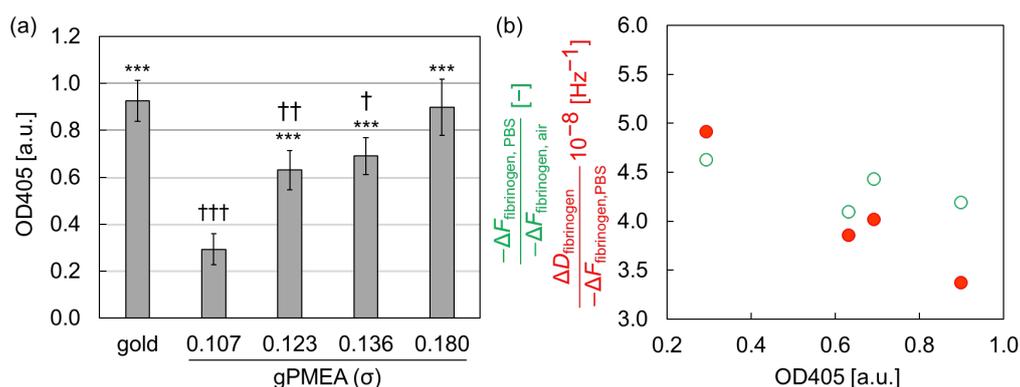


Figure 3-7. (a) Exposure degree of γ chain of fibrinogen on the gold and gPMEA surface evaluated by the ELISA. The data represent the mean \pm SD ($N=3$). *: $P < 0.005$ vs $\sigma = 0.107$. †: $P < 0.05$, ††: $P < 0.01$, †††: $P < 0.005$ vs $\sigma = 0.180$. (b) The relationship between OD405 indicating exposure degree of γ chain of fibrinogen and $-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, air}})$, $\Delta D_{\text{fibrinogen}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}})$.**

3.3.3 PMEА グラフト密度と血小板粘着数との関係

ここでは血小板が粘着するコントロールとして金基板を、血小板の粘着を抑制するコントロールとしてPET基板上にPMEAをスピコートした基板(PMEAsp, 40 μL の0.2 wt/vol%のPMEA/メタノール溶液を2回スピコート)を用いた。血小板粘着試験を行ったサンプルの表面をSEMで観察した結果 (Fig. 3-8(a))、血小板を良く粘着するgold表面では黒い粒状の血小板が多く確認され、さらに粘着した血小板は仮足を伸ばし、活性化していた。一方、gPMEAは全ての σ に対して粘着した血小板はほとんど球状を保っており、血小板の活性化を抑制していた。SEM画像から血小板の数をカウントした結果 (Fig. 3-8(b))、gPMEA上の血小板粘着数は σ の増加に伴って減少し、 $\sigma = 0.113\text{-}0.124$ の範囲でほとんど血小板の粘着を抑制した後に、 σ の増加に伴って増加した。この σ に対する血小板粘着数はフィブリノーゲンの吸着量や構造変化、 γ 鎖の露出量などの結果とよく一致しており、血小板の粘着足場タンパク質であるフィブリノーゲンの吸着量や γ 鎖の露出量に起因することが示され、特に $\sigma = 0.113$ のgPMEAは優れた抗血栓性を示した。

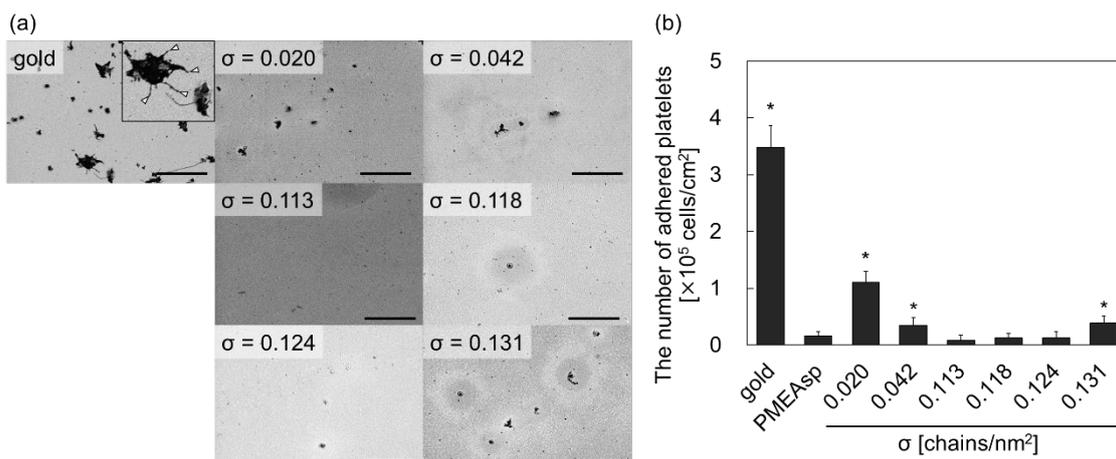


Figure 3-8. Evaluation of antithrombotic properties at gPMEA surfaces with different grafting densities. (a) SEM images of adhered platelets on gold and gPMEA surfaces. The scale bar is 25 μm . The insertion for gold is an enlarged view of an adhered platelet, and the arrowheads indicate the activating sites. (b) Number of adhered platelets on gPMEA, gold, PMEAsp (spin-coated PMEА film on PET) surfaces. The data are presented as the means \pm SD ($N = 3$, 1 donor \times 3 substrates). * $P < 0.01$ vs $\sigma = 0.113$.

3.3.4 gPMEA の水和状態とフィブリノーゲンの吸着状態および血小板粘着との相関

ここで、本章での gPMEA 上のフィブリノーゲンの構造変化や血小板の粘着の結果と、第二章で議論した gPMEA の水和量や粘弾性、水との界面に形成される微細構造との関係を議論する。タンパク質の吸着量や構造変化は材料側の水和量や運動性と相関することが報告されている²⁶⁻²⁹。第二章 2.5.2.3 節で議論したように gPMEA は σ に応じて水和量や運動性が異なるため、水和量 $[-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})]-1$ および運動性 $[\Delta D_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, water}})]$ に対する、フィブリノーゲンの吸着量および QCM-A から得られたフィブリノーゲンの含水率 ($W_{\text{fibrinogen}}$) と粘弾性パラメータ $[\Delta D_{\text{fibrinogen}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}})]$ の関係を Figure 3-9 と Figure 3-10 に示した。

フィブリノーゲンの吸着量は gPMEA 中の含水量 ($[-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})]-1$) の増加に伴って減少した。親水表面の水和層は、タンパク質の非特異的吸着を抑制する役割を果たすと考えられており³⁰⁻³³、Dai らは高分子ブラシ内の含水量とタンパク質吸着量との間には負の相関があることを報告した²⁷。gPMEA の場合、 σ に応じて含水量は変化 ($[-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})]-1 = 0.1\sim 0.6$) し、 $\sigma = 0.10\sim 0.12$ の範囲では、水和量が高い表面が形成 ($[-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})]-1 > 0.3$) されることでフィブリノーゲンの吸着を抑制したと推察できる。一方、含水 gPMEA の運動性の指標となる $\Delta D_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, water}})$ とフィブリノーゲンの吸着量には相関は見られなかった (Fig. 3-9(b))。

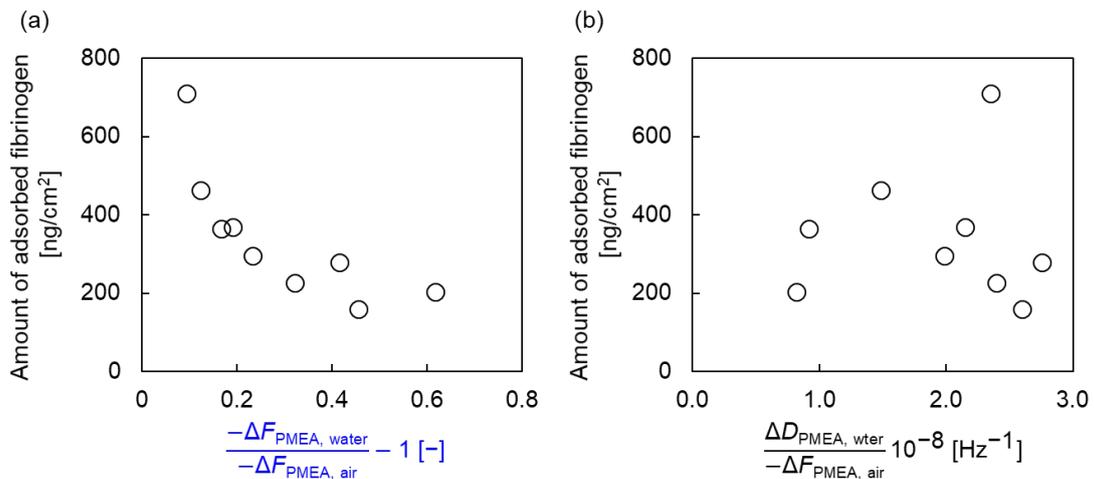


Figure 3-9. Relationship between the amount of adsorbed fibrinogen and (a) $[-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})] - 1$, (b) $\Delta D_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})$ of the hydrated gPMEA.

第三章

吸着したフィブリノーゲンの変性と gPMEA の水和状態の關係に着目すると (Fig. 3-10)、gPMEA 中の水和量および水和した PMEA 鎖の運動性がともに高い領域 ($\Delta D_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, water}}) > 2.0 \times 10^{-8} \text{ Hz}^{-1}$ 、 $[-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})]-1 > 0.2 \text{ g g}^{-1}$) では、gPMEA に吸着したフィブリノーゲンの変性度は抑制されていた。一方、水和した PMEA 鎖の運動性が高く ($\Delta D_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, water}}) > 2.0 \times 10^{-8} \text{ Hz}^{-1}$)、gPMEA 中の水和量が少ない場合 ($[-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})]-1 < 0.2 \text{ g g}^{-1}$)、吸着したフィブリノーゲンの水和量と粘弾性パラメータの値は低く、吸着したフィブリノーゲンの構造は変化していると考えられる。この gPMEA の運動性は高く水和量は低い領域では、gPMEA 表面へのフィブリノーゲンの吸着を抑制するために必要な水和水の量が不十分であったため、フィブリノーゲンは gPMEA の表面に容易に吸着しその構造は変化したと推察される。ポリマーブラシの水和水の量が多くなるほど、タンパク質の吸着は抑制されることも報告されており²⁷、水和水の量はフィブリノーゲンなどのタンパク質の吸着と変性を抑制するために重要であることが明らかとなった。次に水和した PMEA 鎖の運動性は低く ($\Delta D_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, water}}) < 2.0 \times 10^{-8} \text{ Hz}^{-1}$)、gPMEA 中の水和量が高い場合 ($[-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})]-1 > 0.4 \text{ g g}^{-1}$) でも、吸着したフィブリノーゲンは脱水和し表面に吸着していた。この水和した gPMEA の運動性は低く水和量は高い領域というのは、PMEA 鎖に結合した水分子自身の運動性も低いことが推察され、つまり、この領域の gPMEA には第一章で明記した不凍水などの高分子との相互作用が強く運動性の低い水を多量に含んでいると考えられる。PMEA の水和水は分子運動性が非常に高く、バルク水の水分子の構造を乱すことがないのに対して、フィブリノーゲンなどのタンパク質の構造を変化させる PHEMA の水和水は、バルク水の状態とは大きく異なり、分子運動性は低く、ポリマー鎖に強く結合していることが報告されている^{34,35}。したがって、フィブリノーゲンが脱水和した領域では、不凍水などの分子運動性の低い水分子が gPMEA 中に多く存在すると推察した。

第三章

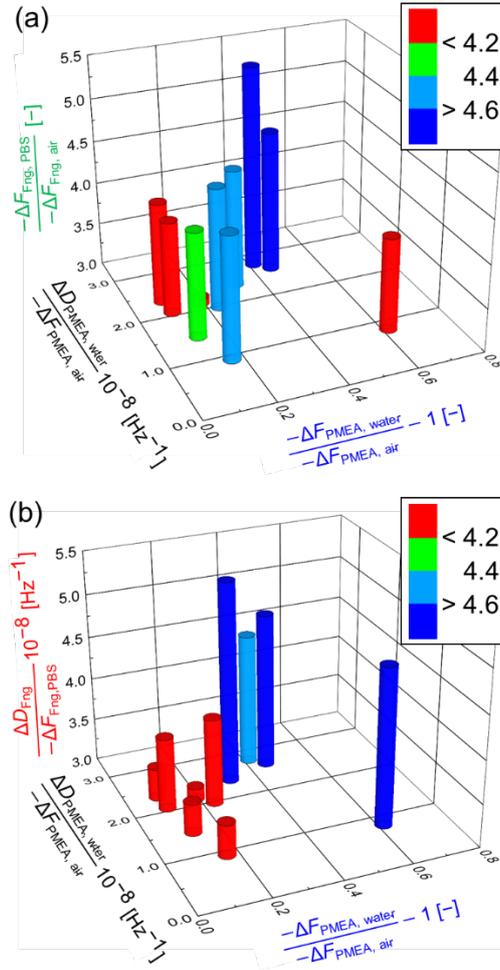


Figure 3-10. 3D histograms of the relationship among $[-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})] - 1$, $\Delta D_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})$ of the hydrated gPMEA, and (a) $-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, air}})$, (b) $\Delta D_{\text{fibrinogen}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}})$ of adsorbed fibrinogen. $(-\Delta F_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})) - 1$ indicates the amount of hydrated water in gPMEA per unit mass of PMEAs chains g g^{-1} . $\Delta D_{\text{PMEA, water}}/(-\Delta F_{\text{PMEA, air}})$ indicates the mobility of hydrated PMEAs Hz^{-1} . $-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, air}})$ indicates hydration degree of adsorbed fibrinogen, $\Delta D_{\text{fibrinogen}}/(-\Delta F_{\text{fibrinogen, PBS}})$ indicates viscoelasticity of adsorbed fibrinogen. The blue and red color cylinder indicates the low degree of denaturation of adsorbed fibrinogen and the changed and dehydrated structure of adsorbed fibrinogen, respectively.

第三章

Yoshikawa らは、表面開始原子移動ラジカル重合法によって低密度から高密度の PMEА ブラシ ($\sigma = 0.0054, 0.072, 0.75$) を作製し、総タンパク質の吸着量やその中の成分、また血小板粘着試験を行った³⁶。PMEА が他の高分子 (PHEMA, PHEA, PPEGMA) と比べて分子量の大きいアポリポタンパク質の吸着量が多く、また中程度の密度で血小板の粘着数が低いことを報告しており、血小板の粘着の抑制には PMEА は高密度ブラシによるサイズ排除効果ではなく、PMEА 膜の膨潤層による他の因子によるものと推察された。そこで、次に第二章で議論した gPMEА と水との界面に形成される微細構造と血小板粘着の関係を議論する。第二章で算出した各 σ に対する gPMEА/水界面での Polymer-rich 相と血小板粘着数との関係 (Fig. 3-11) からわかるように、Polymer-rich 相の割合が 60%未満 (Water-rich 相が 40%を超える) の場合、血小板の粘着は十分に抑制された。また gPMEА 表面の対水接触角は $\sigma = 0.113-0.118$ 付近で低い値を示したことから、Water-rich 相で水と PMEА 鎖の親和性が高いと推察される。これは、Water-rich 相での PMEА 鎖への水和が、血小板の粘着を抑制するのに非常に有効であることを明らかにした。一方、Polymer-rich 相の割合が 90%に増加すると、血小板の粘着数が有意に増加した。Geiger らは血小板の接着に対する接着リガンド間隔の影響について報告しており、接着剤リガンドの間隔を 80~100 nm に増加させると、血小板の粘着数は減少した³⁷。したがって、Polymer-rich 相が 60%未満の場合は、フィブリノーゲンの吸着の足場となるような Polymer-rich 相の間隔が広く、また連続性がないため、血小板の粘着や活性化が抑制されたことを明らかにした。

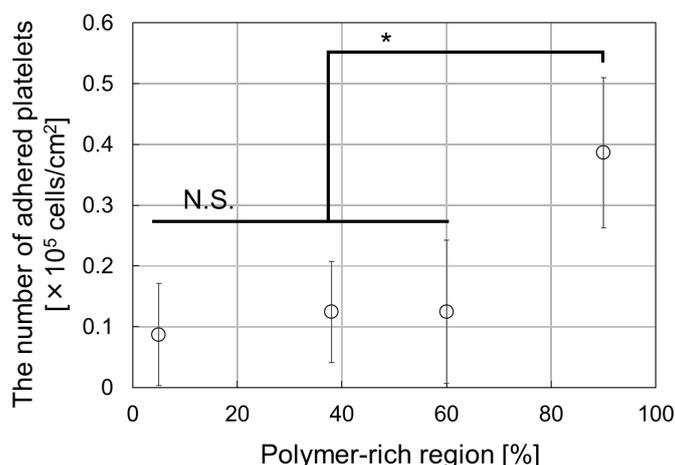


Figure 3-11. Relationship between the Polymer-rich region and the number of adhered platelets. The number of adhered platelets is presented as the means \pm SD ($N = 3, 1$ donor \times 3 substrates). $*P < 0.01$.

第三章

3.4 結論

本章では、第二章で作製したグラフト密度の異なる gPMEA に対する抗血栓性評価としてフィブリノーゲンの吸着挙動の評価および血小板粘着試験を行った。

gPMEA 上のフィブリノーゲンの吸着量および血小板の粘着数は σ の増加に伴って減少し、 $\sigma=0.12$ 付近で最小となり、その後、 σ の増加に伴って増加した。そのため、 $\sigma=0.12$ 付近の密度の gPMEA は特に抗血栓性に優れていることを明らかにした。

本章の結果および第二章で議論した gPMEA の水和量や運動性、界面構造の相関について評価したところ、フィブリノーゲンの吸着量は水和した PMEA 鎖の運動性とは相関がなく、gPMEA 中の水和量に対して負の相関を示した。またフィブリノーゲンの変性は水和した gPMEA の運動性および水和量がともに高い領域で抑制された。血小板の粘着数は gPMEA/水界面の PMEA-rich 相が 60%以下、すなわち Water-rich 相が 40%以上の時に有意に少なく、血小板の粘着と gPMEA/水界面の微細構造には密接な関係があることが示された。

gPMEA の Water-rich 相が優れた血小板粘着抑制を示すこと、また水和量と運動性がともに高い領域でフィブリノーゲンの変性が抑制されたことから、Water-rich 相とは水和水の量が多く、水和した高分子鎖の運動性が高い領域であり、多くの高分子鎖が水中に分散して適度に水和していることから、PMEA/水界面に大量の IW が存在すると推察した。したがって、タンパク質の吸着や変性、血小板の粘着を抑制するためには、高分子/水界面に多くの高分子鎖が水和し分散する界面を設計することが重要であることが示唆された。

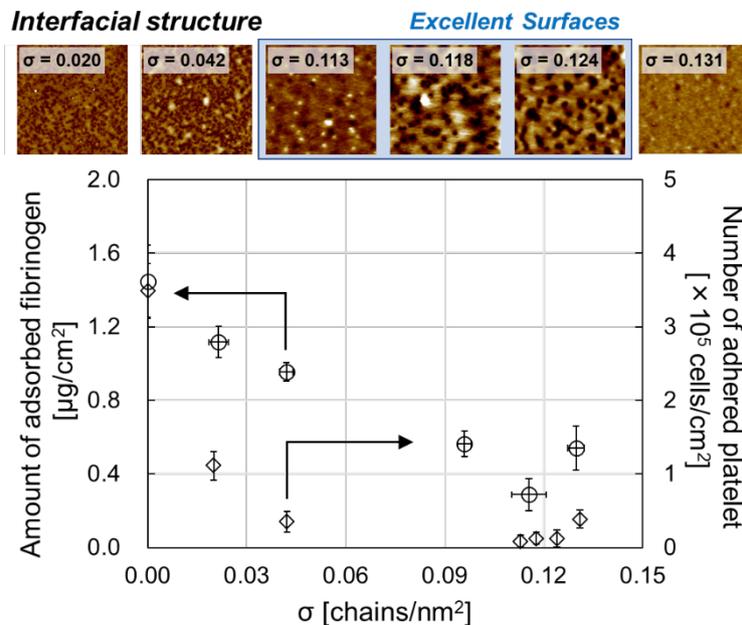


Figure 3-12. Summary of antithrombogenicity for the gPMEA with different grafting densities.

3.5 引用文献

1. Hickman, D. S. A., Pawlowski, C. L., Sekhon, U. D. S., Marks, J. & Gupta, A. Sen. Biomaterials and Advanced Technologies for Hemostatic Management of Bleeding. *Adv. Mater.* **30**, 1–40 (2018).
2. Ruggeri, Z. M. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb. Haemost.* **78**, 611–616 (1997).
3. Furie, B. & Furie, B. C. Thrombus formation in vivo. *J. Clin. Invest.* **115**, 3355–3362 (2005).
4. Furie, B. & Furie, B. C. Mechanisms of thrombus formation. Mechanisms of Disease. *N. Engl. J. Med.* **359**, 938–49 (2008).
5. Rivera, J., Lozano, M. L., Navarro-Núñez, L. & Vicente García, V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* **94**, 700–711 (2009).
6. Hoffman, M. & Monroe, D. M. Coagulation 2006: A Modern View of Hemostasis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **21**, 1–11 (2007).
7. Mosesson, M. W., Homandberg, G. A. & Amrani, D. L. Human platelet fibrinogen gamma chain structure. *Blood* **63**, 990–995 (1984).
8. Ware, S., Anderson, W. F., Donahue, J. P. & Hawiger, J. Structure of the fibrinogen γ -chain integrin binding and factor XIIIa cross-linking sites obtained through carrier protein driven crystallization. *Protein Sci.* **8**, 2663–2671 (1999).
9. Seo, J. H. *et al.* Designing dynamic surfaces for regulation of biological responses. *Soft Matter* **8**, 5477–5485 (2012).
10. Xu, L. C., Bauer, J. W. & Siedlecki, C. A. Proteins, platelets, and blood coagulation at biomaterial interfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **124**, 49–68 (2014).
11. Chen, X. & Taguchi, T. Hydrophobically modified poly(vinyl alcohol)s as antithrombogenic coating materials. *Mater. Sci. Eng. C* **102**, 289–298 (2019).
12. Rodahl, M. *et al.* Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discuss.* **107**, 229–246 (1997).
13. Green, R. J., Davies, J., Davies, M. C., Roberts, C. J. & Tendler, S. J. B. Surface plasmon resonance for real time in situ analysis of protein adsorption to polymer surfaces. *Biomaterials* **18**, 405–413 (1997).
14. Ouberai, M. M., Xu, K. & Welland, M. E. Effect of the interplay between protein and surface on the properties of adsorbed protein layers. *Biomaterials* **35**, 6157–6163 (2014).
15. Yamashita, S. *et al.* Effect of Honeycomb-Patterned Surface Topography on the Adhesion and Signal Transduction of Porcine Aortic Endothelial Cells. *Langmuir* **23**, 8114–8120 (2007).
16. Bergström, K. *et al.* Reduction of fibrinogen adsorption on PEG-coated polystyrene surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **26**, 779–790 (1992).

第三章

17. Hirata, T., Matsuno, H., Tanaka, M. & Tanaka, K. Surface segregation of poly(2-methoxyethyl acrylate) in a mixture with poly(methyl methacrylate). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 4928–4934 (2011).
18. Nishimura, S. N., Ueda, T., Kobayashi, S. & Tanaka, M. Silsesquioxane/Poly(2-methoxyethyl acrylate) Hybrid with Both Antithrombotic and Endothelial Cell Adhesive Properties. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2**, 4790–4801 (2020).
19. Tanaka, M. *et al.* Study on kinetics of early stage protein adsorption on poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) surface. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **203**, 195–204 (2002).
20. Kobayashi, S., Wakui, M., Iwata, Y. & Tanaka, M. Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)s: Nonthrombogenic Polymer Family with Tunable Protein Adsorption. *Biomacromolecules* **18**, 4214–4223 (2017).
21. Kubiak, K., Adamczyk, Z. & Wasilewska, M. Mechanisms of fibrinogen adsorption at the silica substrate determined by QCM-D measurements. *J. Colloid Interface Sci.* **457**, 378–387 (2015).
22. Hall, C. E. & Slayter, H. S. The Fibrinogen Molecule : Its Size , Shape , and Mode of Polymerization. *J. Biophys. biotechnical Cytol.* **5**, 11–27 (1959).
23. Vogler, E. A. Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials* **33**, 1201–1237 (2012).
24. Hemmersam, A. G., Foss, M., Chevallier, J. & Besenbacher, F. Adsorption of fibrinogen on tantalum oxide, titanium oxide and gold studied by the QCM-D technique. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **43**, 208–215 (2005).
25. Guicai, L., Xiaoli, S., Ping, Y., Ansha, Z. & Nan, H. Investigation of fibrinogen adsorption on solid surface by quartz crystal microbalance with dissipation(QCM-D) and ELISA. *Solid State Ionics* **179**, 932–935 (2008).
26. Unsworth, L. D., Sheardown, H. & Brash, J. L. Protein Resistance of Surfaces Prepared by Sorption of End-Thiolated Poly(ethylene glycol) to Gold: Effect of Surface Chain Density. *Langmuir* **21**, 1036–1041 (2005).
27. Dai, W. *et al.* A negative correlation between water content and protein adsorption on polymer brushes. *J. Mater. Chem. B* (2019). doi:10.1039/C8TB03061H
28. Ge, A., Seo, J. H., Qiao, L., Yui, N. & Ye, S. Structural Reorganization and Fibrinogen Adsorption Behaviors on the Polyrotaxane Surfaces Investigated by Sum Frequency Generation Spectroscopy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 22709–22718 (2015).
29. Beckner, W., He, Y. & Pfaendtner, J. Chain Flexibility in Self-Assembled Monolayers Affects Protein Adsorption and Surface Hydration: A Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B* **120**, 10423–10432 (2016).
30. Chen, S., Li, L., Zhao, C. & Zheng, J. Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials. *Polymer (Guildf)*. **51**, 5283–5293 (2010).

第三章

31. Chang, R. *et al.* Water near bioinert self-assembled monolayers. *Polym. J.* **50**, 563–571 (2018).
32. Ishihara, K. Revolutionary advances in 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers as biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **107**, 933–943 (2019).
33. Tanaka, M. *et al.* Design of Polymeric Biomaterials: The ‘Intermediate Water Concept’. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **92**, 2043–2057 (2019).
34. Miwa, Y., Ishida, H., Saitô, H., Tanaka, M. & Mochizuki, A. Network structures and dynamics of dry and swollen poly(acrylate)s. Characterization of high- and low-frequency motions as revealed by suppressed or recovered intensities (SRI) analysis of ^{13}C NMR. *Polymer (Guildf)*. **50**, 6091–6099 (2009).
35. Miwa, Y., Ishida, H., Tanaka, M. & Mochizuki, A. ^2H -NMR and ^{13}C -NMR Study of the Hydration Behavior of Poly(2-methoxyethyl acrylate), Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and Poly(tetrahydrofurfuryl acrylate) in Relation to Their Blood Compatibility as Biomaterials. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **21**, 1911–1924 (2010).
36. Yoshikawa, C., Hattori, S., Huang, C. F., Kobayashi, H. & Tanaka, M. In vitro and in vivo blood compatibility of concentrated polymer brushes. *J. Mater. Chem. B* **9**, 5794–5804 (2021).
37. Zarka, R. *et al.* Differential Modulation of Platelet Adhesion and Spreading by Adhesive Ligand Density. *Nano Lett.* **19**, 1418–1427 (2019).

第四章

PMEA の密度と水和構造との関係

第四章

4.1 緒言

第三章まではグラフト密度(σ)の異なる gPMEA について、親水性や水和水量、運動性、界面構造の評価を行い、各種物性とフィブリノーゲンの吸着・変性、血小板の粘着との関係を議論することで PMEA の密度がもたらす影響について考察した。 $\sigma = 0.11-0.12$ の範囲の gPMEA において、水和水量・水和した高分子鎖の運動性がともに高く、さらに Water-rich 相が多く存在するため優れた血小板粘着抑制を示すことを明らかにし、この Water-rich 相が中間水 (IW) の存在と密接な関係にあると推察した。この gPMEA の σ 、特に Water-rich 相と IW との関係性について明らかにすることができれば、抗血栓性や血液適合性材料の開発に向けて大きな知見を得ることが期待できる。近年、湿度を制御して高分子ブラシ内の水和構造を解析している研究が多く存在する¹⁻⁴。Yamazoe らは、潤滑性や防汚性に優れる高分子電解質ブラシに対して、湿度制御下で水分子の局所的な水素結合状態の分析が可能な超高分解能軟 X 線発光分光法 (High-resolution soft X-ray emission spectroscopy; XES)^{5,6} を用いることで、バルク水と高分子電解質ブラシ中の水の水素結合にどのような違いがあるかを報告した³。高分子電解質ブラシ中の水は、室温でありながら氷のようにほぼすべての水素結合でつながれており、氷よりは歪んだ水素結合状態にあることを明らかにしている。また、Nagasawa らは QCM を用いて湿度制御下における各種高分子ブラシ中の水分子の量を算出し、タンパク質吸着との相関性について議論している¹。このように σ の異なる gPMEA に対して湿度制御下でグラフト高分子中の水分子の吸着挙動やその湿度下での水和状態を解析することで、IW との関連性や新たな知見が得られることが期待できる

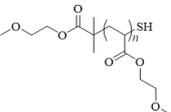
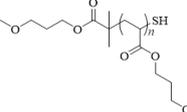
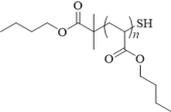
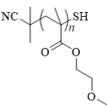
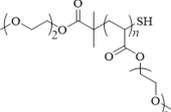
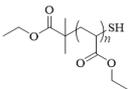
そこで本章では、 σ の異なる gPMEA の水和状態について血液適合性の発現因子と考えられる IW との関係性についてより詳細に議論するために、IW の量のことなる PMEA 類似高分子を用いて、第二章で行った水和した高分子の水和水量と運動性について QCM-A を用いて評価した。また、湿度変化に伴う水和状態の違いを、吸着水の量と物質の粘弾性を定量的に測定可能な QCM-A を用いて評価することで、各種グラフト高分子および σ の異なる gPMEA の水和状態、特に各種高分子・PMEA の密度・IW との関係について詳細に議論する。

第四章

4.2 PMEAS 類似高分子とグラフト用の溶液調製

本章で使用する、PMEA-SH と同様に RAFT 重合及び主鎖末端の還元反応によって合成された PMEAS 類似高分子の化学構造、重合度 (N)、分子量 (M_n)、分子量分散度 (D) および飽和含水時における IW の量を **Table 4-1** に示した。本博士論文では、各高分子をグラフトした際に鎖長が同等になるように重合度 (N) がおよそ同じ高分子を使用した。

Table 4-1. Chemical structure, degree of polymerization (N), number average molecular weight (M_n), molecular weight distribution (D) and amount of IW of PMEAS analogues.

name	Chemical structure	N	M_n [kg/mol]	D	IW [mg/g]
poly(2-methoxyethyl acrylate) : PMEAS-SH		292	38.0	1.17	49.7
poly(3-methoxypropyl acrylate) : PMPA-SH		291	42.0	1.19	40.0
poly(<i>n</i> -butyl acrylate) : PBA-SH		297	38.0	1.07	7.3
poly(2-methoxyethyl methacrylate) : PMEMA-SH		278	40.0	1.15	—
poly[2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate] : PME2AS-SH		258	45.0	1.17	310
poly(ethyl acrylate) : PEA-SH		300	30.1	1.09	13.5

PMEAS-SH はメタノールを用いて 1.0 μM 、MPMA-SH, PME2AS-SH, PEA-SH はメタノール、PBA-SH はメタノール/エタノール (V/V=1/1)、PMEMA-SH はメタノール/水 (v/v=9/1) をそれぞれ用いて 10 μM の濃度の溶液を調製した。全ての高分子溶液は溶液中のほこり等を取り除くため、シリンジフィルター (ADVANTEC® Toyo Roshi Kaisha, PORE SIZE 0.20 μm) にかき、4°C の冷蔵庫内にて保管し、2 週間以内に使用した。

第四章

4.3 グラフト高分子の水和量および運動性の評価

本節では 2.5.2 節と同様の手法によって、4.2 節で調製した高分子溶液から作製したグラフト PMEA 類似高分子（全 5 種）中の水和量や水和した高分子鎖の運動性を評価し、 σ の変化と水和量や運動性といった高分子の水和状態との関連性について議論する。

4.3.1 実験手法

QCM 用基板 (QA-A9M-AU(M)、SEIKO EG&G Co., LTD., Au コート, 一体型) をエタノールで洗浄しブローアード乾燥させた後、UV オゾンクリーナー (UV253E(R)、Filgen Inc.) を用いて QCM 基板の両面を 30 min UV O₃/O₂ 処理し、QCM 基板の金表面に付着している有機物を取り除いた。UV O₃/O₂ 処理した QCM 基板を QCM 用の透明ウェル型セル (QA-CL5) に取り付けた。その後、2.5.2.2 節と同様の実験手順で実験を行った。グラフト前の QCM 基板の大気下および純水中での共振周波数 ($F_{\text{before, air}}$, $F_{\text{before, water}}$) および水中での散逸値 (D_{before}) を測定した。水中での測定後はメタノールを用いて金表面を洗浄し、シリカゲルを用いて低湿度 (RH < 10%) 下で乾燥を行った。その後、調製した高分子溶液をウェル内に 200 μ L 加え、所定の時間でグラフト反応を行った。グラフト後、高分子溶液に用いた溶媒を用いて、5 回以上基板表面を洗浄し、低湿度 (RH < 10%) 下での乾燥を 12 時間行った。乾燥後、高分子をグラフトした後の QCM 基板 (gPolymer) の大気下および純水中での共振周波数 ($F_{\text{after, air}}$, $F_{\text{after, water}}$) および水中での散逸値 (D_{after}) を測定した (Fig.4-1)。大気下および水中でのグラフト前後の周波数変化 ($\Delta F_{\text{gPolymer, air}}$, $\Delta F_{\text{gPolymer, water}}$) および散逸値変化 ($\Delta D_{\text{gPolymer}}$) を算出した。

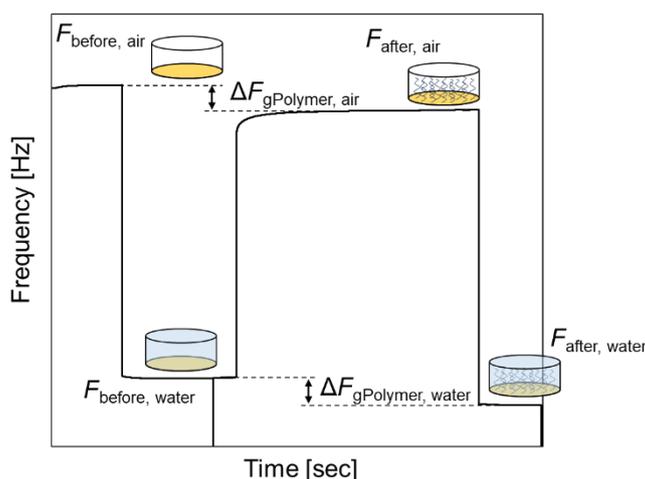


Figure 4-1. Scheme of QCM-A method. The resonance frequency of the bare substrate without polymer immobilization was measured in air ($F_{\text{before, air}}$) and water ($F_{\text{before, water}}$), respectively. Subsequently, the resonance frequency of the substrate after polymer immobilization was measured in air ($F_{\text{polymer, air}}$) and water ($F_{\text{polymer, water}}$), respectively.

4.3.2 結果および考察

Figure 4-2 に各種高分子のグラフト前後の共振周波数変化の大気中 ($-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}$) と純水中 ($-\Delta F_{\text{gPolymer, water}}$) との関係を示した。 $-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}$ はグラフトした高分子の質量による周波数変化 (ΔF) を、 $-\Delta F_{\text{gPolymer, water}}$ はグラフトした高分子鎖の質量と高分子鎖とともに振動する水分子の質量とを合わせ質量による周波数変化を示している。各種高分子の結果に注目すると、疎水性高分子でありバルクでの飽和含水量の少ない PEA や PBA⁷ は、 $-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}$ と $-\Delta F_{\text{gPolymer, water}}$ との関係はほぼ直線的な関係であった。一方、比較的親水的であり飽和含水量の多い PME A の類似高分子である PMPA⁸、PME2A⁹ では gPME A と同様に $-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}$ の増加とともに $-\Delta F_{\text{gPolymer, water}}$ は増加するが、その増加量はある $-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}$ の値を境に減少した ($-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}$ と $-\Delta F_{\text{gPolymer, water}}$ の関係が非直線的であった)。これについて、より詳細に議論するため Figure 4-3 に Figure 4-2 から算出された σ とモノマーユニット当たり水和した水分子の数との関係を示した。

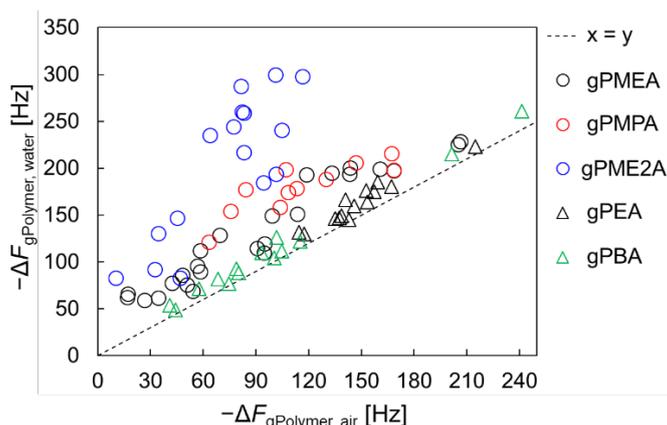


Figure 4-2. $-\Delta F_{\text{gPolymer, water}}$ with $-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}$ values for gPolymer on a QCM plate in water.

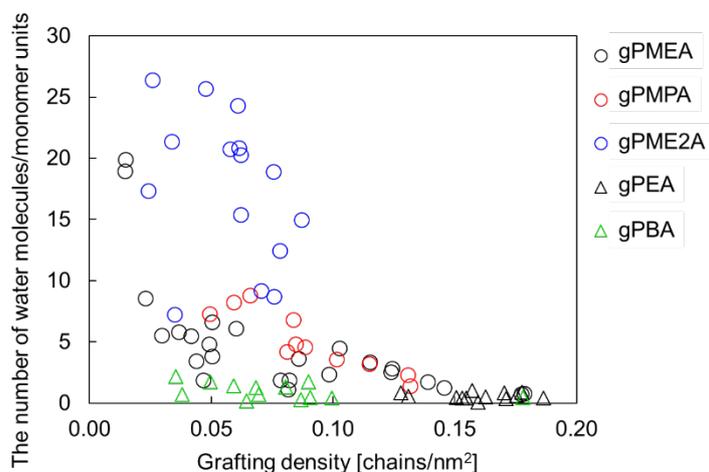


Figure 4-3. Relationship between grafting densities (σ) and the number of water molecules for the monomer units.

第四章

PEA および PBA は σ に依存せずモノマーユニットあたりに結合し、高分子鎖とともに振動する水分子の数は 2 以下であった。一方、PMPA、PME2A ではモノマーユニットあたりの水分子の数は σ の増加に伴って減少した。特に、PME2A では $\sigma=0.05$ 付近で 25 分子であり、 $\sigma = 0.08-0.09$ の範囲では 10~15 分子に減少した。同様に PMPA や PME2A も $\sigma = 0.05$ 付近で 5~8 分子から $\sigma = 0.15$ 付近では約 1 分子まで減少した。これは σ の増加に伴い高分子鎖間の隙間が減少し、高分子鎖間に水分子が水和しにくくなったためだと推察される。またこれは水溶性高分子である PME2A に顕著にみられた。次に、水中でのグラフト高分子の $\Delta D_{g\text{Polymer}}/(-\Delta F_{g\text{Polymer, air}})$ 値を水和した高分子鎖の運動性パラメータとして定義し評価した (Fig. 4-4)。その結果どの高分子においても σ の増加とともに運動性は低下した。 σ が増加すると高分子鎖の自由体積が減少するため、高分子鎖の運動性は σ の増加に伴い減少するためだと推察される。しかしながら、低密度領域においての高分子鎖の運動性は疎水性であり水中では凝集するような PEA や PBA に比べて水溶性の PME2A や水との親和性の高い PME2A や PMPA は低密度領域では運動性は高い値を示した。

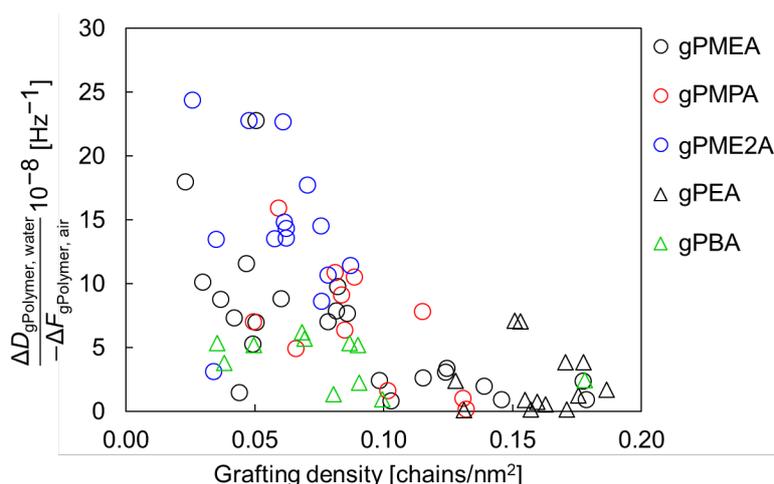


Figure 4-4. $\Delta D_{g\text{Polymer}}/(-\Delta F_{g\text{Polymer, air}})$ with grafting density (σ) [chains/nm²] for grafted polymer. $\Delta D_{g\text{Polymer}}/(-\Delta F_{g\text{Polymer, air}})$ indicates the mobility of hydrated polymer [Hz⁻¹].

以上の結果を元に、各 σ における水和水量 ($(-\Delta F_{g\text{Polymer, water}})/(-\Delta F_{g\text{Polymer, air}})-1$) と水和した高分子鎖の運動性 ($\Delta D_{g\text{Polymer}}/(-\Delta F_{g\text{Polymer, air}})$) との関係を Figure 4-5 に示した。Figure 4-5(a)の結果に注目すると、水溶性であり水との親和性が高い PME2A では水和量 ($(-\Delta F_{g\text{Polymer, water}})/(-\Delta F_{g\text{Polymer, air}})-1 > 2.0$) および運動性 ($\Delta D_{g\text{Polymer}}/(-\Delta F_{g\text{Polymer, air}}) > 10$) がともに高い値を示していた。次に各高分子の *IW* の量とグラフト高分子における水和量と運動性との関係をより詳細に議論するために、Figure 4-5(a)の一部を拡大し示した (Fig. 4-5(b))。IW を有し抗血栓性に優れる PME2A (*IW* = 49.7 mg/g) や PMPA (*IW* = 40 mg/g) では運動性の値が高く ($\Delta D_{g\text{Polymer}}/(-\Delta F_{g\text{Polymer, air}}) > 2$)、水和水量の高い領域 ($(-\Delta F_{g\text{Polymer, water}})/(-\Delta F_{g\text{Polymer, air}})-1 > 0.2$) が多かった。一方、*IW* の量が少ない PBA (*IW* = 7.3 mg/g) や PEA (*IW* = 13.5 mg/g) では、

第四章

運動性が $\Delta D_{\text{gPolymer}}/(-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}) < 6$ 、水和水量が $(-\Delta F_{\text{gPolymer, water}})/(-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}) - 1 < 0.2$ の範囲に密集しており、運動性が高い領域は散在するものの、ほとんどの密度において水和量は少なかった。また PEA や PBA の場合においても血小板はよく粘着し、フィブリノーゲンの変性も確認されている。この PEA や PBA が存在する範囲において該当する PMEА のグラフト密度 ($\sigma = 0.13 \sim 0.18$) の場合、第三章で述べたように血小板の粘着数は多く、フィブリノーゲンの変性度は高い値を示していた。以上のことから $\sigma = 0.13 \sim 0.18$ の gPMEA の IW の量は他のグラフト密度 ($\sigma < 0.13$) に比べて十分に少なく、PEA や PBA に近いと推察される。また、水和量 $(-\Delta F_{\text{gPolymer, water}})/(-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}) - 1 > 0.2$ で運動性 ($\Delta D_{\text{gPolymer}}/(-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}) > 2$ の範囲 ($0.1 < \sigma < 0.13$ 、Fig. 2-16 と Fig. 2-17 参照) では、フリーラジカル重合で合成した PMEА をスピコートした基板と同等もしくはそれ以上に血小板の粘着やフィブリノーゲンの吸着・変性を抑制していた (第三章参照) ため、IW の量は DSC で算出されるバルク PMEА の IW の量 (49.7 mg/g) よりも多いと推察される。

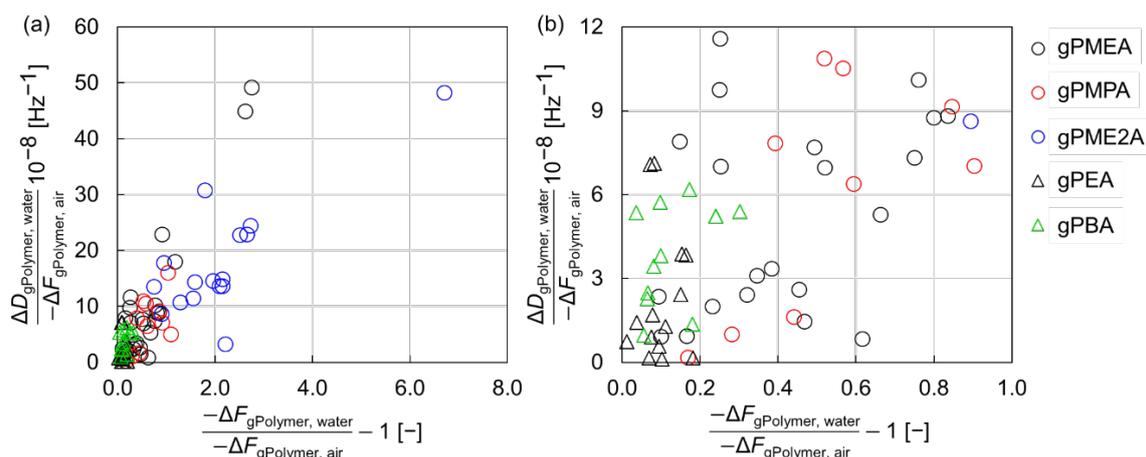


Figure 4-5. Relationship between water content $(-\Delta F_{\text{gPolymer, water}})/(-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}) - 1$ and energy dissipation per unit mass $[\Delta D_{\text{gPolymer}}/(-\Delta F_{\text{gPolymer, air}})]$ of grafted polymer in water. (a) All data, (b) enlarged view in (a).

第四章

4.4 湿度変化に対するグラフト高分子への水和挙動の評価

本節では、密度の異なる gPMEA やバルク中での IW の量や生体応答が異なる PMEAA 類似高分子に対して、湿度変化に伴う水和挙動を評価し、PMEA の密度変化と各種水和水との関連性について議論する。また本博士論文では湿度変化に伴う水和挙動として、湿度変化に伴って吸着した水分子 (水和水) の量や高分子が水和されることに伴う粘弾性の変化を第二章で紹介した QCM-A を用いて評価した。

4.4.1 実験手法

UV O_3/O_2 処理した QCM 基板または 4.3.1 節で作製した gPolymer 基板を QCM 用の透明ウェル型セルに取り付けた後、 $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ に保持可能なインキュベータ内に設置した、4 チャンネル測定に対応したマルチプレクサー QCM (QCM922A-910) に接続した (QCM in Fig. 4-6)。インキュベータ内に精密調湿発生器 (me-40DP-H60-2FM-FH, micro equipment Inc.) からの調湿空気出口部を接続し、接続した QCM 基板の上部には湿度変換型精密温度湿度計 (TAA801HRCS-BH-ADPT, Toplas Engineering Co., Ltd) のセンサーを設置し、QCM 測定時の温度・湿度をモニタリングした。

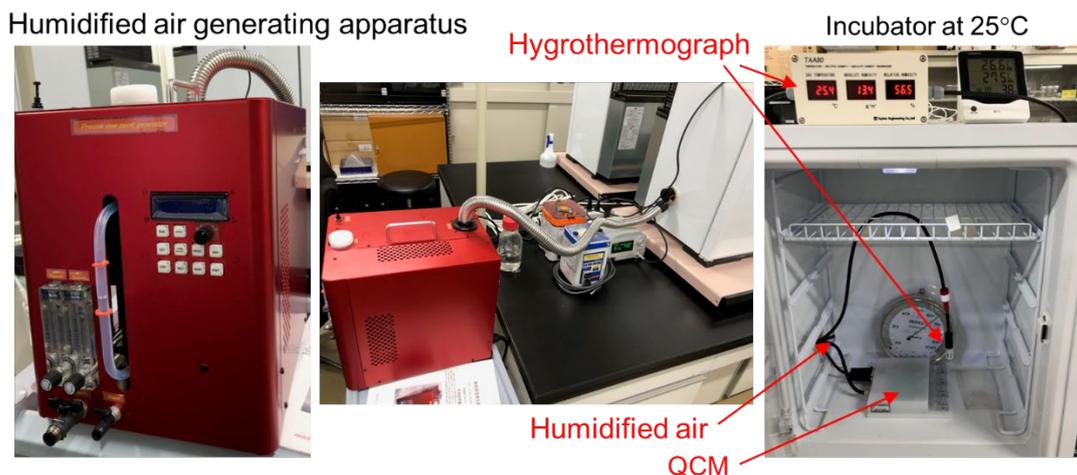


Figure 4-6. The picture of the experimental setup for humidity-controlled QCM measurement.

シリカゲルを用いてインキュベータ内の湿度を 10% RH 以下に保ち、この時の各基板の共振周波数を基準の周波数 (F_0) とした。その後、インキュベータ内の湿度が 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95% RH になるように調湿発生器から湿潤空気をインキュベータ内に送り込んだ。各湿度は $\pm 0.5\%$ RH 以下で保ち、各湿度下での共振周波数 (F_1) と 2.5.2 節と同様にアドミタンス解析から散逸値 (D) を測定し、gPolymer 中への水分子の吸着量 ($\Delta F = F_0 - F_1$) と粘弾性パラメータ (ΔD) を評価した。

4.4.2 結果および考察

本節で用いた gPolymer の種類とグラフト密度 (σ) および接触角 (対水・対気泡) の値¹⁰ を Table 4-2 に示した。各種グラフト高分子基板の接触角は基材である金基板と異なっていることから金基板上に高分子が被覆できていることを確認した。また大気下での親水性は gPMEMA < gPMEA ($\sigma = 0.051 \sim 0.177$) < gPMPA < gPBA であったのに対して、水中に対する気泡の接触角から考えられるグラフト基板の親水性は、gPMEA ($\sigma = 0.051 \sim 0.177$) < gPMPA < gPMEMA < gPBA であった。gPMEMA の序列が大きく変化しているが、PMEMA は他の高分子のアクリレート系とは異なり α 位にメチル基を有するメタクリレートであるため、 α メチル基が基材側に配向¹¹ し、大気下では gPMEA とほとんど同じの親水性になったと推察される。一方、PMEMA は 24~27°C 付近に T_g を有するため^{9,12}、本章の QCM-A の測定条件である 25°C では PMEMA はガラス状態にあり剛直であるため、水中に浸させても高分子鎖は膨潤せず、疎水的になったと推察される。

Table 4-2. List of grafted polymers for humidity-controlled QCM measurement. Grafting densities, water contact angle (sessile drop), and air contact angle (captive bubble). The data are presented as the means \pm SD ($N = 9, 3$ points \times 3 substrates).

name	gold	gPMEA				gPBA	gPMPA	gPMEMA
σ [chains/nm ²]	—	0.051	0.103	0.124	0.177	0.099	0.100	0.100
Sessile drop [°]	83.4 \pm 0.9	63.8 \pm 0.6	68.8 \pm 1.6	67.4 \pm 0.3	69.3 \pm 0.9	83.4 \pm 0.2	72.4 \pm 1.7	67.1 \pm 0.3
Captive bubble [°]	135.3 \pm 0.4	136.8 \pm 0.6	137.4 \pm 0.8	134.3 \pm 0.6	134.4 \pm 0.1	115.6 \pm 0.2	132.6 \pm 0.8	125.9 \pm 1.1

第四章

次に $\sigma = 0.1$ 付近の各種グラフト高分子に対して、湿度の増加に伴う各基板の周波数の変化を経時的に測定した (Fig. 4-7)。その結果、各高分子の種類に応じて各湿度下での周波数変化量が異なっており、95% RH では $gPBA < gPMEMA < gPMPA < gPMEA$ の順に周波数変化 (ΔF) は大きくなった。さらに、Figure 4-7 の結果から ΔF を算出し、各湿度に対する ΔF のプロットを Figure 4-8 に示した。

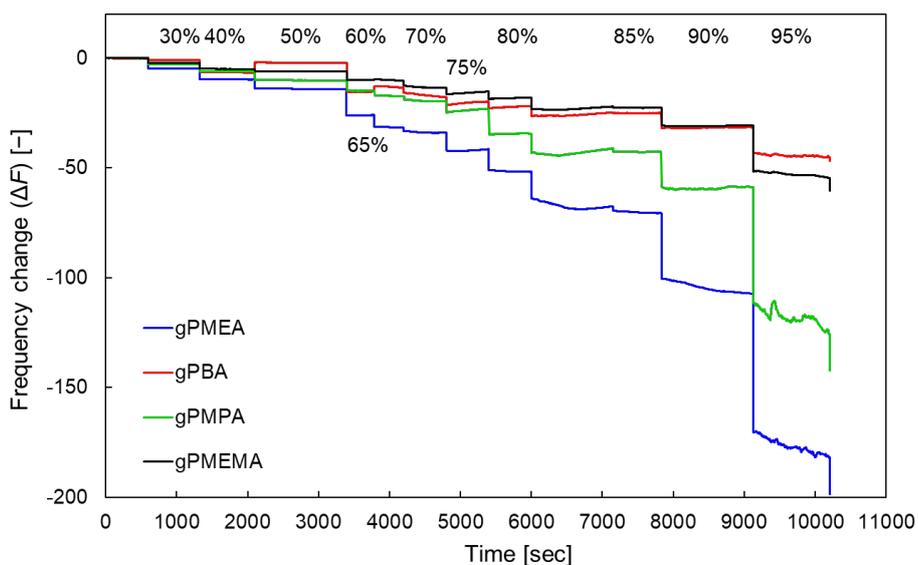


Figure 4-7. Change in frequency (Δf) as a function of time in stepwise increasing relative humidity (% RH) as detected by QCM-A water vapor adsorption measurements for grafted polymer substrate. Four types of grafted polymer are indicated with colors.

$gPBA$ と $gPMEMA$ は、金基板と同様に、湿度が増加しても最大で 30Hz 程度の周波数変化しかなかった。また、90% RH から 95% RH に湿度が増加したとき、周波数が急激に変化したのは、95% RH と高湿度になりグラフト表面に吸着する水分子が増加することで水分子のクラスターなどが増加したためだと推察される。一方、 $gPMEA$ と $gPMPA$ の周波数変化は、湿度の増加に伴って緩やかに増加した。特に、 $PMEA$ は 50% RH から徐々に吸着水に伴う周波数変化量は増加し (Fig. 4-8(a))、 $PMPA$ は 70% RH から周波数変化量は増加した (Fig. 4-8(b))。このように湿度の変化に伴う水和挙動は、高分子の種類によって異なっており、 $gPMEA$ および $gPMPA$ の湿度に対して高分子中への水分子の拡散しやすさは、 $gPBA$ および $gPMEMA$ よりも高いと推察できる。また、その傾向は $gPMEMA < gPBA < gPMPA < gPMEA$ であり、DSC で測定された飽和含水量の傾向や水中での対気泡接触角から考えられる基板の親水性の傾向と一致していた。

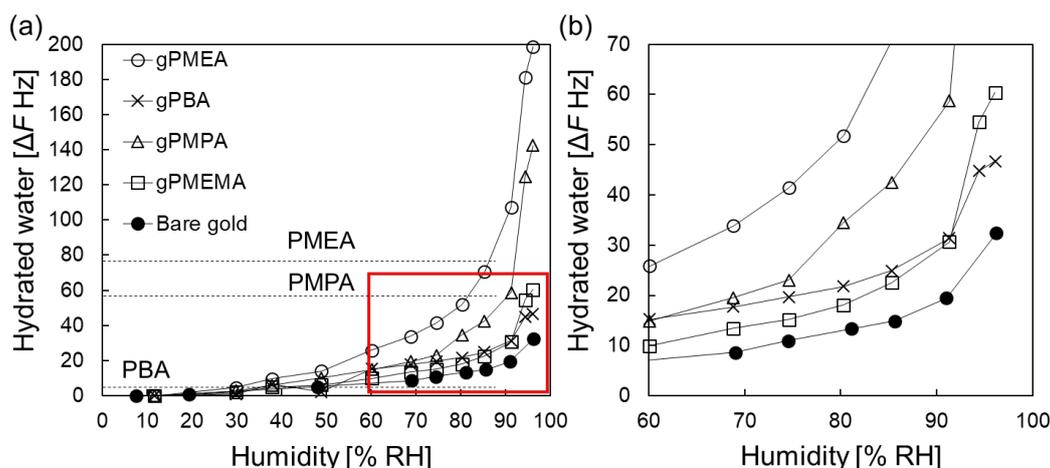


Figure 4-8. Dependence of the frequency change (ΔF [Hz]) on the relative humidity (% RH) for the four types grafted polymer. (a) All data, (b) enlarged view in the red region in (a).

gPBA や gPMEMA では湿度の増加に伴って、グラフト高分子鎖間への水分子の拡散が起こり (Flory-Huggins の格子理論¹³)、水分子が高分子鎖間の隙間を占有してしまうと高分子はほとんど膨潤せず、グラフト高分子表面に水分子が吸着し、クラスター化した水分子 (バルク水の吸着) が増加したと推察される (Fig. 4-9 (a))。一方、gPMEA および gPMPA では、初めに gPBA や gPMEMA と同様に高分子鎖間へと水分子が拡散し、その後、高分子鎖が湿度の増加に伴い水和と同時に膨潤することで高分子鎖間に更なる空間が生じ水分子の吸着がより増加したと推察される (PMEA; 50% RH <, PMPA; 70% RH <) (Fig. 4-9 (b))。

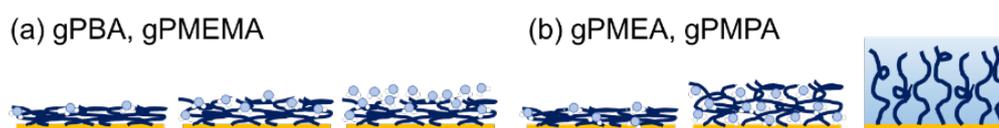


Figure 4-9. Schematic image of the adsorption of the water molecules to the grafted polymer during the changes of relative humidity.

次に、湿度変化に伴うグラフト高分子のエネルギー散逸の変化 (ΔD) の結果 (Fig. 4-10) について議論する。これらの結果は湿度 10% RH のときの D 値を 0 とし、その後の D 値の変化量を ΔD とした。 $\Delta D > 0$ の場合、グラフト高分子は 10% RH のときよりも柔らかくなっていることを示し、 $\Delta D < 0$ の場合、グラフト高分子は硬くなっていることを示す。gPBA では、湿度の増加に伴って ΔD は単調的に増加した。Oksanen らは、高分子に水分子が吸着することで、水分子の可塑効果によって高分子の T_g が含水量に応じて減少することを報告している¹⁴。以上のことより、PBA で湿度の増加に伴って ΔD が単調的に増加した理由として、PBA 内に拡散した水分子によって PBA 自身の主鎖の運動性が乾燥状態よりも増加したためだと推察される。また PBA に拡散された水分子は PBA との相互作用は弱く、ほとんど

第四章

自由水のような状態にあると推察される。次に gPMEMA は吸着水による周波数変化量はほとんど gPBA と同等であった (Fig. 4-8) 一方で、 ΔD の変化量は gPBA と顕著に異なっていた (Fig. 4-10)。PMEMA は主鎖の α 位にメチル基を有しており、また側鎖に極性基であるメトキシ基を有するため、PMEMA 内に拡散された水分子は PMEMA 鎖と強く相互作用し、束縛されていると推察できる。実際に PMEMA の不凍水 (NFW) の量は $3.8 \pm 0.3 \text{ wt}\%$ ¹⁵ と PBA の NFW の量 ($1.5 \pm 0.2 \text{ wt}\%$)¹⁵ よりも約 2 倍多いことと、PMEMA の水和水による ΔF の変化量が PBA の ΔF の変化量よりも少ないため、PMEMA 内部に拡散した水分子はほとんど NFW であると推察される。次に、PMEA および PMPA は前述した PBA や PMEMA と顕著に異なる挙動を示した。湿度 < 60% RH の範囲では PMEMA と同様に ΔD の変化はほとんどなく、これは PMEMA の時と同様に、高分子内部に拡散した水分子は高分子鎖と強く相互作用することで NFW のような状態にあると推察される。一方、50% RH から 60% RH へと湿度が増加した際に ΔD は顕著に増加した。

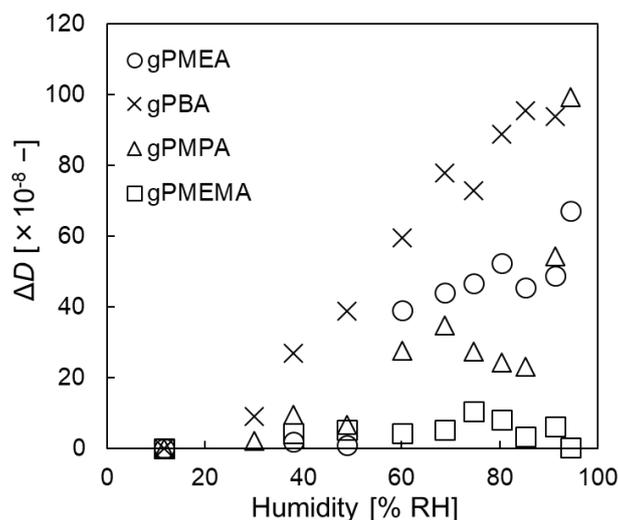


Figure 4-10. Dependence of the energy dissipation change ($\Delta D [\times 10^{-8}]$) on the relative humidity (% RH) for the four types grafted polymer.

第四章

以上の各種高分子の結果を元に、湿度を制御した際の σ の異なる PMEА の水和挙動について議論する。 σ の異なる gPMEА に対して、湿度の増加に伴う周波数変化を経時的に測定した (Fig. 4-11)。またこの結果から、各相対湿度に対する周波数変化量のプロットを Figure 4-12 に示した。

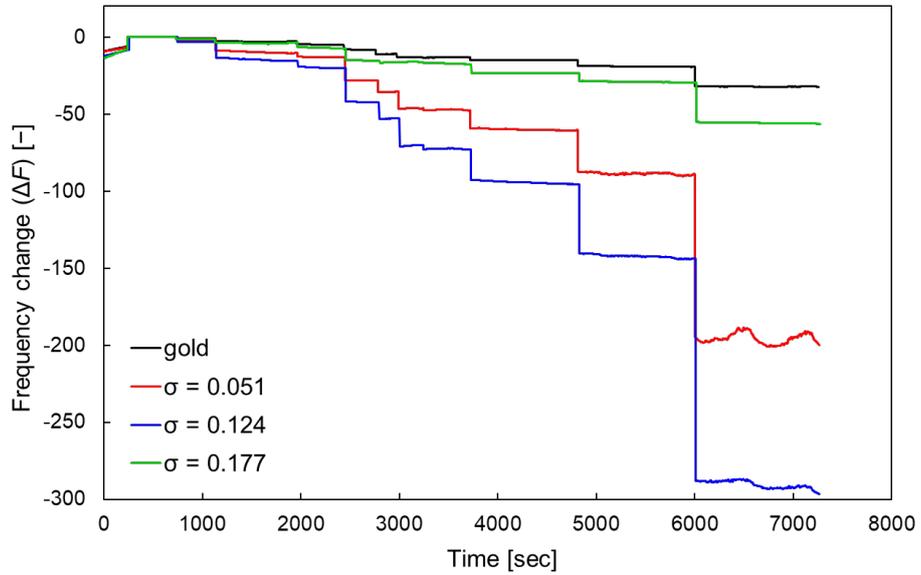


Figure 4-11. Change in frequency (Δf) as a function of time in stepwise increasing relative humidity (% RH) as detected by QCM-A water vapor adsorption measurements for gold and gPMEА with different grafting densities. Different grafting densities of gPMEА are indicated with colors.

第四章

gPMEA の $\sigma = 0.051$ 、 0.103 、 0.124 の周波数変化量は、湿度が高くなるにつれて緩やかに増加した。特に、 ΔF の増加量は PMEA の σ の高い（単位面積当たりの PMEA 鎖の量が多い）、 $\sigma = 0.124$ で顕著であった。一方、 $\sigma = 0.177$ は、金基板や PBA、PMEMA などの非血液適合性高分子の結果（Fig. 4-8）と同様に、湿度が増加しても周波数の変化はほとんどなく一定であった。 $\sigma = 0.051 \sim 0.124$ の範囲では、加湿下における PMEA の水和挙動は前述した $\sigma = 0.103$ の時と同様に、まず低湿度下（10-50% RH）では高分子鎖間へと水分子が拡散し、その拡散した水分子はクラスター化していると推察され、その後湿度が増加すると、水分子の吸着とともに高分子鎖が膨潤し、 ΔF の増加量の大きい 75-80% RH で水和した水分子が *IW* としてふるまっていると推察できる（Fig. 4-13(a)）。一方、 $\sigma = 0.177$ では σ が高いため、PMEA 鎖間へ拡散できる水分子は少なく、80% RH 以上で、gPMEA 表面に吸着する水分子が増加、その後水分子同士がクラスター化することで、周波数の変化量が増加したと推察できる（Fig. 4-13(b)）。そのため、 $\sigma = 0.177$ の gPMEA の内部の水分子の状態は、*IW* のような抗血栓の発現に関与するような水分子は少なく、PMEA 鎖と強く相互作用する水分子 (*NFW*) が大半を占めると推察した。

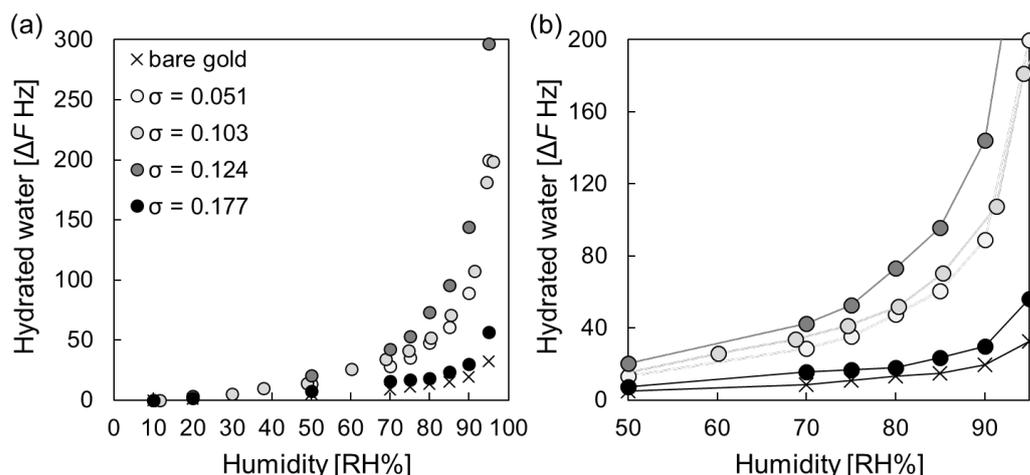


Figure 4-12. Dependence of the frequency change (ΔF [Hz]) on the humidity (RH%) for the gPMEA with different grafting densities. (a) All data, (b) enlarged view (50-95%RH) in (a).

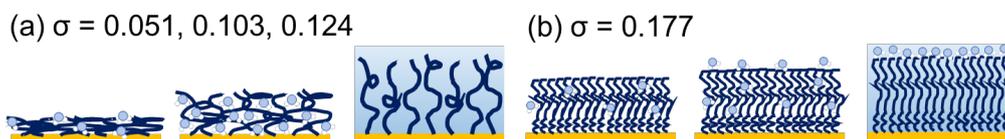


Figure 4-13. Schematic image of the adsorption of the water molecules to the grafted PMEA with different grafting densities during the changes of relative humidity.

4.5 軟 X 線発光分光測手による水和状態の評価

水分子の局所的な水素結合状態の分析が可能な XES^{5,6} と AFM を用いて、制御された湿度下で gPMEA ($\sigma = 0.10$) や gPBA ($\sigma = 0.092$) の表面構造と内部の水素結合状態を可視化し、界面水の水素結合状態について報告した (Fig. 4-14 に XES のセットアップ図を示す)¹⁶。加湿した際に gPMEA の表面を AFM で観察した場合、25, 50% RH で一度表面粗さが増加 (微細構造の出現) し、70% RH を越えると表面粗さは減少した (微細構造の消失) (Fig. 4-15)。

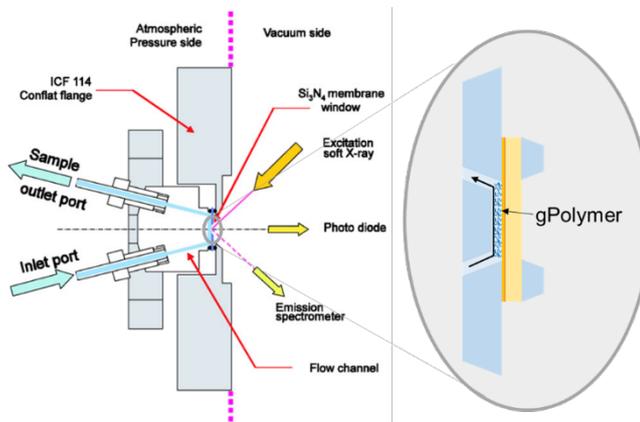


Figure 4-14. Schematic image of XES setup.

一方、gPBA の場合、湿度の増加に伴って表面粗さは増加した後にほぼ一定になった。また XES スペクトルから得られた結果 (Fig. 4-16) から、30% RH の時、gPBA の場合は 527.0 eV にピークが現れるガス状態の水分子が検出されたことから、PBA 中に水分子が孤立して拡散していると推察できた。一方 PMEА の場合は疎水性の高分子鎖と水の相互作用により、そのピークが低エネルギー側にシフトしている様子が観察された。さらに 60%RH 付近で gPMEA, gPBA とともに相分離構造が形成した後も 527 eV 付近のガス様の水分子の吸着が見られたが、gPMEA ではほとんどピークシフトがなかったのに対し、gPBA 上の水のピークは 526.8 eV まで低エネルギー側にシフトしていた。次に、AFM による表面粗さ測定の結果と合わせて議論する。gPBA では疎水的な Polymer-rich 相への水分子の吸着が起こっているのに対し、gPMEA では親水的な Water-rich 相への吸着が優先的に起こり、Water-rich 相中での高分子鎖の膨潤が AFM 観察での表面粗さの低下につながっていると考えられる。このことは前述の QCM 測定 (Fig. 4-8 や Fig. 4-12) により、 $\sigma = 0.1$ 付近の gPMEA では水分子の吸着とともに高分子鎖の膨潤が起こっているという観察結果と矛盾しない。gPMEA では Water-rich 相へ、gPBA では Polymer-rich 相への水分子の吸着が優先して起こる理由としては、初めにカルボニル基に水分子が吸着 (NFW) し、相分離を起こした際の高分子鎖および水分子の配向性がそれぞれの Water-rich 相中で大きく異なり、そのことが引き続いて吸着する水分子の挙動を決定していると予想している。以上のことを Figure 4-10 の結果に当てはめると、gPBA は内部に拡散した水分子は孤立し、その後、吸着水量が多くなると高分子鎖は膨潤し、相分離構造が形成し、Polymer-rich 相に水分子が吸着することによって、 ΔD が増加したと考えられる。一方、PMEA や PMPA の場合、60% RH 未満では水分子が高分子内部に拡散し、その拡散した水分子はガス状態とは異なりクラスター化していると推察できる。その後、60% RH では水分子の吸着に伴う高分子鎖の膨潤と相分離が起こるため、 ΔD 値が急激に増加し、その後相分離によって形成した Water-rich 相に吸着する水分子は IW のような水和構造を形成したと推察した。

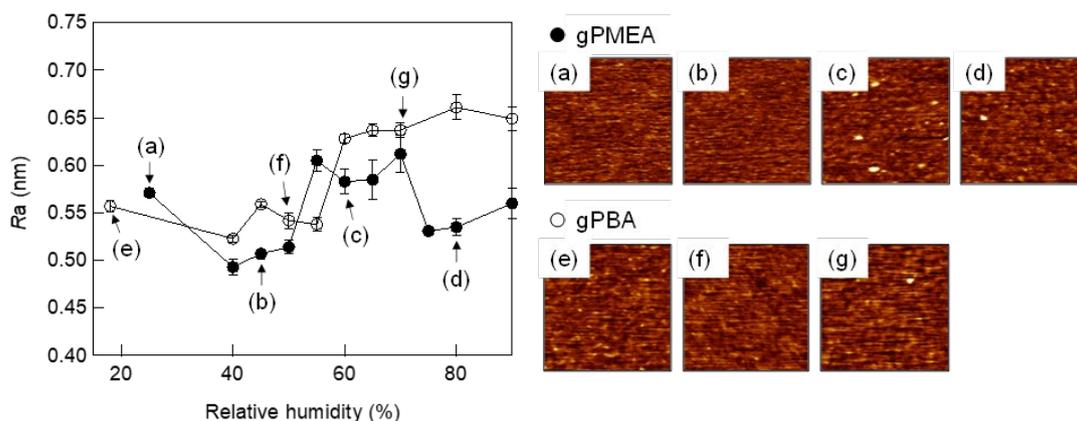


Figure 4-15. Estimated surface roughness (Ra) of gPMEA (filled circles) and gPBA (open circles) based on averaging four 500 nm × 500 nm AFM images. The insets are representative AFM images (500 nm × 500 nm). This figure sited from Ref. 16.

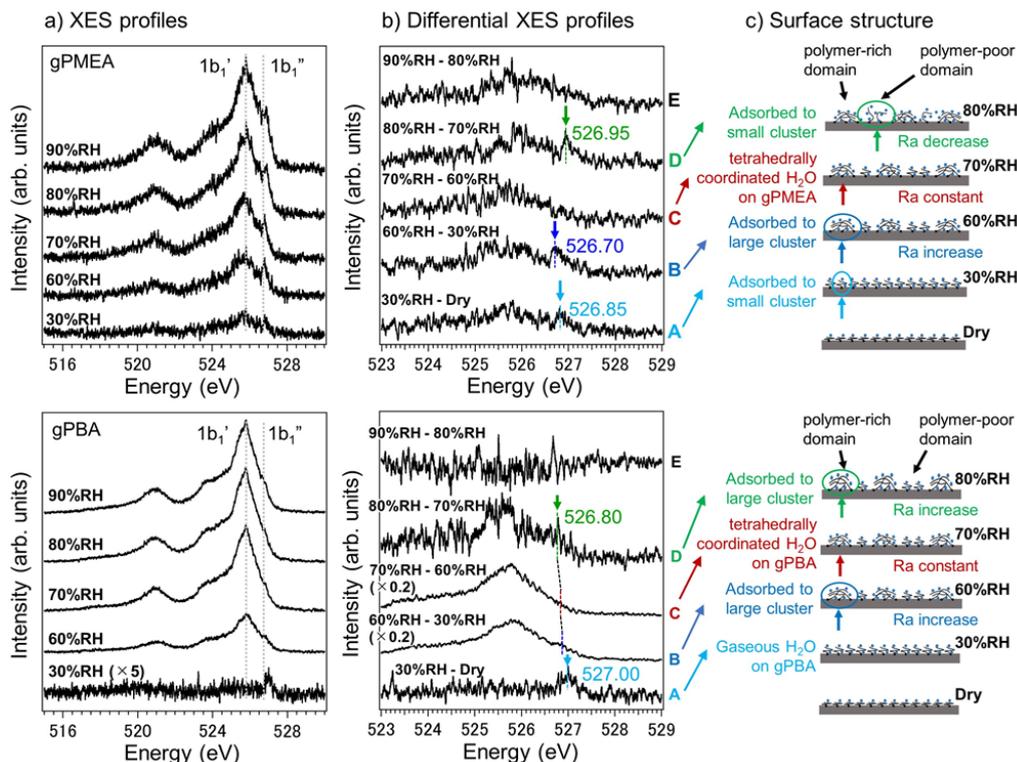


Figure 4-16. (a) O 1s XES profiles of gPMEA and gPBA for different humidity conditions. The spectra are normalized by the intensity of the incident soft X-rays and the accumulation time. The spectrum of gPBA at 30% RH is shown with the intensity multiplied by a factor of five. (b) Differential XES profiles between successive RH levels, which indicate any humidity-related structural changes in the hydrated water. Spectra B (60% RH–30% RH) and C (70% RH–60% RH) of gPBA have been adjusted by a factor of 0.2. (c) Diagrams of the surface structure at different RH levels based on the AFM images (Fig. 4.5-1). This figure sited from Ref. 16.

第四章

4.6 結論

本章では、 σ の異なる gPMEA の水和状態、特に *IW* との関係性についてより詳細に議論するため、*IW* の量の異なる PMEА 類似高分子の水和量および水和した高分子鎖の運動性を評価した。また湿度を制御した際の水分子の吸着挙動、特に質量の変化と水分子の吸着に伴う高分子鎖の粘弾性の変化を QCM-A により評価した。これにより、疎水性高分子である PEA や PBA の場合、水和量はどの σ でも少なく、加湿下では PBA 内部に拡散した水分子は孤立し、高分子鎖自身の運動性が増加することを明らかにした。一方、側鎖に極性官能基（メトキシ基）を有する PMEMA は自身の剛直性から、水分子が内部に拡散しても高分子鎖は膨潤せず剛直にあり、*NFW* のような高分子と強く相互作用し運動性の低い水分子で大半を占めると推察した。一方、PMEA や PMPA、PME2A のような抗血栓性を発現するような高分子では水和量および水和した高分子鎖の運動性がともに高く、また加湿下で水分子が拡散し、高分子鎖が容易に膨潤していると結論付けた。

本章では、この水和量と高分子鎖の運動性がともに高いことが *IW* の発現と大きく関与していることを新たな知見として得ることができた。一方で、 σ の高い $\sigma = 0.177$ では水和量および運動性も低く、さらに加湿下での水分子の吸着による周波数変化量が小さいことから、 $\sigma = 0.177$ のようなグラフト密度の高い gPMEA では、相対的に *IW* の量は少なく、*NFW* で大半を占めていると推察した。

4.6 引用文献

1. Nagasawa, D., Azuma, T., Noguchi, H., Uosaki, K. & Takai, M. Role of Interfacial Water in Protein Adsorption onto Polymer Brushes as Studied by SFG Spectroscopy and QCM. *J. Phys. Chem. C* **119**, 17193–17201 (2015).
2. Grossutti, M. & Dutcher, J. R. Correlation between Chain Architecture and Hydration Water Structure in Polysaccharides. *Biomacromolecules* **17**, 1198–1204 (2016).
3. Yamazoe, K. *et al.* Enhancement of the Hydrogen-Bonding Network of Water Confined in a Polyelectrolyte Brush. *Langmuir* **33**, 3954–3959 (2017).
4. Hoshina, H., Iwasaki, Y., Katahira, E., Okamoto, M. & Otani, C. Structure and dynamics of bound water in poly(ethylene-vinylalcohol) copolymers studied by terahertz spectroscopy. *Polymer (Guildf)*. **148**, 49–60 (2018).
5. Lange, K. M. *et al.* On the origin of the hydrogen-bond-network nature of water: X-ray absorption and emission spectra of water-acetonitrile mixtures. *Angewandte Chemie - International Edition* **50**, 10621–10625 (2011).
6. Fransson, T. *et al.* X-ray and Electron Spectroscopy of Water. *Chem. Rev.* **116**, 7551–7569 (2016).
7. Murakami, D., Segami, Y., Ueda, T. & Tanaka, M. Control of interfacial structures and anti-platelet adhesion property of blood-compatible random copolymers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **31**, 207–218 (2019).
8. Kobayashi, S., Wakui, M., Iwata, Y. & Tanaka, M. Poly(ω -methoxyalkyl acrylate)s: Nonthrombogenic Polymer Family with Tunable Protein Adsorption. *Biomacromolecules* **18**, 4214–4223 (2017).
9. Sato, K. *et al.* The Relationship between Water Structure and Blood Compatibility in Poly(2-methoxyethyl Acrylate) (PMEA) Analogues. *Macromol. Biosci.* **15**, 1296–1303 (2015).
10. Murakami, D., Nishimura, S., Tanaka, Y. & Tanaka, M. Observing the repulsion layers on blood-compatible polymer-grafted interfaces by frequency modulation atomic force microscopy. *Mater. Sci. Eng. C* 112596 (2021). doi:10.1016/j.msec.2021.112596
11. Tateishi, Y. *et al.* Local conformation of poly(methyl methacrylate) at nitrogen and water interfaces. *Polym. Chem.* **1**, 303–311 (2010).
12. Kuo, A. T., Urata, S., Koguchi, R., Yamamoto, K. & Tanaka, M. Analyses of equilibrium water content and blood compatibility for Poly(2-methoxyethyl acrylate) by molecular dynamics simulation. *Polymer (Guildf)*. **170**, 76–84 (2019).
13. Hakalahti, M., Faustini, M., Boissière, C., Kontturi, E. & Tammelin, T. Interfacial Mechanisms of Water Vapor Sorption into Cellulose Nanofibril Films as Revealed by Quantitative Models. *Biomacromolecules* **18**, 2951–2958 (2017).

第四章

14. Oksanen, C. a. & Zografi, G. The relationship between the glass transition temperature and water vapor absorption by poly(vinylpyrrolidone). *Pharmaceutical Research* **7**, 654–657 (1990).
15. Tanaka, M. & Mochizuki, A. Effect of water structure on blood compatibility--thermal analysis of water in poly(meth)acrylate. *J. Biomed. Mater. Res. A* **68**, 684–695 (2004).
16. Murakami, D. *et al.* Hydration mechanism in blood-compatible polymers undergoing phase separation. *Langmuir* (2022). doi:10.1021/acs.langmuir.1c02672

第五章

gPMEA 表面上の 血管内皮細胞の接着挙動の評価

5.1 緒言

第四章までは、グラフト密度 (σ) の異なる gPMEA や PMEA 類似高分子のグラフト基板の水和状態や抗血栓性との関係性について述べてきた。第一章で述べたように、ECMO や人工血管のような多量の血液と接触する表面では血栓の形成を抑制する抗血栓性のみだけでなく、血液と接触しても炎症反応などの異物反応を誘発することなく材料自身の機能を発揮する性質である、血液適合性¹がより望まれる。この血液適合性のある表面として、第二・三・四章で述べてきた生体分子を付着せず血栓形成を抑制する「抗付着性表面」²と血管の内面を構成する内皮細胞などで材料表面を覆い疑似血管表面を構築する「内皮細胞接着表面」³が挙げられる。さらに、近年では抗付着性、とりわけ抗血栓性を有しながら血管内皮細胞を接着させるような表面の構築を行うことで、現在の課題としても挙げられる小口径人工血管の開発に展開できることが期待できる。ここで血管内皮細胞の接着を制御する研究について大きく2つ5.1.1節で述べる。

5.1.1 血管内皮細胞 (HUVEC) の接着を制御する表面

5.1.1-1 HUVEC 接着リガンドを用いた研究

Massia らは、ヒト血管内皮細胞上にヒト血漿フィブロネクチン (FN) に由来するテトラペプチド[Arg-Glu-Asp-Val (REDV)] に対するレセプターが発現していることと、REDV ペプチドを固定化した培養基板上で、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、血小板は接着しない一方で内皮細胞の接着と進展が特異的に亢進されることを報告した^{4,5}。Massia らによって血管内皮細胞との特異的結合能が高いことが報告されて以降、人工血管への内皮細胞の接着を亢進しうる機能性ペプチドの第一候補として広く研究されている。

Mahara らは、REDV を非共有結合的に固定化した脱細胞化ダチョウ頸動脈を大腿動脈—大腿動脈バイパスで移植したところ、わずか1週間後にグラフト中央部に至る全面に新生内膜が形成され、その後も長期間開存したことを報告している⁶。

この機能性ペプチドである REDV と非特異的吸着を抑制する高分子⁷や生分解性高分子⁵と融合した材料の開発が盛んに行われている。このように機能性ペプチド類を用いた場合、単一のインテグリンを特異的に活性化することが可能で生理活性の制御が容易であり、優れた細胞選択性を示すが、第一章で述べたように機能性ペプチドを利用せず、合成高分子のみで優れた細胞選択性を発現するような表面を構築することが可能となれば、難題とされている小口径人工血管の開発に大きく貢献できることが期待できる。次に材料側の粘弾性に着目した研究例を示す。

5.1.1-2 基板の弾性率による HUVEC の接着制御

細胞は接着する足場の硬さや粘弾性といった機械的特性に応じて接着の形態を変化することが報告されている⁸。特に、足場である基材が硬くなるほど、接着する細胞は接着斑が多く形成され、細胞の接着面積が増加するとともに、細胞のアクチンの束や網目構造を発達させる。さらに、細胞が接着する際に足場するタンパク質などの細胞外マトリックス (Extracellular Matrix; ECM) の硬さも細胞の接着力や接着形態に大きく影響を与えることが報告されている⁹。また、HUVEC の場合でも同様に基材や ECM の硬さに応じて接着形態や接着力が異なることが報告されている。

Jalali らはポリアクリルアミドを用いて 3 種の異なる硬さの基材を作成し、基材の硬さと HUVEC の接着力および形態との関係について報告している¹⁰。基材の硬さが硬くなる、すなわち弾性率が高くなると HUVEC の接着力および伸展度は増加した。約 200 Pa と柔らかい基板では HUVEC は丸い形態を保ったまま接着した様子が確認されている。

以上のように、HUVEC の足場となる基材の硬さに応じて細胞との相互作用力や伸展度が大きく変化するため基材側の硬さは HUVEC の接着制御には大きく関係し、基材の硬さを制御することで HUVEC の接着や伸展を促進するような表面を構築することが期待できる。

5.1.2 本章の内容

5.1 節で述べたように、足場となる材料の細胞接着部位や弾性率を調整することで HUVEC の接着や伸展を制御することが期待できる。また本博士論文の主として用いている PMEА はそのコーティング膜上で血小板などは接着しない一方で HUVEC が接着・伸展することが報告されている¹¹。この PMEА の抗血栓性と内皮細胞の接着性を併せ持つ、細胞選択性という機能については未だ不明瞭な部分が多い一方、著者は PMEА/水界面で自発的に発現する微細構造が細胞選択性の発現に寄与しているのではないかと推察している。そこで第四章までに評価してきた σ の異なる PMEА を用いて HUVEC の接着挙動を評価し、第二章・第四章で議論した gPMEА の水和量や運動性などの水和状態との関係について議論することで、細胞選択性の発現機構の解明に繋がると考えた。また、血小板の粘着を大きく抑制した $\sigma=0.11$ 付近で HUVEC が接着や伸展することができれば、抗血栓性と HUVEC の接着性を併せ持つ血液適合性表面の実現に繋がると考えられる。

そこで本章では、gPMEА ($\sigma = 0.10\sim 0.18$) 上の HUVEC の接着数や接着面積を評価した。さらに gPMEА 上に吸着したタンパク質、特に細胞接着の足場となるタンパク質の細胞接着部位の露出量が細胞の接着数や伸展度にどのような影響を与えるかを調査するため、細胞の接着に関与する代表的なタンパク質である FN とビトロネクチン (VN) 中の細胞接着部位の露出量を ELISA 法により評価した。最後に gPMEА の水和量や運動性が HUVEC の接着や伸展にどのような影響を与えるかについても議論する。

5.2 実験

5.2.1 グラフト基板の作製

gPMEA は 2.4 節の作製方法と同様の手法で作製した。また作製した gPMEA の σ 、接触角の結果を Table 5-1 に示した。

Table 5-1. List of grafted PMEA with different grafting densities for humidity-controlled QCM measurement. Grafting densities, water contact angle (sessile drop), and air contact angle (captive bubble). The data are presented as the means \pm SD ($N = 9$, 3 points \times 3 substrates).

name	gold	gPMEA			
σ [chains/nm ²]	—	0.097	0.107	0.124	0.180
Sessile drop [°]	83.4 \pm 0.9	72.0 \pm 0.5	68.8 \pm 1.6	67.4 \pm 0.3	69.3 \pm 0.9
Captive bubble [°]	135.3 \pm 0.4	136.5 \pm 0.7	137.4 \pm 0.8	134.3 \pm 0.6	134.4 \pm 0.1

5.2.2 HUVEC の接着試験（蛍光免疫染色）

金基板 (gold) および密度の異なる gPMEA を 24 well plate に移し、30 分間 UV 処理を行った。その後、PBS(-)で軽く表面をすすいだ後、HUVEC の培養培地である EGMTM-2 を 500 μ L ずつ添加して 37°C、5% CO₂ 環境下で 1 時間プレコンディショニング操作を行った。その後、培地を吸い取り、HUVEC の播種密度が 2.0 \times 10³ cells/cm² となるように各基板上に播種した。播種後、37°C、5% CO₂ 環境下で 1, 24, 72 時間培養した。各時間培養した後は、PBS(-)で軽く 1 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド（富士フィルム和光純薬株式会社）を 500 μ L ずつ添加して、37°C のインキュベーター内で 10 分間静置することで、細胞を固定した。その後、PBS で 1 回洗浄して 1.0% tritonX-100 (MP Biomedicals) の PBS 溶液を 500 μ L ずつ添加し、10 分間室温で静置し、PBS で 3 回洗浄した。その後、ブロッキングワン (Blocking One, ナカライテスク株式会社) を 500 μ L ずつ添加し、室温で 1 時間静置させた。PBS で 3 回洗浄した後、アクチンに特異的に結合する Alexa Fluor 488-conjugated Phalloidin (Invitrogen, Co.)、細胞核を染色する 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, Co.) を PBS(-)で 50 倍希釈したブロッキングワンでそれぞれ 1,000 倍、1,000 倍に希釈した溶液を添加し、遮光下、室温で 1 時間静置した。各基板を PBS で 3 回洗浄したのち、スライドガラスに移した。カバーガラスに退色防止剤である Prolong Gold antifade reagent を塗布して、スライドガラスに上から被せてプレパラートを作製した。作製した基板を共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal laser scanning microscopy; CLSM, FV3000, OLYMPUS) で観察した。また、撮影した画像から HUVEC の細胞数、ImageJ を用いて細胞面積および円形度を定量的に評価した。

5.2.3 ELISA による gPMEA 上の吸着タンパク質中の細胞接着部位の露出度の評価

金基板および密度の異なる gPMEA、各種 4 枚ずつの基板上に PBS(-)を滴下し、37°C で 1 時間プライミング処理した。その後、HUVEC の培養に使用した培地 (EGMTM-2 (2% FBS)、Lonza) を 200 μ L 滴下し、37°C で 1 時間吸着させた。その後、PBS(-)で洗浄を 3 回行い、一次抗体の非特異的吸着を抑制するために PBS(-)で 5 倍希釈したブロッキングワンを滴下し 37°C で 1 時間インキュベートした。その後、PBS(-)で洗浄を 3 回行い、PBS(-)で 50 倍希釈したブロッキングワんで 1000 倍希釈した一次抗体 (FN; anti-human fibronectin, monoclonal, clone FN 12-8, Takara Bio Inc., VN; Vitronectin 65/75 (D-8) HRP, nacalai tesque) を滴下し、37°C で 1.5 時間インキュベートした。その後、PBS(-)で洗浄を 3 回行い、FN を評価する方には、50 倍希釈のブロッキングワんで 5000 倍希釈した HRP で標識された二次抗体を滴下し、37°C で 2 時間インキュベートした。その後、PBS(-)で洗浄を 3 回行い、1 mg/mL の ABTS 溶液を 200 μ L ずつ滴下し、室温 (25°C) で 30 分間反応させた。呈色後、溶液を 96 well plate に 100 μ L ずつ移し、マイクロプレートリーダーで波長 405 nm の吸光度を測定した。

5.3 結果および考察

5.3.1 蛍光免疫染色による gPMEA 上の HUVEC の接着数・接着形態の評価

Figure 5-1 に金基板および各 σ の gPMEA 上で培養を行った HUVEC のそれぞれの時間における細胞数の結果を示した。細胞接着の初期過程でもある培養 1 時間の結果では、すべての基板で細胞の播種数の 30%以上は接着しており、gPMEA 上には HUVEC がコントロールであり抗付着性表面としても知られる gPEG の表面よりもよく接着していた。特に $\sigma=0.127$ では他の σ に比べて細胞数は多かった (播種細胞数の 50%以上が接着)。この結果と第三章の gPMEA 上の血小板粘着の結果 (Fig. 3-8)、 $\sigma = 0.107-0.127$ では血小板の粘着を抑制するという優れた抗血栓性を示しながら、HUVEC の接着性も高いことが示された。次に培養 24 時間では、全ての σ の gPMEA において基材でもある金基板よりも細胞数は多く、また HUVEC の接着数は σ に依存せず同等であった (播種細胞数の約 70%)。培養 72 時間では σ に応じて gPMEA 上に接着している HUVEC の数は異なっていた。特に、 $\sigma=0.097$ および 0.127 の HUVEC の数は金基板やおよび他の σ に比べて多く、約 4.6×10^3 cells/cm² であった。HUVEC の倍化時間がおおよそ 24 時間であることから培養 72 時間における HUVEC の数は初めに接着した HUVEC が分裂し、増殖していることになる。このことから培養 72 時間の細胞数と培養 24 時間の細胞数の比を増殖率として定義し、金基板および各 σ の gPMEA 上での HUVEC の増殖率を算出した結果、2.93 (gold)、3.11 ($\sigma = 0.097$)、2.78 ($\sigma = 0.107$)、3.13 ($\sigma = 0.127$)、2.21 ($\sigma = 0.180$) であった。 $\sigma = 0.097$ および 0.127 では金基板に対して HUVEC の増殖が約 50%促進された。一方、 $\sigma = 0.107$ および $\sigma = 0.180$ では増殖速度が遅くなっており、特に $\sigma = 0.180$ で顕著に遅くなっていた。次に、培養 72 時間における各基板上での HUVEC の蛍光画像および接着面積について議論する (Fig. 5-2)。

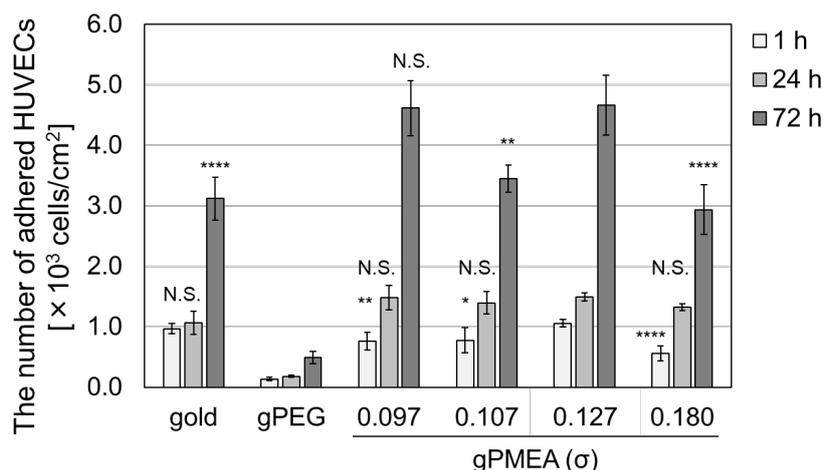


Figure 5-1. Initial adhesion behavior and growth behavior of HUVECs cultured on the gold, gPEG, and gPMEA with different grafting densities in the serum medium. Number of adhesion cells cultured at 1, 24, 72 h. The data are presented as the means \pm SD ($N = 3$ substrates).

第五章

金基板および $\sigma=0.127$ の基板上では細胞は良く伸展 (Fig. 5-2(b)) し、アクチンフィラメントがよく発達していた (Figure 5-2(a)の緑色で示される)。 $\sigma=0.107$ および 0.180 の基板上では接着している細胞数も少なく、細胞のアクチンフィラメントは発達しておらず、丸みを帯びた形態を示した (Fig. 5-2(b))。以上のように、 $\sigma=0.127$ の gPMEA 上に接着した HUVEC の数は多く、さらに良く伸展していることが明らかになった。このように gPMEA の σ に応じて HUVEC の数や伸展面積が異なっていたことについて、HUVEC の接着足場となるタンパク質の細胞接着部位の露出量が影響していると考え、5.3.2 節に gPMEA 上に吸着したタンパク質中の細胞接着部位の露出量と HUVEC の数や伸展面積との関係について議論する。

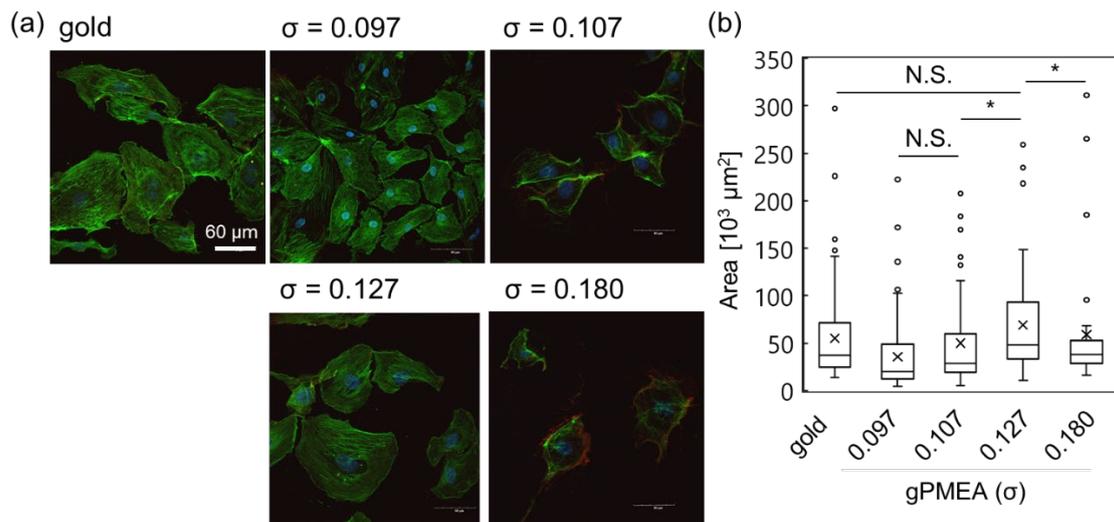


Figure 5-2. (a) CLSM images of the HUVECs cultured at 72 h on the gold and gPMEA with different σ . The cells stained with actin filaments (green), cell nuclei (blue). **(b)** Spreading area of HUVECs on the gold and gPMEA from CLSM images using Image J Fiji (ver. 1.53) (> 100 cells counted). The data are presented as the means \pm SD ($N=3$, $*P < 0.05$, N.S.: not significant).

5.3.2 gPMEA 上に吸着したタンパク質の細胞接着部位の露出度

ELISA を用いて gPMEA 上に吸着した FN および VN 中の細胞接着部位の露出量を評価した (Fig. 5-3)。各結果は金基板の吸光度を 1 とした相対値を示す。gPMEA 上に吸着した FN 中の細胞接着部位の露出量は、gPMEA の σ の増加とともに減少した (Fig. 5-3(a))。一方、VN の場合では、 σ に依存せず細胞接着部位の露出量は同等であった (Fig. 5-3(b))。VN の場合は金基板と比べて gPMEA 表面上に吸着した VN の量が極めて少なく、 σ に依存して相対的な細胞接着部位の露出量が変化するほどの吸着量がなかったと推察している。

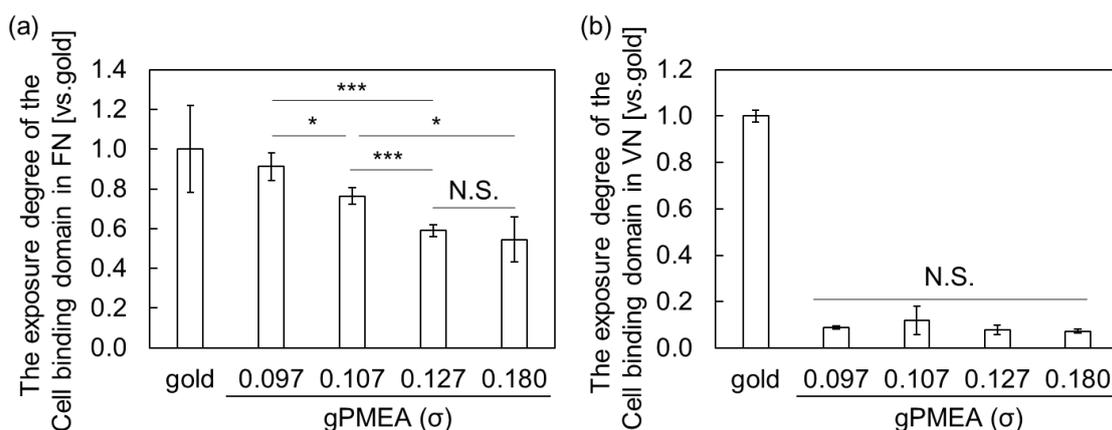


Figure 5-3. Exposure degree of the cell binding domain in (a) FN and (b) VN on the gold and gPMEA surface evaluated by ELISA. The data are presented as the means \pm SD ($N=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, N.S.: not significant).

ここでまず本章で使用した各基板の表面特性 (Table 5-2) と各種タンパク質の細胞接着部位の露出量との関係について議論する。

Table 5-2. Surface characterization of gold and gPMEA. Grafting densities (σ), water contact angle (sessile drop), air contact angle (captive bubble), water content in gPMEA, viscoelasticity of hydrated gPMEA. The data are presented as the means (SD) ($N=3$).

Sample name	Contact angle [°]		water content [g/g]	$\Delta D/\Delta F$ mobility 10^{-8} [Hz $^{-1}$]	
	Sessile drop (30 sec)	Captive bubble (1 h Immersion)			
gold	90.9 (0.8)	116.1 (1.0)	-	-	
gPMEA (σ) [chains/nm 2]	0.097	72.0 (0.5)	136.5 (0.7)	0.55 (0.05)	2.40 (1.02)
	0.107	68.8 (1.6)	137.4 (0.8)	0.53 (0.08)	2.01 (0.73)
	0.127	67.4 (0.3)	134.3 (0.6)	0.32 (0.13)	2.77 (0.48)
	0.180	69.3 (0.9)	134.4 (0.1)	0.10 (0.003)	1.63 (0.72)

第五章

Figure 5-4 に各基板の表面特性と PME A の σ とともに変化した FN 中の細胞接着部位の露出量との関係を示した。まず gPME A 中の水和水の量の増加に伴って FN 中の細胞接着部位の露出量は増加傾向を示した (Fig. 5-4(a))。しかし、同じ水含量 (約 0.55 g/g) でも FN 中の細胞接着部位の露出量が 2 倍違う gPME A も存在した。また対水接触角 (WC) の値の増加に伴って接着部位の露出量は増加していた (Fig. 5-4(c))。一方、含水した PME A 鎖の運動性を示す $\Delta D_{\text{gPolymer}}/(-\Delta F_{\text{gPolymer, air}})$ 値 (Fig. 5-4(b)) や対気泡接触角の値 (Fig. 5-4(d)) とは相関は見られなかった。大気下と水中での PME A 鎖の配向の変化の度合いを表す接触角のヒステリシス値 (対水接触角の値と対気接触角との差) との関係に着目すると、ヒステリシス値が増加するほど細胞接着部位の露出量は増加した (Fig. 5-4(e))。特に、ヒステリシス値が高い gPME A は $\sigma = 0.097$ であった。接触角のヒステリシスの原因は、表面の粗さ、化学的不均一性、固液界面での分子再配列などの影響によるものと言われている¹²。 $\sigma = 0.097$ は大気下および水中で表面は平滑であり均一な表面である (第 2 章参照) ことから、PME A 鎖の分子再配向が大きく変化したと考えられる。また $\sigma = 0.097$ の gPME A はポリマー鎖が水和し比較的高い運動性 ($\Delta D_{\text{gPolymer}}/(-\Delta F_{\text{gPolymer, air}}) = 2.40 \times 10^{-8} [\text{Hz}^{-1}]$) を有している。またアルキルアクリレートの側鎖炭素数が増加し、高分子鎖の運動性が増加するとその表面で FN の吸着状態が変化し、ネットワーク構造を形成することが Salmerón-Sánchez らのグループによって報告されている^{13,14}。接触角のヒステリシスや水和した PME A 鎖の運動性が高い表面 ($\sigma = 0.097$) では FN の変性を促し、細胞接着部位の露出量が高くなったと推察される。

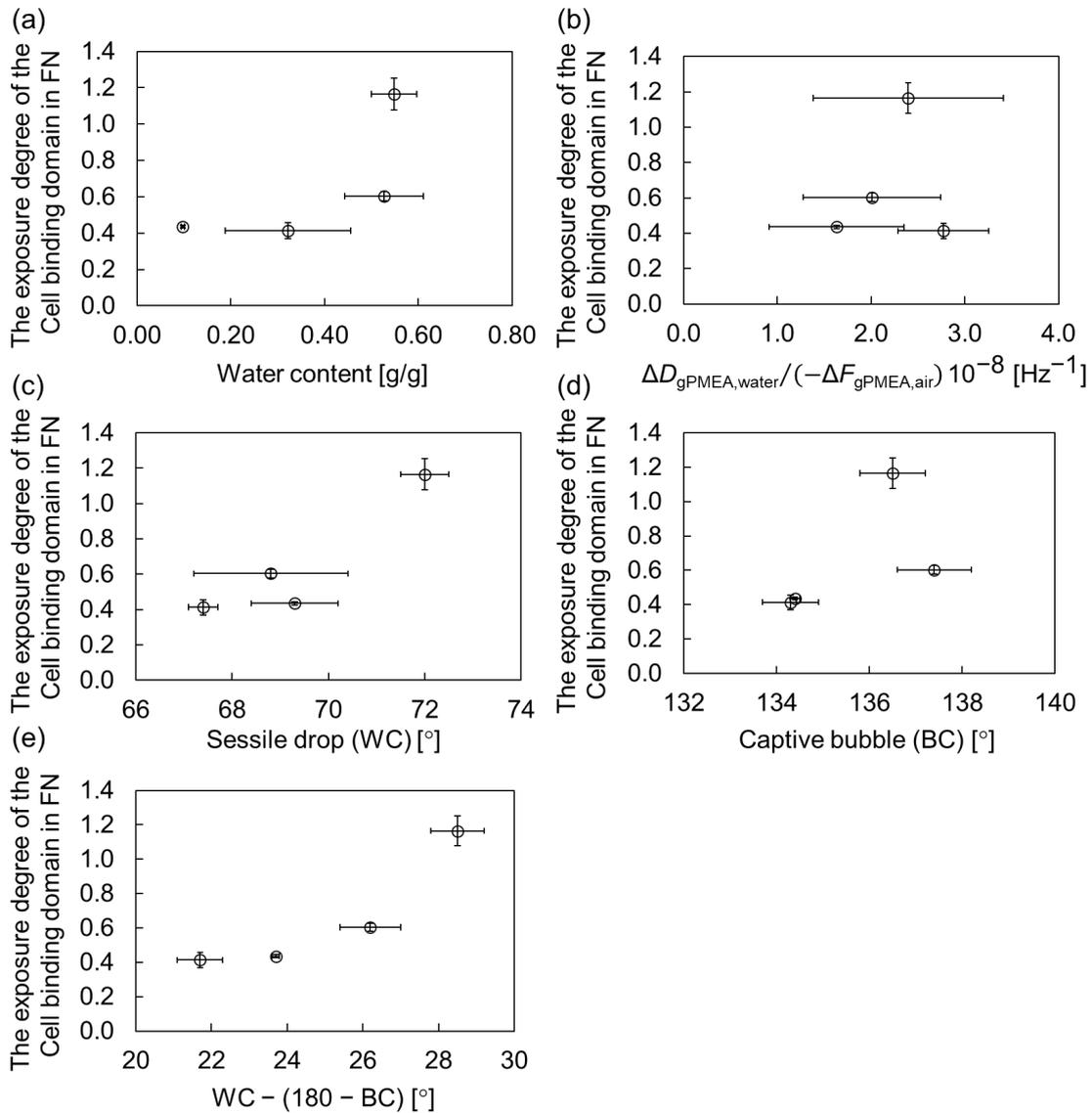


Figure 5-4. Correlation between the exposure degree of cell binding domain in adsorbed FN and (a) water content in gPMEA, (b) $\Delta D_{gPMEA,water}/(-\Delta F_{gPMEA,air})$ indicates the mobility of hydrated PMEAs chains, (c) water contact angle, (d) bubble contact angle, (e) hysteresis of contact angle between water and bubble. The data are presented as the means \pm SD ($N=3$)

次に gPMEA 表面に吸着した FN 中の細胞接着部位の露出量と HUVEC の接着数との関係について議論する (Fig. 5-5)。一般的に、細胞の接着量や伸展度はその足場となる FN 中の細胞接着部位の露出量に依存して変化する¹⁵⁻¹⁷。しかし、gPMEA の場合、培養時間に関係なく、FN 中の細胞接着部位の露出量と gPMEA 上に接着した HUVEC の数との相関はなかった。そのため、HUVEC の接着や伸展には足場となる FN などのタンパク質のみではなく、gPMEA 表面の特性も影響していると推察した。そこで、5.3.3 節に gPMEA の各種表面特性と HUVEC の数や伸展面積との関係について議論する。

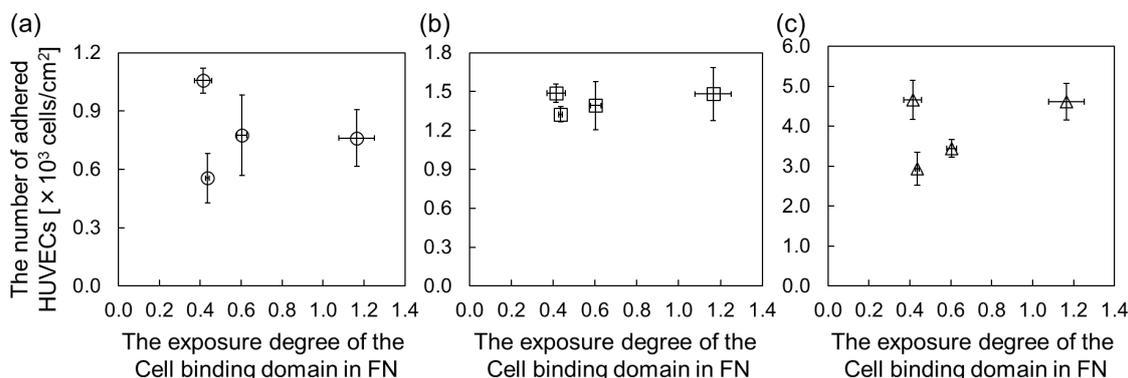


Figure 5-5. Correlation between the exposure degree of cell binding domain in adsorbed FN and the number of adhered HUVECs cultured on gPMEA at (a) 1 h, (b) 24 h, (c) 72 h. The data are presented as the means \pm SD ($N=3$).

5.3.3 gPMEA の水和量・運動性と HUVEC の接着挙動

培養 1 時間および培養 72 時間の接着した細胞数と gPMEA 中の水和量との関係は、水和量が 0.3 g/g までは水和量の増加に伴って HUVEC の数は増加した。一方、水和量が 0.3 g/g から増加すると HUVEC の数は減少 (Fig. 5-6(a))、もしくはほぼ一定 (Fig. 5-6(c)) となった。Nisida らは、DSC 測定で見積もられた中間水 (IW) と不凍水を併せた「結合水」の量が異なる PMEA 類似ポリマーを用いて細胞の接着力の評価を行い、結合水量が細胞接着に与える影響について報告している¹⁸。正常細胞およびがん細胞と各種ポリマーとの接着力や、各種ポリマー上での細胞の伸展面積は結合水量の増加に伴って減少したことが示された。さらに、Sato らの DSC で見積もられた IW の量の異なる基板上で HUVEC および平滑筋細胞の接着数を調べた報告によると、ある一定の IW の量までは細胞の接着数は増加し、その後 IW の量の増加に伴って細胞の接着数は減少していた¹¹。このようにポリマー中の結合水量や IW の量の増加によって細胞との相互作用力が小さくなり細胞の接着数は減少すると結論付けられている。本章の結果は、gPMEA 表面の水和水によって細胞との相互作用が小さくなるため、水和水量の増加に伴って HUVEC の接着数や伸展面積は減少した (Fig. 5-7(a)) と推察している。

次に、運動性について検討すると、水和した PMEA 鎖の運動性の増加に伴って細胞の接着数は増加するという正の相関係数を示した (Fig. 5-6(b),(d))。一方、接着した細胞の伸展面積は水和した PMEA 鎖の運動性と相関を示さなかった (Fig. 5-7(b))。第二章、第四章で述べたように水和した PMEA 鎖の運動性が高い $\sigma = 0.127$ では PMEA 鎖だけでなく水和した水分子の運動性も高いことを推察しており、PMEA 鎖とともに振動する水分子の運動性が高いことで細胞の接着や伸展を促すと推察している。gPMEA 上の HUVEC の接着には、FN 中の細胞接着部位の露出量や PMEA 中の水和量だけでなく、水和した PMEA 鎖の運動性 (高分子鎖・水分子) が大きく影響していることを明らかにした。

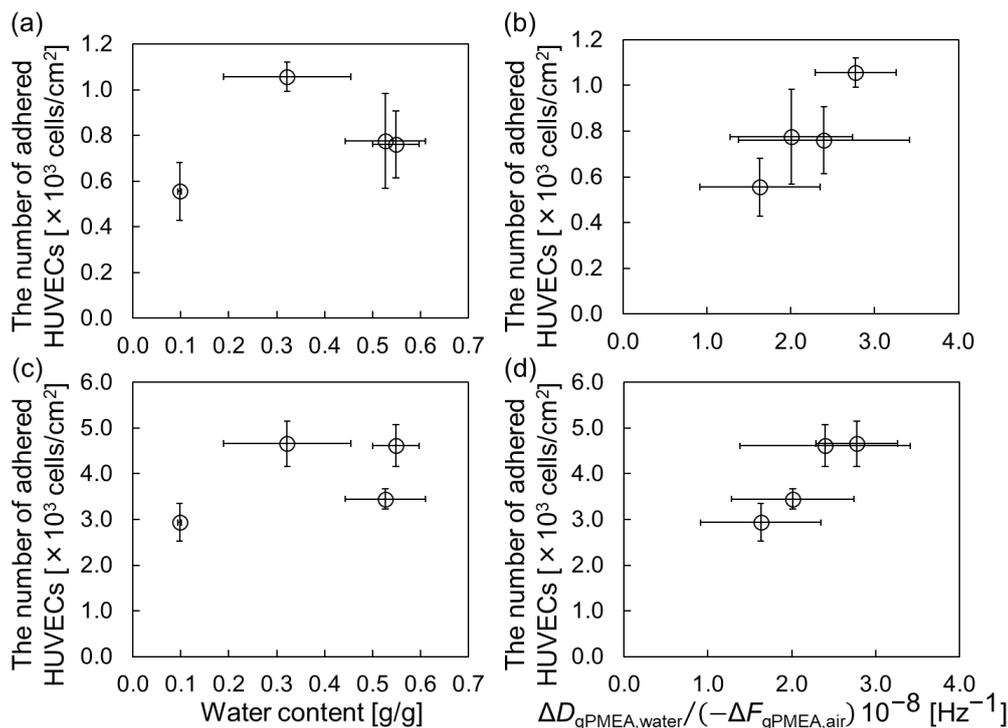


Figure 5-6. Correlation between the water content in gPMEA and the number of adhered HUVECs on gPMEA((a) 1h, (c) 72 h), and the mobility of hydrated PME chains and the number of adhered HUVECs on gPMEA((b) 1h, (d) 72 h). The data are presented as the means \pm SD ($N=3$)

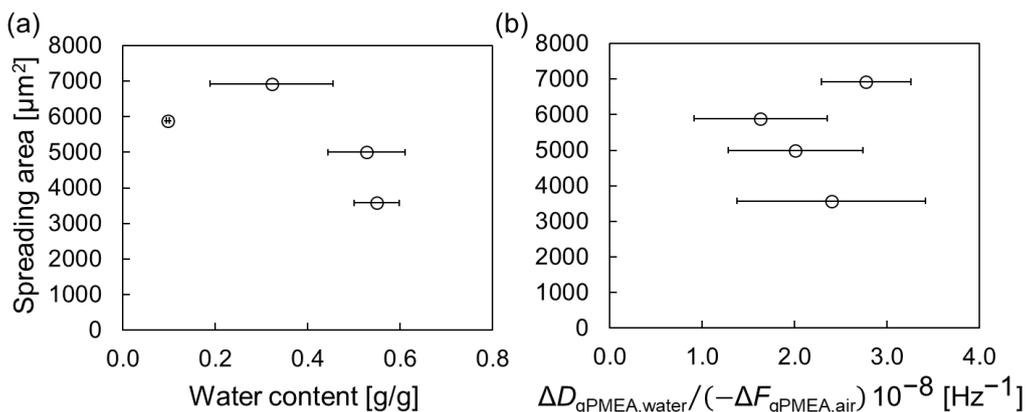


Figure 5-7. Correlation between spreading area of HUVECs on the gold and gPMEA from CLSM images using Image J and (a) water content in gPMEA and (b) the mobility of hydrated PME chains. The data are presented as the means \pm SD ($N=3$)

5.4 結論

本章では、PMEA が抗血栓性という血小板を粘着させない性質を示す一方で、血管内皮細胞 (HUVEC) は接着するという細胞選択性の発現機構の解明に向けて、グラフト密度 (σ) を制御した PMEA (gPMEA) 上の HUVEC の接着挙動の評価を行った。gPMEA 上には HUVEC がコントロールで gPEG の表面よりもよく接着していた。さらに、gPMEA 上の HUVEC の初期接着 (培養 1 時間) では $\sigma = 0.127$ で他の σ に比べて HUVEC の接着数は多く、72 時間培養後の接着した HUVEC の数は $\sigma = 0.097, 0.127$ で顕著に多かった。特に、 $\sigma = 0.127$ では接着した HUVEC は良く伸展しており、増殖率も高いこと、血小板の粘着を極めて抑制したことから、抗血栓性と HUVEC の接着性を併せ持つ高機能な界面であることを明らかにした。

次に gPMEA 上で HUVEC が良く接着した要因について足場タンパク質、特に FN と VN 中の細胞接着部位の露出量について議論した。FN 中の細胞接着部位の露出量は σ の増加とともに減少し、VN 中の細胞接着部位の露出量は σ に依存せず同等であった。特に FN 中の細胞接着部位の露出量は gPMEA 中の水和量の増加に伴って増加した。このことから、細胞接着に関与する FN が gPMEA/水界面の水和量の高い領域でも接着・細胞接着部位を露出するため、PMEA 表面上で HUVEC は接着し伸展したと推察した。さらに、gPMEA 上に吸着したタンパク質中の細胞接着部位の露出量と HUVEC の接着数や伸展面積と相関は得られなかったため、gPMEA 中の水和量や水和した PMEA 鎖の運動性といった gPMEA 表面の特性との相関について議論した。HUVEC の接着数や伸展面積は水和した PMEA 鎖の運動性と良い相関を示した。以上のことから、HUVEC の接着数や伸展といった接着挙動には、足場となるタンパク質中の細胞接着部位の露出量だけでなく、高分子膜側の運動性も重要であることを明らかにした。

材料側の水和量でフィブリノーゲンやフィブロネクチンなどの各種タンパク質の吸着や変性を制御し、材料側の運動性の増加によって接着した HUVEC の伸展を促進することができた。これらの知見は小口径人工血管の開発に大きな発展をもたらすことが期待できる。

また PMEA 膜表面ではフィブリノーゲンやフィブロネクチンといった種々のタンパク質で吸着挙動が異なっていたことから、タンパク質側の一次構造、二次構造、三次構造、電荷、分子量、水和状態といった情報を整理することで、タンパク質の分離膜としても使用できることが期待できる。特にタンパク質側の水和状態は今後、ナノメートルレベルの分解能で水和層の可視化が可能な FM-AFM を用いた分析が期待される。

5.5 引用文献

1. Ratner, B. D. Introduction: Biology and Medicine - Key Concepts in the Use of Biomaterials in Surgery and Medical Devices. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition* 393–394 (2013). doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00035-8
2. Ma, Y. *et al.* Anchorable phosphorylcholine copolymer synthesis and cell membrane mimetic antifouling coating fabrication for blood compatible applications. *J. Mater. Chem. B* **8**, 4299–4309 (2020).
3. Bedair, T. M. *et al.* Persulfated flavonoids accelerated re-endothelialization and improved blood compatibility for vascular medical implants. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **181**, 174–184 (2019).
4. Hubbell, J. A., Massia, S. P., Desai, N. P. & Drumheller, P. D. TISSUE ENGINEERING IN THE VASCULAR GRAn VIA. *Biotechnology* **9**, 568–572 (1991).
5. Massia, S. P. & Hubbell, J. A. Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin $\alpha 4\beta 1$. *J. Biol. Chem.* **267**, 14019–14026 (1992).
6. Mahara, A. *et al.* Tissue-engineered acellular small diameter long-bypass grafts withneointima-inducing activity. *Biomaterials* **58**, 54–62 (2015).
7. Liu, Y., Yang Tan, T. T., Yuan, S. & Choong, C. Multifunctional P(PEGMA)-REDV conjugated titanium surfaces for improved endothelial cell selectivity and hemocompatibility. *J. Mater. Chem. B* **1**, 157–167 (2013).
8. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
9. Chaudhuri, O., Cooper-White, J., Janmey, P. A., Mooney, D. J. & Shenoy, V. B. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* **584**, 535–546 (2020).
10. Jalali, S., Tafazzoli-Shadpour, M., Haghighipour, N., Omidvar, R. & Safshekan, F. Regulation of Endothelial Cell Adherence and Elastic Modulus by Substrate Stiffness. *Cell Commun. Adhes.* **22**, 79–89 (2015).
11. Sato, C., Aoki, M. & Tanaka, M. Blood-compatible poly(2-methoxyethyl acrylate) for the adhesion and proliferation of endothelial and smooth muscle cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **145**, 586–596 (2016).
12. Hozumi, A., Cheng, D. F. & Yagihashi, M. Hydrophobic/superhydrophobic oxidized metal surfaces showing negligible contact angle hysteresis. *J. Colloid Interface Sci.* **353**, 582–587 (2011).
13. Vanterpool, F. A., Cantini, M., Seib, F. P. & Salmerón-Sánchez, M. A Material-Based Platform to Modulate Fibronectin Activity and Focal Adhesion Assembly. *Biores. Open Access* **3**, 286–296 (2014).

第五章

14. Bathawab, F. *et al.* Lateral Chain Length in Polyalkyl Acrylates Determines the Mobility of Fibronectin at the Cell/Material Interface. *Langmuir* **32**, 800–809 (2016).
15. Singh, P., Carraher, C. & Schwarzbauer, J. E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 397–419 (2010).
16. Arnold, M. *et al.* Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *ChemPhysChem* **5**, 383–388 (2004).
17. Seo, J. H. & Yui, N. The effect of molecular mobility of supramolecular polymer surfaces on fibroblast adhesion. *Biomaterials* **34**, 55–63 (2013).
18. Nishida, K., Anada, T., Kobayashi, S., Ueda, T. & Tanaka, M. Effect of bound water content on cell adhesion strength to water-insoluble polymers. *Acta Biomater.* **134**, 313–324 (2021).

第六章

総括

第六章

少子高齢化社会において、医療機器は生活の質の向上のために必要不可欠である。医療機器の多くは汎用性高分子から構成されている。この高分子材料に血液が接触すると血栓形成の反応が惹起される。したがって、材料表面には血液と接触しても異物反応を起こさない「血液適合性」が求められる。特に血栓形成反応を抑制する性質である「抗血栓性」の付与には血栓形成にむけての初期過程である材料表面でのタンパク質の吸着・構造変化や血小板の粘着・活性化を抑制することが重要である。また、長期の抗血栓性を発現するために、血管の内表面に存在する血管内皮細胞による内皮化を促進する材料表面の設計というのは抗血栓性を付与することともに必要である。

現代の難題とされている小口径人工血管の開発に向けて、血小板の非粘着性と血管内皮細胞の接着性を併せ持つ血液適合性表面の構築に関する研究が盛んに行われている。例えば、ポリ(2-メトキシエチルアクリレート) PMEA は、血小板は粘着させず血管内皮細胞 (HUVEC) は接着するという選択的な細胞接着性を有している。この細胞選択性の発現機構の解明に向けて、生体の大部分を占めている「水」が高分子と接触した際にできる水和状態の解析が行われた。血液適合性を有する高分子には特徴的な水である「中間水」が観測され、この中間水の量と血液適合性との間に相関があることが見出されている。しかし、中間水の具体的な役割は不明瞭な部分もある。最近、PMEA/水界面では自発的に密度の異なる領域 (Polymer-rich 相・Water-rich 相) が形成されることが報告され、その密度の違いによってタンパク質の吸着や血小板などの細胞の接着が異なることが示唆されている。本博士論文では密度を制御した PMEA での水和量や運動性などの水和状態と生体応答を評価することで、PMEA の密度と抗血栓性・内皮細胞接着性との関係を理解することを目的とした。

第二章では、PMEA の密度によって PMEA/水界面の水和量や PMEA 鎖の運動性が変化するという予想のもと、PMEA の密度を制御したモデル基板 (gPMEA) を作製した。gPMEA のグラフト密度 (σ) は反応濃度・反応時間によって制御することが可能であり、 $\sigma=0.02\sim 0.18$ chains/nm² の gPMEA を作製することに成功した。 $\sigma=0.118$ の gPMEA は最も親水的であり、水和量は σ の増加に伴って減少した。一方、水和した PMEA の運動性は $\sigma=0.12$ 付近の gPMEA で最大であったことから、 $\sigma=0.12$ の gPMEA では運動性の高い水分子、特に自由水や中間水が多いことが示唆された。gPMEA/水界面の構造は σ に応じて変化し、 $0.11 < \sigma < 0.13$ では微細構造が確認できた。この相分離によって形成した Polymer-rich 相の割合は $\sigma=0.113$ で一番少なく、 σ の増加に伴って増加しており、Water-rich 相の割合が高い、すなわち水和量や運動性がともに高い密度である $\sigma=0.11\sim 0.12$ 付近の gPMEA は、中間水が gPMEA/水界面で多く存在することを示唆した。

第三章では、 σ の異なる gPMEA に対して抗血栓性の評価を行った。gPMEA 上のフィブリノーゲンの吸着量および血小板の粘着数は σ の増加に伴って減少し、 $\sigma=0.12$ 付近で最小となった後、 σ の増加に伴って増加した。また、フィブリノーゲンの吸着量は gPMEA 中の

第六章

水和量と負の相関を示し、gPMEA 中の水和量と水和した PMEА 鎖の運動性がともに高い領域でフィブリノーゲンの変性が抑制されたことが確認された。gPMEA 表面上への血小板の粘着は gPMEA/水界面の Water-rich 相が 40%以上の時に有意に抑制しており、gPMEA/水界面の Water-rich 相、特に水和水の量や水和した高分子鎖の運動性が高いことが血小板の粘着を抑制するのに極めて重要であった。このことから、多くの高分子鎖が水中に分散して適度に水和する界面を設計することが、その表面へのフィブリノーゲンや血小板の接着・粘着を抑制するのに重要であることを明らかにした。

第四章では、中間水量の異なる PMEА 類似高分子の水和水量や運動性を評価し、 σ の異なる gPMEA の結果と比較することで PMEА の σ と水和状態、特に中間水との関係について詳細な議論を行った。さらに、湿度制御下で水分子の吸着挙動を水晶振動子マイクロバランスにより評価した。疎水性高分子では水和量は σ に依存せず少ないことを明らかにした。中間水を有し抗血栓性を発現する高分子では水和量および水和した高分子鎖の運動性がともに高く、加湿下では水分子が高分子鎖内部に拡散し、高分子鎖が容易に膨潤した。また、この時に形成される Water-rich 相に存在する水分子は中間水であることが示唆された。さらに、高分子中の水和量と高分子鎖の運動性がともに高いことが中間水の発現と大きく関連していることを新たな知見として得ることができた。

第五章では、より優れた血液適合性高分子の設計指針の確立と PMEА の細胞選択性の発現機構の解明に向けて、 σ を制御した gPMEA 上の HUVEC の接着挙動を評価した。 $\sigma=0.127$ の gPMEA は、血小板の粘着を極めて抑制し、HUVEC は良く伸展・増殖することから、抗血栓性と HUVEC の接着性を併せ持つ高機能な界面であることを明らかにした。gPMEA 上への細胞接着に関与するタンパク質であるフィブロネクチンは密度に依存せず一定量接着した。さらに、gPMEA/水界面の水和量の増加に伴って接着したフィブロネクチン中の細胞接着部位の露出量は増加した。細胞接着に関与するフィブロネクチンは抗血栓性の指標となるフィブリノーゲンとは違い、水和量および運動性の高い表面でも接着し、細胞の接着部位を露出させることで HUVEC が接着することを明らかにした。gPMEA 上に接着した HUVEC の数や伸展面積は、足場となるタンパク質、FN と VN 中の細胞接着部位の露出量と相関がない一方で、水和した PMEА 鎖の運動性と良い相関を示した。HUVEC の接着数や伸展などの接着挙動には、足場となるタンパク質中の細胞接着部位の露出量だけでなく、高分子膜側の運動性も重要であることを明らかにした。

本研究で使用したアドミッタンスシステムを導入した水晶振動子マイクロバランス (QCM-A) は高分子中の水和水量を見積もるだけでなく、水和水の状態、特に水和した高分子の運動性を評価でき、同時に水と高分子の情報を得ることのできる強力なツールである。未だ QCM を用いた高分子中の水和状態の解析例は少ないため、高分子中の水和状態を

第六章

解析する手法の一つとして、本研究の成果は非常に有意義な知見をもたらしたと言える。さらに、QCMは時間を関数とした評価も可能であることから、湿度制御下で水分子の吸着過程や脱離過程を速度論的に理解することができるため、高分子中の水和状態を解釈する手段として大いに貢献できることが期待される。

本研究でタンパク質の吸着や変性、血小板の粘着を抑制するためには、高分子/水界面に高分子鎖が水和し分散することで水和量が多く水和した高分子鎖の運動性が高い界面を設計することが重要であることが明らかとなり、抗血栓性高分子材料の開発に向けて有意義な知見となることが期待される。さらに、材料側の水和量で各種吸着タンパク質中の細胞接着部位の露出量を制御し、材料側の運動性を制御することで、接着した HUVEC の数・伸展・増殖率を制御することが可能であり、これらの知見は小口径人工血管の開発に大きな発展をもたらすことが期待できる。今後、ナノメートルスケールレベルの局所的な水和状態の解析を行える周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) や AFM と IR を組み合わせた Nano-IR を用いることで PMEА/水界面で形成される Polymer-rich 相・Water-rich 相中の不凍水、中間水、自由水などの各種水和水を直接解析することで、血液適合性の発現に重要な水和量と運動性がともに高い相と中間水との関係を詳細に理解することが可能であることが期待される。

研究業績一覽

1. Tomoya Ueda, Daiki Murakami, Masaru Tanaka. “Analysis of Interaction between Interfacial Structure and Fibrinogen at Blood-Compatible Polymer/Water Interface”, *Frontiers in Chemistry*, **2018**, 6, 542. DOI: 10.3389/fchem.2018.00542.
2. Tomoya Ueda, Daiki Murakami, Masaru Tanaka, “Effect of Interfacial Structure Based on Grafting Density of Poly(2-Methoxyethyl Acrylate) on Blood Compatibility”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2021**, 199, 111517. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2020.111517.
3. Tomoya Ueda, Daiki Murakami, Masaru Tanaka, “Effect of Amount of Hydrated Water and Mobility of Hydrated Poly(2-Methoxyethyl Acrylate) on Denaturation of Adsorbed Fibrinogen”, *Journal of Polymer Science*, **2021**, 59(22), 2763. DOI:10.1002/pol.20210496.

他共著論文

1. Daiki Murakami, Yuto Segami, Tomoya Ueda, Masaru Tanaka. “Control of interfacial structures and anti-platelet adhesion property of blood-compatible random copolymers”, *Journal of Biomaterials Science*, **2020**, 31, 207-218. DOI: 10.1080/09205063.2019.1680930.
2. Shin-nosuke Nishimura, Tomoya Ueda, Shingo Kobayashi, Masaru Tanaka, “Silsesquioxane/Poly(2-methoxyethyl acrylate) Hybrid with Both Antithrombotic and Endothelial Cell Adhesive Properties”, *ACS Applied Polymer Materials*, **2020**, 2(11), 4790-4801. DOI: 10.1021/acsapm.0c00776.
3. Shin-nosuke Nishimura, Tomoya Ueda, Daiki Murakami, Masaru Tanaka, “Chain End Effect for Intermediate Water Formation of Poly(2-methoxyethyl acrylate)”, *Organic Materials*, **2021**, 3, 214-220. DOI: 10.1055/a-1441-8239.
4. Shichen Liu, Shingo Kobayashi, Shin-nosuke Nishimura, Tomoya Ueda, Masaru Tanaka, “Effect of Pendant Groups on the Blood Compatibility and Hydration States of Poly(2-oxazoline)s”, *Journal of Polymer Science*, **2021**, 59(21), 2559. DOI: 10.1002/pol.20210410.
5. Kei Nishida, Takahisa Anada, Shingo Kobayashi, Tomoya Ueda, Masaru Tanaka, “Effect of bound water content on cell adhesion strength of water-insoluble polymers”, *Acta Biomaterialia*, **2021**, 134, 313-324. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.07.058.
6. Daiki Murakami, Kosuke Yamazoe, Shin-nosuke Nishimura, Naoya Kurahashi, Tomoya Ueda, Jun Miyawaki, Yuka Ikemoto, Masaru Tanaka, and Yoshihisa Harada. “Hydration Mechanism in Blood-Compatible Polymers Undergoing Phase Separation”, *Langmuir*, **2022**, DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c02672.

謝辞

本本研究の遂行ならびに本学位論文をまとめるにあたり、研究の機会を頂くとともに、常日頃から適切な御指導・御鞭撻を賜りました九州大学先導物質化学研究所 教授 田中 賢先生、同准教授 穴田貴久先生、同助教 村上大樹先生、同特任准教授 小林慎吾先生に心より感謝申し上げます。

学位論文審査にあたり、ご多忙の中、副査を引き受けてくださった九州大学 先導物質化学研究所 分子集積化学部門 医用生物物理化学分野 教授 木戸秋 悟先生、九州大学 大学院工学研究院 化学工学部門 教授 三浦佳子先生、九州大学 大学院工学研究院 応用化学部門 主幹教授 田中敬二先生に深く感謝申し上げます。

日頃から研究活動だけでなく生活面でも相談に乗ってくださり支えてくださった、荒木久美子さんに心より感謝申し上げます。

一番身近な立場で常日頃から研究者として研究に取り組む姿勢など多くのことを学ばせて頂きました現 東京工業大学 生命理工学院 助教 西田 慶先生、学術研究員の西村慎之介博士、塩本昌平博士さんに尊敬の念と感謝申し上げます。

日頃から研究の合間に雑談や談笑し楽しく研究をおくらせてくださいました、学術研究員の柏崎亜樹さん、テクニカルスタッフの平井晴香さん、蔡 孟諭さん、田中有希子さん、小川依未さん、マシューズ 知子さん、山本安希さん、宇高愛里さんに感謝申し上げます。

日々の研究生活で協力し合いながら互いを高め合った、同期の平松大知君、藤田直輝君、馬渡なみさん、上原広貴君、先輩方、後輩諸君に心より感謝申し上げます。

常に私の近くで精神的に支えてくれた坂井優香、そして研究者を志す機会を与え、研究生生活を常日頃から応援してくれた両親に謹んで感謝申し上げます。

最後に、本研究に取り組んだ期間、とても有意義な研究生生活を送ることができました。本研究を行う際にご協力をいただいたすべての皆様に感謝の意を表します。

2022年1月18日

九州大学 大学院工学府 物質創造工学専攻 田中 賢 研究室
上田 智也