The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	生体ヘテロ界面のナノスケール制御
Author(s)	松崎, 典弥; 明石, 満; 高井, まどか 他
Citation	表面科学. 2009, 30(4), p. 193-201
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/50294
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

研究紹介

表面科学 Vol. 30, No. 4, pp. 193−201, 2009
特集「ソフトナノテクノロジー部会特集」

生体ヘテロ界面のナノスケール制御

松崎典弥[1,2]・明石　満[1]・高井まどか[3,4]・石原一彦[3,4]・荻野俊郎[5]

[1]大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻　〒565−0871　大阪府吹田市山田丘 2−1
[2]科学技術振興機構さきがけ　〒332−0012　埼玉県川口市本町 4−1−8
[3]東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻　〒113−8656　東京都文京区本郷 7−3−1
[4]東京大学ナノバイオ・インテグレーション研究拠点　〒113−8656　東京都文京区本郷 7−3−1
[5]横浜国立大学工学府物理情報工学専攻　〒240−8501　神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台 79−5

（2009 年 2 月 19 日受理）

Nanoscale Control of Hetero-biointerfaces

Michiya Matsusaki[1,2], Mitsuru Akashi[1], Madoka Takai[3,4], Kazuhiko Ishihara[3,4] and Toshio Ogino[5]

[1]Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2−1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565−0871
[2]PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST), 4−1−8 Honcho Kawaguchi, Saitama 332−0012
[3]Department of Materials Engineering, The University of Tokyo, 7−3−1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113−8656
[4]Center for NanoBio Integration, The University of Tokyo, 7−3−1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113−8656
[5]Department of Electrical and Computer Engineering, Yokohama National University,
79−5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama, Kanagawa 240−8501

(Received February 19, 2009)

In the multileveled bio-engineering including amino-acids, proteins, organelle, cells, tissues, and organs, control of hetero-biointerfaces is a key technology. In particular, recent development of nanotechnology has made the nanoscaled control possible. In this article, we selected current topics in the hetero-biointerfaces. In the layer-by-layer stacking technique of cells, artificial tissues similar to a blood vessel has been realized. Phospholipid polymers similar to cell membrane were used to control the biomaterial surfaces. Properties of their interfaces with proteins are analyzed focusing on functions of the interface water layers. Selective adsorption of protein molecules on a solid surface is also demonstrated. In the biointerface engineering, nanoscale control play crucial roles.

KEYWORDS : biointerface, cell interface, biomaterial, layered tissue, protein adsorption

1. は　じ　め　に

生体は階層構造を持つ。原子から順に，アミノ酸（amino acid）などの分子量の小さい分子，アミノ酸が結合して特定の立体構造と機能を発現したタンパク質（protein），細胞内で生命活動の一部分を担う細胞内小器官（organelle），生命の基本単位である細胞（cell），多数の細胞が共同して特定の機能を獲得した組織（tissue），組織が集まって形成される心臓や目などの器官（organ），そして生物個体に至る階層である。こうした生体の要素が集合して高次の機能をつくる段階では，それら要素間の界面が重要な働きを持つ。例えば多数の細胞が集合して組織を形成するとき，この界面は細胞同士が直接接着しているのではなく，細胞外マトリクスと呼ばれる細胞間の物質が大きな役割を果たしていることが認識されている。また，バイオデバイスや生体内デバイスにおいては，無機材料やポリマーなどの固体表面と生体分子との相互作用の制御が重要である。一方，近年のナノテクノロジーの発展は，これら異種（ヘテロ）界面の性質をナノスケールで評価し，人工的に制御することを可能にしつつある。その結果，バイオセンサーを初めとする生体/固体融合デバイス技術や，生体組織の再生をナノスケールで制御する研究が活発に行われるようになっ

E-mail : togino@ynu.ac.jp
E-mail : takai@mpc.t.u-tokyo.ac.jp
E-mail : m-matsus@chem.eng.osaka-u.ac.jp

てきた[1,2]。

本研究紹介では，さまざまな生体ヘテロ界面のナノスケール制御の中で，今注目の集まっているテーマを取り上げた。第2節で取り上げる細胞の積層は，細胞から人工的に組織を作る上で必須の技術である。ここでは細胞に細胞外マトリクスを積層し，細胞が積層する足場を作る技術が鍵となる。あらゆるバイオデバイスでは，タンパク質の非特異吸着が最重要課題の一つである。第3節では，生体適合性ポリマーと生体とのヘテロ界面に関する研究を，特に界面水の存在に注目して紹介する。最後に，無機固体表面がタンパク質分子を選択的に吸着できる可能性を第4節で紹介する。

2. 細胞の界面制御による積層組織の創製（松崎典弥，明石　満）

2.1　交互積層法の概要

生体組織は，タンパク質や糖タンパク質で構成される細胞外マトリックス（ECM）と様々な種類の細胞により複雑かつ高度に組織化された構造を有し，機能を発現している。細胞は，外部との情報交換や機能発現を細胞膜界面で制御しており，ECMは細胞界面のマイクロ環境を制御し，細胞機能に重要な役割を果たしている[3]。例えば，細胞接着とは細胞膜のインテグリン分子とECM成分であるコラーゲンやフィブロネクチン（FN）の相互作用であり，また，FNと細胞膜分子の相互作用が細胞の生存や増殖，シグナル伝達，分化誘導に強く影響することが明らかにされている[4]。ECM成分は一般的に数十ナノから数百マイクロメートルの直径を有する線維として細胞周囲に存在し，細胞のベッドとして存在している[5]。したがって，様々な種類の細胞とECM成分の線維マトリックスをうまく複合化することができれば，再生医療で切望されている生体外での人工組織の構築が達成できると期待される。近年，ハイドロゲルや自己組織化バイオマテリアルを人工ECMとして用いた細胞のマイクロ環境の制御と再生医療への応用が研究されているが[6,7]，様々な種類の細胞の三次元的な配置を制御し，生体組織に類似の構造を構築することは困難であった。

著者らは，細胞の表面にECMの薄膜を形成することで次層の細胞の接着足場が提供され，細胞の表面に細胞を接着することが可能となり，様々な種類の細胞の三次元的な配置を制御して組織化できると考えた。つまり，細胞を一層ずつ積み上げていく方法（積層化）である。本手法が可能であれば，細胞とECM成分を三次元的に複合化できると期待される。著者らは，生体高分子や他の高分子電解質の多層薄膜を容易に調製できる交互積層法[8]を用い，細胞表面に様々な生体高分子または合成高分子のナノ薄膜を調製した。興味深いことに，FNの結合ドメインを介した相互作用による薄膜のみ細胞表面で薄膜から線維へ形態を変化し，天然のECM線維と類似の構造と機能を示すことが明らかとなった。また，このナノ薄膜を細胞表面に形成して細胞を積層化することで，ヒト血管壁や骨格筋に類似した積層組織モデルの構築が可能であった。本手法は，細胞界面のマイクロ環境の制御と細胞の積層化を可能とする新しいナノバイオ技術として期待される。

2.2　細胞表面へのナノ薄膜形成と細胞毒性

交互積層法（LbL法）は，これまで困難であった高分子電解質の多層薄膜が容易に調製できる高分子積層技術として1991年にG. Decherらによって見出された手法である[9]。相互作用を有する二種類の高分子溶液へ基板を交互に浸漬するだけでナノからマイクロオーダーの薄膜が調製できるため，これまで幅広く研究が展開されてきた。細胞表面への交互積層薄膜の調製は2001年から報告されており，中空カプセルの調製[10]や膵島細胞の免疫隔離膜としての応用[11]が研究されている。著者らは，細胞表面に形成した膜厚を直接測定することは困難であるため，細胞膜モデルとしてリン脂質二分子膜を用いて薄膜の形成を評価した。薄膜の形成は，水晶発振子マイクロバランス（QCM）を用いて評価した。QCMとは，物質が吸着した時の水晶の振動数の減少から吸着量を求めることができるナノグラムの天秤と考えていただきたい[12]. Krishnaらの報告[13]に従い，1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine（DPPC）と1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate（DPPA）の4：1のリン脂質二分子膜をQCM基板上に作成し，この基板を0.2 mg/mLのFN/トリス緩衝液（50 mM, pH＝7.4）に37℃で1分間浸漬し，トリス緩衝液を用いて洗浄後に振動数を測定した。次に，0.2 mg/mLのゼラチン（G）またはデキストラン硫酸（Dex）/トリス緩衝液（50 mM, pH＝7.4）に37℃で15分間浸漬し，洗浄後に振動数を測定した。このステップを繰り返すと逐次的な振動数の減少が観察され，FN-GおよびFN-Dex薄膜の形成が示唆された。膜厚は交互積層回数に依存して増加し，10〜20回でおよそ10〜100 nmの薄膜が調製できた。つまり，細胞膜表面においても同程度の膜厚の各薄膜が調製できると考えられる。興味深いことに，FNとGやFNとDexの組み合わせは中性のトリス緩衝液中で双方マイナスチャージを帯びているにもかかわらず，薄膜が逐次的に調製された。これは，FNがコラーゲン結合ドメインやヘパリン結合ドメインを有しており，FNドメインとの相互作用によると推察される[4,14]。形成した薄膜は10%のウシ胎

仔血清（FBS）を含む Eagle's 培地中で安定であった。

細胞膜表面への薄膜形成を評価するため，ローダミンラベル化 FN（Rh-FN）と G を用いてマウス L929 線維芽細胞表面へ薄膜を調製し，蛍光顕微鏡で観察した。セルトラッカーグリーンで細胞膜を蛍光ラベル化したマウス L929 線維芽細胞を基板に接着させた後，上記手法で細胞表面へ薄膜を調製した。蛍光顕微鏡観察の結果，細胞由来の蛍光と薄膜由来の蛍光が完全に一致し，細胞表面への Rh-FN-G 薄膜の形成が示唆された。他の組み合わせにおいても同様に膜の形成が確認された。また，交互積層ステップ数の増加に伴い Rh-FN の蛍光強度が増加したことから，細胞膜表面においても逐次的な薄膜の形成が確認された。細胞表面に調製された各薄膜の細胞毒性を調べる目的で，薄膜を調製してから 24 時間後の細胞数と膜厚の関係を検討した（**Fig. 1**）。興味深いことに，FN の結合ドメインを介した相互作用を駆動力とする FN-G と FN-Dex 薄膜の場合，膜厚に依存せず細胞毒性は見られなかったが，静電的相互作用を駆動力とする薄膜の場合は膜厚に依存した細胞毒性が観察された。詳細な理由はまだ明らかではないが，カチオン性のタンパク質や高分子が細胞膜表面に濃縮され，膜表面のシアル酸や膜タンパク質に結合することで細胞毒性が発現したと考えられる。静電的相互作用を駆動力とする交互積層薄膜への細胞接着に関するこれまでの研究では，カチオン性表面では培地中の接着タンパク質が吸着しやすいため，細胞接着性が向上することが報告されている[15]。つまり，交互積層薄膜へ細胞が直接接着するのではなく，薄膜表面へ吸着した接着タンパク質を介したインテグリンとの相互作用により接着するため，薄膜が細胞の上か下かという違いではなく，薄膜と細胞の接触が根本的に異なると考えられる。以上より，交互積層薄膜を細胞表面に形成する場合，細胞膜表面へ直接薄膜が形成されるため，薄膜への細胞接着とはその影響が大きく異なることが初めて明らかとなった。

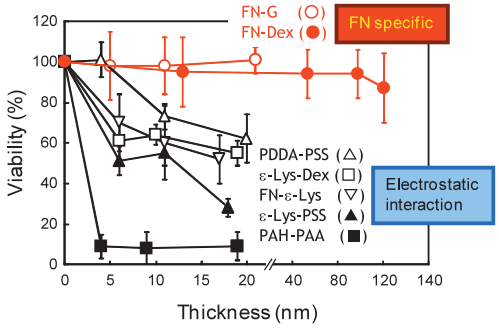


Fig. 1. (color online). Relationship between thickness of various nanofilms and cell viability for 24 h after the film preparation.

2. 3　細胞表面でのナノ薄膜の形態変化

細胞表面に形成した薄膜がどのような形態をしているか観察するため，Rh-FN と FITC ラベル化 G（FITC-G）を用いて細胞表面へ 21 nm の薄膜を調製し，蛍光顕微鏡により経時的に観察した。薄膜調製直後は細胞表面に均一に蛍光が観察され，薄膜の存在が示唆されたが，24 時間培養後には線維状の形態が観察された（**Fig. 2** (a)）。この線維は FN と G の両成分から構成されていることが重ね画像から示唆され，また，走査型電子顕微鏡観察より，直径約 160 nm，長さ数 μm のナノファイバーであることが確認された（Fig. 2（b），（c））。さらに，このナノファイバーは，細胞骨格であるアクチン繊維の配向と同じ配向を示していることがアクチンの蛍光染色より明らかとなった。これまで，細胞が膜表面へ産出した FN は形成から約 6〜12 時間後に細胞内のアクチン繊維との相互作用によりアクチンの配向に沿って線維化され，コラーゲン等と会合することで ECM 線維を形成することが報告されている[4, 16, 17]。しかし，人工的に ECM 線維を作製して細胞と複合化させることは困難であっ

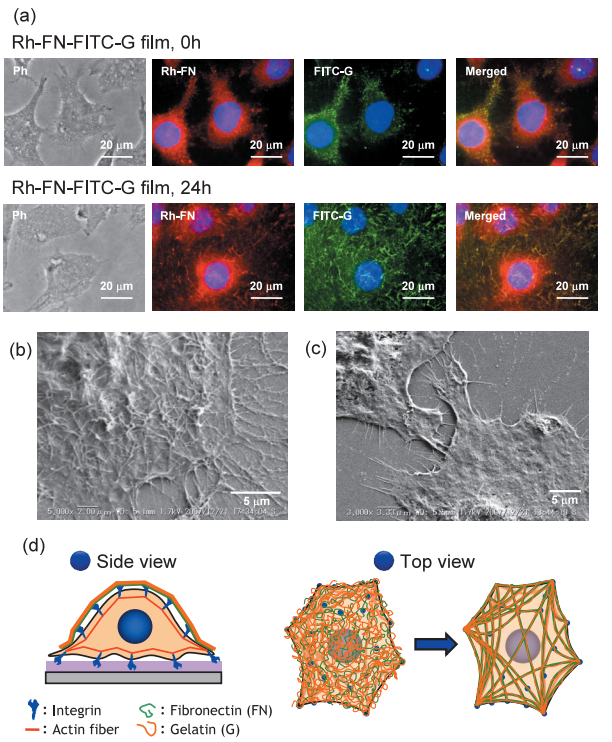


Fig. 2. (color online). Confocal fluorescence microscope images of L929 fibroblast cells with 21 nm of FN-G nanofilms after 0 or 24 h of incubation (a). SEM images of L929 cell surface with (b) or without (c) the FN-Dex films after 24 h of incubation. Schematic illustration of FN-G film fibrillation on cell surface (d).

た。このナノ薄膜の線維化は FN-Dex 薄膜においても確認されているため，FN の結合ドメインと相互作用する成分であればタンパク質や糖鎖を問わず複合化して ECM 様の線維を細胞表面に形成できることが示された。興味深いのはナノ薄膜からナノファイバーへの形態変化であるが，ナノファイバーの配向がアクチン繊維と相関していたことから，細胞が産出した FN と同様の機構だと考えている。つまり，薄膜形成後，アクチン繊維がインテグリン分子を介して薄膜内の FN に張力をかけることで FN の線維化が開始され，FN と G や Dex が複合化した線維が形成されたと推察される（Fig. 2（d））。この結果は，細胞の界面をナノ薄膜により制御し，人工的に ECM 線維を細胞と複合化して作製した初めての例である。

2. 4　細胞の積層化による積層組織の構築

細胞表面に形成した FN-G ナノ薄膜が ECM 線維と同様の形態を有していたことから，ECM としての機能を示すことが期待される。そこで，細胞表面に形成した FN-G ナノ薄膜が次層の細胞の接着足場として機能することができれば，人工 ECM 層を介して様々な細胞を三次元的に積層化できるのではないかと考えた。コンフルエントの細胞密度でマウス L929 線維芽細胞やヒト初代線維芽細胞を基板に接着させ，その表面へおよそ 6 nm の FN-G 薄膜を形成し，二層目の細胞を播種して 12 時間インキュベートした。薄膜を形成しない場合や FN のみを細胞表面へ吸着させた場合（膜厚およそ 2 nm）は，二層目の細胞が一層目の細胞表面へ接着できずに隙間へもぐりこんで基板へ接着し，高密度な単層構造しか観察されなかった。しかしながら，FN-G 薄膜を形成した場合，二層目の細胞が一層目の細胞表面へ接着している様子が観察された。これは，FN-G のナノ薄膜から構造転移したナノ線維が ECM 線維と同様に細胞の接着足場として機能していることを示しており，また，FN だけ吸着させた場合では足場として不十分であり，ECM 線維と同様の機能を発現するためにはおよそ 6 nm の膜厚が必要であるという重要な知見が得られた[18]。FN-G ナノ薄膜が人工 ECM 線維として機能することが示唆されたため，この手法を用いて複数種類の細胞を積層化し，人工的なモデル組織の構築に取り組んだ。具体的には，四層のヒト血管平滑筋細胞（UASMC）を積層化し，最外層に一層のヒト血管内皮細胞（HUVEC）を積層化することでヒト血管壁のモデル組織を構築した。**Fig. 3** に，作成した積層構造を 3 日間培養した後の組織学的評価を行った結果を示した。ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色より細胞の五層構造が確認され，また，血管内皮細胞の第八因子の免疫染色より血管内皮細胞が最外層に存在していることが明らかとなった。また，細胞の基底膜成分である四型コラーゲンの免疫染色の結果，各層間において強い発現が観察され，各層の細胞が基底膜を産生していることが示唆された。比較としてラット大動脈の組織切片を同様に染色したところ，作成した五層構造が良く似た階層構造を有していることが明らかとなった（Fig. 3（d），（e））。また，平滑筋細胞の層数を 1〜10 層まで変えて血管内皮細胞を最外層に積層しても同様の血管壁類似の階層構造が得られており，作製された積層構造はヒト血管モデル組織として再生医療や薬剤の評価試験への応用が期待される。現在，この積層組織の血管モデル組織としての機能を評価している。本手法を用いることで，他にもラット筋芽細胞や心筋細胞の積層化が可能であることを既に見出しており，細胞の層数を制御して異なる種類の細胞を自在に積層化する新しい再生医療技術として期待される。

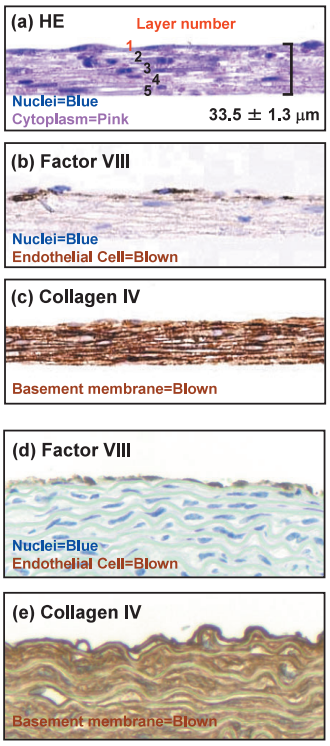


Fig. 3.　(color online). Histological evaluation of 5-layered cellular multilayers composed of 4-layered UASMC and monolayer of HUVEC like a blood vessel by HE staining (a) and factor VIII (b) or type IV collagen (c) immunostaining, respectively. Factor VIII (d) and type IV collagen immunostaining images of rat artery sections.

2. 5　本節のまとめ

細胞表面に様々なナノ薄膜を調製すると，その薄膜の組成や形成駆動力により細胞への影響が異なることが明らかとなった。また，FN の結合ドメインを介した相互

作用の薄膜（FN-G や FN-Dex）は，細胞膜界面でナノファイバーへと線維化することが確認され，天然の ECM 線維と類似の構造と機能を有していることが確認された。さらに，FN-G や FN-Dex ナノ薄膜を細胞表面に形成することで細胞の積層化が可能となり，生体組織類似の階層構造が作製可能であった。本手法を用いることで異種類のヒト初代細胞の積層化が可能であり，生体外で血管壁に類似した積層組織モデルを構築できることが示された。本技術は，細胞表面を制御し，細胞と ECM を三次元的に組織化できる革新的な細胞操作技術として期待される。

3. 細胞膜類似リン脂質ポリマーによるナノバイオインターフェース（高井まどか，石原一彦）

3.1　バイオマテリアルの研究概要

タンパク質，核酸あるいは多糖類などのバイオ分子は，外部からの刺激により構造が大きく変化するソフトな特性を有している。人工臓器や診断用センサーなどのバイオデバイスは，このようなソフトな特性を有する生体分子と相互作用を起こさない性能や，生体分子の機能を十分に発揮させ性能をもつ材料：バイオマテリアルが必要となる。つまり，バイオデバイスの開発のためには，例えばバイオ分子が固定化された静的なマテリアル表面を，バイオ分子を含む動的かつ空間的な界面ととらえ，その界面の特性を分子レベルで理解することが求められている。しかし，タンパク質の吸着現象をとってみても，そこでの界面現象を完全に説明できていないのが現状である。本節では，タンパク質の吸着を抑制する細胞膜類似ポリマー表面について，表面のナノ構築法とタンパク質の吸着抑制メカニズムをマテリアル表面の水に着目して行った筆者らの最近の研究を紹介する。

3.2　タンパク質の吸着とバイオマテリアル表面の水

生体内で利用する各種バイオデバイス表面において，タンパク質の吸着から引き起こされる血栓形成，バイオフィルム形成などの好ましくない生体反応は抑制しなければならない。現在までに理解されているタンパク質の吸着は，**Fig. 4** に示されるようなマテリアル表面の結合水とタンパク質周囲の結合水の交換反応，脱水和を伴った Park らのモデル[19]が広く理解されている。SAM 表面の様々な官能基を用いた実験から，タンパク質は，電荷を有する表面や，疎水的な表面には吸着しやすく，また水酸基末端オリゴエチレングリコールのような水溶性かつ非イオン性高分子で，十分に排除体積効果（立体斥力）が得られる表面ではタンパク質の吸着は抑制されることが報告されている[20, 21]。一方，細胞膜を構成する脂

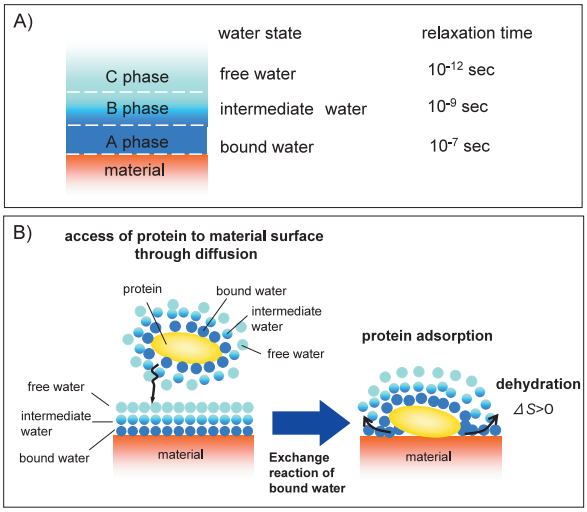


Fig. 4.　(color online). Water structure on material surface and protein adsorption mechanism.

質二分子膜の外膜に多く存在するホスファチジルコリンの親水性基であるホスホリルコリン基（PC 基）は，リン酸部位とコリン部位が電荷を打ち消し見かけ上中性分子として振る舞う。この PC 基を側鎖に有する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）ポリマーは，親水性かつ非イオン性であり，このポリマーを固定化した場合，PC 基が表面に配向することでタンパク質の吸着を抑制し，優れた血液適合性を示すことが知られている[22, 23]。これらの実験事実を，Fig. 4 に示したタンパク質の吸着モデルで考察してみると，マテリアル表面に存在している水の性質が，タンパク質の吸着に大きな影響を及ぼしていると言える。水分子は，局所的に分子間水素結合（1 つの水分子は，4 個の水分子と水素結合をしている）により結合した 3 次元クラスターを形成している強い極性をもつ会合液体と理解されている。このような性質をもつ水に，イオン，または疎水性物質が溶解すると，水の配列（局所的な 3 次元クラスター構造）は，純水中よりも乱されている状態になる。つまり，疎水性を示すマテリアル表面へ結合した水は，バルク中の自由な水と比較し束縛されている。タンパク質の周囲の結合水と，マテリアル表面の結合水が交換を起こすと，タンパク質の吸着が起こるというモデルから考察すると，親水性のポリマー鎖で被覆された表面でタンパク質の吸着が抑制される理由は，交換反応を起こさない性質の水がポリマー鎖近傍に存在するということにつながる。ここで交換反応を起こさない性質の水とは，局所的な 3 次元クラスター構造が維持された水と読み替えることができると著者らは考えている。このようなバイオマテリアル界面の水の役割については未だわからないことが多く，マテリアル表面の水の構造について様々な研

究結果が報告されているのが現状である[2, 24, 25]。

3.3　細胞膜類似リン脂質ポリマーによるマテリアル表面への機能性付加

MPC ポリマーは，先述したようにタンパク質の吸着を抑制する優れたバイオマテリアルである。また抗血栓性に優れることから人工血管や人工心臓用の表面処理マテリアル，さらには高潤滑特性を示すことから人工股関節の表面処理マテリアルとして応用されはじめている[26, 27]。このような優れたタンパク質の吸着抑制，抗血栓性，潤滑性を得るためには，MPC ポリマーの極性基が細胞膜構造と類似した表面ナノ構造を構築する必要がある。ここでは，その一例を紹介する。

MPC ポリマーは，使用目的にあわせて様々な分子設計がされている。例えば疎水性ポリマーマテリアル表面へ修飾する場合には，マテリアルとの密着性を考慮し，疎水性ユニットとの共重合体 poly（MPC_x-*co*-*n*-ブチルメタクリレート（BMA）$_y$）（PMB）としている。この PMB は，親水性と疎水性のユニットのバランスにより，水への溶解性を制御することができる。分子量が数十万のポリマーであれば，MPC ユニット組成が，約 30 mol% 以下で不溶，それ以上で水に溶解する。例えばエタノールに溶解した水不溶な MPC ユニット組成 30 mol% の共重合体 PMB30 は，疎水性ポリマーマテリアル表面へコーティングにより修飾できる。ここで問題になるのは，PC 基はドライ環境下では表面自由エネルギーを最小にするためにポリマー鎖の下に潜っており，これに生体親和性を発揮させる，すなわち PC 基を表面に配向させるためには長時間水に浸けておくという十分な前処理が必要なことである。**Fig. 5** に PMB の化学構造式と PC 基の界面への配向の概念図を示す。PMB30 のコーティング膜では PC 基が表面に配向して平衡に達するまでに 5 時間ほどの時間を要する[28]。最近著者らは，PC 基の配向を制御し，その分子運動を抑制することで，大気環境下においても PC 基が表面に高密度に集積しており，平衡化処理を全く必要としない，高い親水性の非平衡状態をもつ表面を創製した[29]。この表面は，MPC と共重合させるコモノマーに MPC と溶解性が大きく異なること，ベンゼン環を有しガラス転移温度が高いことを条件として 2-ビニルナフタレンを選定した。このポリマー（PMvN）は，ガラス転移温度が 154℃と非常に高いことから，室温では分子運動性の低いポリマーである。大気中，水溶液中で PC 基の配向性を評価する目的で，0.5 w% PMvN を含む 20% エタノール水溶液を用いてポリエチレンテレフタレート（PET）基板へコーティングした後，40℃オーブンで 100 分間乾燥させた後 24 時間減圧乾燥させた試料と，PMB30 を通常のエタノール雰囲気下でゆっくり乾燥させた試料の表面特性を動的接触角（DCA）測定から解析した。

Fig. 6 の DCA 曲線から，PMB30 をエタノール雰囲気下で乾燥させたサンプルのヒステリシスは大きく，水に浸けることで親水性基の再配向が起きていることがわかる。一方，40℃オーブンで乾燥させた PMvN のヒステリシスは，浸漬・離脱で変化せずに極めて小さく，ほぼ 0 であることがわかる。これは乾燥状態から水に浸けたときの環境変化に対して，親水性基の再配向がほとんど起こらないことを示している。さらに，前進接触角は約 20°と低く，高い親水性表面をもつことがわかった。相溶性を利用した乾燥条件の工夫により，親水性の PC 基を表面に配向させることができ，さらにポリマーの分子運動性が低いことから，その非平衡状態が維持されていると考えられる。**Fig. 7** はタンパク質（ウシ血清アルブミン：BSA）の吸着実験の結果である。PMvN をコーティングした PET 基板の BSA 吸着量は，未処理の PET

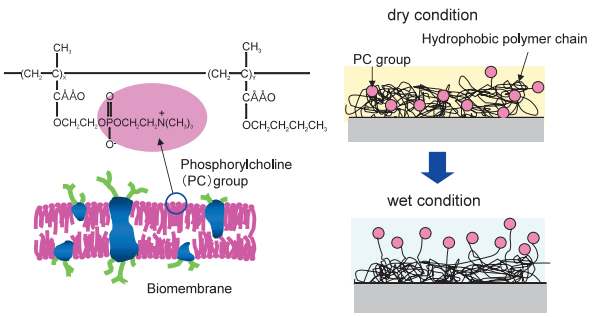
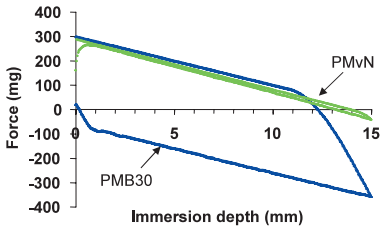


Fig. 5.　(color online). Chemical structure of poly(MPC-co-BMA) : PMB, and images of PMB-coated surface structures in dry and wet condition.



Sample	Contact angle (degrees)		Mf [a]
	θ_A	θ_R	
PMvN	24	22	0.083
PMB30	101	16	0.84
Non-coating	90	60	0.33

[a] Mobility factor

Fig. 6.　(color online). DCA curves of the PMvN-coated and PMB-coated PET plates dipped in water at a speed of 80 μm/s. The curve of the PMvN-coated PET plate shows an extremely hydrophilic and motionless surface.

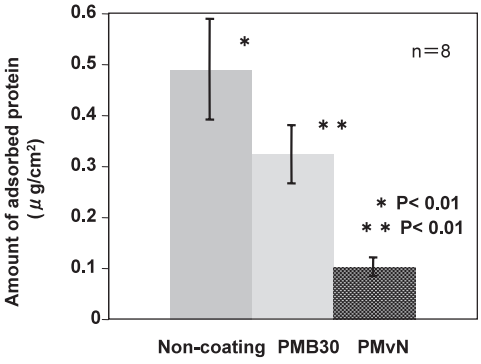


Fig. 7. The amount of adsorbed BSA on the polymer surfaces under dry conditions. The sample plates were in contact with 0.45 g/dL BSA solution for 60 min at 37℃.

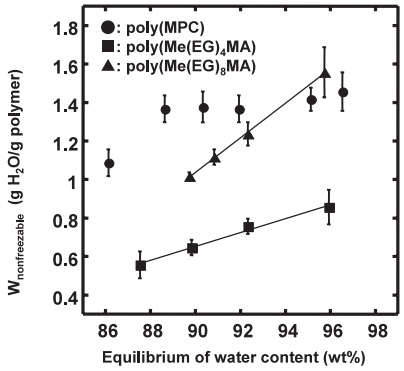


Fig. 8. Weight of nonfreezable water relative to that of the polymer in the hydrogels as a function of EWC : poly (MPC) (●), poly(Me(EG)$_4$ MA) (■), and poly(Me (EG)$_8$ MA) (▲) hydrogels. The plotted values are the average of four measurements, and the standard deviation is used as the range of errors in the values.

基板および PMB をコーティングした PET 基板に比べ優位に抑制されており，平衡化処理を行わずとも，優れた生体親和性を発揮することがわかった。これは，乾燥状態においても表面付近に PC 基が高密度に集積された非平衡状態を維持していることによる効果であり，細胞膜類似表面構造が表面に形成されることで，その特異的な生体親和性を発揮すると結論づけられる。表面開始グラフト重合法で poly（MPC）を修飾した表面では，ナノメートルスケールでのグラフト密度，鎖長によりタンパク質の吸着量が異なることが明らかとなっている[23, 30, 31]。では，実際に MPC ポリマー表面にはどのような水が存在するのか。どの程度の PC 基の密度が必要なのか。その問いに対し，ここでは，MPC ポリマーハイドロゲル内の水の構造を解析した結果を紹介する。

3. 4　MPC ポリマーハイドロゲル内の水の構造

バイオマテリアル界面の水の構造の解析には，熱分析，核磁気共鳴，赤外線分光やラマン分光など様々な手法があるが，ここでは生体親和性を示すこれらのマテリアル表面における水の構造を示差走査熱量計（DSC）とパルス核磁気共鳴装置（^{1}H NMR）を用いて解析することで，機能性発現機構の解明を試みた。

MPC およびメトキシオリゴエチレングリコールメタクリレート（Me(EG)$_n$ MA, n = 4 or 8）を一成分とするポリマーハイドロゲルを用いて，ゲル中に存在する水の構造を DSC により解析した。同程度の平衡含水率の 3 種類のハイドロゲルの自由水量を比較したところ，ハイドロゲルの種類によらずほぼ同じ値を示した。これに対し不凍水量は，ハイドロゲルの種類によって異なり，**Fig. 8** に示すように，poly（MPC）ハイドロゲルでは，平衡含水率にほぼ依存なく不凍水量が多く，一方 poly（Me(EG)$_n$ MA）ハイドロゲルでは，エチレングリコール鎖の繰り返し単位が大きいものほど不凍水量が多く，さらに平衡含水率に従って増加する結果となった。また中間水に起因する発熱ピークはこれらの系では得られなかった。DSC の結果から，平衡含水率はポリマーの種類によらず自由水量によって決定され，ポリマーの種類により異なるのは，不凍水（結合水）量であることが確かめられた[32]。そこで，ポリマー鎖近傍の水分子の運動性をパルス^{1}H NMR を用いて検討した。25℃の条件で縦緩和時間（T_1）と横緩和時間（T_2）を測定し，T_1 が自由水，T_2 が結合水に対応した水の構造を測定した値であることがわかった。そこで，自由水による影響を排除し，DSC で不凍水と分類された水の状態を解析するため，－25℃の凍結状態で T_2 を測定した。全ての平衡含水率に対して poly（MPC）ハイドロゲル中の水分子の T_2 が，poly（Me(EG)$_n$ MA）ハイドロゲルと比較して長いという結果が得られた。これから poly（MPC）ハイドロゲル中の結合水は，poly（Me(EG)$_n$ MA）ハイドロゲル中の水より運動性の高い水和構造を形成していると考察される[33]。MPC ポリマーは，PEG と比較して長時間タンパク質の吸着を抑制できることが報告されている[34]。これと水の構造解析の結果とあわせて，高い運動性をもつ厚い結合水層を有するマテリアル界面において生体親和性が発現すると考察できる。現在，赤外線分光やラマン分光法などを用いて，水の構造を多面的に解析することで，より厳密な生体親和性の発現機構解明に取り組んでいる。

3. 5　本節のまとめ

ポリマーバイオマテリアルの中で，細胞膜類似構造を有する MPC ポリマーを取り上げ，生体親和性（非特異的タンパク質吸着抑制）を得る表面修飾手法と，非特異的タンパク質吸着抑制メカニズムについて水の構造から

解説した。MPC ポリマーにおいては，PC 基が表面に高密度に存在するナノレベルで均一な構造を有し，その周囲が運動性の高い結合水で覆われることで，その機能性が発現するものと考察される。私たちの研究結果のように，表面の水の構造が，タンパク質の吸着と強く相間していることは，多くの研究者により報告されているが，系統的な見解は未だ明らかにされていない。あらゆるバイオデバイス創製において，生体親和性の付与は必要不可欠である。多角的にバイオマテリアル表面の研究が進展し，その基本設計概念の構築されることを期待している。

4. 無機固体表面による生体分子の認識（荻野俊郎）

固体表面への生体分子の吸着については，前節でも紹介された非特異吸着の抑制という観点から論ぜられることが多かった。最近になって，特定のアミノ酸配列を持つペプチドが，半導体結晶表面を認識する（吸着確率が高い）ことが報告され[35]，さらに Ti を認識するペプチドも見つかっている[36]。固体表面によって生体分子を認識できれば，安定で長期使用が可能，信号処理系と集積化が可能という固体デバイスの特徴を生かした新規デバイスの創出が期待できる。ここでは，表面構造を制御したサファイア基板により，タンパク質分子の選別が非常に明確に行えることを紹介する[37]。

サファイアは結晶性の良い酸化物であるのでステップ/テラス構造を形成でき，大気中や溶液中でも原子構造が利用可能である。サファイア（0001）面を 1300〜1400℃，大気中で熱処理すると，バンチングしたステップとテラスの構造が現れる。この表面を酸処理すると，テラス上には周囲に比べて疎水性の強いドメインが自己形成する。これは，表面の OH 基密度の差に起因することがわかっている。この表面に各種のタンパク質をバッファ溶液中で吸着させ，原子間力顕微鏡によって液中観察すると，**Fig. 9** に示すように明瞭な選択性が観察される。すなわち，Fig. 9（a）に示すアルブミンは楕円形のドメイン（OH 基密度が低い）に，Fig. 9（b）に示すアビジンは楕円形の外のドメイン（OH 基密度が高い）にそれぞれ優先的に吸着する。吸着に関わる力は，親水性表面同士の間に働く水和斥力（束縛水を排除するために必要なエネルギー），疎水性表面同士の間に働く疎水相互作用（引力），表面電荷による静電相互作用（引力または斥力），ファンデアワールス力（常に引力），である。こうした相互作用のいくつかは溶液環境を選ぶことによって制御可能であるので，多くの種類のタンパク質分子を固体表面によって選別できる可能性がある。

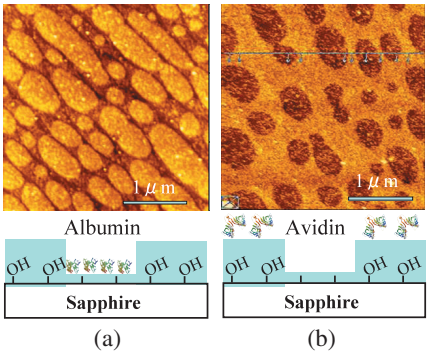


Fig. 9. (color online). Adsorption patterns of protein molecules on the acid-treated sapphire surfaces : (a) Albumin and (b) avidin. Protein molecules are preferentially adsorbed on the bright domains.

5. お　わ　り　に

生体ヘテロ界面制御について，生体の組織形成へ向けた細胞間のヘテロ界面制御と細胞積層技術，生体適合性へ向けたリン脂質ポリマーと生体のヘテロ界面制御，および無機固体による生体分子の認識へ向けた無機/生体界面制御について紹介した。ここでは，いずれもナノスケールの界面制御と評価技術とが主要な役割を演じており，ナノテクノロジーとバイオテクノロジーの融合分野の代表例であると言える。このような学際分野は従来の学問体系の枠組みを大きく超えており，学際的な研究交流が強く望まれる。

文　献

1) L. Tiefenauer and R. Ros : Colloids Surfaces B : Biointerfaces **23**, 95 (2003)
2) B. Kasemo : Surf. Sci. **500**, 656 (2002).
3) N.J. Boudreau and P.L. Jones : Biochem. J. **339 (Pt 3)**, 481 (1999).
4) R.O. Hynes : “Fibronectins” (Springer-Verlag Inc., New York, 1990).
5) M.M. Stevens and J.H. George : Science **310**, 1135 (2005).
6) M.P. Lutolf and J.A. Hubbell : Nat. Biotech. **23**, 47 (2005).
7) K.Y. Lee and D.J. Mooney : Chem. Rev. **101**, 1869 (2001).
8) G. Decher : Science **277**, 1232 (1997).
9) G. Decher and J.-D. Hong : Macromol. Chem. Macromol. Symp. **46**, 321 (1991).
10) B. Neu, A. Voigt, R. Mitlöhner, S. Leporatti, C.Y. Gao, E. Donath, H. Kiesewetter, H. Möhwald, H.J. Meiselman and H. Bäumler : J. Microencapsul. **18**, 385 (2001).
11) Y. Teramura and H. Iwata : Bioconjugate Chem. **19**, 1389 (2008).
12) Y. Okahata, K. Niikura, Y. Sugiura, M. Sawada and T. Morii : Biochemistry **37**, 5666 (1998).

13) G. Krishna, T. Shutava and Y. Lvov : Chem. Commun. 2796 (2005).
14) E. Ruoslahti and M.D. Pierschbacher : Science **238**, 491 (1987)
15) C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J.C. Voegel, S. Muller and J.F. Stoltz : Biomaterials **24**, 3521 (2003).
16) R.O. Hynes and A.T. Destree : Cell **15**, 875 (1978).
17) Y. Mao and J.E. Schwarzbauer : Matrix Biol. **24**, 389 (2005).
18) M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara and M. Akashi : Angew. Chem. Int. Ed. **46**, 4689 (2007).
19) D.R. Lu, S.J. Lee and K. Park : J. Biomater. Sci., Polymer Edition **3**, 127 (1991).
20) E. Ostuni, R.G. Chapman, R. E Holmilin, S. Takayama and G.M. Whitesides : Langmuir **17**, 5605 (2001).
21) S. Pasche, J. Vo1ros, H.J. Griesser, N.D. Spencer and M. Textor : J. Phys. Chem. B **109**, 17545 (2005).
22) K. Ishihara, H. Oshida, Y. Endo, T. Ueda, A. Watanabe and N. Nakabayashi : J. Biomed. Mater. Res. **26**, 1543 (1992).
23) W. Feng, J.L. Brash and S. Zhu : Biomaterials **27**, 847 (2006).
24) M. Tanaka and A. Mochizuki : J. Biomed. Mater. Res. **68A**, 684 (2004).
25) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi : J. Biomed. Mater. Res. **39**, 323 (1997).
26) T. Moro, Y. Takatori, K. Ishihara, T. Konno, Y. Takigawa, T. Matsushita, U.I. Chung, K. Nakamura and H. Kawaguchi : Nature Materials **3**, 839 (2004).
27) T. Yoneyama, K. Ishihara, N. Nakabayashi, M. Ito and Y. Mishima : J. Biomed. Mater. Res. **43**, 15 (1998).
28) A. Yamasaki, Y. Imamura, K. Kurita, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi and K. Ishihara : Colloids Surf. B : Biointerfaces **28**, 53 (2003).
29) K. Futamura, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara : Langmuir **24**, 10340 (2008).
30) T. Goda, R. Matsuno, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara : Colloids and Surf. B : Biointerfaces **63**, 64 (2008).
31) T. Hoshi, R. Matsuno, T. Sawaguchi, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara : Appl. Surf. Sci. **255**, 379 (2008).
32) T. Morisaku, J. Watanabe, T. Konno, M. Takai and K. Ishihara : Polymer **49**, 4652 (2008).
33) 森作俊紀 : 東京大学大学院工学系研究科博士論文 (2007).
34) K. Ishihara, Y. Iwasaki, S. Ebihara, Y. Shindo and N. Nakabayashi : Colloids Surf. B : Biointerfaces **18**, 325 (2000).
35) S.R. Whaley, D.S. English, E.L. Hu, P.F. Barbara and A.M. Belcher : Nature **405**, 665 (2000).
36) K. Sano and K. Shiba : J. Am. Chem. Soc. **125**, 14234 (2003).
37) 荻野俊郎 : 応用物理 **77**, 1206 (2008).