

# 博士学位論文

温度応答性ポリマーを用いた  
新規なバイオマテリアルの創製に関する研究

令和5年3月

近畿大学大学院  
システム工学研究科システム工学専攻

農宗 辰己

## 目次

序論.....	2
第1章：Poly（Acrylamide-co-Acrylonitrile）グラフト化ガラス基板の調整と表面に 接着した hiMSC の熱刺激はく離.....	10
第2章：プラズマ照射ーポスト重合による PNiPAAm グラフト酸素富化膜の調製と 細胞増殖に及ぼす酸素供給の影響.....	43
総括.....	65
引用文献.....	69
謝辞	

## 序論

2022年現在、日本は世界トップクラスの長寿国であると同時に、65歳以上の高齢者が全人口の約29%を占める超高齢化社会である<sup>1)</sup>。超高齢化社会に伴い、要介護者・要支援の認定者や慢性疾患・重篤疾患の患者は、増大の一途を辿っており、高齢者の quality of life (QOL) 向上や健康寿命の延長による社会保障制度および医療体制の維持・立て直しは急務である。QOL 向上と健康寿命の延長には、慢性疾患や重篤疾患の予防だけでなく、これら疾病の根本治療が不可欠であり、再生医療を用いた治療法の開発が進められている<sup>2)</sup>。再生医療による慢性疾患や重篤疾患の根本治療は、患者数の減少による社会保障費・医療費の削減のみならず、患者の社会復帰への貢献も見込まれる。また再生医療の市場規模は、国内で2020年の250億円から2030年には1兆円、世界市場では2030年に12兆円に拡大すると試算されており、政治・経済面での期待も大きい<sup>3),4)</sup>。このように再生医療は、今後の医療の中核を担う技術であると同時に、社会基盤を支える技術に発展すると予想される。

再生医療は幹細胞を利用して損傷組織や臓器の再生を促すことと定義され、組織工学と細胞移植の技術からなる。組織工学は、「細胞」、「生理活性物質（サイトカイン）」、「細胞足場」の三要素から構成される<sup>5)</sup>。再生医療における細胞は、多能性幹細胞や組織幹細胞といった幹細胞を指し、自身の持つ自己複製能と分化能によって、必要に応じた体細胞に分化し体組織を再生する機能を持つ。サイトカインは、細胞が分泌する低タンパク物質の総称で、外的刺激に応答して分泌され細胞の増殖や分化等の細胞活動の制御・調整を行う機能を持つ。細胞足場は、サイトカインの伝達を調節し、同時に細胞活動の場を提供する役割を持つ。細胞足場は、人工的な調整が容易であり、サイトカイン及び幹細胞の自己複製能・分化能の制御に影響を及ぼすため再生医療での細胞足場技術の重要度は大きい。従って細胞足場となるバイオマテリアルの開発は、再生医療の発展および課題解決に

重要な技術であるといえる<sup>9)</sup>。細胞移植は、幹細胞を患部に直接移植する細胞治療と人工生体組織を埋め込むスキファールド治療があり、安全性や治療効果の最大化のため、治療薬の製造過程で細胞損傷や薬害汚染がないことが望ましい。一方で再生医療を必要とする疾患患者は、治療の緊急性が高く迅速な治療が必要なため、再生医療製品のハイスループット製造と安定供給が求められる。再生医療製品の製造は、体細胞組織や分化誘導した細胞群等から任意の細胞を選択回収する工程と選択回収した細胞を増やして細胞治療薬とする工程から成り、再生医療製品の製造・供給体制の進展には、細胞の選択回収と培養・組織化技術を支えるバイオデバイスの革新的な技術の開発が必要である。従来の細胞の選択回収技術は、フローサイトメトリー法や磁気細胞分離（MACS）が用いられ、分離速度や回収効率の悪さ、分析時の細胞損傷、ランニングコストが高いといった課題を持つ。細胞の培養・組織化の技術は、酸素分圧、pH、重力環境等の培養環境を制御することで細胞培養効率を高めた細胞培養装置が開発されている<sup>7)-10)</sup>。しかし、これら培養デバイスは、細胞の組織化や細胞損傷なく回収する機能をもっておらず細胞移植への応用に適した技術ではない。上記の課題の解決には、細胞の選択回収、培養・組織化を細胞損傷なく実行可能なバイオマテリアルの創製が有効であり、これら課題の解決は、細胞治療薬のハイスループット製造を実現し、再生医療の発展や実用化に貢献すると予想される<sup>11)</sup>。

細胞損傷を起こさずに細胞の接着・はく離を制御する技術の一つに、温度応答性ポリマーを利用したバイオデバイスがある。温度応答性ポリマーを利用した細胞足場は、トリプシン等の薬剤を使用せずとも細胞の接着・はく離を温度刺激のみで制御できる<sup>12)</sup>。温度刺激による細胞はく離は、細胞間の細胞外マトリックス（ECM）を保持できるため、培養皿上で単層組織化した細胞をシート状に回収でき細胞治療薬の製造に利用されている<sup>13)</sup>。しかし、現行の温度応答性ポリマーを用いたバイオデバイスは、細胞シートの製造を目的と

した細胞回収技術であり、幹細胞の作製に必要な不要細胞の除去もしくは、単一細胞および少数細胞群の選択・回収は実行できない。また、温度応答性ポリマーを固定化する基板材料の多くは、ポリスチレン（PS）やガラスであり、それら材料を用いた細胞培養皿は、再生医療で求められる3次元化した細胞組織の作製、細胞増殖の促進を行うことができない。上述の背景から、温度応答性ポリマー用いた「単一細胞および少数細胞群の選択分離・回収する機能」及び「細胞増殖を促進させ、同時に培養細胞を非侵襲的に回収する機能」を持つバイオマテリアルの創製は、再生医療に求められる細胞移植や細胞工学技術の課題解決に貢献できる。また、この技術は、細胞診断、細胞保存・輸送技術、組織培養技術などの技術応用も期待でき、再生医療全体の進展に寄与するものである<sup>14-16)</sup>。

温度応答性ポリマーが持つ細胞の接着－はく離の制御機能は、基板界面に固定化した温度応答性ポリマーが熱刺激によって相転移した際に起きる分子鎖のコンフォメーション変化と、それに起因する細胞足場の親水性－疎水性の変化で発現する<sup>17)</sup>。このことから温度応答性ポリマーの高分子鎖構造と、相転移による分子鎖のコンフォメーション変化および界面の濡れ性の変化度合いは、細胞の接着－はく離に密接な関係があることが知られている。例えば下限臨界共容温度（LCST）型の温度応答性ポリマーである Poly(N-isopropylacrylamide) [PNiPAAm]は、分子鎖長や分子密度が過剰になると細胞接着が起きず、一方で分子鎖長や分子密度が不足すると細胞はく離がうまく起きないことが報告されている<sup>18)</sup>。従って、細胞の接着－はく離の効率を最大化するには、温度応答性ポリマーの分子鎖長、分子密度、基板界面特性の制御が重要となる。

温度応答性ポリマーは、LCST型と上限臨界共容温度（UCST）型の2つのタイプがある

<sup>18)</sup> LCST型温度応答性ポリマーである PNiPAAm を用いた細胞足場は、細胞培養温度より

も冷却して接着細胞をはく離するため、広域に接着した細胞群のはく離に向いている<sup>19)</sup>。対称的に UCST 型温度応答性ポリマーは、細胞培養温度よりも、わずかに加温して接着細胞をはく離するため、近赤外線レーザーを用いて局所的にポリマーを加温すれば点在する細胞群のはく離が可能となる<sup>20),21)</sup>。しかし UCST 型温度応答性ポリマーを細胞足場へ適応した事例は少なく<sup>22)-24)</sup>、また細胞へのヒートショックなどの懸念から細胞の生存可能温度の上限未満、培養温度以上の狭い温度域に相転移温度を精密に制御する必要がある。UCST 型温度応答性ポリマーの一つである Poly { 2-[(Methacryloyloxy) ethyl] dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide }<sup>25)</sup>は、分子間のイオン結合が変化することで相転移を示す双性イオン型高分子で、生体適合性や生体物質の吸着抑制機能を持つため、様々なバイオデバイスへ活用が検討されてきた。しかし、イオン物質の影響で相転移温度が変化するため、生理条件下では利用に制限がある<sup>20),25)</sup>。対称的に、ノニオン型高分子である Poly (Acrylamide-co-Acrylonitrile) (J. sering)<sup>26)</sup>は、溶媒中のイオン物質の影響が小さく、分子設計によって任意の相転移温度に調整できる分子デザインとなっている。従って Poly (Acrylamide-co-Acrylonitrile)のようなノニオン型の UCST 型温度応答性ポリマーを用いた細胞足場は、温度応答性ポリマーを活用した新たなバイオデバイスの設計指針を与えると期待できる。

細胞の診断・選択を行うバイオデバイスの一つに細胞マイクロアレイがある。細胞マイクロアレイは、細胞を基板上に高密度に配列・序列化して固定化しハイスループットな細胞診断・選択ができるが、固定化した細胞を回収する機能は持っていない<sup>27)</sup>。そこで、温度応答性ポリマーを化学固定した細胞マイクロアレイに細胞を配列して固定化し、レーザーを照射することで、顕微鏡で選別したターゲット細胞を選択的に回収できるデバイスを考案した<sup>28),29)</sup>。LCST 温度応答性ポリマーを細胞足場とした細胞マイクロアレイは、単

一の細胞群を回収するために不要細胞を紫外線レーザー等で死誘導する工程が必須であり<sup>28)</sup>、作業効率の低下と死細胞がコンタミネーションするリスクを招いてしまう。対照的に、UCST 型温度応答性ポリマーを細胞足場とした細胞マイクロアレイは、近赤外レーザーを使用することで目的細胞をピンポイントに接着面から、はく離・回収することが可能である。そのため LCST 型温度応答性ポリマーを細胞足場としたマイクロアレイと比較し UCST 型温度応答性ポリマーを細胞足場とした細胞マイクロアレイは、よりハイスループットな細胞の選択・回収が達成できる。また低温環境でも細胞接着面として機能する UCST 型温度応答性ポリマーの細胞足場は、細胞の低温保存時の細胞固定材として利用可能である。従って UCST 型温度応答性ポリマーを細胞足場とした細胞接着-はく離の最適化および解明は、ハイスループットな細胞診断・回収機能を持つ新規のバイオデバイスの開発に寄与し、さらに細胞治療薬および細胞組織の低温保存・輸送技術への応用も期待できる。このように UCST 型温度応答性ポリマーを応用した細胞足場は、従来の LCST 型温度応答性ポリマーでは実現できないバイオデバイスの開発が可能となる。

生体内の細胞は、全身に張り巡らされた毛細血管や細胞マトリックスを介して栄養素や酸素等が供給されるため細胞が積層化し組織化している。一方、一般的な静置条件での細胞培養環境は、細胞足場となる細胞培養皿の基底材料がポリスチレン等の酸素透過能が著しく低い素材を使用し、細胞間に毛細管が存在しないため、細胞への酸素供給は培地に依存している。そのため細胞組織は、1-2 層の単層や部分的な 3 次元凝集（スフェロイド）しか形成せず、高密度な組織化が起きない<sup>30), 31)</sup>。酸素透過能を持つ Polydimethylsiloxane (PDMS) を細胞培養皿の基底材料に使用することで細胞の酸素要求性を満たし、従来の静置培養で観察できなかった高度組織化現象や遺伝子発現等が報告されている<sup>32)</sup>。PDMS のように高い酸素透過能とガス選択能を持つ化合物は、酸素富化膜と呼ばれる。酸素富化

膜は、窒素分子と酸素分子のポリマー鎖への溶解・拡散速度の違いで酸素分子を選択分離・濃縮し、圧力差で濃縮濃度を制御する機能を持つ。酸素富化膜を介した酸素供給は、分子内部への気体分子の溶解・拡散であるため、気相と細胞および培養培地が直接接触せず酸素供給時にコンタミネーションのリスクがない。また酸素富化膜は、構造によって気体透過能および選択性が異なる。酸素富化膜の一つである Poly [1-Phenyl-2-(trimethylsilyl) acetylene] [PTMSDPA]<sup>33) - 35)</sup>は、芳香環とアセチレン構造の剛直な分子構造を持ち、PDMSの約2倍の酸素透過能と不飽和結合を活用した化学修飾による改質が可能である。従ってPTMSDPAを細胞足場の基底材料とし、温度応答性ポリマーを表面固定することで、酸素供給量の制御による細胞増殖・組織化を促す機能と温度応答機能による細胞組織の非侵襲的な回収機能を両立した新規のバイオデバイス開発が可能となる。これにより細胞培養の効率化が期待でき、細胞治療薬の製造コストの削減、細胞活動の制御が期待される。

本研究は、温度応答性ポリマーと機能性材料を複合した「選択した接着細胞を局所加温によって、はく離・回収する細胞診断・単一細胞自動回収システム」及び「酸素供給量の制御と非侵襲的細胞回収機能によるハイスループット細胞培養システム」の基幹技術となる2つのバイオマテリアルの創製を主眼としている。本システムは、細胞移植に必要な細胞の選択回収を「選択した接着細胞を局所加温によって、はく離・回収する細胞診断・単一細胞自動回収システム」で行い、前記システムで回収した細胞を「酸素供給量の制御と非侵襲的細胞回収機能によるハイスループット細胞培養システム」で効率的に培養することで、再生医療製品のハイスループット製造に貢献する。開発したバイオマテリアルは、温度応答性ポリマーの分子構造の制御または機能性基板材料との複合化により調整され、温度応答機能、細胞の接着－はく離、増殖挙動から評価した。

本論文は、「選択した接着細胞を局所加温によって、はく離・回収する細胞診断・単一細胞自動回収システム」の基幹技術である UCST 型温度応答性ポリマーの設計と「酸素供給量の制御と非侵襲的細胞回収機能によるハイスループット細胞培養システム」の基幹材料である酸素の選択的透過・濃縮機能を持つ機能材料に温度応答性ポリマーを複合化した細胞足場材の開発からなる 2 つの章で構成されている。

第 1 章では、UCST 型温度応答性ポリマーの加温による相転移を利用し、選択した接着細胞を局所加温によって、はく離・回収する細胞診断・単一細胞自動回収システムの基幹技術の開発を目的に UCST 型ポリマー Poly(Acrylamide-co-Acrylonitrile) [PAA] の相転移とグラフト固定条件の最適化による細胞はく離挙動を検証した。PAA は、RAFT 重合及び Si-RAFT 重合<sup>36)</sup>を用いて、分子量と AN の共重合比率の異なるフリーポリマーと PAA グラフト化ガラスを調整した。得られたポリマーの相転移温度、グラフト化表面の相転移挙動、ヒト不死化間葉系幹細胞 (hiMSC)<sup>37)</sup>を用いて細胞の接着-はく離の効率化を検討し、加温によって接着細胞をはく離・回収する UCST 型温度応答性ポリマーを用いたバイオマテリアルの開発について論述した。

第 2 章では、酸素供給量の制御と非侵襲的な細胞の回収機能を持つハイスループット細胞培養システムの開発を目的に、酸素の選択的透過・濃縮機能を持つ poly [1-Phenyl-2-(trimethylsilyl) acetylene] [PTMSDPA] に Poly(N-isopropylacrylamide) [PNiPAAm] をグラフト固定した基板材料 g-PTMSDPA の開発について論述した。g-PTMSDPA は、フィルム化した PTMSDPA をプラズマ照射-ポスト重合法<sup>38)</sup>を用いてフィルム表面に PNiPAAm をグラフトして調整した。得られた g-PTMSDPA を細胞足場とし、酸素分圧による影響が不明なヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞)<sup>39)</sup>とヒト神経芽細胞株 (SK-N-SH)<sup>40)</sup>を用いて、高酸素供

給による細胞培養の効果と温度刺激・はく離を検証し、酸素供給量の制御と、非侵襲的な細胞の回収機能を持つ細胞培養デバイスとしての有用性を論述した。

# 第1章 Poly (Acrylamide-co-Acrylonitrile) グラフト化ガラス基板の調整と 表面に接着した hiMSC の熱刺激はく離

## 1.1. 緒言

温度応答性ポリマーを表面に化学固定したポリスチレン及びポリジメチルシロキサン基板<sup>41)</sup>は、温度刺激のみで細胞の接着—はく離挙動やタンパク質吸着の制御が可能であり、細胞やタンパク質が薬害で変質するのを防止できる。細胞培養皿の表面固定に用いる温度応答性ポリマーの多くは、下限臨界共容温度 (LCST) 型ポリマーである Poly(N-isopropylacrylamide) [PNiPAAm]であり<sup>42),43)</sup>、上限臨界共容温度 (UCST) 型ポリマーを用いた細胞培養皿の研究は、ほとんどみられない。LCST 型ポリマーを固定化した細胞培養皿は、組織化した細胞シートの作製は可能だが、単一の目的細胞の分離は困難である。対照的に、UCST 型ポリマーを固定化した細胞培養皿は、目的細胞の接着面を局所的に加温し、目的細胞のみの分離・はく離が期待できる。細胞工学と再生医療は、細胞群から目的細胞を分離・回収する技術が必要である<sup>44)</sup>。UCST 型ポリマーを固定化した細胞マイクロアレイと電子顕微鏡を組み合わせた複合デバイスは、目的細胞の単離・回収が可能となる<sup>45)</sup>。そこで我々の研究室は、温度応答性ポリマーをパターンニング固定した細胞マイクロアレイと電子顕微鏡、近赤外レーザーを組み合わせたデバイスを考案した<sup>20)</sup>。上記システムに LCST 型ポリマーを採用した場合、不要な細胞を紫外線 (UV) レーザーで、不要な細胞を死滅誘導により除去して目的細胞のみを生細胞とした後、温度刺激によって目的細胞を分離・回収必要がある。この方法は、2つの課題を抱えている。死細胞による汚染と同時に細胞の選別・回収が行えないことである。上述の2つの問題は、UCST 型ポリマーと電子顕微鏡、近赤外レーザーの組み合わせによって解決できる<sup>46)</sup>。従って UCST 型ポリマーを用いたシステムは、細

胞マイクロアレイ上で識別した目的細胞に、近赤外レーザーを照射して目的細胞のみを分離・回収することが可能であり、LCST 型のシステムよりも回収効率の面で優れている。また低温環境でも細胞接着面として機能する UCST 型ポリマーの細胞足場は、細胞の低温保存時の細胞固定材として利用可能である。細胞の低温保存は、従来の凍結保存法による細胞損傷や解凍に時間が掛かる問題の解決に有効とされ、細胞および臓器移植治療への応用が期待される技術である<sup>47)</sup>。本研究は、UCST 型ポリマーの相転移温度の調整と基板への表面固定化を検討した。細胞培養皿に使用する UCST 型ポリマーの相転移温度は、30 °C～40 °Cの間に調整しなければ、温度刺激を加えた際に細胞に熱損傷を与えてしまう<sup>48)</sup>。一般的に、UCST 型ポリマーの相転移温度は、ポリマーの分子量と密度に依存し変化する。さらに UCST を示す高分子の一つであるベタイン系ポリマーは、水溶液中のイオン物質の影響を受け相転移温度が変化してしまう<sup>49)</sup>。そこで本研究では、アクリルアミド (AAm) とアクリロニトリル (AN) 共重合体 [Poly(Acrylamide-co-Acrylonitrile)] [PAA]<sup>26)</sup>を用いた。PAA は、親水性を示す AAm と疎水性を示す AN の共重合体であり、シアノ基を起因とした双極子相互作用により相転移挙動を示すためイオン物質の影響が小さい<sup>50)</sup>。また AN の組成比で相転移温度を調整できる<sup>51), 52)</sup>。PAA を利用したアプリケーションは、ドラッグデリバリーシステムの報告がいくつかあるが、細胞培養皿への検討は報告がない<sup>22)-24)</sup>。そこで、PAA をガラス基板に表面開始可逆的付加連鎖移動 (Si-RAFT) 重合でグラフト固定し、ヒト不死化間葉系細胞 (hiMSC) の接着挙動の観察を行った。始めに、可逆的付加連鎖移動 (RAFT) 重合で PAA の分子量と AN の組成比を変えて相転移温度を測定した。次に Si-RAFT 重合で PAA を固定化したガラス基板のグラフトポリマー鎖長を変えて重合し、表面の相転移および特性を測定した。このとき AN の組成比は一定とした。最後に、hiMSC の培養温度が 30 °C と 38 °C の時の PAA-g 上での接着細胞数を計測し熱刺激はく離を観察した。

## 1.2. 実験

### 1.2.1. 試薬

Acrylamide (AAm; 富士フィルム和光純薬工業(株)製) はトルエンに溶解させ再結晶して精製した. Acrylonitrile (AN; 東京化成工業(株)製) は, 蒸留して用いた.

ラジカル開始剤; 4,4'-azobis (4-cyanovaleric acid) (V501) , 脱水縮合剤; N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) , RAFT 剤; 4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio) pentanoic acid (charge transfer agent; CTA) は, 富士フィルム和光純薬工業(株)から購入した.

シランカップリング剤; 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMSi) は東京化成工業(株)から購入した. Dimethyl sulfoxide (DMSO) , N,N-dimethylformamide (DMF) , ethanol は, 富士フィルム和光純薬工業(株)から購入し, そのまま用いた.

Cell culture: hiMSC は, 鳥取大学 (Tottori, Japan) から提供いただいた.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) と  $Mg^{2+}$ -and  $Ca^{2+}$ -free Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) は GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA) から購入した. Fetal bovine serum (FBS) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した.

Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution は, 富士フィルム和光純薬工業(株)から購入した.

### 1.2.2. 分子量と AN 組成比を変更したフリーポリマーの合成

PAA は、任意のモノマー比率に調整した AAm と AN, 開始剤の V501, CTA を DMSO に溶解させた混合溶液を RAFT 重合した (Figure 1) . PAA の AN 組成比を変化させて重合した時の混合溶液の組成は以下の通りである ;

$$[\text{モノマー}]/[\text{V501}]/[\text{CTA}] = 500 / 38 / 2.5$$

モノマーは AAm と AN の混合物であり、総モノマー濃度は 1.0 mol/L に調整した。一例として、モノマー混合物中の AN 組成比が 31 mol% の条件を示す。

AAm (245 mg; 3.45 mmol) 及び AN (82.2 mg; 1.55 mmol) をスクリー管内の DMSO 5 mL に溶解し、次に V501 (10.5 mg; 0.038 mmol) 及び CTA (7.0 mg; 0.025 mmol) を添加した後、管を密封した。凍結-脱気-解凍 (FPT) サイクルを行って内容物を脱気し、70 °C で 20 時間重合した。次に、内容物の 10 倍等量のメタノールを添加して重合した PAA の沈殿と精製を同時に行った。精製した PAA は、ガラスフィルターを使用して収集し、重量が一定になるまで真空下で乾燥させた。収率は、精製したポリマーの乾燥重量から決定した。またモノマー及び CTA 濃度を適宜変更して、異なるポリマー鎖長の PAA を重合した。重合したポリマー混合物の組成比は以下の通りである ;

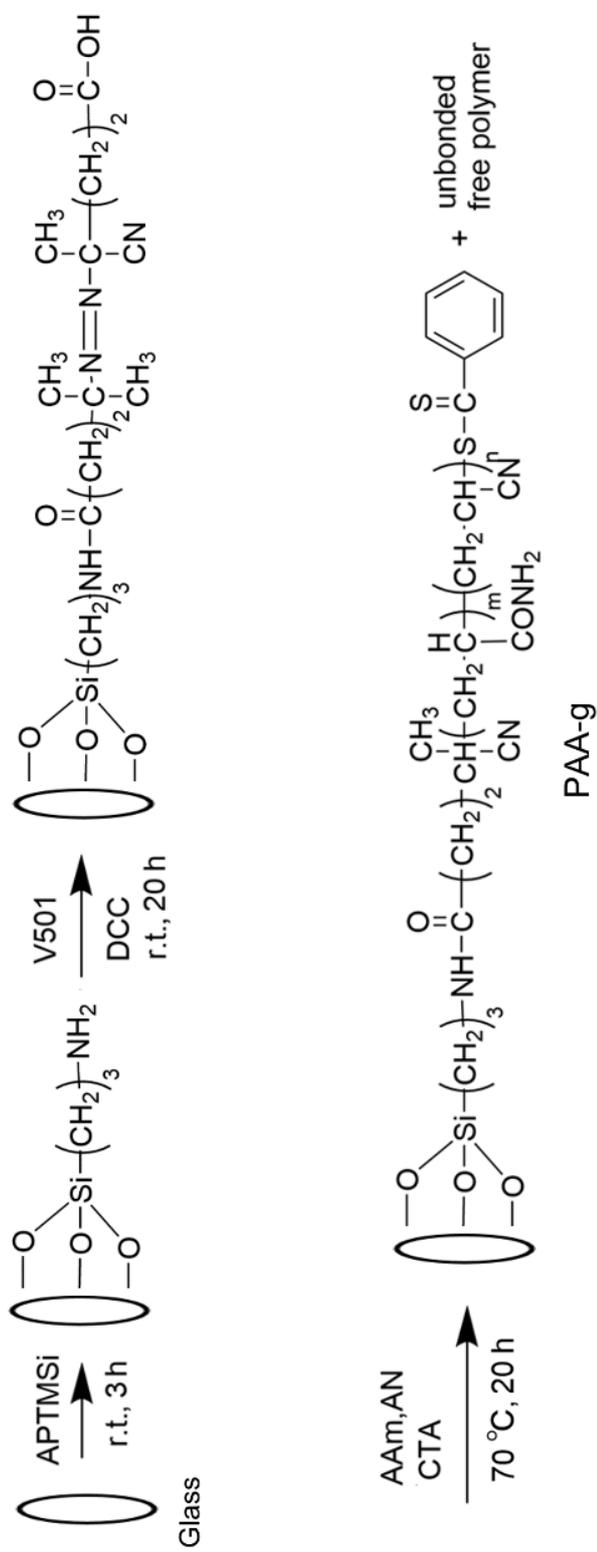
$$[\text{モノマー}]/[\text{V501}]/[\text{CTA}] = 500 \sim 1500 / 38 / 0.83 \sim 2.5$$

このとき総モノマー濃度は 1.0~3.0 mol/L とした。



### 1.2.3. ガラス基板表面固定化 PAA (PAA-g)の合成

ガラス基板 (micro cover glass,  $\phi = 15$  mm; 松浪硝子工業(株製)) は, ピラニア処理 (30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  / 98 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1/3 v/v; 富士フィルム和光純薬(株)) を室温で1時間行った後, 純水で十分に濯ぎ 80 °Cの乾燥機で1時間乾燥させて表面を洗浄して用いた. PAA グラフト化ガラスは, 表面開始可逆的付加連鎖移動 (Si-RAFT) 重合<sup>53)</sup>によりガラス表面に PAA をグラフト重合した (Figure 2) . 開始剤を固定化したガラス基板は, シランカップリング反応とアミド化反応を用いて調整した. シランカップリング反応は, 2 mL の DMF に溶解した ATMSi (0.179 g; 1.0 mmol) を 60 °C で 3 時間処理し, DMF とエタノールで十分に濯ぎ, 乾燥機で 80 °C で 1 時間乾燥処理して行った. 次に, シランカップリング剤を固定化したガラスを V501 (21 mg; 0.075 mmol) 及び DCC (30 mg; 0.15 mmol) を含む 2 mL の DMF に室温で 20 時間, 浸漬してアミド化反応を行った. 反応終了後は, メタノールで十分に濯いで洗浄し, 真空下で乾燥させて開始剤を固定化したガラス基板を得た. 開始剤を固定化したガラスは, AAm (245 mg; 3.45 mmol) , AN (82.2 mg; 1.55 mmol) , CTA (0.07 mg; 0.25  $\mu\text{mol}$ ) を含む DMSO 5 mL に浸し, FPT サイクルで脱気した後 Si-RAFT 重合を行った. Si-RAFT 重合は, 窒素雰囲気下, 70 °C で 20 時間反応させ, 反応終了後, DMSO と純水で十分に濯いで基板を洗浄し, 真空下で乾燥させた. グラフト鎖の長さは, モノマー濃度を変化させて調整した .



**FIGURE 2** Synthetic pathways for the Si-RAFT method for PAA-g.

#### 1.2.4. 特性

$^{13}\text{C}$ -NMR は、標準試薬に tetra methyl silane (TMS) を含んだ DMSO- $d_6$  を溶媒として EX-400 spectrometer (JEOL 日本電子(株)製) で測定した。分子量と分子量分散 (PDI) は、2つの線形カラム (Shodex<sup>TM</sup>, GPC-LF-404 ; 昭和電気(株)製) と示唆屈折率検出器を備えたゲルクロマトグラフィ (GPC) を用いて決定した。測定は、Poly(methyl methacrylate) を標準試薬として校正し、溶離液 Sodium Trifluoroacetate / Hexafluoro-2-propanol (10 mmol/L) , 流速 0.3 mL/min, 測定温度 40 °C の条件で行った。

数平均分子量 ( $M_n$ ) は、Equation 1 (Eq 1) を用いて概算した。十分に分子量が制御された RAFT 重合は、生成したポリマーの数平均分子量 ( $M_n$ ) を下記の Eq 1 に基づいて概算できる。

$$M_n = [M]_0 / [CTA]_0 \times [M_w]_{monomer} \times Conv. + [M_n]_{CTA} \quad (Eq.1)$$

ここでの  $[M]_0$  と  $[CTA]_0$  は、各モノマーと CTA の初期濃度, Conv ; 各ポリマーの収率,  $[M_w]_{monomer}$  ; モノマーの平均分子量,  $[M_n]_{CTA}$  ; CTA の分子量を示す<sup>54)</sup>。

FT-IR スペクトルは、KBr ペレット法と FT-IR prestage2 ((株)島津製作所製) を使用して測定した。PAA の AAm と AN の組成比率は、 $1650\text{ cm}^{-1}$  C=O と  $2232\text{ cm}^{-1}$  CN 伸縮振動バンドのピーク強度から計算した。

### 1.2.5. 曇天測定

純水, PBS, DMEM 中の PAA 1.0 wt% の曇点 (CP) は, 温度コントローラー (範囲  $\pm 0.1$  °C, TCC コントローラー; (株)島津製作所製) を備えた紫外可視 (UV-Vis) 分光光度計 (UV-1800; (株)島津製作所製) を用いて測定した. 溶液の温度は, PAA 溶液に温度補正された熱電対センサー (K 型クロメル・アルメル) を挿入して実測した. 昇温速度は  $0.5$  °C/min とし, 波長  $570$  nm で溶液の透過率を測定して透過度が  $50\%$  以下となった温度を相転移温度とした. 測定温度範囲は,  $10$  °C から  $70$  °C とした.

### 1.2.6. フリーラジカルの定量

開始剤を固定化したガラス板 ( $\phi = 15$  mm) を DPPH 溶液 ( $5$  mL;  $0.1$  mmol/L) [1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH; 東京化成工業(株)), ベンゼンを溶媒とした] に入れ, FPT サイクルで脱気して密封し,  $70$  °C で  $20$  時間振とうした. DPPH 溶液は, UV-1800 ((株)島津製作所) を使用して UV-Vis 測定を実施した. 生成したフリーラジカル量は, 分光光度法により DPPH 溶液の波長  $520$  nm の吸収消失を測定し決定した (吸収係数:  $8870$  L/mol cm)<sup>28)</sup>.

### 1.2.7. 接触角の測定

水の接触角 ( $\theta$ ) は, ヒーターステージを備えた接触角計 (G-I; エルマ販売(株)製) を用いて液滴法で測定した. 測定温度は, G-I に拡張したヒートステージで  $30 \pm 0.1$  °C 及び  $38 \pm 0.1$  °C に制御した. PAA-g 表面の  $\theta$  値は,  $10$   $\mu$ L の水滴と接触後の  $30$  秒経過時を測定した. 測定は, 各サンプル表面を無作為に  $5$  カ所行い, その平均値とした<sup>28)</sup>.

### 1.2.8. 走査型プローブ顕微鏡

PAA-g 表面の走査型プローブ顕微鏡 (SPM) 画像は, WET-SPM シリーズ; サンプル加熱および冷却ユニットを備えた SPM-9700HT (株島津製作所) を使用して取得した. 測定は, CONTR-10 POINTPROBE®シリコーン SPM センサー (厚さ 2  $\mu\text{m}$ , 長さ 450  $\mu\text{m}$ , 幅 50  $\mu\text{m}$ , ばね定数 1.7 N/m, 共振周波数 70 kHz; Nanoworld AG, Neuchâtel, Switzerland) を用いて 30 °C または 38 °C の水中での位相モード分析によって PAA-g 表面の不均一性と粘弾性を測定した. また断面分析を用いて, ポリマーブラシの平均高さおよび最小高さ ( $R_v$ ) の差からポリマー鎖長を決定した.

### 1.2.9. 細胞の接着とはく離 (加温刺激)

hiMSC 細胞<sup>37)</sup> は, 10 wt% FBS, 0.1 mM MEM 非必須アミノ酸, 1 mM MEM sodium pyruvate 100 U/mL penicillin を含む DMEM で培養し, インキュベータ (SCA-165; アステック株) 内で 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  の条件で培養した. 培養して得た hiMSC 層は, 1 % trypsin-EDTA solution で処理して分離した. PAA-g は, PAA 固定化表面の裏側を透明な粘着テープ (厚さ 0.1 mm, HJ-3160W; 日東電工株) を用いて, 4 ウェルディッシュ (Nunc™, PS 製,  $\phi = 19 \text{ mm}$ ) に固定化し PAA-g 固定化ウェルとし, 70 % エタノール溶液で濯いで洗浄した後, 紫外線照射を 30 分間行い滅菌した. 次に各ウェルに hiMSC 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/ウェル) を播種し, インキュベータ内で 30 °C で 6 時間培養した. 細胞はく離は, PAA-g 固定化ウェル内の培地を除去し, 細胞を新鮮な DMEM で 3 回洗浄した後, 直ちに培地を 38 °C に予熱した無血清 DMEM に交換し, インキュベータに 38 °C で 10 分間静置して行った. 温度刺激で, はく離した細胞を回収し, 血球計算盤を用いて細胞数をカウントした ( $N=3$ ). はく離しなかった接着細胞は, 1 % trypsin-EDTA solution で PAA-g から分離し同一の方法で細胞数をカウントした.

#### 1.2.10. 細胞の接着とはく離（脱温刺激）

洗淨, 滅菌処理を行った PAA-g 固定化ウェルの各ウェルに hiMSC 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/ウェル) を播種し, インキュベータ内で  $37^\circ\text{C}$  で 6 時間培養した. 細胞はく離は, PAA-g 固定化ウェル内の培地を除去し, 細胞を新鮮な無血清 DMEM で 3 回洗淨した後,  $20^\circ\text{C}$  に設定したスターラー (クールスターラー-CPS-300; アズワン(株)製) に 10 分間静置して行った. 温度刺激で, はく離した細胞を回収し, 血球計算盤を用いて細胞数をカウントした (N=3). はく離しなかった接着細胞は, 1 % trypsin-EDTA solution で PAA-g から分離し同一の方法で細胞数をカウントした.

### 1.3. 結果および考察

#### 1.3.1 PAA フリーポリマーのキャラクタリゼーション

異なる分子量の PAA フリーポリマーは, AN 組成比を 31 % で固定し, CTA とモノマー溶液の濃度を変えて RAFT 重合により調整した (Table 1) . PAA の構造は  $^{13}\text{C}$ -NMR と FT-IR スペクトル<sup>26)</sup>から確認した (Figure 3) . 数平均分子量は GPC と理論分子量 (Equation 1) で概算した. 2 つの方法で数平均分子量の結果は, ほぼ近似した. 従って PAA の分子量は, V501 と CTA の濃度で制御が可能である. 調製したサンプルの PDI は 1.7-1.8 であった.

TABLE 1 Characterization of various molecular weights of PAA

Sample	AAm (mmol)	AN (mmol)	CTA $\times 10^{-2}$ (mmol)	Yield (%)	<sup>a)</sup> M <sub>w</sub>	<sup>a)</sup> M <sub>n</sub>	Calcd M <sub>n</sub>	<sup>a)</sup> PDI
1	3.45	1.55	2.50	65.7	13,500	7,900	8,800	1.71
2	6.90	3.10	2.50	66.0	33,000	19,800	17,500	1.67
3	10.35	4.65	2.50	62.4	38,000	21,800	25,200	1.74
4	6.90	3.10	1.25	74.0	63,000	35,400	39,300	1.78
5	6.90	3.10	0.83	77.0	101,000	55,500	60,600	1.82

Note: Monomer; [AAm (Acrylamide)], [AN (Acrylonitrile)], RAFT agent; [CTA (charge transfer agent)]. Initiator; [V501] =  $3.7 \times 10^{-2}$  mmol/L in 5 mL DMSO.

<sup>a)</sup> Estimated by GPC using sodium trifluoroacetate in hexafluoroisopropanol at 40 °C.

$$[\text{Calcd Mn}] = [\text{M}]_0 / [\text{CTA}]_0 \times [\text{Mw}]_{\text{monomer}} \times \text{Conv.} + [\text{Mn}]_{\text{CTA}}. [\text{PDI (polydispersity)}] = (M_w/M_n) .$$

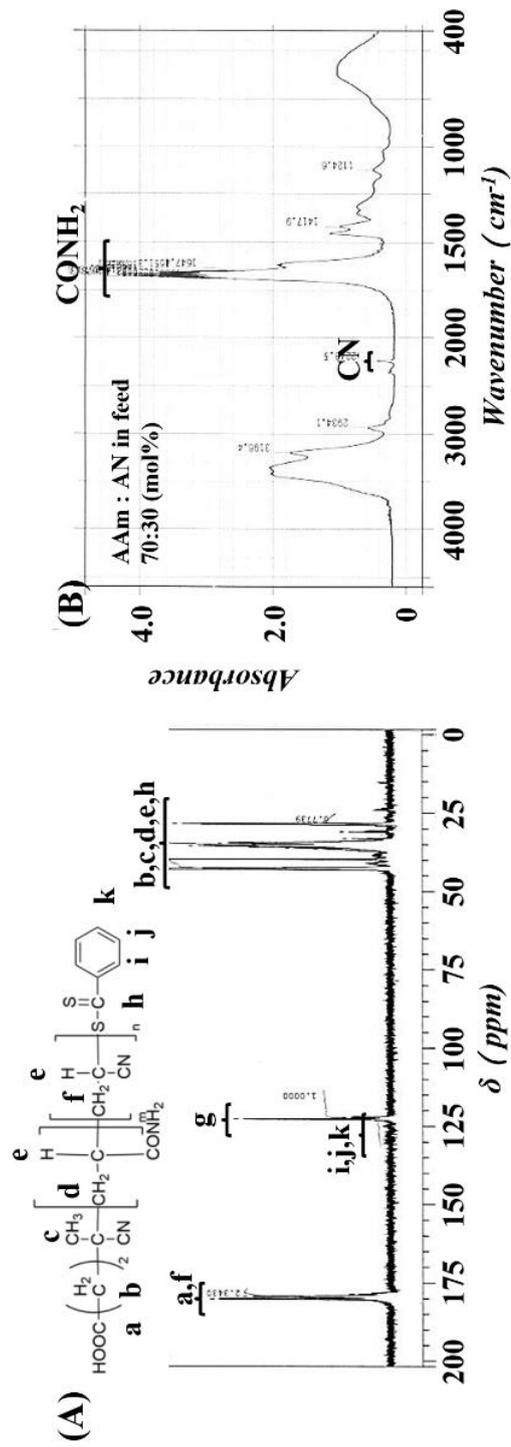
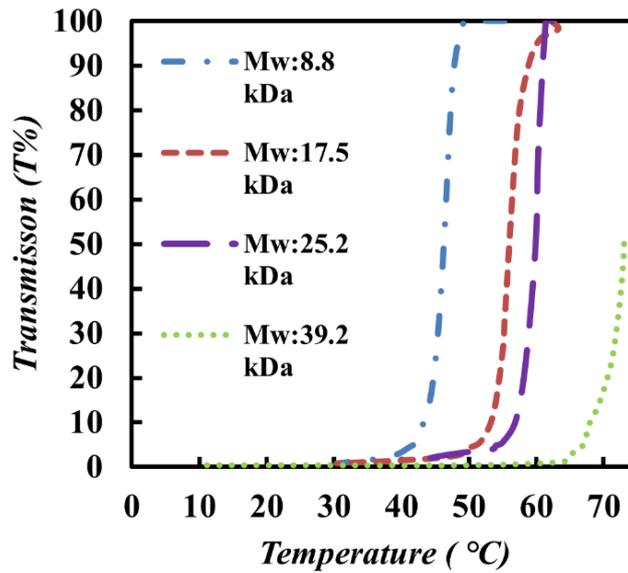
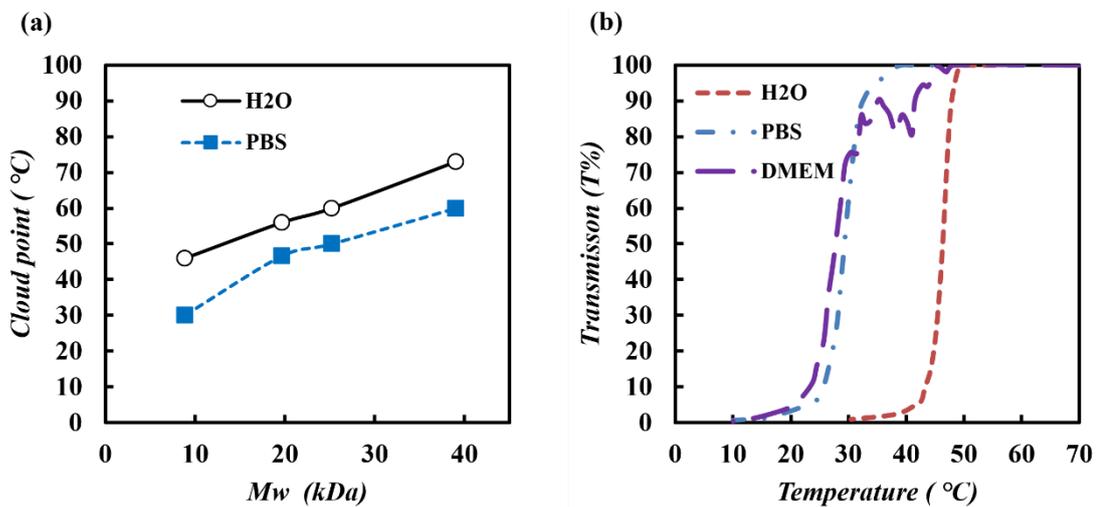


FIGURE 3 (a) <sup>13</sup>C-NMR spectrum and (b) FT-IR spectrum of free PAA.

重合した異なる分子量の PAA を用いて 1.0 wt% の水溶液, PBS 溶液を調整し, UV-Vis 分光光度計を用いて曇天 (CP) を測定した. 濁度曲線は, ポリマーの分子量の増加に伴い, 相転移温度がより高温側にシフトし同時に, すべての sample で鋭い相転移の挙動が観察された (Figure 4). Sample 4 の曇点は 73 °C 付近から開始し, Sample 5 の曇点は 73 °C を超えても挙動を示さなかったため, 正確な値は測定できていない. PAA はノニオン型のポリマーであるが, 相転移温度がイオン物質の影響を受けることを確認した<sup>50), 51)</sup>. Figure 5 は, 相転移温度と分子量の関係を溶媒が純水と PBS の場合で比較している. 分子量が 8.8 kDa から 39.3 kDa に増加すると, 純水と PBS とともに相転移温度は約 30 °C 上昇し, それぞれの上昇率に差は見られないが, 分子量が同じ条件では, 純水と PBS とで比較し PBS の CP が一律して 10 °C 程度低下する差が見られた [Figure 5 (a)]. また sample 1 を用いて PBS と DMEM 溶液中での濁度曲線を比較した [Figure 5 (b)]. 結果から DMEM の相転移は, PAA の分子量, ポリマー濃度, 溶液中の電解質含有量が同一の条件下では, PBS の相転移挙動と差がなく近似することが分かった. 従って DMEM 中に含まれるグルコースや血清は, PAA 相転移に影響を与えないことが判明した.



**FIGURE 4** Turbidity of PAA with various molecular weights in pure water with heating. The concentration of the solutions was 1.0 wt%.



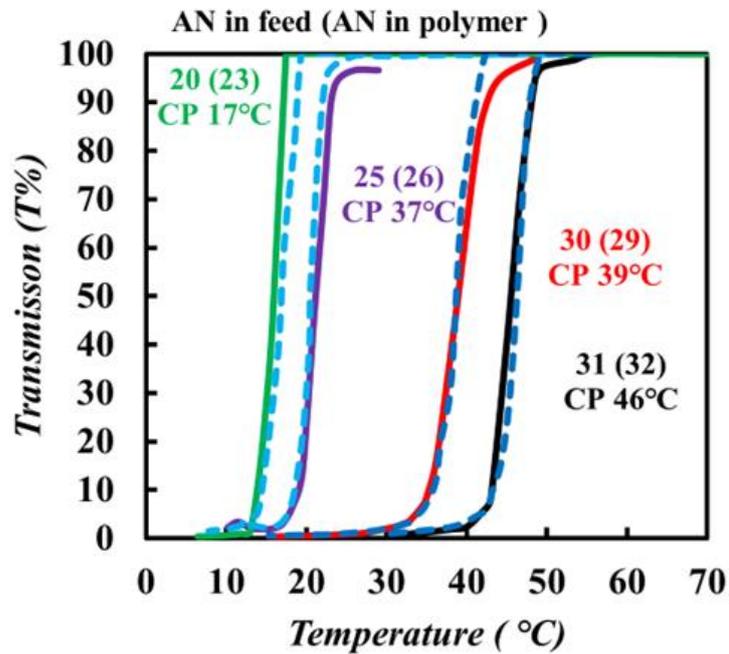
**FIGURE 5** (a) The CP (cloud point) temperature of free PAA with various molecular weights at 1.0 wt% in pure water vs. PBS and DMEM medium. (b) Turbidity of PAA with a molecular weight of 8.8 kDa in pure water, PBS, or DMEM (Sample 1) with heating.

次に, PAA の AN 組成を変化させ相転移への影響を確認した. AN 組成の異なる PAA は, V501 及び CTA のモル濃度, 反応時間を一定にし, モノマー中の AN 組成比率を 20~35 mol%に変化させて調製した (Table 2) .AN 組成を変化させた PAA の収率は, AN モノマー濃度を上昇に合わせて増加する傾向を示した. AN 組成は, FT-IR から算出された PAA の AN 組成比と重合に用いたモノマー溶液の AN 濃度比との差が 3 %未満であり, RAFT 重合は, 重合溶液中の AN モノマー濃度比を調整することで任意の AN 組成比に PAA を調製が可能であった. AN 組成を変化させた PAA の CP は, 分子量を変化させた PAA と同じ方法で測定した. 濁度曲線は, AN 濃度の増加に伴い相転移温度が高温側にシフトした (Figure 6) . PAA20 から PAA31 (H) は, 16~60 °C で相転移温度を示したが, PAA35 は, 70 °C まで温度を上昇させても相転移を示さなかった. 濁度曲線は, 加熱時と冷却時での差が小さく, すべてのポリマーは昇温降温に関わらず鋭い相転移を示した. 以上の結果から, PAA は, 電解質濃度が一定の条件であれば, 共重合体の分子量と AN 組成比を調整することで任意の相転移温度に制御が可能であることが判明した.

**TABLE 2** Characterization of various AN-compositions in PAA

Sample	AAm (mmol)	AN (mmol)	Yield (%)	Calcd Mn	AN- compositions (mol%)	CP (°C)	
						Heating	Cooling
PAA20	4.00	1.00	43.0	6,100	23	16	17
PAA25	3.75	1.25	55.7	7,700	26	22	21
PAA30	3.50	1.50	58.6	8,000	29	39	39
PAA31	3.45	1.55	65.7	8,800	32	46	46
PAA31H	10.35	4.65	62.4	25,200	28	60	61
PAA35	3.25	1.75	47.4	6,400	35	>70	>70

Note: Monomer; [AAm (Acrylamide)], [AN (Acrylonitrile)], initiator; [V501] =  $3.7 \times 10^{-2}$  mmol/L, RAFT agent; [CTA (charge transfer agent)] =  $2.5 \times 10^{-2}$  mmol/L in 5 mL DMSO. [Calcd Mn] =  $[M]_0 / [CTA]_0 \times [Mw]_{\text{monomer}} \times \text{Conv.} + [Mn]_{\text{CTA}}$ . The AN-compositions were determined by IR spectroscopy using a calibration curve for -CN (w, 2242  $\text{cm}^{-1}$ ) and C=O (vs, 1659  $\text{cm}^{-1}$ ). The CP (cloud point) was defined upon heating as the temperature when the transmittance increased over 50 % and upon cooling as the temperature when the transmittance decreased below 50 % in pure water.



**FIGURE 6** Turbidity of PAA in pure water with different copolymer AN-compositions upon heating and cooling. The concentration of the solutions was 1.0 wt%. Solid lines are heating cycles, dotted lines are cooling cycles. The CP (cloud point) was defined upon heating as the temperature when the transmittance is over 50 % and upon cooling as the temperature when the transmittance is less than 50 %.

### 1.3.2 PAA-g のキャラクタリゼーション

UCST 型ポリマーを固定化した基板は、接着細胞を近赤外レーザー (wavelength = 1450 nm, laser-type: continuous wave) の照射によって非侵襲的な目的細胞の回収を行うことが目的のため、透明性が高く近赤外線吸収が少ないガラス基板を選択した。Si-RAFT 重合は、ラジカル開始剤を固定化した基板をモノマーと CTA からなる重合溶液に浸漬して行う<sup>53)</sup>。そこで PAA-g の重合は、開始剤を固定化したガラス基板を調整し用いた<sup>55)</sup>。ラジカル開始剤固定化ガラスは、シランカップリング反応とアミド化反応を利用し開始剤を固定化した。固定化したラジカル開始剤の量は、DPPH ラジカル補足法により算出した<sup>28)</sup>。通常フリーラジカルは、溶液中に拡散するラジカル種とガラス基板表面に固定化したラジカル種の 2 つに分かれる。従って、DPPH によって補足されるラジカルは、基板表面に存在するラジカルの 2 倍量であり、溶液中に拡散したラジカルを含んだフリーラジカルの総量が測定される。従って、測定値の 1/2 量を基板表面に存在する開始剤の量と想定した<sup>28)</sup>。その結果、ガラス基板表面の開始剤の固定化量は、 $2.33 \times 10^{-6}$  mmol/cm<sup>2</sup>であった。Si-RAFT 重合は、液相でのラジカル拡散によるフリーポリマーの重合と基板表面でのグラフトポリマーの重合が同時に発生する。この時、グラフトポリマーとフリーポリマーの PAA の分子量は、Si-RAFT 重合により一様に制御できるため同一と仮定できる<sup>56)</sup>。従って PAA-g サンプルは、Si-RAFT 重合を用いて反応時間は一定にし、モノマー濃度の変化で分子量の調製を行った (Table 3)。同時に重合した PAA フリーポリマーは、PAA-g1 と PAA-g2 共に溶媒から分離できなかった。ラジカル開始剤の濃度が低く、回収に十分なポリマー量が生成していないことが要因と考える。曇点の測定は、フリーポリマーが未回収のため実行しなかった。

**TABLE 3** Preparation and characterization of PAA-g

<b>Sample</b>	<b>AAm (mmol)</b>	<b>AN (mmol)</b>	<b>V501 × 10<sup>-4</sup> (mmol)</b>	<b>CTA × 10<sup>-2</sup> (mmol)</b>	<b>Yield (%)</b>
<b>PAA-g1</b>	6.90	3.10	0.040	0.025	Trace
<b>PAA-g2</b>	10.35	4.65	0.040	0.025	Trace

Note: Monomer; [AAm (Acrylamide)], [AN (Acrylonitrile)], initiator; [V501] =  $4.0 \times 10^{-6}$  mmol (the immobilized glass surface area was  $1.77 \text{ cm}^2$ , the amount of immobilized initiator was  $2.33 \times 10^{-6}$  mmol/cm<sup>2</sup>), RAFT agent; [CTA (charge transfer agent)] =  $2.5 \times 10^{-4}$  mmol/L in 5 mL DMSO.

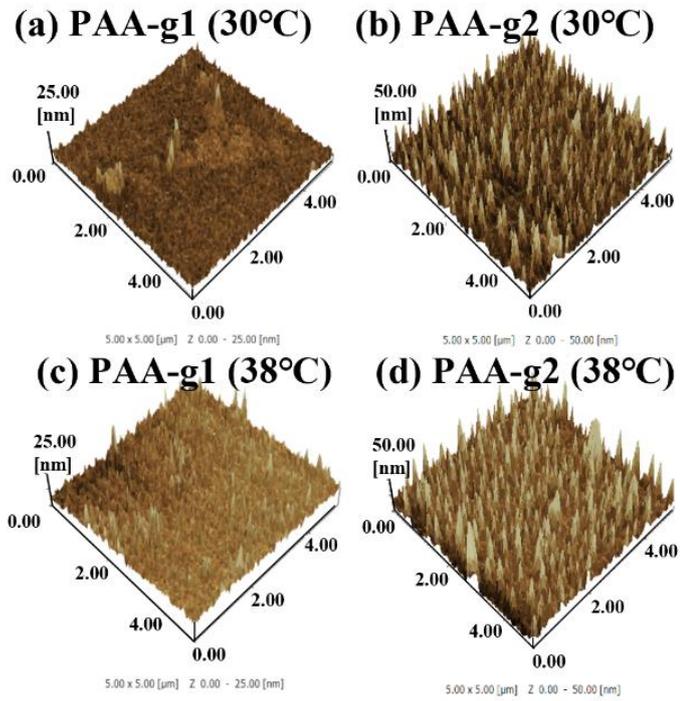
PAA-g1, PAA-g2 は、静置での水の接触角と水中での SPM 解析を行った (Table 4) . PAA-g 表面は、30 °C または 38 °C の静置での水の接触角測定より UCST 挙動を確認した. 水の接触角測定から PAA-g 表面は、温度を 30 °C と 38 °C に変化させると可逆的に親水性 – 疎水性が変化する機能を示した. SPM 分析は、30 °C または 38 °C の水中でガラス表面に固定化された PAA ブラシを視覚化した (Figure 7) . PAA-g2 は、PAA-g1 よりもポリマーブラシの高さが大きく、重合溶液のモノマー濃度が高いほどポリマーブラシ高さが大きくなることを示した<sup>56),57)</sup>. またすべての PAA-g は、38 °C の水中でポリマーブラシの延伸と膨張を確認した. SPM の粘弾性分析は、粘弾性の強度分布を色勾配で表示する (Figure 8, 低粘弾性; 青色系, 高粘弾性; 赤色系)<sup>58)</sup>. 分布図から PAA ブラシ長さの延伸により粘弾性が高くなることが判明した. また Figure 8 のサイドバーは、粘弾性の相対分布比の程度を示すヒストグラムである. 温度を 38 °C に上げたときの粘弾性の程度を比較すると, Figure 8 (a), (b)

(測定温度 30 °C) と比較し Figure 8 (c) , (d) (測定温度 38 °C) は, 赤色で表示された粘弾性の高い領域が大幅に増加している. 対照的に, 青色で表示された粘弾性の低い領域は減少している. また PAA-g1 と PAA-g2 の接触角は, 温度が 30 °C から 38 °C に上昇すると, どちらも接触角が減少する変化を確認した. 確認できたポリマーの水和状態の変化 (温度による接触角の変化, ポリマーブラシの延伸, 水中の表面粘弾性の差) が示す疎水性-親水性の切り替わり機能は, 熱刺激による細胞の接着性に密接な関係があると推定する. また, ここまでの結果から PAA-g1, PAA-g2 を固定化したガラスの UCST は, 30 °C から 38 °C の間に存在すると断定した. PAA-g 表面の粘弾性は, 温度刺激で変化を示し, PAA-g1 の赤色領域は 29.1 % から 74.2 % [Figure 8 (a) , (c)] , PAA-g2 の赤色領域は, 77.0 % から 80.0 % [Figure 8 (b) , (d)] に変化した. ポリマーブラシが長い PAA-g2 の表面は, 緊密化しているため 30 °C (UCST 以下の低温) でも高い粘弾性と疎水性を示したと考察する. ポリマーブラシの短い PAA-g1 は, 30 °C (UCST 以下の低温) でのポリマー鎖のコンフォメーションの収縮が PAA-g2 よりも大きい可能性がある. 一方で, PAA のポリマーブラシは, 水和状態 (38 °C) 時では PAA-g1 と PAA-g2 のポリマーブラシ長さの違いによる粘弾性の差が小さい. 従って, PAA-g1 表面の温度刺激 (30 °C から 38 °C へ) による粘弾性の差は, PAA-g2 と比較して大きいと考えている.

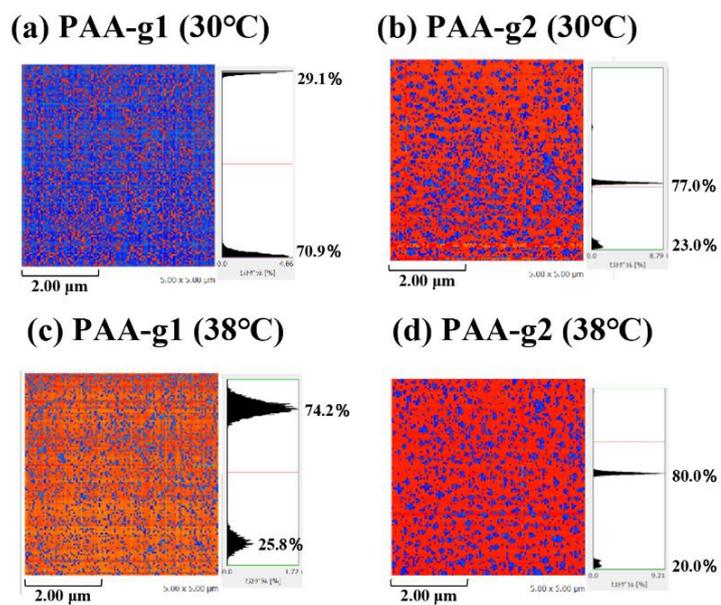
**TABLE 4** Characterization of PAA-g

<b>Sample</b>	<b>PAA brushes (nm)</b>	<b>Surface Roughness (nm<sup>2</sup>)</b>	<b>Water contact angle (<math>\theta</math>)</b>
<b>PAA-g1 (30 °C)</b>	7.9	1.9	60.4° ± 1.1
<b>PAA-g1 (38 °C)</b>	10.0	2.5	53.0° ± 1.2
<b>PAA-g2 (30 °C)</b>	14.4	8.4	56.6° ± 1.9
<b>PAA-g2 (38 °C)</b>	22.2	8.9	53.2° ± 1.8

Note: The PAA brushes were determined from the difference between the average and minimum heights (Rv) using cross section analysis. Surface roughness was calculated from the unevenness image.



**FIGURE 7** Unevenness of immobilized PAA surfaces at 30 °C for (a) and (b), and at 38 °C for (c) and (d), observed in water using SPM analysis.



**FIGURE 8** Viscoelasticity of immobilized PAA surfaces at 30 °C (a) and (b), and at 38 °C (c) and (d), observed in water using SPM analysis. The side bars show the degree of viscoelasticity as histograms of the relative distribution ratios (upper: reddish color, lower: blueish color).

### 1.3.3 PAA-g の細胞接着/細胞はく離の挙動

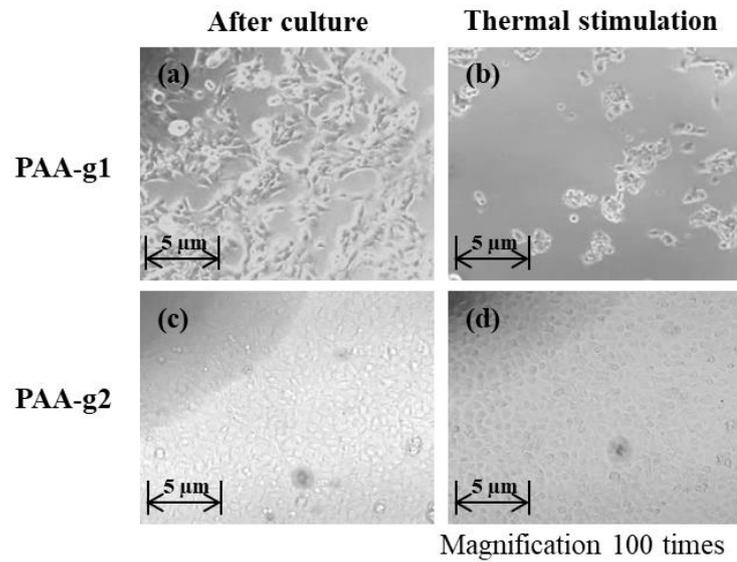
細胞の接着とはく離は、PAA-g1 と PAA-g2 上に接着した hiMSC に熱刺激を与えて評価した。考案した UCST 型のシステムで接着細胞を回収するには、ガラス界面での温度上昇を近赤外レーザーの照射によって達成し、UCST ポリマーの膨潤を起こす必要がある。ガラスに接着した細胞表面へ熱損傷を起こす可能性を考慮し、熱刺激は、通常の培養温度(37 °C)より 1 °C 高い 38 °C に設定した。細胞接着温度は、相転移温度の関係から通常の培養温度よりも低い温度に設定する必要がある。熱刺激はく離は、UCST ポリマーで固定化された表面の物性の変化が大きく、同時に接着細胞への熱損傷が最小である選択可能な最大温度での評価が必要のため培養温度は 30 °C に設定した。32°C 以下の低温培養では、コールドショックによる細胞ストレスや細胞活動の低下が発生するが、短時間であれば細胞死や定常温度に戻した際の細胞挙動変化は見られない<sup>59)</sup>。本論文では、コールドショックの解析は未実施だが、培養時間が短時間(6時間)であり、さらに温度刺激により回収した細胞は、TCPS 製の培養皿に播種し、インキュベータ内で 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> の条件で培養した結果、正常に細胞が増殖を示したことから培養および熱刺激の設定温度は妥当であったと考えている。また細胞のコールドショックは、培地組成の最適化により緩和できることが分かっており、より低ストレス環境下での試験実施は可能である<sup>47)</sup>。Figure 9 は、PAA-g1, PAA-g2 上の hiMSC が接着及びはく離した時の光学顕微鏡の画像である。PAA-g1 上の hiMSC の接着領域は、疎らで小さいが、PAA-g2 上は、全面に均一化している。しかしながら、PAA-g1, PAA-g2 に接着した細胞数は同一であった。PAA-g1 上に接着した hiMSC は熱刺激で、はく離したが、PAA-g2 上では、はく離が起きなかった [Figure 9 (b), (d)]。このとき PAA-g1 の hiMSC のはく離率は約 77% であった (Figure 10)。PNiPAAm グラフトガラス上での細胞接着-はく離は、ポリマー鎖の長さやグラフト密度が影響する<sup>53), 60)-62)</sup>。PNiPPAm グラフト表

面は、ポリマーの分子量が過剰になると細胞接着が起きないことが報告されている<sup>63)</sup>。UCST 型ポリマーである PAA グラフトガラスの場合、グラフトされた PAA ポリマーブラシの長さによって、DMEM 中の水和状態と hiMSC の接着形態、はく離率が異なる結果を示した。細胞の接着性は、水の接触角 ( $60^{\circ} \sim 90^{\circ}$ ) 程度の基板表面が良好であり、ポリアクリルアミド表面は細胞が接着しにくいことが分かっている<sup>64)</sup>。またポリアクリロニトリルは、シアノ基の陰性電荷がサイトカインの陽性電荷を吸着する機能をもつ<sup>65)</sup>。このことから PAA 表面の細胞接着は、接着因子を含むサイトカインが基板界面に存在するシアノ基に吸着することで発生すると考えられる。PAA のポリマーブラシ中に含まれるシアノ基の含有量は、ポリマーブラシが長くなるに従い増加する。そのため、吸着するサイトカインの量は、ポリマーブラシの長さに比例して増加し、増加に伴い細胞接着性は向上すると推測される。従って、ポリマーブラシの長い PAA-g2 は、シアノ基の含有量が大きいことためサイトカインの吸着量が多く細胞接着が盤石となり、接着細胞が広範囲に進展したと考察する。PAA は、相転移以下では疎水性相互作用により分子凝集を起こし、シアノ基の含有量の増加に応じて凝集体積が大きくなる。一方で相転移以上では、疎水性相互作用が緩和し水和してシアノ基を介した分子間会合を起こすことが分かっている<sup>50)</sup>。また PAA-g は、ポリマーブラシが界面に固定されているため、分子鎖が長くなると排除体積効果により分子凝集の一部が阻害されると考えられ、相転移以下でも局所的に水和を起こしていると推測する。よって Figure 8 の粘弾性が高い領域 (赤色) は、水和することで分子間会合したシアノ基の分布を示していると考察する。しかし、前述の考察は、PAA-g1 [Figure 8 (c) :  $38^{\circ}\text{C}$ ] が PAA-g1 [Figure 8 (a) :  $30^{\circ}\text{C}$ ] よりも相転移によって界面のシアノ基が増加しているにも関わらず、細胞接着性が低下し細胞はく離が生じた点を説明できない。そこで PAA-g1 を用いて通常の培養温度 ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) で 6 時間を培養したところ細胞接着が発生し、

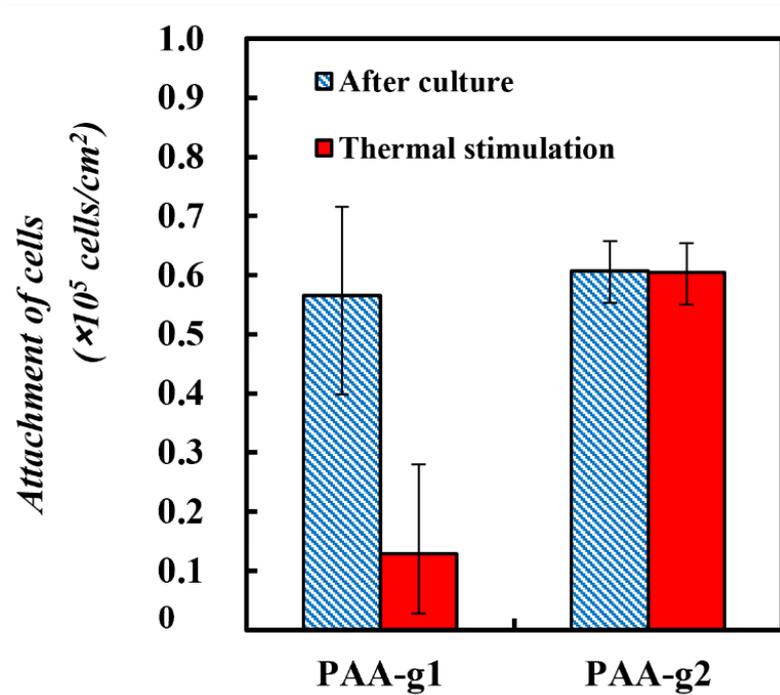
さらに脱温 (20 °C, 10 min) による温度刺激を与えると細胞はく離が発生する結果が得られた (Figure 11) . このとき接着細胞の数は, 低温 (30 °C) と比較し約半分 ( $0.3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) であり, 温度刺激 (20 °C) によるはく離率は, 約 58 %であった (Figure 12) . これらの結果は, PAA-g 上での細胞接着—はく離が, ポリマーブラシの膨潤伸縮を起因として発生していることを示し, シアノ基含有量と細胞接着性に関する上述の考察を証明する一つの結果であると考えている.

以上の結果から, PAA-g1 に接着した hiMSC が効果的にはく離・回収された要因は, PAA-g1 の 30 °Cでの収縮, 38 °Cでの膨張した際の水和状態, 30 °Cでの hiMSC の接着形態が, PAA-g2 と比較し大きく異なる点であると暫定的に結論付けている. 従って PAA の細胞接着—はく離機能の最適化は, 相転移によるポリマーの伸縮とシアノ基量の制御による細胞接着性の最適化が重要である.

温度応答性ポリマー上の細胞接着—はく離機能は, 細胞の種類によって変化することが分かっている<sup>66)</sup>. PAA は, AN 含有量の制御により細胞接着や相転移温度の制御が可能であり, 多様な細胞種および培養環境への適応が可能である. 一方で, UCST 型ポリマーの分子量, 表面粘弾性, 細胞接着の関係は, 今後さらなる解明が必要であり, また近赤外レーザーによる接着細胞の熱刺激はく離及び PAA-g から回収された細胞への熱損傷について研究も進めている.

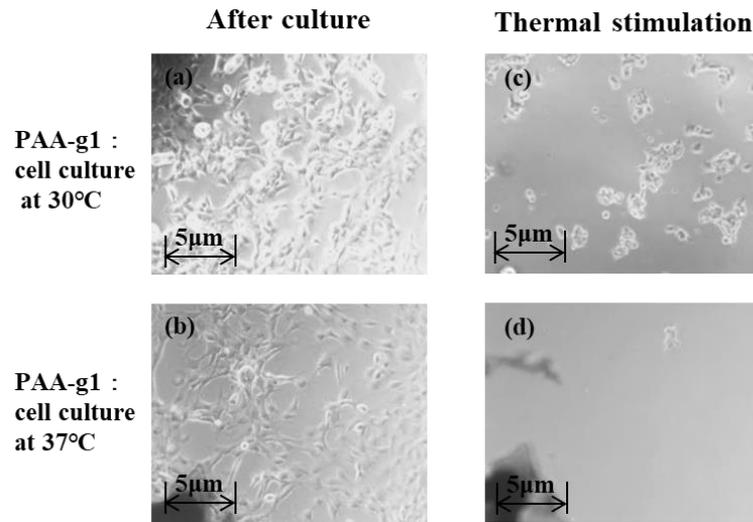


**FIGURE 9** Microscope images of cells adhered on PAA-g. (a) and (c) Attachment of cells after culture with PAA-g1 and -g2 in DMEM with 10 % FBS for 8h at 30 °C. (b) and (d) Thermal stimulation of PAA-g1 and -g2 in serum-free DMEM for 10 min at 38 °C. (magnification 100 times; CKX31, Olympus Corp., Tokyo, Japan).

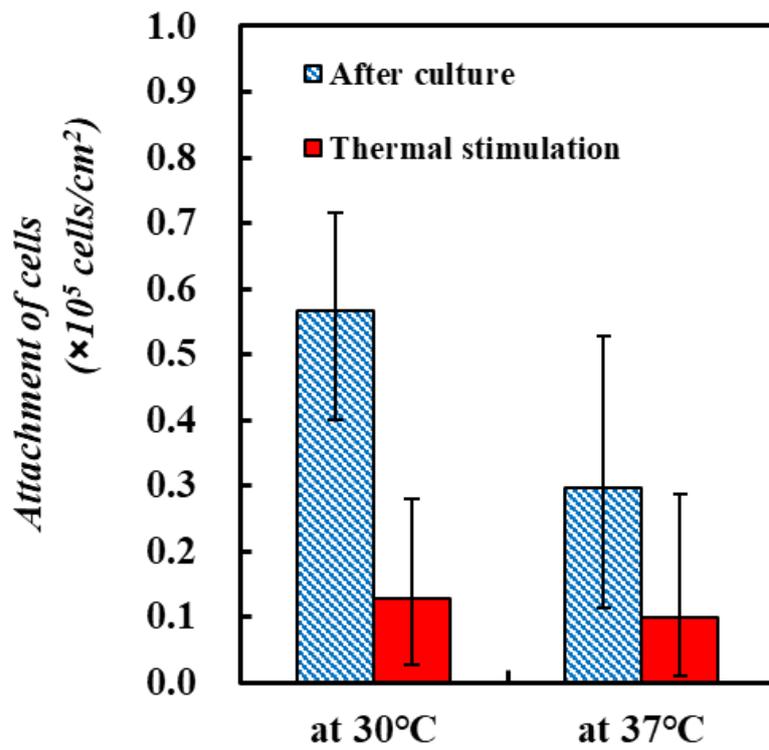


**FIGURE 10** Comparison of cell attachment (culture medium temperature 30 °C; blue) and cell detachment (culture medium temperature 38 °C; red) on PAA-g1 and -g2;

t-test for “After culture” vs. “Thermal stimulation” on PAA-g1 [ $t(14) = 9.62, P = 1.50 \times 10^{-7}$ ] or on PAA-g2 [ $t(6) = 0.07, P = 0.95$ ] as counted at different cell attachment regions (15  $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ ).



**FIGURE 11** Microscope images of cells adhered on PAA-g. (a) Attachment of cells after culture with PAA-g1 in DMEM with 10 % FBS for 6 h at 30 °C. (b) Attachment of cells after culture with PAA-g1 in DMEM with 10 % FBS for 6 h at 37 °C. (c) Thermal stimulation of PAA-g1 in serum-free DMEM for 10 min at 38 °C. (d) Thermal stimulation of PAA-g1 in serum-free DMEM for 10 min at 20 °C. (magnification 100 times; CKX31, Olympus Corp., Tokyo, Japan).



**FIGURE 12** Comparison of cell attachment (culture medium temperature 30 °C or 37 °C; blue) and cell detachment (culture medium temperature 38 °C or 20 °C; red) on PAA-g1.

## 1.4 結言

本章では、細胞付着足場として使用するために UCST 型アクリルアミド (AAm) とアクリロニトリル (AN) 共重合体 [Poly(Acrylamide-co-Acrylonitrile)] [PAA] を Si-RAFT 重合によってガラス基板にグラフト化し、熱刺激で非侵襲的な標的細胞の回収が可能な新規細胞培養基板の開発を目的とした基礎研究を報告した。

PAA の分子量と AN 組成に応じた UCST の挙動を理解するために、初めに分子量と AN 組成が異なるフリーポリマーの PAA を RAFT 重合により調整した。PAA の UCST は、PAA の分子量と AN 組成に応じて変化した。さらに、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) および細胞培養培地 (DMEM) 中での PAA の UCST は、純水中の UCST よりも低くなるが、グルコースや血清は、PAA の相転移に影響を与えないことを示した。次に、最適化した AN 組成 (PAA 中に 31 mol%) の PAA を、Si-RAFT 重合によってガラス上にグラフト重合した。グラフト化 PAA の AN 濃度 (31 mol%) を一定に保ちながら、モノマーの分子量を変化させて PAA-g サンプルを重合した。PAA-g のポリマーブラシ長さによる表面特性の変化を 30 °C 及び 38 °C の水中での SPM 測定と静置での水接触角によって評価した。すべての PAA-g サンプルの表面は、温度が 30 °C から 38 °C に上昇すると親水性に変化し、同時にポリマーブラシが膨潤した。また PAA のポリマーブラシ長さが増加すると、PAA-g 表面全体は、より高い粘弾性を示した。

PAA-g2 と比較して PAA-g1 は、粘弾性の変化が大きいことに関連して、38 °C の熱刺激による PAA-g1 に接着した hiMSC のはく離率 ( $76.8 \pm 16.6\%$ ) は、PAA-g2 のはく離率 ( $0.4 \pm 0.1\%$ ) よりも大きくなった。さらに、ポリマーブラシ長さの違いで細胞の接着形態は異なっていた。また PAA-g1 は、通常の培養温度 (37 °C) で細胞接着が可能で 20 °C の温度刺激によって細胞はく離 (はく離率 58%) を示した。この結果から SPM 解析で観察された

高い粘弾性を示す領域は、水和により分子間会合したシアノ基と考えられ、PAA-g の細胞接着性と分子間会合したシアノ基に関係性があることが示唆された。従って、PAA ポリマーブラシ長さと AN 組成の最適化が、hiMSC 細胞の接着挙動の制御に重要であると結論付ける。

## 第2章 プラズマ照射-ポスト重合による PNiPAAm グラフト酸素富化膜の調製と

### 細胞増殖に及ぼす酸素供給の影響

#### 2.1 緒言

生体内 (*in vivo*) と生体外 (*in vitro*) では、細胞は、しばしば異なる応答を示す。細胞の *in vivo* 応答を知るには、*in vivo* 類似の培養条件を与える必要がある。*in vivo* で、細胞は毛細血管から供給される酸素の拡散域約 200  $\mu\text{m}$  以内で組織化しており、酸素圧変化に敏感な応答をする<sup>30)</sup>。一方、*in vitro* 細胞培養では、*in vivo* と異なり、組織化や高密度化が起きにくい場合もある<sup>30)</sup>。*in vitro* 培養で用いる組織培養用ポリスチレン製シャーレ (TCPS) などは、細胞接着面からの酸素供給がなく、接着表層で細胞は低酸素条件となる。そこで培養基材を酸素選択透過性ポリマー膜 (酸素富化膜: ORM) とし、酸素供給を改善する試みがなされている<sup>30),31)</sup>。ORM は酸素に対して窒素やその他の気体の膜中への溶解・拡散速度の違いで酸素を選択分離でき、圧力で濃縮を調節できる<sup>67)-69)</sup>。培養基材を ORM とすると、これまで *in vivo* のみ観察されていた高度組織化や遺伝子発現などが *in vitro* で確認され、細胞応答の有意な変化が報告されている<sup>30)-32)</sup>。しかし、いずれも酸素供給による応答が既に知られている肝細胞や神経細胞の組織化や分化影響の報告例が多い。本研究では ORM の細胞培養用基材としての利点を知り、応用できる細胞種を拡げるため、酸素供給下、培養例の少ないヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞)<sup>39)</sup>あるいは酸素供給の影響が大きいとされる神経細胞<sup>70)</sup>への分化能をもつヒト神経芽細胞株 (SK-N-SH)<sup>40)</sup>を用いて、細胞増殖に及ぼす酸素供給への影響を検討した。

ここに、用いた ORM 材は、細胞培養基材としての応用例の少ないジフェニルアセチレン構造内にトリメチルシリルプロピンを導入した poly[1-phenyl-2-(4-trimethylsilyl)phenyl]

acetylene [PTMSDPA]<sup>33)-35)</sup> を選択した. すでにシリコン系 ORM である Poly dimethyl siloxane (PDMS) 上での細胞培養で酸素供給効果は実証されている<sup>70)</sup>. しかし PTMSDPA は, PDMS のおよそ 2 倍の酸素透過速度と同等の O<sub>2</sub> / N<sub>2</sub> 選択能を持ち, 制御可能な酸素供給速度の範囲が大きい. 従って PTMSDPA は Poly(N-isopropylacrylamide) [PNiPPAm] 固定化等の表面処理後も十分な酸素透過能を持ち, また PDMS よりも効果的に酸素供給が可能な細胞足場の設計が可能であると考えた. さらに PDMS と異なり, 主鎖中に不飽和結合などの反応基を持つため表面改質が容易であり, また結晶性高分子のため加工がしやすい利点がある. しかし, PTMSDPA 表面は疎水性が高いため, 細胞が接着しにくく, 細胞培養用基板として十分な表面性状とはいえない. そこで, PTMSDPA の細胞接着性改善および培養後, 温度刺激による非侵襲的な細胞回収を期待して, PNiPAAm<sup>12)</sup>をプラズマ照射-ポスト重合<sup>38),71)</sup>により PTMSDPA フィルム上への固定化を試みた. PNiPAAm グラフト化 PTMSDPA (g-PTMSDPA) を用いて, 酸素供給下での細胞の増殖と温度刺激による細胞回収を検討した.

## 2.2. 実験

### 2.2.1. 試薬

poly[1-phenyl-2-(4-trimethylsilyl)phenyl]acetylene (PTMSDPA ; 日油(株)提供品, 数平均分子 (Mn) : 25000) をそのまま使用した. N-isopropylacrylamide (NiPAAm ; 和光純薬工業(株)製) は, ベンゼン : ヘキサン = 1:30 (v/v) で再結晶した. Polyethyleneimine (PEI ; 和光純薬工業(株)製, 数平均分子量 (Mn) : 1800) は, そのまま用いた.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH ; 和光純薬工業(株)製) は, そのまま用いた. 水は MILLIPORE 製 Mill-Q Synthesis A10 超純水製造機を用いて精製して使用した.

Minimum Essential Medium (MEM) と Minimum Essential Medium Alpha (MEM $\alpha$ ) , Non-Essential amino acid (NEAA) は GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA) から購入した. Fetal bovine serum (FBS) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した.

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS : pH 7.4) , 0.25 % Trypsin, 0.1 % Trypsin は常法に従って調製した. 滅菌水は水をオートクレーブ滅菌して用いた. 核染色試薬は 4 %パラホルムアルデヒドとエオジン Y 液, マイヤーヘマトキシンは, 武藤化学(株)製から購入した.

酸素ガスは (太陽日酸(株)製 ; 純度 99.9 %) をそのまま使用した.

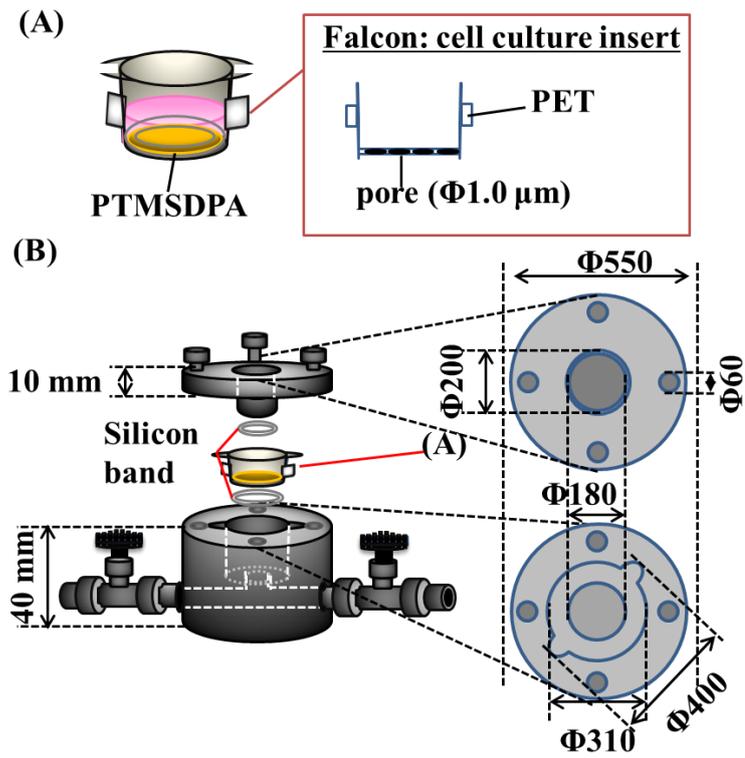
その他の溶媒などは常法に従って精製後に使用した.

### 2.2.2. PTMSDPA の製膜

1.4 wt% PTMSDPA のトルエン溶液 2 mL をガラス製シャーレ ( $\phi = 25$  mm) の上に展開し、常温常圧下で溶媒を蒸発させ製膜した。水に浸漬してシャーレから剥離し、数回表面を水洗後、減圧下で真空乾燥した。

### 2.2.3. 酸素供給培養システム

試作した酸素供給装置を Figure 1 に示す。マトリゲルインベーションチャンバー [Falcon co. Ltd.: cell culture inserts (細孔径: 1.0  $\mu\text{m}$ )] の基底面上に PTMSDPA フィルムを静置 [Figure 1 (A)] し、金属製枠にネジ固定した [Figure 1 (B)]。このとき、チャンバーと枠との接触部の力学的な緩衝および密閉を目的にシリコンリング (外径: 22 mm, 内径: 20 mm) を挟みこんだ。マトリゲルインベーションチャンバーは、底面 8.0  $\mu\text{m}$  厚 PET 製膜で、物質透過用の細孔をもち、PTMSDPA フィルムへの酸素供給が可能な支持体として用いた。また、酸素供給装置に調圧バルブとフローメーター (KOFLOC: 3810DS-V) を酸素ポンベに接続して供給酸素量を計測・調整した。



**FIGURE 1** Oxygen enrich system (A) PTMSDPA culture dish, (B) Equipment Overview.

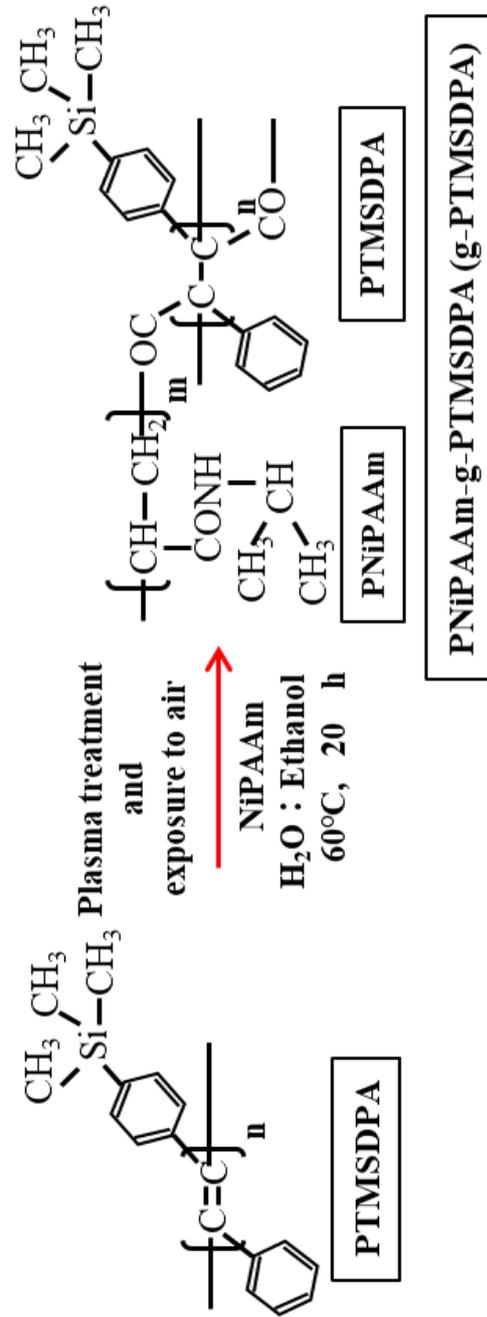
## PTMSDPA 表面への PNiPAAm の固定化とキャラクタリゼーション

### 2.2.4. 低温プラズマ処理による活性種の定量

既報<sup>38), 71)</sup>に従って, セパラブルフラスコの底面に PTMSDPA フィルム ( $\phi = 22$  mm, 厚さ  $\approx 30\mu\text{m}$ ) を置き, Ar ガス圧 1.3 Pa, 流量 10 sccm, 出力 20 W, 照射時間 120 秒の条件で, 常温にてプラズマ照射した. 処理後, 1 分間大気中に暴露した後, 直ちに PTMSDPA フィルムを, 10 mL DPPH ベンゼン溶液 ( $[\text{DPPH}] = 1.0 \times 10^{-4}$  mol/L) の入ったガラス製サンプル瓶に浸漬した. シリコン製セプタムキャップで密閉した後, 液体窒素浴中, 凍結-脱気-N<sub>2</sub>置換を繰り返して溶存酸素除去後, 真空下 60 °C で 20 時間振り混ぜた. 残存 DPPH の吸光度 (520 nm) と Ar プラズマ照射を行わずに同処理した PTMSDPA フィルムの吸光度差を消費ラジカル量とし, プラズマ照射面の面積で除して, 単位面積当たり ( $\text{cm}^2$ ) のラジカル量を見積もった.

### 2.2.5. PTMSDPA 上への PNiPAAm 重合体の合成

NiPAAm 0.5590 g (4.94 mmol) の水/エタノール [17 : 3 (v/v)] 溶液 5.5 mL をガラス製サンプル瓶に入れ, 2.2.4 項と同様に溶存酸素除去した後, Ar プラズマ照射後の PTMSDPA フィルムを浸漬して 60 °C, 20 時間ポスト重合した (Figure 2). 重合後, 未反応モノマーを除去するため, 1 日間, 水に浸漬し, 真空乾燥して g-PTMSDPA を得た. メトラー・トレド製精密天秤 UMX2 を用いて, 重合後のフィルム重量の増加及び Ar プラズマ照射後の PTMSDPA 重量をブランクとして差し引き, PNiPAAm グラフト量とした. さらに 2.2.4 項で求めた表面ラジカル量から, 平均分子量と重合度を見積もった. 比較のため, Ar プラズマ照射のみの PTMSDPA フィルム (PTMSDPA/p) も調製した.



**FIGURE 2** Reaction model of the membrane surface of low-temperature plasma irradiation and post-polymerization of PNiPAAm-grafted PTMSDPA (g-PTMSDPA) .

### 2.2.6. g-PTMSDPA のキャラクタリゼーション

水接触角 ( $\theta$ ) は、温度調節ステージ付きの Erma(株)社製ゴニオメーター式接触角測定機 G-I 型を用いて測定した。20 °C から 40 °C まで 1 °C 刻みで、 $\pm 0.1$  °C に温度調整した基板上的のフィルムに 1  $\mu$ L の水滴を置き、1 分以内に水滴の左右の接触角を測定した。5 回測定して、最大値および最小値を除いた平均を  $\theta$  値とした。走査型プローブ顕微鏡 (SPM) 測定は、SPM9500J3 型 [島津製作所(株), カンチレバー: Budget sensors Tap300AI-G (Innovation Solutions Bulgaria Ltd. 製)] を用い、大気雰囲気中で、走査範囲 20  $\mu$ m  $\times$  20  $\mu$ m, 走査速度 0.5 Hz とし、位相検出システムによる表面の高低測定から評価した。<sup>1</sup>H-NMR は、600 MHz 核磁気共鳴装置 (Varian 600 PS) を用いて溶媒を重クロロホルムとして 512 time で測定した。

### 2.2.7. 酸素供給速度の測定

g-PTMSDPA を固定化した酸素供給装置に PBS 5 ml を入れ、供給圧力 0.01 MPa, 流速 20 sccm で装置に酸素を流し、インキュベータ (SCA-165D; アステック(株), 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) 中に置いた。溶存酸素 (DO) 電極 (9520-10D; HORIBA(株)) を用いて 24 時間経過ごとの PBS 中の DO 量 (mg/L) を測定した。このとき TCPS (Nunc™, ウェルサイズ  $\phi = 60$  mm) も同様の条件で DO 量を計測して、気-液界面からの供給酸素量ブランクとして上記 DO 量から減じて、経時時間との増加曲線から供給速度を見積もり、g-PTMSDPA フィルム面積と培養時間で除して酸素供給速度 (pmol/s  $\cdot$  cm<sup>2</sup>) とした。

### 2.2.8. 細胞培養 HeLa 細胞

HeLa 細胞 (RCB007; 理研 cells バンク) を 1% NEAA 及び 10% FBS 含有 MEM 培地で培養後, 1 mL の 0.25% Trypsin (2.5 mg/mL) 添加で, はく離・回収した. 細胞懸濁液中の細胞濃度を  $2.0 \times 10^5$  cells/mL または  $2.0 \times 10^4$  cells/mL とし, g-PTMSDPA 上に 1 mL または 2 mL を播種した.

### 2.2.9. 細胞培養 SK-N-SH

SK-N-SH (RCB0426; 理研 cells バンク) は, 10% FBS 含有 MEM $\alpha$  培地で培養後, 1 mL の 0.1% Trypsin (1.0 mg/mL) 添加で, はく離・回収した. 細胞懸濁液中の細胞濃度を  $2.0 \times 10^5$  cells/mL とし, g-PTMSDPA 上に 2 mL を播種した.

### 2.2.10. HeLa 細胞の接着と温度刺激はく離

g-PTMSDPA は, オートクレーブ滅菌後, 光学フィルム固定用透明両面テープ (HJ-3160W; 日東電工株) を PNiPAAm グラフト PTMSDPA の裏面に貼り付け, 4 ウェルのマルチディッシュ (Nunc<sup>TM</sup>, ウェルサイズ  $\phi = 15$  mm) 上に固定化した. HeLa 細胞懸濁液 ( $2.0 \times 10^5$  cells/mL) 1 mL を播種し, インキュベータ中 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) で 1 日間培養した. 未処理 PTMSDPA, PTMSDPA/p, PTMSDPA/p に細胞接着性物質 PEI (30 wt%水溶液) を塗布し, 自然乾燥させたフィルム (PTMSDPA/PEI) も同様に培養した. 培養後, g-PTMSDPA 上の非接着 HeLa 細胞を除去するため, 800  $\mu$ L の 37 °C の MEM 培地を用いて 3 回マイクロピペットから強く噴き出し, 細胞の接着の確認および洗浄した後, 接着細胞数を倒立型ルーチン位相差顕微鏡 (CKX31; オリンパス株製) で観察して, 顕微鏡視野をデジタル画像で記録した.

温度刺激によるはく離は、20 °Cのサーモプレート（FTP-28190；アズワン(株)製）上に g-PTMSDPA 固定化マルチディッシュを 25 分間、静置後、800  $\mu$ L の 20 °C の MEM 培地を 3 回マイクロピペットから強く噴き出し、吸引してはく離細胞を回収後、g-PTMSDPA 上に残存する接着細胞数を同様に記録した。また、比較として PTMSDPA/p 上の接着 HeLa 細胞でも同刺激を与えた。細胞はく離率は、温度刺激前後でのデジタル画像中の細胞を数え、その差から算出した。

### 2.2.11. HeLa 細胞の低温培養

2.2.10 項と同様に g-PTMSDPA をオートクレーブ滅菌後、4 ウェルのマルチディッシュ（Nunc™, ウェルサイズ  $\phi = 15$  mm）上に固定化し、HeLa 細胞懸濁液（ $2.0 \times 10^4$  cells/mL）1 mL を播種した。初期接着細胞数を通常培養と揃えるためインキュベータ中（37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>）で 4 時間培養した。g-PTMSDPA 上への細胞付着を倒立型ルーチン位相差顕微鏡（CKX31；オリンパス(株)製）で確認後、34 °C, 5 % CO<sub>2</sub> の条件に設定したインキュベータ中に 96 時間静置し培養した。比較として通常培養（37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>）の条件についても同様の操作後、96 時間培養した。培養後、接着細胞数を倒立型ルーチン位相差顕微鏡（CKX31；オリンパス(株)製）で観察して、顕微鏡視野をデジタル画像で記録した。

### 2.2.12. 酸素供給下での細胞培養

g-PTMSDPA をオートクレーブ滅菌後、酸素供給装置 (Figure 1) に固定化し、クリーンベンチ中で UV 滅菌灯下約 30 cm の距離に静置し、装置全体を 1 時間 UV 照射滅菌した。HeLa 細胞 ( $2.0 \times 10^4$  cells/mL) 及び SK-N-SH ( $2.0 \times 10^5$  cells/mL) の細胞懸濁液 2 mL を上記装置に固定化した g-PTMSDPA 上に播種し、2.2.10.項と同様にインキュベータ (37 °C, 24 時間) 中、静置培養した。次に、PTMSDPA 裏面から酸素 (供給圧力 0.01 MPa, 20 sccm) を供給して 24 時間培養した。このとき培養温度は 37 °C または 34 °C で実施した。培養後、PBS で洗浄し、4 % パラホルムアルデヒドに 5 分間浸漬して細胞を固定化し、直ちに、多量の水で洗浄した。次に、マイヤーヘマトキシソ溶液に 3 分間浸漬し、多量の水で再度洗浄後、エオジン Y 溶液に 2 分間浸漬し、水洗後に HE 染色した。染色標本を 2.2.10.項と同様の顕微鏡観察から、PTMSDPA 上の全細胞数を計測した。同様に、同装置にて酸素供給無しで試験を実施した。接着細胞数は、単位面積当りの細胞数の平均値を求め、酸素供給の有/無による細胞数差の有意性を t 検定した。

## 2.3. 結果および考察

### 2.3.1. g-PTMSDPA の調製とキャラクタリゼーション

PTMSDPA フィルム表面は疎水性 ( $\theta=90^\circ$ ) が高い. 細胞は  $50^\circ\sim 80^\circ$  の水接触角 ( $\theta$ ) の基板表面に接着しやすく,  $50^\circ$  以下の親水性あるいは  $80^\circ$  以上の疎水性では接着しにくくなることから<sup>64)</sup>, 細胞接着・培養に適した表面性状への改善を目的に, 低温プラズマ照射-ポスト重合を用いて PNiPAAm をグラフト重合した. PTMSDPA への PNiPAAm のグラフト後のキャラクタリゼーションを Table 1 にまとめる.  $^1\text{H-NMR}$  により g-PTMSDPA は, (-CH=CH<sub>2</sub>) (4.9, 5.6 ppm) シグナルの消失と (-CH-CH<sub>2</sub>-) (2.3-2.4 ppm) シグナルの発生, NiPAAm の持つ [-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (3.6 ppm) に帰属されるシグナルを確認でき PNiPAAm のグラフト化を認めた. また PTMSDPA 表面に PNiPAAm を固定化した結果, 重量変化 (増加重量:  $0.089\pm 0.033$  mg, プラズマ消失重量:  $0.017\pm 0.004$  mg) からグラフト量は  $0.019\pm 0.09$  mg/cm<sup>2</sup> であった. グラフト化 PNiPAAm の平均鎖長を知るため, DPPH によるラジカル活性種の定量を行い, 活性種とグラフト量から, 数平均分子量 (Mn) と重合度の概算を行った. Ar プラズマ照射と大気への暴露で PTMSDPA 表面に, ROOH, ROOR' 型の過酸化物などが発生すると考えられる. その後, 加熱すると過酸化の分解 (ROOH $\rightarrow$ RO $\cdot$  +  $\cdot$ OH) により発生したラジカルによって表面開始ラジカル重合が進行する. 発生フリーラジカルは, PTMSDPA 表面への残存と液相へ拡散遊離するラジカルとなるため, DPPH との接触によって捕捉されたラジカル量の 1/2 等量を表面活性ラジカル量として見積もり, 単位面積当たり (cm<sup>2</sup>) のラジカル量を算出した<sup>38)</sup>. その結果, 表面活性種量は, 5.8 nmol/cm<sup>2</sup> となり, 重合後の PTMSDPA 重量増加から PNiPAAm の Mn は,  $0.32\pm 0.15\times 10^4$ , 重合度 (DP) を  $29\pm 13$  と算出した. また,  $^1\text{H-NMR}$  のシグナル及び PTMSDPA の Mn  $2.5\times 10^4$  から, PNiPAAm の Mn は,  $1.4\times 10^4$  と算出した. 重合は表面のみであり, 単位面積で除すると Mn は,  $0.36\times 10^4$  (DP:31)

であり、活性ラジカル量と重量増加から算出した結果と近似した。SPM から、重合後、未処理 PTMSDPA フィルムに認められないブラシ状突起物を観察した (Figure 3) 。また、重合後、20 °C の g-PTMSDPA 表面の  $\theta$  値 (48 °) は未処理  $\theta$  値 (90 °) より低下する親水表面となった。さらに、34 °C 以上で  $\theta$  値の上昇を認め、細胞培養温度 38 °C で  $\theta$  値 (53 °) と疎水性を示す温度応答性から (Figure 4) , PNiPAAm 鎖グラフトによる表面改質を認めた。

g-PTMSDPA による酸素供給速度を測定するため、酸素ガスの供給 (供給圧力 0.01 MPa, 流速 20 sccm) により増加する PBS 中の DO 量を 0~72 時間経時測定した。酸素供給時間に対する DO 増加曲線から、PBS 中への酸素供給速度 ( $\text{pmol/s} \cdot \text{cm}^2$ ) を見積もった。このとき、TCPS での DO 増加量 ( $19 \pm 9 \text{ pmol/s} \cdot \text{cm}^2$ ) を気-液界面からの酸素供給とし、ブランクとして差し引いた。酸素供給無しでは、インキュベータ中で、PTMSDPA の酸素富化能により増加する g-PTMSDPA 上の酸素供給速度は  $45 \pm 22 \text{ pmol/s} \cdot \text{cm}^2$ , g-PTMSDPA 裏面から酸素ガスを供給すると、 $1389 \pm 625 \text{ pmol/s} \cdot \text{cm}^2$  となり、いずれも 72 時間後も DO 量は増加していた。基底面からの酸素供給を実施せずとも酸素要求量の高い肝細胞種 ( $40 \text{ pmol/s} \cdot \text{cm}^2$ )<sup>30)</sup> の要求量を満しており、細胞培養に十分な酸素供給が期待できる。また基底面からの酸素供給 (供給圧力 0.01 MPa, 流速 20 sccm) でより高濃度酸素環境 (酸素供給無しの約 21 倍の酸素供給) での培養が可能であることがわかった。

**TABLE 1** Characterization of ORM

ORM	weight change <sup>a)</sup> / $\times 10^{-2} \text{ mg cm}^{-1}$	Mn of grafted PNiPAAm <sup>b)</sup> [Mn $\times 10^4$ ]	Contact angle <sup>c)</sup> [ $\theta$ ]		Oxygen supply rate <sup>d)</sup> [ $\text{pmol/s} \cdot \text{cm}^2$ ]	
			20°C	38°C	Non	Supply
g-PTMSDPA	$1.9 \pm 0.9$	$0.32 \pm 0.15$	48°	53°	$45 \pm 22$	$1389 \pm 625$

<sup>a)</sup>Calculated from the non treat PTMSDPA weight. <sup>b)</sup>Calculated from the amount of free radicals on the surface by the DPPH radical scavenge method and the amount of grafted polymer. <sup>c)</sup>Pure water on ORM at room temperature. <sup>d)</sup>Calculated from the dissolved oxygen amount in PBS.

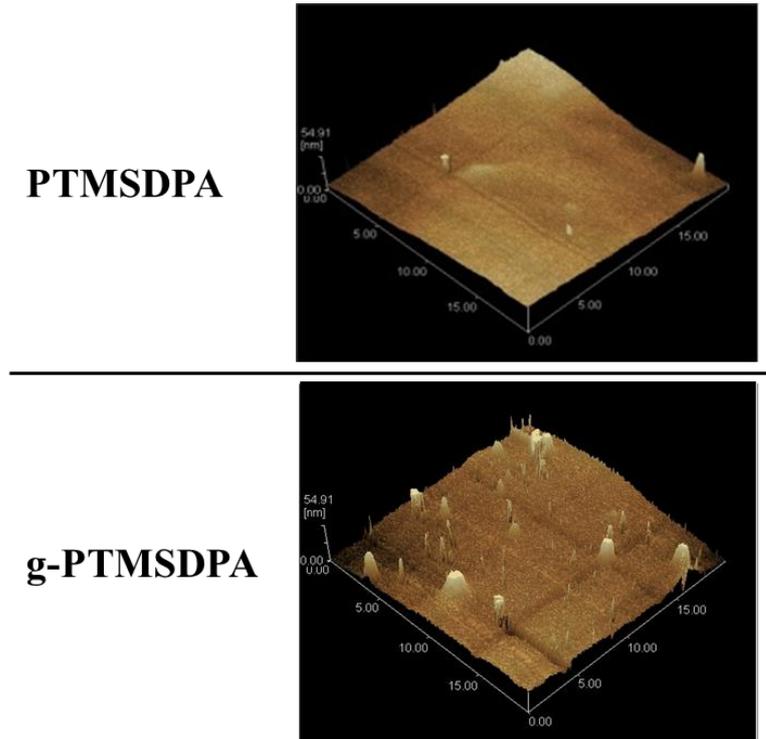


FIGURE 3 SPM image of PTMSDPA and g-PTMSDPA

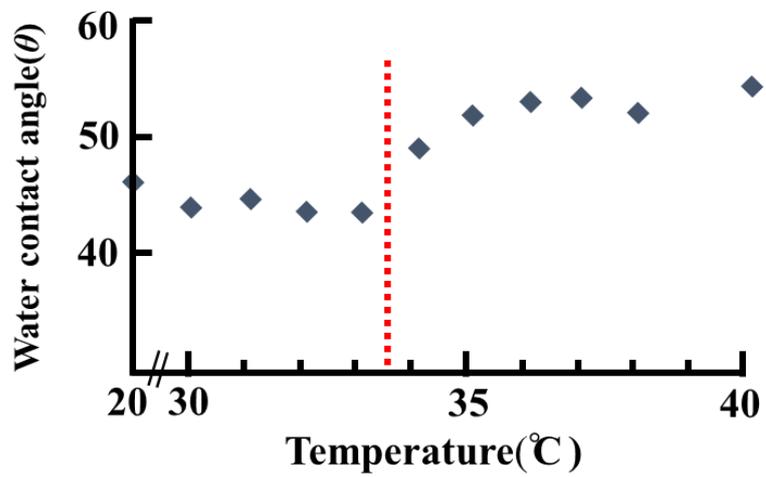


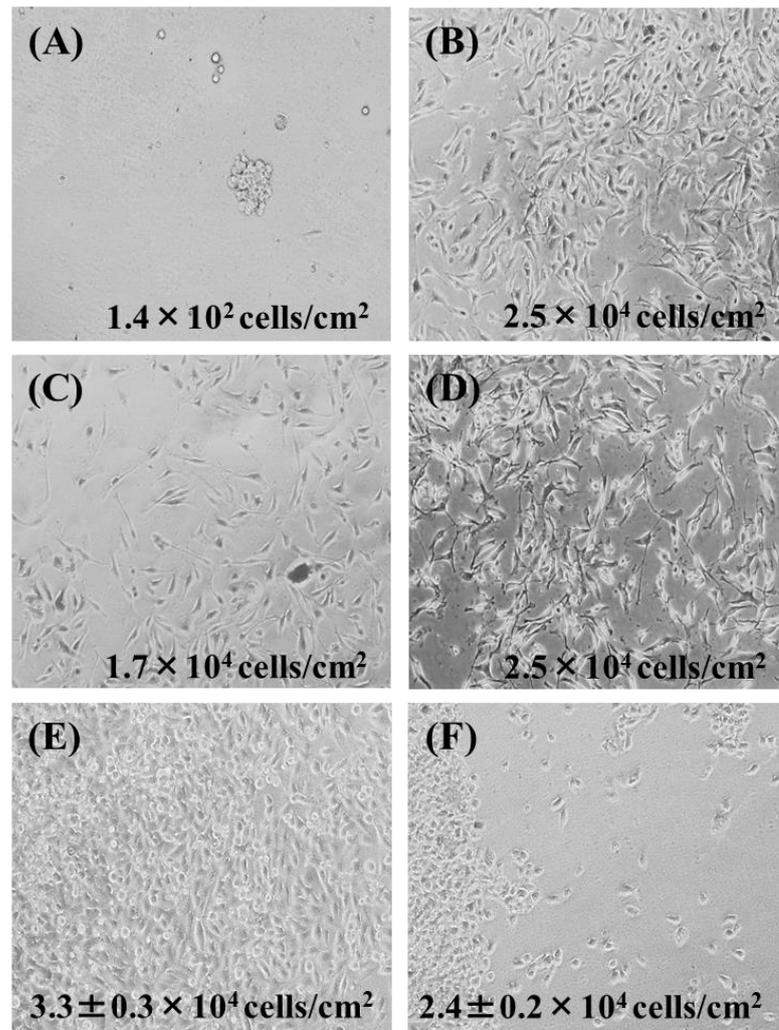
FIGURE 4 Change of contact angle ( $\theta$ ) to water ad a function of temperature on the g-PTMSDPA

### 2.3.2. 細胞の接着と温度刺激はく離

g-PTMSDPA の細胞培養基材としての有用性と温度刺激による細胞はく離能を評価した。HeLa 細胞  $2.0 \times 10^4$  cells/mL, 1 mL を播種後 (37 °C, 24 時間) , 未処理 PTMSDPA 上には, ほとんど HeLa 細胞は接着しないが [Figure 5 (A)] , 表面処理した全ての PTMSDPA フィルム上で HeLa 細胞の接着を確認し, 表面処理により HeLa 細胞の接着性の改善を認めた。また, PTMSDPA/p ( $\theta=10^\circ$ ) [Figure 5 (B)] 及び g-PTMSDPA ( $\theta=53^\circ, 37^\circ\text{C}$ ) [Figure 5 (D)] は, PTMSDPA-PEI ( $\theta=40^\circ$ ) [Figure 5 (C)] よりも接着細胞数が約 1.5 倍であった。PTMSDPA/p は, 水の接触角が  $50^\circ$  以下の超親水性表面であるが, プラズマ処理によりカルボン酸 (-COOH) 及び水酸基 (-OH) が付加した陰性電荷を持つ表面構造になったと考えられる。陰性電荷は, サイトカインの陽性電荷を引き付け細胞の接着促す効果があることから PTMSDPA/p 上に細胞が接着・伸展したと推察している<sup>64),65)</sup>。PTMSDPA は同様な操作で低温プラズマ処理した PET フィルム ( $18.3 \text{ nmol/cm}^2$ )<sup>38)</sup> よりも生成ラジカル量が減少しており PNiPAAm 鎖数も少ないと考えられる。また PTMSDPA 上の HeLa 細胞の接着性改善は PNiPAAm グラフトのみならず, Ar プラズマ照射-大気接触で表面に導入された親水性官能基が寄与していると考えられる。

次に, 温度刺激はく離の評価のため, g-PTMSDPA 上にコンフレントで細胞を接着させる目的で細胞懸濁液濃度を  $2.0 \times 10^5$  cells/mL に増やし, HeLa 細胞を g-PTMSDPA 上に 1 mL 播種後, インキュベータ (37 °C, 24 時間) 中で培養した。培養後, 37 °C では, 機械刺激を与えてもはく離しなかったのに対し [Figure 5 (E)] , 温度刺激 (20 °C, 25 分間) 後では, 接着細胞 ( $3.3 \pm 0.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) の  $28 \pm 0.9\%$  がはく離した ( $n=3, **p<0.01$ ) [Figure 5 (F)] 。温度刺激による細胞はく離は, 基板表面および温度応答性ポリマーのグラフト鎖長などにより接着-はく離性能が変化する<sup>51),71)-73)</sup>。従って, 細胞種に応じた接着-はく離に適した

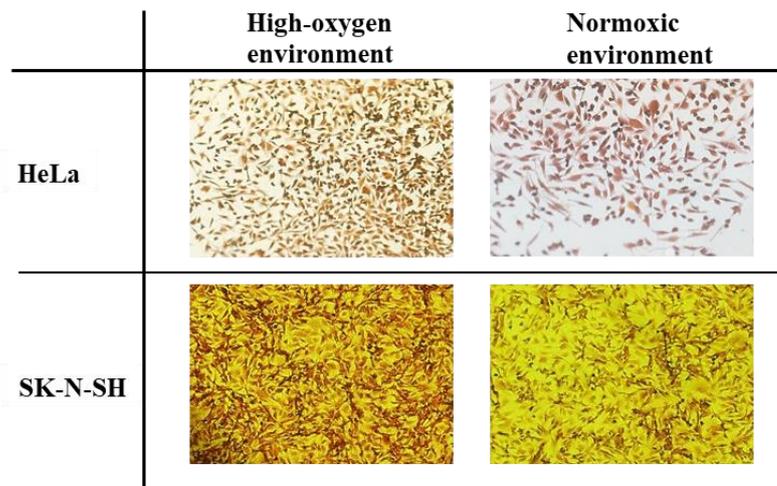
表面性状に最適化するため、温度応答性グラフトポリマーの種類、鎖長などの表面構造の制御が今後必要であると考えられる。



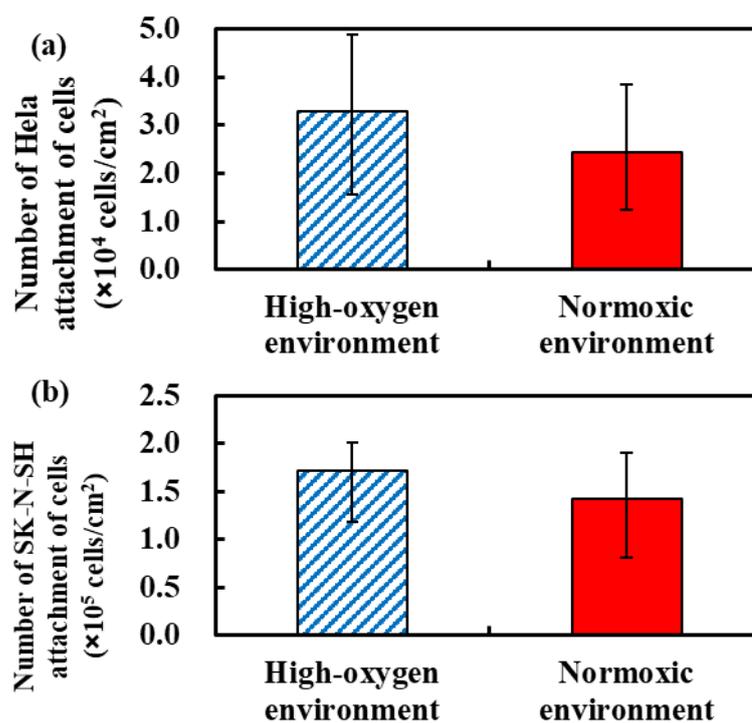
**FIGURE 5** HeLa cells attachment on (A) PTMSDPA, (B) PTMSDPA-plasma, (C) PTMSDPA-PEI, (D) g-PTMSDPA after cultivation in MEM with 10 % FBS for 24 h at 37 °C. The mechanical or / and thermal stimuli-exfoliation of the attached Hela cells on the g-PTMSDPA in MEM with 10 % FBS (E) at 37 °C, (F) at 20 °C (magnification 100 times; CKX31, Olympus Corp., Tokyo, Japan).

### 2.3.3. 酸素供給による細胞増殖への影響

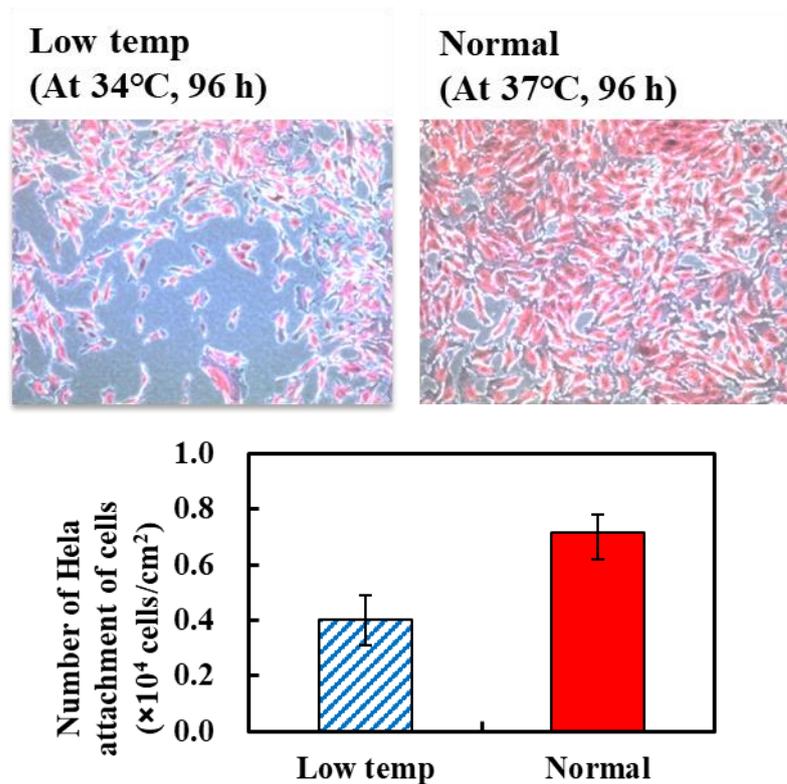
酸素供給による細胞増殖への影響を評価するため、酸素供給装置に g-PTMSDPA を固定化し、酸素供給下で細胞培養した (Figure 6) . 酸素供給培養により HeLa 細胞は、通常培養 (酸素供給無し) と比較して、酸素供給有りは、接着細胞数が約 1.4 倍となった ( $n=3$ ,  $*p<0.05$ ) . さらに, SK-N-SH でも HeLa 細胞と同様の効果が確認され、酸素供給有りは、通常培養と比較して約 1.3 倍に接着細胞数が増加した ( $n=3$ ,  $*p<0.05$ ) (Figure 7) . 低酸素条件下では低酸素誘導因子の発現増加により、増殖因子の発現阻害が報告されている<sup>32), 40)</sup>. また、高酸素条件下でも、細胞密度の上昇によって部分的に低酸素濃度となり細胞死が起こるが、PDMS 上での肝細胞の培養では、細胞が高密度化しても好気呼吸代謝が盛んに行われることが報告されている<sup>30), 31)</sup>. HeLa 細胞および SK-N-SH についても、g-PTMSDPA 上の細胞接着裏面からの酸素供給が、同様な有意な効果を示して、接着細胞数が増加したと推測する. 従って、TCPS 上での培養と異なり g-PTMSDPA 上の酸素供給条件下での培養により、異なる細胞種でも有意な細胞増殖の促進を与えられと考えられる. また低温環境では、細胞の代謝が低下し、細胞の成長、増殖が遅延する<sup>74)</sup>. そこで低温 ( $34^{\circ}\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ ) 環境で HeLa 細胞を g-PTMSDPA 上で 96 時間培養した. 低温環境では、通常の培養温度と比較し細胞接着数が半減し細胞増殖の遅延を確認した ( $n=3$ ,  $**p<0.01$ ) (Figure 8) . さらに酸素供給下で HeLa 細胞を低温環境で培養したところ、酸素供給有無で細胞接着数に差は見られなかった (Figure 9) . ただし低温での酸素供給培養の結果は、データ数不足のため統計分析は未実施である. 低温環境で細胞の代謝が抑制されている状態では、高酸素供給で細胞増殖の向上が期待できない可能性が高い. 生体内では、臓器や器官ごとに酸素濃度、生育環境が異なる<sup>75)</sup>. 従って細胞分化や細胞活動の制御には、細胞種に合わせた適切な酸素供給や培養条件の設定が必要であり、今後のさらなる解明が必要である.



**FIGURE 6** Microscopic observations of HeLa and SK-N-SH cell cultures under high and normoxic oxygen environments using g-PTMSDPA. HeLa cells after cultivation in MEM with 10 % FBS for 24 h at 37 °C. SK-N-SH cells after cultivation in MEM  $\alpha$  with 10 % FBS for 24 h at 37 °C. (magnification 200 times; CKX31, Olympus Corp., Tokyo, Japan)

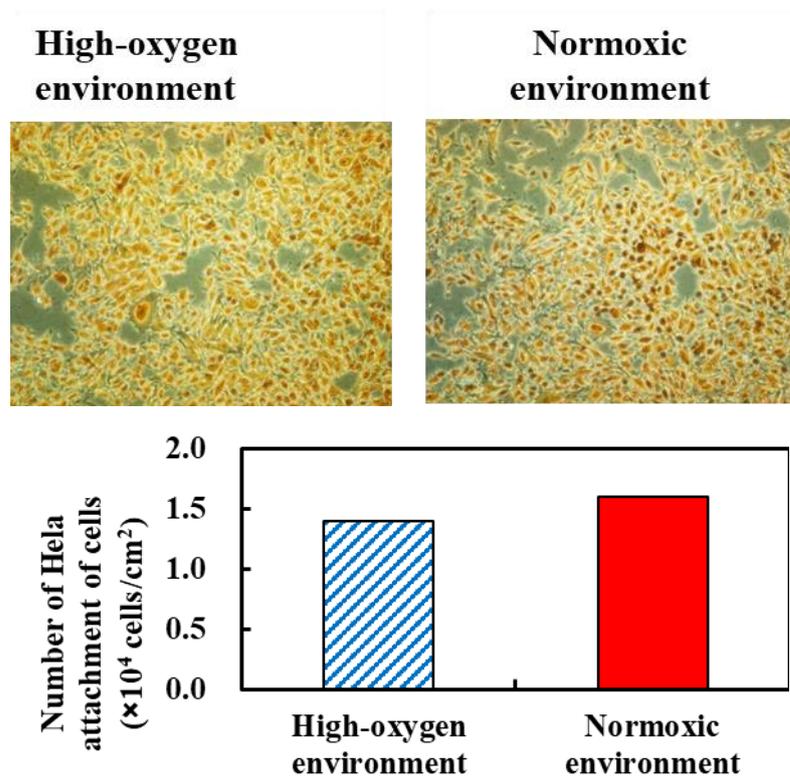


**FIGURE 7** The total number of attached (a) HeLa and (b) SK-N-SH cells on the g-PTMSDPA after cultivation under high or normoxic at 37 °C for 24 h; t-test for “High-oxygen environment” vs. “Normoxic environment” on g-PTMSDPA as counted at attached HeLa [ $t(3) = 3.02, P = 0.047$ ] and SK-N-SH cells [ $t(3) = 3.12, P = 0.045$ ].



**FIGURE 8** Microscopic observations of HeLa cell cultures under normal (at 37 °C) and Low temp (at 34 °C) environments for 96 h using g-PTMSDPA. HeLa cells after cultivation in MEM with 10 % FBS for 96 h at 34 or 37 °C. (magnification 200 times; CKX31, Olympus Corp., Tokyo, Japan).

The total number of attached HeLa cells on the g-PTMSDPA after cultivation Low temp at 34°C or Normal at 37 °C for 96 h; t-test for “Low temp” vs. “Normal” on g-PTMSDPA as counted at attached HeLa [ $t(3) = -4.88, P = 0.008$ ].



**FIGURE 9** Microscopic observations of HeLa cell cultures under high and normoxic oxygen environments using g-PTMSDPA. HeLa cells after cultivation in MEM with 10 % FBS for 24 h at 34 °C. (magnification 200 times; CKX31, Olympus Corp., Tokyo, Japan). The total number of attached HeLa cells on the g-PTMSDPA after cultivation under high and normoxic oxygen environments at 34 °C for 24 h.

## 2.4 結言

PTMSDPA は, PNiPAAm 固定化により細胞接着性を改善でき, 酸素の選択透過能の保持と温度刺激で細胞回収できる培養基板となった. HeLa 細胞および SK-N-SH とともに, g-PTMSDPA 上に接着および増殖し, 裏面からの酸素供給により, 接着細胞数がそれぞれ約 1.3 倍, 1.4 倍に増大する細胞の活動に有意な影響を示す利点があり, 他細胞種にも応用可能な基材であると考えられる. 本章で示した酸素供給システム及び g-PTMSDPA は, 特別な設備なしにインキュベータ中に組み込み可能なサイズで, 簡便な表面処理で細胞の接着性の制御および細胞増殖の向上が可能な細胞培養基材として有用であると考え. 高酸素環境下が与える細胞ストレスの解析, 酸素供給量と細胞増殖性, 温度刺激はく離を改善する PTMSDPA 上に固定化する PNiPAAm などの温度応答性ポリマーの構造最適化について, 現在検討を進めている.

## 総括

超高齢化社会では、慢性疾患や重篤疾患の予防および根本治療が不可欠であり、再生医療の実用化が進められている。再生医療は、患者の社会復帰への貢献、社会保障費・医療費の削減、市場規模が巨大など、社会基盤を支え医療の中核を担う技術に発展すると予想されるが、実用化には再生医療製品の生産性向上が課題である。再生医療製品の生産性向上には、「単一細胞および少数細胞群の選択分離・回収する機能」及び「細胞増殖を促進させ、同時に培養細胞を非侵襲的に回収する機能」を持つバイオデバイスの確立が必要であるが、これらの機能を持たせたデバイスへの応用・開発は十分に確立していない。

本研究では、「選択した接着細胞を局所加温によって、はく離・回収する細胞診断・単一細胞自動回収システム」及び「酸素供給量の制御と非侵襲的細胞回収機能によるハイスループット細胞培養システム」の基幹技術となるバイオマテリアルの開発を温度応答性ポリマーの分子構造の制御または機能性基板材料との複合化により調整を試み、温度応答機能や細胞の接着－はく離、増殖挙動の評価に関する研究を行った。

各章の概要は以下の通りである。

第1章では、選択した接着細胞を局所加温によって、はく離・回収する細胞診断・単一細胞自動回収システムの基幹技術の開発を目的に UCST 型ポリマー Poly(Acrylamide-co-Acrylonitrile) [PAA] を表面開始可逆的連鎖移動重合 (Si-RAFT) でグラフト重合したガラス基板を用いて、加温による細胞の温度刺激はく離を論述した。PAA は、RAFT 重合及び Si-RAFT 重合を用いて、分子量と AN の共重合比率の異なるフリーポリマー (PAA) と最適化した AN 組成比でポリマーブラシ長さの異なる PAA グラフト化ガラス (PAA-g) を調整した。PAA の UCST は、PAA の分子量と AN 組成に応じて変化し、純水中よりもリン

酸緩衝生理食塩水 (PBS) や細胞培養培地 (DMEM) 中では UCST が低下することが分かった。このとき DMEM に含まれるグルコースや血清は, PAA の相転移への影響が小さく, PBS 中での相転移挙動と結果が近似した。静置での水接触角から PAA-g 表面は, 温度が 30 °C から 38 °C に上昇すると親水性に変化した。さらに水中での SPM 測定から PAA-g のポリマーブラシは, 温度が 30 °C から 38 °C に上昇するとポリマーブラシが膨潤し, ポリマーブラシ長さの増加と, 同時に PAA-g 表面全体がより高い粘弾性を示した。また PAA-g 表面の粘弾性は, ポリマーブラシ長さが増加すると温度応答前後の粘弾性の変化が小さくなる傾向を示した。PAA-g に接着したヒト不死化間葉系幹細胞 (hiMSC) は, 温度を 30 °C から 38 °C に上げることで温度刺激によりはく離するが, hiMSC のはく離の程度は, PAA-g のポリマーブラシの長さ及び粘弾性の変化が, はく離率に影響を与えることを示唆した。さらに, ポリマーブラシ長さの違いで細胞の接着形態は異なっていた。また PAA-g1 は, 通常の培養温度 (37 °C) での細胞接着も可能で 20 °C の温度刺激によって細胞はく離を示し, PAA ポリマーブラシ長さ と AN 組成の最適化が hiMSC 細胞の接着挙動の制御に重要であることが分かった。

以上の結果から, 選択した接着細胞を局所加温によって, はく離・回収する細胞診断・単一細胞自動回収システムの基幹技術となる UCST 型ポリマー Poly(Acrylamide-co-Acrylonitrile) [PAA] を細胞足場としたガラス状で温度刺激による hiMSC 細胞の接着—はく離を達成した。さらに PAA の相転移の制御, グラフトポリマー条件と細胞接着—はく離の関係について論述した。

第 2 章では, 酸素供給量の制御と非侵襲的細胞回収機能によるハイスループット細胞培養システムの開発を目的に, 酸素の選択的透過・濃縮機能を持つ poly[1-Phenyl-2-(trimethyl silyl) acetylene] [PTMSDPA] に Poly(N-isopropylacrylamide) [PNiPAAm] をグラフト固定した基

板材料 g-PTMSDPA の開発と酸素供給培養による細胞増殖挙動と温度刺激による細胞はく離について論述した。フィルム状にした PTMSDPA に低温プラズマ照射-ポスト重合法を用いて PNiPAAm を表面開始グラフトし g-PTMSDPA を調整した。g-PTMSDPA は、未処理の PTMSDPA よりも親水表面に変化し、HeLa 細胞とヒト神経芽細胞株 (SK-N-SH) の接着および培養が可能であった。また g-PTMSDPA 表面は、20 °C から 37 °C に温度を上昇させることで疎水表面に変化する温度応答性も認めた。また g-PTMSDPA に接着した HeLa 細胞は、温度を 37 °C から 20 °C に冷却することで接着細胞数の  $28 \pm 0.9\%$  がはく離した。また g-PTMSDPA 上に接着した HeLa 細胞と SK-N-SH は、37 °C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベータ内で基底面から酸素 (供給圧力 0.01 MPa, 流速 20 sccm, 24 時間) を供給して培養した場合、定常培養よりも 1.3~1.4 倍の細胞数となり増殖能の向上を示した。

従って、酸素供給による細胞培養の高速化と温度刺激・はく離の両機能を持った細胞培養基材の調整を達成し、培養基材および酸素供給培養システムとしての有効性を論述した。

各章の結果から、合目的な機能をもつバイオマテリアルを温度応答性ポリマーと機能性材料との複合化に着目した材料設計から創製が可能であることを示した。

PAA-g は、UCST 機能を持つ細胞足場材であることから、細胞診断・回収機能を持つバイオデバイスや細胞治療薬・組織の低温保存・輸送技術への応用展開が期待され、従来の LCST 型温度応答性ポリマーでは実現できないバイオデバイスの開発が可能である。

g-PTMSDPA は、酸素供給量の調節による細胞の代謝系の制御と温度刺激による細胞の回収が可能なデバイスであり、細胞組織の重層化、分化誘導、細胞培養期間の短縮などの効果が期待でき、再生医療製品製造や細胞工学等の細胞の酸素要求性に関する研究への応用展開が期待される。

PAA-g 及び g-PTMSDPA は, 再生医療に求められる細胞移植や細胞工学技術の課題解決に貢献するとともに, 各デバイスを併用することで再生医療製品のハイスループット製造が期待できる. また細胞診断, 細胞保存・輸送技術, 組織培養技術などへの応用が可能であり, 再生医療全体の進展および細胞工学の発展に貢献するバイオマテリアルであると結論付ける.

## 引用文献

- 1) 内閣府, 令和 4 年版高齢社会白書.  
<https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/index-w.html>
- 2) 田中 基嗣, “生体・医療材料の現状と展望”, *Journal of The Society of Materials Science, Japan*, 2019, 68, 8, 656-661.
- 3) 総務省 商務・サービスグループ 生物化学産業課, 再生医療・遺伝子治療の産業化に向けた基盤技術開発事業, 複数課題プログラムの概要, 資料 5, 令和 2 年 3 月 2 日.
- 4) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構委託調査, 2019 年度 再生医療・遺伝子治療の市場調査 最終報告書.  
<https://www.amd.go.jp/content/000062056.pdf>
- 5) 上田 実, “再生医療とインプラント 究極の QOL 向上医療を目指して”, クインテッセンス出版, 2007.
- 6) Hamed Amani, Hamidreza Arzaghi, Mehrdad Bayandori, Amin Shiralizadeh Dezfuli, Hamidreza Pazoki-Toroudi, Abbas Shafiee, Lida Moradi.; *Adv. Mater. Interfaces*, 2019, 6, 13, 1900572.  
([doi.org/10.1002/admi.201900572](https://doi.org/10.1002/admi.201900572))
- 7) Dimitar Tasev, Laura Dekker-Vroling, Michiel van Wijhe, Henk J. Broxterman, Pieter Koolwijk, Victor W. M. van Hinsbergh.; *frontiers in medicine*, 2018, 5, 356.  
([doi.org/10.3389/fmed.2018.00356](https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00356))
- 8) Milica Radisic, Jos Malda, Eric Epping, Wenliang Geng, Robert Langer, Gordana Vunjak-Novakovic.; *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 93, 2, 332-343.  
([doi.org/10.1002/bit.20722](https://doi.org/10.1002/bit.20722))

- 9) Shara M Dellatore, A Sofia Garcia, William M Miller.; *Current Opinion Biotechnology*, 2008, 19, 5, 534-540. ([doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.010](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.010))
- 10) Takeshi Imura, Takashi Otsuka, Yumi Kawahara, Louis Yuge.; *Regenerative Therapy*, 2019, 12, 15, 2-5. ([doi.org/10.1016/j.reth.2019.03.001](https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.03.001))
- 11) 澤 芳樹, “再生医療の最前線”, *医療と社会*, 2018, 28, 1, 93-101.
- 12) Masayuki Yamato, Teruo Okano.; *materials today*, 2004, 7, 5, 42-47.  
([doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00234-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00234-2))
- 13) Yoshikazu Kumashiro, Masayuki Yamato, Teruo Okano.; *Ann Biomed Eng*, 2010, 38, 6.  
(doi: 10.1007/s10439-010-0035-1)
- 14) 五十嵐 友香, 佐藤 陽治, “再生医療・細胞治療の規制および開発の現状と課題”, *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)*, 2018, 151, 254-259.
- 15) John M.Baust, William L.Corwin, Robert VanBuskirk, John G. Baust.; *Biobanking in the 21st Century. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015, 864.  
([doi.org/10.1007/978-3-319-20579-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20579-3_4))
- 16) Cristina Mas-Bargues, Jorge Sanz-Ros, Aurora Roman-Dominguez, Marta Ingles, Lucia Gimeno-Mallench, Marya El Alami, Jose Vina-Almunia, Juan Gambini, jose Vina, Consuelo Borrás.; *International Journal of Molecular Sciences.*, 2019, 20, 5, 1195.  
([doi.org/10.3390/ijms20051195](https://doi.org/10.3390/ijms20051195))
- 17) Linhui Li, Yang Zhu, Bo Li, Changyou Gao.; *Langmuir*, 2008, 24, 23, 13632-13639.  
([doi.org/10.1021/la802556e](https://doi.org/10.1021/la802556e))
- 18) Mattia Sponchioni, Umberto Capasso Palmiero, Davide Moscatelli.; *Materials Science & Engineering C*, 2019, 102, 589-605. ([doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.069](https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.069))

- 19) Hirose Motohiro, Oh Hyeong Kwon, Yamato Masayuki, Kikuchi Akihiko, Okano Teruo.;  
Biomacromolecules, 2000, 1, 3, 377-381. (doi.org/10.1021/bm0002961)
- 20) 今城 明典, 伊藤 大時, 白石 浩平, 近畿大学工学部研究報告, 2014, 48, 19-24.
- 21) 白石 浩平, 山田 康枝, 今城 明典, 伊藤 大時, 農宗 辰己, 近畿大学次世代基盤技術研  
究所報告書, 2014, 5, 49-53.
- 22) Hu Zhang, Xia Tong, Yue Zhao.; Langmuir, 2014, 30, 38, 11433-11441.  
(doi.org/10.1021/la5026334)
- 23) Guoquan Tong, Zhangnian Fang, Gang Huang, Yihan Jing, Shulin Dai, Qing Jiang, Chao Zhang,  
Shi-Ting Feng, Zi-Ping Li.; RSC Advances., 2016, 56, 6, 50534-50542.  
(doi.org/10.1039/c6ra04038a)
- 24) Jun Yang, Shaodong Zhai, Huan Qin, He Yan, Da Xing, Xianglong Hu.; Biomaterials, 2018, 176,  
1. (doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.033)
- 25) Yung Chang, Wetra Yandi, Wen-Yih Chen, Yu-JU Shih, Chang-Chung Yang, Yu Chang, Qing-  
Dong Ling, Akon Higuchi.; Biomacromolecules, 2010, 11, 4, 1101-1110.  
(doi.org/10.1021/bm100093g)
- 26) Jan Seuring, Seema Agarwal.; Macromolecules, 2012, 45, 9, 3910-3918.  
(doi.org/10.1021/ma300355k)
- 27) Randy Z Wu, Steve N Bailey, David M Sabatini.; Trends in Cell Biology, 2002, 12, 10, 485-488.  
(doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02354-1)
- 28) 農宗 辰己, 今城 明典, 白石 浩平, 高分子論文集, 2015, 72, 354.  
(Online-ISSN:1881-5685) (doi.org/10.1295/koron.2014-0099)

- 29) 今城 昭典, 伊藤 大時, 山田 康枝, 白石 浩平, 近畿大学次世代基盤技術研究所報告書, 2015, 6, 55-59.
- 30) 西川 昌輝, 小島 伸彦, 山本 貴富喜, 中島 芳浩, 近江谷 克裕, 藤井 輝夫, 酒井 康行, 生産研究, 2008, 60, 2, 152-159. (doi.org/10.11188/seisankenkyu.60.152)
- 31) 白樫 了, 高野 清, Christophe Provin, 酒井 康行, 藤井 輝夫, 日本機械学会論文集 (B編), 2009, 75, 752, 864-870.
- 32) Morgan M Stanton, Johanna M Rankenberg, Byung-Wook Park, W Grant McGimpsey, Christopher Malcuit, Christopher R Lambert.; *Macromolecular. Bioscience*, 2014, 14, 7, 953-964. (doi.org/10.1002/mabi.201300504)
- 33) Kenji Tsuchihara, Toshio Masuda, Toshinobu Higashimura.; *Macromolecules.*, 1992, 25, 21, 5816-58200. (doi.org/10.1021/ma00047a038)
- 34) Toshio Masuda, Eiji Isobe, Toshinobu Higashimura, Koichi Takada.; *Journal of the American chemical society.*, 1983, 105, 25, 7473-7474. (doi.org/10.1021/ja00363a061) .
- 35) Kazukiyo Nagai, Toshio Masuda, Tsutomu Nakagawa, Benny D. Freeman, Ingo Pinnau.; *Progress in polymer science*, 2001, 26, 5, 721-798. (doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00008-9)
- 36) Graeme Moad, Ezio Rizzardo, San H. Thang.; *Accounts of chemical research.*, 2008, 41, 9, 1133-1142. (doi.org/10.1021/ar800075n)
- 37) Xianying Ren, Motonobu Katoh, Hidetoshi Hoshiya, Akihiro Kurimasa, Toshiaki Inoue, Fumiaki Ayabe, Kotaro Shibata, Junya Toguchida, Mitsuo Oshimura.; *Stem Cells*, 2005, 23, 10, 1608-1616. (doi.org/10.1634/stemcells.2005-0021)

- 38) Kazuo Sugiyama, Kazuya Kato, Masakazu Kido, Kohei Shiraishi, Koji Ohga, Kiyotaka Okada, Osamu Matsuo.; *Macromolecular chemistry and physics*, 1998, 199, 6, 1201-1208.  
(doi.org/10.1002/(SICI)1521-3935(19980601)199:6<1201::AID-MACP1201>3.0.CO;2-6)
- 39) John R. Masters.; *NATURE REVIEWS CANCER*, 2002, 2, 315–319.  
(doi.org/10.1038/nrc775)
- 40) 田中 具治, 広田 喜一, *Anesthesia 21 Century*, 2013, 15, 9.
- 41) Joseph Yang, Masayuki Yamamoto, Kohji Nishida, Takeshi Ohki, Masato Kanzaki, Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano.; *Journal of Controlled Release*, 2006, 116, 2, 193-203.  
(doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.022)
- 42) Masamichi Nakayama, Teruo Okano, Françoise M. Winnik.; *Material Matters*, 2010, 5, 3, 56.
- 43) Maria E. Nash, Deirdre Healy, William M. Carroll, Carlos Elvira, Yury A. Rochev.; *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22, 19386. (doi.org/10.1039/c2jm31748f)
- 44) Lars Ahrlund-Richter, Michele De Luca, Daniel R. Marshak, Megan Munsie, Anna Veiga, Mahendra Rao.; *Cell Stem Cell*, 2009, 4, 1, 20-26. (doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.012)
- 45) Tiago G. Fernandes, Maria Margarida Diogo, Douglas S. Clark, Jonathan S. Dordick, Joaquim M. S. Cabral.; *Trends in Biotechnology*, 2009, 27, 6, 342-349.  
(doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.009)
- 46) Akinori Imajo, Taiji Ito, Tatsuki Nousou, Kohei Shiraishi.; *Kindai-University Research Reports of the Faculty of Engineering*, 2016, 50, 1.
- 47) Sara Freitas-Ribeiro, Rui L Reis, Rogério P Pirraco.; *PNAS Nexus*, 2022, 1, 4, 212.  
(doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac212)

- 48) Hu Zhang, Shengwei Guo, Shangyi Fu, Yue Zhao.; *Polymers*, 2017, 9, 6, 238.  
(doi.org/10.3390/polym9060238)
- 49) Nan Cheng, Andrew A. Brown, Omar Azzaroni, Wilhelm T. S. Huck.; *Macromolecules*, 2008, 41, 17, 6317-6321. (doi.org/10.1021/ma800625y)
- 50) Asad Asadujjaman, Ben Kent, Annabelle Bertin.; *Soft Matter*, 2017, 13, 3, 658-669.  
(doi.org/10.1039/c6sm02262f)
- 51) Beatriz A, Pineda – Contreras, Holger Schmalz, Seema Agarwal.; *Polymer Chemistry*, 2016, 7, 10, 1979-1986. (doi.org/10.1039/c6py00162a)
- 52) Chie Otsuka, Yuko Wakahara, Kohki Okabe, Juri Sakata, Masaki Okuyama, Akinobu Hayashi, Hidetoshi Tokuyama, Seiichi Uchiyama.; *Macromolecule*, 2019, 52, 20, 7646–7660  
(doi.org/10.1021/acs.macromol.9b00880)
- 53) Hironobu Takahashi, Masamichi Nakayama, Masayuki Yamato, Teruo Okano.; *Biomacromolecules*, 2010, 11, 8, 1991–1999. (doi.org/10.1021/bm100342e)
- 54) Fangyao Liu, Jun Seuring, Seema Agarwal.; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2012, 50, 23, 4920-4928. (doi.org/10.1002/pola.26322)
- 55) Marina Baum, William J. Brittain.; *Macromolecules*, 2002, 35, 3, 610-615.  
(doi.org/10.1021/ma0112467)
- 56) Jiyeon Choi, Philipp Schattling, Florian D. Jochum, Jeffrey Pyun, Kookheon Char, Patrick Theato.; *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2012, 50, 19, 4010-4018.  
(doi.org/10.1002/pola.26200)
- 57) Bogdan Zdyrko, Viktor Klep, Igor Luzinov.; *Langmuir*, 2003, 19, 24, 10179-10187.  
(doi.org/10.1021/la034974r)

- 58) Risa Katayama, Musashi Ikeda, Kohei Shiraishi, Akikazu Matsumoto, Chie Kojima.; *Langmuir*, 2019, 35, 37, 12229-12235. ([doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00178](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00178))
- 59) Jun Fujita.; *J. Mol. Microbiol Biotechnol.*, 1999, 1, 2, 243-255.
- 60) Beiyi Chen, F. j. Xu., Ning Fang, K. G. Neoh, E. T. Kang, Wei Ning Chen, Vincent Chan.; *Acta Biomaterialia*, 2008, 4, 2, 218. ([doi.org/10.1016/j.actbio.2007.09.002](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.09.002))
- 61) Yoshikatsu Akiyama, Akihiko Kikuchi, Masayuki Yamato, Teruo Okano.; *Langmuir*, 2004, 20, 13, 5506-5511. ([doi.org/10.1021/la036139f](https://doi.org/10.1021/la036139f))
- 62) Kyle N. Plunkett, Xi Zhu, Jeffrey S. Moore, Deborah E. Leckband.; *Langmuir*, 2006, 22, 9, 4259-4266. ([doi.org/10.1021/la0531502](https://doi.org/10.1021/la0531502))
- 63) Akihiko Kikuchi, Teruo Okano.; *Journal of Controlled Release*, 2005, 101, 1-3, 69-84. ([doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.026](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.026))
- 64) Yasushi Tamada, Yoshito Ikada.; *Polymer Science and Technology.*, 1986, 34, 101. ([doi.org/10.1007/978-1-4613-1809-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1809-5_8))
- 65) 堀 和芳, 石田 等, 並木 陽一, 安池 智一, 東 千秋, *日本急性血液浄化学会雑誌*, 2019, 10, 2, 119-124.
- 66) Teruo Okano, Noriko Yamada, Minako Okuhara, Hideaki Sakai, Yasuhisa Sakurai.; *Biomaterials*, 16, 4, 297-303, 1995. ([doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)93257-E](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)93257-E))
- 67) 永井 一清, “*気体分離膜・透過膜・バリア膜の最新技術*”, シーエムシー出版, 2007.
- 68) 眞田 耕大, 阪口 壽一, 橋本 保, *高分子論文集*, 2011, 68, 4, 182-189. ([doi.org/10.1295/koron.68.182](https://doi.org/10.1295/koron.68.182))
- 69) 辻田 義治, *表面技術*, 2010, 61, 10, 675. ([doi.org/10.4139/sfj.61.675](https://doi.org/10.4139/sfj.61.675))

- 70) Kisuk Yang, Sewoon Han, Yoojin Shin, Eunkyung Ko, Jin Kim, Kook In Park, Seok Chung, Seung-Woo Cho.; *Biomaterials*, 2013, 34, 28, 6607-6614.  
(doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.067)
- 71) 白石 浩平, 大段 恵, 前田 和磨, 杉山 一男, 鈴木 克之, 細谷 浩史, 高分子論文集, 2006, 63, 9. (doi.org/10.1295/koron.63.613) .
- 72) 原口 裕次, 清水 達也, 大和 雅之, 菊池 明彦, 岡野 光夫, 日本再生歯科医学学会誌, 2004, 2, 2, 83-92. (doi.org/10.11223/jard.2.83)
- 73) 白石 浩平, 繁定 哲行, 山本 和彦, 杉山 一男, 高分子論文, 2008, 65, 2, 132-139.  
(doi.org/10.1295/koron.65.132) .
- 74) Anne Roobol, Martin J Carden, Ray J Newsam, C. Mark Smales.; *FEBS Journal*, 2009, 276, 1, 286-302. (doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06781.x)
- 75) M Christiane Brahim-Horn, Jacques Pouysségur.; *FEBS Lett.* 2007, 581, 19, 3582-91.  
(doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.018)

## 謝辞

本学位論文をまとめるに当たり、多くのご指導ご鞭撻を賜りました、主査の近畿大学大学院システム工学研究科 芦田 利文教授、副主査の関西大学化学生命工学部 副学部長 平野 義明教授、副査の近畿大学医学部 岡田 清孝教授に感謝の意を表します。

細胞実験に当たり、また適切なお助言を賜りました、鳥取大学名誉教授の押村光雄 名誉教授、近畿大学大学院システム工学研究科 山田康枝教授、近畿大学工学部教育推進センター 小河智弘講師に感謝の意を表します。

学位の取得に快く送り出して下さり、多大な支援を下さいましたサンユレック株式会社 永井孝一郎 代表取締役社長、開発部 石井健治 部長を始めとする皆様、そして学業に多忙な私を支えてくれた祖父母、両親、家族に感謝いたします。

最後になりましたが、本研究全体に当たり、終始に渡り多大なご指導ご鞭撻を賜りました、近畿大学大学院システム工学研究科 白石 浩平教授に感謝の意を表します。