

プラズマ照射ーポスト重合法でUCST型スルホベタイン系ポリマーを 表面修飾したPETフィルムの調製

今城 明典・伊藤 大時・白石 浩平

Preparation of UCST types of thermoresponsive sulfobetaine polymer modified poly(ethylene terephthalate) films by Ar plasma-post polymerization method

Akinori IMAJO^{*2}, Taiji ITO^{*2}, and Kohei SHIRAISHI^{*1, *2, *3}

Abstract

For high-throughput cell-diagnosis and non-invasive target cell recovery by heating laser-irradiation to microarray(μA y) spots using immobilized with single cell or several number of cells, the surface-modified poly(ethylene terephthalate) films [PET] substrate with poly{2-[(methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide} [poly(SBMA)] of upper critical solution temperature(UCST) polymer was prepared by Ar plasma-post polymerization method. From the scanning probe microscopy (SPM) measurements, poly(SBMA) brushes were observed on the PET substrate(g-PET). From the contact angle(θ) measurements to water at 26°C, the θ values of g-PET(amount of grafted polymer=0.018 mg cm⁻²) decreased from $\theta=75^\circ$ (the untreated PET) to $\theta=49^\circ$. On the other hand, the θ values at 40°C, the θ values of g-PET decreased from $\theta=49^\circ$ to $\theta=46^\circ$. The number average molecular weight (Mn) of g-PET was Mn=0.13x10⁴.

Key Words ; 2-[(Methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide/

Upper critical solution temperature (UCST)/ Ar plasma-post polymerization/ Poly(ethylene terephthalate) film

1. 緒言

細胞工学の発展は著しくなかでも細胞を利用した再生

医療は、先天的、又は事故や疾患によって後天的に失われた組織や器官を再生する医療として、注目を集め、研究が

*1 近畿大学工学部化学生命工学科

*2 同大学院システム工学研究科

*3 同次世代基盤技術研究所

*1 Department of Biotechnology and Chemistry,
Faculty of Engineering, Kinki University

*2 Graduate School of Systems Engineering, Kinki
University

*3 Research Institute of Fundamental Technology
For Next Generation

活発化するなか、産業面における将来的な発展も見込まれている⁽¹⁾。日本に於いては、現在は、人工多能性幹細胞(iPS細胞:induced pluripotent stem cell)をはじめ幹細胞等の再生医療等への応用は国を挙げた取り組みとして、安全性確保や培養技術の高効率化等の技術開発が勢力的に進められている。一例として、間葉系幹細胞(MSC)は、筋芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞等に分化可能な幹細胞であり、心筋、骨格筋、骨、軟骨、血管の再構築等の再生医療への応用が世界的にも期待されている。しかしながら、再生医療に供される多能性幹細胞は安全で純度が高く無キズな細胞であることが要求されるが、胚性幹細胞(ES細胞:embryonic stem cell)等、分化組織に残された未分化幹細胞を採取・培養する過程で、細胞の分化が進行し、破損障害を生じた細胞が混在する等の重大な問題がある⁽²⁾。これらの重大な問題を解決することが医療・バイオ分野の発展に必要不可欠である。一方、細胞の診断及び選択的な回収装置として知られる、従来のフローセルアナライザーやフローセルソーターは、研究室向けでも大型装置であり高価である。加えて、前処理操作等を含めて煩雑であるとされ、高精度で細胞を回収するためには熟練した技術者が必要とされる等、バイオ医療支援機器として普及するには多くの課題が残っている。従って、分化能が高く安全で良質な細胞を選別し、安価で扱いやすいツールが求められている。

細胞診断を多検体同時に、かつハイスループットに行なえるツールの1つとして細胞マイクロアレイ(μ Ay)が注目されている^{(3),(4)}。特に、 μ Ay上へ細胞を等間隔に配置する手法は、機能解析のためのツールとして注目されており、創薬のための薬剤スクリーニング⁽⁵⁾⁻⁽⁷⁾、医薬品や化学物質などの有用性や安全性の評価⁽⁸⁾⁻⁽¹⁰⁾、細胞の分化誘導因子や遺伝子群のスクリーニング⁽¹¹⁾⁻⁽¹³⁾など μ Ayの可能性は大きい。また、細胞機能の診断では、従来までは多くの細胞から一括で得ていた情報を、1個あるいは数個の限られた細胞毎に得られる。細胞接着面と非接着面を定率的に配列した μ Ayは細胞の精密な診断ツールとしての機能を有していると考えられる。著者らは、凹部を細胞接着面のガラススポット、凸部を細胞非接着面の金素材とした μ Ayを用い

て、個細胞の診断及び非侵襲的かつ選択的に回収し得る技術の開発を行なっている^{(14),(15)}。このとき非侵襲的な細胞回収機能を与えるため、下限臨界共溶温度(LCST)型温度応答性ポリマーは、溶液中の温度変化で親・疎水性が、相転移温度を境に低温(親水性)⇔高温(疎水性)と可逆的に変化する。LCST型ポリマーを表面に固定化した素材は、接着細胞の培養温度を低下させ非侵襲的に細胞回収する方法として実用化されており^{(16),(17)}、 μ Ayを用いた細胞の選択的な回収への応用を進めている。一方、LCST型ポリマー固定化 μ Ay上での選択的な回収では、 μ Ayスポットの局所を冷却するか、レーザー光で不用細胞を予め除去したのち、 μ Ay全体を冷却して目的細胞を回収する方法を開発している⁽¹⁷⁾。しかし、LCST型ポリマー固定化 μ Ayでは目的細胞が極少数の場合に応用がしにくい。本報では、LCST型ポリマーと逆の高温で親水性を示し低温で疎水性を示す上限臨界共溶温度(UCST)型温度応答性ポリマー^{(18),(19)}を用い、 μ Ayスポットに固定化して、高精度な位置決めCWレーザー光照射による局所加温による選択的な回収技術の基礎的な知見を得ることを目的とし、poly(ethylene terephthalate) [PET]フィルムにUCST型ポリマーをArプラズマ照射・ポスト重合法による固定化を試みた。ここでは、生体適合性材料および生体物質の接着抑制効果を示す素材⁽²⁰⁾で接着細胞へのダメージの軽減と接着性制御が容易と考えられる両性イオン構造 poly{2-[(methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide} [poly(SBMA)]をUCST型ポリマー⁽²¹⁾として選択し、poly(SBMA)固定化PET(g-PET)の調製を試み、細胞培養・はく離基材としての性能を評価した。

2. 実験

2.1 試薬

2-[(methacryloyloxy)ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide (SBMA) (Sigma-ALDRICH 製)はそのまま使用した。エタノール等の溶媒類は、常法に従って精製した。n-butyl methacrylate (BMA) (和光純薬(株)製)は[60°C/30 mmHg]で減圧蒸留して用いた。ポリエチレンテレフタレートフィルム [PET]はダイアホイル S100

#50 (PET ; 厚さ \approx 50 μm : 三菱化学ポリエステルフィルム(株)製)を、 $\phi=12$ mm としてエタノール洗浄した後、真空乾燥して用いた。純水は MILLIPORE 製 MILL-Q Synthesis A10 超純水製造装置を用いて精製して使用した。Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO 製)、牛胎児血清 (FCS) (GIBCO 製)は常法に従って調整して用いた。非必須アミノ酸 (NEAA)はそのまま用いた。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (pH7.4)は常法に従って調整して用いた。0.25%Trypsin は常法に従って調整して用いた。滅菌水は純水をオートクレーブ滅菌して用いた。

2.2 poly(SBMA) グラフト化 [poly(SBMA)-g-PET] と SBMA/BMA 共重合体グラフト化 PET [poly(SBMA-co-BMA)-g-PET] の調製

プラズマ照射は既報^{(22),(23)}に従って行った。セパラブルフラスコの底に PET フィルム($\phi 12$ mm, 厚さ \approx 50 μm)を置いた。Ar プラズマ照射条件は Ar の流量を 10 sccm, 圧力を 0.1 Pa, 出力 20 W, プラズマ照射時間を 120 sec とした。Ar プラズマ処理後、約 1 min 空気中に暴露した。その後、セプタムキャップ付きのガラス製スクリュー管に SBMA 0.528 g (0.945 M), 純水とエタノールをそれぞれ 0.674 mL, 1.326 mL の混合溶液 2 mL に調製し, Ar プラズマ処理した PET フィルムを入れた。液体窒素浴で凍結-脱気-窒素置換を 3 回繰り返した後、80°C で 20 h 重合した。反応終了後、純水に浸し、80°C の恒温槽で 30 min 振とう洗浄した後、30 min 超音波洗浄を行い、真空乾燥し、poly(SBMA)-g-PET (g-PET-1)を得た。上記と同様の手法を用い BMA との共重合体 PET も調製した。ここに SBMA に対し、BMA を SBMA:BMA=99:1 のモル比に調整し、poly(SBMA-co-BMA)-g-PET (g-PET-2)を得た。PET フィルム上のグラフト量はポスト重合後のフィルム重量の増加をメトラー・トレド製精密天秤 TG50 MT5 によって計量して求めた。グラフトポリマーの数平均分子量 (M_n)は既報⁽²⁴⁾で報告しているプラズマ照射後の PET 表面のフリーラジカル量とポスト重合後の g-PET のグラフトポリマー量から見積もった。

2.3 g-PET 表面のキャラクタリゼーション

水に対する接触角は温度調節ステージ付きの Erma 光学社製ゴニオメーター式接触角測定機 G-1 型を用いて測定した⁽²²⁾。このとき、熱電対をステージ上に接触させ表面温度を計測しながら $\pm 0.1^\circ\text{C}$ で温度調節した。ステージ温度を 26°C とした後、基板上に 1 μL の水滴を置いた。1 min 以内に水滴の左右の接触角を測定した。測定は計 5 回のうち、最大値および最小値を除いた平均を接触角とした。また測定温度を 40°C に上昇させ同様の操作を行い、接触角の測定を行った。また、走査型プローブ顕微鏡 (SPM) の測定は Shimadzu 製 SPM-9500J3 型 (カンチレバーに Innovation Solutions Bulgaria Ltd. 製 Budget sensors Tap300AI-G) を用い、大気雰囲気中で、走査範囲 : 30 $\mu\text{m} \times 30$ μm , 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。

2.4 g-PET フィルム上での HeLa 細胞の接着と増殖

g-PET は光学フィルム固定用透明両面テープ HJ-3160W (日東電工(株))をグラフト面の裏面に貼り付け、g-PET を 4 ウェルのマルチディッシュ (ウェルサイズ $\phi 15$ mm : PS (Nunc)) に固定化した。クリーンベンチ中で固定した g-PET 表面をオートクレーブ滅菌済の滅菌水にて 800 μL で 3 回洗浄し、70% エタノール 800 μL で 1 回洗浄した。その後、クリーンベンチ中の UV 滅菌灯下約 30 cm の距離にマルチディッシュの蓋を開けて静置、g-PET 表面を 1 h UV 照射して滅菌した。滅菌後、PBS 800 μL で 2 回洗浄を行った。HeLa 細胞を 10% FCS, 1% NEAA 含有 MEM 培地で培養した。その後、HeLa 細胞は 1 mL の Trypsin 溶液 (2.5 mg mL^{-1}) を添加してはく離した。HeLa 細胞は浮遊細胞濃度を (3.0 $\times 10^4$ cells mL^{-1}) に調製後、800 μL を上記 g-PET を固定化したウェル上加え、インキュベーター (APC-50D : アステック) 5% 二酸化炭素雰囲気下 30°C, 24 h 培養した。

Table 1. Ar plasma-post polymerization of thermoresponsive sulfobetaine polymer onto PET.

RUN	SBMA	BMA	Amount of grafted copolymer mg cm ⁻²	Contact angle(θ)		Mn of grafted copolymer
	g(mmol)	g(mmol)		(degree)		Mn $\times 10^4$
			26°C 40°C			
PET	—————	—————	—————	75	75	—————
g-PET-1	0.528(1.89)	—————	0.018	49	46	0.13
g-PET-2	0.528(1.89)	0.00271(0.0191)	0.022	29	27	0.16

2.5 HeLa 細胞の温度刺激はく離

2.4 節に従って HeLa 細胞を培養後, g-PET 上に接着をしていない HeLa 細胞を除去するため, PBS を用いて非接着細胞を 1 回洗浄した後, 倒立型リサーチ顕微鏡(IX71 : OLYMPUS)で観察し, 顕微鏡デジタルカメラ(DP72-B SW)を用いて撮影した. その後, 温度刺激によるはく離を行うため, 予め, 温度を 37°C に設定しておいたサーモプレート(FTP-28190 : AZ ONE)に g-PET を固定しているマルチディッシュを 2 h 静置した. 静置後, 800 μ L の PBS を用い, 3 回洗浄してはく離細胞を除去し, PET 上に残存する接着細胞数を倒立型リサーチ顕微鏡(IX71 : OLYMPUS)で観察し, 顕微鏡デジタルカメラ(DP72-BSW)を用いて撮影した. 細胞数の計測は, 倒立型リサーチ顕微鏡(IX71 : OLYMPUS)の観察から見積もった. 細胞は異なる 5 箇所顕微鏡視野をデジタル画像として保存後, 細胞数を計測した. その平均値を接着細胞数とした. 一方, 加温によるはく離操作後, 上澄みを取り除き, 残存する接着細胞数を同様に計算した. はく離率(%)は接着細胞数との差から算出した.

3. 結果と考察

3.1 poly(SBMA) と poly(SBMA-co-BMA) グラフト

PET(g-PET)の調製と表面キャラクタリゼーション
細胞培養およびはく離基材としての応用さらには CW レーザー照射機を用いた局所的な加温による細胞の選択的なはく離・回収を目的とし, UCST を示す poly(SBMA) および poly(SBMA-co-BMA)-g-PET の調製を Ar プラズマ照射-ポスト重合法により試みた. PET フィルムにグラフトしたポリマーの平均鎖長を知るため, 既報で報告されて

いるプラズマ照射後の PET 表面上のフリーラジカル量を用いて, ポスト重合後の g-PET のグラフトポリマー量から PET 表面の数平均分子量(Mn)を見積もった(Table 1). 既に単位面積(cm²)当たりの PET 表面の表面活性種量は 1.38 $\times 10^5$ mmol cm⁻²と報告している, そこから PET フィルム表面にグラフトしたポリマー量の数値から算出した Mn は g-PET-1 では 0.13 $\times 10^4$, g-PET-2 では 0.16 $\times 10^4$ と見積もられた. PET 表面上の poly(SBMA)と poly(SBMA-co-BMA)の修飾を確認するため, 大気雰囲気下での表面での SPM 測定(30 μ m \times 30 μ m)の結果を Fig.1 に示す. 未処理 PET では凹凸が無くフラットであることにに対し, poly(SBMA)と poly(SBMA-co-BMA)をグラフト重合した g-PET ではそれぞれ, これらにポリマー由来と考えられるナノスケールでのブラシ状の凹凸が表面上に観察された. 次に, g-PET の水に対する接触角(θ)を測定した結果, ステージ温度 26°C では未処理 PET の $\theta=75^\circ$ に対して poly(SBMA)を修飾した g-PET-1 では $\theta=49^\circ$ となり poly(SBMA)固定化により θ が減少し, g-PET 表面が親水性に変化したことを認めた. また, BMA を共重合した g-PET-2 は同様に $\theta=29^\circ$ となった. θ は g-PET-1 より g-PET-2 が減少した. これは, SPM 画像や数平均分子量からも g-PET-2 の方が g-PET-1 よりもポリマー密度また分子量が大きく, g-PET 表面上の濡れ性が向上したことが原因であると考えられる. 一方, ステージ温度を 40°C に上げ測定した未処理 PET の θ は変化しないのに対し, g-PET-1 では $\theta=46^\circ$, g-PET-2 では $\theta=27^\circ$ と温度上昇によって, 表面の濡れ性が増して親水性へと変化した. これは, PET 表面にグラフトした poly(SBMA)及び poly(SBMA-co-BMA)の UCST 以上となり, それぞれのポリマー鎖がグロビュール状からランダ

ムコイル状へと相転移し、表面の濡れ性が疎水から親水性へと変化したためと考えられる。g-PET-1 と g-PET-2 との表面性状の違いは、BMA の共重合によって、グラフトポリマー鎖長、密度、さらには組成が変化したためと考えられるが、詳細は現在検討中である。

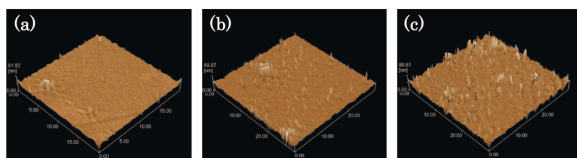


Fig.1 SPM images of various PET: (a)Untreated, (b)g-PET-1, and (c)g-PET-2.

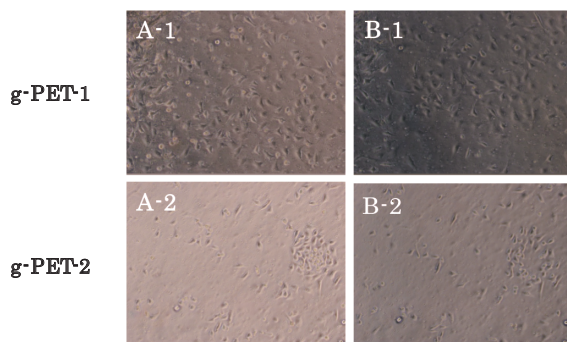


Fig.2 Phase-contrast microscope observation of HeLa cells attached PET: (A)30°C and (B)37°C.

3.2 g-PET 表面での細胞培養と温度刺激によるはく離

3.1 節で温度刺激により親・疎水性が変化し、SPM 測定により表面性状の変化を認めた g-PET 上の細胞培養ならびに加温によるはく離性能を知るため、調製した g-PET 表面での HeLa 細胞を用いた細胞培養と加温による温度刺激はく離を検討した。4 ウェルの培養シャーレに直径 12 mm の g-PET をウェル上に透明両面テープで貼り付けた。UV 滅菌後、 3.0×10^4 cells mL⁻¹ の HeLa 細胞を播種後、24 h 経過後の位相差顕微鏡写真を Fig.2 に示す。図から 30°C で HeLa 細胞は g-PET-1, 2 いずれも接着・伸展し増殖可能であった。培養後、PBS(25°C)洗浄を 1 回行い、基板への未接着の細胞を取り除き、37°C のホットプレート上に g-PET を接着固定している 4 ウェルマルチディッシュを

移し、2 h 静置した。次に、PBS(25°C)で 3 回洗浄し、はく離を行った。加温による HeLa 細胞のはく離率を残留する接着細胞数から見積もったはく離細胞数の割合は、g-PET-1 ははく離率約 16%で、g-PET-2 のはく離率は~0%であり、ほとんどはく離しなかった。g-PET-1 の UCST を示す poly(SBMA)グラフト鎖の固定化と部分的なはく離を確認したが、g-PET-2 では UCST 以下の温度で接着した HeLa 細胞を UCST 以上に加温することによりはく離する効果を認めることはできなかった。poly(SBMA)固定化 PET よりも poly(SBMA-co-BMA)固定化 PET のはく離率は低下したことから、両性イオン型 SBMA 鎖の示す UCST はポリマー鎖の性質に加えて、媒体の塩等に大きく影響を受けると考えられる。さらに、温度応答性ポリマー鎖固定化表面はポリマー鎖の密度や分子量に大きく影響を受けることから⁽²⁴⁾、細胞接着及びはく離に最適な性状に固定化ポリマー鎖を調整する必要があると考えられる。また、g-PET-2 では g-PET-1 よりもはく離率が低く、共重合した BMA セグメントによる疎水性の影響等も考えられ、UCST 温度のみならず固定化時の表面の親・疎水性についても検討する必要があると考えられる。現在、ノニオン型の acrylamide と acrylonitrile の共重合体である UCST 型ポリマーを使用した基板を作製し、同様の実験を行い、比較検討を行っている。

4. 結言

SPM 測定および、水の接触角の測定結果により、Ar プラズマ照射-ポスト重合法によって PET 表面に poly(SBMA)あるいは poly(SBMA-co-BMA)の固定化を認めた。g-PET のフリーラジカル量からそれぞれの g-PET の数平均分子量(Mn)を見積った。poly(SBMA)あるいは poly(SBMA-co-BMA)を固定化した PET は 26°C から 40°C への加温により接触角が低下し、表面が疎水性から親水性に変化する UCST 性を示した。HeLa 細胞を用いた接着・はく離試験では、poly(SBMA)または poly(SBMA-co-BMA)修飾 PET 基板は、30°C では PET 表面に接着・増殖した。poly(SBMA)固定化 PET は 37°C へ温度を上昇することによる基板上的細胞のはく離は部分的であった。

以上の結果から、UCSTを示すポリマーの固定化が可能であったが、細胞を用いたはく離また、温度応答性を向上させるためには、g-PETの固定化ポリマーの鎖長、密度、組成等のさらなる最適化が必要である。

これらの加温によるはく離性能の確立によって、UCST型ポリマー固定化基板とCWレーザー照射機を用いたシステムによって目的細胞の選択的なはく離・回収ツールの作製に応用ができると考えられる。

5. 参考文献

- (1)R. Deutsch, E. Guldborg, *J. Mater. Chem.*, **20**, (2010), 8942-8951
- (2)山中伸弥, “iPS細胞の産業的応用技術”, シーエムシー出版, 2009
- (3)斉藤通紀ら, 遺伝子医学MOOK, **10**, (2008),62-71.
- (4)伊藤嘉浩, “マイクロアレイ・バイオチップの最新技術”, シーエムシー出版, 2007.
- (5)Wu.F.J *et al.*, *Biotechnol.Bioeng.*, **50**, (1995), 404.
- (6)Bailey, S. N *et al.*, *Drug Discovery Today*, **7(18)**, (2002), 113.
- (7)Bailey, S. N *et al.*, *PNAS*, **101**, (2004), 16144.
- (8)Maria Jose G. L. *et al.*, *Chemico-Biological Interactions*, **168**, (2007), 30.
- (9)R. Roguet *et al.*, *ATLA*, **27**, (1999), 333.
- (10)K. Schlotmann *et al.*, *International Journal of Cosmetic Science*, **23**, (2001), 309.
- (11)J. Ziauddin *et al.*, *Nature Biotechnology*, **411**, (2001), 107.
- (12)T. Yoshikawa *et al.*, *Journal of Controlled Release*, **96**, (2004), 227.
- (13)E. Uchimura *et al.*, *Cytometry Research*,**14**, (2004), **39**.
- (14)古屋智子ら, 「セルアレイシステムの開発と応用」, Bioベンチャー, **7-8**, (2004), 14.
- (15)K. Shiraishi *et al.*, *J. Photo.Polym. Sci. & Tech.*, **24(4)**, (2011), 447.
- (16)白石浩平ら, 近畿大学工学部研究報告, **47**, (2013), 7.
- (17)T. Okano *et al.*, *Biomaterials*, **21**, (2000), 981.
- (18)大西徳幸ら, *Polym. Prepr. Jpn.* **47**, (1998), 2359.
- (19)J. Seuring *et al.*, *Macromol. Rapid Commun.* **33**, (2012),1898.
- (20)Ai T. Nguyen *et al.*,*Langmuir*; **28**, (2012), 604.
- (21)Yu-Ju Shih *et al.*,*Langmuir*; **26**, (2010), 17286.
- (22)K. Sugiyama *et al.*, *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, (1998), 1201
- (23)K. Sugiyama *et al.*, *Macromol. Mater. Eng.*, **282**, (2000), 5
- (24)杉山一男ら, 高分子論文集, **63(9)**, 2006, 613-620