

氏名	り れいお 李 黎夫
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	富生命博甲第 85 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 31 日
専攻名	先端ナノ・バイオ科学専攻
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条 3 項該当
学位論文題目	Micro-fabrication by Different Approaches of Irradiation on Biocompatible Polymer-modified Surfaces (生体適合性高分子による表面改質および微細加工に関 する研究)
論文審査委員	
(主査)	教授 遠田 浩司 教授 樋口 弘行 准教授 阿部 肇
指導教員	教授 遠田 浩司

学位論文内容要旨

その一

(ふりがな)	り れいお	◎男・女
氏 名	李 黎夫	

Micro-fabrication by Different Approaches of Irradiation on Biocompatible Polymer-modified Surfaces

In this thesis, the author showed that various functions (high hydrophilicity, and suppression ability of protein adsorption and cell adhesion) required as medical materials can be introduced into the surface of solid material by the surface modification with the biocompatible polymers (poly[2-deoxy-2-*N*-(2-methacryloyloxyethyl)aminocarbonyl *D*-glucose] (PGUMA) or poly[1-carboxy-*N,N*-dimethyl-*N*-(2-methacryloyloxyethyl)methanaminium hydroxide inner salt] (PCMB)). Further, by combining these surfaces with the technology of surface micro-fabrication by the irradiation of ultraviolet (UV) or ion beam (IB), the construction of the specific patterning/gradation of biological substance like proteins and cells could be pursued.

In **Chapter 2**, a polymer brush with pendent PGUMA was obtained by surface-initiated reversible addition-fragmentation chain transfer (SI-RAFT) polymerization of GUMA on the substrate. The bicinchoninic acid method indicated that the PGUMA brush was significantly resistant against non-specific adsorption of bovine serum albumin (BSA) and lysozyme (egg white). Furthermore, the adhesion of cells was strongly suppressed by the presence of PGUMA brush. Such glucosylurea group-carrying polymer brush prepared here might be quite useful to provide a “bio-inert (anti-biofouling)” surface in bio-medical fields.

Subsequently, IB irradiation was used to prepare a heart-shaped patterning of PGUMA brush surface. By performing the experimental of cell adhesion, a patterning of cells that the irradiated area was covered with cells while no cells attached to other area was observed, and anti-biofouling properties of the PGUMA brush was definitely indicated.

学位論文内容要旨

その二

(ふりがな)

り れいお

氏 名

李 黎夫

⊙男・女

Previously, a similar approach of IB irradiation was also used on the copolymer (poly(CMB-*r*-MPTMS))-modified surface to prepare a heart-shaped patterning of cells, as reported in our research group (3-methacryloxypropyltrimethoxysilane, MPTMS). The reforming and cell patterning of poly(CMB-*r*-MPTMS)-modified surface was easily realized by the IB irradiation, but a problem that IB irradiation is not suitable as a method to reform large area still remained. In contrast, the surface reforming by UV irradiation showed that, although the photomask pattern is necessary for the purpose, it is advantageous in convenience that a large area can be quickly reformed in one shot.

Therefore, the author carried out the UV irradiation at 193 nm (an excimer laser, ArF) to a copolymer layer-modified surface and observed a patterning of the fluorophore-labeled protein in **Chapter 3**. The thin layer composed of random copolymer poly(CMB-*r*-STMS) or poly(CMB-*r*-MPTMS) was easily constructed on a substrate (*p*-trimethoxysilylstyrene, STMS). The copolymer layer was highly resistant against non-specific adsorption of BSA. However, on ArF-UV irradiation at 193 nm, the layer became hydrophobic and BSA was significantly adsorbed on the substrate. Therefore, upon UV irradiation through a photomask, a patterning of the fluorophore-labeled protein with a resolution of about 1 μm could be clearly observed. On the other hand, the poly(CMB-*r*-STMS) layer decomposed more quickly compared with the poly(CMB-*r*-MPTMS) layer at low irradiation dose. Hence, the efficient cleavage of the layer upon UV-irradiation makes poly(CMB-*r*-STMS) highly useful in diverse biomedical applications.

学位論文内容要旨

その三

(ふりがな)

り れいお

氏 名

李 黎夫

⊙・女

In **Chapter 4**, an approach by the UV irradiation at 254 nm was applied on the surface that was covered with a SAM of a 2-bromoisobutyryl end group-carrying initiator for atom transfer radical polymerization (ATRP). When the initiator SAM was irradiated with UV light at 254 nm, the surface density of bromine atoms was reduced by the scission of C-Br bonds as observed by XPS. With the surface-initiated ATRP of the CMB, the surface density of PCMB brushes could be easily varied by changing the irradiation period of UV light prior to the polymerization. Furthermore, by using a UV-cut shutter sliding above the initiator SAM-modified substrate at a constant speed, the degree of bromine atom removal could be linearly varied along the direction of movement of the shutter.

This approach does not require the high-energy light/beams sources such as ArF-excimer laser and focused ion beams: there is a great advantage that normal UV light source is sufficient for the surface fabrication. Consequently, the amount of both proteins adsorbed and cells adhered to the PCMB brush-covered substrate could easily be controlled by the gradation of the surface density of PCMB brushes, which suppressed protein adsorption and cell adhesion. Such a technique is very simple and useful for the regulation of the surface density of adsorbed proteins and adhered cells on an originally bio-inert surface.

Based on the results of **Chapter 4**, the author tried a patterning with two kinds of polymer brush domain on mixed SAM by using the 254 nm-UV, and introduced the binary polymer brush onto solid substrates in **Chapter 5**.

学位論文内容要旨

その四

(ふりがな)

り れいお

氏 名

李 黎夫

⊙男・女

In **Chapter 5**, a mixed SAM of an initiator BPE for ATRP and an RAFT agent EHT for RAFT polymerization was constructed on a surface. Then, the 254 nm-UV was irradiated at the mixed SAM through a photomask to selectively decompose the C-Br bond of BPE. At the surface-initiated ATRP of 2-ethylhexyl methacrylate (EHMA), consequently, the shape and size of PEHMA brush domain could be very easily modulated. Subsequently, surface-initiated RAFT polymerization of CMB monomer, was carried out. Using the sequential polymerization, a patterning of PCMB and PEHMA brush domains on the solid substrate could be very easily pursued. Since the PCMB brush indicated anti-biofouling properties and the PEHMA brush had non-polar properties, the patterning with biocompatible (hydrophilic) domain and adhesive (hydrophobic) domain could be realized. Such a micro-fabrication technique is very simple and useful for the construction of complex surface including different domain of polymer brush.

Thus, this thesis showed the construction of surface having ability suppressing the adhesion of the biological substances, by combining the biocompatible polymers with various surface reforming methods/techniques. Further, it showed that it is possible to construct specific patterning and concentration gradient (gradation) of biological materials such as proteins and cells. These techniques could be very useful for the micro-fabricating patterned surfaces that could be suitable as cell arrays for the screening of novel drugs and the evaluation of cell migration and chemotaxis. Therefore, the author believes that they can contribute to the further development of biomaterial/cell biology/molecular biology in the future.

【博士学位論文審査結果の要旨】

本論文は、医療材料に要求される高い親水性やタンパク質吸着抑制力及び細胞接着抑制力などの様々な機能を、生体適合性高分子による表面修飾により導入できることを示したものである。更に、これらの生体適合性高分子表面に紫外線(UV)やイオンビーム(IB)を用いた微細加工技術を適用することによって、規定したパターンニング/グラデーションでタンパク質や細胞等の生体物質を吸着/接着させることが可能な表面が構築できることを示したものである。

第2章では、GUMA (glucosylureaethyl methacrylate)の界面開始可逆的付加開裂連鎖移動重合法(SI-RAFT)によりペンダントPGUMAポリマーブラシを基板上に構築している。このPGUMAブラシは牛血清アルブミン(BSA)やリゾチームの非特異的な吸着に対して優れた耐性を有していることを実験的に示している。更に、細胞の接着がPGUMAの存在により強く抑制されることを見出し、このようなグルコシルウレア基を有するポリマーブラシが生体医療分野における「生体不活性(耐生物付着性)」な表面を与えるのに極めて有用であることを明らかにしている。続いて、イオンビームを用いてPGUMAブラシ表面にハート型のパターンニングを施し、細胞接着実験を行なった結果、ハート型の細胞接着が観察された。これは、PGUMAブラシの耐生物付着性を明瞭に示すものである。

第3章では、エキシマ(ArF-UV)レーザーによるUV光を共重合体修飾表面に照射し、蛍光タンパク質のパターンニングを行っている。基板上に容易に構築できるランダム共重合体poly(CMB- γ -STMS) (CMB: carboxymethylbetaine, STMS: p-trimethoxysilylstyrene)あるいはpoly(CMB- γ -MPTMS) (MPTMS: 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane)からなる薄層はBSAの非特異的吸着に対して高い耐性を有するが、ArF-UVを照射すると疎水性となりBSAが表面へ強く吸着する。そこでフォトマスクを用いUV照射することにより、約1 μm の分解能で蛍光タンパク質吸着のパターンニングを達成している。更に、poly(CMB- γ -STMS)薄層はpoly(CMB- γ -MPTMS)薄層に比べて弱いUV照射でより迅速に分解することを見出している。このUV照射によるpoly(CMB- γ -STMS)薄層の効率の良い開裂は、多彩な生体医療分野への応用に極めて有用であると述べている。

第4章では、原子移動ラジカル重合(ATRP)の開始剤としての2-bromoisobutyryl末端基(BPE)を有する自己組織化単分子膜(SAM)を構築した基板に254 nmの波長のUV光を照射する微細加工の手法が述べられている。開始剤SAMに254 nmのUV光を照射すると、BPE中のC-Br結合の開裂により臭素原子の表面密度が減少することをXPSで観測している。CMBモノマーの表面開始ATRPにおいて、重合時のUV照射時間を変えることによりPCMBポリマーブラシの表面密度を容易に変化させることに成功している。更に、SAM修飾基板上でUVカットシャッターを一定速度で動かすことにより、臭素原子の除去の度合いがシャッターの動きの方向に沿って直線的に変化することを見出している。この手法はArF-エキシマレーザーやイオンビーム(IB)のような高エネルギーの光源/ビーム源を用いる必要がなく、表面加工に通常のUV光源を用いることができるという点で、大きな利点

がある。得られた結果は、タンパク質や細胞の接着を抑制する PCMB ブラシの表面密度に傾斜をつける(グラデーション)ことによって、タンパク質の吸着量や細胞の接着量を容易に制御できることを示しており、この微細加工の手法は、本来生体不活性な表面のタンパク質吸着や細胞接着の表面密度を制御できる極めて簡単で有用な方法であると結論づけている。

第 5 章では、254 nm の UV 光照射により、固体表面に二成分のパターン化したポリマーブラシを導入する手法が述べられている。まず、ATRP のための BPE 開始剤 SAM と RAFT 重合のための EHT ((((2-methylthio)-carbonothioyl)thio)-2-phenylacetate)ラフト剤 SAM の混合 SAM を基板の上に構築した後、基板をフォトマスクで覆って UV 光を照射し、選択的に BPE 中の C-Br 結合を切断した。次に 2-ethylhexyl methacrylate (EHMA)の表面開始 ATRP 法により、サイズの揃った PRHMA ブラシを構築した後、CMB モノマーを用いて表面開始 RAFT 重合を行った。この連続した重合法により、固体基板上に PCMB ブラシと PHEMA ブラシからなるパターンニングが極めて容易に達成できる。PCMB ブラシは耐生物付着性を示し、PEHMA ブラシは非極性を示すことから、生体適合性(親水性)ドメインと接着性(疎水性)ドメインのパターンニングが達成されている。このような微細加工技術は、異なったドメインを有するポリマーブラシを含んだ複雑な表面を構築するための極めて簡単で有用な手法であると結論づけている。

以上、本論文では、生体適合性高分子と基板表面改質技術によって、生体物質の接着を抑制する能力を持った表面を構築できることを実験的に示している。更に、UV 光照射とフォトマスクという簡便な微細加工技術を用いて、規定されたパターンニングや濃度勾配(グラデーション)でタンパク質や細胞などの生体物質が吸着/接着する表面を構築できることを示している。本論文で述べられている微細加工の手法は、新薬のスクリーニングや細胞移動、細胞走化性評価のための細胞アレイ構築が可能な表面を得るために極めて有用であり、将来の生体材料/細胞生物学/分子生物学のさらなる発展に寄与できるものであることから、博士論文として価値があるものと判断した。

平成 29 年 2 月 15 日午後 4 時 00 分より工学部管理棟中会議室において博士論文公聴会を行なった。口頭発表後、質疑応答が行われた。質問はパターンニングした生体適合性表面の構造や精密重合法の利点、パターン化した生体適合性表面の応用法など多岐にわたってなされたが、申請者は全ての質問に対し適切に回答を行った。以上より、最終試験の結果については、審査員全員一致で合格とした。