

Accounts of Materials & Surface Research

Coating of Polydimethylsiloxane Substrate with Photo-cross-linkable Biocompatible Copolymers

Shin-ichi Yusa*

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, University of Hyogo,
2167 Shosha, Himeji, Hyogo, 671-2280, Japan.
yusa@eng.u-hyogo.ac.jp

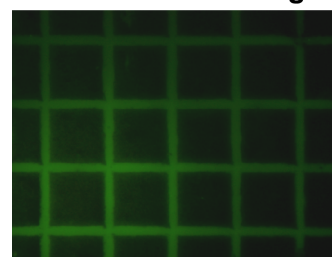
Pendant photo-cross-linkable groups-containing amphiphilic diblock copolymers (PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA)_y) were prepared via controlled radical polymerization using poly(2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine) (PMPC) macro-chain transfer agent. PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA)_y is composed of PMPC block and random copolymer P(TSM/CEA)_y block of 3-(tris(trimethylsilyloxy)silyl)propyl methacrylate (TSM) and 2-cinnamoyloxyethyl acrylate (CEA). Thin film of PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA)_y was formed onto polydimethylsiloxane (PDMS) surface due to physical adsorption of TSM unit and photo-crosslinking of the CEA unit. A lattice pattern of fluorescence-labeled polymers on PDMS surface was prepared upon UV-irradiation through a photomask, which was confirmed by fluorescence microscopy. PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA)_y-coated PDMS shows protein antifouling. Cell patterning can be achieved by culturing on the PMPC patterned PDMS. The diblock copolymer can be applied for coating of the surface of microchannel to avoid adsorption of proteins and cell patterning for control of cell differentiation. It is expected that the micro fluidic channels can be covered with PMPC easily. The polymer solution was flowed in micro fluidic channels made from PDMS, and consequently UV is irradiated to coat the inside wall of the channels, because PDMS surface can be coated by the copolymer upon UV-irradiation.

Keyword: Controlled radical polymerization, Block copolymer, Photo-cross-linking, Polymer film, Patterning

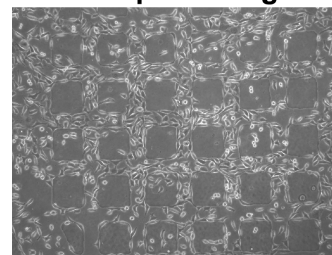
Shin-ichi Yusa is a native of Japan and received B.S. (1993) and M.S. (1995) degrees in polymer chemistry from Osaka University under the direction of Prof. Mikiharu Kamachi and Prof. Yotaro Morishima. He received a Ph.D. from Osaka University (2000) for a thesis entitled: "Synthesis of Cholesterol Bearing Polymers and Their Self-Assembling Properties." He joined Himeji Institute of Technology as an assistant professor in 1997. He became associate professor of University of Hyogo (2008). His research interests are in controlled radical polymerization and characterization of water-soluble polymers. He is currently on Polymer Chemistry Section Editor in Chief of Polymers (MDPI) and Editorial Advisory Board of Langmuir (ACS).



Protein antifouling



Cell patterning



光架橋生体適合性高分子による ポリジメチルシロキサン基材の被覆

遊佐真一

兵庫県立大学大学院工学研究科応用化学専攻

1. はじめに

ポリジメチルシロキサン (PDMS) は柔軟性、加工性、機械的特性、ガス透過性、透明性に優れ、細胞毒性が低いことから、カテーテル、マイクロ流路、コンタクトレンズなど、様々な医療関連分野に応用されている。¹ 医療や生体分析分野用デバイスの材料に PDMS を用いた場合、タンパク質の吸着による機能低下が問題となる。マイクロリアクターは微小空間を利用した装置で、通常スケールでは制御できなかった反応や分析が可能となる。² しかしマイクロリアクター流路に PDMS を用いた場合、³ 流路壁面へのタンパク質付着は、反応や分析を阻害する。PDMS のマイクロ流路表面へのタンパク質吸着を抑制するには、流路表面に PEG をグラフトするなどの処理が必要となる。⁴

近年、細胞を培養する「場」が重要と認識され、細胞が成長する環境が、細胞の分化・成長に重要であることが報告されている。⁵⁻⁷ 基板上的選択的な場のみで、細胞を培養すると細胞をパターンニングできる。この細胞パターンニングにより、細胞の集合体である組織の形状を制御できるため、再生医療における組織形成・再生・維持などのバイオメディカル分野で有用だと期待さ

れる。

細胞膜を形成するリン脂質の親水性部位と同じ化学構造のホスホリルコリン基を側鎖結合したポリ((2-メタクリロイル)オキシエチルホスホリルコリン) (PMPC) は、^{8,9} 高い生体適合性および血液適合性を示す。基材の表面に PMPC を被覆すると、タンパク質の吸着抑制、高い濡れ性、低い摩耗性などの機能を付与できるため、人工心臓および人工血管等の医療分野に利用されている。¹⁰⁻¹²

従来の基材表面の被覆法として、グラフト法がよく利用されている。PDMS をプラズマで処理してから、加熱することで PDMS の表面に PEG をグラフト重合する方法が報告されている。¹³ また、PDMS 表面をプラズマ処理してから、ベンゾフェノン塗布して、紫外 (UV) 光照射による光開始重合で(2-メタクリロイル)オキシエチルホスホリルコリン (MPC) をグラフトする方法が知られている。¹⁴ これまでのグラフト法は操作が煩雑で、手間と時間がかかる。またプラズマ処理法は表面を親水性にするため、幅広く用いられているが、パターン形成は困難であり、短時間で疎水性に戻ってしまう。¹⁵⁻¹⁷

本研究では PMPC ブロックと、3-(トリス(トリメ

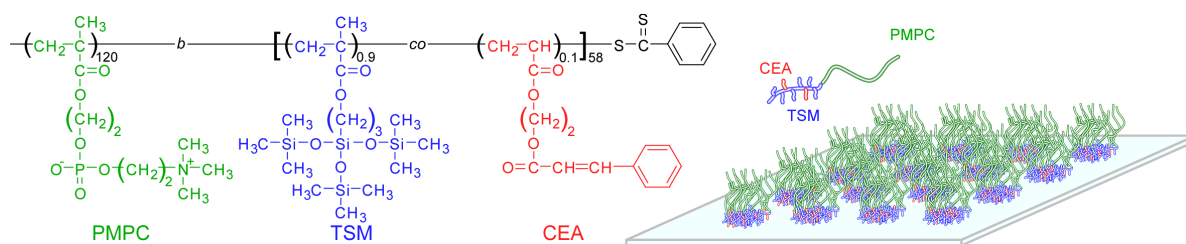


Figure 1 Chemical structure of the diblock copolymer, PMPC₁₂₀-P(TSM/CEAx)_y, and schematic illustration of pattern formation of the polymer film onto the PDMS substrate.

チルシロキシ)シロキシ)プロピルメタクリレート (TSM) および 2-シンナモイルエチルアクリレート (CEA) のランダム共重合体ブロックからなるジブロック共重合体 (PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA)_x) を可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 型制御ラジカル重合法で合成し、PDMS 基板表面との物理的吸着および光架橋を利用して、PMPC による PDMS 表面の被覆を行った (Figure 1)。PDMS への親和性が高いと考えられるシロキサン結合を側鎖に持つ TSM ユニットの、PDMS 基板表面に物理的に吸着する。¹⁸ またシンナモイル基を側鎖結合した CEA は、UV 照射で光二量化による光架橋が起こる。¹⁹⁻²¹ つまり光架橋を利用する事で、UV 照射部位のみを選択的に架橋できる。ポリマー溶液を塗布して、UV 光照射のみで、簡単にどのような形状表面でも強固に被覆できる。

PDMS 基板表面へのポリマーの吸着を確認するため、ポリマー鎖末端を蛍光ラベル化して、PDMS の被覆を蛍光顕微鏡で評価した。またタンパク質の吸着抑制を確認するため、蛍光ラベル化した牛血清アルブミン (488BSA) を用いて、PMPC で被覆した PDMS 基板へのタンパク質の吸着の抑制を確認した。PMPC でパターンニング

した PDMS 基板上で細胞を培養することで、細胞のパターンニングを試みた。

2. ポリマーの合成とキャラクタリゼーション

ブロック共重合体を合成するため、まず PMPC₁₂₀ マクロ連鎖移動剤を合成した。MPC、連鎖移動剤 (CTA) の 4-シアノ吉草酸ジチオベンゾエート、開始剤の 4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸) を、水とメタノールの混合溶媒 (9/1 v/v) に溶解し、アルゴン雰囲気下 70°C で 4 時間重合した。重合終了後、溶液を水で 3 日間透析し、凍結乾燥で PMPC₁₂₀ を回収した。合成した PMPC₁₂₀ の GPC 溶出曲線は単峰性で、分子量分布 (M_w/M_n) は 1.15 とせまい値を示したため、構造は制御されている。¹H NMR における 7.5-8 ppm のポリマー鎖末端の CTA のフェニル基由来のピークと、PMPC 側鎖のメチレンプロトン由来の 3.6 ppm のピークの積分強度比から算出した PMPC の分子量 (M_n (NMR)) 及び重合度 (DP) は、それぞれ 35,700 g/mol と 120 だった。

次に RAFT でブロック共重合体を合成するため、次の操作を行った。PMPC₁₂₀、TSM、CEA、2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル) をエタノールに溶解し、アルゴン雰囲気下 60°C で 20 時間重

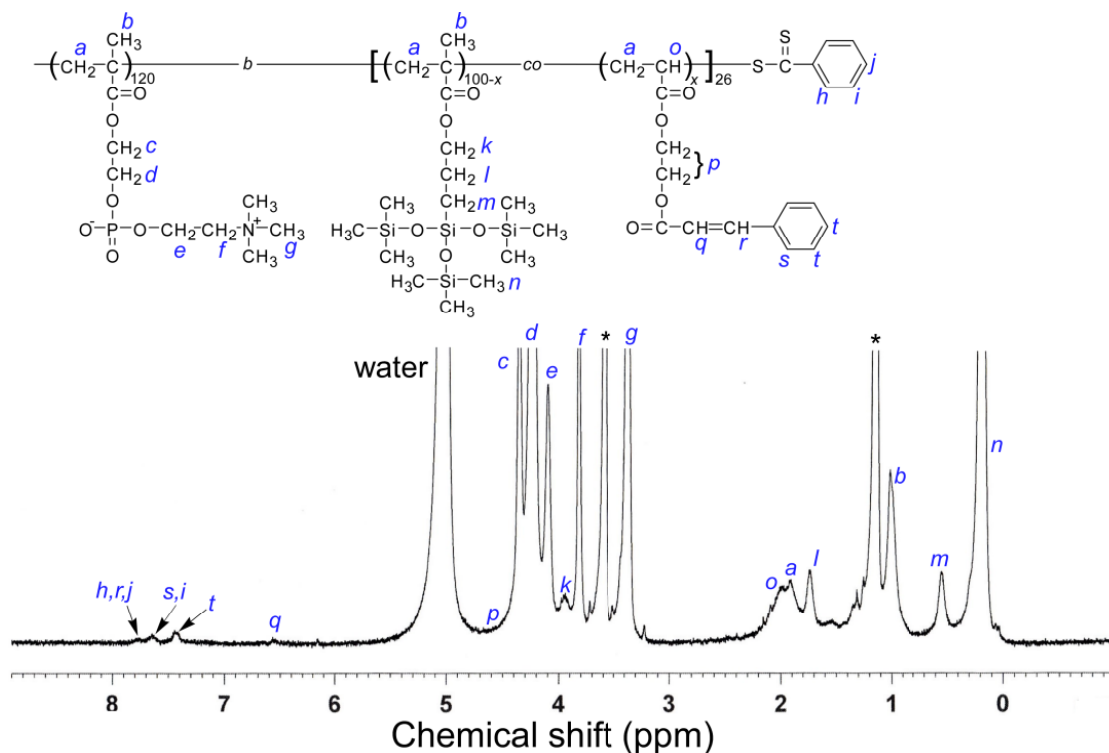


Figure 2 ¹H NMR spectrum for PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA)₂₆ in methanol-*d*₄.

合した。重合終了後、エタノール/アセトンで 2 回再沈殿した。40 °C で減圧乾燥を行って PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ を回収した。同様に重合度の異なる PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA9)₂₆ も合成した。

PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ および PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA9)₂₆ の TSM の組成は、PMPC の側鎖メチレン由来の 3.6 ppm のピークと、TSM 側鎖のトリメチルシリル基由来の 0.18 ppm のピークの積分強度比から求めた (Figure 2)。PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ および PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA9)₂₆ の CEA の組成は、PMPC の 3.6 ppm のピークと CEA のフェニルプロトン由来の 7.2 ppm のピークの積分強度比から求めた。また ¹H NMR から求めた PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ と PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA9)₂₆ の M_n (NMR) は、それぞれ 59,200 g/mol と 46,200 g/mol だった。

数平均分子量の理論値 (M_n (theo)) は、試薬の仕込み比と、コンバージョンから以下の式で算出した。

$$M_n(\text{theo}) = \frac{[M]_0}{[CTA]_0} \frac{x}{100} M_m + M_{CTA} \quad (1)$$

ここで、 $[M]_0$ と $[CTA]_0$ は、モノマーと CTA の初期濃度、 x はモノマーのコンバージョン、 M_m と M_{CTA} はモノマーと CTA の分子量を示す。PMPC₁₂₀、PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ および、PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA9)₂₆ の M_n (theo) は、それぞれ 35,700 g/mol、63,700 g/mol、49,700 g/mol

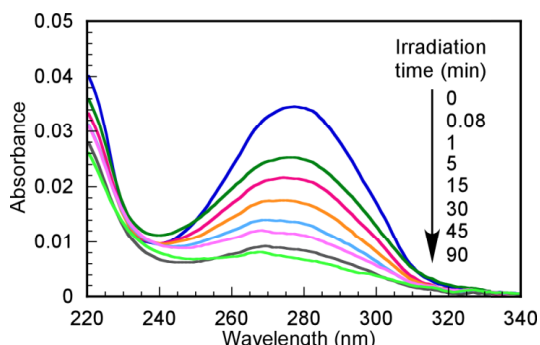


Figure 3 Changes in UV-Vis adsorption spectra of PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ film prepared on a quartz glass substrate upon UV irradiation (time indicated in the figure).

だった。 M_n (theo)より M_n (NMR)の値が小さくなった。これはメタノール中で一部、会合体を形成したため TSM 由来のプロトンの運動が抑制されて、積分強度が減少したためと考えられる。ブロック共重合体は、エタノールおよびメタノールのみで溶解した。溶解する展開溶媒がなかったため、GPC を測定できなかった。

PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ のエタノール溶液を石英ガラス板にスピコートして、ポリマー薄膜を作製した。紫外・可視吸収スペクトルで、ポリマー側鎖のシナモイル基に由来する 275 nm の吸収ピークを観測できた。さまざまな UV 照射時間における、ポリマー薄膜の吸収スペクトルの変化を調べた (Figure 3)。吸光度は、UV 照射時間の増加に伴い減少した。この吸光度の減少は、シナモイル基のトランスからシスへの光異性化と、シナモイル基の 2 + 2 光環状付加反応の進行を示す。²²15 分間の UV 照射で、シナモイル基の吸光度は 76% 減少した。

3. PDMS への被覆

PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ のエタノール溶液を PDMS 基板にスピコートして、UV を照射し、水で洗浄を行った (Figure 4)。PDMS 基板とコートした PDMS 基板の接触は、それぞれ 107.9° と 37.5° となった (Figure 5)。ポリマーによる被覆、UV 照射、洗浄の操作で、高い親水性表面を得ることが出来た。したがって、UV 照射した部位は親水性の PMPC 鎖で被覆できている。

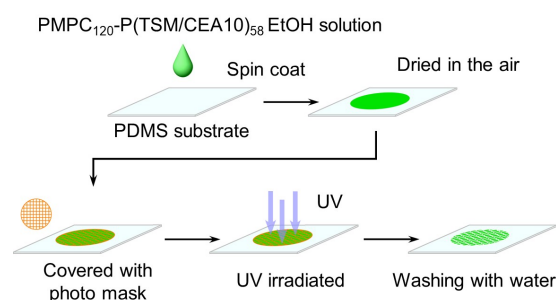


Figure 4 Surface treatment process of PDMS substrate using PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ by UV-irradiation through a photomask.

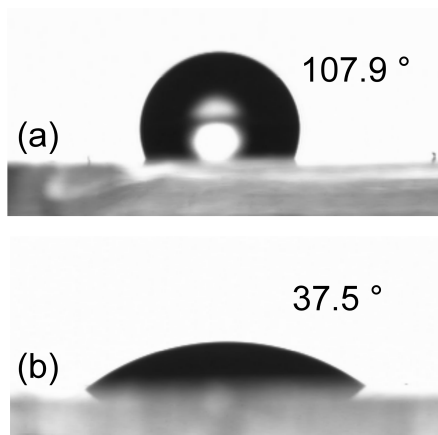


Figure 5 Water contact angles of the PDMS substrate (a) without coating and (b) with coating using PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈.

PDMS 基板を PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ で被覆できたことを確認するため、何も行ってない PDMS 基板と、被覆後 UV 照射、洗浄した基板の X 線光電子分光法 (XPS) による、表面の元素分析を行った。被覆後の PDMS 基板からはリンや窒素のピークが観測された。これは基板表面に存在する PMPC 鎖に由来すると考えられる。一方、未修飾の PDMS から、リンや窒素のピークは観測できなかった。

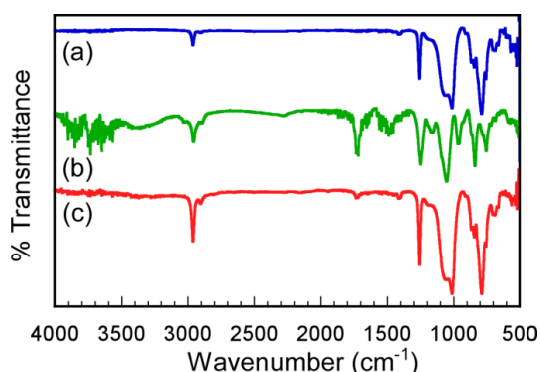


Figure 6 ATR-IR spectra for (a) bare PDMS substrate, (b) PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ powder, and (c) PDMS substrate coated with PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈.

さらに被覆を確認するため、全反射測定 (ATR) 法による基板表面の赤外 (IR) スペクトルを測定した (Figure 6)。被覆してない PDMS 基板は、790 cm⁻¹ と 1070 cm⁻¹ に Si-O 由来の吸収、1260 cm⁻¹ と 2960 cm⁻¹ に C-H 由来の吸収が観測された。被覆後の PDMS 基板では、上記シグナルに加えて、1728 cm⁻¹ に C=O 由来の吸収が観測された。これは PMPC₁₂₀-

P(TSM/CEA10)₅₈ 側鎖のエステル結合に由来する。したがって、ATR-IR からポリマーによる PDMS の被覆を確認できた。

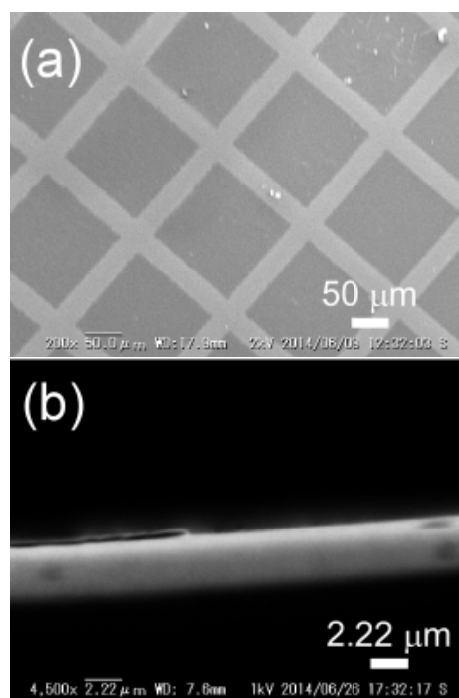


Figure 7 SEM images of (a) PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ lattice pattern on PDMS substrate and (b) its cross section.

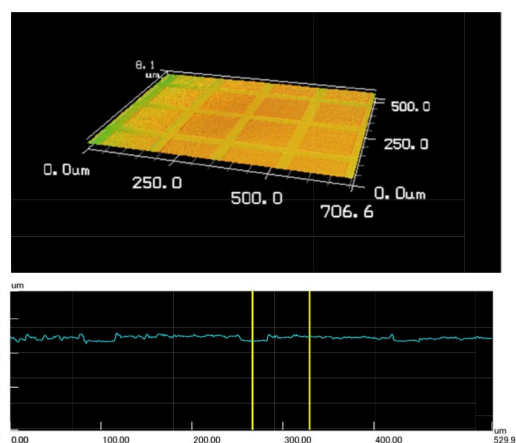


Figure 8 Laser microscopic observation for PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ pattern on the PDMS substrate.

PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ のエタノール溶液をスピコート後、フォトマスクを用いて UV 光を照射後、水で洗浄を行い、PDMS 基板表面を選択的に被覆した。被覆した PDMS 基板を白金でスパッタコートして、SEM 観察を行った (Figure 7)。また被覆した PDMS 基板を切断し、断面の観察も行った。断面 SEM 観察より、被覆部の膜

厚は 290 nm だった。レーザー顕微鏡観察で、被覆部と被覆していない部位との差より、膜厚を測定した(Figure 8)。膜厚は 260 nm で SEM 観察から得られた膜厚と、ほぼ一致した

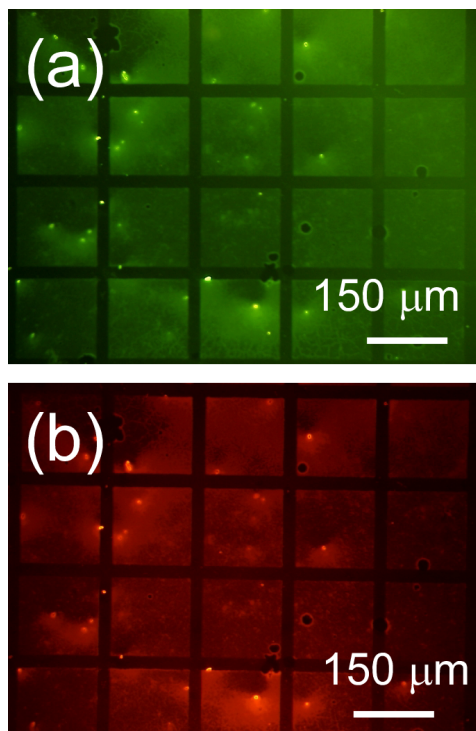


Figure 9 Fluorescence micrographs of (a) PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈F coated on the surface of the PDMS substrate and (b) PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈F coated on the surface of a PDMS substrate stained with rhodamine 6G.

ポリマーによる被覆を確認するため、ポリマー鎖末端を蛍光ラベル化した。ポリマー鎖末端のジチオベンゾエート基を、1級アミンでチオールに誘導し、チオール-エネ-クリック反応でフルオレセインを導入した。フルオレセインで蛍光標識した PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈F のエタノール溶液を PDMS の表面に滴下し、スピコートで薄膜を作製した後、フォトマスクを介して UV 光を照射した。洗浄後、パターン化した PDMS 基板を蛍光顕微鏡で観察した(Figure 9a)。PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈F に起因する緑色蛍光により、フォトマスクのパターンを観察できた。

ローダミン 6G は、カチオン性で親油性の色素で、ホスファチジルコリンに特異的に吸着する。さらにローダミン 6G は、PMPC を含むリン脂質ベースのポリマーに吸着する。²³ ローダミン 6G

水溶液を、パターン化された PDMS 基板に滴下して、PMPC を染色した。水で洗浄して過剰な色素を除去した後、PDMS 基質を蛍光顕微鏡で観察した(Figure 9b)。ローダミン 6G に起因する赤色の蛍光が、格子状に観察できた。つまり、フォトマスクを反映した格子パターン状の PMPC の存在を確認できた。ローダミン 6G からの赤色蛍光の正方形の領域は、蛍光ラベル化ポリマーからの緑色蛍光の領域と完全に重なった。これらのデータは、PDMS 基板表面に生体適合性 PMPC を、UV 照射で選択的に被覆できることを示す。

疎水性の P(TSM/CEA_x)_y ブロックと PDMS 基板の親和性により、ジブロック共重合体は、PDMS 表面に弱く吸着する。UV 照射による光架橋で、ポリマーの分子量が増加して、水に不溶となる。この水に不溶な部分が、パターン化した被膜を形成する。ジブロック共重合体は、水への親和性が高いため、未架橋部位は PDMS 基板から除去されて、パターンを形成できる。この仮説を確認するため、以下の実験を行った。化学構造に光架橋基を含まないフルオレセインを標識した PMPC₁₂₀F および PMPC₁₂₀-PTSM₆₈F のエタノール溶液を PDMS 基板の上に滴下し、スピコートで薄膜を作製した。格子パターンをフォトマスクを介して、UV 光を照射した。水で洗浄した後、PDMS 基板を蛍光顕微鏡で観察すると、緑色蛍光を、全く観察できなかった。これは、光架橋しないと、洗浄でポリマーは PDMS 基板から除去されることを示している。

4. タンパク質吸着抑制と細胞パターンニング

PDMS 基板の上に PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ をスピコートし、減圧乾燥した。150 μm のメッシュサイズの TEM 用グリッドをフォトマスクとして用いて、UV 光を照射し、水で洗浄した。洗浄後、蛍光ラベル化 BSA (488-BSS) 溶液を滴下し、洗浄後、蛍光顕微鏡観察を行った(Figure 10)。

UV 光照射部位のみ BSA の吸着抑制効果が観測された。また BSA の吸着抑制効果が観測された部位には、ローダミン 6G により MPC の存在を確認できた。PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA9)₂₆ を用

いて同様に PDMS 基板上にコートを行い、BSA 溶液を滴下し、洗浄後に蛍光顕微鏡観察を行った。しかし、この場合 PMPC を被覆した部位にもタンパク質が吸着した。P(TSM/CEA9)₂₆ 鎖が PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ に比べて短いため、PDMS 基板表面との相互作用が弱く、PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA9)₂₆ が剥がれたと考えられる。

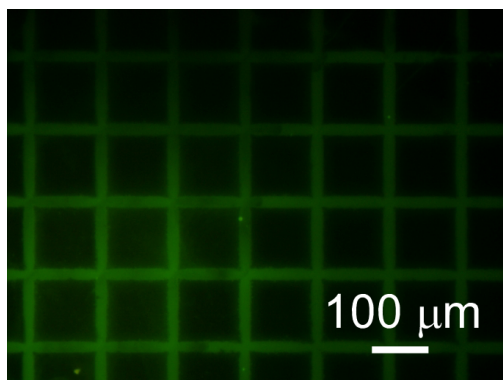


Figure 10 Fluorescence micrographs of PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ coated on the surface of PDMS substrate after adsorption of 488-BSA.

ポリマーを被覆した PDMS 基板を水中に浸漬すると、最表面に PMPC 鎖が移動する。PMPC が最表面に移動することで、タンパク質の吸着抑制の効率が高くなると予想される。PDMS 基板上に PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA10)₅₈ を被覆して UV 光を照射した後、水に一晩浸漬した。蛍光ラベル化 BSA 溶液を滴下し、蛍光顕微鏡観察を行ったが、水への浸漬によるタンパク質吸着抑制の改善効果は認められなかった。光で架橋したためポリマーの運動性が低下したと考えられる。



Figure 11 Typical behavior of L929 cells on a PMPC-patterned PDMS substrate.

細胞のパターニングを調べるため、ブロック共重合体で、縦スリットのフォトマスクを用いて、ポリマー被膜のスリットパターンを作製した。この PDMS 基板上で L929 細胞の挙動を調べた (Figure 11)。30 分間の培養後、PBS で洗浄してから顕微鏡で観察した。細胞は基板の PMPC が存在しない箇所に吸着して、伸展したようすが観察された。

5. まとめ

PMPC をマクロ連鎖移動剤に用いた RAFT 重合法で、光架橋性基を側鎖結合した PMPC₁₂₀-P(TSM/CEA x) _{y} を合成した。光架橋性ジブロック共重合体を用いることで、PDMS 基板表面に、UV 光を照射した部位のみ、PMPC で選択的に被覆できた。本研究で用いたポリマーは UV 照射部位を選択的に PMPC で被覆できるので、ポリマー溶液をマイクロ流路に流し、UV を照射するだけで簡単に流路内部を被覆できると期待される。

6. 謝辞

本稿は東京都立大学システムデザイン学部の三好洋美先生、九州大学ネガティブエミッションテクノロジー研究センターの高原淳先生、関西大学化学生命工学部の岩崎泰彦先生、神戸大学バイオシグナル総合研究センターの森垣憲一先生、大阪大学工学研究科の石原一彦先生からの貴重なコメントに基づき得られた研究成果の総括である。また研究に携わった兵庫県立大学の学生、卒業生に厚くお礼申し上げたい。本稿の成果の一部は JSPS 科研費 (21H02005、21K19931、21H05027、21H05535)、JSPS 二国間交流事業 (JPJSBP120203509)、「物質・デバイス領域共同研究拠点」における「人・環境と物質をつなぐイノベーション創出ダイナミック・アライアンス」の共同研究プログラム (20214044) の助成を受けたものです。

参考文献

- 1) M. Chhabra, J. M. Prausnitz, C. J. Radke,

- Biomaterials* **2007**, *28*, 4331–4342.
- 2) A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer, *Sens. Actuators B* **1990**, *1*, 244–248.
 - 3) M. Pumera, A. Merkoçi, S. Alegret, *Trends. Anal. Chem.* **2006**, *25*, 219–235.
 - 4) G. Sui, J. Wang, C. C. Lee, W. Lu, S. P. Lee, J. V. Leyton, A. M. Wu, H. R. Tseng, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5543–5551.
 - 5) D. Falconnet, G. Csucs, H. Michelle Grandin, M. Textor, *Biomaterials* **2006**, *27*, 3044–3063.
 - 6) J. El-Ali, P. K. Sorger, K. F. Jensen, *Nature* **2006**, *442*, 403–411.
 - 7) J. Doh, D. J. Irvine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 5700–5705.
 - 8) K. Ishihara, T. Ueda, N. Nakabayashi, *Polym. J.* **1990**, *22*, 355–360.
 - 9) T. Ueda, H. Oshida, K. Kurita, K. Ishihara, N. Nakabayashi, *Polym. J.* **1992**, *24*, 1259–1269.
 - 10) M. Kyomoto, Y. Iwasaki, T. Moro, T. Konno, F. Miyaji, H. Kawaguchi, Y. Takatori, K. Nakamura, K. Ishihara, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3121–3130.
 - 11) M. Kyomoto, Y. Iwasaki, T. Moro, K. Saiga, F. Miyaji, H. Kawaguchi, Y. Takatori, K. Nakamura, K. Ishihara, *Biomaterials* **2010**, *31*, 658–668.
 - 12) S. H. Ye, C. A. Johnson Jr, J. R. Woodlley, H. Murata, L. J. Gamble, K. Ishihara, W. R. Wanger, *Colloids. Surf. B: Biointerfaces* **2010**, *79*, 357–364.
 - 13) S. Pintoa, P. Alves, C. M. Matos, A. C. Santos, L. R. Rodrigues, *Colloids Surf., B* **2010**, *81*, 20–26.
 - 14) T. Goda, T. Konno, M. Takai, T. Moro, K. Ishihara, *Biomaterials* **2006**, *27*, 5151–5160.
 - 15) M. Ouyang, C. Yuan, R. J. Muisener, A. Boulares, J. T. Koberstein, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1591–1596.
 - 16) D. Bodas, C. K. Malek, *Microelectr. Eng.* **2006**, *83*, 1277–1279.
 - 17) M. Morra, E. Occhiello, R. Marola, F. Garbassi, P. Humphery, D. Johnson, *J. Colloid. Interface. Sci.* **1990**, *137*, 11–24.
 - 18) G. Schreyeck, P. Marie, *Langmuir* **1999**, *15*, 8212–8219.
 - 19) M. Kato, T. Ichijo, K. Ishii, M. Hasegawa, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **1971**, *9*, 2109–2128.
 - 20) A. Guo, G. Liu, J. Tao, *Macromolecules* **1996**, *29*, 2487–2493.
 - 21) S. Murase, K. Kinoshita, K. Horie, S. Morino, *Macromolecules* **1997**, *30*, 8088–8090.
 - 22) Y. Iwasaki, A. Matsumoto, S. Yusa, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, *4*, 3254–3260.
 - 23) J. H. Wang, J. D. Bartlett, A. C. Dunn, S. Small, S. L. Willis, M. J. Driver and A. L. Lewis, *J. Microscopy* **2005**, *217*, 216–224.