

# Accounts of Materials & Surface Research

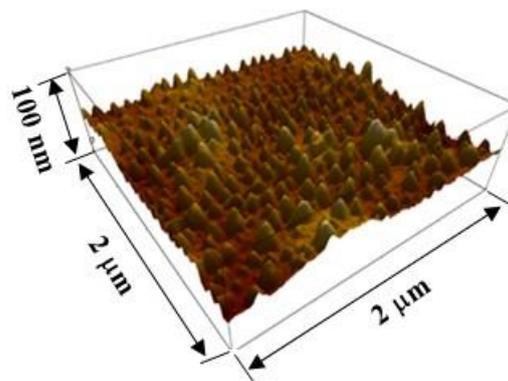
## Analyses on biocompatible polymer poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)/water interface.

Daiki Murakami<sup>1</sup>, Masaru Tanaka<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>: Department of Biological and Environmental Chemistry, Faculty of Humanity-Oriented Science and Engineering, Kindai University, 11-6 Kayanomori, Iizuka, Fukuoka, 820-8555, Japan

<sup>2</sup>: Institute for Material Chemistry and Engineering and Graduate School of Engineering, Kyushu University, Fukuoka 819-0395, Japan  
[masaru\\_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp](mailto:masaru_tanaka@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp)

Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) is a well-known biocompatible polymer. We performed the detailed analyses of the interfacial structure and property on PMEA/water interface. Atomic force microscopy (AFM) revealed the presence of fine structures on PMEA/water interface. These structures are generated by the phase separation of polymer and water at the interfacial region. The polymer-poor (water-rich) regions contribute to the biocompatibility of PMEA. Our research revealed that the polymer density on the interface is an important factor. Frequency modulation AFM demonstrated that the hydrated polymer layer causes the repulsion force in the polymer-poor region on the PMEA/water interface. Thus the hydration of water molecules (called Intermediate water) on PMEA interface is a key of the biocompatibility.

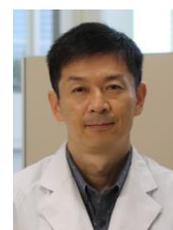


**Keyword:** PMEA, biocompatibility, interface, hydration, AFM

**Daiki Murakami** has been a lecturer at Kindai University since 2022. He received a Ph.D from Kyushu University in 2009. He worked as a researcher in Kyushu University and visited University of Bayreuth (Germany) in 2009. In 2010~2015, he worked for the research of polymer surface in JST ERATO project and moved to SAGA Light Source. He started the research of biomaterials as an assistant professor in Kyushu University in 2015~2022. His main research field is interfacial analysis on polymer materials, and he published over 50 papers in peer reviewed journals.



**Masaru Tanaka** worked for TERUMO Co. and commercialized medical devices such as artificial lung (Approved by FDA and Global market's No.1 share). In 2000 he moved to Hokkaido University and in 2007 he moved to Tohoku University. He was a Visiting Scientist, at Max-Planck-Institute (2008-2009). In 2009 he was awarded a full professorship at Yamagata University. Since 2015, he has been at Kyushu University as a full Professor. Thus far, he has published over 200 papers in peer reviewed journals (H-index 56), 50 book chapter, 125 others, more than 250 patents. He received the Japanese Society for Biomaterials Award, the SPSJ Asahi Kasei Award, and the British Council PMI2 Connect-Research Co-operation (UK) Award.



# 生体親和性高分子 Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)／水界面の構造解析

村上大樹<sup>1</sup>、田中 賢<sup>2</sup>

1: 近畿大学産業理工学部、2: 九州大学先端物質化学研究所

## 1. 背景

少子高齢化社会を迎えている現代、高い生活水準を維持するために医療機器の発展は必要不可欠なものとなっている。医療機器には様々な金属材料や高分子材料が用いられるが、血液や生体組織と接触して使用される材料の場合、時間経過とともに血液の凝固や生体成分の付着などにより十分な機能を発揮することができなくなってしまう。例えば人工血管や透析膜のように血液と接する材料では、血液との接触後すぐに血液凝固や血栓形成が生じ、生命に関わる重大な事故に繋がってしまう可能性がある。そのため、生体と接触して使用される材料、すなわちバイオマテリアルには、高い生体親和性が求められる。

特に血栓形成反応を抑制する性質である「抗血栓性」を有する材料は、血栓形成反応の初期過程である材料表面へのタンパク質の吸着・構造変化や血小板の粘着・活性化を抑制することが重要となる。抗血栓性材料の研究は数多く為され、高機能な材料も開発されているが、具体的に材料表面のどのような性質が機能発現に本質的に寄与しているのか、いまだに明確な答えは得られていない。

Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA ; Fig.1 中の化学構造参照) は近年高い注目を集めている抗血栓性高分子材料である。poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC)<sup>1,2</sup> や poly(ethylene glycol) (PEG)<sup>3,4</sup> などのよく知られた抗血栓性高分子が水溶性を示すのに対し、PMEA は非水溶性であるためコーティングが容易であることに加え、優れた抗血栓性を有している。また、PMEA は血栓形成を抑

制しながら、他の接着性細胞は接着する細胞選択的な特徴を有しており、例えば血液中からのがん細胞の分離・診断技術への応用などが期待されている。PMEA のこのような性質には、生体の主成分である水との特異な相互作用が深く関わっていると考えられている。通常、含水状態の高分子材料中では高分子鎖と弱く相互作用した自由水と、強く相互作用した不凍水の 2 種類の水が観測される。PMEA の場合には自由水、不凍水に加えて、それらの中間的な性質を有する「中間水」が存在することが、熱測定や赤外分光測定、NMR 測定から解明されている。<sup>5-7</sup> この中間水の存在が PMEA の特異な性質の根幹を担っていることが、これまで種々の研究から報告されている。

しかし、なぜ PMEA は含水することで中間水を生じるのか、中間水が具体的にどのように抗血栓性に寄与しているのかについては不明な点も多い。本稿では PMEA／水界面の構造・物性解析を通して、そのメカニズムの解明に向けた一連の研究を紹介する。

## 2. PMEA／水界面の AFM 観察<sup>8</sup>

PMEA およびその類似化合物である poly(3-methoxypropyl acrylate) (PMC3A), poly(*n*-butyl acrylate) (PBA), poly(2-methoxyethyl methacrylate) (PMEMA) を polyethylene terephthalate (PET) 基板上にスピンコートし、原子間力顕微鏡 (AFM) による観察を行った。Fig. 1 には PBS 中での観察結果を示している。(図中では x, y 軸は 2 μm のスケールで示し、z 軸はより拡大して示している。) PMEA は乾燥時(空気/PMEA 表面)ではほぼ完全に平滑な界面であったのに対

し、PMEA/リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 界面では数十～百ナノメートル程度の微細な凹凸構造が界面一様に観察された。この構造は純水との界面でも同様に観察されており、PMEA と水の相互作用に起因した構造であると考えられた。PMEA と同様に中間水を有し優れた抗血栓性を示す PMC3A についても同様の現象が観察された。一方、中間水を有さない PBA や PMEMA では水中、PBS 中において界面形状の変化は観察されたものの、その構造は前述高分子のように均一ではなく、大きな凝集体や不規則な界面構造が形成されていた。これらの結果から、界面構造と中間水の存在には相関関係があることが予想される。そのため、この界面構造についてより詳細な検討を行った。

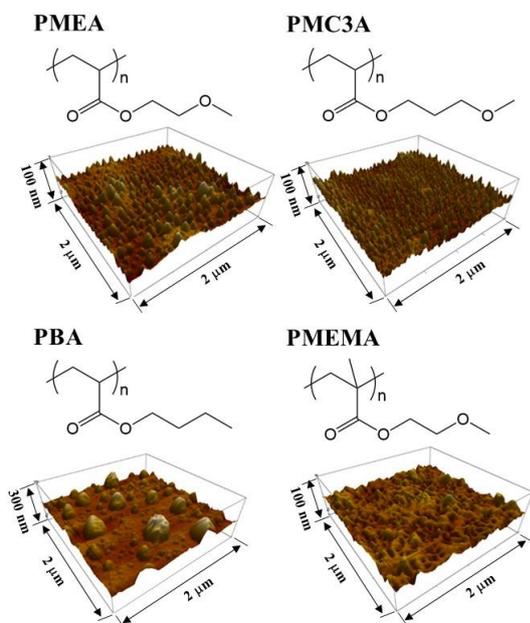


Fig. 1 Interfacial structures of polymer/PBS interfaces observed by AFM.

### 3. 界面構造の形成駆動力の解明<sup>9</sup>

ここでは上述の界面構造の形成駆動力を明らかにすることを目的に研究を行った。PMEA と同様に中間水を有して抗血栓性に優れ、PBS 中で約 19 °C に下限臨界溶解温度を有する高分子である poly[2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate] (PMe2MA) を合成し、PMe2MA/PBS 界面の AFM 観察を行った (Fig.2)。PMEA

や PMC3A と同様に、生体温度である 37 °C では界面にナノメートルスケールの微細構造が一様に形成していた。しかし、この界面構造は温度低下と共に減少し、22 °C ではほぼ平滑な界面が観察されたが、温度を 37 °C に戻すことで再び発現した。類似の界面構造の変化が以前に高分子ブラシ/溶媒系で観察されており、界面における高分子と溶媒の面内マイクロ相分離に起因するものと推察されている。<sup>10</sup> 今回我々が観察した、下部臨界溶解温度よりもわずかに高い温度で構造変化が起こる挙動は、この高分子ブラシ系での報告と類似している。このことから界面構造の形成駆動力は、高分子/水界面領域における高分子密部、高分子疎部への面内相分離現象によるものと結論付けた。この相分離現象は膨潤し、高分子と水が高い割合で混ざり合った界面領域で発現する。またバルク中での高分子の絡み合いのためにナノメートルスケールの相分離構造が生じ、さらに高分子疎部における少量の高分子鎖の存在は AFM では感知できないため、Figs. 1, 2 に示したような凹凸構造が観察されたと予想している。

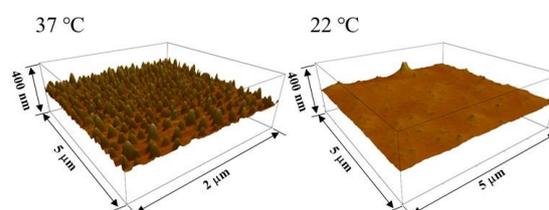


Fig. 2 Temperature dependence of interfacial structures of PMe2MA/PBS interface.

さらに、面内相分離構造と生体親和性との相関を検証するために、PMe2MA を用い、抗血栓性を示す重要な生体現象である血小板粘着の度合いを 37 °C および 22 °C のそれぞれで測定した。ヒト全血から採取した血漿成分を高分子膜と接触させ、その後血小板の粘着数を走査型電子顕微鏡により観察した。Fig. 3 には PET, PMEA, PMe2MA 上における血小板粘着数を示している。高分子未コート PET 基板上では温度によらずほぼ一定の、高い粘着数を示してい

た。それに対し、PMEA 上では 37°C、22°C のどちらにおいても血小板粘着数は極めて低く、高い抗血栓性が確認された。一方、PMe2MA の場合には 37°C では PET の半数ほどであった血小板の粘着数が、22°C では顕著に減少していた。Fig. 2 の AFM 観察の結果から、22°C では高分子密部がほぼ消失し、一面が高分子疎部で被覆されたような状態と考えられる。このことから、高分子疎部が血小板粘着の抑制に寄与していることが予想された。

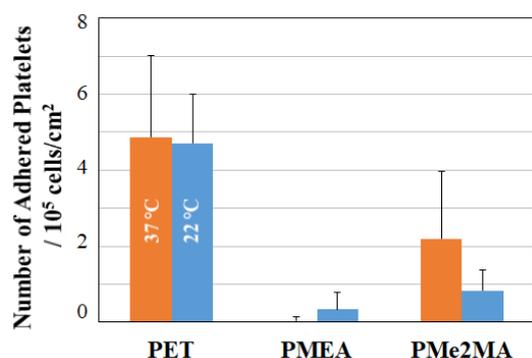


Fig. 3 Temperature dependence of platelet adhesion on PET, PMEA and PMe2MA.

#### 4. PMEA 表面-フィブリノーゲン間相互作用の評価<sup>11</sup>

ここでは上述したような高分子疎部が血小板粘着を抑制するという考えをより定量的に評価することを目的とした。材料表面への血小板粘着や細胞接着は、初めに生体中のタンパク質が材料表面に吸着し、構造変化を起こして細胞接着部位を露出することで引き起こされる。ここでは血小板粘着・血栓形成の重要な足場タンパク質であるフィブリノーゲンを AFM 用カンチレバーの探針に修飾し、界面の相分離構造の各部との相互作用を測定した。高分子には PMEA と、含水時に中間水をほとんど形成しない PBA (Fig. 1 参照) を使用した。各高分子の高分子密部・疎部それぞれにおける相互作用測定の結果を Fig. 4 に示している。高分子密部では PMEA, PBA どちらにおいても、ある距離において探針が界面に引き寄せられる、引力的相互作用が観測され

た。PBA の方が強い引力が働いているのは、疎水性相互作用がより強く働いているためと考えられる。この引力は PBA 疎部においてはかなり弱まっていた。これは高分子疎部では密部に比べて多量の水を含んでおり、そのため疎水性相互作用が弱まっていることによる。一方、興味深いことに、中間水を有する PMEA では疎部において引力は観測されず、緩やかな斥力のみが観測された。このことは、フィブリノーゲンが PMEA 疎部には吸着せず、密部に優先的に吸着するという意味している。Fig. 4 には代表的な相互作用カーブのみを載せているが、各点で測定した吸着力をヒストグラム化した結果を Fig. 5 に示す。明らかに、PMEA の疎部ではフィブリノーゲンの吸着が起きていないことが確認でき、PMEA の優れた抗血栓性には、界面相分離構造の高分子疎部におけるフィブリノーゲンの吸着抑制が大きく寄与していることが明らかとなった。

さらに最近の研究では、タンパク質の種類によって、高分子密部・疎部への吸着挙動が大きく異なることも分かってきている。<sup>12</sup> 血球細胞は接着しないが、その他の多くの細胞は接着する PMEA の選択的な細胞接着性にもこの界面構造が関連していると予想できる。

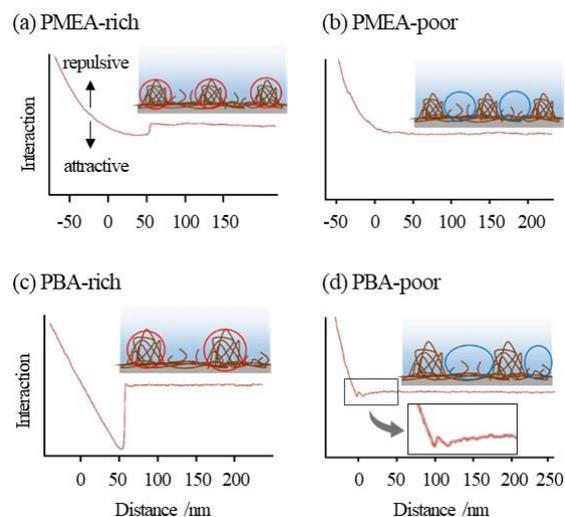


Fig. 4 Interaction-distance curves on PMEA/PBS and PBA/PBS interfaces.

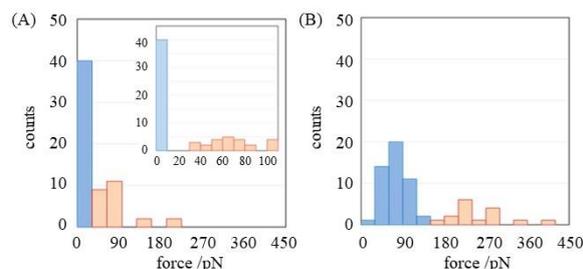


Fig. 5 Histograms of interaction on (A)PMEA and (B)PBA. (red)polymer-rich, (blue)polymer-poor. (inlet) detailed histograms in narrow range.

## 5. 高分子ブラシを用いた PMEA 密度と抗血栓性の関係の評価<sup>13</sup>

高分子密部、疎部でタンパク質の吸着挙動が異なることを示したこれまでの結果から、界面におけるPMEAの密度がタンパク質吸着抑制や抗血栓性に大きく関与することが予想できる。そこでPMEAの界面密度を制御して抗血栓性との関係の評価するために、高分子鎖の片末端を基板に化学的に固定した高分子ブラシを合成して研究を行った。はじめに末端にチオール基を有するPMEAを合成し、金表面にgraft-to法により修飾した。修飾する際の溶液濃度や反応時間を変えることにより、様々な界面密度のPMEAブラシを作製した。PMEAブラシの密度は水晶振動子マイクロバランス(QCM)法により決定した。

QCM法により測定したPMEAブラシ上でのフィブリノーゲン吸着量とPMEA密度( $\sigma$ )との関係をFig. 6に示している。またPMEAのキャスト膜で得られたフィブリノーゲンの吸着量(PMEA<sub>free</sub> cast)も同時に示している。 $\sigma = 0-0.042$  chains/nm<sup>2</sup>の低密度領域では、グラフト密度の増加に伴い、フィブリノーゲン吸着量は減少する傾向が観察された。 $\sigma = 0.09-0.12$  chains/nm<sup>2</sup>の範囲ではPMEA<sub>free</sub> castよりも吸着量が少なく、 $\sigma = 0.12$  chains/nm<sup>2</sup>付近で最小値となった。一方、 $\sigma = 0.12-0.13$  chains/nm<sup>2</sup>の範囲では密度の増加に伴って、吸着量は増加する傾向を示し、 $\sigma = 0.13$  chains/nm<sup>2</sup>での吸着量は $0.70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と最小値とは明らかに有意な差を示していた。

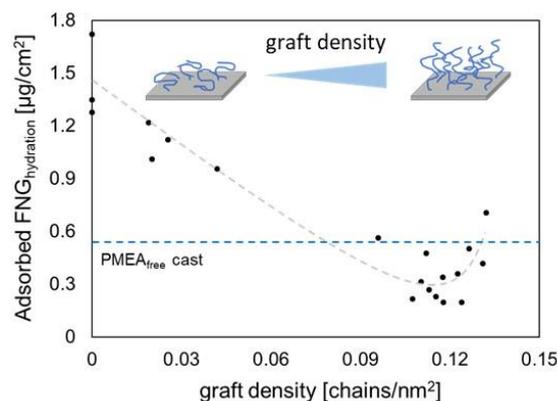


Fig. 6 PMEA density dependence of fibrinogen adsorption on PMEA brushes.

さらに、ヒト全血を用いて、密度制御したPMEAブラシ上での血小板粘着数の評価を行った(Fig. 7)。血小板の活性化度はI型からIII型に向かうほど血栓形成を誘起する。したがって、血小板が粘着していてもIII型が多い高分子よりI型が多い高分子では、血栓形成を惹起しにくいとされている。ネガティブコントロールである金薄膜上には、血小板は多く粘着しており活性化もしていた。対してポジティブコントロールであるPMEAスピコート膜(PMEA<sub>s</sub>)は、血小板の粘着を良く抑制しており、粘着した血小板の活性化度もI型が多く、活性化も抑制していた。PMEAブラシに着目すると、すべてのグラフト密度においてAu薄膜よりも血小板の粘着を抑制していた。 $\sigma = 0.020-0.113$  chains/nm<sup>2</sup>の範囲ではグラフト密度の増加に伴い、血小板の粘着数は減少する傾向を示した。また $\sigma = 0.113-0.124$  chains/nm<sup>2</sup>の範囲では、PMEA<sub>s</sub>と同等の血小板粘着数であり、血小板の粘着を良く抑制していた。一方で、 $\sigma = 0.131$  chains/nm<sup>2</sup>にグラフト密度が増加すると、血小板粘着数は増加していた。この高密度領域で抗血栓性が低下する傾向は上述したフィブリノーゲン吸着実験で得られた結果と同様である。

これらの結果から、予想したようにPMEAの抗血栓性にはPMEAの界面密度が大きく関与していることが分かった。PMEA密度が高すぎると抗血栓性が低下するという結果は、高密度ではPMEAと相互作用した水分子が排斥されることが原因であると予想される。

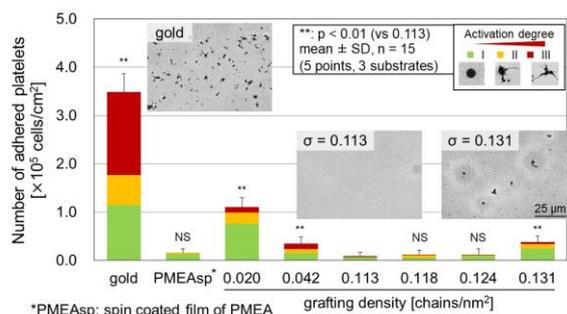


Fig. 7 PMEAsp density dependence of platelet adhesion on PMEAsp brushes.

### 6. 周波数変調型 AFM を用いた、PMEA の水和膨潤層の観察<sup>14</sup>

PMEA の界面密度と抗血栓性を評価した上記の研究から、PMEA は 0.1 chains/nm<sup>2</sup> 付近で最も抗血栓性が高くなることが明らかとなった。水和して膨潤した高分子による斥力が抗血栓性発現の理由であると予想したが、そのような極めて弱い相互作用の存在を実証することは容易ではない。そこで周波数変調型 AFM (FM-AFM) を用いた評価を実施した。FM-AFM はカンチレバーの振動周波数をフィードバックに利用することで、従来の AFM に比べて高い分解能での測定が可能である<sup>15, 16</sup>。

試料には前項で最も抗血栓性が高かった  $\sigma = 0.1$  chains/nm<sup>2</sup> の PMEAsp を使用した。また比較のため、Fig.1 に示した PMC3A、PBA、PMEMA についても同様に  $\sigma = 0.1$  chains/nm<sup>2</sup> の高分子ブラシを作製し、評価を行った。FM-AFM 測定は島津製作所の SPM8100 を用いて、PBS 中、23°C の条件で行った。

Fig. 7 は FM-AFM 測定による高分子ブラシ/PBS 界面の z-x 平面スキャンの結果を示しており、青白く示された領域が斥力が観測された領域を示している。PMEMA の場合には界面において短距離の斥力が観察された以外には顕著な斥力は観察されず、未修飾金基板とほぼ同様であった。PMEA、PMPA、PBA のグラフト高分子/PBS 界面では高分子密部および高分子疎部ドメインへのマイクロ相分離が生じることが従来の AFM 観察により確認されており、それぞれの界面に観測されるドーム状の構造は高分子密部ドメインに対応している。中間水をほとんど

形成しない PBA の場合には高分子密部ドメインの他には明確な斥力層は確認されず、これは高分子疎部中では高分子鎖と水がほとんど相互作用せず、バルク水に近い水が存在していることを意味している。一方、PMEA や PMPA の場合には高分子疎部と考えられる領域でも明確な斥力層が観測されており、高分子鎖と水が混和した水和高分子層を形成することで斥力が生じっていると予想される。これまでの実験結果から高分子疎部ドメインがタンパク質の吸着および構造変化を抑制することで抗血栓性発現に寄与していることも分かっており、本研究でその起源となる水和高分子層の存在を実証することに成功したといえる。

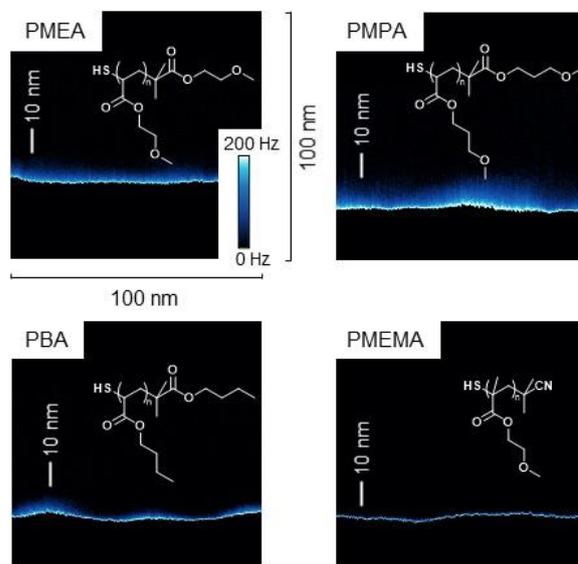


Fig.7 FM-AFM images of polymer brush/PBS interfaces.

### 7. 結語

本稿では生体親和性高分子 PMEAsp の界面構造解析に基づく一連の研究を紹介した。AFM により発見された PMEAsp/PBS 界面における微細構造は界面における高分子と水の相分離に起因するものであり、その存在が PMEAsp の優れた抗血栓性に寄与していることがタンパク質吸着や血小板粘着挙動の詳細な解析により明らかとなった。高分子ブラシを用いた検討では、PMEA の界面密度が 0.1 chains/nm<sup>2</sup> 付近で最も抗血栓性が高くなることが明らかとなった。周波数変調型 AFM による観察では、この密度では

PMEA 界面がほぼ高分子疎部で覆われた状態になっており、高分子の水和膨潤層による明確な斥力が存在する様子も観察された。

これら一連の研究により、PMEA の優れた抗血栓性には界面における高分子の水和状態が大きく寄与していることが明らかとなった。高分子疎部中で PMEA 鎖と相互作用する水が、PMEA が有する中間水と強く関連していると予想できる。この関連については X 線や中性子などを用いた解析も行っており、また別の機会でも報告したい。最後に、本稿を通して得られた高分子と水の界面における解析結果が、さらなる高機能な PMEA より優れた抗血栓性を有する合成高分子の創製と予防・診断・治療用の医療機器の表面処理技術の発展に繋がることを期待したい。

## 6. 謝辞

本稿で紹介した一連の研究成果は日本学術振興会科研費（18K12080, 19H05720, 22H00591）、「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」の助成を受けて実施されました。

## 参考文献

- 1) Ishihara, K., Ziats, N. P., Tierney, B. P., Nakabayashi, N., Anderson, J. M. *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, *25*, 1397–1407.
- 2) Ishihara, K., Fukumoto, K., Iwasaki, Y., Nakabayashi, N. *Biomaterials*, **1999**, *20*, 1553–1559.
- 3) Nagasaki, Y. *Polym. J.* **2011**, *43*, 949–958.
- 4) Sofia, S. J., Premnath, V., Merrill, E. W. *Macromolecules*, **1998**, *31*, 5059–5070.
- 5) Tanaka, M., Motomura, T., Ishii, N., Shimura, K., Onishi, M., Mochizuki, A., Hatakeyama, T. *Polym. Int.* **2000**, *49*, 1709–1713.
- 6) Morita, S., Tanaka, M., Ozaki, Y. *Langmuir*, **2007**, *23*, 3750–3761.
- 7) Miwa, Y., Ishida, H., Saito, H., Tanaka, M., Mochizuki, A. *Polymer*, **2009**, *50*, 6091–6099.
- 8) Murakami, D., Kobayashi, S., Tanaka, M. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2016**, *2*, 2122–2126.
- 9) Murakami, D., Kitahara, Y., Kobayashi, S., Tanaka, M. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 1591–1597.
- 10) Murakami, D., Norizoe, Y., Higaki, Y., Takahara, A., Jinnai, H. *Macromolecules*, **2016**, *49*, 4862–4866.
- 11) Ueda, T., Murakami, D., Tanaka, M. *Front Chem* **2018**, *6*, 542.
- 12) Nishida, K., Baba, K., Murakami, D., Tanaka, M., *Biomaterials Science*, **2022**, *10*, 2953–2963.
- 13) Ueda, T., Murakami, D., Tanaka, M., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2021**, *199*, 111517.
- 14) Murakami, D., Nishimura, S., Tanaka, Y., Tanaka, M., *Biomaterials Advances*, **2022**, *133*, 112596.
- 15) Fukuma, T., *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2010**, *11*, 033003.
- 16) Fukuma, T., Garcia, R., *ACS Nano*, **2018**, *12*, 11785–11797.