

令和 2 年 11 月 27 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14047

研究課題名(和文)ファウリングを抑制するコアセルベート界面の創製

研究課題名(英文)Creation of coacervate interfaces for controlling fouling behavior

研究代表者

青木 隆史(AOKI, Takashi)

京都工芸繊維大学・繊維学系・准教授

研究者番号：80231760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：新しいコンセプトに基づいたポリマー表面修飾剤による防汚効果について検討している。N,N-dimethylacrylamide (DMAAm)とn-butyl methacrylate (BMA)とからなるコポリマーが、バルク水から液-液相分離(水を含んだポリマー濃厚溶液(コアセルベート))を生起する。このコポリマーの水処理膜表面への化学修飾を想定し、タンパク質の吸着挙動を調べた結果、当該コポリマー修飾表面上でタンパク質吸着が抑えられている結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水/固体界面で生起する吸着現象は古くから知られており、吸着することは、界面が存在すれば自然に生起する現象である。したがって、反対に吸着を抑制することは容易なことではなく、抑制するための新規界面の獲得は重要な課題である。今回、実施した実験結果の中から、水/固体界面で生起する吸着を抑える表面の状態についての分子設計がより明らかになったと同時に、水浄化のための水処理膜表面でのファウリング現象や人工臓器などで課題となっている血液の凝固反応を軽減するための母材表面へのポリマー修飾方法についての初歩的な知見が得られ、様々な応用展開へ繋がるのが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The fundamental polymeric material and its technology to control a bio-fouling on a water/polymer interface has been developed. PDB copolymers composed of N,N-dimethylacrylamide (DMAAm) and n-butyl methacrylate (BMA) have hydrophobic aggregation above certain temperatures and ionic strength to show liquid-liquid phase separation in water. The PDB copolymer-modified substrate surfaces suppressed to adsorb a blood-coagulation protein, fibrinogen, as well as to adhere blood cells, platelets. Further, a primitive study for a modification of the polymers on some material surfaces was conducted. The copolymers in this study will be good candidate materials for suppressing the fouling of water-treatment membranes to remove impurities in unclean water and the bio-fouling of biomaterials in special medical devices such as artificial vessels and hearts.

研究分野：高分子化学

キーワード：コアセルベート ポリマー濃縮層 ファウリング タンパク質 水処理膜

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

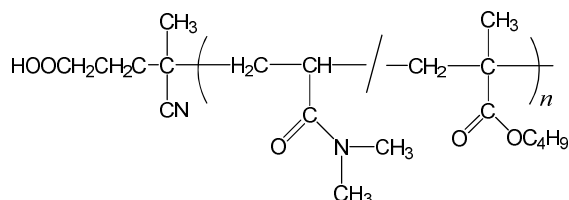
われわれは、ポリマー濃縮層(コアセルベート)を形成するポリマーを基板表面に化学修飾して、ファウリングを抑制する新規ソフト界面の創生を目指している。コアセルベートは、もともと、ポリアニオンとポリカチオンを混合することにより、水和しつつもポリマーイオンコンプレックスを形成して高分子濃縮状態となり、水から相分離したコロイド液滴となっている。ソ連のアレクサンドル・オパーリンが生命発生の起源となるモデルとして提唱したことで有名である。

これまでに、ポリマー濃縮層を形成するポリマーとして、*N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm)と疎水性モノマーである *n*-butyl methacrylate (BMA) とのコポリマー(PDB, Scheme 1)を選び、血小板接着の抑制効果について議論してきた。このポリマーは非イオン性であり、ある条件下で、疎水性凝集すると同時に部分的には水和していることから固体沈殿を作らず、液-液相分離となってバルク水との動的な界面を形成する。このポリマー濃縮層界面と水中の溶存成分や浮遊成分との相互作用は不安定であろうと仮定し、このコポリマーを基板に化学修飾して血液実験を行った。その結果、血栓形成の主要な働きをする血小板の接着が抑えられていた。この表面は、水処理膜のファウリングを抑制するために有効ではないかと考えられ、水処理膜へ応用展開する考えに至った。

### 2. 研究の目的

水を浄化するために、膜形状の素材を使い水分子のみを透過させて水をろ過する作業が行われる。この膜形状の素材は固体であり、対象となる水は液体であるので、その固-液界面に水分子だけでなく水溶液に含まれる物質が吸着する。この吸着が進行すると膜表面に吸着物質による吸着層を生じ、この層が水分子のろ過を阻害し浄化作業の効率を低下させる。この吸着は膜表面上の汚れ(ファウリング現象)と見なされ、このファウリングをいかに抑えるかが、水処理を効率よく遂行するための鍵となる。

本研究課題では、新しいコンセプトに基づいたポリマー表面修飾剤による防汚効果について検討している。*N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm) と *n*-butyl methacrylate (BMA) とからなる PDB コポリマーが、ある特定の組成範囲内で水に溶解せず、バルク水から相分離を生起する。しかし、その相分離状態は固体沈殿ではなく、水を含んだポリマー濃厚溶液(コアセルベート)状態の液体である。われわれは、この水とポリマーから構成されるポリマー濃厚溶液が、血液中の血小板の接着を抑制することを明らかにしており、固-液界面でのバイオフィウリングを抑制する効果を見出している。当該研究課題では、微生物の接着や有機酸などの低分子化合物の吸着を抑制する効果を期待し、水処理膜表面にポリマー濃厚層を築くための水処理膜表面へのポリマー修飾を念頭に置いて検討を行っている。特に本研究課題では、固体表面で初期段階に認められるタンパク質などの水溶性成分の吸着を抑制できるのかどうかにかぎを置き、均質で効果的に上記のポリマー濃厚層を形成するポリマーの基板表面への化学修飾と、その表面上へのリン酸バッファー(PBS, pH 7.4) 中でのタンパク質の吸着挙動の検討を、分子間相互作用解析システムを用いて行った。



Scheme 1 Structural formula of poly(DMAAm-co-BMA) (PDB).

### 3. 研究の方法

ポリマー濃縮層を形成する PDB コポリマー (Scheme 1) を金基板表面上に化学修飾し、その修飾基板上へのタンパク質の吸着量について、分子間相互作用解析システムである水晶振動子マイクロバランス(QCM-D, Biolin Scientific AB, Sweden) を用いて評価した。QCM-D 用の金基板にアミノエタンチオールを使い、金基板表面にアミノ基の化学修飾を施した。このアミノ化表面に片末端にカルボキシル基を有する PDB コポリマーを縮合剤を用いて反応させ、PDB 修飾金基板を調製した。化学修飾に用いた PDB コポリマーは、表 1 に示したコポリマーのうち、液-液相分離する温度が 56°C で生理温度の 37°C では溶解している PDB-8、液-液相分離する温度が 20°C であるので 37°C でポリマー濃縮層を形成する PDB-17、そして、水に不溶の PDB-34 の 3 種類を使用した。さらに、対象基板として、ポリマーを修飾していない金基板、アミノ化金基板、ホモポリマーである PDMAAm と PBMA も使用して、タンパク質吸着を評価した。

金基板上への化学修飾の確認は、X 線光電子分光法 (XPS) と高感度反射法 (Reflection Absorption

Table 1. Characterization of polymers obtained by free radical polymerization

Polymer	BMA composition / mol%	Yield / %	$M_n$ <sup>a)</sup> / $10^4$	$M_w$ <sup>a)</sup> / $10^4$	C.P. in water / °C
PDMAAm	0	49.7	0.9	2.3	Soluble
PDB-8	8.1	78.4	0.9	2.0	53.0
PDB-17	17.0	38.2	1.5	3.3	20.0
PDB-34	33.9	53.4	2.1	5.5	Insoluble
PBMA	100	33.3	3.6	7.7	Insoluble

Spectroscopy, RAS-FTIR) を用いた。

タンパク質は fibrinogen を用い、37°C 下、最終濃度 0.3 mg/mL で平衡吸着に達した後、PBS で洗浄して可逆的に脱着しなかったタンパク質の吸着量を定量した。

#### 4. 研究成果

##### (I) PDB の金基板上への化学修飾の確認

Scheme 1 に示したように、本研究課題で使用したポリマーの片末端にはカルボキシル基を有し、金基板上に施したアミノ基と縮合剤を用いてポリマーを化学的に固定した。XPS スペクトルより、金基板表面上にポリマーに含まれる元素の存在を確認し、RAS FT-IR スペクトルからは、PDB 中の DMAAm と BMA ユニットがもつ、それぞれの C=O 伸縮振動が 1620 と 1732  $\text{cm}^{-1}$  に観察され、金基板表面上にポリマーが化学修飾できていることを確認した。

##### (II) タンパク質の吸着挙動の検討

各基板への fibrinogen 吸着量を、水晶発振子の振動数変化( $\Delta f$ )から sauerbrey の式を用いて求めた。図 1 に示したように、Au 基板が最も高い fibrinogen 吸着量を示した。金属基板である Au 基板では、他のポリマー修飾基板と比較して高い表面自由エネルギーを持つため、高い fibrinogen 吸着量を示したと考えられる。アミノ基修飾基板に関しては、生理 pH 条件下で  $-\text{NH}_3^+$  のカチオン性を示し静電的相互作用が働くことにより fibrinogen 吸着量が高くなったと考えられる。また、Au 基板やアミノ基修飾基板のようにポリマーを修飾していない基板と PDMAAm、PDB-8、PDB-17、PDB-34、PBMA などのポリマーを修飾している基板の間での fibrinogen 吸着量の違いが認められた。Au 基板表面を化学修飾を介してそれぞれのポリマーで覆ったことにより、上記のような金属表面そしてアミノ基の性質が消失し、さらにそれぞれのポリマーの特性が反映したものと見える。ポリマー修飾基板の中では、ホモポリマーである PDMAAm と PBMA 表面において、相対的に高い吸着量を示した。特に、極性が低く水に不溶である PBMA 表面上への fibrinogen の吸着が高く、このことは水中での疎水性相互作用を介した吸着が PBMA 表面上で起こり、高い吸着量を示したことが考えられる。また、水溶性の PDMAAm 修飾基板上でも、PBMA に次いで高い fibrinogen の吸着を示した。一般に、水中のタンパク質は疎水性表面に吸着しやすく、親水性表面には吸着しにくい。しかし、金基板上の PDMAAm 鎖はグラフト密度が高くないプラシ表面ではないことから、水中の溶存タンパク質を排除するだけの斥力を生じさせることができず、fibrinogen の吸着をもたらしたことが考えられる。一方、PDB-17 修飾基板における fibrinogen 吸着量が最も低い値となった。PDB-17 は 37°C で液液相分離を起こしており、金基板上にポリマー濃縮層が形成されている。このポリマー濃縮層はポリマーと水から構成していることより、水/ポリマー界面としてではなく、水/(水+ポリマー)界面として界面が存在している。このことは、(水+ポリマー)界面が、水に溶解している溶質物質が吸着するのに十分な界面として機能しないと言える。

今回の実験で得られた修飾 Au 基板と fibrinogen との吸着結果から 37°C でポリマー濃縮層を形成する PDB-17 が fibrinogen 吸着を抑制するのに効果的であることを示すことができた。

fibrinogen と血小板の間には血小板の膜タンパク質レセプター (GP / a) を介した特異的な相互作用が存在するので、fibrinogen の吸着が抑えられることにより血小板の接着・凝集が抑えられた先行実験の結果を説明することができる。

今回の実験はバッチ法により行われた。今後、ある流速の条件下、動的な水ならびに水中のタンパク質や細胞との相互作用を調べ、タンパク質などの吸着がどのような挙動を示すのかを調べていく必要がある。

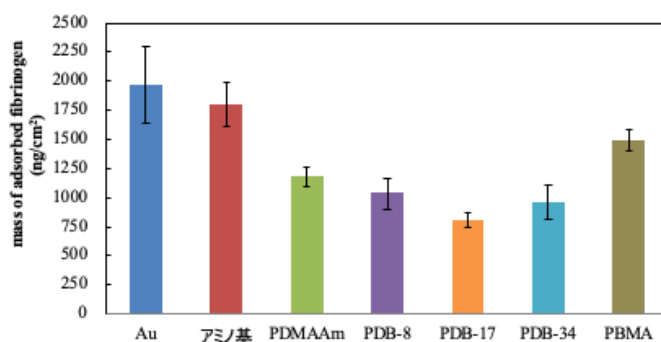


Figure 1. 各基板への fibrinogen 吸着量 ( $n = 4$ )

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- (1) Koji Arai, Tsutomu Mizutani, Masatoshi Miyamoto, Yoshiharu Kimura, Takashi Aoki, “Colloidal silica bearing thin polyacrylate coat: A facile inorganic modifier of acrylic emulsions for fabricating hybrid films with least aggregation of silica nanoparticles”, *Progress in Organic Coatings*, **128**, 11–20 (2019).
- (2) Rasha Ahmed Hanafy Bayomi, Takashi Aoki, Takuma Shimojima, Hideaki Takagi, Nobutaka Shimizu, Noriyuki Igarashi, Sono Sasaki, Shinichi Sakurai, “Structural analyses of sphere- and cylinder-forming triblock copolymer thin films near the free surface by atomic force microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, and grazing-incidence small-angle X-ray scattering”, *Polymer*, **147**, 202–212 (2018).

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 青木隆史、野神寛太、第67回高分子学会年次大会「高分子濃縮層による血液成分との相互作用の抑制」(名古屋)2018年5月23日
- (2) 青木隆史、野神寛太、平成30年度繊維学会秋季研究発表会「血液成分との相互作用を抑制するポリマー濃縮層」(福井)2018年11月1日
- (3) 舟木健太・青木隆史 第40回日本バイオマテリアル学会大会「血液成分との相互作用における高分子濃縮層の効果」(神戸)2018年11月12日

〔図書〕(計1件)

- (1) 青木隆史, 第1章 温度応答性, 第4節 「キラル構造を有する刺激応答性ゲル」 pp.358-368 「刺激応答性高分子ハンドブック」, 監修者 宮田隆志, 株式会社エヌ・ティー・エス, 発行日 2018年12月18日 初版第1刷発行

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

研究分担者なし

研究協力者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。