

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18560748  
 研究課題名（和文） 生分解性ポリマーブレンド多孔質膜の内部構造制御と  
 バイオプロセスへの応用  
 研究課題名（英文） Control of internal structure of porous membranes of biodegradable  
 polymer blends and its application to bioprocesses  
 研究代表者  
 田中 孝明（TANAKA TAKAAKI）  
 新潟大学・自然科学系・准教授  
 研究者番号：00217043

## 研究成果の概要：

本研究は、生分解性ポリマーブレンド多孔質膜の内部構造を制御して高機能化し、バイオプロセスに利用することを目的として進めた。内部構造の制御については、ポリ乳酸とポリカプロラク톤のポリマーブレンドについて種々の混合比のポリマーブレンド溶液の相分離挙動を観察し、さらに相分離法により各種生分解性ポリマーブレンド多孔質膜を作製した。バイオプロセスへの応用については分離膜への応用と生分解性ポリマーブレンド多孔質体内でのヒト肝細胞 HepG2 の培養を検討した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

## 研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：生分解性ポリエステル，ポリマーブレンド，相分離法，多孔質，分離膜

## 1. 研究開始当初の背景

ポリ乳酸やポリカプロラク톤などの生分解性ポリエステルは、環境中及び生体内で分解されることから、環境にやさしいグリーンサステナブルな材料として、また、医療用材料として注目されている。研究代表者は米国テキサス大学工学部化学工学科 D. R. ロイド教授とともに多孔質化による生分解性ポリマーの高機能化と多孔質化した生分解性ポリマーのバイオプロセスにおける高度な利用法の開発研究に取り組んでいる。21

世紀に入ってポリ乳酸の生産技術が発展し、それまでと比較して安価になったことに着目し、研究代表者らは世界に先駆けてポリ乳酸製濾過膜の開発を行った (T. Tanaka and D. R. Lloyd, J. Membr. Sci., 238, 65-73 (2004))。さらに、各種生分解性ポリエステル製多孔質膜を開発する過程において、生分解性ポリエステルのポリマーブレンドを用いることにより、新たな内部構造をもつ生分解性多孔質膜を作製することにも成功した (T. Tanaka, et al., Desalination, 193,

## 2. 研究の目的

本研究は、上記の研究を発展させて、生分解性ポリマーブレンド多孔質膜の内部構造を制御して高機能化し、バイオプロセスに利用することを目的として進めた。内部構造の制御については、ポリ乳酸とポリカプロラク톤のポリマーブレンドについて種々の混合比のポリマーブレンド溶液の相分離挙動を観察し、さらに相分離法により各種生分解性ポリマーブレンド多孔質膜を作製した。バイオプロセスへの応用については濾過フィルターへの応用と生分解性ポリマーブレンド多孔質体内でのヒト肝細胞 HepG2 の培養を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 生分解性ポリマーブレンド多孔質膜の内部構造の制御

#### ① PLLA-PCL-ポリマーブレンドの相分離特性

熱誘起相分離法では高温のポリマー溶液を型に流し込んだ後、急冷することにより、ポリマー溶液中にミクロンオーダーの溶媒液滴を生じさせる相分離とその後のポリマー溶液の固化により、多孔質膜を作製した。非溶媒誘起相分離法ではポリマー溶液を薄層になるようにキャスト後、非溶媒槽に浸漬することにより、相分離と固化を行った。

溶媒には、生分解性ポリエステル多孔質膜の作製に適していた水含有 1,4-ジオキサンおよびクロロホルムを用いた。

#### ② PLLA-PCL-ポリマーブレンド多孔質膜の内部構造の制御

上述の方法で得られた相図をもとにポリマーブレンド溶液の濃度・組成及び冷却開始温度を設定した。ポリマーブレンド溶液をステンレス製の型に流し込み、種々の冷却速度で冷却し、多孔質膜を作製した。作製した膜は切断し、内部構造を走査型電子顕微鏡で観察する。冷却過程における内部構造形成を光学顕微鏡と試料加熱冷却台を用いて観察した。

### (2) 生分解性ポリマーブレンド多孔質膜の濾過フィルターとしての応用

(1) で作製した PLLA-PCL-ポリマーブレンド多孔質膜を用いて、水 (透過性測定)、及び酵母懸濁液、バクテリア培養液の濾過実験を行った。酵母懸濁液は乾燥酵母を水に懸濁して調製した。バクテリア培養液は乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を MRS 培地を用いて培養して調製した。種々の条件で作成した多孔質膜を用い、濾過条件 (菌体の種類、菌

体濃度、圧力) を変化させて濾過実験を行い、各多孔質膜の菌体の阻止率及び透過流束を測定した。

### (3) 生分解性ポリマーブレンド多孔質膜の細胞培養用足場材料としての応用

接着依存性動物細胞として、株化したヒト肝細胞 HepG2 を用い、PLLA-PCL-ポリマーブレンド多孔質膜上に播種して細胞の侵入と増殖について調べた。多孔質膜内の細胞の増殖は細胞を固定化処理後、膜を液体窒素中で切断し、走査型電子顕微鏡で観察して評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 生分解性ポリマーブレンド多孔質膜の内部構造の制御

#### ① PLLA-PCL-ポリマーブレンドの相分離特性

多孔質化にはポリマー溶液の濃度と相分離温度の関係 (相図) を求める必要がある。本研究課題のポリマーブレンドの場合はブレンド比も重要なパラメータであり、これを考慮した相図を実験的に求め、多孔質膜作製の基礎データとした (図 1)。各温度における図の Diluent 側 (上側) が 1 相、反対側が 2 相の領域となる。

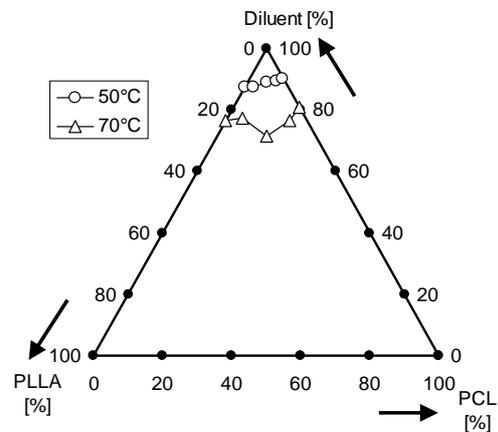


図 1 PLLA-PCL-希釈剤の相図. 希釈剤として 13%水含有 1,4-ジオキサンを用いた例.

#### ② PLLA-PCL-ポリマーブレンド多孔質膜の内部構造の制御

PLLA-PCL-希釈剤の溶液から熱誘起相分離法にて多孔質膜を作製したときの多孔質膜内部の構造を図 2 に示す。ポリ乳酸のみの場合は、比較的径の揃った孔が形成されていたのに対し、ポリマーブレンド多孔質膜の場合は大きな径をもつ孔と小さな径を孔が組み合わさった内部構造を示した。これはポリ乳酸とポリカプロラクトンが冷却の過程で溶

液から、希釈剤相が分離した後に、さらに高分子溶液相内部で相分離したためと考えられる。また、ブレンド比によっても内部構造が変化することが示された。

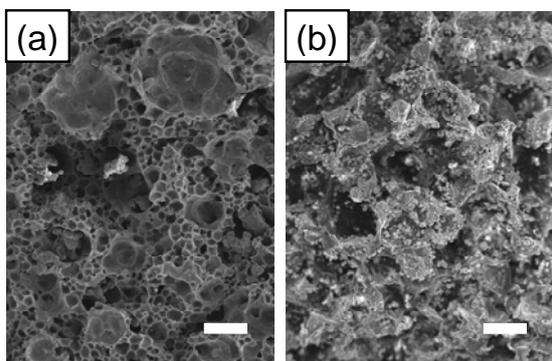


図2 PLLA-PCL ポリマーブレンド多孔質体の内部構造. Bar = 200  $\mu$ m. (a) PLLA:PCL = 1:1, (b) PLLA:PCL = 1:4.

#### (2) 生分解性ポリマーブレンド多孔質膜の濾過フィルターとしての応用

ポリ乳酸-ポリカプロラクトン-膜, ポリ乳酸-ポリブチレンサクシネート-膜を, 熱誘起相分離法, 非溶媒誘起相分離法を用いて作製し, その濾過特性を検討した。酵母懸濁液の濾過にはポリ乳酸-ポリカプロラクトン-膜が適していた。バクテリア懸濁液の濾過には, ポリ乳酸-ポリブチレンサクシネート-膜が適していた。バクテリア懸濁液用生分解性濾過膜については, 今後も研究を継続する予定である。

#### (3) 生分解性ポリマーブレンド多孔質膜の細胞培養用足場材料としての応用

図2に示した内部構造から, PLLA-PCL-ポリマーブレンド多孔質体は接着依存性細胞の足場となる内表面となる径の小さな孔と栄養分や老廃物が通過するための径の大きな貫通孔を有する生分解性足場材料への利用が可能と考えられた。そこで, ヒト肝細胞HepG2をこの多孔質材料とともに培養したところ, 材料の内部まで増殖することが示された。ポリ乳酸のみの場合は表面付近のみしか, 増殖しなかったが, PLLA-PCL-ポリマーブレンド多孔質体の場合は, 図3(b)のように内部にまで細胞が増殖していた。表面(図3(a))と比較すると細胞密度は低かったが, これは, 酸素の供給不足が原因と考えられる。本研究では実施できなかったが, 灌流型の培養システムを構成し, 適切な酸素運搬体を用いれば, PLLA-PCL-ポリマーブレンド多孔質体内部の細胞増殖密度も高められると考えられる。

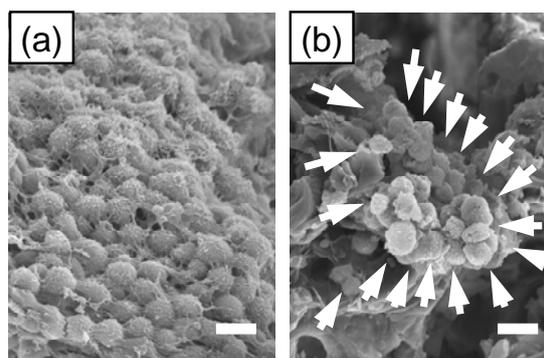


図3. PLLA-PCL-ポリマーブレンド(1:4)多孔質体表面及び内部でのHepG2細胞の増殖. 10日間培養後. Bar = 10  $\mu$ m. 材料表面からの深さ(a) 0.0 mm, (b) 0.5 mm.

#### (4) 研究成果のまとめ

以上のように本研究では生分解性ポリマーブレンド多孔質膜を作製するための相分離条件と作製した PLLA-PCL ポリマーブレンド多孔質体の構造評価を行い, 濾過フィルターと足場材料への応用を検討した。一部, 研究継続中のものもあるが, おおむね研究計画を達成できたと考えている。研究成果の一部を学術雑誌や国内外の学会にて発表した。これらの研究成果により, 研究代表者は, 日本食品工学会奨励賞を受賞し, 日本膜学会にてシンポジウム講演を依頼されるなど, 高い評価を受けた。また, イノベーションジャパン2007にて研究シーズの発表を行うなど, 社会への研究成果の紹介にも努めた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線を記した)

[雑誌論文] (計5件)

- ① T. Tanaka, S. Eguchi, H. Saitoh, M. Taniguchi, and D.R. Lloyd, Microporous foams of polymer blends of poly(L-lactic acid) and poly( $\epsilon$ -caprolactone), *Desalination*, 234 巻, 175-183 (2008), 査読有。
- ② 田中孝明, 生分解性プラスチック製濾過膜の開発, *膜*, 33 巻(4), 165-172 (2008), 査読有。
- ③ 田中孝明, 谷口正之, ポリ乳酸の多孔質化・複合化による機能性材料の開発, *日本生物工学会誌*, 86 巻(7), 346-348 (2008), 査読無。
- ④ T. Tanaka, S. Eguchi, T. Aoki, T. Tamura, H. Saitoh, M. Taniguchi, H. Ohara, K. Nakanishi, and D.R. Lloyd, Production of laccase by membrane-surface liquid culture of

*Trametes versicolor* using a poly(L-lactic acid) membrane, *Biochem. Eng. J.*, 33 卷(2), 188-191 (2007), 査読有.

- ⑤ 田中孝明, 食品微生物の膜分離に関する研究, *日本食品工学会誌*, 8 卷(4), 221-229 (2007), 査読有.

[学会発表] (計6件)

- ① 田中孝明, 生分解性プラスチック製濾過膜の開発, 日本膜学会, 依頼講演, 2008年5月15日, 東京都新宿区.
- ② 田中孝明, 谷口正之, ポリ乳酸の多孔質化・複合化による機能性材料の開発, 日本生物工学会, 2007年9月27日, 東広島市.
- ③ T. Tanaka, S. Eguchi, H. Saitoh, M. Taniguchi, and D.R. Lloyd, Microporous foams of polymer blends of poly(L-lactic acid) and poly( $\epsilon$ -caprolactone), The Fourth Conference of Aseanian Membrane Society, 0-11-3, 2007年8月18日, 台湾台北市.
- ④ 田中孝明, 食品微生物の膜分離に関する研究, 日本食品工学会, 受賞講演奨励賞, 2007年8月3日, 大阪府吹田市.
- ⑤ T. Tanaka, T. Aoki, S. Eguchi, M. Taniguchi, W. Ogawa, Y. Tanabe, and D.R. Lloyd, Mechanical properties of microporous foams of biodegradable polyesters formed via thermally induced phase separation, 2006 AIChE Annual Meeting, 475l, 2006年11月15日, アメリカ合衆国サンフランシスコ市.
- ⑥ T. Tanaka, T. Tsuchiya, H. Takahashi, M. Taniguchi, and D.R. Lloyd, Depth filter membranes of biodegradable polyesters, 2006 AIChE Annual Meeting, 257f, 2006年11月14日, アメリカ合衆国サンフランシスコ市.

[その他]

- ① ホームページ  
[http://tctanaka.eng.niigata-u.ac.jp/top\\_e.html](http://tctanaka.eng.niigata-u.ac.jp/top_e.html)
- ② 受賞  
田中孝明, 日本食品工学会 2006 年度奨励賞, 「食品微生物の膜分離に関する研究」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 孝明 (TANAKA TAKAAKI)  
新潟大学・自然科学系・准教授  
研究者番号：00217043

(2) 研究分担者  
なし

### (3) 連携研究者

谷口 正之 (TANIGUCHI MASAYUKI)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：00163634