

平成22年 4月20日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19350107
 研究課題名（和文） ブロック共重合体ナノポーラス構造のサイズ制御と機能化による医用材料への展開
 研究課題名（英文） Pore-Size Control and Fictionalization of Nanoporous Membrane Prepared from Block Copolymer Precursor for Medical Device Materials
 研究代表者
 上原 宏樹（UEHARA HIROKI）
 群馬大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：70292620

研究成果の概要（和文）：ポリエチレン／ポリスチレン・ジブロック共重合体の結晶化フィルムに様々な時間でエッチング処理を施してナノポーラス膜を調製したところ、エッチング時間の経過に伴い細孔モルフォロジーが明瞭化していることが走査プローブ顕微鏡像から確認された。そこで、細孔サイズを定量的に比較するために、観察像から断面プロファイルを切り出し、細孔サイズ分布を見積もった。平均細孔サイズはエッチング時間とともに増加していることがわかった。これらエッチング膜に加えて、エッチング処理を施していない結晶化フィルム（細孔サイズ0nm）を用いてヒト肝ガン細胞 Hep G2 の増殖実験を行った。その結果、どの膜上でも細胞の増殖が認められた。また、細胞培養1週間培養後トリプシンを用いた細胞分離処理後の膜の様子を比較したところ、ナノポーラス膜では細胞分離処理後も細胞が膜表面に残存していることがわかった。そこで、回収した細胞数を計測したところ、細孔サイズの増大に従い、回収細胞数が減少していることが確認された。これは、ナノポーラス膜では細胞の持つ仮足が膜表面の細孔内部にまで入り込むことで強固に接着していることを示唆していた。

研究成果の概要（英文）：Nanoporous membranes with different pore dimensions were prepared from a series of polyethylene (PE) / polystyrene (PS) diblock copolymer films by acid etching under various conditions. Scanning probe microscope (SPM) observation indicated that the pore morphology was emphasized by elongation of etching time with elimination of amorphous PS phase. However, further etching destructs the PE crystalline phase which supports the network geometry of nanoporous membrane. For quantitative analyses of pore morphology, pore size distribution was evaluable by the height profiles extracted from a series of the scanning probe microscope images. The pore size was controllable by acid treatment conditions. Their biological applications were examined by cell proliferation tests using Hep G2 cells. Cell proliferation was confirmed for all membranes prepared in this study. However, membranes exhibiting typical nanoporous morphologies gave the lower numbers of cells after cell removal treatment by trypsin addition and centrifugation, compared to those for un-etched membrane having smooth surface. These results indicate the robust attachment between cell and membrane surface for the former membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・高分子・繊維材料

キーワード：ナノ・ポーラス、ブロック共重合体、細孔膜、医用材料、自己組織化、インテリジェント・メンブレン

1. 研究開始当初の背景

ブロック共重合体はナノメートルサイズの相分離構造を自己組織化的に形成する。したがって、現在、キーテクノロジー材料として注目されているが、その利用は基板に精密リソグラフィを行うための薄膜マスク材などに限られていた。これは、ブロック共重合体の形成する相構造の連続性が、バルク膜の場合には膜厚全体にわたっては保障されないためであった。

これに対して、本研究代表者らは、結晶性セグメントと非晶性セグメントの組み合わせで構成されるブロック共重合体を選択し、結晶化条件を最適化することで結晶相と非晶相がそれぞれネットワーク状につながった「共連続」構造を得ることに成功した。出発試料としては、結晶性のポリエチレン(PE)と非晶性のポリスチレン(PS)で構成されるジブロック共重合体を用い、結晶化条件を制御することによって結晶相／非晶相の割合を変化させた一連のフィルム試料を作製した。その結果、90°Cで結晶化させると、厚さ数十 μm に渡って、結晶相と非晶相がそれぞれ連結した共連続構造が得られることが明らかとなった。これを酸処理することによって、非晶相のみを選択的に除去したところ、直径約30nmの貫通細孔がネットワーク状に繋がったナノ・ポーラス構造が得られた。

2. 研究の目的

本研究では、上記のような研究成果を元に、ブロック共重合体が形成する結晶／非晶の共連続相構造のサイズ・規則性を制御するためのエッチング条件の最適化を試みる。さらに、これらの膜中の細孔壁表面には酸処理によって-COOH基や-NO₂基が分布していると考えられるので、これらを足場としたナノ・ポーラス膜上での細胞組織の増殖を行い、生体適合材料としての可能性を検討する。なお、細胞増殖実験に用いる細胞としては、増殖速度の速く、ヒト由来である肝ガン細胞HepG2を用いた。

3. 研究の方法

3.1 試料

試料は、Polymer source社製ポリスチレン(PS) /ポリエチレン(PE)・ジブロック共重合体を用いた。PS成分及びPE成分の重量平均分子量はそれぞれ54000及び67000であり、

分子量分布は1.07であった。

3.2 フィルム作成

μ -キシレンに試料を0.5wt%になるように沸点(180°C)にて5分間溶かし込みを行い、室温でテフロンシャーレ(直径100mm)にキャスト後、約2週間室温で乾燥させ、キャストフィルムを得た。このフィルムを減圧オーブンにて室温で3日間減圧乾燥させた後、180°Cで5分間熔融させ、その後、放冷によって90°Cまで冷却し、この温度で1週間等温結晶化させた試料を作製した。

3.3 発煙硝酸エッチング処理

試料フィルムから非晶相のみを選択的に取り除くために、発煙硝酸エッチングを行った。3.2.3で作成した結晶化フィルムを、21°C及び26°Cで発煙硝酸(濃度97%、密度1.52g/cc)中に10、20、30、40、50、60分間浸漬した。その後、エッチング膜を蒸留水及びエタノールで洗浄し、エタノールの入ったバイアル中で保存した。

3.4 再エッチング処理

3.3の手順で作成したPEナノポーラス膜の細孔サイズを制御するために上記の発煙硝酸で再エッチング処理を施した。再エッチング時間は、3分及び7分とした。

3.5 測定

3.5.1 DFM測定

様々な条件で作成したPEナノポーラス膜を1cm×1cmの正方形に切り出し、SIINT製環境制御型ユニットE-sweepダイナミックフォースモード(DFM)を用いて、走査エリア1500nm四方の表面構造を測定周波数0.5Hzで観察した。このとき使用したカンチレバーは、先端半径が10nmのものを使用した。

3.5.2 細胞増殖実験

Fig.1のように、24穴シャーレを用い、各条件でエッチングした膜をUV殺菌したステンレスナットで固定し、その膜上でHepG2 2.0×10⁴cells/wellをまき、1週間培養した。培養は、温度37°C、0.5%CO₂に設定したインキ

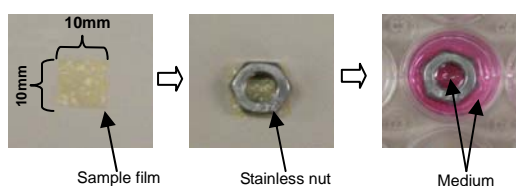


Fig.1. Experimental setup for cell proliferation tests examined this work.

ューベーター中で行った。また、培地はD-MEM(低グルコース)を使用し、1日おきに交換した。培養後、リン酸バッファー(PBS)とエチレンジアミン四酢酸(EDTA)で洗浄し、細胞を膜からはがすためにトリプシンを滴下し、インキュベーター中で約5分放置した。さらに培地を加えてピペッティング後、遠心機にかけて膜から細胞をはがした。膜を取り出し、さらに遠心機にかけ細胞と培地を分離して培地を吸引した。新たな培地10 μ lとトリパンブルー10 μ lを加えて、細胞の染色を行った。これをマイクロピペットで取り、血球計算盤で細胞数をカウントした。

4. 研究成果

4.1 エッチング膜のモルフォロジー観察

Fig. 2 に処理温度 26 $^{\circ}$ C でエッチング時間を変えて調製した PE ナノポーラス膜の DFM 像を示す。それぞれ(A)が10分間、(B)が20分間、(C)が30分間、(D)が40分間、(E)が50分間、(F)が60分間のエッチング時間である。エッチング時間40分までは、時間の経過とともに細孔モルフォロジーが明瞭となっているが、50分以降では細孔モルフォロジーが不明瞭である。

4.2 細孔サイズの定量化

エッチング時間の経過に伴う細孔モルフォロジーの変化を定量的に議論するために、

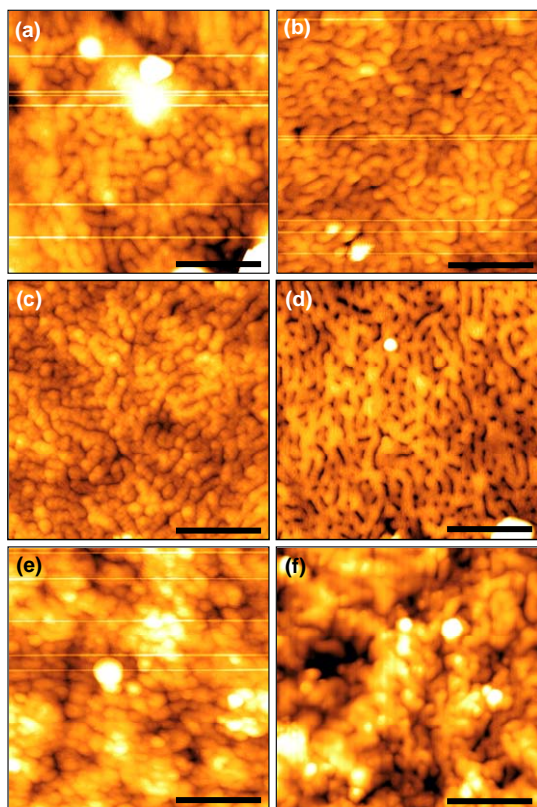


Fig.2. A series of DFM images of membranes etched under different treatment times at 26 $^{\circ}$ C (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60min. Scale bar, 500 nm.

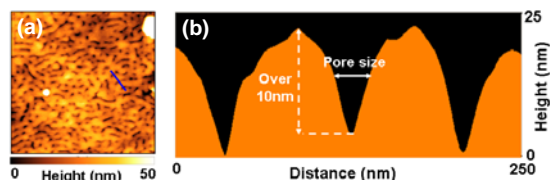


Fig.3. Pore-size estimation procedure. Height profile (b) was extracted from the blue line in whole image (a).

細孔サイズの定量化を行った。その方法を Fig. 3 に示す。まず、Fig. 3a の様に DFM 像から細孔の長軸方向に対して垂直方向に断面プロファイルを100個切り出した。次に、カンチレバーの先端半径が10nmであることから深さ10nm以上の凹凸を細孔とし、その幅を計測した(Fig. 3b)。サイズ計測後、平均値を求めエッチング時間に対してプロットしたグラフが Fig. 4 である。これより、エッチング時間40分で最大22nmの細孔が得られることがわかった。一方エッチング時間20分までは細孔サイズに大きな変化は見られなかったことから、この時間領域は発煙硝酸により膜表面が親水性となる過程(親水化過程)に相当すると考えられる。これ以降、40分までは、PS成分が溶け出すことで、細孔サイズが増大する開孔化過程であると考えられる。一方、エッチング時間50分以降では、PE成分までもが酸エッチングされるために、細孔サイズの見積もり値が小さくなると考えられる。

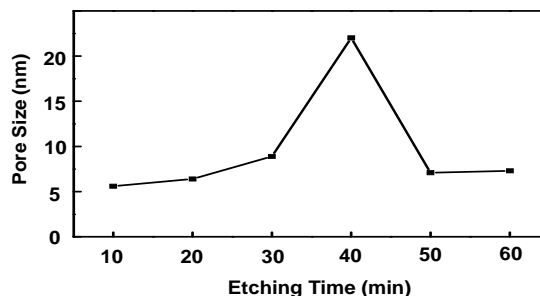


Fig.4. A relationship between pore size and etching time for the membranes etched at 26 $^{\circ}$ C.

次に、処理温度21 $^{\circ}$ Cでも同様の方法でエッチングを行い、PEナノポーラス膜を調製した。このDFM像をFig. 5に示した。それぞれのエッチング時間は(A)が30分、(B)が40分、(C)が50分である。処理温度26 $^{\circ}$ Cのときと同様の計測方法で、細孔サイズを見積もったところ、細孔サイズはエッチング時間50分で最大値20nmを示した。そこで、これら異なるエッチング温度における親水化過程と開孔化過程の反応時間及び反応速度の比較を行った(Fig. 6)。それぞれの処理温度について、開孔化過程におけるグラフの傾きは温度にかかわらず、ほぼ同じ値を示しており、反応速度に変化は認められなかった。一方、親水化過程については、処理温度21 $^{\circ}$ Cの方が長か

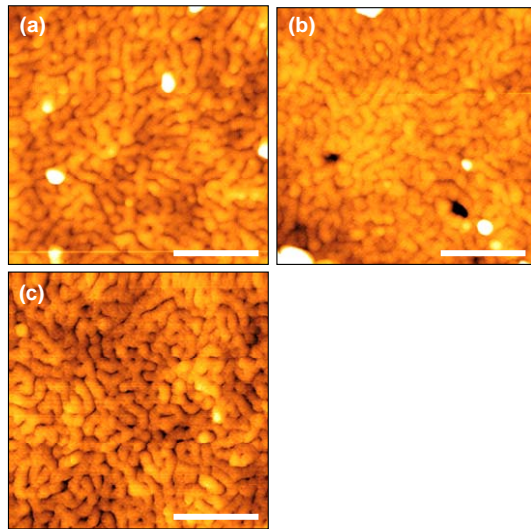


Fig.5. A series of DFM images of the membranes etched for different treatment times at 21°C: (a) 30, (b) 40, (c) 50min. Scale bar, 500 nm.

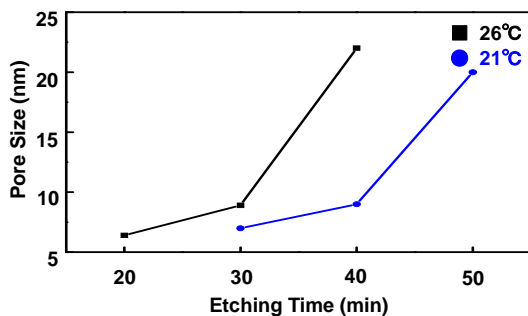


Fig.6. A relationship between pore size and etching time. The data obtained for different etching temperatures are compared.

った。このことは、処理温度が親水化過程に影響を与えていることを示唆している。この理由として、分解されにくいポリエチレン成分が膜の最表面に偏析していることが挙げられる。

4.4 再エッチングによる細孔サイズ制御

細孔モルフォロジーの不明瞭なエッチング膜や細孔サイズの小さなナノポーラス膜の細孔サイズを増大させる方法として、エッチング膜の再エッチング処理を検討した。Fig. 7にエッチング時間40分で得られた細孔モルフォロジーの不明瞭なエッチング膜(A)と、その膜を3分間(B)及び7分間(C)再エッチング処理を施したエッチング膜のDFM像を示す。このとき、エッチング時間が合計47分の膜でPE ナノポーラス膜に特徴的な細孔モルフォロジーが確認された。

そこで、4.3と同様の方法で細孔サイズを計測し、エッチング時間に対してプロットしたものをFig. 8に示す。このとき細孔サイズは、エッチング時間47分で最大17nmとなった。Fig. 6と比較すると、Fig. 10の再エッチングの方が短時間で細孔サイズを増大させ

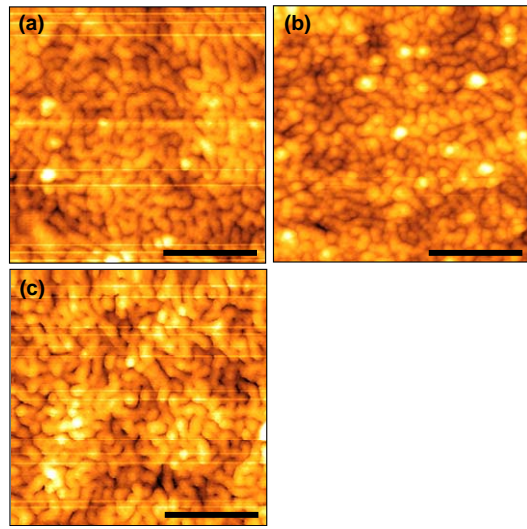


Fig.7. A series of DFM images of membranes 1st-etched and 2nd-etched for different treatment times at 21°C: (a)1st-etched for 40min, (b) 2nd-etched for 3min (total etching time of 43min), (c) 2nd-etched for 7min (total etching time of 47min). 2nd-etching was made for the membrane 1st-etched for 40min. Scale bar, 500 nm.

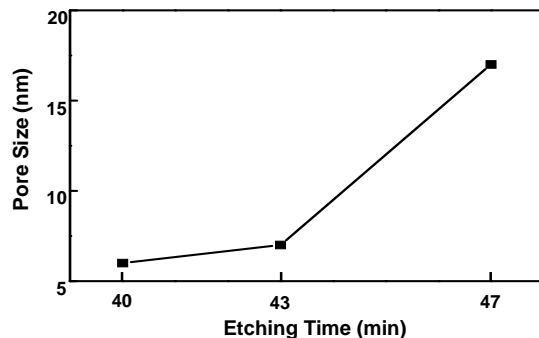


Fig.8. A relationship between pore size and etching time for the 2nd-etched membranes.

ることが可能であることがわかった。これは、最初のエッチングによって試料表面が十分に親水化するためであると考えられる。

4.4 エッチング膜上における細胞増殖実験

未処理膜(エッチング時間0分)と処理温度26°Cで作成したエッチング時間20分、40分、60分のエッチング膜上でHepG2細胞の増殖実験を行った。その結果、どの膜上でも細胞の増殖が観察された。しかし、培養6日後にリン酸バッファー(PBS)とエチレンジアミン四酢酸(EDTA)で洗浄後、トリプシン処理により細胞をはがした結果を比較すると、未処理膜では細胞の回収が容易だったのに対し、細孔を有するエッチング膜では回収処理後でも膜上に多くの細胞が残っていた (Fig. 9)。特に細孔サイズの最も大きなエッチング時間40分の膜では、その様子が顕著に現れている。これは、細胞が持つ仮足が細孔内部にまで入

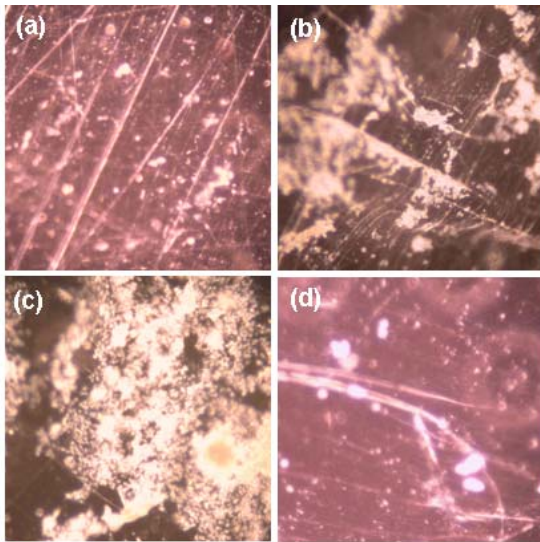


Fig.9. Optical microscope images for residual cells after washing with PBS and EDTA after 6-day cell-proliferation treatment: (a) initial, (b) 20-min, (c) 40-min, (d) 60-min etched membranes. Etching was made at 26°C

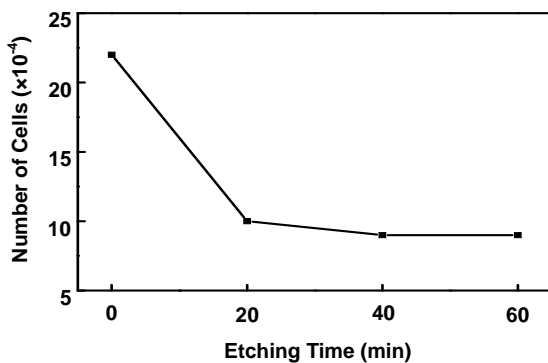


Fig.10. A relationship between number of cells removed from membrane surface and etching time for the membrane preparation.

り込むことにより、強固に接着したためであると考えられる。そこで、洗浄液に含まれる細胞数をカウントすれば、逆に接着力の弱い細胞の量を定量化できると考えた。Fig. 10は、各エッチング時間で調製した膜について、細胞増殖後の回収溶液中に存在した細胞数を比較したものである。このグラフから、エッチング時間の増加に伴い回収された細胞数、つまり接着の弱い細胞が減少していることがわかる。このことは、ナノポーラス化によって、細胞の接着性が向上したことを示唆している。

4.4 結論

PE-*h*-PS 結晶化フィルムを発煙硝酸エッチングしてナノポーラス膜を調製した。得られたナノポーラス膜の構造をDFM観察し、細孔サイズおよびその分布を解析したところ、エッチング時間を変化させることにより細孔サイズのコントロールが可能であることが

わかった。この際のフィルム構造変化は、エッチング初期ではフィルム表面の親水化が起り、その後、PS成分が分解される開孔化過程、さらにPE骨格相がエッチングされる破壊過程にされる破壊過程に分けられることがわかった。なお、エッチング処理温度は主に親水化過程に影響を与えていた。すなわち、エッチング温度が高いほど、親水化過程が短くなり、より短時間でPS成分を除去することができた。また、一度エッチングした膜を再度エッチングすることにより、細孔サイズを増大させることができた。このとき同程度の細孔サイズを与えるエッチング処理の時間は、一度目のエッチングに比べ短縮されていた。これは、一度目のエッチングによって最表面層の親水化が進んでいたためであると考えられる。

これら各エッチング時間で処理した膜を対象として細胞増殖実験を行ったところ、膜上での増殖状態はほとんど同じであった。しかし、細胞分離処理を行った後では、細孔径の増大とともに膜上に残存する細胞数が増加していた。これは、ナノポーラス化によって発達した細孔内部に細胞が持つ仮足が入り込むことにより膜表面と強固に接着したためであると考えられる。今後、このナノポーラス膜の細孔部分を化学修飾することにより、生体分子を認識可能なセンサー膜が調製できると期待される。

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)

[雑誌論文] (計4件)

① Masaki Kakiage, Rie Takamastu, Hiroki Uehara, Takeshi Yamanobe, Keizo Suzuki, “Nano-Platelet Structure of Clay Materials Observed by Atomic Force Microscope”, *Key Engineering Materials*, 査読有, in press.

② Masaki Kakiage, Tomoyuki Ichikawa, Takeshi Yamanobe, Hiroki Uehara, Daiske Sawai, “Structure and Property Gradation from Surface to Bulk of Poly(L-lactic acid)/Poly(D-lactic acid) Blended Films as Estimated from Nanoscratch Tests Using Scanning Probe Microscopy”, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 査読有, in press

③ Hiroki Uehara, Masaki Kakiage, Miho Sekiya, Tsukasa Yamagishi, Takeshi Yamanobe, Katsuhiko Nakajima, Toshio Watanabe, Kumiko Nomura, Kohei Hase, Masatoshi Matsuda, “Novel Design Solving the Conductivity vs Water-Uptake Trade-Off for Polymer Electrolyte Membrane by Bicontinuous Crystalline/

Amorphous Morphology of Block Copolymer”, *Macromolecules*, 査読有, Vol. 42, No. 20, 2009, pp. 7627-7630

④ Hiroki Uehara, Masaki Kakiage, Miho Sekiya, Daisuke Sakuma, Takeshi Yamanobe, Nao Takano, Antoine Barraud, Eric Meurville, Peter Rysler, “Size-Selective Diffusion in Nanoporous but Flexible Membranes for Glucose Sensors”, *ACS Nano*, 査読有, Vol. 3, No. 4, 2009, pp. 924-932

[学会発表] (計 12 件)

① 上原宏樹, 「高分子材料の延伸過程における相構造形成のin-situ計測と高性能化・高機能化」、日本レオロジー学会・高分子加工技術研究会・第 72 回研究会例会、2010. 3. 10、東工大大岡山キャンパス・蔵前会館

② Masaki Kakiage, Rie Takamatsu, Hiroki Uehara, Takeshi Yamanobe, “Nano-Platelet Structure of Clay Materials Observed by AFM and Its Application for Polymer Composites”, International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (AMDE 2009), 2009. 12. 10, Kiryu (Gunma)

③ Yusuke Karaki, Hiroki Uehara, Takeshi Yamanobe, “Stereo-Complex Crystallization of Poly(lactic acid) Enhanced in Nanospace Confined by Block Copolymer Phase Separation”, 11th Pacific Polymer Conference 2009, 2009. 12. 8, Cairns (Australia)

④ 狩野真貴子, 坂本憲昭, 上原宏樹, 井上裕介, 山延健, 「ポリエチレンナノポーラス膜の細孔サイズ制御と生体膜への応用」、第 58 回高分子学会討論会、2009. 9. 17、熊本大学

⑤ 齊藤正純, 上原宏樹, 山延健, 野口圭太, 大石香月, 秋山映一, 「剛直性及び多分岐性を付与した新規シリコーンの熱架橋挙動のin-situ計測とその力学物性評価」、第 58 回高分子学会討論会、2009. 9. 18、熊本大学

⑥ 山延健, 池田佳史, 上原宏樹, 「固体状態におけるシクロデキストリン/ポリ乳酸包接複合体の構造と分子運動に関する研究」、第 26 回シクロデキストリンシンポジウム、2009. 9. 9、栃木県総合文化センター

⑦ 上原宏樹, 「分子鎖絡み合い・異方性に着目した汎用性高分子のナノ構造制御とケイ素材料への応用」、第 4 回相模ケイ素材料フォーラム、2009. 8. 27、相模中央化学研究所

⑧ 齊藤正純, 上原宏樹, 山延健, 野口圭太, 大石香月, 秋山映一, 「剛直性及び多分岐性を付与した新規シリコーンの熱架橋挙動のin-situ計測とその力学物性評価」、第 4 回相模ケイ素材料フォーラム、2009. 8. 27、相模中央化学研究所

⑨ 池田佳史, 上原宏樹, 山延健, 「シクロデキストリン包接複合体の構造に関する研究」、高分子学会関東支部群馬栃木地区講演会、

2009. 3. 17、群馬大学桐生キャンパス

⑩ 横山祐佳, 唐木由佑, 上原宏樹, 山延健, 「ポリL乳酸/ポリD乳酸・ブレンドフィルム」のステレオコンプレックス結晶化と熱処理による構造変化」、高分子学会関東支部群馬栃木地区講演会、2009. 3. 17、群馬大学桐生キャンパス

⑪ 上原宏樹, 「分子鎖絡み合い・異方性に着目した高分子材料のナノ構造制御と物性発現」、東工大・G-COE化学講演会、2009. 1. 23、東工大

⑫ 市川智之, 攪上将規, 上原宏樹, 山延健, 澤井大輔, 「SPMナノスクラッチにより見積もったポリ乳酸フィルムの表面変形挙動」、第 57 回高分子学会年次大会、2008. 5. 29、パシフィコ横浜

[図書] (計 2 件)

① Hiroki Uehara and Takeshi Yamanobe, “Morphology and Molecular Motion of Polyethylene Reactor Powders”, in *Reactor Powder Morphology*, L. P. Myasnikova and P. J. Lemstra Ed., Nova Science Publishers, New York, in press.

② Takeshi Yamanobe, Hiroki Uehara, Masaki Kakiage, “Practical NMR Analysis of Morphology and Structure of Polymers”, in press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ポリ乳酸ステレオコンプレックス結晶の製造方法、ポリ乳酸、その成形体、合成繊維、多孔体およびイオン伝導体

発明者: 上原宏樹、山延健、唐木由佑

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-209413

出願年月日: 2009 年 9 月 10 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 宏樹 (UEHARA HIROKI)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 70292620