

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22350101

研究課題名(和文)水の相転移挙動から観た高分子材料の生体適合性の発現機構

研究課題名(英文)Expression mechanism of biocompatibility of polymer materials based on the state-change behavior of incorporated water molecules

研究代表者

北野 博巳 (Kitano, Hiromi)

富山大学・理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：40115829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：血液適合性(血小板接着抑制能)に優れた高分子材料中に観られる水の低温結晶化(昇温過程での結晶化)は、無定型氷から結晶氷への転移ではなく、単分子あるいは2-3量体の水分子が起源であることを、温度可変赤外分光法により明らかにした。これは、生体適合性材料中の特殊な水素結合ネットワーク構造を有する水の存在を否定している。さらに、生体適合性に劣る数種の高分子材料中の水の温度摂動に伴う状態変化を調査し、多くの材料中に低温結晶化水を見いだした。高分子材料のガラス転移温度および構成元素の比較により、低温結晶化水の有無は材料の生体適合性ではなく、高分子鎖の運動性および水分子の捕捉力に依存していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Using temperature-variable infrared spectroscopy, recrystallization phenomena (crystallization of water molecules during the heating process) observed for water molecules incorporated in blood-compatible polymer materials could be ascribed to state changes of monomeric or oligomeric water molecules and not to the transition of amorphous ice to crystal ice, which denied the presence of water molecules having a specific hydrogen-bonded network. Furthermore, the infrared measurements of water molecules incorporated in several kinds of polymer materials without blood compatibility indicated the presence of recrystallization phenomena, too. Comparing the glass transition temperature with the composition of elements in the polymers indicated that the recrystallization phenomena are strongly related to the mobility of polymer chains and the electrostatic interaction between water molecules and the polymers.

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：生体適合材料 水の構造 相転移 温度可変赤外分光法

1. 研究開始当初の背景

医用インプラント材料あるいはバイオセンシング素子などに要求される最も基本的な表面特性は生体適合性である。血液と接触する材料は、血液成分の凝固・粘着は許されず、バイオセンシング素子は、バイオマーカー(ある疾患由来の生体物質)以外の夾雑物の接着を回避しなければハイスループットアッセイは実現できない。両者ともに生体由来物質の非接着性が基本的な要求事項であるが、この生体適合性の発現機構については決定的な結論を得るに至っておらず、専らスクリーニング的に材料探索が行われている。しかしながら、先進的な生体適合材料の開発のためには、その発現機構の解明が必須である。

この分野における深刻な問題は、各研究グループが異なった基準で生体適合性を述べている点であり、”生体由来物質”を何にするかによって全く異なる結論を与える。

一方で、生体適合性(タンパク質接着量が少ないという意味で)を有するとされる材料中の水の動態から生体適合性の発現機構を解明する試みがなされている。高分子-水系の水の動態の評価手法で、最も一般的に用いられる示差走査熱量法(DSC)によれば、生体適合性に優れた材料中の水は、 -100°C においても凍らない水(不凍水)が少ないとする幾つかの報告がある。これとは別に、申請者らは、室温下での振動分光法(VS)により固体高分子および水溶液中の水を評価し、生体適合材料の水和圏は極めて小さい、ということを見出している。DSC法および室温下でのVS法は、原理や捉えている物理化学現象は異なるが、両報告からは、水分子間の水素結合をあまり乱さない、あるいは水分子を強く拘束しない材料が生体適合性を有する、と解釈できると申請者らは考えた。ところが最近、申請者らは、振動分光法により固体高分子中に存在する極微量の水の相転移挙動の *in site* 測定が可能な手法を構築し、固体高分子中の水の相転移について検討したところ、これまでの常識では考えられなかった水の凝縮、結晶化、蒸着、昇華が存在することを見出した。この結果は、DSC法による解釈を全て否定するものではないが、DSC法により得られる情報の一部を修正しなければならないことを強く示唆する。

2. 研究の目的

上述の背景を基に、最終的に高分子材料の生体適合性の発現機構を解明することを目指し、示差走査熱量法および申請者が開発した温度可変赤外分光装置を用いて、種々の高分子中の水の構造(相転移挙動)を解析し、熱量測定法と振動分光法により解釈される水の相転移の違いを明確化する。生体適合性(タンパク質の吸着量および細胞群の反応(接着、伸展挙動))が異なる材料を選び出して重点的に調査し、水の相転移と生体適合性との相関について検討する。

3. 研究の方法

赤外吸収スペクトルの温度依存測定は、フーリエ変換赤外分光器と分光用クライオスタットを、自動ステージにより運動し構築した温度可変赤外分光装置(Figure 1)により行った。分光器は、Perkin Elmer社製近赤外分光器 SPECTRUM ONE NTS、自動ステージおよびステージコントローラは、シグマ光機株式会社製 SGSP26-150 および Mark-204、分光用クライオスタットおよび温度コントローラは、Oxford Instruments社製 Optistat-DN および ITC601 T で構成した。Optistat-DNの温度モニター部位は、試料設置部位と異なるため、別途試料付近に測温体を設置し試料温度をモニターした。

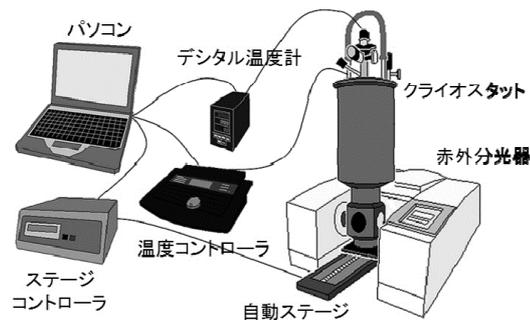


Figure 1. Schematic illustration of temperature variable Fourier transform infrared spectroscopy.

温度可変赤外分光装置を用いて、種々の含水固体高分子中あるいは高分子水溶液中の水の温度依存スペクトルを得た。測定温度は、298 K から 170 K の範囲とした。固体高分子の場合には、乾燥高分子膜との差スペクトルから、水のみスペクトルを得た。

4. 研究成果

4-1. ポリ-*n*-ブチルアクリレート中の水の相転移挙動

ポリスチレンおよびポリ-2-メトキシエチルアクリレート(PMEA)膜中の一次水和水の相転移挙動に関する研究から、一般的解釈である「一次水和水 = 不凍水」は、必ずしも正しくなく、不凍水のみ存在すると考えられてきた含水領域においても水の状態変化が起こりうることを明らかにしてきたが、本研究においては、さらに、固体高分子中の水の凝縮、蒸着、昇華、気化の4つの状態変化は、広く水構造の解析に用いられている熱量測定では、検出不可能であることを明らかにした。具体的には、ポリ-*n*-ブチルアクリレート中の一次水和水の相転移挙動を分光学的に解析したところ、ポリスチレンと同様に、一次水和水の凝縮・凍結・蒸着および昇華・融解・気化が確認された(Figure 2)。しかしながら、熱量測定においては、凝縮、蒸着、あるいは昇華、気化を明確に示すシグナルを得ることができなかった(Figure 3)。この結果の差異は、それぞれの測定手法の水に対する感度の違いではなく、検出対象が異なる、と

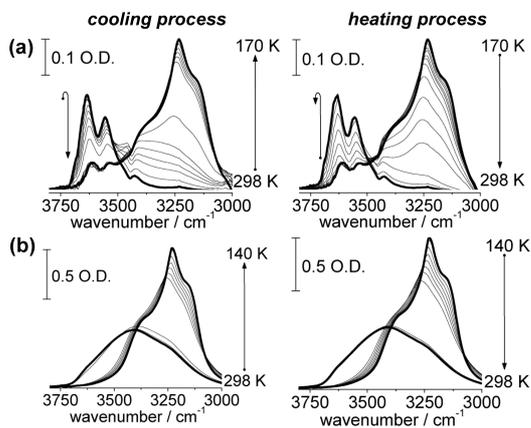


Figure 2. Temperature-dependence of infrared spectrum of water in poly (*n*-butyl acrylate) with a water content of 0.44 wt% (a) and pure water (b).

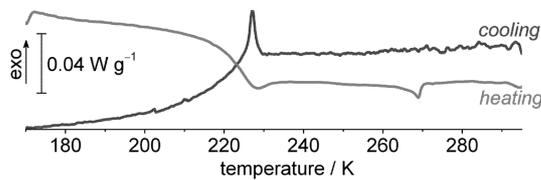


Figure 3. DSC curve of a hydrated poly(*n*-butyl acrylate) with a water content of 0.44 wt%.

という原理的な問題であることが判明した。

熱量測定は、系の熱流束をともなう転移（変化）を検出するが、固体高分子中の一次水と水の凝縮、蒸着、あるいは昇華、気化は、それぞれの転移と同時に、高分子マトリックスからの脱着あるいはマトリックス中への収着を伴い、その脱・収着熱が、水の相転移熱と逆符号でほぼ等しく、互いの熱流束が打ち消され、熱量測定では検出できないと考え、上記の結果を説明できる。

4 - 2 . 水に不溶な高分子中の水の相転移挙動

生体適合性に劣るとされる高分子材料 (Table 1) 中の水の温度摂動に伴う状態変化について温度可変赤外分光法を用いて調査したところ、多くの材料中に低温結晶化水が存在することが判明した。評価した高分子材料のガラス転移温度および構成元素を比較したところ、低温結晶化水の有無は、

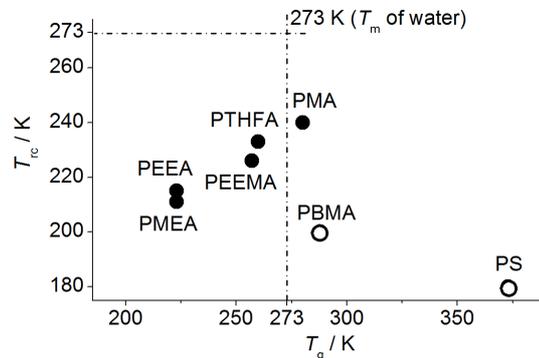


Figure 4. Relation between recrystallization temperature (T_{rc}) of water in various polymers and their T_g .

材料の生体適合性ではなく、高分子鎖の運動性および水分子の捕捉力に依存していることが分かった (Figure 4)。

4 - 3 . ポリエチレングリコール水溶液の相転移挙動

高い生体適合性を有する合成高分子として知られているポリエチレングリコール (PEG) 水溶液の再結晶化挙動を、温度可変赤外分光法により調査した。近年、高い抗血栓性を有することが見出された PMEА 中にも同様に再結晶化水が見出され、PEG と PMEА に共通のある特殊な水の存在が生体適合性の発現に関与する、と提案されている。我々はこれまでに、PMEА 中の再結晶化水は、単分子様の水が昇温過程で拡散を経て結晶化 (氷形成) することを報告した。本研究では、含水率 37.5 wt% の PEG 水溶液の再結晶化について精査した。PEG 水溶液中の水の再結晶化は、PMEА と同様に、降温速度に強く依存しており、低い降温速度で処理した試料では、降温過程で全ての水が結晶化し、昇温過程での結晶化は全く認められなかった (Figure 5 (left))。一方、高い降温速度では、降温過程での結晶化は観測されず、昇温過程での結晶化、すなわち再結晶化のみが観測された (Figure 5 (right))。PMEА の場合、240 K 付近での一段階の再結晶化であったのに対し、PEG 水溶液では、198 K および 210 K における二段階での再結晶化が観測された (Figure 7 (top))。水の再結晶化に伴う PEG 鎖の形態変化について、CH 伸縮振動領域の IR スペクトル (Figure 6 and Figure 5 (bottom)) をもとに評価したところ、

Table 1. Used polymers and their characteristics

polymer		$M_w \times 10^{-3}$	T_g / K	$W_C^* / wt\%$
Poly(<i>n</i> -butyl acrylate)	PBA	79	224	0.437
Poly(<i>n</i> -butyl methacrylate)	PBMA	54	288	0.199
Poly(2-methoxyethyl acrylate)	PMEA	66	223	2.99
Poly(2-methoxyethylmethacrylate)	PMEMA	87	273	1.88
Poly(2-ethoxyethyl acrylate)	PEEA	75	250	2.42
Poly(2-ethoxyethyl methacrylate)	PEEMA	61	266	1.23

* Water content (W_C) at 88 %RH

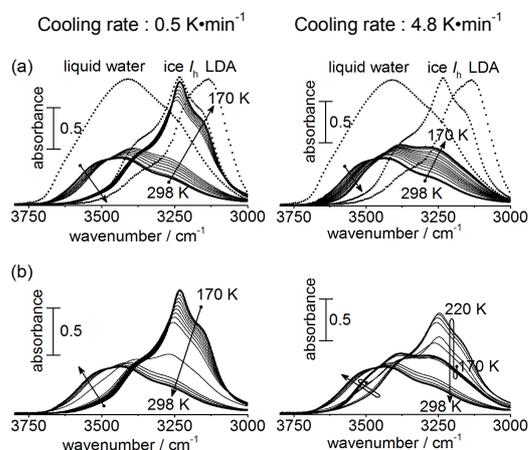


Figure 5. Temperature dependence of IR spectra of PEG aqueous solution with a water content of 37.5 wt% in the OH stretching region. (a) Cooling process, (b) heating process. LDA: low-density amorphous solid water

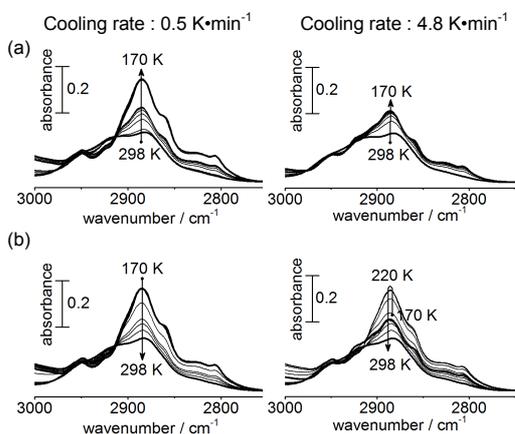


Figure 6. Temperature dependence of IR spectra of PEG aqueous solution with a water content of 37.5 wt% in the CH stretching region. (a) Cooling process, (b) heating process.

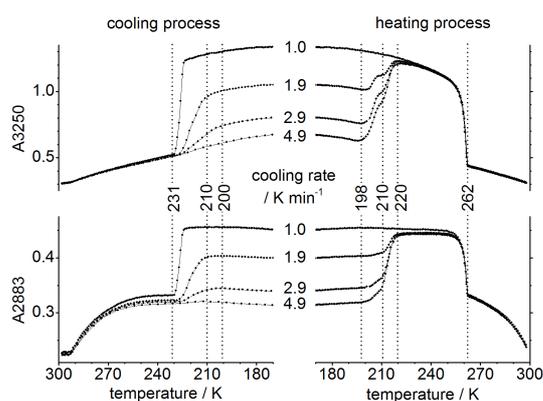


Figure 7. Temperature dependence of absorbance at 3250 cm^{-1} (A3250, top) and 2883 cm^{-1} (A2883) (bottom). A3250: Characteristic peak of ice I_h , A2883: Characteristic peak of helical conformation of PEG.

198 K で再結晶化した水は、PEG の結晶構造単位を有する高分子鎖に水和した水分子であり、210 K で再結晶化した水は、PEG のランダム鎖に水和した水分子であることが判

明した。これらの結果は、再結晶化水が、ある特定の水素結合構造を持たないこと示す。

4 - 4 . ま と め

本研究では、高分子濃厚水溶液中、および高分子マトリックス内部における水の状態変化と、当該材料の機能との相関を詳細に検討した。水の収着・凍結・融解は、高分子材料の劣化をもたらす重要な現象であり、本研究で用いた手法による *in situ* での解析により、汎用的高分子から高付加価値の高分子まで、また、極地や宇宙船内壁の下地材など極低温下で使用されるものまで、様々な材料の耐久性向上にとって不可欠の情報が得られると期待される。

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20件)

1. Temperature-responsive Polymer Brush Constructed on a Glass Surface by Atom Transfer Radical Polymerization. Kitano, H.; Kondo, T.; Suzuki, H.; Ohno, K., *J. Colloid Interface Sci.*, **2010**, *345*, 3250-331.
2. Molecular Recognition at the Exterior Surface of Zwitterionic Telomer Brush. Kitano, H.; Suzuki, H.; Matsuura, K.; Ohno, K., *Langmuir* **2010**, *26*, 6767-6774.
3. Thermally Latent Water in a Polymer Matrix. Gemmi-Ide, M.; Ohya, A.; Kitano, H., *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 4310-4312.
4. Direct Spectroscopic Observation of Binding of Sugars to Polymers Having Phenylboronic Acids Substituted with an *ortho*-Phenylazo group. Okasaka, Y.; Kitano, H., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2010**, *79*, 434-439.
5. Drying Dissipative Structures of Colloidal Crystals of Silica Spheres Coated with Polymer Brushes of Poly(carboxymethyl betaine). Okubo, T.; Suzuki, H.; Kitano, H.; Ohno, K.; Mizutani, M.; Tsuchida, A., *Colloid Polymer Sci.*, **2010**, *287*, 115-1165.
6. Suitability of Synthetic Copolymer Membranes as a Human Skin Alternative for *In Vitro* Skin Permeation Testing. Kiki, R.; Kimura, S.; Ueda, H.; Shimamura, T.; Numajiri, S.; Seki, T.; Juni, K.; Kitano, H.; Morimoto, Y., *Alternative for In Vitro Skin Permeation Testing*, **2010**, *15*, 14-27.
7. Anti-biofouling properties of amphoteric polymer brush constructed on a glass substrate. Kitano, H.; Kondo, T.; Iwanaga, S.; Nakamura, M.; Ohno, K., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, *88*, 455-462.
8. Silica particles coated with zwitterionic polymer brush: Formation of colloidal crystals and anti-biofouling properties in aqueous medium. Suzuki, H.; Murou, M.; Kitano, H.

Ohno, K.; Saruwatari, Y., *Colloids Surfaces B: Biointerface*, **2011**, *84*, 111-116.

9. Image Printing on the Surface of Anti-biofouling Zwitterionic Polymer Brush by Ion Beam Irradiation. Kitano, H.; Suzuki, H.; Kondo, T.; Sasaki, K.; Iwanaga, S.; Nakamura, M.; Ohno, K.; Saruwatari, Y., *Macromol. Biosci.*, **2011**, *11*, 557-564.

10. Polymer brush with pendent glucosylurea groups constructed on a glass substrate. Kitano, H.; Liu, T.; Tokuwaka, K.; Li, L.; Iwanaga, S.; Nakamura, M.; Kanayama, N.; Ohno, K.; Saruwatari, Y., *Eur. Polym. J.*, **2012**, *48*, 1875-1882.

11. Structure of water in the vicinity of a zwitterionic polymer brush as examined by sum frequency generation method. Kondo, T.; Nomura, K.; Murou, M.; Gemmei-Ide, M.; Kitano, H.; Ohno, K.; Noguchi, H.; Uosaki, K.; Saruwatari, Y., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2012**, *100*, 126-132.

12. Carboxymethylbetaine copolymer layer covalently fixed to a glass substrate. Suzuki, H.; Li, L.; Nakaji, T.; Kitano, H.; Ohno, K.; Matsuoka, K.; Saruwatari, Y., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2012**, *94*, 107-113.

13. Recrystallization of Water in Non-Water-Soluble (Meth)Acrylate Polymers is Not Rare and is Not Devitrification. Gemmei-Ide, M.; Ohya, A.; Kitano, H., *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*, 1850-1857.

14. Binding of β -amyloid to sulfated sugar residues in a polymer brush. Kitano, H.; Saito, D.; Kamada, T.; Gemmei-Ide, M., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **2012**, *93*, 219-225.

15. Sum frequency generation study on the structure of water in the vicinity of an amphoteric polymer brush. Kondo, T.; Gemmei-Ide, M.; Kitano, H.; Ohno, K.; Noguchi, H.; Uosaki, K., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, *91*, 215-218.

16. Biodegradable microparticles for strictly regulating the release of neurotrophic factors. Gujral, C.; Minagawa, Y.; Fujimoto, K.; Kitano, H.; Nakaji-Hirabayashi, T. *J. Control. Release* **2013**, *168*, 307-316.

17. Two-Step Recrystallization of Water in Concentrated Aqueous Solution of Poly(ethylene glycol). Gemmei-Ide, M.; Kasai, R.; Motonaga, T.; Kitano, H., *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117*, 2688-2694.

18. Self-association of zwitterionic polymer-lipid conjugates in water as examined by scattering measurements. Murou, M.; Kitano, H.; Fujita, M.; Maeda, M.; Saruwatari, Y., *J. Colloid Interface Sci.*, **2013**, *390*, 47-53.

19. Structure of water at zwitterionic copolymer film-liquid water interfaces as examined by the sum frequency generation method. Kondo, T.; Nomura, K.; Gemmei-Ide, M.; Kitano, H.;

Noguchi, H.; Uosaki, K.; Saruwatari, Y., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *113*, 361-367).

20. Sum-frequency Generation Analyses on the Structure of Water at Amphoteric SAM-Liquid Water Interfaces. Nomura, K.; Nakaji-Hirabayashi, T.; Gemmei-Ide, M.; Kitano, H.; Noguchi, H.; Uosaki, K., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, in press).

【総説】(計3件)

1. 界面科学の基礎, 北野博巳, CSJ カレントレビュー04, 新しい局面を迎えた界面の分子科学-機能デザインと計測技術の展開, 日本化学会編, pp. 10-16 (2011).

2. 高分子材料近傍の水の構造と機能との関係, 源明誠, 北野博巳, 未来材料, Vol. 11, No. 10, pp. 40-46 (2011)

3. 固体高分子中の水の結晶化挙動と生体適合性の相関, 源明誠, 北野博巳, 表面科学, Vol. 33, pp. 15-20 (2012).

【図書】(計3件)

1. 双性イオン型高分子シランカップリング剤とその応用, 北野博巳, 李黎夫, 中路正, 「シランカップリング剤の効果と使用方法」サイエンス&テクノロジー株式会社, pp. 334-351(2012)

2. 温度可変赤外分光法による固体高分子中の水の相転移挙動の評価, 源明誠, 北野博巳, 「IR 分析 テクニック事例集」株式会社技術情報協会, pp. 410-413 (2013).

3. 高い抗血栓性を持つ材料の開発, 源明誠, 北野博巳, 「埋め込み医療機器」(仮題) 株式会社 技術情報協会, 印刷中 (2014).

6. 研究組織

(1)研究代表者

北野 博巳 (KITANO, Hiromi)

富山大学・大学院理工学研究部・教授

研究者番号: 4 0 1 1 5 8 2 9

(2)研究分担者

源明 誠 (GEMMEI, Makoto)

富山大学・大学院理工学研究部・准教授

研究者番号: 7 0 3 3 4 7 1 1