

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24560957

研究課題名(和文) 界面活性剤を利用した生分解性多孔質膜の内部・表面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 the internal and surface structures of biodegradable porous membranes with the aid of surfactants and their application to bioprocess

研究代表者

田中 孝明 (TANAKA, Takaaki)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00217043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：製膜時に界面活性剤を利用して生分解性プラスチック製多孔質膜の内部・表面構造を制御することにより、生分解性の分離膜と細胞の足場材料の開発を行った。ポリ乳酸の1,4-ジオキサン溶液にTween 80などの親水性親油性バランス(HLB)値が15.3-16.7の界面活性剤を添加すると0.1 μmオーダーの孔を有する非対称性多孔質分離膜を作製できた。粗い面を利用して骨芽細胞様細胞を培養することによって、500 μmの厚みの生分解性多孔質膜の内部にまで細胞を培養できることを示した。

研究成果の概要(英文)：Biodegradable separation membrane and scaffold materials have been developed by controlling their internal and surface structures with the aid of surfactants. Asymmetric microporous separation membranes of poly(L-lactic acid) with pores in the order of 0.1 μm were prepared from the polymer solutions containing surfactants with the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) values from 15.3 to 16.7. Osteoblast-like cells grew in the 500 μm-thick biodegradable microporous membranes when the cells were seeded on the rough side of the membranes.

研究分野：生物化学工学

キーワード：多孔質膜 生分解性材料 生体材料 バイオプロセス バイオセパレーション

1. 研究開始当初の背景

(1) 生分解性プラスチックは、使用後に汚れ成分とともにコンポスト(堆肥)化処理が可能な環境にやさしい材料として、また、ポリ乳酸(図1)やポリカプロラクトンなどの一部の生分解性プラスチックは生体吸収性を示すことから、医療用材料としても注目されている。

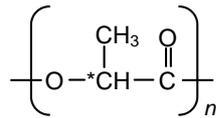


図1 ポリ乳酸

研究代表者の田中は生分解性プラスチックの高機能化とバイオプロセスへの応用に関する研究を進めており、特に相分離法を用いて多孔質化することにより、分離膜および再生医療用足場材料へ応用する研究を行っている。相分離法とは、高分子溶液を冷却、または、非溶媒分子を拡散させることにより、溶液中に高分子をほとんど含まない微小液滴を生じさせた後、溶液全体を固化することにより、多孔質材料を作製する方法である。

(2) 生体吸収性材料としての生分解性プラスチック製多孔質材料に関しては、米国MITのLangerらの再生医療用足場材料(Science, 260, 920-926 (1993))などの先行研究があったが、研究代表者の田中はポリ乳酸製の精密濾過膜を世界に先駆けて開発した(Tanaka & Lloyd, J. Membr. Sci., 238, 65-73 (2004))。

研究代表者の田中は上記の研究に続いて、各種生分解性プラスチックの多孔質膜を作製し、分離機能や細胞増殖用足場機能を有する生分解性多孔質材料を開発してきた。これらの研究を進める中で、ポリ乳酸膜を製膜時に溶媒 1,4-ジオキサンへ 10-15%の界面活性剤 Tween 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate)を加えると膜の内部構造と分離機能が大きく改善されることを見出した。

Tween 80は図2に示すようにオレイン酸由来の疎水性部分とポリエチレングリコール類似の比較的大きな親水性部分を有する。ポリ乳酸溶液に界面活性剤 Tween 80を添加すると、親水性部分の効果でポリマー溶液への水の浸透が容易となり、膜の多孔質構造が形成できると考えられる。

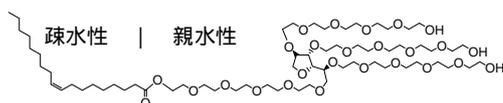


図2 Tween 80

2. 研究の目的

本研究では界面活性剤の添加による生分解性多孔質材料の内部構造・表面構造の制御を行い、分離膜・再生医療用足場材料への応用を目指した。

3. 研究の方法

(1) 高分子溶液の相分離

最初に相分離法の基礎的知見となる、生分解性プラスチック-溶媒-界面活性剤-非溶媒-4成分系の溶液の相分離特性を実験的に明らかにした。具体的にはポリ乳酸-1,4-ジオキサン-Tween 80の溶液に非溶媒である水を滴下することによって曇り点を求めた。

(2) 多孔質膜の作製

次に厚さ 500 μmの型に組成(高分子濃度、界面活性剤濃度)を系統的に変化させた高分子溶液をキャストし、非溶媒である水に浸漬することによって生分解性多孔質膜を作製した。膜の構造は走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。

(3) 多孔質膜の分離膜としての評価

分離膜としての評価は、精製水および粒子懸濁液の濾過実験により行った。粒子としては大きさ 0.7 x 2.5 μmの乳酸菌 *Lactobacillus plantarum*を用いた。

(4) 多孔質膜の安定性・分解性の評価

安定性ならびに分解性の評価は試料を 60 日の湿潤条件下で 0~28 日間インキュベーター後に引張試験を行うことにより行った。

(5) 多孔質膜の足場材料としての評価

ポリ乳酸多孔質膜の再生医療用足場材料としての評価は主として骨芽細胞様細胞である Saos-2 細胞を用いて行った。非対象構造の粗い面側に Saos-2 細胞を播種し、10% 牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle medium 中にて 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。培養液は 3-4 日毎に新鮮培地と交換した。膜内部の細胞の増殖の様子は MTT 染色後の割断したポリ乳酸多孔質膜の光学顕微鏡観察と細胞を固定化後に割断した試料の走査型電子顕微鏡観察により行った。

4. 研究成果

(1) 高分子溶液への界面活性剤の添加が相分離現象に及ぼす影響

相分離法によるポリ乳酸製多孔質膜作製の基礎となるポリ乳酸-1,4-ジオキサン-Tween 80-水系の相図を滴定法により求めた(図3)。界面活性剤を含まない場合について滴定法で求めた曇り点と熱誘起相分離現象における曇り点とを比較すると、同じ高分子濃度において滴定法で求めた曇り点の方が水分濃度が低いことが示された。これは滴定法では、局所的な水分濃度の上昇により生

じた微小なゲルが再溶解するのに長時間を要し、熱力学的な平衡に達しないためであると考えられた。この局所的かつ速度論的な現象は光学純度が高い(98.5%)ため、結晶化しやすいポリ乳酸を用いていることも一因と推察される。本研究で製膜に用いた非溶媒誘起相分離法では高分子溶液が非溶媒に接した際に同様な局所的かつ速度論的な現象を伴う相分離現象が生じていると考えられる。滴定法を用いて界面活性剤の添加効果を調べたところ、界面活性剤の濃度を高めるにしたがって、低濃度の水にて相分離現象が生じることが示された。

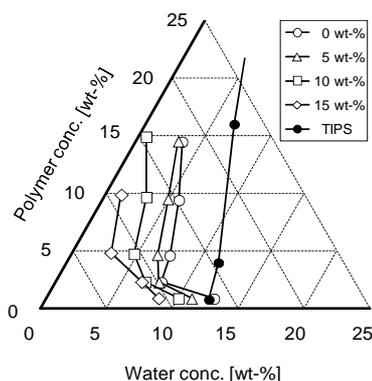


図3 PLLA-1,4-dioxane-Tween 80-water 系の相図 (25)

(2) 界面活性剤の膜構造への影響ならびに作製した多孔質膜の分離膜としての特性の評価

図4はポリ乳酸-1,4-ジオキサン-溶液をガラス板上に500 μm厚でキャストした後、ポリ乳酸を溶解しない水に浸漬して作製した膜の断面を示す(非溶媒誘起相分離法)。Tween 80を添加しない場合は、厚み方向に6分の1に収縮したポリ乳酸膜(図4(a))となった。ポリ乳酸溶液が非溶媒である水に接したときに水分子のポリ乳酸溶液への拡散速度よりも溶媒1,4-ジオキサンの水への拡散速度が著しく高いため、厚み方向に収縮したと考えられる。これに対して溶媒に Tween 80を10-15%添加すると膜の収縮が2-2.5分の1程度に抑えられた(図4(b))。界面活性剤の添加効果は図3で観測されたように少量の水により、相分離が生じるためとも考えられたが、溶媒の1,4-ジオキサンにあらかじめ5%の水を添加したポリ乳酸溶液を用いて製膜しても、図4(a)と同様に厚み方向に収縮した膜となった。界面活性剤 Tween 80の10-15%の添加により、高分子溶液への水分子の拡散が促進されたため、膜の厚み方向の収縮が抑制されたと考えられる。

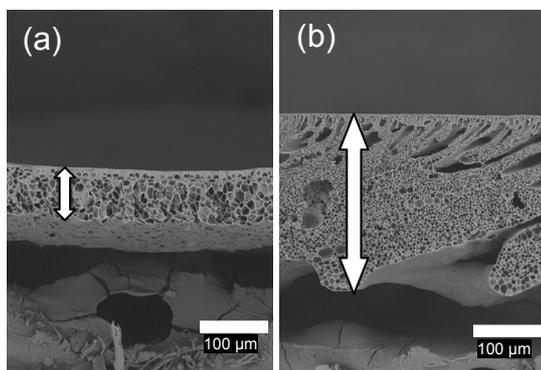


図4 非溶媒誘起相分離法にて作成したポリ乳酸製多孔質膜。ポリ乳酸濃度 = 10%, 混合溶媒中の Tween 80 濃度 = 0% (a), 10% (b)。

作製したポリ乳酸製多孔質膜の濾過特性を調べたところ、溶媒に10%の Tween 80を添加して作製したポリ乳酸製濾過膜は、水の透過性が高い(濾過抵抗が小さい)ポリ乳酸膜を得ることができた(図5)。大きさ0.7 x 2.5 μmの乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を用い細菌の阻止率も99%以上であった。この膜は牛血清アルブミン(10 nm)を透過させたため、0.1 μmオーダーの細孔を有すると考えられる。生分解性の精密濾過膜への応用が考えられる。

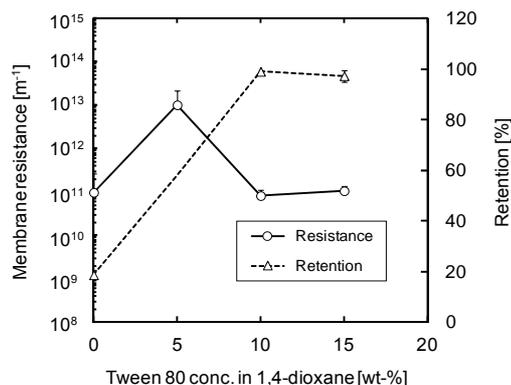


図5 Tween 80の濃度の膜濾過抵抗ならびに粒子阻止率への影響

Tween 80以外の界面活性剤についても溶媒への添加効果を検討したところ、Tween 40, Tween 60, ポリオキシエチレンオレイルエーテル(POE)などに同様の効果がみられた(図5)。効果のあった界面活性剤の性質について調べたところ、親水性親油性バランス(HLB)値が15.3-16.7の範囲の界面活性剤が添加効果を有することが示された。

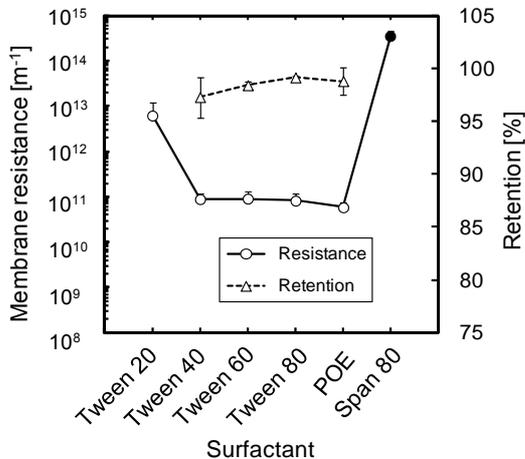


図6 界面活性剤の種類の膜濾過抵抗ならびに粒子阻止率への影響

(3) 作製したポリ乳酸製多孔質膜の安定性・分解特性の評価

ポリ乳酸-1,4-ジオキサン-Tween 80-水-系溶液から非溶媒誘起相分離法を用いて作製したポリ乳酸製濾過膜の安定性・分解特性を検討した。卓上試験機を用いた引張試験により、応力-歪曲線を求め、主として破断伸びを用いて膜の力学的特性を評価した。室温 25 °C においては湿潤条件下で 28 日間経過後も、80%の破断伸びを保持していたが、コンポスト化に用いられる湿潤かつ温度 60 °C の条件においては 7 日間後には破断伸びは 20% 以下に低下した。これらの実験結果から、作製したポリ乳酸多孔質膜は使用中には強度が保持できるが、目詰まり後にはコンポスト化処理により分解できる分離膜として利用できることが明らかとなった。

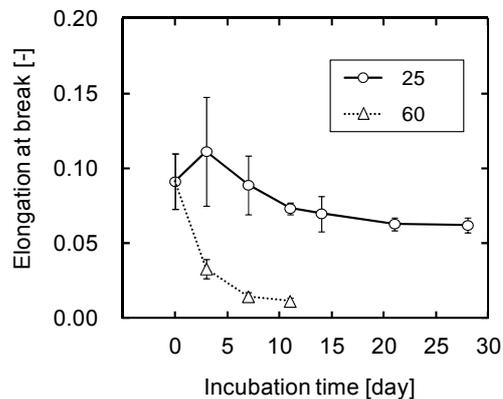


図7 ポリ乳酸膜の安定性・分解特性

(4) 作製したポリ乳酸製多孔質膜の足場材料としての評価

生分解性多孔質膜は組織工学において細胞

の足場材料として注目されている。多孔質化することにより、通常は一層にしか増殖することができない接着依存性細胞を多層に増殖でき、組織と類似した多層細胞シートが作製できるからである。移植後には生分解性高分子が徐々に分解されることにより、組織の再生に役立つ。ポリ乳酸膜の研究と並行して行ったポリ乳酸-ポリカプロラクトン製多孔質膜を用いたの骨膜組織の培養では骨膜組織そのものが容易に多層化した。そこで多層化の困難な骨芽細胞様細胞 Saos-2 細胞を用いてポリ乳酸製多孔質膜を用いて多層細胞シートの作製を検討した。多孔質膜の作製条件を検討したが、細胞の侵入可能な 10-50 μm の孔を有する多孔質膜を作成することができなかった。そこで、非対称性の膜構造に注目し、多孔質膜の粗い構造を有する裏面を利用して多層培養を行うことを検討したところ、膜内部まで細胞が増殖可能なことが示された。界面活性剤濃度や型の厚みを検討して 500 μm のポリ乳酸製多孔質膜にすること Saos-2 細胞を培養した結果を図 8 に示す。20 日間にわたり、細胞が増殖することが確認できた。

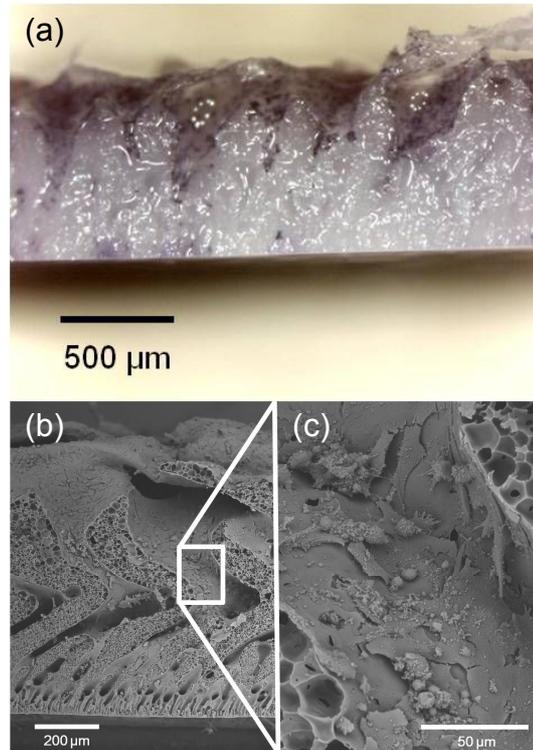


図8 界面活性剤を利用して作製したポリ乳酸製多孔質膜内部での骨芽細胞様細胞の培養。(a) MTT 染色, (b, c) SEM 観察。

(5) 研究成果のまとめ

製膜時に界面活性剤を利用することにより、生分解性多孔質膜の内部・表面構造を制御することができた。この方法によって作製

したポリ乳酸製多孔質膜は生分解性分離膜や細胞を増殖させるための足場材料としてバイオプロセスへの応用が可能なことを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

民部裕洋, 田中孝明, 生分解性ポリエステル多孔質膜に支持された培養細胞シート, 膜, 査読有, 40巻, 2016, 124-129
DOI: 10.5360/membrane.40.124

H. Minbu, A. Ochiai, T. Kawase, M. Taniguchi, D.R. Lloyd, T. Tanaka, Preparation of poly(L-lactic acid) microfiltration membranes by nonsolvent-induced phase separation method with the aid of surfactants, Journal of Membrane Science, 査読有, 479, 2015, 85-94
DOI: 10.1016/j.memsci.2015.01.021

田中孝明, 膜を利用した固液系深層濾過, 膜, 査読有, 39巻, 2014, 21-27
DOI: 10.5360/membrane.39.21

T. Kouya, S. Tada, H. Minbu, Y. Nakajima, M. Horimizu, T. Kawase, D.R. Lloyd, T. Tanaka, Microporous membranes of PLLA/PCL blends for periosteal tissue scaffold, Materials Letters, 査読有, 95巻, 2013, 103-106.
DOI: 10.1016/j.matlet.2012.12.076

〔学会発表〕(計 12件)

水野陽樹, 民部裕洋, 谷口正之, 田中孝明, 界面活性剤を用いて作製したポリ乳酸膜の濾過特性, 化学工学会第47回秋季大会, 2015年9月11日, 北海道大学(北海道・札幌市)

田中孝明, [招待講演], バイオ分離用シングルユースデプスフィルター, 化学工学会第47回秋季大会, 2015年9月10日, 北海道大学(北海道・札幌市)

田中孝明, [招待講演], 多孔質膜を利用した固液系深層濾過, 化学工学会第47回秋季大会, 2015年9月10日, 北海道大学(北海道・札幌市)

H. Minbu, A. Ochiai, M. Taniguchi, T. Tanaka, Development of microfiltration membranes of biomass and biodegradable plastics, GSC-7 & 4th JACI/GSC Symposium, 2015年7月7日, 一橋講堂(東京都・千代田区)

民部裕洋, 谷口正之, 川瀬知之, 田中孝明, 界面活性剤を用いて作製したポリ乳酸製多孔質膜の骨芽細胞用細胞培養への応用, 化学工学会新潟大会 2014, 2014年11月22日, 新潟大学(新潟県・新潟市)

T. Tanaka, Y. Takai, A. Nagase, K. Teraguchi, S. Tada, Hi. Minbu, I. Kimura, M. Taniguchi, Protein adsorption and recovery by hydroxyapatite microcapsules and their composite membranes with microporous membranes, The 10th International Congress on Membranes and Membrane Processes, 2014年7月24日, Suzhou (People's Republic of China)

H. Minbu, M. Taniguchi, D.R. Lloyd, T. Tanaka, PLLA microporous membranes prepared via nonsolvent induced phase separation method with surfactants, The 10th International Congress on Membranes and Membrane Processes, 2014年7月22日, Suzhou (People's Republic of China)

民部裕洋, 谷口正之, 田中孝明, 界面活性剤を用いたポリ乳酸製多孔質膜の作製と評価, 日本膜学会年会, 2014年5月12日, 早稲田大学(東京都・新宿区)

民部裕洋, 谷口正之, 田中孝明, 非溶媒誘起相分離法を用いたポリ乳酸製濾過膜の作製と評価, 化学工学会第45回秋季大会, 2013年9月16日, 岡山大学(岡山県・岡山市)

T. Tanaka, H. Minbu, M. Taniguchi, D. Lloyd, Control of Microstructure of PLLA Membranes with Nonionic Surfactants, 9th World Congress of Chemical Engineering, 2013年8月22日, Seoul (Republic of Korea)

田中孝明, [招待講演], Microporous membranes of biodegradable polyesters for biomedical applications, 化学工学会第78年会, 2013年3月18日, 大阪大学(大阪府・豊中市)

民部裕洋, 谷口正之, 田中孝明, 界面活性剤を用いたポリ乳酸製濾過膜の開発, 化学工学会第44回秋季大会, 2012年9月19日, 東北大学(宮城県・仙台市)

〔図書〕(計 2件)

田中孝明, 佐光貞樹, 川島敏行, 富康博, 石塚紀生, 瀧健太郎, 串崎義幸, 平井悠司,

下村政嗣, 横山英明, 早川晃鏡, 武野明義,
高橋紳矢, 松田裕行, 小野寺恒信, 笠井均,
及川英俊, 河野公一, 山田一博, 西川聡, 多
孔質フィルム / 膜の製造技術, 2016, 150
ページ

山下明泰, 田中孝明, 浦瀬太郎, 伊藤雅
喜, 高島由布子, 大村岳雄, 入谷英司, 中
村一穂, 青木裕, 山村寛, 深澤宏, 志村靖
二, 中倉英雄, 田中孝徳, 岩田政司, 橋本
光紀, 横井誠, 加藤智, 向井康人, 熊野淳
夫, 他 7 1 名, 技術情報協会, 濾過スケ
ールアップの正しい進め方と成功事例集,
2014, 531 ページ

〔その他〕

ホームページ

「生分解性プラスチックを機能材料へ」

http://tctanaka.eng.niigata-u.ac.jp/FunctionalBiodegradablePlastics_a5.pdf

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・教授

研究者番号: 00217043

(2) 連携研究者

川瀬 知之 (KAWASE, Tomoyuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 90191999