

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 12 月 1 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25600063

研究課題名(和文)有機高分子薄膜による医用圧電ナノアクチュエーター材料の開発

研究課題名(英文)Piezoelectric polymer for nano actuator applicable for medical application

## 研究代表者

吉木 啓介(Keisuke, Yoshiki)

兵庫県立大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60432548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：溶液状態のコラーゲンから電気化学的にコラーゲン線維を作成することで単一fibrilオーダーの太さのコラーゲン線維を得た。さらにこれを機械的試験を行うことができるよう、静電誘導法を用いた把持を行うことに成功した。さらに、液晶状態をつくることによって、配向したシート状のコラーゲン組織を作成することに成功した。膨潤状態で30 $\mu$ m厚であることから、乾燥状態ではサブ $\mu$ mオーダーの厚みが得られると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Single collagen fibril was fabricated from collagen water solute using electrochemically alignment method. The fibril was hold between one pair of probes applied mechanical load to estimate characteristics of mechanical and piezoelectric properties. Thin collagen sheet which is liquid crystal phase was obtained in a 30 $\mu$ m gap between a pair of glass slide. The expected thickness of dried sheet would be sub- $\mu$ m scale.

研究分野：顕微分光

キーワード：コラーゲン 第2高調波発生顕微鏡 高分子圧電素子 電気化学法 2光子蛍光顕微鏡 リオトロピック  
液晶 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

多くの蛋白質は乾燥と同時に機能を失うが、コラーゲンのような線維材料は乾燥することで圧電性を獲得する。本材料は生体親和性が極めて高く、生体内で機能する医用デバイスの動力源、もしくはセンサとして機能しうる。さらに、役割を終えた後は分解、もしくはそのまま生体内に残留してその形状を残す。ただし、これらの生体由来物質は成形性に問題があり、配向性を保った状態でのナノ・マイクロオーダーの部材作製、マニピュレーションは困難であった。

その一方、GICBによるスパッタや、電気化学的なコラーゲン材料の創成等、新しいナノ・マイクロ高分子材料を成形できる可能性のある手段が現れており、これらを適用することで、コラーゲン材料を用いたナノマイクロアクチュエーター、およびそれらを用いたデバイスの製造手段を構築できる可能性がある。

2. 研究の目的

乾燥状態で nm オーダーのサイズになるコラーゲン部材を作成し、圧電性が発揮されることを確認する。そのための部材作製手段をウェット、ドライ、双方のプロセスを試行することにより、より最適なプロセスの構築を目指す。また、作成した部材に関しては力学的な試験が施せるよう、顕微鏡上で動作可能な力学試験機に導入する。さらに、圧電性の試験のために、AFM の探針、もしくは試料に直接に電圧を印加することによって圧電片変形を直接観測する。

3. 研究の方法

- ・電気化学法による微細線維の作成

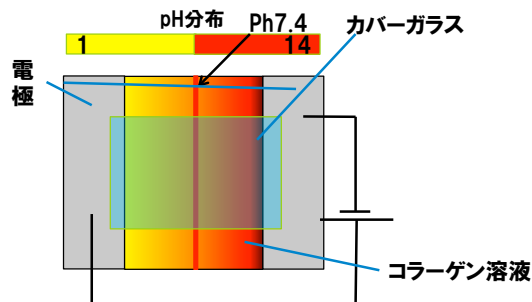


Fig. 1 電気化学法によるコラーゲン線維の作製

Fig. 1 に示すように、電極間にコラーゲン酸性溶液を満たし、電極間に電圧をかけることによって、電極表面で発生する酸化還元反応によって、溶液内に pH 分布を作った。pH 分布が形成された後、コラーゲンが析出する中性領域においてコラーゲン線維が形成され、その方向は電極と平行な方向となる。電極は市販の銅テープを用い、スライドガラスに貼付け後、カッティングプロッターによって切断することで正確な電極間隔を形成した。最小電極幅は 200  $\mu\text{m}$  となった。電極反応の様子は電圧印加直後からの電流の時系列変化を計測することによって行った。Fig. 2 にその典型的な時系列プロットの例を示す。

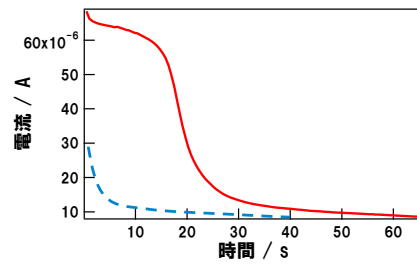


Fig. 2 電圧印加後の電流の変化. 青: 閾値以下, 赤: 閾値以上

酸化還元反応を発生させるためには、最低限必要な電圧閾値が存在し、その電圧はおよそ 2V であった。図中の赤プロットは閾値以上、青プロットは閾値以下の電圧を印加した時の変化である。まず、電圧を加えた瞬間、主に電気二重層を形成するために高い電流がごく短時間流れる。この現象は両プロットで共通に見られるが、その後、電極反応が起こらない青プロットでは電流が低下し、その後変化は起こらない。一方、電極反応が開始する赤プロットでは、酸化還元反応に使用される電流がしばらく流れた後、pH 分布が安定すると同時に電流レベルが下る。電流が低下した後はほぼ両プロットともほぼ同じ電流値で安定しており、これは電気浸透流などに使われていると推測される。また、このようにして作成されたコラーゲン線維がどのような構造を持っているのか、また、線維周辺の溶液内のコラーゲン分子の様子を観察するために、同一試料を顕微鏡下で位置を動かすことなく、顕微鏡の部品の着脱によって複数の観察モードで観察できる顕微システムを構築した。Fig. 3 にその撮影画像を示す。偏光顕微鏡を (a)、暗視野顕微鏡を (b)、位相差顕微鏡を (c)、蛍光顕微鏡 (UV 励起) を (d)、そして、微分干渉顕微鏡 (e) で示す。また 2 光子蛍光顕微鏡、SHG 顕微鏡でも観察することができ、試料の同一部位を様々な視点から

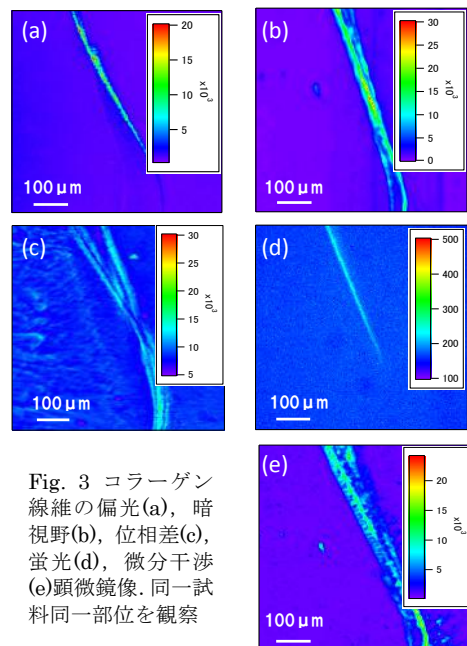


Fig. 3 コラーゲン線維の偏光(a)、暗視野(b)、位相差(c)、蛍光(d)、微分干渉(e)顕微鏡像. 同一試料同一部位を観察

観察した。それぞれの顕微モードで抽出される情報は、偏光顕微鏡はコラーゲン分子の配向性の情報、暗視野顕微鏡は、何らかの構造物がある場合、それを最も高感度に捉えることが出来るため、ごく微細で配向性も失った状態の線維でも界面の屈折率の違いによって生じる僅かな散乱によって検出出来ると考えられる。また、位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡は、屈折率の分布を可視化することができ、蛍光顕微鏡はコラーゲン分子の密度を表し、コラーゲン作製の際の泳動による分子移動を観察することが出来る。また、2光子蛍光顕微鏡は立体的なコラーゲン密度分布を計測することができ、SHG 顕微鏡は偏光顕微鏡と同様、配向情報を立体的に計測することが出来る。また、2次の非線形感受率と圧電歪マトリクスには類似性があり、間接的に圧電性も検出している可能性がある。また、応力負荷によっても SHG 強度やその偏光特性が影響を受けることもわかっており、SHG 像には内部応力の情報も重畳していると考えられる。

Fig. 4 に示すマイクロ力学試験機を用いてコラーゲン水溶液間に電圧を印加する手法でコラーゲン線維を作成し、もう一对の電極で把持を行った。これらの過程は顕微鏡で観察され、明視野のみならず、偏光、微分干渉、位相差、暗視野、蛍光、そして SHG 観察を一台

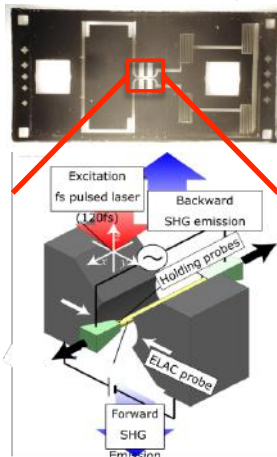


Fig. 4 マイクロ引張試験機

の顕微鏡に実装することで、同一試料を多角的に観察し、線維のみならず、線維周辺の様子についても観察できる装置を開発した。

#### ・マイクロ力学試験のためのコラーゲン線維の把持

マイクロ力学試験を行うための把持機構を検討した。顕微鏡下で力学試験を行いながら顕微観察をする際、コラーゲン線維に力学的負荷をかけるために、両端を把持する必要があるが、線維を生成する電気化学的手法にはその機能はない。そのため、線維生成に先立って、コラーゲンを把持電極に引き寄せる手法を開発した。DEP (静電誘導) 法を用いて把持電極間に交流電圧を印加し、電極近傍に分子を引き寄せた。その後、電気化学法によってコラーゲン線維を生成することで、DEP 法によって把持電極に付着したコラーゲン線維と融合し、電極に把持されたコラーゲン線維を作製した。

#### ・より細いコラーゲン線維の生成

通常、天然のコラーゲン線維は bundle 状態で存在しており、これは fibril という単位構造の集合体である。bundle のままでは、配

幅10mm ×奥行18mm ×高さ1mm

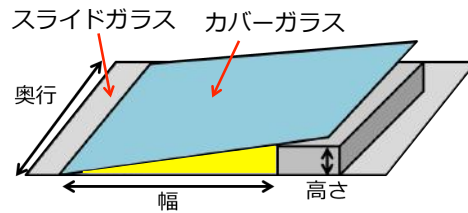


Fig. 5 マイクロ引張試験機

向の均一性に限界があるため、fibril の生成を目指して作成条件を探索した。検討したパラメーターは、電極間隔、厚み、そして印加電圧である。

#### ・液晶コラーゲンシートの作成

電気化学的手法による圧電性線材の作製を行うと同時に、液晶技術を用いたコラーゲンのシート材の作成を行った。コラーゲン溶液を濃縮していくと、液晶層が現れるため、平板間において濃縮を繰り返すと液晶シートが現れる。本研究ではその作成条件の探索を行った。検討したパラメーターは、コラーゲン溶液の初期濃度と平板の表面粗さ制御である。

#### ・圧電性の確認

作成されたコラーゲン線維の形状、および圧電性の評価を、確認方法は AFM による凹凸測定、および、コラーゲンに電圧をかけた時の変形量を計測することによって行った。これによって評価される圧電性、表面形状から推察される結晶性と、SHG 顕微鏡によって得られる強度情報との相関を得ることによって、SHG 顕微鏡のコラーゲン圧電デバイスの評価ツールとしての可能性を検証した。

#### 4. 研究成果

Fig. 5 に電極間隔 500  $\mu\text{m}$  (a)、電極間隔 200  $\mu\text{m}$  (b) の電極間隔でコラーゲン線維を作製した時のコラーゲン線維の偏光顕微鏡像を示す。

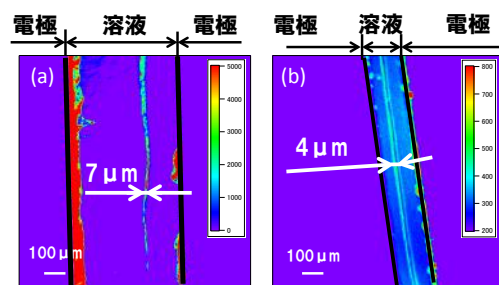


Fig. 5 電気化学法によって作製されたコラーゲン線維、電極間隔 500  $\mu\text{m}$  (a)、電極間隔 200  $\mu\text{m}$  (b)。

電極間隔を縮小することによって、最小で 4  $\mu\text{m}$  径のコラーゲン線維の作製に成功した。また、コラーゲン溶液の濃度によっても線維の太さは変化し、希薄な溶液ほど細い繊維が形成された。ただし、電極間隔が狭くなると希薄な溶液では線維の形成が確認されなくなった。これは、コラーゲン線維が形成される中性領域が電極間隔の縮小とともに狭窄化するために、中性領域に含まれるコラーゲ



ン分子の量が制限され、線維形成に必要な分子数が集まらなかった可能性がある。また、電極の厚みも線維径と相関があり、厚みの減

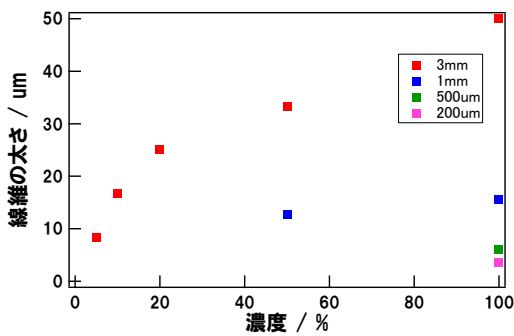


Fig. 6 コラーゲン溶液濃度による線維径の変化

少とともに線維径も縮小することがわかった。これらの結果から推測される理想の厚みは1 μm 程度であると考えられる。これ以下のサイズであれば、電極間隔も狭めていくことで fibril オーダーの線維の作製が可能で

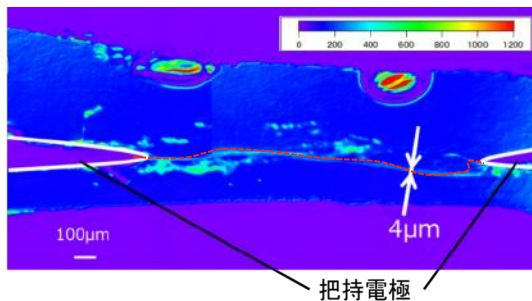


Fig. 7 φ4 μm コラーゲン線維の作製と把持

あることが明らかになった。さらに Fig. 7 の微分干渉像に示すとおり、コラーゲン線維の把持にも成功した。本例では左右に配置した電極の間に、現状の最小径となる4 μm の線維径の把持を行った。今後はSHG 顕微鏡下で引張を行いながら材料評価を行っていくが、シリコンデバイスで pH 分布を作製することはできているが、コラーゲン線維の確認がまだできていない。その理由として、線維径が細すぎてSHG 顕微鏡の検出限界を超えている可能性がある。そのため、今後は単一光子係数法によって検出感度を向上させることによって、コラーゲン線維の検出を行う予定である。また、この電極を平板にすれば理論上はシート材も可能と考えられる。ただし、電気化学的に作成したシートは分子配向が安定しないことが問題である。一方、リオトロピック液晶を用いてコラーゲンを液晶化し、シートを形成した場合、配向がそろった素材が得られることが明らかとなった。その結果を Fig. 8 に示す。本画像は偏光顕微鏡によって得られたものである。既に Fig. 5 で説明したとおり、本液晶は平板間ギャップを形成し、そこに注入したコラーゲンを自然乾燥によりゆっくり濃縮した結果生成されたものであるが、このようにして作成されたコラーゲン液晶はコレステリック液晶を形成すると言われている。実験結果でも、淡いながらシート内に縞ができており、未確認なが

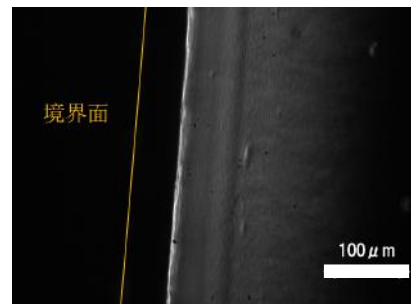


Fig. 8 コラーゲン液晶シート

らコレステリック液晶が存在している可能性がある。厚みは5-30 μm であり、これを乾燥すると、厚みが減少して当初予定していたサブミクロンの厚みに近い膜厚が得られる可能性がある。しかし、保水性が高く、自然乾燥では十分に乾燥することは難しかった。そのため、真空乾燥、超臨界乾燥などを行うことにより厚みを縮小し、より理想的な薄膜材料に近づける試みが必要である。また、このような液晶の発現には基板によるサンドイッチ構造が必須であり、基板による配向制御が機能していることが示唆された。また、基板表面の粗さによって、配向を制御することが可能であり、配向制御されたシート材の実現も可能である。最後に Fig. 9 に電気化

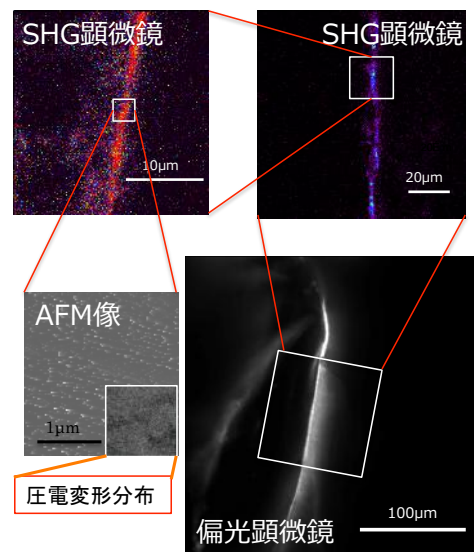


Fig. 9 コラーゲン線維の SHG 輝度分布と高輝度部位のトポグラフィおよび圧電変形分布

学的に作成された線維材料の圧電特性を計測した結果を示す。乾燥状態のコラーゲン線維をSHG 顕微鏡で計測し、もっとも強度が強い部分を分子配向性が高く、圧電性も高い領域とみなして計測を行った。その結果、当該領域においてはうろこ状の規則的な構造が観察され、圧電性も水晶と同程度に観察された。また、SHG 光の発生強度が低い部分に関しては結晶構造が乱れており、圧電性も低かった。また、SHG 光強度は太い繊維より細い繊維の方が強い傾向にあり、AFM によるトポグラフィ像もそれを示唆する結果を示している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. M. Hashimoto, H. Niioka, K. Ashida, K. Yoshiki, T. Araki,  
“Second harmonic generation microscopy of self-assembled monolayer on platinum excited by radially polarized beam for high-sensitivity and high-resolution imaging”, 査読有り, Appl. Phys. Express, Vol. 8, (2015), p. 112401.
2. M. Hashimoto, K. Yoshiki, M. Kurihara, N. Hashimoto, T. Araki  
“Orientation detection of a single molecule using pupil filter with electrically-controllable polarization pattern”, 査読有り, Opt. Rev., Vol. 22, (2015), p. 875-881.

〔学会発表〕(計2件)

1. 電気化学法によるマイクロコラーゲン線維の作製条件の検討  
本田祐貴, 吉木啓介, 生津資大, 井上尚三  
第76回応用物理学関係連合講演会,  
14a-PB1-2(2015年9月14日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))
2. 第2高調波発生顕微鏡によるアキレス腱内の応力分布の定量計測  
吉木啓介, 生津資大, 井上尚三  
第76回応用物理学関係連合講演会,  
14a-PB1-1(2015年9月14日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 偏光制御装置および偏光制御方法  
発明者: 吉木啓介、橋本守  
権利者: 兵庫県立大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-230675  
出願年月日: 28年11月28日  
国内外の別: 国内

〔その他(産学交流イベント)〕

1. 電気化学法によるコラーゲン圧電線維材料の開発, 吉木啓介, 第2回学産交流ポスターセッション(2015年12月3日, 新化学技術推進協会(東京都千代田区))
2. 生体高分子が持つ圧電性を利用した微小アクチュエーター, 発電素子の開発, 吉木啓介, 生津資大, 井上尚三, 第4回ネイチャー・インダストリー・アワード(2015年12月4日, 大阪科学技術センター(大阪市西区))
3. 既設光学機器に様々な機能を付加する偏光光学素子, 新技術説明会(2016年11月29日, JST東京本部別館1階ホール(東京都千代田区))

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉木 啓介 (YOSHIKI, Keisuke)  
兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号: 60432548