

量子ビームが可能にする高分子ナノ構造体の創製

研究代表者 鷲 尾 方 一
(先進理工学部・応用物理学科 教授)

1. 研究課題

高分子材料はその軽量性、耐化学薬品性、低誘電率、絶縁性、生体分子適合性等多くの特性を備えている。本研究ではこれらの特性を持つ種々の高分子材料に対し、イオンビームや電子線、X線（FELを含む）レーザー等のいわゆる量子ビームを利用し、マイクロメートルスケールからナノメートルスケールの3次元構造体の創製技術を開発するとともに、その応用開発を行い、新しい機能性材料の実用化も目指すものである。高分子材料のマイクロナノ加工、は固体高分子型燃料電池やMEMS、生体適合材料、先端的半導体材料創製に必須の技術となりつつあり、本研究開発では、マイクロナノ構造体を効率よく作成する実用的な技術の実現を目指して研究開発を実施している。

本プロジェクトでは、特に高分子を材料として放射線照射による化学反応を利用し、その応用研究として温度応答性の医療用デバイス開発についての研究開発を実施してきた。ここでは本プロジェクトの終了時報告ということで、昨年までに得られた結果及び昨年引き続き実施した研究の進捗状況を中心に報告する。

2. 主な研究成果

人体に近い温度で親水・疎水の温度応答性を示す高分子、ポリ N イソプロピルアクリルアミド (PNIPAAm) を用いた医薬デバイスの開発が進められている。PNIPAAm は約 32°C で濡れ性と分子鎖の伸縮が変化する高分子である。このような特徴を持つビニルモノマーを異種の高分子材料に自在に導入することが出来る放射線グラフト重合法を用いて、温度応答性スイッチング機能を持つデバイスが作製出来ると考えられる。特に、近年薬学分野において注目されている再生医療用の培養皿において大きな成果が挙げられている。従来、培養細胞を獲得するにはトリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いて培養器材から剥離する必要があった。しかし、このようなタンパク質分解酵素を利用する剥離処理は、細胞間の結合をも分解してしまうという課題があった。そこで、上で述べたように、温度応答性を利用して表面の濡れ性を温度で制御し、タンパク質分解酵素を用いることなく細胞の接着剥離を行なうことが可能な培養用のテンプレート開発研究がなされてきた。

我々はこのような先行研究を参考にしながら放射線グラフト重合技術を用いて簡便で使いやすい細胞培養膜の創製を目指してきた。ここでは、この開発の一部について報告する。

近年、体内組織と親和性の高い培養細胞を獲得するため、 Poly(N-イソプロピルアクリルアミド)

(PNIPAAm)を導入した細胞培養器材の開発が進められており、本プロジェクトにおいても上記の性能を持つ細胞培養膜の研究に取り組んできた。本研究では、重合時に使用する NIPAAm 溶液の濃度を変えることで異なるグラフト率の試料を作製し、温度応答性を評価した。さらに今年度は実際の生体組織（例えば筋組織）に対応可能な配向性を持つ細胞培養を目指して、培養細胞に微細構造を導入することを試みた。具体的には、培養基材表面に微細構造を導入し配向性を持つ細胞シートの創製を目指した。

実験方法

ETFE(ダイキン工業, 膜厚:50 μ m)に対し低エネルギー電子線加速器(NHV コーポレーション, Curetron[®])を用いて電子線(200kV, 1mA, 150kGy)を室温, 窒素気流中で照射した。そして1時間大気曝露を施した後, 反応容器に試料と 10, 20, 30, 40, 50, 60 wt%に調製した NIPAAm 溶液を入れ, 80 $^{\circ}$ C の恒温槽内で 24 時間重合反応させた。作製したグラフト重合試料(GM)に対し, グラフト率(GY)の測定, 及び 37 $^{\circ}$ C と 20 $^{\circ}$ C における接触角測定を行なった。そして C2C12 細胞を試料上に 5×10^5 cells 播種し, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 下で 2 日間培養した。その後, 20 $^{\circ}$ C の環境下に移動させ, 細胞シート of 剥離を実施した。

一方、作製した温度応答性細胞培養膜に微細構造を付与するため、熱インプリント時の鋳型となる Si モールドをフォトリソグラフィープロセスによって作製した。Si モールドは Line & Space の溝構造からなり、そのピッチは 20 μ m, 10 μ m, 6 μ m, 4 μ m の 4 種類を作成した。図1に 4 μ m ピッチの溝構造からなる Si モールドの断面図を示す。なお以下では、温度応答性細胞培養膜に熱インプリントを施した試料を p-TRCCM-n (n は溝のピッチの大きさ) と呼称する。

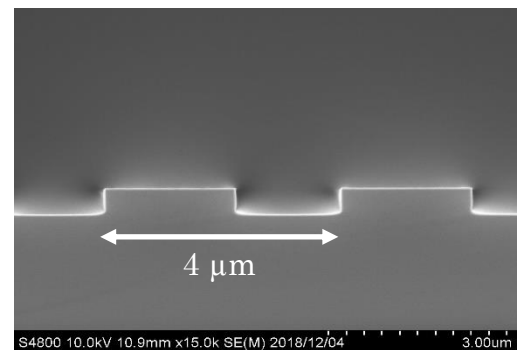


図1 作成した Si モールドの断面図 (4 μ m ピッチ)

結果と考察

グラフト率の測定^[10]

上で説明したグラフト条件下でのグラフト率の NIPAAm 濃度依存性を調べた結果を図2に示す。

この依存性は概ね以下のように解釈できる。低濃度側では溶媒である 2-プロパノールも生成したラジカルを捕獲しある種 NIPAAm と競争的な反応が起こっている。すなわち濃度が低い場合にはそのグラフト率は低く、NIPAAm の濃度上昇に伴いグラフト率の向上が確認できる。一方、このグラフト率は溶液濃度 30% 程度のところで最大値を迎え、その後濃度上昇に伴いグラフト率の減少を確認できる。この状態では、モノマーが単独でグラフト重合（ホモポリマーの生成）が誘起されたものと考えられる。

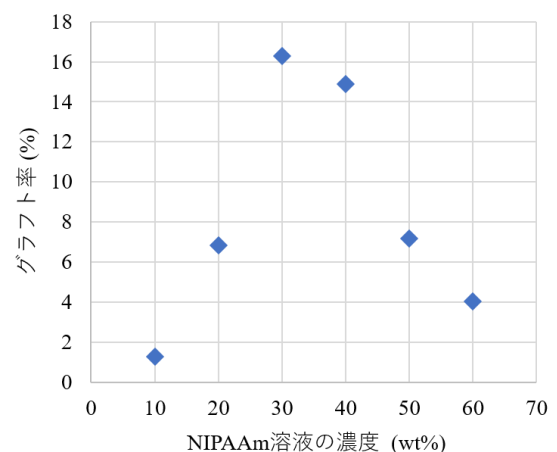


図2 グラフト率の NIPAAm 濃度依存性

接触角の測定

図3に作製した試料それぞれについて、温度 37 $^{\circ}$ C と 20 $^{\circ}$ C での接触角の測定結果を示した。ETFE で全く処理を行わなかったものについては接触角の温度依存性は全く確認されていない。一方照射

ETFEでは電子線照射によりその濡れ性が上昇していることが分かる。またその試料において温度による微小ながらも濡れ性が変化していることが分かる。

グラフト試料については最もグラフト率の高い試料で37℃の接触角がもっとも小さく（つまり濡れ性が高い）溶液濃度を上げた試料（グラフト率が下降する領域）では濡れ性が下がっていくことが分かる。ここで、もう一度細胞培養の最適条件を思い起こすと、37℃における接触角（培養の場合は適切な疎水性）が細胞培養の成否を決める。一方20℃における親水性は生成した細胞膜の剥離の性能を左右することになる。

下で細胞培養の結果について述べるが、ここでこれらの接触角が細胞培養に何をもたらすかについて簡単に説明しておく。

図3から37℃における接触角の値は30GMで最も小さく約85度である。また20GM、40GMでは87度から88度程度と、ほとんど違いがないが、この微妙な違いで細胞培養の成否が決まっていることが分かってきた。（実際には、準備したGMにおいて30GM以外はすべて細胞の培養についてはコンフルエント（コンフルエントとは、接着細胞が培養容器の接着面を覆いつくした状態のこと。）になっていることが確認されており、この細胞培養においては接触角85度付近にクリティカルポイントがあることが分かっている）このように最適な細胞培養基材を準備する際には、厳密なグラフト率の制御が必要になることが示された。

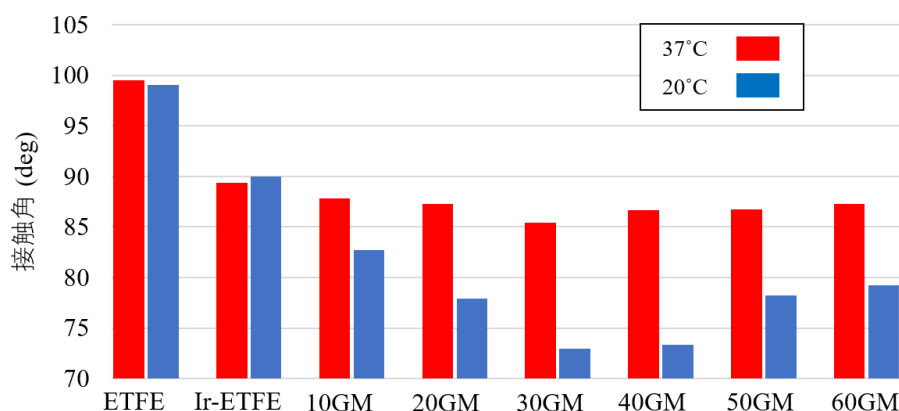


図3 温度 37℃及び 20℃における試験試料の接触角の計測結果

細胞培養試験

剥離により得た細胞膜について、図4に示した。培養環境(37℃)から20℃に温度を下げることにより、約5分で剥離開始が確認され、約15分で完全な剥離細胞膜を確認できた。上で述べたように、30GMでは表面の親水性が大きくなりすぎて細胞接着に適さなくなったが、それ以外の試料10GM、20GM、40GM、50GM、60GMにおいてはコンフルエントに培養ができることが確認された。一方剥離性能については、グラフト率が高くなるに従って濡れ性の増加量が大きくなりグラフト率の高い30GMや40GMでは最短15分での細胞剥離が確認された。

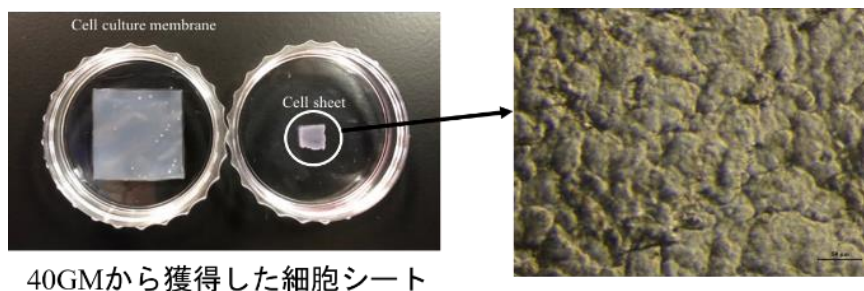


図4 40GM を使って培養し温度 20℃下 15 分で得られた細胞シート

次に、微細構造を持たせた

細胞培養膜について、溝構造のピッチに対する細胞増殖性の違いを評価するため、上記と同様にマウス骨格筋芽細胞（C2C12）を用いて、各培養器材上で培養試験を行った。まず低密度で細胞を播種し、細胞の成長方向を測定し、不偏分散の平方根 σ を計算した。なお、全ての細胞がパターンに沿って成長した場合、 $\sigma = 0^\circ$ となる。測定の結果、p-TRCCM-20 では $\sigma = 21^\circ$ 、p-TRCCM-4 では $\sigma = 10^\circ$ となり、ピッチの減少に伴って細胞の配向性が増すことがわかった。図3左に p-TRCCM-4 上で培

養した C2C12 細胞の様子を示す. 次に, p-TRCCM-4 上に細胞をコンフルエントとなるまで培養し, 培養器材を 20°Cの環境に 15 分静置することで, 細胞シートの剥離が観察された. 図 3 右に温度変化によって剥離した細胞シートの様子を示す



図 3 左 p-TRCCM-4 上で培養した C2C12 細胞の様子
右 温度変化によって剥離した微細構造細胞シートの様子

謝辞：本研究の遂行において、早稲田大学先進理工学研究科、武岡真司教授及び武岡研、末松良隆院生に細胞培養にかかわる実験において多大なご協力をいただいた。ここに謝意を表したい。また大阪大学大学院工学研究科、大島明博特任教授には研究全般に関して、多くのご助言をいただいた。ここに謝意を表したい。

3. 共同研究者

有光晃二（理工総研・客員上級研究員）
岡 壽崇（理工総研・招聘研究員）
伊藤 政幸（理工総研・招聘研究員）
佐々木 隆（理工総研・招聘研究員）
大山 智子（理工総研・招聘研究員）

小林慶規（理工総研・客員上級研究員）
坂上 和之（現東京大学・上席研究員）
三浦 喬晴（理工総研・招聘研究員）
保坂 勇志（理工総研・招聘研究員）
長澤 尚胤（理工総研・招聘研究員）

4. 研究業績

4.1 学術論文

電子線グラフト重合法を用いた微細構造を有する温度応答性細胞培養膜の作製、堀内寛仁, 志村亮弥, 武岡真司, 大島明博, 鷺尾方一, *RADIOISOTOPES*, **69**, No.4, 1-6 (2020)

4.2 総説・著書

鷺尾方一、大島明博

電子線グラフトによる温度応答性細胞培養膜の開発 「UV・EB 効果技術の最新開発動向第 7 章 3, pp. 338-344」, シーエムシー、2021

4.3 招待講演

なし

4.4 受賞・表彰

なし

4.5 学会および社会的活動

日本放射線化学会や日本アイソトープ協会, 日本加速器学会等の活動を通じ、本プロジェクトの成果を種々の場で発信するとともに、実用に際する共同研究も視野に入れた活動を強化する。

5. 研究活動の課題と展望

イオンビームや種々のエネルギーの電子線, 更には良く制御された（空間的, 時間的に）X線などを用いることで、細な構造を持つ種々の先端デバイスの創製について大きな期待がもたれている。また実用化を目指すため, 電子線を用いた微細加工についてもさらに検討を加える。今後はレーザーを含む量子ビームを有機的に組み合わせた実用的なデバイス創製とメカニズム解明に向けた研究を継続する。