

バイオミメティック材料 プロセッシングの開発

高井 治* 齋藤永宏** 石崎貴裕***

1. はじめに

地球の誕生は今から約46億年前であり、その頃の地球は雷放電、火山噴火、隕石落下等の激しい環境下に曝されていたと言われている。このような激しい環境下において、雷の放電に誘発された化学反応により無機物から有機物が合成され、生命体が誕生したとの仮説がある。人類を含む生物は現在まで、数億年の間環境の変化に順応を重ね、環境と共存しながら進化をとげ、現在の環境に順応している。

自然界に目を向けると、環境に順応するための特異的な機能を有する生物が多数存在する。たとえば、水鳥の羽、アメンボウの足、里芋や蓮の葉などは水を極めて良く弾く。この機能を「超はっ水」と呼ぶ。超はっ水性を示す要因は、表面を覆っている疎水性ワックス状物質と表面の微細な凹凸構造にある。自然界では、様々な動植物が環境に順応するため、超はっ水性を獲得してきているのである。一方、海藻等に代表されるように水中に生きる動植物の体皮は、超親水性のものも少なくない。また、アフリカ南部のナミブ砂漠に生息するナミビアン・ダークリン・ビートルという甲虫は、鞘翅に0.5 mmの突起(親水性)を有しており、この突起と突起の間に、ナノレベルの小さな突起(はっ水性)を持つ。この甲虫は、霧の中に浮遊する微細な水滴を親水性の部分で収集する。収集した水滴は融合し大きくなり、その水滴ははっ水性の突起上を転がり、甲虫の口に誘導される。これにより、甲虫は水分を補給する。このようにはっ水性、親水性という濡れ性の観点から対峙する機能を保有することにより生命活動

を営んでいる生物もいる。生物が有するこれらの高次機能、高次構造は、環境の変化に順応した生物の進化とともに、常温・常圧下の低環境負荷型のプロセスにより作り出されている。このような「生物の高次構造、高次機能、環境低負荷型低温プロセス」を学び、新規材料を創成していくことが、「バイオミメティック材料プロセッシング」である。このプロセスは低温プロセスを活用するためエネルギー消費量が少ないため、CO₂削減に大いに寄与する材料プロセスであるといえる。

我々のグループは、バイオミメティック材料プロセッシングを実現させるために、蓮の葉の有する特異的な機能(超はっ水性)を発現させている「かたち」を模倣し、工学的に超はっ水表面を形成することに成功している。また、生命の起源とも言われている水中のプラズマ(ソリューションプラズマ)を反応場に用いたナノ材料創製や表面改質も行っている。本報では、現在までに我々が取り組んできたバイオミメティック材料プロセッシングについて紹介する。

2. 超はっ水・超親水マイクロパターン表面での細菌接着挙動

超はっ水膜の形成法としてゾル・ゲル法⁽¹⁾⁽²⁾、熱CVD法⁽³⁾、プラズマCVD法⁽⁴⁾等のさまざまな方法が研究開発されている。この中で、プラズマCVD法は常温かつ基板に対してダメージフリーな成膜プロセスであり、プラスチック、ガラス、半導体、金属、紙等、多種多様な基材へのはっ水性付与を実現できるプロセスの一つである。

* 名古屋大学教授；エコトピア科学研究所(〒464-8603 名古屋市千種区不老町)

** 名古屋大学准教授；工学研究科

*** 産業技術総合研究所サステナブルマテリアル研究部門研究員

Development of Biomimetic Materials Processing; Osamu Takai*, Nagahiro Saito**, Takahiro Ishizaki*** (*EcoTopia Science Institute, Nagoya University, Nagoya. **Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya. ***National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Materials Research Institute for Sustainable Development, Nagoya)

Keywords: biomimetic, ultra water repellent (UWR) surface, super-hydrophilic surface, fibrinogen, solution plasma, carbon nanoball (CNB), surface modification

2008年12月8日受理

ここでは、マイクロ波プラズマCVD法による超はっ水膜表面の作製法について説明する。まず、基板をエタノール中で約10分間超音波洗浄し、自然乾燥させる。この基板を反応容器内に設置する。原料にはトリメチルメトキシシラン(TMMOS)を用い、基板にはn型Si(111)およびガラス基板を用いた。反応容器内に基板を設置した後、ロータリーポンプで反応容器内を排気し、反応容器内が5 Pa以下の真空度に到達した後、励起ガスとしてアルゴン(Ar)を30 Pa導入した。その後、TMMOSを反応容器内に導入し、マイクロ波出力300 Wで10分間プラズマを共振させた。その他の詳細に関しては引用文献を参照されたい⁽⁴⁾⁻⁽⁷⁾。図1に、プラズマCVD法により作製した超はっ水膜上の水滴挙動を示す。この水滴接触角は150度をかなり超えており、この表面は超はっ水性表面である。また、この超はっ水膜の可視光の透過率は90%を超えており、ほぼ透明である。

プラズマCVD法により作製した超はっ水膜表面に波長172 nmの真空紫外(VUV)光を照射することでシラノール基(Si-OH)を形成することができる⁽⁸⁾。この場合の表面の水滴接触角度は0°になり、その表面は超親水性となる。VUV光を利用することにより、超はっ水・超親水パターン表面を形成できる。プラズマCVD法により作製した超はっ水膜表面上にフォトマスクと石英板を置き、真空チャンバー内で10 Paまで減圧してVUV光を20分間照射する。このVUV光の照射により、TMMOSを構成する有機分子はCO、CO₂、H₂Oといった気体分子となり除去される。フォトマスクを用いることにより、露光部の超はっ水膜表面が分解・除去され、下地のシリコン基板が露出し、超はっ水・超親水のマイクロパターンを作製できる。このパターン上では、濡れ性という点において究極に対峙する二つの状態が集積化されている。ESEM(環境制御走査型顕微鏡)による超はっ水・超親水のマイクロパターン上での水滴の様子を図2に示す。球状の水滴が超親水領域上で選択的に形成されていることを確認できる。

超はっ水・超親水マイクロパターン表面を足場として微生物の培養を行った。培養に用いた細菌は、大腸菌、枯草菌、土壤菌、緑膿菌の4種類である。培養条件は、培養時間を24時間、培養温度を37°C、CO₂濃度を5%、初期の細菌濃度を1.0×10⁴ cell/mlとした。

超はっ水・超親水マイクロパターン表面で大腸菌、枯草



図1 ガラス上に成膜した超はっ水表面上の水滴の様子。

菌、土壤菌、緑膿菌を培養した後の位相差顕微鏡像を図3に示す。大腸菌および枯草菌は超はっ水・超親水マイクロパターン上で超はっ水領域に選択的に付着した。一方、土壤菌は表面にほとんど付着しなかった。また、緑膿菌は両方の領域で僅かに付着した。次に、パターン上における超はっ水領域の幅を10 μmにした表面で同様に培養を行った。その結果を図4に示す。この場合でも同様に、大腸菌および枯草菌が超はっ水領域に選択的に付着した。このような菌の付着性の違いを調べるために、基材の表面特性(表面粗さ、表面電

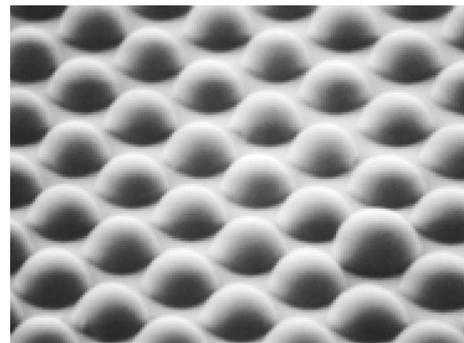


図2 超はっ水・超親水マイクロパターン表面上のESEM写真。

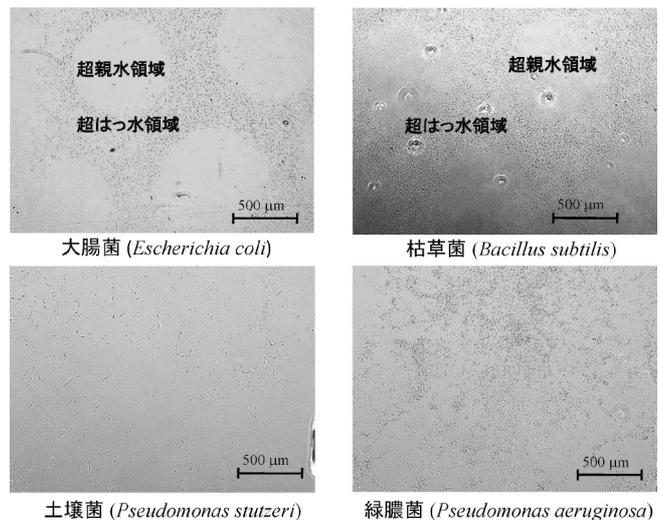


図3 超はっ水・超親水マイクロパターンへの細菌の付着の位相差顕微鏡像。

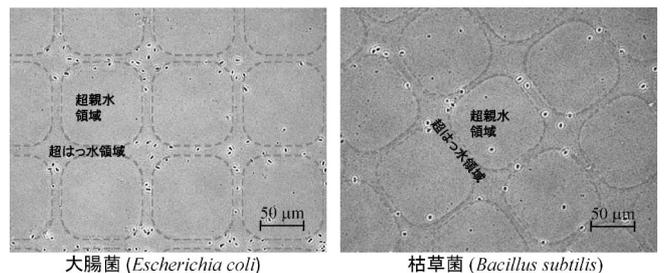


図4 超はっ水・超親水マイクロパターンへの微生物の付着の位相差顕微鏡像。

位、ゼータ電位)および菌と培地中のたんぱく質のゼータ電位の測定を行った。超はっ水および超親水性表面の表面粗さを計測した結果、表面粗さは同程度であった。一方、表面電位およびゼータ電位では、超はっ水表面の方が超親水性表面よりも高かった。このような表面特性の違いが菌の選択的な付着に大きな影響を与えていると考えられる。また、菌およびたんぱく質のゼータ電位はすべて負の値を示し、その絶対値の大きさの順番は、枯草菌≒緑膿菌>大腸菌>たんぱく質>土壌菌であった。これらの結果から、菌の表面への付着は、①初期状態では微生物と培地中のたんぱく質は分散、②表面との静電斥力の小さい培地中のタンパク質が微生物より先に表面に付着(この時のたんぱく質の付着は疎水性が高い表面で促進される)、③表面がタンパク質で覆われた後に微生物が付着、の順に起こっていると推察できる。より精密な細菌パターンを形成するためには、より詳細な細菌付着機構の解明が必要である。

3. 高分子電解質ブラシ被覆親水性表面へのタンパク質の接着制御

高分子ブラシは、長鎖高分子が直線的に延伸し、ブラシ状になったものである。この延伸は、材料表面において高分子の充填密度が高い場合に、分子鎖の重なりを避けるために高分子間に作用する斥力により生じる。このような高分子の振る舞いも自己組織化であり、バイオミメティックの範疇である。高分子ブラシの中でもポリマーに高分子電解質を用いたものを高分子電解質ブラシ(PEB: Polyelectrolyte Brush)という。PEBは電解質であるため、水溶液中で対イオンの捕捉・放出が可能である。このため、PEBは帯電していない高分子ブラシに比べて強い静電相互作用があり、直鎖状に伸長できる。また、対イオンを捕捉することにより、収縮することも可能であり、構造としての自由度が高い。さらに、PEB表面は帯電しているため親水性であり、その親水性を保持することができる。このような性質から高分子電解質ブラシはタンパク質の吸着制御のモデル表面として注目されている。

本項では、高分子電解質ブラシであるポリスチレンスルホン酸ナトリウムブラシ(PSSB: Poly(Styrene Sulfonate sodium salt) Brush)を被覆した表面におけるフィブリノゲンの吸着について紹介する。

ブラシ作製の原料にはアニオン重合によって合成したポリスチレン(PS)の末端が SiCl_3 でキャッピングされたポリマーを含むトルエン溶液を用いた。PSSBの作製にはn型(111)Si基板およびスライドガラスを用いた。まず、基板をアセトン、エタノール、超純水の順にそれぞれ10分間ずつ超音波洗浄を行い、真空乾燥した。続いて、大気圧下でVUV光を30分照射し、基板表面の有機物の除去を行うとともにOH基を導入した。VUV照射後、基板をPSのトルエン溶液に浸漬させ、室温下で1時間静置した。基板を溶液から引き上げ、電気炉の中に入れ減圧した。その後、窒素雰囲気下

160°Cで24時間加熱して、ポリスチレンブラシ(PSB)を作製した。次に、ドラフト内で、ジクロロエタン、無水酢酸、濃硫酸を所定の濃度で混合し、その混合液にPSブラシ基板を浸漬させた。一定温度で数十分間加熱し、PSBのベンゼン環にスルホ基を導入した。所定の反応時間経過後に、基板を取り出しエタノールで表面をリンスした後、0.5 Mの NaHCO_3 水溶液に約一日浸漬させ、スルホ基の水素イオンをナトリウムイオンに置換し、ポリスチレンスルホン酸ナトリウムブラシ(PSSB)を作製した。

タンパク質には、フィブリノゲンを、溶媒には、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(D-PBS)を用いた。タンパク質の吸着実験の手順は次の通りである。D-PBSを溶媒として濃度 $0.1 \mu\text{M}$ ($34 \mu\text{g/ml}$: 血中濃度の約1/100)フィブリノゲン溶液を調整した。調整したタンパク質溶液をインキュベータ内で約30分暖め、VUV照射した基板とPSSB基板を浸漬させた。浸漬時間は1~60分とした。Si基板とPSSB基板へのタンパク質の吸着量変化は、赤外吸収分光法(FT-IR)により評価した。

タンパク質が基板に吸着すると、タンパク質に起因するアミドIバンドの赤外吸収スペクトルが出現する。このため、タンパク質吸着の確認には、アミドIバンドの赤外吸収スペクトルが用いられる。アミドIバンドは $1600\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ の領域に存在し、N-Hの変角およびC-Nの伸縮運動などを伴ったペプチド結合部におけるグループ振動の中のC=O伸縮に起因する。また、タンパク質の二次構造である α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイルなどに帰属される複合吸収ピークである。そのため、アミドI吸収帯の変化を追跡することは、タンパク質の定量分析や構造分析に有効である。アミドIバンドによるピーク面積強度から、タンパク質の吸着量を見積もった。フィブリノゲンを吸着させたPSSB基板およびSi基板の各時間におけるFT-IRの結果を図5、6にそれぞれ示す。時間の経過に伴って、アミドIバンドのピーク強度が大きくなり、このアミドIバンドのピーク面積強度を比べることで相対的にタンパク質の吸着量の変化がわかる。

フィブリノゲンを吸着させたPSSB基板およびSi基板のアミドIバンドのピーク面積強度の時間変化を図7に示す。タンパク質の吸着量は、Si基板よりもPSSB基板上で多い。タンパク質は一般的に疎水性表面につきやすい。これは、タンパク質に含まれる疎水性官能基と表面に存在する疎水性官能基との間に働く疎水性相互作用に起因する。水滴接触角に着目すると、Si基板表面は約 40° 、PSSB表面は $5\sim 10^\circ$ であり、PSSB表面の方が高い親水性である。定説どおりであれば、PSSB表面よりもSi基板表面に多くのタンパク質が吸着すると予想できる。しかし、Si基板表面およびPSSB表面はいずれも親水性であるが、タンパク質の吸着量が大きく異なり、PSSB表面における吸着量の方が遙かに大きい。これは、単純な親水性、疎水性による効果ではなく、PSSBが表面に存在するためである。このようなタンパク質吸着の促進効果は、PSSBが電解質であり、対イオンの存在

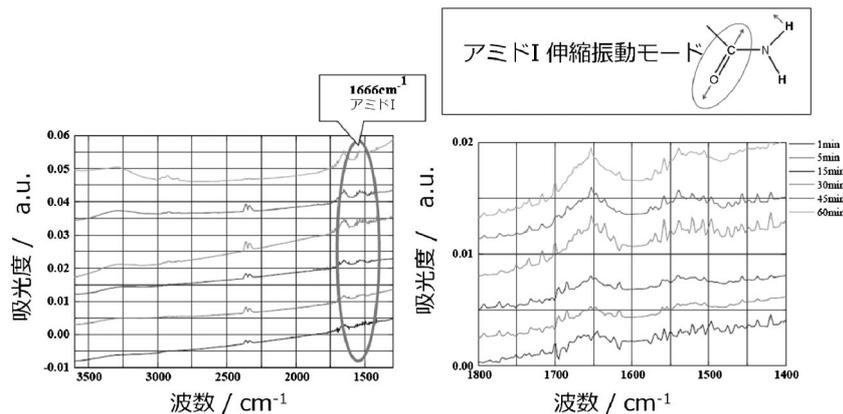


図5 フィブリンゲン吸着後の PSSB 基板上における FT-IR スペクトル.

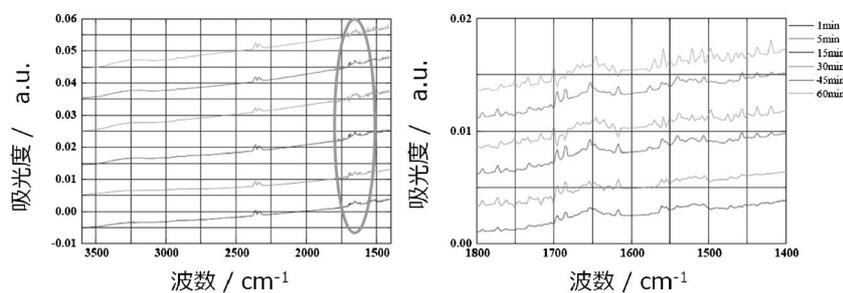


図6 フィブリンゲン吸着後の Si 基板上における FT-IR スペクトル.

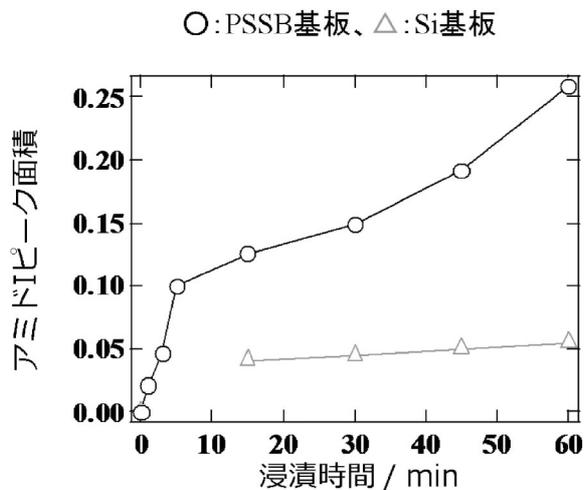


図7 フィブリンゲン吸着後の PSSB 基板および Si 基板のアミド I バンドのピーク面積強度の時間変化.

によるところが大きいであろう。一方、タンパク質の吸着に起因する主要な因子の解明については、今後の検討課題である。

このように基板とタンパク質の接着界面に高分子電解質ブラシを用いることで、タンパク質の接着を促進することができる。

4. ソリューションプラズマによるカーボンナノボール(CNB)の表面修飾

ソリューションプラズマは、溶液中で生成するプラズマで



図8 溶液の色変化の様子.

あり、気相中のプラズマとは異なる性質を有する。ソリューションプラズマにより、ラジカル、電子、紫外線、過酸化水素、オゾンなどの活性種が溶液中で発生する。ソリューションプラズマは、従来の液中プラズマに対し、高周波数で電圧を印加していることを特徴としている。これにより、液中で非平衡低温プラズマの形成が実現し、また、プラズマ相を囲む液体の膨張・圧縮運動とプラズマ相が連動することができる。筆者らは、動的な物質移動界面を有し、かつ、非平衡低温プラズマである「ソリューションプラズマ」を反応場として、新しいナノ材料合成⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾や材料の表面改質プロセスに関する研究を進めている。本項では、ソリューションプラズマによるカーボンナノボール(CNB)への Pt 修飾に関する現況を紹介する。

原料には、150 mL の超純水に、塩化白金酸六水和物(H₂

