

原子間力顕微鏡を用いた高分子の形状計測

Shape Measurement of Polymers by using Atomic Force Microscope (AFM)

0030115 竹原真紀 太田裕治

Maki TAKEHARA and Yuji OHTA

1. はじめに

現在、高分子材料は様々な分野で利用されており、医用材料にも多く使われている。医用材料には人工臓器材料・臨床化学分析用材料・高分子医薬用材料・細胞・免疫工学材料などがあり、そのなかでも外部刺激に応答性を示す刺激応答性高分子を利用した材料の研究開発が盛んに行われている。刺激応答性高分子の一つである温度応答性高分子は、溶液中において低温時には親水性、高温時には疎水性を示すもので、再生医療、組織工学、薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の分野への応用が期待される。すなわち、薬剤投与の際には、長時間、一定濃度で体内に留まる放出制御 (Control Release)、ターゲット臓器や細胞に対する薬剤送達が要求されるためである。本研究では、この温度応答性高分子をナノデバイスとして利用するための基礎研究として、原子間力顕微鏡を用いたナノスケール挙動解析を行うことを目的とする。本実験では原子間力顕微鏡を用いて高分子試料の表面形状を観察するとともに、試料作製法を確立するために行った。

2. 温度応答性高分子の性質

温度応答性を示すポリ-*N*-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm)は下限臨界溶液温度 32°C付近を境に、低温側では水に溶解し、高温では高分子鎖が凝集し不溶性となる。(図1)

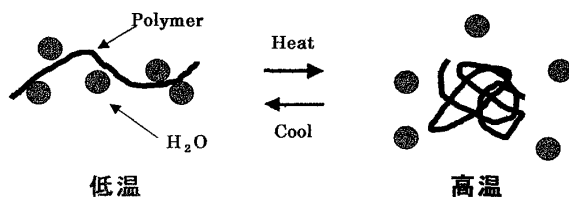


図1 温度応答性高分子の構造変化

3. 原子間力顕微鏡 (AFM)

本実験では AFM に走査型プローブ顕微鏡

SPM-9500 (島津製作所製) を用いた。AFM は試料表面と探針間に働く原子 (分子) 間力を検出し、表面を走査することで像を得る。電子顕微鏡と同程度以上のナノスケール分解能を有し、観察対象を選ばず、大気中、真空中、液体中での観察が可能である。AFM の動作モードはコンタクトモードとダイナミックモードの大きく二つに分けられる。前者は探針を試料表面に直接接触させ、その際に試料と探針間に作用する力をカンチレバーの変位、すなわちたわみとして検出する方法である。また、後者はカンチレバーを一定周波数で強制共振させた状態で、探針を試料表面に近づけ、試料と探針間に働く力を振幅変化として検出する方法である。

4. 実験

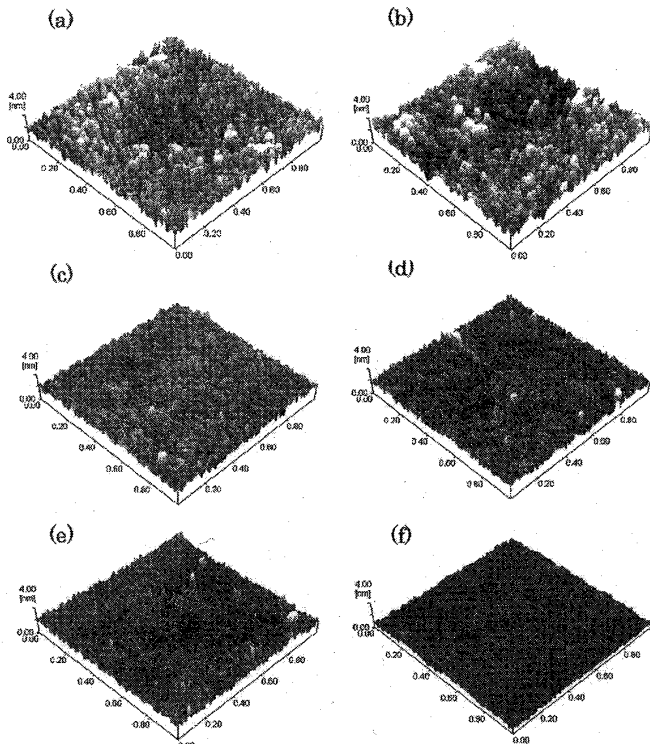
4-1 試料作製

ウシ血清アルブミン (BSA) 粉末 0.5 g を 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 10 mL に溶かし、50 mg/mL 標準 BSA 溶液を調製した。調製した 50 mg/mL 標準 BSA 溶液を希釈し、5 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.05 mg/mL の BSA 溶液を作製した。濃度を変えた 4 種の BSA 溶液と 0.01 M PBS を、3-アミノプロピルトリエトキシシランをコーティングしたシランコートスライドガラス (武藤化学製) 上に展開させ、一晚反応させた後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗い流し、10°C 以下、大気圧下で一晩乾燥させたものを試料とした。

4-2 AFM による表面観察

作製した 4 種類の BSA 試料と PBS 試料 (比較対照) を、AFM を用いて観察した。本実験では、バネ定数 42 N/m のカンチレバー (オリンパス製) を用い、走査範囲はいずれも 1 μm とし、大気中においてダイナミックモードで行った。AFM 観

察像より、断面形状解析、表面粗さ解析を行った。
 図 2 に試料の AFM 観察像を示す。



(a) 50 mg/mL, (b) 5 mg/mL, (c) 0.5 mg/mL,
 (d) 0.05 mg/mL, (e) 0.01 M PBS, (f) Slide Glass

図 2 AFM 観察像

5. 結果および考察

(1) 断面形状解析

AFM 観察像上の X 軸方向に長さ 0.2 μm の任意断面をとり、断面形状を比較した。(c), (d), (e) は、同程度の変化であったので、この観察範囲においてタンパク質は結合していないと考えられる。解析結果のうち、(a), (b)ならびに (e) の結果を図 3 に示す。

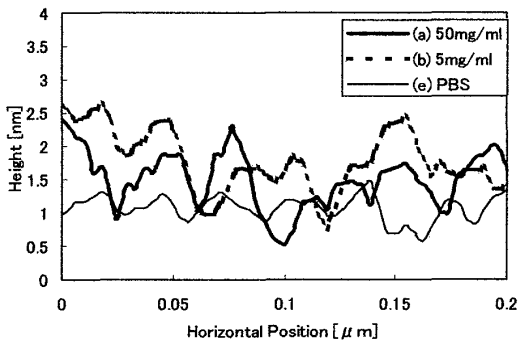


図 3 AFM 断面解析

試料 (a), (b) では (e) に比べ高低差が大きく、凹凸の形状が観察できた。断面解析において凹凸

の水平長さが約 30 nm 前後であることから、この凹凸は BSA 分子であると考えられる。

(2) 面粗さ解析

観察像の平均面粗さを表 1 に示す。

表 1 平均面粗さ Ra

| Sample | Ra /nm |
|-----------------|--------|
| (a) 50 mg/mL | 0.554 |
| (b) 5 mg/mL | 0.597 |
| (c) 0.5 mg/mL | 0.263 |
| (d) 0.05 mg/mL | 0.264 |
| (e) 0.01M PBS | 0.263 |
| (f) Slide Glass | 0.183 |

(a), (b) の面粗さ Ra は (c), (d), (e), (f) と比較すると 50%大きいことと、また、観察像の様子から、(a), (b) ではタンパク質が結合しているといえる。

(1), (2) の結果より、基板にタンパク質を固定させるにはある程度の濃度が必要であるといえる。基板に物質が結合するためには、溶液の適切な濃度範囲が存在することがわかった。

6. 今後の展開

本実験の結果より、高分子であるタンパク質のスライドガラス上への共有結合による導入が可能であった。さらに AFM を用いた表面観察により、物質の固定化には溶液を適切な濃度範囲に調製する必要があることがわかった。今後、分子量の大きな高分子を試料に用いて AFM で観察し、分子量による形状の差異を検討し、さらには PNIPAAm 試料の表面解析ならびに挙動解析を行いたい。

参考文献

- 山田真太郎, 原子間力顕微鏡を用いた温度応答性高分子の画像化, 平成 12 年度卒業論文, 東洋大学
- 岡本弘志, 原子間力顕微鏡を用いた細胞膜表面分子の認識に関する研究, 平成 13 年度学位論文, 東洋大学大学院