

was used as the definition of molecular surface contour. This isoelectric envelope contains 96% of all electrons (Bader *et al.*, 1987), and has been shown to be suitable for expressing the molecular surface, because the contour of 0.0020 a.u. describes the outer boundary of the molecule that contacts with other molecules (Pacios, 1995).

The molecular surface area for a solvent molecule s_i can be directly estimated using the above procedure. However, for the polymer molecule, an additional calculation is necessary because of the existence of the polymer terminal groups. Here, an n -mer polymer is supposed to consist of two terminal units and $n - 2$ internal units, and the surface area of the n -mer is regarded as the sum of the surface areas of the two types of unit. The molecular surface area of the monomeric unit $s_{2,mon}$ [$\text{\AA}^2/\text{monomeric unit}$] (the unit is equal to $6.023 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{mol-monomeric unit}$ and the SI units will be used hereafter) should correspond to that of an internal unit. The surface areas of 8-mer, 10-mer, and 12-mer polymers were calculated, and the internal unit surface area was obtained using an optimization algorithm.

The semiempirical quantum chemical calculation was carried out three times for each substance and the average values were used. Data deviation was less than 1% for solvent molecules and less than 4% for polymer molecules. In some cases of polymer molecule, there is electron cloud overlap among its side groups, which produces deviation of polymer surface area; therefore, folded conformations of polymers were avoided for the calculation.

1.4 Calculation of free volume

As noted above in Section 2.2, the free volume in the system is also an important parameter in the shell-like free volume theory, and to evaluate it, we followed the Vrentas–Duda free volume representation in which both polymers and solvents contribute to the free volume of the system (Vrentas and Duda, 1977a). Vrentas and Duda assumed that the free volume of component i , $V_{f,i}/\gamma$ [cm^3/g], has a linear temperature-dependent function as shown by Eq. (7).

$$V_{f,i}/\gamma = (K_{1i}/\gamma)(K_{2i} - T_{gi} + T) \quad (7)$$

where, (K_{1i}/γ) [$\text{cm}^3/(\text{g K})$] and $(K_{2i} - T_{gi})$ [K] are the free volume parameters of component i . These parameters can be estimated using the rheological properties of the polymer and solvent. The solvent free volume parameters, (K_{1s}/γ) and $(K_{2s} - T_{gs})$, are calculated from the pure solvent viscosity data by combining the Dullien equation (Dullien, 1972; Chhabra, 1991) and the free volume theory. The polymer free volume parameters, (K_{1p}/γ) and $(K_{2p} - T_{gp})$, are connected to the Williams–Landel–Ferry (WLF) parameters (Ferry, 1970), which are estimated from polymer melt

viscoelastic properties. These parameters were well estimated for various solvents and polymers by Zielinski, Hong, and other researchers (Zielinski and Duda, 1992; Hong, 1995; Yamaguchi *et al.*, 2003). Additivities of the free volumes can be assumed in a case of the combinations between nonpolar substances as our target, and thus, the free volume of a mixed system $V_{f,sys}/\gamma$ [cm^3/g] can be expressed as the summation of the free volumes of every component as shown by Eq. (8).

$$V_{f,sys}/\gamma = \sum_i \omega_i (V_{f,i}/\gamma) \quad (8)$$

1.5 Prediction of penetrant self-diffusivity in polymer using shell-like free volume theory

All of the parameters used in the calculation of shell-like free volume theory are pure-component parameters, and can be evaluated using their viscoelastic properties and semiempirical quantum chemical calculations. The predictive ability of the theory is validated by evaluating experimental self-diffusivity data. In this study, the following solvent–polymer binary systems were used for validation of shell-like free volume theory: benzene–polystyrene (Kosfeld and Zumkley, 1979), ethylbenzene–polystyrene (Kosfeld and Zumkley, 1979; Zgadzai and Maklakov, 1985), n -dodecane–polystyrene (Kim *et al.*, 1994), benzene–polyisobutylene (Kosfeld and Zumkley, 1979), toluene–polyisobutylene (Bandis *et al.*, 1995), and n -hexadecane–polyisobutylene (Moore and Ferry, 1962).

All the experimental self-diffusivity data values were measured at temperatures higher than the glass transition temperature of the relevant polymer, to assure the homogeneity of the system as the fundamental assumption of free volume theory. All parameters of each substance used in the calculation are tabulated in Tables 1 and 2.

2. Results and Discussion

2.1 Validation of shell-like free volume theory by comparing experimental and calculated penetrant self-diffusivities in polymer

Experimental and predicted solvent self-diffusivities are compared in Figures 4–8. As can be seen in all of the figures, the shell-like free volume theory gives excellent agreement for the self-diffusivity of solvent molecules in polymer solutions in middle to high solvent concentrations. However, in the n -dodecane–polystyrene and toluene–polyisobutylene systems in Figures 5 and 7, the deviations between experimental and calculated self-diffusivities are somewhat large in the low solvent concentration range. The deviation may mainly result from errors in free volumes. A small error in free volume tends to cause a large error in self-diffusivity because of the exponential

Table 1 Solvent parameters used in self-diffusivity prediction with shell-like free volume theory for penetrant in penetrant-polymer binary systems

| | K_{11}/γ [cm ³ /(g K)] | $K_{21} - T_{g1}$ [K] | \hat{V}_1^* [cm ³ /g] | M_1 [g/mol] | D_0 [cm ² /s] | s_1 [cm ² /mol] ^a | [Å ² /molecule] ^b |
|----------------------|---|--------------------------|---------------------------------------|------------------|-------------------------------|--|---|
| Benzene | 1.51×10^{-3} | -94.32 | 0.901 | 78.1 | 4.47×10^{-4} | 6.81×10^9 | 113.1 |
| Toluene | 2.20×10^{-3} | -102.72 | 0.917 | 94.1 | 1.87×10^{-4} | 8.07×10^9 | 134.0 |
| Ethylbenzene | 2.22×10^{-3} | -100.08 | 0.928 | 106.2 | 1.54×10^{-4} | 9.20×10^9 | 152.7 |
| <i>n</i> -Dodecane | 1.05×10^{-3} | -57.96 | 1.070 | 170.3 | 6.13×10^{-4} | 1.70×10^{10} | 281.5 |
| <i>n</i> -Hexadecane | 0.83×10^{-3} | -53.66 | 1.053 | 226.5 | 7.33×10^{-4} | 2.18×10^{10} | 361.8 |

^aShown in SI units; ^bShown in microscopic units;
Unit conversion: 1 [Å²/molecule] = 6.023×10^7 [cm²/mol]

Table 2 Polymer parameters used in self-diffusivity prediction with shell-like free volume theory for penetrant in penetrant-polymer binary systems

| | K_{12}/γ [cm ³ /(g K)] | $K_{22} - T_{g2}$ [K] | \hat{V}_2^* [cm ³ /g] | $M_{2,mon}$ [g/mol] | T_{g2} [K] | $s_{2,mon}$ [cm ² /mol-monomeric unit] ^a | [Å ² /monomeric unit] ^b |
|-----------------|---|--------------------------|---------------------------------------|------------------------|-----------------|---|---|
| Polystyrene | 5.82×10^{-4} | -327.0 | 0.850 | 104 | 373 | 5.95×10^9 | 98.8 |
| Polyisobutylene | 2.51×10^{-4} | -100.6 | 1.004 | 56 | 205 | 3.30×10^9 | 54.7 |

^aShown in SI units; ^bShown in microscopic units;
Unit conversion: 1 [Å²/monomeric unit] = 6.023×10^7 [cm²/mol-monomeric unit]

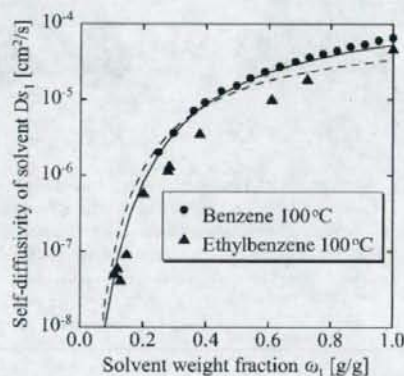


Fig. 4 Penetrant self-diffusivities in polystyrene solution; ● is the experimental self-diffusivity of benzene in the benzene-polystyrene binary system, and ▲ is that of ethylbenzene in the ethylbenzene-polystyrene binary system; the solid line shows the prediction for benzene, and the broken line is for ethylbenzene; lines are predicted using shell-like free volume theory

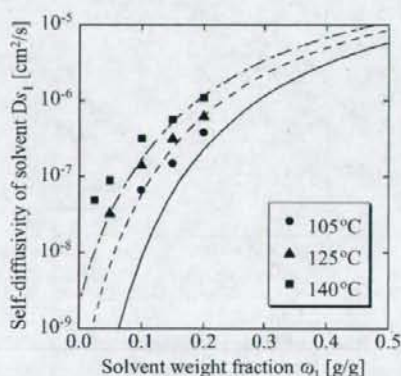


Fig. 5 *n*-Dodecane self-diffusivity in polystyrene solution; ●, ▲, and ■ are experimental self-diffusivities of *n*-dodecane in the *n*-dodecane-polystyrene binary system at temperatures of 105, 125, and 140°C, respectively; the solid line represents the prediction for 105°C, the broken line for 125°C, and the dashed-dotted line for 140°C

term in the fundamental free volume equation Eq. (1), especially in the region of small free volumes; thus, more precise parameters are required to attain more precise calculation. With these exceptions, the shell-like free volume theory can successfully estimate the

self-diffusivities of every penetrant molecule in both polymers over wide temperature and composition ranges. This certainly reflects the validity of the microscopic notion that it is the contacting free space that is available for penetrant molecular diffusive motion.

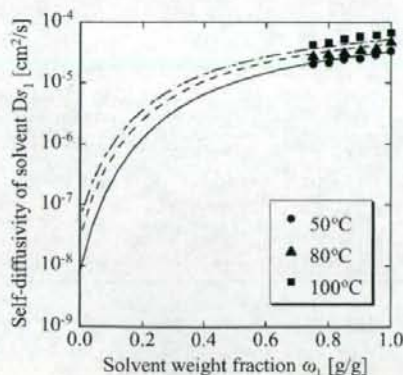


Fig. 6 Benzene self-diffusivity in polyisobutylene solution; ●, ▲, and ■ are experimental self-diffusivities of benzene in the benzene–polyisobutylene binary system at temperatures of 50, 80, and 100°C, respectively; the solid line represents the prediction for 50°C, the broken line for 80°C, and the dashed-dotted line for 100°C

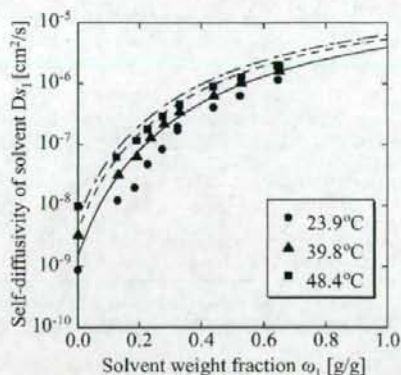


Fig. 8 *n*-Hexadecane (cetane) self-diffusivity in polyisobutylene solution; ●, ▲, and ■ are experimental self-diffusivities of cetane in the cetane–polyisobutylene binary system at temperatures of 23.9, 39.8, and 48.4°C, respectively; the solid line represents the prediction for 23.9°C, the broken line for 39.8°C, and the dashed-dotted line for 48.4°C

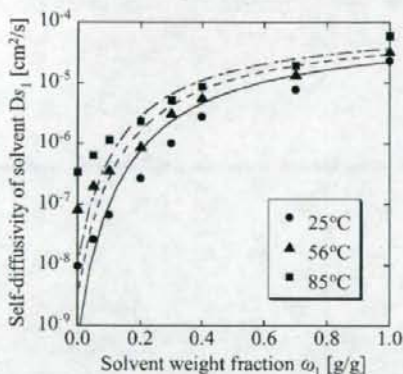


Fig. 7 Toluene self-diffusivity in polyisobutylene solution; ●, ▲, and ■ are experimental self-diffusivities of toluene in the toluene–polyisobutylene binary system at temperatures of 25, 56, and 85°C, respectively; the solid line represents the prediction for 25°C, the broken line for 56°C, and the dashed-dotted line for 85°C

The developed model can predict without the use of an arbitrary adjustable parameter due to the successful introduction of the microscopic notion of the molecular collisions. Nevertheless, the practical estimation accuracy of our model was found to be equal or even better than those of other models over a wide range of temperatures, compositions, and molecular shapes. The detailed and careful comparative calculations between the model and other models will be sum-

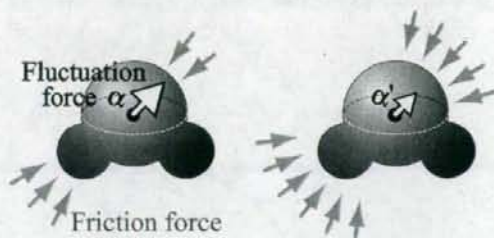


Fig. 9 Schematic of fluctuation force imposed on a penetrant molecule; when the friction frequency is small, the fluctuation force α is large (left); on the other hand, when the friction frequency is large, the fluctuation force α' becomes small because the friction force imposed on the penetrant molecule from various directions is averaged out (right)

marized in another paper.

2.2 Consideration of shell-like free volume in terms of molecular collisions

As described above, molecular diffusion originates in collisions between molecules (Cussler, 1977). Detailed consideration of shell-like free volume in terms of molecular collisions is given. This relationship can be discussed in terms of molecular surface area and free volume thickness, the constituents of the shell-like free volume.

When the molecular surface area is large, the collision frequency of the penetrant molecule is large. In this case, the fluctuation force α [N s/m molecule] for the molecule becomes small, because the frictional

force is imposed on the penetrant from various directions, and thus the fluctuation force is averaged out (Figure 9). Molecular self-diffusivity and the fluctuation force imposed on the molecule can be related by Einstein's relation (Kubo *et al.*, 1985) shown as Eq. (9).

$$D_s = \frac{kT}{\alpha} \quad (9)$$

This is derived from nonequilibrium statistical mechanics, where k [J/(molecule K)] denotes the Boltzmann coefficient. From this equation, larger molecular surface areas imply faster molecular diffusion, that is, from the standpoint of the molecular surface area, the relationship between shell-like free volume and self-diffusivity is validated by considering molecular collisions.

On the other hand, when the free volume thickness is large, the mean distance between collisions becomes longer. Self-diffusivity can also be roughly described as shown by Eq. (10).

$$D_s = \frac{d^2}{6\tau} = \frac{d \cdot u}{6} \quad (10)$$

This is the formula for self-diffusivity of a random walk jumping motion, where d [cm] is the mean molecular jumping distance between molecular collisions, τ [s] is the mean time required to carry out one jump, and u [cm/s] represents the mean molecular kinetic velocity. The mean molecular velocity is constant at constant temperature because it is determined by the mean kinetic energy of the molecule. Thus, it is easy to see that larger distances between molecules imply larger molecular self-diffusivities. Therefore, in relation to the free volume thickness, the relationship between shell-like free volume and self-diffusivity is validated using the concept of molecular collisions.

2.3 Advantages of the shell-like free volume theory

The shell-like free volume equation Eq. (5) includes only pure-component parameters, and these parameters can be evaluated using the components' viscoelastic properties and semiempirical quantum chemical calculations. This means that the shell-like free volume equation can predict penetrant self-diffusivity with only known pure-component parameters, without using any arbitrary adjustable parameters. Reconsideration of diffusive motion in terms of microscopic molecular collisions gives physical meanings to all of the parameters included in the theory.

The discussion is applicable to penetrant molecules with shapes ranging from spherical to long chains, and this is the correct microscopic explanation of why the present model can predict self-diffusivities of various types of penetrant molecules in a polymer matrix so well. Molecular collisions are a common

mechanism for diffusion of various types of penetrants in polymers; thus, the shell-like free volume theory has the potential to predict gas molecular diffusion in polymers and diffusion in ternary systems, which we are currently pursuing.

Conclusions

We have developed a novel microscopic concept of "shell-like free volume" around a molecule. The simple but comprehensive notion is that the contacting free space is the space available for the diffusive jumping motion of a penetrant molecule. The concept is associated with the microscopic notion of molecular collisions from the viewpoints of both molecular surface area and free volume thickness, the constituents of the shell-like free volume. All of the parameters used in shell-like free volume theory have physical meaning based on microscopic concepts, and can be evaluated using only pure-component properties: the free volume can be obtained from experimental rheological data, i.e. viscosity for the solvent and viscoelasticity for the polymer, and molecular surface area is obtained using the semiempirical quantum chemical calculation. Thus, the developed model can predict penetrant self-diffusivity in a polymer without using any arbitrary adjustable parameters. The developed model accurately predicts the self-diffusivity of molecules with shapes ranging from spherical to long chains in polymer solutions over wide ranges of temperature and concentration. These results show the validity of the microscopic concept of the shell-like free volume.

Nomenclature

| | | | |
|-------------------|---|--|-------------------------------------|
| D_0 | = | preexponential factor | [cm ² /s] |
| D_s | = | self-diffusivity of penetrant molecule | [cm ² /s] |
| d | = | mean molecular jumping distance between molecular collisions | [cm] |
| K_i/γ | = | free volume parameters of component i | [cm ³ /g K] |
| $K_{2i} - T_{2i}$ | = | free volume parameters of component i | [K] |
| k | = | the Boltzmann coefficient | [J/(molecule K)] |
| N_A | = | the Avogadro's number | [molecules/mol] |
| S_{sys} | = | total surface area of all molecules contained in the system | [cm ² /g] |
| s_i | = | molecular surface area of component i | [Å ² /molecule] |
| T | = | temperature of the system | [K] |
| u | = | mean molecular kinetic velocity | [cm/s] |
| \hat{V}_c^* | = | critical volume of penetrant, $=v_1^* N_A/M_1$ | [cm ³ /g] |
| V_i/γ | = | free volume of component i | [cm ³ /g] |
| V_{sys}/γ | = | total free volume contained in the system | [cm ³ /g] |
| v^* | = | critical molecular volume of penetrant molecule | [cm ³ /molecule] |
| v_{LSLV} | = | shell-like free volume of penetrant molecule | [cm ³ /molecule] |
| α | = | fluctuation force | [N s/m molecule] |
| δ_i | = | free volume thickness of component i | [cm] |
| τ | = | mean time required to carry out one diffusive jump | [s] |
| σ_i | = | surface area fraction of component i | [cm ² /cm ²] |
| ω_i | = | weight fraction of component i | [g/g] |

Literature Cited

- Atkins, P. W.; Physical Chemistry, 4th ed., Oxford University Press, Oxford, U.K. (1990)
- Bader, R. F. W., M. T. Carroll, J. R. Cheeseman and C. Chang; "Properties of Atoms in Molecules—Atomic Volumes," *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7968–7979 (1987)
- Bandis, A., P. T. Inglefield, A. A. Jones and W.-Y. Wen; "A Nuclear-Magnetic-Resonance Study of Dynamics in Toluene-Polyisobutylene Solutions. 1. Penetrant Diffusion and Fujita Theory," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **33**, 1495–1503 (1995)
- Chhabra, R. P.; "Effect of Pressure on Self-Diffusion in Liquids," *Int. J. Thermophys.*, **12**, 153–161 (1991)
- Cohen, M. H. and D. Turnbull; "Molecular Transport in Liquids and Glasses," *J. Chem. Phys.*, **31**, 1164–1169 (1959)
- Cukier, R. I.; "Diffusion of Brownian Spheres in Semidilute Polymer-Solutions," *Macromolecules*, **17**, 252–255 (1984)
- Cussler, E. L.; Diffusion, Mass Transfer in Fluid Systems, 2nd ed., Cambridge University Press, New York, U.S.A. (1977)
- Dewar, M. J. S., E. F. Healy, A. J. Holder and Y.-C. Yuan; "Comments on a Comparison of AM1 with the Recently Developed PM3 Method," *J. Comput. Chem.*, **11**, 541–542 (1990)
- Doolittle, A. K.; "Studies in Newtonian Flow. II. The Dependence of the Viscosity of Liquids on Free-Space," *J. Appl. Phys.*, **22**, 1471–1475 (1951)
- Doolittle, A. K. and D. B. Doolittle; "Studies in Newtonian Flow. V. Further Verification of the Free-Space Viscosity Equation," *J. Appl. Phys.*, **28**, 901–905 (1957)
- Dullien, F. A. L.; "New Relationship between Viscosity and Diffusion Coefficients Based on Lamms Theory of Diffusion," *Trans. Faraday Soc.*, **59**, 856–868 (1963)
- Dullien, F. A. L.; "Predictive Equations for Self-Diffusion in Liquids—Different Approach," *AIChE J.*, **18**, 62–70 (1972)
- Dymond, J. H.; "Corrected Enskog Theory and Transport-Coefficients of Liquids," *J. Chem. Phys.*, **60**, 969–973 (1974)
- Ferry, J. D.; Viscoelastic Properties of Polymers, 2nd ed., Wiley, New York, U.S.A. (1970)
- Fujita, H.; "Diffusion in Polymer-Diluent Systems," *Fortschr. Hochpolym.—Forsch.*, **3**, 1–47 (1961)
- Haward, R. N.; "Occupied Volume of Liquids and Polymers," *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C4**, 191–242 (1970)
- Ho, W. S. W. and T. K. Poddar; "New Membrane Technology for Removal and Recovery of Chromium from Waste Waters," *Environ. Prog.*, **20**, 44–52 (2001)
- Hong, S.-U.; "Prediction of Polymer-Solvent Diffusion Behavior Using Free-Volume Theory," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **34**, 2536–2544 (1995)
- Kim, D., J. M. Caruthers, N. A. Peppas and E. von Meerwall; "Self-Diffusion and Mutual-Diffusion Coefficients in the Dodecane Polystyrene System," *J. Appl. Polym. Sci.*, **51**, 661–668 (1994)
- Kloczkowski, A. and J. E. Mark; "On the Pace—Datyner Theory of Diffusion of Small Molecules through Polymers," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **8**, 1663–1674 (1989)
- Kosfeld, R. and L. Zunkley; "Mobility of Small Molecules in Polymer Systems," *Ber. Bunsen Ges. Phys. Chem.*, **83**, 392–396 (1979)
- Kubo, R., M. Toda and N. Hashitsume; Nonequilibrium Statistical Mechanics, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, Germany (1985)
- Lamm, O.; "The Formal Theory of Diffusion, and Its Relation to Self-Diffusion, Sedimentation Equilibrium, and Viscosity," *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1120–1128 (1954)
- Liu, H. Q., C. M. Silva and E. A. Macedo; "Generalised Free-Volume Theory for Transport Properties and New Trends about the Relationship between Free Volume and Equations of State," *Fluid Phase Equilib.*, **202**, 89–107 (2002)
- Mackie, J. S. and P. Meares; "The Diffusion of Electrolytes in a Cation-Exchange Resin Membrane. I. Theoretical," *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, **232**, 498–509 (1955)
- Masaro, L. and X. X. Zhu; "Physical Models of Diffusion for Polymer Solutions, Gels and Solids," *Prog. Polym. Sci.*, **24**, 731–775 (1999)
- Merkel, T. C., V. I. Bondar, K. Nagai, B. D. Freeman and I. Pinnau; "Sorption and Transport of Hydrocarbon and Perfluorocarbon Gases in Poly(1-trimethylsilyl-1-propyne)," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **38**, 415–434 (2000)
- Moore, R. S. and J. D. Ferry; "Diffusion of Radioactively Tagged Cetane in Polyisobutylene-Cetane Mixtures and in Three Methacrylate Polymers," *J. Phys. Chem.*, **66**, 2699–2704 (1962)
- Muhr, A. H. and J. M. V. Blanshard; "Diffusion in Gels," *Polymer*, **23**, 1012–1026 (1982)
- Ogston, A. G., B. N. Preston and J. D. Wells; "Transport of Compact Particles through Solutions of Chain-Polymers," *Proc. R. Soc. London A*, **333**, 297–316 (1973)
- Pace, R. J. and A. Datyner; "Statistical Mechanical Model for Diffusion of Simple Penetrants in Polymers. 1. Theory," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **17**, 437–451 (1979a)
- Pace, R. J. and A. Datyner; "Statistical Mechanical Model of Diffusion of Complex Penetrants in Polymers. 1. Theory," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **17**, 1675–1692 (1979b)
- Pacios, L. F.; "Atomic Radii Scales and Electron Properties Deduced from the Charge-Density," *J. Comput. Chem.*, **16**, 133–145 (1995)
- Park, J. Y. and D. R. Paul; "Correlation and Prediction of Gas Permeability in Glassy Polymer Membrane Materials via a Modified Free Volume Based Group Contribution Method," *J. Membr. Sci.*, **125**, 23–39 (1997)
- Paul, C. W.; "A Model for Predicting Solvent Self-Diffusion Coefficients in Nonglassy Polymer Solvent Solutions," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **21**, 425–439 (1983)
- Phillies, G. D. J.; "The Hydrodynamic Scaling Model for Polymer Self-Diffusion," *J. Phys. Chem.*, **93**, 5029–5039 (1989)
- Russell, G. T., R. G. Gilbert and D. H. Napper; "Chain-Length-Dependent Termination Rate Processes in Free-Radical Polymerizations. 2. Modeling Methodology and Application to Methyl-Methacrylate Emulsion Polymerizations," *Macromolecules*, **26**, 3538–3552 (1993)
- Stewart, J. J. P.; "Optimization of Parameters for Semiempirical Method. 1. Method," *J. Comput. Chem.*, **10**, 209–220 (1989)
- Tefera, N., G. Weickert and K. R. Westerterp; "Modeling of Free Radical Polymerization up to High Conversion. 2. Development of a Mathematical Model," *J. Appl. Polym. Sci.*, **63**, 1663–1680 (1997)
- Tirrell, M.; "Polymer Self-Diffusion in Entangled Systems," *Rubber Chem. Technol.*, **57**, 523–556 (1984)
- Vanbeije, H. and M. H. Ernst; "Modified Enskog Equation," *Physica*, **68**, 437–456 (1973)
- von Meerwall, E., S. Beckman, J. Jang and W. L. Mattice; "Diffusion of Liquid *n*-Alkanes: Free-Volume and Density Effects," *J. Chem. Phys.*, **108**, 4299–4304 (1998)
- von Meerwall, E., E. J. Feick, R. Ozisik and W. L. Mattice; "Diffusion in Binary Liquid *n*-Alkane and Alkane-Polyethylene Blends," *J. Chem. Phys.*, **111**, 750–757 (1999)
- von Meerwall, E. D., N. Dirama and W. L. Mattice; "Diffusion in Polyethylene Blends: Constraint Release and Entanglement Dilution," *Macromolecules*, **40**, 3970–3976 (2007)
- Vrentas, J. S. and J. L. Duda; "Diffusion in Polymer-Solvent Systems. 1. Re-Examination of Free-Volume Theory," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **15**, 403–416 (1977a)
- Vrentas, J. S. and J. L. Duda; "Diffusion in Polymer-Solvent Systems. 2. Predictive Theory for Dependence of Diffusion-Coefficients on Temperature, Concentration, and Molecular-Weight," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **15**, 417–439 (1977b)
- Vrentas, J. S. and C. M. Vrentas; "Predictive Methods for Self-Diffusion and Mutual Diffusion Coefficients in Polymer-Solvent Systems," *Eur. Polym. J.*, **34**, 797–803 (1998)

- Vrentas, J. S., C. M. Vrentas and N. Faridi; "Effect of Solvent Size on Solvent Self-Diffusion in Polymer-Solvent Systems," *Macromolecules*, **29**, 3272-3276 (1996)
- Wong, S.-S., T. A. Altinkaya and S. K. Mallapragada; "Understanding the Effect of Skin Formation on the Removal of Solvents from Semicrystalline Polymers," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **43**, 3191-3204 (2005)
- Yamaguchi, T., S. Nakao and S. Kimura; "Plasma-Graft Filling Polymerization Preparation—Preparation of a New Type of Pervaporation Membrane for Organic Liquid-Mixtures," *Macromolecules*, **24**, 5522-5527 (1991)
- Yamaguchi, T., B.-G. Wang, E. Matsuda, S. Suzuki and S.-I. Nakao; "Prediction and Estimation of Solvent Diffusivities in Polyacrylate and Polymethacrylates," *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **41**, 1393-1400 (2003)
- Zgadzi, O. E. and A. I. Maklakov; "Solvent Self-Diffusion in the System Polystyrene-Ethylbenzene in Terms of the Modified Free-Volume Theory," *Acta Polym.*, **11**, 621-623 (1985)
- Zielinski, J. M. and J. L. Duda; "Predicting Polymer Solvent Diffusion-Coefficients Using Free-Volume Theory," *AIChE J.*, **38**, 405-415 (1992)



多孔体の精密制御と機能・物性評価

サイエンス&テクノロジー

58. 多孔体へのプラズマグラフト重合を用いたバイオ材料システムの開発

東京工業大学 伊藤 大知 山口 猛央

はじめに

有機材料・無機材料を問わず細孔径が数nmから数10 μ mまで様々な多孔体が開発され、これら多孔体は様々な産業用途で用いられており、特に近年バイオ用途として多孔体の比重がますます増している。例えば血液透析膜や血球分離膜、人工血管などのメディカル機器・細胞・組織と材料が接触するバイオインターフェイス、生体材料を認識するバイオセンサー、組織工学におけるスキヤフォールド、DDS(ドラッグデリバリー)担体などに幅広く用いられている。これらの用途において多孔体の表面物性の制御が極めて重要であり、プラズマグラフト重合が極めて有効であることが数多く報告されている。

さらに表面だけでなく、多孔体細孔内部の空間は通常の自由空間と異なる独特な化学反応・吸着挙動・物質移動を発現する場としてますます期待されている。我々はプラズマ処理は多孔体の内部まで浸透せず、プラズマグラフト重合が多孔体表面でしか起こらないと考えられていたにも関わらず、プラズマ照射条件や重合条件を最適化することによって、多孔体内部の細孔表面にプラズマグラフト重合が起こることを見出した^{1,2)}。これを契機にして、プラズマグラフト重合を多孔体表面の改質に用いるだけでなく、多孔体内部の細孔表面修飾および細孔空間の構造制御に用いることが可能になり、様々な機能性材料の研究に発展してきている。例えば、未来のバイオ・医療工学を支えることが期待される、シグナルを介して生体と協調しあいながら生体のように振舞うようなバイオインスパイアード材料を、多孔体へのプラズマグラフト重合を用いて作製し提案してきた。

本総説では前半でバイオマテリアル多孔体表面改質としてのプラズマグラフト重合法を、後半では多孔体とプラズマグラフト重合法を用いた我々の新しいバイオインスパイアード材料開発の手法を紹介する。

1. バイオマテリアルの表面改質

1.1 人工血管

動脈硬化などの循環器疾患において、切除部の代用血管として、人工合成ポリマーで作製された人工血管が広く用いられている。様々な検討を経て現在臨床で広く用いられているのが多孔PTFEであるePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) と、DacronなどのPET (polyethylene terephthalate) 織布である。血栓による閉塞を防ぐために、また人工血管上層に血管内皮細胞による層が形成され長期に渡って閉塞を起こさないように、結果として多孔構造を持った素材が用いられるようになった。さらに初期の細孔から血液漏出を防ぐためにゼラチン・コラーゲン・アルブミンなどがコーティングされることが一般的である。このePTFE人工血管を酸素プラズマグラフト重合によって、poly-AAm (アクリルアミド)、poly-HEMA (ヒドロキシメチルメタクリレート) などで改質した例³⁾、PETフィルム上にpoly-MPC (2-(methacryloyloxy)ethylphosphorylcholine) をアルゴンプラズマグラフト重合し、表面改質を行った例⁴⁾も報告されている。

1.2 スキャフォールド

上記の人工血管に代わる将来の人工血管として、生分解性のスキャフォールドである Chronoflex などの多孔ポリウレタンを用いた人工血管が近年盛んに研究されている。これはティッシュエンジニアリングのアプローチであり、多孔ポリウレタンは最終的に分解除去され、再生した血管に置き換わることを目指したものである。この多孔ポリウレタンの細胞接着性を増したり、血液適合性を向上させるためにプラズマグラフト重合が用いられている。例えば緻密な意味ではプラズマグラフト重合ではないが SO_2 プラズマ処理して SO_3H 基を固定した例⁶⁾、あるいはアルゴンプラズマ処理により生成したパーオキシド基を開始点として L-lactide の開環重合を行い、多孔ポリウレタン上に PLLA (poly (L-lactic acid)) をグラフトした例⁸⁾などが報告されている。

一般的に言ってもティッシュエンジニアリングにおいて細胞の足場となる多孔材料は重要な要素である。最も良く用いられる多孔材料は PLGA (poly (L-lactic-co-glycolic acid)) 及び PLLA であろう。PLLA 多孔基材へアンモニアプラズマ処理してアミノ基を形成し、これとコラーゲンを反応させることによってグラフトした例⁷⁾、アルゴンプラズマ照射後にパーオキシド基を形成してキトサンとカップリングさせてグラフトした例⁸⁾が報告されている。アンモニアプラズマ処理において、アミノ基と色素の反応によりプラズマの浸透距離を測定した結果、この系では、表面から 4mm までプラズマ処理が及ぶことが明らかになっている。

ここに記すことができなかつた例として既往の総説^{9,10)}を挙げる。同様のアプローチは、レドックスグラフト重合、UV グラフト重合など他の様々なグラフト重合によって実現できるものもあり実際数多く報告されているが、容易に開始点を生成し、かつバルク材料の物性を損なわず表面のみを修飾すること出来るという点で、プラズマグラフト重合は優れている。バイオメディカル用途に用いられる多孔素材は PTFE、PET、シリコンラバーから生分解性のポリウレタン、PLGA・PLA まで多岐に渡り、そのほとんどにプラズマグラフト重合が用いられていると言って良い。

2. バイオインスパイアード材料

2.1 分子認識ゲート膜

生体膜では分子シグナルにตอบสนองして、特定イオンを認識して能動輸送するイオンチャンネルが存在する。また、受動的に特定イオンだけを輸送するイオンチャンネルも存在する。これらが連携し、外場の刺激に応じて細胞内の特定イオン濃度を制御し、さらに情報伝達を可能としている。この分子認識するイオンチャンネルのようにゲート機能を持つ人工ゲート膜を開発することを考えた。

Irie ら¹¹⁾は、NIPAM (N-isopropylacrylamide) と BCAM (Benzo-18-Crown-6-acrylamide) の共重合体ポリマーの K^+ 濃度応答性を報告している。NIPAM ゲルは、温度変化を与えるで LCST (相転移温度): 32°C で、可逆的に膨潤・収縮する。一方、クラウンエーテルの一種である Benzo-18-Crown-6 は、中心の空洞にフィットする K^+ イオンを選択的に捕捉することが知られている。このため、このポリマーは、Benzo-18-Crown-6 のイオン配位により変化する相転移温度の間で定温操作を行えば、外部での特定イオン濃度により膨潤・収縮が引き起こされることになる。

図 1 に提案している「分子認識ゲート膜」の概念を示す。我々は、PE 多孔質基材の細孔中に、NIPAM-co-BCAM をプラズマグラフト重合し、グラフト鎖の膨潤・収縮によって、特定イオンにตอบสนองするゲート膜の開発を行った^{12,13)}。膜は、PE 多孔フィルム基材 (孔径 $0.3\text{--}0.5\ \mu\text{m}$ ・厚み $110\ \mu\text{m}$) に、NIPAM と BCAM を割合を変えてプラズマグラフト重合法^{12,13)}により細孔中の壁表面からグラフト鎖を成長させ作製した。

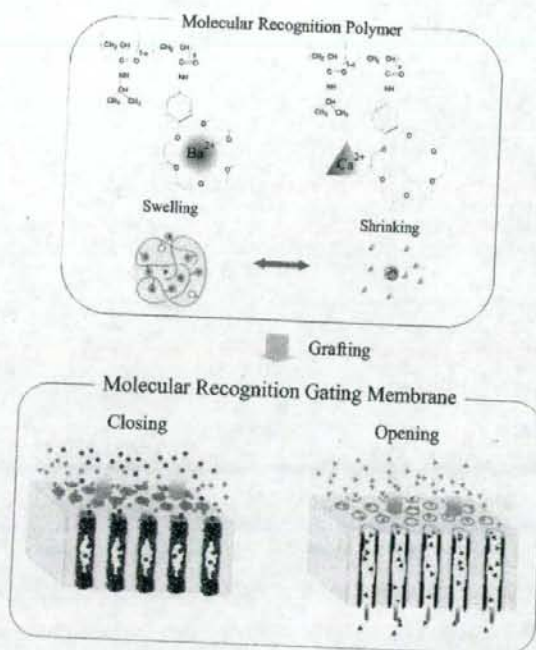


図1 Schematic representation of molecular recognition ion gating membrane.

架橋性のハイドロゲルを用いた環境応答材料は数時間、数十分など応答性に時間がかかるものが殆どだが、レセプターをゲル自身に含有させることにより速い認識性を実現し、かつポリマーを直鎖状のグラフト鎖とし多孔膜に固定することにより高い水の拡散性と短い拡散距離を設定し、速い応答性を実現する。膜は、センサー部により M^+ を特異的に認識し、バルク中の M^+ 濃度が一定濃度より高くなると感温性グラフト鎖が急激に膨潤し膜細孔を閉じて M^+ の溶出を阻止する。この時、他のイオンの濃度には影響を受けない。逆に、バルク中の M^+ 濃度が低くなると、グラフト鎖が収縮し膜細孔を開いて、 M^+ 以外の Na^+ などを含んだ溶液が透過する。この膜細孔の開閉の「ゲート効果」によって、バルク中の M^+ 濃度の制御、 M^+ の溶出防止、イオンシグナルによる情報伝達などができる。

様々なイオンを含む水溶液の膜透過係数、 L_p の温度依存性を図2に示す。 Li^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} など配位定数の小さいイオンの場合、透過係数の温度依存性は純水の場合と同様で、ほぼ35℃付近で急激に透過性が変化した。膜細孔中で、ゲルが温度の上昇により収縮したためである。一方、配位定数が大きな K^+ 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} などは、低濃度でもLCSTが大きくシフトし、 Ba^{2+} 、 Pb^{2+} などは50℃においても透過係数の増加は認められなかった。クラウンホストがイオンを捕捉したため、親疎水性が変化しLCSTが高濃側にシフトしたと考えられる。クラウンエーテルによる分子認識によって、ゲート挙動が変化していることが明らかで

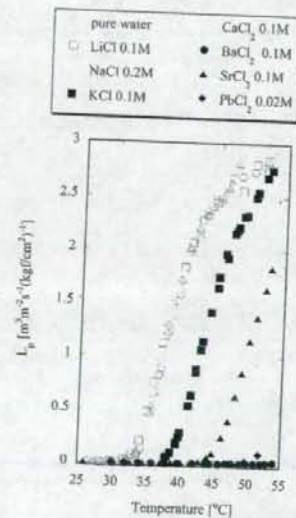


図2 Temperature dependence of pure water permeability coefficient for water containing different ions through the molecular recognition ion gating membrane.

ある。

温度を38℃一定にしてBa²⁺ 0.01 [M]/Ca²⁺ 0.09 [M] 混合溶液とCa²⁺ 0.1 [M] を交互に透過させた結果を図3に示す。Ca²⁺ はBenzo-18-crown-6と錯形成しないため大量に混合していてもゲートの応答性には関与せず、混合している微量なBa²⁺ に応答して、ゲートが迅速に可逆的に開閉することが分かる。また、応答速度は非常に早く、開閉時ともに30秒以内で透過性が大きく変わった。また、透過性の変化は50倍以上と高いゲート効果を示した。

以上のように圧力をかけて透過する透過性能を、分子認識によって制御できることを示したが、さらに圧力をかけない状態で膜細孔が開閉すると、分子認識によって浸透圧を発生・消滅することができることを見出した¹⁴⁾。この結果を図4に示す。2チャンバーのセルに分子認識ゲート膜をセットし、37℃一定化で膜両面に0.1M Ca²⁺ が供給された場合は膜が開いて浸透圧が消滅するのに対して、0.1M Ba²⁺ が供給された場合は膜細孔がしまつて浸透圧が発生する。この場合浸透圧の駆動力となる濃度勾配は0.2g/ml dextranを膜片側にも供給することによって与えている。膜の開閉を分子認識によって制御すれば、駆動力となる物質の濃度勾配は何でも良い。この応答は完全に可逆的に起こる。これは浸透圧が発生する場合、開放系では濃度勾配を駆動力として浸透流が発生することを示している。さらにこの浸透圧は、認識されるシグナルイオンそのものの濃度勾配でも発生することを見出した。

さらに考察を深めると、分子認識ゲート膜は分子刺激に対して、圧力透過制御性能と浸透圧制御機能の2つを有することを示されたが、この2つは独立に起こるものではなくお互いに関連している。つまり膜細孔が開いた状態では圧力透過流の大きさは最大になり、浸透流は発生しない。一方で膜細孔が閉まった状態では圧力透過流はなくなり、浸透流が発生する。つまりどちらかが大きくなったときは、片方は必ず小さくなる性質を持っている。このことを利用して、特定のシグナルイオン刺激に応答して膜が開閉し続ける膜の開発に成功した¹⁵⁾。この発振現象は生体膜の興奮現象と、メカニズムはまったく異なるが似通った現象である。

このように多孔基材細孔内で、分子センサーと刺激応答ポリマーをうまく組み合わせたシステムを作れば、生体膜のイオンチャネルと類似な機構の分子認識ゲート膜の開発が可能である。

2.2 DDS製剤のための分子認識マイクロカプセル

単純な平膜だけでなく、将来静脈注射などによって血中に導入するために、マイクロカプセル化も検討している。図5に示すようにマイクロカプセルの表面を多孔膜とし、その細孔中にセンサーとアクチュエータを埋め込めば、カプセル内部の薬剤を分子シグナルにより放出する分子認識マイクロカプセルが開発できる。

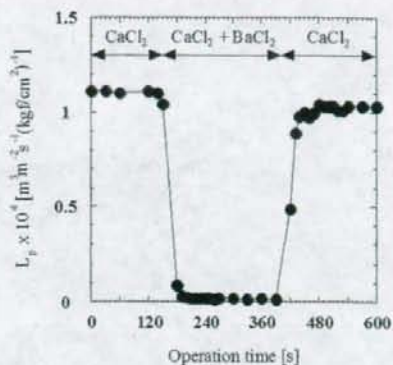


図3 Response rate of the molecular recognition ion gating membrane to the ion signal.

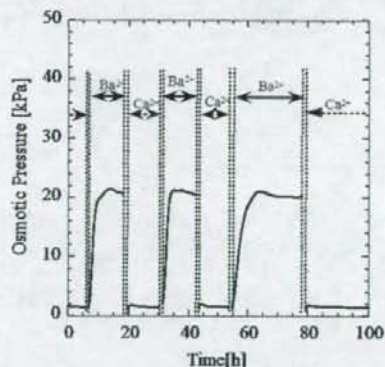


図4 Osmotic pressure changes with ion signal swing. Dextran and ion concentration were constant at 0.2 g/ml and 0.1M, respectively. However, the ion specie was changed alternately between Ba²⁺ and Ca²⁺.

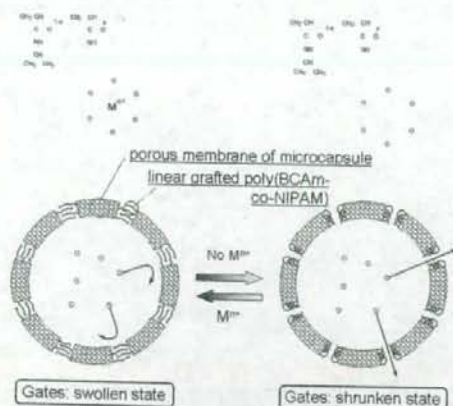


図5 Schematic representation of the molecular recognition microcapsule for environmental stimuli-responsive controlled-release.

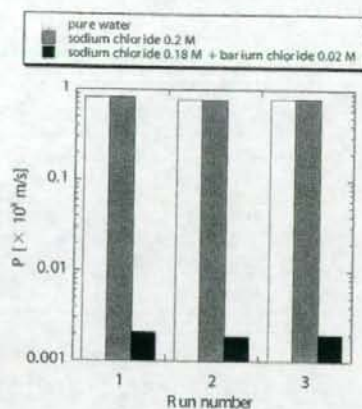


図6 Environmental stimuli-responsive controlled-release of microcapsules by molecular recognition and the reversible release characteristics of the microcapsules at 38°C.

エマルジョン粒子の界面で界面重合を行うことにより、マイクロカプセルが開発可能である¹⁶⁾。中が空洞になった40ミクロン程度の粒径のマイクロカプセルであり、そのシェル部である膜は多孔構造となっている。重合条件を変更すれば、4ミクロンまで小さくできる¹⁷⁾。このカプセルの粒子群をガラスアンプルにつめ、プラズマグラフト重合を行った。粒子群全体にプラズマを照射し、その後モノマー溶液と接触させ、カプセル表面部の多孔膜の細孔内部にグラフト鎖を成長させる。ここでもNIPAMとBCAmの共重合を行った。

作成したカプセルの内部にビタミンB12を入れ、その放出挙動を外部溶液濃度変化から測定した。38°Cでの放出フラックスを図6に示す。CaCl₂水溶液では、純水のとくと同様に高いビタミンB12の拡散フラックスを示す。クラウン環が認識するBaCl₂を用いると、その拡散フラックスは1000倍近く低下し、膜細孔が閉じたことが確認できる。このように、分子認識ゲート膜は平膜だけでなく、マイクロカプセルにも応用でき、プラズマグラフト重合により効率よく生産できる¹⁸⁾。

2.3 シグナル認識新陳代謝可能細胞システム

近年、細胞を利用したバイオリアクターの開発やティッシュエンジニアリング¹⁹⁾の研究が進められており、岡野らは細胞シート工学を提唱している²⁰⁾。肝臓や腎臓などの臓器が細胞シートを単位として積層化されていることに注目し、無傷で細胞シートを回収する技術を開発した。温度応答性高分子NIPAMを培養床表面に用いると、接着・伸展・増殖した培養細胞を、細胞の機能低下をもたらす分解酵素を用いることなく培養温度を下げるという極めて非侵襲的な方法で、脱着・回収することが可能である。

このような平面培養の手法をバイオリアクターとして用いるときに、時に細胞は長期間の培養によって障害を受ける。バイオリアクターやバイオ人工臓器などの人工材料と、生体内の決定的な違いは新陳代謝が不可能なことであり、細胞が障害をうけて放出した炎症性物質が周辺の細胞に傷害を及ぼす。そこで、本研究では膜上に細胞を培養し、例えば細胞死が起きた場合、細胞死という情報を膜界面が認識することによって選択的に炎症部を排除する新陳代謝が可能なシステムを考えた。排除された空間は、細胞が増殖することによって自己修復する、自己修復型細胞集積材料システムである。

本研究では、図7に示すように、上記のイオンゲート膜に用いた特定イオンに応答するポリマーを固定し

た材料表面に細胞の培養を行った。このシグナル認識ポリマーは、N-isopropylacrylamide (NIPAM) およびクラウンエーテルをペンダントとして持つ Benzo-18-Crown-6-acrylamide (BCAm) モノマーの共重合鎖である。上述のように生体が活動する 37°C 付近で用いると、クラウン環に特定のイオンが捕捉されたときのみ NIPAM が親水性になり、膨潤が起きる。通常、細胞内部でのカリウムイオン濃度は 140mM であるが、細胞外では 5mM である²⁰⁾。しかし、細胞死が起きると細胞膜が破壊され、細胞内に

濃縮されていたカリウムイオンの流出が起きる。細胞が死滅すると、恒常性が維持できなくなるために、細胞内容物の流出が起きるためである。さらに、細胞シートの回収として説明したように、細胞は培養温度 37°C から NIPAM の LCST 以下に温度変化を与えたとき、NIPAM 固定膜表面から脱着する。これは、NIPAM 表面が親水性となり、細胞が表面に接着しにくくなり、細胞接着の足場を奪われるためである。

そこで、細胞死が起きると、膜界面が死細胞から流出されるカリウムイオンを認識し、NIPAM が親水性となり膨潤することで死細胞の脱着が起き、選択的に死細胞が脱着すると考えた。さらに、死細胞脱着後はカリウムイオンが拡散し NIPAM 鎖が元の収縮した状態に戻るため、周辺の生細胞が増殖することで元の状態に再生することが可能であると考えた²¹⁾。

まず細胞を confluent に培養した各膜に、細胞死を誘導するために紫外線を 3 分間照射し脱着実験を行った。脱着した細胞数は血球計算盤にて測定した。また、膜面に残った細胞数をトリプシン-EDTA 溶液にて脱着させ、細胞数を血球計算盤にて測定した。結果を図 8、9 に示す。PE 膜、NIPAM 膜は、同じ傾向を示しており、脱着細胞は少なかった。それに対し、NIPAM-co-BCAm 膜から非常に高い死細胞脱着率が得られた。この結果は、死細胞から放出された K^+ によって LCST が高温側にシフトしたため NIPAM 鎖の膨潤が起き、細胞が脱着したものと考えられる²¹⁾。また、細胞死を起こすと死細胞はバラバラになって脱着しているが、生細胞はある程度の塊(シートが凝集を起こしたもの)になって脱着することが分かった。細胞は、死滅することによって、細胞-細胞間結合が弱まりバラバラになる²²⁾ため、死細胞が選択的に脱着することが可能であったと考えられる。

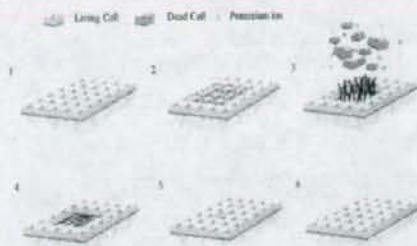


図7 Design concept of the proposed regenerable cell culture material.

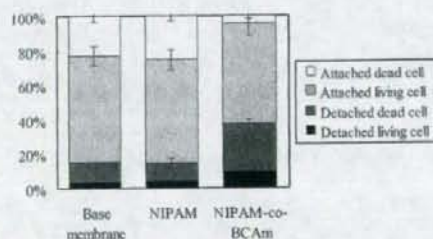


図8 Cell abundance ratio after UV irradiation.

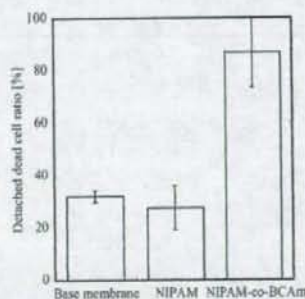


図9 Detached dead cell ratio after UV irradiation.

さらに、紫外線を局所的に照射して部分的な細胞死を誘導した後、培養を継続したところ、NIPAM-co-BCAm 膜では素早い細胞の再生が起きることを確認した。これは、死細胞の素早い脱着によって、培養系が

炎症状態に陥らず、紫外線照射部の周辺の生細胞の増殖活性が保たれるためであると考えられる。

これらの結果により、シグナル認識膜は死細胞を素早く培養表面から脱着することが可能であり、新陳代謝可能材料として有用であると考えられる。将来は幹細胞などと組み合わせて、生体のように修復しつつ連続的に使用することができるバイオリクターやバイオ人工臓器、細胞死が原因で培養が困難となっている細胞の培養皿など幅広い応用用途が考えられる。

おわりに

プラズマグラフト重合法を用いた多孔体の表面修飾は広範囲に渡って利用されている。バイオマテリアルとして多孔体は非常に重要であり、血液適合性や細胞性接着性の改善のためにプラズマグラフト重合は広く用いられてきた。さらには、多孔体の表面だけでなく、多孔体の細孔内部表面もプラズマグラフト重合によって修飾することができるため、多孔体の内部の細孔中に様々な構造を作りこむことができる。これを利用して材料自体をシステムとして捉えて、機能が最適化された形で様々なバイオインスパイアード材料を構築できる。これらの新しい材料は、将来が期待される、再生医療、ドラッグデリバリー、簡易診断のためのセンサーなどに不可欠な材料となっていくことが期待され、多孔体をプラズマグラフト重合により機能化する方法はますます重要性を増すであろう。

参考文献

- 1) T. Yamaguchi, S. Nakao, S. Kimura, "Plasma-Graft Filling Polymerization-Preparation of a New Type of Pervaporation Membrane for Organic Liquid-Mixtures", *Macromolecules*, 24, No.20, 1991, pp.5522-5527.
- 2) T. Kai, W. Ueno, T. Yamaguchi, S. Nakao, "Role of vacuum ultraviolet irradiation in plasma-induced graft polymerization in the pore-filling polymerization of porous materials", *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, 43, No.10, 2005, pp.2068-2074.
- 3) C.-L. Li, C.-Y. Tu, J.-S. Huang, Y.-L. Liu, K.-R. Lee, J.-Y. Lai, "Surface modification and adhesion improvement of expanded poly (tetrafluoroethylene) films by plasma graft polymerization", *Surf. Coating. Tech.*, 201, No.1-2, 2006, pp.63-72.
- 4) K. Sugiyama, K. Kato, M. Kido, K. Shiraishi, K. Ohga, K. Okada, O. Matsuo, "Grafting of vinyl monomers on the surface of a poly (ethylene terephthalate) film using Ar plasma post polymerization technique to increase biocompatibility", *Macromol. Chem. Phys.*, 199, No.6, 1998, pp.1201-1208.
- 5) Q. Lv, C. Cao, H. Zhu, "Blood compatibility of polyurethane immobilized with acrylic acid and plasma grafting sulfonic acid", *J. Mater. Sci. Med.*, 15, No.5, 2004, pp.607-611.
- 6) S.-H. Hsu, W.-C. Chen, "Improved cell adhesion by plasma-induced grafting of L-lactide onto polyurethane surface", *Biomaterials*, 21, No.4, 2000, pp.359-367.
- 7) J. Yang, Y. Wan, J. Yang, J. Bei, S. Wang, "Plasma-treated, collagen-anchored polylactone: Its cell affinity evaluation under shear or shear-free conditions", *J. Biomed. Mater. Res. A*, 67A, No.4, 2003, pp.1139-1147.
- 8) Z. Ding, J. Chen, S. Gao, J. Chang, J. Zhang, E.T. Kang, "Immobilization of chitosan onto poly-L-lactic acid film surface by plasma graft polymerization to control the morphology of fibroblast and liver cells", *Biomaterials*, 25, No.6, 2004, pp.1059-1067.
- 9) F. Poncin-Epaillard, G. Legeary, "Surface engineering of biomaterials with plasma techniques", *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 14, No.10, 2003, pp.1005-1028.
- 10) S. Wang, W. Cui, J. Bei, "Bulk and surface modifications of polylactide", *Anal. Bioanal. Chem.*, 381, No.3, 2005.

pp.547-556.

- 11) M. Irie, Y. Misumi, T. Tanaka, "Stimuli-Responsive Polymers-Chemical-Induced Reversible Phase-Separation of an Aqueous-Solution of Poly (N-Isopropylacrylamide) with Pendent Crown-Ether Groups", *Polymer*, 34, No.21, 1993, pp.4531-4535.
- 12) T. Yamaguchi, T. Ito, T. Sato, T. Shinbo, S. Nakao, "Development of a fast response molecular recognition ion gating membrane", *J. Am. Chem. Soc.*, 121, No.16, 1999, pp.4078-4079.
- 13) T. Ito, T. Hioki, T. Yamaguchi, T. Shinbo, S. Nakao, S. Kimura, "Development of a molecular recognition ion gating membrane and estimation of its pore size control", *J. Am. Chem. Soc.*, 124, No.26, 2002, pp.7840-7846.
- 14) T. Ito, T. Yamaguchi, "Osmotic pressure control in response to a specific ion signal at physiological temperature using a molecular recognition ion gating membrane", *J. Am. Chem. Soc.*, 126, No.20, 2004, pp.6202-6203.
- 15) T. Ito, T. Yamaguchi, "Nonlinear self-excited oscillation of a synthetic ion-channel-inspired membrane", *Angew. Chem. Int. Edit.* 45, No.34, 2006, pp.5630-5633.
- 16) L.-Y. Chu, S.-H. Park, T. Yamaguchi, S. Nakao, "Preparation of thermo-responsive core-shell microcapsules with a porous membrane and poly (N-isopropylacrylamide) gates", *J. Membrane Sci.*, 192, No.1-2, 2001, pp.27-39.
- 17) L.-Y. Chu, S.-H. Park, T. Yamaguchi, S. Nakao, "Preparation of micron-sized monodispersed thermoresponsive core-shell microcapsules", *Langmuir*, 18, No.5, 2002, pp.1856-1864.
- 18) L.-Y. Chu, T. Yamaguchi, S. Nakao, "A molecular-recognition microcapsule for environmental stimuli-responsive controlled release", *Advanced Materials*, 14, No.5, 2002, pp.386-389.
- 19) R. Langer, J. P. Vacanti, "Tissue Engineering", *Science* 260, No.5110, 1993, pp.920-926.
- 20) T. Okano, N. Yamada, H. Sakai, Y. Sakurai, "A Novel Recovery-System for Cultured-Cells Using Plasma-Treated Polystyrene Dishes Grafted with Poly (N-Isopropylacrylamide)", *J. Biomed. Mater. Res.* 27, No.10, 1993, pp.1243-1251.
- 21) S. Okajima, Y. Sakai, T. Yamaguchi, "Development of a regenerable cell culture system that senses and releases dead cells", *Langmuir* 21, No.9, 2005, pp.4043-4049.
- 22) S. Okajima, T. Yamaguchi, Y. Sakai, S. Nakao, "Regulation of cell adhesion using a signal-responsive membrane substrate", *Biotech. & Bioeng.* 91, No.2, 2005, pp.237-243.