

# エマルション重合過程におけるマイクロ生体高分子ゲルの粘弾性測定法の開発

東京大学大学院総合文化研究科先進科学研究機構

柳澤 実穂

Although biopolymer microgels are used in a variety of applications, their viscoelastic properties have been difficult to determine due to their difficulty in analysis. In this study, the surface viscoelasticity of gelatin microgels prepared in lipid droplets were investigated using cyclic micropipette aspiration. It was found that the gelatin gel gelled inside the small droplets with a radius of about 50  $\mu\text{m}$  or less covered with a lipid membrane was about 10 times harder than the bulk gel. By changing the aspiration pressure cyclically, we also evaluated their storage modulus  $E'$  (reflecting elasticity) and loss modulus  $E''$  (reflecting viscosity). Then, the microgels have a smaller  $E''/E'$  ratio than the corresponding bulk gels, meaning the microgels have a distinct nanostructure from bulk gels. Nanostructure analysis showed that small microgels contained more beta sheets in their structures than bulk gels. Our findings indicate that the confinement of gelling polymers in lipid membranes contributes to the variation in viscoelasticity of protein-based microgels through changes in secondary structure.

## 1. 緒言

コラーゲンから得られるタンパク質由来のゼラチンや海藻から得られる多糖類由来のアガロースなど、多くの生体高分子ゲルはその優れた生体親和性や生分解性により、化粧品や医薬品、食品などの材料として活用されている。特に油中液滴(エマルション)中でのゲル化(エマルション重合法)により得られる1ミリメートル以下の小さなマイクロゲルは、その大きな表面積・体積比により、周囲の環境変化にすばやく応答し、例えば体積変化に応じてゲル中に内包した薬物を放出する医薬用カプセルなど、高度な機能性材料として注目されている。こうしたマイクロゲルの基本的機能は、そのナノ構造と粘弾性特性に依存しているが、マイクロゲル分散液としての解析が進む一方、実際に機能を担うマイクロゲル単体に対しては未解明な点が多い。

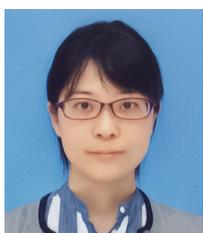
エマルション重合により形成されるマイクロゲルは、重合時に常にゲル化高分子が膜界面と接しており、界面物性がマイクロゲルの構造や物性へ影響することが予想される。生体高分子ゲルでは、ゲル構造がタンパク質の2次構造であるヘリックス構造やベーターシート構造であることから、膜界面の電荷などを含む物性がそれら2次構造転移を変化させる可能性が高い。実際に筆者らは、生体高分子ゲルとしてゼラチンを用い、リン脂質からなるエマルション中でゲル化させて得られるマイクロゲルに対し、表面弾性(ヤング率)の測定とナノ構造解析を行った。その結果、半径が

約50 $\mu\text{m}$ 以下のマイクロゲルは、従来のバルクゲルよりも約10倍ゲル弾性が高くなること、従来知られてきたナノ構造であるヘリックス構造だけでなく、ベーターシート構造も多く含まれることを見出した<sup>1)</sup>。これらのサイズ依存性から、エマルション重合によりゼラチン・ゲルにベーターシートが形成され、それが新たな架橋点となることでゲル弾性が上昇したと考えられる。しかし、なぜエマルション重合がゼラチン・マイクロゲルのナノ構造変化とゲル弾性上昇を招いたのかは不明である。そこで本申請研究では、この問いに対し(i)膜界面効果として考えられる膜の電気的特性や界面に働くラプラス圧とヤング率の相関関係を解析すること、(ii)そしてナノ構造をより強く反映する粘弾性を1つのマイクロゲルに対して測定する手法を開発し、その解析からナノ構造変化の要因へ迫ることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. エマルション界面の影響評価

エマルション重合過程における膜界面効果として、膜物性特性と膜によるマイクロ空間閉じ込めに伴うラプラス圧、膜との直接的接着による影響をそれぞれ個別に評価するため、膜物性と油水界面に生じる界面張力が異なる2種のリン脂質:1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)、1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)、界面活性剤:Span 80を用いてゼラチン・マイクロゲルを作製した。膜表面電荷は基本的に全て負に帯電しており、その大きさはDOPC < DOPE < Span 80の順であることが知られている。また、界面張力の大きさは、DOPC < Span 80 < DOPE << 活性剤無しの順で大きくなる。ゼラチン・マイクロゲルは、これらのリン脂質や界面活性剤を溶解したミネラルオイルと高温(約60 $^{\circ}\text{C}$ )のゼラチン溶液を攪拌してエマルション化し、その後ゲル化温度(30 $^{\circ}\text{C}$ )以下に冷却することで作製した。さらに、ゲル化



Viscoelastic analysis of biopolymer microgel prepared from emulsion polymerization

Miho Yanagisawa

Komaba Institute for Science, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo

しない高分子であるポリエチレングリコール(PEG)とゼラチンからなる2成分混合溶液を、均一相状態でエマルション化し、部分濡れ型の相分離パターン形成後にゲル化させることで、膜接触有りと膜接触無しの異なる2面を持つヤス型マイクロゲルを作製できる<sup>2)</sup>。これより、ゲル化時に同じDOPC膜で覆われたマイクロ空間へ閉じ込められているが、膜接着している部分と膜接着していない部分を有するマイクロゲルが形成できる。このそれぞれの部分に対してヤング率とナノ構造を解析すれば、膜への直接的接触と膜によるマイクロ空間閉じ込めのどちらが弾性率上昇やナノ構造転移へ影響をもたらしているのかを導くことができる。

## 2.2. ベーターシートの蛍光可視化

マイクロゲル中に形成されたベーターシート構造を可視化するため、ベーターシートに富むアミロイド構造の蛍光観察に使用されるThioflavin T(ThT)をゲル化前のゼラチン溶液に添加し、温度をゲル化温度以下に冷却した後での蛍光強度変化を、共焦点レーザー顕微鏡(FV1200, オリンパス)にて観察した<sup>1)</sup>。

## 2.3. ミクロゲル表面の粘弾性測定

マイクロゲルの表面弾性(ヤング率)は、ゲル表面をガラスキャピラリーにより微小吸引し、吸引圧 $P$ と吸引長さ $L$ の比例関係から求めた<sup>1)</sup>。本研究ではさらに、ゲル化過程で膜に接していた部分と接していなかった部分の異なる2面を備えたマイクロゲルに対し、局所的なヤング率を測定することで、膜への直接的接触がヤング率へ及ぼす影響を導く<sup>3)</sup>。さらに、キャピラリーの吸引圧 $P$ をサインカーブのように周期的に変化させることで粘弾性を評価するシステムを構築した(図1)<sup>4)</sup>。吸引圧力と変形長さの時間変化に対して、その振幅と、圧力と変形との遅延に該当する位相差 $\delta$ を用いて、貯蔵弾性率 $E'$ 、損失弾性率 $E''$ を求めることで粘弾性を評価する。これにより、マイクロゲルの弾性が支配的であったとしても、微小変形に伴うマイクロゲル表面の粘弾性を評価できるようになる。

## 3. 結果と考察

### (i) 膜界面の効果

はじめに、異なる脂質や界面活性剤を用いて半径が50  $\mu\text{m}$ 以下の球形のゼラチン・マイクロゲルを作製し、その表面のヤング率と膜物性の相関関係を調べた。エマルション重合過程では、膜界面に働く張力の大きさに比例するラプラス圧による影響を受ける。そこで、膜界面張力値の異なる4つの系(DOPC < Span 80 < DOPE << 活性剤無し)に対して、ヤング率を比較したところ、系統的な違いは見られなかった。次にエマルションを覆う膜の電気物性との相関関係を調べた。その結果、帯電の割合が増すにつれて

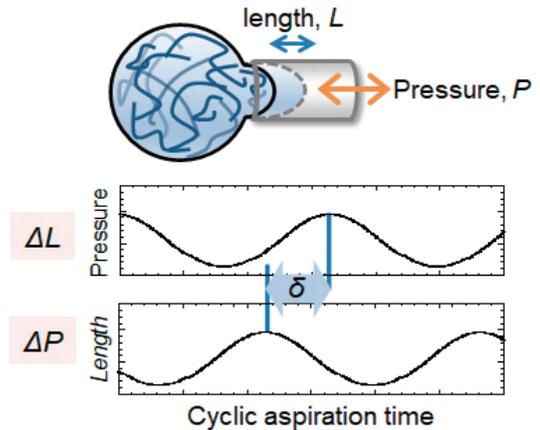


図1 ミクロゲルの周期的吸引による表面粘弾性測定(上)と、吸引に伴うキャピラリー内への変形長さ $L$ と吸引圧 $P$ の時間変化(下)を示す模式図

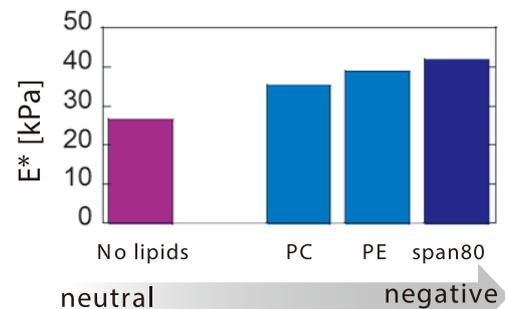


図2 球形マイクロゲルを覆う膜の負帯電度とゲル表面のヤング率の相関関係

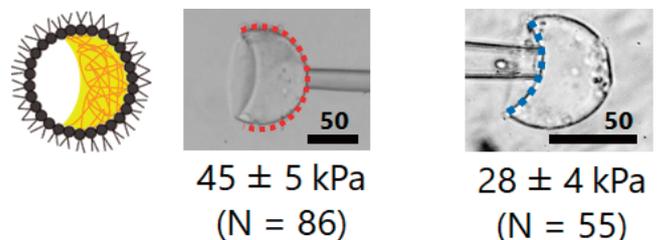


図3 非球形のゼラチン・マイクロゲルにおける局所的なヤング率(Ave.  $\pm$  SE.)。凸面(脂質膜接触有りと凹面(脂質膜接触無し)でのヤング率の違い。Nはゲル数。

(DOPC < DOPE < Span 80の順)、ヤング率が大きくなることが分かった(図2)。負に帯電する界面活性剤をゲル化する生体高分子に添加すると、ヘリックス形成が阻害されることが報告されており<sup>5)</sup>、我々の実験においても、負帯電した膜がヘリックス形成を阻害し、逆にベーターシート形成を促進したためにヤング率が上昇した起源と考えられる。

つぎに、直接的な膜接触が表面ゲル弾性へ与える影響を導くため、膜接触有りと無しのそれぞれの面に対して弾性測定を行った(図3)。その結果、接触有りの面が接触無しの面よりも高弾性となったものの、バルクゲルの弾性(5 kPa)と比べると共に遥かに高弾性であった<sup>3)</sup>。このことは、

膜接触がゲル弾性を高めるが、マイクロ閉じ込めによりその効果が内部まで到達すると解釈できる<sup>2)</sup>。さらに、この相分離したマイクロゲルに対してThTを添加したところ、ゲル化に伴いマイクロゲルの中央まで蛍光強度が均一に上昇した(図4)。この結果は、膜の負電荷により形成が誘起されるベーターシート構造が、膜近傍だけでなく、マイクロゲルの内部まで生じることを意味している。

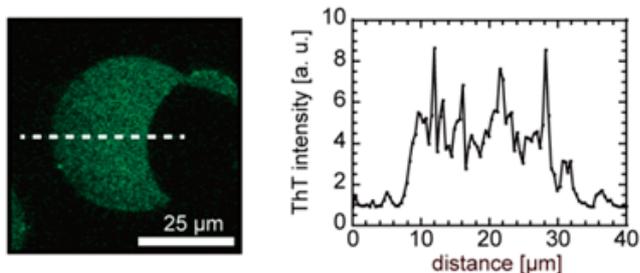


図4 相分離マイクロゲルのThT 蛍光画像

(ii) ミクロゲルの粘弾性特性

次に、キャピラリー吸引の圧力を周期的に変化させることで、弾性を反映する貯蔵弾性率 $E'$ と粘性を反映する損失弾性率 $E''$ の相関を調べた。バルクゲルでは、粘弾性比 $E''/E'$ はゼラチン濃度によらず、また低周波数領域( $f < 0.1$  Hz)ではほぼ一定となる(図5)。そこで、周波数を $f = 0.01$  Hzに固定して、マイクロゲルとバルクゲルに対して、粘弾性比率を測定し比較した(図6)。その結果、マイクロゲルの方が小さな $E''/E'$ 値をもつことが分かった<sup>6)</sup>。この値の違いは、ゼラチン濃度では説明できないことから、マイクロゲルがバルクゲルとは異なるナノ構造を持つことを支持する。マイクロゲルでは、トリプルヘリックスだけでなく、多量のベーターシートも形成されていることから、従来の未反応なランダムコイル部位がベーターシートへ転移することで粘性が低下し、 $E''/E'$ 値が減少したと考えられる。

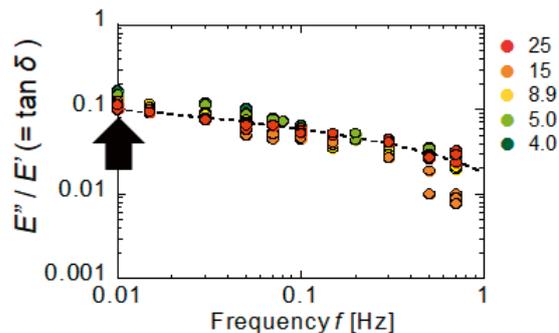


図5 バルクサイズのゼラチン・ゲルにおける粘弾性比( $E''/E'$ )と周波数  $f$  の関係

5. 総括

本申請研究では、エマルジョン重合によりナノ構造とヤング率が上昇するゼラチン・マイクロゲルに対し、その理由を膜物性と膜接着、ラプラス圧による膜界面効果の評価と、ゲル表面の粘弾性測定から迫ることを目的とした。その結果、膜の負帯電と膜によるマイクロ閉じ込めがゲル弾性上昇を生むこと、ランダムコイルがベーターシートへ転移することで従来のバルクゲルとは異なる粘弾性比を持つことが明らかとなった。この知見は、ゼラチン・ゲルに限定されず、他の生体高分子ゲルに対しても成り立つことが期待される。また、本研究により構築したキャピラリー吸引による粘弾性評価は、その他のマイクロ材料の力学評価として役立っており<sup>7,8)</sup>、今後は同様のサイズを持つ生細胞などの力学的評価にも応用可能であることを実証していきたい。

謝辞

本研究にご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深くお礼申し上げます。

(引用文献)

1) A. Sakai, Y. Murayama, K. Fujiwara, T. Fujisawa, S. Sasaki, S. Kidoaki, and Miho Yanagisawa, *ACS Cent. Sci.*, 4, 477-483 (2019).

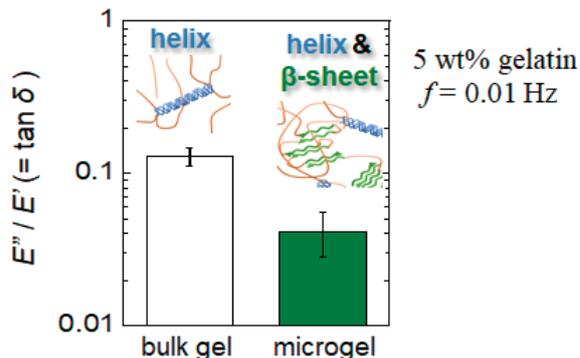


図6 周波数  $f = 0.01$  Hz の 5.0wt% ゼラチンのバルクゲルとマイクロゲルに対する粘弾性比( $E''/E'$ )の比較

2) M. Yanagisawa, S. Nigorikawa, T. Sakaue, K. Fujiwara, M. Tokita, *PNAS*, 111, 15894-15899 (2014)  
 3) Sakai, N. Hiro-oka, S. Sasaki, S. Kidoaki, M. Yanagisawa, *Nihon Reoroji Gakk.*, 47, 55-59, (2019).  
 4) 特願 2020-15270, 柳澤実穂, 酒井淳, 「粘弾性測定方法および粘弾性測定装置」  
 5) R. Wustneck, E. Buder, R. Wetzal, H. Hermel, *Cholloid Polym. Sci.*, 267, 429-433 (1989).  
 6) A. Sakai, A. Sakai, Y. Murayama, M. Yanagisawa, *Langmuir*, 36: 5186-5191 (2020).  
 7) Y. Kurashina, M. Tsuchiya, A. Sakai, T. Maeda, Y. Jung Heo, F. Rossi, N. Choi, M. Yanagisawa, H. Onoe, *Appl. Mater. Today*, 21, 100937 (2021).  
 8) S. Hayasaki, M. Shimizu, Y. Katsurada, A. Sakai, M. Yanagisawa, Y. Atomi, T. Watanabe, *J. Fiber Sci. Technol.*, 76: 288-295 (2020).