高分子ベシクル積層膜の秩序構造とダイナミクス

大分大学理工学部

檜垣 勇次

Polymer micelles are valid for the bio-compatible smart molecular system in the field of nanomedicine. Double zwitterionic diblock copolymers composed of a poly(carboxybetaine methacrylate) (PCB) chain and a poly(sulfobetaine methacrylate) (PSB) chain (PCB-b-PSB) were synthesized by radical addition fragmentation chain transfer polymerization. Well-defined diblock copolymers with narrow molecular weight distribution were systematically produced. The hydrodynamic radius of gyration of the particles produced by the PCB-b-PSB aggregation was determined by dynamic light scattering measurement. The PCB-b-PSB diblock copolymers with high molecular weight PSB block produced uniform micellar aggregates with narrow size distribution in the salt-free aqueous solution. Because the sulfobetaines show electrostatic and/or dipolar cohesive interactions to produce sulfobetaine couples in salt-free water, the PSB chains yield insoluble core with network structure to produce micellar aggregates. The micellar structure depends on the concentration of co-existing zwitterions. The PCB-b-PSB micellar aggregates transformed in the presence of sulfobetaine compounds, whereas the other zwitterions including glycine and taurine hardly induced the transformation of the aggregates. The zwitterion-specific structure modulation is rationalized by the complementary interaction of the zwitterions depending on the charged groups, charge density balance, and geometric form. The micellar structure transform efficiency also depends on the charge spacer length (CSL) of the sulfobetine compounds. The dissociation of PCB-b-PSB chains from the micellar aggregates was preferentially induced through the interactions with sulfobetaines with long CSL. The electrostatic and dipolar interactions are encouraged in the long CSL sulfobetaines because the dipole moment and charge density are augmented by separating the charges.

1. 緒 言

両親媒性分子の媒質中における会合により形成されるミ セル状分子集合体や中空球状分子集合体であるベシクルは, 薬物や美容有効成分の輸送や徐放、微小反応場など、物質 科学分野や医療分野における実用化の可能性から多大な注 目を集めている。ベシクル内部に薬剤を直接内包した薬物 内包ベシクル、ベシクルに酵素を内包した生体内反応性ベ シクル、腫瘍への集積を促進するターゲッティング機能を 付与したベシクルキャリアなど、数多くの機能性ベシクル が提案されている。しかしながら、脂質分子で構成された ベシクルは、構造安定性が低い上に、膜透過性が高く、選 択的物質輸送に課題がある。さらに、細胞膜では内葉と外 葉を構成する脂質の組成が非対称であるため膜貫通タンパ ク質の配向が制御されており選択的物質輸送が実現される のに対し、脂質分子の自己集合により形成される人工ベシ クルは対称構造であるため, 膜構成物質の配向制御や, 内 層と外層の独立した膜機能の制御に課題がある¹⁾。一方, 非対称多成分高分子鎖であるブロック共重合体の集積によ り構築される高分子ミセル/ベシクルは、高分子量鎖状分



Ordered Structure and Dynamics of Polymer Vesicle Multi-Layered Films Yuji Higaki

Faculty of Science and Technology, Oita University

子の集合体であるため低分子量両親媒性分子である界面活 性剤や脂質と比較して,会合体の構造安定性が高く,分子 量の制御や分子鎖の部分的な修飾によって,会合体の形態 と環境応答性の設計が容易である(Fig. 1)^{2.3)}。

正電荷と負電荷が炭化水素鎖で連結された双性イオンを 側鎖に有する双性イオン高分子は、電荷と水との強い相互 作用により極めて親水性が高く、実効電荷が中性であるた め生体高分子を含む荷電粒子との相互作用が弱く、非特異 的吸着が抑制されるため、生体適合性高分子として注目さ れている^{4.5)}。双性イオン高分子は、双性イオン構造、分 子量、高分子濃度に応じて多様な自己集合特性を示す。ポ リカルボキシベタイン (PCB) は水中で高度に水和して溶解 する。一方、ポリスルホベタイン (PSB) は水中でスルホベ



Fig. 1 Schematic representations of aggregate geometry depending on the volume fraction of block copolymer components.

タイン基同士の相互作用により凝集する。スルホベタイン 凝集体はイオンにより相互作用が遮蔽されるため,電解質 水溶液中では分子鎖が解離する⁶⁾。したがって,双性イオ ン高分子を適切に分子設計することで,ブロック共重合体 の固体表面への集積とナノメートルスケールの秩序構造形 成の制御が実現され,隔離された層に局在化した内包分子 が計画的に徐放される積層ラメラ膜が構築されると着想し た。

そこで本研究では、PCBとPSBで構成される双性イオン高分子ブロック共重合体 (PCB-b-PSB) が固体表面で形成する高分子構造体の秩序構造とそのダイナミクスの解明を目的とした。PCB-b-PSBの合成、PCB-b-PSBが水溶液中で形成する高分子会合体の構造と環境応答性形態変化の解明まで研究が進捗したので、研究成果を報告する。

2. 方法

PCB-b-PSB双性イオン高分子ブロック共重合 体の合成

可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により,PCB高 分子連鎖移動剤(PCB Macro-CTA)を合成した。PCB Macro-CTAよりPSB鎖をRAFT重合によって鎖延長す ることでPCB-b-PSBを合成した(Fig. 2)⁷⁾。反応溶液を透 析精製した後,溶液をメタノールに滴下し,沈殿物を遠心 分離により回収した。

合成したブロック共重合体のPCB/PSB組成は¹H-NMR 測定,数平均分子量 (M_n) と分子量分布 (M_w/M_n) はGPC測 定により計測した。¹H-NMR測定は,AVANCE-III 400 (Bruker Co., Ltd.)を用い,室温,400MHzで測定した。 重溶媒には 200mM NaCl重水溶液を用いた。GPC 測定は, 島津製作所製高速液体クロマトグラフィーシステムを用い, TSKgel G5000PWXLとTSKgel G3000PWXLを連結した カラムを用いて,溶離液を 200mM NaCl水溶液とし,流 速 0.6mL/min, カラムオーブン温度 40℃で測定した。ポ リエチレンオキシド標準試料でキャリブレーションした。

2. 2. PCB-b-PSB水溶液中における会合体構造の 解析

動的光散乱 (DLS) 測定は、Zetasizer Nano ZS (Malvern) にて、He-Ne レーザー (波長 633 nm)を用い、測定温度 25 C,測定角度 173°で行った。溶液の PCB-*b*-PSB 濃度は 1.0 mg/mL とし、孔径 0.20 μ m の親水化 PTFE フィルタ ー (Advantec, HP 020 AN) で濾過して測定に供した。散乱 光強度の自己相関関数から計測した緩和時間より算出した 剛体球の拡散係数より、Stokes - Einstein 式に基づき流体 力学的半径 (R_b)を求めた。

3. 結果·考察

3.1. PCB-b-PSB双性イオン高分子ブロック共重合 体の合成

合成した PCB Macro-CTA と PCB-*b*-PSB の GPC 測定 により計測した数平均分子量 ($M_{n, GPC}$) と分子量分布 ($M_{w}/M_{n, GPC}$), ¹H-NMR 測定により計測した PSB 鎖の重合度に 基づき算出した数平均分子量 ($M_{n, NMR}$), PCB 鎖と PSB 鎖 の重合度から算出したブロック共重合体の重合度比を Table 1 に示す。PCB Macro-CTA の分子量分布は十分に 狭く, 高度に分子量制御された高分子鎖が得られた。PCB



Fig. 2 Preparation of the PCB Macro-CTA and PCB-b-PSB diblock copolymers

Table 1	Characteristics	of the PCB	Macro-CTA	and PCB-b-PSB	diblock	copolymers
---------	-----------------	------------	-----------	---------------	---------	------------

Sample	$M_{ m n, \ GPC}{}^a$	$M_{ m w}/M_{ m n, \ GPC}{}^a$	$M_{ m n, NMR}{}^b$	PCB/PSB _{NMR} ^b
PCB_{43} Macro-CTA	9,500	1.11	-	_
$PCB_{43}-b-PSB_{40}$	21,100	1.11	21,200	1/0.93
$PCB_{43}-b-PSB_{100}$	32,100	1.10	38,800	1/2.33
$PCB_{43}-b-PSB_{166}$	55,800	1.08	58,200	1/3.86

^{*a*} The data were determined by GPC measurements, ^{*b*} The data were determined by the integration of ¹H-NMR signals assigned to methyl protons of quaternary ammonium cations.

Macro-CTAをRAFT重合で鎖延長してPSB鎖の分子量 を制御することでPCB/PSB組成比の異なるPCB-*b*-PSB ブロック共重合体を系統的に合成した。PCB-*b*-PSB の ¹H-NMRスペクトルには、PCBの四級アンモニウムカチ オンメチル基(3.35 ppm)とPSBの四級アンモニウムカチ オンメチル基(3.24 ppm)に帰属されるシグナルがそれぞ れ観測され、それらの積分比よりPSB鎖の重合度を算出 してPCB-*b*-PSBの数平均分子量を算出した($M_{n,NMR}$)。 $M_{n,GPC}$ と $M_{n,NMR}$ がよく対応しており、GPC測定で計測された分 子量、分子量分布は十分に正確であると考えられる。

3.2. PCB-b-PSB水溶液中における会合体構造の 解析【分子構造依存性】

PCB₄₃-*b*-PSB₁₆₆は純水中で R_h =40.5nmの粒径分布の 狭い均質な会合体を形成した (Fig. 3(a))。ブロック共重合 体を構成する PCB 鎖と PSB 鎖は共に親水性であるが、 PSB は水中で側鎖のスルホベタイン基同士が静電的相互作 用、あるいは双極子相互作用により凝集する。したがって、 PCB-*b*-PSB は PSB 鎖が凝集したコアを形成し、PCB 鎖が 水和膨潤したシェルを形成することにより、コアシェル型 球状会合体を形成していると考えられる。透過型電子顕微 鏡による相補的な解析が必要であるが、ブロック共重合体 が形成する高分子ベシクルは、 R_h >100 nm となることが 多いため、計測されている会合体はミセル状会合体である と解釈している。

一方, PSB組成比の低いPCB₄₃-b-PSB₁₀₀とPCB₄₃-b-PSB40は、会合体由来のシグナルと単分子鎖由来のシグナ ルがそれぞれ観測された (Fig. 3(b), (c))。PSBの重合度が 低下すると、分子鎖間で相互作用するスルホベタイン基の 数が減少するため、会合駆動力が低下する。したがって、 孤立分子鎖に相当するR_h ≒ 4nmの散乱体が発生している と推測する。また、PCBとPSBの重合度が同等である PCB₄₃-b-PSB₄₀では、ブロック共重合体の分子量が小さ いにもかかわらず, 会合体のRhが大きくなった。PCB鎖 とPSB鎖の体積比が均等になるとブロック共重合体凝集 体の界面曲率が低下して二分子膜状の会合体を形成する。 すなわち、ミセル状会合体からベシクル状会合体への構造 転移を起こしていると考えられる。あるいは、PCB鎖と PSB鎖の界面曲率が低下したために会合数が増大している と解釈することもできる。ただし、R_hが小さいほど散乱 光強度が弱いため、大部分の分子鎖は孤立鎖として存在し ている。

PCB₄₃-b-PSB₁₆₆, PCB₄₃-b-PSB₁₀₀は純水中でミセル状 会合体を形成していたが,塩濃度の増加に伴い,分子鎖が 会合体から脱離した(Fig. 4(a), (b))。PSB側鎖のスルホベ タイン基間相互作用が水溶液中のイオンにより阻害される ためであると考えられる。一方,PCB₄₃-b-PSB₄₀は会合 形態の変化がみられなかった(Fig. 4(c))。二分子膜状会合 体は球状会合体と比較して分子鎖の狭雑によるエントロピ ー損失が小さいことに加え,PSB分子鎖の分子量が低いた めイオンによる会合阻害の影響が低かったと考えられる。







Fig. 4 *R*_h distributions of (a) PCB₄₃-*b*-PSB₁₆₆, (b) PCB₄₃-*b*-PSB₁₀₀, (c) PCB₄₃-*b*-PSB₄₀ aggregates in salt-free water (blue), 10mM NaCl aq. (green), and 100 mM NaCl aq. (red).

3.3. PCB-b-PSB水溶液中における会合体構造の 解析【双性イオン選択的相互作用】

双性イオン高分子 PCB-b-PSB は、スルホベタイン基が 選択的に会合することでミセル状会合体を形成する。すな わち、スルホベタイン、カルボキシベタインは双性イオン 選択的に会合し分子構造体を形成している。したがって、 この分子組織体は共存する双性イオンの構造に応じて構造 変化が誘導されると考えられる。

純水中で最も均質な会合体を形成するPCB43-b-PSB166 について双性イオン特異的な会合形態変化を研究した。実



Sulfobetaine (SB6)

Fig. 5 Chemical structure of zwitterions employed in this study.

験に用いた双性イオンの構造をFig. 5 に示す。PCB₄₃-b-PSB₁₆₆が形成する R_h =40.5 nmの均質会合体の形態は,共 存するスルホベタイン (SB4)の濃度増大に応じて不安定化, 粗大化し,孤立鎖に解離した (Fig. 6)。PSB 側鎖のスルホ ベタイン基と溶液中に存在する SB4 が相互作用するため, スルホベタイン 側鎖間の凝集が解離することで PCB-b-PSB の会合が阻害されたと考える (Fig. 7)。また,電荷間 スペーサー炭素数 6 のスルホベタインが最も効果的に会合 を阻害した (Fig. 8)。電荷間距離が離れているため双極子 モーメントが大きく,分子形態の自由度が高いことに加え,



Fig. 6 R_h distributions of PCB₄₃-b-PSB₁₆₆ in (a) salt-free water (blue), (b) 10 mM SB4 aq. (green), (c) 100 mM SB4 aq. (purple), and (d) 1000mM SB4 aq. (red).



Fig. 7 Schematic representation of PCB-b-PSB aggregate form variation through the association and dissociation of zwitterions depending on the co-existing zwitterion species and the concentration.



Fig. 8 *R*_h distributions of PCB₄₃-*b*-PSB₁₆₆ in (a) salt-free water (blue), (b) 100mM SB2 aq. (green), (c) 100mM SB4 aq. (purple), and (d) 100mM SB6 aq. (red).

正電荷と負電荷が干渉しないため電荷密度が高く,電荷間 の相互作用が強く働くためであると考える。一方,グリシ ン水溶液とタウリン水溶液では会合体の形態変化は誘導さ れなかった。グリシンとタウリンはスルホベタインと同じ く双性イオンであるが,電荷部位の構造,電荷間距離,電 荷密度についてスルホベタインとの対称性が低く,スルホ ベタイン基の会合が阻害されないためであると考える。す なわち,PCB-b-PSB会合体の形態は共存する双性イオン との双性イオン特異的な相互作用により大きく変化するこ とが示された。

4. 総 括

合成した PCB-*b*-PSB 双性イオン高分子ブロック共重合体は、ブロック共重合体の分子量と PCB/PSB 組成比に応じて水溶液中で多様な形態の会合体を形成することが明らかとなった。両双性イオン高分子ブロック共重合体は、双性イオン高分子鎖における水溶性の非対称性と環境応答性を利用した新たな会合性高分子群として位置づけられる。本研究の目的である固体表面に集積したブロック共重合体会合体の秩序構造とそのダイナミクスの解明のため、固体表面に吸着したブロック共重合体が形成する構造を中性子反射率測定⁸⁾,相互作用ポテンシャルを反射干渉顕微鏡⁹⁾により計測する実験をそれぞれ実施する予定である。今年度は、感染症拡大による移動制限のため当初計画していた中性子反射率測定による吸着膜の構造解析、および反射干渉顕微鏡実験を実施することができなかった。

謝 辞

本研究の遂行にあたり,多大なるご支援を賜りました公 益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝 申し上げます。

また,本研究は当研究室の清水 茜 氏の尽力によるもの であり,動的光散乱測定装置を用いた研究にあたり 一二三 恵美 教授(大分大学全学研究推進機構)にご協力い ただきました。この場をお借りいたしまして厚く御礼申し 上げます。

(引用文献)

- Peyret, A.; Zhao, H.; Lecommandoux, S., Preparation and Properties of Asymmetric Synthetic Membranes Based on Lipid and Polymer Self-Assembly. *Langmuir* 2018, *34*, 3376–3385.
- Blanazs, A.; Armes, S. P.; Ryan, A. J., Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. *Macromol. Rapid Commun.* 2009, *30*, 267–277.
- Cabral, H.; Miyata, K.; Osada, K.; Kataoka, K., Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications. *Chem. Rev.* 2018, 118, 6844–6892.
- Shao, Q.; Jiang, S., Molecular Understanding and Design of Zwitterionic Materials. *Adv. Mater.* 2014, *27*, 15-26.
- Paschke, S.; Lienkamp, K., Polyzwitterions: From Surface Properties and Bioactivity Profiles to Biomedical Applications. ACS Appl. Polym. Mater. 2020, 2, 129-151.
- Shao, Q.; Mi, L.; Han, X.; Bai, T.; Liu, S.; Li, Y.; Jiang, S., Differences in Cationic and Anionic Charge Densities Dictate Zwitterionic Associations and Stimuli Responses. *J. Phys. Chem. B* 2014, *118*, 6956–6962.
- 7) Lim, J.; Matsuoka, H.; Yusa, S.; Saruwatari, Y., Temperature-Responsive Behavior of Double Hydrophilic Carboxy-Sulfobetaine Block Copolymers and Their Self-Assemblies in Water. *Langmuir* 2019, 35, 1571-1582.
- 8) Higaki, Y.; Kobayashi, M.; Takahara, A., Hydration State Variation of Polyzwitterion Brushes through Interplay with Ions. *Langmuir* **2020**, *36*, 9015-9024.
- 9) Higaki, Y.; Fröhlich, B.; Yamamoto, A.; Murakami, R.; Kaneko, M.; Takahara, A.; Tanaka, M., Ion-Specific Modulation of Interfacial Interaction Potentials between Solid Substrates and Cell-Sized Particles Mediated via Zwitterionic, Super-Hydrophilic Poly (sulfobetaine) Brushes. J. Phys. Chem. B 2017, 121, 1396-1404.