

日 本 化 学 纖 維 研 究 所

講 演 集

第 6 3 集

2006年3月

日 本 化 学 繊 維 研 究 所

講 演 集

第 6 3 集

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu

Vol. 63

(Annual Report of the Research Institute
for Chemical Fibers, Japan : Vol. 63)

March 2006

2006年3月

財団法人 日本化学繊維研究所講演会（第63回）

〔第63回講演会：平成17年11月18日 京都大学桂キャンパス・桂ホール〕

目 次

1. リビングラジカル重合による機能性高分子の精密合成……………(1)
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○澤 本 光 男、安 藤 剛
大 内 誠
2. 半屈曲性高分子のダイナミクス……………(9)
—ポリ(*n*-ヘキシルイソシアナート)の核磁気緩和 吉 崎 武 尚
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻
3. 水溶性会合高分子のゲル化に関する理論的研究……………(13)
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○田 中 文 彦、古 賀 毅
岡 田 幸 典
4. せん流動場における高分子の結晶化過程……………(23)
京都大学化学研究所 ○金 谷 利 治、萩 野 慈 子
坂 元 梓 也、高 山 義 之
松 葉 豪、西 田 幸 次
5. 印加電圧に応答してヘリックスのタイプを替える
ペプチド分子デバイス……………(29)
京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 北 川 和 哉、森 田 智 行
○木 村 俊 作
6. 特別講演 繊維の極限強度の追求—工業からのアプローチ—……………(35)
東洋紡総合研究所 コーポレート研究所 大 田 康 雄
7. 高分子ゲルの遠心場での収縮挙動……………(43)
1) 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 ○瀧 川 敏 算¹⁾、浦 山 健 治¹⁾
2) 京都大学化学研究所 堀 中 順 一¹⁾、野 坂 尚 司¹⁾
岡 田 真 一²⁾、渡 辺 宏²⁾
8. ソフトマターにおけるナノ構造の3D-TEMによる可視化……………(47)
1) 京都大学化学研究所、2) ㈱日産アーク研究部 ○鞠 谷 信 三¹⁾、加 藤 淳²⁾
9. 濃厚ポリマーブラシの構造と物性……………(61)
京都大学化学研究所 ○福 田 猛、辻 井 敬 亘
大 野 工 司、後 藤 淳
10. ナノスケールでみる表面・界面領域での高分子鎖の形と分布……………(69)
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○伊 藤 紳三郎、青 木 裕 之
湯 浅 毅
11. ポリエチレングリコール脂質による生細胞の表面修飾……………(77)
京都大学再生医科学研究所 三 浦 傑、寺 村 裕 治
○岩 田 博 夫
12. 遺伝子導入試薬としてのカチオン化多糖誘導体の合成……………(85)
京都大学再生医科学研究所 城 潤一郎、岡 崎 有 道
○田 畑 泰 彦

リビングラジカル重合による機能性高分子の精密合成

澤本 光男・安藤 剛・大内 誠

Mitsuo Sawamoto, Tsuyoshi Ando, Makoto Ouchi

京都大学 大学院 工学研究科 高分子化学専攻

1. はじめに

リビングラジカル重合は、その代表的な手法やラジカル重合の精密制御の一般的原理がおおむね確立され、現在はこれらを用いて様々な高分子材料を精密合成する研究と開発が世界的に産官学で広範に行われている。本講演集¹⁾あるいは総説²⁾にも、筆者らの開発した遷移金属錯体を触媒とするリビングラジカル重合³⁾(図1)を中心に、その概要と最近の展開が詳しく述べられている。

リビング重合は、高分子の精密合成を可能にするが、一分子の比較的高価な開始剤から一分子の高分子しか生成しないという原理的な特徴があるため、高分子量の汎用材料よりむしろ、分子設計と機能発現が重要な中分子量の機能性材料の精密合成により適している、というのが一般的な認識である。とくに、ラジカル重合は広範な種類のモノマーが重合可能であり、とくにイオン機構のリビング重合に比べて、極性・機能性置換基をもつモノマーも多くがこれらの保護と脱保護を施さずに重合可能であることから、これらの機能性(中分子量)高分子材料の精密合成に関心が集まっており、一部には実用化に近い例も知られている。

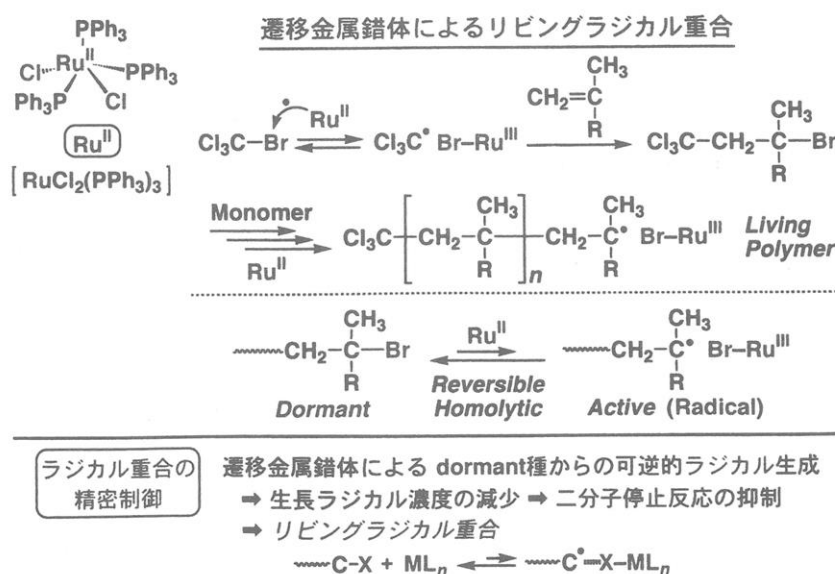


図1. 遷移金属錯体触媒によるリビングラジカル重合

昨年の本講演会¹⁾でも一部紹介したが、種々の機能性置換基を側鎖とするメタクリレート、アクリレートが知られており、これらのリビングラジカル重合が可能となってきた。金属錯体を触媒とする場合、ラジカル生長種は極性官能基により悪影響は受けないが、（ある意味では皮肉なことに）重合の精密制御のために導入した金属錯体がこれらによって被毒される可能性があり、注意が必要である。しかし、とくにルテニウムのように官能基に対する耐性が高い触媒を用いると、種々の機能性モノマーのリビングラジカル重合が可能となる。

本稿では、機能性モノマーの精密ラジカル重合に焦点を当てて、次の3点を述べる。

- (1) 機能性モノマーのランダム・ブロック共重合
- (2) 機能性 α -オレフィンと極性モノマーのランダム共重合
- (3) 機能性モノマーを含むABA-ブロック共重合体

2. 機能性モノマーのランダム・ブロック共重合

機能性モノマーの共重合体には、図2に模式的に示すように、ランダム、ブロック、グラフトなどいくつかの様式がある。これらのうち、ランダム共重合体には、種々の機能性置換基が「適度に」分散して分子中に分布するという特徴があり、一方ブロック共重合体には、とくに両親媒性高分子に見られるように、特定の機能や溶解性を示す機能性置換基が特定の部分（セグメント）に配置されるという利点がある。

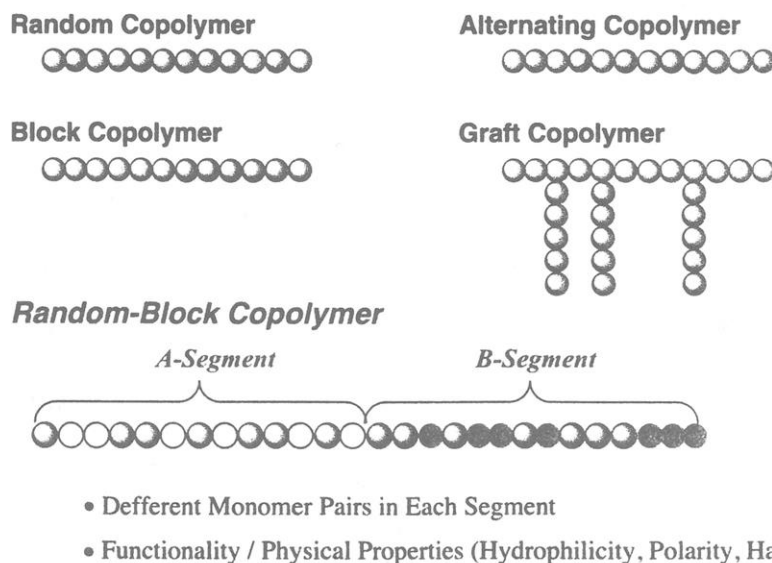


図2. 機能性モノマーの種々の共重合体

一方、色素・顔料の分散安定剤、建築用材料の添加物、ディスプレイ用光学材料、フォトレジストなどのような、より高機能の共重合体では、単に親水性や疎水性という違いのみならず、電子的、立体的に異なる複数個の機能性基の共存と協調が求められる場合が少なくない。従来は、この要求に対して、種々のモノマーが容易にランダム共重合するというラジカル重合の特徴を生かして、3種以上の機能性モノマーを種々の比率で単純にランダム共重合する方法が一般的に用いられてきた。

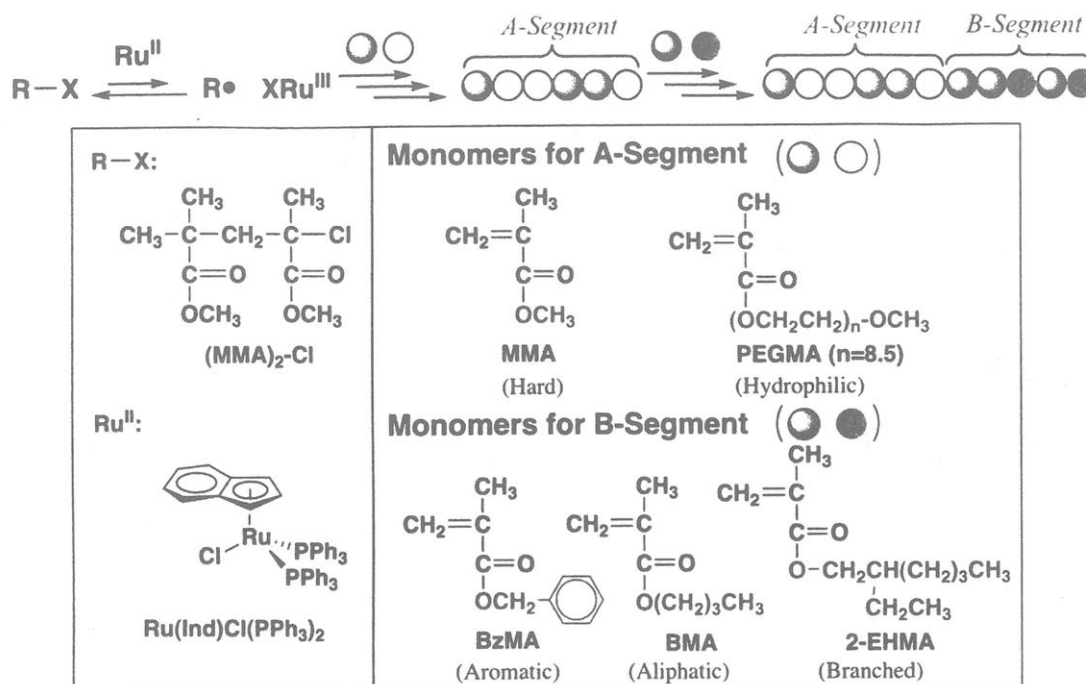


図3. 機能性メタクリレートのランダムブロック共重合

筆者らは、上記のランダム共重合体とブロック共重合体の特徴を併せ持つ共重合体として、異なる組み合わせの機能性モノマーから得られるランダム共重合体を各セグメントとするAB型ブロック共重合体の精密合成を検討している（図3）。

たとえば、ルテニウム・インデニル錯体を触媒とするリビングラジカル重合を用いると、親水性でアルコールにも容易に溶解するポリエチレングリコール（PEG）側鎖のPEG-メタクリレートとガラス状鎖を与えるメタクリル酸メチル（MMA）をリビング共重合することができる（図4）。とく両方のモノマーの仕込み組成と重合度にもよるが、適当な条件では分子量が規制されたランダム共重合体を得られる。

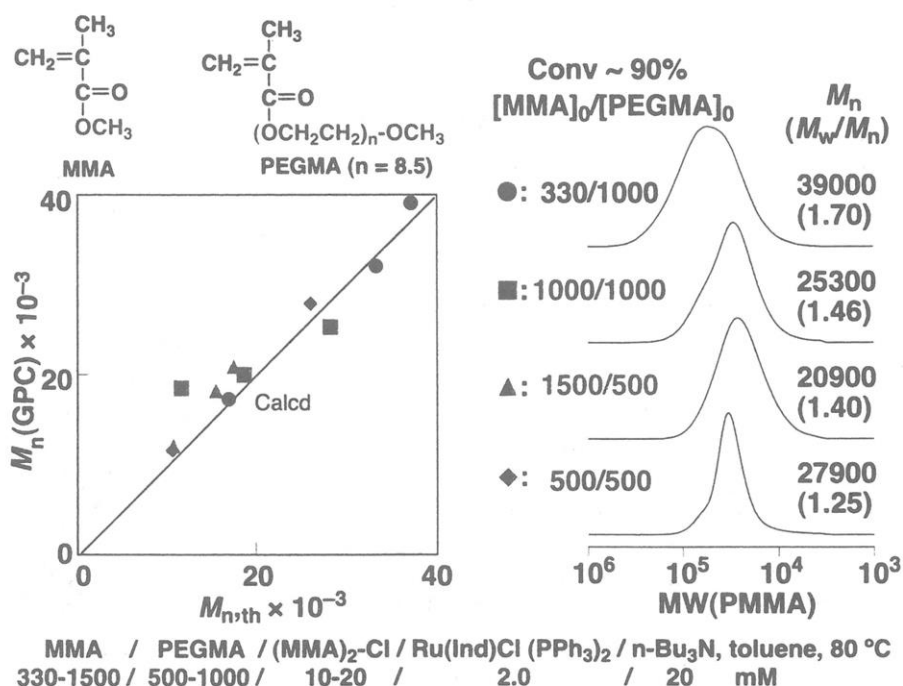


図4. PEG-メタクリレートとMMAのランダム共重合：Aセグメントの合成

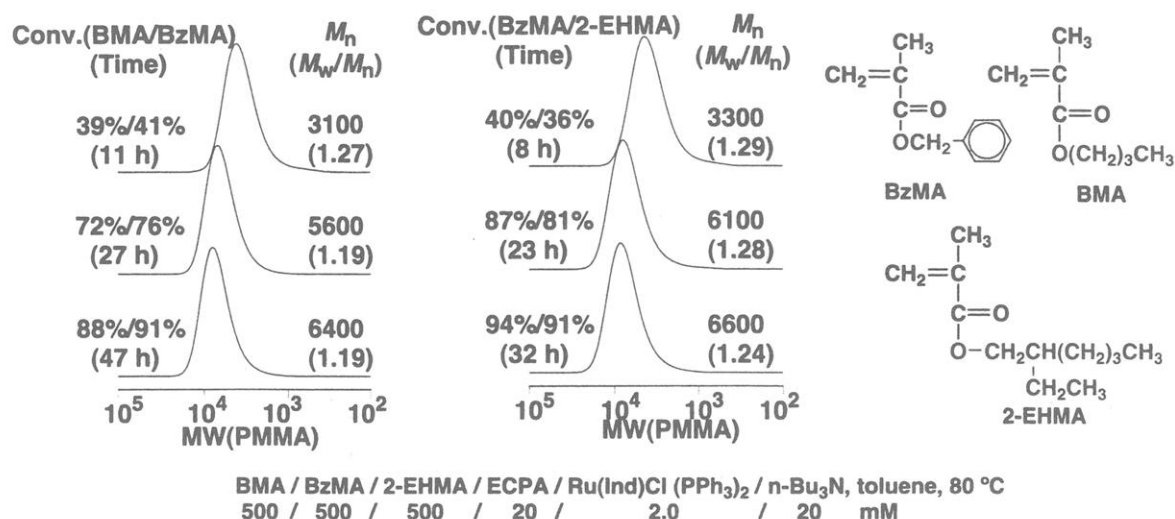


図5. ベンジルおよびアルキルメタクリレートのランダム共重合：Bセグメントの合成

一方、芳香族の有機分子（色素など）と π - π 相互作用可能なベンジル基をもつメタクリレートや、溶媒中に分散した粒子の物理的凝集を立体反発で抑制する、かさ高いアルキル基をもつメタクリレートも、ルテニウム錯体触媒でリビングランダム共重合することがわかった（図5）。

これらに基づいて、まずPEG-メタクリレートとMMAのリビングランダム共重合を行い（A-セグメント）、その後のベンジルメタクリレートとかさ高いアルキル・メタクリレートとのリビング共重合を行うと（B-セグメント）、両者のランダム共重合体を結合したAB-型ランダムブロック共重合体が得られた（図6）。その他にも、図3に示した種々の機能性メタクリレートやアルキル・メタクリレートの組み合わせに対して、同様なランダムブロック共重合体を合成することができる。これらは、それぞれのセグメントの特性を生かして、色素の安定分散化と溶解除去など、様々な機能を多角的に発揮するものと期待される。

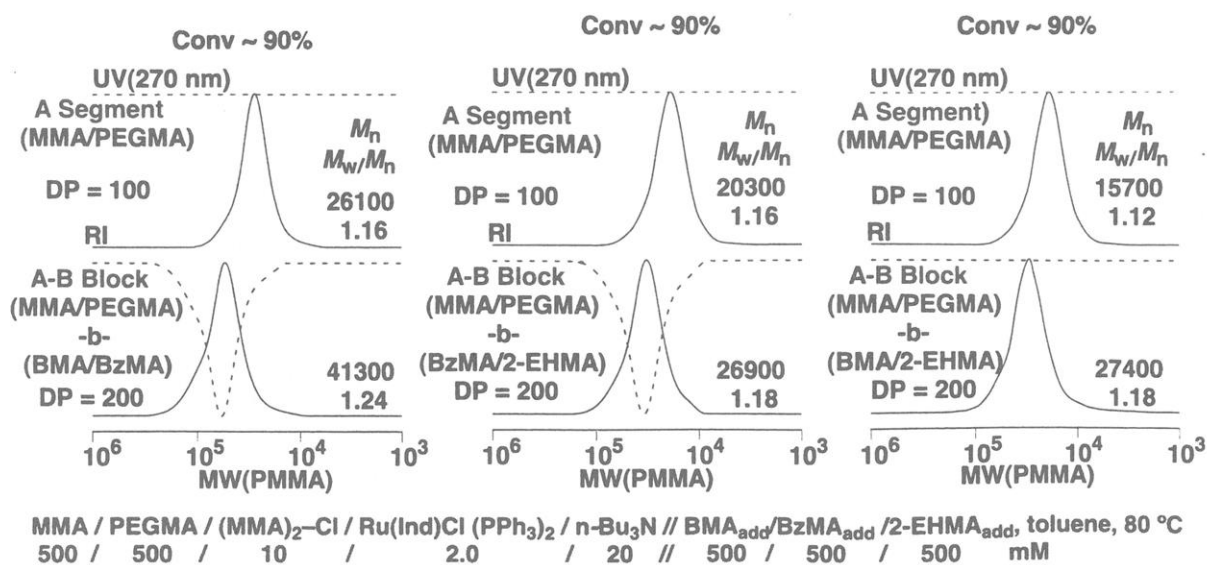


図6. 多数の機能性メタクリレートからなる種々のAB-型ランダムブロック共重合体

3. 機能性 α -オレフィンと極性モノマーのランダム共重合

筆者らは、鉄錯体の一種を触媒とすると、アクリル酸メチルなどの極性のラジカル重合性モノマーと、エチレン、1-ヘキセンなど非共役でラジカル重合性がきわめて低い α -オレフィンとが共重合し、極性モノマーの主鎖にオレフィンに基づく単位が分散した共重合体が生成することを見出している。これらの共重合では、ある程度の分子量の制御が可能であるとともに、共重合体の組成が分子量にそれほど依存しない（組成分布が狭い）という特徴も明らかとなっている。

これらに着目し、ここでは水酸基などの極性基をアルキル側鎖の末端にもつ α -オレフィンとアクリル酸メチルのランダム共重合を検討した（図7）。

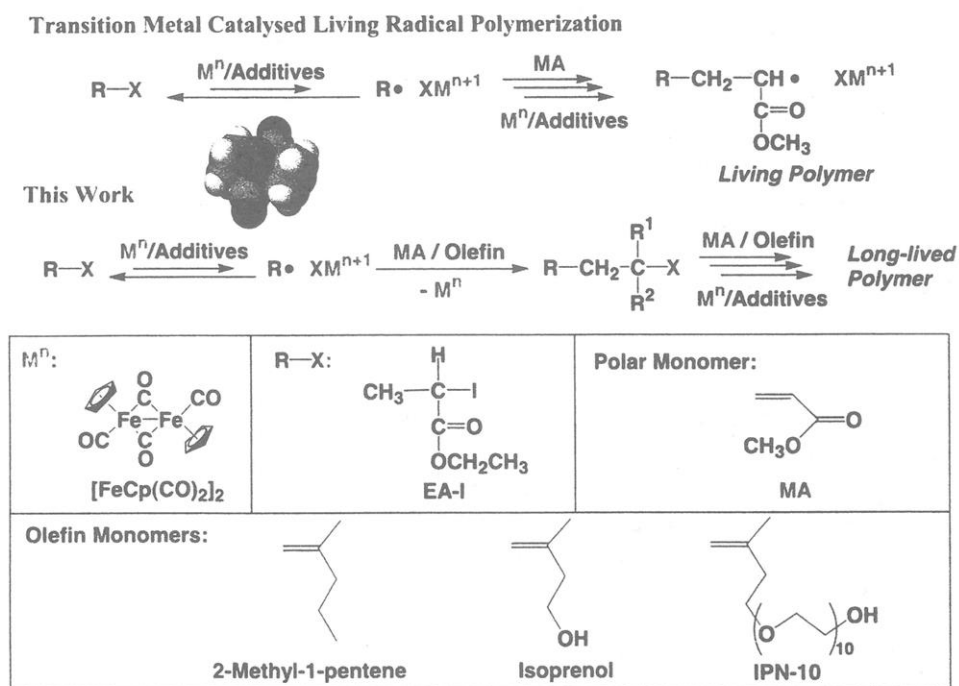


図7. 機能性 α -オレフィンとアクリル酸メチルの共重合

極性基側鎖のない α -オレフィンとの共重合では、上記の鉄二核錯体が高活性で有効であったが、 α -オレフィンに極性基を導入すると、これにより鉄錯体は容易に失活し、共重合が完結しないことがわかった。

そこで、これらの機能性 α -オレフィンの水酸基をエステルなどで保護すると、同じ鉄錯体で容易にランダム共重合が起り、分子量が規制された共重合体が生成した（図8）。保護基を必要としない、というラジカル重合の特徴を生かし切れていない点に改善の余地はあるが、分子量が制御された新しい α -オレフィン修飾型共重合体として興味もたれる。

Copolymerization of MA / Acetyl-isoprenol or Trimethylsilyl-isoprenol

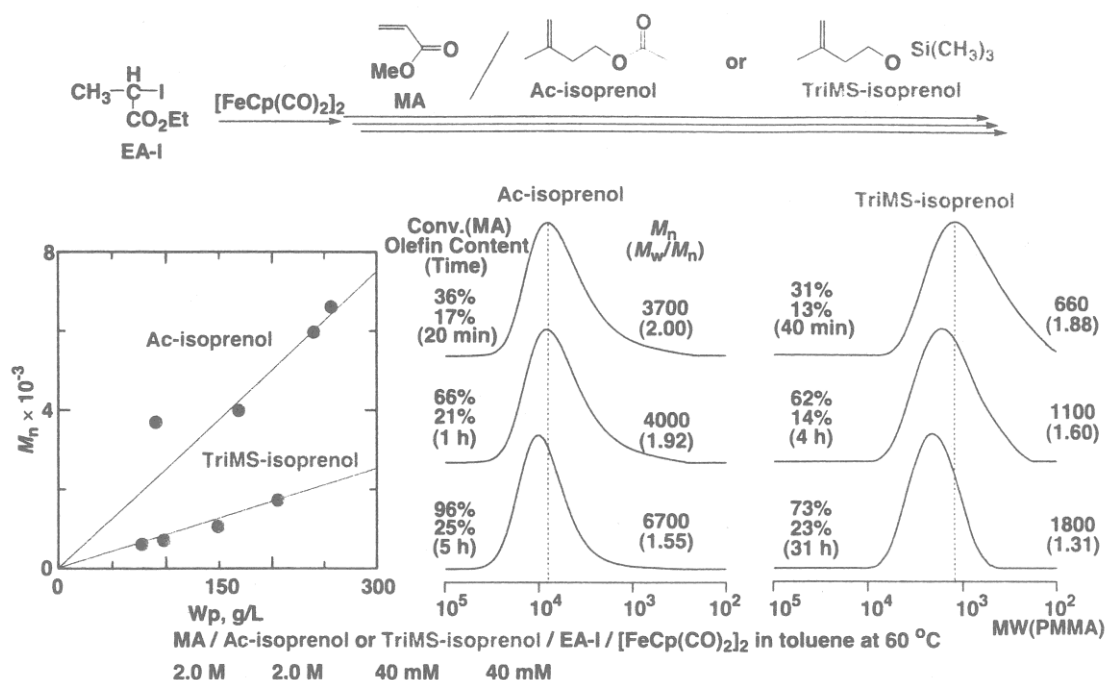


図8. 保護した水酸基をもつ α -オレフィンとアクリル酸メチルの共重合

4. 機能性モノマーを含むABA-ブロック共重合体

—PEGメタクリレート-スチレン・三元ブロック共重合体

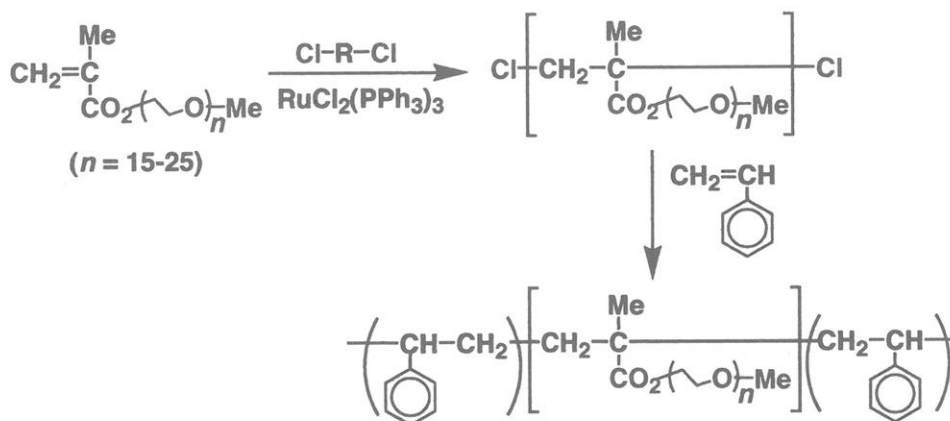
PEG鎖は両親媒性・感温性基として興味ある挙動を示すが、同時にイオン伝導体としても注目されており、ゲル型PEGによる電池材料などの開発が進んでいる。最近、筆者らは同様なPEG鎖を側鎖とするメタクルレートのリビングラジカル重合に、ルテニウム錯体がとくに有効であることを見出した。

最近これらの知見に基づいて、PEG鎖を中心鎖とし、両端に凝集性のポリスチレン鎖を結合したABA-型ブロック共重合体の合成が検討されている（図9）⁵⁾。すなわち、二官能性塩素型開始剤（ジクロロアセトフェノン）を開始剤とし、ルテニウム塩化物などを触媒として、PEG-メタクリレートをまずリビングラジカル重合し、生成する両端型の二官能性リビング鎖からスチレンを逐次重合した。必要に応じて、二官能性のPEG-メタクルレート鎖をいったん単離してから、再びスチレンを重合してもよい。

このポリマーでは、PEG-メタクリレートのセグメントを十分に長くすると、これを連続相、比較的短いポリスチレン鎖を物理的架橋点とする高分子フィルムが得られる。この高分子は、耐熱性と力学的強度に優れ、さらに高い伝導性（リチウムイオン媒体）を示し、リチウム二次電池の固体電解質用高分子フィルムなどとして注目される。

PEGMA-Styrene ABA Block Polymers for Secondary Lithium Battery

Polymer Solid Electrolyte / Thermally Stable Film



High Strength 5 MPa (25 C)
 High Conductivity: 2×10^{-4} S/cm (30 C)
 High Capacity: 100 mAh/g (RT)

ABA Block Polymer
 (PEGMA / St = 1000 / 1)

(Niitani et al./ Nippon Soda; 2003)

図 9. PEGメタクリレート-スチレン ABA三元ブロック共重合体
 (高強度フィルム固体電解質の開発)

文 献

- 1) 澤本光男, 上垣外正己, 安藤剛, 化繊研講演集, **56**, 61 (1999); **57**, 9 (2000); **58**, 1 (2001); **59**, 21 (2002); **60**, 9 (2003); **61**, 11 (2004); **62**, 73 (2005).
- 2) 総説: (a) 安藤剛, 上垣外正己, 澤本光男, 高分子論文集, **59**, 199 (2002).
 (b) M. Kamigaito, T. Ando, M. Sawamoto, *Chem. Rev.*, **101**, 3689 (2001).
 (c) 上垣外正己, 澤本光男, 現代化学, No. 6, 34 (2001)
- 3) 原報: (a) 加藤充, 上垣外正己, 澤本光男, 東村敏延, 高分子学会予稿集, **43**, 1792 (1994). (b) M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura, *Macromolecules*, **28**, 1721 (1995). (c) T. Ando, M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, *Macromolecules*, **29**, 1070 (1996).
- 4) 本稿で述べた機能性モノマーのリビングラジカル共重合に関連する学会発表:
 高分子学会予稿集, **54**, 2444, 2447 (2005).
- 5) 新谷武史, 第44回電池討論会 (2003)

半屈曲性高分子のダイナミクス —ポリ (*n*-ヘキシルイソシアナート) の核磁気緩和¹⁾

吉崎 武尚

T. Yoshizaki

京都大学大学院 工学研究科 高分子化学専攻

1. はじめに

核磁気緩和は、誘電緩和や蛍光偏光解消などとならんで、高分子鎖の局所運動—高分子鎖を構成する繰返し単位の回転運動に関する有用な情報を与えてくれる。¹³Cの核磁気緩和は、主に¹³Cに直接結合している¹Hが作る摂動磁場の揺らぎ、すなわち結合ベクトル¹³C → ¹Hの熱(回転)運動によって起こる。そのような熱運動のみで緩和すると仮定すると、核磁気緩和実験から決定されるスピン-格子緩和時間 T_1 、スピン-スピン緩和時間 T_2 、核 Overhauser 効果 NOE は、結合ベクトルのダイアド成分の時間相関関数で書き表すことができ、繰返し単位の配向緩和を反映する物理量である。

我々はこれまでに代表的な屈曲性高分子であるポリスチレン²⁾とポリメタクリル酸メチル^{3,4)}、ポリ (α -メチルスチレン)⁵⁾の主鎖骨格¹³Cの T_1 およびNOEに関する実験的研究を行ってきた。屈曲性高分子の場合、分子量 M が大きくなると、繰返し単位の回転運動と高分子鎖全体の運動に相関がなくなる。したがって、 M の小さいオリゴマー領域を除いて、 T_1 、 T_2 、NOEはほとんど M に依存せず、それぞれある一定値となる。一方、半屈曲性高分子の場合、高分子鎖の固さのために、 M の大きい領域においても、それら二つの運動の間に相関があるので、 T_1 、 T_2 、NOEは M に依存し、それらの挙動は屈曲性高分子の場合とはかなり異なると考えられる。また、その M 依存性から、高分子鎖の固さに関する情報を得ることができる。しかし、半屈曲性高分子に関する実験的研究は、Buddら⁶⁾が行った、剛直高分子であるポリ (γ -ベンジル L-グルタメート)の T_1 、 T_2 に関するものだけであり、実験データの蓄積が十分とはいえない。そこで、本研究ではポリ (*n*-ヘキシルイソシアナート) (PHIC)の T_1 、 T_2 、NOEの M 依存性を調べ、高分子鎖の固さの影響を検討する。

PHICは、典型的な半屈曲性高分子であり、その静的物理量はKratky-Porod (KP) みみず鎖モデル^{7,8)}を用いて完全に記述できることが知られている。したがって、その動的物理量はらせんみみず (HW) 鎖モデルの特別な場合である一般化KP鎖モデル⁸⁾で記述できると考えられるが、 T_1 、 T_2 、NOEに関する実験的検証は、上記のような理由で不十分である。KPモデル定数—鎖の固さを表す剛直性パラメタ $\lambda^{-1} = 840 \text{ \AA}$ 、単位KP鎖長当りの分子量を表すシフト因子 $M_L = 71.5 \text{ \AA}^{-1}$ 、および流体力学的直径 d が正確に決定されている⁹⁾PHICについて、 T_1 、 T_2 、NOEの実験結果と一般化KPモデル理論⁸⁾との比較から、その妥当性を明らかにすることができる。

2. モデルと T_1 、 T_2 、NOE

HW鎖⁸⁾は、曲げおよび振れの弾性エネルギーを持つワイヤーを絶対温度 T の熱浴に入れた統計モデルである。HW鎖は、その全弾性エネルギーが最小値0のとき、完全らせんとなる。この完全らせんを特性らせんと呼び、その形状は微分幾何学的曲率 κ_0 と振れ τ_0 で規定される。屈曲性高分子を対象とする場合、曲げと振れの弾性定数を等しくおいても一般性を損なわない。その場合、HW鎖モデルは κ_0 、 τ_0 の他に長さの次元を持つ静的剛直性パラメタ λ^{-1} で記述さ

れる。HW 鎖は特性らせんが揺らいだ形態をとり、 λ^{-1} が小さい程揺らぎが大きい。 $\lambda^{-1} \rightarrow 0$ の極限が完全ランダムコイルに対応し、一方、 $\lambda^{-1} \rightarrow \infty$ の極限が剛直な完全らせんに対応する。 $\kappa_0 = 0$ の場合、 τ_0 の値によらずエネルギー最小形態は棒となり、平衡状態における形態の分布に関する限り HW 鎖は KP 鎖と等価になる。ただし、捩れのエネルギーを有しているので、それを考慮しない KP 鎖と区別する必要がある場合、 $\kappa_0 = 0$ の HW 鎖を一般化 KP 鎖と呼ぶ⁸⁾。

連続鎖である HW 鎖を繰返し単位程度の大きさの運動単位（扁平回転楕円体）が繋がった離散化モデルに拡張することで、動的物性が記述できるようになる。この動的モデルを離散化 HW 鎖と呼ぶ⁸⁾。離散化 HW 鎖の特徴は、鎖を構成する運動単位が並進のみならず回転の自由度を持つ点である。そのため、繰返し単位の配向緩和が問題となる核磁気緩和のような現象の記述も可能になる。運動単位の動的性質を記述するモデル定数として運動単位の並進および回転摩擦係数が付け加わる。さらに、離散化 HW 鎖を実在の高分子に対応させるためには M_L が必要となる。

上にも述べたように、 ^{13}C の核磁気結合ベクトル $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ の熱（回転）運動のみによって起こると仮定すると、 T_1 、 T_2 、NOE はそれぞれ次のように書かれる。

$$T_1^{-1} = (1/20)K^2r^{-6}[J_0(\omega_H - \omega_C) + 3J_1(\omega_C) + 6J_2(\omega_H + \omega_C)] \quad (1)$$

$$T_2^{-1} = (1/40)K^2r^{-6}[4J_0(0) + J_0(\omega_H - \omega_C) + 3J_1(\omega_C) + 6J_1(\omega_H) + 6J_2(\omega_H + \omega_C)] \quad (2)$$

$$\text{NOE} = 1 + \frac{\gamma_H}{\gamma_C} \left[\frac{6J_2(\omega_H + \omega_C) - J_0(\omega_H - \omega_C)}{J_0(\omega_H - \omega_C) + 3J_1(\omega_C) + 6J_2(\omega_H + \omega_C)} \right] \quad (3)$$

r は ^{13}C と ^1H の結合距離であり、 K は ^{13}C と ^1H の磁気回転比 γ_C 、 γ_H を用いて次のように定義される量である。

$$K = \hbar\gamma_C\gamma_H \quad (4)$$

ただし、 $\hbar$ は Planck 定数を 2π で割った Dirac 定数である。また、 ^{13}C と ^1H の Larmor 周波数 ω_C 、 ω_H を変数とするスペクトル密度関数 J_m ($m = 0, 1, 2$) は、離散化 HW 理論では次のように与えられる⁸⁾。

$$J_m(\omega) = 2N^{-1} \sum_{k=1}^N \sum_{j=-2}^2 \frac{A_{2,k}^j \tau_{2,k}^j}{1 + (\omega\tau_{2,k}^j)^2} \quad (5)$$

N は離散化 HW 鎖を構成する運動単位の数である。また、 $\tau_{2,k}^j$ は添字の組 (k, j) で指定される運動モードの緩和時間であり、次のように与えられる。

$$\tau_{2,k}^j = 1/\lambda_{2,k}^j \quad (6)$$

式 (6) 右辺の $\lambda_{2,k}^j$ は、離散化 HW 鎖の時間発展を記述する拡散方程式に現われる拡散演算子の固有値であり、上に述べた離散化 HW 鎖を記述するモデル定数に加え、鎖の中心線と結合ベクトル $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ のなす角 α に依存する。

PHIC に対応する一般化 KP 鎖の結果を得るのに、以上の結果において $\kappa_0 = 0$ 、 $\tau_0 = 1.33 \text{ \AA}^{-1}$ とした。また、屈曲性高分子に適用する場合と同様、曲げと捩れの弾性定数が等しいと仮定した。

3. 結果と考察

重量平均分子量 M_w が 1.64×10^4 、 2.66×10^4 、 2.90×10^4 、 4.71×10^4 、 5.71×10^4 の五つの PHIC 試料の n -ヘキサン中 25.0°C における T_1 (○)、 T_2 (△)、NOE (□) の実験結果を図 1 に示す。なお、何れの試料についても、 M_w と数平均分子量 M_n の比 M_w/M_n は 1.1 以下であり、

分子量分布は十分狭い。PHICの主鎖骨格 ^{13}C には直接結合する ^1H がないので、側鎖である n -ヘキシル基に属する ^{13}C の中で最も主鎖骨格に近い ^{13}C について測定を行った。

上に述べた屈曲性高分子の場合、 $M_w \gtrsim 10^3$ で T_1 , T_2 は M_w によらず一定であり、ほぼ同じ値となるのに対し、PHICの場合、測定した M_w の領域で、 M_w の増加とともに T_1 は単調に増加、 T_2 は単調に減少し、 T_1 に比べて T_2 は随分小さい。これは、 M_w の増加に伴い局所運動が遅くなること、すなわち、このように大きな M_w の領域においても、高分子鎖の固さの影響により、局所的な回転運動と高分子鎖全体の運動に相関があること、また局所運動が屈曲性高分子の場合に比べて随分遅いことを表している。また、NOEの値 ~ 1.2 は、屈曲性高分子の値 ~ 3 に比べてかなり小さく、これも T_1 , T_2 の結果と同様のことを示唆している。

図中、太い実線、破線、点線はそれぞれ T_1 , T_2 , NOEに対する一般化KP理論値を表す。なお、理論値の計算においては、(離散化)一般化KP鎖を構成する扁平回転楕円体の直径 d_s を $23 \text{ \AA}$ とした。また、 n -ヘキシル基に属する ^{13}C の中で最も主鎖骨格に近い ^{13}C からの二つの結合ベクトル $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ に対する α は 39° と 71° であり、二つの値に対する理論値を適切に平均した値を示した。 T_1 , T_2 に対する理論値は実験値の挙動を定量的に再現している。また、NOEに対する理論値 ~ 1.4 も実験値と半定量的に一致している。理論値の計算に用いた $d_s = 23 \text{ \AA}$ が固有粘度、沈降係数から決定された流体力学的直径 d の値⁹⁾ $16, 25 \text{ \AA}$ とほぼ一致しているので、以上の理論値と実験値の一致から一般化KP理論が妥当であることが結論できる。

図には、比較のため、回転軸(長軸)の長さが $d_{\parallel}$ 、短軸の長さが $d_{\perp}$ の扁長回転楕円体を用いて計算した T_1 , T_2 , NOEの値をそれぞれ細い実線、破線、点線で示した。扁長回転楕円体のスペクトル密度関数 J_m ($m = 0, 1, 2$)は次のように与えられる¹⁰⁾。

$$J_m(\omega) = \frac{(3 \cos^2 \alpha - 1)^2}{2} \frac{\tau_1}{1 + (\omega\tau_1)^2} + \frac{3 \sin^2(2\alpha)}{2} \frac{\tau_2}{1 + (\omega\tau_2)^2} + \frac{3 \sin^4 \alpha}{2} \frac{\tau_3}{1 + (\omega\tau_3)^2} \quad (7)$$

α ($= 39^\circ$ あるいは 71°) は、一般化KP鎖の場合に対応して、結合ベクトル $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ と扁長回転楕円体の長軸のなす角である。また、 τ_i ($i = 1, 2, 3$) は次のように定義される緩和時間である。

$$\begin{aligned} \tau_1 &= (6D_{\perp})^{-1} \\ \tau_2 &= (5D_{\perp} + D_{\parallel})^{-1} \\ \tau_3 &= (2D_{\perp} + 4D_{\parallel})^{-1} \end{aligned} \quad (8)$$

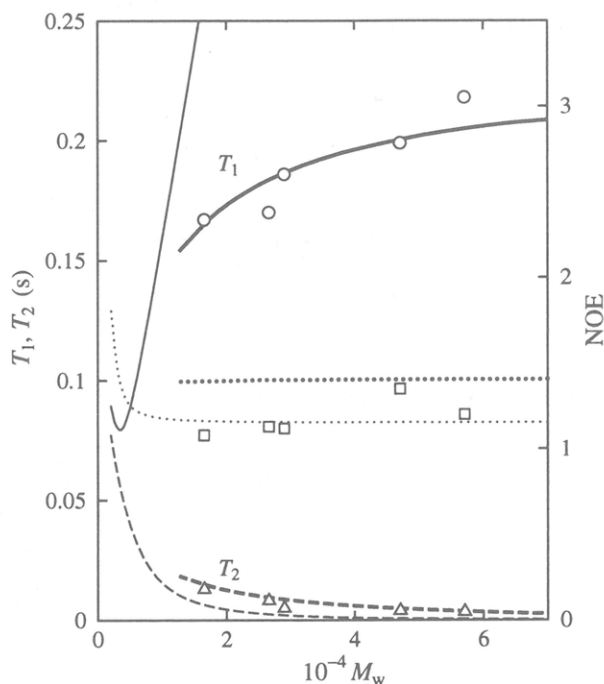


図1. T_1 , T_2 , NOE 対 M_w プロット

ここで、 $D_{\parallel}$ と $D_{\perp}$ はそれぞれ扁長回転楕円体の長軸および短軸回りの回転拡散係数であり、次のように与えられる^{11,12)}。

$$\frac{\pi\eta_0 d_{\perp}^3 D_{\parallel}}{k_B T} = \frac{3}{2(\epsilon^2 - 1)} [\epsilon - F(\epsilon)] \quad (9)$$

$$\frac{\pi\eta_0 d_{\perp}^3 D_{\perp}}{k_B T} = \frac{3}{2(\epsilon^4 - 1)} [(2\epsilon^2 - 1)F(\epsilon) - \epsilon] \quad (10)$$

k_B は Boltzmann 定数、 T は絶対温度であり、 $\epsilon = d_{\parallel}/d_{\perp}$ の関数 F は次のように与えられる。

$$F(\epsilon) = (\epsilon^2 - 1)^{-1/2} \cosh^{-1} \epsilon \quad (11)$$

なお、扁長回転楕円体を分子量 M_w の PHIC に対応付けるために、 $d_{\parallel} = M_w/M_L$ 、 $d_{\perp} = (3/2)^{1/2}d$ とした。

扁長回転楕円体は T_1 を過大評価、 T_2 を過小評価していることが分かる。さらに、 M_w の増加に伴い T_1 、 T_2 が共にそれぞれのある一定値に漸近していく挙動を説明できない。これは、剛体に固定された結合ベクトル $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ の運動は剛体の回転運動によって完全に規定されるからである。半屈曲性高分子であっても、 M_w が大きくなると、局所的な回転運動と高分子鎖全体の運動に相関が徐々になくなっていき、そのような挙動が一般化 KP 鎖を用いて適切に記述できることが分かる。

式 (1) — (3) から明らかのように、 T_1 、 T_2 、NOE は ^{13}C と ^1H の Larmor 周波数 ω_C 、 ω_H に依存するので、実験結果は測定に用いる分光器の磁場強度に依存する。しかし、現在用いられている磁場強度の範囲では、定性的挙動に変化はないので、 M_w の増加に伴い T_1 、 T_2 がそれぞれ増加、減少するようであれば、それは高分子鎖の固さの影響によるものであると判断してよい。またその場合、NOE も 3 よりかなり小さい値 (> 1) となるはずである。

文献

- 1) M. Nakatsuji, T. Yoshizaki, and H. Yamakawa, *Polym. J.*, **37**, 535 (2005).
- 2) Y. Takaeda, T. Yoshizaki, and H. Yamakawa, *Macromolecules*, **27**, 4248 (1994).
- 3) Y. Takaeda, T. Yoshizaki, and H. Yamakawa, *Macromolecules*, **28**, 682 (1995).
- 4) Y. Naito, N. Sawatari, Y. Takaeda, T. Yoshizaki, and H. Yamakawa, *Macromolecules*, **30**, 2751 (1997).
- 5) M. Osa, H. Ueda, T. Yoshizaki, and H. Yamakawa, *Polym. J.*, **37**, 14 (2005).
- 6) P. M. Budd, F. Heatley, T. J. Holton, and C. Price, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **77**, 759 (1981).
- 7) O. Kratky and G. Porod, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **68**, 1106 (1949).
- 8) H. Yamakawa, *Helical Wormlike Chains in Polymer Solutions*, Springer, Berlin, 1997.
- 9) H. Murakami, T. Norisuye, and H. Fujita, *Macromolecules*, **13**, 345 (1980).
- 10) D. E. Woessner, *J. Chem. Phys.*, **37**, 647 (1962).
- 11) G. B. Jeffery, *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, **102**, 161 (1922).
- 12) F. Perrin, *J. Phys. Radium*, **7**, 1 (1936).

水溶性会合高分子のゲル化に関する理論的研究

京都大学大学院工学研究科・高分子化学専攻
田中文彦, 古賀毅, 岡田幸典

概要 多官能性分子の重縮合によるゲル化は古典的な問題であるが熱力学的研究は少ない。本講演では離脱水分子の蒸気圧を制御することにより反応系をゲル化点に留めるための熱力学的な原理を探索し、相分離を避けて均質なゲルを得るための温度・圧力条件を見出す試みを報告する。

1 はじめに— ゾル・ゲル転換について —

ゾル・ゲル転換とは温度、濃度、外場、pH、圧力などの人為的に可変なパラメータを用いて溶液のゾル状態（分子が互いに独立に運動できる流動液体状態）とゲル状態（分子が互いに連結してネットワークを形成した状態）の間をコントロールしながら転換する操作を意味する。当研究室の主たる研究テーマは高分子物質のゾル・ゲル転換の物理・化学的な原理を理論とシミュレーションの方法で解明することである。最近の具体的なテーマを3つ挙げると(1) 水溶性高分子の疎水性凝集によるゾル・ゲル転換、(2) 分子間水素結合によるゾル・ゲル転換 (3) 化学反応（重縮合）によるゾル・ゲル転換、である。

(1) に関しては、疎水化水溶性高分子（会合高分子）の溶液中における凝集構造と物性に関する研究を行ってきた [1]。部分的に疎水化されたポリエチレンオキシド (PEO) やポリイソプロピルアクリルアミド (PNIPAm) は、水中で疎水基の会合によりミセル形成、ゾル・ゲル転移、LCST型相分離などの転移現象を有し、花型ミセルや組み替えネットワークのような特異な自己集合構造を形成する。また、動的には剪断流下での粘性増大（シェアシックニング）、応力のオーバーシュートなど極めて特徴的なレオロジー特性を示すので、高分子の分子論的な基礎研究面からも工業上の応用という視点からも興味を持たれている。我々の研究室では水溶性の中性高分子の代表である PEO と PNIPAm とを対比しながら、両末端疎水化会合高分子（テレケリック鎖）の凝集・離散過程の分子論的な機構を理論・シミュレーションの手法で研究してきた。

(2) に関しては、両末端水素結合性の高分子（高分子ゲル化剤）、ポリエチレンオキシドとポリアクリル酸の非極性溶媒中の複合体形成、水素結合可逆ゴム、多糖高分子水溶液中でのコイル・ヘリックス転移による連鎖性水素結合に関して研究してきた。(1)(2) いずれも順調な進捗が得られたので、今回の研究発表では (3) に関する最近の研究成果を報告することにする。

2 圧力制御ゾル・ゲル転換

縮合反応によるゲルの創製に関する研究は、反応論としての研究史 [2, 3, 4, 5] は長いが熱力学的な視点からの研究は意外に少ない。縮合反応



を取り上げると、反応平衡状態では

$$[-AB-][H_2O]/[-A](1-p_A)[B-](1-p_B) = \lambda(T), \quad (2)$$

の平衡式が成立する。 p_A と p_B は A 基と B 基の反応度、 $\lambda(T)$ は平衡定数である。等モル反応では $[-A] = [B-]$ 、および $p_A = p_B$ (α と記す) となるので平衡式 (2) より反応度は近似的に $\alpha \simeq 1 - 1/\sqrt{h}$ で与えられ、重合度 $\langle x \rangle$ は数平均も重量平均も $\langle x \rangle \simeq 1/\sqrt{h}$ となる。ここで

$$h \equiv [H_2O]/\lambda(T)\psi \quad (3)$$

は脱離する水の影響を表す重要なパラメータ (ψ は官能基の濃度、 $[H_2O]$ は水の濃度) で実験条件により変化させることが出来る。通常、ナイロンやポリエステル合成においては高分子量のポリマーを得るために離脱小分子の蒸気 (水蒸気) は直ちに取り除かれる [2]。

線状高分子とは対照的に、多官能性分子の縮合反応では低い反応度 ($1/(f-1)$ 程度、 $f(\geq 3)$ は一次分子の官能数) でゲル化点に達し 3 次元ネットワークが形成されるので、水やアルコールの蒸気圧を制御して系をゲル化点近傍に留めることができる。そのためには、反応度、温度、高分子濃度と蒸気圧との熱力学的な関係に関する知見が必要である。すなわち、縮合反応を可逆反応の視点から見直し、統計熱力学的な手法で解析する必要がある。本研究では蒸気圧調整によるゾル・ゲル転換の熱力学的原理について考察し、無機高分子 (TEOS や TMOS) の低温ゾル・ゲル合成法に圧力調整を導入する試みを行う。密閉系に関してはすでに水、アルコール分子の生成を取り入れた予備的な分子シミュレーションを行っている (山口 M2)。以下に紹介するのは溶媒の蒸気圧を制御した開放系でのゲル化点の同定法と化学反応と相分離との干渉に関する理論予測である [6]。

3 反応性溶液の自由エネルギー

官能基 ($-OH$ など) を f 個有する f -官能性モノマーの水溶液中における縮合反応を考える。モノマーは水分子の体積 a^3 (基準体積) の n 倍であるとする。調製段階では N 個のモノマーと N_0 個の水分子を混合する。混合直後の溶液の体積は $V_0 = (N_0 + nN)a^3$ であるが、反応の進行とともに水分子が蒸発し、溶液の体積や濃度が変化する。十分時間が経過し温度 T で反応が平衡に達したとした時の体積を V とする。以下では高分子溶液の格子理論 [7, 8, 9] に基づいて解析するので、体積は格子セルの総数 Ω で表す。

初期体積は $\Omega_0 = N_0 + nN$, 終体積は $\Omega = V/a^3$ である. 閉じた容器中での反応では $\Omega = \Omega_0$ となるが, 圧力を制御した系では両者は等しくならない (図 1). 生成分子の濃度 ϕ は初期濃度 $\Phi \equiv nN/\Omega_0$ と異なり, 未知の変数になる.

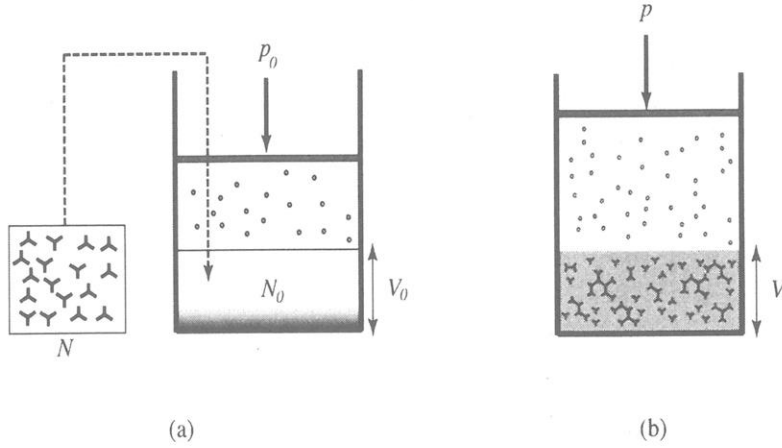


図 1: (a) Preparation of the polycondensing solution with the initial volume V_0 and vapour pressure p_0 immediately after mixing. (b) The final equilibrium state with a solution phase of volume V and a gas phase at pressure p .

以下では重合平衡



を仮定する. ここで Δn_l は反応により生成する水分子の数で最小 $l-1$ (樹状構造) から最大 $fl/2$ (完全縮合) まで変化する. l -量体の実体積は $n_l = ln - \Delta n_l$ で与えられる. 以下では重合体は樹状構造をしているものと仮定し古典的なゲル化反応理論 [3, 4, 5] を使用する. 従って l -量体の体積は $n_l = ln - (l-1)$ である. さて, 体系中に生成した l -量体の総数を N_l , ゲル部分に存在する A 分子の数を N^G とすると, 溶液の体積は

$$\Omega = N_0 + \sum_{l \geq 1} (l-1)N_l + \Delta n^G N^G + \sum_{l \geq 1} n_l N_l + n^G N^G, \quad (5)$$

で与えられる. ここで n^G はゲル上の A 分子の数, Δn^G はゲル中の架橋ボンドの数である. 最初の 3 項は合わせると水分子の総数 $N_w \equiv N_0 + \sum_{l \geq 1} (l-1)N_l + \Delta n^G N^G$ となり, ゼル部分の体積分率は $\phi^S = \sum_{l \geq 1} n_l N_l / \Omega$, ゲル部分のそれは $\phi^G = n^G N^G / \Omega$, 全体積分率は $\phi = \phi^S + \phi^G$ で与えられる. 一方, 水分子の体積分率は $\phi_w \equiv N_w / \Omega = 1 - \phi$ で, 溶液から平衡蒸気相に移動した水分子の数は $\Delta N_0 = \Omega_0(1 - \Phi) - \Omega(1 - \phi)$ となり, A 分子の総数は一定値を保つ.

4 自由エネルギー

以上の定義のもとに高分子溶液の格子理論に基づく自由エネルギーを導入する。自由エネルギーは反応の項と混合の項とからなり、通常の考察から

$$\beta\Delta F = N_w \ln(1 - \phi) + \sum_{l \geq 1} N_l \ln \phi_l + \chi(T) \Omega \phi(1 - \phi) + \sum_{l \geq 1} \Delta_l N_l + \delta(\phi) N^G, \quad (6)$$

で与えられることが分かる [1, 10, 11]. ここで $\chi(T)$ はフローリの相互作用パラメータ, $\Delta_l \equiv \beta(\mu_l^\circ - l\mu_1^\circ)$ は l -量体形成の内部自由エネルギー, $\phi_l \equiv n_l N_l / \Omega$ は l -量体の体積分率, $\nu_l \equiv N_l / \Omega$ はそれらの数濃度である. これから水分子と l -量体の化学ポテンシャルが導かれ, さらに縮合反応に関する化学平衡条件

$$l\Delta\mu_1 = \Delta\mu_l + (l - 1)\Delta\mu_w \quad (7)$$

からクラスターの分布関数が

$$\phi_l = K_l(\phi) \phi_1^l / \phi_w^{l-1}, \quad (8)$$

のような形に得られる. ここで

$$K_l(\phi) \equiv \exp \{ -[\Delta_l - (l - 1)\chi(T)(1 - 2\phi)] \} \quad (9)$$

は平衡定数であるが, 溶媒-溶質間の接触数が変化することから溶媒分子の効果がない会合溶液とは異なって, 平衡定数は高分子濃度に依存する. 今,

$$\eta(\phi) \equiv e^{\chi(1-2\phi)} / (1 - \phi) \quad (10)$$

で定義された濃度因子を導入すると, この因子を含めて有効濃度を考えた時に通常の平衡条件

$$\eta(\phi) \phi_l = K_l^\circ [\eta(\phi) \phi_1]^l, \quad (11)$$

が成立していることが見てとれる. すなわち, この因子は水分子の生成により変化した相互作用が濃度に繰り込まれる時の効果を現し, 繰り込まれた濃度を用いると平衡定数 $K_l^\circ \equiv \exp(-\Delta_l)$ は濃度に依存しない従来の定数に帰着する. これと全く同形の因子は吸着相転移の解析に現れ, イジング模型と同質の相転移を引き起こすことが知られている [12]. 縮合反応の問題では低温領域で反応度が濃度の単調関数でなくなり, 同一の反応度を与える濃度が3個存在し, 圧力変化で一種の相転移現象を示す. また, 平衡定数に χ パラメータが現れるのは水分子の生成によりモノマーと水との接触数が変化するためである.

縮合反応に関してはゲル化反応の古典論 [3, 4, 5] を用い, 蒸気圧, 浸透圧, スピノダル条件, 相平衡条件については蒸気の化学ポテンシャルを使用して熱力学の法則に則り温度と圧力の関数として記述する. ゲル化点は条件

$$(f - 1)\alpha(T, p) = 1/(f - 1) \quad (12)$$

で定まる. ここで圧力は高分子の不揮発性により蒸気圧に等しく

$$\ln(p/p_0) = \ln(1 - \phi) + (1 - 1/n)\phi / (1 - f_1\alpha/2) + \chi\phi^2 + \delta'(\phi)\nu^G\phi. \quad (13)$$

で与えられる.

5 モデル数値計算

数値計算に用いるパラメータは以下のように定める。最初に χ -パラメータに対しては Shultz-Flory の形 $\chi(T) = 1/2 - \psi\tau$ [13] を仮定する。ここで $\tau \equiv 1 - \Theta/T$ は基準温度 Θ からの差を無次元化したもの、基準温度は反応が生じないと仮定した仮想的溶液のテータ条件 $\chi(\Theta) = 1/2$ できまる温度、 ψ は物質定数である。無次元化温度を用いると平衡定数は $\lambda(T) = \lambda_0 \exp(|\epsilon|/k_B T) = \lambda_0 \exp[\gamma(1 - \tau)]$ のような形に書ける。ここで λ_0 は反応のエントロピー変化による因子で、 $\gamma \equiv |\epsilon|/k_B \Theta$ は反応エンタルピーを熱運動エネルギー基準で表したものである。基準温度 Θ は浸透圧の第2ビリアル係数が消失する真のテータ温度ではないことに注意。第2ビリアル係数は化学反応のボンド形成により $A_2(T) = 1/2 - \chi(T) - (1 - 1/n)\lambda(T)f_1^2/2$ という引力項が加わる。以下では $\psi = 1.0$, $\lambda_0 = 1.0$ とし、反応エンタルピー γ を変化させる。反応エンタルピーが相互作用エネルギーより十分に大きい $\gamma > 1.0$ の場合を「強い反応系」逆の場合を「弱い反応系」とよぶことにする。官能数と分子量は TEOS のゾル-ゲル法を念頭に置き $f = 4$, $n = 5$ に固定する。これは珪酸 $\text{Si}(\text{OH})_4$ の水溶液中での縮合に対応する。水とアルコール中での TEOS の反応 [14, 15] では3成分系 $\text{Si}(\text{OR})_4/\text{H}_2\text{O}/\text{ROH}$ としての解析が必要である。

5.1 強い反応系

強い反応系では化学反応のエンタルピーが大きいので、相互作用エネルギーを損失しても反応が進行する傾向が勝り分子同士が結合して容易に相分離が起こる。反応は圧力減少とともに進行し高濃度でゲル化点に達する。図2は濃度を圧力の関数として表している。(見やすくするために圧力を縦軸にとってあるが、縦軸が独立変数である。) 低温で圧力と濃度は単調変化しなくなり相分離が起こる [5]。図3には反応度を濃度の関数としてプロットしてある。

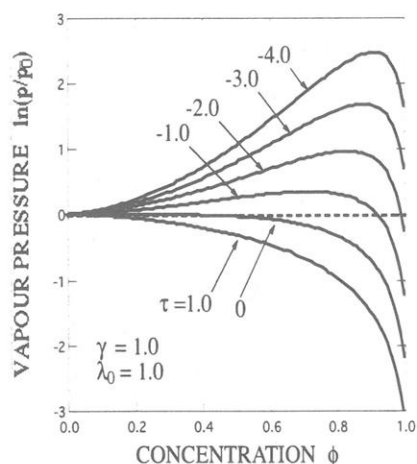


図 2: Polymer concentration (horizontal axis) plotted as a function of the vapour pressure (vertical axis) of the solvent in the case of strong reaction.

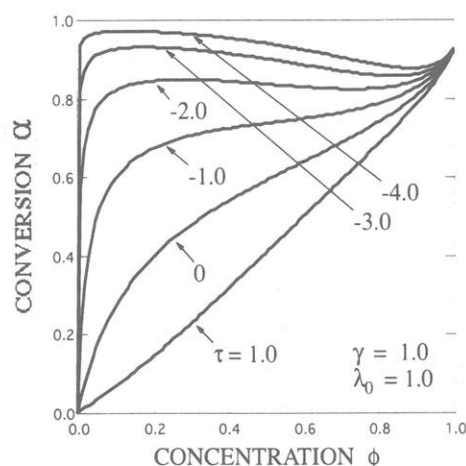


図 3: The conversion of the functional groups plotted against the polymer concentration produced in the solution. At low temperatures, they are not monotonically increasing functions of the concentration due to the backward reaction.

図 4 は温度-圧力平面での相図を示す。実線はゾル・ゲル転移線、破線はスピノダル線で、それぞれ 3 つの反応エンタルピー値に対して描いてある。スピノダル線は文字通りの糸巻き型の尖った形になる。この頂点より下の温度で減圧するとゲル化する前に相分離領域に入ってしまうので均一なゲルは得られない。図 5 には同様の結果を温度-濃度平面で示してある。記号 2Φ で示した領域が 2 相分離領域である。このようなゾル・ゲル転移と相分離が競合する相図は会合系に関連して詳細な検討を行って来た [1, 10, 11]。しかし、縮合系では濃度は制御し難い変数であるので通常の温度-濃度相図はゲル化の予測に有用ではない。

5.2 弱い反応系

図 6 から 9 までは弱い反応系に関して同様の内容を調べた結果を示してある。反応エンタルピーは $\gamma = 0.05 \sim 0.15$ の範囲で変化させた。分子間相互作用のエンタルピー $-\chi(1-2\phi)$ の効果は反応エンタルピーより大きくなるので、特に低温では加圧により容易に逆反応が強化され相分離傾向が強くなる。その結果、高压で興味深い再帰ゾル相が出現する。

図 7 で示された反応度は非単調となり、指定された値に対して 3 つの濃度が存在する領域が出現する。たとえば温度 $\tau = -4.0$ では反応度は 0.25 まで押し戻され、ゲル化点の臨界値の 0.33 より小さくなるので、加圧により溶液はゾル相に戻るのである。このような一見逆傾向の結果になるのは、反応エンタルピーと相互作用エンタルピーが競合し、低温では相互作用による相分離が支配的となるからである。

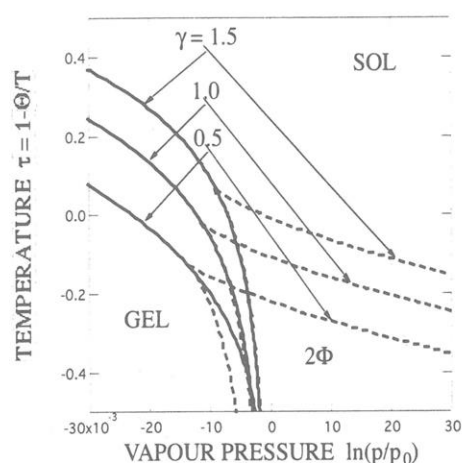


图 4: The sol/gel transition lines (solid lines) together with the spinodal lines (broken lines) drawn on the temperature-pressure phase plane in the case of strong reaction. The enthalpy of reaction is changed from curve to curve. The two curves (sol/gel and spinodal) cross with each other at the spike point of the spinodal region (phase separation region). The reaction enthalpy is changed from curve to curve.

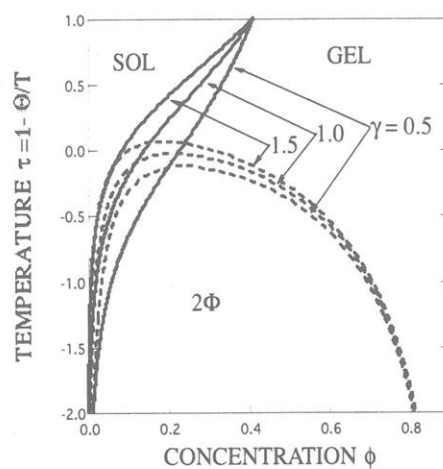


图 5: The sol/gel transition lines (solid lines) together with the spinodal lines (broken lines) drawn on the usual temperature-concentration plane. The two curves cross with each other at the top of the spinodal region (phase separation region). The reaction enthalpy is changed from curve to curve.

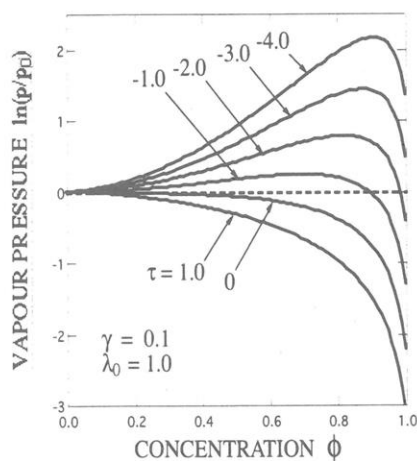


图 6: Polymer concentration (horizontal axis) plotted as a function of the vapour pressure (vertical axis) of the solvent in the case of weak reaction.

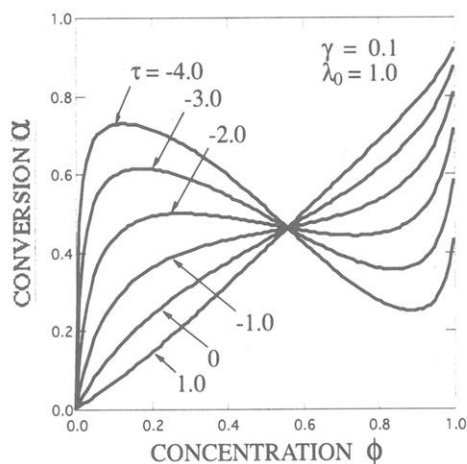


图 7: The conversion of the functional groups plotted against the polymer concentration produced in the solution in the case of weak reaction.

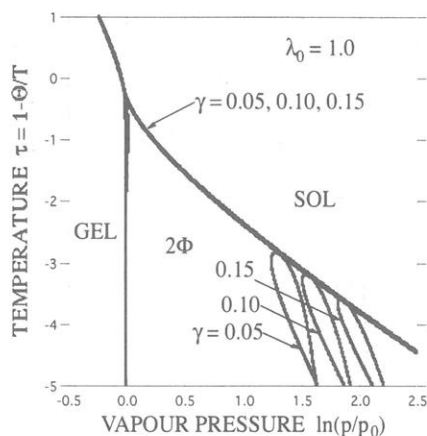


図 8: The sol/gel transition lines (solid lines) together with the spinodal lines (broken lines) drawn on the temperature-pressure phase plane in the case of strong reaction. The enthalpy of reaction is changed from curve to curve. The two curves (sol/gel and spinodal) cross with each other at the top of the spinodal region (phase separation region). The reaction enthalpy is changed from curve to curve.

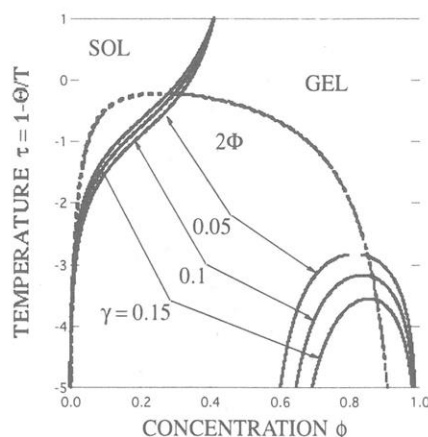


図 9: The sol/gel transition lines (solid lines) together with the spinodal lines (broken lines) drawn on the usual temperature-concentration plane. The two curves cross with each other at the top of the spinodal region (phase separation region). The reaction enthalpy is changed from curve to curve.

5.3 閉じた系での反応

我々は閉じた系での反応に関しても、圧力変化によるゾル・ゲル転換の可能性を調べた。閉じた系では溶液の体積が一定に保たれる結果、系の圧力は反応の進行とともに上昇する。条件 $\Omega = \Omega_0$ の結果高分子濃度は因子 $f_1\alpha/2$ だけ減少し、反応度は

$$2f_1\lambda\Phi(1-\alpha)^2\exp[\chi(T)(f_1\Phi\alpha+1-2\Phi)] = [2(1-\Phi)+f_1\Phi\alpha]\alpha \quad (14)$$

の関係で定まる。ここで Φ は反応開始前の初期混合濃度である。結果の詳細は別の機会に紹介する。閉じた系に対しては、これらの理論研究と並行して分子シミュレーションによる研究も行った。山口 (M2) は修士研究において TEOS の 3 成分系反応を正確に記述するような反応系をモンテカルロ法で解析し、三角相図上で反応経路を表示するプログラムを開発した。これにより初期混合比 $h \equiv [\text{Si}(\text{OH})_4]/[\text{H}_2\text{O}]$ の終状態に及ぼす影響が、反応の経時変化を観測する方法で解明されつつある。

6 結論

重縮合反応系に対して離脱小分子 (水) の効果を取り入れた熱力学的な解析を行い、圧力制御によるゾル・ゲル転換の原理を研究した。ゲル化点の条件と相分離領域との

関係を調べ、均一ゲルを得るための熱力学的な条件を推定した。弱い反応系においては加圧により再帰ゾル相が出現することが予測された。

参考文献

- [1] Tanaka, F. Chap.1 in *Molecular Gels*; Ed. Weiss, G.; Terech, P., Kluwer Academic Pub.: London 2006.
- [2] Flory, P.J. Chap. IIX in *Principles of Polymer Chemistry*; Cornell University Press: Ithaca, NY 1953.
- [3] Flory, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 3091; 3096.
- [4] Stockmayer, W.H. *J. Chem. Phys.* **1943**, *11* 45 ; **1944**, *12*, 125.
- [5] Ref.[2], Chap. IX.
- [6] Tanaka, F. submitted to *Macromolecules* (2006).
- [7] Flory, P.J. *J. Chem. Phys.*, **1944**, *12*, 425.
- [8] Huggins, M.L. *J. Chem. Phys.* **1942**, *46*, 151.
- [9] Ref. [2], Chap. XII.
- [10] Tanaka, F. *Macromolecules* **1990**, *23*, 3784; 3790.
- [11] Tanaka F.; Stockmayer, W.H. *Macromolecules* **1994**, *27*, 3943.
- [12] Hill, T.L. Chap.14 in *An Introduction to Statistical Thermodynamics*; Dover Pub.: NY 1986.
- [13] Shultz A.R.; Flory, P.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *75*, 3888; 5631.
- [14] Brinker C.J.; Scherer, G.W. Chap.3 in *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*; Academic Press: San Diego 1990.
- [15] Sakka, S.; Kozuka, H. *J. Non-Crystal. Solids* **1988**, *100*, 142.

せん流動場における高分子の結晶化過程

金谷利治・荻野慈子・坂元梓也・高山義之

Toshiji Kanaya, Yoshiko Ogino, Shinya Sakamoto, Yoshiyuki Takayama

松葉豪、西田幸次

Go Matsuba, Koji Nishida

京都大学化学研究所 高分子物質科学領域

1. はじめに

射出成形、押し出し成形、紡糸などほとんどの加工過程において溶融高分子はせん断流動、伸張流動およびその混合流動を経験しながら結晶化を起こす。このような流動場で結晶化した高分子は静置場で結晶化した場合とは非常に異なるモルフォロジー、いわゆるシシカバブ構造を示すことはよく知られている。シシカバブ構造とは、図1に示すように芯をなす伸張鎖結晶の回りに高分子鎖の折りたたみラメラ結晶が規則的な間隔を保ちながらエピタキシー的に成長したものであると考えられている。この名前の由来は、トルコ料理の串刺しの焼き肉(シシが串、

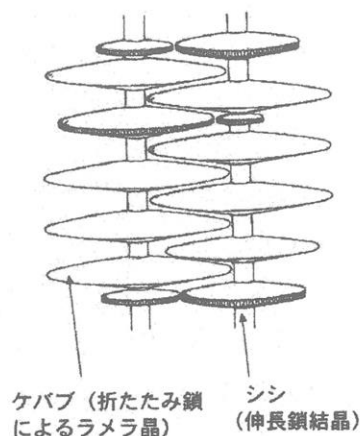


図1. シシカバブ構造の模式図。

ケバブが焼き肉) に似ていることによる。シシカバブ構造は繊維の高弾性率、高強度を支える分子的起源であると考えられており、非常に多くの研究がなされてきた[1]。しかし、生成機構に関してはほとんど解明されていないのが現状であり、構造制御が十分になされているとは言いがたい。最近、シンクロトロン放射光の超強力X線、中性子散乱など新たな測定手法が容易に利用できるようになってきており、シシカバブ構造生成機構解明の研究も新たな側面を迎えている。本稿では、最近我々の研究室で行った時間分割偏光解消光散乱、小角X線散乱、小角中性子散乱、広角X線散乱、光学顕微鏡などを用いたシシカバブ構造形成過程についての研究を紹介する[2-5]。これらの手法を駆使することで、オングストロームからマイクロメートルの幅広い空間スケールでシシカバブ形成過程をその場観測でき、幾つかの新たな情報が得られる。種々の高分子について研究を進めているが、ここでは主にポリエチレンおよびアイソタクチックポリプロピレンの結果について紹介する。

2. 実験

光散乱測定にはHe-Neレーザーを光源とする自作の装置を用いた。温度およびせん断流動の制御にはリンカム社製CSS-450を用いた。時間分割X線小角散乱は放射光施設Spring-8のビームラインBL45XUおよびBL40B2で行い、広角X線散乱は

BL40B2 で行った。小角中性子散乱測定は東海村原子力研究所改 3 号炉に設置されている SANS-U 分光器を用いた。

それぞれの試料を融点より高温で融解させた後、 $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で結晶化温度 T_c まで降下させる。結晶化温度到達直後にパルス的なせん断を加え、その後の等温結晶化過程を種々の手段で時間分割測定した。

3. 偏光解消光散乱測定 —シシの生成—

3.1 せん断速度、せん断歪み依存性

図 2 に 129°C にけるせん断流印加後の PE ($M_w=58,600$ 、 $M_w/M_n=5.06$) の偏光解消光散乱強度の時間は発展を示す。せん断歪みは 3200% である。弱いせん断速度 (1 s^{-1}) では異方性散乱は観測されないが、 16 s^{-1} では明らかにせん断流と垂直の方向に鋭いストリーク状散乱が観察され、流動方向と平行にミクロンスケールの配向構造が生成していることが分かる。これがシシもしくはシシ構造の前駆体である。散乱の異方性を各せん断歪み量について、せん断速度の関数として図 3 に示してある。明らかに散乱の異方性の出現には臨界のせん断速度および臨界のせん断歪みが存在することが分かる。臨界せん断速度をせん断歪み量無限大に外挿し、仮想連続せん断流における臨界せん断速度を評価したところ約 1.5 s^{-1} となった。この値は、レオロジー測定から求めた終端緩和時間とほぼ等しく、シシ構造生成に高分子鎖の絡み合いが大きく関係していることを示唆する。すなわち、せん断流動が分子鎖の絡み合いの緩和に打ち勝ち分子鎖の配向を促進することがシシ構想形成には必要なのであろう。

ここで用いている PE は分子量分布が広く ($M_w/M_n=5.06$)、緩和時間に対する分子量分布の影響、特に超高分子量成分の影響は無視できないと考えられる。そこで、超高分子量 (HMPE) 成分を添加することにより、その効果を調べた。

3.2 超高分子量成分の効果

超高分子量成分の影響を調べるため上述の PE に超高分子量 PE ($M_w=2,000,000$ 、 $M_w/M_n=12$) を 0~3wt% 溶液混合した試料を準備し、上と同様の条件で時間分割偏光

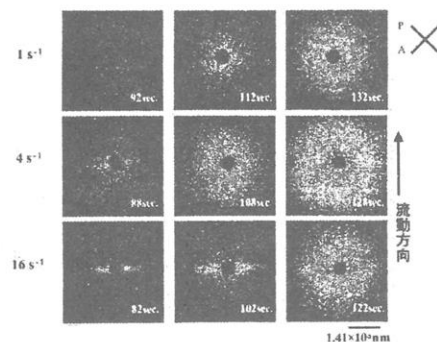


図 2. 種々のせん断速度における PE 偏光解消光散乱パターンの時間発展。せん断歪み 3200%、結晶化温度 129°C 。

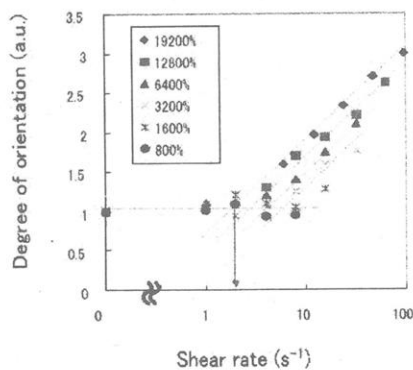


図 3. 種々のせん断歪みにおける PE 偏光解消光散乱パターンの異方性のせん断速度依存性。結晶化温度 129°C 。

解消光散乱を行った。図4に超高分子量成分を含まない場合(Matrix)と3 wt%含む試料について129°Cでせん断速度 4s^{-1} 、せん断歪み1600%のパルスせん断流を印加後の偏光解消光散乱パターンの時間発展を示してある。超高分子量成分を含まない場合にはシシ構造もしくはその前駆体由来のストリーク状の散乱は観測されないのに対して、3 wt%の添加により明らかにシシ形成由来のストリークが観察される。超高分子量成分がシシ構造生成を促進しているのは明らかである。超高分子量成分添加による配向異方性を超高分子量成分の濃度の関数として図5に示した。約0.6 wt%に異方性発現(シシ発現)の超高分子量成分の臨界濃度が存在するのが分かる。この濃度は、超高分子量分子鎖の接触の臨界濃度(いわゆるオーバーラップ濃度)の約3倍であり、絡み合いが発現する濃度にほぼ対応する。すなわち、この結果も超高分子量成分の絡み合いがシシ形成に本質的な役割を演じていることを強く示唆している。

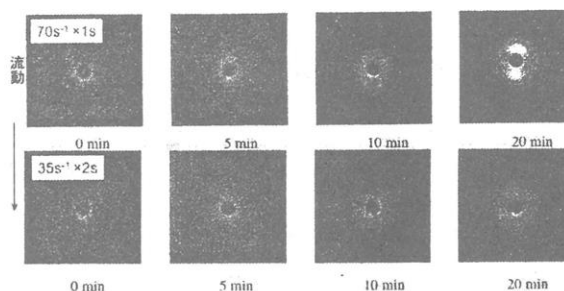


図4. 超高分子量成分(HMPE)を3wt%含むPEのおよび含まないPE(Matrix)の偏光解消光散乱パターンの時間発展。

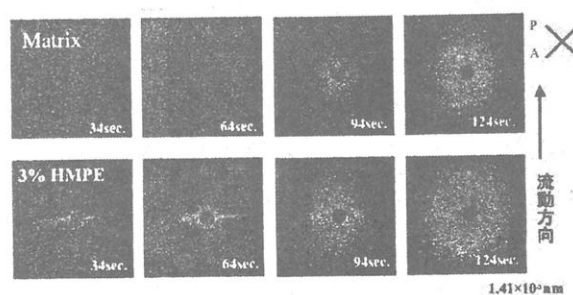


図5. 偏光解消光散乱パターンの異方性の超高分子量成分(HMPE)濃度依存性。

4. 時間分割小角X線散乱 —ケバブの生成—

ケバブ構造(積層ラメラ晶構造)はミクロンスケールのシシに比べ数百ナノメートルのスケールに存在し、小角X線散乱(SAXS)法が有効である。図6にiPP($M_w=238,000$ 、 $M_w/M_n=8.1$)に132°Cにおいてせん断流印加した後における2次元SAXSパターンの時間発展を示す。偏光解消光散乱の場合とは逆に流動方向に平行方向にストリーク状の散乱が現れ、それが時間と共に2スポット状の散乱に発展していく。ケバブ構造の形成に対応している。ケバブ構造の生成に対しても臨界のせん断速度が存在した。本iPPではせん断歪み7000%において、偏光解消

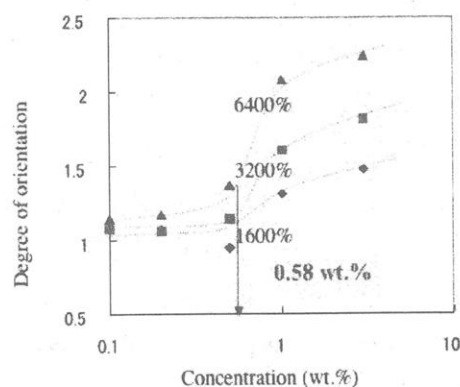


図6. せん断速度35, 70 s^{-1} におけるiPPの小角X線散乱(SAXS)パターンの時間発展。せん断歪み7000%、結晶化温度132°C。

光散乱より見積もったシシ構造生成に対する臨界せん断速度は 3.4 s^{-1} であったのに対して、SAXS より見積もったケバブ構造の臨界せん断速度は 4.2 s^{-1} であり、ほとんど同じであった。このことは、ケバブ構造は生成したシシ構造の上にエピタキシー的に成長するため、その異方性はシシ構造が出現できるかどうかによって決まっていることを示唆している。すなわち、シシ構造がケバブ構造生成を支配していると言える。

5. 時間分割広角 X 線散乱 —ケバブ結晶構造—

結晶格子の生成過程を時間分割広角 X 線散乱(WAXS)により追跡した。SAXS 測定と同様、iPP ($M_w=238,000$ 、 $M_w/M_n=8.1$) に 132°C においてせん断流印加した後における流動に平行および垂直方向の散乱強度の時間発展を図 7 示す。iPP の α -結晶が成長していることが分かる。WAXS の異方性出現に対しても臨界のせん断速度が観察されたが、これもシシ出現に対する臨界のせん断速度とほぼ等しくなり、再度シシ構造がケバブ構造生成を支配していることを強く示唆する結果となった。図 8 に偏光解消光散乱

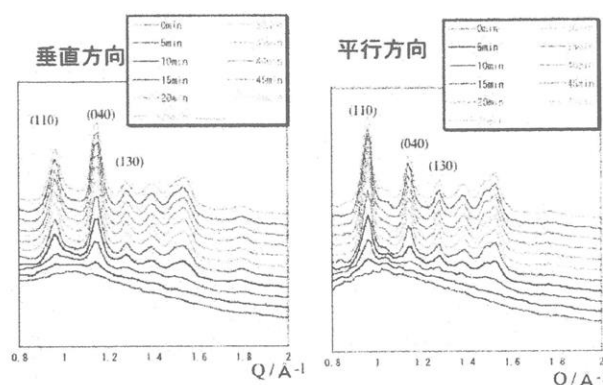


図 7. せん断速度 70 s^{-1} における iPP の広角 X 線散乱 (WAXS) の流動に平行および垂直方向の散乱強度の時間発展。せん断歪み 7000%、結晶化温度 132°C 。

強く示唆する結果となった。図 8 に偏光解消光散乱 (DPLS)、小角 X 線散乱(SAXS)、広角 X 線散乱 (WAXS)強度の時間発展をまとめた。明らかにシシ構造生成に対応する DPLS 強度がまず立ち上がり、続いて SAXS 強度、WAXS 強度と立ち上がる。すなわち、まずシシ構想 (もしくはその前駆体) が生成し、それにエピタキシー的にケバブ構造が成長を始める。しかし、成長の初期では結晶構造はまだ十分成長しておらず密度揺らぎとして SAXS は観測されるが WAXS 強度は立ち上がらない。徐々にケバブ構造中での結晶化進行し、始めて WAXS 強度が立ち上がると考えられる。

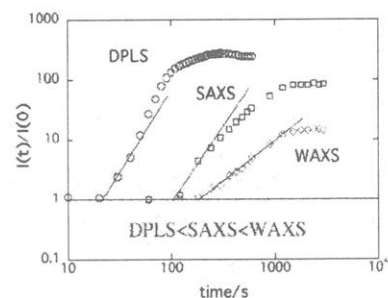


図 8. iPP の偏光解消光散乱 (DPLS)、小角 X 線散乱 (SAXS)、広角 X 線散乱(WAXS)強度の時間発展。せん断速度 70 s^{-1} 、せん断歪み 7000%、結晶化温度 132°C 。

6. 中性子小角散乱 —シシのコントラスト強調測定—

図 6 に示した小角 X 線散乱パターンにはシシ構造由来の流動方向に垂直方向のストリーク状の散乱は観測されない。しかし、偏光解消光散乱測定からシシ構造が存在し

ていることは疑いがない。では、なぜ SAXS 測定ではシシが観察されないのでしょうか？本実験で我々は超高分子量成分の添加がシシ構造の生成を促進することを知った。また、中性子散乱法では、化学的にはほとんど等価な水素 (H) と重水素 (D) の間に大きな散乱能の違いがあることが知られている。よって、重水素化 PE

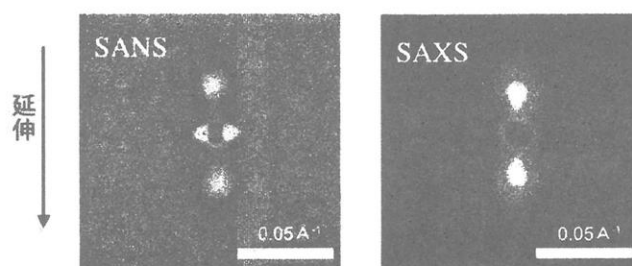


図9. 超高分子量成分 (HMPE、軽水素化物) 2.8wt% 含む重水素化 PE の6倍延伸物の小角中性子散乱 (SANS) および小角 X 線散乱 (SAXS) パターン。

($M_w=198,000$ 、 $M_w/M_n=5\sim6$) に超高分子量 PE を 2.8wt% 添加したものを融点直下で6倍延伸した試料を準備し、小角中性子散乱(SANS)および小角 X 線散乱(SAXS)を行った。図9に SANS および SAXS の結果を示す。SAXS では延伸方向に垂直な方向にケバブ構造由来の2スポットパターンのみが観測されたが、SANS では2スポットパターンに加え、垂直方向にシシ構造由来のストリーク状の散乱が明確に観察された。この結果から、小角 X 線散乱測定において、シシ構造が観測されないからといって、シシ構造が存在しない訳ではないと結論される。多分、シシ構造はシシカバブ構造の全体の中ではその分率がかなり小さく、またそのサイズがミクロンスケールに存在するため SAXS の分解能では観測しにくいことも影響しているのではないかと考えられる。

7. おわりに

このようにシシカバブ構造生成過程の観測がかなり定量的になされ、また議論できるようになってきている。まだまだ、不明な点も多いが、測定技術の進展を考えると、今後数年間はシシカバブ構造生成機構の解明に大きな進展があると期待が高まる。

- [1]例えば、Keller A, Kolnaar J W H. In: Meijer HEH. Processing of Polymers. New York: VCH; 1997. p. 189-268.
- [2] Fukushima, H. Ogino, Y. Matsuba, G. Nishida, K. and Kanaya, T. :*Polymer*, 46, 1878 (2005)
- [3] Ogino, Y. Fukushima, H. Matsuba, G. Nishida, K. and Kanaya, T. :*Polymer*, in press.
- [4] Kanaya, T. Ogino, Y. Fukushima, H. Matsuba, G. Nishida, K.: Proceedings of 5th Osaka University Macromolecular Symposium, p. 49-56, 2005
- [5] Kanaya, T.: ACS National Meetings 228 (2004), U440-U440 172-PMSE Part2.

印加電圧に応答してヘリックスのタイプを替える ペプチド分子デバイス

北川 和哉・森田 智行・木村 俊作

Kazuya Kitagawa, Tomoyuki Morita, Shunsaku Kimura

京都大学大学院工学研究科材料化学専攻

1. 緒言

究極の集積回路は、スイッチやトランジスタ、メモリなどの機能が分子レベルで発現する分子デバイスで構成されたものになると予想される。現在の段階では、素機能を果たす分子デバイスのモデル分子が合成され、その単独での物性評価が行われている段階であるが、様々な分子が取り上げられるようになってきた。われわれは、らせん形成ペプチドを用いて、長距離電子移動のメディエータとなること、ダイオード特性を示すこと、および、光増感剤と組み合わせることで分子フォトダイオードと名付けられる分子システムを構築できることを示してきた[1]。ここでは、らせん形成ペプチドが2種類のらせん構造をとり得ることに注目し、分子メモリデバイスとして応用できる可能性について検討した結果を報告する。

われわれは、2-aminoisobutyric acid (Aib) 残基を含むペプチド分子を取り扱ってきた。Aibは α 、 α 二置換アミノ酸であり、通常のアミノ酸に比べて、立体障害を発生するため限られたコンホメーションを主鎖骨格に誘導する。天然に存在する抗生物質アラメチシンは、20量体の疎水性ペプチドであり8個のAib残基を含む。アラメチシンはらせん構造をとり、脂質膜を貫通した形で分配し、バンドルを形成して膜電位依存性イオンチャンネルを形成する。このようなAibを含む生理活性ペプチドの構造と活性相関を調べることを背景に、Aibを含むモデルペプチドが数多く合成され、コンホメーション解析が行われている。

Aibだけからなるポリマーは 3_{10} ヘリックス構造をとり、Aibを通常のアミノ酸の一置換アミノ酸に変えてその含量減らすと、 α ヘリックス構造を好むようになる。また、Aibと通常のアミノ酸が混合している場合、鎖長が長くなると α ヘリックス構造を好むようになり、一方、極性溶媒では α ヘリックスが 3_{10} ヘリックスよりも安定化される。ここで 3_{10} ヘリックスとは、3残基で1周するらせん構造で、1残基あたり2.0Åだけらせん軸方向に移動する。これに対し、 α ヘリックスは3.6残基で1周し、1残基長くなるとらせん軸が1.5Å伸びる構造である。従って、 3_{10} ヘリックスの断面の直径は α ヘリックスより短く、同じ残基数のペプチドを比較すると、鎖長は 3_{10} ヘリックス

の方が α ヘリックスより長い。分子内水素結合に関与しない末端に位置するアミド水素とカルボニル酸素の個数は、 3_{10} ヘリックスの方が α ヘリックスよりそれぞれ1つずつ少なく、その結果、溶媒の極性が上がると α ヘリックスを好むようになる場合がある。図1に、16量体ペプチドが α ヘリックスをとる場合と 3_{10} ヘリックスをとる場合の様子を、分子モデルにて示した。後者の方が分子内水素結合の数が前者より1個多くなる。

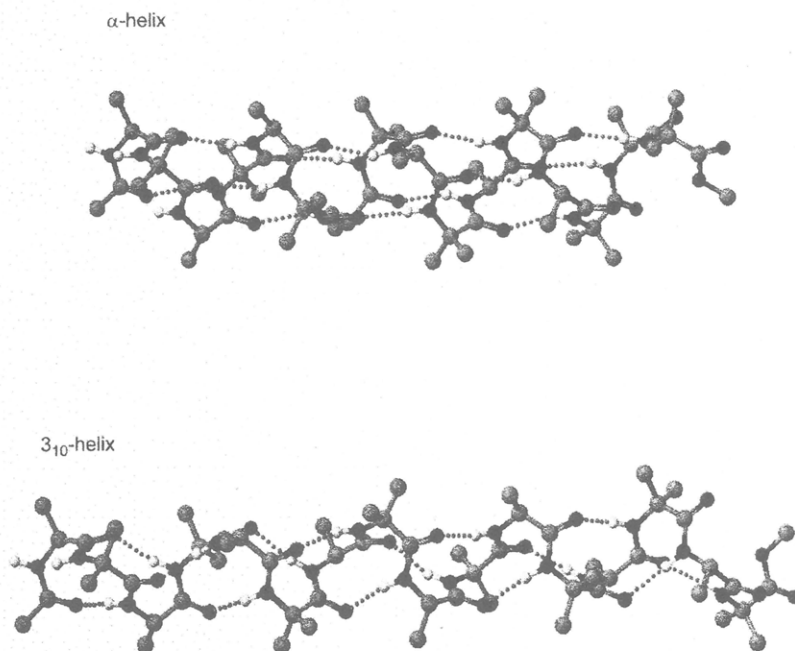


図1 16量体ペプチドの分子モデル。 α ヘリックス（上図）および 3_{10} ヘリックス（下図）。N末端はアセチル基で、C末端はメチルエステルでそれぞれ保護されている。一次構造は、AlaとAibとの交互配列である。

例えば、 $\text{Boc}-(\text{Ala}-\text{Aib})_n-\text{OMe}$ ($n = 4, 6, 8$)のコンホメーションを調べると、結晶解析から8量体は 3_{10} ヘリックス、16量体は α ヘリックスであることがわかった。溶液中での解析から12量体は α ヘリックスであることから、8量体から12量体の間で、一連のペプチド分子がとる安定なヘリックスのタイプは変化することが示された[2]。別の言い方をすると、ある鎖長の $\text{Boc}-(\text{Ala}-\text{Aib})_n-\text{OMe}$ は、ある環境中では α ヘリックス構造も 3_{10} ヘリックス構造も同様の安定性で取り得ること（双安定性）を意味する。

2. 疎水性ヘリックスペプチド

図 2 に、本研究で用いた疎水性ヘリックスペプチドの構造式を示した。Leu と Aib の交互配列を有し、金基板への固定化のため N 端側あるいは C 端側にチオフェニレン基が導入してある。これまでに、リポ酸等のアルキル基を、ペプチド分子を金基板に結合するリンカーに用いてきたが、アルキル鎖を介しての電子移動は電子トンネリングに基づいて起こるため、その移動速度が距離の指数関数で減少し、界面での電子移動が全体の電子移動過程の律速段階となる問題があった。これに対して、リンカーにフェニル基を用いると π 電子の存在が原因と思われるが、金とペプチド分子間での電子移動が促進される。

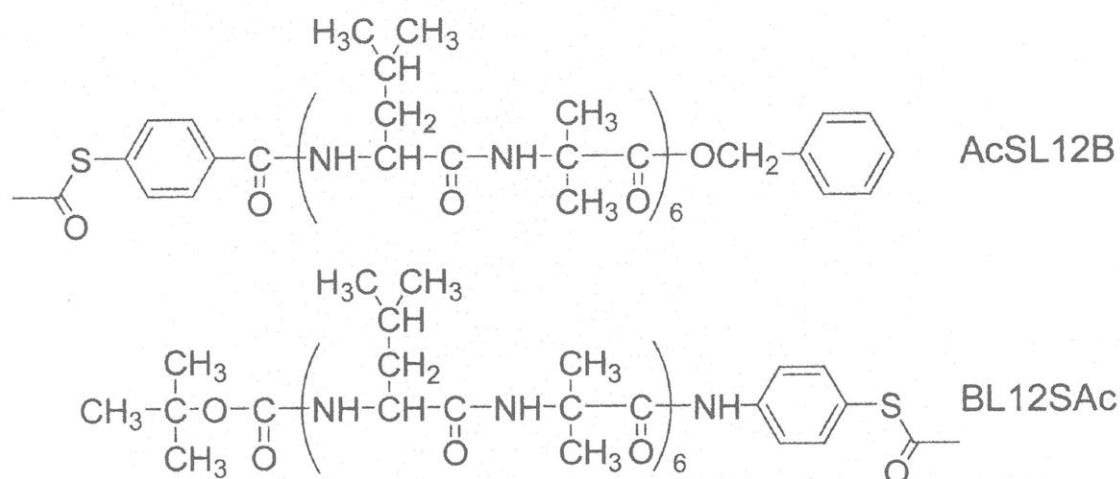


図 2 Molecular structure of hydrophobic helical peptides.

金基板にこれらのペプチド分子を固定化する際には、アセチル基を予め除去した後、金基板をペプチド溶液に浸漬した。

3. ヘリックスペプチドの STM 観察

ヘリックスペプチドの単分子観察を超高真空下での STM を用いて行った [3]。単分子観察では、測定対象とする分子長が 2nm を越えることから微弱なトンネル電流を計測することとなる。実際、セット電流を数 pA とし、サンプルバイアスは、金-チオール結合を切断しないように 1V 前後に抑えた。また、同じサイトを数回スキャンし、イメージが変化しないことを確認している。これは、非特異的に吸着しているペプチド分子等が存在している場合、STM の走査によりそれらが位置を変えてしまうことでチェックできるからである。ただし、分子の明滅現象を観察するときには、STM イメージ中のペプチド分子のイメージ変化を追跡する必要があり、同じサイトでの観察を継続するため熱ドリフトに注意をはらった。

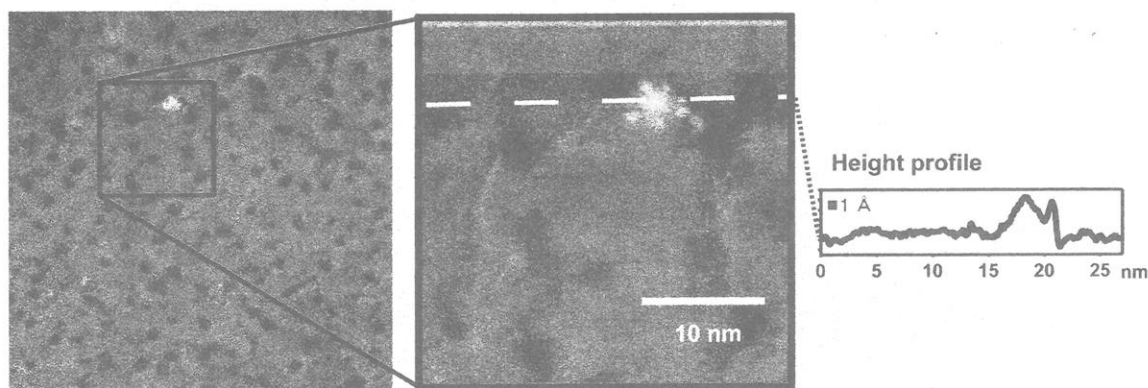


図3 STM image of AcSL12B in the dodecanethiolate SAM [3].

AcSL12B をドデカンチオール自己組織化膜(SAM)に埋め込んだサンプルのSTMイメージを図3に示す。ドデカンチオールの細密充填構造の中に、明るいドットの集合体が認められ、ヘリックスペプチドがおよそ10本程度バンドルとなって存在している様子がみてとれる。

このように高分解イメージがとれることを確認して、経時変化を追跡した。その結果、図4に示すようにヘリックスペプチドの明滅現象を見出した。数時間の観察の間に明滅する様子が数回観測された。各イメージ図でピットの位置等が同じであることから同じサイトを観察していることは明らかであり、その特定の部位でヘリックスペプチドの明滅が見えることから、ペプチド分子がその部位に固定化されているにもかかわらず、見かけ上の高さが時間と共に変化していると考えられる。

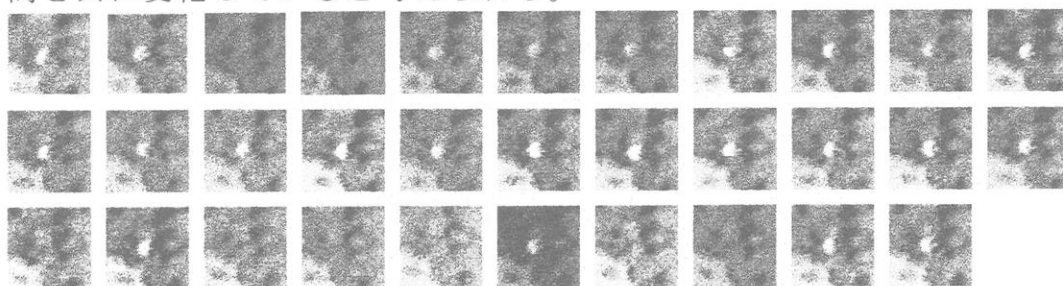


図4 Time course of STM image changes of AcSL12B in the dodecanethiolate SAM [4].

4. ヘリックスペプチドの明滅現象とサンプルバイアス

ヘリックスペプチドの明滅現象には、幾つの特徴のあることがわかった。N端側で金基板に固定化しているAcSL12Bの単分子イメージは、サンプルバイアスを -1.3 V 程度印加する条件下で観察できるのに対し、サンプルバイアスを反転して $+1.3\text{ V}$ とするとヘリックスペプチド由来の明るいドットが検出できなくなった(図5)。このようなサンプルバイアス依存性は、C端側

で金基板に固定化した BL12SAc の単分子イメージ測定の場合にも認められた。ただし、BL12SAc の場合、ヘリックスペプチド由来の明るいドットはサンプルバイアスを +1.5 V 程度にすると観察できるのに対し、サンプルバイアスを -1.5 V 程度印加する条件下では観察が難しくなった。つまり、このらせん形成分子を STM 観察するには、分子の基板上での向きに応じて、サンプルバイアスの極性を合わせる必要がある。

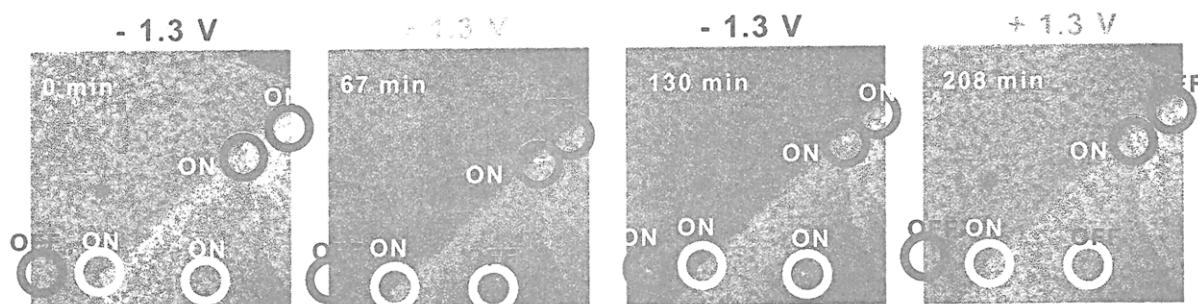


図 5 Constant current STM images of AcSL12B in the dodecanethiolate SAM with changing the sample bias.

ヘリックスペプチドをドデカンチオール SAM に埋入したサンプルの特定箇所を、サンプルバイアスを変えて測定した結果を図 5 に示す。エッジに存在が認められる 2 個の明るいドットは、サンプルバイアスを変えても同じように明るく見えている。これは、エッジとペプチド分子とが強く相互作用しており、ペプチド分子のコンホメーション変化が抑えられている結果と考えられる。一方、テラスの平坦部に取り込まれているペプチド分子は、サンプルバイアスがマイナスのときは明るく観測されるのに対し、サンプルバイアスをプラスに変えるとイメージが消失した。再び、サンプルバイアスをマイナスにすると、明るいドットが再現することから、ヘリックスペプチドは同じ場所に固定化されており、ヘリックスペプチドの見かけ上の高さが STM 観察におけるサンプルバイアスにより変化したことが考えられる。

これらの STM 観察と、このペプチド分子のもつダイポールの特性を考えると、つぎのようなことが明らかになった。C 末端側でらせん形成分子を金基板に固定化すると、らせん形成分子のダイポールモーメントは外側を向き、STM の走査において、プラスの部分電荷をもつ N 末端側が STM チップに近接することになる。サンプルバイアスが +1.3 V ではチップはマイナスに帯電していることから、両者の間には引力が発生すると考えられる。これにより、らせん形成分子は引き伸ばされ 3_{10} ヘリックスをとるようになり、STM イメージでは分子が高い状態として観察される。一方、サンプルバイアスをマイナスとすると、ペプチド分子の末端とチップとの間には斥力が働き、

分子は α ヘリックス構造に留まるため、周囲のドデカンチオールとの高さの差が小さく、STM観察が困難になったと理解できる。

このように、らせん形成分子のダイポールとSTMチップとの相互作用が原因とすると、らせん形成分子の向きを逆転してN末端側で金基板に固定化した場合、分子の見える条件が逆転するはずである。つまり、サンプルバイアスがマイナスのときにチップがプラスとなり、マイナスの部分電荷を有するC末端と引力が発生し、らせん形成分子は引き伸ばされ明るいイメージとして観察されるはずである。実際、SL12Bの観察においては、この通りとなった。

以上のことから、このらせん形成分子は2種類のらせん構造を金基板上でとることができ、その種類をその分子末端の近傍においたSTMチップの印加電圧の極性により制御できることがわかった。

5. おわりに

有機分子では、単分子のレベルで、双安定な構造を有するらせん分子を開発でき、可逆的に両者の間を繰り返し変換させることができる。とくに、らせん形成ペプチド分子の場合、分子内水素結合により各らせん構造は安定化しており、各らせん構造にとどめておくことが可能であろう。つまり、二つの状態間にエネルギー差が存在しなくても、両者の変換には水素結合の掛け替えが必要であり、変換のための活性化エネルギーが高いと考えられる。したがって、このらせん形成ペプチド分子は、分子の長さに基づく分子メモリーデバイスとして有用な材料と期待される。

参考文献

- [1] S. Yasutomi, T. Morita, Y. Imanishi, S. Kimura, *Science*, 2004, **304**, 1944.
- [2] K. Otoda, Y. Kitagawa, S. Kimura, Y. Imanishi, *Biopolymers*, 1993, **33**, 1337.
- [3] K. Kitagawa, T. Morita, S. Kimura, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 15090.
- [4] K. Kitagawa, T. Morita, S. Kimura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 6330.

繊維の極限強度の追求-工業からのアプローチ-

大田 康雄

Yasuo Ohta

東洋紡総合研究所 コーポレート研究所

1. はじめに

通常の繊維の強度をはるかに凌ぐいわゆる高強度・高弾性率繊維（スーパー繊維）が既に数多く工業化されている。高強度ポリエチレン繊維はオランダ DSM 社の Smith と Lemstra らにより発明された屈曲性高分子からなるスーパー繊維の代表例であり、基本発明から既に 20 年以上が経過し様々な分野で用途展開が進んでいる。[1]本繊維が製造される「ゲル紡糸法」において、高強度繊維が得られるメカニズム、つまり分子鎖が高度に配向した結晶構造が得られる構造発現のメカニズムに関しては、過去からの膨大な研究[1-3]にもかかわらず必ずしも明確であるとは言えない。逆にそれらがより明確にされることで、さらなる強度向上などの発展につながると考えられる。本稿では、報告者らが行ってきた超高分子量ポリエチレンの均一な準希薄溶液から、伸びきり鎖構造を有する繊維に変化するメカニズムについての検討結果について報告することにする。

2. 高強度ポリエチレン繊維の微細構造発現機構

図 1 に高強度ポリエチレン繊維の製造プロセスを示す。詳細は引用文献に譲るが[1]、図中に模式的に示したように、各工程を通じて超高分子量ポリエチレン（以下 UHMW-PE）分子は、溶液中でのランダムコイル状態（無配向、均一溶液状態）から、分子鎖が高度に配向結晶化したいわゆる伸びきり鎖結晶構造というように、一次構造から高次構造に亘って大きな構造変化を経ていると考えられる。以下、この構造形成の観点から順次工程に沿って報告する。

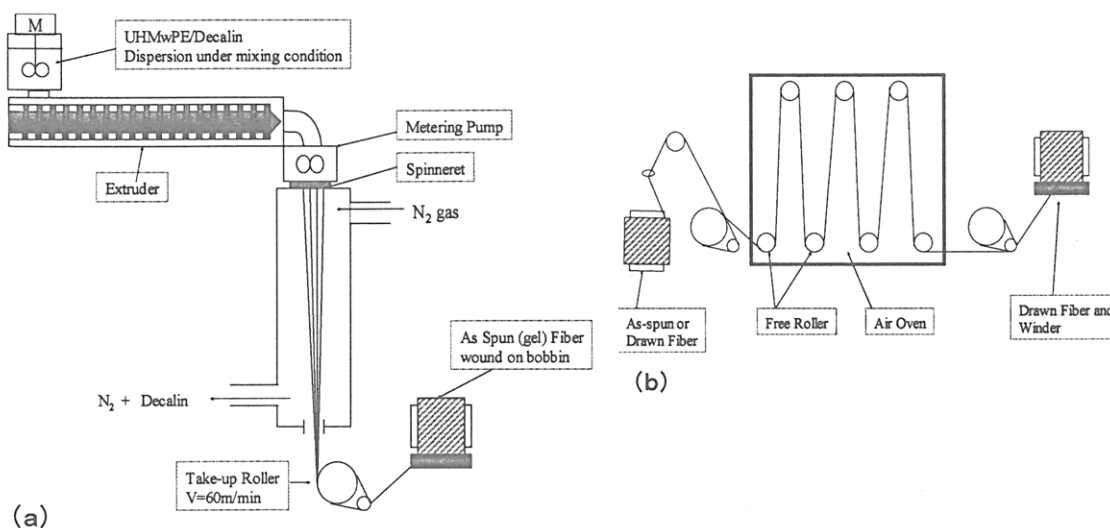


図 1 ゲル紡糸法の模式図： (a)紡糸過程および(b)延伸過程を示す。

2-1 UHMW-PE 準希薄溶液の特性と剪断変形下での構造形成[4, 6]

図2は UHMW-PE/パラフィンの準希薄溶液（濃度3及び5 wt% : $C^* \sim 0.5 \text{ wt\%}$ ）を用いて得られた剪断粘度の剪断速度依存性である。図に示すように、測定した剪断速度レンジにおいて明確な平坦領域が見られない、いわゆる非ニュートン流体の特性（Shear-thinning 特性）を示す。さらに高剪断速度領域では剪断粘度が上昇し、最終的にはコーンプレートから漏れるような現象が観察された。このような超高分子量ポリマーの準希薄溶液の粘弾性特性、加えて高剪断速度領域での異常な挙動については、UHMW-PS/DOP の系において Kume らにより詳細に研究されている。[5]彼らは透明なコーンプレート上でのその場合光散乱測定より、レオロジー的な異動挙動と並行して系中での濃度揺らぎが増幅されていることを観察し、その散乱パターンの時間発展による散乱関数の解析等により、本現象はいわゆる剪断誘起の液-液相分離現象であると報告している。PS と PE の差はあるが同様の現象が起こる可能性が示唆されるので、我々も本系においてその場合光散乱観察を実施することにした。（橋本竹治京都大学名誉教授のご指導による）

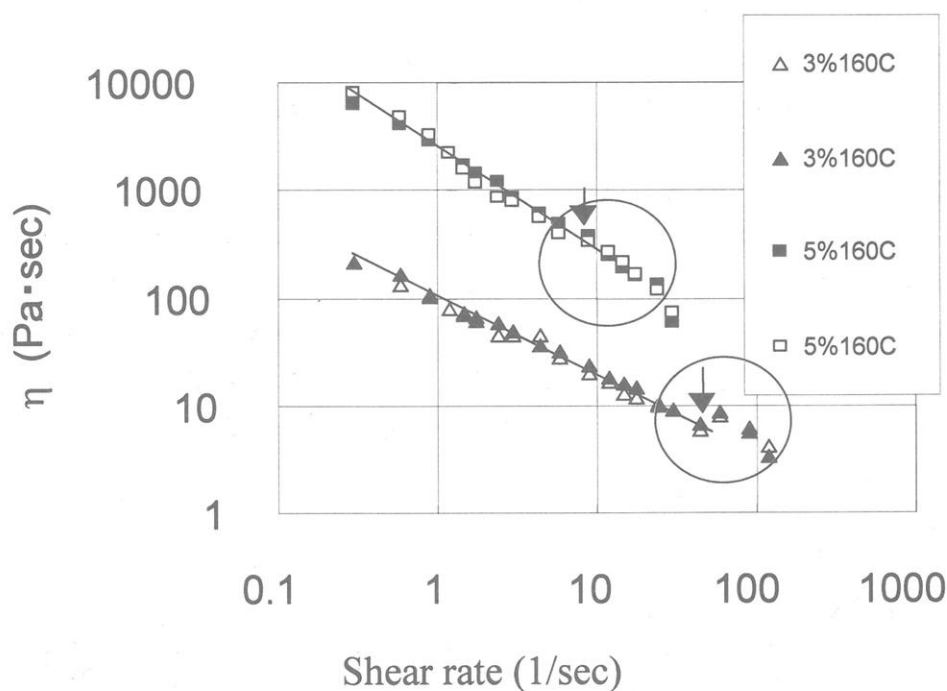


図2 UHMW-PE/パラフィン溶液の粘度の剪断速度依存性

図3に我々が用いた装置の概略図と、図4に UHMW-PE/パラフィン(3wt%) 溶液の剪断変形下より得られた光散乱像を示す。基本的には前述の Kume らの結果と同様にある臨界剪断速度以上の領域では剪断速度の増加に伴い光散乱強度が増大していくことが判明した。すなわち、本溶液は剪断等の外から受ける力学的変形によ

り濃度揺らぎが増幅（相分離過程が進行していると推定される）される系であることが確認された。本現象が普遍性を持つことが証明される一方、本系が Kume らによるポリスチレンと異なる点は、ポリエチレンは結晶性高分子でありその剪断変形下で観察された構造を急冷する事により固定化できる可能性があることにある。逆に言えば現実の紡糸プロセスにおいて、例えばノズルを溶液が通過する際に上記のような現象が起こると仮定すれば、ノズルから押し出された後の結晶化（構造形成過程では最も重要）にもその前駆体的な構造として影響を与える可能性を示唆していると言え、興味深い現象と言える。現在、上記の検討を継続して、ポリマーの融解温度より若干上でさらに高剪断を付与すると、ストリング状の構造が溶液中に出現するなどの興味ある研究が村瀬らにより検討されている。[7]

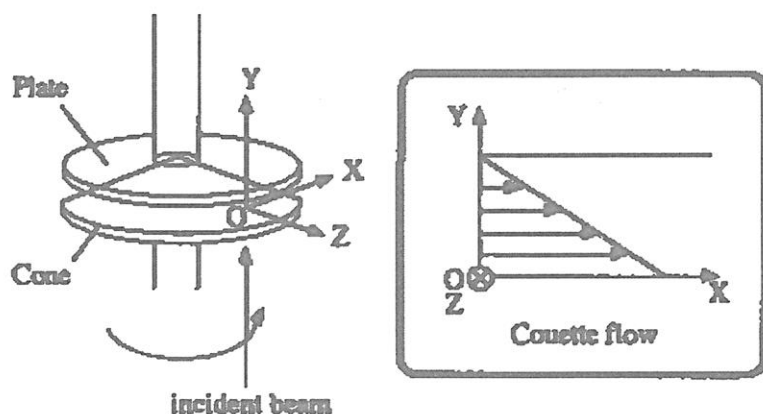
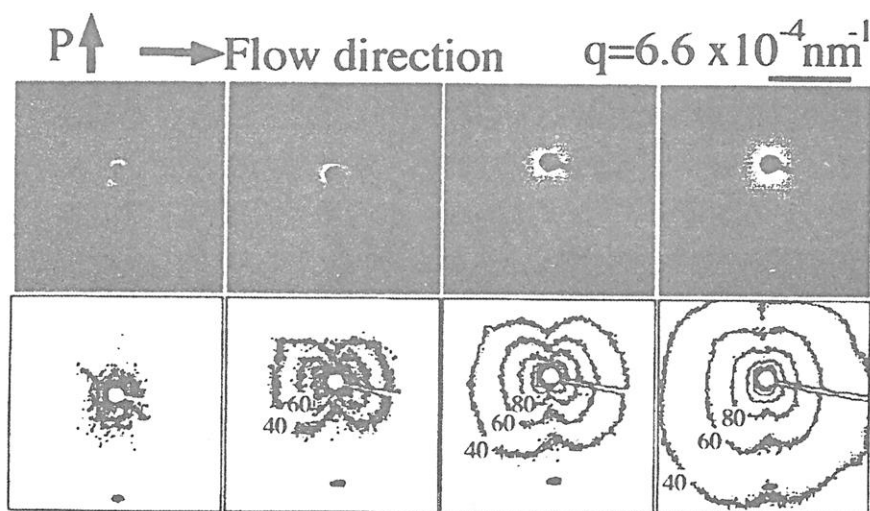


図3 透明のコーンプレート型剪断付与装置と座標系（右）



(a) quiescent (b) 4.6 s^{-1} (c) 46 s^{-1} (d) 115 s^{-1}

図4 UHMW-PE/パラフィン(3wt%)溶液の剪断変形下での光散乱パターン(上部：散乱光観察、下部：上図より求めた強度の等高線図)

2-2 As-spun ゲル糸の内部構造と延伸機構[8]

前述のように、ノズルから吐出されてから紡糸に至る過程が構造発現の場としては最も重要であるが、実際の紡糸過程では冷却に伴う結晶化と伸張変形、場合によっては脱溶剤等が複雑に影響をあたえるため、その解析は非常に困難である。ここでは、紡糸で一旦得られたゲル状の物質（従って既に紡糸での結晶化が進行して冷却固化された状態）とそれを出発にした一連の延伸物に対して透過型電子顕微鏡による構造解析を実施することにした。図5(a)に紡糸直後に得られた繊維より繊維軸方向に繊維の中心を通り平行に切り出した超薄切片より観察した TEM 像を示す。紡糸直下で得られた繊維の内部構造は UHMW-PE の希薄溶液の流動変形下で観察される“シシカバブ状”の構造が主体となって構成されていることが判明した。この観察自体は、目新しいことでは無いが、前述のとおり紡糸過程に至るまでの溶液状態で受けた変形履歴により構造形成がどのように影響を受けているか？が興味深い点である。また、このシシカバブ状の構造が、高温下で非常にスムーズに延伸可能であることも興味深い。我々は、図5(a)の As-spun 糸から、それを用いた熱延伸物についても同様の TEM 像観察を実施し、延伸過程を通じて

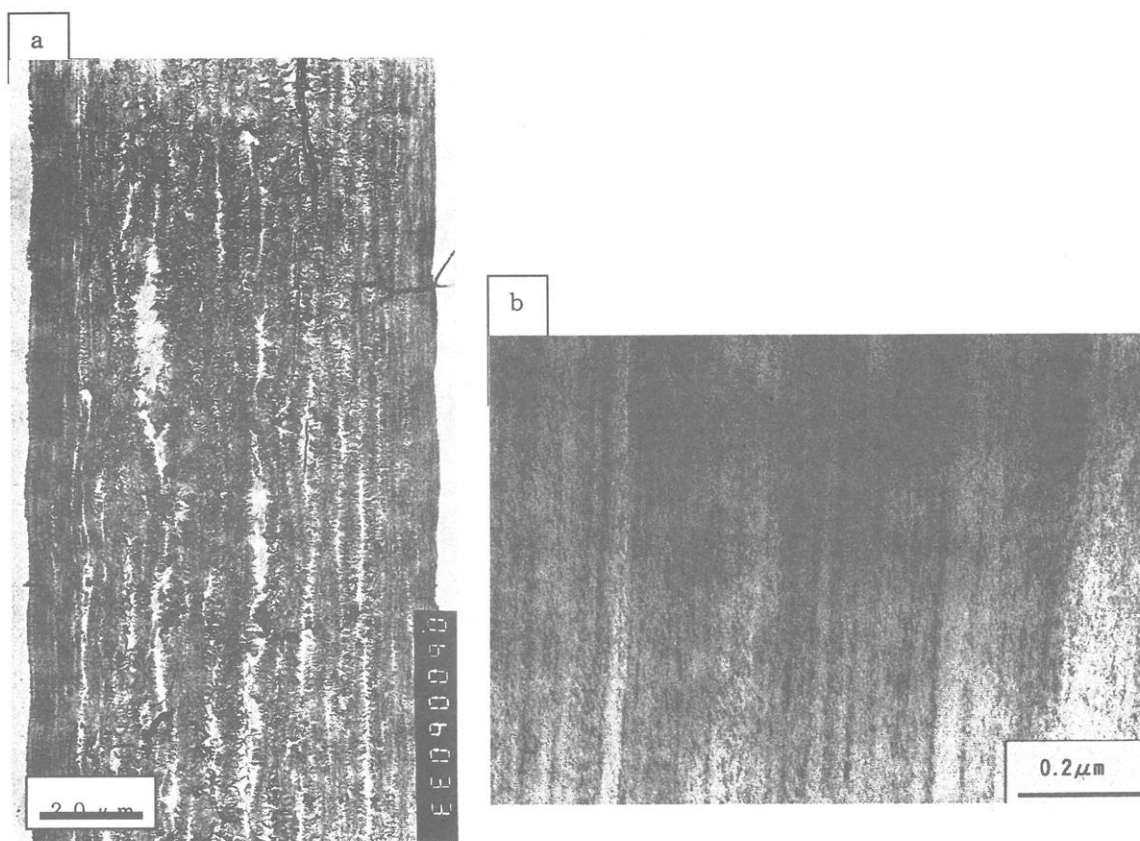


図5 UHMW-PE 繊維の繊維軸に対して平行かつ中心軸を通る面で切り出した超薄切片から得られた TEM 像：(a)As-Spun 繊維、(b)延伸糸（9 倍）

シカバブ構造の芯にあたる部分の構造がそのまま、最終的にはいわゆる繊維の基本骨格であるマイクロフィブリルに変化していることが判明した。(図 5(b):As-spun 糸を 9 倍延伸したもの) また、この変形の過程でシシ部の太さは大きく変化しないという結果を得た。[9]過去に Pennings らによっても、希薄溶液のクエット流の下で得られたシシカバブ構造が、作成される条件によっては延伸が可能であるとの報告はあるが[10]、本系では特に As-spun 糸中にあるシシカバブ状の構造において、伸びきり鎖のように見えるシシの内部でも、分子鎖は高温下では非常にスムーズな滑り変形(拡散)を起こしていることを示唆している点が興味深い。逆に言えば、このシシ状の構造を介在してカバブ構造(折畳み鎖結晶)からシシ(マイクロフィブリル)状構造(伸びきり鎖結晶)へ無理なく転換されていることが超延伸における分子変形メカニズムのポイントであると推定される。

2-3 UHMW-PE 繊維の動的粘弾性特性とクリープ特性に及ぼす短鎖分岐等の影響[11, 12]

前段で分子が高度に配向した結晶内部(シシ内部)でも、分子鎖間の滑りが容易に起る点はポリエチレンでいわゆる超延伸が成功した理由として重要である。伸びきり状の結晶内部での分子-分子間のスリップが超延伸の主要なメカニズムと仮定すると、リニアな UHMW-PE に若干量の短鎖メチル分岐を導入(プロピレンとの共重合化)することで、分子鎖のすべりが大きく影響を受けることが予測される。

図 6 は分岐がほとんど無い UHMW-PE と分岐が若干量多い UHMW-PE より作成されたほぼ同程度の弾性率を有する繊維の種々の温度で求めたクリープ速度のアレニウスプロットでの比較である。(一定荷重: 0.77GPa) 予想通り、ごく少量のメチル分岐を導入するとクリープ速度が広範囲な温度で著しく低減し、また温度依存性の傾き(活性化エネルギー)も大きくなることが判明した。ここで、式(1)を用いて、クリープ速度の温度・荷重依存性から見かけの活性化エネルギーと活性化体積を種々の分岐度と延伸倍率の異なる試料で比較した。結果、活性化エネルギーは分岐の量にほぼ比例して高くなる(すなわち分子スリップするためのポテンシャルエネルギーの障壁が高くなる)一方で、活性化体積は分岐の量には依存せず、繊維の弾性率(延伸倍率)の増加とともに小さくなり、最終の延伸糸では分子鎖一本が占める断面積に近いオーダー(10-20Å³)であることが判明した。

$$\dot{\epsilon} = \epsilon_0 \exp\{(-E + \sigma V)/kT\} \quad (1)$$

(ここで、 ϵ_0 は物質定数、 E は活性化エネルギー、 V は活性化体積、 σ は荷重、 T は絶対温度、 k はボルツマン定数)

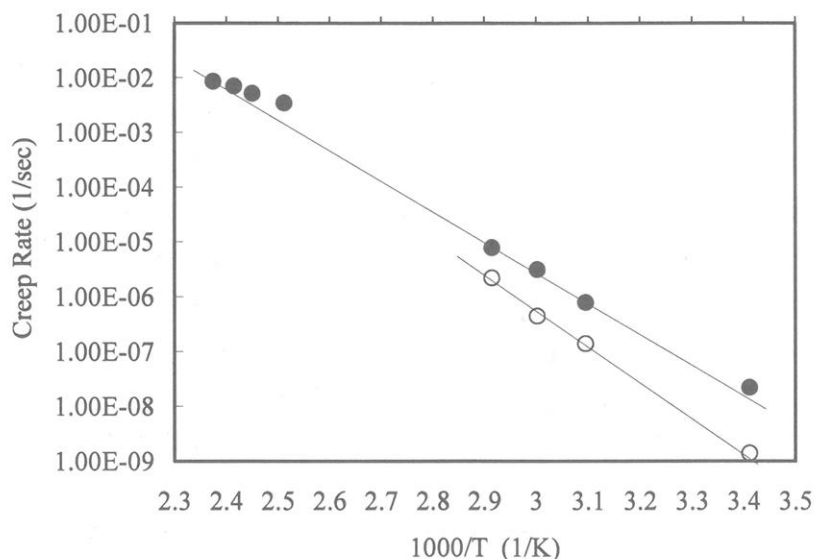


図6 分岐度の異なる UHMW-PE 繊維のクリープ速度の温度依存性：(●)分岐度 1.0CH₃/1000C (○) 分岐度 6.8CH₃/1000C

この事は、クリープ変形を支配する構造単位は分子鎖一本一本の滑りに対応し、ごく少量の分岐が延伸（特に超延伸では最終段階）を大きく阻害することを示唆している。さらに同じサンプルを用いて測定した動的粘弾性測定において、先ほどの分子のスリップ運動の活性化エネルギーは、結晶 α c 分散（微結晶内部での分子鎖間の滑りによる緩和）のそれにほぼ一致することが得られている。[12]この結果はクリープや延伸などの粘性的な大変形が主に微結晶内の分子鎖間のすべり現象に由来していることを示唆している。[13]以上、延伸過程をクリープ実験で解析しようとする点等は間接的な解析であり、より直接的なエビデンスを求めて現在報告者らは、シンクロトロン放射光下での延伸時の結晶構造や分子コンフォメーションの変化の研究を継続しており、今後さらに超延伸のメカニズムを明らかにしていきたいと考えている。[14]

3. 終わりに

ゲル紡糸における構造発現機構は、その出発点として希薄溶液からの濃度揺らぎをスタートとする相分離の機構からして非常に複雑な過程であり、精緻な実験と議論が必要である。本報告での溶液構造から最終の延伸された繊維の構造までを結びつけての議論は非常に強引で乱暴な仮説を連ねているが、高強度ポリエチレン繊維の構造発現機構を考察する一つのたたき台としてご議論賜れば幸甚です。

謝辞

本研究を行うにあたり、種々ご指導を賜りました京都大学名誉教授 橋本竹治先生ならびに竹中幹人先生、西条賢二先生、JASRI の中前勝彦先生ならびに小寺賢先生、また共同研究者である東洋紡の村瀬浩貴博士はじめ研究員一同、ならび関係各位に衷心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) P. Smith and P. J. Lemstra, *J. Mater. Sci.*, **15**, 505(1980).: P. J. Lemstra, R. Kirschgbaum, T. Ohta and H. Yasuda, *Developments in Oriented Polymers-2'* (Ed. I. M. Ward), Eelsvier, New York, 1987, p. 39.
- 2) P. Smith, A. Boudet and H. Chanzy, *J. Mater. Sci.*, **4**, 13(1985).
- 3) J. M. Brady and E. L. Thomas, *J. Mater. Sci.*, **24**, 3311(1989).: *ibid.*, **24**, 3319(1989).
- 4) Y. Ohta, A. Kaji, H. Sugiyama and H. Yasuda, *Polym. Eng. Sci.*, **40**(11), 2414(2001).
- 5) T. Hashimoto and T. Kume, *J. Phys. Soc. Jap.*, **61**, 1839(1992).
- 6) H. Murase, T. Kume, T. Hashimoto, Y. Ohta, and T. Mizukami, *Macromolecules*, **28**, 7724(1995).
- 7) H. Murase, Y. Ohta, T. Mizukami, H. Yasuda, T. Kume and T. Hashimoto, *Proc. The International Symposium of Fiber Science and technology (ISF'94)*, p286(1994).
- 8) Y. Ohta, H. Murase and T. Hashimoto, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **43**, 2639(2005).
- 9) Y. Ohta, H. Murase and T. Hashimoto, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, submitted.
- 10) J. Smook, and A. J. Pennings, *J. Mater. Sci.*, **19**, 31(1984).: A. J. Pennings and J. Smook, *J. Mater. Sci.*, **19**, 3443(1984).
- 11) Y. Ohta, H. Sugiyama and H. Yasuda, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **32**
- 12) Y. Ohta and H. Yasuda, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **32**, 2241(1994).
- 13) M. Mansfield and R. H. Boyd, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, **16**, 1227(1978).
- 14) 村瀬浩貴、「第5回理研シンポジウム」予稿集(2004).: 阪本悟堂 他、繊維学会討論会予稿集, 2B03(2004).

高分子ゲルの遠心場での収縮挙動

瀧川敏算¹⁾, 浦山健治¹⁾, 堀中順一¹⁾, 野坂尚司¹⁾, 岡田真一²⁾, 渡辺宏²⁾

Toshikazu Takigawa, Kenji Urayama, Jun-ichi Horinaka, Shoji Nosaka, Shinichi Okada, Hiroshi Watanabe

1) 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻

2) 京都大学化学研究所

1. はじめに

高分子ゲルの膨潤のキネティクスは, “静止した溶媒の中を高分子網目が運動する” モデル (Diffusion Model)¹⁾ で取り扱われることが多い. このモデルは現象を非常に単純化しているため直感的には理解しやすいが, 実際のゲルの拡散現象を記述するには不十分である. 以前, 我々は高分子ゲル膜を溶媒が透過するとゲルは再膨潤することを報告した.²⁾ この溶媒流による膨潤は Diffusion Model では容易には説明できない. 溶媒が動くためである. 広範なゲルの膨潤挙動をより正確に記述するためには, 網目と溶媒との相対運動に着目する必要がある. このことは, 現在では多くの研究者に受け入れられている. 最近では網目の運動を溶媒と網目との相対運動に置き換えたモデル (Stress-Diffusion Coupling Model)³⁾ も提案され, 単純な系に限定されるが計算により膨潤挙動を推定することが可能になってきている. しかし, このモデルは非常に単純な系以外では計算が非常に複雑になるという問題がある.

遠心機のセル中にゲルを入れ遠心力を印加すると, 網目と溶媒の密度に差があれば, 網目が溶媒に対し相対的に移動する. この運動を解析することにより, ゲルの膨潤を支配する重要な因子である網目と溶媒との間の摩擦係数や浸透体積弾性率などを求めることができる. 遠心機の中での網目の相対運動を支配する運動方程式は上に示したどちらのモデルを用いても同じになるので, 取り扱いの容易な Diffusion Model を解析に用いても不都合は生じない. 本研究では, 遠心機の中にある網目の運動を実験により調べ, 得られた結果を Diffusion Model によって解析した.⁴⁾

2. Diffusion Model

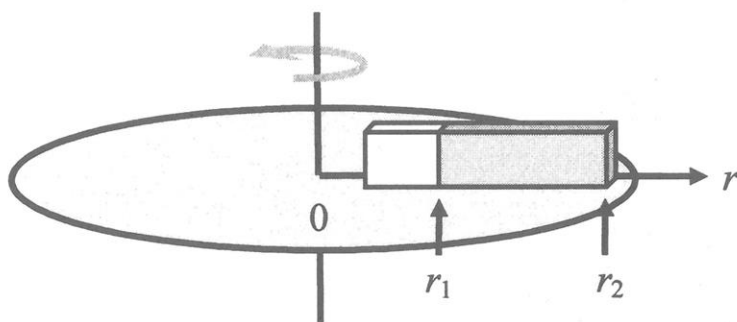


Figure 1 Schematic representation of a polymer gel in a centrifugal cell.

Figure 1 は遠心機中にある高分子ゲルを模式的に示した図である. セルの底面の位置が r_2 である. r_1 は, 時間 $t=0$ でのゲル—空気界面 (時間が経過した後は溶媒—ゲル界面) の位置である. この円盤上にある回転座標系では, 網目の運動方程式 (動径方向) は以下ようになる.

$$\frac{\partial u(r,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u(r,t)}{\partial r^2} + \frac{\phi \Delta \rho \omega^2}{f} r \quad (1)$$

ここで f は網目-溶媒間の摩擦係数, $D = (K + 4/3G)/f (\equiv L/f)$ は網目の拡散係数, K , G はそれぞれ体積弾性率, ずり弾性率である. $u(r,t)$ は位置 r , 時間 t での動径方向の変位, ϕ は網目の体積分率, $\Delta \rho$ は網目と溶媒の密度差, ω は角速度である. $t=0$ でローターが回転を始め, $\Delta \rho > 0$ (網目の密度の方が溶媒のそれよりも大きい) 場合には, (1)式の初期及び境界条件は,

$$\frac{\partial u(r_1,t)}{\partial t} = 0 \quad \text{at } t=0 \quad (2a)$$

$$u(r_2,t) = 0 \quad \text{at } r=r_2 \quad (2b)$$

となり, (2)式を満たす(1)式の解は,

$$u(r,t) = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \exp\left(-\frac{(2n-1)^2 t}{\tau_L}\right) + u_{\infty}(r) \quad (3)$$

となる. ただし,

$$A_n = \frac{16 a^2 \phi \Delta \rho \omega^2}{\pi^4} \left\{ \frac{(-1)^n \pi r_2}{(2n-1)^3} + \frac{2a}{(2n-1)^4} \right\} \cos \frac{(2n-1)\pi(r-r_1)}{2a}$$

$$\tau_L = \frac{4a^2}{\pi^2 D}$$

$$a = r_2 - r_1$$

$$u_{\infty}(r) = \frac{\phi \Delta \rho \omega^2}{6L} (r_2^3 + 3r_1^2 r - 3r_1^2 r_2 - r^3)$$

である. 網目の濃度($c(r,t)$)および濃度勾配($\partial c/\partial r$)は, (3)式から,

$$c(r,t) = \frac{c_0}{1 + \frac{\partial u(r,t)}{\partial r}} \quad (4)$$

$$\frac{\partial c(r,t)}{\partial r} = \frac{-c_0 \frac{\partial^2 u(r,t)}{\partial r^2}}{\left(1 + \frac{\partial u(r,t)}{\partial r}\right)^2} \quad (5)$$

となる. ただし, c_0 は初期濃度である.

3. 実験

超遠心機(Beckman Spinco Model E)のセル中でアクリルアミド (AAm) と N,N'-メチレンビスア

クリルアミド(BIS)(架橋剤)を共重合しポリアクリルアミド(PAAm)ゲルを作製した。溶媒には水、重合開始剤にはペルオキシ二硫酸アンモニウム(AP), 反応促進剤にはN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を用いた。水溶液中の全モノマー重量濃度は3%, AAmとBISのモル濃度の比, $[AAm]/[BIS]$ は100である。ゲル化終了後, 超遠心機のローターにセルをいれ, 一定の回転速度下でゲルの収縮挙動を観察した。全ての測定において温度は25℃であった。シュリーレン光学系を用いてセル内の濃度勾配を観察し, ゲル-溶媒界面の位置の時間変化を追跡した。ポリビニルアルコール(PVA)ゲルについても同様の実験を行った。ジメチルスルフォキシド(DMSO)と水の混合物(重量比でDMSO:水=4:1)溶媒として用いた。PVAの濃度は3.2%であった。

4. 結果と考察

Figure 2に回転速度が $1.80 \times 10^4 \text{ rpm}$ (遠心加速度 $\alpha = r_1 \omega^2 / g = 2.26 \times 10^4 G$; g : 重力加速度)におけるPAAmゲルのシュリーレン写真を示す。シュリーレン光学系では空気-溶媒界面および溶媒-ゲル界面の位置は濃度勾配の発散として現れる。回転開始からほとんど時間が経過していない $t = 6.00 \times 10^2 \text{ s}$ ではゲルの収縮は観察されず, 界面の位置は回転前の位置にある。 $t = 9.38 \times 10^4 \text{ s}$ では溶媒-ゲル界面のセル底方向への移動, すなわちゲルの収縮が観察される。ゲル相での濃度勾配は(5)式とは少し異なり, 溶媒-ゲル界面付近に比較的大きな濃度勾配が現れている。一方, 空気-溶媒界面は, 溶媒が非圧縮性的のために, 動いてはいない。さらに長時間後($t = 6.95 \times 10^5 \text{ s}$)にはゲルはさらに収縮し, 定常状態に達した。また回転停止から十分な時間が経過すると収縮は完全に消失する。このことから遠心力による収縮によってゲルに不可逆的な構造変化が起きていないことがわかる。

Figure 3に回転速度が $1.80 \times 10^4 \text{ rpm}$ ($\alpha = 2.26 \times 10^4 G$) および $6.00 \times 10^4 \text{ rpm}$ ($\alpha = 2.57 \times 10^5 G$)でのPAAmゲルのゲル-溶媒界面の位置の時間変化を示す。図中の r は, 回転中心から溶媒-ゲル界面までの距離であり, $t = 0$ での r (r_1)は遠心前の空気-ゲル界面の位置に相当する。どちらの回転速度の場合も, 遠心後の初期段階では, ゲルはほぼ一定の速度で収縮することがわかる。比較的短時間領域での溶媒-ゲル界面の移動速度(v)は, (3)式から,

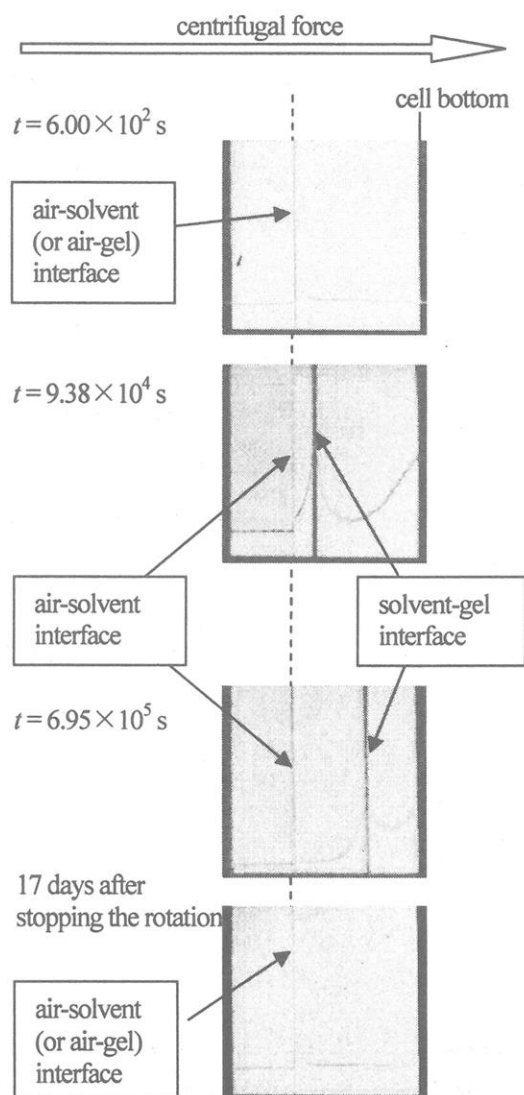


Fig. 2 The Schlieren patterns in the shrinking process of a PAAm gel at the centrifugal acceleration $\alpha = 2.26 \times 10^4 G$ as a function of time. The last column shows an example of the patterns sufficiently long after stopping the rotation.

$$v = \frac{\partial}{\partial t} u(r_1, t) \approx \frac{\phi \Delta \rho r_1 \omega^2}{f} \quad (6)$$

となる。すなわち、比較的短時間領域では、界面の移動速度は遠心力と摩擦係数の比で決まることになる。

回転速度が 1.80×10^4 rpm の場合では、長時間後に収縮が定常状態に達していることもわかる。長時間領域では、(3)式の定常解の $r=r_1$ での値 $u_\infty(r_1)$ が、

$$u_\infty(r_1) = \frac{\phi \Delta \rho \omega^2}{6L} (2r_1^3 - 3r_1^2 r_2 + r_2^3) \quad (7)$$

となるため、定常状態でのゲルの大きさ（収縮の程度）は遠心力と縦波の弾性率 ($L = K + (4/3)G$) の比で決まることがわかる。

この図中の実線は(3)式を $n=1$ の項のみを含む式で近似し、その式を用いてフィッティングした結果である。曲線は実験点はほぼ再現できることがわかる。この結果から PAAm ゲルでは、 $f = 9.2 \times 10^{13} \text{ Nsm}^{-4}$, $L = K + (4/3)G = 1.5 \times 10^4 \text{ Pa}$ と見積ることができた。

Figure 4はPVAゲルの溶媒-ゲル界面の移動速度(v)の α 依存性である。PAAmゲルでは測定点を増やすことができなかったが、PVAゲルでは広い α の範囲で v を測定することができた。図からわかるように、 $v \propto \alpha(\propto \omega^2)$ の関係がかなり広い α の範囲で成立していることがわかる。

文献

- 1) T. Tanaka, L. O. Hocker, G. B. Benedek, *J. Chem. Phys.*, **59**, 5151 (1973); T. Tanaka, D. J. filmore, *J. Chem. Phys.*, **70**, 1214 (1979).
- 2) T. Takigawa, K. Uchida, K. Takahashi, T. Masuda, *J. Chem. Phys.*, **111**, 2295 (1999).
- 3) T. Yamaue, M. Doi, *Phys. Rev.*, **E 69**, 041402 (2004).
- 4) K. Urayama, S. Okada, S. Nosaka, H. Watanabe, T. Takigawa, *J. Chem. Phys.*, **122**, 024906 (2005); S. Nosaka, S. Okada, Y. Takayama, K. Urayama, H. Watanabe, T. Takigawa, *Polymer*, **46**, 12607 (2005).

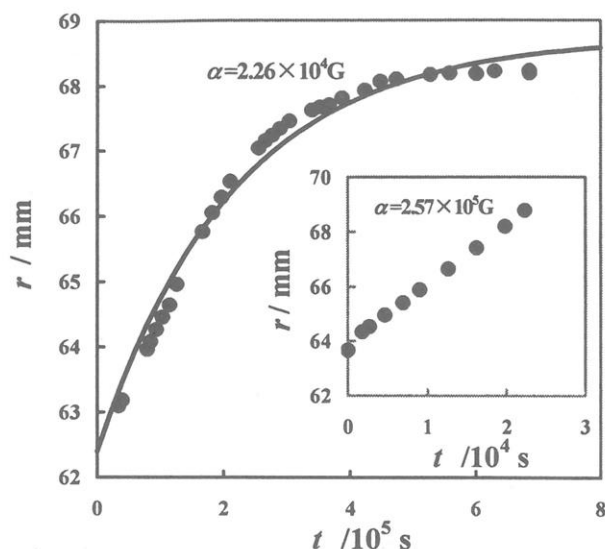


Fig. 3 Position of the solvent-gel interface of a PAAm gel as a function of time at the centrifugal acceleration of $\alpha = 2.26 \times 10^4 \text{ G}$. The inset shows the same plots for the data at $\alpha = 2.57 \times 10^5 \text{ G}$.

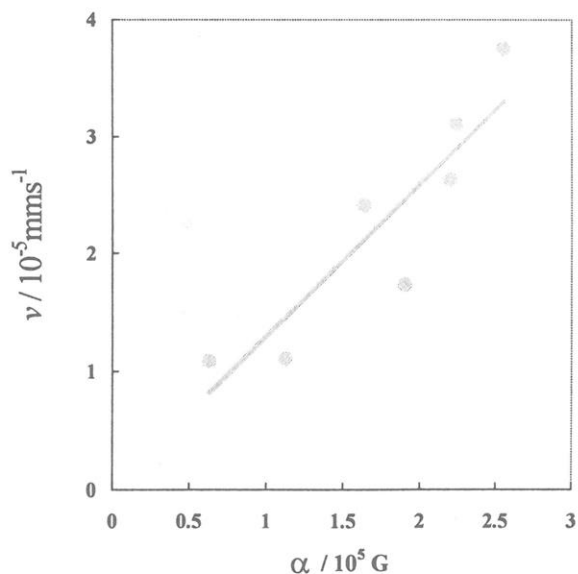


Figure 4 Plots of velocity (v) against centrifugal acceleration (α) for PVA gels.

ソフトマターにおけるナノ構造の 3D-TEM による可視化

糴谷信三¹・加藤 淳²

Shinzo Kohjiya, Atsushi Kato

¹京都大学化学研究所, ²(株)日産アーク研究部

要旨

ソフトマターとしてカーボンブラックを天然ゴムマトリックスに分散させたナノコンポジットを対象として、カーボンブラックの分散状態を透過型電子顕微鏡 (TEM) とコンピュータトモグラフィーを組合せた手法 (3D-TEM) により三次元的に可視化することができた。ナノフィラーであるカーボンブラックがゴム中で凝集してアグリゲートを形成していることが明らかとなり、そのサイズと分布、形状を示すパラメータとしてのアスペクト比などの計測が可能となった。さらにアグリゲートの凝集によりアグロメレートが形成され、ゴム中でアグロメレートはネットワーク構造となっていることも可視化像からわかった。カーボンブラックの体積抵抗率測定は、容積分率 0.17 付近をしきい値としてパーコレートすることを示し、さらに 3D-TEM に基づく構造パラメータとの比較から電子がカーボンアグリゲート間の距離約 3nm のゴム相をホッピングして導電性を示すことが推定された。3D-TEM により得られた構造パラメータと物性との相関の確立は、ナノテクノロジーを科学の土台の上で発展させる重要な役割を演じるであろうことが示唆される。

1. 緒言

物理科学の世界で、「21 世紀はエラストマー、ポリマーゲル、コロイド、液晶などソフトマターの世紀」といわれている^{1)~3)}。生物科学では、もともとソフトマターなしに生命は存在しえず、研究対象はソフトマターが圧倒的な比率を占めている。両者を合わせて前言は決して誇張ではない。一方で、ナノテクノロジーが近未来の技術として社会的に大きな注目を集めている^{3)~7)}。極言すれば、「ナノテクという名の妖怪が世界を徘徊している」中で、一方ではナノテクノロジーに対する過剰な期待感があり、他方では未だに正体のはっきりしないナノテクについての不安感も拡大しているのが現状であろう^{3),8)}。

このような状況の中で、サイエンスの立場からは「そろそろナノテクノロジーの定義、少なくとも範囲をはっきりさせるべきだ」というのは正論である。しかし、単に「ナノメートル(nm)レベル」と指定しても範囲は膨大である。何かキー(鍵)となる材料あるいはデバイスについて nm レベルでの構造(ナノ構造)を明らかにした上で、その合成(作製)方法や物性とナノ構造の相関を明らかにすることが、ナノテクの確立に必要な科学的手順の第一歩である。この観点からソフトマターのナノ構造を全面的に(たとえば三次元的に)解明することが、ナノテクノロジーが科学の世界で一分

野として成立するための突破口になりうると考えられる^{3),9)}。ここで英語のテクノロジーは「技術」と「技術学」の両方の意味を含んでいるので、ナノテクノロジーを nm レベルでの技術を対象とした科学の一分野として用いた。

ナノ構造解析にとって透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察が有効な手段であることは広く認められている¹⁰⁾。特に、TEM はサブ nm に至る高い分解能で構造を可視化する点でユニークであり、もし三次元構造の可視化が nm レベルで可能となれば、物性との相関の確立を通じて、サイエンスとしてのナノテクノロジーに大きな貢献が期待できる。TEM を用いた三次元 (3D) 像の構築は構造生物学では 1970 年前後にスタートして^{11),12)}、コンピュータトモグラフィーの発展とともに現在ではエレクトロントモグラフィーあるいは 3D-TEM として一般化している¹³⁾。しかし、材料科学の分野での 3D-TEM はごく最近始まったばかりであり^{14),15)}、最近の総説¹⁶⁾では高分子関係は 2 件^{17),18)}が引用されているに過ぎない。

バイオ以外のナノ材料においては nm 分解能が要求されることに加えて、結晶性の試料が多数あり微結晶による電子線回折が三次元像の再構築に大きな制約であった^{14),15),18)}。これは従来の TEM 像が結晶性試料を主対象として電子線回折が構造解析に大きな役割を果たしたことと対照的である¹⁰⁾。高分子系ソフトマターはバイオ分野と同じく結晶性試料以外にも多くの構造体があり、3D-TEM にとって一般的な明視野法の適用が容易である^{16),18)}。したがって結晶性試料については 3D-TEM の手法の適用は困難である。現在、最も有力とされているのは暗視野法の一つとして高角度散乱円環状検出暗視野 (HAADF) 法を用いる走査型 TEM、すなわち HAADF-STEM^{14),16),19)~21)}である。他にも電子エネルギー損失分光法 (EELS) を用いて元素識別型 3D-TEM も提唱されているが²²⁾、いずれの手法も照射された電子線の一部のみを像形成に用いるもので、三次元像構築にはかなりの無理が予想される。特に、電子線損傷を受けやすい有機高分子への適用には万全の注意が必要で、適用できる試料はかなり限定されると考えるべきであろう^{10),23)}。

2. ソフトマターの 3D-TEM 法によるナノ構造の可視化

ソフトマターの代表例として、ここではナノフィラー（代表例として nm オーダーの粒径を有するカーボンブラック）をゴムマトリックスに分散させたコンポジットを考える。日常的に私たちが目にする自動車タイヤのトレッドゴム（タイヤの接地面となる）は、タイヤの性能を決定づける重要なソフトマテリアルであり、ナノフィラーとゴムから成る複合体である^{24)~26)}。トレッドゴムの接地面に対するグリップ性、摩擦係数、耐摩耗性など実用上必須の特性を決定している最重要因子が、ゴム中でのナノフィラーの分散状態すなわちナノフィラーのモルホロジーである^{9),26)~28)}。Figure 1 にナノフィラーのゴム中での一般的なモルホロジーを示す。ナノフィラー粒子表面はゴム分子により濡れており、バウンドラバーあるいはフィラーゲルによって表面がカバーされていると考えられている。その一方で、フィラー間の相互作用によってナノ

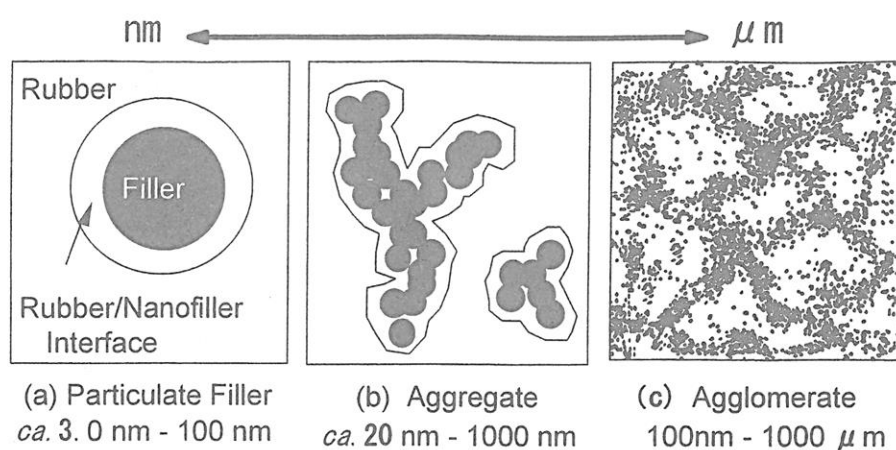


Figure 1 Morphology of nanofiller in rubbery matrix: Nanoparticles are aggregated, and the aggregates also associate to give agglomerates in rubber.

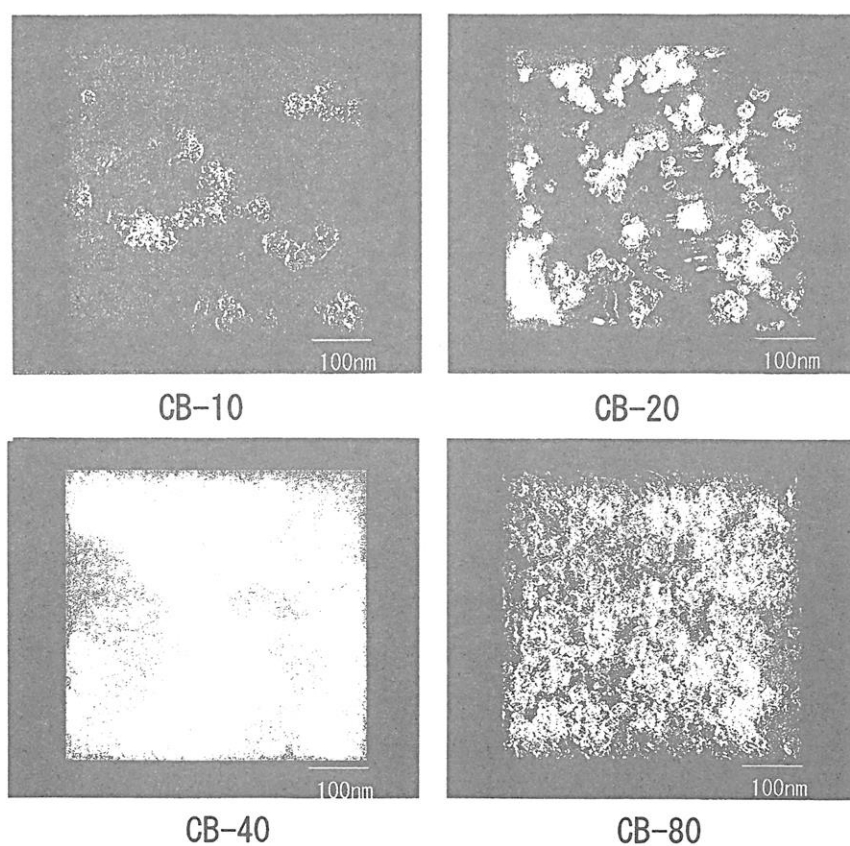


Figure 2 Bright-field 3D-TEM images of carbon black (CB) filled NRs in black and white display. CB is in white. The numerals after CB represent amount of mixed CB in phr (parts per 100 rubber in weight).

フィラーは基本的にアグリゲート（凝集体）として存在している。アグリゲートがさらに相互作用をもって会合すると、より大きなサイズのアグロメレートを形成する。ゴムの中で、アグロメレートはネットワーク構造を形成すると考えられ、この擬似ネットワークが力学的性質を含めて多くの物性に影響を与えると解釈されてきた。ゴム材料設計にとって、フィラーの会合により生成するモルホロジーの制御は中心的課題であり、そのスタート点としてゴムマトリックス中でのナノフィラー分散状態を三次元的に可視化することは、永年に渡って技術者の「夢」であった。

エレクトロントモグラフィーすなわち 3D-TEM の確立以前から、ナノフィラーのモルホロジーは TEM を主要な武器として研究されてきた^{27)~30)}。TEM は nm 以下オンゲストルームオーダーの分解能を有しているが、三次元物体を二次元 (x,y) 平面に投影した像としての制約がある。すなわち、試料の厚み方向 (z 軸) の構造は累積した情報としてしか得られない。この限界への挑戦はソフトマターの材料科学分野でも以前から精力的に行われて来し論文もあるが^{29),30)}、一般的に認められる三次元像ではなかった。筆者らのグループは 2002 年に天然ゴム架橋体中におけるナノフィラーの 3D-TEM 像を得ることを目的とした研究を開始し、2003 年に高分子学会での発表³¹⁾を行った。シリカ粒子、カーボンブラック粒子のモルホロジーを三次元可視化像として得ることに成功し、一部物性との相関についても興味ある結果が得られるようになったので、これまでの結果をまとめて報告する。

三次元像の構築が実現すればその任意の断面解析が可能となり、通常の二次元的情報のすべてを得ることが可能である。3D-TEM 像を得るためのハードウェア（機器）については、鷹岡による簡潔な紹介があるので参考にされたい³²⁾。

本研究では (株) 日産アークに設置されている FEI Co. 製 TECNAI G2F20 を用い、加速電圧 200kV で明視野法により無染色試料の測定を行った。今回の試料では無機フィラーと有機ゴムマトリックスで十分なコントラストがあり、電子染色は不要であった。染色は有機高分子試料で高いコントラストを得る上で有効ではあるが、染色による変形や体積変化などが本質的には不可避であり、再構築された三次元像は元の試料のそれとは大なり小なり異なっている点に留意しなければならない。

測定には大きく二つのステップがあり、いずれのステップでもコンピュータが大きな役割を果たしている。まず、クライオミクロトームを用いて約 200nm 厚の試料を作製する。粒径 10nm の金コロイド粒子を試料に添加し、ホルダーに装てんする。試料グリッドを 2° ずつチルトさせながら電子線を照射して TEM 画像の取込みを行う。このチルトシリーズ TEM 画像取込みはコンピュータ制御により自動化されており、±65° のチルト角範囲で行った。ここまでの TEM 測定を行うステップで、トモグラフィーを中心として第 2 のステップは取り込まれた TEM データの二次元逆フーリエ変換像の積算により断面像を再構成し、三次元再構築像を得るものである。再構築に当たって像の位置合せあるいは像のズレの補正が、良好な 3D-TEM 像を得る上に極めて重要である。画像が同一視野を抽出する自動処理に加えて金コロイド粒子によるマ

Table 1 Recipes of NR compounding.^{a)}

Materials	CB-0	CB-5	CB-10	CB-20	CB-30	CB-40	CB-50	CB-60	CB-80
NR	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Steric acid	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Active ZnO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
CBS ^{b)}	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Sulfur	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Carbon black (CB)	0	5	10	20	30	40	50	60	80
CB volume fraction ^{c)}	0.0000	0.0255	0.0498	0.0949	0.1359	0.1734	0.2077	0.2393	0.2955

^{a)} Parts by weight per hundred parts of rubber.

^{b)} N-cyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide.

^{c)} Specific gravities of carbon black (HAF) and vulcanized NR are 1.85 and 0.97 g/cm³.

ーキング (Fiducial Marker Method) を行った。ソフトウェアとしては IMOD³³⁾および amira³⁴⁾が世界的に用いられている。

三次元像が再構築された後にもコンピュータ技術が大きな役割を演ずる。つまり、三次元像の可視化、種々の画像処理による表現 (三次元像をどのように魅力的なプレゼンテーションにするかも大切であろう)、三次元像から種々の構造パラメータの計測などである。

3. カーボンブラック／天然ゴム系の 3D-TEM

ゴム用補強性ナノフィラーとして、100 年におよび歴史を有するカーボンブラックが今も最も広く使用されている。カーボンブラックの消費量の 9 割はタイヤ用である²⁸⁾。ゴム材料設計の中核の 1 つがカーボンブラックの選択とその混合方法であり、ゴム架橋体中でその分散状態が力学的特性をはじめとするゴム製品 (たとえばタイヤ) の物性を支配している^{24)~28)}。ゴム用カーボンブラックは 10nm~50nm の粒径を有しオイルファーネス法で製造され、製造時に凝集してアグリゲート、さらにアグリゲートの会合によるアグロメレートを形成している。バンバリーミキサーなどゴムへの機械的混合操作中に、発達したアグロメレートの一部は崩壊してゴムマトリックス中に分散するが、アグリゲートは細分化されない。

Table 1 にゴム試料の配合を示す^{35)~38)}。2 本ロール機によりこれらを混合して配合物を得、金型を用いて 145°C で加硫を圧縮成形法により行って天然ゴム架橋体試料 (厚さ 1mm のシート状) を得た。Figure 2 にカーボンブラック (CB) 10, 20, 40, 80phr (ゴム 100g に対する CB の g 数) 配合 NR の 3D-TEM 像を示す³⁸⁾。コントラストは逆になっており図中の白い部分が CB である。CB-10 では CB の容積分率は 0.05 であるが CB はアグリゲートとして存在していることが明らかである。このことはゴムマトリックス中の CB が混合量のいかんにかかわらずフラクタルとして存在していることを示している^{39),40)}。CB-40 になると (CB の容積分率 0.17) アグリゲートのつながり (アグロメレート) がパーコレートしてネットワーク構造の形成を示唆している。

nm オーダーで三次元像を構築できた意義は各種の構造パラメータがこの三次元像から定量的に評価できることにある。Table 2 に得られた結果の一部を示す^{38)~40)}。3D-TEM 像の解析により得られる情報は膨大であるが、問題は計算のためのソフトウェアである。一般的なソフトウェアで評価できる範囲は限られており、目的に沿ったソフト開発の質と量が勝負といえるかもしれない。Table 2 に示した CB アグリゲート間の最近接距離 (dp) を CB 配合量に対してプロットすると Figure 3 の結果が得られる^{38),40)}。dp は CB40phr 付近で一定値 (約 3nm) に収束しており、CB アグリゲートの充填を密にしても相互の間には 3nm 程度のゴム相が存在することを示している。これを従来から考えられてきた、バウンドラバー (bound rubber) やフィラーゲル (filler gel) あるいはナノフィラー周囲に形成されるゴムの不動層 (immobilized layer) などの概念に対応するゴム相と考えることも可能であり、約 3nm という厚み

Table 2 Nanostructural parameters from 3D-TEM images of CB-filled NRs.

Parameter	CB-10	CB-20	CB-40	CB-80
Average diameter ^{a)}				
in nm	23.3 (10.2) ^c	26.4 (12.3)	30.1 (13.5)	39.2 (13.1)
Aspect ratio	2.22 (0.76)	2.56 (1.27)	2.27 (1.34)	1.84 (0.67)
d_p ^{b)} in nm	4.88 (3.70)	3.81 (5.00)	3.21 (4.46)	2.70 (1.23)

^{a)}Diameter of the equivalent sphere of the same volume for each aggregate.

^{b)}Distance between the rim of two neighboring aggregates.

^{c)}The numerals in the parentheses are the standard deviations.

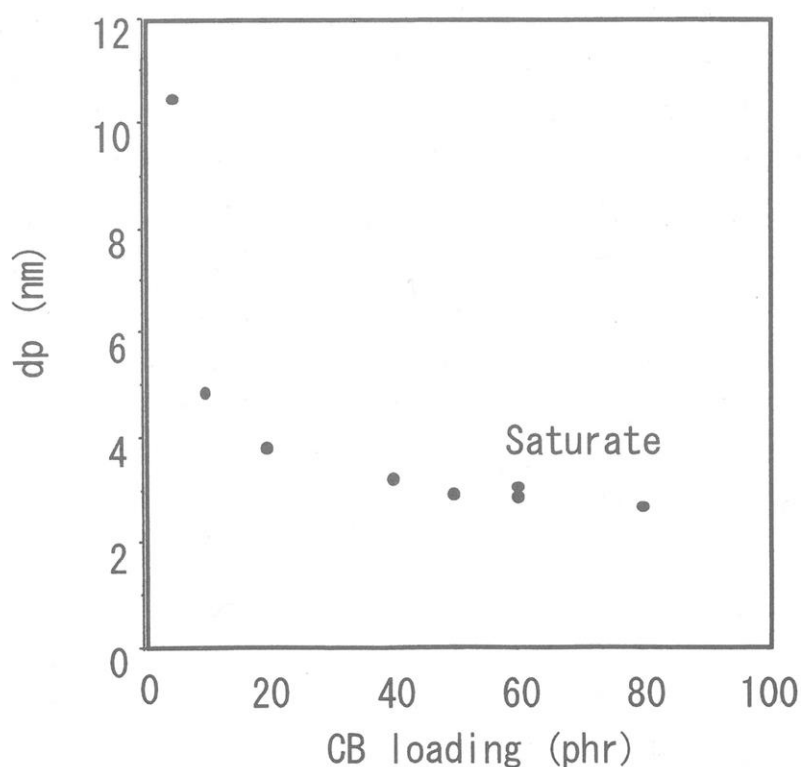


Figure 3 Dependence of the nearest neighboring distance between the CB aggregates (dp) on CB loading in NR.

も今までの多数の報告例と矛盾しない^{41)~44)}。したがってこの結果は 3D-TEM により天然ゴム中での HAF ブラックの周辺バウンドラバーの厚みが検出できたと解釈できる。

カーボンブラックはシリカや炭酸カルシウムなどと異なり導電性を有している。カーボン配合天然ゴムの体積抵抗率を測定すると Figure 4 のようになった⁴⁰⁾。ゴムは絶縁体であるが、HAF カーボンが 10phr 以上になると電気抵抗は急激に低下し（導電率は急上昇し）、40phr 付近から一定値に収束する傾向を示した。これはパーコレーションとして良く知られている挙動であり、40phr 付近に導電性を示すしきい値が存在すると考えられる。このしきい値は体積分率で約 0.173 であり、天然ゴムで今までに報告されている 0.13 から 0.17 の範囲にある⁴⁵⁾。

さらに興味深いことは、Figure 3, Figure 4 はカーボン配合量依存性が極めて似ている点である。導電性のデータから、電子は CB アグリゲート間の距離が約 3nm 以内であればホッピング (hopping) によりゴム相を飛び越えて隣接する CB アグリゲートへ移動可能であることになる。hopping が量子力学的なトンネル効果によるかどうかはともかく、nm レベルでは絶縁体も効果を失う例と解釈できる。したがって、電子が移動できるパスを結んでやると、パーコレーション後には導電パスがネットワーク状にゴムマトリックス全体に広がっていることになる。

隣接している（距離 3nm 以下）CB アグリゲートの重心を直線で結んで行くとゴムマトリックス中で CB が形成しているネットワーク構造の骨格が可視化できる。Figure 5 にこうして得られたネットワーク構造を示す⁴⁶⁾。CB のようなナノフィラーはゴム中でネットワーク構造を形成していることは、導電率の測定結果だけでなく、ペイン効果^{47)~49)}やマリンス効果⁵⁰⁾など力学的データからも古くから推定されてきたが⁵¹⁾、Figure 5 は長く想像の域を出なかったイメージを 3D-TEM の結果に基づいてみごとに可視化したものである。注意すべきことは、CB はその製造段階で凝集しており、パーコレーション以前の少量配合ゴム中でも擬似ネットワーク構造を形成していることである。パーコレーションは CB アグロメレートのネットワークが系全体に行きわたったこと（ゲル化と同じ）を示している。すなわち、CB 配合ゴム架橋体はゴム分子の架橋によるポリマーネットワークと CB アグリゲートによるネットワークを有し、ダブルネットワーク構造といえる。

4. ブロックコポリマー

1965 年、米国で発表された SBS（ポリスチレン-ポリブタジエン-ポリスチレンのトリブロックコポリマー、商品名 Kraton）は“架橋なしに使えるエラストマー”の歌い文句で世界中に大きな衝撃を与えた⁵²⁾。すでにポリ塩化ビニルあるいはポリウレタンが知られていたにもかかわらず、SBS の出現は工業面で熱可塑性エラストマー（TPE）を新しい材料として世の脚光を浴びるに至らせた点で特筆すべきことであった。そして、“何故架橋なしにゴム弾性を示すのか？”および“カーボンブラックのよ

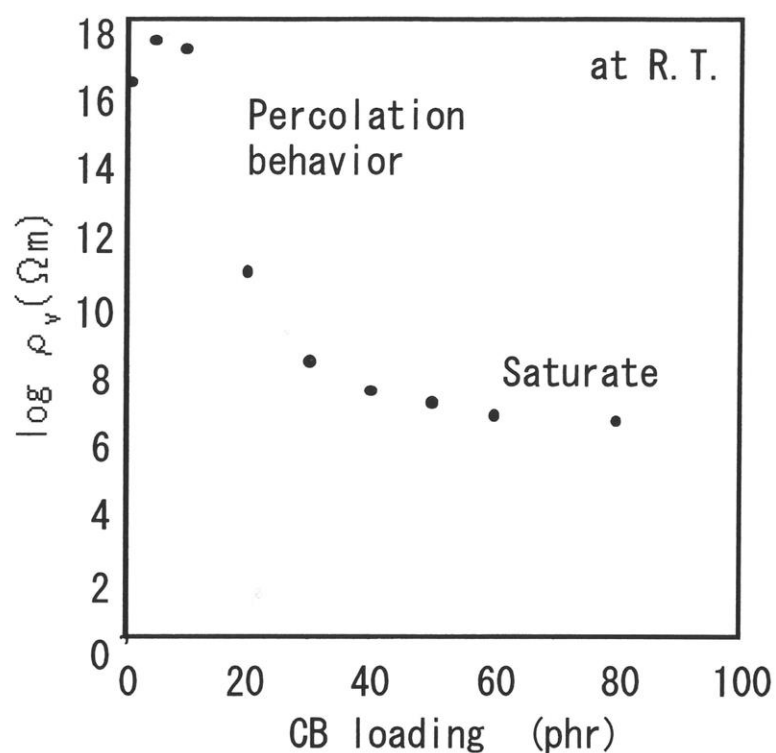


Figure 4 Dependence of volume resistivity of CB filled NR at room temperature on CB loading.

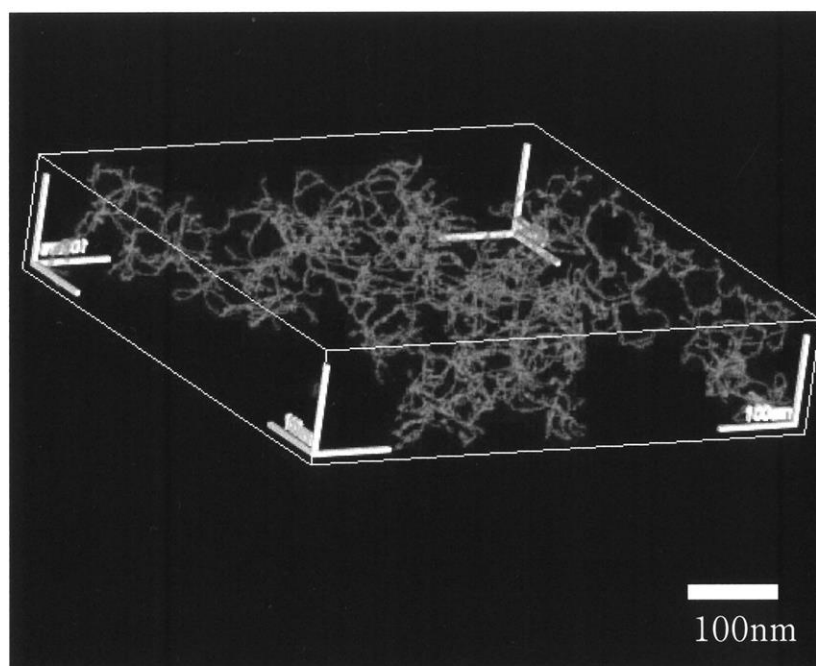


Figure 5 Skeltonized representation of network structure by agglomeration of CB aggregates in NR based on 3D-TEM image of CB-40 and electron-conductivity results.

うなフィラーなしに優れた力学的特性を示すのは何故か？”を問題意識として当時の有力な高分子科学者が集まってシンポジウムが開催された⁵³⁾。このシンポジウムに刺激されて日本を含めて世界の多くのグループが、今日言うところの「ミクロ相分離構造」の解明に向かって行った。この潮流は Molau による前記疑問への一応の回答⁵⁴⁾にも留まることはなく、「ミクロ」から「ナノ」へとかなり初期に展開され、現在では高分子分野でのナノテクノロジーの基盤の一つと目されている⁵⁵⁾。

ブロックコポリマーの「ナノ相分離構造」の 3D-TEM による可視化も、当然早くから検討されたが^{56),57)}、再構築された三次元像は十分に鮮明なものではなかった。実質的には長谷川らによるもの^{17),55)}がブロックコポリマーの 3D-TEM 解析の最初の例といえる。しかし、TEM 測定のベースは電子染色を行った試料であり、観測されたナノ構造の体積分率などの構造パラメータ計測は保留が必要と思われる。特に重金属 (Os や Ru) による染色⁵⁸⁾では重金属の粒状化の可能性が否定できず、この場合モルホロジー観察では大きな問題ではないが、nm サイズの構造解析には障害となる。ソフトマテリアルとして nm オーダーの「ナノ相分離」を利用した各種ブロック共重合体が示す多様なナノ構造は魅力的であるが、3D-TEM 観察においては、電子染色と電子線損傷の 2 点に十分に注意を払う必要がある。

5. 結言

高分子への適用はいまだ初期段階ではあるが、バイオ分野で発展して来た 3D-TEM あるいはエレクトロントモグラフィーの手法が、ナノテクノロジーとの関係も含めて大きな注目を集めている。有機高分子の場合、通常の TEM でも問題であった電子線損傷が 3D-TEM ではより深刻であることに注意しなければならない。また重金属を用いた電子染色はナノ構造を変化させる可能性があり、再構築された三次元像から計測された構造パラメータの扱いには慎重さが必要である。天然ゴムの場合には、照射効果が架橋と分解で相半ばしており⁵⁹⁾、無機フィラーとの組合せでは比較的問題の少ない幸運な場合といえる。また、ゴムの硫黄架橋体では金属亜鉛の除去も鮮明な画像形成に有効であった^{18),26)}。3D-TEM における分解能の評価もいまだ確立していない問題点である。3D-TEM では試料傾斜とそれに伴う試料厚みの変化の補正、三次元像再構築のためのトモグラフィー処理にともなう問題点など定量的な評価方法は現在も模索段階にある。総合的には数 nm の分解能は達成されつつあると考えられており、最近では 1nm の分解能も報告されている⁶⁰⁾。

これらの問題点にもかかわらず、ソフトマターとしての高分子は非晶質性が基本であることから、明視野法 3D-TEM の絶好の対象であり^{16),18),38),61)}、研究論文はさらに増加してゆくものと思われる。明視野以外の 3D-TEM を志向した手法について、筆者らはいささか悲観的であるが、最近、展開を見せている位相コントラスト TEM^{62),63)}の三次元像形成への試み⁶⁴⁾は注目に値する。この方法では試料に照射された電子線はすべて像形成に用いることができるので、ブロックコポリマーのように有機高分子の

みから成る系に対しても適用可能だからである。

すでに確立した明視野法 3D-TEM の他にもいくつかの手法の発展により，ソフトマターの nm レベルでの三次元構造解析が進展し，ナノテクノロジーの確立に大きく貢献することが大きく期待される。

文献

- 1) I. W. Hamley, *"Introduction to Soft Matter"*, Wiley, Chichester, U.K. (2002).
- 2) M. Kleman and O. D. Lavrentovich, *"Soft Matter Physics"*, Springer, Berlin (2002).
- 3) 糴谷信三, "ナノテクノロジーとソフトマター", ゴム技術フォーラム編, ポスティブコーポレーション, 東京 (2005), pp.1-7.
- 4) K. E. Drexler, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 5275 (1981).
- 5) K. E. Drexler, *"Engines of Creation : The Coming Era of Nanotechnology"*, Anchor Press, New York (1986).
- 6) K. E. Drexler, *"The Materials Revolution"*, T. Forester, ed., The MIT Press, Cambridge (1998), Chap. 20.
- 7) D. Mulhall. *"Our Molecular Future"*, Prometheus Books, New York (2002).
- 8) 糴谷信三, "第 18 回公開フォーラム予稿集", 日本ゴム協会ゴム技術フォーラム (2005 年 4 月, 東工大百年記念会館), pp.1-8.
- 9) 池田裕子, *繊維学会誌*, 61, P34 (2005).
- 10) M. Tsuji and S. Kohjiya, *Prog. Polym. Sci.*, 20, 259 (1995).
- 11) D. DeRosier and A. Klug, *Nature*, 217, 130 (1968).
- 12) W. Hoppe, J. Gassman, N. Hunsmann, H. J. Schramm, and M. Stur, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 355, 1483 (1974).
- 13) *"Electron Tomography : Three-Dimensional Imaging with the Transmission Electron Microscope"*, J. Frank, ed., Plenum Press, New York (1992).
- 14) M. Weyland, *Topics in Catalysis*, 21, 175 (2002).
- 15) K. P. de Jong and A. J. Koster, *Chem Phys Chem*, 3, 776 (2002).
- 16) M. Weyland and P. A. Midgley, *Materials Today*, 7(12), 32 (2004).
- 17) K. Yamauchi, K. Takahashi, H. Hasegawa, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, T. Kaneko, Y. Nishikawa, H. Jinnai, T. Matsui, H. Nishioka, M. Shimizu and H. Furukawa, *Macromolecules*, 36, 6962 (2003).
- 18) Y. Ikeda, A. Katoh, J. Shimanuki, and S. Kohjiya, *Macromol. Rapid Commun.*, 25, 1186 (2004).
- 19) 田中信夫, *顕微鏡*, 39, 26(2004).
- 20) P. A. Midgley, M. Weyland, J. M. Tohmas, and B. F. G. Johnson, *Chem. Commun.*, 2002, 907.

- 21) P. A. Midgley and M. Weyland, *Ultramicroscopy*, **96**, 413 (2003).
- 22) 陣内浩司, *日本ゴム協会誌*, **76**, 384 (2003).
- 23) 辻 正樹, 藤田雅弘, 糴谷信三, *日本レオロジー学会誌*, **78**, 180 (2005).
- 24) “新版ゴム技術の基礎”, 日本ゴム協会編, 日本ゴム協会, 東京 (1999).
- 25) “ゴムの事典”, 奥山通夫, 糴谷信三, 西 敏夫, 山口幸一編, 朝倉書店, 東京 (2000).
- 26) 加藤 淳, 池田裕子, 糴谷信三, *日本ゴム協会誌*, **78**, 180 (2005).
- 27) “*Reinforcement of Elastomers*”, G. Kraus, ed., Interscience, New York (1965).
- 28) J.-B. Donnet, R. C. Bansal, and M.-J. Wang, “*Carbon Black*”, Marcel Dekker, New York (1993).
- 29) C. R. Herd, G. C. McDonald, and W. Hess, *Rubber Chem. Technol.*, **65**, 107 (1992).
- 30) T. C. Gruber, T. W. Zerda, and M. Gerspacher, *Rubber Chem. Technol.*, **67**, 280 (1994).
- 31) 加藤 淳, 島貫純一, 叶際平, 澤部壽宏, 須田敬也, 西岡麻依子, 児嶋伸夫, 池田裕子, 糴谷信三, *高分子学会予稿集*, **52**, (2003年9月, 山口), p.2331.
- 32) 鷹岡昭夫, *顕微鏡*, **39**, 11 (2004).
- 33) Boulder Lab. for 3-D Electron Microscopy of Cells, The IMOD Home Page, <http://bio3d.colorado.edu/imod/index.html>.
- 34) The TGS Co. Home Page, <http://tgs.com>.
- 35) S. Poompradub, M. Tosaka, S. Kohjiya, Y. Ikeda, S. Toki, I. Sics and B. S. Hsiao, *J. Appl. Phys.*, **97**, 103529 (2005).
- 36) 長谷川利則, 加藤 淳, 島貫純一, 澤部壽宏, 権田まゆみ, 西岡麻依子, 児嶋伸夫, 須田敬也, 池田裕子, 糴谷信三, *高分子学会予稿集*, **53**, (2004年5月, 神戸), p.917.
- 37) S. Kohjiya, A. Kato, J. Shimanuki, Y. Ikeda, M. Tosaka, S. Poompradub, S. Toki, and B. S. Hsiao, Paper 33 presented at ACS Rubber Div. 167th Spring Meeting (May 2005, San Antonio, TX).
- 38) S. Kohjiya, A. Kato, J. Shimanuki, T. Hasegawa, and Y. Ikeda, *J. Mater. Sci.*, **40**, 2553 (2005).
- 39) 加藤 淳, 島貫純一, 澤部壽宏, 権田まゆみ, 須田敬也, 児嶋伸夫, 西岡麻依子, 長谷川利則, 池田裕子, 糴谷信三, *高分子学会予稿集*, **54**, (2005年5月, 横浜), p.712.
- 40) 糴谷信三, 西本一夫, 加藤 淳, 島貫純一, 須田敬也, 池田裕子, *高分子学会予稿集*, **54**, (2005年5月, 横浜), p.713.
- 41) 藤本邦彦, *日本ゴム協会誌*, **37**, 602 (1964).
- 42) S. Fujiwara and K. Fujimoto, *Rubber Chem. Technol.*, **44**, 1273 (1971).

- 43) 西 敏夫, 表面, 20, 316 (1982).
- 44) 深堀美英, 日本ゴム協会誌, 77, 18 (2004).
- 45) N. Probst, Ref. 28), Chap. 8.
- 46) S. Kohjiya, A. Kato, T. Suda, J. Shimanuki, and Y. Ikeda, *Polymer*, 投稿中.
- 47) A. R. Payne, *J. Polym. Sci.*, 6, 57 (1962).
- 48) A. R. Payne, *Rubber Chem. Technol.*, 36, 432 (1963).
- 49) A. R. Payne and R. E. Whittaker, *Rubber Chem. Technol.*, 44, 440 (1971).
- 50) L. Mullins, *Rubber Chem. Technol.*, 42, 339 (1969).
- 51) 五十野善信, 日本ゴム協会誌, 78, 176 (2005).
- 52) “*Thermoplastic Elastomers*”, 2nd edition, G. Holden, N. R. Legge, R. Quirk, H. E. Schroeder, eds., Hanser, Munich (1996).
- 53) アメリカ化学会とカリフォルニア工科大学が共催して 1967 年 6 月にカリフォルニア州パサデナで開催された. その成果は *J. Polym. Sci.*, C26 (1969) に特集号として発表されている.
- 54) “*Colloidal and Morphological Behavior of Block and Graft Copolymers*”, G. E. Molau, ed., Plenum Press, New York (1970).
- 55) 長谷川博一, “ナノテクノロジーとソフトマター”, ゴム技術フォーラム編, ポステイコーポレーション, 東京 (2005), pp.8-14.
- 56) R. J. Spontak, J. C. Fung, M. B. Braunfeld, J. W. Sedat, D. A. Agard, L. Kane, S. D. Smith, M. M. Satkowski, A. Ashraf, D. A. Hajduk, and S. M. Gruner, *Macromolecules*, 29, 4494 (1996).
- 57) J. H. Laurer, D. A. Hajduk, J. C. Fung, J. W. Sedat, D. A. Agard, and R. J. Spontak, *Macromolecules*, 30, 3938 (1997).
- 58) K. Kato, *Polym. Eng. Sci.*, 7, 38 (1967).
- 59) S. Kohjiya, Y. Matsumura, S. Yamashita, H. Yamaoka, and T. Matsuyama, *J. Mater. Sci. Lett.*, 3, 121 (1984).
- 60) 田中信夫, 日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会(2005 年 6 月, 筑波), 講演番号 IB-01.
- 61) S. Kohjiya, A. Katoh, J. Shimanuki, T. Hasegawa and Y. Ikeda, *Polymer*, 46, 4440 (2005).
- 62) R. Danev and K. Nagayama, *Ultramicroscopy*, 88, 243 (2001).
- 63) 永山国昭, 電子顕微鏡, 38, 29 (2001).
- 64) 登阪雅聡, 糺谷信三, D. Radstin, 永山国昭, 高分子学会予稿集, 54, 776 (2005).

濃厚ポリマーブラシの構造と物性

福田 猛、辻井敬亘、大野工司、後藤 淳

Takeshi Fukuda, Yoshinobu Tsujii, Kohji Ohno, Atsushi Goto

京都大学化学研究所

1. はじめに

表面は、材料と外界の相互作用の接点として極めて重要な役割を担っている。色や反射などの光学的性質、硬さ、滑らかさ、磨耗性といった力学的性質、さらには、吸・接着、透過・排除、防錆、触媒作用から他物質との混和・相溶や他物質への熱・電気伝導に至る様々な熱力学的、化学的、物理的諸現象はすべからず表面の性質に支配される。このため、表面の修飾・改質は科学技術の主要課題の一つとして、古くより様々な方法が考案され、研究され、実用されてきた。その中で、表面の性質を劇的に改変しうる一法として、表面にその一端を固定 (grafting: グラフト) された高分子からなる薄膜を付与する方法がある。材料表面に高分子薄膜を付与する方法は、高分子と表面の相互作用を利用する物理的方法と両者間に化学結合を導入する化学的方法に大別される。前者は、各種の塗膜作製法に加え、ラングミュア・ブロッジェット (LB) 法や交互吸着法などナノ構造膜の作製技術を含む。化学的方法には、既成の高分子と表面の官能基の反応による「grafting to」法と、表面に化学的に固定された開始基からの重合反応による「grafting from」法 (表面開始グラフト重合) がある。物理膜が耐熱性や耐溶剤性に欠け、力学的にも弱いのに対し、化学膜は、耐環境的にも、力学的にもより丈夫である。「grafting to」法と「grafting from」法を比較すると、前者では、反応の進行に伴って材料表面の高分子濃度が上昇するため、新たな高分子がこの濃度勾配に逆らって表面に到達する可能性が指数関数的に減少する。このため、反応は一定の限界値を超えて進行しない。この限界値が高分子の分子量とともに減少することは容易に理解される。一方、「grafting from」法では、材料表面に固定された高分子が、通常は低分子化合物であるモノマーや触媒の接近に対する障害となる程度ははるかに小さい。したがって、少なくとも原理的には、モノマーや触媒が入り込めないほど反応環境が密にならない限り、重合反応が進行しうると考えられる。

良溶媒中の高分子鎖は、膨潤したランダムコイル形態をとるが、固体表面にその一端を固定すると、その形態は高さ方向にやや歪んだものになると考えられる (マシユルーム形態: 図 1 参照)。グラフト鎖の表面密度が上昇し、マシユルーム同士が互いに重なり合うと、濃度の増大を避けるべく浸透圧が鎖を高さ方向に延伸する。この状態の分子組織を「ポリマーブラシ」と呼ぶ。比較的表面密度 σ の低いポリマーブラシは「準希薄ポリマーブラシ」と呼ばれ、“blob”概念に基づくスケーリング理論によると、その膨潤膜厚 L_e は次式で表される^{1)~4)}。

$$L_e \sim \beta L_c \sigma^{1/3} \quad (1)$$

ここで L_e は鎖の全長（伸び切り鎖長）、 β は溶媒力に依存する定数である。表面密度がさらに増大すると、グラフト鎖間の長距離相互作用が遮蔽される「濃厚ポリマーブラシ」領域に入り、 L_e は式（１）より大きな σ 依存性を持つと考えられる⁵⁾。上と同様なモデルによる予測は次のとおりである⁶⁾。

$$L_e \sim L_c \sigma^{1/2} \quad (2)$$

準希薄ブラシに対する式（１）は実験的に確認された（下記参照）。しかし、従来技術で合成しうる構造の明確なポリマーブラシは準希薄ブラシ領域までであり、グラフト鎖の表面占有率が約 10 % から数 10 % に及ぶ濃厚ブラシは最近まで実験的にほとんど未経験の領域であった。

著者らは、リビングラジカル重合の利用により、長さの揃ったグラフト鎖からなる濃厚ポリマーブラシの合成に世界に先駆けて成功し、式（２）の妥当性を検討するとともに、濃厚ブラシ中の柔軟な高分子鎖が、良溶媒中で伸び切り鎖長に匹敵するほど高度に伸張配向するという驚くべき事実を発見した。この他多くの点で、濃厚ブラシは準希薄ブラシとはまったく異なる、独自で斬新な性質を示すことが明らかになりつつあり、多様な応用分野への展開が期待される。以下に、濃厚ポリマーブラシの合成と構造・物性に関する筆者らの研究を紹介する。既発表の総説⁷⁾を併せて参照されたい。

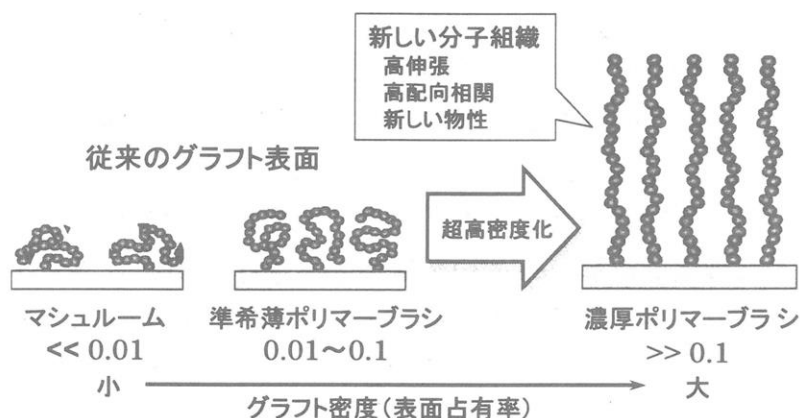


Figure 1. Schematic representation of chain conformation as a function of graft density.

2. ポリマーブラシの精密合成：表面開始リビングラジカル重合

古典的な表面開始グラフト重合法は、汎用性に優れる反面、常法では分子量や分子量分布をはじめとするグラフト鎖構造の制御が困難であり、また、開始効率が一般に低いために（上記の指摘にも拘わらず）グラフト密度があまり高くない。この困難を克服すべく、最近、リビングアニオン重合、リビングカチオン重合、リビング開環重合、リビングラジカル重合（LRP）など各種のリビング重合法の適用が試みられている⁸⁾。この中で LRP は、多くのモノマーに適用しうる汎用性と特に厳格な実験条件の設定を必要としない簡便性のゆえに、最もよく用いられている。

リビングラジカル重合 (LRP) の基本機作は、成長ラジカルを適当なキャッピング基で一時的に共有結合化 (ドーマント化) し、この共有結合の開裂によるラジカルの再生-成長-再ドーマント化のサイクルを擬平衡下で進行させることにある。低分子量のドーマントモデル化合物を開始種とし、上記のサイクル数が十分多くなるように、また停止反応等により失活する分子の相対分率を十分低く抑えるように反応設計すれば、各成長鎖の分子量が平均化され、分子量分布が狭く、末端活性率の高いポリマーが得られる^{9),10)}。主なキャッピング基に、ニトロキシドなどの安定ラジカルやハロゲン、ジチオエステル化合物があり、これらを利用する代表的な LRP として、それぞれニトロキシド媒介重合 (NMP)¹¹⁾、原子移動ラジカル重合 (ATRP)^{12),13)}、可逆的付加-解裂連鎖移動 (RAFT) 重合¹⁴⁾ が挙げられる¹⁰⁾。ATRP におけるハロゲン (Cl または Br) の授受 (移動) は遷移金属錯体の媒介による。

LRP を表面開始グラフト重合に利用した最初の系統的な研究は、著者らによるポリメタクリル酸メチル (PMMA) ブラシの合成である¹⁵⁾。p-toluenesulfonylchloride 型の頭部を有するシランカップリング剤を用いてシリコン基板上に開始基 (クロリド) を固定化し、等価なフリー開始剤 (トシルクロリド) の共存下で銅錯体を触媒とする ATRP 重合を行った。図 2 は、単位表面積当たりのグラフト量と (フリー開始剤から成長した) フリー鎖の数平均分子量 M_n の関係を示す。参考のため、他の開始基を用いた系に加え、シリカ微粒子やシリカモノリスなど非平面材料による結果も併せて示してある⁷⁾。重合時間はいずれも 10 時間以内である。フリー開始剤の濃度や表面の曲率を問わず、すべての実験点は原点を通る 1 本の直線で近似される。微粒子表面からフッ化水素酸処理によりグラフト鎖を切り出して解析した結果を図 3¹⁶⁾ に示す。グラフト鎖の M_n はモノマー転化率に比例し、 M_w/M_n 比も比較的小さい。また、グラフ

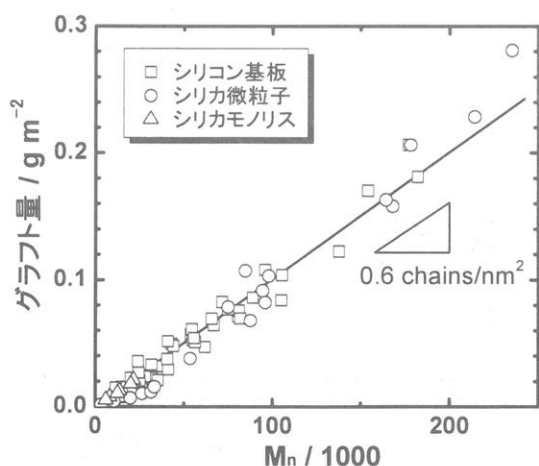


Figure 2. Grafted amount as a function of M_n of the free polymer.

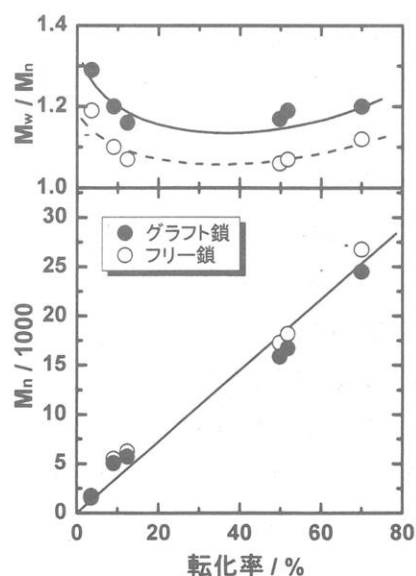


Figure 3. M_n and M_w/M_n of the graft and free polymers as a function of monomer conversion.

ト鎖とフリー鎖の分子特性はほぼ一致しており、したがってフリー鎖はグラフト鎖のよい指針となる。図2と図3から、この表面グラフト重合は、基材表面の曲率を問わずフリー鎖の成長とはほぼ同じ速度でリビング的に進行し、数密度 σ で約 $0.6 \text{ chains nm}^{-2}$ (図2の直線の勾配)、表面占有率で約 35 % という高い密度の、分子量分布の狭いグラフト膜を与えると結論された。なお、本系および他系¹⁷⁾におけるフリー開始剤は、均一溶液系での重合と同様に、キャッピング剤 (この例では2価のハロゲン化銅) の濃度を、いわゆる持続ラジカル効果^{9),18)}により自動調節させる働きをもつ。フリー開始剤を用いずに制御重合を達成するためには、適量のキャッピング剤を予め系に添加する必要がある¹⁹⁾⁻²¹⁾。この量は、均一系実験の解析結果によるか、または試行錯誤的に設定せざるをえない。

原理的に見て、LRPの開始効率是非常に高い。Yamamotoら^{22,23)}は、シリコン基板上に固定化した開始剤単分子膜 (開始基密度約 $4.5 \text{ groups nm}^{-2}$) を UV 照射で部分的に失活させる方法で、開始基の表面密度 σ_i を異にする一連の基板を作製し、これにより、既述の方法で PMMA ブラシを調製した。その結果によると、 σ_i が約 0.5 nm^{-2} 以下で、 σ_i とグラフト鎖の表面密度 σ はほぼ一致しており、この領域での開始効率はほぼ 100 % といえるが、この領域を超えると σ は σ_i に追随せず、約 0.7 nm^{-2} なる飽和値に留まる。分子間の立体障害が開始反応または成長反応 (またはその両者) を妨げ、この飽和値をもたらすと考えられる。

3. 濃厚ポリマーブラシの構造と物性

表面開始 LRP による分子構造の制御された高密度ポリマーブラシの合成が可能となり、これを用いて、濃厚ポリマーブラシという、従来、実験的にほとんど未開拓であった分野の系統的な研究が始まった。その結果、以下に述べるように、濃厚ブラシ膨潤膜および乾燥膜の構造と物性に関して多くの新しい発見が産まれていく。

PMMA 濃厚ブラシのトルエン膨潤膜を原子間力顕微鏡 (AFM) で調べたところ、その膨潤膜厚はグラフト密度の増加とともに、準希薄ブラシに対する式(1)の予測を超えて、式(2)にほぼ従って急激に増大し、最も密度の高いブラシの膜厚は伸び切り鎖長の 80~90 % にも達することが判明した (図4)²²⁾。これは、グラフト鎖が高度に伸張配向し、図1が模式的に示すような、文字通り

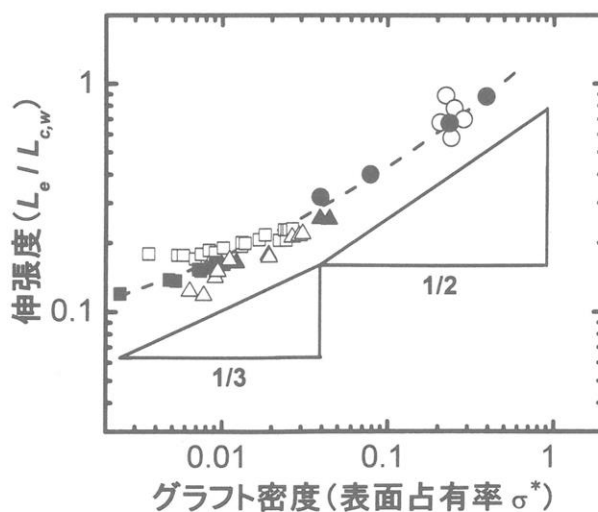


Figure 4. Degree of chain extension as a function of graft density (surface occupancy).

の「ポリマーブラシ」構造を形成していることを示す。この濃厚ブラシ膨潤膜は圧縮に対して強い抵抗を示すが（文献^{22),23)} 参照）、その一方で、摩擦に対する抵抗がほとんどない極低摩擦表面であることが、最近、ナノトライボロジ的に確認された²⁴⁾。図5は、ブラシ密度が $0.024 \text{ chains nm}^{-2}$ の準希薄領域から、同 $0.53 \text{ chains nm}^{-2}$ の濃厚領域に増大するとき、摩擦係数が2桁以上低下するという驚くべき事実を示している。

表面占有率が、例えば35%であることは、乾燥状態のグラフト膜

厚が伸び切り鎖長の35%であることを意味する。参考までに、このグラフト密度をもつ分子量10万（重合度1000）の単分散PMMAブラシを例にとると、グラフト鎖の伸び切り鎖長は250 nmであるから、その乾燥膜厚は約90 nmとなり、この値はフリー鎖の非摂動両端間距離約20 nmよりずっと大きい。つまり、このような濃厚ブラシを形成するグラフト鎖は、乾燥状態においても顕著に伸張配向している。この事実に対応すると考えられるが、乾燥濃厚ブラシ膜は等価なスピン・キャスト膜に比べて、高分子量領域でも顕著に高いガラス転移温度をもち²⁵⁾、また、熔融状態における圧縮弾性率が40%以上大きい²⁶⁾。さらに、中性子反射率測定により、濃厚ブラシは同種のフリーポリマーと熔融状態で全く相溶しないことが確認された²⁷⁾。グラフト鎖の伸張配向は、伸張度が大きいほど、多大な形態エントロピー減を伴う。他者との混合は、グラフト鎖にさらなる伸張を余儀なくするが、この大きなペナルティを高分子-高分子混合の僅かなエントロピー増で埋め合わせることは到底できない。つまり、実験が示すとおり、両者は混合しない。これらの諸性質も、すべて濃厚ブラシ特有のものである。

濃厚ブラシはまた、膨潤状態においても他分子との相互作用において顕著な選択性を示す。例えば、シリカモノリスはその微細孔により、GPC（サイズ排除）効果をもつことが知られるが、LRP法によりこの微細孔の壁面にびっしりと濃厚ブラシを“生やす”ことが可能である。このようなPMMA修飾カラム（グラフト密度約 $0.6 \text{ chains nm}^{-2}$ ）を用いた実験は、濃厚ブラシ層がサイズ排除効果もつ（分子量約700以上の溶質ポリスチレンをブラシ層から排除し、これ以下の溶質を層内に取り込む）ことを実証している²⁸⁾。また、図6に示すように、水溶性高分子ポリメタクリル酸ヒドロキシエチル（PHEMA）の準希薄ブラシが、多量のタンパクを吸着するのに対して、濃厚ブラシは同タンパクをほとんど吸着しない²⁹⁾。タンパクのような大きな分子が、濃厚ブラシ層

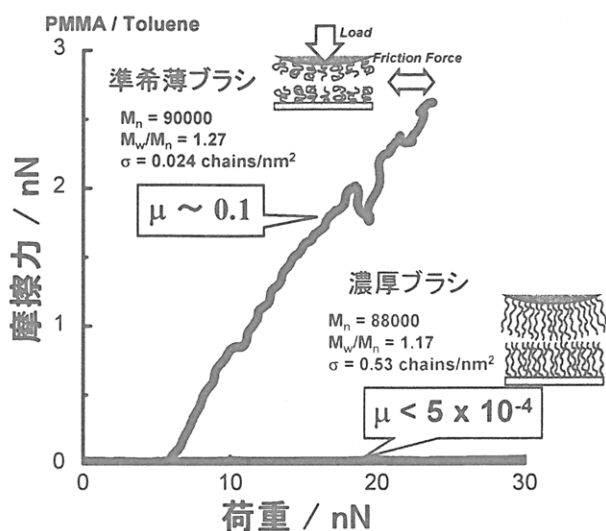


Figure 5. Nanotribologically measured frictional force as a function of applied weight.

から物理的に排除されること（内部吸着の抑制）に加えて、ブラシ層表面での吸着（接着）も抑制されるものと考えられ、その機構は今後の興味深い課題である。

濃厚ポリマーブラシを付与した微粒子は、気液界面で秩序構造を形成する。グラフト鎖の高度な伸張を反映し、隣接粒子間の距離は一般に極めて大きく、分子量とともに増大する³⁰⁾。最近、濃厚ブラシを付与した単分散シリカ微粒子が、有機溶媒分散液中でコロイド結晶を形成することが見出された(図7)⁶⁾。従来、剛体球ポテンシャルとクーロンポテンシャルをそれぞれ駆動力とするハード系およびソフト系コロイド結晶が知られるが、この系の駆動力は伸張グラフト鎖間の長距離相互作用であり、この意味で準ソフト系とでも呼ぶべき新しいタイプの結晶である。ハード系とソフト系結晶の典型的な相転移点が体積分率でそれぞれ約50%と数%であるのに対し、準ソフト系結晶の相転移点はグラフト密度と微粒子径に対するグラフト鎖長の相対比に依存し、一般にハード系とソフト系の中間の濃度域に位置する。また、微粒子間のポテンシャルもグラフト密度とグラフト鎖長／微粒子径比に依存し、この比の増大とともにハード型からソフト型へ移行し、これに伴って結晶構造も変化するものと考えられる。

4. おわりに

表面開始リビング重合、特に表面開始 LRP が構造の明確な濃厚ポリマーブラシの合成を可能にし、その濃厚ブラシが、準希薄ブラシの延長線上にない、新しい、時には思いがけない性質を示すことを観た。豊かな応用に繋がることを期待したい。とは言え、現時点のグラフト密度のチャンピオンデータは、表面占有率にして高々40%であ

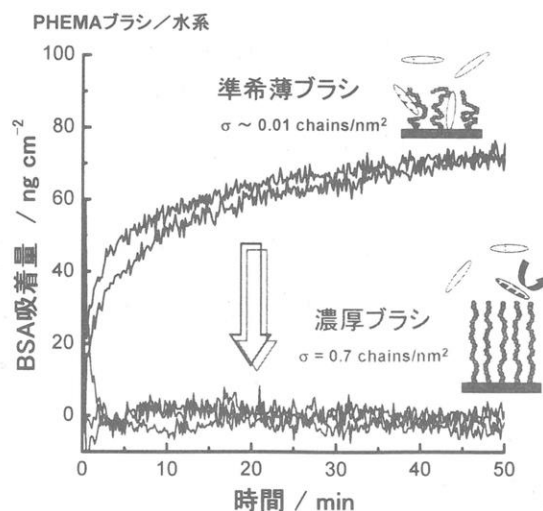


Figure 6. Adsorption of protein SBA onto PHEMA semi-dilute and concentrated brushes.

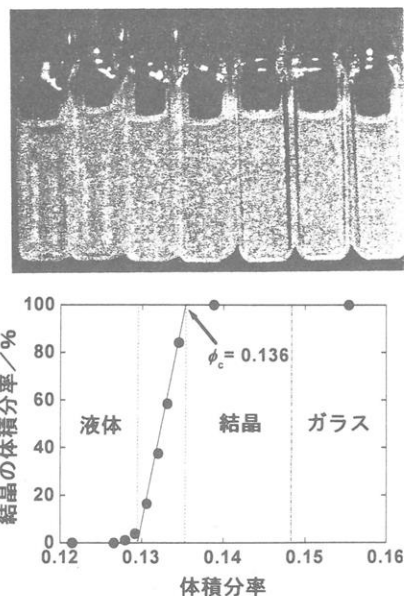


Figure 7. Crystal-liquid phase transition of monodisperse silica-PMMA concentrated brush composite particles dispersed in a nearly iso-refractive and iso-buoyant mixed solvent.

り、これが限界であるべき明確な理論的根拠はない。グラフト密度の上昇が濃厚ブラシ特性の更なる飛躍的向上に繋がることは疑いなく、この方面の発展も期待される。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金「特別推進研究(17002007)」および「基盤研究 A(17205022)」の補助により行った。

文献

- 1) Alexander, S. *J. Phys. (Paris)* **1977**, 38, 977.
- 2) de Gennes, P. G. *Macromolecules* **1980**, 13, 1069.
- 3) Daoud, M.; Cotton, J. P. *J. Phys. (Paris)* **1982**, 43, 531.
- 4) Birstein, T. M.; Zhulina, E. B. *Polymer* **1984**, 25, 1453.
- 5) Shim, D. F. K.; Cates, M. E. *J. Phys. (Paris)* **1989**, 50, 3535.
- 6) Ohno, K.; Morinaga, T.; Takeno, S.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Macromolecules* **2006**, 39, in press.
- 7) Tsujii, Y.; Ohno, K.; Goto, A.; Fukuda, T. *Adv. Polym. Sci.* **2005**, in press.
- 8) 福田 猛, *高分子* **2005**, 54, 483.
- 9) Fukuda, T. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.* **2004**, 42, 4743.
- 10) Goto, A.; Fukuda, T. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 329.
- 11) Georges, M. K.; Veregin, R. P. N.; Kazmaier, P. M.; Hamer, G. K. *Macromolecules* **1993**, 26, 2987.
- 12) Wang, J. S.; Matyjaszewski, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5614.
- 13) Kato, M.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M.; Higashimura, T. *Macromolecules* **1995**, 28, 1721.
- 14) Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffrey, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E. *Macromolecules* **1998**, 31, 5559.
- 15) Ejaz, M.; Yamamoto, S.; Ohno, K.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Macromolecules* **1998**, 31, 5934.
- 16) Tsujii, Y.; Ejaz, M.; Yamamoto, S.; Ohno, K.; Urayama, K.; Fukuda, T. in *Polymer Brushes*: Advincula, R. C.; Brittain, W. J.; Caster, K. C.; Ruehe, J.; Eds.: Wiley-VCH, Weinheim (2004): Chap. 14.
- 17) Husseman, M.; Malmstrom, E. E.; McNamara, M.; Mate, M.; Mecerreyes, D.; Benoit, D. G.; Hedrick, J. L.; Mansky, P.; Huang, E.; Russell, T. P.; Hawker, C. J. *Macromolecules* **1999**, 32, 1424.
- 18) Fischer, H. *Macromolecules* **1997**, 30, 5666.

- 19) Matyjaszewski, K.; Miller, P. J.; Shukula, N.; Immaraporn, B.; Gelman, A.; Luokala, B. B.; Siclován, T. M.; Kickelbick, G.; Vallant, T.; Hoffmann, H.; Pakula, T. *Macromolecules* **1999**, *32*, 8716.
- 20) Jeyapragash, J. D.; Samuel, J. D.; Dhamodharan, R.; Rühle, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 277.
- 21) Kim, J. B.; Huang, W. H.; Miller, M. D.; Baker, G. L.; Bruening, M. L. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.* **2003**, *41*, 386.
- 22) Yamamoto, S.; Ejaz, M.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5608.
- 23) Yamamoto, S.; Ejaz, M.; Tsujii, Y.; Matsumoto, M.; Fukuda, T. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5602.
- 24) 岡安賢治 ; 辻井敬亘 ; 福田 猛 *高分子学会予稿集* **2005**, *54*, 922.
- 25) Yamamoto, S.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Macromolecules* **2002**, *35*, 6077.
- 26) Urayama, K.; Yamamoto, S.; Tsujii, Y.; Fukuda, T.; Neher, D. *Macromolecules* **2002**, *35*, 9459.
- 27) 岡安賢治, 山本真平, 辻井敬亘, 福田 猛, 鳥飼直也, 武田全康 *高分子学会予稿集* **2005**, *54*, 921.
- 28) 何 漢宏 ; 辻井敬亘 ; 福田 猛 ; 山元和哉 ; 木村 剛 ; 岸田晶夫 *高分子学会予稿集* **2003**, *52*, 2961.
- 29) Yoshikawa, C.; Goto, A.; Tsujii, Y.; Fukuda, T.; Kimura, T.; Yamamoto, K.; Kishida, A. *Macromolecules* **2006**, *39*, in press.
- 30) Ohno, K.; Koh, K.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2751.

ナノスケールでみる表面・界面領域での高分子鎖の形と分布

伊藤 紳三郎・青木 裕之・湯浅 毅

Shinzaburo ITO, Hiroyuki AOKI, Tsuyoshi YUASA

京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻

1. はじめに

分子のミクロな世界で起こるさまざまな機能を探求し、マクロな世界で有効に働かせることがナノテクノロジーの主要な命題である。高分子はナノからミクロンに至る集合構造を構成する重要な素材である。よく知られているように、高分子1分子鎖の大きさは数10 nmであり、物質構成の基本単位としての分子鎖がこの空間スケールを占めている。そのため、ナノメートルの空間領域(1 - 1000 nm)は高分子科学にとってとりわけ重要な意味をもっている。しかしながら、研究の基礎となる構造解析の手段が確立されているわけではない。ナノスケールにこそ高分子の集合構造が働く場があり、この空間領域での構造解析手段の開発、とくに高分子のようなソフトマテリアルに適用できる手法の開発は高分子科学の発展に大きく寄与するものと思われる。

光学顕微鏡は古くから高分子の研究に役立ってきたが、回折限界のために光の波長を超える空間分解能を達成できないために、ミクロン領域の観測手段と考えられてきた。しかし最近開発された走査型近接場光学顕微鏡(Scanning Near-field Optical Microscopy: SNOM, または NSOM)は100 nm以下の空間分解能をもつことから、高分子が形作るナノ空間に迫る新しい光技術として注目されている。¹⁻³⁾すでに本講演集では、その特長と紫外線領域での応用について、いくつかの実例を用いて紹介した。⁴⁾今回はSNOMを高分子の拡散や表面分布の研究に適用した例を紹介したい。

2. SNOMの光学顕微鏡としての意義

SNOMの特長の多くは、他の光学顕微鏡と同じように、生物試料、高分子、有機材料、水中試料など、穏和な環境でその場観察できることにある。図1にその概念図を示したが、SNOMが原子間力顕微鏡(AFM)と大きく異なるのは、試料表面を掃引するプローブが先端を先鋭化した光ファイバーにより作製されている点である。プローブに光ファイバーを用いることで、各種レーザーからの光を導入し、試料をナノスケールの局所場で照射することができる。先鋭化された光ファイバークプローブの先端はわずか50 nm程度であり、開口径は100 nm以下になっている。このため、光は回折限界の

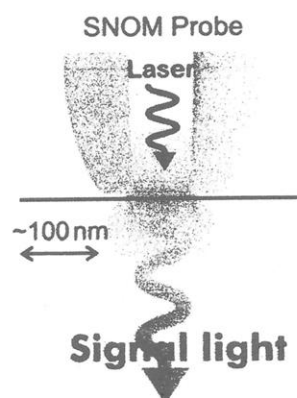


図1 SNOMプローブの概念図

制約を受けることなく機械的に集光されるので、高い分解能が得られるのである。このような微小開口から漏れ出す近接場光を試料表面で走査することにより、表面近傍に存在する蛍光性物質を励起する。試料から発せられる蛍光を集め、高感度検出器によりその強度を位置情報をもとに画像化すれば、高分解能の蛍光顕微鏡像が得られる。また、その光を分光器付き検出器で観測することにより局所場でのスペクトル分析が可能になる。その特長をまとめると、

- ① 光の回折限界を超えるナノスケールの空間分解能をもつ。
- ② 光の透過性により固体表面のみならず表面下の内部構造を可視化できる。
- ③ 常温、常圧で観察でき、有機試料でも観察による損傷が少ない。
- ④ 光の検出が極めて高感度なため、高分子鎖や単一分子をも観察できる。
- ⑤ 分光能力があるため、局所場でスペクトル分析や化学種のマッピングができる。
- ⑥ 蛍光プローブ法を顕微鏡下で活用できる。
- ⑦ 光のエネルギーを用いて微小化学反応や光ナノ加工、光記録ができる。

など、他の高分解能顕微鏡にはない数々の特長をもっている。

以上のように、従来の光学顕微鏡の空間分解能は光の波長限界によりミクロン領域での観測に制限されていたが、SNOMはこの限界を破り、ナノメートル領域の光学実像を示すことができる。その結果、散乱・回折法による集団平均の解析によって得られるモデル構造とは根本的に異なる、ナノ空間での高分子の実像による研究が可能になった。^{5), 6)}

3. 感度と分解能の評価

一般的に顕微鏡の性能評価には既知の大きさをもつラテックスが使われるが、ここでは感度と分解能の限界を同時に明らかにするため、Rhodamine 6G (R6G)の1分子観察を行った。R6Gを極微量含む溶液をガラス基板に塗布し、さらにPMMAを保護膜としてスピンキャストした試料を測定した。図2にこのSNOM像を示した。単一分子に対応するスポットが観測される。各スポットの蛍光は明滅するため、完全に円形に観測されるものは少ない。1分子が繰り返し励起されて発光し、1スポットとして観測されるので、その間に非発光性の状態に変化すると一瞬画面から消えるのである。やがて回復するもの、あるいは非可逆的に失活するもの

Rhodamine 6G

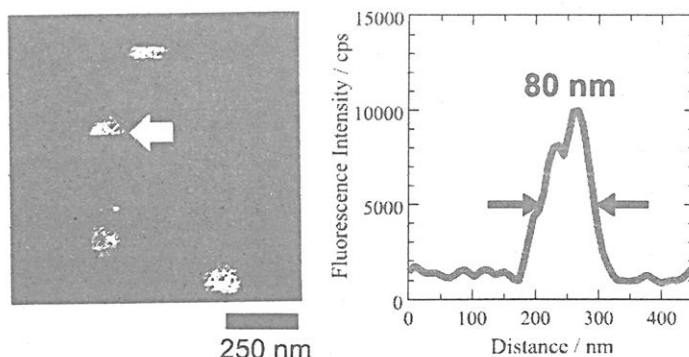


図2 検出感度を示す R6G 色素の単一分子像（左）と、1スポットの半値幅（右）により示される空間分解能

もある。このような明滅は、観測された信号が明-暗の2値、すなわち単一分子からのものであることを証明している。つまり、この顕微鏡が単一分子からの1フォトン
の信号を確実に捕らえていることを表しているのである。1分子のサイズは、プローブの開口径に比べると極めて小さいため、観測された像は顕微鏡の分解能そのものを表している。図2に示したように光強度のラインプロファイルからもとめられる半値幅約 80 nm は、使用している光ファイバプローブの空間分解能を示している。

4. 単一高分子鎖の観察

SNOM の優れた能力を例示したのが図3である。これは PMMA 鎖一本を観察した SNOM 像である。フィルム表面に吸着された PMMA 鎖ではなく、厚さ数 10 nm のフィルム内部に浮かぶ一本の PMMA 鎖をあるがままに可視化している。側鎖の 1 % 以下を蛍光性のペリレン (Pe) でラベルした PMMA 鎖を合成し、これを市販の PMMA の中にごく微量混合し、その溶液をスピ
ンキャストして得た試料である。分子内の蛍光ラベル量もラベル鎖の混

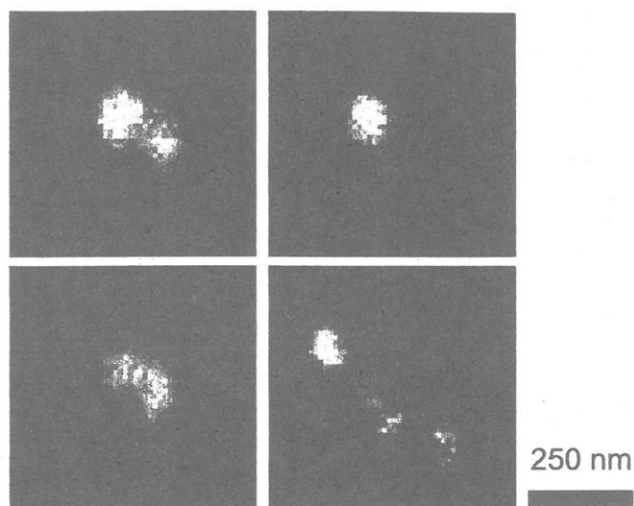


図3 SNOM で観察される PMMA 薄膜中の PMMA 単一分子鎖像

合比もごくわずかなので、本来の形態などには影響しない。それでも蛍光検出の感度がきわめて高いので、フィルム内の単一分子鎖の姿がはっきりと観察される。⁷⁾

図3においては、観測点のピクセルごとに蛍光強度を表示しており、詳細に見るとモザイク状に表示されている。その輝度つまり蛍光強度は、その観測点に存在する蛍光分子数、すなわち各点での高分子鎖のセグメント密度に比例する。これにより、高分子鎖のセグメント密度の空間分布を観測できることが分かる。図3のような単一分子鎖の観測から単なる高分子の形態のみならず、高分子鎖の広がりを実量的に直接評価することが可能になる。

5. 高分子の界面での分子拡散

高分子材料の機能の多くは、表面・界面での分子形態とそこで起こる分子ダイナミクスにより支配されている。表面では高分子鎖の形態がバルクのそれとは異なる、あるいは絡み合いや分子量や組成が異なるといわれており、その結果、表面特有の物性が現れる。また、界面における分子の拡散は高分子材料の機械的強度や接着、ヒーリング現象と密接に関連しており、実用的にも重要な研究対象となっている。

SNOM を用いることにより、表面・界面での高分子鎖の分子形態や分子分布をナノスケールで見ることができるようになった。

高分子と高分子とを混合すると大半の組み合わせにおいて非相溶であり、相分離を起こして界面ができる。また、同種の高分子、あるいは相溶性の組み合わせで高分子を接着すると、界面はヒーリング現象により消失する。これらの現象は高分子材料を応用するうえでは重要な現象である。

SNOMは本来、薄膜表面から蛍光像を観測する装置であるが、マイクロトームを利用して100 nm 以下の薄片を作成すれば、試料の断面を観察することもできる。これにより、表面からの物質拡散や界面の融合過程などを追跡することが可能となる。

図4に試料の作製法を示した。マトリックス高分子としては分子量 1×10^5 のPolystyrene (PS) を用い、蛍光ラベルとしては Pe を採用した。Vinylperylene を合成し、1%程度の微量のモノマーをstyreneと共重合させることにより、分子量が 9.1×10^3 から 7.0×10^4 のラベル化 Polystyrene (PS-Pe) を合成した。この PS-Pe を通常の PS に数%混合して膜

厚 $1 \mu\text{m}$ の蛍光性薄膜とし、さらにこの薄膜を膜厚が $200 \mu\text{m}$ 程度の PS フィルムに接着することで、一方の層にのみ蛍光ラベルされた高分子が分布した試料を作製した。

このようにして作製したPS試料を 150°C でアニーリングすることにより、高分子鎖をフィルム内で拡散させた。図5は所定

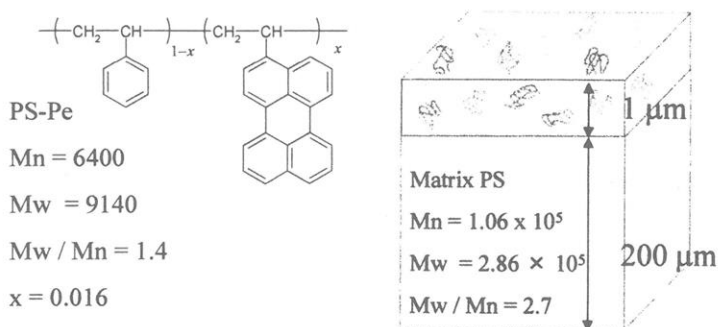


図4 蛍光ラベル PS と SNOM 観察試料の作製

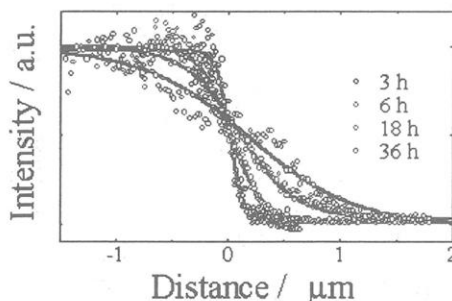
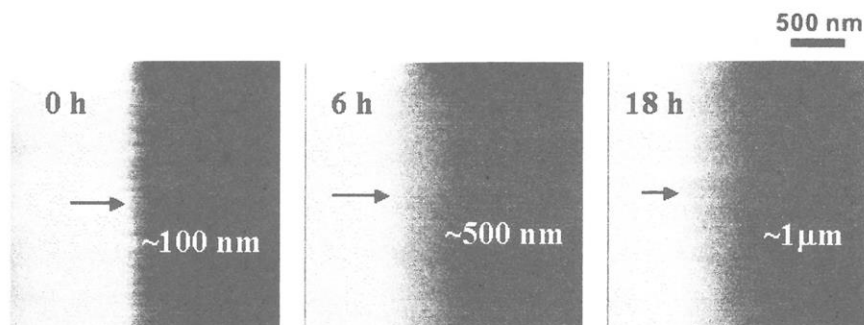


図5 上段:SNOMにより直接観察される高分子鎖の界面拡散現象(左から 0 h、6 h、18 h、 150°C でアニーリング)、下段: 蛍光強度のプロファイルにより示される濃度勾配の時間依存性

の時間アニーリングの後、試料をマイクロトームで 50 nm から 100 nm の膜厚の超薄切片とし、断面を観察した SNOM 像である。印刷のために明瞭ではないが、時間の経過とともに左の PS 膜にあったラベル PS-Pe 鎖が、アニーリングにより右の無ラベル PS 膜の中に浸透し、界面が消失していく様子が見られる。界面における蛍光像は広がり、高分子鎖が浸透拡散していく過程が直接可視化されている。蛍光強度は高分子の数に比例するため、界面を横切るラインで強度プロファイルを求めると高分子鎖の濃度分布を表すことができる。図 5 下段は、このような濃度勾配の時間変化を示している。このときの濃度勾配が蛍光強度により観測できるので、拡散方程式の解と濃度分布を比較することができる。

膜厚方向 x についての Fick の拡散式

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (1)$$

を用いて、この系の初期条件 $C(0, t) = C_0$ 、 $C(x, 0) = 0$ ($x > 0$) により解をもとめると、

$$C(x, t) = C_0 \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}}\right) \quad (2)$$

が得られる。この2式を用いて、実験で得られた図 5 の濃度分布 $C(x, t)$ を再現する分布関数が実線で描いてある。このようなフィティングにより最適値として高分子鎖の拡散係数 D が評価できる。この例では $D = 3.6 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ が得られた。

同様に、蛍光ラベルを施した薄膜を PS フィルムの内部に配置してアニーリングを行うと、図 6 のような結果が得られる。等方的な分布関数の広がりが観測され、ガウス分布を保ちながら高分子鎖が拡散する様子が定量的に解析される。図の横軸の値でわかるように、 $1 \mu\text{m}$ 以下のナノスケールで高分子鎖の空間分布が解析できる。これ

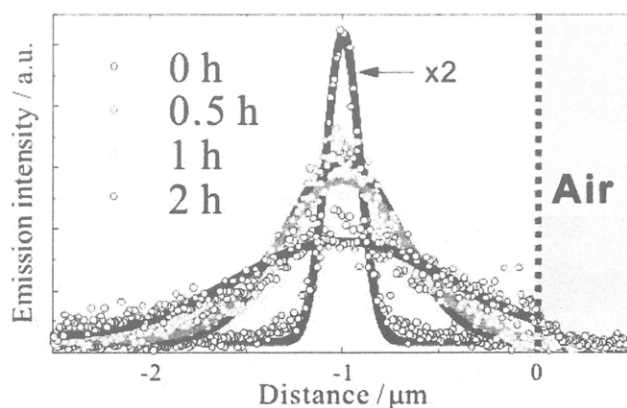


図 6 PS 鎖のフィルム内部での等方的な拡散現象。

まで強制レーリー散乱や干渉縞を用いた蛍光回復により拡散現象が測定されてきたが、ナノスケールの微小変位を顕微鏡で直接観察できることから、遅い高分子拡散を短時間で評価できる。ここではデータを省略するが、ラベルされた PS-Pe の分子量を変化させて拡散係数をもとめることにより、高分子鎖の拡散係数が -2 乗により変

化することも確かめられた。

6. 高分子表面からの浸透拡散

蛍光ラベル鎖を含む薄膜の厚さをさらに薄く、顕微鏡の分解能に近い 200 nm 以下にしてバルクフィルムの上に接着すると、蛍光ラベルが材料表面にのみ導入されたとみなせる試料を得ることができる。この試料をアニーリングすることにより、蛍光性の高分子や低分子が表面からバルク内部へ浸透拡散する様子を見ることができる。

図 7 上はこの過程を観察した例である。左側の空気表面から高分子内部に PS-Pe 鎖が拡散している。図 6 下の実線は、1 式を全拡散物質の量 Q が一定という条件のもとに解いて得られる 3 式によりフィッティングを行った結果を示している。

$$C(x, t) = \frac{Q}{\sqrt{\pi Dt}} \exp\left(-\frac{x^2}{4Dt}\right) \quad (3)$$

全体の空間分布をよく再現しており、この解析によっても拡散係数 D を求めることができる。

以上の実験結果より、PS フィルム中を同種の PS 鎖が拡散する挙動は拡散方程式の予測どおりの極めて正常な挙動を示しており、表面・界面において特異性は現れていないといえる。

そこで次に、PMMA を高分子マトリクスとし、その中を異種高分子である PS 鎖が拡散浸透するヘテロ系を作成した。図 8 に示したように、ラベル化 PS-Pe と PMMA のブレンド薄膜 (200 nm) を作製し、これをベースとなる単分散 PMMA 厚膜の上に接着した。図 8 では拡散成分であるラベル鎖のみランダムコイル鎖として模式的に表している。表層となる薄膜内で PS 成分と PMMA 成分のブレンド比を変化させて、拡散挙動を観測した。その結果、拡散はブレンド比で大きく異なること

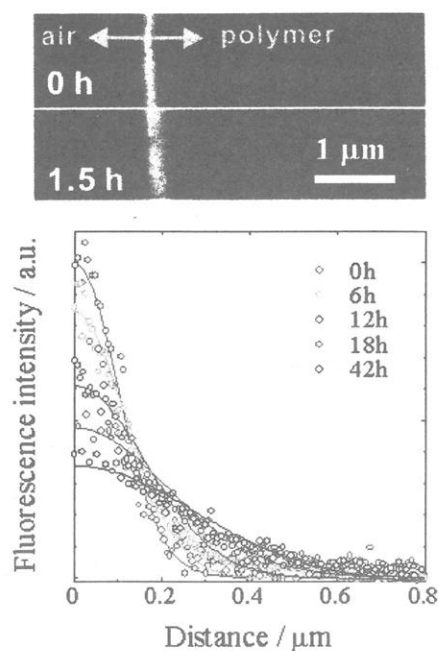


図 7 上：高分子フィルムの空気表面からの分子拡散像、下：拡散式にもとづいた空間分布の解析例

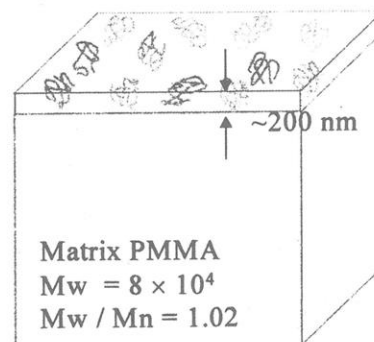
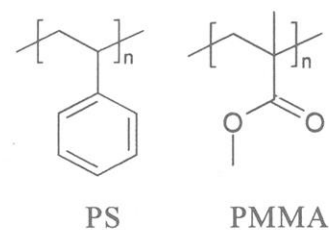


図 8 異種高分子の拡散浸透モデルの試料構成

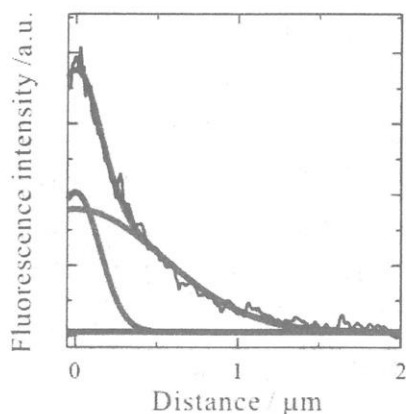


図9 PMMA フィルム内に拡散した PS 鎖の空間分布 (表面層での PS 比は 10%)

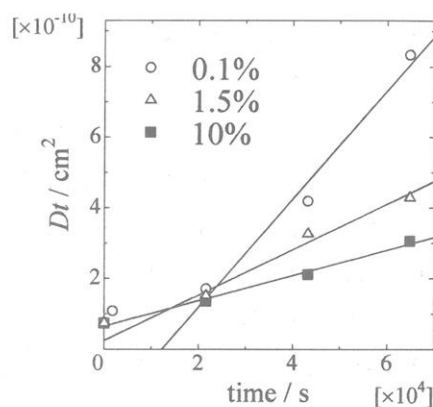


図 10 拡散速度のブレンド比依存性

が分かった。PS:PMMA=1:99 (1%) のように PS 成分が極端に少ないときは、図 7 の同種拡散のときと同じように PS 鎖の空間分布はガウス型で近似でき、得られた拡散係数 D も大きな値であった。しかしながら、ブレンド比が大きくなると、PS 鎖の空間分布は拡散モデルから大きくずれ、表面付近に滞留するような挙動を示した。

図 9 には PS:PMMA=10:90 (10%) の試料において実測された PS 鎖の空間分布を示した。この分布は、これまでのガウス型分布では表せないことから、実線で示したように、速い拡散を示すブロードな成分と、表面に滞留する遅い成分の 2 つの分布関数の和としてフィッティングさせた。拡散が速い成分は希薄な場合の拡散に相当すると思われる、表面の PS 鎖が濃厚な領域から逃れた分子鎖が分子分散状態で PMMA マトリクスの中を拡散していく様子を示していると考えられる。実際、表面層に存在する PS 量の時間減衰からみかけの拡散係数をもとめるため、 Dt を縦軸に、 t を横軸にしたプロットを図 10 に示した。直線の勾配は拡散速度を表すが、明らかに組成依存性を持ち、PS ブレンド比の増加により、急速に拡散速度が低下することを示している。

この原因は図 11 に示したように、PS の相分離であることが明白である。図 11 左は

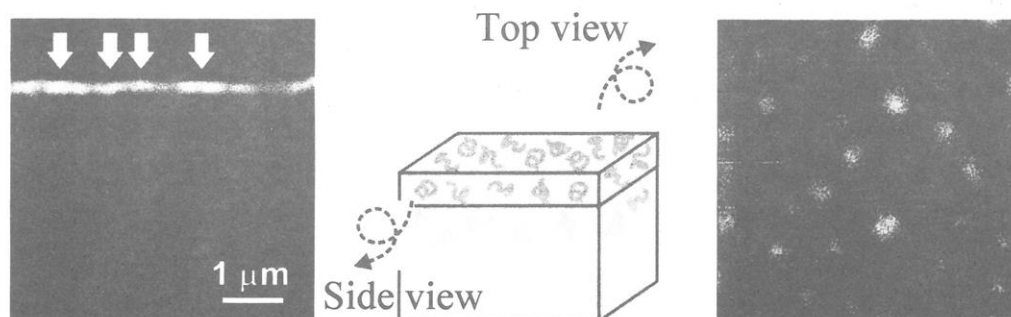


図 11 左: PS:PMMA=10:90 の表面層からの拡散過程を表す断面像と、右: 表面蛍光像で観察される相分離構造

アニーリングを行った後、マイクロトームで薄片とした試料の断面像である。矢印の領域では明らかに PS 濃度が高くなっており、PMMA 中で PS のドメインが成長している。図 10 右は上面から見た蛍光表面像である。完全な相分離には至っていないが、蛍光強度の濃淡により、PS の多いドメインと少ない領域が混在していることが分かる。このような PS 同士の凝集構造に PS 鎖が取り込まれ、その結果、PMMA バルク中への分子拡散が低下していることが原因である。拡散速度の低下は、まだ相分離構造が明白には観測されない数%のブレンド比でも起こっており、このような低濃度でも分子レベルでの凝集が始まっていることが分かる。ナノスケールでの高分子鎖の空間分布から拡散速度が測定され、鋭敏に分子鎖凝集の現象を検出できることが明らかになった。

7. おわりに

以上に述べた例は、SNOM を用いてできる実験の一部に過ぎない。ナノスケールでの集合構造のほか、1 分子レベルで高分子の形態や配向を研究するなど、魅力的な対象は数多くあり、SNOM の適用範囲は広い。SNOM はまだ成長期にある測定技術であり、改良改善が試みられているが、解像度の向上により、高分子が活躍する重要なスケールである 10 nm ~ 100 nm の領域での構造解析や物性研究に新しい光を照らすことができるものと思われる。

参考文献

- 1) M. Fujihira, S. Ito, A. Takahara, O. Karthaus, S. Okazaki, K. Kajikawa, Nano-Optics, S. Kawata, M. Ohtsu, M. Irie eds., pp.151-190, Springer (2002).
- 2) 伊藤紳三郎、青木裕之、ナノ光工学ハンドブック、大津元一、河田聡、堀裕和 編、pp.429-435, 朝倉書店 (2002).
- 3) S. Ito, H. Aoki, *Adv. Polym. Sci.*, **182**, 131 (2005).
- 4) 伊藤紳三郎、青木裕之、日本化学繊維研究所講演集、**58**, 43 (2001); **61**, 1 (2004).
- 5) 青木裕之、伊藤紳三郎、レーザー研究、**29**, 717 (2001).
- 6) S. Ito and H. Aoki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **76**, 1693 (2003).
- 7) H. Aoki, M. Anryu, S. Ito, *Polymer*, **46**, 5896 (2005).

ポリエチレングリコール脂質による生細胞の表面修飾

三浦 傑・寺村 裕治・岩田 博夫

Suguru Miura, Yuji Teramura, Hiroo Iwata

京都大学再生医科学研究所

1. 緒言

インスリン依存型糖尿病の治療に用いるバイオ人工膵臓の開発が進められている。バイオ人工膵臓とは、インスリン分泌組織である膵ランゲルハンス島（膵島）を高分子製の半透膜に封入し、患者の免疫系の攻撃を受けないようにした後移植する膵島移植法である。バイオ人工膵臓には各種タイプがあるが、われわれのグループではマイクロカプセルタイプの研究を進めてきた。アガロースをマイクロカプセル化素材として用い糖尿病モデル動物で長期間の血糖値を正常化させることが可能であると報告してきた[1]。しかし、カプセル膜が厚くその臨床応用は困難であるとあるといわれている。マイクロカプセル化後、その直径が膵島の5倍であれば、その体積は125倍にもなる。ヒト臨床の膵島移植では、マイクロカプセル化膵島の体積が1L以上にもなり、移植することが不可能である。さらに、マイクロカプセル化条件をよくコントロールして径をできる限り小さくしたとしても、門脈内に移植することは依然として不可能である。インスリン依存型糖尿病の子供の治療に膵島移植を適用できるようにするには、極めて薄く免疫隔離能が十分ある膜の開発が必須である。

これらの条件を満たす新たなカプセルを開発するヒントになる研究には、細胞膜タンパクを反応点としたカプセル化膜の研究[2]がある。この方法では膜タンパクと共有結合を作らせるため、安定な修飾であるが、膜タンパクが修飾されるため、細胞の生存に悪影響を与えると考える。また、ポリエチレングリコール(PEG)修飾脂質を用いた細胞膜表面特性の改変を行った研究例[3]がある。この方法では、マイルドな条件下に細胞の抗原性を修飾できる。本研究では後者のPEG-脂質を用いて生細胞の表面修飾を行うことを試みた。細胞でのPEG-脂質の局在、また細胞へ与える障害等を検討した。

2. 実験

PEG-脂質合成： α -N-hydroxysuccineimide- ω -tert-butoxycarbonyl Poly(ethyleneglycol) (BOC-PEG-NHS, MW:5000, Nektar) と 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE, 日本油脂) をクロロホルム中で一晩反応させた。この際 Triethylamine (TEA) を DPPE と等モル加えた。その後氷上で冷却しながら TFA を加え 30 分反応させアミノ基の保護基である BOC

基をはずした。反応物をジエチルエーテル中に滴下し、生じた沈殿をガラスフィルターで回収した。クロロホルムによりガラスフィルターからの生成物を溶出し回収を行った。エバポレータでクロロホルム除去後ベンゼンに再溶解させ凍結乾燥した。以上の操作により末端にアミノ基をもった PEG-DPPE 脂質複合体 (PEG-脂質) 白色粉末を得た。PEG-脂質の細胞への導入後の局在化を追跡するために PEG-脂質の一部を蛍光色素 Fluorescein isothiocyanate(FITC)と反応し蛍光ラベルした。未反応の FITC と蛍光ラベルされた PEG-脂質(FITC-PEG-脂質)の分離はゲル濾過クロマトグラフィー (Sephadex G-25 カラム)により分離した。それぞれの反応の進行は Thin layer chromatography (TLC)と Nuclear Magnetic Resonance (NMR)により追跡した。

細胞膜への FITC-PEG-脂質の導入:細胞はヒト腎臓細胞株である HEK293 細胞を用いた。HEK293 細胞 5×10^5 cells を濃度の異なる FITC-PEG-脂質の Hanks' balanced salt solution(HBSS)溶液(1, 10, 100, 1000 μM)に懸濁し 37 $^{\circ}\text{C}$ で適時攪拌しながら 120 min PEG-脂質処理した。その後リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)溶液で 2 回洗浄し、共焦点顕微鏡(Olympus)により細胞の横断面また縦断面の蛍光像の観察を行った。細胞内への非特異な蛍光の取り込みを見るために、比較として FITC を HBSS に溶解させた溶液(10 μM)と HEK293 細胞 5×10^5 cells を混合し 37 $^{\circ}\text{C}$ で静置後共焦点顕微鏡により細胞の蛍光観察を行った。この際 FITC 中のイソチオシアネート基と細胞中のアミノ基との結合を無くするため FITC はあらかじめ HBSS に溶解後 1 日静置しイソチオシアネート基を不活性化させたものを使用した。

細胞毒性試験:濃度の異なる PEG-脂質溶液(10,100,1000 μM)と細胞を混合し 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間静置することで PEG-脂質を細胞へ導入した。その後、PEG-脂質導入細胞のトリパンブルー色素排除試験を行い生細胞率を出した。また、100 μM の PEG-脂質溶液と HEK293 を混合し 37 $^{\circ}\text{C}$ で異なる時間(30,60,120 min) PEG-脂質処理した。その後同様にトリパンブルー色素排除試験により生細胞率を出した。

細胞膜への PEG-脂質導入量の検討:濃度標準溶液として各種濃度の FITC-PEG-脂質溶液(10,20,50,100 nM)の蛍光強度を測定した。FITC-PEG-脂質溶液の蛍光強度を各濃度に対してプロットして検量線を引いた。次に HEK293 細胞 5×10^5 cells を 10 μM または 100 μM の FITC-PEG-脂質 HBSS 溶液に懸濁し 37 $^{\circ}\text{C}$ で 120min 間 PEG-脂質処理した。PBS で 2 回洗浄後、FITC-PEG-脂質で修飾された HEK293 細胞懸濁液(5×10^5 cells/ml)の蛍光強度を測定した。細胞懸濁液の蛍光強度から上記検量線を用いて細胞に導入された FITC-PEG-脂質の量を見積もった。

細胞接着試験: HEK293 細胞 5×10^5 cells を PEG-脂質 HBSS 溶液 10 μM に

接着 PEG 修飾細胞の観察：HEK293 細胞 5×10^5 cells を FITC-PEG-脂質/HBSS 溶液 100 μ M に懸濁し 37 $^{\circ}$ C で 120 min 静置した。FITC-PEG-脂質修飾細胞をガラスボトムディッシュに播種し 37 $^{\circ}$ C で 1 日培養後，細胞表面，内部の蛍光を調べるため共焦点蛍光顕微鏡による細胞観察を行った。また細胞と基板の接着面での蛍光を調べるため全反射蛍光顕微鏡による細胞観察を行った。

PEG-脂質の細胞への導入：本研究で合成した PEG-脂質は脂質部に由来する疎水性部位と PEG 鎖に由来する親水性部位を持つ両親媒性の化合物（スキーム 1）である。



なお、脂質部位は細胞膜を構成するリン脂質に類似の構造である。この PEG-脂質を細胞と混合すると、疎水性相互作用により自発的に細胞膜に PEG-脂質の疎水部が導入されることを期待している(スキーム2)。



HEK293 5×10^5 cells 細胞と $10 \mu\text{M}$ FITC-PEG-脂質溶液を $150 \mu\text{l}$ 混合し 37°C で2時間PEG-脂質した後、PBSで2回洗浄後共焦点蛍光顕微鏡による蛍光観察を行った。結果を Figure 1-a に示した。また、比較実験として FITC / HBSS 溶液と細胞を混合し同様に蛍光観察を行った。結果を Figure 1-b に示した。FITC-PEG-脂質を導入した細胞では細胞の表面近傍でのみ蛍光が見られた。一方、加水分解した FITC 溶液と混合した細胞では細胞質全体に蛍光が見られ、FITC-PEG-脂質を導入した細胞のように細胞表面に特異的な蛍光は見られなかった。これらの結果からスキーム2に示したように FITC-PEG-脂質が細胞膜に導入されていることがわかる。

次に細胞と混合する FITC-PEG-脂質の濃度と蛍光強度の関係を調べた。細胞と FITC-PEG-脂質を混合する際に FITC-PEG-脂質濃度を $1, 10, 100, 1000 \mu\text{M}$ の4種で実験を行った。Figure 2 に FITC-PEG-脂質修飾細胞の共焦点蛍光顕微鏡像を示した。FITC-PEG-脂質の濃度が上がるにつれて細胞表面での蛍光が強くなっているのがわかる。また、FITC-PEG-脂質の濃度が高くなると細胞内にも FITC-PEG-脂質が取り込まれているような像が見られた。これはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた FITC-PEG-脂質が細胞内小器官の膜に導入されたものと思われる。

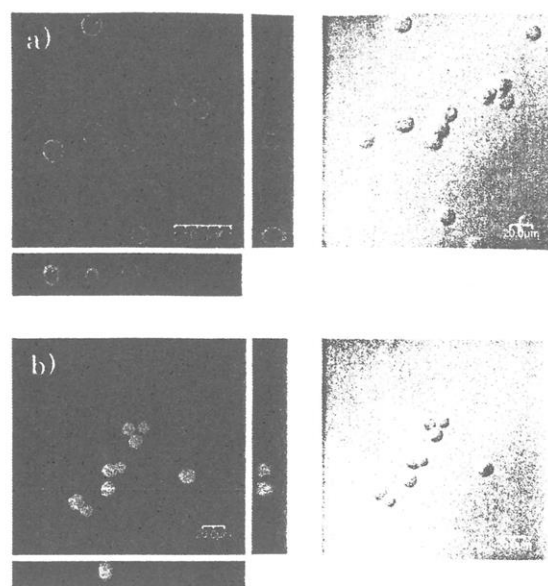


Figure 1. Confocal and differential interference contrast images. a) A solution of FITC-PEG-lipids in HBSS was added to a HEK293 cell suspension. b) An aqueous solution of FITC was added to a HEK 293 cell suspension

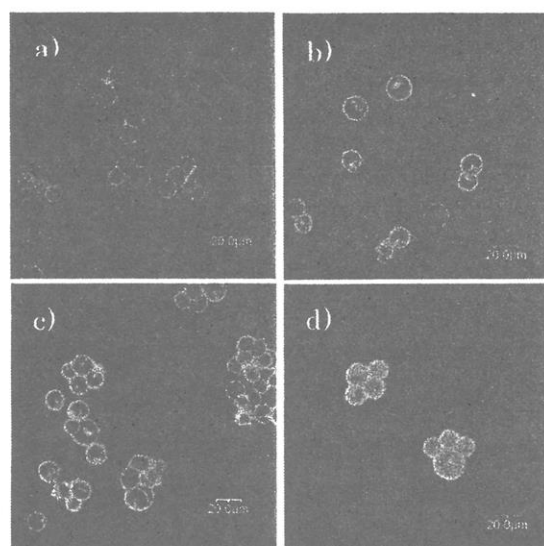


Figure 2. Confocal microscopic images of FITC-PEG-modified cells incubated at each concentration. a) $1 \mu\text{M}$, b) $10 \mu\text{M}$, c) $100 \mu\text{M}$, d) $1000 \mu\text{M}$

FITC-PEG-脂質修飾された細胞の蛍光強度を測定する事で細胞膜に導入された FITC-PEG-脂質の量を見積もった。標準溶液として FITC-PEG-脂質溶液を 10, 20, 50, 100 nM の 4 種用意し蛍光強度を測定した (Figure 3)。FITC-PEG-脂質末端の FITC 由来の蛍光ピーク (520 nm) での蛍光強度を FITC-PEG-脂質濃度に対してプロットし検量線を得た。また, FITC-PEG-脂質を導入した細胞懸濁液 (5×10^5 cells / ml) の蛍光強度を測定した。細胞への FITC-PEG-脂質導入する際の FITC-PEG-脂質の濃度は 10, 100 μ M の 2 種である。FITC-PEG-脂質導入細胞懸濁液の蛍光強度から FITC-PEG-脂質溶液の検量線を用いて細胞に導入された FITC-PEG-脂質の分子数を見積もった。FITC-PEG-脂質濃度 10 μ M を用いた系では 1 細胞あたり 2×10^7 分子, 100 μ M 系では 1 細胞あたり 1×10^8 分子の FITC-PEG-脂質が導入されていた。細胞を直径 15 μ m の球と仮定すると、PEG-脂質濃度 10 μ M で細胞導入を行った系では細胞表面 32 nm^2 あたり FITC-PEG-脂質分子が 1 分子, FITC-PEG-脂質濃度 100 μ M の系では細胞表面 8 nm^2 あたり FITC-PEG-脂質が 1 分子存在することがわかった。

細胞表面修飾による細胞毒性検討：PEG-脂質を細胞膜へ導入することによる細胞障害性を調べた。種々の濃度の PEG-脂質溶液中に細胞を 2 時間懸濁後トリパンブルー色素排除法により細胞の生死を判断した。Figure 4-a には縦軸には生細胞率, 横軸に PEG-脂質濃度を示した。また, Figure 4-b には細胞を PEG-脂質溶液中に懸濁する時間の影響を調べた結果を示した。いずれの条件においても、未処理細胞の生細胞率と大差は見られず細胞膜に PEG-脂質が導入されても細胞への障害は無いことがわかった。

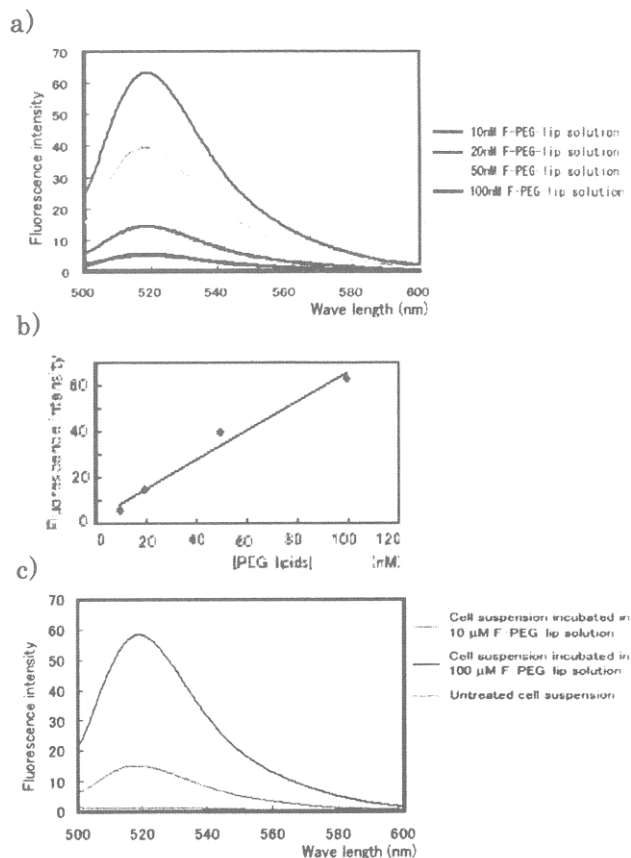


Figure3. Determination of PEG-lipid number on the cell surface a) Fluorescence intensity of FITC-PEG-lip solution. b) standard curve of FITC-PEG-lip solution c) Fluorescence intensity of FITC-PEG-lip modified cell suspension

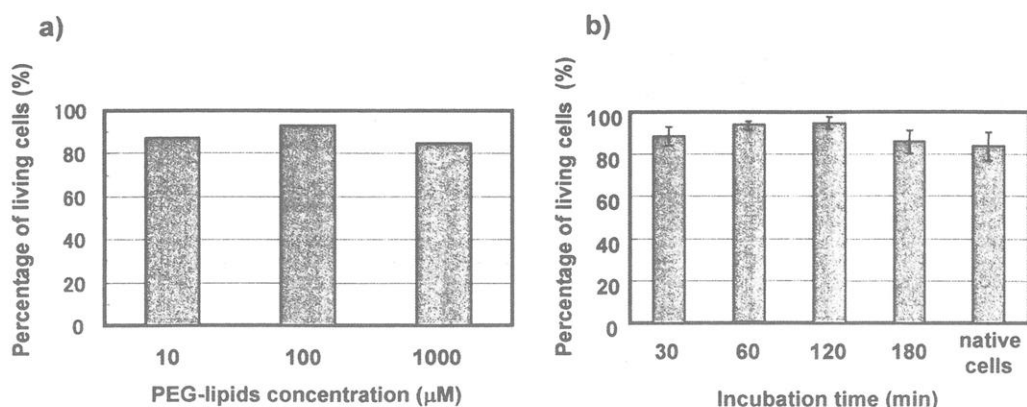


Figure 4. Percentage of living cells. a) Incubated for 60 min at each concentration of PEG-lipid. b) at each incubation time of PEG-lipid treatment in 10 μM

PEG-脂質導入細胞の細胞接着挙動：PEG-脂質による細胞表面修飾が細胞接着に及ぼす影響を調べた。細胞を PEG-脂質で表面修飾後細胞培養用ディッシュに播種し経時的に細胞の形態を観察することで、細胞接着挙動を評価した。Figure 5 に一例として細胞播種 1 時間後の細胞像を示した。未修飾の細胞は、基材上で接着伸展し平板な形態と取っているが、PEG-脂質修飾した細胞では、球形のまま存在し、基板に接着していなかった。これは写真上のイメージ図に示すように、PEG-脂質が細胞と培養基材との間に介在し、細胞と基材との接触を妨げているためであろう。Figure 5-c には、PEG-脂質処理時間が 30, 60, 120 min である細胞の接着細胞数をプロットした。細胞播種 1 時間後では、未修飾の細胞では約 50 % の細胞が接着するのに対し、PEG-脂質修飾した細胞ではほとんどの細胞が接着していなかった。しかし、その効果は一時的でその後細胞は徐々に基板に接着していった。

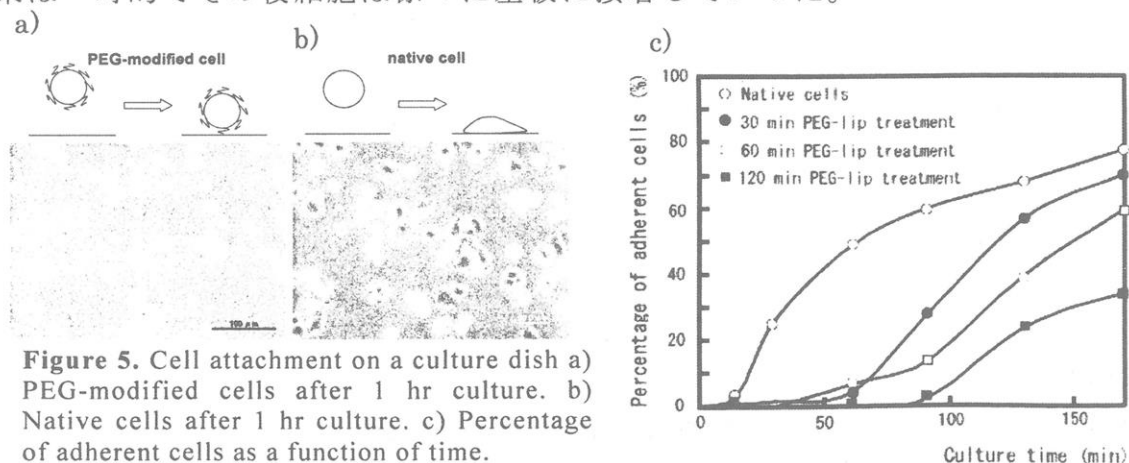


Figure 5. Cell attachment on a culture dish a) PEG-modified cells after 1 hr culture. b) Native cells after 1 hr culture. c) Percentage of adherent cells as a function of time.

PEG-脂質修飾細胞の基材への接着防止効果が限定的である原因はいくつか考えられる。1 つは細胞に導入された PEG-脂質が抜けている可能性、2 つ目は基板と PEG 鎖が接触した後 PEG-脂質が接着面以外の表面に移動し接着面

には PEG-脂質が存在しない可能性、3 つ目は細胞表面の PEG 層の外側まで接着タンパク質が出ている可能性がある。これらの可能性を検討するため、FITC-PEG-脂質処理細胞をガラスボトムディッシュに播種し接着後の蛍光像を共焦点顕微鏡と全反射顕微鏡を用いて詳しく観察した。細胞接着後の共焦点蛍光像で、依然として細胞表面に蛍光分子が存在することがわかった。また、各断面での蛍光を高さ方向に 3 次元的に蛍光画像を重ね合わせた図を見ると 3 次元的にも細胞表面全体に蛍光が確認できた。これらの結果から、細胞表面に導入された FITC-PEG-脂質は基板に接着後も細胞膜上に存在していることがわかる。一方、一日培養後の培地中の蛍光強度は細胞播種直後と比較して高くなっていた。これは、細胞から FITC-PEG-脂質が一部抜けていることを示している。これらの事実から FITC-PEG-脂質導入細胞の基板への接着後、FITC-PEG-脂質は細胞から一部抜けているもののその大部分は細胞膜にとどまっていると考えられる。

細胞と基材との接着面の蛍光を全反射蛍光顕微鏡で観察した。Figure 6 に示したように、底面全体に蛍光が見られ FITC-PEG-脂質が接着面の細胞膜にも存在していることがわかった。以上のように FITC-PEG-脂質は細胞接着後も細胞表面に存在していることがわかった。残る可能性として PEG 層の外側まで接着タンパク質が出ている可能性がある。細胞膜に導入された FITC-PEG-脂質がとり得る構造としては PEG 鎖同士が相互作用しないマッシュルーム型、あるいは PEG 鎖同士が相互作用

する場合のブラシ型の 2 種類が考えられる。マッシュルーム型の場合 PEG 鎖の高さは 5 nm、ブラシ型の場合は 10 nm 程度であると見積もられる[4]。一方接着タンパク質であるインテグリンは細胞膜からの突出部が 20 nm あると報告されている [5]。細胞表面に存在する PEG 層の厚さは最大で 10 nm 程度でありインテグリンの突出部の外側には届かないことから細胞の接着を完全に抑えるには不十分であったと考えられる。接着が遅れているのは PEG 層の厚さがインテグリンの高さには及ばないものの PEG 層がその接着部位に一部干渉したためだと思われる。

本研究では PEG 脂質を用いることで、細胞表面を細胞に障害を与えるこ

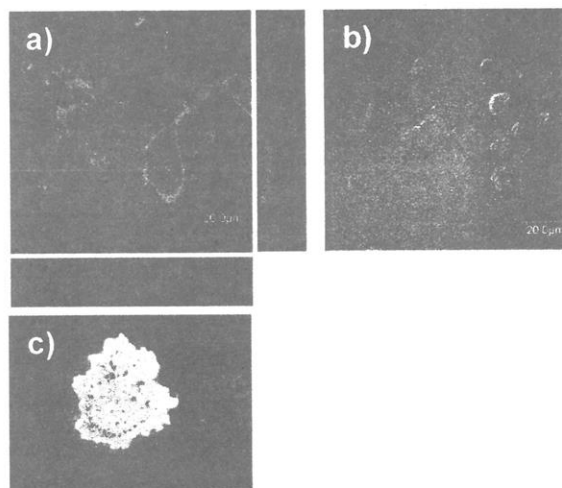


Figure 6. Microscopic images of FITC-PEG-lipid modified cells a) Confocal and b) differential interference contrast images c) TIRFM image

となく極めて薄い層で覆うことができた。現段階では突出した部分膜タンパク部分があるため免疫隔離能は不十分であると思われる。安定に生細胞表面を修飾できたことで、今後末端にアミノ基を有する PEG-脂質をカプセル化の足場としてポリイオンコンプレックスなどの安定膜を形成させることでより免疫隔離能を向上させることができると考えている。

4. 参考文献

- [1] Iwata H, Takagi T, Shimizu H, Yamashita K, Kobayashi K, Akutsu T, *J Biomed Mater Res*, **26**, 967-77, (1992).
- [2] J. Contreras, D. Xie, J. Mays, C. Smyth, C. Eckstein, F. Rahemtulla, C. Young, J. Anthony Thompson, G. Bilbao, D. Curiel, *Surgery*, **136**, 537-47 (2004).
- [3] Chung HA, Kato K, Itoh C, Ohhashi S, Nagamune, *J Biomed Mater Res A*, **70**, 179-85 (2004).
- [4] A.K.Kenworthy, K.Hristova, D.Needham, T.J.McIntosh. *Biophysical Journal*, **68**, 1921-1936 (1995)
- [5] M.V.Nermut, N.M.Green, P.Eason, S.S.Yamada, K.M.Yamada, *The EMBO Journal*, **7**, 4093-4099 (1988)

遺伝子導入試薬としてのカチオン化多糖誘導体の合成

城 潤一郎、岡崎 有道、田畑 泰彦

Jun-ichiro Jo, Arimichi Okazaki, and Yasuhiko Tabata

京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 生体材料学分野

1. 緒言

近年の基礎分子生物学の進歩により、遺伝子レベルにおける研究が大きく進展している。欠陥遺伝子や変異遺伝子を補充、もしくは生体が本来有している治癒力を補う遺伝子治療^{1,2}においては、遺伝性疾患、悪性腫瘍、自己免疫性疾患などの難治性疾患に対する臨床応用が開始されている^{1,3-6}。また、アンチセンス核酸に加え、近年、RNA interference を起こす 2 本鎖 RNA の small interference RNA (siRNA) による遺伝子発現抑制機構が見出だされ⁷、この現象を利用した遺伝子発現の人為的な増強もしくは抑制が理論的に可能になってきた。これらの知見により、ある機能を司る遺伝子の同定、および同定した遺伝子を用いた細胞機能の解明と制御、加えて、機能を改善、増強、抑制した細胞の作製とそれらの細胞を用いた移植治療など、基礎生物医学研究の展開と新しい治療法の開発が期待される。そこで、これらの研究開発を推進させるためには、遺伝子を安全に効率よく導入する技術・方法論が必要不可欠である。一般に、遺伝子を細胞に導入する方法として、ウイルスを用いる方法⁸⁻¹¹と非ウイルスを用いる方法¹²⁻¹⁶がある。ウイルスはそれ自身の感染力の強さから遺伝子導入効率は非常に高いという長所があるものの、毒性、免疫原性などに問題があり、臨床応用が懸念されているほか、ウイルスを使用できる施設に制限があり、その普遍性はきわめて低い。非ウイルスを用いる方法として、電気、磁気、および超音波などの物理刺激を用いた方法、およびカチオン化脂質やカチオン化高分子などの非ウイルス性の遺伝子キャリアを用いる方法がある。非ウイルスを用いる方法は、ウイルスよりも安全性には優れているが、遺伝子導入効率は低いという点に改良の余地がある。この点を解決するべく、様々な非ウイルス性遺伝子キャリアのデザインと合成が行われている。遺伝子は、負電荷を有するリン酸基の連なった構造をしており、生理条件下で分子内の負電荷同士の反発により広がった構造をしている。そのため、負電荷を有する細胞表面との電氣的反発およびその大きな分子サイズをもつ裸の遺伝子を細胞に導入するのはきわめて困難である。一般に、非ウイルス性遺伝子キャリアは、遺伝子と複合体を形成させることにより、複合体の表面を正電荷に、かつその分子サイズを下げ、細胞に取り込まれやすくすることができる。このような、遺伝子の性質を変化させることにより、その細胞内への導入を容易にしている。しかしながら、この場合、遺伝子の細胞内への取り込みは、複合体と細胞表面との間の静電的な相互作用力によるものであるため、その細胞特異性は乏しいと言わざるを得ない。そこで、細胞特異的な遺伝子導入を可能とする非ウイルス性遺伝子キャリアの設計が必要である。

多糖は、多数の単糖がグリコシド結合によって脱水縮合した高分子化合物である。その多くが水溶性であり、医薬品・食品添加物などに用いられてきた長い歴史をもち、その安全性・生体適合性は実証済みである。また、さまざまな分子量、溶解度などの物理化学的性質を変化させた試料を作製できる点も多糖の利点である。多糖は、多数のヒドロキシル基を有するため、化学修飾が容易であり、そのことにより多糖の化学的、物理的および生物学的機能を改変することができる。加えて、それは多糖が単糖からなっているため、細胞表面に存在する糖鎖認識レセプターによって認識される可能性がある点である。多糖には、遺伝子導入のための非ウイルス性遺伝子キャリアとして有用な点がもうひとつある。すなわち、多糖は、細胞表面レセプターによる認識により細胞に取り込まれるため、多糖からなる遺伝子キャリアを用いることで、遺伝子が細胞特異的に取り込まれることが期待できる。本研究では、カチオン性残基として生体内に存在するポリアミンのひとつで、しかも、pH の低下を抑えるバッファー効果を有しているスぺルミンを用いた¹⁷⁾。本稿では、多糖を材料とした遺伝子キャリア、カチオン化多糖誘導体の合成とその遺伝子導入試薬としての有効性について検討を行った結果について報告する。

2. 実験

2.1 カチオン化多糖誘導体およびプラスミド DNA の作製

プルラン（株式会社林原生物化学研究所製、重量平均分子量：5,900、12,200、23,700、48,000、100,000、および 200,000）、デキストラン（シグマアルドリッチ株式会社製、重量平均分子量：57,000）、マンナン（ナカライテスク株式会社製、重量平均分子量：36,000）、およびアミロペクチン（ナカライテスク株式会社製、重量平均分子量：42,500）を脱水ジメチルスルホキシドに溶解させた（10 mg/ml）。次に、種々の濃度の *N*, *N'*-carbonyldiimidazole（CDI）、および *N,N'*-bis(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine（スぺルミン）を加え、35℃、20 時間の条件で攪拌した。反応溶液を蒸留水に対して 2 日間の透析、凍結乾燥することにより、スぺルミン導入カチオン化多糖誘導体を得た。多糖のヒドロキシル基に対するスぺルミンの導入されたモルパーセントを導入率とし、元素分析の結果より算出した。

プラスミド DNA としてルシフェラーゼをコードするプラスミド DNA を用いた。アンピシリン耐性遺伝子を含むルシフェラーゼのプラスミド DNA を大腸菌にトランスフォームした後、アンピシリン含有 LB 培地にて、37℃、18 時間の条件下で培養させた。増殖した大腸菌を遠心回収し、アルカリ-SDS 法¹⁸⁾によりプラスミド DNA を抽出した。プラスミド DNA の純度評価として、得られたプラスミド DNA 水溶液の 280 nm に対する 260 nm の比を測定したところ、1.8–2.0 の間であった。

2.2. カチオン化多糖誘導体とプラスミド DNA とのポリイオンコンプレックス形成

濃度の異なるカチオン化多糖誘導体水溶液とプラスミド DNA の 10 mM リン酸緩衝生理食塩水溶液（PBS, pH 7.4）とを同体積で混合、室温で 15 分間、静置するこ

とにより、両者のポリイオンコンプレックス (PIC) を形成させた。スペルミン導入カチオン化多糖誘導体とプラスミド DNA との混合モル比 (N/P 比) は (カチオン化多糖誘導体のアミノ基モル数) / (プラスミド DNA のリン酸基モル数) である。

2.3 カチオン化多糖誘導体とプラスミド DNA とのポリイオンコンプレックスのキャラクタリゼーション

2.3.1 濁度測定

PIC を異なるイオン強度からなる NaCl 含有 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で N/P 比=3 の条件で形成させた。形成した PIC の水溶液濁度を波長 500 nm の吸光度変化により評価した。

2.3.2 電気泳動

PIC を 10 mM PBS 中で N/P 比=3 の条件で形成させた。得られたポリイオンコンプレックスを EtBr (0.1 mg/ml) を含んだアガロース (1 wt%) 水溶液から作製したゲルを用いて、100 V、30 分の条件で電気泳動した。電気泳動用緩衝液は、10 mM のエチレンジアミン四酢酸を含む 445 mM トリス-ほう酸緩衝液 (pH 8.3) である。UV トランスイルミネーター (Gel Doc 2000 : 日本バイオ・ラッドラボラトリーズ製) により電気泳動されたプラスミド DNA を観察した。

2.3.3 分子サイズ・ゼータ電位の測定

PIC を 10 mM PBS 中で N/P 比=3 の条件で形成させた。得られた PIC の分子サイズおよびゼータ電位を、それぞれ動的光散乱 (Dynamic Light Scattering, DLS) 法および電気泳動光散乱 (Electrophoretic Light Scattering, ELS) 法を用いて測定した。DLS は、Ar レーザーを備えた DLS-7000 (大塚電子製) にて測定 (検出角度 90°、25°C) し、PIC の流体力学的半径 R は、測定によって得られた散乱強度-時間相関関数および Einstein-Stokes の式 : $R = kT/3\pi\eta D$ (k : ボルツマン定数、 T : 絶対温度、 η : 溶媒の粘度、 D : 拡散係数) とから算出した。ELS は、ELS-6000 (大塚電子製) にて測定 (検出角度 20°、25°C) し、PIC のゼータ電位 ζ は、測定によって得られた電気移動度および Smoluchowski の式 : $U_p = \varepsilon\zeta/(4\pi\eta)$ (U_p : 電気移動度、 ε : 溶媒の誘電率、 η : 溶媒の粘度) とから算出した。

2.4 ラット骨髄由来間葉系幹細胞への遺伝子導入実験

細胞としてラット骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を用いた。MSC は Wister rat (オス、3 週齢) の大腿骨および頸骨から採取した骨髄液に存在する細胞のうち培養皿に接着する細胞分画であり、2 回の継代を行った細胞を実験に用いた。12 ウェルプレート (Costar 製) に、 5×10^4 cells/well の細胞を播種し、10 vol% 仔ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) を添加した α Minimum Essential Medium (α MEM-FCS) 中にて、

5% CO₂- 95% Air 、 37℃で 24 時間、培養した。血清を含まないαMEM 培地へ交換した後、ルシフェラーゼプラスミド DNA あるいはその PIC を加えて、6 時間、培養した。次に、培地を MEM-FCS に交換し、さらに 24 時間、培養を続けた。培地を除去、細胞を PBS でよく洗浄した後、細胞溶解液(25 mM トリスーリン酸緩衝液(pH 7.8)、2 mM dithiothreitol、2 mM 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid、10% glycerol、1% Triton®X-100)を加え、細胞を溶解させた。細胞溶解液中のルシフェラーゼタンパク質の化学発光を測定することによって、遺伝子発現を定量した。また、Bicinchoninate (BCA) 法¹⁹にて細胞溶解液中の総タンパク質量を測定した。

3. 結果と考察

3.1 カチオン化多糖誘導体の作製

Table 1 は作製したカチオン化多糖誘導体のスベルミン導入率を示す。導入率は CDI の添加量により変化できることがわかった。CDI の添加量を一定にすることにより、スベルミン導入率は用いる多糖の種類および分子量に依らず一定となった。この導入率が 10 モル％程度のそろったサンプルを用いて、多糖の種類がプラスミド DNA 導入に与える影響について調べた。

Table 1. Preparation and characterization of spermine-polysaccharide.

Polysaccharide Molecular weight	[CDI]/[OH] ^{a)}				
	0.5	1	1.5	3	5
Pullulan					
5,900			12.9 ^{b)}	18.8	
11,800			12.3	22.0	
22,800			11.0	23.0	
47,300	2.69	5.60	12.3	20.4	32.5
112,000	1.07	5.95	10.7	26.3	32.9
212,000	2.19	7.35	9.74	30.7	33.1
Dextran					
57,000			9.51		
Mannan					
36,000			13.3		
Amylopectin					
42,500			12.3		

a) Molar ratio of N,N'-carbonyldiimidazole (CDI) initially added to the hydroxyl groups (OH) of polysaccharide.

b) Molar percentage of spermine introduced to the hydroxyl groups of polysaccharide.

3.2 カチオン化多糖誘導体とプラスミド DNA とのポリイオンコンプレックスのキャラクタリゼーション

Figure 1 は異なるイオン強度をもつ水溶液中で、カチオン化多糖誘導体とプラスミド DNA とを混合した時の水溶液濁度測定の結果である。水溶液のイオン強度の上昇とともに、PIC 水溶液の濁度は減少した。これは、イオン強度が高くなることにより、プラスミド DNA の負電荷ならびにカチオン化多糖誘導体の正電荷がそれぞれ遮蔽され、お互いの静電相互作用が弱められたことが原因であると考えられる。これらの結果は、カチオン化多糖誘導体とプラスミド DNA との複合体 (PIC) が静電相互作用により形成されていることを示している。

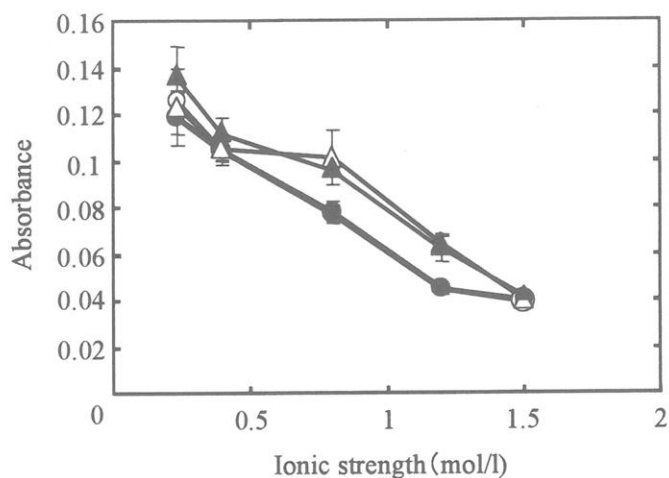


Figure 1. Solution turbidity of spermine-polysaccharide-plasmid DNA complexes prepared at the N/P ratio of 3.0 as a function of the solution ionic strength. The polysaccharide used for spermine introduction is (○) pullulan (Mw = 47,300), (●) dextran, (△) mannan or (▲) amylopectin.

Figure 2 は、プラスミド DNA と異なるカチオン化多糖誘導体との混合により形成された PIC のアガロースゲル電気泳動の結果を示す。PIC を形成することにより、サンプルの泳動が制限された。PIC 形成により複合体の表面電荷および見かけの分子サイズが変化したためであると考えられる。

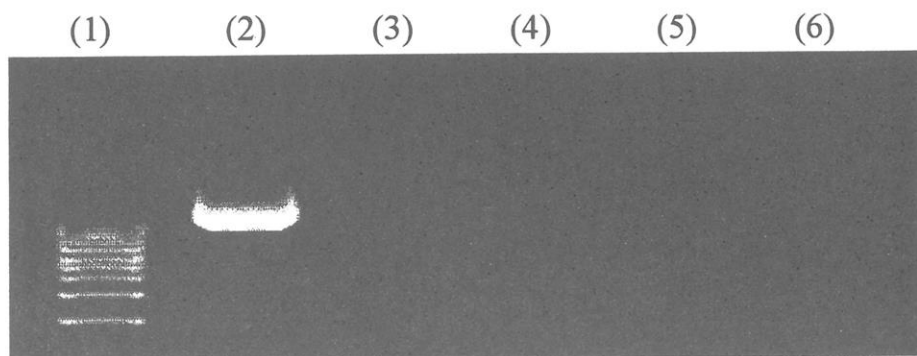


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of spermine-polysaccharide-plasmid DNA complexes at the N/P ratio of 3.0. The sample applied is (1) DNA marker, (2) free plasmid DNA or complexes prepared by spermine derivatives of (3) amylopectin, (4) dextran, (5) mannan, and (6) pullulan (Mw = 47,300).

Table 2 はプラスミド DNA と異なるカチオン化多糖誘導体との混合により形成された PIC の分子サイズおよびゼータ電位を示す。遊離のプラスミド DNA と比較して、PIC の分子サイズおよびゼータ電位は変化した。プラスミド DNA はポリアニ

オンであるため、その分子鎖は、電氣的反発力で広がっている。カチオン化多糖誘導体とのポリイオンコンプレックス形成により、電氣的中和と分子鎖のからまりによって、この分子鎖の広がり（分子サイズ）およびゼータ電位が変化したものと考えられる。カチオン化多糖誘導体の分子量およびスベルミン導入率の増大とともに、得られた PIC の分子サイズが減少する傾向が見られた。分子量が小さく、あるいは導入率が低いカチオン化多糖誘導体を用いた場合には、分子鎖が短く、かつカチオン性残基同士の間隔が広いことから、全体電荷が足りないためにプラスミド DNA が十分に複合体を形成できない。その結果として、カチオン化多糖誘導体を介してプラスミド DNA 同士が凝集し、分子サイズが増大したと考えられる。

Table 2. Apparent molecular size and zeta potential of plasmid DNA complexed with cationized polysaccharides

cationized polysaccharides					
Polysaccharide Molecular weight		Apparent molecular size (nm) / zeta potential (mV) (spermine introduction)			
Pullulan					
5,900		1530 / +11.3 (12.9)			
11,800		1290 / +14.4 (12.3)			
22,800	2200 / +7.00 (5.60)	327 / +14.3 (11.0)	282 / +13.6 (23.0)	195 / +14.5 (32.5)	
47,300	1280 / +9.04 (5.95)	246 / +15.0 (12.3)	205 / +16.0 (20.4)	282 / +16.8 (32.9)	
112,000	1250 / +10.0 (7.35)	259 / +13.4 (10.7)	288 / +10.8 (26.3)	282 / +11.3 (33.1)	
212,000		280 / +14.1 (9.74)			
Dextran					
57,000		157 / +12.2 (9.51)			
Mannan					
36,000		294 / +14.0 (13.3)			
Amylopectin					
42,500		122 / +13.3 (12.3)			
Free plasmid DNA		410 / -14.7 (-)			

The complex was prepared at a N/P ratio of 3.

3.2 ラット骨髓由来間葉系幹細胞への遺伝子導入実験

3.2.1 MSC の遺伝子発現レベルに与える多糖の種類の影響

Figure 3 は、種々のカチオン化多糖誘導体を用いた MSC における遺伝子発現レベルを示す。図から明らかなように、多糖の種類により遺伝子発現レベルは変化し、カチオン化プルラン誘導体を用いたときに最も高い遺伝子発現レベルを示した。また、その遺伝子発現レベルは市販の遺伝子導入試薬(Lipofectamine 2000[®], SuperFect[®])よりも高いことがわかった。遺伝子発現レベルは、遺伝子キャリアの分子サイズおよびゼータ電位に影響を受けることが知られている^{16,20}。しかしながら、Table 2 に示すように、カチオン化多糖誘導体からなる PIC の分子サイズおよびゼータ電位は、多糖の種類によらず、同程度であった。また、用いる細胞により、遺伝子発現レベルが変化し、

最も高いレベルを与える多糖の種類も異なっていた。細胞の種類により、その表面の糖認識レセプターの数と種類が異なっていることから、PICの遺伝子発現増強の理由の一つとして、糖鎖レセプターを介した細胞特異的な取り込みの関与が考えられる。

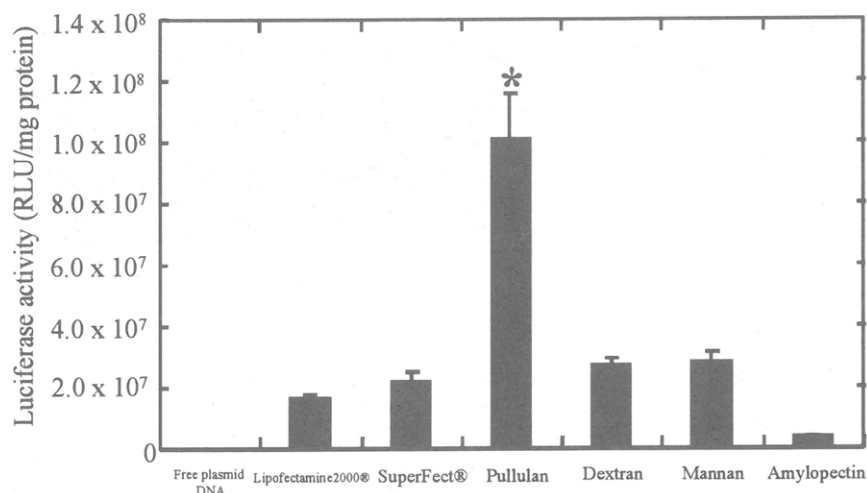


Figure 3. Effect of the polysaccharide type on the luciferase expression of spermine-polysaccharide-plasmid DNA complexes for MSC. The plasmid DNA amount applied is 2.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ and the N/P ratio is 3.0. *, $p < 0.05$; significant against the expression level of complexes prepared with other spermine-polysaccharides.

3.2.2 MSCの遺伝子発現レベルに与えるプルランの分子量および導入率の影響

Figure 4 および **5** は、異なる分子量ならびにカチオン化度をもつカチオン化プルラン誘導体を用いた MSC における遺伝子発現レベルを示す。いずれの分子量のプルランを用いた場合も、プルランのカチオン化度（スpermin導入率）に依存して遺伝子発現は変化した。また、最も高い遺伝子発現を示すカチオン化度は、用いたプルランの分子量により異なっていた。

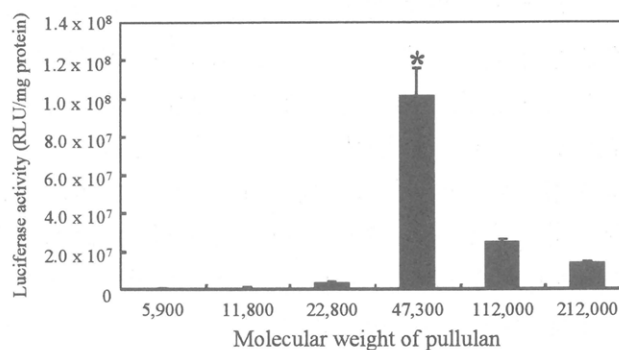


Figure 4. Effect of the pullulan molecular weight on the luciferase expression of spermine-pullulan-plasmid DNA complexes for MSC. The plasmid DNA amount applied is 2.5 $\mu\text{g}/\text{well}$ and the N/P ratio is 3.0. *, $p < 0.05$; significant against the expression level of complexes prepared with other spermine-pullulans.

プルラン誘導体の分子量が 22,800 より高く、導入率が 10% より高い場合、ポリイオンコンプレックスの分子サイズは、200~300 nm 程度、ゼータ電位は約 +15 mV である (Table 2)。ポリイオンコンプレックスのサイズが 200 nm 程度で正に帯電している場合、高い遺伝子発現が得られることが報告されている^{16,20}。しかしながら、PICの分子サイズやゼータ電位だけでは、今回の結果を説明することはできない。

例えば、分子量やスベルミン導入率が高い場合、ポリイオンコンプレックスの安定性が高く、細胞内で遺伝子がカチオン化多糖キャリアから解離しないため、遺伝子発現が低下したことが可能性として考えられる。このように、遺伝子発現には、細胞内取り込み後の PIC の細胞内動態が大きく関わっていることが予想され、であろう。この点に関してより詳細な検討が必要である。

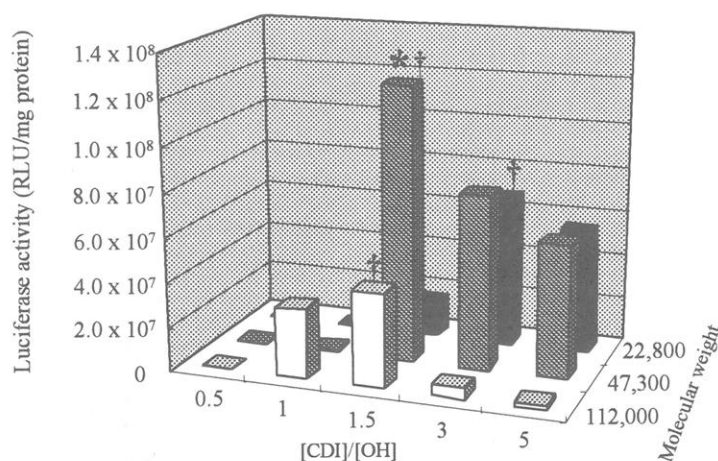


Figure 5. Effect of the extents of spermine introduced and pullulan molecular weight on the luciferase expression of spermine-pullulan-plasmid DNA complexes for MSC. The molecular weight of pullulan used for spermine introduction is 22,800, 47,300 or 112,000. The plasmid DNA amount applied is 2.5 μ g/well and the N/P ratio is 3.0. *, $p < 0.05$; significant against the expression level of complexes prepared with other spermine-pullulans with corresponding molecular weight. †, $p < 0.05$; significant against expression level of complexes prepared with other spermine-pullulans with corresponding spermine introduction.

4. おわりに

本研究では、異なる多糖にスベルミンを導入したカチオン化多糖誘導体を作製した。カチオン化誘導体反応の条件を変化させることにより、異なるカチオン化多糖誘導体を作製できた。カチオン化多糖誘導体はプラスミド DNA とポリイオンコンプレックスを形成することができ、細胞の遺伝子発現レベルを増強することができた。この発現レベルは、市販のカチオン化リポソームに比べて高いことがわかった。多糖誘導体を用いた MSC に対する遺伝子発現レベルは、そのレベルが用いた多糖の種類、分子量、導入率により変化した。この理由については、現在、不明な点も多いため、PIC の物理化学的性質と細胞との相互作用、あるいは細胞内動態などとの相関性について、今後の検討が必要となる。

カチオン化多糖誘導体を用いることで、株化細胞、ガン細胞、初代培養細胞、胚性幹細胞、および脂肪由来間葉系幹細胞などの細胞への遺伝子導入にも成功している²¹。今後、これらの非ウイルスキャリアを用いた遺伝子解析、遺伝子治療、細胞の機能改変とそれらの細胞による移植治療などへの研究展開が大いに期待される。

5. 参考文献

1. Ratko TA, Cummings JP, Blebea J, et al. Clinical gene therapy for nonmalignant disease. *Am J Med.* Nov 2003;115(7):560-569.
2. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol.* Mar 2000;18(3):119-128.

3. Nemunaitis J, Fong T, Robbins JM, et al. Phase I trial of interferon-gamma (IFN-gamma) retroviral vector administered intratumorally to patients with metastatic melanoma. *Cancer Gene Ther.* Jul-Aug 1999;6(4):322-330.
4. Vecil GG, Lang FF. Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses. *J Neurooncol.* Dec 2003;65(3):237-246.
5. Riddell SR, Elliott M, Lewinsohn DA, et al. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med.* Feb 1996;2(2):216-223.
6. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* Oct 20 1995;270(5235):475-480.
7. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* May 24 2001;411(6836):494-498.
8. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther.* Oct 1998;80(1):35-47.
9. Duisit G, Salvetti A, Moullier P, et al. Functional characterization of adenoviral/retroviral chimeric vectors and their use for efficient screening of retroviral producer cell lines. *Hum Gene Ther.* Jan 20 1999;10(2):189-200.
10. Kim YS, Lim HK, Kim KJ. Production of high-titer retroviral vectors and detection of replication-competent retroviruses. *Mol Cells.* Feb 28 1998;8(1):36-42.
11. Peng KW, Russell SJ. Viral vector targeting. *Curr Opin Biotechnol.* Oct 1999;10(5):454-457.
12. Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature.* Jan 26 1989;337(6205):387-388.
13. Nishi T, Yoshizato K, Yamashiro S, et al. High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation. *Cancer Res.* Mar 1 1996;56(5):1050-1055.
14. Toncheva V, Wolfert MA, Dash PR, et al. Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers. *Biochim Biophys Acta.* May 8 1998;1380(3):354-368.
15. Oupicky D, Konak C, Ulbrich K, et al. DNA delivery systems based on complexes of DNA with synthetic polycations and their copolymers. *J Control Release.* Mar 1 2000;65(1-2):149-171.
16. Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther.* May 20 2001;12(8):861-870.
17. Hosseinkhani H, Aoyama T, Yamamoto S, et al. In vitro transfection of plasmid DNA by amine derivatives of gelatin accompanied with ultrasound irradiation. *Pharm Res.*

- Oct 2002;19(10):1471-1479.
18. J. Sambrook, D.W. Russell, E. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual 3rd ed. Chapter 1*; 2001.
 19. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oct 1985;150(1):76-85.
 20. Zhou X, Huang L. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta.* Jan 19 1994;1189(2):195-203.
 21. Yamamoto M, Jo, J., Ikai, T., Okazaki, A., Hirano, Y., Tabata Y. カチオン化プルラン誘導体を用いた in vitro および in vivo 遺伝子導入. *Polymer Preprints.* 2004;53(2):4318.

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu

Vol. 63

(Annual Report of the Research Institute for

Chemical Fibers, Japan: Vol. 63, 2006)

Published by

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho

Kyoto, Japan

日 本 化 学 繊 維 研 究 所 第 63 回 講 演 集

2006年 3 月20日 印刷

2006年 3 月31日 発行

財団法人日本化学繊維研究所

編集兼発行者 尾 池 和 夫

発行所 財団
 法人 日本化学繊維研究所

京都市左京区吉田河原町14

(財)近畿地方発明センター内

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu
Vol. 63
(Annual Report of the Research Institute
for Chemical Fibers, Japan : Vol. 63)

March 2006