

ISBN 0368-6280

公益財団法人
日本化学繊維研究所

講 演 集

第 79 集

2022 年 3 月

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu
Vol.79
(Annual Report of the Research Institute for
Chemical Fibers, Japan: Vol.79)
March 2022

公益財団法人 日本化学繊維研究所の概要

【沿革・目的・背景】

本財団は、繊維商社社長（当時）伊藤萬助氏による京都帝国大学への寄附金 20 万円を基に、化学繊維の学術と産業の振興を目的として 1936 年 9 月 1 日に同大学内に設立されました。それ以来 76 年の長きにわたり、旧民法に基づく財団法人として、代々の京大総長を理事長に招き、その活動を継続してきました。2008 年の新法人法の施行に伴い、2013 年 4 月 1 日より、京都大学とは独立した新たな公益財団法人として生まれ変わり、現在に至っています。

本財団の目的と事業内容は時代とともに変化しましたが、現在は、広く高分子科学分野の学術及び科学技術の振興を目的とし、当該分野における研究成果の公開及び専門知識の普及、産学間及び国際的学術交流、並びに研究教育の支援に関する諸事業を行っています。具体的には、公開講演会、研究者育成講座、国際研究集会などの開催、学術講演集の刊行、及び公募型研究助成を主事業としています。

前記の歴史的経緯が示すとおり、本財団は、京都大学の繊維・高分子関連分野（旧工学部工業化学教室・繊維化学教室、現大学院工学研究科高分子化学専攻・材料化学専攻及び協力研究室）との連携が強く、また現京都大学の高分子科学研究者を主要メンバーとする非営利学術組織 Kyoto Institute of Polymer Science (KIPS) と連携・協力関係にあります。一方、産業界からは、財団の維持会員企業として年会費（寄付金）の拠出を受けています。これらの連携・協力と支援が、本財団の一貫した背景をなしています。

【事業内容】

（1）日本化学繊維研究所講演会および同講演集

本講演会および講演集は、歴史的には、櫻田一郎先生によるビニロンの発明や堀尾正雄先生の二浴緊張紡糸法の発明など、往年の京大学派が産み出した数々の輝かしい研究成果に関し、その逸早い発表の場を提供するという貴重な使命を果たしてきました。

現在は、上記の京都大学高分子関連研究室の担当教授を網羅する講師陣と関連産業界から招く特別講師による、毎年 1 回の公開学術講演会の開催およびその詳録（講演集）の刊行により、高分子科学に関する最新の研究成果等を一般に公開しています。講演会終了後の懇親会は、産・学・市民交流の場となっています。

（2）国際研究集会

上記の KIPS および京都大学高分子化学専攻との連携の下で、2 年に 1 回の頻度で国際高分子研究集会を開催し、最新研究情報の交換と緊密な学術交流を行っています。パートナーとなる国外の特定の大学または研究組織との共同による、連続 2 回（初回は京都、第 2 回は相手方都市で）の開催を原則とし、講演と講演予稿集を一般に公開しています。

（3）若手研究集会

高分子科学の先導的研究者の養成と持続的な学術振興を目的とし、KIPS の若手メンバーを運営主体として京都地域内外の若手研究者を招いて 2 年に 1 回、開催しています。

（4）研究者育成講座：KIPS 高分子講座

企業の若手研究者を主な対象とする通年の育成講座です。KIPS の教授メンバー約 20 名が、初級者にも理解しうる基礎から最先端の応用に至る幅広い領域についての専門知識と学術情報を、延べ 20 余回にわたって平易に解説します。若手研究者の育成のみならず、産学間の交流と連携を推進するための持続的ネットワークの形成を目指しています。

（5）研究助成（公募型）

京都府、滋賀県および奈良県下の大学の繊維・高分子化学分野における先端的な研究に対して、公募によって申請のあった研究について、有識者からなる選考委員会に諮り、申請資金の全部または一部を助成しています。

公益財団法人 日本化学繊維研究所 講演集目次 (第79集)

3.01	高分子ナノ粒子/血小板ハイブリッド ドラッグデリバリーシステムの構築 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 ¹⁾ 田畑泰彦 ¹⁾ 、江見翼 ¹⁾ 、城潤一郎 ¹⁾²⁾ 大阪歯科大学 ²⁾	… 4
3.02	タンパク質モチーフを利用した機能材料の創出 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 沼田圭司、大前仁、宇治広隆、土屋康佑 及川和聡、藤田聖矢、Foong Choon Pin 寺田佳世	… 9
3.03	π 共役を拡張しない狭エネルギーギャップ化の設計戦略と近赤外発光性高分子の開発 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 田中一生、権正行、伊藤峻一郎	… 13
3.04	ポリスチレンスルホン酸ナトリウムからなるブラシ状高分子の分子パラメータ 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 中村洋、松居大志、柴山雅貴	… 18
3.05	バロプラスチックの圧力誘起相転移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 古賀毅、出垣大貴	… 23
3.06	高分子太陽電池における電圧損失機構 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 大北英生、齋藤俊晴、玉井康成	… 27
3.07	配列制御ポリマーの精密合成と配列に基づく温度応答特性 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 大内誠、柴田健太郎、徐孝炎、黒田啓太	… 32
3.08	ブラシ状高分子による結晶アンカリング特性の制御 京都大学化学研究所 ¹⁾ 辻井敬亘 ¹⁾ 、黄瀬雄司 ¹⁾ 、佐藤治 ²⁾ 東京大学 ²⁾ 大野工司 ¹⁾	… 36
3.09	活性ラジカルと安定ラジカル間のカップリングと水素引き抜き反応に及ぼす粘度の効果 京都大学化学研究所 山子茂、Li Xiaopei、中村泰之	… 40
3.10	ASAXS法によるゴム充填系の階層構造に関する研究 京都大学化学研究所 竹中幹人、渡辺幸	… 47
3.11	生体膜を基盤とする高分子ナノハイブリッドの創製とバイオ応用 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 秋吉一成、水田涼介、澤田晋一、佐々木善浩	… 51
3.12	オルガノイドを用いたコロナウイルス感染モデル 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 永樂 元次	… 56
4.00	謝辞	… 59

高分子ナノ粒子/血小板ハイブリッド ドラッグデリバリーシステムの構築

Construction of a drug delivery system by the platelet hybrid with polymer nanospheres

○田畑 泰彦¹⁾、江見 翼¹⁾、城 潤一郎^{1),2)}

Yasuhiko TABATA ¹⁾, Tsubasa EMI ¹⁾, Jun-ichiro JO ^{1),2)}

¹⁾Laboratory of Biomaterials, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

²⁾Department of Biomaterials, Faculty of Dentistry, Osaka Dental University

The objective of this study is to construct a platelet-mediated delivery system for drug incorporated nanospheres. Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA-NS) nanospheres with different sizes and surface properties were prepared by changing the preparation parameters. When incubated with platelets, PLGA-NS prepared with poly(vinyl alcohol) suppressed the platelet activation. It was revealed by the flow cytometric analysis that platelets associated with PLGA-NS (platelet hybrids, PH) had a similar biological property to that of the original platelets. When applied in an in vitro model of tumor tissue composed of an upper chamber pre-coated with fibrin and a lower chamber culturing tumor cells, the PH with PLGA-NS incorporating an anti-tumor drug suppressed the growth of tumor cells through the specific adhesion onto the upper chamber and drug release from the upper chamber.

1. 緒言

ドラッグデリバリーシステム (DDS) は、材料と組み合わせることによって薬剤の活性を最大限発揮させる技術、方法論である。DDSの目的の1つであるターゲティングは、薬剤を標的の組織あるいは細胞へ特異的に送達することを目指している。1975年にRingsdorf博士が提唱した、高分子によるターゲティングキャリアの設計論¹⁾に基づき、これまでに様々な人工材料からなるターゲティングキャリアがデザインされている。高分子ナノ粒子は、がんあるいは炎症組織への薬剤ターゲティングキャリアとして有望視されているが、そのターゲティング能は十分とは言えない状況である。一方、体内に存在する一部の細胞あるいはその分泌物は、それぞれの役割に基づき目的部位へ自発的に移動し、所望の生物機能を発揮することによって、正常時には恒常性を保ち、異常時には病態を沈静化する。近年、このような細胞あるいはその分泌物の働きに着目し、細胞、細胞膜、あるいはその分泌物をDDSキャリアとして用いる研究も行われている^{2,3)}。

血小板は、がんおよび炎症組織中の血管損傷部位に存在するフィブリン、コラーゲン等を認識して集積し、活性化(凝集と脱顆粒化)することで周辺部位と相互作用することが知られている^{4,5)}。一方、血小板は、さまざまなサイズ、材質の粒子を取り込み、異物の排除に寄与する^{6,7)}。そこで、これらの2つの特長に基づき、血小板と抗がん剤内包高分子ナノ粒子とを組み合わせる(血小板ハイブリッド)ことによって、血小板のフィブリン認識能に基づく抗がん剤のがんターゲティング技術を構築できないかと考えた。

血小板ハイブリッドの作製において考慮しなければならない点は、ハイブリッド形成時の血小板の活性化である。血小板は、異常を感知すると不可逆的に活性化し、その生物機能は失われてしまう。そこで本研究では、血小板

の活性化を回避した高分子ナノ粒子とのハイブリッドを構築するための条件について検証した。すなわち、表面が種々の高分子で被覆された乳酸-グリコール酸共重合体(PLGA)ナノ粒子を作製し、混合による血小板の凝集挙動を評価した。続いて、血小板活性化を誘導しないPLGAナノ粒子を用いて血小板ハイブリッドの作製を試みた。最後に、得られた血小板ハイブリッドの生物機能と抗がん活性を調べた⁸⁾。

2. 材料と方法

2-1. サイズと表面性状の異なるPLGAナノ粒子の作製

種々の高分子界面活性剤(ポリビニルアルコール(重合度1,000、けん化度86-90%:PVA)、ゼラチン(重量平均分子量100,000、等電点5.0:pI5あるいは等電点9.0:pI9)を含む水溶液(10 ml)へ、PLGA(分子量20,000、乳酸/グリコール酸比=75/25)のアセトン溶液(1 ml)を滴下することでエマルジョンを形成させた。その後、攪拌しながらアセトンを十分に蒸発させ、遠心洗浄することでPLGAナノ粒子を得た。PLGAあるいは高分子界面活性剤の濃度、攪拌速度、およびイオン強度の異なる条件で、種々のPLGAナノ粒子を作製した。動的光散乱(DLS)および電気泳動光散乱(ELS)により、得られたPLGAナノ粒子のサイズとゼータ電位を計測した。

2-2. ナノ粒子との混合による血小板の凝集挙動の評価

血小板は、常法⁹⁾にてC57BL/6Nマウス(10-15週齢、オス)より単離した。この血小板とPLGAナノ粒子とを混合し、37°Cで30分間静置した。遠心処理後、血小板数を血球計算盤で計測することによって、PLGAナノ粒子との混合による血小板の凝集挙動を評価した。

2-3. 薬剤内包PLGAナノ粒子の作製

混合による血小板凝集が観察されなかったPLGAナノ粒子の作製条件にて、クマリン6 (CMR) あるいはパクリタキセル (PTX) を内包したPLGAナノ粒子を作製した。DLSおよびELSにより、得られた薬剤内包PLGAナノ粒子のサイズとゼータ電位を計測した。加えて、蛍光分光光度計 (CMR) あるいは高速液体クロマトグラフィー (PTX) にてナノ粒子中の薬剤内包量を測定した。

2-4. 血小板ハイブリッドの作製

血小板 (10⁸個) の懸濁液へ、異なる量のCMR内包PLGAナノ粒子を加え、37℃、30分間の条件で静置した。得られた混合液を遠心、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄することで血小板ハイブリッドを得た。血小板へのPLGAナノ粒子の取り込み量を蛍光分光光度計にて算出するとともに、得られた血小板ハイブリッドの蛍光挙動をフローサイトメーターにて評価した。

2-5. 血小板ハイブリッドの生物機能評価

血小板ハイブリッドへ血小板活性化剤のトロンビンを加えた。添加前後の血小板表面抗原CD41/61の発現量変化をフローサイトメーターで計測、ハイブリッド形成後の血小板の活性化能を評価した。種々のタンパク質 (ウシ血清アルブミン、コラーゲン、およびフィブリン) をコーティングしたガラス基材上へ、CMR内包PLGAナノ粒子で得た血小板ハイブリッドを添加し、37℃、30分間の条件で培養した。PBSにて洗浄後、種々のコーティング基材に粘着した血小板ハイブリッドを蛍光顕微鏡にて観察することで、血小板ハイブリッドのタンパク質認識能を評価した。フィブリンでコーティングしたガラス基材上に粘着した血小板ハイブリッドを経時的に蛍光顕微鏡観察した。加えて、培養液上清の蛍光強度を測定し、血小板ハイブリッドの薬剤放出挙動を評価した。

2-6. 血小板ハイブリッドの抗がん活性の評価

フィブリンでコーティングしたTranswell[®]上部チャンバーへ、PTX内包PLGAナノ粒子で得た血小板ハイブリッドを添加し、37℃、30分間の条件で培養した。PBSにて洗浄後、

血小板ハイブリッドが粘着した上部チャンバーと、がん細胞 (B16F10細胞) を培養している下部チャンバーとを組み合わせて共培養した。経時的にがん細胞を計数することで、血小板ハイブリッドの抗がん活性を評価した。

3. 結果と考察

3-1. PLGAナノ粒子の物性評価

表1に、PLGAナノ粒子の作製条件と物性を示す。PLGAあるいは高分子界面活性剤の濃度、攪拌速度、ならびにイオン強度などの作製条件を変化させることで、サイズと表面性状の異なるPLGAナノ粒子が得られた。

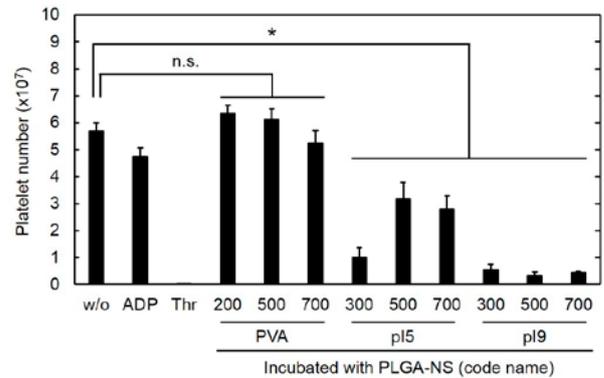


Figure 1. Number of platelets 30 h after incubation with PLGA-NS of different sizes prepared in the presence of various surfactants (PVA, pI5, and pI9). The ADP and thrombin (Thr) were used as agonists for platelet activation. n.s.: not significant. * $p < 0.05$: significant differences between two groups. This figure is used in the literature ⁹⁾.

3-2. ナノ粒子との混合による血小板の凝集挙動の評価

図1は、種々のPLGAナノ粒子と混合後の血小板数である。pI5あるいはpI9で被覆したPLGAナノ粒子は、混合により血小板数が有意に減少した。一方、PVAを被覆したPLGAナノ粒子は、混合による血小板数の減少が抑制された。これは、ナノ粒子表面に被覆された高分子が血小板の凝集挙動に影響を与えていることを示している。

Table 1. Preparation and physicochemical properties of PLGA nanospheres ⁹⁾.

Code	Preparation condition				Property		
	Surfactant (w/v%)	PLGA (w/v%)	Stirring rate (rpm)	NaCl (mM)	Apparent size (nm)	PDI ^{a)}	Zeta potential (mV)
PVA ₂₀₀	1	2	800	-	220 ± 0.93 ^{b)}	0.047	-0.77 ± 0.16
PVA ₅₀₀	1	2	400	500	470 ± 11	0.17	-0.62 ± 0.098
PVA ₇₀₀	4	4	400	1,000	660 ± 14	0.21	-0.56 ± 0.11
pI5 ₃₀₀	1	0.5	800	-	310 ± 2.7	0.15	-10 ± 0.87
pI5 ₅₀₀	2	2	400	-	490 ± 1.1	0.14	-7.3 ± 0.41
pI5 ₇₀₀	2	4	400	-	600 ± 29	0.16	-7.8 ± 1.1
pI9 ₃₀₀	1	0.5	1,200	-	290 ± 1.8	0.1	-1.9 ± 0.19
pI9 ₅₀₀	1	2	800	-	460 ± 11	0.15	-1.9 ± 0.19
pI9 ₇₀₀	1	4	400	-	670 ± 21	0.16	-2.0 ± 0.58

^{a)} Polydispersity index, ^{b)} Mean ± SD

ゼラチン被覆PLGAナノ粒子では、ゼラチン鎖が血小板凝集を誘導したため、遠心後の血小板数が減少したものと考えられる。以降の実験では、PVAで被覆されたサイズ200 nm程度のPLGAナノ粒子 (PVA₂₀₀-PLGA-NS) を用いた。

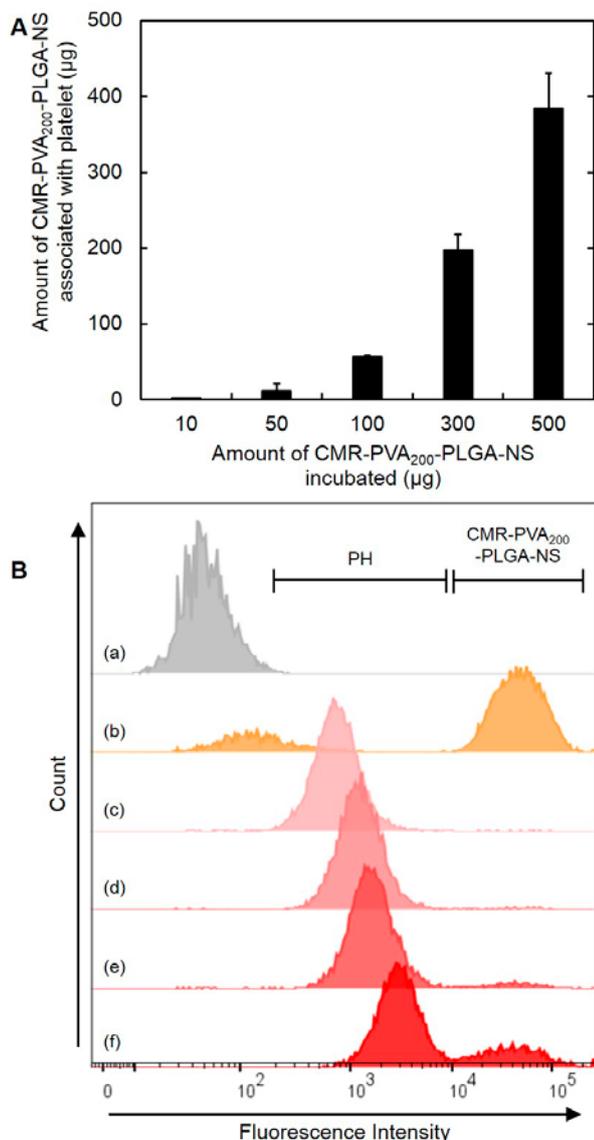


Figure 2. (A) The amount of CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NS associated with platelets 30 min after incubation with different amounts of CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NS. (B) Flow cytometric histograms of platelets (a), CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NS (b), or platelet hybrids (PH) obtained by incubation with 10 (c), 50 (d), 100 (e), or 300 µg of CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NS (f). This figure is used in the literature ⁹⁾.

3-3. 薬剤内包PLGAナノ粒子の作製

表2に、薬剤内包PLGAナノ粒子の物性を示す。CMR内包PLGAナノ粒子 (CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NS) あるいはPTX内包ナノ粒子 (PTX-PVA₂₀₀-PLGA-NS) は、薬剤が内包されていないPLGAナノ粒子と同等のサイズとゼータ電位を有し、CMRあるいはPTXを内包することが確認された。

3-4. 血小板ハイブリッドの作製

図2に、血小板によるナノ粒子取り込みに与えるPLGAナノ粒子の仕込み量の影響を示す。PLGAナノ粒子の仕込み量が増加すると、取り込み量が増加した (図2A)。しかしながら、フローサイトメトリー解析により、仕込み量の多いPLGAナノ粒子 (300 µg) では、血小板内に取り込まれていないナノ粒子が出現することが明らかとなった (図2B)。そこで以降の実験では、ハイブリッド形成時に混合するPLGAナノ粒子量を、100 µg/10⁸血小板とすることとした。

3-5. 血小板ハイブリッドの生物機能

図3は、血小板活性化剤トロンビンの添加前後の血小板表面抗原CD41/61の発現量変化を示している。トロンビン添加前は、血小板あるいは血小板ハイブリッドいずれにおいても、CD41/61発現量は低かった。しかしながら、トロンビンを添加すると、血小板ハイブリッドにおいて、血小板と同様にCD41/61発現量が上昇した。これは、ハイブリッド形成後も血小板が活性化能を保持していることを示している。一方、遊離PTXと血小板の混合群は、トロンビン添加後もCD41/61発現量の上昇はわずかであった。これは遊離PTXにより血小板の活性化が阻害されたためと考えられる。興味深いことに、PTX内包PLGAナノ粒子 (PTX-PVA₂₀₀-PLGA-NS) で得た血小板ハイブリッドは、トロンビン添加によりCD41/61発現量が上昇した。このことは、PTXのもつ血小板機能障害性が、ナノ粒子内包により回避されたことを示しており、血小板ハイブリッド形成におけるナノ粒子利用の有効性が示されたと考えられる。

図4に、種々のタンパク質をコーティングしたガラス基材へのCMR内包PLGAナノ粒子 (CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NS) およびその血小板ハイブリッドの吸着あるいは粘着挙動を示す。CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NSは、ガラスへ非特異吸着したが、タンパク質のコーティングによってこの非特異吸着は抑制された。一方、フィブリンをコーティングしたガラス基材では、CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NS添加群よりも血小板ハイブリッド添加群の方が多くの蛍光が観察された。これは、血小板ハイブリッドによりPLGAナノ粒子にフィブリン認識能が付与されたためと考えられる。

Table 2. Physicochemical properties of drug-loaded PLGA nanospheres ⁹⁾.

Code	Apparent size (nm)	Zeta potential (mV)	Loading (wt%)
PVA ₂₀₀ -PLGA-NS	220 ± 0.93 ^{a)}	-0.77 ± 0.16	-
CMR-PVA ₂₀₀ -PLGA-NS	240 ± 8.9	-0.51 ± 0.18	2.7
PTX-PVA ₂₀₀ -PLGA-NS	240 ± 1.4	-0.59 ± 0.097	9.6

^{a)} Mean ± SD

フィブリンをコーティングしたガラス基材に粘着した血小板ハイブリッドを経時的に観察したところ、時間とともに培養液の蛍光強度が高くなった(図5)。これは、血小板ハイブリッドがフィブリンへ粘着後、薬剤(CMR)を徐放しているためと考えられる。

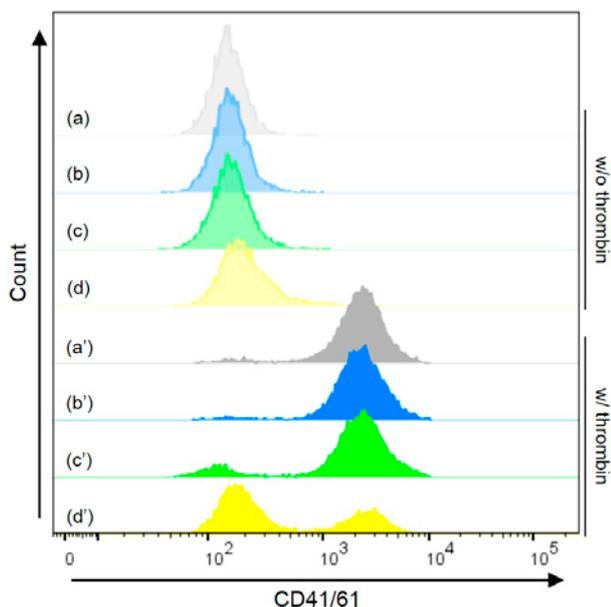


Figure 3. Flow cytometric histograms of platelets (a), platelet hybrids (PH) with PVA₂₀₀-PLGA-NS (b) or PTX-PVA₂₀₀-PLGA-NS (c), or platelets incubated with PTX (d) under the treatment without (blurred colors, a-d) or with thrombin (plain colors, a'-d'). The platelets or PH were stained with CD41/61. The amount of PTX in the PH (c, c') was same as that incubated with platelets (d, d'). This figure is partially used in the literature ⁹⁾.

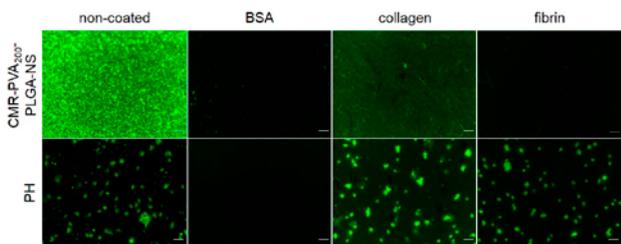


Figure 4. Fluorescent microscopic images of CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NS or their platelet hybrids (PH) adhered on the bare glass bottom dish or the dish pre-coated with BSA, collagen, and fibrin. This figure is partially used in the literature ⁹⁾.

3-6. 血小板ハイブリッドの抗がん活性

図6に、Transwell®チャンバーを介して血小板ハイブリッドと共培養したがん細胞の増殖挙動を示す。Transwell®チャンバーへ培地、血小板、あるいは抗がん剤内包PLGAナノ粒子 (PTX-PVA₂₀₀-PLGA-NS) を添加した群と比較して、PTX-PVA₂₀₀-PLGA-NSで得た血小板ハイブリッドの添加群

は、有意にがん細胞の増殖を抑制した。これは、血小板ハイブリッドがフィブリンを特異的に認識して粘着し、そこでPTXを放出してがん細胞へ作用したためと考えられる。血小板ハイブリッドが遊離PTXを放出したのか、それともPTX-PVA₂₀₀-PLGA-NSを放出したのかは明らかとなっておらず、今後、詳細な検証が必要である。

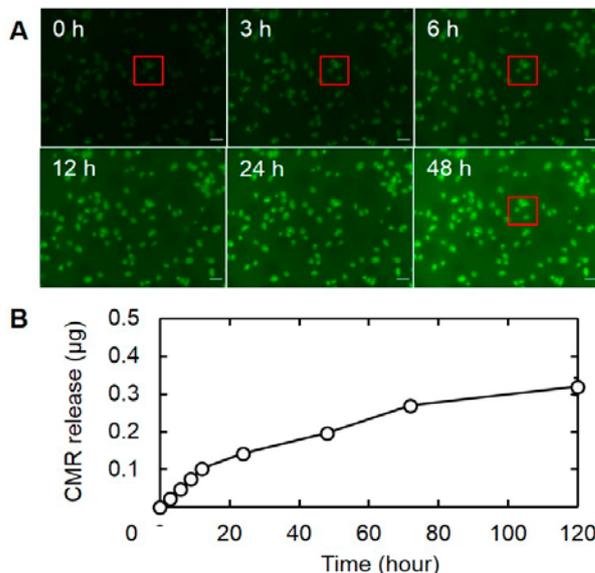


Figure 5. Time course of CMR-PVA₂₀₀-PLGA-NS released from platelet hybrids. (A) Time-lapse fluorescent microscopic images 0, 3, 6, 12, 24, and 48 hr after incubation of PH. Scale bar is 10 µm. (B) Time profile of CMR release from PH. This figure is partially used in the literature ⁹⁾.

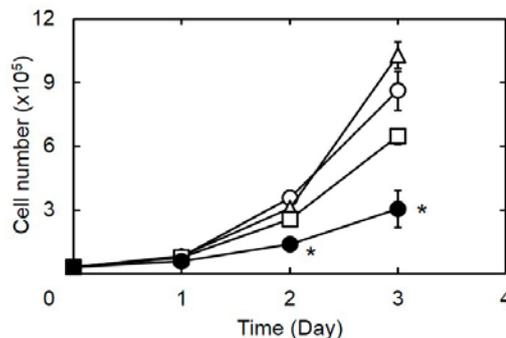


Figure 6. Time profiles of B16F10 cells number cultured on the lower chamber inserted with the upper Transwell® chamber pre-coated with fibrin, followed by the culture without (○) or with platelet (Δ), PTX-PVA₂₀₀-PLGA-NS (□), and their platelet hybrids (PH) on day 0 (●). The amount of PTX incorporated in each group (PTX-PVA₂₀₀-PLGA-NS or PH) is 5.5 µg. *, p < 0.05: significant difference against other groups at the corresponding time. This figure is partially used in the literature ⁹⁾.

4. まとめ

PLGAナノ粒子によるハイブリッド形成により、血小板の生物機能が保持され、フィブリン認識能および抗がん活性

をもつことがわかった。この血小板ハイブリッドは、炎症部位へのターゲティングにも用いることが可能である。今後、血小板ハイブリッドによる炎症制御を介した再生治療が期待される。

参考文献

- 1) Ringsdorf H. *J Polym Sci Pol Sym*, 135-153 (1975).
- 2) Xue J. et al. *Nat. Nanotechnol.* **2017**, 12, 692–700.
- 3) Hu CM. et al. *Nature* **2015**, 526, 118–121.
- 4) Xu P. et al. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 42632.
- 5) Mehta P. *Blood* **1984**, 63, 55–63.
- 6) White JG. *Platelets* **2005**, 16, 121–131.
- 7) Male R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9191–9195.
- 8) Jo J. et al. *Pharmaceutics* **2021**, 13(10), 1724.
- 9) Nishikawa T. et al. *Molecular therapy* **2014**, 22, 2046-2055.

タンパク質モチーフを利用した機能材料の創出

Molecular Design and Synthesis of Functional Materials Containing Protein Motifs

沼田 圭司・大前 仁・宇治 広隆・

土屋 康佑・及川 和聡・藤田 聖矢・Foong Choon Pin・Yagi Shamitha Rao・Thagun Chonprakun・寺田佳世

Keiji NUMATA, Masashi OHMAE, Hirotaka UJI, Kousuke TSUCHIYA, Kazusato OIKAWA, Seiya FUJITA, Choon Pin FOONG, Shamitha Rao YAGI, Chonprakun THAGUN, Kayo TERADA

Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

The natural motifs of proteins, such as peptides, are versatile tools in biotechnology, especially in gene/protein delivery fields. The combinations of the motifs can create the unnatural and/or outstanding physical, chemical, and biological functionalities. DNA-free genome editing using Cas9 ribonucleoprotein is advantageous because it introduces fewer potential undesirable genetic modifications than comparable methods. Here, we show a direct protein delivery system for plants using a cell-penetrating peptide-displayed polyion complex vesicle, CPP-PICsome, as a biological nanocarrier. With this system, we demonstrate nuclear genome editing by delivery of a Cas9 ribonucleoprotein complex in *Arabidopsis thaliana* callus.

1. 社会的背景と研究目的

近年、植物研究は解析技術の目覚ましい発展により大きく変化してきている。次世代シーケンシングやゲノム編集技術により、様々な種類の植物のゲノム情報の取得が容易になり、またゲノム編集技術と相まって、非モデル植物における逆遺伝学的な解析が可能になっている。これらの解析技術は非モデル植物における分子生物学やバイオテクノロジーを可能にするだけでなく、植物研究一般をスピードアップさせている。その一方で、DNA、RNA、およびタンパク質等の生体高分子を植物に導入する技術に関しては大きな進歩が見られていない。植物へのDNA導入法としてはアグロバクテリウムやパーティクルガン法が確立された手法として長い間用いられてきているが、適用できる植物が限定され、染色体へのダメージが生じる等のデメリットが知られている。またPEG法はプロトプラストから植物体の再生技術が必須である。我々が研究を進めているペプチド法は、複数の機能ドメインを持つペプチドで構成された融合ペプチドを用いて核酸やタンパク質を細胞内に送達する方法であり、先述した既存の導入法を補完することが可能である^[1-3]。また、生体高分子を葉緑体やミトコンドリア等のオルガネラ特異的に送達させることのできる方法でもある。

2. PICsomeによるCas9の送達

ノーベル賞にも表れているように、ゲノム編集技術の発展により様々な生物でゲノム編集が可能になっており、特にCas9/CRISPRによるゲノム編集は基礎から応用まで幅広く用いられている。さらに、Cas9/CRISPRによるゲノム編集においては、オフターゲットが少ないことや外来遺

伝子の導入を伴わないことから、Cas9リボヌクレオタンパク質 (RNP) の直接導入によるゲノム編集技術が様々な用途において求められている。

Cas9リボヌクレオタンパク質を植物細胞内に直接的に導入する方法としては、エレクトロポレーション法とポリエチレングリコール (PEG) 法が知られている。しかしながら、いずれもプロトプラスト化した細胞を用いる方法であり、汎用性が高いとは言い難い。プロトプラストから植物体の再生が可能な植物は限られているため、より多くの植物に用いることのできる汎用性の高いCas9リボヌクレオタンパク質導入法が求められている。また、カルスは多くの植物の様々な組織から誘導可能な未分化細胞であり、またその一部から植物体を再生することができることから、汎用性の高いゲノム編集を行うための材料として適切であると考えられている。

我々は、半透過性膜で構成され様々な生体高分子を内包することができるポリイオンコンプレックス型ベシクル (PICsome) に着目し、タンパク質やCas9リボヌクレオタンパク質を細胞内に送達するための担体として検討した (Figure 1)^[4]。PICsomeは、生物活性分子送達およびナノリアクターシステムのための有望なプラットフォームである。陰イオン性および陽イオン性の荷電ブロックに加えて、親水性ポリエチレングリコール (PEG) ブロックが主にPICsomeの形成に使用される。

まず、アミノ酸を骨格とするポリマーであるポリペプチドを混ぜ合わせるによりPICsomeを作製し、同時に蛍光タンパクであるCitrineタンパク質をこのPICsomeに内包させることに成功した。用いたポリペプチドは、二分

岐型のオリゴジンをカチオンとして、直鎖状のカルボキシ化リジンをアニオンとして用いた。さらに、細胞内への送達効率を上げるために、アルキンアジドのクリック反応により、PICsomeの表面に細胞透過性ペプチド (CPP) を付加した (CPP-PICsome)。

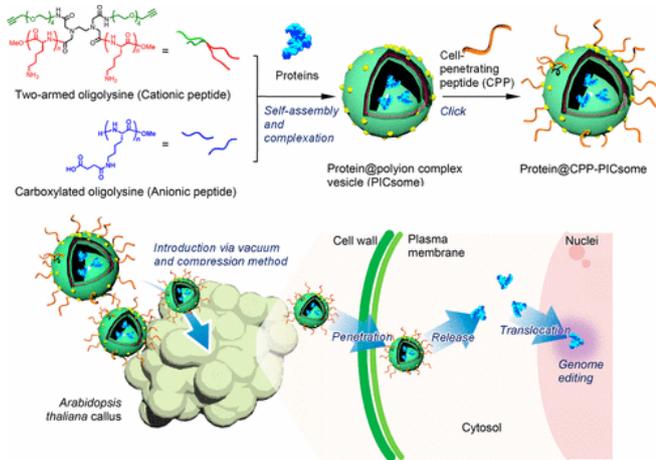


Figure 1. Schematic illustration of the generation of PICsomes. Schematic illustration of protein transduction with CPP-displayed PICsomes into plant cells. The mixing of proteins and two peptides forms PICsome-encapsulating proteins by electrostatic interactions. CPPs are then conjugated to the PICsome surface in order to enhance the delivery efficiency to cells. Protein@CPP-PICsomes were introduced into *A. thaliana* calli via the vacuum and compression method.^[4]

黄色蛍光タンパク質Citrineを内包させたCPP-PICsomeをモデル植物であるシロイヌナズナのカルス（未分化細胞塊）に導入したところ、細胞内への効率的なCitrineタンパク質の取り込みが観察された。また、CPP-PICsomeで処理した細胞は90%以上と高い生存率を示したことから、この手法の細胞毒性が低いことも明らかになった。

つづいて、蛍光色素で標識したCas9リボヌクレオタンパク質をCPP-PICsomeに内包させ、カルスに導入した。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察の結果、CPP-PICsome によって送達したCas9リボヌクレオタンパク質がカルス細胞内に効率良く取り込まれることが明らかになった。また、蛍光相関分光法 (FCS) 測定により、蛍光タンパク質がPICsomeに内包されていることが示された。

CPP-PICsomeによってCas9リボヌクレオタンパク質を導入したカルスのゲノム編集を解析するため、標的配列である *PDS3* 遺伝子のディープシーケンシング解析^[6]を行った。シーケンシングの結果、Cas9リボヌクレオタンパク質を導入したカルスの *PDS3* 遺伝子において、ゲノム編集による典型的な変異が確認された (Figure 2)。

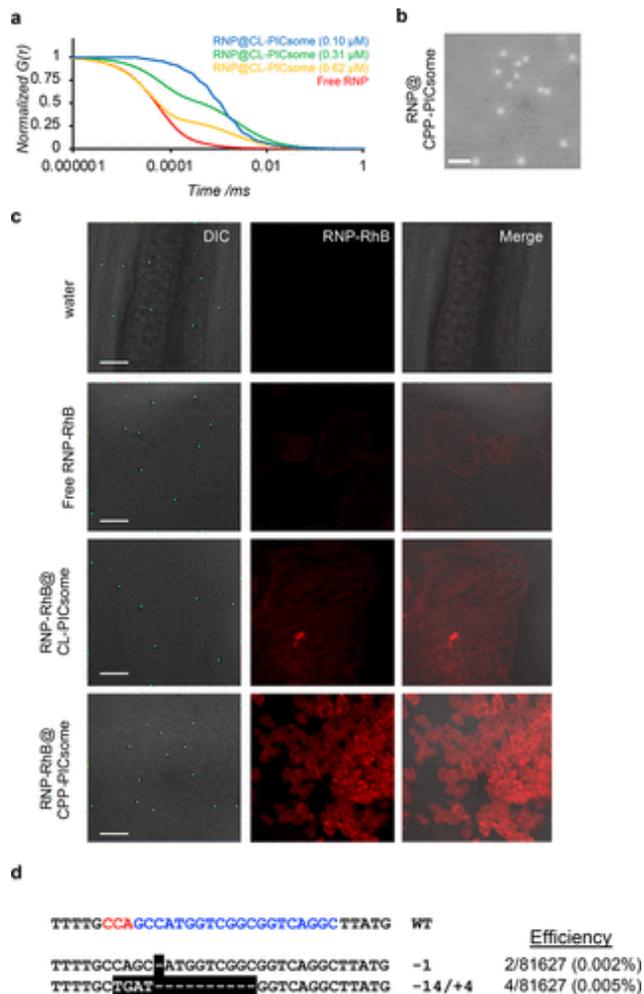


Figure 2. RNP delivery into *A. thaliana* calli using a PICsome. (a) Verification of RNPs complexed with a PICsome. After the preparation of fluorescently labeled RNPs (0.1, 0.31, or 0.62 μ M) encapsulated within PICsome (500 μ M), each sample was analyzed by FCS using CLSM. (b) Representative morphology of RNP@CPP-PICsomes observed by FE-SEM (working distance, 1.4 mm; acceleration voltage, 2.0 kV). (c) Subcellular distribution of delivered RNP-RhB with CPP-PICsome in *A. thaliana* callus. Free RNP-RhB, RNP-RhB@CL-PICsome, or RNP-RhB@CPP-PICsome were introduced into calli via the vacuum and pump method (-0.08 MPa, 1 min; +0.08 MPa, 1 min). After treatment, the calli were maintained in the RNP-containing solution for 24 h. The samples were observed by CLSM. (d) Mutation patterns in *PDS3* detected by deep sequencing. Top: wild-type (WT) sequence. The target DNA sequence is shown in blue and the PAM site in red. Bottom: Mutations detected at the gRNA2 target site in calli treated with RNP@CPP-PICsome. The mutations are highlighted in black, and the deletions are denoted by dashes. The editing efficiency is shown by the number of reads with mutation/total reads. Scale bars: (b) 200 nm; (c) 20 μ m.^[4]

3. PEGを利用しないPICsome

水性媒体で満たされた中空構造を有する高分子ベシクルは、医療用途における効率的な分子送達のための有望な材料である。生細胞内のリポソームと同様に、カーゴ分子は、完全な機能を犠牲にすることなく、中空構造で内包することが可能である。現在まで、さまざまな外因性生体分子を生体組織/細胞に送達するために、ナノキャリアおよび/またはナノリアクター用に多くのタイプの両親媒性ブロックコポリマーが開発されてきた。特に、PICsomeは、生理活性分子を送達するための実用的な高分子担体として、また、*in-vivo*での限定された選択的反応のためのナノリアクターとして盛んに研究されてきた。PICsomeのポリマー成分の一般的な構造は、親水性ポリマー、代表的にはPEG、および相補電荷を持つイオン性ポリマーで構成される場合が多い。

一方、我々が中心的に用いているペプチドは、一次構造の幅広いバリエーションにより、多数の機能シーケンスを設計できるため、材料デリバリープラットフォームの機能コンポーネントとして機能することができる^[5-9]。さらに、ペプチドは生分解性および生体適合性を達成することが可能である。植物細胞へのタンパク質の直接送達は、永続的な遺伝子改変なしに植物に新規の形質や表現形、機能または特性を与えることができる。そこで、ペプチドベースの担体（ナノキャリア）を使用した植物への生理活性分子の送達を目指し、研究を推進した。最近、PICsomeがテトラエチレングリコール（TEG）と融合したカチオン性およびアニオン性オリゴペプチドを混合することによって調製され、得られた小胞が機能性酵素を送達するための担体として機能できることを報告した^[10]。この先行研究では、ペプチドベースのPICsomeに酵素であるNPT IIを封入することで、NPT IIが植物細胞内で長期間安定して機能することが可能となり、カナマイシンなどの抗生物質に対する耐性を植物に与えることに成功した。したがって、静電相互作用によって複合体を形成する能力を備えたペプチドは、PICsomeの成分として有効であることが実証されている。

PEGは、免疫原性と生体分子との非特異的相互作用を低減する生理学的に不活性な性質を示すため、材料デリバリープラットフォームで最も広く使用されているポリマー成分の1つである。PICsomeおよび他の高分子ベシクルは、一般に、親水性成分としてPEGを含み、*in-vivo*での材料送達の使用において長い循環時間を達成することができる。ただし、PEGバックボーンの長期的な安定性のため、PEG成分の持続時間が生物で安全であるかどうかはまだ議論の余地が残っている論調が目立つ。最近、非特異的な生体分子の吸収に耐性のある他の生物学的に不活

性なポリマーが、PEG成分の代替として採用され始めている。サルコシン（Sar）残基からなるポリペプチドは、親水性の生体適合性ポリマーとして知られており、ポリマーミセル、デンドリマー、およびポリマーソームなど、ドラッグデリバリー用の生体適合性担体として報告されている。タンパク質構成アミノ酸ではないものの、Sarは生物に自然界にも存在している。したがって、Sarに富むポリペプチドは、一定期間のタンパク質分解耐性の後に分解可能であることは実証されている。

我々の研究では、全ペプチドベースのPICsomeを調製するためのカチオン性およびアニオン性ペプチドを新たに設計した。PICsomeは、Sarを親水性残基として含むアニオン性オリゴ（L-グルタミン酸）と融合し、カチオン性ペプチドであるオリゴリジンと混合することで正常に形成され、中空構造でのタンパク質のカプセル化に利用されることを実証した^[11]。細胞膜透過配列（CPP）を表面に修飾後、得られたPICsomeは、モデル酵素をカプセル化して植物細胞に送達可能であることを示した（Figure 3）。ペプチドベースのPICsomeは、材料送達用および/または生体システムのナノリアクターとしての有望なPEGフリープラットフォームであると言える。

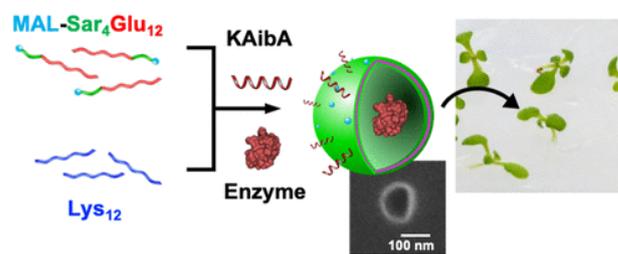


Figure 3. An all-peptide-based polyion complex vesicle (PICsome), which contains sarcosine oligomer as a hydrophilic block, is a promising platform for bioactive molecule delivery as well as nanoreactor systems. After modification of the surface with cell penetrating peptide, the protein-encapsulated PICsome was successfully delivered into plant cells.^[11]

各ペプチドおよびPICsome調製のスキームをFigure 4に示す。カチオン性のペプチドとしては、リジン（Lys）に加えて、オルニチン（Orn）とアルギニン（Arg）からなるオリゴペプチドも比較検討した。得られたポリイオン複合体集合体が中空構造を有することを確認するために、エポキシ樹脂中に包埋し、そして樹脂の薄いスライスの断面についてFE-SEM観察を行った。集合体の断面画像をFigure 5に示す。Lys₁₂/MAL-Sar₄Glu₁₂集合体は、球状かつ明確に中空構造を示し、PICsomeを形成した。膜の厚さはFE-SEM画像で約17nmであり、これは完全に伸びきった2つのペプチド分子の長さに対応する。そのため、この集合体はペプチドの二分子膜で構成されていると考えられる。

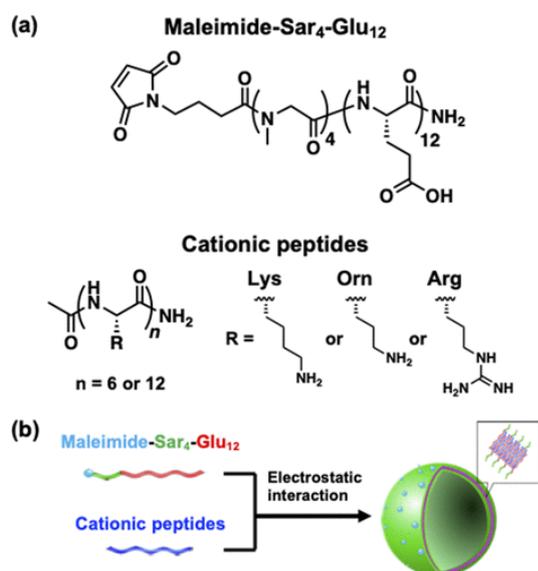


Figure 4. Schematic illustration of PICsome formation with reactive maleimide groups on the surface by mixing anionic and cationic peptides.^[11]

対照的に、Orn₁₂ / MAL-SAR₄Glu₁₂は球状の形状を有していたが、中空構造が確認できなかった。これらの結果は、以前の研究で報告されているように、より長いメチレン鎖によって引き起こされるより高い疎水性がラメラ構造におけるポリイオン複合体のより安定した集合をもたらすため、より長い脂肪族側鎖を有するカチオン性ペプチドが小胞の形成に有利であることを示している。また、Lys₁₂の2当量のLys₆を用いた場合も、中空構造を示さなかった。この結果は、カチオン性ペプチドとアニオン性ペプチドの厳密に同じ主鎖長と、最適な側鎖長がPICsome形成に必要であることを示している。

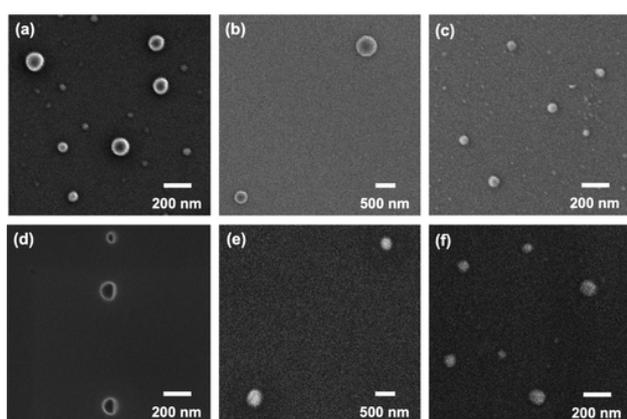


Figure 5. (a–c) FE-SEM images of polyion complex assemblies formed by mixing cationic and anionic peptides: (a) Lys₁₂/ MAL-Sar₄Glu₁₂, (b) Orn₁₂/ MAL-Sar₄Glu₁₂, and (c) Lys₆/ MAL-Sar₄Glu₁₂. (d–f) Cross-sectional FE-SEM images of spherical assemblies obtained from (d) Lys₁₂/ MAL-Sar₄Glu₁₂, (e) Orn₁₂/ MAL-Sar₄Glu₁₂, and (f) Lys₆/ MAL-Sar₄Glu₁₂.

5. まとめと将来展望

本研究では、まず、PICsomeに細胞透過性ペプチドを組み合わせるにより、内包させたタンパク質の活性を維持したまま植物カサの細胞内に効率的に送達させることに成功した。さらに、Cas9リボヌクレオタンパク質をPICsomeに内包させることにより、植物カサのゲノム編集を可能にした。この技術を利用したCas9リボヌクレオタンパク質によるゲノム編集は、汎用性の高い安全なゲノム編集技術として様々な実用植物の品種改良に貢献すると期待できる。

後半では、PEGの抱えるリスクを排除するため、PEGを含まない、ペプチド成分だけからなる、新規のPEGフリーPICsomeを合成した。PEGブロックの代わりに、親水性ブロックとしてSarオリゴマーを選択し、アニオン性オリゴGluと融合した。Sar含有アニオン性ペプチドとカチオン性オリゴLysは、安定したベシクルの形成を可能にした。ペプチドだけからなるPICsomeは、モデルタンパク質を中空構造にカプセル化することができた。本項では、紹介できなかったが、細胞透過性ペプチドで表面を修飾した後、タンパク質にカプセル化されたPICsomeは植物細胞に正常に送達され、タンパク質送達用の生体適合性担体としての応用が可能であることも示されている。

参考文献

- 1) K. Numata. *Biopolymer Science for Proteins and Peptides*. Elsevier (2021).
- 2) K. Numata. *Polymer Journal*, **52**, 1043 (2020).
- 3) K. Watanabe, M. Odahara, T. Miyamoto, K. Numata. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, **7**(6), 2246–2254, **2021**.
- 4) M. Odahara, K. Watanabe, R. Kawasaki, K. Tsuchiya, A. Tateishi, Y. Motoda, T. Kigawa, Y. Kodama, K. Numata. *ACS Appl. Nano Mater.* **4**, 6, 5630–5635, **2021**.
- 5) T. Miyamoto, K. Toyooka, J. Chuah, M. Odahara, M. Higchi-Takeuchi, Y. Goto, Y. Motoda, T. Kigawa, Y. Kodama, K. Numata. *JACS Au*. **Accepted, 2022**.
- 6) J. Gimenez-Dejoo, K. Numata. *Nanoscale Advances*. **accepted, 2021**.
- 7) K. Oikawa, A. Tateishi, M. Odahara, Y. Kodama, K. Numata. *Fornt. Plant Sci.* **12**:759871, **2021**.
- 8) T. Miyamoto, K. Tsuchiya, K. Numata. *Nanoscale*, **13**, 5679–5692, **2021**.
- 9) K. Terada, J. Gimenez-Dejoo, T. Kurita, K. Oikawa, H. Uji, K. Tsuchiya, K. Numata. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **7**(4), 1475–1484, **2021**.
- 10) S. Fujita, Y. Motoda, T. Kigawa, K. Tsuchiya, K. Numata. *Biomacromolecules*, **22**(3), 1080–1090, **2021**.
- 11) S. Fujita, K. Tsuchiya, K. Numata. *ACS Polymers Au*. **1**(1), 30–38, **2021**.

π共役系を拡張しない狭エネルギーギャップ化の設計戦略と 近赤外発光性高分子の開発

Design strategy for narrow energy band gap without π -conjugation extension and development of near-infrared polymer.

田中 一生・権 正行・伊藤 峻一郎

Kazuo TANAKA, Masayuki GON, Shunichiro ITO

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Near infrared (NIR) emissive dyes have tremendously attracted attention as a versatile platform for realizing future optical technology. However, due to critical non-specific intermolecular interactions in condensed state, it is still difficult to obtain intense solid-state emission in the NIR region. In particular, comparing to those of visible-emissive dyes, relatively-larger π -conjugated systems which are essential for inducing NIR emission are unfavorable for obtaining intense emission in solid. We recently established to narrow energy gaps between frontier molecular orbitals (FMOs) without expanding π -conjugated system. By replacing the skeletal carbon, where only the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) is localized, to nitrogen (aza-substitution), it is possible to selectively lower the energy level of LUMO. Finally, we obtained deep-red and/or NIR-luminescent materials with solid-state emission properties through the aza-substitution. In this presentation, the basic concept for obtaining NIR emission with the aza-substitution at the isolated LUMO is initially illustrated.

1. 序文

有機半導体を用いた有機エレクトロニクスは、近年その軽量性、柔軟性、成型加工のしやすさから注目を集めている分野である^{1a-c}。シリコンなどの共有結合している無機結晶と比べ、有機物質は弱い分子間相互作用のため柔軟性に富んでおり、また様々な分子設計により幅広い性質を付与することが可能である。さらに印刷技術を用いて塗布することにより低コスト、大面積での利用が実現できる。このような技術を用いれば、有機ELディスプレイや有機EL照明、有機光センサーなどのフレキシブルなデバイスへの応用が期待できる。

ここで、狭いHOMO(最高被占軌道, Highest Occupied Molecular Orbital)-LUMO(最低空軌道, Lowest Unoccupied

Molecular Orbital)ギャップをもち、長波長領域において吸収を示す物質は、従来の可視光吸収材料では活用できない太陽光の近赤外領域の利用につながることから、有機薄膜太陽電池への応用が期待できる。近赤外領域に吸収を持つ材料の設計指針として、これまでにドナー・アクセプター型の分子²やポルフィリン類縁体³といった π 共役系化合物が提示されている。また、深いLUMO準位を持つ分子は還元状態を安定化することができ、電子輸送を利用したn型有機半導体や有機電界効果トランジスタへの応用が期待できる。n型有機半導体としてはシロール環を含む化合物やフラーレン誘導体などが挙げられる⁴。しかし、このような物性を持つ化合物の分子設計の幅には限りがあるため、以上のような物性を満たし、それを精密に制御可能な新たな分子設計を見出せれば幅広い応用が期待できる。

当研究室ではその新しい分子設計として、これまでとは異なる基盤骨格であるペンタアザフェナレン(5AP, Figure 1a)やその誘導体ポリマーの研究が行われてきた⁵⁻⁷。5APは不安定化合物であるフェナレニルアニオンと等価な電子構造であるが、電荷密度の高い位置にある炭素原子を電気陰性度の高い窒素原子に置き換えることで、高い安定性を有している^{8,9}。さらに、5APの特徴としてベンゼン環のような 6π 電子系を持たない特殊な π 共役系と分離したHOMO・LUMOが挙げられ、置換基の導入位置に依存してHOMO・LUMO一方のみで置換基の共役効果が現れるという5AP誘導体の特異な物性が明らかにされている⁵⁻⁷。

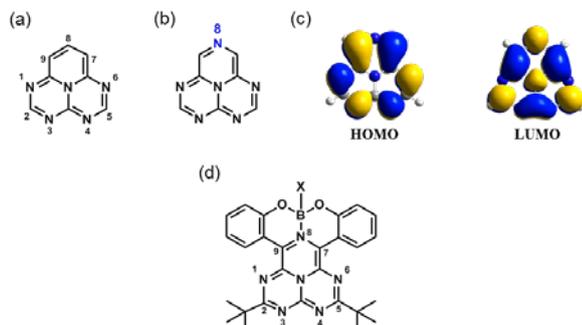
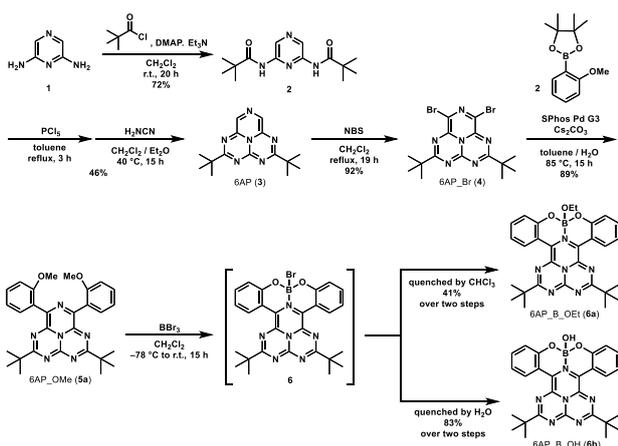
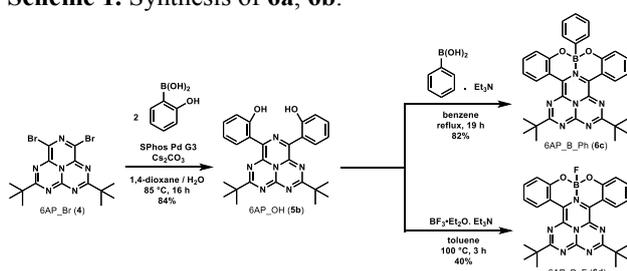


Figure 1. a) Chemical structure of 5AP. b) Chemical structure of 6AP. (c) Frontier orbitals of 6AP (Gaussian 16, B3LYP/6-31+G(d,p) level of theory). (d) Chemical structure of boron complexes synthesized in this work.



Scheme 1. Synthesis of **6a**, **6b**.



Scheme 2. Synthesis of **6c**, **6d**.

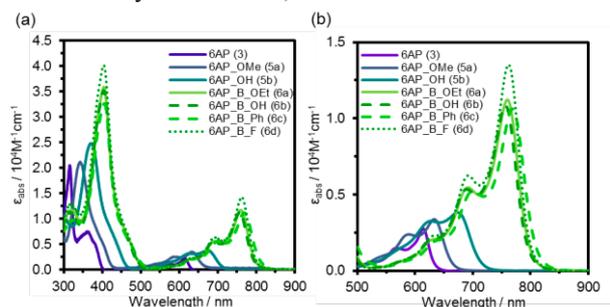


Figure 2. a) UV-vis-NIR absorption spectra of **3**, **5a-b**, **6a-d** (1.0×10^{-5} M in CHCl_3). b) Enlarged spectra in the visible to NIR region of **3**, **5a-b**, **6a-d** (1.0×10^{-4} M in CHCl_3).

本研究では、5APの8位の位置にさらに窒素原子を一つ導入したヘキサアザフェナレン (6AP, Figure 1b) に着目した。6APは電気陰性度の大きな窒素原子の誘起効果のためにLUMO準位が低下し、5APに比べて長波長の光を吸収することが明らかになっている。したがって6APは、狭いHOMO-LUMOギャップと深いLUMO準位を持つ化合物として魅力的な骨格であると言える (Figure 1b)。また、6APの8位の窒素原子にはフロンティア軌道のうちHOMOは存在せずLUMOのみが存在することがDFT計算から確認できる (Figure 1c)。この窒素原子にルイス酸を作用させればLUMO準位の大きな低下が期待される。空のp軌道を持ったホウ素原子はルイス酸として作用し、ま

Table 1. Optical properties of **3**, **5a-5b**, **6a-6d**

Compound	$\lambda_{\text{abs},1}^a$ [nm]	$\epsilon_{\text{abs},1}^a$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	$\lambda_{\text{abs},2}^b$ [nm]	$\epsilon_{\text{abs},2}^b$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	λ_{onset}^c [nm]
6AP (3)	315	21000	614	2800	633
6AP_OMe (5a)	343	21000	632	3400	665
6AP_OH (5b)	371	25000	673	3800	714
6AP_B_OEt (6a)	404	36000	760	12000	797
6AP_B_OH (6b)	404	35000	756	11000	795
6AP_B_Ph (6c)	406	33000	768	11000	809
6AP_B_F (6d)	404	40000	762	14000	797

^a for absorption maxima ^b for peaks at the longer wavelength region ^c Onset wavelength of the absorption spectra

たホウ素上の置換基を変えることでさまざまな分子設計が可能である。さらに4配位ホウ素を含む有機化合物は、その化学的熱力学的な安定性、高い発光効率、高いキャリア移動度を示すことから有機発光ダイオード (OLED) などへの応用も検討されている¹⁰。このようなホウ素原子のルイス酸性と高い性能を考慮し、Figure 1dのようなホウ素錯体を設計した。6APの7位と9位で共役を拡張しHOMOを上昇させるとともに、8位の窒素原子に対しホウ素原子を配位させることで、窒素原子がLUMOを下げる効果を強め、深いLUMOと狭いHOMO-LUMOギャップをもつ化合物を創出することを目指した。本研究ではこの設計に基づいた化合物を合成し、光学測定、サイクリックボルタンメトリー、密度汎関数(Density Functional Theory, DFT)法による量子化学計算で軌道エネルギーについて検討した。

2. 結果と考察

まず、Scheme 1に従い化合物6AP_B_OEt (**6a**), 6AP_B_OH (**6b**)を5段階で合成した。2,6-ジアミノピラジン (**1**)を出発物とし、ピバロイルクロリドとの反応により化合物**2**を合成した。続いて、五塩化リンとの反応で**2**をイミド酸塩化物に変換し、溶媒と揮発性の副生成物を留去した後、粗生成物のイミド酸塩化物にシアナミドを添加することで6AP (**3**)を得た。さらに**3**を*N*-プロモスクシンイミドを用いて臭素化した6AP-Br (**4**)に鈴木-宮浦クロスカップリング反応を用いて7位と9位に2-メトキシフェニル基を導入し、化合物6AP_OMe (**5a**)を合成した。最後に**5a**を三臭化ホウ素と反応させ、反応溶液をクロロホルムまたは水で処理したところ、それぞれ**6a**, **6b**の生成を確認した。これは中間体として**6**のような化合物が生成しており、これとクロロホルム中の安定剤であるエタノールまたは水が反応し**6a**, **6b**がそれぞれ生成したと考えられる。

また、Scheme 2に従い**4**から6AP_B_Ph (**6c**), 6AP_B_F (**6d**)を2段階で合成した。**4**に鈴木-宮浦カップリング反応を用

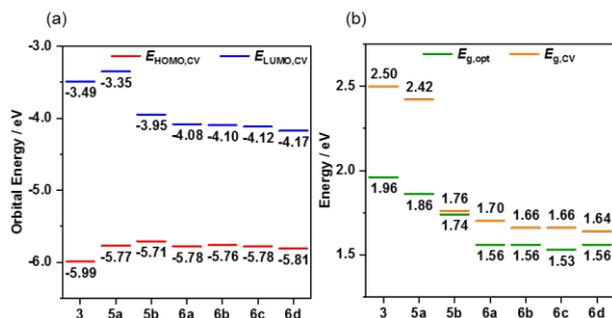


Figure 3. a) Energy levels of HOMOs and LUMOs estimated from cyclic voltammetry. b) Comparison of $E_{g,opt}$ (energy of the onset wavelengths in absorption spectra) and $E_{g,CV}$ (energy of HOMO-LUMO gap from cyclic voltammetry). The onset potentials were converted to the electron volt unit according to the following formula: $E_{HOMO,CV}$ (eV) = $-(5.10 + E_{ox,onset})$, $E_{LUMO,CV}$ (eV) = $-(5.10 + E_{red,onset})$.

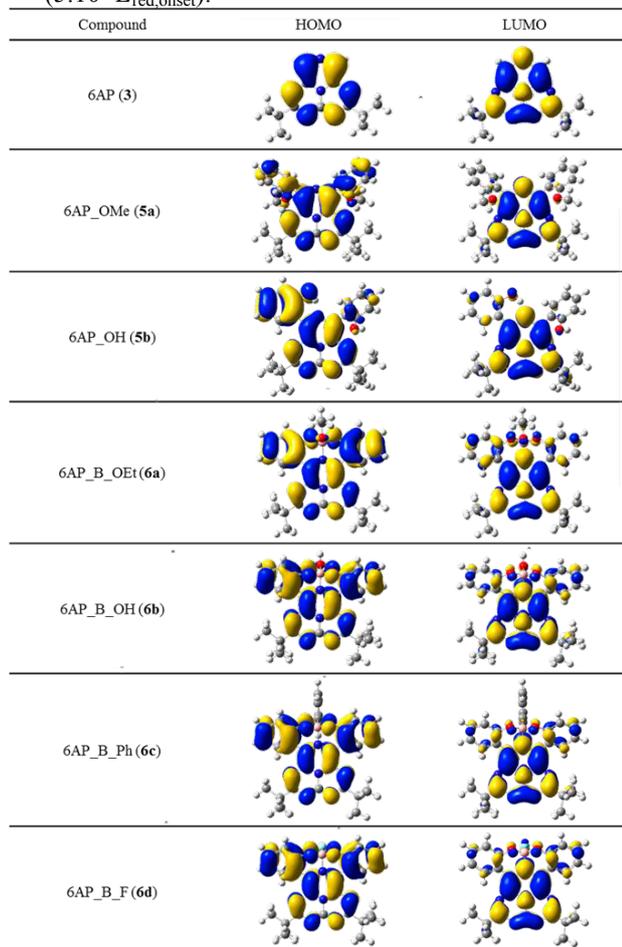


Figure 4. Frontier orbitals of **3**, **5a-b**, **6a-d** at B3LYP/6-31+G(d,p) level of theory.

いて6AP_OH (**5b**)を合成し、ボロン酸交換反応で**6c**を、 $BF_3 \cdot Et_2O$ を用いてホウ素上にフッ素が入った**6d**をそれぞれ得た。**2**、**4**, **5a-b**, **6a-d**の各化合物は 1H , ^{11}B (1H), ^{13}C (1H) NMR

および高分解能マスペクトル (HRMS) により同定した。**6b**の ^{13}C (1H) NMRにおいて29.8 ppm付近に非常に小さいがピークが見られるが、HRMSで**6b**のボロン酸無水物が検出されていることからこれはボロン酸無水物のtBu基のピークと考えられる。しかしtBu基以外のピークは見られず極微量であるため、光学特性への影響はほとんどないと考えられる。また、**6c**の ^{13}C (1H) NMRにおいては、ホウ素に結合するフェニル基の4級炭素が ^{13}C と ^{11}B のカップリングにより観測されなかった。

合成した7種類の化合物 (**3**, **5a-b**, **6a-d**) それぞれについて、紫外・可視吸収スペクトル測定を行った (Figure 2, Table 1)。先行研究によると、アザフェナレン類の最も長波長における吸収はHOMOからLUMOへの遷移に帰属されるため¹¹、今回の6APを基盤にした化合物も同様に長波長領域の吸収帯はHOMO-LUMO遷移に由来すると考えられる。**5a**, **5b**を**3**と比較すると、7位と9位に電子供与性の置換基を導入し、HOMOが上昇したことによる吸収波長の長波長シフトが見られる。**5b**は**5a**よりさらに長波長シフトしている。これは**5b**が持つヒドロキシ基の水素原子が6APの8位の窒素原子と水素結合を形成しており、水素原子がルイス酸としてはたらいでLUMOが下がった効果によるものだと考えられる。

次に**6a-d**を**5a**, **5b**と比較すると、最も長波長における吸収帯において大きな長波長シフトが確認できた。これは分子設計どおり、ホウ素が6APの8位の窒素に配位することによるLUMO準位の低下の影響であると考えられる。また、今回合成した4つのホウ素錯体において、ホウ素上の置換基による吸収波長の大きな変化は見られなかった。

このように、可視光領域に吸収帯を持つ6APを基盤にして合成したホウ素錯体は、800 nm付近の近赤外領域まで吸収帯を持つことが確認でき、狭いHOMO-LUMOギャップを持っていることが示唆された。

置換基またはホウ素原子を導入することによるHOMO準位とLUMO準位の変化を独立に評価するため、サイクリックボルタンメトリー測定を行った (Figure 3a, 3b)。HOMO準位は第一酸化波の立ち上がり電位 ($E_{ox,onset}$) を、LUMO準位は第一還元波立ち上がり電位 ($E_{red,onset}$) をそれぞれ読み取ることで推定した¹²。測定条件の詳細については実験項で述べる。

5a, **5b**を**3**と比較すると、HOMO準位の上昇が確認できる。また、**6a-d**のホウ素錯体は**5a**, **5b**に比べてHOMO準位の変化はほとんど見られず、LUMO準位のみが低下していることが確認できた (Figure 3a)。これらは、7,9位に電子供与性の置換基を導入したことによるHOMO準位の上昇と、8位の窒素原子にホウ素原子を配位させたことによるLUMO準位の低下を強く支持する結果である。さらにFigure 3bを見ると、CVから求めたHOMO-LUMOギャップ ($E_{g,CV}$) の傾向は吸収スペクトルから求めた光学的バンドギャップの傾向

Table 2. Summary of TD-DFT calculation (B3LYP/6-31G+(d,p) level)

Compound	$E_{S_0-S_1,DFT}$ [eV]	f	Component (coefficient)
6AP (3)	2.31	0.0146	HOMO → LUMO (0.69) HOMO → LUMO+1 (-0.13)
6AP_OMe (5a)	2.21	0.0405	HOMO → LUMO (0.69) HOMO → LUMO+1 (0.13)
6AP_OH (5b)	1.99	0.0572	HOMO → LUMO (0.68) HOMO → LUMO+1 (0.13)
6AP_B_OEt (6a)	1.66	0.0793	HOMO → LUMO (0.69) HOMO → LUMO+1 (0.12)
6AP_B_OH (6b)	1.66	0.0828	HOMO → LUMO (0.69) HOMO → LUMO+1 (0.12)
6AP_B_Ph (6c)	1.63	0.0745	HOMO → LUMO (0.69) HOMO → LUMO+1 (-0.11)
6AP_B_F (6d)	1.68	0.0865	HOMO → LUMO (0.69) HOMO → LUMO+1 (0.13)

Table 3. Comparison of experimental data and the results of DFT calculations

Compound	$E_{HOMO,CV}$ [eV]	$E_{LUMO,CV}$ [eV]	$E_{HOMO,DFT}$ [eV]	$E_{LUMO,DFT}$ [eV]	E_g,CV [eV]	λ_{onset} [nm]	$E_{g,opt}$ [eV]	$E_{g,DFT}^a$ [eV]	$E_{S_0-S_1,DFT}$ [eV]
6AP (3)	-5.99	-3.49	-6.13	-2.91	2.50	633	1.96	3.22	2.31
6AP_OMe (5a)	-5.77	-3.35	-5.58	-2.56	2.42	665	1.86	3.02	2.21
6AP_OH (5b)	-5.71	-3.95	-5.57	-2.90	1.76	714	1.74	2.67	1.99
6AP_BOEt (6a)	-5.78	-4.08	-5.65	-3.42	1.69	797	1.56	2.23	1.66
6AP_BOH (6b)	-5.76	-4.10	-5.65	-3.43	1.67	795	1.56	2.22	1.66
6AP_BPh (6c)	-5.78	-4.12	-5.69	-3.50	1.66	809	1.53	2.19	1.63
6AP_BF (6d)	-5.81	-4.17	-5.77	-3.54	1.64	797	1.56	1.23	1.68

^a $E_{LUMO,DFT} - E_{HOMO,DFT}$.

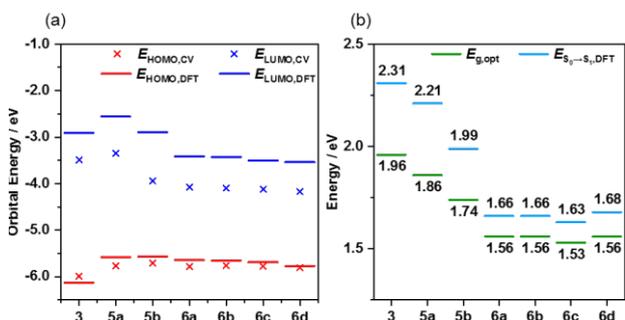


Figure 5. a) Comparisons of energies levels of HOMOs and LUMOs estimated from cyclic voltammery ($E_{HOMO,CV}$ and $E_{LUMO,CV}$) and obtained by the DFT calculation ($E_{HOMO,DFT}$ and $E_{LUMO,DFT}$). b) Comparison of $E_{g,opt}$ (energy of the onset wavelengths in absorption spectra) and $E_{S_0-S_1,DFT}$ (the vertical excitation energy from the ground state (S_0) to the excited state 1 (S_1) calculated by the TD-DFT method).

($E_{g,opt}$) と一致しており、分子設計通りの挙動が確認された。

ところで5bはホウ素原子を持たないが5aに比べるとLUMO準位が大きく低下している。これは上記でも述べた、

5bの持つヒドロキシ基の水素原子が6APの8位の窒素原子と水素結合を形成している影響と考えられる。一方で光学的バンドギャップから予想されるよりその低下の度合いは大きく、これは還元挙動の違いが原因であると推測される。

DFT計算 (B3LYP/6-31G+(d, p) level) から得られた各化合物のHOMOとLUMOの分子軌道をFigure 4に示した。先行研究の5APの系と同様に⁵⁻⁷、5aはHOMOのみで共役の拡張が見られ、LUMOではほとんど見られない。また、5bは一方のアリール基のみでHOMOの共役が拡張している。これは一方のアリール基が持つヒドロキシ基の水素原子が6APの窒素原子と水素結合しており、6AP平面に固定されることで二つのアリール基が非等価になっていることを示唆している。そして、6a-6dはホウ素が配位したことによる軌道の形の変化が見られるとともに、LUMOでは導入したフェニル基や酸素原子にもその軌道が乗っていることが確認された。

ここでFigure 2においてホウ素錯体 (6a-d) のモル吸光係数 ($\epsilon_{abs,2}$) が3, 5a-bに比べて増大していることについて考察する。TD-DFT計算 (TD-B3LYP/6-31G+(d, p) level) から得られた振動子強度の値と最も長波長の吸収帯における遷移の帰属をTable 2に示した。先行研究によると、5APの最も長波長の吸収帯はHOMOからLUMOへの遷移に帰属される¹¹。これは6APにおいても同様であることがTable 2から確認できた。また、Table 1の3の化合物において最も長波長の吸収帯の吸光係数が2800 $M^{-1}cm^{-1}$ (振動子強度: $f = 0.0146$ in Table 2) と非常に小さいことからわかるように、アザフェナレン類は一般にHOMO-LUMO遷移が禁制であることが報告されている¹³。しかし6a-dの吸光係数は11000~14000 $M^{-1}cm^{-1}$ と5倍程度に増大している。これは、Table 2の振動子強度が0.0800程度に増大していることから裏付けられるように、HOMO-LUMO遷移が緩和されていることに由来すると示唆された。先に述べた、LUMOの軌道の形や分布の変化が影響していると考えられる。

最後に、Table 3はDFT計算から求められたデータと実験データをまとめたものである。これらをグラフにして比較すると、DFT計算から求めたHOMO準位 ($E_{HOMO,DFT}$) とLUMO準位 ($E_{LUMO,DFT}$) の定性的な傾向はCVで得られたものと一致していること (Figure 5a)、またTD-DFT計算から求めた基底状態から第一励起状態への垂直遷移エネルギー ($E_{S_0-S_1,DFT}$) の傾向は、吸収スペクトルから求めたHOMO-LUMOギャップ ($E_{g,opt}$) のそれと一致していること (Figure 5b) が確認できる。従って量子化学計算からも電子供与性基でHOMO準位を上昇させホウ素原子によってLUMO準位を低下させるという分子設計通りの挙動が裏付けられた。

3. 結論

6AP誘導体を配位子に用いたホウ素錯体を合成することにより、狭いHOMO-LUMOギャップを持つ化合物を創出する

ことに成功した。サイクリックボルタンメトリーやDFT計算から推定されたLUMO準位は、先行研究⁴の5AP誘導体のそれよりも大きく低下していることから、6APの有する8位の窒素原子にホウ素原子を配位させ深いLUMOを得るという分子設計の有効性を強く支持する結果となった。

また、合成したホウ素錯体の吸収スペクトルは800 nm付近まで吸収帯を有し、さらにHOMO-LUMO遷移が禁制である6AP (3)と比べてモル吸光係数の増大が確認された。これは、7, 9位でのHOMOの共役が伸びたことに加え、LUMOの軌道が変化していることがDFT計算から分かり、これが大きく影響していることが示唆された。今回の実験結果は、6APが有するHOMOとLUMOが分離した特徴的な電子構造を活かし、フロンティア軌道の準位を精密に制御可能な新たな分子設計の指針となったと言える。

参考文献

- 1) (a) Wang, C.; Dong, H.; Hu, W.; Liu, Y.; Zhu, D. *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 2208–2267.
(b) Facchetti, A. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 733–758.
(c) Xiao, L.; Chen, Z.; Qu, B.; Luo, J.; Kong, S.; Gong, Qihuang.; Kido, J. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 926–952.
- 2) Dou, L.; Liu, Y.; Hong, Z.; Li, G.; Yang, Y. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12633–12665.
- 3) Muranaka, A.; Yonehara, M.; Uchiyama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7844–7845.
- 4) Anthony, J.E.; Facchetti, A.; Heeney, F.; Marder, S.R.; Zhan, X. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 3876–3892.
- 5) Watanabe, H.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *J. Org. Chem.*, **2019**, *84*, 2768–2778.
- 6) Watanabe, H.; Hirose, M.; Tanaka, K.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 3674–3680.
- 7) Yeo, H.; Hirose, M.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Polymer Journal.* **2014**, *46*, 688–693.
- 8) Gimarc, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1979–1984.
- 9) Rossman, M.A.; Leonard, N.J.; Urano, S.; LeBreton, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3884–3890.
- 10) Li, D.; Zhang, H.; Wang, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8416–8433.
- 11) Leupin, W.; Wirz, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6068–6075.
- 12) Cardona, C. M.; Li, W.; Kaifer, A.E.; Stockdale, D.; Bazan, G. C. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2367–2371.
- 13) Rossman, M, A.; Hosmane, R, S.; Leonard, N, J. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4324.

ポリスチレンスルホン酸ナトリウムからなるブラシ状高分子の分子パラメータ

Molecular Parameters for Brush-Like Polymers Consisting of Poly(sodium styrene sulfonate)

中村 洋・松居 大志・柴山 雅貴

Yo NAKAMURA, Taishi MATSUI, Masataka SHIBAYAMA

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

By sulfonating polystyrene polymacromonomers, four samples of brush-like polymers (BLP) consisting of poly(styrene sulfonate) with about 75 monomeric units in a side chain were prepared. Small-angle X-ray scattering and size-exclusion chromatography equipped with multi-angle light scattering and viscosity detectors were performed on these polymers in NaCl aqueous solutions to determine the particle scattering function, the radius of gyration, and the intrinsic viscosity as functions of the weight-average molecular weight. By the analysis of the data, the cross-section diameter d and the stiffness parameter λ^{-1} of the BLP were determined as functions of the salt concentration C_s . Both of the molecular parameters decreased with increasing C_s reflecting the shielding of the repulsive interaction between the electric charges on the side chains. By a molecular model with straight side chains having charges with equal separations, the electro-static contribution $\lambda e l^{-1}$ to the stiffness parameter of polyelectrolyte BLP was calculated considering the Manning polycondensation hypothesis and the Donnan equilibrium between the inside and the outside of the brush. The calculated values were too small compared with the experimental values suggesting the necessity of the improvement of the theory.

1. 序

これまで、側鎖重合度 n が約15および110のポリスチレンスルホン酸ナトリウム (NaPSS) からなるブラシ状高分子 (BLP)の溶液物性について検討してきた^{1,2)}。その結果、 $n \sim 15$ のNaPSSからなるBLP(SF15)においては、スルホン化前に比べて塩水溶液中における主鎖剛直性パラメータ λ^{-1} が約8倍となり、顕著に増大したり。これは、側鎖上の電荷間の斥力相互作用によるものと考えられた。一方で、分子の断面直径 d はスルホン化前と大きく変わらなかった。これに対し、 $n \sim 110$ のNaPSSからなるBLP(SF110)についてはスルホン化前後で λ^{-1} は顕著に変わらなかったが、一方でスルホン化後の d がスルホン化前に比べて約2倍となった²⁾。

$n \sim 15$ と $n \sim 110$ のBLPが異なる挙動をしたが、中間の n でどのような挙動をするのか、分子パラメータの値の変化がどのくらいの n で現れるのか調べることは側鎖間の相互作用がBLPの形態に与える影響を考えるうえでも重要である。そこで本研究では、 $n \sim 75$ のNaPSSからなるBLPを合成し、その溶液物性について検討した。

2. 実験

ポリスチレンポリマクロモノマーの合成

n -butyllithium/tetramethylethylenediamine/toluene 配位子錯体を開始剤としてスチレンを重合し、末端がリビングの状態ですルホン化と反応させることによりポリスチレンからなるマクロモノマーを合成した。マクロモノマーの合成は2度行い、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析により、重量平均分子量 M_w をそれぞれ 8.33×10^3 (F78)、 7.61×10^3 (F70)と決定した。両試料について、 M_w と数平均分子量 M_n の比は1.01であった。得た

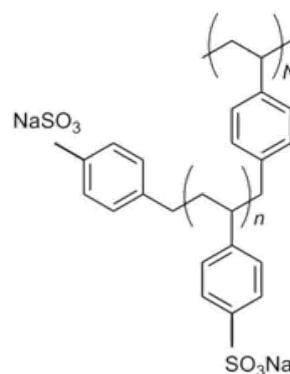


Figure 1. Chemical structure of brush-like polymer consisting of NaPSS.

マクロモノマーをbenzeneに溶解し、ラジカル重合開始剤であるazobis(isobutyronitrile)を加え、アルゴン雰囲気下、60°Cで48時間ラジカル重合を行い、ポリスチレンポリマクロモノマー(PSPM)を得た。F70とF78で若干重合度が異なるが、のちのBLPに対するデータの解析において、この違いは無視する。

ポリスチレンポリマクロモノマーのスルホン化

得たPSPMをVinkの方法³⁾によってスルホン化した。PSPMをcyclohexaneに溶かし、五酸化二リンを添加した濃硫酸中にゆっくりと加え、40°Cに保ちながら3時間反応させた。その後、氷浴中に浸しながら氷片を加え、ポリマーを析出させた。溶液を分液漏斗に移し、純水を加えてポリ

マーを溶かし、水相を回収した。得た水溶液を純水中で約1週間透析し、イオン交換カラムに通して残留低分子イオンの除去および高分子の対金属イオンを水素イオンに交換した。その後、NaOH水溶液を溶媒、ethanolを沈殿剤として分別沈殿をおこない、中間のフラクションに対して、イオン交換後、NaOH溶液により中和した。中和点として直鎖NaPSSに対して知られる値⁴⁾、pH = 7.6を用いた。得た水溶液を凍結乾燥し、図1の化学構造を持つ側鎖重合度約75のNaPSSからなるポリマクロモノマー(NaPSSPM)試料(SF75)を得た。得た、NaPSSPM試料の一覧と元素分析によ

Table 1. Degree of Sulfonation of NaPSSPM Samples

Sample	Degree of Sulfonation
SF75-20	-----
SF75-40	0.9 ₇
SF75-240	1.0 ₉
SF75-450	1.0 ₇

り炭素と硫黄の含有率の比より決定したスルホン化度を表1に示す。スルホン化度は実験誤差内で1とみなせる。

小角X線散乱測定

0.005M、0.05M、0.5M NaCl水溶液に溶解したSF75-40試料に対して25°Cで小角X線散乱(SAXS)測定を行った。測定は高輝度放射光施設SPring-8のBL40B2ビームラインで、入射X線波長1.0 Å、カメラ長4 mで行った。各塩濃度においてポリマー濃度が約2.5、5.0、7.5、10.0 mg/mLの4つの溶液について測定した。各溶液に対する散乱強度から溶媒に対する散乱強度を引き、それに純水に対する散乱強度より求めた装置定数を掛けることにより、還元過剰散乱強度 $\Delta I(q)$ を得た。散乱ベクトルの絶対値 q における $\Delta I(q)$ の濃度0への外挿値 $(\Delta I(q))_{c=0}$ を求め、 $(\Delta I(q))_{c=0}/(\Delta I(0))_{c=0}$ より、粒子散乱関数 $P(q)$ を求めた。

サイズ排除クロマトグラフィー—多角度光散乱—粘度測定

0.005M、0.05M、0.5M NaCl水溶液に溶解したSF75-450、SF75-240、SF75-40、およびSF75-20に対してサイズ排除クロマトグラフィー—多角度光散乱—粘度(SEC-MALS-VISC)測定を行った。多角度光散乱(MALS)検出器にWyatt社製DAWN HELEOS II、粘度(VISC)検出器にWyatt社製Visco Starを示差屈折率計にWyatt社製Optilabを用い、カラムにはShodex OHPak SB-806HQを用いた。MALSより各流出体積における重量平均分子量 M_w 、平均二乗回転半径 $\langle S^2 \rangle$ を、VISCより固有粘度 $[\eta]$ を求めた。

3. 結果

SAXS測定結果

図2に3塩濃度における $\ln(\Delta I(q)/c)_{c=0}$ の q^2 に対するプロット(Guinierプロット)を示す。低角における実験データを直線で表し、各直線の傾きより $\langle S^2 \rangle$ を求めた。

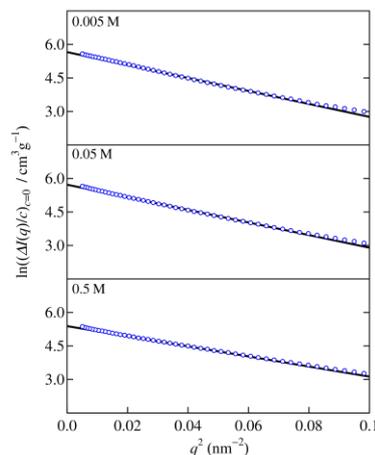


Figure 2. Guinier plots for SF75-40 in NaCl aq. at the indicated salt concentrations.

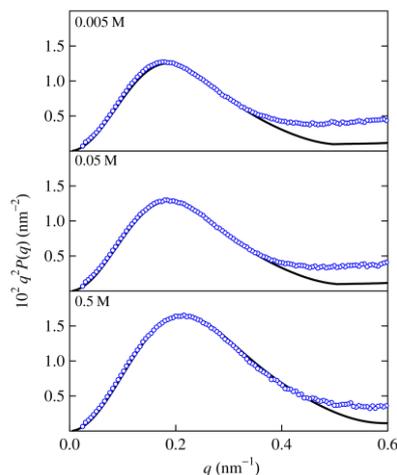


Figure 3. Kratky plots for SF75-40 in NaCl aq. at the indicated salt concentrations.

図3に各塩濃度における $q^2 P(q)$ 対 q のプロット(Kratkyプロット)を示す。いずれの塩濃度においても、軸比の小さい溶質に特徴的なピークを示している。実験データを両端に半球のついた円筒モデルに対する理論値⁵⁾によってフィッティングした結果を図中の実線で示す。円筒部の断面直径を d 、円筒部の長さを b として、実験データを最もよく表

す値を決めた。

SEC-MALS測定結果

図4に一例として塩濃度 $C_s = 0.005\text{M}$ におけるSEC-MALS測定から得たSF75に対する $\langle S^2 \rangle$ 対 M_w の両対数プロットを示す。図中にSAXSから求めたデータも含める。図中の実線は非摂動みみず鎖理論⁶⁾に鎖の太さを考慮した次式による計算値を示す。

$$\langle S^2 \rangle = \frac{L}{6\lambda} - \frac{1}{4\lambda^2} + \frac{1}{4\lambda^3 L} - \frac{1}{8\lambda^4 L^2} (1 - e^{-2\lambda L}) + \frac{d^2}{8} \quad (1)$$

式中、 L は鎖の経路長を、 λ^{-1} は剛直性パラメータを示す。 L は主鎖経路長 M/M_L (M は分子量、 M_L は単位経路長当たりの分子量)に鎖の末端において側鎖がはみ出すことによる寄与 δ を加えることによって求めた。 M_L は主鎖繰り返し単位当たりの分子量と経路長をそれぞれ M_0 、 h で表すと M_0/h で計算することができる。 h に対してはSF15 に対して実験的に求められた値²⁾ $h = 0.26\text{ nm}$ を用い、 M_0 にマクロモノマー分子量にスルホン化による増分を考慮した値を用いることで、 $M_L = 6.03 \times 10^4\text{ nm}^{-1}$ と求めた。

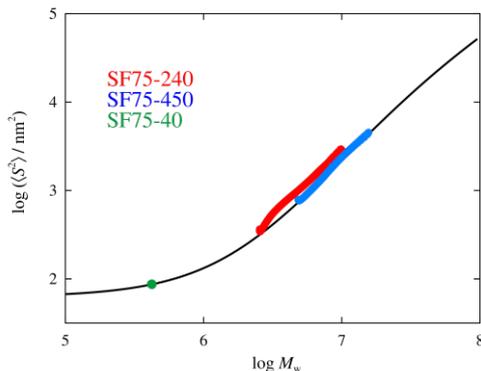


Figure 4. $\langle S^2 \rangle$ for SF75 NaPSSPM in 0.005M NaCl aq. double-logarithmically plotted against M_w .

SEC-VISC測定結果

図5 に一例として $C_s = 0.05\text{ M}$ におけるSEC-VISC測定より求めたNaPSSPMに対する $[\eta]$ の分子量依存性を両対数プロットで示す。軸比が小さいポリマクロモノマー分子に特徴的な下に凸の形状を示している。これらの実験データに対し両端に回転楕円体キャップのついた円筒みみず鎖モデルに基づく理論⁷⁾によるフィッティングを行った結果を図中の実線で示す。 $[\eta]$ より求めた λ^{-1} は $\langle S^2 \rangle$ から求めた値と大きく変わらなかったが、 $[\eta]$ から求めた d については、 $C_s = 0.005\text{M}$ においては $\langle S^2 \rangle$ から求めた値の約1.5倍、 $C_s = 0.05\text{M}$ においては $\langle S^2 \rangle$ から求めた値の約1.3倍と大きくなった。

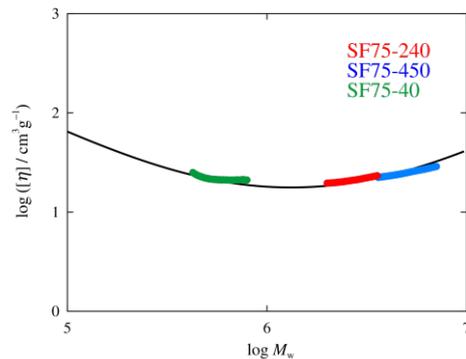


Figure 5. $[\eta]$ for SF75 NaPSSPM in 0.05M NaCl aq. double-logarithmically plotted against M_w .

4. 考察

分子パラメータの側鎖重合度依存性

図6に $C_s = 0.05\text{ M}$ におけるNaPSSPMの d の側鎖重合度 n に対するプロットを示す。図中にSF15¹⁾、SF110²⁾に対するデータ点およびトルエン中におけるポリスチレンポリマクロモノマー(PSPM)に対するデータ点⁸⁻¹⁰⁾を含む。 n が小さいときはNaPSSPMに対するデータ点はPSPMに対する値と近いが、 n が大きくなるとともにPSPMとの差は大きくなる。図中の実線は側鎖が伸びきっていると仮定したときの値を示し、 $n > 100$ の点 (SF110) はこれに近くなっていることがわかる。

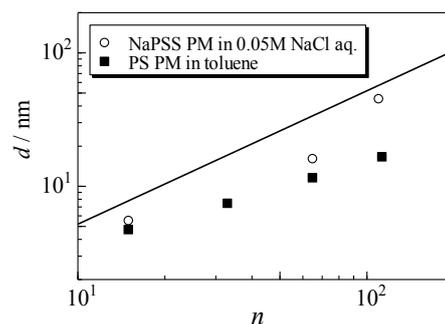


Figure 6. Molecular diameter d for NaPSSPM in 0.05M NaCl aq. (circles) double-logarithmically plotted against the number of monomeric units n of the side chain comparing with the data for polystyrene polymacromonomers in toluene (squares).

NaPSSPMの剛直性パラメータ λ^{-1} の側鎖重合度依存性を図7に示す。図中にPSPMのデータを含む。NaPSSPMの λ^{-1}

は n が小さい時にはPSPMに比べてはるかに大きい、 n 依存性はPSPMに比べて弱く、 n が大きくなるとともにPSPMの値に近づいていく。

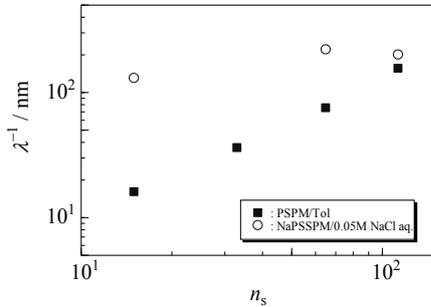


Figure 7. Stiffness parameter λ^{-1} for NaPSSPM in 0.05M NaCl aq. (circles) double-logarithmically plotted against the number of monomeric units n of the side chain comparing with the data for polystyrene polymacromonomers in toluene (squares).

分子パラメータの塩濃度依存性

図8にSF75のSAXS測定から求めた d および λ^{-1} の C_s に対するプロットを示す。両パラメータはともに C_s の増大とともに減少している。塩濃度の増大とともに側鎖間の斥力相互作用が遮蔽されたことによると考えられる。

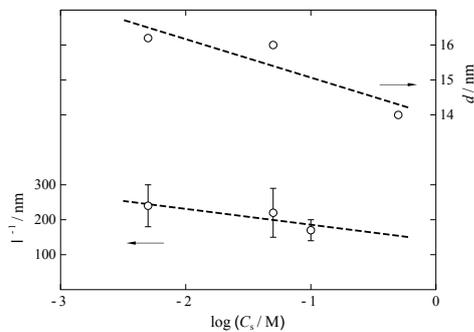


Figure 8. d and λ^{-1} for SF75 in NaCl aq. plotted against C_s .

剛直性パラメータの計算

ブラシ状分子をモデル化し、SF75の λ^{-1} を計算した。側鎖は棒状で主鎖と直角に結合しているとし、電離基間距離はNaPSSの構造から0.25 nmであると、Manningのイオン凝縮¹¹⁾を考慮した。電離基間にDebye-Hückelの相互作用ポテンシャルが働いているとした。ブラシ状分子の内部と外部でDonnan平衡が成り立っていると仮定し、ブラシ状分子

内部における局所的なイオン濃度を計算し、そのイオン環境において電離基同志が相互作用するとした。すべての電離基間の相互作用ポテンシャルの和から1分子当たりのHelmholzの自由エネルギーを計算した。ただし、側鎖はすべての向きを等確率で取りうると仮定し、主鎖周りの回転角についての平均値を用いた。主鎖が直線状の状態から、一定の曲率半径 R_c で曲げたときの自由エネルギーの増分 ΔF を計算し、次式を用いて電荷間相互作用による主鎖剛直性パラメータ λ_{el}^{-1} を計算した^{2,12)}。

$$\lambda_{el}^{-1} = \frac{4R_c \Delta F}{L k_B T} \quad (2)$$

L は主鎖の経路長を示す。主鎖に沿っての側鎖間隔は0.25 nmであるとした。計算値が主鎖重合度 N に依存したため N を変えて計算し、 $N^{-1} \rightarrow 0$ への外挿値を求め、実験値と比較した。その結果を図9に示す。破線で表す式(2)による計算値は実験値よりもはるかに小さくなった。高分子電解質からなるブラシ状分子の λ^{-1} には電荷間相互作用の寄与 λ_{el}^{-1} に非電荷間相互作用の寄与 λ_{ne}^{-1} を足した次式で表されると考えられる²⁾。

$$\lambda^{-1} = \lambda_{el}^{-1} + \lambda_{ne}^{-1} \quad (3)$$

図中の実線は上で計算した λ_{el}^{-1} に $\lambda_{ne}^{-1} = 200 \text{ nm}$ を加えた式(3)による計算値を示す。計算値は実験値をよく表すが、用いた λ_{ne}^{-1} はSF110に対する値²⁾150 nmよりも大きく、過大評価している可能性が高い。これは、 λ_{ne}^{-1} に対する計算値が低く見積もられていることによると考えられる。 λ_{ne}^{-1} の計算方法についてはさらなる考察が必要である。

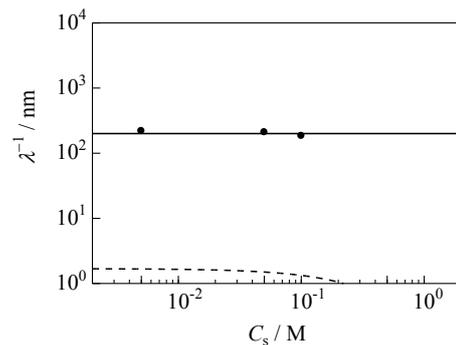


Figure 9. Stiffness parameter λ^{-1} for SF75 (circles) in NaCl aq. double-logarithmically plotted against C_s . Solid and dashed lines show the calculated values from Eqs (3) and (2), respectively.

5. 結論

ポリスチレンからなるポリマクロモノマーをスルホン化することで側鎖重合度が約75のポリスチレンスルホン

酸ナトリウムからなるブラシ状高分子を合成した。主鎖重合度の異なる4試料に対して、小角X線散乱、サイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱-粘度測定を行い、得たデータを解析することにより、ブラシ状分子直径 d および剛直性パラメータ λ^1 を塩濃度 C_s の関数として決定した。両パラメータは C_s の増大とともに減少し、側鎖上にある電荷間相互作用が溶解イオンによって遮蔽されてることが示された。

棒状の側鎖に等間隔に電荷を配置したブラシ状分子のモデルについて電荷間相互作用による λ^1 への寄与 λ_{el}^{-1} を計算した。ブラシ内外でDonnan平衡が成立していると仮定すると、 λ_{el}^{-1} は実験値に比べはるかに小さくなった。 λ_{el}^{-1} に非電荷間相互作用による寄与 λ_{ne}^{-1} を足すことによって実験データに近い値を得ることができたが、 λ_{ne}^{-1} が側鎖重合度がより高いSF110に比べて大きくなり、過大評価している可能性が示唆された。この原因として、 λ_{el}^{-1} を過小評価していることが考えられ、 λ_{el}^{-1} の計算法についてさらなる考察が必要であることが示された。

参考文献

- 1) E. Kanemaru, K. Terao, Y. Nakamura, and T. Norisuye, *Polymer*, **49**, 4174 (2008).
- 2) Y. Kitagawa, Y. Hasegawa, K. Ide, and Y. Nakamura, *Polym. J.*, **51**, 861 (2019).
- 3) H. Vink, *Makromol. Chem.*, **182**, 279 (1981).
- 4) E. Hirose, Y. Iwamoto, and T. Norisuye, *Macromolecules*, **32**, 8629 (1999).
- 5) M. A. Haney, *J. Appl. Polym. Sci.*, **30**, 3023 (1985).
- 6) H. Benoit and P. Doty, *J. Phys. Chem.*, **57**, 958 (1953).
- 7) H. Yamakawa and T. Yoshizaki, *Macromolecules*, **13**, 633 (1980).
- 8) K. Terao, Y. Nakamura, and T. Norisuye, *Macromolecules*, **32**, 711 (1999).
- 9) T. Hokajo, K. Terao, Y. Nakamura, and T. Norisuye, *Polym. J.*, **33**, 481 (2001).
- 10) M. Sugiyama, Y. Nakamura, and T. Norisuye, *Polym. J.*, **40**, 109 (2008).
- 11) G. S. Manning, *J. Chem. Phys.*, **51**, 924 (1969).
- 12) Y. Nakamura and T. Norisuye, *Polym. J.*, **33**, 874 (2001).

バロプラスチックの圧力誘起相転移に関する理論的研究

Theoretical Study on Pressure-Induced Phase Transition of Baroplastics

古賀 毅・出垣 大貴

Tsuyoshi KOGA, Hiroki DEGAKI

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Baroplastics are known as multiphase polymer systems which show phase transition induced by applied pressure. Some baroplastic block copolymers (BCPs) possess room temperature processability because the BCPs show the order-disorder transition (ODT) by applying pressure and exhibit fluidity. Due to this property, the baroplastics are expected as materials which contribute to the realization of a sustainable society. From a theoretical point of view, the theoretical study of baroplastics has been developed based on the theory of polymer mixtures, not the theory of block copolymers. Therefore, in this study, we have developed the self-consistent field theory (SCFT) for compressible BCPs by combining SCFT with the equation-of-state of the system. We also derived the pressure-dependence of the effective interaction parameters. The theoretical results about the lamellar structures for polystyrene-*block*-poly(*n*-butyl methacrylate) agree well with the experimental observations. We have also discussed the origin of the baroplastic behavior.

1. 緒言

ブロック共重合体は、分子内に異種セグメントの接合点があるため、マクロな相分離を起こさず、分子の慣性半径程度の周期を持つマイクロ相分離構造を形成する。マイクロ相分離構造には、空間対称性を持つ様々な周期構造が見出されている。例えば、各ブロックの体積分率が等しい場合には、1次元のラメラ構造 (Fig. 1) を形成することが知られている¹⁾。このようなマイクロ相分離構造は温度変化によって可逆的な構造転移を起こす。特に、ラメラ相のように空間対称性を持つ秩序相から、異種セグメントがランダムに相溶する無秩序相への構造転移は、秩序-無秩序転移 (Order-Disorder Transition: ODT) と呼ばれる。

ブロック共重合体の中には、温度変化だけでなく、圧力変化によってもODTを起こすものがある。特に、加圧によって、固化した秩序相から流動する無秩序相への相転移を起こすものは**バロプラスチック (baroplastic)** の一種として知られる (Fig. 1)。室温程度の低温で圧力誘起相転移を起こすバロプラスチックもいくつか見出されている²⁾。これらは室温において加圧するだけで流動する。したがって成形加工の過程で加熱・冷却を必要としないため、プラスチック加工におけるエネルギーを低減するとともに、CO₂排出量の削減への貢献が期待されている。また、リサイクルの際にも加熱を必要とせず、ポリマーの熱分解が抑制されることから、力学的特性を保ったリサイクルを実現できる。さらに、バロプラスチックへの生分解性の付与も達成されており、海洋マイクロプラスチック問題の解決に寄与する可能性も秘めている³⁾。

バロプラスチックの系を予測するツールとして、発見当初より Compressible Regular Solution (CRS) モデルが用いられてきた^{2,4)}。これは、Flory-Huggins理論を拡張し、圧縮性

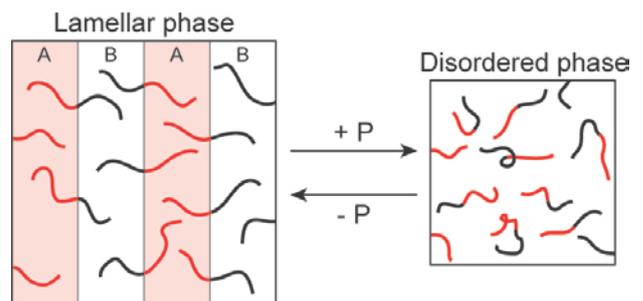


Fig. 1 Pressure-induced phase transition of baroplastics in the case of diblock copolymers.

を導入した理論であるが、相溶性への圧力の影響を定性的に予測するにとどまっている。また、あくまで異種ホモポリマーのブレンドに対する理論であり、**ブロック共重合体の連結効果を取り入れた理論になっていない。**

本報では、ブロック共重合体の精密な構造計算に広く用いられてきた自己無撞着場理論 (Self-Consistent Field Theory: SCFT)¹⁾に実効相互作用パラメータ χ_{eff} を導入し、バロプラスチックのブロック共重合体の理論を新たに構築した。この理論では、CRSモデルの拡張によって誘導した χ_{eff} を通じて高分子の圧縮性の効果 (状態方程式) を取り入れており、ブロックの連結効果を考慮した、バロプラスチックの直接的な構造計算を行うことができる。構築した理論を用いて、バロプラスチックの圧力誘起相転移の起源と構造変化について調べた。

2. 理論

バロプラスチックの等方的な加圧を考え、等温-等圧 (npT) アンサンブルにおける圧縮性ブロック共重合体の自己無撞着場理論 (SCFT) の定式化を行う。CRSモデルを

拡張して実効相互作用パラメータ χ_{eff} を誘導し、この χ_{eff} をSCFTの相互作用項に用いることで圧力の効果を導入する。CRSモデルにおいては、状態方程式を用いて密度（体積）を決定することで、圧力の効果が考慮される。

2-1. 自己無撞着場理論 (SCFT)

自己無撞着場理論 (SCFT) とは、物理的考察から得られる複数の関係式（自己無撞着場方程式）から、全ての関係式において矛盾が生じないように、すなわち自己無撞着に、種々の物理量を決定する理論的枠組みである¹⁾。ここでは、計算に便利なアンサンブルとして等温-等圧 (npT) アンサンブルを選択し、variable cell shape method を用いる⁵⁾。この方法では、外から加えた圧力と、ラメラで生じる内部応力が釣りあうような解を容易に決定することができる。

A, Bの2ブロックからなる n 分子のジブロック共重合体の系を考える。系の分配関数は次のように書ける。

$$Z = \int d\mathbf{h} \int d^n \mathbf{r} \exp[-\beta V \mathbf{r} : \boldsymbol{\epsilon} - \beta \mathcal{H}(\mathbf{r})]$$

ここで、 \mathbf{r} は各分子の位置ベクトル、 \mathbf{h} は系の3次元的な形状を表す2階テンソルであり、 β は逆温度で $\beta \equiv 1/k_B T$ 、 V は系の体積である。 $\boldsymbol{\tau}$ は外部応力を表す第2パイオラ・キルヒホッフ応力テンソル、 $\boldsymbol{\epsilon}$ は歪みテンソルであり、 $\boldsymbol{\tau} : \boldsymbol{\epsilon}$ はダブルドット積である。高分子鎖に作用するポテンシャル \mathcal{H} は、理想鎖の項 \mathcal{H}_0 とセグメント間相互作用の項 \mathcal{W} の和として

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_0 + \mathcal{W}$$

と表せる。セグメント間相互作用の項は、CRSモデルの考え方を一般化することで、以下のように書ける⁴⁾。

$$\mathcal{W} = \rho_0 \int d\mathbf{r} \sum_i \sum_j \phi_i \phi_j \tilde{\rho}_i \tilde{\rho}_j \left(\frac{1}{2} z \epsilon_{ij} \right)$$

ここで、 ρ_0 はモノマーの平均数密度、 ϕ_i は i 種セグメントの体積分率、 z は最近接モノマーの配位数、 ϵ_{ij} は i, j モノマー間の相互作用エネルギー（凝集エネルギー）である。 $\tilde{\rho}_i$ は i 種セグメントのreduced densityである。reduced densityは、与えられた温度・圧力におけるモノマーハードコアの充填率に等しく、自由体積の増減を表す。このreduced densityで体積の増減を表現することで、高分子の圧縮性を理論に導入することができる。上式を整理していくと、最終的にセグメント間相互作用を以下のように書き直せる。

$$\beta \mathcal{W} = \chi_{\text{eff}} \rho_0 \int d\mathbf{r} \phi_A(\mathbf{r}) \phi_B(\mathbf{r})$$

χ_{eff} は2種類のブロックの相溶性を表す実効相互作用パラメータであり、具体的な表式は次節で述べる。

SCFTでは、互いに相互作用する高分子鎖を、A, Bセグメントにはたらく自己無撞着場 $w_A(\mathbf{r}), w_B(\mathbf{r})$ 中の1本の理想鎖として平均場近似を行う。この近似を行うことで、自由エネルギーが次のように計算できる。

$$\frac{F}{nk_B T} = \frac{V \boldsymbol{\tau} : \boldsymbol{\epsilon}}{nk_B T} + \frac{1}{V} \int d\mathbf{r} [\chi_{\text{eff}} N \phi_A \phi_B - w_A \phi_A - w_B \phi_B - \xi(1 - \phi_A - \phi_B)] - \ln \left(\frac{Q}{V} \right)$$

ここで、 N は重合度、 Q は平均場近似した系の分配関数である。 ξ は拘束条件 $\phi_A(\mathbf{r}) + \phi_B(\mathbf{r}) = 1$ についてのLagrange未定乗数である。この拘束条件は、混合に伴う体積変化を無視する仮定から生じる。体積分率 ϕ_A, ϕ_B および分配関数 Q は、高分子鎖の末端分布関数 q から計算することができる。この末端分布関数は、次の拡散方程式に従う。

$$\frac{\partial q(\mathbf{r}, s)}{\partial s} = \frac{1}{6} N a^2 \nabla^2 q(\mathbf{r}, s) - w(\mathbf{r}, s) q(\mathbf{r}, s)$$

ここで、 a は統計セグメント長、 s ($0 \leq s \leq 1$)は鎖に沿った位置のパラメータであり、Aブロック末端で $s = 0$ 、ABブロックの境界（接合点）で $s = f$ 、Bブロック末端で $s = 1$ をとる (f はAブロックの体積分率)。初期条件は $q(\mathbf{r}, 0) = 1$ である。また、

$$w(\mathbf{r}, s) = \begin{cases} w_A(\mathbf{r}) & (0 \leq s \leq f) \\ w_B(\mathbf{r}) & (f \leq s \leq 1) \end{cases}$$

である。末端分布関数 q と ϕ_A, ϕ_B, Q との関係は以下のとおりである。

$$\begin{aligned} \phi_A(\mathbf{r}) &= \frac{V}{Q} \int_0^f ds q(\mathbf{r}, s) q(\mathbf{r}, 1-s) \\ \phi_B(\mathbf{r}) &= \frac{V}{Q} \int_f^1 ds q(\mathbf{r}, s) q(\mathbf{r}, 1-s) \\ Q &= \int d\mathbf{r} q(\mathbf{r}, 1) \end{aligned}$$

自由エネルギーの最小値から平衡状態を考えることで、自己無撞着場方程式が以下のように与えられる。

$$\begin{aligned} w_A(\mathbf{r}) &= \chi_{\text{eff}} N \phi_B(\mathbf{r}) + \xi(\mathbf{r}) \\ w_B(\mathbf{r}) &= \chi_{\text{eff}} N \phi_A(\mathbf{r}) + \xi(\mathbf{r}) \\ \phi_A(\mathbf{r}) + \phi_B(\mathbf{r}) &= 1 \\ \boldsymbol{\sigma}^{\text{int}} &= p \mathbf{I} \end{aligned}$$

\mathbf{I} は単位テンソルである。最後の式は、内部Cauchy応力が外部圧力 p と釣りあうことを表している。系の形状変化を考える場合、 $\boldsymbol{\sigma}^{\text{int}}$ の異方性部分 $\hat{\boldsymbol{\sigma}}^{\text{int}}$ が重要であり、次の式から計算できる。

$$\hat{\boldsymbol{\sigma}}_{\alpha\beta}^{\text{int}} = \frac{3k_B T}{V N a^2} \sum_{i=1}^n \left\langle \int_0^1 ds \frac{dr_{i\alpha}}{ds} \frac{dr_{i\beta}}{ds} \right\rangle$$

上記の拡散方程式と自己無撞着場方程式を数値的な反復計算によって解けば、その解からブロック共重合体の構造を決定することができる。ここでは、ラメラの界面に垂直な方向に x 軸を取り、拡散方程式を実空間で差分化して計算を行う。

2-2. 実効相互作用パラメータ

前節に述べたように、CRSモデルを拡張することで、実効相互作用パラメータ χ_{eff} を計算できる。 χ_{eff} は、以下のよう2つの項の和の形で表せる。

$$\chi_{\text{eff}} = \chi_1 + \chi_2$$

ここで、 χ_1 は混合エンタルピー変化の項で、

$$\chi_1 = \beta \tilde{\rho}_A \tilde{\rho}_B \frac{z(2\epsilon_{AB} - \epsilon_{AA} - \epsilon_{BB})}{2}$$

と書ける。係数 $\tilde{\rho}_A \tilde{\rho}_B$ は、自由体積（空隙）による希釈の効果を表している。非圧縮極限 ($\tilde{\rho}_i \rightarrow 1$) の場合、この項は古典的なFlory-Huggins理論の相互作用パラメータに一致

する。 χ_2 はブロック間の圧縮性のちがいに由来する項であり、

$$\chi_2 = -\beta(\tilde{\rho}_A - \tilde{\rho}_B) \left(\tilde{\rho}_A \frac{z\epsilon_{AA}}{2} - \tilde{\rho}_B \frac{z\epsilon_{BB}}{2} \right)$$

と表せる。非圧縮極限 ($\tilde{\rho}_i \rightarrow 1$) の場合、両ブロックの圧縮性の差は消失するので ($\tilde{\rho}_A - \tilde{\rho}_B \rightarrow 0$)、 χ_2 は値を持たない。

圧縮に伴う体積変化を表すreduced densityは、状態方程式を用いて計算することができる。高分子系に対する状態方程式には様々なものが提案されているが、本報では、オリジナルのCRSモデルで使われているTait式を用いる^{4,6}。Tait式の場合、reduced densityは以下のように計算できる。

$$\tilde{\rho}_i = \frac{1}{1 - C \ln[1 + p/B_i(T)]} \exp(-\alpha_i T)$$

ここで、 $B_i(T) = B_{i,0} \exp(-B_{i,1} T)$ であり、 C はセグメント種によらない定数、 $\alpha_i, B_{i,0}, B_{i,1}$ はセグメント種による定数である。

セグメント間相互作用エネルギー (凝集エネルギー) は、Hansenの溶解度パラメータ δ_{ij} から次のように計算することができる。

$$\delta_{ij} = -\frac{\epsilon_{ij}}{2v}$$

ここで、 v は平均のモノマー体積である。溶解度パラメータの評価法にも様々なものがあるが、ここではオリジナルのCRSモデルと同様に、group contribution法を用いる^{4,7}。

3. 結果と考察

代表的なバロプラスチック⁸⁾であるpoly(styrene)-*b*-poly(*n*-butyl methacrylate) (PS-*b*-PBMA)についてSCFT計算を行った。両ブロックの体積分率が等しく対称的なジブロック共重合体を仮定し、計算に必要なパラメータは文献値^{4,6,7,9)}を用いた (Table 1)。また、重合度は $N=185$ 、温度は $T=443$ Kとした。

3-1. 実効相互作用パラメータの圧力依存性

まず、加圧に対する相溶性の変化を調べるため、相互作用パラメータの計算を行った。Fig. 2に3つの相互作用パラメータ $\chi_{\text{eff}}, \chi_1, \chi_2$ の圧力依存性を示している。実効相互作用パラメータ χ_{eff} が加圧とともに小さくなっている。実効相互作用パラメータは、古典的な非圧縮性高分子の理論であるFlory-Huggins理論の χ パラメータに対応する相互作用パラメータであり、系の相分離する傾向の強さ、すなわち偏析力を表している。 χ_{eff} が小さくなるということは、異種セグメントの相溶性が向上するということであり、モデル

Table 1 Parameters used in SCFT calculation

Parameters	PS	PBMA
α [10^{-4}K^{-1}]	5.13	6.05
B_0 [bar]	2169	2267
B_1 [10^{-3}K^{-1}]	3.319	5.344
$N_{Av}v$ [cm^3/mol]	83.96	112.45
δ [$\text{J}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$] (at 0 K)	21.16	19.89

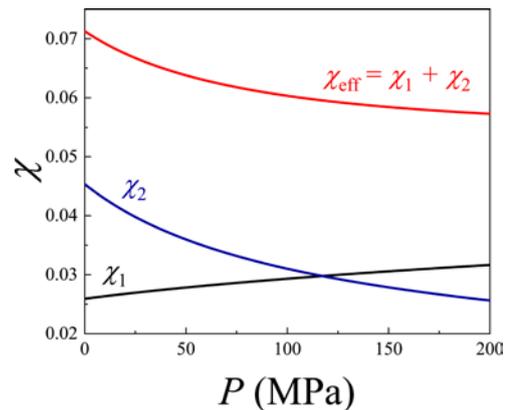


Fig. 2 Pressure dependence of the effective interaction parameter of PS/PBMA system at 443 K.

のPS-*b*-PBMAの系が加圧によって相溶するバロプラスチックの性質を持つことを意味している。

既に述べたように $\chi_{\text{eff}} = \chi_1 + \chi_2$ であるので、実効相互作用パラメータの挙動は χ_1 と χ_2 の挙動を調べることで理解できる。 χ_1 は、各セグメントのreduced density $\tilde{\rho}_i$ に比例する。一般的に、加圧により高分子の自由体積は減少するので、その定義から明らかなように、 $\tilde{\rho}_i$ は圧力を大きくすると1に向かって増加する。したがって χ_1 は、どのような系でも加圧にともない増加するので、バロプラスチックの性質に寄与することはないと考えることができる。一方 χ_2 は、各セグメントの圧縮性の差に起因する項であるが、どのような圧力依存性を示すかは各成分の圧力依存性 (それぞれの状態方程式) により様々である。今回の系では、加圧とともに両セグメント間の密度差が小さくなるため、 χ_2 が減少すると考えられる。この χ_2 の減少が χ_1 に比べて顕著であるため、これら2項の和である χ_{eff} が減少したといえる。すなわち、各セグメントの圧縮性に差があって、実効相互作用パラメータに対する χ_2 の寄与が支配的であり、加圧とともに両ブロックの密度差が小さくなっていく場合、その系はバロプラスチックになると考えることができる。

3-2. ラメラの構造プロファイル

次に、SCFTの解として得られる密度プロファイルから、加圧に伴うラメラの構造変化を調べた。Fig. 3に加圧に伴う密度分布の変化を示した。2種のセグメントについて対称な密度プロファイルは、系が1次元的な層構造 (ラメラ) を形成していることを示している。前節で述べたように、PS-*b*-PBMAでは加圧に伴い偏析力が低下し、2種類のブロックが相溶しやすくなる。そのため、加圧とともに各層に異種セグメントが侵入し、密度分布が一樣となる方向に構造変化を起こしていることが分かる。このような構造変化は、小角中性子散乱 (SANS) プロットにおけるピーク強度の減少として、実験的にも確認されている⁸⁾。

Fig. 4にラメラ周期の圧力依存性を示している。圧力を高くすると、ラメラの周期が短くなっていくことが分かる。これは、界面における異種セグメントの反発と鎖の伸

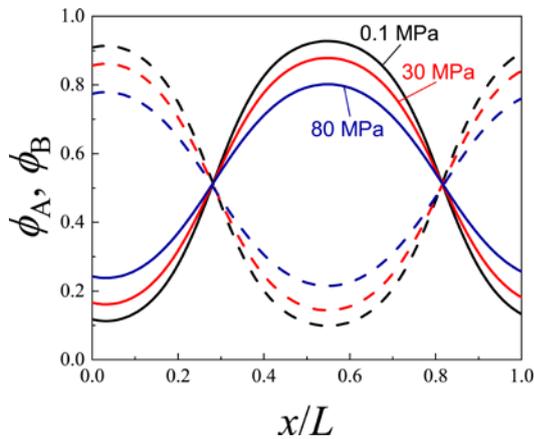


Fig. 3 Comparisons of the model PS-*b*-PBMA lamellar structures at 0.1, 30, and 80 MPa.

長の効果を考えれば説明できる。界面では、異種セグメント間の偏析力による反発のために、高分子鎖は伸びた形態を取ろうとする。これにより、界面積を減らして系を安定化することができる。一方で、エントロピー的には高分子鎖は屈曲した方が安定である。したがって、これらの2つの効果のバランスによってラメラの周期が決定される。低圧の時、偏析力は大きいため、反発の効果が相対的に大きくなってラメラの周期は長くなる。加圧していくと、偏析力が小さくなるので、鎖の屈曲が許されラメラ周期が小さくなる。バロプラスチックの構造周期が加圧とともに減少していくという事実は、SANS曲線のピークの高波数側へのシフトとして実験的に確認されており⁸⁾、計算の結果とも定性的に一致する。本計算は、バロプラスチックの加圧にともなうラメラ周期の減少を直接計算した初めての例である。

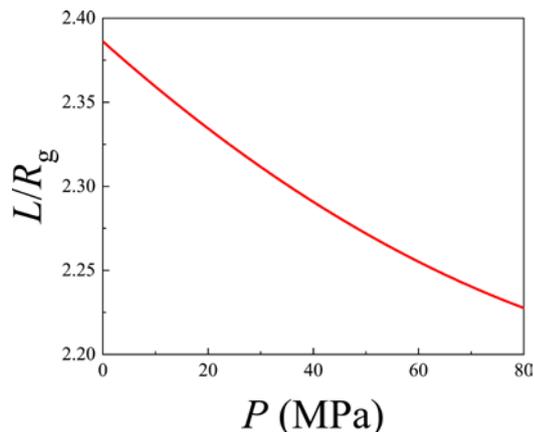


Fig. 4 Lamellar period L of the model PS-*b*-PBMA as a function of pressure P .

4. 結言

バロプラスチックに関する既存の理論であるCRSモデルを発展させ、自己無撞着場理論に高分子の圧縮性の効果(状態方程式)を導入して、バロプラスチックの圧力誘起

相転移を記述することができる新たな理論的枠組み(圧縮性自己無撞着場理論)を構築した。実効相互作用パラメータについても詳細な考察を行い、バロプラスチックの特異な性質の起源についての考察を行った。これらを用いて加圧による偏析力の低下に伴う構造変化を計算し、実験結果と一致する結果を得ることができた。

持続可能な社会の実現に向けた取り組みにおいて、低温で成形加工が可能なバロプラスチックは、エネルギー消費やCO₂排出の低減、リサイクル性の向上を実現できる材料として期待されている。本研究は、そのようなバロプラスチックの合理的な分子設計指針を構築する際に基盤となる理論体系の定式化に成功した。

謝辞

ディスカッションで貴重なご意見をいただきました海洋研究開発機構の出口茂先生、九州大学の谷口育雄先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) M. W. Matsen and M. Schick, *Phys. Rev. Lett.*, **72**, 2660 (1994).
- 2) J. A. Gonzalez-Leon, M. H. Acar, S.-W. Ryu, A.-V. G. Ruzette, and A. M. Mayes, *Nature*, **426**, 424 (2003).
- 3) I. Taniguchi and N. G. Lovell, *Macromolecules*, **45**, 7420 (2012).
- 4) A.-V. G. Ruzette, P. Banerjee, A. M. Mayes, and T. P. Russell, *J. Chem. Phys.*, **114**, 8205 (2001).
- 5) J.-L. Barrat, G. H. Fredrickson, and S. W. Sides, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 6694 (2005).
- 6) P. A. Rodgers, *J. Appl. Polym. Sci.*, **48**, 1061 (1993).
- 7) D. W. van Krevelen and P. J. Hoftyzer, *Properties of Polymers. Correlation with Chemical Structure*, Elsevier: New York, 1972.
- 8) M. Pollard, T. P. Russell, A.-V. G. Ruzette, A. M. Mayes, and Y. Gallot, *Macromolecules*, **31**, 6493 (1998).
- 9) O. Olabisi and R. Simha, *Macromolecules*, **8**, 206 (1974).

高分子太陽電池における電圧損失機構

Voltage Loss Mechanism in Polymer Solar Cells

大北 英生・齋藤 俊晴・玉井 康成

Hideo OHKITA, Toshiharu SAITO, Yasunari TAMAI

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Herein, we have studied photon energy loss (E_{loss}) in open-circuit voltage (V_{OC}) of various polymer solar cells with different offset energies at a donor/acceptor interface. The E_{loss} is defined as $E_{\text{loss}} = E_{\text{g}} - qV_{\text{OC}}$ where E_{g} is an optical energy gap of the photovoltaic (PV) material and q is elementary charge. This energy loss is due to radiative and nonradiative recombination of charge carriers in solar cells. In order to evaluate the radiative recombination loss, we analyzed external quantum efficiency (EQE_{PV}) spectra of the PV cells. As a result, we found that the radiative recombination loss is decreased with decreasing offset energy. This is because a small EQE_{PV} shoulder due to interfacial charge transfer (CT) state is more clearly observed in addition to EQE_{PV} tail below the E_{g} for polymer solar cells with larger offset energies. Such additional EQE_{PV} signals result in larger radiative recombination losses. We further evaluated the nonradiative recombination loss by measuring EQE_{EL} of electroluminescence (EL) of the polymer solar cells. As a result, we found that the nonradiative recombination loss is decreased especially for the device with a negligibly small offset energy. This is because radiative CT transition is strongly enhanced by hybridization of locally excited (LE) and CT states due to such a small offset energy. We therefore conclude that both radiative and nonradiative recombination losses could be minimized by using donor/acceptor materials with a small offset energy.

1. はじめに

2015年に仏国パリにて開催された国連気候変動枠組条約第21回締結国会議 (COP21) では、世界の平均気温の上昇幅を産業革命以前に比べて2 °Cより十分低い値を維持することが目標とされ、1.5 °Cは努力目標にとどまっていた。2021年に英国グラスゴーにて開催されたCOP26では、さらに一歩踏み込んで、1.5 °Cに抑える努力を追求することを決意すると明記され、事実上1.5 °C目標シナリオが世界の新たな共通目標となった。世界の平均気温はすでに1 °C以上上昇しているため、この目標を目指すには2050年までに世界の二酸化炭素排出量を実質ゼロにすることが必要とされている¹⁾。そのためカーボンニュートラル宣言が世界各地でなされるようになり、2020年10月に日本政府も「2050年カーボンニュートラル宣言」を発表し、2050年までに脱炭素社会を実現し、温室効果ガスの排出を実質ゼロにすることを目標として掲げている²⁾。

これを受けて経済産業省は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) に2兆円規模のグリーンイノベーション基金事業を立ち上げ、14の重点分野に対して研究開発・実証から社会実装までを10年間にわたって支援する事業を開始した³⁾。太陽電池はその最重要分野の一つであり、次世代再生可能エネルギーもその中に含まれている。日本は国土面積あたりの太陽光発電の導入量では主要国の中ですでに1位の状況であり、適地の確保が導入拡大を実現するうえで最大の課題である。この課題を克服するには既存の技術では太陽光発電を設置することができなかった耐荷重の低い工場の屋根やビル壁面等にも導入を可能とする技術開発が必要不可欠である。そこで軽量で柔軟な次世代太陽電池の開発が求められ、同事業ではペロブスカイト

太陽電池が対象として支援されている⁴⁾。

高分子太陽電池は発電層に共役高分子あるいは低分子の半導体を用いており、軽量かつ柔軟性のある次世代太陽電池である。エネルギー変換効率 (power conversion efficiency: PCE) は、ペロブスカイト太陽電池などの他の次世代太陽電池に比べてやや遅れをとってきたが、近年急速に向上している⁵⁾。2021年には単セル構造およびタンデムセル構造の素子に対していずれも19%以上の効率^{6,7)}が報告されるようになり、変換効率20%も間近に迫りつつある状況である。このような高効率素子についてさらなる素子特性の向上を実現するには、太陽電池の基本パラメータである短絡電流密度 (J_{sc})、開放電圧 (V_{oc})、曲線因子 (FF) の損失要因を詳細に分析することが求められる。本稿では、このうち開放電圧の損失要因について種々の電子ドナー性材料および電子アクセプター性材料からなる高分子太陽電池に対して系統的に検討した結果を報告する。具体的には最高被占軌道 (highest occupied molecular orbital: HOMO) および最低空軌道 (lowest unoccupied molecular orbital: LUMO) 準位の異なる材料の組み合わせに対して、これらのエネルギー準位差 (オフセット) と電圧損失の関係について輻射再結合損失および無輻射再結合損失の観点から系統的に検討を行った⁸⁾。開放電圧の各種損失の定量解析方法については既報の総説を参照されたい⁹⁾。本稿もこの論文の解析方法を採用して評価を行った。

2. 太陽電池特性

本研究で用いた種々の電子ドナー性共役高分子と電子アクセプター分子の構造式を図1に示す。具体的には、電子ドナー性共役高分子にPTB7-Th, PBDB-T, PM6, PSBTBTの4

種類の材料を、電子アクセプター分子にはフラレン誘導体 (ICBA, PC₇₁BM, bis-PCBM)、直線状縮環系 π 共役分子 (IDFBR, IDT-2BR, ITIC, IT-M, IT-DM)、ペリレンジイミド二量体 (di-PDI)、および屈曲状縮環系 π 共役分子 (Y1, Y5, Y6) の12種類の材料を用い、これらを適宜組み合わせることにより表1に示す合計17種類のブレンド素子を作製した。

高分子太陽電池は、電子ドナー性共役高分子をPTB7-Thに固定して種々の電子アクセプター性分子を組み合わせたものと、種々の電子ドナー性共役高分子とYシリーズ (Yn) 電子アクセプター性分子を組み合わせたものを作製した。前者の素子ではPTB7-Thの吸収帯が最も長波長であり、後者の素子ではYn分子の吸収帯が最も長波長であり、素子のバンドギャップエネルギー E_g はこれらの材料に依存する。それゆえ、電荷生成は前者の素子ではPTB7-Thの一重項励起子状態から、後者の素子ではYn分子の一重項励起子状態から進行する。したがって、電荷生成の駆動力となるオフセットエネルギーは、前者は電子ドナー性材料と

電子アクセプター性材料のLUMO準位差に、後者は電子ドナー性材料と電子アクセプター性材料のHOMO準位差に相当する。このオフセットエネルギーは、電荷生成の駆動力となる一方で開放電圧における損失につながる。これらの素子の素子特性と E_g からの開放電圧の損失エネルギー ($E_{\text{loss}} = E_g - qV_{\text{oc}}$) を表1に示す。ここで、 q は電気素量を表す。LUMOオフセット系のPTB7-Th素子およびHOMOオフセット系のYn素子のいずれに対しても損失エネルギー E_{loss} はおよそ0.5–1 eV程度のものが系統的に得られたことが分かる。これらの素子について、損失の内訳を詳細に解析し、オフセットエネルギーとの関係について定量的に議論を行う。

Table 1. Photovoltaic parameters of PTB7-Th/Acceptor and Donor/Yn solar cells.

Donor/ Acceptor	J_{sc} / mA cm ⁻²	V_{oc} / V	FF	PCE / %	E_{loss} / eV
PTB7-Th/ IDFBR	6.07	1.129	0.357	2.45	0.515
PTB7-Th/ IDT-2BR	11.54	1.056	0.511	6.19	0.592
PTB7-Th/ ICBA	10.37	1.017	0.542	5.71	0.631
PTB7-Th/ bis-PCBM	10.20	0.972	0.504	5.00	0.673
PTB7-Th/ IT-DM	13.82	0.892	0.546	6.71	0.755
PTB7-Th/ IT-M	13.89	0.846	0.557	6.55	0.799
PTB7-Th/ ITIC	12.57	0.812	0.483	4.93	0.830
PTB7-Th/ PC ₇₁ BM	14.45	0.785	0.610	6.91	0.863
PTB7-Th/ di-PDI	10.07	0.748	0.389	2.94	0.898
PM6/Y1	15.10	0.940	0.549	7.82	0.518
PM6/Y5	11.97	0.964	0.574	6.65	0.498
PM6/Y6	25.42	0.840	0.698	14.90	0.580
PBDB-T/Y1	22.59	0.868	0.638	12.51	0.589
PBDB-T/Y5	20.69	0.870	0.587	10.59	0.592
PBDB-T/Y6	24.78	0.707	0.596	10.43	0.713
PTB7-Th/Y6	19.82	0.666	0.540	7.08	0.756
PSBTBT/Y6	10.46	0.433	0.536	2.45	0.987

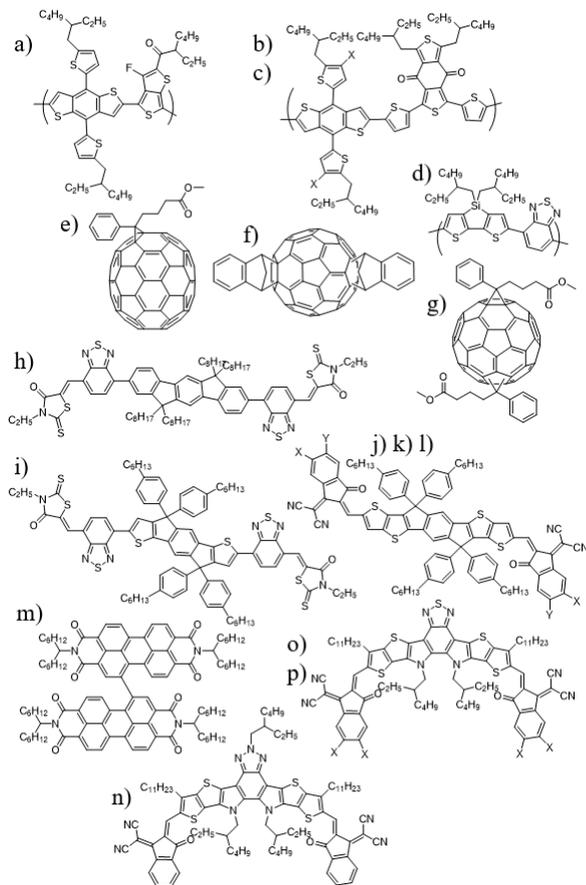


Figure 1. Chemical structures of materials employed in this study: a) PTB7-Th, b) PBDB-T (X = H), c) PM6 (X = F), d) PSBTBT, e) PC₇₁BM, f) ICBA, g) bis-PCBM, h) IDFBR, i) IDT-2BR, j) ITIC (X = Y = CH₃), k) IT-M (X = H, Y = CH₃), l) IT-DM (X = Y = CH₃), m) di-PDI, n) Y1, o) Y5 (X = H), and p) Y6 (X = F).

3. 輻射再結合損失

まず、開放電圧損失のうち輻射再結合損失について検討する。輻射再結合遷移は吸収遷移の逆過程であるので、光を吸収してそのエネルギーを利用する太陽電池では避けることのできない損失過程である。光吸収により生成した電子・正孔キャリアの再結合失活が輻射過程のみの場合に取り出せる最大電圧を $V_{OC,rad}$ 、無輻射再結合による電圧損失を ΔV_{nrad} とすると、開放電圧は式1で与えられる。

$$V_{OC} = V_{OC,rad} - \Delta V_{nrad} \quad (1)$$

$$= \frac{k_B T}{q} \ln \left(\frac{J_{SC}}{J_{0,rad}} \right) - \frac{k_B T}{q} \ln \left(\frac{J_{0,rad}}{J_0} \right)$$

ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は素子温度、 $J_{0,rad}$ は輻射再結合のみによる飽和電流密度、 J_0 は輻射および無輻射再結合による飽和電流密度を表す。このうち輻射再結合損失は $\Delta q V_{rad} = E_g - q V_{OC,rad}$ であるので、式1の右辺第一項の J_{SC} と $J_{0,rad}$ が得られれば求めることができる。 J_{SC} は素子の発電特性として実測が可能であり、 $J_{0,rad}$ も素子の発電特性である外部量子収率 $EQE_{PV}(E)$ と黒体放射スペクトル $\Phi_{BB}(E)$ を用いて式2に示すように表せるので実験的に評価することが可能である。

$$J_{0,rad} = q \int_0^\infty EQE_{PV}(E) \Phi_{BB}(E) dE \quad (2)$$

輻射再結合損失は $V_{OC,rad}$ が小さいほど大きいので、 $J_{0,rad}$ が大きなものほど大きいことが分かる。式2において $\Phi_{BB}(E)$ は素子温度が同じであれば共通であるので、 $EQE_{PV}(E)$ が大きなものほど輻射再結合損失が大きいといえる。 $EQE_{PV}(E)$

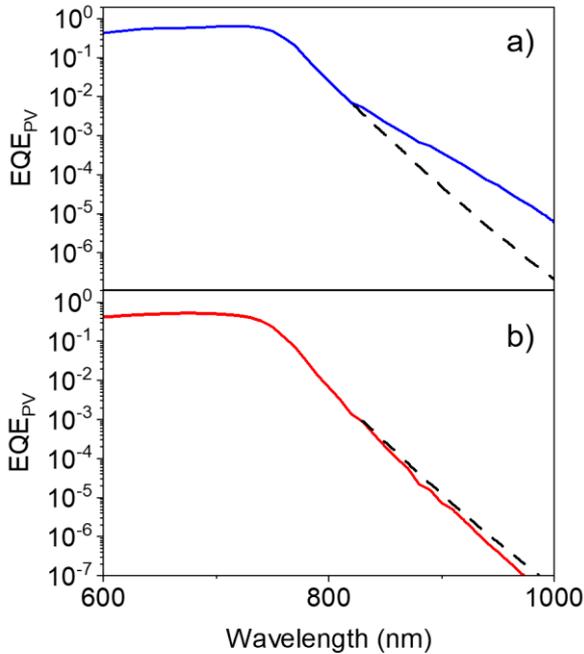


Figure 2. External quantum efficiency (EQE_{PV}) spectra of a) PTB7-Th/ITIC and b) PTB7-Th/IDT-2BR solar cells. The broken lines represent EQE spectra of PTB7-Th neat devices.

は光電変換効率を表すので、変換効率の高いものほど損失が大きいという一見矛盾した関係のように見える。確かにより多くの電流を発生させるには発電に関与する吸収域での $EQE_{PV}(E)$ は最大の100%に近いことが理想であるが、発電に関与しない E_g 以下の裾の部分の $EQE_{PV}(E)$ は限りなくゼロに近いほど損失が抑えられることを意味している。したがって、 $EQE_{PV}(E)$ スペクトルとしては E_g を下限とした矩形形状が理論上は理想的なものとなる。太陽電池の理論限界効率を詳細釣合平衡に基づき議論したShockley-Queisserのモデルでも $EQE_{PV}(E)$ が100%の矩形スペクトルが仮定されている¹⁰⁾。

図2はオフセットエネルギーが異なる代表的な素子の $EQE_{PV}(E)$ スペクトルである。図2aに示すPTB7-Th/ITIC素子のオフセットエネルギーは0.2 eV、図2bに示すPTB7-Th/IDT-2BR素子のオフセットエネルギーは0.05 eVである。オフセットエネルギーが大きなPTB7-Th/ITIC素子では800 nmよりも長波長側に破線よりも大きな肩がみられるのに対して、オフセットエネルギーが小さなPTB7-Th/IDT-2BR素子は破線とほぼ同程度であることが分かる。破線はPTB7-Thニート素子のスペクトルであり、PTB7-Thの E_g である750 nm以下になだらかな吸収の裾が続くことを示している。PTB7-Th/ITIC素子には、破線よりも大きな成分が観測されているのでPTB7-Thの吸収以外の吸収帯がこの波長域に存在していることを示している。このような E_g 以下の領域にはドナー・アクセプターブレンドの界面に形成する電荷移動 (CT) 状態に由来する吸収帯が観測されることが知られており、図2aの破線からのずれの成分もCT吸収帯に帰属される。オフセットエネルギーが大きな系では、 E_g よりも低エネルギー域にCT準位が位置することになるため、このような低エネルギー域にCT吸収に由来するEQE応答が観測されたと考えられる。一方、図2bに示すように、オフセットエネルギーが小さなPTB7-Th/IDT-2BR素子にはCT吸収に由来するEQE応答はまったく見られない。これは、オフセットがわずか0.05 eVしかないために、CT準位と E_g とがほぼ同じになるためCT吸収帯がPTB7-Thの局在励起 (LE) 帯に重なるために観測されないものと考えられる。この結果、PTB7-Th/ITIC素子の輻射再結合損失 $\Delta q V_{rad}$ は0.44 eVであるのに対して、PTB7-Th/IDT-2BR素子では0.34 eVと0.1 eVも抑制されている。他の素子についても同様の傾向が観測されていることから、オフセットエネルギーの小さな素子ではCT吸収帯による付加的な輻射再結合損失を抑制できるといえる。

4. 無輻射再結合損失

次に、開放電圧損失のうちの無輻射再結合損失 ΔV_{nrad} について検討する。 ΔV_{nrad} は、式1の右辺第二項で与えられるが、この式は式3のように変形することができるので、素子に電流を流して観測されるエレクトロルミネッセンスの外

部量子収率 $\text{EQE}_{\text{EL}}(E)$ を測定することにより実験的に評価することができる。

$$\Delta V_{\text{nrad}} = \frac{k_{\text{B}}T}{q} \ln\left(\frac{J_{0,\text{rad}}}{J_0}\right) = \frac{k_{\text{B}}T}{q} \ln\left(\frac{1}{\text{EQE}_{\text{EL}}(E)}\right) \quad (3)$$

前節で議論したオフセットエネルギーが異なる代表的な素子であるPTB7-Th/ITIC素子およびPTB7-Th/IDT-2BR素子について $\text{EQE}_{\text{EL}}(E)$ を測定したところ、表2に示すように、1000倍以上の差があることが分かった。 $\text{EQE}_{\text{EL}}(E)$ は界面CT状態からの発光量子収率であるので、CT状態から基底状態への輻射遷移速度 k_{r} および無輻射遷移速度 k_{nr} とは以下の関係が成り立つ。

$$\text{EQE}_{\text{EL}}(E) \propto \frac{k_{\text{r}}}{k_{\text{r}} + k_{\text{nr}}} \approx \frac{k_{\text{r}}}{k_{\text{nr}}} \quad (4)$$

界面CT状態ではドナーのHOMOに正孔が、アクセプターのLUMOに電子が存在するので、両者の軌道の重なりは小さく一般に $k_{\text{r}} \ll k_{\text{nr}}$ の関係にあるので上式の近似が成立する。したがって、 $\text{EQE}_{\text{EL}}(E)$ の1000倍もの差は、PTB7-Th/IDT-2BRにおいて k_{r} が大きい k_{nr} が小さいかまたはその両方であることを示唆している。時間分解分光測定を行い k_{r} および k_{nr} を評価したところ、表2に示すように、 k_{nr} にはほとんど差がなく、 k_{r} が1000倍以上大きいことが分かった。すなわちオフセットエネルギーの小さなPTB7-Th/IDT-2BR素子ではCT状態における輻射遷移速度が3桁大きいため $\text{EQE}_{\text{EL}}(E)$ も3桁大きくなり、その結果 ΔV_{nrad} が0.15 Vも抑制されていることが分かった。

Table 2. Energetic and kinetic parameters of PTB7-Th/ITIC and PTB7-Th/IDT-2BR solar cells.

	PTB7-Th/ITIC	PTB7-Th/IDT-2BR
Offset / eV	0.20	0.05
ΔqV_{nrad} / eV	0.406	0.256
EQE_{EL}	9.7×10^{-8}	8.9×10^{-5}
τ_{CT} / ns	1.9	1.3
k_{r} / s^{-1}	5.1×10	6.8×10^4
k_{nr} / s^{-1}	5.3×10^8	7.7×10^8

5. LE-CT混成による無輻射再結合損失の低減

最後に、オフセットエネルギーが異なるPTB7-Th/ITIC素子およびPTB7-Th/IDT-2BR素子において界面CT状態における輻射遷移速度が3桁も異なる値を示す機構について考察する。図3に示すように、オフセットエネルギーが小さなPTB7-Th/IDT-2BR素子においては、PTB7-Thの一項励起子準位とCT準位が近接した状態となるため両者が混成した状態を形成すると考えられる。このような混成状態での振動子強度 $f_{\text{S}_0,\text{CT}}$ は次式で与えられる。

$$f_{\text{S}_0,\text{CT}}^* = f_{\text{S}_0,\text{CT}} + 2\sqrt{f_{\text{S}_0,\text{CT}}f_{\text{S}_1,\text{S}_0}} \frac{V_{\text{S}_1,\text{CT}}}{\Delta E_{\text{S}_1-\text{CT}}} + f_{\text{S}_1,\text{S}_0} \left(\frac{V_{\text{S}_1,\text{CT}}}{\Delta E_{\text{S}_1-\text{CT}}}\right)^2 \quad (5)$$

ここで、 $f_{\text{S}_0,\text{CT}}$ はCT状態から基底状態 S_0 への遷移の振動子強度、 $f_{\text{S}_1,\text{S}_0}$ はPTB7-Thの励起状態 S_1 から基底状態 S_0 への遷移の振動子強度、 $V_{\text{S}_1,\text{CT}}$ はPTB7-Thの励起状態 S_1 とCT状態の電子の相互作用、 $\Delta E_{\text{S}_1-\text{CT}}$ はPTB7-Thの励起状態 S_1 とCT状態のエネルギー差（エネルギーオフセット）を表す。エネルギーオフセットが大きいPTB7-Th/ITIC素子では右辺第二項および第三項は無視できるので混成は起こらないといえる。これに対してエネルギーオフセットが小さなPTB7-Th/IDT-2BR素子では右辺第二項および第三項の寄与が大きくなるので、振動子強度の大きな $f_{\text{S}_0,\text{CT}}$ のため混成状態での振動子強度 $f_{\text{S}_0,\text{CT}}^*$ は大きく増加することが分かる。この効果は $f_{\text{S}_1,\text{S}_0}$ が大きな発光量子収率の高い材料を用いたときに顕著に表れると考えられる。

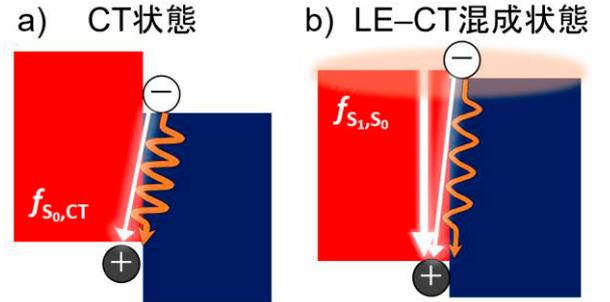


Figure 3. Energy diagram for two typical donor (red)/acceptor (navy blue) blends with a) a large offset energy and b) a small offset energy. The solid and wavy arrows represent weak radiative and nonradiative transitions in CT states at a donor/acceptor interface. The thick solid arrow represents strong radiative transition in local excitation (LE) state of the donor.

6. まとめ

HOMOおよびLUMO準位の異なる種々のドナー性材料およびアクセプター性材料を適宜組み合わせさせた高分子太陽電池を作製し、オフセットエネルギーと開放電圧損失の関係について輻射再結合および無輻射再結合の観点から系統的に検討した。その結果、オフセットエネルギーが減少するにつれて、 E_{g} 以下の領域に通常観測されるCT吸収帯が E_{g} に近づき見かけ上消失するため、輻射再結合による電圧損失が抑制されることが分かった。また、無輻射再結合損失もオフセットエネルギーがゼロに近い系で顕著に小さくなることを明らかにした。これは、オフセットエネルギーがゼロに近づくことによりCT準位が励起子のLE準位に近づき混成状態を形成するためCT状態から基底状態への振動子強度が著しく増大するためである。以上のことから、開放電圧損失の観点からはオフセットエネルギーが小さく、 E_{g} 近傍に吸収帯を有する材料は発光量子収率の高い

ものを選択することが重要であるといえる。ただし、オフセットエネルギーを小さくしすぎると電荷生成効率が低下するので、そのバランスをとることが求められる。このように合理的な設計指針に基づいてバランスの良い素子の開発を進めることによって効率20%が実現できると期待される。

参考文献

- 1) 国立研究開発法人国立環境研究所 社会システム領域, 研究コラム, 亀山康子
<https://www.nies.go.jp/social/navi/colum/cop26.html>
- 2) 首相官邸, グリーン社会の実現
<https://www.kantei.go.jp/jp/headline/tokushu/green.html>
- 3) 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構, グリーンイノベーション基金事業
<https://green-innovation.nedo.go.jp/>
- 4) グリーンイノベーション基金事業「次世代型太陽電池の開発」プロジェクトに係る公募要領
- 5) O. Almora, D. Baran, G. C. Bazan, C. Berger, C. I. Cabrera, K. R. Catchpole, S. E.-Ela, F. Guo, J. Hauch, A. W. Y. Ho-Baillie, T. J. Jacobsson, R. A. Janssen, T. Kirchartz, N. Kopidakis, Y. Li, M. A. Loi, R. R. Lunt, X. Mathew, M. D. McGehee, J. Min, D. B. Mitzi, M. K. Naeeruddin, J. Nelson, A. F. Nogueira, U. W. Paetzold, Nam-Gyu Park, B. P. Rand, U. Rau, H. J. Snaith, E. Unger, L. Vaillant-Roca, H.-L. Yip, C. J. Brabec, *Adv. Energy Mater.*, **11**, 2102526 (2021).
- 6) Y. Cui, Y. Xu, H. Yao, P. Bi, L. Hong, J. Zhang, Y. Zu, T. Zhang, J. Qin, J. Ren, Z. Chen, C. He, X. Hao, Z. Wei, J. Hou, *Adv. Mater.*, **33**, 2102420 (2021).
- 7) J. Wang, Z. Zheng, Y. Zu, Y. Wang, X. Liu, S. Zhang, M. Zhang, J. Hou, *Adv. Mater.*, **33**, 2102787 (2021).
- 8) T. Saito, S. Natsuda, K. Imakita, Y. Tamai, H. Ohkita, *Sol. RRL*, **4**, 2000255 (2020).
- 9) T. Kirchartz, U. Rau, *Adv. Energy Mater.*, **8**, 1703385 (2018).
- 10) W. Shockley, H. J. Queisser, *J. Appl. Phys.*, **32**, 510 (1961).

配列制御ポリマーの精密合成と配列に基づく温度応答特性

Precision Syntheses of Sequence-Controlled Polymers and

Sequence-Oriented Thermal Response Behaviors

大内 誠・柴田 健太郎・徐 孝炎・黒田 啓太

Makoto OUCHI, Kentaro SHIBATA, Xiaoyan XU, and Keita KURODA

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

We have proposed some methodologies for syntheses of sequence-controlled oligomers/polymers made of commodity monomer units, such as methacrylate, acrylate, acrylamide, styrene. The common key points in the methodologies are the utilization of bulky pendant group and/or cyclization to control the order of reacted vinyl groups and design of the initiator and monomer for transformation into commodity monomer units carrying various pendant groups. In addition, it is important to synthesize the corresponding sequence-uncontrolled polymers or statistical copolymers for evaluation of the sequence-specific properties/functions. In this thesis, we focus on the two methods to synthesize alternating copolymers by using non-homopolymerizable and pendant-transformable monomers or divinyl monomers carrying transformable spacer. The resultant alternating copolymers exhibited sequence-specific properties, such as thermal response/pH response in solutions and glass transition properties in bulk, which were different from the corresponding 1:1 statistical copolymers.

1. 緒言：配列制御高分子

リビング重合の発展により、分子量分布の狭い高分子、末端官能性高分子、ブロック共重合体、多分枝高分子、グラフト共重合体など構造が明確な高分子を合成できるようになり、高分子特性の解明、ならびに高機能材料開発に大きく寄与してきた。一方、ラジカル共重合などによって複数のモノマーを同時に組み合わせさせた共重合を行う場合、特殊なモノマーの組み合わせを除いて、得られる共重合体には組成分布が存在し、様々な組成比の共重合体の混ざり物が得られる。また、モノマーの並び方の規則性を制御するのは難しい。例えば、最も単純なAB交互配列が制御された共重合体を考えても、配列が制御されていない1:1統計的共重合体に比べて組成分布と周期性に大きな違いがあり、高分子として物性や機能に大きな違いが生まれる可能

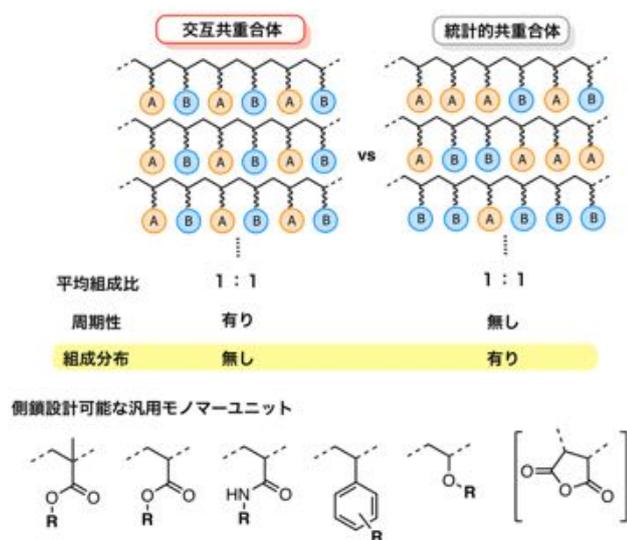


Fig. 1 Difference between alternating copolymer and statistical copolymer

性がある(図1)。ここで、配列(シーケンス)が物性や機能に及ぼす影響を調べるためには配列制御高分子と配列非制御高分子をつくり分ける必要があり、さらに物性や機能を評価するためには(メタ)アクリレート、スチレン、アクリルアミドといった特性がよく知られている汎用モノマーユニットの配列を制御することが求められる。近年、合成高分子に対する配列制御¹⁻⁵⁾が注目されているが、配列に基づく特性を明らかにすることは本分野の大きな課題である。

我々は汎用モノマーから成る共重合体に対して側鎖置換基の配列を制御するために、4つの配列制御手法を開発してきた(図2)。⁶⁾特に環化重合(反応)やかさ高さや電子密度の設計によって、特異的な共重合や一分子付加反応を制御し、重合後に構造を変換して、狙いの側鎖を有する汎用モノマーユニットに変換する点に特徴がある。ここでは単独重合性の低い変換性モノマーを用いた方法(方法3)、ジビニルモノマーの選択的環化重合と後変換による方法(方法4)によるメタクリレート、スチレン、アクリル

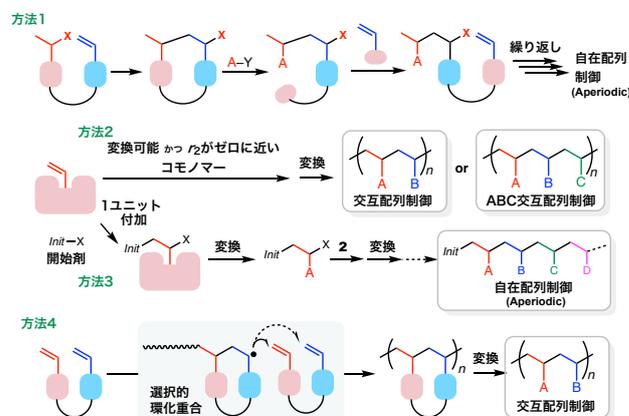


Fig. 2 Four methods for syntheses of sequence-controlled polymers carrying various pendant groups

アミドを含む交互共重合体⁷⁾の合成とその特性について、特に温度応答特性を中心に述べる。

2. メタクリレート-NIPAM交互共重合体

我々はエチルフェンコールを側鎖に有するメタクリレート (EFMA) がかさ高さのために単独ラジカル重合性を示さないことを見出した (図3)。⁸⁾しかし、その二重結合の反応性はメタクリレートと同様の性質を示し、例えばメタクリル酸メチルとの共重合においては、スムーズに消費される。このようなモノマーをM₁とし、モノマー反応性比r₂が小さいコモノマーと組み合わせるとかさ高さのためにr₁がゼロになるため交互共重合が進行すると考えられる。さらにEFMAの側鎖は三級エステルであり、酸によって汎用モノマーであるメタクリル酸に変換できる。コモノマーとして活性化エステル (Nヒドロキシコハク酸イミド) を有するアクリレート (NSA) を組み合わせるとモノマー反応性比を算出すると、r₁がほぼゼロ、r₂は0.21となり、1:1の仕込みで交互性の高い共重合体を得られることがわかった。EFMAとNSAのRAFT共重合の後に、イソプロピルアミンによるアミノリシス反応、トリフルオロ酢酸によるアシドリシス反応を経て、NIPAM (N-イソプロピルアクリルアミド) とMAA (メタクリル酸) の交互共重合体を得た。得られたポリマーはpH4以下では温度応答性を示し、1:1の統計的共重合ではこのような明確な温度温度応答性は観測されなかった。

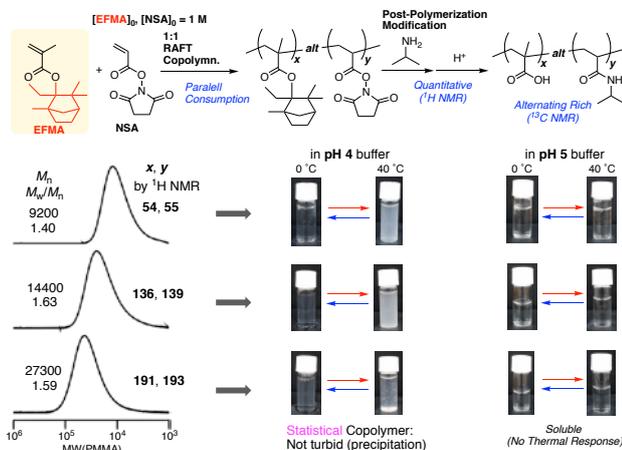


Fig. 3 Synthesis of NIPAM-MAA alternating copolymer via RAFT copolymerization of EFMA with NSA, aminolysis transformation by *i*-PrNH₂ and acidolysis by TFA.

3. メタクリレート-スチレン交互共重合体

上述したように単独重合性を示さないが共重合が可能なモノマーは配列制御の基盤モノマーとして利用できる可能性がある。そこで、単独重合性が低いことが知られている二置換メタクリルアミドに着目し、さらに重合後に変換してメタクリレートに変換することを指向して、脱離性の高いサッカリンを側鎖に有するメタクリルアミ

ド (SMAm) を設計した (図4)。⁹⁾

SMAmに対し、ラジカル重合開始剤であるAIBNを用いて60°Cで反応させても重合は起こらず、単独重合性が無いことを確認した。しかし、SMAmをスチレンと組み合わせると、速やかに等速度で両モノマーは消費され、ポリマーが得られた。仕込み比を変化させた共重合の重合初期のモノマー消費率からモノマー反応性比を見積ると、r₁、r₂ともにほぼゼロとなったことからこの共重合では交互ポリマーが得られることがわかった。この共重合挙動は二置換メタクリルアミド (ジブチルアクリルアミド) とスチレンの組み合わせでは見られなかったことからSMAmの側鎖の電子求引性効果であることがわかった。

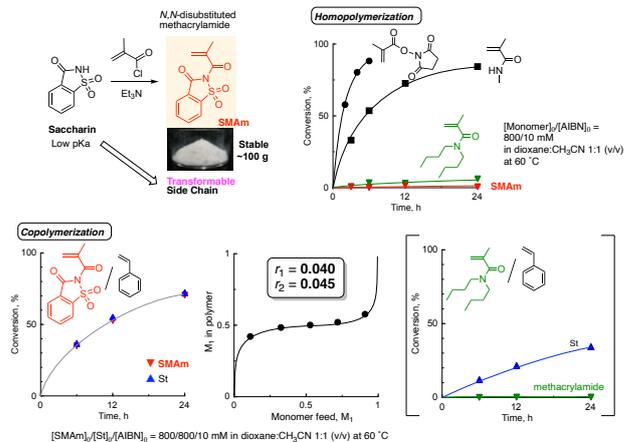


Fig. 4 Design of saccharin-methacrylamide (SMAm) as non-homopolymerizable and transformable monomer. Specific reactivity ratios in radical copolymerization of SMAm with styrene allowing control of alternating sequence.

重合後のサッカリンアミド側鎖の反応性を調べるために、ポリマー中の繰り返し単位のモデル化合物を合成し、水とアルコールに対する反応性をモノマーと比較したところ、繰り返し単位のモデル化合物の側鎖はモノマーであるSMAmの側鎖に比べて、反応性がとても大きいことがわかった。すなわち、SMAmは空気中でも安定に取り扱えるモノマーであるが、共重合した後、その側鎖はアルコールシス反応や加水分解反応によって変換され、メタクリレートやメタクリル酸に変換される可能性が示唆された。

そこで、重合中に加水分解されることを抑制するためにSMAmとスチレンの共重合をモレキュラーシーブス上で行い、生成するポリマーを取り出すことなく、重合溶液に過剰のアルコールを直接添加することで、加えたアルコール由来のメタクリレートとスチレンの交互共重合体への変換を検討した (図5)。例えばメタノールを添加して得られたポリマーの¹H NMRスペクトルは、交互共重合を与えることが知られているルイス酸存在下のメタクリル酸メチル (MMA) とスチレンのラジカル共重合で得られるコポリマーの¹H NMRスペクトルと形状が似ており、¹⁰⁾シャープであ

った。これは組成分布がなく、周期的な配列を有しているためと考えられる。さらにピークの面積比もほぼ同じであり、両モノマーのユニットは1:1であり、SMAmのユニットが定量的にMMAに変換されたことがわかった。また、様々なアルコールを添加して変換したところ、アルキルメタクリレートとスチレンの1:1共重合で得られる統計的共重合体に比べて、SMAmから得られる共重合体はガラス転移温度 (T_g) が小さくなることがわかった。これはメタクリレート、あるいはスチレンの連続シークエンスがなくなり、主鎖が柔軟くなったためと考えられる。

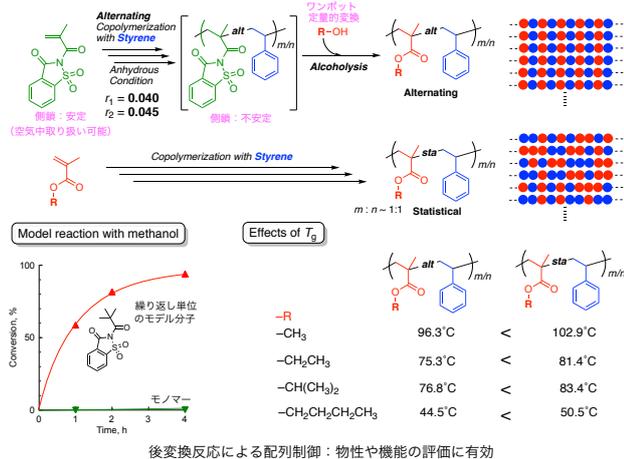


Fig. 5 Alternating copolymerization of SMAm with styrene under anhydrous condition, followed by alcoholysis reaction for transformation into alkyl methacrylate unit. The lower T_g s of resultant alternating copolymers than the corresponding 1:1 statistical copolymers.

4. アクリルアミド交互共重合体

我々はこれまでに切断や変換が可能なスペーサーを有する非対称ジビニルモノマーの選択的環化重合を制御し、重合後に環化繰り返し構造を変換して、汎用モノマーから成る交互共重合体を合成してきた。¹¹⁻¹⁵ 交互共重合の制御

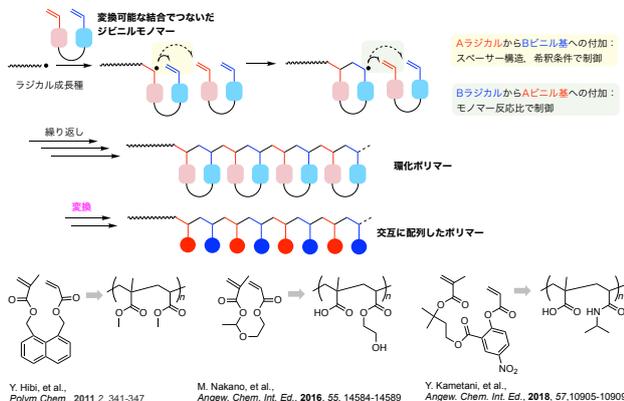


Fig. 6 Selective cyclopolymerization of asymmetric divinyl monomer carrying transformable spacer for syntheses of alternating copolymers made of commodity monomer units.

においては、環化重合の制御のみならず、環化後の成長ラジカル種が異なるビニル基と反応する選択性が重要であり、この選択性は対応するモデルモノマーのモノマー反応性比 r_2 がゼロに近いことで評価できる (図6)。

最近、我々は電子求引性基であるニトロ基をベンゼン環に有するサリチル酸をスペーサーとして、アクリレートとアクリルアミドから成るジビニルモノマー (AAm-NO₂) を設計した (図7)。この側鎖には2つのエステル基が設計されており、両者ともニトロ基で活性化されており、アミノリシス反応によって、アクリルアミドと2-ヒドロキシアクリルアミドに変換される。また、アクリレートの電子密度はニトロ基の影響で低下しており、そのためかモノマー反応性比 r_2 もゼロに近く選択的な環化重合が可能であることがわかった。しかし、ニトロ基があることでラジカル重合の進行が遅く、生成ポリマーの物性評価や精密重合による合成展開が難しかった。そこで新しいモノマーとしてCF₃基を有するジビニルモノマー (AAm-CF₃) を設計したところ、選択的環化重合が効率よく進行し、精密重合も可能であった。さらにアミノリシス後変換も問題なく制御でき、変換後の¹H NMRスペクトルは対応するアルキルアクリルアミドと2ヒドロキシエチルアクリルアミドの1:1ランダム共重合体と全く同じ¹H NMRスペクトルを示した。こうして、様々なアクリルアミド交互共重合体、あるいは交互共重合セグメントを含むブロック共重合体の合成に成功した。

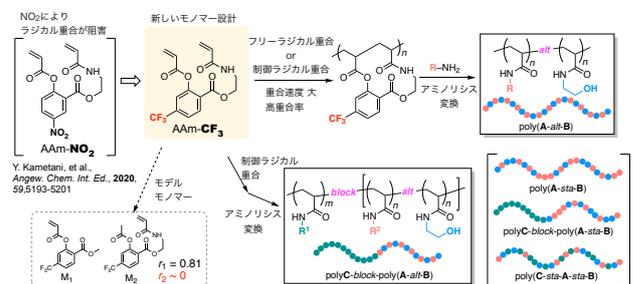


Fig. 7 Selective cyclopolymerization of asymmetric divinyl monomer carrying transformable spacer for syntheses of alternating copolymers made of commodity monomer units.

ブチルアミン (C4アミン)、ペンチルアミン (C5アミン) で変換して合成したアルキルアクリルアミド-2ヒドロキシエチルアクリルアミドの交互共重合体は、*n*-ペンチルアミンで変換したポリマーをのぞいて、低温で水に溶けるが、温度を上げるとある温度で急激に濁る温度応答性挙動を示した (図8)。*n*-ペンチルアミンで変換したポリマーは水に不溶であり、温度を変えても溶解性は変化しなかった。温度応答性における曇点はアルキル基の構造によって20-40°Cにわたって変化した。また、一部のアルキルアミンについては、対応する1:1統計的ランダム共重合体も合成し、同様に温度応答性挙動を調べたところ、明らかに鈍い温度範囲にわたって温度応答性を示した。これは組成分布

があるために、親水性/疎水性にばらつきがあるためと考えられる。

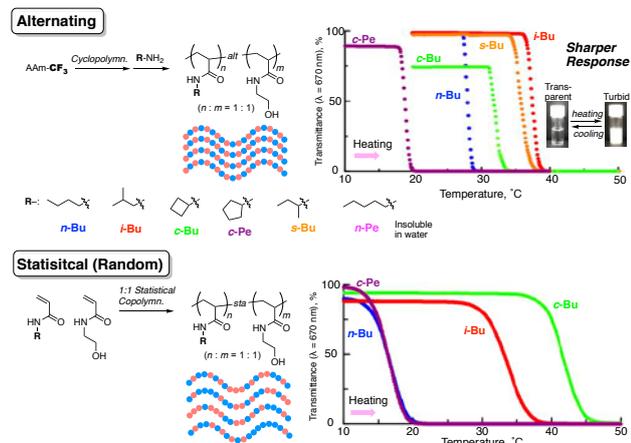


Fig. 8 Turbidity measurement for the aqueous solutions of C₄/C₅-alkyl acryl amide/2-hydroxyethylacrylamide alternating copolymers in comparison with the corresponding 1:1 statistical copolymers. Concentration: 10 mg/ml in H₂O, Heating Rate: 1.0°C/min

AAm-CF₃はアクリレートとアクリルアミドで構成されるが、これをアクリレートとメタクリレートの組み合わせに変えたジビニルモノマーを設計し、同様に環化重合を制御した後にアミノリシス変換を行うことで、アクリルアミドと2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) の交互共重合を合成した (図9)。特にイソプロピルアミンでアミノリシス変換を行うことで、NIPAMとHEMAの交互共重合体を合成し、その温度応答性を調べたところ、分子量に応じて25–32°Cにわたって曇点を示すことがわかった。また、その温度応答性は比較的敏感であったが、対応する1:1統計

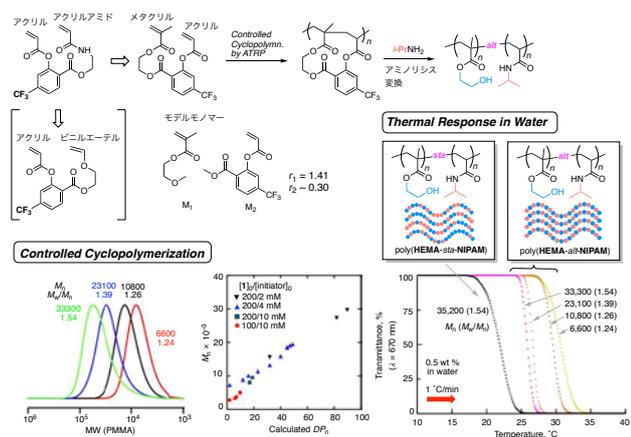


Fig. 9 Precise syntheses of the alternating copolymers of NIPAM-HEMA via selective radical cyclopolymerization and aminolysis transformation with isopropyl amine. Turbidity measurement for the aqueous solutions of in comparison with the corresponding 1:1 statistical copolymers. Concentration: 5.0 mg/ml in H₂O, Heating Rate: 1.0°C/min

的共重合体はやはり組成分布の影響のために鈍感であった。

6. まとめ

単独重合性がないが変換可能なモノマー、あるいは変換可能な非対称ジビニルモノマーを用いることで、様々な側鎖を有するメタクリレート、アクリレート、スチレン、アクリルアミドなどの汎用モノマーユニットの交互共重合体の合成に成功した。また、対応する1:1統計的共重合体も合成し、その特性を比較することで、周期的で組成分布の無い交互配列特有の水中温度応答性やバルク熱特性を明らかにした。

参考文献

- 1) J. F. Lutz, M. Ouchi, D. R. Liu and M. Sawamoto, *Science*, 2013, **341**, 628.
- 2) M. Ouchi and M. Sawamoto, *Polym J*, 2018, **50**, 83-94.
- 3) C. J. Yang, K. B. Wu, Y. Deng, J. S. Yuan and J. Niu, *ACS Macro Lett*, 2021, **10**, 243-257.
- 4) J. F. Lutz, *Macromol Rapid Comm*, 2017, **38**.
- 5) J. De Neve, J. J. Haven, L. Maes and T. Junkers, *Polym. Chem.*, 2018, **9**, 4692-4705.
- 6) M. Ouchi, *Polym J*, 2021, **53**, 239-248.
- 7) K. Nishimori and M. Ouchi, *Chem. Commun.*, 2020, **56**, 3473-3483.
- 8) D. Oh, Y. Furuya and M. Ouchi, *Macromolecules*, 2019, **52**, 8577-8586.
- 9) Y. Kametani and M. Ouchi, *ACS Polymers Au*, 2021, **1**, 10-15.
- 10) A. M. Aerdt, J. W. de Haan and A. L. German, *Macromolecules*, 1993, **26**, 1965-1971.
- 11) Y. Hibi, S. Tokuoka, T. Terashima, M. Ouchi and M. Sawamoto, *Polym. Chem.*, 2011, **2**, 341-347.
- 12) M. Ouchi, M. Nakano, T. Nakanishi and M. Sawamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2016, **55**, 14584-14589.
- 13) Y. Kametani, M. Nakano, T. Yamamoto, M. Ouchi and M. Sawamoto, *ACS Macro Lett*, 2017, **6**, 754-757.
- 14) Y. Kametani, M. Sawamoto and M. Ouchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 10905-10909.
- 15) Y. Kametani, F. Tournilhac, M. Sawamoto and M. Ouchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, **59**, 5193-5201.

ブラシ状高分子による液晶アンカリング特性の制御

Precision Control of Anchoring Properties of Liquid Crystals by Brush-like Polymers

辻井敬亘¹・黄瀬雄司¹・佐藤治²・大野工司¹

Yoshinobu TSUJII¹, Yuji KINOSE¹, Osamu SATO², Kohji Ohno

1) Institute for Chemical Research, Kyoto University

2) Department of Management, Tokyo University of Science

The direction of liquid crystals in bulk can be controlled by external field, such as electric and magnetic fields, while the change in direction of liquid crystals at the interface is restricted because of an interaction between liquid-crystal molecules and interface, which is known as the anchoring effect. A concentrated polymer brush and a cross-linked bottlebrush film composed of poly(hexyl methacrylate) were reported to exhibit extremely weak anchoring in azimuthal direction (near-zero azimuthal anchoring) even at room temperature. In this study, we more focused on the bottlebrush systems and revealed that the mobility of liquid crystal at the interface is closely related to the relaxation of brush polymer in swollen state with liquid crystal to discuss the detail anchoring mechanism of liquid crystals on polymer-brush surfaces

1. はじめに

液晶分子は、外場（電場・磁場）により、バルク中ではその配向方向を容易に変化させるが、固体表面近傍では界面相互作用により配向方向の変化に制限を受ける（アンカリング効果）。強アンカリング界面を有する液晶デバイスに外場を印加すると、外場に応答するバルク中の液晶と、配向方向が固定されている界面近傍の液晶の間にねじれが生じ、弾性エネルギーが蓄えられる。一方、表面と液晶の相互作用が無視できるゼロアンカリング界面上の液晶分子は、外場に対する応答性がバルク中の液晶と等しく、配向方向のねじれが生じない。そのため、低電圧・高速駆動特性やメモリー効果を付与した液晶デバイスの実現や液晶の基礎研究のプラットフォームとしての利用が期待される¹⁻⁴⁾。

しかしながら、強アンカリング表面と比較し、弱アンカリング表面の実現手法は限られていた。液晶を液体で挟む構造により、方位角方向のアンカリング強度 (A_2) がほぼゼロである、ゼロ面アンカリング界面の実現が報告されたものの、この手法はデバイスの安定性が乏しい問題点を有していたり。佐藤らは、固体表面に高密度に高分子鎖を付与して得られる濃厚ポリマーブラシ (CPB) に着目し、ポリヘキシルメタクリレート (PHMA) 系CPB付与表面が熱安定性に優れながらも室温においてもゼロ面アンカリング特性を示すことを見出した⁵⁾。また、ポリエチルメタクリレート (PEMA) 系CPBやポリスチレン系CPB界面では、低温領域においては強アンカリング、高温領域においては弱アンカリングとなり、それらの間の温度領域では電場を印加すると徐々に透過率が変化するグライディング挙動を示すことを明らかにした⁶⁻⁸⁾。

ただし、このようなCPB界面が低アンカリング特性を示すメカニズムに関しては、ポリマーのガラス転移温度と関連があると予測されるに留まり、詳細は明らかではなかつ

た⁷⁾。本稿では、液晶のゼロ面アンカリングメカニズム解明に向けて、CPB系を模擬して我々がこれまでに取り組んできたボトルブラシポリマー (BB: 高密度に側鎖を有するグラフトポリマー) に関する成果をまとめる⁹⁾。

2. BB架橋膜の弱アンカリング特性

CPBは安定性に優れる利点があるものの、その作製には基材を長時間反応溶液に浸漬する必要があり、産業的には受容し難い。そこで、分子鎖構造制御によりCPB特性発現が期待され、かつ、塗布法により簡便に大面積の基材を改質できるBBの架橋膜を対象として、その液晶アンカリング特性を評価した。その結果、PHMAを主成分とするBB架橋膜 (PHMA系BB架橋膜) は、PHMA系CPBと同様にゼロ面アンカリング特性を示すことが明らかとなった。また、PHMA系BBを液晶ディスプレイに展開すると、低アンカリング特性に基づく性能向上 (最大透過光強度の増加、電場非印加時の透過光強度の減少、それらに伴うコントラスト比の増加) を示し、ブラシ状高分子によるゼロ面アンカリング特性が優れた実用性を有することを実証した¹⁰⁾。また、BB系ブラシ状ポリマー薄膜は、後述する粘弾性評価の容易性から、アンカリングメカニズムを解明するに好適な系でもある。以降、室温でもゼロ面アンカリング特性を発現するPHMA系BB、および、PHMAよりもガラス転移温度の高いPEMAからなるPEMA系BBの特性評価の結果を解説する (Figure 1)。

BB架橋膜は、側鎖末端に架橋性セグメントを有する架橋性BB (PHMA-BB-MOPSおよびPEMA-BB-MOPS) を基材に塗布後、熱処理によりBB間およびBB-基材間に共有結合を形成させ作製した。なお、架橋性BBが有する架橋性モノマーはごく少量とし、架橋後の側鎖の運動性の低下の抑制を図った (後述)。液晶はポジ型の低粘度ネマチック液晶 (JNC社JC-5051XX, NI点: 112.7 °C) を使用した。

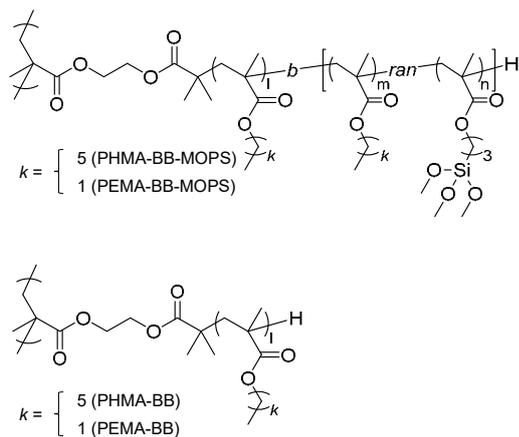


Figure 1. Chemical structure of bottlebrushes with and without cross-linking moiety.

BB架橋膜を付与した櫛歯電極基板、および、ラビング処理（櫛歯電極に対し20°方向）済みポリイミド膜を付与した対向基板で液晶を挟持したIPS液晶セルを作製した（Figure 2）。この液晶セルに印加する電場を掃引し、クロスニコル下、透過率の変化を追跡し、電圧-透過率曲線（*V-T*カーブ）を得た。透過率が增大し始める閾値電圧から、方位角方向のアンカリング強度 A_2 を算出した^{11,12)}。

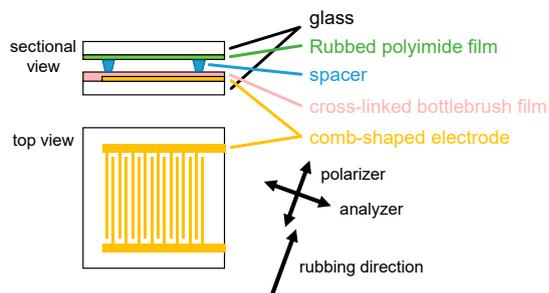


Figure 2. Schematic illustration of LC cell with cross-linked bottlebrush film.

Figure 3にPHMA系およびPEMA系BB架橋膜の A_2 の温度依存性を示す。PHMA系BBでは-15 °Cから45 °Cにかけて温度上昇とともに A_2 の値が減少し、それ以上の温度領域ではほぼ一定となった。一方、PEMA系BBは-15 °Cから45 °Cは A_2 が一定であったが、それ以上の温度領域では温度上昇とともに A_2 が減少し、90 °CではPHMA系と同程度の A_2 に至った。これらの温度に対する A_2 の挙動はCPBと同等であった⁷⁾。特にPHMA系においては A_2 の絶対値もほぼ等しく、BB架橋膜とCPBの液晶に対するアンカリングメカニズムは同等と推察した。

架橋性官能基フリーの非架橋性BB（PHMA-BB、PEMA-BB）と液晶の混合物の運動性を液晶セル中におけるBB架橋膜の運動性の指標とすることが可能であるかを調査するため、膨潤度をパラメータとして、架橋構造がBB架橋膜に与える影響を検討した。まず、膜厚の異なる種々のBB架橋膜を作製し、液晶による膨潤前後の膜厚をエリプソメータで測定した。乾燥膜厚に対して膨潤膜厚をプロットした

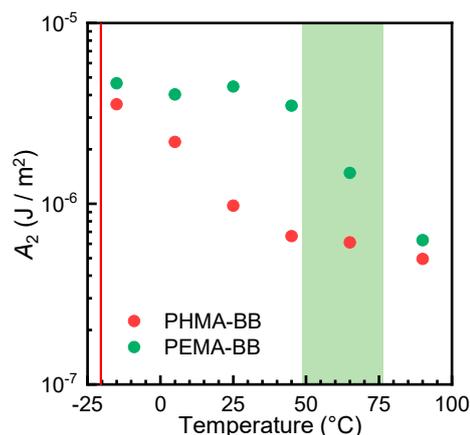


Figure 3. Temperature dependency of A_2 for the cross-linked BB films. The red line and green band represent the characteristic temperatures of the side-chain relaxation for the PHMA and PEMA with LC, respectively. Reprinted with permission from ref. 9. Copyright 2021 American Chemical Society.

ところ両者は比例関係にあり、その傾きから平衡膨潤度を評価した。具体的に、膨潤度は、PHMA系BB架橋膜では1.6、PEMA系BB架橋膜では 1.2と算出された。続いて、種々の重量比で非架橋性BBと液晶の混合物を調製し、偏光顕微鏡観察（透過像）を行った（Figure 4）。PHMA系およびPEMA系BBともに、液晶濃度が低い領域では系は均一で光学的に等方的、液晶濃度が高い領域では系は不均一で光学的に異方的であった。これら2つの状態の濃度境界が非架橋性BBの平衡膨潤状態であると判断される。ここで、BB架橋膜の平衡膨潤状態でのBBポリマー重量分率は、この濃度境界に近く（Figure 4、blue cross）、架橋は膨潤挙動に大きな影響を与えないことが確認された。これは、架橋性BBに導入した架橋性モノマー導入量を抑制したことを反映していると考えられる。よって、非架橋性BB/液晶混合物の運動性を液晶セル内部のBB架橋膜の運動性の指標とすることが可能であると結論した。

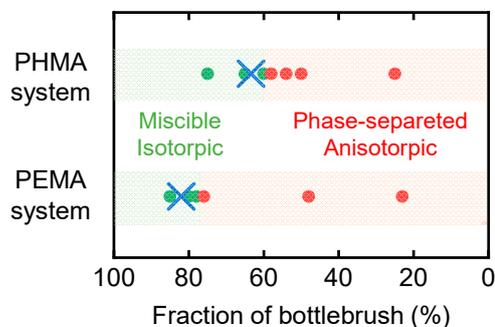


Figure 4. Phase diagrams of mixtures of the bottlebrush and LCs. The blue crosses represent the weight fractions of the cross-linked bottlebrush films. Reprinted with permission from ref. 9. Copyright 2021 American Chemical Society.

3. ブラシ状ポリマーの弱アンカリングのメカニズム (粘弾性に基づく考察)

平衡膨潤状態におけるBB架橋膜のポリマー重量分率と等しい非架橋性BB/液晶混合物を調製し、回転式レオメータで粘弾性特性を評価した。Figure 5aに、得られた粘弾性データから作成したマスターカーブを示す。いずれもバルクのBBポリマーと同様の形状を示し、特に、PEMA系の低温領域にはBBのマイクロブラウン運動が凍結されたガラス領域が、PHMA系の高温領域にはBBポリマー同士の相対位置が変化する流動領域が観測されている^{13,14}。

マスターカーブにおける平坦領域が極小となって現れるvan Gorp–Palmenプロット (横軸に貯蔵弾性率 G' 、縦軸に位相 δ) を、バルクのBBと同様にBB/液晶混合物に適用し解析を行った (Figure 6)¹³⁻¹⁵。その結果、PHMA系では $G' = 1.3 \times 10^5$ Paに一つの極小が現れ、側鎖の緩和に対応する貯蔵弾性率と帰属された。一方、PEMA系では一つの極小ではなく、 $G' = 6.6 \times 10^5 - 1.7 \times 10^7$ Paの範囲に渡り極小が現れた。この原因は明確ではないが、ガラス転移温度に近いことが原因の一つとして考えられる¹⁴。いずれにせよPHMA系と同様に、van Gorp–Palmenプロットに現れた極小が側鎖の緩和に対応する貯蔵弾性率と相関するものと判断した。

得られた側鎖緩和の貯蔵弾性率に対応する温度 (特性温度) を見積もるため、マスターカーブおよび a_T の温度依存性 (Figure 5b) を利用した。側鎖緩和の貯蔵弾性率から、対応する角周波数をマスターカーブより算出すると、PHMA系では $\omega a_T = 2.5 \times 10^2$ rad/s、PEMA系では $\omega a_T = 3.2 \times 10^{-8} - 3.2 \times 10^{-5}$ rad/sと算出された。ここで、 A_2 の値を評価する V - T カーブ測定における電圧の掃引時間から、BB架橋膜上の液晶の方位角方向の回転 (ω) を0.1 rad/sと見積もり、この値から側鎖の運動に対応するシフトファクター a_T を、さらに a_T の温度依存性のグラフから特性温度を算出した。その結果、PHMA系BBでは -26 °C、PEMA系BBでは $50-81$ °Cと算出された。これらの温度を A_2 の温度依存性と比較すると、両者ともに A_2 の値が減少し始める温度領域と特性温度が一致した (Figure 3)。そのため、BB架橋膜における液晶のアンカリング強度の減少、すなわち界面の液晶の運動性の増大は、BB架橋膜の側鎖の運動性の増大によりもたらされるものであると結論づけた。

4. 液晶のグライディングアンカリング挙動

ポリマーを付与した液晶セルの外場に対する応答性は、バルクの液晶の性質や液晶-高分子の相互作用の影響を受ける。具体的には、バルクの液晶に関しては (a) 液晶の粘度が、液晶-高分子の相互作用に関しては高分子の緩和を伴わない相互作用である (b) 界面の液晶のダイレクター容易軸からのねじれによる緩和が、高分子の緩和を伴う相互作用に関しては (c) ポリマー膜の運動が関与した容易軸自体の変化を伴うグライディングアンカリングが影響す

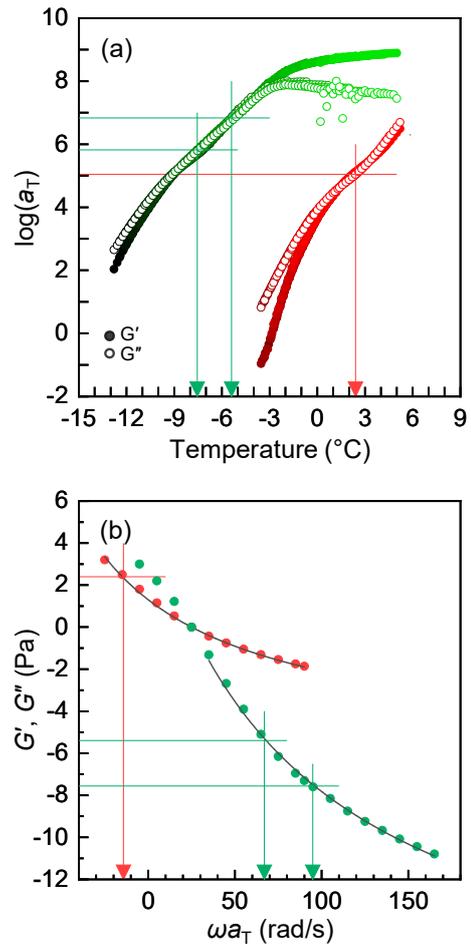


Figure 5. Master curves (a) and temperature dependency of the shift factor a_T (b) of mixtures of PHMA-BB (red dots) and PEMA-BB (green dots) with LCs. Reprinted with permission from ref. 9. Copyright 2021 American Chemical Society.

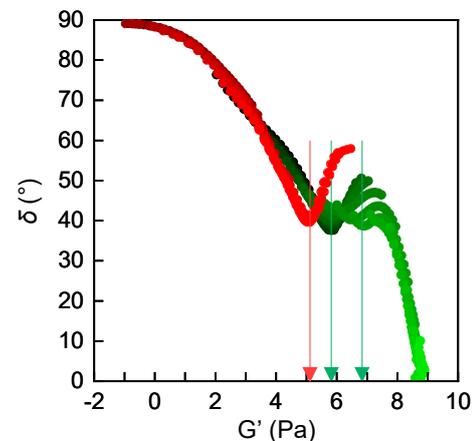


Figure 6. Van Gorp–Palmen plot for PHMA-BB (red dot) and PEMA-BB (green dot) with LC. Reprinted with permission from ref. 9. Copyright 2021 American Chemical Society.

ると考えられる。このうち、(a) と (b) の短い緩和時間に対して、(c) は長い緩和時間を有すると予測される。この点を明らかにすべく、我々は、種々の温度において、PHMA系BB架橋膜付与液晶セルに対して電場をステップ状に印加し、その際の透過率変化を計測した (Figure 7)。70 °Cでは透過率は瞬時に増大し、0.1 s以降はほぼ一定となった。一方、35 °Cでは電場を印加後、透過率はわずかに増大し、その後漸近的な増大に転じた。この結果から、0.1秒未満の緩和時間の短い応答が (a) および (b) に、0.1秒以降の緩和時間の長い応答が (c) に対応している判断した。

これらのデータを二つの指数型緩和モードの和としてフィッティングし、(c) に対応する (緩和時間の長い) 緩和モードに関してArrheniusプロットを作成し、活性化エネルギーを算出した。その結果、BB架橋膜によるグライディング挙動の活性化エネルギーは、 1.3×10^2 kJ/molと算出された。この値は、直鎖状PHMAのパルクにおけるガラス転移の活性化エネルギー (2.4×10^2 kJ/mol)¹⁶⁾よりも低かった。これは、運動性の高いポリマー末端が表面に集積していること、および、液晶との高い親和性によりポリマーの局所濃度低下していることの影響を受けていると考えられる。いずれにしても、グライディング挙動が側鎖の運動と同程度の活性化エネルギーを有することが示唆された。

5. 最後に

これまでのBB架橋膜を付与した液晶の電場に対する応答性およびBB/液晶混合物の粘弾性特性の解析から、低温領域ではBBの側鎖の運動性は凍結されており、それに伴い界面の液晶の配向が変化せず A_2 の値は高く、高温領域では高い運動性のBBの側鎖により界面の液晶の配向変化が促進され、 A_2 の値が低くなることが示された。さらに、グライディング挙動と側鎖の運動の活性化エネルギーは同程度であり、界面の液晶の運動がブラシ鎖の運動と密接に相関していることも示唆され、ブラシ状界面における液晶のアンカリング効果を、高分子鎖の分子運動性の観点から理解することに成功した。この知見は、液晶ディスプレイの性能向上につながる表面設計の指針だけでなく、界面高分子鎖のダイナミクスを評価する新しい手法への展開が期待される。

参考文献

- 1) J. Yamamoto, H. Yokoyama, J. Watanabe, Zero Surface Anchoring the Liquid Crystal Alignment Method and a Liquid Crystal Device, in: J. Patent (Ed.) Japan, 2007.
- 2) X. Nie, R. Lu, H. Xianyu, T.X. Wu, S.T. Wu, J. Appl. Phys., 101, 103110 (2007).
- 3) C. Blanc, D. Svesnek, S. Zumer, M. Nobili, Phys. Rev. Lett., 95, 097802 (2005).
- 4) D.N. Stoenescu, H.T. Nguyen, P. Barois, L. Navailles, M.

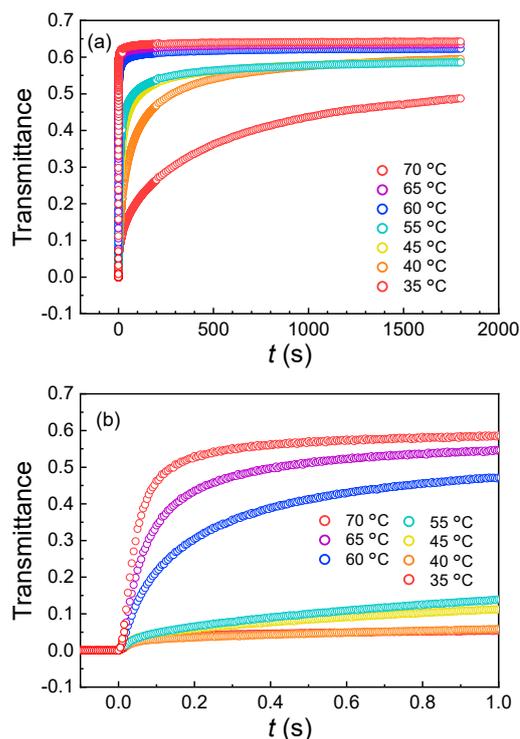


Figure 7. Time evolution of the transmittance of LC cell with cross-linked PHMA bottlebrush film (a: 0 to 1800 s; b: 0 to 1 s).

- Nobili, P. Martinot-Lagarde, I. Dozov, Mol. Cryst. Liq. Cryst., 358, 275 (2006).
- 5) O. Sato, T. Kasai, M. Sato, K. Sakajiri, Y. Tsujii, S. Kang, J. Watanabe, M. Tokita, J. Mater. Chem. C, 1, 7992 (2013).
- 6) I. Janossy, T.I. Kosa, Phys. Rev. E, 70, 052701 (2004).
- 7) O. Sato, N. Iwata, T. Kasai, Y. Tsujii, S.M. Kang, J. Watanabe, M. Tokita, Liq. Cryst., 42, 181 (2015).
- 8) O. Sato, T. Kasai, A. Nomura, Y. Tsujii, S. Kang, M. Tokita, J. Watanabe, Liq. Cryst., 40, 221 (2012).
- 9) Y. Kinose, K. Sakakibara, O. Sato, Y. Tsujii, ACS Appl. Polym. Mater., 3, 2618 (2021).
- 10) O. Sato, H. Okuno, I. Adachi, J. Watanabe, M. Tokita, K. Sakakibara, Y. Kinose, A. Goto, Y. Tsujii, Jpn. J. Appl. Phys., 58, 066503 (2019).
- 11) M. Oh - e, K. Kondo, Appl. Phys. Lett., 67, 3895 (1995).
- 12) M. Yoneya, K. Iwasaki, Y. Tomioka, K. Kondo, Appl. Phys. Lett., 74, 803 (1999).
- 13) M. Hu, Y. Xia, G.B. McKenna, J.A. Kornfield, R.H. Grubbs, Macromolecules, 44, 6935 (2011).
- 14) S.J. Dalsin, M.A. Hillmyer, F.S. Bates, Macromolecules, 48, 4680 (2015).
- 15) S. Trinkle, C. Friedrich, Rheol. Acta, 40, 322 (2001).
- 16) X. He, J. Wu, G. Huang, X. Wang, J. Macromol. Sci., Part B: Phys., 50, 188 (2010).

活性ラジカルと安定ラジカル間のカップリングと水素引き抜き反応に及ぼす 粘度の効果

The Effect of Viscosity on the Coupling and Hydrogen-Abstraction Reaction between Transient and Persistent Radicals

山子 茂¹・Li Xiaopei¹・中村 泰之²

Shigeru YAMAGO,¹ Xiaopei LI,¹ Yasuyuki NAKAMURA²

¹Institute for Chemical Research, Kyoto University

²Research and Services Division of Materials Data and Integrated System,
National Institute for Materials Science

The effect of viscosity on the radical termination reaction between a transient radical and a persistent radical undergoing a coupling reaction (*Coup*) or hydrogen abstraction (*Abst*) was examined. In a non-viscous solvent, all the transient radicals studied exclusively coupled with 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) with >99% *Coup/Abst* selectivity, but *Coup/Abst* decreased as the viscosity increased. Poly(methyl methacrylate) (PMMA)-end radicals had a more significant viscosity effect than polystyrene (PSt)-end radicals, and the *Coup/Abst* ratio of the former dropped to 50/50 in highly viscous media ($\eta_{\text{bulk}} = 3980 \text{ mPa s}$), while the latter maintained high *Coup/Abst* selectivity (84/16). These results, together with the low thermal stability of dormant PMMA-TEMPO species compared with that of PSt-TEMPO species, are attributed to the limitation of the nitroxide-mediated radical polymerization of MMA. While both organotellurium and bromine compounds were used as precursors of radicals, the former was superior to the latter for the clean generation of radical species.

1. 緒言

ラジカルは中性で反応性の高い化学種であることから、ラジカルカップリング反応は、有機およびポリマー合成の両方において、有用な反応であると原理的に考えられる。しかし実際には、活性ラジカル (transient radical) を高濃度で生成することが難しいことから、コルベ電解や^{1,2}ピナコールカップリング³⁻⁵等の活性ラジカルを効率的に生成できる系を除いて、合成反応に用いられることはほとんど無かった。しかし、この状況が最近変化してきている。

重要なブレイクスルーは、ニトロキシドを介したラジカル重合 (NMP) の開発である。NMPでは、活性なポリマー末端ラジカルと、2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド (TEMPO) 等の安定ラジカル (persistent radical) とのカップリング (*Coup*) により、ヒドロキシルアミン休止種が生成する (Fig. 1a)。^{6,7} 休止種とラジカルの可逆的な活性化/非活性化は、ラジカル重合にリビング性を付与し、分子量と分散度の制御を可能にした。しかし、NMPで重合制御可能なモノマー種はスチレン (St) とアクリレートに限定される。メタクリレートの重合では、TEMPOによるポリマー末端ラジカルからの水素引き抜き反応 (*Abst*) の競合により、ポリマー鎖は十分に成長しない (Fig. 1a)。^{8,9}

さらに最近では、活性ラジカル同士のカップリング反応も注目を集めている。例えば、原子移動ラジカル重合、¹⁰⁻¹⁶ コバルト媒介ラジカル重合、¹⁷⁻²⁰ 有機テルリウム媒介ラジカル重合²¹⁻²⁶で合成した、マクロ開始剤から生成したポリ

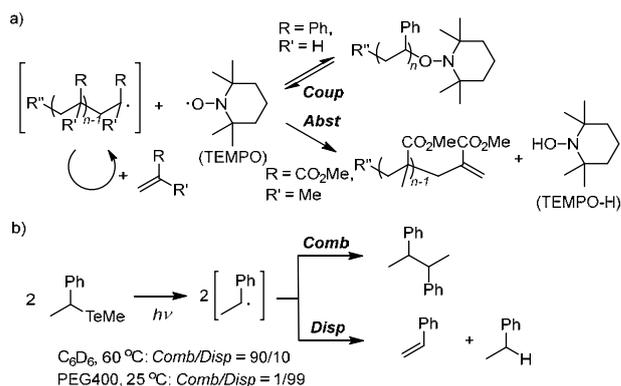


Fig. 1. a) Coupling (*Coup*)/hydrogen-abstraction (*Abst*) pathways in nitroxide-mediated radical polymerization (NMP) and b) combination (*Comb*)/disproportionation (*Disp*) pathways in the self-termination reaction of a polystyrene (PSt) mimetic radical, 1-phenylethyl. Copyright (2021) The Chemical Society of Japan [47]

マー末端ラジカルのカップリング反応が、対称ポリマーの制御合成法として注目されている。さらに、小分子合成においても、アシルテルリドから生成された α -アルコキシラジカルのホモ^{27,28}およびヘテロカップリング²⁷反応により、イオン反応では合成困難な分子の合成が報告されている。さらにポリマー合成では、構造的制御されたポリマー末端ラジカルとTEMPO誘導体とのヘテロカップリング反応が、ポリマー末端への官能基の導入に利用されている。²⁹⁻³³ これらの例では、カップリング効率率は中程度以上と優れて

いるが、反応を制御する因子は十分に解明されていない。

ポリマー鎖末端ラジカル同士の反応は、ラジカル重合中にも停止反応として発生し、結合 (*Comb*) または不均化 (*Disp*) によりデッドポリマーが生じる。^{34,35} 停止反応は分子量と末端構造とに直接影響を与え、さらに靱性や熱安定性などのさまざまな材料特性に関係することから、停止反応機構、すなわち、*Comb*と*Disp*の選択性の定量化と制御とはポリマー材料の合理的な設計に不可欠である。^{9,36} しかし、未だに十分ではない。

最近我々は、停止機構を定量的に解析する新しい方法の提案を行った。³⁷⁻⁴² すなわち、構造の制御されたポリマー末端ラジカルを発生させ、その反応による生成物を解析する方法である。その結果、*Comb/Disp*選択性の定量化と共に、これが粘度により大きく影響されることから、選択性を制御できることを初めて明らかにした (Fig. 2b)。⁴⁰ 例えば、PSt末端模倣ラジカルである1-フェニルエチルラジカルの*Comb/Disp*選択性は、低粘度条件 (C₆D₆, 60 °C, バルク粘度 $\eta_{\text{bulk}} = 0.4 \text{ mPa s}$) から高粘度条件 (PEG400, 25 °C, $\eta_{\text{bulk}} = 84 \text{ mPa s}$) になると90/10から1/99に逆転した (Fig. 1b)。なお、これまでも小分子三級ラジカルである*tert*-ブチルおよび2-ヒドロキシ-2-プロピルラジカルの停止反応において、粘度の効果が報告されている。⁴³⁻⁴⁵ しかし、この粘度効果の一般性、例えば、安定ラジカルが関与する反応でも発現するのか、との点は不明であった。

そこで本研究では、活性ラジカルと安定ラジカルとの反応における、*Coup/Abst*選択性に対する粘度の効果について検討を行ったので報告する。具体的には、NMPの重要性を鑑み、安定ラジカルとしてTEMPOを選び、メタクリル酸メチル (MMA)、アクリル酸メチル (MA)、Stの重合における重合末端ラジカルとその小分子モデルラジカル**2**、**6**との反応について検討した (Fig. 2)。なお、活性ラジカルである**2**および**6**は、対応する炭素骨格を持つ有機テルル化合物または有機臭素化合物**1**あるいは**5** (X = TePh or Br) から、それぞれ光照射または低原子価銅による一電子還元反応によって生成した。さらに、PMMA末端およびPSt末端ラジカルの*Coup/Abst*選択性に対する粘度の影響と、対応するTEMPOカップリング体**3**、**7**の熱安定性を調べることで、何故メタクリレートとの重合がNMPで制御できないのか、との点に関する疑問の解明を行った。

2. 実験法

一般的事項。 反応は窒素雰囲気下で実施した。反応溶液の粘度 η_{bulk} (mPa s) は、窒素雰囲気下で調製したサンプルを電磁回転粘度計を用いて測定した。拡散定数 (*D*) は、**1** および**5**の末端水素体 (X = H) を**2**および**6**のモデル化合物

として用い、Bruker社のNMR装置においてledbpgpr2sパルスシーケンスを使用したDOSY NMR実験により求めた。小分子ラジカルにおいては、球状構造を仮定してStokes-Einstein式によりマイクロ粘度を求めた。

典型的な実験手順。 窒素気流下、NMRチューブ中に **1aA** (R¹ = H, X = TePh, 4.6 μL , 0.030 mmol) とTEMPO (5.2 mg, 0.033 mmol) のC₆D₆ (0.60 mL) 溶液を、470 nmカットオフフィルターを介して500 W高圧Hgランプを60 °Cで1時間照射した。**1aA**が完全に消費されたことを確認した後、**3a**および**4a**の収率 (それぞれ99%および0.6%) を¹H NMRにより決定した。さらに、*Coup*と*Abst*の選択性を**3a**と**4a**の生成比から求めた (*Coup/Abst* = 99.4/0.6, Table 1, run 1)。

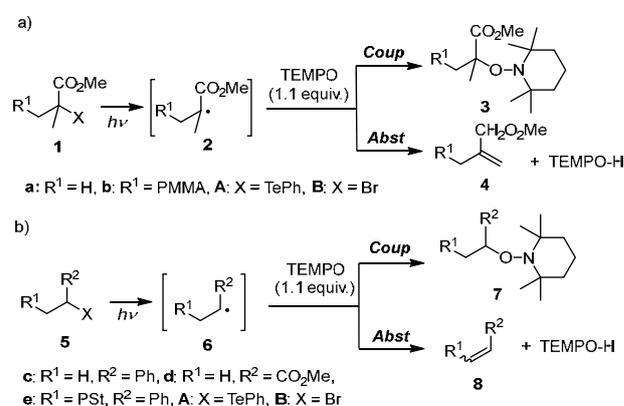


Fig. 2. TEMPO trapping experiments for the radicals generated from organotellurium and organobromine precursors. Copyright (2021) The Chemical Society of Japan [47]

3. 結果と議論

3-1. TEMPOによるポリマー末端モデルラジカルに対する粘度の影響。

1aA から生成するPMMA末端モデルラジカル**2a**とTEMPOとのC₆D₆中における60 °Cでの反応では、カップリング生成物**3a**と水素引き抜き生成物であるMMA (**4a**) がそれぞれ99%と0.6%で得られた (Table 1, run 1)。なお、この反応では **3a**と同じ量のTEMPO-Hが生成するはずであるが、特徴的な¹H NMRシグナルが無いと共に予想される収率が低いため、同定することはできなかった。このことから、*Coup*と*Abst*の選択性は、**3a**と**4a**の生成比から求めた。ここで得られた高い*Coup/Abst*選択性は、NMPで報告されている水素引き抜き反応 (Fig. 1a) と矛盾する結果の様に思えるが、この点については、次のセクションで議論する。

次に、ラジカル前駆体を臭化物 **1aB** (R¹ = H, X = Br) を用い、*N,N,N',N'',N'''*-ペンタメチルジエチレントリアミン ((PMDETA) 配位子存在下で過剰量の低原子価銅 (Cu(0), 1.5 equiv., Cu(I)Br, 4.0 equiv.) を作用させる条件で検討を行

Table 1. Effect of bulk and microviscosity in the reaction between transient and persistent radicals^a

Run	Precursor	Solvent	Temp (°C)	η_{bulk}^b (mPa·s)	D^c ($\times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	Yield ^d (%)		Coup/Abst ^e
						3 or 7	4 or 8	
1	1aA	C ₆ D ₆	60	0.41	3.27	99	0.6	99.4/0.6
2	1aB	C ₆ D ₆	60	0.41	3.27	96	0.7	-
3	1aA	C ₆ D ₆	40	0.61	2.38	99	0.5	99.5/0.5
4	1aB	C ₆ D ₆	40	0.61	2.38	97	0.4	-
5	1aA	C ₆ D ₆	25	1.1	2.01	99	0.6	99.4/0.6
6	1aB	C ₆ D ₆	25	1.1	2.01	96	0.4	-
7	1aA	DMSO-d ₆	60	1.2	1.45	97	2.1	97.9/2.1
8	1aB	DMSO-d ₆	60	1.2	1.45	95	2.3	-
9	1aA	DMSO-d ₆	40	1.7	1.09	96	2.5	97.5/2.5
10	1aB	DMSO-d ₆	40	1.7	1.09	94	2.1	-
11	1aA	DMSO-d ₆	25	2.3	0.88	95	3.8	96/4
12	1aB	DMSO-d ₆	25	2.3	0.88	93	2.6	-
13	1aA	PEG400	60	21	0.56	90	8.9	91/9
14	1aB	PEG400	60	21	0.56	88	1.9	-
15	1aA	PEG400	40	44	0.47	84	9.4	88/12
16	1aB	PEG400	40	44	0.47	83	3.1	-
17	1aA	PEG400	25	84	0.41	79	13.4	85/15
18	1aB	PEG400	25	84	0.41	79	5.3	-
19	5cA	C ₆ D ₆	60	0.41	2.01	99	0.2	99.8/0.2
20	5cA	C ₆ D ₆	40	0.61	1.45	99	0.3	99.7/0.3
21	5cA	C ₆ D ₆	25	1.1	1.09	99	0.5	99.5/0.5
22 ^f	5cA	C ₆ D ₆	25	1.1	1.09	99	0.6	99.4/0.6
23	5cB	C ₆ D ₆	25	1.1	0.88	97	0.8	-
24	5cA	DMSO-d ₆	60	1.2	0.88	98	1.3	98.7/1.3
25	5cA	DMSO-d ₆	40	1.7	0.56	98	1.7	98.2/1.8
26	5cA	DMSO-d ₆	25	2.3	3.27	97	2.3	97.7/2.3
27	5cB	DMSO-d ₆	25	2.3	2.38	96	2.0	-
28	5cA	PEG400	60	21	2.01	91	4.1	96/4
29	5cA	PEG400	40	44	2.01	89	7.3	93/7
30	5cA	PEG400	25	84	1.45	84	9	89/11
31 ^f	5cA	PEG400	25	84	1.45	83	8	89/11
32	5cB	PEG400	25	84	1.09	83	1	-
33	5dA	C ₆ D ₆	60	0.41	3.27	99	0.4	99.6/0.4
34	5dA	C ₆ D ₆	40	0.61	2.38	99	0.6	99.4/0.6
35	5dA	C ₆ D ₆	25	1.1	2.01	99	0.6	99.4/0.6
36	5dB	C ₆ D ₆	25	1.1	2.01	96	1.0	-
37	5dA	DMSO-d ₆	60	1.2	1.45	98	0.8	99.2/0.8
38	5dA	DMSO-d ₆	40	1.7	1.09	98	1.2	98.8/1.2
39	5dA	DMSO-d ₆	25	2.3	0.88	96	2.3	97.7/2.3
40	5dB	DMSO-d ₆	25	2.3	0.88	96	0.9	-
41	5dA	PEG400	60	21	0.56	90	4.5	95/5
42	5dA	PEG400	40	44	3.27	85	6.0	92/8
43	5dA	PEG400	25	84	2.38	82	10	89/11
44	5dB	PEG400	25	84	2.01	79	0	-
45	1bA	C ₆ D ₆	25	1.38	n.d. ^g	99 ^h	0.4	99/1
46	1bA	C ₆ D ₆ /PSt (8/2)	25	808	n.d. ^g	66 ^h	34	66/34
47	1bA	C ₆ D ₆ /PSt (1/1)	25	3980	n.d. ^g	50 ^h	50	50/50
48	5eA	C ₆ D ₆	25	1.53	n.d. ^g	99	0.2	99/1
49	5eA	C ₆ D ₆ /PSt (8/2)	25	780	n.d. ^g	82	9.0	90/10
50	5eA	C ₆ D ₆ /PSt (1/1)	25	3580	n.d. ^g	78	15	84/16

^aA solution of the precursor (0.030 mmol) and TEMPO (1.1 equiv.) in a solvent (0.60 mL) was irradiated by a 500 W mercury lamp through a <470 nm cut-off filter. ^bBulk viscosity determined by a viscometer. ^cDiffusion constant of methyl isobutyrate, which is a model compound of radical **2a**, determined by the DOSY NMR experiments. The same diffusion constants were used for radicals **6c** and **6d** due to the low concentration of the reaction. ^dDetermined by the ¹H NMR. ^eOnly the ratio obtained using **1A** and **5A** was calculated because of the presence of side reaction when **1B** and **5B** were used. ^fTIPNO was used instead of TEMPO. ^gNot determined. ^hYield was estimated by subtracting the yield of **4b** after confirming the quantitative conversion of **1bA** to PMMA having same M_n by size exclusion chromatography.

った (run 2)。その結果、**3a**および**4a**がそれぞれ96%および0.7%の収率で得られると共に、少量の**4a**のオリゴマー (~2%) の生成が¹H NMRから示唆された。**1aA**を用いた場合とほぼ同じ結果ではあったが、オリゴマーの生成が確認されたことから、以下の*Coup/Abst*選択性の議論においては**1aA**を用いた結果を用いる。また、対照実験により、TEMPO-Hは低原子価銅により定量的にTEMPOへと変換されることもわかった。

次に、温度と溶媒を変えて同じ実験を行った。C₆D₆溶媒中、40 °Cおよび 25 °Cにおける*Coup/Abst*選択性は、ラジカル前駆体の種類に関係なくほぼ同じであり、**3a**が高収率で得られた。しかし、温度が低くなる、すなわち、粘度が低くなると、わずかではあるが *Coup/Abst*選択性が低下した (runs 3-6)。また、同じ反応をDMSO-d₆を用いて行ったところ、C₆D₆中と同様に**3a**は93%以上の高収率で生成した (runs 7-12)。しかし、**4a**の収率はC₆D₆中に比べわずかに増加した。さらに、*Coup/Abst*選択性も温度の低下により低下した。これらの結果は、活性ラジカルの停止機構における*Comb/Disp*選択性と同様な傾向である。⁴⁰

さらに、高粘度のPEG400を使用した場合、**3a**の生成は79~90%と大幅に減少する一方、**4a**の生成が増加した (runs 13-18)。さらに、*Coup/Abst*選択性も温度の低下により96/4から85/15へと低下した。なお、**1aB**を用いた場合には物質収支が低下したが、これは**4a**のオリゴマー生成であることが¹H NMRから示唆された。このことから、テルル化合物の方が臭化物よりも炭素ラジカル前駆体として優れていることが示唆された。なお、**1aA**を使用した実験では、**4a**とほぼ同じ量のTEMPO-Hも観察された。

*Coup/Abst*選択性を絶対温度の逆数、あるいはバルク粘度に対して両対数プロットを行ったところ、各溶媒においてそれぞれ良い相関が見られた (Fig. 3a and 3b, ■, ▲, ▲, ■)。さらに、*Coup/Abst*選択性と拡散定数の逆数、すなわちマイクロ粘度との相関を見たところ、溶媒の種類にかかわらず、より一般的な相関が見られた (Fig. 3c)。これらの結果は、活性ラジカルにおける*Comb/Disp*選択性の温度および粘度依存性の結果と一致している。⁴⁰

次に、PST末端モデルラジカル**6c** (R¹ = H, R² = Ph) とTEMPOとの反応に対する粘度の影響を、**5cA** (R¹ = H, R² = Ph, X = TePh) を用いて検討した (runs 19-21, 24-26, and 28-30)。その結果、D₆D₆およびDMSO-d₆のいずれの溶媒中でも、*Coup*生成物である**7c**が>97%以上の収率で高選択的に得られた。また、*Coup/Abst*選択性は、C₆D₆/60 °CからDMSO-d₆/25 °Cへと粘度が高くなるにつれ、99.8/0.2から97.7/2.3へと、わずかであるが増加した。さらにPEG400中では*Coup/Abst*選択性はさらに低下し、25 °Cでは89/11であ

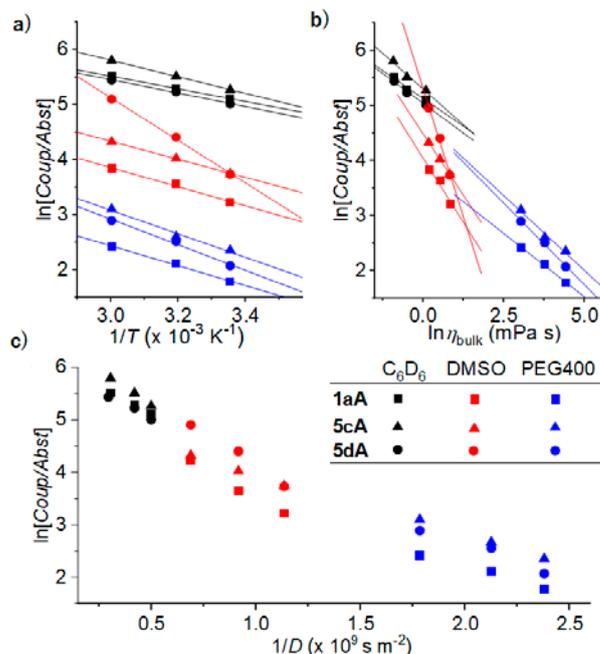


Fig. 3. Correlation of *Coup/Abst* selectivity and a) inverse of temperature, b) bulk viscosity, and c) inverse of diffusion constant for radical-radical reaction. Copyright (2021) The Chemical Society of Japan [47]

った。これらの結果はTEMPOを用いるNMPにおいて、Stの制御重合が行える事実と良く一致する。さらに、先と同様に、*Coup/Abst*選択性を絶対温度の逆数、あるいはバルク粘度に対して両対数プロットを行ったところ、各溶媒においてそれぞれ良い相関が見られた (Fig. 3a and 3b, ▲, ▲, ▲)。さらに、**6c**の場合も拡散定数の逆数の方が、溶媒の種類に依らずに*Coup/Abst*選択性と良い相関を持つことがわかった (Fig. 3c)。

*Coup/Abst*選択性における粘度効果の一般性を明らかにするため、安定ラジカルとして2,2,5-トリメチル-4-フェニル-3-アザヘキサン-3-ニトロキド (TIPNO, Fig. 4)⁴⁶を用いたコントロール実験を行った。その結果、C₆D₆およびPEG400中における**6c**との反応では、TEMPOを用いた場合と同じ*Coup/Abst*選択性を示したことから、粘度効果の一般性が示された (runs 22 and 31)。



Fig. 4. Structure of TIPNO.

次に、**5dA** (R¹ = H, R² = CO₂Me, X = TePh) から発生するPMA末端モデルラジカル**6d**とTEMPOとの反応について検討した (runs 33-35, 37-39, and 41-43)。その結果、**2a, 6c**の反応性と基本的に同じ傾向を示し、いずれも*Abst*生成物**7d**が高選択的に取れると共に、*Comb/Abst*選択性は粘度の

増加により低下した。すなわち、C₆D₆、60 °Cでは99.6/0.4であったが、PEG400、25 °Cでは89/11へと低下した。さらに、*Coup/Abst*選択性と温度、バルク粘度、および拡散係数の逆数とは、先と同様に良い相関が見られた (Fig. 3a, 3b, and 3b, ●, ●, ●)。

以上の結果は、*Comb/Abst*選択性における粘度効果の一般性を明確に示しており、活性ラジカルの停止反応 (*Comb/Disp*選択性) における粘度効果ですでに提唱されている、衝突モデルで説明できる。^{40,43} **2a**とTEMPOとの反応例をFig. 5に示した。ラジカルペアが反応するには、スピン状態が三重項から一重項へと項間交差する必要があり、そのためには二つのラジカルは互いのSOMO軌道が直交した配置を取る必要がある。それが反応を起こす時には、ラジカル分子が回転して、SOMOが同一線上となる配置となる必要があり、この分子の回転は周りの溶媒の移動と再配列に影響を及ぼす。*Abst*を起こす配座に対し、*Coup*を起こす配座の数が少ないことから、後の方がより粘度に敏感であり、溶媒の粘度が高くなるとこちらの経路がより不利となる。

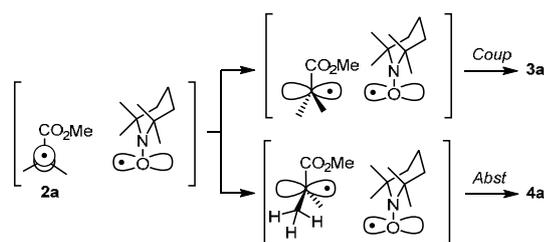


Fig. 5. The collision model for explaining the viscosity effect. Copyright (2021) The Chemical Society of Japan [47]

臭化物**5cB** (R¹ = H, R² = Ph, X = Br) および**5dB** (R¹ = H, R² = CO₂Me, X = Br) をラジカル前駆体として用いた場合、C₆D₆およびDMSO-d₆ 溶媒中ではテルル化合物を用いた場合とほぼ同じであったが (runs 23, 27, 36, and 40)、PEG400を使用した場合、*Abst*生成物である**8**の収量と全体の物質収支が大きく低下した (runs 32 and 44)。これは、極性溶媒中で2電子還元が加速したためと考えられる。³⁹これらの結果からも、活性炭素ラジカル生成における有機テルル化合物の利点がさらに明確になったものと考えている。

3-2. TEMPOによるポリマー末端ラジカルへの粘度の影響。

PMMAおよびPSt末端ラジカル**2b**および**6e**とTEMPOとの反応を、**1bA** (R¹ = PMMA, X = TePh, M_n = 3,400, *D* = 1.14, End group fidelity (EDF) = 97%) と**5eA** (R¹ = PSt, X = TePh, M_n = 2,900, *D* = 1.16, EDF = 96%) を前駆体として用いて検討した。C₆D₆、25°Cでは、**2b**および **6e**はいずれも > 99/1

の*Coup/Abst*選択性を示し、*Abst*は観測されなかった (runs 45 and 48)。次に粘度の効果を見るため、C₆D₆とPSt (M_n = 96,000, *D* = 1.46) の混合溶媒中で同じ反応を行ったところ、いずれの場合も*Abst*の割合が増加したが、その程度はPStラジカル**6e**よりもPMMAラジカル**2b**の方が顕著であった (runs 46, 47, 49, and 50)。すなわち、C₆D₆/PStの1/1混合溶媒 ($\eta_{\text{bulk}} \sim 4000$ mPa s) では、**2b**の*Coup/Abst*選択性は50/50であったが、**6e**では84/16であった。また、いずれも*Coup/Abst*選択性は、バルク粘度と良好な相関関係があることがわかった (Fig. 6)。重合反応では、重合の進行と共に反応系の粘度が上がることから、PStラジカルとPMMAラジカルの*Abst*反応に対する粘度依存性の違いが、NMPにおけるStとMMAの重合の違いに一因であることが示唆された。しかし、NMPで報告されている違いに比べ、この粘度効果は極めて小さいと考えられる。

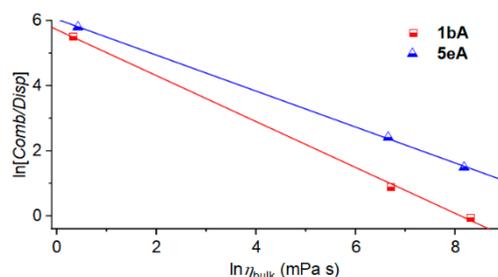


Fig. 6. Correlation of *Coup/Abst* selectivity and bulk viscosity. Copyright (2021) The Chemical Society of Japan [47]

この点を明確にするために、NMPにおける休止種の安定性について検討した。すなわち、ポリマー休止種の小分子モデル**3a**および**7c**の混合物を過剰量のベンゼンチオール (50 equiv.) 存在下、C₆D₆溶媒中で100 °Cで加熱し、その分解速度を調べた (Fig. 7)。その結果、**3a**は約10分以内に完全に消費され、2-メチルプロピオン酸メチルが定量的に生成した。一方、**7c**の消失は遅く、完全に消費するには約12時間かかった。この結果は、休眠種の熱安定性の有意差を明確に示している。なお、**3a**と**7c**のTEMPO部位と反応したベンゼンチオールは、それぞれTEMPO-Hとジフェニルジスルフィドとして回収された。

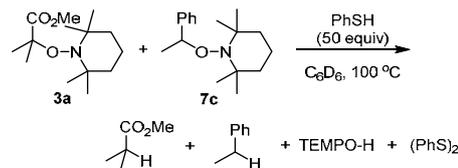


Fig. 7. Thermal decomposition of TEMPO adducts **3a** and **7c** in the presence of benzenethiol. Copyright (2021) The Chemical Society of Japan [47]

3a および **7c** の分解はいずれも基質に対して一次であることから (Fig. 8)、出発基質の炭素-酸素結合のホモリシスによるラジカルペアの生成が律速段階であることが示唆された。さらに、見かけの一次反応速度定数 k_{app} はそれぞれ 2.7 s^{-1} と 0.03 s^{-1} であることから、PMMA-TEMPO休止種はPSt-TEMPO休止種よりも約90倍活性化されやすいことがわかった。なお、安定性を厳密に比較するには、結合開裂により生成したラジカルペアの再結合反応の寄与を考慮する必要がある。しかし、これはほぼ同じであると考えられる。一方、MMAのホモ重合における成長反応速度はStに比べて3倍である。したがって、PMMA末端ラジカルは同じ鎖長のポリマーを形成するために、PSt末端ラジカルよりも約30倍回の不活性化と活性化とを経験することになる。この違いと $Abst$ の粘度依存性の違いが、NMPにおけるStとMMAの重合の違いであることが強く示唆された。

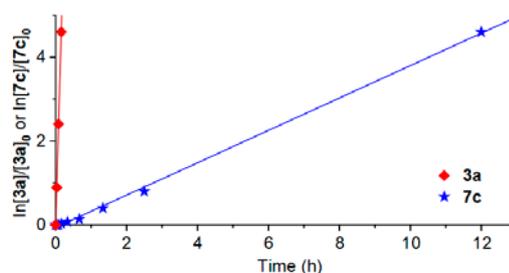


Figure 4. The decomposition kinetics of **3a** and **7c**. (The inset shows the decomposition of **3a**). Copyright (2021) The Chemical Society of Japan [xx]

4. 結言

活性ラジカルと安定ラジカル間の反応は、活性ラジカル同士の反応ほどではないものの、比較的大きな粘度効果を持つことを明らかにした。すなわち、非粘性溶媒中では高選択的に $Coup$ が進行する一方、粘度が高くなると $Abst$ が増加した。この傾向は、活性ラジカルにおける $Comb/Disp$ 選択性の粘度効果と同じ傾向である。さらに、今回の反応においても、バルク粘度よりマイクロ粘度の方が反応性を予測する良いパラメータであることも示された。さらに、NMPにおけるStとMMA重合の違いの解明にも成功した。本研究はポリマー合成と共に有機合成における効率的なラジカルカップリング反応を設計するのに役立つものと考えている。⁴⁷

5. 謝辞

本研究は科研費 (16H06352) および京大化学研究所共拠点 (2020-20) の支援により行われた。

References

1. A. S. Lindsey, H. Jeskey, *Chem. Rev.* **1957**, *57*, 583-620.
2. H. J. Schäfer, , *Recent contributions of Kolbe electrolysis to organic synthesis, Electrochemistry*. Editor, Steckhan E., Springer, Berlin, Heidelberg, **1990**.
3. J. Inanaga, H. Furuno, *Comprehensive Chirality*, Elsevier, Amsterdam **2012**.
4. T. Wirth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 61-63.
5. A. Chatterjee, N. N. Joshi, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 12137-12158.
6. J. Nicolas, Y. Guillaneuf, C. Lefay, D. Bertin, D. Gigmes, B. Charleux, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 63-235.
7. M. K. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, G. K. Hamer, *Macromolecules* **1993**, *26*, 2987-2988.
8. G. S. Ananchenko, H. Fischer, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2001**, *39*, 3604-3621.
9. S. Yamago, E. Kayahara, H. Yamada, *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 416-423.
10. G. Wang, J. Huang, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 277-308.
11. S. Yurteri, I. Cianga, Y. Yagci, *Macromol. Chem. Phys.* **2003**, *204*, 1771-1783.
12. T. Sarbu, K.-Y. Lin, J. Ell, D. J. Siegwart, J. Spanswick, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3120-3127.
13. Y. Qin, C. Cui, F. Jäkle, *Macromolecules* **2007**, *40*, 1413-1420.
14. A. F. Voter, E. S. Tillman, *Macromolecules* **2010**, *43*, 10304-10310.
15. A. Bunha, M. C. Tria, R. Advincula, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9173.
16. K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **2012**, *45*, 4015-4039.
17. A. Debuigne, C. Jérôme, C. Detrembleur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1422-1424.
18. A. Debuigne, R. Poli, J. D. Winter, P. Laurent, P. Gerbaux, P. Dubois, J.-P. Wathélet, C. Jérôme, C. Detrembleur, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1799-1811.
19. A. Debuigne, R. Poli, J. D. Winter, P. Laurent, P. Gerbaux, J.-P. Wathélet, C. Jérôme, C. Detrembleur, *Macromolecules* **2010**, *43*, 2801-2813.
20. A. Debuigne, R. Poli, C. Jérôme, R. Jérôme, C. Detrembleur, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 211-239.
21. Y. Nakamura, T. Arima, S. Tomita, S. Yamago, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5536-5539.
22. Y. Nakamura, T. Arima, S. Yamago, *Macromolecules* **2014**, *47*, 582-588.
23. W. Fan, Y. Nakamura, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 17006-17010.
24. S. Yamago, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5051-5068.
25. S. Yamago, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2020**, *93*, 287-298.
26. S. Yamago, K. Iida, J. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2874-2875.
27. K. Masuda, M. Nagatomo, M. Inoue, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 207-212.
28. T. Kawamata, A. Yamaguchi, M. Nagatomo, M. Inoue, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 18907-18912.
29. S. Coiai, E. Passaglia, F. Cicogna, *Polym. Int.* **2019**, *68*, 27-63.
30. S. Holmberg, P. Holmlund, R. Nicolas, C.-E. Wilén, T. Kallio, G. Sundholm, F. Sundholm, *Macromolecules* **2004**, *37*, 9909-9915.
31. A. Debuigne, J.-R. Caille, R. Jérôme, *Macromolecules* **2005**, *38*, 5452-5458.
32. Y. Lu, T. Nemoto, M. Tosaka, S. Yamago, *Nat. Commun.*

- 2017, 8, 1836-1844.
33. Y. Lu, S. Yamago, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 3952-3956.
34. G. Odian, *Principles of Polymerization Fourth Edition*. Editor, Wiley-Interscience, Canada, **2004**.
35. G. Moad, D. H. Solomon, *The Chemistry of Radical Polymerization 2nd Edition*. Editor, Elsevier, Amsterdam, **2006**.
36. D. W. V. Krevelen, K. T. Nijenhuis, *Properties of Polymers. Their Correlation with Chemical Structure; their Numerical Estimation and Prediction from Additive Group Contributions 4th Edition*. Editor, Elsevier Science, Slovenia, **2009**.
37. Y. Nakamura, S. Yamago, *Macromolecules* **2015**, 48, 6450-6456.
38. Y. Nakamura, R. Lee, M. L. Coote, S. Yamago, *Macromol. Rapid Commun.* **2016**, 37, 506-513.
39. Y. Nakamura, T. Ogihara, S. Yamago, *ACS Macro Lett.* **2016**, 5, 248-252.
40. Y. Nakamura, T. Ogihara, S. Hatano, M. Abe, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 1299-1305.
41. X. Li, T. Ogihara, M. Abe, Y. Nakamura, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 9846-9850.
42. X. Li, T. Ogihara, T. Kato, Y. Nakamura, S. Yamago, Evidence for Polarity- and Viscosity-controlled Domains in the Termination Reaction in the Radical Polymerization of Acrylonitrile, **2021**, submitted.
43. H.-H. Schuh, H. Fischer, *Helv. Chim. Acta.* **1978**, 61, 2463-2481.
44. H. Fischer, H. Paul, *Acc. Chem. Res.* **1987**, 20, 200-206.
45. D. D. Tanner, P. M. Rahimi, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 225-229.
46. D. Benoit, V. Chiplinski, R. Braslau, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3904-3920.
47. X. Li, T. Kato, Y. Nakamura, S. Yamago, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2021**, 94, 966-972.

ASAXS法によるゴム充填系の階層構造に関する研究

Notice to Authors of "Annual Report of Institute for Chemical Fibers, Japan"

竹中 幹人・渡辺 幸

Mikihito TAKENAKA, Yuki WATANABE

Institute for Chemical Research, Kyoto University

The hierarchical structures of carbon black (CB) in Poly(styrene-ran-butadiene) (SBR) rubber/CB systems vulcanized with sulfur and ZnO were clarified by using anomalous small-angle X-ray scattering (ASAXS) near the Zn absorption edge. The SBR/CB systems vulcanized with sulfur and ZnO are commonly used and quantitative analyses of the hierarchical structures in the SBR/CB systems are needed. However, the hierarchical structures in the SBR/CB systems have not been well investigated since the strong scattering contrast of Zn hinders the quantitative analyses of the hierarchical structures of CB by using X-ray scattering. In this study, we eliminated the effects of Zn on the scattering intensity and obtained the structure factors of CB in SBR/CB systems by using the ASAXS method.

1. 緒言

シリカやカーボンブラック (CB) などのフィラーで強化されたゴムは、日常生活の中で広く利用されています。ゴム充填系の力学特性は、充填材が形成する構造に依存するため、その構造を解析することは、力学特性を制御する上で最も重要な課題の1つである。これまで多くの研究者が散乱法を用いてゴム-フィラー系の構造を調査し、Fig.1に示すようにフィラーがゴム中に階層的な構造を形成していることを報告している¹⁻¹⁰⁾。古賀らは、SBR/CB系において、CBの一次粒子が10nmオーダーの"Aggregate"を形成し、Aggregateが質量フラクタル次元で連結して"Agglomerate"を形成することを発見している。

しかし、ゴム-フィラー系の散乱実験は、硫黄と酸化亜鉛による加硫が実用化されているにもかかわらず、過酸化合物で加硫した試料が多く用いられてきた。これは、ZnOがX線散乱に対して強いコントラストを持つからである。ZnOはゴム充填剤系では通常5vol%以下であるが、ゴム充填剤系でのZnOの散乱強度は従来のX線散乱に影響を与えるほど強く、充填剤の階層構造の定量的な解析が困難であ

った。ゴム中のZnOの粒子径は通常100-1000 nmであり、フィラーの「集合体」のサイズに近い^{11,12)}。したがって、ゴム-フィラー系の階層構造を定量的に解析するためには、散乱強度からZnOの影響を排除する必要がある。

そこで、ZnOの影響を除去するために、異常小角X線散乱法 (ASAXS) を採用した。ASAXSはコントラスト変動散乱法であり、多成分系における各成分の構造因子を推定することができる。ASAXS実験では、X線の吸収端近傍での散乱強度の入射X線エネルギー依存性を測定し、後述するX線エネルギーによる散乱強度の変化を解析することで、系の各構造因子を得ることができる。ZnOを含むゴムフィラー系の場合、ASAXSにはZnのK吸収端を用いる。MorfinらはZnOとフィラーを分離した構造因子をZnのK吸収端を用いて推定するためにASAXSを適用した¹²⁾。しかし、彼らはフィラーの階層構造やZnOの詳細な構造については詳しく解析していない。そこで本研究では、ZnOで加硫したSBR/CB系においてCB量が階層構造にどのように影響するかをASAXS法により検討した。また、SBR/CB系におけるZnの空間分布も調べた。

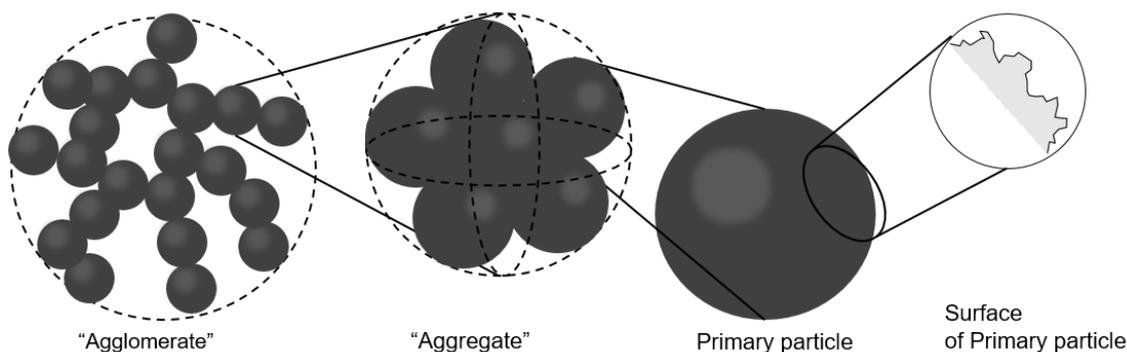


Fig.1 Schematic picture of Hierarchical structures of CB formed in rubber/CB systems

2. 実験

2-1. 試料

ゴムとしては、Poly(styrene-ran-butadiene) (SBR; Nipol 1502)を使用した。SBRの特性を表1に示す。CB (HAFクラスグレード) は、日本の東海カーボン株式会社から入手したものである。表2に示すように、SBR(100phr)、CB(20 phr)、ステアリン酸 (StAc) (2.0 phr)、硫黄(2.0 phr)、促進剤(2.5 phr)、ZnO(3.0 phr)をバンバリーミキサーを用いて280 (sec) でSBRに配合し、オープンロールミルを用いて混合SBRに硫黄および促進剤を配合した。その後、160°C、30minの条件で成形し、加硫を行った。

Table 1. Characterization of SBR

Polymer	M _w	M _w /M _n	wPS(%)	Vinyl (%)
SBR	5.0×10 ⁵	3.4	23.5	15

2-2. ASAXS実験

SPring-8で、BL03XUを用いたASAXS測定を行った。入射X線のエネルギーはZnのK吸収端近傍の9.6361, 9.6511, 9.6541, 9.6571, 9.6611 keVに設定した。Fig.2には散乱長密度のエネルギー依存性を示す。Znにおいて変化が見られるのがわかる。二次元検出器にはPILATUS-2Mを使用した。試料から検出器までの距離は7.8mであり、観測された q の範囲は0.011nm⁻¹から0.2nm⁻¹であった。ここで q は次式で定義される散乱ベクトルの大きさである。

$$q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2) \quad (1)$$

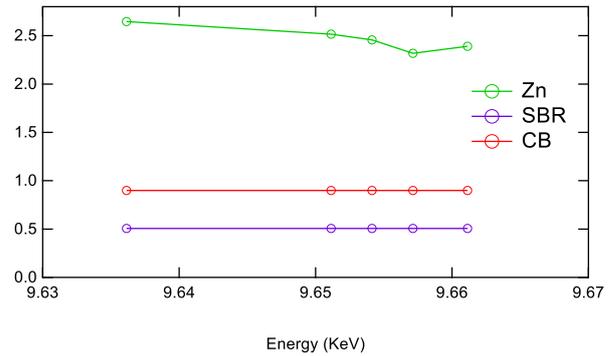


Fig.2 Energy dependence of scattering length density of Zn, SBR, and CB

λ および θ はそれぞれ、入射ビームの波長と散乱角である。得られた二次元散乱データを空気散乱に補正した。

3. 結果と考察

3-1. 散乱プロファイルのエネルギー依存性

Fig.3に入射X線エネルギーによる散乱プロファイル $I(q)$ の変化を示す。CB/SBR系の散乱プロファイルは以下の3つの領域に分けられる⁸⁾: (i) q の大きい領域 ($0.08 < q < 0.2 \text{ nm}^{-1}$) において、 $I(q)$ は指数-3.3のべき乗の振る舞いを示し、CB表面の表面フラクタルが反映されていることがわかる。(ii) $0.04 < q < 0.2 \text{ nm}^{-1}$ の中間領域では、一次粒子の「凝集体」

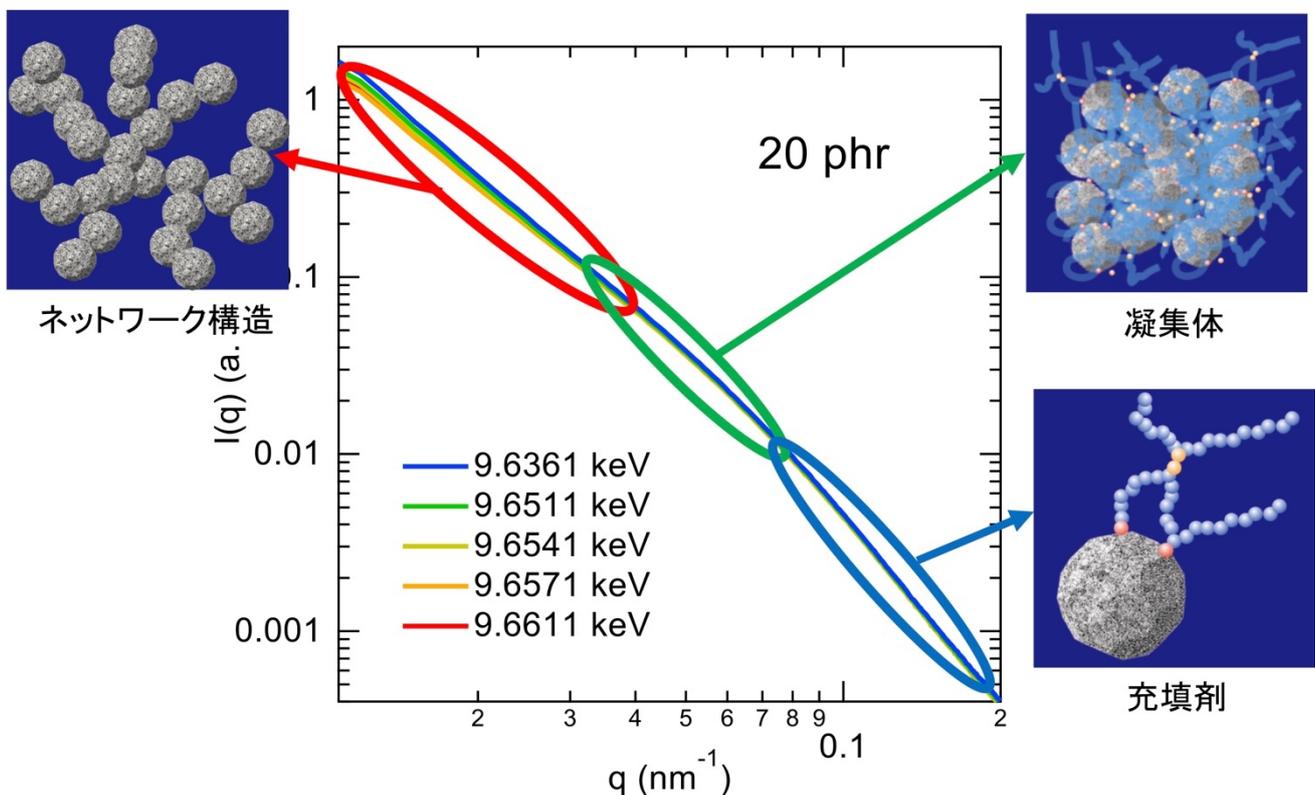


Fig.3 X-ray energy dependencies of scattered intensity

サイズを特徴づけるショルダーが観察される。(iii) q の小さい領域 ($q < 0.04 \text{ nm}^{-1}$) では、べき乗則の挙動が観察される。これは、凝集体のネットワーク構造に由来するもので、マスマフラタルの分布を示す。 $I(q)$ においても同様の挙動が見られている。 $I(q)$ は、 $q < 0.03 \text{ nm}^{-1}$ でX線エネルギーに依存して変化することがわかる。これは、サブミクロンスケールの ZnO の構造または凝集が散乱強度に影響を与えるためと考えられる。

コントラスト変動法を用いて、この散乱プロファイルを解析した。系はSBR, CB, Znの3成分として扱われると仮定すると、非圧縮性の条件下で散乱プロファイルは以下のように記述される。

$$I(q, E) = \left[(\rho_{0,Z} + \rho'_Z(E) - \rho_{0,SBR})^2 + \rho''_Z(E)^2 \right] S_{ZZ}(q) + 2(\rho_{0,Z} + \rho'_Z(E) - \rho_{0,SBR})(\rho_{0,C} - \rho_{0,SBR})S_{ZC}(q) + (\rho_{0,C} - \rho_{0,SBR})^2 S_{CC}(q) \quad (2)$$

ここで、 $S_{ij}(q)$ は次式で定義される部分散乱関数である。

$$S_{ij}(q) = \frac{1}{V} \iint (\delta\phi_i(\vec{r})\delta\phi_j(\vec{r}')) \exp[i\vec{q}(\vec{r} - \vec{r}')] d\vec{r}d\vec{r}' \quad (3)$$

ここで、 V は散乱体積、 $\delta\phi_i(\vec{r})$ は位置 \vec{r} における i 成分の体積分率の平均値からの揺らぎ、 $\rho_{0,i}$ は i 成分の散乱長密度であり、次のように定義される。

$$\rho_{0,i} = \frac{f_0}{A} \mu \quad (4)$$

ここで、 f_0 は原子散乱係数、 A はモル質量、 μ は比重である。Znの吸収K吸収端近傍での散乱長密度 ρ_Z は入射X線のエネルギー E に依存して変化し、次式で表される。

$$\rho_Z = \rho'_Z + \rho''_Z = \frac{f_0 + f'(E)}{A} \mu + \frac{if''(E)}{A} \mu \quad (5)$$

ここで、 $f'(E)$ と $f''(E)$ はそれぞれ異常分散の実部と虚部である。散乱強度のベクトル

$$\vec{I} = [I(q, E_1), I(q, E_2), I(q, E_3), I(q, E_4), I(q, E_5)] \quad (6)$$

は次式で表すことができる。

$$\vec{I} = \mathbf{M} \cdot \vec{S} \quad (7)$$

ここで、 \mathbf{M} は散乱長密度の差の2乗の行列、 \vec{S} は部分散乱関数のベクトル $[S_{ZZ}(q), S_{ZC}(q), S_{CC}(q)]$ である。散乱強度ベクトルに $\mathbf{M}^T \cdot \mathbf{M} = \mathbf{E}$ を満たす転置行列 \mathbf{M}^T を適用することによって部分散乱関数ベクトル \vec{S} を求めることができる。

3-2. 部分散乱関数

Fig.4にFig.3の散乱関数のエネルギー依存性から計算された部分散乱関数を示す。 $S_{ZC}(q)$ は負になっており、CBとZnが相補的に存在しているのがわかる。Fig.5は $S_{ZZ}(q)$ の両対数プロットである。100nm以上の大きさのZnOの粒子の表面を反映したPorod則の q^{-4} 依存性が観測され、小角側において、散乱に影響を与えていることがわかる。Fig.6は $S_{CC}(q)$ の両対数プロットである。Fig.7は $S_{CC}(q)$ を $I(q)$ と比較したものを示す。小角側でのズレが明確に見出されており、この領域ではZnOの影響があることがわかる。よって、ASSAXS法によって分離して解析をしないとCBの構造関数は正確に求められないことがわかる。 $S_{CC}(q)$ から凝集体

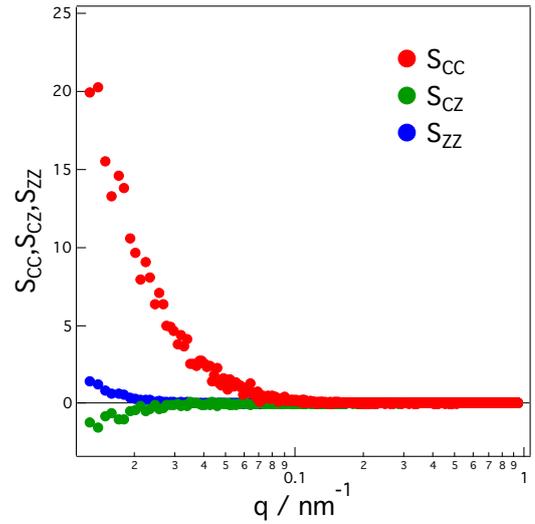


Fig.4 Partial structure factors of SBR/CB systems

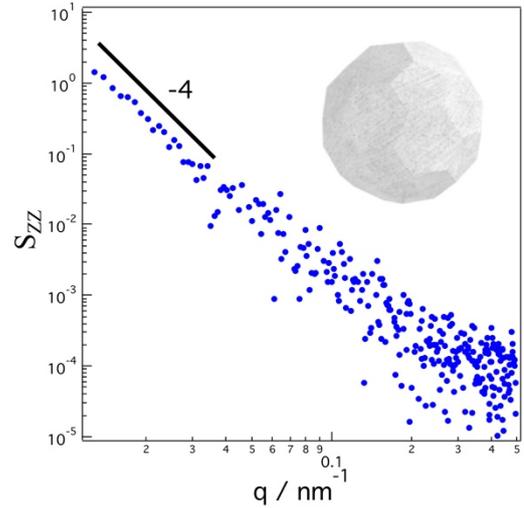


Fig.5 Log-Log plot of $S_{ZZ}(q)$

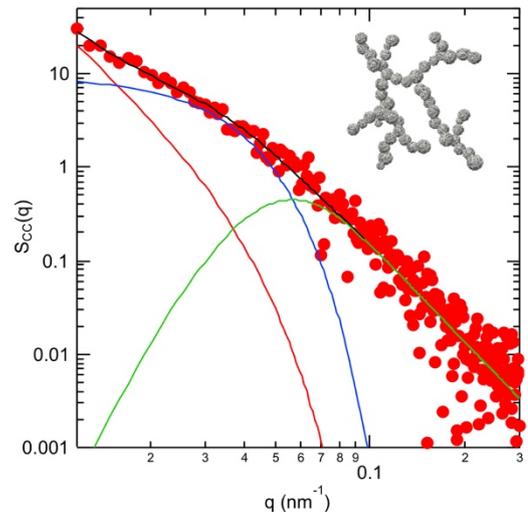


Fig.6 Log-Log plot of $S_{CC}(q)$

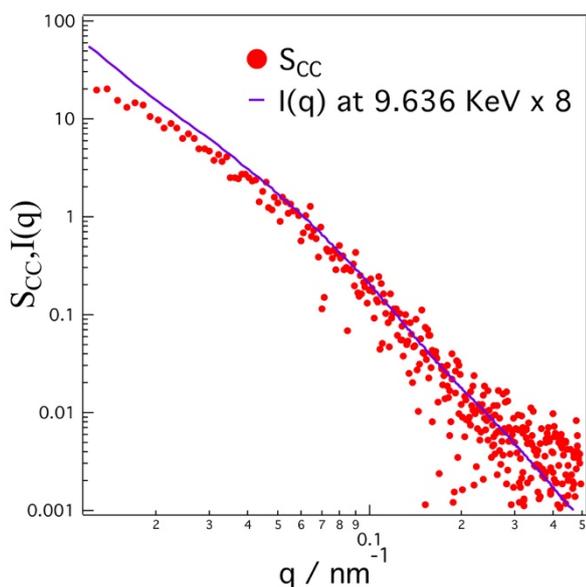


Fig.7 Log-Log plot of $S_{cc}(q)$ and $I(q)$

の慣性半径を求めるために次式のUnified-Guinier power-law approach⁸⁾を用いて解析を行った。

$$I(q) = A \cdot \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) q^{-Dm} + B \cdot \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) + C \cdot \left[\operatorname{erf}\left(\frac{q R_g}{\sqrt{6}}\right)\right]^{3(6-p)} q^{-(6-p)} \quad (8)$$

ここで、 R_g , Dm , p はそれぞれ、凝集体の回転半径、凝集体のネットワークのマスフラクタル次元、凝集体の表面フラクタル次元を表している。図中の黒線がfitting結果であり、fittingより凝集体の回転半径45nm、 $Dm = 2.3$ 、 $p=3.8$ が求められた。

4. まとめ

硫黄とZnOで加硫したポリスチレンブタジエンゴム/CB系におけるCBの階層構造をZn吸収端近傍での異常小角X線散乱法を用いて明らかにすることを試みた。求められたZnの散乱関数 $S_{zz}(q)$ には100nm以上の大きさのZnOの粒子の表面を反映したPorod則の q^{-4} 依存性が観測された。CBの散乱関数 $S_{cc}(q)$ は、凝集体がネットワークを形成した構造を反映しており、凝集体の回転半径、凝集体のネットワークのマスフラクタル次元、凝集体の表面フラクタル次元を求めることができた。 $S_{cc}(q)$ を $I(q)$ と比較した結果、小角側でのズレが明確に見出されており、ASSAXS法によって分離して解析をしないとCBの構造関数は正確に求められないことがわかった。

謝辞

本研究の一部はフロンティアソフトウェア開発専用ビームライン (FSBL) 産学連合体において行われた。(課題番

号: 2019A7215, 2019B7264, 2020A7213)。

参考文献

- 1) Koga T., Hashimoto T., Mikihiro T., Kazuya A., Amino N., Nakamura M., Yamaguchi D., Koizumi S., *Macromolecules*. 2008. 41, 453-464.
- 2) McGlasson A., Rishi K., Beaucage G., Chauby M., Kuppa V., Ilavsky J., Raclaitis M., *Macromolecules*. 2020. 53, 2235-2248.
- 3) Rishi K., Beaucage G., Kuppa V., Mulderig A., Narayanan V., McGlasson A., Rackaitis M., Ilavsky J., *Macromolecules*. 2018, 51, 7893-7904.
- 4) Shinohara Y., Kishimoto H., Inoue K., Suzuki Y., Takeuchi A., Uesugi K., Yagi N., Muraoka K., Mizoguchi T., Amemiya Y., *J. Appl. Crystallogr.* 2007. 40, s397-s401.
- 5) Nishitsuji S., Mikihiro T., Amino N., Ishikawa Y., *Elastomers and Composites*. 2019. 54-2, 156-160.
- 6) Noda Y., Koizumi S., Masui T., Mahita Ryo., Kishimoto H., Yamaguchi D., Kumada T., Takata S., Ohishi K., Suzuki J., *J. Appl. Crystallogr.* 2016. 49, 2036-2045.
- 7) Takenaka M., Nishitsuji S., Amino N., Ishikawa Y., Yamaguchi D., Koizumi S., *Macromolecules*. 2009. 42, 308-311.
- 8) Koga T., Takenaka M., Aizawa K., Nakamura M., Hashimoto T., *Langmuir*. 2005. 21, 11409-11413.
- 9) Baeza P. G., Genix C. A., Degrandcourt C., Petitjean L., Gummel J., Couty M., Oberdisse J., *Macromolecules*. 2013. 46, 317-329.
- 10) Yamaguchi D., Yuasa T., Sone T., Tominaga T., Noda Y., Koizumi S., Takeji H., *Macromolecules*. 2017. 50, 7739-7759.
- 11) Staropoli M., Gerstner D., Radulescu A., Sztucki M., Duez B., Westermann S., Lenoble D., *Polymers*. 2020. 12, 502.
- 12) Morfin I., Ehrburger-Dolle F., Grillo I., Livet F., Bley F., *Synchrotron Radiation*. 2006. 13, 445-452.

生体膜を基盤とする高分子ナノハイブリッドの創製とバイオ応用

Polymer Nanohybrids Based on Biomembranes and Their Potential Bioapplications

秋吉一成、水田涼介、澤田晋一、佐々木善浩

Kazunari AKIYOSHI, Ryosuke MIZUTA, Shinichi SAWADA, Yoshihiro SASAKI

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

In this research, we will present a new concept of intelligent materials by hybridizing biomolecule, especially biomembranes, with inorganic materials that have unique properties not found in organic materials, such as ferromagnetic, semiconducting, and mechanically responsive properties. Biomembranes, which can change their morphology and functions dynamically in response to changes in the external environment, can be regarded as the ultimate "smart molecular system" in nature. In this paper, based on the biomembranes, we investigate the functionalization of liposomes and exosomes as artificial cell membranes, hybridization with inorganic materials and polymers, control of membrane morphology, and complexation with membrane proteins.

1. はじめに

細胞や多くの細胞内小器官は、外界と内界を隔てる機能的な界面としての生体膜に取り囲まれている。この膜は主に、自己組織化した脂質、膜タンパク質、多糖類などの生体高分子から構成されている。また、生体膜は様々な環境刺激に応答し、情報処理、輸送、物質・エネルギー変換などの高度な機能を担っている。例えば、細胞間のシグナル伝達、光合成によるエネルギー生産、イオンチャネルによる物質輸送などは、すべてこの生体膜上で行われている現象である。このように、生体膜はナノスケールで機能を厳密に制御するためには極めてすぐれた分子システムとみなすことができる。

一方、光、熱、磁場、電場、音波など、多彩な環境刺激に応答する材料開発も近年盛んである。また、この材料のバイオメディカル分野などへの応用展開が特に期待されている。その際に、有機物をしのご環境応答性をもつ無機物の特性を組み込むことは、インテリジェント材料を構築する上で有用なアプローチとなる。

例えば、アップコンバージョン材料、半導体微粒子、磁

性粒子、など、多くの材料が用いられてきた。しかしながら、多くは無機物による高強度化、発光、磁気誘導などの機能化のみにとどまっている。これまで行われてきたような、単なる構造、機能のハイブリッド化にとどまらず、無機材料による生体分子や細胞の新しい機能開拓に踏み込んだ研究例は極めて少ないのが現状である。

本稿では、自己組織化と合理的分子設計の原理に基づいて、生体膜と合成材料をハイブリッド化し、スマートな分子システム (Fig. 1) の構築を行なった結果についてのべる。

2. 人工細胞膜ハイブリッド

天然に存在する膜は、単離、精製、安定性などが困難であるため、薬学、医学、工学などの分野における生体材料として必ずしも適しているとはいえないのが現状である。このような背景のもと、筆者らは、人工細胞膜を構築するためのさまざまな両親媒性化合物を設計、合成してきた。例えば、無機化合物と脂質をハイブリッド化することにより、膜の安定性を向上させることができることを見出し

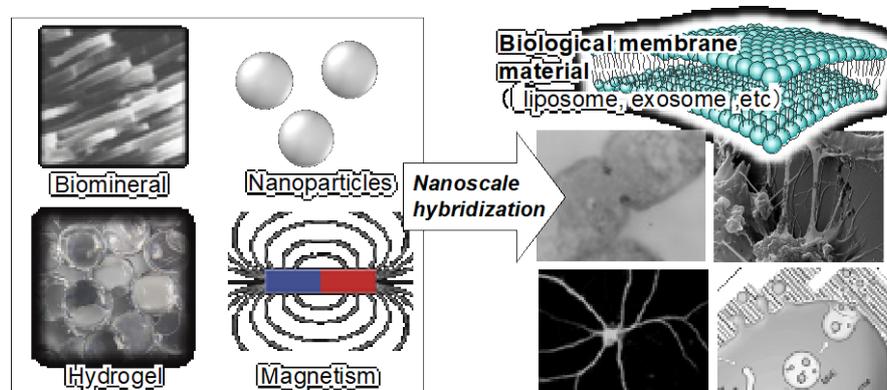


Fig. 1 Design concept of intelligent hybrid materials based on biomembranes for bioapplications.

た。具体的には、シリカコロイド粒子と同様の表面を持ちながら、細胞膜と同様の二分子構造と内水相を持つ有機-無機複合体を作製した。また、人工細胞膜の革新的な安定化戦略を利用した新しい遺伝子導入法も開発している[1]。類似の手法により、リポソームを無機ナノ粒子や他の無機材料で機能化し、ドラッグデリバリーシステムや他のアプリケーションに応用する研究も広く行われている[2,3]。

また、生体膜を安定化する手法として、我々は、リポソームと疎水性多糖類ナノゲルからなるナノゲル-リポソームハイブリッドを構築した[4,5]。この系では、ナノゲルが疎水性相互作用により、リポソーム表面に吸着することで安定にリポソームを被覆している[6]。さらに、リポソーム表面に吸着したナノゲルを架橋することにより、リポソームハイブリッドマクロゲルを調製することもできる[6]。このハイブリッドゲルは、ナノゲルとリポソームの2段階の徐放性を示し、再生医療において薬剤やサイトカインを順次放出するための足場として利用できる。最近、このようなリポソーム-ゲル複合体を薬物の放出制御、創傷治癒、およびインジェクタブルゲルとして応用する研究が行われており[7,8]、我々のナノゲル-リポソーム系もそのような医療応用が期待できる。

近年、ナノスケールのリポソーム状の集合体、すなわち

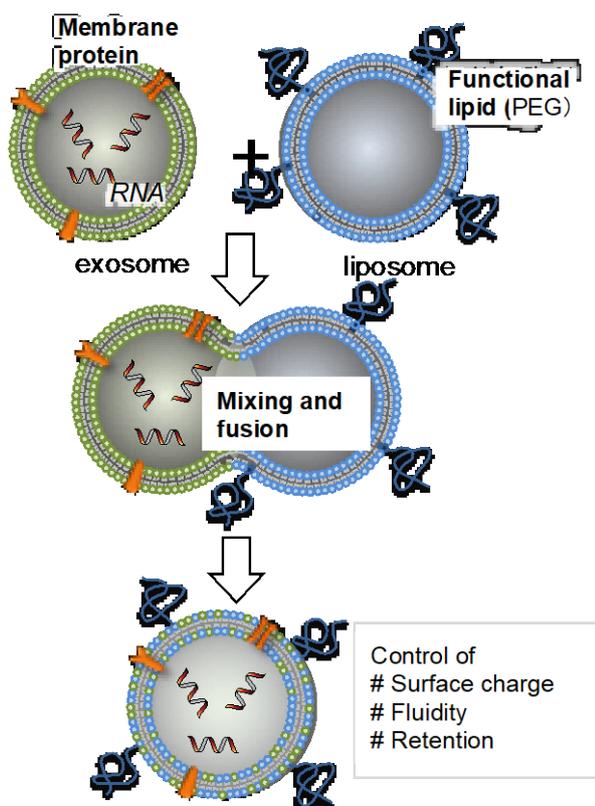


Fig. 2 Schematic diagram of membrane fusion between artificial cell membrane (liposome) and exosome.

細胞外微粒子が生体内で重要な機能を持つことが注目されている[9]。生体内の多くの細胞は、この細胞外微粒子の一種のエクソソームを分泌し、比較的長い距離の細胞間コミュニケーションを行っている。このエクソソームに内包される核酸やタンパク質は、細胞の増殖や分化など様々な機能の調節に関連している。このエクソソームは薬物輸送担体として有用であるが効率的に薬物を導入することが極めて困難であり、その手法の確率が望まれている。この問題に対し、我々は、エクソソームと人工細胞膜を融合することで薬物を導入する新しい手法を開発した。具体的には、リポソームとマウスマクロファージ様細胞由来のエクソソームを混合し、凍結融解サイクルを行うことで両者を融合できることを見出した (Fig. 2) [10]。この方法は、宿主細胞の遺伝子改変を行わずに、極めて簡便にエクソソーム内に物質を内包させる有効な手法である。また、最近ではゲルとエクソソームのハイブリッド化により、エクソソーム放出を調節する再生医療への応用なども多く研究されている[11]。

再生医療やドラッグデリバリーなど、エクソソームの高度医療応用のためには、標的細胞や組織への送達効率をさらに向上させる技術開発が必要である。そこで我々は、エクソソームを効率的に細胞内に送達する多糖類ベースの磁性ナノキャリアを開発した。磁場は非侵襲的であり、外部からの標的薬物送達に非常に有効である。先述のようにエクソソームはバイオ医薬品として注目されているが、一般にエクソソームの活性や機能を保持したまま効率的に細胞内に導入することは困難である。我々はこれまでに、タンパク質との複合化と磁気誘導能を併せ持つ酸化鉄ナノ粒子と、コレステリル置換プルランナノゲルを混合し、タンパク質を効率的に細胞内に導入することに成功してきた[12]。さらに、このナノゲルは、そのコレステリル基を介して人工細胞膜と安定な複合体を形成することも明らかにした (Fig. 3) [6, 13]。具体的には、ナノゲルから部分的に解離した疎水性のコレステリル基が脂質膜に接近すると、ナノゲルの構造を保ったまま脂質膜にコレステリル基を挿入し、疎水性相互作用を介した複合体を形成する。この二つの原理、すなわち磁気微粒子に細胞内導入とナノゲルと生体膜の複合化、を利用した。具体的には、磁性ナノゲルとエクソソームとを複合化し、磁場を照射することでエクソソームを非常に効率よく細胞内に導入することができた。またこのようにして細胞内に導入したエクソソームは、分化誘導などの機能を示すこともわかった (Fig. 3) [14]。このエクソソーム導入法は、機能未知のエクソソームの微量分析、およびエクソソームに含まれるmiRNAなどによる細胞機能制御のための新規技術として有用である。また、近年、磁気微粒子のみならず、金ナノ粒子や量子ドットをエクソソームとハイブリッド化し、セラノスティクス、光熱療法、イメージングなどの先端医療

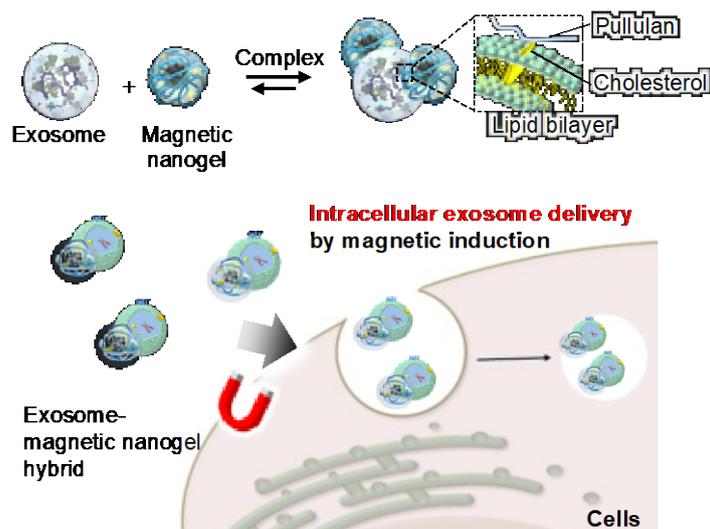


Fig. 3 Nanohybrids of exosomes and magnetic nanogels for intracellular delivery of exosomes by magnetic fields.

への応用が研究されており[15,16]、これら無機微粒子とナノゲルとの複合化についても現在検討を行っている。

3. 膜の動的構造制御

生体系では、細胞膜を支える細胞骨格などの構造を巧みに変化させることで、最安定な平衡状態ではなく速度論的に準安定状態にある脂質膜構造を動的に制御し、その多彩な膜構造を利用した機能化を行っている。このようなシステムを用いることで、生体は膜の形態形成を効率的に誘導・制御し、細胞間コミュニケーションなどの高度な細胞機能を可能にしている。先に述べたように、生きている細胞は、マイクロベシクル、アポトーシスベシクル、エクソソームなどの細胞外小胞を分泌し、タンパク質や核酸を他の細胞へ輸送しており、これは膜の形態変化が細胞間コミュニケーションに関与している一例といえる[9]。

またごく最近、細胞が極めて細いチューブにより互いに直接連結されていることが見出されている。この細いチューブはトンネル型ナノチューブと呼ばれ、この脂質ナノチューブによって細胞は互いに連結され、細胞質間の直接物質交換を行っている[17]。また、これらの脂質ナノチューブは、免疫細胞や神経細胞など様々な細胞系において、輸送やシグナル伝達に関与していることもと明らかになってきている。近年、このトンネル型脂質ナノチューブ膜の形態に関与する因子を同定・分離し、モデルシステムにおいてメカニズムを解明する試みが盛んである[18]。しかしながら、この種の膜形態を人工的に制御することは未だ困難であるが、いくつかの先駆的な研究がみられる。この膜の形態制御には大きく分けて、機械的な操作を直接行うものと、外部刺激を与えるものに分けられる。以下のその最近の例について簡単に述べる。脂質ナノチューブは、内膜

と外膜の間の浸透圧差の結果として形成される[19]。水性二相系を内包する脂質ベシクルを高浸透圧の溶液中に置くと、膜の形態が変化し、チューブが自然に形成されることがある[20]。また、機械的な外力を加えることによっても、脂質ナノチューブが形成される。Orwarらは、リポソームの脂質膜をマイクロマニピュレーターでドラッグすることにより、脂質ナノチューブの伸張とネットワーク化を先駆的に行っている[21]。また、自然の分子モーターで脂質膜を引きずることによってもナノチューブが形成さ

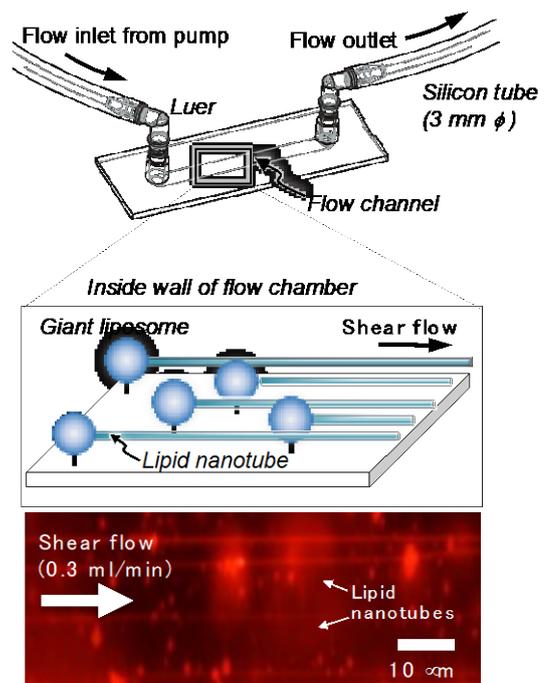


Fig. 3 Lipid nanotube formation by applying shear flow to immobilized liposomes..

れる[22]。リポソーム内での微小管の重合によるナノチューブ形成も報告されている[23]。また、マイクロ流体チャンネルを用いたトップダウン方式によるチャンネルやチューブの形成[24]、ペプチドからなる針状単結晶を鋳型とした形成[25]などもある。ごく最近では、固体基板上的ナノチューブを介したリポソーム形成のメカニズムが提案されており、プロトセル（原始細胞）との関連から興味を持たれている[26]。物理的な外部刺激としては、基板上に固定化したリポソームに電場[27]やせん断応力[28]を加えることにより、比較的容易に配向制御した脂質ナノチューブを作製することができる。

我々は、外部電場による荷電ナノ粒子の電気泳動を通じて、脂質ナノチューブを延伸する方法を開発した (Fig. 4) [29]。またごく最近、カチオン性ポリマーを介して2次元脂質ナノシートを形成した例が報告されている[30]。我々もある種の両親媒性高分子を脂質膜に添加することで、脂質ナノチューブへの形態変化を効率的に誘起できることを見出している。このような合成高分子による膜の形態制御は、細胞膜が関与する多くの生命現象の制御、解明との関連からも極めて興味深いものと考えられる。

6. 最後に

生体膜とのハイブリッド化による賢い分子システムの創成について、異種の分子もしくは分子システムとのハイブリッドによる機能化、その形態を制御する「膜モルフォジェネシス」、さらに機能性素子としての膜タンパク質とのハイブリッド化について、筆者らの研究例を交えて述べた。今後、バイオ機能素子としての「人工細胞」が具現化し、次世代ナノバイオデバイスへ応用展開されることが期待される。

参考文献

- 1) Sasaki Y, Matsui K, Aoyama Y, Kikuchi J. Cerasome as an infusible and cell-friendly gene carrier: synthesis of cerasome-forming lipids and transfection using cerasome. *Nat Protoc.* 2006;1:1227–34.
- 2) Vargas K, Shon Y. Hybrid lipid–nanoparticle complexes for biomedical applications. *J Mater Chem B.* 2019;7:695–708.
- 3) Mohammadi M, Taghavi S, Abnos K, Taghdisi SM, Ramezani M, Alibolandi M. Hybrid vesicular drug delivery systems for cancer therapeutics. *Adv Funct Mater.* 2018;28:1802136.
- 4) Sasaki Y, Akiyoshi K. Nanogel engineering for new nanobiomaterials: from chaperoning engineering to biomedical applications. *Chem Rec.* 2010;10:366–76.
- 5) Sasaki Y, Akiyoshi K. Self-assembled nanogel engineering for advanced biomedical technology. *Chem Lett.* 2012;41:202–8.
- 6) Sekine Y, Moritani Y, Ikeda-Fukazawa T, Sasaki Y, Akiyoshi K. A hybrid hydrogel biomaterial by nanogel engineering: bottom-up design with nanogel and liposome building blocks to develop a multidrug delivery system. *Adv Healthcare Mater.* 2012;1:722–8.
- 7) Ternullo S, Werning L, Holsater A, Basnet N. Curcumin-in-deformable liposomes-in-chitosan-hydrogel as a novel wound dressing. *Pharmaceutics.* 2020;12:8.
- 8) Xu S, An X. Preparation, microstructure and function for injectable liposome-hydrogels. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2019;560:20–5.
- 9) Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science.* 2020;367: <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>.
- 10) Sato K, Umezaki K, Sawada S, Mukai S, Sasaki Y, Harada N, et al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Sci Rep.* 2016;6:21933.
- 11) Akbari A, Jabbari N, Sharifi R, Ahmadi M, Vahhabi A, Seyedzadeh SJ, et al. Free and hydrogel encapsulated exosome-based therapies in regenerative medicine. *Life Sci.* 2020;249:117447.
- 12) Kawasaki R, Sasaki Y, Katagiri K, Mukai SA, Sawada S, Akiyoshi K. Magnetically guided protein transduction by hybrid nanogel chaperones with iron oxide nanoparticles. *Angew Chem Int Ed.* 2016;55:11377–81.
- 13) Ueda T, Lee SJ, Nakatani Y, Ourisson G, Sunamoto J. Coating of POPC giant liposomes with hydrophobized polysaccharide. *Chem Lett.* 1998;5:417–418.
- 14) Mizuta R, Sasaki Y, Kawasaki R, Katagiri K, Sawada S, Mukai SA, et al. Magnetically navigated intracellular delivery of extracellular vesicles using amphiphilic nanogels. *Bioconj Chem.* 2019;30:2150–5.
- 15) Sancho-Albero M, Encabo-Berzosa MDM, Beltrán-Visiedo M, Fernández-Messina L, Sebastián V, Sánchez-Madrid F, et al. Efficient encapsulation of theranostic nanoparticles in cell-derived exosomes: leveraging the exosomal biogenesis pathway to obtain hollow gold nanoparticle-hybrids. *Nanoscale.* 2019;11:18825–36.
- 16) Cao Y, Wu T, Zhang K, Meng X, Dai W, Wang D, et al. Engineered exosome-mediated near-infrared-II region V2C quantum dot delivery for nucleus-target low-temperature photothermal therapy. *ACS Nano.* 2019;13:1499–510.

- 17) Hurtig J, Chiu DT, Onfelt B. Intercellular nanotubes: insights from imaging studies and beyond. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2010;2:260–76.
- 18) Jorsh IK, Daste F, Gallop JL. Membrane curvature in cell biology: an integration of molecular mechanisms. J Cell Biol. 2016;214:375–87.
- 19) Nomura F, Honda M, Takeda S, Inaba T, Takiguchi K, Itoh TJ, et al. Morphological and topological transformation of membrane vesicles. J Biol Phys. 2002;28:225–35.
- 20) Dimova R, Lipowsky R. Giant vesicles exposed to aqueous two-phase systems: membrane wetting, budding processes, and spontaneous tubulation. Adv Mater Interfaces. 2017;4:16600451
- 21) Karlsson A, Karlsson R, Karlsson M, Cans AS, Strömberg A, Ryttsén F, et al. Networks of nanotubes and containers. Nature. 2001;490:150–2.
- 22) Gerbrand K, Martijn V, Bas H, Marileen D. Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. Proc Natl Acad Sci. 2003;100:15583–8.
- 23) Hayashi M, Nishiyama M, Kazayama Y, Toyota T, Harada Y, Takiguchi K. Reversible morphological control of tubulin-encapsulating giant liposomes by hydrostatic pressure. Langmuir. 2016;32:3794–802.
- 24) Brazhnik KP, Vreeland WN, Hutchison JB, Kishore R, Wells J, Helmerson K, et al. Directed growth of pure phosphatidylcholine nanotubes in microfluidic channels. Langmuir. 2005;21:10814–7.
- 25) Fu M, Li Q, Sun B, Yang Y, Dai L, Nylander T, et al. Disassembly of dipeptide single crystals can transform the lipid membrane into a network. ACS Nano. 2017;11:7349–54.
- 26) Koksál ES, Liese S, Kantarci I, Olsson R, Carlson A, Gozen I. Nanotube-mediated path to protocell formation. ACS Nano. 2019;13:6867–78.
- 27) Castillo JA, Narciso DM, Hayes MA. Bionanotubule formation from surface-attached liposomes using electric field. Langmuir. 2009;25:391–6.
- 28) Sekine Y, Abe K, Shimizu Z, Sasaki Y, Sawada S, Akiyoshi K. Shear flow-induced nanotubulation of surface-immobilized liposomes. RSC Adv. 2012;2:2682–4.
- 29) Sasaki Y, Akiyoshi K. PCT Int. Appl. JP2011, 06933.
- 30) Shimada N, Kinoshita H, Umegae T, Azumai S, Kume N, Ochiai T, et al. Cationic copolymer-chaperoned 2D–3D reversible conversion of lipid membranes. Adv Mater. 2019;31:1904032.

オルガノイドを用いたコロナウイルス感染モデル

Olfactory epithelium organoids as model for SARS-CoV2 infection

永樂 元次

Mototsugu EIRAKU

Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University

Since the first report on the technology for forming cerebral cortical tissue in culture dishes from mouse and human embryonic stem cells (ES cells) (Eiraku et al., 2008), competition for the development of neural organoids technology has spread worldwide. At present, neural organoids are used in a wide range of research fields, including regenerative medicine, pathological models, applications of drug discovery platforms, and those that show usefulness as evolutionary and developmental biological models of human brain formation, and many reports have been made. Neural organoids are often formed from pluripotent stem cells (ES / iPS cells). Multicellular phenomena such as nerve induction, neuroepithelium formation, neural pattern formation, neurogenesis, tissue morphogenesis, and layer structure formation are recapitulated in a culture dish. Here, I introduce the process of mammalian neural development and the principle of formation of neuronal organoids, and introduce our recent achievement, olfactory organoid formation technology.

1. はじめに

マウスおよびヒト胚性幹細胞 (ES細胞) から培養ディッシュ内で大脳皮質組織を形成する技術について初めて報告されて以降 (Eiraku et al., 2008)、神経オルガノイド研究は世界的に広がり、現在では再生医療の移植用途や病態モデル、創薬プラットフォームなどの応用を目指したものから、ヒト脳形成の進化発生生物学的モデルとしての有用性を示すものまで、幅広い研究分野で受け入れられ多くの報告がなされている。神経オルガノイドは多くの場合、多能性幹細胞 (ES/iPS細胞) をソースとして使用し、神経誘導、神経上皮形成、パターン形成、神経産生、組織形態形成、層構造形成などの多細胞現象を培養ディッシュ内で再現する。以前から、神経幹細胞は1細胞からニューロスフェアと呼ばれる神経細胞塊を形成することは知られていたが、ニューロスフェアでは層構造形成や組織形態形成などの生体の神経発生過程において観察される複雑な多細胞現象を再現することはできない。この点は、腸管オルガノイドなどの体性幹細胞をソースとし1細胞からオルガノイド形成が可能な実験系とは異なる。本講演では、哺乳類の神経発生過程と神経オルガノイドの形成原理を概説し、われわれの最近の成果である中枢時計の機能を有するオルガノイド形成技術について紹介したい。

2. 神経オルガノイド 誘導の技術的背景

神経オルガノイドは、神経発生過程を再現することで誘導される。以下に、神経発生の3つのステップに分けて説明する。

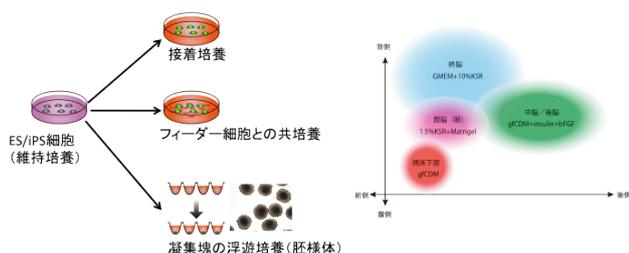
1) 神経誘導過程

多能性幹細胞の培養系において、神経外胚葉は上述した「神経誘導のデフォルトモデル」に従い、Wntシグナル、BMPシグナルおよびNodalシグナルなどの後方の中内胚葉組織を誘導するために働く各種シグナルを抑制することによって誘導される。また、このような多能性幹細胞からの神経細胞への自発的な分化は、培養液に血清やBMPを加えることによって抑制されることが知られている。これらの実験結果は多能性幹細胞の培養系においても、神経外胚葉が分化の“デフォルト”であることを示唆している。無血清培地で多能性幹細胞を培養することによって効率よく神経細胞へと分化誘導することが可能になるが、この場合大きく分けて二通りの手法が広く用いられている。一つはES細胞あるいはES細胞から分化させた胚様体をトリプシンなどで分散し接着培養する方法、もう一つは胚様体を作製し浮遊培養を行う方法である。神経オルガノイドは主に後者の手法を用いて行う。前者の特徴として培養の簡便さや再現性の良さなどが挙げられるが、後者で得られるような三次元組織の形成を再現することはできない。また、モルフォゲン濃度勾配のような三次元組織特有の発生現象をin vitroで再現することは後者でのみ可能である。

2) パターン形成過程

上述したように、脊椎動物の胚発生において神経上皮組織は前後軸、あるいは背腹軸に沿って異なった特徴を持った神経細胞へと分化する。我々は既知の知見をもとに、特定の種類の神経細胞を *in vitro* で誘導する試みを行ってきた。その試みの中で、KSR (knockout serum) を含む無血清培地で ES 細胞を浮遊培養すると、終脳 (telencephalon) を含む前脳 (forebrain) の特徴を持った神経細胞が誘導されてくることがわかった。また、血清に加えてインシュリンも含まない培地 (CDMI) で ES 細胞を浮遊培養すると、間脳前部とくに視床下部の神経細胞が効率よく誘導された。こういった実験事実は、Wnt や FGF などの特定の位置情報シグナルを含まない環境においては、神経管のより前方の特徴を有した神経組織が優先的に分化誘導されることを示唆している。実際、初期の培養条件に後方化シグナル因子として知られる Wnt や FGF あるいはレチノイン酸を加えると、小脳を含む後脳領域や脊髄などのより後方の神経組織を効率よく誘導することが出来る。このように、目的の神経オルガノイドを誘導するためには、適切な基本培地を選定し、適切なタイミングで外部から増殖因子等の刺激を導入することが重要である (図2)。

また、これまでの研究により、神経上皮組織は自己組織的にパターン形成を行うことがわかってきた。我々が開発してきたSFEBq法 (Serum-free culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation) を開発した (Eiraku et al., 2008) ではES/iPS細胞を低吸着性のウェルを用いて素早く再凝集させ無血清培地で浮遊培養する。SFEBq法を用いる利点として、同じサイズのES細胞塊を大量に作成できること、また高い再現性を持って効率よく神経上皮組織へと分化させることが挙げられる。SFEBq法では培地の組成によって大脳や小脳、網膜といった脳の様々な領域を誘導する事が出来るが、特定の領域の神経組織を100%の効率で誘導できる訳ではない。多くは複数の領



域の混じった神経オルガノイドとして誘導される。例えば、CDM (Chemically Defined Medium) と呼ばれる培地を用いて神経誘導を行なった場合、ES細胞はSix3を発現する前脳領域とIrx3を発現する中脳領域の2つの領域に相互排他的に分割された神経オルガノイドを形成する (Wataya et al., 2008, Takata et al., 2017)。このような自発的なパターン形成は、初期の分化誘導ステージにおいて、FGFシグナル活性の異方性がまず生じ、そのことが引き金となってSix3の局所的な発現およびWntシグナルのパターン形成を誘導することがわかっている。SFEBq法では外部環境は均一であり、比較的均一なES細胞からなる多細胞体から、細胞間相互作用によってのみ一連の複雑な現象が自己組織的に起こることは非常に興味深い。しかしながら、FGFシグナルの極性を自己組織的に誘導する分子機構について不明である。また、Oct4とSix3の相互排他的な発現は初期のマウス胚においても確認されたことから、個体発生過程でも今回明らかになった組織自律的な前後軸形成機構が働いている可能性が考えられる。

3. 嗅上皮オルガノイドの形成

上記の様にこれまでに様々な脳オルガノイド形成手法が開発されてきたが、同時に神経と同じく外胚葉由来組織である感覚器官オルガノイドの研究も進められてきた。球殻組織や内耳、レンズなどの感覚器官はプラコードと呼ばれる共通の外胚葉由来組織から発生する。多能性幹細胞からプラコード組織を誘導する手法はこれまでも報告されているが、嗅上皮組織の発生を模倣する技術はまだ開発されていなかった。今回、我々は嗅上皮および鼻腔呼吸上皮を含む鼻腔オルガノイドをヒト多能性幹細胞から誘導する方法論を新たに確立した。

鼻腔上皮は嗅プラコードに由来する。ヒトES細胞から嗅プラコードを誘導するために、非神経外胚葉の分化に関与するBMPシグナルおよびプラコードの前後軸パターンに関与するFGF/WNTシグナルに注目して培養条件の検討を行った。その結果、嗅プラコードのマーカー分子であるSIX1およびSOX2を発現する培養条件を見つけた。免疫染色および定量PCRによる各遺伝子発現を調べた結果、この培養条件でES細胞を誘導すると、主に嗅上皮、鼻腔呼吸上皮および

終脳組織の三種類の組織を含んだ多細胞体が構築されることがわかった。次に、1細胞RNA-seqにより嗅オルガノイドに含まれる約10000細胞のトランスクリプトームを取得した。既報のヒトの鼻腔上皮から採取したバイオブシーサンプルの1細胞RNA-seqデータとの比較解析の結果、嗅上皮に含まれるほとんどの細胞がヒトES細胞から誘導した嗅オルガノイドに存在することが明らかになった。

4. 嗅上皮オルガノイドを用いたSARS-CoV2の感染動態解析

ヒト細胞から誘導した培養28日の嗅オルガノイドを用いてSARS-CoV2の感染実験を行った。ウイルス増殖試験の結果、嗅オルガノイドでは感染二日後に増殖ピークを迎えたのち増殖スピードは下降するが、感染7日以降に再び増殖し始め、2ヶ月以上もウイルス産生が持続することが明らかになった。これはインフルエンザウイルスが7日でウイルス産生を停止するのと対照的であった。感染サンプルの1細胞RNA-seq解析の結果、ヒト鼻腔上皮ではまず鼻腔呼吸上皮がSARS-CoV2の初期の感染ターゲットとなり、感染2日目に感染が嗅上皮組織へと拡大していることが明らかになった。また、嗅上皮ではSARS-CoV2は嗅神経細胞の前駆細胞に感染しており、その細胞死を誘導していることがわかった。COVID19の患者では長期にわたる嗅覚異常が頻繁に起こることが報告されており、今回の実験結果はこの様なSARS-CoV2による嗅覚異常の発生機構に対して新たな重要な知見を与えた。今後はさらなる感染機構の解析とオルガノイドを用いた創薬スクリーニングのためのプラットフォーム構築が期待される。

Acampora D. et al., *Development* 121, 3279, 1995

Zakin L. et al., *PNAS* 19, 14388, 2000

Eiraku et al., *Cell Stem Cell* 3, 519, 2008

Wataya et al., *PNAS* 105, 11796, 2008

Takata et al., *Nature Commu* 8, 1339, 2017

Eiraku et al., *Nature* 472, 51, 2011

Hasegawa et al., *Development*, 143, 3895, 2016

謝辞

本講演会の講師各位ならびに本講演会を含む当財団諸事業にご支援をいただいている維持会員各社に厚くお礼申し上げます。

公益財団法人 日本化学繊維研究所

理事長 福田 猛

維持会員

旭化成（株）

帝人（株）

東洋紡（株）

東レ（株）

松本油脂製薬（株）

三菱ケミカル（株）

ユニチカ（株）