

ISBN 0368-6280

公益財団法人
日本化学繊維研究所

講 演 集

第 77 集

2020 年 3 月

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu
Vol.77
(Annual Report of the Research Institute for
Chemical Fibers, Japan: Vol.77)
March 2020

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77集)

(第77回講演会：令和元年11月12日 京都大学桂キャンパス・桂ホール)

特別講演

スマートファイバー、スマートテキスタイル研究について 東レ株式会社 繊維研究所 所長 荒西 義高	… 4
1. 反復凍結解凍法で作製したポリビニルアルコールゲルのクリープ挙動 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 ○瀧川敏算、堀中順一、矢尾晃一	… 19
2. 水中のプラスチック微粒子識別のための蛍光プローブ開発 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	… 21
3. 側鎖元素置換による従来合成が困難であった高分子の合成 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○大内誠、西川剛	… 25
4. ポリマーブラシ付与複合微粒子の混晶形成 京都大学化学研究所 辻井敬亘、○大野工司、大野晴久、久富達也	… 30
5. 水溶性高分子の水和と相挙動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、小島広之	… 34
6. ナノゲルワクチンによるがん治療 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○秋吉一成、三浦理紗子、澤田晋一、佐々木善浩	… 40
7. 結晶性高分子太陽電池における開放電圧 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻 ○大北英生、玉井康成、山崎浩志、部谷拓斗	… 44
8. 時分割 GISAXS 法によるブロックコポリマー薄膜の自己組織化過程の解明 京都大学化学研究所 ○竹中幹人、重栖拓也、小川 紘樹	… 49
9. 楕形環状高分子の Θ 溶媒中における広がり 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、月見亮介、高野敦志 辻陽介、松下裕秀	… 53
10. ラジカルペアの拡散および停止反応における粘度効果 京都大学化学研究所 ○山子茂、Li Xiaopei、中村泰之	… 57
11. 細胞機能の可視化を目指した細胞内核酸検出プローブの細胞内送達技術の開発 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 田畑泰彦、村田勇樹、○城潤一郎	… 62
12. 幹細胞からのオルガノイド形成 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 ○永樂 元次	… 67
謝辞	… 71



日本化学繊維研究所 第77回講演会

スマートファイバー、スマートテキスタイル 研究について

2019年11月12日

東レ株式会社 繊維研究所
所長 荒西 義高

目次

1. 東レの概要

2. スマートファイバー研究

3. スマートテキスタイル研究

4. さいごに

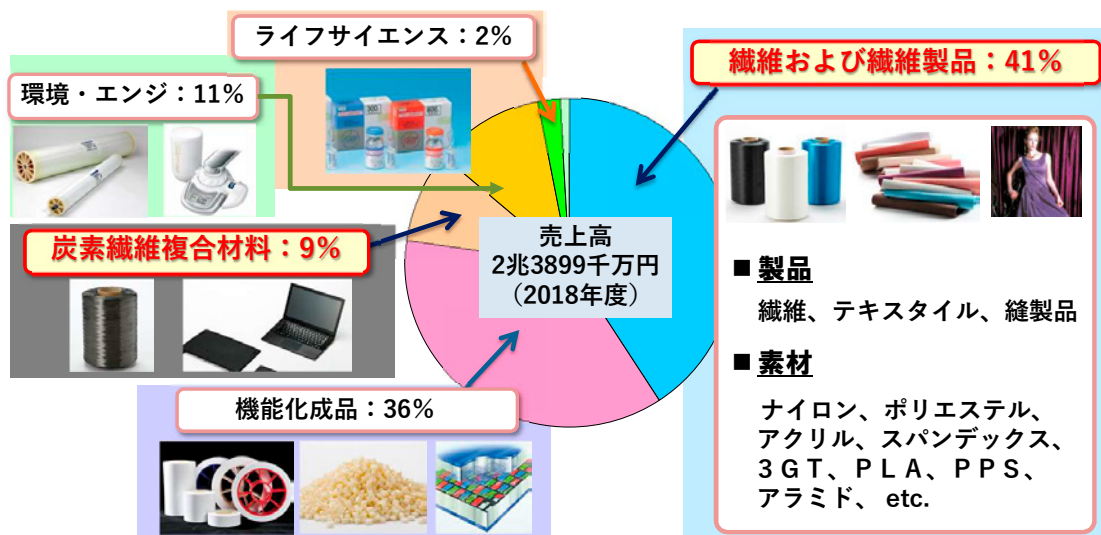
東レの概要

設立 1926（大正15）年

社長 日覺 昭廣

従業員 48,320人

関係会社 275社（26か国）



Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

3

TORAY

東レの素材紹介

◆事例1 ユニクロとの戦略的パートナーシップ



《ヒートテック》

服の持つ機能性を前面に押し出し、
2017年度に累計10億枚達成。

東レとユニクロが共同開発。保有
する繊維技術を結集し、発熱・保
温・吸水速乾などの機能を実現。

世の中に新しい価値を生み出す

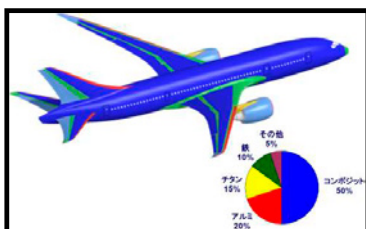
Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

4

TORAY

東レの素材紹介

◆事例2 航空機の構造材料を開発



《ボーイング787》

燃費性能が同クラス比20%改善。
日本—欧州、米国東海岸等の長距離
路線での運航が可能となった。

鉄の10倍強く重さは1/4という炭素
繊維を機体重量の50%以上に使用。
低燃費化、快適性向上を実現。

極限追求で得た優れた物性の新素材を活用

Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

5

TORAY

東レの素材紹介

◆事例3 海水を飲料水にかえる水処理膜



《RO膜（逆浸透膜）》

地球上に存在する99.99%の水は、
飲料水には使えない。水資源の不足
は、地球規模の問題となっている。

塩分等を分離する水処理膜を開発。
現在までの出荷量は、水量に換算
すると1億人分の生活用水に当たる。

地球規模の問題へソリューションを提供する

Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

6

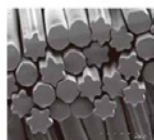
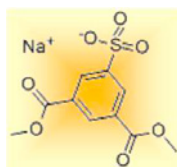
TORAY

東レ（株）繊維研究所



ポリマー研究事例

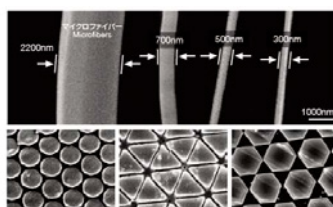
●カチオン可染ポリエステル



カチオン染料に可染のポリエステルは”ヒートテック®”にも活用

製糸技術研究事例

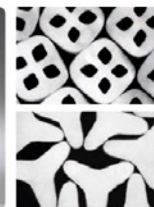
●革新複合紡糸技術 Nanodesign®



新しい複合方式により超極細や異形断面ナノファイバーを創出

テキスタイル研究事例

●熱可塑性セルロース繊維 “フォレッセ®”



セルロースの熱可塑性化によって熔融紡糸を可能に

繊維研究の「源流」として、繊維先端材料・革新要素技術を創出

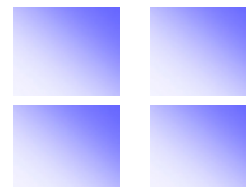
Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

7

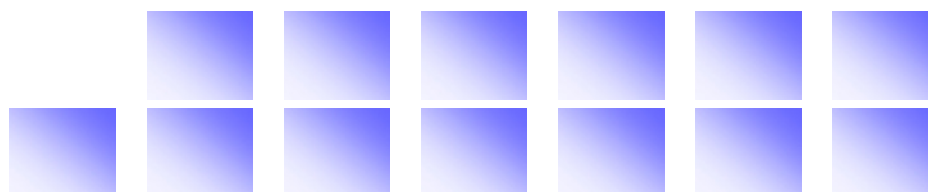
TORAY

R&D 研究開発

東レグループは科学技術に立脚した基礎素材メーカーとして、
独創性の高い先端材料・先端技術の研究開発に
取り組んでいます。



2. スマートファイバー研究

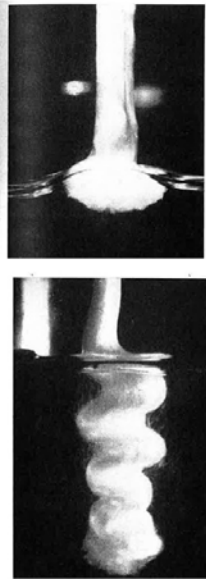


Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

8

TORAY

昭和初期のスマートファイバー「捲縮スフ」



特許請求ノ範圍 本文に詳記せる如く紡絲原液を硫酸七〇—一三〇瓦毎立並に凝固作用鹽類三三〇瓦毎立以上就中硫酸曹達三〇〇瓦毎立以上及硫酸亞鉛五—一五〇瓦毎立を含有する凝固浴中に紡絲する工程と依て得らるゝ厚密なる凝固外層と未分解内層とより成る紡出纖維を緊張しつゝ熱水、熱酸液、熱鹽液等の熱液に接觸せしめ前記紡出纖維内の未分解液を急激に凝固分解せしむる工程と斯て得らるゝ内外不均質にして歪曲性の潜在せる再生纖維素纖維を水又はアルカリ液等の如く纖維を膨潤せしむる作用ある水溶液中に浸漬せしむることに依り捲縮を顯現せしむる工程との結合を特徴とする人造纖維の製造法

特許第一七四五三九號（昭和十七年公告第一四六〇號）
第一六六類 七、人造絹絲及模造纖維
出願 昭和十五年一月十八日
公告 昭和十七年三月三日
特許 昭和二十二年六月四日
大阪府三島郡高槻町上田部二九一番地 武彦
發行者 關田
京都府左京區吉田町 京都帝國大學内 財団法人日本化學纖維研究所
特許代理人 竹田吉郎

天然ウールの構造にも、その後の合纖バイメタル糸の構造にも類似

Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

9

TORAY

昭和初期のスマートファイバー「ナイロン」

1934年、米国デュポン社のカロザースがナイロン66を発明

<鐘紡>

1938年、鐘紡ニューヨーク駐在員がサンプル入手、津田社長へ届けた。日本化学纖維研究所へ数mg提供。
桜田教授： X線回折法でN66であることを確認

<東レ>

1938年、研究をスタート、三井物産ニューヨーク支店にサンプル・情報収集を依頼。
星野孝平： 加水分解してN66であることを確認

財団法人 日本合成纖維研究協会 第1分科会

幹事： 東洋レーヨン 種村功太郎

技術委員： 東工大 星野敏夫教授、京大 小田良平教授、京大 桜田一郎教授、阪大 村橋俊介教授ら



東洋レーヨン第1号の
ナイロン紡糸機（1943）

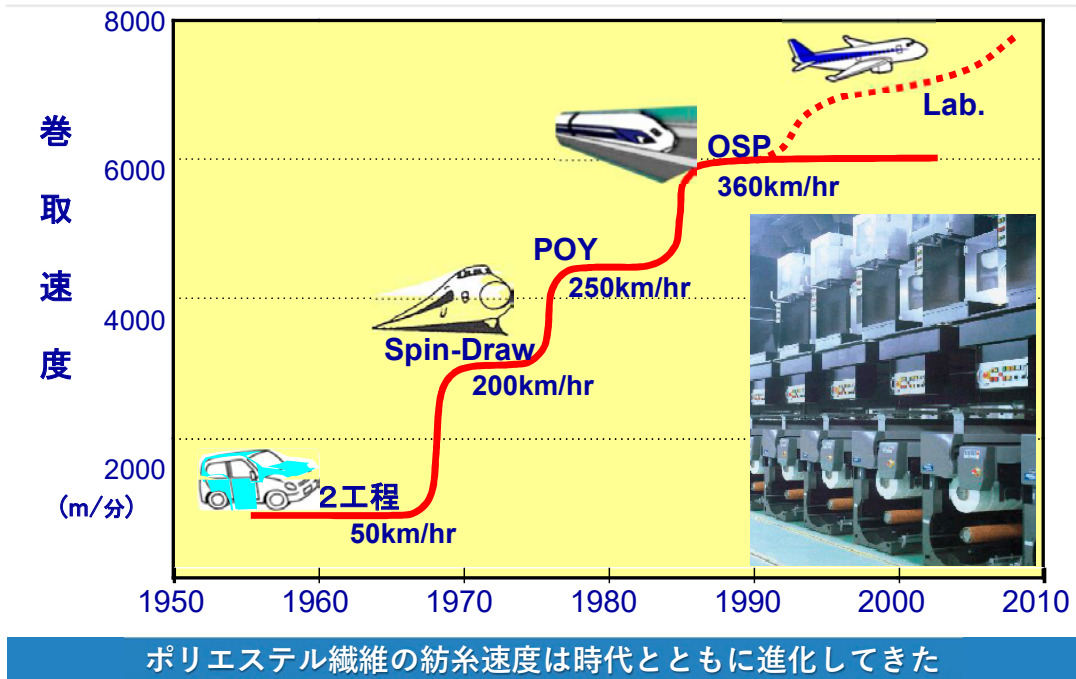
1943年にナイロンの事業化がスタート

Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

10

TORAY

ポリエステル繊維（紡糸速度の進化）

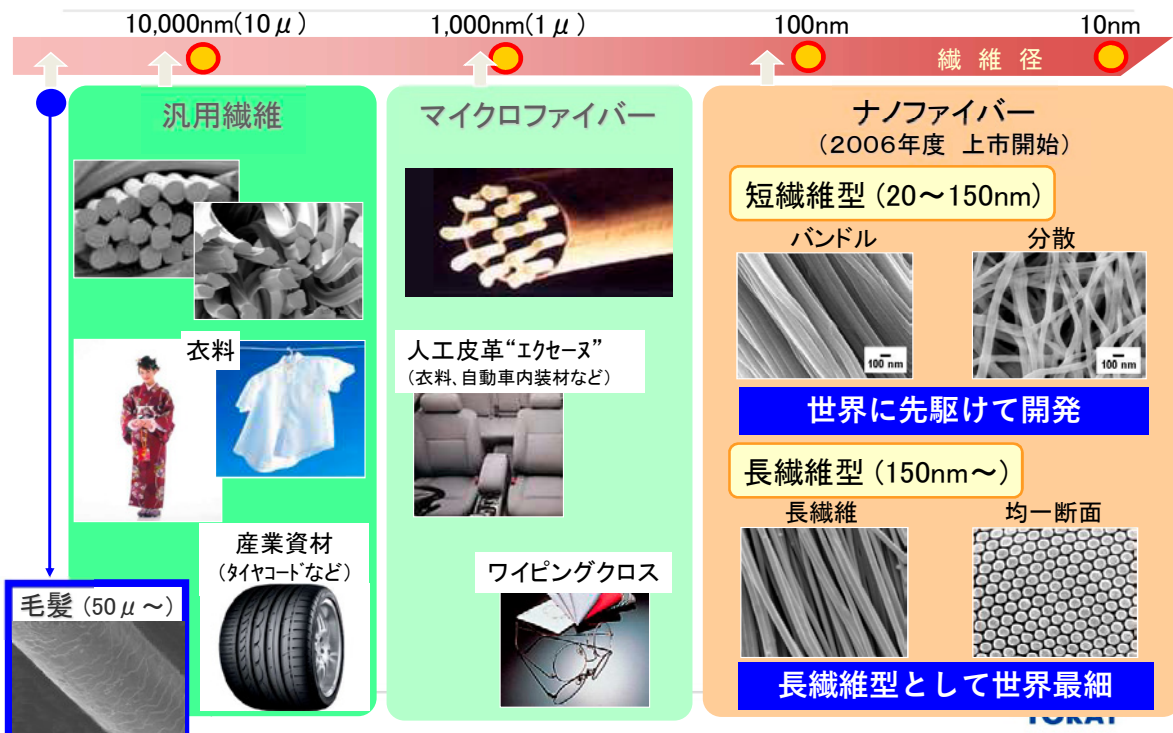


Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

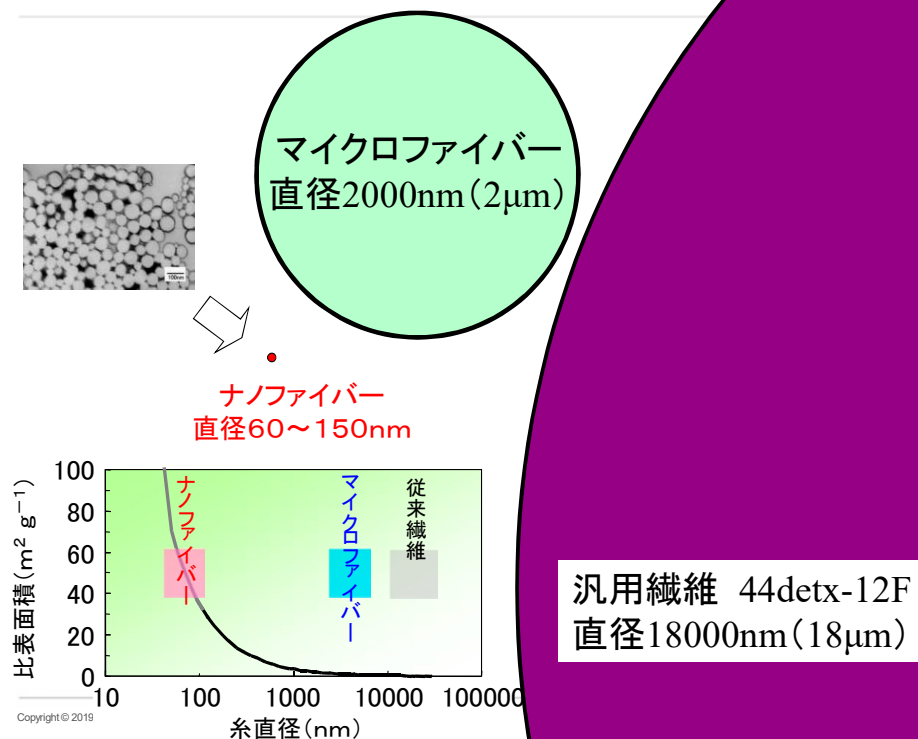
11

TORAY

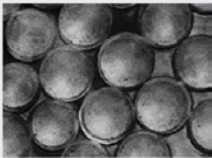
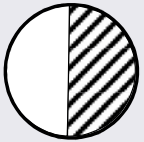
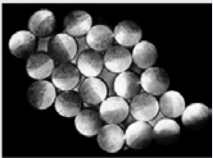
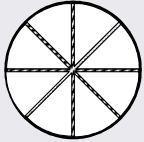
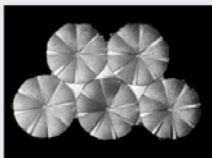
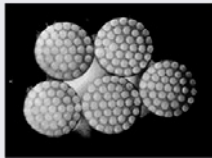
ナノファイバー（細さの極限追求）



ナノファイバーの特徴



溶融紡糸における既存の複合紡糸技術

分類	繊維物性		細繊維度化	
技術	芯鞘複合	サイドバイサイド	分割型	海島型
断面	 	 	 	 
目的	・機能性付与	・嵩高性付与	・極細化 ・混繊糸	・超極細化

海島複合紡糸は比較的古くから事業化されている（1970年代）

新しい紡糸技術 “NANODESIGN”

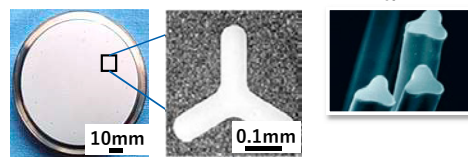
繊維の『細さ』や『形』をナノメートルのオーダーでデザイン

従来の断面制御の考え方

吐出孔形状により断面を形作る

⇒バリエーションは機械加工の精度に依存するため、とりうる断面には制約あり。

< 紡糸口金 > < Y孔吐出孔 > < 繊維断面 >

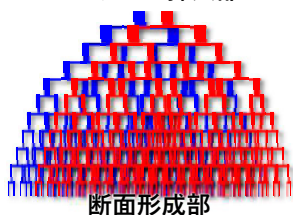


研究コンセプト

断面制御の原理を根本的に変える→技術革新

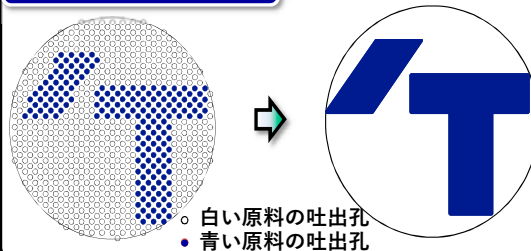
ポリマー流を「極限まで分割」

ポリマー挿入部



断面形成部

断面を「点」で形成



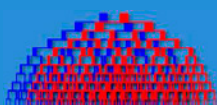
従来とは全くことなる方式の複合紡糸技術“NANODESIGN”を創出

複合紡糸技術 “NANODESIGN”の展開

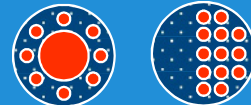


繊維の断面をナノサイズでデザインする

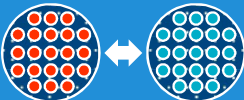
超精密な複合断面
微細な流れで断面を形成



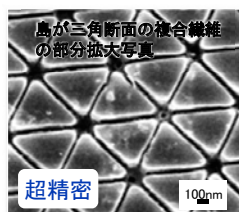
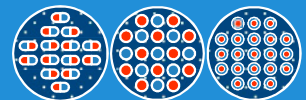
自由な断面設計
複雑な形態も形成可能



ポリマーの多様性
様々なポリマーの複合が可能

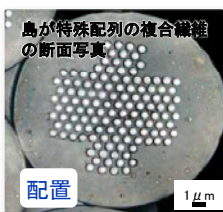


3成分複合も可能
複合型極細繊維製造も可能



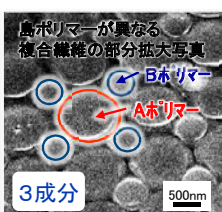
超精密

100nm



配置

1μm



3成分

500nm

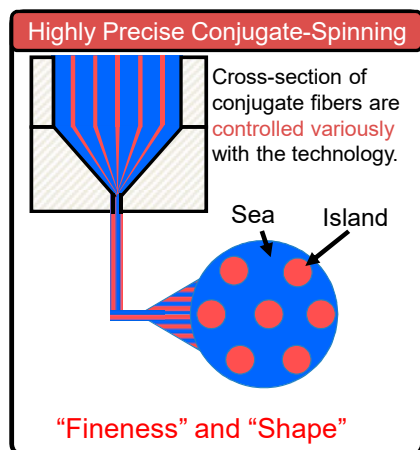


多様性

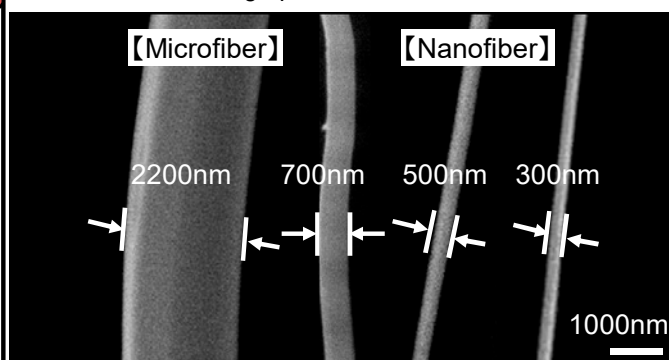
30μm

“NANODESIGN”は繊維の「細さ」と「形」を多用に制御可能

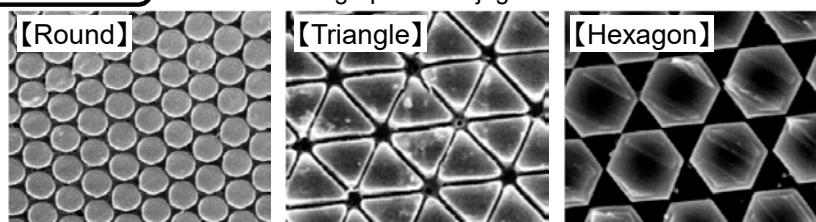
革新複合紡糸技術 “ナノデザイン”



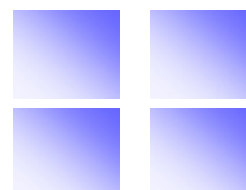
<SEM Photograph of Innovative Nanofiber>



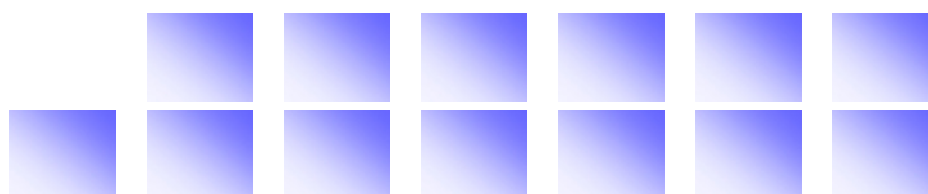
<SEM Photograph of Conjugate Fiber>



従来得られなかった300nm以下、あるいは異形断面のナノ長繊維を創出

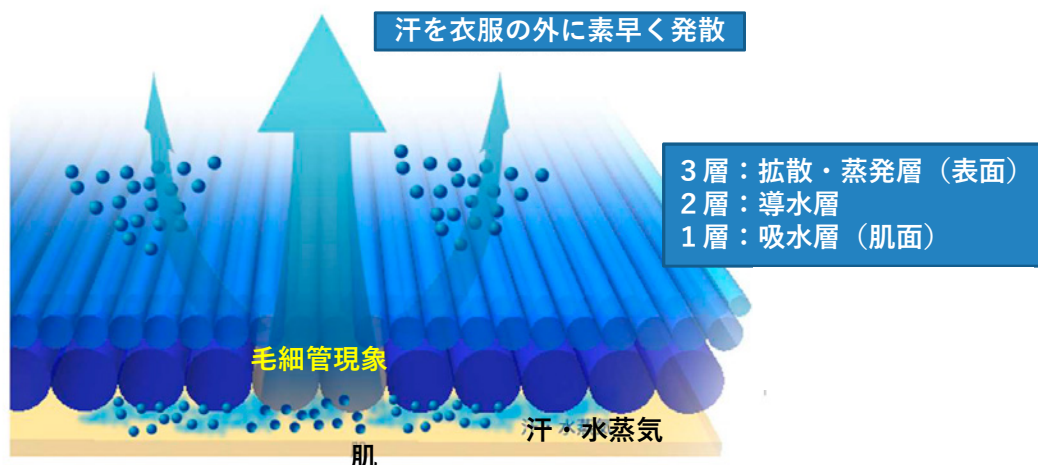


3. スマートテキスタイル研究



東レのスマートテキスタイル

第一世代の例：“フィールドセンサー”



原糸・高次加工の要素技術組み合わせで吸水速乾性を発現

Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

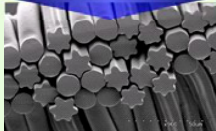
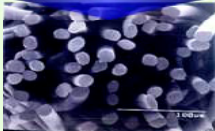
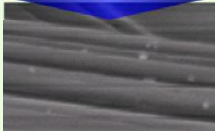
19

TORAY

東レのスマートテキスタイル

第一世代の例：“ヒートテック”



ポリエステル繊維	アクリル繊維	レーヨン繊維	ポリウレタン繊維
断面ミックス繊維	特品極細繊維	特殊成分含有	ストレッチ、高堅牢性
			
水分移動、温度調整	優れた保温特性	肌触り、吸湿発熱	フィット感、着心地

従来の綿素材から高機能性“合繊インナー”へパラダイムシフト

Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

20

TORAY

東レのスマートテキスタイル “hitoe”

“hitoe®”を使用したウェア

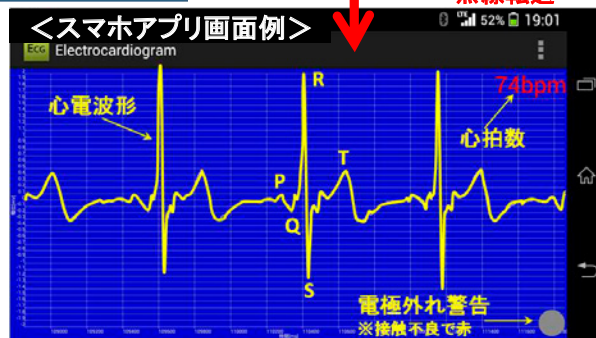


生体情報検知機能素材
(NTT社との共同開発)

※本品は医療機器ではありません

Bluetooth

心電波形をリアルタイムで
スマートフォン等へ
無線転送



着用することで心拍・心電などの生体情報を検出→端末に送信可能

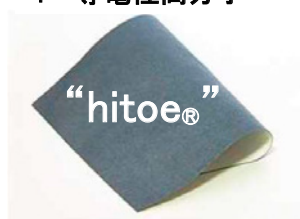
Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

21

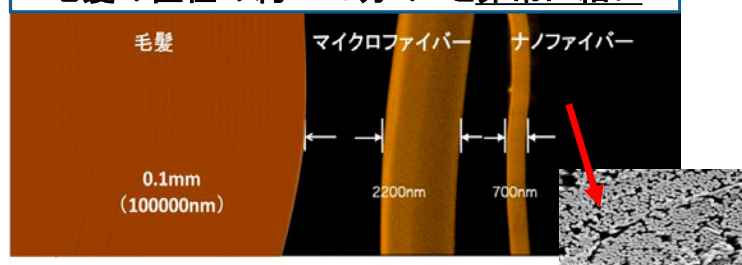
TORAY

“hitoe®”のメカニズム

ポリエステルナノファイバー
+ 導電性高分子



“hitoe®”を構成するナノファイバーは、
毛髪の直径の約140分の1と非常に細い



導電性高分子
(PEDOT-PSS)



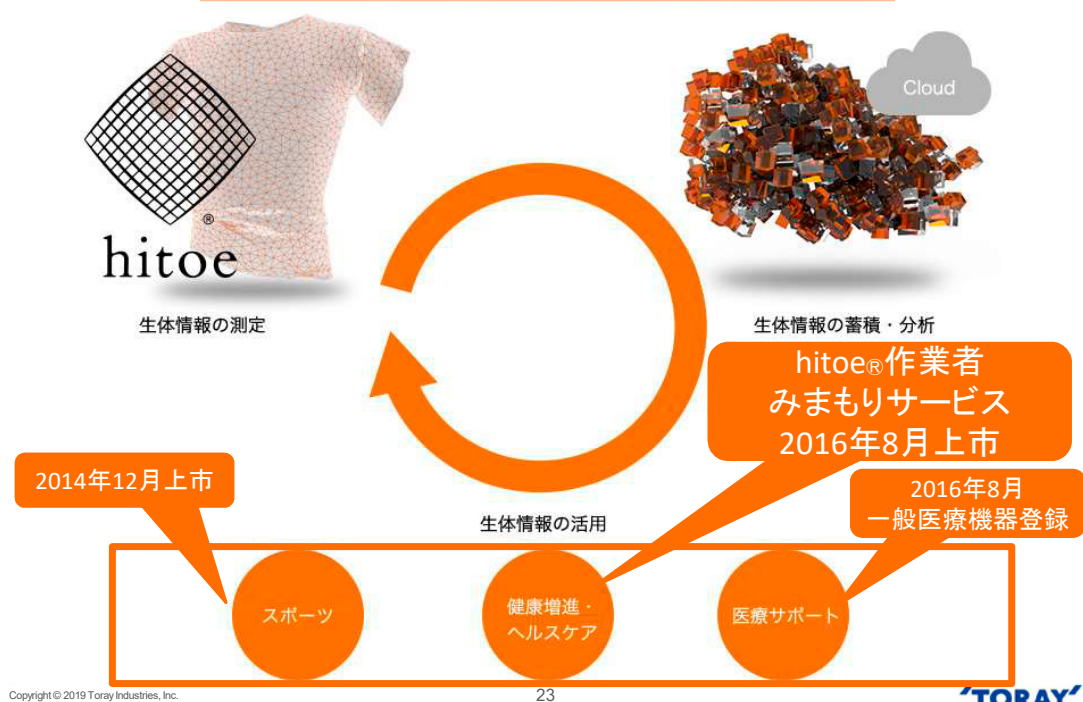
ナノファイバー間へ導電性高分子を高含浸：導電性・耐久性・安定検出

Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

22

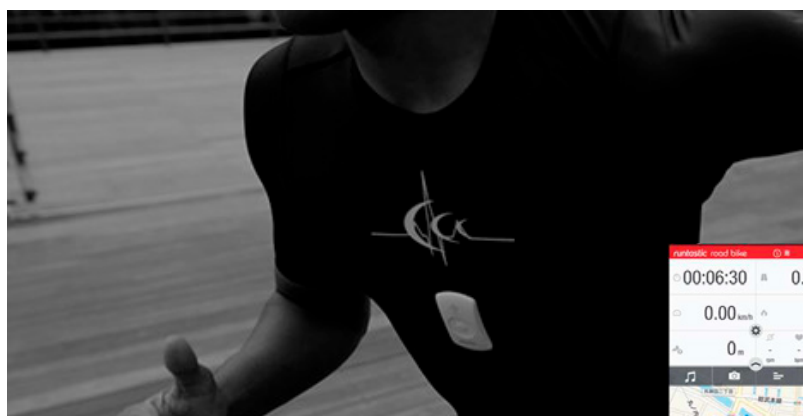
TORAY

“hitoe®”で展開する主な用途

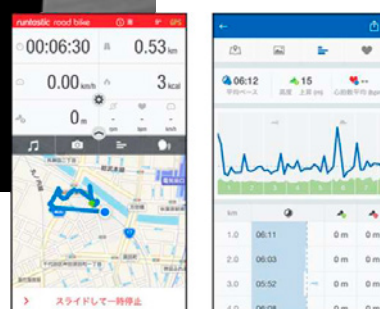


“hitoe®”を活用したサービス例（1）

【スポーツ心拍見守りシステム】



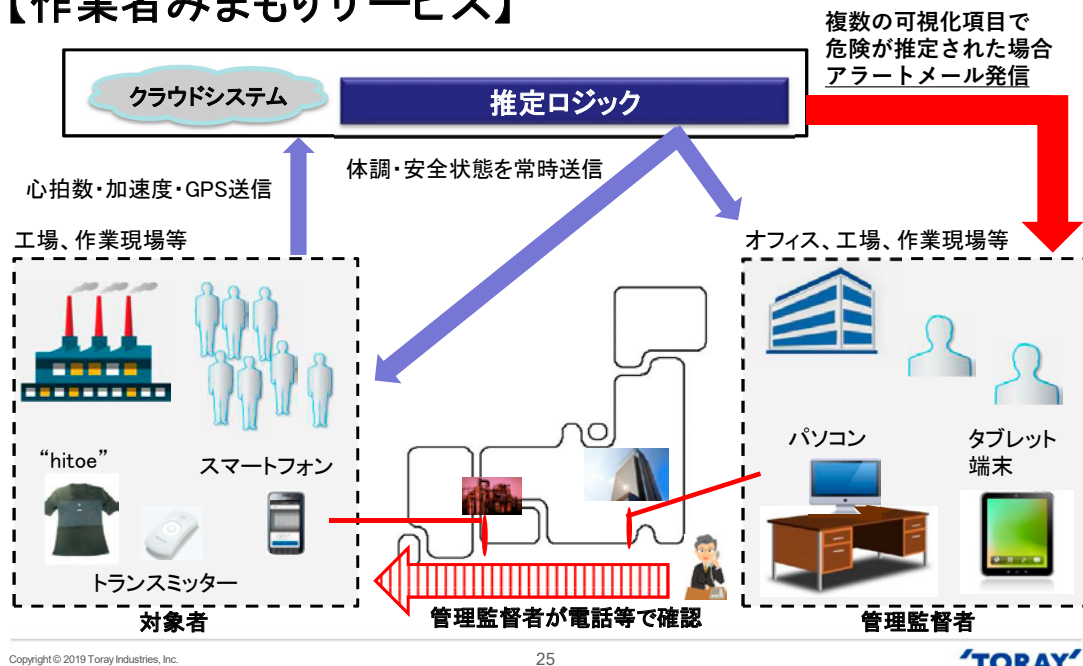
効果的なトレーニングに



ウェアはゴールドウィン社製 C3fit IN-pulse、アプリはRuntastic for docomo

“hitoe®”を活用したサービス例（2）

【作業者みまもりサービス】



東レのスマートテキスタイル

国内ニュース

環境省、東レに「快適新素材」創出事業を委託

発表日：2018.08.20

環境省は、「空調負荷低減を実現する革新的快適新素材創出事業委託業務（平成30年度）」において、東レ（株）を委託先に選定したと発表した。同業務委託は、オフィスや家庭内で常用的に着用する衣料を対象として、空調利用を10%削減しても快適性を維持できる快適新素材および衣料を創出し、フィールド実証等を通じて有効性を実証するとともに社会実装に向けた課題を抽出し、その課題解決を行うもの（予算：エネルギー対策特別会計）。実証・評価等に係る事業提案の募集（平成30年6月）、外部有識者からなる審査委員会を経て、同社の提案「未来型快適新素材の開発・実証」が採択された。

“エレクトロニクス”と“テキスタイル”の融合に挑戦していく

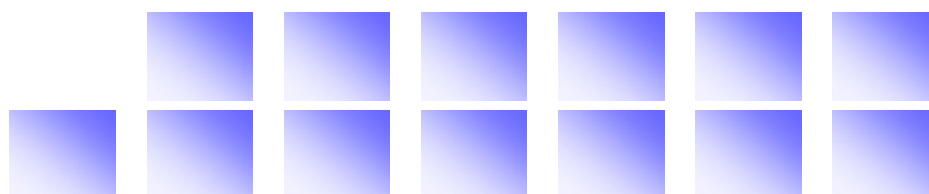
Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

26

TORAY



4. さいごに



繊維学会の歴代会長

	1943.12－1948.03	厚木勝基		1980.04－1981.03	石川欣造
	1948.04－1952.03	内田豊作		1981.04－1982.03	佐古田正昭
	1952.04－1954.03	桜田一郎		1982.04－1983.03	久世 栄一
	1954.04－1958.03	祖父江 寛		1984.05－1986.04	稲垣 博
	1958.04－1960.03	藪田為三		1986.05－1987.06	清水二郎
	1960.04－1962.03	白樫 侃		1987.06－1988.06	中野準三
	1962.04－1964.03	篠田 籙		1988.06－1989.05	飯島俊郎
	1964.04－1966.03	関戸 実		1989.05－1991.05	大塚保治
	1966.04－1967.03	星野孝平		1991.05－1993.05	北条舒正
	1967.04－1968.03	岡島三郎		1993.05－1995.05	中島利誠
	1968.04－1969.03	堀尾正雄		1995.05－1997.05	宮本武明
	1969.04－1970.03	石川章一		1997.05－1999.05	瓜生敏之
	1970.04－1971.03	前田弘邦		1999.05－2002.06	宮田清蔵
	1971.04－1972.03	長野正満		2002.05－2006.05	白井汪芳
	1972.04－1974.03	辻 和一郎		2006.06－2010.05	川口春馬
	1974.04－1976.03	森本佐一		2010.06－2012.06	木村良晴
	1976.04－1977.03	礪波宏明		2012.06－2014.06	平井利博
	1977.04－1979.03	河合弘雄		2014.06－2018.06	鞠谷雄士
	1979.04－1980.03	松崎 啓		2018.06－	木村邦生

京大関係の先生方が多数会長をお務めに

令和10年プロジェクト

以前チッソ（株）でお勤めの小島盛男様より、繊維学会にご寄付のお申し出あり

学会活性化プログラム

若手会員増強プログラム

若手研究者育成プログラム

・JFST（月刊）

「JFST」はオンライン（J-Stage）で発行されます。どなたでも、[こちら](#)から全文を無料でご覧いただけるオープンアクセスジャーナルです。

JFSTは、和文、英文どちらの論文も掲載します。追加料金無しでカラー原稿を掲載できます。会員各位からのご投稿をお待ちしています。投稿に関する詳細は[こちら](#)をご覧ください。

6月頃： 繊維学会年次大会
（東京都江戸川区船堀）

9月頃： 夏季セミナー
（2019年度は北海道でした）

11月頃： 繊維学会秋季大会
（2019年度は信州大でした）

先生方にはJFSTへのご投稿、若手の皆さんには学会行事へのご参加を是非

Copyright © 2019 Toray Industries, Inc.

29

TORAY

TORAY
Innovation by Chemistry

反復凍結解凍法で作製したポリビニルアルコールゲルのクリープ挙動

Creep Behavior of Poly(vinyl alcohol) Gels Prepared by Repeated Freezing and Thawing Cycles

瀧川 敏算・堀中 順一・矢尾晃一

Toshikazu TAKIGAWA, Jun-ichi HORINAKA, Koichi YAO

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

We have examined the creep behavior of cylindrical poly(vinyl alcohol) (PVA) gels under uniaxial compression. In this system the creep occurs by the solvent squeeze from the gels by load. The retardation time for the gels under different weights does not depend on the diameter of the specimens, and the total creep is well described by a single exponential function. A simple model, possessing the load-independent retardation time and then decaying in a single-exponential manner, is also presented in this study.

1. はじめに

ポリビニルアルコール (PVA) のハイドロゲルを作製する方法として、反復凍結解凍法がある¹⁾。この方法で得られたハイドロゲルは不透明ではあるが、優れた力学特性を示すことが知られている。昨年のこの講演会では、凍結解凍サイクルでのPVAのゲル化に塩析効果を応用し、凍結-解凍サイクルの短縮を試みた結果を報告した²⁾。さらに、塩析効果を組み込んだ反復凍結解凍法により作製したPVAハイドロゲルの伸長特性についても報告した²⁾。反復凍結解凍法で作製したゲルでは、構造が不均一なため、圧縮によりゲル中の溶媒を容易に搾りだす (スクイズする) ことができるが、円柱状のPVAゲルのクリープ (一軸圧縮変形下) による溶媒の”絞り出し (squeezing-out)”過程では、ゲルの断面積はほとんど変化せず高さだけが減少する挙動が見られることも昨年の講演会で発表した²⁾。本研究の目的は、円柱状PVAゲルの一定荷重下でのsqueezing-out過程を詳細に調べることである。さらに、得られた結果を説明できるモデルの構築も目指す。

2. 実験

PVAハイドロゲルの作製法は昨年度の講演集に記載のものと基本的に同じである²⁾。すなわち、PVAは市販品 (VM-17, 日本酢ビ・ポパール (株)) であり、その重合度とケン化度は各々、1700および95~97mol%である。溶媒には蒸留水 (Wako) を、添加塩には、 K_2CO_3 (Wako) を用いた。PVAハイドロゲルは低温で塩析効果が働くように改良した反復凍結解凍法により作製した。まずPVA水溶液を95°Cで作製した。この溶液に、事前に作製しておいた K_2CO_3 水溶液を加えて、所定のPVA濃度 (c) および添加塩濃度 (c_s) のプレゲル溶液を調整した。今回の実験では、 c_s は3wt%, c は10wt%に固定して試料作製を行った。

円柱状ゲル (直径と高さは共に10mm) の作製には金型を使用した。PVA水溶液を流し込んだ金型を-25°Cの冷凍庫で10時間冷却した後、冷凍庫から取り出し室温で2時間静置することで解凍した。この冷凍-解凍サイクルを3回繰り返すことでクリープ試験用PVAハイドロゲルを作製し

た。クリープ試験で印加したおもりは、49g, 69g, 89g, 109gであった。この荷重印加状態の試料のサンプルコードをPVAxxxと表すことにする。ここで、xxxはg単位での荷重である。荷重印加後のゲルの直径 (d) と高さ (h) の経時変化をビデオカメラとDVDレコーダーを用いて録画・解析することで、クリープ挙動を調べた。

3. 結果

PVA049の荷重印加後の d と h の時間 (t) 変化をFig. 1に示す。荷重印加前の h と d (初期の高さと直径; h_{ini} および d_{ini} と記す) は、荷重印加により瞬間的に変化する。 h は急激に減少し、 d には瞬間的な上昇が起こる。これはゲルの弾性変形に起因している。弾性変形が起こった後、 d では t が経過しても全く変化が見られない。一方、 h は t の経過とともに単調に減少し、やがて一定値 (以降、 h_∞ と記す) に漸近することがわかる。

Fig. 2は種々の荷重を印加したゲルの $(h - h_\infty)/h_{ini}$ を t に対して片対数プロットしたものである。直線の位置は荷重とは明確な相関を示してはいないが、4種類のゲルに対する

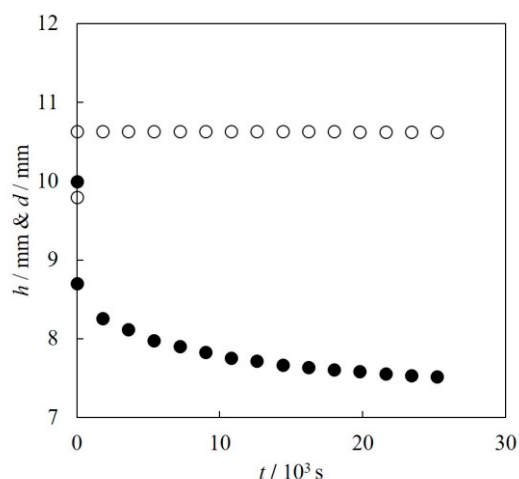


Fig. 1 Time (t) dependence of the height (h) and the diameter (d) of PVA049.

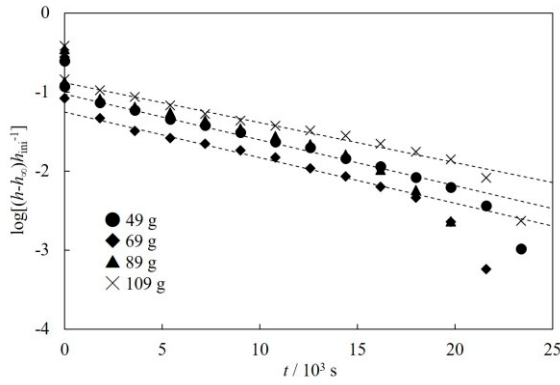


Fig. 2 Time (t) dependence of $(h - h_\infty)/h_{ini}$ for PVA gels under various loads.

Sample Code	d_{ini} / mm	τ / 10^3 s	ε_0	ε_∞
PVA049	9.80	6.7	0.13	0.25
PVA069	10.0	7.1	0.20	0.28
PVA089	10.0	6.7	0.21	0.35
PVA109	10.0	8.8	0.24	0.39

Table 1 Initial diameter (d_{ini}), retardation time (τ), strain by elastic deformation (ε_0) and total strain (ε_∞).

直線の傾きはほぼ等しいとみなしてもよいことがわかる。すなわち、ゲルのクリープ（溶媒の搾りだし）の遅延時間 τ は印加荷重に依存しないことがわかる。これは、 $t > 0$ の h が

$$h(t) = (h_0 - h_\infty) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + h_\infty \quad (1)$$

でほぼ記述できることを意味している。ここで、 h_0 は $t \rightarrow +0$ のときの h の値である。

Table 1 は異なる荷重下のゲルに対して得られた τ と 2 種類のひずみ (ε_0 および ε_∞) をまとめたものである。ここで、 ε_0 は $\varepsilon_0 = (h_{ini} - h_0)/h_{ini}$ で定義されるひずみであり、荷重印加直後の弾性変形の寄与を表している。他方、 ε_∞ は $\varepsilon_\infty = (h_{ini} - h_\infty)/h_{ini}$ で定義されるひずみで、弾性変形とクリープ（溶媒のスクイーズ）で生じる変形の和に対応している。先にも述べたように、 τ は荷重によらずほぼである。しかし、ひずみに関しては、2 種類のひずみ共に荷重の増加と共にひずみも大きくなっている。一定となっている。

4. 考察

前項に示した結果は簡単な現象論モデルで説明できる。Fig. 3 はゲルからの溶媒のスクイーズ挙動を説明するために導入したモデルである。ここでは、高分子ゲルを 1) 弾性ばね（ばね定数を E とする）、2) 溶媒、3) 溶媒を透過

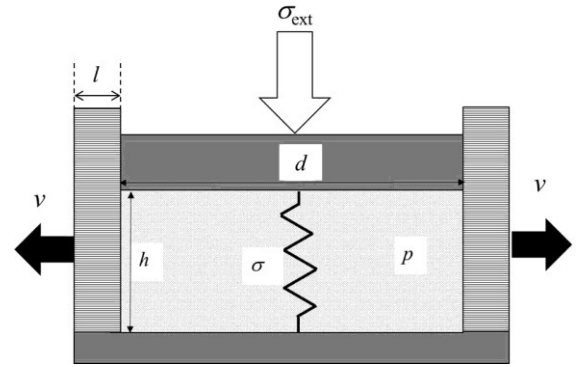


Fig. 3 A spring-linked cylinder modeling solvent squeeze from a polymer gel.

膜（透過率を k とする）の 3 つの要素でできたシリンダーで置き換えている。ばねはゲルの網目による弾性を、膜はゲル自身がもつ溶媒を透過するという性質を表しているのである。ここで、図中の h はゲル試料の高さ、 d はゲルの直径、 l は膜厚であり（ここでは、 $l \ll d$ と仮定している）、 σ はばねにかかっている力（＝高分子網目にかかっている力）、 p はゲル中の溶媒にかかっている単位体積あたりの力（＝溶媒の圧力）、 v は膜を透って流出する溶媒の速度であり、 σ_{ext} はゲルにかかっている外力（印加荷重）である。詳細³⁾は省力するが、このモデルでは h の時間変化は

$$\frac{E(h_{ini} - h)}{h_{ini}} - \frac{dl}{4kh} \frac{dh}{dt} = \sigma_{ext} \quad (2)$$

で決まるので、 $\varepsilon_\infty \ll 1$ ならば h は

$$h(t) = (h_{ini} - h_\infty) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + h_\infty \quad (3)$$

となり、このモデルは実験での h の挙動（式(1)参照）をうまく説明できることがわかる。また、式(1)と式(3)を比較すればわかるように、 $h_{ini} = h_\infty$ ならこれら 2 つの式は一致するが、これは弾性変形が存在しない場合に対応している。上記のモデルでは、遅延弾性が現れるため式(3)の τ は遅延時間になるが、この τ は $\tau = dl/4kE$ と表すことができ、印加荷重には依存しない。これは実験結果と一致している。

参考文献

- 1) M. Watase, K. Nishinari, M. Nambu, *Cryo. Lett.*, **4**, 197 (1983).
- 2) K. Yao, J. Horinaka, T. Takigawa, *Nihon Reoroji-gakkaishi*, **46**, 233 (2018).
- 3) K. Yao, J. Horinaka, T. Takigawa, *Nihon Reoroji-gakkaishi*, **47**, 25 (2019).

水中のプラスチック微粒子識別のための蛍光プローブ開発

Development of Fluorescence Probes for Detecting Plastic Particles in Water

田中 一生・権 正行

Kazuo TANAKA, Masayuki GON

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

We report the fluorescent sensor for nano-sized plastics, called as “nanoplastics”, in water. The sensor was constructed based on the dye-modified organic-inorganic hybrid gel presenting dual emission property. From luminescent color change, the existence of plastic particles in water can be detected, whereas silica particles, which are the main component of wild sand and rock, are negligible. Furthermore, it was shown that the sensor can monitor only nano-sized plastic particles. From these data, we can say that water pollution by “nanoplastics” can be rapidly evaluated through the facile detection system. In this paper, the detection mechanism is illustrated.

1. はじめに

無機元素を含む機能の最小ユニットを「元素ブロック」と呼び、これらを連結、集積することで「元素ブロック材料」と呼べる無機成分の特性を活かした高機能性材料の創出が期待できる¹。ここで我々は、かご型シルセスキオキサン(POSS, Fig. 1)をハイブリッド化のための“元素ブロック”とみなした。POSSは各種のアルキル基や官能基を有するトリアルコキシシランやトリクロロシランを用い、希薄溶液中で縮合させることで得ることができる。他のポリシロキサンやポリシルセスキオキサンはエラストマーとなるものが多いが、POSSは剛直なシリカの立方体核から放射線状に有機置換基が配置されている立体的な分子であり、特異な物性を持つ機能性材料が得られる。例えば、POSSを高分子主鎖に連結することで熱分解温度を著しく向上させることや、POSSをフィラー(添加剤)として高分子に混合することのみでも熱安定性や機械的特性を向上することが可能である。また、POSSを含む高分子による相分離に伴う微細構造形成も報告されており、集積回路作成のためのレジストとしての応用が図られている。さらに、POSS核自体は極性が極めて低い骨格であり、例えば、POSSを基板上に集積すると高撥水性の表面が得られる。ここで、組成式

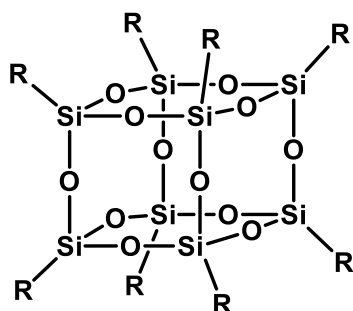


Fig. 1 Chemical structure of POSS “element-block”.

が $(\text{RSiO}_{1.5})_8$ で表されることから、すなわち、高分子材料にPOSSを添加し、それらが均一に分散している場合を考えると、材料中には有機-無機ハイブリッドと同様の状態が実現しているとみなすことができる。言い換えると、POSSは「混合するだけでハイブリッド化が可能な便利な元素ブロック」であるといえる。さらに、POSSは一般的な有機合成的手法により有機置換基を修飾・変換することが可能であることや、高次構造形成の足場としても働くことが可能

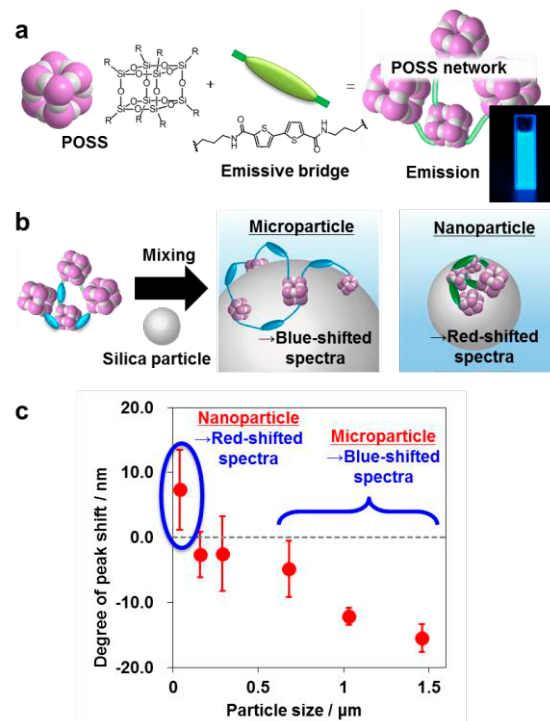


Fig. 2 (a) Emissive POSS networks for the size-discrimination of silica particles. (b) Plausible model for the detection. (c) Changes in the optical properties of POSS networks in the presence of various sizes of silica particles.

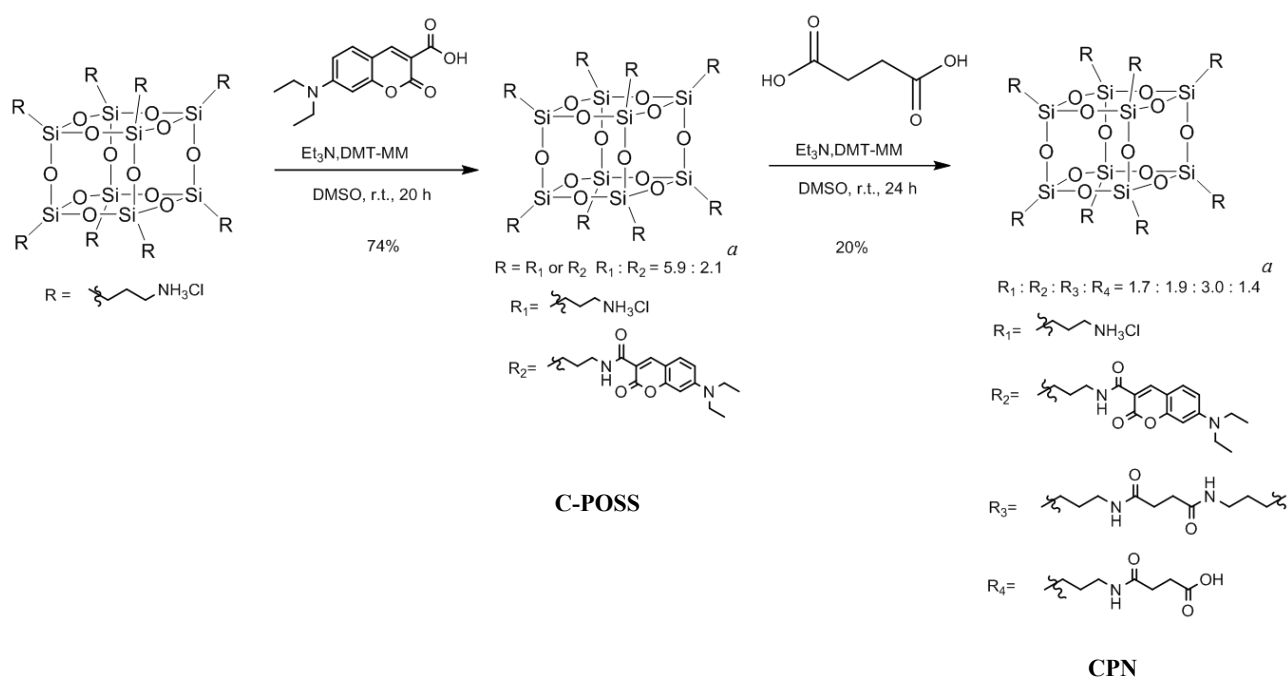


Fig. 3 Synthetic scheme of C-POSS.

であることから、ハイブリッド材料開発に精密設計を可能にし、「デザインナブルハイブリッド」と呼べるような複合材料を創出することにPOSSは適した物質であると考えられる。このような考えの元、我々が行ってきた最近の研究を中心に、POSSを“元素ブロック”として用いることで得られた「デザインナブルハイブリッド」について説明する。特に、POSSを生体関連材料に適用することで、ハイブリッド材料を基盤とした環境センサーを開発したので、それらの成果について報告する。

2. 水溶性POSS含有高分子における特殊空間創出

POSSを用いると剛直かつ高対称性のビルディングブロックを材料中の任意の部位に導入可能である。このような特徴を活用することで、特に水中で使用が想定される生体関連材料において、POSSは特異な機能を発現する。POSSにおいてシリカの立方体核から放射線状に側鎖が配置されており、平面上の八官能性の化合物とは異なる物性が得られる。例えば、アンモニウム基などイオン性置換基をPOSSに導入した場合、高い水溶性を付与できる。ここで、上述のようにPOSSは閉じたシリカの立方体構造を有することから極性の低い物質であるが、各頂点上に存在する有機置換基の立体障害により凝集状態の形成を抑制できる。したがって、一般的な平面状の分子の場合、上下でスタッキング等の分子間相互作用を起こし、凝集沈殿が進行する場合であっても、POSSに吸着した分子やPOSS上の機能性分子団は水中でも孤立して存在できる。また、シリカの立方体核の各頂点から置換基が立体的に配置されており、隙間の多い構造を有している。このため、POSSの強い疎水場をむき

出しで水中に存在させることにつながり、これは分子レベルの微小な「油滴」を水中に多数存在させることと同様の状態が実現されているとみなせる。実際、これまでにPOSSを用いて水溶性ネットワークポリマーやデンドリマーなどの多分岐型高分子材料が得られており、POSS付近に現出する疎水場に起因して、特異な機能が導出している。これらの特徴を活かした環境センサーの開発に取り組んだ。

PM2.5などのマイクロメートル以下のサイズを持つ微小粒子状物質は、生体に対して健康被害をもたらすことから、大気汚染の原因の一つとなっている。ぜんそくやその他のアレルギー疾患など、具体的な疾病に関する報告も多数集まっており、大気中に長時間・長距離浮遊することから近年では世界レベルでの対策が必要とされている。また、微小粒子状物質による水質汚染についても懸念が広がっている。自動車や工業製品に含まれるマイクロプラスチックや本研究で実際に検出対象としたマイクロガラスなどの粒子状物質は、天然では分解できない成分でできていることから、それらが海や川に流れ込み、魚介類により生物濃縮され、人体に到達することも報告されている。それらの物質からの健康被害も想定されてきており、実際、欧米では工業製品にマイクロプラスチックを用いることが禁止されている。したがって、これらのマイクロからナノメートルサイズにいたる物質の環境・生体への影響について調べるのが喫緊の課題とされている。特に、粒子のサイズは浮遊時間から生体中での滞留に至るまで、毒性や環境被害を決める重要な因子であることから、これらの情報を簡便に取得する方法が重要とされている。

これまでに微小粒子状物質を検知するための手法とし

て、微細なフィルターを有する集塵装置や放射線計測に基づく装置が開発され、現在運用されている。実験室レベルでは電子顕微鏡による直接観察や光散乱による粒径の計測等が行われている。一方、これらの手法では水中に存在する微粒子状物質の捕捉は困難である。また、大型の装置を用いることや、測定のための試料の前処理など、専門的な技術が必要とされる。これらの状況から、混ぜるだけで測定が可能な蛍光化学センサーの開発に着手した。

2. 研究方法

POSSは各種のアルキル基や官能基を有するトリアルコキシシランやトリクロロシランを用い、希薄溶液中で縮合させることで得ることができる²。他のポリシロキサンやポリシルセスキオキサンはエラストマーとなるものが多いが、POSSは剛直なシリカの立方体核から放射線状に有機置換基が配置されている立体的な分子であり、特異な物性を持つ機能性材料が得られる。このような疎水性を利用すると、水中で薬剤や色素を吸着・保持させることができる³⁻⁵。今回このPOSSを架橋点として用いて水溶性のゲルを作成することで、超疎水性表面を露出させ、微粒子の捕捉を試みた。具体的には、有機色素とPOSSをネットワーク化させた発光性有機-無機ハイブリッドゲルを合成した (Fig. 2a)。このゲルは水に可溶であり、水中で強い発光を示した。さらに、想定どおりにシリカ微粒子に高い吸着性を示した (Fig. 2b)。特に、微粒子の粒子径により発光スペクトルが移動することが明らかとなった (Fig. 2c)。元々青色の発光を有するゲルにおいて、数十ナノメートルのシリカ微粒子存在下では発光が長波長側に移動し、一方1マイクロメートル以上の微粒子存在下では紫外領域に発光帯が変化することが示された。解析の結果、微粒子に吸着することでスポンジのように膨潤収縮が引き起こされ、ゲルの内部環境が変化し、発光特性が変わったことが示唆された。また、このスペクトル変化はシリカ微粒子表面の官能基をアンモニウムなどの親水性基導入や、逆にアルキル基導入による疎水性を増強した状態でも観測することができた。このことは、測定対象の粒子の組成や表面の化学的性質に依らず、サイズのみを認識可能であることを示唆している。

次に、POSSの8頂点に3-アミノプロピル基を有するAmino-POSSと7-(ジエチルアミノ)クマリン-3-カルボン酸を反応させ、Coumarin-POSS (C-POSS) を合成した。さらに、CPを種々のジカルボン酸と反応することにより、Coumarin-POSS Network (CPN) を合成し、水溶性画分 (wCPN) を得た (Fig. 3)。C-POSSへのPOSS導入数、ジカルボン酸によるネットワーク架橋度は¹H-NMRスペクトルから推定した。

C-POSS、各wCPNをクマリン換算で 1.0×10^{-3} Mに調整した水溶液を、終濃度 5.0×10^{-6} Mとなるよう市販のポリスチレ

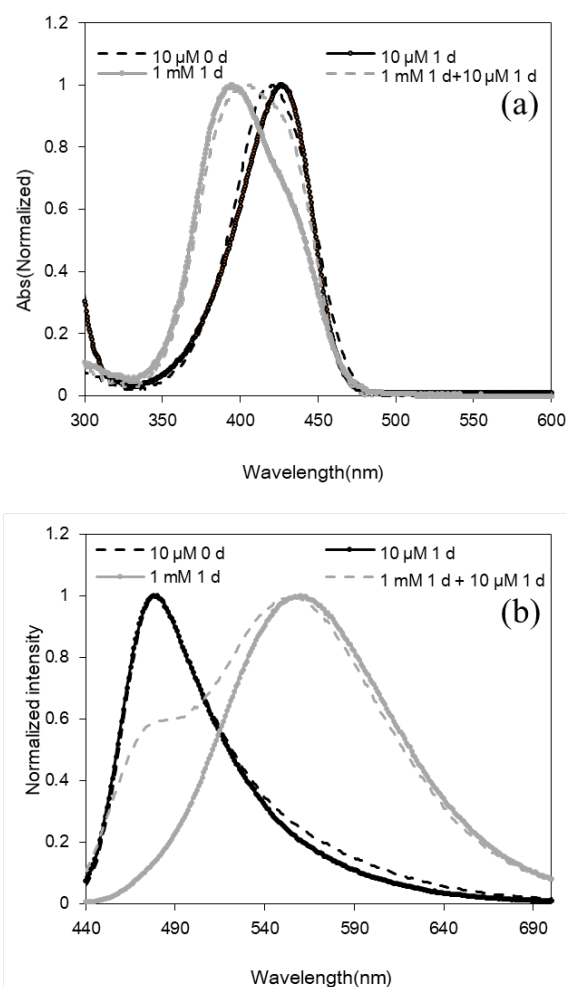


Fig. 4 (a) UV-vis absorption spectra and (b) PL spectra of C-POSS with the excitation light at 427 nm in water at either 10 μ M or 1 mM with variable incubation time. The concentration was based on coumarin D-1421 unit.

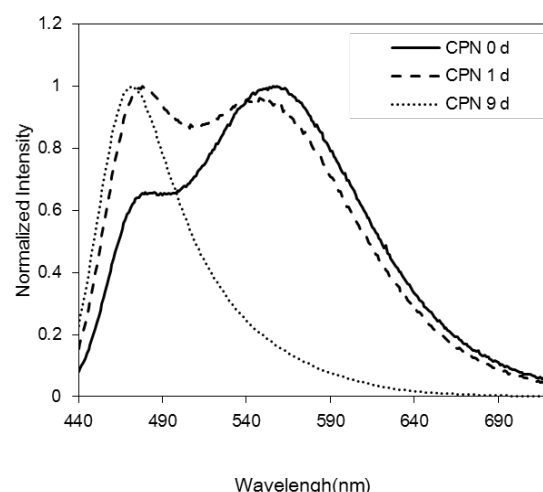


Fig. 5 PL spectra of CPN in water at various incubation time after dilution of stock solution (1 mM). The concentration was based on coumarin D-1421 unit. The excitation light was at 427 nm.

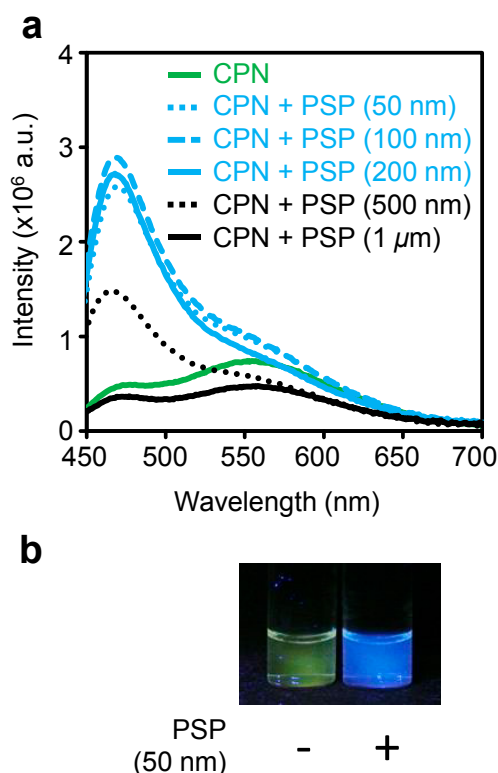


Fig. 6 (a) PL spectra of CPN in the absence and presence of polystyrene particles. (b) Luminescent color change by the particles.

ン微粒子 (PSP) や作製したシリカ微粒子 (SP) の懸濁液 (表面積 $58 \text{ cm}^2/\text{mL}$) と混合し、その発光特性の変化を確認した。

3. 結果と考察

C-POSSは水溶液中の濃度によってその発光特性が変化し、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ では $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ と比較して発光スペクトルは長波長側にシフトした (Fig. 4)。この変化はC-POSSが高濃度中で凝集状態をとることに起因していると考えられた。この現象はwCPNにおいても観察され (Fig. 5)、微粒子との吸着試験では上記したように 10^{-3} M オーダーで長波長発光を主に示す状態で供試した。

PSPとの混合試験において、C-POSSでは発光波長の変化が見られなかったのに対し、wCPNでは発光色が黄色から青色へと変化した (Fig. 6)。これは短波長側の発光ピークが増大したことによるが、その増大の程度は、微粒子のサイズが小さいほど大きくなり、 200 nm 以下の粒径でほぼ一定となった。また、wCPNのPSPに対する応答は、リンカーのジカルボン酸の炭素数によって異なった。一方、SPとの混合試験では、wCPNの発光ピーク変化は小さく、目視での発光色変化も観察されなかった。これらの結果から、wCPNは微粒子のサイズだけでなく、その種類についても識別することが示唆された⁶。さらに、発光強度と発光色の変化によ

り、検出を容易にできる可能性も示された。

4. 結言

将来的な応用として、ナノ微粒子のサイズに依る発光色のラベル化への応用が期待できる。従来、微粒子の生体内での移動を調べるには、微粒子自体に発光能を持たせる必要があった。サイズ毎に発光色を変えることができれば、それぞれの径による物理的性質や生体挙動を調べることが可能となる。本研究成果を用いると、微粒子と混ぜることのみでサイズに応じて異なる発光色に着色できることから、上述の微粒子状物質の挙動を調べることや、粒子を簡便に発光材料化する応用が考えられる。

参考文献

- 1) Chujo, Y., Tanaka, K., New polymeric materials based on element-blocks, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 88 (2015) 633-643.
- 2) Kakuta, T., Tanaka, K., Chujo, Y., Synthesis of emissive water-soluble network polymers based on polyhedral oligomeric silsesquioxane and their application as optical sensors for discriminating the particle size, *Journal of Materials Chemistry C*, 3 (2015) 12539-12545.
- 3) Narikiyo, H., Kakuta, T., Matsuyama, H., Gon, M., Tanaka, K., Chujo, Y., Development of the optical sensor for discriminating isomers of fatty acids based on emissive network polymers composed of polyhedral oligomeric silsesquioxane, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 25 (2017) 3431-3436.
- 4) Tanaka, K., Inafuku, K., Adachi, S., Chujo, Y., Tuning of properties of POSS-condensed water-soluble network polymers by modulating the cross-linking ratio between POSS, *Macromolecules*, 42 (2009) 3489-3492.
- 5) Tanaka, K., Inafuku, K., Naka, K., Chujo, Y., Enhancement of entrapping ability of dendrimers by a cubic silsesquioxane core, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6 (2008) 3899-3901.
- 6) Nakamura, R., Narikiyo, H., Gon, M., Tanaka, K., Chujo, Y., An Optical Sensor for Discriminating the Chemical Compositions and Sizes of Plastic Particles in Water Based on Water-Soluble Networks Consisting of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Presenting Dual-Color Luminescence, *Materials Chemistry Frontiers*, 3 (2019) 2690-2695.

側鎖元素置換による従来合成が困難であった高分子の合成

Syntheses of Conventionally Inaccessible Polymers through Side Chain Replacement

大内 誠・西川 剛

Makoto OUCHI, Tsuyoshi NISHIKAWA

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

The ability of isopropenyl boronate pinacol ester (IPBpin) as a monomer for radical polymerization was found and utilized to establish polymer synthesis on the basis of side chain replacement. IPBpin was smoothly polymerized in typical free radical polymerization condition, affording high polymer ($M_n = 1.4 \times 10^4$) bearing boronyl substituents on the main chain. Density functional theory-based investigation suggested the contribution of empty p-orbital on boron for moderate stabilization of radical chain end as the key for efficient radical polymerization of IPBpin. Controlled radical polymerization of IPBpin was possible by using reversible addition-fragmentation chain transfer system, enabling the tuning of polymerization degree and synthesis of block copolymer with common monomers such as methyl acrylate and styrene. The boronyl pendants on the main chain of obtained polymer can be used as replaceable side chain in polymer reaction for synthesis of poly(α -methyl vinyl alcohol) and poly(α -methyl vinyl amine), which are difficult to synthesize in conventional polymer synthesis.

1. 高分子合成における側鎖構造の制限

ビニルポリマーは構造材料開発のみならず先端機能材料開発において不可欠な高分子素材である。ビニルポリマーは基本的に対応する構造を有するビニルモノマーの連鎖重合により合成されるが、例えばビニルエーテルがカチオン重合性を有するもののアニオン重合性を示さないなど、重合挙動はビニル基に置換した元素・官能基に強く依存する (図1)¹。つまり、モノマー構造に依存して重合手法を適宜使い分ける必要があるほか、側鎖構造によってはいかなる重合手法を用いてもポリマーが得られない場合もある。得られるビニルポリマーの物性・機能を適切にチューニングする上で側鎖構造の分子設計は極めて重要であるが、上記の制約は高分子合成において導入可能な側鎖構造が制限されていることを意味する。そのため、ビニルポリマーの自在な分子設計を可能にする新たな高分子合成戦略が強く望まれる。

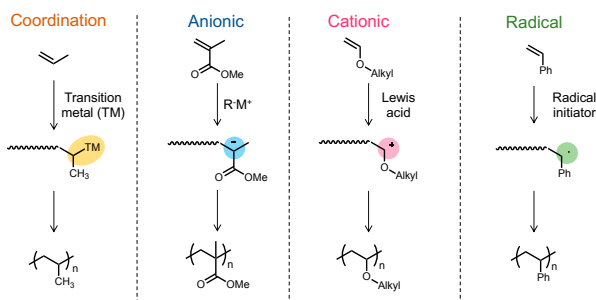


Fig. 1 Polymer synthesis depending on the molecular structure of side chains in monomers.

重合手法に縛られない高分子合成を実現する上で有望と考えられるのは、予め変換可能な置換基を側鎖上に導入しておき、重合後に分子変換を行う高分子反応である²。ポリ酢酸ビニルの加水分解によるポリビニルアルコール合成など、広く用いられている。しかし、高分子反応を用いても主鎖に直接結合した元素・官能基 (例: ポリビニルアルコールにおける酸素原子、ポリアクリル酸メチルにおけるカルボニル基など) を異なる置換基に置き換えることは極めて困難である。このために、現状においては高分子反応を用いても側鎖を自在に分子設計することはできない。もし高分子反応において側鎖自身を多様な官能基へと「置き換える」ことの可能なビニルモノマーを見出すことができれば、モノマーの重合性に起因する制約を打ち破り、従来は困難とされてきた高分子合成が可能になると期待される (図2)。

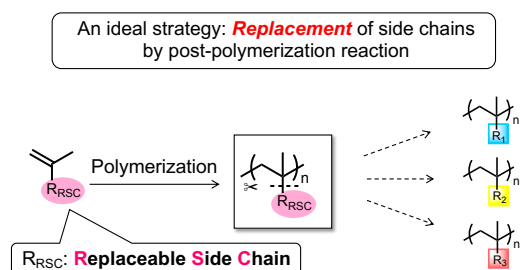


Fig. 2 Polymer synthesis based on replaceable side chain

我々は上記「側鎖置換」に基づく高分子合成戦略を実現するため、ホウ素に着目した。ホウ素は比較的高い電気陰性度を有する半金属としての性質や空のp軌道に由来するルイス酸性など興味深い特性を有する元素である。有機合成化学において、こうした性質を利用して含ホウ素化合物の合成や分子変換反応が数多く開発されてきた³。鈴木-宮浦クロスカップリング反応に代表されるように、ホウ素は有機合成において不可欠なツールとなりつつある^{4,6}。我々は特に炭素-ホウ素結合の切断により幅広い官能基導入が可能である点に注目し、ボロン酸エステル基が主鎖に直接置換したビニルポリマーを合成することで、側鎖置換に基づく新しい高分子合成が可能になると考えた。このためには、アルケニルボロン酸エステルをモノマーとする連鎖重合を実現する必要があるが、こうした研究はこれまでほとんど行われていない。Jäkleら⁷、もしくはKlausenら⁸はそれぞれ芳香族性を持つアザボリンを側鎖として有するアルケン分子がスチレンと類似した重合挙動を示すことを報告しているが、アザボリン部位の高い安定性のために幅広い分子変換に用いるのは困難である。一方で我々は空のp軌道を有するホウ素が隣接した炭素ラジカルを安定化可能であるという点に着目し、適切な分子設計によりアルケニルボロン酸エステルは十分なラジカル重合性を有しうると考えた。本稿ではイソプロペニルボロン酸ピナコールエステル(IPBpin)をラジカル重合のモノマーとして用いたボロン酸エステル側鎖を有するポリマーの合成、並びに重合後の炭素-ホウ素結合の切断による側鎖置換を通した高分子合成に関して述べる。

2. IPBpinのラジカル重合性における元素効果

まず、IPBpinのラジカル重合性に関して調べるため、ラジカル開始剤であるアゾビスイソブチロニトリル(AIBN)の存在下、IPBpinのトルエン溶液を60°Cに加熱・攪拌し、重合を¹H NMRとサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて追跡した(図3)。反応開始直後からIPBpinは効率的に消費され、24時間後には69%に達し、最終的には80%を超えた。モノマー消費率と得られたポリマーの数平均分子量の関係に関して調べたところ、重合開始直後から数平均分子量 1.4×10^4 (ポリスチレン換算)を超えるポリマーが生成していることが分かった。この結果は、IPBpinをモノマーとする典型的なフリーラジカル重合が進行したことを示している。続いて、sp²炭素上に結合したホウ素がラジカル重合に与える影響に関して調べるため、異なる元素が結合したアルケン分子とのラジカル重合性の比較を行った。炭素を有する2-Methylnonene (MNon)は同重合条件下、48時間後も7%の消費に止まり、ポリマーに対応するSECピークは全く見られなかった。加えて、酸素がアルケン部位上に結合したIsopropenyl acetate (IPOAc)は24時間後に17%が消費されたが、数平均分子量 10^3 以下のオリゴマーが生成したの

みであった。これらの比較により、IPBpinの高いラジカル重合性を実現する上で、アルケン部位上に結合したホウ素が重要な役割を果たしていることが示唆された。

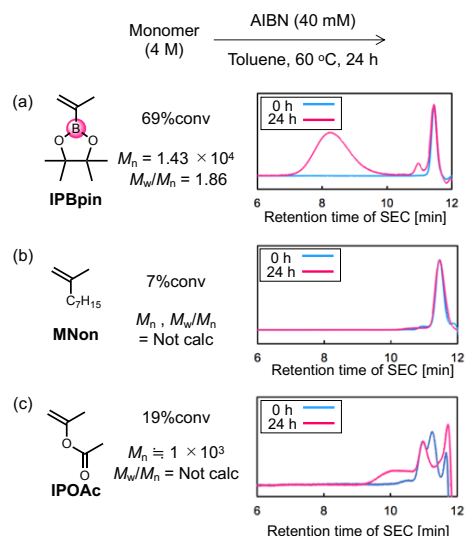


Fig. 3 Free radical polymerization of IPBpin, MNon, and IPOAc for comparison of their ability as the monomer for radical polymerization.

IPBpinのラジカル重合におけるホウ素の役割について明らかにするため、汎密度関数理論(DFT)に基づく量子化学計算による詳細な検討を行った(図4)。ホウ素の効果によりフリーラジカル重合中において特定の副反応が抑制されていると考え、退化的連鎖移動反応(DCT)に着目した。 α 位にメチル基を有するタイプのモノマーは成長ラジカルによるモノマーの水素引き抜きによって比較的安定なアリルラジカルを与える形式のDCTにより重合が阻害される場合があることが知られる。実際に、IPOAcのラジカル重合においてはDCTが頻発するために高分子量が得られないことが報告されている⁹。そこで、IPOAcとIPBpinに関してDCTにおけるエネルギー変化をDFT計算により求めた。

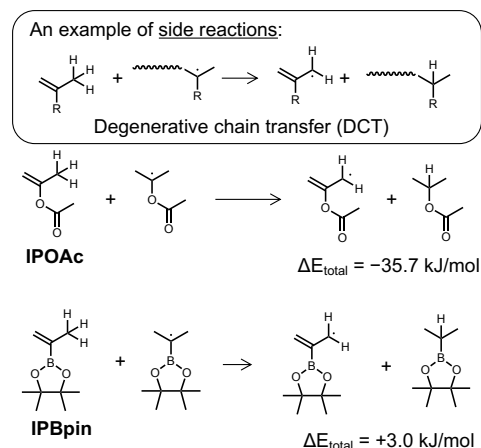


Fig. 4 DFT-calculation of total energy change in DCT process in the case of IPOAc and IPBpin (UB3LYP/6-31G*).

IPOAcの場合にはDCTは大きな発熱を伴う過程($\Delta E_{\text{total}} = -35.7 \text{ kJ/mol}$)であり、フリーラジカル重合中においてこの種の副反応が頻発していることが示唆された。一方でIPBpinの場合にはDCTは吸熱過程($\Delta E_{\text{total}} = +3.0 \text{ kJ/mol}$)であり、フリーラジカル重合中においても比較的DCTが抑制されていることが示唆された。これは、IPBpinの成長末端における炭素中心ラジカルが空のp軌道を有するホウ素に隣接していることにより安定化され、相対的にDCTによって生じるアリルラジカル種が不安定化したためであると考えられる。つまり、ホウ素の有する特異な元素特性がIPBpinの効率的なラジカル重合を実現する上で重要な鍵となることが分かる。

3. IPBpinをモノマーとする制御ラジカル重合

続いて、IPBpinをモノマーとして利用する機能性高分子材料開発の可能性を探るため、可逆的付加-開裂連鎖移動(RAFT)に基づく制御ラジカル重合に関する検討を行った(図5)。市販の2-cyano-2-propyl dodecyl trithiocarbonate(CPDT)とラジカル開始剤であるAIBNの存在下、IPBpinのトルエン溶液を加熱・攪拌した。CPDTが存在する条件下においてもIPBpinは順調に消費され、反応開始より48時間後には消費率が80%近くに達した。SECを用いたサンプリングによると、モノマー消費と共にSECピークが徐々に高分子量側へとシフトした。消費率とポリマーの数平均分子量の関係をプロットしたところ、概ね直線関係となるほか、分子量分布は1.3程度と比較的低い値となった。以上の結果より、IPBpinをモノマーとして用いる制御ラジカル重合が進行したことが示唆された。

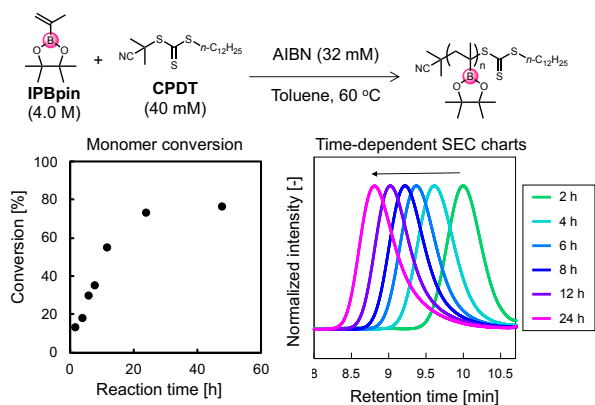


Fig. 5 Monitoring of radical polymerization of IPBpin in the presence of RAFT reagent.

上記に加え、IPBpinとCPDTの物質質量比を様々に変化した条件の元でRAFT重合を行った。おおよそ $[\text{IPBpin}]/[\text{CPDT}] = 5\text{--}80$ の範囲で検討を行ったところ、いずれの条件においても重合はスムーズに進行し、各重合において得られたポリマーの数平均分子量は仕込み比と消費

率より求められた予想重合度に対して直線関係となった。つまり、RAFT重合によってIPBpinのラジカル重合により得られるポリマーの重合度を制御可能であることが分かった。

更に、IPBpinをモノマーとするブロック共重合体合成を試みた。メチルアクリレート(MA)とCPDTから調製されるマクロ連鎖移動剤を用い、IPBpinのラジカル重合を行った。反応前後におけるSECピークを比較した結果、単峰性を保ったまま高分子量側へとシフトしており、MAとIPBpinからなるブロックコポリマーの合成が可能であることが分かった。また、IPBpinとCPDTから調製されるマクロ連鎖移動剤を利用し、スチレンのラジカル重合を試みた。反応後に得られたポリマーのSECピークを見ると、小さなピークが低分子量側に残るものの、全体としてピークは高分子量側へとシフトしており、スチレンからなるセグメントが導入されたことが分かった。このようにIPBpinはRAFT試薬を用いた制御ラジカル重合に適用可能であり、分子量制御やブロックコポリマー合成に成功した。

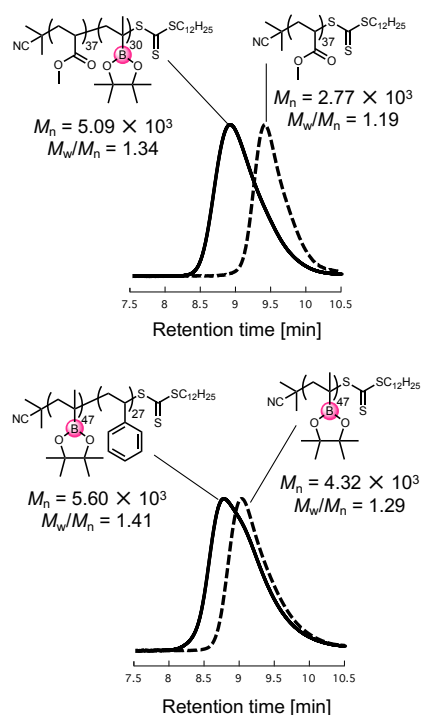


Fig. 6 Block copolymer synthesis using IPBpin with MA or Styrene.

4. ボロン酸エステル側鎖の置換反応を鍵とする新規高分子合成

IPBpinのラジカル重合により得られたビニルポリマーは、主鎖に直接置換したボロン酸エステル側鎖を有している。このボロン酸エステル側鎖を異なる官能基で置き換えることにより、従来法では困難とされてきた高分子合成を行った。まず、興味深い両親媒性を示すことが知られポリ(α -メチルビニルアルコール)(PMVA)を標的とした¹⁰。ポリ

ビニルアルコールは酢酸ビニルのラジカル重合と高分子反応（酸化）によって合成されるが、上述したようにIPOAcは退化的連鎖移動を起こすために同様のプロセスでPMVAを合成するのは困難であることが知られている。そこで、本研究において得られたポリマーのボロン酸エステル側鎖をヒドロキシ基で置き換えることによりPMVAの合成を行った。加熱条件下で過酸化水素と水酸化ナトリウムを作用させ、得られたポリマーのIRスペクトル測定を行った。反応前と比較して3300 cm⁻¹付近に大きくブロードなピークが生じており、ヒドロキシ基の導入が示唆された。また、¹H NMRスペクトルに関しても反応前後において比較を行ったところ、反応前に存在したボロン酸エステル側鎖のピナコールに由来するピークcが消失し、反応後にヒドロキシ基に由来するピークc'が6.0 ppm付近に生じていた。これらの結果は側鎖置換反応が定量的に進行し、従来は困難であったPMVAの合成に成功したことを意味している。

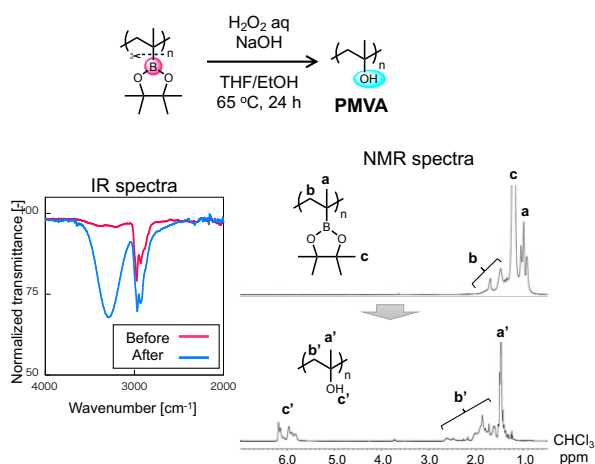


Fig. 7 Side chain replacement for synthesis of PMVA.

また、*O*-メチルヒドロキシアミンを窒素源とするアルキルボロン酸エステルのアミノ化反応が報告されている¹¹。そこで本研究で得られたポリマーにこの反応を適用し、ポリ(α -メチルビニルアミン)を合成する試みも行った。反応後に得られたポリマーは溶解性が大きく変化し、重クロロホルムに溶解しなかったために重メタノールを用いた¹H NMR測定を行った。得られたピークはブロードであり、 α 位のメチル基と高極性のアミノ基が共存することで、何らかの集合体形成が起こったと考えられる。加えてIRスペクトル測定を行うと-NH₂基の伸縮振動に由来する3300 cm⁻¹付近のブロードなピークと変角振動に由来する1600 cm⁻¹付近のピークが見られた。これにより、炭素-ホウ素結合の切断に伴い、アミノ基が導入されたことが示唆された。

更に、ボロン酸エステル部位を利用する側鎖置換反応を利用した新規ブロック共重合体合成に取り組んだ。RAFT

重合により得られたIPBpinとスチレンからなるブロック共重合体を酸化条件に付し、PMVAセグメントを有するブロックコポリマーへと変換した。得られたコポリマーをメタノールに溶解させ、動的光散乱法による測定を行ったところ、ナノメートルスケールの集合体が形成されていることが分かった。さらに透過型電子顕微鏡(TEM)を用いた観察を行ったところ、同様のスケールの粒子状集合体が観察され、PMVA/スチレンセグメントの両親水性に由来するミセル形成が起こっていることが明らかになった。PMVAセグメントを有するブロックコポリマーの形成は過去に例がなく、側鎖置換反応を鍵とする高分子合成の有効性を示している。

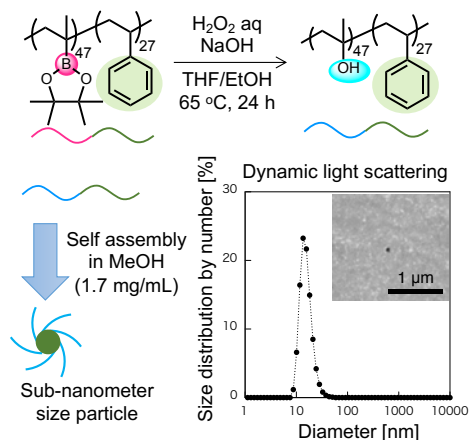


Fig. 8 Block copolymer synthesis through side chain replacement.

5. まとめと今後の展開

本研究ではホウ素がアルケン部位に結合したIPBpinが高いラジカル重合性を有することを初めて見出し、量子化学計算によりホウ素の隣接炭素ラジカル安定化効果が効率的な連鎖成長を実現する上で重要な役割を果たしていることが分かった¹²。RAFT試薬を用いる制御ラジカル重合にも適用可能であり、重合度の制御やブロックコポリマー合成を達成した。更に高分子反応においてボロン酸エステル側鎖はヒドロキシ基やアミノ基へと変換可能であり、これを利用して従来は困難とされてきた高分子合成に成功した。今後は更なる高重合度体の合成を目指したホウ素上置換基構造・重合システムの最適化に加え、ボロン酸エステル側鎖の幅広い変換反応の開発を行う予定である。

参考文献

- 1) Odian, G. *Principles of Polymerization*, 4th ed.; Wiley: Hoboken, NJ (2004).
- 2) Hawker, J. C.; Wooley, L. K. *Science* 309, 1200 (2005).

- 3) Hall, D. G. *Boronic Acids : Preparation and Applications in Organic Synthesis, Medicine and Materials*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany (2011).
- 4) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **95**, 2457 (1995).
- 5) Sandford, C.; Aggarwal, K. V. *Chem. Commun.* **53**, 5481 (2017).
- 6) Matteson, S. D. *Chem. Rev.* **89**, 1535 (1989).
- 7) Wan, M. W.; Baggett, W. A.; Cheng, F.; Lin, H.; Liu, Y. S.; Jäkle, F. *Chem. Commun.* **52**, 13616 (2016).
- 8) van de Wouw, H. L.; Lee, Y. J.; Klausen, S. R. *Chem. Commun.* **53**, 7262 (2017).
- 9) Kuwae, Y.; Kamachi, M.; Nozakura, S. *Macromolecules* **19**, 2912 (1986).
- 10) Nishino, T.; Kitamura, N.; Murotani, K. *J. Polym. Sci. Part A* **47**, 754 (2009).
- 11) Edelstein, K. E.; Grote, C. A.; Palkowitz, D. M.; Morken, P. J. *Synlett* **29**, 1749 (2018).
- 12) Nishikawa, T.; Ouchi, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 12435 (2019).

ポリマーブラシ付与微粒子の混晶形成

Binary Colloidal Crystal of Polymer-Brush-Decorated Hybrid Particles

辻井 敬亘・大野 工司・大野 晴久・久富 達也

Yoshinobu TSUJII, Kohji OHNO, Haruhisa OHNO, Tatsuya HISATOMI

Institute for Chemical Research, Kyoto University

We here construct binary colloidal crystals by exerting attractive force between two kinds of particles grafted with polymer brushes having hydrogen-bonding ability, which are synthesized by surface-initiated living radical polymerization. For this goal, two types of silica particles labelled with rhodamine B and NBD as fluorescent dyes are synthesized (referred to Rh-SiP and NBD-SiP, respectively). Polymer brushes composed of copolymers of an adenine-containing monomer and methyl methacrylate (MMA) as well as a thymine-containing monomer and MMA are grafted onto Rh-SiPs and NBD-SiPs, respectively. As a result of confocal laser scanning microscope observation for a mixed suspension of the nucleobase-containing-polymer-brush-decorated hybrid particles, these particles form binary colloidal crystals by appropriately controlling the attractive force exerting between them with parameters such as the content of nucleobases and the type of solvent.

1. はじめに

コロイド粒子が周期的に配列したコロイド結晶は、その周期的な構造に起因して特定の波長の光を選択的に反射するという特徴を持つ。その性質を利用し、回折格子やレーザー、センサーなど、幅広い分野での応用が期待されている。また、原子や分子、イオンからなる一般的な結晶とは異なり、コロイド結晶は構築する粒子の配列や挙動を顕微鏡により直接観察することができる。そのため、結晶化を研究する際のモデル系として用いられている。一種類のコロイド粒子からなる一成分系コロイド結晶を構築した例は多く報告されているものの、とり得る構造に制限がある。一方で、二種類のコロイド粒子から成る二成分系コロイド結晶は、微粒子のサイズ比や混合比により多彩な構造をとると考えられ、実用化の幅を広げ得る。

これまでに、二成分系コロイド結晶の構築を達成した例として、イオンコロイド結晶¹⁾や、微粒子表面に付与されたDNA鎖間で形成される水素結合を用いた研究²⁻⁶⁾が挙げられる。DNA誘導型コロイド結晶は、非常に興味深い材料ではあるが、DNAの合成が煩雑さであることが課題となる。基本的に、二成分系コロイド結晶では相補的な相互作用を用いており、様々な系で同様の混晶が形成できると考えられるがほとんど例がない。そこで本研究では、水素結合を形成する分子として、DNAに含まれる一種類の核酸塩基対、アデニンおよびチミンのみを用いる方法を検討した。これらの核酸塩基を微粒子表面に導入するにあたり、ポリマーがコア微粒子表面に高密度にグラフトされたポリマーブラシ付与複合微粒子を用いた。この複合微粒子は、コア微粒子の種類や粒径、グラフトするポリマーの種類や鎖長、分散させる溶媒などの各要素を任意に設計することができる。⁷⁻¹⁰⁾この特徴を活かし、一方の微粒子には

アデニンを、他方の微粒子にはチミンを含有する水素結合性ポリマーブラシを表面開始リビングラジカル重合により付与し、ポリマー間に水素結合を形成することで二成分系コロイド結晶の構築を試みた。

2. 実験

2-1. 核酸塩基含有ポリマーブラシ付与複合微粒子の精密合成

Stöber法によりRhodamine BとNitrobenzoxadiazole (NBD)でそれぞれ蛍光標識したシリカ微粒子 (SiP) を合成した (Rh-SiPおよびNBD-SiPと表記する)。得られたシリカ微粒子に原子移動ラジカル重合法 (ATRP) の開始基を付与し、さらに、表面開始ATRP (SI-ATRP) によりファーストブロックとしてmethyl methacrylate (MMA)を重合した。次にRh-SiPにはセカンドブロックとして、MMAとアデニン含有モノマー (Fig. 1a) からなる共重合体を導入した。一方、NBD-SiPにはMMAとチミン含有モノマー (Fig. 1b) からなる共重合体を導入した。

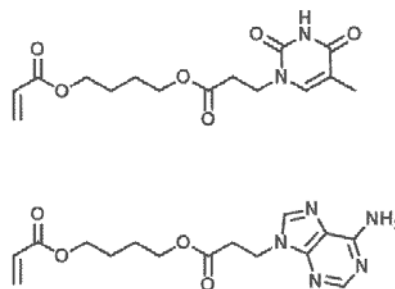


Fig. 1 Chemical structures of thymine-carrying and adenine-carrying monomers.

2-2. 複合微粒子分散液の顕微鏡観察

コロイド結晶を構築するため、複合微粒子の分散液を様々な濃度、溶媒を用いて調製した。2種類の複合微粒子分散液を混合しそれを共焦点レーザースキャン顕微鏡 (CLSM) および2種類の蛍光を同時に検出できる特殊な蛍光顕微鏡で観察した。

3. 結果および考察

3-1. 複合微粒子の合成

CLSMによる観察の際に2種類の微粒子を区別するため、Rh-SiPおよびNBD-SiPを合成し、コア微粒子として用いた。透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察から、コア微粒子の粒径がRh-SiP、NBD-SiPともに約800 nmであることが確認された (Fig. 2)。Rh-SiPとNBD-SiPにSI-ATRPによりファーストブロックとしてPMMA、セカンドブロックにそれぞれMMAとアデニン含有モノマー、MMAとチミン含有モノマーからなる共重合体を導入した。セカンドブロック中の核酸塩基モノマーの含有率は10 mol%である。Rh-SiPに導入されたファーストブロックの数平均分子量(M_n)は114000、セカンドブロックの M_n は27000、グラフト密度は0.45 chains/nm²であった。一方、NBD-SiPに導入されたポリマーブラシのそれらは、それぞれ、112000、37000、0.45 chains/nm²であった。

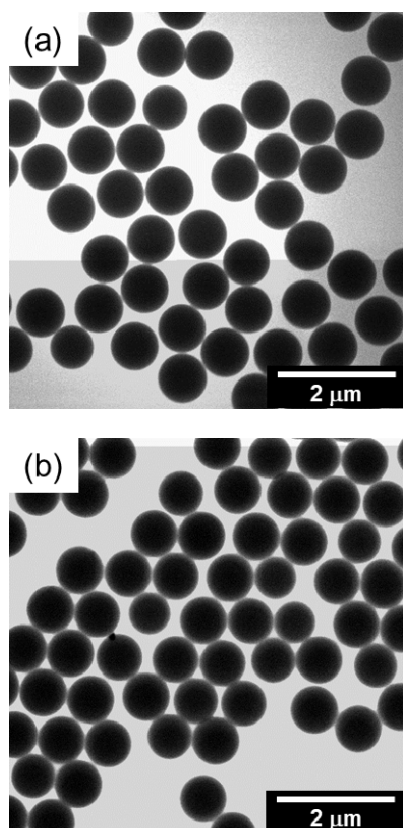


Fig. 2 TEM images of (a) rhodamine-labeled SiPs and (b) NBD-labeled SiPs.

3-2. 複合微粒子の混晶形成

上記2種類のポリマーブラシ付与複合微粒子を1,4-ジオキサン中で混合した。一方の複合微粒子の濃度が大きいときには、低濃度の粒子の周りに複数の他方の粒子が結合した構造体が形成した (Fig. 3a)。また、両者の複合微粒子の濃度が等しいときには、分散液全体で微粒子が凝集した様子が確認された (Fig. 3b)。これらの結果は、2種類の微粒子間に引力が発現していると考えらる。しかし、相互作用が強すぎたために凝集体が形成したと考えられる。

そこで、引力 (水素結合) を弱める方法として、2つのアプローチをとった。その1つが、Rh-SiPのセカンドブロックと同じ組成の共重合体を系中に添加することである。その結果、フリーの共重合体が複合微粒子と拮抗的に相互作用することにより、混合分散液において微粒子を分散させることに成功した。また、極性溶媒であるDMFを添加することにより水素結合を弱めることを行った。その結果、ジオキサンにある体積分率のDMFを混合することにより両者の微粒子が凝集することなく完全に分散することを確認した。これらの結果は、両者の複合微粒子が微粒子表面に存在するアデニンとチミンの相補的な相互作用

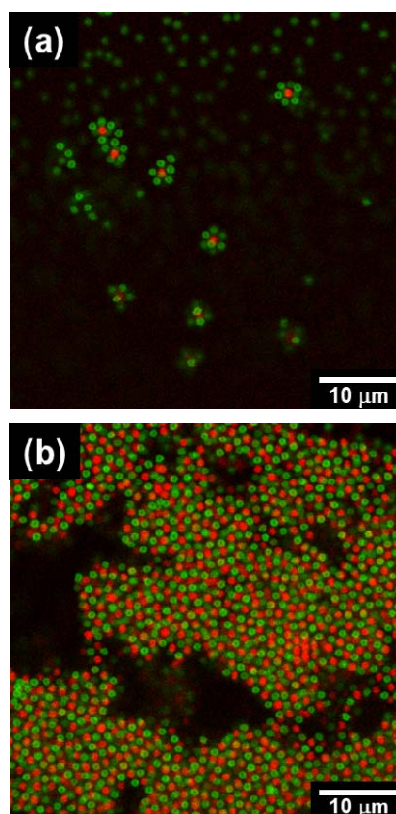


Fig. 3 CLSM images of mixed suspensions of two types of polymer-brush-decorated hybrid particles. (a) The concentration of one of those particles is higher than that of another particles. (b) The concentrations of those particles are almost identical.

によって構造を形成していることを示唆する。

次に、DMFの添加量を変化させ同様に複合微粒子を混合した。Fig. 4に示すように、DMFの濃度が増加するに伴い、微粒子が分散する様子が確認された。また、適切なDMF濃度を用いることにより、両者の複合微粒子が結晶状に配列した混晶を構築することに成功した。同様の濃度依存性はフリー共重合体を添加した系においても観察され、混晶を形成することも確認された。

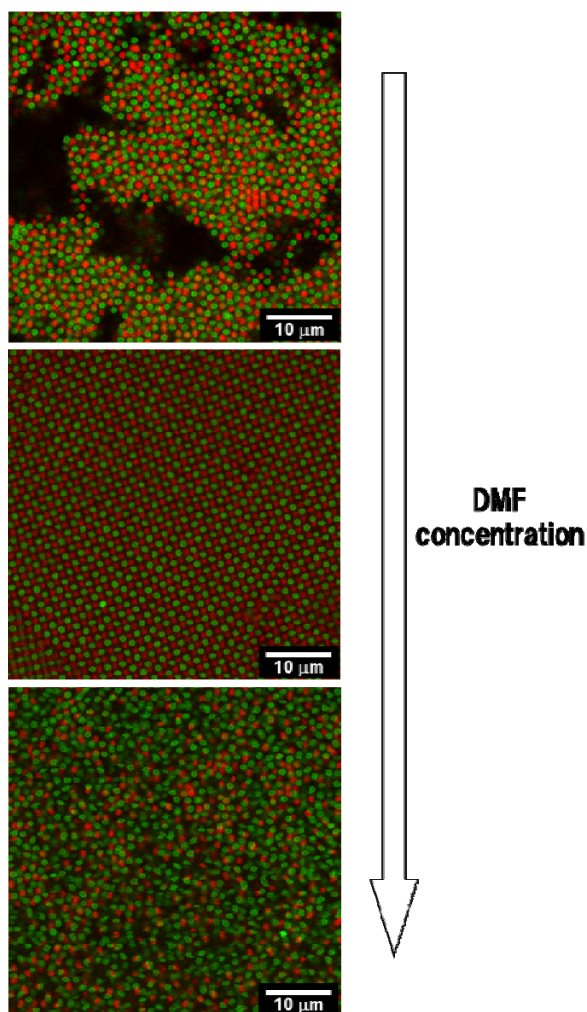


Fig. 4 CLSM images of mixed suspensions of two types of polymer-brush-decorated hybrid particles. The interparticle interaction was controlled by DMF concentration. Under an appropriate DMF concentration, the particle suspension formed a binary colloidal crystal.

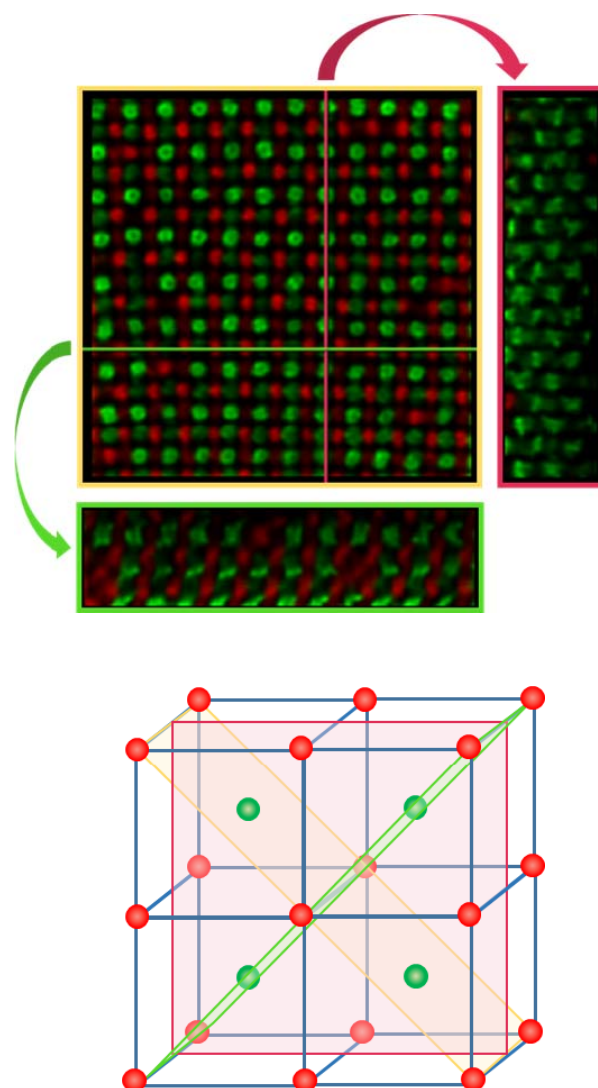
3-3. 混晶の構造解析

共焦点レーザースキャン顕微鏡により得られた混晶の三次元画像を取得した。得られた三次元画像から画像解析ソフトを用いて様々な結晶面を抽出することにより結晶構造を同定することを行った。Fig. 5にコロイド結晶を直

行する3つの平面で切断したときの断面図を示す。この微粒子の配列が、右側の塩化セシウム型結晶の模式図と一致することが確認できた。例えば、断面図の黄色で囲んだ部分の粒子の配列が、模式図の黄色で囲んだ部分の配列と一致することを確認している。このことから、今回構築したコロイド結晶の構造は、塩化セシウム型であると同定した。

3-4. 混晶形成の直性観察

アデニンおよびチミンを含有したポリマーブラシ付与複合微粒子を混合した系において、混晶を形成することが明らかとなった。本系においては混晶中に多くの水素結合



CsCl-type crystal structure

Fig. 5 Structural analysis of binary colloidal crystals by CLSM. The binary colloidal crystals obtained here have a CsCl type crystal structure.

が存在している。それにもかかわらず、なぜ結晶を形成することができるのか、結晶を形成する際にどのように微粒子が運動しているのかは明らかとなっていない。これを解明するために、特殊な蛍光顕微鏡を用いて混晶の形成過程を直接観察することを行った (Fig. 6)。その結果、分散液中において、複合微粒子は激しく運動しており、徐々に2種類の複合微粒子が交互に配列していく様子が確認された。さらに観察を進めると、結晶核が形成しそれが徐々に成長していく様子が確認された。これは、引力系のコロイド結晶において、斥力系と同様の過程を経て結晶が形成していることを直接観察した初めての結果である。

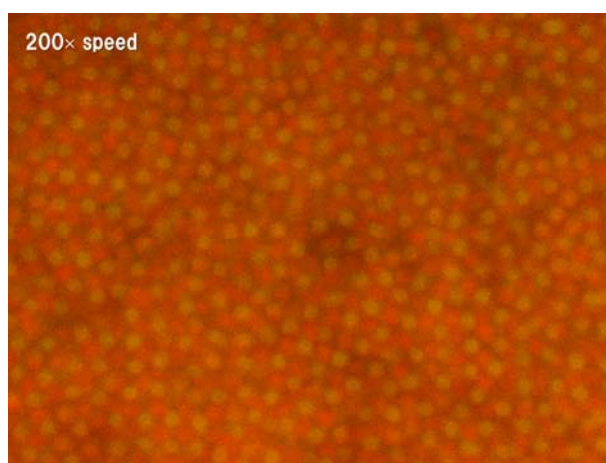


Fig. 6 Video microscopy image of binary colloidal crystal formation. The image was obtained by a fluorescence microscope equipped with a unique optical system which can detect two different wavelengths simultaneously. We confirm that the particles moved around, the alternating arrangement of green and red particles gradually increases, crystal nuclei form, and crystals grow gradually.

4. 最後に

DNA間に形成される相補的な水素結合を用いたコロイド結晶の構築が達成されていたが、本研究では水素結合を形成する分子としてアデニンとチミンのみを用いたよりシンプルな系での混晶の構築を行った。アデニンおよびチミンを含有するモノマーを合成した後、蛍光標識した微粒子表面からSI-ATRPを行うことで、水素結合性ポリマーブラシを付与した複合微粒子を合成した。そして低極性溶媒中でそれらの微粒子間に引力が働くことを確認し、さらに、第三成分 (極性溶媒など) の添加により引力相互作用を調節できることが分かった。微粒子間の引力を適切に調節することで、二成分系コロイド結晶が構築することを明らかにした。さらに、その混晶形成過程をユニークな光学顕微鏡システムで直接観察することに成功した。本研究でコロイド混合結晶の新しい系を構築できたことは意義深い。それに加え、ここで観察された現象は、他のソフトマ

ターの高次構造形成を理解する上でも有用な知見になると考えている。今後はコロイド系だけでなく、ゲルや自己修復材料への応用も視野に入れ材料設計に取り組む。

参考文献

- 1) M. E. Leunissen, C. G. Christova, A.-P. Hynninen, C. P. Royall, A. I. Campbell, A. Imhof, M. Dijkstra, R. van Roij, A. van Blaaderen, *Nature*, **437**, 235 (2005).
- 2) C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature*, **382**, 607 (1996).
- 3) S. Y. Park, A. K. R. Lytton-Jean, B. Lee, S. Weigand, G. C. Schatz, C. A. Mirkin, *Nature*, **451**, 553 (2008).
- 4) D. Nykypanchuk, M. M. Maye, D. van der Lelie, O. Gang, *Nature*, **451**, 549 (2008).
- 5) Y. Wang, Y. Wang, X. Zheng, E. Ducrot, J. S. Yodh, M. Weck, D. J. Pine, *Nature Commun.*, **6**, 7253 (2015).
- 6) J. Zhu, Y. Kim, H. Lin, S. Wang, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 5061 (2018).
- 7) K. Ohno, T. Morinaga, K. Koh, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, **38**, 2137 (2005).
- 8) K. Ohno, T. Morinaga, S. Takeno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, **39**, 1245 (2006).
- 9) K. Ohno, T. Morinaga, S. Takeno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, **40**, 9143 (2007).
- 10) K. Ohno, T. Akashi, Y. Huang, Y. Tsujii, *Macromolecules*, **43**, 8805 (2010).

水溶性高分子の水和と相挙動に関する理論的研究

Theoretical Study of Hydration and Phase Behavior of Water-soluble Polymers

古賀 毅・小島 広之

Tsuyoshi KOGA, Hiroyuki KOJIMA

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

Phase behaviors of aqueous solutions of hyperbranched poly(*N*-isopropylacrylamide)s have been theoretically investigated on the basis of cooperative hydration of polymer chains. The cooperative hydration is a hydration of polymers with a tendency to form long sequences of bound water molecules along the polymer chains. By assuming that the cooperativity of hydration is interrupted by the branching points, we have discussed the effects of the molecular branching structures, such as the molecular weight, the chain length between branching points, and the generation number, on the phase behavior. The phase diagrams are constructed by numerical calculation of the binodal curves, the spinodal curves, and the critical point. The effect of hydration of branching points and end groups on the phase behavior are also investigated. The calculation results of transition temperature have been compared with the experimental cloud point data, and a good qualitative agreement has been found.

1. 緒言

水溶性高分子は、その物理化学的性質を活かして、食品、化粧品、衛生用品、医療用品、塗料、環境浄化剤などで利用されており、日常生活から産業技術にわたる幅広い分野で必要不可欠な高分子材料となっている。水溶性高分子の物性を物理化学に基づいて理解することは、基礎科学的な知見の蓄積だけでなく、水溶性高分子の機能開発及び制御のために重要である。

代表的な水溶性高分子の一つである Polyethylene oxide (PEO)の水溶液は下限臨界相溶温度を示し、その相図の形状は分子量に依存し、閉環状や砂時計型などの形状をとることが知られている¹⁾。水中における高分子の水和現象が水溶液の相挙動を決める重要な要因と考えられている²⁾。温度変化に敏感に応答する水溶性高分子として知られるポリ *N* イソプロピルアクリルアミド (PNIPAM) は、温度上昇に伴い約 32℃を境にその高分子鎖の形態がランダムコイルからグロビュール状態に変化し、その水溶液は白濁する^{3,4)}。また、PNIPAM を化学架橋したハイドロゲルは、温度変化に伴ってその体積が不連続に変化する体積相転移を示すことが知られている⁵⁾。このような PNIPAM の感熱性は、高分子鎖に沿って隣接した、高分子に水素結合した水分子（水和水）の間に協同性があると考えると、これらの挙動をよく説明できることが分かってきた^{6,7)}。

PNIPAM 水溶液の相図に及ぼす高分子鎖の末端基効果に関する研究によると⁸⁾、その末端基の親水性及び疎水性によって、水溶液の曇点は分子量の低下に伴って増加または低下を示す。比較的長い疎水性末端基を有する PNIPAM では、分子量低下に伴う曇点の顕著な低下を示す。これは、高分子の疎水性末端基の会合による会合体形成に起因すると考えられている。また、両末端を疎水基で修飾したテレケリック PNIPAM (tel-PNIPAM) 水溶液の小角中性子散

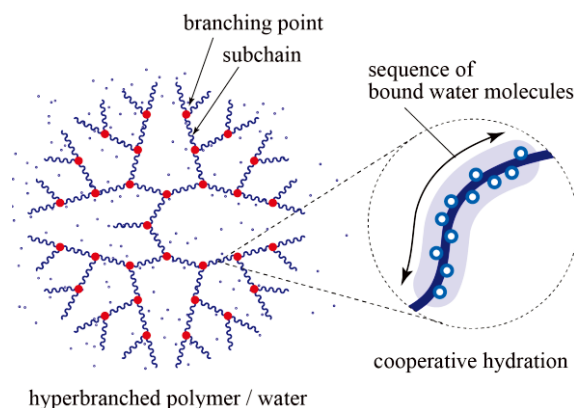


Fig. 1 Schematic image of thermosensitive hyperbranched polymers in water, where the chains between branching points are hydrated with a tendency to form long sequences of bound water molecules along the polymer chains.

乱測定結果の理論解析により、PNIPAM 鎖が脱水和により凝集し、階層的な会合構造を形成することが分かってきた⁹⁾。このように、直鎖 PNIPAM 水溶液に関する物性が実験・理論両面から研究が進められている。

近年、高分子合成手法の進歩により、分布の狭い直鎖高分子だけでなく、分子構造の制御された多分岐構造を有する高分子の合成が簡便にできるようになってきた¹⁰⁾。多分岐高分子は直鎖高分子と比べて、低い粘性、高い溶解性などの特徴を持ち、様々な分野での応用が期待されている¹¹⁾。三次元構造が制御された多分岐 PNIPAM が合成され、その水溶液の相挙動が調べられ¹²⁾、サイズの小さな分岐点及び末端基を有する多分岐 PNIPAM において、分子量の低下に伴い、その水溶液の曇点は低下することが報告された。先述の疎水性末端基を有する直鎖 PNIPAM の水溶液が示す分子量低下に伴う曇点降下⁸⁾とは異なる分子機構で生じているものと考えられる。

本報では、制御された多分岐構造を有する PNIPAM の水溶液が示す分子量低下に伴う曇点降下の分子機構を明らかにするため、多分岐高分子の協同水和の統計熱力学的モデルを構築し、水和の協同性と多分岐性の関係が相挙動に与える影響について調べた (Fig.1)。

2. 理論

溶液の非圧縮性を仮定し、多分岐高分子水溶液を多分岐高分子と水分子の2成分系として、格子モデルをもとに溶液の自由エネルギーを見積もる。また、高分子の多分散性は無視し、1つの多分岐高分子は n 個のセグメントからなるとする。

2-1. 多分岐構造

Fig.2 に、例として第5世代を有する多分岐高分子の化学構造を2次元平面上に描いたものを示す。フォーカルポイントからでた部分鎖が分岐点で二手に分岐し、新たな世代の部分鎖がでる。さらに次の世代の分岐点から二手に部分鎖が分岐する。これを繰り返す、最後に部分鎖の端に末端基が入る。中心から外側へ向かって世代が大きくなる。

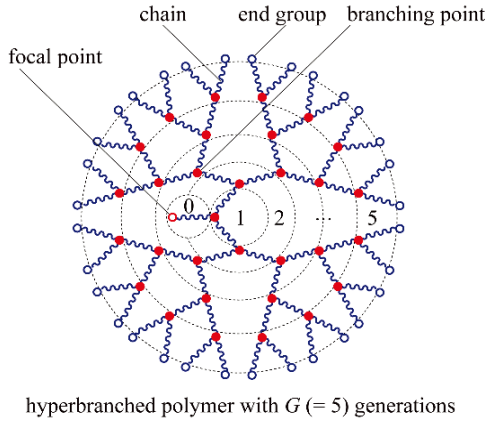


Fig. 2 Schematic image of thermosensitive hyperbranched polymers with $G(=5)$ generations.

第 α 世代に属する分岐点間の高分子鎖（部分鎖）の数を $N_c(\alpha)$ 、分岐点の数 $N_b(\alpha)$ と表す。それぞれ $N_c(\alpha) = 2^\alpha (\alpha \geq 0)$ 、 $N_b(\alpha) = 2^{\alpha-1} (\alpha > 0)$ である。第 $G(>0)$ 世代多分岐高分子が有する部分鎖の数は、各世代の部分鎖の和として $N_c = 2^{G+1} - 1$ となる。同様に、分岐点の数は $N_b = 2^G - 1$ 、末端基の数は $N_e = 2^G$ となる。フォーカルポイントの数は $N_f = 1$ である。世代数 G の増加に伴って分岐点と末端基の数は指数関数的に増加する。

各部分のセグメント数をそれぞれ、 n_f （フォーカルポイント）、 n_c （高分子鎖）、 n_b （分岐点）、 n_e （末端基）とし、1つの多分岐高分子が有する各部分の数をそれぞれ、 N_f （フォーカルポイント）、 N_c （高分子鎖）、 N_b （分岐点）、 N_e （末端基）とすると、1つの多分岐高分子が有するセグメント数 n は以下の式で与えられる。

$$n = n_f N_f + n_c N_c + n_b N_b + n_e N_e$$

2-2. 溶液の自由エネルギーと会合平衡

溶液の自由エネルギーを以下のように混合及び水和による寄与の和で表されるとする。

$$\Delta F = \Delta_{\text{mix}} F + \Delta_{\text{hyd}} F$$

高分子の水和状態を識別する標識 j を導入すると、混合自由エネルギー $\Delta_{\text{mix}} F$ は以下のように与えられる。

$$\beta \Delta_{\text{mix}} F = N_{\text{fw}} \ln \phi_{\text{fw}} + \sum_j N(j) \ln \phi(j) + \Omega \chi(T) \phi(1 - \phi)$$

ここで $\beta \equiv 1/(k_B T)$ である。右辺第1式は高分子の水和に関与していない水分子（自由水）の並進エントロピーであり、 N_{fw} 、 ϕ_{fw} はそれぞれ自由水の分子数、体積分率である。高分子と水素結合した水分子（水和水）の並進自由度は失われる。右辺第2式は様々な水和状態にある高分子の並進エントロピーの和であり、 $N(j)$ 、 $\phi(j)$ はそれぞれ水和状態 j の高分子の分子数、体積分率である。右辺第3式は高分子と水分子の接触エネルギーによる相互作用項であり、熱エネルギーで無次元化したFloryの相互作用パラメータ $\chi(T)$ で表され、温度のみの関数であるとする。 ϕ は高分子の体積分率である。水和自由エネルギー変化 $\Delta_{\text{hyd}} F$ は以下のように、全ての水和状態からの寄与の和である。

$$\beta \Delta_{\text{hyd}} F = \sum_j N(j) \beta \Delta A(j)$$

ここで、 $\Delta A(j)$ は水和していない状態 j_0 （基準状態）にある高分子から水和状態 j の高分子を形成するさいに必要な自由エネルギー変化である。水和状態の平衡分布を得るため、これらの自由エネルギーから以下の各分子の化学ポテンシャルを得る。

$$\beta \Delta \mu_{\text{fw}} = 1 + \ln y - v^S + \chi \phi^2$$

$$\beta \Delta \mu_{\text{fp}} = 1 + \ln x - n v^S + n \chi (1 - \phi)^2$$

$$\beta \Delta \mu(j) = 1 + \ln \phi(j) - n(j) v^S + n \chi [(1 - \phi)^2 + \theta(j) \phi^2] + \beta \Delta A(j)$$

ここで、簡単のため $x \equiv \phi(j_0)$ 、 $y \equiv \phi_{\text{fw}}$ 、 $\Delta \mu_{\text{fp}} \equiv \Delta \mu(j_0)$ と表した。並進自由度を有する分子の数密度 $v^S \equiv y + \phi/n$ である。高分子の水和に関する以下の会合平衡条件

$$\Delta \mu(j) = \Delta \mu_{\text{fp}} + n \theta(j) \Delta \mu_{\text{fw}}$$

を課し、以下の平衡分布を得る。

$$\phi(j) = K(j) x y^{n \theta(j)} \quad (1)$$

ここで、 $K(j)$ は会合平衡定数

$$K(j) \equiv \exp[n \theta(j) - \beta \Delta A(j)]$$

である。

2-3. 吸着多項式

以下の高分子の k 次の吸着多項式 $g_k(y)$ を以下のように定義する。

$$g_k(y) \equiv \sum_j \theta(j)^k v(j) y^{n \theta(j)}, \quad (k = 0, 1, 2, \dots)$$

ここで

$$v(j) \equiv K(j) / [1 + \theta(j)]$$

である。以下の関係式を用いて、低次の吸着多項式から高次の多項式が計算できる。

$$g_k(y) = \frac{1}{n} \frac{\partial g_{k-1}(y)}{\partial \ln y}, \quad (k = 0, 1, 2, \dots) \quad (2)$$

これらの多項式を用いると、高分子の平均水和率 θ 、水和の揺らぎ δ が以下のように計算できる。

$$\theta = \frac{g_1(y)}{g_0(y)}$$

$$\delta = \frac{g_2(y)}{g_0(y)} - \left(\frac{g_1(y)}{g_0(y)} \right)^2$$

分布の式(1)の和を取ると

$$\phi = x g_0(y)$$

また、水和水の数 ϕ_{bw} は

$$\phi_{bw} = \theta \phi$$

と表せる。これより、物質保存の関係式

$$1 = \phi_{fw} + \phi_{bw} + \phi$$

に代入して次式を得る。

$$1 = y + (1 + \theta)\phi$$

この方程式を y について解くことで、 y を温度 T と濃度 ϕ の関数として得る。これより温度 T と濃度 ϕ における高分子の平均水和率 θ 、水和の揺らぎ δ が計算できる。また、各世代に属する部分鎖、分岐点、末端基に関する吸着多項式を定義し、

$$f_k(y) \equiv \sum_j \theta_f(j)^k v_f(j) y^{n_f \theta_f(j)},$$

$$c_k^{(\alpha)}(y) \equiv \sum_j \theta_c(j)^k v_c(j) y^{n_c \theta_c(j)},$$

$$b_k^{(\alpha)}(y) \equiv \sum_j \theta_b(j)^k v_b(j) y^{n_b \theta_b(j)},$$

$$e_k(y) \equiv \sum_j \theta_e(j)^k v_e(j) y^{n_e \theta_e(j)}$$

これらを用いて以下の関係式より、それぞれの水和率を計算することができる。

$$\theta_f = \frac{f_1(y)}{f_0(y)}$$

$$\theta_c = \frac{c_1(y)}{c_0(y)}$$

$$\theta_b = \frac{b_1(y)}{b_0(y)}$$

$$\theta_e = \frac{e_1(y)}{e_0(y)}$$

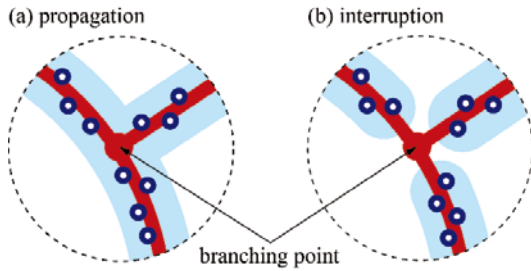


Fig. 3 (a) Propagation of cooperativity through the branching point and (b) interruption of cooperativity by the branching point.

Fig.3a に示すように、部分鎖の水和の協同性は分岐点を通じて他の部分鎖へ伝播することも考えられるが、部分鎖セグメントと分岐点の化学構造の違いから、分岐点を伝って隣接する部分鎖には伝播せず、分岐点で途切れると仮定する (**Fig.3b**)。

これより各部分の水和は独立に扱えるので、高分子の0次の吸着多項式は以下のように書ける。

$$g_0(y)$$

$$= [f_0(y)]^{n_f} \left[\prod_{\alpha=0}^G [c_0^{(\alpha)}(y)]^{N_c(\alpha)} \right] \left[\prod_{\alpha=0}^G [b_0^{(\alpha)}(y)]^{N_b(\alpha)} \right] [e_0(y)]^{N_e}$$

世代ごとに水和率が異なっている場合も扱えるが、ここで、各部分の水和がすべての世代で同等であると仮定すると、高分子の0次の吸着多項式は以下により簡単な形となる。

$$g_0(y) = [f_0(y)]^{n_f} [c_0(y)]^{N_c} [b_0(y)]^{N_b} [e_0(y)]^{N_e}$$

以下ではこれをもとに計算を進める。転送行列法を用いて各部分の水和に関する吸着多項式は以下のように求められる。

$$c_0(y) = e^{M_c} [\lambda_1^{n_c-1} (e^{C_c+K_c} \cos \phi_c + e^{-C_c-K_c} \sin \phi_c)^2 + \lambda_2^{n_c-1} (-e^{C_c+K_c} \sin \phi_c + e^{-C_c-K_c} \cos \phi_c)^2]$$

$$b_0(y) = e^{M_b} [2 \cosh(2C_b)]^{n_b}$$

$$f_0(y) = e^{M_f} [2 \cosh(2C_f)]^{n_f}$$

$$e_0(y) = e^{M_e} [2 \cosh(2C_e)]^{n_e}$$

ここで

$$C_c = \frac{1}{4} \ln(\lambda_c y)$$

$$M_c = \frac{n_c}{2} \ln(\lambda_c y) + \frac{1}{4} (n_c + 1) \ln \sigma$$

$$K_c = \frac{1}{4} \ln \sigma$$

$$C_x = \frac{1}{4} \ln(\lambda_x y), \quad (x = f, b, e)$$

$$M_x = \frac{n_x}{2} \ln(\lambda_x y), \quad (x = f, b, e)$$

である。 λ_c 、 λ_f 、 λ_b 、 λ_e はそれぞれ、部分鎖、フォーカルポイント、分岐点、末端基の水和に関する会合定数である。

3. 結果と考察

温度は高分子の水和を考慮しないときの θ 温度で無次元化した温度 $\tau \equiv 1 - \theta/T$ を用い、 χ パラメータは

$$\chi = 1/2 - \psi \tau$$

とする。 ψ は高分子と溶媒分子により決まる物質定数である。会合定数を

$$\lambda_x = \lambda_{x0} \exp[\gamma_x (1 - \tau)], \quad (x = c, f, b, e)$$

と表し、 λ_{x0} 及び γ_x の値には直鎖 PNIPAM 水溶液の相図研究で用いられた数値を用い、 $\lambda_{x0} = 0.002$ ($x = c, f, b, e$)、 $\gamma_c = 3.5$ とした。部分鎖の水和の協同性、及び部分鎖以外の部分の水和強度の効果を調べるため、これらの値を系統的に変化させ、これらが相挙動および水和挙動に与える効果を調べた。

3-1. 多分岐構造と協同水和

多分岐高分子の分岐点における水和の協同性の分断が相挙動に及ぼす効果について調べるため、ここでは、分岐点が部分鎖間における水和の協同性を阻害するものとしてのみ働き、分子量への寄与は小さく無視できるとし、各部分のセグメント数を $n_f = 0$ (フォーカルポイント)、 $n_c = 5 \sim 600$ (部分鎖)、 $n_b = 0$ (分岐点)、 $n_e = 0$ (末端基)とした。部分鎖以外の部分の水和はここでは考えない。

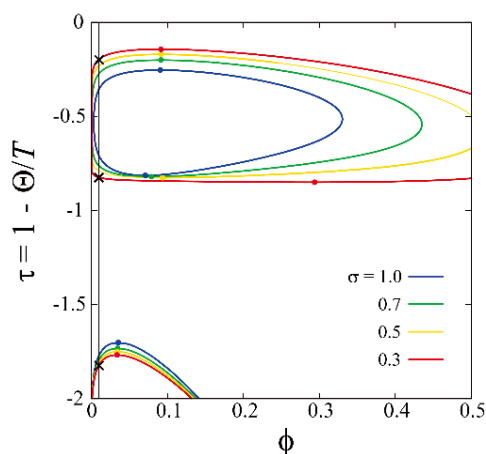


Fig. 4 Phase diagram of linear polymers in water. The cooperativity parameter σ is varied from curve to curve.

Fig.4 に直鎖高分子 ($G = 0$) における温度・濃度平面上にバイノーダル線を示した。岡田・田中らのスピノーダル線と同様に、協同性により平らな相転移曲線が得られた。以下では、高分子濃度を $\phi = 0.01$ と固定し、その濃度におけるバイノーダル点を相転移温度として分子量依存性を議論する。**Fig.4** に示すように相図では 3 つの温度が存在する可能性があるが、実験で観測される温度範囲内の相転移温度に対応する中間のバイノーダル点に着目する (**Fig.4** の $\sigma = 0.3$ における $\times$ 印)。以下では、多分岐高分子の世代数 G と協同性パラメータ σ の関係を議論する。

Fig.5 に世代数 $G = 0, 3, 4, 5$ の直鎖高分子及び多分岐高分子の相転移温度の分子量依存性を示す。協同性パラメータ σ を系統的に変化させた。**Fig.5a** は $\sigma = 1.0$ (水和に協同性のない独立水和) の結果を示している。この場合、世代数 G の値に関わらず、相転移温度の分子量依存性は一つの線上に重なる。これは、水和に協同性がなく、分岐点による水和への影響がないためである。**Fig.5b, 5c, 5d** では、協同性パラメータ σ を 0.7, 0.5, 0.3 と変化させた。協同性が強くなるほど、相転移温度の分子量依存性が世代数 G に強く依存するようになる。いずれの場合も世代数 G の大きい場合ほど相転移温度が低下する。協同性がある程度強くなると分子量の低下に伴い相転移温度が低下する傾向が現れる (**Fig.5c, 5d**)。これは水和の協同性が分岐点の導入に従い分断されるためである。ここでは水和の協同性と高分子の分岐構造に焦点を当てるため、高分子の分岐構造が混合エントロピーに及ぼす影響は理論には含めていない。

次に、**Fig.6** に水和の協同性と多分岐構造が高分子の水和挙動 (水和率の温度依存性) に与える効果を示す。協同性パラメータ σ の値を (a) 1.0 (独立水和)、(b) 0.7、(c) 0.5、(d) 0.3 と系統的に変化させた。世代数 $G = 0, 3, 5$ の結果を重ねてプロットした。**Fig.6a** は水和に協同性がない場合の

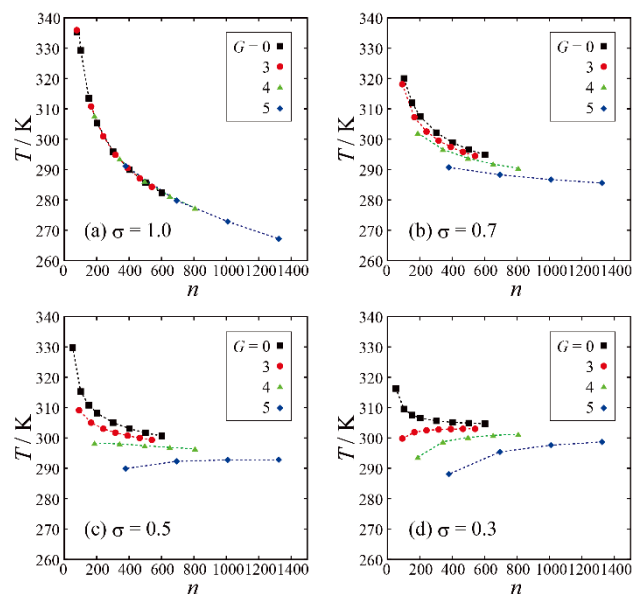


Fig. 5 Molecular weight dependence of transition temperature (binodal point) of hyperbranched polymers with the number of generations $G = 0, 3, 4, 5$. The cooperativity parameter σ is varied from curve to curve.

結果であり、分岐点の導入は水和に影響しないため、水和曲線は世代数 G に依存しない。一方、水和に協同性がある場合、水和の協同性は強くなるほど (σ が小さくなるほど)、また、大きな世代数 G の水和曲線ほどより低温側へシフトし、その温度変化が緩やかになる (**Fig.6b, 6c, 6d**)。これは世代数の増加 (分岐点の導入) により水和の協同性が阻害されるためである。

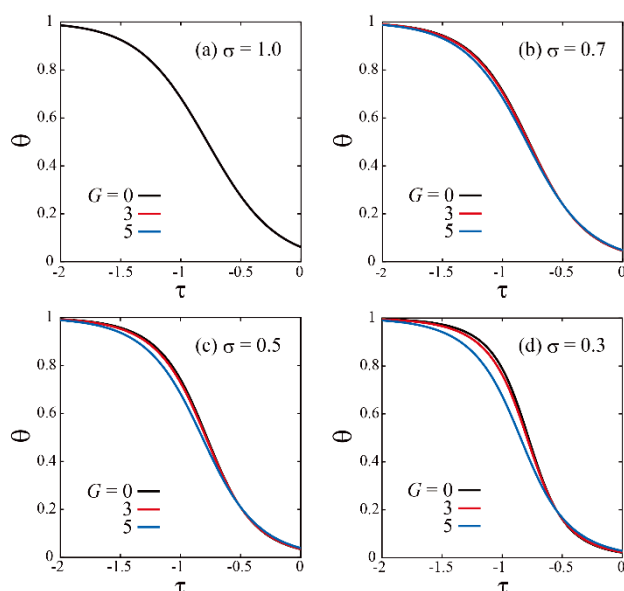


Fig. 6 Hydration degree of hyperbranched polymers at fixed polymer concentration $\phi = 0.01$. The generation number G is varied as 0, 3, and 5. The cooperativity parameter is (a) $\sigma = 1.0$ (random hydration), (b) $\sigma = 0.7$, (c) $\sigma = 0.5$, and (d) $\sigma = 0.3$.

Fig.7a に相転移温度（バイノーダル点）の分子量依存性の計算結果（ $\sigma = 0.3$ ）を示す。世代数 G の増加に伴って、分子量の低下に伴う相転移温度の降下は大きくなる。この計算結果は実験結果¹²⁾と定性的に一致する。**Fig.7b** に相転移温度を部分鎖長に対してプロットしたものを示す。実験結果では異なる世代数 G の相転移温度がほぼ重なるが、計算結果では完全に重ならず、大きな世代数のものほど相転移温度が低下している。これらの差異の原因としては、実際には分岐点による水和の協同性の阻害が完全なものではなく、部分的に分岐点をまたいで伝播する可能性が挙げられる。また、混合自由エネルギーへの多分岐構造の影響も考えられ、これらの点についてさらなる検討が必要である。

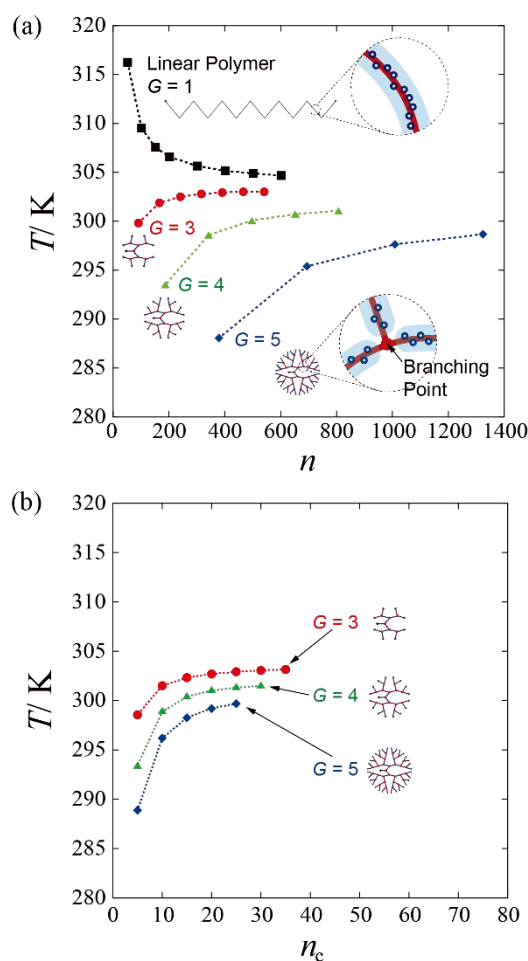


Fig. 7 (a) Molecular weight n dependence of transition temperature (binodal point) of aqueous solutions of hyperbranched polymers with the number of generations $G = 0, 3, 4, 5$. The cooperativity parameter σ is varied from curve to curve. (b) Transition temperature (binodal point) plotted against the sub-chain length n_c .

3-2. 分岐点と末端基の水和

次に、分岐点と末端基の水和が相挙動に及ぼす影響を調べた。各部分のセグメント数を $n_f = 1$ （フォーカルポイン

ト）、 $n_b = 1$ （分岐点）、 $n_e = 1$ （末端基）とし、部分鎖については全体の重合度を一定に保つように設定した（ $n_c = 4 \sim 314$ ）。フォーカルポイント、分岐点、末端基は、それぞれそのセグメント数と同数の水和サイトを有するものとした。分岐点、および末端基の水和強度をそれぞれ γ_f 、 γ_b 、 γ_e で表し、これらを系統的に変化させた。ここでは簡単に、 $\gamma_c = \gamma_c = \gamma_c$ として、 γ （ $\equiv \gamma_c = \gamma_c = \gamma_c$ ）を系統的に変化させた。

Fig.8 に、分子量を固定して相転移温度を世代数 G に対してプロットした。直鎖高分子（ $G = 0$ ）の場合、末端基の水和強度の変化に対して曇点の変化は小さい。一方、世代数 G の増加に伴う分岐点及び末端基の数の指数関数的な増加により、直鎖高分子に比べて、これらの水和効果が相挙動に大きく影響する。水和強度が大きい場合、曇点は上昇する。一方、水和強度が小さくなると、相転移温度は大きく低下する。ある水和強度（ $\gamma = 4.5$ ）では、世代数の増加に伴い世代数 $G = 3$ までは相転移温度が増加し、それ以上の世代数 G において低下している。これは、世代数 G の増加、すなわち、分岐点の導入に伴い、多数の分岐点と末端基の水和によって溶解性を向上させる効果と、部分鎖の水和の協同性を阻害することによる溶解性を低下させる効果が拮抗していること示す。このように、直鎖高分子に比べて、多分岐高分子では、分岐点及び末端基の水和が水溶液の相挙動を大きく変化させることを示しており、これらの化学修飾などによる相転移温度の制御が極めて有効であることを示している。

Fig.9 に直鎖高分子と多分岐高分子の水和挙動の比較を示す。**Fig.9a, 9b, 9c** は直鎖高分子（ $G = 0$ ）、**Fig.9d, 9e, 9f**

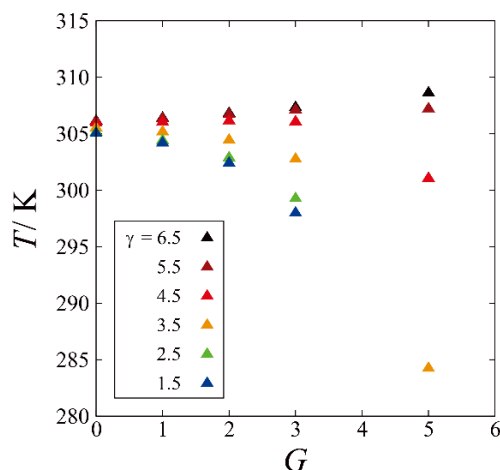


Fig. 8 Generation number G dependence of transition temperature (binodal temperature). The total number of segments n (molecular weight) is fixed at 316. $n_f = 1$ (focal point), $n_b = 1$ (branching point), $n_e = 1$ (end group), $n_c = 314 (G = 0)$, $104 (G = 1)$, $44 (G = 2)$, $20 (G = 3)$, and $4 (G = 5)$. The strength of hydration is set to be $\gamma_c = 3.5$ for sub-chains, and γ ($\equiv \gamma_f = \gamma_b = \gamma_e$) is varied from curve to curve.

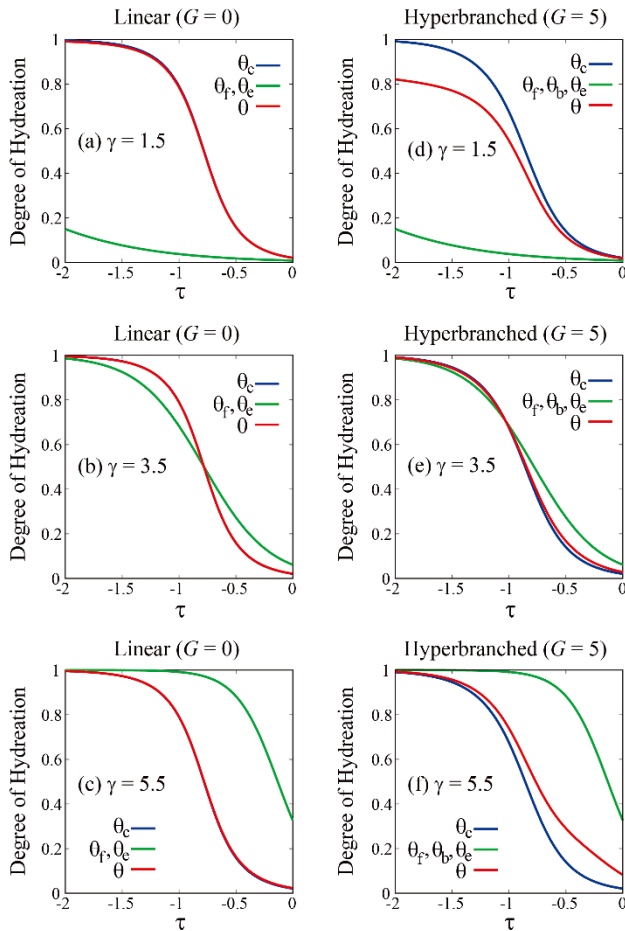


Fig. 9 Hydration curves of the linear polymer ($G = 0$) and hyperbranched polymer ($G = 5$). The hydration degrees of each part are plotted against reduced temperature: θ_c (sub-chain), θ_f (focal point), θ_b (branching point), θ_e (end group), θ (total). The strength of hydration is set to be $\gamma_c = 3.5$ for sub-chains, and $\gamma (\equiv \gamma_f = \gamma_b = \gamma_e)$ is varied from curve to curve.

は多分岐高分子 ($G = 5$) の水和曲線である。直鎖高分子 ($G = 0$) の場合、**Fig.9a** ($\gamma = 1.5$)、**Fig.9b** ($\gamma = 3.5$)、**Fig.9c** ($\gamma = 5.5$) の順に末端基の水和強度 γ が大きくなる。水和強度 γ が大きくなるほど、末端基の水和率 (緑色) は大きくなり、その水和曲線は高温側へシフトするが、高分子全体の水和率 (赤色) は末端基の水和強度の変化に対してほとんど影響を受けていない。一方、多分岐高分子 ($G = 5$) の場合、**Fig.9d** ($\gamma = 1.5$)、**Fig.9e** ($\gamma = 3.5$)、**Fig.9f** ($\gamma = 5.5$) に示すように、分岐点及び末端基の水和強度 γ が変化すると、分岐点及び末端基の水和率 (緑色) とともに、高分子全体の水和率 (赤色) も変化する。多分岐高分子では、末端基及び分岐点の水和挙動が全体の高分子の水和挙動に大きく影響することが分かる。

4. 結言

感熱水溶性高分子である PNIPAM に関して、その水溶液の相挙動に及ぼす末端効果と多分岐性の効果について、実

験・理論両面から最近の研究を紹介した。特に、最近新たに合成された多分岐 PNIPAM 水溶液の特異な相挙動について、PNIPAM の協同的な水和が分岐点で阻害されるというアイデアで説明できることを示した。水溶性高分子は持続可能な社会の実現に向けてその重要性を増しており、本研究で得られた感熱水溶性高分子である PNIPAM の相挙動に関する基礎的知見は、環境負荷や持続可能性に配慮した環境調和型の材料開発を支える理論的基盤となることが期待される。

参考文献

- 1) S. Saeki, N. Kuwahara, M. Nakata, and M. Kaneko, *Polymer*, **17**, 685(1976).
- 2) A. Matsuyama and F. Tanaka, *Phys. Rev. Lett.*, **65**, 341(1990).
- 3) S. Fujishige, K. Kubota, and I. Ando, *J. Phys. Chem.*, **93**, 3311(1989).
- 4) R. G. de Azevedo, L. P. N. Rebelo, A. M. Ramos, J. Szydlowski, H. C. de Sousa, J. Klein, *J. Fluid Phase Equilib.*, **185**, 189(2001).
- 5) Y. Hirokawa, T. Tanaka, E. S. Matsuo, *J. Chem. Phys.*, **81**, 6379(1984).
- 6) Y. Okada and F. Tanaka, *Macromolecules*, **38**, 4465(2005).
- 7) H. Kojima and F. Tanaka, *Macromolecules*, **43**, 5103(2010).
- 8) XP. Qiu, T. Koga, F. Tanaka, and F. M. Winnik, *Sci. China Chem.*, **56**, 56(2013).
- 9) T. Koga, F. Tanaka, R. Motokawa, S. Koizumi, and F. M. Winnik, *Macromolecules*, **41**, 9413(2008).
- 10) Y. Lu, T. Nemoto, M. Tosaka, and S. Yamago, *Nature Commun.*, **8**, 1863(2017).
- 11) M. Seiler, *Fluid Phase Equilibria*, **241**, 155(2006).
- 12) Yangtian Lu, "Synthesis of Structurally Controlled Hyperbranched Polymers Through the Design of New Monomers with Hierarchical Reactivity", Ph.D. diss., Japan, Kyoto: Kyoto University, 2019, 58-74.

ナノゲルワクチンによるがん治療

秋吉 一成・三浦理沙子・澤田晋一・佐々木 善浩

Kazunari AKIYOSHI, Risako MIURA, Shin-ichi SAWADA, Yoshihiro SASAKI

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

Although the effect of cancer treatment by self-assembled nanogel vaccine is shown, there is still room to improve the treatment efficacy. Therefore, we tried to develop more effective cancer therapeutic vaccine utilizing advantages of self-assembled nanogels. The efficacy of cancer therapeutic vaccine is concerned with the activation of CTLs. There are three steps in the process; (1) antigen delivery to lymph nodes, (2) activation of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by interaction of vaccines with antigen presenting cells (APCs) and (3) efficient attack of cancer cells by CTLs. We have developed nanogel vaccine systems which approached to each step.

1. はじめに

近年新規がん治療法として、患者の免疫システムを活性化させることで治療を行う免疫療法が注目されている。がん抗原を用いたがんワクチンや、サイトカイン療法、免疫チェックポイント抗体療法等、タンパク質や核酸の優れた機能を利用した治療法が展開されている。一方で、十分な治療効果を発揮するためには安定性の向上や体内分布の制御などが課題として残されている。近年、ナノ微粒子を用いたドラッグデリバリーシステムが免疫療法へ活発に展開されている。当研究室では、疎水化多糖が自己組織化して形成するナノサイズのゲル（ナノゲル）を用いたタンパク質デリバリーについて研究を進めてきた。¹⁻³⁾ 疎水化多糖から成る自己組織化ナノゲルは、多糖由来の高い親水性表面を有しており、生体適合性が高く、疎水的相互作用

を駆動力としてタンパク質を内包・放出可能であるという特徴を有している。抗原タンパク質を内包した自己組織化ナノゲルは、抗原の体内分解を抑制し、免疫活性に重要なリンパ節や抗原提示細胞へ効率よく抗原を送達することで、抗原特異的な免疫活性を誘導するがん治療ワクチンとして機能することが報告されてきた。⁴⁾

ここでは、自己組織化ナノゲルを基盤とし、免疫活性へ多面的なアプローチを行う抗原デリバリーシステムの開発について報告する。自己組織化ナノゲルを機能化することにより、免疫活性プロセスの一部であるリンパ節への抗原送達や抗原提示細胞との相互作用を制御し、免疫活性への影響について評価を行った。さらに、他の免疫療法との併用によるナノゲルワクチンとの相乗的ながん治療、及びそのメカニズムについて評価を行った。

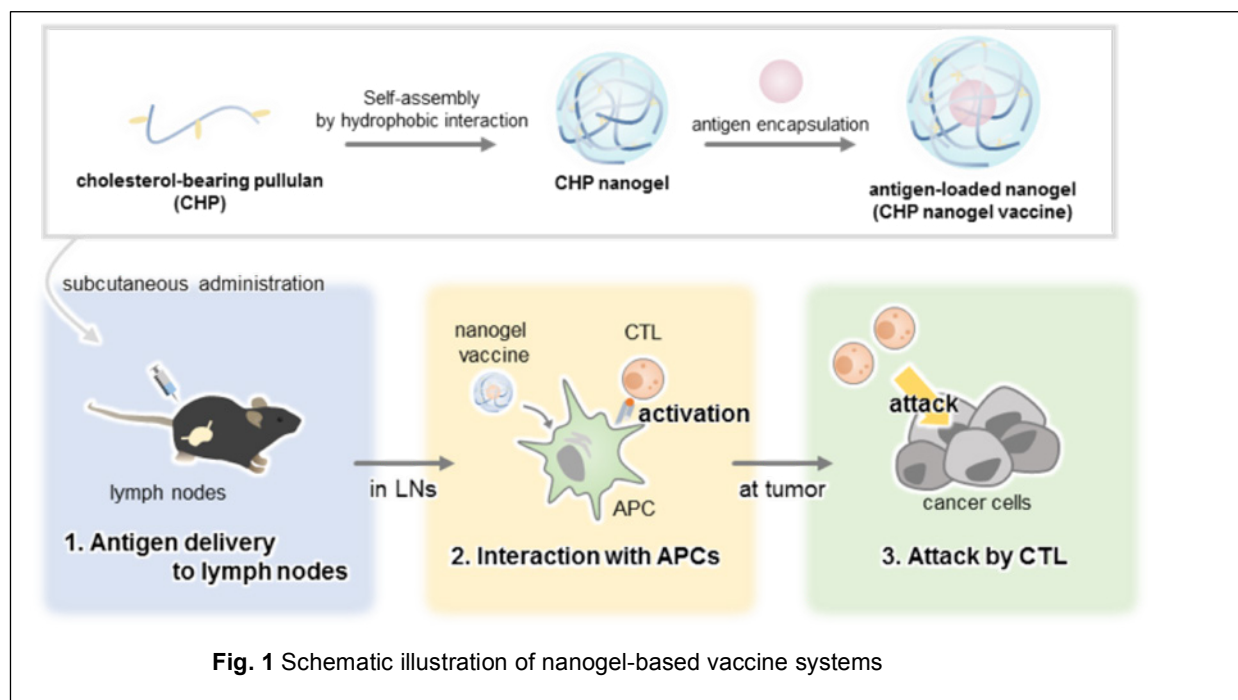


Fig. 1 Schematic illustration of nanogel-based vaccine systems

2. ナノゲルの構造変化によるリンパ節標的性ナノゲルワクチンの開発

皮下投与の場合、リンパ節へのナノ微粒子の移行性はその粒子径と相関があり、小さなナノ微粒子の方が効率的に移行することが明らかとなっている。⁵⁾そこで、粒子径が異なる2種類の自己組織化ナノゲルを用いてナノゲルワクチンを調製し、リンパ節への送達性の変化及び免疫活性への影響を評価した。

用いたナノゲルは直鎖状多糖を骨格とするコレステリル基置換プルラン(cholesterol-bearing pullulan; CHP) と分岐状多糖を骨格とするコレステリル基置換クラスターデキストリン (cholesterol-bearing cluster dextrin; CH-CDex) の2種類である。CH-CDexナノゲルはその糖鎖密度が高い多糖構造により小さくパッキングするため、抗原複合化後においてCHPナノゲルより小さな粒子径を示した(CHP; 63 nm, CH-CDex; 23 nm)。

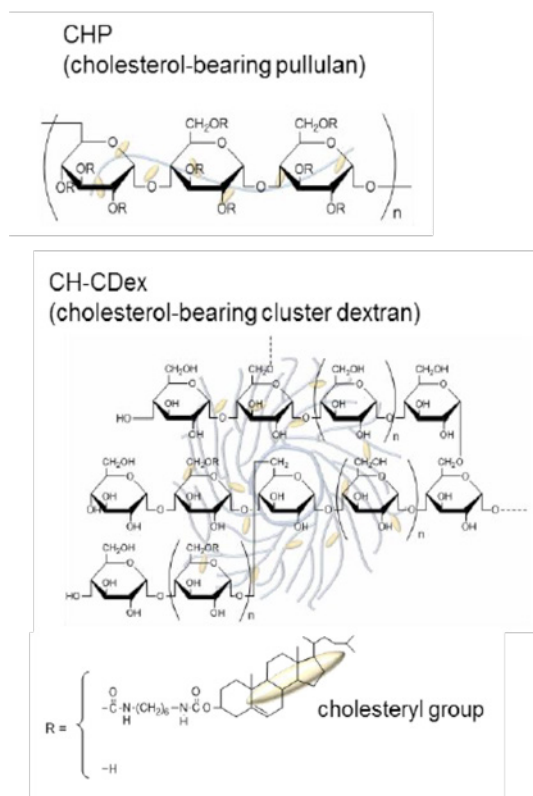


Fig. 2 Schematic illustration of chemical structures of CHP and CH-CDex.

Table 1 Characteristics of nanogels

	Diameter (nm)	with OVA	
		Diameter (nm)	Zeta potential (mV)
CHP	32.1±5.5	63.0±1.3	-1.8±0.5
CH-CDex	23.4±5.3	22.7±0.8	-2.6±0.8

小粒子径を示すCH-CDexナノゲルは、より短時間で効率的なリンパ節への抗原デリバリーを実現し、リンパ節内部で抗原提示細胞との相互作用が向上した。いずれのナノゲルワクチンも細胞性・液性免疫の双方を活性化し、特にCH-CDexナノゲルワクチンにより抗腫瘍効果が改善された。つまり、自己組織化ナノゲルの構造と粒子径を制御することで、リンパ節への抗原送達性及び免疫活性が向上することが明らかとなった。⁶⁾

3. アニオン性ナノゲルによる抗原提示細胞標的性ナノゲルワクチンの開発

抗原提示細胞には、ポリアニオンや多糖を認識する様々なレセプター(例:スカベンジャーレセプター、ランジェリン、マンノースレセプター)が発現していることが明らかとなっている。そこで本章では、CHPへカルボキシル基を導入しアニオン性を付与したCHPCOOHを2種類合成し、抗原提示細胞との相互作用の変化及び免疫活性について評価した。

Table 2 Characteristics of nanogels

	Diameter (nm)	Zeta potential (mV)	with OVA	
			Diameter (nm)	Zeta potential (mV)
CHP	32.1±5.5	-2.5±0.6	63.0±1.3	-1.8±0.5
CHPCOOH19	34.9±5.9	-12.2±1.3	96.2±32.0	-15.0±3.8
CHPCOOH40	51.1±1.4	-18.1±3.0	97.6±31.6	-21.8±5.7

アニオン性ナノゲルは、CHPナノゲルと比較して粒子径は増大したものの同等の抗原内包率を示し、抗原デリバリーシステムへの応用が可能なことが明らかとなった。アニオン性の付与により*in vitro*, *in vivo*双方において抗原提示細胞への取り込みが優位に向上し、抗原提示細胞表層の特異的なレセプターとの相互作用が示唆された。⁷⁾

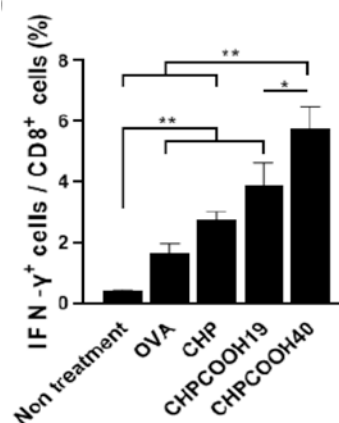


Fig. 3 *In vivo* immune responses by nanogel vaccines.

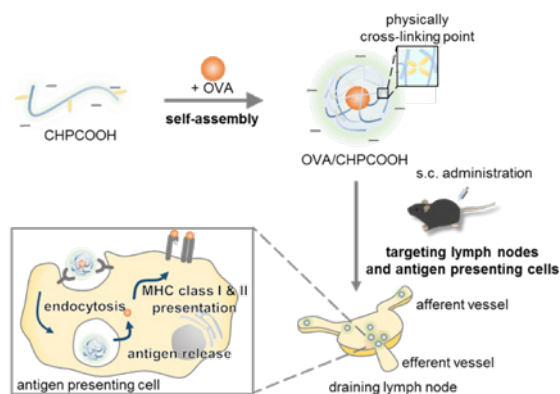


Fig. 4 *In vivo* immune responses by nanogel vaccines. Schematic illustration of this study. CHPCOOH nanogel actively interact with APCs by ligand-receptor interaction and induce immune responses.

4. ナノゲルワクチンと抗PD-1抗体の併用による相乗効果的な免疫活性システムの開発

近年、がん細胞とキラーT細胞間の免疫チェックポイント分子を介したシグナル伝達により、一度活性化したキラーT細胞が活性を失った状態、疲弊状態に陥ることが明らかとなっている。ナノゲルワクチンにおいても腫瘍内部でキラーT細胞の一部が疲弊していると考えられ、疲弊を抑制することでより良好な治療効果が得られると期待される。そこで本章では、CHPナノゲルワクチンへ免疫チェックポイント抗体である抗PD-1抗体の併用効果を検討した。ナノゲルワクチンと抗PD-1抗体の併用群において、非常に高い腫瘍増殖抑制効果と完全奏効率を実現した。この際、抗PD-1抗体のみ、あるいはナノゲルと複合化していない抗原のみのワクチン投与では抗腫瘍効果は見られなかった。

抗体の併用投与により、腫瘍浸潤性キラーT細胞は増加し、さらにキラーT細胞の疲弊マーカーの発現は減少したことが示された。ナノゲルワクチンによる強いキラーT細胞活性の誘導と、そこへ抗PD-1抗体を投与することで相乗効果的な抗腫瘍効果の向上が実現したと考えられる。また、強い免疫誘導を実現した一方で体重の減少や脾臓の肥大、肝臓障害などの副作用は誘導していないことが明らかとなった。

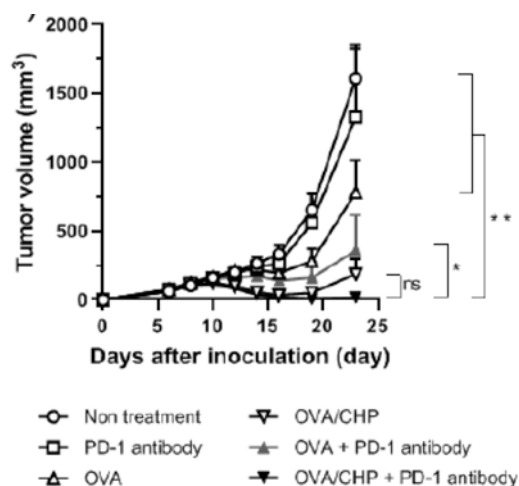


Fig. 5 Anti-tumor efficacy of vaccines in E.G7-OVA tumor-bearing mice. OVA or OVA/CHP nanogel vaccines and anti-PD-1 antibody was administrated

以上のように、CHPナノゲルワクチンと抗PD-1抗体の併用により、副作用無く、非常に高いがん治療効果を実現することが示され、今後様々ながん種へ展開されると期待できる。

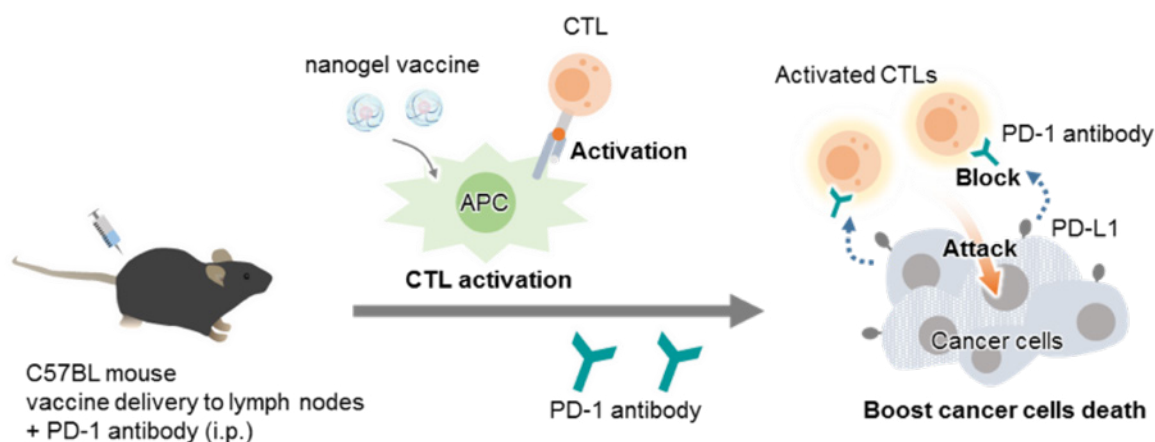


Fig. 6 Synergistic anti-tumor effect by the combination therapy of CHP nanogel vaccine with anti-PD-1 antibody. First, nanogel vaccine induces antigen-specific CTLs, and then blocking of PD-1/PD-L1 signaling by anti-PD-1 antibody enhances the CTLs aggressiveness.

5. ナノゲルワクチンによる腫瘍微小環境の制御

近年、腫瘍局所に豊富に存在するマクロファージは、腫瘍に対する免疫を抑制する重要な役割を果たしていることが明らかになり、免疫チェックポイント抗体治療による治療効果が向上しない系の理由の一つとして考えられている。⁸⁾ ナノゲルワクチンを静脈投与し腫瘍へ抗原送達を行うことで、腫瘍内の免疫環境が活性化しえることが明らかとなってきた。そこで、CHPナノゲルワクチンを用いて、従来の検討通り皮下投与を行うことによりキラーT細胞の活性化を誘導し、さらに静脈投与を併用し腫瘍環境の活性化を誘導することで、抗腫瘍効果が向上することを期待し検討を行った。

CHPナノゲルワクチンの静脈投与を行うことで、EPR効果により腫瘍へ抗原が集積された。また、皮下投与と静脈投与を併用することで、腫瘍内部のマクロファージが減少することが示された。腫瘍内部のマクロファージは、免疫抑制性サイトカインの分泌によりがんの成長や転移を促進し悪性化を助長していることが知られており、マクロファージの減少により腫瘍内部の免疫系が活性化しやすい環境へ変換されたと考えられる。抗腫瘍効果を評価したところ、皮下投与のみでは効果が得られない系において、静脈投与を併用することにより強い抗腫瘍効果がえられた。同じナノゲルワクチンでも投与経路を変えることにより、異なる免疫活性が誘導され、併用を行うことで相乗的な治療効果が得られることが明らかとなった。

6. 最後に

自己組織化ナノゲルの優れた抗原デリバリーシステムを利用し、さらにナノゲルの機能化及び他の免疫療法との併用を行うことにより、様々ながん治療ワクチン及び免疫活性化システムの開発を行った。ナノゲルの粒子径や表面電荷の制御という工学的なアプローチにより、免疫システム、特に細胞性免疫の向上が実現された。また、ナノゲルワクチンの免疫活性化を基盤とし、免疫チェックポイント抗体の併用や腫瘍環境の活性化を行うことで、高い安全性を示しつつ相乗効果的に強い抗腫瘍効果が得られた。

本研究で用いた自己組織化ナノゲル及び抗PD-1抗体は、いずれも生体において安全であることが臨床試験で示されている。以上のことから、開発された自己組織化ナノゲルを基盤とした免疫活性化システムは、非常に実用的で治療効果が高い手法として臨床応用が期待される。

参考文献

- 1) Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *The Chemical Record*, 10, 366-376(2010)
- 2) T. Nochi, Y. Yuki, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, G. Kong, A. Sato, N. Kataoka, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, H. Kiyono, *Nature Materials*, 9, 572-578 (2010)
- 3) Y. Hashimoto, S. Mukai, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Adv. Healthcare Materials*, 23(7), 1800729 (2018)
- 4) Y. Tahara, K. Akiyoshi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **95**, 65–76 (2015).
- 5) D. Muraoka, N. Harada, T. Hayashi, Y. Tahara, F. Momose, S. Sawada, S. Mukai, K. Akiyoshi, H. Shiku, *ACSNano*, 8, 9209-9218 (2014)
- 6) R. Miura, Y. Tahara, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Scientific Reports*, 8, 16464 (2018)
- 7) R. Miura, S. Sawada, S. Mukai, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, *Biomacromolecules*, *in press*
- 8) D. Muraoka, N. Seo, T. Hayashi, Y. Tahara, K. Fujii, I. Tawara, Y. Miyahara, K. Okamori, H. Yagita, S. Imoto, R. Yamaguchi, M. Komura, S. Miyano, M. Goto, S. Sawada, A. Asai, H. Ikeda, K. Akiyoshi, N. Harada, H. Shiku, *J. Clin. Invest.*, 129(3), 1278-1294 (2019)

結晶性高分子太陽電池における開放電圧

Open-Circuit Voltage in Crystalline Polymer Solar Cells

大北 英生¹・玉井 康成^{1,2}・山崎 浩志¹・部谷 拓斗¹

Hideo OHKITA, Yasunari TAMAI, Koshi YAMAZAKI, Takuto HIDANI

¹Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

²PRESTO, Japan Science and Technology Agency

Herein, we have studied open-circuit voltage (V_{oc}) of polymer solar cells based on a blend of a crystalline conjugated polymer and a fullerene derivative (PCBM). We employed two thiazolothiazole (TzTz)-based crystalline polymers with different side chains: PTzBT-BOHD has two branched side chains of 2-butyloctyl (BO) and 2-hexyldecyl (HD) and PTzBT-12OD has a linear side chain of *n*-dodecyl (12) and a branched side chain of 2-octyldodecyl (OD). Interestingly, polymer solar cells based on blends of PTzBT-BOHD/PCBM and PTzBT-12OD/PCBM exhibited different V_{oc} even though these two polymers exhibit the same highest occupied molecular orbital (HOMO) energy level in neat films because they have the same conjugated main chain. In order to address the origin of the different V_{oc} , we measured temperature dependence of V_{oc} of these polymer solar cells. From an extrapolated value of V_{oc} at 0 K, we evaluated an effective bandgap energy ΔE_{DA} of charge transfer (CT) state formed at a donor/acceptor interface in these polymer solar cells. We found different ΔE_{DA} for the two polymer solar cells, which suggests different HOMO levels in the blend films. We therefore measured the HOMO level of these conjugated polymers in the blend films by cyclic voltammetry. As a result, we found that these two polymers have the same HOMO level in crystalline phase but different HOMO levels in disordered phase mixed with PCBM. In order to address the origin of the different HOMO levels, we thus calculated the HOMO energy levels for model compounds for these polymers. As a result, we found that the HOMO level of the 12OD-attached compound is shallower than that of BOHD-attached compound. The shallower HOMO level is due to an extension of π -orbital to the linear side chain (π /C-H interaction). We therefore conclude that higher V_{oc} can be obtained by using crystalline polymers with appropriate branched side chains.

1. はじめに

エネルギー問題は人類が直面している克服すべき最重要課題の一つであり、クリーンで無尽蔵に降り注ぐ太陽光エネルギーは最も有望な再生可能エネルギー源である。シリコン太陽電池などの無機半導体を用いた太陽電池はすでに実用化されており、わが国における累積導入量は導入コストの低下にともなって増加し、2017年末の時点では4773 kWにまで達している¹⁾。さらなる導入拡大を進めるために、低コスト化に向けた技術開発とともに、シリコン太陽電池に代わる種々の次世代太陽電池に関する研究が活発に進められている。

高分子太陽電池は、発電層に共役高分子半導体とフラーレン誘導体を用いた次世代太陽電池であり、室温で有機溶媒に溶解することから、印刷技術による生産が可能であり、大幅な低コスト化が期待されている。また、軽量、フレキシブルといった物理的な特徴とともに、カラフルであり意匠性に富むことから、無機太陽電池とは異なる用途展開も期待されている。効率面においては無機太陽電池には及ばないものの、近年の向上は目覚ましく、17%を超えるエネルギー変換効率 (power conversion efficiency: PCE) が単セル素子²⁾やタンデム素子³⁾について報告されるまでに至っている。さらなる効率向上へ向けた研究が進められている。

太陽電池のエネルギー変換効率は、入射した太陽光エネルギーに対して最大出力できる太陽電池の電力で定義さ

れ、短絡電流密度 (J_{sc}) と開放電圧 (V_{oc}) と曲線因子 (FF) の積で与えられる。したがって、太陽電池の効率を向上させるには、これら三つのパラメータをバランスよく増加させることが求められる。このうち V_{oc} は、発電層に生成した正孔と電子のエネルギー準位差に律速される。高分子太陽電池では、正孔は共役高分子の最高被占軌道 (highest occupied molecular orbital: HOMO) に、電子はフラーレンの最低空軌道 (lowest unoccupied molecular orbital: LUMO) にそれぞれ存在するため、 V_{oc} はドナー (D) である共役高分子のHOMO準位とアクセプター (A) であるフラーレン誘導体のLUMO準位のエネルギー差 ΔE_{DA} に律速されることになる。実際、高分子太陽電池の開放電圧エネルギー qV_{oc} (q は電気素量) は、 ΔE_{DA} と線形関係を示すことが報告されている⁴⁾。本稿では、結晶性共役高分子を用いた高分子太陽電池について、高分子の構造と開放電圧の関係について議論した研究成果を報告する。

2. 分子構造と太陽電池特性

本研究で用いた二種類の結晶性共役高分子 (PTzBT-BOHDおよびPTzBT-12OD) の構造式を図1に示す。いずれも主鎖構造はチアゾロチアゾール (TzTz) とピチオフェン (BT) から構成されており、チオフェンユニットに異なる側鎖が置換している。PTzBT-BOHDは枝分かれ側鎖である2-butyloctyl基 (BO) と2-hexyldecyl基 (HD) を有しており、PTzBT-12ODは直鎖状の側鎖である *n*-dodecyl

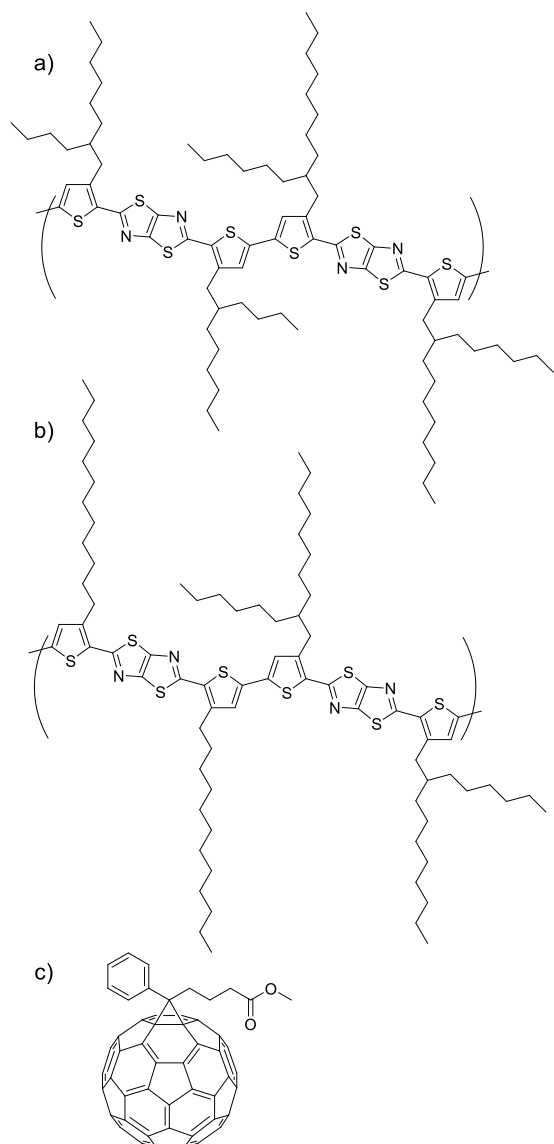


Figure 1. Chemical structures of materials employed in this study: a) PTzBT-BOHD, b) PTzBT-12OD, and c) PCBM.

基 (12) と 2-octyldodecyl 基 (OD) を有している。これらの高分子ニート薄膜に対して、光電子収量分光 (PYS) 測定により HOMO 準位を測定したところいずれも 5.20 eV であることが分かった。主鎖共役系の構造が同じであることからこの結果は合理的である。一方で、PTzBT-BOHD/PCBM および PTzBT-12OD/PCBM ブレンドからなる高分子太陽電池は、図2に示すように、異なる V_{oc} を示すことが報告されている⁹⁾。枝分かれ側鎖のみを有する PTzBT を用いた PTzBT-BOHD/PCBM 素子の V_{oc} は 0.89 V であるのに対して、直鎖状側鎖と枝分かれ側鎖を有する PTzBT を用いた PTzBT-12OD/PCBM 素子の V_{oc} は 0.82 V であり、0.07 V 程度であるが有意な差が見られる。PYS 測定の結果では、両ポリマーのニート膜では同じ HOMO 準位を示したことから、アクセプターとして同じ PCBM を用いたこれらの高分子太陽電池は同程度の V_{oc} を示すと予測され

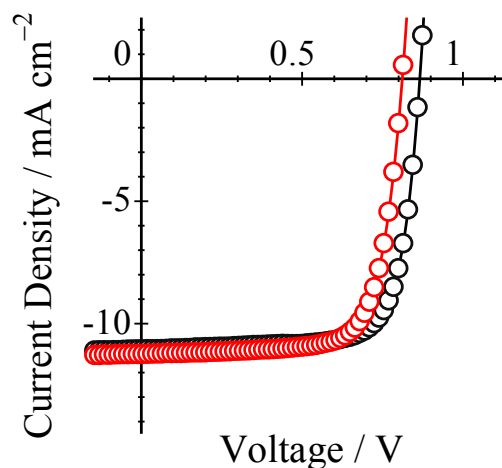


Figure 2. J - V characteristics of crystalline polymer solar cells: PTzBT-BOHD/PCBM (black circles) and PTzBT-12OD/PCBM (red circles).

る。この異なる V_{oc} の起源を明らかにするため以下の三項目について検討した。すなわち、1) ヘテロ接合界面に形成する電荷移動 (CT) 状態の実効的なバンドギャップである ΔE_{DA} の評価、2) ブレンド膜中での共役高分子の HOMO 準位の評価、3) 密度汎関数理論 (DFT) に基づくモデル化合物に対する HOMO 準位の評価を行った。

3. ヘテロ接合界面での ΔE_{DA} の評価

ブレンド膜中のヘテロ接合界面において形成する CT 状態の実効的なバンドギャップである ΔE_{DA} は、上述したように、素子の qV_{oc} と線形関係にあることが知られている。また、 qV_{oc} との間には一般に以下の関係式が成立するので、

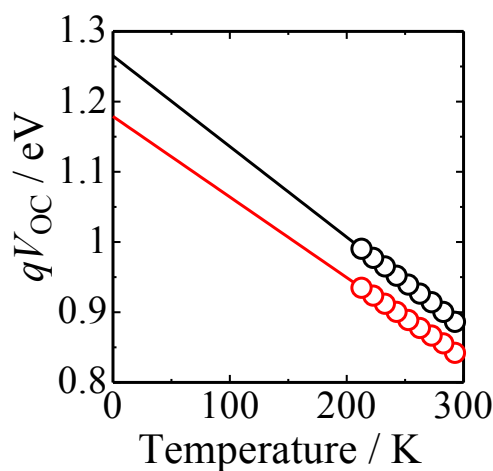


Figure 3. Temperature dependence of qV_{oc} for crystalline polymer solar cells: PTzBT-BOHD/PCBM (black circles) and PTzBT-12OD/PCBM (red circles). The solid lines represent the fitting curves with Eq. 1.

qV_{OC} の値を0 Kへ外挿した値から ΔE_{DA} を見積もることができる。

$$qV_{OC} = \Delta E_{DA} - k_B T \ln \left(\frac{N_c N_v}{np} \right) \quad (1)$$

ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 N_c および N_v はそれぞれ伝導帯および価電子帯の状態密度、 n および p は発電層における電子および正孔の密度をそれぞれ表す。図3に示すように、 qV_{OC} の0 Kへの外挿値から ΔE_{DA} を評価すると、PTzBT-BOHD/PCBM素子では1.27 eV、PTzBT-12OD/PCBM素子では1.18 eVと見積られた。すなわち、これらのブレンド膜中のヘテロ接合界面において形成するCT状態の ΔE_{DA} が異なることを示している。両者のアクセプターはPCBMで共通であるので、この結果はブレンド膜中ではPTzBT-BOHDとPTzBT-12ODのHOMO準位が異なることを示唆している。

4. ブレンド膜中におけるHOMO準位の評価

ブレンド膜中でのPTzBT-BOHDとPTzBT-12ODのHOMO準位を評価するため、ITO基板上に製膜したPTzBT-BOHD/PCBMおよびPTzBT-12OD/PCBMブレンド膜について、サイクリックボルタンメトリー (CV) 測定を行った。図4に示すように、Ag/AgCl参照電極に対する電位が0.4 V付近と0.6–0.8 V付近に酸化波が観測された。それぞれの酸化波の帰属を行うため、電位掃引時の吸収スペク

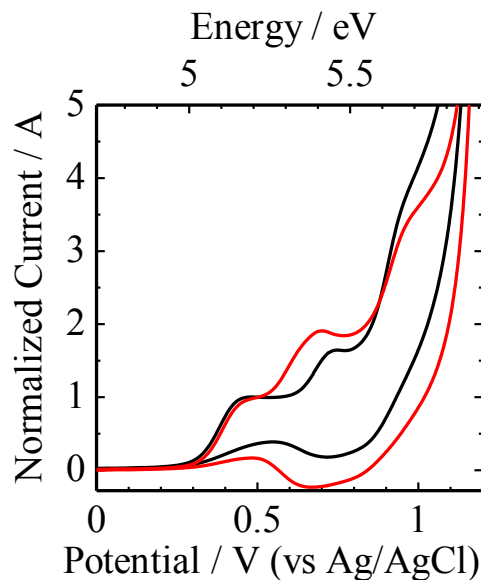


Figure 4. Cyclic voltammogram for crystalline polymer solar cells: PTzBT-BOHD/PCBM (black circles) and PTzBT-12OD/PCBM (red circles). The scan rate was 5 mV s⁻¹. The upper axis is a relative energy assuming that the redox potential of Fe/Fe⁺ is 4.8 eV.

トルを測定した。その結果、0.4 V付近の第一酸化波に対応する吸収スペクトルには結晶相に特徴的な0–0振動バンドが明瞭に観測されることから、第一酸化波を結晶相のHOMO準位に帰属した。0.6–0.8 V付近の第二酸化波対応する吸収スペクトルの振動バンドはやや不明瞭となったことから、第二酸化波を非晶相のHOMO準位に帰属した。これらの電位を、Fe/Fe⁺の酸化還元電位を4.8 eVとして真空準位に換算すると、第一および第二酸化波電位はそれぞれ約5.1 eVおよび約5.4 eVに相当し、前者はPYS測定により求めたHOMO準位に5.2 eV近い値を示すことが分かった。PYS測定では、自由度が高く結晶が成長しやすいフィルム表面のHOMO準位を測定することから、結晶相のHOMO準位を観測していると考えられるのでこの帰属と矛盾しない。第一酸化波の電位は、PTzBT-BOHD/PCBMとPTzBT-12OD/PCBMにおいて同じ値を示したことから結晶相においては、両者は同じHOMO準位を示すと結論できる。一方、第二酸化波の電位はPTzBT-BOHD/PCBMとPTzBT-12OD/PCBMでは異なる値を示し、80 mV程度PTzBT-BOHDのHOMO準位が深いことが分かった。このHOMO準位の差は qV_{OC} の差の70 meVと近い値であることから、異なる V_{OC} の起源は非晶相におけるHOMO準位の差であると結論できる。

5. DFT計算によるHOMO準位の評価

非晶相における異なるHOMO準位が何に由来しているのかを明らかにするため、図1に示すPTzBT-BOHDとPTzBT-12ODの最小繰り返し構造を単量体モデル化合物として、DFT計算により構造最適化し、それぞれのHOMO準位を評価した。その結果、表1に示すように、PTzBT-BOHDおよびPTzBT-12ODの単量体モデル化合物のHOMO準位は、それぞれ6.357 eVおよび6.285 eVとなり、72 meVだけPTzBT-BOHDモデル化合物が深いことが分かった。この結果は、CV測定の結果とほぼ一致している。このHOMO準位の差が分子構造のどの部分に由来するのかを検討するため、主鎖構造を固定した状態で側鎖をすべて除いた分子構造に対してHOMO準位の計算を行った。その結果、側鎖を除いたPTzBT-BOHDおよびPTzBT-12ODの単量体モデル化合物のHOMO準位は、それぞれ6.529 eVおよび6.504 eVとなり、エネルギー差は25 meVとなった。この値はもともとの差である72 meVの1/3程度であり、主鎖構造の違いによるHOMO準位の差の寄与は1/3程度であるといえる。したがって、残りの2/3程度の寄与は側鎖が置換したことに由来すると考えられる。

Table 1. HOMO energy levels of the monomer models.

	BOHD	12OD
With side chains	6.357 eV	6.285 eV
Without side chains	6.529 eV	6.504 eV

BOHDと12ODの側鎖の違いによりHOMO準位がなぜ変化するかを明らかにするため、モデル化合物の構造と分子軌道について両者を比較した。図5に示すように、PTzBT-BOHDモデル化合物では、緑色で表す主鎖の共役平面と赤色で表す2-butylloctyl側鎖がなす平面（トランスジグザグがなす平面）は同一平面になく、二面角はおよそ70°もねじれている。これに対して、PTzBT-12ODモデル化合物では、主鎖の共役平面と*n*-dodecyl側鎖の平面は同一平面に存在し、二面角はほぼ0°である。この違いは、PTzBT-BOHDモデル化合物の2-butylloctyl側鎖では2位に置換しているブチル基の立体反発が存在するのにに対して、PTzBT-12ODモデル化合物の*n*-dodecyl側鎖には立体反発がまったくないためであると考えられる。

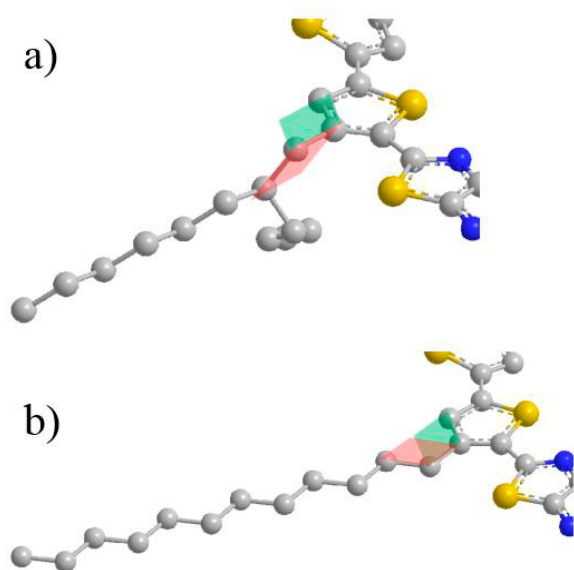


Figure 5. Optimized molecular structures of monomer model compounds for a) the 2-butylloctyl (BO) side chain in PTzBT-BOHD and b) the *n*-dodecyl (12) side chain in PTzBT-12OD. The green and red planes represent a plane for π -conjugation in the main chain and a plane for all-trans alkyl in the side chain, respectively. The angle between the two planes is $\sim 70^\circ$ for PTzBT-BOHD and $\sim 0^\circ$ for PTzBT-12OD model compounds.

次に、HOMOの分布状況を両者で比較した。上述の構造の違いを反映して、図6に示すように、両者のHOMOの広がりにも差が見られる。PTzBT-BOHDモデル化合物の場合、HOMOは主鎖共役平面に主に分布し、2-butylloctyl側鎖には根元付近にわずかに分布が見られるが、これらの軌道は分離している。これに対して、PTzBT-12ODモデル化合物の場合、HOMOは同様に主鎖共役平面に主に分布するとともに*n*-dodecyl側鎖の根元付近にまで連続的に分布していることが分かる。すなわち、PTzBT-12ODモデル化合物では、主鎖共役が側鎖にまで広がっていることを示す。このように、PTzBT-12ODでは主鎖共役平面が側鎖にまで拡張することによって、HOMO準位がPTzBT-BOHDよりも浅

くなったと考えられる。

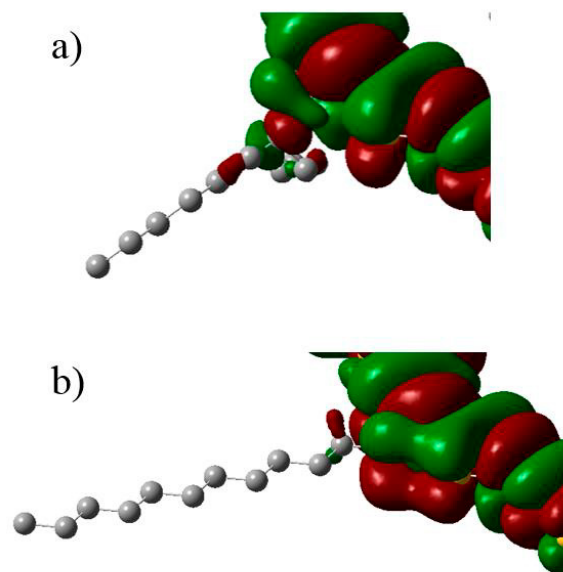


Figure 6. Spatial distribution of HOMO in the optimized monomer model compounds for a) the 2-butylloctyl (BO) side chain in PTzBT-BOHD and b) the *n*-dodecyl (12) side chain in PTzBT-12OD.

6. まとめ

主鎖構造は同じで側鎖構造のみ異なる結晶性共役高分子PTzBT-BOHDならびにPTzBT-12ODを用いた高分子太陽電池の開放電圧の違いについて、系統的に検討した。その結果、結晶相では両者のHOMO準位は同じであるものの、PCBMと混合する非晶相ではHOMO準位が異なることを見出した。そのためCT状態の実効的バンドギャップが異なり、開放電圧にも違いが現れることを明らかにした。非晶相においては、側鎖の立体反発を避けた安定構造をとるが、側鎖構造により異なる分子構造をとるため異なるHOMO準位を示すことが分かった。具体的には、枝分かれ側鎖を有するPTzBT-BOHDでは主鎖共役平面と側鎖平面は70°程度ねじれ、主鎖共役は主鎖内に局在化しているのに対して、直鎖状側鎖を有するPTzBT-12ODでは主鎖共役平面と側鎖平面はほぼ同一平面にあり、主鎖共役は側鎖にまで非局在化していることを明らかにした。この共役系の広がりのため非晶相のPTzBT-12ODはPTzBT-BOHDよりも浅いHOMO準位を示したと考えられる。以上のことから、側鎖構造を適切に設計することにより、結晶相と非晶相のHOMO準位を制御できることが分かった。2-butylloctyl側鎖は、ほどよいかさ高さであるために、結晶性を保ちつつ、非晶相のHOMO準位を深くすることによって、高い開放電圧を実現することができたと考えられる。このようなバランスの良い材料設計は、高分子太陽電池に限らず高効率・高機能なデバイスを開発する上で重要であろう。

謝辞

本研究で用いたPTzBT-BOHDならびにPTzBT-12ODは、広島大学大学院工学研究科の尾坂格教授、斎藤慎彦助教よりご提供いただいた。また、本研究はJSTのALCAプログラム（JPMJAL1404）の支援を受けて実施したものである。この場を借りて御礼申し上げる。

参考文献

- 1) 経済産業省資源エネルギー庁 エネルギー白書2019.
- 2) L. Meng, Y. Zhang, X. Wan, C. Li, X. Zhang, Y. Wang, X. Ke, Z. Xiao, L. Ding, R. Xia, H.-L. Yip, Y. Cao, and Y. Chen, *Science*, **361**, 1094–1098 (2018).
- 3) Y. Lin, B. Adilbekova, Y. Firdaus, E. Yengel, H. Faber, M. Sajjad, Z. Yarali, A. Seitkhan, O. M. Bakr, A. El-Labban, U. Schwingenschlögl, V. Tung, I. McCulloch, F. Laquai, and T. D. Anthopoulos, *Adv. Mater.*, **31**, 1902965 (2019).
- 4) M. Scharber, D. Mühlbacher, M. Koppe, P. Denk, C. Waldauf, A. Heeger, and C. Brabec, *Adv. Mater.*, **18**, 789–794 (2006).
- 5) I. Osaka, M. Saito, T. Koganezawa, and K. Takimiya, *Adv. Mater.*, **26**, 331–338 (2014).

時分割GISAXS法によるブロックコポリマー薄膜の自己組織化過程の解明

In-situ measurement of self-assembling processes in blockcopolymer thin films with GISAXS

竹中 幹人・重栖 拓也・小川 紘樹

Mikihito TAKENAKA, Takuya OMOSU, Hiroki OGAWA

Institute for Chemical Research, Kyoto University

Directed self-assembly (DSA) of block copolymers (BCPs) has been one of the most promising next generation lithography candidates. In order to use the DSA lithography for advanced semiconductor device manufacturing, we need to mitigate defects in the DSA materials and processes and to clarify the defect generation mechanism by using in-situ measurement of the self-assembling processes of BCPs. In this study, we observed the process of the self-assembly of a diblock copolymer by grazing incident angle small angle X-ray scattering (GISAXS) during heating process. An isotropic structure was induced near the glass transition temperature, and transformation to lamella structure was observed at 135°C. The lamellar structure has a larger period than isotropic structure. The structure gradually grew according to the temperature, and it turned out that the whole film had a vertical lamellar structure at 145°C. At higher temperature the long-range order of vertical lamellar structure was developed with temperature.

1. はじめに

近年、ビッグデータの活用など取り扱うデータ容量の増大に伴い、メモリデバイスのさらなる大容量化がもてられている。この大容量化を達成するために、10~sub-10 nmでのパターニング技術の開発が急務となっている。このスケールでのパターニング技術の有力な手法の一つとして、ブロックコポリマーの誘導自己組織化がある。

ブロックコポリマーは二種類以上の種類の異なる高分子が共有結合により一つに結び付けられている高分子であり、異種高分子間の偏斥力の増加に伴い、異種高分子が相溶した無秩序状態から数十ナノメートルオーダーの周期を持った長距離秩序を持ったマイクロ相分離構造を自己組

織化する。しかし、その自己組織化構造の廃校は制御されておらず、また、グレイン間では欠陥が生じてしまうために、自己組織化のみでは、パターニングに用いることができない。そこで、誘導自己組織化では、ボトムアップの手法であるブロックコポリマーの自己組織化とトップダウンの手法で作成したガイドパターンを組み合わせることによって高精度・無欠陥の10~sub-10 nmパターニングを行う¹⁾²⁾。代表的な誘導自己組織化のプロセスの例をFigure 1に示す。まずガイドパターンを基板状に塗布し、レチクル（フォトマスク）を用いてパターニングする。そこから紫外線等のビームを照射することでガイドを幅はコポリマーのD-spacingの半分、間隔はD-spacingの整数倍、今回で今

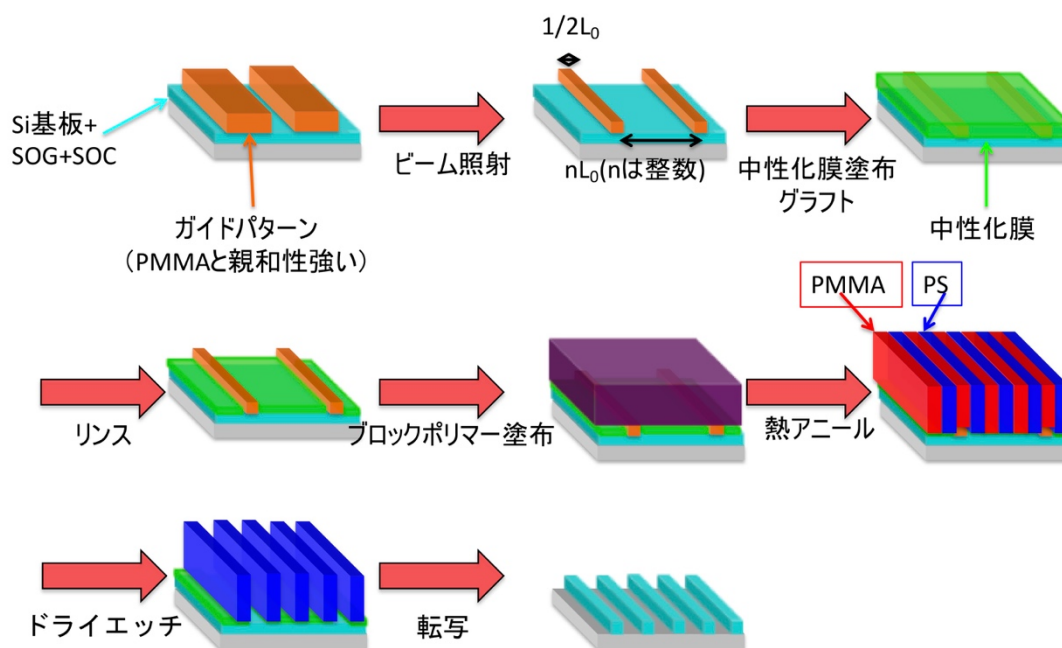


Fig.1 Schematic procedure of a typical DSA process

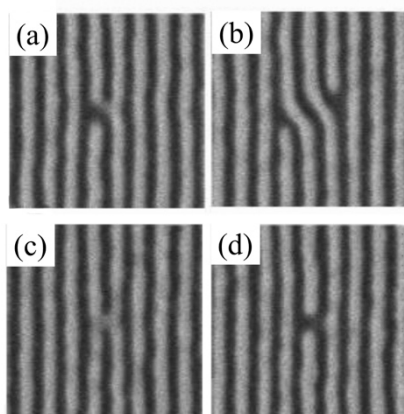


Fig.2 Defects formed in DSA process. (a) (b) dislocation, (c) short, (d) open

回で言えば幅15nm、間隔90nm周期のスペースになる様に削る。その上から基板とコポリマーの配向性の差をなくすためにランダムコポリマーを塗布、加熱して基板状にグラフトさせる。そしてリンスによりグラフトしていない部分を取り除くことでガイドパターンを作成する。この上にブロックコポリマーを塗布し、ガイドに沿って自己組織化させることによって、D-spacingのピッチのパターンを完成させる。これを用いてSi基板までエッチングすることによってパターンニングすることができる。この手法における現在の課題は、Figure 2に示すようなパターン欠陥をいかに減らすかであり、そのためには、ブロックコポリマー薄膜の自己組織化過程を明らかにすることが重要な研究テーマとなっている。特に、相分離構造の深さ方向の成長の違いが欠陥の原因になっていると考えられており、深さ方向の成長を明らかにすることが望まれている。

解明することを試みた。GI-SAXS法では薄膜試料に対し、膜面に対して平行に近い角度でX線を入射して小角X線散乱の測定を行う。この光学系の設定によって膜面に対して平行な面内方向の構造だけでなく膜面に対して垂直な面外方向の構造の観察も可能となる。また入射角が臨界角より浅い場合は表面側のみから得られる散乱を、臨界角以上の場合では表面からサンプル全体からの散乱が得られるため、構造の深さ依存性を測定することができる。よって、深さ方向の構造の不均一性についてもその場観察できる特徴があり、自己組織化における膜面方向と深さ方向の成長の違いを詳細に調べることができる。

2. 実験

ブロックコポリマーとしてはpoly(styrene-block-methyl methacrylate) (PS-b-PMMA) (数平均分子量 M_n : 29800-b-28700)を試料として用いた。PS-b-PMMA の体積分率の比率はほぼ50/50であり、ラメラ構造を形成する。

基板としては、PS-b-PMMAの形成するラメラ構造を基板表面に対して垂直に配向させるために、シリコン基板表面上に中性化膜として、Nealeyらの方法³⁾に従ってポリスチレンポリメタクリル酸メチルランダムコポリマーをグラフトさせた。ランダムコポリマーの組成比はポリスチレン/ポリメタクリル酸メチル=25/75である。この表面処理した基板の上に、PS-b-PMMAおよび混合系を良溶媒のプロピレングリコールモノメチルエーテルアセテートに溶解し、5wt%溶液を作成した。この溶液を回転数1500rpmにてスピコートし、基盤上に厚み45nmの薄膜を作成した。

上記の方法で作成した薄膜試料の昇温過程における自己組織化をGI-SAXSとAFMを用いて観察を行った。GI-

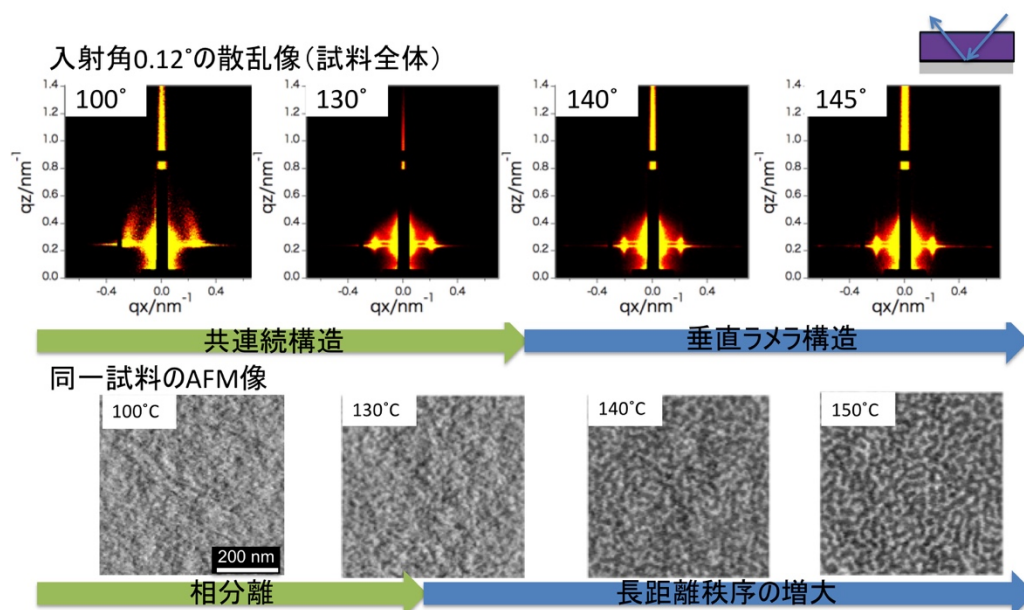


Fig.3 Temperature dependence of 2D-GI-SAXS images and AFM images of PS-b-PMMA thin film during heating process

真空下で実験を行った。臨界角より浅い入射角 0.05° では表面から約5nmから得られる散乱を、臨界角より深い 0.12° ではサンプル全体から得られる散乱を観察できるため、試料の構造の深さ依存性を調べる事ができる。昇温過程は 80°C から 5°C ずつ昇温し、目標温度に達してから5分間アニール後に測定というプロセスで 200°C まで測定を行なった。AFM測定は同じ昇温過程においてのその場観察を行った。

3. 結果・考察

Figure 3に昇温過程における入射角 0.12° におけるGISAXSの二次元像と対応するAFM像を示す。AFM像においては 130°C から相分離構造が観測され始め、それに対応してGISAXSの二次元像においても、等方的なネットワーク構造を反映するリング状散乱パターンから垂直ラメラ構造によるIn-plane方向へのスポット散乱へと変化しているのが観測される。各温度で得られた二次元パターンにおけるYonedaピーク位置におけるin-plane方向の散乱プロファイルを波数 q に対してプロットしたものをFigure 4に示す。どの温度においても、ピークが観測されており、温度の上昇とともに波数の小さい方へシフトしている。ガラス転移温度以下の $80, 110^\circ\text{C}$ においては、等方的なネットワーク構造に伴うブロードなピークが観測されているが、 130°C においてはブロードなピークとラメラ構造に伴う鋭いピークが現れてくる。これは、AFMでラメラ構造が現れてくるのに対応している。さらに、高温になるにつれて、ブロードなピークは消失し、ラメラ構造に伴う鋭いピークのみとなり、さらに長距離秩序の発展に伴った高次ピークが現れてくるのが観測される。

Figure 5には1次ピークにおけるOut-of-plane方向の散乱プロファイルを示す。温度の上昇とともに深さ方向への相分離構造の発展に伴ってフリンジが現れてくるのが観測される。このフリンジよりDWBA理論を用いた散乱関数の計算のFittingによって相分離構造の高さを求めたものがFigure 6である。 140°C で膜厚程度の高さの構造ができているのがわかる。これは二次元像でリング状のピークが消えた温度と一致しており、 140°C までは深さ方向へは相分離構造が膜厚全体までに達していないことがわかる。

Figure 7に昇温過程における入射角 0.05° におけるGISAXSの二次元像を示す。入射角 0.05° においては、 k_z 殺している深さが5nm程度であるので、3次元ネットワークの散乱は確認できないが、 135°C あたりからラメラ構造に伴う鋭いピークが確認できる。Yonedaピーク位置におけるin-plane方向の散乱プロファイルを波数 q に対してプロットしたものをFigure 8に示す。 0.12° と同様にピークが温度の上昇とともに波数の小さい方へシフトしているのが観測されている。

入射角 0.05° および 0.12° での1次ピーク位置の波数より

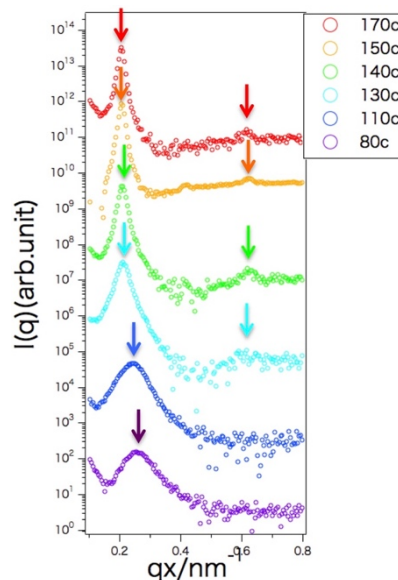


Fig.4 Temperature dependence of SAXS profiles along In-plane direction of GI-SAXS images at 0.12° .

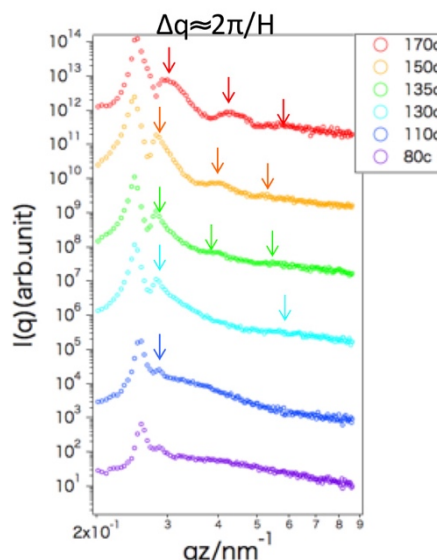


Fig.5 Temperature dependence of SAXS profiles along Out-of-plane direction of GI-SAXS images at 0.12° .

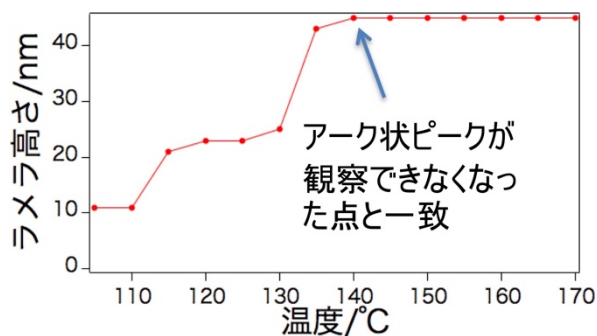


Fig.6 Temperature dependence of height of lamellar structure estimated from the SAXS profiles along Out-of-plane direction at 0.12° .

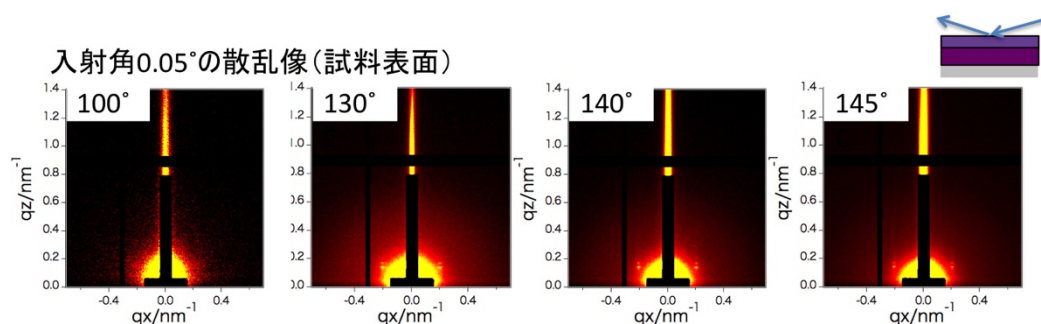


Fig.7 Temperature dependence of 2D-GI-SAXS images of PS-b-PMMA thin film during heating process at 0.05°.

求められるD-spacingの温度依存性プロットしたものがこの図にFigure 9に示す。どちらにおいてもガラス転移温度付近の100°Cを超えたところからD-spacingが増大し始め、ラメラ構造の形成が確認できる130°Cあたりで一定となるが、0.05°での変化が早いため、表面側から自己組織化が起こっていることがわかる。表面から自己組織化が始まる理由として表面のガラス転移温度が内部よりも低いことによって起こることが考えられる。

4. まとめ

GI-SAXS法によりPS-b-PMMA薄膜の昇温過程における相分離過程について、観察した結果、以下に述べる様な過程をとることが明らかになった。ガラス転移温度付近で等方的な構造が誘起され、135°Cあたりで表面側から、等方的な構造より大きな周期を持つラメラ構造の成長が始まること、その構造は温度に応じて徐々に成長していき、145°Cで膜全体が垂直ラメラ構造が形成された。またそれ以上の温度へと加熱を続けるとより長距離の秩序構造を形成していくことも見出された。 よって、ガイドパターンからの拘束が効かない表面からの成長が欠陥を生み出すことも見出された。

謝辞

本研究は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の支援を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) “Self-Assembly of Block Copolymers: Its Science and Technology” M.Takenak, H. Hasegawa ed., CMC Republishing (2013).
- 2) “Nanolithography: The Art of fabricating Nanoelectronic and Nanophotonic Devices and Systems”, 1st edition, M. Feldman ed., Woodhead Publishing (2013).
- 3) E.Han, K.O.Stuen, Y-H. La, P. F. Nealey, P.Gopalan, Macromolecules, 41, 9090 (2008).
- 4) H. Ogawa, H. Masunaga, S. Sasaki et al. Polymer Journal, 45, 109-116 (2013).

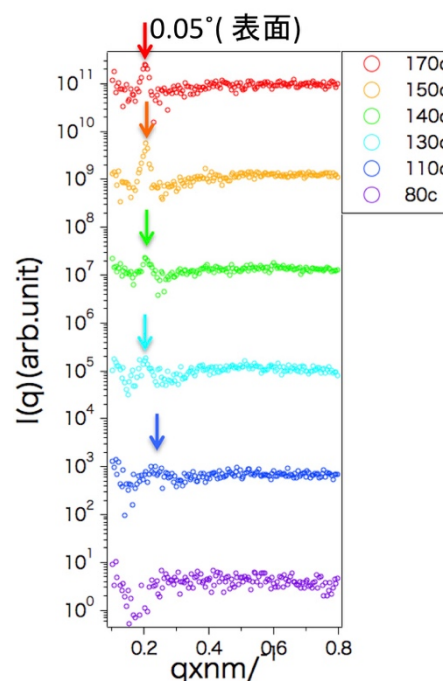


Fig.8 Temperature dependence of SAXS profiles along Out-of-plane direction of GI-SAXS images at 0.05°.

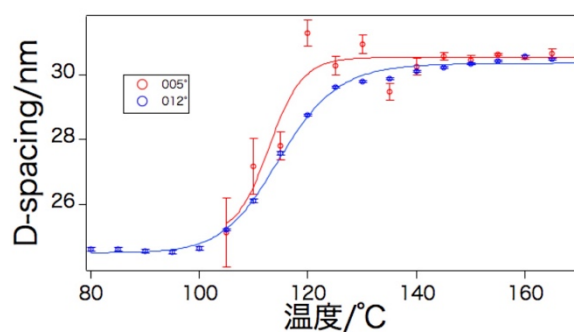


Fig.9 Temperature dependence of D-spacing estimated from the SAXS profiles along In-plane direction.

- 5) T. Fujisawa, K.Inoue, T. Oka et al. J. Appl. Crystallogr., 33, 797-800(2000).
- 6) "Microsystem Technology in Chemistry and Life Sciences", A. Manz and H. Becker, Springer, Berlin (1999).

櫛形環状高分子の Θ溶媒中における広がり

Dimension of Cyclic Comb Polymers in Theta Solvents

中村 洋¹・松居大志¹・月見亮介¹・高野敦志²・辻 陽介²・松下裕秀²
Yo NAKAMURA,¹ Taishi MATSUI,¹ Ryosuke TSUKIMI,¹ Atsushi TAKANO,²
Yosuke TSUJI,² Yushu MATSUSHITA²

¹Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

²Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya University

Light scattering measurements were made on three linear polybutadiene and one ring polybutadiene chains grafted with polystyrene chains in cyclohexane solutions at 34.5°C to determine the weight-average molecular weight and the mean-square radius of gyration $\langle S^2 \rangle$. The $\langle S^2 \rangle$ data were analyzed with the aid of the theory for wormlike chain model and determine the stiffness parameter λ^{-1} for each polymer. The λ^{-1} values for the linear and ring comb polymers with the same side chain length were found to be close each other. The previous $\langle S^2 \rangle$ data for the same polymers in toluene were re-analyzed by considering the excluded-volume effects, but the conclusion was not changed.

1. 序

寺尾ら^{1,2)}はいくつかの環状アミロース誘導体について、一定の溶媒条件下で剛直性パラメータ λ^{-1} が直鎖に比べて小さくなることを示した。彼らは、この原因として環状鎖において曲率が大きくなることにより、主鎖のらせん構造に変化が生ずることによると解釈した。これは、鎖の剛直性が鎖の幾何学構造とは無関係であるとの一般的考えと異なり、注目された。

一方で、我々³⁾は最近、直鎖状および環状ポリイソブレン鎖にポリスチレンをグラフトしたブラシ状高分子に対して、光散乱測定をおこない、トルエン中の平均二乗回転半径 $\langle S^2 \rangle$ を測定した。得たデータをみみず鎖に基づく理論を用いて解析し、環状鎖の λ^{-1} が、直鎖に比べて大きいことを示した。これは、曲率の増大とともに曲げの弾性率が非線形的に変化することによるものと解釈された。

上記の研究は、側鎖ポリスチレンの良溶媒であるトルエン中における結果であるが、ポリスチレンのシータ溶媒であるシクロヘキサン中でどうなるか興味深い。そこで本研究では、直鎖および環状のポリイソブレンにポリスチレンをグラフトしたブラシ状高分子のシクロヘキサン溶液に対して光散乱測定をおこない、 $\langle S^2 \rangle$ を測定し λ^{-1} を評価した。

2. 実験

ポリマー試料

線状および環状の櫛形高分子はトルエン溶液に対する研究³⁾に用いたものと同じ試料を使用した。

それぞれの高分子に対する、幹鎖、側鎖の分子量およびグラフト率をTable 1に示す。NMR測定より決めた主鎖ポリブタジエンの1,2-, 3,4-, 1,4-構造の比は36 : 60 : 4であった。

Table 1. Molecular weights of the components and the grafting ratios for the ring (R) and linear (L) graft polymers.

Sample	trunk chain $10^{-4} M_w$	side chain $10^{-3} M_w$	grafting ratio (%)
R-g-s 92k	9.2	5.8	40
L-g-s 92k	9.2	5.2	43
L-g-Ls 92k	9.2	7.8	45
L-g-s 178k	17.8	5.2	38

測定

ポリマー試料をシクロヘキサンに溶解し、多角度光散乱(MALS) 検出器を用いて静的光散乱測定を行った。セルの温度調整が可能なWyatt 社製のDAWN EOS を用い、光源は波長690 nm の垂直偏光とした。測定温度はポリスチレンのシータ温度である34.5°Cとした。各試料について、最大濃度約0.1 mg/ml として濃度既知の溶液を5 点調製した。孔径0.45 μm のテフロン製フィルタを通して溶液を測定セルに注入し、セル内を溶液で完全に置換して測定を行った。溶液と溶媒の散乱光強度の差から散乱角 θ における過剰還元散乱光強度 R_θ を決定し、Berry平方根プロットを用いて解析した。Figure 1に測定結果を示す。 $(Kc/R_\theta)^{1/2}$ の散乱ベクトルの2乗 k^2 および高分子質量濃度 c に対するプロットの傾きより、それぞれ $\langle S^2 \rangle$ と第二ビリアル係数 A_2 を決定した。いずれの試料に対する A_2 も $1 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$ 以下であり、シータ状態に近いことがわかった。

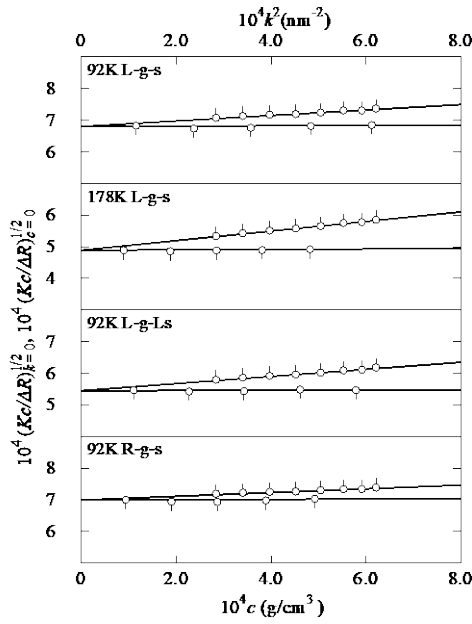


Figure 1. Square root of the reciprocal reduced scattering intensities for linear and ring brush-like polymers in cyclohexane at 34.5 °C plotting against square of the magnitude of the scattering vector (circles with pip up) and against the mass concentration of polymer (circles with pip down).

3. 結果

Figure 2に各試料に対する $\langle S^2 \rangle$ の重量平均幹鎖重合度 N_w に対する両対数プロットを示す。□は環状楕形高分子に対するデータを、○は側鎖分子量が5,200の、△は側鎖分子量が7,800の直鎖楕形高分子に対するデータを示す。幹鎖重合度が同じ3試料を比較すると、環状鎖の $\langle S^2 \rangle$ が一番小さく、直鎖については側鎖重合度が高くなるにしたがって $\langle S^2 \rangle$ が大きくなっている。幹鎖重合度、側鎖分子量ともにほぼ等しい環状楕形高分子の $\langle S^2 \rangle$ を直鎖の値で割ると0.66となった。これは、非摂動の環状高分子に対して知られている値³⁾0.5よりも大きく、同試料のトルエン中における値0.77と近くなった。

4. 考察

4-1. 直鎖楕形高分子の剛直性パラメータ

直鎖楕形高分子の $\langle S^2 \rangle$ に対するデータをみみず鎖モデルに対する次のBenoit-Dotyの式⁴⁾を用いて解析した。

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

式中で L は幹鎖の経路長を示す。 $\langle S^2 \rangle$ に対する太さの効果の

寄与については、トルエン溶液に対するデータ解析³⁾と同様に無視した。

各楕形高分子の主鎖経路長 L は以下の様に計算した。1,2-および3,4-結合に対する繰り返し単位当たりの経路長 h を0.25 nm、1,4-結合に対しては0.44 nmと見積もり、 h の平均値0.26 nmを得た。これを N_w に掛けることにより L を求めた。式(1)において、 L が決まれば $\langle S^2 \rangle$ は λ^{-1} のみの関数となり、実験データに計算値をフィッティングすることにより λ^{-1} を決めることができる。

Figure 2に直鎖楕形高分子の $\langle S^2 \rangle$ に対する式(1)を用いたフィッティングの結果を示す。破線が側鎖分子7,800の試料のデータに対するフィッティングを実線が側鎖分子5,200の試料のデータに対するフィッティングの結果であり、それぞれの試料に対する λ^{-1} を23 nmおよび15 nmと決定した。

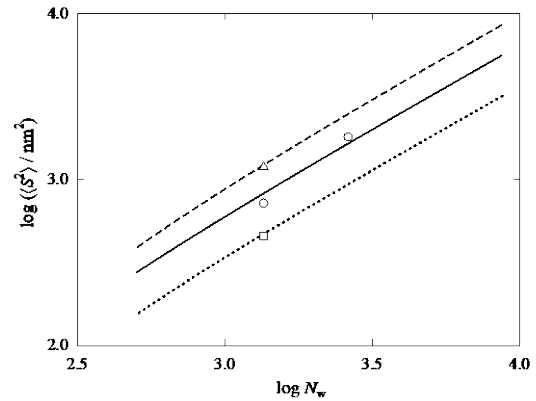


Figure 2. Mean-square radius of gyration for brush-like polymers plotted against the weight-average degree of polymerization of the trunk chain: triangle, L-g-Ls; circles, L-g-s; square, R-g-s.

4-2. 環状楕形高分子の剛直性パラメータ

みみず鎖モデルに基づけば、環状鎖の $\langle S^2 \rangle$ は次の様に表される⁵⁾。

$$\begin{aligned} \langle S^2 \rangle = \frac{(\lambda L)^2}{4\pi^2} & \left[1 - 0.1140(\lambda L) - 0.0055258(\lambda L)^2 \right. \\ & \left. + 0.0022471(\lambda L)^3 - 0.00013155(\lambda L)^4 \right] \quad \text{for } \lambda L \leq 6 \\ \langle S^2 \rangle = \frac{\lambda L}{12} & \left[1 - \frac{7}{6\lambda L} - 0.025 \exp[-0.01(\lambda L)^2] \right] \quad \text{for } \lambda L > 6 \end{aligned} \quad (2)$$

Figure 2中の点線は環状楕形高分子の $\langle S^2 \rangle$ に対する式(2)の計算値によるフィッティングの結果を示す。計算に用いたパラメータより、 λ^{-1} を17 nmと決定した。

このようにして求めた λ^{-1} を側鎖重合度 n に対してプロッ

トしたものをFigure 3に示す。図中で白丸が直鎖楕形高分子に対する値を、黒丸が環状楕形高分子に対する値を示す。実線は直鎖楕形高分子に対する2点を直線で結んだものである。環状楕形高分子の λ^{-1} は直線の値と近くなった。これより、この溶媒中の直鎖および環状楕形高分子の剛直性はほぼ一致することが確認された。これは環状鎖の λ^{-1} が直鎖に比べて大きくなったトルエン中の結果と異なる。

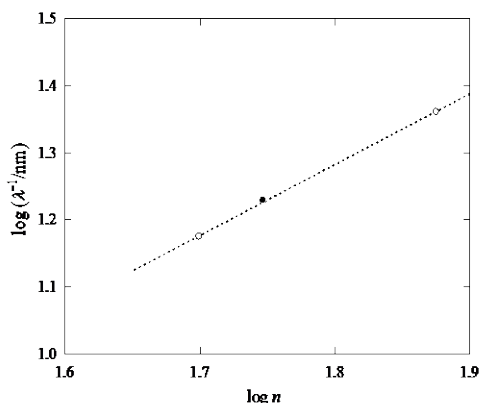


Figure 3. Stiffness parameter for linear (unfilled circles) and ring (filled circle) brush-like polymers in cyclohexane (34.5°C) plotted against the degree of polymerization of side chain.

4-3. トルエン溶液に対するデータの再解析

以前のトルエン溶液に対するデータの解析³⁾においては分子内排除体積効果の影響を無視した解析をしていた。しかしながら、トルエンは側鎖ポリスチレンの良溶媒であり、分子内排除体積効果によって鎖が膨張していたと考えられる。そのために直鎖および環状鎖に対する λ^{-1} を過大評価していた可能性が考えられる。そこで、ここでは直鎖および環状ブラシ状高分子の $\langle S^2 \rangle$ に対する排除体積効果を考慮し、以前のデータを再解析する。

$\langle S^2 \rangle$ への排除体積効果は排除体積効果の働かない、いわゆる非摂動状態における平均二乗回転半径 $\langle S^2 \rangle_0$ に半径膨張因子 α_s の2乗を掛けることで考慮することができる⁶⁾。

$$\langle S^2 \rangle = \alpha_s^2 \langle S^2 \rangle_0 \quad (3)$$

直鎖に対する α_s は次式で定義される排除体積パラメータ z の関数として表されることが知られている⁶⁾。

$$z = \left(\frac{3}{2\pi} \right)^{3/2} \lambda B (\lambda L)^{1/2} \quad (4)$$

ここで、 B は排除体積パラメータを示す。

直鎖に対する回転半径膨張因子 $\alpha_{s, \text{linear}}$ に対して、次式の

Domb-Barettの式⁷⁾が良く用いられる。

$$\alpha_{s, \text{linear}}^2 = [1 + 10z + 27.8z^2 + 44.6z^3]^{2/15} \times [0.933 + 0.067 \exp(-0.85z - 1.39z^2)] \quad (5)$$

環状鎖の回転半径膨張因子 $\alpha_{s, \text{ring}}$ に対する式は知られていないので、次の様に定式化した。Domb-Barettの両末端距離膨張因子に対する式⁷⁾を参考に次の様に表した。

$$\alpha_{s, \text{ring}}^2 = [1 + C_1 z + C_2 z^2 + C_3 z^3]^\gamma \quad (6)$$

$z \rightarrow \infty$ で $\alpha_{s, \text{ring}}^2 \propto z^{2/15}$ となる様に指数 γ は2/15とし、 C_1 は上式を z について展開したとき、 z の1乗の係数が1次摂動係数⁸⁾ $\pi/2$ と合うように $\pi/(2\gamma)$ とした。 C_2 はDomb-Barett式の値27.8をそのまま用いた。

C_3 は次の様に決定した。環状鎖の $\langle S^2 \rangle$ の同分子量の直鎖の $\langle S^2 \rangle$ に対する比を g_s と表す。良溶媒中の g_s と Θ 溶媒中の $g_{s,0}$ との関係は次式で表される。

$$g_s = \frac{\alpha_{s, \text{ring}}^2}{\alpha_{s, \text{linear}}^2} g_{s,0} \quad (7)$$

$z \rightarrow \infty$ では、式(5)、(6)を用いて上式は次の様になる。

$$g_s = \frac{1.55}{C_3^{2/15}} g_{s,0} \quad (8)$$

また、屈曲性高分子に対して $g_{s,0} = 0.5$ が知られる⁹⁾。一方、 $z \rightarrow \infty$ における g_s として、モンテカルロシミュレーションによる値0.56が知られる^{10,11)}。これらの値を式(8)に代入し、 C_3 に対する値62.6を得た。

式(3)~(8)を用いてフィッティングした結果をFigure 4~6に示す。図中、破線と実線はそれぞれ非摂動および摂動鎖に対する $\langle S^2 \rangle$ の計算値を示す。

求めた λ^{-1} の側鎖重合度 n に対するプロットをFigure 7に示す。環状楕形高分子に対する値(●)は直鎖楕形高分子に対する2点(○)を結んだ直線状よりも上にあり、環状楕形高分子の λ^{-1} は直鎖に比べて大きいという前回の結論³⁾を支持する。

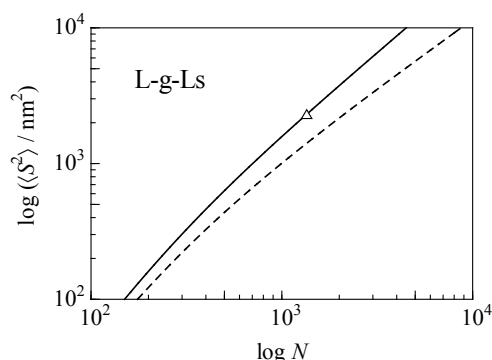


Figure 4. Fitting results to the $\langle S^2 \rangle$ data for L-g-Ls linear comb polymer in toluene. Dashed and solid lines show the calculated values for unperturbed and perturbed chains.

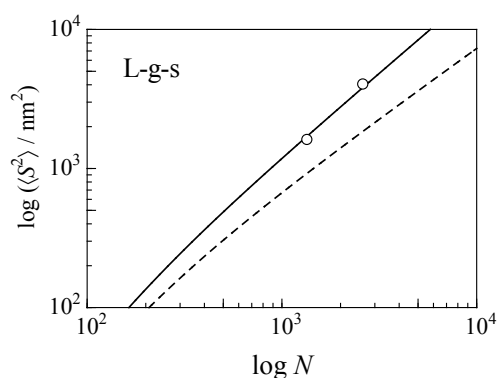


Figure 5. Fitting results to the $\langle S^2 \rangle$ data for L-g-s linear comb polymer in toluene. Dashed and solid lines show the calculated values for unperturbed and perturbed chains.

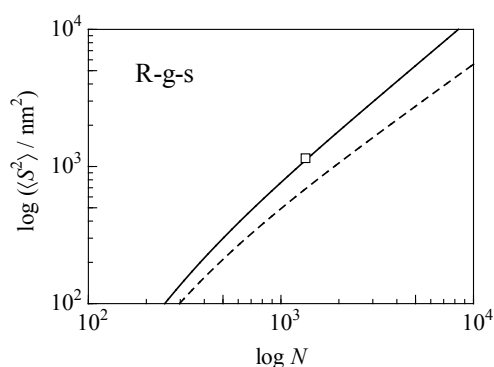


Figure 6. Fitting results to the $\langle S^2 \rangle$ data for R-g-s ring comb polymer in toluene. Dashed and solid lines show the calculated values for unperturbed and perturbed chains.

5. 結論

重合度約50および75のポリスチレン鎖をグラフトした直鎖楕形高分子および重合度約50のポリスチレン鎖をグラフトした環状楕形高分子の Θ 溶媒中における広がりを測定し、みみず鎖理論を用いてそれぞれの高分子の剛直性パラメータ λ^{-1} を決定した。環状楕形高分子の λ^{-1} は、側鎖重合度の異なる2つの直鎖状楕形高分子に対する λ^{-1} を結んだ直線に近くなった。これより、この溶媒中における環状楕形高分子の λ^{-1} が直鎖状楕形高分子の λ^{-1} とほぼ変わらないことがわかった。これは、環状楕形高分子の λ^{-1} は直鎖楕形高分子に比べて大きいという良溶媒中の結果と異なった。排除体積効果を考慮して良溶媒中の結果を解析しなおしたが、結論に変化はなかった。

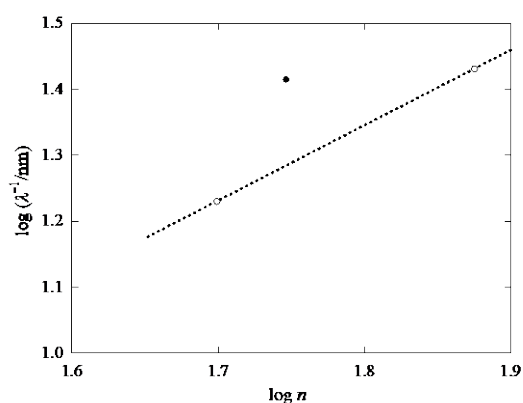


Figure 7. Stiffness parameter for linear (unfilled circles) and ring (filled circle) brush-like polymers in toluene (25°C) plotted against the degree of polymerization of side chain.

参考文献

- 1) K., Terao, K. Shigeuchi, K. Oyamada, S. Kitamura, and T. Sato, *Macromolecules*, **46**, 5355 (2013).
- 2) A. Ryoki, H. Yokobatake, H. Hasegawa, A. Takenaka, D. Ida, S. Kitamura, and K. Terao, *Macromolecules*, **50**, 4000 (2017).
- 3) 月見亮介、中村 洋、高野敦志、辻 陽介、松下裕秀、化繊研要旨集, **76**, 65 (2019).
- 4) H. Benoit and P. Doty, *J. Phys. Chem.*, **57**, 958 (1953).
- 5) J. Shimada and H. Yamakawa, *Biopolymers*, **27**, 657 (1988).
- 6) H. Yamakawa and T. Yoshizaki, *Helical Wormlike Chains in Polymer Solutions* 2nd Ed., Springer, Heidelberg, 2016.
- 7) C. Domb and A. J. Barrett, *Polymer*, **17**, 179 (1976).
- 8) E. F. Casassa, *J. Polym. Sci. Part A*, **3**, 605 (1965).
- 9) Zimm, B. H., and W. H. Stockmayer, *J. Chem. Phys.*, **17**, 1301 (1949).
- 10) T. Deguchi, *J. Phys. A: Math. Theor.*, **41**, 145004 (2008).
- 11) G. Zifferer and W. Preusser, *Macromol. Theory Simul.*, **10**, 397 (2001).

ラジカルペアの拡散および停止反応における粘度効果

The Effect of Viscosity on the Diffusion and Termination Mechanism of Radical Pairs

山子 茂¹・李 小培¹・中村 泰之²

Shigeru YAMAGO, Xiaopei LI, Yasuyuki NAKAMURA

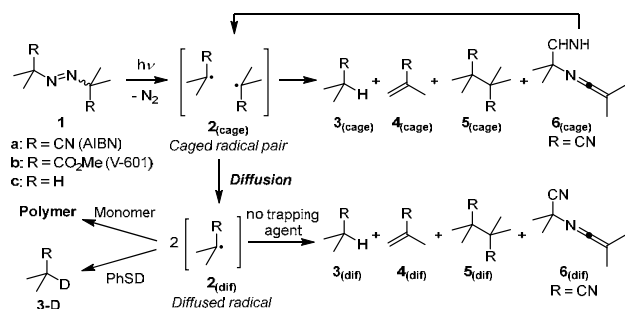
¹Institute for Chemical Research, Kyoto University, and ²National Institute for Materials Science

The effect of viscosity on the diffusion efficiency (F_{dif}) of an organic radical pair in a solvent cage and the termination mechanism, i.e., the selectivity of disproportionation (*Disp*) and combination (*Comb*) of the geminated caged radical pair and the diffused radicals encountered, were investigated quantitatively by the photolysis of dimethyl 2,2'-azobis(2-methylpropionate) (V-601, **1b**) in the absence and presence of PhSD. F_{dif} and *Disp/Comb* selectivity outside the cage ($\text{Disp}_{(\text{dif})}/\text{Comb}_{(\text{dif})}$) are highly sensitive to the viscosity. In contrast, the *Disp/Comb* selectivity inside the cage, $\text{Disp}_{(\text{cage})}/\text{Comb}_{(\text{cage})}$, is rather insensitive. Furthermore, while the bulk viscosity of each solvent shows good correlation with F_{dif} and *Disp/Comb* selectivity, microviscosity is the better parameter predicting F_{dif} and $\text{Disp}_{(\text{dif})}/\text{Comb}_{(\text{dif})}$ selectivity regardless of the solvents.

1. 序

ラジカルペアの溶媒ケージ効果と停止機構、すなわち不均化反応 (*Disp*) と結合反応 (*Comb*) の選択性は、高分子合成のみならず、有機化学、生化学、物理化学などの多くの分野において重要な問題である。¹⁾しかし、温度や粘度等の様々な因子がケージ効果と停止機構に及ぼす影響は定性的に知られているが、定量的理解は進んでいない。

アゾ化合物**1**、例えばAIBN **1a**やV-601 **1b**は加熱や光照射により窒素の脱離を伴ってラジカル**2**を生成することから (Scheme 1)、ラジカル重合開始剤として広く用いられている。^{2,3)}しかし、重合開始効率は理論値以下である。これは、**1**の分解直後に生成する溶媒ケージ内ラジカル**2(cage)**の一部が、拡散して拡散ラジカル**2(dif)**となる前に停止反応を起こすためである。例えば、**1a**の拡散効率 (F_{dif}) は約60%である。³⁻⁶⁾また、その効率が反応溶媒の粘度の上昇や温度の低下により減少することは知られているが、^{7,8)}十分に信頼できるデータは得られていない。

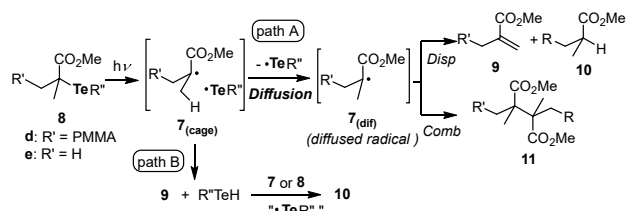


Scheme 1. Generation of radicals from azo initiators and the fate of the generated radicals in the presence or absence of the monomer and radical trapping agent PhSD.

アゾ化合物はラジカル重合の停止機構研究において、重合末端モデルを生成する前駆体としても利用されている。⁹⁻¹²⁾この場合、*Disp*により**3**と**4**の1:1混合物が、*Comb*により**5**が生成する (ニトリル置換基がある場合はC-N *Comb*によ

る**6**も生成する)。しかし、**2(cage)**と**2(dif)**の停止機構が必ずしも同じでないことから、拡散ラジカルのみが関与する重合停止機構の解明にアゾ化合物を用いる妥当性は自明ではない。Tannerはすでに*t*-Buラジカル (**2c**) を生成するアゾ化合物**1c**の停止反応において、その停止機構がケージの内外で大きく異なることを報告している。¹³⁾すなわち、**2c(cage)**と**2c(dif)**の停止反応は、いずれも溶媒の粘度の上昇により*Disp*が増えるが、**2c(dif)**の方がより大きな粘度効果を受けることを明らかにしている。しかし、R置換基としてニトリルやエステル等の極性官能基を持つラジカルにおけるケージ効果の粘度効果については、これまで研究例はなかった。ごく最近、Matyjaszewski, Poliらは**1b**を用いた停止機構の検討を報告しており、**2b**の停止機構は粘度や温度により影響を受けない、と結論している。¹⁴⁾しかし、彼らは溶媒ケージ効果を全く考えていなかった。

我々は最近、生成物の構造解析に基づくラジカル重合の停止機構解明法を提唱している。¹⁵⁻¹⁷⁾すなわち、分子量の制御された重合末端ラジカル**7**を、TERP^{18,19)}で合成した有機テルル成長末端を持つポリマー**8**から生成し、*Disp*生成物**9**、**10**と*Comb*生成物**11**の生成を解析する方法である。MMAの重合停止機構の例をScheme 2に示した。なお、小分子モデル前駆体**8e**を用いた場合、生成するラジカル**7e**、生



Scheme 2. Cage effects in the termination reaction of PMMA and its model radical starting from organotellurium compound **8**. Diffusion of the radical gave termination products (path A) and the tellanyl radical mediated the abstraction proposed in reference 14 (path B).

成物**9e**, **10e**, **11e**はScheme 1の**2b**, **3b**, **4b**, **5b**と同じ化合物である。この検討により、これまで二つの重要な結論を得ている。すなわち、メタクリレートとスチレンの重合末端ラジカルの停止機構は溶媒粘度により制御可能であり、高粘度溶媒中では選択的に $Disp$ で停止することと、¹⁷アクリレートの重合末端ラジカルは常に選択的に $Disp$ で停止することである。¹⁶これらの結論は教科書に記載されている内容と大きく異なるものである。

一方、Matyjaszewski, Poliらは先述の**1b**を用いた停止機構研究の結果から、我々の結果は**8**から生成した**7(cage)**とテラニルラジカルのケージ内での反応によると提案している。すなわち、**7(cage)**から**7(dif)**へ拡散する (path A) のではなく、ケージ内でテラニルラジカルが**7(cage)**の水素引き抜き反応により**9**とテルロールR[”]TeHが生成した後、テルロールがさらに**7**を還元することで**10**が生成する経路 (path B) である。¹⁴さらに、我々のアクリレートの停止機構の結論についても、その妥当性に疑問を投げかけた。

我々はこのような意見の相違は、溶媒ケージ効果と停止機構の定量的なデータが欠如しているために起きていると考え、拡散効率 F_{dif} と溶媒ケージ内外における $Disp/Comb$ 選択性を定量化を行ったので報告する。なお、最近Tylerらは、[Cp[”]Mo(CO)₃]₂の光分解により得られるCp[”]Mo(CO)₃ラジカルペアの拡散における溶媒ケージ効果の研究において、バルク粘度よりもマイクロ粘度の方がラジカル拡散効率の良いパラメータとなることを示している。^{20,21}そこで、本研究においてもケージ内外の $Disp/Comb$ 選択性に対するマイクロ粘度の効果についても検討した。

2. 実験方法

1bをアゾ化合物として選択した。**1b**はMatyjaszewski, Poliらが用いたアゾ化合物であると共に、PMMA末端ラジカルの小分子モデルラジカル**2b** (**7e**)を生成する。さらに、**1a**とは異なり、R置換基がエステルであるため、**6**に相当する化合物を生成しない。すなわち、**6**は反応条件下で分解してラジカル**2a**を生じる可能性があるため、拡散効率を過剰に見積もってしまう可能性がある。

まず、**1b**溶液 (0.050 mol L⁻¹溶液) に対し、種々の温度でUV光を照射することでラジカル**2b**を生成した。**1b**が消失後、生成物を同定すると共に、**3**と**5**の生成比から $Disp/Comb$ の選択性 ($Disp_{(sum)}/Comb_{(sum)}$) を求めた。続いて、同じ反応を過剰のPhSD中で行うことで、拡散ラジカル**2b(dif)**をすべて重水素化体**3b-D**へと捕捉し、**3b-D**の生成量から $F_{dif}(\%)$ を求めた。さらに、**3**と**5**の生成比から溶媒ケージ中での選択性 ($Disp_{(cage)}/Comb_{(cage)}$) を求めた。さらに、これらの得られた結果から、**2b(dif)**の停止反応選択性 ($Disp_{(dif)}/Comb_{(dif)}$) を推定した。なお、いずれの反応においても、少量のオリゴマーが確認されると共に、**4b**の生成量は常に**3b**よりも少なかった。これは、生成した**4b**が**2b**との反応により消費されたものと考えられる。なお、**3**と**5**の合計収率は64-73%であった。

それぞれの反応条件におけるバルク粘度 (η_{bulk}) は粘度計で、マイクロ粘度 (η_{micro}) はイソブチル酸メチル (MIB) をラジカル**2b**のモデルとして用い、¹H DOSY NMR実験においてMIBの拡散係数を求め、Stokes-Einstein式より求めた。その際、MIBの分子半径は、DFT計算により求めた分

Table 1. The effect of bulk and microviscosity on diffusion efficiency F_{dif} and $Disp/Comb$ termination selectivity for caged and diffused radicals generated from V-601 (**1b**)

Run	Solvent/Temp.	η_{bulk} (mPa s)	η_{micro} (mPa s)	$Disp_{(sum)}/Comb_{(sum)}^{[a]}$	F_{dif} (%)	$Disp_{(cage)}/Comb_{(cage)}$	$Disp_{(dif)}/Comb_{(dif)}$	$Disp/Comb$
1	C ₆ D ₆ /80	0.35	0.081	44/56	55	43/57	45/55	46/54
2	C ₆ D ₆ /60	0.41	0.096	45/55	53	44/56	46/54	47/53 ^[d]
3	C ₆ D ₆ /40	0.60	0.13	48/52	48	46/54	50/50	51/49 ^[d]
4	C ₆ D ₆ /25	1.1	0.17	51/49	46	47/53	56/44	59/41 ^[d]
5	DMSO- <i>d</i> ₆ /80	0.82	0.38	55/45	33	52/48	65/35	67/33
6	DMSO- <i>d</i> ₆ /60	1.2	0.44	58/42	30	53/47	67/33	71/29 ^[d]
7	DMSO- <i>d</i> ₆ /40	1.7	0.52	59/41	26	55/45	70/30	73/27 ^[d]
8	DMSO- <i>d</i> ₆ /25	2.3	0.59	60/40	20	56/44	73/27	76/24 ^[d]
9	PEG400/80	11	0.63	55/45	19	49/51	70/30	71/29
10	PEG400/60	21	0.78	58/42	16	51/49	77/23	78/22 ^[d]
11	PEG400/40	44	0.83	62/38	11	53/47	86/14	90/10 ^[d]
12	PEG400/25	84	0.88	66/34	7	57/43	91/9	94/6 ^[d]

[a] The $Disp/Comb$ selectivity obtained in the absence of PhSD. [b] The $Disp/Comb$ selectivity of the caged radical obtained by the addition of PhSD. [c] The $Disp/Comb$ selectivity of the diffused radical estimated from $Disp_{(sum)}/Comb_{(sum)}$, $Disp_{(cage)}/Comb_{(cage)}$, and F_{dif} . [d] The $Disp/Comb$ selectivity obtained using the organotellurium compound **8e**. Data taken from ref. 17.

子体積 (144.2 Å³) に対し、球体近似を行った値を用いた (ラジカル**2b**の分子体積: 137.4 Å³)。

PhSDの量は95-98%の重水素化率のものを調整して用いた。さらに、PhSHとPhSDの二次同位体効果を調べたところ4.8であったことから、PhSDの重水素化率に応じて実験結果に補正を行った。さらに、予備的検討を行い、15当量のPhSDを用いた。PhSDの添加により粘度の高い溶媒中ではバルク粘度が低下したが、その程度は無視できるほど小さかったので、以下においてはこの効果は考慮していない。また、反応したPhSDはジフェニルジスルフィドとしてほぼ定量的 (>95%) に回収したことから、還元反応において生じるPhSラジカルと**2**との反応が無視できることも分かった。

3. 結果と考察

溶媒としてC₆D₆, DMSO-*d*₆, PEG400を選び、それぞれの溶媒中で25, 40, 60, 80 °Cで反応を行った。結果をTable 1にまとめた。なお、最も粘度の低い条件がC₆D₆/80 °C ($\eta_{\text{bulk}} = 0.35$ mPa s, $\eta_{\text{micro}} = 0.081$ mPa s)、高い条件がPEG400/20 °C ($\eta_{\text{bulk}} = 84$ mPa s, $\eta_{\text{micro}} = 0.88$ mPa s) であった。同一の溶媒において、バルク粘度に比べてマイクロ粘度は温度の影響は少なく、特にPEG400ではそれが顕著であった。Tylerは、ポリマーはバルク粘度を大きく影響を与える一方、マイクロ粘度への影響は小さいことを報告しており、²¹⁾その結果と一致する。

$\text{Disp}(\text{sum})/\text{Comb}(\text{sum})$ は粘度の増加により、44/56から66/34まで変化するものの、有機テルル化合物**8e**を用いて検討を行った Disp/Comb 選択性よりは変化は小さく、Matyjaszewski, Poliらの結果と良い一致を示した。¹⁴⁾

一方、 F_{dif} は溶媒粘度により大きく変化した。C₆D₆/80 °C条件では55%であり、この値はこれまでの報告と良く一致している。^{8,22)}それに対し、PEG400/20 °Cでは、 F_{dif} はわずか7%であった。 F_{dif} を温度およびバルク粘度に対してプロットしたところ、それぞれの溶媒においてよい相関が得られたことから (Fig. 1a, b)、これらがラジカルの溶媒ケージからの拡散を支配する重要な因子であることが示された。一方、 F_{dif} とマイクロ粘度の間では、溶媒の種類に依ることなく良い相関が見られた (Fig. 1c)。このことから、Tylerらの報告と同様に、マイクロ粘度が温度やバルク粘度よりもラジカルの拡散を支配するより重要な因子であることが示された。

さらに、停止機構の粘度依存性は溶媒ケージの内外で大きく異なることがわかった。すなわち、ケージ内ラジカル**2b**(_{cage})の $\text{Disp}(\text{cage})/\text{Comb}(\text{cage})$ 選択性の粘度依存性は極めて小さく、C₆D₆/80 °CとPEG400/20 °Cでは、高々43/57が57/43に変化する程度であった。一方、拡散ラジカル**2b**(_{dif})の $\text{Disp}(\text{cage})/\text{Comb}(\text{cage})$ 選択性は45/55から91/9へと大きく変化した。 Disp/Comb とバルク粘度の両対数プロットでは、それぞれの溶媒において、ケージ内外の両方の選択性がよい直線関係を示した (Fig. 2a)。それに対し、 Disp/Comb とマイクロ粘度の両対数プロットでは、変曲点はあるものの、バルク粘度との相関に比べて良い相関を示した (Fig. 2b)。このことから、停止機構においてもマイクロ粘度の方がバルク粘度よりも良いパラメータになることが示唆された。さらに、ケージ内ラジカル**7**(_{cage})よりも拡散したラジカル**7**(_{dif})の方がマイクロ粘度に対して良い相関を持つことが示された。この点は以下で議論する。

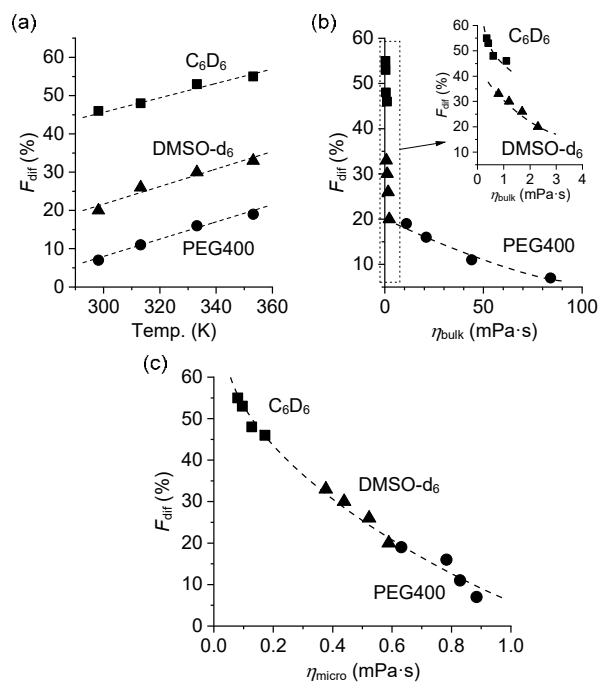


Fig. 1 Correlations between diffusion efficiency (F_{dif}) and temperature (a), bulk viscosity (the inset shows the wider viscosity range) (b), and microviscosity (c) for radical pair **2b**(_{cage}) generated from **1b**. The lines and curves are for guidance. Reprinted with permission from ref. 30. Copyright 2019 John Wiley and Sons.

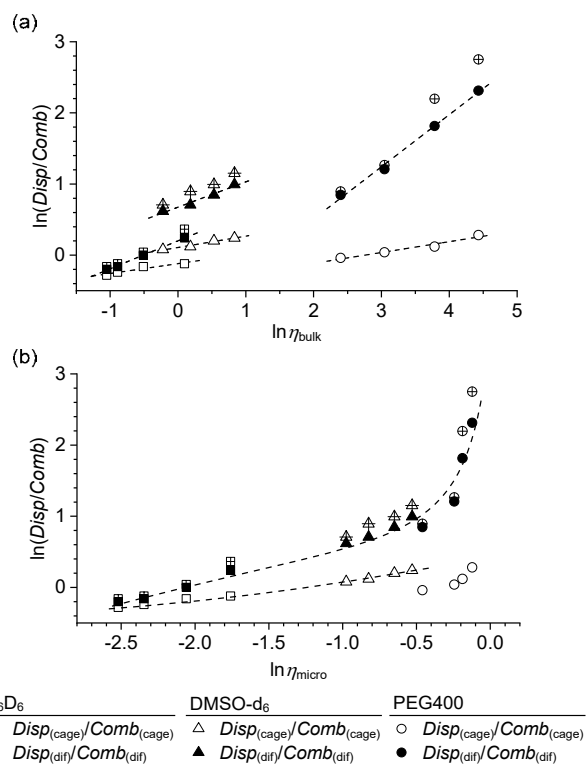
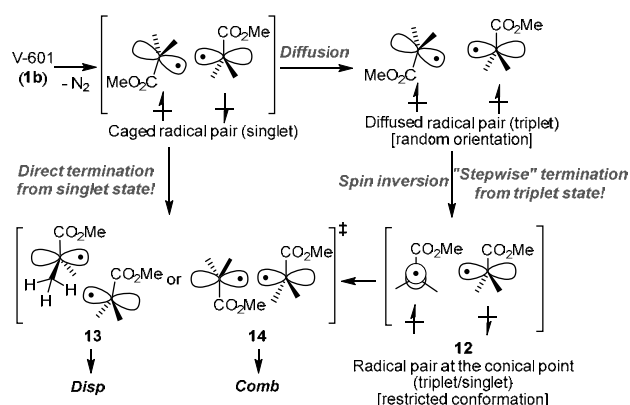


Fig. 2. Correlation of a) bulk and b) microviscosity with Disp/Comb selectivity in the termination reaction generated from V-601 (**1b**) and organotellurium compound **8e**. The lines and curves are for guidance.

7_(dif)の停止機構の選択性 ($Disp_{(dif)}/Comb_{(dif)}$) は有機テルル化合物8eをラジカル前駆体として用いた結果と良い一致を示した (Table 1)。¹⁷⁾このことは、8eから生じたラジカル7は副反応を起こすことなく、すべてが7_(dif)へと拡散することを示している (Scheme 2, path A)。ただし、これはテラニルラジカルとの溶媒ケージ内ラジカルペアが無い、という事ではない。ラジカルペアの反応は選択的に結合反応による8の再生であり、これはテラニルラジカルには水素引き抜き反応性が無いためであろう。これらの結果より、停止機構の研究において有機テルル化合物を重合末端ラジカル前駆体として用いることの妥当性が示された。

停止機構選択性における溶媒ケージ効果は、停止反応を起こすラジカルペアのスピン状態と、²³⁾すでに我々が提唱している修正Fischer衝突モデルを考えることで理解できる (Scheme 3)。^{17,24)}アゾ化合物の分解で生じたラジカルペアのスピン状態は一重項であることから、ケージ内におけるラジカルペアのほとんどが一重項であると考えられる。それに対し、一旦拡散したラジカル7_(dif)が再び衝突して停止反応を起こすには、ラジカルペアが三重項から一重項へと項間交差を起こす必要があり、このためには二つのラジカルがほぼ直交した構造12を取る必要がある。¹⁷⁾12からDispおよびCombを与える遷移状態13および14へ構造変化を起こすが、13への構造変化の方が14よりも小さい。すなわち、この構造変化に伴うラジカル近傍の溶媒の動き、換言すると、溶媒の再配列エネルギーが、前者が後者に比べて小さくなると予想される。このため、拡散ラジカルの停止反応では、溶媒の粘度が高くなるにつれてCombが不利となる。一方、ケージ内にある一重項ラジカルペアは、12を経ることなくそのまま13, 14へと変化できることから、粘度の効果が小さいと考えられる。



Scheme 3. The colliding model of the termination reaction of caged and diffused radicals generated from V-601 (1b)

上記の反応機構モデルは、それぞれの素反応過程の時間スケールからも支持される。すなわち、ラジカルペアの溶媒ケージからの拡散は 10^2 ps以下の極めて速い過程である。²⁵⁻²⁷⁾一方、停止反応は拡散律速で進行する点で通常の化学反応の中では極めて速い反応であるが ($\sim 10^8$ - 10^9 s⁻¹)、溶媒ケージ内におけるラジカルの再結合速度 ($>10^{10}$ s⁻¹) に比べると十分に遅い。^{28,29)}このような極めて短い時間スケールにおいて、例えばTylerは、Cp'Mo(CO)₃ラジカルの溶媒ケージ内での停止反応が

数ps程度で進行し、その間にはラジカルは回転運動さえも十分に起こらないと報告している。²⁷⁾従って、7のケージ内でのラジカルペアにおいても、12の構造に変化するなどの大きな構造変化無しに、停止反応を起こしていると考えられる。

4. 結論

PMMA末端構造を模した、極性官能基を持つ小分子ラジカルペアの溶媒ケージからの拡散と、ケージ内外における停止機構における粘度の効果を定量的に解析することに成功した。いずれも粘度により大きく影響を受けるが、拡散と拡散したラジカルの停止機構が極めて大きく粘度の影響を受けることを明らかにした。さらに、この程度の予測には、マイクロ粘度の方がバルク粘度よりも適していることを明らかにした。これは、拡散および停止反応はいずれも分子の物質輸送や部分構造変化に対応することから、少なくとも小分子においては、マイクロな環境で進行する事象であることから、妥当であると考えられる。今後、高分子を用いた検討へ展開することで、高分子の停止反応におけるバルクおよびマイクロ粘度の効果を明確にする予定である。さらに、有機テルル化合物から生じるラジカルはすべて拡散ラジカルとして振舞うことから、我々がこれまで行ってきた検討の妥当性も示された。これらの結果は、ラジカル反応とラジカル重合の素過程に対する理解を深め、より論理的な反応設計を行うための基礎となる成果であると考えている。³⁰⁾

謝辞

本研究は科研費 (No. 16H06352 [SY] 16K05795 [YN]) とICR共同研究プログラム (2018-26) の支援により、理論計算はNIMS材料数値シミュレーターを用いて行なわれた。

参考文献

- 1) C. Reichardt, *Solvent and Solvent Effects in Organic Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, **2003**.
- 2) K. Matyjaszewski, T. P. Davis, *Handbook of Radical Polymerization*, Wiley-Interscience, New York, **2002**.
- 3) G. Moad, D. H. Solomon, *The Chemistry of Radical Polymerization*, Elsevier, Amsterdam, **2006**.
- 4) G. Ayrey, *Chem. Rev.* **1963**, 63, 645–667.
- 5) G. Moad, E. Rizzardo, D. H. Solomon, S. R. Johns, R. I. Willing, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1984**, 5, 793–798.
- 6) J. K. Fink, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **1983**, 21, 1445–1455.
- 7) E. Niki, Y. Kamiya, N. Ohta, *Bul. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, 42, 3220–3223.
- 8) T. Sato, S. Inui, H. Tanaka, T. Ota, M. Kamachi, K. Tanaka, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **1987**, 25, 637–652.
- 9) S. Bizilj, D. P. Kelly, A. K. Serelis, D. H. Solomon, K. E. White, *Aust. J. Chem.* **1985**, 38, 1657–1673.

- 10) D. J. Trecker, R. S. Foote, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3527–3534.
- 11) V. A. Schreck, A. K. Serelis, D. H. Solomon, *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 375–393.
- 12) G. Gleixner, O. F. Olaj, J. W. Breitenbach, *Makromol. Chem.* **1979**, *180*, 2581–2590.
- 13) a) D. D. Tanner, P. M. Rahimi, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 225–229. b) M. Newcomb, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1151–1176.
- 14) T. G. Ribelli, S. M. W. Rahaman, K. Matyjaszewski, R. Poli, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 13879–13882.
- 15) Y. Nakamura, S. Yamago, *Macromolecules* **2015**, *48*, 6450–6456.
- 16) Y. Nakamura, R. Lee, M. L. Coote, S. Yamago, *Macromol. Rapid Commun.* **2016**, *37*, 506–513.
- 17) Y. Nakamura, T. Ogihara, S. Hatano, M. Abe, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 1299–1305.
- 18) S. Yamago, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5051–5068.
- 19) S. Yamago, K. Iida, J. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13666–13667.
- 20) J. T. Barry, D. J. Berg, D. R. Tyler, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9389–9392.
- 21) J. T. Barry, D. J. Berg, D. R. Tyler, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14399–14405.
- 22) M. Stickler, *Makromol. Chem.* **1986**, *187*, 1765–1775.
- 23) T. Koenig, H. Fischer, in *Free Radicals* (Ed.: J.K. Kochi), Wiley, New York, **1973**.
- 24) H.-H. Schuh, H. Fischer, *Helv. Chim. Acta* **1978**, *61*, 2463–2481.
- 25) Q. Liu, J.-K. Wang, A. H. Zewail, *Nature* **1996**, *364*, 427–430.
- 26) T. Bultmann, N. P. Ernsting, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19417–19424.
- 27) A. B. Oelkers, L. F. Scatena, D. R. Tyler, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 5353–5360.
- 28) M. J. Gibian, R. C. Corley, *Chem. Rev.* **1973**, *73*, 441–464.
- 29) D. Griller, in *Radical Reaction Rates in Liquids* (Ed.: H. Fischer), Springer-Verlag, Berlin, **1984**.
- 30) X. Li, T. Ogihara, M. Abe, Y. Nakamura, S. Yamago, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 9846–9850.

細胞機能の可視化を目指した細胞内核酸検出プローブの 細胞内送達技術の開発

Development of Intracellular Delivery Technology of Imaging Probe to Detect Intracellular Nucleic Acids Aiming at Visualization of Cell Functions

田畑 泰彦・村田 勇樹・城 潤一郎

Yasuhiko TABATA, Yuki MURATA, Jun-ichiro JO

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

The objective of this study is to prepare cationized gelatin nanospheres (cGNS) incorporating molecular beacon (MB) and a cationized gelatin-MB complex, and evaluate the time period of mRNA visualization. The cGNS with different degradabilities were prepared to incorporate MB. There was no difference in the apparent size and zeta potential between the cGNS incorporating MB and the complex, while the MB release from the complex was faster than that from the cGNS. When mouse mesenchymal stem cells were incubated with the complex and cGNS, the intracellular fluorescence of cGNS was observed over 14 days, whereas that of complex disappeared within 5 days. As the result, it is likely that the intracellular fluorescence was retained at a high level for longer time periods. The findings indicate that the intracellular controlled release of MB is a promising to achieve the long-term and continuous visualization of mRNA which regulates various cell functions.

1. 緒言

近年、細胞治療、細胞工学、オルガノイド研究などの細胞のもつ能力を駆使した研究分野がますます脚光を浴びている¹⁻³⁾。これらの研究分野の発展には、細胞のもつ分化能、増殖能、代謝経路、および細胞死などの生物学的機能（細胞機能）の評価が必要不可欠である。細胞機能は、細胞内の酵素、それらをコードする遺伝子、およびメッセンジャーRNA (mRNA) などの細胞内核酸分子の濃度と発現期間によって制御される。既存の生化学的な評価方法では、これらの標的分子を調べるために細胞を破壊する必要がある、一時的な細胞集団としての情報しか得られない。また、標的分子を認識する既存の蛍光プローブなどは、細胞内での作用が一過的であり、検出活性が数日程度しか維持されない場合が多い。このような状況の下、細胞機能を細胞非破壊的かつ長期にわたって可視化するイメージング技術の研究開発が強く望まれている。

モレキュラービーコン (MB) は、細胞機能を制御する mRNA などの細胞内核酸を検出するイメージングプローブである⁴⁾。MBは、両末端に蛍光分子と消光分子をもつステム-ループ構造の核酸誘導体であり、単独では消光状態を保っている。その一方で、標的mRNA存在下では、配列特異的な結合を介して構造が変化し蛍光発光することで、様々な細胞内mRNAを検出することができる。しかしながら、単独のMBは不安定であり、細胞内に導入されにくい。これまでにわれわれは、MBをカチオン化ゼラチンナノ粒子に内包することによって効率よくMBを細胞内に送達する技術を報告している。細胞内に送達されたMBは、細胞

死（アポトーシス）誘導によって増加したカスパーゼ-3の mRNA と特異的に反応し、マウス間葉系幹細胞のアポトーシスを可視化することができた⁵⁾。

一般的に、細胞機能は週のオーダーで時々刻々と変化することが知られる。そのため、細胞機能を経時的かつ従来よりも長期にわたって可視化する技術・方法論が必要となる。そこで本研究では、MBを細胞内で徐放することによってその細胞内濃度を高く保ち、MBの検出活性を長期化することを試みた。細胞内で常に一定の発現が知られる、グルセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対するMBを設計し、これを内包するカチオン化ゼラチンナノ粒子を作製した。架橋度および分解性の異なるナノ粒子を作製し、比較のために、架橋をほどさないカチオン化ゼラチン-MB複合体 (complex) を作製した。これらを細胞内に取り込ませ、MBの徐放性を評価するとともに、経時的に細胞内mRNAのイメージングを行った。

2. 実験方法

2-1. カチオン化ゼラチンナノ粒子の作製

ゼラチン（等電点9.0、重量平均分子量100,000、新田ゼラチン株式会社より供与）のカルボキシル基に対して、スベルミンを結合させることでカチオン化ゼラチンを作製した。2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法によってカチオン化ゼラチンのアミノ基を定量したところ、スベルミンの導入率は44.8 mole%であった。

次に、カチオン化ゼラチン水溶液（50 mg/ml、1.25 ml）にアセトン5 mlを滴下することでコアセルベーションを形

成させた。その後、25 wt%グルタルアルデヒド (GA) 水溶液 (20、60、および100 μ l) を添加し、異なる架橋度をもつカチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS) を得た。過剰量のグリシン水溶液により未反応のアルデヒド基をブロックし、遠心分離 (14,000 rpm、30分間、25 $^{\circ}$ C) によりナノ粒子を水洗浄した。

2-2. カチオン化ゼラチンナノ粒子の分解性評価

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にcGNS (200 μ g) を分散させ、37 $^{\circ}$ Cで静置した。所定の時間の後、遠心分離 (14,000 rpm、10分間、25 $^{\circ}$ C) によって上澄を回収し、新しいPBSにナノ粒子を再分散させた。9時間後、コラゲナーゼ (50 μ g/ml) を含むPBSを添加し、同様に37 $^{\circ}$ Cで静置、遠心分離による上澄の回収とコラゲナーゼ含有PBS溶液の添加を繰り返した。上澄中のカチオン化ゼラチンは、Micro BCATM Protein Assay Kitを用いて定量した。

2-3. MB内包カチオン化ゼラチンナノ粒子およびカチオン化ゼラチン-MB複合体の作製

cGNSおよびMBを水溶液中で混合し (20 pmole/ μ g cGNS)、15分間室温で静置した。その後、混合溶液を遠心分離 (14,000 rpm、30分間、25 $^{\circ}$ C) し、2回蒸留水に再分散させることでMB内包ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{MB}) を作製した。また、カチオン化ゼラチン-MB複合体 (complex) は、カチオン化ゼラチンとMBを2回蒸留水中で混合し (15 pmole/ μ g カチオン化ゼラチン)、15分間室温で静置することで作製した。

cGNS、cGNS_{MB}、およびcomplexの見かけのサイズとゼータ電位は、動的光散乱法および電気泳動光散乱法によってそれぞれ測定した。また、MB内包量を¹²⁵Iによって標識したMBを用いることで、放射活性より測定した。

2-4. MBの徐放性評価

¹²⁵I標識MBを用いて作製したcGNS_{MB} (GA20 μ lで架橋) およびcomplex (いずれも200 μ g) を1 mlのPBSに分散させ、分子量分画が1,000,000の透析膜を用いて、50 mlのPBSに対して37 $^{\circ}$ Cで透析した。所定の時間の後、50 mlのPBSを新しいPBSに交換し、透析を続けた。9時間後、コラゲナーゼ (50 μ g/ml) を透析膜中に添加し、さらに50 μ g/mlのコラゲナーゼを含むPBSに対して透析を行った。透析膜外に放出されたMBを放射活性によって定量した。

2-5. cGNS_{MB}およびcomplexの細胞内導入および細胞毒性の評価

マウス骨髄由来間葉系幹細胞株 (KUM6) を播種、24時間培養した後培地を無血清培地に置換し、¹²⁵I標識MBを用いて作製した異なる濃度のcGNS_{MB}およびcomplexを添加した。3時間後、細胞をトリプシン処理によって剥離し、放射活性からMBの細胞内導入量を評価した。また、細胞毒性はミトコンドリア活性によって評価した。cGNS_{MB}およびcomplex添加3時間後、2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium (WST-8) 溶

液を細胞に添加し、1時間後に450 nmの吸光度を測定した。cGNS_{MB}およびcomplexを添加していない細胞の吸光度を100%として表した。

2-6. 細胞内局在の評価

細胞をガラスボトムディッシュに播種、24時間培養した後、培地を無血清培地に置換し、cGNS_{MB} (GA20 μ lで架橋) およびcomplex (いずれも5 μ g/ml) を添加した。3時間後、細胞をPBSで洗浄し、さらに培養を続けた。cGNS_{MB}およびcomplexを添加した5および12時間後に、LysoTracker Red (80 nM) によってライソソームを染色した。その後、4% パラホルムアルデヒドによって細胞を固定し、4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 300 nM) によって核を染色し、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

2-7. 細胞内mRNAの経時的イメージングおよびMB細胞内残存性の評価

細胞をガラスボトムディッシュに播種、24時間培養した後、cGNS_{MB}およびcomplex (いずれも5 μ g/ml) を同様に添加し、3時間培養した (day 0)。さらに培養を続け、経時的に蛍光顕微鏡で観察するとともに、トリプシン処理にて細胞を剥離し、MBの放射活性からMBの細胞内残存量を測定した (day 1、2、3、5、7、9、および14)。

3. 結果と考察

3-1. cGNSの物性評価

cGNSの見かけのサイズとゼータ電位は、それぞれ152.4 $\pm$ 2.0 nmおよび8.89 $\pm$ 0.37 mVであり、ナノ粒子作製時のGA量によらず一定の値であった。図1に、異なるGA量で架橋したcGNSの分解挙動を示す。コラゲナーゼを含まないPBS中では、GA20、60、および100 μ lで架橋したcGNSから、それぞれ58、44、および38 wt%のゼラチンが溶出した。また、いずれのcGNSにおいてもコラゲナーゼの添加によってゼラチンの分解が促進され、GA量の増加とともにその分解速度は遅くなった。

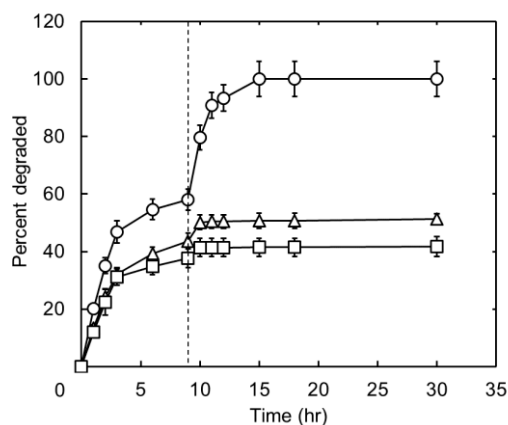


Fig. 1. Time profiles of degradation of cGNS crosslinked with 20 (○), 60 (△), and 100 μ l of GA (□). The degradation test was performed in PBS for the initial 9 hr, and thereafter in PBS containing collagenase at 37 $^{\circ}$ C.

Table 1. Physicochemical properties of complex and cGNS_{MB}.

	Amount of MB incorporated (pmole/ μ g)	Apparent size (nm)	Zeta potential (mV)
Complex	15	223.6 $\pm$ 42.3	7.55 $\pm$ 0.90
cGNS _{MB} (GA20 μ l) ^{a)}	15 $\pm$ 0.1 ^{b)}	225.9 $\pm$ 19.8	9.23 $\pm$ 1.12
cGNS _{MB} (GA60 μ l)	14 $\pm$ 1.2	223.8 $\pm$ 19.3	6.84 $\pm$ 0.89
cGNS _{MB} (GA100 μ l)	13 $\pm$ 0.4	251.5 $\pm$ 27.5	2.90 $\pm$ 1.09

a) The volume of GA added in cGNS preparation.

b) Average $\pm$ standard deviation.

3-2. cGNS_{MB}およびcomplexの物性評価

表1は、作製した complex および cGNS_{MB}のMB内包量、見かけのサイズ、およびゼータ電位である。cGNS_{MB}の見かけのサイズは、GA量によらず一定であったが、MB内包量とゼータ電位はGA量の増加とともにわずかに減少した。これは、ナノ粒子作製時のGA量の増加によって架橋度が増大し、ゼラチンハイドロゲル内部までMBが浸透しづらく、ナノ粒子表面に存在するMB分子が増加したためであると考えられる。しかしながら、complexおよびcGNS_{MB}の見かけのサイズに大きな差はなく、ゼータ電位はいずれも正の値であり、エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれやすい物性であることがわかった⁶⁾。

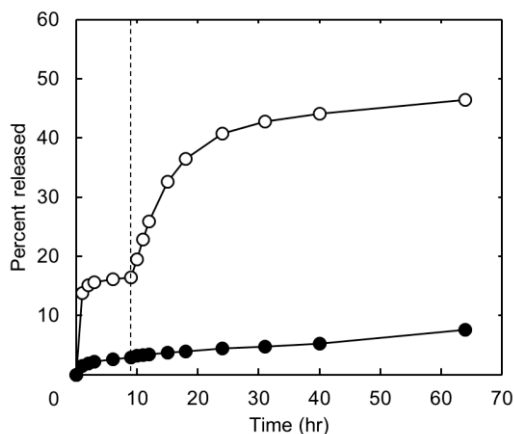


Fig. 2. MB release from complex (○) and cGNS_{MB} (●) crosslinked with 20 μ l of GA. The release test was performed in PBS for the initial 9 hr, and thereafter in PBS containing collagenase at 37 $^{\circ}$ C.

図2は、complexおよびGA20 μ lで架橋したcGNS_{MB}からのMB徐放試験の結果である。コラゲナーゼを含まないPBS中では、complexおよびcGNS_{MB}から、それぞれ16および3 wt%のMBが放出された。その後、complexはコラゲナーゼの添加とともにMBの放出が促進され、その放出はcGNS_{MB}よりも早かった。これは、架橋されていないcomplexでは、GAによって架橋されたcGNS_{MB}よりもコラゲナーゼによって分解されやすく、ゼラチンの分解に伴ってカチオン化ゼラチンと複合体化したMBが放出されたためであると考えられる。その一方で、cGNS_{MB}ではコラゲナーゼ添加によらずMBが一定の速度で放出された。これは、cGNS_{MB}がコラゲナーゼ溶液中で凝集しやすく、凝集体の表面から

MBが放出されたためであると考えられる。

3-3. cGNS_{MB}およびcomplexの細胞内導入および細胞毒性の評価

マウス間葉系幹細胞に異なる濃度のcomplexおよびcGNS_{MB}を添加したところ、細胞生存率は、cGNS_{MB}およびcomplex濃度の増加とともに低下し（図3AおよびB）、MB細胞内導入量は、cGNS_{MB}およびcomplex濃度の増加とともに増加した（図3CおよびD）。より高濃度では、complexの方がcGNS_{MB}よりも細胞内導入量は多く、有意な細胞毒性が見られた。一般的に、カチオン性物質は細胞毒性を示すことが知られている⁷⁾。cGNS_{MB}とcomplexを比較すると、架橋されていないcomplexの方が、カチオン化ゼラチン分子はよりフレキシブルであると考えられ、細胞膜と相互作用しやすい可能性がある。さらに、複合体化に関与していないカチオン化ゼラチンがより高い細胞毒性を示したことも理由の一つとして考えられる。以降の実験では、complexとcGNS_{MB}を比較するために、いずれも細胞毒性が無く、同程度の細胞内導入量である5 μ g/mlを選択した。

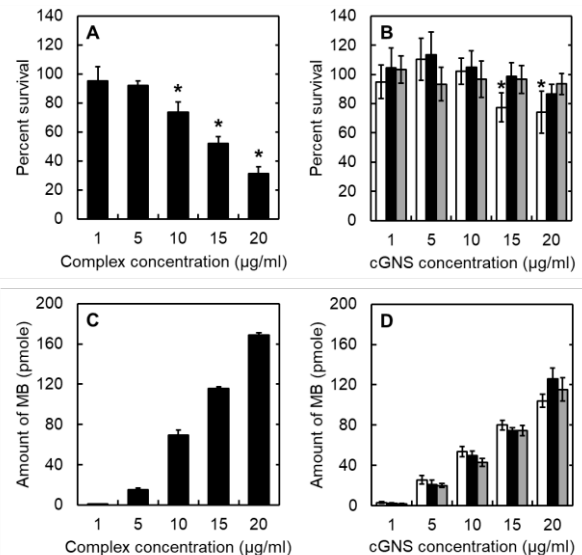


Fig. 3. Cell viability (A and B) and amount of MB internalized into the cells (C and D) incubated with different concentrations of complex (A and C) and cGNS_{MB} (B and D) crosslinked with 20 (□), 60 (■), and 100 μ l (▢) of GA. The viability of cells incubated without complex nor cGNS_{MB} was expressed as 100%. *, $p < 0.05$; significant against the percent survival of cells without complex nor cGNS_{MB}.

3-4. 細胞内局在の評価

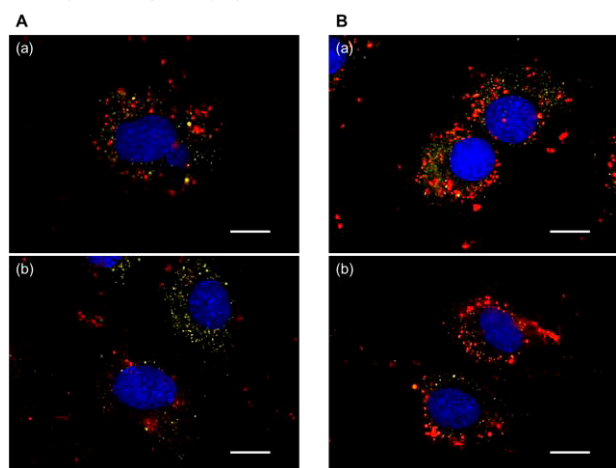


Fig. 4. Fluorescent microscopic images of cells after the incubation with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of complex (A) and cGNS_{MB} crosslinked with 20 μl of GA (B). After the incubation with complex or cGNS_{MB}, the images were taken at 5 (a) and 12 hr latter (b). Red: MB. Yellow: lysosomes. Blue: nuclei. Scale bar is 20 μm .

図4は、細胞にcomplexあるいはcGNS_{MB}を添加した5、および12時間後の蛍光顕微鏡画像である。complexおよびcGNS_{MB}は、5および12時間後のいずれにおいてもMBの蛍光はライソソームとは局在しておらず、細胞質から蛍光が

観察された。これは、complexおよびcGNS_{MB}がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、スベルミンのプロトンスポンジ効果によってエンドソームから脱出し⁸⁾、細胞質に存在するmRNAと反応したためであると考えられる。また、5時間後のcomplexおよびcGNS_{MB}の蛍光は同程度であったが、12時間後にはcomplexの蛍光は減弱していることが観察された。

3-5. 細胞内mRNAの経時的イメージングおよびMB細胞内残存性の評価

図5は、complexあるいはcGNS_{MB}を細胞に取り込ませ、経時的に細胞を蛍光顕微鏡で観察した画像である。complexの蛍光は、day 5以降においてほとんど観察されなかった。この結果は、複合体形成に基づく一般的な遺伝子導入試薬を用いて、MBを細胞内に導入した報告とよく一致した⁹⁾。これに対して、cGNS_{MB}の蛍光は14日間にわたって維持され、ナノ粒子作製時の添加GA量の増加とともに、より長期にわたって蛍光が強く観察された。

図6は、complexあるいはcGNS_{MB}を取り込んだ細胞において、MBの細胞内残存割合を経時的に測定した結果である。day 1における細胞内残存割合は、complexでは10%程度であったのに対し、cGNS_{MB}では60%程度であり、ナノ粒子作製時の添加GA量の増加とともに、MBの細胞内残存期間は延長した。これは、細胞内でcGNSの分解にともなっ

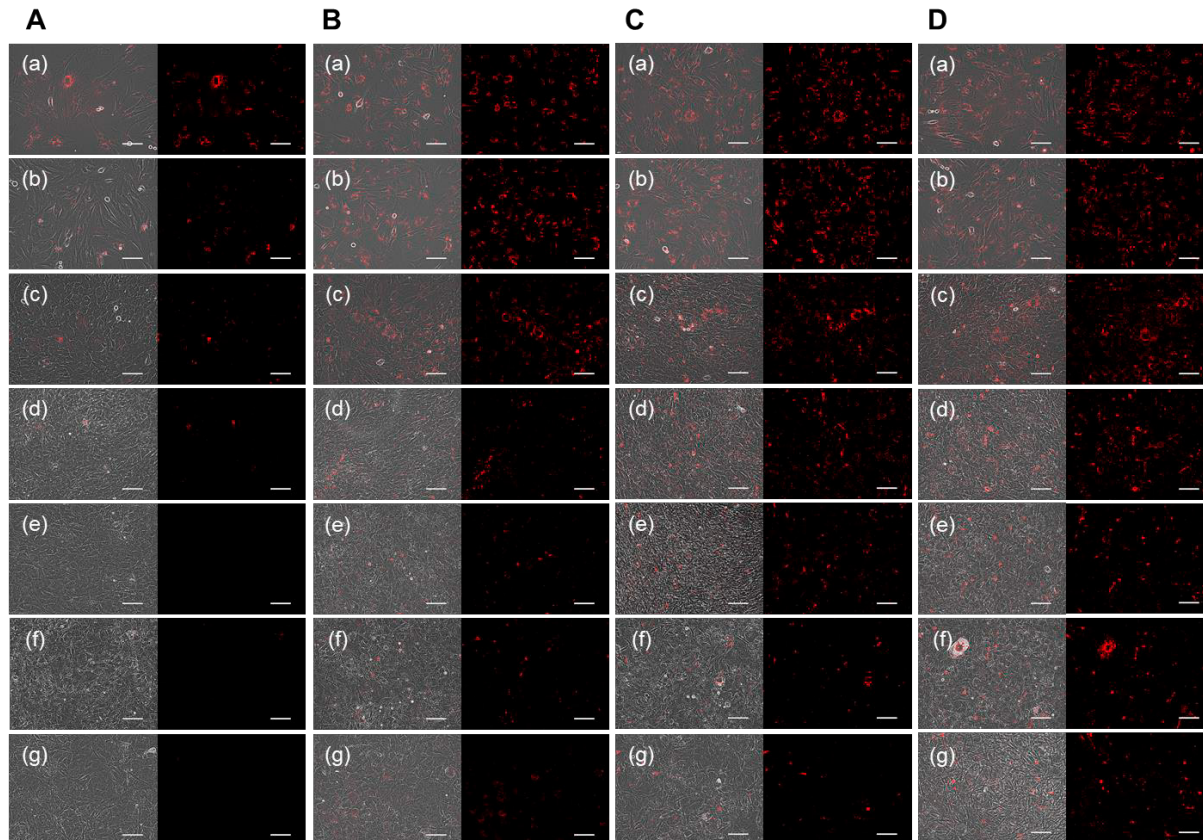


Fig. 5. Fluorescent microscopic images of cells incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of complex (A) and cGNS_{MB} crosslinked with 20 (B), 60 (C), and 100 μl (D) of GA for different time periods: 1 (a), 2 (b), 3 (c), 5 (d), 7 (e), 9 (f), and 14 days later (g). Scale bar is 100 μm .

て、MBが徐放されたためであると考えられる。細胞質へのMBの放出および細胞外へのMBの排出に関するメカニズムは未だ不明点が多い。しかしながら、これらの結果は、ナノ粒子の架橋度および分解性を制御することによって、MBの徐放性および細胞内残存性を延長することができ、MBの細胞内活性を長期化できることを示唆している。MB細胞内徐放の詳細なメカニズムを明らかにするために、complexおよびcGNS_{MB}が細胞内に導入された後の事象を今後さらに調べる必要がある。

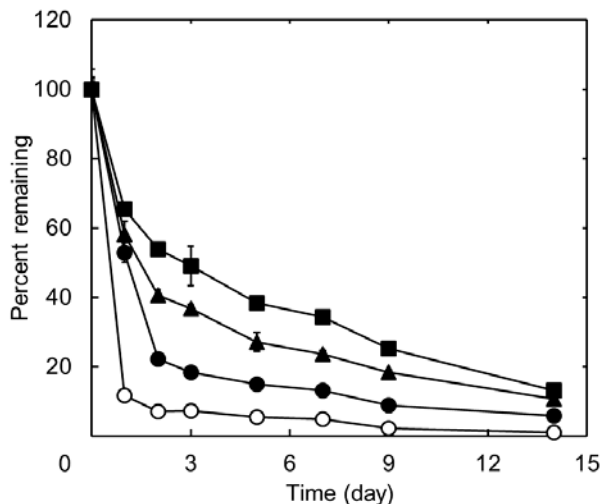


Fig. 6. Intracellular remaining of complex (○) and cGNS_{MB} crosslinked with 20 (●), 60 (▲), and 100 μl of GA (■). The amount of MB at day 0 was expressed as 100%.

4. 結論

分解性の異なるMB内包カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{MB}) およびカチオン化ゼラチン-MB複合体 (complex) を作製した。complexの蛍光は5日目以降ほとんど観察されなかったが、cGNS_{MB}では14日にわたって蛍光が維持された。さらに、ナノ粒子の架橋度および分解性を制御することで、MBの細胞内残存期間が延長され、より強く蛍光が維持された。本研究で開発したMB細胞内徐放技術を応用することで、mRNA検出を基盤とする非侵襲かつ経時的な細胞機能のイメージングが可能となるものと期待される。

参考文献

- 1) Vagnozzi, R. J. et al. *Nature*, <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1802-2> (2019).
- 2) Y. Shao, J. Sang, J. Fu, *Biomaterials*, **52**, 26-43 (2015).
- 3) M. Huch, B. K. Koo, *Development*, **142**, 3113-3125 (2015).
- 4) S. Tyagi, F.R. Kramer, *Nat Biotechnol.*, **14**, 303-308 (1996).
- 5) Y. Murata, J. Jo, Y. Tabata, *Sci Rep.*, **8**, 14839 (2018).

- 6) K.Y. Win, S.S. Feng, *Biomaterials*, **26**, 2713-2722 (2005).
- 7) E. Frohlich, *Int J Nanomedicine.*, **7**, 5577-5591 (2012).
- 8) J. Jo, K. Nagane, M. Yamamoto, Y. Tabata, *J Biomater Sci Polym Ed.*, **21**, 225-236 (2010).
- 9) H.V. Desai, I.S. Voruganti, C. Jayasuriya, Q. Chen, E.M. Darling, *Tissue Eng Part A.*, **20**, 899-907 (2014).

幹細胞からのオルガノイド形成

Self-organized formation of complex organoids from stem cells

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 explain the process of mammalian neural development and the principle of formation of neuronal organoids, and introduce our recent achievement, SCN organoid formation technology with a central clock function.

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、多能生幹細胞（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. 哺乳類神経発生過程

ほ乳類の胚盤胞において、内部細胞塊（inner cell mass）はエピブラスト（epiblast）と呼ばれる多能性を有した上皮組織へと分化する。エピブラストの後方ではWntシグナルおよびNodalシグナルの作用により原条（primitive streak）が誘導される。原条では上皮間葉転換を介して中内胚葉系の細胞が産生される。一方、エピブラストの前方ではこれらの誘導シグナルの活性が阻害因子であるDkkやLeftyの発現により抑制され、神経外胚葉を形成する。このような神経組織誘導メカニズムは哺乳類だけでみられるのではなく、アフリカツメガエルを用いた古典的な発生生物学的研究から明らかにされてきたように、脊椎動物では共通してみられる機構で「神経誘導のデフォルトモデル」として知られている（Sasai et al., 1994）。つまり初期胚の

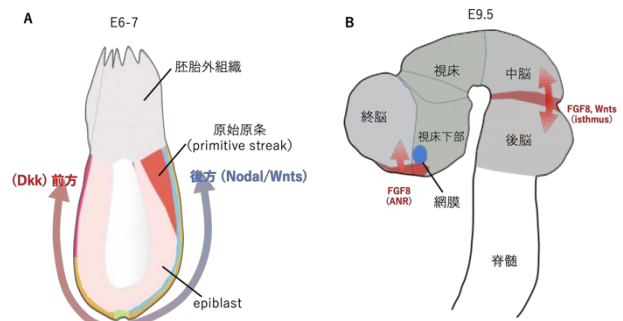


図1. A マウス初期胚の前後軸形成に関わるモルフogen. B マウス神経管の領域化

多能性上皮組織は外部からの刺激がない状態に置かれると、細胞に内在した時計に応じて自発的に神経上皮組織へと細胞状態が遷移するという考え方である。このようにして誘導された神経外胚葉は、神経管形成が起こる以前に既に胚の前後軸に沿ってパターン化されており、Dkk1などのWntシグナル抑制因子やOtx2やSix3などの転写因子が初期の前方神経上皮形成に重要な役割を果たす事が変異マウスの表現系解析や最近のゲノムワイドなエビジェネティクス解析から示唆されている (Acampora, 1995, Metzis et al., 2018)。また、胚体外組織であるvisceral endodermも神経外胚葉の前後パターンニングの形成に関与していることも知られている。その後、チューブ状の神経管が形成され、様々なパターンニング因子が働くことで前後・背腹・内外側の3つの軸が形成され、その位置情報に応じて神経の各領域が形成される。この時、神経管に位置情報を与えるオーガナイザーとして、前方神経境界領域 (anterior neural ridge: ANR) からのFGFシグナルや中脳後脳境界部 (isthmus) からのWnt・FGFの各シグナルが前後軸形成に関与し、背側正中領域 (蓋板、roof plate) からのBMPシグナルや腹側正中領域 (床板、floor plate) からのShhシグナルが背腹軸形成に関与することがニワトリのオーガナイザー移植実験やマウス遺伝学的研究により明らかになっている。このようなオーガナイザーの形成は組織自律的あるいは多組織との相互作用により誘導されると報告されているものもあるが、個体発生過程は様々な組織の相互作用を伴う複雑な状況で進行する現象であることから、神経組織自立的な機構と外部からの誘導機構とを厳密な意味では区別する事は出来ないのが現状である。パターン形成が進むとともに、後脳にはいくつかのくびれが生じ分節化される。これらの分節はrhombomereとよばれ各分節間では神経細胞の移動は制限され、後脳の機能的な分画化を達成する。同時に前脳 (終脳および間脳) においても、Luis Puellasらによってprosomereと名付けられた領域化が進行する。Prosomereはマーカー遺伝子発現パターンおよび解剖学的な観察結果を組み合わせで考案された概念である (図1B) (Puelles and Rubenstein, 2003)。

3. 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、上述した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

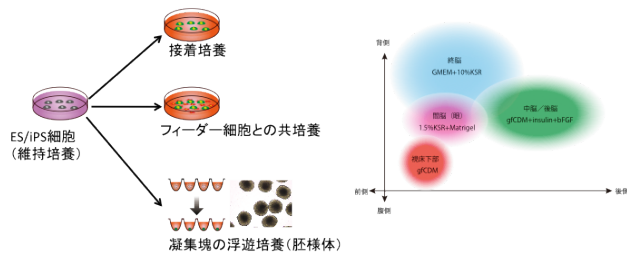


図2、ES/iPS細胞からの神経オルガノイド 形成

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

組織化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。

2. 体内時計と視交叉上核（SCN）

上記の様にこれまでに様々な神経オルガノイドの形成技術が報告されてきたが、体内時計の重要な中枢である視交叉上核（SCN）の神経オルガノイド形成技術はまだ確立されていない。

われわれは、夜になると眠くなり、朝自然に目が覚めるように、いわゆる体内時計をもっている。体内時計は睡眠覚醒リズムの他にも、血圧・体温調節、代謝活動、ホルモン分泌、免疫といったさまざまな生理的現象を制御している。また、体内時計の異常によっておこる睡眠覚醒リズムの障害は、さまざまな精神神経疾患・老化関連疾患を引き起こし、3, 4 寿命の短縮にもつながる。さらに、超高齢社会で問題となってきた“せん妄”では、昼夜逆転などの睡眠覚醒リズム障害が必発であり、転倒・骨折から寝たきりになってしまう危険性もある。一方、時間生物学的治療によりこれらが予防可能であることも示されつつある。7 このように臨床的にも重要な体内時計の本体は、時計遺伝子と呼ばれる約20種類の転写因子による遺伝子ネットワークである。体内時計は全身ほぼすべての細胞に内在されているが、視床下部の視交叉上核（Suprachiasmatic Nucleus: SCN）が時計中枢として機能し、時刻情報を全身に伝えている。SCNでは、細胞同士の神経投射による同期機構により、個々の細胞内にある時計の時刻を揃えることで、強固なリズムを全身に送り出している。しかし、体内時計はその強固さゆえに柔軟性が低く、現代の眠らない社会へ適応できなくなっている。近年、SCNの同期機構を弱めると、時差ぼけ・交代勤務型睡眠リズム障害・昼夜逆転などになりやすく、これらの病態による寿命短縮も改善することが示されてきている。SCNの同期機構は、創薬ターゲットとして有望である。

3. SCNオルガノイドの形成

脳は機能の部位特異性が高く、神経回路を形成しており、三次元構造が複雑である。従来、再生医療やヒトの病態研究の目的で脳組織を準備することは、非常に困難であった。しかし近年、ES/iPS細胞から網膜¹⁵・大脳皮質¹⁶などの試験管内脳組織を作製することが可能になってきており、脳オルガノイド技術と呼ばれている。われわれは最近、マウスES細胞から機能的な成熟三次元SCNを試験管内で誘導することに成功した。現在SCN破壊マウスへの移植実験を施行しており、試験管内脳回路で行動リズムが回復できるかを観察中である。今後、ヒトiPS細胞からヒトSCNを試験管内で大量に作製し、生細胞発光イメージングを用いた薬剤スクリーニングをおこなうことで、時差ぼけ治療薬の同定を目指すことを計画している。本治療薬は交代勤務型睡眠リズム障害・若年者の社会的ジェットラグ・高齢者の昼夜逆転などさまざまな病態にも応用可能と考えられる。徹夜・夜勤の後も一粒飲めば、体内時計と外界の時刻の時差が解消できる、夢のような治療薬の同定を試みていきたい。

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）

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu
Vol.77
(Annual Report of the Research Institute for
Chemical Fibers, Japan: Vol.77, 2020)

Published by
Nippon Kagakusen-i Kenkyusho
Kyoto, Japan

日本化学繊維研究所 第 77 回講演集
2020 年 3 月 1 日 発行
発行所 公益財団法人 日本化学繊維研究所
〒606-8305 京都市左京区吉田河原町 14
