

ISBN 0368-6280

公益財団法人
日本化学繊維研究所

講 演 集

第 8 1 集

2024 年 3 月

Nippon Kagakusen-i Kenkyusho Koenshu
Vol.81
(Annual Report of the Research Institute for
Chemical Fibers, Japan: Vol.81)
March 2024

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 81 集)

【特別講演】 耐溶剤性中空糸分離膜 WINSEP® の開発			
	ユニチカ (株) 中央研究所グループ長	小野貴博	… 5
1. ペプチドを利用したオルガネラ選択的遺伝子導入に関する研究	京都大学大学院工学研究科材料化学専攻	沼田 圭司、阿部直哉、小田原真樹	… 12
2. 含フッ素テルル化合物を用いる TERP とテルルの回収・再利用	京都大学化学研究所	山子茂、Jiang Yuhan、Mengmeng Yu、 関豊光、登阪雅敏	… 16
3. STXM 法による延伸下ポリエチレンの分子鎖配向の空間分布評価	京都大学化学研究所	竹中幹人、荒川勝利、中西洋平	… 21
4. ミトコンドリア細胞移植のためのカチオン化ハイドロゲルのデザイン	京都大学医生物学研究所	田畑泰彦、阿部哲士、Wenxuan Yang	… 26
5. 多段階自己集合による 2 次元ブロック超分子ポリマーの合成	京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	杉安和憲	… 31
6. 機械学習を用いた小角散乱データ解析	京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	古賀毅、川瀬温士	… 35
7. ポリマーブラシ付与セルロースナノクリスタルの精密合成と自己組織化	京都大学化学研究所	辻井敬亘、藤本清太郎、黄瀬雄司	… 39
8. 縮環系 π 共役分子の輻射および無輻射遷移速度	京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	大北英生、佐藤友揮	… 43
9. ヒト顎形成を再現するためのオルガノイド技術の開発	京都大学医生物学研究所	永樂 元次、瀬戸 裕介	… 47
10. ヘテロ元素含有高分子を基盤とした刺激応答性発光材料の開発	京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	田中一生、権正行、伊藤峻一郎	… 51
11. 希薄溶液中の低分子量ポリスチレンスルホン酸ナトリウムに対する光および小角 X 線散乱測定	京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	中村洋、渡部史、領木研之	… 56
12. マイクロ DIC とマイクロビーム WAXS の相補的解析からみた天然ゴムのき裂先端近傍の結晶化挙動	京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 *京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 **(株) ブリヂストン	浦山健治、Mai Thanh Tam、 安威友裕*、田中墨登*、櫻井伸一* 角田克彦**	… 60

13. 配列・立体規則性の制御されたポリマーのライブラリー合成を可能にする側鎖後修飾型モノマーの開発	大内誠、ジョ コウエン、	…	65
京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻	パン ユハン、近藤環	…	70
謝辞			

耐溶剤性中空糸分離膜 WINSEP® の開発

ユニチカ株式会社 総合研究所
小野 貴博

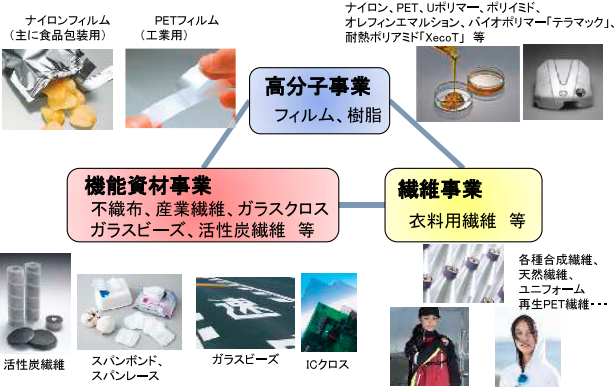
本資料の成果の一部は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の助成事業の結果得られたものです。

1. ユニチカ(株)のご紹介

創業 1889年(明治22年) (創業134年)
 資本金 100,450,000円
 売上高 117,942百万円(2022年度)
 従業員数 2,944名
事業拠点
 大阪本社 大阪府中央区久太郎町
 東京本社 東京都中央区日本橋
 総合研究所 京都府宇治市
 事業所 宇治事業所(京都府宇治市)、岡崎事業所(愛知県岡崎市)
 垂井事業所(岐阜県不破郡)、坂越事業所(兵庫県赤穂市)
海外拠点 ニューヨーク事務所 など



1. ユニチカ(株)のご紹介



1. ユニチカ(株)のご紹介

高分子事業

フィルム ナイロンフィルム(主に食品包装用)、PETフィルム(工業用)



樹脂 ナイロン、PET、Uポリマー、ポリイミド、オレフィンエマルジョン、バイオポリマー「テラマック」、耐熱ポリアミド「XecoT」



1. ユニチカ(株)のご紹介

機能資材事業1

不織布

ポリエステルスパンボンド、綿スパンレース
芯鞘複合スパンボンド「エルベス」



産業繊維

釣り糸、3Dプリンターフィラメント、工専用シート、遮水用シート



1. ユニチカ(株)のご紹介

機能資材事業2

活性炭繊維 活性炭繊維、気相フィルター、液相フィルター



ガラスクロス

ICクロス、耐火スクリーン、フィルタークロス



ガラスビーズ

道路標識反射材、ロードマーキング、衣料用反射材



1. ユニチカ(株)のご紹介

繊維事業

衣料用繊維 各種合成繊維、天然繊維、ユニフォーム再生PET繊維・・・



UNITIKA

7

1. ユニチカ(株)のご紹介

サステナビリティ

ユニチカグループの環境負荷低減活動



UNITIKA

8

1. ユニチカ(株)のご紹介

国内シェア優位事業

	製品	国内シェア	主要用途	当社の強み
高分子	ナイロンフィルム	40% (1位)	食品包装用 (世界シェア約15%)	同時二軸延伸技術、商品のバリエーション
	ポリアリレート樹脂	当社独自	自動車部品、電気・精密機器部材	耐熱性・透明性
機能資材	ガラスクロス (産業用)	20% (2位)	フィルター素材、FRP用、建築・土木資材	原織・製織技術
	ガラスビーズ	40% (1位)	各種反射材、工業用ビーズ	商品のバリエーション
	ポリエステルスパンボンド	35% (1位)	自動車内装、建築、土木資材、農業資材、衛生材料、生活資材	複合繊維化技術
	コットンスパンレース	60% (1位)	衛生材料、生活資材、医療資材	天然素材のシート化技術

シェアは当社推定

UNITIKA

9

1. ユニチカ(株)のご紹介

ユニチカ(株)総合研究所 開発品

ユニチカ 開発品の紹介 🔍 検索



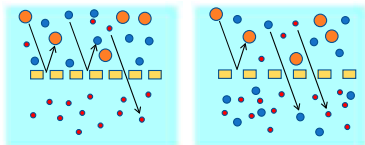
柔軟耐熱フィルム 柔軟耐熱ポリアミド イミド系エポキシ硬化剤 GNF強化ナイロン樹脂

UNITIKA

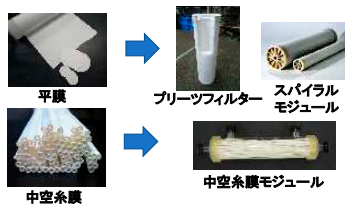
10

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-1. 分離膜とは



膜に開いた穴の孔径や、溶解度差、親和性差などを利用して物質を分ける。気体、液体中の粒子の分離、溶質の分離、気体や液体の種類による分離など様々な分離膜がある。



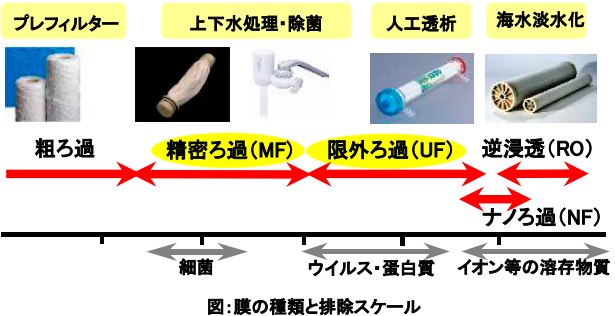
分離膜は、その形状によって平膜、中空糸膜、セラミック膜などがあり、平膜はモジュール化方法によりプリーツフィルター、スパイラル膜等に分けられる。

UNITIKA

11

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-1. 分離膜とは



図：膜の種類と排除スケール

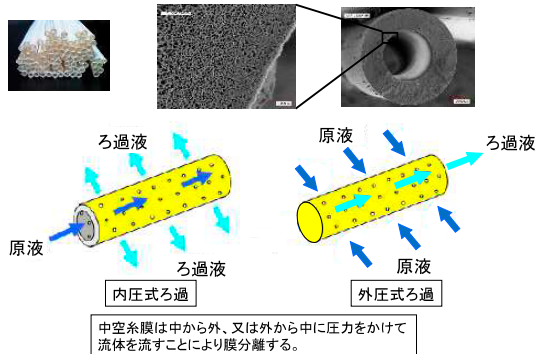
ユニチカは精密ろ過膜(MF膜)、限外ろ過膜(UF膜)を開発ターゲットとした。

UNITIKA

12

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-1. 分離膜とは



UNITIKA

13

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-2. ポリアミドの特徴

ポリアミド = 総称 ナイロン

アミド結合により縮合したポリマーで、構造によりポリアミド6、11、12、66...と多数。一般的に、この数字が小さいほどアミド基の数が多くなり、親水性が高い。また強固な水素結合を形成するために耐熱性、強度、耐薬品性に優れている。

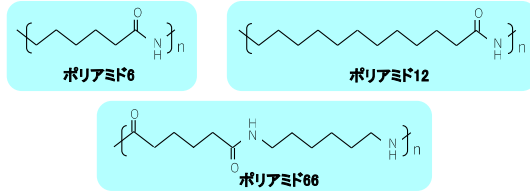


図:ポリアミドの化学構造

UNITIKA

14

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-2. ポリアミドの特徴

各種自動車材料



食品包装フィルム



釣り糸、ガット



衣料用繊維

耐熱耐油チューブ

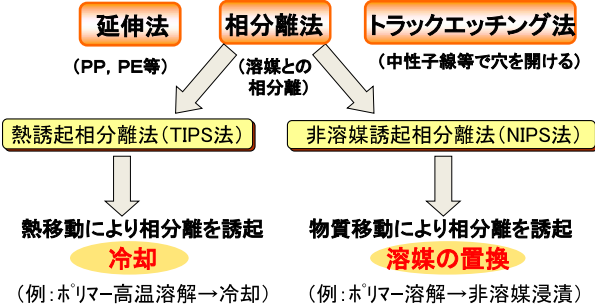


UNITIKA

15

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-3. 多孔質分離膜の製造方法



NIPS, TIPSどちらも溶媒選択が重要！！

UNITIKA

16

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-3. 多孔質分離膜の製造方法

表:製膜方法と中空糸膜の特徴

TIPS法	NIPS法	延伸法
スポンジ状の均質構造 長所 ・高強度にできる傾向 ・室温で溶けない溶媒も使用できる 短所 ・装置が複雑 ・スキン層を作りにくい MF製膜に適している	マクロポイドによる指状構造 長所 ・スキン層を形成しやすい ・高流量が得られる 短所 ・強度が出にくい ・室温で溶解する良溶媒が必要 UF作製例が多い	粗い構造 長所 ・低コスト 短所 ・粗い構造でろ過精度は低い 浄水器用PE膜が多い

UNITIKA

17

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-4. ポリアミド中空糸分離膜の開発

ポリアミド: 室温ではギ酸又は一部の含フッ素系溶媒のみにしか溶けない。

既往の報告

ギ酸を使用したNIPS法
 Liao-Ping Chengら, 1995、Tai-Horng youngら, 1999
 USP4340479, 1980 (Pall corporation)、USP4477598, 1984 (Puro pore Inc.)
 特開昭58-65009号 (アグ・エス・ヴェー)、特開昭63-41545号 (東洋濾紙) など

プロセスの安全性、コスト面で問題

本研究: TIPS法の適用

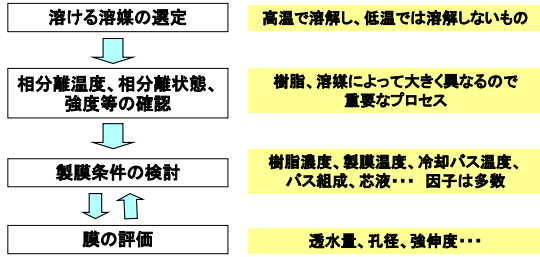
UNITIKA

18

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-4. ポリアミド中空糸分離膜の開発

TIPS法での作製条件確立の流れ



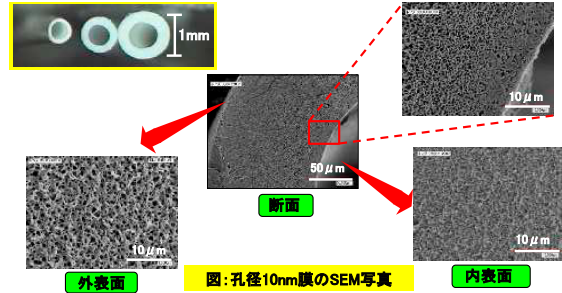
UNITIKA

19

2. 耐有機溶剤性中空糸分離膜の開発

2-4. ポリアミド中空糸分離膜の開発

製膜条件を変えることにより、様々な中空糸分離膜を作ることができた。
外径: 0.3~1.4mm 孔径: 5nm~100nm



UNITIKA

20

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-1. WINSEP® MFの特徴

- 特長1 高親水性であり、水系での使用にも湿潤処理不要 UFにも共通
- 特長2 中空糸膜なので、高流量・高寿命
- 特長3 超微細孔径 (MF膜: 5nm~100nm)
- 特長4 有機溶剤系での使用が可能 (強酸、含ハロゲン系溶剤、フェノール系溶剤を除く) UFにも共通
- 特長5 非対称膜化できる。用途に応じた構造が作製可能 UFにも共通
- 特長6 低溶出であり、半導体分野等での使用も可能 UFにも共通

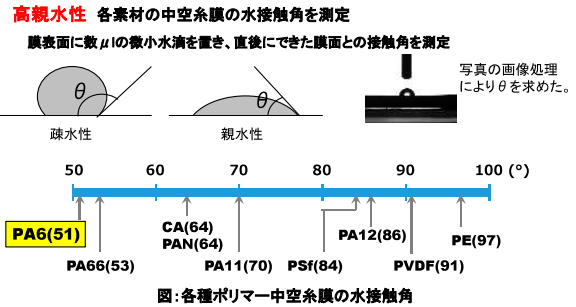
UNITIKA

21

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-1. WINSEP® MFの特徴

UFにも共通



PA8は酢酸セルロース(CA)、PANより低い接触角であり、高い親水性を有している。水系でも湿潤処理無しで乾燥状態からの通水が可能。親水性ゲル等も捕捉可能。

UNITIKA

22

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-1. WINSEP® MFの特徴

高流量・高寿命 → 中空糸膜を詰め込むため、ブリーツフィルターに比べ、単位体積当たりの濾過面積が増える。



実用化済みのカートリッジフィルター (10インチ)

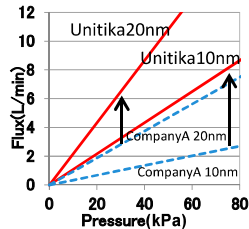


図: 孔径10nmポリアミドフィルターの流量比較 (10インチカートリッジ、純水、20°C)

微細孔径: 公称孔径 → 5nm、10nm、40nm、100nmが可能 (より微細孔径も開発中)

UNITIKA

23

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-1. WINSEP® MFの特徴

UFにも共通

耐有機溶剤性

表: 溶剤浸漬2ヶ月後の中空糸膜性能変化

溶剤	強度	伸度	重量	分子量	透水量
ヘキサン	○	○	○	○	○
トルエン	○	○	○	○	○
シクロヘキサン	○	○	○	○	○
酢酸エチル	○	○	○	○	○
PGMEA	○	○	○	○	○
THF	○	○	○	○	○
PGME	○	○	○	○	○
トリエチルアミン	○	○	○	○	○
ピリジン	○	○	○	○	○
メタノール	○	○	○	○	○
イソプロパノール	○	○	○	○	○
NMP	○	○	○	○	○

PGMEA: フロレング/コール モリチル/エーアアゼート
THF: テトヒドロフラン
PGME: フロレング/コール
メタノール: モリチル/エーアゼート
NMP: N-メチル-2-ピロリドン

変化率: ○ <10%, △ 10%~20%, × ≥20%

比較的強い有機溶剤にも耐性があり、各種有機溶剤のろ過への適用が可能 (フェノール類、含ハロゲン系、強酸は除く)

UNITIKA

24

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-1. WINSEP® MFの特徴

UFにも共通

非対称膜化 外表面、内表面等の孔サイズ等の構造を変えられる。

例:カートリッジフィルターの場合、入側の外表面の孔径を大きく、出側の内表面の孔径を小さくすることで、膜厚全体で粒子捕捉でき高寿命、高捕捉率が出る。クロスフローモジュールの場合、入側の内表面をスキン構造にすることで、粒子が内部に入り込まず詰まりにくく逆圧洗浄しやすい構造となる。

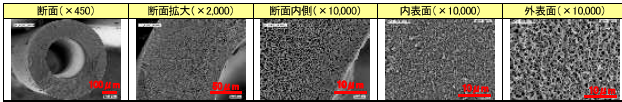


図:孔径10nmMF膜の構造

低溶出 ナイロン6は特に触媒等を使わず重合され、中空糸膜製造時も配慮しているため、メタル溶出が少ないクリーンな膜となっている。

UNITIKA

25

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-1. WINSEP® MFの特徴

UFにも共通

モジュール化の検討

耐有機溶剤性分離膜を使用するにはモジュールにも耐溶剤性が必要。ケースは金属をはじめ種々の材料が使用できるが、問題は中空糸膜束の間を埋め、モジュールケースを接着する「**ポッティング剤**」であった。種々材料を検討した結果、N-メチル-2-ピロリドン(NMP)といった非常に強い溶剤にも耐性を有するエポキシ系ポッティング剤を開発した。



UNITIKA

26

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-1. WINSEP® MFの特徴

UFにも共通

<各種試験用膜モジュール>



初期分離試験用モジュール



ミニモジュール(型番-1)



ミニモジュール(型番-2)



ミニモジュール(型番-2) 高圧タイプ



小型モジュール(型番-3)



中型モジュール(型番-4)

UNITIKA

27

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-2. WINSEP® MFを使った分離事例

微粒子(金ナノコロイド)分離試験

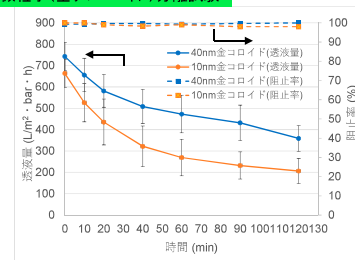


図:孔径10nm膜での金ナノコロイド膜分離試験結果

粒径10nm、40nmの金コロイド粒子をほぼ完全に阻止。



原液 透過液
10nm金ナノコロイド

UNITIKA

28

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-2. WINSEP® MFを使った分離事例

微粒子(銀ナノインク)分離試験

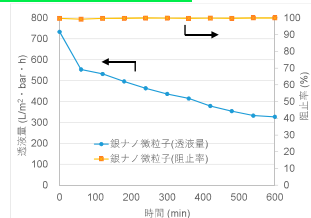


図:孔径10nm膜での銀ナノ微粒子インク膜分離試験結果

ナノ粒子製造の際の濃縮、溶媒交換、添加物除去などに使用できる可能性

蒸留、遠心分離⇄洗浄 ⇄ 膜分離法で省エネ、高効率に



原液 透過液
20nm銀ナノ微粒子

市販銀ナノ微粒子インクも完全に阻止。

UNITIKA

29

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-2. WINSEP® MFを使った分離事例

エマルジョン分離

エマルジョン分離試験1

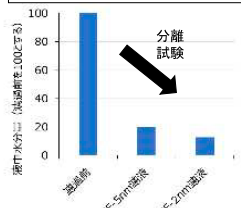
膜:WINSEP® MF-2nm(開発品)
分散媒:イソパラフィン系炭化水素(90%)
分散質:水(10%)
着色剤:Acid red(水溶性)



w/oエマルジョンの水除去が可能

エマルジョン分離試験2

膜:WINSEP® MF-2nm+5nm
分散媒:イソパラフィン系炭化水素(90%)
分散質:水(10%)
界面活性剤(HLB7):1%添加



UNITIKA

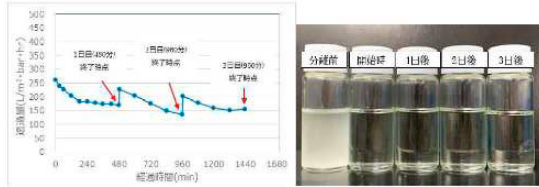
30

3. 耐溶剤性精密ろ過膜 WINSEP® MF

3-2. WINSEP® MFを使った分離事例

エマルションの分離試験③

実験
 試験液：市販炭化水素系洗浄剤に1wt%の純水を添加しエマルション化したもの。
 中空糸膜モジュール：MF 孔径10nm、有効膜面積 880mm²
 ろ過方式：内圧クロスフロー方式 圧力：0.1MPa 時間：8時間(480分)×3日間



図：経時的な流量変化

図：原液、透過液の写真
(激しく振った直後の写真)

★ 炭化水素系洗浄剤から長期間にわたり水の除去が可能！

4. 耐溶剤性限外ろ過膜 WINSEP® UF

4-1. WINSEP® UFの特徴

当社での定義

MF膜

- ・微粒子和液体の分離をする膜
- ・異物ろ過、ナノ微粒子回収など
- ・孔径で表示

UF膜

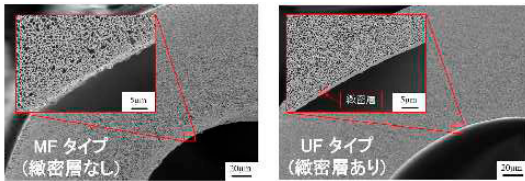
- ・溶液中に溶解している物質をその分子量の差で分離する膜
- ・ポリマー濃縮、低分子成分除去など
- ・分画分子量で表示

WINSEP® UFの分画分子量ラインナップ

分画分子量	規格
120,000 / 50,000 / 30,000	水中、当該分子量のデキストランを90%以上阻止する
3,000 / 1,000 (開発品)	トルエン中、当該分子量のポリスチレンを90%以上阻止する

4. 耐溶剤性限外ろ過膜 WINSEP® UF

4-1. WINSEP® UFの特徴



中空糸膜の断面SEM画像

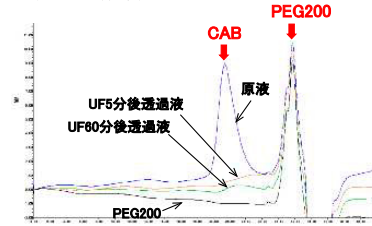
UF膜は内表面に緻密層(スキン層)を形成させ、より小さな分子も分離可能とした。

4. 耐溶剤性限外ろ過膜 WINSEP® UF

4-2. WINSEP® UFを使った分離事例

有機溶剤での分離試験(モジュール)

酢酸エチル中にポリエチレングリコール#200(PEG200)と、セルロースアセテートプレート(Mw=12000)(CAB)を0.5wt%ずつ溶解したものを、ポリアミドUF中空糸膜モジュールで分離(0.15MPa、0.5m/s)。GPCにより分析。



分子量の大きいCABのみを除去することができた。

有機溶剤系での溶解ポリマーを高分子膜で分離した初の事例
 化学工学会第78年全、Q205 (2013)

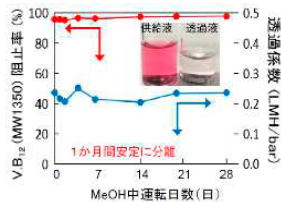
図：PEG,CAB酢酸エチル溶液の膜分離試験

4. 耐溶剤性限外ろ過膜 WINSEP® UF

4-2. WINSEP® UFを使った分離事例

ビタミンB12メタノール溶液の膜分離試験

膜：WINSEP® UF-1,000(開発品)
 溶剤：メタノール 溶質：ビタミンB12(分子量1350)



図：ビタミンB12の膜分離試験

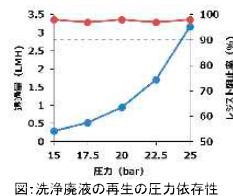
- ・分画分子量1000のナイロン8中空糸UF膜の作製に成功
- ・メタノール溶液中1か月間安定に分離できた。

4. 耐溶剤性限外ろ過膜 WINSEP® UF

4-2. WINSEP® UFを使った分離事例

レジスト洗浄液の膜分離再生

液晶ディスプレイ分野の洗浄プロセスで出るレジストを含む洗浄液から、レジストを分離し溶剤を再生する。WINSEP® UF 1,000(開発中)



図：洗浄廃液の再生の圧力依存性



図：洗浄廃液(左)と膜透過液(右)

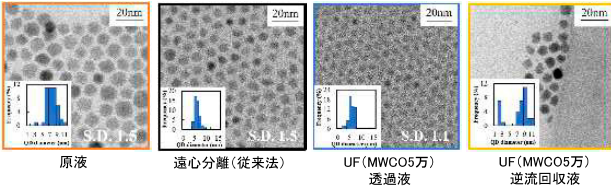
高圧運転でも95%以上の阻止率を維持した。

4. 耐溶剤性限外ろ過膜 WINSEP® UF

4-2. WINSEP® UFを使った分離事例

量子ドットの分級

粒子:PbS量子ドット 連続相:トルエン 分離圧力:0.1MPa



量子ドットは膜分離により分級できる可能性が示唆された。

Jun Tanaka et. al., Jpn. J. Appl. Phys., 62 SG1004 (2023)

UNITIKA

37

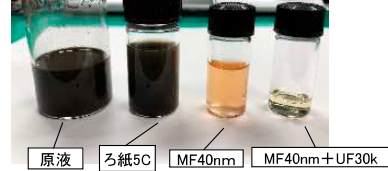
4. 耐溶剤性限外ろ過膜 WINSEP® UF

4-3. WINSEP® MF/UFを使った分離事例

インク廃液の再生

某社の製造タンク洗浄廃液の膜分離、再生実験

膜: WINSEP® MF-40nm, UF-30,000
 溶剤: シクロヘキサノン
 溶質: 色材、バインダー樹脂など



複数の膜を併用することで廃液から色材やバインダー樹脂等の除去が可能

UNITIKA

38

4. 耐溶剤性限外ろ過膜 WINSEP® UF

4-4. WINSEP® UFモジュールの溶剤耐性

溶剤: PGME:PGMEA=7:3
 膜: WINSEP® UF 分画分子量80,000
 溶質: セルロースアセテートブチレート(CAB) Mw=70,000 0.5%

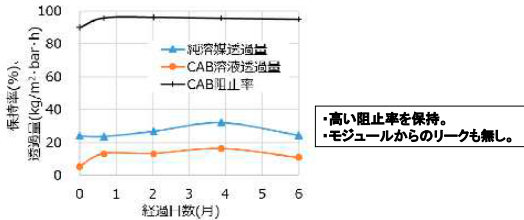


図: 6ヶ月膜分離試験結果

・高い阻止率を保持。
 ・モジュールからのリークも無し。

UNITIKA

39

4. 耐溶剤性限外ろ過膜 WINSEP® UF

4-4. WINSEP® UFモジュールの溶剤耐性

溶剤: NMP
 膜: WINSEP® UF 分画分子量1,000(開発中)
 溶質: ビタミンB12 50ppm

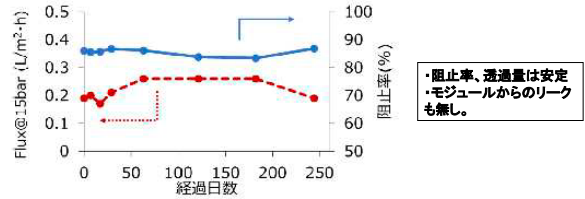


図: 8か月間膜分離試験結果

・阻止率、透過量は安定
 ・モジュールからのリークも無し。

耐有機溶剤性モジュールとして実用可能。
 その他、アセトン、トルエンについても膜モジュールの長期安定性を確認済

UNITIKA

40

5. おわりに

フォローお願いします!



ユニテカ(株)
 研究・技術開発Webサイト

<https://www.unitika.co.jp/technology/>



ユニテカ 中央研究所
 Facebookページ



WINSEP®
 YouTube動画

UNITIKA

41

ペプチドを利用したオルガネラ選択的遺伝子導入に関する研究

Studies on organelle-selective gene transfer using fusion peptides

○沼田 圭司、阿部 直哉、小田原 真樹

Keiji NUMATA, Naoya ABE, Masaki ODAHARA

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

Peptides are versatile tools in biotechnology, especially in gene/protein delivery research fields. The individual character of each amino acid can be combined, resulting in huge advantage for targeted delivery systems. Cationic components make efficient gene delivery agents due to membrane-destabilizing, DNA-condensing and proton sponge effects. A group of molecular transporters such as cell penetrating peptides (CPPs) are short peptide sequences that vary significantly in sequence, hydrophobicity, polarity, and have the remarkable capacity for membrane translocation. Meanwhile, targeted delivery to essential organelles such as the mitochondria can be achieved with mitochondrial-targeting peptides, which are typically N-terminal motifs predicted to form amphipathic helices and enriched in positively charged basic residues. The combination of cationic, cell-penetrating and organelle-targeting components reported here is an exciting new design parameter that enabled cellular uptake, localization and expression of exogenous DNA in target organelles of living plants. We also combined some peptides and carbon nanotubes for further efficient delivery system into plants. Carbon nanotube-based delivery has emerged as a promising solution to this problem and has been shown to effectively deliver DNA and RNA into intact plants. Furthermore, the flexibility of the polymer layer on the carbon nanotube will also allow for the conjugation of other peptides and cargo targeting other organelles for broad applications in plant bioengineering.

1. はじめに

植物への遺伝子送達とは植物の遺伝子形質転換における根幹をなす技術であり、次世代農業やバイオものづくりにおける基礎的な植物科学および植物バイオテクノロジーにとっても非常に重要である (Fig. 1)。核ゲノムは植物形質転換の主な標的だが、葉緑体やミトコンドリアに見られる細胞小器官ゲノム (オルガネラゲノム) は、有用な農業形質の導入や細胞小器官間のコミュニケーションの研究にとって必須である。遺伝子送達を介した形質転換に最も一般的に使用される方法は、アグロバクテリウム媒介形質転換、パーティクルボンバートメント法、およびポリエチレングリコール (PEG) 法と呼ばれるプロトプラストを利用した技

術が挙げられる。これら既存の方法は植物への遺伝子送達に使用されている一方で、多くの種は依然として安定した遺伝子形質転換に課題を抱えています。特に、葉緑体の形質転換は、重要な穀物を含む単子葉植物ではまだ達成されておらず、安定したミトコンドリア形質転換体はどの植物種でも得られていない。

2. ペプチドを利用したナノキャリア

ペプチドは、さまざまな機能を示すことから、効率的な生理活性物質を送達する上で重要な役割を担うことが可能である。これらの機能には、ヌクレアーゼによる分解からDNAを保護することや、エンドサイトーシス機構を活性化することでDNAの細胞への侵入を促進する機能、細胞小

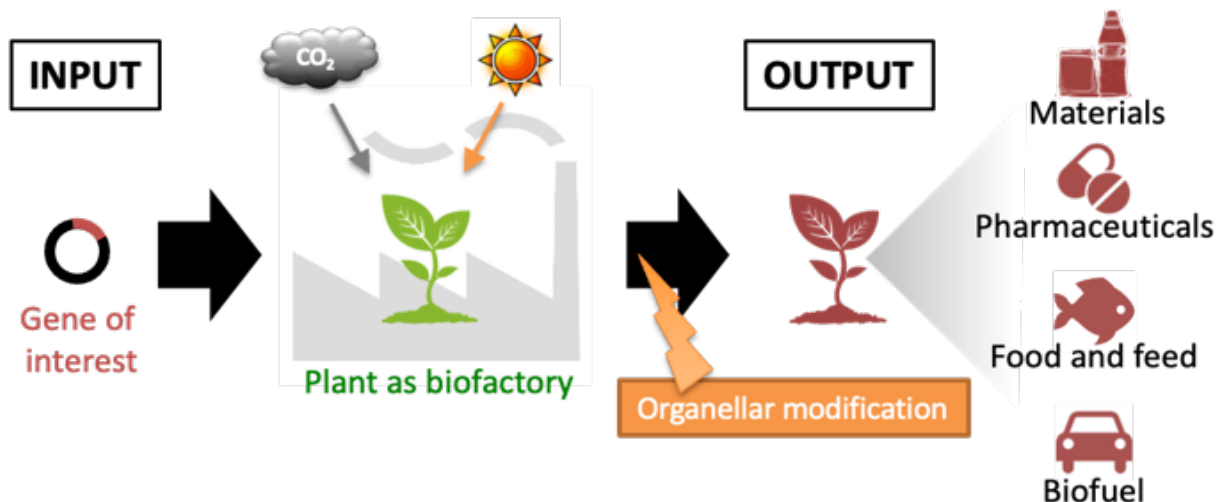


Fig. 1 Schematic illustration of bioproduction via photosynthetic pathway.

器官移行機構による認識を通じて特定の細胞小器官を標的にする点、pHなどの変化や酵素分解などの特定の刺激に応答してDNAを放出する機能などが含まれる。我々は、これらの多様な機能に注目し、DNA結合カチオン性ペプチドと細胞透過ペプチド (CPP) または細胞小器官標的ペプチドを組み合わせることにより、遺伝子キャリアペプチドを設計してきた。これらの設計されたペプチドは、静電相互作用を通じて DNA とコアシェルペイト様の複合体を形成し、核、葉緑体を含む色素体、そしてミトコンドリアなどの特定の細胞小器官への DNA の標的送達を可能にしてきた。

ペプチド/DNA複合体の平均サイズは細胞壁が示すメッシュサイズ (サイズ排除限界) を超える場合が多いが、複合体は依然として植物細胞に侵入する。これは、細胞壁の構造的脆弱性を介してそれらが拡散する可能性があること、またはより小さいサイズの複合体のみが DNA 送達に関与している可能性があることを示唆している。この複合体は、エネルギー依存性のエンドサイトーシス経路を通じて植物細胞に取り込まれ、CPP の存在によりその取り込み効率が向上する。サイトゾルに入ると、複合体は細胞小器官を標的とするペプチドの認識特性と細胞小器官輸入機構を利用して、標的細胞小器官の外表面と相互作用する。複合体からのDNA放出には、内因性酵素によるペプチドの分解や、細胞小器官内に存在する荷電分子によるペプチドとDNA間の静電相互作用の破壊が関与している可能性がある。

ペプチドからなるナノキャリアは、カーゴ DNA に設計された相同領域を利用し、相同組換えによる葉緑体およびミトコンドリアのゲノムへ、遺伝子の挿入を容易にする (Fig. 2)。しかし、ペプチドナノキャリアは、さらなるDNA送達効率を大幅に改善する必要がある。主要な送達ステップには、細胞壁透過、細胞取り込み、サイトゾルへの移行、および目的の位置での DNA の制御放出などが含まれる。我々は、細胞壁弛緩ペプチド、マクロピノサイトーシス誘導ペプチド、エンドソーム破壊ペプチド、刺激応答性分解性ペプチドなどの特殊なペプチドを送達システムに組み込み、DNA 送達の効率を高めてきた。また、カーボンナノチューブ (CNT) とDNA結合ペプチドおよびミトコンドリア標的ペプチドを組み合わせ合わせたハイブリッドを報告している。これらの CNT ハイブリッドは、細胞壁と細胞膜を通過する際に優れた能力を示し、ミトコンドリアを標的とするペプチドを単独で使用する場合と比較して、植物ミトコンドリアへの DNA 送達効率の大幅な向上に繋がることを報告している。

ミトコンドリアは、葉緑体と同様に、内部マトリックスを膜間腔から分離する二重脂質二重層で囲まれている。これらには、核にコードされたタンパク質をインポートするための外膜 (TOM) と内膜 (TIM) のトランスロコンが存在する。TOM による認識を利用することにより、ミトコンドリアターゲティングシグナル (MTS) はカーゴタンパク質のミトコンドリアへの輸入を正確に達しする。MTS は、植物におけるミトコンドリアを標的とした DNA 送達の

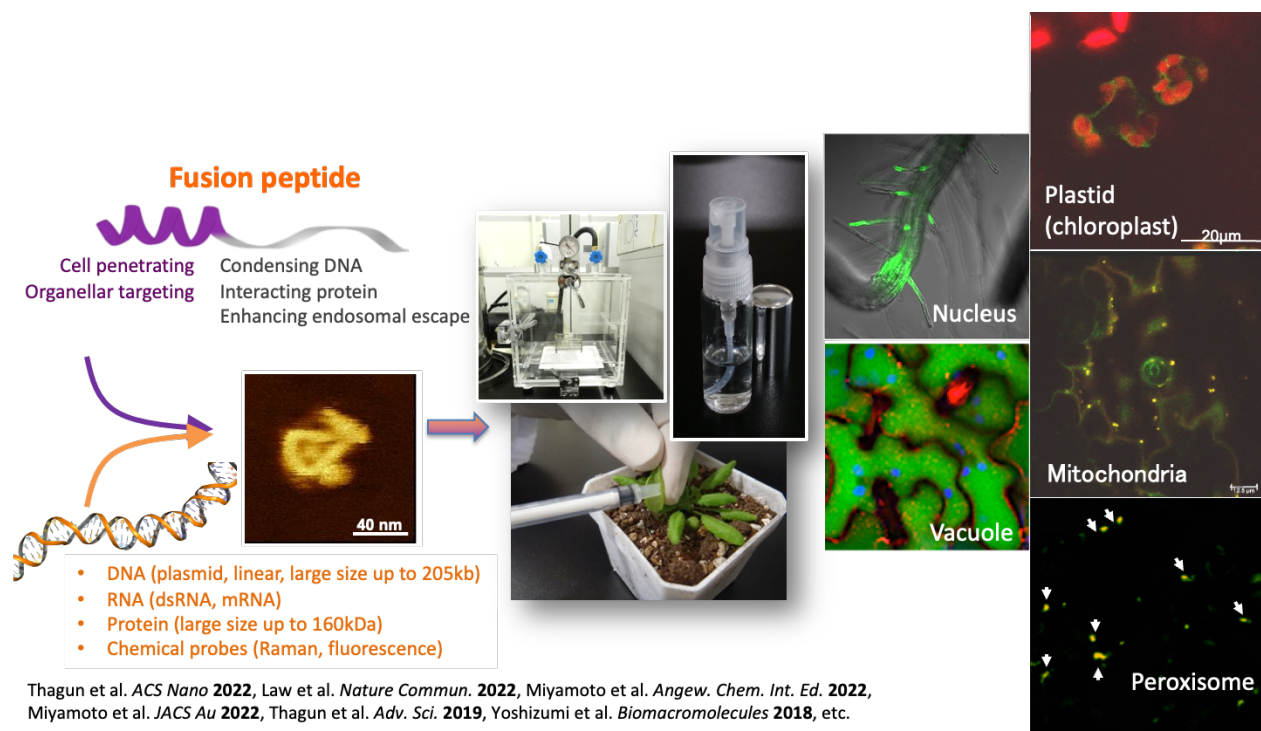


Fig. 2 Schematic illustration of the peptide-mediated gene delivery system.

ために組み込まれた例が報告されている。しかし、TOM/TIM の細孔サイズを超える大きな積荷が植物のミトコンドリアに入るメカニズムは興味深く、ミトコンドリアを標的とした積荷輸送の能力を拡大するためにも今後研究する必要があるトピックである。

3. カーボンナノチューブとの複合化

カーボンナノマテリアルは、薬物送達を含む幅広い用途に最適な独自の特性と特性を備えたナノスケール材料である。カーボンナノマテリアルには、ナノチューブ、グラフェン、フラーレンが含まれ、さまざまな幾何学的配置に配置された炭素原子で構成される。特に、カーボンナノチューブ (CNT) は、驚異的な送達効率と細胞小器官特異性を備え、植物への遺伝子送達の非常に効率的な方法として幅広く利用されている。CNT、特に単層のCNT (SWNT) は、グラフェンのシートを丸めて構成された細長い円筒形の分子であり、表面積対体積比が高く、一般に直径が 2 nm 未満、長さが最大数マイクロメートルである。さらに、それらの化学的および機械的安定性、生体適合性、および調整可能な表面機能化により、細胞内での標的送達に非常に柔軟になる。

我々は、ポリマーコートした CNT を使用すると、植物内の特定の細胞小器官に DNA と RNA を選択的に送達できることを最近報告した。上述のように、ミトコンドリアに移行するシグナルペプチドを利用することで、ミトコンドリアへのDNA導入を達成した。ミトコンドリア移行配列とDNA結合配列で官能化されたカーボンナノチューブを

使用すると、ペプチドのみのアプローチと比較して送達効率がほぼ30倍向上する可能性があることを示した (Fig. 3)。CNT には、シロイヌナズナミトコンドリアに送達するための DNA を複合化させた。このカーゴとなるDNAにはミトコンドリアゲノムと相同の配列を持たせることによりゲノムに挿入することも試みた。より高い送達効率は、遺伝子組込みおよびGFPレポーター構築物の発現におけるより高い安定性に変換され、浸潤の7日後に検出することができた。さらに、葉酸還元酵素遺伝子の組み込みにより、根の成長が促進される細胞内葉酸レベルの増加も実証されており、このシステムのさらなる生物学応用の可能性が強調された。

4. 最後に

植物における細胞小器官特異的形質転換に関して、残された最大の課題は、選択性の欠如と送達の難しさである。これは、形質転換体を取得するための選択システムの欠如と、ホモプラスミーのミトコンドリアまたは葉緑体の形質転換体を取得するのが難しいことによってさらに技術的な困難を伴う。しかし、新しい世代のナノマテリアルでは標的細胞小器官への送達効率と選択性が大幅に向上しており、これらの諸問題は徐々に解決する手段が広がっている。細胞透過性ペプチドに加えて、ミトコンドリアなどのオルガネラに移行するシグナルペプチドを組み合わせることで、効率的かつ選択的なデリバリーシステムが構築されれば、近い将来、CNTやペプチドのようなナノマテリアルを介した遺伝子送達がトランスジェニック植物を生産する商業的に実行可能な方法に導入される可能性がある。

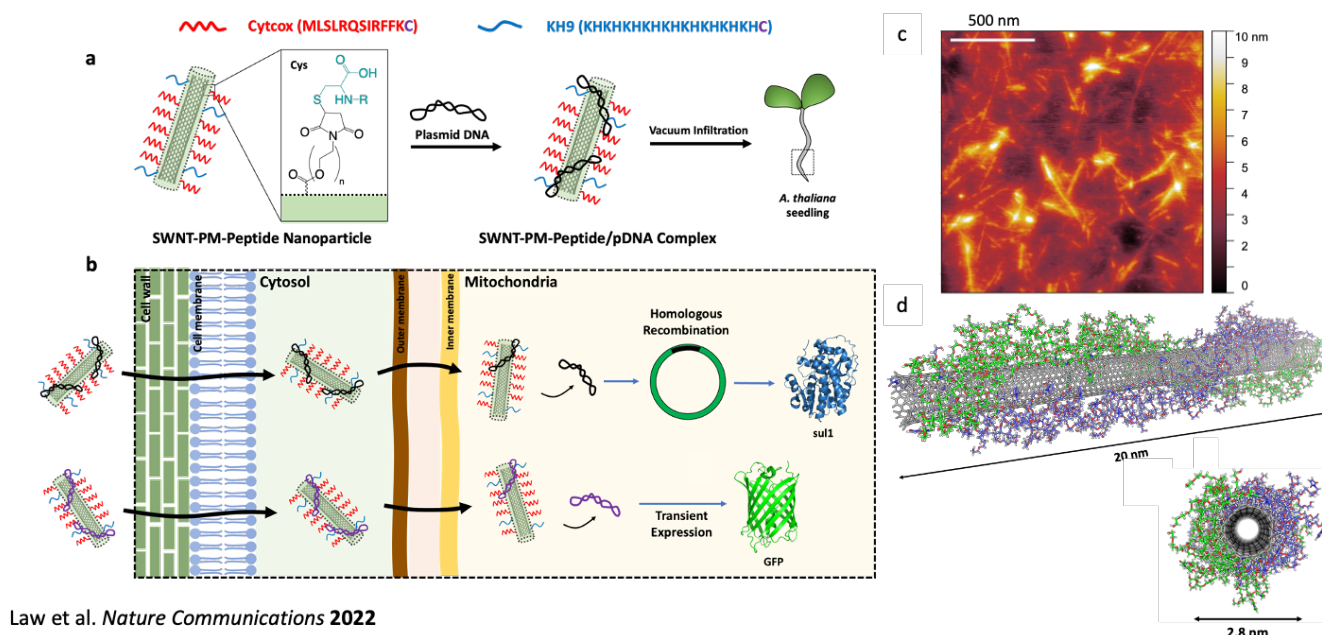


Fig. 3 Single wall carbon nanotube (SWNT)-mediated gene delivery system. SWNT was coated with the polymers containing maleimide (SWNT-PM) and then chemically modified with functional peptides.

また、これらの遺伝子導入手法は、ヒトなどの哺乳類細胞にも適応可能であり、農業や環境バイオから再生医療などまで幅広い分野への波及効果が期待される。

謝辞

本研究は、革新的研究開発推進プログラム (ImPACT) 「超高機能構造タンパク質による素材産業革命 (プログラム・マネージャー: 鈴木隆領、研究課題責任者: 沼田圭司)」、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業ERATO 「沼田オルガネラ反応クラスタープロジェクト (研究総括: 沼田圭司)」、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業学術変革領域研究 (B) 「高分子材料と高分子鎖の精密分解科学 (領域代表者: 沼田圭司)」、文部科学省データ創出・活用型マテリアル研究開発プロジェクトFSおよび本格型拠点 (研究代表者: 沼田圭司)、JST COI-NEXT共創の場 ゼロカーボンバイオ産業創出による資源循環共創拠点 (プロジェクトリーダー: 沼田圭司)、京都大学創立125周年記念ファンド【くすのき・125】による支援を受けて行われました。この場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

- 1) K. Numata. Biopolymer science for proteins and peptides. 1st Edition. Elsevier, 2021. ISBN: 9780128205556
- 2) V. Orbović, K. Numata. *Front. Plant Sci.* 14:1282105. doi: 10.3389/fpls.2023.1282105 (2023).
- 3) T. Miyamoto, K. Numata. *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **96**, 9, 1026-1044 (2023).
- 4) S.S.Y. Law, T. Miyamoto, K. Numata. *Chem. Commun.*, **59**(47), 7166-7181 (2023).
- 5) R. Naka, K. Tsuchiya, K. Numata. *ChemBioChem*, e202200803 (2023).
- 6) P. Srisawat, M. Higuchi-Takeuchi, K. Numata. *Polym. J.*, **54**, 1139-1151 (2022).
- 7) A.D. Malay, H. Craig, J. Chen, N.A. Oktaviani, K. Numata. *Biomacromolecules*. **23**, 5, 1827-1840 (2022).
- 8) N. Yoshinaga, T. Miyamoto, M. Odahara, S. Nara, K. Toyooka, N. Takeda, H. Nishimura, F. Ling, M. Su'etsugu, M. Yoshida, K. Numata. *Advanced Functional Materials*, 2306070 (2023).
- 9) C. Thagun, T. Suzuki, Y. Kodama, K. Numata. *Advanced Biology*, 2300011 (2023).
- 10) N. Abe, S. Fujita, T. Miyamoto, K. Tsuchiya, K. Numata. *Biomacromolecules*. **24** (8), 3657-3665 (2023).
- 11) K. Tsuchiya, J. Gimenez-Dejoz, K. Numata. *Polym. J.*, **55**, 1109-1114 (2023).
- 12) H. Inaba, K. Oikawa, K. Ishikawa, Y. Kodama, K. Matsuura, K. Numata. *Plos One*, **18** (6), e0286421 (2023).
- 13) M. Odahara, A. M. Tanziman, R. Nakagawa, Y. Horii, S. Ishio, S. Ogita, K. Numata. *Plant Biotechnology*, 23.0501a (2023).
- 14) K. Ishikawa, X. Xie, Y. Osaki, A. Miyawaki, K. Numata, Y. Kodama. *Science Advances*. **9** (23), eadh4787 (2023).
- 15) S.S.Y. Law, M. Asanuma, J. Shou, Y. Ozeki, Y. Kodama, K. Numata. *JACS Au*, **3**, 6, 1604-1614 (2023).
- 16) K. Ishikawa, M. Kobayashi, M. Kusano, K. Numata, Y. Kodama. *Plant Cell Reports*. **42**, 599-607 (2023).
- 17) K. Numata. *Polym. J.*, **52**, 1043 (2020).
- 18) K. Midorikawa, A. Tateishi, K. Toyooka, M. Sato, T. Imai, Y. Kodama, K. Numata. *PNAS Nexus*, pgac225, (2022).
- 19) M. Odahara, Y. Horii, J. Itami, K. Watanabe, K. Numata. *Frontiers in Plant Science*. 13:989310. doi: 10.3389/fpls.2022.989310 (2022).
- 20) S. Ichikawa, S. Kato, Y. Fujii, K. Ishikawa, K. Numata, Y. Kodama. *ACS Synthetic Biology*. **1**, 10, 3190-3197, (2022).
- 21) T. Miyamoto, K. Tsuchiya, K. Toyooka, Y. Goto, A. Tateishi, K. Numata. *Angewandte Chemie International Edition*, **61**, e202204234 (2022).
- 22) S.S.Y. Law, G. Liou, Y. Nagai, J. Gimenez-Dejoz, A. Tateishi, K. Tsuchiya, Y. Kodama, T. Fujigaya, K. Numata. *Nature Communications*, **13**, 2417 (2022).
- 23) C. Thagun, Y. Horii, M. Mori, S. Fujita, M. Ohtani, K. Tsuchiya, Y. Kodama, M. Odahara, K. Numata. *ACS Nano*, **16**, 3, 3506-3521 (2022).
- 24) T. Miyamoto, K. Toyooka, J. Chuah, M. Odahara, M. Higuchi-Takeuchi, Y. Goto, Y. Motoda, T. Kigawa, Y. Kodama, K. Numata. *JACS Au*, **2**, 1, 223-233 (2022).

ラジカル重合によるデンドリマー状多分岐高分子形成過程の 確率論的シミュレーション

Stochastic Simulation of Controlled Radical Polymerization of Dendritic Hyperbranched Polymers

山子 茂・竹内 雛子・木船 雅人・全 天翔・朱 南屹・登阪 雅聡
Shigeru YAMAGO, Hinako TAKEUCHI, Masato KIBUNE, Tianxiang TONG, Nanyi ZHU,
Masatoshi TOSAKA
Institute for Chemical Research, Kyoto University

The formation process of hyperbranched polymers (HBPs) based on the reversible deactivation radical polymerization (RDRP) using a branch-inducing monomer, evolmer, was investigated by stochastic simulation. Our original simulation program successfully reproduced the change of dispersities (D s) during the polymerization process. Based on the simulation, we found that the observed D s ($=1.5\text{--}2$) are due to the distribution of the number of branches instead of undesired side reactions. We further found that the branch structures are well controlled, so the majority of HBPs have structures close to the ideal one. The simulation also suggested that, if we pay attention to individual molecules, the branch density slightly changes depending on molecular weight. This trend was experimentally confirmed by synthesizing HBPs with an evolmer having a phenyl group and analyzing the signal intensity from multiple detectors in size exclusion chromatography.

1. 緒言

高度に分岐したポリマーは、直鎖ポリマーに比べて流体力学半径が小さい、固有粘度が低い、等の特異な物性と、複数の鎖末端を機能化できるという特徴を併せ持つ¹⁻⁴。このような高分岐ポリマーを新素材として利用拡大するには、分子量や分岐構造などの制御と効率的な生産が重要である。しかし、従来の合成方法ではこれらの要件を同時に満たすことが非常に困難であった。

構造の制御された高分岐ポリマーは、多官能モノマーの結合反応と精製を多段階繰り返すことにより作られてきたが、このような方法で大量の試料を得ることは困難である。一方、高度に分岐したポリマーの中でもハイパーブランチポリマー (HBP) と呼ばれるものは、分岐誘起モノマーを用いた一段階合成により得られてきた。しかしこの方法では構造の制御性が低いため、分散度 D が非常に大きかった (多くの場合は $D > 4$)。

こうした問題を考慮して我々は可逆的失活ラジカル重合 (RDRP) により、分岐構造の制御されたHBPを一段階で合成する新しい手法を開発した (Fig. 1)⁵⁻⁹。直鎖ポリマーのRDRPでは、開始剤あるいは連鎖移動剤 (CTA) とモノマーのモル比により分子量の制御が可能であり、均等にポリマーが成長するため分散度が小さい ($D \sim 1.0$)。我々の手法はRDRPの中でも、CTAとして有機テルル化合物を使用した技術 (TERP)^{10,11}に基づいており、TERPの合成系中に分岐誘起モノマーとしてビニルテルリド 2 を添加する。 2 の役割は、分岐誘起モノマーの中でもイニマーと呼ばれるもの (重合開始基を持つビニルモノマー) と似ている。

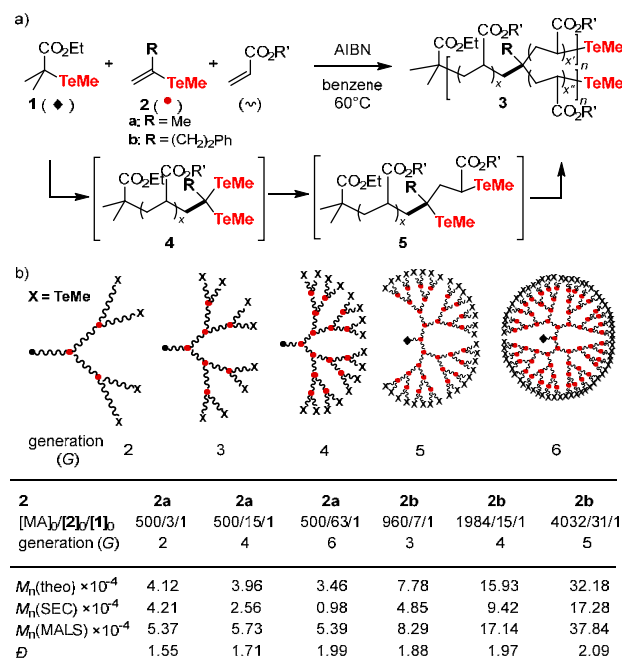


Fig. 1. One-step synthesis of structurally controlled HBPs by TERP using evolmer **2**. a) Reaction scheme and b) schematic structure of the obtained HBPs and summary of polymerization results, in which the ones using **2a** and **2b** have been reported in our works (Refs. ⁵ and ¹²), respectively). MA denotes methyl acrylate.

RDRPの系中にイニマーを添加した場合、開始剤やCTA以外にイニマーからもポリマーが成長するのでポリマー数が増加し、分子量が制御できなくなる。また、成長して

分子量の増大したイニマーが他のポリマーに付加するとポリマーの成長も不均等になり、結果として分散度も大きくなる。それに対し、**2**が持つテルル基は、二重結合部分が反応しポリマーの一部となることで、初めて重合開始基として作用する。この場合はポリマー数が増えないので、分子量の制御性を維持できる。また、ポリマーに付加するのはモノマーと**2**だけなので、ポリマーの成長が均等となり分散度を小さく保てる。このように、**2**は最初モノマーとして振る舞うが、重合後はC-Te結合が重合開始基に「進化 (evolution)」する。この特徴を鑑み、我々はこのモノマー**2**をエボルマー (evolmer) と呼ぶことにする。

本手法における最大の利点は、CTA**1**とエボルマー**2**の比率により、樹枝状構造の世代 (G) を制御できることである。実際に、 $[2]_0/[1]_0$ 比の増加につれて、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) で決定した数平均分子量 ($M_{n(SEC)}$) は小さくなる一方、多角度レーザー光散乱 (MALS) で決定した絶対分子量 ($M_{n(MALS)}$) は、理論値 ($M_{n(theo)}$) に近い値となった (Fig. 1b の表を参照)⁹。この結果は、分岐が増加するとポリマーの流体力学的体積が減少することと整合している。

このような利点がある一方で、我々の手法で得られたHBPのDは、多くの場合1.5~2であった。この値は従来の単段階ラジカル重合で得られるHBPと比べれば大幅に改善されている。しかしながら、RDRPで合成される直鎖ポリマーと比べれば大きい値であり、その原因がどこにあるのか (例えば停止反応などの副反応に依るのか) という点が疑問であった。

この疑問を解消するため、我々のTERPに基づいた手法によるHBPの形成プロセスについて、確率論的コンピュータシミュレーションを行った¹²。その結果、Dの増加は停止反応によるものではなく、分岐数の分布から生じることが明らかとなった。さらにこのシミュレーションから、HBP の分岐構造が適切に制御されていることが示された。

2. シミュレーションの方法

確率的シミュレーションのプログラムは、TERPに基づくHBP合成の素反応 (Fig. 2) を考慮して作成した。TERPは交換連鎖機構で進行する。従って、ここで取り扱うHBP合成の素反応は、ポリマー末端ラジカルPからモノマーMへの成長反応、PからエボルマーEへの分岐反応、および、Pと休止種PX (ポリマー鎖末端または CTA) 間の連鎖移動反応であり、それぞれの速度定数を k_p 、 k_b 、および k_{ex} とした。また望まない副反応として、二つのラジカルPとP'の間で起こる停止反応も、速度定数 k_t を仮定して、シミュレーションで考慮した。

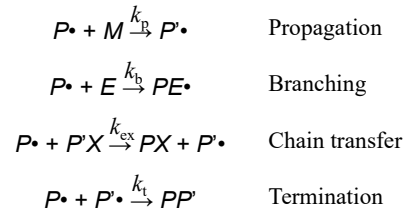


Fig. 2. Elementary reactions in the current HBP synthetic method

これら四種類の素反応のうち、どれがポリマー末端ラジカルに起こるのかは、各々の反応速度の大きさに基づいて確率的に決定される。ここで、素反応の速度はFig. 3のように定式化される。

$$\begin{aligned} v_p &= k_p [P\cdot][M] \quad \left(= -\frac{d[M]}{dt} \right) \\ v_b &= k_b [P\cdot][E] \quad \left(= -\frac{d[E]}{dt} \right) \\ v_{ex} &= k_{ex} [P\cdot][PX] \\ v_t &= k_t [P\cdot]^2 \quad \left(= -\frac{1}{2} \frac{d[P\cdot]}{dt} \right) \end{aligned}$$

Fig. 3. Rates of elementary reactions in the current HBP synthetic method; v_p , v_b , v_{ex} , v_t are reaction rate of propagation, branching, chain transfer and termination, respectively, and t is time.

これらの素反応の競争の結果として、その内の一つが選択される。他の反応が起こらない場合、各素反応が選択される確率は、Fig. 4の式として表される。ここで、 $P_p + P_b + P_{ex} + P_t = 1$ である。

$$\begin{aligned} P_p &= \frac{v_p}{v_p + v_b + v_{ex} + v_t} = \frac{k_p [M]}{k_p [M] + k_b [E] + k_{ex} [PX] + k_t [P\cdot]} \\ P_b &= \frac{v_b}{v_p + v_b + v_{ex} + v_t} = \frac{k_b [E]}{k_p [M] + k_b [E] + k_{ex} [PX] + k_t [P\cdot]} \\ P_{ex} &= \frac{v_{ex}}{v_p + v_b + v_{ex} + v_t} = \frac{k_{ex} [PX]}{k_p [M] + k_b [E] + k_{ex} [PX] + k_t [P\cdot]} \\ P_t &= \frac{v_t}{v_p + v_b + v_{ex} + v_t} = \frac{k_t [P\cdot]}{k_p [M] + k_b [E] + k_{ex} [PX] + k_t [P\cdot]} \end{aligned}$$

Fig. 4. Probability of selection of elementary reactions in the current HBP synthetic method. P_p , P_b , P_{ex} , and P_t are the probability of taking propagation, branching, chain transfer and termination, respectively.

これらの式に基づき、系中に残る化学種の量の変化を考慮して、10,000分子のCTAから始まるHBPの形成過程をシミュレーションした。形成された10,000個の分子についてDを計算した。

3. 結果と考察

3-1. 分散度D

まず、シミュレーションの妥当性をDの再現性によって

検討した。モノマーとしてアクリル酸メチル (MA) を想定し、速度定数には60 °Cで重合した場合の文献値¹⁰⁾として $k_p = 2.40 \times 10^4 \text{ mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_{ex} = 4.60 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$ を用いた。MAおよび**2a**から生成するPについて、それぞれの k_p と k_{ex} は異なる可能性があるが、簡略化のため、ここでは等しいと仮定した。 k_b の値については、以前の報告⁵⁾における共重合反応の速度から、 $4.23 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}\text{s}^{-1}$ と求めた。簡略化のため、停止反応の影響は除外した ($k_t = 0$)。Fig. 5aは、 $[M]_0/[E]_0/[PX]_0 = 500/Y/1$ ($Y = 0, 3, 7, 15, 31$, および63) とした場合のシミュレーション結果を示しており、既報⁵⁾の実験結果に対応する。いずれの場合も D はモノマー転化率と共に急激に減少し、その後プラトーに達した。例えば、 $Y = 63$ のシミュレーション結果では、モノマー転化率が10%になる前に D が一定となり、その後のシミュレーション結果は実験データと一致している (Fig. 5b)。重合終了時における最終的な D の値は、 Y の増加とともに増加する (Fig. 5a)。その値は実験結果をよく再現しており、相関係数は0.84であった (Fig. 5c)。この優れた再現性は、本研究のシミュレーションが妥当であることを示している。

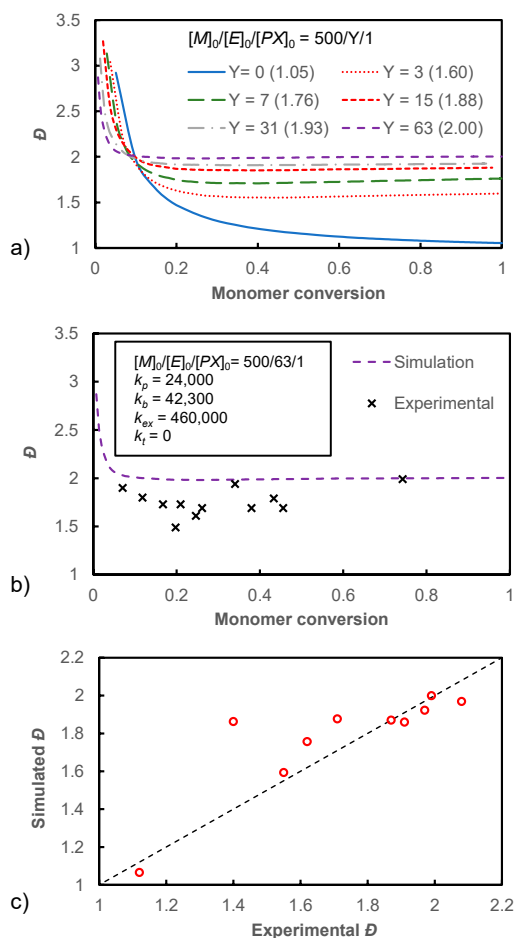


Fig. 5. a) Simulated dependence of D on monomer conversion for linear and HBPs. Values in the parenthesis in the legend indicate the final value of D . $[PX]_0 = 10,000$. The condition corresponds to runs 1-6 of Table 1 in Ref.⁵⁾ b) Simulated and

experimental dependence of D for hyper-branched polymer. The condition corresponds to run 5 of Table 1 in Ref.⁵⁾ c) Comparison between simulated and experimental D s, assuming the absence of termination reaction. Experimental data were taken from runs 1-10 of Table 1 in Ref.⁵⁾.

シミュレーションでは、 $Y > 3$ の場合は全て、HBPの最終 D 値が1.5を超えた。このことから、HBP合成における D 値が大きいのは停止反応によるものではなく、HBP形成プロセスに固有の特徴であることが強く示唆される。(本稿では省略するが、停止反応を含むシミュレーションでは、実験値よりも有意に大きな D 値が得られている。)

3-2. 多岐構造の検証

この確率的シミュレーションの最も重要な利点は、シミュレーションによって生成された各HBP分子の詳細な構造情報にアクセスできることである。本研究では重合度 (DP) および一分子内のエポルマーの個数 (N_{Ev}) に対応するHBPの重量分率を調べることで、Fig. 1b に示された模式的構造の妥当性について検討した。

Fig. 6は、 $Y = 63$ の場合の DP と N_{Ev} に対するHBPの重量分布を示す。設計したHBPの $DP (= 564)$ と一致する DP のHBPが最も多く含まれていることが、この図から分かる。一方で、少量 (0.5%未満) の超高分子量HBP ($DP > 3000$) や、低分子量ポリマーの形成も有意に観察された。このような高分子量と低分子量のHBPの形成が大きな D の起源である。ただし、このように高分子量と低分子量のHBPが存在しても、 DP と N_{Ev} の間に優れた良好な相関関係があることから、分岐構造の制御性は保たれていると言える。異なる $[M]_0/[E]_0/[PX]_0$ 比の条件でシミュレートしたHBPについて同様な解析を行ったが、全ての場合で、理想的な構造に近いものが最も多く生成されていた。この結果は、我々のHBPで「世代」が制御されていることを強く示唆している。

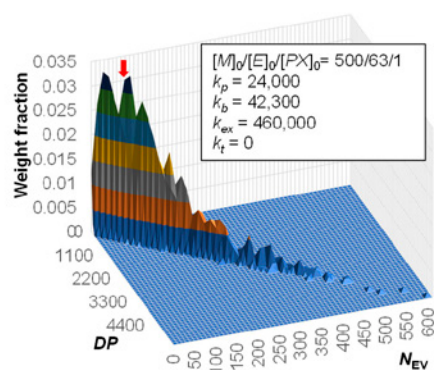


Fig. 6. Weight distribution of simulated structure of HBP. $[PX]_0 = 10,000$. The condition corresponds to run 5 of Table 1 in Ref.⁵⁾. The intended structure is indicated by the arrow.

3-3. セグメント内モノマー数の均一性

ここで、HBP 内の隣接する分岐点の間、および、最も外

側の分岐点と末端の間を構成する線形部分を、「セグメント」と呼ぶことにする。生成したHBPの構造についてより細かく検討するため、新たにシミュレーションを行ってHBPを生成し、そのセグメント長（セグメントを構成するモノマーの個数）を調べた。このシミュレーションに於いては、いずれも同じ平均セグメント長（=64モノマー）を持つが、世代とDPが異なるHBPを生成した。シミュレーションの初期パラメータを $[M]_0/[E]_0/[PX]_0 = Z/Y/1$ としたとき、 $Z/Y = 960/7, 1984/15$, および $4032/31$ であり、各々、第三、第四、第五世代のHBPに対応する。また、以後の議論のため、重合開始点から着目したセグメントに至るまでの経路で通過する分岐点数を N_s と定義する。

このシミュレーションの結果、意外にも、 N_s の増加と共にセグメント長の平均が減少する傾向が明らかとなった（Fig. 7a）。重合開始点付近ではセグメント長の平均が80モノマー程度であったが、 N_s が増加するにつれて徐々に短くなった。この傾向は第三世代のHBPで最も顕著で、第四世代、第五世代と世代が上がるほど緩やかになった。

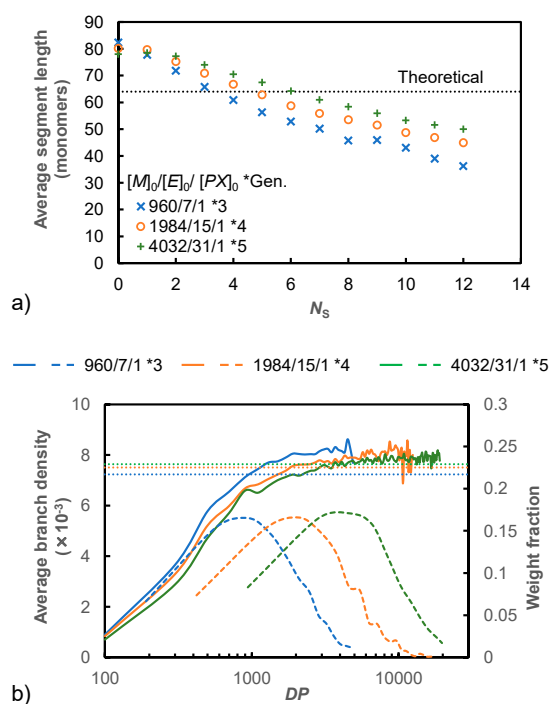


Fig. 7. Relationship between a) N_s and average segment length, and b) DP and average branching density (solid line) along with the weight distribution of HBPs (broken line), obtained by the simulation. The dendritic generation of the sample is indicated after the asterisk in the legend. Horizontal dotted lines indicate the theoretical values.

このようにセグメント長が N_s に依存するので、平均分岐密度（ $=N_{EV}/DP$ ）も DP に依存する（Fig. 7b）。平均分岐密度は、 DP が1000未満のHBPでは理論値（ $\sim 7.5 \times 10^{-3}$ ）よりかなり低い。 $Z/Y = 960/7$ のHBPは重量分率のピークが DP

~ 1000 付近にあるため、その影響は比較的大きいかもしれない。一方、 $Z/Y = 1984/15$, および $4032/31$ のHBPは重量分率のピークが $DP \sim 1000$ よりも十分に高い位置にあり、セグメント長分布の影響は実質的に無視することができ、理想値に近い平均分岐密度を持つHBPが主に形成されていると見なせる。

Fig. 7の結果については、フェニル基を持つ新しいエポマー**2b**（Fig. 1, $R = (CH_2)_2Ph$ ）を用いてHBPを合成し、実験的に検証した。**2b**はフェニル基を有するので、HBPに取り込まれたエポルマーの量は、紫外線吸収（UV）、屈折率（RI）、およびMALS検出器を備えたSEC-MALS分析によって、分子量の関数として定量することができる。すなわち、RI検出器で検出されるシグナル強度（ I_{RI} ）はHBPの濃度だけに比例するが、紫外線検出器で検出されるシグナル強度（ I_{UV} ）は濃度と分岐数の両方に比例する。したがって、MALS検出器によって決定された絶対分子量または DP の関数として、 I_{UV}/I_{RI} によって分岐密度の相対的变化を評価した。

HBP合成は、シミュレーションの設定と同じ条件（ $60^\circ C$ 、 $[M]_0/[E]_0/[PX]_0 = Z/Y/1$ 、 $Z/Y = 960/7, 1984/15$, および $4032/31$ ）で行った。SEC-MALSの結果は、 DP とともに分岐密度が増加することを示した（Fig. 8）。すなわち、 N_s が増加するにつれて、セグメントの長さが徐々に短くなっている。さらに、 I_{UV}/I_{RI} の DP に対する依存性は、 X/Y が小さいほど顕著であった。これらの結果は、シミュレーションで得られた傾向と一致している。より定量的で正確な結果を得るためには、シミュレーション条件の最適化を含めたさらなる研究が必要であろう。

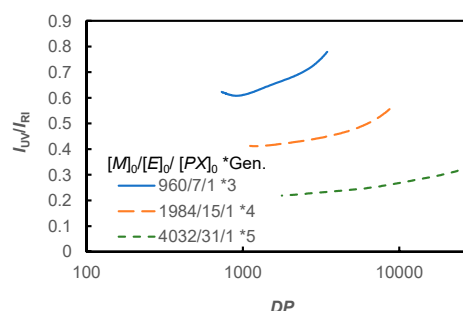


Fig. 8. Experimentally obtained relationship between DP and I_{UV}/I_{RI} for HBP samples using **2b**.

4. 結語

RDRPに基づきエポルマーを用いて合成されたHBPの形成過程を、確率論的にシミュレーションした。シミュレーションの結果、HBPの大きな DP は、停止反応などの望ましくない副反応ではなく、分岐数の分布から生じることが示唆された。さらに、HBPの大部分は理想的な構造に近く、構造の制御に成功していることが示された。シミュレーションから得られたHBPの構造に関する知見は、実験的にも

検証された。

謝辞

本研究は、日本学術振興会 科学研究費補助金 21H05027 (S. Y.) および 21K05184 (M. T.) の助成を受けたものである。

参考文献

- 1) B. I. Voit and A. Lederer, *Chem Rev* **109**(11), 5924–5973 (2009).
- 2) C. Gao and D. Yan, Hyperbranched polymers: From synthesis to applications *Progress in Polymer Science (Oxford)* **29**(3), 183–275 (2004).
- 3) M. Jikei and M.-A. Kakimoto, *Hyperbranched polymers: a promising new class of materials at* <www.elsevier.com/locate/ppolysci>
- 4) N. Hadjichristidis, M. Pitsikalis, S. Pispas, and H. Iatrou, *Chem Rev* **101**(12), 3747–3792 (2001).
- 5) Y. Lu, T. Nemoto, M. Tosaka, and S. Yamago, *Nat Commun* **8**(1), 1863 (2017).
- 6) Y. Lu and S. Yamago, *Angewandte Chemie International Edition* **58**(12), 3952–3956 (2019).
- 7) Y. Lu and S. Yamago, *Macromolecules* **53**(8), 3209–3216 (2020).
- 8) S. Yamago, *Polymer Journal 2021 53:8* **53**(8), 847–864 (2021).
- 9) Y. Jiang, M. Kibune, M. Tosaka, and S. Yamago, *Angewandte Chemie International Edition* **62**(35) (2023).
- 10) S. Yamago, *Chem Rev* **109**(11), 5051–5068 (2009).
- 11) S. Yamago, K. Iida, and J. Yoshida, *J Am Chem Soc* **124**(12), 2874–2875 (2002).
- 12) M. Tosaka *et al.*, *Angewandte Chemie International Edition* **62**(29) (2023).

STXM 法による延伸下ポリエチレンの分子鎖配向の空間分布評価

Evaluation of Spatial Distribution of Chain Orientation of Polyethylene under Stretching by STXM

(タイトルは講演会発表タイトルと同じにしてください)

竹中 幹人・荒川 勝利・中西 洋平

Mikihito Takenaka, Katsutoshi ARAKAWA, Yohei NAKANISHI

Institute for Chemical Research, Kyoto University

We found that the spatial inhomogeneity of the chain orientation on the submicron scale in polyethylene (PE) under strain by scanning transmission X-ray microscopy (STXM). Our previous study [Macromolecules 2020, 53 (20), 9097-9107] clarified that the strain-induced density fluctuations on the submicron scale by using ultra-small-angle X-ray scattering (USAXS) and that the density fluctuations strongly affected the mechanical behavior of PE during strain. The strain is expected to induce the spatial inhomogeneity of chain orientation as well as the density fluctuations and the spatial inhomogeneity also might affect the mechanical behavior. However, wide angle X-ray scattering explored the spatially-averaged local structure and the spatial inhomogeneity of the chain orientation on the submicron scale has not been investigated yet. To clarify the spatial inhomogeneity of the chain orientation, we observed near-edge X-ray absorption fine structure (NEXAFS) spectra at the carbon K-edge of the stretched PE with a resolution of the order of 10 nm by STXM and observed the spatial inhomogeneity of the chain orientation as well as density fluctuations. The intensity of NEXAFS spectra depended on the polarization of X-ray and the dependence revealed the chains were more oriented in the low-density region under stretching. The orientation was induced by the stretch of the polymer chains melted mechanically.

1. 諸言

ポリエチレン(PE)はその優れた力学物性および成形性により、工業的に広く使われる高分子材料の1つである。結晶性高分子であるPEは階層構造(図1)を形成することが知られており、分子鎖が規則正しく折りたたまれた結晶格子構造、結晶相と非晶相が交互に積層したラメラ構造、成長したラメラ構造が形成するフィブリル構造、フィブリル構造が充填されてできる球晶構造といった構造を有する。先行研究^{1, 2}では、延伸に伴う、数百 nmオーダーの空間域(サブミクロンスケール)におけるPEの構造の変化(延伸誘起密度揺らぎ)が超小角X線散乱法(USAXS)により明らかにされ、結晶性高分子の力学挙動に大きな影響を与えることが分かっている。故に、サブミクロンスケールにおける構造

の制御が達成されると、結晶性高分子材料の長寿命化が期待できる。構造制御を達成するにあたり、この密度揺らぎの誘起に伴って起こる結晶構造の配向や非晶部分の分子鎖の配向を調べ、延伸下での結晶性高分子の力学挙動における高分子鎖の配向の役割を明確にさせることが求められる。

そこで、本研究では、結晶性高分子のサブミクロンスケールにおける高分子鎖の配向並びに密度分布を可視化することができる走査型透過X線顕微鏡(STXM)を用いることにより、延伸されたPEの内部構造を調べた。

STXMは、内部構造を局所的に解析でき、軟X線により、最高分解能20 nmのX線吸収微細構造(XAFS)スペクトルが得られる顕微鏡である。また、K核吸収端から離れた320 eV

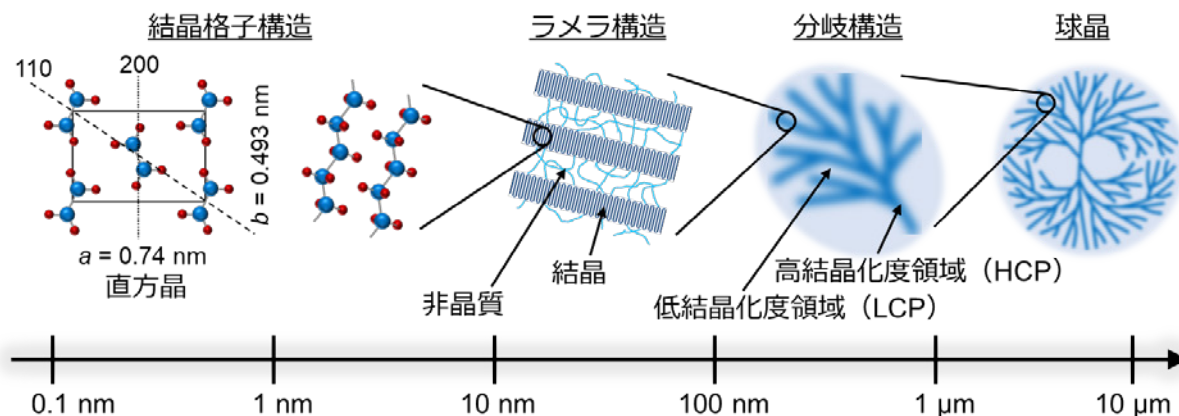


Figure 1. Schematic illustration of the hierarchical structure of PE spherulites.

付近では密度の空間分布が得られ、炭素のK核の吸収端近傍X線吸収微細構造 (NEXAFS) の直線偏光二色性より化学結合の配向の空間分布が得られる。

2. 高密度ポリエチレンにおけるサブミクロンスケールの不均一構造の研究

高密度ポリエチレン (HDPE) を1軸延伸すると、図2に示すように応力ひずみ曲線の降伏を示す。延伸比 ε は、 L_0 、 L をそれぞれ延伸前、延伸後のサンプルの長さとする式 (1) で表される。

$$\varepsilon = L/L_0 \quad (1)$$

先行研究²において、in situ X線散乱法により延伸下のHDPEにおいて降伏点近傍で延伸誘起密度揺らぎが観測され、更に結晶相のフラグメンテーションが起きることが分かっている。そこで、延伸誘起密度揺らぎが観測された延伸比におけるHDPEに対してSTXM測定を行い、サブミクロンスケールの密度揺らぎと分子鎖配向の空間不均一性を観測した。

2-1. 実験

実験に用いたHDPEのポリスチレン換算の重量平均分子量 M_w 、分子量分布 M_w/M_n はそれぞれ、 2.3×10^5 、11.9である。プレス機 (MINI TEST PRESS-10、東洋精機) を用いて、熔融状態 (180 °C) で10分間加圧した後、25 °Cに急冷しプレスシートを作製した。このプロセスにより作成されたHDPEの密度は 0.962 g/cm^3 (20 °C)、重量分率結晶化度 w_c は0.77であった。そこから砂時計型の試験片を打ち抜き、 $\varepsilon = 1.09$ まで延伸速度15 mm/minで延伸した。その後、延伸部分をクライオミクロトーム (EM UC7、Leica Microsystems) により、厚さ100 nm程度に切り出し超薄切片 (図3) を作製し、PF BL19AでSTXM測定を行った。入射X線エネルギーはCのK殻吸収端近傍である280-320 eVの範囲で、同視野で、偏光 (電場) 方向が延伸方向に対して平行および垂直方向それぞれとなるよう行った。

2-2. 結果と考察

図4はSTXM測定により得られた全視野のNEXAFSである。287 eVより大きいエネルギー領域にCのK殻吸収端による吸収が観測され、その吸収には、C-H結合のC-1s \rightarrow σ^* C-Hに由来するピークが288 eVに、C-C結合のC-1s \rightarrow σ^* C-Cに由来する292 eVにピークが観測される。この吸収はSTXMの像においてはOptical Density (OD) として表される。

$$OD = -\ln(I/I_0) = \mu \rho t \quad (2)$$

ここで、 I はX線透過光強度、 I_0 はX線入射光強度、 μ は質量吸収係数、 ρ は密度、 t は試料厚みである。吸収端より離れた320 eV付近において、試料厚みが一定であればODはCの密度のみに依存する³。それに対して、288 eVおよび292 eVに観測される吸収ピークでは、 μ が化学結合の遷移双極子モーメントと入射X線の電場の向きが平行のとき最大値を与え、垂直のとき最小値を与える⁴。よって、分子配向を評

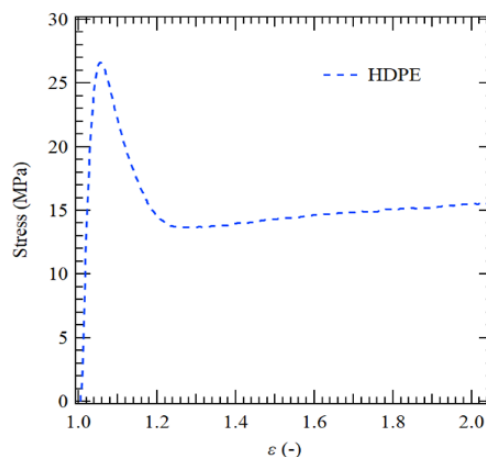


Figure 2. Stress-strain curves of the HDPE

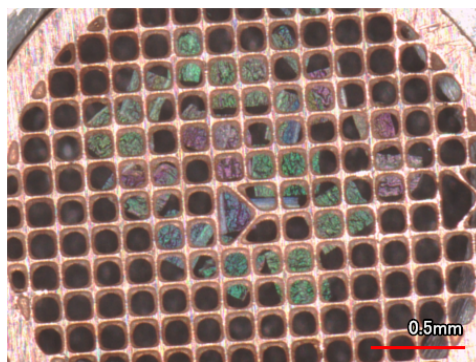


Figure 3. Photograph of ultra-thin sections of the HDPE

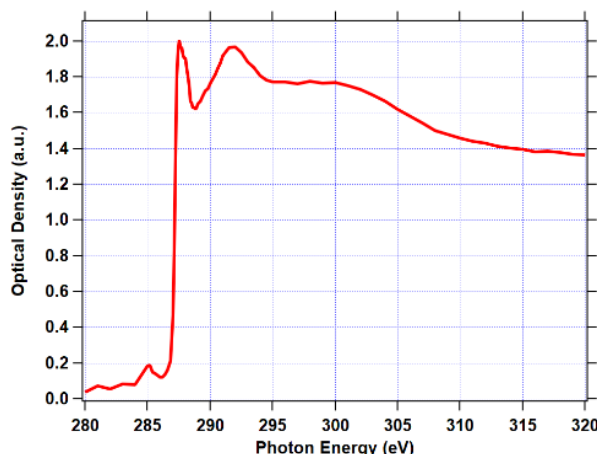


Figure 4. Transmission NEXAFS spectrum of the HDPE at $\varepsilon = 1.09$.

価するために配向秩序度 (P_2) を導入した⁶。配向秩序度 (P_2) は、延伸方向に対して平行および垂直方向に偏光したX線におけるNEXAFSスペクトルをピーク分離し、得られたODをそれぞれ OD_{\parallel} 、 OD_{\perp} とすると、

$$\langle P_2 \rangle = (OD_{\parallel} - OD_{\perp}) / (OD_{\parallel} + 2OD_{\perp}) \quad (3)$$

$\langle P_2 \rangle = 1$ は分子鎖が延伸方向に対して平行に、 $\langle P_2 \rangle = -0.5$

は垂直に配向していることに対応しており、 $\langle P_2 \rangle = 0$ はランダム配向に対応している。図5(a)は 318 ± 2 eVのOD像を示しており、図5(b)は図5(a)の視野におけるODのヒストグラムである。吸収端から十分離れた 318 ± 2 eVのOD像は試料厚みが一定であることを考慮すると、密度揺らぎを反映していると考えられる。ここで観測される不均一性はUSAXSで観測された密度揺らぎとほぼ同じスケールであり、実空間観察においても延伸に誘起される密度揺らぎが観測できることがわかった。また、図6(a), (b)は図5(a)と同一視野で、C-C結合の吸収に由来する 292 ± 1 eVの $\langle P_2 \rangle$ 像および 287.5 ± 0.2 eVでのC-H結合の配向に対応した $\langle P_2 \rangle$ 像をそれぞれ示している。図5(a)、図6(a)を比較すると、密度と分子鎖の配向に相関関係が見られた。すなわち、低密度領域ではC-C結合の延伸方向に対して平行の配向が支配的となり、高密度領域ではランダム配向が支配的となることが分かった。また、図5(a), (b)を比較すると、C-H結合の配向と分子鎖の配向に相関関係が見られ、C-H結合はC-C結合に相補する形で配向することが分かった。以上の結果と先行研究²から、HDPEを $\epsilon = 1.00$ から $\epsilon = 1.09$ まで延伸する過程において、以下の内部構造の変化が起きていると考えられる。低密度領域ではフィブリル間の低結晶化部分が存在し、高密度領域ではフィブリルのような高結晶化部分が存在すると考えられる。低密度領域では、延伸に伴い、高分子鎖や結晶のc軸が延伸方向に対して平行となるように支配的に配向していくが、高密度領域では、主に結晶相のフラグメンテーションが起き、図7のようにラメラ構造がChevron構造を取ったため、低密度領域と比較して延伸に伴う高分子鎖や結晶のc軸の配向が変化しなかったと考えられる。

3. STXMによる延伸LLDPEの分子鎖配向の空間分布評価

先行研究²において、2つの降伏点(図8)を持つ線状低密度ポリエチレン(LLDPE)は延伸により、第一降伏点(1YP)から第二降伏点(2YP)に掛けてサブミクロンスケールの密度揺らぎが誘起され、更に結晶相のフラグメンテーションやメカニカルメルトが起きることがX線散乱法により明らかに

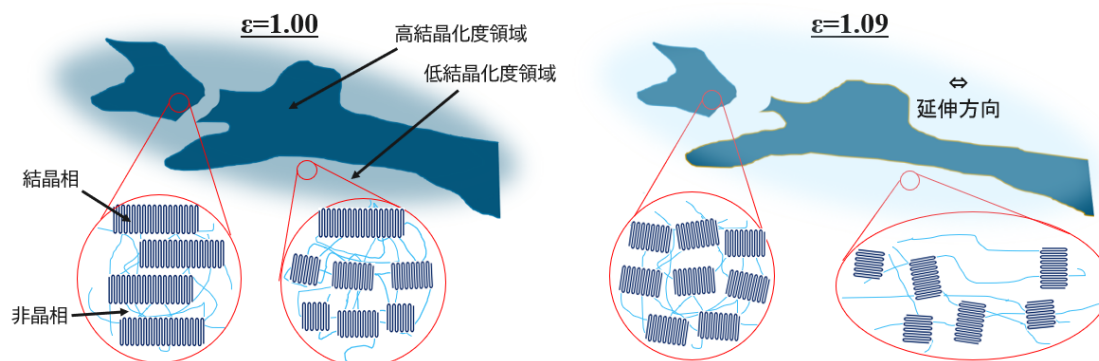


Figure 7. Schematic illustrations of the changes in the hierarchical structures in the HDPE during stretching from $\epsilon = 1.00$ to $\epsilon = 1.09$

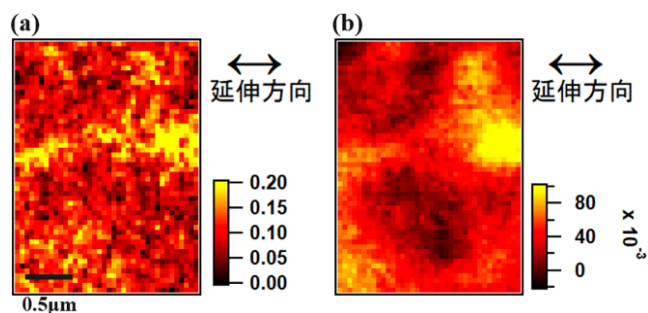


Figure 5. $\langle P_2 \rangle$ images of (a) C-C chain (292 ± 1 eV) and (b) C-H chain (287.5 ± 0.2 eV)

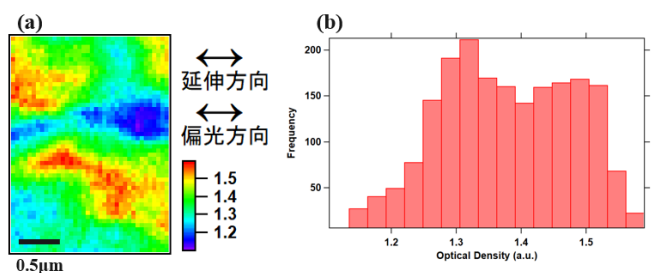


Figure 6. (a) OD (318 ± 2 eV) images and (b) Histogram of OD (318 ± 2 eV) of the HDPE at $\epsilon = 1.09$

されている。本研究では延伸比が異なるLLDPEに対してSTXM測定を行い、延伸に伴う密度揺らぎの経時変化や、分子配向の変化について調べた。

3-1. 実験

実験に用いたLLDPEのポリスチレン換算の重量平均分子量 M_w 、分子量分布 M_w/M_n はそれぞれ、 2.1×10^5 、5.33である。プレス機(MINI TEST PRESS-10、東洋精機)を用いて、熔融状態(180 °C)で10分間加圧した後、 25 °Cに急冷しプレスシートを作製した。このプロセスにより作成されたLLDPEの密度は 0.937 g/cm³ (20 °C)、重量分率結晶化度 w_c は0.49であった。そこから砂時計型の試験片を打ち抜き、延伸機を用いて延伸誘起密度揺らぎが見られた $\epsilon = 1.11$ 、第二降伏点である $\epsilon = 1.17$ まで延伸速度 1 mm/minで延伸した。その後、延伸部分をクライオマイクローム(EM UC7、Leica Microsystems)により、厚さ 100 nm程度に切り出し

超薄切片を作製し、PF BL19AでSTXM測定を行った。入射X線エネルギーはCのK殻吸収端近傍である280-320 eVの範囲で、同視野で、偏光(電場)方向が延伸方向に対して平行および垂直方向それぞれとなるよう行った。

3-2. 結果と考察

図9に入射X線エネルギー318±2 eVにおけるSTXM測定により観測されたOD像の延伸比ε依存性を示す。ε、ODはそれぞれ式(1)、(2)で表される。CのK殻吸収端より離れた320 eV付近において試料厚み一定の条件下では、ODはCの密度のみに依存する³。よって、図9はCの密度を反映している。また、図10は図9のOD分布を示しており、ε = 1.00-1.17(2YP)のOD分布を比較するため、先行研究²を元にそれぞれの試料厚みを補正している。OD分布について、ε = 1.00, 1.17では正規分布に則ったものが、ε = 1.11では二峰性の分布が得られた。先行研究²より、ε=1.11における二峰性のOD分布は延伸誘起密度揺らぎを示していると考えられる。また、結晶や高分子鎖の配向を評価するために配向秩序度(P₂)、配向角θを導入した⁶。延伸方向に対して平行および垂直に偏光したX線により得られたNEXAFSスペクトルをピーク分離し、得られたC-1s→σ*C-CのODをそれぞれOD_{C-C,∥}、OD_{C-C,⊥}とすると

$$\langle P_2 \rangle = \frac{(OD_{C-C,\parallel} - OD_{C-C,\perp}) / (OD_{C-C,\parallel} + 2OD_{C-C,\perp})}{\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle / 2} \quad (3)$$

$$\theta = 180/\pi \cdot \cos^{-1}(\sqrt{(2\langle P_2 \rangle + 1)/3}) \quad (4)$$

により定義される配向秩序度(P₂)、配向角θにより、結晶や分子鎖の空間配向分布が得られる。θ<54.7356°の場合、結晶や分子鎖は延伸方向に対して平行方向の配向が支配的であり、θ>54.7356°の時、垂直の配向が支配的であり、θ≃54.7356°の時、ランダム配向が支配的に存在することを示している。図12にε = 1.00, 1.11, 1.17における、図9のOD像と同視野におけるθマッピング像を示し、図13に各延伸比のOD値上位15%(高密度領域)、下位15%(低密度領域)における領域のθ分布を示している。図9, 12, 13を比較すると、以下のことが分かった。ε = 1.00では、結晶や高分子鎖は視野全体でランダム配向しているが、ε = 1.17では密度に関わらず延伸方向に平行なC-C結合、すなわち、結晶のc軸や高分子鎖の配向が支配的に延伸方向に対して平行に向いていることが分かった。ε = 1.11では密度と分子鎖の配向に相関関係が見られ、低密度領域では延伸方向に対して平行方向となるC-C結合の配向が支配的となり、高密度領域ではランダム配向が支配的となることが分かった。これは、低密度領域ではフィブリル間のような低結晶化領域が存在し、延伸により結晶・非晶部分の配向が延伸方向に対して平行に配向する一方、高密度領域ではフィブリルのような高結晶化領域が存在し、延伸により結晶部分のフラグメンテーションが起こりchevron構造化したことにより、低密度領域よりも配向の変化が無かったためと考えられる。したがって、

先行研究²と図9, 10, 12, 13より、延伸下におけるLLDPEの密度変化に関して、以下のことが考えられる(図14)。延伸過程で第一降伏点と第二降伏点の間であるε=1.11では低密度領域に存在する低結晶化度部分で結晶相のメカニカルメルトが起き、密度が低下する。しかし、高密度領域

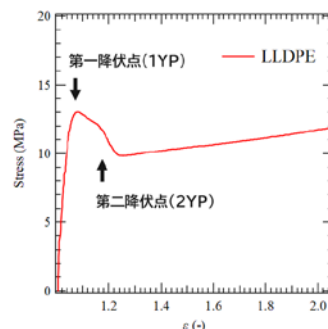


Figure 8. Stress-strain curves of the

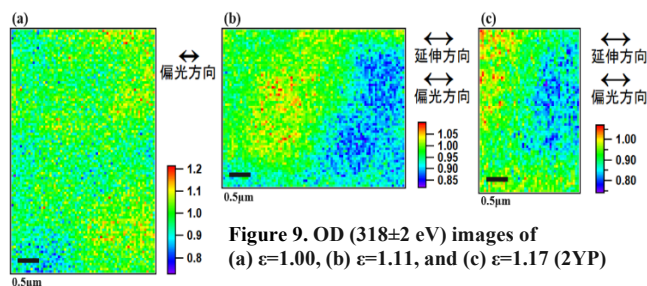


Figure 9. OD (318±2 eV) images of (a) ε=1.00, (b) ε=1.11, and (c) ε=1.17 (2YP)

に存在する高結晶化度部分では結晶相はフラグメンテーションを起こすが、密度はほぼ低下しないため密度揺らぎが増大すると考えられる。ε=1.11からε=1.17までの延伸過

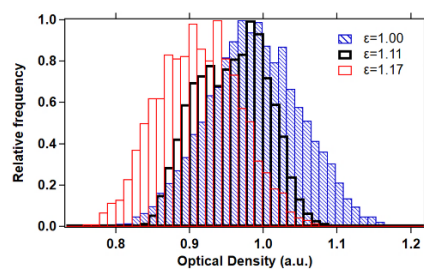


Figure 10. OD (318±2 eV) probability distributions of the LLDPE at ε=1.00, ε=1.11, and ε=1.17 (2YP)

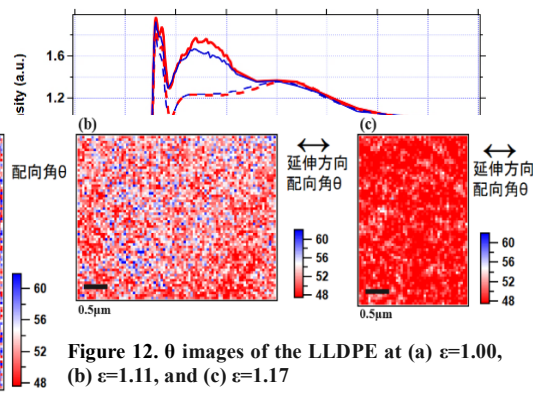


Figure 12. θ images of the LLDPE at (a) ε=1.00, (b) ε=1.11, and (c) ε=1.17

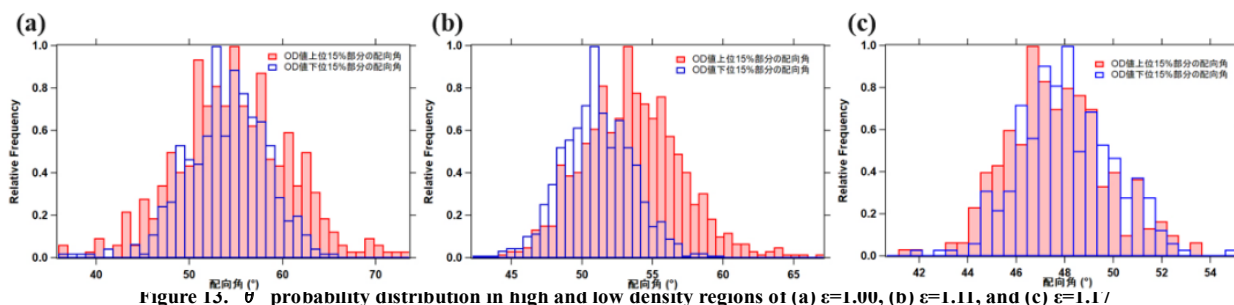


Figure 13. θ probability distribution in high and low density regions of (a) $\varepsilon=1.00$, (b) $\varepsilon=1.11$, and (c) $\varepsilon=1.17$

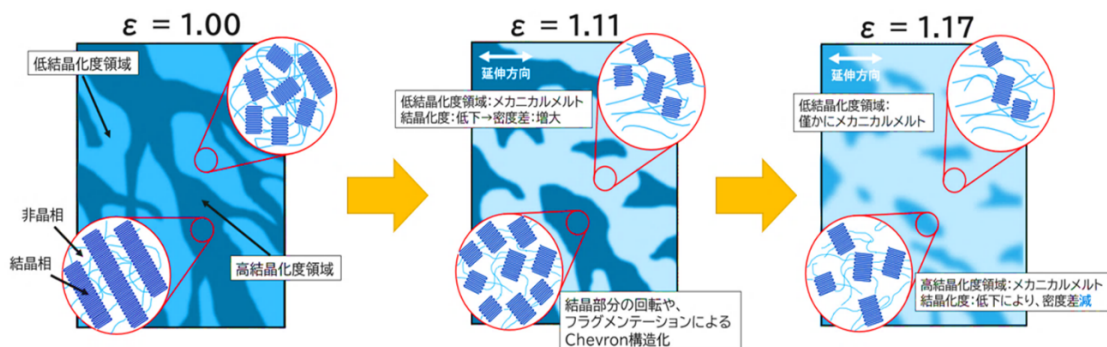


Figure 14. Schematic illustrations of the changes in the hierarchical structures in the LLDPE during stretching.

程においては、主に高結晶化度領域でフラグメンテーションを起こした結晶相でメカニカルメルトが起きたため、 $\varepsilon=1.17$ における全体の密度は $\varepsilon=1.11$ における低密度分布側へシフトするように低下すると考えられる。

謝辞

本研究はJSPS科研費 JP 21H05027の助成を受けたものであり、ここに感謝の意を表します。また、この実験は、SPring-8のBL03XU（課題番号 2019A7215, 2019B7264, 2020A7213）及びフォトンファクトリー-BL-19A（課題番号 2020G091, 2020Y016）にて実施されたものであります。

参考文献

- 1) M. Takenaka, *et al.*, *Phys. Rev. E* **2007** 75, 061802
- 2) M. Kishimoto, *et al.*, *Macromolecules* **2020** 53, 9097-9107
- 3) Y. Wang, *et al.*, *Macromolecules* **2010** 43, 8153–8161
- 4) J. Fu, *et al.*, *J. Phys. Chem. A* **2005** 109, 11724-11732
- 5) M. Arakawa, *et al.*, *Polym. J.* **2022**, 54, 243–248.
- 6) H. Cruz D, *et al.*, *Biomacromolecules* **2006** 7, 3, 836–843
- 7) C. Zhang, *et al.*, *Polymer* **2014** 55, 6915-6923

ミトコンドリア細胞移植のためのカチオン化ハイドロゲルのデザイン

Design of cationic hydrogel for mitochondria transplantation

田畑 泰彦・阿部 哲士・Wenxuan YANG

Yasuhiko TABATA, Satoshi ABE, and Wenxuan YANG

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

The objective of this study is to design a cationized gelatin hydrogel for enhancing the transplantation efficiency of mitochondria (Mt) isolated into cells. To modify the Mt surface, cationized gelatin nanospheres (cGNS) were prepared. The Mt associated with cG (Mt-cG) and cGNS (Mt-cGNS) were co-incubated with H9c2 cells for mitochondria transplantation. As the result, modifying with cGNS significantly increased the mitochondria transplantation efficiency compared with those of without modification and modification with cG. The enhanced mitochondria transplantation efficiency leading to a significantly decreasing superoxide amount and an significantly increasing ATP production compared with that of free Mt. In conclusion, cGNS are promising to improve the efficacy in mitochondria transplantation.

1. 緒言

細胞内小器官の一種であるミトコンドリア (Mt) は、細胞の「発電所」として知られており、細胞呼吸、アポトーシス、活性酸素種 (ROS) の恒常性維持、代謝など、複数の重要な細胞機能に関与している。そのことから、ミトコンドリアの機能不全は、神経変性疾患、心血管疾患、脊髄損傷、癌、老化など、いくつかの疾患発症に関与することが報告されており¹⁻⁴⁾、ミトコンドリア機能不全を治す効果的な治療法を開発することが臨床上緊急の必要性となっている。

近年、トンネルナノチューブを介したミトコンドリアの細胞間移送といった、生理条件下でミトコンドリアが細胞間を移動する現象が報告されている⁵⁻⁶⁾。移動した健康なミトコンドリアは、機能不全に陥っているレシピエント細胞内で、生理活性を示すことで細胞機能を補填し、その結果、組織の修復と炎症の制御につながる。こうしたミトコンドリアの細胞間移送という現象は、健康なミトコンドリアをミトコンドリア機能不全に陥っている細胞に移植すること (ミトコンドリア移植) で、ミトコンドリアの機能不全に対する新たな治療戦略を示唆する。

Mt 移植は、単離した Mt をレシピエント細胞と共培養することで簡単に行うことができる。しかしながら、ミトコンドリアと細胞膜はともに負電荷を帯びていることから、共培養による Mt 移植では静電反発により、細胞内への Mt の導入効率は低い。また、遠心力や磁力などの物理刺激を利用した Mt 移植の方法がいくつか報告されている。しかしながら、これらの方法は移植効率を高めることができるものの、細胞毒性を引き起こす可能性があることに加え、*in vivo* でのミトコンドリア移植への適応には解決すべき技術的な課題が残されている。

その一方、ドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術を

用いた細胞内への薬物送達においては、負電荷を持った核酸やタンパク質などをカチオン性のキャリアに内包することにより、高効率で細胞内に送達可能な方法が開発されている。この知見に基づき、Mt の表面をカチオン性の高分子材料で修飾することにより、細胞内へのミトコンドリア移植の効率を向上させることが期待できると考えられる。

ゼラチンは生体適合性、および、生分解性の材料としてよく知られている。ゼラチンはコラーゲン由来のタンパク質であり、食品や医薬品、臨床での利用と、すでに幅広く応用されており、安全性に優れた薬物キャリアの構成材料である。カチオン化ゼラチン (cG) は、ゼラチン側鎖のアミノ基にスperlミンなどの正電荷もつ化合物を化学的に修飾することで合成できる⁷⁾。正電荷を有するカチオン化ゼラチンのハイドロゲルは、siRNA⁸⁾および pDNA⁹⁾といった負電荷をもつ薬剤の徐放性担体として利用可能であり、高効率で細胞内に送達できることを報告してきた。

そこで本研究の目的は、単離した健康な Mt の細胞内への移植効率を高めるために、カチオン化ゼラチンハイドロゲルを設計することである。cG およびカチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS) を Mt と混合することで Mt の表面に正電荷を付与し、ラット心臓横紋筋細胞株 H9c2 細胞とともに 6 時間培養した後、細胞移植効率を評価した。また、Mt 移植前後の ROS の除去効果と ATP の産生を指標として Mt の機能を評価した。

2. 材料と方法

2-1. カチオン化ゼラチン (cG) およびカチオン化ゼラチンナノスフェア (cGNS) の調製

0.04g/mL のゼラチン水溶液に (等電点 (pI) = 9.0、重量平均分子量 = 99000、豚皮、新田ゼラチン株式会社、大阪府)、ゼラチンのカルボキシル基に対して 50 モル等量に

なるようにスペルミンを加えた。その後、11M HCl 水溶液を加えて溶液の pH を 5.0 に調整した。次に、ゼラチンのカルボキシル基に対して 3 モル等量になるように 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) を加えた。反応溶液を 37°C で 18 時間攪拌した後、続いて、室温で 3 日間超純水 (DDW) を用いて透析した。得られた水溶液を凍結乾燥することでカチオン化ゼラチン (cG) を得た。ゼラチンに導入されたアミノ基の割合は、2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)(和光純薬工業株式会社、大阪、日本) 法により算出した。その導入効率は、ゼラチン中のカルボキシル基の 44.5 モル%であった。

cGNS はコアセルベーション法によって調製した⁸⁾。40°C に加温した 1.25 ml のカチオン化ゼラチン水溶液 (2.5、3.25、6.25、および 10 wt%) に、5 ml のアセトンを滴下することで、コアセルベートを形成した。続いて、グルタルアルデヒド (25 wt%、20 μ l) を添加し、6 時間化学的架橋を施した。未反応のアルデヒド基をブロックは、0.5M グリシン水溶液 2mL を添加することで行なった。得られた水溶液を 40°C で一晩攪拌することでアセトンを蒸発させた後、250,000 g、25°C、30 分間の遠心分離を行うことで cGNS を回収し、DDW に再懸濁した。

2-2. 細胞培養

H9c2 細胞(ATCC、メリーランド州ロックビル) を、10% のウシ胎児血清および 1% のペニシリン/ストレプトマイシン入りのダルバッコ改変イーグル培地 (サーモフィッシュサイエンティフィック社、マサチューセッツ州) を用いて、5% CO₂ を含む加湿雰囲気中、37°C で培養した。蛍光標識されたミトコンドリアを単離することを目的に、Su9 融合緑色蛍光タンパク質 (Su9-GFP) を安定に発現する H9c2 細胞 (GFP-H9c2) を作製した。Su9-EGFP 発現プラスミド DNA は、石原博士¹⁰⁾ (大阪大学大学院理学研究科生命科学専攻) のご厚意により提供していただいた。Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., マサチューセッツ州) を用いた pDNA を用いて H9c2 細胞に遺伝子導入し、G418 を含む培地で 3 週間培養した。続いて、GFP 陽性細胞をセルソーター (MA900: ソニー株式会社、東京、日本) を用いることで単離した。Su9-EGFP 発現 H9c2 細胞を、ミトコンドリア特異的色素 MitoBright LT Deep Red (同仁堂、熊本、日本) または Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific, Inc., マサチューセッツ) で染色した。H9c2 細胞における GFP の発現は、蛍光顕微鏡 (BZ-X700: キーエンス株式会社、大阪、日本) を用いて観察した。

2-3. ミトコンドリアの単離

分画遠心分離法によって H9c2 細胞または GFP-H9c2 細胞からミトコンドリアを単離した。細胞を細胞破碎緩衝液 [HB; 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4)、220 mM マンニトール、70 mM スクロース、100 μ M PMSF (フッ化フェニルメチルスルホニル)] 中で 27 ゲージのシリンジ針を通すこ

とで破壊した。細胞破碎液を 400g、4°C で 5 分間遠心分離することで、未破壊の細胞を除去した。続いて、上清を 6,000g で 5 分間遠心分離し、上清を細胞質画分として、また、沈殿物を Mt が多く含まれる画分 (Mt 画分) として回収した。以降では、H9c2 細胞から単離したミトコンドリアを Mt、GFP-H9c2 細胞から単離したミトコンドリアを Mt-GFP と表記する。各画分中のタンパク質量は、PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., マサチューセッツ州) を用いて評価した。得られたミトコンドリアの純度は、ミトコンドリア特異的なタンパク質 COXIV と細胞質特異的なタンパク質 α -チューブリンを検出することで評価した。

2-4. cG および cGNS 修飾 Mt の調製

cG および cGNS (5 μ l、1mg/ml) を Mt (5 μ g) の懸濁液 95 μ l に添加し、穏やかに混合し、続いて氷上で 10 分間静置した。ゼータ電位は、ELS (Zetasizer NanoZS: Malvern Instruments Ltd., ウースターシャー、英国) を用いて評価した。さらに、MitoBright LT DeepRed で標識した Mt と FITC で標識した cGNS を混合した後、蛍光顕微鏡を用いて共局在を評価した。

2-5. ウェスタンブロッティングによるミトコンドリアの移植効率の評価

H9c2 細胞を 6 マルチウェル培養プレートの各ウェルに 1×10^5 細胞/ウェルの密度で播種した。24 時間後、Mt-GFP、Mt-GFP-cG、および Mt-GFP-cGNS (50、100、200、および 400、数字は cGNS のサイズを表す) を培地に添加した後 6 時間培養した。ミトコンドリア移植後、トリプシン処理によって細胞を回収し、Laemmli バッファー (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) と混合して細胞溶解物を調製した。細胞溶解物中の GFP の量をウェスタンブロッティングにより定量した。

2-6. ミトコンドリア移植後の酸化ストレス評価

H9c2 細胞 (5×10^3 細胞/ウェル) を 96 マルチウェル培養プレート (Corning Inc., NY, USA) の各ウェルに播種し、一晩培養した。Mt、Mt-cGNS (50、100、200、および 400) と 6 時間培養した後、細胞を 5 μ M メナジオンおよび 0.5 mg/ml cytochrome c で 1 時間処理した。マルチモードマイクロプレートリーダー (SpectraMax i3x、モレキュラーデバイスジャパン株式会社、東京、日本) を用いて還元型 cytochrome c 濃度を 550 nm での吸光度を測定することで定量した。

2-7. ミトコンドリア移植後の ATP 量の評価

ミトコンドリアの機能を評価するために、Mt を移植した細胞内 ATP 量を評価した。H9c2 細胞 (5×10^3 細胞/ウェル) を 96 マルチウェルプレート (Corning Inc., NY, USA) の各ウェルに播種し、一晩培養した。Mt、Mt-cGNS (50) と 6 時間培養した後、CellTiter-Glo® 2.0 試薬 (Promega Corporation、米国マディソン) を用いて ATP 量を測定した。

3. 結果と考察

3-1. 単離したミトコンドリアの特性評価

ミトコンドリアの単離操作中に得られたさまざまな画分サンプルの COXIV、および、 α -チューブリンに対するウェスタンブロットティングの結果を Figure 1 に示す。Mt 画分では、ミトコンドリア特異的タンパク質である COXIV の存在が確認でき、細胞質特異的タンパク質である α -チューブリンの存在が認められなかったことから、Mt が高純度で単離できたと考えられる。

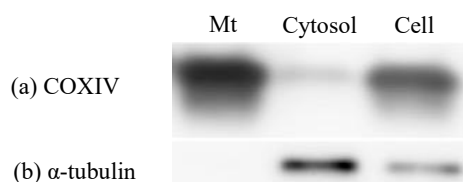


Fig. 1 Western blotting images of different fractions obtained by the conventional differential centrifugation: Mt fraction (Mt), cytosolic fraction (Cytosol), and total cell extracts (Cell). Anti-COXIV (a) and anti- α -tubulin antibodies (b) are used as the markers of Mt and cytosol, respectively.

3-2. cGNS の有無に関係するミトコンドリアの特性評価

本研究では、粒子サイズが 50 ~ 400 nm の cGNS を用いており、それぞれの粒子サイズと電荷は Table 1 の通りであった。cGNS の見かけのサイズは、添加する cG 濃度が増加するとともに増加した。cG、あるいは、cGNS と Mt を混合した後、ゼータ電位の変化を評価したところ、cG、あるいは、cGNS との混合によって Mt のゼータ電位は増加した (Table 2)。これは、Mt の大きさが 1 μ m 程度であることを考慮すると、cG と cGNS が静電相互作用によって Mt 表面に付着した結果、Mt のゼータ電位が増大したと考えられる。

Table 1 Physicochemical properties of cGNS prepared

Code	Apparent size (nm)	Zeta potential (mV)
cGNS(50)	151.8 \pm 0.12 ^{a)}	6.21 \pm 0.71 ^{a)}
cGNS(100)	194.4 \pm 0.39	8.75 \pm 0.64
cGNS(200)	197.0 \pm 2.26	7.51 \pm 0.52
cGNS(400)	403.0 \pm 4.97	6.99 \pm 0.21

a) average \pm standard deviation

Table 2 Zeta potentials of Mt and Mt associated with cG and cGNS

Sample	Zeta potential (mV)
Mt	-26.3 \pm 1.79 ^{a)}
Mt-cG	-9.09 \pm 0.714
Mt-cGNS(50)	-14.4 \pm 1.59
Mt-cGNS(100)	-20.4 \pm 0.41
Mt-cGNS(200)	-20.4 \pm 0.49
Mt-cGNS(400)	-20.7 \pm 0.62

a) average \pm standard deviation

3-3. cG および cGNS の有無による Mt の細胞移植効率

続いて、cG、あるいは、cGNS を表面修飾した Mt、ならびに、Mt を細胞に移植した際の導入効率について評価した (Figure 2)。Figure 2A より、すべての Mt 導入群で外来 Mt 由来の su9-GFP の存在が認められたことから、外因性の Mt を細胞に移植することが成功したことが明らかとなった。また、cGNS の粒子サイズに関係なく Mt-cGNS 導入群では、単に Mt を導入した群に比べて有意に高い su9-GFP の存在量が検出された。このことから、Mt 表面をカチオン化物質で修飾することで、Mt の移植効率の向上に寄与したと考えられる。一方、Mt-cGNS は Mt-cG よりも高い移植効率が認められた。これは、カチオンの自由度の観点から説明できると考えられる。水溶性高分子である cG 分子は柔軟であり、Mt 表面の負電荷と密接に相互作用している可能性がある。その一方、cGNS の正電荷は、ナノ粒子の表面に局在しているため、むしろ固定されており、集合体の中での自由度が低くなると考えられる。したがって、ナノ粒子の片側の正電荷が Mt と相互作用することに加えて、もう一方の側に存在する正電荷はレシピエント細胞と相互作用することができるため、細胞への Mt の移植が促進されたと考えられる。

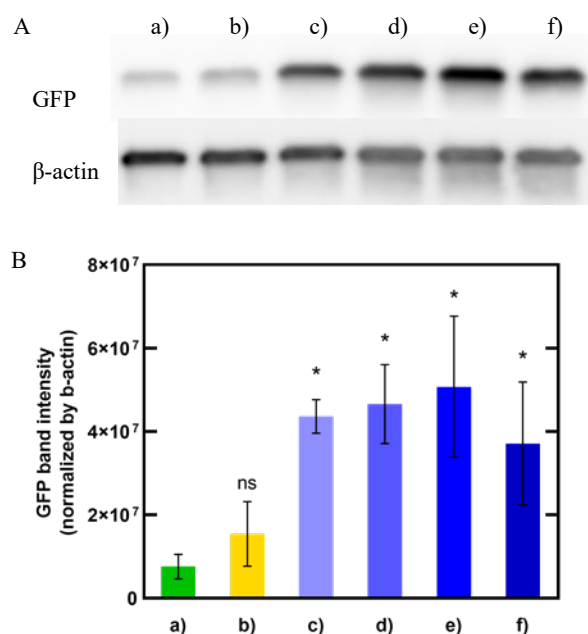


Fig. 2 A. Western blotting image of cell lysates after cellular internalization of a) Mt and b) Mt associated with cG, c) cGNS(50), d) cGNS(100), e) cGNS(200), and f) cGNS(400). B. Efficiency of cellular internalization of Mt and Mt associated with cG and cGNS. The value for the Mt group is 1. *, $p < 0.05$; significant difference from the Mt group, ns; not significant.

Mt キャリアとして、cGNS の異なる粒子サイズ間で移植効率の有意差は認められなかった。しかしながら、理由は明らかではないが、Mt-cGNS(400) 群の移植効率は、他の粒子サイズの cGNS を使用した群に比べ、移植効率より

も相対的に低かった。これは、おそらく cGNS の粒子サイズが大きいほど、多くの Mt と接触しやすくなり、その結果、Mt と cGNS の凝集体形成が促進され、Mt 移植の効率が低下する原因につながった可能性がある。単離した Mt はマクロピノサイトーシスによって細胞内に取り込まれることが報告されている¹¹⁾。マクロピノソームの大きさが 0.2 μm から 5 μm であることが知られていることから、Mt と cGNS の凝集により粒子サイズが増大することで Mt の細胞取り込みに影響を及ぼし、その結果、Mt-cGNS(400) の移植効率が相対的に低くなると考えられる。移植メカニズムを明らかにするには、今後さらなる検討が必要である。

3-4. Mt 移植後のミトコンドリア機能

本研究では、Mt 移植後に Mt の 2 つの機能を指標にすることで、移植後の細胞機能の増強を評価した。1 つ目は、活性酸素種 (ROS) の恒常性を維持に着目した。細胞内の ROS は、主に Mt が発生源になることが知られている。その一方で、Mt には、ROS を除去するための抗酸化酵素システムも備わっている。健康な細胞では、酸化ストレスを回避するためにミトコンドリアによって ROS の生成と除去のバランスが保たれている¹²⁻¹³⁾。

メナジオンは、スーパーオキシドアニオンを発生することによって酸化ストレスや虚血後損傷モデルを作製するためによく使用される化合物である¹⁴⁾。そこで、Mt を移植した後、細胞にメナジオン処理することで酸化ストレスを与え、Mt 移植による抗酸化能の増強を評価した。その結果、スーパーオキシドの産生量は、Mt 単独、Mt-cG、および Mt-cGNS で処理することにより減少した (Figure 3)。特に注目すべきことは、Mt-cGNS 投与群においてスーパーオキシドの産生が最も減少した。この結果より、Mt の移植によって ROS の除去が促進されたことが明らかとなった。これまでに、Mt 移植後に抗酸化酵素であるカタラーゼとスーパーオキシドジスムターゼ 2 の産生が亢進され、これが ROS 産生の阻害に関与していることが報告されている¹⁵⁻¹⁶⁾。Figure 2 より得られた結果と合わせ、細胞内に取り込まれた Mt の量が増加すればするほど、より多くのスーパーオキシドを除去することが可能であると考えられる。

続いてミトコンドリアの機能として、ATP 産生能に着目した。Mt を移植した後、細胞内で産生される ATP 量を評価することで、Mt 移植による細胞機能の増強を評価した (Figure 4)。検討には、粒子サイズ 50 nm の cGNS を用いて、さまざまな濃度の Mt-cGNS で処理した。その結果、Mt 移植後の細胞では、Mt 移植をしていない細胞に比べ ATP の産生量が増加した。健康な Mt の移植により、ATP 産生が可能な Mt がより多く細胞に導入され、ATP の産生量が増加と考えられる。その一方、Mt-cGNS 投与量に依存して ATP 産生量の増加は認められなかった。これは、投与した Mt の 100% がレシピエントの細胞に移植されるわけではないことに起因すると考えられる。仮に投与した

Mt の 100% が細胞に取り込まれたと仮定すると、今回得られた結果は、Mt 移植には最適な Mt 量が存在することを示唆する結果と考えられる。Mt の投量の最適化と、レシピエント細胞に取り込まれる正確な Mt の量の評価は、今後の検討を進める必要がある。

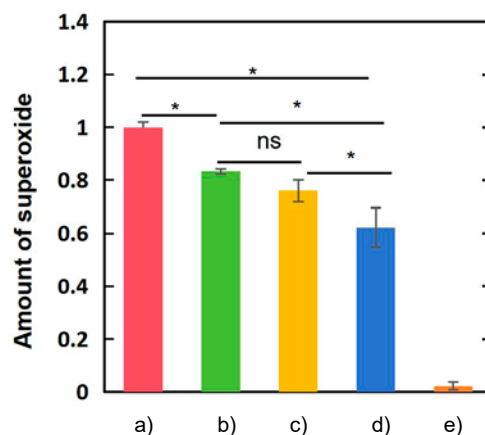


Fig. 3 The amount of superoxide generated from cells by the menadione treatment. a) treated with menadione, b) transplanted of Mt and treated with menadione, c) transplanted of Mt-cG and treated with menadione, d) transplanted of Mt-cGNS(50) and treated with menadione, e) without any treatment. The value of cells treated with menadione is 1. *, $p < 0.05$; significant difference between the two groups, ns; not significant.

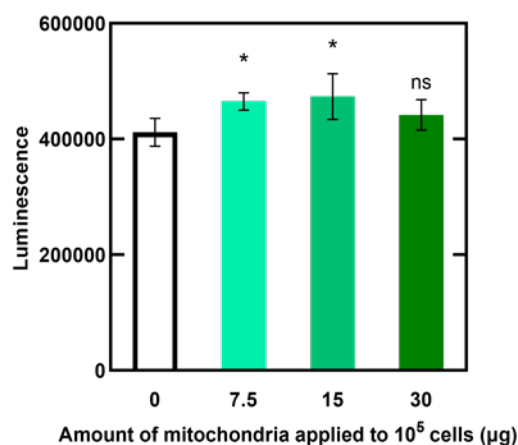


Fig. 4 ATP amount of cells 6 hr incubated with 7.5, 15, and 30 μg Mt associated with cGNS. *, $p < 0.05$; significant difference from the value of mitochondria amount 0 μg, ns; not significant.

4. まとめ

ミトコンドリア移植は、ミトコンドリア機能不全治療のための革新的な治療戦略である。本研究は、cGNS が外因性 Mt の細胞内取り込みを増強し、Mt 機能の回復につながることを示している。cGNS を Mt に修飾することにより、Mt の移植効率が大幅に増加した。加えて、細胞内に取り

込まれる Mt の量が増加することで、ROS の除去や ATP 産生といった Mt に由来する細胞機能が增強された。以上より、cGNS はミトコンドリア移植の治療効果を向上させる潜在的なキャリアとなり得ると考えられる。

参考文献

- 1) Ballinger, S. W., *Free Radical Biology and Medicine* **2005**, *38* (10), 1278-1295.
- 2) Sorrentino, V.; Menzies, K. J.; Auwerx, J., Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol 58*, Insel, P. A., Ed. 2018; Vol. 58, pp 353-389.
- 3) Wang, W.; Zhao, F.; Ma, X.; Perry, G.; Zhu, X., *Molecular Neurodegeneration* **2020**, *15* (1), 1-22.
- 4) Moon, H. E.; Paek, S. H., *Experimental neurobiology* **2015**, *24* (2), 103.
- 5) Lin, H.-Y.; Liou, C.-W.; Chen, S.-D.; Hsu, T.-Y.; Chuang, J.-H.; Wang, P.-W.; Huang, S.-T.; Tiao, M.-M.; Chen, J.-B.; Lin, T.-K.; Chuang, Y.-C., *Mitochondrion* **2015**, *22*, 31-44.
- 6) Spees, J. L.; Olson, S. D.; Whitney, M. J.; Prockop, D. J., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (5), 1283-8.
- 7) Kushibiki, T.; Tomoshige, R.; Iwanaga, K.; Kakemi, M.; Tabata, Y., *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2006**, *17* (6), 645-658.
- 8) Ishikawa, H.; Nakamura, Y.; Jo, J.-i.; Tabata, Y., *Biomaterials* **2012**, *33* (35), 9097-9104.
- 9) Fukunaka, Y.; Iwanaga, K.; Morimoto, K.; Kakemi, M.; Tabata, Y., *Journal of controlled release* **2002**, *80* (1-3), 333-343.
- 10) Eura, Y.; Ishihara, N.; Yokota, S.; Mihara, K., *Journal of biochemistry* **2003**, *134* (3), 333-44.
- 11) Kitani, T.; Kami, D.; Matoba, S.; Gojo, S., *J Cell Mol Med* **2014**, *18* (8), 1694-703.
- 12) Murphy, M. P., *The Biochemical journal* **2009**, *417* (1), 1-13.
- 13) Ighodaro, O. M.; Akinloye, O. A., *Alexandria Journal of Medicine* **2018**, *54* (4), 287-293.
- 14) White, E. J.; Clark, J. B., *The Biochemical journal* **1988**, *253* (2), 425-33.
- 15) Chang, J.-C.; Chang, H.-S.; Wu, Y.-C.; Cheng, W.-L.; Lin, T.-T.; Chang, H.-J.; Kuo, S.-J.; Chen, S.-T.; Liu, C.-S., *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2019**, *38* (1), 30.
- 16) Konari, N.; Nagaishi, K.; Kikuchi, S.; Fujimiya, M., *Scientific Reports* **2019**, *9* (1), 5184.

多段階自己集合による2次元ブロック超分子ポリマーの合成

Multistep synthesis of two-dimensional block supramolecular polymers

杉安 和憲

Kazunori SUGIYASU

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

Unlike covalent bond-based organic syntheses, it has remained a challenge to create complex structures using non-covalent bonds such as hydrogen bonding. As the non-covalent syntheses (or molecular self-assembly) permit to build up structures much larger than the molecular level, the development of controlling the weak non-covalent interactions will open a new door in synthetic chemistry. Herein we discuss our recent achievements based on “living supramolecular polymerization” which we have developed in the past 10 years. This method, like living polymerization in polymer chemistry, enables to synthesize supramolecular polymers with controlled length and narrow distribution. Now, we are able to synthesize block supramolecular polymers with controlled composition and sequence of monomers.

1. はじめに

有機・高分子合成化学の発展によって、共有結合の形成や切断、組み替えなどを自在に制御して、複雑な分子骨格を構築することができるようになった。もし同様に、非共有結合の形成や切断、組み替えなどを自在に制御することができれば、新しい物質創出手法として有用であろう。特に、分子レベルよりも大きなスケールで分子集合体を精密合成できれば、メソスコピックスケールの他の物質—例えば、金属ナノ粒子やトップダウン手法で得られるパターン構造、ウィルスなど—と匹敵して相互作用しうる合成分子の創出へとつながり、材料科学や生命科学に大きな波及効果をもたらすと期待される¹⁾。

われわれの研究グループでは、超分子ポリマーの精密合成に関する研究を展開してきた。超分子ポリマーは、モノマー分子が水素結合などの非共有結合によって連結された擬似的なポリマーである。10年ほど前に、われわれは世界で初めてリビング超分子重合に成功し、超分子ポリマーの長さの制御を達成した²⁾。その後、2次元超分子ポリマー（単分子厚みのナノシート）も同様に精密合成できることを実証し、数百ナノメートル四方のナノシートを、その面積や形状を制御して精密合成することに成功した³⁾。

以上のようにして推進した超分子ポリマーの精密合成は、超分子化学と高分子化学との間にあった垣根を取り払い、新しい重合体を合成するための強力な手法として大きく発展していくと期待している。ここでは、さらに高度化されたリビング超分子重合について紹介する。

2. アルキメデススパイラル

有機溶媒中においてポルフィリン分子 1_{zn} は、ポルフィリン環の π スタッキングやアミド基間の水素結合を介して一次元の超分子ポリマーを形成する。ドデカンなどの脂肪族溶媒を用いると、側鎖のフルオロアルキル基を隠すように

超分子ポリマーがフォールディングし、アルキメデススパイラルと呼ばれる構造を形成した（図2上）⁴⁾。温度可変吸収スペクトル測定によってアルキメデススパイラルの形成過程を追跡した結果、核形成温度が確認された。すなわち、アルキメデススパイラルは、核形成—伸長メカニズムによって成長することが明らかとなった。

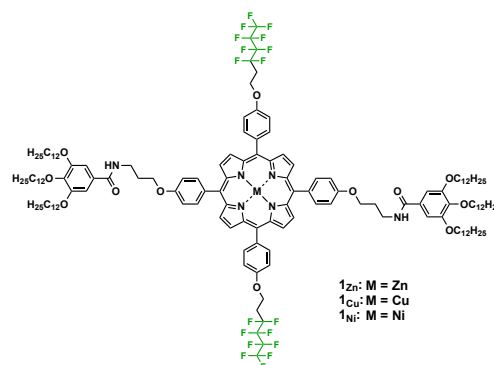


図1 モノマー分子の構造

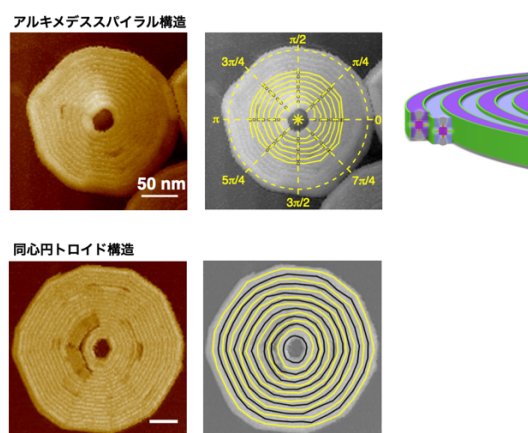


図2 アルキメデススパイラル構造と同心円トロイド構造

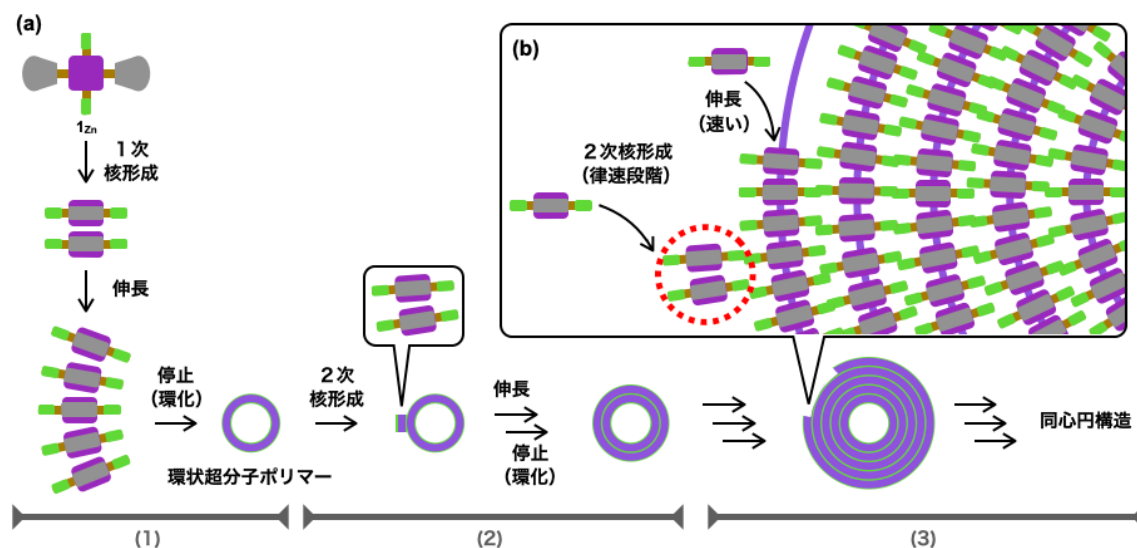


図3 同心円トロイド構造の形成メカニズム

モノマーの濃度を変えながら同様の実験を行ったところ、高濃度 (10~15 μM) 条件下と低濃度 (2.5~7.5 μM) 条件下とは、スペクトル変化の挙動がわずかに異なることが明らかとなった。低濃度条件下ではアルキメデススパイラルとは異なる構造が形成されていると考えられたため、その溶液をHOPG基盤にスピナーティングし、AFM観察を行った。その結果、アルキメデススパイラルと似た円形のナノシート構造が確認されたが、その構造を詳しく観察すると、環状超分子ポリマー (トロイド) が同心円状に多数集積していることが明らかとなった (図2下)。

アルキメデススパイラルと同心円トロイドは、結晶多形のようなものであると考えられるが、分子レベルでの集積構造 (ポルフィリン環の集積様式やアミド基の水素結合様式) にはほとんど違いがない。メゾスコピックスケールにおいて構造が異なるという点で、珍しいタイプの多形であると考えられ、それらを作り分けられるということは分子集合体の精密合成化学という観点から大きな意義がある。

3. 同心円トロイド構造の精密合成

3-1. 同心円トロイドの精密合成

同心円トロイド構造は、多数のトロイド構造が同心円状に集積して形成されているため、その形成メカニズムは、一般的な分子の自己集合メカニズムとは異なる。同心円トロイド構造は以下のようなプロセスで成長したと考えられる。カッコ内の数字は図3下部のそれと対応する。

(1) モノマーの核形成を経て1次元の超分子ポリマーが伸長する。環が閉じることによって超分子重合は停止する (曲率の起源は明らかになっていない)。

(2) 生成した環状超分子ポリマーの界面で2次核形成が起こり、1つ目の環状超分子ポリマーに沿って2つ目の環状超分子ポリマーが伸長する。この際、フルオロアルキル鎖の疎溶媒効果が働いていると考えられる。環が閉じることによって重合が停止する。

(3) (2)を繰り返すことで同心円構造が成長する。2次核形成は同心円構造の内側でも起こるが、直径が約20 nmよりも小さな環状超分子ポリマーは確認されていない。曲率が大きくなりすぎるためであると考えられる。結果として、同心円構造の中央には直径が約20 nm程度の穴が残る。

すなわち、モノマーがいつぱんに集まって同心円構造を形成するわけではなく、その自己集合プロセスはいくつかの素過程に分解することができる。

通常、2次核形成速度は伸長速度に比べて著しく小さい (図3b)。同心円構造が成長する過程 (3) に注目すると、2次核形成→伸長→停止→2次核形成・・・という一連のプロセスにおいて律速段階となるのは2次核形成である。ちなみに同心円構造の成長のタイムスケールは10分強であり、一般的な自己集合に比べてかなり遅い。したがって、ここに速度論的制御を持ちこんで、同心円トロイド構造を精密合成できる可能性がある。

サンプル瓶に1Znのトルエン溶液をいれ、その上にドデカン (1Znの貧溶媒) を静かに重ねた。これを素早く混合することによって1次核形成を誘起し、その溶液を室温で静置した (図4a)。吸収スペクトルの時間変化を追跡しながら、数分ごとにAFM観察用のサンプルを調整した。AFM画像から求めた同心円構造の数平均面積 (A_n) を吸収スペクトルの変化量から求めたモノマーの“反応進行度”に対してプロッ

トすると直線関係が得られた (図4b)。各サンプルにおいて重量平均面積と数平均面積の比 (A_w/A_n) は約1.2であった。また、モノマーが完全に消費された後で新たにモノマーのトルエン溶液を添加すると同心円構造はさらに大きく成長した。これらの結果は、同心円構造がリビング重合のようなメカニズムによって自己集合が進行したことを示している。以上のように、同心円トロイド構造のようなユニークな構造においても、その形成プロセスを速度論的に制御することによって、リビング超分子重合が可能であることが示された⁴⁾。

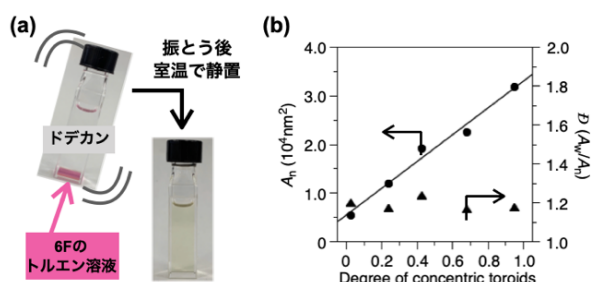


図4 (a) 同心円トロイドの精密合成法 (b) 反応進行度と同心円トロイドの面積の相関および多分散度 (A_w/A_n)

3-2. ブロック同心円トロイドの精密合成

リビング重合ができるのであれば、ブロックポリマーを合成できるはずである。われわれは、 1_{Zn} の他に銅錯体とニッケル錯体の 1_{Cu} および 1_{Ni} を合成し、これら3種類のモノマーを用いて、ブロック超分子ポリマーの合成を試みた⁵⁾。

前項目3-1で合成したサイズの揃った 1_{Zn} の同心円トロイド構造のドデカン溶液に対して、 1_{Cu} のトルエン溶液を混合し、静置した。吸収スペクトル測定の結果、 1_{Cu} がモノマー状態から会合体へと変化したことがわかった。また、AFM観察によって、同心円トロイド構造の面積が大きくなっていることが明らかとなった。すなわち、 1_{Zn} の同心円トロイド構造をタネとして 1_{Cu} のトロイド構造が成長したと考えられた。

走査透過電子顕微鏡によって元素マッピングに成功した。図5に示す通り、亜鉛原子(紫色)を含む同心円トロイド構造の周辺部に銅原子(緑色)を含む同心円トロイド構造が確認された。

非常に興味深いことに、 1_{Cu} の同心円トロイド構造は、 1_{Zn} のその外縁部ではなく内縁部に成長していた。当初、 1_{Zn} の同心円トロイド構造は、外縁部も内縁部ともにフルオロアルキル基で覆われているため、いずれの界面も2次核形成部位として働くと考えていた。しかしながら実際には、 1_{Zn} の同心円トロイド構造の内縁部のみで選択的に 1_{Cu} の同心円トロイド構造が成長していることがわかった。おそらく、外縁部と内縁部では界面の曲率が異なり、フルオロアルキル基がより密集した内縁部の方が、2次核形成を引き

起こす界面として適しているのであろう。同様の手法によって 1_{Ni} を用いてブロック構造を得ることも可能であった。

以上のように、段階的な自己集合によって、高分子化学におけるブロックポリマーのように2種類のモノマーからなる超分子集合体を得ることができた。しかしながら、図5から分かる通り、2種類のモノマーの組成比を制御して合成することはできなかった。

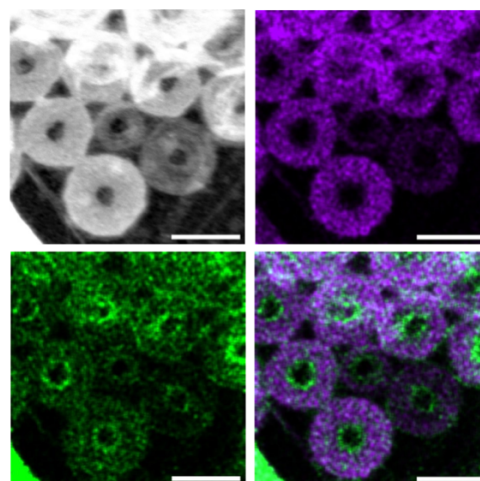


図5 1_{Zn} と 1_{Cu} からなるブロック状同心円トロイド構造の走査透過電子顕微鏡 (スケールバーは200 nm) : 紫色で亜鉛原子を、緑色で銅原子をマッピングした

そこでわれわれは新たなアプローチをとることとした。 1_{Zn} の同心円トロイド構造にルイス塩基を加えると亜鉛金属への軸配位によって同心円トロイド構造が部分的に分解する。こうして得られた 1_{Zn} の同心円トロイド構造をタネとして 1_{Cu} の同心円トロイド構造を成長させることによって、 1_{Zn} と 1_{Cu} の組成比を制御できると考えた。

図6に示す合成スキームによって多段階精密合成を行った。まず、3-1で合成したサイズの揃った 1_{Zn} の同心円トロイド構造のドデカン溶液に*N,N*-ジメチルアミノピリジン (DMAP) を添加した。図7に示すように同心円トロイド構造の中心部の穴が大きくなるように、内側から分解していくことがわかった。

こうして得られた穴の大きな同心円トロイド構造に対して 1_{Cu} のトルエン溶液を添加したところ、 1_{Zn} と 1_{Cu} の組成比が異なるブロック構造を得ることができた (図7)。さらに、 1_{Cu} のトルエン溶液に引き続いて、 1_{Ni} のトルエン溶液を添加した場合には、 $1_{Zn}/1_{Cu}/1_{Ni}$ からなるトリブロック構造の合成も可能であった。この場合、 1_{Cu} と 1_{Ni} の添加の順序を入れ替えれば、トリブロック構造内部における配列の制御も可能であった。

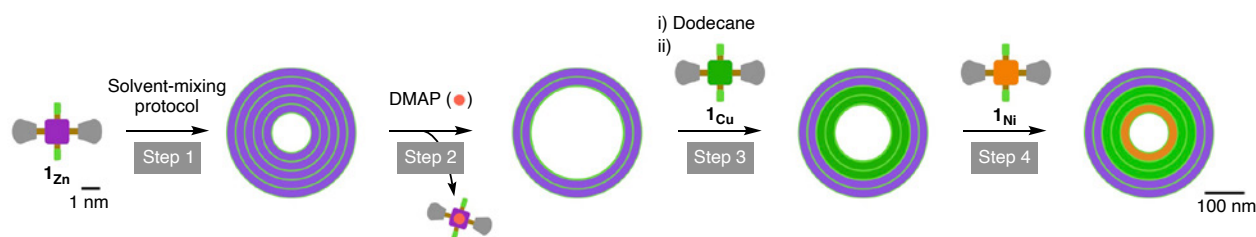


図6 多段階自己集合によるブロック状同心円トロイド構造の精密合成

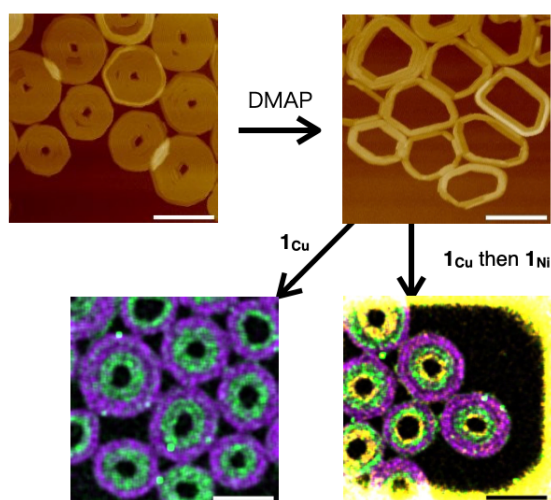


図7 Step2およびStep3の後に得られた同心円トロイド構造のAFM像(上)と走査透過電子顕微鏡像(下)：紫色で亜鉛原子を、緑色で銅原子を、黄色でニッケル原子をマッピングした

4. 最後に

本研究によって、有機・高分子合成と分子の自己集合との類似性が示された。非共有結合に基づいた自己集合プロセスにおいても、速度論の支配下において段階的に“反応”を進めることが可能であり、こうして複数成分からなる高次構造を合成できることが示された。

謝辞

共同研究者である物質・材料研究機構の佐々木紀彦博士(現 鳥取大学助教)、今村澄氏、吉川純主幹研究員、竹内正之グループリーダー、名古屋大学の内橋貴之教授、石井義記氏に感謝いたします。また、科学研究費補助金(19K05592、20H04682、JP22H02134)、公益財団法人泉科学技術振興財団、公益財団法人池谷科学技術振興財団、公益財団法人村田学術振興財団、積水科学自然に学ぶものづくり研究助成プログラム、公益財団法人三菱財団、および日本化学繊維研究所からの研究助成に深謝いたします。

参考文献

- 1) a) Wehner, M. & Würthner, F. Supramolecular polymerization through kinetic pathway control and living chain growth. *Nat. Rev. Chem.* **4**, 38–53 (2020); b) Besenius, P. Controlling supramolecular polymerization through multicomponent self-assembly. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **55**, 34–78 (2017); c) Vantomme, G. & Meijer E. W. The construction of supramolecular systems. *Science* **363**, 1396–1397 (2019); d) Dong, Y. et al. Multistep molecular and macromolecular assembly for the creation of complex nanostructures. *Chem. Phys. Rev.* **3**, 021305 (2022).
- 2) Ogi, S., Sugiyasu, K., Manna, S., Samitsu, S. & Takeuchi, M. Living supramolecular polymerization realized through a biomimetic approach. *Nat. Chem.* **6**, 188–195 (2014).
- 3) a) Fukui, T. *et al.* Control over differentiation of a metastable supramolecular assembly in one and two dimensions. *Nat. Chem.* **9**, 493–499 (2017); b) Sasaki, N., Yuan, J., Fukui, T., Takeuchi, M. & Sugiyasu, K. Control over the aspect ratio of supramolecular nanosheets by molecular design. *Chem. Eur. J.* **26**, 7840–7846 (2020).
- 4) Sasaki, N. *et al.* Supramolecular double-stranded Archimedean spirals and concentric toroids. *Nat. Commun.* **11**, 3578 (2020).
- 5) Sasaki, N. *et al.* Multistep, site-selective noncovalent synthesis of two-dimensional block supramolecular polymers. *Nat. Chem.* **15**, 922–929 (2023).

機械学習を用いた小角散乱データ解析

Small-angle Scattering Analysis using Machine Learning

古賀 毅・川瀬 温士

Tsuyoshi KOGA, Atsushi KAWASE

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

Small-angle scattering methods are widely used to study various kinds of structures formed in polymer systems. The purpose of this research is to construct a machine learning model using deep learning that can estimate the shape of a corresponding object in real space when scattering data is given. First, we built a deep learning model that can correctly classify scattering data for typical shapes such as spheres and ellipsoids. We applied this model to scattering data of a silica particle dispersion system and showed that this model can correctly classify the shape of experimental data as well.

1. 緒言

小角散乱法は、試料内の散乱長密度の空間的揺らぎによる中性子やX線の散乱から生じる干渉パターンを測定する手法である。この手法により、溶液中のポリマーの拡がり、水溶液中のタンパク質の大きさや高次構造、ミセルの構造などのナノスケール構造を非破壊で観察することができる。散乱法は、高分子物性の解析にも広く用いられており、ナノスケールの複雑な構造に対する情報を得ることができる。しかし、小角散乱データを解析する場合、散乱プロファイルを適切な散乱モデルに適合させる必要がある。従来、このプロセスは経験豊富な研究者の専門知識と直感に頼っており、この分野に新しく参入する研究者にとっては大きなハードルとなってきた。

このような課題を解決するために、本研究ではFig.1に示すように、フィッティングプロセスにインフォーマティクスを取り入れることを試みる。小角散乱データ解析にインフォーマティクスを導入する試みは幾つか行われており¹⁻³⁾、文献1)では幾つかの分類器を用いた解析を行い、ランダムフォレストが最も高精度であったと報告されている¹⁾。本研究では、先行研究で採用されていない畳み込みニューラルネットワーク(CNN)を用いて精度の改善を試みる。また、先行研究では分類精度のみが議論され、機械学習が何を根拠に分類したかどうかまでは検討されていなかったが、本研究では、分類過程を可視化するアルゴリズムであるGrad-

CAM⁴⁾を適用することで、結果の解釈を説明できる手法を取り入れた機械学習モデルの開発を行う。

本研究では、まず散乱プロファイルが与えられた場合に、対応する実空間の物体の形状を推定することができる機械学習モデルを開発する。

さらに、このモデルをシリカ粒子分散系の散乱データに適用し、モデルにより実験データに対しても正しく形状を分類できるかを検証する。実験データは、京都大学量子ビーム分析アライアンスの竹中幹人教授、宮崎司教授、柴田基樹助教に提供して頂いた⁵⁾。

なお、散乱モデルの散乱関数は、一般に形状因子と構造因子で構成されるが、本研究では形状因子のみを対象とする。実験用いたシリカ粒子分散系もエタノール中に分散した0.1 wt%のシリカ粒子を含む希薄溶液である。構造因子を含む高次構造への展開についてはまとめて述べる。

2. 機械学習モデルの構築

はじめに、散乱曲線が与えられた場合に、対応する実空間の物体の形状を推定することができる機械学習モデルを開発した。例えば、SasView⁶⁾のような小角散乱解析ソフトウェアには40種類以上の散乱曲線の理論モデルがあるが、本研究では、解析に一般的に使用される5つの散乱モデル(円柱形、円盤形、球形、扁平回転楕円体、長形回転楕円体)を候補とした。Fig. 2はそれらの形状に対する散乱プロファイルの例を示している。この問題を機械学習の観点から考えると、5つの異なるクラスを分類するタスクと捉えることができる。機械学習モデルを開発する主要なステップとして、データ生成、データ前処理、モデルの構築および性能評価がある。

2-1. データ生成

データ生成のステップでは、SasView⁶⁾という、小角散乱解析に特化したGUIアプリケーションを用いた。SasView内のsasmodelsツールを使用して、円柱形、円盤形、球形、扁平回転楕円体、長形回転楕円体の理論モデルを選択して

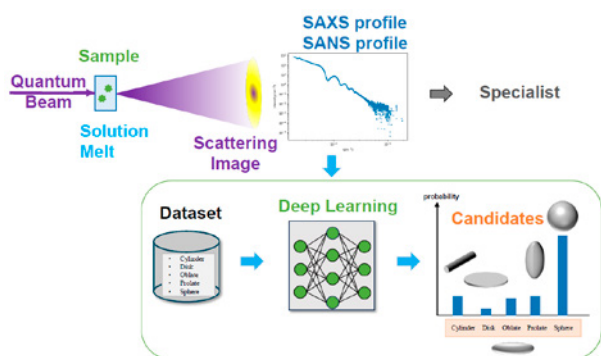


Fig. 1 Schematic diagram showing the concept of this study.

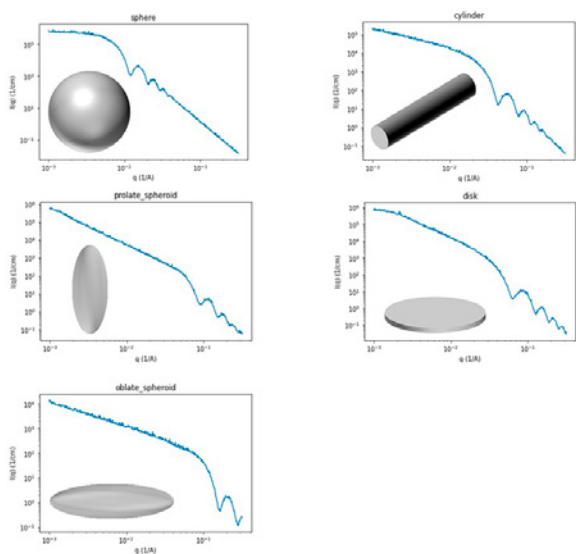


Fig. 2 The scattering profiles of the five models.

散乱データを生成した。これらのモデルはPythonファイルとして実装されており、 (x, y) 曲線を作成することができる。ここで、 x は散乱ベクトル $q \text{ nm}^{-1}$ を、 y は散乱強度表す。

散乱ベクトル q 、粒子の散乱長密度、および溶媒の散乱長密度の範囲は、シリカ粒子分散系に基づいて設定した。半径、長さ、多分散度、アスペクト比などのパラメータは、Numpyパッケージを使用してランダムに割り当てた。また、散乱曲線にノイズを付与した。このような方法で、各モデルにつき4,500曲線の計22,500データポイントから成るデータセットを作成した。

2-2. データ前処理

生成された散乱曲線に対して、 x と y の両方を対数にし、両対数の散乱曲線に対して平滑化処理と微分処理を施した。平滑化および微分の手順はScipyパッケージのSavitzky-Golayフィルターによって実装され、散乱データは、対応する散乱体の形状因子に基づいてラベル付けした。そして、ラベル付きデータセットは表データとしてCSV形式で保存した。後の解析のために、データセットをトレーニングセット (15,000データポイント) とテストセット (7,500データポイント) に分割し、トレーニングデータに対してはさらに、深層学習モデルのパラメータを最適化するために訓練用セットと検証用セットに分割した。

2-3. 深層学習モデルの構築

1次元畳み込みニューラルネットワーク(1D-CNN)と呼ばれる深層学習モデルを構築した。1D-CNNは特に一次元のスペクトルデータに適しており、疎なデータを処理するためのCNNである⁷⁾。このモデルは、学習データの入力層、データの特徴を抽出する畳み込み層、分類を行う全結合層、そして分類された形状を出力層で構成されている。最

も高い分類精度を実現するために1D-CNNのパラメータを調整し、モデルの最適化を行った。データの前処理とモデルの構築の一連の流れをFig.3に示す。

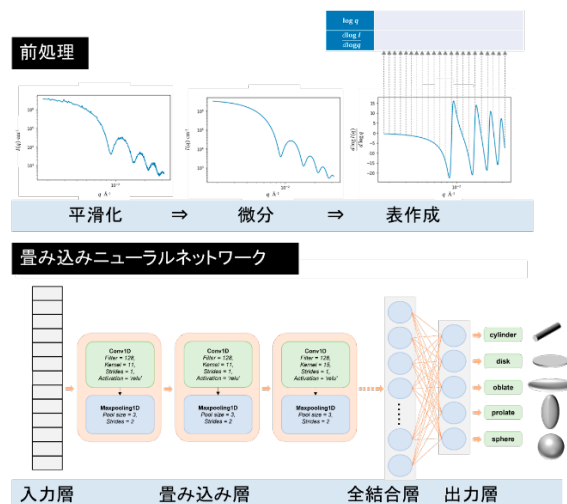


Fig. 3 Data preprocessing and work flow of this study.

2-4. モデルの評価

トレーニングセットとテストセットに対して、機械学習による分類を行ない、4つの指標 (Precision、Recall、F1-score、Accuracy) で機械学習モデルの評価を行なった。Table 1 では、トレーニングデータセットとテストデータセットの分類精度を示しており、トレーニングデータに対して、Accuracyが96%、テストデータに対してAccuracyが94%が示された。トレーニングデータセットのAccuracyよりテストデータセットのAccuracyの方が値が小さいので、モデルが過学習していないことが示された。各形状クラスについて計算されたPrecision、Recall、およびF1-scoreは、すべての形状因子で一貫して高いスコアを示した。

2-5. Grad-CAMを用いた深層学習の可視化

説明可能AIの一つであるGrad-CAM⁴⁾を使用して、モデルがクラス分類を行う際の根拠を示すヒートマップを生成した。Grad-CAMは、モデルの最終畳み込み層からの勾配情報を使用し、これらの勾配をスペクトルデータ内の各周波数バンドごとに重み付けをして集約するというアルゴリズムが使用されている⁴⁾。ヒートマップは、散乱データにおいてどの領域が分類において重要だったかを示している。

Fig.5では、ランダムに選ばれたテストデータに対するGrad-CAMヒートマップを示す。これらのデータは95%以上の分類精度があるものの中からランダムに選んだ。ヒートマップの値は、1D-CNNが前処理された学習データで強く認識した領域を示している。

Table 1 Confusion matrix for the CNN model.

Matrix	Training Dataset						Testing Dataset					
	Cylinder	Disk	Oblate	Prolate	Sphere	Average	Cylinder	Disk	Oblate	Prolate	Sphere	Average
Precision	1	0.98	0.97	0.96	0.91	0.96	0.98	0.98	0.95	0.88	0.9	0.94
Recall	0.92	0.94	0.98	0.97	1	0.96	0.92	0.93	0.96	0.95	0.91	0.94
F1-Score	0.96	0.96	0.98	0.96	0.95	0.96	0.95	0.95	0.96	0.91	0.91	0.94
Accuracy	0.96						0.94					

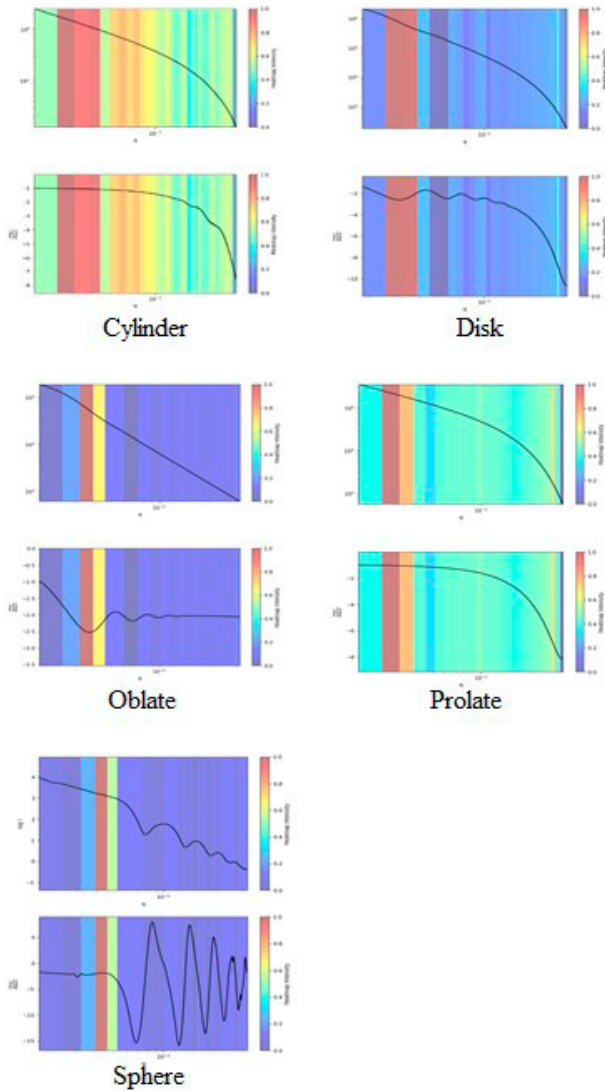


Fig. 4 Grad-CAM heatmap for scattering profiles of each objects.

ヒートマップの強度が1に近いほど、その領域が重要であることを示す。**Fig.5**は上のグラフは元の未処理の散乱データを示し、下のグラフは前処理された散乱データを示す。結果はすべてのクラスにおいてある特定の小角領域において高いヒートマップの強度（赤色など）を示していることが分かる。つまりこの波数領域が分類プロセスにおいて重要であることを示す。この波数領域は**Fig.5**に示す形状異方性領域に対応すると考えられる。形状異方性領域では、散乱プロファイルのべき指数が形状異方性に強く依存しており、次のように表すことができる。

$$I(q) \sim q^{-p} \quad (1)$$

$$\frac{d \log I(q)}{d \log q} = -p \quad (2)$$

式(1)および式(2)に示されているように微分操作をすることで、べき指数 p を抽出することができる。したがって、データの前処理で行なった平滑化、および微分により1D-CNNは形状異方性領域を効果的に認識できたことが考えられる。

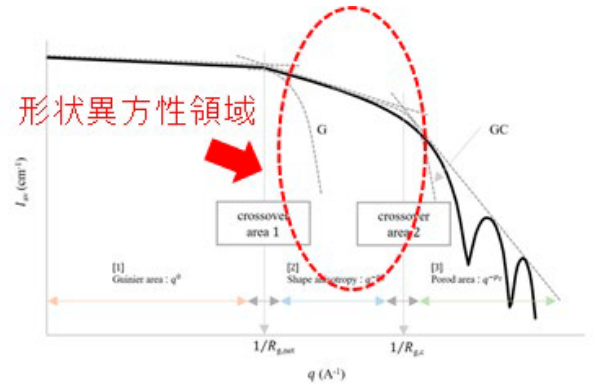


Fig. 5 Schematic figure of power law in small-angle scattering profile.

3. シリカ粒子分散系の散乱データ適用への適用

前節までに構築した機械学習モデルを、シリカ粒子分散系（濃度0.1 wt%，溶媒エタノール）の中性子小角散乱データ⁵⁾に適用した。

3-1. シリカ粒子分散系の散乱データの分類結果

Fig.6は1D-CNNのソフトマックス関数の出力値を示すグラフを示す。x軸は分類ラベルの名前に対応し、y軸は確率値を表しており、全てのクラスの確率値の総和が1になる。グラフより球である確率が1に近いことが分かった。つまり、94%の分類精度でトレーニングされた1D-CNNモデルにより、シリカ粒子分散系の散乱データの形状因子が球であると正確に予測できた。

3-2. Grad-CAMを用いた深層学習の可視化

Fig.7のシリカ粒子分散系の散乱プロファイルのヒートマップにおいても、他の形状因子のヒートマップと同様に特定の小角領域において強度が大きく現れていることが分かった。このことから1D-CNNモデルが散乱プロファイルの形状異方性を認識していることが確認できた。

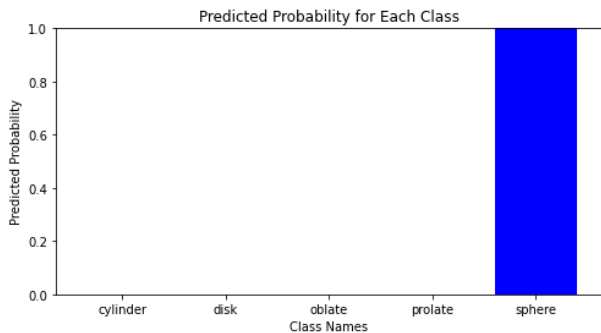


Fig. 6 The probability values of the model objects for the silica particle dispersion.

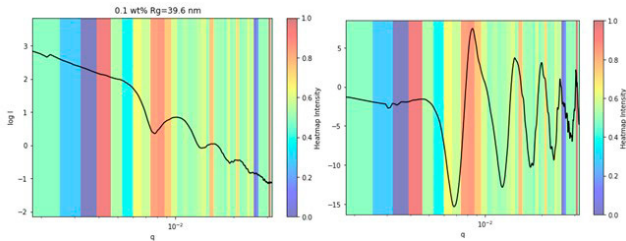


Fig. 7 Grad-CAM heatmap for scattering profiles of the silica particle dispersion.

4. まとめと展望

小角散乱データ解析に機械学習を活用することで、実験データから実空間での散乱体の形状を自動的に予測できる手法の構築を目的として研究を行った。

ニューラルネットワークを用いて小角散乱曲線の特徴を抽出することのできる手法を開発し、形状因子については100%に近い精度で分類ができることを示した。

本研究により、専門家の経験による部分が大きかった小角散乱データの解析において、実験データから自動的に実空間での形状を提示するシステムの構築が可能となるので、研究分野において精密な自動解析技術を提供するという学術的意義だけでなく、量子ビーム解析の産業利用の促進という観点から産業的な意義も大きいと考えられる。

本研究では、特定の候補の中から適切な形状因子を予測するモデルを開発したが、構造因子を考慮しておらず、高分子ミセルなどの階層構造を有する系⁶⁾に適用するにはまだ十分ではない。近年は生成AI等のAI技術の進化がめざましいが、そのような技術を用いながら、特定の散乱モデルに限定されずに散乱体の構造を予測することができるツールを開発することが我々の今後の課題である。将来的には、散乱データの解析にとどまらず、マテリアルズ・インフォマティクスや計測インフォマティクスとも融合して、新規材料開発において有効な手法として発展させることが重要であると考えられる。

参考文献

- 1) C. Do, W.-R. Chen, S. Lee, *MRS Advances*, **5**, 1577 (2020).
- 2) P. Tomaszewski, S. Yu, M. Borg, J. Ronnols, *2021 Swedish Workshop on Data Science (SweDS)* (2021): 1-6.
- 3) D. Franke, C. M. Jeffries, D. I. Svergun, *Biophysical Journal*, **114**, 2485 (2018).
- 4) R. R. Selvaraju, M. Cogswell, A. Das, R. Vedantam, D. Parikh, D. Batra, *Inter. J. Comp. Vision*, **128**, 336 (2020).
- 5) M. Shibata, T. Miyazaki, M. Takenaka, (private communication).
- 6) SasView: <https://sasview.github.io/>
- 7) S. Kiranyaz, O. Avci, O. Abdeljaber, T. Ince, M. Gabbouj, D. J. Inman, *Mechanical Systems and Signal Processing*, **151**, 107398 (2021).
- 8) T. Koga, F. Tanaka, R. Motokawa, S. Koizumi, F. M. Winnik, *Macromolecules*, **41**, 9413 (2008).

ポリマーブラシ付与セルロースナノクリスタルの精密合成と自己組織化

Precise Synthesis and Self-Assembly of Polymer-Brush-Modified Cellulose Nanocrystals

辻井敬亅・藤本清太郎・黄瀬雄司

Yoshinobu TSUJII, Seitarou FUJIMOTO, Yuji KINOSE

Institute for Chemical Research, Kyoto University

Cellulose nanocrystal (CNC), obtained by the hydrolysis of cellulose nanofibrils, is a rod-shape nanoparticle with aldehyde groups (hemiacetals) at its one end (reducing end) and hydroxy groups on the other surfaces. This unique chemical structure allows regioselective chemical modification. Our expectation was that by introducing a high-molecular-weight polymer brush at the reducing end and a low-molecular-weight polymer brush on the other surfaces (resulting in asymmetric polymer-brush-modified CNC), novel ordered structures could be formed because of high compression resistance and extremely low friction of the concentrated polymer brushes. In this study, we have developed a new synthetic route and clarified the assembled structure at the gas-liquid interface of asymmetric polymer-brush-modified CNC.

1. 緒言

コロイド粒子が形成する秩序構造は、粒子単体やその無秩序な集合体では発現しえない様々な特性・機能（センシング、光学的特性など）を有するため、その制御や形成機構の理解は重要である[1, 2]。

枯渴力や静電相互作用により生じる粒子間引力はコロイド結晶の形成に大きな影響を与えるが、斥力のみでもコロイド結晶が生成することが知られている。例えば、斥力相互作用のみが働くコロイド分散液の濃度がある臨界点を超えるとき、球状粒子ではコロイド結晶への（Kirkwood–Alder転移）、棒状粒子では等方相からネマチック相への（Onsager転移）相転移が生じる。これらの相転移過程で、配置/配向エントロピーの減少と同時に並進エントロピーが増大し、結果、系全体のエントロピーが増大することで自発的な秩序構造の形成が達成される。

このような相転移は、剛体球ポテンシャルを有するハード系コロイドや静電的斥力ポテンシャルを有するソフト系コロイドのみならず、セミソフト系コロイドと呼ばれる濃厚ポリマーブラシ（CPB）が導入された複合微粒子においても生じる[3]。CPBは、良溶媒中で高い浸透圧を起源とする高伸長特性や高反発特性、極低摩擦特性を示すため、CPB付与複合微粒子は高濃度条件下でも高い分散性、運動性を維持する。実際、不揮発性溶媒を添加した球状複合微粒子は、共溶媒の揮発操作のみで平衡状態とみなせるコロイド結晶を形成する[4]。これまで、球状粒子やシリンダー状粒子[5]、平板粒子等[6]、様々な形状のセミソフト系コロイドによる秩序構造の形成が達成されてきたが、粒子に導入されたポリマーブラシの長さが非対称的なセミソフト系コロイド粒子に関する報告はなかった。そこで我々は、棒状微粒子に付与するCPBの鎖長を非対称とした新たな

設計のセミソフト系コロイド粒子（非対称的ポリマーブラシ付与ロッド）の合成を企図した。この粒子は、主たる側面の短鎖ポリマーブラシにより高い分散性、運動性を獲得するとともに、棒状部の排除体積効果に由来する配向・並進エントロピー変化に加えて、片末端に導入された長鎖ポリマーブラシが形成する球状の排除体積効果や配座エントロピー変化も寄与する新規秩序構造の形成が期待される。

本研究では、非対称的ポリマーブラシ付与ロッドの合成経路の開発を目指し、セルロースナノフィブリルを加水分解して得られるセルロースナノクリスタル（CNC；Figure 1a）をコア粒子に採用した。CNCは棒状で異方性が高く表面に水酸基が露出している。加えて、片末端に還元性を有するヘミアセタール構造が集積しているため、位置選択的な化学修飾が可能である。これらを活用した位置選択的なポリマーブラシの導入により[7]、CNCをコア粒子とした非対称的ポリマーブラシ付与ロッド（asymmetric polymer-

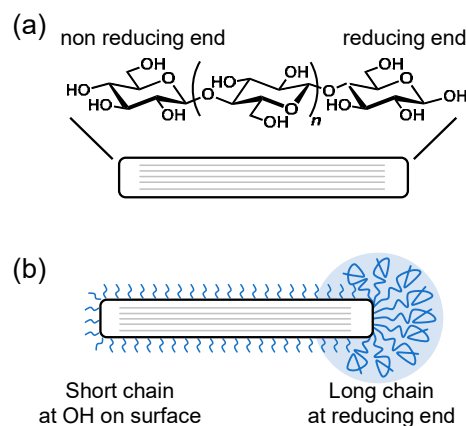


Figure 1 Schematic illustration of CNC (a) and aPB-CNC (b).

brush-modified CNC; aPB-CNC) の実現が期待される (Figure 1b)。

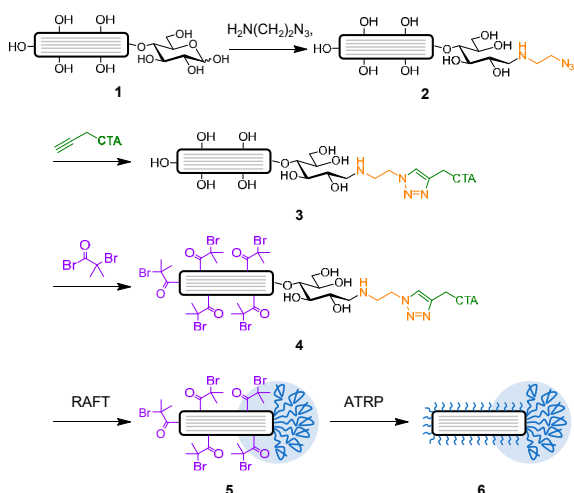
本稿では、新たに確立したaPB-CNCの合成経路の詳細に加えて、3次元秩序構造の探索に先立ち、気液界面（2次元系）における表面圧 (π) ー面積 (A) 等温線測定の結果に基づき、aPB-CNC水面単分子膜の圧縮過程における構造形成について議論する。

2. aPB-CNCの合成

本研究では、還元性末端とその他側面に分子量あるいはポリマー種の異なるポリマーブラシを系統的に付与する、汎用性の高いaPB-CNCの合成ルートの確立を目指した。合成戦略をScheme 1に示す。鍵は、ポリマーブラシ形成にgrafting-from法を適用するためのCNC二官能開始剤の設計にあり、還元性末端とその他側面に、活性化機構が異なり独立実施可能な制御ラジカル重合の開始基（ドーマント基）を導入することにある。具体的には、制御ラジカル重合法として、適用範囲の広い可逆的付加開裂連鎖移動（RAFT）重合および原子移動ラジカル重合（ATRP）を用いることとした。また、還元性末端へミアセタール基の反応性および生成ポリマーブラシの立体反発等を考慮し、その他側面に先行して、還元性末端部へドーマント基およびポリマーブラシを導入すべく、RAFT基を還元性末端に、ATRP開始基を表面水酸基に導入することを計画した。

2-1. 二官能開始剤の合成

セルロースナノクリスタルの調製：既報を参考に、濾紙を小片に切り分け、硫酸（64%）中、50℃で加水分解した後、脱イオン水で希釈・分散し、遠心分離、次いで、超音波処理再分散／透析にて精製し、CNC（1）を得た。得られたCNCは水中で良好に分散しており、続く表面改質に適したものであると判断した。



Scheme 1 Synthetic route of asymmetrically polymer-brush-modified CNC.

前駆体アジド基の導入：還元性末端への置換基の導入に際し、銅を触媒としたアジドアルキン環化付加（CuAAC）反応を行うため、CNCの還元性末端へのアジド基の導入を試みた。反応剤である2-azidoethylamineは、C/Nが1の有機アジドであり爆発性が高いため、脱イオン水中で2-chloroethylamine hydrochlorideとNaN₃から合成した後、精製・単離せず、続く反応に用いた。既報[8]を参考に、pHを酢酸で4に調整したCNC分散液に、前記2-azidoethylamine水溶液と2-picolineboraneを添加し、反応させた。生成物を透析にて精製し、アジド化CNC（2）を得た。

CNCの残存アルデヒド基の定量を行った結果、反応前のCNCは23 $\mu\text{mol/g}$ のアルデヒド基を有していたが、反応後は9 $\mu\text{mol/g}$ まで減少していた。また、精製物のIRスペクトル（Figure 2）ではアジド由来のピークを2125 cm^{-1} に確認した。これらの結果より、還元的アミノ化により、CNCが有するヘミアセタール構造の約60%にアジド基が導入されたことが明らかとなった。還元性末端表面の単位面積あたりに換算すると、1.3 groups/ nm^2 となり後段の制御ラジカル重合によるCPB形成に十分な密度であると判断した（次ステップの高い反応収率を想定）。

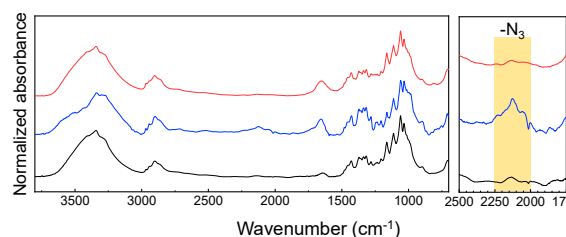


Figure 2 IR spectra for CNC (1, black curve) and its derivatives 2 and 3 (blue and red curves).

クリック反応によるRAFT基導入：既報を参考に[10]、CH₂Cl₂中、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride、4-dimethylaminopyridine (DMAP)存在下、室温で、4-cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentanoic acid (CTA)とpropargyl alcoholを反応させ、分液／カラムクロマトグラフィーにて精製し、生成物（HC≡CCH₂-CTA）を得た。

次いで、2の水分散液をトルエンとの共沸にてN-methylpyrrolidone (NMP)に溶媒置換した後、Ar置換条件にて、CuSO₄·5H₂OとL-ascorbic acid sodium saltを用いて、HC≡CCH₂-CTAとのCuAAC反応を室温で行った。反応液を透析膜にて精製し、CTA付与CNC（3）を得た。

合成された3のIRスペクトルでは、前駆体2に存在していたアジド由来のピークが消失していたため、CuAAC反応を経由する合成経路により位置選択的かつ高密度にCNC末端にCTAが導入されたと結論した（1.3 groups/ nm^2 ）。

ATRP開始基の付与：3のその他側面の残存水酸基へのATRP開始基の導入を行うため、エステル化反応を行った。具体的には、脱水NMP中、pyridineとDMAP存在下、3を2-

bromoisobutryl bromideと室温で反応させた後、遠心分離にて精製した。精製物のIRスペクトルにおいてATRP開始基のカルボニル炭素由来のピークが 1750 cm^{-1} に現れており (Figure 3)、二官能開始剤4の生成を確認した。なお、元素分析の結果、臭素の含有率が9.0%であり、CNC表面の水酸基の50%がATRP開始基で置換されたと算出された。CNC側面における開始基密度は 1.5 group/nm^2 となり、CPB形成に十分な値であると判断した。

以上、還元性末端およびその他側面に異なる機構の制御ラジカル重合ドーメント基が導入されたCNC二官能開始剤の合成に成功した。

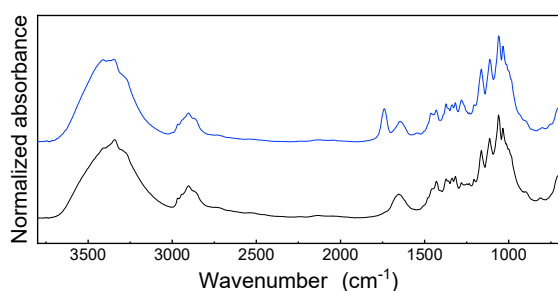


Figure 3 IR spectra for 3 and 4 (black and blue curves).

2-2. CNCへの位置選択的ポリマーブラシ付与

4を二官能開始剤として、methyl methacrylate (MMA) のRAFT重合とATRPによる表面開始グラフト重合を逐次実施し、還元性末端およびその他側面に分子量の異なるPMMAブラシを導入した。具体的な重合手順は以下のとおりである。

RAFT重合: NMP中、CNC二官能開始剤4とともに、2,2'-azobis(isobutyronitrile)とCTAを加えて、Ar雰囲気下、MMAのRAFT重合を行った。重合後、遠心分離にて精製し、5を得た。

ATRP: NMP中、5とともに、ethyl 2-bromoisobutyrateを加え、Ar雰囲気下、CuCl/CuCl₂/4,4'-dinonyl-2,2'-bipyridyl触媒系にてMMAのATRPを行った。重合後、遠心分離にて精製し、6を得た。

Table 1に、CNC二官能開始剤に導入されたPMMAブラシの分子鎖特性を示す。なお、数平均分子量 M_n および分散 D は、ポリマーブラシ合成時に生成したフリーポリマーをサイズ排除クロマトグラフィーで評価した値を用いた (遊離ドーメント剤共存下での表面開始制御ラジカル重合では、分子量に関して、生成するフリーポリマーがグラフトポリマーのよい指標となることが実証されている)。後述する6のTEM画像 (Figure 4) からCNCのサイズ (幅: 10 nm、長さ: 200 nm) を、IRスペクトルから各重合により導入されたPMMAブラシの重量分率を見積もり、前記の M_n 値を用いてグラフト密度 (σ) を計算した。還元性末端とその他側面のいずれにおいても、グラフト密度は 0.2 chains/nm^2 を超

え、表面占有率に換算すると0.1以上と濃厚ブラシ領域に達しており、PMMAブラシが高密度で導入されたことが判明した。Figure 4に合成された6の単分子膜のTEM画像を示す。長さ200 nm程度の棒状の白い影はCNC骨格に帰属され、それらは互いに分散していた。これは高密度に導入されたPMMAブラシによって、CNC同士の凝集が抑制され、良好な分散性が達成されたことを示唆する。以上の結果より、CNC誘導体4は逐次制御ラジカル重合 (RAFT重合→ATRP) の二官能開始剤として機能し、分散性を保ったまま鎖長やポリマー種等の異なる各種ブラシの導入も可能であることが示唆された。

Table 1 Characteristics of PMMA brushes in aPB-CNC

	M_n	D	σ (chains/nm ²)
RAFT	1.1×10^5	1.3	0.2
ATRP	4.2×10^3	1.2	0.3

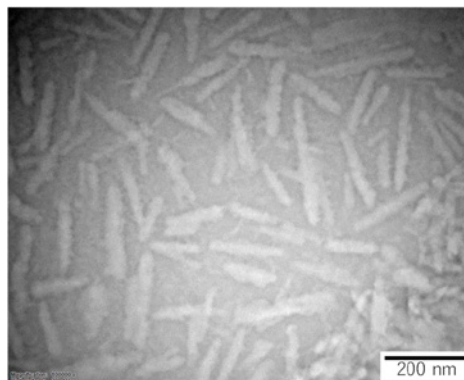


Figure 4 TEM image of aPB-CNC (6).

3. 水面単分子膜における構造形成

上記合成したCNC誘導体には、還元性末端およびその他側面に分子量の異なるPMMAブラシが導入されている。高い分散性が確認されたこと、PMMA鎖が水面単分子膜形成能を有することに鑑み、このaPB-CNC (6) を気液界面に展開し、2次元単分子膜状態における高次構造形成を検討すべく、表面圧 (π) - 占有面積 (A) 等温線を測定した。還元性末端に導入された長鎖PMMAブラシの影響を検討するため、比較として、還元性末端へのRAFT基導入を行わず、CNCの表面全体に同一PMMAブラシを導入した対称的ポリマーブラシ付与ロッド粒子 (symmetric polymer-brush-modified CNC; sPB-CNC) も評価した。

Figure 5に、CHCl₃溶液より水面展開して測定された、2種類のPB-CNCの π - A 等温線を示す。大きく見れば、いずれも、(i) 圧縮に伴い急激に表面圧が上昇する領域と(ii) それ以降に表面圧の増大が緩やかになる領域に分けられる。二つの領域の境界を示す屈曲点は、約 $1800\text{ nm}^2/\text{particle}$

であり、PB-CNCの長軸断面 (Figure 4) の専有面積に近いことから、いずれも安定かつ緻密な単分子膜の形成を示唆する。一方、領域 (ii) では複層膜あるいは垂直配向への転移の可能性が予見される。なお、両者の違いとして、aPB-CNCには領域 (i) の低表面圧域において特徴的なショルダーが現れており、長鎖ブラシが粒子間相互作用に影響を与えたことによると考えている。例えば、還元性末端の長鎖ブラシが低表面圧領域においては水面上に広がっている可能性を考察している。今後、水面膜の構造を乱すことなく固体基板に写しとり、PB-CNC配列状態を直接観察することで詳細な構造を明らかにしていく。

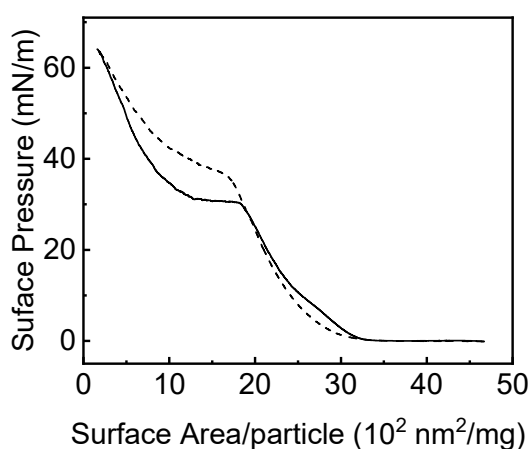


Figure 5 π -A isotherms for aPB-CNC (6) (solid curve) and sPB-CNC (broken curve).

4. 最後に

本研究では、CNCの還元性末端およびその他側面に、それぞれアルデヒド基および水酸基を足掛かりとして、(i) 位置選択的に二種の制御ラジカル重合のドーマント基を導入したCNC二官能開始剤を設計・合成し、(ii) 表面開始制御ラジカル重合を逐次的 (RAFT重合 \rightarrow ATRP) に実施し、異なる分子量のポリマーブラシを付与したCNCを合成した。一連の反応を経ても、CNCの分散性は保たれており、目的とするaPB-CNCの合成経路の確立に成功したと結論した。また、aPB-CNCの π -A等温線測定より、還元性末端に導入された高分子量PMMAが粒子間に斥力相互作用を生み出すことが示唆された。圧縮過程を工夫することで、気液界面においてより高いレベルで制御された秩序構造の形成が期待される。

このCNC二官能開始剤を用いると異なる化学特性を有するポリマーブラシを位置選択的に導入可能であり、斥力相互作用のみならず引力相互も駆動力とした多彩な秩序構造を探索していきたい。加えて、還元性末端の修飾には、基質特異性が高く温和な条件で進行するクリック反応を活用しており、重合開始基のみならず、様々な置換基の

導入に展開が可能であり、化学修飾を鍵とするCNCの機能的誘導体化に関する研究の一助となることを期待している。

参考文献

- [1] K. Thorkelsson, P. Bai, T. Xu, Self-assembly and applications of anisotropic nanomaterials: A review, *Nano Today* 10(1) (2015) 48-66.
- [2] Z. Li, Q. Fan, Y. Yin, Colloidal Self-Assembly Approaches to Smart Nanostructured Materials, *Chem. Rev.* 122(5) (2022) 4976-5067.
- [3] K. Ohno, T. Morinaga, S. Takeno, Y. Tsujii, T. Fukuda, Suspensions of Silica Particles Grafted with Concentrated Polymer Brush: A New Family of Colloidal Crystals, *Macromolecules* 39(3) (2005) 1245-1249.
- [4] Y. Nakanishi, R. Ishige, H. Ogawa, K. Sakakibara, K. Ohno, T. Morinaga, T. Sato, T. Kanaya, Y. Tsujii, USAXS analysis of concentration-dependent self-assembling of polymer-brush-modified nanoparticles in ionic liquid: [I] concentrated-brush regime, *J. Chem. Phys.* 148(12) (2018) 124902.
- [5] Y. Huang, T. Sasano, Y. Tsujii, K. Ohno, Well-Defined Polymer-Brush-Coated Rod-Shaped Particles: Synthesis and Formation of Liquid Crystals, *Macromolecules* 49(22) (2016) 8430-8439.
- [6] K. Ohno, C. Zhao, Y. Nishina, Polymer-Brush-Decorated Graphene Oxide: Precision Synthesis and Liquid-Crystal Formation, *Langmuir* 35(33) (2019) 10900-10909.
- [7] H. Tao, N. Lavoine, F. Jiang, J. Tang, N. Lin, Reducing end modification on cellulose nanocrystals: strategy, characterization, applications and challenges, *Nanoscale Horiz.* 5(4) (2020) 607-627.
- [8] G. Delepierre, K. Heise, K. Malinen, T. Koso, L. Pitkanen, E.D. Cranston, I. Kilpelainen, M.A. Kostiaainen, E. Kontturi, C. Weder, J.O. Zoppe, A.W.T. King, Challenges in Synthesis and Analysis of Asymmetrically Grafted Cellulose Nanocrystals via Atom Transfer Radical Polymerization, *Biomacromolecules* 22(6) (2021) 2702-2717.
- [10] Y. Zhao, Z.H. Houston, J.D. Simpson, L. Chen, N.L. Fletcher, A.V. Fuchs, I. Blakey, K.J. Thurecht, Using Peptide Aptamer Targeted Polymers as a Model Nanomedicine for Investigating Drug Distribution in Cancer Nanotheranostics, *Mol. Pharmaceutics* 14(10) (2017) 3539-3549.

縮環系 π 共役分子の輻射および無輻射遷移速度

Radiative and Nonradiative Transition Rates of Fused-Ring π -Conjugated Molecules

大北 英生・佐藤 友揮

Hideo OHKITA, Yuki SATO

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

Herein, we have studied radiative and nonradiative transition rates (k_r and k_{nr}) of singlet excitons in fused-ring π -conjugated polymer films by spectroscopic measurements. More specifically, we employed three different conjugated polymers (PTQ1, PNTz4T, PTNT2T) with different sizes of fused-ring π -conjugation system. In order to evaluate radiative and nonradiative transition rates, we measured fluorescence lifetime τ_f by time-correlated single-photon-counting method and fluorescence quantum yield Φ_f by absolute photoluminescence quantum yield method. As a result, we found that both τ_f and Φ_f increased with increasing fused-ring π -conjugation system in polymer main chains, resulting in smaller k_r and k_{nr} . For radiative transition rates k_r , it can be quantitatively analyzed by Stricker–Berg equation with molar absorption coefficient for each polymer, suggesting that k_r is mainly governed by the molar absorption coefficient. For nonradiative transition rates k_{nr} , it can be analyzed by Englman–Jortner equation with reorganization energy λ and vibronic coupling parameter C . For reorganization energy λ , it decreased for larger fused-ring π -conjugation system in polymer main chains, suggesting that rigid fused-rings can suppress λ effectively owing to small structural change and hence can reduce k_{nr} . For vibronic coupling parameter C , it also decreased for larger fused-ring π -conjugation system in polymer main chains. This is due to smaller C in larger fused-ring π -conjugation system due to smaller overlap between HOMO and LUMO in the main chain. We therefore conclude that fused-ring π -conjugation system would be beneficial for designing highly emissive conjugated polymers with well suppressed nonradiative transitions.

1. はじめに

π 共役系分子は、共役系を構成する π 電子間での相互作用が σ 電子に比べて小さいため、ドーピングによる電子の授受が容易であり電荷輸送材料として機能する。また、 π - π^* 遷移のエネルギーが比較的小さく可視光域に存在するため光捕集あるいは発光材料としても機能する。そのため π 共役系分子は有機エレクトロルミネセンス (EL) や有機薄膜太陽電池 (OPV) など有機エレクトロニクス of 基幹材料として重要な役割を果たしている。

本研究では、 π 共役系の主鎖構造が異なる共役高分子における励起子物性に着目し、 π 共役構造と一重項励起状態における輻射遷移ならびに無輻射遷移の関係について比較検討を行った。具体的には、図1に示すように、縮環構

造の異なる三種類の共役高分子について検討した。

2. 輻射・無輻射遷移速度の評価

輻射遷移速度 k_r ならび無輻射遷移速度 k_{nr} は、蛍光量子収率 Φ_f および蛍光寿命 τ_f と次式の関係がある。

$$\Phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1)$$

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} = \frac{\Phi_f}{k_r} \quad (2)$$

したがって、蛍光量子収率 Φ_f および蛍光寿命 τ_f を実測することにより輻射遷移速度 k_r ならび無輻射遷移速度 k_{nr} を定量的に評価することができる。本研究では、蛍光量子収率 Φ_f は積分球を用いた絶対蛍光量子収率測定法を、蛍光寿命 τ_f は時間相関単一光子計数測定法を用いてそれぞれ評価した。なお、共役高分子はクロロベンゼンに溶解し、石英基板上にスピコート法により製膜したものを封止したのちに測定を行った。また、吸収スペクトルならびに蛍光スペクトルを測定し、規格化したスペクトルの交点から一重

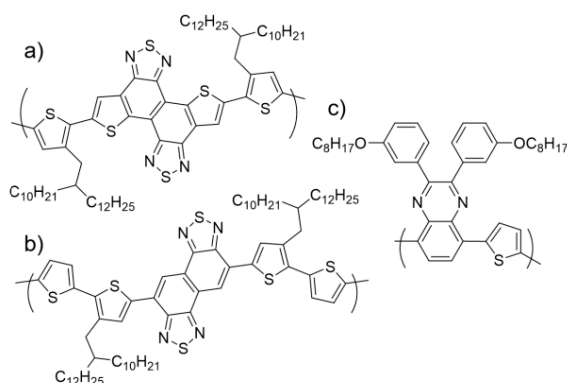


Figure 1. Chemical structures of π -conjugated polymers studied in this study: a) PTNT2T, b) PNTz4T, and c) PTQ1.

Table 1. Exciton properties of conjugated polymers.

Polymer	E_g / eV	Φ_f	τ_f / ns	$k_r / 10^7 \text{ s}^{-1}$	$k_{nr} / 10^9 \text{ s}^{-1}$
PTQ1	1.83	0.030	0.35	8.6	2.8
PNTz4T	1.60	0.046	0.84	5.5	1.1
PTNT2T	1.70	0.061	1.71	3.6	0.55

項励起状態のエネルギー E_g を評価した。得られた結果を表1にまとめる。

用いた共役高分子の主鎖は、表の下ほど拡張した縮環構造を有しており、この順に蛍光量子収率 Φ_f および蛍光寿命 τ_f ともに増大していることが分かる。これに対応して、輻射遷移速度 k_r ならび無輻射遷移速度 k_{nr} は逆に縮環構造が拡張した構造の高分子ほど小さな値を示した。輻射遷移速度 k_r と無輻射遷移速度 k_{nr} を比較すると、 k_{nr} の値が二桁ほど大きいことから蛍光寿命 τ_f は無輻射遷移速度 k_{nr} に支配されているといえる。

興味深いことに、無輻射遷移速度 k_{nr} はPTNT2Tにおいて最も抑制されており、 k_{nr} と E_g の間に明瞭な相関関係は見られなかった。一般に、 k_{nr} は E_g の減少とともに指数関数的に増加するエネルギーギャップ則にしたがう¹⁾。この法則にしたがうとすれば、 E_g が最も小さなPNTz4Tが最も大きな k_{nr} を示し、 E_g が最も大きなPTQ1が最も小さな k_{nr} を示すと予想されるが、実際にはこの関係は見られない。これは、今回用いた共役高分子の E_g は1.6から1.8 eVとほぼ同程度の大きさであるために、エネルギーギャップ則による違いは限定的であり、他の要因が支配的であるためと考えられる。他の要因について後ほど詳しく議論する。

3. 輻射遷移速度の比較

まず、輻射遷移速度について実測値と理論式との対応を検討する。室温下における数eV程度の輻射遷移では誘導放出は無視でき自然放出が支配的であるので、自然放出を記述するアインシュタインのA係数により輻射遷移速度 k_r を記述することができる。StricklerとBergは、A係数とLampert–Beer則の関係から輻射遷移速度 k_r が次式で与えられることを示した²⁾。

$$k_r = \frac{8000 \ln 10 \pi n^2}{c N_A} \langle \nu_f^{-3} \rangle^{-1} \int \frac{\varepsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (3)$$

ここで、 n は媒体の屈折率、 c は真空中での光速、 N_A はアボガドロ数、 $\varepsilon(\nu)$ は周波数 ν でのモル吸光係数である。また、蛍光スペクトル $I(\nu)$ の ν^3 の重み平均は次式で与えられる。

$$\langle \nu_f^{-3} \rangle = \frac{\int \nu^{-3} I(\nu) d\nu}{\int I(\nu) d\nu} \quad (4)$$

例として、PTNT2T薄膜の吸収および蛍光スペクトルを示す。蛍光スペクトルは754 nm付近にピークを示す単峰でシャープな形状をしているのに対して、吸収スペクトルは682 nmと613 nmにピークを示す二峰でブロードな形状をしており、鏡像関係にないことが分かる。溶液状態での吸収スペクトルは高温ほど短波長側に大きくシフトすることから薄膜状態では凝集によりスペクトルが変化していると考えられる。吸収スペクトルにおける二つのピークはJ凝集ならびにH凝集に由来すると考えられる。短波長側の吸収ピークに対応するH凝集状態からの発光は禁制遷移で

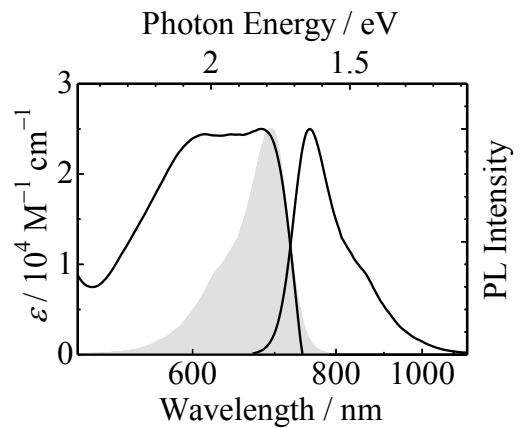


Figure 2. Absorption and photoluminescence (PL) spectra of PTNT2T films. The shaded portion is a mirror image of the PL spectrum

あるので、観測された発光は長波長側の吸収ピークに対応するJ凝集状態からの発光に起因すると帰属した。したがって、観測した蛍光に起因するJ凝集の吸収スペクトルは蛍光スペクトルと鏡像関係にあると仮定し、図2の灰色部のような形状であるとした。この仮定のもと式3を用いて輻射遷移速度 k_r を評価したところ $k_r = 3.7 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ と見積もられ、実測値の $k_r = 3.6 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ と良い一致を示すことが分かった。その他の共役高分子についても同様に吸収スペクトルと蛍光スペクトルから輻射遷移速度 k_r を評価したところ、PTQ1では $k_r = 7.9 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ 、PNTz4Tでは $k_r = 6.8 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ と見積もられ、表1に示す実測値といずれも良い一致を示した。したがって、輻射遷移に関しては基本的にモル吸光係数により説明できる。つまり、今回用いた共役高分子はモル吸光係数がいずれも $\sim 2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 程度であるため、輻射遷移速度 k_r はいずれも $\sim 5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ 程度であったといえる。

4. 無輻射遷移速度の比較

次に、無輻射遷移速度について実測値と理論式との対応について検討する。芳香族分子の無輻射遷移速度 k_{nr} はEnglmanとJortnerにより定式化され、単一の振動モード $\hbar\omega$ に対して以下のようにあらわされる¹⁾。

$$k_{nr} = \frac{C^2}{\hbar} \sqrt{\frac{2\pi}{\hbar\omega E_g}} \exp\left(-\frac{\lambda}{\hbar\omega}\right) \exp\left(-\gamma \frac{E_g}{\hbar\omega}\right) \quad (5)$$

ここで、 C^2 は相互作用パラメータ、 λ は再配向エネルギーであり、 γ は以下の式で与えられる。

$$\gamma = \ln\left(\frac{E_g}{\lambda}\right) - 1 \quad (6)$$

$\lambda < \hbar\omega$ の弱カップリングの条件では、 $\exp(-\lambda/\hbar\omega) \approx 1$ であり、 γ も定数とみなせるので、

$$k_{nr} = \frac{C^2}{\hbar} \sqrt{\frac{2\pi}{\hbar\omega E_g}} \exp\left(-\gamma \frac{E_g}{\hbar\omega}\right) \quad (7)$$

式7のエネルギーギャップ則に帰着する。式5から分かるように、無輻射遷移速度 k_{nr} は、今回のように E_g が同程度であれば、再配向エネルギー λ 、相互作用パラメータ C^2 、振動エネルギー $\hbar\omega$ に依存する。このうち振動エネルギー $\hbar\omega$ については、芳香族分子の場合は芳香環骨格のC=C伸縮振動が主な振動モードであるので、今回用いた共役高分子についても骨格振動として $\hbar\omega = 1500 \text{ cm}^{-1}$ (0.19 eV)を採用する。したがって、以降では再配向エネルギー λ と相互作用パラメータ C^2 に着目してそれぞれ議論を進める。

4-1. 再配向エネルギー

再配向エネルギー λ は、吸収および発光スペクトルから評価した。基底状態 S_0 と最低一重項励起状態 S_1 間の遷移に関与する分子の振動を調和振動であると仮定すると、 S_0 と S_1 の放物線ポテンシャルの関係は、図3に示すように、模式的にあらわすことができる。青線が最大の吸収遷移にともなうエネルギー E_A であり、赤線が最大の発光遷移にともなうエネルギー E_{PL} である。 S_0 と S_1 の放物線ポテンシャルの曲率が等しいと仮定すれば、吸収および発光にともなう再配向エネルギー λ は等しく、 $2\lambda = E_A - E_{PL}$ の関係にあることが図よりわかる。 $E_A - E_{PL}$ は吸収および発光スペクトルのピークエネルギーの差、すなわちストークスシフトから求めることができる。各共役高分子についてストークスシフトから再配向エネルギーを評価すると、PTQ1では $\lambda = 0.12 \text{ eV}$ 、PNTz4Tでは $\lambda = 0.10 \text{ eV}$ 、PTNT2Tでは $\lambda = 0.08 \text{ eV}$ と見積もられた。つまり、主鎖の縮環構造が拡大するにつれて再配向エネルギーが低下していることを示している。剛直な縮環構造の拡張により基底状態と励起状態における平衡核配置の違いが減少したためとみることができる。また、今回用いた共役高分子の再配向エネルギーは0.12 eV以下であり、 $\lambda < \hbar\omega$ の弱カップリング条件を概ね満たしてい

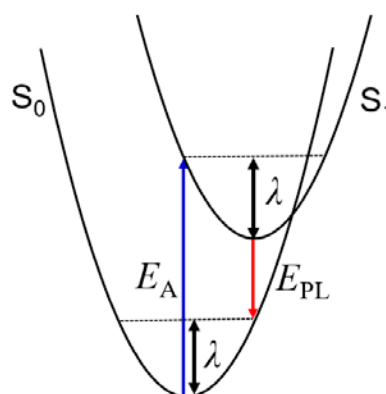


Figure 3. Potential energy curves of the ground state S_0 and the lowest singlet excited state S_1 assuming harmonic vibrations of molecules. The blue and red arrows are absorption and emission transitions with an energy of E_A and E_{PL} , respectively. The black arrows are reorganization energy λ . Here, the relationship $2\lambda = E_A - E_{PL}$ holds.

る。式7を用いて、無輻射遷移速度 k_{nr} を再配向エネルギー λ に対してプロットすると、 λ の減少とともに k_{nr} も単調に減少することが分かる。この傾向は、再配向エネルギー λ が小さな共役高分子ほど k_{nr} の値が小さいという実験事実と符合している。したがって、縮環構造が拡大した共役高分子では分子構造変化が抑制されることにより再配向エネルギーが低下し、無輻射遷移速度 k_{nr} も効果的に抑制されていると考えることができる。

4-2. 相互作用パラメータ

C は振電相互作用と関連し、振電相互作用は無輻射遷移に関与する電子軌道の重なり密度と振動変位に関する項の積を空間積分したものに比例する³⁻⁶。振動変位に関する

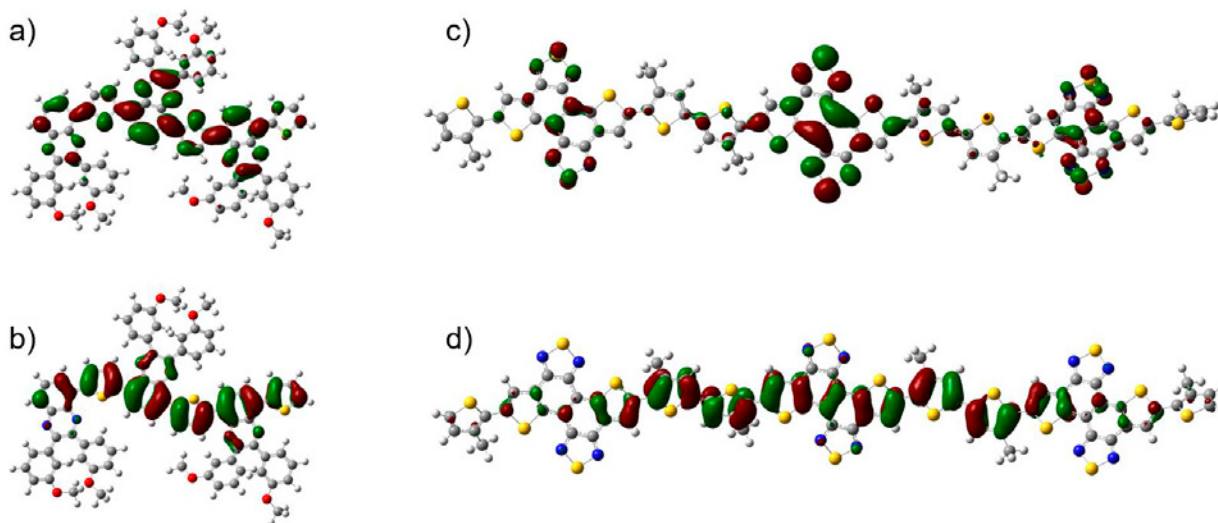


Figure 4. Frontier orbitals in trimer unit of conjugated polymers employed in this study, which were obtained by DFT calculation at B3LYP/6-311G (d,p) basis set: a) LUMO and b) HOMO of PTQ1, c) LUMO and d) HOMO of PTNT2T.

項に関しては、今回用いた共役高分子では芳香環骨格のC=C伸縮振動に帰属できるので、いずれの系も主鎖縮環構造の二重結合に着目することとする。基底状態 S_0 と最低一重項励起状態 S_1 間の遷移としてHOMOとLUMO間での遷移が主たる成分であると考えられるので、密度汎関数理論(DFT)計算によりHOMOおよびLUMOの軌道の広がりを評価した。その結果を図4に示す。縮環構造が小さなPTQ1と縮環構造の大きなPTNT2Tを比較として取り上げる。HOMOについてはいずれの系ともに主鎖共役全体に広がっていることが分かる。一方、LUMOについては、PTQ1ではHOMOと同様に主鎖共役全体に広がっているのに対して、PTNT2TではTNTユニットに局在化するため主鎖の軌道密度は低下していることが分かる。したがって、PTQ1ではHOMOとLUMOの軌道の重なりが大きいものに対して、PTNT2Tでは軌道の重なりはかなり減少すると予想される。特に、PTNT2TのTNTユニットはHOMOとLUMOでは軌道の広がりに特徴的な違いが見られる。HOMOはチアジアゾール部位には広がらないのに対して、LUMOではチアジアゾール部位にまで広がっているため、TNTユニットにおけるHOMOとLUMOの軌道の重なりが効果的に抑制されている。その結果、振電相互作用が低減し、無輻射遷移速度が抑制されたと考えられる。

まとめ

縮環系 π 共役構造の異なる主鎖骨格を有する共役高分子PTQ1、PNz4T、PTNT2Tについて輻射遷移速度 k_r および無輻射遷移速度 k_{nr} を各種分光測定により評価し、分子構造の観点から比較検討を行った。その結果、縮環構造が大きく発達した共役高分子ほど蛍光寿命 τ_f は長寿命であり、蛍光量子収率 Φ_f も高くなることが分かった。 τ_f および Φ_f の値から k_r および k_{nr} を評価したところ、 k_r に比べて k_{nr} の値が二桁程度大きいことから、 τ_f および Φ_f はおもに無輻射遷移速度 k_{nr} に支配されていることが分かった。

輻射遷移速度 k_r は、モル吸光係数および蛍光スペクトルを用いてStrickler-Berg式により定量的に解析することができた。ただし、吸収スペクトルはH凝集およびJ凝集に起因したブロードな形状であったため、許容遷移であるJ凝集の吸収スペクトルは鏡像関係を仮定して蛍光スペクトルをもとに再現して解析に用いた。実測した k_r をほぼ定量的に解析することができたことから妥当な帰属であったといえる。今回用いた共役高分子については、縮環構造に違いは見られるもののモル吸光係数はいずれも $\sim 2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 程度であるため、 k_r もいずれも同程度の $\sim 5 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ 程度となった。

無輻射遷移速度 k_{nr} は、Englman-Jortner式に基づいて再配向エネルギー、相互作用パラメータの観点から比較検討を行った。再配向エネルギーは縮環構造が発達するにつれて減少しており、剛直な縮環構造が導入されることにより基

底状態と励起状態における構造変化を抑制されていた。その結果、再配向エネルギーの低下が無輻射遷移速度の抑制に寄与しているといえる。振電相互作用に関連する相互作用パラメータは無輻射遷移に関与する電子軌道の重なり密度に依存するが、基底状態 S_0 および最低一重項励起状態 S_1 をHOMOおよびLUMOの軌道で近似すると、その重なりは主鎖の π 共役構造により顕著に異なることを明らかにした。縮環のあまり発達していないPTQ1では、HOMOおよびLUMOともに主鎖 π 共役系に広がっており、両者の重なりは大きいことが分かった。一方、縮環が主鎖垂直方向にも発達した電子受容性のTNTユニットを導入したPTNT2Tでは、HOMOは主鎖 π 共役系に広がるのに対してLUMOはTNTユニットに局在化し、HOMOおよびLUMOの重なりが効果的に抑制されていることが分かった。これによりPTNT2TではPTQ1と比べると振電相互作用が低減することにより、無輻射遷移速度の抑制に寄与していると考えられる。

以上のことから、ドナー性ユニットとアクセプター性にユニットからなる主鎖共役構造や主鎖から張り出す形で発達した縮環系 π 共役構造は、剛直な構造により再配向エネルギーが減少するとともに、HOMOとLUMOの軌道の重なりを効果的に減少することによる振電相互作用を低減するので、無輻射遷移を抑制する上で有効な分子設計戦略であるといえる。

謝辞

本研究で用いたPNz4TならびにPTNT2Tは、広島大学大学院先進理工系科学研究科の尾坂格教授よりご提供いただいた。また、本研究は科学研究費 挑戦的研究(萌芽)(22K19062JP)ならびにJSTの未来社会創造事業 探索研究(JPMJMI20E2)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) R. Englman and J. Jortner, *Mol. Phys.*, **18**, 145–164 (1970).
- 2) S. J. Strick and R. A. Berg, *J. Chem. Phys.*, **37**, 814–822 (1962).
- 3) Y. Niu, Q. Peng, C. Deng, X. Gao, and Z. Shuai, *J. Phys. Chem. A*, **114**, 7817–7831 (2010).
- 4) S. Manzhos, H. Segawa, and K. Yamashita, *Chem. Phys. Lett.*, **501**, 580–586 (2011).
- 5) K. Shizu, H. Noda, H. Tanaka, M. Taneda, M. Uejima, T. Sato, K. Tanaka, H. Kaji, and C. Adachi, *J. Phys. Chem. C*, **119**, 26283–26289 (2015).
- 6) 志津功将, 日本化学会情報部会誌, **35**, 138–141 (2017).

ヒト顎形成を再現するためのオルガノイド技術の開発

In vitro induction of patterned branchial arch-like aggregate from human pluripotent stem cells

瀬戸 裕介、永樂 元次

Yusuke Seto^{1,2}, Mototsugu EIRAKU^{1,2}

¹Institute for Life and Medical Sciences, Kyoto University

² Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Early patterning of neural crest cells (NCCs) in the craniofacial primordium is important for subsequent development of proper craniofacial structures. However, because of the complexity of the environment of developing tissues, surveying the early specification and patterning of NCCs is difficult. In this study, we develop a simplified in vitro 3D model using human pluripotent stem cells to analyze the early stages of facial development. In this model, cranial NCC-like cells spontaneously differentiate from neural plate border-like cells into maxillary arch-like mesenchyme after a long-term culture. Upon the addition of EDN1 and BMP4, these aggregates are converted into a mandibular arch-like state. Furthermore, temporary treatment with EDN1 and BMP4 induces the formation of spatially separated domains expressing mandibular and maxillary arch markers within a single aggregate. These results suggest that this in vitro model is useful for determining the mechanisms underlying cell fate specification and patterning during early facial development.

顔面組織は動物の生存に不可欠であるが、その発生機構は依然として不明な部分が多い。顔面を構成する大部分は神経堤細胞 (NCC) と呼ばれる外胚葉由来の細胞集団から生じる。NCCは神経板境界 (NPB) から発生する一過性の細胞集団である。NCCは神経板境界から腹側の頭蓋顔面原基へと移動し、軟骨、骨、結合組織に寄与する。

顔面原基は、前頭鼻隆起、上顎弓 (MX)、下顎弓 (MN) の3つの部分に分けられ、顔の異なる部分を生み出す。顔面原基のNCCはさらに、特定の遺伝子の発現によって特徴づけられるいくつかのドメインにパターンニングされる。初期段階における段階的なパターン形成は、適切な顔面の発達にとって重要である。しかし、その根底にある細胞過程はまだ完全には解明されていない。技術的な限界や発生過程の組織の環境の複雑さにより、このような初期過程をin vivoで研究することは困難である。そこでわれわれは、顔面発生におけるこれらの初期過程を再現するin vitroモデルを確立することを目指した。

胚性幹細胞 (ESC) や人工多能性幹細胞 (iPSC) などのヒト多能性幹細胞 (hPSC) は、in vitroでのNCC誘導に用いられてきた。hPSCからのNCCの指向性分化では、モデル動物におけるNCCの誘導と同様に、バランスのとれたWNT/BMPシグナルが誘導に重要である。これらの方法には、低分子制御因子の添加によるシグナルの外在的操作が必要である。本研

究では、hPSC由来凝集体の浮遊培養において、無添加で多数のNCC様細胞を誘導する方法の確立を目指した。

1. hPSC凝集体におけるNCCの誘導

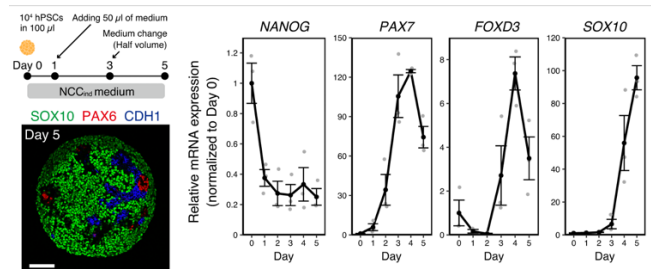


図1 hPSCからのNCCの誘導

hPSCからNCCを誘導するための培養条件の探索を行い最適な培地 (NCC_{ind}培地) を同定した (図1)。5日目の凝集体は、SOX10+ NCC様細胞を80%の効率で誘導できることがわかった。しかし、少数のPAX6+神経上皮細胞 (NEC) とCDH1+非神経上皮細胞 (NNE) も含まれていた (図1)。hPSCマーカーであるNANOGは初日にダウンレギュレートされ、その後、初期NCCマーカーFOXD3と後期マーカーSOX10が発現上昇した。これらの遺伝子の発現を免疫組織化学 (IHC) で確認した結果、培養3日目からFOXD3を発現する細胞を確認することができた。またNPPマーカーであるTFAP2Aは培養2日目から発現が上昇することがわかった。これらの結果はNCC_{ind}培地で誘導することで、初期のNCCの発生過程が再現されていることを示唆していた。

2. scRNA-seqによるNCCを含む凝集体の解析

5日目の凝集体には非NCC型細胞が含まれていたため（図1）、シングルセルRNA-seq (scRNA-seq) を用いてKhES-1細胞由来の凝集体の含有量を解析した。合計1877個の細胞を、教師なし様多様体近似投影法 (UMAP) を用いて14のクラスターに分けた（図2a, b）。クラスター0、1、3、4、5、6、7はSOX10+ NCC様細胞で、全細胞の71.9%を占めた（図2c, d）。PAX7とFOXD3の発現は、NCC様クラスターよりもクラスター5で高かったことから、クラスター5は新生NCC様細胞であることが示された（図2e, g）。PAX7high/FOXD3high細胞の存在は、IHCを用いて確認された（図1d）。クラスター5に隣接するクラスター8は、SP5+/PAX7+/FOXD3+ NPB様細胞であった（図2f, g）。クラスター8は、SOX10の発現が極めて低いことも特徴であった（図2b, d, g）。クラスター9はより成熟な細胞で、POU5F1発現が高く、内胚葉細胞（Endo）のマーカ遺伝子であるSOX17発現がないことが特徴であった（図2h）。クラスター10にはCDH1+/TFAP2A+のNNE様細胞が含まれ、SIX1+のPPE様細胞も含まれていた（図2i）。3種類の神経系クラスターが観察された（図2j）。クラスター2はISL1+/SIX1+ NCC由来のニューロン様細胞

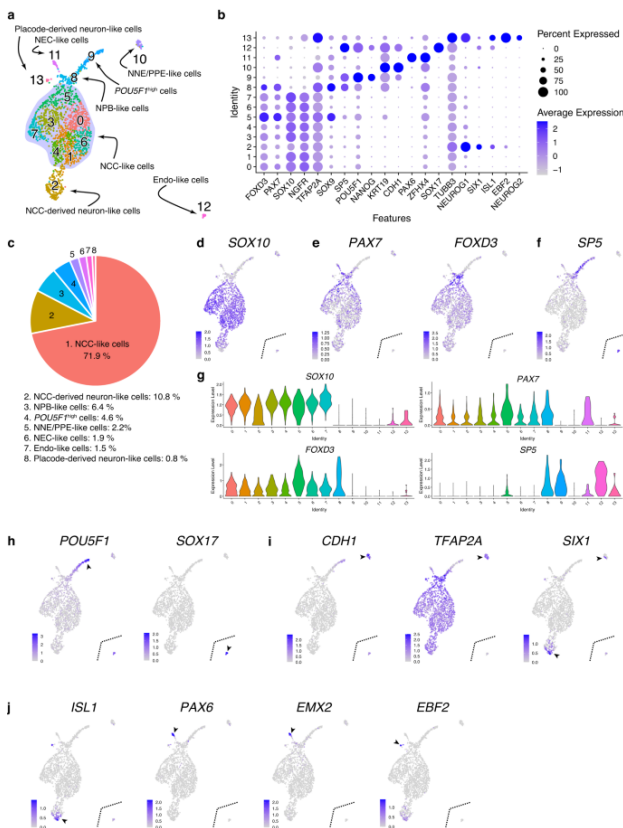


図2 hPSCから誘導した凝集体のscRNAseq

(図2i, j)、クラスター11はPAX6+/EMX2+ NEC様細胞（図

2j) 22を含んでいた。クラスター13は、EBF2+ブラコード由来のニューロン様細胞から構成されていた（図2j）。クラスター12はSOX17+内胚葉細胞であった（図2h）。IHCを用いて、これらの細胞タイプの存在も確認した。

3. hPSCからNCCの分化過程はin vivoの発生を再現する

2日目、3日目、4日目の凝集体のscRNA-seqデータを、5日目の凝集体のデータに追加し、凝集体（合計8466細胞、23クラスター）の発生過程をさらに解析した（図3）。クラスター15の細胞はPOU5F1+/NANOG+/EOMES-であり、PSC様の状態を示していた（図3b）。初期NPBマーカであるTFAP2Aは、hPSCで過剰発現させるとNCCマーカ遺伝子の発現を誘導することができるが、クラスター15に隣接するクラスター7で発現が上昇し、その発現はNCC様細胞やNNE/PPE様細胞への分化を通して継続した（図3c）。NPBマーカであるSP5とIRX1は、クラスター7に隣接するクラスターのグループ（クラスター3、6、8、9、13、14、16、19）で発現が上昇した（図4d）18, 31。別のクラスター群（クラスター1、2、4、5、11、17、20）には、SOX10+ NCC様細胞が含まれていた。このグループでは、いくつかのマーカ遺伝子が発現パターンに差を示し、細胞状態の変化を示唆していた。クラスター0は、FOXD3とSOX9を高レベルで発現しているNPB様クラスターとNCC様クラスター間の移行点であった（図3e）。クラスター10には、SIX1+ NCC由来のニューロン様細胞が含まれていた（図4f）。クラスター12/18にはKRT18高NNE/PPE様細胞が、クラスター22にはPAX6+ NEC様細胞が含まれていた（図3f）。クラスター21にはSOX17+内胚葉様細胞が含まれていた（図3g）。RNA速度解析から、ほとんどのhPSCがNPB様状態に分化したことが示唆された。しかし、SOX17+内胚葉様細胞に分化した細胞はごく少数であった（図3h）。NCC様細胞の分化過程における遺伝子発現ダイナミクスを推測するため、NNE/PPE様細胞、NEC様細胞、およびendo様細胞クラスターを除いたクラスターについて、擬似時間解析を行った（図3i）。PSC、NPB、NCCのマーカは、擬似時間と共に発現が上昇し、in vivoでのNCC誘導過程がある程度再現されていることが示された（図3j）。これら

の結果はhPSCからのNCC誘導系が脊椎動物のNCC発生過程でみられる遺伝子制御システムの変遷を再現できることを示している。

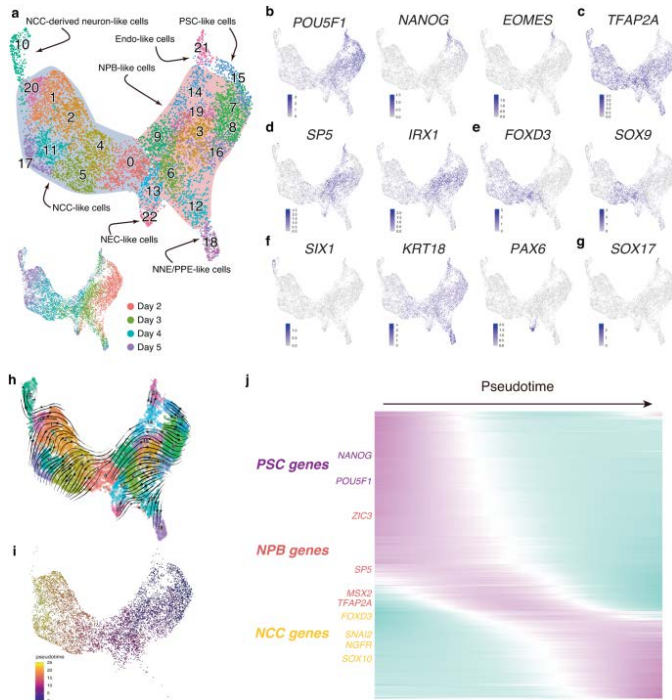


図3 hPSCから誘導した凝集体の継時的scRNAseq

4. 一時的処理によるパターン化枝弓様集合体の形成

MXとMNは、最も背側がPOU3F3+のMXであり、腹側がMNのHAND2+領域であることから、同じ組織の背側と腹側として認識できる(図4a)。14日目、MX様状態に分化したbFGF処理凝集体では、ほとんどのNCC細胞がまだSOX10を発現していた。対照的に、MN様状態に分化したEDN1/BMP4処理凝集体では、ほとんどの間葉系細胞がSOX10の代わりにDLX5を発現し、MN様系への運命コミットメントを示していた。しかし、これらの凝集体では、細胞の一部がまだSOX10を発現しており、MN様系譜にコミットしておらず、EDN1とBMP4を培地から除去すればMX様系譜に分化できることが示唆された。14日目に培地からEDN1とBMP4を除去し、単一凝集体がPOU3F3+細胞(背側MX様)とHAND2+細胞(腹側MN様)の両方を含むかどうかをテストした(図4b)。一時的に処理した凝集体(図8bの条件2)は、21日目にEDN1/BMP4処理(図4bの条件3)および非処理凝集体(図4bの条件1)よりも高い

レベルでPOU3F3とHAND2の両方を発現した(図4c)。さらに、一時的に処理した凝集体では、POU3F3+細胞とHAND2+細胞は空間的に分離したドメインを形成しており、これは相互に排他的な運命選択と細胞の自己パターン形成特性を示している(図4d)。

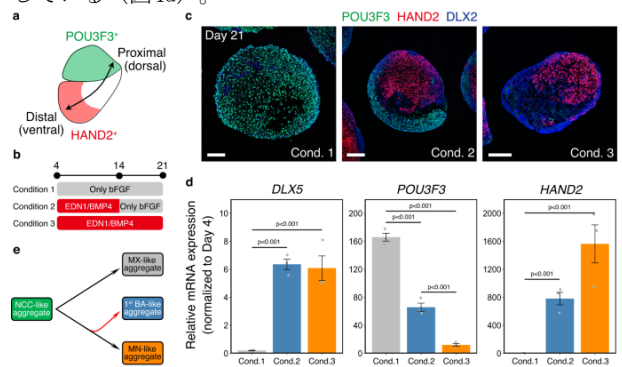


図4 hPSCからの咽頭弓様組織の誘導

MX間充織はin vivoで頭蓋顔面の骨や軟骨に分化することから、培養期間を延長して凝集体の骨形成/軟骨形成能を解析した(図5a)。35日目に、一時的に処理した凝集体は、骨形成/軟骨形成系細胞のマーカであるRUNX2を発現した(図5b)。一部のRUNX2+細胞は、骨形成細胞マーカであるSP7を発現しており、この系譜への分化を示している。

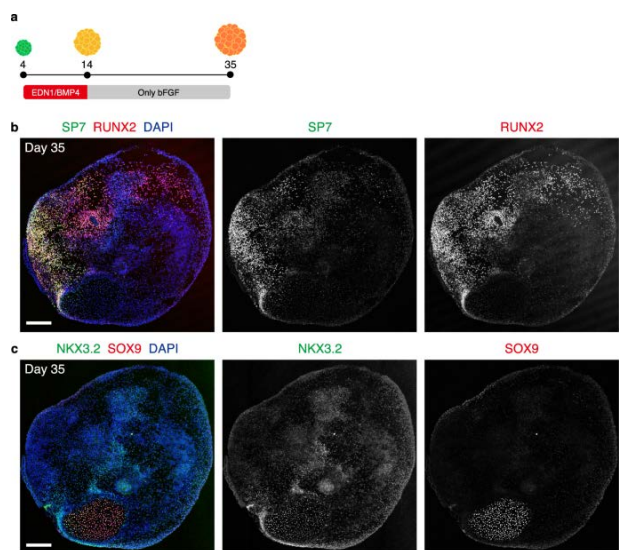


図5 長期培養による軟骨・骨形成

さらに、凝集塊の中には、マウス胚のメッケル軟骨で発現しているSOX9とNKX3.2に陽性の細胞凝縮体があった（図5c）。これらの結果は、培養においてNCC様細胞が自発的に骨形成/軟骨形成系に分化することを示唆している。

5. 結言

本研究では、NCC様細胞が濃縮された凝集体を上腕弓様状態に分化誘導する方法を確立した。この方法では、細胞株によって異なるが、45.4-76.5%の効率で、5日以内に簡単な手順でNCC様細胞を誘導することができる。凝集体内在性のWNT/BMPシグナルは、NPB様状態のNCC様細胞を誘導することができる。NPB様細胞は、NEC様細胞やNNE/PPE様細胞を含む他の外胚葉系譜にも分化する。この特徴は、多能性NPB様細胞における運命選択の基礎となるメカニズムを、自然な状況で研究するのに適しているかもしれない。

5. 参考文献

[1] Y. Seto, et al. Nat Comm, 2024, 15, 1351

ヘテロ元素含有高分子を基盤とした刺激応答性発光材料の開発

Development of Stimuli-Responsive Luminescent Materials Based on Heteroatom-Containing Polymers

田中一生・権 正行・伊藤峻一郎

Kazuo TANAKA, Masayuki GON, Shunichiro ITO

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

Recent reports have shown potential applicability of metal complexes and clusters as an element-block, which is a minimum functional unit containing inorganic element, for developing functional optical materials. Here, we describe luminochromic materials based on element-blocks having various types of heteroatom. By comparing the optical properties of aluminum complexes and gallium complexes in the solution state, significant differences were observed in absorption/emission maximum wavelengths and Lewis base responsiveness. It was suggested that the longer absorption and emission maximum wavelengths in LGaMe compared to LAlMe are due to the destabilization of the HOMO level resulting from the inert electron pair effect. On the other hand, it was proposed that the difference in Lewis base responsiveness was due to the difference in charge of the central atom. Homologous elements are generally known to have similar properties, and the fact that this study found remarkable differences in absorption and emission wavelengths and stimulus responsiveness is a very interesting result. Furthermore, in the solid state, all complexes exhibited AIE properties, and CIEE properties were also confirmed in LGaMe. It has already been reported that dialdimine complexes containing boron as the central atom exhibit luminescence in both solution and solid states. It has become clear that similar results are obtained when the central atom is aluminum or gallium.

1. 序文

共役系分子は優れた発光性や軽量であること、成型加工のしやすさといった特徴があることから、有機EL素子や有機太陽電池等に応用されてきた。この中で、有機金属錯体を含む共役系分子は、中心元素と配位子間の電子的相互作用に由来した多様な光学特性を発現するほか、中心原子や配位子構造等の分子設計によって光学特性を幅広く制御できるといった特徴がある。また、中心原子が外部刺激に対する応答性を示す起点となるため、刺激応答性材料への応用において注目されている。π共役系の有機金属錯体の中でも、電子不足な13族元素を中心元素にもつ錯体は、低い最低空軌道(LUMO)をもつことや強い発光性を有することが知られている^{1,2)}。13族元素錯体は溶液状態では強い発光性を示すものの、凝集することによってπ-π相互作用によって発光効率が低下するという現象(ACQ)が起こることが多く、固体状態では発光しないという課題がある。

ジイミン配位子から成る13族元素錯体では捻じれた分子構造によりACQが起きず、振動緩和による無輻射失活が抑制されることで発現する凝集誘起型発光(AIE)や結晶化誘起型発光増強(CIEE)といった固体発光性を有することが知られている³⁾。ジイミン錯体には、分子構造によってジケチミン錯体とジアルジミン錯体の2種類が存在する。ジケチミン錯体は立体障害の大きさによる安定性等の特徴があるものの、溶液状態での発光が弱い。それに対し、本研究で主に扱うジアルジミン錯体では溶液状態と固体

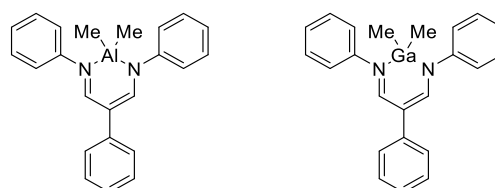


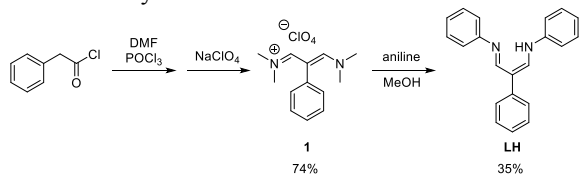
Fig. 1. Structures of group 13 element dialdimine complexes.

状態ともに発光することが知られている。

錯体の構造を変えて光学特性の変化を評価する研究がこれまで広く行われてきた^{4,5)}。錯体の構造が物性に与える影響を調べることで、分子設計によって物性を細かく制御できるようになる。その中でも、配位子の構造を変えることで錯体の光学特性の変化を評価する研究はこれまで多く報告されてきた¹⁾。しかし、中心原子のみを同族元素内で変え、錯体の光学特性の変化を調査する報告に関しては少なく、中心原子が錯体の光学特性に与える影響については未だ明らかされていない^{4,6,7)}。

本研究では、Fig. 1のように配位子骨格を統一し、同族であるアルミニウムとガリウムを中心元素として用いた2種類のジアルジミン錯体を合成し、それらの光学特性を比較した。分子設計としては、ジアルジミン配位子を採用することで固体状態だけでなく溶液状態での光学特性の比較が可能になるほか、13族元素上にメチル基を導入することで、錯体の安定性を確保している。これらの錯体間で光学

Scheme 1. Synthetic scheme of dialdimine



Scheme 2. Synthetic scheme of aluminum and gallium dialdiminate complexes

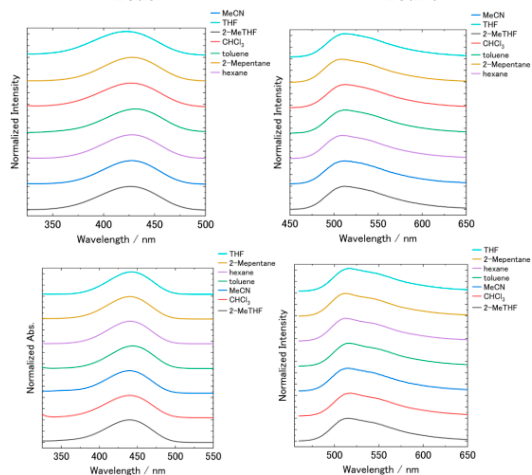
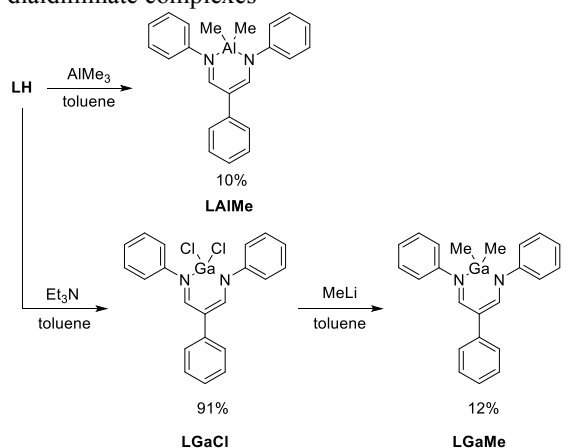


Fig. 2. Normalized UV-vis absorption spectra of (a) **LAIME** and (c) **LGaMe** in each solvent (1.0×10^{-5} M). Normalized photoluminescence spectra of (b) **LAIME** and (d) **LGaMe** in each solvent (1.0×10^{-5} M) excited at the absorption maxima.

物性を比較したところ、溶液状態において吸収・発光極大波長およびLewis塩基応答性の2点で大きな差異が認められた。それらの差異が現れた原因について、測定結果と計算結果を通して考察した。また、各錯体について固体状態における光学特性についても調査した。

2. 合成

Scheme 1に従って、ジアルジミン配位子を合成した。*N,N*-ジメチルホルムアミドと塩化ホスホリルとの反応によりVilsmeier試薬を調製し、フェニル酢酸塩化物を作用させ、過塩素酸ナトリウム水溶液中に滴下することでピナミジ

ニウム過塩素酸塩**1**を合成した⁸⁾。**1**にアニリンを作用させることでジアルジミン配位子を合成した⁹⁾。**LH**に対してトリメチルアルミニウムを作用させることで、アルミニウムジアルジミン錯体**LAIME**を合成した (Scheme 2)。また、**LH**にトリエチルアミンの存在下で三塩化ガリウムを作用させることでガリウム錯体**LGaCl**を合成し、これをメチルリチウムと反応させることで目的の錯体**LGaMe**を合成した (Scheme 2)。

3. 光学特性評価

LAIMEおよび**LGaMe**は溶液状態において緑色の発光を示した。これらの化合物の光学特性を評価するために、**LAIME**は窒素雰囲気下、**LGaMe**は大気下で室温で紫外可視吸収スペクトル測定と発光スペクトル測定を行った。溶媒は、アセトニトリル (MeCN)、テトラヒドロフラン (THF)、2-メチルテトラヒドロフラン (2-MeTHF)、クロロホルム (CF)、トルエン (PhMe)、2-メチルペンタン (2-MP)、ヘキサン (Hex) を用い、 1.0×10^{-5} Mの濃度で測定溶液を調製した。これらの化合物の紫外可視吸収スペクトルおよび発光スペクトルはFig. 2に示す通りである。**LAIME**に対して**LGaMe**の方が吸収極大波長・発光極大波長ともに長波長化した (Table 1)。また、発光量子収率 (Φ_{PL}) を比較すると、**LAIME**において、非Lewis塩基性溶媒中 (Φ_{PL} = Hex, 0.13; 2-MP, 0.16; PhMe, 0.17; CF, 0.11) と比べて、Lewis塩基性溶媒中 (Φ_{PL} = 2-MeTHF, 0.057; THF, 0.056; MeCN, 0.030) では発光量子収率がより大きく低下した。一方、**LGaMe**の発光量子収率は非Lewis塩基性溶媒中 (Φ_{PL} = Hex, 0.18; 2-MP, 0.17; PhMe, 0.19; CF, 0.15) とLewis塩基性溶媒中 (2-MeTHF, 0.10; THF, 0.11; MeCN, 0.14) とで顕著な差は見られなかった。以下ではこれらの錯体の光学特性の差異について考察する。

初めに、**LAIME**よりも**LGaMe**でより長波長側に吸収・発光波長が観測された原因を調査するため、Gaussian 16 Revision C.01¹⁰⁾によって密度汎関数法 (DFT) および時間依存 (TD-) DFTを用いた量子化学計算を行った。汎関数としてCAM-B3LYPを用いて計算を行った。また、基底関数は基底一重項 (S_0) における構造最適化および振動数計算、一点計算は6-31G(d,p)を用いて行い、最低励起一重項 (S_1) における構造最適化および振動数計算はGaとAlに対してLan12DZを用い、C、H、Nに対して6-31+G(d,p)を用い、一点計算はいずれの原子に対しても6-31+G(d,p)を用いて計算した。 S_0 および S_1 における分子の構造最適化を行った結果、振動数計算において虚の振動がないことから局所安定構造であることを確かめた。また、それらの構造において、一点計算を行うことで電子遷移について計算した。Fig. 3とFig. 4は、それぞれ S_0 と S_1 における最高被占有軌道 (HOMO) と最低空軌道 (LUMO) のエネルギーダイアグラムおよび位相図を示している。 S_0 および S_1 において、**LAIME**に対し

Table 1. Results of optical measurements of **LAlMe** and **LGaMe** in the solutions^a

LAlMe									
Solvent	$\epsilon / 10^4 \text{ M cm}^{-1b}$	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}^c$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}^d$	Φ_{PL}^e	τ / ns^f	χ^2^e	$k_r / 10^8 \text{ s}^{-1g}$	$k_{\text{nr}} / 10^8 \text{ s}^{-1g}$	
MeCN	2.32	428	512	0.030	0.24 (100%)	0.82	1.3		41
THF	3.09	423	513	0.056	0.36 (22.7%), 0.62 (77.3%)	1.2	1.0		17
2-MeTHF	1.77	427	512	0.057	0.49 (72.7%), 0.70 (27.3%)	1.2	1.0		17
CHCl ₃	2.19	427	513	0.11	0.34 (46.9%), 0.96 (52.1%), 5.2 (1%)	1.1	1.5		12
Toluene	2.64	432	511	0.17	1.0 (100%)	0.92	1.6		8.1
2-Methylpentane	2.32	429	510	0.16	1.2 (95.8%), 6.1 (4.2%)	1.3	1.1		6.1
Hexane	2.41	428	509	0.13	1.0 (100%)	1.0	1.3		8.6
LGaMe									
Solvent	$\epsilon / 10^4 \text{ M cm}^{-1b}$	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}^c$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}^d$	Φ_{PL}^e	τ / ns^f	χ^2^e	$k_r / 10^8 \text{ s}^{-1g}$	$k_{\text{nr}} / 10^8 \text{ s}^{-1g}$	
MeCN	2.08	440	514	0.14	0.36 (99.6%), 6.5 (0.4%)	1.2	3.7		22
THF	2.22	442	516	0.11	0.63 (57.0%), 0.83 (43.0%)	1.2	1.5		13
2-MeTHF	1.88	440	515	0.10	0.67 (100%)	1.2	1.5		13
CHCl ₃	2.27	440	518	0.15	1.1 (98.9%), 6.8 (1.1%)	1.2	1.3		7.6
Toluene	2.35	444	516	0.19	1.4 (98.2%), 7.6 (1.8%)	1.2	1.2		5.2
2-Methylpentane	2.55	441	512	0.17	1.3 (95.9%), 6.6 (4.1%)	1.1	1.2		5.6
Hexane	2.29	441	512	0.18	1.3 (98.4%), 7.2 (1.6%)	1.1	1.2		5.8

^a Photophysical properties were recorded for 1.0×10^{-5} M solutions. ^b Molar absorption coefficient. ^c Wavelength at absorption maxima. ^d Wavelength at emission maxima. Excited at absorption maxima. ^e Absolute quantum yield determined by an integration sphere method. ^f Fluorescence lifetime determined by time-correlated single-photon counting. Excited with an LED laser at 375 nm. ^g Radiative (k_r) and non-radiative (k_{nr}) decay rate constants calculated with the following formula: $k_r = \Phi_{\text{PL}} / \langle \tau \rangle$; $k_{\text{nr}} = (1 - \Phi_{\text{PL}}) / \langle \tau \rangle$.

て**LGaMe**の方が、HOMOとLUMOともにエネルギー準位が高くなったが、LUMOと比べてHOMOの上昇幅の方がより大きいという結果になった。そのため、**LGaMe**の方がHOMO-LUMO間のエネルギーギャップがより小さくなり、吸収極大波長と発光極大波長がともに長波長化したといえる。

HOMOとLUMOの軌道の広がりに着目すると、金属上のメチル基の軌道がHOMOに大きな寄与をもつ一方、LUMOにはほとんど寄与がないことがわかった。そのためHOMOとLUMOの上昇幅に変化が生じた原因は、このメチル基上の軌道に起因すると考えられる。

HOMOの上昇幅が**LAlMe**に比べて**LGaMe**でより大きくなった原因を調査するため、Gaussian 16 Revision C.01¹⁰⁾によって自然密度解析 (NPA) を行い、自然結合軌道 (NBO) を算出した。汎関数はCAM-B3LYPを用い、基底関数はAlとGaに対してはLan12DZを用い、それ以外の原子に対しては6-31G(d,p)を用いた。ここで、これらの錯体の最適化構造は、対称性を考慮せずに計算したものの擬似的にC₂対称軸

を持ち、二つのメチル基はほぼ等価とみなせた。先の軌道位相図における考察のとおり、LUMOに比べてHOMOに対するC1の軌道係数が十分大きいことが明らかとなった。そこで、C1の非共有電子対から成るNBO (NBO-1) に注目する。**LAlMe**と**LGaMe**の間で、NBO-1のポテンシャルエネルギーを比較すると、**LGaMe**の方がより高いエネルギーをもつことがわかった。したがって、**LGaMe**のHOMOが**LAlMe**のHOMOよりも高くなった原因は、錯体のHOMOに大きな寄与を持つC1の軌道、すなわちNBO-1のエネルギーが上昇したためであると推察される。以下では、このC1の軌道エネルギーの上昇の原因について考察する。

NBO-1の混成比を比較すると**LGaMe**の方が2p_z軌道の混成比が大きかった。また、いずれの錯体においても、中心原子の空軌道から成るNBOのうち、NBO-1との相互作用が最も大きいものはNBO-2であることが分かった。このNBO-2の混成比は**LAlMe**では3s軌道、**LGaMe**では4s軌道が最も大きく、**LGaMe**の方がs軌道の混成比が大きい。このことは、不活性電子対効果によって、高周期元素であるGa

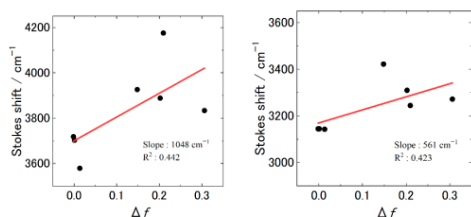


Fig. 3. Lippert–Mataga plots for (a) LAIME and (b) LGaMe. Δf denotes the Lippert’s polarity parameter of solvents.

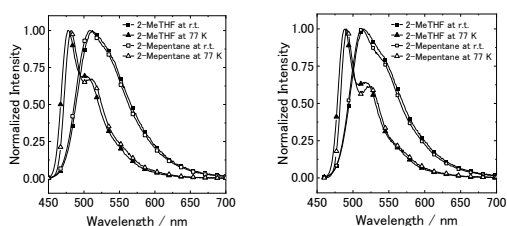


Fig. 4. Normalized photoluminescence spectra of (a) LAIME and (b) LGaMe in each solvent (1.0×10^{-5} M) at room temperature and 77 K. Excitation was carried out at each absorption maximum.

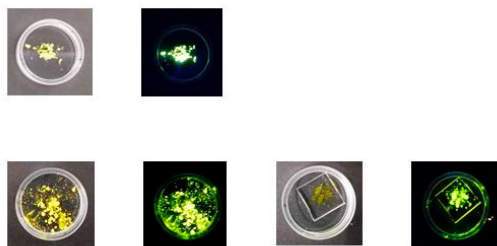


Fig. 5. Photographs of (a) LAIME in the crystal state and (b) LGaMe in (b) crystal and (c) amorphous states under natural light and UV (365 nm) irradiation.

の方がより混成しにくいことに起因すると考えられる。

以上より、LAIMEに比べてLGaMeの方がNBO-1を占有する電子が金属側により偏在しているため、C1の正電荷による安定化がより弱く、結果としてメチル基の軌道が不安定化したと考えられる。さらに、C1と中心原子の電荷を比較すると、LAIMEに比べてLGaMeの方がC1と中心原子間の電荷差がより小さい。このことは、LGaMeにおいて、C1と中心原子間の結合がより高い共有結合性をもつことを示唆しており、NBO-1のエネルギーがより高いことを支持する結果といえる。したがって、不活性電子対効果により、NBO-2のs性がGaでより高くなった結果、LAIMEに比べてLGaMeの方がC1の軌道エネルギーが高くなったため、HOMOのエネルギー準位が上昇したと考えられる。

次に、MeCNおよびTHF、2-MeTHF溶液中において、LGaMeに比べてLAIMEにおいて量子収率がより低下したことについて調査するために、Lippert–Matagaプロットによって溶媒の極性に対する依存性を調べた (Fig. 3)。

Lippert–Matagaプロットは、溶媒に固有な極性パラメータ Δf に対して、その溶媒中でのストークスシフトをプロットしたものである。ただし、 ϵ と n はそれぞれ溶媒の誘電率と屈折率である。得られたプロットに対する近似直線の傾きはLAIMEで 1048 cm^{-1} 、LGaMeで 561 cm^{-1} となった (Fig. 3)。いずれの化合物においても傾きが十分に小さく、 R^2 値も0.4程度と低い値を示していることから、溶媒の極性が錯体の光学特性に与える影響は低いといえる。このことから、MeCNとTHF、2-MeTHFの溶媒に共通するルイス塩基性が錯体の光学特性に影響を与えていると示唆された。

LAIMEとLGaMeの量子収率に対してルイス塩基性の分子が与える影響を考察するために、ルイス塩基性溶媒 (2-MeTHF) と非ルイス塩基性溶媒 (2-MP) 中での低温状態における光学測定を行った (Fig. 4)。LGaMeは低温状態の場合、非ルイス塩基性溶媒中およびルイス塩基性溶媒中ともに発光量子収率が0.9程度の値を示した。一方、LAIMEは低温状態において、非ルイス塩基性溶媒中では発光量子収率が0.98なのに対し、ルイス塩基性溶媒中では0.55まで低下した。また、ルイス塩基性溶媒中では非ルイス塩基性溶媒中より無輻射失活速度定数 (k_{nr}) が増大したのに対して、輻射失活速度定数 (k_r) は大きく変化していないため、ルイス塩基との相互作用により、無輻射失活過程が加速されていることが示唆された。また、NPA解析の結果、LGaMeに比べてLAIMEの方が中心原子の電荷がより大きな正電荷をもつことがわかった。以上より、この正電荷によって、LAIMEはLGaMeに比べてルイス塩基とより相互作用しやすいと考えられる。したがって、励起状態のLAIMEはLGaMeよりもルイス塩基とより強く相互作用するため、無輻射失活がより加速され、発光量子収率がより大きく低下したと考えられる。

LAIMEおよびLGaMeは固体状態において、緑色の発光を示した (Fig. 5)。固体試料の光学特性を評価するために、LAIMEとLGaMeともに大気下において室温で紫外可視吸収スペクトル測定と発光スペクトル測定を行った。また、LAIMEは貧溶媒中でのスローエバポレーションによって結晶サンプルを調製し、LGaMeは再沈殿によって結晶サンプルを得た。LGaMeのアモルファスサンプルは、結晶サンプルを融点まで昇温した後、 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ まで急冷させることで調製した。各錯体の固体状態における発光スペクトルを測定した。LAIMEとLGaMeはともに溶液状態と比べ、固体状態では発光波長が長波長側にシフトした。固体状態においては、錯体分子間の平均距離が短くなるため、分子間で π 共役ユニットによる π - π 相互作用が生じて長波長化したと考えられる。また、LAIMEおよびLGaMeの溶液状態での発光量子収率はそれぞれ0.03–0.17および0.1–0.19なのに対し、結晶状態ではそれぞれ0.32および0.49と上昇した。このことから、いずれの錯体においてもAIE性が発現することが明らかとなった。また、LGaMeではアモルファス状態で

発光量子収率が0.17である一方、結晶状態では0.49に上昇した。このことから、**LGaMe**においてCIEE性が発現することが分かった。

4. 結言

アルミニウム錯体とガリウム錯体の溶液状態での光学特性を比較することで、吸収・発光極大波長およびルイス塩基応答性に顕著な差異が認められた。**LAlMe**に比べ**LGaMe**において吸収・発光極大波長が長波長化したのは、不活性電子対効果に由来したHOMO準位の不安定化に依るものであると示唆された。一方、ルイス塩基応答性に差異が現れたのは、中心原子の電荷の違いに依るものであると示唆された。一般的には同族元素は類似した性質を有することが知られており、今回の研究を通して吸収発光波長や刺激応答性に顕著な差異が見られたのは、非常に興味深い結果であるといえる。また、固体状態においては、いずれの錯体においてもAIE特性が発現し、**LGaMe**においてはCIEE性も確認された。ホウ素を中心原子とするジアルジミン錯体は、溶液と固体いずれの状態においても発光性を示すことが既に報告されている。中心原子がアルミニウムおよびガリウムの場合においても、同様の結果を示すことが明らかとなった。

参考文献

- 1) Yoshii, R.; Hirose, A.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 18131–18139.
- 2) Jäkle, F. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3985–4022.
- 3) Yoshii, R.; Nagai, A.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4506–4512.
- 4) Sumiyoshi, A.; Chiba, Y.; Matsuoka, R.; Noda, T.; Nabeshima, T. *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 13169–13175.
- 5) Yamane, H.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6786–6790.
- 6) Ito, S.; Hirose, A.; Yamaguchi, M.; Tanaka, K.; Chujo, Y. *Polymers* **2017**, *9*, 68.
- 7) Yanik, H.; Aydyn, D.; Durmus, M.; Ahsen, V. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **2009**, *206*, 18–26.
- 8) Davies, I.; Tellers, D.; Shultz, C.; Fleitz, F.; Cai, D.; Sun, Y. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2969–2972.
- 9) Gompper, R.; Müller, T. J. J.; Polborn, K. *J. Mater. Chem.* **1998**, *8*, 2011–2018.
- 10) Gaussian 16, Revision C.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2016**.

希薄溶液中の低分子量ポリスチレンスルホン酸ナトリウムに対する光および小角X線散乱測定

Light and Small-Angle X-ray Scattering Measurements on Low Molecular Weight Poly(styrene sulfonate) in Dilute Solutions

中村 洋・渡部 史・領木研之

Yo NAKAMURA, Fumi WATANABE, Akiyuki RYOKI

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

Four sodium poly(styrene sulfonate) (NaPSS) samples with different weight-average molecular weights M_w ranging from 9×10^3 to 2×10^3 were prepared by sulfonation of polystyrene samples. Light scattering measurements were made on these samples in aqueous NaCl to determine M_w and the second virial coefficient as a function of the salt concentration C_s . Small-angle X-ray scattering measurements were also carried out to determine the mean-square radius of gyration and the particle scattering function at different C_s . Analyzing the obtained data, the stiffness parameter and the excluded-volume strength were determined as functions of C_s . These molecular parameters for NaPSS were close to those obtained by Iwamoto et al. by analyses of the intrinsic viscosity data.

1. 序

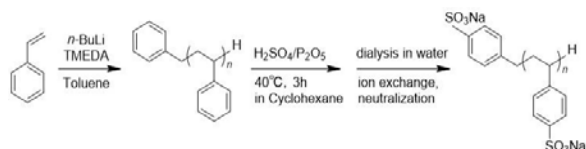
塩水溶液中の高分子電解質は電離基間の静電反発により、有機溶媒中の中性高分子に比べて広がった形態を取ることが知られている。この斥力相互作用は高分子鎖の剛直性を高める働きと、高分子セグメント間の排除体積効果を強める働きの2つの効果に寄与することが知られている¹⁻³⁾。前者の効果は高分子鎖の剛直性パラメータ λ^{-1} の、後者の効果は排除体積強度 B の増大として表れる。両パラメータを実験的に分離評価することは一般に困難であるが、則末らの塩水溶液中のヒアルロン酸ナトリウム⁴⁾、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム (NaPSS)^{5,6)}、ポリ(2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸ナトリウム) (NaPAMPS)^{7,8)}に対する試みがある。彼らは広い分子量範囲にわたる多数の高分子試料に対して粘度測定を行い、固有粘度 $[\eta]$ の分子量依存性を解析して両パラメータを分離評価した。一方で、固有粘度以外の測定によって同様の分離評価された例はなかった。最近、帖佐ら⁹⁾は広い分子量範囲にわたる四級化ポリ(ビニルピリジン)試料を作成し、静的光散乱および小角X線散乱 (SAXS) 測定を行い、第2ビリアル係数 A_2 、 z -平均二乗回転半径 $\langle S^2 \rangle_z$ 、粒子散乱関数 $P(q)$ を求め (q は散乱ベクトルの絶対値を表す)、それらのデータを総合的に解析することにより λ^{-1} と B を分離評価することに成功した。

本研究では、帖佐らの方法がNaPSSに応用できるのかを調べるために、重量平均分子量 M_w が3万以下のNaPSSを4種類合成し、静的光散乱およびSAXS測定を行い、 A_2 、 $\langle S^2 \rangle_z$ 、 $P(q)$ を求めた。得られたデータをみみず鎖モデルに基づく理論を用いて解析し、 λ^{-1} および B を求め、その塩濃度依存性について検討した。

2. 実験

NaPSS試料の調製

試料の合成は、Scheme 1 に示す手順で行った。開始剤に n -ブチルリチウム/テトラメチルエチレンジアミン/トルエン配位子錯体を、溶媒にトルエンを用い、アルゴン雰囲気下でスチレンモノマーのリビングアニオン重合を行った。メタノールを用いて停止反応、再沈澱を行った後、真空乾燥し、ポリスチレン (PS) を得た。以上の操作にて4つのPS試料を合成した。これらの試料に対して¹H NMR測定を行い、重合開始末端にベンジル基が導入されていることを確認した。次に、上記のPS試料に対してVinkの方法¹⁰⁾に従ってスルホン化反応を行った。まず、PSをシクロヘキサンに溶かし、五酸化二リンを添加した濃硫酸にゆっくりと加えスルホン化した。その後透析、分別沈澱、イオン交換、中和を行うことで試料の対イオンを全て Na^+ にした。中和点として、広瀬⁹⁾が直鎖のポリスチレンスルホン酸について決定した値、 $\text{pH} = 7.6$ を用いた。最後に凍結乾燥を行い、末端にブチル基等の疎水基を持たない4つのNaPSS試料 (NaPSS-3k, 8k, 23k, 25k) を得た。 M_w と数平均分子量 M_n の比は、25 °C、0.1 M NaCl水溶液中におけるサイズ排除クロマトグラフィー測定を行うことによりいずれも1.1以下であることを確認した。また、各試料に



Scheme 1. Scheme of NaPSS synthesis.

対して元素分析を行い、炭素と硫黄の含有率の比からスルホン化度を計算したところ、いずれも 1.0 ± 0.1 となった。

小角X線散乱測定

3つのNaPSS試料 (NaPSS-3k, 8k, 23k) を塩濃度 C_s が 1.0, 0.1, 0.05, 0.01 M の NaCl 水溶液に溶解し, SPring-8 BL40B2 ビームラインにおいて SAXS 測定を行った。Dectris 社製 PILATUS3 2 M 検出器を使用し, 入射X線波長 1 Å, カメラ長約 4.2 m, 測定温度 25 °C, 照射時間 300 秒, 溶質高分子の質量濃度 c が約 $2.0 \times 10^{-3} - 9.0 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-3}$ の範囲にある4つの濃度の溶液について過剰散乱強度 $\Delta I(q)$ を測定した。各散乱角における $[c / \Delta I(q)]^{1/2}$ 対 c の関係を直線で近似し, 濃度 0 への外挿値 $[c / \Delta I(q)]_{c \rightarrow 0}^{1/2}$ を求めた。Figure 1 に一例として NaPSS-23 に対する $q^2 < 0.2 \text{ nm}^{-2}$ における $[c / \Delta I(q)]_{c \rightarrow 0}^{1/2}$ の q^2 に対するプロットを示す。各塩濃度における実験値は直線で表され, 直線の傾きと $q \rightarrow 0$ への外挿値 $[c / \Delta I(0)]_{c \rightarrow 0}^{1/2}$ より $\langle S^2 \rangle_2$ を求めた。また, 次式より粒子散乱関数 $P(q)$ を得た。

$$P(q) = \frac{[c / \Delta I(0)]_{c \rightarrow 0}}{[c / \Delta I(q)]_{c \rightarrow 0}} \quad (1)$$

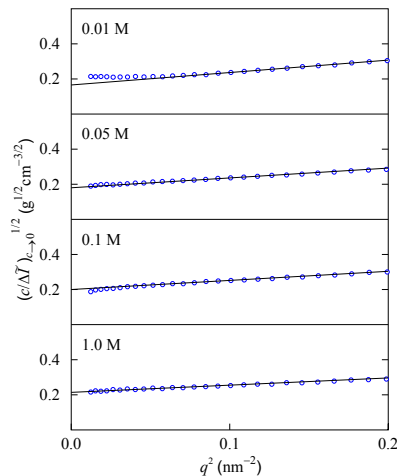


Figure 1. Berry plots for NaPSS-23 in aqueous NaCl solutions with the indicated salt concentrations.

静的光散乱測定

NaPSS-3k, 8k, 23k, 25k の 4 種類の NaPSS 試料を C_s が 1.0, 0.1, 0.01 M の NaCl 水溶液に溶解し, 逐次注入法による多角度光散乱 (MALS) 測定を行った。測定装置として Wyatt Technology 社製 DAWN EOS を使い, 測定波長 690 nm, 測定温度 25 °C とした。測定溶液および溶媒はいずれも孔径 0.45 nm のポリフッ化ビニリデンフィルタ (PALL 社 Acrodisc) を使用し, 光学精製を行った。各 C_s について 5 つの c における還元過剰散乱光強度 $\Delta R(q)$ を測定し, $[Kc / \Delta R(q)]^{1/2}$ 対 q のプロットを用いて $q \rightarrow 0$ への外挿値 $[Kc / \Delta R(0)]^{1/2}$ を求め, $[Kc / \Delta R(0)]^{1/2}$ 対 c のプロットより A_2 , M_w を求めた。こ

こでは K は次式で定義する光学定数である。

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (2)$$

式中, n_0 , λ_0 , N_A はそれぞれ溶媒の屈折率, 入射光波長, アボガドロ定数を示す。各 C_s における屈折率増分 $(\partial n / \partial c)$ の値は経験式 $\partial n / \partial c \propto \lambda_0^{-2}$ を用いて, 異なる λ_0 における文献値^{5,6)} を直線外挿することにより算出した。

また, 各 C_s の NaCl 水溶液中の NaPSS についてデータ解析に必要となる 25 °C における溶質の部分比容 \bar{v} を Anton Paar 社製 DMA5000 振動式密度計を使用して決定した。

3. 結果および考察

3-1. 実験データのフィッティング

Figure 2 に一例として $C_s = 0.01, 0.05, 0.1, 1.0 \text{ M}$ NaCl 水溶液中における NaPSS-23k に対する Kratky プロットを示す。みみず鎖モデルに基づく理論¹¹⁾によれば, $P(q)$ は鎖の直径 d , 剛直性パラメータ λ^{-1} , 鎖の経路長 L を用いて次の様に表される。

$$P(q) = P(q; \lambda L, \lambda d) \quad (3)$$

L は単位経路長あたりの分子量 M_L を用いて次式より分子量と関連付けられる。

$$L = M_w / M_L \quad (4)$$

図中の実線は M_L を主鎖コンフォメーションがトランスジグザグであるとしたときの値 820 nm^{-1} に固定し $d = 2.1 \text{ nm}$ として計算した理論値を表す。図に示す q の領域において, 計算値は実験値をよく表している。他の C_s におけるデータに関しても同様にフィッティングを行い, 各 C_s における NaPSS 鎖の d および剛直性パラメータ λ^{-1} を決定した。

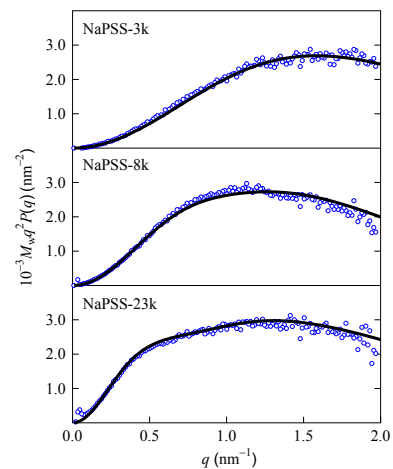


Figure 2. Kratky plots for NaPSS samples in aqueous NaCl (0.1 M) solutions. Solid lines show the calculated values by eq. (3).

Figure 3に $\langle S^2 \rangle_z$ 対 M_w の両対数プロットを示す。SAXS測定より求めた $\langle S^2 \rangle_z$ の M_w に対する両対数プロットを図2に示す。排除体積効果を考慮すると、みみず鎖モデルの $\langle S^2 \rangle$ は次式で表される¹¹⁾。

$$\langle S^2 \rangle = \alpha_S^2 \left[\frac{L}{6\lambda} - \frac{1}{4\lambda^2} + \frac{1}{4\lambda^3 L} - \frac{1}{8\lambda^4 L^2} (1 - e^{-2\lambda L}) \right] + \frac{d^2}{8} \quad (5)$$

α_S は回転半径膨張因子であり、 λL と λB の関数として表される。図中の実線は散乱関数の解析に用いた分子パラメータを用いた式(5)による理論値を表し、実験値は理論値によって表すことができる。

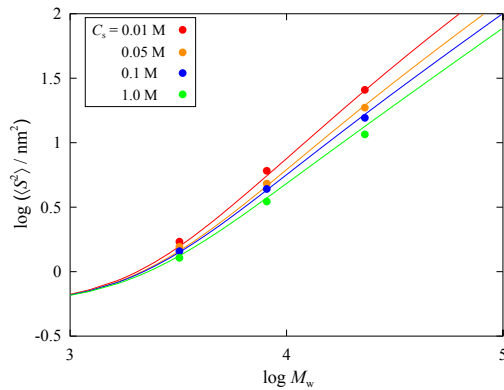


Figure 3. Mean-square radius of gyration for NaPSS in NaCl aq. with the indicated salt concentrations plotted double-logarithmically against M_w . Solid lines show the calculated values by eq. (5).

Figure 4は光散乱によって決定した A_2 の分子量依存性を示す。 A_2 は C_s の減少に伴い増加している。みみず鎖モデルに基づく理論¹¹⁾によると、 A_2 は次式で表される。

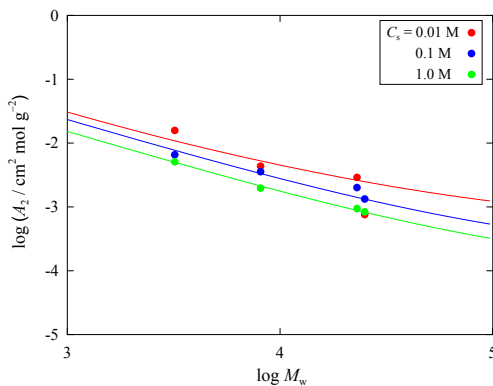


Figure 4. Second virial coefficient for NaPSS in NaCl aq. with the indicated salt concentrations plotted double-logarithmically against M_w . Solid lines show the calculated values by eq. (6).

$$A_2 = 4\pi^{3/2} N_A \frac{\langle S^2 \rangle^{3/2}}{M^2} \Psi(\lambda L, \lambda B) + \frac{a}{M} \quad (6)$$

Ψ は貫入度関数、 a は分子末端からの寄与を表すパラメータである。図中の実線は散乱関数および $\langle S^2 \rangle_z$ の解析に使用した分子パラメータを用いて式(6)による計算値を表し、実験値は理論値によってよく表すことができる。

3-2. 分子パラメータの塩濃度依存性

Figure 5の丸印は本研究で決定したNaPSSの λ^{-1} の $C_s^{-1/2}$ に対するプロットを示す。図中に岩本ら^{5,6)}のNaPSSに対するデータ点を三角で示す。本研究で求めた値は岩本らの値と近くなった。

高分子電解質の λ^{-1} は λ_0^{-1} と電荷間相互作用による寄与 λ_{el}^{-1} の和として表されると考えられている^{1,2)}。

$$\lambda^{-1} = \lambda_0^{-1} + \lambda_{el}^{-1} \quad (7)$$

Figure 5中の破線は $\lambda_0^{-1} = 1.38 \text{ nm}$ とし、Odik-Skolnick-Fixman (OSF) 理論^{1,2)}による λ_{el}^{-1} を用いて計算した値を示す。理論値は実験値と近くなっているが、実験値が上に凸の曲線挙動を取っているのに対し、理論値は下に凸の曲線を描き、定性的に合っているとはいえない。

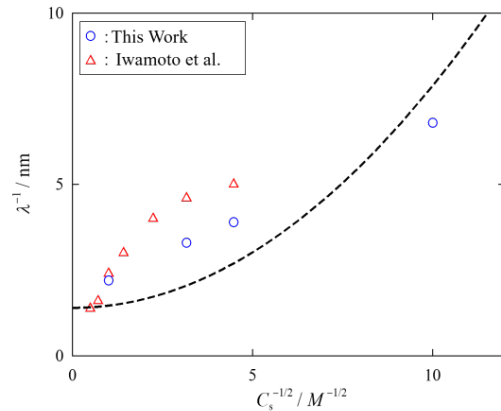


Figure 5. Stiffness parameters for NaPSS (filled circles) in NaCl aq. plotted against $C_s^{-1/2}$. Circles, values determined in this work; triangles, values obtained by Iwamoto et al.^{5,6} dashed line, calculated values by the OSF theory.^{1,2}

Figure 6にNaPSSの排除体積強度 B の $C_s^{-1/2}$ に対するプロットを示す。記号はFigure 5と同じものを用いている。本研究で求めた値は岩本ら^{5,6)}の値とほぼ一致した。

図中の破線はFixman-Skolnick (FS) の理論³⁾による計算値を示す。 $C_s^{-1/2} < 0.5 \text{ M}^{-1/2}$ における理論値は実験値と近くなっているが、 $C_s^{-1/2}$ がそれ以上では理論値は実験値を表すことができない。

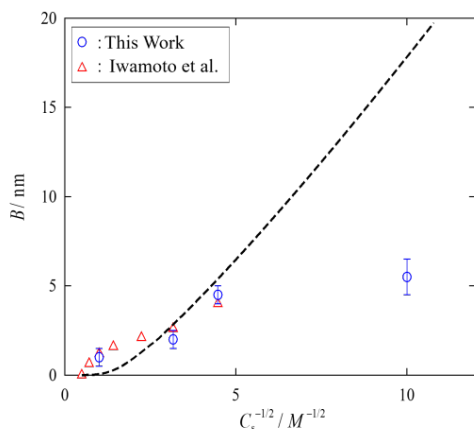


Figure 6. Excluded-volume strengths for NaPSS in NaCl aq. plotted against $C_s^{-1/2}$. Circles, determined in this work; triangles, values obtained by Iwamoto et al;^{5,6} dashed line, calculated values by the FS theory.³

4. 結論

本研究では分子量分布が狭く、かつ末端に疎水性基を持たない比較的低分子量のNaPSS 4試料を新たに合成した。NaCl水溶液に溶解したそれらの試料に対して、SAXSおよびSLS測定を行い、溶媒塩濃度 $C_s = 0.01-1.0$ Mにおける $P(q)$, $\langle S^2 \rangle_z$, A_2 を得た。得られた結果について、摂動みみず鎖モデルに基づく理論を用いてフィッティングを行い、各 C_s のNaCl水溶液中におけるNaPSSの分子パラメータを決定した。本研究で決定した λ^{-1} , B は同溶媒中の $[\eta]$ から求められた値^{5,6}と近い値となった。このことから、小角X線散乱測定および静的光散乱測定量を用いた λ^{-1} と B の分離評価が可能であることが示された。

参考文献

- 1) T. Odijk, *Polymer*, **19**, 989 (1978).
- 2) J. Skolnick and M. Fixman, *Macromolecules*, **10**, 944 (1977).
- 3) M. Fixman and J. Skolnick, *Macromolecules*, **11**, 863 (1978).
- 4) K. Hayashi, K. Tsutsumi, T. Norisuye, and A. Teramoto, *Polym. J.*, **28**, 922 (1996).
- 5) E. Hirose, Y. Iwamoto, and T. Norisuye, *Macromolecules*, **32**, 8629 (1999).
- 6) Y. Iwamoto, E. Hirose, and T. Norisuye, *Polym. J.*, **32**, 428 (2000).
- 7) J. Yashiro, R. Hagino, S. Sato, and T. Norisuye, *Polym. J.*, **38**, 57 (2006).
- 8) R. Hagino, J. Yashiro, M. Sakata, T. Norisuye, *Polym. J.*, **38**, 861 (2006).

9) 帖佐智也・中村 洋, 日本化学繊維研究所要旨集 **80** (2023).

10) H. Vink, *Makromol. Chem.*, **182**, 279 (1981).

11) H. Yamakawa and T. Yoshizaki, *Helical Wormlike Chains in Polymer Solutions* 2nd Ed., Springer, Heidelberg, 2016.

マイクロDICとマイクロビームWAXSの相補的解析からみた

天然ゴムのき裂先端近傍の結晶化挙動

Crystallization near Crack-Tips of Natural Rubber Characterized by Micro-scale DIC and Micro-Beam Scanning WAXS

浦山 健治¹・Tam Thanh Mai¹・安威 友裕²・田中 墨登²・櫻井 伸一²・角田 克彦³

Kenji URAYAMA, Tam Thanh MAI, Tomohiro YASUI, Ruito TANAKA, Shinichi SAKURAI, Katsuhiko TSUNODA

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

²Department of Biobased Materials Science, Kyoto Institute of Technology

³Sustainable and Advanced Materials Division, Bridgestone Corporation

Strain-induced crystallization (SIC) in natural rubber near crack tips pronouncedly enhances crack growth resistance, but the relationship between local strain field and crystallization remains unclear because of confined and heterogeneous characteristics. Using micro-scale digital image correlation and scanning wide-angle X-ray diffraction (with a narrow 10 μm square beam) complementary, we elucidate the distributions of local strain tensor and SIC near the crack tip and its peripheral zone. The analysis indicates a tight correlation between these properties. In the peripheral zone, there is a proportionality for the tilt angles of both the principal strain axis and the crystal orientation relative to the crack opening direction. This linear relationship shows that shear strain plays a crucial role in determining the crystal orientation. Importantly, the maximum tensile component in the tensor of local principal strains governs local crystallinity. This simplicity arises from the limited change in deformation type within the SIC region between planar and uniaxial extension. These findings enable to calculate crystallinity distribution using solely strain field data, providing valuable insights into the role of SIC in enhancing the crack growth resistance.

1. 緒言

天然ゴム(NR)はひずみ誘起結晶化(SIC)由来のひずみ硬化の自己補強効果を示し、他のゴムとは一線を画した優れた力学的性質を有している。なかでも、高ひずみ状態となる静止き裂や疲労き裂の先端近傍ではSICによるひずみ硬化が生じるため、NRではき裂の進展が抑制されるという大きな優位性がある。マイクロビームを用いた広角X線散乱測定(μ -WAXS)の既往研究[1]は、NRの静止き裂や疲労き裂ではき裂先端からおおよそ100 μm 程度の距離までSICが生じていることが報告されている。

一方で、き裂先端近傍のSICのトリガーであるひずみは非常に不均一である。非SICゴムのき裂先端近傍のひずみ

場については詳しく研究されており、ひずみテンソルの各成分の大きさ、二軸性、ひずみテンソルの主軸の傾き、など様々な量が広く分布している[2]。このため、NRのき裂先端近傍のSICには結晶化度や配向方向に空間分布があるはずであるが、不均一なひずみ分布とSICの分布の相関は明確化されていない。我々は、NRのき裂先端の2次元ひずみ場を顕微鏡下でデジタル画像相関法(μ -DIC)を用い、高い空間分解能で特性化した。同一試料のき裂先端近傍を細いX線を走査し、得られた広角X線散乱(μ -beam scanning WAXS)の2次元パターンマップを解析することにより結晶化度と結晶配向方向の2次元分布を求めた。2つの測定法を相補的に用いて得たひずみとSICの空間分布を詳しく解析し、き裂先端近傍の狭小空間でのSIC機構を明確化することを目的とした。

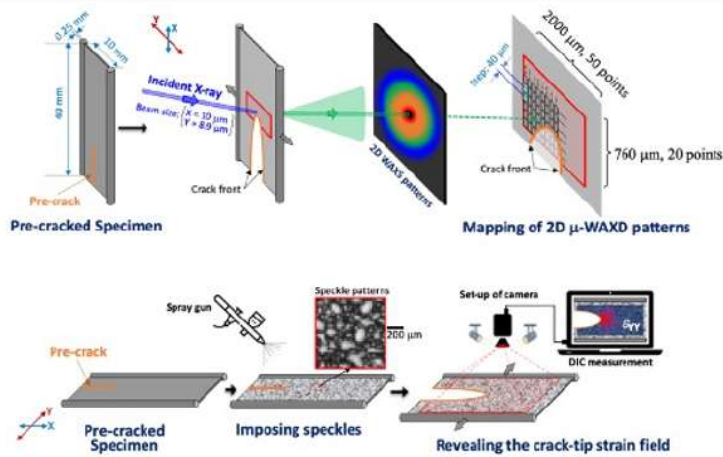


Figure 1. Experimental setups for μ -beam scanning WAXS and μ -scale DIC.

2. 実験

初期き裂を与えた加硫NRシート試料に対して、き裂方向と垂直方向に一定の伸長を与えた状態で走査 μ -WAXS測定およびDIC測定を行った (Fig. 1)。与えた伸長ひずみは、き裂が自走し始めるひずみよりもやや小さい値に設定した (真ひずみ0.62)。 μ -beam WAXS測定のビームサイズは $10\ \mu\text{m} \times 8.9\ \mu\text{m}$ 、隣接測定点の間隔は $40\ \mu\text{m}$ である。

DIC測定は顕微鏡下で行った。塗布したランダム模様の特長の平均サイズは $20\ \mu\text{m}$ 、 $4\ \mu\text{m}/\text{pixel}$ の解像度であり、 μ -WAXS測定と同程度の空間分解能は同程度である。

測定前に試料に荷重-除荷重サイクルを繰り返し、応力に対するひずみ履歴効果を除去した。また、応力緩和の影響を除くために、応力が平衡化するひずみ印加10分後に測定を行った。

3. 結果と考察

き裂周辺の走査 μ -WAXS測定で得られた2次元WAXSパターンのマッピングの結果をFig. 2に示す。図中で結晶回折が確認されたものを黄色、結晶化度が1%以下のものを赤色で示している。き裂先端からの距離が異なる7つのラインで測定された2次元パターンを図中に示す。き裂の輪郭 (オレンジ線) の近傍では結晶化が生じている一方で、き裂輪郭からの距離が大きくなるにつれて結晶化度は小さくなり、き裂から十分に遠くなると非晶領域になることがわかる。この伸長条件 (マクロな真ひずみ0.65) ではき裂先端から約 $160\ \mu\text{m}$ の距離まで結晶領域が広がっている。また、結晶c軸はき裂中心あたりでは伸長方向に平行であるが、中心から離れるに従って結晶c軸の傾きが大きくなっている。

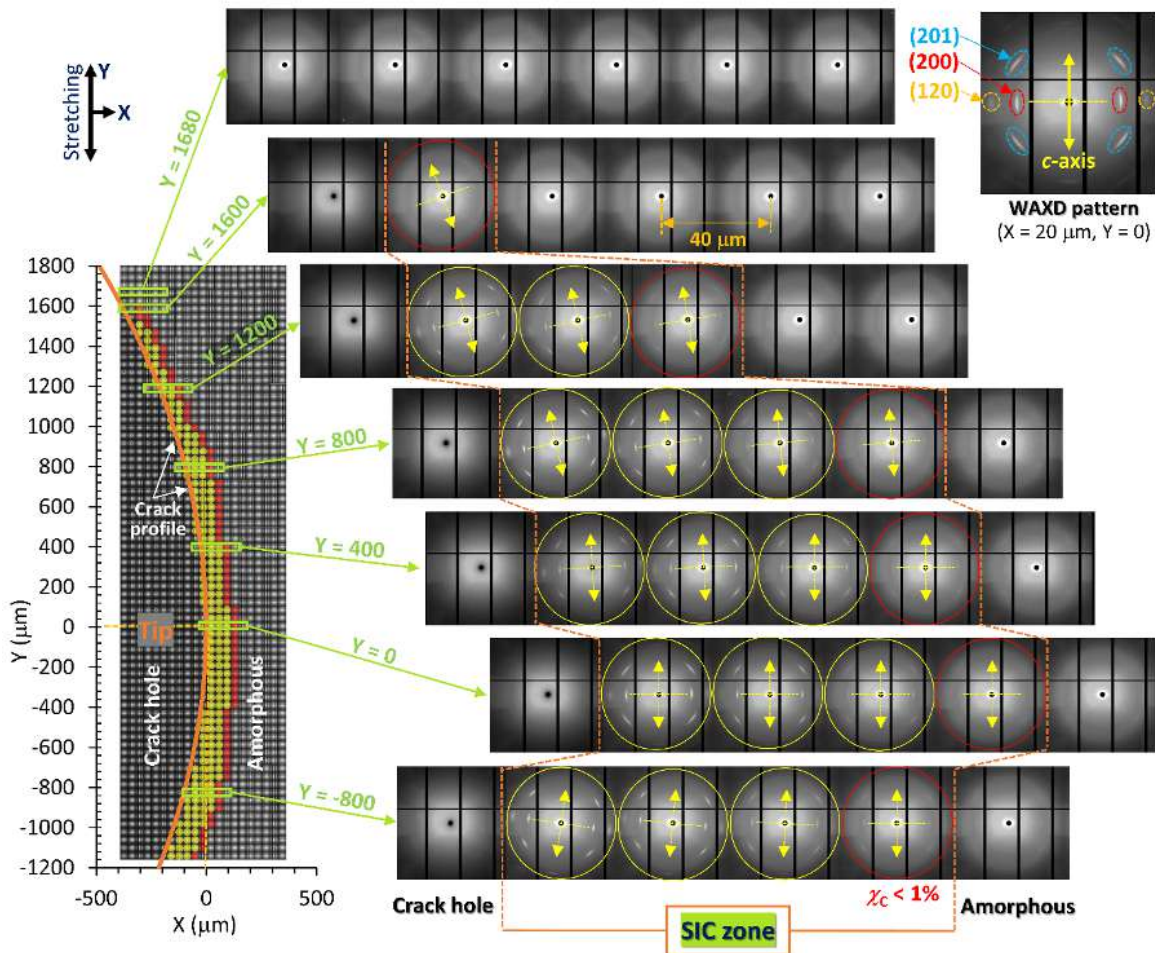


Figure 2. Two-dimensional mapping of WAXD patterns around the crack tip including peripheral zone. The patterns are mapped on a grid of 21 points on the X-axis and 75 points on the Y-axis, each separated by $40\ \mu\text{m}$. The strain-induced crystallization (SIC) zone, highlighted in yellow, surrounds the crack-tip. It is defined by a boundary with less than 1% crystallinity, marked by red circle patterns.

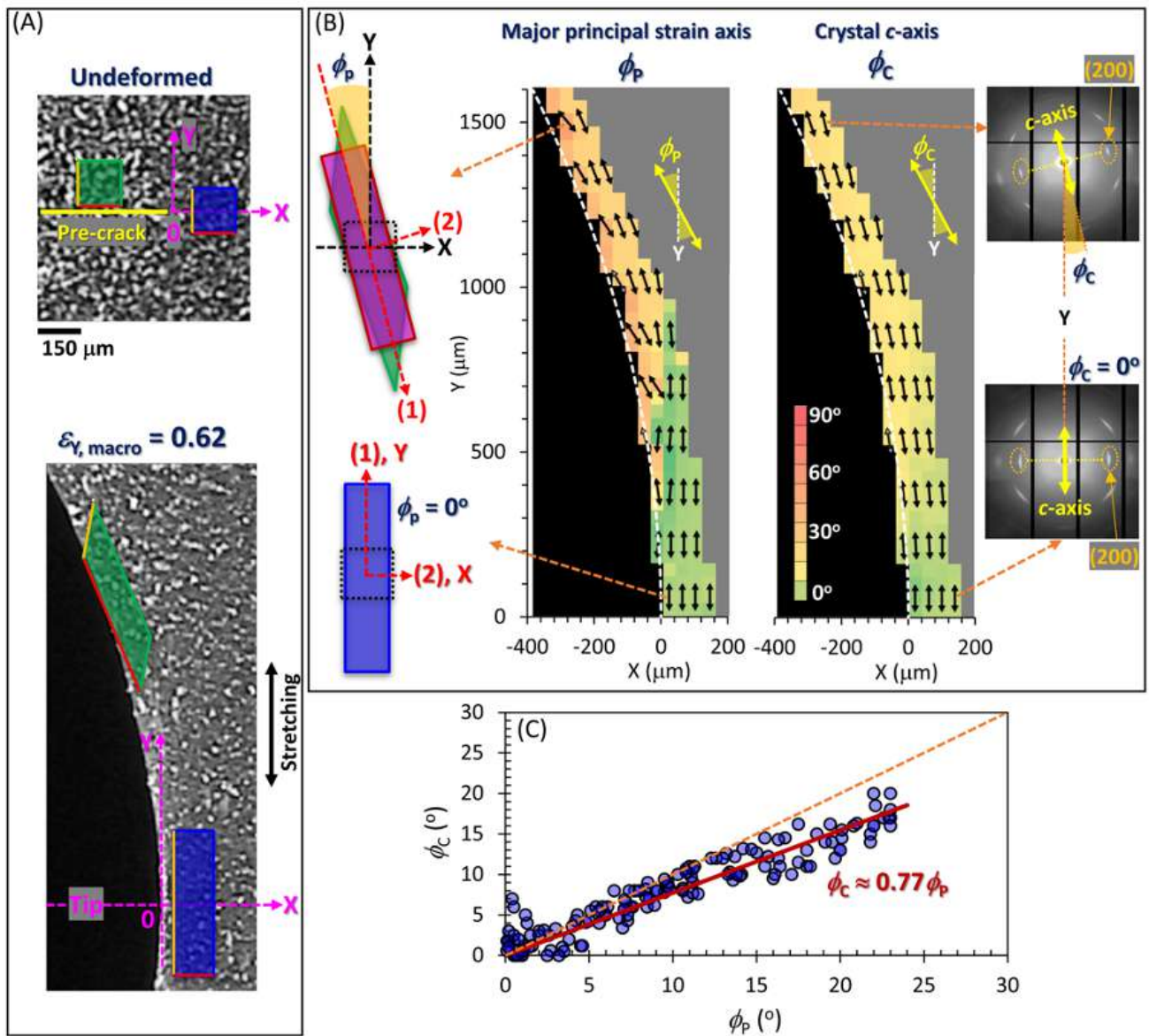


Fig. 3Aからわかるように、き裂の開口に伴って、き裂先端からの中心線付近ではY軸方向への伸長変形が生じているのに対し(青色の四辺形)、先端から離れた場所ではひずみを伴わない純粋回転、二次元のずり変形および伸長変形があわさった複雑な変形が生じている(緑色の四辺形)。DIC解析によって各位置の局所変形のひずみテンソルを求め、変形の回転成分を除去した主ひずみテンソルを算出した。主ひずみテンソルの主軸方向(つまり生じた変形の伸長成分の方向)とY軸の傾き ϕ_p と、Fig.2のWAXSパターンから求めた結晶c軸の傾き ϕ_c の2次元分布をFig.3Bに示した。 ϕ_p と ϕ_c の相関をさらに詳しくみるために全測定点について両者をプロットした結果をFig.3Cに示す。両者は係数が1に近い比例関係にあり、結晶の配向は局所変形のずり成分によって生じているといえる。

Figure 3. Spatial distributions of local tilting of principal strain axis and crystal *c*-axis near a crack tip. (A) Deformation of a square finite element due to crack-tip opening at two distinct positions, i.e., near and distant from the $Y = 0$ line. (B) Spatial distributions of the angles of major principal strain axis (ϕ_p) and crystal *c*-axis (ϕ_c) relative to the *Y*-axis in the vicinity of a crack tip and its peripheral zone. The notations (1) and (2) designate the directions of the major and minor principal strains, respectively, within the local strain tensor. The angle ϕ_p at each specific position within its spatial distribution is evaluated concurrently at the identical position as the angle ϕ_c in its respective distribution. (C) Plots of ϕ_c against ϕ_p for all measured positions. The dashed line represents the line with a slope of unity for comparison.

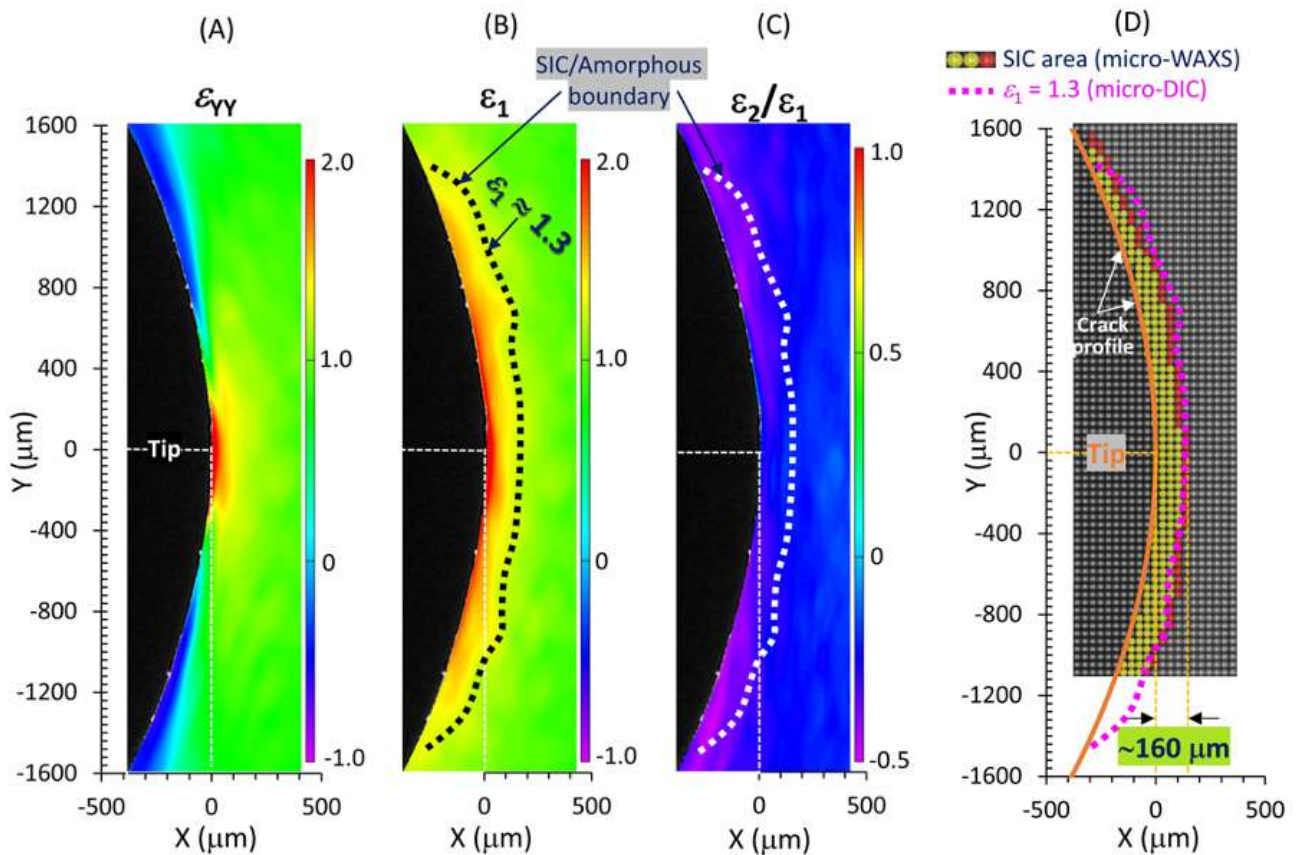


Figure 4. Spatial distribution of local strains around a crack tip. Two-dimensional distributions of (A) true strain ϵ_{yy} in laboratory coordinate, (B) major principal true strain ϵ_1 , and (C) strain biaxiality of principal strains ϵ_2/ϵ_1 for a pre-notched NR specimen subjected to an applied macroscopic tensile true strain of 0.62. The dotted line depicts the iso- ϵ_1 line of $\epsilon_1 = 1.3$. (D) Comparison between the SIC zone (as shown in Figure 2) identified by micro-beam WAXD measurements, and the area where $\epsilon_1 > 1.3$, as determined by micro-DIC. The iso- ϵ_1 line of $\epsilon_1 = 1.3$ closely parallels the boundary between SIC and amorphous states.

Fig. 4にDIC測定によって求めた実験室座標系でみたY方向の真ひずみ (ϵ_{yy}) およびひずみ主軸系でみた主軸方向の最大主ひずみ (ϵ_1) の2次元分布を示す。き裂中心から離れた領域で ϵ_{yy} と ϵ_1 は大きく異なっている。これはFig.3で示したように当該領域では必ず変形の寄与が大きく、ひずみの主軸がY方向に対して大きく傾いているためである。Fig. 4Cより、 $\epsilon_1 = 1.3$ の等ひずみ線が結晶と非晶領域の境界とおおよそ一致することがわかる。このことから、SICを決めているのはひずみ主軸方向の最大ひずみであることがわかる。Fig. 3Cに、変形の二軸性の指標となる主ひずみテンソルの最大成分 (ϵ_1) と最小成分 (ϵ_2) の比の分布を示す。 ϵ_2/ϵ_1 は平面伸長で0, 等二軸伸長で1, 一軸伸長で約0.5になる。結晶領域の ϵ_2/ϵ_1 の値の変域は小さく、 -0.25 ± 0.1 (平面伸長と一軸伸長の中間あたり) である。結晶/非晶領域の境界が、ひずみの二軸性に関係なく ϵ_1 だけで決まっているのは、SIC領域のひずみ状態の二軸性がほとんど変わっていないためであろう。また、き裂周辺のSIC開始ひずみ $\epsilon_1 = 1.3$ は、別の実験で求めたき裂のないバルクNR試料の一軸伸長と平面伸長の値と ($\epsilon_1 = 1.4$) とかなり近い。このこと

から、き裂周辺のひずみ場は不均一ではあるが、SICの開始ひずみは均一な伸長下のバルク試料の値とほぼ同じであるといえる。

Fig. 5にき裂周辺の様々な位置で評価した局所ひずみと結晶化度 χ_c の関係を示す。いずれの線に沿った挙動をみても、き裂輪郭に近づくにつれて、 ϵ_1 と χ_c が増加する傾向がある。一方で、Fig. 3Cでみたようにひずみ比 ϵ_2/ϵ_1 は場所によらずほぼ一定である。全ての測定点での χ_c をその位置での ϵ_1 に対してプロットした結果をFig. 5Dに示す。様々な位置の全データ点が1本の曲線上にあり、き裂周辺の χ_c は ϵ_1 のみの関数で表せることがわかる。図中の線はデータの傾向を再現できるようにフィッティングした現象論的関数である。ここで見出された χ_c の単純性もつ意義は大きい。 $\chi_c - \epsilon_1$ 関係を表す関数がわかれば、任意の開口度のSICによる結晶化度の分布が、 μ -WAXD測定に頼らずに、 ϵ_1 の分布のデータのみから予測できるからである。

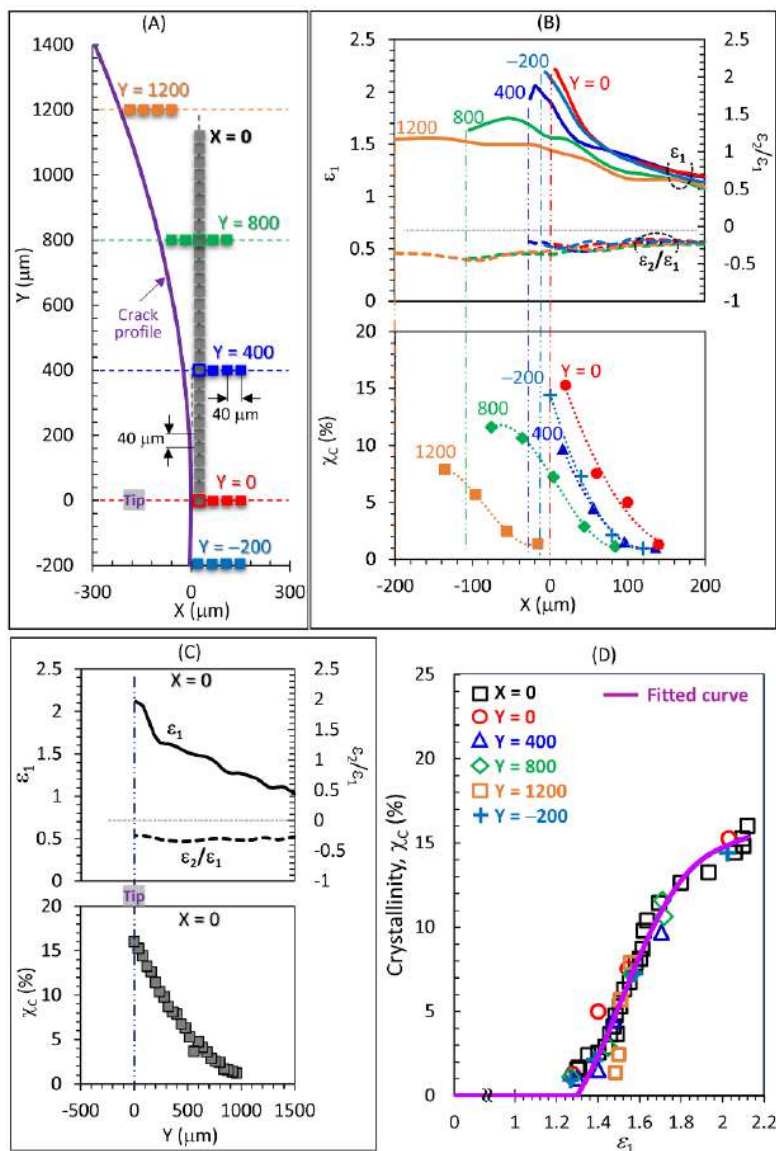


Figure 5. Correlations between local strains and local crystallinity in the SIC zone. Correlations between major principal true strain (ϵ_1), strain biaxiality (ϵ_2/ϵ_1), and local crystallinity (χ_c) at various positions along (A) specific six lines: (B) the $Y = 0, 400, 800, 1200,$ and $-200 \mu\text{m}$ lines, and (C) the $X = 0$ line. (D) Plots of c_c against ϵ_1 for the data in (B) and (C). The various data at different positions fall on a singular fitted curve, depicted by the violet line. The fitted curve is given by a quartic function, $c_c(X, Y) = \sum a_k [\epsilon_1 - \epsilon_1^*]^k$ for $\epsilon_1 \geq \epsilon_1^*$ with $k = 1, 2, 3, 4$, and $c_c(X, Y) = 0$ for $\epsilon_1 < \epsilon_1^*$. The SIC onset strain ϵ_1^* is set at 1.3, and the coefficients from the fitting are $a_1 = 17.85, a_2 = 70.02, a_3 = -148.55,$ and $a_4 = 78.62$.

4. まとめ

天然ゴムの静止き裂先端近傍の狭小空間で生じる不均一なひずみ場が誘起する結晶化挙動を明確化した。結晶化は局所的な主ひずみテンソルの最大真ひずみが約1.3に達すると生じた。このSICの開始ひずみはき裂のないバルク試料の一軸および平面伸長で生じるSICの開始ひずみとほぼ同じである。き裂周辺の変形状態は、 ϵ_1 はき裂輪郭線に近づくほど大きくなるが ϵ_2/ϵ_1 はほとんど一定であり、一軸伸長と平面伸長の中間ぐらいの変形モードが生じている。局所結晶化度は、位置に関係なく、 ϵ_1 のみの関数であることがわかった。この関数を用いると、 ϵ_1 の2次元分布データのみで結晶化度分布が計算でき、その意義は大きい。

5. 参考文献

- 1) 例えば, Brüning, K.; Schneider, K., Roth, S. V., Heinrich, *Polymer* **54**, 6200 (2013).
- 2) Mai, T.-T., Morishita, Y., Tsunoda, K., Urayama, K., *Adv. Polym. Sci.*, **289**, 239 (2023).
- 3) Mai, T.-T., Yasui, T., Tanaka, R., Masunaga, H., Kabe, T., Tsunoda, K., Sakurai, S., Urayama, K., submitted.

配列・立体規則性の制御されたポリマーのライブラリー合成を可能にする 側鎖後修飾型モノマーの開発

Development of Monomers for Post-Polymerization Modification Enabling a Library Synthesis of Sequence- and Tacticity-Controlled Polymers

大内 誠, ジョ コウエン, パン ユハン, 近藤 環

Makoto OUCHI, Xiaoyan XU, Yuehang PAN, Tamaki KONDO

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

We have designed some pendant-transformable monomers suitable for selective radical cyclopolymerization, alternating radical copolymerization, and stereospecific radical polymerization to achieve a library synthesis of sequence-controlled polymers and isotactic polymers. Importantly, the polymerizations and the post-polymerization modifications allowed syntheses of such (co)polymers made of commodity monomer units such as (meth)acrylate, styrene, acrylamide, and vinyl ether carrying various pendant groups. The properties/functions derived from sequence and tacticity were also evaluated through comparison with the non-controlled counterparts.

1. 配列・立体規則性が制御された高分子

合成高分子は一次構造に分布があるため、物性と構造の相関を調べるのが難しい。そのため、たとえ煩雑な合成プロセスであっても一次構造を精密に制御し、物性との相関を明らかにすることは重要である。リビング重合によって分子量や末端基の制御は可能になったが、物性制御に有用な統計的共重合体については配列（シーケンス）がランダムで、鎖間に組成分布があり、平均組成比でしか物性を議論できない。配列が制御されると全てのポリマー鎖が均一な共重合体となるのみならず、配列に基づく物性や機能の発現が期待できる。また、立体規則性は、制御することで結晶性が発現するなど物性に大きく影響を与える一次構造であり、その制御は重要である。触媒規制・末端規制による立体規則性の制御系はこれまで報告されてきたが、立体規則性は側鎖置換基のかさ高さや極性に大きく影響を受けるために、1つの重合系を用いて幅広い側鎖構造に対して立体規則性を制御するのは難しい。また、極性官能基を有するポリマーの立体規則性制御に展開すると、触媒やルイス酸が被毒し、立体規則性の制御が難しくなることが多く、多くの立体規則性ポリマーの側鎖は比較的単純なアルキル基に限られる。

2. 重合後修飾反応による高分子合成

重合後に置換変換反応が可能な側鎖を有するモノマーを重合し、重合後に置換反応によって任意の置換基を導入する反応は重合後修飾反応（Post-Polymerization Modification; PPM）と呼ばれる¹⁾。ライブラリー合成、重合を阻害する官能基を有するポリマーの合成が可能、という特徴を有する。電子求引性基で活性化されたエステル結合を側鎖に有するアクリレートやメタクリレートのラジ

カル重合後にその側鎖をアミンやアルコールと反応させることで様々な置換基を有するポリマーを得る反応がPPMの代表例であり、これまで様々な（メタ）アクリレートが開発されてきた（図1）¹⁾。最近ではアミド基型のPPMモノマーも報告されており²⁾、窒素上に2つの置換基を設計するために一次構造制御に対して興味深いモノマー群と考えられる。

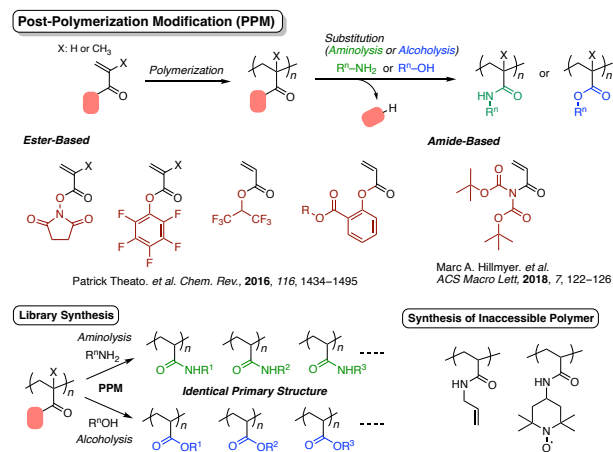


Figure 1. Postpolymerization modification (PPM) and examples of PPM monomers.

我々はこの重合後修飾反応が可能なモノマーの側鎖構造を利用して配列や立体規則性を制御し、PPMによって側鎖に様々な置換基を導入しながら、様々な側鎖を有する汎用モノマー単位からなる「交互共重合体」「アイソタクチックポリマー」の合成に成功してきた（図2）³⁾⁻¹⁸⁾。その最新の結果を報告する。

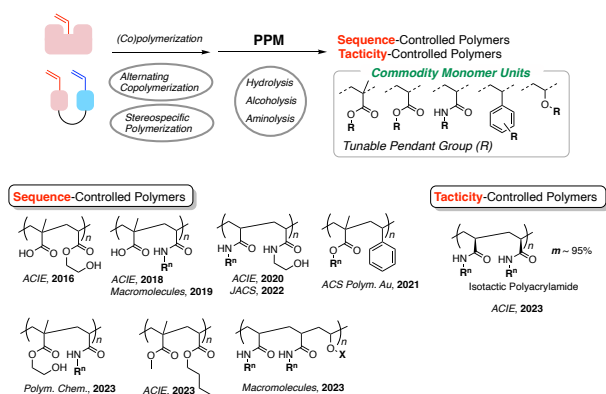


Figure 2. Alternating copolymerization or stereospecific polymerization of pendant-transformable monomers and postpolymerization modification (PPM) for a library synthesis of sequence-controlled polymers and tacticity-controlled polymers.

3. アイソタクチックポリアクリルアミドのライブラリー合成

スルホンアミド基を含む環状ウレイド骨格を有するアクリルアミドモノマーに対し、ウレイド骨格の窒素上にイソプロピル基を導入したモノマー**1**を設計した (図3)⁶。側鎖アミド結合は、スルホンアミド基とカルボニル基の2つの電子求引性基によって活性化されており、この側鎖は重合後にアミンやアルコールとの反応 (アミノリシス、アルコールリシス) によって置換され、ポリアクリルアミド、ポリアクリレートに変換できると考えた。また、ウレイド骨格の窒素上に導入したイソプロピル基はかさ高く、側鎖間の反発による立体規則性の制御を狙った。

モノマー**1**のラジカル重合を行い、重合後にメタノールを添加することでポリアクリル酸メチル (PMA) への変換を行い、その立体規則性をNMRによって評価した。詳細は割愛するが、重合時にリチウムトリフラート (LiOTf) を添加し、重合溶液に過剰のメタノールを直接添加することで定量的なPMAへの変換が可能であった。得られるPMAの立体規則性をNMRによって調べると、重合温度、モノマー濃度によって立体規則性が変化し、特にモノマー濃度を低くし、低温で重合すると、得られるPMAのアイソタクチシティが増加することがわかった。LiOTf存在下、モノマー濃度100 mM (溶媒ジクロロエタン)、重合温度 -40°C [AIBNを開始剤とし、LED UV光 (365 nm) を照射] で重合し、メタノールを添加して得られたPMAはメソダイアド93%のアイソタクチックPMAであった。なお、メタノール以外のアルコールを検討したが、定量的な変換は難しかった。一方、アミンによるアミノリシス反応は定量的に進行し、アミノリシス反応はLi塩を添加しなくても進行した。例えばイソプロピルアミンで変換すると、メソダイアド約95%のアイソタクチックポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM) が得られた。図1のNMRスペクトルをみると、立

体規則性が制御されているために、アタクチックPNIPAMに比べてピークがシャープであることがわかる。他に長鎖アルキルアミン、ベンジルアミン、シクロヘキシルアミン、ジメチルアミノエチルアミン、などでも変換可能であり、いずれも得られるポリアクリルアミドは高いアイソタクチシティを有していることがわかった。なお、アイソタクチックPNIPAMは温度に関わらず水に不溶であり、水中で温度応答性を示すアタクチックPNIPAM (低温で可溶、高温で不溶) とは全く異なる物性を示した。また、オクチルアミン ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NH}_2$) で変換して得られるポリマーは結晶性を示した。アタクチックなポリオクチルアクリルアミドはアモルファスであることから、アイソタクチックに制御されて結晶性を有するようになったと考えられる。側鎖変換性モノマーを使うことで、幅広い側鎖の立体規則性ポリマーをライブラリー合成でき、立体規則性による物性を見いだせた意義は大きい。

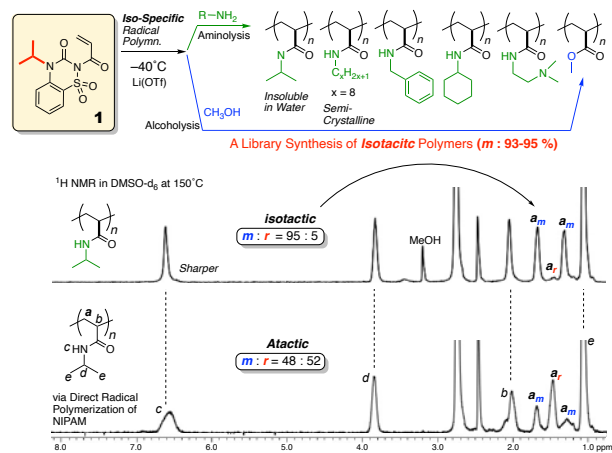


Figure 3. A library synthesis of isotactic polymers via stereospecific radical polymerization of **1** at -40°C and subsequent aminolysis or alcoholysis.

3. 交互配列特異的な自己修復物性

最近、Urbanらはメタクリル酸メチル (MMA) とアクリル酸ブチル (BA) の共重合体において、交互シーケンスによってポリマー鎖間のファンデルワールス力が向上し、ランダム配列に比べて自己修復特性が向上する可能性を示した¹⁹。検証された共重合体は交互リッチなポリマーであったが、その配列は制御されたものではなかった。我々はMMAとBAの交互共重合体の合成を目指し、単独重合性がなほほどかさ高く、重合後にMMAユニットに変換できるメタクリレートを検討し、BAとの交互共重合を制御し、メタノールで側鎖変換することでMMAとBAの交互共重合体の合成を目指した。

かさ高く側鎖変換可能なメタクリレートとして、トリクロロサリチル酸エステルを側鎖に有するメタクリレートを検討・合成した (図4)⁸。フェノールでメタクリレー

トエステル結合を形成し、オルト位にあるカルボン酸に対してバルキーなアルコールを反応させることで単独重合性を低下させることを考えた。電子求引性基である3つの塩素によって、エステル結合が活性化され、重合後のメタノールによる側鎖変換が可能になると考えた。トリクロロサリチル酸エステルを側鎖に有するメタクリレートのカルボン酸の置換基をメチル基、シクロヘキシル基、アダマンチル基、とかさ高くすると、重合率が低下し、得られる生成物の分子量が低下したことから、明確に単独重合性が低下した。特に最もかさ高いアダマンチル基を導入したモノマーを用いた場合は、生成物の分子量は800となりポリマーは生成しないことがわかった。そこでこのアダマンチル基を導入したモノマー**2**を用い、BAとのラジカル共重合を行ったところ、モノマー反応性比は $r_1 = 0.11$, $r_2 = 0.12$ と小さくなり、交互性の高い共重合体が生成していることがわかった。この低いモノマー反応性比は、MMAとBA、電子求引性基を有するメタクリレート (PFMA) とBAの組み合わせと比べても特異的であり、アダマンチル基のかさ高さによる単独重合性の低下が効いていると考えられる。

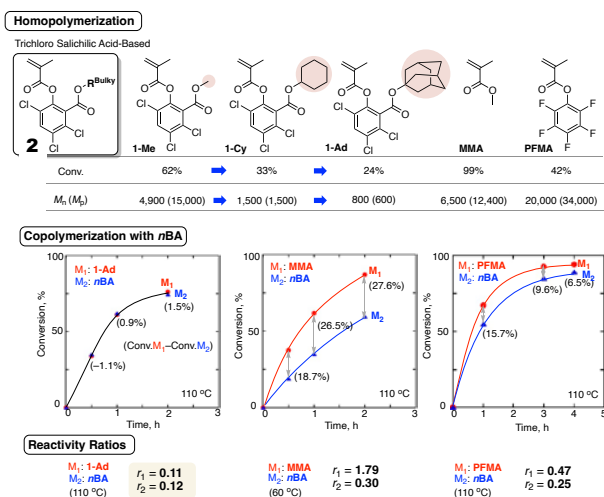


Figure 4. Monomer characters of **2** in comparison with the derivatives, MMA, and PFMA: Conversions after heating with AIBN in d_8 -toluene at 60°C for 30 h ($[\text{monomer}]_0/[\text{Initiator}]_0 = 700/30$ mM) and M_n (M_w) of the products measured by SEC. (B) Time-conversion profiles of free radical copolymerization with nBA in comparison with MMA and PFMA: $[\mathbf{2}]_0$ or MMA or PFMA] $_0/[\text{nBA}]_0/[\text{VAm-110}]_0 = 500/500/30$ mM in d_8 -toluene at 110 °C. (C) Reactivity ratios for copolymerizations of **2**/nBA, MMA/nBA and PFMA/nBA.

このモノマー**2**とBAのラジカル共重合を行い、その後メタノールによるユニット**2**の側鎖変換によって、MMAとBAの交互共重合体を得た (図5)。また、MMAとBAの直接ラジカル共重合によって対応する1:1の統計的共重合体も得た。フィルムを作成し、表面に傷をつけてその修復挙動を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、交互ポリマーの修復が統計的共重合体と比べて明らかに速いことがわか

った。こうして交互共重合体の優れた自己修復挙動が確認された。

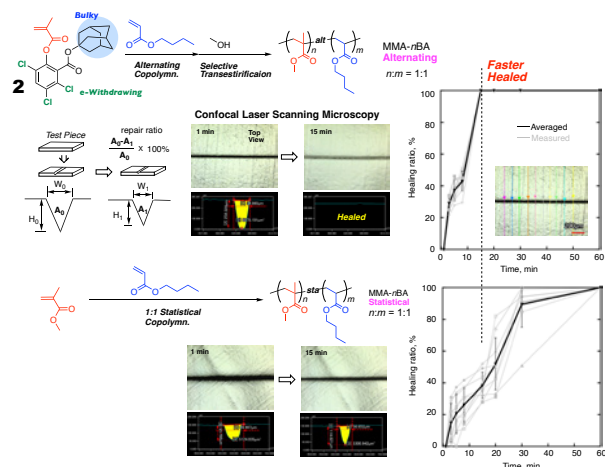


Figure 5. Evaluation of self-healing property of MMA-BA alternating copolymer by confocal laser scanning microscopy in comparison with the corresponding 1:1 statistical copolymer.

また、UrbanらはBAとスチレンの交互シークエンスも自己修復特性に寄与することを報告している²⁰⁾。我々は最近、BAとスチレンの交互共重合体を合成するための、変換性モノマー**3**を設計・合成し、スチレンとの交互共重合体の合成、ブタノールによる側鎖変換によってBAとスチレンの交互共重合体の合成にも成功し、この自己修復特性の評価を行っている (図6)。

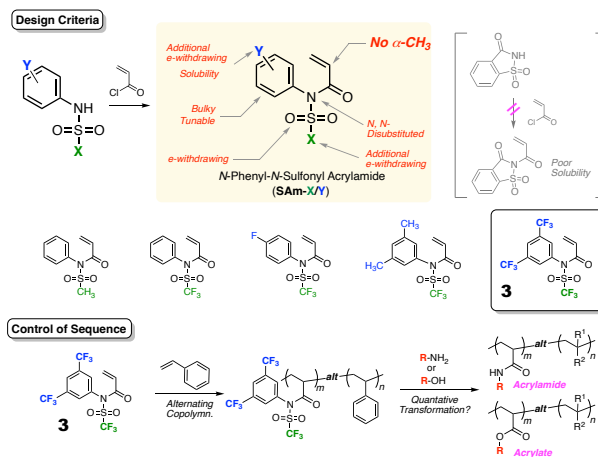


Figure 6. Design of a pendant-transformable acrylamide monomer **3** for synthesis of alternating copolymer of acrylamide or acrylate with styrene.

4. AAB交互共重合体の合成

我々はこれまでに主に汎用モノマーのAB交互共重合体の合成を達成してきたが、AB交互以外の周期配列制御は困難であった。ここではAAB交互共重合体の合成を目指し、環化効率の高い電子不足アクリレートジビニルモノマーと電子豊富なビニルエーテルの環化交互共重合を制御し、側鎖変換によってAAB交互共重合体の合成を検討した。具

体的には環化効率の高い電子不足ジアクリレートモノマーとして、モノマー**4**を設計・合成した(図7)⁵⁾。2つのアクリレートは近接させるためにベンゼン環のオルト位で結合しており、ソーブインゴールド則による環化効率向上のためにgem-ジCF₃基を導入している。2つのビニル基とも電子求引性基のCF₃基によって電子不足となっており、ビニルエーテルとの交互共重合性が向上しており、またカルボニル基は活性化されており、重合後のアミノリシス変換が可能である。重合中の架橋を抑制するために希釈条件にし、VEを過剰に用いることで**4**の環化、ビニルエーテルへの付加が交互に起こる環化交互共重合を制御した。得られたポリマーに対し、アミンを添加して変換することで、アクリルアミド-アクリルアミド-VEのAAB交互共重合体の合成に成功した。イソプロピルアミンで変換することで、NIPAMを含むAAB交互共重合体とし、その水中温度応答性を確認した。

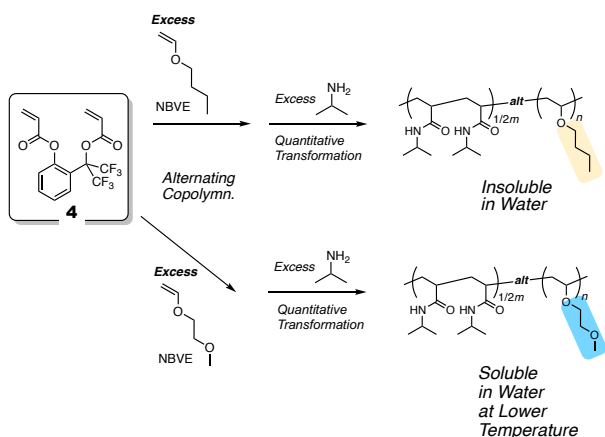


Figure 7. Design of a pendant-transformable diacrylamide monomer **4** for synthesis of AAB alternating copolymer of acrylamide with vinyl ether.

5. まとめ

モノマーの側鎖置換基に応じて一次構造の制御されたポリマーを合成しようとしても、モノマー構造が変わると一次構造制御が難しくなる。本研究では側鎖変換可能なモノマーを用いて立体特異的重合や交互共重合を制御し、重合後に側鎖変換をすることで様々な側鎖置換基を有するアイソタクチックポリマーや交互共重合体のライブラリー合成が可能になることを示した。ライブラリー合成ができるために、制御した一次構造(立体規則性, 配列)に特異的な物性や機能を見出しやすい特徴がある。また、側鎖変換で化合物が脱離するため、原子効率が問題であるが、この脱離化合物の分離、リサイクルについて検討している。今後は分子量, 末端基, 立体規則性, 配列, が制御された共重合体の合成, ペプチドに迫る高分子性の解明も期待される。

参考文献

- 1) A. Das, P. Theato, Activated Ester Containing Polymers: Opportunities and Challenges for the Design of Functional Macromolecules. *Chem Rev* **116**, 1434-1495 (2016).
- 2) M. B. Larsen, S. E. Herzog, H. C. Quilter, M. A. Hillmyer, Activated Polyacrylamides as Versatile Substrates for Postpolymerization Modification. *ACS Macro Lett* **7**, 122-126 (2018).
- 3) M. Ouchi, Construction methodologies and sequence-oriented properties of sequence-controlled oligomers/polymers generated via radical polymerization. *Polym J* **53**, 239-248 (2021).
- 4) X. Xu, K. Shibata, M. Ouchi, Precision syntheses of poly(NIPAM-alt-HEMA) and effects of the alternating sequence on thermoresponsive behaviors in water. *Polym. Chem.* **14**, 55-61 (2023).
- 5) X. Xu, M. Ouchi, Radical Cyclocopolymerization of a Transformable Divinyl Monomer with a Monovinyl Monomer and Postpolymerization Modification for the Synthesis of AAB-Type Alternating Copolymers Composed of NIPAM and Vinyl Ether. *Macromolecules* **56**, 7950-7960 (2023).
- 6) Y. Pan, M. Ouchi, Stereospecific Radical Polymerization of a Side-Chain Transformable Bulky Acrylamide Monomer and Subsequent Post-Polymerization Modification for Syntheses of Isotactic Polyacrylate and Polyacrylamide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **62**, e202308855 (2023).
- 7) D. Oh, M. Ouchi, Synthesis of methacrylic acid-acrylonitrile alternating copolymer using an extremely bulky methacrylate and the sequence-dependent thermal reaction behaviors. *Eur. Polym. J.* **193**, (2023).
- 8) H. Lai *et al.*, A Transformable and Bulky Methacrylate Monomer That Enables the Synthesis of an MMA-nBA Alternating Copolymer: Sequence-Dependent Self-Healing Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **62**, e202218597 (2023).
- 9) K. Shibata, Y. Kametani, Y. Daito, M. Ouchi, Homopolymer-block-Alternating Copolymers Composed of Acrylamide Units: Design of Transformable Divinyl Monomers and Sequence-Specific Thermoresponsive Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 9959-9970 (2022).
- 10) Y. Kametani, M. Ouchi, Copolymerizations of Saccharin Methacrylamide with Dienes toward Softer Alternating Copolymers and Advanced Sequence Control. *Macromolecular Chemistry and Physics* **223**, 2100249 (2022).

- 11) H. W. Lai, M. Ouchi, Backbone-Degradable Polymers via Radical Copolymerizations of Pentafluorophenyl Methacrylate with Cyclic Ketene Acetal: Pendant Modification and Efficient Degradation by Alternating-Rich Sequence. *ACS Macro Lett* **10**, 1223-1228 (2021).
- 12) Y. Kametani, M. Ouchi, One-Pot Preparation of Methacrylate/Styrene Alternating Copolymers via Radical Copolymerization and Alcoholysis Modification: Sequence Impacts on Glass Transition Temperature. *ACS Polymers Au* **1**, 10-15 (2021).
- 13) Y. Kametani, F. Tournilhac, M. Sawamoto, M. Ouchi, Unprecedented Sequence Control and Sequence-Driven Properties in a Series of AB-Alternating Copolymers Consisting Solely of Acrylamide Units. *Angew. Chem. Int. Ed* **59**, 5193-5201 (2020).
- 14) Y. Kametani, M. Ouchi, Saccharin-pendant methacrylamide as a unique monomer in radical copolymerization: peculiar alternating copolymerization with styrene. *Polym. Chem.* **11**, 6505-6511 (2020).
- 15) D. Oh, Y. Furuya, M. Ouchi, Unusual Radical Copolymerization of Suprabulky Methacrylate with N-Hydroxysuccinimide Acrylate: Facile Syntheses of Alternating-Rich Copolymers of Methacrylic Acid and N-Alkyl Acrylamide. *Macromolecules* **52**, 8577-8586 (2019).
- 16) Y. Kametani, M. Sawamoto, M. Ouchi, Control of the Alternating Sequence for N-Isopropylacrylamide (NIPAM) and Methacrylic Acid Units in a Copolymer by Cyclopolymerization and Transformation of the Cyclopendant Group. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 10905-10909 (2018).
- 17) Y. Kametani, M. Nakano, T. Yamamoto, M. Ouchi, M. Sawamoto, Cyclopolymerization of Cleavable Acrylate-Vinyl Ether Divinyl Monomer via Nitroxide-Mediated Radical Polymerization: Copolymer beyond Reactivity Ratio. *ACS Macro Lett* **6**, 754-757 (2017).
- 18) M. Ouchi, M. Nakano, T. Nakanishi, M. Sawamoto, Alternating Sequence Control for Carboxylic Acid and Hydroxy Pendant Groups by Controlled Radical Cyclopolymerization of a Divinyl Monomer Carrying a Cleavable Spacer. *Angew. Chem. Int. Ed* **55**, 14584-14589 (2016).
- 19) M. W. Urban *et al.*, Key-and-lock commodity self-healing copolymers. *Science* **362**, 220-225 (2018).
- 20) S. Gaikwad, M. W. Urban, Interactions in Self-Healable Styrenic Copolymers. *J Am Chem Soc* **145**, 9693-9699 (2023).

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 伊藤 紳三郎

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.81
(Annual Report of the Research Institute for
Chemical Fibers, Japan: Vol.81, 2024)

Published by
Nippon Kagakusen-i Kenkyusho
Kyoto, Japan

日本化学繊維研究所 第81回講演集
2024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
