

整理番号	2020-J-010	報告者氏名	遊佐 真一
------	------------	-------	-------

研究課題名

光で制御放出可能な高分子ベシクル

<代表研究者> 機関名：兵庫県立大学大学院工学研究科 職名： 准教授 氏名： 遊佐真一

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

水中で反対電荷の高分子電解質を混合すると、水に不溶なポリイオンコンプレックス (PIC) を形成するが、電荷を持たない水溶性高分子ブロックと反対電荷の高分子電解質ブロックからなるジブロック共重合体を水中で混合すると、水溶性 PIC ミセルを形成する。ポリ (2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (PMPC) は、ホスホベタイン構造で、ポリマー鎖内の電荷は打ち消されている水溶性高分子として知られている。PMPC ブロックと反対電荷のイオン性ブロックからなるジブロック共重合体を、電荷を中和するように水中で混合すると、水溶性 PIC ミセルを形成する。PIC ミセルは電荷を持つ化合物をコア中に内包できるが、内包ゲスト分子を制御放出できない。

ポリ(*o*-ニトロベンジルメタクリレート) (PNBM) に光を照射すると、*o*-ニトロベンジル基が脱離して、ポリメタクリル酸を生じる。塩基性で PNBM に光を照射すると、アニオン性のポリメタクリル酸ナトリウム (PMA) を生じる。そこで本研究では、*o*-ニトロベンジルメタクリレート (NBM) とメタクリル酸のランダム共重合体 (P(MN₁₈)₁₃₉) を合成した。P(MN₁₈)₁₃₉ は、塩基性の水中で光を照射すると NBM ユニットが分解して、メタクリル酸のナトリウム塩を生じるため側鎖のアニオンの数が増加する。PMPC ブロックとポリ (3-(メタクリロイルアミド)プロピルトリメチルアンモニウムクロリド) (MAPTAC) ブロックからなる、カチオン性のジブロック共重合体 (P₁₀₀T₉₆) を制御ラジカル重合法で作製した。アニオン性の P(MN₁₈)₁₃₉ と、カチオン性ジブロック共重合体の P₁₀₀T₉₆ を、混合することで水溶性 PIC ミセルを形成した。溶液中に含まれるアニオン性の MA とカチオン性の MAPTAC ユニットの全濃度に対する、MAPTAC のモル比を f と定義した。 $f = 0.5$ で作製した PIC ミセルの溶液に UV 照射すると 2-ニトロベンズアルデヒドが脱離し、アニオンが増加することで電荷バランスが崩れたが、粒径等は変化しなかった。これは NBM ユニットが分解してもアニオンの増加が少ないためだと考えられる。そこで $f = 0.4$ で作製した PIC ミセルに UV 光を照射した。この場合、PIC ミセルの r サイズや散乱光が、UV 光照射時間に応じて変化した。 $f = 0.4$ で作製した PIC ミセル中の NBM ユニットが UV 光照射により完全に光分解した場合の f は 0.36 になる。このときアニオンの割合が多く電荷バランスが崩れたため、PIC ミセルが膨潤してサイズが大きくなり、密度が低下したために散乱光強度は低下した。PIC ミセルの会合状態を光で制御できるため、薬物などの内包ゲスト分子を制御放出可能なドラッグデリバリーシステム (DDS) 等への応用が期待される。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

口頭発表：

(1) Biocompatible Polyion Complex (PIC) Aggregates Formed by Electrostatic Interactions in Water (Invited Lecture), Shin-ichi Yusa, Molecules to Materials (MTM2020), Department of Applied Chemistry, S. V. National Institute of Technology, Surat, Gujarat, India (web), December, 17-18, 2020, Oral

(2) Water-soluble Biocompatible Polyion Complex (PIC) Aggregates
Shin-ichi Yusa, Advanced Biomaterials and Medical Membrane Symposium - Bio-inspired interfaces and membranes (Taiwan, Web), December 11, 2020, Oral

(3) Formation of polyelectrolyte complexes from oppositely charged diblock copolymer in aqueous solution
Thu Thao Pham, Kazuhiko Ishihara, Shin-ichi Yusa
3rd GLowing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K2020), (Tokyo, Japan, web), November, 28, 2020, Oral

(4) PIC formation of amphoteric diblock copolymers and its salt and temperature responsive behaviors in water
Hirokazu Fukumoto, Shin-ichi Yusa
3rd GLowing Polymer Symposium in KANTO (GPS-K2020), (Tokyo, Japan, web), November, 28, 2020, Oral

(5) Synthesis of Polymer Micelles Formed from Functionalizable Core and Zwitterionic Shell via Polymerization-induced Self-assembly (PISA)

P. Damsongsang, V. P. Hoven, S. Yusa

第30回日本MRS年次大会、オンライン開催、令和2年12月9-11日(2020)、口頭

(6) Preparation of Polyion Complex (PIC) Aggregates Composed of Oppositely Charged Polystyrene Based-Polyelectrolytes

T. Pham, K. Ishihara, S. Yusa

第30回日本MRS年次大会、オンライン開催、令和2年12月9-11日(2020)、口頭

ポスター発表：

(7) Clear Liquid Marble Prepared with Hydrophobic Silica Particles

S. Kano, S. Fujii, Y. Nakamura, S. Yusa

第30回日本MRS年次大会、オンライン開催、令和2年12月9-11日(2020)、ポスター

(8) Salt and temperature responsive behavior of amphoteric diblock copolymers

H. Fukumoto, S. Yusa

第30回日本MRS年次大会、オンライン開催、令和2年12月9-11日(2020)、ポスター

<研究の目的、経過、結果、考察 (5000 字程度、中間報告は 2000 字程度) >

研究の目的 反対電荷のポリアニオンとポリカチオンを水中で混合すると、水に不溶なポリイオンコンプレックス (PIC) を形成する。非イオン性で水溶性のポリ (エチレングリコール) (PEG) ブロックと反対電荷のイオン性ブロックからなるジブロック共重合体を水中で混合すると、ポリマー間の静電相互作用で水溶性の PIC ミセルを形成する。2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) は生体膜を構成するリン脂質と同じ構造のホスホリルコリン基を側鎖に持つため、親水性で高い生体適合性を示す。PMPC ブロックと反対電荷のイオン性ブロックからなるジブロック共重合体を、水中で電荷を中和するように混合すると、静電相互作用で水溶性 PIC ミセルを形成する。イオン性ブロックと PMPC ブロックの鎖長が同じ場合、PIC ミセルを形成するが、内包ゲスト分子を制御放出できない。Cao らはポリ(*o*-ニトロベンジルメタクリレート) (PNBM) とポリ(ジメチルアミノエチルメタクリレート) (PDMAEMA) の両親媒性ジブロック共重合体が光、pH、温度に刺激応答するミセルを作製した。Zhang らは NBM と 7-(2-メタクリロイルオキシ-エトキシ)-4-メチルクマリン (CMA) を用いた会合体制作を報告した。この会合体は重合に伴い球状、ワーム、ラメラ、ベシクルを形成する。

本研究では NBM が UV 照射で、メタクリル酸 (MA) に分解することに注目し、NBM と塩基性条件下でカルボキシレートアニオンを生じる MA のランダム共重合体 (P(MN₁₈)₁₃₉) を合成した。P(MN₁₈)₁₃₉ とカチオン性ジブロック共重合体 (P₁₀₀T₉₆) を混合することで PIC ミセルを形成した。ミセル溶液に UV 照射すると 2-ニトロベンズアルデヒド (2BA) が脱離し、カルボキシレートアニオンを生じた。アニオンが増加することで電荷バランスが崩れ、ミセルの形状が変化する (Figure 1)。この PIC ミセルは光照射で、薬物などの内包ゲスト分子を制御放出できる可能性があるため、ドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用が期待される。

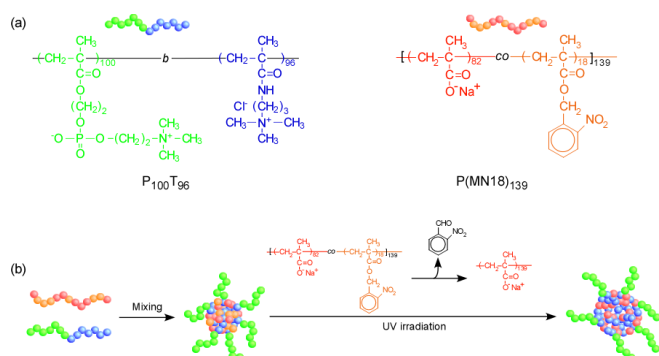


Figure 1. (a) Chemical structures of P₁₀₀T₉₆ and P(MN₁₈)₁₃₉, and (b) conceptual illustration of preparation for photo-responsive PIC micelle and swelling of PIC micelle by UV irradiation.

経過 材料: メタクリル酸 (MA, 98%) は関東化学から購入し減圧蒸留して使用した。*o*-ニトロベンジルメタクリレート (NBM) は文献に従い合成した。2,2'-アゾビスイソブチルニトリル (AIBN, 98%) は Sigma-Aldrich から購入し、メタノールで再結晶後に使用した。連鎖移動剤の 4-シアノペンタン酸ジチオベンゾエート (CPD) は文献に従い合成した。2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) は日油から購入し、アセトニトリルで再結晶した。3-(メタクリロイルアミド)プロピルトリメチルアンモニウムクロリド (MAPTAC) と 4,4'-アゾビス-(4-シアノ吉草酸) (V-501) は和光純薬工業から購入しそのまま使用した。メタノールはモルキュラーシーブスで 1 日乾燥した後、蒸留して使用した。水はイオン交換水を使用した。

P(MN₁₈)₁₃₉ の合成: MPC (15.0 g, 50.8 mmol) を 45.7 mL の水に溶解し、CPD (0.142 g, 0.508 mmol) と V-501 (71.2 mg, 0.254 mmol) を添加した。水溶液をアルゴン雰囲気下で 30 分脱気した後、70 °C で 4 時間重合した。重合溶液を純水に対し 5 日間透析し、凍結乾燥でポリマー (PMPC₁₀₀-CTA) を回収した (12.2 g, 80.5%)。¹H NMR から求めた PMPC₁₀₀-CTA の重合度 (DP(NMR)) と数平均分子量

(M_n (NMR)) は、それぞれ 100 と 29,800 g/mol だった。ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) から求めた PMPC₁₀₀-CTA の数平均分子量 (M_n (GPC)) と分子量分布 (M_w/M_n) は 17,800 g/mol と 1.05 だった。

次に PMPC₁₀₀-CTA を用いて MAPTAC の重合を行った。MAPTAC (1.09 g, 4.96 mmol)、V-501 (7.00 mg, 0.0250 mmol)、PMPC₁₀₀-CTA (1.00 g, 0.0496 mmol、 M_n (NMR) = 2.98×10^4 、 $M_w/M_n = 1.05$) を 10 mL の水に溶解した。水溶液を 30 分脱気した後、70 °C で 6 時間重合した。重合溶液を純水に対し 2 日間透析し、凍結乾燥でジブロック共重合体 (P₁₀₀T₉₆) を回収した (1.79 g, 85.6%)。¹H NMR から求めた P₁₀₀T₉₆ の DP(NMR) と M_n (NMR) は 96 と 49,900 g/mol だった。GPC から求めた P₁₀₀T₉₆ の M_n (GPC) と M_w/M_n は 99,100 g/mol と 1.11 だった。

RAFT 重合で P(MN₁₈)₁₃₉ を合成した。MA (0.907 g, 10.5 mmol)、NBM (1.00 g, 4.52 mmol)、CPD (14.0 mg, 0.0501 mmol)、AIBN (8.13 mg, 0.0495 mmol) をメタノール/水 = 8/2 の混合溶媒 (4.41 mL) に溶解した。アルゴン雰囲気下 60 °C で 20 時間加熱した (74.4%)。¹H NMR スペクトルから算出したコンバージョンは 74.4% だった。重合溶液をメタノールに対し 2 日間、純水に対し 2 日間透析して精製を行い、凍結乾燥で回収した (0.443 g, 23.2%)。GPC から求めた P(MN₁₈)₁₃₉ の M_n (GPC) と M_w/M_n は、それぞれ 15,550 g/mol と 1.50 だった。

PIC ミセルの作製：P(MN₁₈)₁₃₉ と P₁₀₀T₉₆ をそれぞれ $C_p = 0.1$ g/L で 0.1 M NaCl aq に溶解し pH 11.8 に調製した。溶液中に含まれるアニオン性の MA と、カチオン性の MAPTAC ユニットの全濃度に対する、MAPTAC のモル比を f と定義した。 $f = 0.4$ および 0.5 の 2 種類の溶液を調製した。

UV 光照射：P(MN₁₈)₁₃₉ と P₁₀₀T₉₆ をそれぞれ $C_p = 0.1$ g/L で 0.1 M NaCl aq に溶解し pH 11.8 に調製して、PIC ミセル溶液を調製した。Asahi Spectra MAX-301 Compact Xenon Light Source を用いて、275 nm 以上の波長で強度が 20.0 mW/cm² の光を照射した。

測定：¹H NMR は Bruker DRX 500 FT-NMR spectrometer を用いた。GPC 測定は検出器に東ソー RI-8020 屈折率計、ポンプに東ソー DP-8020、カラムに Shodex GF-7M を用いた。展開溶媒は pH 9 の 50 mM リン酸緩衝溶液とアセトニトリルの混合溶媒 (9/1 (v/v)) を用いて 40 °C で溶出した。 M_n と M_w/M_n は標準ポリスチレンスルホン酸ナトリウム換算で決定した。可視紫外吸光度測定は、Jasco V-730 UV-vis spectrometer で行った。光照射器は Asahi Spectra の MAX-301 Compact Xenon Light Source を用いて、短波長カットフィルター (LUX275) を使用し 275 nm 以上の波長の光を照射した。動的光散乱 (DLS) は Malvern Zetasizer nano で測定し、流体力学的半径 (R_h) を求めた。ゼータ電位は Malvern Instruments Zetasizer nano ZS で、光源として 632.8 nm の波長の He-Ne レーザー (4 mW) で行った。TEM 観察は 160 kV の加速電圧で JEOL JEM-2100 で行った。銅グリッド上に PIC ミセル溶液を一滴滴下して、リンタングステン酸ナトリウムで染色し、一日減圧下で乾燥した。SLS 測定で、重量平均分子量 (M_w (SLS))、回転二乗半径 (R_g)、第二ビリアル係数 (A_2) を求めた。

結果と考察 高分子合成：重水中 70 °C の P(MN₁₈)₁₃₉ の ¹H NMR スペクトルで、1.4~2.5 ppm のポリマー主鎖由来のピークと 5.8 ppm の NBM のメチレンプロトン由来のピークから NBM の組成を 18 mol% と算出した。リン酸バッファーを展開溶媒に用いた P(MN₁₈)₁₃₉ の GPC を測定した。溶出曲線はユニモーダルで、 M_w/M_n は 1.45 だった。

P(MN₁₈)₁₃₉ への光照射：pH 12 の水に溶解した 0.1 g/L の P(MN₁₈)₁₃₉ に 120 分間、UV 光を照射したときの吸収スペクトルの変化を測定した (Figure 2)。照射時間の増加に伴い 268 nm のピークが減少し、309 nm のピークが増加した。PNBM が光開裂を起こして 2BA が生成したと考えられる。

Wieboldt らは 268 nm のピークを合成した 2-ニトロベンジル誘導体、338 nm のピークを光開裂後のニトロソフェニル-ケト酸と結論づけた。このことから 268 nm のピークは NBM ユニット、309 nm の

ピークは2BAだと考えられ、UV照射による光開裂で2BAが生じたことを確認した。溶液の色は無色から黄色に変化した。これはUV照射による光開裂で脱離した2BA由来の色だと考えられる。

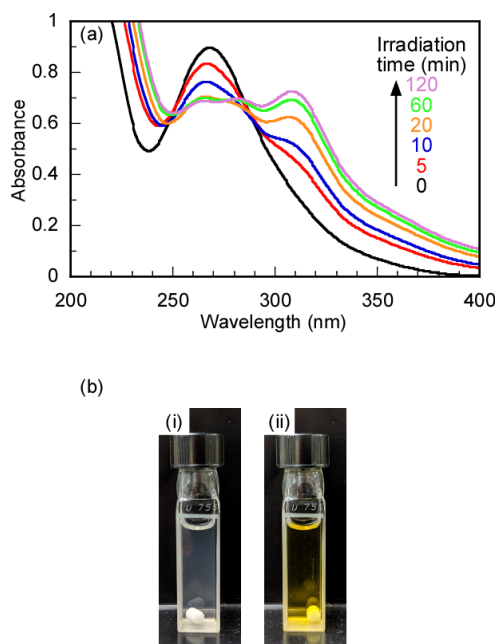


Figure 2. (a) UV-vis adsorption spectra of P(MN18)₁₃₉ aqueous solution at C_p = 0.1 g/L at pH 12 with UV irradiation for 120 min and (b) photograph of P(MN18)₁₃₉ solution; (i) before and (ii) after UV irradiation.

P(MN18)₁₃₉ の pH 12 の水溶液への UV 照射前後の DLS を測定した (Figure 3)。UV 照射前はユニマー状態のポリマーと、凝集体による粒径の大きな会合体が観測された。一方、UV 照射後はポリマー間の会合体のみが観測された。また、UV 照射前後のゼータ電位は、それぞれ -13.2 mV と -26.0 mV だった。UV 照射で NBM ユニットが光開裂しアニオンが増加した。

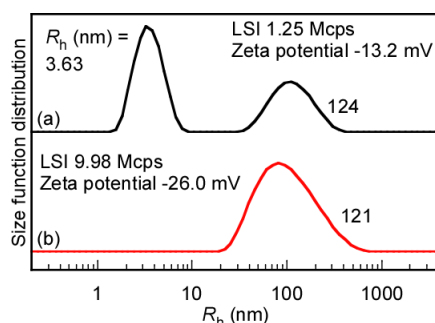


Figure 3. R_h distribution for P(MN18)₁₃₉: (a) before and (b) after UV irradiation.

PIC ミセルの作製: P(MN18)₁₃₉/P₁₀₀T₉₆ による PIC ミセルのカチオンとアニオンの混合比である f を変化したときの R_h、LSI、ゼータ電位を調べた (Figure 4)。 $f = 0.5$ で R_h は 24.2 nm、LSI は 0.515 kcps で最大となった。このことから共重合体の電荷が、中和されたときにサイズの大きな PIC ミセルを形成することを確認できた。 $f = 0.5$ でゼータ電位は 0.486 mV とゼロに近かった。

UV 光照射前後の吸収スペクトルの変化を測定した (Figure 5a)。UV 光の照射時間の増加に伴い、NBM ユニット由来の 268 nm の吸収ピークが減少し、2BA 由来の 309 nm の吸収ピークが増加した。したがって、2BA の解離が確認できた。 $f = 0.5$ で作製した PIC ミセルに UV 光を照射した時の R_h、LSI の変化について調べた (Figure 5b)。pH 11.8 で $f = 0.5$ になるよう PIC ミセルを調製し、30 分間 275 nm 以上の紫外光を照射して DLS を測定した。R_h、LSI ともに UV 光を照射しても変化しなかった。PIC ミセルは PMPC シェルに覆われているため、UV 光を照射してもゼータ電位は変化しないと考

えられる。この PIC ミセル中の NBM ユニットが UV 光照射により完全に光分解した場合の f^* は 0.45 になる。この負電荷の増加率は低く、PIC ミセルを膨潤させるほどの負電荷の増加には及ばなかったと考えられる。

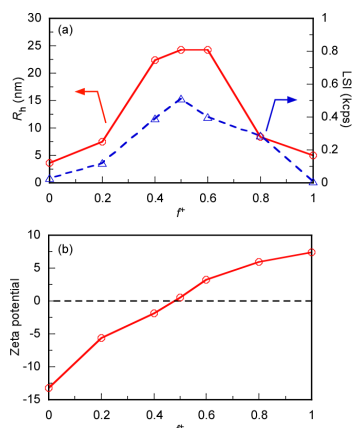


Figure 4. (a) R_h (\circ) and light scattering intensity (\triangle) of P(MN18)₁₃₉/P100T₉₆ as a function of f^* ($=$ [MAPTAC]/([MAPTAC]+[MA])) in 0.1 M NaCl aqueous solutions at 25°C. (b) Zeta-potential of P(MN18)₁₃₉/P100T₉₆ as a function of f^* in 0.1 M NaCl aqueous solutions. The concentrations of the total copolymers were fixed at 0.1 g/L.

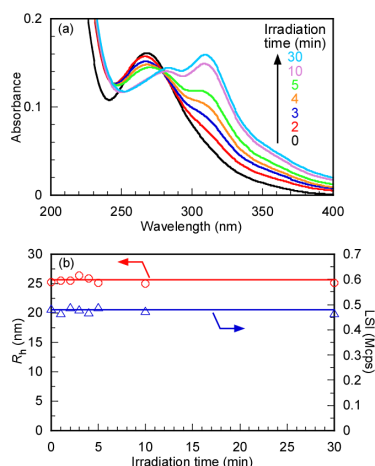


Figure 5. (a) Hydrodynamic radius (R_h) and light scattering intensity (LSI) for PIC micelle as a function of UV irradiation time and (b) UV-vis adsorption spectra against irradiation time from 0 to 30 min for PIC micelles with $f^* = 0.5$ at pH 11.8.

UV 光照射前後で $f^* = 0.5$ の PIC ミセルの R_h は変化しなかったため、 $f^* = 0.4$ で作製した PIC ミセルに UV 光を照射した時の吸収スペクトル、 R_h 、LSI の変化について調べた。 $f^* = 0.4$ で作製した PIC ミセル中の NBM ユニットが UV 光照射により完全に光分解した場合の f^* は 0.36 になる。その状態は電荷が中和している $f^* = 0.5$ よりもアニオンの割合が多く電荷バランスが崩れるため、UV 照射前後で PIC ミセルの粒径が変化すると期待される。UV 光照射前後の吸収スペクトルにおいて、NBM ユニット由来の 269 nm のピークが減少し、2BA 由来の 310 nm のピークが増加した (Figure 6a)。pH 11.8 で $C_p = 0.1$ g/L の P(MN18)₁₃₉ と P100T₉₆ のそれぞれの溶液を、 $f^* = 0.4$ になるよう両者を混合し PIC ミセルを作製した。0 から 30 分間 275 nm 以上の UV 光を照射した。照射時間に伴い R_h は 22.4 nm から 26.5 nm に増加し、LSI は 0.415 kcps から 0.286 kcps に減少した (Figure 6b)。NBM ユニット側鎖が光分解しアニオンが増加することで、会合体が膨潤したと考えられる。UV 光照射前後のゼータ電位は 0.415 mV および 0.286 mV で、ほぼ一定だった。PIC ミセルは PMPC シェルに覆われているため、UV 光を照射してもゼータ電位は変化しなかった。 $f^* = 0.4$ で作製した PIC ミセルの照射前の TEM から見

積もった半径 (R_{TEM}) は 24.2 nm だった。照射前の R_h は 22.4 nm だった。また照射後の R_{TEM} および R_h は、それぞれ 28.2 nm および 26.5 nm で同様の結果だった。

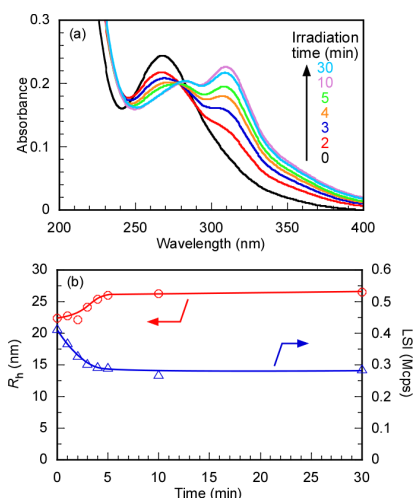


Figure 6. (a) R_h and LSI for PIC micelle as a function of UV irradiation time and (b) UV-vis adsorption spectra against irradiation time for 0, 30 min for PIC micelles with $f^* = 0.4$ at pH 11.8.

P(MN₁₈)₁₃₉ と P₁₀₀T₉₆ をそれぞれ $C_p = 0.1$ g/L になるように 0.1 M NaCl aq に溶解し pH 11.8 に調製し、 $f^* = 0.4$ になるよう両者を混合し、UV 照射前の SLS 測定を行った。P₁₀₀T₉₆ および P(MN₁₈)₁₃₉ の重量平均分子量と、SLS 測定から得られた PIC 会合体の $M_w(\text{SLS})$ の比から計算した会合数 N_{agg} は 220 となった。 R_g/R_h は 0.714 だった。理論的に R_g/R_h は、0.775 の時に剛体球、1 で球、2 以上で棒状になることが知られている。したがって R_g/R_h から PIC ミセルは剛体球に近いと考えられる。一方、UV 照射後の PIC の N_{agg} 、 R_g/R_h はそれぞれ 197 と 1.12 だった。このことから、UV 照射で PIC ミセルの会合数は、ほぼ変化せず、膨潤したと考えられる。

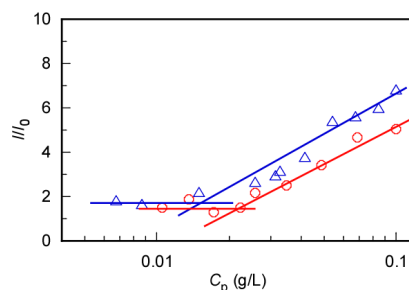


Figure 7. LSI ratio (I/I_0) of PIC micelles with $f^* = 0.4$ (○) and 0.5 (△) as a function of the polymer concentration.

PIC ミセル溶液の C_p を変えた時の、PIC ミセルの LSI (I) と pH 12 の NaCl aq の LSI (I_0) の比 (I/I_0) を測定した (Figure 7)。 C_p に対する I/I_0 をプロットし、二つの直線から $f^* = 0.4$ および 0.5 の CMC はそれぞれ 0.0220 g/L および 0.0153 g/L と決定した。 $f^* = 0.5$ の PIC ミセルは電氣的に中性で、P(MN₁₈)₁₃₉ と P₁₀₀T₉₆ の間に働く静電相互作用が強くなるため CMC が低下したと考えられる。

結論 RAFT 重合で構造の制御された光応答性の P(MN₁₈)₁₃₉ を合成した。P(MN₁₈)₁₃₉ に UV 照射した後の吸収スペクトルの変化から 2BA の脱離を確認した。このランダム共重合体とカチオン性の P₁₀₀T₉₆ を塩基性水中で混合することにより PIC ミセルを形成した。DLS、SLS、TEM から、UV 照射後の PIC ミセルは NBM ユニットの光開裂による 2BA の脱離とカルボキシレートアニオンの増加により PIC ミセルは膨潤した。以上より、光応答性会合体の作製に成功した。今後、この光応答 PIC ミセルの鎖長を制御することで、光に応答して解離する PIC ベシクルを作製できると期待される。