

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15337

研究課題名（和文）溶液状態での電子顕微鏡法によるベシクルの形成メカニズムに関する研究

研究課題名（英文）Formation mechanism of polymersome studied by microscopy

研究代表者

高橋 倫太郎（Takahashi, Rintaro）

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：10794125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：高分子ベシクルがどのようなメカニズムで形成されるかを解明することを目的として、溶液状態での透過型電子顕微鏡（LP-TEM）観察と時間分解小角X線散乱（TR-SAXS）測定を行った。TR-SAXS測定においては、球状ミセル、棒状ミセル、ディスク状ミセル、ベシクルと形態が変化してベシクルになることがわかった。LP-TEM観察では、溶媒の電子密度が高いことや、ミセル・ベシクルのブラウン運動が速すぎるために観察が困難であった。そこで様々な系を探索した結果、エチレングリコールとスチレンから成るブロック共重合体をイミダゾリウム系イオン液体に溶解させた系が観察に適していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベシクルはドラッグデリバリーシステム（DDS）への応用が期待されている。DDSへの応用においては、そのキャリアのサイズ（半径）が50 nm程度のときに効率よく細胞に取り込まれることが知られており、サイズ制御は実用化のために不可欠な課題である。ベシクルのサイズは形成のメカニズムによって異なると考えられる。また、薬剤をベシクルに取り込ませる際の取り込み効率はベシクルの形成メカニズムに依存すると考えられる。ベシクルの形成メカニズムを理解する意義はこれらの点にある。

研究成果の概要（英文）：To clarify the formation mechanisms of polymer vesicles, we performed time-resolved small-angle X-ray scattering (TR-SAXS) and liquid-phase transmission electron microscopy (LP-TEM). The results of TR-SAXS revealed that the transformations from spherical micelles to cylindrical micelles to disk-like micelles to vesicles are involved during the vesicle formation. In the LP-TEM measurements, the high electron density of the solvent and Brownian motion made the tracking of micelles/vesicles difficult. Systems composed of styrene-ethylene glycol block copolymers in ionic liquids appeared to be relatively suitable for the LP-TEM measurements.

研究分野：高分子科学

キーワード：small-angle scattering block copolymer vesicle electron microscopy

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

2つの異なる高分子の末端同士が結合した構造を持つブロック共重合体は、様々な形の自己集合体を形成する。この自己集合現象はソフトマター分野における中心的研究課題である。1990年代にブロック共重合体がベシクルを形成することが発見された [B. M. Dscher *et al.*, *Science* (1999).]。それ以来、極めて多くの研究が行われてきた。(Scopusで検索すると約2万報の論文がヒットする)。現在では、ブロック共重合体が形成する基本的な構造として、球状ミセル、棒状ミセルと並んでよく知られている。高分子ベシクルは、脂質からなるベシクル(リポソーム)と比べて膜が厚く、頑丈であることに加え、容易に化学修飾できるため、様々な機能性を付与させられる。また、内部に物質を内包できるスペースがあり、ナノ物質の貯蔵・輸送するための応用においても重要である。

これまでの多くの研究によって、高分子ベシクルの「静的な」構造・性質については比較的 understanding が進んできている。その一方で、「高分子ベシクルがどのようなメカニズムで形成されるか?」という「動的な」側面に関する実験データは皆無である。ベシクルの形成メカニズムは、Figure 1に示す3つのメカニズムが提唱されている。これらのメカニズムによって、形成されるベシクルのサイズが異なると考えられる [R. Bleul *et al.*, *Macromolecules* (2015).]。「サイズ制御」は実用化のための不可欠な課題である。さらに、物質をベシクルに取り込ませる際の「取り込み効率」は、ベシクルの形成メカニズムに依存すると考えられている。しかしながら、その観測方法の困難さから研究が進んでこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、時間分解小角X線散乱(SAXS)測定および溶液状態での透過型電子顕微鏡(TEM)観察により、以下の項目を達成することを目標とする。

- ベシクル形成過程を溶液状態のTEMによって観察し、これまでに提唱されている3つのメカニズム(Figure 1)のうち、いずれかを識別する
- 溶液条件(温度、濃度、溶媒の種類など)や高分子の重合度をどのようにすればFigure 1の3つのメカニズムのうち、いずれのメカニズムでベシクルが形成されるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法と研究成果

### (1) 時間分解 SAXS 測定

電氣的に中性なブロック鎖とカチオン性のブロック鎖からなるブロック共重合体と、電氣的に中性なブロック鎖とアニオン性のブロック鎖からなるブロック共重合体を水中で混合すると自発的にベシクルを形成することがこれまでの研究によってわかっている。本研究では、溶液を2.5ミリ秒で混合することのできるストップフロー装置を用いて、球状ミセルからベシクルになるように溶液の条件を瞬時に変化させ、その直後から各5ミリ秒の照射時間で超小角X線

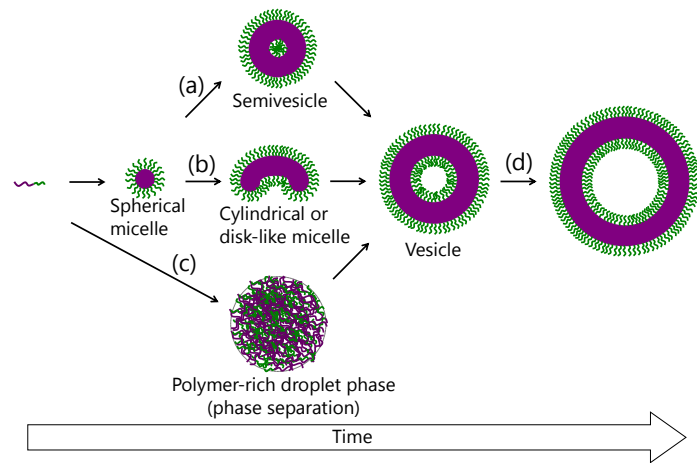


Figure 1. Schematic Illustrations of Possible Pathways of Vesicle Formation.

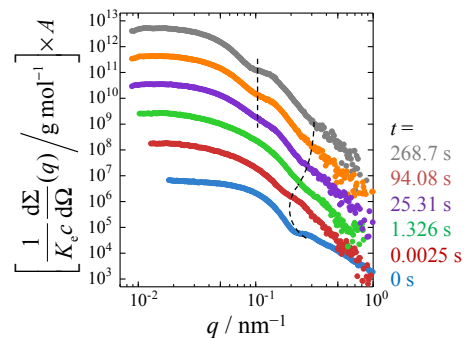


Figure 2. Time-evolution of USAXS profiles during the polymersomes formation from the spherical micelles. Each curve is shifted vertically for clarity.

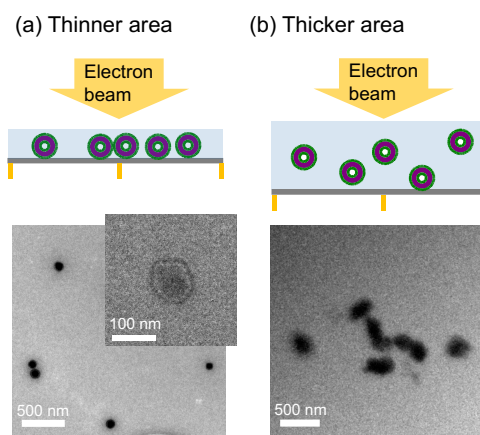
散乱 (USAXS) 測定を繰り返し行った。すなわち、球状ミセルからベシクルへの転移過程を観測した。

Figure 2 には、その USAXS プロファイルの時間発展を示す。 $d\Sigma/d\Omega$  は微分散乱断面積、 $K_0$  は光学定数、 $c$  は高分子濃度 (5 mg/mL)、 $q$  は散乱ベクトルの絶対値を表す。図中の青い点は初期状態の球状ミセルに対するデータを表す。赤い点はストップとフロー装置で混合してから初めの X 線照射によって得られたデータである。時間 ( $t$ ) が経過するにつれて、小  $q$  側の傾きが大きくなり、 $0.1 \text{ nm}^{-1}$  付近に振動が現れる。この振動はポリマーソームの形状因子によるものであり、その振動の位置はポリマーソーム全体のサイズに対応する。振動の位置が時間経過によって変化しないことから観測した時間の範囲内において、サイズがほとんど変化していないことがわかる。一方、初期から見られる高  $q$  側 ( $0.2\text{--}0.4 \text{ nm}^{-1}$ ) の振動は、球状ミセルの直径や、ポリマーソームあるいは中間遷移体構造の膜厚に対応するものであり、そのサイズは初期に増加したのち、徐々に減少した。この形成過程の途中の USAXS プロファイルは、球状ミセル、棒状ミセル、ディスク状ミセル、ベシクルのモデルを組み合わせることによって再現することができた。そのモデルによる解析から、以下の情報が得られた。初期に球状ミセルの分率が減少し、棒状ミセルの分率が増加した。その後、棒状ミセルの分率が現象してディスク状ミセルの分率が増え、その後はベシクルの分率が増えた。つまり、Figure 1 の①の過程のように、球状ミセルが成長して棒状ミセルとなり、棒状ミセルがディスク状ミセルとなり、最終的にディスク状ミセルからベシクルになったと考えられる。

## (2) 溶液状態での TEM 観察

2 種類 の イオン液体 [1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide ([EMIM][TFSI]) と 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide ([BMIM][TFSI]) の重量比 1:9] の混合物に、poly(*tert*-butyl methacrylate)-*b*-poly(ethylene oxide) (PtBMA-*b*-PEO) を溶解させると、室温では分子分散状態、 $60^\circ\text{C}$  以上に昇温するとベシクルを形成することがわかった。このサンプルに対して、Figure 3 のように、グリッド上に溶液が薄い箇所と厚い箇所があり、薄い箇所ではベシクルの膜の構造が見られたが、厚い箇所では見られなかった。しかし、厚い箇所ではベシクルがブラウン運動する様子を観察することができた。しかしながら、溶媒の電子密度が高く明瞭な像が観察できず、さらにミセル・ベシクルのブラウン運動が速いためそれらを追跡するのが困難であることが判明した。そこで、溶媒の電子密度が比較的低く、不揮発性で、溶液の粘度が高いことを満たす系を探索した。結果として、エチレングリコールとスチレンから成るブロック共重合体を 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate に溶解させた系が比較的測定に適することがわかった。

(1) の方法では、溶液中の X 線が照射される領域に分散している全ての溶質粒子の情報が反映されたデータが得られる。このことは客観的で統計的なデータが得られるという利点がある一方、本研究結果のように複数種類の形態の溶質粒子が共存している場合には、そのデータの解析が複雑になり、個々の形態の構造を取り出すことが難しい。(2) の方法では、実空間で個々の粒子を観察できるが、上述のような実験上の困難な点も判明した。ベシクルのような比較的複雑な構造の形成メカニズムを解明するためには、(i) と(ii)の手法を相補的に利用する必要がある。



**Figure 3.** Representative LP-TEM images for PEG<sub>11</sub>-*b*-PtBMA<sub>141</sub> in the ionic liquid at  $60^\circ\text{C}$  where the polymer concentration was 0.25 wt%. Upper illustrations indicate the state of the solution on the grid. In panel (a), the polymersomes settled out, and the solution was thinner. Inset displays an enlarged image. In panel (b), the solution was thicker, and the polymersomes were in motion.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Riku Yamanaka, Ayae Sugawara-Narutaki, Rintaro Takahashi	4. 巻 56
2. 論文標題 In Situ Monitoring of Polymerization-Induced Self-Assembly and Gelation During the Synthesis of Triblock Copolymers via Time-Resolved Small-Angle X-ray Scattering and Rheology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.macromol.3c00444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Rintaro, Narayanan Theyencheri, Yusa Shin-ichi, Sato Takahiro	4. 巻 55
2. 論文標題 Formation Kinetics of Polymer Vesicles from Spherical and Cylindrical Micelles Bearing the Polyelectrolyte Complex Core Studied by Time-Resolved USAXS and SAXS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 684 ~ 695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.macromol.1c02210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山中 理久, 鳴瀧 彩絵, 高橋 倫太郎
2. 発表標題 三元ブロック共重合体の重合誘起自己組織化を用いたイオンゲルの作製：時間分解小角X線散乱による形成過程の観察
3. 学会等名 第183回東海高分子研究会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山中 理久, 鳴瀧 彩絵, 高橋 倫太郎
2. 発表標題 重合誘起自己組織化によるイオンゲルの作製：形成メカニズムと物性の解明
3. 学会等名 日本原子力学会中部支部 第 54 回研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋倫太郎, NARAYANAN Theyencheri, 遊佐真一, 佐藤尚弘
2. 発表標題 時間分解超小角X線散乱による高分子ベシクルの形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第73回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rintaro Takahashi
2. 発表標題 Observing the vesicle formation by time-resolved small-angle X-ray scattering
3. 学会等名 Linkoping University Seminar (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 倫太郎
2. 発表標題 小角散乱とレオロジーによる高分子イオン液体溶液およびイオンゲルの基礎物性に関する研究
3. 学会等名 第 14 回日本レオロジー学会中部支部講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山中 理久、鳴瀧 彩絵、高橋 倫太郎
2. 発表標題 三元ブロック共重合体の重合誘起自己組織化によるイオンゲルの作製
3. 学会等名 第73回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 倫太郎、Theyencheri NARAYANAN、遊佐 真一、佐藤 尚弘
2. 発表標題 時間分解超小角X線散乱による高分子ベシクルの形成過程のその場観察
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青樹昂汰、高橋倫太郎、鳴瀧彩絵
2. 発表標題 フッ化ビニリデンとヘキサフルオロプロピレンから成る ランダム共重合体のイオン液体中における会合挙動
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋倫太郎
2. 発表標題 ソフトマター分野における放射光小角 X 線散乱の重要性:時間分解測定による動的過程のその場観察
3. 学会等名 放射光を利用したサイエンスの展開と次世代放射光への期待
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋倫太郎
2. 発表標題 分子ベシクルの形成メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------