

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05997

研究課題名(和文) 高分子微粒子界面近傍選択的架橋による中空粒子合成法の確立と機能性粒子創製への応用

研究課題名(英文) Interfacial Photo-crosslinking as Synthetic Route of Functional Polymer Particles

研究代表者

北山 雄己哉 (Kitayama, Yukiya)

神戸大学・工学研究科・助教

研究者番号：40649745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：二量化反応を示す光反応性基を有する高分子微粒子の界面近傍選択的な光架橋反応を進行させる界面光架橋反応を利用して、中空高分子微粒子を得る新たな手法を確立した。さらに、本手法を基盤技術として利用し、還元刺激、pHおよび光など様々な刺激応答性を示す機能性カプセル粒子の創製に挑戦した。さらに、光照射領域を限定することで異形高分子微粒子の創製にも成功し、光反応の特性を生かした微粒子合成を展開した。これらの一連の研究により、界面光架橋反応という新技術を利用した機能性高分子微粒子の創製を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中空高分子微粒子は、化粧品や断熱塗料などの産業分野で用いられるだけでなく、内部に機能性分子を内包しカプセル化することで、生体イメージング材料や薬物送達による医薬品としての応用可能な機能性材料として展開できる。本研究で確立する界面光架橋反応を利用した機能性中空・カプセル粒子創製法は、産業界で広く用いられている中空・カプセル粒子の簡便かつ安全な新規合成技術として提案できるだけでなく、微粒子材料を応用した上述の様々なアプリケーションの発展に繋がると予想され、合成分野の領域を超えた広範な波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we developed the new strategy “interfacial photo-crosslinking” to prepare the functional polymer particles. Utilizing interfacial photo-crosslinking towards spherical polymer particles bearing the [2 +2] photo-reactive groups and subsequent removal of non-crosslinked polymer, shell-crosslinked hollow polymer particles were successfully obtained. The solvent exchange procedure lead to the posteriori encapsulation of the various molecules such as fluorescent dye and anti-cancer drugs, resulting in the fabrication of capsule particles. By introducing various functions such as stimuli responsive properties to the seed spherical polymer particles, various stimuli responsive capsule polymer particles were successfully created by the interfacial photo-crosslinking. Furthermore, the non-spherical bowl-shaped polymer particles were also successfully created by the spatially controlled photo-induced crosslinking.

研究分野：高分子化学、コロイド界面化学

キーワード：高分子微粒子 光反応 中空粒子 カプセル粒子 刺激応答性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コア部に空隙を有する中空高分子微粒子は、白色顔料や断熱材などの汎用工業分野に使用されるだけでなく、薬剤を封入することでドラッグデリバリーシステム (DDS) や自己修復材料などの先端学術研究で用いられる機能性微粒子として注目されている。そのため、これまで国内外において中空高分子微粒子創製法に関する研究が盛んに行われてきた。具体的な中空粒子合成法として、テンプレート法 (無機テンプレート粒子表面にポリマーシェル層を構築しテンプレート粒子のみを溶出させる方法)、ブロックコポリマーの自己組織化法、相分離自己組織化法などが報告されてきた。

そのような中、申請者らは最近の研究で、光によって $[2\pi+2\pi]$ 環化付加反応を示す Cinnamoyl 基をもつポリマーからなる真球状高分子微粒子に光を照射すると、界面近傍選択的に架橋反応が進行する現象を見出した (界面光架橋反応)。その後、未架橋ポリマーを除去することで中空粒子を得ることに成功し、テンプレート粒子や精密合成技術を用いず、単純な真球状高分子微粒子から中空粒子を直接合成できる新たな中空粒子合成法として提案した (図 1)。

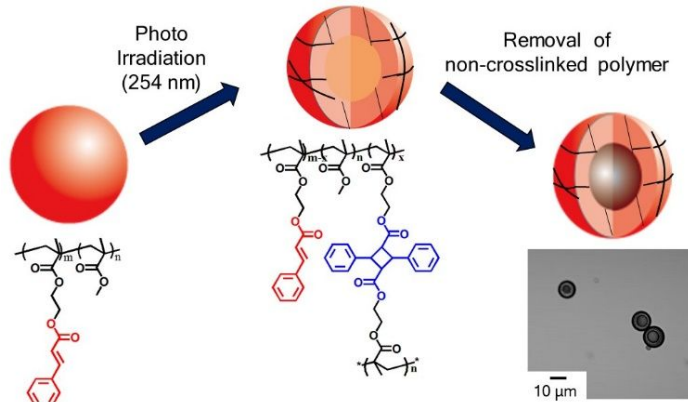


図 1 高分子微粒子の界面光架橋反応による中空粒子の合成

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者が偶然見出した高分子微粒子の“界面光架橋反応”について、粒子径や分子量などの種々の要素が与える影響を調査し、本反応を中空粒子合成技術として確立することを目的とした。さらに、界面光架橋反応を基盤技術として、様々な機能性高分子微粒子の創製に挑戦した。具体的には、内部に薬剤などを封入したカプセル粒子、特定刺激にตอบสนองして内包物を制御放出可能な刺激応答性カプセル粒子の作製を試みた。また、異なる波長で $[2\pi+2\pi]$ 環化付加反応を示す光反応性高分子微粒子を合成し、界面光架橋反応に利用可能な波長の拡大を試みるとともに、界面光架橋反応の汎用性を評価した。さらに、高分子微粒子表面の光照射領域を限定することで同一の光反応性高分子微粒子から、中空粒子だけでなく異形粒子を合成するモルフォロジー制御を実現し、光反応の特性を生かした高分子微粒子合成を展開した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 界面光架橋反応による中空粒子合成法の確立と諸条件の検討

真球状高分子微粒子の界面光架橋反応に与える種々の因子について評価し、中空粒子合成法としての確立を目指した。後天的光架橋部位として Cinnamoyl 基を側鎖に有する高分子を合成し、同一高分子から粒子径を異にする微粒子を作製した。これらに光照射 ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) を行うことで光架橋によって得られた架橋性ポリマーの収率を求めるとともに、内部構造を評価した。さらに、可逆的不可解裂型連鎖移動 (RAFT) 重合を利用して分子量分布の狭い異なる分子量を有する光反応性高分子を合成し、これらからなる高分子微粒子に対する光反応の進行を調査することで、分子量の影響を調査した。さらに、共重合可能なモノマー種の汎用性を評価した。

#### 2) 界面光架橋反応を利用したカプセル粒子の合成

界面光架橋反応によって合成した中空粒子は、Cinnamoyl 基二量体を架橋点とするシェル層を有しているため、良溶媒に浸漬させた場合においても微粒子形態は保持したまま膨潤し、網目構造が拡大すると考えられ、貧溶媒に浸漬させた場合はシェル層が収縮すると考えられる。そこで、封入したい分子を良溶媒に溶解させ、中空粒子内部に導入した後、貧溶媒でシェル層を収縮させる溶媒交換法 (図 2) により、目的の分子を物理的に封入したカプセル粒子の作製を試みた。

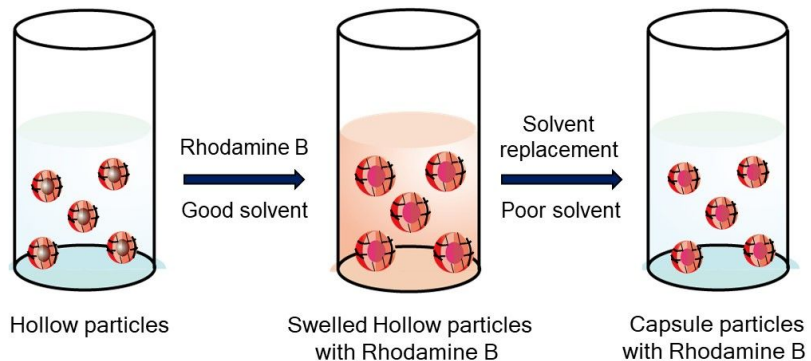


図 2 溶媒交換法による中空粒子への後天的な試薬導入：カプセル粒子化

### 3) 還元刺激応答性カプセルの合成

例えば DDS におけるキャリアとして応用を見据えた際に、腫瘍組織に到達したキャリアは分解され、薬物を放出することが望ましい。細胞室内では、グルタチオン濃度が高く、還元環境であることが明らかとなっている。そこで、還元環境によって切断可能な disulfide 基を有する光架橋性モノマーを新たに合成し(図3)、界面近傍選択的な架橋形成反応を応用することで還元刺激による分解性を示すカプセル粒子の合成を試みた。

### 4) pH 応答性カプセルの合成

腫瘍周辺や細胞内エンドソームでは酸性 pH 環境であることが知られているため、pH 応答性も重要な刺激応答性として認識されている。そこで、pH 応答性モノマーと光反応性モノマーの共重合体からなる高分子微粒子を界面光架橋反応に用いることで、pH 応答性カプセル粒子の合成を試みた。さらに、共重合比率を変更することにより pH 応答性の制御も試みた。

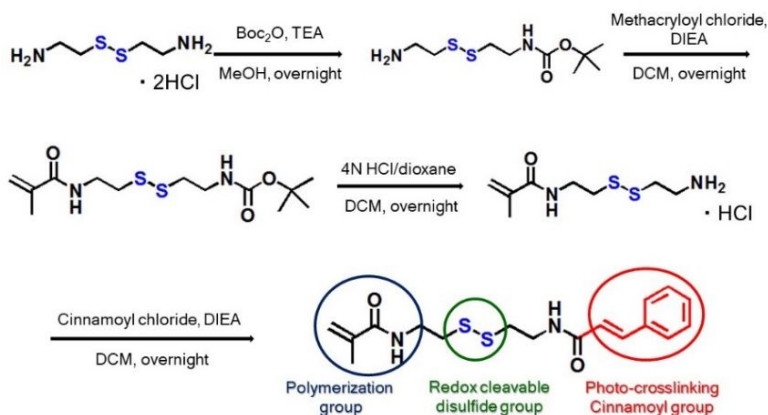


図3 還元性切断部位を有する光反応性モノマーの合成

### 5) 界面光架橋反応に適用可能な波長の拡大

新たに光反応性基として Coumarin 基を有する高分子微粒子を合成し、本高分子微粒子に対する  $\lambda = 365 \text{ nm}$  光を利用した界面光反応を行うことで中空・カプセル粒子の合成を試み、界面光架橋反応に用いることが可能な波長の拡大を目指した。さらに、Coumarin 二量体の逆反応を利用することにより、光で分解可能なカプセル粒子としての応用を試みた。

### 6) 領域限定的な界面光架橋反応による異形粒子の合成

高分子微粒子界面の光反応領域を制御することで、得られる架橋高分子微粒子のモルフォロジ制御を試み、異形粒子の合成法として応用した。光反応領域を制限するために、光反応性高分子微粒子を乾燥させ、一方向から光照射を行うことで、微粒子上面のみに光照射を行い、未架橋ポリマーを除去した際のモルフォロジを各種顕微鏡で確認した。さらに、光照射時間に伴うモルフォロジの変化についても検討した。

## 4. 研究成果

### 1) 界面光架橋反応による中空粒子合成法の確立と諸条件の検討

後天的光架橋部位として Cinnamoyl 基を側鎖にもつ光反応性モノマー (2-Cinnamoyl ethyl methacrylate: CEMA) と Methyl methacrylate (MMA) の共重合体 (P(MMA-CEMA)) をラジカル重合により合成し、溶媒蒸発法によって微粒子化することでミクロンサイズの微粒子を得た。この P(MMA-CEMA) 粒子分散液に対して光照射 ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) し架橋形成反応を行ったところ、照射時間を長くしても得られる高分子微粒子は完全に架橋されることはなかった。一方で、別途作製したサブミクロンサイズの P(MMA-CEMA) 粒子では、ほぼ 100% の光架橋形成が確認された。光照射後のミクロンサイズ P(MMA-CEMA) 粒子の未架橋ポリマーを有機溶媒で除去し、光学顕微鏡で観察したところ、中空状の高分子微粒子が得られていたことがわかった。さらに、重合性蛍光色素を合成し、これを 1 mol% 共重合した光架橋性高分子微粒子を同様に処理して合成した微粒子を、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察したところ、蛍光はシェル部のみから観察され中心部は空隙であり、やはり中空粒子であることが明らかになった。このことは、P(MMA-CEMA) 粒子の界面近傍が選択的に光架橋し、コアまで光照射が届かないことが示唆された。

界面近傍選択的な架橋が生じることをさらに確かめるために、様々な底面積を有するガラスシャーレ上に、キャスト法により透明な P(MMA-CEMA) 膜を形成し、そこに光照射を行うことで、架橋されたポリマー膜厚を算出した。その結果、シャーレ底面積 (すなわち光照射面積) と架橋ポリマー量の間には明確な直線性が見られ、表面から一定の膜厚で、光架橋反応が進行していることが明らかになった。

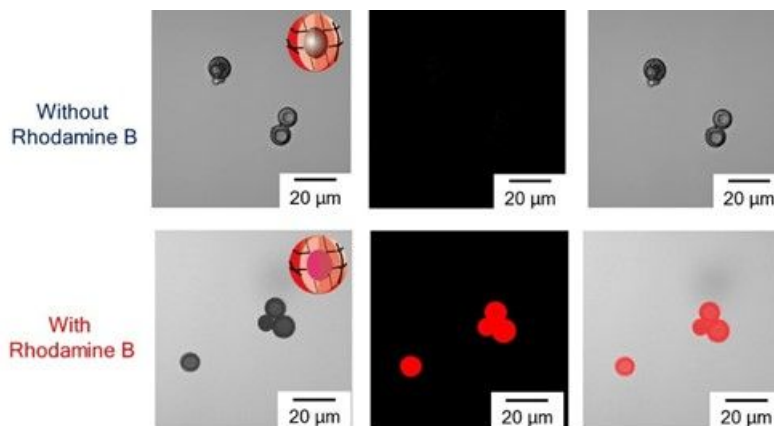
また、RAFT 重合を利用し、分子量が異なる P(MMA-CEMA) 微粒子を合成し界面選択的光反応を検討した結果、分子量が長くなるほど短時間で中空高分子微粒子が得られた。さらに、MMA に代えて様々なコモノマー種を用いた場合においても中空高分子微粒子が得られることを明らかにし、利用可能なコモノマーの汎用性を確認した。

### 2) 界面光架橋反応を利用したカプセル粒子の合成

モデル分子として蛍光色素 Rhodamine B を良溶媒である DMSO/THF に溶解し、そこに中空

化した P(MMA-CEMA) 粒子を分散させた。その後、貧溶媒である純水に溶媒置換し、十分に洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察を行った。その結果、Rhodamine B 由来蛍光が粒子コア部より明瞭に観察され、カプセル化ができていることを明らかにした (図 4)。さらに、この溶媒交換法によるカプセル化の汎用性を確認するために、Fluorescein acrylamide および抗がん剤である Doxorubicin (DOX) についても同様に検討を行ったところ、すべてにおいて架橋性中空 P(MMA-CEMA) 粒子に内包できており、本手法の汎用性を確認した。

図 4 カプセル粒子化前後の CLSM 写真



### 3) 還元刺激応答性カプセルの合成

光架橋性官能基 (Cinnamoyl 基) と重合性官能基 (Vinyl 基) のリンカー部に還元切断可能な disulfide 基を有する新規機能性モノマーとして *N*-Cinnamoyl-*N'*-methacryloylcystamine (MCC) を合成した。MCC および MMA をラジカル重合によって合成し、P(MCC-MMA) を得た。<sup>1</sup>H-NMR による解析からポリマー内に MCC が 27% 含まれていることがわかった。ホモジナイザーで作製した P(MCC-MMA) 粒子に対して光照射を試みたところ、経時的に架橋性ポリマー成分の割合が増大していることが明らかになり、約 12 時間以降にほぼ一定に達することが明らかになった。THF で未架橋ポリマーを除去した後、粒子モルフォロジーを CLSM で確認したところ、コア部に空隙が存在する中空粒子が形成されていることが明らかとなり、本研究で新たに設計・合成した P(MCC-MMA) に対して界面光架橋反応が適用できることを明らかにした。さらに、溶媒交換法によりカプセル化できることも明らかにした。

得られたカプセル粒子の刺激応答性について確認するため、還元剤添加後における透過率の経時測定を行った。ポリマー主鎖と架橋点の間に disulfide 基を有する P(MMA-MCC) においては、還元剤を添加後、透過率が增大している様子が明確に観察された。一方で、disulfide 基を有さないリファレンス粒子である P(MMA-CEMA) 粒子に同様の処理を行ったところ、ほとんど透過率が增大せず分解性を示さなかった (図 5)。この結果から、還元刺激応答性官能基を分子内に導入することにより、還元環境に応答して分解する性質を有する機能性カプセル粒子の合成に成功した。

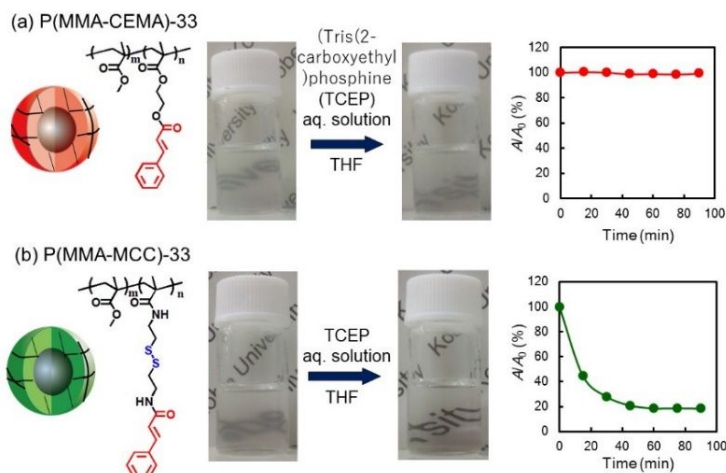


図 5 還元刺激により分解する中空粒子

### 4) pH 応答性カプセルの合成

2-(Diethylamino)ethyl methacrylate と 2-Cinnamoyl ethyl methacrylate の共重合体 (P(DEAEMA-CEMA)) を作製し、溶媒蒸発法によって真球状 P(DEAEMA-CEMA) 粒子を合成した。本粒子分散液に対して  $\lambda=254$  nm の光照射を行った後、有機溶剤による未架橋ポリマー除去を行った結果、中空粒子の合成に成功した。さらに、本中空粒子に対して蛍光色素などの低分子化合物を内包し、カプセル粒子が得られた。さらに、異なる pH に調整した水溶液中に蛍光色素内包カプセル粒子を分散させ、一定時間後の上澄み中の蛍光強度を測定した結果、pH7.4 の条件下では内包物の放出がほとんど観察されなかったが、pH5.5 の条件では徐々に上澄み中に蛍光色素が放出されていることがわかった。さらに pH3.5 の条件下では、インキュベーション初期から急激に蛍光色素由来の吸収が増大した。一方で、リファレンスとして作製した *n*-butyl methacrylate (BMA) と CEMA との共重合体 (P(BMA-CEMA)) 粒子をカプセル化し、同様に pH 応答性評価を行ったところ、全ての pH において上澄み中に蛍光色素が溶出することはなかつ

た。以上の結果から、光反応性モノマーと pH 応答性モノマーの共重合体粒子を用いた界面光架橋反応によって pH 応答性カプセル粒子を創製することに成功した。

### 5) 界面光架橋反応に適用可能な波長の拡大

Coumarin 基を側鎖に有する光反応性モノマー(7-(2-methacryloyloxy ethoxy)coumarin: COMA)を合成し、MMA との共重合体を作製した。合成石英基板上に、キャスト法により薄膜化し、 $\lambda=365\text{ nm}$  の光照射を行い、経時的な UV-Vis 測定を行った。その結果、光照射時間の増大に伴い、Coumarin 基に由来する吸収が減少し、二量化反応が進行していることが示唆された。さらに、 $\lambda=254\text{ nm}$  の光照射を行ったところ、Coumarin 基由来の吸収が増大したことから、光反応の可逆性を確認した。

P(MMA-COMA)粒子を溶媒蒸発法によって作製し、 $\lambda=365\text{ nm}$  の光照射を行い、その後未架橋ポリマーを除去した結果、シェルが架橋した中空状の高分子微粒子を得ることに成功した。さらに、溶媒交換法によりカプセル化できることも示した。これらの結果から、新たに合成した Coumarin 基を含む光反応性ポリマーを用いることで、界面光架橋反応に適用できる波長の拡大に成功した。

さらに、Coumarin 基 dimer の逆反応が生じる  $\lambda=254\text{ nm}$  の光照射を行ったところ、架橋性中空粒子に由来する濁度が減少し、中空粒子が分解したことを示されたことから、光刺激応答的に分解性を示す中空・カプセル粒子を創製することに成功した(図6)。

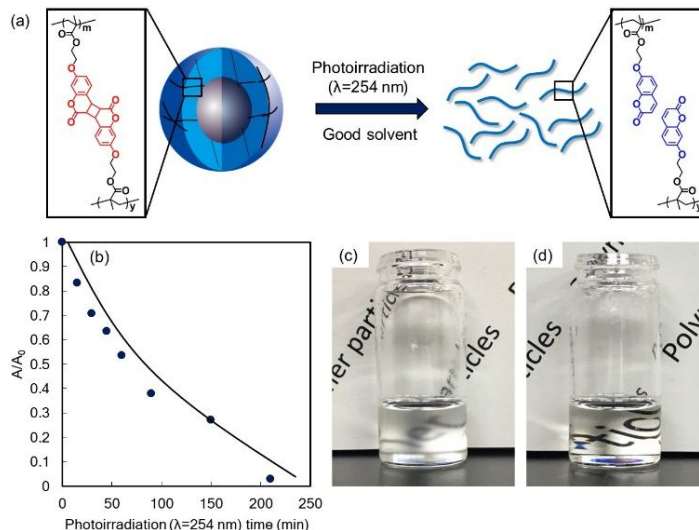


図6 光によって分解可能な Coumarin 基二量体を架橋点としてもつ中空粒子

### 6) 領域限定的な界面光架橋反応による異形粒子の合成

光反応性基として Cinnamoyl 基を有する P(MMA-CEMA)からなる真球状高分子微粒子を作製し、界面光反応時の分散状態を制御することでモルフォロジー制御を試みた。具体的には、P(MMA-CEMA)粒子を水媒体中での分散状態で界面光架橋反応を生じさせた場合、微粒子の自由回転により全面が架橋された結果、シェル架橋性中空高分子微粒子が得られた。一方で、微粒子の自由回転を無くした乾燥状態で一方向から光照射を行った場合、光照射された上面のみが架橋された結果、お椀状異形高分子微粒子が得られた(図7)。

さらに、光照射時間がお椀粒子のモルフォロジーに与える影響についても検討を行った。その結果、光照射時間が短い場合、強度が弱く、折りたたまれた状態で得られることがわかり、お椀状粒子を得るためには、十分な光照射時間が必要であることを明らかにした。

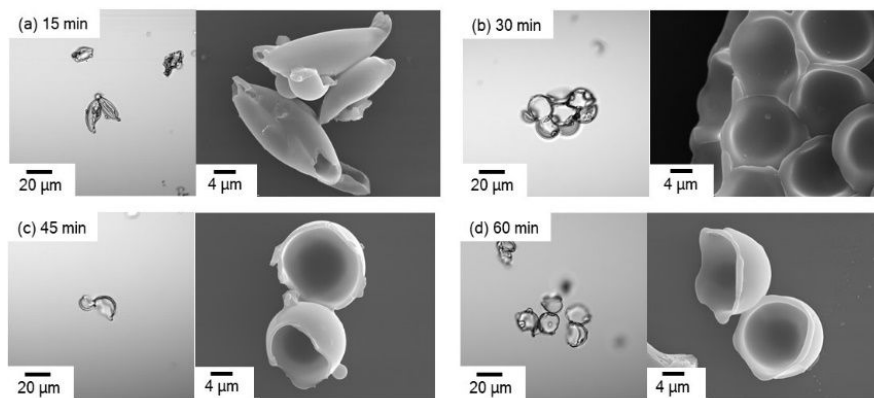


図7 反応領域を限定した界面光架橋反応によって得られた異形高分子微粒子の照射時間の影響

これらの成果から、光反応の特性を生かして界面光架橋反応を用いた高分子微粒子のモルフォロジー制御を達成した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yukiya Kitayama, Toshifumi Takeuchi	4. 巻 530
2. 論文標題 Morphology control of shell-crosslinked polymer particles prepared by photo-induced shell-selective crosslinking approach via dispersed state control	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Colloid Interface Sci.	6. 最初と最後の頁 88-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcis.2018.06.043	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 -

1. 著者名 Yukiya Kitayama, Toshifumi Takeuchi	4. 巻 23
2. 論文標題 Fabrication of Redox-Responsive Degradable Capsule Particles by a Shell-Selective Photoinduced Cross-Linking Approach from Spherical Polymer Particles	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chem. Eur. J.	6. 最初と最後の頁 12870-12875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201702367	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 -

1. 著者名 Yukiya Kitayama, Kazuki Yoshikawa, Toshifumi Takeuchi	4. 巻 50
2. 論文標題 Post-Cross-Linked Molecular Imprinting with Functional Polymers as a Universal Building Block for Artificial Polymeric Receptors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 7526-7534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.macromol.7b01233	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 -

1. 著者名 Yukiya Kitayama	4. 巻 51
2. 論文標題 The interfacial photoreaction: an efficient strategy to create functional polymer particles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 963 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-019-0219-y	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北山 雄己哉・竹内 俊文
2. 発表標題 界面光反応による機能性中空高分子微粒子の創製
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北山 雄己哉・竹内 俊文
2. 発表標題 微粒子界面光反応による異形高分子微粒子の創製
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北山 雄己哉
2. 発表標題 光反応を利用した機能性高分子合成
3. 学会等名 ラドテック研究会156回講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北山 雄己哉
2. 発表標題 光反応を利用した機能性高分子微粒子の創製
3. 学会等名 日本接着学会粘着研究会第165回（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北山雄己哉、竹内俊文
2. 発表標題 光架橋性真球状微粒子の界面選択的架橋による機能性カプセル微粒子の合成
3. 学会等名 第66回高分子年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北山雄己哉
2. 発表標題 UVを利用した機能性カプセル粒子の創製
3. 学会等名 日本接着学会 次世代接着材料研究会Part (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北山雄己哉	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 333
3. 書名 (1)界面光反応を利用する機能性高分子微粒子の創製と特性『光機能性有機・高分子材料における新たな息吹』 部分執筆	

〔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