

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26810115

研究課題名(和文)機能性高分子微粒子のナノ構造制御

研究課題名(英文)Control of nano structures for functional polymer particles

研究代表者

伊藤 大道 (Itoh, Tomomichi)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・講師

研究者番号：40363254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではポリペプチドで被覆された高分子微粒子の合成を検討し、次の3点の成果を得た。本研究によって開発したマクロモノマー型ポリグルタミン酸とマクロモノマー型ポリリシンは、分散重合の分散安定剤および微粒子の表面修飾剤として優れた機能を示した。分散重合における微粒子形成過程と表面構造形成過程に関する実験的な知見を得た。機能性高分子微粒子の粒径の制御、表面構造の制御、さらに微粒子コアの多様化をすべて満たす合成法を見いだした。

研究成果の概要(英文)：We developed an effective strategy to control particle size and surface structure for surface-functional polymer particles prepared from various monomers. Novel macromonomers composed of poly(L-glutamic acid) or poly(L-lysine) were successfully synthesized. They were used as a functional stabilizers for the dispersion polymerization of styrene to give narrowly-distributed polystyrene particles on which the polypeptide chains were grafted. It was found that the particle size and the surface density of the resultant particles could be varied by tuning the concentrations of the macromonomer, styrene, and initiator used in the initial solution of the dispersion polymerization. The polypeptide macromonomers were also found to be effective for the dispersion polymerization of various monomers to give high functional and high performance particle cores.

研究分野：高分子化学

キーワード：高分子微粒子 表面機能 表面構造 精密制御 刺激応答 ポリペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

数百から数千 nm の粒径をもつ高分子微粒子は、総表面積の大きさと利便性の高さから様々な用途に使用されている重要な高分子材料である。近年では精密な機能性微粒子が求められている。たとえば医用材料として用いる場合、微粒子表面は生体分子と接して使用されるため生体適合性材料で被覆する必要があり、物質特異的な吸着や外的な刺激に応答する必要がある。さらに高感度なセンシングを実現するためには微粒子サイズの均一性を著しく高めるとともに、微粒子コアに使用する化学種や機能も多様化が求められ、微粒子表面の刺激応答などの動的な現象もナノレベルで制御しなければならない。しかし、それぞれを制御することは可能でも、微粒子コアの形状や化学種を維持しながら表面に化学的な修飾を施すには制約が大きいという課題がある。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、ポリペプチドが表面に結合した精密高分子微粒子を通して上記課題の克服を試みた。ポリペプチドは生体適合性、刺激応答性といった高い機能のほか、分子量の揃ったものを化学的に合成することが可能であり、機能性高分子微粒子の表面ナノ構造の精密制御を検討する系として適している。具体的にはポリペプチド鎖が結合した高分子微粒子の精密合成し、粒径の制御、表面構造の制御、さらには微粒子コアの多様化を目的として検討を行うこととした。

本研究の特徴は大きくふたつ挙げられる。ひとつは、一段合成による高分子微粒子表面の精密制御である。微粒子の表面修飾は、いったん高分子微粒子を得た後に表面を化学的に修飾する多段階による手法が一般的である。しかし、この方法では微粒子表面の修飾を施す際に微粒子コアが変形を受けてはならないため、微粒子コアに適用できる化学種が限られている。そこで本研究では、この制約を避けるため、高分子微粒子が形成すると同時にポリペプチド鎖の微粒子表面に吸着させる一段合成を採用することにした。ふたつめは、高分子微粒子表面の形成メカニズムを実験的に解明するという点である。上記の一段合成の手法は、高分子微粒子の形成過程、とくに表面構造の形成過程と密接に関係しており、そのメカニズムを明らかにしなければ制御は不可能である。しかし、微粒子表面の化学種の定量は難しく、その形成過程に関する実験的な情報が圧倒的に不足している。一方、本研究で取り扱うポリペプチドには定量可能な官能基が組み込まれており、分子量も揃っていることから、表面に吸着したポリペプチドを定量すれば表面構造が明らかとなる。以上のように、本研究は機能性精

密高分子微粒子を合成する新たなアプローチを行う技術的な側面と、微粒子表面の形成メカニズムの解明という学術的な側面との両面から、この分野に貢献することができる。

### 3. 研究の方法

本研究は次の(1)～(3)の3つの段階を踏んで検討を行った。

#### (1) ポリペプチド吸着剤の開発

微粒子表面にポリペプチドを吸着させるためには、その足がかりとなるアンカー鎖が必要になる。本研究代表者は予めアンカー鎖を有しているブロック共重合体型のポリペプチドを吸着剤としてこれまで使用してきたが、微粒子コアとアンカーとが同種でなければ吸着しにくいという問題があった。そこで本研究では微粒子形成時に同種のアンカー鎖を生成するマクロモノマー型のポリペプチドを新たに開発することとした。

ポリペプチドとしては以下の4点からポリ( $\alpha$ -L-グルタミン酸)とポリ( $\alpha$ -L-リシン)のふたつが本研究に適していると考え、採用した。①いずれも古くから検討されており様々な情報が蓄積されている、②分子量や末端構造が制御できる、③pHなどの刺激によってコンホメーションを $\alpha$ -ヘリックス構造やランダムコイル構造、 $\beta$ -構造に変化させる、④定量可能な官能基を有する。

#### (2) 機能性高分子微粒子の精密合成

上記(1)で開発したポリペプチド吸着剤を分散安定剤とした分散重合により高分子微粒子を得た。分散重合は高分子微粒子を合成する方法のひとつであり、粒径が著しく均一な微粒子が得られることを特徴としている。この方法では分散安定剤を微粒子表面に吸着させることで微粒子同士の癒着や合体を抑制することが必要である。上記マクロモノマー型ポリペプチドを分散安定剤として用いれば、微粒子表面をポリペプチドで修飾した高分子微粒子を一段で得ることができる。ここでは重合挙動を詳細に検討するため、分散重合の研究で広く使用されているスチレンを原料として用い、ポリペプチドで表面が修飾されたポリスチレン微粒子を合成し、その粒径と表面密度の制御について詳細な検討を行うことで、微粒子の形成過程における表面構造の形成過程を議論した。

#### (3) 様々なコアをもつ機能性高分子微粒子

上記(2)で得られた知見をもとに、スチレン以外の原料を用いた分散重合を実施し、ポリペプチドで表面修飾された様々な高分子微粒子が合成できることと、その制御可能性について検討した。

#### 4. 研究成果

本研究ではマクロモノマー型ポリペプチドを2種類開発し、それぞれについて検討を行った。

##### (1) ポリグルタミン酸で表面修飾を施した高分子微粒子の精密制御

マクロモノマー型ポリグルタミン酸 (mPLGA) の合成ルートを図1に示す。アミノメチルスチレンを開始剤とした  $\gamma$ -ベンジル-L-グルタミン酸 *N*-カルボキシ無水物の開環重合を行って前駆体を得た後、エステル基の加水分解を施すことで目的のmPLGAを得た。NMR測定から各段階での反応が進行しており、重合度  $n = 100$  であること、およびGPC測定から高分子量であること、さらに分子量分布の分散度が1.12であり分子量の揃った目的のmPLGAが合成できていることを確認した。

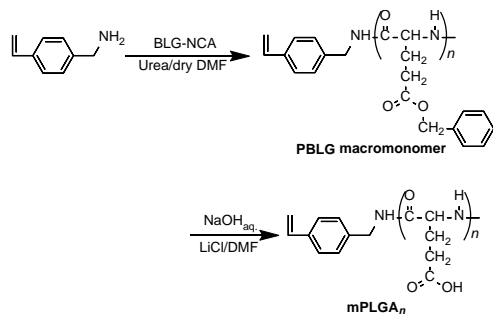


図1. mPLGAの合成

次に、mPLGAを分散安定剤に用いたスチレンの分散重合を検討した。75/25 (w/w) DMF-水混合溶媒にスチレン (5 wt %), mPLGA (0.25 wt %), 重合開始剤AIBN (0.08 %) を溶解し、重合管に入れて高真空下で封管した後、70°Cのオイルバスに17時間置いて重合を進行させた。その後、重合管を開管し、メタノールで洗浄して濾過をすることで白色の固体を収率93%で得た。得られた固体は図2の走査型電子顕微鏡写真に示すように真球状であり、粒径  $D_n = 1.24 \mu\text{m}$ 、粒径分布  $D_w/D_n = 1.01$  の粒径が著しく均一なポリスチレン微粒子であることを確認した。このことは上記で開発したmPLGAが分散重合の分散安定剤として優れた機能をもつことを示している。

分散重合においては、分散安定剤が微粒子表面に吸着して微粒子同士の癒着や合体が抑制されることで微粒子として得られることが知られている。つまり上記の結果から、得られた微粒子の表面はポリグルタミン酸で修飾されていると考えられる。このことを確認するため、得られた微粒子を酸性、中性、アルカリ性の水溶液にそれぞれ入れ、超音波をかけて分散させた後に数時間放置した。す

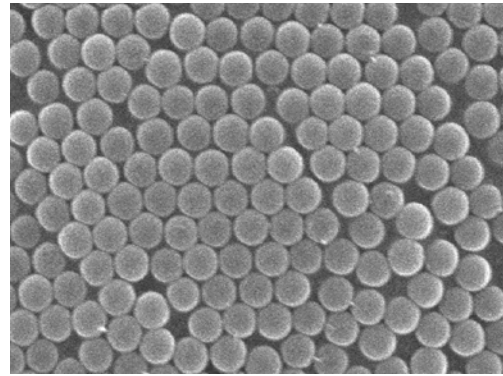


図2. ポリグルタミン酸で表面を修飾したポリスチレン微粒子の走査型多電子顕微鏡写真

ると、図3に示すように、中性とアルカリ性の水溶液中では分散安定性を維持していたが、酸性では微粒子は析出して沈殿した。このことはポリグルタミン酸中に含まれるカルボン酸の解離 ( $pK_a = 4$ ) によく対応している。中性とアルカリ性の水溶液中ではカルボン酸からプロトンが解離するため、微粒子表面の親水性が非常に高く、分散性が維持されている。一方、酸性ではカルボン酸が解離していないため親水性が低い。この結果はポリスチレン微粒子の表面をポリグルタミン酸で修飾できたことを示している。

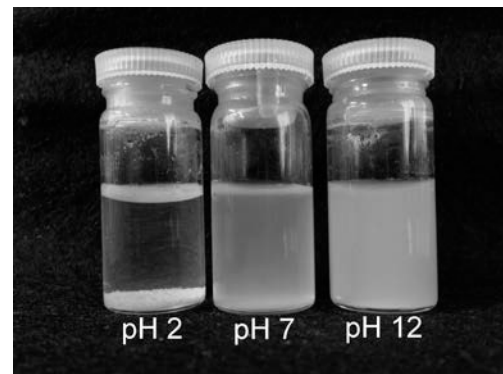


図3. ポリグルタミン酸で表面を修飾したポリスチレン微粒子のpH応答分散

ポリグルタミン酸の吸着量はpH滴定から容易に定量でき、微粒子表面  $1 \text{nm}^2$  あたり0.76個のグルタミン酸ユニットが存在することがわかった。使用したmPLGA<sub>n</sub>の重合度が  $n = 100$  であることから、ポリグルタミン酸1本あたり  $130 \text{nm}^2$  を占有していることがわかる。ポリグルタミン酸がもっともコンパクトな鎖状形態である  $\alpha$ -ヘリックス構造を形成していたと仮定した場合、ランダムに配置するには1本あたり  $180 \text{nm}^2$  の占有面積が必要なことから、ポリグルタミン酸は微粒子表面上で隣接したポリグルタミン酸と接触できる程度の距離で配置していると考えられる。このように、微粒子表面上での機能性吸着剤の構造が非常に明確であることが本研究の特徴である。

分散重合法ではモノマー、分散安定剤、開始剤の仕込み比や分散媒の極性を変えることで粒径の制御ができることが知られている。これらのファクターは微粒子表面上に吸着するグルタミン酸ユニットの吸着密度  $\sigma$  にも影響があると考え、重合条件を様々に変化させて詳細な検討を行った。その結果、本研究においては次の関係式を得ることができ、それぞれのファクターについて微粒子形成過程と表面構造形成過程への依存性を詳細な議論を行った。なお、AIBN濃度に対しては一定のトレンドは得られなかった。

$$D_n \propto [\text{mPLGA}]^{-0.13} n^{0.19} [\text{styrene}]^{0.55}$$

$$\sigma \propto [\text{mPLGA}]^{0.61} n^{-0.63} [\text{styrene}]^{-0.39}$$

マクロモノマー型分散安定剤を用いた分散重合における、粒径に対する各ファクターのべき乗則は報告があるが、表面密度に対する系統的な検討例はなく、本研究が初めての報告である。上記の式に従えば、得られる微粒子の粒径と表面密度との独立した制御が可能であり、たとえば粒径が  $D_n = 2 \mu\text{m}$  で表面密度  $\sigma = 0.45$  と  $2.6$  ユニット/ $\text{nm}^2$  のものをそれぞれ作り分けることに成功した。

本研究ではさらに、分散重合のメカニズムに対して当初は想定していなかった新たな発見があった。分散重合で得られた高分子微粒子に対してGPC測定を行ったところ、得られたGPC曲線は3つのガウス曲線に分離することができた(図4挿入図)。このことは高分子微粒子を構成する高分子鎖には3つの生成過程が存在することを示している。しかもその組成は重合条件によって変化し、一定の傾向が見られた。この結果から、分散重合における微粒子形成過程における重合場について議論し、図4に示した①分散媒中における溶液重合、②析出した高分子鎖が一時的に形成する不安定な粒子内での重合、③安定化した微粒子内部での固相重合の3つの重合場モデルを提案した。

本研究ではポリペプチドで修飾した高分子微粒子が得られることと、粒径および表面構造が精密に制御できることを示した。この結果を踏まえ、次にマクロモノマー型ポリリシンを用いた分散重合について検討を行った。

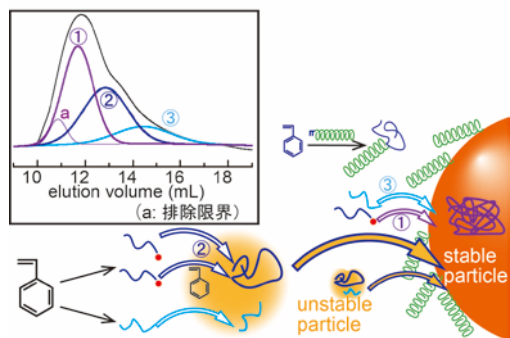


図4. 分散重合における重合場の模式図

(2) ポリリシンで表面修飾を施した高分子微粒子の合成と多様化

マクロモノマー型ポリリシン (mPLL) を合成し、これを分散安定剤とした分散重合を検討した。前述のポリグルタミン酸がアニオン性の高分子電解質であるのに対してポリリシンはカチオン性であり、抗菌性、二酸化炭素吸着性、遺伝子デリバリーなどに利用されている高機能性高分子である。

mPLLは図5に示すように、まずプロパルギル基を末端にもつポリリシンを合成し、これとビニルベンジルアジドとのクリック反応を行って得た。合成はNMRとGPCで確認し、重合度  $n = 27$  のmPLLの合成に成功した。

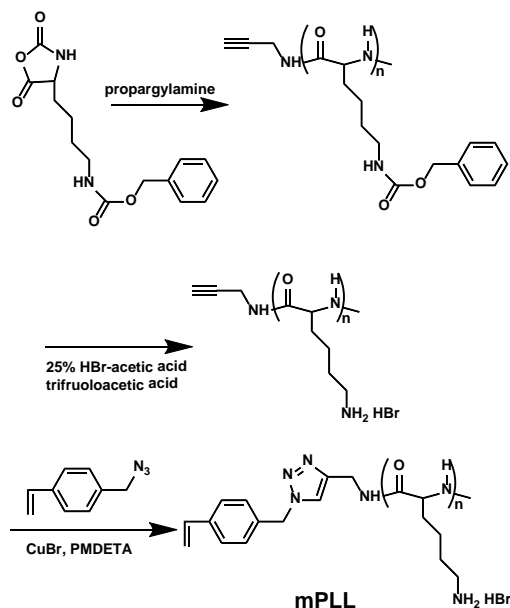


図5. mPLLの合成

得られたmPLLを分散安定剤に用いて、91/9 (w/w) メタノール/水混合溶媒中でスチレンの分散重合を行ったところ、図6左に示すように真球状のポリスチレン微粒子が得られた。また、水溶液中での分散安定性はmPLGAを用いた系とは逆で、酸性と中性の水溶液中では分散性を維持したが、塩基性水溶液では沈殿した。これはアミノ基 ( $\text{pK}_a = 9$ ) のプロトン化と解離によく一致している。これらのことから、mPLLは分散重合の安定剤として優れた機能を有し、微粒子表面を修飾することがわかった。pH



図6. ポリリシンで表面を修飾したポリスチレン微粒子の走査型多電子顕微鏡写真(左)とpH応答分散(右)

滴定で表面に吸着したリシンユニットを定量したところ、その表面密度は  $\sigma = 0.27$  ユニット/nm<sup>2</sup>であった。

分散重合の重合条件を様々に変えて、mPLL、スチレン、AIBNの仕込み濃度が粒径と表面密度に与える効果を検討したところ、図7に示す関係性を得た。これらはmPLGAマクロモノマーを用いた系と比べて依存性の大小は異なるものの、基本的には同様の傾向を示している。本系においても粒径と表面密度の制御に成功したと言える。

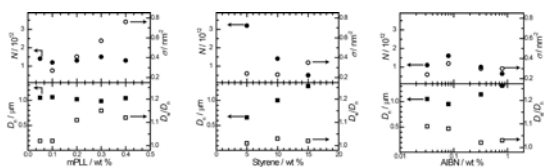


図7. mPLLを用いたスチレンの分散重合における各ファクター依存性

次に、スチレンの代わりにメタクリル酸メチルを用いて分散重合を行ったところ、図8上に示す粒径  $D_n = 1.07 \mu\text{m}$ 、粒径分布  $D_w/D_n = 1.01$  の真球状のポリメタクリル酸メチル微粒子が得られた。さらに、分散重合におけるmPLLとメタクリル酸メチルの仕込み濃度を変えることで粒径と表面密度を変えることができた。メタクリル酸誘導体は側鎖のエステル基を変えることで様々な官能基を導入することが可能であるため、この結果はポリリシンで表面を修飾した精密高分子微粒子のコア機能の多様化が可能であることを示している。また、スチレン/アクリロニトリルの50/50 (w/w) 混合物をモノマーとした場合にも図8下に示す  $D_n = 0.48 \mu\text{m}$  の高分子微粒子が得られ、その表面密度は  $\sigma = 2.5$  ユニット/nm<sup>2</sup>と比較的高い値を示した。スチレンとアクリロニトリルからなるランダム共重合体は機械的強度に優れていることが知られており、この結果は高性能高分子微粒子の表面修飾が可能であることを示している。いずれの場合も、表面修飾法として一般的な多段階合成法では得られない高分子微粒子であり、本研究による一段合成によって表面修飾を施した高機能、高性能高分子微粒子が合成できることが明らかとなった。

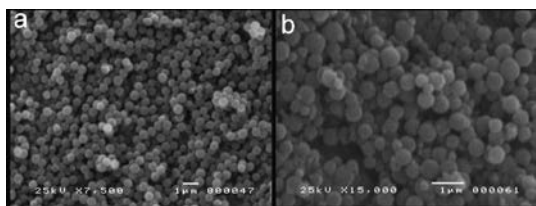


図8. ポリリシンで表面修飾されたポリメタクリル酸メチル微粒子 (左) とスチレン/アクリロニトリル共重合体微粒子 (右)

本研究ではポリペプチドで被覆された高

分子微粒子の合成を検討し、次の3点の成果を得た。①本研究によって開発したマクロモノマー型ポリグルタミン酸とマクロモノマー型ポリリシンは、分散重合の分散安定剤および微粒子の表面修飾剤として優れた機能を示した。②分散重合における微粒子形成過程と表面構造形成過程に関する実験的な知見を得た。③機能性高分子微粒子の粒径の制御、表面構造の制御、さらに微粒子コアの多様化をすべて満たす合成法を見いだした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- (1) Tomomichi Itoh, Shingo Okada, Katsuaki Kojima, Hironori Asano, Hiroaki Shimomoto, Eiji Ihara, Controlled cationic polymer particles prepared by dispersion polymerizations using poly(L-lysine) macromonomers as a stabilizer, *Polymer* **2017**, *118*, 215–222, DOI: 10.1016/j.polymer.2017.04.077, 査読有り
- (2) Tomomichi Itoh, Tetsuo Tamamitsu, Hiroaki Shimomoto, Eiji Ihara, Surface structure and composition of narrowly-distributed functional polystyrene particles prepared by dispersion polymerization with poly(L-glutamic acid) macromonomer as stabilizer, *Polymer* **2015**, *70*, 183–193, DOI: 10.1016/j.polymer.2015.06.022, 査読有り

[学会発表] (計14件)

- (1) Tomomichi Itoh, Tetsuo Tamamitsu, Katsuaki Kojima, Kento Tsutsui, Hiroaki Shimomoto, Eiji Ihara, Preparation of Surface-Functional Particles Undergoing Thermally/Photochemically-Induced Shape Change by Dispersion Polymerization, The 11th SPSJ International Polymer conference (IPC2016), 2016年12月14日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- (2) 児島 克明、下元 浩晃、井原 栄治、伊藤 大道、ポリ(L-グルタミン酸)がグラフトした機能性ポリスチレン微粒子の精密合成、2016日本化学会中国四国支部大会、2016年11月6日、香川大学 (香川県高松市)
- (3) 伊藤 大道、玉光 徹生、児島 克明、筒井 健人、下元 浩晃、井原 栄治、分散重合における機能性高分子微粒子の表面構造制御、第65回高分子討論会、2016年9月16日、神奈川大学 (神奈川県横浜市)
- (4) 岡田 真伍、下元 浩晃、井原 栄治、伊藤 大道、ポリリシンマクロモノマーを安定剤に用いた分散重合による刺激応答性高分子微粒子の合成、2015日本化学会中国四国支部大会、2015年11月14日、岡山大学 (岡山県岡山市)

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.ach.ehime-u.ac.jp/poly/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 大道 (ITO, Tomomichi)  
愛媛大学・大学院理工学研究科・講師  
研究者番号：40363254