

# スルホベタインをシェルとする刺激応答性高分子会合体 Stimuli-Responsive Polymer Assemblies with Sulfobetaine as a Shell

京都大学大学院工学研究科物質エネルギー化学専攻 特定研究員 金 東昱  
Department of Energy and Hydrocarbon Chemistry, Kyoto University, Dongwook Kim

## 要旨

スルホベタイン鎖と疎水性鎖からなる高分子ミセルの温度応答性に対するコア部分の疎水性度と添加塩の影響について検討を行った。スルホベタインとしてPSPP、疎水性鎖としてPEHA、PnBA、PEA、PnHAを用いてRAFT重合によりブロックコポリマーを合成した。透過率測定により、スルホベタインホモポリマーの転移温度は、添加塩濃度、ポリマーの重合度(DP)、高分子水溶液の濃度を調節することで制御できることが明らかになった。また、スルホベタイン鎖の化学構造特性により添加塩のアニオン種に依存する傾向が観察され、その程度は、ホフマイスター系列の構造破壊性が強いイオン種の順序と一致した。コア部分の疎水性度とミセルの調製方法に応じた高分子ミセルの温度応答性とミセル形成挙動をSLS、ピレンによる蛍光測定、DLS、透過率、AFMにより観察した。その結果、温度応答性を示さなかったミセルがコア部分の疎水性度および透析による再形成法により温度応答性が発現できることがわかった。それらの転移温度は、ブロック比、疎水性度、高分子水溶液の濃度、添加塩濃度および添加塩のイオン種を調節することで制御できることが明らかになった。

## 1. はじめに

一つの繰り返し単位に負電荷と正電荷の両方を併せ持つ両イオン性のベタインポリマーは[1]、ポリマーブラシ、ゲル、界面活性剤、高分子ミセルまたはベシクル、エネルギー材料などの様々な分野で研究されている。それらの構造的特異性は、塩の存在下で既存のイオン性ポリマーとは異なる挙動を表すだけでなく、タンパク質の吸着や血球の接着を抑制する特性も同時に持たせる。両イオン性ポリマーのカチオン部は一般的に第四級化アンモニウムカチオン(NR<sub>4</sub><sup>+</sup>)であり、アニオン部の官能基に応じてカルボキシ(CB)、フォスフォ(PB)、スルホベタイン(SB)に分類される。そのうち、2種類のベタインポリマーが刺激応答性を示す。カルボキシベタインはpH応答を示し、スルホベタインは上限臨界溶液温度(UCST)型の温度応答性を有する。カルボキシベタインのpH応答挙動は酸によるカルボキシ基のプロトン化によるもので、スルホベタインの温度応答挙動は分子内または分子間イオンペア(塩)の形成とその解消に起因する[2]。

親水性鎖と疎水性鎖からなる両親媒性ブロック共重合体は、溶媒中において様々な形で存在

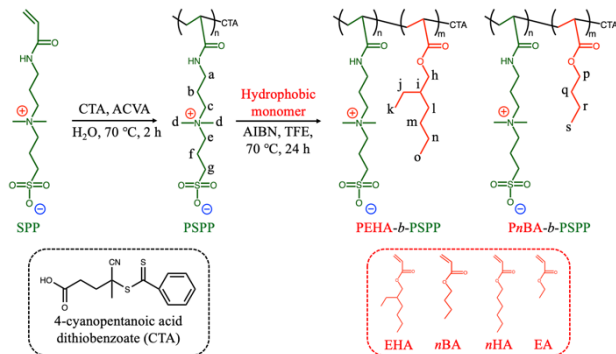
する。ブロックコポリマーの場合、臨界ミセル濃度(CMC)以上の濃度でミセルを形成、その形状は疎水性部分の比率の増加に従って球状→シリンドラ状→ラメラ構造に変化する[3]。すなわち、ミセルの形状は自己組織体内の共重合体が占める実体積に対する疎水性分子体積の比率によって決まる。一般的なルールとして、親水鎖より疎水鎖が短い場合は球状のミセル、親水鎖と疎水鎖が同じ長さであればラメラ構造を有する。そして、疎水鎖が長い場合、溶媒との接触面積を減らすため、ラメラ構造は曲がってベシクルを形成する。さらに、温度、濃度、溶媒、pHおよび混合比などによりミセル-ベシクル変換をする。

ポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルは、ポリアニオンとポリカチオンのポリイオンコンプレックスをコアとする新規な自己組織体である[4]。通常、両親媒性ブロックコポリマーは、疎水鎖の会合によりコアが形成され高分子ミセルとなるが、PICミセルはポリアニオンとポリカチオン間の静電引力、および会合により放出されるカウンターイオンによるエントロピーの増大が駆動力である。よって、ミセルとしての安定性や、添加塩に対する応答などは、両者で

大きく異なると予想される。いずれも、刺激応答性を有する高分子をシェルとするドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用が可能であり、幅広く研究されている。それらの応答性と形状は、温度、濃度、溶媒、pH、混合比およびブロック比などによって制御できる。

先行研究において、刺激応答性を有するスルホベタインをシェルとするPICミセルについて検討を行った[5]。PICミセルの場合、シェルになるスルホベタインブロックの重合度、高分子水溶液の濃度、添加塩濃度、添加塩のイオン種を調節することで転移温度が制御できることが明らかになった。また、透析による再形成法を用いるとPICミセルのサイズや均一性が制御できることがわかった。

本研究では、スルホベタイン鎖と疎水性鎖からなる高分子ミセルの温度応答性に及ぼすコア部分の疎水性度と添加塩の影響について検討を行った。



Scheme 1. Synthesis of polymers

## 2. 実験方法

スルホベタインホモポリマーの温度応答性に及ぼす重合度、高分子水溶液の濃度、添加塩濃度、添加塩のイオン種の影響を透過率により検討した。コア部分の疎水性度とミセルの調製方法に応じた温度応答挙動とミセル形成挙動をSLS、ピレンによる蛍光測定、DLS、透過率、AFMにより検討した。さらに、ブロック比、疎水性度、高分子水溶液の濃度、添加塩濃度、添加塩のイオン種がミセルの温度応答性に及ぼす影響を調べた。

### 2-1 ホモポリマーとブロックコポリマーの合成

可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合によりPSPPホモポリマーを合成した。PSPP(macro-CTAとして)、疎水鎖(EHA、*n*BA、EA、*n*HA)モノマー、およびAIBN(開始剤)を様々なモル比(macro-CTA: monomer: initiator)で合成した(Scheme 1)。重合度(DP)と分子量分布(*D*)は、それぞれ、<sup>1</sup>H NMRとGPCより確認した。

## 3. 実験結果

### 3-1. PSPPホモポリマーの熱応答性

PSPPホモポリマーはUCST型の温度応答性を示し、1 wt%のSPP<sub>57</sub>では、10~25 °C付近で透過率が0~100 %に変化した。一方、SPPモノマーは100 wt%の高濃度でも温度応答性を示さなかった。このことから、スルホベタインの温度応答性は、ポリマーとの組み合わせによってのみ発現される一種のポリマー効果であることが示唆された。

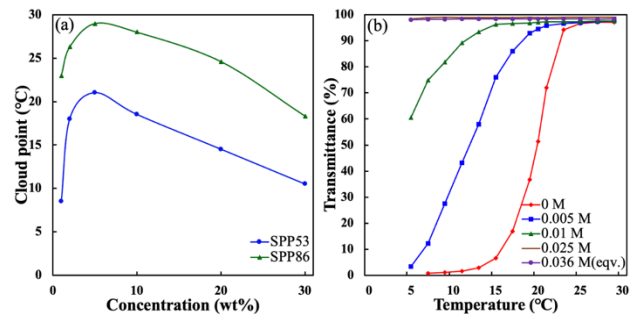


Figure 1. Temperature responsivity of PSPP homopolymers: changes of transition temperature depending on the (a) DP and concentration and (b) concentration of the added salt.

重合度の異なるPSPPホモポリマー(DP:53~86)を用いて、濃度変化による転移温度の変化を調べた。図1aに示しているに、1~30 wt%の濃度範囲で典型的なUCST曲線が得られた。熱力学的には、水/PSPP系のエントロピーは約5 wt%の濃度で最大になった。一方、分子的に説明すると、低濃度での転移温度の上昇によりPSPPの数が増加し、分子間会合が促進した。ただし、高濃度では、添加されたPSPPはポリマー塩のように作用し、重なり濃度付近で可溶化を引き

起こした。この可溶化は、分子内(イオン)相互作用を弱め、その結果、ポリマー鎖が延長され、溶解度が増加した。これらの結果から、スルホペタインの温度応答性はDPと濃度に依存することがわかった。

図1bは、PSPPの温度応答性における添加塩効果を示している。0.005 Mの微量のNaClの添加でも温度—透過率曲線は低温側へシフトし、等量点より薄い濃度の0.025 M程度を添加すると温度応答性が消失した。等量点とは、PSPPの全ての電荷が遮蔽できるNaClの濃度であり、PSPPとNaClのモル濃度から計算した。等量点を下回る塩濃度で応答性が消失した理由は、添加塩のアニオン種の影響である。PSPPでは、アニオン部とカチオン部の電荷密度の差によって電荷間の関連性が決まる。アニオン部とカチオン部の電荷密度が等しい場合、より強い相互作用と刺激応答挙動を引き起こす。この場合、PSPPのカチオン部が塩のアニオン種によって部分的に遮蔽され、両電荷間に大きな電荷密度の差が生じ、PSPPのアニオン部が完全に水和され、両イオン性部分がさらに水和された。そのため、分子内や分子間イオンペアを形成しにくくなり、温度応答性が消失した。また、塩濃度が増加すると転移温度が低下し、温度応答性が消失した。この観察結果は、温度応答性の発現機構が分子内または分子間イオンペア(塩)の形成とその解消によるものであることが示唆された。

添加塩のイオン種依存性を調べた。0.0025 Mの(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NCl、KCl、NaClおよびLiCl(カチオン種の塩)を1 wt%のSPP<sub>92</sub>に添加した。全てのサンプルの転移温度は塩の添加により低下したが、カチオン種依存性は見られなかった。一方、温度応答性に対するアニオン種依存性が見られ、その影響は、I>Br>Cl>Fの順であった。ホフマイスター系列の構造破壊性が強いイオン種の順序と一致した。構造破壊性が強くなるにつれて転移温度が低下し、アニオン種の中で最も構造破壊性の強いNaIの添加により温度応答性が消失した。添加した塩のアニオン種とスルホペタインのカチオン部が強く相互作用し、カチオ

ン部の電荷が遮蔽された。その結果、スルホペタインのアニオン部は完全に水和され、分子内または分子間塩を形成できなくなり、温度応答性が失われた。従って、スルホペタインのアニオン部の水和度は、転移温度を制御する上で重要な要素であった。

### 3-2 温度応答性を有する高分子ミセルの形成

親水性鎖と疎水性鎖からなる両親媒性ジブロックコポリマーの凝集体の形成と臨界ミセル濃度(CMC)は、静的光散乱法(SLS)とピレンによる蛍光測定により確認した。凝集体のサイズと形状は、それぞれ、動的光散乱法(DLS)と原子間力顕微鏡(AFM)によって検討した。EHA<sub>54</sub>-b-SPP<sub>51</sub>を用いて高分子ミセルを調製した。ミセルは3.51 x 10<sup>-3</sup> wt%以上の濃度から形成された。DLS測定は、0.01 wt%のサンプルを室温で測定し、流体力学的半径(R<sub>h</sub>)が83 nmであることがわかった。自己相関関数により単分散であることを確認した。また、AFMにより凝集体のサイズが約80~90 nmであり、球状であることが明らかになった。しかし、EHAの水への溶解度は0.01 g/100 mLであり、疎水性が高いため不安定で大きい凝集体を構築し、温度応答性を示さなかった。そこで、温度応答性を有する高分子ミセルを構築するために、コア部分の疎水性を下げる方法と、透析によりミセルを調製する方法を試みた。

EHAより疎水性が低いnBA(水への溶解度が0.14 g/100 mL)を用いてnBA<sub>14</sub>-b-SPP<sub>54</sub>を合成し、CMCを調べた。CMCは、9.4 x 10<sup>-3</sup> wt%であった。DLS、AFM、およびTEMによって観察した凝集体は、37 nmのR<sub>h</sub>を有し、球状で単分散であった。コア部分の疎水性を下げることにより、より小さな凝集体を構築することがわかった。これらの温度応答性に対する濃度依存性を検討した(濃度範囲: 0.125~1 wt%)。温度応答は0.125 wt%の濃度から現れ始め、濃度増加に伴い転移温度は15 °Cから32 °Cまで上昇した。

この結果から、凝集体のコア部分の疎水性を下げることにより小さくて安定なミセルが形成され、温度応答性が発現できることがわかった。

さらに、ミセルの転移温度は高分子水溶液の濃度によって変化することが明らかになった。

hydrophobic group ratio (%) / preparation method	EHA		nBA	
	direct	dialysis	direct	dialysis
50	X	X	X	O
40	X	X	X	O
20	X	X	O	O

Table 1. Expression of temperature responsiveness by the ratio of hydrophobic moiety and the preparation method of micelles

EHA-*b*-SPPとnBA-*b*-SPPの直接調製法と透析調製法を用いて様々なブロック比で高分子ミセルを調整し、それらの温度応答性を比較した(表 1)。透析によってミセルを調製するには、ブロックコポリマーの親水性部と疎水性部の両方にとって良溶媒であるTFE(Trifluoro Ethanol)に溶解し、透析膜(MWCO:12000~14000)に入れ、水中で2~3日間透析して平衡状態でミセルを再形成した。EHA-*b*-SPPは、調製方法に関係なく温度応答性を示さなかった。しかし、透析法により小さいミセルが構築できた。EHA<sub>18</sub>-*b*-SPP<sub>68</sub>(疎水性部分の含有率が20%)を用いたミセルの半径は、直接法および透析法で調製した場合、それぞれ、35 nmと15 nmであった。一方、直接法では温度応答性を示さなかったnBA-*b*-SPPのブロック共重合体(疎水性部分の含有率が50%と40%)は、透析法で調製することにより応答性を示した。直接法では急激に相互作用し、温度応答性を示さない不安定で大きい凝集体を形成するが、透析法では平衡状態でミセルが再形成することが可能で、より小さくて安定した温度応答性を有するミセルを構築した。疎水部分の含有率が20%の場合(nBA<sub>14</sub>-*b*-SPP<sub>54</sub>)、直接法および透析法の両方とも温度応答性を示した。ただし、半径は37 nmから18 nmに減少し、それに伴って転移温度は33.5 °Cから21.5 °Cへシフトした。これらの結果から、透析法により、より小さくて安定なミセルが構築でき、温度応答性の発現にも影響を与えることが明らかになった。

### 3-3. 高分子ミセルの温度応答挙動

図2aは、スルホベタインホモポリマーと高分子ミセルの転移温度を示している。1 wt%のSPP<sub>54</sub>の転移温度は12 °C、1 wt%のnBA<sub>14</sub>-*b*-SPP<sub>54</sub>からなるミセルの転移温度は32 °Cであった。温度応答性を有するスルホベタインブロックの長さは同じであったが、疎水性鎖の導入により転移温度が上昇し、コアシェル構造のミセルを構築した。疎水性が高く、粒子サイズが大きくなるほど、凝集体は大きくなるのが原因である。

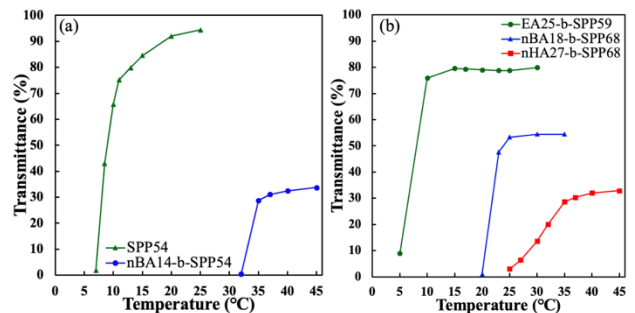


Figure 2. Temperature responsiveness of micelles: changes in transition temperature due to (a) the difference between homo- and block polymer and (b) the hydrophobicity of the core.

シェルとなるスルホベタイン鎖の長さによる転移温度の変化を調査した。nBA<sub>26</sub>-*b*-SPP<sub>54</sub>(ブロック比1:2.1)は温度応答性を示さなかった。しかし、nBA<sub>29</sub>-*b*-SPP<sub>92</sub>(ブロック比1:3.2)から応答性を示し、スルホベタイン鎖の長さの増加(nBA<sub>33</sub>-*b*-SPP<sub>147</sub>、ブロック比1:4.5)に伴い転移温度が15 °Cから25 °Cに上昇した。

高分子ミセルの温度応答性に対するコア部分の疎水性の影響について検討を行った(図 2b)。疎水性モノマーとしてEA、nBA、およびnHAを用いた。それぞれ、水に対する溶解度は2.00 g/100 mL、0.14 g/100 mL、および0.04 g/100 mLであった。疎水性が最も低いEA<sub>25</sub>-*b*-SPP<sub>59</sub>の転移温度は8 °Cであり、疎水性が高くなるほど転移温度も上昇した。コアの疎水性が高まるとコア近傍の誘電率が低くなる。アクリル酸ポリマーの誘電率は室温で3.5~5である。誘電率はEA(アクリル酸エチル)からnHA(アクリル酸*n*-ヘキシル)に減少する。また、疎水性部分は、

溶媒(水)との接触を最小化するために、疎水鎖同士がより強く絡み合う。このような、総合的な相互作用により、コア付近のスルホベタイン鎖間の静電相互作用がより強くなり、分子内または分子間塩が形成されやすくなり、転移温度が上昇する。

高分子ミセルの温度応答性に対する添加塩効果を調べた。1 wt%の $nBA_{14}-b-SPP_{54}$ からなるミセルの転移温度は32 °Cで、0.0025 M NaClの添加により転移温度が22 °Cに低下した。添加塩のイオンがスルホベタインのカチオン部とアニオン部の両方と静電相互作用し、電荷が遮蔽され、分子内または分子間塩の形成が困難になったためである。この結果は、スルホベタインホモポリマーの温度応答性に対する添加塩効果と一致した。これらの結果から、高分子ミセルの転移温度はブロック比、コアの疎水性、および添加塩濃度によって制御できることが明らかになった。

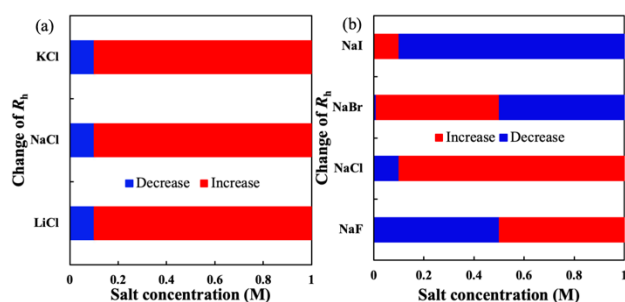


Figure 3. Change of  $R_h$  due to ionic species

### 3-4. 添加塩のイオン種の影響

KCl、NaCl、およびLiCl(カチオン種の塩)を0.1 wt%の $nBA_{29}-b-SPP_{92}$ に添加し、ミセルの半径( $R_h$ )の変化を観察した(図 3a)。いずれも、塩濃度が増加するにつれてポリマー鎖は収縮し始め、その後伸張した。ただし、スルホベタインホモポリマーの場合と同様、カチオン種依存性が見られなかった。一方、アニオン種依存性を確認するために、NaI、NaBr、NaCl、およびNaF(アニオン種の塩)を同様に添加した(図 3b)。ミセルの半径は、ホフマイスター系列の構造破壊性は強いイオン種の順序( $I > Br > Cl > F$ )で影響を受けた。ポリマー鎖は、NaIの最低濃度で伸張し、NaFの最高濃度で伸張した。この結果

は、スルホベタインホモポリマーで得られた結果と一致した。添加塩のアニオン種によって、スルホベタイン鎖のアニオン部( $SO_3^-$ )が水和される程度が異なるのが原因であった。添加塩濃度とイオン種に応じてコロナが伸縮するため、ミセルの大きさを制御できる。

## 4. まとめ

スルホベタイン鎖と疎水性鎖からなる高分子ミセルの温度応答性に及ぼす疎水性度と添加塩効果を確認した。ミセルの温度応答性はコア部分の疎水性と調製方法に影響を受けた。これらの転移温度は、スルホベタインブロックの割合、コアの疎水性、高分子水溶液の濃度、添加塩濃度およびイオン種によって制御できた。

## 謝辞

本研究は京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻の松岡秀樹准教授との共同研究です。

また、本研究を援助していただいた公益財団法人京都技術科学センターに感謝致します。

## 参考文献

- [1] Laschewsky, A. *Polymers* **2014**, 6, 1544-1601.
- [2] Galin, J. C. et al. *Polymer* **1984**, 25, 254-262.
- [3] Battaglia, G. et al. *nanotoday* **2008**, 3, 38-46.
- [4] Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1995**, 28, 5294-5299.
- [5] Kim, D.; Matsuoka, H.; Saruwatari, Y. *Langmuir* **2020**, 36, 10130-10137.

## 研究成果発表

- 1) Kim, D. et al. Effect of Hydrophobicity and Salt on the Temperature Responsiveness of Polymeric Micelles Consisting of Hydrophobic and Sulfobetaine Chains. *Langmuir* **2023**, 39, 1444-1455.
- 2) キム ドンウク、松岡秀樹、猿渡欣幸、第71回高分子討論会、3Pb036
- 3) 金東昱、松岡秀樹、猿渡欣幸、第73回コロイドおよび界面化学討論会、3F06
- 4) 金東昱、松岡秀樹、猿渡欣幸、第103回日本化学会春季大会、P1-2pm-12