# 自己組織化した分子会合体の溶液物性: 分子描像の可視化へのこころみ



## 櫻井和朗

北九州市立大学国際環境工学部 [808-0135] 北九州市若松区ひびきの1-1 教授,理学博士. 専門は生体高分子,DDS,散乱,高分子物性.

## 1. はじめに

鎖状に連結した分子の存在をはじめて主張した Staudingerの悩みの種は、コロイド会合説に固執して 高分子の存在を頑固に否定する同僚の化学者であった。 Staudingerは「会合説」を論破するために、セルロース およびその誘導体の分子量を浸透圧法などから正確に 求め、分子量の値が当時の常識を超えた大きな値であり、 その値が化学修飾によってほとんど変わらないことを示 した。さらに、極限粘度が分子量と相関していることを発 見するなど、溶液論的手法が高分子の特性評価にきわめて 有用であることを示した。以来、高分子溶液論においては 「会合」は鬼門であり、会合している高分子の分子量は測 定できないから、会合体は相手にしないと敬遠してきたよ うに思える。しかし、自然界には高分子が共有結合以外の 相互作用で緩やかに結合して自己組織化している「超分子 集合体」が多く存在する。高分子に限らず、両親媒性の低 分子化合物は水溶液中で会合して、球状や紐状のミセル を形成する。ミセルの形状は溶質濃度や塩濃度、水素イ オン濃度に強く依存する。とくに紐状ミセルは疑似的な 高分子として振る舞い、古くから高分子物性の研究対象 であった。イオン性の低分子化合物が作るミセルに逆の 電荷をもつ高分子電解質を混合した系では、きわめて複 雑で階層的な構造が出現し、条件によっては液々相分離 が起きる。このような系も「超分子集合体」に分類でき るであろう。

超分子集合体の溶液中での状態を調べて、会合体のモル 質量や形態などの分子特性を知ることは科学的な興味を 大いに刺激する。紐状ミセルと高分子電解質からなる複 合体は、シャンプーや洗剤として日常的に使われている。 さらに、この系は遺伝子導入剤などの薬物送達系 (DDS) として応用が期待されている。したがって、実用的な観 点からも超分子集合体の分子特性解析は重要である。最 近では高分子鎖を観察する顕微鏡法や計算化学も飛躍的 に進歩し、複雑な階層構造を可視化することも可能とな っている。しかし、モル質量を含めた統計熱力学的な物 理量を決定するためには溶液中での超分子集合体の分子 特性解析が不可欠である。本稿では散乱法を中心とした 超分子集合体の溶液中の形態の研究について紹介する。

### 2. 散乱法

溶液散乱の測定では散乱光強度I(q)を散乱角 $\theta$ もし くは $q = (2\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ で定義される散乱ベクトルの絶 対値の関数として測定する。ここで $\lambda$ は光の波長である。 測定対象の大きさが $1-10^3$  nm 程度の場合、光散乱では 全角度範囲で、X線小角散乱では数度以下の小角の範 囲で測定を行う。この角度の違いは光とX線の $\lambda$ の差 から来ている。粒子間の干渉が無視できる程度の希薄 溶液からの光散乱やX線小角散乱の強度I(q)は以下の 式で重量平均モル質量 $M_W$ と関係づけることができる。

$$I(q) = N(\rho V)^{2} S(q) = \frac{M_{W}}{N_{A}} c(\rho v)^{2} S(q)$$
(1)

ここでN、V、 $\rho$ 、S(q)、 $N_A$ 、c、vはそれぞれ単位体積中 の散乱体の数、一つの散乱体の体積、散乱体の平均電子 密度、形状因子、アボガドロ数、重量濃度、比容である。 S(q)は角度零で1となるように規格化されている。小 さなqにおけるS(q)の漸近挙動から慣性半径 $< S^2 > が$ 求まり、大きなqのS(q)から散乱体の内部構造に関す る情報が得られる。光散乱では $\rho v$ の積が溶質の屈折率 増分として独立に決定できるため $M_W$ が正確に求めら れるが、S(q)からは粒子の大きさの指標である $< S^2 >$ が求められるのみである。一方、X線小角散乱では $\rho$ に 関して仮定が必要であるため $M_W$ の決定に不確かさが 残るが、S(q)からは原子レベルに至るまでの内部構造 に関する情報が得られる。二つの方法ではこのように それぞれ短長所があり、双方を相互補完的に組み合わ せることで、より正確な分子描像が得られる。

## 3. 放射光の利用

光速に近い高エネルギーの電子が磁場中を通過する と、磁場によって軌道を曲げられた電子が強力なX線 を出す。たとえば、我が国のSPring-8においてはその 輝度は実験室のX線発生装置から得られる光の明るさ に比べ1億倍近くなるため、超希薄溶液からの散乱や 動的な散乱などさまざまな新しい測定が可能となる。 ここ数年の間に、放射光測定の経験がない研究者への 支援が充実してきたことから、放射光を用いた有機材 料の研究例は飛躍的な増加を示している。世界各地で 有機材料用のビームラインや放射光施設の建設が伝え られている。我が国でも2010年に高分子専用のX線小 角広角散乱のビームラインが竣工した<sup>1)</sup>。

散乱測定において実験誤差の最大の原因は窓材や空気 からの寄生散乱である。後述するX線吸収端を利用した 異常X線散乱や希薄溶液からの散乱を測定するために は、この寄生散乱を可能な限り低減する必要がある。筆 者らは石英セルに封入した溶液からの散乱を真空中で簡 便にできる装置を考案した。この装置により、低角度で 三桁、高角度で一桁近く寄生散乱を低減できた<sup>2),3)</sup>。

## 4. 分画装置と連結した光散乱法の利用

水溶液からの光散乱測定の最大の実験的障害は測定 対象より大きなゴミである。式(1) が示すように*I*(*q*) はVの2乗に比例する。大きなゴミがある場合はそれか らの散乱が強く、溶質からの散乱強度が観測できないと きがある。試料溶液の遠心処理やクリーンルーム内での 作業など正確なデータを得るためには煩雑な操作が必要 である。近年、ゲルクロマトグラム法 (GPC) や流動場 分画法 (FFF) で溶質を流体力学的な大きさで分けた後 に光散乱光度計で連続的に溶離液を測定する装置が利 用できる。この装置を使うと厄介な光学精製の問題を解 決できる。しかし、低分子ミセルや高分子会合体などは、 GPCのゲルカラムによって構造が破壊されるか吸着して 溶離してこないため、GPCには向かないとされてきた。 高分子ミセルがDDS粒子として研究され始めて長いが、 ミセルの会合数が容易に決定できないのはこれらの理由 による。一方、FFFでは分離に流動場を使っているので この吸着の問題を回避できる。図1にFFFの原理と高分 子ミセルを分画したときのデータを示す。図1Bの赤い 曲線は光散乱90度の強度であり、緑は屈折率から換算 した濃度である。光散乱の11分あたりに幅広の流出が 観測されるが、RIでは検出されない。このピークはミ



図1 (A) FFFの原理. (B) FFF で分画した高分子ミセルのクロマト グラム.赤は光散乱,青は濃度.

セルの2次凝集体と思わる。バッチ測定でこのような 成分があれば光散乱の角度外挿に誤差が入ってくる。

#### 5. 高分子ミセルの内部の分子描像<sup>2),3)</sup>

両親媒性ブロック共重合体は水溶液中で自己集合し球 形ミセルを形成する。疎水性鎖は内殻で密に詰まった固 体状態で存在し、親水性鎖は溶媒と水和してステルス性 と呼ばれ生体親和性の外殻を与える。片岡、岡野、横山 らはこの高分子ミセルをDDSへの応用展開を行ってき ており実用化も近い4)。しかし、先に述べた光学精製の 点に障害があるため、DDS用の系に限らず、光散乱か ら高分子ミセルの水溶液中での会合数を求め、内部構 造や形態などを含めた詳細な構造解析の研究は少ない。 やや系が異なるが、中性子小角散乱を用いた松岡らの研 究があるのみである<sup>5)</sup>。高分子ミセルからの小角散乱の データを詳細に解析するには理論的なモデルが必要とな る。内殻は剛体球として扱えば良いが、外殻内で溶媒和 している鎖間からの散乱をどのように取り扱うかが問題 となる。Pendersenらは、外殻内の鎖が混みあってい る場合とそうでない場合の2種類に分けて散乱関数を導 いているが6)、変数が多くて実際には使いにくい。外殻 鎖が混みあっている場合には、単純な2層の剛体球モデ ルか、外殻のセグメント密度がミセル半径に関して指数 関数的に減少していくコア・コロナモデルが使われる。 その指数としてはHalperinらが、複数の鎖が一点で結 合している星形高分子に対して、半径に比例してブロッ ブ長が増加していくモデルから求めた-4/3がよく用い られる。しかし、その正当性を実験的に確かめた例はな いように思う。セグメントの密度が距離に依存する系に ブロッブの概念を適用して良いのか筆者には不明であ る。しかし、外殻鎖がポリエチレングリコール (PEO) の 場合、溶媒の水との電子密度差が少なく、どのような モデルを使っても実際の解析には支障がないのが現実 である。一方、内殻の電子密度は高いことが多く、内 殻の半径や電子密度はきわめて正確に求められる。



図2 (A) 高分子ミセルからの SAXS と ASAXS の比較.
(B) 薬剤を内包した高分子ミセルの内部構造の模式図.赤い玉は薬剤,赤い螺旋は内殻鎖の高次構造, ξはブロッブ半径を示す.

図 2Aに高分子ミセルからの典型的な SAXS の結果を 示す。試料は PEO-block-poly ( $\alpha$ , $\beta$ -benzyl-L-aspartate) で、PEOと疎水鎖の重合度はそれぞれ 120と 27、ベンジ ル化率は 84%である。光散乱から会合数 60と求められ た。図中の赤線は 2層からなるコア・コロナ球体モデル から計算した値であり、内殻と外殻を 5.6 nm と 11.4 nm としたときに実験データをよく再現している。なお、q=3 nm<sup>-1</sup>の広角にあらわれるピークは内殻の分子の配向に よる。詳細は最近の横山と秋葉の本誌記事を参照され たい<sup>7)</sup>。光散乱から得た会合体の  $M_w$ を使うと式(1)の Nが求まるから、X線散乱強度を絶対値として求めて おけば、内殻と外殻の電子密度の絶対値を決定できる。

重合度とベンジル化率が異なる疏水鎖の試料を作り、 それらに関して系統的にFFF/MALSとSAXSの測定をした。その結果得られた高分子ミセルの内部構造を模式的 に図2Bに示す。会合数と内殻半径から、内外殻の界面 でのPEO鎖は溶媒中での自由鎖と比較して5倍程度密に 詰まっていること、水と外殻の界面では自由鎖とほぼ同 じ程度の密度であることがわかった。当然のことながら、 会合数と内殻の体積はきわめて良い相関があり、それを 決定する因子は第1義的にはベンジル化率、すなわち内 殻を構成する鎖の疎水性である。ベンジル化率が80から 90%に増加すると、会合数は30から100まで増加した。 第2の因子は疎水鎖の鎖長であった。これらはスケーリ ング則<sup>8)</sup>から予測される挙動と定性的に一致していた。

内殻に取り込まれた疎水性の化合物の分布を知ること は、高分子ミセルをDDSへ応用する上できわめて重要 な課題である。しかし、電子顕微鏡や通常のSAXSでは この課題の解決ができない。放射光の特徴である入射X 線の波長を精密に可変できるという特徴を使うと、特定 元素のX線吸収端近傍で波長をごくわずかに変えてSAXS 測定を行うことが可能となる。波長の差は3×10<sup>-2</sup> Å、 エネルギーで40 eVと微小な差を用いた実験である。得 られた散乱強度から特定元素の位置情報のみを抽出す ることが可能となる。この手法は、Anomalous SAXS (ASAXS)と呼ばれ、金属酸化物などの無機化合物では 古くから使われている。ここ数年の間に、第3世代の安定



図3 (A) カリクサレン系両親媒化合物の構造.(B) 水溶液 中での散乱曲線のpH 依存性とモデルとの比較.(C) 形 状決定ソフトで求めたミセルの形に分子を重ねた図.

した強度の強いX線が利用できるようになり、有機化合物への応用が始まっている<sup>9),10)</sup>。高分子ミセルの内殻に tetrabromobenzene-1,2-diol (TBC)をモデル疎水性化合物として内包させ、ASAXSによって得たBrからのみの 散乱曲線を図2A(2)に示す。(1)は同じ試料をSAXSで 測定した結果である。曲線(2)は半径6.0 nmの剛体球から計算した値と一致しており、SAXSから得た半径5.6 nm では再現できない。この差0.4 nm は小角散乱では誤差 範囲を超えて有意な差である。この事実から、疎水性化 合物は内外殻界面にわずかに染み出ていることが示唆さ れる。おそらく、PEO 鎖が混雑しているために水が追い 出され、疎水的になった部分に、TBCが存在していると 思われる。図2Bにはその様子が模式的に示してある。

強力な放射光を使って高分子ミセルの形成過程を動的 に観察する試みも始まっている。Lundら<sup>11)</sup>は、2液混 合型のセルをつかって瞬間的に溶媒組成を変え、高分子 ミセルの形成過程を時間分割SAXSで調べている。彼ら によると、疎水鎖が凝集する早い過程と、それらが集ま って最終的なミセルが形成される遅い過程がある。この 手法は、ミセルからの薬剤の放出挙動を動的に観察する ことにも応用できる。提案されている放出のメカニズム はおもに2種類ある。薬剤が単独で拡散律速で放出され ていく、あるいは高分子ミセルのユニマーとミセルの間 の平衡に従ってユニマーと薬剤の複合体として水溶液中 に出ていくと機構である。放射光やFFFを用いればこの 課題にたいして答えることができると考える。

## 6. 正六面体形態を取るカリクサレン系 両親媒性化合物の集合体<sup>12)</sup>

剛直な骨格を有する両親媒性低分子は脂質では見られ ない規則的な集合体を形成する。たとえば新海らのコレ ステロール誘導体は水中で特徴的な螺旋構造を作る。剛 直なカリクサレンを骨格とした両親媒性化合物にかんし て、Kellermannらは透過型電子顕微鏡で得られたミセル の像から三次元像を再構成し、それが7量体であると推 定している<sup>13)</sup>。しかし、会合体のモル質量やその分布に ついては測定をしておらず、その会合数に関しては推定 の域を出ていない。その後、Jagerら<sup>14)</sup>は、会合数が決 まった脂質が出現する理由が剛直な骨格にあるのではな く、親水性頭部と対イオンとの特殊な相互作用にあると 提案している。

筆者らは図3Aに示す両親媒性化合物がpHに応答して 酸性では球状で中性では棒状に変化することを見いだし た(図3B)。図3Bは異なったpHにおけるSAXSの結果を 示してある。散乱曲線の $q = 2.0 \text{ nm}^{-1}$ 辺りの谷が鋭角に 落ち込んでいる。この谷の鋭さは図2の高分子ミセルと 比較すると明瞭である。このような谷の存在は、散乱体 の形状に分布がなくかつ対称性が高いことを示してい る。FFFではミセルが吸着するような支持体を使う必要

表1 Molar masses determined with different methods and the aggregation numbers.

sample	SAXS LS		AUC			
	M <sub>w</sub> / 10 <sup>3</sup> g mol <sup>-1</sup>	M <sub>w</sub> / 10 <sup>3</sup> g mol <sup>-1</sup>	$M_w/M_n$	M <sub>w</sub> / 10 <sup>3</sup> g mol <sup>-1</sup>	$M_z/M_w$	number
CaL[4]C3	5.80 ± 0.20	5.69 ± 0.93	1.01	6.10 ±0.20	1.07	6
CaL[4]C6	14.4 ± 0.95	-	-	14.7 ± 0.90	1.5	12

SAXS: synchrotron small-angle X-ray scattering. LS: static light scattering combined with column purification

AUC: analytical ultracentrifugation

がないことを利用して、この酸性条件のミセルを流動場 で分画し、UVから求めた濃度と90度のLSの強度のク ロマトグラムはほぼ重なった。式(1)が示すように散乱 強度は濃度とモル質量の積である。したがって、分子量 に分布がある場合は、2つのクロマトグラムは重ならない。 この両者が一致していることは、きわめて分布が小さい ことの証明である。実際に分布を計算すると*M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>*で 1.01と小さい値を得た。光散乱以外にもSAXSや超遠心 測定からもモル質量と分布を求め、それらの値を**表1**に 比較する。10%程度差があるものの独立した測定でほぼ 同じモル質量の値が得られ、分布も小さかった。

分子量に分布がないタンパク質溶液からの SAXS の 解析には形状決定プログラムが使われる。最も使われ ているものが Svergun が開発した Dummy Beads 法であ る<sup>15)</sup>。散乱体を電子密度が同じ複数個の仮想の球 (Dummy Bead)の集合体として近似し、仮想粒子の配 置を変えながら集合体からの散乱曲線を計算して、最も 実験データに一致する仮想球の配置を得る方法である。 Dummy Beads 法で上述のカリクサレン系のデータを解 析した結果が図3Cの灰色の球からなる形状である。ア ルキル鎖が存在するため電子密度が周囲より低いと思わ れるミセルの中心には仮想球は存在せず、またミセル頭 部の形は一分子の頭部を忠実に再現している。さらに6 量体を反映して、おおよそ正四面体の形状が再現される ことは興味深い。分子構造を重ねてみると、原子レベル とは言えないまでも、分子のおおよその配置を再現して いるように見える。Dummy Beads モデルを水中のミセ ルに適用するにあたって、溶媒和している水や仮想の球 の連続状態をどのように扱うかなど考慮しなくてはなら ない問題が存在する。今後、このような計算ソフトの高 分子分野での開発が望まれる。タンパク質の溶液散乱 ではSAXSと計算科学を組み合わせた解析が進んでお り<sup>16)</sup>、いずれ、分布のある有機材料の集合体や高分子 でも同様な解析が行われることになるだろう。

## 7. その他

いままで述べた系は、濃度によって会合体の形状が大 きく変化しない場合であった。しかし、紐状ミセルでは その長さが強く濃度に依存する。このような系に関して 佐藤と栄永らの研究がある。最近、栄永が基礎的な理論 から実際の測定結果までを詳細にまとめた解説をインタ ーネット上で公開しているので、それを参照されたい<sup>17)</sup>。

筆者らは天然多糖 β1,3 グルカンと核酸が3 重螺旋の 複合体を形成することを見いだし、それを用いた核酸 医薬の選択的送達に関して研究している<sup>18),19)</sup>。応用研 究を進めていく上で、複合体が水溶液中でどのような 形態を取っているかを理解することは、きわめて重要 である。多糖 β1,3 グルカンは水中で3 重螺旋を形成し、 枝分かれがないきわめて剛直な半屈曲性鎖として振る 舞う。伝統的な極限粘度や慣性半径の分子量依存性か ら多糖核酸複合体も分岐がない剛直な半屈曲性鎖とし て振る舞うことを示した<sup>20)</sup>。また SAXS からも同様の 結論を導いている。

#### 8. おわりに

絵がもつ単純性はときには誤解の原因となる。筆者が 学生や新入社員の頃は安易な絵を書くと「分子をホンマ に見てきたんか、いい加減なことを言うな」と叱られた ものである。科学的に正確でないことや実証されていな い結果を図にすることを嫌う真摯な態度である。物理化 学の原理に基づいて測定された数字には鋭角的な鋭さ があり、Staudingerがコロイド説を論破できたのもこ の「鋭さ」があったからに違いない。特許の明細書や製 品のスペックに必要なのは数値限定でありイメージ図で はない。しかし、専門外の研究者や一般の人に研究の内 容を理解してもらうにはイメージ図が必要である。でき るだけ正確なイメージ図を作るためにも、物理化学的測 定から得られた分子描像を可視化することはきわめて大 切なことである。この可視化には大きく分けて、電子顕 微鏡、計算科学、散乱法の3種がある。この中で散乱法 は可視化を最も苦手とする。

文 献

- 1) H. Masunaga, et al., Polym. J., 43, 471 (2011)
- 2) I. Akiba, et al., Langmuir, 26, 7544 (2010)
- 3) Y. Sanada, et al., J. Phys. Chem. B (2012)
- 4) 西谷孝子ら,日本薬理学雑誌,137,75 (2011)
- 5) M. Nakano, et al., Macromolecules, 32, 697 (1999)
- 6) J. S. Pedersen, et al., Macromolecules, 36, 416 (2003)
- 7) 秋葉 勇, 横山昌幸, 高分子, 61, 527 (2012)
- 8) E. B. Zhulina, et al., Macromolecules, 38, 5330 (2005)
- 9) M. Sztucki, et al., J. Appl. Crystallogr., 43, 1479 (2010)
- 10) Akiba, et al., Macromolecules, accepted (2012)
- 11) R. Lund, et al., Phys. Rev. Lett., 102, 188301 (2009)
- 12) S. Fujii, et al., Langmuir, 28, 3092 (2011)
- 13) M. Kellermann, et al., Angew. Chem., Int. Ed., 43, 2959 (2004)
- 14) C. M. Jäger, et al., Chem. Eur. J., 15, 8586 (2009)
- 15) D. I. Svergun, Biophys. J., 76, 2879 (1999)
- 16) 佐藤 衛, 高分子, 60, 798 (2011)
- 17) 榮永義之, ミセル溶液学基礎, http://www.molsci.polym.kyoto-u.ac.jp/ archives
- 18) S. Koyama, et al., Science TM, 2, 25 (2010)
- 19) S. Mochizuki and K. Sakurai, J. Control Release, 151, 155 (2011)
- 20) Y. Sanada, et al., J. Phys. Chem. B, 116, 87 (2011)





#### Kazuo SAKURAI

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Environmental Engineering, The Kitakyushu of University E-mail: sakurai@kitakyu-u.ac.jp

Characterizing self-assembled molecules in solutions is a rather open field since traditional techniques for polymers in dilute solutions are difficult to use for aggregates. By combining synchrotron small angle X-ray scattering and light scattering coupled with field flow fractionation, it becomes possible to look at their inner structures. The present report briefly reviews our recent studies on polymer micelles and a shape persistent calixarene micelle.

Keywords: \*\*\*\*\*