

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32613

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14208

研究課題名(和文) 水性二相ナノ液滴の創製と応用

研究課題名(英文) Development of nanodroplets formed by aqueous two-phase system

研究代表者

中尾 真一 (Nakao, Shin-ichi)

工学院大学・先進工学部・教授

研究者番号：00155665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：水性二相系とは、複数種類のポリマーや塩を高濃度で含む水溶液が自発的に二相に分離する系であり、ポリエチレングリコール(PEG)とデキストラン(DEX)は水性二相系を構成する代表的なポリマーの組み合わせである。本研究では、これをエマルション液滴内で実現した水性二相ナノ液滴の開発を目指し、膜乳化法を利用してPEG-DEX均一水溶液を分散相とするエマルション調製後に、エマルション液滴内のPEG-DEXを濃縮することで、コンセプト通り水性二相ナノ液滴を調製できることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Aqueous two-phase system is a biphasic system formed by mixing of a polymer and salt or of two polymers in water, and one of the well-known systems is a combination of poly(ethylene glycol) (PEG) and dextran (DEX). In this study, we developed the formation of the aqueous two-phase system in an emulsion droplet, which is a novel system. When Water-in-Oil (W/O) emulsion in which PEG and DEX were contained was prepared by the SPG membrane emulsification technique, followed by the extraction of water in the emulsion droplets, we successfully demonstrated that the aqueous two-phase system was formed in the small droplets.

研究分野：膜工学

キーワード：化学工学 膜 エマルション 相分離

1. 研究開始当初の背景

水性二相系とは、複数種類のポリマーや塩を高濃度で含む水溶液が、自発的に二相に分離する系である。ポリエチレングリコール(PEG)とデキストラン(DEX)は水性二相系を構成する代表的なポリマーの組み合わせであり、Fig.1のように二相(上相がPEGリッチ、下相がDEXリッチ)に分離する。タンパクや細胞は、その性質により各相への親和性が異なるため、水性二相系をバイオセパレーションに適用した報告は多い。

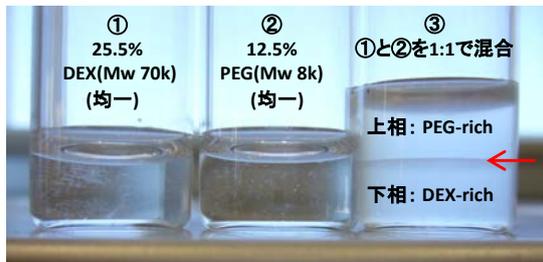


Fig.1. Aqueous two phase separation in PEG-DEX system

上述のように、水性二相系は主に生化学の分野で、生体分子などの”分離場”として捉えられ研究されてきたが、それ以上の学術的展開は見られなかった。近年になって、この興味深い現象をエマルション液滴内などで発現させる試みに関する数例の報告が見られる。しかし、いずれの報告も、マイクロ流路を利用した液滴調製であり、その液滴径は小さくても $100\mu\text{m}$ 程度であった。この液滴径を小さくすることで新しい系を提供でき、新たな工学的展開も期待される。具体的には、機能性微粒子調製に新しい展開を与える可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究はこの水性二相系を $1\mu\text{m}$ 以下のナノ空間で構築した新しい系を提供することを目的とした。図2に示す2通りの構造を予想しており、1つは(a)内水相が二重液滴となる(Water-in-Water)構造で、もう1つは(b)上下に相分離する構造である。いずれの場合も油中に分散するナノ液滴内で水性二相分離した系を構築するものであり、このような系を実現した例は存在しない。また水性二相ナノ液滴内のポリマーを、架橋反応を利用して粒子化すれば、様々な構造(中空・コア-

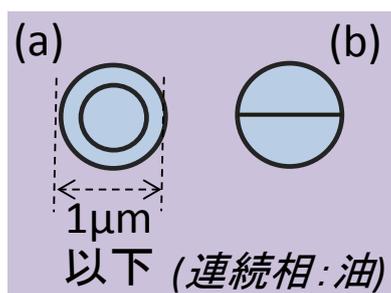


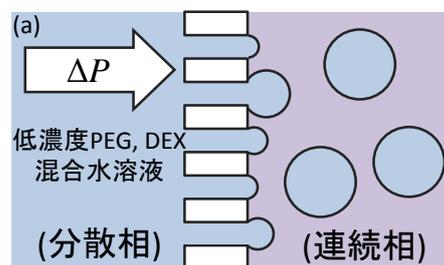
Fig.2. Potential droplets prepared in this study

シェル・半球・ヤヌス)を有する粒子が調製できると考えられる。さらに水性二相系におけるタンパクの分配の差の違いを利用すれば、将来的にはタンパクを一方の相に偏在させたヘテロ粒子を調製できると考えられる。

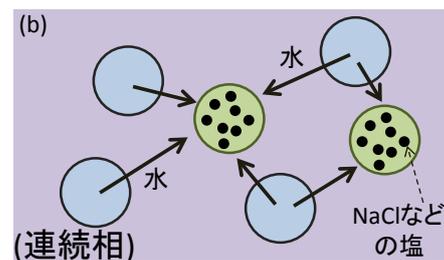
3. 研究の方法

(1) SPG 膜乳化法を用いた水性二相液滴の調製

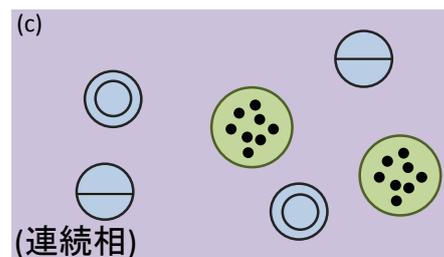
膜乳化法は、均一相溶液をこれと混和しない連続相中へ分散させてエマルションを調製するものであり、水性二相分離したPEG-DEX混合水溶液を膜乳化することは原理的に不可能である。よって、膜乳化により調製される液滴内で水性二相系を実現するためには、1つ工夫が必要である。本研究では、「2種類のW/Oエマルションの化学ポテンシャル(=浸透圧)差を利用した、液滴内部の溶質の濃縮」を利用する手法を検討した。PEGとDEXは低濃度では均一溶液であり、高濃度になると水性二相系を形成するため、Fig.3に示すように、まずはPEGとDEXを低濃度で溶解した水溶液を、膜乳化法により油中に分散する。ここに高濃度の塩水溶液を内水相にもつエマルションを加えると、2種類の液滴間の浸透圧差が生じるため、PEGとDEXを内水相にもつエマルションから、塩水溶液を内水相にもつエマルションへ水が移動する。この結果、液滴内のPEGとDEX濃



<Step1: PEG, DEX混合水溶液の膜乳化>



<Step2: 高濃度塩水溶液エマルションと混合>



<Step3: PEG, DEXの分相>

Fig.3. Strategy for preparing PEG-DEX droplets

度が高くなり、自発的に水性二相系を構築する。

コンセプト実証のため、分散相として PEG-DEX を混合した均一水溶液、連続相として 1wt% Tetraglycerin-Condensed Ricinolate (TGCR)-ケロシン溶液を用い、SPG 膜乳化法にて Water-in-Oil(W/O)エマルジョンを調製した。また浸透圧差を与えるため、分散相として塩化ナトリウムと Allura Red を溶解した水溶液、連続相として 1wt% TGCR-ケロシン溶液を用い、SPG 膜乳化法にて Water-in-Oil(W/O)エマルジョンを調製した。両エマルジョンをスターラーで混合し、液滴の様子を経時的に観察した。

(2) 水性二相液滴形成メカニズムの検討

水性二相液滴形成のメカニズムが Fig.3 に示した通りであれば、浸透圧差を与えるエマルジョンは溶質に依らないはずである。これを実証するために、溶質として塩化ナトリウムとグルコースを用い、溶質濃度を変化させて (1) の実験を行った。

(3) SPG 膜の細孔径が水性二相液滴径に与える影響の評価

膜乳化法では、調製直後の液滴径のサイズは膜細孔径の 3 倍となることが知られており、これを利用することで水性二相液滴径を制御できるはずである。これを実証するため、細孔径の異なる SPG 膜を使用して (1) の実験を行った。

(4) 水性二相液滴をテンプレートとした非球形粒子の調製

(1) の実験において、ジアクリレート基を有する PEG(PEGDA)を用い、液滴内で水性二相を実現後に UV 照射を行い、PEG のみを架橋することで粒子化を行った。UV 架橋後の粒子は洗浄・乾燥し、FE-SEM にて形状を観察した。

4. 研究成果

(1) SPG 膜乳化法を用いた水性二相液滴の調製

分散相の PEG と DEX の濃度をそれぞれ 2% と 4% として調製したエマルジョンと、分散相の NaCl 濃度を 3% として調製したエマルジョンを混合した直後、および混合後 2 時間経過したときの液滴の様子を Fig.4 に示す。使用した SPG 膜の細孔径はいずれも 12 μm である。混合直後と比較すると、2 時間後の PEG-DEX エマルジョンが液滴内で二相に分離していることが明らかである。相分離構造は Fig.2 の(a)と(b)のいずれも観察された。また PEG-DEX エマルジョンの液滴径は時間経過とともに小さくなり、NaCl エマルジョンの液滴径は時間経過とともに大きくなることを確認された。浸透圧差に起因する油相 (=連続相) を介した水分子の移動が生じ、液滴内の PEG-DEX 濃度が高くなり、二相に

分離したと考えられる。

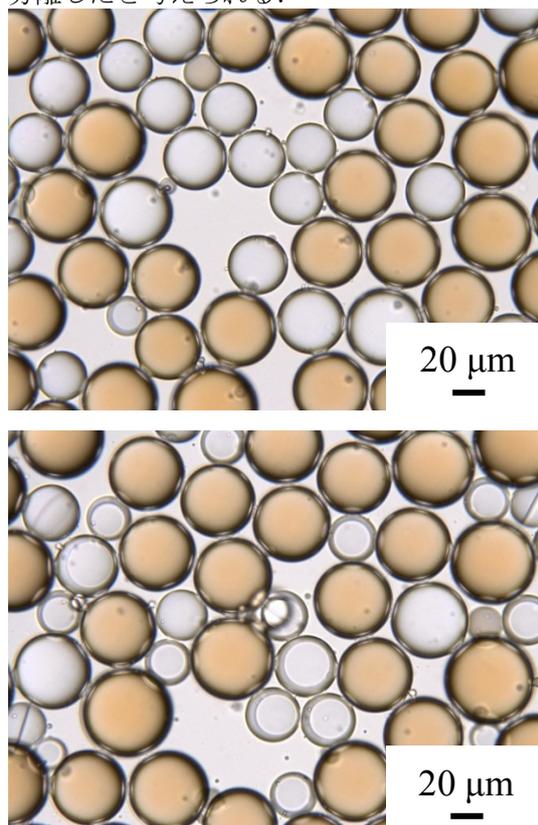


Fig.4. Pictures of the mixtures of the emulsion droplets in 0 h and 2 h

(2) 水性二相液滴形成メカニズムの検討

浸透圧差を与える溶質としてグルコースを用い、(1) の実験を行ったところ、NaCl を用いたときと同様に水性二相液滴が形成された。

また浸透圧差を与える溶質として NaCl を用いるものの、濃度を 10 分の 1 として (1) の実験を行ったところ、6 時間経過しても相分離は観察されなかった。

これら 2 つの結果と (1) の結果をあわせて、水性二相液滴が形成されるメカニズムは研究開始時に想定した通りであると言える。

(3) SPG 膜の細孔径が水性二相液滴径に与える影響の評価

(1) と (2) では、細孔径が 12 μm の SPG 膜を用いたが、この細孔径を 5.5 μm 、1.1 μm と小さくしても、水性二相液滴を調製することができ、しかも SPG 膜の細孔径を小さくすると調製される水性二相液滴の液滴径も小さくなることが示された。すなわち SPG 膜の細孔径により水性二相液滴径を制御できることが明らかとなった。

(4) 水性二相液滴をテンプレートとした非球形粒子の調製

細孔径 1.1 μm の SPG 膜を用いて調製した PEGDA と DEX の均一混合水溶液を分散相としたエマルジョンと、同じく細孔径 1.1 μm の SPG 膜を用いて調製した NaCl を分

散相としたエマルションを混合後、PEGDA 架橋反応を行った。その後、洗浄・凍結乾燥を行った。得られた粒子の FE-SEM 画像を Fig.5 に示す。PEGDA を用いても水性二相系が形成されることは確認したため、一部は半球状の非球形粒子が調製できることを期待したが、いずれも球形であった。架橋条件が適切でなく、粒子形成が遅かったため、半球状を維持できなかったのが原因と考えている。

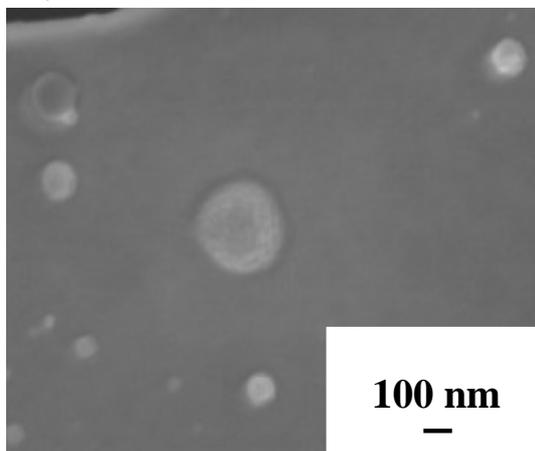


Fig. 5. FE-SEM of the particles prepared from PEGDA-DEX droplets

研究期間内に論文発表に至らなかったが、今後これらの成果を報告すべく論文発表を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

www.ns.kogakuin.ac.jp/~wwb1051/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 真一 (NAKAO, Shin-ichi)

工学院大学・先進工学部・教授

研究者番号：00155665

(2) 研究分担者

赤松 憲樹 (AKAMATSU, Kazuki)

工学院大学・先進工学部・准教授

研究者番号：50451795

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし