

温度応答性コアセルベートの反応場への展開

山元 和哉

鹿児島大学大学院理工学研究科 化学生命・化学工学専攻

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40

TEL: 099-285-7843

要旨

温度応答性高分子から構成される高分子濃厚水溶液（コアセルベート滴）の界面および液滴内部を反応場とした材料展開を検討した。水酸基を有するポリアクリルアミド誘導体からの温度応答性高分子を調製し、温度変化に伴うコアセルベート滴の形成を確認した。界面を反応場とする反応系としては、ピッカリング型エマルション（水-油型の安定化）に類似したナノ粒子の安定化を検討した。コロイダルシリカ (ca. 15 nm) と温度応答性コアセルベートを混合し、“ピッカリング効果”による温度応答性コアセルベート滴複合体の安定性を評価した結果、所定条件において時間経過に伴う液滴の粒径サイズの増大が抑制された。これよりコロイダルシリカとコアセルベート滴の複合化によるコアセルベート界面の安定性の向上が示唆された。また液滴内を反応場とする反応系としては、コアセルベート滴の有無における重合挙動を評価した。結果として、わずかではあるが、コアセルベート液滴内へのモノマーの濃縮に起因すると考えられる高分子の生成量の増加が確認された。

1. 緒言

ある種の水溶性高分子は低温で水に溶解し透明の溶液となるが、これを昇温させると、ある温度で不溶化して白濁もしくは沈殿が生じる。この白濁・沈殿を引き起こす温度は下限臨界溶液温度 (Lower Critical Solution Temperature; LCST) と呼ばれる。我々はこれまでに外部刺激として pH¹⁾、温度²⁾、圧力³⁾により、水環境中で分子内(間)相互作用に伴い構造変化が誘発される刺激応答性高分子の構築およびそのメカニズムについて検討してきた。反応性を考慮したモノマー構造に伴う“高分子の一次構造における親水性-疎水性のバランス”を制御することで、水溶液中で鋭敏な応答性を有する高分子の濃厚水溶液から構成されるコアセルベート滴を形成する液-液相分離および液-固相転移を示す刺激応答性高分子を開発してきた。

また近年、刺激応答性高分子をベースとしたスマート材料が著しい発展を成し遂げ、バイオマテリアルを中心とした幅広い分野で応用されている。この刺激応答性高分子を積極的に材料展開するには、如何にその応答性を損なうことなく連鎖中へ官能基を導入出来るが重要な因子となる。そのような観点から多くの研究者らにより官能基を導入するための様々な手法が提案されているが、それらの多くは応答性の緩慢化を引

き起こし、また複雑なプロセスを要求する。我々は代表的な温度応答性高分子である poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) のモノマー構造に着目した分子設計論に基づき様々な機能性モノマーも合成しており、これら一連のモノマーを用いることで鋭敏な応答性を損なうことなく種々の反応性官能基を導入させることにも成功している。またこれら新規モノマーと NIPAAm から得られる共重合体はその組成比や外部環境を制御することで、高分子鎖が多量の水分子を保持したまま会合して液滴を形成するコアセルベーションを示すことも明らかとしている⁴⁾。さらに形成されるコアセルベート滴はその粒径を数十ナノメートルから数マイクロメートルまで制御可能であり、かつサイズ分布も比較的単分散であった⁵⁾。このような特長は既報されている他の温度応答性コアセルベートとは一線を画しており、またモノマー導入率や外部環境の制御により二種類の異なる温度応答挙動を発現し得る高分子は本研究が最初の報告例である。さらにこれら新規高分子を用いて二種の刺激応答性高分子から構成される複合型のコアセルベートを構築することにも成功しており、この複合型コアセルベートを利用することで、高機能かつ複雑な構造を有する刺激応答性 semi-IPN (セミ相互侵入高分子網目) マイクロゲルを非常に簡便な手法で作製することにも成功している⁶⁾。またリビングラジカル重合法の一つである原子移動ラジカル重合 (ATRP) により、ブロック共重合体を合成し、水溶液中での二段階の温度特性についても報告している⁷⁾。

本研究では、水酸基を有する温度応答性コアセルベートに着目した界面および内部における反応場としての展開を目的とする。これは水環境中で形成されるため、たとえばその水酸基の分布は、界面（表面）側へ分布すると考えられる。我々が設計した刺激応答性高分子はこれまでの基礎物性評価から種々の刺激によりその水和状態を制御可能であり、またコアセルベートはミセル等の会合体と比べて非常に動的で“ゆるい”会合体であるため、その分子鎖分布を動的かつ自在に制御可能であると期待される。この界面においてピッカリング型エマルション（水-油型の安定化）に類似したナノ粒子の安定化が確認されれば、ナノ粒子の異方的修飾の反応場として期待出来る。また液滴内に効率良く内包されるモノマーをラジカル重合することで、乳化重合のような新規な反応場への展開も期待される。どちらの反応場も、温度を下げることで均一な高分子溶液に、すなわち液滴を消失できるため、反応物の容易な精製および回収も可能となると考え検討した。

2. 理論

2.1 ピッカリング型エマルション

水と油からなるエマルションは、界面活性物質を混合させることで安定化することができる。一方、コロイド粒子が乳化剤としての役割を果たし、水-油界面に粒子が吸着することでも安定化されたエマルションが形成される。このようなエマルションは“ピッカリング型エマルション”と呼ばれている⁸⁾。界面活性剤を用いずにエマルションを長期安定化させることができるために、液-液界面を反応場とする場合、魅力的な

研究の一つである。このような水-油界面へのコロイド粒子の吸着は、界面の自由エネルギーの減少に起因していることも明らかとなっている⁸⁾。また従来では困難であった数ナノメートルオーダーの粒子 (Fig.1) を用いてもピッカリングエマルションの形成が可能であることが報告されている⁹⁾。

2.2 刺激応答性コアセルベート

コアセルベーションとは、コロイドが引き起こす相分離現象であり、高分子の濃厚相と溶液相からなるコアセルベート滴を形成するものである。我々はこれまでに、LCST 以上で高分子の濃厚溶液から成るマイクロメートルオーダーの液滴が形成する温度応答性高分子の合成に成功している (Fig.2)²⁾。

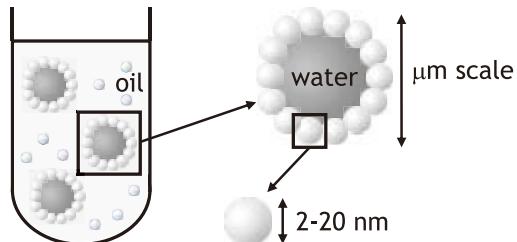


Fig.1 Pickering emulsion formation by using a nanometer order colloidal particle.

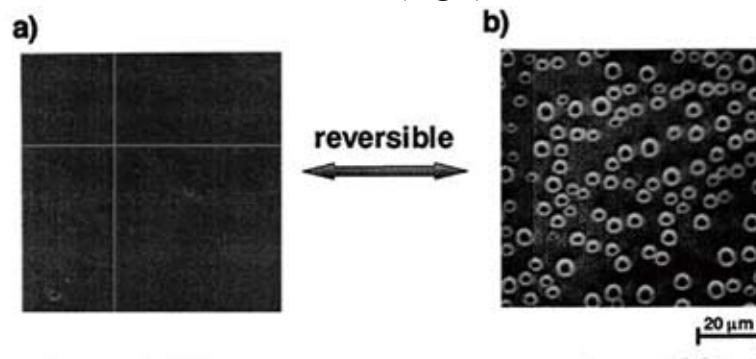


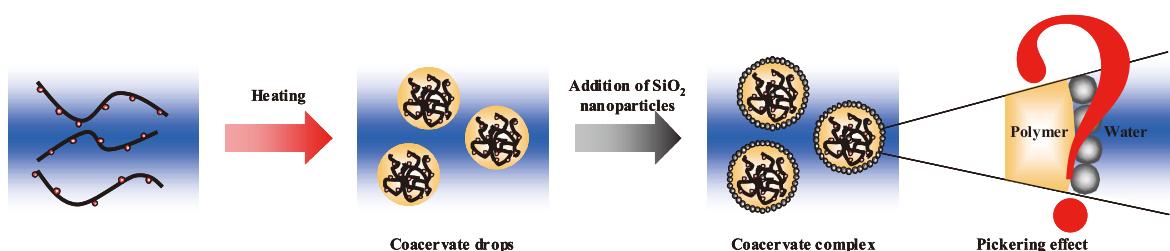
Fig. 2. Photographs of temperature-responsive polymer solution.

コアセルベートは生理活性物質の分離・精製といったバイオテクノロジー等での分野での応用が期待されることから非常に興味深く、その研究例は比較的少ないものの高いポテンシャルを秘めている。コアセルベートは界面変性を抑制し、タンパク・DNAなどの種々の生体分子や細胞までをもその機能を損なうことなく内包することが可能であり、DDS キャリアやバイオセパレーションにおける分離キャリアなどへの応用も期待される。これまでの研究で、我々は代表的な刺激（温度）応答性高分子である PNIPAAm に官能基を有する NIPAAm 構造類似性の新規機能性モノマー (*e.g.*, 2-hydroxyisopropyl- acrylamide (HIPAAm), 2-carboxyisopropylacrylamide (CIPAAm)) を導入することで、得られるポリマーが PNIPAAm と同様の温度に応答した鋭敏な脱水和・凝集挙動を示すばかりでなく、刺激に応答して形成及び消失するようなコアセルベートを生起することを見出している^{4),5),10)}。さらにこれら新規機能性高分子が形成するコアセルベートは、既報されているものと比べてサイズが小さくかつ単分散であり、また優れた分離能を発揮するなど種々の特長を有していることを明らかにしている^{6),11)}。

3. 実験

3.1 シリカ粒子によるコアセルベート滴の安定化（ピッカリング型エマルション）

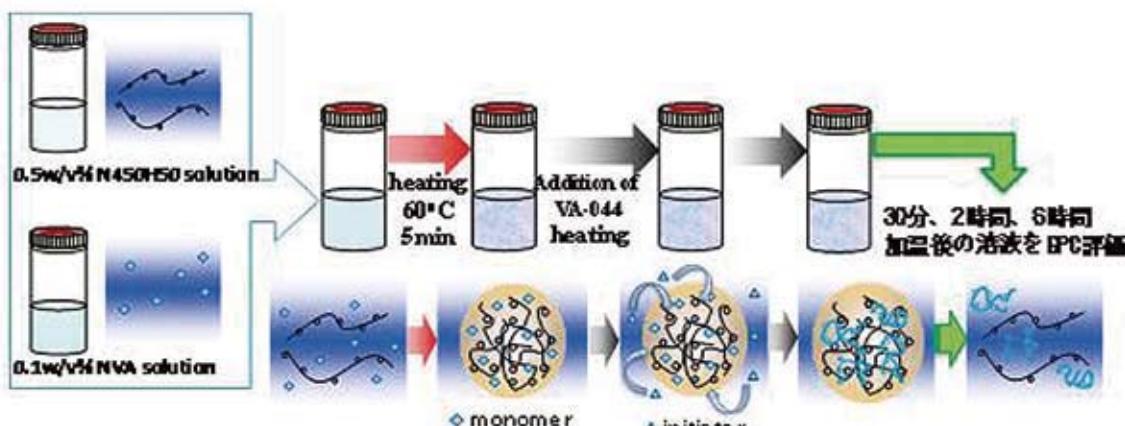
NIPAAm と *N*-hydroxymethylacrylamide (HMAAm) をモノマーとして、フリーラジカル重合により poly(NIPAAm-*co*-HMAAm) を調製し、特定温度で可逆的に液-液相分離型のコアセルベート滴を発現する温度応答性高分子を調製した。このコアセルベート滴は非常に不安定な会合体であるため、水溶液を LCST 以上に加熱し続けることで融合化が起こり、時間経過に伴い粒径が増大した。そこで液-液界面の安定化として、約 15 nm の球状ナノ粒子であるコロイダルシリカを混合し、“ピッカリング効果”による温度応答性コアセルベート滴複合体の安定性を評価した(Scheme 1)。



Scheme 1. Schematic illustration of stabilized thermo-responsive coacervate complex by using nanoparticles

3.2 コアセルベート滴内でのフリーラジカル重合

NIPAAm、HMAAmをモノマーとして、開始剤にethyl 2-bromoisobutyrate (EBB)、触媒に CuBr 、リガンドに tris(2-dimethyl-aminoethyl)amine (Me₆TREN)を用い、所定の条件でATRPにより、分子量制御されたpoly(NIPAAm-*co*-HMAAm) を調製した。次にモノマーにNVA 、開始剤に水溶性のアゾ系開始剤である 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin- 2-yl)propane] dihydrochloride (VA-044) を用い、所定の条件でコアセルベート滴の有無におけるフリーラジカル重合を行った。反応後、GPC 測定により、NVA の重合挙動を評価した(Scheme 2)。



Scheme 2. Free radical polymerization under thermo-responsive coacervate droplets

4. 結果と考察

4.1 シリカ粒子によるコアセルベート滴の安定化（ピッカリング型エマルション）

フリーラジカル重合により得られた共重合体の組成比を¹H NMRにより解析した結果、仕込み比と同程度の組成比であった(NIPAAm n mol %, HMAAm m mol % の試料は、N_nH_mと表記する)。また塩濃度を調整した水に共重合体(0.5 w/v %)を溶解させ、UV-vis 分光光度計により温度変化に対する透過率挙動を測定した結果、鋭敏かつ可逆的な透過率変化を示した。LCST(透過率50 %の温度と定義)は共重合体中の水酸基の割合の増加に伴い高温度側に、また塩濃度の増加に伴い低温度側にシフトした(Fig. 3)。

次に所定濃度に調整した共重合体水溶液についてLCST以上(60 °C)で顕微鏡観察を行ったところ、コアセルベート滴が観察され、LCST以下に冷却すると完全に消失した。さらに塩濃度150 mMの共重合体水溶液は、LCST以上(60 °C)の保温状態において、塩無条件下に比べて、液滴の粒径サイズが大きくなり、さらに時間経過に伴う液滴の粒径サイズの増大も観察された(Fig. 4)。これはコアセルベート滴同士の融合化によるものと考えられる。

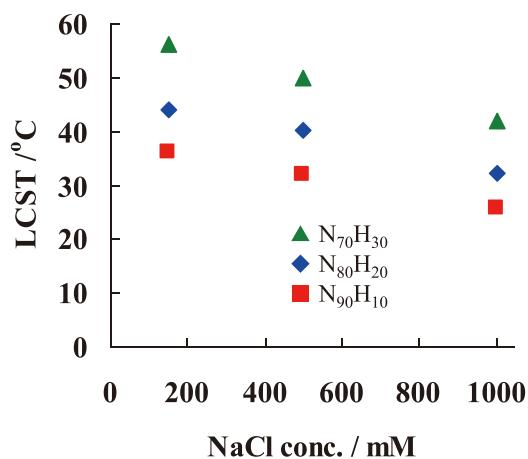


Fig. 3 Relationship between LCST (°C) and HMAAm content (mol %) in polymer.

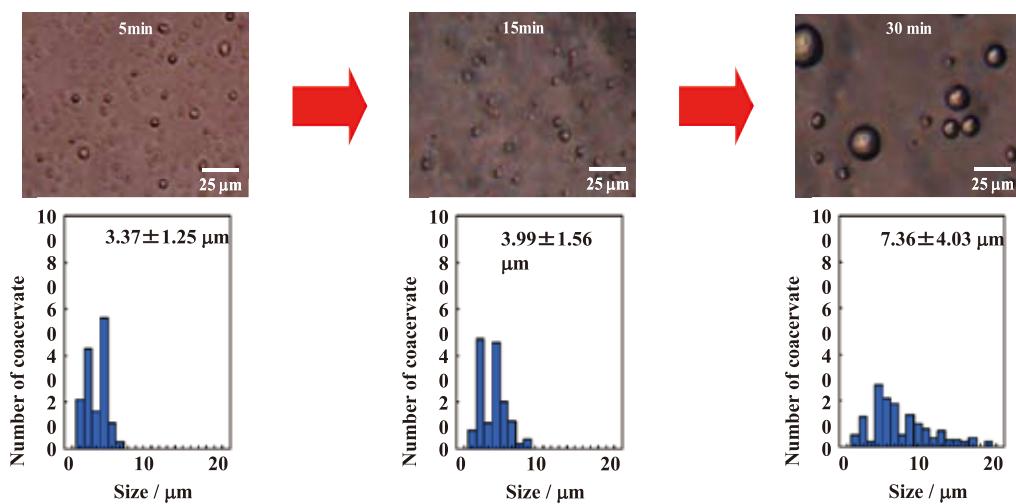


Fig. 4 Photographs and size distribution histograms of N₉₀H₁₀(0.5 w/v %) in water containing salt (NaCl conc., 0, 150 mM) above the LCST (at 60 °C).

次に、塩濃度150 mMの共重合体溶液をLCST以上(60 °C)で保温し、コアセルベート滴の形成後に所定濃度のコロイダルシリカを添加した。顕微鏡観察より、共重合体水溶液のみのとき(Fig. 4)とは異なり、時間経過に伴う液滴の粒径サイズの増大が抑制されていた

(Fig. 5)。これよりコロイダルシリカとコアセルベート滴の複合化により、コアセルベート界面の安定性の向上が示唆された。

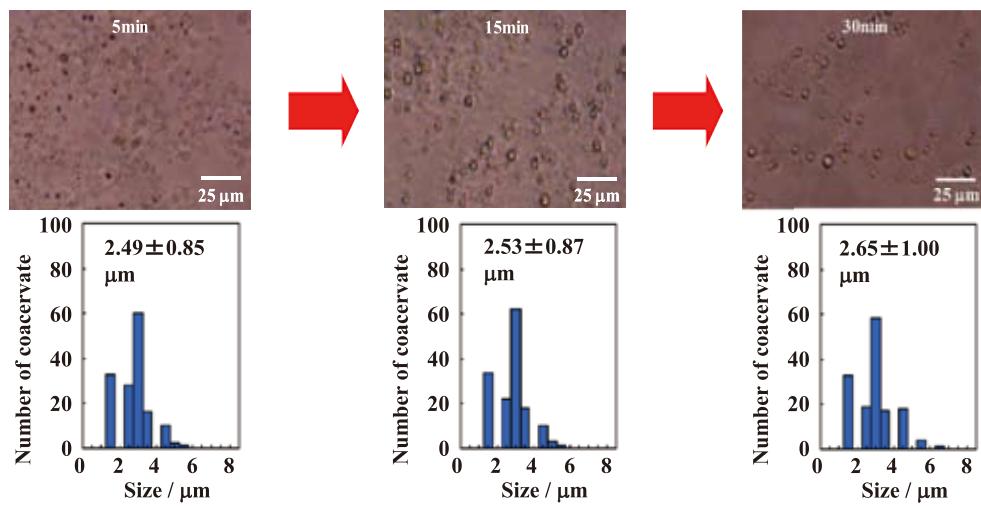


Fig. 5 Photographs and size distribution histograms of $\text{N}_{90}\text{H}_{10}$ (0.5 w/v % ; 2000 μL) with colloidal silica (20 w/v % ; 100 μL) in water containing salt (NaCl conc., 150 mM) above the LCST (at 60 °C).

最後にコロイダルシリカとコアセルベート滴の複合化の評価として、乾燥状態のSEM観察を行った。共重合体のみの条件ではスムースな表面であるコアセルベート滴様な球体が観察されたのに対し(Fig. 6)、コロイダルシリカを添加した系では、コアセルベート滴様な球体表面をコロイダルシリカが覆う様子が確認された(Fig. 7)。

これよりコロイダルシリカとコアセルベート滴の複合化(ピッカリング)の形成により、コアセルベート滴の安定性が向上したと考えられる。

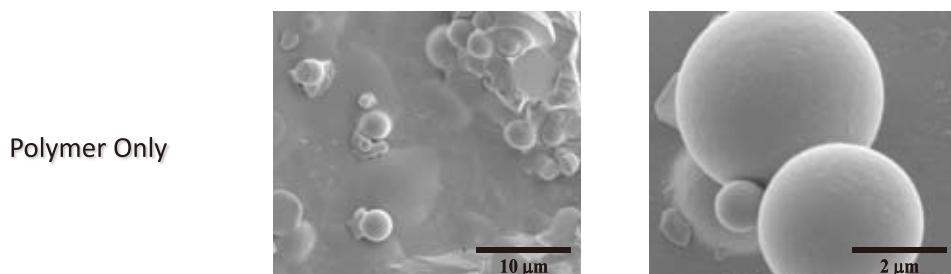


Fig. 6 SEM images of $\text{N}_{90}\text{H}_{10}$ (0.5 w/v% ; 2000 μL) in water containing salt (NaCl conc., 150 mM) above the LCST (at 60 °C).

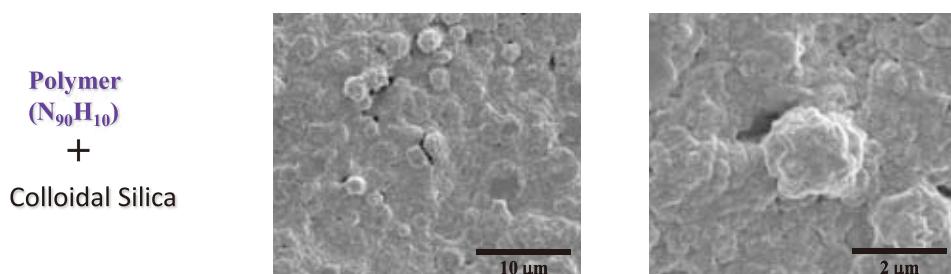


Fig. 7 SEM images of $\text{N}_{90}\text{H}_{10}$ (0.5 w/v % ; 2000 μL) with colloidal silica (20 w/v %) 100 μL in water containing salt (NaCl conc., 150 mM) above the LCST (at 60 °C).

4.2 コアセルベート滴内でのフリーラジカル重合

ATRPにより得られた共重合体の重合結果をTable 1に示す。得られた共重合体の組成比を¹H NMRにより解析した結果、仕込み比に近い組成比を有する分子量(M_n)が異なる3種類の共重合体の調製を確認した。得られた共重合体のUV-vis分光光度による温度変化に対する透過率挙動を評価した結果、鋭敏かつ可逆的な透過率変化が観測され、LCSTは M_n に依存せずほぼ同じであった。またフリーラジカル重合で調製した共重合体と同様に塩濃度の増加に伴いLCSTは低温度側にシフトした。

また所定濃度に調整した共重合体溶液のLCST以上(60°C)で顕微鏡観察を行ったところ、コアセルベート滴が観察され、LCST以下では完全に消失した。そこで共重合体水溶液をLCST以上(60 °C)で保温した状態でNVAの重合を行った。反応後のGPC測定の結果より、コアセルベート滴存在下では、polyNVAに由来するピークの増大が確認された。さらに反応時間の経過に伴って、polyNVAの分子量のわずかながらの増加、モノマーのピークの減少が確認された。

これより水溶性モノマーとしてNVAを選択し、コアセルベート滴の存在有無における重合挙動を評価した結果、モノマーの濃縮に起因すると考えられるpolyNVAの生成量の増加が確認された。

Table 1. Characterizations of poly(NIPAAm-*co*-HMAAm) by ATRP^{a)}

Code	e) Copolymer		^f Mn	^f PDI
	NIPAAm [mol %]	HMAAm [mol %]		
^b) N ₄₅₀ H ₅₀	90.4	9.6	56000	1.99
^c) N ₉₀₀ H ₁₀₀	91.9	8.1	80600	2.09
^d) N ₁₈₀₀ H ₂₀₀	90.3	9.7	176000	2.80

^{a)}Monomer concentration= 2M,
Solvent : DMF/H₂O = 1/1,
Pressure = 6000atm, Reaction time = 3h,
Reaction temperature = 20 °C,
^b)[Monomer]₀ / [EBB]₀ / [CuBr]₀ / [Me₆TREN]₀ = 500/1/2/2
^c)[Monomer]₀ / [EBB]₀ / [CuBr]₀ / [Me₆TREN]₀ = 1000/1/2/2
^d)[Monomer]₀ / [EBB]₀ / [CuBr]₀ / [Me₆TREN]₀ = 2000/1/2/2
^eEstimated by ¹H NMR ^fEstimated by GPC.

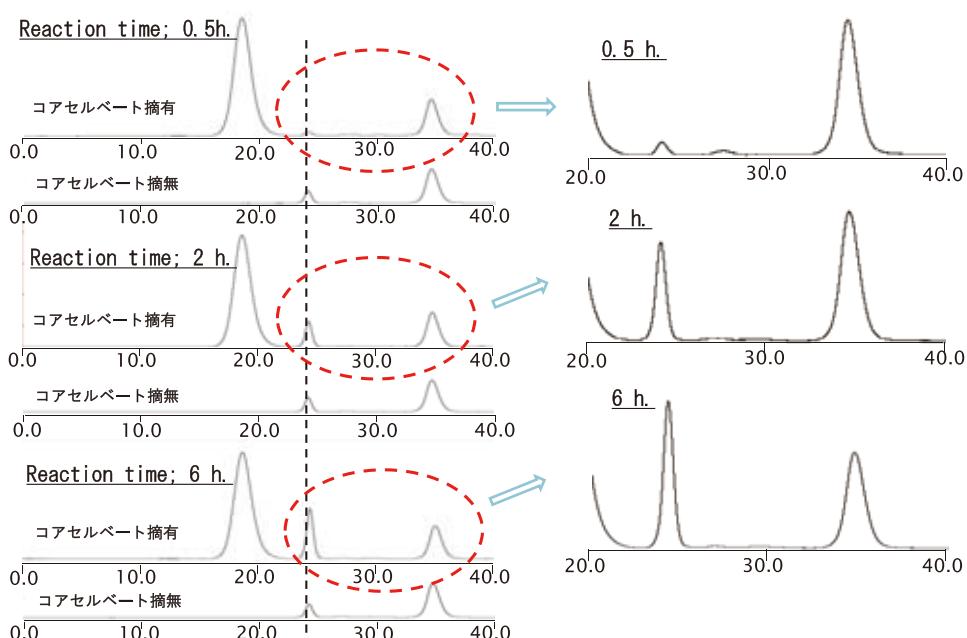


Fig. 8 GPC traces of polyNVA obtained in coacervation

5. 結論

ポリアクリルアミド誘導体のラジカル重合およびATRPにより、仕込み比および分子量が制御された共重合体が調製できた。温度変化に対して鋭敏かつ可逆的な透過率変化を示し、LCSTは共重合体中の水酸基の割合の増加に伴い高温度側に、また塩濃度の増加に伴い低温度側にシフトした。また光学顕微鏡より温度変化に伴うコアセルベート滴の形成が確認され、共重合体水溶液を LCST 以上で保温した場合、時間経過に伴いコアセルベート滴同士の融合化による粒径サイズの増大が観察された。しかしながらコアセルベート滴の形成後に所定濃度のコロイダルシリカを添加することで、時間経過に伴う粒径サイズの増大が抑制された。これはコロイダルシリカとコアセルベート滴の複合化（ピッカリング効果）により、コアセルベート界面の安定性の向上されたためと考えられた。またコアセルベート滴の有無におけるモノマーの重合挙動を評価した結果、コアセルベート液滴内へのモノマーの濃縮に起因すると考えられる高分子の生成量の増加が確認された。

6. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究助成を頂いたサンケイ科学振興財団に感謝申し上げます。また研究に関して助言を頂いた門川淳一教授にお礼申し上げます。

7. 引用文献

- 1) K. Yamamoto, T. Serizawa, Y. Muraoka, M. Akashi, *Macromolecules* **2001**, 34, 8014.
- 2) K. Yamamoto, T. Serizawa, M. Akashi, *Macromol. Chem. Phys.*, **2003**, 204, 1027.
- 3) S. Kunugi, K. Takano, Y. Yamazaki, K. Yamamoto, M. Akashi, *Langmuir* **2000**, 16, 2042.
- 4) T. Maeda, T. Kanda, Y. Yonekura, K. Yamamoto, T. Aoyagi, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 545.
- 5) T. Maeda, M. Takenouchi, K. Yamamoto, T. Aoyagi, *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2230.
- 6) T. Maeda, Y. Akasaki, K. Yamamoto, T. Aoyagi, *Langmuir* **2009**, 25(16), 9510.
- 7) Y. Kotsuchibash, M. Ebara, K. Yamamoto, T. Aoyagi, *Polymer Chemistry* **2011**, 2(6), 1362.
- 8) P. Pieranski, *Phys. Rev. Lett.*, **1980**, 45, 569.
- 9) L. Dai, R. Sharma, C. Wu, *Langmuir* **2005**, 21, 2641.
- 10) T. Maeda, K. Yamamoto, T. Aoyagi, *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 302, 467.
- 11) T. Maeda, M. Takenouchi, K. Yamamoto, T. Aoyagi, *Polymer Journal* **2009**, 41 (3), 181.

Development of temperature-responsive coacervate as the reaction field.

Kazuya Yamamoto

Department of Chemistry, Biotechnology, and Chemical Engineering,
Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University,

1-21-40 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

Tel: +81-99-285-7843, Fax: +81-99-285-7856, E-mail: yamamoto@eng.kagoshima-u.ac.jp

In this study, we examined the development of temperature-responsive coacervate as the reaction field. The coacervate droplets were easily formed by heating of a aqueous solution including the temperature-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N*-hydroxy methylacrylamide [poly(NIPAAm-*co*-HMAAm)] above a lower critical solution temperature (LCST). First, when we added the silica nanoparticle (ca. 15 nm) as colloidal particles to the coacervate droplets, the emulsions were stable for a long time. Furthermore, we performed analysis of interfacial assembly behavior of silica nanoparticles on the liquid-liquid interface. The formations and size of the silica/coacervate droplets was observed by microscope. As a result, it was demonstrated that the nanoparticles were effectively integrated into the coacervate droplets. Next, we examined a new type of radical polymerization that starts with the temperature-responsive coacervate droplet. We could prepare the polymer by heating the mixing aqueous solution consisting of the poly(NIPAAm-*co*-HMAAm)s, monomer, and azo-initiator.

