

ポリ(乳酸 - エチレングリコール) トリブロック共重合体の乳化特性

松本康夫* 北村吉朗* 吉澤秀和*

Emulsification Properties of Poly(lactide-*block*-ethylene glycol-*block*-lactide) Block Polymers

Yasuo MATSUMOTO,
Yoshiro KITAMURA, Hidekazu YOSHIZAWA

(Received November 30, 2005)

Homo- and copolymers of poly(lactic acid) have gathered much attention because of their biodegradability and biocompatibility. They have numerous applications in the biomedical field due to their potential. In their polymers, we are interested in poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) block polymers. The amphiphilic triblock copolymers, poly(DL-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(DL-lactic acid) (PLEL), have known to be surface-active ability. Therefore, we have studied emulsification properties with the polymers. PLEL were prepared by ring-opening copolymerization of DL-lactide and poly(ethylene glycol) catalyzed by stannous 2-ethylhexanoate. We prepared ethyl acetate-water-PLEL emulsion and applied this emulsion to biodegradable polymer scaffolds. PLA scaffolds were prepared by an emulsion freeze-drying method. These scaffolds were made by varying water weight fraction. Their surface pore size became larger with increasing water weight fraction.

Key words: Poly(lactic acid), Poly(ethylene glycol), Biodegradable polymer, Tissue Engineering, Surfactant

1 緒言

近年、環境や人体に負荷の少ない生分解性高分子であるポリ乳酸 (PLA) が注目されている。PLA は生体適合性・生分解性を有することから、生体内における薬物や農薬、肥料などの徐放制御を目的としたマイクロカプセル (MC) のマトリックスとして用いられている。また、PLA などの生体適合性の合成高分子は Tissue Engineering において、細胞の増殖や分化の足場となる細胞外マトリックスへの応用が期待されている。

PLA MC は、主としてエマルジョンの液中乾燥法により調製される。これは、良溶媒に PLA を溶解させ、界面活性剤を用いて水などの貧溶媒中に分散させてエマルジョンを調製し、内相の良溶媒を蒸発させることで PLA MC を得る方法である。しかし、この方法ではエマルジョン調製時の機械的攪拌により油滴が多分散化する。そこで

本研究では、微細かつ比較的単分散なエマルジョンを調製することが可能な転相乳化法に注目した。

転相乳化法は、界面活性剤を用いて目的とする型のエマルジョンと反対の型のエマルジョンを調製し、温度や体積比を変化させることによって目的とする型のエマルジョンに転相させる方法である (竹内節, 1999)。温度変化による転相乳化法は、ノニオン性界面活性剤の曇点を利用した乳化法であり、転相温度付近では親水性-疎水性バランス (HLB) が釣り合うため低界面張力場となり、微細なエマルジョンを調製することができる (紺野ら, 1999)。一方、体積比の変化による転相乳化は、油相あるいは水相にもう一方の相を攪拌しながら加え、転相点で十分攪拌することで粘度によるせん断的効果が働き、微細かつ単分散なエマルジョンを得る方法である (辻薦, 1976)。

本研究では、疎水基に PLA セグメント、親水基に生体

* 岡山大学環境理工学部環境物質工学科

適合性に優れたポリエチレングリコール (PEG) セグメントを持つ両親媒性高分子である PLA-PEG-PLA トリブロック共重合体 (PLEL) を用いて、転相乳化法によってエマルジョンを調製し、その乳化特性に関する基礎的検討を行った。また、疎水性の PLEL を用いて調製した高内相の W/O エマルジョンを利用し、細胞培養を目指した生分解性多孔質材料の創製を試みた。

2 実験方法

2.1 PLEL の合成と評価

PLEL の合成は 2-エチルヘキサン酸スズを触媒とした D,L-Lactide のバルク重合により行った。反応スキームを Fig. 1 に示す。まず、アンプル管に D,L-Lactide と PEG (重量平均分子量: 2000) を挿入し、触媒を加えた。1 時間減圧乾燥した後、アンプル管を封管し、130 °C で 24 時間反応させた。反応後、未反応のモノマーおよび PEG を取り除くため重合物をクロロホルムに溶解させ、メタノール中での再沈澱操作により目的物を得た。生成した PLEL は ¹H-NMR (溶媒 CDCl₃) により構造を確認した。PLEL の分子量及び分子量分布をポリスチレンを基準物質とするゲル浸透クロマトグラフィ (GPC) により測定した。

2.2 PLEL の水溶性試験

10 wt% PLEL 水溶液を調製し、25°C、150 rpm で 24 時間振とうさせた後、水溶液の様子を目視で観察した。

2.3 量点測定

1 wt% PLEL 水溶液を調製し、冷熱式セル温度コントローラーにより連続的に温度を変化させ、水溶液中の濁度を波長 600 nm の吸光度により測定した。昇温・降温速度は 1 °C/min とした。

2.4 乳化実験

PLEL を酢酸イソプロピルに溶解させ、水:油=1:1 (重量比) となるように混合し、ホモジナイザー (12,000 rpm, 2min) によってエマルジョンを調製した。エマルジョンの型は、サーキットテスターによる電気抵抗測定より決定した。PLEL による転相乳化は水/油の重量比を変化させることにより行った。まず、1 wt% の PLEL 酢酸イソプロピル溶液を調製した。その溶液を (12,000 rpm) で攪拌しながら、W/O 型から O/W 型へ転相するまで超純水または水溶液 PLEL の 1 wt% 水溶液を少量ずつ滴下した。

2.5 PLA スポンジの調製と評価

実験に使用した PLA と PLEL の重量平均分子量はそれぞれ 79,000、13,500 (PEG 2,000) である。Fig. 2 に

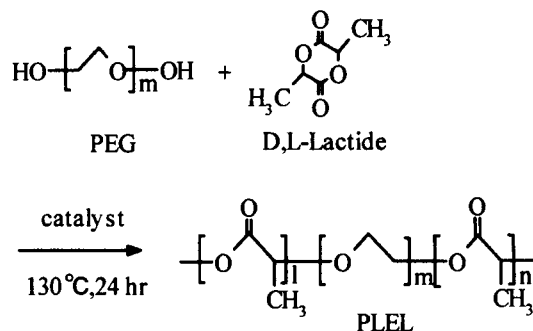


Fig. 1 Synthetic scheme of PLEL

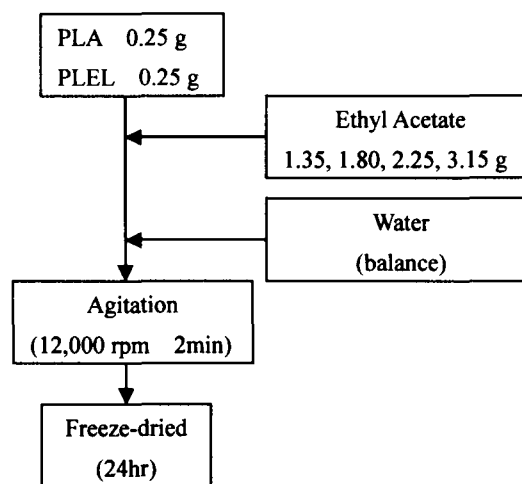


Fig. 2 Preparation flow chart of PLA sponge

Table 1 Preparation condition of PLA sponge

Water:Oil	PLA concentration [wt%]	PLEL concentration [wt%]	Water concentration [wt%]	Ethyl acetate concentration [wt%]
3:7	5	5	27	63
5:5			50	50
6:4			54	36
7:3			63	27

PLA スポンジ調製のフローチャートを示す。PLA 0.25 g と PLEL 0.25 g を酢酸エチルに溶解させ、ホモジナイザー (12,000 rpm) で攪拌しながら超純水を加え、W/O エマルジョンを調製した。調製した W/O エマルジョンを 24 時間凍結乾燥することで PLA を固化させ、PLA スポンジを調製した。調製後、デシケーター内で数日間乾燥させた。Table 1 に調製条件を示す。水と酢酸エチルの重量比を水:酢酸エチル=3:7~7:3 と変化させた。

得られた PLA スポンジの表面形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。また、細孔径分布を水銀ポロシメーターにより測定した。測定に用いた PLA スポンジは測定前日に窒素雰囲気下、30°C で一晚乾燥させたものを用いた。サンプル量は 0.05g とした。

3 実験結果と考察

3.1 乳化実験

3.1.1 エマルションの型

HLBの異なるPLELを用いて調製したエマルションの型をTable 1に示す。Table 1よりPLELのHLBが6以下(非水溶性)ではW/Oエマルション、7以上(水溶性)ではO/Wエマルションを形成し、水への溶解性がエマルションの型を決定する因子であることが分かった。これは油溶性界面活性剤を用いた系では油相が連続相となり、水溶性界面活性剤を用いた系では水相が連続相を形成するというバンクロフトの規則と一致した。以上よりPLELのHLBによりエマルションの型を変化させることが可能であることが分かった。

3.1.2 体積変化による転相乳化

Fig. 3に水相と油相の体積比を変化させた時のエマルションの光学顕微鏡写真を示す。まず、超純水を少量添加した時、混合溶液は均一に乳化され安定なW/Oエマルションを形成した。さらに水を滴下し、水の体積比をかなり大きくしたにも関わらず、W/Oエマルションを保持したままであった。この時、分散液の粘度は著しく増加し、内水滴が密集していることが分かった(Fig. 3-a)。これはPLELのHLBがかなり低いため、バンクロフトの規則に従う水/油比の範囲が広いためであると考えられる。次に、水:油=1:7にした時、分散液の粘度が減少し抵抗値が低下したため、エマルションが転相したと考えられる。このとき分散液はW/O/Wエマルションを形成した(Fig. 3-b)また、転相直後クリーミングを起こした。24 hr後、このエマルションを観察したところ、O/Wエマルションとなった(Fig. 3-c)。これはW/O/Wエマルションの内水滴が油滴を介して連続相の水へ拡散するためであると考えられる。

一方、水溶性PLELの1wt%水溶液を滴下した場合、超純水を滴下した時と同様に、高内相のW/Oエマルションを形成後、水:油=1:5で転相した。この時、W/O/Wエマルションを形成し、24 hr後、O/Wエマルションを形成した(Fig. 3-d)。しかし、超純水を滴下した系と比較して油敵は小さく、エマルションは安定であった。これは親水基のPLELがO/Wエマルションを安定化しているためであると考えられる。

3.2 PLA スポンジの調製

3.2.1 PLA スポンジの表面形態

調製したPLAスポンジの表面SEM観察の結果をFig. 4に示す。SEM写真より、PLAの表面に多くの孔が観察され、PLAスポンジの調製に成功した。細孔径がエマルションの滴径と同程度であることから、エマルションの凍結乾燥によって水滴が蒸発して細孔になったと考えられる。また、写真より内相である超純水の割合が増えるに従い、

Table 2 Emulsion type of Water/Isopropyl acetate/PLEL system

PLEL <i>M_w</i>	PLA <i>M_w</i>	HLB	solubility test	cloud point[°C]	emulsion type
11124	9281	3.3	×	-	W/O
6200	4357	5.9	×	-	W/O
5637	3821	6.4	▲	-	W/O
5253	3410	7.0	●	-	O/W
4567	2724	8.1	○	34.5	O/W
4274	2431	8.6	○	42.0	O/W

water/ Isopropyl acetate /PLEL=47.5/47.5/5 (wt%)

×Precipitation ▲Dispersion ●Translucent ○Clear

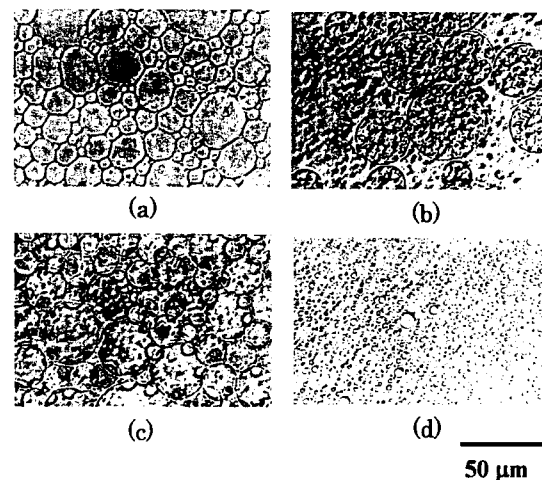


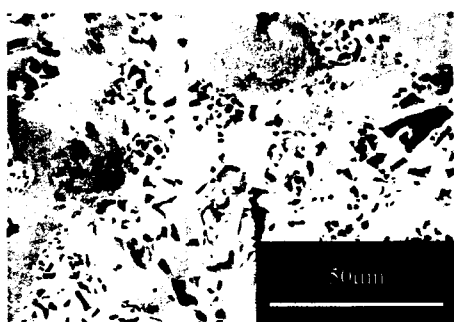
Fig. 3 Optical microscope images of water / isopropyl acetate / PLEL emulsion, (a) water:oil=1:6, (b) water:oil=1:7, (c) after 1 day of (b) and (d) after 1 day of 1 wt% PLEL aq :oil=1:5

スポンジ表面の細孔が大きくなっているのが分かった。これは水滴が増加し、内相の密度が高くなったことで蒸発する水の量が多くなり、表面に多くの穴があいたためと考えられる。

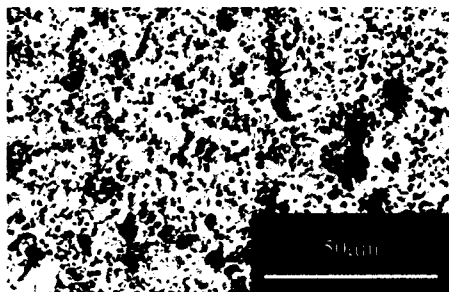
3.2.2 PLA スポンジの水銀ポロシメーター測定

水銀ポロシメーター測定により得られた各組成のPLAスポンジの細孔径分布をFig. 5に、ピークトップの細孔径をTable 3に示す。まずグラフより、細孔径が数nmから数十nmおよび数μmから数十μmの範囲に分布していることが分かった。このような細孔の大きさの違いは形成原因の違いによるものと考えられる。数μmの孔の形成原因は酢酸エチルが蒸発することでポリマーが固化し、残った水滴が蒸発することにより、水滴部分が孔になったと考えられる。一方、数nmの孔の形成原因は凍結乾燥時の乾燥プロセスであると考えられる。凍結乾燥時、酢酸エチルが上部から蒸発してポリマーが固化するため、下部には蒸発していない酢酸エチルが存在している。その結果、下部の酢酸エチルが蒸発する際、上部で固化したポリマーに孔をあけると考えられる。

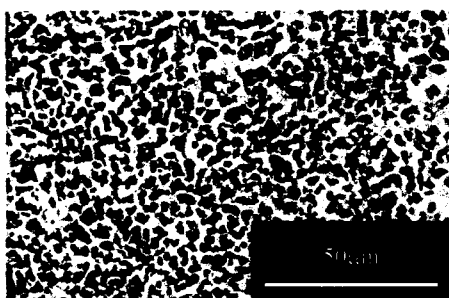
Fig. 5における数μm付近のピークに注目すると、水の



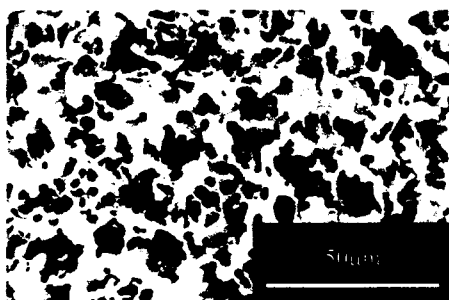
water:oil=3:7



water:oil=5:5



water:oil=6:4



water:oil=7:3

Fig. 4 SEM micrographs of PLA sponge surfaces

割合の増加に伴いピークが大きくなり、細孔径分布はシャープとなった。また、ピークトップの位置が孔径の大きい方へシフトしていることが分かった (Table 3)。これを以下のように考察した。水の割合が小さい場合、水滴が少ないため液滴密度が低くなる。その結果、凍結乾燥後に細孔同士が合体することは少なく比較的小さい細孔になっ

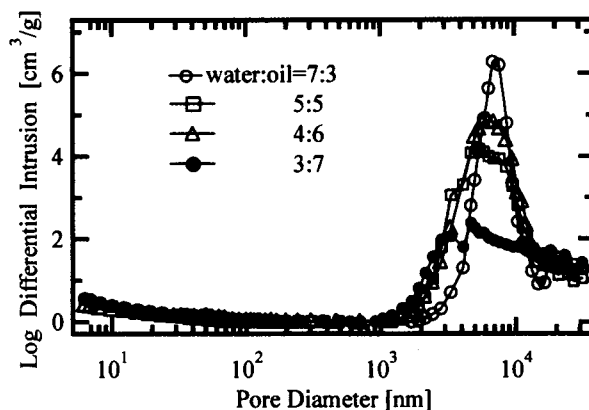


Fig. 5 Pore size Distribution of PLA sponge

Table 3 Pore diameter of peak top from Fig. 5

Water : Ethyl acetate	Diameter of peak top [nm]
3:7	約4500
5:5	約5500
6:4	約6000
7:3	約7000

たとえられる。一方、水の割合が大きい場合、水滴密度が高いため液滴同士が接触していると考えられる。その結果、凍結乾燥後に孔同士が合体して大きな細孔になったと考えられる。以上より、水の割合の増加に伴い、小さな細孔が減少し孔径の大きな方へピークがシフトしたと考えられる。

4 結言

PLEL を界面活性剤として用いてエマルジョンの調製を試みた結果、PLEL の水溶性によってエマルジョンの型が決定された。

PLEL を界面活性剤として用いて調製した W/O エマルジョンを凍結乾燥し、PLA スポンジの調製を試みたところ、分散相の割合によってスポンジ表面の細孔径およびスポンジの細孔径分布が変化した。

以上より PLEL の乳化特性を利用し PLA スポンジの調製が可能であり、調製条件を変化させることで表面形態および細孔径分布の制御が可能であると言える。

参考文献

- 紺野義一, 菅谷良夫, 広部みどり, 外尾恵美 (1999) : 転相温度 (PIT) 乳化法による微細エマルジョンの調製, J. Soc. Cosmet. Chem. Japan, 33, pp.59-65
 竹内節 (1999) : 界面活性剤 上手に使いこなすための基礎知識, 米田出版, p.102-127
 辻薦 (1976) : 乳化・可溶化の技術 工学図書, p.66-72