in situ 重合を利用した機能性カプセル粒子の創製

Encapsulation of Functional Materials Using in situ Polymerization Processes

清水 秀 信

1. はじめに

コロイド溶液とは、直径数 nm から数 μm の範囲にあるコロイド粒子が分散した溶液のことである。コロイド粒子は、マクロの世界の生物組織や工業製品とも、ミクロの世界の原子・分子とも異なる特異な挙動を示すことから、コロイド粒子の研究は、メゾスコピック領域という独自の学問領域の中で展開されてきた¹⁾。この領域に属する粒子のふるまいは、粒子の熱運動と粒子間相互作用のデリケートなバランスによって規定されているため、粒子の表面特性(鎖の形態や電荷密度など)を変化させると、粒子の分散安定性も顕著に変わることが報告されている^{2,3)}。

これまでに様々な機能性コロイド粒子の開発が行われており、本誌においても 2004 年の 7 月号に「単分散性コロイド粒子の合成と用途開発」という特集が組まれている。例をあげると、粒子表面上で、抗原抗体反応などの分子認識を行わせたり、タンパク質の立体構造形成反応を行わせたりする試みがある。特に、タンパク質を再生させる場として粒子表面を活用する例では、コロイド粒子の特徴の 1 つである比表面積が大きいことをうまく利用している。すなわち、広大な表面積を有する粒子表面に、凝集しやすい変性タンパク質を分子分散させ、その場でタンパク質を再生させることにより、分子間凝集反応を抑制でき、活性のあるタンパク質を高収率で得ることが可能となる⁴⁾。このような反応場を設計・構築するポイントは、「一部の疎水性残基が水中に露出している変性タンパク質を選択的に粒子表面に吸着させ、天然状態のタンパク質は粒子表面に吸着しないようにすること」である。

近年では、粒子表面だけでなく粒子内部を利用する研究も活発に行われている。粒子内部に蛍光分子や薬物などの機能性物質をカプセル化した粒子は、標識剤やドラッグデリバリーシステム(DDS)用の担体として有用である。粒子に機能性物質をカプセル化する方法としては、①完成し

た粒子(あるいは高分子鎖)と機能性物質の相互作用を利用して機能性物質を封入する“吸着法”と、②モノマーを重合させることにより得られる粒子化と機能性物質のカプセル化が同時に進行する“*in situ* 法”に大別できる。本稿では、粒子内にカプセル化できる機能性物質の含量を高くすることが可能である *in situ* 法について紹介する。

2. ミニエマルジョン技術

2.1 O/W 型エマルジョンの分類

界面活性剤の存在下で油を水中に分散させた O/W 型のエマルジョンは、大きさと安定性の違いにより、図 1 のように 3 つに分類することができる。マクロエマルジョンは熱力学的に不安定なため、界面エネルギーをできるだけ減らそうとして、小さな粒子が縮小・消滅し、より大きな液滴を生成する(オストワルト熟成)。得られるエマルジョンの大きさは、通常 $1\mu\text{m}$ 以上である。

オストワルト熟成は、水にほとんど溶解しない物質(ハイドロフォブと呼ばれている)を油層の中へ添加することにより、ある程度抑制することができる。なぜならば、水中を拡散できないハイドロフォブを含むエマルジョン(ミニエマルジョンと呼ばれている)は、油層を構成している成分の水中への拡散も抑えるため(浸透圧が働くため)である。ミニエマルジョンは、油層にハイドロフォブを添加して強い剪断力をかけることにより容易に得ることができ、大きさは 50-500nm である。また、生成したミニエマルジョンは数ヶ月間安定である。

マイクロエマルジョンは、大きさが 5-50nm の非常に微

図 1 水中油型(O/W 型)エマルジョンの分類

HIDENOBU SHIMIZU

神奈川県立大学 応用バイオ科学部 応用バイオ科学科 准教授 博士(工学)
〒243-0292 厚木市下荻野 1030
Tel: 046-291-3148 Fax: 046-291-3148
E-mail: shimizu@bio.kanagawa-it.ac.jp
〈専門〉高分子微粒子、生体関連高分子
〈趣味〉ジョギング

細なエマルションで、多量の界面活性剤を使用することにより得られる。外観は透明、または、半透明である。マイクロエマルションは、界面活性剤、水、油の割合により一義的に決まる熱力学的に安定なエマルションである。

2.2 ミニエマルション重合によるカプセル化

O/W 型のエマルションのうちミニエマルションは、機能性物質をカプセル化するのに適している。ミニエマルションを利用して機能性カプセル粒子を作製する方法を図2に示す。まず、機能性物質とハイドロフォブ(ヘキサデカンなど)を油性モノマー(スチレンやメチルメタクリレートなど)に溶解、または、分散させる。次に、この溶液、または、分散液を界面活性剤(ドデシル硫酸ナトリウムなど)水溶液に加えて強い剪断力をかけ、機能性物質を含むミニエマルションを得る。粒子径の制御は、水溶液の界面活性剤濃度を変化させることにより簡単に行うことができ、濃度が高いほど粒子径は小さくなる。最後に、ミニエマルションを構成しているモノマーを重合させると、

図2 ミニエマルション重合を利用したカプセル粒子の作製方法

機能性物質が封入されたポリマー微粒子を得ることができる。この方法では、エマルション内の機能性物質が水中にもれ出す確率が低いため、モノマーに溶かした、または、分散させた、ほぼすべての機能性物質をカプセル化することができる。すなわち、本法において機能性物質の含有量を規定している要因は、機能性物質のモノマーへの溶解性、または、分散性である。本法は、染料や顔料などのカプセル化に有効な方法であることが報告されている⁵⁶⁾。

O/W 型のミニエマルションの場合、カプセル化できる物質は油性の物質に限定されてしまうため、本法は水溶

性物質のカプセル化には適さない。W/O 型のミニエマルションを用いれば、水溶性物質を封入した粒子を得ることはできるが、得られた粒子は油層に分散しているため、水分散性カプセル粒子とするためには溶媒置換をする必要があり、水分散性に優れた粒子を得ることは難しいことが予想される⁷⁾。

3. 水溶性物質のカプセル化

タンパク質やアミノ酸などの生体分子、カテキンやタンニンなどの食品分子は、水環境下において様々な機能を発現することが知られている。これらの分子を集積・カプセル化して、水分散性に優れたカプセル化粒子が作製できれば、機能性物質の濃縮効果やコロイド粒子のサイズ効果に由来する新たな機能の発現が期待できる。このような粒子を作製する場合、2.2 で述べたように、カプセル化粒子を使用する環境と作製する環境は同じである方が、粒子の分散性や表面構造設計の立場からは望ましい。筆者らはこれまでに、水環境下で粒子を作製すると同時にカプセル化も行える重合系について検討を行ってきたので、その一部について紹介する⁸⁾。

3.1 重合系の構築指針

水環境下で粒子を作製する方法として、(ソープフリー)乳化重合や沈澱重合があげられる⁹⁾。この2つの方法の大きな違いは、モノマーが水に溶けるか(沈澱重合)溶けないか(乳化重合)である。これらの方法を用いることにより、ポリスチレンやポリ *N*-イソプロピルアクリルアミドなどの単分散性に優れた粒子を、大きさが20-1000nmの範囲で作製することができる。しかしこれらの重合は通常ラジカル重合系であるため、カプセル化したい水溶性物質を共存させた状態で重合を行うと、反応性のラジカルがモノマーだけでなく機能性物質にも作用するため、カプセル化と粒子化を同時に行うことは難しい。したがって、重合反応を利用して、水中の機能性物質を集積・カプセル化するためには、重合過程において機能性物質の活性を損なわないような条件でコロイド粒子が得られる系を探索する必要がある。例えば、ヘモグロビンのようなタンパク質を *in situ* 重合によりカプセル化しようとした場合、水中、室温という穏和な条件下、また、できるだけ短時間で粒子が生成する重合系が望ましい。筆者らは、アルデヒドの選択的な反応性を利用して、水溶性物質を集積・カプセル化できる重合系の構築を試みている。すなわち、機能性物質よりもはるかに高いアルデヒド反応性を示す化合物をモノマーとして用いることにより、機能性物質の機能を保持しながら、粒子化とカプセル化を同時に起こさせることを提唱している。

3.2 アルデヒドの縮合反応により得られるコロイド粒子

図3に、ホルムアルデヒド(FA)とアルキルシアノ酢酸(ACNA)を縮合反応させたときの反応スキームを示す。

図3 ホルムアルデヒド(FA)とアルキルシアノ酢酸(ACNA)からポリアルキルシアノアクリレート(PACNA)が生成する反応スキーム

この反応により得られるポリマーは、生分解性のポリアルキルシアノアクリレート(PACNA)である。ジメチルアミン(DMA)を触媒としてFAとブチルシアノ酢酸(BCNA)を水中で縮合させると、コロイド状の(水分散性に優れた)ポリブチルシアノアクリレート(PBCNA)粒子が生成する。機能性物質のカプセル化を行うことを考慮に入れ、重合溶媒に0.1mol/LのHEPES緩衝液(pH 7.4)を用い、まず、機能性物質が存在しない系で反応を行い、得られる粒子の特性について検討を行った。表1に、反応時間毎の回収率と粒子径の結果をまとめた。回収率はわずか5分で90%近くに達することから、この縮合反応は約5分で完了する反応であることがわかる。また、得られたPBCNA粒子の分散度は、いずれの時間においても1.03以下であることから比較的単分散な粒子が得られることもわかる。粒子径は時間とともに大きくなるが、5分のときの粒子数は、4分のときのそれに比べて約半分となった。これは、重合中に粒子同士が凝集してより大きなコロイド粒子が生成し

表1 回収率と粒子径の重合時間依存性

重合時間(min)	3	4	5
回収率(%)	70.1	76.6	87.0
粒子径(nm)	480	510	650
分散度	1.03	1.02	1.02
粒子数 $\times 10^{-15}(\text{L}^{-1})$	6.70	6.11	3.35

たためと推測される。

3.3 ヘモグロビン(Hb)のカプセル化

水溶性の機能性物質のモデルとしてヘモグロビン(Hb)

図4 Hbカプセル化粒子の作製方法

を *in situ* 重合によりカプセル化した例について、以下に紹介する。

図4にHbをカプセル化する手順を示す。まず、HbをHEPES緩衝液に溶かすと、水溶液の色は紅色となる。このHbが溶けている溶液に、粒子を作るために必要となる3種類の化合物(BCNA、FA、DMA)を順に加えていくと、わずか数分で溶液は不透明となり、コロイド溶液が得られる。得られた粒子分散液は、自然に沈降することなく、良好な水分散性を示す。BCNAを加えずに、Hb、FA、DMAを混ぜ合わせただけでは、このようなコロイド溶液は得られないことから、粒子が生成するためには、FAとBCNAの縮合反応が進行することが重要であるといえる。次に、得られた粒子分散液を遠心分離により沈殿物と上澄みに分離したところ、上澄みはほとんど着色しておらず、沈殿物が着色していたことから、溶液中のHbはほとんどコロイド粒子の中に取り込まれたことがわかる。この結果から、本法において機能性物質の含量を規定している要因は、機能性物質の水に対する溶解性、または、分散性であることがわかる。

3.4 成分含有率のHb濃度依存性

カプセル化粒子を各種溶媒により抽出して分析した結果、タンパク質のHb、縮合ポリマーのPBCNA、緩衝液由来のHEPESの3成分から構成されていることを確認している。成分含有率の測定は、粒子に含まれるHbの量を以下の方法で直接定量することにより算出した。凍結乾燥したHbカプセル化粒子にアセトンを加えてPBCNAを抽出し、重量を測定した。次に、このアセトン不溶物から蒸留水によりHEPESを抽出し、重量を測定した。ここで、アセトンにも蒸留水にも抽出されなかった成分がHbである。

図5に、系内のHbの濃度を変えて重合を行ったときに得られたコロイド粒子の成分含有率(粒子の重量のうちHbの重量が占める割合)の結果を示す。Hbの濃度は、BCNAに対するHbの仕込み重量パーセントで表してい

図5 コロイド粒子に含まれる3成分(PBCNA、Hb、HEPES)の含有率のHb仕込み濃度依存性

る。Hb の含有率は、Hb の濃度が増えるにつれ単調に増加し、最大で約 30wt% に達した。また、HEPES(塩)の含有率も Hb 濃度の増加にともない増加する傾向を示したことから、Hb と HEPES は弱く相互作用している可能性が示唆された。一方、Hb が存在しない系においても、HEPES が粒子の構成成分として約 10wt% 含まれていることから、粒子が生成する過程において、PBCNA 鎖と HEPES の間に非特異的な相互作用が働き、粒子に取り込まれているものと考えられる。以上の結果は、BCNA と FA の縮合反応を Hb 水溶液中で行うことにより、Hb が封入されたタンパク質ナノカプセルが得られることを示している。

3.5 粒子径の Hb 濃度依存性

Hb 存在下で BCNA と FA の縮合反応を行わせることにより、Hb を含むコロイド粒子が得られることはわかったので、次に得られる粒子の大きさを動的光散乱により評価した。図 6 に、系内の Hb 濃度を変えたときに得られた粒子径の結果を示す。Hb を加えないときには約 700nm であった粒子の大きさは、Hb を 10wt% 添加すると 200nm に低下した。さらに添加濃度を高くすると、徐々に粒子径は小さくなり、Hb の含有率が最も高いときの粒子径は 110nm となった。Hb 濃度の増加にともない粒子径が小さくなるのは、Hb が界面活性剤の役割を果たしているためと推測される。

3.6 カプセル化 Hb の機能性

たとえ水溶性の機能性物質を本法により効率よくカプセル化できたとしても、カプセル化した物質の機能が失われてしまっただけでは何の意味もない。そこで、カプセル化された Hb がきちんと機能を保持しているかどうかを、Hb の酸素吸脱着能により評価した。

図 7 に、仕込みの Hb 濃度が 40wt% の条件で作製したコロイド粒子の吸収スペクトルを測定した結果を示す。酸素を結合した天然状態のオキシヘモグロビンは、緑色部の 580 および 540nm に 2 本の特徴的な吸収を示す。また、

図 6 Hb 仕込み濃度を変えたときに得られるカプセル化粒子の大きさ

図 7 酸素吸脱着にともなうカプセル化 Hb と天然 Hb の吸収スペクトルの変化

紫色部では 410nm に鋭いピークを示す。一方、脱酸素されたデオキシヘモグロビンは、緑色部では 555nm に 1 本の太い吸収を示し、紫色部では 430nm に吸収を示す。カプセル化 Hb は、酸素の吸脱着にともない、天然状態の Hb と同様なスペクトル変化を示したことから、カプセル化された Hb は 90% 以上、その機能を保持していることがわかった。

4. おわりに

Hb 水溶液中で FA と BCNA からコロイド粒子を作製すると、粒子径が約 100nm で、重量にして約 30% の Hb を含む機能性カプセル粒子が得られることを示した。本系は、水に溶解している物質を取り込みながら重合が進み、粒子化している可能性が高い。現在のところ取り込まれる機構は不明であるが、粒子成長過程において安定性が低くなった粒子が、別の安定状態に移ろうとするために凝集して大きくなるときに、水溶性物質が非特異的に取り込まれていると推測できる。非特異的に機能性物質を取り込みながらカプセル化する方法の利点としては、①複数の水溶性物質を一度に取り込むことができる、②静電的相互作用などに比べて、カプセル化される物質に与える影響が少ない、などがあげられる。このように、FA と BCNA からコロイド粒子が生成する過程は、得られる粒子が比較的単分散であることから、凝集過程がある程度制御されているように見える。凝集過程が制御されて粒子が生成するという現象は、アルツハイマー病などに見られるタンパク質が制御されながら凝集していく過程¹⁰⁾と類似している。今後の機能性コロイド粒子の発展が、これら生態系の現象解明にも役立つことを期待したい。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、神奈川工科大学岡部・清水研究室において行ったものです。岡部 勝教授、和田理征博士、並びに、研究室の院生・卒研生諸君にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) W. Norde, "Colloids and Interfaces in Life Sciences", Marcel Dekker, New York (2003).
- 2) G. J. Fleer, M. A. Cohen Stuart, J. M. H. M. Scheutjens, T. Cosgrove, and B. Vincent, "Polymers at Interfaces", Chapman & Hall, London (1993).
- 3) 川島由香, 和田理征, 清水秀信, 岡部 勝, 高分子論文集, **65**(3), 242(2008).
- 4) H. Shimizu, K. Fujimoto, and H. Kawaguchi, *Biotech. Prog.*, **16**(2), 248 (2000).
- 5) M. Takasu, T. Shiroya, K. Takeshita, M. Sakamoto, and H. Kawaguchi, *Colloid. Polym. Sci.*, **282**(7), 740 (2004).
- 6) K. Landfester, *Macromol. Rapid Commun.*, **22**(12), 896 (2001).
- 7) U. Paiphansiri, J. Dausend, A. Musyanovych, V. Mailander, and K. Landfester, *Macromol. Biosci.*, **9**(6), 575 (2009).
- 8) H. Shimizu, M. Tomizawa, R. Wada, and M. Okabe, *Macromol. Symp.*, **288**(1), 111 (2010).
- 9) P. A. Lovell, and M. S. El-Aasser (eds), "Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers", John Wiley and Sons, New York (1997).
- 10) R. N. Sifers, *Science*, **329** (5988), 154 (2010).