単分散ゼラチンマイクロビーズの調製のための マイクロチャネル乳化に適した油相の検討

岩本悟志*, 中川 圭, 中嶋光敏, 鍋谷浩志
(独立行政法人食品総合研究所)

平成 16 年 11 月 1 日受理

*Effect of oil phase kinds on preparation of monodisperse gelatin
microbeads using microchannel emulsification*

Satoshi IWAMOTO, Kei NAKAGAWA, Mitsutoshi NAKAJIMA, Hiroshi NABETANI
National Food Research Institute

The effect of the oil phase kinds has been investigated in the preparation of monodisperse gelatin microbeads using the microchannel (MC) emulsification. Hexane, heptane, ethyl hexanoate, octanoic acid and triolein were used as continuous phases with 5 wt% tetraglycerin condensed ricinoleic acid ester. Gelatin solution (5 wt%) was used as disperse phase. The disperse phase was fed into the continuous phase through the MCs with MC equivalent diameter of $16.8\ \mu\text{m}$ at 40°C . Emulsion droplets were formed with average diameters of $38.7\ \mu\text{m}$ in hexane, $37.7\ \mu\text{m}$ in heptane and $36.8\ \mu\text{m}$ in ethyl hexanoate. Relative standard deviations were 3.5% in hexane, 4.5% in heptane and 3.4% in ethyl hexanoate, while the average diameter and relative standard deviation of the gelatin solution in triolein emulsion were $63.5\ \mu\text{m}$ and 20%. On the contrary, the continuous outflow of the disperse phase into octanoic acid system was observed. It was difficult to collect emulsion droplets in water-in-hexane systems. Therefore, the preparations of gelatin microbeads were performed only with water-in-heptane and water-in-ethyl hexanoate systems. Average diameters of microbeads formed in heptane and ethyl hexanoate systems were $18.2\ \mu\text{m}$ and $16.9\ \mu\text{m}$, respectively. Relative standard deviations were 8.8% in heptane and 18% in ethyl hexanoate.

(Received November 1, 2004)

Key words: microcapsules ; microbeads ; microchannel emulsification ; monodisperse ; gelatin

緒言

近年、機能性材料としてマイクロカプセルが注目され、さまざまな分野で研究開発が進められている⁽¹⁾。特に医薬の分野において薬物キャリアとしてのマイクロカプセルの利用が注目され、一部実用化されている。一般に薬物の最適な徐放速度と投与経路を与える理想的な粒径があるといわれているが、薬物送達の制御に密接に関わっている粒径とその分布の制御はマイクロカプセル作製においてますます重要になってきている⁽²⁾。

マイクロカプセルの調製法には噴霧法、相分離法やエマルション法などいくつかの方法^(3,4)が挙げられている。特に、エマルションを利用する方法は実験室レベルや工業レベルで広く用いられている。しかし攪拌などを用いた従来の乳化法では、強い剪断力をかけることによって数 μm 以下の比較的単分散な液滴が作製可能であるが、希望する任意の粒径で単分散な液滴を作製するこ

とは困難である。そこで単分散液滴の作製を可能とする他の乳化法によって作製したエマルションからのマイクロカプセル作製を検討する必要がある。マイクロチャネル (MC) 乳化法は、単分散液滴を作製可能とするため近年開発された乳化法である。MC 乳化法はシリコン単結晶基板上に作製した微細流路を通して分散相を連続相中に押し込むことによって液滴を作製する乳化法であり、油中水滴型 (W/O) と水中油滴型 (O/W) の両方のエマルションを作製可能であり、液滴の粒径は系の粘性および微細流路の大きさ、特に深さに対応する^(5~14)。また、微細流路の作製は半導体加工技術によるものであるため加工精度が高く、精密な液滴径制御が可能である。さらに、MC 乳化法は攪拌と比べるとエネルギーの損失が少なく、系に過剰な力がかからないという特徴がある⁽¹⁰⁾。

生体適合性のある天然高分子であり医薬用マイクロカプセルの代表的な壁材としても知られているゼラチンは、熱可逆性ゲルであり、高温でランダムコイル状態に

あった分子が、試料の温度の低下とともにヘリックスを形成しゲル化する^(11~16)。筆者らはすでに、ゼラチン溶液を分散相、界面活性剤を含むイソオクタンを連続相としてゲル化温度以上でMC乳化を行ない、その後単分散エマルジョンを冷却し、分散相液滴をゲル化させて平均粒径が $15.6\mu\text{m}$ の単分散ゼラチンマイクロビーズの作製に成功している⁽¹⁷⁾。このマイクロビーズに有用物質を内包させることにより、単分散ゼラチンマイクロカプセルの調製が可能となるが、ゼラチンマイクロカプセルの食品や医薬品用途への応用のためには、毒性の高い油相の使用は避けねばならない。

本研究では、食品添加物として使用可能な油相を連続相とし、ゼラチン溶液を分散相として用いて、MC乳化を試み、水相にゼラチンを含むW/Oエマルジョン作製に与える油相の種類の影響を調べた。さらにMC乳化によって単分散エマルジョンが得られた系に関しては、分散相液滴をゲル化することによりマイクロビーズを調製し、その特性を検討した。

実験方法

試料

ゼラチン (Bタイプ, 300Bloom) は新田ゼラチン(株)から、トリオレインは日本リーバ(株)から、テトラグリセリン縮合リシノレイン酸エステル (CR-310) は阪本薬品工業からそれぞれ提供を受けた。ヘキサン、ヘプタン、ヘキサン酸エチルおよびオクタン酸は和光純薬工業(株)から、またヘキサメチルジシラザン (LS-7150) は信越化学工業からそれぞれ購入した。ヘキサンは食用油脂の抽出剤、ヘキサン酸エチルとオクタン酸は香料、縮合リシノレイン酸トリグリセリドは乳化剤という限定付きで食品添加物としての利用が可能である。ヘプタンは使用制限のない食品添加物であり、トリオレインは食用油脂に含まれる成分である⁽¹⁸⁾。

MC基板およびその表面処理

本研究に用いたMC基板をFig. 1に示す。MC基板は一辺15 mmの正方形のシリコン基板で、その中央には分散相を供給する貫通穴が開けられている (a)。貫通穴の周囲に一辺が10 mmのテラスと呼ばれる土手が形成されている。MC壁はテラスの上に作製されており、MC壁に挟まれた部分がMCとなる。本研究で用いたMCのサイズを (b) に示す。MC幅およびMC深さはそれぞれ、 $16\mu\text{m}$ および $11\mu\text{m}$ 、テラス幅およびテラス長は、 $50\mu\text{m}$ および $30\mu\text{m}$ 、MC壁の幅は $40\mu\text{m}$ である。

Fig. 1. Schematic diagram of a silicon MC plate.

(a) top and bottom view of the silicon MC plate, (b) detailed configuration of the MCs, and (c) flow in the MC module.

(c) に示すように、このMC基板にガラス板を押しつけて、MC壁の上部と接触させることでMCが形成され、分散相を加圧することにより乳化が行なわれる。

MC乳化でW/Oエマルジョンを作製する場合はMC基板およびガラス板の表面が疎水的になっている必要がある^(7,17)。MC基板およびガラス板は、本来は親水性であるので、以下の手順で疎水化処理を行なった。MC基板およびガラス板を十分に洗浄、乾燥した後、酸素プラズマ発生装置 (Plasma Reactor PP41, ヤマト科学) を用いて酸素プラズマを15分間照射し、一昼夜1 mol/l 硝酸に浸した。MC基板およびガラス板を硝酸から取り出した後、超純水中で超音波洗浄し乾燥した。次にMC基板をヘキサメチルジシラザン原液に、ガラス板を10 wt%のヘキサメチルジシラザン-ヘキサン溶液に一昼夜浸した。疎水化されたMC基板およびガラス板は純水で十分に洗浄し実験に供した。

MC 乳化装置

MC 基板を固定し分散相および連続相の流路を確保する役割を持つ MC 乳化モジュールの模式図を Fig. 2 に示す。モジュールには分散相と連続相それぞれの供給口とエマルションの取り出し口があり、それらにチューブを接続して供給口はシリンジに、取り出し口は回収用のサンプル瓶に繋いだ。分散相はシリンジポンプ (Pump 11; HARVARD Co., Inc.) により供給した。本研究で用いたモジュールは、恒温槽の水を循環することによって温度調節が可能である。モジュールの下には 20 倍の対物レンズ (CF Plan 20x; ニコン) を付けた CCD カメラ (HV-C20M; 日立電子) が接続され、MC 乳化の様子をリアルタイムで観察すると同時にビデオ録画が行なえる。

MC 乳化によるゼラチンマイクロビーズの調製

ゼラチンを pH 7.4 の 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液に溶解させて 5 wt% 溶液としたものを分散相、ヘキサン、ヘプタン、ヘキサン酸エチル、オクタン酸およびトリオレインのそれぞれに CR-310 を溶解させて 5 wt% 溶液としたものを連続相として MC 乳化を行ない、液滴作製の様子を観察した。乳化は 40°C で行なった。分散相供給量は 0.2 ml/hr とした。また、ヘプタン、ヘキサン酸エチルを連続相として用いた系に関しては乳化後室温で保存して 1 日後に得られたゼラチンマイクロビーズの粒径についても調べた。

Fig. 2. Experimental apparatus (the MC module and microscope video system).

粒径の測定

液滴や粒子の直径は画像解析により求めた。顕微ビデオシステムや各種顕微鏡に接続したビデオカメラで撮影した画像をパーソナルコンピュータに取り込み、画像解析ソフト (WinRoof, 三谷商事) により液滴あるいは粒子の直径を 1 つずつ測定し、200 個分のデータを基に平均径 D_{av} と標準偏差 σ を求めた。粒子の単分散性を表わす相対標準偏差 RSD は以下の式から算出した。

$$RSD = \frac{\sigma}{D_{av}}$$

実験結果

各連続相を用いた系の乳化中の液滴画像を Fig. 3 に示す。ヘキサン、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合、MC 乳化は良好に行なわれた。またオクタン酸を連続相として用いた場合、分散相が流出し液滴を得ることが困難であった。一方、トリオレインを連続相として用いた系では、液滴の作製は可能であったが、ヘキサン、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合に比べて液滴径が大きく、多

Fig. 3. Photomicrographs of emulsion droplets formed with MC emulsification at 40°C.

Disperse phase: 5 wt% gelatin solution. Continuous phase: (a) hexane, (b) heptane, (c) ethyl hexanoate, (d) octanoic acid and (e) triolein. Surfactant: Tetraglycerin condensed ricinoleic acid ester.

Fig. 4. Diameter distribution of the emulsion droplets.

Disperse phase: 5 wt% gelatin solution. Continuous phase: (a) hexane, (b) heptane, (c) ethyl hexanoate, (d) octanoic acid and (e) triolein. Surfactant: Tetraglycerin condensed ricinoleic acid ester.

Fig. 5. Photomicrographs of gelatin microbeads.
Continuous phase: (a) heptane and (b) ethyl hexanoate.

分散なエマルションが得られた。

次に、得られたエマルションの画像データから粒径分布を算出した。結果を Fig. 4 に示す。ヘキサン、ヘプタ

Fig. 6. Diameter distribution of gelatin microbeads.

Continuous phase: (a) heptane and (b) ethyl hexanoate.

ンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合、その平均粒径 D_{av} は、それぞれ 38.7, 37.7 および 36.8 μm となった。また相対標準偏差 RSD は、それぞれ 3.5, 4.5 および 3.4% となった。一般の攪拌による乳化では、RSD が 25~50% になることもしばしば起こりうることから^(19~21)、本研究では粒径の揃ったゼラチン液滴を得ることに成功したといえる。一方、トリオレインを連続相として用いた系では、 D_{av} および RSD は、それぞれ 63.5 μm および 20% となった。なお、液滴の作製が困難であった、オクタン酸については粒径分布は算出していない。

ヘキサン、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた系では、RSD の値が小さいエマルションを作製できた。ヘキサンを連続相として用いて MC 乳化を行なうと、単分散なエマルションを得ることができるが、ヘキサンの沸点が 69℃ であるため、MC 乳化温度の 40℃ においては、ヘキサンの揮発量が多くエマルションの回収が困難であった。したがってゼラチンマイクロビーズの調製は、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合にのみ行なった。得られたゼラチンマイクロビーズの顕微鏡写真を Fig. 5 にその粒径分布を Fig. 6 に示す。ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合、その平均粒径 D_{av} は、それぞれ 18.2 および 16.9 μm となった。相対標準偏差 RSD については、ヘプタンが 8.8% で、ヘキサン酸エチルが

Table 1. Effect of continuous phase kinds on MC emulsification and creation of microbeads

Continuous phase	Emulsion droplets		Microbeads		Viscosity of continuous phase [mPa·s]
	D_{av} [μm]	RSD [%]	D_{av} [μm]	RSD [%]	
Hexane	38.7	3.5			0.34
Heptane	37.7	4.5	18.2	8.8	0.44
Ethyl hexanoate	36.8	3.4	16.9	18	0.86
Octanoic acid	—	—			5.2
Triolein	63.5	20			46

18%であった。連続相粘度ならびに液滴およびゼラチンマイクロビーズの D_{av} と RSD を Table 1 にまとめた。

考察

Figure 3 から確認できるように、連続相をヘキサン、ヘプタン、ヘキサン酸エチルおよびトリオレインとした場合、顕微鏡観察から MC 乳化が可能なが確認された。一方、オクタン酸を連続相として用いた場合は MC から分散相の流出が観察され液滴の作製は困難であった。オクタン酸の水への溶解度は 0.068 g/100 ml で、乳化が成功しているヘキサン酸エチルの水への溶解度は 0.063 g/100 ml であり、この両者の水への溶解度の差は、ほとんど認められない。一方で、オクタン酸塩であるオクタン酸ナトリウムは、界面活性を有しその臨界ミセル濃度は、6.0 g/100 ml である。本実験では、分散相の pH 調整にリン酸ナトリウム緩衝液を用いているため、ナトリウムイオンは分散相に存在し、油水界面でのオクタン酸のプロトンとナトリウムイオンの交換が行なわれていると考えられる。オクタン酸ナトリウムの溶解度はオクタン酸に比べて高いので、ナトリウムイオンの存在がオクタン酸の分散相への溶解を助けていると考えられる。また Davies らによって実験的に求められている HLB 基数値⁽²²⁾を用いてオクタン酸およびオクタン酸ナトリウムの HLB を算出したところオクタン酸が 5.77、オクタン酸ナトリウム 22.7 となった。一般に HLB の高い界面活性剤は O/W エマルションの作製に適しており、オクタン酸ナトリウムの分散相内での存在が、本研究で目的としている W/O エマルションの MC 乳化を阻害したと考えられる。ちなみに長鎖脂肪酸であるオレイン酸を連続相とした場合、良好な MC 乳化が行なえることがすでに報告されている⁽⁷⁾。この場合のオレイン酸は水に不溶である。

ヘキサン、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合、MC 乳化は良好に行なわれ単分散エマルションを得ることができた。一方、トリオレインを

連続相で用いた系では、液滴の作製は可能であったが、ヘキサン、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合に比べて液滴径が大きく、多分散エマルションが得られた。MC 乳化法を用いて、W/O エマルションを作製する際には、連続相の粘度が高くなると作製される液滴径が大きくなり、さらに粘度が高くなると多分散液滴が作製されることが報告されている⁽⁹⁾が、Table 1 に示した通りヘキサン、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルの粘度が 1 mPa·s 以下なのに比べてトリオレインのそれは 46 mPa·s であり、粘度の差異がこの結果を導いたと考えられる。

ヘプタンを連続相として用いた場合、作製されたゼラチンビーズの平均粒径は 18.2 μm 、RSD は 8.8% となった。ヘプタンの沸点は 98°C であるので、40°C の操作条件下でもヘキサンほど揮発量が多くないためエマルションの回収も容易であった。筆者ら⁽¹⁷⁾はイソオクタンを連続相として、平均粒径および RSD がそれぞれ 15.6 μm および 5.9% の単分散ゼラチンマイクロビーズの作製に成功しているが、本研究でのマイクロビーズの RSD もイソオクタンを用いた場合とほぼ同様の単分散性を示した。一方、ヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合も、その沸点は 168°C であるので、エマルションの回収が容易であった。ゼラチンビーズの平均粒径は 16.9 μm となったが、RSD は 18% であり、ヘプタンの場合に比べて多分散となった。さらにビーズの表面もヘプタンのものと比べて凹凸が確認された。連続相がゼラチンのゲル化に影響を与えていると推測されるが、詳細な検討が今後必要である。

食用油脂の抽出に用途が限定されているヘキサンや着香目的にのみ利用が可能なヘキサン酸エチルと比べて、ヘプタンは、製造溶剤として特に制限のない利用が認められており、MC 乳化による単分散ゼラチンマイクロカプセル調製に適した油相であると考えられる。

要約

単分散マイクロビーズの調製を目的として、食品加工に使用可能な油相を連続相とし、ゼラチン溶液を分散相として用いて、MC相当直径が $16.8\ \mu\text{m}$ の基板によりMC乳化を試み、水相にゼラチンを含む水中油滴型(W/O)エマルション作製に与える影響を調べた。ゼラチンをpH 7.4の0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶解させて5 wt%溶液としたものを分散相として、ヘキサン、ヘプタン、ヘキサン酸エチル、オクタン酸およびトリオレインのそれぞれにテトラグリセリン縮合リシノレイン酸エステルを溶解させて5 wt%溶液としたものを連続相としてMC乳化を行なった。ヘキサン、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合、その平均粒径 D_{av} は、それぞれ38.7、37.7および $36.8\ \mu\text{m}$ となった。また相対標準偏差RSDは、3.5、4.5および3.4%となり、MC乳化が良好に行なわれたことが確認できた。またオクタン酸を連続相として用いた場合、分散相が流出し液滴を得ることが困難であった。一方、トリオレインを連続相で用いた系では、液滴の作製は可能であったが、 D_{av} およびRSDは、それぞれ $63.5\ \mu\text{m}$ および20%となり、ヘキサン、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合に比べて液滴径が大きく多分散なエマルションが得られた。

ヘキサンについては、良好なMC乳化が行なわれるが、 40°C においては、揮発量が多くエマルションの回収が困難であった。したがってゼラチンマイクロビーズの調製は、ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合にのみ行なった。ヘプタンおよびヘキサン酸エチルを連続相として用いた場合、その D_{av} は、それぞれ18.2および $16.9\ \mu\text{m}$ となった。RSDについては、ヘプタンが8.8%で、ヘキサン酸エチルが18%であった。

食用油脂の抽出に用途が限定されているヘキサンや着香目的にのみ利用が可能なヘキサン酸エチルと比べて、ヘプタンは製造用剤として特に制限のない利用が認められており、MC乳化によるゼラチンマイクロビーズ調製に適した油相であると考えられる。

本研究の一部は農水省ナノテクノロジープロジェクトの助成を受けて行なわれた。

文献

- 1) C. Washington, "Microencapsulation", ed. by S. Benita, Marcel Dekker, New York, NY, 1996, p. 155.
- 2) M. Goosen, "Cell Encapsulation Technology and Therapeutics", ed. by W. Kùhitreiber, R. Lanza and W. Chick, Birkhäuser, Boston, MA, 1999, p. 18.
- 3) F. Lacasse, P. Hildgen, J. Perodin, E. Escher, N. Phillips & J. McMullen: *Pharm. Res.*, **14**(7), 887 (1997).
- 4) M. Luck, K. Pistel, Y. Li, T. Blunk, R. Muller & T. Kissel: *J Control. Release*, **55**, 107 (1998).
- 5) T. Kawakatsu, Y. Kikuchi & M. Nakajima: *JAOCs*, **74**, 317 (1997).
- 6) T. Kawakatsu, G. Tragardh, Y. Kikuchi, M. Nakajima, H. Nabetani & T. Yonemoto: *J. Surfactants Detergents*, **3**, 295 (2000).
- 7) T. Kawakatsu, G. Trägårdh, C. Trägårdh, M. Nakajima, N. Oda & T. Yonemoto: *Colloids Surfaces A*, **179**, 29 (2001).
- 8) S. Sugiura, M. Nakajima, J. Tong, H. Nabetani & M. Seki: *J. Colloid Interface Sci.*, **227**, 95 (2000).
- 9) S. Sugiura, M. Nakajima, H. Ushijima, K. Yamamoto & M. Seki: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **34**, 757 (2001).
- 10) S. Sugiura, M. Nakajima, S. Iwamoto & M. Seki: *Langmuir*, **17**, 5562 (2001).
- 11) J. Chatellier, D. Durand & J. Emery: *Int. J. Biol. Macromolecules*, **7**, 311 (1985).
- 12) M. Djabourov, J. Leblond & P. Papon: *J. Phys. France*, **49**, 319 (1988).
- 13) I. Pezron, M. Djabourov & J. Leblond: *Polymer*, **32**, 3201 (1991).
- 14) H. Jizomoto, E. Kanaoka, K. Sugita & K. Hirano: *Pharm. Res.*, **10**, 1115 (1993).
- 15) M. Tsung & D. Burgess: *J. Pharm. Sci.*, **86**, 603 (1997).
- 16) G. Strauss & S. Gibson: *Food Hydrocolloids*, **18**, 81 (2004).
- 17) S. Iwamoto, K. Nakagawa, S. Sugiura & M. Nakajima: *AAPS Pharm. Scitech.*, **3**(3), article 25 (2002).
- 18) 食品化学新聞社監修: "食品添加物総覧 2004", 食品化学新聞社, 2004, p. 157.
- 19) Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino & T. Niwa: *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 41 (1998).
- 20) C. Stureson & J. Carlfors: *J Control Release*, **67**, 171 (2000).
- 21) A. Tinsley-Bown, R. Fretwell, A. Dowsett, S. Davis & G. Farrar: *J. Control. Release*, **66**, 229 (2000).
- 22) 近澤正敏, 田嶋和夫: "基礎化学コース 界面化学", 丸善 2001, p. 159.