

バイオシステムにおける物質創製を
モチーフとしたポリマーナノ粒子の創製と
機能性材料への応用

2011 年度

福井 有香

学位論文 博士（工学）

バイオシステムにおける物質創製を
モチーフとしたポリマーナノ粒子の創製と
機能性材料への応用

2011 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

福井 有香

主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第 号	氏 名	福井 有香
<p>主論文題目： バイオシステムにおける物質創製をモチーフとしたポリマーナノ粒子の創製と機能性材料への応用</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>ナノサイズの物質はバルク状態と異なる光学的、磁氣的、化学的特性など、特徴的なナノサイズ効果を発揮するため、幅広い分野で研究が行われている。バイオシステムにおいてもナノサイズの材料である、タンパク質、多糖類、および核酸といった高分子物質がナノスペースにおいて重要な機能を担っている。そのナノ領域では精密にナノ構造が設計・合成され、さらにこれらが階層的に組織化することで、高次な構造や機能を発現し、生物の生命活動を担っている。本論文における研究では、このような生物の行うナノテクノロジーに着目し、それを高分子化学の視点から捉えてマテリアル創製のモチーフとして用いることにより、ナノ粒子、ナノカプセルおよびナノ薄膜といった新しい高分子ナノマテリアルの創製と機能性材料への応用を目指した。</p> <p>序論では、生物の行うナノテクノロジーについて、実例を挙げて概説をし、それを高分子化学の視点から考察するとともに、ナノ粒子、ナノカプセル、ナノ薄膜、ナノハイブリッドなどのポリマーナノマテリアルの特徴について記述し、本研究の目的と位置付けをした。</p> <p>第2章では、生体膜とバイオポリマーの相互作用におけるダイナミクスに着目し、生体膜由来のナノカプセルであるリポソーム表面への多糖やDNAといった様々なバイオポリマーの交互積層化によるカプセルウォールの構築およびナノカプセル（リポナノカプセル）の作製について記述した。作製したリポナノカプセルの薬物送達キャリアとしての機能化を行うため、種々の低分子化合物を封入し放出挙動の検討を行ったところ、リポソームに比べてナノカプセルでは放出が抑制され、高い物質保持能を付与することに成功した。また、DNAのカプセルウォールではDNAの融解挙動を利用することにより、物質の放出を促進させることに成功した。</p> <p>第3章では、生体高分子によるバイオミネラルイゼーションに着目し、リポナノカプセル表面へのリン酸カルシウム(CaP)の析出による有機無機ハイブリッドリポナノカプセルの作製について記述した。第2章にて作製したリポナノカプセルの放出性に着目し、カプセルウォールを介したイオンの相互拡散を利用したCaPの新しい表面析出技術を開発することができた。反応場となるリポナノカプセルの高分子膜の種類や反応条件(pH、温度など)によって、CaP層の結晶形態、結晶性、厚みを制御できることを見出した。また、ナノハイブリッドカプセルを薬物および遺伝子の送達キャリアに応用するための検討を行い、CaPの溶解性を利用した物質放出能の付与およびCaPの界面特性を利用することにより骨モデルであるヒドロキシアパタイトへの集積能の付与に成功した。</p> <p>第4章では、ナノ環境におけるバイオミネラルイゼーションへの有機高分子の働きかけによる物質創製の制御に注目し、油相中にナノサイズの水滴を分散させたW/O (water in oil) ミニエマルジョンをナノリアクターとして用いて、ポリマーの合成と炭酸カルシウムの生成によるハイブリッドナノ粒子の創製について記述した。限定された空間である水滴内での重合および結晶生成・成長を操作することにより、ナノ粒子内部の無機物の結晶構造やハイブリッドナノ粒子の形状の制御に成功した。また、コーティング剤などへの応用を目指し、得られたハイブリッドナノ粒子を基板に積層化させることによってナノハイブリッドフィルムを作製を達成した。</p> <p>第5章では、本研究を総括し、今後の展望について記述した。</p>			

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number 80945101	SURNAME, First name YUUKA, Fukui
<p>Title</p> <p>Bio-inspired approaches in preparation and functionalization of polymer nanoparticles</p>		
<p>Abstract</p> <p>Nano-sized materials are of great scientific interest in a variety of fields, as they possess intriguing size-dependent properties. In biological systems, nano-sized polymeric materials such as proteins, polysaccharides and nucleic acids play important roles in formation of hierarchical structures and in regulating a multitude of biological functions. Inspired by such supramolecular bio-systems, we intended to design and create functional nanomaterials including nanoparticles, nanocapsules and nanofilms by the use of polymer chemistry.</p> <p>Firstly, biomaterial-derived nanocapsules (liponano-capsules) were prepared by the layer-by-layer deposition of polysaccharides onto the liposome made up of a phospholipids bilayer membrane. For their applications as a drug delivery carrier, a variety of substances were incorporated into the liponano-capsule. The release was suppressed by the presence of polymeric capsule wall. The temperature-dependent release was achieved by applying denaturation of DNA in the capsule wall, which induced the membrane perturbation.</p> <p>Secondly, organic-inorganic hybrid nanocapsules were created by utilizing polysaccharide-coated liposomes as a reaction site for the deposition of calcium phosphate (CaP). Control in biomineralization, such as thickness and crystal properties, over the nanocapsules was achieved by tuning the counter-diffusion of the calcium and phosphate ions through the capsule wall and the surface chemical composition of nanocapsules. Furthermore, DNA was releasable from the nanocapsules by CaP dissolution and this is advantageous for gene delivery.</p> <p>Finally, in order to create organic-inorganic hybrid nanoparticles with diverse structures and morphologies, control in both mineralization and polymerization inside the nanoreactor based on the miniemulsion system was achieved. By utilizing hybrid nanoparticles as building blocks, transparent nanofilms were obtained, in which a variety of nano-CaCO₃ were uniformly distributed.</p>		

目次

第 1 章 序論	1
1.1 はじめに	1
1.2 生物の行うナノテクノロジーと高分子	2
1.3 高分子ナノマテリアルの特徴と用途	7
1.4 本論文の概要	9
第 1 章の参考文献	11
第 2 章 リポソーム表面へのバイオポリマーの積層化によるナノカプセルの作製	15
2.1 序論	15
2.2 実験方法	
2.2.1 負電荷リポソームの作製	17
2.2.1.1 試薬	17
2.2.1.2 エクストストルージョン法によるリポソームの作製	18
2.2.2 リポソームのキャラクタリゼーション	19
2.2.2.1 リン脂質濃度の測定	19
2.2.2.2 動的光散乱法 (DLS) による粒径測定	20
2.2.2.3 透過型電子顕微鏡 (TEM) による形状観察	21
2.2.2.4 リポソームのゼータ電位の測定	22
2.2.3 リポソーム表面へのポリマーの交互吸着によるリポナノカプセルの作製	23
2.2.3.1 試薬および種々の溶液調整	23
2.2.3.2 リポソーム表面に対する CHI 吸着等温線の作製	25
2.2.3.3 リポソーム表面へのポリマーの交互吸着によるリポナノカプセルの作製法	27
2.2.3.4 動的光散乱法 (DLS) による粒径測定	28
2.2.3.5 透過型電子顕微鏡による形状観察	28
2.2.3.6 ゼータ電位の測定	28
2.2.3.7 界面活性剤 (Triton X-100) に対する膜安定性の評価	28
2.2.4 リポナノカプセルへの種々の物質の封入および放出挙動の検討	30
2.2.4.1 試薬および溶液調整	30
2.2.4.2 リポナノカプセル内部への種々の物質の封入検討	30
2.2.4.3 封入量の測定	31
2.2.4.4 リポナノカプセルの放出挙動の検討	32
2.2.4.5 リポナノカプセルの膜流動性の測定	34
2.2.5 DNA の融解挙動を利用した放出スイッチング機能の検討	35
2.2.5.1 さけの精巢由来 DNA の融解挙動の検討	35
2.2.5.2 異なる温度条件下におけるリポナノカプセルの放出挙動の検討	35
2.2.5.3 ナノカプセル表面からの DNA 脱着の確認	35
2.2.6 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡による骨のモデルへの集積能の検討	36

2.3	結果および考察	37
2.3.1	負電荷リポソームの作製およびキャラクタリゼーション	37
2.3.1.1	動的光散乱法 (DLS) による粒径測定	37
2.3.1.2	透過型電子顕微鏡による形状観察	37
2.3.1.3	リポソームのゼータ電位の測定	37
2.3.2	リポナノカプセルの作製およびキャラクタリゼーション	38
2.3.2.1	リポソーム表面への CHI(50)の吸着および評価	38
2.3.2.2	リポナノカプセルの水中粒径および形状観察	41
2.3.2.3	リポナノカプセルのゼータ電位の測定	42
2.3.2.4	界面活性剤 (Triton X-100) に対する膜安定性の評価	42
2.3.3	リポナノカプセルへの種々の物質の封入および放出挙動の検討	45
2.3.3.1	種々の物質の封入量	45
2.3.3.2	リポナノカプセルの放出挙動の検討	45
2.3.3.3	リポナノカプセルの膜流動性の測定	47
2.3.4	DNA の融解挙動を利用したリポナノカプセルからの放出スイッチング機能の 検討	49
2.3.4.1	さけの精巢由来 DNA の融解挙動について	49
2.3.4.2	リポナノカプセルの温度による放出挙動について	49
2.3.4.3	リポナノカプセル (liponano-CHI-DNA) 表面からの DNA 脱着について	50
2.3.5	リポナノカプセルの骨のモデルへの集積能について	51
2.4	結論	53
	Appendix	54
A2.1	リポソーム形成について	54
A2.2	リポナノカプセル形成に用いるバイオポリマーについて	54
A2.3	リポソームの調整について	55
	第 2 章の参考文献	56
第 3 章	リポソームを用いた有機無機ナノハイブリッドカプセルの作製	60
3.1	序論	60
3.2	実験方法	61
3.2.1	ハイブリッドリポナノカプセルの作製	61
3.2.1.1	試薬および緩衝液の作製	61
3.2.1.2	ハイブリッドリポナノカプセルの作製	61
3.2.2	ハイブリッドリポナノカプセルのキャラクタリゼーション	64
3.2.2.1	透過型電子顕微鏡 (TEM) による形状および電子線回折像の観察	64
3.2.2.2	エネルギー分散型 X 線分光器 (EDX) による元素分析	64
3.2.2.3	走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) による形状観察	65
3.2.2.4	フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) を用いた結晶構造の同定	65
3.2.2.5	リポナノカプセルからのリン酸イオン放出量の定量	65
3.2.3	CaP カプセル層への DNA の吸着	66
3.2.3.1	TRITC ラベル化 DNA の作製	66

3.2.3.2	Lipo-CaP-DNA の作製	68
3.2.3.3	Lipo-CaP への DNA 吸着量の定量	68
3.2.3.4	Lipo-CaP-DNA の表面電位測定	68
3.2.4	CaP 層溶解に伴う DNA 放出の検討	68
3.2.4.1	低 pH におけるナノハイブリッドカプセル表面からの DNA の放出量の測定	68
3.2.4.2	イオンクロマトグラフィによる CaP 層溶解性の検討	68
3.2.4.3	CaP 層溶解後のナノカプセルの TEM 観察	68
3.2.5	共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡観察 (CLSM) による骨のモデルへの集積能の検討	69
3.3	結果および考察	69
3.3.1	ハイブリッドリポナノカプセルの作製およびキャラクタリゼーション	69
3.3.1.1	リポナノカプセル表面の高分子の種類および pH による影響	69
3.3.1.2	温度による影響	75
3.3.1.3	CaP 形成の反応時間による影響	76
3.3.1.4	イオン種による影響	78
3.3.1.5	外液のリン酸イオン濃度による影響	78
3.3.2	CaP カプセル層への DNA の吸着	80
3.3.2.1	TRITC ラベル化 DNA の作製	80
3.3.2.2	Lipo-CaP への DNA 吸着量の定量	80
3.3.3	CaP 層溶解に伴う DNA 放出能の検討	80
3.3.3.1	低 pH におけるナノハイブリッドカプセル表面からの DNA の放出	80
3.3.3.2	イオンクロマトグラフィによる CaP 層溶解性の検討	81
3.3.3.3	CaP 層溶解後のナノカプセルの観察	83
3.3.4	共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡観察 (CLSM) による骨のモデルへの集積能の検討	83
3.4	結論	85
	Appendix	86
A3.1	リン酸カルシウム (CaP) について	86
A3.2	不均一核形成とテンプレートの役割	86
	第 3 章の参考文献	87
	第 4 章 ミニエマルション重合を用いた有機無機ナノハイブリッドマテリアルの作製	90
4.1	序論	90
4.2	実験方法	92
4.2.1	ミニエマルション重合によるポリマーナノ粒子の作製	92
4.2.1.1	試薬	92
4.2.1.2	PAAm ナノ粒子の作製	93
4.2.1.3	PHEMA ナノ粒子の作製	94
4.2.2	ナノ粒子のキャラクタリゼーション	94
4.2.2.1	動的光散乱法 (DLS) による粒径測定	94

4.2.2.2	FE-TEMによる形態観察	94
4.2.3	ミニエマルジョン内での炭酸カルシウムナノ粒子 (nano-CaCO ₃) の作製	95
4.2.3.1	溶液中における CaCO ₃ の作製	95
4.2.3.2	CO ₂ バブリング法による nano-CaCO ₃ の作製	96
4.2.3.3	Fusion/fission 法による nano-CaCO ₃ の作製	95
4.2.4	Nano-CaCO ₃ のキャラクタリゼーション	96
4.2.4.1	FE-TEMによる形状観察	96
4.2.4.2	FE-SEMによる形状観察	96
4.2.4.3	粉末 X線回折 (XRD) 法による結晶構造の評価	97
4.2.5	ミニエマルジョン内での有機無機ナノハイブリッド粒子の作製	97
4.2.5.1	Fusion / fission および重合によるナノハイブリッド粒子の作製	97
4.2.5.2	¹ H 核磁気共鳴 (¹ H NMR) 法による転化率変化測定	99
4.2.5.3	FE-TEMによる形状観察	99
4.2.5.4	FE-SEMによる形状観察	99
4.2.5.5	XRDによる結晶構造解析	100
4.2.5.6	FT-IRによる poly(HEMA)と CaCO ₃ の相互作用の検討	100
4.2.5.7	¹ H NMRによる PHEMA と CaCO ₃ の相互作用の検討	100
4.2.6	ナノハイブリッドフィルムの作製	100
4.1.6.1	スピコート法によるナノフィルムの作製	100
4.1.6.2	スピコート法によるナノハイブリッドフィルムの作製	100
4.1.6.3	FE-TEMによる観察	101
4.1.6.4	FE-SEMによる観察	101
4.1.6.5	ナノフィルムの光透過性の検討	101
4.3	結果および考察	102
4.3.1	ミニエマルジョン重合によるポリマーナノ粒子の作製	102
4.3.1.1	PAAm ナノ粒子の作製およびキャラクタリゼーション	102
4.3.1.2	PHEMA ナノ粒子の作製およびキャラクタリゼーション	102
4.3.2	ミニエマルジョン内での炭酸カルシウムナノ粒子 (nano-CaCO ₃) の作製	104
4.3.2.1	CO ₂ bubbling 法による nano-CaCO ₃ の作製	104
4.3.2.2	Fusion / fission 法による nano-CaCO ₃ の作製—モノマーによる影響—	105
4.3.2.3	Fusion / fission 法による nano-CaCO の作製—温度による影響—	107
4.3.3	ミニエマルジョン内での有機無機ナノハイブリッド粒子の作製	108
4.3.3.1	転化率について	108
4.3.3.2	プレインキュベーション時間による影響	109
4.3.3.3	モノマー濃度による影響	111
4.3.3.4	PHEMA と CaCO ₃ の相互作用について	112
4.3.3.5	プレインキュベーション温度とエイジングによる影響	114
4.3.3.6	開始剤量についての影響	116
4.3.3.7	[イオン]/[モノマー]比による影響	120
4.3.3.8	SEMによる形状観察	121
4.3.4	有機無機ナノハイブリッドフィルムの作製	122
4.3.4.1	スピコート法によるナノフィルムの作製条件	122

4.3.4.2	スピコート法によるナノハイブリッドフィルムの作製	123
4.3.4.3	ナノハイブリッドフィルムの光透過性について	123
4.3.4.4	ナノハイブリッドフィルム内での nano-CaCO ₃ の結晶成長	124
4.4	結論	126
	Appendix	127
A4.1	ミニエマルションについて	127
A4.2	CaCO ₃ について	128
A4.3	ミニエマルション重合におけるナノ粒子形成機構	128
	第4章の参考文献	129
	第5章 総括	132
	学術論文および学会発表	135
	謝辞	138

1.1 はじめに

ナノテクノロジーとは、ナノメートルのスケール (10^{-9} m) で原子あるいは分子を操作・制御したり、物質の構造や配列を制御することにより、ナノサイズ特有の物質特性を利用して、優れた特性、新しい機能を発現させる技術のことである。近年、電子工学、材料、化学、機械など幅広い分野において、ナノテクノロジーを利用して、新たな知見や物質などが次々と発見され、情報、素材、医療などの分野で新技術への発展が期待されている。固体物質の大きさが数十 nm 以下となると、比表面積の増大により、気体や液体などの媒体との界面が大きくなるため、表面特性が固体物質の特性に大きな影響を与えるようになる。また、物質のサイズが光の波長、導体の平均自由行程、あるいは磁性体の磁区よりも小さくなると、同じ物質のバルク状態と異なる光学的、磁氣的、化学的、機械的特性など、様々なナノサイズ効果を発揮するようになる¹⁻³⁾。例えば、半導体の粒子サイズをナノサイズ化することにより、サイズによってバンドギャップエネルギーを制御し、それに伴う発光特性を利用したナノ蛍光体の開発が挙げられる⁴⁾。バイオの分野においても、様々なナノ効果およびナノテクノロジーを駆使して、画期的なナノマテリアルの開発が行われてきた。たとえば、100 nm 以下のサイズのキャリアが、がん組織周辺に蓄積されるという効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect ; EPR 効果) を利用することによって、薬物を必要な部位に選択的に運搬するデリバリー用ナノキャリアの開発、さらにターゲット部位へ到達後に物理的または化学的刺激によって、薬物を放出する機能を有するナノキャリアの開発が行われてきた⁵⁾。また、ナノサイズの構造体が持っている特異な自己組織化現象を利用して、人工組織など新しい生体材料を合成する研究などが進んでいる^{6,7)}。

ナノテクノロジーと生物学の融合に目を向けてみると、Biomimetics や Bio-inspired technology といったような「生物に学んだものづくり」が盛んに行われている。例えば、蓮の葉表面のナノからマイクロスケールの凹凸構造から超撥水性塗装技術 (Lotusan, Evonik 社) とセルフクリーニング技術が開発されている。さらに、タマムシやモルフォ蝶の微細な周期構造から学んだ研究から、構造発色性塗料、繊維 (モルフォテックス, 帝人ファイバー(株))、フォトニクス結晶などが生み出されている。Fig. 1.1 に示したように、バイオシステムのナノ領域においては、タンパク質、多糖類、および核酸といった高分子物質が重要な機能を担っており、生体の秩序だった階層構造を作り出している。本論文における研究は、生物の行うナノテクノロジーに着目し、それを高分子化学の視点から捉え、ナノ粒子、ナノカプセル、ナノ薄膜などといった新しい高分子ナノマテリアルを開発することを目指している。以降では、研究の着眼点である生体内環境における高分子の役割や、様々な高分子ナノマテリアルについて述べていく。

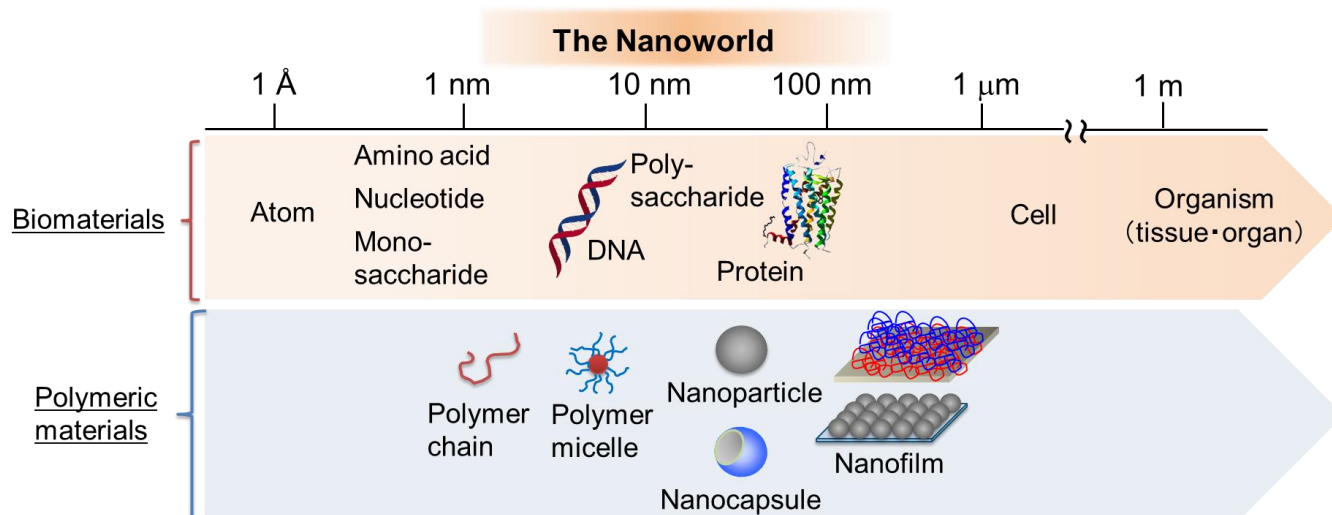


Fig. 1.1 The length-scale of biomaterials and polymeric materials in the hierarchical nanoworld.

1.2 生物の行うナノテクノロジーと高分子

人間がナノテクノロジーを提唱するよりもはるか昔から、生物の中では当たり前のようにナノテクノロジーが行われてきた。例えば、細胞膜はリン脂質の自己組織化により形成された数～数十 nm の 2 分子膜から組み上げられている。さらに、細胞においては、DNA が設計図となり、情報の保持や伝達、さらにはタンパク質合成などが行われている。これらタンパク質はナノメートルスケールの特徴的な構造へと折りたたまれて、酵素や抗体などに見られるように高次の機能や役割を担うようになる。このように生体内の微小環境において、精密にナノ構造体が設計・合成され、さらにこれらが階層的に組織化することで、高次の構造や機能を発現し、生物の生命活動を担っている。次に、生物の行う様々なナノテクノロジーについて高分子との関わりという観点から述べていく。

<細胞膜と高分子>

生体膜とは、形質膜や細胞内に存在する細胞内小器官（オルガネラ）を構成する膜の総称である。生体膜は主に脂質とタンパク質の自己組織化構造から成っている。脂質分子は、親水性頭部と疎水性炭化水素部から成っているため、多数の脂質分子を水中に分散すると自発的に約 6-10 nm の厚みを持った 2 分子膜構造を形成する^{8,9)}。この分子集合体は、親水性頭部が水に配向して、疎水性炭化水素部を水にさらすことなく閉じた構造をとる。1972 年に提唱された Singer と Nicolson の流動モザイクモデル（fluid mosaic model）¹⁰⁾によると、脂質からなる 2 分子膜構造の間にタンパク質が割り込むように存在し、流動性に富む脂質分子の間をタンパク質は拡散しながら存在している。このように疎水性相互作用によって膜内にまで入り込む「内在性膜たんぱく質」以外にも、膜たんぱく質には静電的な相互作用で脂質膜表面に結合する「表在性膜たんぱく質」がある。これらは細胞の生命活動に必須な種々の重要な機能を担っているが、それには脂質膜の動的構造が深く関与している^{11, 12)}。以下に脂質膜と膜タンパク質との関わり合いについて、いくつか例を紹介する（Fig. 1.2）。

- 生体膜中の脂質とタンパク質の疎水性相互作用^{13, 14)}

リン脂質の炭化水素鎖は、鎖長の違いだけでなく、鎖中の二重結合の数と位置にも多様な種類があり、これら炭化水素鎖の組み合わせによって脂質の分子種数は膨大なものになる。タンパク質などの他種の分子との相互作用においては、この炭化水素鎖の構造が分子間の疎水性相互作用に影響を及ぼしている。内在性膜タンパク質は疎水性面を脂質膜の疎水性領域に向けるように存在し、膜内で酵素活性を示したり、数分子集合して親水性の孔を形成することで、水溶性の物質やイオンを特異的に通過させるチャンネルの役割を担ったりしている。また、内在性膜タンパク質のいくつかは、脂質の炭化水素鎖と膜タンパク質の疎水領域のサイズが一致したとき、最大の疎水性相互作用となり安定化することが知られている。酵素活性が脂質二重層膜の厚みによって調節されていることもわかっている。

- 生体膜中の脂質とタンパク質の静電的相互作用

生体膜の構成脂質は、リン脂質、糖脂質、コレステロールであり、リン脂質は中性リン脂質や酸性リン脂質に分類できる。酸性リン脂質は負電荷を有しており、正電荷を有している低分子、ペプチド、タンパク質などが脂質膜表面に結合するときは、脂質が相分離することで局所的に酸性リン脂質の濃度が高い領域（ドメイン）が形成される。このようなドメインへの吸着によっていくつかのタンパク質は活性化されて機能発現が変化する。例えば、ドメイン中に負電荷を帯びた酵素基質が濃縮されることにより、酵素による加水分解が抑制されたりする。また、脂質膜表面に吸着したペプチドが構造転移を起こすことで、病気の発症を促すことがある。アルツハイマー病の発症と密接な関わりをもつ、アミロイドβやアミリンというペプチドは脂質膜と結合してβシート構造に転移し、最終的に繊維化することが病気の発症につながっていると考えられている^{15, 16)}。

- 生体膜内におけるラフト構造¹⁷⁾

膜脂質は、膜面上にて均一に分布しているわけではなく、スフィンゴリン脂質とコレステロールを主成分とする動的な膜ドメインが存在し、それが情報伝達分子が集まるラフト（いかに構造）として機能している。このラフトに情報伝達にかかわるタンパク質が集合、局在化することで、その効率を上げているといわれている。また、ラフトに存在する分子の種類や数を制御することで、情報伝達における信号強度や伝達方向を変えたり、情報を変換している。

以上のように生体膜では、流動性に富んだ脂質二重層構造とタンパク質との相互作用を巧みに制御することで、細胞の高次な機能発現を調節している。

本研究では、このような生体膜の動的なシステムに着目し、生体膜からなる中空構造と表層における高分子物質との機能的な相互作用をモチーフとしたナノマテリアルの創製を目指した。

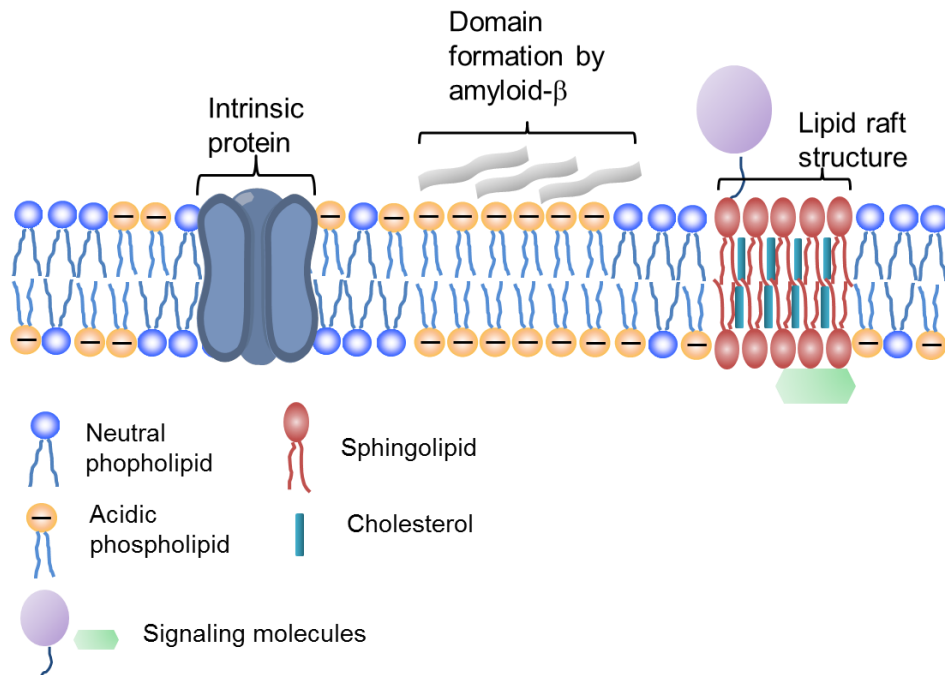


Fig. 1.2 Lipid structures found in cell surface membrane.

<タンパク質としての高分子>

生命活動の鍵をにぎるタンパク質は、遺伝子から読みだされる mRNA の遺伝情報をタンパク質合成システムによってアミノ酸配列へと変換することによって作り出される。リボソームにおいて合成されたタンパク質はアミノ酸配列に基づく一次構造にはじまり、 α ヘリックスや β シートなどの二次構造、それらが規則的に並んだ超二次構造、側鎖の特異的な相互作用で決まる三次構造、さらにタンパク質間の相互作用に基づく四次構造などの階層構造を有する¹⁸⁾。抗体は病原体などに由来する抗原を特異的に認識して免疫システムの要となり、酵素は生体内で起きる種々の化学反応を触媒する役割を果たしている。このように、タンパク質はその特徴的な立体構造により、生体内で種々の機能を発現するようになる。タンパク質の立体構造は一次構造により一義的に決定され（アンフィンセン・ドグマ¹⁹⁾）、その配列上において近くのアミノ酸間の相互作用（局所相互作用）と互いに離れたアミノ酸間の相互作用（非局所相互作用）の両者の影響を受けて、全体的としてエネルギーが最小状態をとるようにポリペプチド鎖が折りたたまれて形成される。このような折りたたみ反応をフォールディング反応という²⁰⁾。

タンパク質の立体構造形成を利用した天然の機能性ナノマテリアルの一例として、ウイルスが挙げられる（Fig. 1.3 参照）。ウイルスは、50-300 ナノメートルオーダーのタンパク質と核酸のみからなる分子集合体であり、薬剤や遺伝子を運搬する天然のナノキャリアとしても注目されている²¹⁾。ウイルスは、自己複製能力がないため、動物の体内へ侵入した後に細胞内へ取り込まれ、そこへ自己の持つ DNA または RNA を流し込んでウイルスの構成成分を作らせる。ウイルス自体は核酸分子がタンパク質からなるカプシドと呼ばれる殻に覆われた構造をしている。周りを脂質二分子膜と糖タンパ

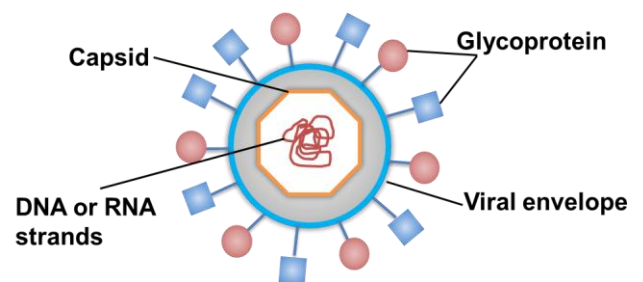


Fig. 1.3 A virus structure.

ク質を含むエンベロープによって包まれた構造をしているものもある。ウイルスの被膜は様々な構造をしており、らせん構造をとるもの、正二十面体構造をとるもの、無数の突起をもつものなどがある。このようなウイルスのナノサイズの特徴的な形態は、ウイルスの感染機構とも関係している。例えば、表面上の無数の突起は、表面積を大きくして、宿主に対する吸着力を高める働きなどがあることが知られている。このように、ウイルスの構造は、機能を最適化するためにタンパク質を用いてナノオーダーで精密に設計・構築されている。

タンパク質をはじめとする天然高分子の作り出す特異な構造に着目し、それらをナノマテリアルのデザインへ活かすことを考えた。

<バイオミネラリゼーションにおける高分子>

動物や植物の生命活動を通して、無機や有機の様々な結晶が生体内につくられる。生物の多くは、カルシウムのリン酸塩や炭酸塩に代表される無機物と少量の有機物からなる硬組織を合成する。この合成反応は常温常圧下でほぼ中性の条件で行われる。これら硬組織は有機高分子を含むため、様々な形態と物理的特性を持っている。例えば、骨や貝殻は硬くて曲げに対して強く、ウニのとげである方解石は折れにくいなどの特徴を持つ。水溶液中での無機塩類の結晶成長は、過飽和水溶液から核形成と核成長が進行するのに対して、生体中では結晶が生命活動に必要な機能を担うために、さらに精密に合目的に結晶形成が行われる。例えば、細胞内や器官内のように閉じられた空間内において結晶成長が行われている。また、タンパク質、多糖類、あるいはそれらがつくる有機物シートによっても、結晶成長が精密に制御されている。このような特殊性が、生命活動でできる無機物に非晶質および準安定構造の存在を許したり、結晶の形や質の制御などを可能にしている。このように生物が無機物と有機物からなる硬い組織を合成することをバイオミネラリゼーションといい、生物の持つナノテクノロジーということもできる²²⁾。以下に、バイオミネラリゼーションの例を示す。

● 骨の形成について

骨組織は基質と細胞からなる結合組織である。基質には細胞外基質とリン酸カルシウムを主とする無機塩類が含まれており、コラーゲンなどの多種類のタンパク質からなる細胞外基質は無機結晶の形成や細胞機能の調節などを行っている。このように骨は有機物と無機物の複合材料であり、体を支えるための力学的強度の付与、カルシウムおよびリンの貯蔵庫として体液の電解質平衡の維持などの機能を果たしている。骨に含まれるリン酸カルシウム塩はアパタイト構造を有しており、数十 nm のアパタイト微結晶が、コラーゲンの繊維方向にそろって配列した精緻な 3 次元構造体となっている。骨組織には骨をつくる骨芽細胞と骨を溶かす破骨細胞があり、それらが競合してアパタイトの成長と溶解を繰り返している（骨リモデリング）²³⁾。骨形成の過程で、カルシウムイオンとリン酸イオンは基質小胞と呼ばれる生体膜に覆われた直径約 10-100 nm の閉鎖空間内に濃縮され、アパタイトの前駆体をつくる²⁴⁾。ある程度大きくなった微結晶は基質小胞の膜をつき破り、コラーゲン繊維上に沈着する。ここで、コラーゲン繊維やその周辺に存在するタンパク質や多糖鎖がテンプレートとなり、カルシウムイオンやリン酸イオンを引き寄せることで、結晶の析出を促す役割を果たしている（Fig. 1.4 参照）。

このように骨内のアパタイト形成とその結晶形態や性質は、ナノスケールで有機高分子によって巧みにコントロールされており、その結果、骨全体の強度や剛性などの力学的性質が発現される。

● 貝殻や真珠層の形成について

真珠などの貝殻は、炭酸カルシウムの結晶と有機質タンパク質より構成される。炭酸カルシウムの中でも貝殻に含まれるものは、カルサイトとアラゴナイトである。貝殻は、貝の中の外套膜内で行われるタンパク質や糖が、体液を通して運ばれるカルシウムイオンや炭酸イオンと反応して、粘液となり、その中で炭酸カルシウムが沈着して形成される。コンキオリンと呼ばれるタンパク質はシート状構造をとり、タンパク質の成分であるアスパラギン酸の単位が規則的に配列し、そのマイナス電荷にカルシウムイオンが結合し、続いて炭酸イオンとの反応が起こる²⁵⁾ (Fig. 1.5 参照)。また、真珠貝の貝殻は、三層構造をとっており、内部にある核を中心として、内側から殻皮層、ついで稜柱層、最外層は真珠層から成っている。真珠層は、アラゴナイト結晶からなる平板状の炭酸カルシウムが有機物でコーティングされた状態で積層した構造を持つ²⁶⁾ (Fig. 1.6 参照)。真珠層では、まず、有機物の重合によって層状のコンキオリンシートが形成される。このコンキオリンのシートで仕切られた部屋（コンパートメント）の中へ、結晶化に必要な物質が分泌され、部屋の中が一杯になるまで結晶が成長し、そして停止する。これが繰り返されることで、タンパク質と炭酸カルシウムのモルタル構造が形成される²⁷⁾。真珠光沢の発生に最も重要なのはこの真珠層であり、コンキオリンからなる層と炭酸カルシウム層が多重層を形成することで、光の干渉をひきおこし、構造色を出している。このように真珠層は、限られた空間の中で形成された無機と有機高分子の複合材料であり、この複合化によって柔軟な機械的特性や光沢性などの特徴的な機能が発現するようになる。

このようにバイオミネラリゼーションにおいては、有機高分子の織り成す物理的および化学的環境に

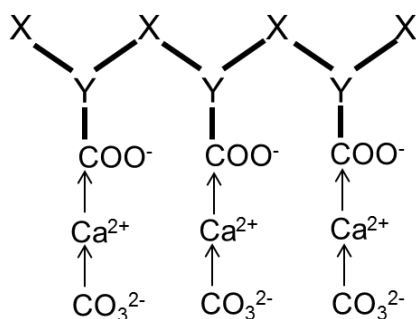


Fig. 1.5 A model of conchiolin protein. X represents serine or glycine and Y-COO⁻ represents aspartic acid.

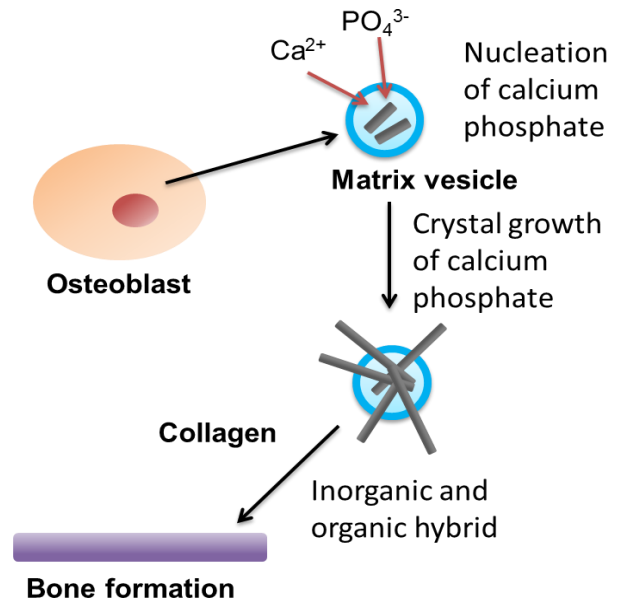


Fig. 1.4 Mechanism of bone mineralization.

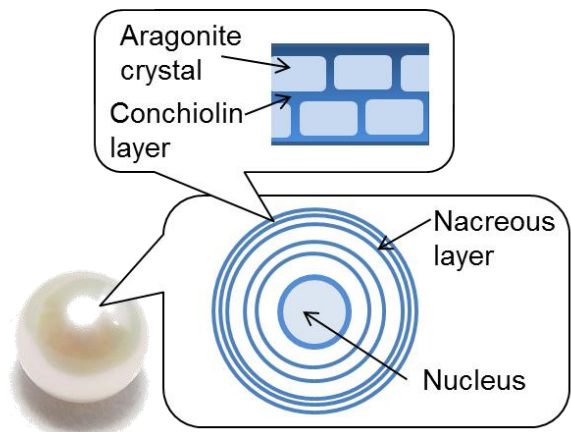


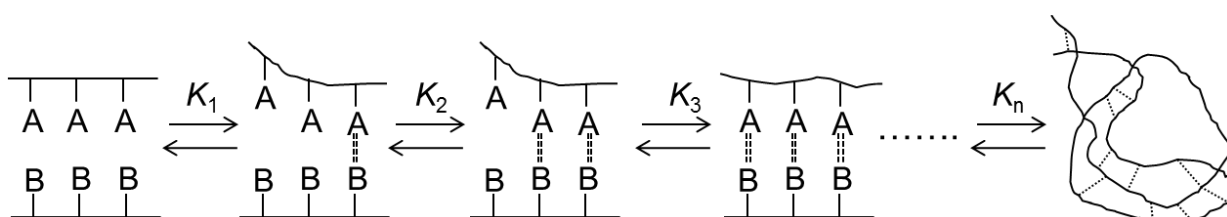
Fig. 1.6 The nacre structure in a pearl.

よって、無機物の生成が緻密に制御されている。本研究では、このようなバイオミネラリゼーションにおける有機高分子の働きに着目し、ナノハイブリッド材料のデザインにおけるモチーフとして選択した。

<バイオシステムにみられる高分子効果について>

これまで述べてきたように生体のナノスケールにおける構造の微細制御や機能発現は、高分子の持つ特有の性質を巧みに利用している。高分子はいくつかの繰り返し単位が共有結合でつながり、2次元または3次元的に特徴的な構造を形作っている。その物性や反応性などの特性は、繰り返し単位の単なる和ではない。これは連鎖内や連鎖間に協動的な相互作用が働くために発現したものであり、そのような高分子特有の効果を「高分子効果」という。高分子効果には、1)協動的相互作用、2)協奏的相互作用、3)構造相補性、および4)特殊な局所場の形成によるものの4つが考えられている^{28, 29)}。例えば、1)協動的相互作用は多数の同種官能基が同時に働く効果であり、生体膜の疎水部または電荷をもった脂質のドメインとタンパクの相互作用にみられ、多数の官能基が結合に関与することによって、結合定数が大きくなり、安定に結合できるようになる (Fig. 1.7 参照)。また、2)協奏的相互作用は多種類の官能基が同時に働く効果であり、脂質膜上でアミロイドβやアミリンというペプチドがβシート構造をとるのも、ペプチド内の複数の官能基が水素結合や疎水性相互作用などの分子間力を形成することによるものである。3)構造相補的相互作用は、相互作用力が最も有効に働くように、高分子の構造が分子認識に最適な立体構造や空間的配置・配列をとる効果であり、タンパク質のフォールディングや、真珠層形成にてコンキオリンのシート構造における官能基の配列による結晶形成にみられる。一方、骨や真珠形成におけるバイオミネラリゼーションでは、高分子の電荷を帯びた官能基が結晶形成に関わるイオンをひきつけ、局所的に濃縮している。これは、高分子が4)特殊な局所場を提供していることを表している。

以上のように、生体が行う様々なナノテクノロジーには、高分子特有の高分子効果が不可欠であり、本研究では、上記で述べた様々な生体内ナノ環境における高分子の構造や機能をモチーフとして、ナノ材料デザインを行うことを目的とした。



Equilibrium constant : $K_1 < K_2 < K_3 < K_4 \dots \doteq K_n$

Fig. 1.7 The cooperative effect for polymer complex.

1.3 高分子ナノ材料の特徴と用途

高分子ナノ材料は、ポリマー組成や構造に由来する特性とともに、1.1項で述べたナノ効果のようなサイズに由来する特性を示す。本研究では、高分子からなるナノ材料として、ナノ粒子、ナノカプセル、ナノ薄膜、およびナノハイブリッド材料に注目しており、これらの一般的な機能特

性について述べる。

<ナノ粒子>

ナノ粒子は、一本のポリマー鎖または複数のポリマー鎖が集まることで形成される。その作製法はいくつかあるが、あらかじめ用意したポリマーを組み上げて作製する方法とモノマーを重合して粒子の形にする方法の二つに大きく分けることができる³⁰⁾。前者では、親水性部および疎水性部を有するブロック共重合体を水中へ滴下することで、内側に疎水性部を外側に親水性部を有するミセルを形成する方法³¹⁾やポリマー溶液を小さな液滴として分散させ、溶媒を除去することでポリマーを固化する液中乾燥法などがある³²⁾。ナノ粒子の用途は幅広く、単体としては、薬剤担体、抗体などアフィニティ分子を固定化した診断薬、トナー粒子、化粧品のファンデーション製剤が挙げられる²⁾。一方、これらナノ粒子を集積化させたコロイド結晶やフォトニック結晶は、センサーや光学デバイスへの応用が期待されている。

<ナノカプセル>

ナノカプセルは高分子や脂質などからなる膜（カプセルウォール）によって内部が外界と隔てられた中空ナノマテリアルであり、その内部にナノサイズの特異な空間を有している³³⁾。ナノカプセルの作製法は、ミニエマルジョン中で溶液を相分離した後重合する方法や^{34, 35)}、コア粒子をテンプレートとして界面で重合を行った後、あるいは表面に高分子を積層化させた後に、焼成や溶媒抽出により内部からテンプレートを除去することで行われている。このようにして得られたナノカプセルは、薬物や遺伝子のキャリア、電子ペーパーのカプセル用インクなどの素材や、酵素反応などの反応場としての利用などが挙げられる。

<ナノ薄膜>

ナノ構造体として、古くから研究されているものの一つにナノ薄膜がある。高分子ナノ薄膜の形成は、基板上に高分子溶液をキャストし、乾燥させることにより薄膜化させる方法や³⁶⁾、基板表面に静電相互作用により種々の高分子やタンパク質などを吸着させて形成したり³⁷⁾、基板表面からグラフト重合を行うことによっても得ることができる³⁸⁾。ナノ粒子やナノカプセルの場合には、それらを界面に集積化することにより、ナノ薄膜を形成することができる。この他に、溶媒の流れとメニスカスの毛細管引力による自己集積を利用したナノ粒子の移流集積法³⁹⁾や水面上に展開したナノ粒子を固体基板上に累積して得る Langmuir-Blodgett (LB) 法⁴⁰⁾などがある。このようなナノ粒子薄膜は、ナノ薄膜の特性に加え、粒子特有の性質を合わせもつことから、ディスプレイ材料としての反射防止膜⁴¹⁾、粒子間スペースを利用したろ過膜⁴²⁾、微細凹凸構造を有する細胞培養基板としての利用⁶⁾などが挙げられる。

<ナノハイブリッドマテリアル>

ナノテクノロジーの発展により、有機材料と無機材料をナノレベルで複合化したナノハイブリッドマテリアルが注目されている。ハイブリッド化することにより、単独の材料ではなしえなかった高機能化が期待できるため、上記で示した様々なナノマテリアルを用いてハイブリッド化が行われている⁴³⁾。例えば、半導体ナノ粒子や量子ドットなどの無機機能性ナノマテリアルを内包させたナノ粒子によるバイオセンサー⁴⁴⁾、磁性体含有ナノ粒子による温熱療法用のターゲット⁵⁾、リン酸カルシウムと有機高分子をナノレベルで複合化させたハイドロゲル膜の骨再生材料⁴⁵⁾などが挙げられる。

1.4 本論文の概要

本研究では、生物のナノテクノロジーに学ぶという立場から、生物のマテリアルを模倣するアプローチ (biomimetic) というよりは、生物の行うエンジニアリングにヒントを得て (bioinspired)、マテリアルをデザインし、生物を超えるようなナノマテリアルを作製することを目的としている。特に、生体膜システムやバイオミネラリゼーションでみられる動的な状態変化あるいは構造化において、高分子効果を巧みに利用することで、多機能性高分子ナノマテリアルの創製を目指した。

第 2 章では、生体膜の動的なシステムに着目し、生体膜からなる中空構造とその表面におけるバイオポリマーの構造化および機能発現からヒントを得て、ナノカプセルの創製を行った。すなわち、生体膜由来のナノカプセルであるリポソーム表面に多糖や DNA といったバイオポリマーを交互に積層化し、様々な高分子からなるカプセルウォールを有するカプセル (リポナノカプセル) の作製を行った (Fig. 1.8 参照)。このリポナノカプセルのナノキャリアとしての特性を検討するために、界面活性剤に対するカプセルウォールの安定性、内部に封入した物質の放出性、ターゲティング能などの機能について検討した。

第 3 章では、第 2 章にて作製したリポナノカプセルの特徴と生体高分子によるバイオミネラリゼーションに着目し、リポナノカプセル表面に無機物であるリン酸カルシウム (calcium phosphate: CaP) を析出させて、有機無機ハイブリッドリポナノカプセルの作製を行った (Fig. 1.8 参照)。ここではリポナノカプセル自体の持つ機能に加え、CaP 由来の強度、溶解性、および骨親和性といった特徴を付与できると考えた。さらに、リポナノカプセルの物質放出性に着目し、カプセルウォールを介したイオンの相互拡散を利用した CaP の新しい表面析出方法の開発を行った。反応場となるリポナノカプセルの高分子膜の種類や反応条件 (pH、温度など) が CaP の結晶構造や形態へ与える影響について検討を行った。また、作製したハイブリッドナノカプセルの CaP 溶解性を利用した内封物質の放出性についても検討を行った。

第 4 章では、ナノ環境におけるバイオミネラリゼーションと有機高分子の働きから学び、限定された空間において重合とバイオミネラリゼーションを組み合わせたナノハイブリッド粒子の作製を行った。油相中にナノサイズの水滴を分散させた W/O (water-in-oil) 型ミニエマルジョンをナノリアクターとして用いて (Fig. 1.9 参照)、モノマーとしてコンタクトレンズなどにも用いられている 2-hydroxyethyl methacrylate を選択し、バイオミネラル化には炭酸カルシウム (calcium carbonate: CaCO₃) 形成を用いて検討を行った。このとき、水滴内での重合および結晶生成・成長を制御することにより、ナノ粒子内部の無機物の結晶構造や形態、さらにナノハイブリッド粒子の形状へ与える影響について検討を行った。また、高分子ナノ粒子の組織化に着目して、得られたナノハイブリッド粒子を基板に積層化させることによってナノフィルムの作製を行った。このナノハイブリッドフィルムは透明性を有し、フィルム内部の CaCO₃ の結晶構造や結晶形態の制御によって光特性や力学特性などの機能発現が期待されるナノマテリアルである。

第 5 章では、総括として本研究の意義、今後の研究の展望などを述べた。

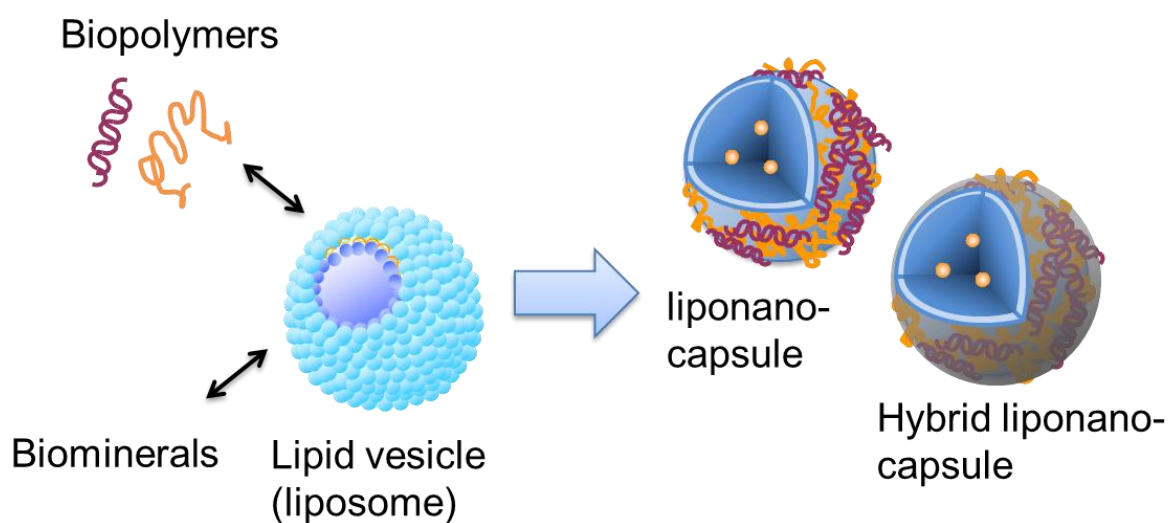


Fig. 1.8 Creation of liponano-capsules inspired from dynamic and hierarchical organization of lipid membrane with biopolymers and biominerals.

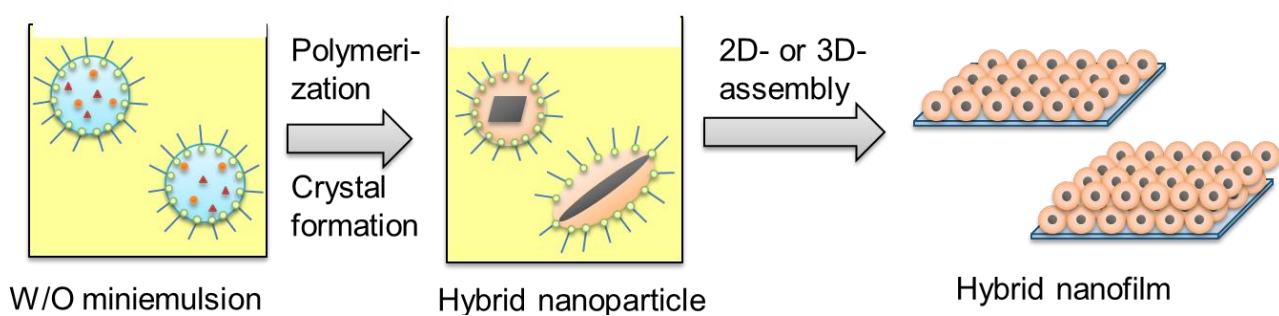


Fig. 1.9 Creation of organic-inorganic hybrid nanomaterials inspired from the template function of organic polymers in the compartmentalized system of biomimetalization.

第 1 章の参考文献

- 1) 岩村秀, “ナノ粒子科学—基本原理から応用まで—”, 株式会社エヌ・ティー・エス (2007).
- 2) 細川益男, “ナノパーティクル・テクノロジー”, 日刊工業新聞社 (2003).
- 3) Liu, W., “Nanoparticles and their biological and environmental applications RID C-8788-2011”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102**, 1-7 (2006).
- 4) Smith, A. M., Nie, S., “Semiconductor Nanocrystals: Structure, Properties, and Band Gap Engineering RID B-1567-2010 RID E-4843-2011”, *Accounts of Chemical Research*, **43**, 190-200 (2010).
- 5) 田畑泰彦, “絵で見てわかるナノDDS-マテリアルから見た治療・診断・予後・予防, ヘルスケア技術の最先端—”, 株式会社メディカル ドウ (2007).
- 6) 美浦学, “高分子微粒子からなる微細構造表面の創製と細胞接着の制御および細胞組織体の構築”, 慶應義塾大学理工学研究科 (2009).
- 7) 石原一彦, “ナノバイオエンジニアリングマテリアル”, フロンティア出版 (2004).
- 8) Israelachvili, J., Mitchell, D., Ninham, B., “Theory of Self-Assembly of Lipid Bilayers and Vesicles”, *Biochimica et biophysica acta*, **470**, 185-201 (1977).
- 9) Israelachvili, J., “Refinement of Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure”, *Biochimica et biophysica acta*, **469**, 221-225 (1977).
- 10) Singer, S., Nicolson, G., “Fluid Mosaic Model of Structure of Cell-Membranes”, *Science*, **175**, 720-731 (1972).
- 11) Sandermann, H., “Regulation of Membrane Enzymes by Lipids”, *Biochimica et biophysica acta*, **515**, 209-237 (1978).
- 12) 大木和夫, “生体膜の脂質と蛋白質との相互作用”, *化学工業*, **5月号**, 19-25 (1997).
- 13) Mouritsen, O., Bloom, M., “Mattress Model of Lipid-Protein Interactions in Membranes”, *Biophysical journal*, **46**, 141-153 (1984).
- 14) Owicki, J., Springgate, M., McConnell, H., “Theoretical-Study of Protein-Lipid Interactions in Bilayer Membranes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **75**, 1616-1619 (1978).

- 15) 三浦隆史, “脂質膜によるペプチドの 2 次構造制御”, *生物物理*, **50**, 184-185 (2010).
- 16) Abedini, A., Raleigh, D. P., “A critical assessment of the role of helical intermediates in amyloid formation by natively unfolded proteins and polypeptides”, *Protein Engineering Design & Selection*, **22**, 453-459 (2009).
- 17) Simons, K., Ikonen, E., “Functional rafts in cell membranes”, *Nature*, **387**, 569-572 (1997).
- 18) Perutz, M., “タンパク質-立体構造と医療への応用-”, 東京化学同人 (1995).
- 19) 中野明彦, 遠藤斗志也, “タンパク質の一生”, 共立出版 (2000).
- 20) Pain, R. H., “「タンパク質のフォールディング」 原理・機構・応用”, シュプリンガー・フェアラーク東京 (1995).
- 21) 日本 DDS 学会編集委員会, “ウイルスハンドブック”, 日本医学館 (2008).
- 22) 加藤隆史, “バイオミネラリゼーションとそれに倣う新機能材料の創製”, シーエムシー出版 (2007).
- 23) Caplan, A., “Bone-Development and Repair”, *Bioessays*, **6**, 171-175 (1987).
- 24) Mahamid, J., Sharir, A., Gur, D., Zelzer, E., Addadi, L., Weiner, S., “Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study”, *Journal of structural biology*, **174**, 527-535 (2011).
- 25) Mann, S., “Biom mineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry”, Oxford University Press (2001).
- 26) 竹本喜一, “機能性プラスチックが身近になる本”, シーエムシー出版 (2004).
- 27) Benyus, M. J., “自然と生体に学ぶバイオミクリー”, オーム社, (2006).
- 28) 阿部康次 土, “高分子と細胞膜の相互作用”, 共立出版 (1992).
- 29) Mammen, M., Choi, S., Whitesides, G., “Polyvalent interactions in biological systems: Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors”, *Angewandte Chemie-International Edition*, **37**, 2755-2794 (1998).
- 30) 藤本啓二, “ナノ粒子”, *Drug Delivery System*, **16**, 155-164 (2001).
- 31) Iijima, M., Nagasaki, Y., Okada, T., Kato, M., Kataoka, K., “Core-polymerized reactive micelles from heterotelechelic amphiphilic block copolymers”, *Macromolecules*, **32**, 1140-1146 (1999).

- 32) 小川泰亮, “生体分解性高分子の DDS 製剤への応用”, *Drug Delivery System*, **15**, 429-436 (2000).
- 33) 小石眞澄, “マイクロ/ナノ系カプセル・微粒子の開発と応用”, シーエムシー出版 (2003).
- 34) Theisinger, S., Schoeller, K., Osborn, B., Sarkar, M., Landfester, K., “Encapsulation of a Fragrance via Miniemulsion Polymerization for Temperature-Controlled Release RID F-9449-2011”, *Macromolecular Chemistry and Physics*, **210**, 411-420 (2009).
- 35) Paiphansiri, U., Tangboriboonrat, P., Landfester, K., “Polymeric nanocapsules containing an antiseptic agent obtained by controlled nanoprecipitation onto water-in-oil miniemulsion droplets RID F-9449-2011”, *Macromolecular Bioscience*, **6**, 33-40 (2006).
- 36) Frank, C., Rao, V., Despotopoulou, M., Pease, R., Hinsberg, W., Miller, R., et al., “Structure in thin and ultrathin spin-cast polymer films”, *Science*, **273**, 912-915 (1996).
- 37) Decher, G., “Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites RID E-7665-2011”, *Science*, **277**, 1232-1237 (1997).
- 38) Tokarev, I., Motornov, M., Minko, S., “Molecular-engineered stimuli-responsive thin polymer film: a platform for the development of integrated multifunctional intelligent materials RID B-2876-2009 RID A-9458-2009”, *Journal of Materials Chemistry*, **19**, 6932-6948 (2009).
- 39) Grzelczak, M., Vermant, J., Furst, E. M., Liz-Marzan, L. M., “Directed Self-Assembly of Nanoparticles RID B-8910-2011”, *Acs Nano*, **4**, 3591-3605 (2010).
- 40) Fujimoto, K., Nakahama, K., Shidara, M., Kawaguchi, H., “Preparation of unsymmetrical microspheres at the interfaces”, *Langmuir*, **15**, 4630-4635 (1999).
- 41) Shipway, A., Katz, E., Willner, I., “Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications”, *ChemPhysChem*, **1**, 18-52 (2000).
- 42) Peng, X., Jin, J., Nakamura, Y., Ohno, T., Ichinose, I., “Ultrafast permeation of water through protein-based membranes RID A-1295-2009”, *Nature Nanotechnology*, **4**, 353-357 (2009).
- 43) 国武豊喜, “ナノマテリアルハンドブック”, 株式会社エヌ・ティー・エス (2005).
- 44) Di Corato, R., Bigall, N. C., Ragusa, A., Dorfs, D., Genovese, A., Marotta, R., et al., “Multifunctional Nanobeads Based on Quantum Dots and Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Cancer Cell Targeting and Sorting RID C-3606-2008 RID A-5563-2008 RID G-2339-2010”, *Acs Nano*, **5**, 1109-1121 (2011).

45) Song, J., Saiz, E., Bertozzi, C., “A new approach to mineralization of biocompatible hydrogel scaffolds: An efficient process toward 3-dimensional bonelike composites”, *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 1236-1243 (2003).

2.1 序論

第2章では、生体膜由来のナノカプセルであるリポソームをテンプレートとし、静電相互作用により表面へ種々のバイオポリマーを積層化することにより、脂質とポリマーの複合化カプセル（リポナノカプセル）の作製と評価を行った。また、作製したりポナノカプセルの薬剤や遺伝子などのキャリアとしての応用を目指して、リポナノカプセル内部への物質封入、放出機能、および特定部位へのターゲティング機能の付与の検討を行った。

カプセル材料は、豊富なキャビティへの機能性物質の保持、シェル層（capsule wall）を通した内封物の放出制御などの機能から、医薬品、画像記録、化粧品など幅広い分野で応用されてきた¹⁾。近年では、それらのナノサイズ化による新しい効果の発現に注目が集まっている。例えば DDS キャリアとしては EPR 効果や細胞内動態制御によるピンポイントデリバリー、化粧品担体としては組織浸透性の向上、バイオイメージングプローブとしてはクラスター効果による検出感度の向上などが挙げられる。本研究ではカプセル素材として、脂質分子の自己組織化によって形成された、柔軟な中空構造体であるリポソームに着目した²⁾。リポソームの内部と膜部分にそれぞれ水溶性と脂溶性の物質を同時に封入することができる。さらに、リポソームへの物質の封入は作製時に可能であるため、低分子から高分子まで幅広い種類の物質を封入することができる^{3,4)}。

ここでリポナノカプセルのテンプレートとして用いるリポソームは、生体膜の構成成分であるリン脂質の二重膜からなる人工の閉鎖小胞である（A2.1 参照）。1965年にケンブリッジ大学の Bangham らにより初めて報告され、生体膜モデルや機能材料として古くから研究されてきた。リン脂質分子は極性基と疎水性基からなる両親媒性物質で、水中では熱力学的に安定な二重層構造をとり、ラメラ、ベシクル、リポソーム、円筒型ミセル、ジャイロイドなどの形態をとる。特に、リポソームは粒子径や膜組成を自由に選択でき、膜表面の修飾も容易であるなど、様々な機能化が可能である。さらに、生体由来であるため安全性に優れ、脂溶性物質を膜内の疎水性部分に、水溶性物質を内水相に含有させることができるため、薬剤や遺伝子のデリバリーキャリア、化粧品、食品などの幅広い分野で応用が行われている²⁾。本研究では、表面に負電荷を付与するために、構性脂質として酸性リン脂質である dilauroyl phosphatidic acid (DLPA) を選択し、中性リン脂質である dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC) と混合することにより、負電荷を有する粒径約 100 nm のリポソームを作製した。

リポソームのみでは封入物質の長期保持と放出制御は困難であるため、脂質膜に作用する物質を用いた様々な機能特性の付与についての研究が行われてきた。例えば、リポソーム表面へ、親疎水性を併せ持つブロック共重合体を修飾し、これが温度によってコイル-グロブユール転移を起こすことで脂質膜の不安定化を誘発し、放出を促進する温度応答性リポソーム⁵⁾や光重合性脂質を導入したりポソームに UV を照射することで、脂質の重合を促し、不安定化を誘発することで放出を促す光応答性リポソーム⁶⁾などが挙げられる。これらは脂質膜と膜タンパク質との相互作用になぞらえることができる。そこで、本研究ではリポソーム表面にポリマーを積層化することによってカプセルウォールを形成させて、脂質とポリマーの複合化カプセル（リポナノカプセル）の作製を行った。ポリマーの積層化には薄膜作製技術の一つである交互吸着（layer-by-layer, LbL）法を選択した。この LbL 法は、1991年に G.Decher らによって考案された画期的な薄膜作製技術⁸⁾である。これはアフィニティを有するポリマー鎖間の分子間相互作用を利用して、対となるポリマーを交互に積層させる方法であり、一層毎に精密な膜厚制御が可能である。この方法はどんな材質や形状のもの（テンプレート）にも適用でき、コロイド粒子⁹⁻¹²⁾、細胞¹³⁾、

油滴¹⁴⁾など様々なテンプレート表面にポリマーの多層化とカプセル形成が行われてきた。例えば Caruso らは、コロイド粒子をテンプレートとし、表面に高分子電解質または電荷を持ったナノ粒子を交互に吸着させ、最後にコロイド粒子を溶解して除去することで中空構造化を行った¹⁵⁾。コロイド粒子を除去するために強酸、フッ化水素などが用いられるため、生体に用いる際には毒性が懸念される。また、カプセル形成後に内部に物質を封入する必要がある。そこで、本研究ではコロイド粒子ではなく、中空であるリポソームをテンプレートとして用いて、負電荷を帯びたリポソームの表面に、反対電荷を持ったバイオポリマーを交互に吸着させることでナノカプセルの作製を行った。この方法では、流動性に富む脂質膜表面によって吸着後のポリマーの形態が変化するため、多様な構造を有するカプセルウォールの構築が可能となる。また、脂質膜の存在により、内部に封入する物質保持能の向上が期待できる。以前の研究では、正電荷をもつポリペプチドである poly-L-lysine (P_{Lys}) と負電荷をもつ poly-L-aspartic acid (P_{Asp}) を交互に積層させたナノカプセルを作製した¹⁶⁾。

本章では、すべて天然由来成分からなるナノカプセルの作製を目指して、キトサンやデキストラン硫酸といった多糖類および核酸である DNA をバイオポリマーとして選択した。これらはそれぞれの生体機能・生理活性に加えて、親水性、生分解性、ユニークな高次構造形成能など高分子素材としても興味深い特徴を備えている (A2.2 参照)。そのため、これらをリポソーム膜表面へ積層化することにより、リポソームの安定性の向上とともに、外部刺激に応答した放出制御、特定部位へのターゲティング能などの機能を付与することも期待した。ここでは、種々の化学的および物理的特性を有するバイオポリマーをリポソーム表面というダイナミックなソフト界面へ吸着、積層化することでナノカプセルを形成し、力学的特性、表面特性、膜特性などへの影響やそれに伴う物質放出機能について検討を行った。さらに薬物などの有効成分を効率的に目的地へ到達させるための DDS 技術への利用を考えて、表面の官能基による部位特異的標的指向性についても検討を行った。

2.2 実験方法

2.2.1 負電荷リポソームの作製

2.2.1.1 試薬

薬品名	分子量	メーカー
2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸 (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, HEPES)	238.31	和光純薬工業株式会社
2-モルホリノエタンスルホン酸、一水和物 (2-morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate, MES)	213.25	和光純薬工業株式会社
0.1, 0.01M 水酸化ナトリウム (sodium hydroxide, NaOH)	40.00	和光純薬工業株式会社
リン酸水素二ナトリウム 12 水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	358.14	和光純薬工業株式会社
リン酸二水素ナトリウム 2 水和物 (sodium dihydrogenphosphate dihydrate, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	156.01	和光純薬工業株式会社
1,2-dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate, monosodium salt, (DLPA) (Fig. 2.1 (a))	557.66	Avanti Polar lipids, Inc.
L- α -phosphatidylcholine, dimyristoyl, (DMPC) (Fig. 2.1 (b))	695.96	和光純薬工業株式会社
メタノール、特級 (methanol)	32.04	純正化学株式会社
過塩素酸、70%、特級 (perchloric acid, HClO_4)	100.46	純正化学株式会社
七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 (hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1235.86	和光純薬工業株式会社
L(+)-アスコルビン酸 (L(+)-ascorbic acid)	176.13	和光純薬工業株式会社
リン酸二水素カリウム (potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4)	136.09	和光純薬工業株式会社
コロジオン(酢酸イソアミル溶液, 2%)		日新 EM 株式会社
エタノール、特級 (ethanol)	46.07	和光純薬工業株式会社
アセトン、特級 (acetone)	58.08	和光純薬工業株式会社

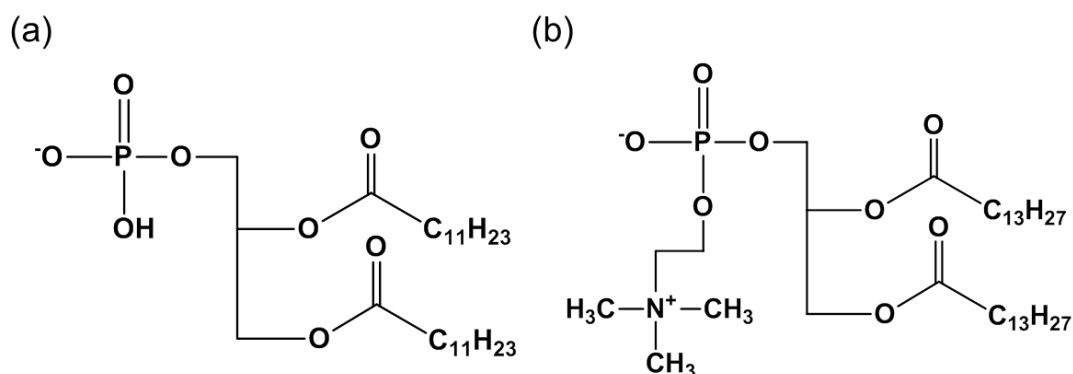


Fig. 2.1 Chemical structures of DLPA (a) and DMPC (b).

緩衝液の調製方法

- HEPES 緩衝液の調製

HEPES 2.38 g を 100 mL 超純水にて溶解させ、pH メーターで確認しながら 100 mM NaOH を滴下することで、HEPES 緩衝液 (100 mM, pH 7.4) を調製した。この溶液を超純水によって希釈し、10 mM として使用した。

- MES 緩衝液の調製

MES 2.13g を 100 mL 超純水にて溶解させ、pH メーターで確認しながら 100 mM NaOH を滴下することで、MES 緩衝液 (100 mM, pH 4.5) を調製した。この溶液を超純水によって希釈し、10 mM として使用した。

2.2.1.2 エクストルージョン法によるリポソームの作製

リポソームの作製には、目的に応じて様々な方法があるが (A2.3 参照)、本研究では凍結融解法^{*1}およびエクストルージョン法^{*2}を用いた。リポソームのリン脂質構成成分である、dilauroyl phosphatidic acid (DLPA) (Fig. 2.1(a)) と dimyristoyl phosphatidyl choline (DMPC) (Fig. 2.1(b)) をあわせて 10⁻⁵ mol 秤り取り、スリ付きナス型フラスコ中で 1 mL のメタノールに溶解した。ロータリーエバポレーターにて減圧下で溶媒を蒸発させて脂質フィルムを得た。その後、デシケーターに移し、真空ポンプを用いて 6 時間減圧乾燥することで溶媒を完全に除去した。これに 1 mL の緩衝液を加え、浴槽型ソニケーターで機械的振動を加えることで脂質フィルムを壁から剥離して水和を促進させて、多重膜リポソーム (multilamellar vesicle: MLV) を得た。脂質フィルムを水和して閉鎖小胞の脂質二重層を得るためには、脂質が流動性の高いゲル相である必要があるため、浴槽の温度は脂質の相転移温度より約 10°C 高い 50°C に設定した。

次に凍結融解法に従って水和させた脂質分散液を液体窒素にて凍結、室温にて融解、50°C にて加温を 3 回繰り返すことでリポソームの融合と脂質二重層の再配列を促し、大きな MLV を得た。

次にエクストルーター (LF-1, Avestin, Inc.) を用いて、リポソーム分散液を 100 nm のポアサイズを有するフィルターから、押し出しながら通すことを 20 回繰り返す、小さな一枚膜リポソーム (small unilamellar vesicle: SUV) を作製した。この方法をエクストルージョン法といい、フィルターのポアサイズを変えることでサイズの揃ったリポソームの生成を容易に行うことができる。

*1 凍結融解法

両親媒性のリン脂質は、水溶液中でその親水基は水相に配向し、疎水基は互いに集合することにより、脂質二重層を形成する。このようにして得られたリポソーム分散液を凍結すると水和していた水分子は氷となり脱水和が起きる。このため脂質二重層同士が近づき、リポソームの融合が起きる。次の融解の過程では親水基は再び水和し、脂質二重層の再配列が起きる。こうして大きな MLV を形成させることができる。また、薬剤などの水溶性物質も凍結時に濃縮され、融解の過程においてリポソーム膜の水和と再配列が起こる。このとき脂質膜が一時的に崩壊し、膜透過性が高まるため、物質がリポソーム内へ高濃度に保持される。よって、様々な水溶性物質を高効率で内包化できることが特徴である。

*2 エクストルージョン法

押し出し法またはポリカーボネート膜ろ過法という。リポソームを薬剤カプセルとして用いる場合は、サイズの制御とその分散度の向上が重要となってくる。凍結融解法により作製した大きな MLV を均一サイズの穴が開いたポリカーボネート膜に繰り返し通すことで、一枚膜の小さな均一サイズリポソームを作製することができる。他の方法と比較すると、操作が容易で迅速に処理でき、脂質の分解がほとんどなく再現性が高い。また、比較的高濃度の脂質溶液にも適用でき、収率が高いことも利点である。

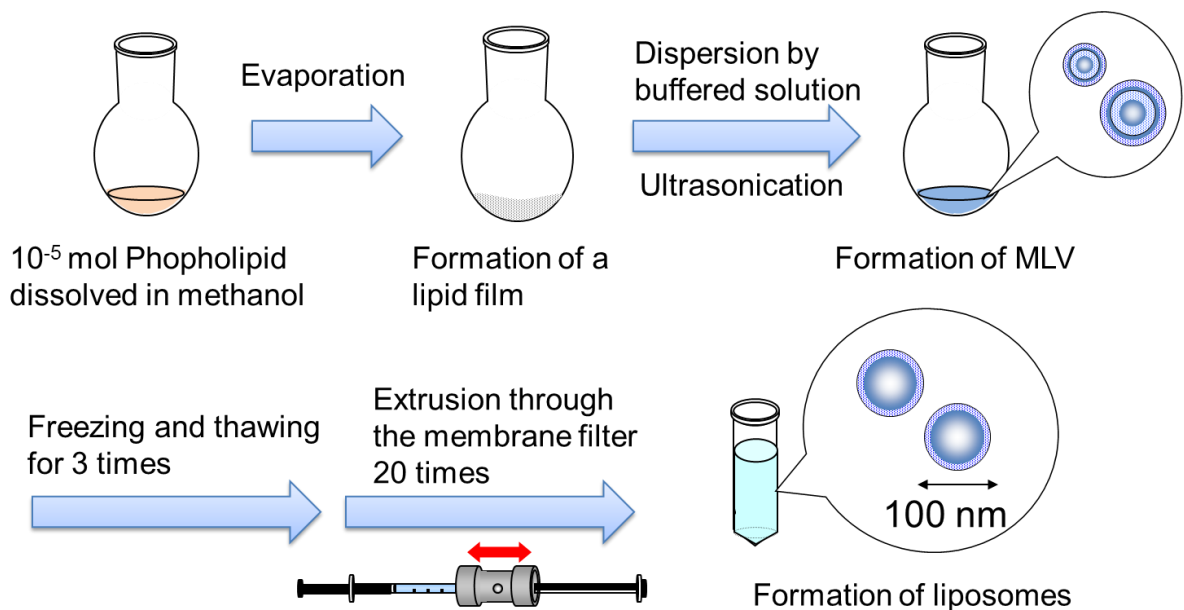


Fig. 2.2 Preparation of a liposome.

2.2.2 リポソームのキャラクタリゼーション

2.2.2.1 リン脂質濃度測定

リポソーム分散液の濃度を決定するためにリン脂質濃度の測定を行った。リン脂質濃度の定量はリン脂質を構成するリン原子の含量を測定することで行われる。まず、リン脂質を過塩素酸によって分解して無機リンとする。さらにモリブデン酸と錯体を形成させて、リンモリブデン酸を形成させた後に、アスコルビン酸によって還元して、発色度を測定する。

リポソーム分散液を超純水によって2倍希釈し100 μLとし、試験管に入れた。さらに70%過塩素酸を500 μL加え、ガラス球でふたをした後、ヒーティングブロック中で200°Cにて90分間加熱した。室温

に戻した後、超純水を 2.5 mL 加えてよく管壁を洗った。これを未知試料とした。リン脂質標準液として、100 mg/dL の KH_2PO_4 水溶液 (600 mg/dL のリン脂質に相当) を調製し、希釈することで 0、25、50 および 75 mg/dL の水溶液を得た。これら 100 μL をそれぞれ試験管に入れ、過塩素酸 500 μL と超純水 2.5 mL を加えた。未知試料と標準液に 2.5% (w/v) モリブデン酸アンモニウム溶液をそれぞれ 500 μL 加えて攪拌した。さらに 10% (w/v) アスコルビン酸溶液 500 μL を加えて攪拌し、ふたをした後に 100°C で 10 分間加熱した。水冷して室温に戻した後、吸光度計 (U-2001, HITACHI) を用いて 820 nm の吸光度を測定した。標準液から作成した検量線より未知試料のリン脂質濃度を求めた。

2.2.2.2 動的光散乱法 (DLS) による粒径測定

<動的光散乱法 (DLS) の原理>

溶液中の粒子にレーザー光線を照射すると散乱光のゆらぎが生じる。これは粒子がミクロブラウン運動によってランダムな動きをしているために、粒子の分布が一樣でなく、粒子濃度がゆらいでいるために生じる。粒子径が小さい程 (拡散速度が大きい程) このゆらぎも速くなる。このゆらぎの統計的処理から粒子径を求めるのが動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering : DLS) であり、3 nm~5 μm が測定範囲である。液体中でブラウン運動する粒子群に、レーザー光を照射する。粒子群からの散乱光を光検出器で受光する。レーザー光源から粒子 A または B を通り、検出器までの光路長は、各粒子によって異なるので、各粒子からの散乱光を合わせると、光路長差による光干渉が生じる。粒子はブラウン運動をしているため、各粒子からの光路長は刻々と変化し、光干渉により受光強度 $I(t)$ はゆらぐことになる。このような動的変化の情報は自己相関関数を求めることによって得られる。時間 τ (相関時間) だけ離れた受光強度間の積の平均 $\langle I(t)I(t+\tau) \rangle$ を $\langle I(t) \rangle^2$ で割った自己相関関数 $g^{(2)}(\tau)$ について、 t と τ とを変えて測定した値から、粒子のブラウン運動性、つまりは拡散係数に関する情報を得ることができる。さらに、以下の計算式により粒径や粒度分布を求めることができる。

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta |g^{(1)}(\tau)|^2 \quad (2.1)$$

τ : 相関時間

β : 実験条件に依存する定数

$g^{(1)}(\tau)$: 規格化された一次相関関数

ここで粒子が球形で入射光の波長に比べて十分小さい場合、 $g^{(1)}(\tau)$ は以下のように表される。

$$|g^{(1)}(\tau)| = \exp(-DK^2\tau) \quad (2.2)$$

$$K = (4\pi n/\lambda)\sin(\theta/2) \quad (2.3)$$

D : 並進拡散係数

K : 散乱光ベクトル

n : 溶媒の屈折率

λ : レーザー光の波長

θ : 散乱角

D が実験的に求められると、粒子径 R は Stokes-Einstein の式より以下のように求められる。

$$R = kT / 3\pi\eta D \quad (2.4)$$

k : ボルツマン係数

η : 溶媒の粘性係数

T : 絶対温度

<実験方法>

リポソーム分散液を緩衝液によって希釈し、レーザー粒径解析装置 (PAR-III、大塚電子 (株)) を用いて、20°C および 37°C において 50 回の測定を 4 回繰り返した。

2.2.2.3 透過型電子顕微鏡 (TEM) による形状観察

<透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope, TEM) による形状観察>

作製したリポソームの乾燥時の形状を TEM により観察した。本研究では、ネガティブ染色を用いてリポソームの形状観察を行った。ネガティブ染色法は一般的な染色法と異なり、無構造でかつ高密度な低分子化合物など試料が染色剤と反応しない場合に、電子線の透過性が低い染色液で試料の周りを囲むことで濃淡を増し、試料の大きさやその表面微細構造を観察する手法である。ここで用いたモリブデンのような重金属イオンはリポソームの存在しない部分に分布するため、その部分の電子密度が濃く現れ、結果としてリポソームの脂質部位である二分子膜構造が白い帯状で観察できる。

まず、コロジオン膜でコートした銅製グリッドにカーボン蒸着を施した後、そのグリッド上へ 0.5 mL に調製したリポソーム分散液を 3 μ L 滴下した。約 1~2 分後にろ紙を用いて液体を吸い取った。さらに染色剤として 1% (w/v) モリブデン酸アンモニウム溶液 3 μ L を滴下し、直ちにろ紙で吸い取った。これについて TEM (FEI company, 120 kV) により形状観察を行った。

<低温透過電子顕微鏡 (Cryo-TEM) による形状観察>

Cryo-TEM は液体窒素による試料冷却ステージを備えた顕微鏡であり、試料を 4 K まで冷却して観察することが可能である。冷却により電子線損傷を低減できるほかに、急速凍結氷包埋法を併用することにより、通常の TEM では観察不可能である液中構造の観察が可能である。水を徐々に冷やして行くと、やがて 0°C で氷になる。氷は水の結晶であるので、電子線を当てると電子顕微鏡の蛍光板に結晶構造に由来する斑点 (回折像) を生じる。しかし、水を液体窒素で急激に冷却すると、ガラス状の結晶構造を持たない氷となり、電子線を当てても回折像を生じない。このため、膜状に形成されたガラス状の氷を支持膜として適用でき、固定も染色も、乾燥も必要としない方法である。

リン脂質濃度 1 mM に調整したリポソーム分散液に対して支持膜を張っていないグリッドを浸漬し、ろ紙で余分な液体を吸い取った。これにより、リポソーム分散液がグリッドの小孔に表面張力により薄膜として張られる。これをそのまま液体窒素で急激に冷やし、ただちに TEM (FEI company, 120 kV) で観察を行った。

2.2.2.4 リポソームのゼータ電位の測定

溶液中に分散している粒子は、その表面極性基の解離やイオンの吸着によって電氣的に負または正に帯電している。そのため粒子周辺には表面電荷を中和するために、過剰に存在する反対符号を持つイオンと少量の同符号を持つイオンが拡散的に分布しており、電気二重層を形成している。二重層は界面から水和イオン半径にほぼ等しいところに存在する面（Stern 面）によって固定層と拡散層に分けられる。電場中の帯電粒子が動くとき、粒子表面に強く吸着したイオンは粒子と一緒に動くが、弱く引き付けられているイオンは一緒についていけず、すべりが生じる。このすべりが生じる面は Stern 面の近くにあると考えられ、このときの電位をゼータ電位（ ζ -potential）という。溶液中の粒子の表面電位を直接測ることは困難なため、ゼータ電位が測定され、微粒子の分散安定性の指標として用いられる。ゼータ電位の絶対値が大きければ、粒子間の反発力が強く、安定性は高いが、逆にゼータ電位がゼロに近づくと、粒子は凝集しやすくなる。

次にゼータ電位の測定法について説明する。電解質溶液中に荷電粒子を分散させ、外部から電場をかけると、荷電粒子は電場から力を受けて泳動する。しかし、同時に液体からの粘性抵抗を受け、やがてこの粘性力と電場から受ける力が均衡し、粒子は等速運動するようになる。この移動の速さを測定し、電場の強さで割ることによって、式 (2.5) より、粒子の電気泳動移動度 (M) が求められる。さらに M の値から Henry の式 (2.6) を用いて粒子のゼータ電位を算出できる。

$$M \text{ (mm} \cdot \text{cm} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}\text{)} = u \times d/V \tag{2.5}$$

u : 移動速度 (mm · sec⁻¹)

d : 電極間距離 (cm)

V : 電圧 (V)

$$\zeta = \pi \times \eta \times M / (f \times \varepsilon) \tag{2.6}$$

ζ : ゼータ電位

η : 分散媒の粘度

f : 比例定数

ε : 分散媒の誘電率 (希薄溶液)

本実験では、リポソーム分散液を MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.5) で希釈し、コンパクトゼータ電位測定装置 (ZEEDCOM, マイクロテック・ニチオン社) を用いてゼータ電位を測定した。

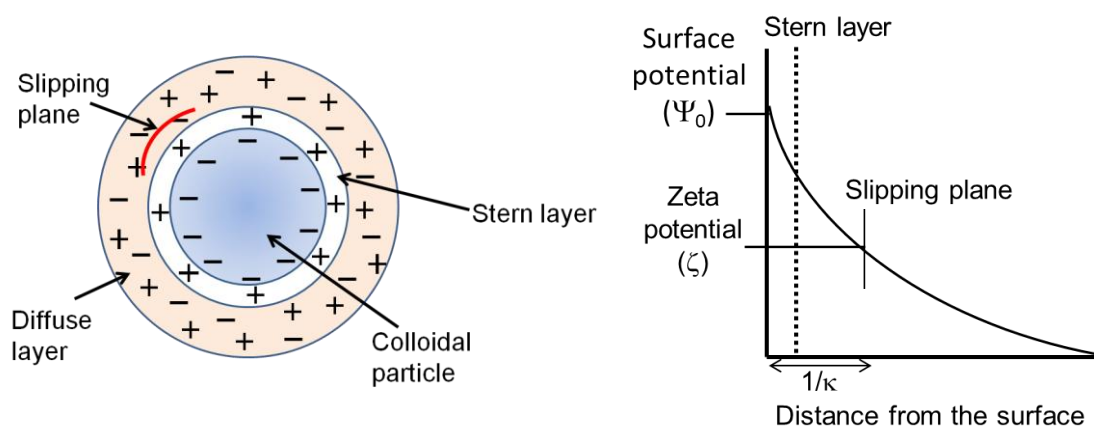


Fig. 2.3 Theoretical model of zeta-potential of a particle.

2.2.3 リポソーム表面へのポリマーの交互吸着によるリポナノカプセルの作製

2.2.3.1 試薬および種々の溶液調製

薬品名	分子量	メーカー
chitosan water soluble, CHI(50) (degree of deacetylation: 50%) (Fig. 2.4 (a))	3000-10000	和光純薬工業株式会社
chitosan LL-40, CHI(80) (degree of deacetylation: 80%) (Fig. 2.4 (a))	10000-100000	焼津水産化学株式会社
酢酸ナトリウム 3水和物 (sodium acetate 3-water, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	136.08	和光純薬工業株式会社
酢酸、特級 (acetic acid, CH_3COOH)	60.05	和光純薬工業株式会社
四ホウ酸ナトリウム (sodium tetraborate (Borax))	381.37	和光純薬工業株式会社
D(+)-グルコサミン塩酸塩 (D(+)-glucosamine hydrochloric salt)	215.63	和光純薬工業株式会社
polyethylene glycol mono-4-octylphenyl ether, (Triton X-100)	~625	東京化成工業株式会社
0.01 mol/L 塩酸 (hydrochloric acid, HCl)	36.46	和光純薬工業株式会社
デキストラン硫酸ナトリウム (sodium dextran sulfate, DXS) (Fig. 2.4 (b))	5000	和光純薬工業株式会社
deoxyribonucleic acid sodium salt (salmon spermary, DNA)	300000- 9000000	和光純薬工業株式会社
フルオレスカミン (fluorescamine)	278.26	Molecular Probes
hydroxyapatite (DNA grade, Bio-Gel, HTP Gel) (Fig. 2.4 (c))		BIO-RAD

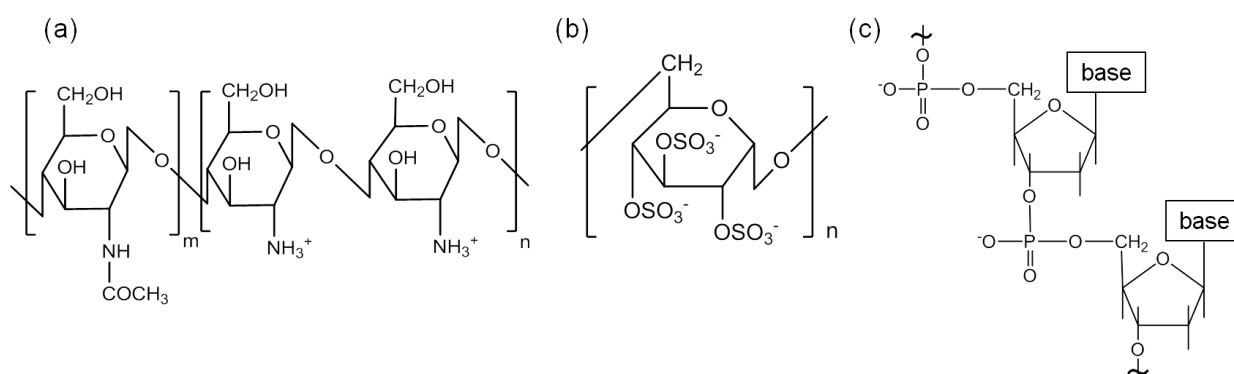


Fig. 2.4 Chemical structures of chitosan (CHI) (a), dextran sulfate (DXS) (b) and DNA (c).

緩衝液の調製方法

• 50 mM phosphate buffered solution (PB) の調製

NaH₂PO₄ を 780.05 mg 秤り取り、100 mL の超純水 (Milli-Q) に溶解させた。さらに 1.79 g の Na₂HPO₄ を 100 mL の超純水 (Milli-Q) に溶解させた。これら二種類の溶液を適当な量比で混合させ、pH メーターにて目的の pH に調整し、50 mM リン酸緩衝液 (PB) を調製した。

• CHI(80)溶液の調製

CHI(80)は水溶性が低いため、緩衝液に溶解させることができなかったため、以下の方法を用いて調製を行った。

CHI(80)を 0.1 M 酢酸溶液中で 25°C、24 時間攪拌することで溶解させた。この溶液に 0.1 M 酢酸ナトリウム溶液を添加し、pH メーターを用いて pH 4.5 に調整した。その後、溶媒置換するために、透析膜 (Spectra/Por®, 分画分子量: 1000, Spectrum Laboratories Inc.) を用いて MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.5) 中で 3 日間透析を行った。不溶物を除去するために DISMIC®-25cs (0.2 μm, cellulose acetate, ADVANTEC) を用いてフィルター濾過を行った。得られた CHI(80)溶液の濃度は、アミノ基の定量試薬であるフルオレスカミンを用いて決定した (Fig. 2.5 参照)。この時、CHI(80)の濃度はその構成単位であるグルコサミン濃度として換算した。以降、この CHI(80)溶液を MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.5) にて必要な濃度に希釈して、実験に用いた。

<フルオレスカミン法>

フルオレスカミンはタンパク質の N 末端のアミノ基やリジン残基の ε-アミノ基などの第一級アミンと pH 8-9 で反応して蛍光物質を生成する。よって、CHI 中に含まれるアミノ基を定量することで系中に存在する CHI 濃度を決定することが可能である (Fig. 2.5 参照)。

1.4 mL の PB (50 mM, pH 7.0) に対して、100 μL のサンプル溶液を加えた。ここに、300 ppm でアセトンに溶解させたフルオレスカミン溶液 500 μL を攪拌しながら加えた。フルオレスカミンは加水分解されやすいので攪拌しながら添加する必要がある。5 分後に分光蛍光光度計 (FP6500, 日本分光) を用いて、λ_{ex}=390 nm, λ_{em}=475 nm にて蛍光強度を測定し、グルコサミン溶液の検量線を用いることによって、サンプル中のアミノ基を定量した。

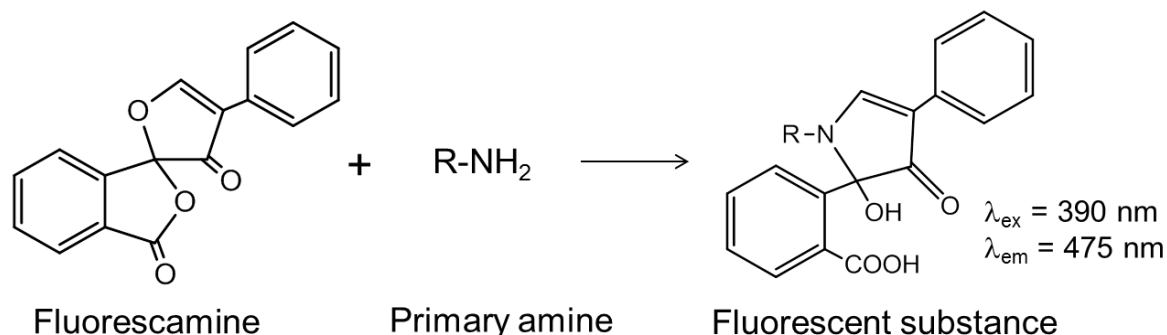


Fig. 2.5 Reaction scheme for fluorescamine assay.

2.2.3.2 リポソーム表面に対する CHI 吸着等温線の作製

2.2.1.2 項で作製したリポソームに対して吸着させる CHI (Fig. 2.4 (a)参照) の濃度を変化させて吸着等温線を作製した。リン脂質濃度 1.0 mM のリポソーム分散液 500 μ L を 500 μ L の CHI 溶液に加え、20°C、700 rpm の攪拌条件下で 30 分間吸着させた。このとき、それぞれの分散液は MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.5) と HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を用いて調製した。また、脂質比 DLPA/DMPC が 0.1/0.9 または 0.5/0.5 の二種類のリポソームを用いて検討を行った。反応後、分離用小型超遠心機 (CS100GX, 日立工機) を用いて、4°C で溶液の超遠心分離 (70000 rpm, 45 min) を行った。上清の CHI (50) 濃度を TNBS 法により、CHI (80) をフルオレスカミン法 (CHI (80) 溶液の調製参照) によりそれぞれ定量し、以下の定量法を用いてリポソーム表面への吸着量を求めた。

<TNBS 法>

2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) は、第一級アミンと反応して 420 nm に吸収極大を持つようになるアミノ基定量試薬である。これにより CHI 中に含まれるアミノ基を定量し、CHI 濃度を測定することができる。

96 穴マイクロプレートに 0.1 M 四ホウ酸ナトリウム水溶液を 270 μ L、サンプル溶液を 30 μ L、さらに 0.03 M TNBS 溶液を 7.5 μ L 加え、37°C で 2 時間インキュベートした後、450 nm における吸光度を測定した。グルコサミンを用いて検量線を作製し、フルオレスカミン法と同様に、CHI の濃度をその構成単位であるグルコサミン濃度換算で算出した。

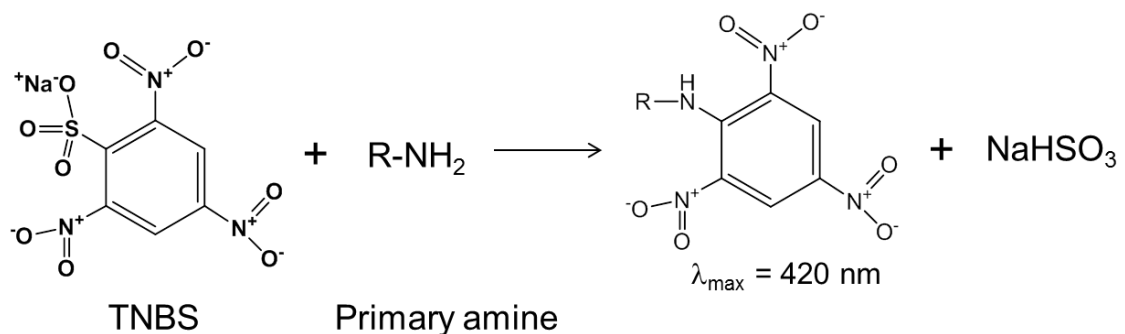


Fig. 2.6 Reaction scheme for TNBS assay.

<吸着量算出法>

リポソームの単位表面積当たりの CHI の吸着量 W は式 (2.7) により計算できる。

$$W = V(C_0 - C_i) / A \quad (2.7)$$

W : 単位表面積当たりの CHI の吸着量 (g/cm^2)

V : 溶液の体積 (mL)

C_0 : CHI 濃度 (g/mL)

C_i : CHI の平衡濃度 (未吸着の CHI 濃度) (g/mL)

A : リポソームの全表面積 (cm^2)

ここで C_i を横軸に W を縦軸にプロットすると吸着等温線が得られる。

以下にリポソームの表面積 A の計算法を示す。

DLPA 分子の断面積 a_{PA} は 0.60 nm^2 であり¹⁷⁾、C-C 結合が全てトランスの場合の分子鎖長 l_{PA} は 1.51 nm である。DMPC 分子の場合はそれぞれ、 $a_{PC} = 0.65 \text{ nm}^2$ と $l_{PC} = 1.76 \text{ nm}$ である (Fig. 2.7 参照)。このとき、分子鎖長は、C-C 結合長を 1.54 \AA 、C-C 結合角を $109^\circ 28'$ として算出した。直径 100 nm のリポソーム一個に含まれる脂質分子数は、リポソームの外表面積と内表面積の和を脂質分子一個分が占める面積で割ることによって算出できる。脂質組成比 DLPA/DMPC=0.5/0.5 または 0.1/0.9 のリポソーム一個に含まれる脂質分子の総数 N_{lipid} は、

(DLPA/DMPC=0.5/0.5 の場合)

$$N_{lipid} = \{4 \times \pi \times (50^2 + (50 - 2l_{PC})^2)\} / (0.5a_{PA} + 0.5a_{PC}) \quad (2.8)$$

(DLPA/DMPC=0.1/0.9 の場合)

$$N_{lipid} = \{4 \times \pi \times (50^2 + (50 - 2l_{PC})^2)\} / (0.1a_{PA} + 0.9a_{PC}) \quad (2.9)$$

となる。よってリン脂質 1 mol 当りに含まれるリポソームの個数 N_{lipo} は以下のようになる。

$$N_{lipo} = N_A / N_{lipid} \quad (2.10)$$

N_A : アボガドロ数

吸着には、 0.5 mM のリポソーム分散液を 1 mL 用いて行っており、系内の全リポソーム表面積 A は以下のようになる。

$$A (\text{cm}^2/\text{mL}) = 4 \times \pi \times (50 \times 10^{-7})^2 \times (N_{lipo} \times 5 \times 10^{-7}) \quad (2.11)$$

ここで、 $C_0 - C_i$ (g/mL) のキトサン全てがリポソームの表面に吸着したと仮定すると、吸着量は以下のように表すことができる。

$$W (\text{ng} / \text{cm}^2) = (C_0 - C_i) \times 10^9 (\text{ng} / \text{mL}) / A (\text{cm}^2 / \text{mL}) \quad (2.12)$$

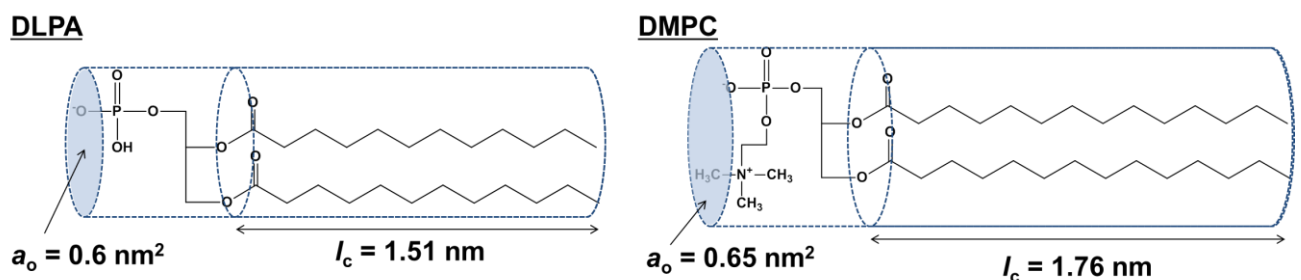


Fig. 2.7 Molecular models for DLPA and DMPC.

2.2.3.3 リポソーム表面へのポリマーの交互吸着によるリポナノカプセルの作製法

負電荷を帯びたリポソーム表面へ、静電相互作用により、バイオポリマーを交互に吸着 (layer-by-layer, LbL) し、多様なポリマー層 (ポリマーの種類、吸着量、吸着形態、層数) を有するリポナノカプセルを作製した (Fig. 2.8 参照)。

<liponano-CHI(50)の作製法>

MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.5) を用いて調製した 1000 ppm の CHI(50)溶液 500 μ L に、同じ緩衝液を用いて調製したリポソーム分散液 (リン脂質濃度; 1.0 mM) を 500 μ L 加えて、20°C、700 rpm の攪拌条件下で 30 分間吸着させた。また、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を用いて調製した 500 ppm の CHI(50)溶液 500 μ L に、同じ緩衝液を用いて調製したリポソーム分散液 (リン脂質濃度; 1.0 mM) を 500 μ L 加えて、20°C、700 rpm の攪拌条件下で 30 分間吸着させた。その後、それぞれ限外ろ過フィルター (Amicon Ultra-4, 分画分子量: 100000) を用いて、ろ過精製 (20°C, 3000 rpm, 2 min, 7 times) を行い、未吸着の CHI(50)を除去した。こうして作製したナノカプセルを liponano-CHI(50)とした。

<liponano-CHI(80)の作製法>

MES 緩衝液 (10 mM, pH4.5) を用いて、脂質組成比 DLPA/DMPC が 0.1/0.9 と 0.5/0.5 のリポソーム分散液の希釈を行い、リン脂質濃度をそれぞれ 1.0 mM に調整した。次に、MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.5) を用いて 460 ppm の CHI 溶液を 500 μ L 調製した。この CHI 溶液にリポソーム分散液 500 μ L を加えて、20°C、700 rpm の攪拌条件下で 30 分間吸着させた。その後、それぞれ限外ろ過フィルター (VIVA SPIN 20, 分画分子量: 300000) を用いて、ろ過精製 (20°C, 3000 rpm, 2 min, 10 times) を行い、未吸着の CHI(80)を除去した。こうして作製したナノカプセルを liponano-CHI(80)とした。

<liponano-CHI-DXS および liponano-CHI-DNA の作製法>

作製した liponano-CHI(80)分散液 500 μ L に、1000 ppm の DXS 溶液 (10 mM MES, pH 4.5) (Fig. 2.4 (b)参照) または 1000 ppm の DNA 溶液 (10 mM HEPES, pH 7.0) (Fig. 2.4 (c)参照) をそれぞれ 500 μ L 加えて、上記と同条件にて吸着させた後、精製を行った。得られたナノカプセルをそれぞれ liponano-CHI-DXS と liponano-CHI-DNA と表した。上記の吸着と精製を繰り返すことで、さらに第三層および第四層目まで積層化させたナノカプセルを作製し、それぞれ liponano-CHI-DXS-CHI と liponano-(CHI/DXS)₂ と表した。

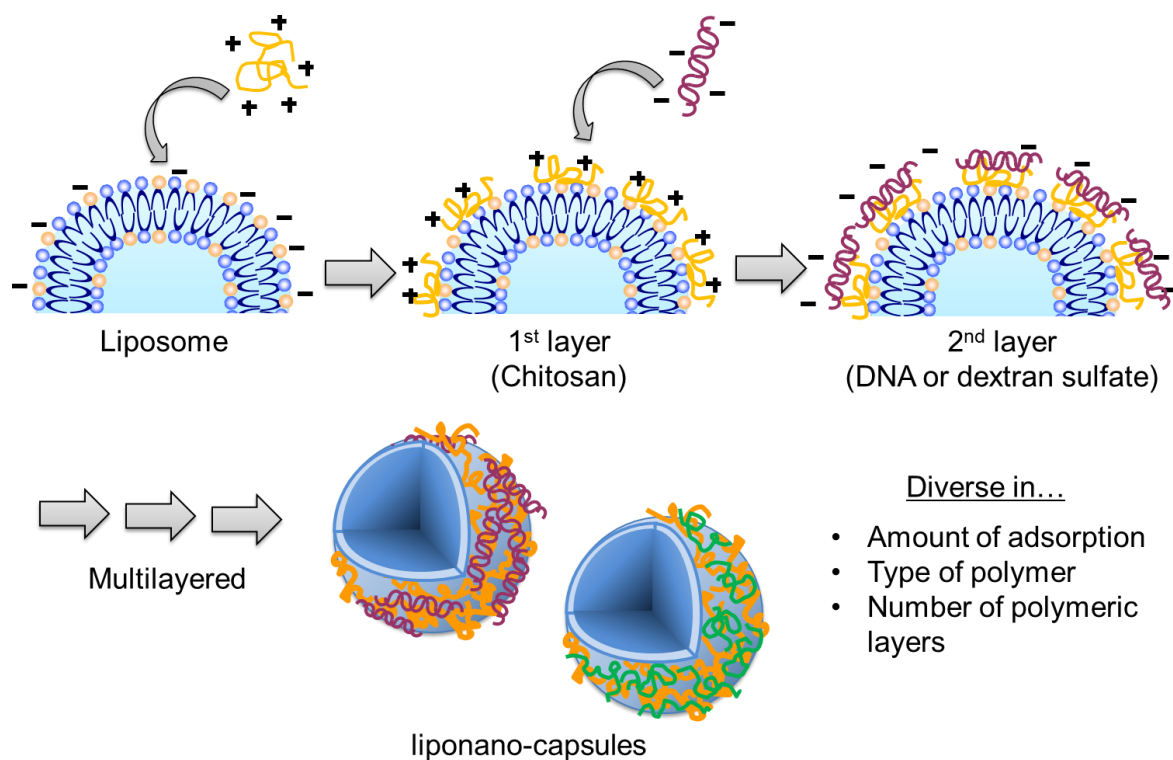


Fig. 2.8 Layer-by-layer deposition of biopolymers onto the surface of the liposome to produce various liponano-capsules.

2.2.3.4 動的光散乱法 (DLS) による粒径測定

2.2.3.3 項にて作製した liponano-CHI、liponano-CHI-DXS および liponano-CHI-DNA の水中粒径を動的光散乱法 (DLS) により測定した。実験操作また原理は、2.2.2.2 項で示した通りである。

2.2.3.5 透過型電子顕微鏡による形状観察

2.2.3.3 項で作製した liponano-CHI、liponano-CHI-DXS および liponano-CHI-DNA の形状観察を TEM (120 kV) を用いて行った。方法および原理は 2.2.2.3 項と同様であり、サンプルにあらかじめネガティブ染色を施すことでリポソーム由来のリン脂質膜の有無と形状について観察を行った。

2.2.3.6 ゼータ電位の測定

2.2.3.3 項にて作製した、liponano-CHI、liponano-CHI-DXS および liponano-CHI-DNA のゼータ電位を MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.5) 中と HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0) 中で測定した。測定方法および原理は 2.2.2.4 項と同様である。

2.2.3.7 界面活性剤 (Triton X-100) に対する膜安定性の評価

生体膜などに含まれる膜構成成分 (タンパク質など) を膜から分離することを可溶化という。可溶化には Triton X-100 のような非イオン性界面活性剤が用いられる。Triton X-100 は、生体膜やリポソームを構成するリン脂質と同じ両親媒性分子である。これをリポソーム分散液中に添加すると一部は気液界面へ、また一部はリポソーム二分子膜中に取り込まれる。しかし、Triton X-100 の臨界ミセル濃度 (cmc: 0.24

mM) 以上になると、界面活性剤同士が凝集してより安定な形態であるミセル構造を形成する。この時、脂質がミセル内に取り込まれ可溶化が起これることで、リポソームの二分子膜構造が崩壊し、リポソームの破壊が起きると考えられる。

本実験では、リポソームと種々のリポナノカプセルの Triton X-100 に対する膜安定性について以下の方法を用いて評価した。

<散乱強度測定>

2.2.1.2 項で作製したリポソーム分散液と 2.2.3.3 項で作製したリポナノカプセル分散液を作製時に用いた緩衝液 (10 mM MES, pH 4.5 or 10 mM HEPES, pH 7.0) で希釈することにより、リン脂質濃度が 0.05 mM の分散液をそれぞれ 2 mL 調製した。これらの分散液について 400 nm における散乱強度を分光蛍光光度計により 30 秒毎に 5 分間測定した。さらに、20 μ L の Triton X-100 (終濃度 0.01wt%) を 3 分毎に添加して測定を 20 分間行った。

<TEMによる観察>

2.2.1.2 項で作製したリポソーム分散液と 2.2.3.3 項で作製したリポナノカプセル分散液をリン脂質濃度 0.5 mM でそれぞれ調製し、これに 0.1wt% の Triton X-100 を加え、ネガティブ染色後 (2.2.2.3 項参照) に TEM によって観察した。

<可溶化に伴う封入物質の放出量の測定>

蛍光物質である HPTS を封入したリポソーム、liponano-CHI、および liponano-CHI-DXS を作製し (2.2.4.2 項参照)、リン脂質濃度 0.5 mM の分散液を調製した。これに対して 0.1wt% の Triton X-100 を加えて、超遠心分離 (4°C, 70000 rpm, 1 h, 5 times) を行って、上澄みの蛍光強度 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}=413$ nm/512 nm) を分光蛍光光度計により測定した。

2.2.4 リポナノカプセルへの種々の物質の封入および放出挙動の検討

2.2.4.1 試薬および溶液調製

薬品名	分子量	メーカー
hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonic acid (HPTS) (Fig. 2.9 (a))	524.4	Sigma-Aldrich
アレンドロン酸ナトリウム (sodium alendronate) (Fig. 2.9 (b))	325.12	LKT Laboratories, Inc
D(+)-グルコース (D(+)-glucose) (Fig. 2.9 (c))	180.16	和光純薬工業株式会社
dextran-FITC glucose assay kit	150000	Polymer Science Inc. BioVision
o-フタルアルデヒド (o-phthalaldehyde, OPA)	134.13	東京化成工業株式会社
2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol)	78.13	純正化学株式会社
ピレン (pyrene)	202.25	東京化成工業株式会社
ジフェニルヘキサトリエン (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, 98%, DPH)	232.33	Sigma-Aldrich

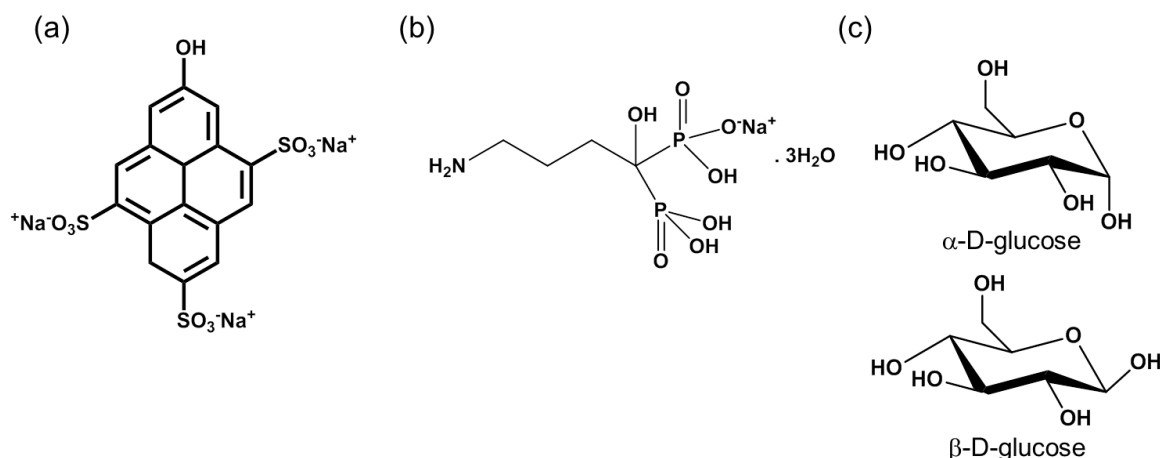


Fig. 2.9 Chemical structures of HPTS (a), sodium alendronate (b) and glucose (c).

2.2.4.2 リポナノカプセル内部への種々の物質の封入検討

低分子の封入物質として HPTS（蛍光物質、アニオン性）（Fig. 2.9 (a)参照）、sodium alendronate（骨粗しょう症治療薬、両性）（Fig. 2.9 (b)参照）、およびグルコース（中性）（Fig. 2.9 (c)参照）を、さらに高分子封入物質として dextran-FITC を選択し、これらをそれぞれナノカプセル内部に封入し、その放出挙動について検討した。以下にこれらの物質のリポソームへの封入方法を示した。

2.2.1.2 項と同様の方法より、DLPA/DMPC=0.5/0.5 のリン脂質組成からなる脂質フィルムを作製し、各封入物質を MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.5) を用いて Table 2.1 に示した濃度に調整し、その溶液をそれぞれ 1 mL ずつ加えて脂質フィルムを水和させた。凍結融解後、ポアサイズ 100 nm のメンブレンフィルターを用いてエクストルージョン法によってサイズ調節を行い、物質封入リポソームを作製した。低分子化合物を封入したりポソーム分散液は、MES 緩衝液 (10 mM, pH4.5) を溶離液としてゲルろ過 (Sephadex™ G-25 Fine) を行った後、超遠心分離 (4°C, 70000 rpm, 1 h, 5 times) を行った。Dextran-FITC を封入したりポソーム分散液は、限外ろ過フィルター (VIVA SPIN 20, 分画分子量: 300000) を用いて限外ろ過精製 (20°C, 5000 rpm, 5 min, 15 times) を行った。

これらの化合物を封入したりポソーム表面へ、2.2.3.3 項と同様の方法で、ポリマーを積層化することにより物質封入リポナノカプセルを作製した。

2.2.4.3 封入量の測定

0.5 mM のリン脂質濃度になるように調整したりポソーム分散液とリポナノカプセル (liponano-CHI、liponano-CHI-DXS、liponano-CHI-DNA) 分散液に、それぞれ Triton X-100 を終濃度が 0.1wt% になるように加えた後、超音波処理することでナノカプセルを溶解させた。この溶液を用いて式 (2.13) と以下に示した方法を用いて、物質の保持効率と封入量をそれぞれ算出した。

$$\text{保持効率 (\%)} = \text{リポソーム中の物質濃度 (mM)} / \text{仕込み時の物質濃度 (mM)} \times 100 \quad (2.13)$$

<HPTS と dextran-FITC の封入量測定>

ナノカプセルを溶解させた溶液の蛍光強度について、HPTS の場合には励起波長 413 nm と蛍光波長 512 nm で、dextran-FITC の場合には励起波長 497 nm と蛍光波長 520 nm にて分光蛍光光度計を用いて測定し、それぞれの物質の検量線より封入量を求めた。

<Sodium alendronate の封入量測定>

ナノカプセルを溶解させた溶液中の alendronate の濃度は OPA 法を用いて測定した。OPA はアルカリ性環境下で 2-メルカプトエタノールのような還元剤の共存下で一級アミンと反応し、蛍光性誘導体を形成する (Fig. 2.10 参照)。この反応は室温にて速やかに完結し、生成物の蛍光強度は 5-25 分間安定である。

まず、50 mM 四ホウ酸ナトリウムに 50 mM NaOH を加えて pH 9.5 に調整した。OPA と 2-メルカプトエタノールをそれぞれ 10 mg/mL と 5 μ L/ml となるようにエタノールに溶解させた。得られた四ホウ酸ナトリウム溶液 45 mL に OPA 溶液および 2-メルカプトエタノール溶液を 750 μ L ずつ加え、反応溶液とした。1935 μ L の反応溶液を量り取り、そこに 65 μ L のサンプル溶液を加え、遮光下 5 分間攪拌し、蛍光強度 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=340 \text{ nm}/455 \text{ nm}$) を分光蛍光光度計により測定した。また、マイクロプレートリーダー

Table 2.1 Types and concentration of encapsulated substances.

Substance	Concentration
HPTS	10 mM
Sodium alendronate	30 mM
Glucose	300 mM
Dextran-FITC	6.7 μ m

を用いる場合は、反応溶液 300 μL に 10 μL のサンプル溶液を加えて反応させた。

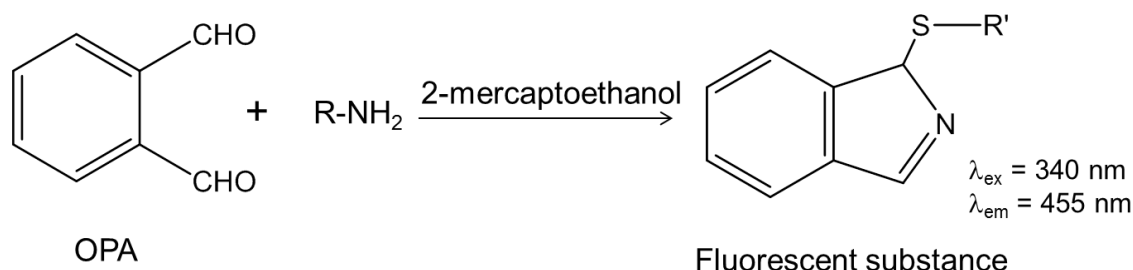


Fig. 2.10 Reaction scheme for OPA assay.

<グルコースの封入量測定>

ナノカプセルを溶解させた溶液中のグルコース濃度は glucose assay kit を用いて測定した。グルコースの測定には、①グルコースの還元力を利用する反応、②糖の酸性下における縮合反応、および③酵素反応を利用する三つの方法がある。ここで用いた Glucose assay は③酵素法を利用して、血清などの生体サンプル中のグルコースを高感度に検出するアッセイである。キットに含まれるグルコースオキシダーゼがグルコースを選択的に酸化し、その生成物が色素と反応することで 587 nm に蛍光を発する (λ_{ex} : 535 nm)。以下に測定法について述べる。

Glucose assay kit には、glucose assay buffer、glucose probe、および glucose enzyme mix が含まれている。まず、glucose probe と glucose enzyme mix をそれぞれ 220 μL の DMSO と 220 μL の glucose assay buffer に溶解させた。さらに、これらの希釈溶液を体積比で 1:1:23=glucose probe 希釈溶液: glucose enzyme mix 希釈溶液: glucose assay buffer で混合し、反応溶液とした。96 穴プレートへ 50 μL の反応溶液と 50 μL サンプル溶液を分注し、37°C で 30 分間反応させた。次に蛍光マイクロプレートリーダー (FP-6500, 日本分光) を用いて、蛍光強度 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 535/590 \text{ nm}$) を測定した。

2.2.4.4 リポナノカプセルの放出挙動の検討

2.2.4.2 項に述べたようにリポソームとリポナノカプセルに低分子化合物を封入し、それらの分散液を緩衝液中で透析することにより放出量の経時変化を測定した (Fig. 2.11 参照)。以下にそれぞれの測定法について示した。

<HPTS の放出量測定法>

0.5 mM のリン脂質濃度になるように調整したリポソーム分散液とリポナノカプセル (liponano-CHI, liponano-CHI-DXS) の分散液を 450 μL 分取し、Slide-A-Lyzer Mini Dialysis (分画分子量: 10000) を用いて、それぞれ 22.5 mL の MES 緩衝液 (10mM, pH 4.5) または HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) に対して 25°C で透析を行った。外液中に放出された HPTS の蛍光強度を分光蛍光光度計にて 3 日間測定することにより、HPTS 放出量の経時変化を測定した。

<Sodium alendronate の放出量測定法>

0.5 mM のリン脂質濃度になるように調整したリポソーム分散液とリポナノカプセル (liponano-CHI,

liponano-CHI-DXS, liponano-CHI-DNA)の分散液を 800 μ L 分取し、それぞれ 5 mL の MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.5) に対して 25°C で透析を行った。85 時間後に外液を採取し、OPA 法により alendronate 放出量を測定した。

<グルコースの放出量測定法>

0.5 mM のリン脂質濃度になるように調整したリポソーム分散液とリポナノカプセル分散液を 900 μ L 分取し、それぞれ MES 緩衝液 (10 mM, pH4.5) 中で 37°C、6 日間インキュベートした後、超遠心分離 (4°C, 70000 rpm, 50 min) を行い、上澄みから 500 μ L の溶液を採取した。採取した溶液を glucose assay kit を用いて測定し、放出されたグルコース濃度を算出した。

それぞれの物質の放出量は式 (2.14) より求めた。

$$\text{放出量 (\%)} = \text{外液中の物質質量 (mol)} / \text{最初にリポソームに封入させた物質質量 (mol)} \times 100 \quad (2.14)$$

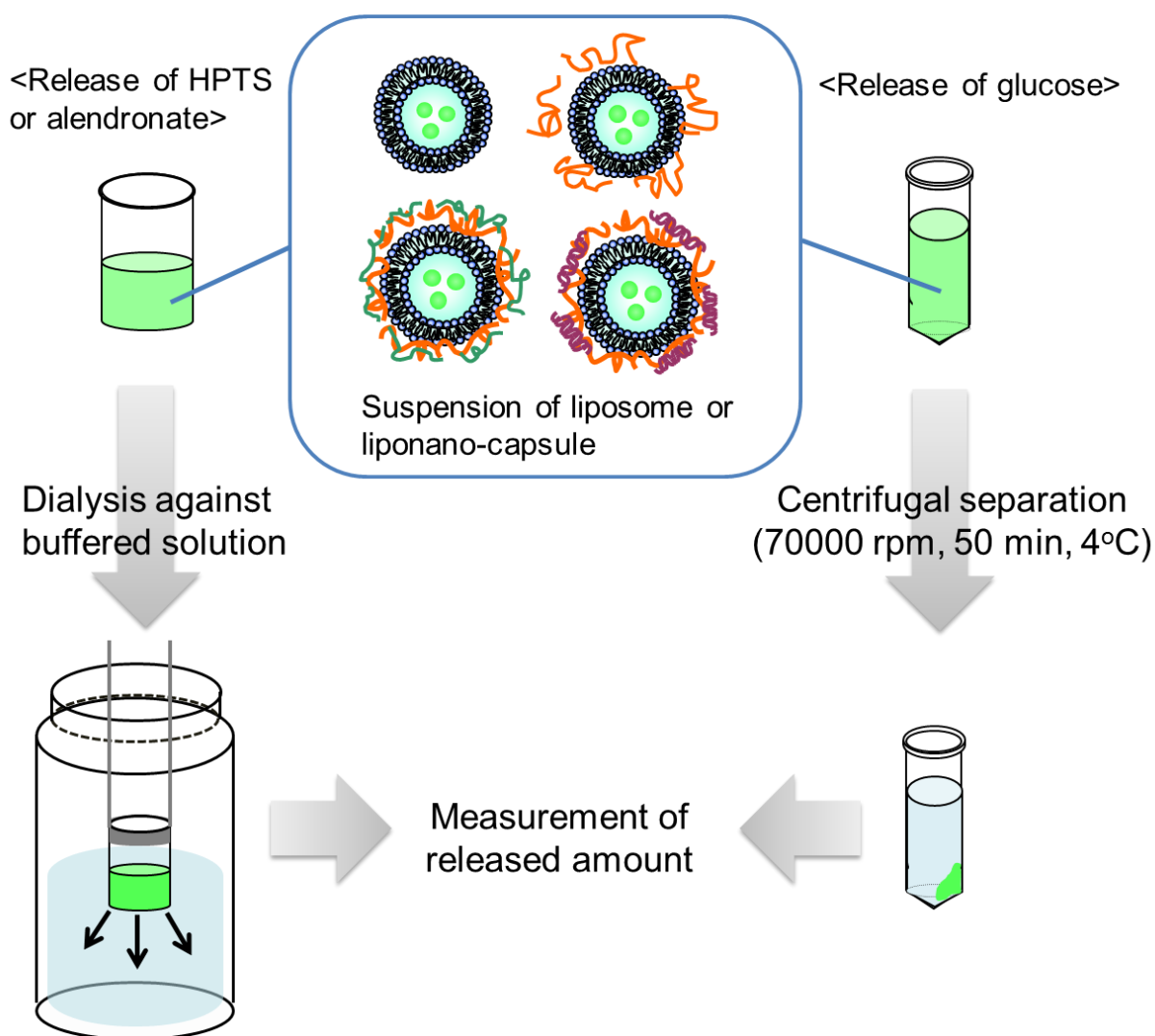


Fig. 2.11 Experimental procedure for measurement of released amount of substances.

2.2.4.5 リポナノカプセルの膜流動性の測定

生体膜などの脂質膜は、液晶状態をとっており、分子軸の配向方向に長距離規則性を示し、液体と結晶の両方の挙動を示す。この液体のような性質を流動性と言う。脂質膜の流動性は、生体膜の物質透過、相転移、薬物輸送、膜融合、発生などにおいて重要となる特性の一つである。脂質分子の移動や拡散には、二次元方向への移動である側方拡散 (lateral diffusion)、膜内での異方性回転軸運動 (anisotropic axial rotation)、および二分子膜の片面からもう一方の面へ脂質が移動するフリップフロップ (flip flop) の三種類がある。このように多くの因子から成る“膜流動性”を一つのパラメーターで表すことは難しいため、蛍光分子の動きに関連する測定を行うことによって数値化することが行われている。測定法としては、蛍光分子の動きをみる蛍光分析法、核磁気共鳴分光法 (NMR)、電子スピン共鳴 (ESR)、赤外分光、ラマン分光などが挙げられる。本実験では、以下に示した蛍光分析法を用いてリポソームとリポナノカプセルの膜流動性の測定を行った。

<Pyrene を用いた膜流動性の測定>

Pyrene は疎水性の強い物質であり、リポソームや生体膜に作用させると、脂質分子の炭素鎖部分に配向する。Pyrene は単量体 (monomer) で存在すると 342 nm で励起され、386 nm で極大蛍光波長を持つ。しかし、pyrene 同士で会合し、excimer となると極大波長が長波長側にシフトし、480 nm となる (Fig. 2.12 参照)。一定濃度の pyrene が脂質に溶けている場合には、excimer 形成速度はそれらの衝突速度に比例する。これは、excimer 形成は脂質分子の拡散速度によって決まることを意味する。従って、monomer の蛍光強度 I_M に対する excimer の蛍光強度 I_E の比 (I_E/I_M) を膜流動性の指標とすることができる。

1 mL のリポソーム分散液 (リン脂質濃度 1 mM, DLPA/DMPC=0.5/0.5, 10 mM MES, pH4.5) に対して 10 mM の pyrene エタノール溶液を 10 μ L 加え、37°C で 1 時間インキュベートし、超遠心精製 (4°C, 70000 rpm, 1 h) を行った。このリポソームに対して 2.2.3.3 項と同様に CHI(80) を吸着させて liponano-CHI(80) を作製した。これらの蛍光強度比 (I_E/I_M) を 25°C から 70°C の間で 10°C 毎に分光蛍光光度計にて測定した。

<蛍光偏光解消法による膜流動性の測定>

分子運動性に関する情報を得るための蛍光分析に偏光解消法がある。液体中の蛍光分子が平面偏光により励起されると、同一の偏光平面で蛍光を放射する。しかし、励起された蛍光分子が回転などの運動を行った場合には、励起平面とは異なった平面へ蛍光を放射し、蛍光偏光が解消される。つまり、蛍光分子の運動性が上がるほど、蛍光偏光は解消されて偏光度は小さくなる。これを利用し、脂質膜内にあらかじめ蛍光物質を導入し、偏光している入射光を照射して蛍光の偏光度を測定することにより、蛍光物質近傍の膜の状態を測定することができる。この偏光度 P (degree of polarization) は、励起光平面に

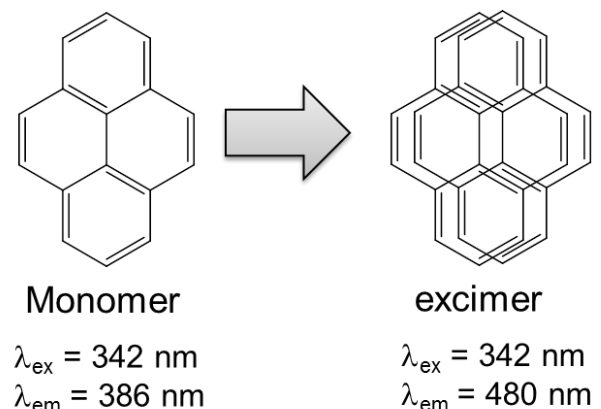


Fig. 2.12 Excimer formation of pyrene.

垂直な蛍光の強度（垂直偏光成分） I_V と平行な蛍光の強度（水平偏光成分） I_H を用いて式（2.15）のように表される。

$$P = (I_V - I_H) / (I_V + I_H) \quad (2.15)$$

本実験では、蛍光プローブとして DPH を用いた（Fig. 2.13 参照）。DPH は、脂質に溶解することで蛍光を発する物質で、分子吸光係数が大きく、量子効率も高いので、リン脂質に対して少量で感度よく測定できる。長い棒状の分子であるため、DPH はその長軸方向を脂質分子に平行直角になるように配向して、脂質分子の変化に敏感に応答することができる^{18, 19)}。

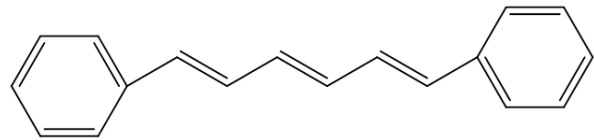


Fig. 2.13 Chemical structure of DPH.

リポソーム分散液（DLPA/DMPC=0.5/0.5）に DPH のエタノール溶液（1 mM）を、モル比がリン脂質：プローブ=200:1 となるように加え、50°C にて 30 分間インキュベートすることにより、リポソームの脂質膜に DPH を導入した。さらにこの DPH 導入リポソームを用いて、2.2.3.3 項と同様な方法で種々のリポナノカプセルを作製した。得られたリポソームおよびリポナノカプセルの分散液の P 値について 20°C から 55°C までの温度変化を、自動偏光測定ユニット（ADP-303、日本分光）を用いて測定した。

2.2.5 DNA の融解挙動を利用した放出スイッチング機能の検討

2.2.5.1 さけの精巢由来 DNA の融解挙動の検討

ポリペプチド、タンパク質、核酸などの生体高分子の紫外スペクトルの多くは、その立体構造の変化にともなって大きく変化する。核酸の 260 nm における吸収強度は二重螺旋およびランダムコイルでは異なる。これは、淡色効果（吸収強度が減少する）および深色効果（吸収強度が増加する）といい、DNA の二重らせん構造の変化によって、ポリヌクレオチド鎖の軸に直角に並んだ塩基に由来する遷移モーメントが変化することに由来する²⁰⁾。

さけの精巢由来 DNA を 100 ppm となるように HEPES 緩衝液（10 mM, pH 7.0）に調製し、260 nm における吸光度の温度変化を 10°C から 80°C 間で 10°C 毎に紫外可視分光光度計（U-2001, HITACHI）を用いて測定し、融解温度（ T_m ）を決定した。

2.2.5.2 異なる温度条件下におけるリポナノカプセルの放出挙動の検討

2.2.4.4 項に示した方法を用いて、リポソームとリポナノカプセル（liponano-CHI, liponano-CHI-DXS, liponano-CHI-DNA）からの HPTS の放出挙動を 25°C と 60°C において検討した。

2.2.5.3 ナノカプセル表面からの DNA 脱着の確認

<ゼータ電位測定による脱着の検討>

2.2.3.3 項と同様に liponano-CHI-DNA を作製し、25°C または 60°C において 20 時間インキュベートした。これを HEPES 緩衝液（10mM, pH 7.0）中で 25°C において 2.2.2.4 項に示した方法でゼータ電位を測定した。

<吸光度測定による脱着量の測定>

2.2.3.3 項と同様に liponano-CHI-DNA を作製し、25°C または 60°C において 20 時間インキュベートした後、超遠心分離 (70000 rpm, 45 min) を行い、ナノカプセルを沈降させた。上澄みの溶液の 260 nm における吸光度を紫外可視分光光度計により測定し、DNA の脱着量を算出した。

2.2.6 共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡による骨のモデルへの集積能の検討

<共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) の原理 : >

共焦点レーザー走査型顕微鏡法は、ある厚みを持った試料中の特定の X-Y 断面に焦点を合わせ、同時にその上下の焦点が合っていない部分からの光を排除しながら観察する手法である。よって、試料の切片像を無侵襲で得られるため、細胞や組織を生きのまま精細に観察することができる。また、複数の Z 軸座標における X-Y 断面の光学的切片像をコンピューターに取り込み、再構築することによって3次元画像を得ることも可能である。

共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡では、観察試料に蛍光物質の励起波長に適合した波長をもつレーザー光を照射し、試料からの蛍光発光を検出する。対物レンズの焦点に収束した照明光は、そこから発した蛍光を、対物レンズが集めて結像させる。この結像位置に合わせてピンホールを置く (このとき光源、試料内の対物レンズの焦点、ピンホールの3か所

が光学的に共役な位置にあることから共焦点と呼ばれる)。ピンホールに結像した光はそこを通過し、検出器で電気信号に変換される。一方、試料内の焦点から外れた場所は、励起強度が焦点位置に比べて低いため、発せられる蛍光強度が弱い。またその蛍光はピンホールとは外れた位置に結像するため、検出器に届きにくい。

<実験方法>

本項では、リポソーム、liponano-CHI、liponano-CHI-DXS、および liponano-CHI-DNA の四種類のナノカプセルについて HAp 粉体 (hydroxyapatite, DNA GRADE Bio-Gel HTP Gel, Bio-Rad) への集積能の検討を行った。2.2.4.2 項の方法によって dextran-FITC を封入させたリポソームを用いて、2.2.3.3 項の方法で種々のリポナノカプセルを作製した。まず、HAp 粉体 (3 mg) を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0)

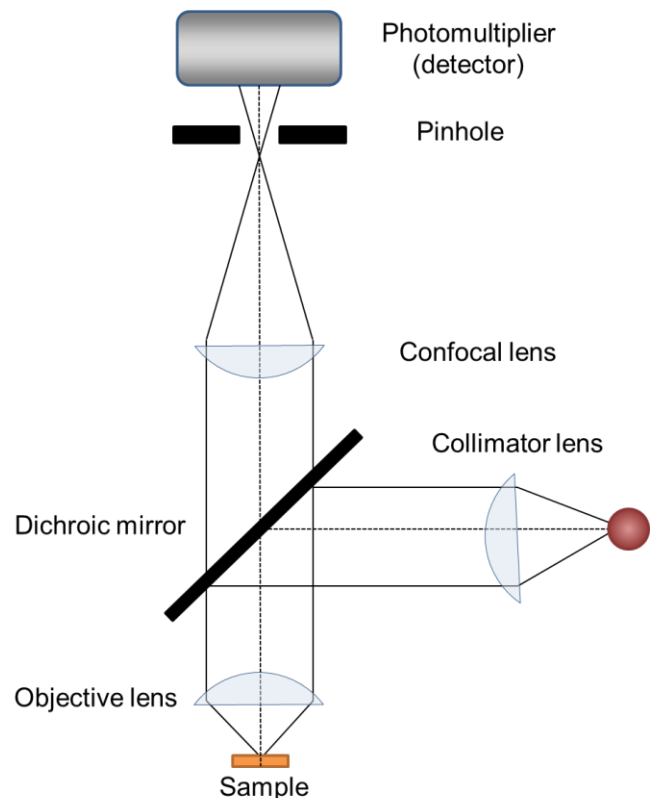


Fig. 2.14 Schematic illustration of a confocal laser scanning microscope.

によって平衡化（遠心精製; 15000 rpm, 2 min, 4 times）し、HAp 粉体内部へ溶媒を浸透させた。これに、リン脂質濃度が 0.107 mM になるように調整したリポソームあるいはリポナノカプセルの分散液（10 mM HEPES, pH7.0）を 500 μ L 加え、回転盤にて 24 時間攪拌した。これらをスライドガラス（MATSUNAMI SLIDE GLASS 76 \times 26mm, Thickness 0.8-1.0mm）に滴下し、カバーガラスを乗せ、共焦点レーザー走査型顕微鏡（Radiance 2000, BIO-RAD）によって観察した。

2.3 結果および考察

2.3.1 負電荷リポソームの作製およびキャラクタリゼーション

2.3.1.1 動的光散乱法（DLS）による粒径測定

Table 2.2 に種々の条件で作製したリポソームの水中粒径を示す。ポアサイズが 100 nm のフィルターを用いてエクストルージョン法で作製したため、再現性良く 100 nm 付近の水中粒径を持つリポソームを得ることができた。

2.3.1.2 透過型電子顕微鏡による形状観察

Fig. 2.15 に作製したリポソームの TEM および cryo-TEM 写真を示す。TEM 写真において、白い部分はリン脂質二重膜である。エクストルージョン前のリポソームは、サイズも大きく、リン脂質膜が多層構造となっていることがわかるが、エクストルージョン後のリポソームは、球状で、サイズが比較的均一であり、脂質二重層が一層であることがわかった。

2.3.1.3 リポソームのゼータ電位の測定

本研究では、静電相互作用を利用してリポソーム表面へポリマーの積層化を行うため、下地となるリポソームの表面電位は重要なファクターである。Table 2.2 に種々の条件で作製したリポソームのゼータ電位を示す。どの条件においてもリポソームは、構成脂質である DLPA のリン酸基由来である負電荷を帯びていることがわかった。DLPA の含有量が多いほど、ゼータ電位の絶対値は大きくなった。また、pH が高い場合においてはリン酸基が解離するため、その絶対値が大きくなることがわかった。

Table 2.2 Hydrodynamic diameters and ζ -potentials of liposomes produced at different lipid ratios and pH.

DLPA/DMPC	0.1/0.9	0.5/0.5	
pH	4.5	4.5	7.4
ζ -potential /mV	-55.3	-94.3	-118.9
Hydrodynamic diameter /nm	100.4 \pm 15.3	111.6 \pm 16.5	106.1 \pm 9.5

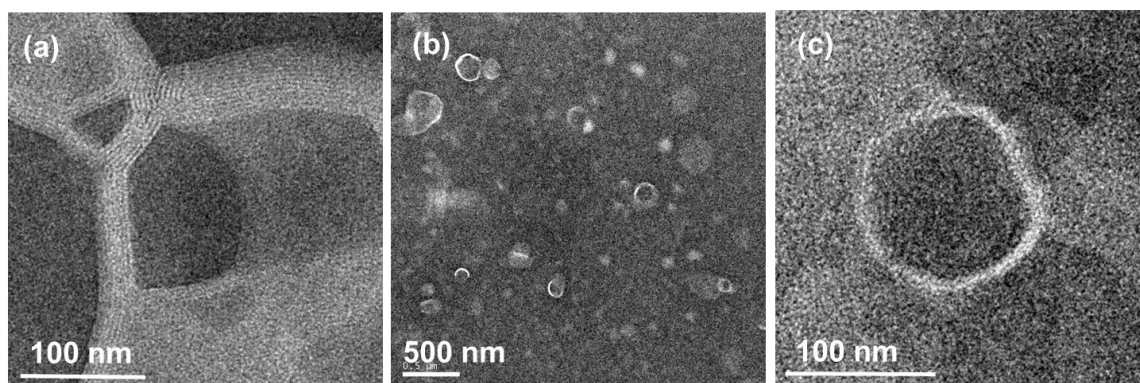


Fig. 2.15 TEM images of liposomes prepared by an extrusion process. A multi-layered vesicle (MLV) (a) was changed into spherical and unilamellar structures ((b) and (c)) by membrane extrusion.

2.3.2 リポナノカプセルの作製およびキャラクタリゼーション

2.3.2.1 リポソーム表面に対する CHI(50)の吸着および評価

リポソーム表面へのポリマーの交互積層化に先立ち、第一層目である CHI のリポソームへの吸着等温線を作製した。pH 4.5 および pH 7.4 におけるリポソーム表面への CHI(50)の吸着等温線を Fig. 2.16 に示す。pH 4.5 では鋭い立ち上がりの後に平衡に達する、高親和型の単分子層吸着 (Langmuir 型吸着) を示した。また、pH 7.4 では吸着は抑制され、ゆるやかな立ち上がり後、pH 4.5 に比べて低い吸着量で平衡に達する様子が見られた。濃度が 80 ppm 付近において、吸着量が低下したのは、ナノカプセル間の凝集が起こったためと考えている。リポソームと CHI の相互作用は、静電相互作用と糖とリン脂質頭部との水素結合によるものと考えられている²¹⁾。pH 4.5 では、リン酸基由来のリポソーム表面は Table 2.2 に示したように十分に負電荷を帯びている。さらに、CHI の pKa は約 6.5 であることから、pH 4.5 ではキトサンのアミノ基量の多くがプロトン化されて正電荷を帯びている。そのため、負電荷を帯びたリポソーム表面と静電相互作用が強く働いて吸着量が多くなったと考えられる。一方、pH 7.4 では CHI 由来の正電荷が減少して、静電相互作用が低下して吸着が抑制されたと考えられる。

pH 4.5 と 7.4 にて作製した、liponano-CHI(50)の水中粒径はそれぞれ、 166 ± 19 nm、 121 ± 21 nm となった。Table 2.2 に示した下地のリポソームの粒径と比較すると、CHI の吸着に伴って粒径が増大した。これはリポソーム表面に CHI 層が形成されたことを示しており²²⁾、これはナノカプセルの立体安定化に寄与すると考えられる。さらに、CHI(50)の吸着量が多いほど、粒径が増大する傾向が見られた。作製した liponano-CHI(50)の表面電位の pH 変化を Fig. 2.17 に示す。どちらも pH が下がるほど、表面に吸着した CHI(50)のアミノ基のプロトン化が進むため、ナノカプセルの表面電位は上昇した。ここでも、吸着量が多いほど表面電位の増加が見られた。しかし、どの条件においても、ナノカプセル表面は負電荷のままであり、CHI 由来の正電荷へと反転する様子は見られなかった。これは、CHI(50)の DDA が低く、吸着した表面のアミノ基量が少ないことが考えられる。そこで、DDA と分子量の高い CHI(80)を用いて、リポソーム表面への吸着を試みた。

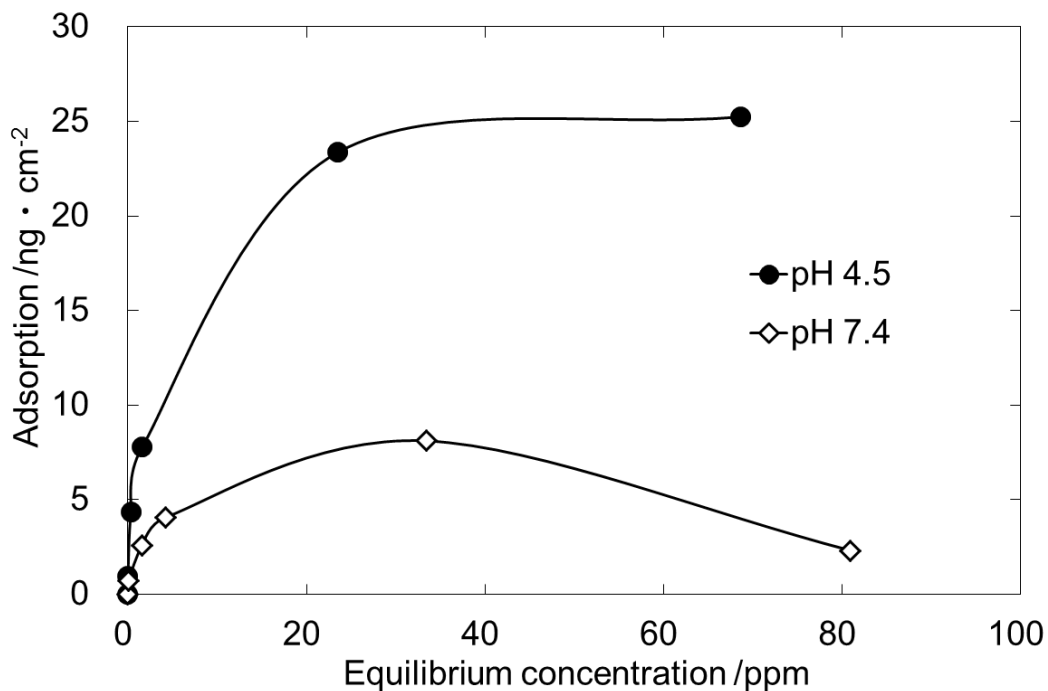


Fig. 2.16 Adsorption isotherms of CHI onto liposomes at pH 4.5 (closed symbol) and 7.4 (open symbol).

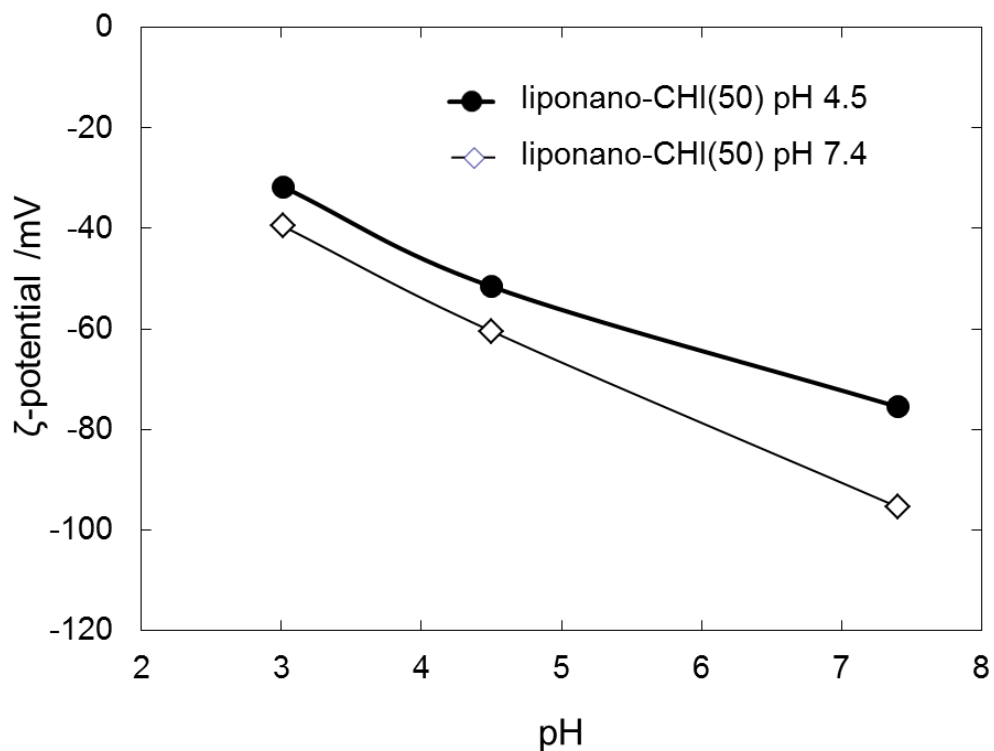


Fig. 2.17 Zeta-potentials of liponano-CHI(50) produced at pH 4.5 (closed symbol) and pH 7.4 (open symbol).

<CHI(80)の吸着等温線>

異なる脂質組成を持つリポソーム (DLPA/DMPC=0.5/0.5 or 0.1/0.9) への CHI(80) の吸着等温線 (pH 4.5) を Fig. 2.18 に示す。DLPA/DMPC=0.5/0.5 では鋭い立ち上がりの後に平衡に達することから、高親和型の単分子層吸着 (Langmuir 型吸着) を示すことがわかった。また、DLPA の含率を低くすると吸着量が大幅に抑制された。これは、酸性リン脂質である DLPA が少ないため、負電荷が弱まり、CHI との間で静電相互作用が働きにくくなったためだと考えられる。

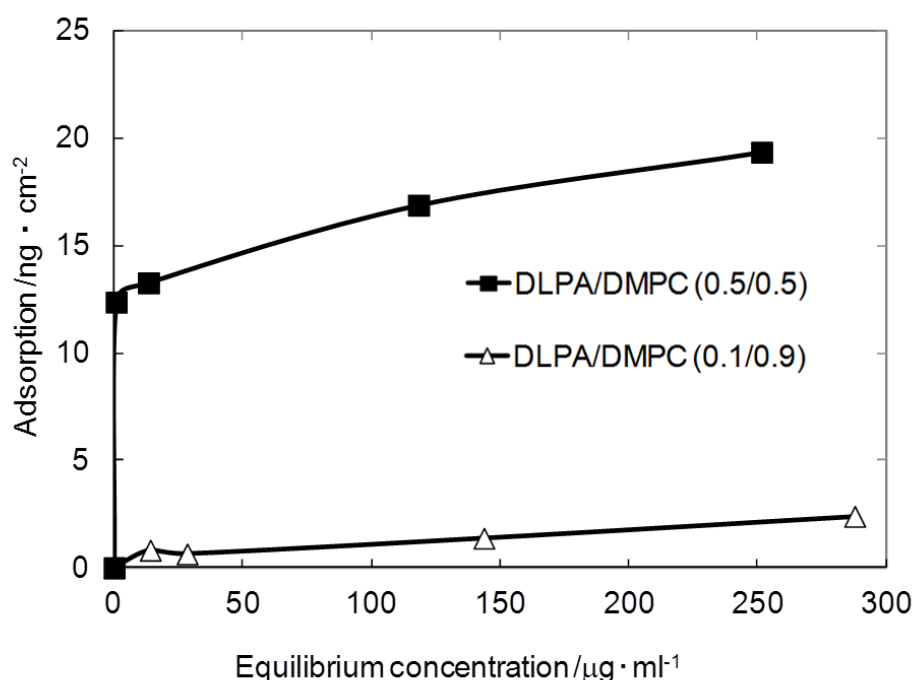


Fig. 2.18 Adsorption isotherms of CHI onto liposomes with different phospholipid compositions at pH 4.5.

Table 2.3 に pH 4.5 および 7.4 における liponano-CHI(80) の水中粒径およびゼータ電位を示す。pH を 4.5 から 7.4 にすると粒径が約半分まで減少した。pH 4.5 では表面層を形成している CHI のアミノ基がプロトン化して広がった状態であるが、pH が上昇すると脱プロトン化によって CHI が収縮してしま

ったためだと考えられる。liponano-CHI(50)とは異なり、ゼータ電位はどちらの pH においても正の値をとるようになった。これは CHI(50)に比べて CHI(80)の DDA が高いため、ナノカプセル表面へのアミノ基の導入量が増加したことによると考えられる。また、pH を高くすると表面電位が 96.4 mV から 12.5 mV へと減少した。これも吸着した CHI のアミノ基の脱プロトン化によるものと考えられる。

以上のように、ナノカプセル表面が CHI 由来の正電荷を呈するようになったため、以降のリポソーム表面への交互積層化には主として CHI(80)を用いることとした。さらに、断らない限り、CHI(80)の吸着は DLPA/DMPC = 0.5/0.5 および pH4.5 の条件で行い、CHI の濃度は良好な分散安定性を示した濃度である 230 ppm とした。

Table 2.3 Hydrodynamic diameters and ζ -potentials for liponano-CHI(80)

pH	4.5	7.4
Hydrodynamic diameter /nm	243 \pm 34	124 \pm 31
ζ -potentials /mV	96.4	15.5

2.3.2.2 リポナノカプセルの水中粒径および形状観察

ポリマーの積層化の際は、リポソーム間の架橋に伴って、ナノカプセルが凝集を起こしやすい。これは、吸着初期やポリマーが低濃度の場合には表面に未吸着部位が残されるため、電荷の相殺により粒子が近づきやすくなることによる。従って、本実験では、吸着時の pH、温度、吸着時間、吸着質濃度、塩濃度などの条件を制御することによって、凝集を抑制して均一なリポナノカプセルの作製を行った。得られた種々のリポナノカプセル

(liponano-CHI, liponano-CHI-DXS, liponano-CHI-DXS-CHI, liponano-(CHI/DXS)₂, liponano-CHI-DNA) の水中粒径を Table 2.4 に示す。これらの吸着においては、それぞれのナノカプセル表面を密にポリマーが覆うように濃度と pH を調節することにより、凝集を抑制した状態でナノカプセルの作製を行った。得られたリポナノカプセルの水中粒径は 115-260 nm であり、サイズ分布はあるもののナノカプセルが凝集せずに単独で分散していることがわかった。さらに作製したリポナノカプセルの TEM 写真を Fig. 2.19 に示す。ポリマー積層化後もすべて球状を保っており、脂質膜由来の白いリングが観察されたことから、リポナノカプセルはすべてリポソーム由来の中空構造を保持していることが確認された。

Table 2.4 Hydrodynamic diameters of various liponano-capsules.

liponano-capsule	Hydrodynamic diameter/ nm
liponano-CHI	243±34. nm
liponano-CHI-DXS	147±28 nm
liponano-CHI-DXS-CHI	260±58 nm
liponano-(CHI/DXS) ₂	115±23 nm
liponano-CHI-DNA	204±40 nm

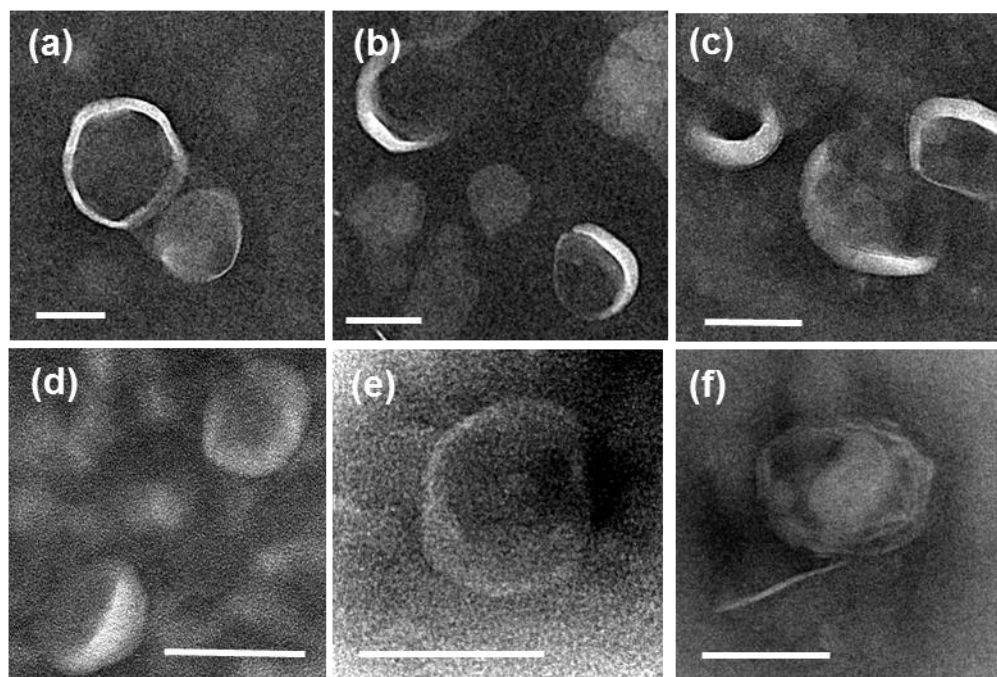


Fig. 2.19 TEM images of a parent liposome (a), liponano-CHI (b), liponano-CHI-DXS (c), liponano-CHI-DXS-CHI (d), liponano-(CHI/DXS)₂ (e) and liponano-CHI-DNA (f). All scale bars are 100 nm.

2.3.2.3 リポナノカプセルのゼータ電位の測定

リポソーム表面にポリマーが積層化されれば、リポナノカプセルの表面電位は最表面に存在するポリマー由来となるはずである。Fig. 2.20 にリポソーム表面へ CHI と DXS を交互に吸着させたときの表面電位の変化を示した。CHI と DXS を交互に吸着すると、リポナノカプセルの表面電位も正と負で交互に反転した。pH 7.0 にて測定した liponano-CHI-DNA の表面電位は、-78.7 mV となり、DNA 由来の負電荷を帯びていることを確認した。このようにリポソーム表面へ多糖や核酸など種々の生体ポリマーを積層化させることにより、多様なカプセルウォールを有したリポナノカプセルを作製することができた。

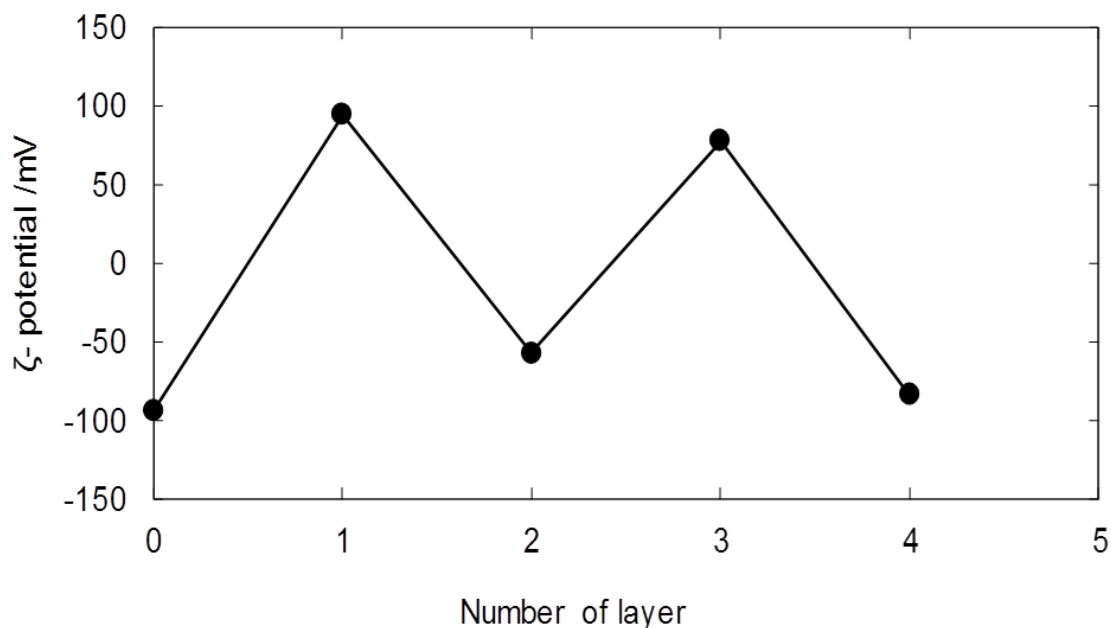


Fig. 2.20 Change in ζ -potentials of liponano-capsules with alternative depositions of CHI and DXS onto the liposome.

2.3.2.4 界面活性剤 (Triton X-100) に対する膜安定性の評価とカプセルウォール形成の確認

通常のリポソームは、リン脂質分子間に働く疎水性相互作用や分散力をはじめとする弱い相互作用によりその小胞体構造を維持しており、攪拌などの機械的あるいは界面活性剤などの化学的刺激に弱い。そこで、多糖や核酸のようなポリマーからなるカプセルウォールを形成させることにより安定性の向上が期待される。Fig. 2.21 にリポソーム、pH 4.5 で吸着を行った liponano-CHI(50)(pH 4.5)、および pH 7.4 で吸着を行った liponano-CHI(50)(pH 7.4)の分散液にそれぞれ Triton X-100 を添加した際の散乱強度の変化を示す。括弧内の pH は吸着時の条件を表している。リポソーム分散液に 3 分毎に Triton X-100 を加えていくと、急激に脂質膜の可溶化が起こり、散乱強度が大きく減少し、最終的には 0% 近くまで達した。一方、CHI(50)の吸着量が多い liponano-CHI(50)(pH 4.5)では、Triton X-100 の添加に伴って若干の散乱強度の低下が見られたが、高い散乱強度を保っていた。また、吸着量の少ない liponano-CHI(50)(pH 7.4)では、大きな散乱強度の低下が見られた。さらに、Fig. 2.22 にリポナノカプセル (liponano-CHI, liponano-CHI-DXS) 分散液に対して Triton X-100 の添加に伴う散乱強度の変化を示す。両者とも、わずかな散乱強度の減少がみられたが、比較的高い数値を維持していた。これらのことより、リポソーム表

面へポリマーを被覆することにより、界面活性剤に対する膜安定性（膜溶解に対する耐性）が向上したことがわかった。また、その膜安定性は、CHI の吸着量により変化することを見出した。さらに、散乱強度変化はポリマー層の数に依存しなかったことから、一層の吸着でも十分に脂質膜が安定化されたことがわかる。CHI はリポソーム表面へ静電的に吸着することによってゲル相を安定化し、界面活性剤による脂質二重層の崩壊を抑制したと考えられる。さらにリポソーム、liponano-CHI、および liponano-CHI-DXS 分散液にそれぞれ 0.1wt% の Triton X-100 を添加してインキュベートした後、TEM による観察を行った。リポソームでは、中空構造は観察されず、脂質膜由来の白い帯状のものが観察され、脂質膜の崩壊が示唆された。一方、liponano-CHI と liponano-CHI-DXS では脂質膜がリング状で観察され、カプセル構造を維持したままであることが確認された (Fig. 2.23 参照)。また、ナノカプセルからの封入物質の漏れの確認を行ったところ、Triton X-100 の添加により、リポソーム、liponano-CHI、および liponano-CHI-DXS の内部からそれぞれ 87、85、77% の HPTS が漏れたことがわかった。このことより、リポナノカプセルでは形状は保持されるものの、Triton X-100 処理によって低分子物質が透過できる程度の脂質膜の構造破壊が起きていると考えられる。

以上より、リポソーム表面へポリマー層を構築することによって、カプセルウォールが形成されていることが確認できた。

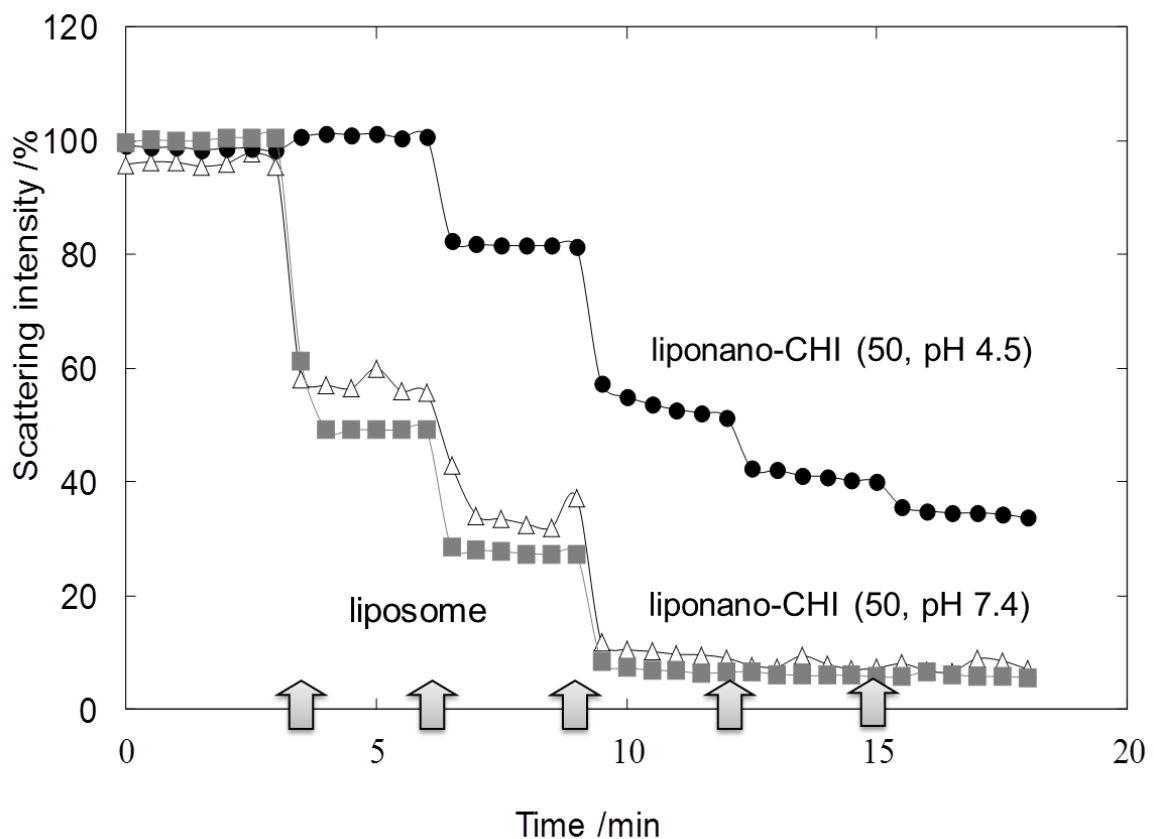


Fig. 2.21 Changes in scattering light intensity of the suspensions of liponano-CHI(50) produced at different pH. Triton X-100 was added at 25°C at each time of the arrows.

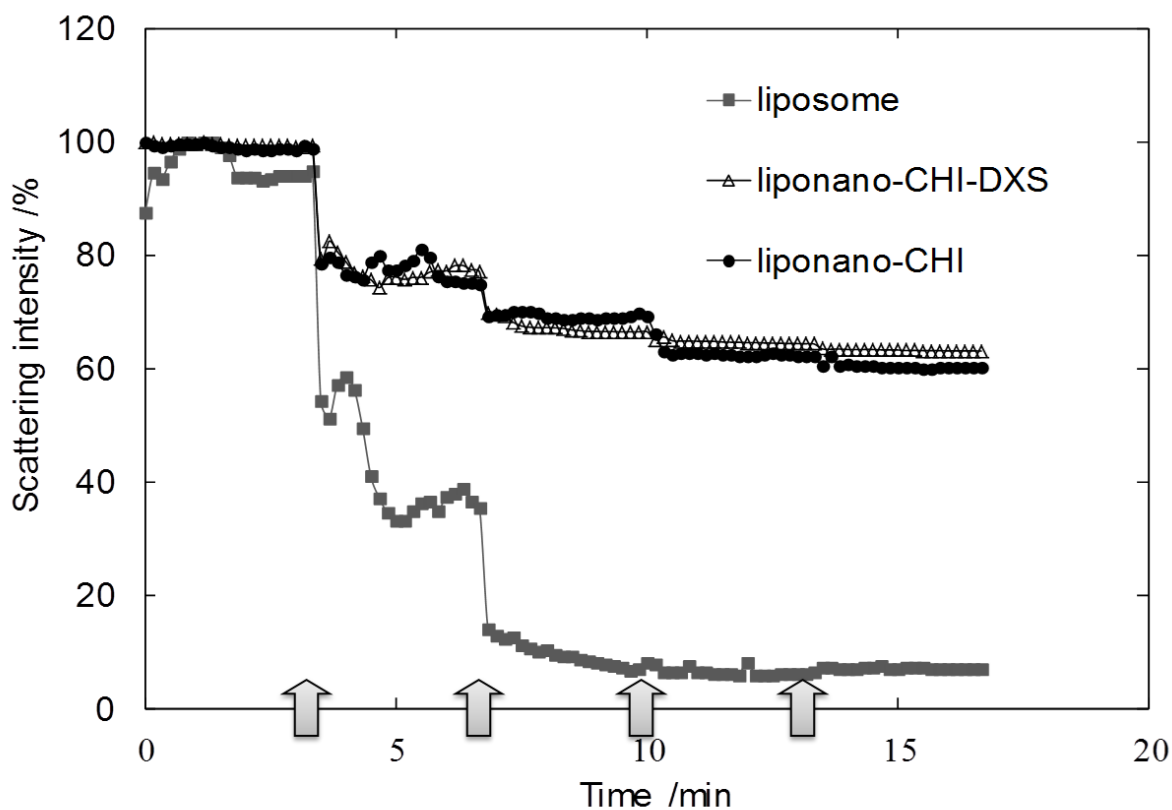


Fig. 2.22 Changes in scattering light intensity of the suspensions of nanocapsules with different numbers of layers. Triton X-100 was added at 25°C at each time of the arrows.

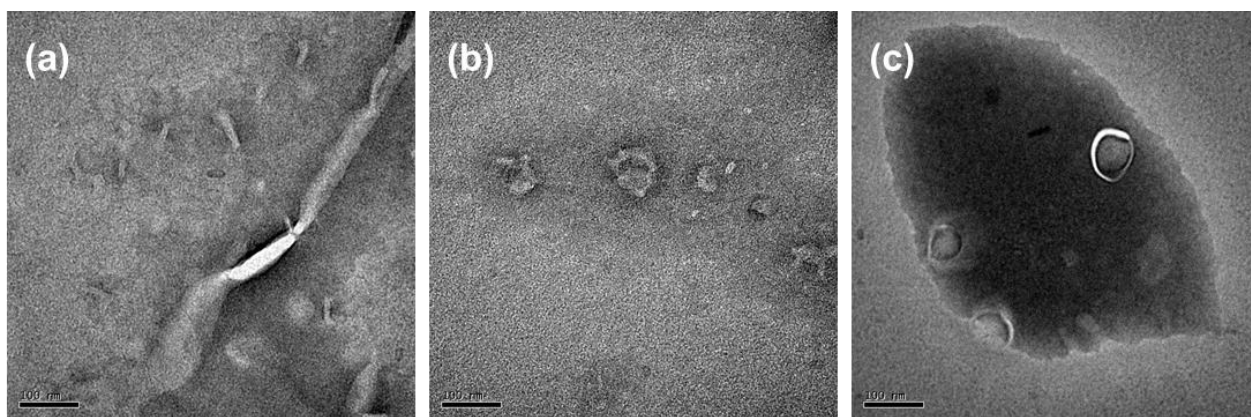


Fig. 2.23 TEM images of a parent liposome (a), liponano-CHI(80) (b), liponano-CHI-DXS (c) after the addition of 0.1wt% Triton X-100. All scale bars are 100 nm.

2.3.3 リポナノカプセルへの種々の物質の封入および放出挙動の検討

2.3.3.1 種々の物質の封入量

リポソームへの物質の封入は、生体膜モデルとして膜透過、膜損傷、膜融合などの研究、細胞とリポソームとの相互作用の研究、薬物キャリアとしての研究などにおいて数多く行われてきた²⁾。本実験でもリポソーム内へ種々の薬物を封入し、その保持効率と封入量を算出した(2.2.4.3 参照)。リポソーム内への封入量は、封入物質の分子量、リポソームのサイズや形態、封入部位(内水相、脂質膜)、封入方法などに依存する。本実験では凍結融解法を用いてリポソームの内水相への物質封入を行った。凍結融解法では脂質膜の融合および物質の濃縮が起こるため、効率よく物質を封入できる(2.2.1.2 項参照)。リン脂質濃度を10 mMとしたときのリポソームとリポナノカプセルへの物質の封入量および保持効率の結果をそれぞれ Table 2.5 に示す。リポソームに比べてリポナノカプセルの方が封入量が低下している。これは、リポソーム表面へのポリマーの吸着過程と精製過程において封入物質が漏れてしまったためであると考えられる。特に封入物質が HPTS およびグルコースといった低分子の場合には、リポナノカプセルの封入量はリポソームの 1/2-1/4 程度にまで低下した。

次にリポソームとリポナノカプセルからの封入物質の放出量を測定した。

Table 2.5 Encapsulation efficiency of various substances into the liposome and liponano-capsules. The numbers in the brackets represent encapsulation efficiencies.

	HPTS	Alendronate	Glucose	Dextran-FITC
Liposome	0.10 mM (1.28 %)	0.34 mM (1.10%)	1.12 mM (0.36 %)	0.55 mM (8.21%)
Liponano-CHI	0.10 mM	0.40 mM	0.30 mM	0.55 mM
Liponano-CHI-DXS	0.06 mM	0.37 mM	0.32 mM	-
Liponano-CHI-DNA	0.05 mM	0.26 mM	-	-

2.3.3.2 リポナノカプセルの放出挙動の検討

これまでに、リポソームの内水相は、薬物、ペプチド、DNA など様々な生体関連物質の封入およびデリバリーなどに用いられてきた。しかし、脂質膜の流動性が高いため、低分子の封入物質を長時間保持することが難しい。一方、ポリマーを積層化したリポナノカプセルでは、封入量が低下するものの、封入物質の保持が期待できる。

透析法または遠心分離法を用いて、リポソームとリポナノカプセルからの物質放出の経時変化を観察した。Fig. 2.24 および 2.25 に HPTS の放出挙動の結果を示した。リポソームからの HPTS の放出は速く、20 時間ほどで 30-60% が放出される結果となった。一方、liponano-CHI からの放出は、外部溶液の pH に関係なく、10% 程度にまで抑制された。さらに、リポソーム表面が二層のポリマー膜で覆われた liponano-CHI-DXS でも放出が 10% 以下に抑えられていた。次に両性の alendronate および非イオン性のグルコースについての放出実験を行った (Table 2.6 参照)。これらについても HPTS と同様に、リポナノカプセルでは封入物質の漏れが抑制され、高い物質保持能を有していることがわかった。特に、グルコースの放出は、6 日後も低く抑えられたままであった。カプセルウォールを介した物質透過性には、封入物質とカプセルウォールとの静電相互作用、ポリマー層の存在あるいは脂質膜の流動性による影響が

考えられる。封入物質の電荷に関わらず、リポナノカプセルからの放出が抑制されたことから、静電相互作用による影響は小さいと考えられる。また、2.3.2.4 項より、Triton X-100 によって脂質膜を破壊すると残存したポリマー層からの物質の漏れが確認されたことから、ポリマー層による物質透過の抑制効果は低いと考えられる。よって、ポリマーの吸着によって、脂質膜の流動性が低下し、カプセルウォールを介した物質透過が抑制されたと考えられる。次の項においてリポソームとリポナノカプセルの膜流動性について検討した。

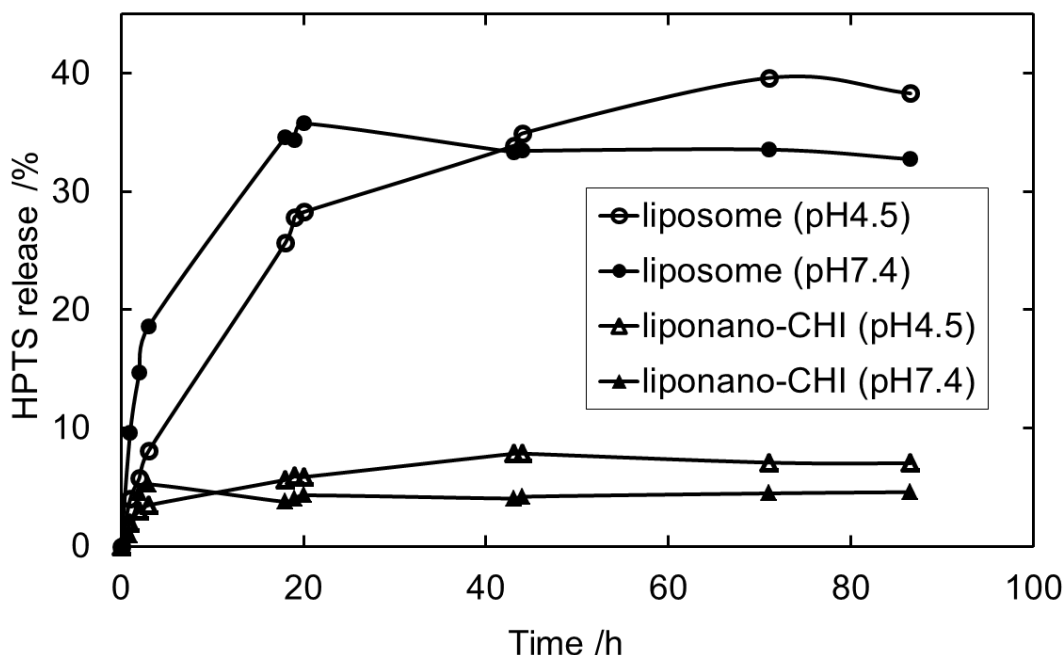


Fig. 2.24 Percentage release of HPTS from a parent liposome and liponano-CHI as a function of time (pH 4.5 and 7.0).

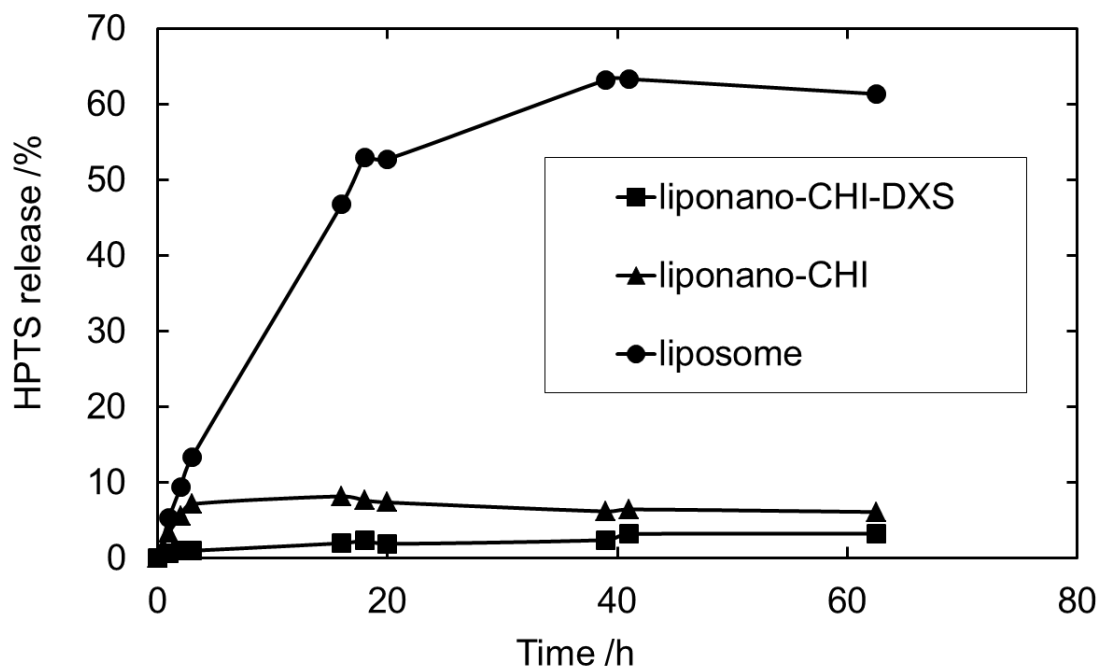


Fig. 2.25 Percentage release of HPTS from a parent liposome, liponano-CHI and liponano-CHI-DXS as a function of time (pH 7.0).

Table 2.6 Percentage release of glucose and alendronate from various liponano-capsules.

Capsule	Glucose /%	Alendronate /%
liposome	37	84
liponano-CHI	0.0	30
liponano-CHI-DXS	0.5	20
liponano-CHI-DNA	No datum	22

The release amount of glucose and alendronate was measured after incubation for 6 d and 85 h, respectively.

2.3.3.3 リポナノカプセルの膜流動性の測定

リポソームとリポナノカプセルの脂質膜の流動性を以下の二種類の方法を用いて測定した。

<Pyrene を用いた膜流動性の測定>

Fig. 2.26 にリポソームと liponano-CHI の膜流動性の測定結果を、 I_E/I_M の時間変化として示した。 I_E/I_M が高いほど脂質膜中での物質拡散が促進され、膜流動性が高いことを意味する。本実験で用いたリポソーム (DLPA/DMPC=0.5/0.5) のゲル-液晶転移温度は 29.2°C である。Fig. 2.26 の結果からも、リポソームの膜流動性は、約 30-40°C において上昇していることがわかった。この膜流動性の上昇は脂質膜の相転移が起こったためである。一方、liponano-CHI の膜流動性は、どの温度条件においてもリポソームに比べて流動性は顕著に抑制されており、脂質膜の相転移による I_E/I_M の変化は観察されなかった。

<蛍光偏光解消法による膜流動性の測定>

上記で用いた pyrene は、その円盤状の分子形状からも推測できるように、流動性の低い脂質のわずかな変化の観測にはあまり適していない。一方、DPH は長い棒状の分子であるため、脂質分子の分子軸に沿って配向するため、膜の運動性の変化に敏感に応答する。そこで、脂質膜内に DPH を分配させて蛍光偏光解消を検出することにより膜流動性を評価した。その結果を Fig. 2.27 に示す。リポソームに関しては、35-45°C で偏光度の急激な減少が見られた。これは、この温度領域で脂質膜のゲルから液晶への転移が起こり、膜内の DPH の運動性が上がって蛍光偏光解消の度合いが大きくなったためと考えられる。一方、liponano-CHI-DXS では、ゲル-液晶転移がやや高温側にシフトし、高温側における蛍光偏光度もリポソームと比較して高く、偏光解消が起りにくくなったことがわかった。よって、脂質膜表面へポリマーが吸着することによって、脂質膜の流動性が低下してゲル-液晶転移が起こりにくくなり、さらに液晶状態となってもその流動性は抑制されていることがわかった。このとき、カチオン性ポリマーによって DLPA の電荷が打ち消されるため、リン脂質頭部同士の電荷の反発がなくなり膜流動性が低下すると考えられる。また、カチオン性ポリマーとアニオン性リン脂質である DLPA が相互作用においては、吸着に伴って脂質膜中で DLPA が集合化したドメインが形成されることも知られている²³⁻²⁵⁾。本研究にて用いたカチオン性ポリマーである CHI は良溶媒中では持続長が長く、棒状高分子であることが知られている²⁶⁾。従って、脂質膜表面で緻密なポリマー層を形成するよりも、いくつかの DLPA ドメインをつなぐように広がって吸着してウォールを形成していると考えられる。以上に述べたように、ポリマーの吸着は脂質の運動性に影響を与えて、膜流動性の抑制につながったと考えられる。逆にポリマー層の形成によって膜物性に影響を与えることが可能となった。

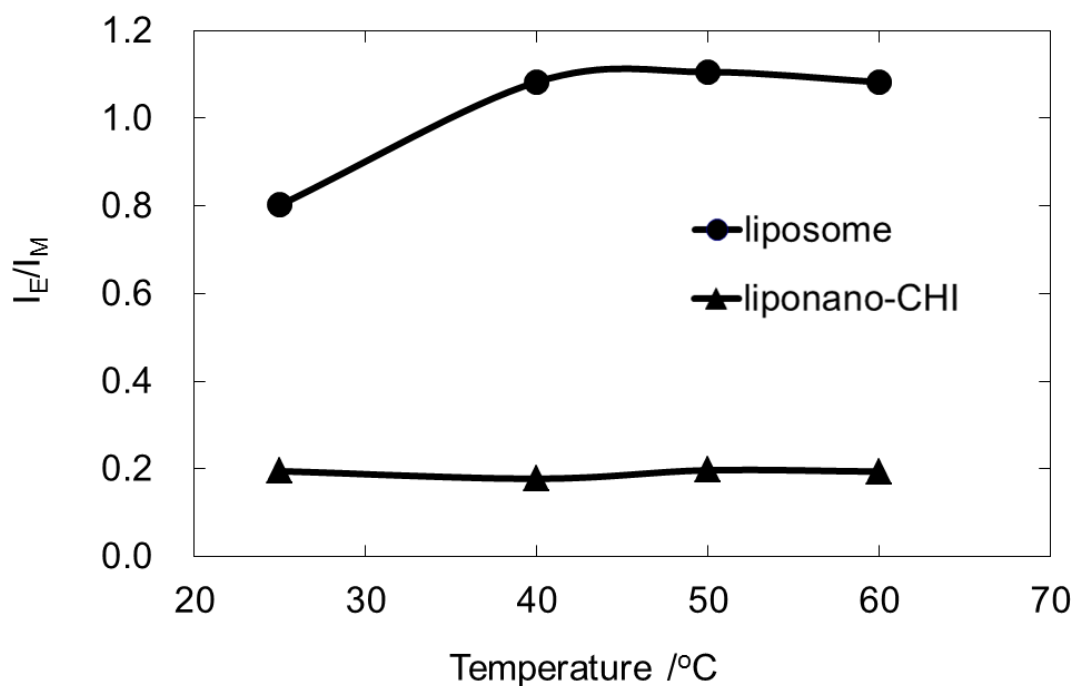


Fig. 2.26 Temperature dependence of the ratio of excimer fluorescence intensity to monomer fluorescence intensity (I_E/I_M) of pyrene incorporated into liposome and liponano-CHI.

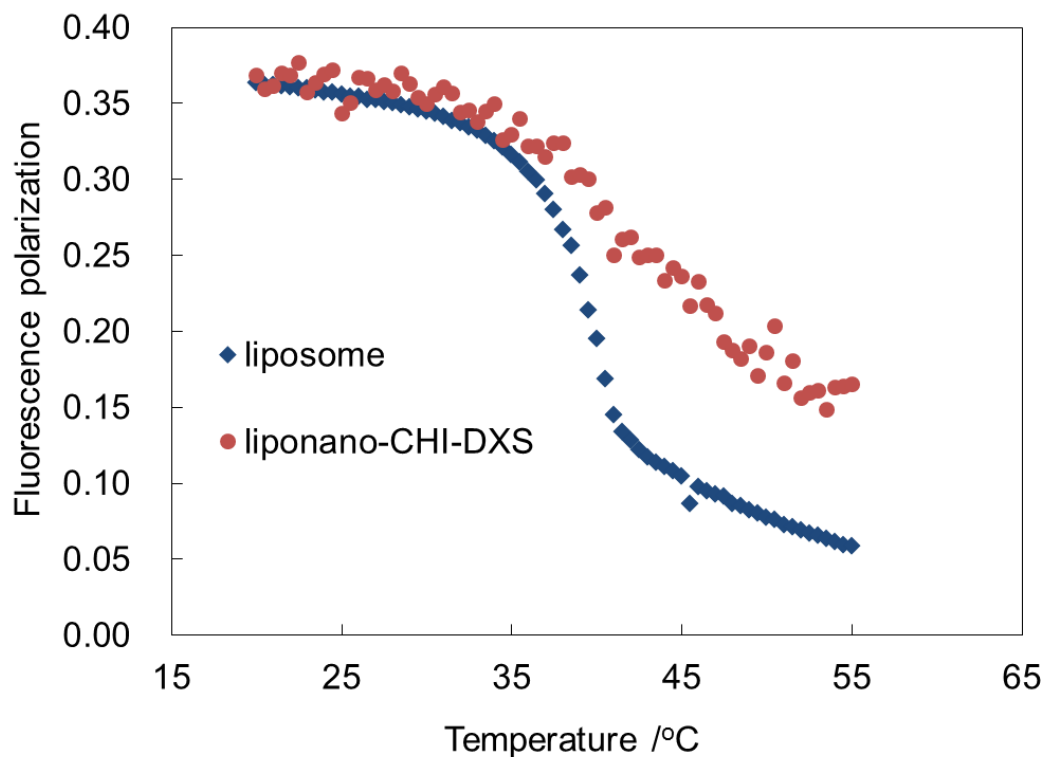


Fig. 2.27 Fluorescence depolarization measurement of DPH in the lipid layer of liposome and liponano-CHI-DXS.

2.3.4 DNAの融解挙動を利用したリポナノカプセルからの放出スイッチング機能の検討

ナノカプセルの内部への物質の保持と放出制御は、DDS や化粧品の担体として欠かせない機能の一つである。放出制御には徐放性以外に環境応答性が含まれる。この環境応答性とは皮膚、組織、細胞内などにおいて外部環境に迅速に反応し、有効成分を放出するという特性である。実際に、様々な環境応答性キャリアが多数報告されている。例えば、pH 応答性を有するキャリアは細胞内の低 pH 条件や皮膚の弱酸性条件で物質のリリースに有効であり、例としては酸性条件下でラメラ構造から逆ミセル構造へ相転移するリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) を用いて作製したリポソームをあげることができる。また、温度応答性ポリマーをリポソーム表面に固定化し、温度によるポリマーの親水性・疎水性変化とそれに伴うコンフォメーション変化を利用して、リポソームを不安定化し、内部の薬物が放出される研究も報告されている。

ナノカプセルからの物質の放出を促進するためには、外部刺激によって脂質膜あるいはカプセルウォールに摂動を与えることが有効である。そこでカプセル表面に吸着させたポリマーの形態変化を利用して膜のゆらぎを誘起することを考えた。ここでは DNA の形態変化に注目した。DNA は、二本鎖から一本鎖へと解離する融解温度 T_m が存在する。本研究では、この融解挙動を利用して封入物質の放出制御を試みた。

2.3.4.1 さけの精巢由来 DNA の融解挙動について

さけの精巢由来 DNA の融解温度 (T_m)、すなわち二本鎖から一本鎖へ解離する温度を測定した。Fig. 2.28 より、10-50°C までは吸光度の変化は見られないが、50-60°C 付近において吸光度の急激な上昇が見られた。この変化は、DNA の二本鎖の協同的な解離が、塩基の電子共鳴構造に変化 (深色効果) をもたらしたことによる。吸光度差が最大値の 1/2 に達するときの温度を T_m とすると、使用した DNA の T_m は 55°C となった。

このような DNA の温度による協同的な構造転移をナノカプセルの機能化に用いることを考え、以下のような実験を行った。

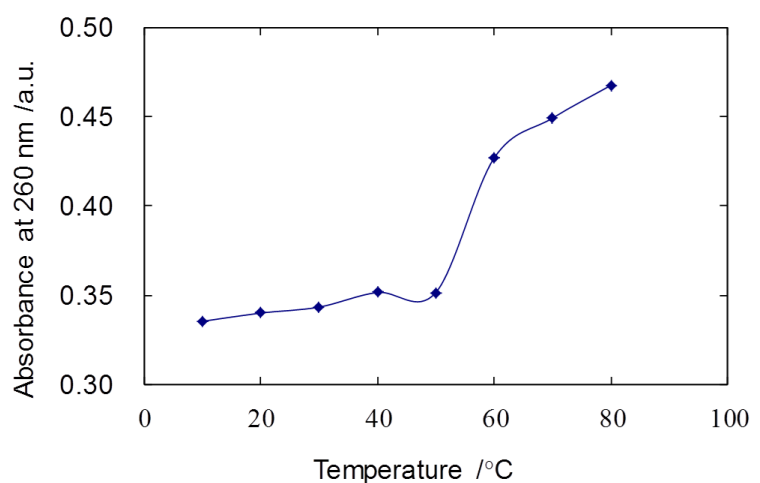


Fig. 2.28 Melting curve of DNA derived from salmon sperm.

2.3.4.2 リポナノカプセルの温度による放出挙動について

透析法を用いてリポソームとリポナノカプセルの 25°C と 60°C における放出挙動について検討した。Fig. 2.29 より、リポソーム、liponano-CHI および liponano-CHI-DXS の放出挙動は温度によらず Fig. 2.25 と同様にリポナノカプセルにおいて放出が顕著に抑えられる結果となった。しかし、liponano-CHI-DNA を 60°C にした場合には、他のリポナノカプセルよりも放出の促進が見られた。これは、温度を上昇させることによってナノカプセル表面の DNA が二本鎖から一本鎖へと解離し、脂質膜の物質透過性が上がった

たことによると推測される。2.3.4.3 項にてナノカプセル表面の DNA の状態変化について述べる。

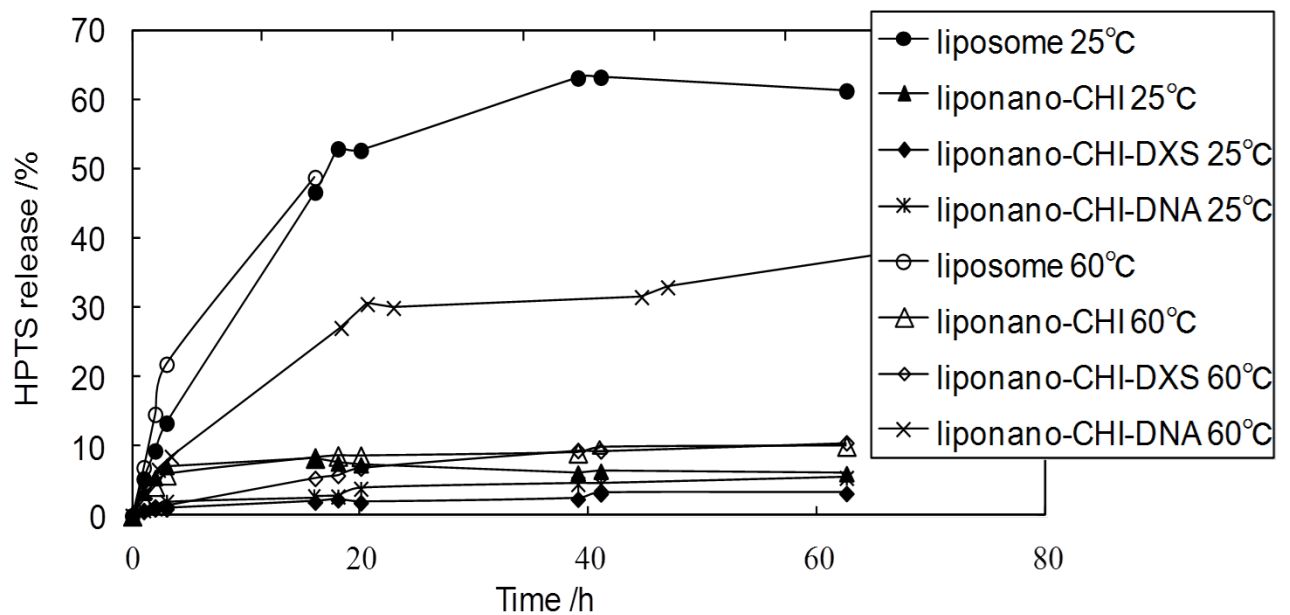


Fig. 2.29 Percentage release of HPTS from a parent liposome and liponano-capsules as a function of time at 25 and 60°C (pH 7.0).

2.3.4.3 リポナノカプセル (liponano-CHI-DNA) 表面からの DNA 脱着について

温度による放出性の向上について検討するために、25°C と 60°C において 20 時間インキュベートした後に liponano-CHI-DNA を沈降させて除き、その上澄み中の DNA 濃度を測定した。Fig. 2.30 より、60°C の DNA 濃度は、25°C と比較して顕著に増加した。これより、60°C ではナノカプセル表面から DNA が脱着していることが示唆された。25°C においても上澄みに DNA が含まれていたのは、liponano-CHI-DNA 作製時に除去しきれなかった未吸着 DNA が存在していたためだと考えている。60°C にてインキュベートした liponano-CHI-DNA のゼータ電位を測定すると、-95.1 から -85.5 mV と負電荷が弱まっていた。これらのことから、60°C では liponano-CHI-DNA 表面から DNA が脱着し、それに伴って脂質膜が揺らいで、膜の物質透過性が上がったと考えられる。これは、リポナノカプセルに温度による放出スイッチング機能を付与することができたことを示唆している。しかしながら、DDS

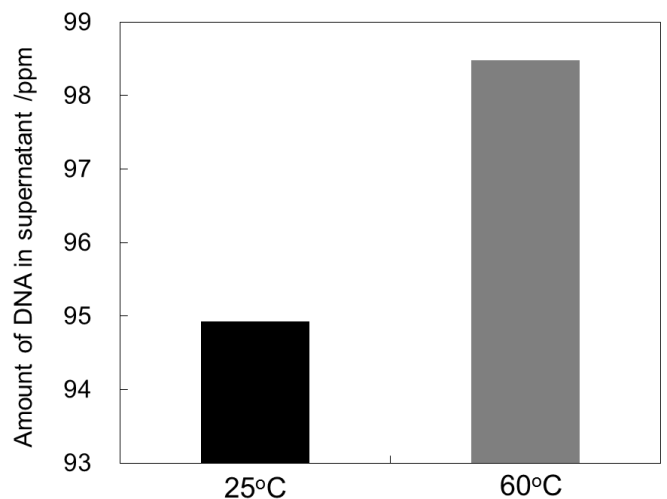


Fig. 2.30 Release of adsorbed DNA from a liponano-CHI-DNA by raising temperature from 25 to 60°C. The concentration of DNA was measured by UV absorption at 260 nm.

に適用する場合には、スイッチング温度を低温側にシフトさせる必要がある。DNA の T_m は塩基であるグアニン (G) とシトシン (C) の含有率、分子量、添加イオンの種類と濃度などに依存する。水素結合三つの G と C の方が二つのアデニン (A) とチミン (T) よりも安定であるため、DNA 中の G と C の含有量が少ない程 T_m は下がる。従って、A と T のみからなる二本鎖 poly (A) · (T) を用いるなどの工夫で T_m を下げることが可能である。

2.3.5 リポナノカプセルの骨のモデルへの集積能について

高齢化社会への移行、生活習慣の変化などの影響により骨粗鬆症やリウマチなどの骨の病気は年々増加している。これに対して、ビスフォスフォネートなど様々な薬剤が開発されてきた。しかし、これらの多くはターゲティング能が低いため、有効濃度では副作用が発現してしまう。そこで骨を特異的に認識し、薬剤を目的部位にデリバリーするためのキャリアの開発が望まれている。リポナノカプセルはパッシブターゲティングにおいては EPR 効果に基づいたナノサイズ効果の発現が期待される。すなわち骨組織近傍の血管は 100 nm 以下の孔を有しているため、骨組織へのデリバリーのためにはキャリアのナノサイズ化が有効であると考えられる。また、標的サイトにのみ薬物を送達するアクティブターゲティングとして、骨の主無機成分として知られるハイドロキシアパタイト (HAp) と DNA との高い親和性に着目した。DNA のリン酸基と HAp 結晶中の Ca^{2+} は、キレート形成または静電相互作用によって強く相互作用することが知られている²⁷⁾。実際に、DNA の単離や精製において HAp カラムが利用されている。従って DNA を最表面に有するリポナノカプセルの HAp 粉体への集積能について検討を行った。

リポソームおよびリポナノカプセル内部に dextran-FITC を封入し、これらの HAp 粉体への集積能について検討した。Fig. 2.31 にナノカプセルに作用させた HAp 粉体の CLSM 写真を示す。緑色は、ナノカプセル内部に封入した dextran-FITC を表し、HAp 粉体への吸着能が高いほど強い蛍光が観察される。結果として、ナノカプセルの HAp 粉体への集積能は、リポソーム > liponano-CHI-DNA > liponano-CHI > liponano-CHI-DXS の順となり、ナノカプセル表面にリン酸基を有するリポソームと liponano-CHI-DNA の吸着能が高いことがわかった。HAp の化学式は、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ であり、六方晶系に属し、カルシウムイオンに富むために正電荷を帯びた a 面とリン酸イオンに富むために負電荷を帯びた c 面の二つの結晶面をもつことが知られている²⁸⁾。これは電荷をもつ物質であれば、正負を問わず、HAp の結晶面と作用することを意味する。リン酸基は HAp との相互作用が強いことが知られている。これは、リン酸基と結晶表面のカルシウムが静電相互作用および配位結合するためである²⁷⁾。以上のようにナノカプセル表面のリン酸基が、骨のモデルである HAp 粉体に強く吸着することがわかり、liponano-CHI-DNA が骨へのターゲティング能を有することが確認できた。

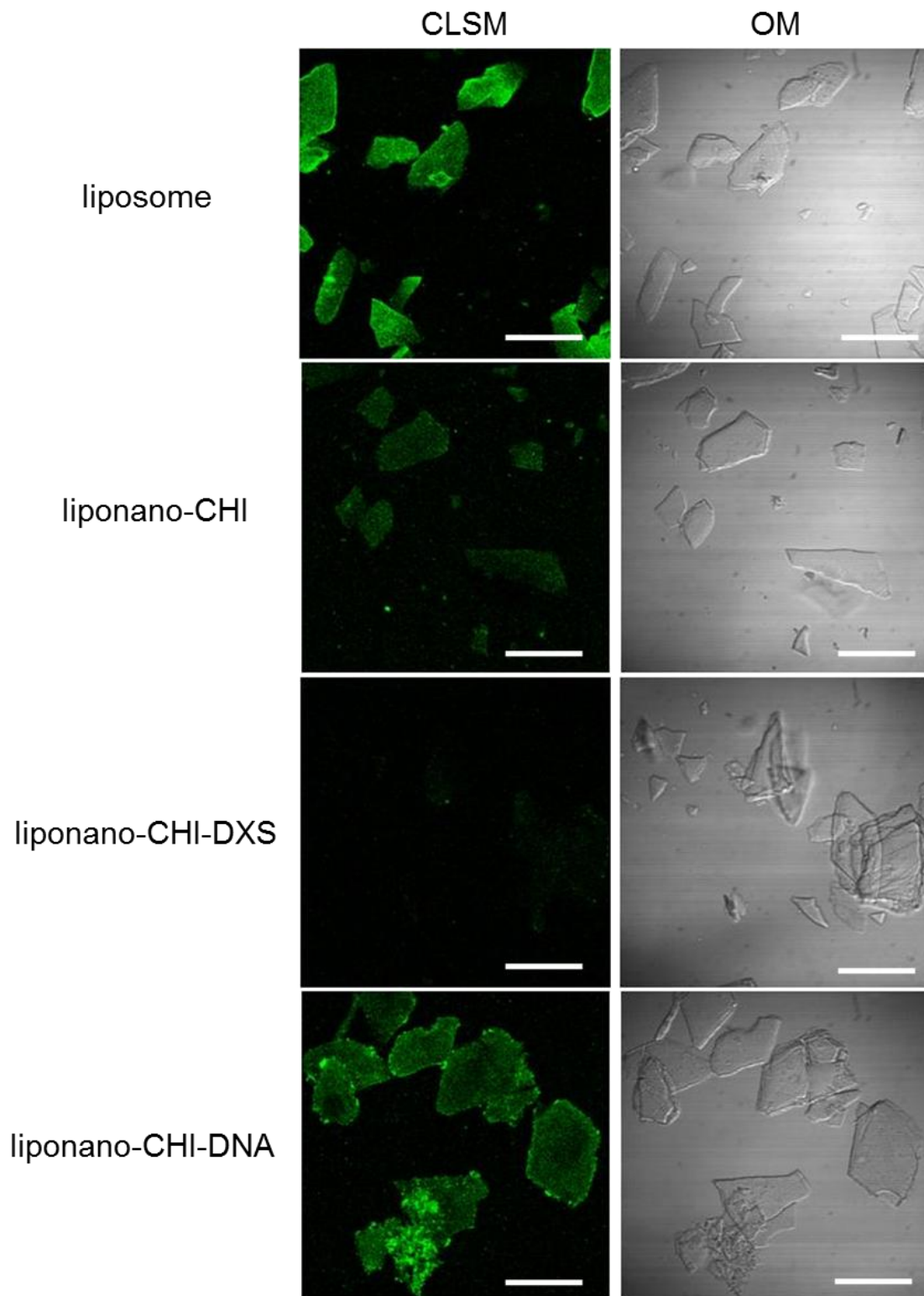


Fig. 2.31 Confocal microscopic images (left) and optical microscopic images (right) of liponano-capsules bound onto powdery HAp. All scale bars are 50 μm . Green regions correspond to dextran-FITC encapsulated into the nanocapsules.

2.4 結論

構成脂質として DLPA と DMPC を用いて、凍結融解法およびエクストルージョン法によって、粒径 100 nm の一枚膜リポソーム (SUV) を作製した。得られたリポソームは、酸性リン脂質である DLPA 由来の負電荷を帯びており、ゼータ電位は pH や脂質組成によって変化した。

作製したリポソーム表面へ静電相互作用によってカチオン性ポリマーである CHI を吸着し、その吸着量を測定することで吸着等温線を作製した。吸着時の pH が低いほど CHI のアミノ基のプロトン化が促進され、吸着量が多くなった。また DLPA の含率が高いほど、CHI の吸着サイトが増え、吸着量が多くなった。リポソーム表面へ DDA が 50% である CHI(50) (MW: 3000~10000) を吸着させて作製した liponano-CHI(50) は、吸着したもののゼータ電位はプラスへと反転しなかった。次に、DDA が 80% で分子量の高い CHI(80) を用いたところ、正電荷を帯びたリポナノカプセルを作製することができた。得られた liponano-CHI(80) へ、アニオン性ポリマーである DXS または DNA を吸着させた。得られたナノカプセルはどちらもアニオン性ポリマー由来の負電荷へと反転した。リポソーム表面へ CHI および DXS を交互に吸着するに伴い、ゼータ電位も正負に反転し、4 層まで積層したリポナノカプセルを作製した。得られたリポナノカプセル (liponano-CHI, liponano-CHI-DXS, liponano-CHI-DNA) のカプセルウォールは界面活性剤 (Triton X-100) に対しても高い形状安定性を示した。また、CHI の吸着量が多いほど安定化効果が高いことがわかった。

リポナノカプセルの送達キャリアとしての機能を評価するために、リポソームとリポナノカプセル内部へ、様々な電荷や分子量を有する物質を封入した。さらにそれらの放出挙動について検討したところ、物質によらず、放出量は大きく抑えられ、リポナノカプセルが高い物質保持能を有していることがわかった。これは、リポソーム表面にポリマーが吸着することによって、脂質膜の膜流動性が低下し、物質透過性が抑えられたためと考えられる。また、60°C において放出挙動の検討を行ったところ、liponano-CHI-DNA について放出が促進された。これは、DNA が二本鎖から一本鎖へと解離を起こす際に、下地の脂質膜に摂動を与えたためだと考えられる。これにより、DNA の融解挙動を利用することによりリポナノカプセルに温度応答性の放出機能を付与することができた。

最後にリポソームとリポナノカプセルの骨への集積能について検討を行った。蛍光物質を封入したナノカプセルを骨の主無機成分である HAp 粉体へ加え、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行ったところ、表面にリン酸基を有するリポソームおよび liponano-CHI-DNA が、HAp 粉体に対して高い集積能を示した。これは、リン酸基が HAp 粉体の結晶表面のカルシウムと、静電相互作用および配位結合するためであると考えている。これより、リポソーム表面へリン酸基を有するポリマーを積層化することによって、骨へのターゲティング能を付与することができた。

Appendix

A2.1 リポソーム形成について

両親媒性の物質を水溶液に懸濁すると、極性基は水和し、非極性基は疎水性相互作用によって集合して構造体を形成する。このときの分子集合体の構造は、その極性基と非極性基の形および充填の度合いにより決定される。分子が円筒型となる場合は、二分子膜（ラメラ層）構造が熱力学的に最も安定となる。生体膜を構成する多くのリン脂質では切頭円錐の形が多く、これらリン脂質の臨界ミセル濃度 (cmc) は、 10^{-6} ~ 10^{-10} M と低く、集合体を形成しやすい²⁹⁾。Israelachvili らは、リン脂質などの両親媒性分子の親疎水性バランスと構造の関係について臨界充填パラメーター (critical packing parameter: CPP) を用いて考察している³⁰⁾。それによると脂質一分子が占める表面積を a 、炭化水素鎖の最大鎖長を l 、炭化水素部位の体積を v とすると、計算上、 v/la の値で水溶液中の分子集合体の種類が決定できる。この値が CPP であり、 $1/3$ 以下では分子は切頭円錐型となり球状ミセルを形成、 $1/3$ ~ $1/2$ では円錐型となり筒状ミセルを形成、 $1/2$ ~ 1 では円筒に近い切頭円錐型分子となり脂質二分子膜を形成、 1 付近では円筒型分子となり平面状二分子層を形成、さらに 1 以上ではくさび型分子となりヘキサゴナル II 構造を形成する。このような分子の形は、極性基と非極性基のサイズのみならず、温度、pH、塩濃度などの外部環境によっても変化する。本研究で用いた中性リン脂質である DMPC は、切頭円錐型分子であり、リポソームの二分子膜形成に不可欠である。また、酸性リン脂質である DLPA も切頭円錐型分子であり、高い曲率を持つリポソーム膜を安定化し、表面を負電荷とするために用いた。

A2.2 リポナノカプセル形成に用いるバイオポリマーについて

<キトサンについて>

キトサンは、カニやエビなどの甲殻類や昆虫類の外骨格に豊富に存在しているキチンを濃アルカリと加熱することで脱アセチル化処理して得られた誘導体である³¹⁾。キトサンは、*N*-アセチル- β -D-グルコサミンと β -D-グルコサミンが β -1,4 結合を介して繰り返された構造をしており (Fig. 2.4 (a)参照)、アミノ基が存在するので、反応性に富み、硫酸基やリン酸基など様々な官能基の導入が可能である。アミノ基の pK_a は 6.5 前後であり、塩基性で不溶、酸性で可溶である。また、キトサンの特性は分子量および脱アセチル化度 (degree of deacetylation, DDA) に大きく依存し、遺伝子と複合化させて遺伝子デリバリーに用いる場合、これらによって遺伝子発現効率が異なることが知られている³²⁾。さらに、キトサンは生体に対して抗原性が低く、抗アレルギー性、抗菌性、リゾチームなどの酵素により生分解性を有していることから、食品、医療、化粧品、環境など幅広い分野で応用されている。例えば、アミノ基由来の正電荷を介して、細菌やウイルスのもつタンパクの負電荷を帯びた表面にキトサンが吸着し、その増殖を抑制すると考えられている³³⁻³⁵⁾。また、キトサンから得られた人工皮膚は、生体親和性が高く、鎮痛、殺菌、止血、肉芽促進作用などがあるので、火傷の治療などに使われている³⁶⁻³⁹⁾。DDS 担体としては、高い粘膜付着性を利用して、臓器の粘膜部に長時間滞留するキトサン表面修飾ナノスフェアなども開発されている^{40,41)}。

<デキストラン硫酸について>

デキストランは、 α -(1 \rightarrow 6)結合のグルコース重合体であり (Fig. 2.4 (b)参照)、*Leuconostoc mesenteroides* などの微生物による発酵などを用いて合成することができる。さらにこれをピリジン中で

クロロスルホン酸と作用させることによって硫酸化したものがデキストラン硫酸である。このような硫酸化多糖は体内で分解される上、生体適合性が高くバイオマテリアルとして注目されている。特に、デキストラン硫酸はヘパリンの持つ脂肪血液浄化作用を有するため、経口的動脈硬化治療剤として用いられている^{42, 43)}。また多くの硫酸化多糖が、抗凝血活性、抗エイズウイルス活性を示すことが知られており、分子量、硫酸化度、分岐の有無などがその活性発現に重要であると考えられている⁴⁴⁾。

<DNA について>

DNA は、4 種類の核酸塩基（アデニン, A; グアニン, G; チミン, T; シトシン, C）を含むヌクレオチドがリン酸エステル結合した重合体であり（Fig. 2.4 (c)参照）、A と T、G と C とが互いに相補的な対を組んだ、二重らせん構造をしている。DNA すべての生物において遺伝情報を担っており、精巧な設計図として機能している。そのため、細胞への遺伝子導入など遺伝子工学、分子生物学、遺伝子治療などの分野で研究が行われている。その一方で、DNA は天然に大量に存在するポリマーでもある。本研究ではさけの精巢から抽出した DNA を試料として用いた。DNA はらせんの外側にリン酸基を持つためアニオン性であるとともに、高次構造に基づく特徴的な部位（メジャーグループ、マイナーグループ）を有している。それにより様々な物質と特異的、選択的に相互作用するため DNA を機能性物質と見なすことができる。実際に DNA を生体適合性、生分解性高分子として、抗菌性フィルムや皮膚に優しい創傷被覆材などの医用材料への応用が提案されている。また、DNA の塩基対間への化学物質のインターカレーションや金属イオンとの強い相互作用性を利用して、環境ホルモンや有害重金属などの汚染物質の選択的除去剤としても用いられている⁴⁵⁾。さらに、DNA はある温度以上で、二本鎖から一本鎖へと解離するコイルーグロビュール転移を示すなど、機能性高分子素材として興味深い特性を有している。

A2.3 リポソームの調製について

リポソームを基礎的研究や実際的な応用に用いる場合、その目的に最も適した安定で均一なリポソームを調製することが課題となる。リポソームは、そのサイズと脂質二重層の数に基づいて 4 種類に分類できる（Table 2.7 参照）。リポソームをドラッグキャリアとして応用する際は、大きさや均一性の違いにより体内分布や、血中保持時間が大きく異なるため、それらの調節が重要となる。たとえば、腫瘍組織近傍では新生毛細血管の物質透過性が亢進しており、その血管壁の隙間から物質が血管外の組織へと浸透していく。ここではリンパ管が十分に発達していないため、物質が排出されにくく、そこに長時間とどまることが知られている。これは EPR（enhanced permeation retention）効果として知られている。サイズが 100 nm 以下の粒子は高い EPR 効果を示し、腫瘍に効果的に集積することが知られており、これによるナノカプセルのパッシブターゲティングが期待できる。本研究では、ナノカプセルのドラッグキャリアとしての応用を目指し、100 nm の小さな一枚膜リポソーム（SUV）を作製した。

Table 2.7 Variation of liposomes in structures, sizes, preparation methods and applications.

リポソームの種類	小さな一枚膜リポソーム (small unilamellar vesicle; SUV)	大きな一枚膜リポソーム (large unilamellar vesicle; LUV)	多重膜リポソーム (multilamellar vesicle; MLV)	巨大リポソーム (giant unilamellar vesicle; GUV)
サイズ	100 nm 以下	100-1000 nm	ランダム	1000 nm 以上
調製法	ソニケーション法、エクストルージョン法	凍結融解法、逆相蒸発法	バンガム法（脂質薄膜へ機械的振動を与える方法）	静置水和法
用途	薬剤や遺伝子キャリアなど		化粧品など	人工細胞モデルなど

第2章の参考文献

- 1) 小石眞澄, “マイクロ/ナノ系カプセル・微粒子の開発と応用”, シーエムシー出版 (2003).
- 2) 秋吉一成, 辻井薫, “リポソーム応用の新展開-人工細胞の開発に向けて-”, 株式会社エヌ・ティー・エス (2005).
- 3) 寺田弘, 吉村哲郎, “ライフサイエンスにおけるリポソーム-実験マニュアル-”, シュプリンガー・フェアラーク (1994).
- 4) 奥直人, “リポソームの作成と実験法”, 廣川書店 (1994).
- 5) Kono, K., Murakami, T., Yoshida, T., Haba, Y., Kanaoka, S., Takagishi, T., et al., “Temperature Sensitization of Liposomes by use of thermosensitive block copolymers synthesized by living cationic polymerization: Effect of copolymer chain length”, *Bioconjugate chemistry*, **16**, 1367-1374 (2005).
- 6) Yavlovich, A., Singh, A., Blumenthal, R., Puri, A., “A novel class of photo-triggerable liposomes containing DPPC:DC(8,9)PC as vehicles for delivery of doxorubicin to cells”, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1808**, 117-126 (2011).
- 7) Yavlovich, A., Singh, A., Tarasov, S., Capala, J., Blumenthal, R., Puri, A., “Design of liposomes containing photopolymerizable phospholipids for triggered release of contents”, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **98**, 97-104 (2009).
- 8) Decher, G., “Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites RID E-7665-2011”, *Science*, **277**, 1232-1237 (1997).

- 9) Angelatos, A., Katagiri, K., Caruso, F., “Bioinspired colloidal systems via layer-by-layer assembly RID A-9587-2011”, *Soft Matter*, **2**, 18-23 (2006).
- 10) Antipov, A., Sukhorukov, G., Donath, E., Mohwald, H., “Sustained release properties of polyelectrolyte multilayer capsules RID E-6193-2011”, *Journal of Physical Chemistry B*, **105**, 2281-2284 (2001).
- 11) Caruso, F., Caruso, R., Mohwald, H., “Nanoengineering of inorganic and hybrid hollow spheres by colloidal templating RID A-9587-2011”, *Science*, **282**, 1111-1114 (1998).
- 12) Shi, X., Caruso, F., “Release behavior of thin-walled microcapsules composed of polyelectrolyte multilayers RID A-1289-2007 RID A-9587-2011”, *Langmuir*, **17**, 2036-2042 (2001).
- 13) Diaspro, A., Silvano, D., Krol, S., Cavalleri, O., Gliozzi, A., “Single living cell encapsulation in nano-organized polyelectrolyte shells RID E-7833-2010”, *Langmuir*, **18**, 5047-5050 (2002).
- 14) Tjijto, E., Cadwell, K. D., Quinn, J. F., Johnston, A. P. R., Abbott, N. L., Caruso, F., “Tailoring the interfaces between nematic liquid crystal emulsions and aqueous phases via layer-by-layer assembly RID A-9254-2011 RID A-9587-2011”, *Nano Letters*, **6**, 2243-2248 (2006).
- 15) Caruso, F., “Hollow capsule processing through colloidal templating and self-assembly RID A-9587-2011”, *Chemistry-A European Journal*, **6**, 413-419 (2000).
- 16) Fujimoto, K., Toyoda, T., Fukui, Y., “Preparation of bionanocapsules by the layer-by-layer deposition of polypeptides onto a liposome”, *Macromolecules*, **40**, 5122-5128 (2007).
- 17) 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三, “リポソーム” 南江堂 (1988).
- 18) Silvander, M., Hansson, P., Edwards, K., “Liposomal surface potential and bilayer packing as affected by PEG-lipid inclusion”, *Langmuir*, **16**, 3696-3702 (2000).
- 19) Girod, S., Cara, L., Maillols, H., Salles, J., Devoisselle, J., “Relationship between conformation of polysaccharides in the dilute regime and their interaction with a phospholipid bilayer”, *Luminescence*, **16**, 109-116 (2001).
- 20) Viet, Donald, Voet, Judith G., (田宮信雄, 村松正実, 八木達彦, 吉田浩訳), “ヴォート 生化学(下)”, 東京化学同人 (1996).
- 21) Mertins, O., Dimova, R., “Binding of Chitosan to Phospholipid Vesicles Studied with Isothermal Titration Calorimetry”, *Langmuir*, **27**, 5506-5515 (2011).

- 22) Guo, J., Ping, Q., Jiang, G., Huang, L., Tong, Y., "Chitosan-coated liposomes: characterization and interaction with leuprolide", *International journal of pharmaceutics*, **260**, 167-173 (2003).
- 23) Hartmann, W., Galla, H., "Binding of Polylysine to Charged Bilayer Membranes - Molecular-Organization of a Lipid - Peptide Complex", *Biochimica et biophysica acta*, **509**, 474-490 (1978).
- 24) Tribet, C., Vial, F., "Flexible macromolecules attached to lipid bilayers: impact on fluidity, curvature, permeability and stability of the membranes RID C-2868-2008", *Soft Matter*, **4**, 68-81 (2008).
- 25) Yaroslavov, A. A., Rakhnyanskaya, A. A., Yaroslavova, E. G., Efimova, A. A., Menger, F. M., "Polyelectrolyte-coated liposomes: Stabilization of the interfacial complexes", *Advances in Colloid and Interface Science*, **142**, 43-52 (2008).
- 26) Mertins, O., Dimova, R., "Binding of Chitosan to Phospholipid Vesicles Studied with Isothermal Titration Calorimetry", *Langmuir*, **27**, 5506-5515 (2011).
- 27) Gagnon, P., Frost, R., Tunon, P., Ogawa, T., "CHT Ceramic Hydroxyapatite - A New Dimension in Chromatography of Biological Molecules", Bio-Rad Laboratories, Inc .
- 28) 相澤 守, 神澤 信, 松本 守, "アパタイトファイバースキャフォールドのナノ構造と細胞分化", *バイオマテリアル-生体材料-*, **23**, 336 (2005).
- 29) Israelachvili, J., Mitchell, D., Ninham, B., "Theory of Self-Assembly of Lipid Bilayers and Vesicles", *Biochimica et biophysica acta*, **470**, 185-201 (1977).
- 30) Israelachvili, J., "分子間力と表面力 第2版", 朝倉書店 (1997).
- 31) キチン・キトサン研究会, "最後のバイオマス-キチン・キトサン", 博報堂出版 (1988).
- 32) Kiang, T., Wen, H., Lim, H., Leong, K., "The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection RID A-7270-2009", *Biomaterials*, **25**, 5293-5301 (2004).
- 33) Krajewska, B., Wydro, P., Janczyk, A., "Probing the Modes of Antibacterial Activity of Chitosan. Effects of pH and Molecular Weight on Chitosan Interactions with Membrane Lipids in Langmuir Films", *Biomacromolecules*, **12**, 4144-4152 (2011).
- 34) Lee, H., Eckmann, D. M., Lee, D., Hickok, N. J., Composto, R. J., "Symmetric pH-Dependent Swelling and Antibacterial Properties of Chitosan Brushes", *Langmuir*, **27**, 12458-12465 (2011).

- 35) Hebeish, A., Abdel-Mohdy, F. A., Fouda, M. M. G., Elsaid, Z., Essam, S., Tammam, G. H., et al., "Green synthesis of easy care and antimicrobial cotton fabrics", *Carbohydrate Polymers*, **86**, 1684-1691 (2011).
- 36) Lim, H. J., Kim, C. J., Oh, E. J., Kim, T. J., Jung, S. Y., Choi, J. H., et al., "Hybrid Scaffolds Composed of Chitosan-PLGA-PEO Nanofibers and PLGA Microfibers for Artificial Skin", *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **8**, 108-115 (2011).
- 37) Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P. T. S., Nair, S. V., Tamura, H., "Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications", *Biotechnology Advances*, **29**, 322-337 (2011).
- 38) Salati, A., Keshvari, H., Karkhaneh, A., Taranejoo, S., "Design and Fabrication of Artificial Skin: Chitosan and Gelatin Immobilization on Silicone by Poly Acrylic Acid Graft Using a Plasma Surface Modification Method", *Journal of Macromolecular Science Part B-Physics*, **50**, 1972-1982 (2011).
- 39) Hayashi, T., "Biodegradable Polymers for Biomedical Uses", *Progress in Polymer Science*, **19**, 663-702 (1994).
- 40) Takeuchi, H., Matsui, Y., Yamamoto, H., Kawashima, Y., "Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats", *Journal of Controlled Release*, **86**, 235-242 (2003).
- 41) Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T., Kawashima, Y., "Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes", *Pharmaceutical research*, **13**, 896-901 (1996).
- 42) Asahi, T., Yamamoto, T., Kutsuki, H., "Blood purification therapies using dextran sulfate cellulose columns liposorb and Selesorb", *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, **7**, 73-77 (2003).
- 43) Julius, U., Parhofer, K. G., Heibges, A., Kurz, S., Klingel, R., Geiss, H., "Dextran-sulfate-adsorption of atherosclerotic lipoproteins from whole blood or separated plasma for lipid-apheresis-comparison of performance characteristics with DALI and Lipidfiltration", *Journal of clinical apheresis*, **22**, 215-223 (2007).
- 44) Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M., Yamamoto, N., "Purification and Characterization of an Avian-Myeloblastosis and Human-Immunodeficiency-Virus Reverse-Transcriptase Inhibitor, Sulfated Polysaccharides Extracted from Sea Algae", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **31**, 1524-1528 (1987).
- 45) 西則雄, 山田真路, 劉向東, "汚染物質除去剤としての DNA", *高分子*, **52** (2003).

3.1 序論

第2章にて、脂質膜表面へポリマーを積層化することにより、放出能やターゲティング能などの機能を有するリポナノカプセルを作製した。本章では、バイオミネラリゼーションにおける有機高分子の機能をモチーフとし、リポナノカプセル表面のバイオポリマーを微小な反応場として、リン酸カルシウム (calcium phosphate, CaP) の生成・成長制御を行い、ナノハイブリッドカプセルの創製を目指した。

ナノハイブリッド材料とは、異なる材料をナノメートルレベルで複合化したもので、物性の改善や、新しい特性の発現を期待したものであり、幅広い分野において研究が行われている。なかでも有機無機ナノハイブリッドは、歯や骨のような硬組織、真珠や貝殻、甲殻類の外殻など自然界に多く存在する。このような生物の行うナノテクノロジーの一つであるバイオミネラリゼーションから学び、これまでに有機高分子や微小反応場の無機結晶の生成・成長制御について様々な研究や応用展開が行われている。Mannらは、水面上にステアリン酸 ($C_{17}H_{35}COOH$) やオクタデシルアミン ($CH_3(CH_2)_{17}NH_2$) を展開して、単分子膜を形成させ、水中に配向させた極性基からなる2次元格子面をテンプレートとして、様々な炭酸カルシウム ($CaCO_3$) 結晶の形成を行った。このとき、単分子膜による表面圧や官能基の種類によって、生成する $CaCO_3$ 結晶の形態や均一性が変化することがわかり、無機結晶が有機分子の配列を認識して成長することがわかった¹⁻⁴⁾。また、Katoらは負電荷を帯びた poly(acrylic acid) 存在下にて、 $CaCO_3$ を作製することで、ポリマーマトリックス中にアモルファスの $CaCO_3$ がナノ分散したハイブリッドフィルムを作製した。得られたフィルムは透明であり、クラックフリーなどの特徴をもつことから、コーティング剤としての応用が期待されている⁵⁾。

本章では、バイオミネラルの中でも CaP に着目した (A3.1 参照)。CaP は、生体内の骨や歯などの硬組織の主要無機成分であり、生体適合性の高い材料として人工骨や人工歯根、骨充填剤などに利用されてきた。また、酸性溶液中で溶解する性質や結晶表面にタンパク質や核酸などの生体分子を吸着する性質などユニークな特性を有する。このような CaP の特徴に着目し、ポリマーゲル⁶⁾、ミセル⁷⁾、リポソーム⁸⁾などをテンプレートとし、CaP と複合化することでナノハイブリッド粒子を作製し、薬物や遺伝子キャリアとしての応用が行われている。例えば、多糖類からなるナノサイズのゲル微粒子をテンプレートとして、その内部に CaP を析出させて作製したナノハイブリッド粒子は、酸性 pH における放出機能を有しているため、DDS キャリアとしての応用が期待されている⁶⁾。

本章では、リポナノカプセル表面の CaP 形成において、反応場となるカプセルウォールの高分子膜の種類や反応条件 (pH、温度など) が CaP の結晶構造や形態へ与える影響について検討を行った。さらに、カプセルウォールを介した物質拡散性に着目し、イオンの相互拡散を利用した新しい CaP の表面析出法の開発を行った。ナノカプセル表面の CaP の結晶構造および形態によって、溶解性、それに伴う物質放出性や生理活性分子の表面付着性などの特徴が変化することから、このようなハイブリッドリポナノカプセルは薬物や遺伝子キャリアとして応用できると考えられる。また、CaP は骨親和性を有することから、ナノカプセルの表層へ骨認識分子をターゲティングリガンドとして固定化を行うことで、ナノカプセル自体が骨形成を助け、骨再生を促すような、骨標的指向性 (bone-targeting) 薬物キャリアとなることも期待できる。第2章にて、表面にリン酸基を有する liponano-CHI-DNA が骨のモデルである HAp 粉体へ高い集積能を示したことから、DNA を骨へのターゲティングリガンドとしてナノカプセル表面に担持させ、酸性 pH における DNA の放出能や骨集積能について検討を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 ハイブリッドリポナノカプセルの作製

3.2.1.1 試薬および緩衝液の作製

薬品名	分子量	メーカー
塩化カルシウム (calcium chloride, CaCl ₂)	238.31	和光純薬工業株式会社
硝酸カルシウム (calcium nitrate, Ca(NO ₃) ₂)	213.25	和光純薬工業株式会社
<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride, commercial grade (EDC)	191.70	Sigma-Aldrich
tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate (TRITC)	478.97	PIERCE
エチレンジアミン・1水和物 (ethylene diamine monohydrate)	60.10	東京化成工業株式会社
ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide)	78.13	純正化学株式会社
<i>N</i> -cyclohexyl-2-amino-ethanesulfonic acid (CHES)	207.29	和光純薬工業株式会社
メタンサルホン酸 (methanesulfonic acid)	96.11	東京化成工業株式会社
Sephadex G-25 fine		GE Healthcare

緩衝液の調製方法

- 10 mM CHES 緩衝液の調製

CHES 0.208 g を 100 mL 超純水にて溶解させ、pH メーターで確認しながら 10 mM NaOH を滴下することで、pH 9.0 または 10.0 の 10 mM CHES 緩衝液を調製した。

- 100 mM CHES 緩衝液の調製

150 mM NaCl 溶液と 50 mM CHES を 1:1 の体積比にて混合し、CHES 緩衝液 (100 mM, pH 9.0) を作製した。

3.2.1.2 ハイブリッドリポナノカプセルの作製

第2章にて作製した、リポソームとリポナノカプセルの表面を反応場としてリン酸カルシウム(CaP)層の作製を行った。作製スキーム (Fig. 3.1 参照) は以下の通りである。

1) リン酸イオンを封入したリポソームの作製を行った。この時、内水相での CaP 析出を抑えるためにリポソーム作製を酸性条件下 (pH 4.5) で行った (Fig. 3.1 (a)参照)。カルシウムイオン存在下では、リポソームが凝集を起こすため、カルシウムイオン封入リポソームによる検討は行わなかった。

2) リポソーム表面へバイオポリマー (CHI, DXS, or DNA) を交互に積層化し、リポナノカプセルを作製

し、外液にカルシウムイオンを加えた。(Fig. 3.1 (b)参照)。

3) 内水相から放出されたリン酸イオンと外液に加えたカルシウムイオンがカプセルウォールを介し、相互拡散することで、表面近傍で CaP の生成と成長を促した (Fig. 3.1 (c) and (d)参照)。このとき、カプセルウォールを介したイオンの拡散速度および反応場となるナノカプセル表面の官能基が CaP 形成において重要なファクターであると考えられる。

本実験では、ハイブリッドリポナノカプセル作製において、①カプセルウォールの有無、②カプセルウォールの種類、③外液 pH、④反応温度、⑤反応時間、⑥イオン種、⑦外液リン酸イオン濃度など反応条件が CaP 層の形成と形態 (厚み)、CaP 結晶の構造および形態に与える影響について検討した。以下に二種類のイオン種を用いた場合の作製方法および反応条件を述べる。

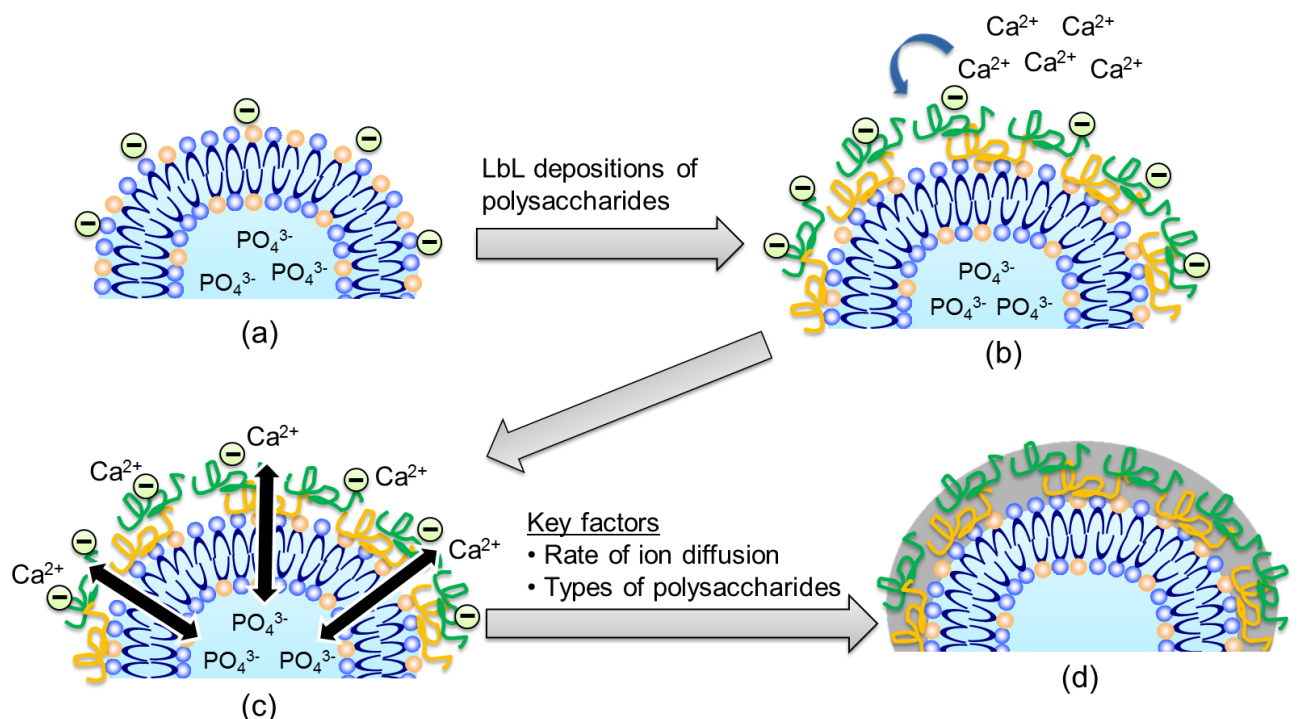


Fig. 3.1 Preparation of organic-inorganic hybrid liponano-capsules via the counter-diffusion of ions across the capsule wall of polysaccharide-coated liposome.

<PB および CaCl_2 を用いた場合>

2.2.1.2 項と同様の方法より、PB (100 mM, pH 4.5) を用いてリン脂質濃度 1.0 mM のリポソーム (DLAP/DMPC=0.5/0.5) を作製した。このリポソーム分散液 500 μL を、同じく PB (100 mM, pH 4.5) を用いて 460 ppm に調整した CHI(80)溶液 500 μL に加えて、20°C、700 rpm の攪拌条件下で 30 分間吸着させた。その後、限外ろ過フィルター (VIVA SPIN 20, 分画分子量: 300000) を用いて、ろ過精製 (20°C、3000 rpm、2 min、10 times) を行い、未吸着の CHI(80)を除去した。作製した liponano-CHI(80) 分散液 500 μL を、PB (100 mM, pH 4.5) を用いて 1000 ppm に調整した DXS と DNA 溶液 500 μL にそれぞれ加えて、上記と同条件にて吸着を行った。さらに HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0) と CHES 緩衝液 (10 mM, pH 10.0) を用いてそれぞれ限外ろ過精製し、外液のリン酸イオンを除去した。リン脂質濃度 0.25 mM のリポソームとリポナノカプセル (liponano-CHI, liponano-CHI-DXS および liponano-CHI-DNA) の分散液を 500 μL 調製し、それぞれに 10 mM の CaCl_2 溶液 500 μL を加えて、700 rpm にて攪拌しながら Table

3.1 に示す条件下で CaP 生成を行った (Fig. 3.2 参照)。このとき、全体のイオン濃度を HAp の溶解度積 ($pK_s=63$) 以下とすることで、溶液中での CaP 生成を抑制した。リポソーム、liponano-CHI、liponano-CHI-DXS および liponano-CHI-DNA を用いて作製したハイブリッドリポナノカプセルを、それぞれ lipo-CaP、liponano-CHI-CaP、liponano-CHI-DXS-CaP および liponano-CHI-DNA-CaP と表記する。

Table 3.1 Conditions for CaP formation over the surface of nanocapsule.

pH	7, 10
Temperature /°C	37, 60
Incubation time /h	1, 18
Concentration of Ca ²⁺ /mM	5
Concentration of phosphate ions in the inner phase of nanocapsule /mM	100

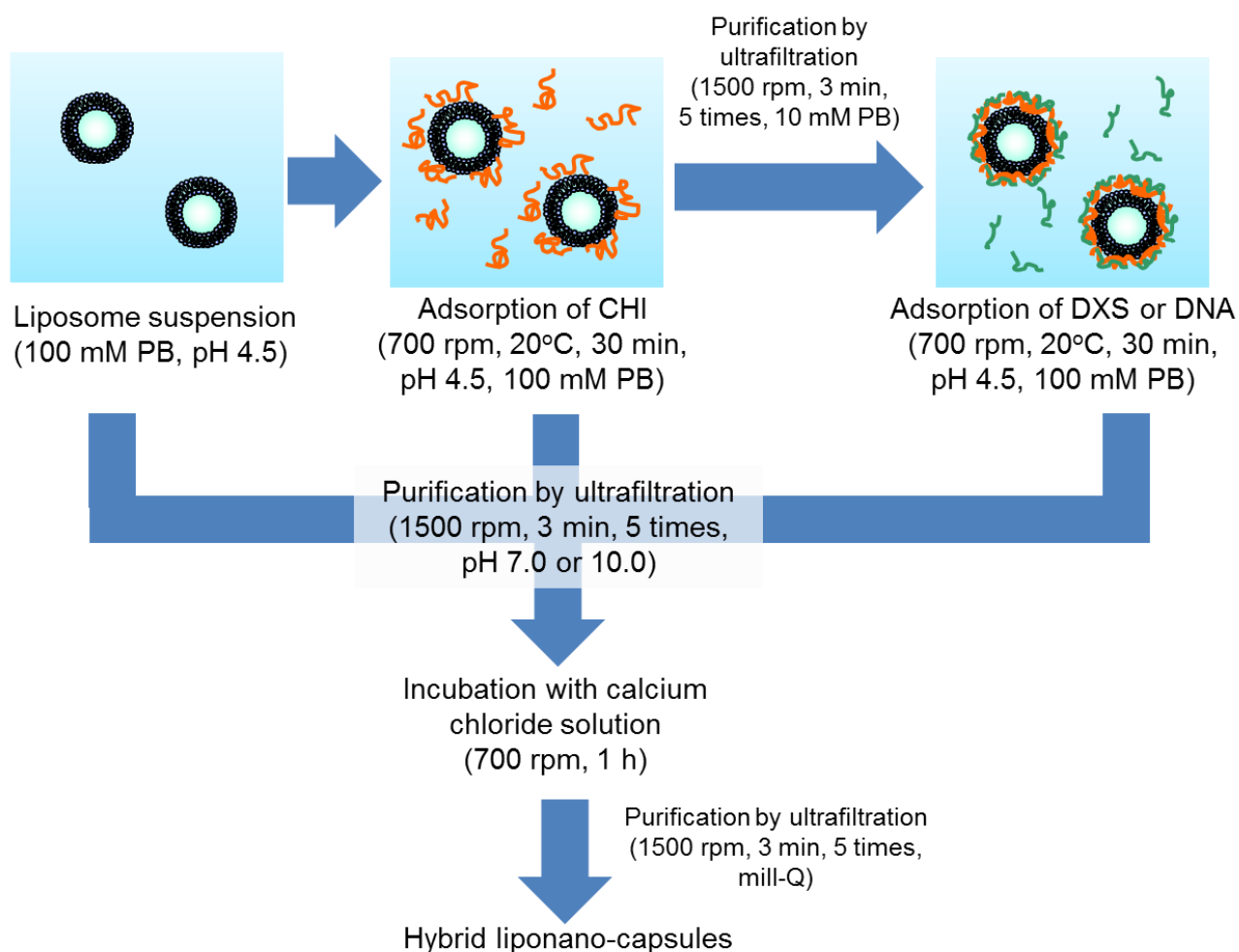


Fig. 3.2 Experimental process for CaP precipitation over liponano-capsules.

<(NH₄)₂HPO₄ および Ca(NO₃)₂ を用いた場合>

同様に 100 mM の(NH₄)₂HPO₄ 溶液と 5 mM の Ca(NO₃)₂ 溶液を用いて、Table 3.2 に示す条件にて、ナノハイブリッドカプセルの作製を行った。外液のリン酸イオン濃度の検討をする場合は、リポナノカプセルの限外ろ過精製を 100 mM の(NH₄)₂HPO₄ 溶液を用いて行った。

Table 3.2 Conditions for CaP formation over the surface of nanocapsules.

pH	6.7, 7.7
Temperature /°C	25
Incubation time /h	1
Concentration of phosphate ion in the outer phase of nanocapsule /mM	0, 0.5, 1.0, 5.0
Concentration of Ca ²⁺ /mM	2.5
Concentration of phosphate ions in the inner phase of nanocapsule /mM	100

3.2.2 ハイブリッドリポナノカプセルのキャラクタリゼーション

3.2.2.1 透過型電子顕微鏡 (TEM) による形状および電子線回折像の観察

まず、コロジオン膜でコートした銅製グリッドにカーボン蒸着を施した。グリッド上へ作製したハイブリッドリポナノカプセル分散液を 3 μL 滴下した。約 1~2 分後にろ紙を用いて液体を吸い取った。乾燥後に TEM (FEI company, 120 kV) により形状観察を行った。また、電界放出型透過電子顕微鏡 (FE-TEM, FEI company, 200 kV) を用いて電子線回折像の観察を行った。

3.2.2.2 エネルギー分散型 X 線分光器 (EDX) による元素分析

<EDX を用いた元素分析の原理>

エネルギー分散型 X 線分光法 (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy: EDX) は、TEM に付属の装置であり、電子線照射により発生する特性 X 線のエネルギーを測定する。各元素の特性 X 線によって現れるピークのエネルギー強度から元素の特定・組成分析を行うことができる。基底状態の原子に電子線を照射するとある確率で内殻電子を原子外に励起し、内殻に空孔が生じる。この空孔を満たすために外殻電子が内殻に遷移する。このときの遷移エネルギーとして特性 X 線が放出される。この特性 X 線は元素により固有のエネルギー値を持つため、これを測定することにより存在する元素を特定することができる。また、照射された電子線の量に比例して、試料の元素濃度相当量の X 線が発生するので、X 線が発生したカウント数から定量分析を行うことができる。特徴として、数 nm 程度の高空間分解能測定が可能であり、検出限界はおおよそ 1 atomic%程度であることが挙げられる。

この TEM (120 kV) の付属の装置である EDX を用いて、3.2.2.1 項と同様にハイブリッドリポナノカプセルの CaP の元素分析を行った。

3.2.2.3 走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) による形状観察

電界放出型走査型電子顕微鏡 (Field Emission Scanning Electron Microscope: FE-SEM) は、物質に入射した電子線がその構成原子と相互作用した結果、その表面から放出された二次電子や反射電子を用いて表面構造を拡大観察する装置である。このとき二次電子を検出器で検知、増幅することにより、試料表面の観察範囲の各点からの二次電子発生量に比例した明暗の画像を得る。

限外ろ過フィルター (Amicon Ultra, 分画分子量: 5000) を用いて、ハイブリッドリポナノカプセル (lipo-CaP, liponano-CHI-DNA-CaP) の分散液のろ過精製 (20°C, 3000 rpm, 3 min, 5 times) を行い、超純水 (milli-Q) にて溶媒置換をして脱塩を行った。この試料を正方形にカットしたポリスチレンディッシュ (35 mm/Non-Treated) 上に数滴垂らし、自然乾燥させ、SEM 試料台へカーボンテープを用いて固定した。この試料に Au-Pd 蒸着 (60 sec) を 2 回行い、FE-SEM (S-4700, Hitachi, 5.0 kV) によって観察した。

3.2.2.4 フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) を用いた結晶構造の同定

<FT-IR の原理>

分子は構成原子間の結合に基づく固有の振動をしている。赤外吸収は、結合の伸縮振動 (stretching vibration) と変角振動 (deformation vibration) によって生じる。変角振動は面内と面外の変角振動があり、振動は分子の対称性によっても分類される (対称性、非対称性)。有機化合物や高分子化合物などの分子性物質に 2.5 μm – 25 μm 範囲で赤外光を照射すると、試料分子の振動と同じ振動数を持つ赤外光のエネルギーが分子振動の励起のために使われる (光吸収)。この分子振動による光吸収を分光測定し、横軸に波数 (波長の逆数)、縦軸に吸収強度 (または透過率) をとったものが赤外 (IR) 吸収スペクトルである。セラミックスなどの無機物質の分子構造を調べるためにも赤外分光法が用いられる。分子が結晶として存在している場合には、単位格子内で分子を取り巻く対称性が選択律を支配する。よって IR を用いることによって、無機物質の結晶形態、結晶性などの情報を得ることができる。このとき異なる周波数での測定を短時間で行うために、短形波あるいは交流のパルスを与えて、その応答を解析してスペクトルを求める。これをフーリエ変換分光という。本研究では、マイケルソン型干渉計とコンピューターを用いたフーリエ変換赤外 (FT-IR) 分光法を用いた。

<実験方法>

限外ろ過フィルター (Amicon Ultra, 分画分子量: 10000) を用いて、ハイブリッドリポナノカプセル (lipo-CaP, liponano-CHI-DNA-CaP) の分散液のろ過精製 (3000 rpm, 20°C, 3 min) を行い、超純水 (milli-Q) にて溶媒置換をして脱塩を行った。これらを凍結乾燥後、臭化カリウム (KBr) 錠剤法により、FT-IR スペクトロメーター (ALPHA, Bruker Optik GmbH, Germany) を用いて、赤外吸収スペクトルの測定を行った。

3.2.2.5 リポナノカプセルからのリン酸イオン放出量の定量

リポソームとリポナノカプセルの内部へ封入したリン酸イオンの放出量を測定した。3.2.1.2 項と同様の方法で、PB (100 mM, pH 4.5) を用いて、リポソームおよび liponano-CHI-DNA を作製した。リン脂質濃度 1 mM に調整したリポソームと liponano-CHI-DNA の分散液 800 μL を、それぞれ 2.5 mL の HEPES

緩衝液 (10 mM, pH 7.0) または CHES 緩衝液 (10 mM, pH 10.0) に対して、Quix Sep Micro Dialysis (分画分子量: 1000) を用いて、37°C にて透析を行った。4 日後の外液を採取し、放出されたリン酸イオン濃度の定量を行った (2.2.2.1 項参照)。

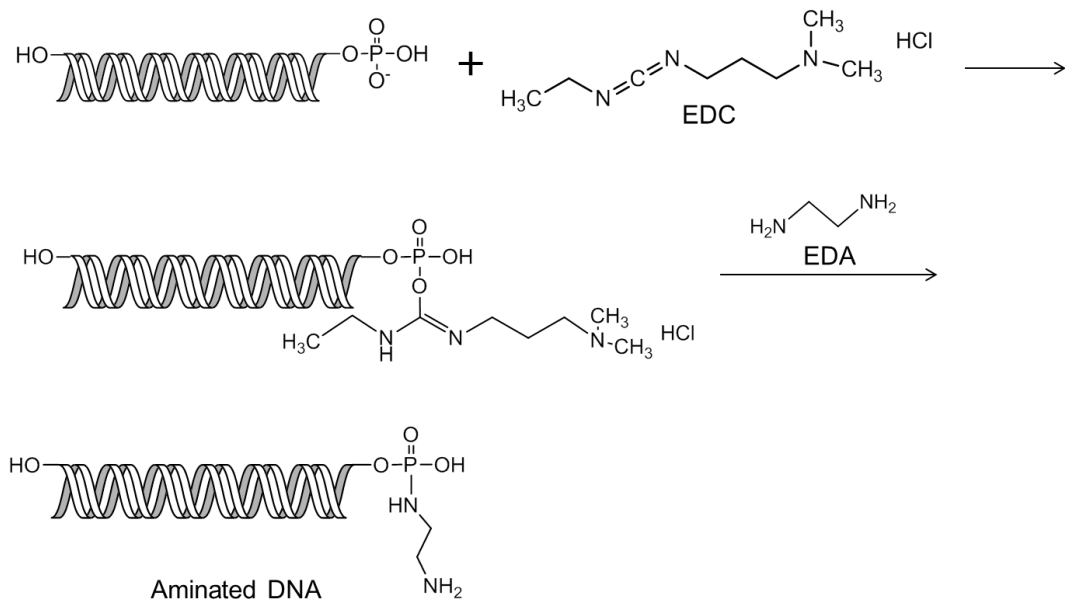
3.2.3 CaP カプセル層への DNA の吸着

3.2.3.1 TRITC ラベル化 DNA の作製

カルボジイミド法は、カルボジイミド (-N=C=N-) を含んだ化合物を用いてカルボキシ基を活性化してアミノ基と結合させる方法である⁹⁾。本項では、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) また ethylene diamine (EDA) を用いて、DNA の 5'末端のアミノ化、そしてそのアミノ基と tetramethylrhodamine-5(and 6)-isothiocyanate (TRITC) との反応の2ステップ反応を介して、DNA の TRITC ラベル化を行った (Fig. 3.3 参照)。TRITC は、ローダミン蛍光色素のアミン反応性誘導体であり、545 nm に吸収と 572 nm に蛍光を持ち、イソチオシアネート基により第一級アミンと反応させることができる。

HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0) を用いて 2000 ppm に調整した DNA 溶液に対して、濃度が 10 mM となるよう EDC (粉末) と EDA 溶液を加え、25°C にて 3 時間反応させた。反応後、Slide-A-lyzer mini dialysis (分画分子量: 3500) を用いて、CHES 緩衝液 (10 mM, pH 9.0) に対して、1 日間透析した。次に、濃度が 10 ppm となるように TRITC の DMSO 溶液を加えて、25°C にて 1 日間反応させた。ゲルろ過によって精製 (Sephadex G-25 fine) を行った後、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0) に対して 1 日間透析を行った。吸光光度計を用いて、DNA の吸収である 260 nm と TRITC の吸収である 545 nm の強度を測定し、DNA への TRITC のラベル化効率を算出した。

Step 1: Amination of 5' end group of DNA



Step 2: Reaction of aminated DNA with TRITC

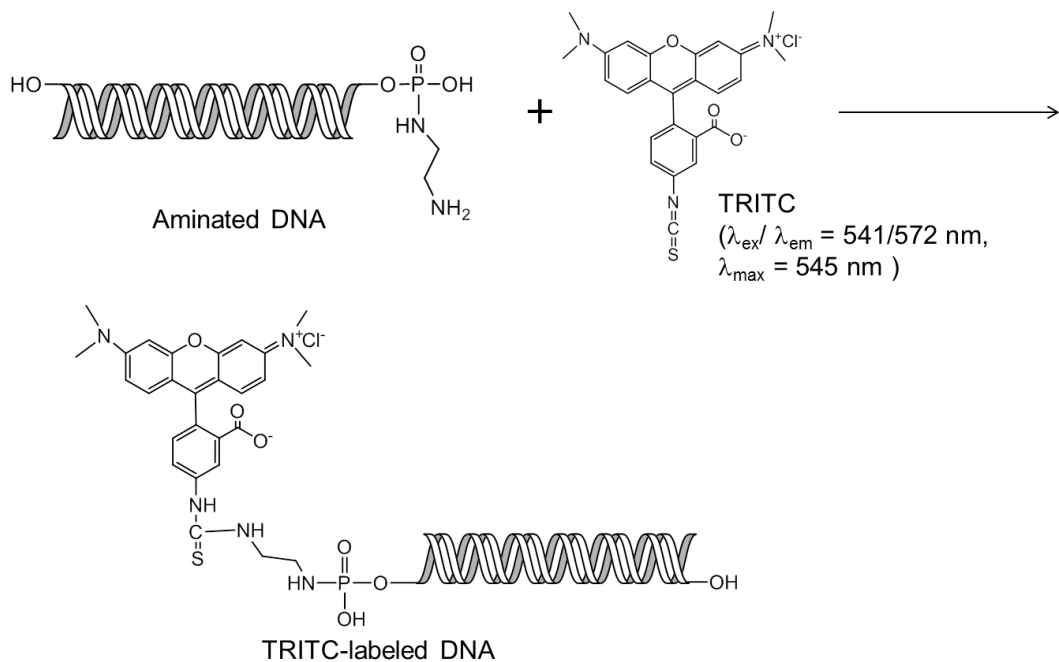


Fig. 3.3 Experimental process for preparation of TRITC-labeled DNA by carbodiimide chemistry.

3.2.3.2 Lipo-CaP-DNA の作製

ナノカプセル表面の CaP へさらに DNA を吸着させ、有機物と無機物の交互積層化を行った。

3.2.1.2 項の PB および CaCl_2 を用いた方法で、pH 10 において lipo-CaP を作製した (37°C, 1 h)。さらに、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0) を用いて限外ろ過精製 (20°C, 3000 rpm, 3 min, 5 times) を行った。

リン脂質濃度 1.0 mM の lipo-CaP 分散液 500 μL を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0) を用いて 250 ppm に調整した TRITC ラベル化 DNA 溶液 500 μL へ滴下し、700 rpm, 20°C で攪拌しながら 1 時間吸着させた。さらに遠心精製 (15000 rpm, 4°C, 1 h) を行うことで未反応の TRITC ラベル化 DNA を除去した。このようにして作製したナノカプセルを lipo-CaP-DNA とした。

3.2.3.3 Lipo-CaP への DNA の吸着量の定量

蛍光光度計を用いて、3.2.3.2 項にて作製した lipo-CaP-DNA の DNA にラベル化した TRITC 由来の蛍光 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 541/572 \text{ nm}$) を測定して、lipo-CaP への DNA 吸着量を測定した。

3.2.3.4 Lipo-CaP-DNA の表面電位測定

3.2.3.2 項にて作製した lipo-CaP および lipo-CaP-DNA のゼータ電位を HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0) 中で測定した。測定方法および原理は 2.2.2.4 項と同様である。

3.2.4 CaP 層溶解に伴う DNA 放出の検討

3.2.4.1 低 pH におけるナノハイブリッドカプセル表面からの DNA の放出量の測定

3.2.3.2 項に述べた方法にて作製した lipo-CaP-DNA 分散液を遠心分離 (4°C, 15000 rpm, 1 h) により沈降させて回収し、MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.0) または HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0) に再分散させた。これらの分散液を 10 分、1 時間、および 17 時間後に遠心分離し (4°C, 15000 rpm, 1 h)、上澄みの DNA の TRITC 由来の蛍光 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 541/572 \text{ nm}$) を測定することにより、放出された DNA 量を定量した。

3.2.4.2 イオンクロマトグラフィによる CaP 層溶解性の検討

CaP の溶解性は、溶液 pH、結晶種、形態、結晶化度や結晶性などによって大きく変化する。本実験で作製した、ナノハイブリッドカプセルの CaP 溶解性について検討した。

3.2.1.2 項の PB および CaCl_2 を用いた方法で、pH 10 において lipo-CaP を作製した (37°C, 1 h)。遠心分離 (4°C, 15000 rpm, 1 h) により lipo-CaP を回収した後、MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.0)、HEPES 緩衝液 (10 mM, pH 7.0)、および CHES 緩衝液 (10 mM, pH 10.0) にそれぞれ再分散させた。一定時間毎に、lipo-CaP 分散液をフィルター濾過 (cellulose acetate, 0.2 μm) し、カルシウムイオン濃度を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 分析 (Shodex IC YS-50、溶離液: 4 mM メタンサルホン酸、流速: 1.0 mL/min、測定時間: 20 min) により測定した。

3.2.4.3 CaP 層溶解後のナノカプセルの TEM 観察

3.2.1.2 項の PB および CaCl_2 を用いた方法で、pH 10 において lipo-CaP を作製した (37°C, 1 h)。さ

らに、MES 緩衝液 (10 mM, pH 4.0) を用いて限外ろ過精製 (20°C, 3000 rpm, 3 min, 5 times) を行った。さらに 3.2.2.1 項と同様の方法で TEM (120 kV) によって溶解後の lipo-CaP の観察を行った。

3.2.5 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡観察 (CLSM) による骨のモデルへの集積能の検討

2.3.5 項にて、DNA のリン酸基が骨の主無機成分である HAp と強く相互作用することがわかった。よって、本実験では、ナノハイブリッドカプセル表面の DNA をターゲティングリガンドとして用いて、骨のモデルである HAp 粉体への集積能について検討した。

本項では、lipo-CaP と lipo-CaP-DNA の HAp 粉体 (hydroxyapatite, DNA GRADE Bio-Gel HTP Gel, Bio-Rad) への集積能の検討を行った。方法は、2.2.6.1 項と同様である。

3.3 結果および考察

3.3.1 ハイブリッドリポナノカプセルの作製およびキャラクタリゼーション

3.3.1.1 リポナノカプセル表面のポリマーの種類および pH による影響

<TEM による形態観察>

リポソームとリポナノカプセルを用いて、pH 7.0 または 10.0 で CaP 形成 (37°C, 1 h) を行った結果を Fig. 3.4 に示す。どちらの pH においても、リポソーム表面へ CaP が特異的に生成し、ナノハイブリッドカプセルの形成が観察された。pH 10.0 で作製した liponano-CHI-DNA 以外のリポナノカプセルにおいては、内部にまで結晶が析出した中実粒子や大きな凝集体の形成が多く見られた。そこで、リポソームおよび liponano-CHI-DNA の内部へ封入したリン酸イオンを定量したところ (Fig. 3.5 参照)、リポソームの場合よりも liponano-CHI-DNA からのリン酸イオンの放出量が抑制されていた。カプセルウォールを介したイオンの拡散速度に影響を与える因子として、イオンのサイズと価数、カプセル内外のイオン濃度勾配、ポリマー層の存在状態 (電荷と構造) および脂質膜の流動性があげられる。ここでは、イオンの種類および濃度は一定であるため、2.3.3.2 項で述べたように脂質膜の流動性による影響が高いと考えられる。よって、2.3.3.2 項の結果と同様に、リポソーム表面へポリマーを被覆することにより、カプセル層の物質透過性が下がったためと考えられる。このようにリポソームと比較し、リポナノカプセル内部からのリン酸イオンの供給が抑制されたため、表面だけでなく内部においても CaP の核形成と成長が起こったと考えられる。一方、pH 10.0 では、liponano-CHI-DNA の表面に特異的に CaP が析出し、ハイブリッドリポナノカプセルが形成された。これには、二つの理由が考えられる。まず一つ目の理由では、結晶形成における重要なファクターである pH に注目して考えた。以下にリン酸イオンの解離状態と HAp の溶解度積 K_{sp} を示す。



$$\log K_{sp} = [\text{Ca}^{2+}]^5 [\text{PO}_4^{3-}] [\text{OH}^-] \quad (3.2)$$

式 (3.1) より、pH 7.0 以上ではリン酸イオンの解離が促進し、溶液中の $[\text{PO}_4^{3-}]$ が上昇する。また $[\text{OH}^-]$ が増大すると、式 (3.2) より過飽和度が高くなり HAp の析出が促進される。よって、pH 10.0 では、HAp の析出が起こりやすく、少量の PO_4^{3-} を供給するだけでハイブリッドリポナノカプセルが形成されたと考

えられる。しかし、これだけでは liponano-CHI と liponano-CHI-DXS の結果と liponano-CHI-DNA の結果の違いを説明できない。そこで、二つ目の理由として、ナノカプセル表面の官能基と Ca^{2+} との親和性に注目して考えた。これまで、低分子から高分子までの様々な物質の CaP 形成への影響について、様々な研究が行われてきた。官能基の中でも、カルボキシ基およびリン酸基が、 Ca^{2+} の吸着および CaP 生成に適していることが知られている¹⁰⁾。例えば、カルボキシ基を豊富に有するコラーゲンや絹タンパクであるセリシン、さらにリン酸化された dentin matrix protein 1 (DMP-1) などが HAp の核生成とエピタキシャル成長を促進することが報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。本実験においては、リポソームと liponano-CHI-DNA を用いた場合にのみハイブリッドリポナノカプセルが得られたことから、リポソームおよび DNA のリン酸基が、核形成の場として適していたためと考えられる。

Fig. 3.6 に、pH 10.0 において CaP 形成 (37°C, 1h) を行うことによって作製した、lipo-CaP と liponano-CHI-DNA-CaP を高倍率で TEM 観察を行った結果を示す。Lipo-CaP については、リポソーム表面が緻密な CaP の厚い層で覆われている様子が観察された。一方、liponano-CHI-DNA-CaP では、脂質膜は白いリング状に見られ、その内側と外側を無機層が挟み込むように形成されている様子が見られた。このことから、liponano-CHI-DNA では内水相でも CaP の生成が起こっていることを示唆している。リポソームを用いた場合は、リン酸イオンの放出が速く、カルシウムイオンが内部へ拡散する前に外液中で CaP の析出が起こったと考えられる。一方、liponano-CHI-DNA を用いた場合は、リン酸イオンの放出が遅いため、表面での CaP 生成が遅く、カルシウムイオンが内部に侵入して CaP が生成されたと考えられる。よって、リポソームを用いた場合は、イオンの放出は内側から外側への方向が優勢であったのに対して、liponano-CHI-DNA を用いた場合は、カプセルウォールを介してイオンの相互拡散が起こって CaP 形成に至ったと考えられる。

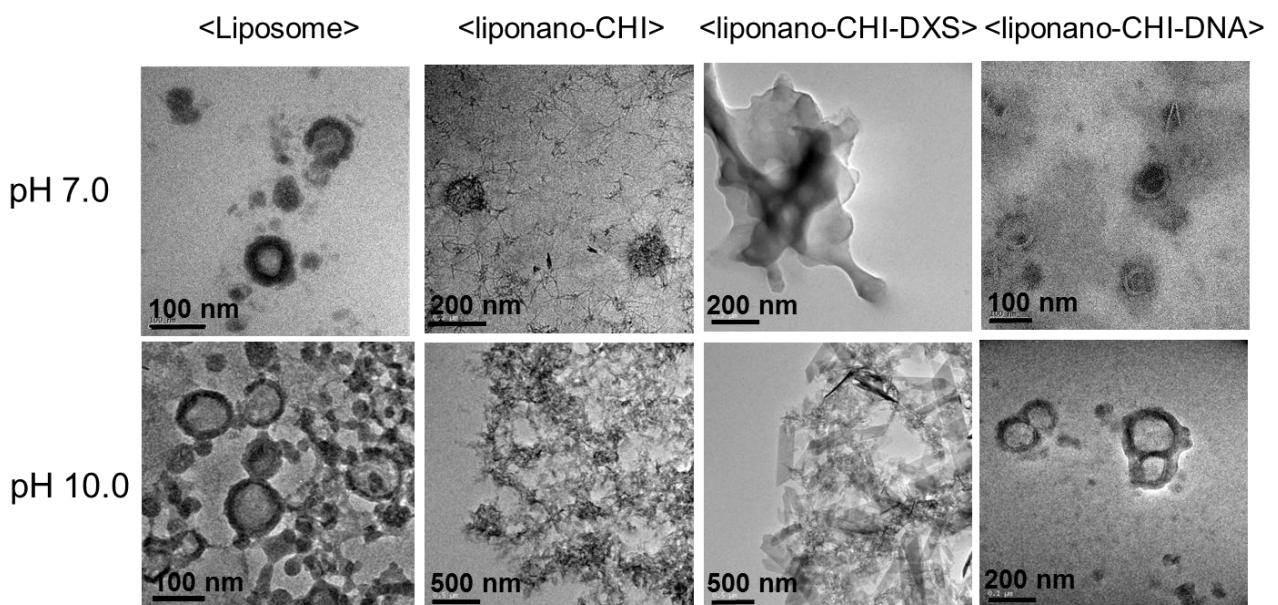


Fig. 3.4 TEM images of hybrid nanocapsules after deposition of CaP over liposome, liponano-CHI, liponano-CHI-DXS and liponano-CHI-DNA at pH7.0 and 10.0. CaP deposition was carried out at 37°C for 1 h using CaCl_2 and $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ as ion species.

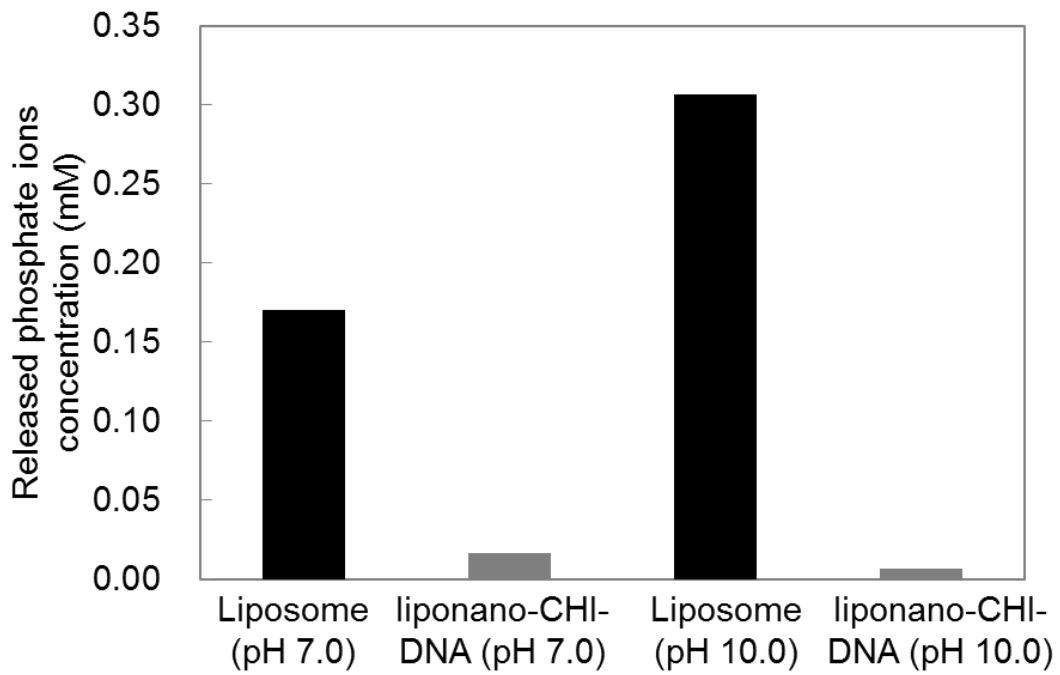


Fig. 3.5 Release of phosphate ions from liposome and liponano-CHI-DNA at 37°C at pH 7.0 and 10.0.

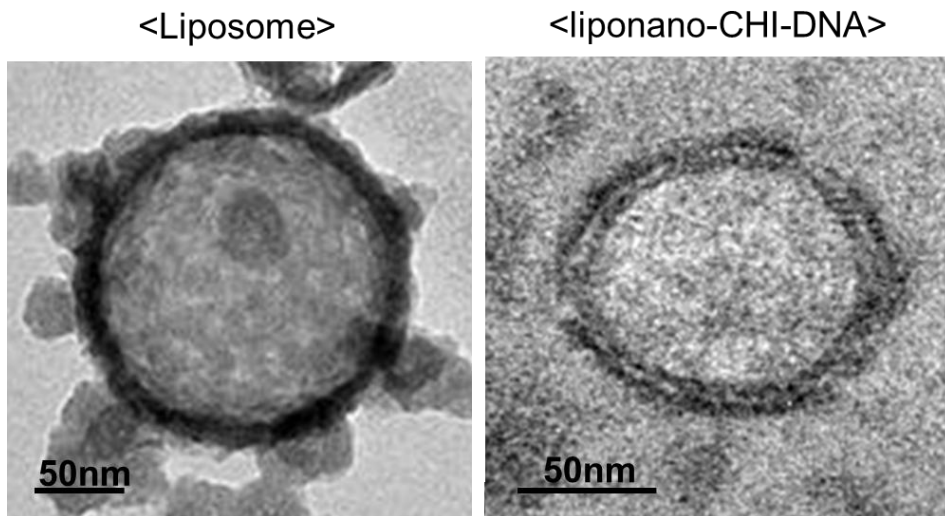


Fig. 3.6 TEM observation at high magnification of a hybrid capsule wall produced on liposome (left) and on liponano-CHI-DNA at 37°C and pH10 (right) at 37°C and pH10.

<SEMによる形態観察>

pH 10.0においてCaP形成(37°C, 1h)を行うことにより作製した、lipo-CaPとliponano-CHI-DNA-CaPのSEM像をFig. 3.7に示す。リポソームは、乾燥により球状の形態を保つことができず、SEMによる観察を行うことができなかった。表面にCaPを析出させたナノハイブリッドカプセルでは、乾燥後も球状を保持したままであることがわかった。

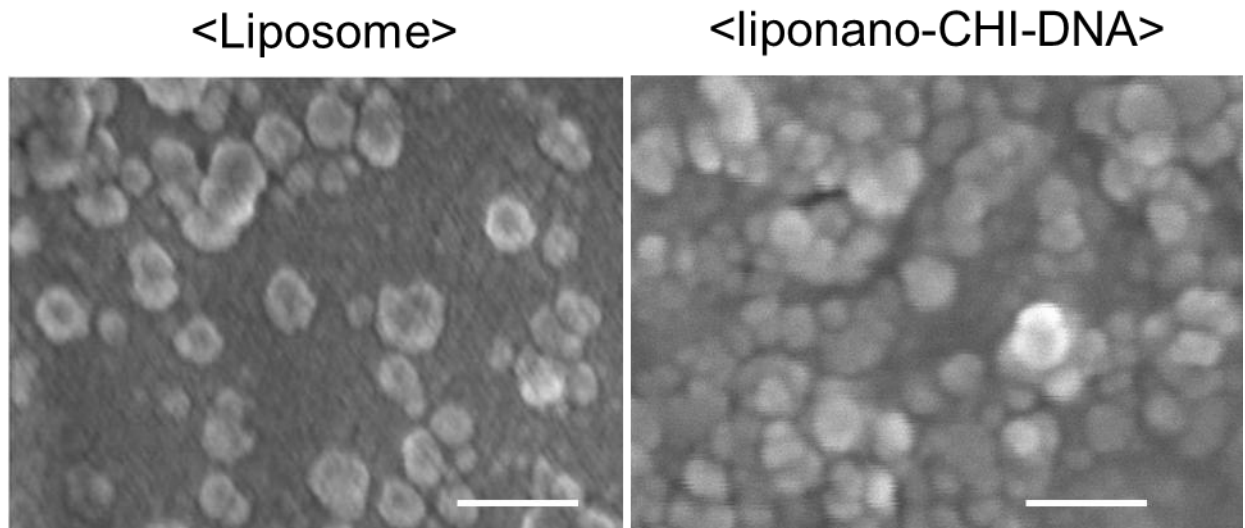


Fig. 3.7 SEM images of hybrid nanocapsules after deposition of CaP over liposome (left) and liponano-CHI-DNA (right) produced at 37°C and pH10. All scale bars are 200 nm.

<元素分析>

pH 10.0においてCaP形成(37°C, 1h)を行って作製した、lipo-CaPとliponano-CHI-DNA-CaPの元素分析の結果をFig. 3.8に示す。どちらの場合も、Caのピークが検出され、CaPの形成が示唆された。Pはリポソームのリン脂質およびDNAのリン酸基にも含まれるため、CaPの形成を確認することはできなかった。

<結晶構造の同定>

37°CでpH 10.0において1時間CaP形成を行って作製した、lipo-CaPとliponano-CHI-DNA-CaPの電子線回折像をFig. 3.8に示す。このとき、lipo-CaPからは回折点は観察されず、ハローパターンを示したことから、アモルファスであることが考えられる。一方、liponano-CHI-DNA-CaPからは、わずかではあるが回折点が観察され、結晶構造を有することがわかった。また、回折点は、CaPの結晶構造の一種であるHApの(300)面であると考えられた。

ナノカプセル表面のCaPの結晶についてさらに検討するため、FT-IRによる解析を行った。結果をFig. 3.9に示す。Fig. 3.9(a)と(b)は、それぞれリポソームとliponano-CHI-DNAのIRスペクトルであり、どちらからもCaP由来の吸収は見られなかった。HApの結晶構造中に含まれる、 PO_4^{3-} は四面体構造であり、四つの基準振動モード($\nu_1 \sim \nu_4$)のうち、 ν_3 および ν_4 が赤外活性であることが知られている¹⁵⁾。また、これらの分裂したピークが鋭くなるほどHAP様になることも知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。Fig. 3.9(c)と(d)はそれ

それぞれ pH 7.0 と 10.0 で作製した lipo-CaP の IR スペクトルであり、CaP に含まれる PO_4^{3-} 由来の吸収が $1050\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (ν_3 : 非対称伸縮振動) および $550\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (ν_4 : 面内変角振動) 付近に見られた。pH 10.0 で作製した lipo-CaP のピークに分裂は見られず、ブロードであることから、アモルファスであると考えられる。Fig. 3.9 (e)より、pH 7.0 で作製した liponano-CHI-DNA-CaP からは、CaP 由来の特徴的なスペクトルは見られなかった。一方、Fig. 3.9 (f)より、pH 10.0 で作製した liponano-CHI-DNA-CaP からは、 PO_4^{3-} 由来の吸収が $1050\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ (ν_3) および $540\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ (ν_4) 付近に見られた。これらのスペクトルは CaP の結晶種である brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) や monetite (CaHPO_4) の IR スペクトル¹⁹⁾とは異なり、前述したように HAp に特有なピークの分裂がみられたため、この結晶が HAp 様であると結論づけた。これらの結果は、上記で述べた電子線回折による結果と一致している。

以上のように、同じ作製条件下でも、ナノカプセルの種類（リポソームまたは liponano-CHI-DNA）によって、得られる CaP の結晶構造が異なることがわかった。これについて、次の二つの理由が考えられる。まず一つ目は、上で述べたように、ナノカプセル内部からのリン酸イオンの放出性の違いによると考えられる。リポソームと比較し、liponano-CHI-DNA からのリン酸イオンの放出は遅く、ナノカプセル表面においてカルシウムイオンとゆるやかに反応して CaP 生成が進行したと考えられる。CaP の中でも HAp の溶解度積 $\text{p}K_{\text{sp}}$ は 63 と低いため、liponano-CHI-DNA 表面での低いリン酸イオン濃度において HAp が優先的に生成したと考えられる。二つ目の理由は、DNA のリン酸基が HAp 形成のテンプレート (A3.2 参照) として適していたことが考えられる。DNA のリン酸基と HAp 結晶中の Ca^{2+} は、キレート形成または静電相互作用によって強く相互作用することが知られている²⁰⁾。カプセル表面の DNA が HAp の結晶核形成および成長エネルギーを低下させ、エピタキシャル成長を促したと推測される。

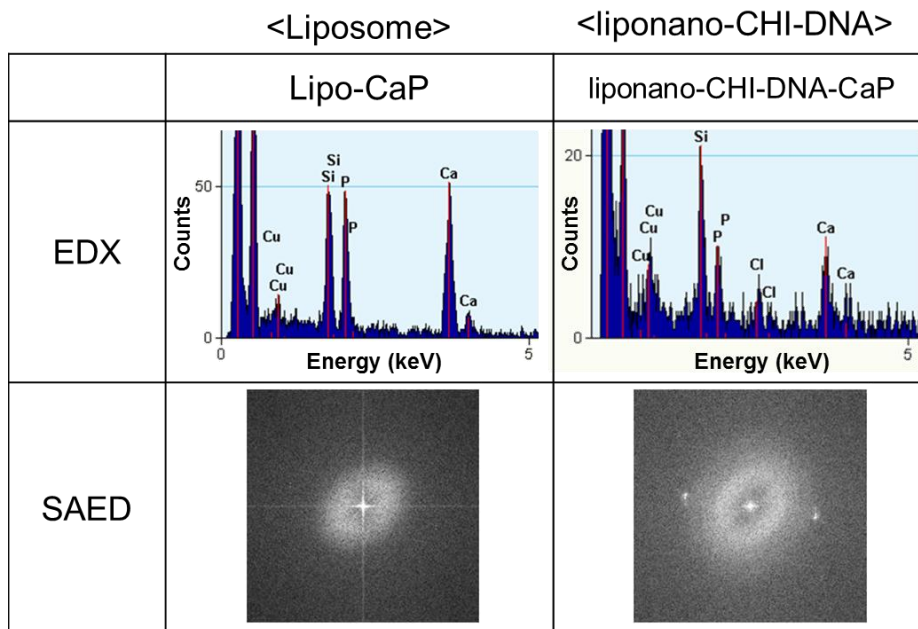


Fig. 3.8 EDX spectra (upper) and selected area electron diffraction images (lower) of lipo-CaP and liponano-CHI-DNA-CaP produced at 37°C and pH 10.

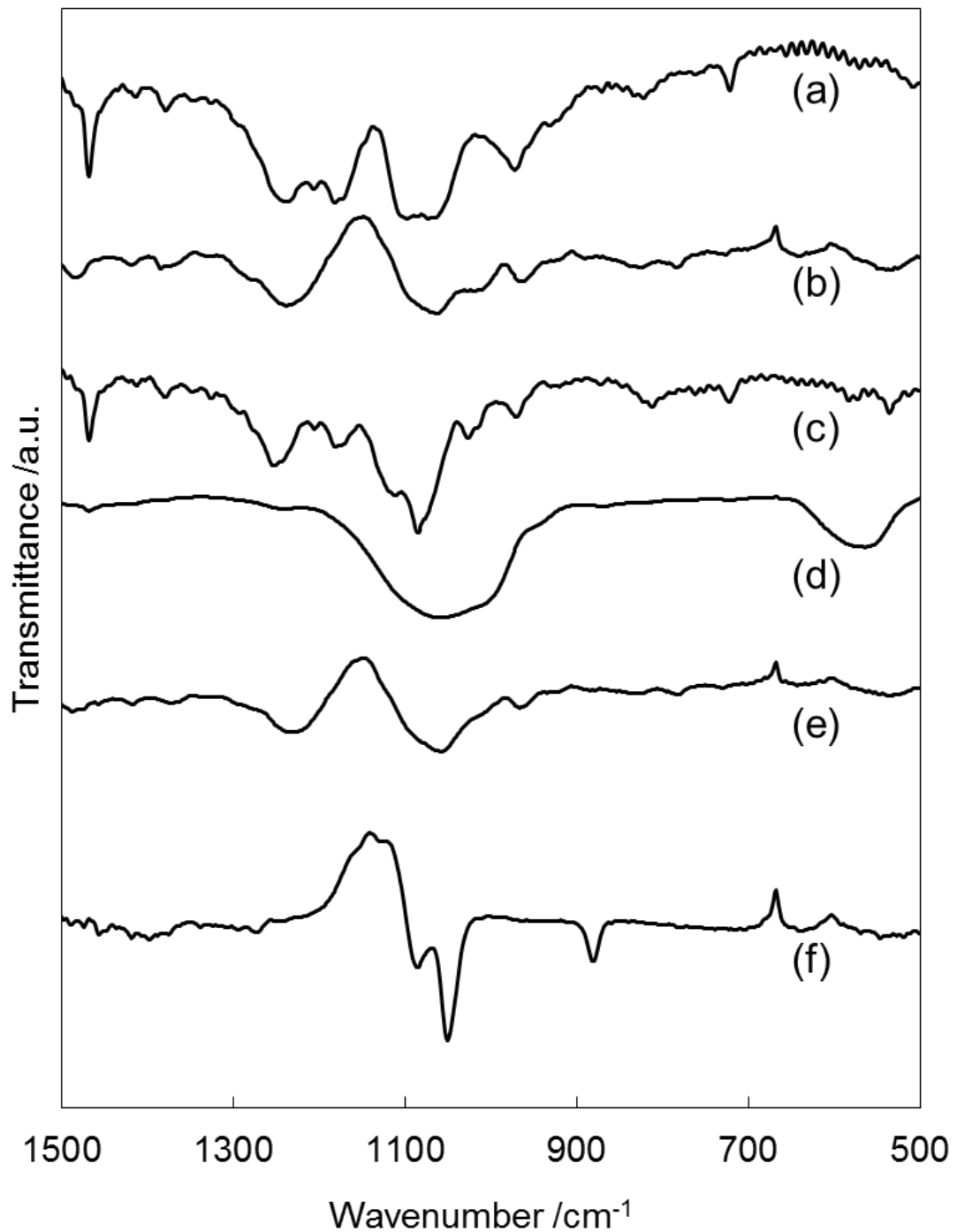


Fig. 3.9 FT-IR spectra of liposome (a), liponano-CHI-DNA (b), lipo-CaP (pH 7) (c), lipo-CaP (pH 10) (d), liponano-CHI-DNA-CaP (pH 7) (e) and liponano-CHI-DNA-CaP (pH 10) (f). CaP deposition was carried out at 37 °C for 1 h.

3.3.1.2 温度による影響

温度によって、CaPの生成速度、結晶構造および結晶性は影響を受けることが知られている²¹⁾。特に、高温条件下において、CaPの生成と成長速度は速くなる。水溶液中でのHApの溶解度積 K_{sp} は、以下の式で表される²²⁾。

$$\log K_{sp}(\text{molL}^{-1}) = -8219.41T^{-1}(\text{K}^{-1}) - 1.6657 - 0.098215T(\text{K}) \quad (3.5)$$

これをプロットすると、 K_{sp} は289K付近に極大を持ち、この温度より高くなるにつれて K_{sp} は減少し、HApが析出しやすくなることがわかる。リポソームおよびliponano-CHI-DNAを用いて、60°CでpH 7.0と10.0においてCaP生成(1h)を行った結果をFig. 3.10に示す。反応温度を、37°Cから60°Cに上げることによって、すべてのlipo-CaPが、球状のカプセル構造であったのが、大きな針状または凝集体へと変化した。上記でも述べたようにリポソームからのリン酸イオンの放出は速く、温度の上昇によって結晶生成と成長も促進されるため、大きな結晶へと成長したと考えられる。また、liponano-CHI-DNAについても、カプセル構造は見られず、内部にまでCaPが析出した中実構造のナノ粒子が得られた。これは、温度の上昇による結晶生成と成長の促進に加え、ナノカプセルの内水相からプロトンが放出されて、内部のpHが上昇し、CaPが析出しやすくなったためと考えている。

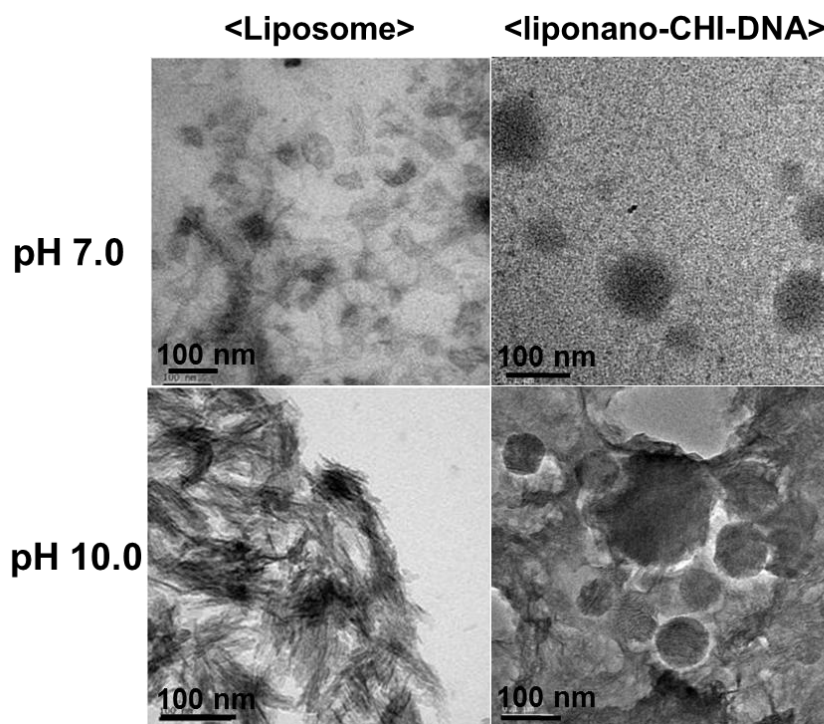


Fig. 3.10 Effect of pH and temperature on the formation of CaP crystals using liposome (left side) and liponano-CHI-DNA (right side) as a template. CaP deposition was carried out at 60°C for 1 h using CaCl_2 and $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ as ion species. The images were taken by FE-TEM.

3.3.1.3 CaP 形成の反応時間による影響

<TEM による形態観察>

CaP 層の厚みを制御するために、CaP 形成の時間による影響について検討した。リポソームと liponano-CHI-DNA を用いて、pH 7.0 と 10.0 において CaP 生成 (37°C, 18 h) を行った結果を Fig. 3.11 に示した。リポソームを用いた場合、形成時間を 1 時間から 18 時間へと長くすると、カプセル構造をもつナノ粒子は見られなくなり、大きな凝集体または針状結晶が確認された。一方、liponano-CHI-DNA を用いた場合は、18 時間後もカプセル構造を保ち、CaP 由来のカプセル層の厚みが増していることを確認した。これはリポソームと liponano-CHI-DNA のリン酸イオンの放出性の違いに起因していると考えられる。上述したようにリポソームからのリン酸イオン放出性は速いため、CaP の生成と成長が速く進行して、秩序のある形状にはならなかったと考えられる。一方、liponano-CHI-DNA からのリン酸イオンの放出は遅く、ナノカプセル表面で結晶生成と成長がゆっくりと起こるため、時間により厚みの制御が可能となったと考えられる。

<FT-IR による結晶構造の同定>

Fig. 3.12 に liponano-CHI-DNA を用いて作製したナノハイブリッドカプセルの IR スペクトルを示す。まず、pH 7.0 にて CaP を形成させた場合、1 時間後では CaP 由来のスペクトルは観察されなかったが、18 時間後になると brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 由来のピークが 795 cm^{-1} 付近 (P-O-H 面外変角振動) および $900\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$ (P-O 伸縮振動) 付近¹⁹⁾に観察されるようになった (Fig. 3.12 (a)参照)。pH 7.0 では CaP の生成と成長が遅いため、時間を長くすることによって、CaP 層の形成が進行することに加えて溶解と再析出による結晶化が進行した可能性も考えられる。このとき、pH 7.0 では HPO_4^{2-} の濃度が高くなることから、HAp よりも brushite が生成しやすくなったと考えられる。一方、Fig. 3.12 (b)より、pH 10.0 においては、1 時間後に HAp が形成され、時間を長くしても、結晶構造に変化は見られなかった。これは、CaP の結晶構造の中でも、HAp が最も熱力学的な安定な形態であるため、厚みが増しても HAp の結晶構造が維持されたと考えられる。

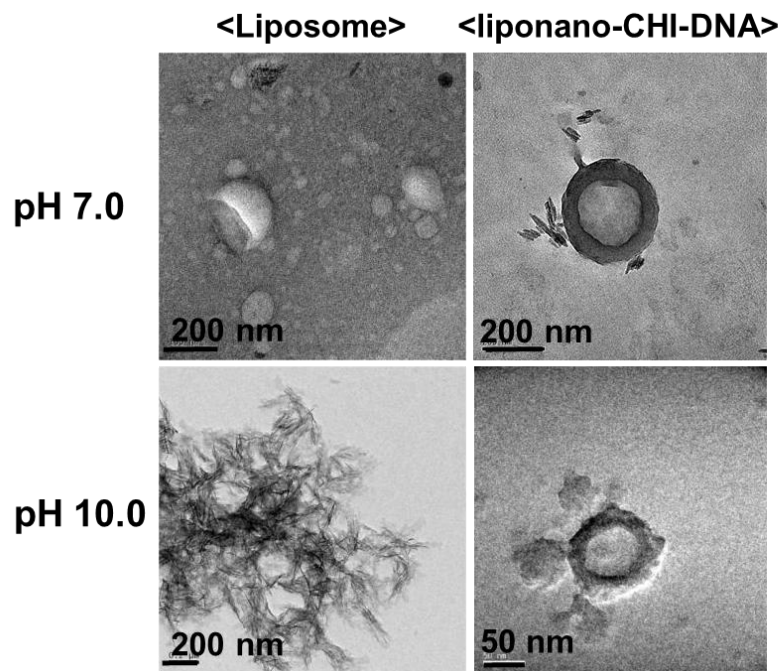


Fig. 3.11 Effect of incubation time on the formation of CaP crystals using liposome (left side) and liponano-CHI-DNA (right side) as a template. CaP deposition was carried out at 37°C for 18 h using CaCl_2 and $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ as ion species. The images were taken by FE-TEM.

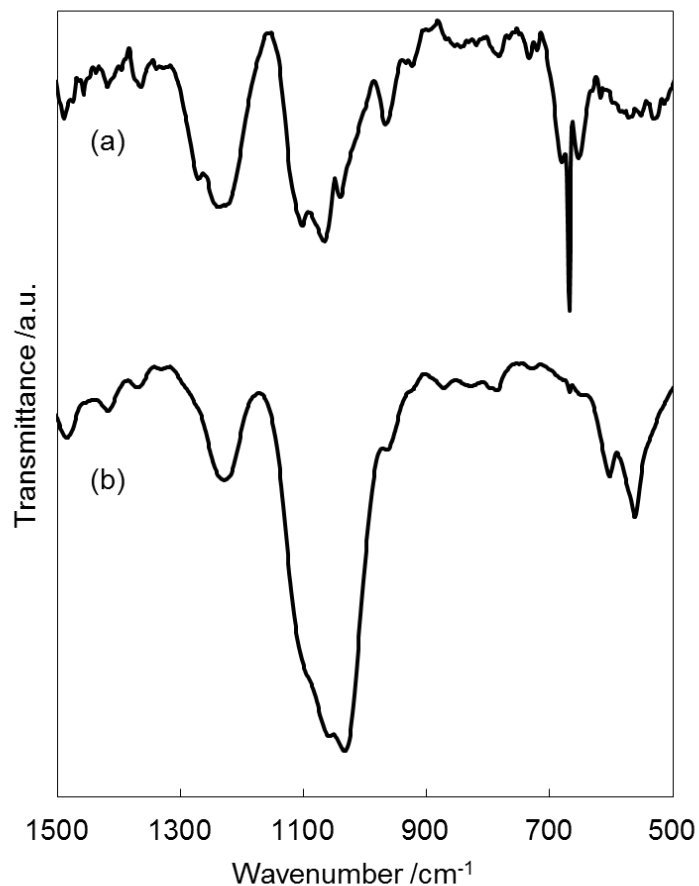


Fig. 3.12 FT-IR spectra of liponano-CHI-DNA-CaP produced at pH 7.0 (a) and 10.0 (b). CaP deposition was carried out at 37°C for 18 h.

3.3.1.4 イオン種による影響

生体組織の HAp では、その結晶中に Na^+ が多量に含まれるため、結晶性の低い HAp となっている。これは、 Na^+ の結晶イオン半径 (0.97Å) が Ca^{2+} の結晶イオン半径 (0.99Å) にほぼ等しいため、容易に結晶格子や結晶表面の Ca^{2+} のサイトへ取り込まれるためである²³⁾。そこで、本項では、イオン種として PB (NaH_2PO_4 と Na_2HPO_4) の代わりに $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を、 CaCl_2 の代わりに $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ を用いることによって、ナノカプセル表面における CaP 生成への Na^+ の影響を検討した。PB と CaCl_2 を用いた場合と同じ条件では、ナノカプセル表面への CaP 生成が見られなかったため、反応条件を変えて検討を行った。

pH 6.7 において CaP 生成 (25°C, 1 h) を行った結果を Fig. 3.13 に示す。Fig. 3.4 の結果と同様にリポソームおよび liponano-CHI-DNA を用いた場合には表面で CaP が生成し、ナノハイブリッドカプセルが得られた。さらに、これまで CaP が生成しなかった liponano-CHI 表面においても CaP の生成が起こり、ナノハイブリッドカプセルを得ることができた。これは、反応時の pH を 7.0 から 6.7 へと下げたため、CHI のアミノ基 (pKa 6.5) がプロトン化するようになり、CaP 生成に必要な Ca^{2+} をナノカプセル表面近傍へ集積化することができたためと考えられる。

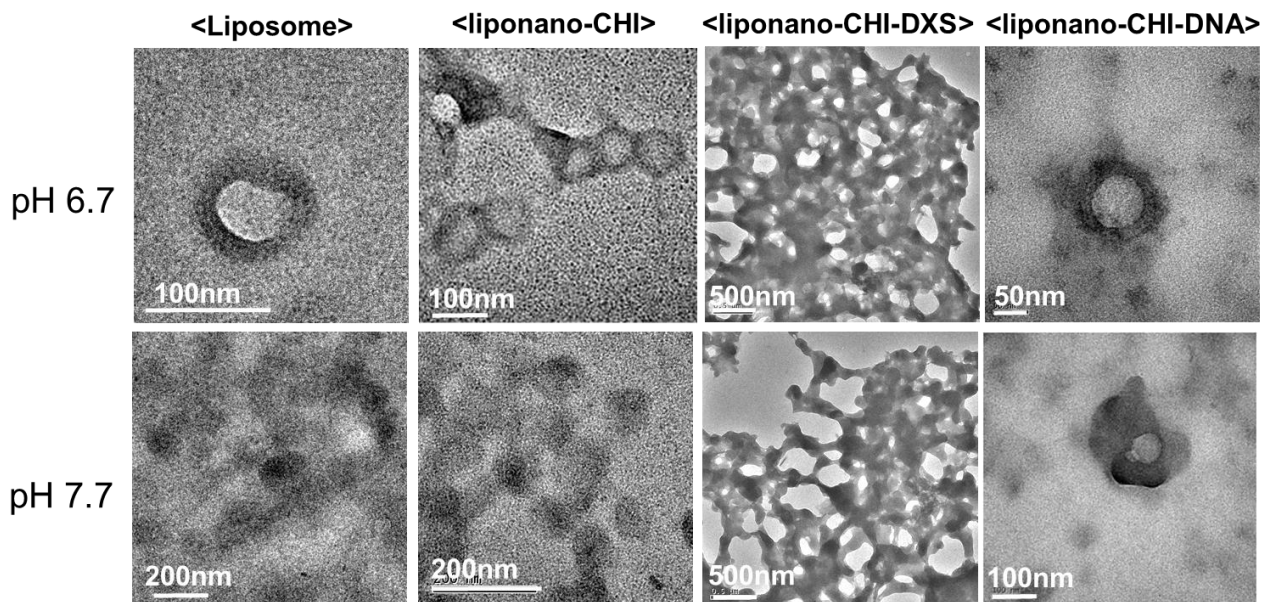


Fig. 3.13 TEM images of hybrid nanocapsules after deposition of CaP over liposome, liponano-CHI, liponano-CHI-DXS and liponano-CHI-DNA at pH 6.7 and 7.7. CaP deposition was carried out at 25°C for 1h using $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ as ion species.

3.3.1.5 外液のリン酸イオン濃度による影響

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ と $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ を用いた系において、CaP 層の厚みを制御するために外液にもリン酸イオンを添加し、CaP 生成を行った結果を Fig. 3.14 と Fig. 3.15 に示した。リポソームおよび liponano-CHI-DNA を用いた場合、pH 7.7 では結晶の生成および成長が促進されるため、中実粒子や針状の結晶が見られた。一方、pH 6.7 では厚みのある CaP 層が得られ、リン酸イオンの濃度によっても厚みの調節が可能であった。liponano-CHI の場合には、外液のリン酸イオン濃度および pH を変化させることによって、様々な CaP の形態を有するナノハイブリッドカプセルが得られた (Fig. 3.15 参照)。CHI のアミノ基はリポソームや DNA のリン酸基と比較し、CaP 生成と成長を誘起する効果が低い。そのため liponano-CHI では外

液のリン酸イオン濃度や pH によって CaP 層の形成を制御することができると考えられる。

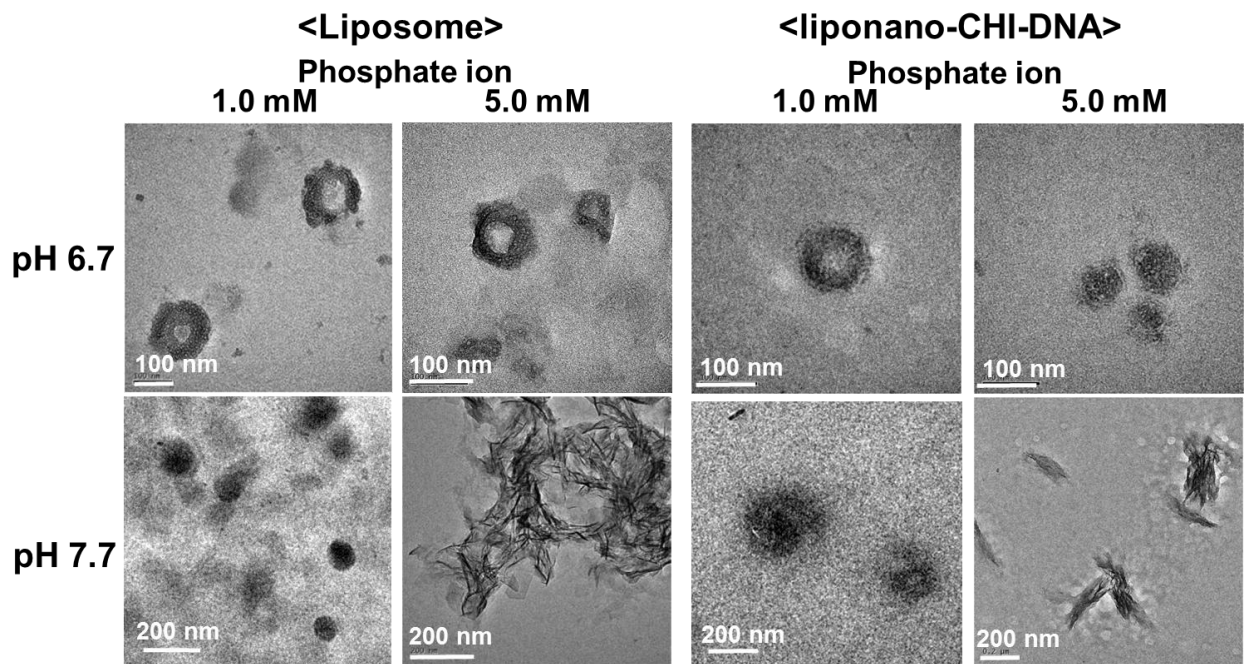


Fig. 3.14 TEM images of hybrid nanocapsules after deposition of CaP over liposome and liponano-CHI-DNA in the presence of phosphate ions in the outer water phase at pH 6.7 and 7.7. CaP deposition was carried out at 25°C for 1 h using $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ as ion species.

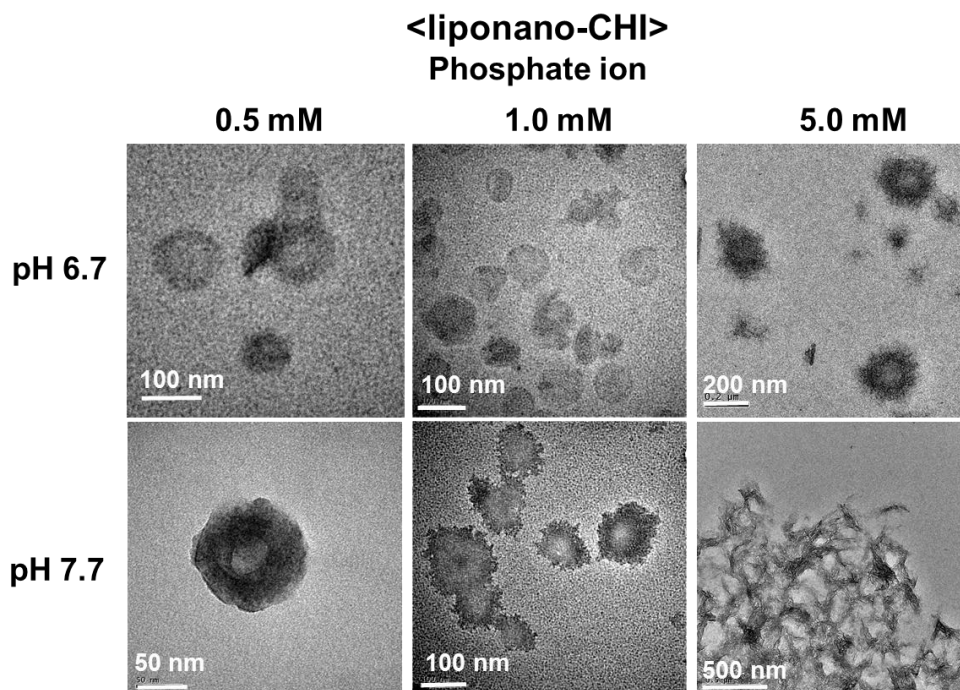


Fig. 3.15 TEM images of hybrid nanocapsules after deposition of CaP over liponano-CHI in the presence of phosphate ions in the outer water phase at pH 6.7 and 7.7. Each reaction was carried out at 25°C for 1 h using $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ as ion species.

3.3.2 CaP カプセル層への DNA の吸着

3.3.2.1 TRITC ラベル化 DNA の作製

カルボジイミド法により、DNA の 5'末端リン酸基に対して蛍光物質である TRITC をラベル化した。DNA への TRITC ラベル化量は、1 mg の DNA に対して、 2.2×10^{-9} mol であった。

3.3.2.2 Lipo-CaP への DNA 吸着量の定量

<吸着量の定量>

Lipo-CaP に対する DNA の吸着量は、 23.8 ng/cm^2 となった。この値は、2.3.2.1 項にて述べたリポソーム表面への CHI の飽和吸着量 19.4 ng/cm^2 よりも多く、DNA は単分子層吸着していると考えられる。

<ゼータ電位測定による吸着の確認>

pH 7.0 における lipo-CaP および lipo-CaP-DNA の表面電位は、それぞれ -65.9 mV および -85.5 mV となった。これは、Lipo-CaP 表面へアニオン性の DNA が吸着したことを示唆している。

3.3.3 CaP 層溶解に伴う DNA 放出能の検討

3.3.3.1 低 pH におけるナノハイブリッドカプセル表面からの DNA の放出

pH 4.0 または 7.0 における lipo-CaP-DNA からの DNA の脱着量の経時変化を Fig. 3.16 に示す。pH 7.0 では、初期にわずかなバーストが見られ、その後はゆるやかな脱着挙動を示した。一方、pH 4.0 においては、pH 7.0 の場合と比較して脱着量が 3 倍近くになり、最終的には 90% 程度の DNA が脱着することがわかった。pH を下げることによって、CaP 層が溶解して表面に吸着していた DNA が放出したと考えられる。ナノハイブリッドカプセルの CaP 層の厚み、結晶構造および結晶化度を制御することによって、CaP 層の溶解および DNA のリリースを精密にコントロールすることができると考えられる。

細胞内のエンドソームの pH は 5.5 付近であることが知られており、本研究で作製したナノハイブリッドカプセルの酸性条件における DNA のリリースを利用し、遺伝子デリバリーへの応用が期待できる。また、ナノカプセル内部へ、薬物や遺伝子導入促進剤を封入することにより、それらとのシナジー効果も期待できる。さらに、エンドソーム内で CaP が溶解することにより、エンドソーム内外に浸透圧差が生まれ、エンドソームの破壊が起きることによる DNA またはナノカプセルのエンドソーム脱出が期待できる。

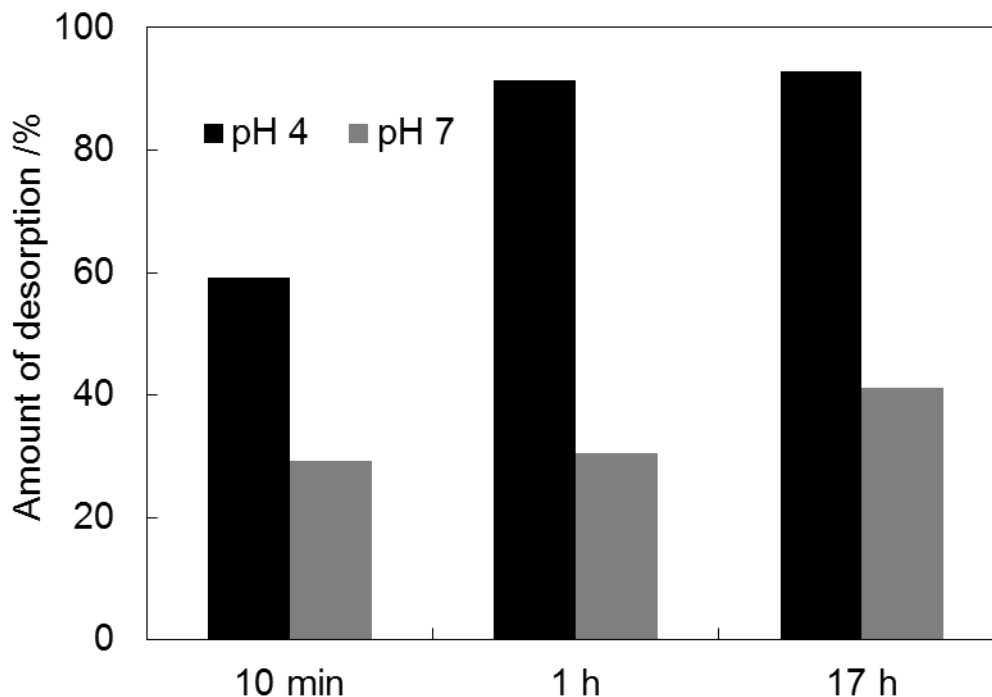


Fig. 3.16 Desorption of DNA at pH 4.0 and 7.0 from lipo-CaP as a function time.

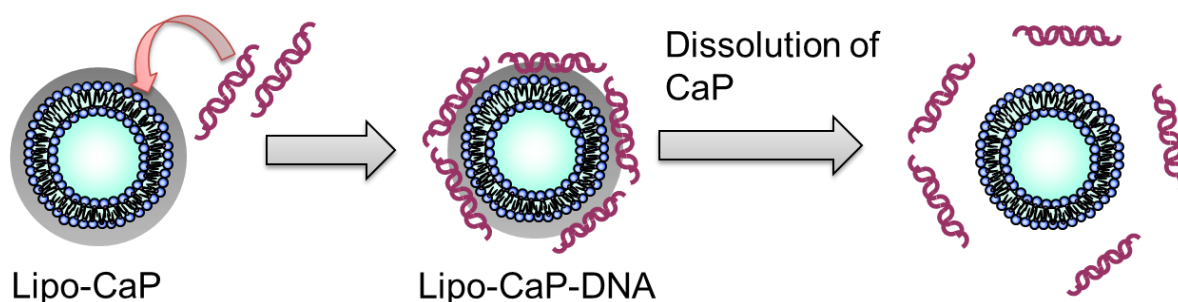


Fig. 3.17 Release of DNA from the surface of lipo-CaP-DNA by dissolution of CaP at low pH.

3.3.3.2 イオンクロマトグラフィによる CaP 層溶解性の検討

Lipo-CaP の pH 4.0、7.0 および 10.0 でのカルシウムイオン溶出量の経時変化を Fig. 3.18 に示す。いずれの pH においても、CaP の溶解は 20 分後には飽和に達していることがわかった。また、pH が低くなるほど CaP の溶解量が多くなることがわかり、3.3.3.1 項でみられた lipo-CaP からの DNA 放出挙動と相関性があった。式 (3.1) より、pH が低いとリン酸イオンの解離が抑えられるため、 $[\text{PO}_4^{3-}]$ が下がる。また、 $[\text{OH}^-]$ も下がるため、式 (3.2) より過飽和度が小さくなり、溶解度が上昇したと考えられる。よって、lipo-CaP-DNA からの DNA の放出は、pH による CaP の溶解性の変化に伴うものであると考えられる。

さらに、ナノハイブリッドカプセルを実際に生体内で応用する際には、体液中に含まれるイオンやタンパク質などによる溶解性への影響を検討する必要がある。血液中には様々なタンパク質が存在するが、中でもアルブミンは分子量 66,000 の血漿中で最も多く存在するタンパク質である。そこで、本実験では、牛血清アルブミン (BSA) 存在下において lipo-CaP の溶解性を検討した。HAp は、電荷を持つ結晶

面を有することから、酸性タンパク質である BSA は静電相互作用により、CaP 表面へ吸着する。BSA が CaP 表面へ吸着することにより、CaP の溶解性に影響を与えることが考えられる。Fig. 3.19 より、BSA 存在下においても CaP 層の溶解性はほとんど変化しなかった。3.3.1.1 項で述べたように、本実験で用いた lipo-CaP はアモルファスであるため、明確な結晶構造を示さず、BSA との吸着サイトが少なくなると、CaP の溶解には影響を与えなかったのではないかと考えている。

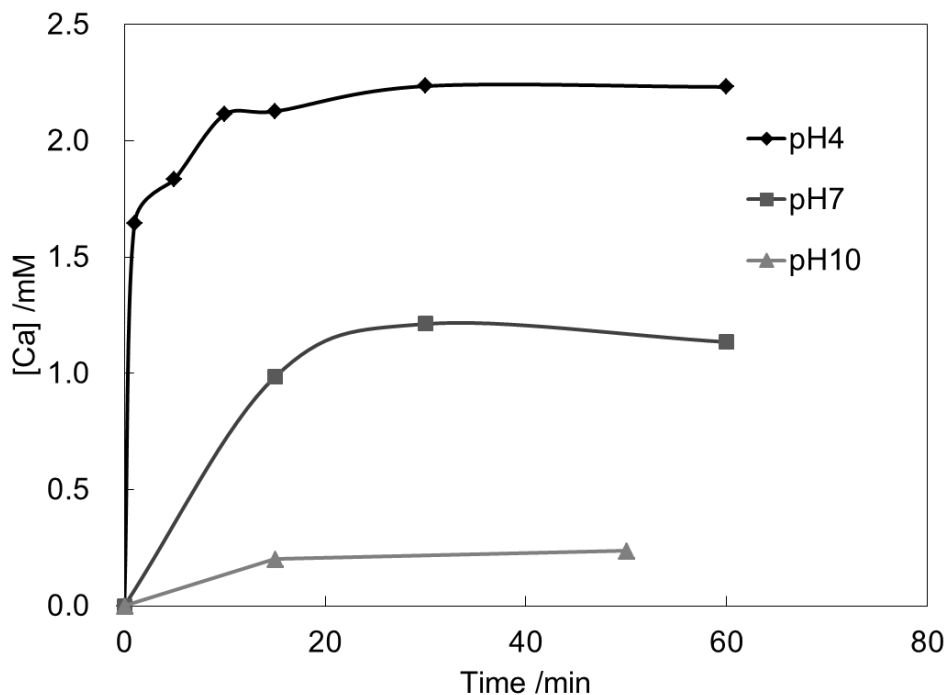


Fig. 3.18 Effect of pH on dissolution of CaP from lipo-CaP. CaP deposition was carried out at 37°C and pH 10 using CaCl₂ and Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ as ionic species.

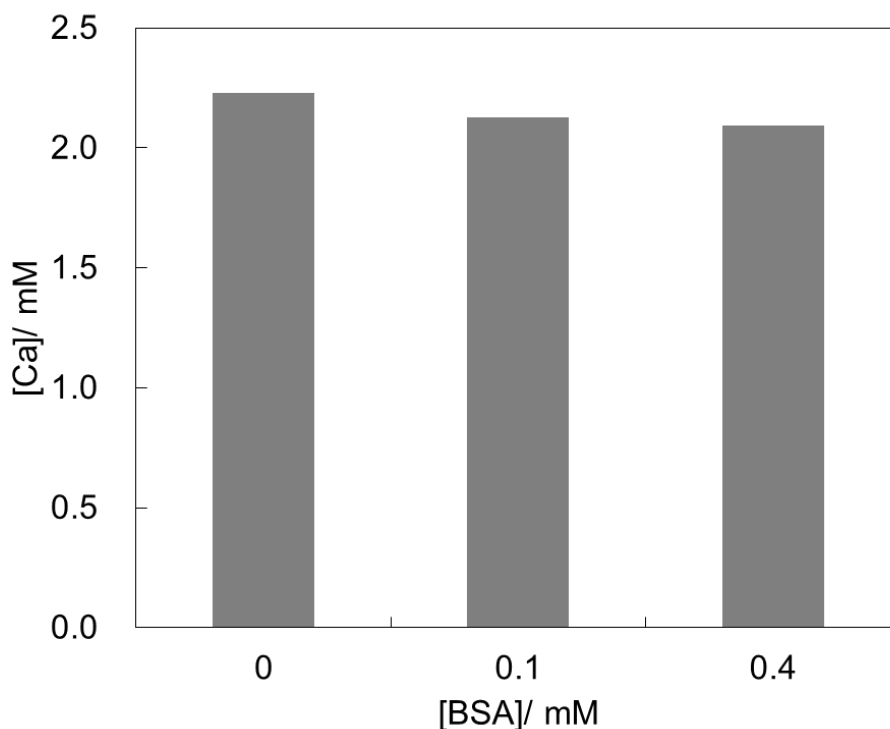


Fig. 3.19 Effect of bovine serum albumin (BSA) on dissolution of CaP from lipo-CaP.

3.3.3.3 CaP 層溶解後のナノカプセルの観察

Lipo-CaP を pH 4.0 にてインキュベートした後の TEM 像を Fig. 3.20 に示す。Fig. 3.4 で見られたような明確な CaP の厚い層はみられず、薄い CaP 層でおおわれたリポソームがいくつか観察された。これは、酸性条件にすることによって、CaP 層が溶解したことを示唆している。また、リポソーム自体は、乾燥によって変形しているものの、それぞれが個々に存在し、球形を保っていた。

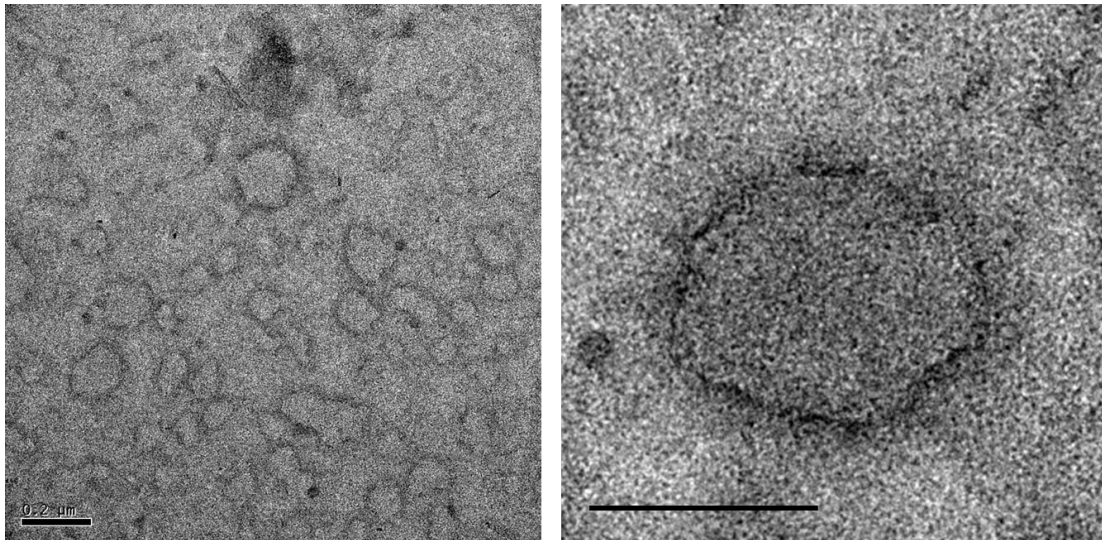


Fig. 3.20 TEM images of lipo-CaP after dissolution of CaP at pH 4.0. All scale bars are 200 nm.

3.3.4 共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡観察 (CLSM) による骨のモデルへの集積能の検討

内水相へ dextran-FITC を封入した、lipo-CaP および lipo-CaP-DNA を pH 7.0 にて HAp 粉体へ作用させ、集積能について検討した。Fig. 3.21 にナノカプセルを作用させた HAp 粉体の CLSM 写真を示す。緑色は、ナノカプセル内部に封入した dextran-FITC 由来であり、HAp 粉体への吸着能が高いほど、強い蛍光が観察される。Lipo-CaP では、HAp 粉体にわずかに緑色の蛍光が観察され、ナノカプセルが吸着していると考えられる。本実験で用いた lipo-CaP の CaP 層は 3.3.1.1 項より、アモルファスであることから、カルシウムイオンに富んだ面とリン酸イオンに富んだ面が混在していると考えられる (A3.1 参照)。HAp 粉体にも a 面または c 面が存在することから、両者の間で静電相互作用が働いて吸着したと考えられる。また、lipo-CaP の一部表面にリン脂質由来のリン酸基が露出し、それが吸着の駆動力になったことも考えられる。一方、lipo-CaP-DNA を作用させた HAp 粉体では、より強い蛍光が観察され、高い集積能を示した。また、DNA にラベル化した TRITC 由来の赤い蛍光も同様に観察されたことから、DNA は脱離せず、HAp 粉体への集積化を促進していることがわかった (Fig. 3.22 参照)。これは、2.3.5 項の結果と一致する結果となった。DNA のリン酸基が静電相互作用に加えてキレート形成能を有するため、HAp 結晶面のカルシウムと強く相互作用したためと考えられる。以上の結果からも、DNA を骨の無機成分へのターゲティングリガンドとして用いることが有効であることがわかった。

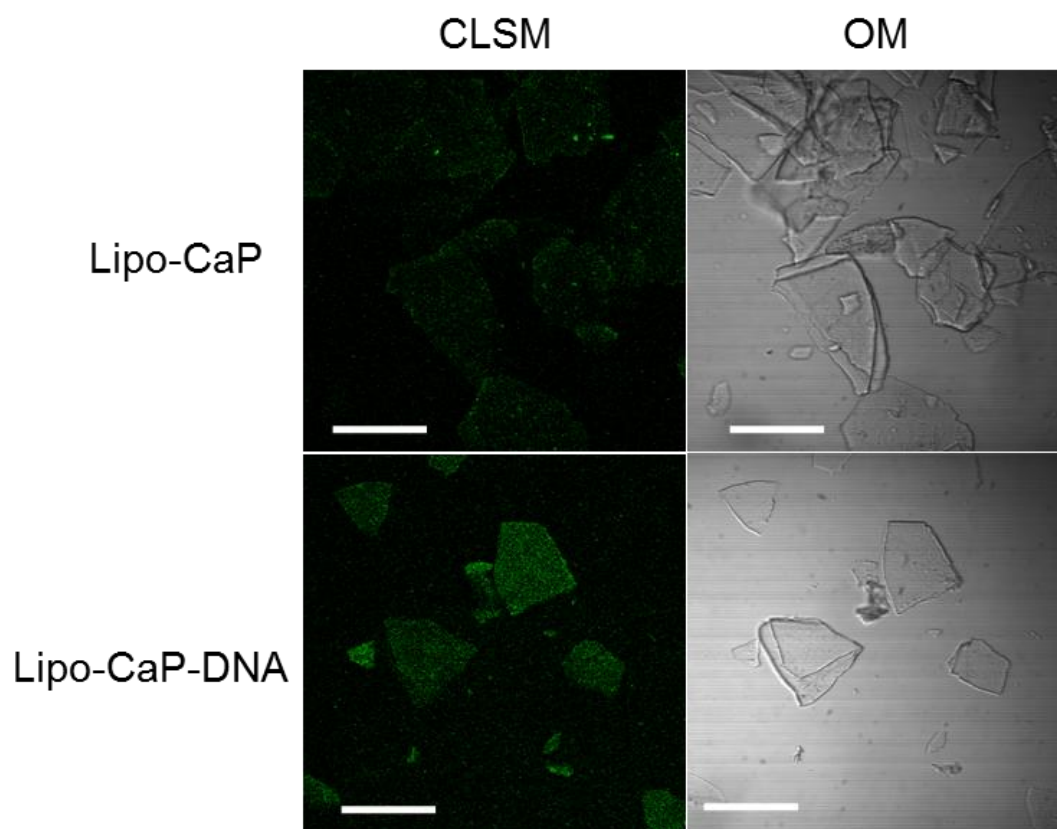


Fig. 3.21 Confocal microscopic images (left) and optical microscopic images (right) of lipo-CaP and lipo-CaP-DNA bound onto powdery HAp. All scale bars are 50 μm . Green regions correspond to dextran-FITC encapsulated into the nanocapsules.

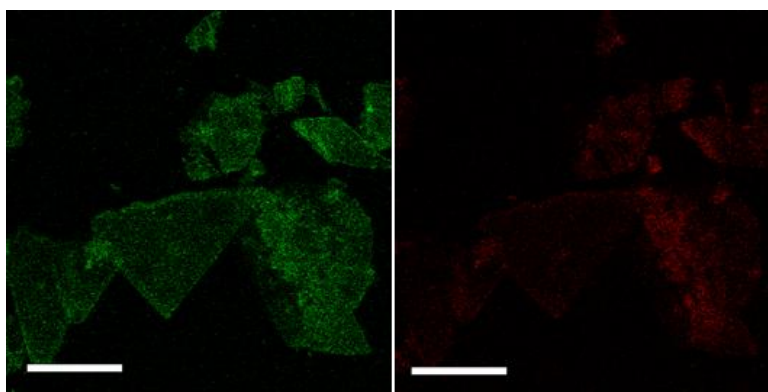


Fig. 3.22 Confocal microscopic images lipo-CaP-DNA bound onto powdery HAp. All scale bars are 50 μm . Green and red regions correspond to dextran-FITC inside the nanocapsules and TRITC-labeled DNA on the capsule wall, respectively.

3.4 結論

第2章にて作製したリポソームおよびポリマー層を有したリポナノカプセル表面にて、無機物であるCaPの析出を行い有機無機ハイブリッドリポナノカプセルの作製を行った。リポソームまたはリポナノカプセルの内部へリン酸イオンを封入し、外液へカルシウムイオンを加えることで、カプセルウォールを介したイオンの相互拡散により、ナノカプセル表面でCaPの析出を促した。このとき、①リポソーム表面のポリマーとその種類、②外液pH、③温度、④時間、⑤イオン種、⑥外液リン酸イオン濃度という種々の条件によるCaP層の構築、結晶構造および厚みへの影響について検討した。

リポソームあるいはliponano-CHI-DNAを用いた場合にのみ、表面特異的にCaPが析出し、ハイブリッドリポナノカプセルを作製することができた。一方、liponano-CHI-DXSあるいはliponano-CHIを用いた場合には、表面へのCaPの析出は見られなかった。これは、ナノカプセル表面のリン酸基が、CaPとの親和性が高かったためと考えられる。pH 7.0において、liponano-CHI-DNA表面でのCaP析出は見られなかったが、pH 10.0では $[\text{PO}_4^{3-}]$ と $[\text{OH}^-]$ が高くなるため、熱力学的に安定なHApが析出しやすくなり、表面でのCaP析出が起こったと考えられる。また、電子線回折像やFT-IRの結果より、リポソーム表面のCaPはアモルファスであったが、liponano-CHI-DNA表面のCaPはHAp様となり、表面層の違いによって結晶構造が異なることがわかった。これは、リポソームと比較して、liponano-CHI-DNAからのリン酸イオンの放出は遅く、ナノカプセル表面でカルシウムイオンとゆるやかに反応が進行したため、溶解度積の低いHApが優先的に析出したためと考えられる。また、DNAのリン酸基の配列が、HApの結晶面に高い適合性を示し、エピタキシャル成長を促してHAp様になったとも考えられる。さらに、リポソームの場合はCaPの析出が表面にのみ見られたが、liponano-CHI-DNAの場合はカプセルの内外にCaP層の生成が見られた。このことからリポソームからのイオンの放出は内側から外側への方向が優勢となるが、liponano-CHI-DNAからの放出はカプセルウォールを介した相互拡散であることがわかった。また、温度を高くすると、HApの生成速度が高くなるため、針状結晶やカプセル内部にまで結晶の析出した中実構造が得られた。さらにliponano-CHI-DNAではイオンの放出がゆるやかにすすむため、時間によってCaP層の厚みを制御することができた。さらに、イオン種を変えて検討を行った。ここではNaイオンを除くことによりCaPの析出が起こりやすくなり、liponano-CHI表面でもCaPを形成させることができた。また、外液にリン酸イオンを添加することで、CaP層の厚みや形態を制御することができた。このようにリポソーム表面へポリマー層を構築することにより、イオンの拡散性や反応場を操作することができ、ナノカプセル表面のCaP層の結晶構造および形態厚みの制御が可能となった。

ナノハイブリッドカプセルの機能化として、lipo-CaP表面へDNAを担持し、その放出能と骨へのターゲティング能を検討した。酸性pHにてCaPは溶解し、表面のDNAが脱着した。また、lipo-CaP-DNAは骨のモデルであるHAp粉体へ特異的に集積化し、DNAが骨へのターゲティングリガンドとして機能することがわかった。以上のことより、ナノハイブリッドカプセルの遺伝子キャリアや骨標的指向性薬物キャリアへの応用の可能性を見出した。

Appendix

A3.1 リン酸カルシウム (CaP) について

生体内において、CaP は骨や歯などの硬組織を構成する主要な無機成分である。その生体適合性により様々なリン酸カルシウム系バイオマテリアルが開発され、骨疾患治療や細胞への薬物送達や遺伝子導入などに利用されている。CaP は化学組成の違いにより数種類の結晶構造に分類され、結晶形態以外に熱力学的安定性や溶解性などの物性が異なることが知られている (Fig. 3.23 参照)。この中で、ヒドロキシアパタイト (HAp) は骨の構成物質であり、熱力学的に最も安定であり、溶解性が低いことが知られている。HAp の化学式は、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で表され、六方晶系のイオン結晶であり、a、b 軸が 0.942 nm、c 軸が 0.688 nm である²⁴⁾。Fig. 3.24 に典型的な HAp の結晶形態を示す。結晶中には、Ca が豊富な正に帯電した面とリン酸が豊富な負に帯電した面があるため、HAp は正負両方の電荷を有する物質に親和性を有する。このように、結晶表面にタンパク質や DNA など様々な電荷を有する物質が吸着する特徴を活かして、アパタイト系材料はカラムクロマトグラフィー充填剤²⁰⁾や吸着剤としての応用も進んでいる。

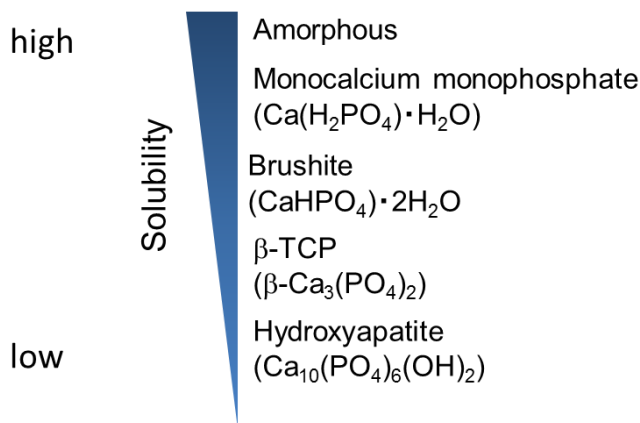


Fig. 3.23 Solubility of various crystals for calcium phosphate.

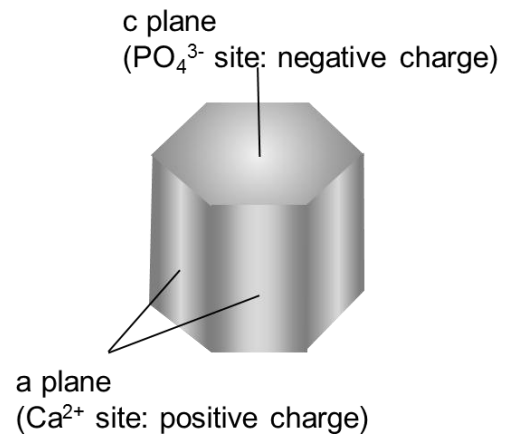


Fig. 3.24 Crystal structure of hydroxyapatite.

A3.2 不均一核形成とテンプレートの役割

結晶の核形成は、過飽和または過冷却状態にある溶液中において、結晶化する溶質同士の相互作用のみにより結晶核が形成される「均一核形成」と、結晶化を促進する触媒機能をもつ物質の介在で溶質の核形成が促進される「不均一核形成」とに分けられる。均一核形成の場合には、主に界面自由エネルギーと核形成の駆動力（過飽和度または過冷却度）によって、核形成速度が決定される。これに対して、不均一核形成では、一般に触媒物質と溶質との相互作用により、結晶核の界面自由エネルギーが低下す

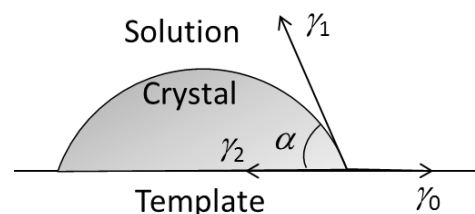


Fig. 3.25 Young equation based on interfacial tensions for heterogeneous crystal formation.

ることによって、核形成速度が増加する。このとき、触媒、結晶および溶液それぞれの界面の自由エネルギー γ の大小は、式(3.3)(ヤングの式)で表すことができる(Fig. 3.25 参照)。

$$\gamma_0 = \gamma_2 + \gamma_1 \cos \alpha \quad (3.3)$$

γ_0 : 界面自由エネルギー (溶液-触媒物質)

γ_1 : 界面自由エネルギー (溶液-結晶核)

γ_2 : 界面自由エネルギー (結晶核-触媒物質)

α : 接触角

この場合、触媒物質によって誘起される不均一核形成を生じさせるために必要な自由エネルギー ΔG_{hetero} は、次式で表される²⁵⁾。

$$\Delta G_{hetero} = \Delta G_{homo} \left(\frac{1}{2} - \frac{3}{4} \cos \alpha + \frac{1}{4} \cos^3 \alpha \right) \quad (3.4)$$

ここで、 ΔG_{homo} は均一核形成に必要な自由エネルギーである。このとき、触媒物質と結晶の親和性が高い場合は α が小さく、逆に α が大きい場合には触媒物質と結晶の間の親和性は低い。さらに、結晶化する溶質との間で特殊な相互作用が生じるように、あらかじめ表面構造を設計した触媒物質を利用すれば、興味深い不均一核形成現象を誘起することが可能である。そのような触媒物質をテンプレート(鑄型)と呼ぶ。例えば、テンプレートの表面に成長させたい結晶の特定の結晶面と類似した分子構造を露出させると、テンプレート表面の分子の配列・配向を鑄型にして結晶の成長する方位を制御したり、多種類ある結晶構造のうち特定の結晶構造を選択的に核形成させることができる。このような結晶成長を「エピタキシャル成長」という²⁵⁾。

生体内のバイオミネラリゼーションにおいて、有機高分子をテンプレートとして用いた、エピタキシャル成長がよくみられる。骨や歯の HAp 生成においても、様々な有機高分子が関与している。例えば、骨基質に含まれ、石灰化に関与するタンパク質として知られる dentin matrix protein 1 (DMP1) の β -sheet ドメインに HAp の結晶格子と一致する酸性アミノ酸の配列が存在し、それが HAp 析出の際に理想的なテンプレートとなり、核形成の活性化エネルギーを低下させると考えられている²⁴⁾。

第3章の参考文献

1) Didymus, J., Mann, S., Benton, W., Collins, I., "Interaction of Poly(alpha,beta-Aspartate) with Octadecylamine Monolayers - Adsorption Behavior and Effects on CaCO₃ Crystallization Ridges", *Langmuir*, **11**, 3130-3136 (1995).

2) Heywood, B., Mann S., "Molecular Construction of Oriented Inorganic Materials - Controlled Nucleation of Calcite and Aragonite Under Compressed Langmuir Monolayers", *Chemistry of Materials*, **6**, 311-318 (1994).

- 3) Mann S., Heywood, B., Rajam, S., Birchall, J., "Interfacial Control of Nucleation of Calcium-Carbonate Under Organized Stearic-Acid Monolayers", *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, **423**, 457-471 (1989).
- 4) Mann, S., Heywood, B., Rajam, S., Walker, J., "Structural and Stereochemical Relationships between Langmuir Monolayers and Calcium-Carbonate Nucleation", *Journal of Physics D-Applied Physics*, **24**, 154-164 (1991).
- 5) Oaki, Y., Kajiyama, S., Nishimura, T., Imai, H., Kato, T., "Nanosegregated Amorphous Composites of Calcium Carbonate and an Organic Polymer", *Advanced Materials*, **20**, 3633-3637 (2008).
- 6) Sugawara, A., Yamane, S., Akiyoshi, K., "Nanogel-templated mineralization: Polymer-calcium phosphate hybrid nanomaterials", *Macromolecular Rapid Communications*, **27**, 441-446 (2006).
- 7) Perkin, K., Turner, J., Wooley, K., Mann, S., "Fabrication of hybrid nanocapsules by calcium phosphate mineralization of shell cross-linked polymer micelles and nanocages", *Nano Letters*, **5**, 1457-1461 (2005).
- 8) Xu, Q., Tanaka, Y., Czernuszka, J. T., "Encapsulation and release of a hydrophobic drug from hydroxyapatite coated liposomes", *Biomaterials*, **28**, 2687-2694 (2007).
- 9) Nakajima, N., Ikada, Y., "Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous-Media", *Bioconjugate chemistry*, **6**, 123-130 (1995).
- 10) 岡崎正之, 山下仁大, "セラミックバイオマテリアル", コロナ社 (2009).
- 11) Wang, J., Zhou, W., Hu, W., Zhou, L., Wang, S., Zhang, S., "Collagen/silk fibroin bi-template induced biomimetic bone-like substitutes", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **99A**, 327-334 (2011).
- 12) Takeuchi, A., Ohtsuki, C., Kamitakahara, M., Ogata, S., Tanihara, M., Miyazaki, T., "Apatite formation on synthetic polypeptide with beta sheet structure in a solution mimicking body environment RID E-4973-2010", *Bioceramics 18, Pts 1 and 2*, **309-311**, 489-492 (2006).
- 13) Takeuchi, A., Ohtsuki, C., Miyazaki, T., Kamitakahara, M., Ogata, S., Yamazaki, M., et al., "Heterogeneous nucleation of hydroxyapatite on protein: structural effect of silk sericin RID E-4973-2010", *Journal of the Royal Society Interface*, **2**, 373-378 (2005).
- 14) Deshpande, S. A., Fang, P., Zhang, X., Jayaraman, T., Sfeir, C., Beniash, E., "Primary Structure and Phosphorylation of Dentin Matrix Protein 1 (DMP 1) and Phosphophoryn (DPP) Uniquely Determine Their Role in Biomineralization", *Biomacromolecules*, **12**, 2933-2945 (2011).
- 18) 日本バイオマテリアル学会, "バイオマテリアルの基礎", 日本医学館 (2010).

- 15) 石原一彦, 埴隆夫, 前田瑞夫, “バイオマテリアルの基礎”, 日本医学館 (2010).
- 16) Gadaleta, S., Paschalis, E., Betts, F., Mendelsohn, R., Boskey, A., “Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: New correlations between X-ray diffraction and infrared data”, *Calcified tissue international*, **58**, 9-16 (1996).
- 17) Lerner, E., Azoury, R., Sarig, S., “Rapid Precipitation of Apatite from Ethanol Water Solution”, *Journal of Crystal Growth*, **97**, 725-730 (1989).
- 18) Termine, J., Posner, A., “Infra-Red Determination of Percentage of Crystallinity in Apatitic Calcium Phosphates”, *Nature*, **211**, 268-270 (1966).
- 19) Xu, J., Butler, I., Gilson, D., “FT-Raman and high-pressure infrared spectroscopic studies of dicalcium phosphate dihydrate (CaHPO₄·2H₂O) and anhydrous dicalcium phosphate (CaHPO₄)”, *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **55**, 2801-2809 (1999).
- 20) Kawasaki, T., “Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing”, *Journal of Chromatography A*, **544**, 147-184 (1991).
- 21) Osamu, Fujino, Hiroyuki, Tamura, Shiro, Gohda, “The basic study on the synthesis of hydroxyapatite in solution”, *Annual Report, Research Institute for Science and Technology; Kinki University*, **15**, 3946-3953 (2003).
- 22) 黒田健介, 市野良一, 興戸正純, “チタン系金属材料の表面改質による骨伝導性の向上”, *電気製鋼*, **79**, 229-237 (2008).
- 23) 嶋林三郎, 植野哲, “アパタイトと生体関連物質とのマイクロ/ナノ結合機構”, *バイオマテリアル*, **24**, 311-318 (2006).
- 24) 松本卓也, 岡崎正之, “皮質骨基質を構成する無機・有機成分”, *バイオマテリアル*, **28**, 257-263 (2010).
- 25) 佐藤清隆, “溶液からの結晶成長-構造と形のデザイン-”, 共立出版 (2010).

4.1 序章

本章では、ナノ環境におけるバイオミネラリゼーションと有機高分子の協奏的な働きをモチーフとして、油相中にナノサイズの水滴を分散させた W/O (water-in-oil) 型ミニエマルションをナノリアクターとして用い、限定されたナノ空間の内部で重合およびバイオミネラリゼーションを行うことで、ナノハイブリッド粒子の作製を行った。

ミニエマルションは、界面活性剤とコストバイザー存在下、超音波などによって高せん断力を与えることによって、ナノ液滴 (30-500 nm) を油中に分散させることによって得られる。ナノ液滴表面の界面活性剤とナノ液滴内に含まれるコストバイザーの存在により、ナノ液滴同士の融合や油相を介した物質拡散によるオストワルド熟成が抑えられている (A4.1 参照)。このため、個々のナノ液滴を独立した反応場とみなすことができる¹⁾。また、ナノ液滴内部はそのサイズに起因した化学的および物理的特徴を有している。例えば、界面の曲率による高いラプラス圧やナノ液滴の内壁への衝突による高い物質拡散性が挙げられる。また、マイクロ空間において内壁がその内部で生成する高分子の構造や形態へ影響を与えられると考えられており、同様の効果がナノ液滴においても見られることが考えられる¹⁾。実際にこのようなナノ液滴のコンパートメント効果に着目し、重合反応や無機および有機物質の合成、酵素反応など様々な反応がこのナノ液滴内部で行われている^{2,3)}。たとえば、ナノ液滴内部で、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) を行うと、溶液中で行う場合よりも、分子レベルで均一に反応を行うことが可能だと報告されている⁴⁾。また、疎水化処理した顔料⁵⁾、TiO₂⁶⁾、磁性粒子⁷⁾をモノマー液滴中に分散させ、重合を行うことによって、様々な有機無機ハイブリッド微粒子が合成されている。この場合、表面処理を施した無機物質の乳化またはミニエマルション中で無機物質の合成を行った後に、重合を行うことでハイブリッド微粒子の作製が行われる。本章では、ナノサイズの限定された空間を有する水滴内部で重合と無機物質の合成を同時に行うことで、ポリマーと無機物質が協奏的に相互作用する反応システムを考えた。

バイオミネラリゼーションにおける無機物として炭酸カルシウム (CaCO₃) を選択した。CaCO₃ は、有孔虫類、サンゴ類、石灰藻類などの殻や骨格に含まれる主要無機成分であり⁸⁻¹⁰⁾、生体適合性を有することから DDS キャリアや人工骨のバイオマテリアルとして利用されてきた¹¹⁻¹³⁾。また、CaCO₃ には、六方晶系のカルサイト、斜方晶系 (針状体) のアラゴナイト、擬六方晶系 (球状体) のバテライトが存在し、それらの特徴的な形状や性質を利用し、工業的にも塗料、充填剤、接着剤など様々な分野で利用されている^{13, 14)} (A4.2 参照)。例えば、カルサイトおよびバテライトからなる球状の多孔質炭酸カルシウム粒子が合成され、これを製紙材料として用いたところ、比光散乱係数が上昇し、白色度が増加したという報告がある¹⁵⁾。次に、ナノ液滴中で重合を行うモノマーとして 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) を選択した。HEMA のポリマー (PHEMA) は、親水性で生体適合性を有するため、ソフトコンタクトレンズや人工骨などのインプラント材料¹⁶⁾として用いられている。また PHEMA はカルシウムイオンと相互作用することが知られている¹⁷⁾。よって、本章では、ナノサイズの限定された空間を有する水滴内部で、HEMA の重合および CaCO₃ の生成を同時に行うことによって、PHEMA と CaCO₃ の相互作用を利用して粒子内の CaCO₃ の結晶構造および粒子自体のモルフォロジーの制御を試みた。

さらに作製した、ナノハイブリッド粒子を組織化することによって、ナノハイブリッドフィルムの作製を行った。CaCO₃ がナノ粒子内へ内包化されることで、ナノサイズの無機結晶が均一に分散したハイブリッドフィルムが形成できると考えた。このようなハイブリッドフィルムは、内部に有する CaCO₃ に

より光学および機械的特性を制御できると考えられるため、塗料などのコーティング材料への応用を期待している。

4.2 実験方法

4.2.1 ミニエマルション重合によるポリマーナノ粒子の作製

4.2.1.1 試薬

薬品名	分子量	メーカー
アクリアミド ^{a)} (acrylamide, AAm) (Fig. 4.1 (a)参照)	71.08	和光純薬工業 (株)
2, 2'-アゾビス (イソブチロニトリル) (2, 2'-azobis(isobutyronitrile), AIBN) (Fig. 4.1 (f)参照)	164.21	和光純薬工業 (株)
水酸化アンモニウム (ammonium hydroxide)	35.05	Sigma-Aldrich
過硫酸アンモニウム (ammonium persulfate, APS) (Fig. 4.1 (e)参照)	228.20	和光純薬工業 (株)
シクロヘキサン (cyclohexane)	84.16	和光純薬工業 (株)
セチル PEG/PPG10/ジメチコン, (ABIL EM-90) (Fig. 4.1 (g)参照)		エポニック ゴールド シュミット
ソルビタンモノオレアート (sorbitan monooleate, Span 80) (Fig. 4.1 (h)参照)	428.6	東京化成工業 (株)
ジメチルスルホキシド-d6 (dimethyl sulfoxide-d6, 99,9% containing 1 v/v% TMS, DMSO-d6)	84.17	和光純薬工業 (株)
炭酸ナトリウム (sodium carbonate, Na ₂ CO ₃)	105.99	純正化学工業 (株)
トルエン (toluene)	92.14	純正化学工業 (株)
2-ヒドロキシエチルメタクリレート ^{b)} (2-hydroxyethyl methacrylate, HEMA) (Fig. 4.1 (c)参照)	130.14	和光純薬工業 (株)
メタクリル酸 ^{b)} (methacrylic acid, MAc) (Fig. 4.1 (d)参照)	86.09	和光純薬工業 (株)
N, N'-メチレンビスアクリルアミド (N, N'-methyleneacrylamide, MBAAm) (Fig. 4.1 (b)参照)	154.17	東京化成工業 (株)

a) エタノールによる再結晶法によって精製後、減圧乾燥を行ったものを回収し使用した。

b) 重合禁止剤やオリゴマー除去のため減圧蒸留して用いた。

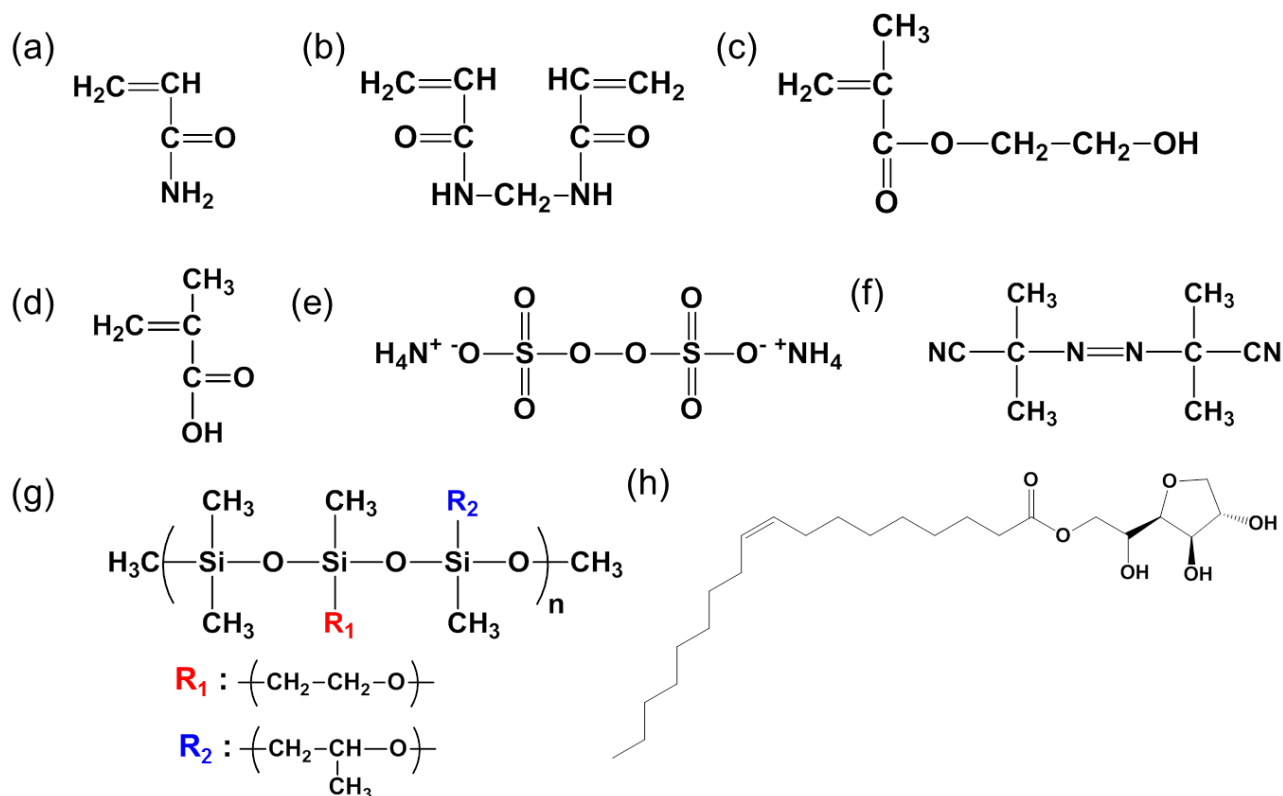


Fig. 4.1 Chemical structures of AAm (a), MBAAm (b), HEMA (c), MAc (d), APS (e), AIBN (f), dimethicone (g) and Span 80 (h).

4.2.1.2 PAAm ナノ粒子の作製

ミニエマルション中でモノマーである acrylamide (AAm, Fig. 4.1 (a)参照) を重合し、polyacrylamide (PAAm) ナノ粒子の作製を行った。レシピを Table 4.1 に示す。非イオン性界面活性剤である Span 80 (Fig. 4.1 (h)参照) をシクロヘキサンに溶解させた (油相)。さらに 0.1 M の NaCl 水溶液に、AAm モノマー、架橋剤である MBAAm モノマー (Fig. 4.1 (b)参照)、開始剤である APS (Fig. 4.1 (e)参照) を溶解した (水相)。これら油相と水相を混合し、1 時間攪拌した後、氷冷下にて 10 分間超音波を照射して、油相中に水相が分散した W/O (water-in-oil) 型ミニエマルションを作製した。さらに N_2 雰囲気中 25°C 、250 rpm で 20 分間攪拌した。次に 60°C の恒温槽中で、200 rpm にて攪拌しながら、3 時間重合 (1 h の N_2 パージを含む) を行った。

Table 4.1 Recipe for preparation of PAAm nanoparticles by miniemulsion polymerization.

	Cyclohexane /g	Span 80 /g	0.1 M NaCl _{aq} /g	AAm /g	MBAAm /g	APS /g
A-1	24	0.75	3	0.568	0.142	0.041
A-2	24	0.75	3	1.95	0.488	0.041

4.2.1.3 PHEMA ナノ粒子の作製

ミニエマルション中でモノマーである 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA, Fig. 4.1 (c)参照) を重合し、poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) ナノ粒子を作製した。レシピを Table 4.2 に示す。非イオン性の高分子界面活性剤であるジメチコン (Fig. 4.1 (g)参照) をシクロヘキサンに溶解した (油相)。さらに HEMA モノマーと蒸留水を混合した (水相)。これら油相と水相を混合し、1 時間攪拌した後、氷冷下にて 10 分間超音波を照射して、W/O 型ミニエマルションを作製した。さらに N₂ 雰囲気中 25°C、200 rpm で 30 分間攪拌した。次に 60°C の恒温槽中で、200 rpm にて攪拌しながら開始剤である AIBN (Fig. 4.1 (f)参照) のトルエン溶液を添加し、4 時間重合 (1 h の N₂ パージを含む) を行った。

Table 4.2 Recipe for preparation of PHEMA nanoparticles by miniemulsion polymerization.

	Cyclohexane /g	Dimethicone /g (weight%)	HEMA /g (weight%)	Water /g	AIBN /mg
H-1	25	1.0 (3.5%)	3.0 (10.3%)	0.25	60
H-2	25	1.0 (3.5%)	2.5 (8.6%)	0.5	60
H-3	25	1.0 (3.5%)	1.5 (5.2%)	1.5	60
H-4	25	2.0 (6.8%)	3.0 (10.3%)	0.25	60
H-5	25	2.0 (6.8%)	2.5 (8.6%)	0.5	60

4.2.2 ナノ粒子のキャラクタリゼーション

4.2.2.1 動的光散乱法 (DLS) による粒径測定

作製したラテックスをシクロヘキサンで 4 倍希釈した後、遠心精製 (15000 rpm, 3 min, 2 times) を行った。この精製後に、ラテックスをシクロヘキサンで希釈し、2.2.2.2 項と同様の方法でシクロヘキサン中における粒径を動的光散乱法 (DLS) によって測定した。

4.2.2.2 FE-TEM による形態観察

得られたラテックスをシクロヘキサンで 4 倍希釈した後、遠心精製 (15000 rpm, 3 min, 2 times) を行った。精製後にシクロヘキサンで 50 倍に希釈したラテックス 3 μ L を、carbon-copper グリッドへ滴下し、乾燥後 FE-TEM による観察を行った。

4.2.3 ミニエマルション内での炭酸カルシウムナノ粒子 (nano-CaCO₃) の作製

4.2.3.1 溶液中における CaCO₃ の作製

HEMA モノマー存在下、0.4 M の Ca(NO₃)₂ 溶液と 0.4 M の Na₂CO₃ 溶液を体積比 1:1 にて混合し、65°C にて 4 時間インキュベートを行った。

また、0.5 M CaCl₂ 溶液に 0.7wt% の NH₃ 水溶液を加えて、15 分間 CO₂ ガスで溶液をバブリングすることによって、溶液中で CaCO₃ を析出させた (CO₂ バブリング法)。

4.2.3.2 CO₂ バブリング法による nano-CaCO₃ の作製

9 g のシクロヘキサン中に Span 80 を 0.4 g 溶解して油相を作製した。さらに 0.5 M CaCl₂ 溶液および 0.7wt% NH₃ 溶液を混合して 1 g の水相を作製した。これら油相と水相を混合して 1 時間攪拌した。ここに CO₂ ガスをバブリングしながら、氷冷下において超音波を 10、30 または 60 分間照射し、W/O 型ミニエマルションの作製とナノ液滴内部での CaCO₃ ナノ粒子 (nano-CaCO₃) 形成を行った (Fig. 4.2 参照)。

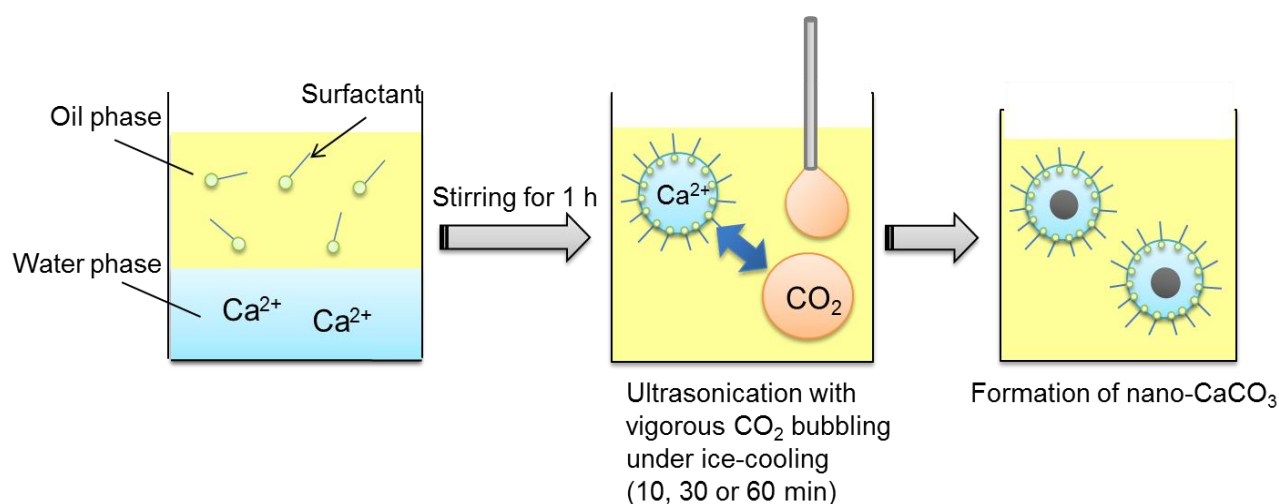


Fig. 4.2 Experimental scheme for preparation of nano-CaCO₃ by CO₂ bubbling method.

4.2.3.3 Fusion/fission 法による nano-CaCO₃ の作製

12.5 g のシクロヘキサン中にジメチコンを 0.5 g 溶解して油相を作製した。さらに HEMA モノマー (0, 3.5 or 5.2wt%) を Ca(NO₃)₂ 溶液 (0.4 or 2 M) と混合して 1.63 g の水相を作製した。これら油相と水相を混合して、1 時間攪拌した後、氷冷下にて 10 分間超音波を照射することで、Ca²⁺およびモノマーを含んだナノ液滴が分散した W/O 型ミニエマルション A (Fig. 4.3 参照) を作製した。同様に、Na₂CO₃ 溶液 (0.4 or 2 M) を用いて 1.63 g の水相を形成し、CO₃²⁻を含んだ W/O 型ミニエマルション B (Fig. 4.3 参照) を作製した。ミニエマルション A および B を混合し、氷冷下にて 10 分間超音波を照射することで、ナノ液滴同士を衝突させて融合と分裂 (fusion/fission) を促した。さらに 25、45、65°C にて 4 時間インキュベートし、ナノ液滴内部で nano-CaCO₃ を作製した。

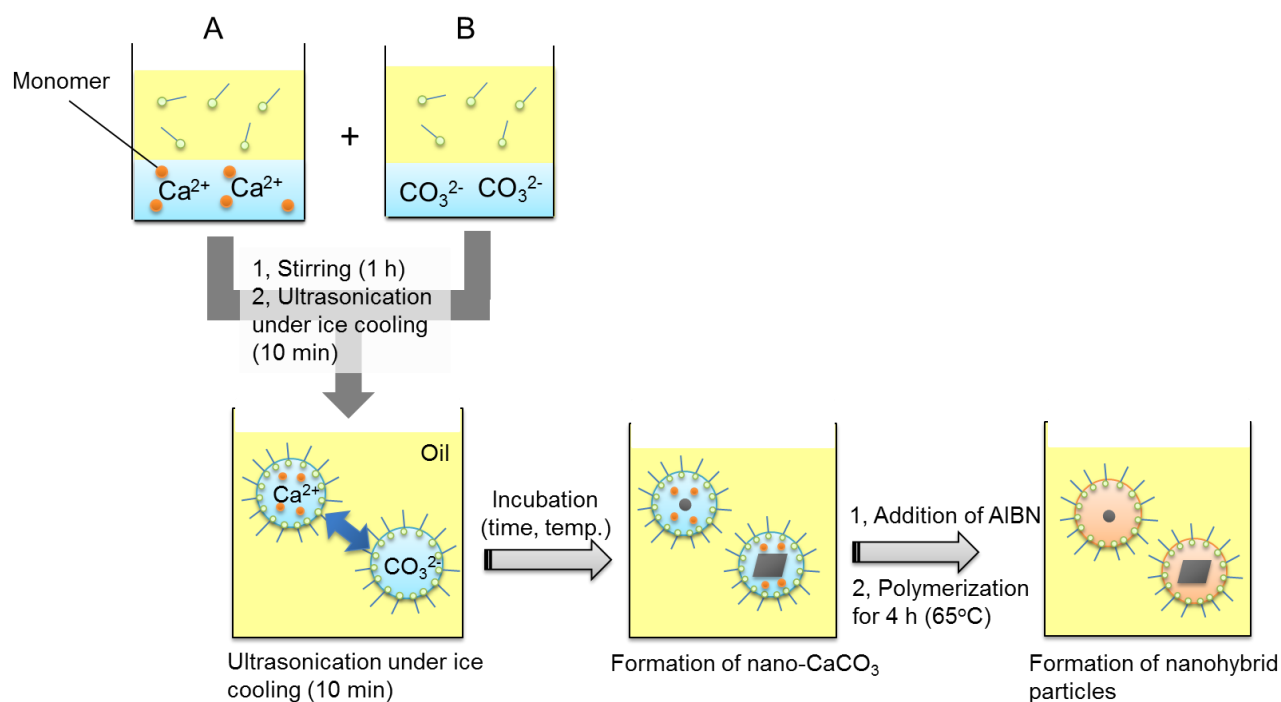


Fig. 4.3 Experimental scheme for preparation of nano-CaCO₃ and nanohybrid particles by fusion/fission method.

4.2.4 Nano-CaCO₃のキャラクタリゼーション

4.2.4.1 FE-TEMによる形状観察

作製した nano-CaCO₃ の形状を FE-TEM によって観察した。まず、シクロヘキサンを用いて nano-CaCO₃ の分散液を 4 倍に希釈した後、遠心精製 (15000 rpm, 3 min, 2 times) を行って、4.2.2.2 項と同様の方法にて観察を行った。

4.2.4.2 FE-SEMによる形状観察

作製した nano-CaCO₃ の形状を FE-SEM によって観察した。まず、nano-CaCO₃ の分散液を遠心精製 (15000 rpm, 3 min, 2 times) した後に 50 倍に希釈し、正方形にカットしたカバーガラス (22 × 22 mm) 上に 3 μL 滴下して自然乾燥させた。次に、このカバーガラスを SEM 試料台にカーボンテープを用いて固定し、Au-Pd 蒸着 (60 sec) を 2 回行い、SEM (S-4700, Hitachi, 5.0 kV) によって観察した。

4.2.4.3 粉末 X 線回折 (XRD) による結晶構造の評価

作製した nano-CaCO₃ の結晶構造の解析を、粉末 X 線回折 (XRD) により行った。

<粉末 X 線回折 (XRD) の原理>

XRD を用いることによって、物質の結晶構造、単位格子の格子定数、結晶相などの情報を得ることができる。

結晶性物質に X 線 (特性 X 線) が入射されると、X 線のつくる電場によって電子が強制振動を受け、入射 X 線と同じ波長の 2 次 X 線を放射する。原子全体からは 2 次 X 線が球状に放射される (散乱)。結晶中では原子でつくられる多くの格子面からの X 線の反射を考えることが必要である。これらは互いに干渉しあうことによって回折が生じる。このとき、式 (4.1) に示されるようなブラッグの回折条件を満たす方向で回折強度が増大し、他は打ち消しあって観察されない。

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (4.1)$$

波長 λ の単色 X 線を照射して、回折角度 θ を観測することで、式 (4.1) より、面間隔 d が求まる。面間隔 d は、一般に物質の結晶格子固有の値で、試料の物質の数個の d とそれに対応する回折 X 線の相対強度が観測できれば、既知物質の X 線回折図と比較することにより、その物質を同定することができる。結晶性の高い試料では、回折線が鋭くて強いが、結晶性の低い試料は、回折線が弱い。また、非晶質の試料の場合では、X 線回折ではなく散乱に由来するハローを与える。

<実験方法>

Nano-CaCO₃ の分散液を遠心分離 (15000 rpm, 15 min) し、上澄みの溶媒を除去した後、25°C にて真空乾燥して試料を作製した。適当な量の試料を乳鉢へ入れ、よくすり潰した後に、試料台に乗せて、ガラス板を用いて試料面を摺り切り、XRD 解析を行った (Bruker D8 Discover, 20 -50°, 40 kV, 40 mA)。得られたソフトウェア (EVA, Bruker) を用いて XRD スペクトルを解析し、International Centre for Diffraction Data (ICDD) データベースと比較することにより、物質の同定および結晶構造の検討を行った。

4.2.5 ミニエマルション内での有機無機ナノハイブリッド粒子の作製

4.2.5.1 Fusion/fission および重合によるナノハイブリッド粒子の作製

4.2.3.3 項と同様に、ミニエマルション中で nano-CaCO₃ を作製した。作製したミニエマルションを四つ口フラスコ (50 mL) に入れ、200 rpm にて攪拌しながら、25°C または 65°C にて、インキュベートを行った。さらに 30 分間窒素置換を行った後に、AIBN (6、20 または 60 mg) のトルエン溶液を添加し、65°C にて 4 時間重合 (1 h の N₂ パージを含む) を行った。ナノハイブリッド粒子作製のためのレシピを Table 4.3 に示す。

Table 4.3 Recipe for preparation of nanohybrid particles.

	Cyclo-hexane /g	Dimethicone /g (weight%)	HEMA /g (weight%)	Ion conc. /M	Incubation time	Incubation temp. /°C	AIBN /mg
HC-1	25	1.0 (3.5%)	1.5 (5.2%)	0.4	30 min	25	60
HC-2	25	1.0 (3.5%)	1.5 (5.2%)	0.4	4 h	25	60
HC-3	25	1.0 (3.5%)	1.5 (5.2%)	0.4	1 d	25	60
HC-4	25	1.0 (3.5%)	1.5 (5.2%)	0.4	4 d	25	60
HC-5	25	1.0 (3.5%)	1.0 (3.5%)	0.4	30 min	25	60
HC-6	25	1.0 (3.5%)	1.0 (3.5%)	0.4	1 d	25	60
HC-7	25	1.0 (3.5%)	1.5 (5.2%)	0.4	4 h	65	60
HC-8	25	1.0 (3.5%)	1.0 (3.5%)	2.0	30 min	25	60
HC-9	25	1.0 (3.5%)	1.0 (3.5%)	2.0	1 d	25	60
HC-10	25	1.0 (3.5%)	1.5 (5.2%)	0.4	30 min	25	10
HC-11	25	1.0 (3.5%)	1.5 (5.2%)	0.4	30 min	25	6

4.2.5.2 ^1H 核磁気共鳴 (^1H NMR) 法による転化率変化測定

ミニエマルション重合におけるモノマー転化率の経時変化を ^1H NMR 法を用いて観察した。すなわち、重合時間によるモノマーの減少量およびポリマーの生成量の変化を ^1H NMR により測定した。

< ^1H NMR の原理およびモノマーおよびポリマーの定量法>

NMR は、有機化合物を対象とした分子構造解析であり、ポリマーの構造解析やコポリマーの組成解析を行ったりすることができる。元素の原子核は正電荷を持ち、負電荷をもつ電子がこの周りを回転するため、磁場が発生する。通常は、この核スピンはそれぞれランダムな方向を向いているが、強い外部磁場を当てると、核スピンの向きは、外部磁場に平行なものと逆なものにわかれる（ゼーマン分裂）。これらは、異なるエネルギー状態を有し、このエネルギー差に相当する電磁波を与えると、核スピンの低エネルギー状態から高エネルギー状態への遷移が起きる。NMR では遷移の際の電磁波の吸収と放出過程を観察する。その時の電磁波の周波数を共鳴周波数という。NMR で観測する原子核には、 ^1H 核や ^{13}C 核があるが、本実験では、 ^1H 核を観測核として用いた。核スピンの共鳴周波数は、原子核の電子環境に密接に関係し、相対的に電子密度の高い原子核ほど高磁場にあらわれ、電子密度の低い原子核ほど低磁場にあらわれる。このような共鳴周波数を基準物質の水素核の共鳴周波数からのずれ（化学シフト、単位は ppm）として表す。有機化合物の構造や官能基の種類と数などによって、化学シフトの大きさが決まっているため、構造決定に重要な役割を果たす。また、得られたスペクトルの積分値、つまりピーク面積は各部分の水素の個数に比例する。よって、ピーク面積比を求めることによって、構造決定や各成分の含有量比を求めることができる。高分子は低分子と異なり、観測する原子核が多く他の原子核に取り囲まれており、これらが付加的な外部磁場として作用する。この磁場の作用は原子核毎に異なるので、スペクトルがある幅を持つようになる。また、低分子に比べて、高分子の分子運動は束縛されており、同じ部位であっても分子運動性が異なるため、スペクトルの幅も変化する。

本実験では、ポリマーおよびモノマーに関するスペクトルの面積（積分値）の比から、転化率を測定した。

<実験方法>

4.2.1.3 項および 4.2.5.1 項に述べた方法により、ミニエマルション重合の途中に、1 mL のラテックスをサンプリングした後、速やかに液体 N_2 に浸漬させることでラジカルを失活させた。さらに遠心分離（20°C, 15000 rpm, 10 min）を行った後、真空乾燥させた。さらに、この試料に 1 mL の重 DMSO を加え、氷冷下にて超音波照射により溶解させて、 ^1H NMR 解析（JEOL 500 MHz NMR）を行った。

4.2.5.3 FE-TEM による形状観察

作製したナノハイブリッド粒子の形状を FE-TEM を用いて観察した。方法は、4.2.2.2 項と同様である。

4.2.5.4 FE-SEM による形状観察

作製したナノハイブリッド粒子の形状を FE-SEM を用いて観察した。方法は、4.2.4.2 項と同様である。

4.2.5.5 XRDによる結晶構造解析

作製したナノハイブリッド粒子内の nano-CaCO₃ の結晶構造を XRD を用いて解析した。方法は、4.2.4.3 項と同様である。

4.2.5.6 FT-IRによる PHEMA と CaCO₃ の相互作用の検討

IR 吸収スペクトルは、有機や無機化合物の同定以外にも、分子構造の違いやコンフォメーションの変化などによって変化することが知られている。本実験では、IR 分光法を用いて、ナノハイブリッド粒子中における PHEMA と CaCO₃ 中に含まれる Ca²⁺ との相互作用について検討を行った。

PHEMA ナノ粒子 (H-3, Table 4.2 参照) の分散液とナノハイブリッド粒子 (HC-8, Table 4.3 参照) 分散液をそれぞれ遠心分離 (15000 rpm, 15 min) して、上澄みの溶媒を除去し、25°C にて真空乾燥させた。臭化カリウム (KBr) 錠剤法を用いて、FT-IR スペクトロメーター (ALPHA, Bruker Optik GmbH) により、これら試料の IR スペクトル測定を行った。

4.2.5.7 ¹H NMRによる PHEMA と CaCO₃ の相互作用の検討

NMR からは有機化合物の分子構造の同定以外にも、高分子鎖の運動や物質間の相互作用についての情報を得ることができる。本実験では、ナノハイブリッド粒子中において PHEMA の側鎖と CaCO₃ 中の Ca²⁺ イオンとの相互作用について、¹H NMR スペクトルの化学シフトの変化から検討を行った。

H-3 の分散液および HC-1 の分散液を遠心分離 (15000 rpm, 15 min) して、上澄みの溶媒を除去し、25°C にて真空乾燥させた。さらに、この試料に 1 mL の重 DMSO を加え、氷冷下にて超音波照射して、溶解させ、¹H NMR 解析 (JEOL 500 MHz NMR) を行った。

4.2.6 ナノハイブリッドフィルムの作製

4.2.6.1 スピンコート法によるナノフィルムの作製

H-3 の分散液を遠心精製 (15000 rpm, 15 min, 2 times) した後、その分散液 500 μL をカバーガラス (22×22 mm) に滴下した。1 分間静置後に、スピナー (SPINCOATER 1H-D3, MIKASA) を用いて、2000 rpm または 5000 rpm で 10 秒間スピンキャストを行い、H-3 のナノフィルムを作製した。

4.2.6.2 スピンコート法によるナノハイブリッドフィルムの作製

ナノハイブリッド粒子 (HC-1, 3 and 8, Table 4.3 参照) 分散液を遠心分離 (15000 rpm, 15 min, 2 times) により精製した。TEM 観察用の carbon-copper グリッドを両面テープによってカバーガラス (22×22 mm) に貼付し、HC-1, 3 および 8 の分散液 500 μL を滴下した。1 分間静置後に、スピナー (SPINCOATER 1H-D3, MIKASA) を用いて、5000 rpm で 10 秒間それぞれスピンキャストを行った。

さらに得られたナノハイブリッドフィルムを 120°C で所定時間静置し、ナノフィルム内における CaCO₃ の結晶成長または溶解と再析出による結晶化を促した。

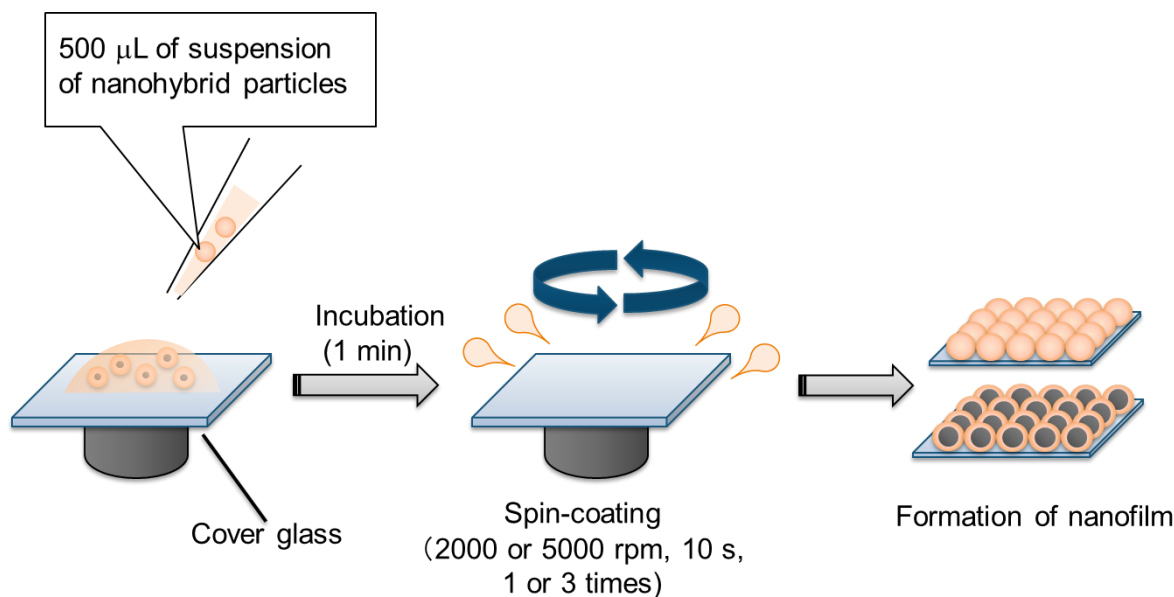


Fig. 4.4 Experimental scheme for preparation of a thin film of nanohybrid particles (nanofilm) by spin-coating.

4.2.6.3 FE-TEMによる形状観察

作製したナノハイブリッドフィルムの形状をFE-TEMを用いて観察した。方法は、4.2.2.2項と同様である。

4.2.6.4 FE-SEMによる形状観察

作製したナノハイブリッドフィルムの形状をFE-SEMを用いて観察した。方法は、4.2.4.2項と同様である。

4.2.6.5 ナノフィルムの光透過性の検討

作製したナノハイブリッドフィルムの紫外—可視光領域における透過率を測定した。4.2.6.2項に述べた方法によってカバーガラス(22×22 mm)上にナノハイブリッドフィルムを作製し、その透過率を分光光度計(Bio Spec-1600, Shimadzu)を用いて測定した。

4.3 結果および考察

4.3.1 ミニエマルション重合によるポリマーナノ粒子の作製

4.3.1.1 PAAm ナノ粒子の作製およびキャラクタリゼーション

ミニエマルション重合によって、PAAm ナノ粒子を作製した (A4.3 参照)。界面活性剤の種類、量、油相/水相比などを調節した結果、Table 4.1 に示したレシピを用いて、ナノ粒子を形成させることができた。Table 4.4 および Fig. 4.5 にそれらのシクロヘキサン中の粒径および TEM による形態観察を示す。作製したナノ粒子の粒径は、約 100 nm であった。TEM による観察からも、100 nm 付近のナノ粒子が確認できたが、サイズのばらつきが見られた。これは、重合中に水滴同士が衝突して融合したこと、あるいは液滴間での物質移動によってオストワルド成長することによって生じたと考えている。さらに粒子同士が融着している様子も見られた。PAAm は水溶性高分子であり、MBAAm と共重合することによって水分を含んだゲル粒子となる。架橋を行っているものの粒子は膨潤しているため、乾燥時に形状を保持することが難しく、粒子同士の融合が起きてしまったと考えられる。

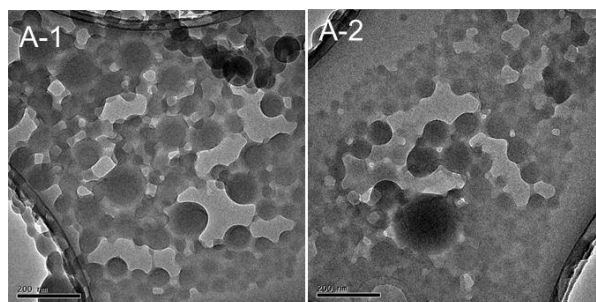


Fig. 4.5 TEM images of PAAm nanoparticles (A-1 and A-2) produced with different monomer concentrations. All scale bars are 200 nm.

Table 4.4 Hydrodynamic diameters of PAAm nanoparticles prepared by miniemulsion polymerization.

	D_n /nm	D_w nm
A-1	122.6 ± 21.3	135.1 ± 25.9
A-2	114.0 ± 18.1	123.9 ± 22.6

4.3.1.2 PHEMA ナノ粒子の作製およびキャラクタリゼーション

モノマーとして HEMA を、界面活性剤としてジメチコンを用いてミニエマルション重合を行った (A4.3 参照)。PHEMA は水に不溶であるため、PAAm ナノ粒子よりも固いナノ粒子となり粒子同士の融着を抑制できると考えた。また、ジメチコンは親水部として poly(ethylene glycol) を、疎水部として poly(propylene glycol) を有したグラフト共重合体であり、HLB 値が 5 付近の非イオン性高分子系界面活性剤である。油相中に溶解して、W/O 型ミニエマルションを形成することができる。さらに、ジメチコンは、4.3.1.1 項で用いた界面活性剤の Span 80 とは異なり、高分子系界面活性剤であるため、溶液中における排除体積効果により、水滴同士の衝突や融合

Table 4.5 Hydrodynamic diameter of PHEMA nanoparticles.

	D_n /nm	D_w /nm	D_w/D_n
H-1	336.4 ± 54.0	364.4 ± 61.9	1.08
H-2	163.3 ± 10.7	165.4 ± 11.0	1.01
H-3	83.1 ± 15.5	93.0 ± 19.4	1.12
H-4	265.3 ± 30.9	279.1 ± 35.9	1.05
H-5	111.9 ± 18.1	121.9 ± 22.3	1.09

を防ぎ、高い分散安定性を示すことが期待できる。

界面活性剤濃度とモノマー濃度を変化させて作製した PHEMA ナノ粒子の水中粒径と TEM による形状観察の結果をそれぞれ、Table 4.5 と Fig. 4.6 に示す。これらの観察より、均一なナノ粒子が得られたことを確認した。さらに、モノマー濃度が高くなるほど粒径の大きいナノ粒子が形成された。また、界面活性剤濃度を増やすと粒径が小さくなった。重合前のミニエマルションの粒径を Table 4.6 に示す。これより、界面活性剤を増やすことによって、ミニエマルションの粒径が減少していることがわかった。また、Table 4.5 の H-1 と H-4 の結果を比較すると、ミニエマルションのサイズによって、ポリマーナノ粒子の粒径が決定されることがわかる。一般的に、エマルションの粒径が小さくなると、系内の比表面積が増えて、界面自由エネルギーが増加する。界面活性剤濃度を増やすことによって、液滴サイズの減少に伴って増加した界面にも吸着できるようになり、界面自由エネルギーの増加を抑制して、小さな粒径の液滴が安定に存在できるようになったと考えられる。

Table 4.6 Hydrodynamic diameter of miniemulsion as a function of amount of surfactant.

	D_n /nm
H-1 (dimethicone: 3.5%)	335 ± 14.74
H-4 (dimethicone: 6.8%)	274 ± 36.70

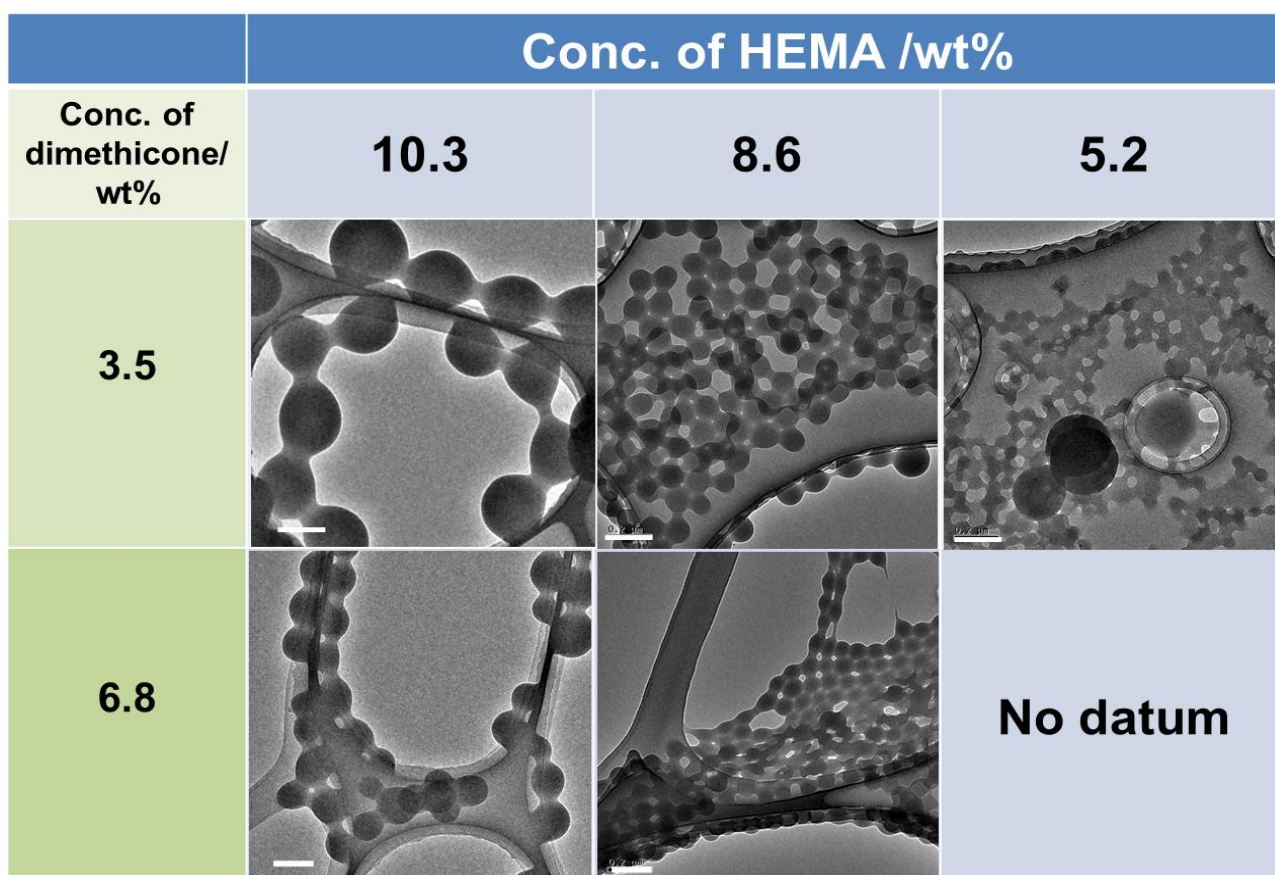
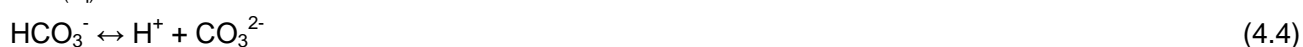


Fig. 4.6 TEM images of PHEMA nanoparticles produced with different amounts of a surfactant and a monomer. All scale bars are 200 nm.

4.3.2 ミニエマルション内での炭酸カルシウムナノ粒子 (nano-CaCO₃) の作製4.3.2.1 CO₂ バブリング法による nano-CaCO₃ の作製

CO₂ バブリング法を用いて、ミニエマルション中で nano-CaCO₃ を作製した。CO₂ は有機溶媒と比較し、水に対する溶解性が高いことが知られている。そこで、ミニエマルション中で超音波処理をしながら CO₂ をバブリングすることにより、ナノ水滴内に CO₂ が溶解して Ca²⁺ と反応して CaCO₃ を生成すると考えた。式 (4.2) ~ (4.4) に示したように、ナノ水滴内部で CO₂ が CO₃²⁻ へと解離し、CaCO₃ の溶解度積を満たす濃度になると、溶液中の Ca²⁺ と反応することによって CaCO₃ を形成する。式 (4.5) に簡略化した反応式を示す。



結果を Fig. 4.7 に示す。TEM による観察結果より、バブリング時間が、10 および 30 分では、明確なナノ粒子は観察されなかった。さらに 60 分間バブリングを行うと、ナノサイズで球状の nano-CaCO₃ が作製できた。ミニエマルションの連続相であるシクロヘキサンに対する CO₂ の溶解性が低いため、ナ

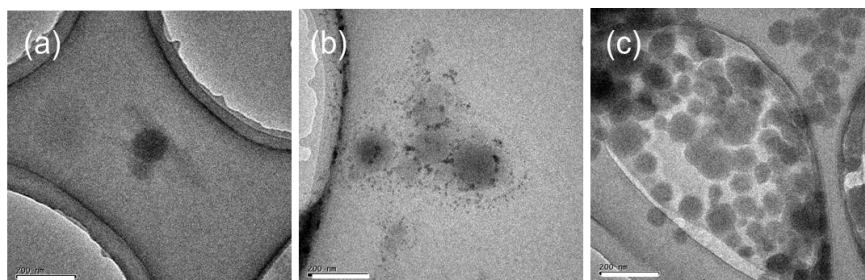


Fig. 4.7 TEM images of nano-CaCO₃ produced with CO₂ bubbling for 10 min (a), 30 min (b) and 60 min (c). All scale bars are 200 nm.

ノ水滴内部での CO₃²⁻ の濃度が CaCO₃ の溶解度積を満たすようになるまでに、時間がかかったと思われる。さらに XRD により、結晶構造の解析を行った。Fig. 4.8 より、ミニエマルション中で得られた nano-CaCO₃ は、カルサイトおよびバテライトを含んでおり、主成分はバテライトであることがわかった。CO₂ バブリング法により、溶液中にて作製した CaCO₃ も同様にカルサイトおよびバテライトを含んでいることがわかった。CaCO₃ の中で、バテライトは最も不安定な結晶相であることが知られている。通常 CaCO₃ は pH が低いとその溶解性が上がることが知られており、その溶解度は熱力学的に不安定な結晶相であるほど高い¹⁸⁾。三種類の結晶形の中でも、バテライトは最も溶解度が高いため、低 pH で生成したバテライトは溶解と再析出を繰り返して、容易にカルサイトへと転移 (溶媒媒介転移) する。本実験で用いた水相中にはアンモニアが含まれており、pH は 11.6 と高い。よって、生成したバテライトが安定に存在できるようになり、カルサイトへ転移しにくくなったと考えられる。

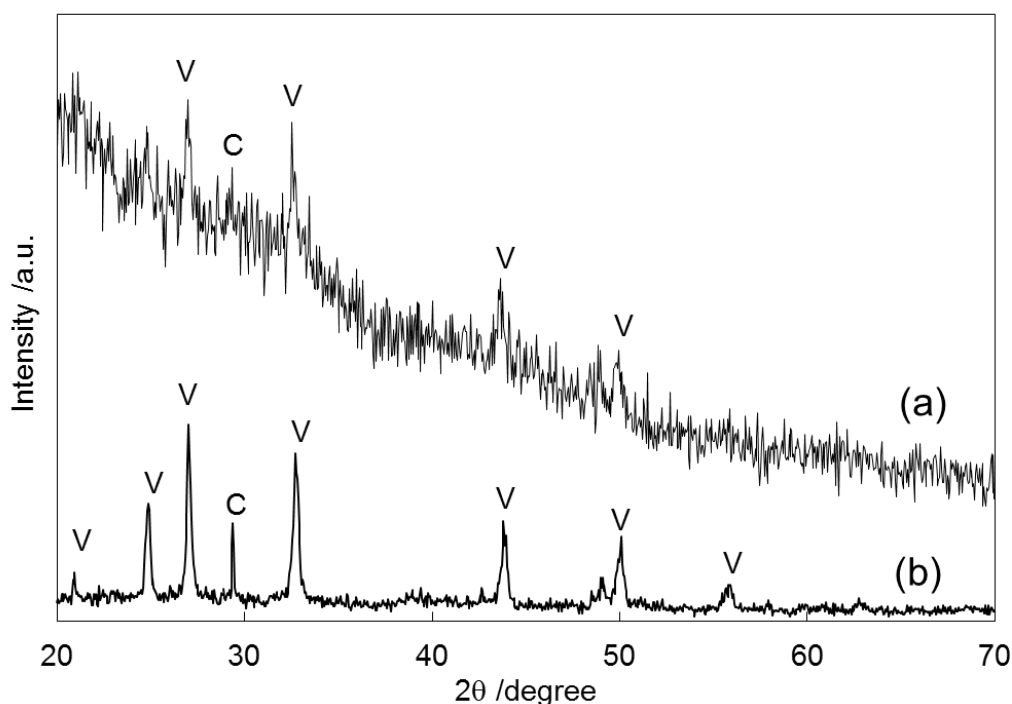


Fig. 4.8 XRD profiles of nano- CaCO_3 produced in miniemulsion (a) and CaCO_3 produced in solution (b) by CO_2 bubbling method. Symbol: C-calcite, V-vaterite

4.3.2.2 Fusion/fission 法による nano- CaCO_3 の作製—モノマーによる影響—

二種類のミニエマルション内部に、0.4 M の $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ と 0.4 M の Na_2CO_3 をそれぞれ内包化させ、fusion/fission を行った後、 65°C にて 4 時間インキュベートすることによって CaCO_3 を作製した。Fig. 4.9 (a) に TEM による形状観察結果を示す。得られた CaCO_3 は粒径約 50 nm の球状のナノ粒子 (nano- CaCO_3) であることがわかった。一方、HEMA モノマー存在下にて同様に生成を行うと、Fig. 4.9 (b) に示すように、ナノサイズで、アスペクト比 (長軸/短軸) の高い、ロッド状の nano- CaCO_3 が得られた。XRD により、結晶構造の解析を行った結果を Fig. 4.10 に示す。モノマーが存在しない系において作製した球状の nano- CaCO_3 は、カルサイトを主に含んでいることがわかった。一方、モノマー存在下において得られたロッド状の nano- CaCO_3 は、カルサイト以外にも通常溶液中では不安定であるバテライトを含んでいることがわかった。この理由について、以下のように考察した。前述したように、種々の低分子および高分子が、 CaCO_3 の生成と成長、さらには結晶形態に与える影響について研究されている。通常、 CaCO_3 には、菱形 (カルサイト)、針状 (アラゴナイト)、および球状 (バテライト) の三種類がよく知られているが、添加物を加えることで、これら以外にもユニークな結晶形態が観察されている²⁹⁾。まず、ミニエマルション系と通常の均一溶液系を比較するために、通常モノマー溶液中で CaCO_3 を作製したところ、ロッド状の結晶は見られず、大きな菱形の沈殿物が見られた (Fig. 4.9 (c) 参照)。また、モノマーの種類による影響について検討するために、methacrylic acid (MAc, Fig. 4.1 (d) 参照) モノマー存在下、ミニエマルション中にて nano- CaCO_3 を作製すると、ロッド状のようなものは見られず、ナノサイズで球状の nano- CaCO_3 が観察された (Fig. 4.9 (d) 参照)。

以上の結果より、ミニエマルションのシステムが作り出すナノサイズの空間において、おそらく HEMA モノマーが CaCO_3 のある特定の結晶面と相互作用することで、結晶面同士の相対的な成長速度が変化し、ある特定方向への結晶面の成長が促進されて、ロッド状の CaCO_3 が形成されたと考えられる。

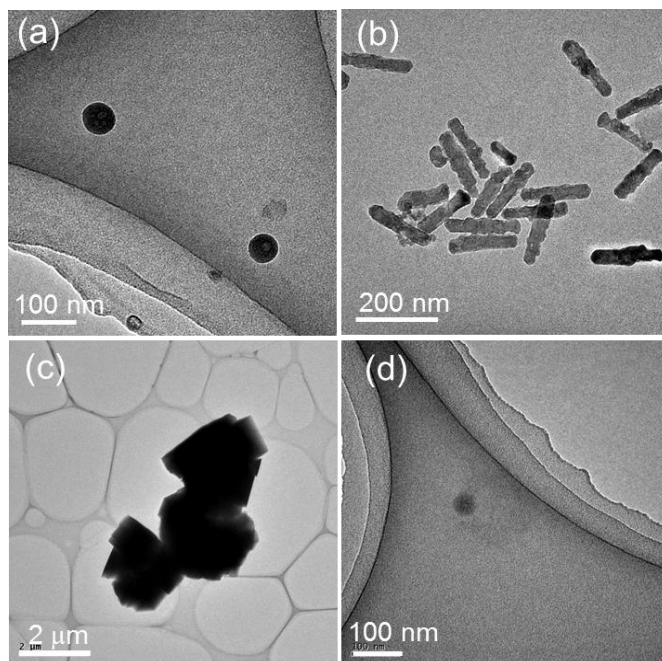


Fig. 4.9 TEM images of nano- CaCO_3 produced in nanodroplets without (a) and with HEMA (b) after incubation for 4 h at 65°C . Formation of CaCO_3 in solution was carried out in the presence of HEMA by the incubation for 4 h at 65°C (c). Nano- CaCO_3 was also produced in nanodroplets with MAc by the incubation for 4 h at 65°C (d).

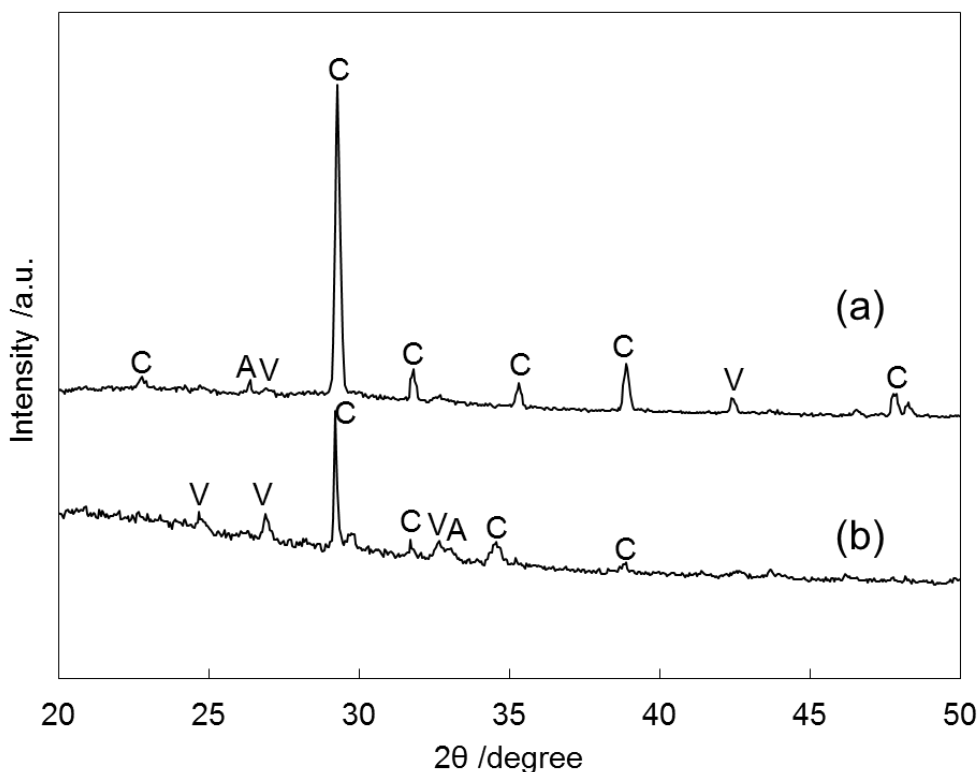


Fig. 4.10 XRD profiles of nano- CaCO_3 produced in miniemulsion without (a) or with HEMA (b). Symbol: C-calcite, A-aragonite, V-vaterite

4.3.2.3 Fusion/fission 法による nano-CaCO₃ の作製—温度による影響—

CaCO₃ の生成と成長において、温度は重要な因子である。これまでの研究報告より、温度が高いほどアラゴナイトやバテライトなどの準安定相が生成しやすくなることが知られている¹⁹⁾。

HEMA モノマー存在下において nano-CaCO₃ を作製し、異なる温度においてインキュベートした結果を Fig. 4.11 に示す。TEM による形態観察より、温度が高くなるほど nano-CaCO₃ のアスペクト比が高くなることがわかった。XRD により、結晶構造を解析すると、25°C および 45°C においては、カルサイトおよびアラゴナイトの混合相であることがわかった (Fig. 4.12 参照)。一方、65°C において得られた nano-CaCO₃ は、カルサイトおよびアラゴナイトの他に、バテライトが存在していることがわかった。このようにミニエマルション中で HEMA が共存する系において、温度によって CaCO₃ の結晶構造が変化することによって、アスペクト比の異なる nano-CaCO₃ を得ることができた。

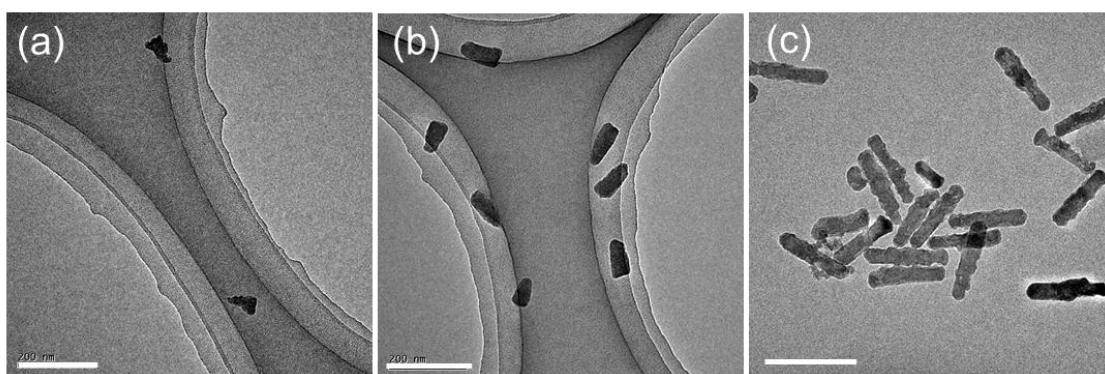


Fig. 4.11 TEM images of nano-CaCO₃ produced in nanodroplets after incubation for 4 h at 25°C (a), 45°C (b) and 65°C (c). All scale bars are 200 nm.

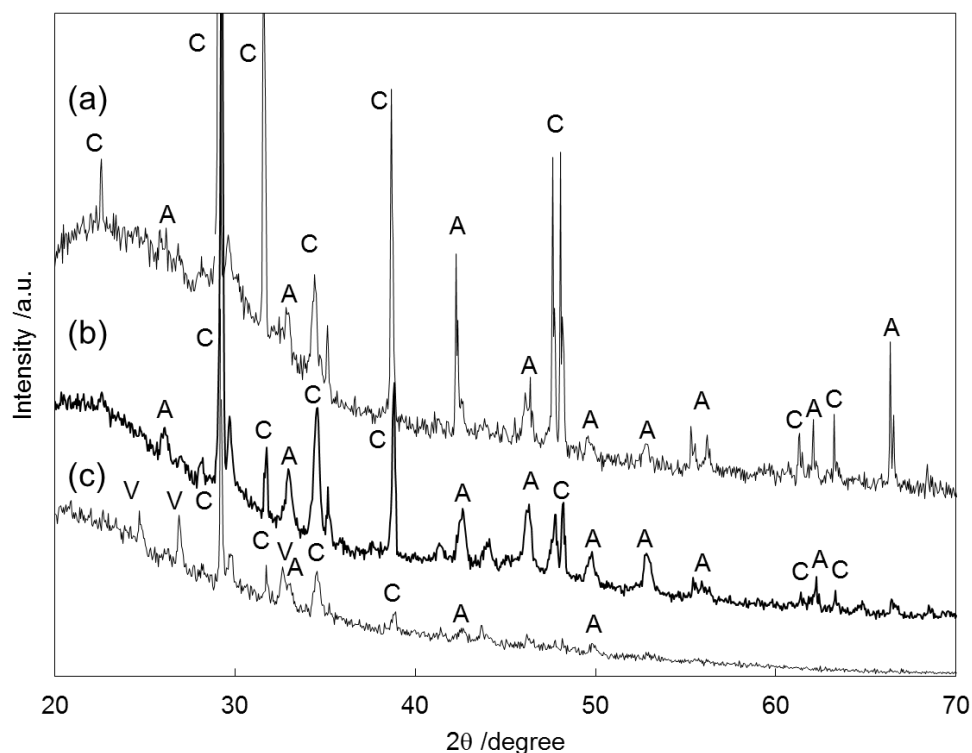


Fig. 4.12 XRD profiles of nano-CaCO₃ produced in nanodroplets after incubation for 4 h at 25°C (a), 45°C (b) and 65°C (c). Symbol: C-calcite, A-aragonite, V-vaterite

4.3.3 ミニエマルション内での有機無機ナノハイブリッド粒子の作製

4.3.3.1 転化率について

ミニエマルション内での nano-CaCO₃ の作製と PHEMA の重合に先立ち、まず、重合だけを行った際の転化率変化を NMR を用いて測定した。Fig. 4.13 に HEMA および PHEMA の NMR スペクトルを示す。モノマーのメチレン基由来のピーク ((A)の d に相当する, $\delta = 4.1$ ppm) およびポリマーのメチレン基由来のピーク ((B)の i, $\delta = 3.9$ ppm) の積分値比より、以下の式を用いて転化率を算出した。

$$\text{転化率(\%)} = \frac{\text{積分値} (\delta = 3.9 \text{ ppm})}{\text{積分値} (\delta = 3.9 \text{ ppm}) + \text{積分値} (\delta = 4.1 \text{ ppm})} \times 100$$

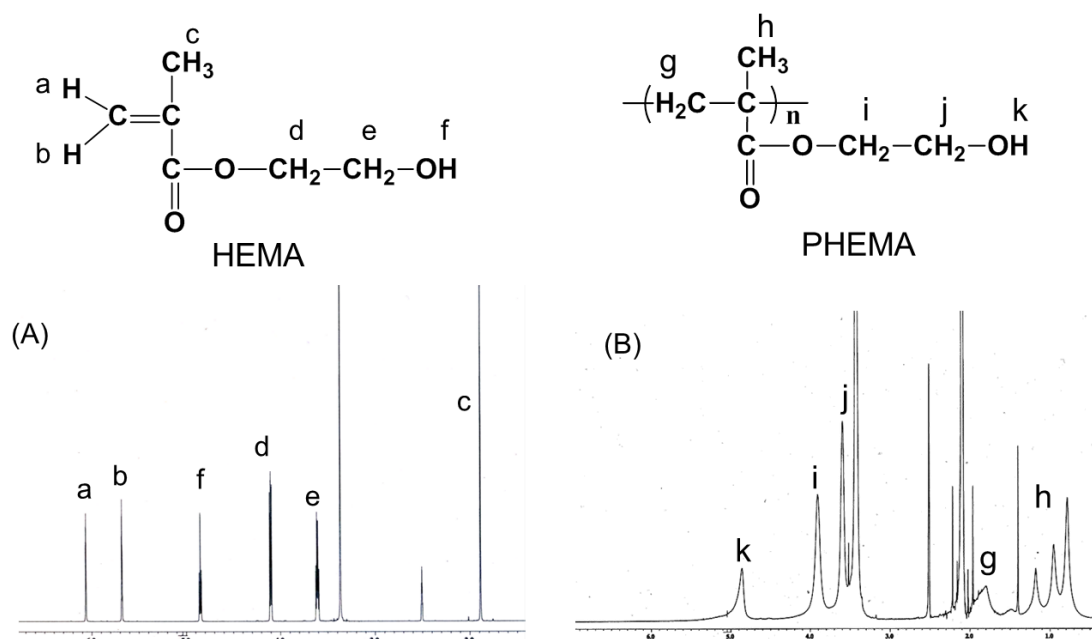


Fig. 4.13 ¹H NMR spectra of HEMA (A) and PHEMA (B) in DMSO-d₆.

ミニエマルション重合は、乳化重合などの溶液中の重合と比較し、重合速度が速いことが知られている。Fig. 4.14 より、H-3 と HC-1 のいずれの場合においても、10 分間の誘導期間後に転化率が急激に上昇し、1 時間でほぼ 100 % に達した。ミニエマルション中では、重合の場がナノスペースに限定されていることで、ラジカルやモノマーがナノ液滴の内壁と頻りに衝突することにより、反応性が高くなって反応時間が短くなることが考えられる。さらに、それにより系内の粘性が上昇して、gel 効果により停止反応が起こりにくくなっていることも考え

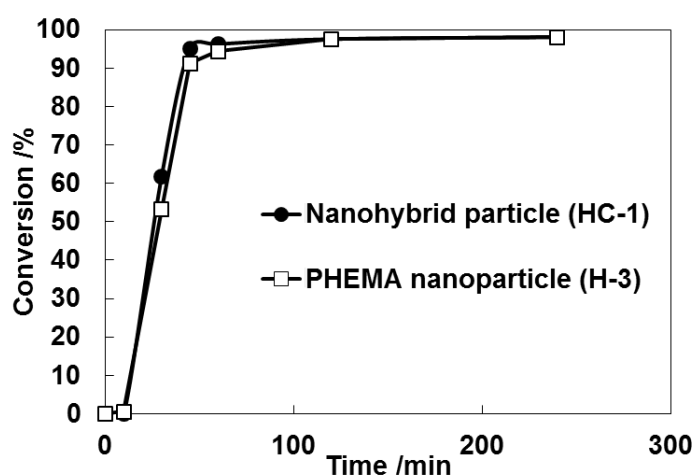


Fig. 4.14 Time courses of monomer conversion in the miniemulsion polymerization.

られる。少なくともミニエマルション内部における nano-CaCO₃ の生成は、重合速度に影響を与えないことがわかった。

4.3.3.2 プレインキュベーション時間による影響

ミニエマルション中で HEMA モノマー存在下にて fusion/fission を行い、次に 25°C にて所定時間プレインキュベートした後、AIBN を加えて重合を行った。Fig. 4.15 に TEM による形状観察を示す。CaCO₃ のような無機結晶と有機ポリマーとは電子密度が異なるため、コントラスト差によりその存在を確認することができる。プレインキュベーションが 30 分と 4 時間の場合は、微小な球状の nano-CaCO₃ がナノ粒子内部に内包化されている様子が確認できた。一方、プレインキュベーションを 1 および 4 日と長くすると、ナノ粒子に内包化された nano-CaCO₃ のサイズも大きくなっていくことがわかった。さらに、これらの結晶構造について XRD を用いて解析を行ったところ、プレインキュベーションが 30 分と 4 時間の場合には、何もピークが検出されず、内部に封入された nano-CaCO₃ はアモルファスであることがわかった (Fig. 4.16 (a) and (b) 参照)。プレインキュベーション時間が 1 および 4 日と長くなった場合には、CaCO₃ 結晶由来のピークが観察され、カルサイトおよびアラゴナイトの混合相であることがわかった (Fig. 4.16 (c) and (d) 参照)。これにより、プレインキュベーションにおいて結晶生成と成長が進行し、その後の重合によってその状態と構造が保持されたと考えられる。さらに、プレインキュベーションが 30 分の場合に得られたナノハイブリッド粒子を 25°C にて 20 日間静置することにより、エイジングによる影響について検討した。TEM による観察から、粒子内の nano-CaCO₃ のサイズには変化はなかった (Fig. 4.15 (e) 参照)。さらに、XRD による結晶構造の解析からも、20 日間静置後もピークは観察されなかった (Fig. 4.16 (e) 参照)。通常、アモルファス CaCO₃ は、熱力学的に不安定であり、溶解性が高いため、時間が経つと安定なカルサイトへの結晶化が進行してしまう^{9, 26)}。しかし、この場合は、nano-CaCO₃ をポリマーで被覆することにより、溶解と再析出を抑えて、アモルファスの状態で安定に存在させることができるようになったと考えられる。

以上の結果より、ミニエマルション中にて重合が行われることによって、nano-CaCO₃ の成長および溶解と再析出による結晶化が抑えられることがわかった。このように、fusion/fission による nano-CaCO₃ 形成後から重合するまでのプレインキュベーション時間を制御することによって、ナノハイブリッド粒子内部に様々なサイズや形態の nano-CaCO₃ を内包化させることができた。さらに、重合を行うことによりそれらをナノ粒子内部で長期間安定に存在させることが可能となった。

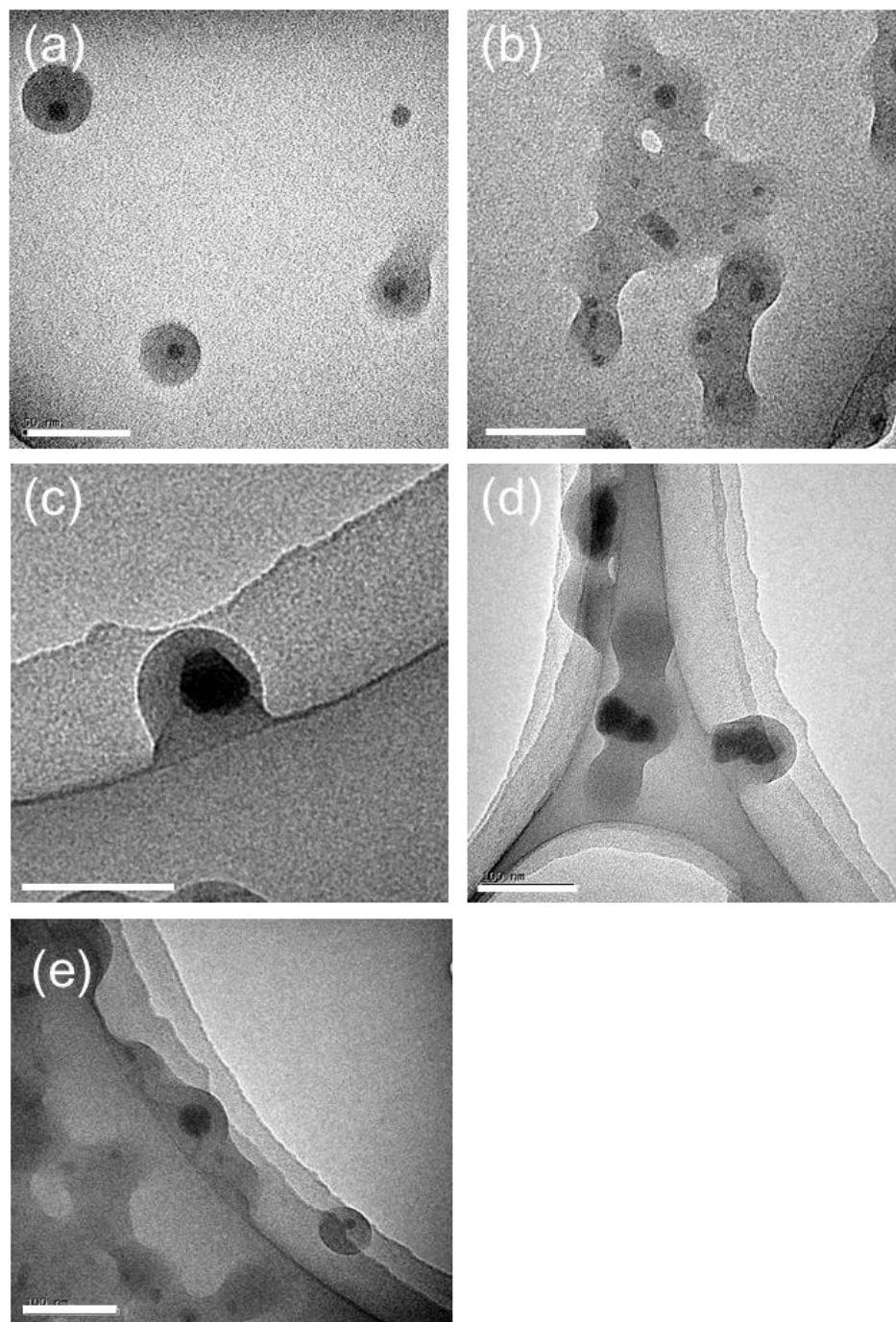


Fig. 4.15 TEM images of nanohybrid particles produced by polymerization after incubation with HEMA for 30 min (a), 4 h (b), 1 d (c) and 4 d (d). TEM image for HC-1 after being aged for 20 days at 25°C (e). Concentrations of ion, monomer and AIBN added were 0.4 M, 5.2wt% and 60 mg, respectively. All scale bars are 100 nm.

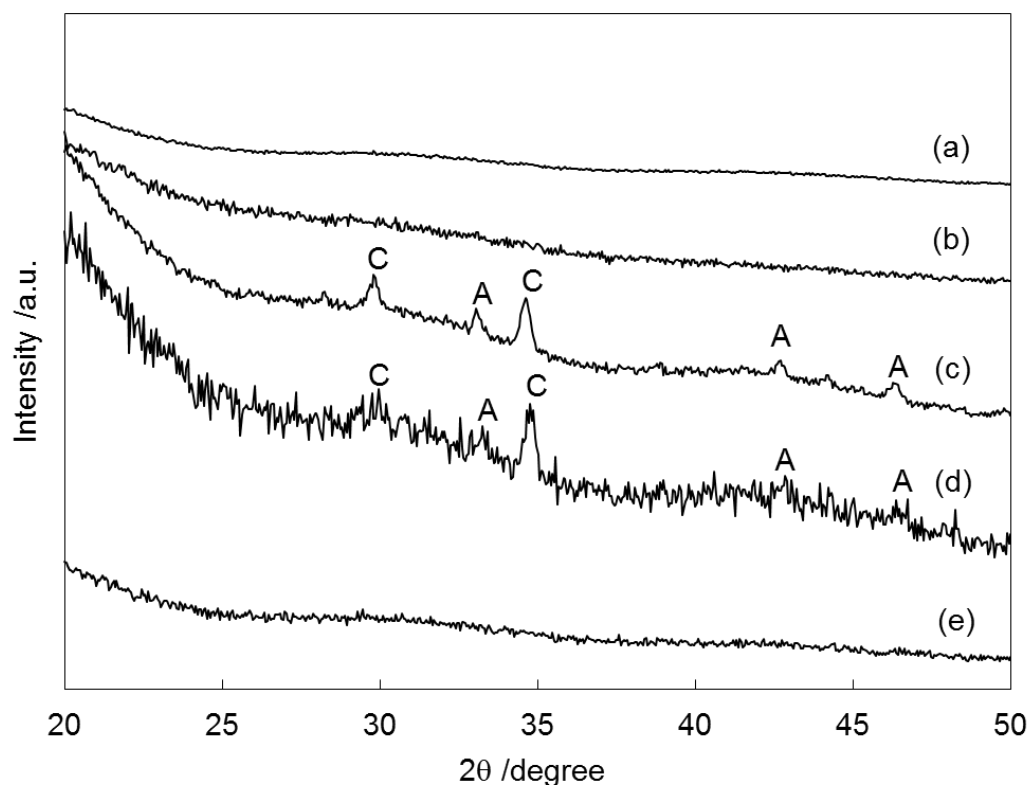


Fig. 4.16 XRD profiles of nanohybrid particles produced by polymerization after incubation with HEMA for 30 min (a), 4 h (b), 1 d (c) and 4 d (d). XRD profile for HC-1 after being aged for 20 days at 25°C (e). Symbol: C-calcite, A-aragonite.

4.3.3.3 モノマー濃度による影響

4.3.3.2 項にて、PHEMA のミニエマルション重合によって内部の nano-CaCO₃ の結晶成長と溶解と再析出による結晶化の抑制効果が示唆された。次に HEMA の濃度による影響について検討を行った。HEMA の濃度を 5.2wt% から 3.5wt% に下げて、プレインキュベーション時間が 30 分と 1 日の場合について検討を行った。Fig. 4.17 に示すように、時間経過により結晶の成長とナノ粒子への内包化が観察されたが、いずれの場合においても 5.2wt% の結果 (Fig. 4.15 (a) and (c)) と変化はみられなかった。

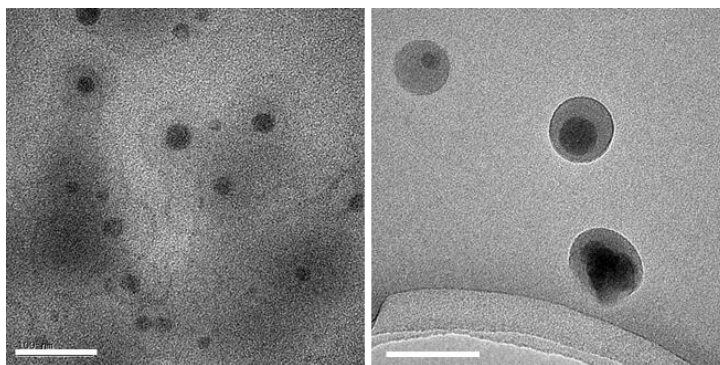


Fig. 4.17 TEM images of nanohybrid particles produced by polymerization after incubation with HEMA for 30 min (a) and 1 d (b). Concentrations of ion, monomer and AIBN added were 0.4 M, 3.5wt% and 60 mg, respectively. All scale bars are 100 nm.

一方、XRD によって結晶構造の解析を行うと、プレインキュベーションが 30 分の場合において、モノマー濃度が 5.2wt% の場合には見られなかったカルサイト由来のピークが確認できた (Fig. 4.18 参照)。1 日の場合も同様にカルサイト由来のピークが観察された。以上のように、モノマー濃度を

低くすると PHEMA の結晶成長阻害効果が低下し、プレインキュベーション時間が短い場合でも、十分に結晶が成長してカルサイトになった nano-CaCO₃ をナノ粒子に内包化できた。

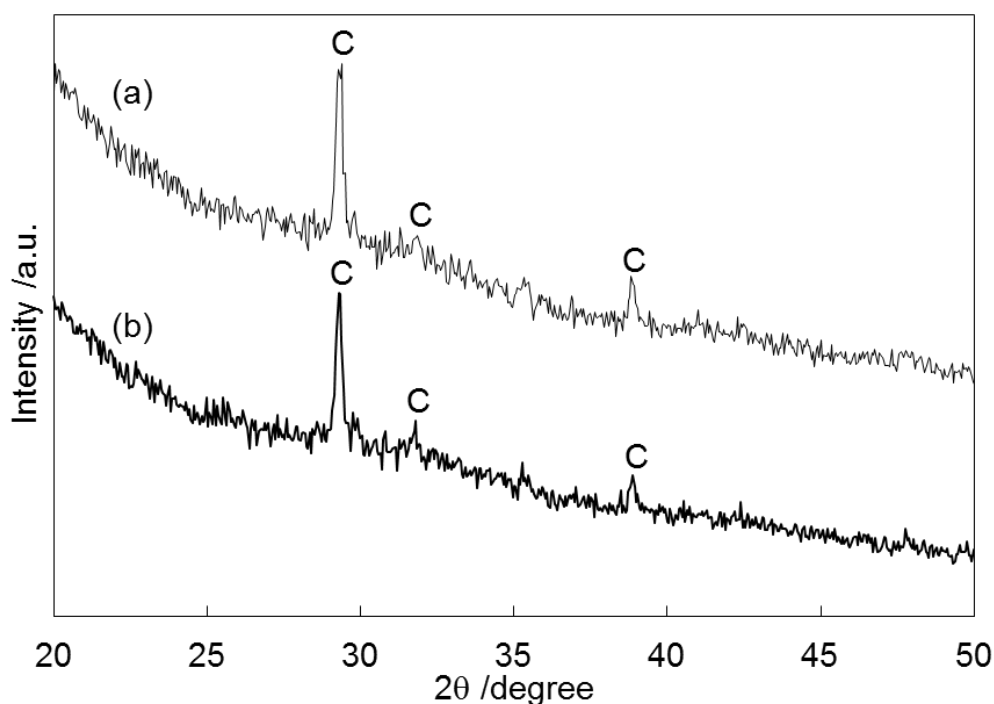


Fig. 4.18 XRD profiles of nanohybrid particles produced by polymerization after incubation with HEMA for 30 min (a) and 1 d (b). Concentrations of ion, monomer and AIBN added were 0.4 M, 3.5wt% and 60 mg, respectively. Symbol: C-calcite

4.3.3.4 PHEMA と CaCO₃ の相互作用について

4.3.3.2 および 4.3.3.3 項に述べたように、ミニエマルション内で PHEMA が CaCO₃ の成長および溶解と再析出による結晶化を阻害していることがわかった。これに対する理由の一つに、ミニエマルション内での重合の進行に伴い、系内の粘性が増大することがあげられる。これによって、イオンの拡散が抑制されることによって、結晶成長、溶解および再析出も抑制されたと考えられる。もう一つの理由として、PHEMA と CaCO₃ との化学的相互作用が挙げられる。これまでポリマーと Ca²⁺ との相互作用について、様々な研究が行われており、ポリマー中のヒドロキシ基やカルボキシ基と Ca²⁺ は強く相互作用して、複合体を形成することが知られている。Chirila らは、PHEMA のヒドロキシ基とエステルのお原子が Ca²⁺ と強く相互作用することを報告している¹⁷⁾。本実験においても、ナノハイブリッド粒子中で PHEMA と CaCO₃ の Ca²⁺ との相互作用について、FT-IR および NMR を用いて検討を行った。

Fig. 4.19 に、PHEMA ナノ粒子 (H-3) とナノハイブリッド粒子 (HC-8) の IR スペクトルを示す。ナノハイブリッド粒子の IR スペクトルにのみ、 1550 cm^{-1} 付近に弱い吸収が確認できた。これは、 Ca^{2+} と PHEMA のエステル部位の O 原子とが、静電相互作用により錯体を形成 (Fig. 4.20 参照) していることを示唆している。

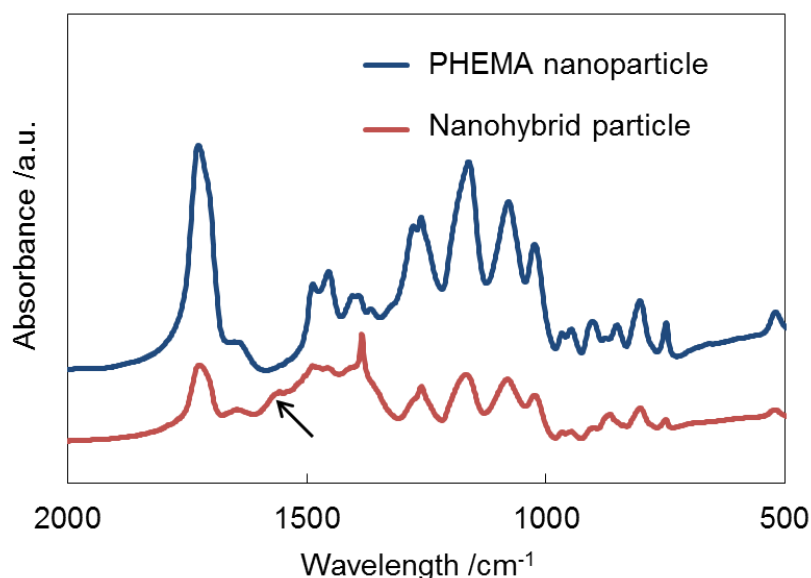


Fig. 4.19 FT-IR spectra of PHEMA nanoparticle (H-3) and nanohybrid particle (HC-8). Samples were measured in the form of KBr discs.

さらに、 $^1\text{H NMR}$ を用いて同様に検討を行った結果を Fig. 4.21 に示す。PHEMA のヒドロキシ基と水によるピークに注目すると、PHEMA ナノ粒子 (H-3) のヒドロキシ基の化学シフト値 δ は 4.81 ppm であるのに対し、ナノハイブリッド粒子 (HC-1) の δ は 4.86 ppm となり、低磁場シフトしていることがわかった。これは、ヒドロキシ基の O 原子と CaCO_3 の Ca^{2+} とが相互作用することにより、プロトンの電子密度が低下して、遮蔽効果が弱まったためと考えている¹⁷⁾。

以上より、ミニエマルション内において、PHEMA のエステル部位またはヒドロキシ基が CaCO_3 中の Ca^{2+} と相互作用していることがわかった。溶液中におけるミネラルゼーションにおいて、ポリマーは結晶化の促進剤または遅延剤として働く場合があることが知られている。本実験においては、PHEMA が nano- CaCO_3 表面と相互作用し、吸着することによって、成長部位への Ca^{2+} の輸送を阻害していると考えられる。

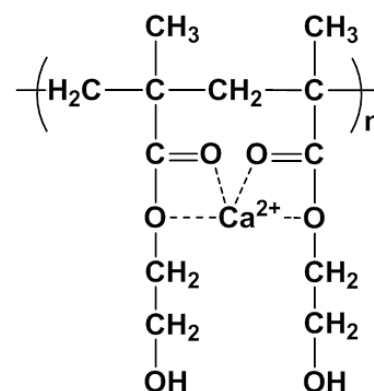


Fig. 4.20 Complexation between calcium ion and ester side chain of PHEMA.

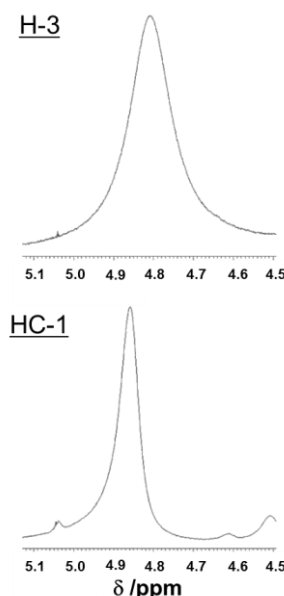


Fig. 4.21 Changes in hydroxyl peak of PHEMA of H-3 and HC-1 in DMSO- d_6 solution.

4.3.3.5 プレインキュベーション温度とエイジングによる影響

4.3.3.2 項より、プレインキュベーション温度が 25°C において作製したナノハイブリッド粒子は、球状の nano-CaCO₃ を内包化していることがわかった。プレインキュベーション温度による影響を検討するために、fusion/fission 法によって nano-CaCO₃ を生成後、65°C にて 4 時間インキュベートした後に重合を行った。TEM による観察結果より、ロッド状の nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子を作製することができた (Fig. 4.22 参照)。これは、4.3.2.3 項に示した、65°C にて作製した nano-CaCO₃ の形状と一致する。さらに、XRD による結晶構造の解析より、カルサイトとアラゴナイトのピークが観察された。Fig. 4.23 と 4.24 より、ロッド状の nano-CaCO₃ は、カルサイトおよびアラゴナイト以外にバテライトを含んでいることが確認されたが、ナノハイブリッド粒子中では、検出されたピークが小さかったためかバテライトは観察されなかった。

さらにロッド状の nano-CaCO₃ とそれを内包化したナノハイブリッド粒子をミニエマルション中で 25°C にて 1 カ月間静置することによって、エイジングによる影響について検討を行った。TEM による、形状観察より、nano-CaCO₃ はロッド状からアスペクト比の低い形状へと形態が変化している様子が観察された。XRD による結晶構造解析からも、エイジング後にアラゴナイトのピークがなくなり、結晶構造が変化していることがわかった。これらの結果は、ミニエマルション中で nano-CaCO₃ が溶解と再析出による溶媒媒介転移が起こり、結晶構造と形態が変化したことを示唆している。一方、ナノハイブリッド粒子中に内包化された nano-CaCO₃ は、TEM と XRD のどちらにおいても、形態や構造の変化は見られなかった。これは PHEMA によって結晶の溶解と析出が阻害されて、結晶構造が保持されていることが確認できた。

以上のことから、nano-CaCO₃ をナノ粒子へ内包化することによって結晶構造や形態を長期間にわたって維持させることができた。

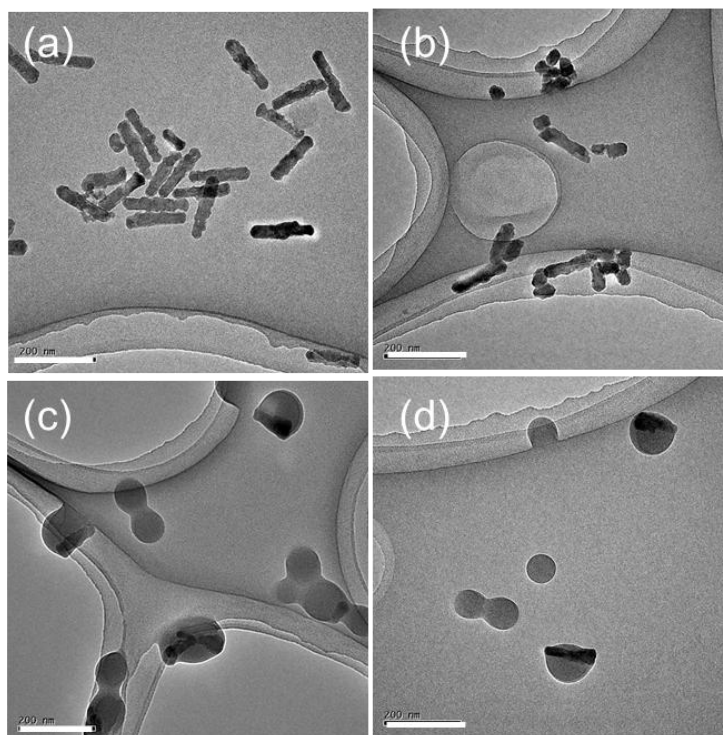


Fig. 4.22 TEM images of nano-CaCO₃ and nanohybrid particles (HC-7) before ((a) and (c)) and after being aged for 1 month at 25°C ((b) and (d)), respectively. All scale bars are 200 nm.

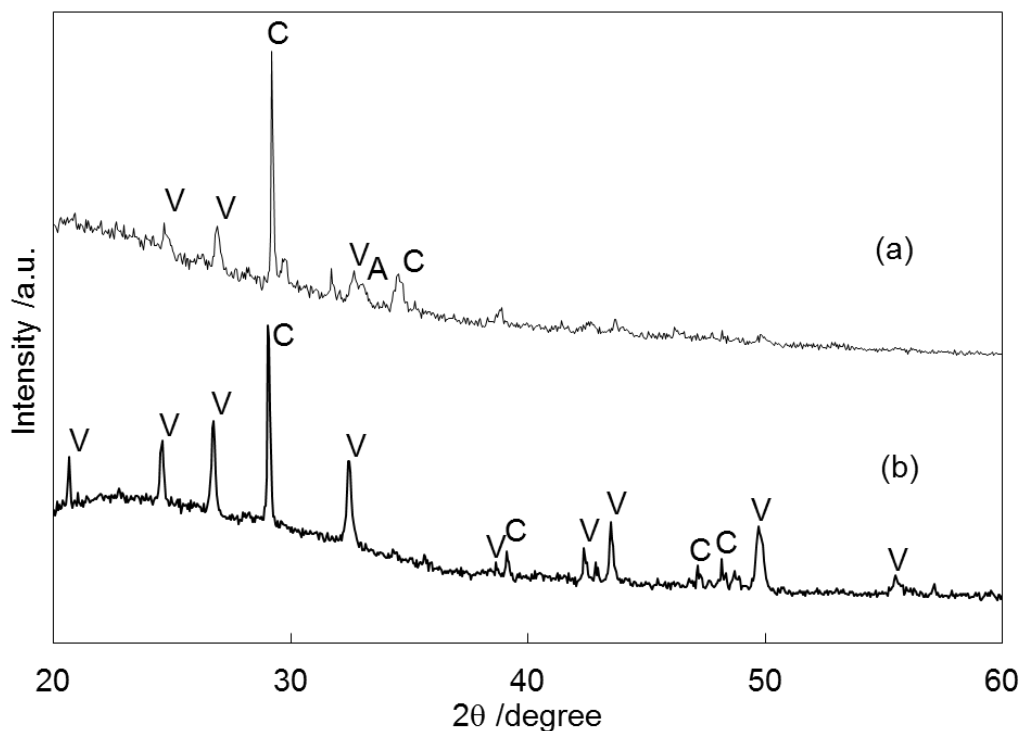


Fig. 4.23 XRD profiles of nano- CaCO_3 before (a) and after being aged for 1 month at 25°C (b). Symbol: C-calcite, A-aragonite, V-vaterite.

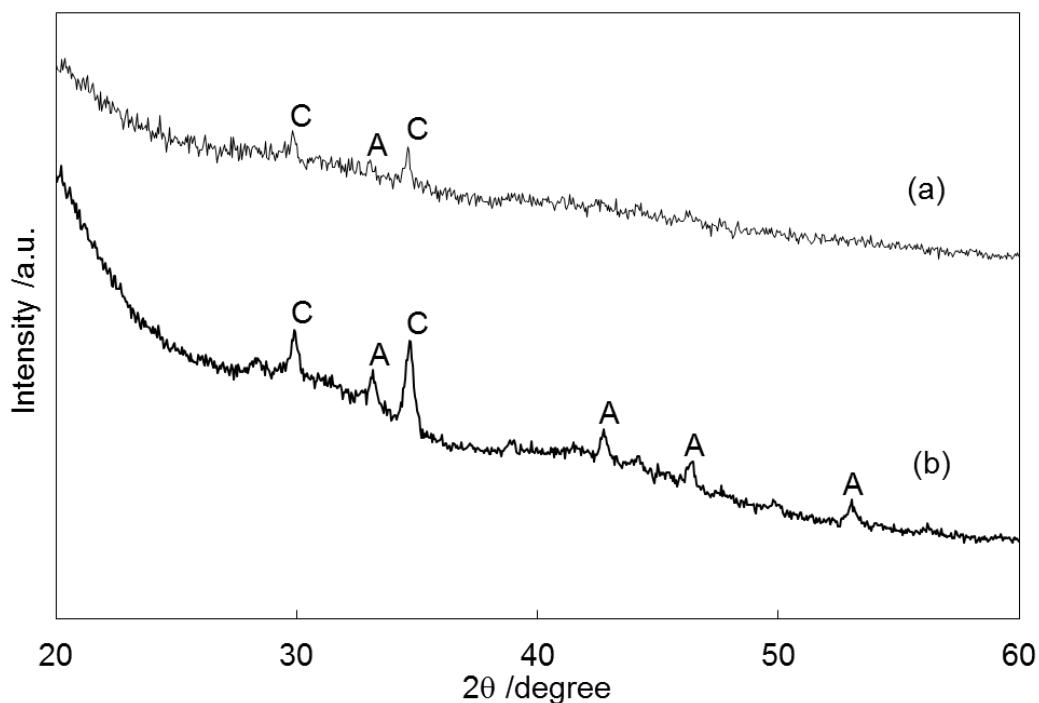


Fig. 4.24 XRD profiles of nanohybrid particles (HC-7) before (a) and after being aged for 1 month at 25°C (b). Symbol: C-calcite, A-aragonite.

4.3.3.6 開始剤量についての影響

開始剤である AIBN の添加量がナノハイブリッド粒子形成に与える影響について検討を行った。Fusion/fission 法により nano-CaCO₃ を形成し、25°C にて 30 分間インキュベート後に、異なる濃度の AIBN を加えて、65°C にて 4 時間重合を行った。Fig. 4.25 に AIBN 量の転化率変化への影響を示す。AIBN 量が 6 および 10 mg の場合、重合速度の遅い誘導期間を経て、急激に重合が進行し、シグモイド型の転化率曲線となった。これは、AIBN の数が減少したことによる油相におけるオリゴラジカルの生成の抑制と、それらのモノマー滴への侵入速度が遅いことを意味している。モノマー滴は、高分子系界面活性剤によって表面を覆われており、これらの立体反発効果によってオリゴラジカルのモノマー滴への侵入が妨げられたと考えられる。しかし、いったんオリゴラジカルがモノマー滴に侵入すると、ミニエマルション特有の高い反応性とゲル効果によって、重合速度が一気に上昇したと考えられる。開始剤量が 60 mg の場合は、オリゴラジカルの侵入阻害期間は見られなかった。

Fig. 4.26 に、開始剤量を変化させて作製したナノハイブリッド粒子の TEM による観察結果を示す。AIBN 量が多いと、球状の nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子が得られたが、AIBN 量を少なくすると、ロッド状の nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子が多くみられた。後者では、重合速度が遅くなるため、PHEMA による影響を受ける前に結晶成長が行われ、4.3.2.3 項にて示した結果と同様に、ロッド状の nano-CaCO₃ が生成したと考えられる。一方、前者では重合速度が速いため、nano-CaCO₃ の形状変化が PHEMA によって阻害されて、球状の nano-CaCO₃ が得られたと考えられる。

次に、重合中にミニエマルションを採取し、TEM にて観察することにより、ナノハイブリッド粒子の形成過程を追った。まず、開始剤量が 60 mg の場合の結果を Fig. 4.27 に示す。開始剤添加から 5 分後において、すでに PHEMA の粒子化が始まっており、球状の nano-CaCO₃ が内包化されている様子が観察された。10 分後には、転化率がほぼ 100% に近づき、界面の明確なナノハイブリッド粒子が観察された。この後にはナノハイブリッド粒子の構造や形態の変化は見られず、nano-CaCO₃ の成長や形態変化が抑制されることがわかった。Fig. 4.28 に開始剤量が 6 mg の場合の結果を示す。転化率の低い 10-40 分後において、nano-CaCO₃ の形状が球状からロッド状へと変化している様子が見られた。重合時間が 50 分になると、転化率が一気に上昇し、ロッド状の nano-CaCO₃ の周りに PHEMA が付着している様子が観察された。さらに重合時間が長くなると、さらに粒子化が進み、4 時間後にはロッド状の nano-CaCO₃ が PHEMA に完全に内包化されている様子が見られた。以上のことから、転化率が 70-80% まで上昇すると、PHEMA によって nano-CaCO₃ が内包化されて結晶成長が抑えられることがわかった。

さらに、Fig. 4.26 (d) より、ロッド状の nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子では、粒子自体が楕円状へと変形することがわかった。これは重合がゆっくりと進むため、nano-CaCO₃ 表面を被覆するように、粒子の核形成および成長が起こったためと考えられる。このように重合速度によって、nano-CaCO₃ の結晶形態やナノハイブリッド粒子の形状を制御することが可能であった。

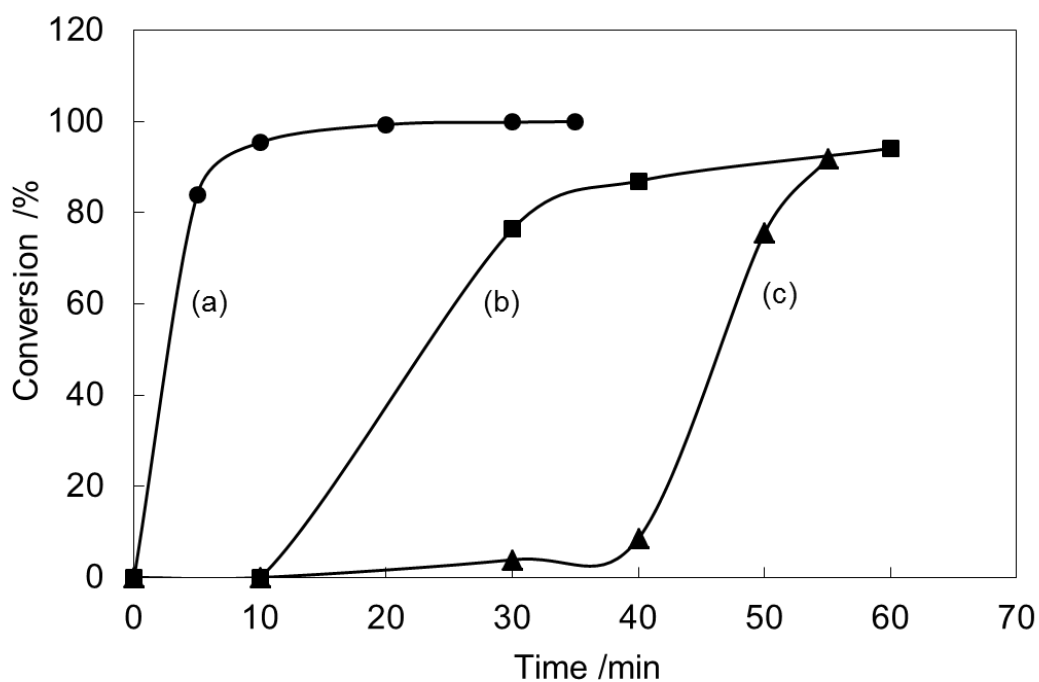


Fig. 4.25 Variation of monomer conversion in the miniemulsion polymerization of HEMA in the presence of nano- CaCO_3 with 60 mg (a), 10 mg (b) and 6 mg (c) of AIBN.

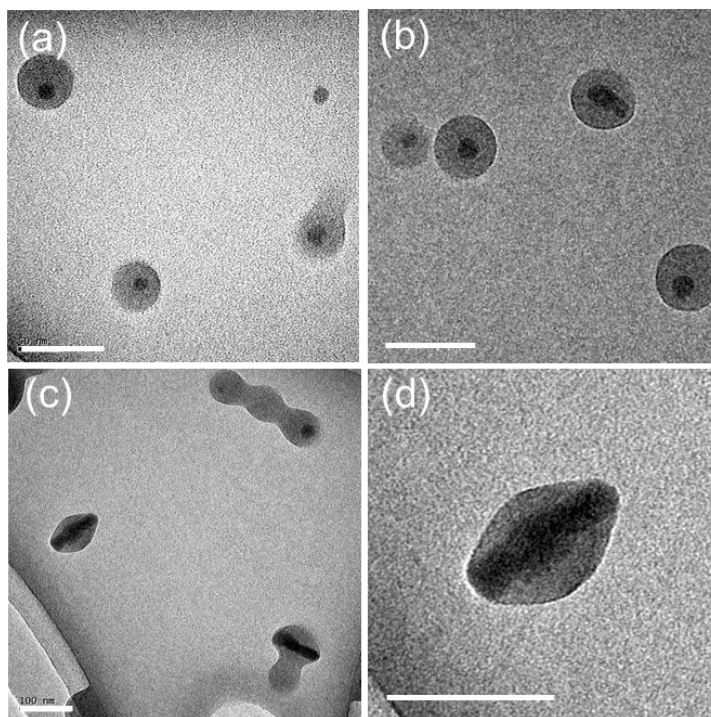


Fig. 4.26 TEM images of nanohybrid particles produced with 60 mg (a), 10 mg (b) and 6 mg (c, d) of AIBN. Concentrations of ion and monomer added were 0.4 M and 5.2wt%, respectively. All scale bars are 100 nm

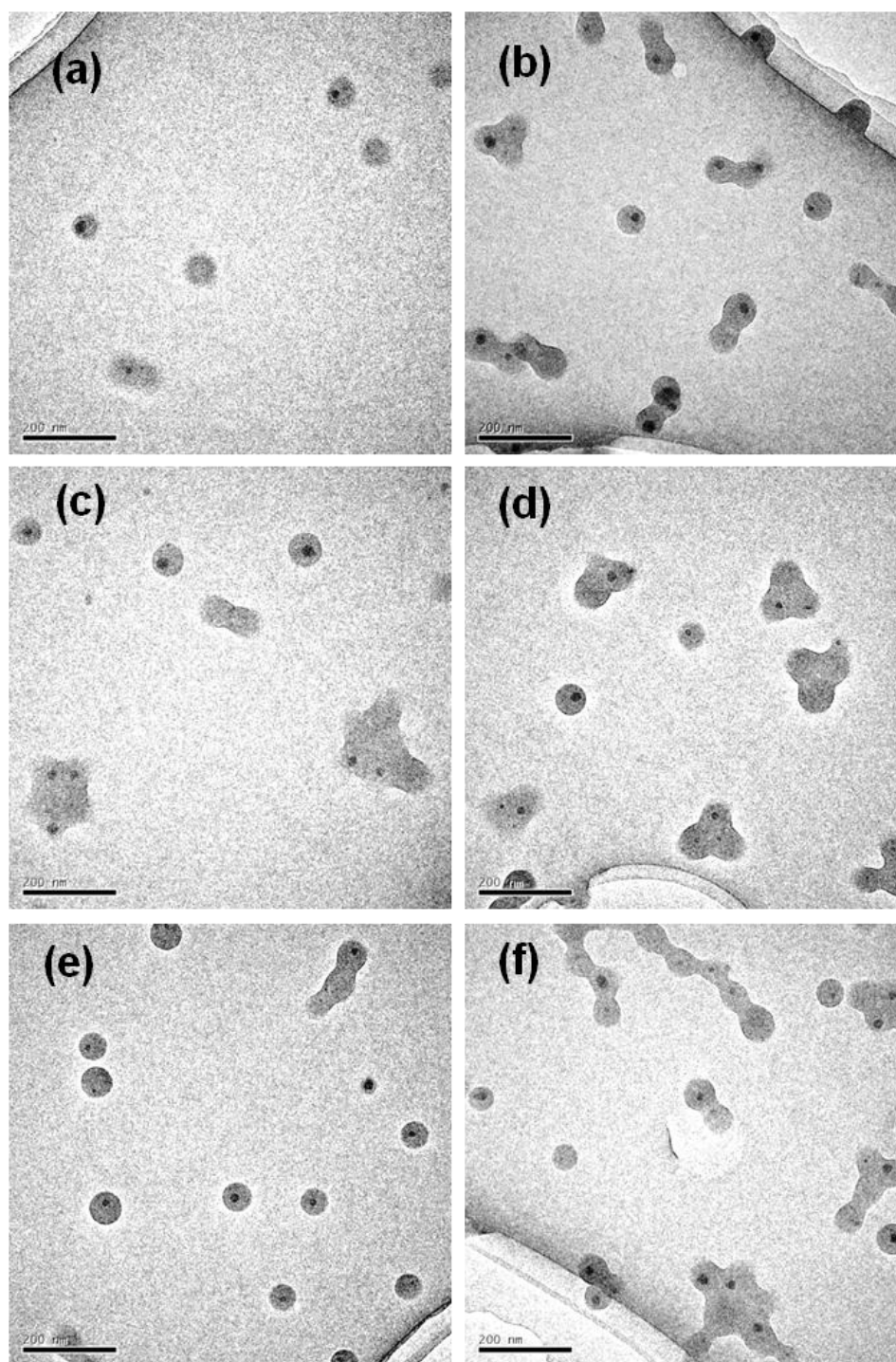


Fig. 4.27 TEM images of nanohybrid particles produced 5 min (a), 10 min (b), 20 min (c), 30 min (d), 40 min (e) and 4 h (f) after the addition of 60 mg of AIBN at 65°C. Ion and monomer concentrations were set at 0.4 M and 5.2wt%, respectively. All scale bars are 200 nm.

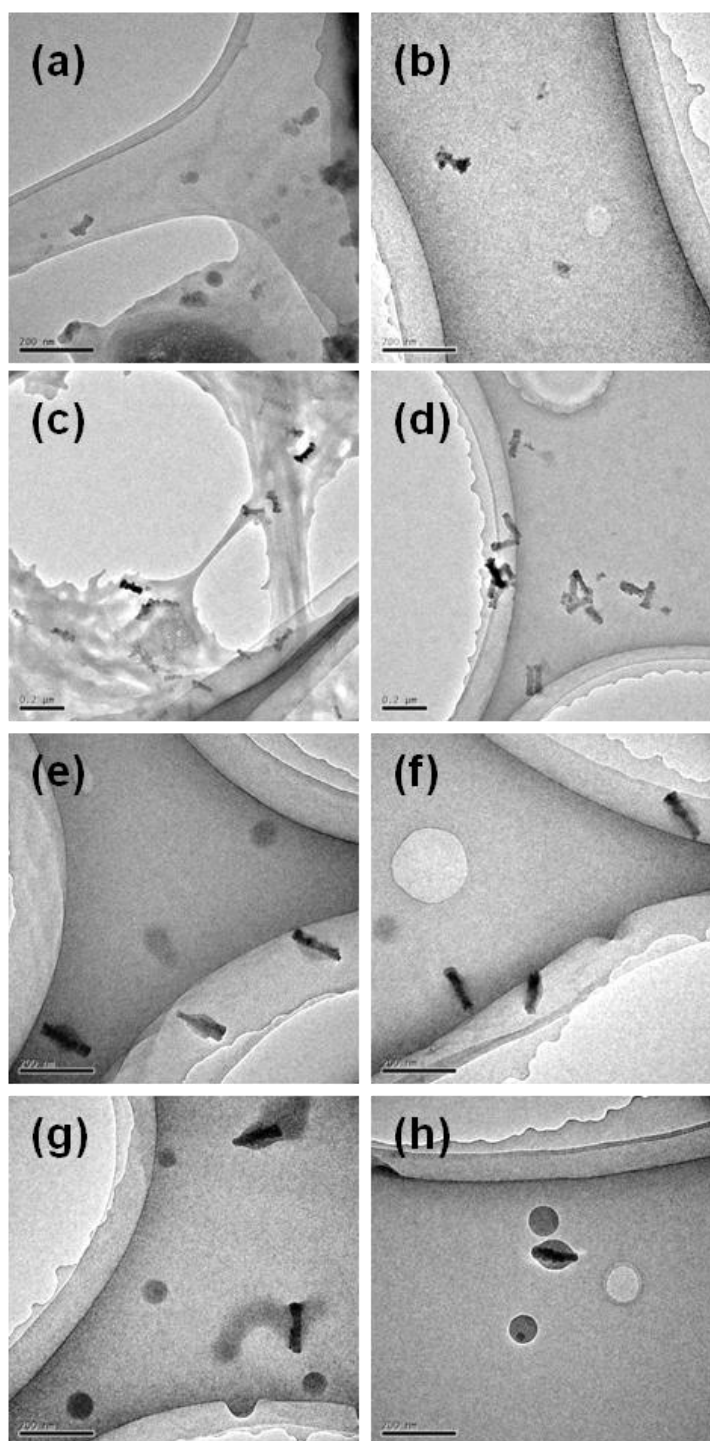


Fig. 4.28 TEM images of nano hybrid particles produced 10 min (a), 20 min (b), 30 min (c), 40 min (d), 50 min (e), 55 min (f), 60 min (g) and 4 h (h) after the addition of 6 mg of AIBN at 65°C. Ion and monomer concentrations were set at 0.4 M and 5.2wt%, respectively. All scale bars are 200 nm.

4.3.3.7 [イオン]/[モノマー]比による影響

[イオン]/[モノマー]比を高くして、大きな粒径の nano-CaCO₃ を含有するナノハイブリッド粒子の作製を試みた。イオン濃度を 2 M およびモノマー濃度を 3.5wt% に設定して、fusion/fission 法により nano-CaCO₃ を作製した。次に 25°C にて 30 分間または 1 日間インキュベートした後 AIBN を加えて、65°C にて 4 時間重合を行った。前述したように、イオン濃度とモノマー濃度がそれぞれ 0.4 M と 5.2wt% の場合には、球状の小さい nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子が見られた。一方、イオン濃度とモノマー濃度がそれぞれ 2 M と 3.5wt% の場合には球状の大きい nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子が作製できた (Fig. 4.29 参照)。

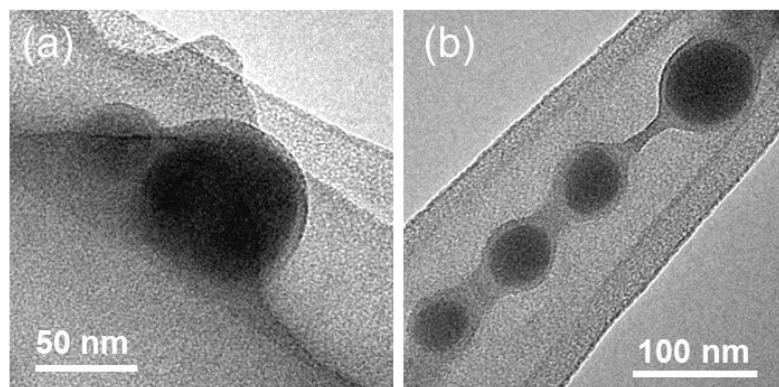


Fig. 4.29 TEM image of nanohybrid particles produced at ion and monomer concentrations of 2 M and 3.5wt%, respectively. Preincubation before polymerization was carried out at 25°C for 30 min (a) and 1 d (b).

結晶構造解析の結果を Fig. 4.30 に示す。[イオン]/[モノマー]比が低い場合には、ピークが観察されなかったが、[イオン]/[モノマー]比を高くするとカルサイトのピークが観察された。これは、モノマー濃度を低くしたことによって、PHEMA による結晶成長阻害効果が抑えられたためと考えられる。

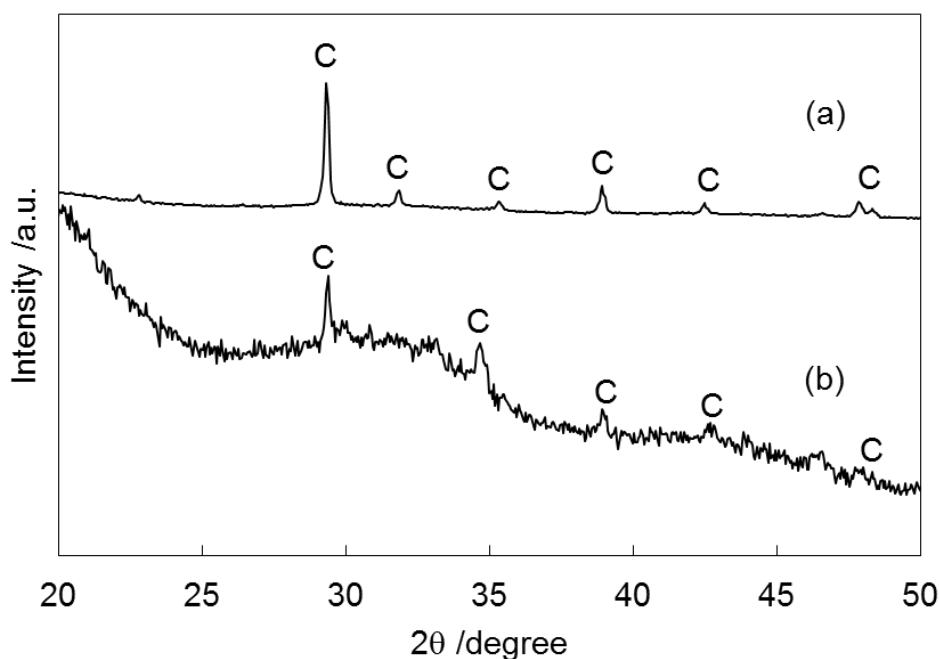


Fig. 4.30 XRD profiles of nanohybrid particles produced at ion and monomer concentrations of 2 M and 3.5wt%, respectively. Preincubation before polymerization was carried out for 30 min (a) and 1 d (b). Symbol: C-calcite.

4.3.3.8 SEMによる形状観察

これまで、様々なサイズや形態を有する nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子を作製することができた。これらのいくつかについて、SEMにより乾燥後の粒子形状の観察を行った。Fig. 4.31 に示すように、いずれのナノハイブリッド粒子も均一なサイズを有していた。小さな球状の nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子 (HC-1, HC-3) については、乾燥によって変形している様子が観察された (Fig. 4.31 (a) and (b))。これは PHEMA が架橋されていないため、形状を維持することが難しかったことによる。また、[イオン]/[モノマー]比が高い系にて作製したナノハイブリッド粒子 (HC-8) は粒子内で nano-CaCO₃ の占める割合が高く、その形状も球形であるため、乾燥による影響は受けずに球形であることがわかった。また、開始剤の量を減らして作製したナノハイブリッド粒子 (HC-11) は、ロッド状の nano-CaCO₃ を内部に有しているため、それに伴って、ナノ粒子の形も楕円状へと変形している様子が確認された。

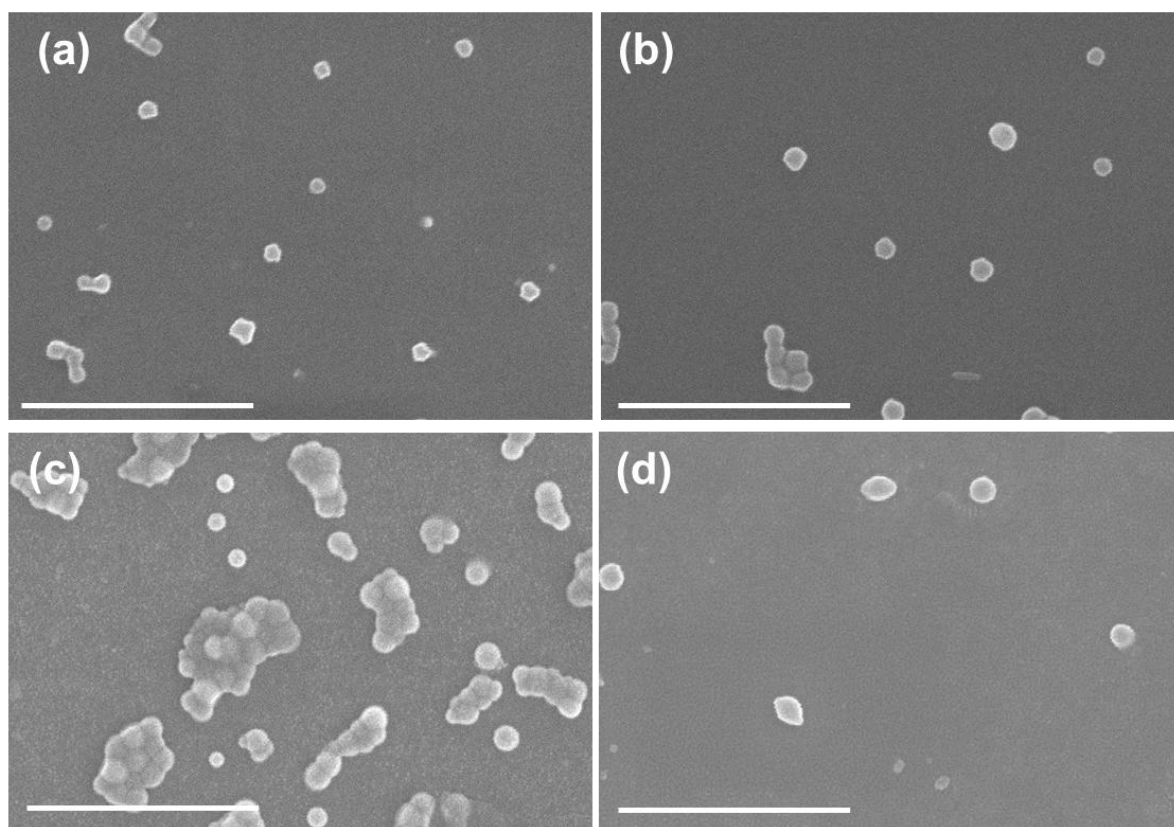


Fig. 4.31 SEM images of nanohybrid particles produced at different conditions. Preincubation was carried out at 25°C for 30 min (a, HC-1) or 1d (b, HC-3), followed by polymerization at concentrations of ion, monomer and AIBN of 0.4 M, 5.2wt% and 60 mg, respectively. Preincubation was carried out at 25°C for 30 min, followed by polymerization at concentrations of ion, monomer and AIBN of 2 M, 3.5wt% and 60 mg (c, HC-8) or 0.4 M, 5.2wt% and 6 mg (d, HC-11), respectively. All scale bars are 1 μ m.

4.3.4 有機無機ナノハイブリッドフィルムの作製

4.3.4.1 スピンコート法によるナノフィルムの作製条件

スピンコート法は固体基板の上に遠心力で液体を塗布する方法であり、フォトレジストをはじめとして薄膜作製のために使われている。このスピンコート法に従って、基板上にナノ粒子の分散液を滴下して高速で回転すると、ナノ粒子が基板表面に広がり、乾燥後にナノ粒子の薄膜が基板表面に残る。本実験では、PHEMA ナノ粒子分散液 (H-3) を用いて、このスピンコート法により、種々の条件下にて、ナノ粒子からなるフィルムを作製した。Fig. 4.32 に SEM による形状観察の結果を示す。どちらの回転速度においても、ナノ粒子が均一に充填された様子が見られた。ただ、回転速度が 5000 rpm の方が 2000 rpm の場合と比較しひび割れが少なかったため、以降の実験からは 5000 rpm にてナノフィルムを作製することとした。また、積層回数を 1 回から 3 回に増やすことでナノハイブリッド粒子を多層化することができた。

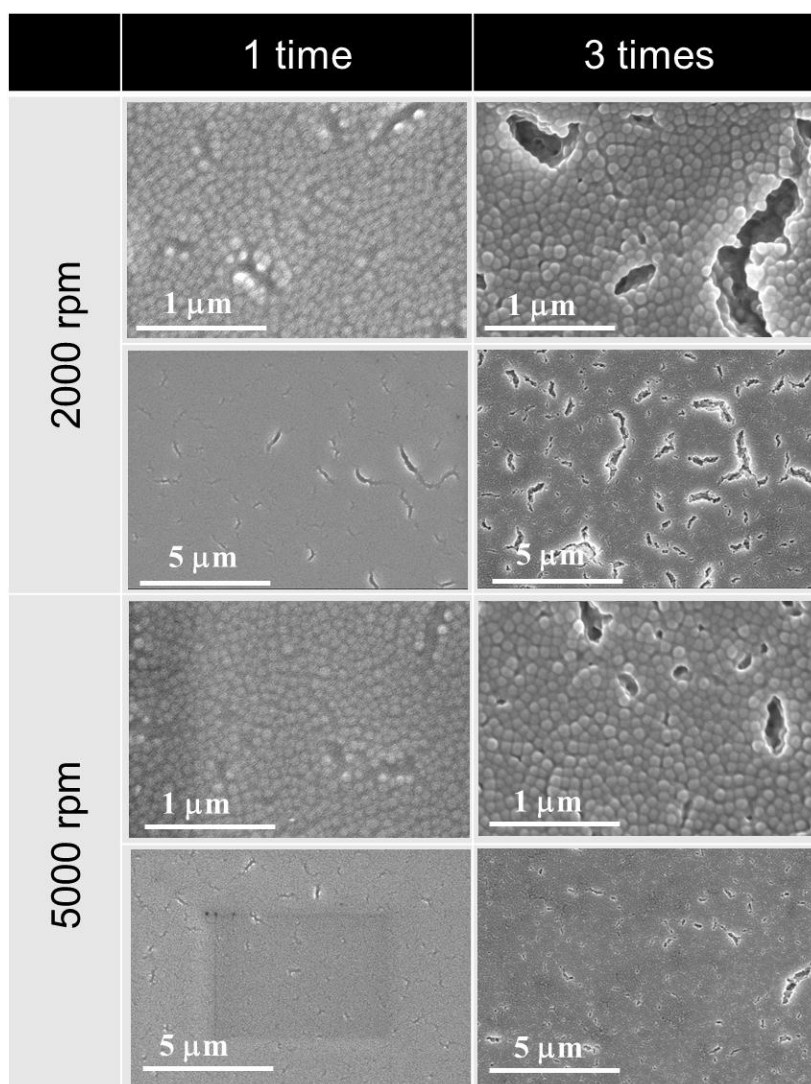


Fig. 4.32 SEM images of PHEMA nanoparticle membranes produced by spin-coating method.

4.3.4.2 スピンコート法によるナノハイブリッドフィルムの作製

人工的に有機無機ハイブリッドフィルムを作製する場合、有機物および無機物の複合化をナノスケールで制御することは難しい。本研究では、様々なサイズや結晶構造を有する nano-CaCO₃ を内包化したナノサイズの PHEMA 粒子（ナノハイブリッド粒子）の分散液（HC-1, 3 and 8）を基板の上にスピコートすることで、ナノハイブリッドフィルムを作製した。TEM および SEM による形状観察の結果を Fig. 4.33 に示す。SEM による観察より充填されたナノハイブリッドフィルムが得られたことがわかった。さらに、TEM による観察より、全てのナノフィルムにおいて、nano-CaCO₃ がもとのサイズや形状を保ったまま PHEMA 粒子内に存在し、フィルム全体に渡って均一に分散している様子が確認できた。これより、PHEMA は nano-CaCO₃ のサイズや形状を安定に保持させるだけでなく、ナノハイブリッドフィルム形成においては、粒子同士を密着させる“のり”として機能することがわかった。

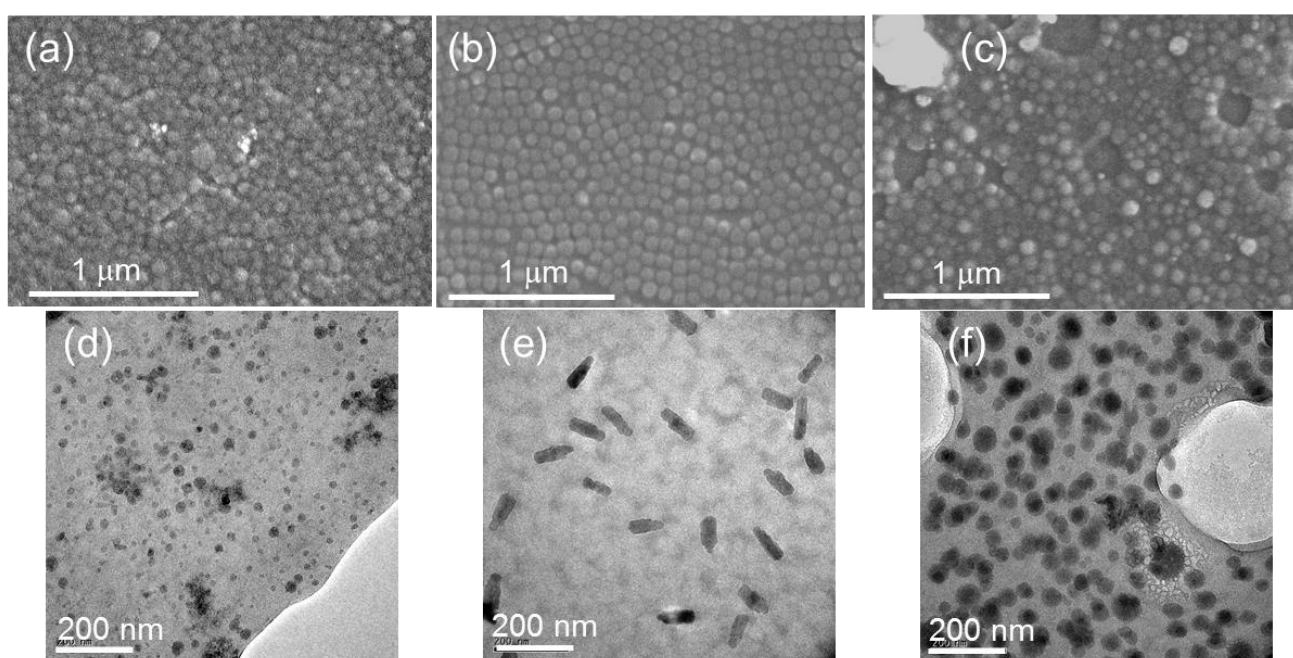


Fig. 4.33 SEM and TEM images nano-hybrid films produced from HC-1((a) and (d)), HC-3 ((b) and (e)) and HC-8 ((c) and (f)).

4.3.4.3 ナノハイブリッドフィルムの光透過性について

HC-1 と HC-8 から作製した、ナノハイブリッドフィルムの紫外—可視光領域における光透過性について検討を行った。Fig. 4.34 に 300-1100 nm における透過率測定の結果を示す。内封された nano-CaCO₃ のサイズや構造に関わらず、どちらのナノフィルムも高い光透過性を示した。通常、有機無機ハイブリッド薄膜は、ポリマーマトリックス中での無機物の凝集や析出により、高い光透過性を有するものは少ない。本研究においては、PHEMA 粒子の融着によって、様々な結晶サイズや構造を保ったまま、高い光透過性を示すナノフィルムを形成することができた。また、ナノハイブリッドフィルムは、無機物のサイズがナノスケールであるため、その存在に関わらず、光透過性が低下しなかったと考えられる。この

ようなナノハイブリッド化によって、無機物のサイズや構造の違いによる光の吸収率、透過率、屈折率などの制御が可能な新規コーティング素材への展開が期待できる。

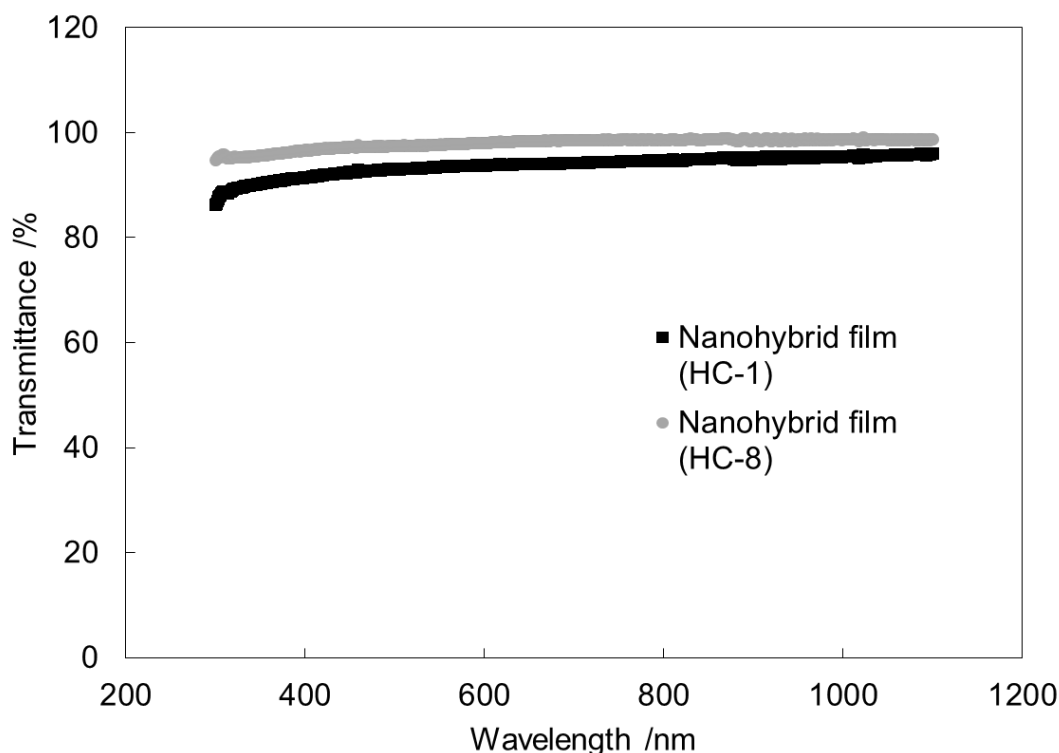


Fig. 4.34 UV-VIS transmission spectra of nanohybrid films composed of nanohybrid particles (HC-1 or HC-8). Nanohybrid particles were spin-coated on a glass plate for measurement of transmittance.

4.3.4.4 ナノハイブリッドフィルム内での nano-CaCO₃ の結晶成長

HC-1、3、および 8 を用いて作製したナノハイブリッドフィルムを、120°C にてインキュベートすることで、ナノフィルム中にて結晶成長を促した。それぞれのナノフィルムの熱処理前および 120°C にて熱処理後の TEM による観察結果を Fig. 4.35 に示す。HC-1 を用いて作製したナノフィルムのみ、熱処理前と比較し、球状の nano-CaCO₃ がロッド状へと結晶成長または溶解と再析出により結晶化が進行している様子が確認された。また、インキュベート時間が 3 時間から 1 日と長くなるほど、ロッド状の nano-CaCO₃ が多く見られた。HC-3 および HC-8 を用いて作製したナノフィルムでは、熱処理前後で nano-CaCO₃ の個数はほとんど変化しなかった。一方、HC-1 を用いて作製したナノフィルムでは、熱処理を 1 日行くと nano-CaCO₃ の個数が約 30% にまで減少していた。4.3.3.2 項より、HC-1 中の nano-CaCO₃ はアモルファスであり、HC-3 と HC-8 中の nano-CaCO₃ はカルサイトであると考えられた。アモルファスの CaCO₃ は熱力学的に不安定であり溶解性が高いため、CaCO₃ 結晶へと変化しやすいことが知られている。PHEMA の T_g は、113°C 付近であることが知られており²⁰⁾、ナノフィルムを 120°C にてインキュベートすることにより、ナノフィルム中でポリマーセグメントのミクロブラウン運動が促進される。65°C にて 3 時間インキュベートした場合には、nano-CaCO₃ の形状変化はみられなかったことから (data not shown)、PHEMA の流動化によって CaCO₃ を安定化する作用が弱まり、さらにナノフィルム中でのイオン拡散が促進されて、CaCO₃ の溶解と再析出が起こり、より安定な結晶構造へと変化したと考えら

れる。以上より、nano-CaCO₃ とポリマーのナノハイブリッド粒子をスピんキャストすることにより、nano-CaCO₃ がナノスケールで分散しているナノフィルムを得ることができ、アモルファスの nano-CaCO₃ が分散しているナノフィルムではポリマーの流動化により結晶構造を変化させることが可能であった。このような制御はナノハイブリッドナノフィルムの強度の調節や光透過性領域のパターニングなど、新規な物性付与および機能発現が期待できる。

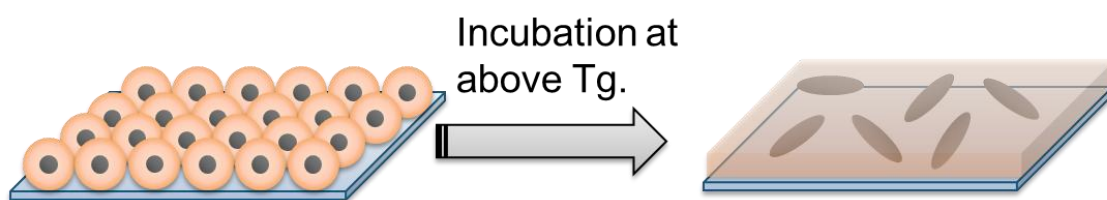
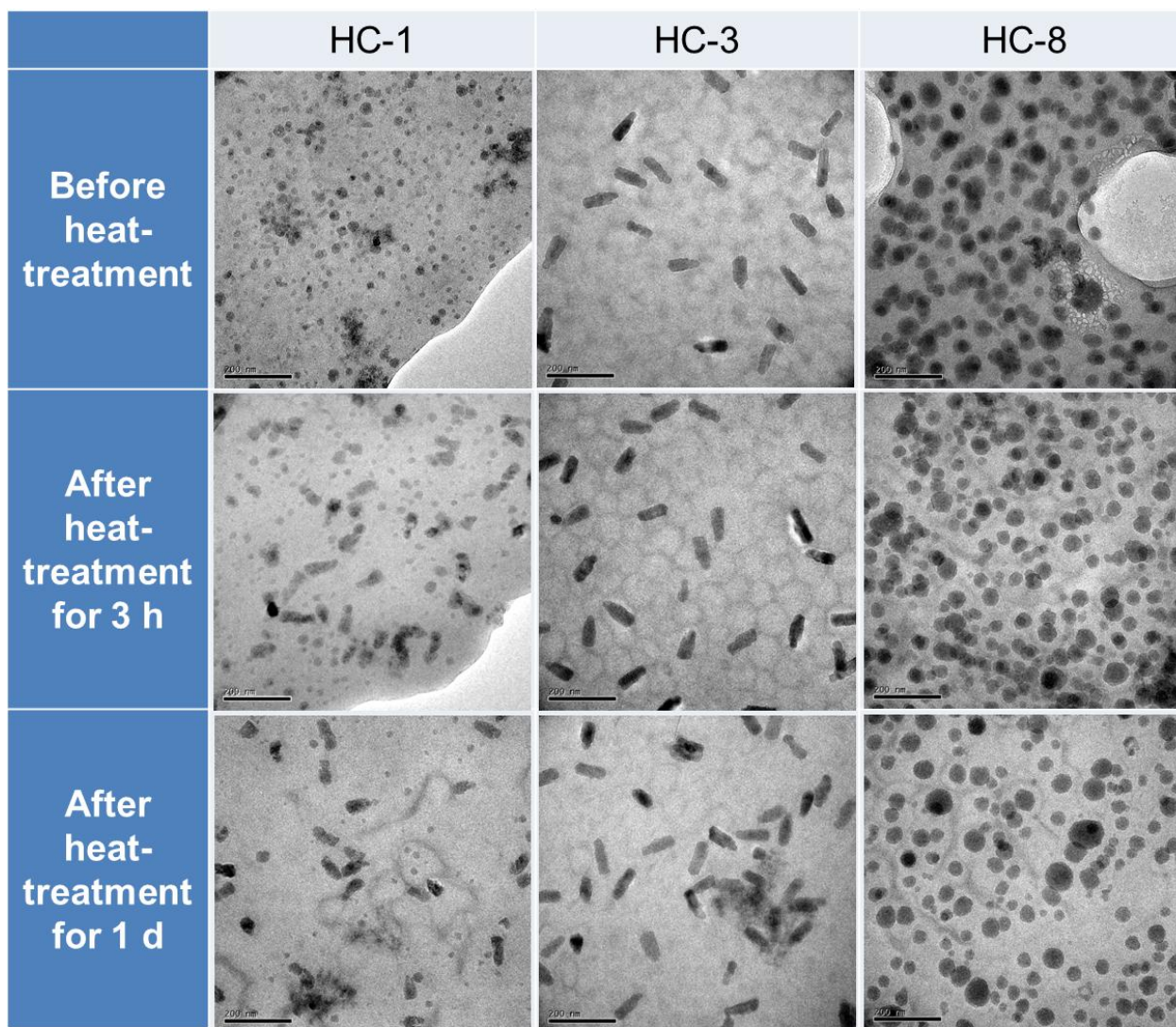


Fig. 4.35 TEM images of nanohybrid films before and after heat-treatment at 120 °C.

4.4 結論

油相に分散したナノサイズの水滴(ミニエマルション)内部で重合およびCaCO₃の形成を行うことで、有機無機ナノハイブリッド粒子の作製を行った。

油相としてシクロヘキサン、界面活性剤として Span 80 またはジメチコンを用いて、W/O 型ミニエマルションを作製した。ナノ水滴内で重合を行って、PAAm ナノ粒子と PHEMA ナノ粒子を合成した。モノマー量や界面活性剤量を変化させることによって、粒径を 100~300 nm の範囲でコントロールすることができた。CO₂ バブリング法と fusion/fission 法の 2 種類の方法を用いて、ミニエマルション内で nano-CaCO₃ の作製を行った。まず、CO₂ バブリング法では CaCl₂ と NH₃ を含んだ水相を用いてミニエマルションを作製し、CO₂ ガスをバブリングすることで、ナノ水滴内部で nano-CaCO₃ の作製を行った。バブリング時間を長くすると、得られる nano-CaCO₃ の量が増加した。また、nano-CaCO₃ はバテライトを多く含んでいることがわかった。Fusion/fission 法ではモノマーである HEMA と Ca(NO₃)₂ を含んだ水相と Na₂CO₃ を含んだ水相をそれぞれ作製し、これらを混合して超音波を当てることで、ミニエマルション中で nano-CaCO₃ の生成を行った。モノマーを含まない場合は球状の nano-CaCO₃ が得られたが、HEMA モノマー存在下ではロッド状の nano-CaCO₃ が得られた。これは、ミニエマルションが作り出すナノサイズの限定された空間において、HEMA モノマーが CaCO₃ のある特定の結晶面と相互作用することで、ある特定方向への結晶面の成長が促進されたためと考えている。また、温度を変化させると、ロッド状の nano-CaCO₃ のアスペクト比が変化し、結晶構造が変化することがわかった。Fusion/fission 法を用いて、モノマー存在下にて nano-CaCO₃ を作製した後、開始剤である AIBN を加えて重合を行い、有機無機ナノハイブリッド粒子を作製した。この時、重合前までのプレインキュベーション時間が 30 分あるいは 4 時間と短い場合では、アモルファスで微小な nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子が得られた。一方、プレインキュベーションを 1~4 日間と長くすると、サイズが大きくなり、カルサイトとアラゴナイトをどちらも含んだ nano-CaCO₃ が生成した。また、粒子内に内包化された nano-CaCO₃ の結晶構造は長期に渡って保持されることがわかった。次に、IR および NMR を用いて、PHEMA と CaCO₃ の相互作用について検討を行った。PHEMA のエステル部位およびヒドロキシ基と結晶中の Ca²⁺ が相互作用していることがわかった。よって、ナノ水滴内部で PHEMA が nano-CaCO₃ 表面に吸着することによって、結晶成長部位へ Ca²⁺ の輸送を阻害して成長が抑制されたと考えている。以上のことから、ミニエマルション内において PHEMA が CaCO₃ の結晶成長や溶解と再析出による構造変化を阻害していると考えられた。また、ミニエマルション内へ添加する開始剤量を少なくすると、ナノ粒子内の nano-CaCO₃ の形態が球状からロッド状へと変化した。これは、重合速度が遅くなることにより、PHEMA よりも nano-CaCO₃ の成長が早く進んだことによると考えられた。また、ロッド状の nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子は、粒子の形が楕円状へと変形していることがわかった。さらに[イオン]/[モノマー]比を上げることによって、ナノ粒子内部の nano-CaCO₃ のサイズを大きくすることができた。作製したナノハイブリッド粒子を、基板上に塗布することで、ナノハイブリッド粒子からなる薄膜(ナノフィルム)を作製した。得られたナノフィルムは透明であり、結晶構造や形態を保ったまま、nano-CaCO₃ を均一にフィルム中に分散することができた。また、PHEMA の T_g 以上に温度を上げることによってポリマー鎖のミクロブラウン運動を促進させたところ、ポリマーフィルムの流動化により nano-CaCO₃ との相互作用が変化して、結晶の成長または溶解と再析出による結晶化を制御することができた。

Appendix

A4.1 ミニエマルションについて

二つの互いに溶け合わない液体の一方が、他方の中に細粒状に分散している系をエマルションという。エマルションには、水が連続相になって油が細粒となっている O/W (oil-in-water) 型とその逆の型である W/O (water-in-oil) 型がある。また、エマルションは、水滴または油滴の分散状態により、マクロエマルション (粒子径: 0.5 μm 以上)、マイクロエマルション (粒子径: 5-50 nm) およびミニエマルション (粒子径: 50-500 nm) の三つのエマルションに分類される²¹⁾。なかでも、ミニエマルションは、界面活性剤およびコスタビライザー存在下、超音波のような機械的せん断をかけることによって作製できる。安定性が高いため、長期に渡って分散状態を維持することができる²²⁾。以下にミニエマルションの安定化に関するメカニズムについて述べる。

一般に、液滴は二つのプロセスによって崩壊または成長することが知られている。一つは、液滴同士の衝突や融合によるものであり、これは、適切な界面活性剤量または種類を選択することによって抑制することが可能である。ミニエマルション形成において、アニオン性、カチオン性、ノニオン性など様々な界面活性剤が用いられている。一般に、HLB (hydrophile-lipophile balance) 値が、3.5~6の間では W/O 型となり、8~18の間では O/W 型となることが知られている。W/O 型ミニエマルションでは、高分子系界面活性剤がよく使われ、その中でも親水性鎖および疎水性鎖からなるブロック共重合体が最も効果的だといわれている。これは、高分子鎖の高い立体安定化効果が、油相中での液滴の分散安定に寄与するためである。二つ目は、液滴間の化学ポテンシャル差 ($\Delta\mu$) にもとづく、分子拡散によるオストワルド熟成によるものである。粒径が小さい液滴は大きい液滴よりもラプラス圧が高いため、内圧が高い状態にあるため、大小の液滴間に化学ポテンシャルの差 ($\Delta\mu$) が生じる。そのため、液滴間に粒径差が生じると、粒径が小さい液滴から大きな液滴へとモノマー

などの物質が移動し、粒径差がより大きくなる (Fig. 4.36 (a))。このオストワルド熟成による物質移動を抑制するために浸透圧効果を付与することが行われる。例えば、O/W 型の場合は疎水性の高い物質である hydrophobe を、W/O 型の場合は親水性の高い物質である lipophobe を液滴内へ添加する。もし、小さい液滴から大きな液滴へと物質が移動すると、小さい液滴において hydrophobe または lipophobe のモル分率が上がり、大きな液滴ではモル分率が下がる。それによって、小さい液滴内のモノマーの化学ポテンシャルが低下する。そのため、大きな液滴から油相を介して小さい液滴に向けて、オストワルド熟成による物質移動とは逆方向に流れが生じる (Fig. 4.36 (b))。こうして両者の液滴に働くラプラス圧と浸透圧差が同じ (熱力学的に安定な平衡状態) になったとき、液滴間の物質移動がなくなり、安定なミニエマルションが形成される。

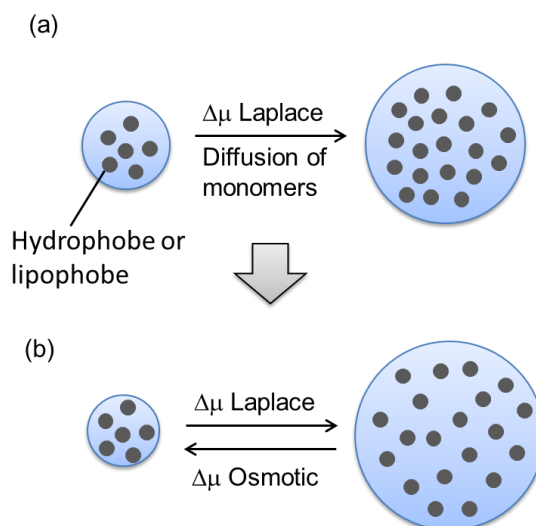


Fig. 4.36 A schematic diagram representing the Ostwald ripening of nanodroplets (a) and its suppression by the balancing of Laplace pressure and osmotic pressure (b).

A4.2 CaCO₃について

CaCO₃は、主としてカルサイト、アラゴナイト、およびバテライトの三つの結晶形をとる²³⁾。カルサイトは常温・常圧で最も安定であり、六方晶系で菱形の結晶形をとる。天然に多く存在するため、セメントや鉄鋼の主原料として利用されている。アラゴナイトは、針状でアスペクト比の大きい斜方晶であり、常温・常圧下では準安定相である。貝殻や真珠には、アラゴナイトとタンパク質が複合化したハイブリッド構造がみられる²⁴⁾。バテライトは、六方晶系で球状の結晶形をとり、常温・常圧下で準安定相であり、三つの結晶形の中で最も熱力学的に不安定な構造である。そのため天然にはほとんど存在しないが、魚類の耳石、腹足類の外骨格などで見られる¹⁰⁾。これは共存する有機電解質の働きにより、結晶の溶媒媒介転移が食い止められているためである。また、バテライトは非常に特異的な二次粒子構造を有している。すなわち、100 nm 前後の微小な一次粒子が凝集して球状の二次粒子を形成するため、非常に大きな比表面積を有する構造となっている。このようなバテライトの特徴的な構造を利用して、製紙剤、充填剤、化粧品などへの応用が注目されている²⁵⁾。CaCO₃は三つの結晶形以外にもアモルファス (amorphous calcium carbonate, ACC) として存在している。例えば、甲殻類には ACC が外骨格の強化に用いられている²⁶⁾。これは ACC の強度というより、その高い溶解性が脱皮期に有効だからである。ACC は特徴的な機械的および光学的特性を有し、さらにカルサイトやアラゴナイト相形成のための前駆体としての働きも有しているため、新機能性材料として注目されている²⁷⁾。実際に、ACC は、ミニエマルション²⁸⁾や有機分子による安定化²⁹⁾を利用して、合成が行われている。以上のように、CaCO₃はその構造の違いによって、形状や物性が異なるため、工業的利用において結晶多形の制御が重要である。

バイオミネラリゼーションにおける有機分子の働きを模倣して、界面活性剤、有機分子、ポリマーなどの添加物による CaCO₃の結晶多形の制御が研究されている³⁰⁾。例えば、CaCO₃形成時に結晶化阻害剤である poly(sodium 4-styrene sulfonate-co-*N*-isopropylacrylamide)を添加し、その濃度を変化させることで、CaCO₃の結晶多形をコントロールできることが報告されている³¹⁾。また、このような添加剤による効果を用いて、天然には見られないような CaCO₃の構造体の合成が行われている。例えば、酸性ポリマーを添加することにより、結晶面同士の成長速度が変化し、コーン型やロッド型のカルサイトが形成される³²⁾。また、界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の添加濃度を変化させることで、ロッド状のアラゴナイトや花びら型のバテライトが形成することも報告されている³³⁾。このように、低分子から高分子までの有機分子を用いることにより、CaCO₃の結晶多形や形状を制御することが可能である。

A4.3 ミニエマルション重合におけるナノ粒子形成機構

ミニエマルション重合は、Ugelstad らにより報告された³⁴⁾。界面活性剤とコスタビライザー存在下で、従来のエマルション重合では重合の場ではなかったモノマー滴を機械的に分散して十分に小さくすれば、この微細化されたモノマー滴中で重合が進行することを報告した。ミニエマルションは、液滴サイズがサブミクロンサイズであるため、界面活性剤のほとんどが液滴表面に吸着し、ミセルは存在しない系となる。粒子核形成はモノマー滴へのラジカル侵入によって起こり、重合はこの液滴内のモノマー消費によって進行するものと考えられている。よって、モノマー滴がそのままポリマー微粒子となるため、最終ポリマーの粒子数や粒子径分布は、最初のモノマー滴に大きく影響を受ける。さらに、あらかじめモノマー滴内に物質を封入しておくとそのまま粒子内に保持させることができる。

本実験では、開始剤として油溶性の AIBN および水溶性の APS を使用した。AIBN は油相中で、熱分解によってラジカルを発生し、油相中にわずかに溶けているモノマーを攻撃する。モノマーが重合し、十分に親水性のオリゴマーとなると、水滴内部に侵入して、重合を開始する。開始剤が APS の場合は、最初からナノ水滴内部に溶解しているため、直接ナノ水滴内部で重合が開始する³⁵⁾。

第4章の参考文献

- 1) 増原極微変換プロジェクト, “マイクロ化学-微笑空間の反応を操る”, 化学同人 (2003).
- 2) Landfester, K., “Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles RID F-9449-2011”, *Angewandte Chemie-International Edition*, **48**, 4488-4507 (2009).
- 3) Willert, M., Rothe, R., Landfester, K., Antonietti, M., “Synthesis of inorganic and metallic nanoparticles by miniemulsification of molten salts and metals”, *Chemistry of Materials*, **13**, 4681-4685 (2001).
- 4) Baier, G., Musyanovych, A., Dass, M., Theisinger, S., Landfester, K., “Cross-Linked Starch Capsules Containing dsDNA Prepared in Inverse Miniemulsion as “Nanoreactors” for Polymerase Chain Reaction RID F-9449-2011”, *Biomacromolecules*, **11**, 960-968 (2010).
- 5) Landfester, K., Weiss, C. K., “Encapsulation by Miniemulsion Polymerization RID F-9449-2011 RID C-9932-2009”, *Modern Techniques for Nano- and Microreactors/-Reactions*, **229**, 1-49 (2010).
- 6) Faridi-Majidi, R., Sharifi-Sanjani, N., “Emulsifier-free miniemulsion polymerization of styrene and the investigation of encapsulation of nanoparticles with polystyrene via this procedure using an anionic initiator”, *Journal of Applied Polymer Science*, **105**, 1244-1250 (2007).
- 7) Ramos, J., Forcada, J., “Surfactant-Free Miniemulsion Polymerization as a Simple Synthetic Route to a Successful Encapsulation of Magnetite Nanoparticles RID F-8147-2010”, *Langmuir*, **27**, 7222-7230 (2011).
- 8) Mann, S., “Biom mineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry”, Oxford University Press (2001).
- 9) Politi, Y., Arad, T., Klein, E., Weiner, S., Addadi, L., “Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase”, *Science*, **306**, 1161-1164 (2004).
- 10) 加藤隆史, “バイオミネラル化とそれに倣う新機能材料の創製”, シーエムシー出版 (2007).
- 11) Kreft, O., Prevot, M., Moehwald, H., Sukhorukov, G. B., “Shell-in-shell microcapsules: A novel tool for integrated, spatially confined enzymatic reactions”, *Angewandte Chemie-International Edition*, **46**, 5605-5608 (2007).

- 12) Ueno, Y., Futagawa, H., Takagi, Y., Ueno, A., Mizushima, Y., "Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system", *Journal of Controlled Release*, **103**, 93-98 (2005).
- 13) Jayasuriya, A. C., Bhat, A., "Fabrication and characterization of novel hybrid organic/inorganic microparticles to apply in bone regeneration", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **93A**, 1280-1288 (2010).
- 14) Yoo, S., Hsieh, J. S., Zou, P., Kokoszka, J., "Utilization of calcium carbonate particles from eggshell waste as coating pigments for ink-jet printing paper", *Bioresource technology*, **100**, 6416-6421 (2009).
- 15) 江前敏晴, 辻野浩司 "球状多孔質炭酸カルシウム粒子の調整と製紙への応用", 第66回紙パルプ研究発表会(盛岡)講演要旨集, 142-147, 紙パルプ技術協会 (1999).
- 16) Song, J., Saiz, E., Bertozzi, C., "A new approach to mineralization of biocompatible hydrogel scaffolds: An efficient process toward 3-dimensional bonelike composites", *Journal of the American Chemical Society*, **125**, 1236-1243 (2003).
- 17) Zainuddin, Hill, D. J. T., Whittaker, A. K., Lambert, L., Chirila, T. V., "Preferential interactions of calcium ions in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, **18**, 1141-1149 (2007).
- 18) Hadiko, G., Han, Y., Fuji, M., Takahashi, M., "Synthesis of hollow calcium carbonate particles by the bubble templating method", *Materials Letters*, **59**, 2519-2522 (2005).
- 19) Kitano, Y., "A Study of the Polymorphic Formation of Calcium Carbonate in Thermal Springs with an Emphasis on the Effect of Temperature", *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **35**, 1980-1985 (1962).
- 20) Meakin, J., Hukins, D., Imrie, C., Aspden, R., "Thermal analysis of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) hydrogels", *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, **14**, 9-15 (2003).
- 21) 古澤邦夫, "新しい分散・乳化の科学と応用技術の新展開", テクノシステム (2006).
- 22) Antonietti, M., Landfester, K., "Polyreactions in miniemulsions", *Progress in Polymer Science*, **27**, 689-757 (2002).
- 23) Agarwal, P., Berglund, K., "In situ monitoring of calcium carbonate polymorphs during batch crystallization in the presence of polymeric additives using Raman spectroscopy", *Crystal Growth & Design*, **3**, 941-946 (2003).
- 24) 竹本喜一, "機能性プラスチックが身近になる本", シーエムシー出版 (2004).

- 25) Walsh, D., Lebeau, B., Mann, S., "Morphosynthesis of calcium carbonate (vaterite) microsponges", *Advanced Materials*, **11**, 324-328 (1999).
- 26) Addadi, L., Raz, S., Weiner, S., "Taking advantage of disorder: Amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization", *Advanced Materials*, **15**, 959-970 (2003).
- 27) Rodriguez-Blanco, J. D., Shaw, S., Benning, L. G., "The kinetics and mechanisms of amorphous calcium carbonate (ACC) crystallization to calcite, via vaterite RID D-6869-2011 RID E-7071-2011", *Nanoscale*, **3**, 265-271 (2011).
- 28) Pai, R. K., Pillai, S., "Nanoparticles of amorphous calcium carbonate by miniemulsion: synthesis and mechanism", *CrystEngComm*, **10**, 865-872 (2008).
- 29) Raz, S., Hamilton, P., Wilt, F., Weiner, S., Addadi, L., "The transient phase of amorphous calcium carbonate in sea urchin larval spicules: The involvement of proteins and magnesium ions in its formation and stabilization", *Advanced Functional Materials*, **13**, 480-486 (2003).
- 30) Sikiric, M. D., Fueredi-Milhofer, H., "The influence of surface active molecules on the crystallization of biominerals in solution", *Advances in Colloid and Interface Science*, **128**, 135-158 (2006).
- 31) Chen, Z., Li, C., Yang, Q., Nan, Z., "Transformation of novel morphologies and polymorphs of CaCO₃ crystals induced by the anionic surfactant SDS", *Materials Chemistry and Physics*, **123**, 534-539 (2010).
- 32) Lee, S., Lee, S. G., Sim, M., Kwak, D., Park, J. H., Cho, K., "Control over the Vertical Growth of Single Calcitic Crystals in Biomineralized Structures", *Crystal Growth & Design*, **11**, 4920-4926 (2011).
- 33) Chen, Z., Li, C., Yang, Q., Nan, Z., "Transformation of novel morphologies and polymorphs of CaCO₃ crystals induced by the anionic surfactant SDS", *Materials Chemistry and Physics*, **123**, 534-539 (2010).
- 34) Ugelstad, J., Elaasser, M., Vanderhoff, J. W., "Emulsion Polymerization - Initiation of Polymerization in Monomer Droplets", *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Letters*, **11**, 503-513 (1973).
- 35) Capek, I., "On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers", *Advances in Colloid and Interface Science*, **156**, 35-61 (2010).

本研究では、生体膜システムやバイオミネラリゼーションでみられる動的な状態変化や物質創製をモチーフとして、高分子特有の物性、反応性、および機能性（高分子効果）を組み込んだ反応システムをデザインし、ナノカプセル、ナノハイブリッドカプセル、ナノ粒子、ナノハイブリッド粒子、ナノフィルム、およびナノハイブリッドフィルムといったポリマーナノマテリアルの創製と機能性材料の開発へ向けて基礎的検討を行った。

第2章では、生体膜由来のナノカプセルであるリポソームをテンプレートとして、静電相互作用により表面へ種々のバイオポリマーを積層化することにより、脂質とポリマーの複合化カプセル（リポナノカプセル）の作製と評価を行った。粒径が約100 nmで負電荷を有するリポソーム膜表面へ、静電相互作用によってカチオン性のCHIを吸着させた。このとき、ポリマー濃度、脂質比、pHによって、CHIの吸着量やナノカプセルの表面電位をコントロールすることができた。さらに liponano-CHI の表面に対して、アニオン性の DXS や DNA を交互に積層化することで、多様なポリマー種、吸着量、積層回数からなるカプセルウォールを有したりリポナノカプセルを作製することができた。リポナノカプセルの DDS キャリアとしての機能を評価するために、リポソームとリポナノカプセル内部へ、様々な電荷や分子量を有する物質を封入した。ナノカプセル形成によって放出は抑えられ、リポナノカプセルが高い物質保持能を有していることがわかった。これは、リポソーム表面にポリマーが吸着することによって、脂質膜の膜流動性が低下し、物質透過性が抑えられたためだと考えられる。また、最外層に二本鎖 DNA を有する liponano-CHI-DNA について、昇温することによって放出が促進される様子がみられた。これは、DNA が二本鎖から一本鎖へと融解して解離するため、下地の脂質膜へ摂動が与えられて物質透過性が向上したためと考えられる。

さらに、表面にリン酸基を有する liponano-CHI-DNA は骨の主無機成分である HAp 粉体へ高い集積能を示した。これは、リン酸基が HAp 粉体の結晶表面のカルシウムと静電相互作用および配位結合するため、高い結合能を示したと考えられる。このように、脂質膜表面へポリマーを積層化することで、リポソームにはない物質放出能やターゲティング能などを付与することができた。今後は、DDS キャリア素材としての応用が期待できる。

第3章では、第2章にて作製したりポナノカプセルの特徴と生体高分子によるバイオミネラリゼーションに着目し、リポナノカプセル表面に無機物であるリン酸カルシウム(calcium phosphate: CaP)を析出させて、有機無機ハイブリッドリポナノカプセルの作製を行った。リポソームまたはリポナノカプセルの放出性に着目し、内部にリン酸イオンを封入し、外液にカルシウムイオンを加えることで、カプセルウォールを介したイオンの相互拡散を利用したナノカプセル表面での CaP の析出法を開発した。表面にリン酸基を有するリポソームおよび liponano-CHI-DNA を用いた場合にのみ、表面特異的に CaP が析出し、ハイブリッドリポナノカプセルを作製することができた。これは、ナノカプセル表面のリン酸基が、その他の官能基と比較し、CaP との親和性が高かったことによると考えられる。リポソーム表面の CaP は、アモルファスであったのに対して、liponano-CHI-DNA 表面の CaP は HAp 様となり、結晶構造が異なることも見出した。これは、リポソームと liponano-CHI-DNA からのリン酸イオンの放出性の違いによる CaP 生成への影響、およびカプセル表層のリン酸基の空間配置の違いによる結晶生成および成長への影響によると考えられる。さらに liponano-CHI-DNA ではイオンの放出がゆるやかにすすむため、pH、温度、および時間によって CaP 層の生成、析出部位、および厚みを制御することができた。次に、lipo-CaP 表面へ DNA を担持し、その放出能と骨へのターゲティング能を検討した。酸性 pH にて CaP は溶解し、

表面の DNA を放出させることができた。また、lipo-CaP-DNA が骨のモデルである HAp 粉体へ特異的に集積化したため、有機無機ハイブリッドリポナノカプセルにおいても DNA を介した骨へのターゲティング能を付与することができることがわかった。以上のことからリポソーム表面へポリマー層を構築することにより、イオンの拡散性や反応場を操作し、目的に応じた CaP 層の結晶構造および厚みといった形態の制御が可能であった。今後は、ナノハイブリッドカプセルの遺伝子キャリアや骨標的指向性薬物キャリアへの多彩な応用展開が期待できる。

第4章では、バイオミネラリゼーションにおけるナノ環境場と有機高分子の機能から学び、油相中にナノサイズの水滴を分散させた W/O (water-in-oil) 型ミニエマルジョンをナノリアクターとして用い、限定された空間の内部で重合およびバイオミネラリゼーションを行うことで、ナノハイブリッド粒子の作製を行った。CO₂ バブリング法と fusion/fission 法の2種類の方法を用いて、ミニエマルジョン内で CaCO₃ の作製を行ったところ、溶液中では得られないサイズや形状を有する nano-CaCO₃ が得られた。特に、カルシウムイオンと炭酸イオンを含むナノ水滴同士を、超音波によって衝突させて反応を行う fusion/fission 法において、HEMA モノマー存在下にてロッド状の nano-CaCO₃ が生成することを見出した。ナノスケールの限定された反応場において、HEMA モノマーが CaCO₃ のある結晶面と相互作用することで、特定の結晶面の成長が促進されたためと考えている。Fusion/fission 法を用いて、モノマー存在下にて nano-CaCO₃ を作製した後、開始剤である AIBN を加えて重合を行い、有機無機ナノハイブリッド粒子を作製した。このとき、ナノ水滴内部での PHEMA の生成により、結晶生成、成長および溶解と再析出による結晶構造の変化が阻害されることがわかった。これは、PHEMA のエステル部位およびヒドロキシル基と結晶中のカルシウムイオンが静電的に相互作用するため、PHEMA が nano-CaCO₃ 表面へ吸着することによって、カルシウムイオンの結晶成長部位への輸送を阻害したことによると考えている。よって、nano-CaCO₃ 生成後のモノマー中でのプレインキュベーション時間、温度、重合速度、[イオン]/[モノマー]比を制御することにより、多様な結晶サイズ、構造および形状を有する nano-CaCO₃ を内包化したナノハイブリッド粒子を作製することができた。粒子内部にロッド状の nano-CaCO₃ を内包化すると、粒子自体の形を楕円状へ変形させることができた。作製したナノハイブリッド粒子を、基板上に塗布することで、nano-CaCO₃ の結晶構造や形態を保ったまま、均一に分散させたナノハイブリッドフィルム（ナノフィルム）を作製できた。このように、ナノ空間内部でポリマーおよび無機結晶の生成制御を行うことで、ナノ粒子内部の無機物の結晶構造、形態さらにナノハイブリッド粒子の形状を制御することができた。今後は、これらの機械的および光学的特性を利用して、ナノコーティングなどの新規機能性材料への応用が期待できる。

序章にて述べたように、生物の動的なシステムにみられるナノスケールの限定された反応場に注目し、その場における物質創製およびその際に用いられる高分子効果をポリマーナノマテリアル創製のコンセプトに取り入れることで、これまでにはない形態や機能を有したナノ素材を開発することができた。

脂質二重膜からなる流動性に富んだソフトな表面へポリマーを吸着することにより、脂質の運動性を制御し、精密な放出機能を有するナノカプセルを作製できた。この積層化したポリマー層表面にて CaP 生成を行うことで、骨の無機成分と同じ HAp や溶液中では安定に存在できないアモルファスの CaP を作製することができ、さらにカプセルウォールの特性を活かすことにより結晶構造や厚みなどの形態をナノスケールで制御可能なナノハイブリッドカプセルの創製へと導くことができた。今後はリポソーム表

面へ積層化する素材の種類や組み合わせを変えたり、化学修飾を行うことで、脂質膜との相互作用を制御して、多様な用途に合わせた機能性リポナノカプセルの創製を目指している。このように生体システムをモチーフとして作製したナノマテリアルは、生体システムへと戻して用いることが可能だと考えている。作製したリポナノカプセルは、天然由来素材からなり、生体適合性や生分解性に優れており、カプセルウォールを介した封入・放出能を有するため、薬物や遺伝子ナノキャリアとして用いることができる。対象疾患に応じて多面的に作用する複数の機能性物質をナノカプセル内部およびカプセルウォール中に封入可能であるため、これらの機能が連動して同時に発現するようなシナジー効果も期待できる。例えば、ナノカプセル内部へ抗がん剤を封入し、カプセルウォール中へ遺伝子を導入することで、薬剤治療および遺伝子治療が同時に可能となる。また、リポナノカプセルを用いることで、骨親和性や溶解性など目的に必要な機能に応じてCaP層の特性を制御できると考えている。例えば、CaP層が骨生成における材料となり、ナノカプセル内部の薬剤と連動することで、骨疾患に対する効果的な治療が期待される。

油相中に分散したナノ水滴内部も限定された空間であり、バルク溶液中とは異なる物質拡散性や反応性などの動的な環境を形作っているため、その特徴を活かしたマテリアルをつくりだすことができると考えた。実際に、ナノ水滴内部を反応場として、内部で重合や無機物の合成を同時に行うことで、ユニークな構造や形態を有する nano-CaCO₃ やナノハイブリッド粒子を得ることができた。これもまた、内部で合成する物質の種類や組み合わせを変えることで、ナノ粒子の多様なデザイン設計が可能になると考えられる。さらに、生物には細胞など小さな機能単位が組み上げられて臓器のような構造体を構築するという階層性が見られる。これに倣って得られたナノ粒子を組織化することで、単なる要素（ナノ粒子）の足し合わせを超えた機能を発現すると考えられる。本研究では、ナノハイブリッド粒子を配列化することにより、ナノハイブリッドフィルムを作製した。今後は、ポリマーの流動性を操作することにより、ナノフィルム内の nano-CaCO₃ 結晶化を制御し、ナノフィルムの強度の調節や光透過性領域のパターニングなど、新規な物性付与および機能発現が期待できる。さらにこの粒子の組み上げ方を創意工夫することで、コロイド結晶やコロイドソーム（粒子によって構成されたカプセル様の構造体）などの3次元構造体の構築とそれによる機能発現も可能であると考えている。

本研究は、ポリマーナノ粒子作製における基盤技術であり、これをまた用途に適合させることで、新しく生まれ変わる可能性を秘めている。本論文が、今後のポリマーナノマテリアル開発の新しい展開やナノ効果の発現のきっかけとなることを願っている。

学術論文および学会発表

1. 主論文に関連する原著論文

[1] Fukui, Y., Fujimoto, K., "The Preparation of Sugar Polymer-Coated Nanocapsules by the Layer-by-Layer Deposition on the Liposome", *Langmuir*, **25**, 10020-10025 (2009).

[2] Fukui, Y., Fujimoto, K., "Control in Mineralization by the Polysaccharide-Coated Liposome via the Counter-Diffusion of Ions", *Chemistry of Materials*, **23**, 4701-4709 (2011).

[3] Fukui, Y., Fujimoto, K., "Bio-inspired nanoreactor based on miniemulsion system to create organic-inorganic hybrid nanoparticles and nanofilms", *Journal of Materials Chemistry*, **22**, 3493-3499 (2012).

2. その他の論文

[1] Fujimoto, K., Toyoda, T., Fukui, Y., "Preparation of bionanocapsules by the layer-by-layer deposition of polypeptides onto a liposome", *Macromolecules*, **40**, 5122-5128 (2007).

[2] Yamamoto, S., Fukui, Y., Kaihara, S., Fujimoto, K., "Preparation and Assembly of Poly(arginine)-coated liposomes to Create a Free-standing Bio-scaffold", *Langmuir*, **27**, 9576-9582 (2011).

3. 国際会議発表

[1] Fukui, Y., Fujimoto, K., "Preparation of lipo-nanocapsules by the layer-by-layer deposition of polysaccharides and coating of calcium phosphate onto a liposome", 11th Liposome Research Days Conference, (Yokohama, Japan, July 2008).

[2] Fukui, Y., Fujimoto, K., "Liponano-capsules: Development of organic and inorganic hybrid nanocapsules for a versatile delivery carrier system", 11th Pacific Polymer Conference, (Cairns, Australia, December 2009).

[3] Fukui, Y., Fujimoto, K., "Preparation of organic-inorganic liponano-capsules via the counter-diffusion of ions across the capsule wall", 2010 MRS Fall Meeting, Boston, (MA, USA, November 2010).

4. 国内学会発表

- [1] 福井有香, 藤本啓二, “リポソームをテンプレートとする多糖被覆ナノバイオカプセルの作製”, 第 56 回高分子学会年次大会, 2007 年 5 月 (京都).
- [2] 福井有香, 藤本啓二, “リポナノカプセルの創製と DDS キャリアへのアプローチ”, 第 29 回日本バイオマテリアル学会, 2007 年 11 月 (大阪).
- [3] 福井有香, 藤本啓二, “多糖リポナノカプセルの創製とリン酸カルシウム中空構造体の構築”, 第 57 回高分子学会年次大会, 2008 年 5 月 (横浜).
- [4] 福井有香, 藤本啓二, “交互吸着法を用いたオーダーメイドリポナノカプセルの創製”, 第 24 回日本 DDS 学会学術集会, 2008 年 6 月 (東京).
- [5] 福井有香, 藤本啓二, “有機・無機ハイブリッド型ナノカプセルの創製とナノウォールの機能化”, 第 57 回高分子討論会, 2008 年 9 月 (大阪).
- [6] 福井有香, 藤本啓二, “Development of lipo-nanocapsules possessing an organic-inorganic hybrid wall by the layer-by-layer deposition on a liposome”, 第 58 回高分子学会年次大会, 2009 年 5 月 (神戸).
- [7] 福井有香, 藤本啓二, “有機・無機ハイブリッドリポナノカプセルの創製とデリバリーキャリアに向けたアプローチ”, 第 38 回医用高分子シンポジウム, 2009 年 7 月 (東京).
- [8] 福井有香, 藤本啓二, “リポソーム表面への有機無機バイオマテリアルの積層化と DDS キャリアに向けたカプセル層の構築”, 第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月 (熊本).
- [9] 福井有香, 藤本啓二, “ミニエマルジョンを反応場とした有機・無機ハイブリッドナノ粒子の創製”, 第 59 回高分子討論会, 第 59 回高分子討論会, 2010 年 9 月 (札幌).
- [10] 福井有香, 藤本啓二, “逆相ミニエマルジョンを反応場とする有機・無機ハイブリッドナノ粒子の形成制御”, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 (大阪).
- [11] 小澤ゆい, 福井有香, 貝原祥子, 藤本啓二, “ミニエマルジョンを反応場としたナノ蛍光体とポリマーの複合化”, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 (大阪).
- [12] 中田早紀, 福井有香, 貝原祥子, 藤本啓二, “炭酸カルシウムとの複合化によるゲル微粒子の表層改質と機能化”, 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 (大阪).

[13] 松山沙織, 福井有香, 貝原祥子, 藤本啓二, “カゼインによるナノ粒子の作製とピッカリングエマルションへの応用”, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 (岡山).

[14] 川端秀典, 福井有香, 貝原祥子, 藤本啓二, “表面開始リビングラジカル重合によるヘア型リポナノカプセルの創製”, 第 33 回日本バイオマテリアル学会, 2011 年 11 月 (京都).

[15] 畠山史江, 福井有香, 貝原祥子, 藤本啓二, “ポリマー層構築によるリポソーム表面の機能化と DDS キャリアへの応用”, 第 33 回日本バイオマテリアル学会, 2011 年 11 月 (京都).

5. その他 (著書)

[1] 藤本啓二, 福井有香, 山崎恵, “生体に学ぶ微粒子材料の創製”, *化学工業*, **59**, 13-18 (2008).

謝辞

本研究を行うに際して、6年間もの長きにわたり懇切なる御指導とご鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部 藤本啓二教授に深く感謝いたします。

本論文の執筆に際し、数々の貴重なご意見、ご指導を賜りました慶應義塾大学理工学部 松村秀一教授、佐藤智典教授、磯部徹彦教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数々のご助言とご指導を賜りました豊田智規氏、林悠里子氏、柿澤英美氏に深謝いたします。

共に学び、日頃から有益なご討論ご助言をいただいた藤本研究室の先輩、同輩、後輩の皆様に感謝の意を表します。

最後に、博士課程の進学を後押しし、研究生活を支えて下さった両親に心から感謝いたします。

なお、本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会特別研究員制度（DC2）、平成 22 年度科学研究費補助金（課題番号：22・5326）による助成を受けて遂行されました。

平成 24 年 2 月