



# エレクトロスプレー/スピニング法による新規マイクロ構造体の開発

松浦, 哲也

---

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Date of Publication)

2019-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7196号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007196>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

エレクトロスプレー/スピニング法による  
新規マイクロ構造体の開発

平成 30 年 1 月

神戸大学大学院工学研究科

松浦 哲也

## 目次

第1章 序論 .....	1
1.1 エレクトロスプレー/スピニング .....	1
1.2 マイクロカプセル .....	4
1.3 ナノ/マイクロファイバー .....	5
1.4 分子認識と自己組織化 .....	7
1.4.1 分子認識 .....	7
1.4.2 自己組織化 .....	9
1.5 本研究の目的 .....	11
1.5.1 表面機能化リン酸カルシウムマイクロカプセルの開発 .....	11
1.5.2 リン脂質ポリマーを用いた高分子ベシクルの開発 .....	12
1.5.3 表面機能化高分子ショートマイクロファイバーの開発 .....	13
1.6 参考文献 .....	14
第2章 表面機能化リン酸カルシウムマイクロカプセルの開発 .....	18
2.1 緒言 .....	18
2.2 実験方法 .....	21
2.2.1 試薬 .....	21
2.2.2 MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルの調製 .....	22
2.2.3 マイクロカプセルのタンパク質吸着特性の評価 .....	22
2.2.4 マイクロカプセルへの物質内封およびその放出特性の評価 .....	23
2.2.5 マイクロカプセル表面への選択的 avidin 固定化 .....	23
2.3 結果および考察 .....	25
2.3.1 MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルの評価 .....	25
2.3.2 マイクロカプセルのタンパク質吸着特性の評価 .....	28
2.3.3 マイクロカプセルへの物質内封およびその放出特性の評価 .....	29
2.3.4 マイクロカプセル表面への選択的 avidin 固定化 .....	32
2.4 結言 .....	34
2.5 参考文献 .....	35

第3章 リン脂質ポリマーを用いた高分子ベシクルの開発.....	38
3.1 緒言 .....	38
3.2 実験方法 .....	40
3.2.1 試薬 .....	40
3.2.2 MPC ポリマーベシクルの調製.....	40
3.2.3 MPC ポリマーベシクルへの物質内封 .....	40
3.2.4 MPC ポリマーベシクルへの酵母内封および培養 .....	41
3.3 結果および考察.....	42
3.3.1 MPC ポリマーベシクルの評価.....	42
3.3.2 MPC ポリマーベシクルへの物質内封 .....	44
3.3.3 MPC ポリマーベシクルへの酵母内封および培養 .....	45
3.4 結言 .....	46
3.5 参考文献 .....	47
第4章 表面機能化高分子ショートマイクロファイバーの開発.....	49
4.1 緒言 .....	49
4.2 実験方法 .....	50
4.2.1 試薬.....	50
4.2.2 高分子ショートマイクロファイバーの調製.....	51
4.2.3 高分子ショートマイクロファイバーの面選択的機能化.....	52
4.2.4 高分子ショートマイクロファイバーの空間的自己組織化.....	53
4.3 結果および考察.....	56
4.3.1 高分子ショートマイクロファイバーの評価.....	56
4.3.2 高分子ショートマイクロファイバーの面選択的機能化.....	57
4.3.3 高分子ショートマイクロファイバーの空間的自己組織化.....	59
4.4 結言 .....	64
4.5 参考文献 .....	65
第5章 結論 .....	68
論文目録 .....	69
謝辞 .....	70

## 第1章 序論

近年、ナノ/マイクロテクノロジーの進展は目覚ましく、様々なナノ/マイクロ材料が開発され、その実用化も進んでいる。最近この分野においては、複雑な形状を有する粒子や、粒子表面への様々な修飾を行うことによる材料の多機能化が注目されている。このような多機能性材料の開発を目指して、マイクロ流体デバイス等を用いた方法が報告されているが、調製プロセスの複雑さ、サイズ制御、連続生産性等に未だ難がある。

そこで本研究では、新たなマイクロ構造体調製技術としてエレクトロスプレー/スピニング法に注目し、その有用性を明らかにすることを目指した。

### 1.1 エレクトロスプレー/スピニング

近年、ナノ/マイクロ構造体の新たな調製技術としてエレクトロスプレー/スピニング法が注目されている。これは Fig. 1-1 に示すように、高電圧を印加した針先から溶液を勢いよく吐出させる方法である。以下に静電的な溶液噴霧技術に関して詳述する。

液滴に高電圧を印加することにより液滴が噴霧される現象は古くから知られている。1882年、Rayleigh は帯電した球形液滴が不安定になると、液滴の両端から微小ジェットが噴出すると初めて予測した<sup>1)</sup>。1914年、Zeleny は流体液滴の挙動に関する実験的研究を行い、針先先端での円錐形のメニスカスを発見した<sup>2)</sup>。その後、Taylor によって、メニスカス内の理論的な解析が初めて報告された<sup>3)</sup>。

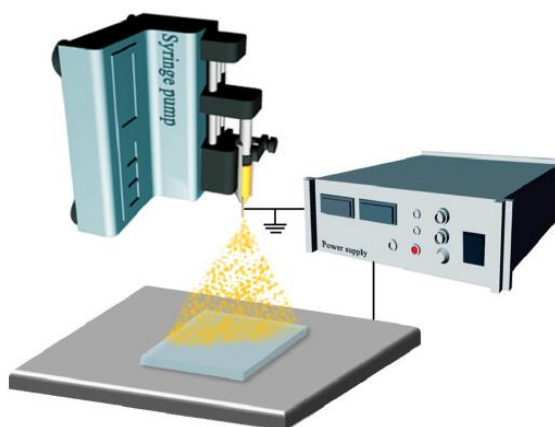


Fig. 1-1. Schematic illustration of an electrospray/electrospinning apparatus.

針先から押し出された液滴には表面張力と重力が働く。このとき、電圧を印加すると、すべての液滴は同一符号の電荷を持ち、電荷は液滴表面に蓄えられる。その電荷間にクーロン斥力が働き、それと同時に反対電極との間にはクーロン引力が働く。Fig. 1-2 に一定の液体流量と印加電圧によるスプレー針先の一般状態図を示す<sup>4)</sup>。印加電圧が低いときは、滴下現象 (Fig. 1-2 (b)) が観察される。電場強度が増加すると液滴の表面形状は長円状になり、液滴の表面張力と、液滴の表面に凝集したクーロン斥力による表面張力に逆らう力がつりあうと、針先先端の液滴は  $49.3^\circ$  の半角を有する円錐状になる<sup>5)</sup>。この円錐は Taylor コーンと呼ばれる。静電反発力が表面張力を超えると、液滴は分裂し電荷をもった微細な液滴が反対電極上にスプレーされる (Fig. 1-2 (c))。この状態をコーンジェットモードという<sup>6)</sup>。このとき、形成されたコーンは比較的安定しており、Fig. 1-2 に示すように液滴が運ぶ電流値はほとんど変化しない。Taylor による理論的解析に続き、円錐内の速度場の解析およびジェットの形成と液滴の発生についての研究がなされており、Fig. 1-2 中に示すように、円錐の表面近傍の液体が円錐先端へと移動し、液体の一部が中心側へ再循環していることが解析的および実験的に確認された<sup>7)</sup>。さらに印加電圧が高くなると、コーン先端が複数に分裂したマルチジェットモードとなる (Fig. 1-2 (d))。マルチジェットモードでは、液滴が運ぶ電流値が急に増加し、不安定となる。

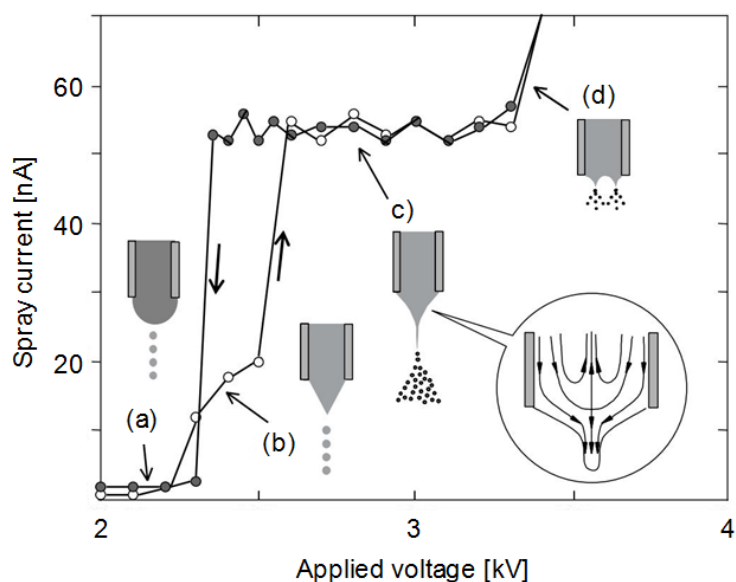


Fig. 1-2. Typical spray current versus applied voltage curve of a liquid/solution.

(a) dripping mode, (b) pulsating mode, (c) stable cone-jet mode, (d) multi-jet mode.

この液滴噴霧中に溶媒蒸発を伴う場合は、溶媒蒸発によって噴霧液滴の体積は減少する。その結果、液滴表面電荷密度が大きくなり、液滴表面上の斥力が表面張力を超えると噴霧液滴はさらに分裂する。この現象は Coulomb 分裂と呼ばれ、この分裂が起きる点を Rayleigh 限界という。Rayleigh 限界を与える電荷量  $q$  は、

$$q^2 = 64\pi^2\sigma\epsilon_0 R^3 \quad (\text{式 1-1})$$

で表される<sup>1)</sup>。ここで、 $\sigma$  は表面張力、 $\epsilon_0$  は真空の誘電率、 $R$  は液滴の半径である。

この分裂過程が繰り返されると、さらなる液滴サイズの低下が起これ、最終的には帯電液滴表面からイオンが脱離する。このエレクトロスプレー技術は、生体分子の質量分析におけるイオン化源として利用されるに至り<sup>8)</sup>、2002年に Fenn がノーベル化学賞を受賞したことからもエレクトロスプレー技術が果たす役割の大きさを理解できる。

電圧を印加した針先から溶液を噴霧するエレクトロスプレー法は、その調製方法の容易さだけでなく、非常に小さく均一な体積の液滴を調製することが可能である、操作条件によって液滴サイズを制御可能である、実験装置が簡便であるなどの利点を有しており、農薬噴霧、車体への噴霧塗装、粒子の合成、エアロゾルの発生、薬剤吸入、薄膜形成などに応用されてきた。

2002年に Loscertales らの同軸エレクトロスプレー法によるナノ/マイクロカプセル化<sup>9)</sup>が報告されると、用いる物質を広範囲に選択可能であることや、それに伴う調製物質の組成と形態に多様性をもたすことが可能であることなどから、エレクトロスプレー法はナノ/マイクロカプセル化技術へとさらに発展した<sup>10,11)</sup>。これらの報告では、操作条件をコントロールすることにより粒子やカプセルのサイズも制御可能であることも明らかにしている。また、エレクトロスプレーとゾルゲル法を組み合わせ、1つのカプセルに複数のコンパートメント構造を有するマイクロカプセルの調製も報告されている。

このように、エレクトロスプレー法は比較的単純なシステムでありながら、微粒子やカプセル、エマルジョンなどの調製が可能であり、スケールアップおよび連続オペレーション化が可能な魅力的技術である。既に、医薬<sup>12-14)</sup>、食品<sup>15,16)</sup>、分析<sup>17)</sup>分野などへの応用が期待される研究報告もなされており、ナノ/マイクロテクノロジーの重要なツールとなっている。

また、後述するように、エレクトロスプレー法は、ほぼ同じ原理、装置を用いたエレクト

トロスピング法によるナノ/マイクロファイバーの調製へも発展している<sup>18)</sup>。ここ 10 年間でエレクトロスピング法を用いたナノ/マイクロファイバーの学術報告例は 1000 件近くにされており、多孔質構造のナノファイバーやチューブ状ナノファイバーの調製に成功している<sup>19)</sup>。また、エレクトロスピング法によって調製したナノファイバーを利用して、生体触媒担持ファイバー<sup>20)</sup>や超撥水性不織布<sup>21)</sup>などが報告されており、フィルターなどの分離膜分野や再生工学分野、縫製分野などでの応用も期待されている。

## 1.2 マイクロカプセル

マイクロカプセルとは球体直径が 1  $\mu\text{m}$  から 1000  $\mu\text{m}$  程度の微小容器のことであり、容器となる壁材と芯物質からなる (Fig. 1-3)。芯物質が単一の場合は単核型カプセル、芯物質が複数の場合は多核型カプセル、芯物質が分子オーダーで存在している場合はマトリックス型カプセルに区別される。マイクロカプセルの機能としては、芯物質の保護隔離、芯物質の制御放出、液体状および気体状芯物質の固体粉末化、芯物質表面の改質、マトリックス材の体積・密度調整などがある。これらの機能を利用し、マイクロカプセルは極めて広い用途で使用されている<sup>22)</sup>。例えば、医薬分野においては、薬物を内包した徐放性マイクロカプセルを用いることで、最小限の薬剤量で長期的に効果を有するカプセルの調製が可能となる。農業材料分野では、殺虫剤をマイクロカプセル内に封入することで、通常に比べて長期間の殺虫効果を示している<sup>23)</sup>。他にも、環境浄化触媒担体、二次電池負極材、断熱材・保温材としての利用や、感熱紙・感圧紙を始めとする記録材料分野や香料、化粧品、食品、接着剤への応用がなされており、日常生活には不可欠な材料として浸透している。

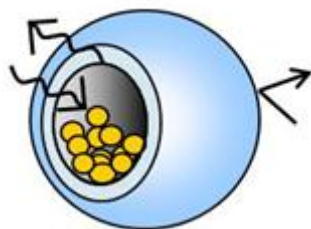


Fig. 1-3. Typical microcapsule structure.

マイクロカプセルの調製法については、既に多様な技術が報告されており、それらは化学的方法、物理化学的方法、機械的方法に大別される。化学的方法としては、懸濁重合法、ミニエマルジョン重合法、乳化重合法、析出重合法、分散重合法、界面重縮合法、液中硬



化法などがあり、物理化学的方法としては、液中乾燥法、転相乳化法、コアセルベーション法などが、機械的方法としては、スプレードライ法、ヘテロ凝集法などがある<sup>24-30</sup>。マイクロカプセルを調製する際は、芯物質と壁材料の組み合わせやマイクロカプセルの使用目的に応じて調製方法が選択される。

このようにマイクロカプセル調製技術は古くから研究がなされているが、工業化を踏まえた連続的かつ安定的なカプセル調製やカプセルサイズの制御といった技術はいまだに確立しておらず大きな課題となっている。そこで近年、ノズルに高電圧をかけ高分子溶液を噴霧させるエレクトロスプレー法を用いてマイクロカプセルを調製することで、様々な種類の芯物質を高効率で封入したり容易にサイズコントロールを行えることが報告されている<sup>31,32</sup>。エレクトロスプレー法は比較的単純なシステムからなる製造法であるため、今後の工業化が期待される。

### 1.3 ナノ/マイクロファイバー

繊維（ファイバー）は細くて長い材料の形態であり、その直径に応じてナノファイバーやマイクロファイバーと呼ばれる。ファイバーは情報通信、交通、建設、宇宙・航空、農林、水産、環境、資源・エネルギー、医療・健康・福祉などあらゆる産業に必要とされており、古くから利用されてきた重要な素材である。しかし、ファイバーのサイエンスとしての研究が始まったのは1920年代になってからである。合成繊維は、原料の高分子を融体あるいは溶液として口金（ノズル）から押し出して調製されるが、これは100年以上前に蚕が繭糸をつくる技術から学んでできた。この発想が、最先端の物理的、化学的技術進歩によって、数 $\mu\text{m}$ 、さらに数 $\text{nm}$ と限りなく細くする技術への挑戦が進んでいる。マイクロファイバー化もしくはナノファイバー化することによる最大の利点は、表面積が飛躍的に増大することがあげられる。例えば、 $100\text{ cm}^2$ の厚みで $1\text{ mm}$ のシートをマイクロファイバーおよびナノファイバーで調製したと仮定する。繊維の直径が $10\ \mu\text{m}$ のマイクロファイバーの場合、表面積は200倍となる。直径が $100\text{ nm}$ のナノファイバーとなると、表面積は2万倍となる。このようにナノ/マイクロファイバーを用いることによって、これまでよりも高機能な材料を開発することが可能となる。このような限りなく細いファイバーを調製する技術として、近年エレクトロスピンニング法が注目されている。

エレクトロスピンニング法は、ポリマー溶液にプラスの高電圧を与え、それがアースやマ

イナスに帯電した表面にスプレーされる過程で繊維化を起こさせる手法である。繊維形成にはノズル先端からスプレーされる溶液の粘度（伸長粘度，せん断粘度），溶液の表面張力が関係する。溶液粘度はポリマーの分子量や溶液中での分子鎖の広がりに影響を受ける。ノズル先端からスプレーされた溶液は、さらに静電反発により細分化される。その時、繊維の表面積が増加するので、溶液中の溶媒は急激に気化し、さらに繊維は細くなりナノファイバーとなる (Fig. 1-4)。

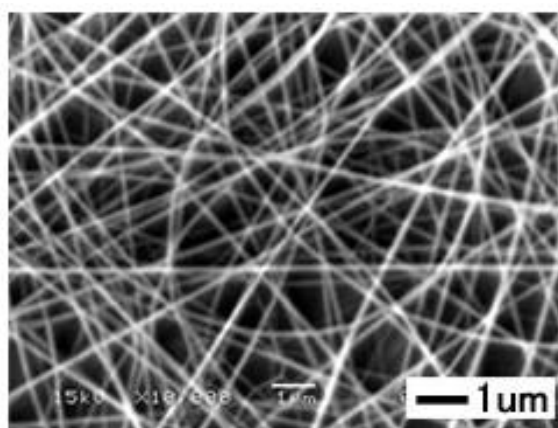


Fig. 1-4. SEM image of electrospun polymeric nanofiber.

エレクトロスピンニング法によりナノオーダーの有機繊維が調製できることは1934年にはすでに知られていたが、初めてこの手法によるナノファイバー調製の報告がなされたのは1971年であった<sup>33)</sup>。しかし、不織布の調製技術においては相分離を利用したフラッシュ紡糸法やメルトブロー法が主流となり、エレクトロスピンニング法は長い間忘れ去られていた。しかし、1995年にRenekerらが詳細な検討を行い、2000年以降にはナノテクノロジー技術の一つとしてアメリカでさかんに研究が行われるようになった<sup>34,35,36)</sup>。最近では日本でも研究が進んでおり、数多くの研究報告がなされている。例えば、Okuzakiらは導電性ナノファイバーを用いた微細配線やケーブル、ヒューズ、アンテナ、コイル、高感度化学センサー、高速応答性素子、繊維状発光素子や繊維状トランジスタなどへの利用を目指している<sup>37)</sup>。またKotakiらはRamakrishnaと共同してPLLAナノファイバーを一方向に配列させる方法を提案した<sup>38)</sup>。エレクトロスピンニング法によるナノファイバーが、最初に実用化されたのはフィルター分野である。エレクトロスピンニング法によって調製されたナノファイバーは、

ウイルスや炭疽菌を除去するフィルターや、既存の繊維表面にナノファイバーをコーティングすることで、高風合を有する素材に仕上げる事が可能である。一般的にフィルターとしてナノファイバーを利用する場合は、それ自身だけで用いられるよりも太い繊維径からなる支持体の上にナノファイバーをスピニングして利用される<sup>39)</sup>。また、最近では細胞培養基材や医療分野など様々な分野への利用も考えられている。このように、容易にナノファイバーを得られるエレクトロスピンニング法は、ラボスケールでの研究から実用化へと移行しつつある。不織布調製技術としては非常にユニークで、ナノファイバーが簡単に得られるというメリットと、一方で生産性の低さ、溶媒回収の必要性、安価なポリオレフィンが利用できないというデメリットを克服し、新しいアプリケーションを探していくことが今後期待される。

## 1.4 分子認識と自己組織化

生体は、膨大な数の構成単位を的確に制御している大変美しい機能体といえる。生体機能は、認識、反応、輸送、制御などの機能が組み合わされて達成され、それは生体内の分子間に起こるさまざまな相互作用により発現している。すべての生体機能の発現の引き金は、特定の分子がその受け皿を見つけて相互作用するところから始まる。すなわち、特定分子を他の分子と見分ける「分子認識」と、さらに生体内の分子が「自己組織化」することが生体機能の根本といえる。高度で複雑な機能性材料が必要とされる今、様々な材料を自発的に構造化・組織化することは非常に重要である。最近では、分子だけにとどまらず、ナノ粒子やさらに大きな材料の自己組織化にも関心が集まっている。

### 1.4.1 分子認識

「分子認識」は、いずれも非共有結合的な弱い相互作用により行われており、重要なものとしては、静電相互作用、水素結合、分散力、電荷移動相互作用、疎水結合などが挙げられる<sup>40-43)</sup>。生体内で行われている分子認識の例として、(1) 酵素の分子認識、(2) 核酸の分子認識、(3) 抗原・抗体反応を、また生体反応以外で、同様に高い分子認識能を示す、(4) Avidin・Biotin 相互作用について以下に述べる。

### (1) 酵素の分子認識

酵素は生体で起こる反応に対して、触媒として機能する分子である。酵素は、構造のわずかに異なる一連の化合物の中から特定物質を厳密に分子認識し、その特定物質の中の特定の位置のみに化学反応を行わせ、目的生成物を選択的に生成する。この優れた酵素の分子認識能がなければ、必要物質が必要な量だけ合成されないのみならず、不要物質が大量に生産され、生体に大きな障害をもたらすことになる。

### (2) 核酸の分子認識

生体の子孫に正しく遺伝情報を伝達するために、重要な働きをしているのが核酸である。核酸を構成するヌクレオチドという分子がきわめて厳格な分子認識を行い、遺伝情報の保持ならびに発現を可能にしている。また、核酸情報に基づくタンパク質の合成に際しても、各種のアミノ酸が遺伝情報に従って厳密に分子認識されて正確に配列される。

### (3) 抗原・抗体反応

生体内には、異物（抗原）と選択的に結合するタンパク質（抗体）が含まれる。異物が生体内に入ると、これに抗体が結合し、最終的に異物を除去したり、あるいは無害化して自己防御する仕組みになっている。ここでも非常に厳密な分子認識が行われており、ある抗体は、他の抗原には見向きもせず、特定の抗原とのみ結合する。

### (4) Avidin・Biotin 相互作用

Avidin は、卵白中に存在する分子量約 7 万の塩基性糖タンパク質で、低分子ビタミンである biotin に極めて強い親和性がある 4 量体タンパク質である。その親和性の強さは、結合定数  $K_a=10^{15} \text{ M}^{-1}$  と一般的な抗原抗体反応 ( $K_a=10^{12} \text{ M}^{-1}$ ) の 1000 倍以上である。この高い親和力は共有結合ではなく、非共有結合であり、avidin 中のトリプトファン残基が biotin との結合に深く関与していることが示されている。ただし、avidin の等電点は pH 10 付近であり、静電相互作用による非特異的結合が起こりやすい。そこで開発されたのが、streptavidin と neutravidin である。Streptavidin は分子量約 6 万で分子中に糖鎖を含まない avidin タンパク質である。等電点は pH 6.8~7.5 であるため、avidin と比較して非特異的結合が少ないが、水には溶けにくい。この改善として作られたのが neutravidin である。Neutravidin は分子量約 6 万の avidin を脱グリコシル化した biotin 結合性タンパク質で、biotin に対する親和力を損なわずに、レクチン結合も検出不可レベルまで減少させることができる。また、等電点は pH 6.3 であるため、非特異的な吸着を最小限に抑制することができ、また誘導体化や架橋反応に

利用可能なリジン残基も残されている。従来、avidin-biotin 架橋は、主にタンパク質間を中心として利用されてきたが、近年、細胞工学の発展に伴い、細胞間架橋、リポソーム間架橋の有用性が注目されている。

### 1.4.2 自己組織化

分子を共有結合のような非可逆的な結合ではなく、水素結合のように弱く、組み換え可能な力によって自己集合させた分子集合体の化学は超分子化学として広く発展してきた<sup>44,45)</sup>。界面活性剤のミセル化や、低分子ゲル化剤と呼ばれる両親媒性分子の自己組織化によるナノファイバー化など、分子が自己集合することによってより高度な機能が発揮される。近年、このことは分子だけにとどまらず、ナノ粒子の集合化においても重要になっている。ナノ粒子は集合することで単体とは異なる光学、電気、磁気的特性を発言することが知られている。ナノ粒子の配列化において、生体高分子の利用が有用な手法となっている。特に分子認識を制御しやすい DNA はナノ粒子の配列に最も有効な分子の一つである。Mirkin らは DNA の二重鎖形成を推進力として、ナノ粒子を規則的に三次元配列化できることを報告している<sup>46)</sup>。ナノスケールでの位置決めができる DNA は、ナノ粒子を配置する鋳型としても大変魅力的な材料である。近年では DNA 折り紙を鋳型としてナノスケール間隔で正確に粒子を配列させる手法が国内外で報告されている<sup>47,48)</sup>。また、粒子間の相互作用を利用しないナノ粒子の配列方法として、粒子を分散させた溶媒を乾燥させる非常にシンプルな手法がある。大面積での調整が可能で、ウェットプロセスに組み込むことで実用化が期待できる。これまでには、トルエンなどの高沸点溶媒を使い、さらに不揮発性の分子を添加して溶媒の蒸発速度を遅くすることで粒子の配列化が行われたという報告もある<sup>49)</sup>。

また、等方的な粒子だけではなく、異方性粒子においてもその配列の制御は非常に重要である。例えば、Kumacheva らは金ナノロッドの両極を特異的にポリスチレンで修飾する手法を報告している<sup>50)</sup>。金ナノロッドはカチオン性の界面活性剤存在下で合成されるが、軸部分に比べて両極は界面活性剤の結合量が少ないため、チオールなどを有する分子がアクセスしやすい。この特性を利用して、金ナノロッドの両極をチオール終端のポリスチレンで被覆することができる。この両末端が疎水的で軸部分が両親媒性を有する金ナノロッドは、水溶液中で末端のポリスチレン同士が疎水性相互作用により結合することで、ネックレス様の一次元構造をはじめ、ナノロッドが平行に会合したカプセル状の構造まで様々

な集合形態をつくることに成功している。この研究は、ナノ粒子表面を機能性分子で部位特異的に修飾することによって自己集合による集合形態の制御が可能であることを示している (Fig. 1-5)。

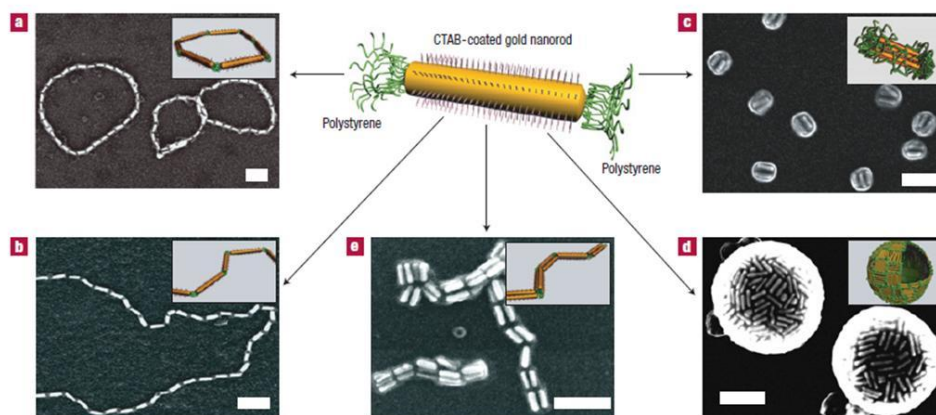


Fig. 1-5. Organized arrays of gold nanorods

さらに、ナノスケールにとどまらず、より大きなスケールの材料の自己組織化についても注目されている。1990 年後半から Whitesides らは分子を自己集合化することでより大きな分子組織体を形成し得るという概念を、分子だけでなくより大きなサイズの部品にも適用し、それらが自己集合してより大きな構造体を自発的に形成できることを説いてきた。当時の技術で簡便にこのコンセプトを証明するために、ミリメートルサイズの多面体物に面ごとに異なる性質をもたせたり、面内に親水性や疎水性のパターンを作りこむことで、多面体の自己集合を自在に制御できることを示した<sup>51)</sup>。しかし、ミリメートルサイズの部品の組み立てであれば、何らかのマニピュレーション技術を用いることも可能であるとして、このコンセプトはナノスケールで多く利用されることとなったが、最近では再びより大きなメゾスコピックスケール材料においての報告が少しずつ増えている。Pine らは凹みのある微粒子とその凹みに合うサイズの粒子を調製し、これらを高分子溶液中に加えることで枯渇性相互作用による粒子同士の構造化を報告している<sup>52)</sup> (Fig. 1-6)。また、DeSimon らは両親媒性のマイクロロッドを調製し、それらの疎水性相互作用による自己組織化について報告している<sup>53)</sup>。また、Harada らは分子認識を巨視化するというコンセプトでミリサイズのシクロデキストリンゲルを分子認識によって構造化させる検討を行っている<sup>54)</sup> (Fig. 1-7)。今後さらにこのような研究が進むことで、より高機能で高性能な材料が開発されるこ

とが期待される。

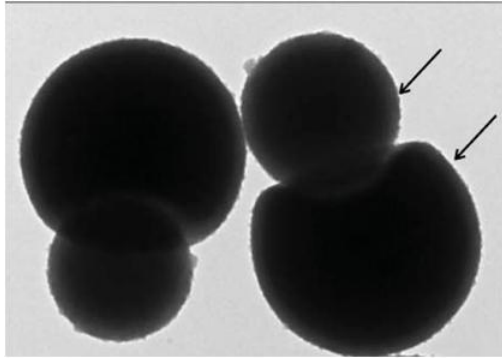


Fig. 1-6. Lock and Key colloids

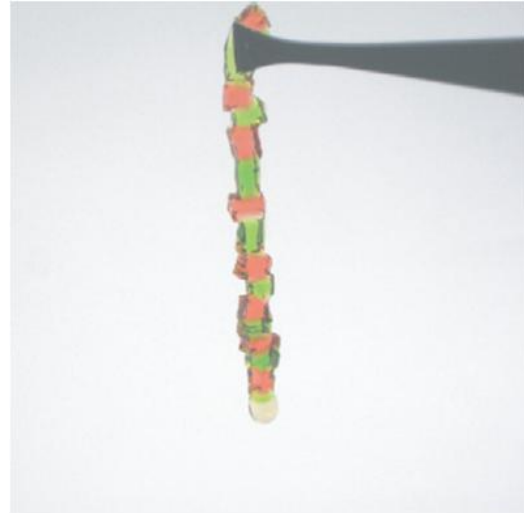


Fig. 1-7. Cyclodextrin gels adhered firmly via molecular recognition

## 1.5 本研究の目的

これまでに示したように、あらゆる分野においてナノ/マイクロ材料は重要であり、これまでにない新しくより高機能な材料の開発が期待される。そこで本研究ではエレクトロスプレー/スピニング法を用いて、表面機能化リン酸カルシウムマイクロカプセルの開発（第2章）、リン脂質ポリマーを用いた高分子ベシクルの開発（第3章）および表面機能化高分子ショートマイクロファイバーの開発（第4章）を行った。

### 1.5.1 表面機能化リン酸カルシウムマイクロカプセルの開発

ナノ/マイクロ材料は生体医療への応用を目指して様々な研究がなされているが、特に、生体適合性や生分解性あるいは資源の豊富さからシリカやリン酸カルシウム、炭酸カルシウムといった無機物質からなる材料の研究が注目されている。その中でも、リン酸カルシウムは生体適合性が高いため、生体材料として幅広く用いられている。また、生体医療のみにとどまらずバイオミネラリゼーションといった環境低負荷な生産への応用も期待されている。これまでに本研究グループでは、エレクトロスプレー法によって微小液滴の径を制御することで、塩化カルシウムをリン酸水素ナトリウムと反応させることにより、リン

酸カルシウムからなるマイクロカプセルの調製に成功している。

リン酸カルシウムマイクロカプセルの生体への応用を考えた際に、生体物質と直接接触するカプセル表面の特性を制御することは非常に重要であると考えられる。実際、リン酸カルシウムは様々な分子に対し非特異的に吸着しやすい特性を有している。そこで本研究では、生体成分との相互作用が極めて低く高度な生体適合性を有することで知られている 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーをコーティング剤として用い、二重管ノズルを用いたエレクトロスプレー法（同軸エレクトロスプレー法）により MPC ポリマーにより被覆されたリン酸カルシウムマイクロカプセルをワンステップで調製し、リン酸カルシウムマイクロカプセル表面へのタンパク質の非特異的吸着を抑制する検討を行った。さらに、biotin で修飾された MPC ポリマーを被覆することで、avidin と biotin の相互作用を利用して、標的タンパク質である avidin のみを選択的にマイクロカプセル表面に固定化させる検討も行った。

### 1.5.2 リン脂質ポリマーを用いた高分子ベシクルの開発

中空微粒子（ベシクル）は既に実用性が明確になっており、バイオテクノロジー、ドラッグデリバリー、触媒、センサーなど様々な分野での利用が検討されている。中空構造の調製方法として様々な手法が開発されているが、調製する際にテンプレートを用いるテンプレート法が広く用いられている。中空構造のテンプレートとしては一般的にコロイド粒子が用いられており、コロイド粒子の周囲に所望の素材を選択的にコーティングしてコア/シェル構造とした後に、コアであるコロイド粒子のみを除去することで中空構造を得ることができる。

1.5.1 で述べたように、同軸エレクトロスプレー法を用いることで MPC ポリマーが被膜されたリン酸カルシウムマイクロ粒子が調製される。さらに、リン酸カルシウムは多孔質な構造を有しているため、粒子内部に様々な物質を内封することが可能である。そこで本研究では、同軸エレクトロスプレー法およびテンプレート法を用いて、MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロ粒子のコア部分であるリン酸カルシウムを溶解させることで、MPC ポリマー膜から成る新規ベシクルの調製を検討した。生体膜類似の MPC ポリマーから成るベシクルは、生体適合性の高いマイクロカプセルとして機能することが期待される。



### 1.5.3 表面機能化高分子ショートマイクロファイバーの開発

ナノ/マイクロ粒子は、電子材料、医療、化粧品、食品、農薬、建築など様々な分野において多様な用途で応用されているが、今後さらにナノ/マイクロ粒子を様々な分野に応用していくためには、自然界に存在するような優れた機能性を有する異方性粒子の開発が重要である。

そのような中で近年、高分子ショートマイクロファイバーが異方性材料として注目されている。高分子ショートマイクロファイバーとは、数十  $\mu\text{m}$  の長さを有する短いファイバーを指し、アスペクト比が球状粒子と比較して大きく、またその短さから液中でも絡まり合うことなく分散することが可能という特徴がある。しかし、高分子ショートマイクロファイバーは、調製の難しさといった理由から、報告されている調製方法も限られている。そこで本研究では、エレクトロスピンニング法により紡糸されたマイクロファイバーに超音波処理を施すことでショートマイクロファイバーとする、新規な高分子ショートマイクロファイバー調製技術の確立を行った。さらに、高分子ショートマイクロファイバーの断面と側面のそれぞれを選択的に機能化し多機能材料とすることも行った。最後に、**avidin** と **biotin** の特異的な相互作用を利用して、高分子ショートマイクロファイバーを自発的に構造化・組織化させることにも挑戦した。

## 1.6 参考文献

- 1) L. Rayleigh, On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity, *Phil. Mag.* 14 (1882) 184–186.
- 2) J. Zeleny, The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces, *Phys. Rev.* 3 (1914) 69–91.
- 3) G.I. Taylor, Disintegration of water drops in an electric field, *Proc. Royal Soc. A* 280 (1964) 383–397.
- 4) W. Lenggoro, K. Okuyama, Application of electrosprays to synthesis and measurement of nanoparticles, *J. Aerosol Res.* 20 (2005) 116–122.
- 5) O.V. Salata, P.J. Dobson, P.J. Hull, J.L. Hutchison, Fabrication of PbS nanoparticles embedded in a polymer film by a gas-aerosol reactive electrostatic deposition technique, *Adv. Mater.* 6 (1994) 772–775.
- 6) M. Cloupeau, B. Prunet-Foch, Electrohydrodynamic spraying functioning modes: a critical review, *J. Aerosol Sci.* 25 (1994) 1021–1036.
- 7) A.J. Rulison, R.C. Flagan, Electrospray atomization of electrolytic solutions, *J. Coll. Interface Sci.* 167 (1994) 135–145.
- 8) J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* 246 (1989) 64–71.
- 9) I.G. Loscertales, A. Barrero, I. Guerrero, R. Cortijo, M. Marquez, A.M. Ganan-Calvo, Micro/nano encapsulation via electrified coaxial liquid jets, *Science* 295 (2002) 1695–1698.
- 10) G. Larsen, R. Velarde-Ortiz, K. Minchow, A. Barrero, I.G. Loscertales, A method for making inorganic and hybrid (organic/inorganic) fibers and vesicles with diameters in the submicrometer and micrometer range via sol-gel chemistry and electrically forced liquid jets, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1154–1155.
- 11) H. Chen, Y. Zhao, Y. Song, L. Jian, One-step multicomponent encapsulation by compound-fluidic electrospray, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 7800–7801.
- 12) M. Murtomaa, N. Kivikero, J.P. Mannermaa, V.P. Lehto, Electrostatic atomization in the microscale granulation, *J. Electrostat.* 63 (2005) 891–897.
- 13) J.C. Ijsebaert, K.B. Geerse, J.C.M. Marijnissen, J.W.J. Lammers, P. Zanen,

- Electro-hydrodynamic atomization of drug solutions for inhalation purposes *J. Appl. Physiol.* 91 (2001) 2735–2741.
- 14) S.W. Li, S.N. Jayasinghe, M.J. Edirisinghe, Aspirin particle formation by electric-field-assisted release of droplets, *Chem. Eng. Sci.* 61 (2006) 3091–3097.
- 15) R. Pareta, M.J. Edirisinghe, A novel method for the preparation of starch films and coatings, *Carbohydrate Polym.* 63 (2006) 425–431.
- 16) R. Bocanegra, A.G. Gaonkar, A. Barrero, I.G. Loscertales, D. Pechack, M. Marquez, Production of cocoa butter microcapsules using an electrospray process, *J. Food Sci.* 70 (2005) 492–497.
- 17) K.C. Lewis, D.M. Dohmeler, J.W. Jorgenson, S.L. Kaufman, F. Zarrin, F.D. Dorman, Electrospray-condensation particle counter: a molecule-counting LC detector for macromolecules, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2285–2292.
- 18) D. Li, Y. Xia, Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel?, *Adv. Mater.* 16 (2004) 1151–1170.
- 19) P. Dayal, J. Liu, S. Kumar, T. Kyu, Experimental and theoretical investigations of porous structure formation in electrospun fibers, *Macromolecules* 40 (2007) 7689–7694.
- 20) H. Jia, G. Zhu, B. Vugrinovich, W. Kataphinan, D.H. Reneker, P. Wang, Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts, *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 1027–1032.
- 21) K. Acatay, E. Simsek, C. Ow-Yang, Y.Z. Menceloglu, Tunable, superhydrophobically stable polymeric surfaces by electrospinning, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 5210–5213.
- 22) 田中真人, ナノ・マイクロカプセル調製のキーポイント (2008)
- 23) 中原佳子, 中原藤也, 金広忠雄, 長江明, 蔭山博之, *材料技術* 5 (1987) 231–235.
- 24) A. Jahn, W.N. Vreeland, M. Gaitan, L.E. Locascio, Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 2674–2675.
- 25) Y.C. Tan, K. Hettiarachchi, M. Siu, Y.R. Pan, A.P. Lee, Controlled microfluidic encapsulation of cells, proteins, and microbeads in lipid vesicles, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 5656–5658.
- 26) 大島栄次, *化学工学論文集* 8 (1982) 188–193.
- 27) 小林悟, 田口佳成, 田中真人, *色材* 78 (2005) 260–264.
- 28) 近藤保, 小石真純, *マイクロカプセル - その製法・性質・応用* (1978)

- 29) 近藤保監修, 最新マイクロカプセル化技術 (1998)
- 30) 小石眞純, 江藤桂, 日暮久乃, 造る+使う マイクロカプセル (2005)
- 31) Y. Fukui, T. Maruyama, Y. Iwamatsu, A. Fujii, T. Tanaka, Y. Ohmukai, H. Matsuyama,  
Preparation of monodispersed polyelectrolyte microcapsules with high encapsulation efficiency  
by an electrospray technique, *Colloids Surf. A* 370 (2010) 28–34.
- 32) A. Yunoki, E. Tsuchiya, Y. Fukui, A. Fujii, T. Maruyama, Preparation of inorganic/organic  
polymer hybrid microcapsules with high encapsulation efficiency by an electrospray technique,  
*ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 11973-11979.
- 33) P.K. Baumgarten, Electrostatic spinning of acrylic microfibers, *J. Colloid and Interface Sci.* 36  
(1971) 71-79.
- 34) J. Doshi, D.H. Reneker, Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *J.*  
*Electrostatics* 35 (1995) 151-160.
- 35) A.L. Yarin, S. Koombhongse, D.H. Reneker, Taylor cone and jetting from liquid droplets in  
electrospinning of nanofibers, *J. Appl. Phys.* 90 (2001) 4836-4846.
- 36) D.H. Reneker, A.L. Yarin, Electrospinning jets and polymer nanofibers, *Polymer* 49 (2008)  
2387-2425.
- 37) H. Okuzaki, M. Ishihara, Spinning and characterization of conducting microfibers, *Macromol.*  
*Rapid Commun.* 24 (2003) 261-264.
- 38) S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.E. Teo, T.C. Lim, Z. Ma, An introduction to electrospinning and  
nanofibers, *World Scientific Publishing Company* (2005) ISBN: 9812564152.
- 39) 小石眞純 監修, マイクロ/ナノ系カプセル・微粒子の応用展開 (2009)
- 40) 新海征治, モレキュラーインフォーマティクスを拓く分子機能材料 (2006)
- 41) 小宮山真, 荒木孝二, 分子認識と生体機能 (1989)
- 42) 早下隆士, 築部浩, 分子認識と超分子 (2007)
- 43) 国武豊喜 監修, 超分子サイエンス&テクノロジー (2009)
- 44) 国武豊喜 監修, 自己組織化ハンドブック (2009)
- 45) 新倉謙一, 居城邦治, 高分子 60 (2011) 531-536.
- 46) S.Y. Park, A.K.R. Lytton-Jean, B. Lee, S. Weigand, G.C. Schatz, C.A. Mirkin,  
DNA-programmable nanoparticle crystallization, *Nature* 451 (2008) 553-556.

- 47) S.J. Tan, M.J. Campolongo, D. Luo, W. Cheng, Building plasmonic nanostructures with DNA, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 268-276.
- 48) A. Kuzuya, N. Koshi, M. Kimura, K. Numajiri, T. Yamazaki, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama, Programmed nanopatterning of organic/inorganic nanoparticles using nanometer-scale wells embedded in a DNA origami scaffold, *Small* 6 (2010) 2664-2667.
- 49) A. Akey, C. Lu, L. Yang, I.P. Heman, Formation of thick, large-area nanoparticle superlattices in lithographically defined geometries, *Nano Lett.* 10 (2010) 1517-1521.
- 50) Z. Nie, D. Fava, E. Kumacheva, S. Zou, G.C. Walker, M. Rubinstein, Self-assembly of metal-polymer analogues of amphiphilic triblock copolymers, *Nat. Mater.* 6 (2007) 609-614.
- 51) G.M. Whitesides, B. Grzybowski, Self-assembly at all scales, *Science* 295 (2002) 2418-2421.
- 52) S. Sacanna, W.T.M. Irvine, P.M. Chaikin, D.J. Pine, Lock and key colloids, *Nature* 464 (2010) 575-578.
- 53) J.Y. Wang, Y. Wang, S.S. Sheiko, D.E. Betts, J.M. DeSimone, Tuning multiphase amphiphilic rods to direct self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 5801-5806.
- 54) A. Harada, R. Kobayashi, Y. Takashima, A. Hashidzume, H. Yamaguchi, Macroscopic self-assembly through molecular recognition, *Nat. Chem.* 3 (2011) 34-37.

## 第2章 表面機能化リン酸カルシウムマイクロカプセルの開発

### 2.1 緒言

ナノ/マイクロ材料は生体医療への応用を目指して様々な研究がなされているが、特に、生体適合性や生分解性あるいは資源の豊富さからシリカやリン酸カルシウム、炭酸カルシウムといった無機物質からなる材料の研究が注目されている<sup>1-4)</sup>。その中でも、リン酸カルシウムは生体適合性が高く、体内で骨と直接結合する性質を示すことから、人工骨の材料として用いられている他、ドラッグデリバリー用の担体や細胞の足場としても幅広く用いられている<sup>5-9)</sup>。また、生体医療のみにとどまらずバイオミネラリゼーションといった環境低負荷な生産への応用も期待されている<sup>10,11)</sup>。

リン酸カルシウムを合成する手法としては、カルシウム化合物とリン酸化合物を水溶液中で反応させる方法が一般的であるが、結晶成長を制御することが困難である<sup>12)</sup>。リン酸カルシウムの粒子径や形状を制御すべく、メカノケミカル法<sup>13)</sup>、化学沈殿法<sup>14)</sup>、乳化法<sup>15)</sup>、水熱処理法<sup>16)</sup>など様々な調製法が報告されている。これまでに本研究グループでは、エレクトロスプレー法によって微小液滴の径を制御することで、塩化カルシウムをリン酸水素ナトリウムと反応させることにより、リン酸カルシウムからなるマイクロカプセルの調製に成功している<sup>17)</sup> (Fig. 2-1)。

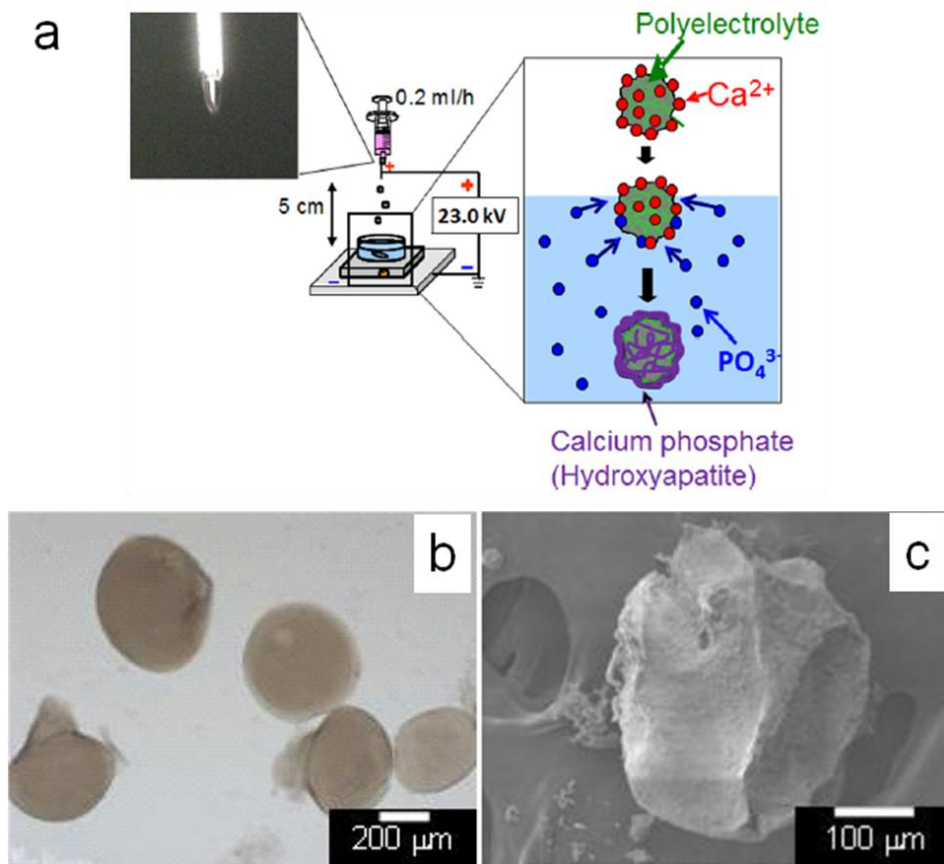


Fig. 2-1. Preparation of calcium phosphate microcapsules by an electrospray technique. (a) Schematic of calcium phosphate microcapsules via electrospray and (b,c) microscope images of calcium phosphate microcapsules. (b) Bright field and (c) FE-SEM image.

リン酸カルシウムマイクロカプセルの生体への応用を考えた際に、生体物質と直接接触するカプセル表面の特性を制御することは非常に重要であると考えられる。実際、リン酸カルシウムは様々な分子に対し非特異的に吸着しやすい特性を有している<sup>18-22)</sup>。しかしながら、これまでにリン酸カルシウム粒子表面の物質吸着を制御する検討は報告されていない。そこで本研究では、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーをコーティング剤として用い、リン酸カルシウムマイクロカプセル表面へのタンパク質の非特異的吸着を抑制する検討を行った。MPC ポリマーは細胞膜を模倣して開発され、細胞膜の構成成分であるリン脂質極性基 (phosphorylcholine 基) と重合性を有する methacryloyl 基から成るポリマーである (Fig. 2-2a)。タンパク質や血球などの生体成分との相互作用が極めて小さ

く極めて優れた抗血栓性を発現することなど、従来にはない高度な生体適合性を有する<sup>23-26)</sup>  
 (Fig. 2-2b)。

本章では、二重管ノズルを用いたエレクトロスプレー法（同軸エレクトロスプレー法）を用いて、MPC ポリマーにより被覆されたリン酸カルシウムマイクロカプセルをワンステップで調製することを検討した。次に、得られたマイクロカプセルのタンパク質吸着特性を評価した。最後に、biotin で修飾された MPC ポリマーを被覆することで、avidin と biotin の相互作用を利用して、標的タンパク質である avidin のみを選択的にマイクロカプセル表面に固定化させる検討も行った。

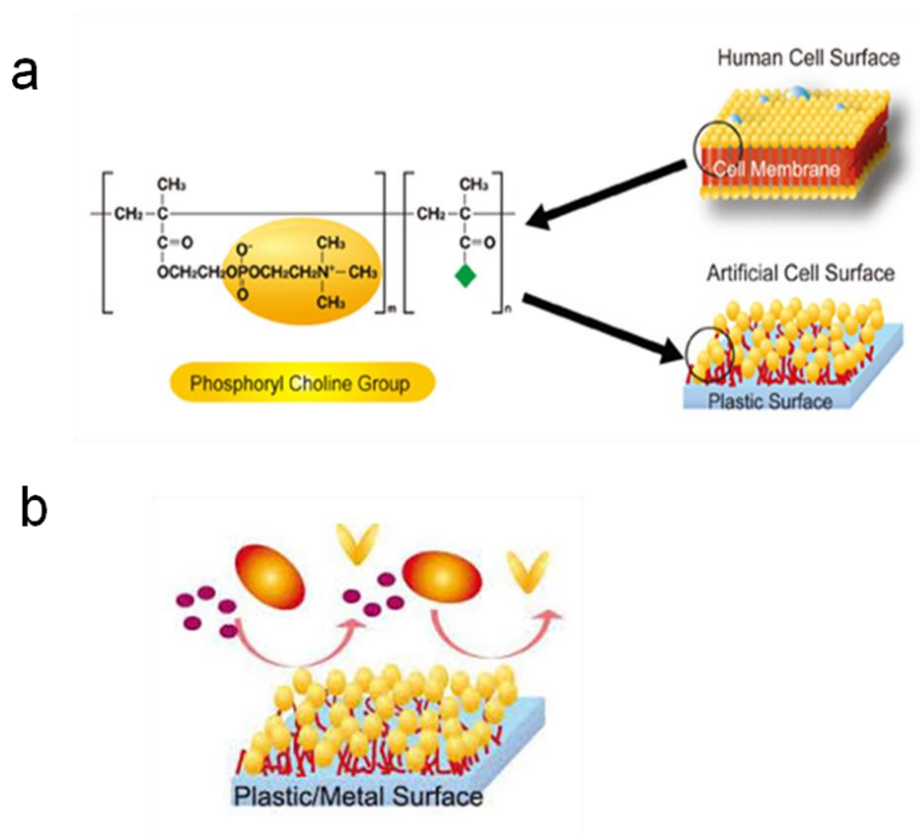


Fig. 2-2. Cell membrane-inspired phosphorylcholine polymers. (a) Chemical structure of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer and (b) MPC polymer coated surface resistant to protein adsorption and cell adhesion. (Illustrations are quoted from NOF website.)



## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試薬

塩化カルシウム	和光純薬
キトサン 10	和光純薬
リン酸水素二ナトリウム	和光純薬
Ethanol	和光純薬
Dimethylformamide (DMF)	和光純薬
MPC polymer (Lipidure <sup>®</sup> -CM)	NOF America
Amine-modified MPC polymer (Lipidure <sup>®</sup> -NH01)	NOF America
Albumin–fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC-BSA)	Sigma-Aldrich
Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran, MW = 2,000,000 Da)	Sigma-Aldrich
Albumin, tetramethylrhodamine isothiocyanate bovine (TRITC-BSA)	Sigma-Aldrich
Anti-mouse IgG (whole molecule)-TRITC antibody produced in goat (TRITC-IgG)	Sigma-Aldrich
Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)	Invitrogen
9-(Biotinamido)-4,7-dioxanonanoic acid N-succinimidyl ester (Biotin-PEG <sub>2</sub> -NHS)	東京化成
AvidinD, TRITC conjugate (TRITC-avidin)	フナコシ

#### <TRITC 修飾 MPC ポリマーの合成方法>

30 mg の TRITC を 1 ml の DMF 中に溶解させ、87 mg の amine-modified MPC polymer を溶解させた 9 ml の 0.1 M 酢酸トリエチルアミン緩衝液 (pH 8) と混合して、室温で 4 時間反応させた。未反応の TRITC を除去するために、分画分子量 3,000 の透析膜を用いて純水中で 2 週間透析を行った後、真空凍結乾燥を行いサンプルを得た。

#### <Biotin 修飾 MPC ポリマーの合成方法>

25 mg の biotin-PEG<sub>2</sub>-NHS を 2 ml の DMF 中に溶解させ、64 mg の amine-modified MPC polymer を溶解させた 8 ml の 0.1 M 酢酸トリエチルアミン緩衝液 (pH 8) と混合して、室温で 24 時間反応させた。未反応の biotin-PEG<sub>2</sub>-NHS を除去するために、分画分子量 3,000

の透析膜を用いて純水中で2日間透析を行った後、真空凍結乾燥を行いサンプルを得た。

### 2.2.2 MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルの調製

エレクトロスプレー装置 (NF-102, メック社製) は、シリンジポンプ, ステンレス製の二重管型針, 高圧電源からなる。内管溶液として塩化カルシウム 5 wt% 水溶液を用い、Taylor コーンの形成を容易にするために、キトサン 2 wt% および酢酸 200 mM を加えた。外管溶液としてエタノールを溶媒とする 0.1, 0.2, 0.5 wt% の MPC ポリマー溶液を用い、被覆部の蛍光標識のために 0.005 wt% の TRITC 修飾 MPC ポリマーを加えた。反対電極上のシャーレ内溶液には 5 wt% のリン酸水素二ナトリウム水溶液を満たした。電圧を印加した二重管型のノズルから一定の流速で溶液を押し出し、溶液中へとエレクトロスプレーし、MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルを調製した。また、内管溶液のみを押し出すことで MPC ポリマー非被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルも調製した。シャーレ中の溶液はエレクトロスプレー中、常に攪拌した (~100 rpm)。エレクトロスプレーの操作条件は、印加電圧 23 kV, 内管溶液流速 0.2 ml/h, 外管溶液流速 0.2 ml/h, 内管針内径 330  $\mu\text{m}$ , 針外径 630  $\mu\text{m}$ , 外管針内径 1.0 mm, 針外径 2.5 mm, 針先からシャーレまでの噴霧距離 5 cm の下で行った。

得られたマイクロカプセルは自然沈降させ上澄み液を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で繰り返し洗浄を行い、PBS 中に分散させた。倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus 社製) および共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-KDM, Olympus 社製) を用いてマイクロカプセルの観察を行い、顕微鏡写真に基づいてマイクロカプセルのサイズを測定した (n=100)。また、X 線回折装置 (SmartLab, リガク社製) を用いてマイクロカプセルの結晶性を評価した。

### 2.2.3 マイクロカプセルのタンパク質吸着特性の評価

FITC-BSA を PBS 中に溶解させ、1 mg/ml 溶液を調製した。本溶液とマイクロカプセル分散液とを容量比 1:1 で混合し、37 °C で 1 時間静置した。上澄み液中の FITC-BSA の量を蛍光光度計を用いて定量し ( $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ )、マイクロカプセルに吸着しているタンパク質量を算出した。

#### 2.2.4 マイクロカプセルへの物質内封およびその放出特性の評価

芯物質として FITC-dextran および FITC-BSA を用いて、マイクロカプセル内への物質内封を評価した。エレクトロスプレー法では、あらかじめ芯物質を分散あるいは溶解させた溶液をスプレーすることが可能であることから、高効率な物質封入の達成が期待される。物質内封実験として、それぞれ 100  $\mu\text{g/ml}$  の FITC-dextran および 100  $\mu\text{g/ml}$  の FITC-BSA を含む内管溶液（塩化カルシウム 5 wt%，キトサン 2 wt% および酢酸 200 mM）および、エタノールを溶媒とする 0.5 wt% の MPC ポリマーと 0.005 wt% の TRITC 修飾 MPC ポリマーを含む外管溶液を、5 wt% のリン酸水素二ナトリウム水溶液中へとスプレーすることでマイクロカプセルを調製した。調製条件は、2.2.2 に示した条件と同じにした。得られたマイクロカプセルは自然沈降させ、上澄み液中の FITC-dextran および FITC-BSA の量を蛍光光度計を用いて定量し（ $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ）、物質内封率を算出した。また、共焦点レーザー顕微鏡（FV1000-KDM, Olympus 社製）を用いて各種物質の内封を確認した。

さらに、FITC-dextran および FITC-BSA を内封したマイクロカプセルを用いて、マイクロカプセルからの芯物質の放出特性を評価した。調製したマイクロカプセルを自然沈降させ、上澄み液を除去し PBS で繰り返し洗浄を行った後、pH 7.4 の 0.1 M HEPES 緩衝液および pH 5.5 の 0.1 M 酢酸緩衝液中にそれぞれ分散させた。分散液は 37  $^{\circ}\text{C}$  で 48 時間静置し、経時的に上澄み液をサンプリングした。蛍光光度計を用いて上澄み液中に含まれる FITC-dextran および FITC-BSA の定量を行い（ $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ）、マイクロカプセルから放出されている内封物質の割合を算出した。

#### 2.2.5 マイクロカプセル表面への選択的 avidin 固定化

Biotin 修飾 MPC ポリマーを用いてリン酸カルシウムマイクロカプセルを被覆し、マイクロカプセル表面への avidin の選択的固定化を試みた。内管溶液（塩化カルシウム 5 wt%，キトサン 2 wt% および酢酸 200 mM）および、エタノールを溶媒とする 0.5 wt% の MPC ポリマーと 0.005 wt% の biotin 修飾 MPC ポリマーを含む外管溶液を、5 wt% のリン酸水素二ナトリウム水溶液中へとスプレーすることでマイクロカプセルを調製した。また、外管溶液としてエタノールを溶媒とする 0.5 wt% の MPC ポリマーのみをスプレーすることで、biotin 非修飾 MPC ポリマーのみで被覆されたマイクロカプセルも調製した。調製条件は、2.2.2 に示した条件と同じにした。得られたマイクロカプセルは自然沈降させ上澄み液を除去し、PBS

で繰り返し洗浄を行った。

次に、TRITC-avidin, TRITC-BSA および TRITC-IgG を PBS に溶解させ、それぞれ 0.01 mg/ml 溶液を調製した。これら各種タンパク質溶液中に biotin 修飾 MPC ポリマー被覆マイクロカプセルを分散させ 37 °C で 1 時間静置した後、上澄み液を除去し PBS で繰り返し洗浄を行い、PBS 中に分散させた。また、biotin 非修飾 MPC ポリマー被覆マイクロカプセルも同様に TRITC-avidin 溶液中に分散させ静置した後、洗浄を行い、PBS 中に分散させた。共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-KDM, Olympus 社製) を用いて各種マイクロカプセルの観察を行った。

## 2.3 結果および考察

### 2.3.1 MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルの評価

本手法によって得られる MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルの形成メカニズムの推測図を Fig. 2-3 に示す。二重管型針先から押出されたそれぞれの溶液は、Taylor コーンから微小液滴としてスプレーされる。針先から噴射された微小液滴は、MPC ポリマー溶液相の内部に塩化カルシウム水溶液相が存在する二重構造となっている。この微小液滴が受け側水溶液に入るのと同時に、受け側水溶液中のリン酸イオンが不完全な MPC ポリマー膜部を介して塩化カルシウム水溶液相に入り込み、カルシウムイオンと反応することでリン酸カルシウム粒子を形成する。その後、MPC ポリマー溶液相中のエタノールが受け側水溶液中へ溶解して取り除かれ MPC ポリマーのリン酸カルシウム表面への強い吸着を伴い、MPC ポリマー膜の形成がリン酸カルシウム粒子の表面で起こり、MPC ポリマーが被膜されたリン酸カルシウムマイクロカプセルを形成する。

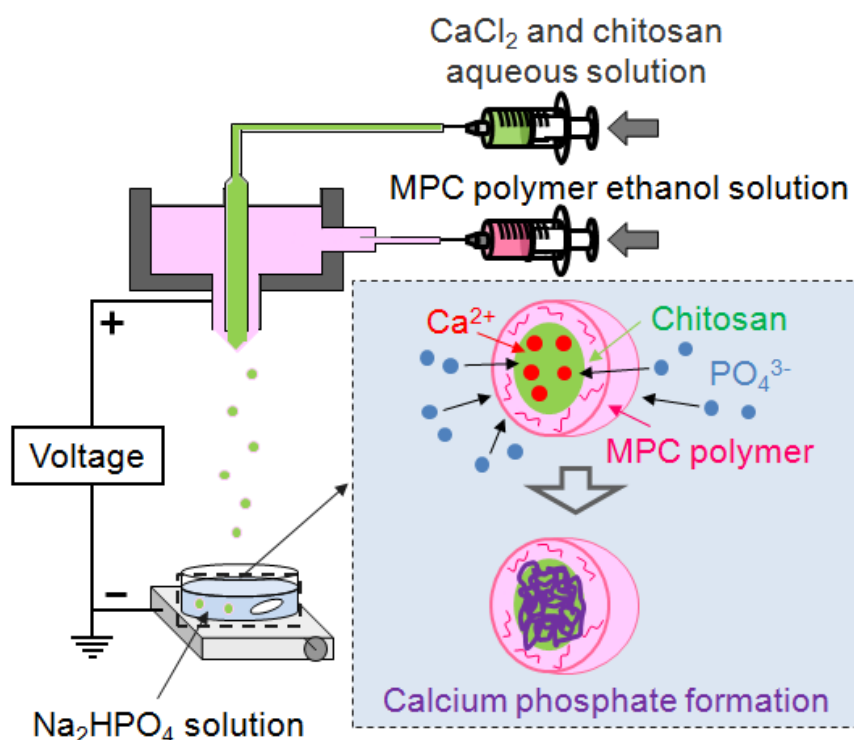


Fig. 2-3. Schematic of the method of preparation of calcium phosphate microcapsules covered with MPC polymer.

得られたマイクロカプセルを Fig. 2-4 に示した。Fig. 2-4a より球状のマイクロカプセルが確認され、エレクトロスプレー法を用いてマイクロカプセルの調製に成功したことが示された。また、Fig. 2-4b より TRITC でラベル化した MPC ポリマー由来の蛍光が確認され、マイクロカプセル表面が MPC ポリマーにより被覆されたことが示された。また、MPC ポリマーは主にマイクロカプセル表面に存在するが、少量の MPC ポリマーがマイクロカプセル内部にも存在することがわかった。これは、スプレー中に一部の MPC ポリマーが微小液滴内に拡散したためと考えられる。また、Fig. 2-5 よりマイクロカプセルの径は 300~500  $\mu\text{m}$  (平均径 410  $\mu\text{m}$ ) であり、変動係数 (CV 値) 17 % と比較的均一で単分散なマイクロカプセルが調製されたことが示された。さらに、Fig. 2-6 に示すようにマイクロカプセルの X 線回折測定を行った結果、ハイドロキシアパタイト結晶固有のピーク (26° および 32°) が観測された。これらの結果より、Fig. 2-3 で示されたマイクロカプセル形成メカニズムの妥当性が示された。

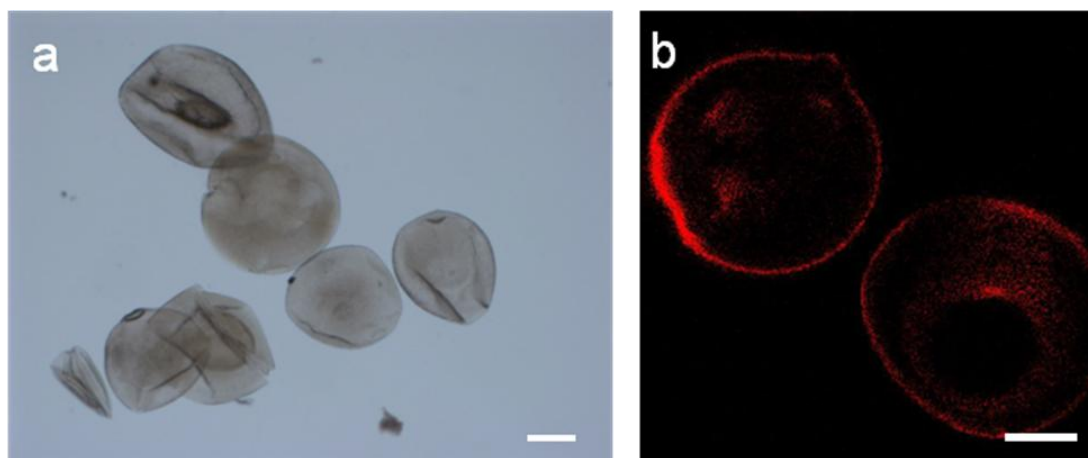


Fig. 2-4. Microscope images of calcium phosphate microcapsules covered with MPC polymer. (a) Bright-field and (b) CLSM image. The scale bars represent 100  $\mu\text{m}$ .

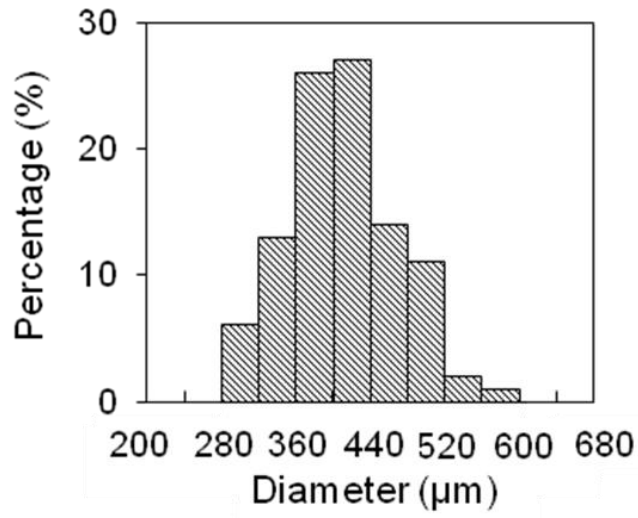


Fig. 2-5. Size distribution of calcium phosphate microcapsules covered with MPC polymer.

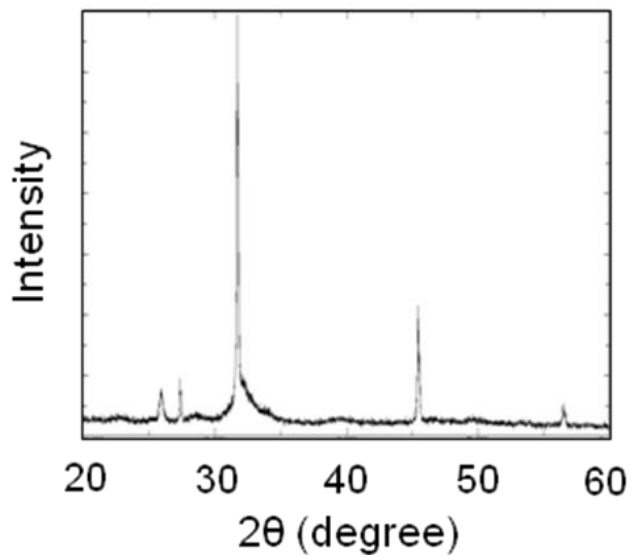


Fig. 2-6. XRD spectrum of calcium phosphate microcapsules covered with MPC polymer.

マイクロカプセルのサイズ制御を行うために、内管の針内径を変えてマイクロカプセルを調製し、マイクロカプセルのサイズに及ぼす影響を検討した。Fig. 2-7 に示すように針内径の増加に伴いマイクロカプセルのサイズが直線的に増加することがわかった。このように単純に針内径を調整することで、マイクロカプセルのサイズを容易に制御できることが示された。

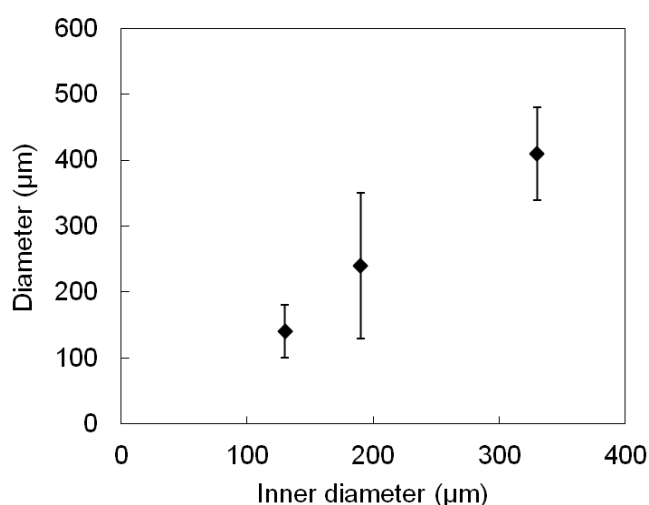


Fig. 2-7. Effect of the inner diameter of a spray needle on the diameter of calcium phosphate microcapsules covered with MPC polymer.

### 2.3.2 マイクロカプセルのタンパク質吸着特性の評価

MPC ポリマーの被覆効果を確認するために、マイクロカプセルのタンパク質吸着特性を評価した。スプレー時の外管溶液中 MPC ポリマー濃度を変えた際の、BSA のマイクロカプセルへの吸着量を Fig. 2-8 に示した。リン酸カルシウムがタンパク質吸着を示すことは数多く報告されており、実際 MPC ポリマー非被覆マイクロカプセルは大量の BSA の吸着を示した (マイクロカプセル 1 mg 当たり BSA 約 250 μg)。一方、MPC ポリマーの被覆量を増加させるに従い、BSA の吸着量は顕著に減少した。スプレー時の外管溶液中 MPC ポリマー濃度を 0.5 % まで増やすことで、BSA の吸着量は MPC ポリマー非被覆の場合と比較して、約 18 % にまで減少した。これらの結果より、同軸エレクトロスプレー法を用いてリン酸カルシウムより成るマイクロカプセルに MPC ポリマーを簡便に被覆させることで、マイクロカプセルへのタンパク質吸着を効果的に抑制できることが示された。



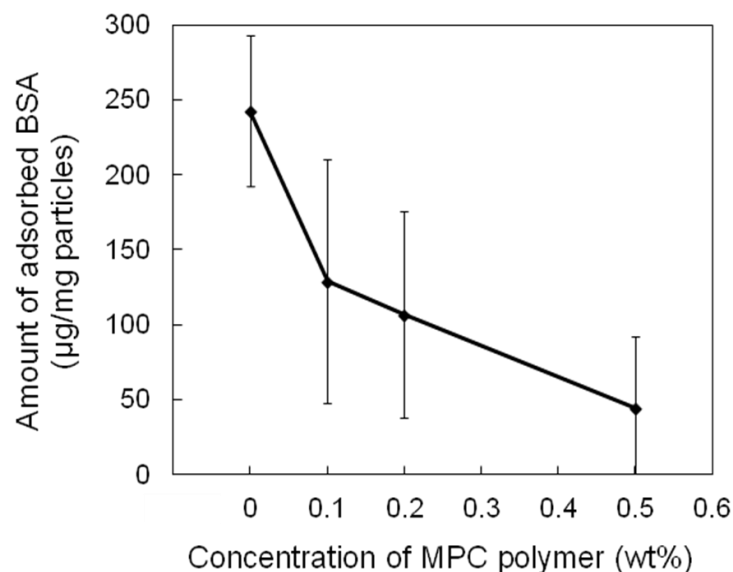


Fig. 2-8. Protein (FITC-BSA) adsorption onto calcium phosphate microcapsules covered with MPC polymer with various concentrations.

### 2.3.3 マイクロカプセルへの物質内封およびその放出特性の評価

エレクトロスプレー法を用いたマイクロカプセル調製の利点の一つとして、高効率かつ簡便にマイクロカプセル内に物質を内封できる点がある。リン酸カルシウムは多孔質な構造を有しており物質内封のための膨大なスペースを有しているため、高効率に物質を内封することが期待される。FITC-dextran と FITC-BSA を用いて、マイクロカプセル内への内封検討を行った。内封したマイクロカプセルの観察を行った結果、FITC-dextran と FITC-BSA 由来の蛍光がカプセル内全体にわたって確認され、物質封入に成功したことがわかった (Fig. 2-9)。また、蛍光強度より内封率を測定した結果、それぞれ 84 % (FITC-dextran)、99 % (FITC-BSA) であり、高い封入効率を達成した。また、FITC-BSA の封入率が FITC-dextran より高いのは、FITC-BSA がリン酸カルシウムと強い親和性を有しているためと考えられる。これらの結果より、エレクトロスプレー法は MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルにおいても高効率に物質内封可能であることを示した。

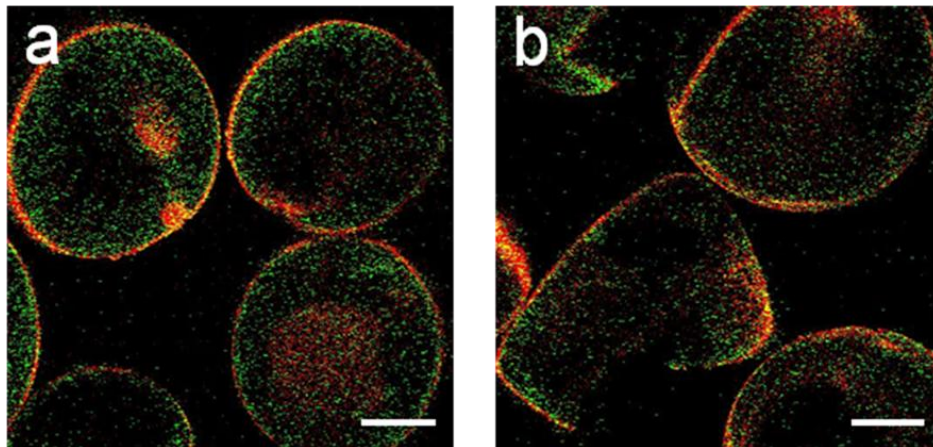


Fig. 2-9. CLSM images of calcium phosphate microcapsules covered with MPC polymer containing FITC-dextran (a) and FITC-BSA (b). The scale bars represent 100  $\mu\text{m}$ .

次に、MPC ポリマー被覆および非被覆マイクロカプセルからの内封物質の放出特性を酸性および中性条件下で評価した (Fig. 2-10)。その結果、FITC-dextran は FITC-BSA よりもいずれの pH 条件下においても放出速度が遅くなることがわかった。これは、高分子量の FITC-dextran のほうがマイクロカプセル表面での透過性が低くなることによるものと考えられる。また、酸性条件下ではリン酸カルシウムの溶解により透過性が上がり、FITC-dextran の放出速度が加速されることもわかった。また、FITC-BSA は中性条件下ではリン酸カルシウムに強く吸着しているため、酸性条件下になると急激に放出が加速されることもわかった。一方、MPC ポリマーの被覆による物質放出への影響を見てみると、FITC-dextran, FITC-BSA とともに中性条件下において被覆カプセルにおいて放出速度が低下していることがわかった。理由として、MPC ポリマー膜が物質放出の際に障壁として作用していることが考えられ、これは 2.3.2 で示したように MPC ポリマーが効果的に物質の非特異的吸着を抑制したことと整合性のある結果である。

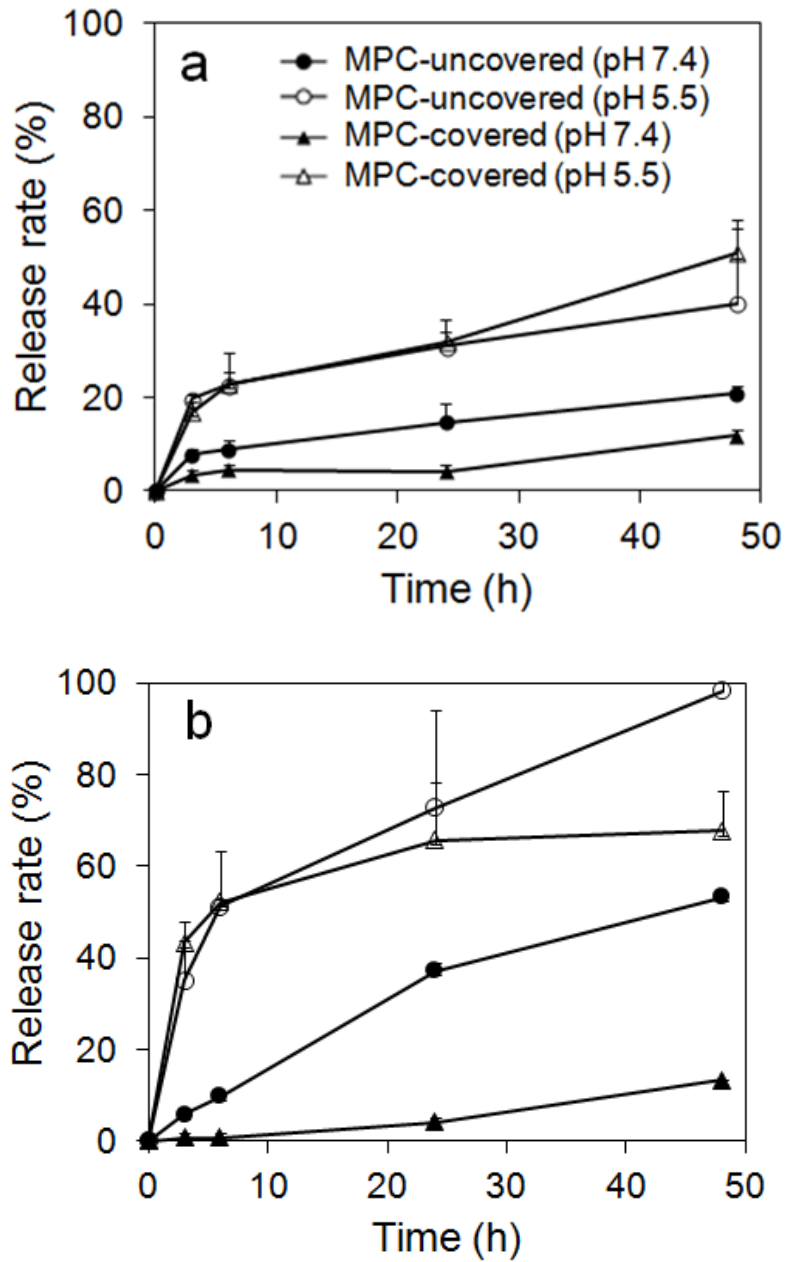


Fig. 2-10. Release of the encapsulated substances (FITC-dextran (a) and FITC-BSA (b)) from calcium phosphate microcapsules covered/uncovered with MPC polymer under different pH conditions (pH 5.5 and 7.4).

### 2.3.4 マイクロカプセル表面への選択的 avidin 固定化

ここまでの検討により、非特異的吸着を抑制する生体適合性の高いリン酸カルシウムマイクロカプセルが開発されたことが示されたが、生体材料において表面の機能化は重要な要素である。そこで、マイクロカプセル表面に対し標的タンパク質のみ固定化することを試みた。Biotin 修飾 MPC ポリマーを被覆したリン酸カルシウムマイクロカプセルを調製し、avidin を選択的にマイクロカプセル表面に結合させる検討を行った (Fig. 2-11)。各種タンパク質のマイクロカプセルへの吸着を評価した結果、biotin 非修飾 MPC ポリマーで被覆されたマイクロカプセルでは avidin が吸着しなかった (Fig. 2-12a) のに対し、biotin 修飾 MPC ポリマーで被覆されたマイクロカプセルでは表面に avidin が存在する (Fig. 2-12b) ことが蛍光観察によりわかった。また、他のタンパク質 (BSA および IgG) は biotin 修飾 MPC ポリマーで被覆されたマイクロカプセル表面に吸着しないことも確認された (Fig. 2-12c, d)。これらの観察結果より、機能化された MPC ポリマーをマイクロカプセルに被覆することで、標的タンパク質のみを選択的にカプセル表面に固定化できることが示された。

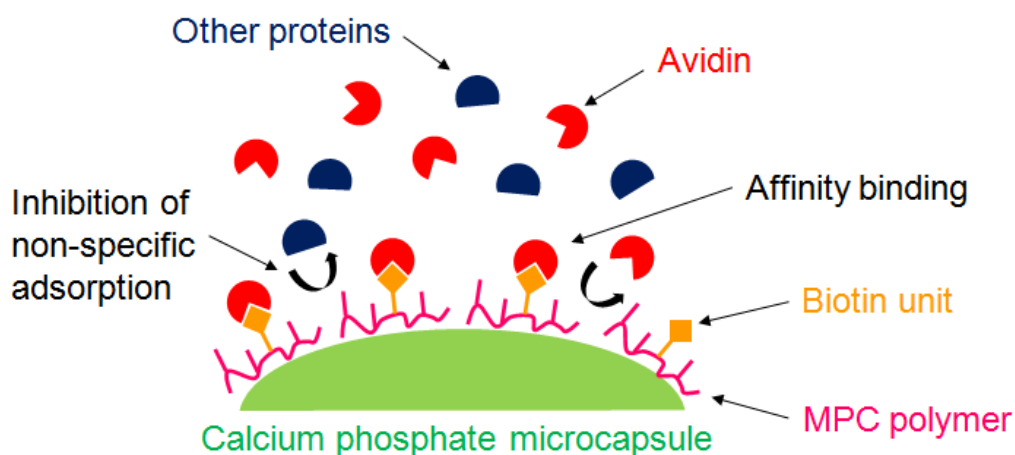


Fig. 2-11. Schematic of selective immobilization of avidin on calcium phosphate microcapsules covered with biotin-conjugated MPC polymer.

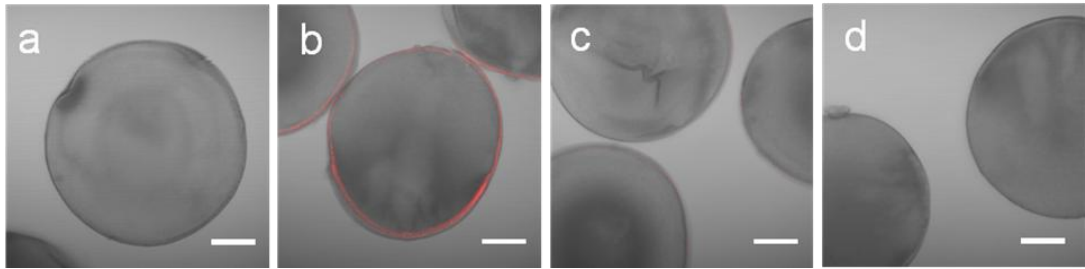


Fig. 2-12. Merged images of CLSM and differential interference images of the microcapsules with fluorescently-labeled proteins. Calcium phosphate microcapsules covered with MPC polymer mixed with TRITC-avidin (a) and calcium phosphate microcapsules covered with biotin-conjugated MPC polymer mixed with TRITC-avidin (b), TRITC-BSA (c) and TRITC-IgG (d). The scale bars represent 100  $\mu\text{m}$ .

## 2.4 結言

本章では、同軸エレクトロスプレー法を用いて MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルの開発を行った。本手法によって調製された MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルは、400  $\mu\text{m}$  程度の比較的単分散なサイズ分布を有しており、スプレー内管の針内径を変化させることによってサイズコントロールも可能であった。調製されたマイクロカプセルは、MPC ポリマーの被覆により効果的にタンパク質の吸着を抑制した。さらに本方法は、様々な芯物質を高効率にマイクロカプセル中に内封することが可能であり、MPC ポリマーの被覆により内封物質の放出速度が抑制されることがわかった。最後に、biotin 修飾 MPC ポリマーを被覆することで、標的タンパク質である avidin のみを選択的にマイクロカプセル表面に固定化できることが示された。これらの結果より、同軸エレクトロスプレー法は、機能化された表面を有するマイクロカプセルを簡便かつ高効率に調製でき、マイクロカプセルの新規調製法として今後の実用化が期待される。

## 2.5 参考文献

- 1) H. Hillebrener, F. Buyukserin, J. D. Stewart, C. R. Martin, Template synthesized nanotubes for biomedical delivery applications, *Nanomedicine* 1 (2006) 39–50.
- 2) D.W. Yu, T.T. Fukuda, S. Kuroda, K. Tanizawa, A. Kondo, M. Ueda, T. Yamada, H. Tada, M. Seno, Engineered bio-nanocapsules, the selective vector for drug delivery system, *IUBMB Life* 58 (2006) 1–6.
- 3) Y. Ding, Y. Hu, L.Y. Zhang, Y. Chen, X.Q. Jiang, Synthesis and magnetic properties of biocompatible hybrid hollow spheres, *Biomacromolecules* 7 (2006) 1766–1772.
- 4) N.E. Botterhuis, Q.Y. Sun, P.C.M.M. Magusin, R.A. van Santen, N.A.J.M. Sommerdijk, Hollow silica spheres with an ordered pore structure and their application in controlled release studies, *Chem.-Eur. J.* 12 (2006) 1448–1456.
- 5) M. Vallet-Regi, J.M. González-Calbet, Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Prog. Solid State Chem.* 32 (2004) 1–31.
- 6) L. Xia, K. Lin, X. Jiang, Y. Xu, M. Zhang, J. Chang, Z. Zhang, Enhanced osteogenesis through nano-structured surface design of macroporous hydroxyapatite bioceramic scaffolds via activation of ERK and p38 MAPK signaling pathways, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 5403–5416.
- 7) M. Bohner, S. Tadier, Nv. Garderen, Ad. Gasparo, N. Döbelin, G. Baroud, Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications, *Biomatter* 3 (2013) e25103.
- 8) S. Dorozhkin, Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine, *Materials* 2 (2009) 1975–2045.
- 9) A. Tabakovic, M. Kester, J.H. Adair, Calcium phosphate-based composite nanoparticles in bioimaging and therapeutic delivery applications, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnol.* 4 (2012) 96–112.
- 10) L.B. Gower, Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4551–4627.
- 11) F.-Z. Cui, Y. Li, J. Ge, Self-assembly of mineralized collagen composites, *Mater. Sci. Eng. R Rep.* 57 (2007) 1–27.
- 12) P.W. Brown, M. Fulmer, Kinetics of hydroxyapatite formation at low-temperature, *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 934–940.

- 13) B. Nasiri-Tabrizi, P. Honarmandi, R. Ebrahimi-Kahrizsangi, P. Honarmandi, Synthesis of nanosize single-crystal hydroxyapatite via mechanochemical method, *Mater. Lett.* 63 (2009) 543–546.
- 14) G.S. Han, S. Lee, D.W. Kim, D.H. Kim, J.H. Noh, J.H. Park, S. Roy, T.K. Ahn, H.S. Jung, A simple method to control morphology of hydroxyapatite nano- and microcrystals by altering phase transition route, *Cryst. Growth Des.* 13 (2013) 3414–3418.
- 15) C. Lai, S. Tang, Y. Wang, K. Wei, Formation of calcium phosphate nanoparticles in reverse microemulsions, *Mater. Lett.* 59 (2005) 210–214.
- 16) A.A. Chaudhry, S. Haque, S. Kellici, P. Boldrin, I. Rehman, F.A. Khalid, J.A. Darr, Instant nano-hydroxyapatite: a continuous and rapid hydrothermal synthesis, *Chem. Commun.* 21 (2006) 2286–2288.
- 17) A. Yunoki, E. Tsuchiya, Y. Fukui, A. Fujii, T. Maruyama, Preparation of inorganic/organic polymer hybrid microcapsules with high encapsulation efficiency by an electrospray technique, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 11973–11979.
- 18) V. Hlady, H. Furedi-Milhofer, Adsorption of human serum albumin on precipitated hydroxyapatite, *J. Coll. Interf. Sci.* 69 (1979) 460–468.
- 19) T. Diana, H. Wassell, R.C. Hall, G. Embery, Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite, *Biomaterials* 16 (1995) 697–702.
- 20) E.C. Moreno, M. Kresak, J.J. Kane, D.I. Hay, Adsorption of proteins, peptides, and organic acids from binary mixtures onto hydroxyapatite, *Langmuir* 3 (1987) 511–519.
- 21) Q. Liua, Y. Zhanga, J.S. Laskowski, The adsorption of polysaccharides onto mineral surfaces: an acid/base interaction, *Int. J. Miner. Process.* 60 (2000) 229–245.
- 22) D.N. Misra, Adsorption of low molecular weight poly(acrylic acid) on hydroxyapatite: role of molecular association and apatite dissolution, *Langmuir* 7 (1991) 2422–2424.
- 23) K. Ishihara, N.P. Ziats, B.P. Tierney, N. Nakabayashi, J.M. Anderson, Protein adsorption from human plasma is reduced on phospholipid polymers, *J. Biomed. Mater. Res.* 25 (1991) 1397–1407.
- 24) K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi, Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption, *J. Biomed. Mater. Res.* 39 (1998) 323–330.



- 25) Y. Xu, M. Takai, K. Ishihara, Suppression of protein adsorption on a charged phospholipid polymer interface, *Biomacromolecules* 10 (2009) 267–274.
- 26) K. Ishihara, Y. Goto, M. Takai, R. Matsuno, Y. Inoue, T. Konno, Novel polymer biomaterials and interfaces inspired from cell membrane functions, *Biochim Biophys Acta* 1810 (2011) 268–275.

## 第3章 リン脂質ポリマーを用いた高分子ベシクルの開発

### 3.1 緒言

中空微粒子（ベシクル）は既に実用性が明確になっており、バイオテクノロジー、ドラッグデリバリー、触媒、センサーなど様々な分野での利用が検討されている<sup>1-7)</sup>。中空構造の調製方法として様々な手法が開発されているが、それらは調製する際にテンプレートを用いるか否かで大別される。テンプレートを用いない方法としては、超音波法<sup>8,9)</sup>，熱分解法<sup>10,11)</sup>，レーザー法<sup>12)</sup>，ポリオンコンプレックス法<sup>13)</sup>などがある。しかし、これらテンプレートを用いない方法はメカニズムが不明瞭なことにより、サイズや形の制御が困難となっている。一方、テンプレート法は、サイズや形、構造の制御が可能であることや、構造形成のメカニズムが明らかであるため、中空粒子の調製法として広く用いられている。

中空構造のテンプレートとしてはコロイド粒子が広く用いられており、一般的に次のようなステップで中空構造が調製される<sup>1)</sup> (Fig. 3-1)。まずテンプレートとなるコロイド粒子を調製し(1)、次にコロイド粒子表面を機能化し(2)、コロイド粒子の周囲に所望の素材を選択的にコーティングしてコア/シェル構造とした(3)後に、コアであるコロイド粒子のみを除去(4)して中空構造を得る。よって、理想的なテンプレートとして均一なコロイド粒子を得ることと、組成、中空部分のサイズ、コーティング膜の厚みなどの精密制御を可能とするコーティング手法の確立に多くの検討がなされてきた<sup>1-3,6,7)</sup>。しかし、テンプレート法の潜在的な問題点として物質の内封が困難であるという問題点を有している。

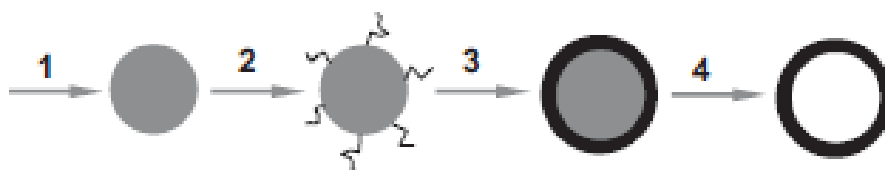


Fig. 3-1. Schematic illustration of a conventional templating process for hollow vesicles preparation.

第2章で示されたように、同軸エレクトロスプレー法を用いることでMPCポリマーが被膜されたリン酸カルシウムマイクロ粒子が調製される。さらに、リン酸カルシウムは多孔

質な構造を有しているため、粒子内部に様々な物質を内封することが可能である<sup>14)</sup>。そこで本章では、同軸エレクトロスプレー法およびテンプレート法を用いて、MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロ粒子のコア部分であるリン酸カルシウムを溶解させることで、MPC ポリマー膜から成る新規ベシクルの調製を検討した (Fig. 3-2)。生体膜類似の MPC ポリマーから成るベシクルは、生体適合性の高いマイクロカプセルとして機能することが期待される。

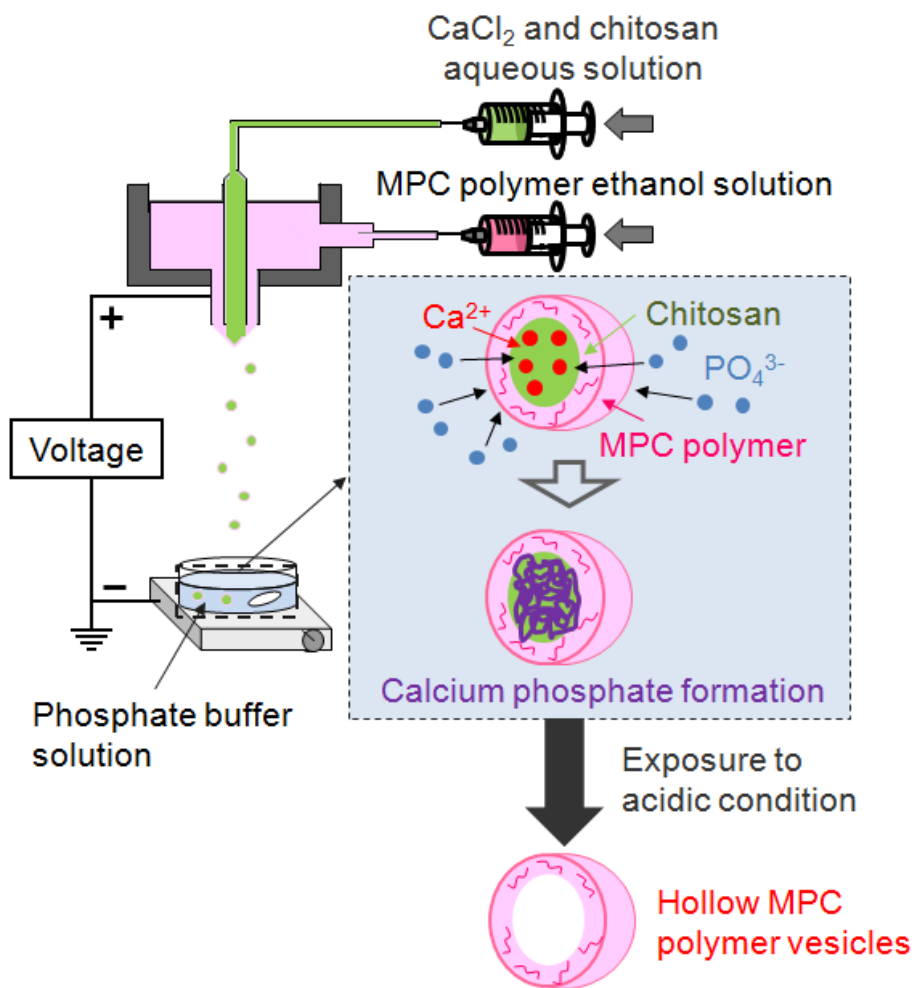


Fig. 3-2. Schematic of the method of preparation of hollow MPC polymer vesicles.

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬

塩化カルシウム	和光純薬
キトサン 10	和光純薬
リン酸水素二ナトリウム	和光純薬
エタノール	和光純薬
酢酸	和光純薬
MPC polymer (Lipidure <sup>®</sup> -CM)	NOF America
TRITC-labeld MPC polymer (自身で合成、2.2.1 参照)	
Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran, MW = 40,000, 500,000, 2,000,000 Da)	Sigma-Aldrich
Yellow-green fluorescent polystyrene microspheres (0.50 $\mu$ m)	Polysciences
Yeast extract	Becton Dickinson
Peptone	Becton Dickinson
D-(+)-グルコース	ナカライテスク

### 3.2.2 MPC ポリマーベシクルの調製

MPC ポリマーが被膜されたリン酸カルシウムマイクロ粒子は、2.2.2 に示したのと同様に同軸エレクトロスプレー法を用いて調製した。得られたマイクロ粒子は酢酸 200 mM 水溶液中に浸漬させ、コア粒子成分であるリン酸カルシウムおよびキトサンを溶解させた後、酢酸水溶液を pH 7.4 の 0.1 M HEPES 緩衝液に置換した。

倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus 社製) および共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-KDM, Olympus 社製) を用いて粒子の観察を行い、顕微鏡写真に基づいて粒子のサイズを測定した (n=100)。

### 3.2.3 MPC ポリマーベシクルへの物質内封

芯物質として FITC-dextran および FITC-microsphere を用いて、ベシクル内への物質内封を評価した。エレクトロスプレー法では、あらかじめ芯物質を分散あるいは溶解させた溶液をスプレーすることが可能であることから、高効率な物質封入の達成が期待される。物質内封実験として、それぞれ 100  $\mu$ g/ml の FITC-dextran (分子量 40, 500, 2000 kDa) および 40

$\mu\text{l/ml}$  の FITC-microsphere ( $0.50 \mu\text{m}$ ) を含む内管溶液 (塩化カルシウム 5 wt%, キトサン 2 wt% および酢酸 200 mM) および、エタノールを溶媒とする 0.5 wt% の MPC ポリマーと 0.005 wt% の TRITC 修飾 MPC ポリマーを含む外管溶液を、5 wt% のリン酸水素二ナトリウム水溶液中へとスプレーすることでマイクロ粒子を調製し、3.2.2 に示したのと同様に酢酸 200 mM 水溶液中に浸漬させてコア粒子を溶解させた。エレクトロスプレー後の受け側水溶液中およびコア粒子溶解後の酢酸水溶液中の FITC-dextran の量を蛍光光度計を用いて定量し ( $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ )、物質内封率を算出した。また、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-KDM, Olympus 社製) を用いて各種物質の内封を確認した。

### 3.2.4 MPC ポリマーベシクルへの酵母内封および培養

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7) は、YPD 培地 (10 g/l 酵母エキス, 20 g/l グルコース, 20 g/l ペプトン) 中  $37^\circ\text{C}$  で一晩培養した。ベシクル内へ酵母を内封するために、酵母 ( $\text{OD} \approx 0.5$ ) を含む内管溶液 (塩化カルシウム 5 wt%, キトサン 2 wt% および酢酸 200 mM) および、エタノールを溶媒とする 0.5 wt% の MPC ポリマーを含む外管溶液を、5 wt% のリン酸水素二ナトリウム水溶液中へとスプレーすることでマイクロ粒子を調製し、3.2.2 と同様に酢酸 200 mM 水溶液中に浸漬させてコア粒子を溶解させた後、新しい YPD 培地中に浸漬させ  $37^\circ\text{C}$  で培養した。一定間隔ごとに、倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus 社製) によって、ベシクル内での酵母増殖過程を観察した。

### 3.3 結果および考察

#### 3.3.1 MPC ポリマーベシクルの評価

2.3.1 で示したとおり、同軸エレクトロスプレー法を用いることで、リン酸カルシウムマイクロ粒子の形成およびリン酸カルシウム表面への MPC ポリマーの吸着がワンステップで引き起こされ、MPC ポリマーで被膜されたリン酸カルシウムマイクロ粒子が調製される。Fig. 3-3a より、コア部分がリン酸カルシウムより形成されるマイクロ粒子が調製されたことが確認された。次に、得られたマイクロ粒子を酢酸水溶液中に浸漬させることでコア部分のリン酸カルシウム粒子を溶解させた。得られたベシクルを Fig. 3-3b, c に示した。Fig. 3-3b よりコア粒子が溶解されたことが確認され、ベシクルの調製に成功したことが示された。また、Fig. 3-3c より TRITC でラベル化した MPC ポリマー由来の蛍光が確認され、ベシクルの膜が MPC ポリマーにより形成されていることが示された。Fig. 3-4 よりマイクロ粒子およびベシクルの径はそれぞれ 300~500  $\mu\text{m}$  (平均径 370  $\mu\text{m}$ )、350~600  $\mu\text{m}$  (平均径 420  $\mu\text{m}$ ) であり、変動係数 (CV 値) はいずれも 14 % と比較的均一で単分散なマイクロ粒子およびベシクルが調製されたことが示された。また、コア溶解の際の浸透圧の影響により、ベシクルはマイクロ粒子と比較して粒子径が大きくなることがわかった。

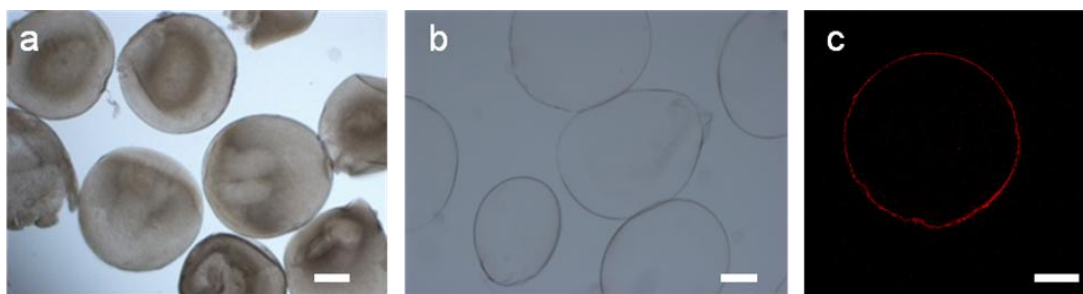


Fig. 3-3. Microscope images of calcium phosphate microparticles covered with MPC polymer and hollow MPC polymer vesicles. (a, b) Bright-field images of calcium phosphate microparticles covered with MPC polymer and hollow MPC polymer vesicles. (c) CLSM image of hollow MPC polymer vesicles. The scale bars represent 100  $\mu\text{m}$ .

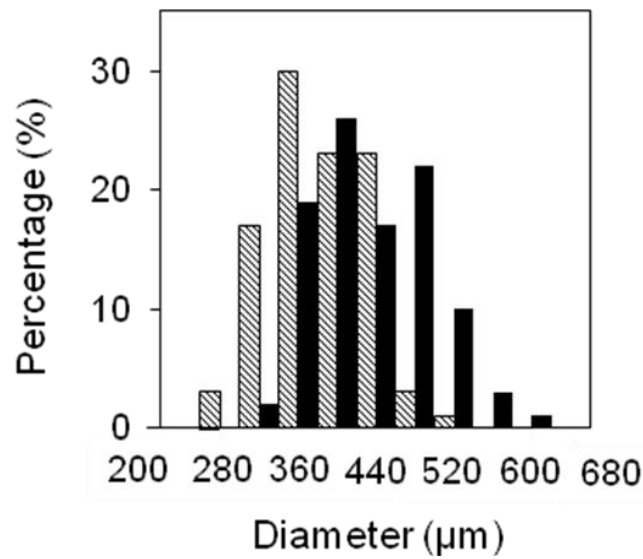


Fig. 3-4. Size distribution of calcium phosphate microparticles covered with MPC polymer (dotted bar) and hollow MPC polymer vesicles (solid bar).

ベシクルのサイズ制御を行うために、2.3.1 と同様に内管の針内径を変えてマイクロ粒子を調製し、ベシクルのサイズに及ぼす影響を検討した。Fig. 3-5 に示すように針内径の増加に伴いベシクルのサイズが直線的に増加することがわかった。このように単純に針内径を調整することで、ベシクルのサイズを容易に制御できることが示された。

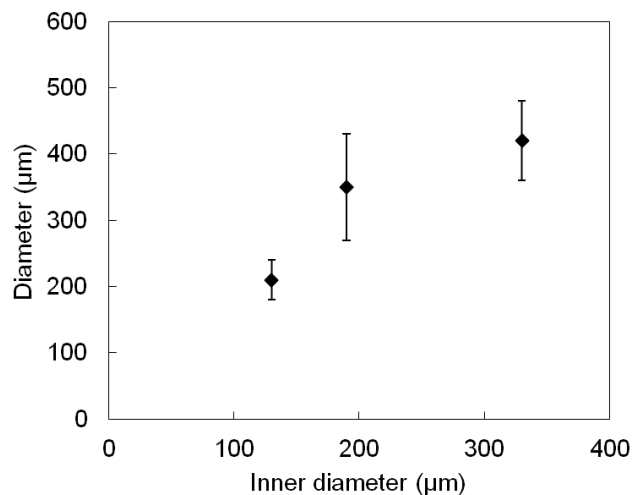


Fig. 3-5. Effect of the inner diameter of a spray needle on the diameter of hollow MPC polymer vesicles.

### 3.3.2 MPC ポリマーベシクルへの物質内封

FITC-dextran および FITC-microsphere を用いて、MPC ポリマーベシクル内への物質封入について検討を行った。Fig. 3-6 に示すように、各分子量を有する FITC-dextran を内封したベシクルの観察を行った。その結果、分子量 40 kDa の dextran は内封されないが、分子量 500 および 2000 kDa の dextran はベシクル内に保持されることがわかった。また、蛍光強度より内封率を測定した結果、それぞれ 1 % (40 kDa), 50 % (500 kDa), 83 % (2000 kDa) であり、観察画像に一致する結果となった。これらの結果から、MPC ポリマー膜は一定の膜透過性を有していることがわかった。

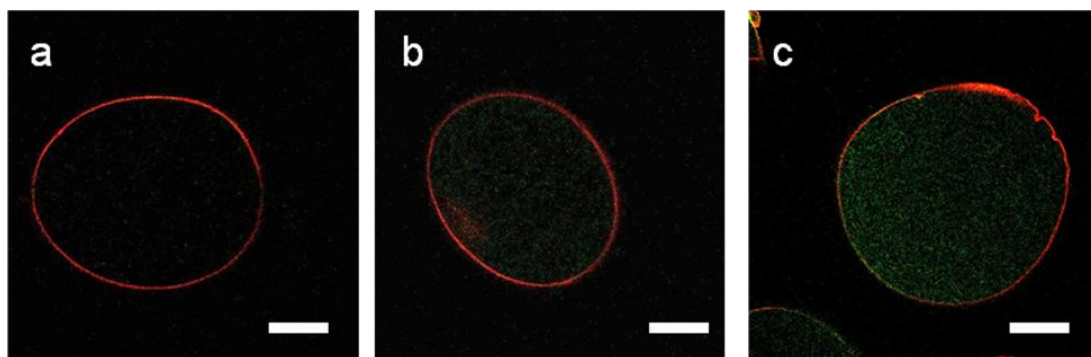


Fig. 3-6. CLSM images of hollow MPC polymer vesicles encapsulating FITC-dextran with *M<sub>w</sub>* of (a) 40, (b) 500 and (c) 2,000 kDa. The scale bars represent 100  $\mu$ m.

Fig. 3-7 に FITC-microsphere を内封したベシクルの観察画像を示す。Fig. 3-7 より、多くの蛍光微粒子の封入に成功し、さらに内封された微粒子は秒単位で中空粒子内を移動していることがわかった。この結果よりベシクル内部が流動性を有することが示唆され、中空構造を持つことが改めて裏付けられた。

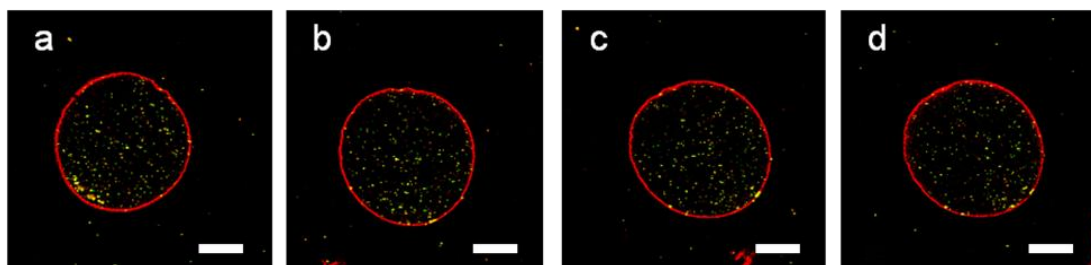


Fig. 3-7. CLSM observation of a hollow MPC polymer vesicle encapsulating 0.5  $\mu$ m fluorescent microspheres over time. (a) 0 s, (b) 1 s, (c) 2 s, (d) 3 s. The scale bars represent 100  $\mu$ m.



### 3.3.3 MPC ポリマーベシクルへの酵母内封および培養

Fig. 3-8 に YPD 培地中の酵母内封ベシクルの顕微鏡写真を示す。Fig. 3-8 より、酵母細胞を MPC ポリマーベシクル内に封入することに成功し、また、ベシクル内で酵母を増殖させることにも成功したことが示された。蛍光微粒子内封の結果より、酵母細胞も高効率で封入されていると考えられる。ベシクル内で酵母が増殖したことから、培地中の低分子物質（グルコースやペプトンなど）は、MPC ポリマーから成る膜を十分に透過していることが確認された。24 時間経過後も酵母を内包したベシクルは裂けることはないことから、MPC ポリマー膜の機械的強度は比較的強いと思われる。これらの結果より、同軸エレクトロスプレー法およびテンプレート法を用いて、活性を損なうことなくベシクル内に生理活性物質を封入することが可能であることがわかった。

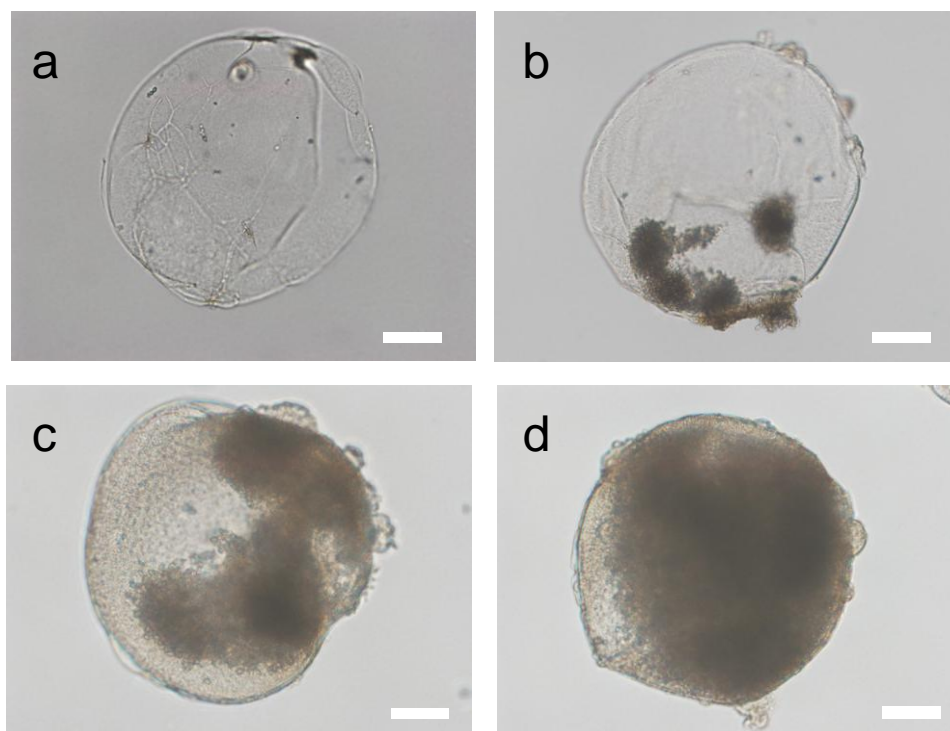


Fig. 3-8. Bright-field microscope images of yeast-encapsulated hollow MPC polymer vesicles in YPD medium at different periods after preparation. (a) 0 h, (b) 8 h, (c) 16 h, (d) 24 h. The scale bars represent 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.4 結言

本章では、同軸エレクトロスプレー法を用いて調製した MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロ粒子のコア粒子であるリン酸カルシウムを溶解させることで、生体膜と同様の構造を持つ MPC ポリマー膜から成るベシクルを開発した。本手法によって調製された MPC ポリマーベシクルは、400  $\mu\text{m}$  程度の比較的単分散なサイズ分布を有しており、スプレー内管の針内径を変化させることによってサイズコントロールも可能であった。調製されたベシクルは比較的高分子量の物質を保持することが可能であり、また、ベシクル内部は流動性を有していることも確認された。さらに本手法は、ベシクル内に細胞を活性を損なうことなく封入でき、内部で細胞を培養することも可能であった。これらの結果より、同軸エレクトロスプレー法およびテンプレート法を用いた本手法は中空微粒子の調製に非常に有用であると考えられる。また、今回調製された MPC ポリマー膜から成るベシクルは高い生体適合性を有していると考えられ、リン脂質ベシクルに代わる新たな選択肢に成り得る。今後、機械的強度や耐久性、内封物質の放出性制御など、より詳細な検討を行うことにより、ドラッグデリバリーや移植細胞のカプセル化といった医療分野への応用が期待される。

### 3.5 参考文献

- 1) X.W. Lou, L.A. Archer, Z.C. Yang, Hollow micro-/nanostructures: synthesis and applications, *Adv. Mater.* 20 (2008) 3987-4019.
- 2) Y. Wang, A.S. Angelatos, F. Caruso, Template synthesis of nanostructured materials via layer-by-layer assembly, *Chem. Mater.* 20 (2008) 848-858.
- 3) W.J. Tong, C.Y. Gao, Multilayer microcapsules with tailored structures for bio-related applications, *J. Mater. Chem.* 18 (2008) 3799-3812
- 4) S.J. Son, X. Bai, S.B. Lee, Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine: Part 1: drug/gene delivery applications, *Drug Discov. Today* 12 (2007) 650-656.
- 5) S.J. Son, X. Bai, S.B. Lee, Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine: Part 2: imaging, diagnostic, and therapeutic applications, *Drug Discov. Today* 12 (2007) 657-663.
- 6) A.P.R. Johnston, C. Cortez, A.S. Angelatos, F. Caruso, Layer-by-layer engineered capsules and their applications, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11 (2006) 203-209.
- 7) H. Zeng, Synthetic architecture of interior space for inorganic nanostructures, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 649-662.
- 8) J.J. Zhu, S. Xu, H. Wang, J.M. Zhu, H.Y. Chen, Sonochemical synthesis of CdSe hollow spherical assemblies via an in-situ template route, *Adv. Mater.* 15 (2003) 156-159.
- 9) S.F. Wang, F. Gu, M.K. Lu, Sonochemical synthesis of hollow PbS nanospheres, *Langmuir* 22 (2006) 398-401.
- 10) P.J. Bruinsma, A.Y. Kim, J. Liu, S. Baskaran, Mesoporous silica synthesized by solvent evaporation: spun fibers and spray-dried hollow spheres. *Chem. Mater.* 9 (1997) 2507-2512.
- 11) M. Iida, T. Sasaki, M. Watanabe, Titanium dioxide hollow microspheres with an extremely thin shell, *Chem. Mater.* 10 (1998) 3780-3782.
- 12) A.M. Herring, J.T. McKinnon, B.D. McCloskey, J. Filley, K.W. Gneshin, R.A., Pavelka, H.J. Kleebe, D.J. Aldrich, A novel method for the templated synthesis of homogeneous samples of hollow carbon nanospheres from cellulose chars, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 9916-9917.
- 13) M.M. Daly, D. Knorr, Chitosan-alginate complex coacervate capsules: effects of calcium chloride, plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability, *Biotechnol. Prog.* 4 (1988) 76-81.

- 14) A. Yunoki, E. Tsuchiya, Y. Fukui, A. Fujii, T. Maruyama, Preparation of inorganic/organic polymer hybrid microcapsules with high encapsulation efficiency by an electrospray technique, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 11973-11979.

## 第4章 表面機能化高分子ショートマイクロファイバーの開発

### 4.1 緒言

ナノ/マイクロ粒子は、電子材料、医療、化粧品、食品、農薬、建築など様々な分野において多様な用途で応用されている<sup>1-4)</sup>。今後さらにナノ/マイクロ粒子を様々な分野に応用していくためには、自然界に存在するような優れた機能性を有する粒子の開発が重要である。実際、自然界には球状ではない様々な形状を有する粒子が多数存在し（細胞、細菌、ウイルス、花粉等）、それぞれ非常に優れた機能を有している<sup>5)</sup>。このような背景から、最近では異方性を有するナノ/マイクロ材料に注目が集まっている<sup>6-10)</sup>。例えば、アスペクト比の大きい、非球状の形状を有する粒子調製や、粒子に不均一に修飾を行うことによって異方性材料とするなどの研究が数多く報告されている。非球状の粒子としては、ロッド型、ディスク型、ダンベル型、ドングリ型、楕円型、シート型など様々な形状を有する粒子が報告されている<sup>5,11-22)</sup>。また、粒子に不均一に修飾を行うことによっても異方性を有する粒子とすることができ、自己組織化、フォトニック材料、ドラッグデリバリーなど多様な分野において注目されている<sup>23-27)</sup>。

そのような中で近年、高分子ショートマイクロファイバーが異方性材料として注目されている。高分子ショートマイクロファイバーとは、数十 $\mu\text{m}$ の長さを有する短いファイバーを指し、アスペクト比が球状粒子と比較して大きく、また、その短さから液中でも絡まり合うことなく分散することが可能という特徴がある。しかし、高分子ショートマイクロファイバーは、調製の難しさといった理由から、報告されている調製方法も限られている<sup>28-33)</sup>。そこで本研究では、エレクトロスピンニング法により紡糸されたマイクロファイバーに超音波処理を施すことでショートマイクロファイバーとする、新規な高分子ショートマイクロファイバー調製技術の確立を行った。本手法は既存の調製技術（microsectioning 法<sup>28,29)</sup>，UV/レーザー照射法<sup>30,31)</sup>，micromolding 法<sup>32,33)</sup>）と比較して簡便かつ高効率であり、温和な条件下で調製可能という利点を有する。さらに、高分子ショートマイクロファイバーの断面と側面のそれぞれを選択的に機能化し多機能材料とすることも行った。最後に、avidin と biotin の特異的な相互作用を利用して、高分子ショートマイクロファイバーを自発的に構造化・組織化させることにも挑戦した。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 試薬

Polymethylmethacrylate(PMMA, MW = 120,000)	Sigma-Aldrich
Methyl methacrylate (MMA)	和光純薬
Glycidyl methacrylate (GMA)	和光純薬
Toluene	和光純薬
2,2-Azobis(2,4-dimethylvalerovitrile) (AIBN)	和光純薬
Methanol	和光純薬
Dimethylformamide (DMF)	和光純薬
Dimethylsulfoxide (DMSO)	和光純薬
Albumin, from Bovine Serum, Cohn Fraction V, pH 7.0 (BSA)	和光純薬
Albumin, Fluorescein isothiocyanate Conjugate bovine (FITC-BSA)	Sigma-Aldrich
(+)-Biotin hydrazide	Sigma-Aldrich
Amine-PEG <sub>11</sub> -Biotin	Thermo Fisher
Biotin Labeling Kit-NH <sub>2</sub>	同仁化学
Biotin-4-fluorescein (FITC-biotin)	Invitrogen
Neutravidin <sup>TM</sup> Biotin-binding Protein	Thermo Fisher
Tetramethylrhodamine 5-(-and 6)-isothiocyanate (5-(6-)TRITC)	Invitrogen
Neutravidin Polystyrene Particles (2.1 μm)	Spherotech
Biotin Polystyrene Particles (3.3 μm)	Spherotech

#### <TRITC-neutravidin の合成方法>

ごく少量の DMSO で TRITC を溶解し、約 1 mg/ml の濃度になるように neutravidin を溶解させた炭酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M, pH 8.8) と混合して、4°C で 24 時間反応させた。TRITC と neutravidin はモル比 1:10 の組成となるようにした。未反応の TRITC を除去するために、分画分子量 15,000 の透析膜を用いて純水中で一晩透析を行った後、真空凍結乾燥を行いサンプルを得た。

### <Poly(MMA-GMA)コポリマーの合成方法>

減圧蒸留を行った MMA と GMA、溶媒としてトルエン、開始剤として AIBN を窒素置換化で混合し、80°Cで 24 時間攪拌してラジカル重合を行い、MMA と GMA のモノマー比が 4:1 の Poly(MMA-GMA)コポリマーとなるように反応させた。重合後にメタノールで再沈殿を行った後、真空凍結乾燥を行いサンプルを得た。

#### 4.2.2 高分子ショートマイクロファイバーの調製

PMMA は硬度の高い材料であるため、PMMA からなるファイバーは外力によって折れやすいと推測される。その性質を利用して、紡糸した Poly(MMA-GMA)ファイバーに超音波処理を行い、ショートファイバーとする方法を検討した。

エレクトロスピンニング装置 (NF-102, メック社製) は、シリンジポンプ, ステンレス製の針, 高圧電源からなる (Fig.4-1a)。一定の流速でシリンジから押出されたポリマー溶液は、反対電極板状に置かれた器具へ橋かけ状に配向紡糸される (Fig. 4-1b)。紡糸条件の一例を示すと、ポリマー溶液には Poly(MMA-GMA)と PMMA を重量比 4 : 1 の組成で、溶液濃度が 30 wt%となるように DMF に溶解させたものを用い、反対電極上へと紡糸した。エレクトロスピンニングの操作条件は、印加電圧 24 kV, ポリマー溶液流速 0.2 ml/h, 針内径 330  $\mu\text{m}$ , 針外径 630  $\mu\text{m}$ , 針先からコレクターまでのスピニング距離 23 cm の下で行った。またエレクトロスピンニング装置内の温度は 15~20°Cとした。

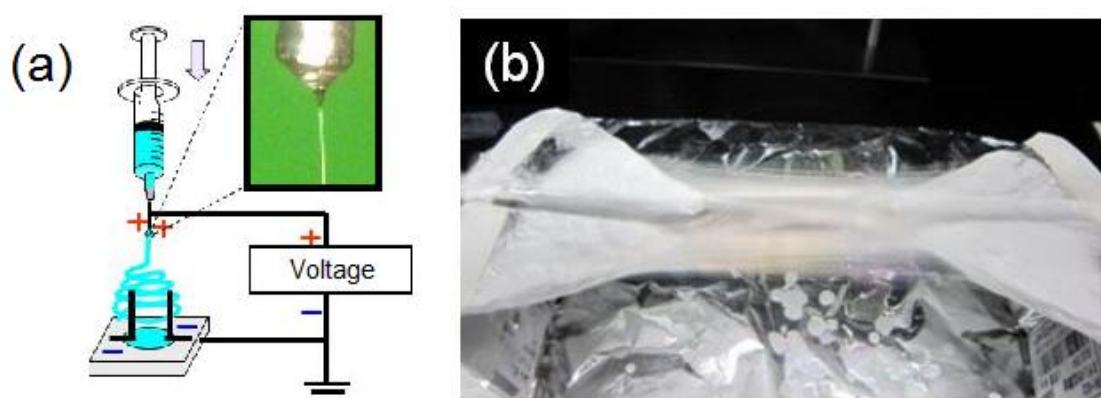


Fig. 4-1. (a) Electrospinning of polymer solution. (b) Electrospun polymeric microfibers.

紡糸したファイバーを BSA 水溶液 (0.1 mg/ml in PBS) および Tris 塩酸塩緩衝液に浸漬させて、ファイバー表面の epoxy 基と BSA および Tris 中の amino 基を反応させた。このファイバーを 2~3 mm 程度にカミソリの刃を用いて切断した。これらを PBS 中に加えて超音波洗浄器 (VS-D100, アズワン社製) を用いて超音波処理を 3 時間行った。ただし、1 時間超音波処理を行った後、ナイロンネットフィルタ (孔径 11  $\mu\text{m}$ , Millipore 社製) を用いてろ過を行い、折れの進んでいない長いファイバーの除去を行った。調製したショートファイバーは倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus 社製) によって観察を行い、顕微鏡写真に基づいてショートファイバーの長さを測定した (n=100)。

#### 4.2.3 高分子ショートマイクロファイバーの面選択的機能化

超音波処理を用いて、高分子ショートマイクロファイバーの調製と、ショートマイクロファイバーの断面選択的な蛍光修飾を同時に行った。4.2.2 同様に、エレクトロスピンニング法により Poly(MMA-GMA)と PMMA からなるマイクロファイバーの紡糸を行った。ファイバー表面に存在する epoxy 基のブロッキングのために、紡糸したファイバーを蛍光修飾されたタンパク質溶液および Tris 塩酸塩緩衝液に浸漬させた後、2 mm 程度にカミソリの刃を用いて切断した。タンパク質溶液には、(i) FITC-BSA 溶液 (0.1 mg/ml in PBS)、または、(ii) TRITC-neutravidin 溶液 (0.1 mg/ml in PBS) を用いた。

(i) FITC-BSA でブロッキングしたショートファイバーについては、これを biotin hydrazide 溶液 (1 mM in 炭酸ナトリウム緩衝液) に加えて超音波処理を 3 時間行った。ただし、1 時間超音波処理を行った後、ナイロンネットフィルタ (孔径 11  $\mu\text{m}$ , Millipore 社製) を用いてろ過を行い、折れの進んでいない長いファイバーの除去を行った。この間に、ファイバーは短く折れてショートファイバーとなりながら、切断面に存在する epoxy 基と biotin hydrazide の amino 基が反応し、断面に biotin 修飾がなされる。十分に洗浄した後、TRITC-neutravidin 溶液 (0.1 mg/ml in PBS) を加えて、断面の biotin と反応させた。この操作手順についてのイラストを Fig. 4-2 に示した。

(ii) TRITC-neutravidin でブロッキングしたショートファイバーについては、これを FITC-BSA 水溶液 (0.1 mg/ml in PBS) に加えて超音波処理を 3 時間行った。ただし、1 時間超音波処理を行った後、ナイロンネットフィルタ (孔径 11  $\mu\text{m}$ , Millipore 社製) を用いてろ過を行い、折れの進んでいない長いファイバーの除去を行った。この間に、ファイバーは



短く折れてショートファイバーとなりながら、切断面に存在する epoxy 基とそれぞれの蛍光修飾タンパク質の amino 基が反応し、断面に側面とは異なる蛍光修飾がなされる。

(i), (ii) により面選択的に修飾を行ったショートファイバーは、遠心分離法によって十分に洗浄を行った後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-KDM, Olympus 社製) を用いて観察を行った。

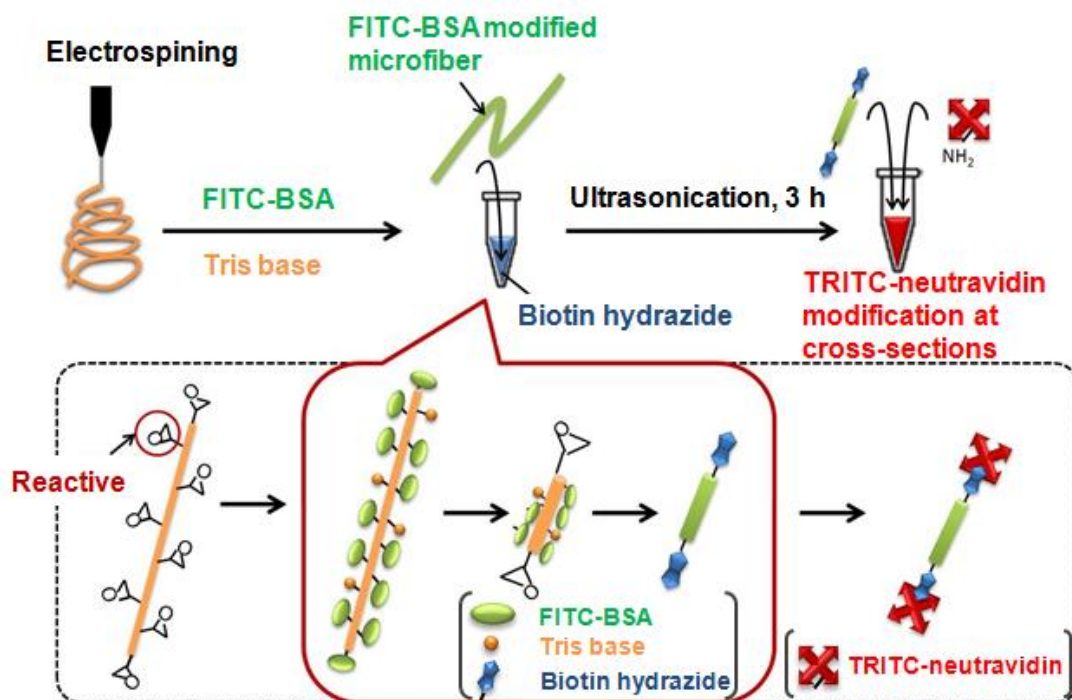


Fig. 4-2. Schematic of surface-selective modification for polymeric short microfibers.

#### 4.2.4 高分子ショートマイクロファイバーの空間的自己組織化

超音波処理によって調製した高分子ショートマイクロファイバーとマイクロ粒子を avidin と biotin の分子の相互作用によって構造化する検討を行った。具体的には、Fig. 4-3a に示すようなショートファイバー断面へ粒子が接着したダンベル型構造体の調製および、Fig. 4-3b に示すようなショートファイバー側面に粒子が接着した鈴なり型構造体の調製を行った。また、表面が機能化されていないショートファイバーでは構造化が起こらないこと (非構造化) の確認も行った (Fig. 4-3c)。

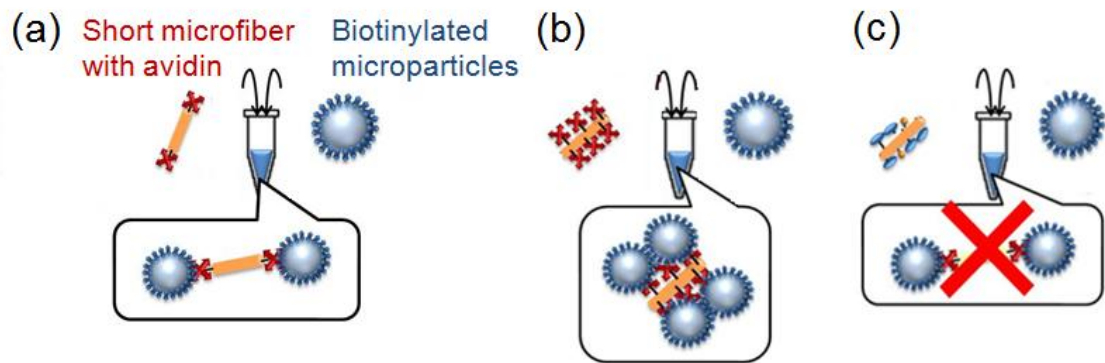


Fig. 4-3. Schematic of self-organization of polymeric short microfibers with polymeric microspheres. (a) Short microfibers with neutravidin-modified cross-sections. (b) Short microfibers with neutravidin-modified lateral surfaces. (c) Short microfibers without neutravidin-modification.

#### (1) ダンベル型構造体

4.2.3 同様に、エレクトロスピンニング法を用いて、Poly(MMA-GMA)とPMMA からなるマイクロファイバーの紡糸を行った。ファイバー表面に存在する epoxy 基のブロッキングのために、紡糸したファイバーを BSA 溶液 (0.1 mg/ml in PBS) および Tris 塩酸塩緩衝液に浸漬させた後、2 mm 程度にカミソリの刃を用いて切断した。さらに、ショートファイバー断面の avidin 修飾または biotin 修飾を行うための溶液に加えて超音波洗浄器 (VS-D100, アズワン社製) を用いて超音波処理を 3 時間行った。avidin 修飾には neutravidin 溶液 (0.1 mg/ml in PBS) を、biotin 修飾には biotin hydrazide 溶液 (1 mM in 炭酸ナトリウム緩衝液) を用いた。ただし、1 時間超音波処理を行った後、ナイロンメッシュフィルタ (孔径 11  $\mu\text{m}$ , ADVANTEC 社製) を用いてろ過を行い、折れの進んでいない長いファイバーの除去を行った。十分に洗浄を行ったショートファイバーを、biotin または neutravidin 表面修飾ポリスチレン粒子懸濁液 (100  $\mu\text{l/ml}$  in PBS) と一晚混合した。調製したダンベル型構造体の観察には、倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus 社製) および電界放出形走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) (JSM-7500F, 日本電子社製) を用いて観察を行った。FE-SEM に用いた試料は、オスミウムコータ (Neoc-STB, メイワフォーシス社製) を用いて 10 s, 10 mA の下で Os 蒸着した。

## (2) 鈴なり型構造体

4.2.3 同様に、エレクトロスピンニング法を用いて、Poly(MMA-GMA)と PMMA からなるマイクロファイバーの紡糸を行った。紡糸したファイバーを neutravidin 溶液 (0.1 mg/ml in PBS) に浸漬させて、epoxy 基と neutravidin 中の amino 基を反応によるファイバー表面の avidin 修飾を行った。これを 2 mm 程度にカミソリの刃を用いて切断後、PBS に加えて超音波洗浄器 (VS-D100, アズワン社製) を用いて超音波処理を 3 時間行った。ただし、1 時間超音波処理を行った後、ナイロンメッシュフィルタ (孔径 11  $\mu\text{m}$ , ADVANTEC 社製) を用いてろ過を行い、折れの進んでいない長いファイバーの除去を行った。十分に洗浄を行ったショートファイバーを、biotin 表面修飾ポリスチレン粒子懸濁液 (100  $\mu\text{l/ml}$  in PBS) と一晩混合した。調製した鈴なり型構造体の観察には、倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus 社製) および電界放出形走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) (JSM-7500F, 日本電子社製) を用いて観察を行った。FE-SEM に用いた試料は、オスミウムコータ (Neoc-STB, メイワフォーシス社製) を用いて 10 s, 10 mA の下で Os 蒸着した。

## (3) 非構造化

4.2.3 同様に、エレクトロスピンニング法を用いて、Poly(MMA-GMA)と PMMA からなるマイクロファイバーの紡糸を行い、ファイバー表面に存在する epoxy 基のブロッキングのために、紡糸したファイバーBSA 水溶液 (0.1 mg/ml in PBS) および Tris 塩酸塩緩衝液に浸漬させた後、2 mm 程度に切断した。これを PBS に加えて超音波洗浄器 (VS-D100, アズワン社製) を用いて超音波処理を 3 時間行った。ただし、1 時間超音波処理を行った後、ナイロンネットフィルタ (孔径 11  $\mu\text{m}$ , Millipore 社製) を用いてろ過を行い、折れの進んでいない長いファイバーの除去を行った。十分に洗浄を行ったショートファイバーを、biotin 表面修飾ポリスチレン粒子懸濁液 (100  $\mu\text{l/ml}$  in PBS) と一晩混合した。調製したダンベル型構造体の観察には、倒立型顕微鏡 (IX71, Olympus 社製) および電界放出形走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) (JSM-7500F, 日本電子社製) を用いて観察を行った。FE-SEM に用いた試料は、オスミウムコータ (Neoc-STB, メイワフォーシス社製) を用いて 10 s, 10 mA の下で Os 蒸着した。

### 4.3 結果および考察

#### 4.3.1 高分子ショートマイクロファイバーの評価

超音波処理によって調製した高分子ショートマイクロファイバーを観察した結果および、超音波処理における経時変化を観察した結果を Fig. 4-4, 4-5 に示す。

Fig. 4-4 より、超音波処理を用いた調製方法において 5~30  $\mu\text{m}$  の長さのショートファイバーが観察された。また Fig. 4-5 より、1 時間処理後には 5~2000  $\mu\text{m}$  の様々な長さのファイバーが観察された。ナイロンネットフィルタを用いてろ過すると、折れの進んでいない長いファイバーを除去することができ、残ったファイバー長さは 5~80  $\mu\text{m}$  となった。さらに、超音波処理を行うと、2 時間後には 5~50  $\mu\text{m}$ 、3 時間後には 5~30  $\mu\text{m}$  の長さのショートファイバーが得られた。この結果より、超音波処理時間によってショートファイバー長を制御可能であることが示唆された。以上より、PMMA 系のポリマーファイバーにおいては超音波処理によってショートファイバーとする方法は有効であると考えられる。

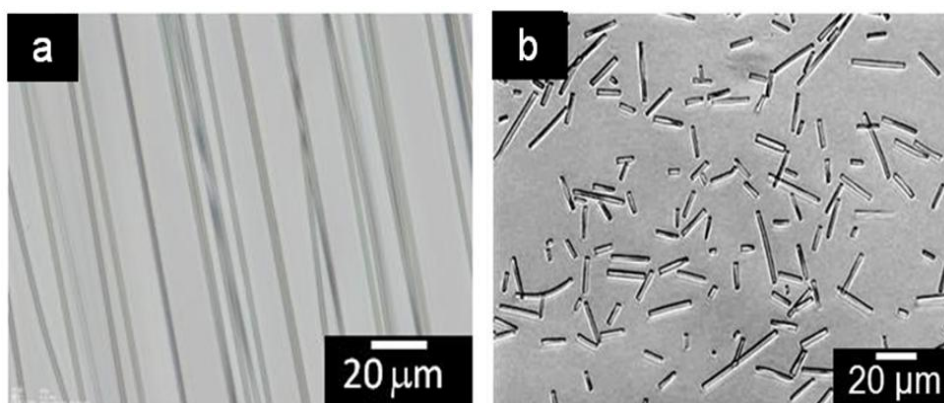


Fig. 4-4. Bright-field microscope images of electrospun polymeric microfibers (a) and polymeric short microfibers prepared by ultrasonication of electrospun polymeric microfibers (b).

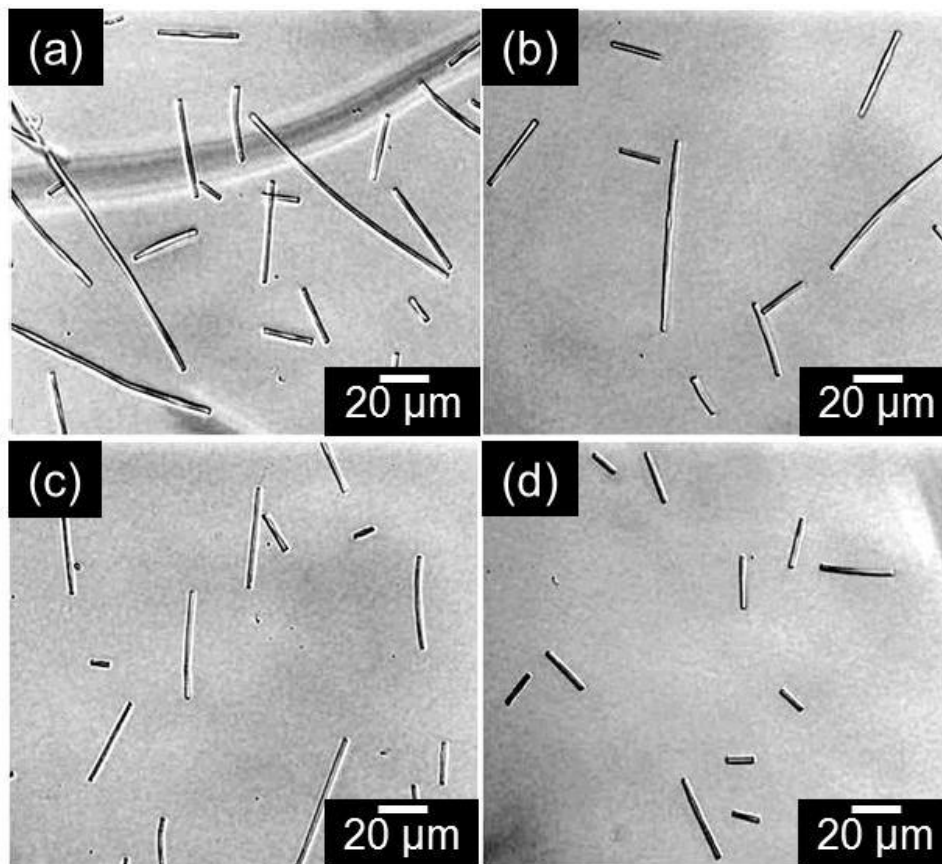


Fig. 4-5. Bright-field microscope images of electrospun polymeric microfibers ultrasonicated for 1 hr (a), after nylon net filtration (b), ultrasonicated for 2 hrs (c) and 3 hrs (d).

#### 4.3.2 高分子ショートマイクロファイバーの面選択的機能化

超音波処理を用いて高分子ショートマイクロファイバーの調製および、ショートファイバーの断面を選択的に蛍光修飾し、側面と断面にそれぞれ異なる蛍光修飾を行った。断面に TRITC-neutravidin および FITC-BSA 修飾を行った結果を Fig. 4-6, 4-7 に示す。

Fig. 4-6 では、ショートファイバー側面に緑色蛍光、断面に赤色蛍光が観察された。これより、側面に FITC-BSA、断面に TRITC-neutravidin をそれぞれ修飾することに成功したことが示唆される。ただし、赤色蛍光はショートファイバー側面にも多少観察でき、この原因については以下のように考察する。まず、光ファイバーとしても利用される PMMA は、光散乱の起こりやすい材料であるため、断面の蛍光が光散乱によって側面にも観察されてしまったのではないかと推測する。また、超音波処理によって側面のブロッキング剤であっ

た BSA がはがれてしまい、その欠陥部分に TRITC-neutravidin が反応し修飾されてしまったのではないかと考察する。

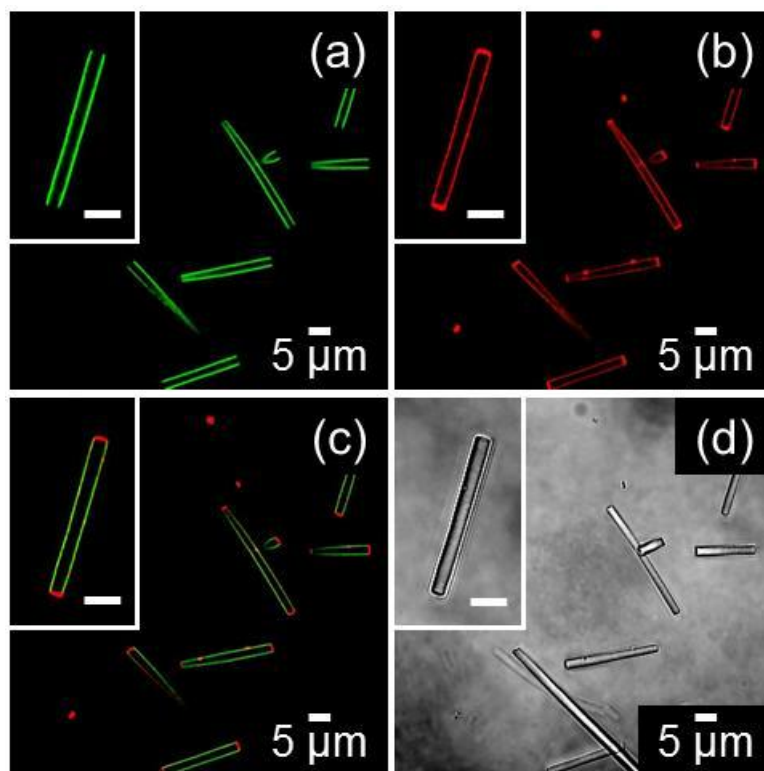


Fig. 4-6. CLSM image of polymeric short microfibers with surface-selective modification. (a) green fluorescence, (b) red fluorescence, (c) merged, (d) differential interference images.

Fig. 4-7 では、ショートファイバー側面に赤色蛍光、断面に緑色蛍光が観察された。これより、側面に TRITC-neutravidin、断面に FITC-BSA をそれぞれ選択的に修飾できたことが示唆される。しかし、緑色蛍光については側面にも多くの蛍光が観察された。この理由としては前述の通り、PMMA ファイバーの光散乱およびブロッキングの欠陥が考えられる。さらに、Fig. 4-6 と比較して多くの側面への緑色蛍光が観察されることから、ファイバー表面に修飾された TRITC-neutravidin への BSA の非特異的な吸着が考えられる。BSA の非特異的な吸着性が高いとすると、BSA をファイバー表面のブロッキング剤として用いた場合 (Fig. 4-6) においても、表面への BSA 修飾は epoxy 基との共有結合だけではなく、ファイバー表面との疎水性相互作用などの非特異的な吸着も起こっていたと考えられる。その結果、超

音波処理によって非特異吸着した BSA が剥がれて欠陥を作る原因となったのではないかと考察する。また、Fig. 4-6 の検討においては断面に biotin 修飾を行った後に TRITC-neutravidin を反応させているため、biotin と avidin の特異な相互作用によって、より多く断面に修飾がなされたのではないかと推測する。

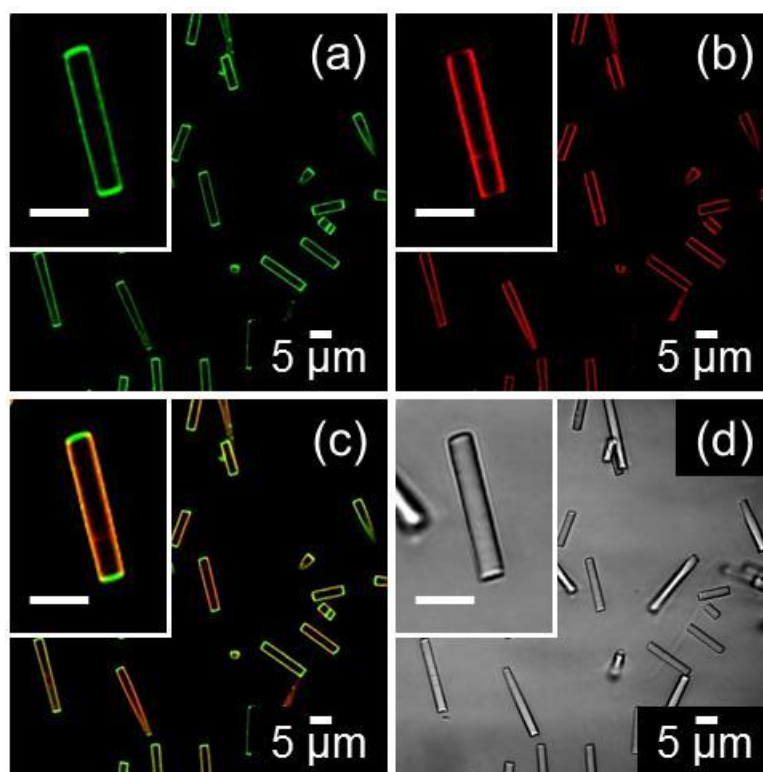


Fig. 4-7. CLSM image of polymeric short microfibers with surface-selective modification. (a) green fluorescence, (b) red fluorescence, (c) merged, (d) differential interference images.

#### 4.3.3 高分子ショートマイクロファイバーの空間的自己組織化

超音波処理を用いて面選択的にショートファイバーの修飾を行い、それとマイクロ粒子を用いて avidin と biotin の相互作用による構造化を行った。

##### (1) ダンベル型構造体

断面修飾ショートファイバーとマイクロ粒子によるダンベル型構造体を調製し、倒立型顕微鏡および FE-SEM を用いて観察を行った結果を Fig. 4-8, 4-9 に示す。Fig. 4-8 では

neutravidin で断面修飾したショートファイバーを用いた結果、Fig. 4-9 では biotin hydrazide で断面修飾したショートファイバーを用いた結果を示している。Fig. 4-8 より、多くのショートファイバー断面にマイクロ粒子の接着したダンベル型の構造体を確認することができた。顕微鏡写真から約 50 本のショートファイバー断面における粒子の被覆率を計算したところ、被覆率は約 70%と非常に高かった。

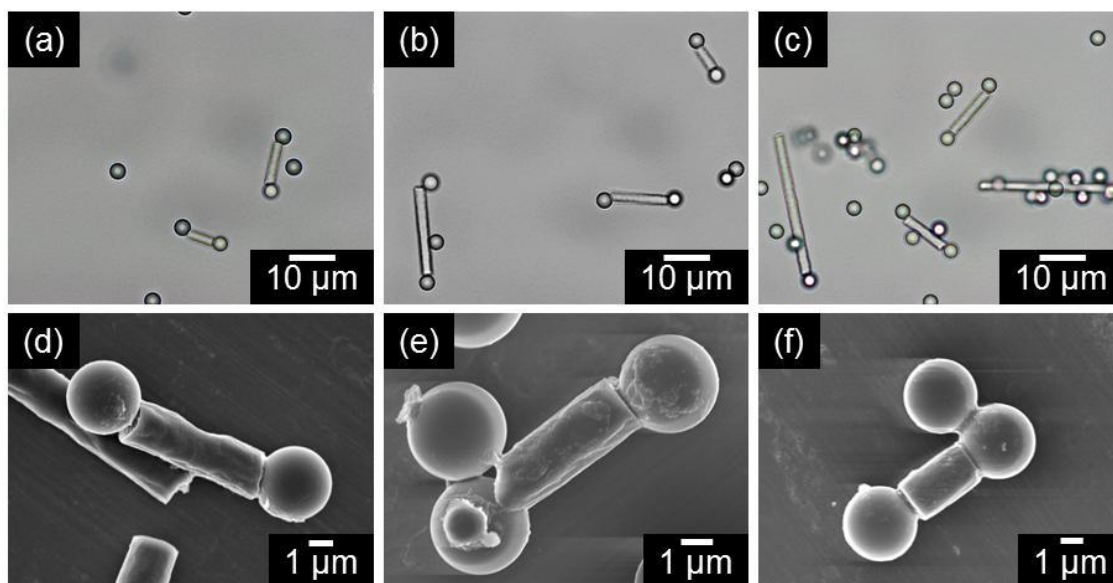


Fig. 4-8. (a,b,c) Bright field microscope images and (d,e,f) FE-SEM images of microstructures consisting of biotinylated polymeric microspheres and polymeric short microfibers with neutravidin-modified cross-sections.

一方、Fig. 4-9 より、biotin 断面修飾したショートファイバーを用いた場合はほとんどのショートファイバーにおいてマイクロ粒子の接着が観察されなかった。以上の結果より、ショートファイバー断面へ修飾される biotin および avidin 量は粒子表面の修飾量と比較して多くないと推測する。また、avidin は 1 分子で 4 つの biotin 分子と結合できるが、biotin 1 分子は avidin 1 分子中の 1 ユニットのみに結合できる。さらに biotin 分子は avidin 分子と比較しても小さい。それゆえ、biotin 断面修飾されたショートファイバーにおいては avidin 修飾粒子を十分に接着することができなかったのではないかと考える。反対に、avidin 断面修飾ショートファイバーにおいては、粒子と比較すると少ない修飾量であったとしても、1 分子で 4 つの biotin 分子を結合でき、また分子量 6 万と大きな分子であるため、接触した粒子と結



合し接着することができたと考察する。

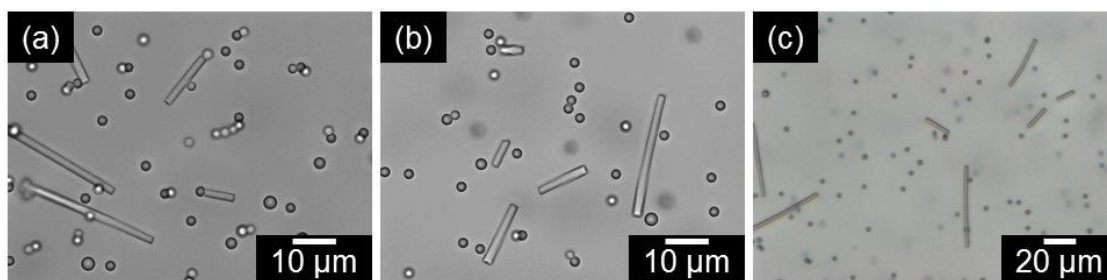


Fig. 4-9. Bright field microscope images of microstructures consisting of neutravidin-modified polymeric microspheres and polymeric short microfibers with biotin-modified cross-sections.

しかしながら、ここで Fig. 4-8b, c に着目すると、ショートファイバー側面にも粒子が接着しており、ショートファイバー側面に avidin 分子が存在して biotin 粒子と結合した、または biotin 粒子の非特異的な接着である可能性が示唆された。そこで、これら構造体懸濁液に対して 1~10 分程度の超音波処理を行ったところ、片断面のみに粒子の接着したマッチ型構造や、粒子接着のない短いショートファイバーが多く観察されるようになったものの、側面への粒子接着は抑制された。このことより、大部分の側面接着は粒子の非特異的な接着であったことが示唆される。ショートファイバー断面に用いた neutravidin が洗浄操作では完全に除去できず、粒子と混合時にも未反応の neutravidin が存在すると考えられ、これが粒子表面へ結合し、さらに neutravidin は前述の通り BSA との相互作用も起こりやすく、結果として粒子が BSA で修飾されたファイバー側面へ非特異的に接着したのではないかと推測する。混合後に粒子の凝集が観察されたことも、未反応の avidin の存在を示唆している。また、マッチ型構造体やより短いショートファイバーが観察された原因は、ダンベル型構造体に対して超音波処理を行ったために、ファイバーがさらに折れてマッチ型になったり、粒子の接着のない短いファイバーになったりしたと考察する。

## (2) 鈴なり型構造体

側面修飾ショートファイバーとマイクロ粒子による鈴なり型構造体を調製し、倒立型顕微鏡およびFE-SEMを用いて観察を行った結果をFig. 4-10に示す。Fig. 4-10より、ショートファイバーの側面にマイクロ粒子の接着した鈴なり型構造体が多数観察された。断面への粒子接着がほとんどないことから、側面に修飾された neutravidin と粒子表面の biotin の相互作用によって、結合していると推測する。また、この検討においては超音波処理中に avidin 修飾等を行っていないため、粒子と混合した際に未反応の avidin 分子が残っている可能性は非常に低く、それゆえこの側面への粒子接着は、前述のダンベル型構造体調製で起こったような avidin と BSA 相互作用による非特異的な接着ではないと考察する。

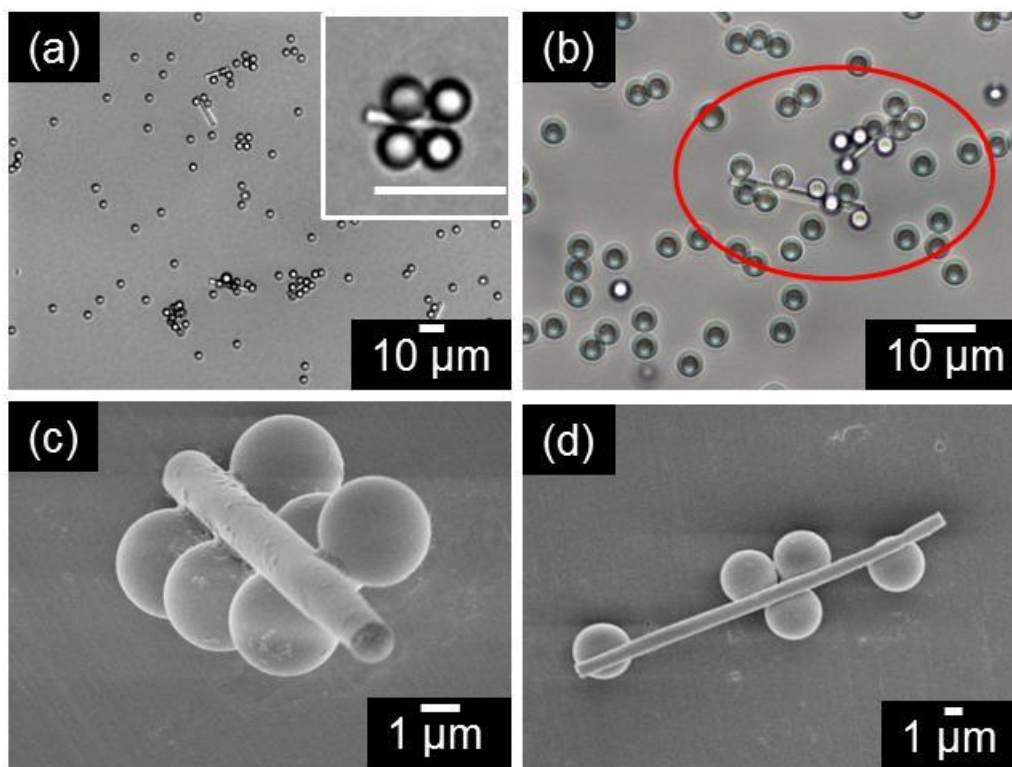


Fig. 4-10. (a,b) Bright field microscope images and (c,d) FE-SEM images of microstructures consisting of biotinylated polymeric microspheres and polymeric short microfibers with neutravidin-modified lateral surfaces.

### (3) 非構造化

前述の通り、超音波処理を用いて断面または側面を avidin 修飾したショートファイバーと biotin 表面修飾したマイクロ粒子による、ダンベル型あるいは鈴なり型の構造体の調製に成功した。これは avidin と biotin の分子の特異的な相互作用による構造化であると推測するが、それを証明するために BSA によるブロッキング修飾のみのショートファイバーを調製し、これを粒子と混合して構造化が起こらないことを確認した。その結果を Fig. 4-11 に示す。Fig. 4-11 より、どのショートファイバーにも粒子が接着していないことがわかる。この結果より、これまでのダンベル型構造体および鈴なり型構造体は avidin と biotin の特異的な相互作用によって構造化していたと考察される。

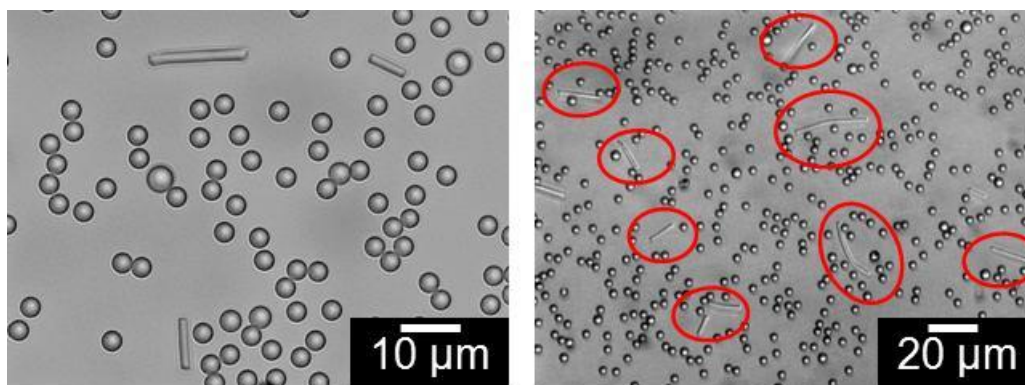


Fig. 4-11. Bright field microscope images of microstructures consisting of biotinylated polymeric microspheres and polymeric short microfibers without neutravidin-modification.

#### 4.4 結言

本章では、エレクトロスピンニング法により紡糸されたマイクロファイバーに超音波処理を施すことでショートマイクロファイバーとする、新規な高分子ショートマイクロファイバー調製技術の確立を行った。本手法は、これまで報告されていたショートファイバー調製技術よりも簡便かつ高効率という利点を有する。また本手法を用いることにより、ショートファイバーの面選択的機能化も可能であった。さらに、面選択的に修飾したショートファイバーを、**avidin** と **biotin** という分子の特異的な相互作用を利用してマイクロ粒子と自発的に構造化させることに成功した。これらの結果より、エレクトロスピンニング法および超音波処理により調製される高分子ショートマイクロファイバーは、表面への機能化および自発的な組織化・配列化が可能なことから、様々な分野に応用可能な高機能材料に成り得る。今後、電子基板への固定化や、各種材料と組み合わせたマイクロ精密構造体の形成など、より詳細な検討を行うことにより、電子材料や分析材料への応用が期待される。さらには、本技術とマイクロ化されたアクチュエータやセンサーとを組み合わせることにより、マイクロマシンを設計し駆動させることも可能になると期待される。

#### 4.5 参考文献

- 1) R.C. Nagarwal, S. Kant, P.N. Singh, P. Maiti, J.K. Pandit, Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery, *J. Control Release* 136 (2009) 2–13.
- 2) C. Grosse, A.V. Delgado, Dielectric dispersion in aqueous colloidal systems, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15 (2010) 145–159.
- 3) V. Wood, M.J. Panzer, J.M. Caruge, J.E. Halpert, M.G. Bawendi, V. Bulović, Air-stable operation of transparent, colloidal quantum dot based LEDs with a unipolar device architecture, *Nano Lett.* 10 (2010) 24–29.
- 4) R. Rhodes, S. Asghar, R. Krakow, M. Horie, Z. Wang, M.L. Turner, B.R. Saunders, Hybrid polymer solar cells: from the role colloid science could play in bringing deployment closer to a study of factors affecting the stability of non-aqueous ZnO dispersions, *Colloids Surf. A* 343 (2009) 50–56.
- 5) S. Mitragotri, J. Lahann, Physical approaches to biomaterial design, *Nat. Mater.* 8 (2009) 15–23.
- 6) J.W. Yoo, N. Doshi, S. Mitragotri, Endocytosis and intracellular distribution of PLGA particles in endothelial cells: effect of particle geometry, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 142–148.
- 7) P. Decuzzi, M. Ferrari, The receptor-mediated endocytosis of non-spherical particles, *Biophys. J.* 94 (2008) 3790–3797.
- 8) H.C. Shum, A.R. Abate, D. Lee, A.R. Studart, B. Wang, C.H. Chen, J. Thiele, R.K. Shah, A. Krummel, D.A. Weitz, Droplet microfluidics for fabrication of non-spherical particles, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 108–118.
- 9) A. Misra, M.W. Urban, Acorn-shape polymeric nano-colloids: synthesis and self-assembled films, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 119–127.
- 10) R. Haghgooeie, M. Toner, P.S. Doyle, Squishy non-spherical hydrogel microparticles, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 128–134.
- 11) A. Perro, S. Reculosa, S. Ravaine, E. Bourgeat-Lami, E. Duguet, Design and synthesis of Janus micro-and nanoparticles, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 3745–3760.
- 12) A. Walther, A.H.E. Muller, Janus particles, *Soft Matter*. 4 (2008) 663–668.
- 13) F. Wurm, A.F.M. Kilbinger, Polymeric Janus particles, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 8412–8421.

- 14) S.M. Yang, S.H. Kim, J.M. Lim, G.R. Yi, Synthesis and assembly of structured colloidal particles, *J. Mater. Chem.* 18 (2008) 2177–2190.
- 15) S. Jiang, Q. Chen, M. Tripathy, E. Luijten, K.S. Schweizer, S. Granick, Janus particle synthesis and assembly, *Adv. Mater.* 22 (2010) 1060–1071.
- 16) A.B. Pawar, I. Kretzschmar, Fabrication, assembly, and application of patchy particles, *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 150–168.
- 17) D. Dendukuri, P.S. Doyle, The synthesis and assembly of polymeric microparticles using microfluidics, *Adv. Mater.* 21 (2009) 4071–4086.
- 18) S.C. Glotzer, M.J. Solomon, Anisotropy of building blocks and their assembly into complex structures, *Nat. Mater.* 6 (2007) 557–562.
- 19) J. Yoon, Y.S. Jung, J.M. Kim, A combinatorial approach for colorimetric differentiation of organic solvents based on conjugated polymer-embedded electrospun fibers, *Adv. Funct. Mater.* 19 (2009) 209–214.
- 20) K.J. Lee, W.K. Oh, J. Song, S. Kim, J. Lee, J. Jang, Photoluminescent polymer nanoparticles for label-free cellular imaging, *Chem. Commun.* 46 (2010) 5229–5231.
- 21) J.Y. Hong, E. Kwon, J. Jang, Fabrication of silica/polythiophene core/shell nanospheres and their electrorheological fluid application, *Soft Matter.* 5 (2009) 951–953.
- 22) J. Jang, Conducting polymer nanomaterials and their applications, *Adv. Polym. Sci.* 199 (2006) 189–259.
- 23) Z. Nie, W. Li, M. Seo, S. Xu, E. Kumacheva, Janus and ternary particles generated by microfluidic synthesis: design, synthesis, and self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 9408–9412.
- 24) D. Dendukuri, D.C. Pregibon, J. Collins, T.A. Hatton, S.D. Patrick, Continuous-flow lithography for high-throughput microparticle synthesis, *Nat. Mater.* 5 (2006) 365–369.
- 25) D. Dendukuri, T.A. Hatton, S.D. Patrick, Synthesis and self-assembly of amphiphilic polymeric microparticles, *Langmuir* 23 (2007) 4669–4674.
- 26) K.W. Bong, K.T. Bong, D.C. Pregibon, P.S. Doyle, Hydrodynamic focusing lithography, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 87–90.
- 27) W.S. Tan, C.L. Lewis, N.E. Horelik, D.C. Pregibon, P.S. Doyle, H. Yi, Hierarchical assembly of

- viral nanotemplates with encoded microparticles via nucleic acid hybridization, *Langmuir* 24 (2008) 12483–12488.
- 28) S. Bhaskar, J. Hitt, S.-W.L. Chang, J. Lahann, Multicompartmental microcylinders, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 4589–4593.
- 29) S. Saha, D. Copic, S. Bhaskar, N. Clay, D. Alessandro, A.J. Hart, J. Lahann, Chemically controlled bending of compositionally anisotropic microcylinders, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2012) 660–665.
- 30) A. Stoiljkovic, S. Agarwal, Short electrospun fibers by UV cutting method, *Macromol. Mater. Eng.* 293 (2008) 895–899.
- 31) O. Kriha, M. Becker, M. Lehmann, D. Kriha, J. Krieglstein, M. Yosef, S. Schlecht, R.B. Wehrspohn, J.H. Wendorff, A. Greiner, Connection of hippocampal neurons by magnetically controlled movement of short electrospun polymer fibers – a route to magnetic micromanipulators, *Adv. Mater.* 19 (2007) 2483–2485.
- 32) J.-Y. Wang, Y. Wang, S.S. Sheiko, D.E. Betts, J.M. DeSimone, Tuning multiphase amphiphilic rods to direct self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 5801–5806.
- 33) O. Kriha, P. Göring, M. Milbradt, S. Agarwal, M. Steinhart, R. Wehrspohn, J.H. Wendorff, A. Greiner, Polymer tubes with longitudinal composition gradient by face-to-face wetting, *Chem. Mater.* 20 (2008) 1076–1081.

## 第5章 結論

本研究では、エレクトロスプレー/スピニング法による新規マイクロ構造体の開発を目的とし、3つのテーマについて検討を行った。

第2章では、同軸エレクトロスプレー法を用いて MPC ポリマー被覆リン酸カルシウムマイクロカプセルの開発を行った。本手法により単分散なマイクロカプセルが得られ、容易にサイズコントロールも可能であった。また、MPC ポリマーの被覆により効果的にマイクロカプセル表面へのタンパク質吸着を抑制した。さらに本手法は、様々な芯物質を高効率にマイクロカプセル中に内封することが可能であった。また、biotin 修飾 MPC ポリマーを被覆することで、標的タンパク質である avidin のみを選択的にマイクロカプセル表面に固定化できることも示された。

第3章では、同軸エレクトロスプレー法およびテンプレート法を用いて MPC ポリマー膜から成るベシクルの開発を行った。本手法により単分散なベシクルが得られ、容易にサイズコントロールも可能であった。さらに、MPC ポリマーベシクルは比較的高分子量の物質を保持することが可能であることがわかり、ベシクル内に細胞を活性を損なうことなく内封し培養することも可能であった。

第4章では、エレクトロスピンニング法を用いた高分子ショートマイクロファイバーの調製および機能化を行った。エレクトロスピンニング法により紡糸されたマイクロファイバーに超音波処理を施すことでショートマイクロファイバーとする、簡便かつ新規な調製技術を確立した。また、本手法を用いることでショートファイバーの断面を選択的に機能化することも可能であった。さらに、面選択的に修飾したショートファイバーを、avidin と biotin 間の分子認識を介してマイクロ粒子と自己組織化させることにも成功した。

最後に、比較的単純なシステムからなるエレクトロスプレー/スピニング法は、連続オペレーション化が可能な魅力的技術であり、ナノ/マイクロテクノロジーの重要なツールとなる可能性を秘めた技術である。今後、エレクトロスプレー/スピニング法が高度な機能を有するナノ/マイクロ構造体材料調製技術として確立されることを期待したい。



## 論文目録

### 第2章

T. Matsuura, T. Maruyama, Calcium phosphate-polymer hybrid microparticles having functionalized surfaces prepared by a coaxially electro spray technique, *Colloids Surf. A* 526 (2017) 64-69.

### 第3章

T. Matsuura, T. Maruyama, Hollow phosphorylcholine polymer vesicles prepared by a coaxial electro spray technique, *Colloid Polym. Sci.* 295 (2017) 1251-1256.

### 第4章

T. Matsuura, E. Tsuchiya, Y. Fukui, T. Maruyama, Electrospun polymeric short microfibers with surface-selective functionalization, *Colloid Polym. Sci.* 296 (2018) 239-244.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始有益なる御指導と御助言を頂きました神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻の丸山達生准教授に深く感謝の意を表します。

本論文を作成するにあたり、御指導と御助言を頂きました神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻の西野孝教授、荻野千秋教授に深く感謝致します。

共焦点レーザー顕微鏡の使用に関して御世話になりました神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻の南秀人准教授に感謝致します。また、酵母を御提供頂いた同専攻の田中勉准教授に感謝致します。

実験室や装置の使用法など親身に御教示くださいました神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻界面材料工学研究室の皆様方に厚く御礼申し上げます。

最後に、終始温かく見守ってくれました家族に感謝致します。

神戸大学博士論文「エレクトロスプレー/スピニング法による新規マイクロ構造体の開発」

全 70 頁

提出日 2018 年 1 月 16 日

本博士論文が神戸大学機関リポジトリ **Kernel** にて掲載される場合、掲載登録日（公開日）はリポジトリの該当ページ上に掲載されます。

© 松浦 哲也

本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製・転載・翻訳することを禁じます。