

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21384

研究課題名(和文) 真球ナノ粒子の形状変換法の確立と2次元相互作用を活用した医用展開

研究課題名(英文) Deformation of spherical nanoparticles to disk-shaped particles and their two-dimensional interactions for biomedical applications

研究代表者

岡村 陽介 (OKAMURA, Yosuke)

東海大学・工学部・准教授

研究者番号：40365408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高分子微粒子は高分子溶液を用いた乳化法やモノマーからの不均相重合法で調製される。得られる微粒子は、通常熱力学的に安定な真球形態のため、粒子同士あるいは界面とは点接触反応(1次元相互作用)となる。ディスク形態のように面をもつ構造体であれば、目的界面と面接触(2次元相互作用)できるため、反応性の向上等、特異な機能発現が期待できる。本研究では、既存の真球微粒子を熱プレスにて変形させディスクとする簡易調製法を確立し、2次元相互作用を活用したユニークな特性(界面接着性の向上、内包物の放出挙動の制御、凝集性の向上)を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Polymer particles with the diameters ranging from nanometer to micrometers are conventionally prepared by an emulsion of polymer solution and polymerization of monomer, etc. The obtained particles are contacted with the various surfaces and particles themselves via point-contact interactions due to the spherical shape. We herein propose a fabrication procedure of disk-shaped particles deformed by a hot-press technique, and their applications using two-dimensional interactions. The glass transition temperature of the polymers and the pressure at 10 MPa in hot-press process were important parameters to deform spheres to disks. Furthermore, we demonstrated that the unique properties of the disk-shaped particles were induced by their two-dimensional interactions, e.g. high adhesiveness to the surfaces, controlled release of encapsulating materials, and high aggregation between disks.

研究分野：生体材料学

キーワード：ナノ粒子 ディスク 形状変換 接着性 薬剤放出特性 凝集反応

## 1. 研究開始当初の背景

近年のナノテクノロジー研究分野において、ナノ寸法に制御した高分子構造体が脚光を浴びている。ナノ粒子はその代表例であり、ナノ寸法ゆえに比表面積( $m^2/g$ )が増大するため、単位重量あたりの表面反応効率は格段に向上する。水に分散可能な高分子ナノ粒子は、モノマーの不均相重合法(乳化重合、懸濁重合、分散重合等)や高分子溶液を界面活性剤中で分散させる乳化法(oil-in-water 等)で調製され、サイズは任意に制御(数十 nm - 数百  $\mu m$ )できる。しかし、界面自由エネルギーが最小になるよう熱力学的に安定な真球となるのが通例であるため、粒子同士あるいは粒子と界面の反応は点接触(1次元相互作用)となる。仮に面をもつ粒子(ディスク状)に設計できれば、互いに面接触(2次元相互作用)できるため、反応性の向上等、ユニークな機能発現に繋がる。これまで、真球以外の異形粒子として紐状構造体(脂質<sup>[1]</sup> or 蛋白質<sup>[2]</sup>)ナノチューブ、紐状ミセルを鋳型にして合成する高分子電解質ロッド<sup>[3]</sup>等が提案されているが、いずれも面をもたず線接触の1次元相互作用に頼る形状である。最近、真球粒子表面でモノマーを反応させるシード分散重合法(オクタン存在下)によってディスク<sup>[4]</sup>を調製する画期的な手法が報告された。しかし重合の特性上、ディスク径や膜厚を任意に制御することは難しい。

参考文献[1] Shimizu T. *et al. Chem. Rev.* **105**, 1401-43 (2005), [2] Komatsu T. *Nanoscale* **4**, 1910-8 (2012), [3] Takeda M, *et al. Langmuir* **27**, 1731-8 (2011), [4] Fujibayashi T. *et al. Langmuir* **23**, 7958-62 (2007).

## 2. 研究の目的

本研究では、既存の真球微粒子を熱プレスにて変形させディスクとする簡易調製法を提案し、2次元相互作用を活用したユニークな特性(界面に対する接着性、内包物の放出特性、分散体の凝集性等)を検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) 真球微粒子の調製法

蛍光標識されたポリスチレン(PS)微粒子(1.0  $\mu m\phi$ ,  $E_x=441$  nm,  $E_m=486$  nm)は Polysciences 社から購入した。生分解性ポリマー(PLLA, PLGA)からなる微粒子は、膜乳化法(内圧式マイクロキット: MN-20, SPG テクノ社製)で調製した。PLLA 溶液(10 mg/mL, 10 mL)あるいは PLGA 溶液(50 mg/mL, 10 mL)を分散相とし、Shirasu Porous Glass(SPG)膜(細孔径: 1.1 or 10  $\mu m\phi$ )に圧入(4-100 kPa)して連続相(ポリビニルアルコール: PVA, 10 mg/mL, 190 mL, 攪拌速度: 1,000 rpm)に分散させた。その後、攪拌(800 rpm, r.t., 4 h)によりジクロロメタンを留去し、遠心分離により PLLA あるいは PLGA 微粒子を精製した。

### (2) ディスク状粒子の調製法

各種真球微粒子( $4 \times 10^6$  -  $5 \times 10^9$  particles/mL,

0.5 mL)をアルギン酸ナトリウム水溶液(Na-Alg, 20 mg/mL, 10 mL)に均一に分散させた後、塩化カルシウム水溶液( $CaCl_2$ , 20 mg/mL, 20 mL)を滴下してゲル化させた。粒子内包ゲルを純水にて洗浄後、小型熱プレス機(AH-2003, アズワン社製)にて熱プレス(r.t. - 120°C, 5 - 40 MPa)した。次いで、EDTA (0.1 M, 25 mL)にてゲルを溶解させ、遠心分離にてディスク状粒子分散液を精製した。走査電子顕微鏡(FE-SEM S-4800, 日立ハイテク社製)を用いてディスク状粒子を観察し、ディスク径を計測した。

### (3) 界面に対する接着性試験

ポリ-L-リジン(PLL, 1 mg/mL)を吸着させたガラス基板にカルボン酸導入ディスク状粒子あるいは真球微粒子を吸着させた(overnight, r.t.)。このガラス基板をフローチャンバーにセットし、空気を流入させた後の脱着挙動を蛍光顕微鏡にて撮影、解析した。

### (4) 内包物の放出挙動評価

薬剤モデルとして 3,3'-diethyl-oxa-carbocyanine iodide ( $DiOC_2$ )を内包した真球状およびディスク状 PLGA 粒子を調製した。これら分散体( $2 \times 10^5$  particles, 1.0 mL, 0.05% Triton x-100)を 37°C で攪拌し、一定時間ごとに粒子分散液(0.1 mL)を分取し、遠心分離(2,000 rpm, r.t., 1 min)により回収した上澄みを蛍光スペクトル測定に供した。また、真球およびディスク状粒子分散液( $2 \times 10^4$  particles, 3  $\mu L$ )をアルギン酸ゲル上にのせ、37°C でインキュベートした。その後、EDTA-2Na (0.1 M, 2 mL)にてゲルを溶解させ、遠心分離(3,500 rpm, 4°C, 10 min)により上澄みを回収し蛍光スペクトル測定に供した。

### (5) 凝集反応試験

ウシ血清アルブミン(BSA)をモデル蛋白質とした。球状及びディスク状粒子に BSA (in PBS, pH 7.4, 20 mg/mL, 0.2 mL)を添加し攪拌した(r.t., 2 h)。その後、遠心分離(14,000 rpm, 4°C, 10 min)により粒子を PBS で洗浄し、BSA 修飾球状及びディスク状粒子分散液を精製した。得られた BSA 修飾粒子分散液( $1 \times 10^8$  particles/mL, 167  $\mu L$ )に glutaraldehyde(GA, 25% solution, 33  $\mu L$ )を加え、目視による凝集判定およびマイクロプレートリーダー(SH-9000, コロナ電子社製)を用いた透過率測定を行った(測定波長 800 nm, 25°C)。また、粒子の凝集塊を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

## 4. 研究成果

### (1) ディスク状粒子の調製と物性

Na-Alg 水溶液に PS 微粒子を滴下し均一に分散させた後、 $CaCl_2$  水溶液を滴下して Ca-Alg ゲルを調製した。得られたゲルを小型熱プレス機にて熱プレス(110°C, 10 MPa, 30 s)した後、EDTA にてゲルを溶解し、遠心分離

にて精製した。分散体を走査電顕にて観察したところ、熱プレス前の真球微粒子と比較して、粒径が増大したディスク状粒子が観察された。断面観察もその結果を支持した。微粒子をゲルに包埋せず基板上に展開し加熱処理すると変形するが、微粒子同士の融合が起こるため、Ca-Alg ゲルは微粒子の融合を回避するマトリックスとして重要であった。従って、熱プレスにて PS 微粒子をディスク状に変形させる簡便な手法を確立した。

熱プレス条件を検討した。圧力を一定(10 MPa)としてプレスしたところ、温度が 100°C 以下では PS 微粒子は変形せず、プレス前の粒径(1015 ± 3 nm)と同等であった。そこで 110°C でプレスしたところ、確実にディスク状へと変形した(1665 ± 38 nm)。これは、PS のガラス転移温度( $T_g$ )付近に相当する。次に、プレス温度を一定(110°C, 30 s)とし圧力を変化させたところ、粒径は圧力に依存して増大しディスク状へと変形した。特に 10 MPa 時では 1665 ± 38 nm と顕著に増大し、20 MPa 以上ではほぼ定値となった。この条件は、PS 微粒子に限らず PLLA 微粒子(粒径: 1.1 μm,  $T_g$  付近: 60°C)あるいは PLGA 微粒子(粒径: 37.6 μm,  $T_g$  付近: 55°C)にも適応できることを確認した。以上の結果より、ディスク状粒子を調製する熱プレス条件(圧力: 10 MPa, 温度: 粒子の  $T_g$  付近)を決定した。さらに、ディスク径は、使用する微粒子の粒径で制御可能であることも実証した。

#### (2) 界面に対する接着性の向上

PLL を吸着させたカチオン表面にカルボキシル基導入 PS 真球微粒子あるいはディスク状粒子を吸着させたところ、両者の吸着数はほぼ同程度であった (それぞれ  $(8.9 \pm 2.9) \times 10^3$ ,  $(9.9 \pm 2.6) \times 10^3$  particles/mm<sup>2</sup>)。そこで、両基板に空気を流入させたところ、真球微粒子の大半は脱着したのに対し(脱着率:  $92.9 \pm 3.7\%$ )、ディスク状粒子の吸着状態は維持されていた(脱着率:  $4.8 \pm 1.4\%$ )。これは、面を有するディスクと界面の 2 次元相互作用に伴い接着性が増大したためと考察でき、粒子をディスクに変形するだけで高い接着性を発現するユニークな特性を明らかにした。

#### (3) 内包物の放出速度の制御

生分解性ポリマー(PLGA)からなる真球微粒子を調製し、加熱プレス法を用いてディスクに変形させた。このとき、薬剤を想定した蛍光色素(DiOC<sub>2</sub>)の内包率は変形後も維持されていた(ディスク: ca. 0.20%, 微粒子: ca. 0.23%)。そこで、生体表面を模倣したゲル表面にディスクならびに真球微粒子を吸着させ経時的に DiOC<sub>2</sub> の放出を測定したところ、前者の放出速度は後者と比較して顕著に加速した。これは、ゲル界面に対する接触面積が増大したためと考えられる。以上より、微粒子の形状によって内包物質放出挙動を制御できることを実証し、新しい薬物運搬用担

体として応用できる可能性を見出した。

#### (4) 凝集反応の向上

モデル蛋白質として BSA を球状及びディスク状粒子表面に吸着させ、GA による BSA の架橋反応を介した粒子の凝集反応を検討した。球状粒子分散液に GA 水溶液を添加し攪拌したところ、約 5 分後に凝集塊が観察された。このとき、反応 30 分後の透過率は 16% から 30% に増加した。一方、ディスク状粒子では、GA 水溶液添加後、約 30 秒で凝集塊が確認され、球状粒子のそれより目視で判定できる大きな塊となった。透過率測定においても 19% から 46% に増加した。また、凝集反応 30 秒後の凝集塊を共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、球状粒子では最密充填様に凝集していたが、ディスク状粒子では嵩が増した状態に凝集していた。以上より、粒子形状を球状からディスク状にするだけで粒子同士の凝集反応が顕著に促進されることを実証した。この知見は、新しい凝集比濁用担体として応用できる可能性を秘めており、現在、抗原抗体反応に置き換えて検証している。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 10 件)

- (1) 岡村 陽介. 生分解性超薄膜の創製と貼るナノ材料としての医用展開. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 (2016.11.21-22, 福岡国際会議場, 福岡)
- (2) Okamura, Y., and Nagase, Y. Fabrication of Freestanding Bio-friendly Nanosheets and Their Biomedical Applications. International Symposium on Integrated Molecular/Materials Science and Engineering (IMSE2016) (2016.10.13-16, Qingdao, China)
- (3) 中川 篤, 岡村 陽介. 生分解性高分子からなるディスク状粒子の調製とユニークな薬剤放出特性. 第 65 回高分子討論会 (2016.9.14-16, 神奈川大学, 横浜)
- (4) 岡村 陽介, 曾我部 大輝, 石倉 賢一, 中川 篤, 長瀬 裕. 真球微粒子を変形させて得るディスク状粒子の調製法と 2 次元相互作用の活用. 第 65 回高分子討論会 (2016.9.14-16, 神奈川大学, 横浜)
- (5) 岡村 陽介, 曾我部 大輝, 中川 篤, 長瀬 裕. 血小板様ディスク状粒子の調製と 2 次元相互作用を活用した接着挙動. 第 39 回日本バイオレオロジー学会年会 (2016.6.18-19, 東海大学校友会館, 千代田区).
- (6) 中川 篤, 岡村 陽介. 生分解性ディスク状粒子の調製法の確立とユニークな薬剤放出挙動. 第 39 回日本バイオレオロジー学会年会 (2016.6.18-19, 東海大学校友会館, 千代田区).
- (7) Sogabe, D., Nagase, Y., and Okamura, Y. Fabrication of disk-shaped particles induced

by hot-press process and their two-dimensional interactions for biomedical applications. PACIFICHEM2015 (2015.12.15-20, Hawaii convention center, Honolulu, USA)

- (8) 岡村 陽介, 曾我部 大輝, 中川 篤, 廣澤 彰英, 長瀬 裕. ディスク状粒子の新規調製法の確立と2次元相互作用を活用したユニークな特性. 第37回日本バイオマテリアル学会大会 (2015.11.9-10, 京都テルサ, 京都)
- (9) 岡村 陽介. 高分子ナノ・マイクロディスク ~ 新規製造法の提案と医療分野への挑戦 ~. イノベーションジャパン 2015 - 大学見本市 (2015.8.27-28, 東京ビックサイト, 江東区)
- (10) 曾我部 大輝, 長瀬 裕, 岡村 陽介. ディスク状粒子の簡易調製法の確立と2次元相互作用を利用した医用展開. 第64回高分子学会年次大会 (2015.5.27-29, 札幌コンベンションセンター, 札幌市)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: 異形高分子粒子の製造方法

発明者: 岡村 陽介, 長瀬 裕, 曾我部 大輝, 中川 篤

権利者: 学校法人東海大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-86663

出願年月日: 2015年4月21日

国内外の別: 国内

〔その他〕

(受賞)

岡村 陽介. 2016年度バイオマテリアル科学奨励賞, 日本バイオマテリアル学会, 生分解性超薄膜の創製と貼るナノ材料としての医用展開 (2016年11月21日, 本成果を一部含む)

(ホームページ)

東海大学マイクロ・ナノ研究開発センターホームページ (<http://www.mnc.u-tokai.ac.jp/>)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 陽介 (OKAMURA, Yosuke)

東海大学・工学部・准教授

研究者番号: 40365408

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

長瀬 裕 (NAGASE, Yu)

東海大学・工学部・教授

研究者番号: 40155932

中川 篤 (NAKAGAWA, Atsushi)

東海大学・マイクロナノ研究開発センター・特定研究員

曾我部 大輝 (SOGABE, Daiki)

東海大学大学院工学研究科・修士2年次生

石倉 賢一 (ISHIKURA, Kenichi)

東海大学工学部応用化学科・学部4年次生