

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008 年
 課題番号：19760537
 研究課題名（和文）超臨界流体の圧力誘起相分離法によるナノ粒子表面修飾と
 生体分子イメージングへの応用
 研究課題名（英文）Surface Modification of Nanoparticles for Bio-imaging
 Using Pressure-induced Phase Separation of Supercritical Fluids
 研究代表者
 松山 清 (MATSUYAMA KIYOSHI)
 福岡大学・工学部・助教
 研究者番号：40299540

研究成果の概要：超臨界および液体状態の二酸化炭素中での圧力誘起相分離法を利用したマイクロ・ナノ粒子の表面修飾技術について検討し、マイクロ・ナノ粒子の高分子による表面改質に成功した。また、高圧下でも利用可能な高出力型超音波分散装置を試作し、高圧状態の二酸化炭素雰囲気下においてもナノ粒子の分散が可能であることを示した。また、分光学的手法を用いて分子レベルでの二酸化炭素に対する高分子の溶解メカニズムについても明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・反応工学・プロセスシステム

キーワード：気・液・固・超臨界流体反応操作

1. 研究開始当初の背景

近年のナノテクノロジーの発展にともない、ナノ粒子が持つ特異性を利用した医療診断システムの開発が注目されている。特定の細胞に対して結合性や親和性を有する生体分子による表面処理等を施したナノ粒子を利用したガン、循環器系、脳神経系の各疾患の超早期画像診断を実現するための生体の分子イメージング技術は、21 世紀の新しい医療技術として近年急速に注目を浴びている。分子イメージング技術は、遺伝子・タンパク質・糖鎖・ペプチドなどの目的部位（生体内のガン細胞）と特異的に結合可能な分子で表

面処理を施したナノサイズの標識化合物を生体内に投与し、PET (ポジトロン断層撮影)、MRI (磁気共鳴イメージング)、超音波診断装置等を用いて画像診断により細胞の状態を観察しようとする手法であり、直径数ミリの超早期ガン細胞でさえ発見が可能である。このため、分子イメージング技術は、悪性腫瘍やアルツハイマー病等の難病疾患の早期発見とそれらに必要とされる莫大な医療費の有力な抑制法と期待されている。また、このような状況の中、新たな医療機器技術による新産業の開発のための最重要課題の一つとして、分子イメージングは期待されている。

これら分子イメージングを利用した各疾患の超早期画像診断法を実用化するには、目的部位に対して特異的に結合や相互作用する遺伝子・タンパク質・糖鎖・抗体・ペプチドなどの生体分子で表面処理を施したナノサイズの微細構造の制御された標識化合物からなるナノ粒子の設計および製造法の開発が重要となる。標識物質として利用可能な複合ナノ粒子の製造方法として、有機溶媒-水系の液液界面における両親媒性分子の自己組織化機能を利用した手法が検討されている。しかし、これらの手法では、残留有機溶媒や液液界面における界面張力による微細構造の崩壊や生体分子の失活、液体溶媒に起因するナノ粒子同士の癒着や凝集が問題となり、ナノ粒子が有するポテンシャルを十分に発揮する微細な構造を達成することは困難な場合が多い。

2. 研究の目的

本研究では、グリーンケミストリーを具現化するための機能性溶媒としても注目されている超臨界および液体二酸化炭素 (CO₂) を用いることで、分子イメージングに利用可能なナノレベルでの微細構造が制御された細胞認識型の表面修飾ナノ粒子の製造法について検討する。これら微細構造が制御された表面修飾ナノ粒子の形成に、通常の液体溶媒に比べ大きな拡散係数、低粘性・低界面張力 (ナノ構造の崩壊の抑制因子) を有する超臨界二酸化炭素中で形成される分子集合体創製技術と超臨界二酸化炭素の圧力誘起相分離法を組み合わせた表面修飾ナノ粒子の合成技術を利用する。

超臨界 CO₂ を用いた分子イメージングに利用可能なナノレベルでの微細構造が制御された細胞認識型の表面修飾ナノ粒子の製造法に関する基礎的な知見を得るために、1) 圧力誘起相分離法を利用したマイクロ・ナノ粒子の表面改質、2) 高出力型超音波分散装置を有する高压反応装置を用いたナノ粒子の分散および表面修飾技術の開発、3) 数十 μm の光路長を有する赤外分光高压容器および可変体積型高压容器を用いた超臨界二酸化炭素に対する生体高分子などの溶解挙動の測定および分子レベルでの溶解メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 圧力誘起相分離法を利用したマイクロ・ナノ粒子の表面改質技術を確立するために、操作温度、圧力、組成などの巨視的な操作因子が粒子形状に及ぼす影響について検討した。表面修飾を施された粒子の表面を元素分析装置 (EPMA) 付き SEM により観察した。(2) 高出力型超音波分散装置を有する高压反応装置を試作し、高压流体中でのナノ粒子の

分散試験を試みた。濁度試験を行うことでナノ粒子の分散試験を試みた。さらに表面改質を施したナノ粒子を用いて、メチルメタクリレート (MMA) モノマーの擬分散重合を試み、超臨界 CO₂ 中での TiO₂ ナノ粒子の表面改質およびナノ粒子表面でのグラフト重合について検討した。

(3) 数十 μm の光路長を有する赤外分光高压容器および可変体積型高压容器を用いた超臨界 CO₂ に対する生体高分子などの溶解挙動の測定および分子レベルでの溶解メカニズムの解明を試みた。

4. 研究成果

(1) 圧力誘起相分離法を利用したマイクロ・ナノ粒子の表面改質

圧力誘起相分離法を利用して製造した PMMA 微粒子および PMMA により表面修飾を施したタルク粒子の SEM を図 1 に示す。CO₂ 膨張エタノール中に PMMA を均一に溶解させた後、減圧操作を施すことで平均粒子径約 1 μm の球形状の微粒子を得ることができた (図 1(a))。また、減圧速度を最適化することで、PMMA によりタルク表面をコーティングすることに成功した。得られた粒子の形状は、圧力誘起相分離の前後でほとんど変化しなかった (図 1(b, c))。しかしながら、減圧速度が速すぎると、エタノール中の PMMA の過飽和度が大きくなり、タルク粒子表面に PMMA の粒子が生成することがわかった (図 1(d))。

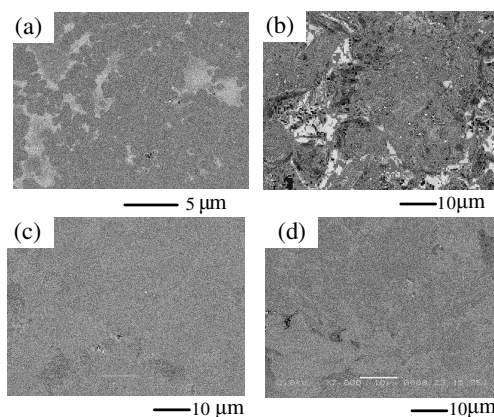


図 1 CO₂ 膨張エタノールの圧力誘起相分離を利用して生成した (a) PMMA 微粒子、(b) タルク原粉、(c) PMMA により表面処理したタルク粒子 (常圧乾燥)、(d) PMMA により表面処理したタルク粒子 (減圧乾燥)

さらに生成した PMMA により表面処理を施したタルク粒子の水中での分散試験および EPMA による表面分析の結果を図 2, 3 に示す。表面が親水性であるタルク粒子は、水中で良好に分散する (図 2(a)) のに対し、PMMA

処理を施したタルク粒子はほとんど水中で分散せず(図2(b))、PMMAによる表面処理によりタルクの表面特性が大きく変化していることがわかる。また、EPMAによる分析の結果、タルク表面にPMMA由来の炭素(C)の元素が多く存在することがわかる。

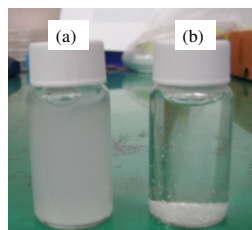


図2 タルク原粉(a)およびPMMAにより表面修飾したタルク(b)の水中での分散

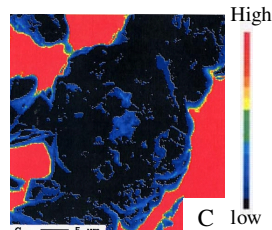
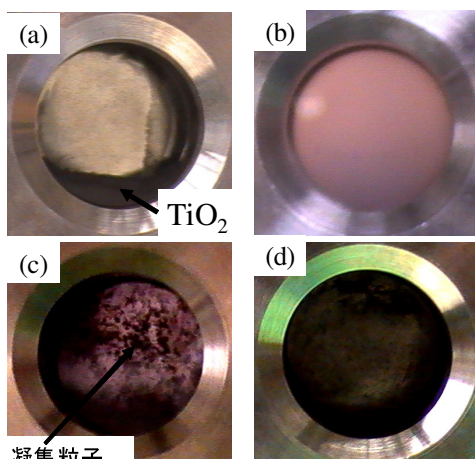


図3 PMMA表面修飾タルクのEPMAによる分析結果

2)高出力型超音波分散装置を有する高压反応装置を用いたナノ粒子の分散および表面修飾技術の開発

高压力型の超音波分散装置(ホーン型:最高出力750W)を高压装置に導入することで、超臨界および液体CO₂中でのナノ粒子(酸化チタン;平均一次粒子径90nm)の分散を試みた。図4に示すように超音波照射を行うことで、酸化チタンナノ粒子は液体CO₂においても分散可能であることがわかった(分散前図4(a),分散後図4(b))。また、超音波照射後の酸化チタン粒子の分散状態を図4(c,d)に示す。表面修飾を施していない酸化チタンは、二酸化炭素中において著しく凝集しているのに対し、シランカップリング剤により表面修飾を施した酸化チタンは二酸化炭素中において比較的分散していることがわかる。



凝集粒子
図4 液体CO₂における酸化チタンナノ粒子の分散状態、(a)超音波照射前、(b)超音波照射中、(c)超音波照射終了後(未修飾TiO₂)、(d)超音波照射終了後(シラン修飾TiO₂)

さらに濁度試験による酸化チタンの分散状態の評価を試みた。He-Neレーザー(λ=780nm)の透過率を測定することで、濁度を決定した。ただし、濁度τは次式で定義される。ここで、Lは光路長、I₀はレーザー光の入射光強度、Iは透過光強度を示す。

$$\tau = \frac{1}{L} \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (1)$$

超音波照射終了後の酸化チタンナノ粒子の分散特性を図5に示す。シラン(3-(trimethoxysilyl)propylmethacrylate)により表面修飾を施した酸化チタン(図5(a))は、未修飾酸化チタン(図5(b))に比べCO₂中(15 MPa, 313 K)にて、良好に分散することがわかった。

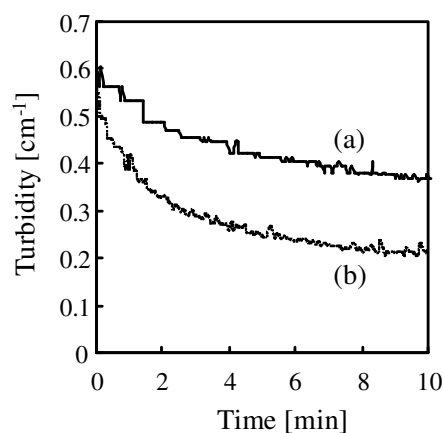


図5 二酸化炭素中(15 MPa, 313 K)における3-(trimethoxysilyl)propylmethacrylate表面修飾酸化チタン(a)および未修飾酸化チタン(b)の濁度試験

さらに分散した表面修飾酸化チタンを用いて超臨界二酸化炭素中でのMMAの擬分散重合を試みたところ、図6に示すような形状を有するPMMA-酸化チタンの複合粒子を界面活性剤を用いることなく得ることができた。

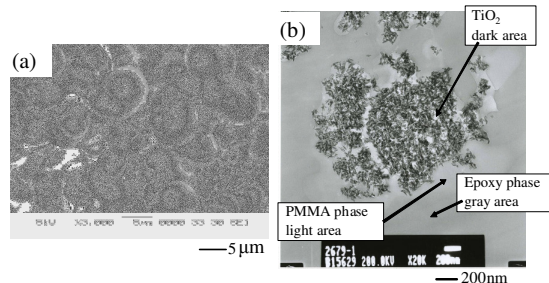


図6 3-(trimethoxysilyl)propylmethacrylateにより表面修飾した酸化チタン表面へのMMAのグラフト重合により生成したPMMA-TiO₂複合粒子のSEM(a)およびTEM(b)

FT-IR などを用いて複合粒子形成メカニズムを検討した結果、MMA モノマーが酸化チタン表面に吸着および化学結合し、酸化チタン表面でグラフト重合が進行していることがわかった。

(3)CO₂ 膨張エタノールに対する高分子の溶解挙動および分光学的手法による溶解メカニズムの解明

可変体積型の観察窓を有する高压容器を用いて、CO₂(1)+PMMA(2)+エタノール(3)系の相分離挙動の観察を試みた。CO₂濃度を变化させた場合の測定結果を図7に示す。

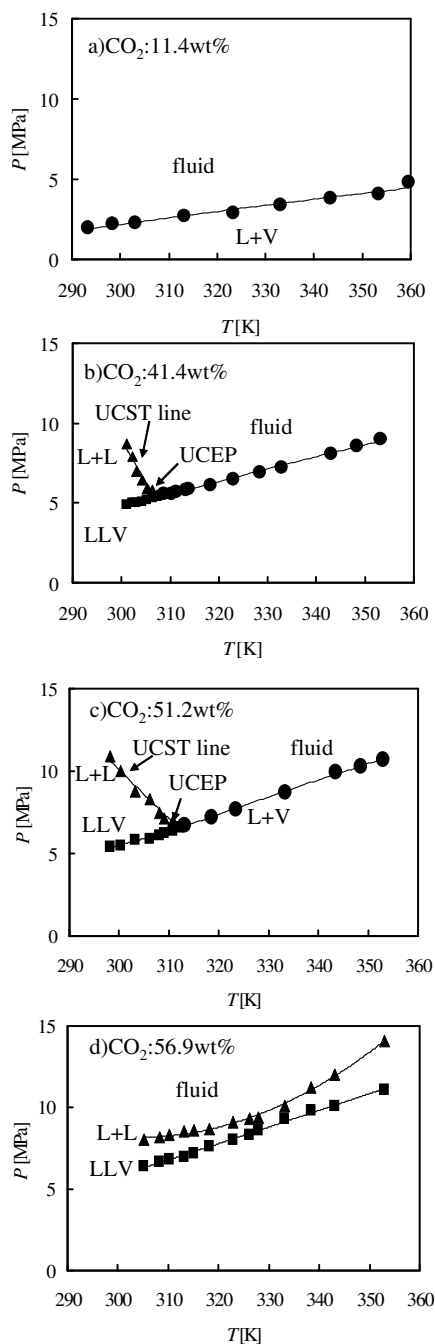


図7 CO₂ + PMMA-15k + エタノール系の相互

溶解度, (a) 11.4wt% CO₂ + 4.5wt% PMMA + 84.1wt% ethanol, (b) 41.4wt% CO₂ + 2.9wt% PMMA + 55.7wt% ethanol, (c) 51.2wt% CO₂ + 2.5wt% PMMA + 46.3wt% ethanol, (d) 56.9wt% CO₂ + 2.2wt% PMMA + 40.9wt% ethanol, ●:液相(L)→液相+気相(L+V), ▲:液相(L)→液相 1+ 液相 2(LL), ■:液相 1+ 液相 2(LL)→液相 1+ 液相 2+気相(LLV)

図7(a)に示すように、系内にCO₂を11.4wt%添加することで、ガス飽和した液相にPMMA-15k (4.5wt.%)が完全に溶解していることがわかる。さらに、CO₂の添加にとともに、UCST (Upper Critical Solution Temperature) およびUCEP (Upper Critical End Point) が出現する (図7(b))。さらに、CO₂を添加すると、UCEPは高温高压側にシフトし (図7(c))、やがて消滅することがわかった (図7(d))。

さらに、約60μmの光路長を有する赤外分光用高压容器を用いてCO₂膨張エタノールに対するPMMAの溶解メカニズムの解明を試みた。CO₂(1)+PMMA(2)+エタノール(3)系のFT-IRスペクトルを図8に示す。特に本研究では、1730cm⁻¹におけるPMMAのカルボニル基のC=O伸縮振動に着目した。図8(a)に示すように常温常圧下においてPMMAはエタノールに溶解することができないため、エタノールに浸したPMMAのC=O伸縮振動は、大気中でのPMMAの測定結果と比較して変化は見られない。しかしながら、CO₂を添加することで、PMMAはエタノール中に溶解し、1715cm⁻¹に新たなピークが確認できた (図8(b))。これは、CO₂の添加によりPMMAの可塑化が進行し、エタノールがPMMAのポリマー鎖中に進行することが可能となり、エタノールの水酸基とPMMAのカルボニル基とで水素結合が形成されたために出現したピークと考えられる。

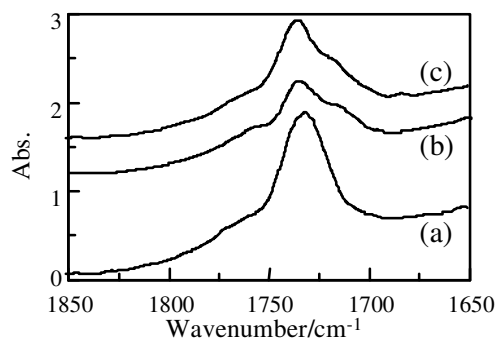


図8 CO₂膨張エタノール中におけるPMMAのC=O伸縮振動, (a)エタノールに浸したPMMA (40°C), (b) CO₂膨張エタノール中 (40°C, 6 MPa), (c)エタノールに溶解したPMMA (80°C)

エタノールに PMMA を加え、80°C程度まで加熱することでエタノール中に PMMA が溶解することも可能であるが、このときも加熱により PMMA の可塑性が進行し、エタノールの水酸基と PMMA のカルボニル基との水素結合に起因するピークが確認できる (図 8c)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① K. Matsuyama, K. Mishima, Preparation of Poly(methyl methacrylate)-TiO₂ Nanoparticle Composites by Pseudo-dispersion Polymerization of Methyl Methacrylate in Supercritical CO₂, J. Supercritical Fluids, 印刷中, 査読有
- ② K. Matsuyama, K. Mishima, Fourier Transform Infrared Study of Dissolution Mechanism of Poly(methyl methacrylate) in CO₂-expanded Ethanol, ChemPhysChem, 10, 503-506, 2009, 査読有
- ③ K. Matsuyama, K. Mishima, Phase Behavior of the Mixtures of CO₂ + Poly(methyl methacrylate) + Ethanol at High Pressure, J. Chem. Eng. Data, 53, 1151-1154, 2008, 査読有
- ④ 三島健司, 松山清, 超臨界二酸化炭素中での高速攪拌技術を利用した酸化チタンナノ粒子内包マイクロカプセルの製造, 化学工学シンポジウムシリーズ, 80, 29-34, 2008, 査読無
- ⑤ 本城政稔, 松山清, 三島健司, 藤原道弘, 二酸化炭素飽和溶液の圧力誘起相分離を利用した無機粒子のコーティング, 化学工学シンポジウムシリーズ, 80, 35-40, 2008, 査読無
- ⑥ K. Matsuyama, K. Mishima, Coacervation Microencapsulation of Talc Particles with Poly(methyl methacrylate) by Pressure-Induced Phase Separation of CO₂-Expanded Ethanol Solutions, Ind. Eng. Chem. Res., 46(19), 6244-6250, 2007, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 松山清, 三島健司, CO₂膨張液体中への高分子の溶解と FT-IR による溶解挙動の解析, 化学工学会第 74 年会(2009. 3. 20, 横浜)
- ② 三島健司, 松山清, 超臨界二酸化炭素を用いた無機多孔体微粒子のコーティング, 化学工学会第 74 年会(2009. 3. 20, 横浜)

③ 三島健司, 松山清, 二酸化炭素飽和溶液の圧力誘起相分離を利用した無機粒子のコーティング, 化学工学会沖縄大会(2008. 8. 8, 沖縄)

④ K. Mishima, K. Matsuyama, Y. Sasaki, M. Nishino, T. Miuchi, Measurement of Solubility of Astaxanthin and β -Carotene in Supercritical Carbon Dioxide by FT-IR Spectroscopy, Proceedings of the 8th Asian Thermophysical Properties Conference, 123(2007. 8. 23, 福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 清 (MATSUYAMA KIYOSHI)
福岡大学・工学部・助教
研究者番号: 40299540

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者