

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780132

研究課題名(和文)凍結濃縮相内でコアシェル型ハイドロゲル微粒子を創製する新規技術開発

研究課題名(英文)Development of a technique to produce hydrogel-based core-shell type micro particles by using the freeze-concentrated phase

研究代表者

中川 究也(Nakagawa, Kyuya)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90433325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：凍結時に形成する凍結濃縮相と呼ばれる高濃度空間における分散質の濃度上昇やゲル化剤の濃度上昇を誘起させることを利用し、種々の特性を有するナノ・マイクロカプセルを作製する技術を研究した。疎水性相互作用によりベータカロテンをカプセル化したカゼイン凝集ナノ粒子、ゼラチン-アカシアガムの複合コアセルベートを利用して作製した油滴内包型コアシェルナノ粒子、複合多糖クライオゲルを利用して作製した油滴内包型コアシェルナノ粒子を作製し、それぞれ特性を評価した。凍結を経ることでカプセル化率が向上するケース、内包物質の初期バーストの低減や放出速度の遅延が実現できるケースなどを見出した。

研究成果の概要(英文)：Freeze-concentrated phase is a concentrated liquid phase that forms due to the ice formation, where solutes and suspended matters are to be concentrated. This concentration phenomenon was used to produce nano- microcapsules with unique characteristics. First, we prepared self-aggregated casein ates nanoparticles that encapsulated beta caroteins by hydrophobic interactions. Second, core-shell type nanoparticle with oil core coated by gelatin-acacia complex coacervate. And third, core-shell type nanoparticle with oil core coated by polysaccharide based cryogel. These three types of nanoparticles were prepared via freezing process, and the resultant characteristics were investigated. It was found that the freezing affected to the resultant encapsulation efficiencies, and the selection of freezing protocol enabled to reduce initial burst of the core materials and/or to control release kinetics.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品工学 凍結濃縮 マイクロカプセル ハイドロゲル

1. 研究開始当初の背景

ハイドロゲルをベースとしたナノ粒子は、食品栄養素や薬剤を体内へ適切に運搬・放出するキャリアとして研究が行われてきた経緯があり、抗がん剤等のドラッグデリバリー用途としても多くの実績がある。2011年9月に開催された **International Symposium on Microencapsulation** においても、ドラッグデリバリー目的のナノ粒子作製の研究発表のうち 70%程度がハイドロゲルをベースとしたものであった。医薬用途のナノ・マイクロカプセルに関して言えば、バイオアベイラビリティ（生体内へのカプセルの取り込み、薬剤放出能）の確保と、カプセルの細胞毒性の低減が課題となる。従ってこれを実現するハイドロゲルの探索や創製（合成）に既に多くの研究成果が報告されている。一方、食品利用を目的としたカプセルでは、バイオアベイラビリティを高く保持できるカプセルを、食品認可された限られた物質の中から作製することが課題となる。先の国際会議でしきりに述べられていたのは、ハイドロゲルナノ粒子に関するこれまでに得られている膨大な化学的知見を、産業生産に結びつけるためのエンジニアリング研究が大きく出遅れているとの見解である。特に、「無菌担保できるシンプルなナノ粒子作製プロセス」そして「ハイドロゲルの物質放出能を制御するエンジニアリング手法」の研究が急務と言われている。

2. 研究の目的

凍結時に形成する氷晶は、溶質成分や分散質を排斥し、凍結濃縮相と呼ばれる高濃度空間を形成する。この凍結濃縮相内部における濃度上昇を利用し、ゲル化剤濃度の上昇を誘起させることにより、凍結濃縮相内部でゲル形成を進行させる。このメカニズムをハイドロゲル微粒子作製に応用する。研究期間内に、凍結濃縮相におけるハイドロゲル形成のダイナミクス（速度論）を解明し、ハイドロゲル微粒子の形成メカニズムを解明する。単一の化学組成を持つ原料から、特性（消化性、生体取り込み能、物質放出能）の異なるハイドロゲル微粒子を作り分けられることを実証する。

ハイドロゲル微粒子の作製法はいくつもの手法が提案されているが、代表的な従来法として、

i) 高分子分散液の pH や塩濃度を大きくシフトさせ分散安定性を崩し、ナノサイズの凝集粒子を得る方法。

ii) エマルションを作製し、分散質表面の高分子をゲル化剤の添加等によって架橋形成させ、コアシェル型ハイドロゲル微粒子を作製する方法。

以上が最も広く研究されている。ここで、ハイドロゲルの形成は溶液の濃度条件（pH や塩濃度）によって支配されており、ゲルの薬剤透過性などの特性も添加物が混合された

段階で決まると考えられる。従ってここでは、ゲルの特性はプロセスによってではなく、原料の組成によって制御され得るものと考えて妥当である。

本研究のアプローチは、上記 i), ii) の従来法によるゲル微粒子形成を、凍結濃縮相にて実施するというものである。

本手法は、従来法と比べ、下記の点で工業的に優位であると期待できる。

A. 最終製品（分散液、乾燥物）を得るまでの工程が、無菌担保可能なシンプルなプロセス（乳化→凍結→インキュベート→凍結乾燥 or 解凍→噴霧乾燥）にて構築されている。

B. ハイドロゲル微粒子の特性を決めるゲル構造とゲル化の程度は、凍結速度とインキュベーション条件にて決定できる。（乾燥プロセスもカプセルの特性に影響を及ぼす）。

C. 毒性を有する化学物質（架橋剤など）の添加量をバルク全体で低減できる。ゲル化剤を必要としない物理架橋を利用できれば、添加剤無しでカプセルを作製できる。

本研究の目的は下記の通り。凍結プロセスをハイドロゲル微粒子製造に利用する。凍結濃縮相内部における濃度上昇を利用し、ゲル化剤濃度の上昇を誘起させ、凍結濃縮相内部におけるゲル形成、複合体形成、タンパク質凝集などを利用して、種々の特性を有するナノ・マイクロカプセルを作り分ける技術进行研究する。

3. 研究の方法

本研究課題では下記①～③の研究計画を設定し実施した。取り消し線にて示すのは、計画として設定したものの実施できなかった項目である。

①. カゼイン凝集ナノ粒子を凍結濃縮相内で作製する研究（自己凝集系の利用）

a) 凍結濃縮相内でのタンパク質凝集ダイナミクスの解明（バルク凝集との相違性）

b) 食品機能性物質を内包するカゼイン・ナノ粒子（コアシェル型）の作製と特性評価

②. ゼラチン-アカシアガムの複合コアセルベートナノ粒子を凍結濃縮相内で作製する研究

a) 凍結濃縮相内でのコアセルベート形成ダイナミクスの解明（バルクのコアセルベーションとの相違性）

b) 凍結コアセルベーションによるコアシェル型コアセルベート・ナノ粒子の作製と特性評価

③. 多糖クライオゲルをコアシェル型ナノ粒子作製に適用する研究（物理架橋の利用）

a) 凍結濃縮相内での分散質界面における物理架橋ゲルの形成ダイナミクスの解明

b) クライオゲル形成によるコアシェル型ハ

4. 研究成果

4.1. カゼイン凝集ナノ粒子作製

カゼインナトリウム溶液の pH を酢酸水溶液によって、7.0 から 4.0 の範囲に調整したものをいくつか作製し、 -40°C で 1 時間冷凍した。凍結過程において凍結濃縮相が生成し、それに伴う pH 値の低下によりカゼイン凝集ナノ粒子が形成することを期待した。カゼインナトリウムの溶液は、pH5.5 以下から視認可能な自己凝集体が形成し、pH5.0 以下で沈殿が形成した。ちなみにこの自己凝集体は、約 100-300 nm 程度の粒子径を持つナノ粒子であった。これらの溶液を凍結解凍したところ pH 値が 5.5 から 6.0 の系において、凍結に起因する沈殿形成を視認できた。すなわち、短い時間スパンにおいて不可逆な凝集が進行したことが伺えた。そもそも pH 依存のカゼインナトリウムの自己凝集は可逆な凝集であるため pH を高くすれば再分散するし、解凍後の溶液を強く攪拌し静置しておく、多くの場合元の状態に戻ることが知られている。放射光施設 (SPring-8, BL40B2) において、凍結過程の溶液に対して小角 X 線散乱測定を実施した。pH を調整したカゼインナトリウムの溶液を、常温から -20°C 付近まで一定速度にて冷却し、凍結開始後の溶液の X 線散乱強度を一定の時間間隔にて測定した。得られた散乱強度プロファイルを対数プロットし、その傾きからフラクタル次元を算出した。この分析は、約 50-200 nm の構造を反映した領域 (q 値範囲 0.03-0.125) の散乱プロファイルにて行っており、得られたフラクタル次元の値は、凍結過程の溶液中の様々なナノ構造を反映しているはずである。特に、今回の測定においては主として固液界面の表面構造を反映すると考えられたため、氷晶と凍結濃縮相による界面、凍結濃縮相内においてタンパク質が凝集することによって形成する界面の双方が、散乱強度に反映されると予測された。酢酸のみを含む溶液においては、凍結の進行に伴うフラクタル次元の変化はほとんど確認できなかった。これはどの q 値領域 (q 値は散乱角の関数。低い q 値ほど大きな構造を反映している) においても同様であった。一方、酢酸にて pH 調整を行ったカゼインナトリウム溶液においては、フラクタル次元の値の明確な変化が見取れた。凍結の進行に伴う温度低下により、フラクタル次元値は減少しており、乱雑な表面構造が系内から減少していることが示唆された。これが凝集カゼインナノ粒子形成の証拠であると結論付けるにはデータが十分ではないが、カゼインナトリウム溶液の凍結過程においてナノサイズレベルの構造変化が起こっていることは確認できた。尚、pH 7.0 の溶液にお

いては凍結の進行に伴ったフラクタル次元の減少はほとんど見られなかった。また、凍結速度を変化させた場合にも、このフラクタル次元の変化履歴は変化することが確認できている。凍結という操作とタンパク質のナノ構造形成がリンクしていることを伺わせる結果だが、まだ研究は継続の必要がある。

凍結前と凍結解凍後の溶液に対して同様に小角 X 線散乱測定を実施し、フラクタル次元分析を行った。pH5.5 の溶液において、凍結前後のフラクタル次元値が明確に減少しており、凍結の過程を経たナノ構造の変化を強く示唆していた。ただし、凍結の前後における大きな粒子径変化は見出されておらず、凍結の過程で進行すると考えられるタンパク質の凝集構造変化は、粒子径を変えるほどのスケールのもではなく、より小さな構造変化であると考えられた。pH5.5 に調整したカゼインナトリウム溶液に β カロテンを混合させ、噴霧乾燥器にて乾燥粉末を作製し、乾燥粉末中への β カロテンの包含率を測定した。この乾燥前の溶液をいったん凍結させたものとさせていないもので、包含率の変化を比較したところ、凍結を経ることで 10%程度包含率が高くなることを見出した。また、pH を 5.5 に調整し、いったん凍結を経たナノ粒子は、未凍結のものと比較し β カロテンの包含率が向上することが見出せた。ただし現時点で見出している変化はいずれも、粒子の機能性を大きく変えるほどのドラスティックなものではないだろう。ナノ粒子の構造を微調整するレベルの変化と考えるのがふさわしいのだろうが、もしその構造が粒子のバイオアベイラビリティと強くリンクするものであれば、今後大きな意義が見出せるであろう。

4.2. ゼラチン-アカシアガムの複合コアセルベートナノ粒子作製

油滴をゼラチン-アカシアガム複合コアセルベーションによって形成した皮膜によってコーティングさせたコアシェル型ナノ粒子を作製した。2 wt%ゼラチン溶液 90 mL に 1000 ppm の β カロテンが溶解したトリオレイン溶液 10 mL を加え、高速ホモジナイザを使用して乳化させた (18000 rpm, 3 分間)。得られた乳液に対し、アカシアガムを 5 wt%となるよう、 60°C で加温しながら溶解、混合させ、得られた乳液の pH を酢酸水溶液によって調整した。この溶液中の油滴の分散状態は酸性度に強い依存性があり、ゼラチン分散液の等イオン点以下の pH になると急速にクリームが進行した。調整したエマルションの pH を 3 程度まで下げると、分散油滴の表面にてコアセルベートが形成し、直ちに分相が開始し、ナノ粒子分散相として回収できた。これは従来のコアセルベート法によるナノ粒子の作製法と同一である。本研究に用いたエマルションは、pH 4.7 程度ではコアセルベート形成が極めて緩慢にしか進行しなかった。し

かしこれを一旦凍結させた後に解凍すると、明確な分相を確認できた。これは凍結濃縮相内における pH 上昇に起因するものと考えられる。さて、溶液 0.5 mL をバイアル瓶に移し、棚板式凍結乾燥器にて凍結乾燥させた。凍結時の冷却条件を変化させ（急冷：-40°C の予冷済み冷媒を流通，徐冷：-1°C/min にて 25°C から -40°C まで冷却，遅冷：-0.25°C/min にて -40°C まで冷却），最終的に得られた乾燥試料を破碎，粉末化し， β カロテンの包含率を測定した。測定はエタノールを用いて抽出することにより実施し，抽出初期（10 分）の放出量を表面包含量，2 日含浸させた後の最終的に放出された β カロテン量を総包含量とし，原料仕込み時に投入した β カロテン量にて除することにより包含率を算出した（従って乳化操作，乾燥操作過程における β カロテン損失を含む）。得られた凍結乾燥試料は，多孔質なマトリックス内にコアシェル型のナノ・マイクロ粒子が埋包される形態で得られた。破碎した乾燥試料を再水和させると，粒子が液中に分散し，これを透過型電子顕微鏡で観察することができた。このように，初期溶液の酸性度を，コアセルベート形成を数時間程度では引き起こさないレベル（pH 4.7 程度）に設定し，凍結を経ることでカプセル形成が達成されることが確認できた。尚，凍結を経ない場合でも，分相の進行を十分待てば同等のカプセルが形成するため，凍結はあくまでもコアセルベート形成をチューニングする役割と期待できる。作製したコアシェル型ナノ粒子のシェルメンブレンの特性の差異は，その油相コア中に溶解した β カロテン包含率（内部包含率）の差に大きく現れた。pH 4.7 及び 4.0 に調製した溶液からナノ粒子を作製した場合，凍結条件を変化させることによって，内部包含率が大きく変化していることが伺えた。今回の実験系においては，除冷条件を選ぶことによって内部包含率を高くすることができていた。一方，pH 3.1 に溶液を調製し，あらかじめコアセルベート形成を引き起こさせた後に乾燥カプセルを作製した場合，包含率に及ぼす凍結の影響はあまり大きくなかった。すなわち，凍結に起因したナノ粒子形成を引き起こすことによって，凍結速度制御を通じたナノ粒子のカプセル化特性のチューニングが達成できると考えられた。

4.3. 多糖クライオゲルをコアシェル型ナノ粒子作製

中性域 pH にて正電荷を有するキトサンと負電荷を有する κ -カラギーナンは，両者の水溶液を混合することによって速やかに複合体ゲルを形成する。しかし，電解質の共存下において，それぞれの多糖が有する電荷がキャンセルされ，混合によってゲル形成が阻害されることが知られている。そこでキトサン， κ -カラギーナン，カルボキシメチルセルロース（CMC）と食塩からなる溶液を調整し，

一定固形分濃度にてキトサン， κ -カラギーナンの比率を変化させ，凍結を経ることによってゲルが形成する組成を探索した。ここで CMC は固形分濃度を一定とするための調整剤として混合した。クルクミンを溶解させたトリオレイン溶液（油相）を上記探索によって得た組成のキトサン， κ -カラギーナン，CMC によって乳化した（Tween80 とキトサンを分散剤として高速ホモジナイザーによる予備乳化後に食塩を添加，その後 κ -カラギーナン，CMC を溶解させた後に超音波ホモジナイザーにて再乳化）。作製した O/W エマルジョンを，室温から -40°C まで一定速度にて冷却し凍結させた。凍結後の溶液をそのまま凍結乾燥させ，凍結乾燥マトリックス内に油滴が格納された形態のマイクロカプセルを作製した。この乾燥試料を再水和させるとコアシェル型の油滴内包ナノ粒子が分散した。

同一組成の O/W エマルジョンから凍結時の冷却速度を変化させて作製した乾燥試料中にカプセル化された油中に溶解しているクルクミンをエタノールによって抽出し，初期溶出量（抽出時間 5 分）から表面油率を，平衡溶出量（抽出時間 24 時間）と表面油率の差から内部包含率を測定した（図 3）。興味深いことに，表面油率，内部包含率は明確に凍結条件に依存しており，この系においては冷却速度が速いほど油滴の内部包含率を向上させられていることが確認できた。これらの試料を，pH 7.4 の緩衝溶液中に含浸させ，油滴中に溶解しているクルクミンの溶出速度を測定したところ，やはり冷却速度が速いほどクルクミンをより遅く放出させることができていた。内包物質の初期バーストの低減がカプセルの持つ機能として重要な場合，今回の手法は冷却速度の変更によってこれをチューニング可能であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- K. Nakagawa, N. Sowasod, W. Tanthapanichakoon and T. Charinpanitkul, Hydrogel Based Oil Encapsulation for Controlled Release of Curcumin by Using a Ternary System of Chitosan, kappa-Carrageenan, and Carboxymethylcellulose Sodium Salt, *LWT Journal of Food Science and Technology*, 54: 600–605 (2013).
- T. Jarunglumlert, K. Nakagawa, Spray-drying of casein aggregates loaded with β -carotene: Influences of acidic conditions and storage time on surface structure and encapsulation efficiencies, *Drying Technology*, 31: 1459–1465 (2013).
- K. Nakagawa, Characterization of freeze-dried core-shell nanoparticles prepared via gelatin-acacia complex coacervation: A study on particle formation upon freezing, *Drying Technology*, 31: 1466–1476 (2013).
- N. Sowasod, K. Nakagawa, W. Tanthapanichakoon and T. Charinpanitkul, Encapsulation of curcumin loaded

oil droplets with chitosan based cryogel: Influence of freezing condition on nanocapsule properties, *Food Science and Technology Research*, 19: 633–640 (2013).

K. Nakagawa and M. Kagemoto, Characterization of casein-based nanoparticles formed upon freezing by in-situ SAXS measurement, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103: 366–374 (2013).

K. Nakagawa and H. Nagao, Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced gelatin-acacia complex coacervation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 411: 129–139 (2012).

[学会発表] (計 9 件)

K. Nakagawa, A Moderate Structural Change of the β -Carotene Loaded Sodium Caseinate Aggregates in a Stock Solution, Food Structure and Functionality Forum Symposium, March, 2014, Amsterdam.

K. Nakagawa, T. Jarunglumlert, S. Adachi, β -Carotene loaded spray-dried sodium caseinate aggregates powder, 6th Training School on Bioencapsulation, March, 2014, Nha Trang

K. Nakagawa, Gelatin-Acacia-based core-shell nanoparticles formed upon freezing: A processing approach to optimize encapsulation efficiencies, 19th International Symposium on Microencapsulation, September, 2013, Pamplona.

T. Jarunglumlert, K. Nakagawa, Characterization of the Spray-Dried Casein Aggregates loaded with β -carotene: A moderate structural modification during storage improves the encapsulation efficiencies, 19th International Symposium on Microencapsulation, September, 2013, Pamplona.

中川 究也, 小林 敬, 安達 修二 「凍結を利用したカゼイン微粒子の作製とその特性制御に関する研究」食品工学会第 14 回年次大会、(京都、2012 年 8 月)

中川 究也 「食品マイクロカプセルの機能性とその制御技術」化学工学会高松大会 (高松、2012 年 12 月)

K. Nakagawa, H. Nagao, M. Kagemoto, Characterization of Freeze-dried Spray-dried Protein-based Nanoparticles Fabricated via Cryoprocessing, 18th International Drying Symposium (IDS 2012), Xiamen, China, Nov. (2012)

中川 究也, 長尾 裕充, 影本 真之 「凍結を利用したハイドロゲル微粒子創製技術の検討」食品工学会第 13 回年次大会、(札幌、2012 年 8 月)

中川 究也, 長尾 裕充, 影本 真之 「凍結を利用し

たコアシェル型ハイドロゲルナノ粒子の新規作製法」化学工学会第 77 年会 (東京、2012 年 3 月)

[図書] (計 1 件)

中川 究也, 凍結を利用してナノカプセル・ナノ粒子の特性を制御する技術, 食品素材のナノ加工を支える技術, 監修: 安達 修二・中嶋 光孝・杉山 滋, シーエムシー出版 (2013), pp. 40-51.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者: 中川 究也

研究者番号: 90433325