

## 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：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24860036

研究課題名(和文) エマルション内架橋プロセスを導入したラズベリー型ナノゲル集合体の構築

研究課題名(英文) Raspberry-like nanogel-based material prepared by emulsion

研究代表者

田原 義朗 (Tahara, Yoshiro)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30638383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で開発したラズベリー型ナノゲル集合体(別名：ナノゲル架橋マイクロスフェア)とは、ナノサイズのマテリアル(ナノゲル)をベースとして、ナノからマイクロメートルまでの幅広いサイズ領域をカバーすることが期待できるバイオマテリアルである。本研究の最大の成果は、ラズベリー型ナノゲル集合体の調製条件を確立できたことである(特許出願済み)。調製されたラズベリー型ナノゲル集合体は、共焦点レーザー顕微鏡像、レーザー回折式粒度分布測定などによって、直径10マイクロメートルの真球型の粒子である事が分かり、ラズベリー型ナノゲル集合体の開発・調製条件の最適化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Nanogel consisting of self-assembled polysaccharides is one of the most attractive carriers for drug delivery systems. In the present study, "raspberry-like nanogel-based material" was prepared by bottom-up approach using nanogels as building units. The effective control and design of the cross-linking and nano-domains in macro-scale hydrogels are important focuses of research. Raspberry-like nanogel-based material was prepared through cross-linking of nanogels in water-in-oil emulsion. The basic characters of raspberry-like nanogel-based materials were evaluated by confocal laser scanning microscopy and laser diffraction particle size analysis. The size of raspberry-like nanogel-based material was controlled in micrometer range. These findings suggested that raspberry-like nanogel-based material enables to be used as carrier for a novel drug delivery system.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：ナノゲル 多糖 エマルション ドラッグデリバリー

### 1. 研究開始当初の背景

近年のナノテクノロジーを基盤としたドラッグデリバリーシステムの発展は目覚ましいが、現在では、これらをベースとして、ナノからマイクロメートルまでの幅広いサイズ領域をカバーできる、マテリアルの構築が切望されている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、疎水化多糖ナノゲルを基本単位に、それをエマルジョン中で組み上げるというプロセスを導入することで、サイズが制御されたラズベリー型ナノゲル集合体を開発することである。

### 3. 研究の方法

本研究では反応性基を導入した疎水化多糖ナノゲルを合成し、Water-in-Oil型エマルジョンの水中で架橋(重合)するというプロセスによって、ラズベリー型ナノゲル集合体を調製した。

#### (1) ナノゲル

疎水化多糖ナノゲルとそれに導入する反応性基については、親水性多糖であるプルランにコレステロール基とアクリロイル基を修飾したCHPOAを用いた。その他のナノゲルを用いることもできたが、生体へ投与する際にイオン性を持たない(低い)ナノゲルが望ましいことからCHPOAに統一して研究を行った(図1)。

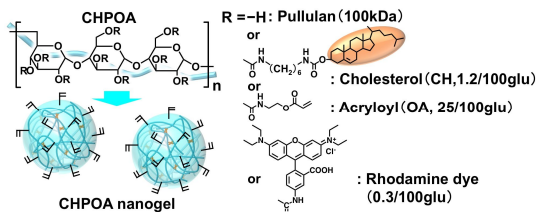


図1 CHPOAの構造

#### (2) 架橋方法

CHPOA ナノゲルの架橋方法については、過去に多くの成果を挙げてきた典型的な架橋剤(末端チオール化ポリエチレングリコール: PEGSH)を用いたマイケル付加反応を行うことを基本とし、エマルジョンの安定性を考慮して光開始剤を用いた光重合反応も検討の対象とした。

#### (3) 粒子の調製方法

エマルジョンを用いたラズベリー型ナノゲル集合体の調製は、水相にCHPOAナノゲルと架橋剤または光開始剤を加え、油相に界面活性剤を加えてWater-in-Oil型エマルジョンを調製し、CHPOAナノゲルを架橋または重合することによってラズベリー型ナノゲル集合体を調製した。さらに凍結乾燥と遠心分離を適切な方法で行うことで、精製されたラズベリー型ナノゲル集合体を得た。

#### (4) 評価法

粒子の形や大きさを、共焦点レーザー顕微鏡やレーザー回折式粒度分布測定によって評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 調製条件の検討

本研究では、ラズベリー型ナノゲル集合体(別名:ナノゲル架橋マイクロスフェア)の調製条件を確立する事に成功した。この方法は本研究によって最初に生み出された手順であり、2013年に特許出願済みである。既存の報告として、Water-in-Oil型エマルジョンを用いて調製されたゲル粒子は、遠心分離、貧溶媒による再沈殿、透析などの方法によってゲル粒子とその他の成分(油相と界面活性剤)を分離する方法が報告されていたが、ラズベリー型ナノゲル集合体の場合はこれらの方法では油相と界面活性剤を除去することができないことが分かった。具体的には既存の方法を参考とした場合、粒子同士が凝集し、水に分散できなかった。そこで油相と界面活性剤を適切に選択し、凍結乾燥とショ糖密度遠心分離を用いることによって、ラズベリー型ナノゲル集合体とその他の成分(油相と界面活性剤)を分離し、ラズベリー型ナノゲル集合体を得ることに成功した(図2)。得られたラズベリー型ナノゲル集合体は水(純水やPBSなど)に分散可能であった。

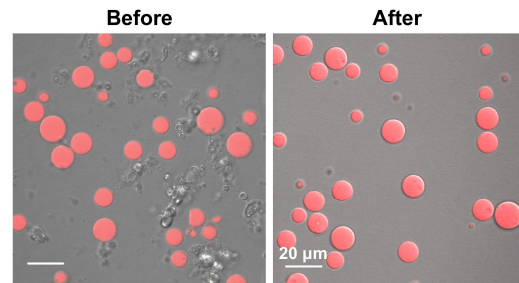


図2 ラズベリー型ナノゲル集合体の精製前後の状態(共に水中)

このようなエマルジョンの調製条件の確立は、既存の乳化重合をはじめとする高分子学の方法というより、むしろ純粋な化学もしくは化学工学(化学プロセス)的な観点からエマルジョン調製の原点に戻り、最適な調製条件を設計することに成功した。このことから最終年度に日本化学会や化学工学にて、開発条件に重点をおいて成果発表を行った。

#### (2) 粒子の評価

調製されたラズベリー型ナノゲル集合体について粒子の形や大きさを評価した。図3はPEGSHを用いて調製されたラズベリー型ナノゲル集合体の共焦点レーザー顕微鏡像と、レーザー回折式粒度分布測定の結果である。共焦点レーザー顕微鏡の画像から、この調製方法によって真球型のラズベリー型ナノゲル集合体が調製できたことが明らかとなっ

た。またレーザー回折式粒度分布測定の結果より、得られたラズベリー型ナノゲル集合体の粒子径は、メジアン径で 6.65 マイクロメートル、モード径で 8.13 マイクロメートルであり、マイクロメートルのスケール領域のマテリアルであることも確認された。

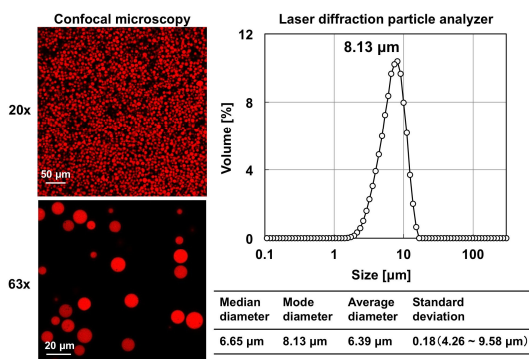


図3 ラズベリー型ナノゲル集合体の粒子の形と大きさ

### (3) 光重合反応の検討

研究の開始当初はエマルションの調製条件が最適化されておらず、エマルションの安定性の低さが懸念されたことから、本研究では研究の開始当初からラズベリー型ナノゲル集合体の調製プロセスに光重合反応を用いる検討を行ってきた。光開始剤を用いた光重合反応は、PEGSH を用いるマイケル付加反応よりも反応速度が速く、エマルションを調製後、直ちに紫外光照射によって迅速な反応の開始・完了が可能であるという特徴をもつ。

最初に光重合反応に用いる光の波長の最適化を行った。今回用いた irgacure2959 というラジカル開始剤において、他の研究者らが以前に報告していた波長は 365nm であり、我々も当初はこの波長によって実験を行っていた。ところがもう一つの水銀ランプの輝線にあたる 313nm では、さらに効率の良い光重合反応が起こることが分かった。

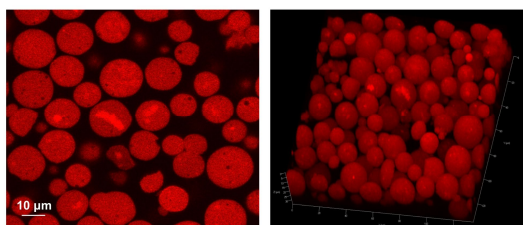


図4 光重合によるラズベリー型ナノゲル集合体

また当初は他の架橋剤（アクリロイル修飾 PEG など）を利用することを試みていた。確かにこれら架橋剤を用いることでナノゲル架橋ゲルの強度の向上や低濃度化は実現できることが分かった。しかしながら上記の PEGSH と同様の方法でラズベリー型ナノゲル

集合体を調製すると、架橋剤の界面活性効果によってエマルションが球形にならないという問題が生じた。そこで架橋剤を用いずに調製すると、エマルションが球形となり、得られたラズベリー型ナノゲル集合体も球に近い構造を得ることに成功した（図4）。この点は本研究によって独自に見いだされたことであり、架橋剤を用いないナノゲル架橋ゲルの調製という点においても、他の研究と差別化できる点である。

光重合反応を用いる場合において得られたラズベリー型ナノゲル集合体が真球の形にならないという問題が生じたため、マイクロ流路法を用いてエマルションを作成することによって改善を期待したが、実際には水相が高粘度の Water-in-Oil 型エマルションをマイクロ流路法によって調製することは、簡単ではなく、新しい技術を確立するのと同じ程に難しいということが分かった。

### (4) まとめ

本研究で得られた最大の成果は、ラズベリー型ナノゲル集合体の調製条件を確立できたことである。ラズベリー型ナノゲル集合体は、架橋反応、エマルション調製方法、精製方法の全てを適切に行うことで初めて調製できるということが分かった。

本研究では架橋反応は PEGSH を用いたマイケル付加反応と、光開始剤を用いた光重合反応の検討を行った。エマルションの安定性の観点から、当初は反応速度の速い光重合反応が好ましいと思われたが、実際にはエマルションの安定性は高く、マイケル付加反応中にエマルションが壊れることは無かったため、結果的に PEGSH を用いたマイケル付加反応の方がより単分散なラズベリー型ナノゲル集合体を調製できることが分かった。

エマルションの調製ではホモジナイザー法、膜乳化法、マイクロ流路法を検討した。確かにホモジナイザー法では厳密に単分散なエマルションを得ることは難しかったが、膜乳化法やマイクロ流路法ではそもそも水相が高粘度の Water-in-Oil 型エマルションを調製することが難しかったため、これらの方法に大差はなく、ホモジナイザー法が簡便で好ましい事が分かった。

本研究では精製方法の確立に最も尽力した。最大のポイントは界面活性剤の選定であり、界面活性剤の種類最適化と、凍結乾燥、ショ糖密度遠心分離という方法をとることによって、マイクロメートルサイズのラズベリー型ナノゲル集合体を得ることに成功した。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yoshiro Tahara, Kazunari Akiyoshi, Pullulan, Encyclopedia of polymeric nanomaterials, in press. (査読無)

Yoshiro Tahara, Satoshi Kosuge, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Nanogel bottom-up gel biomaterials for protein delivery: photopolymerization of an acryloyl-modified polysaccharide nanogel macromonomer, Reactive and Functional Polymers, 73(7) (2013) 958-964. (査読有)

[学会発表](計2件)

田原義朗, 向井貞篤, 澤田晋一, 秋吉一成, ナノゲル架橋マイクロスフェアの開発と評価, 第1回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム, P-36, 名古屋, 2013年9月26日(ポスター発表).

田原義朗, 向井貞篤, 澤田晋一, 秋吉一成, エマルション内架橋プロセスによるナノゲル架橋マイクロスフェアの開発, 化学工学会第45回秋季大会, D105, 岡山, 2013年9月16-18日(口頭発表)

[図書](計1件)

田原義朗, 秋吉一成, ナノゲル基盤材料によるタンパク質医薬の徐放技術とその応用, 遺伝子医学 MOOK 別冊 - ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 -, 第2章-2 (2013) 124-130.

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: ナノゲル架橋ゲル粒子の調製と応用  
発明者: 秋吉一成, 田原義朗, 向井貞篤, 澤田晋一  
権利者: 京都大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2013-072258  
出願年月日: 2013年3月29日  
国内外の別: 国内

[その他]

<http://www.jst.go.jp/erato/akiyoshi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 義朗 (TAHARA, Yoshiro)  
京都大学・工学研究科・特定研究員  
研究者番号: 30638383