

マイクロバブルを利用した中空高分子電解質マイクロカプセルの製造に関する研究

47-086725 松岡 英太郎

指導教員 大宮司 啓文 准教授

A new fabrication method of hollow poly (allylamine hydrochloride)/poly (sodium 4-styrenesulfonate) (PAH/PSS) microcapsules was proposed using microbubble templates without surfactants. In a Na_2CO_3 aqueous solution, PAH becomes colloidal particles of R-NHCOO^- and R-NH_3^+ within a certain pH range. Under such a condition, if microbubbles are present in the solution, the colloidal particles adsorb to the microbubble surface, stabilizing the microbubbles. When PSS is added to the solution sequentially, a bilayer of PAH/PSS can be formed around microbubbles. We successfully fabricated hollow PAH/PSS microcapsules by this method and elucidated the conditions required for the formation of colloidal particles of PAH and a bilayer of PAH/PSS. The size of microcapsules was also successfully controlled by changing the concentration of PAH.

Key words: Hollow microcapsule, Microbubble, Template technique, Biodegradable polymer, Ultrasound contrast agent

1 緒言

近年、マイクロカプセルはバイオ、医薬、触媒、生体など多くの分野、最近では特に超音波造影剤やドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用が期待されている。超音波造影剤としてマイクロバブルが用いられてきたが、血液中にすぐに拡散してしまうか、または拡散を防ぐために音圧を低くする必要がありコントラストが低下してしまうという問題がある。このような問題を解決するために、マイクロバブルを内包した高分子電解質マイクロカプセルを用いることが考えられている。これは、高分子電解質多重膜は生分解性が良く、さらにガスの拡散を防ぐ上で効果的であるという特徴のためである¹⁾。高分子電解質マイクロカプセルの作製方法としては Layer-by-Layer (LbL)法が有名で、芯材料の上に逆の電荷を持った高分子電解質を逐次吸着させていく手法である。これによって芯の回りに多重膜を形成する。LbL法では芯材料の大きさでカプセルの大きさを制御出来る事と、膜数を変える事によって容易に膜厚を制御出来るという特徴がある。さらに、LbL法によって中空マイクロカプセルを作成するには、膜を生成した後に、固体の芯物質を溶かす方法がよく用いられる。しかし、溶解過程において膜にも影響を与えてしまう事が問題となる。近年、Shchkinらはマイクロバブルテンプレートをを用いて中空高分子電解質マイクロカプセルを製造する手法を提案した²⁾。この方法では、アニオン性界面活性剤と超音波発生器を用いて安定なバブルを作成したのち、このバブルの上にカチオン性高分子電解質を吸着させる事によってマイクロカプセルが作られた。この方法によって中空高分子電解質マイクロカプセルを作製することが可能であるが、一方で作製に当たって界面活性剤が使われており、医学、薬学への応用を考えた場合望ましくない。

本研究では、マイクロバブルをテンプレートにして界面活性剤を用いずに電解質高分子マイクロカプセルを製造し、そのメカニズムやプロパティを明らかにする事を目的とした。

2 実験内容

2.1 材料

カチオン性の高分子電解質として Poly(allylamine hydrochloride) (PAH) (Mw: ca. 56,000) (Sigma-Aldrich, US)、アニオン性の高分子電解質として Poly(sodium

4-styrenesulfonate) (PSS) (Mw: ca. 70,000)(Sigma-Aldrich, US)が用いられた。蛍光顕微鏡観察のために Poly (fluorescein isothiocyanate allylamine hydrochloride) (FITC-PAH) (Mw: ca. 56,000) (Sigma-Aldrich, US) が用いられた。pH 調整のために 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (Wako, Japan), 1 M 塩酸 (Wako, Japan), および 炭酸ナトリウム (Wako, Japan) が使われた。純水(電気抵抗率 18.2 M Ω cm)は Milli-Q advantage A10 water purification system によって精製された。

2.2 実験方法

中空マイクロカプセルは以下の手順で作成された。

(a) 1.0 mg/ml PAH 水溶液を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH=12.0 に調整した。(b) (a)で作製した水溶液を数分間、二酸化炭素で 300 kPa に加圧した。(c) 水溶液が透明の状態から白濁の状態へ遷移するので、このときマイクロバブルを発生させるために大気開放した。

PAH と CO_2 の反応を確認するために、同じ実験手順で CO_2 を N_2 に変えて実験を行った。また、白濁の原因であると考えられる PAH コロイドと中空マイクロカプセルの大きさを DLS と顕微鏡を用いて測定した。

大気圧下で同様のマイクロカプセルを作製するため PAH を含む Na_2CO_3 水溶液に対し塩酸を滴定することで液体内に二酸化炭素を発生させた。計算からどのような組成でマイクロカプセルが発生するのかを明らかにした。さらにため FTIR を用いて実験的に成分の測定を行った。また、PAH マイクロカプセルの上に PSS の層を作る事でバイレイヤーマイクロカプセルの製造を行い、製造に必要な条件を明らかにした。最後に大きさを変えてマイクロカプセルを作製するために、PAH の濃度を変えて中空マイクロカプセルを作製し、サイズへの影響を検討した。

3 結果と考察

3.1 中空マイクロカプセルの作成

実験の結果、 CO_2 を加圧し続けると、溶液全体が白濁した後に、再び透明に戻る事がわかった。白濁した状態で大気圧まで減圧すると、白濁した状態はしばらく続き、この時に安定な微小粒子が確認できた。全体が白濁した後もさらに加圧し続けると水溶液は再び透明に戻った。

この実験を CO_2 ガスの代わりに N_2 ガスを用いて、PAH 水溶液の初期 pH を 12.0、8.6、4.0 の 3 種類に対して行った結果、pH 変化が無く、水溶液は終始透明のままであった。圧力を大気圧まで下げたとき、水溶液中にバブルが生じたが、溶解中の PAH ではバブルを包む事は出来ないため、バブルはすぐに消滅した。この実験結果から PAH は CO_2 と反応しているため、 CO_2 が無ければどのような pH 帯においても PAH 水溶液は白濁しないと考えられる。また、加圧中に白濁したことから、白濁の原因はバブルによるものではなく、溶液内の反応のためだと考えられ、水溶液とガスの界面から生じていることから PAH と二酸化炭素が反応しカルバメートを生成しているのだと考えられる。PAH と二酸化炭素が反応する場合、以下の式のように反応が起こると考えられる。



また、PAH の平衡状態は水溶液中で以下の式に従う。



式 1、2 の反応の酸解離定数を常用対数で表すとそれぞれ $\text{p}K_{a1} = 4.8$ 、 $\text{p}K_{a2} = 8.7$ であると報告されている。

式 1 及び 2 より、PAH 水溶液が二酸化炭素を吸収する事によって負の電荷を持つ R-NHCOO^- と正の電荷を持つ R-NH_3^+ が共存する状態があると考えられる。 R-NH_2 、 R-NH_3^+ は通常全て水に溶けているが、 R-NH_3^+ と R-NHCOO^- が水溶液中に共存するとき、この二つの状態の違う PAH が電気的相互作用によってコロイドを形成し、その結果、溶液が白濁したと考えられる。

3.2 コロイドとカプセルの粒径分布

PAH コロイド及び中空マイクロカプセルの大きさを特定するため、DLS 測定が行われた。Fig. 1 に DLS から得た 2 種類の pH 値の異なる PAH 水溶液の粒径分布を示す。水溶液はどちらも 3.1 と同様の方法で、 CO_2 での加圧時間のみの変えたものが用意された。用意された水溶液は pH 値がそれぞれ 10.0 と 8.5 であった。pH 値が 10.0 の水溶液は透明であったが、pH 値 8.5 の水溶液は白濁していた。pH=10.0 における平均直径は約 20 nm、一方、pH=8.5 における平均直径は 4 μm であった。以上の結果から、PAH 分子は pH=10.0 においてコロイドを生成するが、濃度が非常に低いため溶液は透明のままであったと考えられる。これに対して pH=8.5 において PAH は CO_2 ガスをカプセル化すること出来、水溶液も白濁した。以上の結果は PAH コロイドの平均直径は約 20 nm であり、中空 PAH マイクロカプセルの平均直径は約 4 μm である事を示していると考えられる。

pH=8.5 における中空マイクロカプセルの画像は顕微鏡観察によって得られた。Fig. 2 に中空マイクロカプセルの明視野及び蛍光顕微鏡画像を示す。この実験において、PAH と FITC-PAH を混合したもの（混合重量比 PAH:FITC-PAH=100:1）を PAH の代わりに用いた。これらの画像は微小な球体を示しており、蛍光顕微鏡画像は PAH が微小球体に集まっている事を示している。

3.3 滴定によるマイクロカプセルの作製

製造したマイクロカプセルと同様の中空マイクロカプセルを大気圧力で作製するため、PAH を含んだ炭酸ナトリウム水溶液を塩酸で滴定することで水溶液中に二酸化炭素を発生させた。

初めに、PAH を含んだ 0.054 M 炭酸ナトリウム水溶液を用意し、PAH の濃度は 1.0 mg/ml に調整した。このとき pH 値は 11.0 であった。次にこの水溶液 100 ml に対して 1 M 塩酸を用いて滴定を行った。

Fig. 3 に実験および計算から得られた滴定曲線を示す。実験は (a) 水溶液をマグネティックスターラーで常時 300 rpm で攪拌し、水溶液中に塩酸を一分間隔で 1 ml 滴下する条件と、(b) 水溶液をマグネティックスターラーで常時 1000 rpm で攪拌し、水溶液の pH 値が安定するまで待ち、安定したところで 1 ml の塩酸を滴下する（15 分間 pH を測定し、変化が無い場合安定とした。早く安定した域では 15 分、時間がかかった領域で 3 時間程度の間隔となった。）条件の 2 条件で行った。すなわち (a) の条件では気液平衡に達するのを待たずに次の滴定を行っているため CO_2 が過飽和に解けており、(b) の条件では気液平衡に達してから次の滴定を行っている条件である。計算条件としては (a) $\text{CO}_2(\text{aq})$ が水溶液中に過飽和に溶解、外部環境との間で二酸化炭素の移動が無い、すなわち全体の CO_2 の総量 $m_{\text{CO}_2^*} = m_{\text{CO}_3^{2-}} + m_{\text{HCO}_3^-} + m_{\text{CO}_2(\text{aq})} + m_{\text{R-NHCOO}^-}$ が一定であると仮定したものと、(b) ヘンリーの法則に従った飽和量以上は溶解せず、溶解量を超えたものは外部放出する、すなわち $m_{\text{CO}_2(\text{aq})}$ が飽和溶解量を超えた場合、 $m_{\text{CO}_2(\text{aq})}$ は飽和量で一定になると仮定した

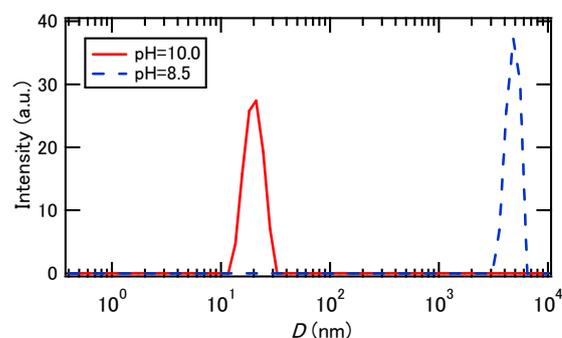


Fig. 1 Diameter distributions of PAH solutions containing CO_2 at two different pHs: pH = 10.0 and 8.5.

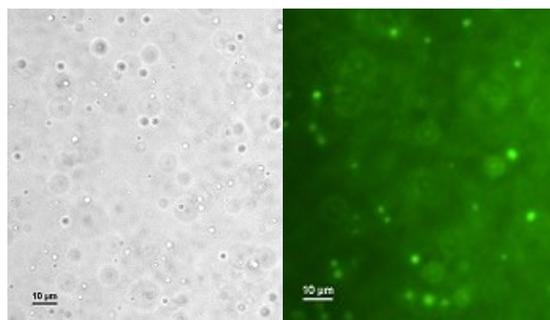


Fig. 2 Bright-field (left) and epifluorescence (right) images of hollow PAH microcapsules. The pH of the solution is 8.5.

ものの2条件で行った。

Fig. 3に示す通り、2条件どちらにおいても実験結果と計算結果が非常に良く一致した。この滴定曲線の結果はPAHを含まない炭酸ナトリウム水溶液においてもほぼ同じ結果が得られ、PAHが滴定曲線に与える影響は限定的なものとなる。どちらの条件においてもpH=9.8でバブルが発生し、pH=9.0で水溶液が白濁した。さらにpHを下げると水溶液は再び透明に戻った。Fig. 4には計算によって求められたpH値における各成分の変化を示す。この計算では、滴定曲線の(a)の条件での計算結果を示している。pH値が7.5~9.0でR-NHCOO⁻とR-NH₃⁺が共存するという結果が見られた。このpH帯は実験において溶液が白濁している範囲であり、これはPAHコロイドがR-NHCOO⁻とR-NH₃⁺の凝集によって出来たものである事を示していると考えられる。また、この領域ではCO₂(aq)が飽和量に達しているため、水溶液中にCO₂のマイクロバブルが発生し、このマイクロバブルをテンプレートとしてマイクロカプセルが生成されたのだと考えられる。

3.4 FTIRによる成分の測定

PAHとCO₂の反応が起こっている事を実験的に調べるため、FTIRを用いて成分の測定が行われた。

試料は炭酸ナトリウム水溶液のPAHを含むものと、含まないものの二種類が用いられた。用意された水溶液はこれまでの滴定実験で用いたものと同様の1.0 mg/ml PAH 0.054 M 炭酸ナトリウム水溶液でpH値は10.9であった。これらの水溶液は1M塩酸を滴下され、各水溶液において6回ずつpHを変えて測定が行われた(pH=10.9, 10.0, 8.9, 8.0, 6.5, 5.5)。Fig. 5に塩酸で滴定したPAHを含む炭酸ナトリウム水溶液およびPAHを含まない炭酸ナトリウム水溶液の純水で規格化されたFTIRスペクトルを示す。

各測定において950-1750 cm⁻¹の範囲を2 cm⁻¹間隔に64回スキャンが行われた。Fig. 5から二種類の水溶液でのFTIR-ATRスペクトルはpH=8.9および8.0においてほぼ同様の結果が得られた。pH=8.9および8.0においてPAHを含んでいる水溶液はどちらも白濁していたが、PAHを含んでいない水溶液はどちらの水溶液においても透明であった。その他のpH帯においては、どちらの水溶液でも全て透明であった。PAHを含む水溶液のpH=8.9および8.0において1200-1600 cm⁻¹の範囲で典型的なカルバメートのFTIR-ATRスペクトルバンドが示された。1500-1600 cm⁻¹付近に現れるバンドはamide IIバンドと呼ばれており、主にカルバメート内のN-H結合部分のdistortion振動、C-N結合部分のstretching振動に起因する。また、1300 cm⁻¹付近に現れるバンドはamide IIIバンドと呼ばれており、C-H結合およびN-H結合のbending振動に起因する。これらのバンドがpH=8.9および8.0に現れたことから、これらはカルバメートに起因すると考えられる。Jacksonらはmonoethanolamine水溶液に対して似たようなFTIR-ATRスペクトル測定を行っており、このピークがカルバメート生成のために現れたと報告している³⁾。PAHを

含まないpH=8.9および8.0の水溶液におけるFTIR-ATR水溶液では1362 cm⁻¹及び1620 cm⁻¹において炭酸塩基のstretching振動によるバンドが示されている。

Fig. 4に示したpH値における各成分の変化においてはpH=10.9および10.0においてもPAHを含む水溶液からカルバメートイオンすなわちR-NHCOO⁻が水溶液中に含まれていることが示されているが、この測定においてはカルバメートを示すamide II, amide IIIの2つのバンドが

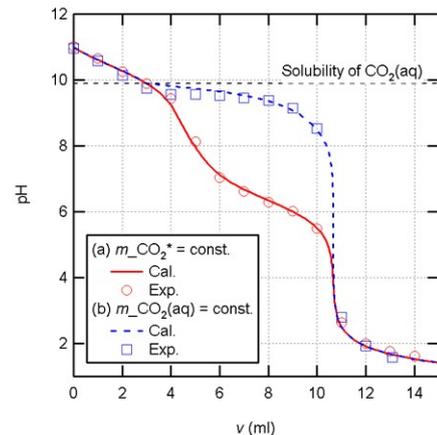


Fig. 3 Measured and calculated titration curves of 100 ml of 0.054 M Na₂CO₃ aqueous solution containing PAH titrated with 1 M HCl under two different conditions.

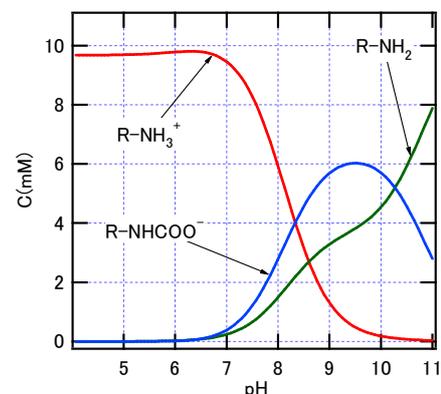


Fig. 4 Calculated compositions vs. pH curves.

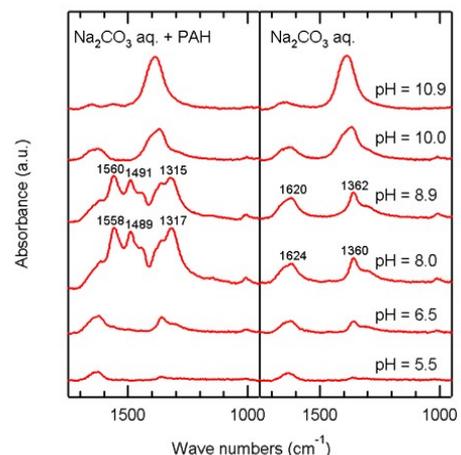


Fig. 5 FTIR-ATR spectra of Na₂CO₃ aqueous solutions with (left) and without PAH (right) titrated with 1 M HCl.

pH=10.9および10.0では現れなかった。これは、 R-NHCOO^- は主に PAH と $\text{CO}_2(\text{aq})$ の反応から生成されており、高 pH 帯では $\text{CO}_2(\text{aq})$ が希薄であるため、平衡に達していなかったためと考えられる。

3.5 (PAH/PSS)マイクロカプセル

これまでに示した PAH マイクロカプセルは、pH 値が 9.0~7.5 の間では安定であったが、これ以上 pH を下げることで消えてしまうことが確認されている。これは R-NH_3^+ と R-NHCOO^- の濃度割合が変わるためにコロイドが分解してしまうために、水中に解けてしまうのだと考えられる。一方で、医薬品としての応用を考える場合、ある程度低い pH 帯でも安定して存在することが重要である。低 pH 域においても安定なマイクロカプセルを作るため、PAH マイクロカプセルの上に PSS の層を作る事でバイレイヤーマイクロカプセルの製造を行った。

本手法で作製した PAH 中空マイクロカプセルは pH 値が 7.5 以下になると水溶液に溶けて消えてしまうことが確認されている。これは R-NH_3^+ と R-NHCOO^- の濃度割合が変わるためにコロイドが分解してしまうためだと考えられる。Fig. 4 に示した pH に対する組成の変化から、pH が低下すると R-NHCOO^- が減り、逆に R-NH_3^+ が増えることが分かる。これは、コロイドの正味の電荷がマイナスからプラスへ変わっている事を示している。このことから、PAH マイクロカプセルの上に PSS の層を作る事が可能であると考えられる。

PAH マイクロカプセルはこれまでと同様に作成し、PAH マイクロカプセル (pH=8.5) を、PAH を含まない 0.054M Na_2CO_3 水溶液 (pH=8.5) によって 20 倍に希釈した。これはカプセルの濃度が高すぎるため PSS を加えた際にカプセル同士が結合するのを防ぐためである。この希釈した水溶液に対して、質量比 PAH : PSS = 5 : 1 の割合で 1 mg/ml PSS を加え、1 M 塩酸で pH=6.9 まで pH を下げ、観察を行った。Fig. 6 に pH=6.9 における中空 PAH/PSS マイクロカプセルの明視野および蛍光の倒立顕微鏡画像を示す。

この画像から pH=6.9 においても微小球体が安定に存在している事が分かる。中空 PAH マイクロカプセルを PSS によって覆う事に成功し、その結果、pH=6.9 でも安定な中空 PAH/PSS マイクロカプセルが得られたと考えられる。

3.6 径の調整

マイクロカプセルの応用を考えた場合、カプセルの大きさを揃えて作る事が必要となる。このため、サイズがどのようなパラメータによって決まっているのかを理解する必要がある。PAH の濃度を変えて中空マイクロカプセルを作製し、サイズへの影響を検討した。

実験は炭酸ナトリウム濃度 (0.054 M) が等しく、PAH 濃度(0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml)が異なる 3 種類の水溶液に対し 1 M 塩酸で滴定を行い、ここで作製されたカプセルの大きさを測定した。PAH の濃度が増えるに従い、

CV 値が大きくなっていることが分かる。CV 値は標準偏差を平均で割った値であり、この値が小さくなるほど均一であるといえる。このことから PAH の濃度が増えるに従い、カプセルの均一性が悪くなることが分かった。この結果から、コロイドがカプセルを包むまでの時間が遅くなったことが考えられる。これは、濃度が増す事によって、コロイドの平均的な大きさが増した事によって、コロイドの運動速度が低下した事が原因だと考えられる。

4 結言

- (1) 本実験で提案した手法によって界面活性剤を用いずに中空高分子電解質マイクロカプセルを作成することに成功した。
- (2) PSS を加える事で中空(PAH/PSS)マイクロカプセルを製造することに成功した。これにより pH=6.9 においても安定なマイクロカプセルを得られた。
- (3) PAH の濃度によってカプセルのサイズを制御出来る事が分かった。

文献

- 1) Kang Ping Xiao et al., Langmuir 17 (2001) 8236–8241.
- 2) Dmitry G. Shchukin et al., Angew. Chem. Int. Ed. 44 (2005) 3310–3314.
- 3) P. Jackson et al., Energy Procedia, 1 (2009) 985–994.

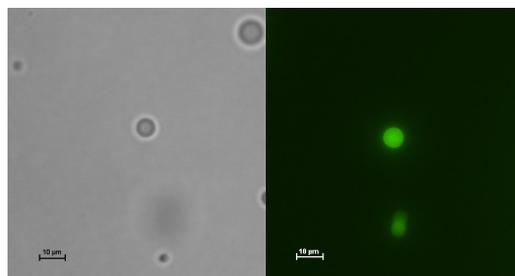


Fig. 6 Bright-field (left) and epifluorescence (right) images of hollow PAH/PSS microcapsules. The pH of the solution is 6.9.

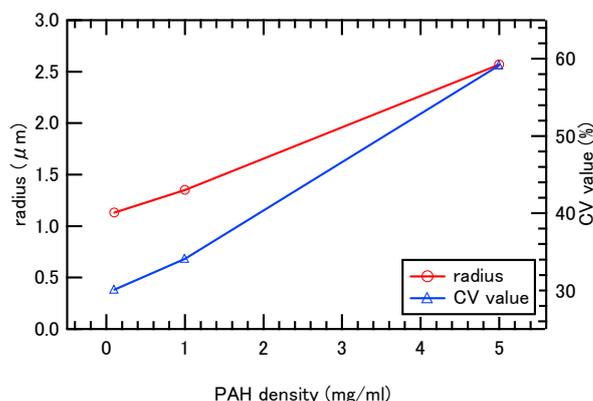


Fig. 7 PAH microcapsule mean radius and CV value change in PAH density.