

界面構造による表面間相互作用の変化の
プローブ AFM 法による解析

Analysis of surface interaction transition between different
interface structures by using probe AFM method

2019.9

東京農工大学大学院
生物システム応用科学府
生物システム応用科学専攻
物質機能システム学専修

山本昌弘

要旨

走査型プローブ顕微鏡 (SPM) の一つである原子力間顕微鏡 (AFM) は 1985 年に開発され、物質間のナノレベルの相互作用を測定するため、AFM プローブのチップ先端に、数 μ サイズの球形粒子を付けたコロイドプローブ AFM 法が、1992 年に W.A.Ducker and T.J.Senden により開発された。本研究では、物質が接触する界面において、界面の構造に起因する相互作用の変化を評価するため、コロイドプローブ及び、カーボンナノチューブ (CNT) プローブを用い、医薬品分野として、ドラッグデリバリーシステム (DDS) での「生体粘膜と薬剤搬送用カプセルの相互作用」、材料分野では、セラミックス粉体の成形過程で、分散剤とゲル化剤の複数の作用を発現する有機高分子 (ISOBAM) の作用機構の解明を試みた。

DDS 分野では、二種類のマイクロカプセルを対象とした。相互作用を評価する生体粘膜としては、小腸や胃の粘膜を構成するムチンを用いた。第一のカプセルは、pH 応答性のある、core-shell 型の球状カプセルを対象とした。小腸内で薬剤を吸収させるため、薬剤をカプセルの core の中に仕込み、経口投与した際、酸性の胃内では shell が収縮し、薬剤が保護され、併せて、shell は胃粘膜には付着せず通過する。アルカリ性である小腸内では、shell が膨潤して core の薬剤を徐放し、ムチン粘膜に吸収させる。そのため、ムチン粘膜と極力長期間カプセルが付着し、薬剤がムチン粘膜に拡散移行するカプセル設計が必要となる。この目的のため、カプセルを、直径数 μ m の凝集球形体としてコロイドプローブ化し、ムチン膜はマイカ平板上に固定化して、相互作用を測定した。本研究では、小腸内でのカプセルの斥力を制御するために、低分子と高分子の架橋剤を shell に導入して、その効果を検討した。低分子架橋剤は、中性域でムチンとの斥力が減り、小腸粘膜に付着しやすくなり、分離時の付着力が維持された。一方、高分子架橋剤では、斥力の増加と、付着力の低下が観察され、逆効果となることが判明した。

第二の DDS 用マイクロカプセルとして、リン脂質二重層の構造を表面に持つ直径数 μ m の球状粒カプセルであるリポソームを対象とした。リポソームは形状を維持する力が弱いいため、外表面にキトサンを被覆修飾することで形状維持力を高め、キトサンの接着性がムチンとの相互作用に及ぼす影響を検討した。形状維持力を評価するため、CNT プローブを用い、プローブ表面にムチン膜を被覆し、カプセルは平板上に固定した。キトサン未修飾では、ムチンと接触後の粘膜付着力が観察されなかったが、キトサン修飾により、付着性の増大が観察された。また、キトサン未修飾では、接触・分離の間にフォースカーブのヒステリシスが観察され、リポソーム膜の柔らかさが確認された。キトサン修飾により剛性の増加も確認された。

最後に、 Al_2O_3 系セラミックスの湿式成形プロセスにおいて、原料粉体の水スラリーに添加した当初は分散剤として作用し、時間の経過とともにゲル化剤の両方の効果を有するアンモニア変性イソブチレン無水マレイン酸共重合体(クラレ(株)製、ISOBAM)の作用機構を解明するため、 Al_2O_3 表面間相互作用の水中での経時変化の測定を試みた。ゲル化作用が発現しない SiO_2 との比較を行った。 SiO_2 と Al_2O_3 のコロイド粒子を用意し、それぞれ SiO_2 板

(ガラス)、 Al_2O_3 板(サファイア)との間で ISOBAM 溶液を介して AFM フォースカーブを取得解析した。その結果、 SiO_2 では、斥力のみが生じ経時変化は少ないため、分散剤としての機能のみが認められた。 Al_2O_3 では、添加当初は斥力と引力の低減が観察され分散作用が高いことが、確認された。時間の経過とともに斥力が消失し、徐々に長距離引力が発生し、長時間作用が残ることが確認された。この長距離引力の発現により、ゲル化が進むことが判明した。

以上のように、プローブ AFM 法による相互作用の計測により、医薬品、セラミックス材料プロセスなど、幅広い分野で、界面構造の制御が、マクロ挙動の影響を及ぼす相互作用を定量的に評価され、現象の解明と、更なる界面構造設計指針を与えることが立証された。

Abstract

By using Atomic Force Microscope (AFM) with different type probe, such as, colloid probe and Carbon Nanotube (CNT) probe, surface interactions between various particles and capsules with different interface structure were characterized and discussed the mechanism of interface structure design on surface interaction and macroscopic behavior of capsules and particle in liquid.

First, the core-shell type micro capsule with pH and temperature response was focused for oral drug delivery system, DDS. To control swelling behavior of pH sensitive shell, cross-linking polymer agents with different molecular weight were doped into shell structure and measured the surface interaction between capsule colloid probe and mucin layer on mica surface. When the small molecular weight polymer was used as cross-linker, repulsive force between capsule and mucin was reduced and easy to absorb on mucin layer. In the case of large polymer cross-linker was not useful to control surface interaction.

Second, the chitosan coated liposome for oral DDS system was characterized adhesion and repulsion force on mucin layer by using CNT probe AFM method. By using CNT probe, the effect of chitosan coat on deformation behavior of liposome. In neutral pH condition modified in small intestine, chitosan coated liposome increased attractive force with mucin layer, and elastic deformation behavior compared with original liposome without chitosan coating.

Third, ammonia denaturing isobutylene maleic anhydride copolymer (tradename :ISOBAM) which worked as a dispersant of dense Al_2O_3 suspension immediately after addition, and then, acted as a gelling agent after 3 hr. The time dependent change of surface interaction between Al_2O_3 after addition of ISOBAM was determined by colloidal probe AFM. Firstly, repulsive force was generated and then observed long range attractive force, and corresponded to gelation phenomena of Al_2O_3 suspension.

Based on the above results, I discussed about the effectiveness of probe AFM for analysis of various fine particles and capsules phenomena.

目次

第 1 章 緒論	1
1.1 AFM による表面間力評価	2
1.1.1 装置原理とフォースカーブ表示例	3
1.1.2 コロイドプローブ AFM 法	4
1.2 マイクロカプセルを用いた薬剤搬送システム、Drug Delivery System (DDS)	6
1.2.1 DDS の研究開発課題の概要	6
1.2.2 薬剤透過性等に関わる粘膜層の構造と性質	8
(1) 粘膜層の構造と成分	8
(2) 粘膜層の役割	10
1.2.3 薬物の消化管からの吸収性改善と分解防止	10
1.2.4 小腸での薬物吸収を目指した製剤設計及び、関連する既往の研究	10
(1) 温度-pH 応答性 core-shell 型ナノゲル粒子の <i>in vitro</i> 評価	11
(2) リポソームのポリマーコーティングによる設計	15
1.2.5 プローブ AFM 法によるマイクロカプセル機能の評価例	21
(1) core-shell 型ナノゲル粒子の評価	21
(2) リポソーム/ヒト血清アルブミン(HSA)間相互作用の測定	22
(3) AFM を用いたリポソームの剛性評価	23
1.2.6 DDS に関する既往の研究における課題	24
1.3 セラミックスプロセスにおける粒子界面設計	25
1.3.1 セラミックス原料粒子の分散・凝集現象と界面設計	25
1.3.2 セラミックス成形プロセスの分類	26
1.3.3 ゲルキャストリング法	27
1.3.4 イソブチレン/マレイン酸共重合体を用いた ゲルキャストリングに関する研究	29
1.3.5 セラミックスプロセスにおけるプローブ AFM 法を用いた研究	32
1.4 本研究の目的と論文構成	33
Reference (引用文献)	34
第 2 章 pH 応答性薬剤カプセルと粘膜の表面間力に対してカプセル内部の 架橋が及ぼす影響のコロイドプローブ AFM 法による評価	40

2.1 緒言	41
2.2 実験	42
2.2.1 core-shell 型ナノゲル粒子の core 部分の調製	42
2.2.2 core-shell 型ナノゲル粒子の調製	44
2.2.3 リン酸緩衝液の調製とナノゲル粒子の電気泳動移動度、 平均粒子径の測定法	44
2.2.4 ナノゲル顆粒を付けたコロイドプローブ調製法	44
2.2.5 洗浄マイカの調製法	46
2.2.6 ムチン担持マイカの調製法	46
2.2.7 ナノゲル顆粒—ムチン層間の相互作用の測定方法	47
2.3 結果及び考察	48
2.3.1 架橋剤の種類と pH の変化がナノゲル粒子の平均粒子径と 電気泳動移動度に及ぼす影響	48
2.3.2 マイカ表面へのカップリング処理剤、ムチン吸着状態の確認	50
2.3.3 ナノゲルコロイドプローブとムチン層間の相互作用の測定結果	52
2.3.4 フォースカーブの分布の平均化処理と統計的考察	56
2.4 結言	59
Reference (引用文献)	60
第 3 章 CNT(カーボンナノチューブ)プローブ AFM 法による キトサン修飾リポソームとムチン間相互作用の評価	62
3.1 緒言	63
3.2 実験	65
3.2.1 リポソームの作成と特性評価	65
3.2.2 マイカ平板表面へのリポソームの固定化	67
3.2.3 CNT へのムチン吸着法の検討、及び CNT プローブへのムチン吸着	67
3.2.4 AFM によるムチン/リポソーム間フォースカーブの測定	69
3.3 実験結果及び考察	70
3.3.1 生成したリポソームのキトサン修飾、形態、粒度分布と考察	70
3.3.2 電気泳動移動度による CNT 表面へのムチン吸着状態の評価	72
3.3.3 リポソームとムチン吸着 CNT プローブ間の フォースカーブ測定と統計的考察	73

(1) ムチン吸着 CNT プローブによるフォースカーブ測定結果.....	73
(2) キトサン未修飾時のヒステリシスと、 キトサン修飾時の引力パターンに関する考察.....	80
3.4 結言.....	83
Reference (引用文献)	84
第4章 イソブチレン・マレイン酸コポリマーによる Al₂O₃ スラリーの分散 及びゲル化過程のコロイドプローブ AFM 法による評価.....	86
4.1 緒言.....	87
4.2 実験.....	88
4.2.1 原料及びスラリー調製と特性評価.....	88
4.2.2 SiO ₂ と Al ₂ O ₃ コロイドプローブの作成.....	90
4.2.3 NaCl と ISOBAM 水溶液中の表面間力の経時的变化.....	94
4.3 結果と考察.....	95
4.3.1 スラリーのゲル化挙動の目視観察.....	95
(1) スラリー挙動の経時変化の目視観察結果.....	95
(2) SiO ₂ スラリーの流動曲線.....	98
(3) Al ₂ O ₃ スラリーの動的粘弾性の経時変化.....	99
(4) Al ₂ O ₃ スラリーへの ISOBAM の吸着特性.....	100
4.3.2 AFM フォースカーブによる経時変化の測定結果.....	100
(1) SiO ₂ コロイドプローブとガラス平板間の経時変化.....	100
(2) Al ₂ O ₃ コロイドプローブとサファイア平板間の経時変化.....	103
4.3.3 粒子系の ISOBAM 液中での作用機構の考察.....	104
(1) SiO ₂ の ISOBAM 液中での作用機構.....	104
(2) Al ₂ O ₃ の ISOBAM 液中での作用機構.....	106
4.4 結言.....	108
Reference (引用文献)	109
第5章 結言.....	115
謝辞.....	118

第1章 緒論

本章では、最初に、本研究において、異なる界面構造を有するカプセル、粒子の表面間相互作用の評価に用いる原子間力顕微鏡（AFM）の原理の概略と、この装置を用いた研究動向を述べる。そして、本研究で実施した、プローブ AFM 法を利用して界面構造と相互作用の関係を検討する研究対象である二つの研究分野、第一に、機能性マイクロカプセルを用いた経口投与による薬剤搬送システム(Drug Delivery System、DDS)での界面設計と実際の薬剤搬送機能の関係に関する研究、第二に、セラミックス製造プロセス、及び本研究で着眼するスラリー調整と成形過程において使用される分散剤、ゲル化剤などの添加剤に関する研究、をそれぞれ概観する。その上で、本研究で対象とした巨視的なカプセルと、粒子・スラリー挙動と微視的な表面間相互作用に関する既往の研究を紹介し、課題と研究目的、及び各章の内容を述べる。

1.1 AFM による表面間力評価

AFM (Atomic Force Microscope) ¹⁾は、走査型プローブ顕微鏡 SPM (Scanning Probe Microscope)^{2,3)}の 1 つであり、探針(プローブ)とサンプル間に働く力をコントロールし、サンプル表面の凹凸情報を画像化する顕微鏡である。Binnig¹⁾らの概念図を Fig.1-1 に示す。図中の TIP が、プローブの先端を示している。

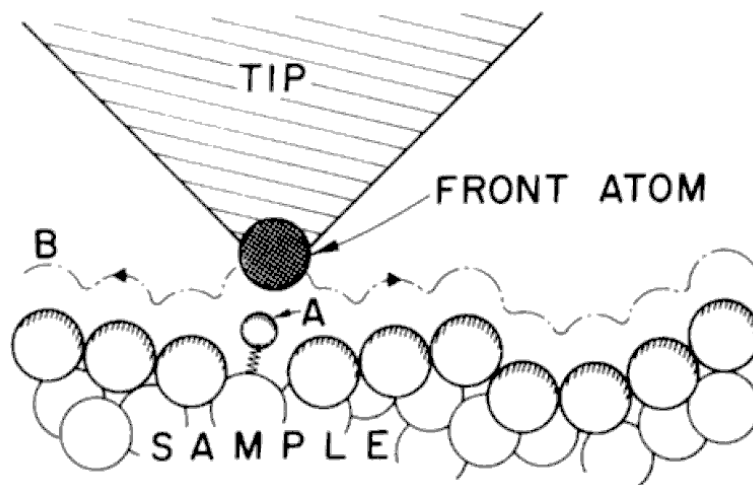


Fig.1-1 Description of the principle operation of an STM as well as that of an AFM¹⁾

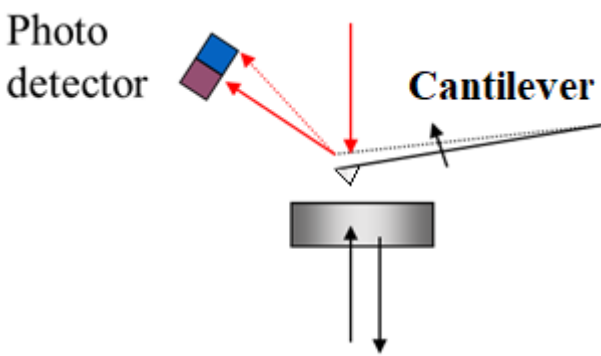
表面画像を計測する目的とともに、プローブとサンプル間を接近、接触そして分離操作の過程で観察される相互作用をフォースカーブとして計測できる。この機能を利用して、TIP 先端に、球形粒子や、カーボンナノチューブ (CNT) を付けたプローブとサンプルの組合せで様々な材質の表面間相互作用を評価することができる。最初に本法の原理と応用事例を概観する。

1.1.1 装置原理とフォースカーブ表示例

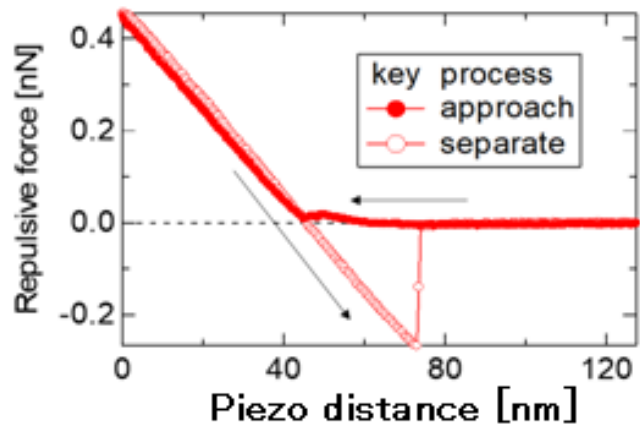
Fig. 1-1 に示した TIP 部は、Fig.1-2(a)に示したように、板バネ原理のカンチレバー (Cantilever)の先端に取り付けられている。サンプルは、 piezo素子を積層させたスキヤナに取り付け、piezo素子に加える電圧でスキヤナの膨張収縮量を制御することで、サンプルと TIP 間を接近、引き離れた際に、TIP とサンプル表面間に力学作用が働くとカンチレバーが変形する。Fig. 1-2(a)に示したようにカンチレバー背面に当てたレーザー光の反射光位置のずれを、二組の光検出器(Photodetector)に当たる光の強度の違いで感知し、その差を電位差に変換し、カンチレバーの変形量を計測する。測定したカンチレバーの変位量と、事前に計測したバネ定数の積により、力に換算する。

Fig. 1-2(b)に観察されるフォースカーブの例を示した。スキヤナの高さ方向の移動量が、X軸の値となり、各位置で計測されるカンチレバーのたわみや反りなどの変位から求めた力が、Y軸に表示されフォースカーブが得られる。

1回のフォースカーブの計測は、Fig. 1-2(b)に示したように、ある表面間距離から、サンプルと TIP を接近させる過程 (approaching, trace,または extract と称する)、サンプル表面に接触後、指定した力 (Set point と称する) まで押上がり、力が Set point に達した時点で反転し、分離方向に駆動させる過程(separating, retrace,または retract と称する)を経て、元の位置に戻る。



(a) Principle of AFM



(b) Example of force curve

Fig. 1-2 Principle of AFM and example of force curve.

1.1.2 コロイドプローブ AFM 法

Ducker らは、市販 AFM 探針にミクロンサイズの球形シリカを接着し、平滑なマイカ劈開面との相互作用を、塩濃度を変えてフォースカーブを測定し DLVO 理論⁴⁾との比較を行った。このような球形粒子を用いた測定法をコロイドプローブ AFM 法⁵⁾と称した。Fig.1-3 に球形シリカ粒子を付けたコロイドプローブの一例を示す。コロイドプローブを作製する手法として、マイクロマニピュレーション装置を用いた方法が報告されており、比較的簡便に作製が可能となっている。⁶⁻⁹⁾

このコロイドプローブを用いた測定例は、多数の報告がある。最初の報告は、Ducker らが行った報告で、Fig.1-4 に示したように、pH を 5.7 に調整して、表面電位を負に設定した上で、NaCl 濃度、すなわち対イオン濃度を変えてフォースカーブを測定した。DLVO 理論から求められる表面電位一定の条件で対イオン濃度を変え、得られる理論曲線とプロットした実測値を比較した結果である。市販探針の 20 nm 程度の鋭い先端の曲率では、厳密な理論値を求めることが困難なため、コロイドプローブにより、曲率をミクロンサイズにすることで理論との比較を可能とした。縦軸は、理論との比較を容易にするため、力を積分したポテンシャル値を与えている。対イオン濃度の変化による理論線と実測結果の良好な一致を示している。

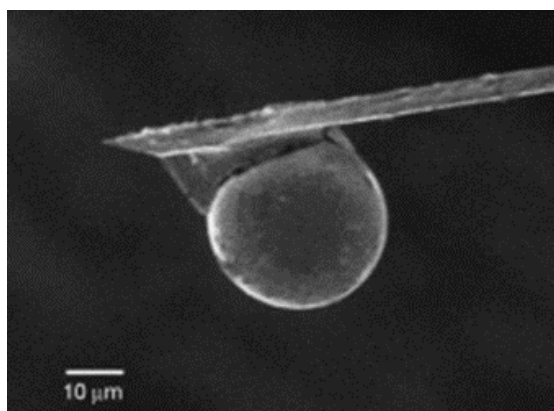


Fig.1-3 Photograph of Colloid probe⁴⁾

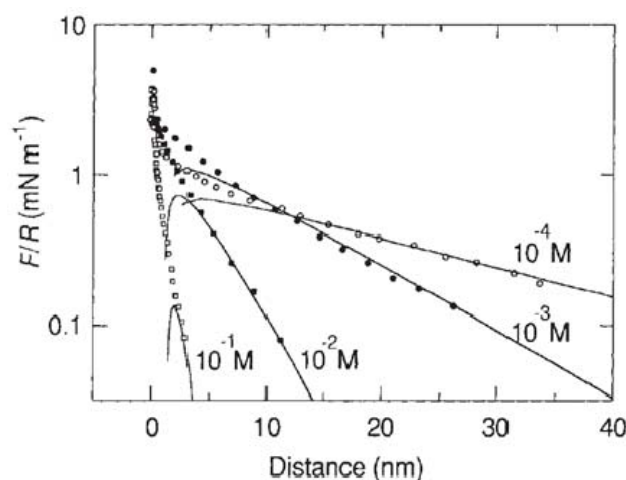


Fig.1-4 Force on a silica-glass particle in aqueous solution in a variety of NaCl solutions at 30°C pH 5.7⁴⁾

その後、現在に至るまで、コロイドプローブ AFM 法を用いた研究は、盛んにおこなわれている。Wada らは、サファイア方位 C (0001) 表面上に生成している親水性、及び疎水性領域の分布を、親水性の SiO₂ 製と、疎水性のポリスチレンのコロイドプローブを用いて相互作用の差を測定し、明確な相互作用の境界を見出した。ポリスチレンコロイドプローブの方の検出精度が良いことを見出している¹⁰⁾。

Ishida らは、親水性の SiO₂ 粒子表面をオクタデシルトリクロシラン (OTS) を使って疎水化しプローブを作製し、疎水性の程度を変えた水中のシリコンウエハ表面との間で、引力の程度を測定し、水との接触角との関係を比較し OTS の効果を調査した。シリコンウエハ表面が完全に親水性の時だけ、DLVO 理論に従うことと、接触角が 40°の時に引力は DLVO 理論値よりも長距離に及ぶことを見出している¹¹⁾。

Nguyen らは、リチウムイオン電池用のバインダーとして、ポリアクリル酸 (PAA)、ポリアクリロニトリル (PAN)、ポリビニールアルコール(PVA)、カルボキシメチルセルローズ (CMC) を、現在、通常の電池で用いられているポリふっ化ビニリデン (PVDF) との接着力の差をコロイドプローブ AFM 法で測定した。気中では、PVDF に比べ同等から数倍程度、ヘキサフルオロリン酸リチウム(LiPF₆)電解液中では全て数十倍以上の接着性を示した。特に PAA と、CMC は、表面も平滑で良好な接着性が得られることも確認された¹²⁾。

以上のように、様々な系を対象に、表面間相互作用への界面構造等の影響を評価する手法として、本方法は使用されている。

本論文では、このプローブ AFM 法を用いる対象として、DDS 用のマイクロカプセル、及び、セラミックス湿式成形プロセスを対象とした。各対象において、界面構造による表面間相互作用の制御が、重要な基盤技術となる事例を示す研究を、それぞれの系について紹介する。

1.2 マイクロカプセルを用いた薬剤搬送システム、Drug Delivery System (DDS)

本項では、薬剤搬送システムの中でマイクロカプセルを用いた経口投与法に関する背景と、研究動向を最初に概観する。DDS は、薬物が病変部位以外では副作用の原因になることを防ぐため、薬物をできるだけ選択的に病変部位に送り徐放させる目的で開発されている^{13,14}。近年、微量でも高い薬理活性を示す医薬品候補物質が開発されてきているが、送達性、安全性に問題があるため、投与に工夫が必要なものが多く、DDS 技術の開発が重要な課題となっている^{15,16}。ここでは最初に、DDS の開発されている主要な手法を概観した後、多くの DDS 技術で薬剤を生体内に効率的に送り込むために制御すべき重要な関門である粘膜層の構造や働きを概観する。

1.2.1 DDS の研究開発課題の概要

DDS 開発における制御の対象としては、薬物放出特性、標的部位指向性等がある。薬物放出特性 (Controlled release) 制御は、病変部位や、作用部位に薬物を供給する速度を制御し、濃度と作用時間の最適化する。濃度制御の考え方の事例を Fig.1-5 に示す¹⁷。

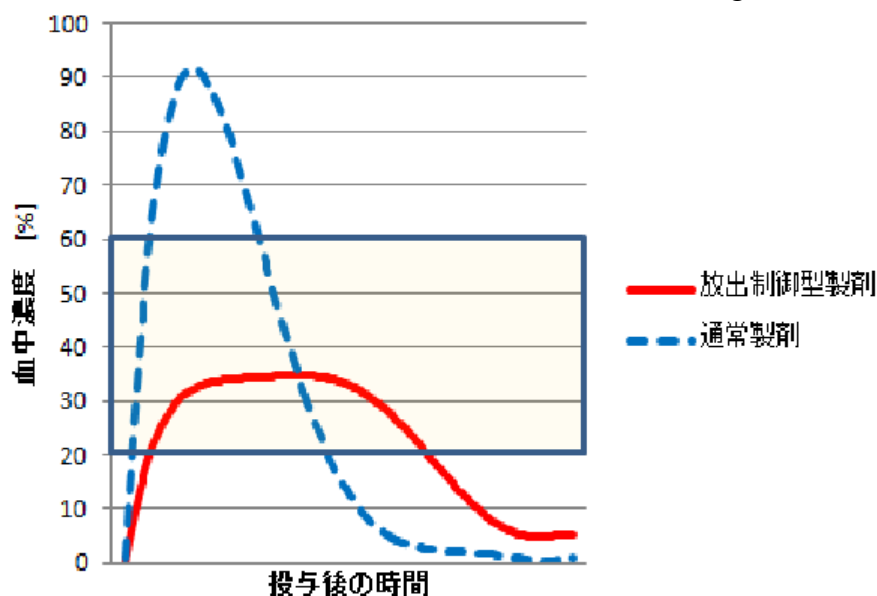


Fig.1-5 Drug levels in the blood normal formulation and controlled release¹⁷⁾

血中薬物濃度が副作用領域 (毒性発現領域) を超える、あるいは、無効域まで低下することを回避するため、血中薬物濃度のピークを平坦にし、薬物濃度をできるだけ長く作用部位付近で維持する制御が一般に試みられる。最も一般的な、経口投与型では、胃、十二指腸、空腸、回腸の消化器での pH の差を利用し、特定部位で薬剤が放出される機能を有するカプセルの徐放化錠剤、半透膜をコーティングした浸透圧ポンプ型の製剤、ゼラチンカプセルに徐放性顆粒などを組み合わせたカプセル剤などがある。消化管粘膜表面の粘液や粘膜上皮細胞に付着しやすい化合物をカプセルに用いて消化管内での滞留性の向上を目

的としたものもある^{18,19)}。

標的部位指向性 (targeting)は、薬物が生体内に入ってから、病変部位にのみ送り込もうとするものである^{20,21)}。これは少量投与で効果を挙げるとともに、副作用を低減する手法である。targeting システムとしては次のようなものが考えられている^{10,22)}。

- ① ターゲット部位に選択的に吸着あるいは作用する薬物。
- ② プロドラッグ法、酵素反応等により、病変部位でのみ活性化する手法。
- ③ 外部から制御する磁性誘導療法。
- ④ 薬物キャリア (ナノゲル、リポソーム、エマルジョン、マイクロスフェアなど) 表面に免疫化学的キャリア (抗体、ホルモンなど) により指向性を付与する療法。

1.2.2 薬剤透過性等に関わる粘膜層の構造と性質

本項では、薬剤カプセルとの相互作用の直接の対象となる生体粘膜がどのような性質を持っているかを概観する。

(1) 粘膜層の構造と成分

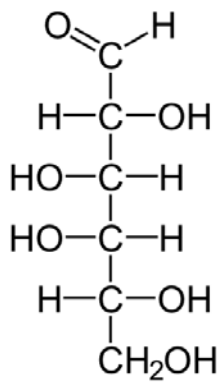
粘膜とは消化器等の上皮表面に付着しているゲル被覆層で、半透明で、粘着性を有する。厚さは、ヒトでは部位によりおよそ 50~450 μm まで変化する²³⁾。小腸や大腸ではひだの表面に形成されている。

粘膜の成分は動物種、存在部位、健康状態、等により変化する。粘膜は胃や小腸では上皮内腔にある外分泌腺により、大腸では上皮表面にある杯細胞により主に分泌される。粘膜成分は一般に以下の **Table1-1** のような構成となっている²⁴⁾。

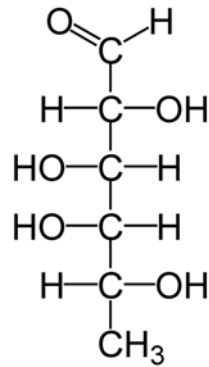
Table 1-1 Mucin components²⁴⁾

水	95%
糖タンパク質と脂質	0.5-5%
無機塩	1%
フリーなタンパク質	0.5-5 %

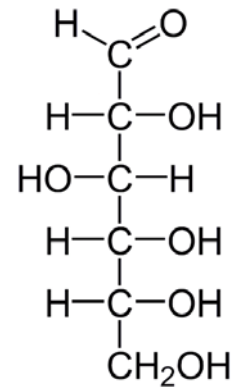
このうち粘膜の主な特性を決定するのは脂質を除いた糖タンパク質でムチンと呼ばれている²⁵⁻²⁷⁾。ムチンの高分子量タンパク質構造は、主鎖を構成するアミノ酸は、酸素原子を介したグリコシド結合による側鎖を持ち、側鎖は直線状のオリゴ糖鎖である。オリゴ糖鎖は、**Fig.1-6** に構造式を示す五つの異なるタイプの単糖が、直鎖状のものは環状になってグリコシド結合で繋がって平均 8~10 環程度で側鎖が形成される。



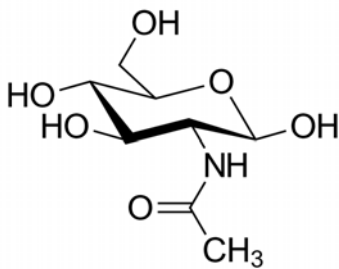
(a) L-フコース



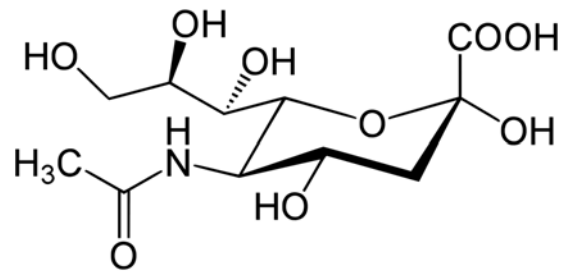
(b) D-ガラクトース



(c) グルコース



(d) N-アセチルグルコサミン



(e) N-アセチルノイラミン酸

Fig.1-6 Molecular structures of the monosaccharide composing mucin²⁸⁾

それらの単糖は L-フコース、D-ガラクトース、グルコース、N-アセチル-D-グルコサミン、シアル酸である²⁸⁾。このうち、最も末端に存在する単糖はほとんどの場合、シアル酸であり、これが粘膜の諸特性の決定因子となる²⁴⁾。人での重要なシアル酸は N-アセチルノイラミン酸である。このシアル酸を含む五つの単糖の構造式を **Fig.1-6** に示す。また、タンパク質主鎖から側鎖を出すアミノ酸は主にセリン、スレオニンである²⁹⁾。

(2) 粘膜層の役割

上皮細胞上を覆う粘膜は様々な役割を担っている。以下に主な役割の概要を示す²³⁻²⁸⁾。

- ①**保護特性**：粘膜組織は消化管上皮細胞表面への消化液等の攻撃から上皮細胞層を保護している。
- ②**障壁の機能**：粘膜は薬物等の透過吸収の阻害となる。薬物の粘膜層透過性は、活性成分の物理化学的特性に大きく依存する。
- ③**付着特性**：粘膜は強い粘着特性を持ち、連続したゲル層として上皮細胞表面に付着している。
- ④**潤滑特性**：粘膜層は上皮細胞を湿らせておく役割を果たす。杯細胞から粘液は連続的に分泌され、バクテリア等で損傷を受けた粘膜層は、常に補われている。

1.2.3 薬物の消化管からの吸収性改善と分解防止

本項では、薬剤カプセルが粘膜と相互作用を行うまでに考慮しなければならない周辺環境について述べる。

経口投与された薬物が、消化管の粘膜に到達し、吸収されるまでには様々な吸収障壁や薬物分解などの阻害要因が存在する。薬物によっては種々の阻害要因のため、吸収性が著しく低い場合も多い。こうした薬物の吸収性を改善するため、吸収障壁や分解作用を何らかの方法で制御することが必要である。考慮する現象として、投与後最初に滞留する胃の中では酸による分解がある。例えば、腸溶性製剤は、錠剤、顆粒剤が、胃の低い pH や中性では溶解せず、腸に到達して塩基性に曝されてはじめて溶ける高分子被膜を施した製剤である。こうした簡便な手法の他、近年、様々な製剤設計が取り組まれている。その研究動向を次項で概観する。

1.2.4 小腸での薬物吸収を目指した製剤設計及び、関連する既往の研究

中分子量のペプチド性薬物は、低分子より副作用が弱く、高分子タンパク薬剤に比べ合成が容易であるため、開発が進んでいる。しかし、一般に化学的安定性に乏しく、また分子量が大きいため生体膜透過性も低い。そのため、これらの薬物を経口適用型製剤とするには、こうした課題を克服するため薬物キャリアとしてカプセル等を用い、界面構造等の高度な設計が必要となってくる^{30,31)}。本研究で対象とした、刺激応答性高分子からなるペプチド性薬剤の経口送達用 core-shell 型ナノゲル粒子の研究³²⁾。及び、リポソームを利用する手法の研究概要を以下に紹介する。

(1) 温度-pH 応答性 core-shell 型ナノゲル粒子の *in vitro* 評価、

本項は第二章の研究の元となる研究背景である。

市川らは、ペプチド性薬物の小腸での吸収を目指した製剤粒子として、水中で 32°C 付近に体積相転移温度を有する poly-N-isopropylacrylamide (**p(NIPAAm)**) ヒドロゲルからなる core の粒子表面に、pH 応答性膨潤収縮挙動を示す polymethacrylic acid-g-ethylene glycol (**p(MAA-g-EG)**) が被覆された core-shell 型ナノゲル粒子の設計を行なった³³⁾。

この core-shell 型ナノゲル粒子の調製方法を **Fig.1-7** に示した。まず、分散剤として添加する 0.2 mM の sodium dodecyl sulfate 水溶液に温度応答性 core 原料の NIPAAm と Tetra ethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA)、重合開始剤として 1-Hydroxycyclohexyl phenyl ketone を混合し、恒温層中 70°C で 30 分間 UV 照射(365 nm)を行なう。この溶液に Methacrylic acid(MAA)/ polyethylene glycol monomethacrylate (PEGMA) さらに架橋剤として polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDMA)を加えた水溶液を 1mL/min の流速で滴下する。滴下終了後、さらに 70°C で 30 分間 UV 照射を行なうことで、コロイド状のナノゲル粒子分散液が精製される。このナノゲル粒子分散液を水中で 5 日間透析し、core-shell 型ナノゲル粒子を調製している。調製された core-shell 型ナノゲル粒子の TEM 画像を **Fig.1-8** に示した³²⁾。

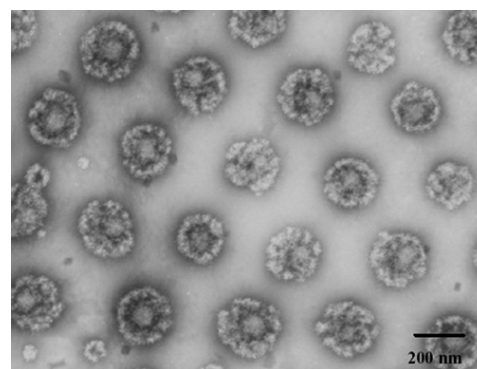
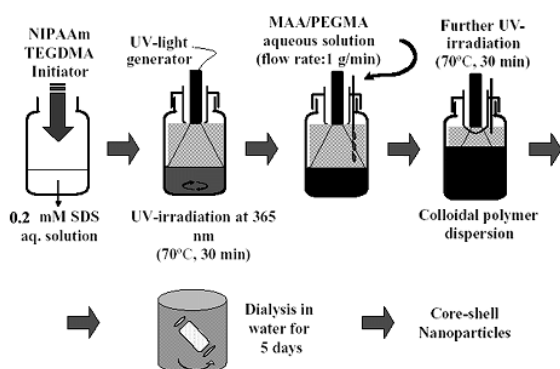


Fig.1-8 TEM image of core-shell nanoparticles³³⁾

Fig.1-7 Preparation method of core-shell nanoparticles (CSNPs)³³⁾

この core-shell 型ナノゲル粒子の特徴を以下に示す。

- ① core-shell が共に膨潤する低温、中性 pH 条件下で、ペプチド性薬物の封入が可能
- ② 経口投与後、胃内の酸性 pH 下で core-shell が収縮、薬物を胃液による分解から保護
- ③ 小腸到達後、小腸内部の pH 上昇を利用して shell が膨潤し、収縮した core から薬物が徐放される

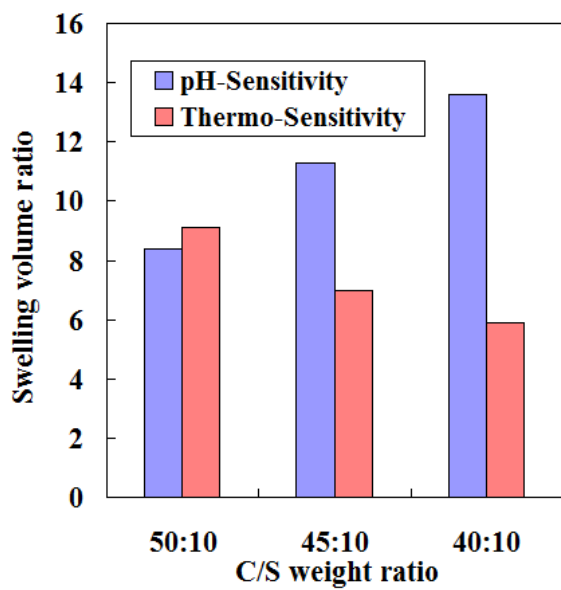
さらに、市川らはこの core-shell 型ナノゲル粒子の調製方法を変えて、それぞれの調製条件での core-shell の膨潤・収縮挙動を評価している³³⁾。体積膨張挙動等をナノゲル粒子の調整条件により比較した結果を Fig.1-9 に示した。

core-shell 比の影響を示した Fig. 1-9(a)では、core 成分の減少で温度による体積膨張率が減少し、pH による体積膨張率が増加した。shell 成分の MAA と EG の影響を評価した Fig. 1-9(b)では、MAA の増加により、温度体積膨張率は減少し、pH による体積膨張率が増加する傾向が見られた。また、shell 成分に架橋を施した Fig. 1-9(c)では、pH 体積膨張率が減少し、温度体積膨張率がやや増加した。

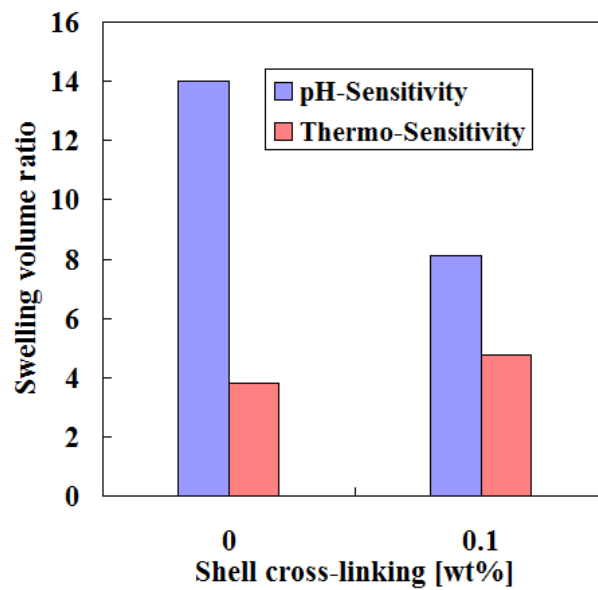
Fig.1-10 に shell 成分の pH による膨潤・収縮挙動メカニズムを示した³⁴⁾。pH 上昇による shell の膨潤は、shell 中の MAA のカルボン酸の負帯電による静電的反発作用と考えられる。shell 成分の MAA の増加によりカルボン酸の割合が増加し、pH による膨潤が促進されたと、考えられた。

core-shell 型ナノゲル粒子からの薬物放出性に関しては、ペプチド性薬物であるバンコマイシンとインスリンを対象として、溶液の pH を変化させたときの薬物放出率の経時変化率を評価している。どちらの薬物の場合でも pH の上昇に伴い薬物放出量が飛躍的に増加していることから、胃での薬物保護、小腸での薬物放出が期待できることが示唆された。また、core-shell 型ナノゲル粒子の上皮細胞間の密着結合 (tight junction) への効果に関しては、上皮細胞層に蛍光標識化デキストラン(FD-4)を混入して上皮細胞層を透過する FD-4 量を測定することで評価している。これによると、ナノゲル粒子存在下の方が FD-4 の透過性が向上していることがわかり、core-shell 型ナノゲル粒子が tight junction を拡張させることが示唆された。

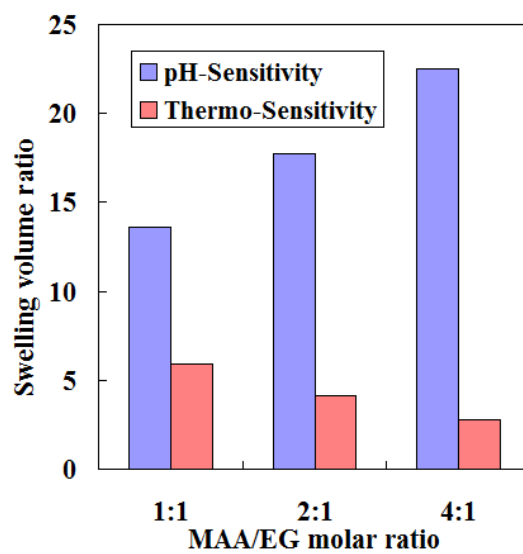
こうした結果から、core-shell 型ナノゲル粒子は消化管吸収性に乏しいペプチド性薬物に対しても、吸収促進効果を向上させる可能性があると考えられた。そこで、この core-shell 型ナノゲル薬剤微粒子が薬効を最大限に発揮できるように、小腸に選択的に捕捉・滞留するゲル構造の設計が必要になる。そのためには、胃では分解されず補足されない shell 構造で、小腸では付着性を示して捕捉・滞留され易い構造を定量的に見出す必要がある。



(MAA:EG=1:1)



(C:S=45:10)



(C:S=55:10)

(MAA:EG=5:1)

Fig.1-9 Swelling behavior of various CSNPs³³⁾

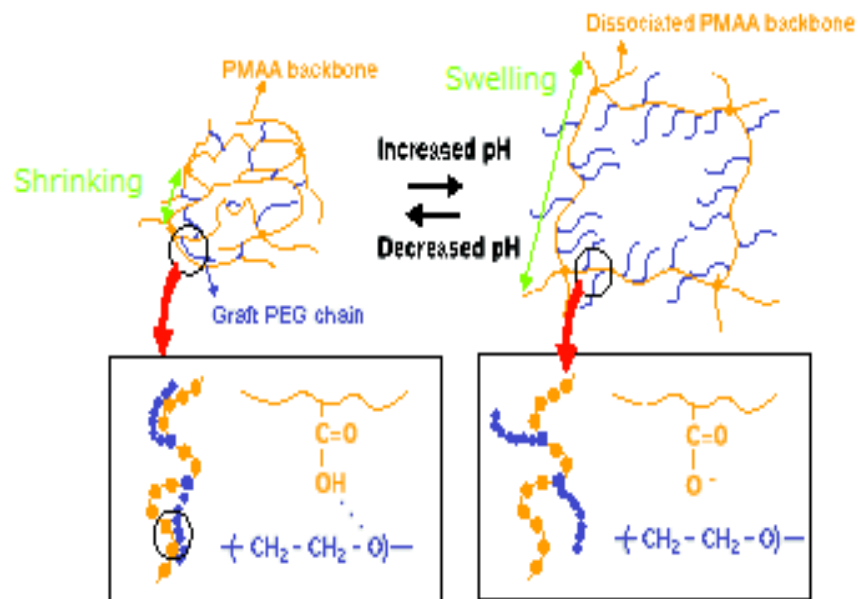


Fig.1-10 Swelling and shrinking mechanism of core-shell nanoparticle^{33,34)}

(2) リポソームのポリマーコーティングによる設計

本項はリポソームの概要に加え、第三章の研究に直接つながる研究背景である。

リポソームは脂質二重膜より構成される小胞体で模式図を **Fig.1-11** に示す³⁵⁾。

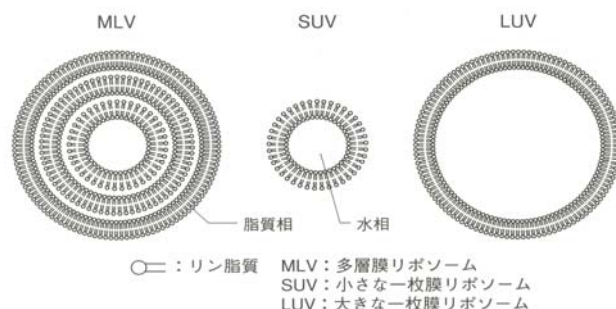


Fig.1-11 Structure of liposome³⁵⁾

図に示すように、リポソームは大きく分けて、多重層リポソーム (multi layer vesicle:MLV)、小さな一枚膜リポソーム (small unilamellar vesicle:SUV)、大きな (large unilamellar vesicle:LUV) の 3 種類がある。MLV の外径は $0.5\sim 10\ \mu\text{m}$ であり、脂質を水溶液に投入するだけで容易に調製できる。脂質二重膜が同心球のように入れ子で重なっており、安定性が良く薬剤等の保持容積も大きい。SUV は MLV を超音波処理することで調製でき、外径は 100nm 以下である。脂質二重膜は一層である。小さいので高分子薬剤などの保持には不向きだが、がん細胞への **targeting** システムに適している。SUV 同士は融合しやすい欠点がある。MLV を適切なサイズの穴をあけたポリカーボネートフィルターを通して変形させると層数を減らすことができ、数層から一層の LUV ができる。外径は $0.1\sim 1\ \mu\text{m}$ である。多くの薬剤を保持できるのが長所だが、変形しやすく壊れやすい。

1960 年代に **Bangham** によりリポソームの存在が明確にされると間もなく、インスリン経口投与への利用に関する研究が開始され、血糖値低下を指標としてリポソームの有効性の有無に関する検討結果が数多く報告された³⁵⁾。近年、リポソームの血中滞留性の増大を目的にリポソーム膜表面にポリエチレングリコール (PEG) を修飾し^{36,37)}、肝臓腫瘍との接触効率を向上させる研究³⁸⁾、PEG の習慣使用に伴って起こる薬効が失われる **accelerated blood clearance (ABC)** 現象^{39,40)} を克服する研究^{41,42)}、ターゲットとなる細胞へ親和性のあるペプチドをリポソーム表面に施す研究^{43,44)}、腫瘍細胞に特有な細胞間に生じる隙間 (**enhanced permeability and retention (EPR)** 効果⁴⁵⁾) を利用し、水溶性抗がん剤を内包したリポソームに PEG をコーティングして隙間から送達させる研究⁴⁶⁾、等がある。厚生省は「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」(薬生審査発 0328 第 19 号)を 2016 年 3 月に発布して、リポソーム剤形の普及を奨励している。

リポソームは①その構成成分が生体内成分のリン脂質からなるため安全性が高い、②超音波処理やフィルター透過などにより粒子径の制御が簡単、および③構成脂質や組成比を

変えることにより表面に電荷を持たせたり、表面を分子修飾が可能、などの特徴を有しており病変部位標的担体として用いられる⁴⁷⁾。近年、バイオテクノロジーの発達により、ペプチドおよび蛋白性薬物の開発が特に盛んになり、その中に薬物吸収性の乏しいものが多いことから、カプセルによる薬物の粘膜吸収促進に関心が集まっている。

リポソーム機能の界面設計による設計研究の一例として、竹内らは、いくつかのポリマーについて、リポソーム表面の修飾が可能であることを明らかにした⁴⁸⁻⁵⁰⁾。検討したポリマーは、①1分子あたり1~数個の疎水基を導入し部分的に疎水化した水溶性高分子、②親水性の高いイオン性高分子の2タイプに分類できる。前者としては、ポリビニルアルコール(PVA)の末端に長鎖アルキル基を導入したPVA-Rなどである。後者としては、特に粘膜付着特性が知られているキトサン(CS)や、架橋ポリアクリル酸である Carboxyvinyl Polymer(CBC(株)商品名：カーボポール)である。両方の機能を持たせるために、イオン性のポリアクリル酸に疎水性コレステロールを導入したPAA-Rも検討された。

キトサンの基本構造式を Fig.1-12 に示した。

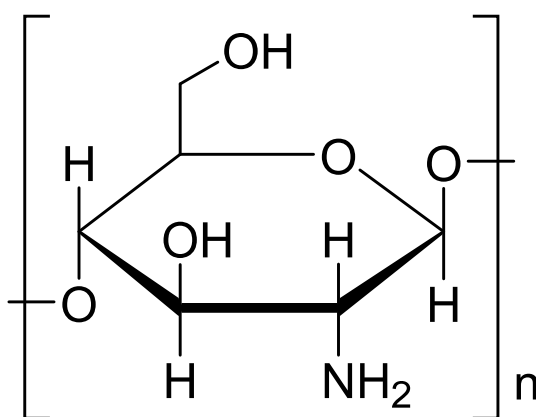


Fig.1-12 Molecular structure of Chitosan ($C_6H_{11}NO_4$)_n

コレステロール、長鎖アルキル基のような疎水基を導入したポリマーでは、疎水基がリポソーム脂質二重膜に貫入すること(anchoring)によりリポソーム表面を被覆できる。たとえば、保護コロイド作用の知られているPVAでもリポソーム表面への物理吸着は起こるが、ポリマー鎖が一様に表面に平行に重なって積層する。PVA-Rの場合は、疎水基部分がリポソーム表面から内部に入り込むことによってPVA鎖は表面から垂直に立ちやすくなり、矢が刺さるような形で密集する。このため、はるかに多いコーティング量、コーティングの厚みが測定され、コーティング様式の違いが明らかとなった。一方、イオン性水溶性ポリマーの場合は、リポソーム表面に反対符号の電荷を与えることにより、イオン結合を形成させコーティングすることが出来る。

Fig.1-13 にキトサン被覆リポソーム(CS-Lips : 分子量 150,000、LCS-Lips : 分子量 22,000) のゼータ電位測定結果を示した⁵¹⁾。0.2 M KOH と 0.2 M KCl により pH の調整を行っている。酸性ではキトサンのアミノ基が H^+ により帯電するため、正に帯電している。塩基性では、キトサンのアミノ基は $-NH_2$ として僅かに分極し δ^- のように負に帯電している。CS-Lips はアミノ基が多いために LCS-Lips よりも高い帯電性を示している。したがっていずれも pH 調整することによってリポソームへのコーティングを制御できる。

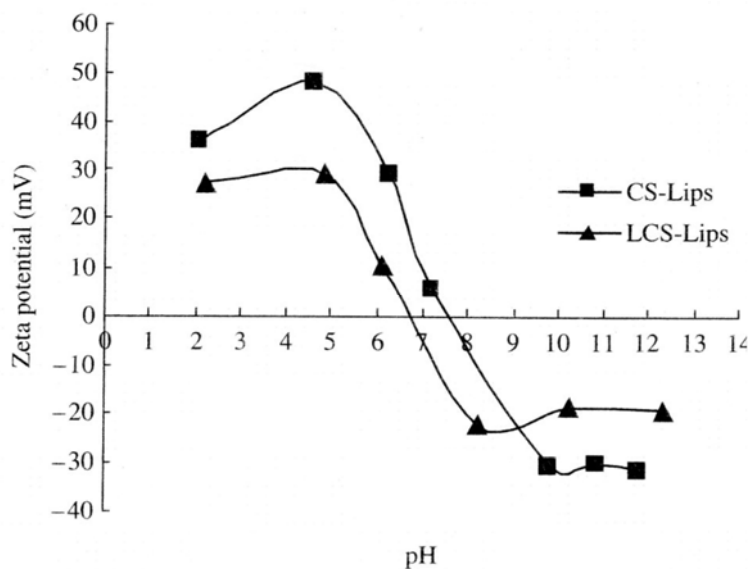


Fig.1-13 Zeta potential profiles of CS-Lips and LCS-Lips under various pH conditions⁵¹⁾

竹内らは表面修飾したリポソームの粘膜付着性を評価する手法として、摘出したラット腸管にリポソームスラリーを封入し、封入直後と一定時間後にコーンターカウンターで測定した数濃度の比較で吸着量を求める *in vitro* 評価法を確立し⁵²⁾。評価結果を **Fig.1-14** に示した。縦軸は腸管内に仕込んだリポソーム粒子の減少割合で、値が大きいほど付着性が高い。キトサンなどポリマーにより表面修飾したリポソームで比較した結果、未修飾の場合はほとんど付着しないのに対し、キトサン修飾リポソーム粒子が最も付着率が高かった。また、キトサン修飾量の増大に伴い、付着率も増加も認められた。

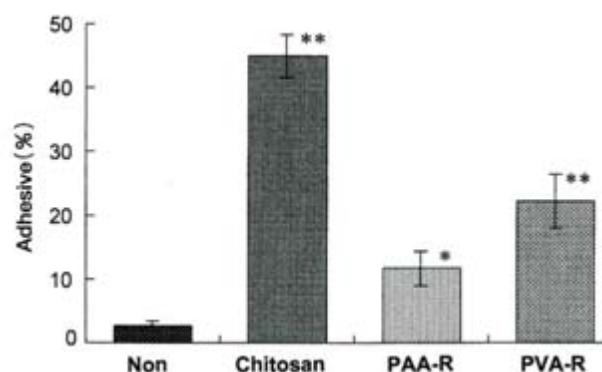


Fig.1-14 Mucoadhesive properties of various polymer coated liposomes⁵²⁾
 (Significant difference to the ‘Non’ *:p<0.05 **:p<0.01)

竹内らは、ポリマー修飾リポソームの実際の腸管での挙動観察のため、脂溶性蛍光マーカーDiIを封入したリポソームをラットに投与後、腸管を取り出し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察し、粘膜吸着・浸透特性の評価法を確立した^{47,53)}。

Fig.1-11 に示した多層膜のリポソーム (MLV Lip)、それより小さなサブミクロン化リポソーム (ss-Lip)、それらをキトサンコーティングしたもの (CS-Lip、ssCS-Lip) の 4 種類について、投与 2 時間後の同一な条件で、評価した結果を **Fig.1-15** に示した。

CLSM 写真より、Lip, ss-Lip いずれの場合も、キトサン修飾により腸管内上部に滞留性の向上が認められた。また、ss-Lip, ssCS-Lip は、粘膜内の基底外側(basolateral side)に存在が確認され、小さいほど移動が認められた。キトサン修飾により粘膜付着性が向上した場合でも、このような粘膜浸透性は観察されず、キトサンの役割は粘膜近傍の粘液層での滞留、浸入にあると推定している。

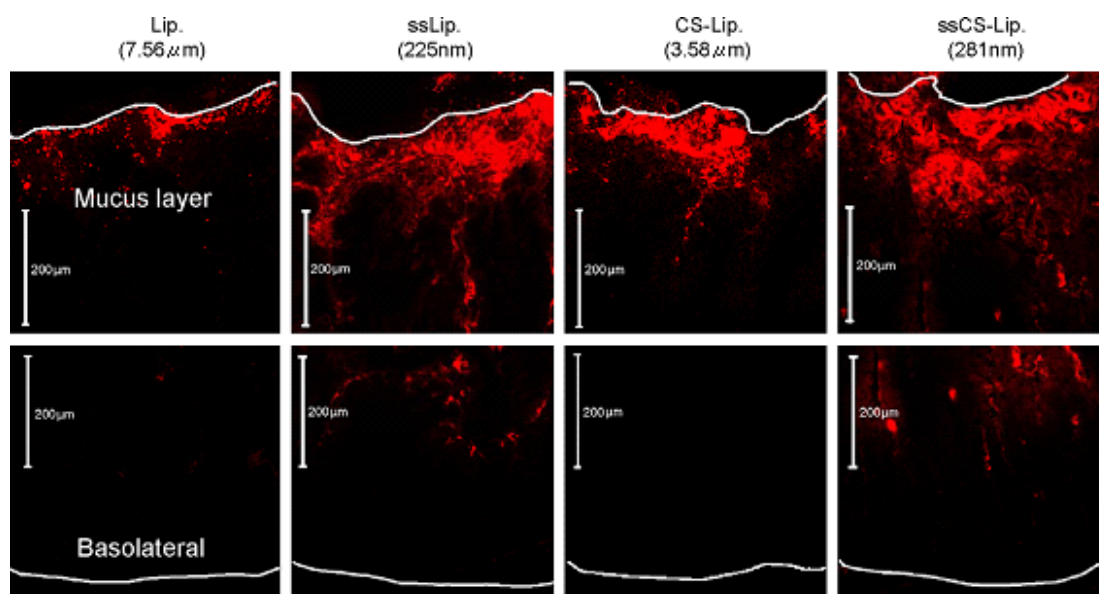


Fig.1-15 Confocal laser scanning microscopy photographs of the lower part of the jejunum 2h after intragastric administration of various types of liposomes⁴⁷⁾

キトサン修飾したほうが、より多く滞留する傾向が確認された。これは粘膜付着性により、腸管内の移行速度が小さくなっていることを表している。**Fig.1-16** には腸管各部位での残存する蛍光物質量の測定結果を示した。この結果からも、ssCS-Lip が優れた滞留性を示している。

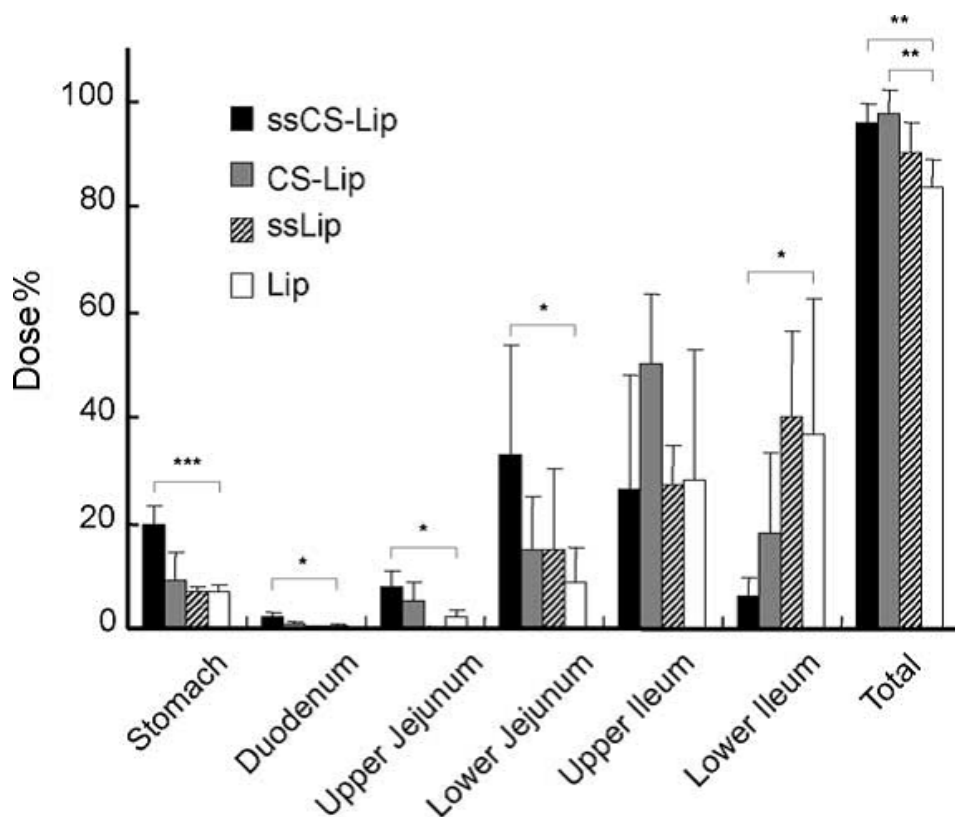


Fig.1-16 Retentive profile of various types of liposomes in the gastrointestinal tract at 1 h after intragastrical administration ⁵³⁾

1.2.5. プローブ AFM 法によるマイクロカプセル機能の評価例

(1) core-shell 型ナノゲル粒子の評価

本項は 1.2.4 の(1)項を受けコロイドプローブ AFM 法を用いた継続研究であり、第二章の研究に直接つながる研究である。

飯島らは市川らが作製した core-shell 型ナノゲル粒子を噴霧凍結乾燥し、ナノゲル粒子凝集粒子を用いて、コロイドプローブを作成することに成功した⁵⁴⁾。また、小腸粘膜主成分であるムチンを疎水処理したマイカ平板に吸着させることで、ナノゲル粒子/ムチン間相互作用を定量的に測定した。**Fig.1-17(a)**に接近時、**Fig.1-17(b)**に分離時のフォースカーブを示した。Fig.1-17(a)から胃の中を模擬する pH=2.2 の酸性条件ではナノゲル粒子が収縮し、shell 層の COOH 基も解離していないので静電反発作用も弱いことが分かる。pH>6 になると、COOH 基が-COO⁻基となり負に帯電するため、ナノゲルの shell 層が膨潤し高分子鎖が広がるため、遠距離から斥力が観察される。Fig.1-11(b)の分離過程では、pH<3 では、shell 層が収縮するため、分離時の遠距離作用は観察されない。pH>6 では高分子鎖が広がることで、ムチンとの間に架橋を形成して長距離の引力が観察された。

この結果から、消化器内でのカプセル機能向上のためには、小腸内部の pH では、shell の膨潤により、立体障害斥力が粘膜層への付着を阻害する恐れがあり、斥力の低減が必要で、逆に胃内部の酸性では斥力が働くような shell の構造設計が必要であることが示された。

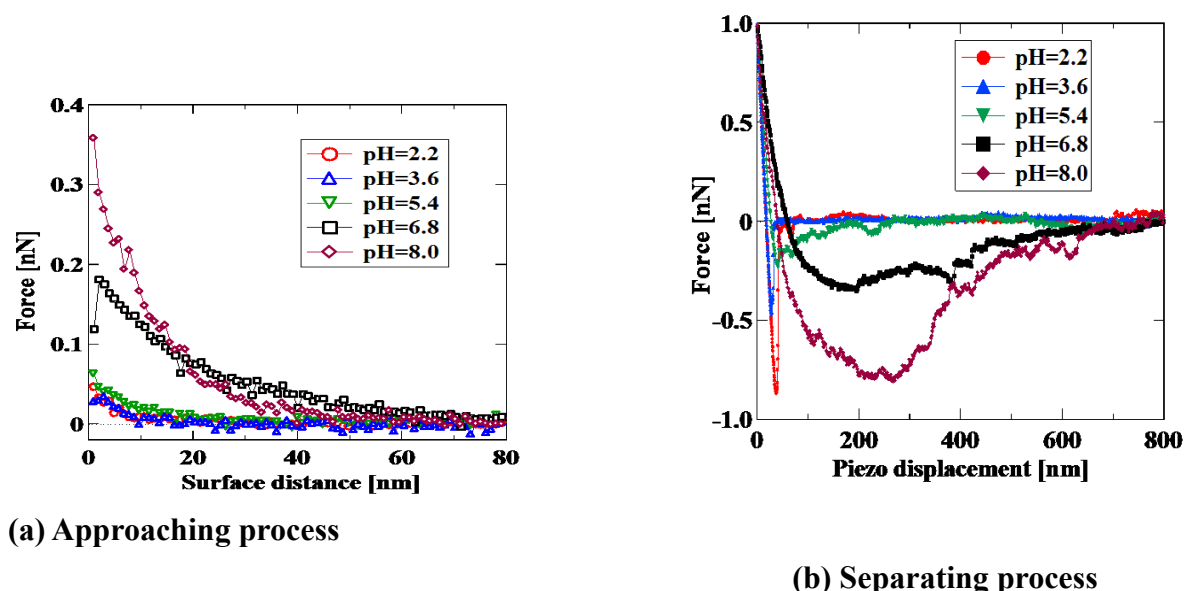


Fig.1-17 Interaction forces between core-shell nanoparticles and mucin⁵⁴⁾

(2) リポソーム／ヒト血清アルブミン(HSA)間相互作用の測定

本項及び次の(3)項は、コロイドプローブ AFM 法を用いたリポソームの一般研究である。第三章の研究に直接つながらないが、その関連研究として紹介する。

コロイドプローブ AFM 法によりリポソームを評価する研究も、Tarasova らにより行われている⁵⁵⁾。リポソームをコンタクトレンズの内側に塗布することで持続的な薬剤の徐放が試みられている。

その際にリポソームへのタンパク質の吸着性評価のため、血清中に多く存在するタンパク質のひとつであるヒト血清アルブミン Human Serum Albumin (HSA) を吸着した SiO₂ 粒子のコロイドプローブでリポソームとの相互作用を検討している。HSA 被覆 SiO₂ プローブは、市販 AFM 探針に SiO₂ 粒子を接着して作成した。HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S) 緩衝液中でカチオン性のポリエチレンジアミン (PEI) 溶液にプローブを浸して PEI を吸着させ、カンチレバーを緩衝液で洗浄後、HEPES 緩衝液中で HSA 溶液を加え、HSA を吸着させた。Fig.1-18 に HSA 被覆の有無による、SiO₂ コロイドとリポソーム間のフォースカーブの変化を示した。分離時の付着力は HSA 被覆により、(b) 0.55 ± 0.04 mN/m から (a) 0.17 ± 0.02 mN/m に減少した。HSA 未吸着の場合に見られた矢印で示す不連続な破断は見られず、HSA は比較的吸着汚染を起こしにくいと評価できた。この吸着量では必ずしも大きな差異ではないが傾向の差は明確に出ており、HSA の吸着量を増せば差は大きくなると予想される。

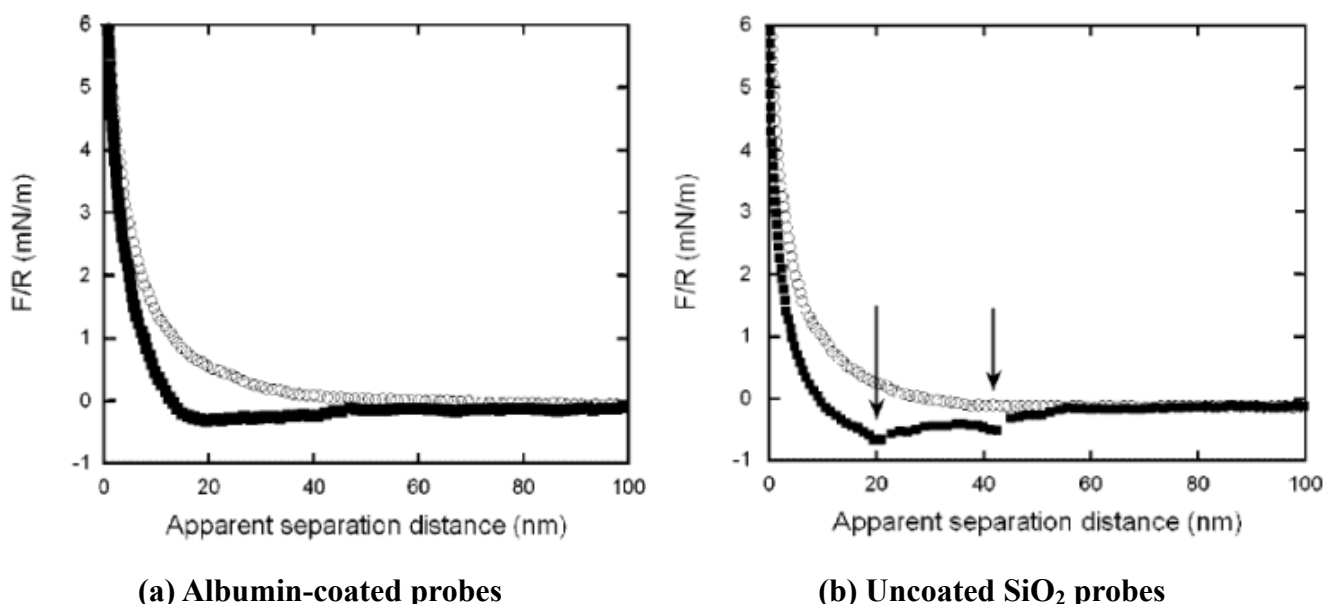


Fig.1-18 Approach (marker ○) and retraction (marker ■) force-separation distance curves, (approach rate, 0.38 μm s⁻¹)⁵⁵⁾

(3) AFM を用いたリポソームの剛性評価

中野らは、表面修飾の無い三成分系の各種リポソームの AFM 表面画像と動的光散乱 (DLS) を組み合わせて剛性評価を行っている⁵⁶⁾。剛性はリポソームの安定性や薬剤の放出特性、血中循環時間などの薬物送達有効性に影響する。**Fig.1-19** に AFM 測定によるリポソーム画像を示した。**Fig.1-20** のように軟らかいものはマイカ平板に吸着させた際に自重でつぶれてしまうが、硬いものは球形を保っていられる。このことから、下式のように AFM から得られたリポソームの高さを DLS の粒子径で割ることで剛性の指標としている。

$$H/P = \frac{\text{Mode of height of adsorbed particles}(H)}{\text{Particle size of particles}(P)} \quad \dots\dots\dots (1-1)\text{式}$$

H=AFM の 10 μm 平方のエリアに沈着した全てのリポソームの平均高さ
 P=AFM 測定をする前に DLS によって測定した平均粒子径

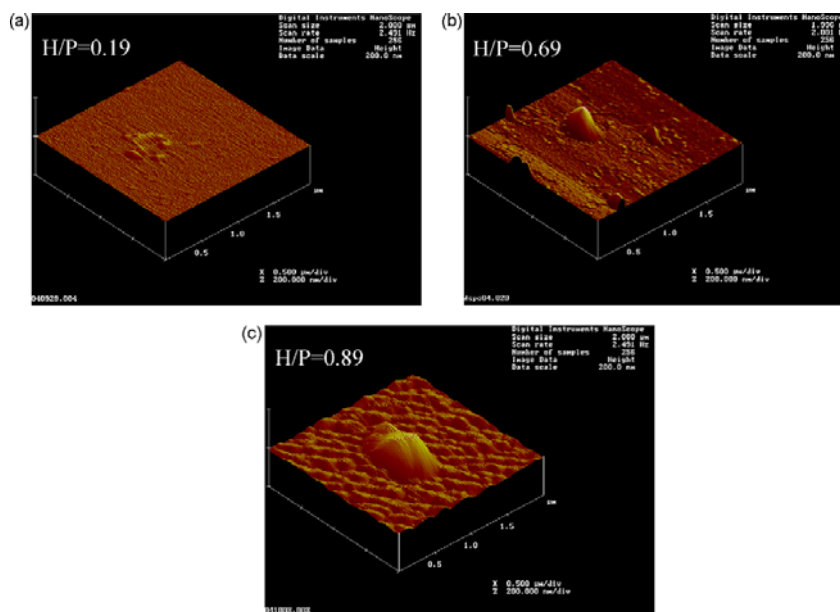


Fig.1-19 The effect of cholesterol concentration on the liposomal rigidity⁵⁶⁾

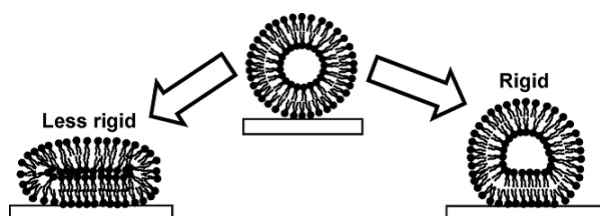


Fig.1-20 A schematic model of liposome adsorbed on the mica surface⁵⁶⁾

1.2.6 DDSに関する既往の研究における課題

以上のような、経口投与による消化器官での DDS による薬物吸収を目指した製剤設計のこれまでの研究動向に基づいて、次のような課題が本研究の対象として抽出された。

- ① 小腸での薬剤キャリアの付着・滞留性の向上に関して、Fig.1-15, 16 に示したような実際に生体器官を用いた方法はあるが、キャリアと生体粘膜との相互作用を直接測定したものでなく、付着機構に基づいた界面構造の設計が困難である。そのため、適切な界面設計のため、多くの試行錯誤を続けなければならない。
- ② キャリアの表面修飾や、界面構造設計による安定性、強度、弾力性などは、市販 AFM により観察はされているが、AFM 画像による評価が主であり、定量的に剛性や変形性を評価できていない。こうした、力学特性は、上記の生体を用いた方法などの画像観察法などでは定量評価困難である。
- ③ HSA とリポソームの相互作用や、リポソームの剛性の評価に、コロイドプローブ AFM 法が使われている事例はあるが、生体分子（粘膜、ムチン層）と界面構造を設計した DDS カプセルとの間の相互作用の研究は殆ど見られない。

以上の点から、プローブ AFM 法を、生体粘膜と界面構造設計したキャリアとの相互作用の評価、及び、キャリアの力学特性の評価法に活用する観点で、本研究の課題を抽出した。

1.3 セラミックスプロセスにおける粒子界面設計

本項では、コロイドプローブ AFM 法による現象解明のもう一つの対象であるセラミックス原料粉の分散、成形プロセスの中で、セラミックススラリー中での粒子間相互作用の制御の重要性など背景を述べ、既往の研究を紹介する。

1.3.1 セラミックス原料粒子の分散・凝集現象と界面設計

ファインセラミックスの材料として、粒子径がサブミクロンサイズの微粒子が用いられる。微粒子は、付着・凝集性が高くセラミックスの均一成形成のために利用するスラリーの作製時には、微粒子が溶媒中に均一に分散状態を保持する必要がある。微粒子の分散については、Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek により体系化された理論があり、彼らの頭文字から DLVO 理論と称される⁴⁾。この理論は水系コロイドについて、水中に存在するイオンにより構成される界面電気二重層による静電的作用と、van der Waals 力を考慮した考え方である。しかし、実際のセラミックスプロセスでは静電的な作用だけでは分散の維持は困難であるため、粒子間に働く相互作用は、DLVO 理論で考慮した作用だけで制御できない系が多数存在する⁵⁾。例えば、粒子表面に吸着した高分子等が粒子接近を妨げる立体障害効果、逆に、吸着した高分子等が粒子間に架橋形成して生じる引力作用、水分子が粒子表面で水和構造を作り、立体障害的な斥力となる水和斥力、未吸着分子が粒子間に存在し、粒子の接近に斥力、または引力作用を起こす Depletion 効果、粒子運動により粒子間の流体が排除、侵入される際に働く流体力学的作用などが挙げられる。

有機高分子が粒子表面に吸着し、これによって引き起こされる立体障害効果や架橋形成作用は、スラリーにおけるセラミック粉体の分散・凝集に大きく寄与する。粒子表面に吸着した高分子により安定化された分散系は、高分子と粒子表面との吸着力が強く、静電的斥力によって分散安定化された系より安定性が高いこともある。水系スラリーだけでなく有機溶媒系スラリーに対しても適用できるという利点がある。

高分子は分子中に含まれる複数の吸着サイトにより粒子表面に吸着する。その吸着の形態は Fig.1-21 に示すようにループ・トレイン構造⁵⁸⁻⁶¹⁾を作ることによって立体障害作用が現れるとされている。高分子の吸着部をトレインと称し、両端が吸着して溶媒中に出ている部位をループ、末端が自由である部分をテールと呼ぶ。ループ・トレイン構造は分散のための立体障害斥力に寄与するため、分散状態を維持するには、吸着点が脱着せず吸着力が維持されることが求められる。

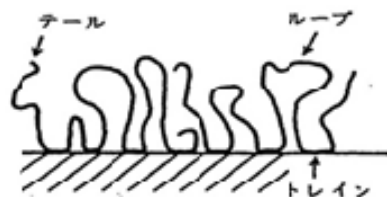


Fig.1-21 Loop-train-tail structure⁵⁸⁻⁶¹⁾

1.3.2 セラミックス成形プロセスの分類

セラミックス原料粉体を液中分散してスラリー化後の次のプロセスとして、必要な形状に成形するプロセス⁵⁷⁾があり、大きく分けて乾式成形と湿式成形がある。乾式成形は、スラリーを噴霧乾燥などにより流動性の高い顆粒状にした上で、金型に充填し、圧力をかけ成形体を得る金型プレス成形法が一般的である。スラリーを経ずに、原料粉の流動性を高める顆粒化法もある。この方法は、比較的単純な形状のセラミックス製品の量産に対しては効率的な方法である。しかし、金型との摩擦で密度ムラが生じ、焼結時の変形原因となる。密度ムラをなくすため、顆粒体をゴム型に充填、または金型成形体をゴム膜中に入れ、液体中で、等方的に加圧成形する冷間静水圧加圧(Cold Isostatic Pressing、CIP)成形法も用いられる。CIP成形体は密度分布が小さく、焼結時の歪みが少ない。しかし、単純な形状に限られるので、複雑形状の製品では、成形後、機械加工が必要となる。

湿式成形法としては、石膏型に流し込み、分散媒を石膏に吸収させることで成形を行う鑄込み成形法や押し出し成形法がある。また、原料粒子を熱可塑性樹脂等の有機材料と加熱混練して金型に射出し、金型を冷却して成形体を得る射出成型法もある。複雑形状の製品を高精度で作製することができ、成型体の密度もほぼ均一にしやすいという利点を持つ。しかし、30wt%程度樹脂など有機分を含むため、加熱による除去(脱脂)は長時間を要することや、脱脂時の変形などの課題がある。いずれの方法も、成形時の流動により、成形体原料粒子の粒度分布や成形体密度に部分的なムラが生じ、焼結時の変形原因となる。こうした弱点を補う手法として、ゲルキャスト法がある。

1.3.3 ゲルキャストリング法

ゲルキャストリング法⁶¹⁻⁶⁴⁾は、ORNL(Oak Ridge National Laboratory, USA)のチームによって開発された方法であり、スラリーに溶解させたメタクリル酸アミドなどのモノマーの重合反応によって粒子間ネットワークを形成し同化させ成形を行う方法である。代表的なフローチャートを Fig.1-22 に示す⁶³⁾。

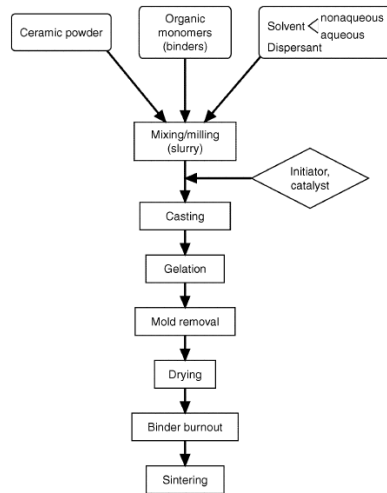


Fig.1-22 General gelcasting process flowchart⁶³⁾

この成型方法は、分散媒にモノマー溶液を溶解させたセラミックススラリーを調製し、水を通さない型に流し込む。型内でモノマーがラジカル重合等により、分散媒の中にポリマーのネットワークが作られ、ゲル湿潤成形体を得られる。その後は、通常の湿式成形体と同様に、乾燥、脱脂、焼成の工程を経て、製品化される。この方法では、スラリーが型に十分に充填された後に、系全体にわたって重合反応が一樣に進むため、粒子密度分布は均一になりやすい。乾燥、焼成過程でも等方に収縮するため射出成型や鋳込み成形に見られるような不均一さは明確には現れない。

これまで Al_2O_3 を粉体原料とした実例が多く報告されているが、Takeshita, Kurita らによる研究⁶⁵⁾などで、Yttrium 安定化 ZrO_2 の空気中におけるゲル化や、Adolfsson による ZrO_2 の寒天主成分であるアガロースによるゲル化⁶⁶⁾、 Si_3N_4 、サイアロン、TiN のような非酸化物、 $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ あるいは Al_2O_3 /酸化クロムの混合物に関する報告もある。スラリーは、乾燥時の収縮及び変形を抑えるために、 Al_2O_3 の場合では 50vol%以上の高濃度であることが必要とされる。スラリー調製方法は鋳込み成形と同様であり、既存の設備や調製の方法が利用できる。形状が複雑な場合は、スラリーの段階で高い流動性が必要となる。

固化反応には、セラミックススラリーにモノマーを含む重合開始剤と触媒を添加する方法が一般的である。水系スラリーにおいてはモノマーと架橋剤（ゲル化剤）であるアクリルアミドと $\text{N,N}'$ -メチレンビスアクリルアミドの混合物、重合開始剤には過硫酸アンモニウム、また、触媒にはテトラメチルエチレンジアミンなどが用いられる⁶²⁾。触媒の代わりに加熱によっても反応を進行できる。モノマーの重合反応は系全体で均一に進み、セラミックスは湿潤ポリマーゲルの網目に保持されて成形体を得られる。

ラジカル重合反応を用いるモノマー系では、スラリー中に溶存酸素があるとラジカルが捉えられてしまい、ゲル化が止まる。この場合はスラリー調製を含め成形時には、窒素やアルゴン雰囲気中に行なわなければならない。

また使用するモノマー種には、神経障害を起こすアクリルアミドなど有害なものがあるため、毒性の低い有機物を使うことも検討されている⁶⁷⁾。このような環境面や安全面への配慮や、使用条件の緩和を目的として、有機モノマー以外の無害なゲル化剤であるゼラチンや寒天などの天然高分子を利用した方法が検討されている。天然高分子をモノマーの代わりに加え、加熱により溶解してゾルにする点と、冷却に伴って固化してゲルになる反応が温度依存である点を除き、モノマー重合を用いるのと同様である。寒天の場合は 85°C以上の温度で溶解が必要で、加熱中に水分が蒸発して粒子が凝集することもある。ゼラチンの場合は、40°C程度で溶解するので扱いやすいが、固化させるためには pH を制御する必要がある。

ゲル化完了直後の成形体は、溶媒を含んだ状態にあり、乾燥を急速に行えば欠陥や亀裂が生じる。そのため、温度と湿度を調整しながら長時間かけてゲル化剤などの有機分や溶媒の除去・乾燥する必要がある。乾燥に伴う線収縮率は、元の原料スラリーの固形分濃度に依存する。乾燥終了後の成形体中には一般に数%程度のポリマーが残る。これは射出成形体での 30wt%程度のポリマー含有量に比べればはるかに少ない量であり、脱脂は比較的容易である。またポリマー含有量が少ない割には乾燥成形体の強度はある⁶⁸⁾が、機械加工は必ずしも容易ではない。また乾燥及び焼結による成形体の収縮が小さくほぼ均一であるため、製品のばらつきが小さい。

この方法は、セラミックスを均一に成形するには優れているが、より高い固形分濃度、安全、工程簡素化への改善研究はまだまだ余地がある。

分散剤の毒性のため環境面や安全面への配慮について 2019 年に、Montanaro ら⁶⁹⁾が、最新情報を整理している。それを Table 1-2 に示す。

Table 1-2 Examples of dense ceramics produced by gelcasting process, by using eco-friendly and toxic-free gelling agents⁶⁹⁾

Powder	solid loading [vol%]	Gelling agent	[wt%]	Green density	Green strength	Fired density	Reference
				[wt%]	[MPa]	[wt%]	
Al ₂ O ₃	50.4	Agarose	1.0	63.0	--	>99	78)
Al ₂ O ₃	50.6	Gellan gum	0.5-1.0	55.1-59.6	~4-5	97.1-98.5	79)
Al ₂ O ₃	50.0	Curdlan	2.5	56.5	3.7±1.2	98.3	80)
Al ₂ O ₃	55.0	Egg white	6.0	>60	7.3	~98	81)
Al ₂ O ₃	53.0	Gelatin	4.5	--	>8	96.5	82)
Hydroxyapatite	41.4	Agar	1.5	52.7	--	99.9	83)
ZrO ₂	20-39	Agarose	0.3-1.0	46-52	--	>99	66)
Yb ₂ Al ₅ O ₁₂	50.0	ISOBAM	0.4-0.8	52-63	14.2-18.7	94.0	84)
MgAl ₂ O ₄	50.0	ISOBAM	0.1-0.7	60.5	2.6	99.5	85)
MgAl ₂ O ₄	61.0	ISOBAM	0.8	65.0	14.5	100.0	86)

これらの成形条件では固体体積分率は、これまでに 50%以上が得られている。ゲル化剤については数 wt%以下の添加で済み、焼成後の脱脂でも、エネルギー的にも低減されている。後述するイソブチレン/マレイン酸の共重合体 ISOBAM（クラレ製、商品名 ISOBAM)がこの中に入っており、この中で最も少ない添加量で固体体積濃度も高い条件で成型が可能である。そこで次項で ISOBAM について詳細を述べる。

1.3.4 イソブチレン/マレイン酸共重合体を用いたゲルキャストリングに関する研究

本項は特定の分散・ゲル化剤の研究であり、第四章の研究に直接つながる研究背景である。

Shimai らは高い固形分率を保持した状態で、室温、大気中で分散・ゲル化する手法として、**Fig.1-23** に基本的な構造式を示すイソブチレン/マレイン酸の共重合体(クラレ製、商品名 ISOBAM⁷⁹⁾) を用いる手法を考案した。

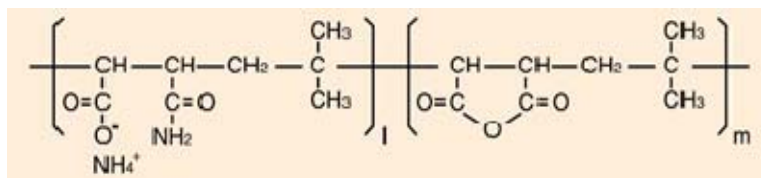


Fig.1-23 Molecular structure of ISOBAM104⁷⁹⁾

Al₂O₃ 粒子に対しこの高分子を約 0.3 wt%、50 vol%以上の水系スラリーに添加することで、添加直後は、分散剤として働きスラリーの流動性を向上させ、静置後、時間の経過とともにゲル化することを発見した⁸⁰⁾。

ゲル化を起こさない低濃度の Al₂O₃ スラリーを対象に、ISOBAM を 0.3 および 1.0 wt% 添加した場合、また、比較のため、ポリアクリル酸のアンモニウム塩 (NH₄⁺PAA) を分散剤として 0.5 wt% 添加した Al₂O₃ スラリーの電位測定結果を **Fig.1-24** に示す。NH₄⁺PAA は、湿式成形で使われる代表的な高分子分散剤である。

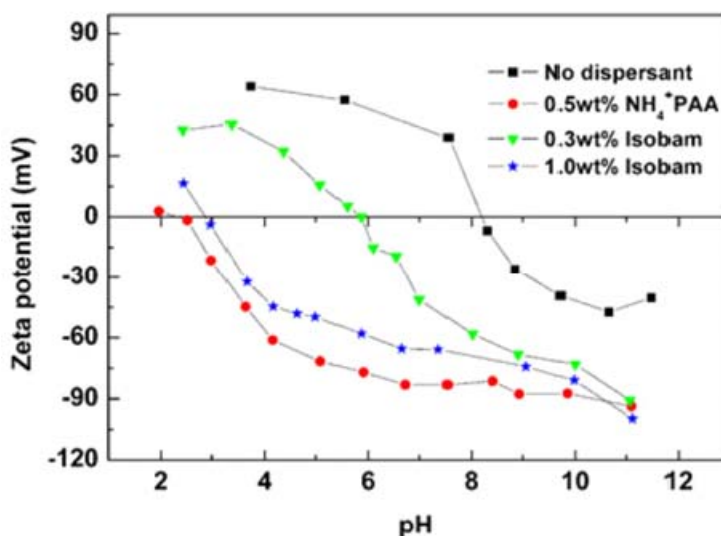


Fig.1-24 Effect of ISOBAM addition on zeta potentials of Al₂O₃ suspension⁸⁰⁾

分散剤を添加しなかった Al_2O_3 スラリーの等電点は $\text{pH}=8.3$ であったのに対し、ISOBAM の 0.3 wt% 添加で等電点は $\text{pH}=5.8$ に、1.0 wt% 添加で $\text{pH}=2.8$ まで低下した。ζ 電位は、0.5 wt% NH_4^+ PAA 添加と 0.5 wt% ISOBAM 添加スラリーが、ほぼ一致した。ISOBAM はカルボキシル基を含み、中性に近い水中では解離し $-\text{COO}^-$ となり、正に帯電している Al_2O_3 粒子表面に吸着する。表面に未吸着の $-\text{COO}^-$ 基があるため、等電点が低下したと考えられる。

Fig.1-25 に、ISOBAM 添加量による Al_2O_3 スラリーの貯蔵弾性率の経時変化測定結果を示す。ISOBAM を 0.3 wt% 添加した Al_2O_3 スラリーの貯蔵弾性率が、時間に対して最も顕著に増加し、これ以上の、過剰な添加では増加率が低下した。 Al_2O_3 スラリーの固形分率と貯蔵弾性率経時変化の関係を Fig.1-26 に示す。ISOBAM 添加濃度は、最もゲル化速度が大きかった 0.3 wt% を採用した。固形分率が高いほど、 Al_2O_3 スラリーの貯蔵弾性率増加速度は大きくなった。スラリーでの Al_2O_3 粒子個数濃度が増加すると粒子間平均距離は小さくなることによってゲル化現象が起こりやすくなったと考えられる。

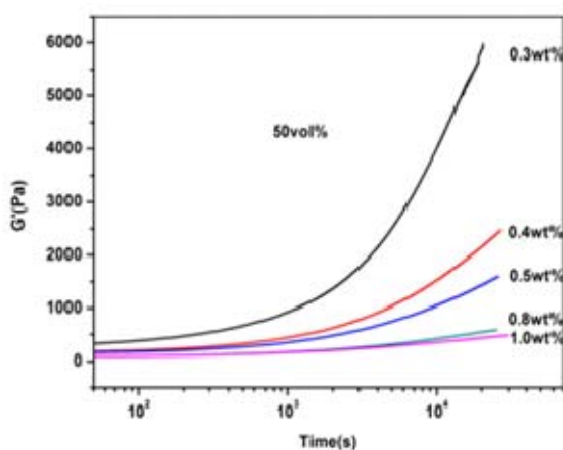


Fig.1-25 Effect of Isobam content on the evolution of storage modulus G' ⁸⁰⁾

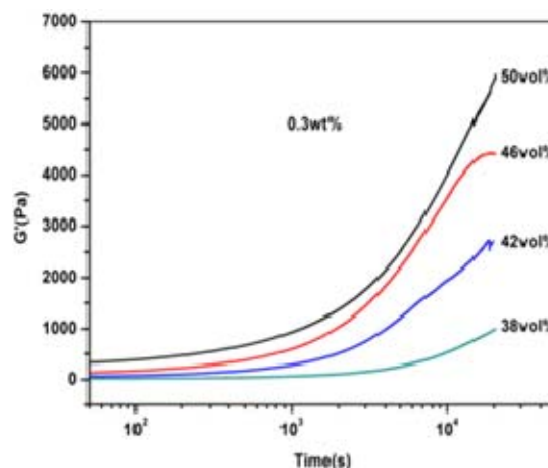
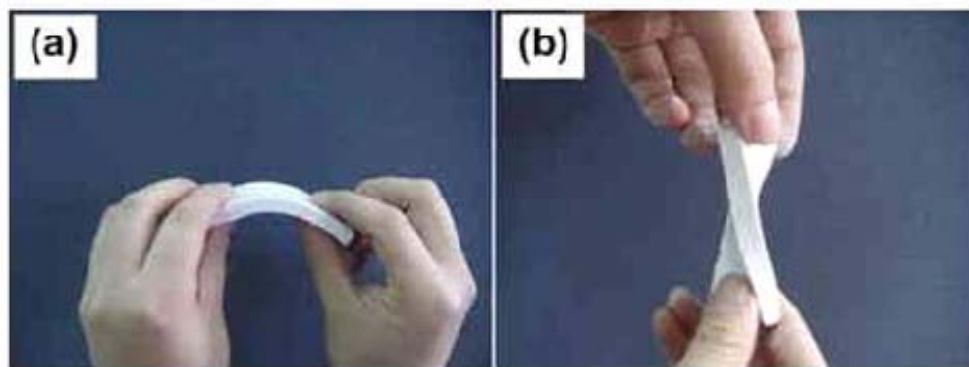


Fig.1-26 Solids loading versus storage modulus and gelling time of slurries with different solids loadings (0.3 wt% Isobam) ⁸⁰⁾

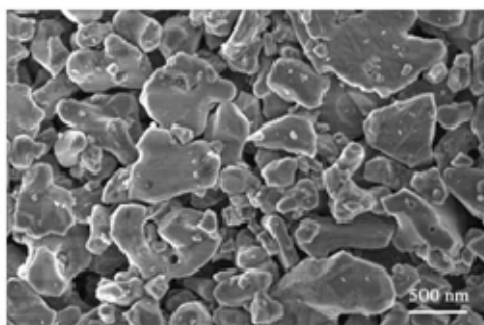
得られた ISOBAM/ Al_2O_3 スラリーのゲル湿潤体の写真 **Fig.1-27** と、SEM 画像を **Fig.1-28** に示す。ゲル湿潤体は Fig.1-28 に示すように自立性と可塑性を併せ持っており、実際にゲルキャストを行った際も、型から取り外す等の操作を容易に行うことができる。また SEM 画像より、ゲル乾燥体中の粒子の周りには ISOBAM によるものと思われる皮膜により形状が丸みを帯びている。



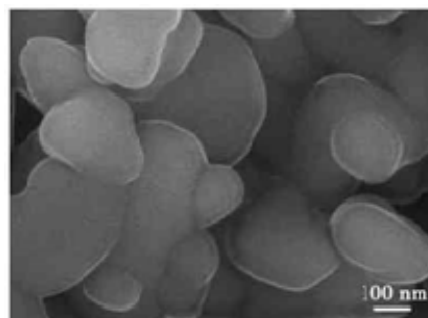
(a) Bending

(b) Twisting

Fig.1-27 Wet gel of Al_2O_3 (50 vol% solids loading; 0.3 wt% ISOBAM)⁸⁰⁾



(a) Raw Al_2O_3 powder



(b) Fracture surface of dried Al_2O_3 gel from a suspension (50 vol% solids loading; 0.3 wt% ISOBAM)

Fig.1-28 Scanning Electron Microscope (SEM) image⁸⁰⁾

以上で報告した Al_2O_3 スラリーのゲル化現象は全て常温の空气中下で、かつ ISOBAM 以外の添加物無しに生じた。すなわち ISOBAM を利用することによって、一種類の添加材でスラリーの分散・流動化の促進とゲル化が行え、ゲルキャスト法の簡便化が期待される。

1.3.5 セラミックスプロセスにおけるプローブ AFM 法を用いた研究

セラミックス製造において調製されるスラリーは、セラミックス粒子を投入した溶液に対し、分子構造や、分子量の異なる分散剤を添加してスラリーの特性を変化させ分散状態を維持する必要がある。この特性は、コロイドプローブ AFM 法により、フォースカーブを取ることで、各分子量の分散剤の吸着を考察することができる。福田らは高純度 Al_2O_3 表面における分子量 10,000 の高分子分散剤(ポリアクリルアミドアンモニウム塩)の吸着挙動の解析のため、 Al_2O_3 コロイドプローブを用いてフォースカーブを測定した^{81,82)}。スラリー粘度などのマクロ挙動との関連を考察し、最適被覆量を超えて添加すると自由な分散剤が増え、 Al_2O_3 表面間の立体障害的反発力を減少させ、スラリー粘度が上がることを測定結果から説明している。その後、同じ手法で松井らは、 Si_3N_4 について⁸³⁾、近藤らは、 TiO_2 について⁸⁴⁾同様の研究を行い、それぞれの立体障害の出方により分散効果を解析している。

また、花田らは、ポリスチレンコロイド上に、カーボンブラックをポリエチレンイミンに吸着させ、それは分散剤として酸性領域での働きが悪いが、トルオイル基をポリエチレンイミンに導入すると改善すること⁸⁵⁾や、森らは、 SiO_2 コロイドにシランカップリング剤を修飾し、修飾量に比例して分散効果が増大すること⁸⁶⁾を見出している。カーボンブラックやシランカップリング剤を Al_2O_3 等の実際のセラミックス材料で使用しての確認が待たれる。このような研究例はあるが、コロイドプローブ AFM 法でのセラミックスプロセス解析研究は世界的にも少ないのが実情である。

以上の背景から、コロイドプローブ AFM 法を用いて、ISOBAM の作用機構の解明に用いることは有効と考えられる。

1.4 本研究の目的と論文構成

界面で発生する現象は、条件ごとに互いに引力又は斥力が働くか、あるいは働かないか、という場合に分けられる。そのような力の原因は、形状に起因する機械的結合や、化学結合、吸着、静電気、相互拡散、酸塩基相互作用、分子間力（van der Waals 力や、水素結合）などがあげられるが、これらは主として表面自由エネルギーに関係している。界面が固液間であればそれらは円環を使って表面張力を測定したり、液滴の接触角を測ったりすることで評価できる。固体間では直接測定はできないが、共通な液体を介し固液で測定し、計算式から液体の因子を消去して間接的測定するフォークスの方法^{87,88)}などが提案されている。ただしこれらの方法ではマクロレベルでの平均的な結果しか得られない。ナノレベルで起こっている詳しい現象を知ればより精緻な界面制御が可能になる筈である。このようなナノレベルの定量化の取り組みは色々な分野でまだ十分なされていない。

本研究では、界面設計したカプセル及び微粒子の表面間相互作用の評価を、原子力間顕微鏡(AFM)による評価で試みる。対象は、DDS とセラミックスプロセスに着目した。DDS 用カプセルとして、pH 応答性シェルを有するナノゲル及び、キトサン修飾リポソームを対象にした。

第一章では、界面構造設計による微粒子やマイクロカプセルを用いたプロセスの制御や、機能向上の効果について、DDS 及びセラミックス材料プロセスに着目して過去の研究をレビューした。

第二章では、core-shell 型ナノカプセル薬剤キャリアの pH 応答性 shell に、分子量の異なる二種類の架橋剤を反応させ、常温での水溶液 pH 変化によるムチン層と shell 層間相互作用力の変化をコロイドプローブ AFM 法により評価した。

第三章では、キトサン修飾リポソームと小腸のムチン層の接着や変形の様子を明らかにするために、ムチンを AFM 用のカーボンナノチューブ(CNT)の表面を疎水化して吸着させた。このムチン層とキトサン修飾の有無を変えたりポソームとの相互作用をリン酸緩衝液の中で、AFM によって測定した。緩衝液の pH は、2.8 と 7.0 で制御した。

第四章では、 Al_2O_3 や Y_2O_3 などのセラミックス微粒子の水系スラリーに添加すると、初期には分散作用を、時間の経過とともにゲル化現象を示すアンモニア変性イソブチレン無水マレイン酸共重合体（市販名：ISOBAM)の表面間相互作用の経時変化を、コロイドプローブ AFM 法により測定した。コロイドプローブには、球形の $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ を使い、接触対象基板には、サファイア結晶板を用いた。

第五章では、以上の結果から、AFM を用いることで、さまざまな素材系での、界面構造の変化による挙動制御の方法として有効性を示し、今後の研究の指針を例示した。

References

- [1] G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber, “Atomic Force Microscope”, *Phys. Rev. Lett.*, 1986, **56**,9, p930-933.
- [2] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, E. Weibel, “Tunnelling through a controllable vacuum gap”, *Appl. Phys. Lett.*, 1982, **40**,2, p178-180.
- [3] G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, E. Weibel, “Surface studies by Scanning Tunneling Microscopy”, *Phys. Rev. Lett.*, 1982, **49**,1, p57-61.
- [4] E. J. W. Verwey, J. Th. G. Overbeek, “Theory of the stability of lyophobic colloids”, *DOVER*, 1999, p77.
- [5] W. A. Ducker, T. J. Senden, R. M. Pashley, “Measurement of forces in liquids using a force microscope”, *Langmuir*, 1992, **8**(7), 1831-1836.
- [6] H. Kamiya, Y. Fukuda, Y. Suzuki, M. Tsukada, T. Kakui, M. Naito, “Effect of polymer dispersant structure on electrostatic interaction and dense alumina suspension behavior”, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1999, **82**, p3407-3412.
- [7] H. Kamiya, S. Matsui, T. Kakui, “Analysis of action mechanism of anionic polymer dispersant with different molecular structure in dense silicon nitride suspension by using colloidal probe AFM”, *Ceram. Trans.*, 2004, **152**, p83-92.
- [8] T. Kakui, T. Miyauchi, H. Kamiya, “Analysis of the action mechanism of polymer dispersant on dense ethanol alumina suspension using colloidal probe AFM”, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 2005, **25**, p655-661.
- [9] M. Iijima, M. Tsukada, H. Kamiya, “Effect of particle size on surface modification of silica nanoparticles by using silane coupling agents and their dispersion stability in methylethylketone”, *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **307**, p418-424.
- [10] Q. D. Nguyen, Eun-S. Oh, Koo-H. Chung, “Nanomechanical properties of polymer binders for Li-ion batteries probed with colloidal probe atomic force microscopy”, *Polymer Testing*, 2019, **76**, p245-253.
- [11] N. Ishida, K. Matsuo, K. Imamura, V. S. J. Craig, “Hydrophobic attraction measured between asymmetric hydrophobic surfaces”, *Langmuir*, 2018, **34**(12), p3588-3596.
- [12] T. Wada, K. Yamazaki, T. Isono, T. Ogino, “Characterization of local Hydrophobicity on sapphire (0001) surfaces in aqueous environment by colloidal probe atomic force microscopy”, *Applied Surface Sci.*, 2017, **396**, p1206-121.
- [13] 渡邊正義ら編, “最先端材料システム One Point9 ドラッグデリバリーシステム”, *高分子学会共立出版*, 2012, **2**, p28-36.
- [14] 田畑泰彦, “ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線”, *メデイカルドゥ*, 2013, p29-30.

- [15] 高橋俊夫, 橋田充, “今日の DDS・薬物送達システム”, *医薬ジャーナル社*, 1999, p18-19.
- [16] 北河修治, “ベーシック薬学教科書シリーズ 20 薬剤学”, *化学同人*, 2008.
- [17] 寺田勝英, “物理薬剤学・製剤学 - 製剤化のサイエンス -”, *朝倉書店*, 2008.
- [18] 瀬崎仁, “医薬品の開発 13 巻 薬物送達法”, *廣川書店*, 1989.
- [19] 瀬崎仁, “薬物送達法”, *廣川書店*, 1988, p10-19.
- [20] 橋田充, “創薬科学・技術の進歩とこれからの DDS 開発”, *医薬ジャーナル Medical Front Line*, 2004, **40**, p5.
- [21] 橋田充, “ナノテクノロジー創薬 - DDS の新展開”, *医学のあゆみ*, 2004, **210**(9).
- [22] 鹿児島正豊, “DDS としてのエアロゾル”, *Johns*, 1993, **9**(10), p19-24.
- [23] 上釜兼人, 川島嘉明, 松田芳久, “製剤学”, *廣川書店*, 2000, p150-160.
- [24] K.R.Kamath et al, “Encyclopedia of Pharmaceutical Technology”, *CRC Press*, 1994, **10**, p133.
- [25] W.Gary, “たんぱく質ハンドブック”, *丸善株式会社*, 2003, p123.
- [26] M.Malmsten, I.Carlstedt, I.Ljusegren, E.Blomberg, P.Claesson, “Mucin layers on hydrophobic surfaces studied with ellipsometry and surface force measurements”, *J. Colloid. Int. Sci.*, 1992, **151**(2), p579-590.
- [27] I. Carlstedt; J. K. Sheehan; A. P. Corfield; J. T. Gallagher, “T, Mucous glycoproteins: a gel of a problem”, *Essays. BioChem.*, 1985, **20**, p40-76.
- [28] M. R Jimenez-Castellanos, H.Zia, C. T. Rhodes, “Mucoadhesive Drug Delivery Systems”, *Drug. Dev. Ind. harm.*, 1993, **19**(1/2), p143-194.
- [29] A.Ahuja, R. K. Khar, J.Ali, “Mucoadhesive drug delivery systems”, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 1997, **23**(5), p489-515.
- [30] P .M .Claesson, E.Blomberg, J. C. Froeberg, T .Nylander, T. Arnebrant, “Protein interactions at solid surfaces”, *Adv. Colloid. Int. Sci.*, 1995, **57**, p161-227.
- [31] D. Duchene, F. Touchard, N .A .Peppas, “Pharmaceutical and medicinal aspects of bioadhesive systems for drug administration”, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 1988, **14**, p283-318.
- [32] H.Ichikawa, N.A. Peppas, “Novel complexation hydrogels for oral peptide delivery: In vitro evaluation of their cytocompatibility and insulin-transport enhancing effects using Caco-2 cell monolayers”, *J.Biomed Mater. Res.*, 2003, **67A**, p609-617.
- [33] H.Ichikawa, Y.Yamazaki, Y. Fukumori, “Novel Composit Nanoparticles of Temperature-sensitive Hydrogels with pH-sensitive Polymeric Layer for Oral Drug Delivery”, in *New Trends in Polymers for Oral and Parental Administration from Design to Receptors*, (Eds, G.Barratt, D.Duchene, F.Fattal, J.Y.Hegendre), Editions De Sante, Paris, 2001, p257-260.

- [34] A.M.Lowman, N.A.Pappas, “Analysis of the Complexation/Decomposition Phenomena in Graft Copolymer Networks”, *Macromolecules*, 1997, **30**,p4959-4965.
- [35] 高山幸三ら編, “製剤学[改訂版]”, ミクス, 2002,p138.
- [36] A.L .Klibanov. et al. “Amphipathic polyethyleneglucols effectively prorong the circulation time of liposomes”, *FEBS .Lett.* ,1990, **268**, p235-7.
- [37] K.Shimada, et al., “Determinatin of thickness of the fixed aqueous layer around the polyethyleneglycol coated liposomes”, *J.Drug Target.*,1995, **3**, p283-9.
- [38] I.Sugiyama, “Effect of liposomes with different double arms polyethyleneglycol on hepatic metastasis model mice and evaluation using a fluoescent imaging device”, *Current Drug Deliv.* ,2016, **13**, in press.
- [39] E.T.Dames, et al, “Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes”, *Pharmacol. Exp. Ther.*,2000,**292**,p1071-1079.
- [40] P.Laverman, P.Laverman, M.G.Carstens, O.C.Boerman et al. “Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection”, *Pharmacol. Exp. Ther.*,2001,**298**,p607-612.
- [41] Y.Do, T.Okada, H.Matsumoto, M.Ichihara, T.Ishida and H.Kiwada, “Combination therapy of metronomic S-1 dosing with oxaliplatin-containing polyethylene glycol-coated liposome improves antitumor activity in a murine colorectal tumor model”, *Cancer Sci.*, 2010, **101**, p2470–2475.
- [42] K.Nakamura, et al., “A Double-modulation Strategy in Cancer Treatment With a Chemotherapeutic Agent and siRNA”, *Mol. Ther.*,2011,**19**,p2040-2047.
- [43] K.Shimizu, et al. , “Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic approach”, *Expart Opin. Ther. Targets.*,2005,**9**,p63-76.
- [44] K.Ichikawa,T.Asai,K. Shimizu,S.Yonezawa,T.Urakami, et al., “ Suppression of immune response by antigen-modified liposomes encapsulating model agents a novel strategy for the treatment of allergy”, *J.Control.Release.* ,2013,**167**(3),p284-289.
- [45] Y.Matsumura,H.Maeda, et al., “A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs”, *Cancer Res.*, 1986,**46**(12Pt1), p6387-6392.
- [46] Y.Tahara,et al., “Encapsulation of a nitric oxide donor into a liposome to boost the enhanced permeation and retention (EPR) effect”, *Med.CHEM.Comm.*, 2017,**8**,p415-421.
- [47] H.Takeuchi, “経口ドラッグキャリアとしてのポリマーコーティングリポソーム”, *Drug Delivery System*, 2004,**19**(6),p511-519.

- [48]K. Nakano, H.Yamamoto, H.Takeuchi, Y.Kawashima, “中部談話会要旨”, 粉体工学会,2005.
- [49]H.Takeuchi, H.Yamamoto, T. Niwa, T.Hino, Y.Kawashima, “ MUCOADHESION OF POLYMER-COATED LIPOSOMES TO RAT INTESTINE *IN VITRO*”, *Chem. Pharm. Bull.* ,1994,**42**,p1954-1956.
- [50] H.Takeuchi, H.Yamamoto, A.Toyoda, H.Toyobuku, T.Hino, “Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol”, *Int. J. Pharm.* ,1998,**164**,p103-111.
- [51]竹内洋文,川島嘉明, “薬物キャリアとしてのリポソーム, リピッドマイクロスフェアに関する製剤学的研究”, *表面*,1994,**32**, p423-429.
- [52]J. Thongborisute, A.Tsuruta,Y. Kawabata,H. Takeuchi, “The effect of particle structure of chitosan-coated liposomes and type of chitosan on oral delivery of calcitonin”,*J. Drug Targeting*,2006,**14**(3),p147-154.
- [53]H. Takeuchi, Y. Matsui, H. Sugihara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, “ Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs”, *Int. J. Pharm.* ,2005,**303**,p160-170.
- [54] M.Iijima, M.Yoshimura, T.Tsuchiya, M.Tsukada, H.Ichikawa, Y.Fukumori, H.Kamiya, “Direct Measurement of Interactions between Stimulation Responsive Drug Delivery Vehicles and Artificial Mucin Layers by Colloid Probe Atomic Force Microscopy”, *Langmuir*, 2008, **24**(8), p3987-3992.
- [55]A.Tarasova, H.J.Griesse,L. Meagher, “ AFM Study of the Stability of a Dense Affinity-Bound Liposome Layer”, *Langmuir*,2008,**24**(14),p7371-7377.
- [56]K.Nakano, Y.Tozuka, H.Yamamoto, Y.Kawashima,H. Takeuchi, “ A novel method for measuring rigidity of submicron-size liposomes with atomic force microscopy”, *Int. J. Pharm.* ,2008,**355**(1-2),p203-209.
- [57] (独)日本学術振興会 高温セラミック材料第124委員会 編, “先進セラミックスの作り方と使い方”, *日刊工業新聞社*, 2005 .
- [58] 中村雅彦, “粉体工学講座 16 II.最近の微粒子制御技術第1章 粒子集合体の制御(2)”, *粉体工学会誌*,1993, **30**(7) .
- [59]A.V.P. Gurumoorthy, K.H. Khan, “Polymers at interfaces biological and non-biological applications”, *Recent Res. in Sci. and Technol.* , 2011, **3**(2), p80-86.
- [60]M.Manciu , E.Ruckenstein, “Loops tails and trains: A simple model for structural transformations of grafted adsorbing neutral polymer brushes”, *J. of Colloid and Interface Sci.* , 2011, **54**(1), p61-69.
- [61]D.Welch, M. P. Lettinga, M.Ripoll, Z.Dogic, G.A.Vliegenthart, “Trains, tails and loops of partially adsorbed semi-flexible filaments”, *Soft Matter*, 2015, **11**, p7507-7514.

- [62] O. O. Omatete, M.A. Janney, R.A. Strehlow, “Gelcasting-a new ceramics forming process”, *Am. Ceram. Soc. Bull.*, 1991, **70**, p1641-1649.
- [63] A.C. Young, O.O. Omatete, M.A. Janney, P.A. Menchhofen, “Gelcasting of Alumina”, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1991, **74**(3), p612-618.
- [64] 福長脩, “セラミックス機能化ハンドブック”, (株)NTS, 2011, p516-517.
- [65] M. Takeshita, S. Kurita, “Development of self-hardening slip casting”, *J. Eur. Ceram. Soc.* 1997, **17**(2/3), p415.
- [66] E. Adolfsson, “Gelcasting of Zirconia Using Agarose”, *J. Am. Ceram. Soc.*, 2006, **89**(6), p1897-1902.
- [67] M.A. Janney, O.O. Omatete, C.A. Walls, S.D. Nunn, R.J. Ogle, G. Westmoreland, “Development of low - toxicity gelcasting systems”, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1998, **81**(3), p581.
- [68] J.S. Ha, “Effect of atmosphere type on gelcasting behavior of Al₂O₃ and evaluation of green strength”, *Ceram. Int.*, 2000, **26**, p251.
- [69] L. Montanaro, B. Coppola, P. Palmero, J.-M. Tulliani, “A review on aqueous gelcasting: A versatile and low-toxic technique to shape ceramics”, *Ceram. Int.*, 2019, **45**, p9653-9673.
- [70] I. Santacruz, M.A. Nieto, R. Moreno, “Alumina bodies with near-to-theoretical density by aqueous gel casting using concentrated agarose solutions”, *Ceram. Int.*, 2005, **31**, p439-445.
- [71] Y. Zhang, J. Xu, Y. Qu, X. Xi, J. Yang, “Gel casting of alumina suspension using gellan gum as gelling agent”, *Ceram. Int.*, 2014, **40**, p5715-5721.
- [72] J. Xu, Y. Zhang, K. Gan, X. Zhang, Y. Qu, N. Ma, J. Yang, “A novel gelcasting of alumina suspension using curdlan gelation”, *Ceram. Int.*, 2015, **41**, p10520-10525. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.04.144>.
- [73] X. He, B. Su, X. Zhou, J. Yang, B. Zhao, X. Wang, G. Yang, Z. Tang, H. Qiu, “Gelcasting of alumina ceramics using egg white protein binder system”, *Ceram. Silik.*, 2011, **55**, p1-7.
- [74] Y. Chen, Z. Xie, J. Yang, Y. Huang, “Alumina casting based on gelation of gelatin”, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 1999, **19**, p271-275.
- [75] M. Mohammadi, J.-M. Tulliani, P. Palmero, “Fabrication of dense and porous hydroxyapatite: effect of dispersion conditions on sinterability and microstructural development”, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 2018.
- [76] X. Wang, H. Xiang, J. Liu, F. Hou, Y. Sun, Y. Zhou, “Gelcasting of Yb₃Al₅O₁₂ using a non-toxic water-soluble copolymer as both dispersant and gelling agent”, *Ceram. Int.*, 2016, **42**, p421-427.

- [77] P. Zhang, P. Liu, Y. Sun, X. Peng, Z. Wang, J. Zhang, “Microstructure and properties of transparent MgAl₂O₄ ceramic fabricated by aqueous gelcasting”, *J. Alloy. Compd.*, 2016, **657**, p246-249.
- [78] H. Shahbazi, H. Shokrollahi, M. Tataei, “Gel-casting of transparent magnesium aluminate spinel ceramics fabricated by spark plasma sintering (SPS)”, *Ceram. Int.*, 2018, **44**, p4955-4960.
- [79] “製品カタログ:アルカリ水溶性ポリマー<イソバン>”, 株式会社クラレ.
- [80] Y. Yang, S. Shimai, et al., “Room-temperature gelcasting of alumina with a water-soluble copolymer”, *J. Mater. Res.*, 2013, **28**(3), p1512.
- [81] Y. Fukuda, H. Kamiya, et al., “Influence of additive content of anionic polymer dispersant on dense alumina suspension viscosity”, *Chem. Eng. Sci.*, 2001, **56**, p3005-3010.
- [82] H. Kamiya, Y. Fukuda, Y. Suzuki, M. Tsukada, T. Kakui, M. Naito, “Effect of polymer dispersant structure on electrosteric interaction and dense alumina suspension behavior”, *J. of the Am. Ceram. Soc.*, 1999, **82**(12), p3407-3412.
- [83] H. Kamiya, S. Matsui, T. Kakui, “Analysis of action mechanism of anionic polymer dispersant with different molecular structure in dense silicon nitride suspension by using colloidal probe AFM”, *Ceram. Transactions*, 2004, **152**, p83-92.
- [84] K. Sato, S. Kondo, M. Tsukada, T. Ishigaki, H. Kamiya, “Influence of solid fraction on the optimum molecular weight of polymer dispersants in aqueous TiO₂ nanoparticle Suspensions”, *J. Am. Ceram. Soc.*, 2007, **90**(11), p3401-3406.
- [85] Y. Hanada, S. Masuda, M. Iijima, H. Kamiya, “Analysis of dispersion and aggregation behavior of carbon black particles in aqueous suspension by colloid probe AFM method”, *Adv. Powder Technol.*, 2013, **24**, p844-851.
- [86] T. Mori, Y. Okada, H. Kamiya, “Effect of surface modification of silica particles on interaction forces and dispersibility in suspension”, *Adv. Powder Technol.*, 2016, **27**, p830-838.
- [87] F. M. Fowkes, “Additivity of intermolecular forces at interfaces. I. determination of the contribution to surface and interfacial tensions of dispersion forces in various liquids”, *J. Phys. Chem.*, 1963, **67**, p2538-2541.
- [88] F. M. Fowkes, “Attractive forces at interfaces”, *Ind. Eng. Chem.*, 1964, **56**, p40-52.

第2章

pH 応答性薬剤カプセルと粘膜の
表面間力に対してカプセル内部の
架橋が及ぼす影響の
コロイドプローブ AFM 法による評価

2.1 緒言

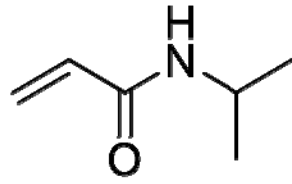
生化学の著しい進歩により、ペプチド、タンパク質^{1,2)}からなる様々な薬剤の発見に結びついた。しかし、ペプチドおよびタンパク質系の治療薬の経口投与は、胃でのペプシンのような分解酵素による分解や、薬理効果の失活を受けたり、吸収されるべき小腸粘膜上で滞留性が不十分なため、体内に取り込む効率が低いことが課題になっている。これを克服するために、過酷な生理環境でのペプチド薬の保護や粘膜付着性向上を目的としたドラッグデリバリーキャリアが近年、注目され研究が進んでいる。その一例として、市川ら³⁾は、温度応答性のある poly-N-isopropylacrylamide (p(NIPAAm))ハイドロゲルを core とし、pH 応答性のある poly-ethylene glycol-monomethacrylate (p(MAA-g-EG))を shell とする DDS 用ナノゲルキャリアを調製した。こうしたキャリアの評価法として Cleary ら⁴⁾の方法に基づいて、飯島ら⁵⁾は、市川らの core-shell 型ナノゲルキャリアを集合体にしたコロイドプローブと、マイカ表面に生成した人工ムチン層との間で AFM(原子間力顕微鏡)を用いてフォースカーブを測定した。その結果、酸性 pH 条件では shell 層の収縮により近距離での作用のみが観察された。一方、中性付近の pH 条件では、shell 層の膨潤による接近過程での長距離からの斥力と、分離過程での膨潤した shell とムチン間の作用による長距離引力が観察された。小腸でのキャリアの付着・滞留性の向上のためには、中性域での分離過程での長距離引力を維持しながら、接近時の長距離斥力を抑制する必要があると考えられる。

本研究では、小腸中の中性域での斥力の原因となる shell の不必要な膨潤を抑制するため、Shell 構造中に架橋剤を添加し、分離時の引力を維持しながら接近時の斥力の低減が可能かを検討した。架橋剤として高分子量の polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDMA) と低分子量の tetraethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) を用い、架橋剤の分子量の影響を検討した。

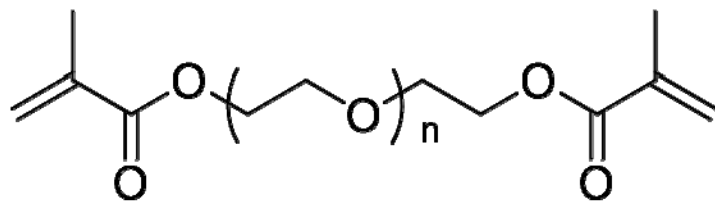
2.2 実験

2.2.1 core-shell 型ナノゲル粒子の core 部分の調製

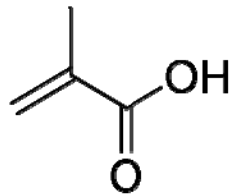
ナノゲル粒子は紫外線照射を利用した光重合法で合成した。core となる **Fig.2-1 (a)** に示した NIPAAm (興人社) モノマーは、予め不純物除去のため再結晶させたものを使用する。このモノマー100g にトルエン (和光純薬工業株) 300mL を加えて完全に溶解し、n-ヘキサン (和光純薬工業株) 6L をゆっくりと加え白色の針状析出物生成させた。一晚静置後、吸引ろ過し約 1 日自然乾燥させ、おおよそ 70~80g 前後の NIPAAm 再結晶品を得た。その再結晶 NIPAAm1.5g に、架橋剤として **Fig.2-1(b)** で n=3 となる TEGDMA(ポリサイエンス社)0.06g、光重合開始剤として 1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone (アルドリッチ・ケミカル) 0.06g、界面活性剤として sodium dodecyl sulfate (ナカライテスク社、SDS) の 9.88 mmol 水溶液 3g に蒸留水を加え、75g の溶液を得た。紫外線照射条件を決定するため、6 通りの溶液を使用した。溶液を攪拌しながら、70°C で維持し波長 365nm の紫外線を強度 2000mW/cm² で 30 分照射し、濾過後、60°C で熱風乾燥した残留固形分を core 重量と見なし、計算上反応率 98.8%が得られたため、これを core 合成条件とした。



(a) Core component NIPAAm



(b) Core and shell components as cross linking agents,
TEGDMA(n=3) / PEGDMA(n=22.7)



(c) Shell component MAA

(d) Shell component PEGMA(n=22.7)

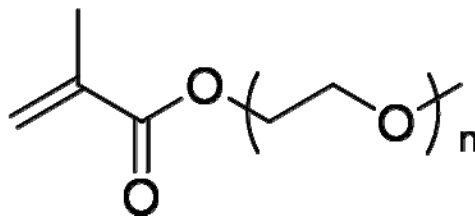


Fig.2-1 Chemical structures of core-shell nanogel components

2.2.2 core-shell 型ナノゲル粒子の調製

shell の合成は、無架橋の場合、Fig.2-1(c) に構造式を示す methacrylic acid (MAA) 0.246g と、Fig.2-1(d) に構造式を示す polyethylene glycol(PEG) 鎖の平均分子量が 1,000 であり、メチル基で末端処理された polyethylene glycol monomethacrylate (PEGMA) 26mg、の二成分に蒸留水を加え 75g とした水溶液を調製し、2.2.1 で得られた core 粒子合成溶液中に、shell 原料の水溶液を 0.8~1 mL/min の速度で滴下し、強度 2,000mW/cm² の紫外線の照射と攪拌をさらに 30 分継続して、core-shell 構造を持つナノゲル粒子を調製した。この結果 shell は p(MAA-g-EG)の 3 次元骨格を持つ構造となる³⁾。架橋剤を含む shell の場合は、MAA と PEGMA のモル比は固定し架橋剤のモル比で 0.08mol%となるよう添加し無架橋 shell と同様のプロセスで滴下合成した。架橋剤は Fig.2-1 (b) に構造式を示す PEG 鎖の平均重合度 n=3 の TEGDMA と、n=22.7 の PEGDMA を用いた。生成したナノゲル粒子は酢酸セルロース透析膜を使用して蒸留水中で 5 日間透析洗浄した。

2.2.3 リン酸緩衝液の調製とナノゲル粒子の電気泳動移動度、平均粒子径の測定法

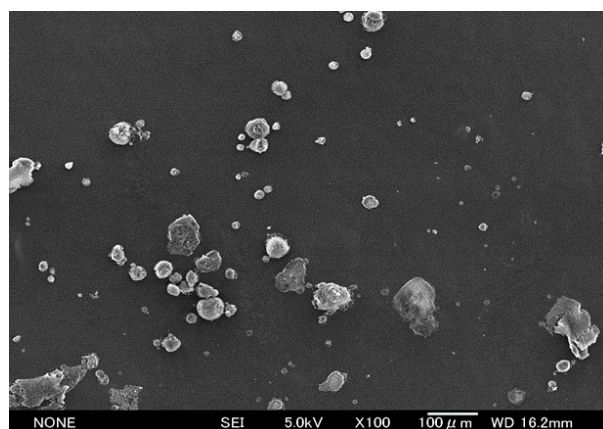
リン酸緩衝液として、リン酸二水素カリウム (和光純薬工業(株)、純度 99.0%以上)、無水リン酸水素二ナトリウム (和光純薬工業(株)、純度 99.0%以上)、リン酸(和光純薬化学工業(株)、85%H₃PO₄)及び、塩化ナトリウム(和光純薬化学工業(株)99.5%以上)を用い、配合比により pH を変えた水溶液を用意した。塩化ナトリウムはイオン強度が 0.1mol/L となるよう添加した。

ナノゲル粒子のリン酸緩衝液中での電気泳動移動度は、z-アナライザー (日本ルフト、モデル 502)、平均粒子径は動的光散乱法(マルバーン・インストルメンツ、モデル HPP5001)により計測した。リン酸緩衝液の pH は 3~8 の範囲で変化させた。

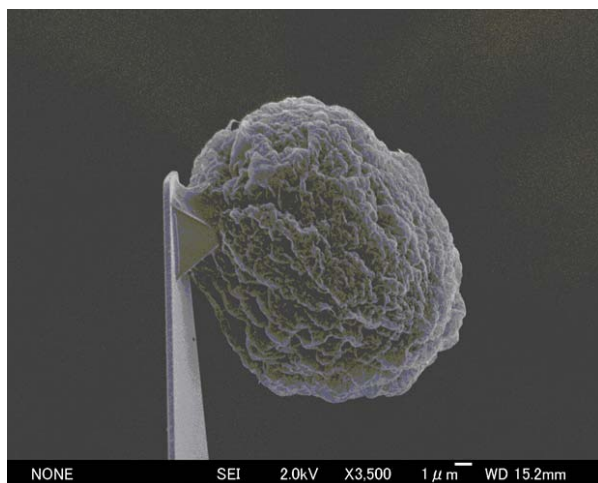
2.2.4 ナノゲル顆粒を付けたコロイドプローブ調製法

コロイドプローブ AFM 用の粒子は、既報⁵⁾と同様に以下のプロセスで調製した。core-shell 型ナノゲル粒子水溶液を、pH=3.5 のリン酸緩衝

液水溶液によって固体濃度が 0.05 mass %になるよう希釈した。この溶液を液体窒素によって冷却した銅板上にスプレーし凍結後 24 時間真空乾燥し、**Fig.2-2(a)**に示す顆粒体を得た^{6,7)}。得られた乾燥試料の中から数マイクロメートルの顆粒体を選び、既報⁵⁾と同様にマイクロマニピュレーション装置によって AFM 用のプローブ(Olympus Corporation、Japan、OMCL-TR800PSA-1)に接着し、**Fig.2-2(b)**のようなコロイドプローブを調製した。



(a) Freeze-dried nano-gel



(b) Colloid probe

Fig.2-2 SEM image of freeze-dried nano-gel particles and colloid probe

2.2.5 洗浄マイカの調製法

ムチン層を形成するための基板として、洗浄マイカを次のように準備した。板状マイカ(株山口雲母製作所)を1cm角で、必要枚数切り出した。気中で劈開し劈開面を使用した。不純物の残存の報告⁸⁾があるため、以下の洗浄を行った。洗浄方法はCrass⁹⁾による8つの方法のうち最も効果が得られたものを採用した。すなわち、濃塩酸(和光純薬工業(株)、純度35%)とメタノール(和光純薬工業(株)、純度99.5%)を1:1の同体積で混合し、その中に劈開したマイカ板を浸漬し20分間攪拌した。超純水で2回洗浄し、吸引ろ過後、室温で2時間真空乾燥した。次に濃硫酸(和光純薬工業(株)、98%)の中にマイカ板を浸漬し30分間攪拌した。超純水で4回洗浄し、吸引ろ過後、室温で15時間真空乾燥した。

2.2.6 ムチン担持マイカの調製法

シアル酸残基のために負に帯電している^{10,11)}ムチンとの強固な接着力を得るために、マイカ表面を、アミノ基を有するカップリング剤である3-Aminopropyltriethoxy silane (信越化学工業(株)、APTS)により改質し、表面を正に帯電させた。

実際の処理方法は、APTS トルエン溶液(0.22mol/L)を三口フラスコに入れ、110°Cのオイルバスの中で攪拌しながら洗浄マイカを加えた。12時間攪拌後に取り出し、トルエン洗浄により未反応カップリング剤を除去し、110°Cで12時間乾燥しシランカップリング修飾したマイカを得た。次に超純水を用いた0.5mass%ムチン(和光純薬工業(株)、豚の胃由来)懸濁液に浸し、24時間ゆっくり攪拌した。マイカを取り出し1時間真空乾燥し、再び15分間超純水ですすぎ、24時間真空乾燥してムチン層吸着マイカを得た。洗浄マイカ、APTS修飾マイカ、ムチン層吸着マイカのそれぞれの表面を原子間力顕微鏡(Bruker Japan Inc.、AFM、PicoForce-Nanoscope IIIa)で表面観察した。さらに洗浄マイカ表面、ムチン層表面の親疎水性評価のため水との接触角を観察測定した。

2.2.7 ナノゲル顆粒-ムチン層間の相互作用の測定法

作成したコロイドプローブとムチン吸着マイカ板を AFM の液中セルに固定し、リン酸緩衝液水溶液中で pH を変えながらフォースカーブを測定した。ピエゾの駆動速度は $1.96\mu\text{m/s}$ 、圧縮力は 3 nN に固定した。カンチレバーのバネ定数は、ピコフォースの機能の一つであるサーマルチューンモードにより測定した。25 点の異なる場所で各 2 回ずつ合計 50 回の測定し、統計的な処理を行った。

2.3 結果及び考察

2.3.1 架橋剤の種類と pH の変化がナノゲル粒子の平均粒子径と電気泳動移動度に及ぼす影響

Fig.2-3 は凍結乾燥前のリン酸緩衝液中で、動的光散乱法により測定されるナノゲル粒子の平均粒子径に及ぼす pH 及び、shell への架橋剤添加の影響を示す。エラーバーは標準偏差を示している。架橋剤添加の有無に寄らず pH5 以下では粒子径は 350 nm 程度である。pH=6 以上になると 600 nm 程度まで増加し、shell の膨潤効果が計測されたと考えられる。

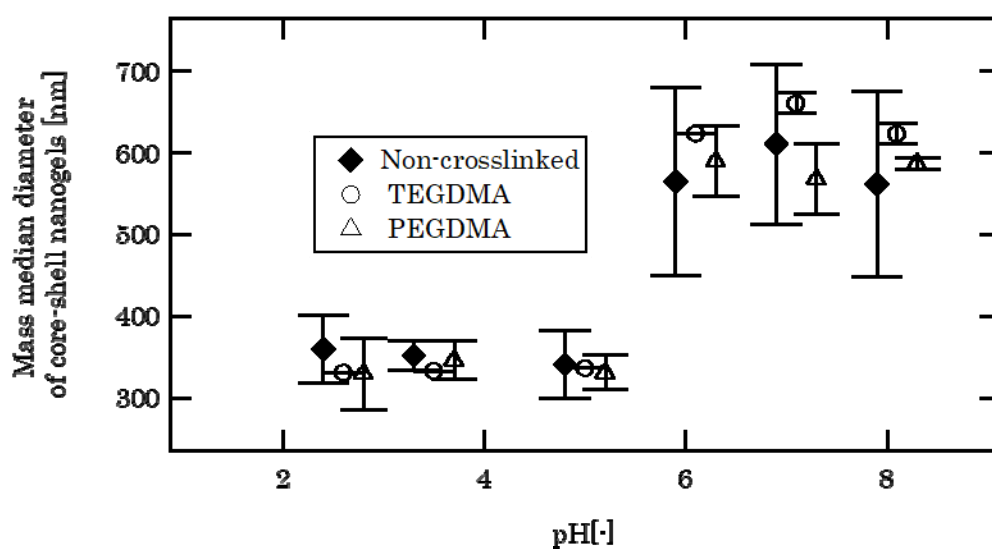


Fig.2-3 Effect of pH on mass median diameter of nano-gel particle with or without crosslinking agents in shell determined by dynamic laser scattering method in phosphate buffer solution at room temperature

Fig.2-4は無架橋または0.08 mol%架橋 shellを有するナノゲル粒子の電気泳動移動度と pH の関係を示す。エラーバーは標準偏差を示している。ナノゲル粒子の等電点は、pH 4~5 程度で、リン酸緩衝液の pH が増加するとともに電気泳動移動度が負側に増加した。PEGDMA または TEGDMA で shell を架橋したナノゲル粒子も無架橋と同様の傾向を示した。

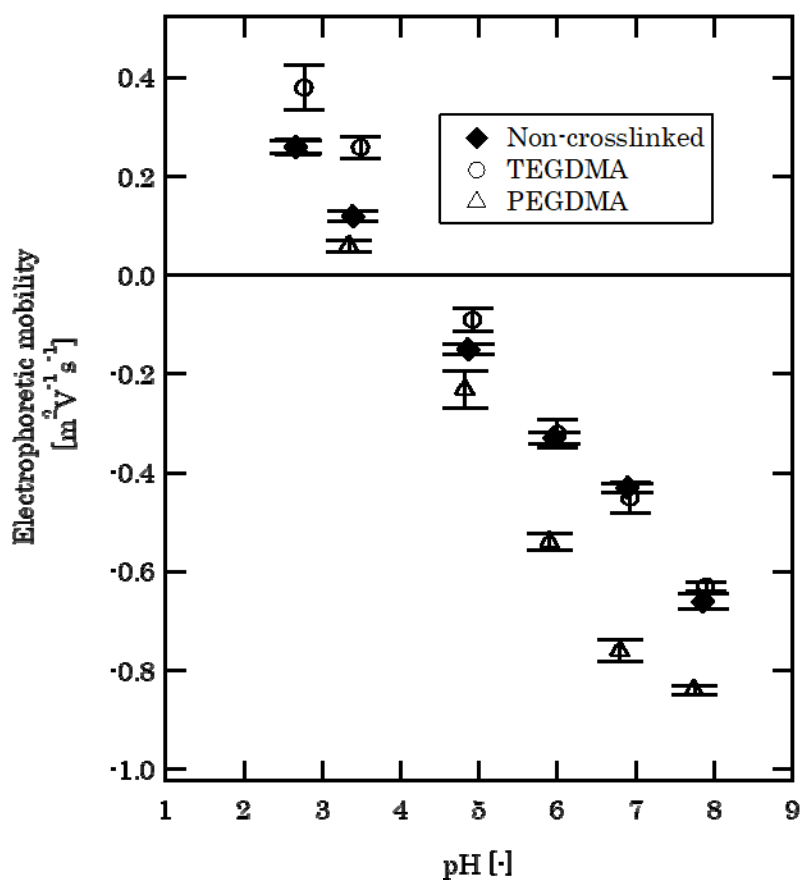


Fig.2-4 Effect of pH on Electrophoresis of nano-gel particle with or without crosslinking agents in shell structure

2.3.2 マイカ表面へのカップリング処理剤、ムチン吸着状態の確認

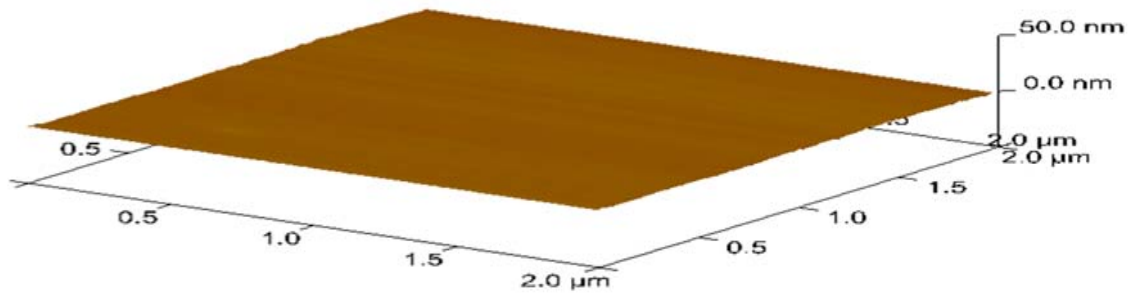
マイカ板表面に超純水を滴下して接触角を観察し、マイカ板状へのシランカップリング剤や、その上のムチン層の積層状態を検討した。Table 2-1 にその結果を示した。

洗浄マイカ板に対する水滴の接触角は 21 度であった。これに APTS を吸着した後の接触角は 95 度に増加し、疎水基を有する APTS が表面に固定されたことが確認された。さらにこの基板にムチンを吸着させると、表面の接触角は 32 度に減少した。ムチンは親水性であるため、この接触角変化はムチン層の吸着を示すものと考えられる。

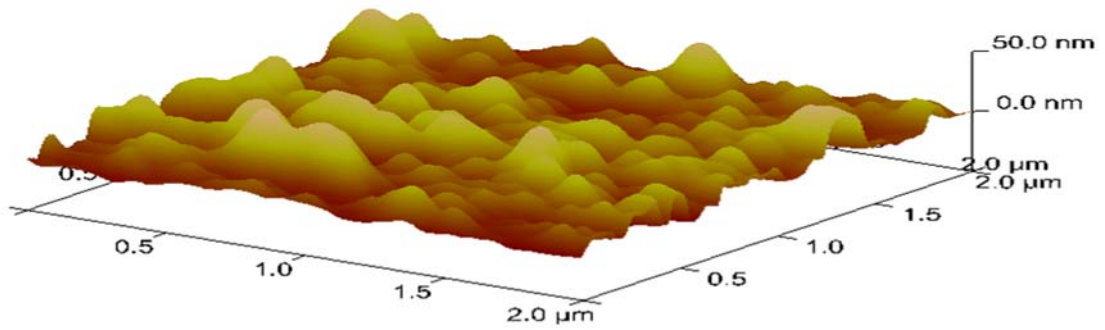
Fig.2-5 はマイカ板、シランカップリング剤の APTS 表面、ムチン吸着後のマイカ表面を観察した AFM イメージを示す。マイカ板 Fig.2-5(a) では平滑面が観察されたが、Fig.2-5(b)の APTS の修飾面では 20~30nm の粗さが現れた。本研究ではムチンをマイカ面に多く吸着させるため、シランカップリング剤の単分子層最小被覆の添加条件に比べ大過剰の条件で処理を行った。その結果、表面の凹凸が観察された。永田¹²⁾らは、過剰な添加により多層修飾が生じ、Fig.2-7(b)と同様な AFM イメージングが得られることを報告している。ムチンを被覆した Fig.2-5(c)では、吸着により粗さは低下した。ムチン層が平滑な平面を作りやすいことは Efremova ら¹³⁾による観察結果に一致している。

Table 2-1 Contact angle of pure water droplet on original and surface-modified mica [degree]

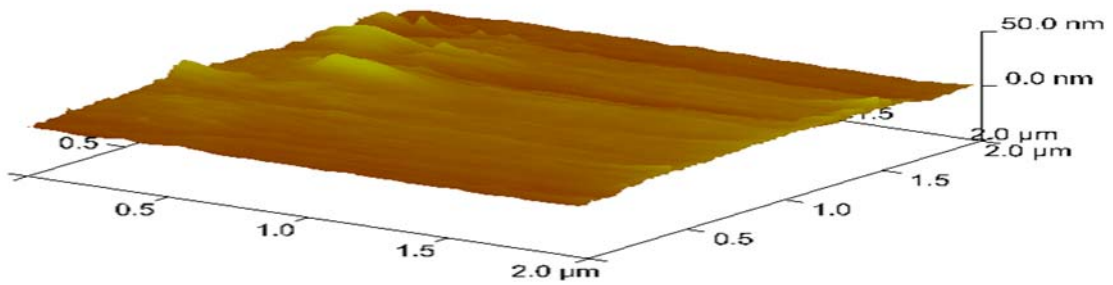
Original Mica	APTS modified	Mucin coated
21±2	95±3	32±2



(a) Original mica



(b) APTS-modified



(c) Mucin-coated

Fig.2-5 Three dimensional observation of original and mica, APTS-modified and mucin coated surface by AFM

2.3.3 ナノゲルコロイドプローブとムチン層間の相互作用の測定結果

Fig.2-6 は、pH=2.6、6.1 及び 8.1 と pH を変化させたリン酸水溶液中の接近過程のフォースカーブの測定結果の一例を示す。この図は 2.3.4 に示す統計的処理により求めた物理量 B 値が、中央値付近となるフォースカーブを代表として示している。無架橋、TEGDMA0.08mol%及び、PEGDMA0.08mol%での架橋 Shell について、圧縮力が 3nN に達した位置をピエゾ変位ゼロの基準としてフォースカーブを重ねた。

pH=2.6 で測定した Fig.2-6(a)は、無架橋、PEGDMA 架橋および TEGDMA 架橋のいずれも 100nm 付近から斥力が観察され、10~30nm 付近で斥力が急増している。架橋剤の添加効果はこの pH 条件では shell 層が収縮しているため顕著には認められない。

pH=6.1 の結果を示した Fig.2-6(b)では、無架橋、PEGDMA 架橋では Fig.2-6(a)に比べ斥力発現距離が 200nm 程度に増加している。これに対し TEGDMA 架橋では斥力発現距離は 20nm 以下であり、架橋により shell 層の膨潤によって生じる長距離斥力が減少したと考えられる。PEGDMA 架橋は無架橋と同様の斥力であることから、この領域で斥力発現距離を低減するには、PEG 鎖が多すぎることを示唆された。pH=8.1 では、無架橋では斥力発現距離が pH=6.1 の場合と同程度に維持され、PEGDMA 架橋では 300nm 程度とさらに増加し、架橋剤分子が長いと遠距離の斥力が増大している。一方、TEGDMA 架橋では、無架橋と同程度に長くなっている。

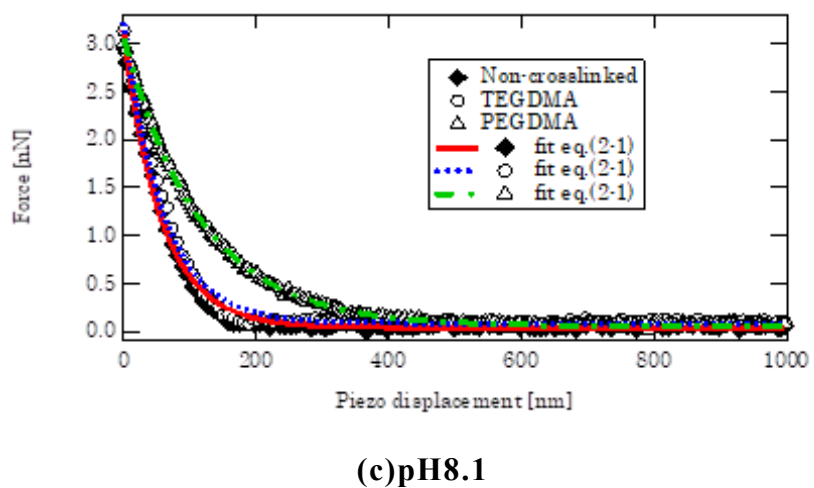
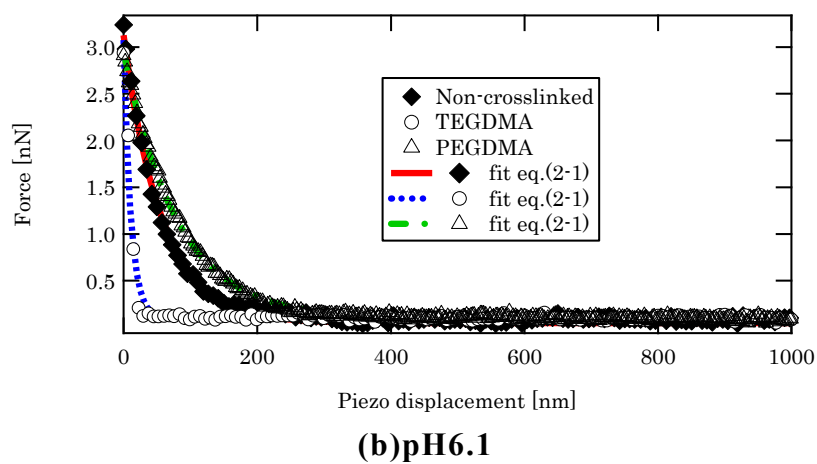
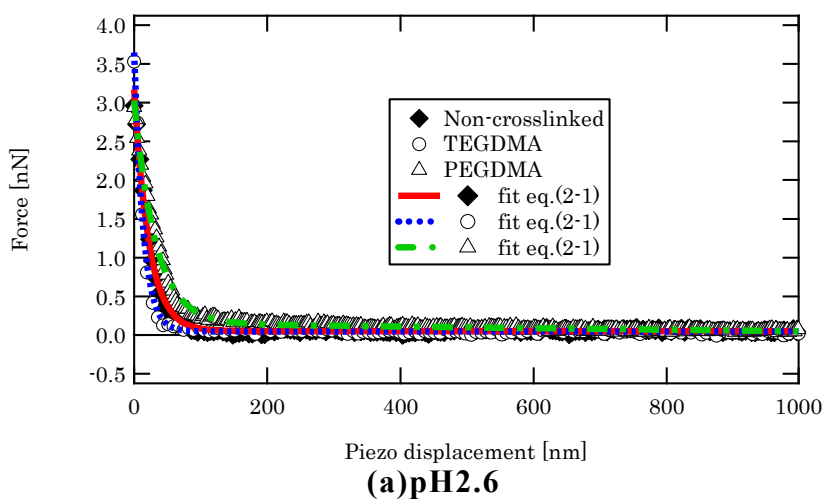
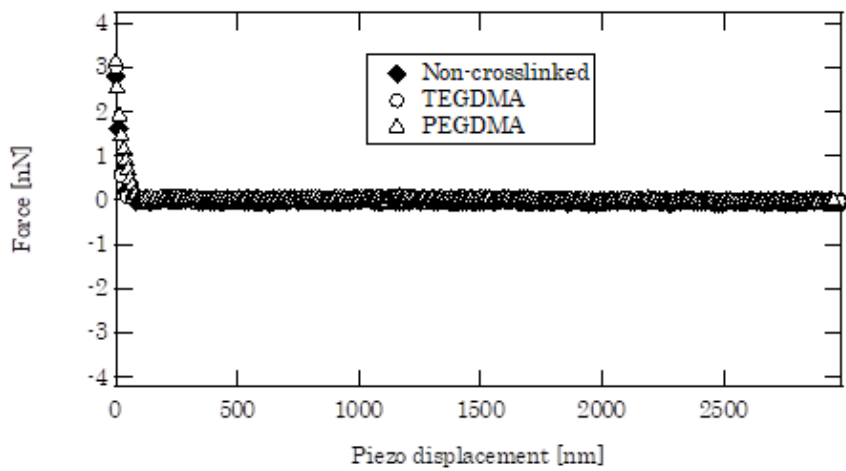
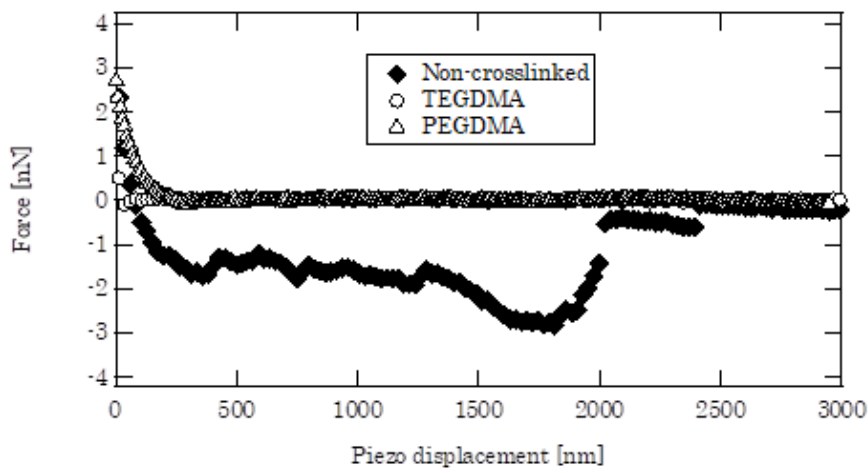


Fig.2-6 Effect of shell structure and pH on AFM force curve during approaching process

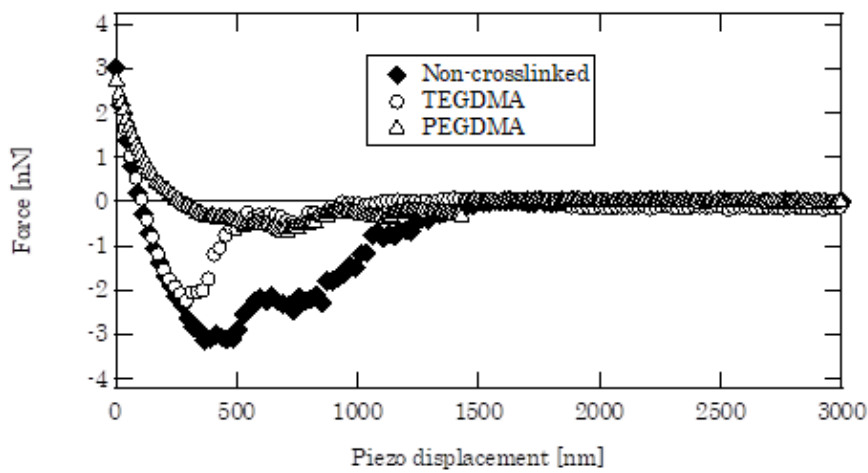
Fig.2-7 は、pH=2.6、6.1 及び 8.1 の pH 別のリン酸水溶液中の分離過程のフォースカーブの測定結果を示す。圧縮力が 3 nN に達した位置をピエゾ変位ゼロの基準としてフォースカーブを重ねている。この図は、2.3.4 の解析により、最大引力が中央値付近の値を示したフォースカーブを代表として示している。pH=2.6 の結果を示した Fig.2-7(a)では、無架橋、PEGDMA 架橋、TEGDMA 架橋いずれも同様のフォースカーブで引力は観察されなかった。この pH では、接近過程と同様に架橋剤の効果は認められない。Fig.2-7(b)の pH=6.1 では、無架橋で発現距離 2,000nm 付近まで長距離引力が観察される。TEGDMA 架橋を行うと引力の発現距離は 100nm 程度まで減少し、引力の絶対値も小さい。PEGDMA 架橋では引力は全く認められない。Fig.2-7(c)の pH=8.1 では、無架橋の場合に観察される 1000nm 以上の長距離引力が、TEGDMA 架橋では若干減少するが 500nm 程度維持される。PEGDMA 架橋では引力が著しく低下している。



(a)pH2.6



(b)pH6.1



(c)pH8.1

Fig.2-7 Effect of shell structure and pH on AFM force curve during separating process

2.3.4 フォースカーブの分布の平均化処理と統計的考察

接近過程においては斥力のみしか観察されないので、得られたフォースカーブを次式¹⁴⁾により最小二乗法を用いてカーブフィッティングを行い、近距離斥力に関する物理量 B [nm]を算出し、その分布を求めた。

$$F/F_{max} = \exp(-Z/B) \dots \dots \dots (2-1) \text{式}$$

ここで、 F_{max} は、圧縮力の最大値3nNを用いた。 Z はプローブとムチン基板間のピエゾ変位量[nm]であり、 F はそれに応じた相互作用の斥力および引力の測定量[nN]である。

接近過程での物理量 B の分布を箱ひげ図を用いて **Fig.2-8** に示した。50 点のデータを大きいほうから並べた結果を示しており、箱の上辺が25%の第1四分点、箱の中央付近の横線が中央値、箱の下辺が75%の第3四分点を示す。無架橋の場合には、pH=6.1 以上で B 値は上昇した。TEGDMA 架橋を行うと pH=6.1 の場合のみ B の値が統計的に見て無架橋に比べ著しく減少し、斥力の低減効果が認められた。しかし、pH=8.1 では無架橋と同程度の B 値となり、斥力低減効果は減少した。一方、PEGDMA 架橋では pH=2.6 では B 値は、無架橋と同程度であるが pH=6.1 及び pH=8.1 では無架橋に比べ B は増加し斥力発生を助長した。大きな PEG 鎖の導入は発現距離の抑制には逆効果である点が統計的に確認できた。

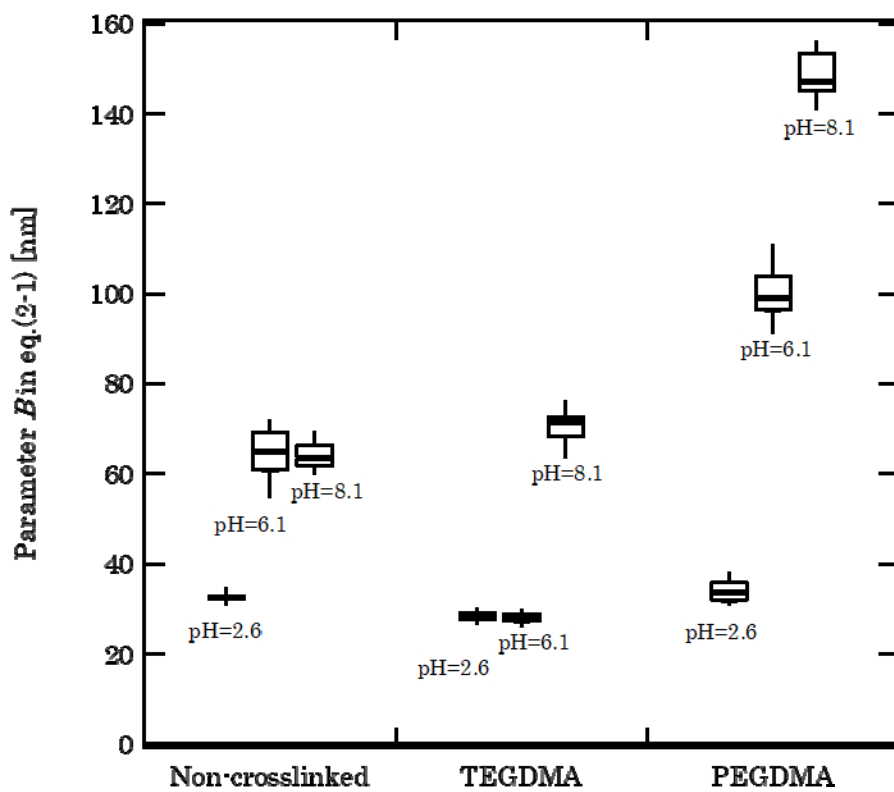


Fig.2-8 Distribution of parameter B in eq.(2-1) determined by curve fitting of force curve during approaching process

分離過程における引力について、最大引力に着目しその大きさのばらつきを統計処理の対象とし、箱ひげ図を用いて Fig.2-9 に結果をまとめた。統計的に見ても Fig.2-7 の傾向と同様に酸性域である pH=2.6 では架橋の有無によらず引力はほぼゼロであった。H=6.1 及び 8.1 では TEGDMA 架橋では無架橋に比べ減少しているものの、引力は観察される。一方 PEGDMA 架橋の場合、引力は統計的に見てもほとんど観察されない。TEGDMA を使うと本研究の目的である接近時の斥力の低減と引力の維持は一部達成されたが、大きな分子量の PEGDMA を架橋剤に用いると斥力が増大し、引力が減少するため、架橋剤の添加は逆効果となった。したがって架橋剤の分子量の制御が、目的の達成には必要である。

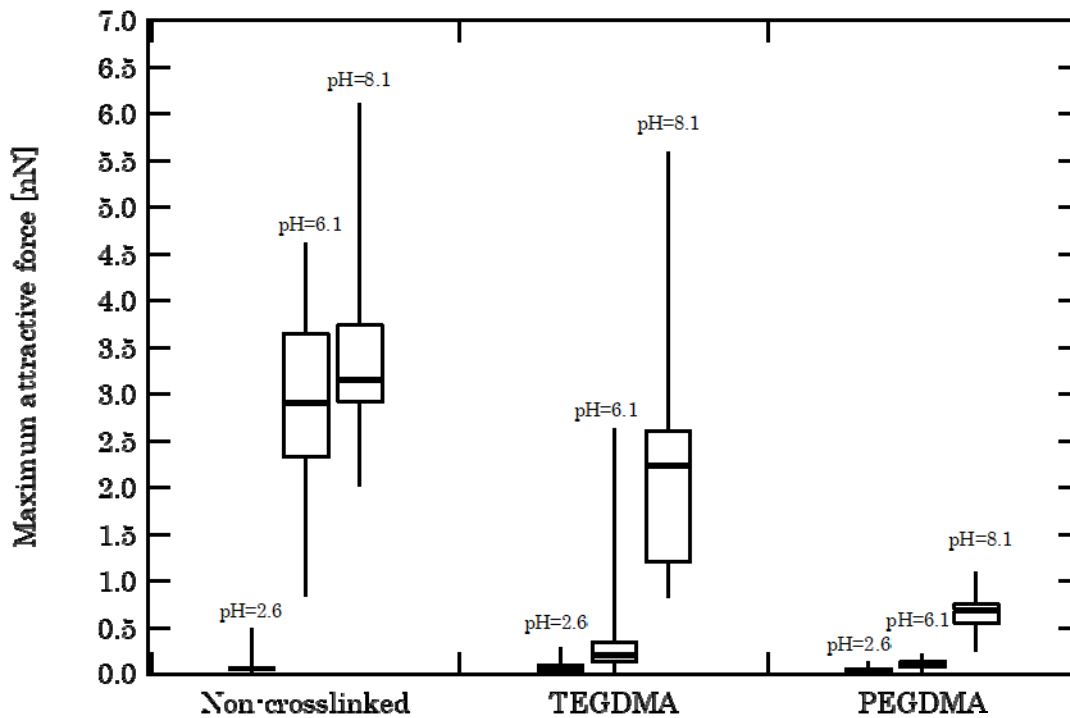
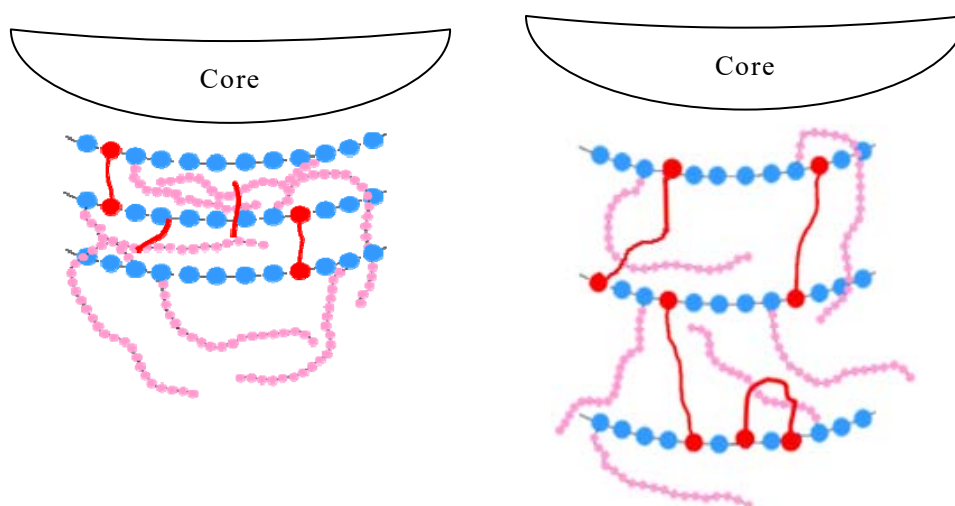


Fig.2-9 Maximum attractive force distribution determined from force curve during separating process

TEGDMA、PEGDMA の架橋導入による相互作用の変化機構を **Fig.2-10** の概念図に基づいて考察する。無架橋と、TEGDMA 架橋では斥力の発現距離はほぼ同等であるが、 $\text{pH}=6.1$ の場合にのみ TEGDMA 架橋で斥力抑制効果が表れた。これは TEGDMA が比較的短く、**Fig.2-10(a)**のように TEGDMA 両端の架橋部が二本の別の MAA 鎖間に繋がり、MAA 鎖の膨潤を繋ぎ留めたと考えられる。PEGDMA による架橋は $\text{pH}=6.1$ になると無架橋よりも B 値が増大したのは、**Fig.2-10(b)**のように MAA 鎖上に架橋しても、MAA の膨潤抑制につながらず、却って MAA 間の間隔を広げる効果が発生したと考えられる。一つの MAA 上に PEGDMA の末端が結合し、ループを形成している可能性もある。



(a) TEGDMA crosslinked shell (b) PEGDMA crosslinked shell

Fig.2-10 Estimated Shell structure of core-shell with crosslinking agents

(blue:MAA chain/pink:PEGMA chain/red:TEGDMA or PEGDMA chain)

2.4 結言

ムチン層とナノゲル粒子の相互作用の制御を目的とした、架橋剤の shell 層への導入効果を、コロイドプローブ AFM 法により測定した。低分子量の TEGDMA 架橋の場合、目的とする小腸内の pH 条件である中性域での接近過程の斥力低減と、分離時の引力ある程度確認できた。しかし、高分子量の PEGDMA 架橋では架橋の導入は接近過程の斥力の増大と、分離過程の引力の消失を起し、逆効果であることを示した。架橋剤の使用により相互作用の可能性を示したが、架橋剤分子量の検討が必要である。

References

- [1] R.J. Edwards, N. Moran, M. Devocelle, A. Kiernan, G. Meade, W. Signac, M. Foy, S.D.E. Park, E. Dunne, D. Kenny, D.C. Shields, "Bioinformatic discovery of novel bioactive peptides", *Nature Chem. Biology*, 2006, **3**(2), p108-112.
- [2] S.R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, S.F. Dowdy, "In vivo protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse", *Sci.*, 1999, **285**(5433), p1569-1572.
- [3] H. Ichikawa, Y. Yamazaki, Y. Fukumori, "Novel Composite Nanoparticles of Temperature-sensitive Hydrogels with pH-sensitive Polymeric Layer for Oral Drug Delivery", in *New Trends in Polymers for Oral and Parental Administration from Design to Receptors*, (Eds, G. Barratt, D. Duchene, F. Fattal, J.Y. Hegendre), Editions De Sante, Paris, 2001, p257-260.
- [4] J. Cleary, L. Bromberg, E. Magner, "Adhesion of polyether-modified poly(acrylic acid) to mucin", *Langmuir*, 2004, **20**(22), p9755-9762.
- [5] M. Iijima, M. Yoshimura, T. Tsuchiya, M. Tsukada, H. Ichikawa, Y. Fukumori, H. Kamiya, "Direct Measurement of Interactions between Stimulation Responsive Drug Delivery Vehicles and Artificial Mucin Layers by Colloid Probe Atomic Force Microscopy", *Langmuir*, 2008, **24**(8), p3987-3992.
- [6] M. Tsukada, R. Irie, Y. Yonemochi, R. Noda, H. Kamiya, W. Watanabe, E.I. Kauppinen, "Adhesion force measurement of a DPI size pharmaceutical particle by colloid probe atomic force microscopy", *Powder Technol.*, 2004, **141**(3), p262-269.
- [7] M. Iijima, M. Tsukada, H. Kamiya, "Effect of particle size on surface modification of silica nanoparticles by using silane coupling agents and their dispersion stability in methylethylketone", *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **307**(2), p418-424.

- [8]大石 祐司,成田 貴行,田上 安宣, (佐賀大学), “疎水性基板及びその製造方法”, 特開 2010-249696, 公開 2010/11/4.
- [9]J.J.Cras, C.A.Rowe-Taitt, D.A.Nivens, F.S.Ligler, “Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization”, *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, **14**, p683-688.
- [10]A.I.Lehninger, “The Neuron Membrane”, *Molecular Neurobiology N.A.S. Symposium*, 1968, **60**, 1069-1080.
- [11]J.Lee, M.Seno, “シアル酸とその誘導体”, *生産研究*, 1990, **11**(40), p617-621.
- [12]永田員也, “シランカップリング剤によるフィラー表面処理の考え方”, *日本ゴム協会誌*, 2005, **6**(78), p231-236.
- [13]N.V.Efremova, D.E.Leckband, Y.Huang, N.A.Peppas, “Direct Measurement of Interactions between Tethered Polyethylene glycol Chains and Adsorbed Mucin Layers”, *Langmuir*, 2002, **18**(3), p836-845.
- [14]J.N.Islaelachvili, R.M.Pashlay, “Measurement of the hydrophobic interaction between two hydrophobic surfaces in aqueous electrolyte solutions”, *J.Colloid Interface Sci.*, 1984, **98**, p500-514.

第3章

CNT(カーボンナノチューブ)
プローブ *AFM* 法による
キトサン修飾リポソームと
ムチン間相互作用の評価

3.1 緒言

薬剤の最も一般的な投与方法である経口投与の主な薬物吸収部位は小腸である。しかし、胃内部でのタンパク質分解酵素の存在により、ペプチドやタンパク質などの薬物は薬物作用の不活性化が生じることが多い。そこで胃内部でのペプチドやタンパク質などの薬剤保護を目的に、胃内では薬剤を保護し、腸内では徐放する目的で様々な複合型カプセル剤がこれまで開発されてきた。その例として、pH-温度応答性 core-shell型ナノゲル粒子¹⁾やリポソーム^{2,3)}を薬剤キャリアとして利用する方法が検討されている。竹内らは、数種のポリマーを表面修飾したリポソームを用い、摘出したラット腸管にリポソーム懸濁液を還流させ、腸管へのリポソームの吸着率を算出した結果、リポソーム表面にキトサン修飾をすると吸着率が向上することを報告している⁴⁾。こうした生体を利用する方法では、用いたカプセルの吸着率などの滞留状態の評価に留まり、設計したカプセルと生体分子の相互作用の変化による吸着性、滞留性を制御する機構の解明や、解明された機構に基づくキャリア構造の設計指針を導くことが難しい。リポソームを用いたカプセルの開発課題の一つであるリポソームの安定性、強度、弾力性などは生体を用いた方法のみでは評価は困難である。その結果、キャリアであるカプセルの構造・機能の設計は試行錯誤的観察による検討に留まっている。

飯島ら⁵⁾は pH温度応答性 core-shell型ナノゲル粒子を対象に、模擬胃液、腸液中での粘膜成分ムチンとの相互作用を、コロイドプローブ原子間力顕微鏡、Atomic Force Microscope (AFM)法により直接評価をおこなった。その結果、胃を模擬した酸性 pH条件では shell層が収縮し、ムチンとの付着力の消失が観察された。一方、小腸内を模擬した中性 pH条件では、shell層の膨潤によるムチンとの引力作用の増大などが測定された。コロイドプローブ AFM法を用いることにより、shell層の構造設計によるムチン層への相互作用の変化が、生体器官を利用することなく定量的に評価でき、shell層の構造設計にフィードバックできることが示された⁶⁾。

本研究ではカーボンナノチューブ (CNT)プローブ AFM法を用い、リポソーム表面へのキトサン修飾が、小腸粘膜層への付着性に及ぼす影響を直接評価することを試みた。リポソームは平滑なマイカ表面に固定し、CNTプローブ表面に小腸粘膜層を模擬したムチン層を固定した。生体を用いた場合は、条件を変えた実験を多数行うことは困難である。この

ため pHを 2.8及び 7.0に調整したリン酸緩衝液中で、リポソームとムチン間のフォースカーブを測定した。pH=2.8は胃液を、pH=7.0は小腸液を簡易的に模擬した。近年、人工胃液や腸液を用いた研究が行われているが、本報では第一段階の研究とした飯島らの研究⁵⁾と同じ模擬液を用いて、単純化した条件で検討を行った。ナノレベルの鋭い先端を有する CNTプローブの利用により、キトサン修飾によるリポソームの微視的な柔軟性、変形性や安定性の評価を試みた。さらに CNT表面に吸着させたムチンとキトサンとの非線形的で数 nm程度まで作用する長距離引力の形から、修飾したキトサンがムチンとどのような機構で作用力を強めているか評価を試みた。その結果から相互作用の変化を詳細にとらえ、修飾したキトサンの働き方を評価することを試みた。小腸への長期滞留性など、効果的なリポソームカプセル設計への検討を与えることを目的とした。

なお、本章は第2章の研究の方向性と大半で一致しているため、ほぼ同様の手法を多数使用している。B値を用いたフォースカーブ斥力の評価法は第2章第3章を通じて共通の考え方に基づいている。

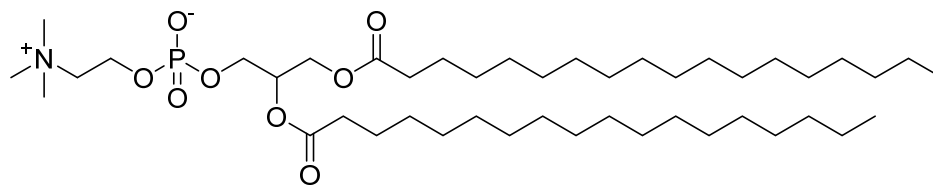
3.2 実験

3.2.1 リポソームの作成と特性評価

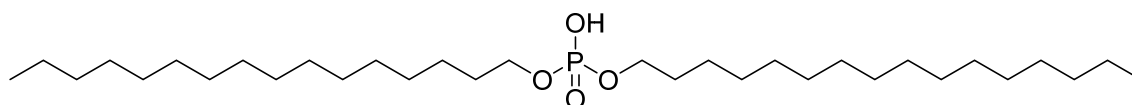
リポソーム原料は、主成分として distearoylphosphatidylcholine (Avantic Polar Lipids. Inc.製,フナコシ(株)販売、純度99%以上、DSPC)、副成分としてリポソームを負に帯電させる dicetylphosphate (ナカライテスク(株)、純度 97%以上、DCP)⁷⁾、膜の分子構造を密にするために添加する cholesterol (林純薬工業(株)、純度 95%以上、Chol.)の 3種類を用い、中野ら⁸⁾の方法に準拠して作成した。各原料の構造式を Fig.3-1(a)~(c)に示した。各成分をモル比で、DSPC : DCP : Chol = 8:2:1になるように、DSPCを126.4mg、DCPを21.88mg、Cholを7.76mgとしてナスフラスコ中で混合し、適量のクロロホルムを加えて全成分を完全に溶解させた。ロータリーエバポレーターを用いて 40°Cの温浴上で 2時間、溶媒を減圧徐去して、減圧下で一晩乾燥させた。薄膜状態になった生成物に室温で蒸留水を 4mL添加、70°Cの温浴で温度を保ち攪拌水和させ、リポソーム分散液を調製した。

得られたリポソームに表面修飾を施すキトサンの構造式を Fig.3-1(d)に示す。使用したキトサン(純正科学(株)、脱アセチル化度 80%以上)は、平均分子量 22,000($n \approx 136$)である。中性水には不溶であるため pH=4.4 で濃度 100mmol/L の酢酸緩衝液(acetate buffer solution、ABS)を用いてキトサン量 44mmol/Lとなるよう溶液を調整した。この溶液 1mL中に、先に作成したリポソーム分散液 1mLを攪拌しながら 10分間混合し、12時間冷暗所に静置した。リポソームが沈殿するので、上澄み液を除去後、生体内に近い環境に変更するため pH=7.0 で濃度 100mmol/L のリン酸緩衝液(phosphate buffer solution、PBS)を 2mL添加し、攪拌再分散させた。これを 12時間静置し上澄み除去の操作を合計 3回繰り返し、最後は PBS の代わりに蒸留水を加えてキトサン修飾リポソーム分散液を調製した。

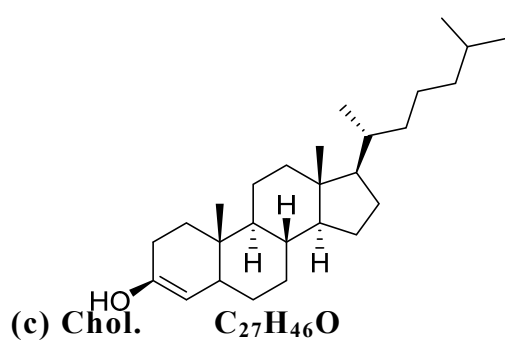
キトサンの修飾を確認するため修飾前後のリポソームのゼータ電位を、電気泳動法(日本ルフト(株)、Z-アナライザーモデル 502)により測定した。生体内でのリポソームの粒子径のpHによる変化を計測するため、pH=2.8及び 7.0のPBSを用意しリポソーム溶液を加えて希釈して、レーザー回折式光散乱粒度分布測定装置(株堀場製作所、LA-950V2)を用いて粒子径分布を測定した。



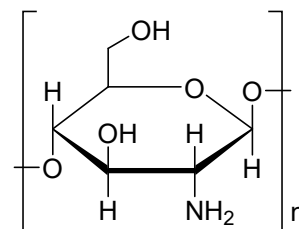
(a) DSPC $C_{44}H_{88}NO_8P$



(b) DCP $C_{32}H_{67}O_4P$



(c) Chol. $C_{27}H_{46}O$



(d) Chitosan $(C_6H_{11}NO_4)_n$

Fig.3-1 Molecular structure of raw materials

3.2.2 マイカ平板表面へのリポソームの固定化

キトサン未修飾、修飾のそれぞれのリポソーム懸濁液を別々のマイカ板上に滴下し、1~2時間放置し乾燥し、乾燥過程での発生する液架橋力によりマイカ表面にリポソームを固定化した。マイカ表面への固定化が弱いリポソームを除去するため、pH=7.0のPBSにより洗浄した。リポソームのマイカへの固定化状態は、原子間力顕微鏡(ブルカージャパン(株)、Multimode SPM、Nanoscope IIIa ピコフォース)によるコンタクトモードでの表面走査観察で、安定的な画像が得られることで確認した。

3.2.3 CNTへのムチン吸着法の検討、及びCNTプローブへのムチン吸着

CNTへのムチン吸着法はプローブでの検討の前に、市販のCNT(Shenzhen Nanotech Port Co. Ltd.、S-MWNT-1030)により表面処理・修飾法を検討した。最初に、ムチンの吸着を促進するため、カーボンブラックへの吸着に関する研究^{9,10)}で使用したカチオン性高分子であるpolyethylene imine (富士フィルム和光純薬(株)、MW=10,000、PEI)の3g/L水溶液に12時間含浸し、PEIを吸着した。吸着操作後、pH=7.0のPBSで洗浄して未吸着のPEIを除去、乾燥した。これを、0.5wt%のムチン懸濁液に入れて一晩浸し、PBSで洗浄を行い乾燥させた。PEI、及びムチン吸着状態は、それぞれ乾燥したものをpH=4.6のABS中で電気泳動移動度の測定により確認した。以上の予備的検討に基づいてCNTプローブ(大研化学工業(株)、DN-DF3)へのムチン吸着を行った。CNTプローブのSEM(日本電子(株)、走査型電子顕微鏡、JSM-6335F)画像をFig.3-2に示した。これをCNTと同様に3g/LのPEI水溶液に12時間含浸し、PEIを吸着した。吸着操作後、pH=7.0のPBSで洗浄して未吸着のPEIを除去、乾燥した。これを、0.5wt%のムチン懸濁液に入れて一晩浸し、PBSで洗浄を行い乾燥させた。このようにしてムチン吸着CNTプローブを得た。

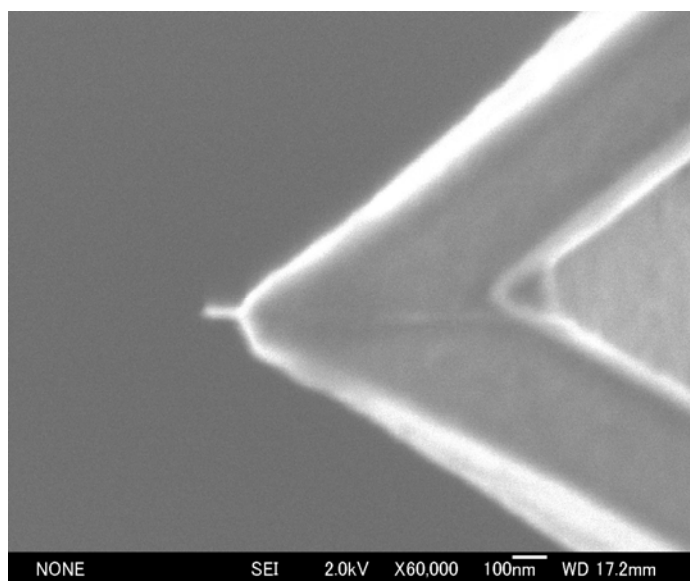


Fig.3-2 FE-SEM image of CNT probe

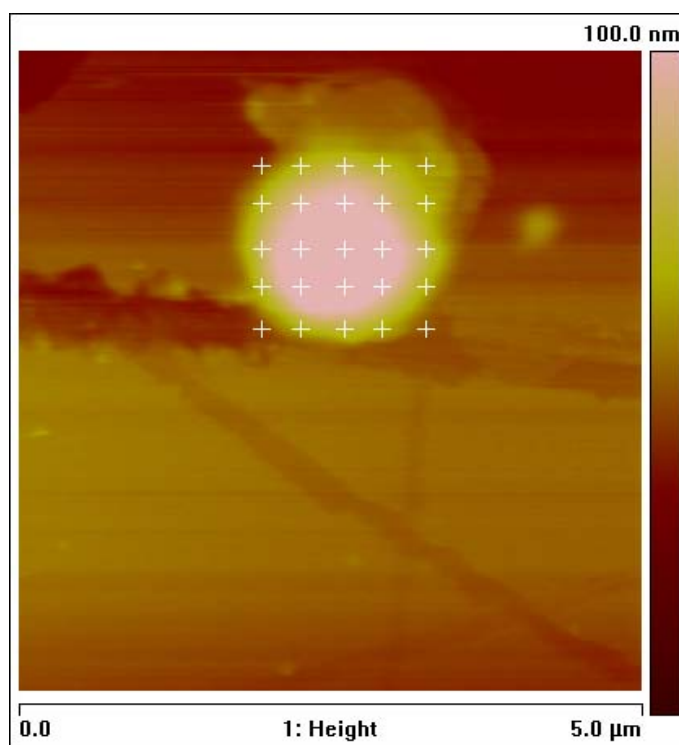


Fig.3-3 AFM image of liposome fixed on cleavage plane of mica by contact mode mapping

3.2.4 AFMによるムチン／リポソーム間フォースカーブの測定

原子間力顕微鏡の液体セルに、リポソームを固定化したマイカ、及びプローブを設置し、pH=2.8、または7.0のPBSを液体セル中に満たした。生理食塩水(イオン強度0.15mol/L)やリンゲル液(イオン強度、0.16mol/L)などの生体液に近い0.2mol/Lのイオン強度となるよう、NaCl(富士フィルム和光純薬株、純度99.5%以上)を適量添加した。測定は、最初にプローブを用いてFig.3-3に示したように画像を得、測定対象とするリポソームを任意に決定した。一つのリポソームにおけるフォースカーブの測定位置を、Fig.3-3中のメッシュのように画像より等間隔で25点を指定し、各位置におけるフォースカーブを各2回合計50点測定した。AFMのピエゾ駆動速度は、498nm/sに固定し、プローブとリポソームの接近過程では、接触後、1.2~1.5nNまたは4nNの圧縮力を加えたところでピエゾを反転させ、分離するまでのフォースカーブを測定した。同じ条件で調整したリポソームについて、合計3個を対象にフォースカーブを測定した。測定結果にバラツキが認められる測定条件については、統計的処理を行った。

3.3 実験結果および考察

3.3.1 生成したリポソームのキトサン修飾、形態、粒度分布と考察

リポソームへのキトサンの修飾の前後でゼータ電位は、負から正側へシフトした。キトサンの有するアミノ基によって正側へシフトしたと考えられ、修飾がなされたものと確認した¹¹⁾。

pH=2.8及び7.0の条件でキトサン修飾の有無による個数基準粒子径分布の測定結果を、**Fig.3-4**に示した。pH=2.8の条件のほうがpH=7.0の中性条件より、粒子径はキトサン修飾の有無によらず大きい傾向がある。キトサン修飾により、リポソームの粒度分布は未修飾に比べ、いずれのpHでも小さくなっている。

低pHで粒径が小さいのは、DCPのホスホン酸基に H^+ イオンが吸着して分子間に静電斥力が働き、リポソームが膨潤したためと思われる。キトサン修飾により、キトサンの有機鎖がリポソームの膨潤を抑制して粒子径が小さくなったと思われる。

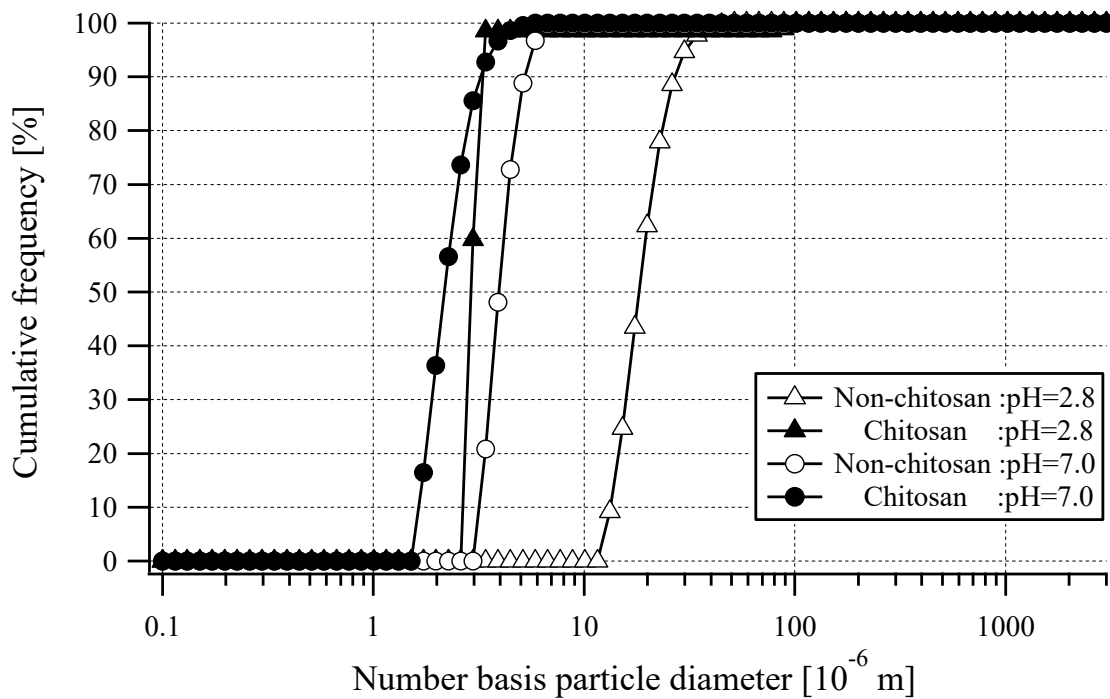


Fig.3-4 Effect of pH and chitosan modification on size distribution of liposome

3.3.2 電気泳動移動度による CNT表面へのムチン吸着状態の評価

CNTへのムチンの吸着性の検討のため市販 CNT(S-MWNT-1030)の分散液を対象に PEI及びムチンの吸着による電気泳動移動度の変化の測定結果を **Table 3-1**に示した。PEIを吸着した CNTは正に帯電し、ムチン吸着後、電位は負側にシフトした。この結果から、PEIを吸着後にムチンを吸着させることで CNT表面にムチンは吸着できると考えられた。

Table 3-1 Electrophoresis measurement of CNT in pH=4.6

	Electrophoretic mobility [$10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ v}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
CNT	-0.70
PEI modified CNT	1.58
Mucin/PEI modified CNT	-0.72

3.3.3 リポソームとムチン吸着CNTプローブ間のフォースカーブ測定と統計処理

(1) ムチン吸着CNTプローブによるフォースカーブ測定結果

キトサン未修飾リポソームとムチン吸着CNTプローブを用いたpH=2.8及び7.0でのフォースカーブの測定結果の一例を **Fig.3-5,6**に示した。pH=2.8の場合を示した Fig.3-5では、接近時、250nm以上の遠距離から非線形の斥力が観察された。分離時は同じ距離での斥力が接近時に比べ小さくなり、ヒステリシスが観察された。接近時、分離時共に引力は認められなかった。

pH=7.0の場合を示した Fig.3-6では、接近時の非線形的な斥力発生距離は100nm程度であり、pH=2.8に比べ短く、ヒステリシスは観察されるが、小さくなった。また距離が約25nm以下では、フォースカーブは直線となりヒステリシスも認められなかった。接近、分離時ともに引力は観察されなかった。

接近、分離時ともに非線形的なフォースカーブを示し、斥力の発現距離や形状は測定点によりばらつきが認められた。

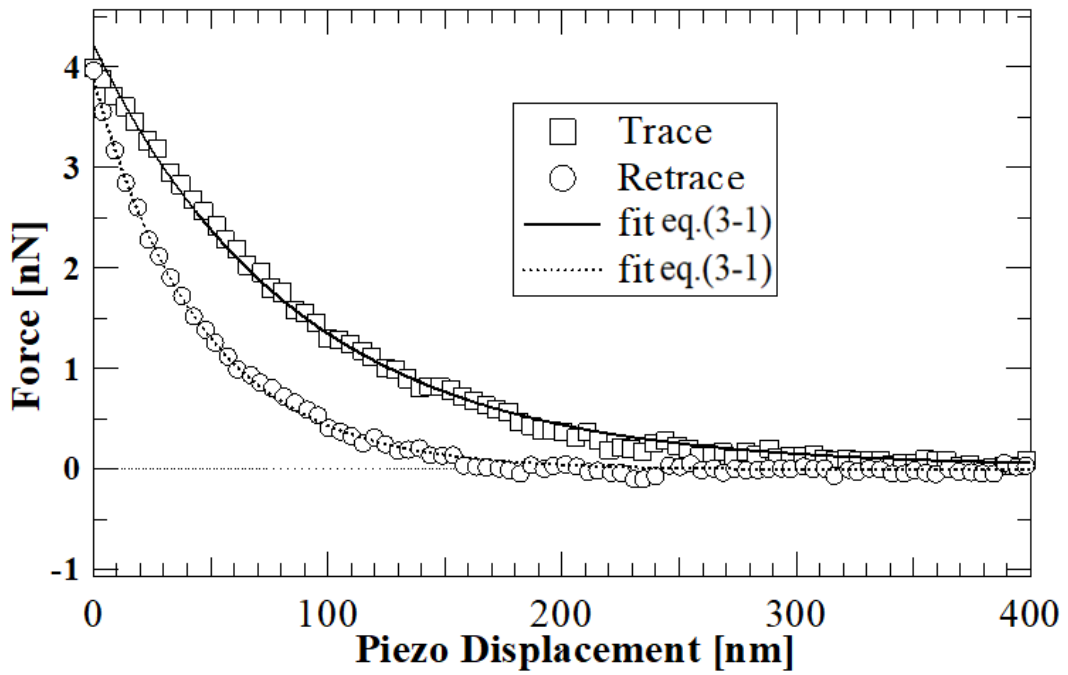


Fig.3-5 Interaction force examples between non-chitosan-coated liposome / CNT mucin in pH=2.8 phosphate buffer solution

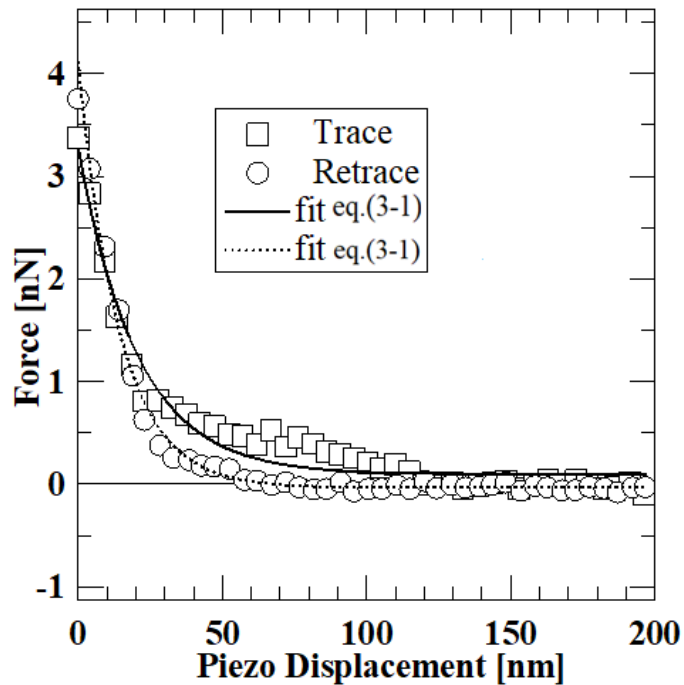


Fig.3-6 Interaction force examples between non-chitosan-coated liposome / CNT mucin in pH=7.0 phosphate buffer solution

そこで第2章同様に、接近分離時のすべてのフォースカーブを(3-1)式¹²⁾により近似し、ばらつきの定量的解析を試みた。

$$F/F_{max} = \exp(-Z/B) \dots \dots \dots (3-1)式$$

F [nN]は計測された斥力、 F_{max} [nN]は、接近時の最大圧縮力であり、本章では4nNに固定した。 B [nm]はフォースカーブの形状を示す係数で、 F が F_{max} の $1/e$ となるピエゾ変位量 Z [nm]の値に該当する。

実測した斥力の eq.(3-1)による近似結果を Fig.3-5,6中に追加した。特に pH=2.8の条件では、eq.(3-1)で良好に近似できている。一方、pH=7.0では距離が 20nmより近い位置で直線的になるため近似性は pH=2.8より悪いが、ほぼ実測値と一致している。この結果から、eq.(3-1)の係数 B によりフォースカーブの形状が表現できるので B の値を 3個のリポソームで計測した全フォースカーブについて算出し、その全分布を RSD(変動係数、Relative Standard Deviation)と共に Fig.3-7に示した。 B が大ききことは、相互作用の作用距離が長いことを示している。また、接近時に対する分離時の B の値の差が大ききほど大きなヒステリシスが生じていることを現わしている。pH=2.8の方が、pH=7.0より B の値は大きく、接近時と分離時の B の値の差も大ききので、pH=2.8の方が、非線形的な斥力が観察される距離とヒステリシスも大きい。

リポソームの粒度分布測定結果を示した Fig. 4 と比較すると、pH=2.8では、リポソームは脂質分子 DCP への H^+ の吸着による帯電で互いに反発し、膨潤していると考えられる。一方、pH=7.0ではリポソームから H^+ を放出し、静電反発作用が弱くなることで、脂質分子間の疎水性相互作用が高まり、膜の構造が収縮していると考えられる。pH=7.0での膜の収縮により、CNT プローブの先端がリポソームに接触した際の、膜の変形が、pH=2.8 に比べ抑制されたため、 B の値が小さくなったと考えられる。

pH=7.0での膜の収縮により、CNT プローブの先端がリポソームに接触した際の、膜の変形が、pH=2.8 に比べ抑制されたため、 B の値が小さくなったと考えられる。

キトサン修飾リポソームとムチン吸着CNTプローブを用いたpH=2.8の場合のフォースカーブの一例を第2章同様の箱ひげ図を用いて Fig.3-8に示した。接近時にはキトサン未修飾の結果を示した Fig.3-5に比べ短い距離であるが、200nm付近から非線形的な斥力が観察された。分離時はキトサン未修飾の場合と異なり、ヒステリシスは認められず接近時と分離時のフォースカーブは一致した。また、分離時に僅かであるが、いずれの測定点で引力が認められた。

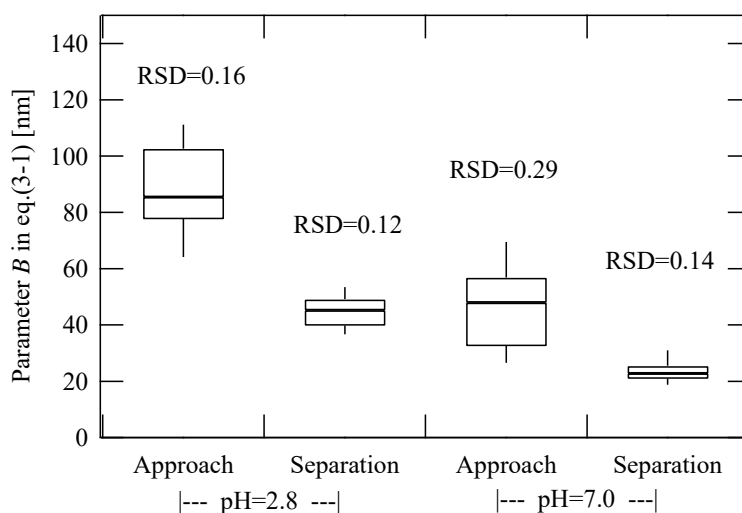


Fig.3-7 Statistics study on trace parameter B between non-chitosan-coated liposome / CNT mucin

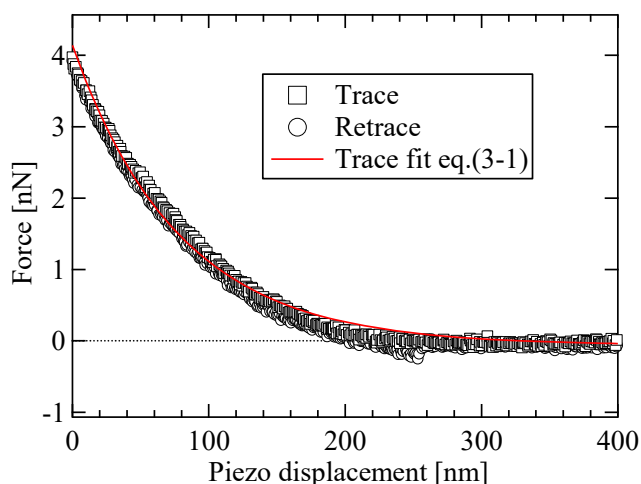


Fig.3-8 Interaction force examples between chitosan-coated liposome / CNT mucin at maximum case in pH=2.8 phosphate buffer solution

接近時の曲線的なフォースカーブ形状、および分離時の最大引力には、測定点によりばらつきが認められた。そこで、測定を行った3個のリポソームの接近時のフォースカーブにeq.(3-1)を近似して B の値を計算し、併せて最大引力の分布を求めた。計算した B の値の分布を箱ひげ図を用いて **Fig.3-9** に示した。Figure9には、比較のためにキトサン未修飾の結果も示した。キトサン未修飾に比べ、修飾することにより、 B の値は平均値で 20nm程度短くなって、分布も狭く、位置による値のばらつきが小さくなっている。

このことはキトサン被覆がリポソームの表面が容易に変形することを防いでいると考えられる。

分離時の引力の分布の計算結果は、pH=7.0の場合と比較して、後述する。

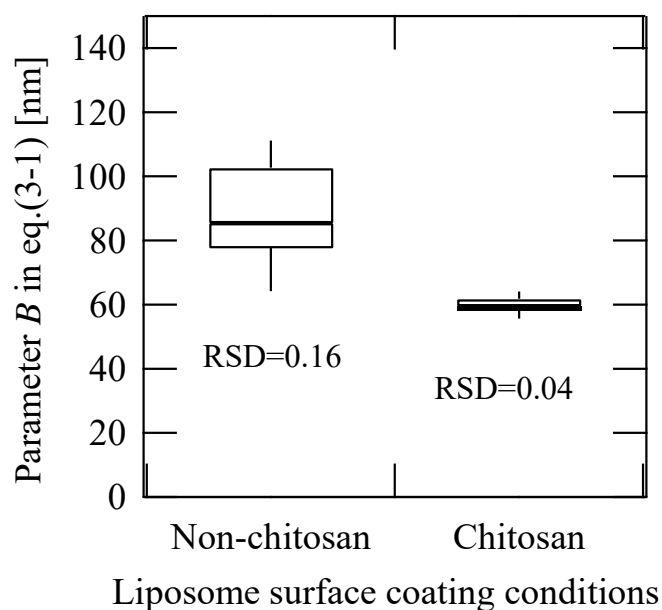
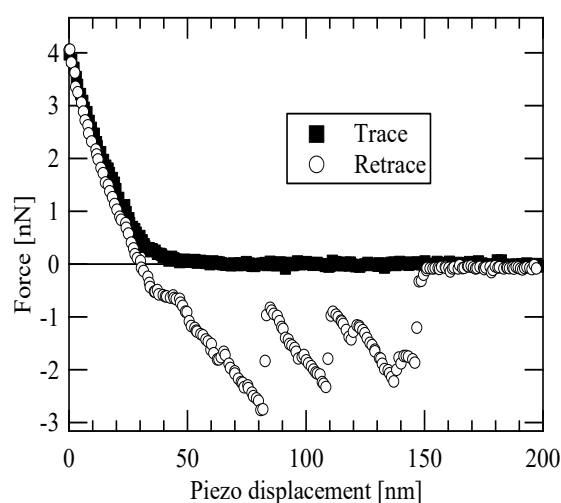
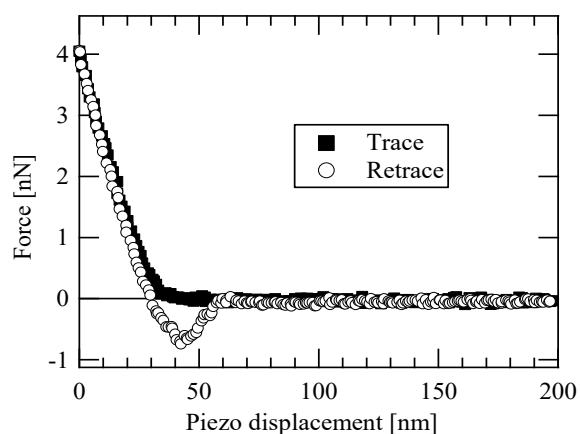


Fig.3-9 Statistics study on trace parameter B during approaching process between liposome / CNT mucin in pH=2.8

pH=7.0 の場合には **Fig.3-10(a),(b)**に示した二つのパターンが観察された。接近時は、いずれのデータも接触後、直線的に斥力が増加し pH=2.8 のような曲線的なカーブは得られなかった。分離時の引力は Fig.3-10(a) のパターンのように複数の引力ピークを持つ変動型が、全体の 3 分の 2 を占めた。また残りの 3 分の 1 は Fig.3-10(b)のように、一つの引力ピークを示した。同じ点を 2 回ずつ測定したが、全ての点で、2 回ほぼ同じパターンとなった。



(a) Multi peaks case



b) Single peak case

**Fig.3-10 Interaction force examples
between chitosan-coated liposome / CNT mucin
in pH=7.0 phosphate buffer solution**

pH= 2.8及び 7.0で計測された分離時のフォースカーブで認められた最大引力値の分布をRSDと共に箱ひげ図を用いて **Fig.3-11**に示した。最大引力値の分布の中央値で比較すると、 pH=2.8に比べ、 pH=7.0では、 4～5倍程度となっており、 分布も広い。

この分布の広さは、 pH=7.0での分離時の引力の変動にも起因している。この分離時の引力の変動は、 キトサンとムチンの分子鎖の絡み合いが、 複数の箇所が発生し、 絡み合いが徐々に切断することで発生していると考えられる。

また、 キトサンの修飾により、 プローブの種類、 pHによらずムチンとの分離時に、 引力を発現させている。竹内らがラットの小腸内へのリポソーム吸着率を求めた結果⁷⁾では、 キトサン修飾リポソームが修飾のないものに比べ吸着率の向上を報告している。キトサン修飾に伴う分離時引力の発現を観察した結果より、 キトサン修飾による小腸へのリポソームの吸着性の向上効果が確認された。

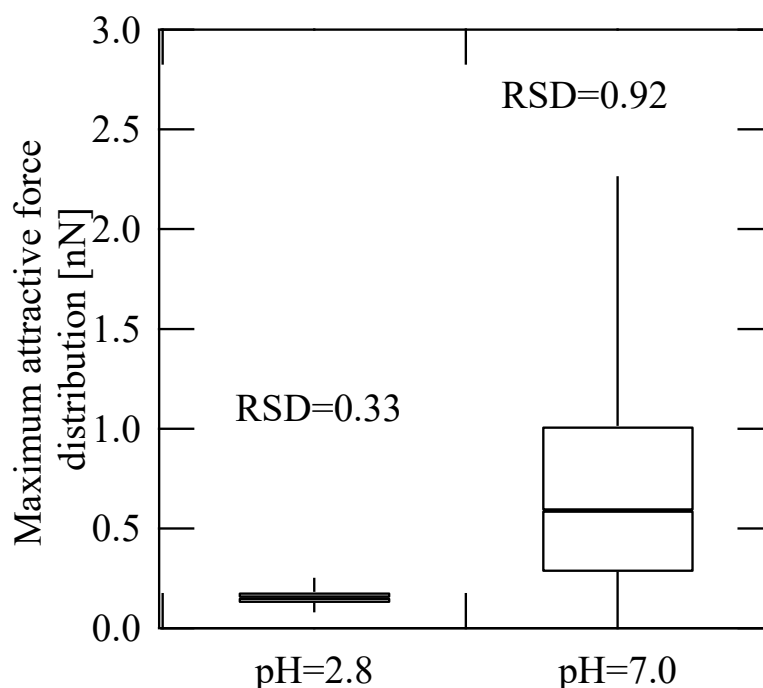


Fig.3-11 Statistics study on attractive force during separating process between chitosan-coated liposome / CNT mucin

(2)キトサン未修飾時のヒステリシスと、キトサン修飾時の引力パターンに関する考察

CNTプローブを用いると、二種類の pH条件とも、キトサン未修飾の場合には、フォースカーブにヒステリシスが生じた原因、キトサン修飾により pH=7.0の場合に分離時に二つのパターンが現れた現象の原因を以下に考察する。

CNTプローブによるリポソームの接触と分離過程でのリポソーム膜とCNTの接触状態、ムチンとキトサン分子鎖の状態を、**Fig.3-12**に模式的に示した。

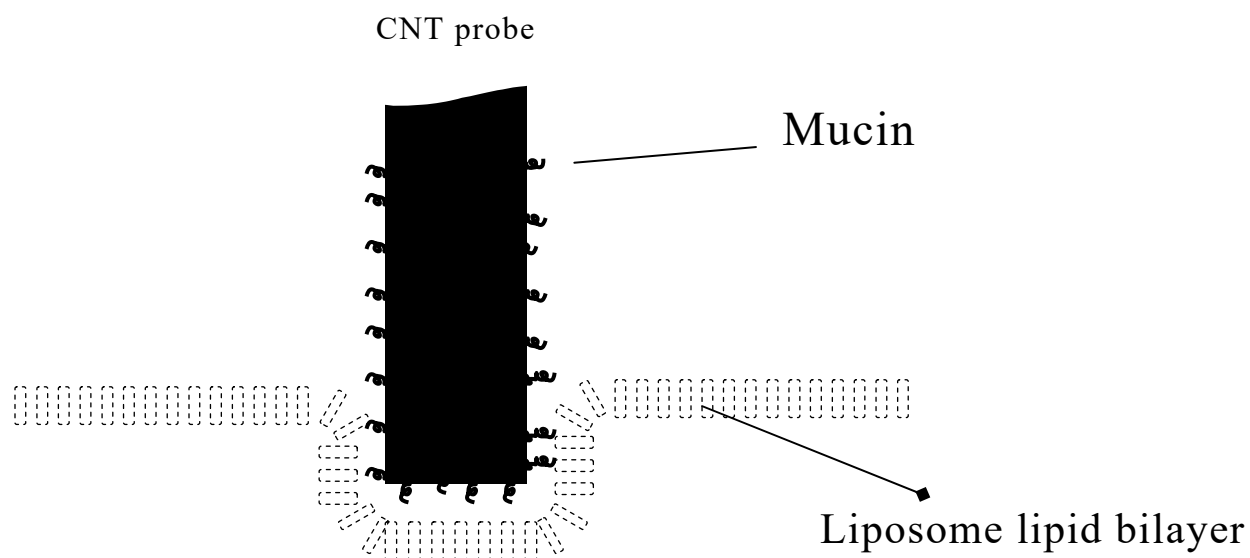
最初に、pH=2.8でキトサン未修飾のリポソームがCNTプローブと最大圧縮力で接触した状態を**Fig.3-12(a)**に示した。粒度分布の測定結果を示した**Fig.3-4**からpH=2.8ではリポソーム分子間が正に帯電し膨潤しており、リポソーム膜は柔らかいと考えられる。CNTプローブの先端がリポソームに接触後、リポソームをCNTプローブに押し付けて行くと、リポソームの膜の変形によりCNTプローブの側面に膜が接触し、プローブの動きに対し、摩擦抵抗が生じていると考えられる。この摩擦力はプローブを押ししていくと接触面積が増加するため斥力が非線形的に増加する。接近時と分離時で膜の非線形的な変形状態が異なるため、CNT側面との接触状態、及び摩擦係数が変化し、ヒステリシスが観察されたと考えられる。pH=7.0の場合、リポソーム構成分子間の静電斥力がpH=2.8の時よりも減少して収縮し、リポソーム膜が固くなるため、**Fig.3-12(a)**のような変形は抑制されたと考えられる。

キトサン修飾リポソームの場合の模式図を、**Fig.3-12(b)**と**(c)**に示した。各図の左側が圧縮過程、右が分離過程を示している。pH=2.8で発生するリポソーム膜の静電的な膨潤は、表面のキトサン修飾により抑制されたと考えられる。その結果、キトサン未修飾の場合に発生するリポソーム膜の変形に伴うCNTプローブ側面への膜の接触現象も抑制され、接近、分離時のフォースカーブのヒステリシスは、消失したと考えられる。しかし、基材のリポソームの膨潤は、ある程度生じるため、リポソーム膜表面でのキトサンの単位面積当たりの存在量は減少する。その結果、**Fig.3-12(b)**の右側図のように、ムチンやキトサンの分子鎖同士の絡み合い数が低下するため、分離時のピークは一つだけの単純なフォースカーブになったと考えられる。

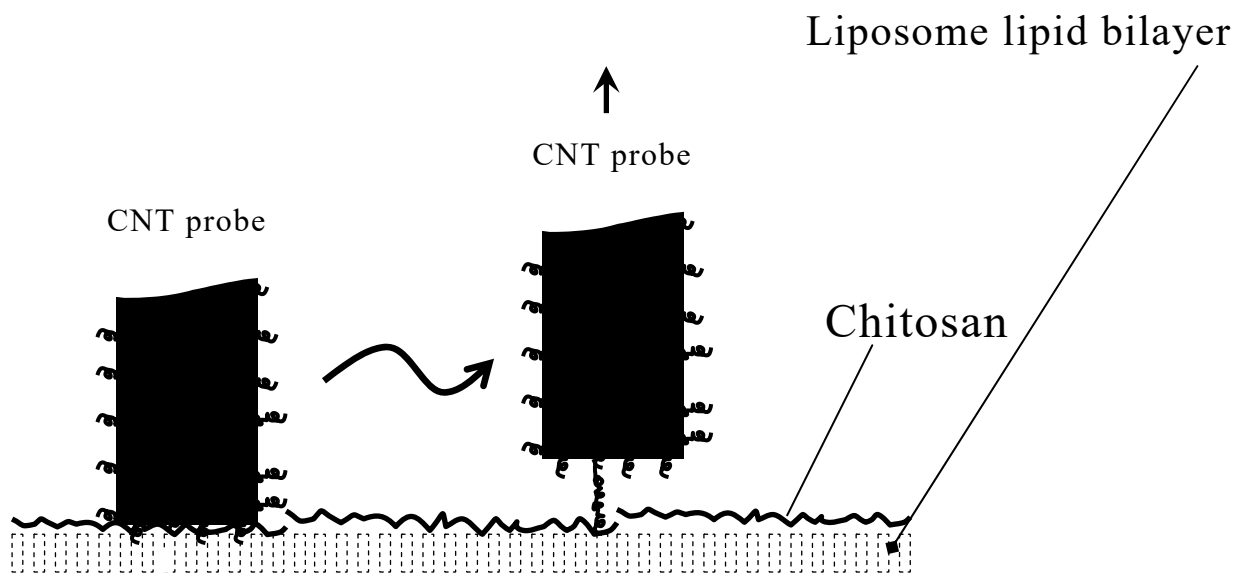
一方、pH=7.0ではpH=2.8に比べ、リポソーム自体が収縮し脂質二

重層表面の構成分子間が狭くなるため、 Fig.3-12(c)のようにリポソーム表面上のキトサン密度が増加し、 ムチンとキトサンの分子鎖の絡み合い個所が増加すると考えられる。その結果、 CNTの先端表面のムチン層とリポソーム表面のキトサン分子鎖同士の絡み合いが増加し、 分離時には Fig.3-12(c)の右側図のように、 キトサンとムチンの分子鎖の絡み合いが徐々に切断するため、 Fig.3-10(a)の変動型のピークが現れたと考えられる。

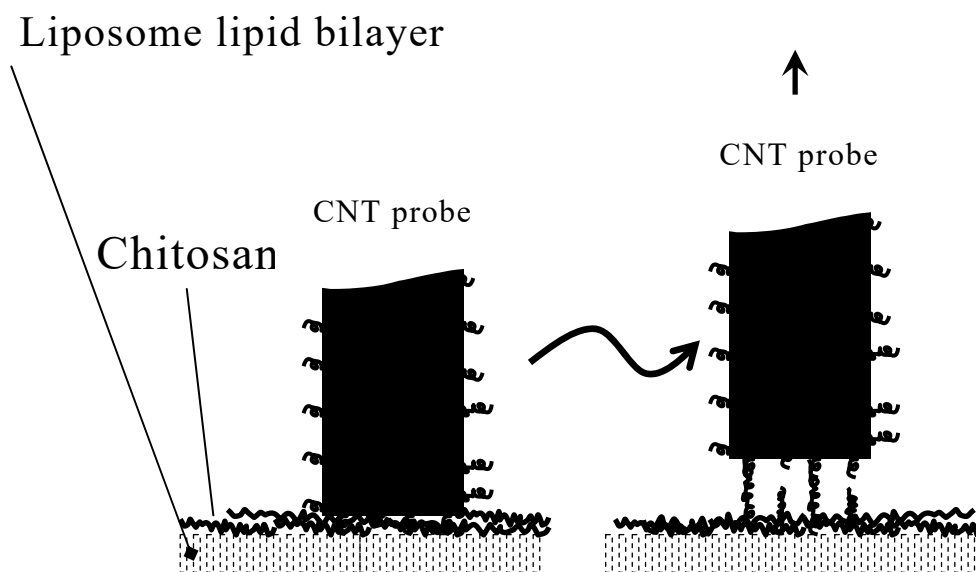
CNTプローブの鋭い先端構造により、 リポソームの変形特性、 ムチンとの相互作用の微細な変化が評価できたと考えられる。



(a) Non chitosan in pH=2.8 long hysteresis
Fig.3-12 Surface contact between CNT probe and liposome



(b) Chitosan in pH=2.8 weak force



(c) Chitosan in pH=7.0 strong force

本研究では、全く条件を同じくして、直径数 μm の球状 SiO_2 コロイドプローブでも実験を行い比較を試みようとしたが、pH条件、キトサン有無などを変えても有意な差が認められなかった。直径の大きなコロイドプローブでは表面形状が変化しやすいリポソームとの接触後は接触面積が急激に大きくなり応力が小さく留まり感度良いデータが得られなかったものとする。

3.4 結言

リポソームへのキトサン表面修飾、及びpHによるムチン層との相互作用力の変化を、CNTプローブ AFM法を用いて評価した結果、以下の結論を得た。

リポソーム表面へのキトサン修飾により、リポソームとムチンとの間に発生する分離時の引力の増加が観察され、既往の研究におけるラット小腸へのリポソームの滞留性向上の測定結果との対応が認められた。

キトサン修飾、及びpHの変化に伴うリポソームと、ムチン吸着したプローブ間の相互作用は、先端の鋭いCNTプローブを用いることにより、リポソーム膜の変形性、柔軟性のpH、及びキトサン修飾の有無による変化に伴うムチン間との相互作用の変化も観察可能であり、ムチンとの相互作用とともにリポソーム膜の変形特性を含め、詳細に評価できることが示された。

References

- [1] H.Ichikawa, Y.Yamazaki, Y. Fukumori, “Novel Composit Nanoparticles of Temperature-sensitive Hydrogels with pH-sensitive Polymeric Layer for Oral Drug Delivery”, in *New Trends in Polymers for Oral and Parental Administration from Design to Receptors*, (Eds,G.Barratt, D.Duchene,F.Fattal,J.Y.Hegendre), Editions De Sante,Paris, 2001, p257-260.
- [2] K.Takayama, K.Terada, Y.Watanabe, “Seizaigaku (Mix yakugaku series 4) ”,2002, p138.
- [3] J.Thongborisute, A.Tsuruta, Y.Kawabata, H.Takeuchi, “ The effect of particle structure of chitosan-coated liposomes and type of chitosan on oral delivery of calcitonin”, *J. of Drug Targeting*, 2006,**14**(3), p147-154.
- [4] H.Takeuchi, “ 経口ドラッグキャリアとしてのポリマーコーティンググリポソーム”, *Drug Delivery System* 2004,**19**(6),p511-519.
- [5] M.Iijima, M.Yoshimura, T.Tsuchiya, M.Tsukada, H.Ichikawa, Y.Fukumori , H.Kamiya, “Direct Measurement of Interactions between Stimulation Responsive Drug Delivery Vehicles and Artificial Mucin Layers by Colloid Probe Atomic Force Microscopy”, *Langmuir*, 2008, **24**(8), p3987-3992.
- [6] M.Yamamoto, S .Tajima, M.Iijima, H.Ichikawa, Y.Fukumori, H.Kamiya, “Characterization of Cross-linking Vehicle Effect on Surface Interactions between pH-sensitive Drug Delivery Vehicle and Mucin Layers by Colloid Probe Atomic Force Microscopy ”, *J. of the Soc. of Powder Technol. Jpn.*, 2017,**54**(5), p305-310.
- [7] H. Takeuchi, Y. Matsui, H. Sugihara, H. Yamamoto, Y. Kawashima, “ Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral administration of peptide drugs”, *Int. J. Pharm.*,2005,**303**,p160-170.

- [8] K.Nakano, Y.Tozuka, H.Yamamoto, Y.Kawashima,H. Takeuchi, “ A novel method for measuring rigidity of submicron-size liposomes with atomic force microscopy”, *Int. J. Pharm.*,2008,**355**(1-2),p203-209.
- [9] M.Iijima, M.Yamazaki, Y.Nomura, H.Kamiya, “Effect of structure of cationic dispersants on stability of carbon black nanoparticles and further processability through layer-by-layer surface modification”, *Chem. Engineering Sci.* 2013,**85**, p30-37.
- [10] Y.Hanada, S.Masuda, M.Iijima, H.Kamiya, “Analysis of dispersion and aggregation behavior of carbon black particles in aqueous suspension by colloid probe AFM method”, *Adv. Powder Technol.*, 2013,**24**, p844-851.
- [11] H.Sugihara, “pH-D thesis at Gifu-pharmaceutical University Japan”,2013, p5.
- [12] J.N.Israelachvili, R.M.Pashlay, “ Measurement of the hydrophobic interaction between two hydrophobic surfaces in aqueous electrolyte solutions”, *J.Colloid Interface Sci.*, 1984,**98**, p500-514.

第4章

イソブチレン・マレイン酸
コポリマーによる Al_2O_3 スラリーの分
散及びゲル化過程の
コロイドプローブ *AFM* 法による評価

4.1 緒言

ファイン・セラミックスは優れた機械的特性と生体適合性を持ち、その用途は耐熱および耐摩耗部品¹⁻⁴⁾として、また医療用の人工骨⁵⁾や人工関節⁶⁾として開発が進んでいる。セラミックスを焼結する前の微粉原料を成形するための手法は、特に複雑形状のファイン・セラミックス⁷⁾製品を得るのに必要である。セラミックス原料粉とバインダーからなるスラリーを金型に流入させる混合物を、射出成形法^{8,9)}が複雑形状のセラミックス成形に用いられる。しかし、ポリマーバインダーを 15~30wt% 添加する必要があり、焼結の前に長時間の脱脂プロセスが必要である¹⁰⁾。さらに高速射出による流動偏析によりのために金型中で粒子密度分布に偏りが生じる¹¹⁾。

ゲルキャストリング法¹²⁻¹⁴⁾は、複雑形状のセラミックス成形に有効な手法の一つである。この方法では、型に充填後の粒子の移動が抑制できるため、成形体の粒子密度分布は均一になりやすい。乾燥や焼成過程でも、成形体の収縮や変形は、他の成形法、例えば鑄込み成形(スリップキャストリング)などに比べ、少ないことが期待される。ゲルキャストリングでは、最初に、分散剤添加により高濃度のセラミックススラリーの流動性を向上させて型に投入する。例えば、スラリーのゲル化には、モノマー重合法^{12,15)}や天然ポリマー¹⁶⁾や、合成ポリマーの架橋法¹⁷⁻¹⁹⁾、粉体表面に吸着したポリマーの絡み合い²⁰⁻²⁵⁾等である。いずれの方法も有害な成分を含んだり、射出成形ほどではないが有機成分を 3~5wt% 添加するため、成型後の脱脂に時間とエネルギーがかかる^{15-17,26)}。また、ゲル化過程で、雰囲気、温度、溶液の pH や開始剤濃度等の制御が必要である。

近年、Shimai らは、水溶性のイソブチレン/マレイン酸ポリマー化合物(以下本章では ISOBAM と称する)を Al₂O₃ 微粒子スラリーに添加すると、添加直後は、高い流動性を示し、室温、大気中で 2~3h 以上静置すると、ゲル化する現象を発見した²⁷⁾。Al₂O₃ に対して 0.3wt% 程度の添加量で、分散とゲル化の両方の作用を有し、透明 Al₂O₃²⁸⁾、Y₂O₃²⁹⁾、yttrium aluminum garnet (YAG)³⁰⁾、aluminum oxynitride (ALON)³¹⁾ などにも適用できることが見出された。しかし、何故、経時変化が現れるのか、セラミックス微粒子と ISOBAM との作用機構は不明である。

原子力間顕微鏡 (AFM) は、様々な表面間相互作用やナノ構造の計測が可能での特徴の測定や操作が可能で、例えば高湿度条件の下での毛細管力³²⁾やナノサイズの細孔構造^{33,34)}の測定が行われる他、ナノスケールマニピュレーション操作³⁵⁻³⁸⁾にも応用されている。

コロイドプローブ AFM 法は、Ducker など³⁹⁾により開発され、Butt など^{40,41)}により体系的に構築された方法で AFM のプローブ先端に球形粒子を接着したプローブを使用する。リチウム電池のバインダーの働きを相互作用として計測⁴²⁾、コロイドと平面間の接触角、摩擦力を定量化^{43,44)}、表面化学構造分布の分析⁴⁵⁻⁴⁷⁾等が行われている。DLVO 理論の検証など基礎的な分野に加えカーボンブラック^{48,49)}、Al₂O₃^{50,51)}、および SiO₂^{52,53)}等の、ポリマー分散剤の吸着やシランカップリング剤による表面処理による相互作用の変化測定に用いられている。

本研究では、スラリー中において Al₂O₃ 粒子間で ISOBAM ポリマーの作用機構を考察するため、Al₂O₃ 表面間相互作用の経時変化を、コロイドプローブ AFM 法により測定した。Al₂O₃ コロイドとサファイア基板の間の表面相互作用の時間依存型変化を計測し、ISOBAM 添加によりスラリーの流動性が最初は増加し、時間の経過とともにゲル化を起こす巨視的な挙動を比較した。時間依存型ゲル化現象が観察されない SiO₂ スラリーとの比較のため ISOBAM 添加による SiO₂ コロイドプローブと SiO₂ ガラス基板の間の表面相互作用も測定し、Al₂O₃ の場合と比較した。観察された結果に基づき、スラリーの挙動の経時変化と、固体表面間相互作用の変化の比較により ISOBAM の作用機構を考察した。

4.2 実験

4.2.1 原料及びスラリー調製と特性評価

添加物としての ISOBAM (Kuraray、商標 ISOBAM) の分子の構造は、Fig.4-1 に構造式を示した。

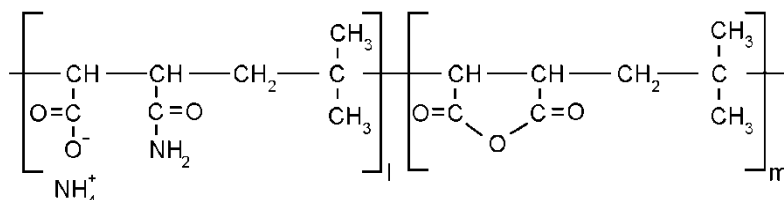
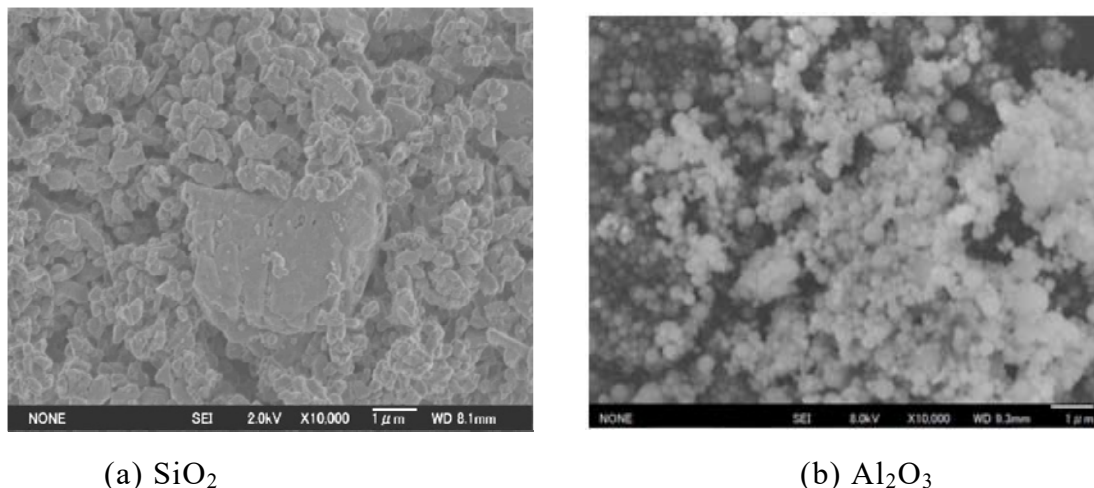


Fig.4-1 Molecular structure of copolymer of isobutylene and maleic anhydride, ISOBAM104 (1:m=7:3)

ISOBAM を、イオン交換水に所定量投入し、スターラーで 30 分攪拌し完全に溶解させた。高純度アモルファス SiO₂ 粒子 (Denka Co. Ltd.、 SFP-20M,

density=2.2g/mL, specific surface area=11.3m²/g) 及び、高純度 Al₂O₃ 粒子 (Sumitomo Chemical Co. Ltd., AES12, density=3.9g/mL, specific surface area=6.5m²/g) を、スラリーの原料とした。Fig.4-2 に各粒子の SEM 観察結果を示した。



(a) SiO₂ (b) Al₂O₃
Fig.4-2 SEM observation of fine powder material
for preparation of aqueous suspension

Al₂O₃ と SiO₂ をそれぞれ固形分濃度 45vol%になるように ISOBAM 水溶液に添加後、ボールミル混合を 2h 行った。混合には、Y₂O₃ で部分安定化させた ZrO₂ 球 (NITTO KAGAKU CO. Ltd., ANZ-50S, 直径=5.0 mm) を用いた。スラリ流動状態を観察するための ISOBAM 添加量は、既報²⁷⁾に基づき固形分に対し 0.3wt%の条件で添加したスラリと、無添加のスラリを用いた。混合完了後静置し、1 昼夜までに数回、スパチュラでスラリを掻き取り滴下状態を目視観察した。

Al₂O₃ スラリの流動特性を ISOBAM 添加量を、固形分に対し 0.3wt%、及び 0.8wt%とし、共軸二重円筒型回転粘度計 (TA Instruments Inc. , AR-G2) による動的粘弾性を貯蔵弾性率 (G') に着目して測定した。測定周波数 1.0Hz、振幅 0.5%の条件で貯蔵弾性率を、3h にわたって測定した。

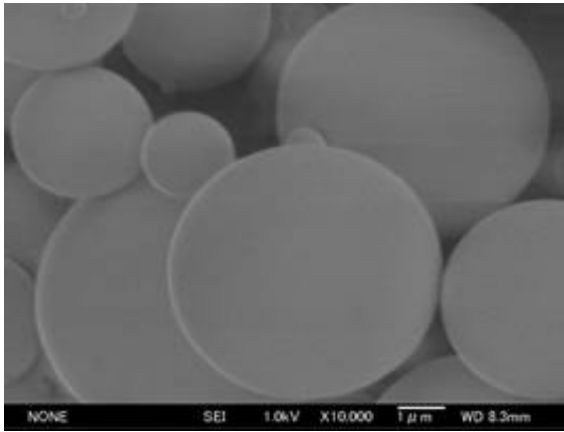
Al₂O₃ 表面への ISOBAM の吸着量の測定のため、ISOBAM 添加量を Al₂O₃ 粒子濃度に対し 0.1~0.8 wt%の範囲で 4 条件選びスラリ調製を同様の方法で行った。混合完了後のスラリを遠心分離機 (Beckman Coulter Inc. , Avanti J-E) により 30,000 G、10 分間の条件で Al₂O₃ 粒子を沈降させ、得られた沈殿物の上澄み液中の ISOBAM 濃度を炭素量に着目し、CHN 分析装置 (J Science Co. Ltd., CHN organic elemental analyzer, MICRO CODER JM10) により測定した。スラリ化する前の ISOBAM 水溶液中の炭

素量と、上澄み液中の炭素量の差から吸着した ISOBAM 量を決定した。

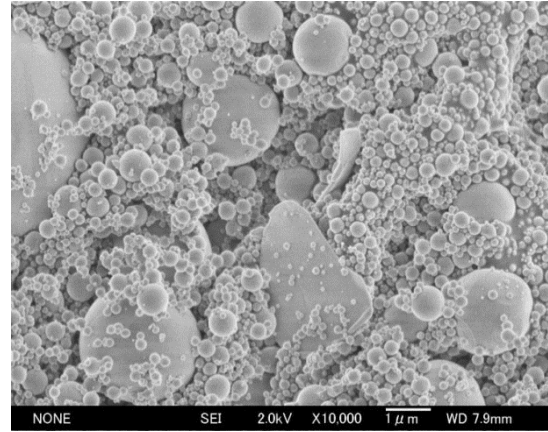
SiO₂ スラリーの流動特性は ISOBAM 添加量は無添加及び、固形分に対し 0.3wt% の SiO₂ スラリーを用いた。共軸二重円筒型回転粘度計 (Thermo Scientific HAAKE, RheoStress 1) に混合完了後のスラリーを数滴滴下し、せん断速度を 0 から 1,000sec⁻¹ まで 2 分間で直線的に上昇させ流動曲線を測定した。

4.2.2 SiO₂ と Al₂O₃ コロイドプローブの作成

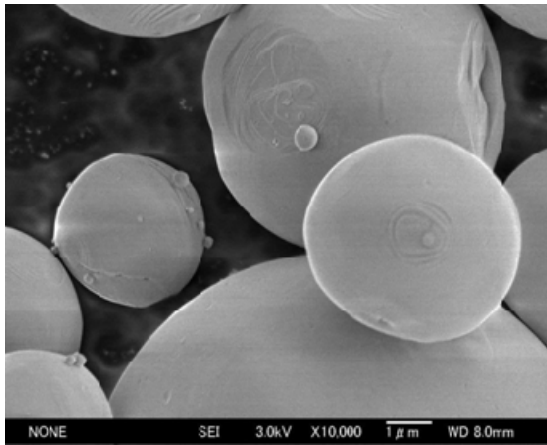
コロイドプローブに用いる粒子は、市販の球形 Al₂O₃ 粒子 (Admatechs Company Limited Japan, AO809)、及び球形 SiO₂ 粒子 (Polysciences Inc., No.25348) を用いた。各球形粒子の SEM 観察結果を **Fig.4-3(a),(b)** に示した。Fig.4-3(b) の球形 Al₂O₃ は、表面に 100nm 以下のナノ粒子が付着しているため、イオン交換水に粒子を分散させ、超音波バスで 60 分処理後、60 分自然沈降した。表面付着ナノ粒子が分散した上澄みを取り除き、イオン交換水を加え再び超音波洗浄バスで洗浄を行った。この操作を 3 回繰り返す、遠心分離した沈殿物を 100°C の真空乾燥器に入れ、一晩乾燥させた。処理後の SEM 画像を示した Fig.4-3(c) から、表面付着ナノ粒子の除去が確認できた。この Al₂O₃ 球形粒子の XRD (Rigaku Corporation、X線回折装置、Rint-2100VPC/N) 観察結果を **Fig.4-4** に示した。



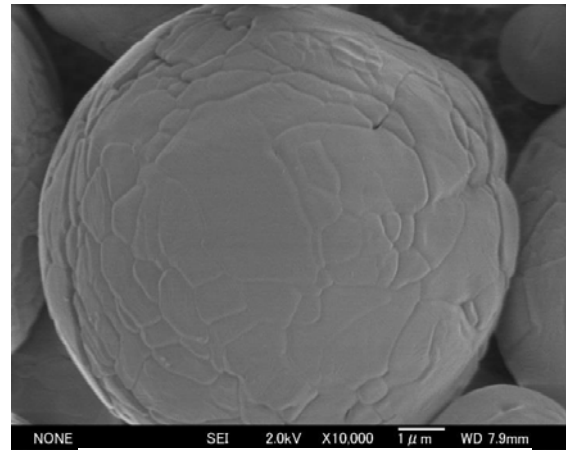
(a) SiO₂



(b) Original spherical Al₂O₃



(c) Al₂O₃ particles
after washing to remove fine
particles



(d) Al₂O₃ particles
after 1300°C heat treatment

Fig.4-3 SEM observation of spherical particles
for preparation of colloidal probe

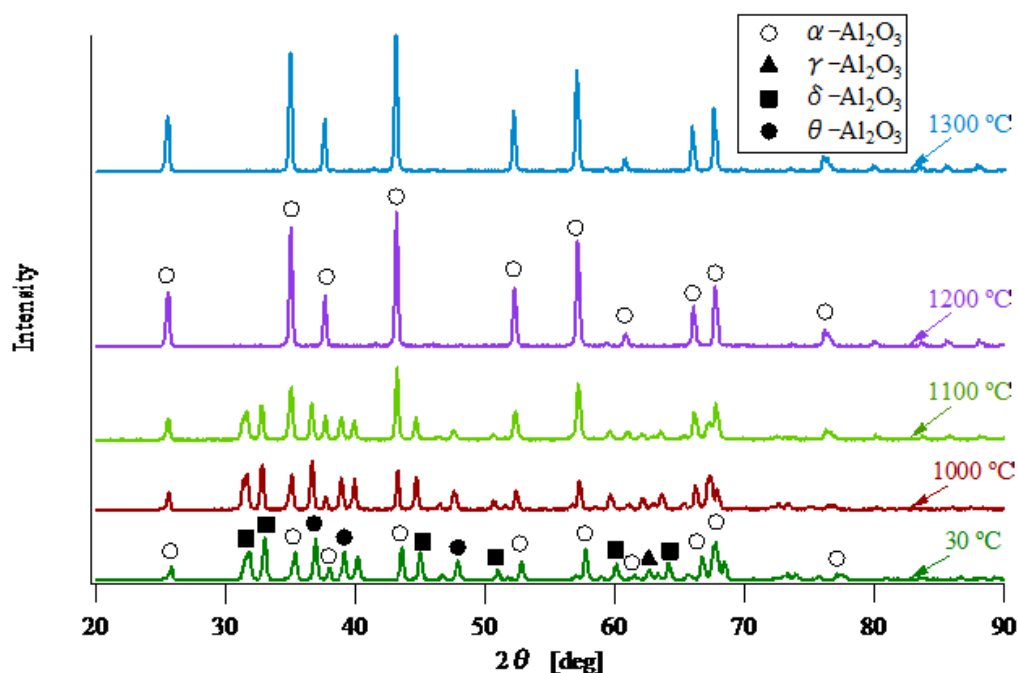
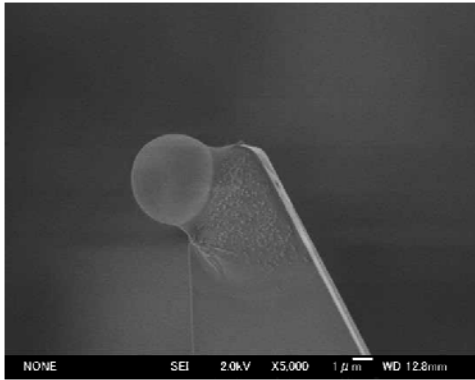


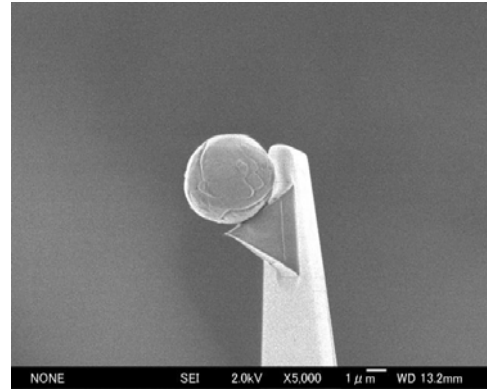
Fig.4-4 XRD pattern of spherical Al_2O_3 particles at different temperature ranging from room temperature to 1300 °C

30°Cでの観察結果からこの粒子の結晶相は α 結晶相以外も含んでおりスラリーに使用した $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ と同じ結晶相とするため熱処理条件の検討を行った。昇温速度を 20°C/分とし、1300°Cまでの温度範囲で測定した高温 XRD パターンを Fig.4-4 に追記した。1200°Cまでの各温度での温度保持時間は 5 分とした。1100°Cまでは他の結晶相も含むが 1200°C以上であれば $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ に変化している事が確認できた。この結果から、 Al_2O_3 においては 1300°Cで 100 分保持して熱処理したものをプローブに用いた。Fig.4-3(d)に 1300°C処理後の球形 Al_2O_3 の SEM 写真を示したが、熱処理後も球形を維持していることを確認した。

コロイドプローブは、市販の AFM のプローブ (Olympus Corporation, OMCL-TR800PSA-1) の先端に、マイクロマニピュレータ (株式会社島津製作所製、OP/MMS-77) を用いて⁵⁴⁾、球形コロイド粒子を接着させた。詳細は既報^{52,55)} による。この操作で作成したコロイドプローブの SEM 観察像を Fig.4-5 に示した。使用したプローブの仕様は Table 4-1 に示した。



(a) SiO₂ colloid probe



(b) Al₂O₃ colloid probe

Fig.4-5 SEM observation of colloid probes

Table 4-1 Specifications and dimensions of micro-cantilever.
(Olympus Corporation, OMCL-TR800PSA-1, soft type)

Tip	Shape	Sharpened pyramidal square
	Height	2.9 nm
	Radius	< 20 nm, 15 nm (typical)
	Angle	25-45 deg.
	Material	Silicon nitride
Lever	Thickness	800 nm
	Resonant frequency	24 kHz
	Spring constant	0.162 N/m

4.2.3 NaClと ISOBAM 水溶液中の表面間力の経時的変化

Al₂O₃ 及び SiO₂ 間の表面間力の経時的変化は、原子力間顕微鏡 (Bruker Japan K.K., NS3A-AFM, Picoforce with Nanoscope IIIa controller)により測定した。プローブやレーザー光源、受光部は、対象試料を置いたスキャナーの上部に設置される方式である。水中や ISOBAM 溶液中での測定のために液体セル (Bruker Japan K.K., MTFML)を用いた。コロイドプローブの試料への接近及び分離速度は 0.2 μm/s とし、接触時の最大圧縮力は 3 nN とした。設定された最大圧縮力に達するとスキャナーを反転し、分離方向に駆動させた。固体表面間の相互作用は、コロイド表面と、平滑な試料表面間で測定した。試料として SiO₂ の場合は、スライドガラス板 (TOSHIN RIKO CO., LTD.)、Al₂O₃ の場合は、鏡面研磨したサファイア平板 (SHINKOSHA CO., LTD.)を用いた。各試料の表面の AFM 観察像を Fig.4-6,7 に示した。任意の 10μm² 範囲内の平均粗さ *Ra* は、0.306nm と 0.157nm であり、最大粗度 *Rz* は、1.72nm と 0.87nm であった。表面間相互作用の最初の測定は 10mol/m³ の NaCl 水溶液中で行った。ISOBAM 水溶液と同じイオン濃度となるように、測定後、液セル中の NaCl 水溶液を速やかに ISOBAM 水溶液で押し出し交換した。1 つのフォースカーブを得るための接近分離必要な時間は、約 1.5 秒であり、経時変化を測定した保持時間のインターバルより遥かに短かく、測定中の経時変化の影響は無視できるとした。同じプローブと基板を用いて ISOBAM 水溶液に置換した直後から 5 時間の間に数回、フォースカーブを測定した。

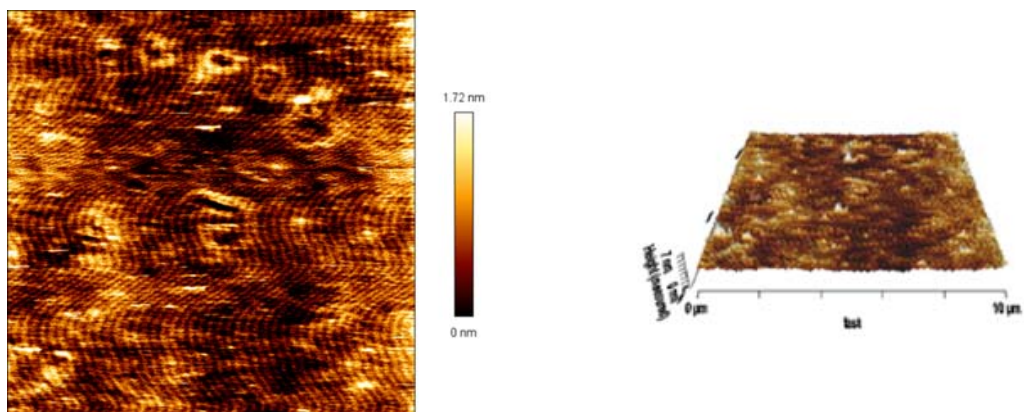


Fig. 4-6 AFM image on the surface of glass substrate ($R_z=1.72\text{nm}$, $R_a=0.306\text{nm}$)

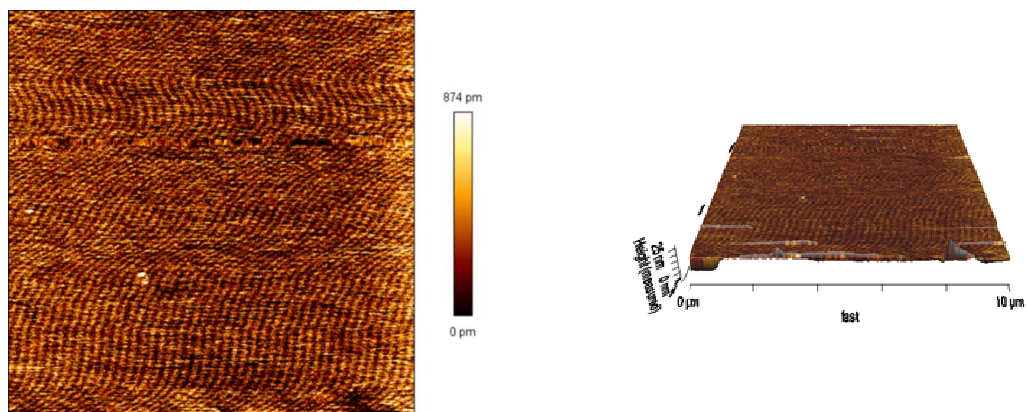


Fig. 4-7 AFM image on the surface of sapphire substrate ($R_z=0.87\text{nm}$, $R_a=0.157\text{nm}$)

4.3 結果と考察

4.3.1 スラリーのゲル化挙動の目視観察

(1) スラリー挙動の経時変化の目視観察結果

固形分濃度 45vol%の SiO_2 と Al_2O_3 の水スラリー挙動の目視結果を Fig.4-8,9 に示した。



After mixing



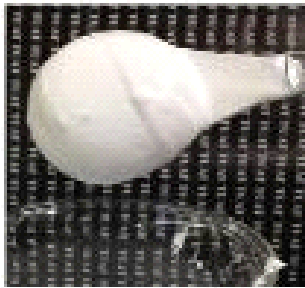
After over one
night aging



(a) Without addition of ISOBAM

(b) With addition of ISOBAM

Fig.4-8 Visual observation of SiO_2 aqueous suspension with and without ISOBAM after mixing and aging after one night.



After mixing



(a) Without ISOBAM addition

30 min



120 min



Over night



(b) With ISOBAM addition

Fig.4-9 Visual observation of Al_2O_3 aqueous suspension with and without ISOBAM after mixing and aging after one night.

Fig.4-8 に示した SiO_2 スラリーでは ISOBAM の添加後、一晩経過してもゲル化は生じることなく流動性が維持された。一方、 Al_2O_3 スラリーは、Fig.4-9(a)の ISOBAM 無添加の場合では、混合直後よりスラリーの流動化は全く起こらない。Fig.4-9(b)の ISOBAM 添加したスラリーは、添加により流動性を示し、30 分ではある程度流動化しているが、60 分では流動性がかなり悪化しており 120 分ではゲル化が進行している。スラリーゲル化挙動は Al_2O_3 と SiO_2 の間で完全に異なった。

(2) SiO_2 スラリーの流動曲線

Fig.4-10 に固形分濃度 45vol% SiO_2 スラリーの流動特性を示した。

ISOBAM 無添加の場合、低せん断速度 0.08sec^{-1} で降伏応力が認められた後、せん断速度の増加につれて、せん断応力は増加した。一方、ISOBAM 添加系は、降伏点は認められない。ISOBAM の添加が若干の流動性向上作用を示した。

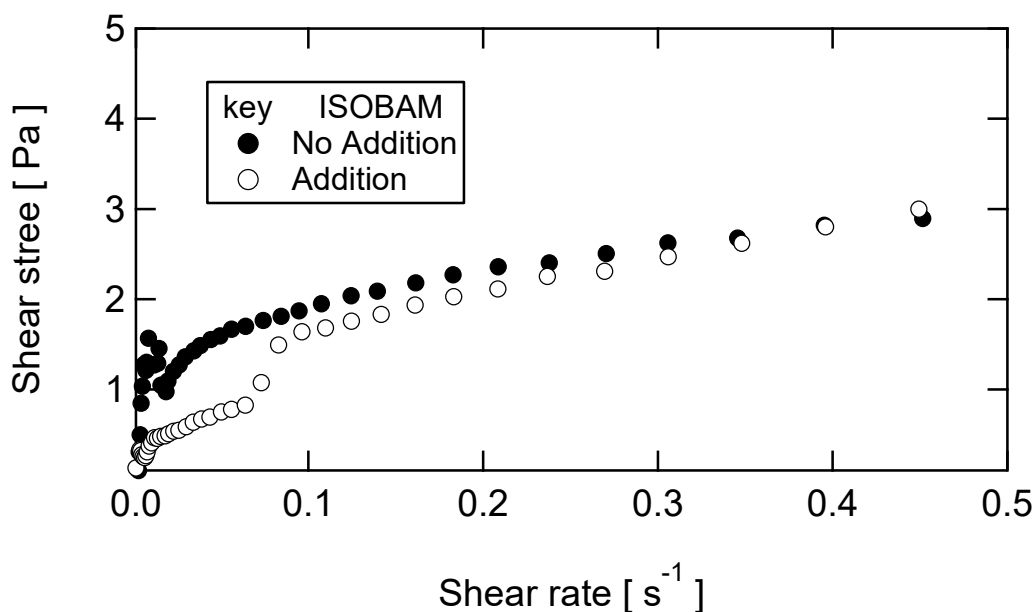


Fig. 4-10 Effect of ISOBAM addition on flow pattern of SiO_2 suspension

(3) Al₂O₃ スラリーの動的粘弾性の経時変化

Fig.4-11 に、ISOBAM 0.3 及び、0.8wt%を添加した固形分濃度 45vol% の Al₂O₃ スラリーの G'の経時変化測定結果を示した。

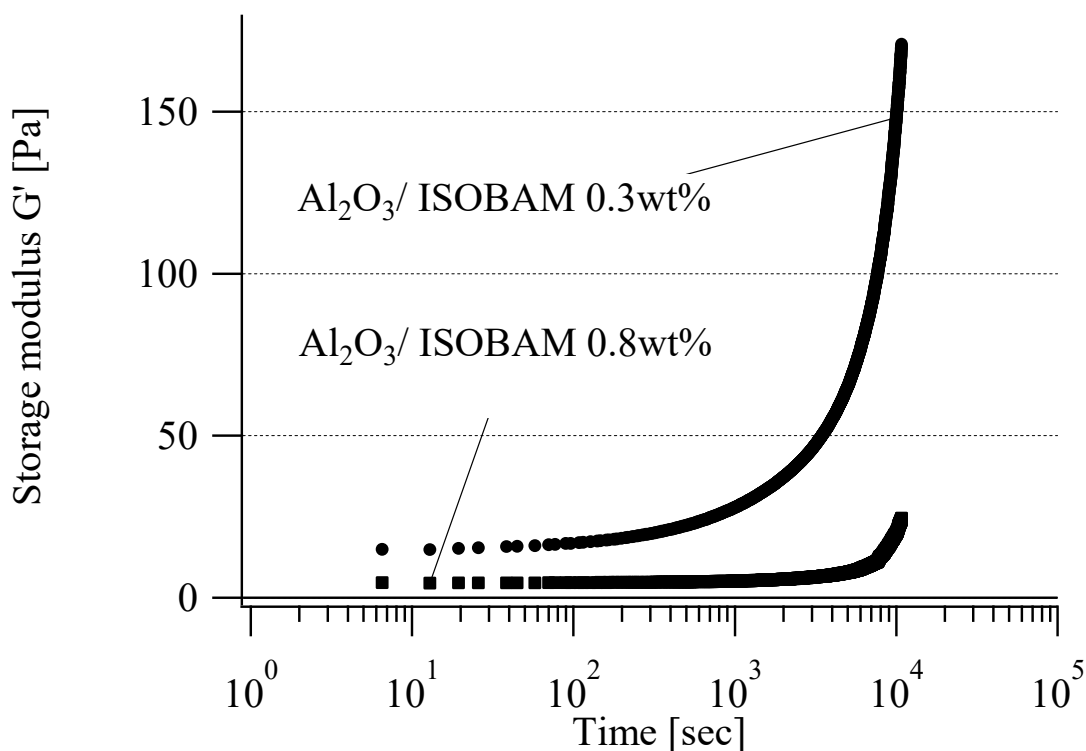


Fig.4-11 Time dependent transition of storage modulus of Al₂O₃ suspension with different concentration of ISOBAM addition.

G'の増加は、経過時間 1,800sec(30分)までは緩やかだが 3,600sec(60分)から急速に大きくなっている。添加量 0.3 wt%の方が、0.8wt%の場合より G'の増加率が高いことを示している。同様の傾向は、1章の既往の研究で紹介した Fig.1-25,26 で示したように、粒子濃度を変化しても確認されている。

(4) Al₂O₃ スラリーへの ISOBAM の吸着特性

Fig.4-12 に、固形分濃度 45vol%での ISOBAM の添加量と吸着量の測定結果を示した。Al₂O₃ に吸着した ISOBAM 量を、各添加量で 3 回測定し、吸着量の平均値と、エラーバーで標準偏差を示した。

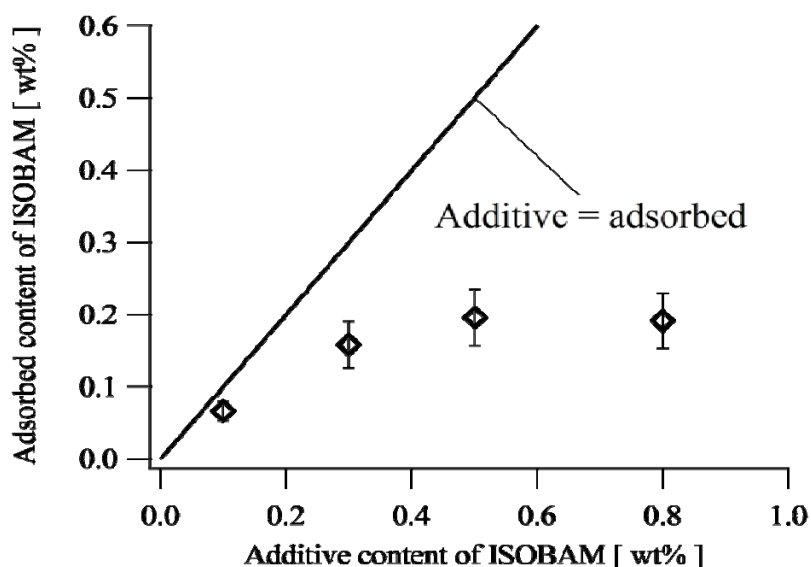


Fig.4-12 Relationship between additive and adsorbed content of ISOBAM in Al₂O₃ aqueous suspension

添加した ISOBAM が全て吸着した場合、図中の直線に一致する。添加量は 0.1 wt% や 0.3 wt% でも、全量が吸着しておらず、添加量を増やしても、吸着量は、ほぼ 0.2 wt% で飽和していることが確認された。スラリーの分散性が添加直後では向上し、その後ゲル化が生じる添加量 0.3 wt% 以上では、フリーの ISOBAM が存在することが示された。しかし、添加量 0.8 wt% のフリーの ISOBAM が増加した場合は、G' が低下しゲル化を抑制することが認められた。

4.3.2 AFM フォースカーブによる経時変化の測定結果

(1) SiO₂ コロイドプローブとガラス平板間の経時変化

ISOBAM 水溶液を液セル導入後の SiO₂ 球形粒子とガラス平板間のフォースカーブの経時変化を Fig.4-13,14 に示した。この図には、ISOBAM 水溶液導入前の NaCl 水溶液中のフォースカーブも示している。

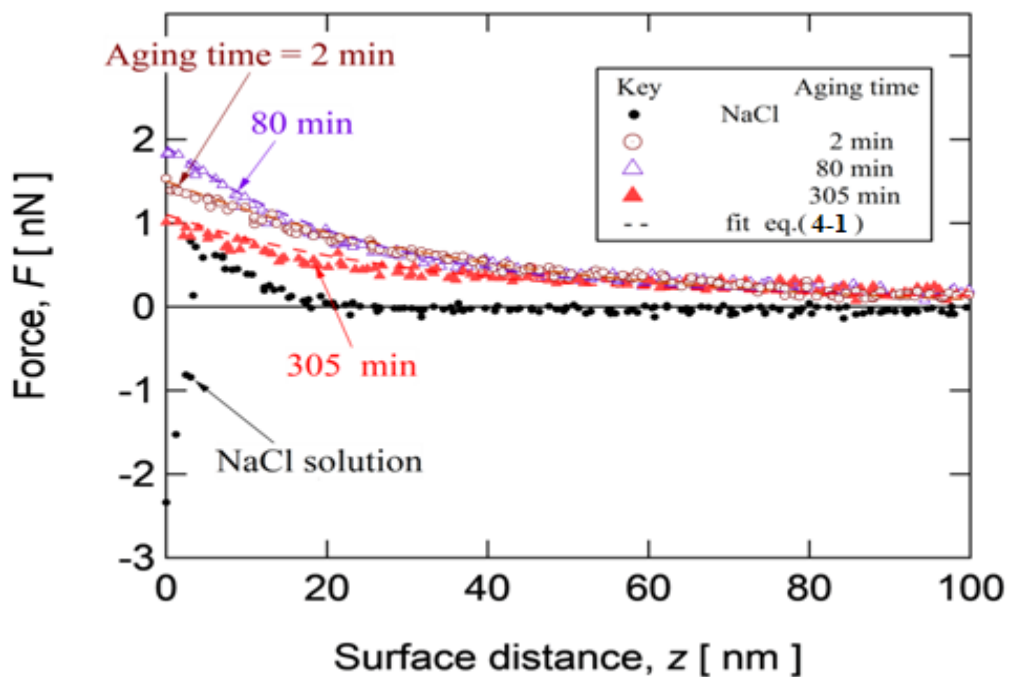


Fig.4-13 Effect of aging time after ISOBAM addition on force curves during extract process between SiO₂ colloidal probe and polished glass substrate

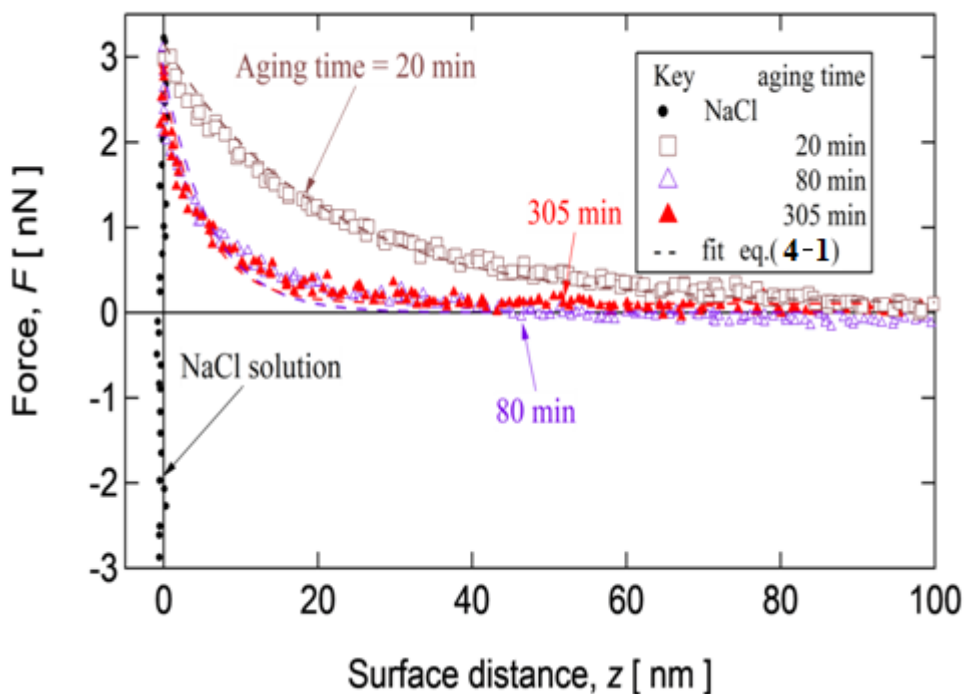


Fig.4-14 Effect of aging time after ISOBAM addition on force curves during retract process between SiO₂ colloidal probe and polished glass substrate

SiO₂間の接近、分離過程での全フォースカーブは第2章、3章と同様に、次の(4-1)式⁵⁶⁾での近似結果を Fig.4-13,14 に示した。

$$F/F_{max} = \exp(-Z/B) \dots \dots \dots (4-1)式$$

接近過程を示した Fig.4-13 では、NaCl 溶液中に比べ斥力は ISOBAM 添加により若干増加が観察された。分離過程を示した Fig.4-14 では、NaCl 溶液中では、分離時に観察される最大引力は 3nN を超えたが、ISOBAM 添加により、引力は添加直後より消失し、接近過程と同様な斥力側のみのフォースカーブが観察された。良好な近似結果を得たので F_{max} 、 B と経過時間の関係を Fig.4-15 に示した。ISOBAM 付加後の 130 分までは、特に B 値は変動するが、130 分以後は、ほぼ一定となっている。の斥力が維持される傾向が示される。

この結果は、ISOBAM が SiO₂ スラリーの中で斥力を増加させ、引力を消失させる分散剤としての作用が現れることを示唆している。

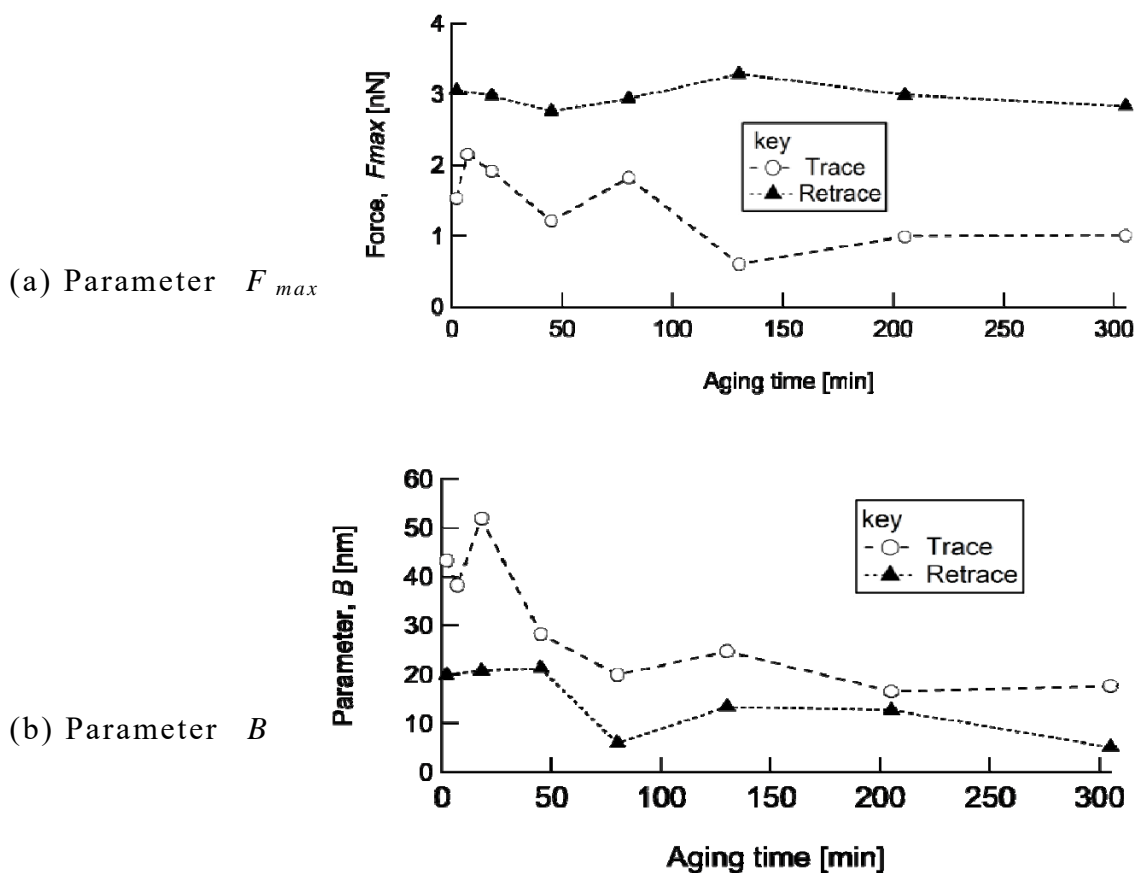


Fig.4-15 Effect of aging time after ISOBAM addition on parameters F_{max} and B in Eq. (4-1)

(2) Al_2O_3 コロイドプローブとサファイア平板間の経時変化

ISOBAM 水溶液添加後の Al_2O_3 球形粒子とサファイア平板間表面間力の経時変化の測定結果を Fig. 4-16,17 に示した。

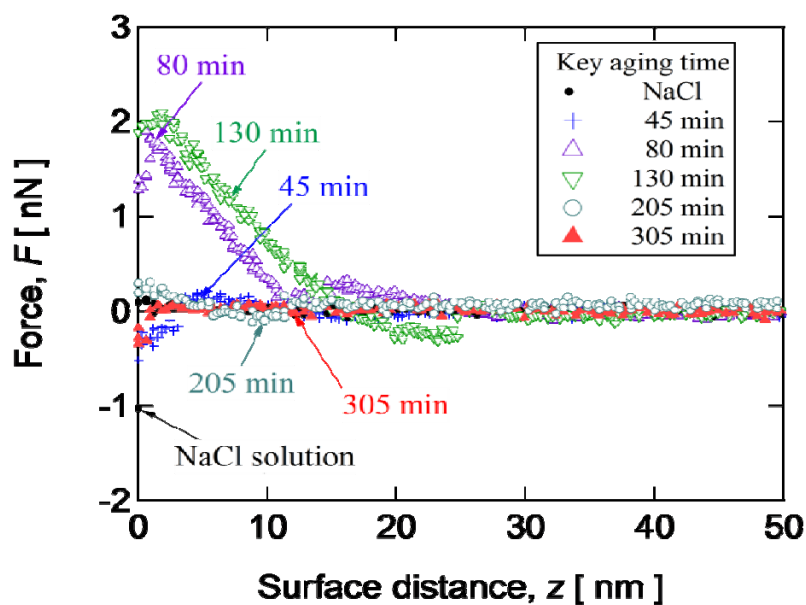


Fig.4-16 Effect of aging time on force curves between Al_2O_3 colloidal probe and polished sapphire substrate during extract process

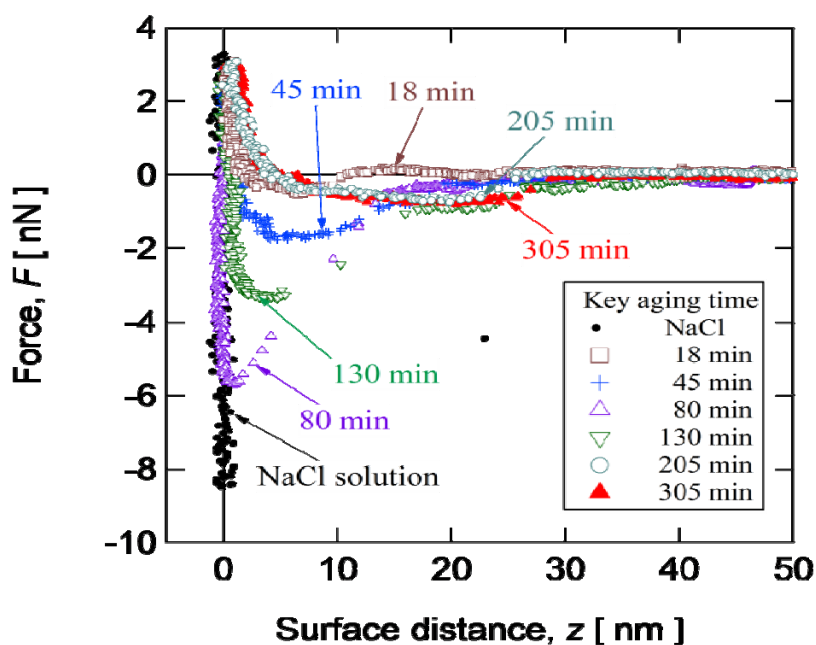


Fig.4-17 Effect of aging time on force curve between Al_2O_3 colloidal probe and polished sapphire substrate during retract process

Fig.4-16 では、NaCl 水溶液中のフォースカーブは、SiO₂と同様に、僅かな斥力が観察される。ISOBAM 添加後は、接近過程で最初の 45 分程度まで、あまり変化せず NaCl 水溶液中と同様であった。80 分及び 130 分経過した時点で、10nm を超える表面間距離で斥力が増加した。この斥力は、205 分以降では減少が観察され 305 分経過すると、斥力は極めて小さくなった。一方、分離過程を示した Fig.4-17 では、NaCl 水溶液中では、分離時に大きな引力が観察される。ISOBAM 添加後 18 分でこの引力は大きく減少するが、80 分では、再び増加し、最大値を示す。その後、最大値は、時間の経過とともに減少するが、長距離引力が観察されはじめる。この長距離引力の最大値は、時間とともに減少するが、長距離作用引力として 205 分以降も観察される。

接近、分離過程ともに、添加後 305 分のフォースカーブで観察された斥力の消失と、長距離引力のみが観察された結果は、Al₂O₃ スラリーの流動性が、添加後数時間経過すると消失しゲル化が進行することに対応している。

4.3.3 粒子系の ISOBAM 液中での作用機構の考察

(1) SiO₂ の ISOBAM 液中での作用機構

ISOBAM 水溶液中では、SiO₂ 間の分離時の引力が消失したことから、ISOBAM は、SiO₂ 表面に吸着して、固体の直接接触を抑制したと考えられる。SiO₂ の等電点は、pH=2~3 程度であり、ISOBAM 水溶液の弱塩基性条件のもとでは、SiO₂ 表面は Si-O⁻ となり負に帯電する。ISOBAM のマレイン酸基部分も解離して-COO⁻ 基となり、負に帯電した SiO₂ 表面には吸着できないと考えられる。SiO₂ 表面への ISOBAM の他の吸着基は、-CO-NH₂ 基部分が考えられるが、吸着力は強くないため、吸着構造は Fig.4-18 に示したように、弱い「ループとトレイン構造」⁵⁷⁻⁵⁹⁾ になっていると考えられる。ループには-COO⁻ 基が存在するため静電的な立体障害的斥力を生じさせると考えられる。この構造は ISOBAM の添加後の最初の 130 分では、 F_{max} と B の値が若干変動するが、それ以後は構造が安定していると考えられる。ISOBAM の吸着による静電的な立体障害により、スラリー中の SiO₂ 粒子同士の接触を妨げ続け、SiO₂ スラリーの分散剤としての機能が生じたと考えられる。

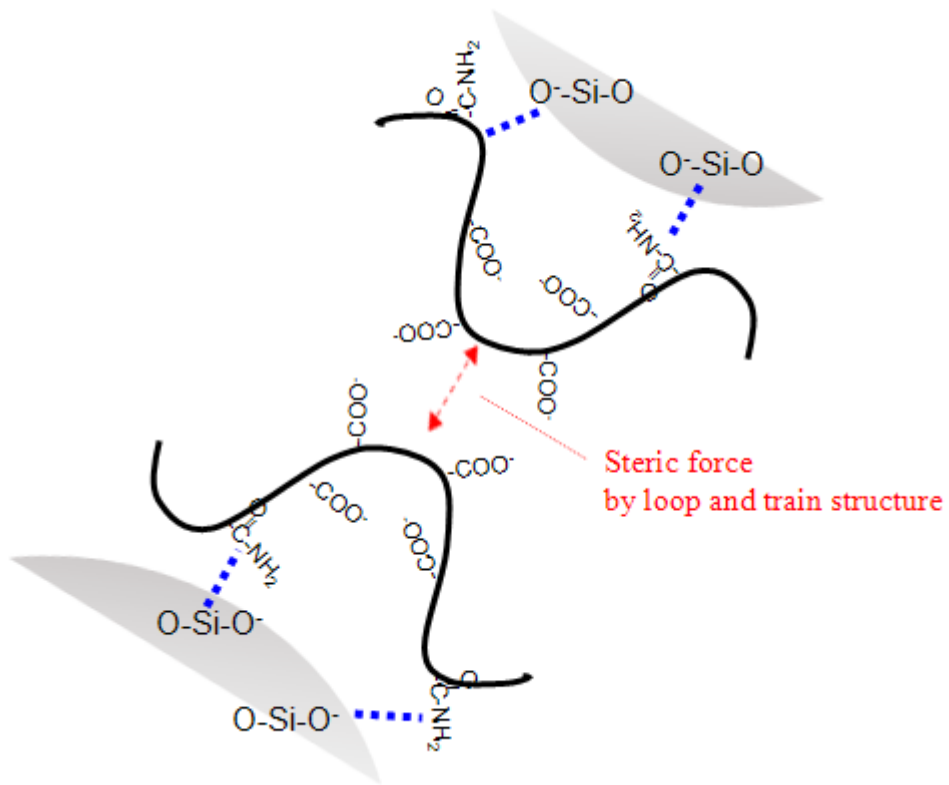


Fig.4-18 Estimation of ISOBAM adsorption structure on SiO₂ surface and interaction generation

(2). Al₂O₃ の ISOBAM 液中の作用機構

Al₂O₃ の等電点は、9~11 程度であるため、ISOBAM 水溶液の弱塩基性の pH では、Al₂O₃ 表面は、僅かに正に帯電していると考えられる。このため ISOBAM の無水マレイン酸部分の開裂で生じた-COO⁻基は、Al₂O₃ の表面に吸着可能と考えられる。最初の 45 分までは Al₂O₃ 表面での ISOBAM 分子の吸着構造は、ISOBAM 分子中の一つの-COO⁻基が吸着した、**Fig.4-19(a)**に示した「テール構造」⁵⁷⁻⁵⁹⁾と考えられる。立体障害力は出現せず、引力は NaCl 水溶液中に比べ、ISOBAM の介在によって妨げられ、大きく減少したと考えられる。

80~130 分の時間経過時は、**Fig.4-19(b)**に示すように一つの ISOBAM 分子中の、複数の-COO⁻基が Al₂O₃ 表面に吸着し「ループ・トレイン構造」が現れる。この構造は、粒子の間の長距離の立体障害斥力を発生させた原因と考えられる。Al₂O₃ 表面に ISOBAM 分子の-COO⁻基が吸着した結果、ISOBAM 分子中の-CO-NH₂ 基の電子密度が低下して分極率(δ⁺)が増加し、溶液中のフリーな ISOBAM ポリマーの-COO⁻基との電気的相互作用が増加すると考えられる。その結果、**Fig.4-19(b)**に示すようにフリーな ISOBAM が粒子表面に吸着した ISOBAM との間に架橋するため長距離引力が観察されたと考えられる。

Fig.4-20(c)に示す 205 分以降では、Al₂O₃ 表面に吸着した ISOBAM 分子の「ループ構造」上にあったほとんどすべての遊離-COO⁻基が Al₂O₃ 表面に吸着し、「ループ構造」が消失するため立体障害斥力が消失したと考えられる。その結果、Al₂O₃ 表面に吸着した ISOBAM 分子の分極した-CO-NH₂ 基とフリーなポリマーの-COO⁻基が架橋を形成するため、長距離引力のみが観察されたと考えられる。

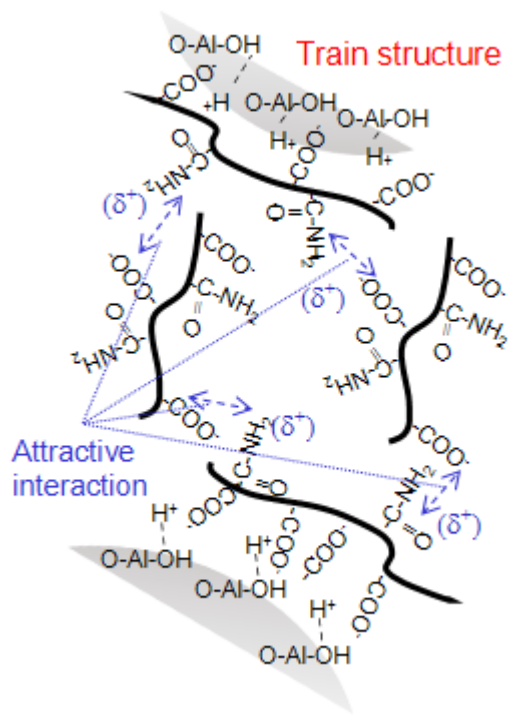
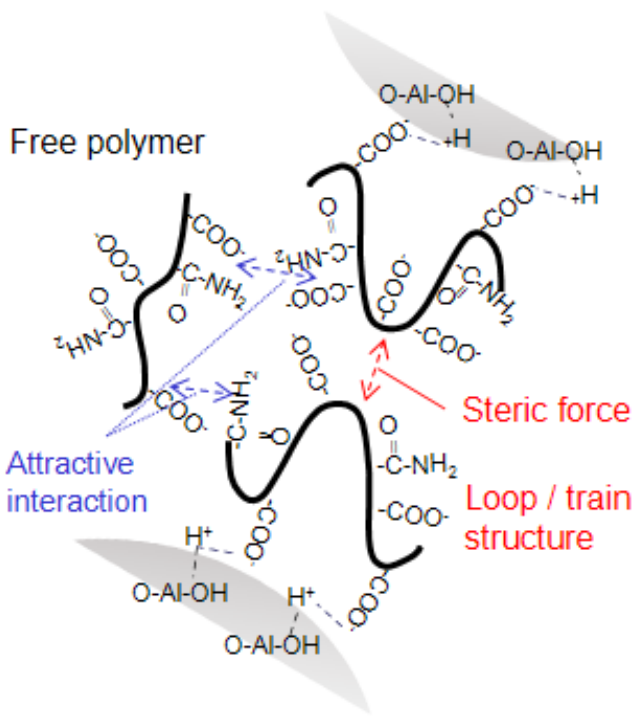
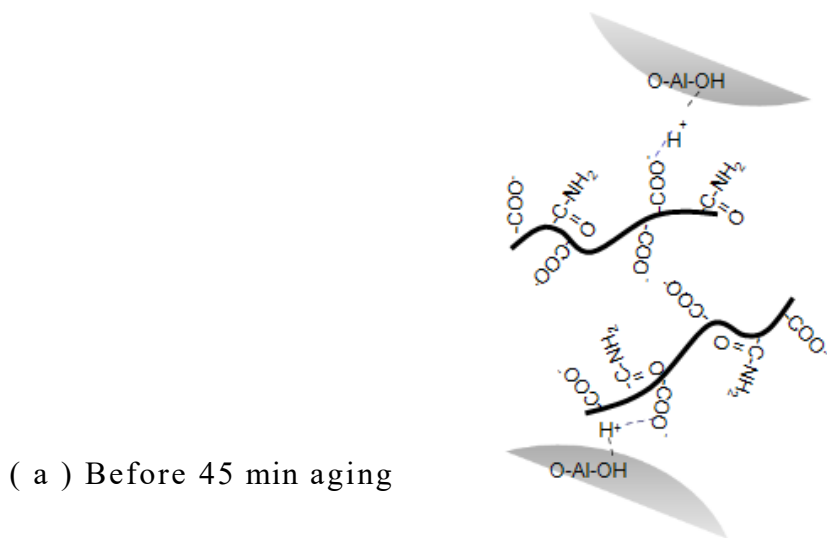


Fig.4-19 Estimation of time dependent transition of ISOBAM adsorption structure on Al_2O_3 surface and interaction generation mechanism

4.4 結言

Al₂O₃ スラリーの ISOBAM 添加による分散性増加と、時間の経過に伴うゲル化過程における ISOBAM の作用機構解明のため、コロイドプローブ AFM 法により相互作用の経時変化を測定した。ゲル化現象を起こさない SiO₂ との比較を行い以下の結論を得た。

ISOBAM は Al₂O₃ や SiO₂ などのセラミックス粒子表面に吸着は起こし、添加の初期段階では、van der Waals 引力の消失が観察された。

SiO₂ については、ISOBAM 吸着により、斥力の増大と引力の減少が起こるが、フォースカーブの経時変化は殆ど観察されず、斥力が生じたまま、スラリーの分散状態が維持される傾向と一致した。

Al₂O₃ については、ISOBAM 添加後、80~130 分の間に長距離に及ぶ大きな斥力と引力が観察された。この斥力によって Al₂O₃ 粒子が分散維持され、スラリーの流動性が保たれるが、205 分後には斥力が消失し、長距離の引力だけが残留し Al₂O₃ スラリーのゲル化現象と対応が示された。

References

- [1] A.Hirano, Y.Shibuya, M.Sekine, A.Takayama, "Evaluations of Ceramic Bearings Used in Electric Water Pumps", *Japanese Soc. of Tribologists*, 2011, **6**(1), p71-75.
- [2] H.Yokouchi, H.Kondo,Minoya, M.Kudo, "Improvement of a rotary vane pump for an ocean wave power converter: Pendolor", *Fluid Power Forth JHPS Int. Symposium*, 1999, p107.
- [3] M.Nosaka, S.Takada, M.Yoshida, M.Kikuchi, T.Sudo, S.Nakamura, "Improvement of durability of hybrid ceramic ball bearings in liquid hydrogen at 3 million DN(120,000rpm)", *Japanese Soc. of Tribologists*, 2010, **5**(1), p60-70.
- [4]Y.Mori, "Research and Development of Down-Hole Pumps in the Sunshine Project in Japan", *Geothermal Res. Soc. of Jpn.*, 1989, **11**(2), p97-108.
- [5]M.Marcacci, E.Kon, V.Moukhachev, A.Lavroukov, S. Kutepov, R. M.Mastrogiacomo, R.Cancedda, "Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- To 7-year outcome of a pilot clinical study", *Tissue Engineering*, 2007, **13**(5), p947-955.
- [6]T.Nakanishi, K.Shikata, M.Ota, J.Ikeda, "Development and Practical Application of New Ceramic for Artificial Joints", *J. of the Ceram. Soc. of Jpn.*, 2012, **47**(7), p546-547.
- [7]M.A. Janney, O.O. Omatete, C.A. Walls, S.D. Nunn, R.J. Ogle, G. Westmoreland, "Development of low-toxicity gelcasting systems", *J. Am. Ceram. Soc.*,1998, **81**(3), p 581-591.
- [8]M.J. Edirisinghe, "Injection Molding", *Encyclopedia of Materials: Science and Technol. (Second Edition)*, 2001, p4088-4094.
- [9]J. Wang, M.J. Edirisinghe, "Ceramic Injection Molding", *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 2016,.
- [10]G.Bandyopadhyay, K.W.French, "Injection-molded ceramics Critical aspects of the binder removal process and component fabrication", *J. of the Eur. Ceram. Soc.*, 1993, **11**(1), p23-34.
- [11] J.W.Oh, C.W.Gal, D.Shin, J.M.Park, W.S.Yang, S.J.Park, "Powder Injection Molding Process in Industrial Fields", *J. Jpn. Soc. of Powder and Powder Metallurgy*, 2018, **65**(9), p539-547.

- [12] O.O.Omatete, et al., "Gelcasting - a new ceramic forming process", *Am. Ceram. Soc. Bull.*, 1991, **70**, p1641-1649.
- [13] R.Gilssen, J.P.Erauw, A.Smolders, E.Vanswijgenhoven, J.Luyten, "Gelcasting a near net shape technique", *Mater. Des.*, 2000, **21**, p251-257.
- [14] L.Montanaro, B.Coppola, P.Palmero, Jean-M.Tulliani, "A review on aqueous gelcasting: A versatile and low-toxic technique to shape ceramics", *Ceram. Int.*, 2019, **45**, p9653-9673.
- [15] A.C.Young, O.O.Omatete, M.A.Janney, P.A.Menchhofen, "Gelcasting of Alumina", *J.Am.Ceram.Soc.*, 1991, **74**(3), p612-618.
- [16] E.Adolfsson, "Gelcasting of zirconia using agarose", *J. Am. Ceram. Soc.*, 2006, **89**(6), p1897-1902.
- [17] M.Takeshita, S.Kurita, "Development of Self-Hardening Slip Casting", *J. Eur. Ceram. Soc.*, 1997, **17**, p415-419.
- [18] X.Mao, S.Shimai, M.Dong, S.W.Wang, "Gelcasting of Alumina Using Epoxy Resin as a Gelling Agent", *J.Am.Ceram.Soc.*, 2007, **90**(3), p986-988.
- [19] X.J.Mao, S.Shimai, M.J.Dong, S.W.Wang, "Gelcasting and pressureless sintering of translucent alumina ceramics", *J.Am.Ceram.Soc.*, 2008, **91**, p1700-1702.
- [20] Y.Yang, S.Shimai, H.Kamiya, S.W.Wang, "Fabrication of porous Al₂O₃ ceramics by rapid gelation and foaming", *J.Mater. Res.*, 2013, **28**(3), p1512-1516.
- [21] Y.Sun, S.Shimai, X.Peng, G.Zhou, H.Kamiya, S.W.Wang, "A method of gelcasting high-strength alumina ceramics with low shrinkage", *J.Mater. Res.*, 2014, **29**(2), p247-251.
- [22] X.Peng, S.Shimai, Y.Sun, S.W.Wang, "Effect of temperature difference on presenter behavior of gelcast thick alumina bodies", *Ceram. Int.*, 2015, **41**, p7151-7156.
- [23] X.Peng, S.Shimai, Y.Sun, G.Zhou, S.W.Wang, "Correlation between microstructure evolution and drying behavior of gelcast alumina green bodies", *Ceram. Int.*, 2015, **41**, p11870-11875.

- [24] J.Yua, Z.Yang, Z. Song, K.Deng, Z.Rena, “Fabrication of porous Al₂O₃-based ceramics using ball-shaped powders by preceramic polymer process in N₂ atmosphere”, *Ceram. Int.*, 2018, **44**, p5915–5920.
- [25] P.Biswas, M.Swathi, P.Ramavath, K.Rajeswari, M.B.Suresh, R.Johnson, “Diametral “deformation behavior and machinability of methyl cellulose thermal gel cast processed alumina ceramics”, *Ceram. Int.*,2012, **38**, p6115–6121.
- [26]A.J.Fanelli, R.D.Silvers, W.S.Frei, J.V.Burlew, G.B.Marsh, “New Aqueous Injection Molding Process for Ceramic Powders”, *J.Am.Ceram.Soc.*,1989,**72**(10),p1833-1836.
- [27]Y.Yang, S.Shimai, S.W.Wang, “Room-temperature gelcasting of alumina with a water-soluble copolymer”, *J.Mater. Res.*, 2013, **28**(3), p1512-1516.
- [28] S.Shimai, Y.Yang, S.W.Wang, H.Kamiya, “Spontaneous gelcasting of translucent alumina ceramics”,*Optical Materials Express*, 2013, **3**(8), p1000-1007.
- [29]Y.Sun, S.Shimai, X.Peng, G.Zhou, H.Kamiya, S.W.Wang, “Fabrication of transparent Y₂O₃ ceramics via aqueous gelcasting”, *Ceram. Int.*, 2014, **40**(6), p8841-8845.
- [30]X.Qin, G.Zhou, Y.Yang, J.Zhang, X.Shu, S.Shimai, S.W.Wang, “Gelcasting of transparent YAG ceramics by a new gelling system”, *Ceram. Int.*, 2014, **40**(8_Part_B), p12745-12750.
- [31]J.Wang, F.Zhang, F.Chen, H.L.Zhang, R.Tian ,M.J.Dong, J.Liu, Z.Zhan, J.Zhang, S.W. Wang, “Fabrication of aluminum oxynitride (AlON) transparent ceramics with modified gelcasting”, *J.Am. Ceram.Soc.*, 2014, **97**, p1353-1355.
- [32] M. H. Korayem, A. Kavousi, N. Ebrahimi, “Dynamic Analysis of Tapping-Mode AFM Considering Capillary Force Interactions”, *Scientia Iranica*, 2011, **18**(1), p121-129.
- [33] X. Liu, D. Song, X.He, Z. Wang, M. Zeng, L.Wang, “Quantitative analysis of coal nanopore characteristics using atomic force microscopy”,*Powder Technol.*, 2019, **346**, p332–340.
- [34] X. Liua, D.Song, X.Hec, Z.Wang, M, Zeng, K,Deng, “Nanopore structure of deep-burial coals explored by AFM”, *Fuel*, 2019, **246**, p9–17.

- [35] M. H. Korayem, M. Zakeri, “Dynamic Modeling of Manipulation of Micro/Nano Particles on Rough Surfaces”, *Applied Surface Science*, 2011, **257**(15), p6503-6513.
- [36] M. H. Korayem, E. Omid, “Robust Controlled Manipulation of Nanoparticles Using Atomic Force Microscopy”, *Micro & Nano Letters*, 2012, **7**(9), p 927-931.
- [37] M.H. Korayem, Z. Mahmoodi, M. Mohammadi, “3D investigation of dynamic behavior and sensitivity analysis of the parameters of spherical biological particles in the first phase of AFM-based manipulations with the consideration of humidity effect”, *J. of Theoretical Biology*, 2018, **436**, p105–119.
- [38] M.H. Korayem, M. Estaji, A. Homayooni, “Nonclassical multiscale modeling of ssDNA manipulation using a CNT-nanocarrier based on AFM”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, **158**, p 102–111.
- [39] W.A. Ducker, T.J. Senden, R.M. Pashley, “Measurement of forces in liquids using a force microscope”, *Langmuir*, 1992, **8**(7), p1831-1836.
- [40] Hans-J. Butt, R. Berger, E. Bonaccorso, Y. Chen, J. Wang, “Impact of atomic force microscopy on interface and colloid science”, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2007, **133** (2), p91-104.
- [41] Hans-J. Butt, C. Brunero, M. Kapp, “Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications”, *Surface Science Reports*, 2005, **59**, p1–152.
- [42] Q.D. Nguyen, Eun-S. Oh, Koo-H. Chung, “Nanomechanical properties of polymer binders for Li-ion batteries probed with colloidal probe atomic force microscopy”, *Polymer Testing*, 2019, **76**, p245-253.
- [43] G. Yelken, M. Polat, “AFM silica-probing of charge distribution on quartz (0001) and sapphire (0001) surfaces”, *J. of the Turkish Chem. Soc., Section B: Chem. Engineering*, 2017, **1**(Iss.2), p25-34.
- [44] N. Ishida, K. Matsuo, K. Imamura, V.S.J. Craig, “Hydrophobic attraction measured between asymmetric hydrophobic surfaces”, *Langmuir*, 2018, **34**(12), p3588-3596.

- [45]K.Ahmad, X. Zhao, Y.Pan, “Effect of surface morphology on measurement and interpretation of boundary slip on superhydrophobic surfaces”, *Surface and Interface Analysis*, 2017, **49**(7), p594-598.
- [46]T.Wada, K.Yamazaki, T.Isono, T.Ogino, “Hydrophobicity on sapphire (0001) surfaces in aqueous environment by colloidal probe atomic force microscopy”, *Applied Surface Science*, 2017, **396**, p1206-121.
- [47]J.D.Willott, T.J. Murdoch, G.B.Webber ,E.J.Wanless, “Nature of the Specific Anion Response of a Hydrophobic Weak Polyelectrolyte Brush Revealed by AFM Force Measurements”, *Macromolecules*, 2016, **49**(6), p2327-2338.
- [48]Y.Hanada, S.Masuda, M.Iijima, H.Kamiya, “Analysis of dispersion and aggregation behavior of carbon black particles in aqueous suspension by colloid probe AFM method”, *Adv. Powder Technol.*, 2013, **24**(5), p844-851.
- [49]H.Kamiya, S.Matsui, T.Kakui, “Analysis of action mechanism of anionic polymer dispersant with different molecular structure in dense silicon nitride suspension by using colloidal probe AFM”, *Ceram. Transactions*, 2004, **152**, p83-92.
- [50]T.Kakui, T.Miyauchi, H.Kamiya, “Analysis of the action mechanism of polymer dispersant on dense ethanol alumina suspension using colloidal probe AFM”, *J. Eur. Ceram. Soc.*, 2005, **25**(5), p655-661.
- [51] T.Kakui, H. Kamiya, “Effects of polymer dispersant molecular structure on nonaqueous ceramic suspensions”, *Ceram. Transactions*, 2005, **146**,p43-50.
- [52]M.Iijima, M.Tsukada, H.Kamiya, “Effect of particle size on surface modification of silica nanoparticles by using silane coupling agents and their dispersion stability in methylethylketone”, *J. of Colloid and Interface Science*, 2007, **307**(2), p418-424.
- [53]T.Mori, Y.Okada, H.Kamiya, “Effect of surface modification of silica particles on interaction forces and dispersibility in suspension”, *Adv. Powder Technol.*, 2016, **27**(3), p830-838.

- [54] M. Tsukada, R. Irie, Y. Yonemochi, R. Noda, H. Kamiya, W. Watanabe, E. I. Kauppinen, "Adhesion force measurement of a DPI size pharmaceutical particle by colloid probe atomic force microscopy", *Powder Technol.*, 2004, **141**(3), p262-269.
- [55] M. Iijima, M. Yoshimura, T. Tsuchiya, M. Tsukada, H. Ichikawa, Y. Fukumori, H. Kamiya, "Direct measurement of interactions between stimulation-responsive drug delivery vehicles and artificial mucin layers by colloid probe atomic force microscopy", *Langmuir*, 2008, **24**(8), p3987-9221.
- [56] J. N. Israelachvili, R. M. Pashlay, "Measurement of the hydrophobic interaction between two hydrophobic surfaces in aqueous electrolyte solutions", *J. Colloid Interface Sci.*, 1984, **98**, p500-514.
- [57] A. V. P. Gurumoorthy, K. H. Khan, "Polymers at interfaces biological and non-biological applications", *Recent Res. in Science and Technol.*, 2011, **3**(2), p80-86.
- [58] M. Manciú, E. Ruckenstein, "Loops tails and trains: A simple model for structural transformations of grafted adsorbing neutral polymer brushes", *J. of Colloid and Interface Science*, 2011, **54**(1), p61-69.
- [59] D. Welch, M. P. Lettinga, M. Ripoll, Z. Dogic, G. A. Vliegenthart, "Trains, tails and loops of partially adsorbed semi-flexible filaments", *Soft Matter*, 2015, **11**, p7507-7514.

第5章 結言

原子間力顕微鏡（AFM）のフォースカーブ取得機能を用いて、二つの物質が水中で接する界面において、界面相互作用を定量的に解明する研究の一環として三通りの組み合わせを追究した。

第2章においては、薬剤キャリアとしての core-shell 型 pH-温度応答性ナノゲル粒子の shell と、生体粘膜（ムチン）との相互作用を扱った。

既往研究からは、高分子鎖の分子量、架橋剤の添加量を調整することで相互作用を制御できる可能性が示唆されていた。そこで shell の高分子の架橋部の長さを変える架橋剤を選んで、無架橋に対し高 pH 領域で、接近時の斥力の低減と引力（付着力）の維持ができるかを調査した。ナノゲル粒子の shell 高分子に無架橋、高分子量 PEGDMA 入れて架橋、PEGDMA 等モルの低分子量 TEGDMA で架橋、の3種類のナノカプセルの合成を行ない、コロイドプローブ AFM 法を用いてのムチンとのフォースカーブ測定を行なった。測定結果からは、PEGDMA を用いるよりは、分子鎖の短い TEGDMA を用いる方が、斥力の作用距離を短く、付着力の減衰幅を小さくできることがわかった。TEGDMA のように分子量の小さな架橋剤でも、引力では無架橋に対して大きさも作用距離も及ばない。斥力では、無架橋と同等レベルであるが、pH=6.1 の弱酸性領域で大きな低減が見られた。これは無架橋より有利な点であった。TGDMA より分子量の小さい架橋剤を使えば、高 pH 領域で、無架橋より斥力が小さくなり、引力も同等になる条件が見つかることが示唆された。

第3章においては、薬剤キャリアとしてキトサン修飾したリポソームと、生体粘膜のムチンとの相互作用を扱った。

市販 CNT プローブに PEI およびムチンを吸着させることにより、針状にしたムチン層のプローブを作成することに成功した。このムチン吸着 CNT プローブによるフォースカーブ測定結果より、キトサン未修飾リポソームと比べて修飾リポソームは中性において付着力の増加が観察された。分離時に付着力が段階的に距離を伴いながら減少する傾向より、粘膜付着力増加の要因はキトサンとムチン間に架橋形成があるものと考えられた。キトサンの被覆によらず、酸性と中性でリポソームの硬さに違いがあることが判明した。キトサン被覆によってリポソーム表面が弾性的に変形する構造に変化していることが観察された。

第4章においては、ISOBAM というイソブチレンとマレイン酸の共重合体と、 Al_2O_3 スラリー中の粒子との相互作用を扱った。

ISOBAM が Al_2O_3 スラリー中の粒子に分散性を付与した後、スラリーをゲル化させるという現象について、実際の Al_2O_3 スラリーを模擬するため ISOBAM 水溶液中で Al_2O_3 粒子とサファイア平板間に働く表面間力の経時変化をフォー

スカーブで測定した。その結果、ISOBAM 水溶液中における Al_2O_3 粒子—サファイア平板間の斥力は、ISOBAM 溶液注入から 80~130 分で増加し、それ以降は減衰した。また分離時の最大付着力は、ISOBAM 未添加の溶液中と比較して大幅に減衰した後、80 分前後で再発現し、その後減衰したが長距離引力の残存が観察され、経時的に維持された。 Al_2O_3 スラリーが ISOBAM 添加直後は分散により粘度が低下し、およそ 1 時間から 2 時間後にゲル化による粘度増加が起き、掬い取っても流下しなくなるという実際の現象との対応が見られた。 Al_2O_3 スラリーが ISOBAM の添加によって分散性向上の後ゲル化するという現象を、粒子間力の観点から測定することに成功した。また SiO_2 スラリーのような ISOBAM と相互作用しない添加材の挙動もフォースカーブより経時的引力が全く発現しないことにより明らかにできた。

以上より、三通りの組み合わせにおける界面現象の定量評価において、AFM によるフォースカーブの測定によって、それぞれに新しい知見が得られ、マクロな現象が、ミクロまたはナノの現象と関連付けて説明できた。

AFM のフォースカーブを用いると、ナノレベルでの界面現象を、引力、斥力を表面間距離の変化に対して測定することができ、界面の間に、pH が変化する液体があっても起こった現象を明らかにできた。そのことは、DDS における薬剤カプセルと消化器粘膜との間の柔らかいもの同士の界面現象であっても可能であり、本研究からは、カプセルの小腸内付着滞留性向上のために、ナノゲルカプセルのシェルへの架橋剤の最適な長さ、量などへのヒントが得られ、リポソームカプセルでは、キトサン修飾の量などへのヒントが得られた。また、ISOBAM に関してのフォースカーブの経時変化の測定からは、テール、ループ、トレインなどが生成消滅する有様が斥力引力の生成消滅に関係づけられ、実際にセラミックスのゲルキャストイングを行う場合の、キャストイング時間や、速度に対するヒントが得られた。このような新しい界面の組み合わせを見出して解析を行ない続けることは、工学的に極めて有用と思われる。しかしながら、フォースカーブでは、ナノレベルのカンチレバーに自由に測定したい物質を固定する技術手法や、長時間接触させておいて、引き離すところから引力を測定する手法に関しては改善の余地があり、限界でもある。前者は、カンチレバーが窒化ケイ素系で、物質を接着固定しにくいものであること、後者は、長時間の固体接触をおこなうと熱ドリフトなどで、接点が大きくずれ測定範囲外になりやすいことが挙げられる。

今後の検討課題として、第 2 章では、shell に対する TEGDMA の添加率の最適化、TEGDMA と PEGDMA 以外の重合度の架橋剤の比較・検討、及びそれらの pH 応答性、測定時の温度条件を体温付近にした際に相互作用はどのような変化

を見せるか、PEGDMA の自己架橋性の検証、架橋剤の重合度分子量の最適化などがあげられる。

第3章では、キトサンのアセチル化度の影響、リポソームが pH の変化でどのように硬さが変わるか及びその表面帯電状態との関係、CNT プローブでの界面構造の解明、といったことが挙げられる。第4章では、ISOBAM にゲル化助剤としてマグネシウムイオンを追加した場合の相互作用の検討があげられる。また ISOBAM にも多様な機能を持つものがある。ゲル化におけるそれらの働きの解明や、高濃度ゲルキャストリングにおける現象の解明などが挙げられる。

謝辞

本博士論文は筆者が東京農工大学大学院生物システム応用科学府生物システム応用科学専攻博士後期課程および研究生に在籍中の研究成果をまとめたものです。同専攻教授神谷秀博先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴きました。ここに深く感謝の意を表します。同専攻教授荻野賢司先生、並びに、同専攻准教授 Wuled Lenggoro 先生、赤井伸行先生、稲澤晋先生には副査として本論文の細部にわたりご指導を戴きました。ここに感謝の意を表します。本研究の第2章では、基本研究を実施した田嶋真一氏、助言頂いた神戸学院大学薬学部教授の市川秀喜先生に対して感謝の意を表します。第3章では基本研究を実施した土屋直氏、リポソーム資料を提供して戴くとともに助言頂いた岐阜薬科大学薬学部教授の竹内洋文先生、同助教の小野寺理沙子先生に対して感謝の意を表します。第4章では基本研究を実施し AFM の手ほどきを頂いた小熊一樹氏、助言頂いた中国科学院上海珪酸盃研究所教授の Shiwei Wang(王士維)先生、同客員教授の島井駿蔵先生に対して感謝の意を表します。また第2章と第3章を通して助言頂いた横浜国立大学大学院環境情報研究院准教授の飯島志行先生に対して感謝の意を表します。そして、本専攻神谷研究室の各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を戴き、特に第4章における一部の追加データ、写真に関しては、小池菜摘氏、坂本賢太郎氏のものを使わせて頂きました。ここに感謝の意を表します。多くの事務手続きを行って頂いた研究室の秘書の岡野雪様に感謝の意を表します。最後に、論文執筆中の健康維持管理に尽力してもらった妻の美智子に感謝いたします。

本研究は科研費(A)「JP16H02413」の助成を受けたものです。