

「バイセルを用いたジアセチレン含有マイクロバブルの作製」

兵庫県立大学耐学院工学研究科

田口 翔悟

1 研究の背景と目的

マイクロバブルは超音波造影剤としての利用が期待されている。そのようなマイクロバブルは長寿命化を狙った脂質分子の殻を持ち、機能性膜材料の一種と言える。機能性膜材料は医薬品、化粧品、農薬といった環境・医工学分野で様々に活用されているが、それらに共通する要素技術は“分子集合体の作製”、“形態安定性制御”、“徐放挙動制御”である。疎水鎖にジアセチレン(DA)骨格を持つ脂肪酸分子(以降、DA分子)が水性溶媒中で形成する球状の二分子膜分子集合体ベシクルは、分散安定性に優れたマイクロバブルの前駆体の一種である。ベシクルを含む水溶液とガスをマイクロ流路内で接触させると連続的にマイクロバブルが発生することが報告されている[Park et al., Langmuir 28(8), 3766-3772 (2012)]。緻密に配列させた DA 分子は紫外線照射によって架橋したポリジアセチレンとなり、ガスの漏出を抑えるシェルとしての機能が期待できる。しかし、ベシクルは水溶液中では安定に分散するため、マイクロバブルのシェルとするには二分子膜構造を高温でいちど破壊する必要がある。一方で、長鎖の脂肪酸またはリン脂質を特定の界面活性剤と混合することで調製可能な分子集合体“バイセル”は、その濃度・組成比によって集合形態を制御できる。報告者は機能性膜材料の開発に取り組み、特にバイセルに着目した基礎検討を行い、最近では脂肪酸を主原料として調製したバイセルに対して、上記要素技術を達成するための分子集合状態評価手法を確立している[1]。バイセルはその分子集合形態の不安定性のために機能性膜材料としての応用例は少ない。事前検討でバイセルを適切な条件で希釈すると、室温でもベシクルを連続的に調製できることを明らかにしている[2]。この手法で調製したバイセルをマイクロバブルの前駆体として用いることで、安定性に優れたマイクロバブルの高効率発生が期待できる。

本研究では、バイセルを前駆体として用いるマイクロ流路デバイスの構築を目指し、DA分子、リン脂質および界面活性剤から成るバイセルをマイクロ流路内で希釈し、マイクロバブルを作製するための手法を確立する。マイクロ流路を用いた機能

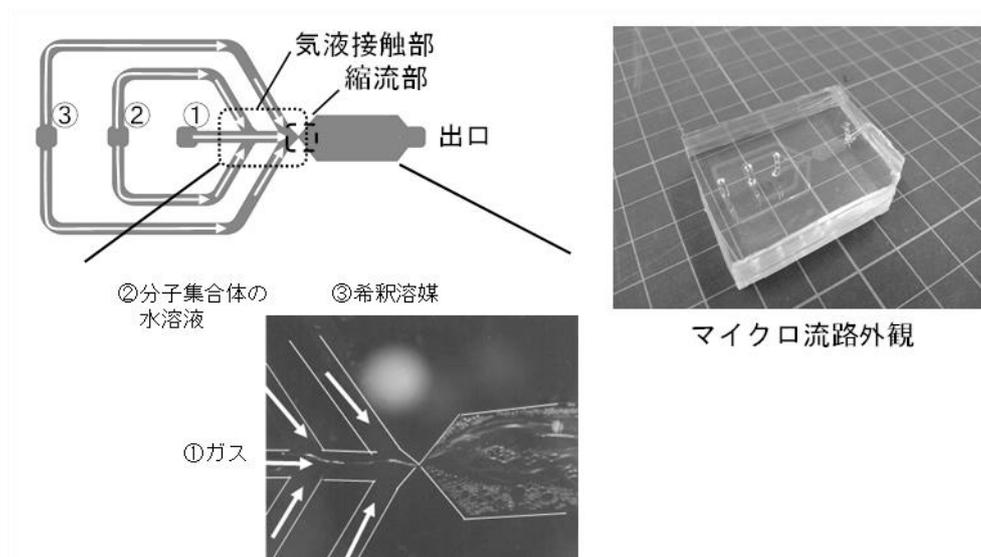


図1. マイクロ流路の外観と形状 (①～③の流路幅約 1 mm、深さ約 30 μ m)

性膜材料作製は、マイクロバブル作製手法として利用でき、また薬物輸送担体作製手法としても応用できる。マイクロバブル作製手法としての新規性に加えてバイセル関連研究への貢献が期待できる。

2 研究方法・研究内容

2-1. バイセルの調製

DA 分子として 10,12-tricosadiynoic acid (TCDA)、分子集合体のサポートとしてリン脂質 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phospholine (DMPC) を使用した。また、界面活性剤として 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonate (CHAPSO) を用い、TCDA/DMPC/CHAPSO 分子集合体を調製した。まず組成比 TCDA/DMPC = 5/5 の TCDA/DMPC ベシクル (リン酸緩衝液 50 mM, pH7) を調製し、CHAPSO 水溶液 20 mM と混合することで TCDA/DMPC/CHAPSO 分子集合体を調製した。混合は以下の濃度比で実施した。

$$x_{\text{TCDA/DMPC}} = \frac{[\text{TCDA/DMPC}]}{[\text{TCDA/DMPC}] + [\text{CHAPSO}]} = 0.5$$

TCDA/DMPC/CHAPSO 分子集合体の形態はネガティブ染色により透過型電子顕微鏡 (TEM, 大阪大学超高压電子顕微鏡センター設備) で観察し、円盤状の分子集合体バイセルの形成条件を調査した。

2-2. 紫外可視分光光度計を用いた TCDA 分子重合性の評価

TCDA/DMPC/CHAPSO 分子集合体中の TCDA 分子の局所濃縮について、UV 光照射 (254nm) による TCDA 分子同士の重合の程度から評価した。重合に伴う呈色を紫外可視分光光度計で測定した。組成比の重合への影響は吸光度を TCDA 濃度で規格化した A/C [L/mmol] で比較した (A : 重合した TCDA の吸光度[-], C : TCDA の濃度 [mmol/L])。

2-3. マイクロ流路を用いたマイクロバブルの作製

マイクロ流路の鋳型には水溶性シート (ツキオカフィルム製薬株) を用い、カッティングプロッタ (CE-7000, Graphtec Corp.) で切り出した。マイクロ流路原料には PDMS を用い、カットした水溶性シートを PDMS で覆い、353K で恒温静置することで硬化させた。硬化後は流路内を洗浄し、水溶性シートを溶出させた。マイクロ流路の深さは水溶性シート厚みと相関し、およそ 30 μm である。マイクロ流路はガス、TCDA/DMPC/CHAPSO 水溶液、希釈溶媒 (リン酸緩衝液 50 mM, pH7) が混合できるようにデザインした (図 1)。

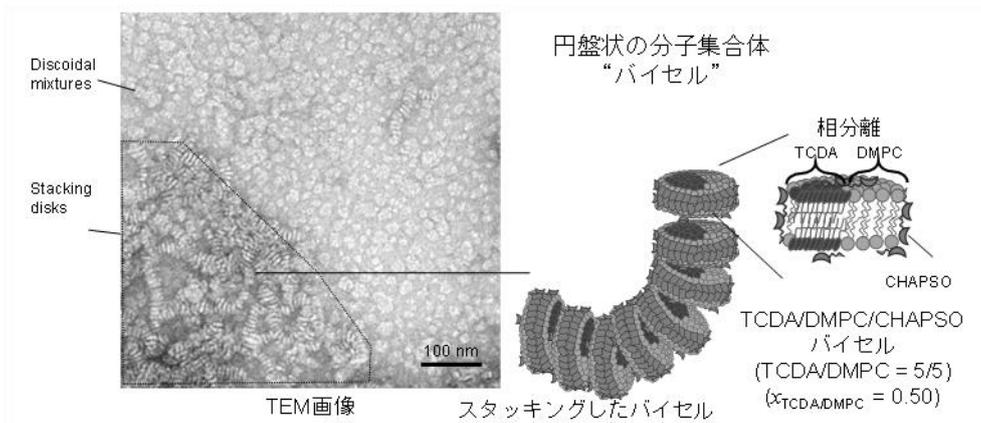


図 2. TCDA/DMPC/CHAPSO 分子集合体の TEM 画像[3]

3 研究成果

3-1. TCDA/DMPC/CHAPSO 分子集合形態と TCDA の局所濃縮

TCDA/DMPC = 5/5 かつ $x_{\text{TCDA/DMPC}} = 0.5$ は円盤状のバイセルが連なった状態の分子集合形態が観察された (図 2)。異なる組成比における TCDA/DMPC/CHAPSO 分子集合体中の TCDA 分子の並びについて、重合性から評価した結果、CHAPSO を混合しない場合 ($x_{\text{TCDA/DMPC}} = 1$) と比べて $x_{\text{TCDA/DMPC}} = 0.7 \sim 0.5$ の範囲ではより重合が促進されることが分かった (図 3)。この現象について、分子間パッキング密度を評価した結果、 $x_{\text{TCDA/DMPC}} = 1$ と比べて $x_{\text{TCDA/DMPC}} = 0.7 \sim 0.5$ の範囲ではパッキング密度の向上が見られた。これは CHAPSO 分子の吸着に伴う、脂質分子の運動の抑制を示唆しており、TCDA 分子のより秩序だった配向に寄与していると考えられる。なお、 $x_{\text{TCDA/DMPC}} = 0.3$ では CHAPSO の過剰な混合により、分子集合体がより小さく分散されるため、TCDA 分子間の重合が抑制されたと考えられる。本研究成果の一部は学会発表され、また原著論文として投稿中である [3][4]。

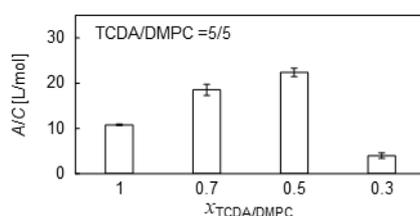


図 3. TCDA/DMPC/CHAPSO 分子集合体中の重合した TCDA の吸光度 [3][4]

3-2. マイクロ流路の作製

マイクロ流路はマイクロバブルの発生のために流路幅を狭めた領域 (縮流部、約 0.2 mm) を作り、乱流機構によるガスの微粒化を試みた。しかし、当初設計した流路では気泡の発生は確認されたが、流路内に気泡が停滞する領域が見られ、これによって気泡同士の合一が観察された。水溶性シートの切り出し技術の制約から縮流部をさらに狭めることが難しいため、気泡の微細化部を設け、せん断による気泡の微細化を試みた (図 1)。水溶液の流量に対してガス流量が過剰であると回収液が泡立つため、それぞれの流量を調整した (図 4)。これにより回収液中にマイクロバブルの存在が確認された。しかし、気泡の合一もいまだ確認されており、合一の抑制方法については今後の検討課題である。

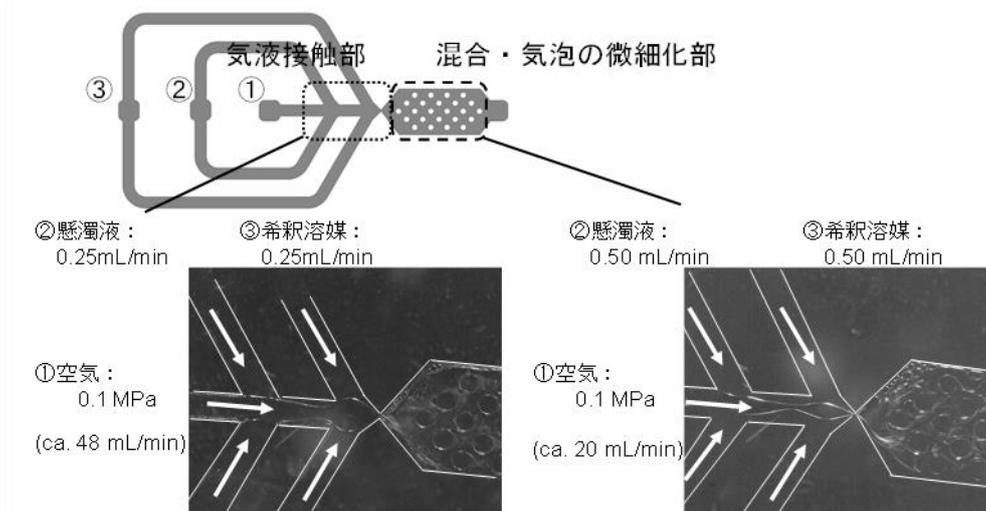


図 4. マイクロ流路の試作と流量の調整。懸濁液には界面活性剤水溶液を使用した。

3-3. DA 分子含有マイクロバブルの作製

上記の TCDA/DMPC/CHAPSO バイセル(TCDA/DMPC = 5/5, $x_{TCDA/DMPC} = 0.5$)を用い、マイクロバブルの作製を試みた。希釈による分子集合形態の変化を目論み、TCDA/DMPC/CHAPSO バイセル水溶液に対して等量の希釈溶媒を送液した(図 5)。顕微鏡観察から、ガスと水溶液の混合が確認され、気泡の微細化が示唆された。一方で、脂質由来の析出物が流路内に現れ、流れを阻害している箇所も見受けられた。マイクロ流路に送液する TCDA/DMPC/CHAPSO バイセルの調製条件については再度検討が必要である。回収液のマイクロバブルについて、動的光散乱法によりサイズの傾向を観察した。ガスと接触させる前(Before, 図 6)と比べて回収液中には約 $3 \mu\text{m}$ のマイクロバブルが存在することが分かった。今後はマイクロバブルの発生経過観察とそのサイズ制御に取り組む。

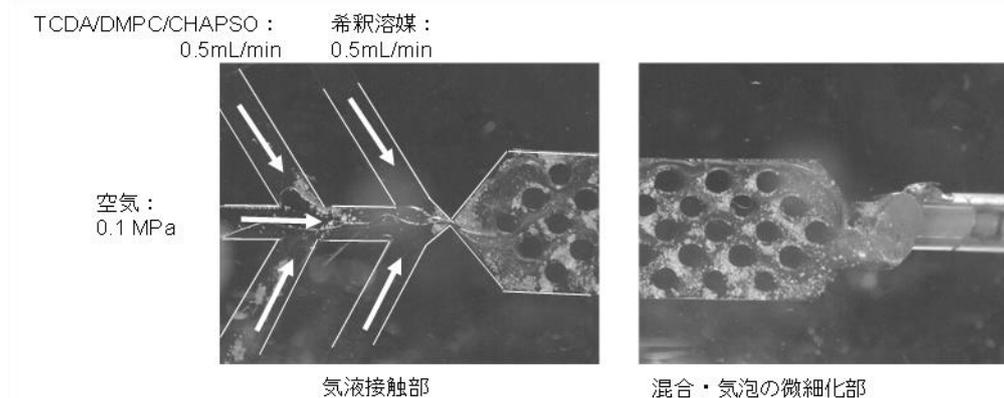


図 5. TCDA/DMPC/CHAPSO バイセルを用いたマイクロバブル作製

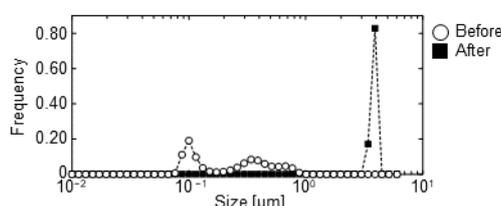


図 6. TCDA/DMPC/CHAPSO 分子集合体のサイズ分布

4 生活や産業への貢献および波及効果

現在市場にある超音波造影剤にはその寿命を延ばすためにリン脂質が用いられている。超音波造影剤は凍結乾燥された状態で保存されており、使用時に水に分散させる。水に分散させてから 6 時間までは造影機能が確認されているが、造影効果の再現性を考慮して 2 時間以内の使用が推奨されており、実使用環境を考慮するならばマイクロバブルの長寿命化は必須である。DA 分子由来のマイクロバブルは外部刺激への応答性も期待でき、超音波造影技術の発展に貢献すると考えられる。

参考文献

- [1] Taguchi, S., et al., *Crystals* 11(9), 1023 (2021)
- [2] Kang, B.S., Choi, S., Taguchi, S., et al., *International J. Precis. Eng. Manuf. - Green Technol.* 11(2), 537–548 (2024)
- [3] Taguchi, S., Hamanishi, S., Satone, H., Yamamoto, T., “Concentration of diynoic acids in bicellar mixtures derived from those phase separation,” (2024) (投稿中)
- [4] 濱西爽、田口翔悟、他、“ジアセチレン脂質を含む二分子膜分子集合体を用いた平面脂質二分子膜の作製(G101)”、化学工学会第54回秋季大会(2023年9月11日)