

修士論文

平成 29 年度

アミド結合による PEG 化アルギン酸の複合化及び
DDS 基材の検討

三重大学大学院 工学研究科 博士前期課程

機械工学専攻

生体システム工学研究室

篠田 直史

目次

1 緒言	…1
2 理論	…3
2.1 DDS 技術と PEG の応用	…3
2.2 磁性流体	…8
2.3 高分子ゲル	…22
3 試料作製	…30
3.1 アルギン酸と PEG 誘導体の合成に関する材料設計	…30
3.2 PEG 化アルギン酸被膜 MF	…47
3.3 PEG 化アルギン酸カルシウム	…55
4 評価方法	…57
4.1 アミド PEG 化アルギン酸	…57
4.2 PEG 化アルギン酸被膜 MF	…60
5 結果	…66
5.1 アミド PEG 化アルギン酸の複合化	…66
5.2 PEG 化アルギン酸被膜 MF の特性	…71
5.3 内包カプセル化のための複合体作製	…81
6 考察	…83
6.1 アミド PEG 化アルギン酸の複合化	…83
6.2 PEG 化アルギン酸被膜 MF の特性	…84
6.3 内包カプセル化のための複合体作製	…95
7 結言	…96
参考文献	…99
謝辞	…101

1. 緒言

科学の急激な進歩によって薬剤治療についても多種多様な手法が提案される現代において、長期療養や侵襲的な治療などに伴う QOL の低下が大きな課題として関心を浴びている。薬剤治療の有効性、安全性が望まれる中、薬物輸送システム (Drug Delivery System, DDS) 技術は薬剤治療の最適化を担う新たな薬剤投与形態として大きな注目を集めている¹⁾。

DDS は目標とする臓器ないし病巣部に対して、必要最低限量の薬物を担持し、送達させることで患部における薬物濃度を高め、薬効を効率的に引き出すシステムである。さらに、DDS は患部に局限して集中的に投与できることから、目標としない部位に対する薬物の流入を抑制し、薬物によって誘発される正常細胞への副作用を低減させることが可能である。DDS 実現のために有機化学的な手法によって薬物自体を改善する例もあるが、近年では高分子材料技術やマイクロ・ナノ粒子技術の進展によってマイクロ・ナノキャリアを使用した DDS への研究アプローチが多く見受けられ、薬物キャリアに関する素材、応用例の多様な報告がなされている²⁾⁴⁾。

一方で、薬物キャリアに求められる最も重要な因子としてしばしば挙げられるのが、生体内、とりわけ血液中において材料が安定的に循環する機能である。通常、生体では外来異物の侵入に対して血漿蛋白質の一群である補体や抗体が非特異的に吸着することで、肝臓に存在する Kupffer 細胞や脾臓に存在する Fixed マクロファージ等を中心とした細網内皮系組織 (ReticuloEndothelial System, RES) の貪食細胞による捕捉作用が促進される。このような補体受容体の活性化を促す非特異的吸着反応はオプソニン化と呼ばれ、人工材料である薬物キャリアに対しても例外なく作用する⁵⁾。このことから、生体内において薬物キャリアが DDS 製剤としての効果を発揮するために十分な時間を獲得することは困難とされている。この問題に対して、現在では種々の薬物キャリアに対して生体内における長期血中滞留性を付与するため、材料表面に対して合成高分子であるポリエチレングリコール (PolyEthylene Glycol, PEG) 誘導体によるコーティングを施す手法が汎用されている⁶⁾。

PEG は変異原性や毒性が極めて低く、生体親和性材料として良好な物性を備えた両親媒性高分子である。糖類や脂質など他の高分子に対する PEG 構造の複合化は PEG 化と呼ばれ、母材に対して高い生体親和性をもたらすことからバイオ関連材料に対して幅広く用いられている。中でも薬物キャリアに対しては専ら血中滞留性の観点に基づいた応用が認められる。PEG 誘導体による材料表面の修飾が施された薬物キャリアは PEG 鎖から形成された材料表面の水和層の立体障害によって、蛋白質を主成分とした補体や抗体の吸着を妨げることでオプソニン化を抑制するため、実質的に血中におけるステルス化を可能とする。代表的な薬物キャリアの一つであるリポソームについても PEG 化に関する研究がなされており、臨床実験において生体分子からのオプソニン化を抑制することによるステルス機能の発現が確認されている⁷⁻¹⁰⁾。また、PEG 化はその原理上リポソーム以外の種々の薬物キャ

リアに対しても、材料に長期血中滞留性を付与させるための手法として有効であることが考えられる。

そこで、近年当研究室では RES 回避型の PEG 化リポソームをモデルとして、ナノマテリアルの一種である磁性流体 (Magnetic Fluid, MF) を薬物キャリアへと応用するための研究が行われてきた。MF はナノサイズの磁性微粒子であるコア材を分散剤の被覆によって液中に均一分散させたナノコロイド溶液の一種である¹¹⁾。当研究室では薬物キャリアとしての用途を考慮した MF の PEG 化を実現するために、コンドロイチン硫酸 C (Chondroitin Sulfate C, CSC) の側鎖に対してアミド結合により PEG を導入したグラフト共重合体を分散剤へと応用する手法が採用された。この際、CSC の PEG 化と MF のコア材表面に対する結合はどちらも CSC の繰り返し単位中に存在するカルボキシル基に着目した反応が利用された。つまり、既存の MF を PEG 化させた訳ではなく、PEG 化した CSC の性質を応用することで事実上、MF の PEG 化を成功させたこととなる。このことから、カルボキシル基を官能基に持つ他の高分子に対してもアミド結合を利用した PEG 化が可能であり、作製したグラフト共重合体の性質に着目した新しい用途展開が期待できる。加えて、母材とする高分子に対して予め PEG の複合化を行うことから、分子量に依存する PEG 鎖密度を比較的容易に制御することが可能である。

本研究では、異なる重合度から成る PEG 誘導体を使用して、DDS 基材としての多様な展開を考慮した PEG 複合型のグラフト共重合体の作製を試みた。グラフト共重合体の側鎖とする PEG の平均分子量は、先行研究においても使用された 2000 に加えて、生体材料分野での用途が認められる 5000 及び 10000 のものを採用し、それぞれ合成を行った。グラフト共重合体の母材には、生体親和性に富む多糖類の中から、良好な反応性を示すカルボニル基を有する天然高分子であるアルギン酸を採用した。アルギン酸は、現存する多糖類の中でも分子量当たりに高い割合でカルボキシル基を保有する水溶性の天然高分子であり、バイオ関連材料に対しての応用も認められる。また、比較的幅広い分子量で存在することから PEG 複合時の多用途展開についても期待できる。また、先行研究と同様に、アルギン酸と各重合度の PEG との複合化はアミド結合による合成を採用した。加えて、作製したグラフト共重合体である PEG 化アルギン酸を素材とした DDS 基材の検討を行った。DDS 基材については先行研究に続く糖被膜型 MF に加えて、PEG 化アルギン酸を母材とするハイドロゲルの作製を試みた。また、作製した DDS 基材に関して PEG の分子量の差異が及ぼす材料特性への影響について調査した。

2. 理論

2.1 DDS 技術と PEG の応用

DDS 技術の開発に用いられる手法は物理化学的手法，化学的手法，生物学的手法の3項目に大別される。そのうち，物理化学的手法とは剤形の形状を利用して薬物を修飾する方法を指しており，薬物の標的指向化や放出制御を目的としたマイクロ・ナノキャリアを応用した製剤はこれに含まれる¹²⁾。一方で，マイクロ・ナノキャリアの開発に際して，最も重要な因子と言われるのがキャリアの体内滞留性であり，この観点に基づいて注目されている材料の一つが PEG である。本節では，マイクロ・ナノ粒子の体内における動態と薬物キャリアの種類，PEG の組成や性質および PEG 化による薬物キャリアの表面改質に関して簡潔に述べる。

2.1.1 マイクロ・ナノ粒子のスケール⁵⁾

マイクロ粒子またはナノ粒子について，一般的にその大きさはそれぞれマイクロメートルオーダー，ナノメートルオーダーのものとして定義される。一方で，分野，研究によっては取り扱うスケールを限定して呼ぶ場合も多く見受けられる。粉体工学においては 1nm～100nm の範囲内にある粒子がナノ粒子とされるのに対して，薬物キャリアを取り扱った多くの研究や文献においては 1nm～1 μ m のサブミクロンサイズまでの範囲内のものが慣例的にナノ粒子と呼ばれている。また，DDS 技術に関連した領域において，マイクロ粒子は数 μ m～数百 μ m の範囲にある粒子を指す場合が多い。本論文では対象とする DDS 基剤について 1nm～1 μ m 程度のものをナノ粒子，1 μ m～100 μ m 程度のものをマイクロ粒子と呼ぶこととする。

2.1.2 薬物キャリアの体内動態

(a) 低分子薬物・ナノ粒子の体内動態⁵⁾

低分子薬物とナノ粒子について一般的な体内での動態を簡略的に述べる。錠剤やカプセル製剤などの市販されている数多くの低分子薬物は，使用者に対して経口摂取により体内へと取り込まれ，胃や腸の消化管から吸収された後，肝臓で代謝を受ける (Fig. 2.1.1(a))。脂溶性薬物は肝臓での代謝によって極性化される。そして，腎臓から尿中への排泄によって薬物分子は体外へと排出される。また，静脈投与された薬物については血中を循環した後，腎臓より速やかに排泄される。そのため病巣部位に対して送達される薬物は微量であり，非特異的な体内分布が認められる。

一方で，ナノ粒子から成る薬物・製剤はその多くが注射剤であり，生体に対して血中に直接ナノ粒子を投与する形態が一般的である (Fig. 2.1.1(b))。先述した通り，生体においては

血中に侵入した外来異物に対して自然免疫系が作用する。抗原特異的な免疫機構である後天性免疫に対して、先天性免疫とも呼ばれる自然免疫は対象とする抗原を特定しない非特異的な免疫系であり、受容体を介することで外来異物や異常細胞の迅速な感知、排除を行う生体防御機構である。特に、血中に投与されたナノ粒子は血漿蛋白質である補体によってオプソニン化され、自然免疫細胞の内、肝臓の Kupffer 細胞や脾臓の Fixed マクロファージといった細胞を中心に貪食される。RES による貪食作用を受ける一方で、ナノ粒子は低分子薬物に対してある程度の大きさをもって存在するために腎臓からは排泄され難い。そのため、ナノ粒子を生体に投与した場合、低分子薬物のように腎臓を経由した排泄は容易にされないものの、RES が多数存在する肝臓や脾臓に選択的に分布する。後述するが、PEG 化はこのような自然免疫系によるオプソニン化を効率的に抑制する作用をもたらすことから Fig.2.1.1(c)のような動態をみせる。

(b) PEG 化

(i) PEG の組成と構造

PEG は繰り返しのエチレングリコールユニットから構成される飽和炭化水素の直鎖炭素鎖であり、ポリマー中に複数のエーテル構造を有することからポリエーテルに分類される高分子化合物である。PEG と同様にポリマー中の繰り返しユニットがエチレングリコールで構成される化合物としてポリエチレンオキシド (PolyEthylene Oxide, PEO) が存在するが、分子量 2 万程度までのものを PEG、数万以上のものを PEO として区別するのが一般的である (Fig. 2.1.2)。

(ii) 高含水率溶解鎖表面の構築^{4),5),13)}

血中に投与されたナノ粒子の体内滞留時間を決定する重要な因子の一つは 2.1.2 (a) でも述べた通り、自然免疫系における血漿蛋白質である補体や抗体による材料のオプソニン化である。そのため、特定の薬物キャリアの材料表面を改質することでオプソニン化を抑制するという手法が多く試みられている。中でも、汎用的なものが親水性ポリマーによる薬物キャリアの表面修飾であり、選択される親水性ポリマーの主な特徴は次の 3 つである。

- ① 極めて良好な溶媒親和性を示す
- ② 溶媒中において大きな排除体積効果を示す
- ③ 溶媒中において高い運動性を示す

血中において、ナノ粒子あるいは薬物ナノキャリアと蛋白質との間にはファンデルワールス力、静電引力、疎水性相互作用、水素結合といった様々な相互作用が存在する。PEG は上記①～③の特性を併せ持つ高分子材料であるとして、それら相互作用を抑制・阻害することが可能であり、材料の血中滞留時間を延長させるために有用であるとされる。

Flory-Huggins 理論によるとモル数 n_0 とする N_0 個の溶媒分子と全セグメントのモル数 x_{N1} とする N_1 個の高分子に対して各体積分率 ϕ_0 , ϕ_1 は次式で示される。

$$\varphi_0 = \frac{N_0}{N_0 + xN_1}, \varphi_1 = \frac{xN_1}{N_0 + xN_1}, (\varphi_0 + \varphi_1 = 1) \quad (1.1)$$

ここで、溶液中におけるエンタルピー変化は溶媒と高分子間の接触によって生じるものと仮定される。混合の際に生じる体積変化を無視して、溶媒と高分子間の接触によって生じるエネルギー変化を ΔE とし、溶媒と高分子間の接触数を q 個とすると、エンタルピー変化 ΔH は $\Delta H = q\Delta E$ として表される。加えて、特定の高分子に近接する座標を z とすると、溶媒中の高分子は $\varphi_0 x z$ 個の溶媒分子に囲まれていると考えられるため、 $kT\chi = z\Delta E$ として混合エンタルピーは次式のように示される。

$$\Delta H = RT\chi\varphi_1 n_0 \quad (1.2)$$

したがって、自由エネルギー ΔF は次のように表される。

$$\Delta F = RT(n_0 \ln \varphi_0 + n_1 \ln \varphi_1 + \chi\varphi_1 n_0) \quad (1.3)$$

ここで、上式における χ は Flory-Huggins 相互作用とも呼ばれ、溶媒分子と高分子との相互作用を示す無次元量のパラメータである。この χ の値が小さいほど良好な溶解性を示す。PEG は χ -パラメータが極めて小さく水溶媒に対して完全相溶性を示す。これは PEG 主鎖エーテル酸素と水との水素結合が極めて強いことに由来するとされる。加えて、溶液中の高分子鎖は排除体積効果と呼ばれる分子間の短距離斥力が働く。Folly の希薄溶液理論において、溶媒の浸透圧 Π 、高分子の分子量 M 、濃度 c の溶液について排除体積効果の大きさは次式の第2ビリアル係数 A_2 によって定められる。

$$\frac{1}{RT} \frac{\Pi}{c} = \frac{1}{M} + A_2 c + A_3 c^2 + \dots \quad (1.4)$$

PEG は上式に示した第2ビリアル係数が大きく、他の親水性高分子と比較して大きな排除体積効果を示す。

PEG を含めた親水性ポリマーについて、ここまでに説明された溶媒親和性と排除体積効果が血漿蛋白質によるオプソニン化を抑制するために重要な因子である。加えて、PEG は水溶媒中において高い運動性を示すことから、ナノ粒子または薬物キャリアなどの材料表面に固定されることで Fig. 2.1.3(a), Fig. 2.1.3 (b)に示すような振る舞いをするために生体内において材料のオプソニン化を抑制し、血中滞留時間の延長について効率的に寄与するものとされる。

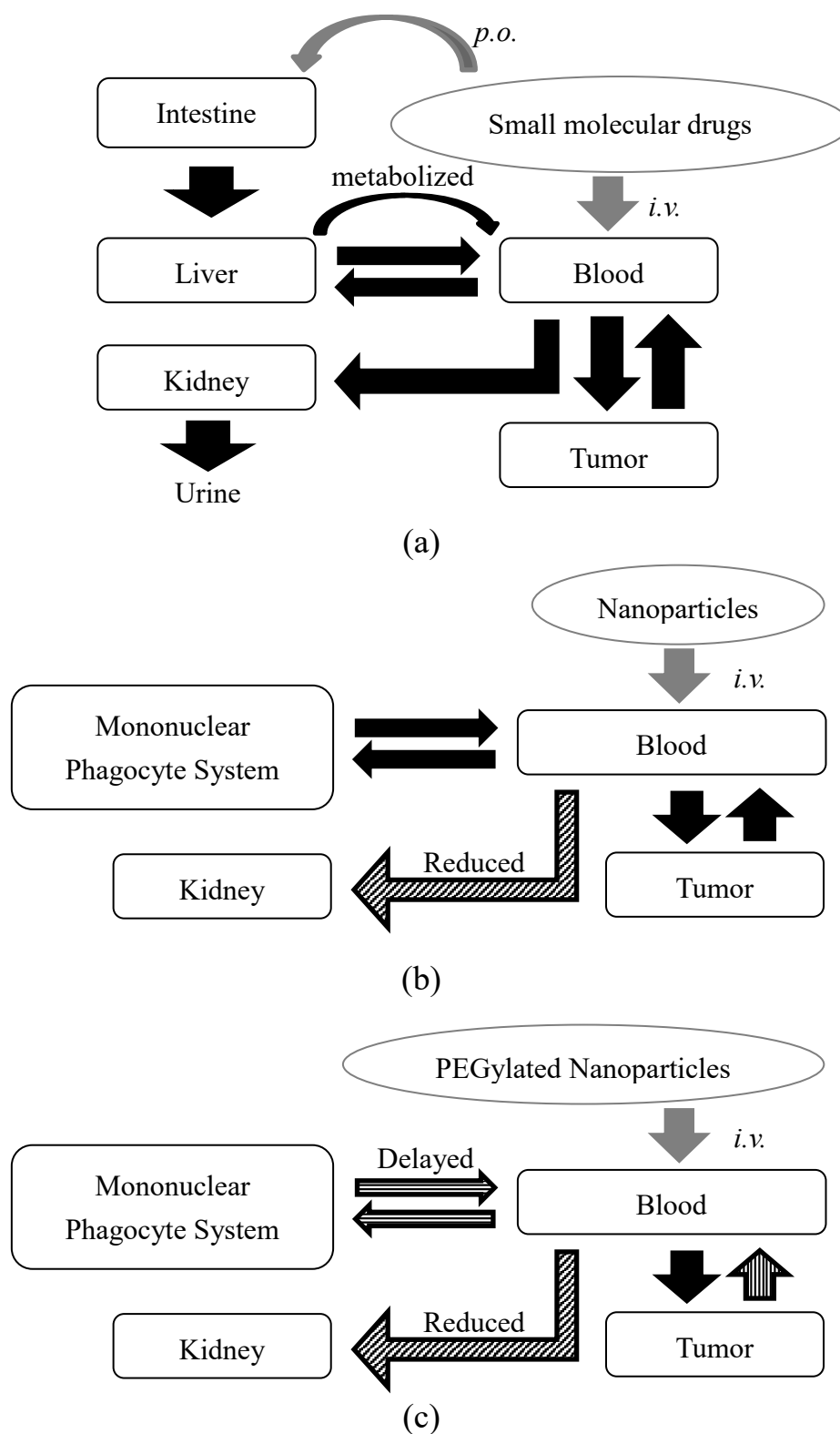


Fig. 2.1.1 ADME of typical small molecular drugs, nanoparticles and PEGylated nanoparticles.

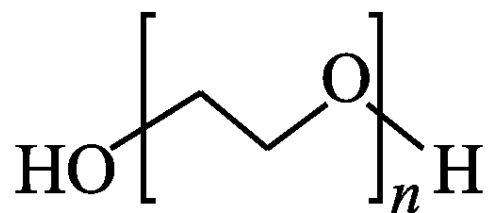


Fig. 2.1.2 Structural formula of PEG (or PEO).

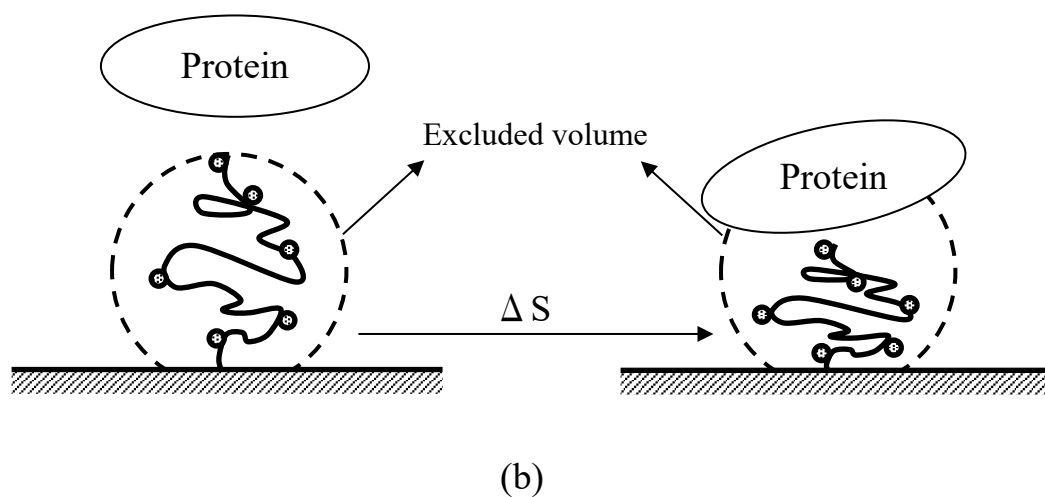
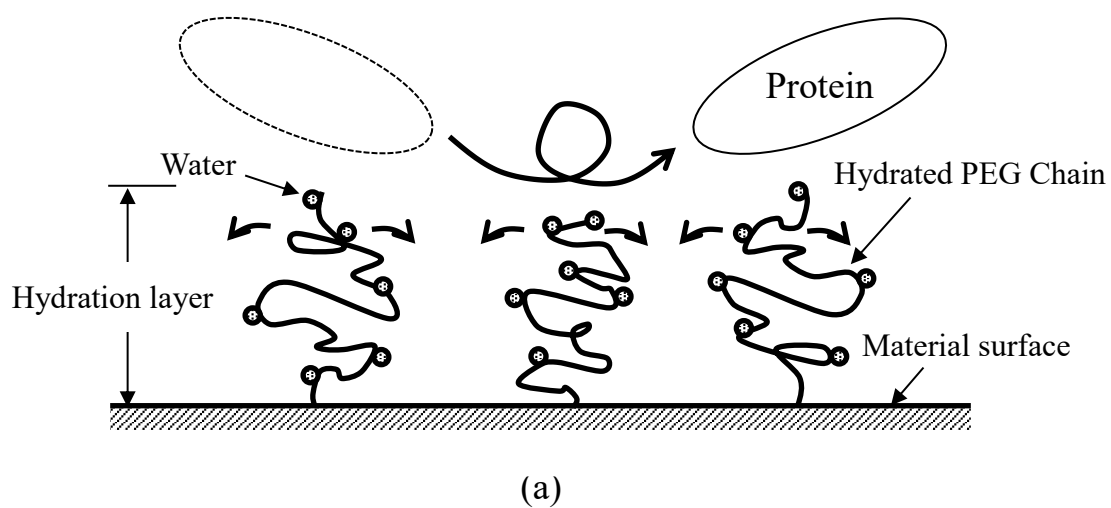


Fig. 2.1.3 Interaction between proteins and surfaces with PEG chains.

2.2 磁性流体

磁性流体の最大の特徴は、液体としての流動性を備えるにも関わらず外部磁場に応答することであり、このような特異的性質を利用した例としてサスペンションやシール材といった工業用途に対する応用がみられる¹¹⁾。

磁性流体は磁性微粒子、分散剤、溶媒の三成分を構成要素としており、分散剤を被覆させた磁性体を溶媒中に均一分散させたコロイド溶液の一種である。本節では、磁性体とコロイド溶液の観点から磁性流体の基本的な物理的性質について述べる。

2.2.1 磁性体の理論

(a) 磁性

本研究で作製する磁性流体の重要な性質の一つに磁氣的性質（磁性）がある。物質の磁性は以下のように分類され、磁気モーメントを用いてそれぞれの性質が示される (Fig. 2.2.1)。

(i) 反磁性 (Diamagnetism)

反磁性物質では磁化率 (Magnetic susceptibility) の値は小さく、負となる。つまり外部磁場が働いたときも磁場の方向とは逆の向きに磁化される。

(ii) 常磁性 (Paramagnetism)

外部磁場がないとき、磁気モーメントの配向は熱運動のために無秩序となり互いに打ち消しあい全体としてみると磁化を示さない。外部磁場が作用するときは全体として磁場の方向に磁化される。

(iii) フェロ磁性 (Ferromagnetism)

フェロ磁性体では物質中の磁気モーメントが平行に並んでおり、原子の磁気モーメントが互いに強く相互作用して、外部磁場がない場合でも自発的に並んでいる。

(iv) フェリ磁性 (Ferrimagnetism)

フェロ磁性とほぼ同じ磁気特性を示すが、フェロ磁性では磁気モーメントが平行に並んでいるが、フェリ磁性では磁気モーメントが逆平行となっている。そのためフェリ磁性の磁気モーメントはその差となり生じる。

(v) 反強磁性 (Antiferromagnetism)

反強磁性体はフェリ磁性と同じく磁気モーメントが逆平行となって、その大きさが等しい物質である。

(b) 物質の磁气的特性

(i) 磁石とは

常温付近の鉄材料は、その内部において Fig. 2.2.2 のように磁壁によって磁区と呼ばれる小部分が形成されている。各磁区の端は、それぞれ N 極と S 極で、Fig. 2.2.2 の矢印は、一つの磁区の中で S 極から N 極に向けてひいてある。この Fig. 2.2.2 のように、磁区ごとに磁

石の向きが異なり、Fig. 2.2.2 (a)の試料では材料の外面に磁極が現れない。Fig. 2.2.2 (a)の試料に対して外部磁場を与えると、磁壁が動き、磁区はFig. 2.2.2 (b), (c)のように変わっていく。この過程で磁場に平行な向きの磁石をもつ磁区が増加し、同時に材料表面に磁極が現れる。こうして現れたS極は、方向磁針のN極を、N極は方向磁針のS極を引きつける。その後、外部磁場がなくなると、材料は元のFig. 2.2.2 (a)の状態に戻ろうとするのであるが、磁壁が移動の途中で材料中の不純物や格子欠陥などにひっかかると、完全に元には戻れず、Fig. 2.2.2 (b)のような状態で止まってしまう。このときの材料の磁石の強さを残留磁化という。この材料の磁区構造をFig. 2.2.2 (a)の状態にまで戻すには、ある強さの反対向きの磁場をかけて、磁壁を強引にもとの位置へ動かす必要がある。このときの磁場の強さを保磁力という。

(ii) 磁化曲線

鉄材料の磁化は連続的に変化する磁場中においてFig. 2.2.3のような挙動を示す。ここで磁化というのは、単位体積中の磁気モーメントのことである。

鉄材料に対する印加磁場が増大するにつれて、材料の磁化も増加し、①と記した曲線をたどっていく。やがて、材料の磁化は飽和磁化に達する。その後Bから連続的に磁場を減少させると、材料の磁化は①に沿ってではなく、②の曲線に沿って減少していく。したがって磁場の値がゼロになっても、材料は残留磁化 M_r をもつ。さらに、逆向きの磁場を増大させていくと、保磁力 H_c で材料の磁化は消滅し、さらに磁場を増大させていくと、材料の磁化は先ほどとは反対向きに飽和する。Cの点から再び磁場を減少させていくと、材料の磁化は、今度は③の曲線に沿って変動する。このような曲線を磁気ヒステリシスと呼ぶ。

(iii) 磁気モーメント

磁区の内部について局在スピン模式図を用いて考える。この模式図では各原子が磁気モーメントを持っていて、それはその原子に局在した内殻電子が担っていると考えられる。Fig. 2.2.4の丸は、各原子に局在した内殻電子を、矢印はその磁気モーメントを表す。

材料中の内殻電子の磁気モーメントがFig. 2.2.4 (a)のような方向を向いているとき、その材料は磁石の性質をもたない。磁区構造もないのである。それに対し、強磁性体と呼ばれる材料中ではとなりあう原子の磁気モーメントの間に互いに平行になろうとする力が作用し、大部分の磁気モーメントがFig. 2.2.4 (b)に示したように同じ向きに揃うようになる。このFig. 2.2.4 (b)では、他の方向を向いている磁気モーメントもあるが、大部分は上を向いている。したがって、この領域は、正味、上向きの磁石になっている。このような磁区の内部の単位体積あたりの磁気モーメントの和を自発磁化という。なお、大多数の磁気モーメントとは違う方向を向く磁気モーメントの数は、温度が下がるにつれて少なくなっていく、絶対零度では一つの磁区の中の磁気モーメントはすべて同じ方向を向いている。また、磁気モーメントを互いに平行にしようとする力を強磁性相互作用という。

(iv) 超微粒子の単磁区構造

磁壁の両側にある原子の磁気モーメントは強磁性相互作用によって互いに平行となろう

とするため、磁壁内の磁気モーメントは、徐々に向きを変えているはずである (Fig. 2.2.6). 強磁性相互作用にとってはこの向きの変更はなるべくゆっくり行われたほうが良い. そのためには、磁壁は厚いほうがよさそうだが、磁壁は厚ければよいというものでもない. それは、固体中では結晶構造の異方性を反映して、磁気モーメントの向きやすい方向（これを磁化容易軸という）と向きにくい方向があるからである. この異方性を磁気異方性という. 例えば、Fig. 2.2.5 において上下方向が磁化容易軸で、磁気モーメントは、上か下を向きやすいとする. すると、磁壁の中の磁気モーメントは、どれも向きたくない方向に向くことを強いられていることになる. このような磁気モーメントの数をなるべく少なくしようとすると、磁壁は薄いほうが良い. 一般には磁壁の厚さというのは 100nm から、1000nm の間といわれている.

粒径が磁壁の厚さ程になると、その材料は単磁区構造と呼ばれる単一の磁区構造を持つ.

単磁区構造をとる微粒子では、その表面に N 極と S 極が現れることになる. 従って超微粒子は、それ自身が一つの小さな磁石といえる. このような単磁区構造の超微粒子の保磁力は、バルクな物質より大きくなることが期待される. 実際、150 nm の超微粒子の保磁力は、2000 nm の粒子の二倍強とされる.

単磁区構造の磁性体の保磁力が大きいのは、自発磁化の反転が粒子内の磁気モーメントの一斉回転によって起こるからである. 反転する前も後も、自発磁化は磁化容易軸を向くのだが、回転の途中で、本来なら向きたくない方向を向かなくてはならない. いわば、磁気モーメントは異方性エネルギーという山を越えなくてはいけないわけである. 通常、バルクな磁性体の磁化は磁壁の移動によって起こる. このときも磁壁内部の磁気モーメントは異方性エネルギーの高い方を向いているが、それは磁場をかける前からそうだったのであって、磁壁の移動に際してエネルギーの高い磁気モーメントの数が増えるわけではない. それに対して、回転磁化の場合は、異方性エネルギーの山を越えるだけの活力を磁気モーメントに与えるために、強い磁場をかけなくてはならないのである.

この異方性エネルギーは、回転する磁気モーメントの数に比例するのだから、大きい粒子ほど回転しにくく、保磁力も大きい. 逆に、あるサイズ以下の微粒子の保磁力の大きさはゼロになる. これは、異方性エネルギーがなくなるからではない. 異方性エネルギーの効果は磁気モーメントの向きが熱的ゆらぎによって弱められる. このために、ある大きさより小さい微粒子では絶対零度でない限り、異方性エネルギーの効果より熱的ゆらぎの効果が上回るようになる. したがって、見かけ上異方性エネルギーがなくなり、保磁力はゼロになる.

そこで、単磁区構造の微粒子の、保磁力とサイズの関係を図示すると Fig. 2.6 の実線のようになる. 横軸は超微粒子の直径であり、 D_p は保磁力がゼロになる時の直径である. 粒子のサイズが充分大きくなると、今度は保磁力が Fig. 2.2.6 に点線で示したように減少していく. これは磁区構造が出来て、磁壁の移動による磁化反転が起こるからである.

詳しい理論によると、一個のイオンの持つ磁気モーメントを μ 、単位体積中のイオン数を N として、磁化の値 M を

$$M = N_{\mu} B_s \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) \quad (2.1)$$

とすると

$$B_s(x) = \frac{2S+1}{2S} \operatorname{ctnh} \left(\frac{(2S+1)x}{2S} \right) - \frac{1}{2S} \operatorname{ctnh} \left(\frac{x}{2S} \right) \quad (2.2)$$

と定義されるブリルアン関数を用いて表される。全ての磁気モーメントの向きが揃えば、全磁気モーメントの大きさは飽和値 N_{μ} のなるはずだから、ブリルアン関数は、実際の磁化が飽和値よりどれだけ小さいかを表している。 S は、イオンの持つ電子スピン量子数と呼ばれ、イオンの元素によって $1/2$ 、 1 、 $3/2$ ・・・という整数の半分の値をとる量である。スピン量子数が S の場合、磁気モーメントは $(2S+1)$ 種類の向きを向くことが出来る。

また、磁化は、磁場と温度に依存するが、この二つの量にばらばらに依存するのではなく、 (H/T) という組み合せたものの関数だということも重要である。また、 $B_s(X)$ という関数は、 $S \rightarrow \infty$ である関数 $L(X)$ に近づく。この関数はランジュバン関数と呼ばれ、磁化を古典統計力学で計算すると、 B_s の代わりにこの関数が出てくる。

$S \rightarrow \infty$ の時、

$$B_s(x) \rightarrow L(x) = \operatorname{ctnh} \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) - \left(\frac{k_B T}{\mu H} \right) \quad (2.3)$$

・・・(ランジュバン関数の式)

常磁性体の試料に非常に強い磁場をかけると磁化は飽和し、そのとき試料中の全ての磁気モーメントは同じ方向を向く。磁化を飽和させて磁場を切ると、この試料の磁化は再びゼロとなる。これは、磁場がない時の常磁性体は、磁化のない状態が最も安定しているからである。実は磁化は、一度にゼロになるのではなく、ある一定の時間変化を経てゼロになる。この現象は磁気緩和現象と呼ばれる。

$$M(t) = M_0 \exp \left(-\frac{t}{\tau} \right) \quad (2.4)$$

この緩和は、必ずしも磁化が飽和したところから始まる必要はなく、 M_0 は磁場をきる直前の、任意の磁化の値である。 τ は緩和時間と呼ばれ、試料の種類や温度に依存する。磁化は、磁気を切ってから τ 秒後に、初期値の $1/e$ となり、その後は、 τ 秒ごとに公比 $1/e$ で等比数列的に減少する。

磁気緩和は、磁気モーメントの熱的ゆらぎによって起こる。たとえば、全ての磁気モーメントを磁場の方向にそろえても、磁場を切ると個々の磁気モーメントは再び自由に向きを変え始める。

(v) 超微粒子の磁気緩和と超常磁性

ここでは、直径が D_p より小さい単磁区構造の超微粒子について述べる。常温の鉄なら、数十 nm という小さい粒子である。個々の粒子は多数の磁性イオンを含んでいるが、イオンの持つ磁気モーメントの間の相互作用の影響は熱的なゆらぎに比べて充分強いので、イオンの磁気モーメントはそれぞれの粒子内部では向きが揃っている。すなわち、各粒子が飽和値に近い自発磁化を持っている。しかし、これらの超微粒子は互いにある距離を置いていて、粒子同士の磁気的な相互作用はないと考える。必然、微粒子ごとに磁気の方向はランダムになっている。そのため、あたかもランダムに配置されたイオンの常磁性状態と同じような構造になる。ただし、各粒子中の全磁気モーメントが、粒子中の磁性イオンの数の平均値を N_p 、一個のイオンの持つ磁気モーメントを μ として $N_p\mu$ 程度の量で表される。いわば、巨大な原子の持つ磁気モーメントが常磁性状態にあるようなもので、超微粒子のこのような磁気的狀態を超常磁性状態とよぶ。超常磁性は外部磁場を印加された時のみ各超微粒子の磁気モーメントが磁場方向に配向し磁化を示し、磁場を取り除くと元の常磁性状態に戻る。その為、磁化曲線は Fig. 2.2.7 に示すように磁気ヒステリシスを示さず、ランジュバン関数で表される一定の曲線にのり、残留磁化も保磁力も示さない。

超常磁性状態にある超微粒子を多数集めて実験試料を作り、磁場をかけると、その試料の磁気モーメントはどのようになるのであろうか。各微粒子の磁気モーメントの向きが、熱的ゆらぎでランダムに方向を変えているのなら、一個のイオンの磁気モーメントの役割を担うのが、微粒子内の全磁気モーメントであるから、式(2.1)のイオンの磁気モーメント μ を $N_p\mu$ で置き換え、イオンの数 N を試料中の粒子数と仮定できる。そして、直径 50 nm の超微粒子でも数千個のイオンを含んでいるため、 $N_p\mu$ は膨大な数であり、超常磁性微粒子の磁化はブリルアン関数ではなくランジュバン関数で表される。

一方で、熱的なゆらぎによって磁気モーメントの方向は不規則なものとなるが、それは一個のイオンに対しては容易に起こるものの、超常磁性微粒子の磁気モーメントの向きが変わるためには、その構成要素の各イオンの磁気モーメントがほとんど一斉に向きを変えなくてはいけない。しかし、何千個もある磁気モーメントが一斉に向きを変えるということは非常にまれにしか起こらない。現実には起こることは、あるイオンの磁気モーメントが熱的ゆらぎによって下を向き、それがまだ上を向いたままの残りの磁気モーメントにひかれて再び熱的ゆらぎによって上向きに戻る前に、周囲にあるほかの磁気モーメントが下向きをかえ、それがさらに周囲の磁気モーメントの向きを変えるというように、何段階もの反転が起こり、ついには全磁気モーメントが下向きになるということである。

ところが、ここにイオンの磁気モーメントの向きを妨げるものがある。異方性エネルギーである。Fig.2.2.6 の超微粒子の結晶軸は粒子ごとに異なり、そのために容易軸方向も格子ごとに異なるため、磁化の方向も粒子ごとに異なる。

熱的ゆらぎの影響のみで全てのイオンの磁気モーメントが異方性エネルギーのピークを越す確率は、異方性エネルギーが大きいほど、また微粒子内の磁気モーメントの数が多いほ

ど小さくなる。従って、磁気モーメントを数多く含む微粒子が磁気モーメントの向きを変えるには長い緩和時間を要する。緩和時間は、前述の確率の逆数に比例するからである。

超常磁性を観測するためには、タイムスケールに比べて、この緩和時間が短くならなくてはならない。緩和時間が長い微粒子は単磁区構造の強磁性体であり、その間にしばしば向きを変えるような緩和時間の短いものは超常磁性体である。

超常磁性の緩和時間は、温度にも依存し、温度が高いほど磁気モーメントは活性化されるため、異方性エネルギーのピークを越えやすい。すなわち、緩和時間が短いのである。いいかえれば、 D_p は温度が高いと大きくなり、温度が下がると小さくなる。

なお、これまで緩和時間は粒子のサイズや温度で決定されると考えてきたが、粉体では緩和時間の長い粒子でも、液体に分散させコロイドにすると緩和時間を短くすることが出来る。その理由は、液体中では微粒子自体が回転できるからである。液体分子は絶えず超微粒子と衝突し、そのために超微粒子は絶えず動いている。これはブラウン運動と呼ばれる現象であるが、同時に向きも絶えず変わる。だから、磁化容易軸の向きが絶えず変動し、それに伴って超微粒子の自発磁化の向きが絶えず変わるのである。この場合、磁気モーメントの向きの変更は異方性エネルギーのピークを超える必要はないので、比較的大きい微粒子でもコロイドになれば超常磁性を示す¹⁴⁾。

2.2.2 コロイドの基礎理論

(a) 極性

固体表面では電子の偏在により静電場が生じており、その強さは pH に依存する。イオン結合している無機塩や金属酸化物表面は水と接触時、水和反応により水酸化物を形成するが、このヒドロキシル基 (-OH) の解離が pH によって変化するためである。Fig. 2.2.8 はアルカリ性水溶液中での解離を示す。金属酸化物表面は、アルカリ性水溶液中では負に、酸性水溶液中では正に帯電する。帯電がゼロとなる pH は等電点と呼ばれ、金属酸化物の種類によって異なる。本研究で用いる $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ (Maghemite) の等電点は 6.5 ± 0.2 である。

(b) 電気二重層

水溶液と接する粒子表面は、溶液中からのイオンの吸着、あるいは表面の解離反応によって表面電荷を帯びている。表面電荷と反対符号の溶液中の対イオンは静電的に表面電荷へと吸着し、イオン固定層を形成する。しかし、粒子表面からの距離が遠くなるにつれて表面電荷の影響力は弱まるため、対イオンはイオンの熱運動によってバルク溶液中へ拡散しようとする。その結果、固-液界面にはある程度の広がりを持った拡散電気二重層が形成される (Fig. 2.2.9)。粒子表面近傍のイオン固定層を Stern 層と呼び、Stern 層より外側の層を拡散層と呼ぶ。Stern 層と拡散層の境界は Stern 面と呼ばれ、最も表面に接近した対イオンの中心面で表面に化学的親和性を有するイオンが特異吸着を起こす面である。粒子表面から溶液にかけての電位の変化は Stern 層と拡散層の二つの部分に分けられる。Stern 層内には電

荷が存在しないので、電位は直線的に変化し拡散層へと続き、拡散層では指数関数的に変化していく (Fig. 2.2.10).

(c) 分散剤

分散剤として使用される界面活性剤は一つの分子中に極性基と非極性基の両方を持つような両親媒性の化合物で、親油基と親水基の数と構造に依存して界面活性度合が異なる。分子量が数千以上で界面活性機能を有するものを一般に高分子界面活性剤と呼ぶ。

粒子は粒子径の縮小に伴って比表面積が増大するため、表面自由エネルギーが増大することで不安定となる。そのため、粒子は凝集により見かけの表面積を減じて安定化しようとする。このような粒子の凝集を防ぐためには粒子の表面自由エネルギーを低下させなければならない。分散剤は、固体粒子の固/液界面に吸着し、固/液の界面エネルギーを低下させて微粒子化を促進する。さらに、微粒子化された粒子どうしの凝集に対してエネルギー障壁をもうけることにより、凝集を妨げ分散安定化をはかる。分散安定化をはかるための粒子どうしの接触に対する斥力には①イオン性分散剤が固体表面に吸着することで生じる静電的斥力、②固体表面に吸着した分散剤の吸着層で生じる立体障害的斥力の二つが考えられる。これらの斥力がファンデルワールスの引力より大きければ分散は安定化する。

(d) 高分子の吸着と分散作用

天然および合成高分子の多くは、コロイド粒子の表面に吸着して厚い吸着層を形成するので、分散系の安定性に大きな影響を与える。高分子吸着層の構造は一般にループ・テイル・トレイン構造をとる (Fig. 2.2.11)。すなわち界面に直接付着した **train** 層と溶液中に拡散した **loop** 層、**tail** 層から成っており微粒子の安定性には **loop** 層や **tail** 層の割合やそれらの長さが大きな影響を及ぼすものと考えられている。このような高分子の吸着性は高分子の種類とその分子量、担体表面の性質および溶媒の高分子に対する溶解性に影響される。

吸着担体は高分子吸着の **driving force** を決定する点で重要である。**driving force** としては静電気力、疎水結合力、ファンデルワールス引力、および水素結合力等が考えられるが、通常の系では二種類以上の力が同時に作用して高分子吸着が形成される場合が少なくない。一般的に言えることは負に解離した極性基を持つ高分子が明らかに負電荷の固体表面にも吸着することであり、静電気力が疎水性引力や高分子特有のエントロピー効果で打ち消されてしまうことである。この現象はタンパク質の固体表面への吸着の際によく見られる。

(e) 高分子吸着層の立体障害効果

立体障害効果とは定義に、分子内で互いに接近して存在する原始または原子団の間の交換反発力のために、正常な原子化の方向性をゆがめられたり、結合の周りの自由回転や共鳴現象が妨げられたりすることをいう。

例えば A と B という物質が反応するとする。反応が起こるためには A という攻撃試薬が

B の反応点近傍まで到達しなければならない。仮に反応点の周囲の空間をすでに他の原子や原子団が占有していた場合、A の接近は妨げられ、反応は起こりにくくなる。逆にその空間が空いていれば、反応がスムーズに行われることとなる。例えばハロゲン化アルキルの S_N2 反応の場合、反応点の近くに分子量の大きい置換基を導入すると、反応速度が著しく低下する。脱離基に対して背面からの攻撃の際、置換基と試薬の間で衝突を生じるからである。

(f) 高分子吸着層間の立体反発力

表面が高分子で覆われたコロイド粒子の凝集過程は、まず表面吸着層の接触—交叉することから始まるが、吸着層の重なりから生ずる安定化の原因として二つの概念が考えられている。一つは混合効果 (Mixing effect) または浸透圧効果 (Osmotic effect) であり、他は容積制限効果 (Volume restriction effect) である。これら二つの効果を合わせて高分子吸着層の立体反発効果と呼ぶ。混合効果は吸着層の重なりで高分子セグメント間の相互作用が増加し、セグメント-溶媒分子間の相互作用の数が減少することから生ずる効果で、用いる溶媒の性質で効果が著しく変化する。また、その反発効果は吸着層の厚さと吸着セグメント密度に比例することが知られている。一方の容積制限効果は、粒子の接近で吸着層が圧縮されて吸着高分子鎖の配座エントロピーが減少することにより生ずる反発力である。一般に容積制限効果で生ずる反発力は混合効果が生ずるより近距離で作用するので、現実の系では重要な効果は及ぼさないと考えられている¹⁵⁾。

(g) 立体反発力の大きさ

高分子吸着層の重なり合いで生じる自由エネルギー変化 (ΔG) は通常、エンタルピー項 (ΔH) とエントロピー項 ($-T\Delta S$) より成り立っている。吸着層の重なりで ΔG が負になれば凝集が進行し、正であれば安定効果として作用する。この吸着層間立体反発力の大きさは、Flory の高分子溶液論の立場から吸着層の重なりによる斥力式が初めて Fischer により導かれた。Fischer は吸着層の重なりにより生ずる化学ポテンシャルの過剰分が吸着層間の立体反発力 ΔV_s として作用すると考え、球状粒子表面間の ΔV_s に対し次の式を提出した。

$$\Delta V_s = \frac{4}{3} \pi k T B C_i^2 \left(\delta - \frac{H}{2} \right)^2 \left(3a + 2\delta + \frac{H}{2} \right) \quad (2.5)$$

ここで C_i は吸着層中のセグメント濃度、 δ は吸着層厚さ、 H は粒子間距離、 a は裸粒子の半径をそれぞれ表す。 B は吸着した高分子鎖・溶媒間の第二ビリアル係数で $B > 0$ で ΔV_s は正 (反発力) になるが、 $B < 0$ の貧溶媒中では引力になることが本理論の特徴である。なお、Fig. 2.2.12 に 高分子吸着層による立体安定化効果の模式図を示す。

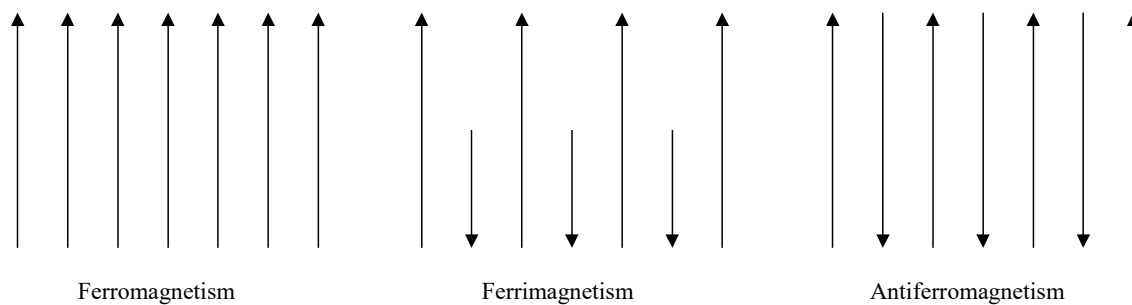


Fig. 2.2.1 Array of magnetic moment.

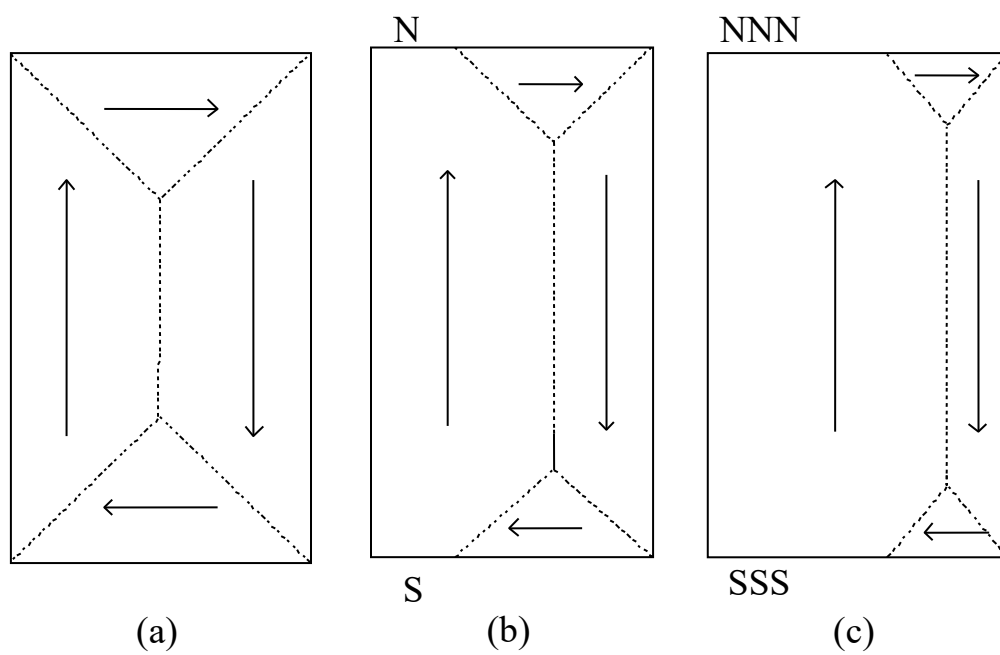


Fig. 2.2.2 Magnetic domain structure of ferromagnetic body.

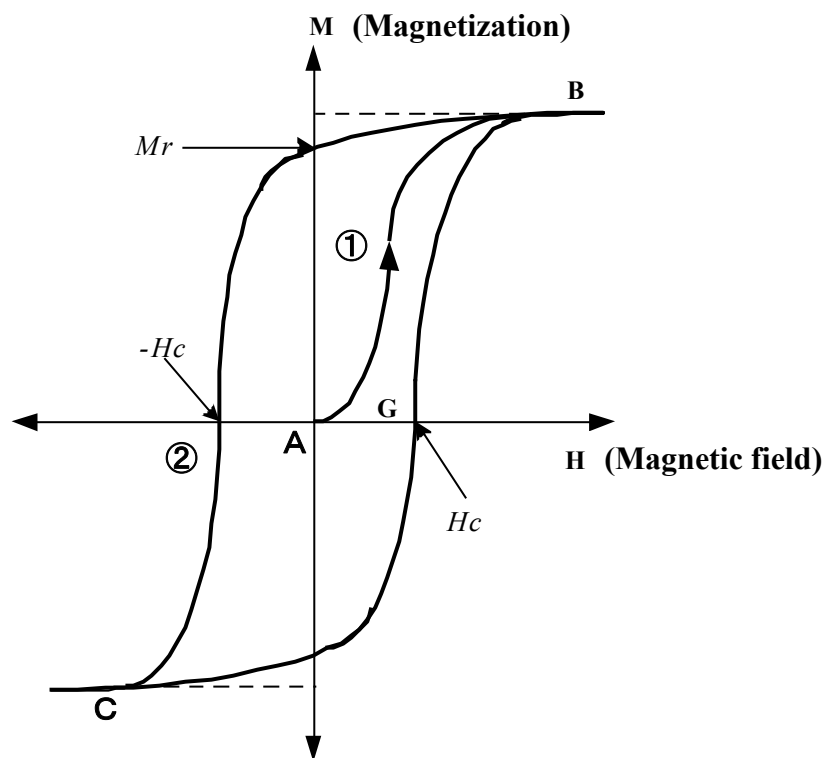


Fig. 2.2.3 Magnetization curve.

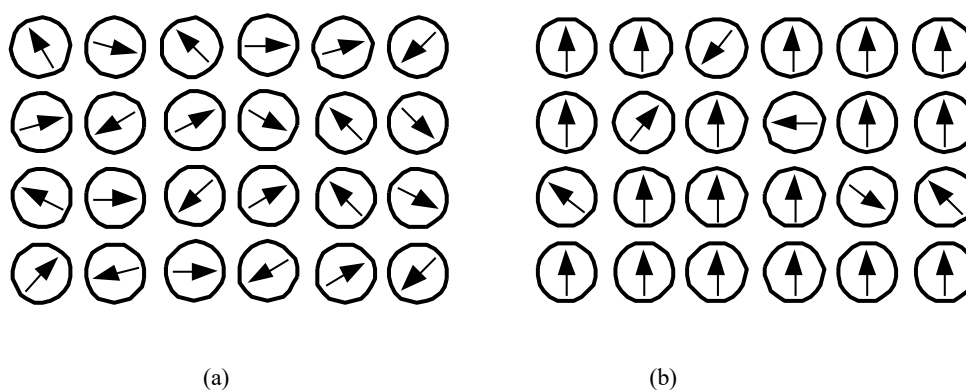


Fig. 2.2.4 Core electron and magnetic moment in each atom.

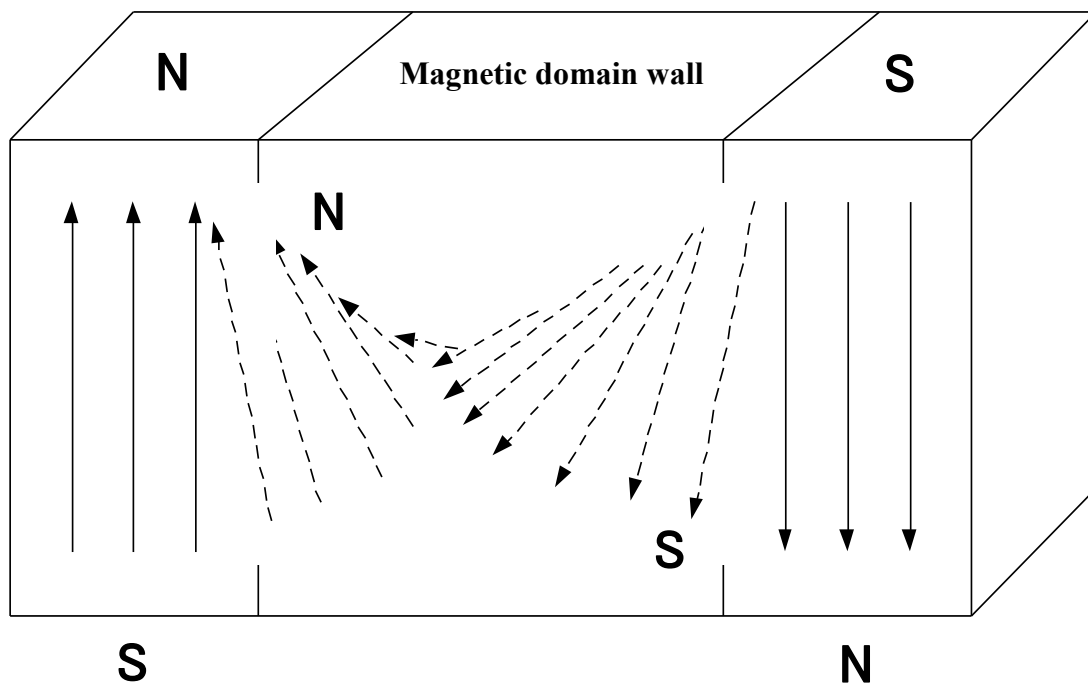


Fig. 2.2.5 Domain wall and magnetic moment.

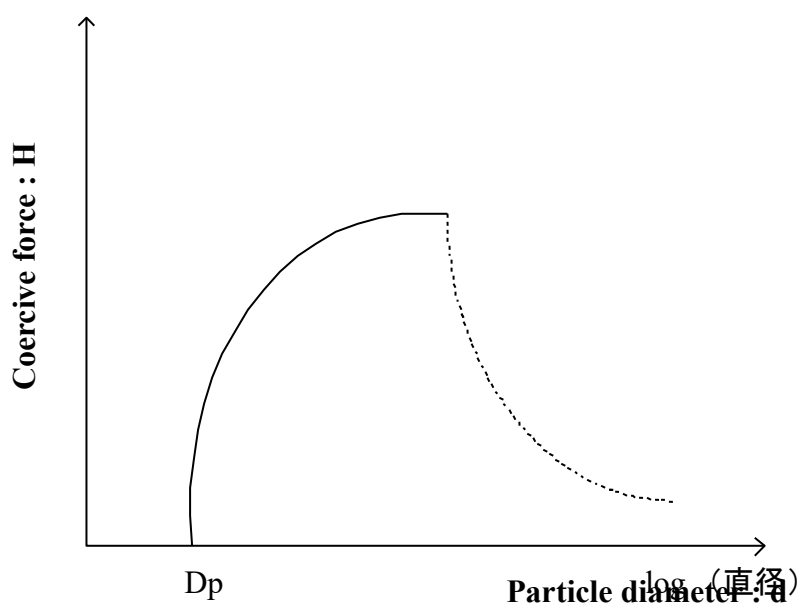


Fig. 2.2.6 Relation between particle size and coercivity of ferromagnetism particle.

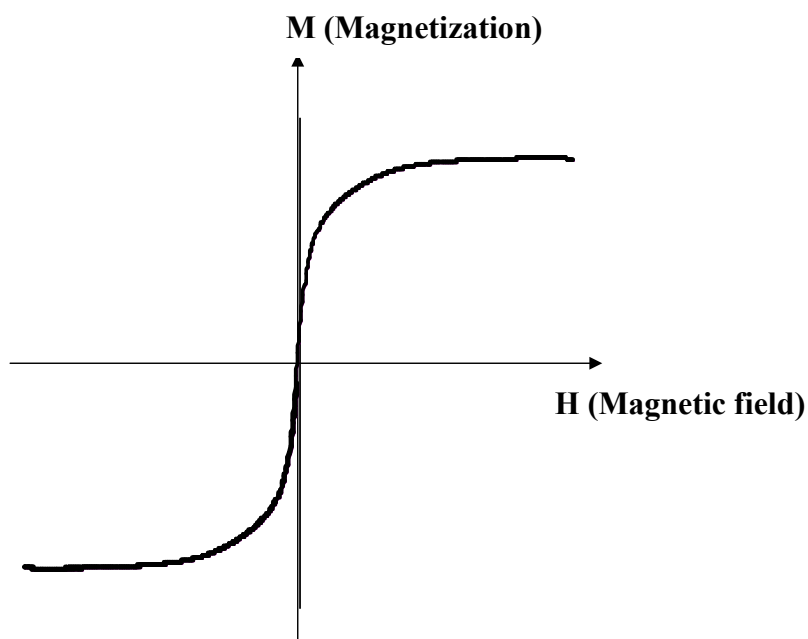


Fig. 2.2.7 Magnetization curve of superparamagnetic particle.

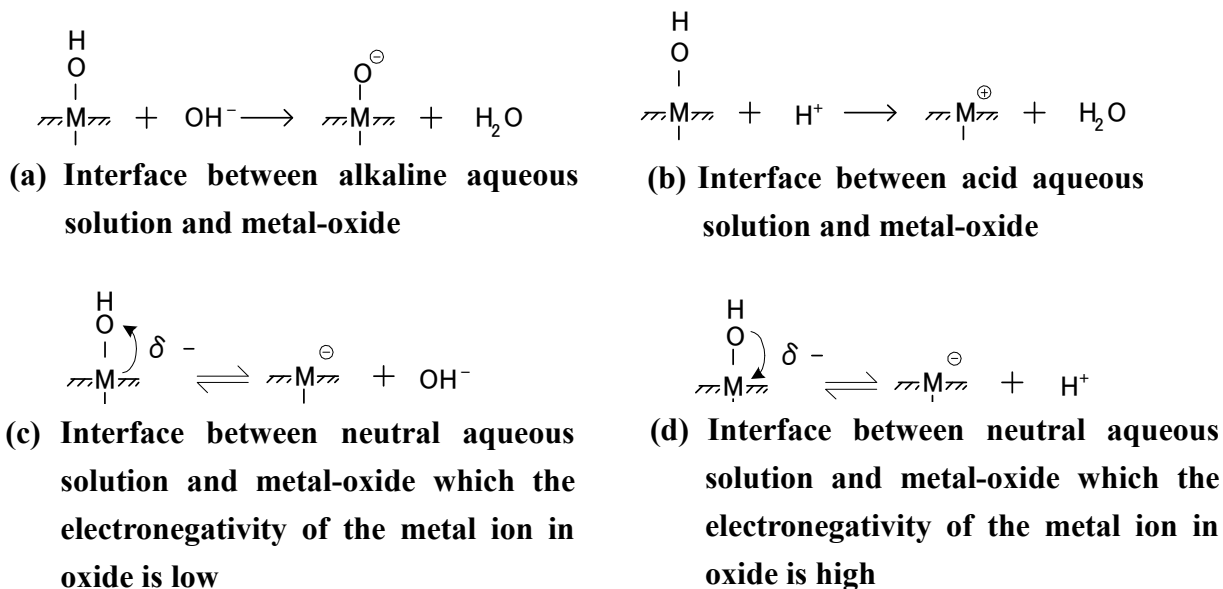


Fig. 2.2.8 Variation of solution interface.

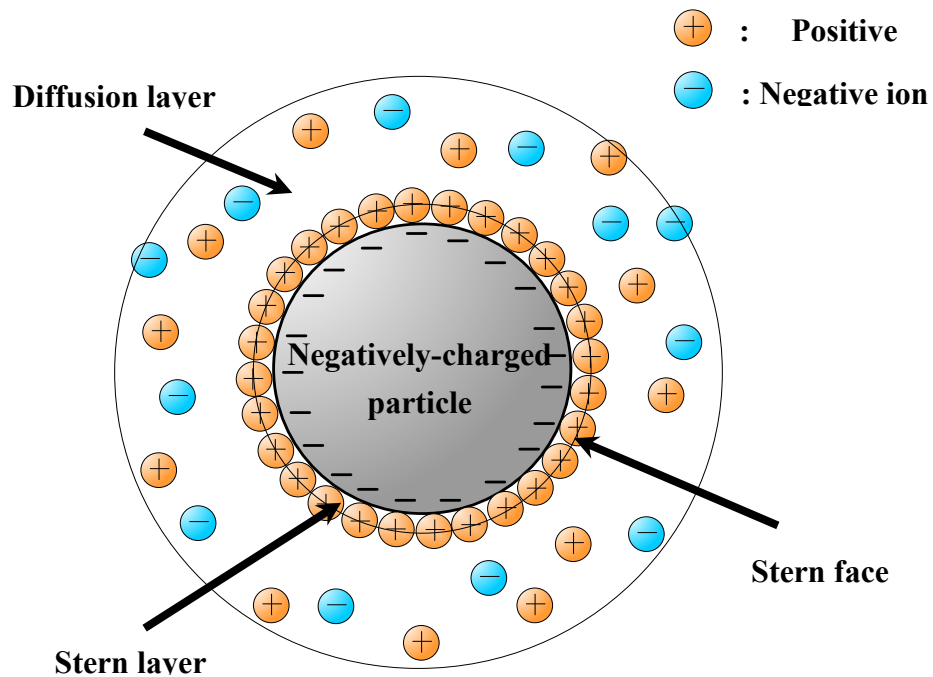


Fig. 2.2.9 electrical double layer.

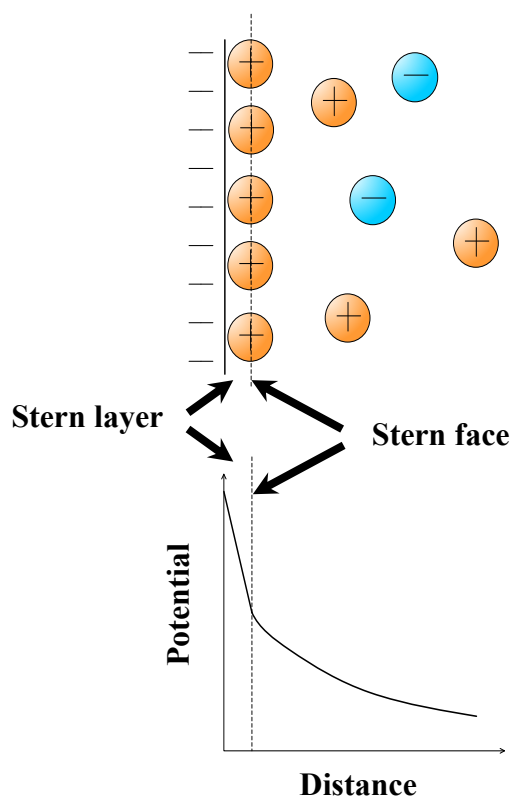


Fig. 2.2.10 Distribution of potentials of electrical double layer.

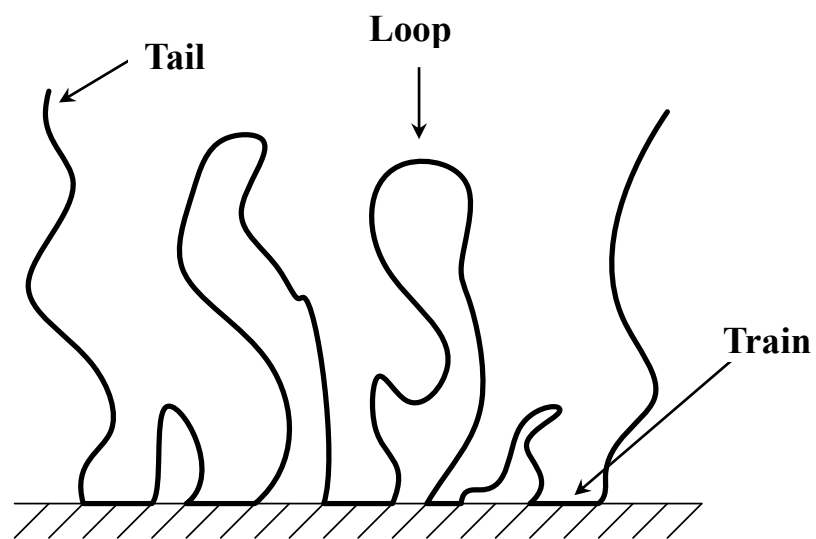


Fig. 2.2.11 Structure of loop·tail·train.

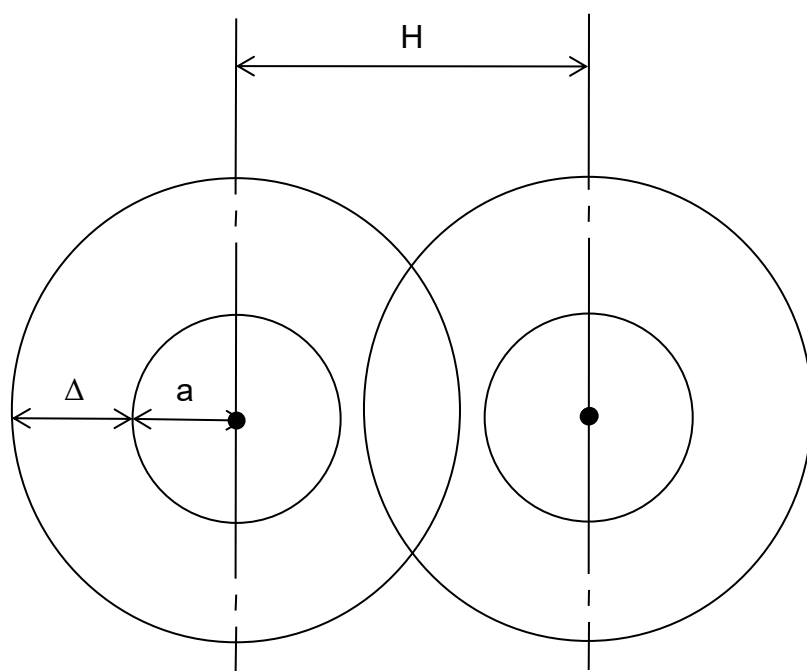


Fig. 2.2.12 Pattern diagrams of sterical stabilization effect by polymer adsorption layer.

2.3 高分子ゲル

ゲルとは溶媒に不溶の三次元的な網目状高分子構造によって形成される膨潤体またはその物質状態の総称である。網目状高分子構造の形成は化学結合に限らず、水素結合のような二次結合力により実現されるものも存在し、一般にゲルとして分類される物質は多岐にわたる¹⁶⁾。実例として、眼球組織の角膜や水晶体は生体分子より構成されるゲルの一種である他、ソフトコンタクトレンズなどの日用品としての利用も認められる。本節では、高分子ゲルの様々な特性などについて述べる。

2.3.1 ゲルの物理化学的性質

高分子ゲルについての主要な特徴を以下(1)~(3)に述べる。

- (1) 親和性溶媒との相互作用によって膨潤するが、架橋構造のため有限の膨潤性と体積を保持する。
- (2) 膨潤度は母材の架橋密度と相関を持ち、架橋密度に反比例して膨潤度は減少する。
- (3) 膨潤したゲルは固体と液体の中間の物質形態を有し、化学組成や作製方法など様々な以上の要因によってゾル状から、ある程度硬度を持つ固体まで変化する。

これらの特徴に示されるように、ゲルは多くの有機物質と比較して、水などの溶媒を極めて多量に吸収し内部に保持することができる。さらに、吸収・保持している溶媒を加圧などで短時間に放出することはないが外部環境の変化に応じて徐放するという特徴がある¹⁷⁾。

2.3.2 ゲルの分類¹⁸⁾

ゲルの三大構成要素は高分子・架橋点・溶媒である。一般的に各要素の性質やゲルの架橋方法、生成したゲルの特性などにより Table 2.3.1 のように分類される。

形態・サイズによる分類では、微粒子状のミクログエルと系全体が1分子のゲルであるような巨大分子化したマクログエルがある。構成成分に着目すると、タンパク質や多糖類などの天然高分子を構成成分とする天然ゲルと、合成高分子を構成成分とする合成ゲルがある。また、生体成分と合成物を組み合わせて生体との適合性を高め、特別の生体機能を賦与して医療やバイオテクノロジーに用いることを目的としたハイブリッドゲルも存在する。架橋方式による分類では、共有結合によって架橋点が形成される化学的架橋と水素結合やイオン結合による分子間相互作用や、高分子鎖の物理的な絡み合いによって架橋が形成される物理的架橋に大別される。一般に、化学架橋によって形成されるゲルは不可逆的状态を示すのに対して、物理架橋によって形成されるゲルの多くは温度、溶媒組成、pHなどの外部環境の変化によってゾル-ゲル状態を可逆的にとることができる。また、溶媒による分類では、水の場合ハイドロゲル、非水性有機溶媒の場合リポゲル、空気の場合エーロゲル、キセロゲルと呼ばれる。

2.3.3 ゲルの生成

(a) 高分子の三態¹⁷⁾

高分子は分子の集合体であり、蒸気になり得る程の熱エネルギーを与えると共有結合が破壊され、高分子構造は崩壊する。つまり沸点は存在しない。また、結晶性高分子は融点を示すが、非結晶性高分子についてはこれを示さない。結晶性高分子であっても融点は明確でなく幅がある。ちなみに高分子の融点には T_m という記号が用いられる。 T_m に幅があることは、高分子が低分子と異なって分子量分布、分枝、立体配置の異なる繰り返し単位の混在など、分子構造に不均一性をもつことに由来する。加えて、高分子にはガラス転移点(T_g)が存在する。肉眼での観察は困難であるが、硬いガラス状から柔らかいゴム状に可逆的変態現象である。融点とは異なり、 T_g は非晶領域を形成している分子鎖の運動の活発化に起因するものであり、一般的に $T_g < T_m$ となる。Fig.2.3.1は、非晶性高分子と結晶性高分子について温度に対する比容をプロットしたものであるが、 T_g が屈曲点として観察されるのに対し、 T_m は不連続な階段状のプロットとして観察される。この T_m の階段における熱の出入りは融解熱である。同時にFig. 2.3.1は、ある温度における高分子の状態を示している。非晶性高分子は T_g より低温では固体のガラス状態Aにあつて硬くて脆い性質を示し、 T_g より高温になるとゴム状態Bを経てCの液体状態に移る。一方、結晶性高分子の曲線は、 T_g 以下の領域Dでは非晶部分と結晶部分が混在していて強靱な固体状態にあり、 T_g と T_m の間の領域Eではゴム状態の非晶部分と結晶部分が混在していて弾力ある固体の性質を示し、そして T_m 以上ではゴム状態Fを経て液体状態Gへと移行していくことを示している。

(b) アルギン酸のゲル化プロセス

Table 2.3.1 に示す通り、ゲルの架橋方法には物理的架橋法と化学的架橋法がある。アルギン酸のゲル化現象についてはイオン結合による架橋で説明づけられるため物理的架橋方法に分類される。アルギン酸は酸性領域、または中性領域において水に不溶な物質であり、ゲル材料の母材として利用する場合は主にナトリウム塩を形成したものが使用される。アルギン酸の一般的なゲル化プロセスは、アルギン酸 (Fig.2.3.2) の繰り返しユニット中に存在するカルボキシル基に対して、他の多価金属塩が反応することによって二つの物質間に金属錯体が形成されることに由来する。Fig. 2.3.2 に示す通り、アルギン酸は β -D-マンヌロン酸 (M unit) と α -L-グルロン酸 (G unit) の二種の単糖により形成される高分子であり、MユニットとGユニットのランダムな配向によって (M-M), (G-G), (M-G) といった3種のブロックが高分子構造中に存在している。アルギン酸のゾルゲル転移はFig. 2.3.3 に示すようなEgg box junction と称される構造をとるが、そのゲルの強度や硬度といった物理的性質の大部分は母材となるアルギン酸中に存在するMユニットとGユニットの割合に依存する。

2.3.4 高分子ゲルの体積相転移¹⁷⁾⁻¹⁹⁾

高分子ゲルは特定の外部環境の変化に伴い膨潤・収縮応答を示し、体積相転移はこのよう

な膨潤特性によって誘起される相変態現象である。高分子ゲルの体積相転移は、一般的にマクロな観点から浸透圧の概念に基づいて説明される。特に、電解質多糖から成るゲルについては立体化学の観点からクーロン斥力によって生じる分子構造の変化に由来する浸透圧も影響する。ゲルの体積相転移理論における浸透圧 Π は次式で示される。

$$\Pi = \Pi_{el} + \Pi_{mix} + \Pi_E + \Pi_D \quad (*)$$

以下に、上記(*)式における右辺各項の浸透圧について簡潔に述べる。

(a) ゴム弾性による浸透圧

ゴムは高分子の三次元の網目からなっており、ゲルの溶媒を除いたものに相当する。ゴムの持つ弾性は、網目を構成している各高分子鎖の持つ弾性による。ここで高分子鎖モデルとして、単位長さ l の線分を自由に折れ曲がるジョイントで繋げたものを考える。この高分子鎖の二つの端を固定して、ジョイントをいろいろに動かしたときに高分子鎖がどれだけの数の異なった構成をとりうるかが状態密度を決定する。この問題は、三次元のランダム・ウォークの問題と等価である。状態密度 W は、線分の数 n が大きいとき、両端間の距離 x の関数として、式(3.1)のガウス分布で与えられる。

$$W(x)d^3x = \exp\left(\frac{-3x^2}{2nl^2}\right)d^3x \quad (3.1)$$

$W(x)4\pi x^2 dx$ は $x \sim \sqrt{nl}$ に極大値をとる。したがって、高分子鎖は平衡状態では、ランダム・ウォークの平均のコンフィギュレーション ($x \sim \sqrt{nl}$) にあり、高分子鎖を引っ張れば縮む力が生じ、押せば伸びようとする力が生じる (Fig. 2.3.4)。一本の高分子鎖に働く浸透圧は、

$$\Pi = \frac{-\partial \left[kT \ln \left\{ \frac{W(x)dx}{W(x_0)dx_0} \right\} \right]}{\partial V} \quad (3.2)$$

$$= \frac{2}{3x^3} kT \left\{ \left(\frac{x_0}{x} \right)^3 - \left(\frac{x_0}{x} \right) \right\} \quad (3.3)$$

式(3.3)で、 $x > x_0$ ならば圧力は負、 $x < x_0$ ならば正になることを示す。高分子の長さ x を体積 $V=x^3$ に直すと、

$$\Pi_{el} = \frac{2}{3V_0} kT \left\{ \left(\frac{V_0}{V} \right) - \left(\frac{V_0}{V} \right)^{\frac{1}{3}} \right\} \quad (3.4)$$

となる。 V_0 はランダム・ウォークの状態 (以下、標準状態) でのゲルの体積である。式(3.4)の第一項は一個の気体分子の圧力と同じであり、高分子における重心の並進の自由度によるものである。第二項はフックの法則に従うバネの圧力と等価である ($F=-kx$)。このような高分子を架橋してゲルを形成すると、その圧力は、

$$\Pi_{el} = \nu kT \left\{ \left(\frac{\varphi}{2\varphi_0} \right) - \left(\frac{\varphi}{\varphi_0} \right)^{\frac{1}{3}} \right\} \quad (3.5)$$

となる。これがゲルのゴム弾性による浸透圧である。ここで、 ν は標準状態における単位体積あたり的高分子の数である。また、 φ はゲル中でのゲル網目の体積分率を表し、体積と一対一の関係にあり $\varphi = \varphi_0 \frac{V_0}{V}$ (φ_0 は標準状態でのゲル網目の体積分率) である。式(3.5)の第二項に”2”が付けられたが、これは高分子が架橋により他の高分子と結合し固定されるので、その自由度が減るためである。

(b) 高分子セグメントと溶媒との相互作用による浸透圧

高分子の他の高分子に対しての親和性は、溶媒に対する親和性と異なる。前者の方が大きければゲルは縮もうとし、後者が大きければゲルは膨潤しようとする。高分子のセグメントが他のセグメントと接触しているときの自由エネルギーを ΔF_{pp} 、セグメントと溶媒、溶媒と溶媒との接触の自由エネルギーをそれぞれ $\Delta F_{ps}, \Delta F_{ss}$ とすると、ゲルにはたらく相互作用の浸透圧は、

$$\Pi_{mix} = - \left(\frac{\Delta F}{2\nu_0} \right) \varphi^2 \quad (3.6)$$

$$\Delta F = \Delta F_{pp} + \Delta F_{ss} - 2\Delta F_{ps} \quad (3.7)$$

である。また、 ν_0 は溶媒一個の体積を表す。式(3.6)の中の φ^2 の項は、高分子セグメントが、他の高分子のセグメントと接触する確率を表す。相互作用の自由エネルギー ΔF は、ゲルや溶媒の組成によって変化する。

(c) 高分子網目と溶媒の混合エントロピーによる浸透圧

固液二相混合物質であるゲル内部では、各々の存在によって互いが束縛しあったエントロピーの高い状態にある。そこで、エントロピーに起因する浸透圧についても考慮する必要がある。いま、標準状態の網目と一定の体積の溶媒があるとして、自由エネルギーを計算する際の基底状態を決める。網目を標準状態の体積 V_0 から最終の体積 V まで変化させる。溶媒を最終の体積にする。このときのエントロピー変化が混合エントロピーと呼ばれる。配位によるエントロピー変化 ΔS は、

$$\Delta S = n \cdot \ln(1 - \varphi) \quad (3.8)$$

式(3.8)のように近似できる。ここで、 n は溶媒分子の数である。混合エントロピーによる浸透圧 Π_E は、

$$\Pi_E = \frac{-\partial(kT\Delta S)}{\partial V} \quad (3.9)$$

$$= \left(\frac{kT}{v_0} \right) [\ln(1-\phi) + \phi] \quad (3.10)$$

となる。ここで、 $n = \left(\frac{V}{v_0} \right) (1-\phi)$ なる関係を用いた。この浸透圧はセグメント数をパラメ

ータとした温度と体積分率の関数であり、セグメント数が大きいほど、高い体積分率での Π_E の起伏は平坦化していく。

(d) 対イオンによるクーロン斥力の影響

電解質高分子は特定の水溶液中において、ユニットに存在する官能基の解離・イオン化によって高分子鎖状に多数の電荷を帯びる。そのため、電荷間には必然的にクーロン斥力が発生して高分子鎖が伸長するためゲルの膨潤が進行する。また、異なる pH 雰囲気を持つ特定の水溶液中においては、ユニット中の官能基の解離が生じないため高分子鎖は収縮する。また、高分子鎖に存在する電荷はゲルの浸透圧に影響を及ぼす。例えば、ゲルの網目が負にイオン化していると考え、ゲル全体の電荷はゼロなので、網目の電荷と等量の電荷をもった対イオンが網目の中に存在し、動きまわっている。これらの対イオンはゲルの外にはほとんど存在しないので、ゲルの表面で大きな濃度勾配ができ、ゲルの外に拡散しようとする。しかし、拡散を始めるとゲルの表面に電荷の二重層ができ、それが内向きの電場をつくり、ゲルの内外にポテンシャル差を生み出す。これはドナーポテンシャルと呼ばれ、対イオンはゲルの中に閉じ込められている。自由な気体分子が箱の中に閉じ込められているようなもので、このような対イオンはゲルの”壁”（ドナーポテンシャルの壁）に圧力 Π_D を及ぼす (Fig. 2.3.5)。

$$\Pi_D = f\nu kT \left(\frac{\phi}{\phi_0} \right) \quad (3.11)$$

ここで、 f は高分子一本あたりの対イオンの数であり、 $f\nu$ は標準状態における単位体積あたりの対イオンの数に相当する。

Table 2.3.1 Classification of the gels.

Classification	Type	Characteristic
Form or Size	Microgel, Bulkgel	Macroscopic
	Microgel, Gel-particles	Microscopic
The base material (polymer)	Natural-gel...①	Protein, Polysaccharide etc...
	Synthetic-gel...②	Organic polymer or Inorganic polymer
	Hybrid-gel	Integration ① and ②
Cross-linking method	Chemical-gel	Formation by covalent-bond
	Physical-gel	Intermolecular interaction, Physical entanglement etc...
Solvent	Hydrogel	Water
	Lipogel	Oil-based
	Aerogel, Xerogel	Air

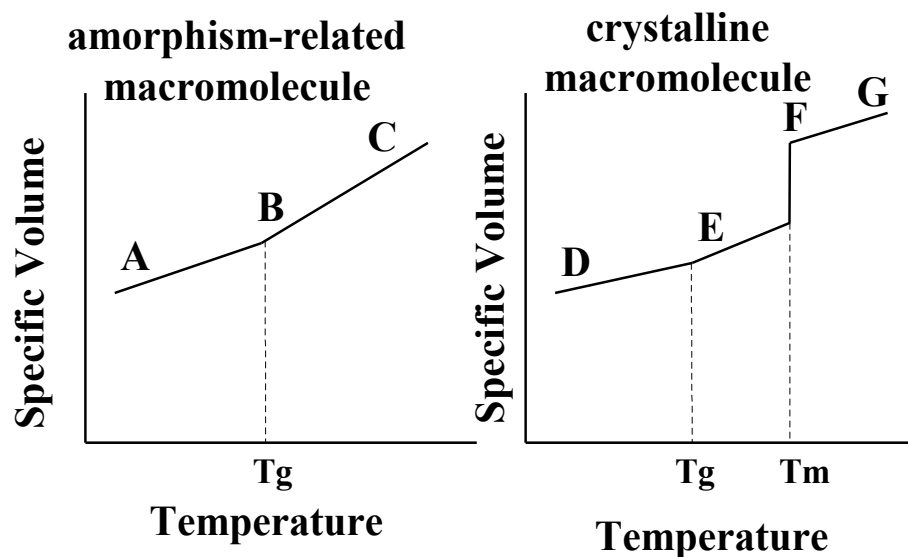


Fig. 2.3.1 Temperature change of specific volume of Amorphous macromolecule and crystalline macromolecule.

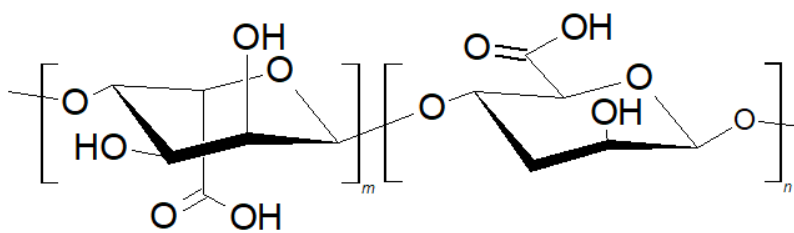


Fig. 2.3.2 Structural formula of alginic acid.

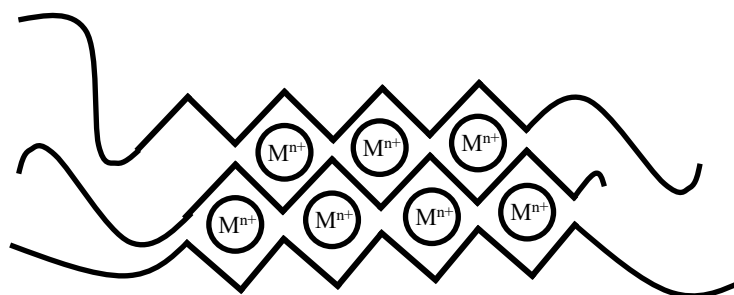


Fig. 2.3.3 Schematic diagram of Egg box junction type gel structure.

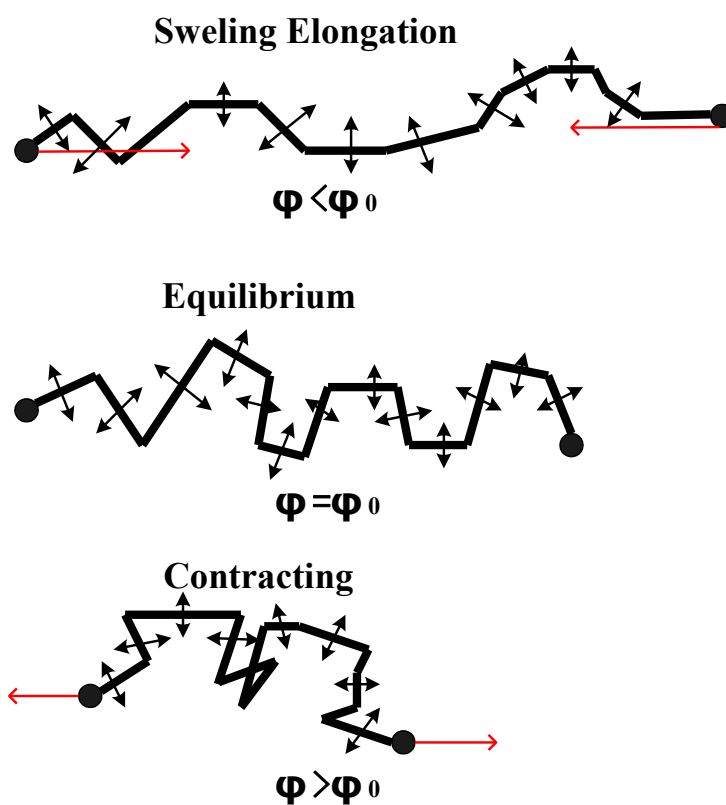


Fig. 2.3.4 Seepage pressure by rubber elasticity.

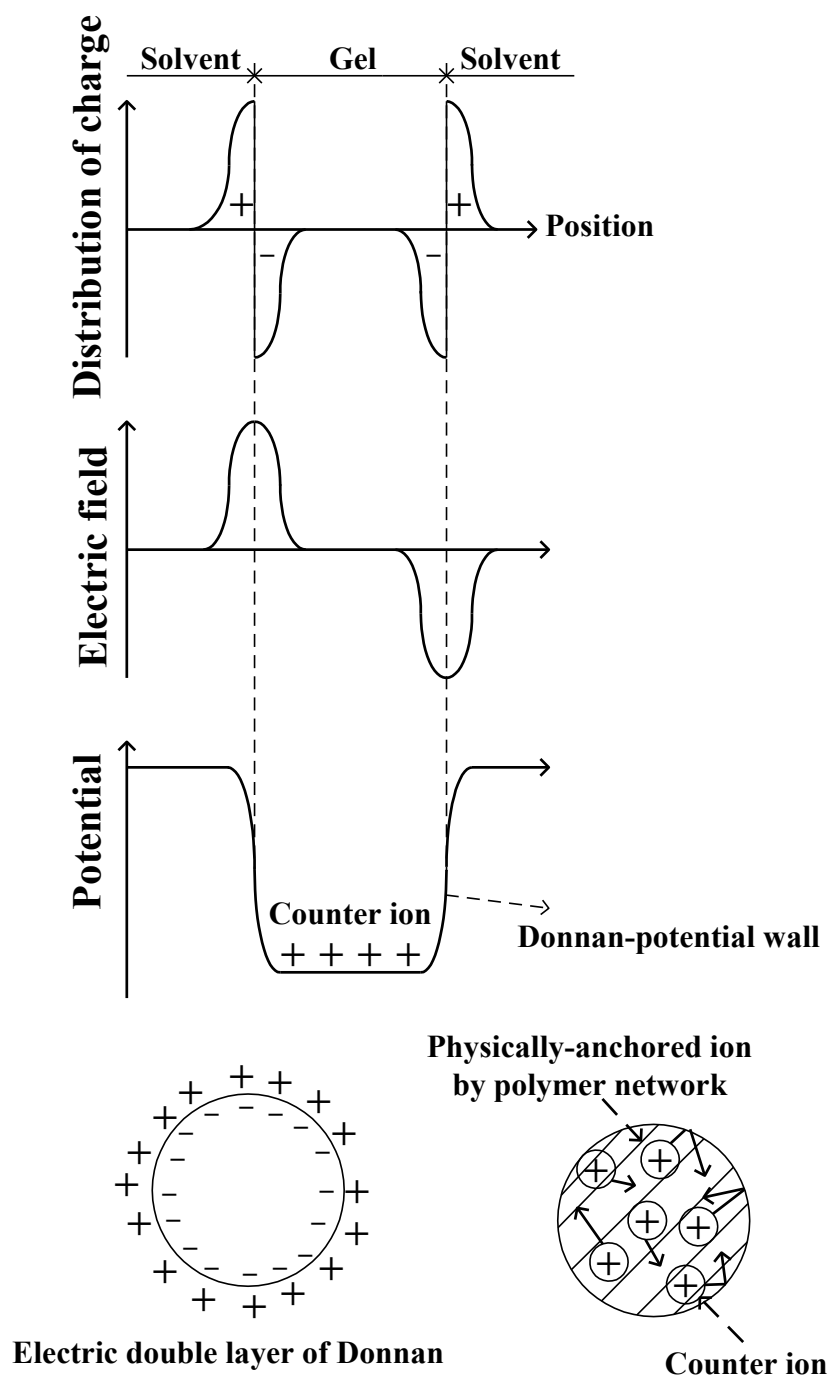


Fig. 2.3.5 Seepage pressure by counter ion.

3. 試料作製

3.1 アルギン酸と PEG 誘導体の合成に関する材料設計

本研究では、DDS 基材への応用を考慮した高分子材料として、アルギン酸の側鎖に対して PEG 鎖を付加したグラフト共重合体の作製を試みた。その際、アルギン酸と PEG 誘導体の重合についてアミド結合を採用したため、PEG 化に使用する PEG 誘導体に対して固定端となる官能基をアミノ基へと変換する操作を施した。本節では、PEG 誘導体片端のアミノ化に使用した試薬とその手順、アミド結合によるアルギン酸の PEG 化に使用した試薬とその手順について述べる。

3.1.1 アミド PEG 化アルギン酸の作製

(a) メトキシ PEG のアミノ化に使用した試薬

本研究では、アミド結合による高分子の PEG 化を行うために、メトキシ PEG (PEG methyl ether) の末端にある水酸基 ($-OH$) をアミノ基 ($-NH_2$) へと置換したメトキシ PEG アミン (α -amino- ω -methoxypoly(ethylene glycol)) の生成を行った。このように、有機化合物にアミノ基を導入する操作をアミノ化 (amination) と呼ぶ。また、メトキシ PEG やメトキシ PEG アミンのように PEG の構造の一部が変化した化合物のことを一般に PEG 誘導体と呼ぶ。本研究では三段階にわたる有機合成を行うことにより、メトキシ PEG をアミノ化することでメトキシ PEG アミンの合成を行った。以下にメトキシ PEG アミンを得る際に用いた試薬や溶媒について述べる。

(i) ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol, PEG)

略称 PEG。エチレングリコールの重合体。飽和炭化水素の直鎖炭素鎖であり、両末端に水酸基を有したポリエーテルである。官能基に水酸基、アルコキシ基を有する。Fig. 3.1.1 (a) に PEG の構造式を示す。エチレンオキシドのアルカリによるアニオン重合、プロトン開始によるカチオン重合により合成される。分子量 200~600 のものは液体、1000 以上のものは固体である。低分子量のものは吸湿性および親水性が大きく水溶性であり、高分子量のものも水溶性である。脂肪族炭化水素に不溶、芳香族炭化水素に可溶。親水性と親油性を備えているので非イオン性界面活性剤として使用することができ、化粧品の乳化剤や中性洗剤などに用いられている。本研究では通常の PEG を使用した場合、PEG と高分子との脱水縮合を行う工程において両末端の水酸基が反応を起こし、高分子鎖どうしが PEG を介して架橋反応を生じ、生成された材料が難溶性となる恐れがあるため、片側末端がメチル基に置換されたメトキシ PEG を用いた。その際、試薬はシグマアルドリッチ(株)製の平均分子量 2000, 5000, 10000 の三種類を使用した。三種とも室温において固体であり、平均分子量 2000, 5000 のものは白色フレーク状、平均分子量 10000 のものは白色の粉体である。メトキシ PEG

の構造式を Fig. 3.1.1 (b)に示す.

(ii) *p*-トルエンスルホニルクロリド (*p*-Toluenesulfonyl chloride)

分子式 $C_7H_7ClO_2S$, 分子量 190.65. トルエンとクロロスルホン酸の反応によって得られ, メチル基 ($-CH_3$) とスルホニル基 ($-S(=O)_2-$) はベンゼン環に対して対称のパラ (*para*, *p*) の位置関係にある. スルホニル基を含む化合物の中には語尾に *-syl* を持つ慣用名が使われるものがある. そのため, 別名として塩化トシル (Tosyl chloride) とも呼ばれ, TsCl と略記される. また, (*p*- $H_3CC_6H_4S(=O)_2-$) の 1 価の基をトシル基と呼び, Ts と略記される. TsCl は塩基の存在下にアルコールやフェノールのヒドロキシ基と縮合させ, 求核置換反応や脱離反応に対する反応性を強める目的で用いられる. アルコールと縮合してできるスルホン酸エステルはトシラート (tosylate), トシル基を導入する反応はトシル化 (tosylation) と呼ばれる. 刺激臭を発する白色結晶性粉末であり, アルコールやエーテル, ベンゼンなどの有機溶媒に可溶, 水に不溶. 融点 $68^\circ C$, 沸点 $146^\circ C$. TsCl は水との接触により加水分解し有毒なガスを発生させるので, 保管するにあたり湿気は避ける. 本研究では東京化成工業 (株) 製の試薬を用いた. Fig. 3.1.2 に TsCl の構造式を示す.

(iii) テトラヒドロフラン (Tetrahydrofuran)

略称 THF. 分子式 C_4H_8O , 分子量 72.11. フランの水素化や 1,4-ブタンジオールの脱水によって得られる. 飽和の 5 員環に酸素を 1 つ含んだ環状エーテル化合物で, 自由に水と混和し, 多くの有機化合物や高分子を溶解する. そのため, 溶媒として使用されることが多く, 本研究においてもメトキシ PEG をトシル化する際の溶媒として用いた. 芳香を持つ無色の液体であり, 沸点 $66^\circ C$, 融点 $-108.5^\circ C$. また, 引火点が $-14.5^\circ C$ と低く, 日本では消防法により危険物第四類 (第一石油類 危険等 2 水溶性) に指定されている. 本研究ではナカライテスク (株) 製の特級試薬を用いた. Fig. 3.1.3 に THF の構造式を示す.

(iv) ジクロロメタン (Dichloromethane)

分子式 CH_2Cl_2 , 分子量 84.93. 慣用名は塩化メチレンといい, DCM, MDC などと略記される場合もある. メタンの水素原子 2 つをハロゲン原子に置換したジハロメタンに分類される. 工業的には, メタン (CH_4) やクロロメタン (慣用名は塩化メチル, CH_3Cl) を $400\sim 500^\circ C$ の温度条件下において気相で塩素とラジカル反応させることで得られる. CH_3Cl は CH_4 よりも早く塩素化されるため, 本製法では CH_4 の H が Cl で多置換されたハロメタンの混合物が生じる. この混合物から副生成物の塩化水素を除去した後, 蒸留によって CH_2Cl_2 のみを精製する. CH_2Cl_2 は多くの有機化合物を溶解し, 水と混ざらず沸点が低いなどの条件を備えているため, 有機化学においてはクロロホルム ($CHCl_3$) と並んで利用される溶媒である. 本研究では主に抽出操作の有機層の溶媒として使用した. 通常, 有機溶媒は水よりも密度が小さいため, 抽出時の上層が有機層であるが, CH_2Cl_2 や $CHCl_3$ などのハロゲン系溶媒は水よりも比重が大きいため下層となる. また, CH_2Cl_2 は産業用の溶媒やペンキの剥がし剤, 部品の脱脂など広く使われている他, コーヒーのカフェインの除去や風味の抽出にも用いられる. 常温では無色で強く甘い芳香をもつ液体で, 極めて多くの種類の有機化合物を溶

解する。沸点 40°C, 融点 -95.1°C. 本研究ではナカライテスク (株) 製の特級試薬を用いた。Fig. 3.1.4 に CH_2Cl_2 の構造式を示す。

(v) 硫酸マグネシウム (Magnesium sulfate)

組成式 MgSO_4 , 式量 120.37. エプソム塩 (エプソムソルト) とも呼ばれる。無水物のほかに一, 三, 七水和物も知られている。天然には七水和物 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ として存在し, 硫苦と呼ばれる。七水和物は無色粉末で, 70°Cで一水和物, 200°Cで無水物となり, 1124°Cで分解する。無水物は水と反応して水和物を生成するので, 有機合成の分野において, 乾燥剤として汎用されている。本研究でも抽出後の有機層に含まれている水分を脱水するために無水物を使用した。その他の用途として, 便秘, 低マグネシウム血症, 子癇, 子宮運動抑制薬などの医薬品や農作物の肥料が挙げられる。無水物は吸湿性のある白色結晶性粉末で, 水分と反応して発熱する。水に易溶, エタノールに微溶。融点 1185°C. 本研究ではナカライテスク (株) 製の特級試薬を用いた。

(vi) ジエチルエーテル (Diethyl ether)

分子式 $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ (示性式 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$), 分子量 74.12. しばしば Et_2O と略記される。単にエーテルというときはこの Et_2O のことを指す場合が多い。硫酸のような強酸を触媒としたエタノールの脱水縮合で合成できる。ただし, この反応は 150°C以下の温度条件下で行わなければならない。これは, 高温になるとエタノールが脱水してエチレンが生成してしまうためである。工業的には, エチレンから気相水とでエタノールを合成する際の副生成物として発生するものが利用されている。またエタノールからアルミナを触媒とした気相脱水でも合成される。 Et_2O は有機合成の際に溶媒としてよく用いられる。本研究では Et_2O に不溶な PEG 誘導体を再沈殿させるために用いた。特徴的な甘い臭気を持つ無色透明の液体で, 水にやや溶けやすい。沸点 35°C, 融点 -116°C. 引火点 -45°Cであり非常に引火性が高い。本研究ではナカライテスク (株) 製の特級試薬を用いた。Fig. 3.1.5 に Et_2O の構造式を示す。

(vii) アセトニトリル (Acetonitrile)

分子式 $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ (示性式 CH_3CN), 分子量 41.05. しばしば AcNt と略記される。 CH_3CN は一般に $\text{R}-\text{C}\equiv\text{N}$ で表されるニトリルの中でも最も単純な構造をもつ。プロピレンにアンモニアと酸素を金属酸化物触媒の存在下で作用させるとアクリロニトリル (CH_2CHCN) を得られる。この工業的製法をソハイオ法もしくはアンモ酸化と呼ぶが, その際の副産物として CH_3CN が得られる。 CH_2CHCN を 100L 製造するとき, 2~4L の CH_3CN が共に得られる。無機塩の非水溶媒あるいは化学工業製品の原料や分析化学用の溶媒として用いられる。本研究ではトシル化 PEG から求核置換反応によって PEG フタルイミドを得る際の溶媒として用いた。 Et_2O の様な独特の臭気を持つ無色の液体。水と任意の割合で混合する非プロトン性極性溶媒で EtOH や Et_2O などの多くの有機溶媒にも極めて溶けやすいが, 石油エーテル (ペンタンやヘキサン) などのパラフィン系溶媒とは分離する。沸点 82°C, 融点 -46°C. 引火点 -12.8°Cであり可燃性で, 大きな誘電率 37.5 (20°C) を持つ。本研究ではナカライテスク (株) 製の特級試薬を用いた。Fig. 3.1.6 に CH_3CN の構造式を示す。

(viii) フタルイミド (Phthalimide)

分子式 $C_8H_5NO_2$, 分子量 147.13. 融点 $232^\circ C$ の昇華性のあるプリズム晶. 無水フタル酸とアンモニアあるいは炭酸アンモニウムとを加熱して製造する. ヘキサン, エーテル, ベンゼン, $CHCl_3$, 水などには溶けにくく, ジメチルホルムアミド, 熱時アルコール, 酢酸には溶解する. フタルイミドのイミド水素の酸性度は高く, 濃いアルカリ水溶液にはよく溶ける. 本研究ではフタルイミドのカリウム塩であるフタルイミドカリウム (Phthalimide potassium salt, 分子式 $C_8H_4KNO_2$, 分子量 185.22) を用いた. また, 試薬は東京化成工業 (株) 製のものを使用した. フタルイミド塩は求核性が高く, フタルイミドカリウムはアルキルハライド等と反応させるGabriel合成と呼ばれる一置換アミン合成法の原料として有用である. フタルイミドカリウムは水に可溶性白色粉末で融点は $300^\circ C$ 以上である. Fig. 3.1.7 にフタルイミドカリウムの構造式を示す.

(ix) ヒドラジン (Hydrazine)

分子式 H_4N_2 (示性式 H_2NNH_2), 分子量 32.05. 無機化合物の一種であり弱塩基. 次亜塩素酸塩を用いてアンモニアを酸化することにより得られる. アンモニアを塩素で気相酸化して H_2NNH_2 を得る製法もある. アンモニアに似た刺激臭を持つ無色の液体で, 空気に触れると白煙を生じる. 沸点 $114^\circ C$, 融点 $2^\circ C$. 水やエタノールに極めて溶けやすく, 強い還元性を示し分解しやすい. また, 引火性があるのでロケットや航空機, ミサイルの燃料や人工衛星や宇宙探査機の姿勢制御用の燃料など, 燃料として幅広く用いられている. さらに, 脱酸素剤として高圧ボイラーの防食剤として使用されている. 毒物であり, 気化吸引および皮膚への接触ともに腐食をもたらす. また中毒症状をおこす. 自然発火温度はさまざまであり, 錆びた鉄の表面では $24^\circ C$ で自然発火する. 通常, 化学実験で用いる際にはヒドラジン一水和物 (示性式 $H_2NNH_2 \cdot H_2O$, 分子量 50.06) が用いられ, 本研究でも PEG フタルイミドのフタルイミド基をアミノ基へと還元する際の還元剤として, ナカライテスク (株) 製の特級試薬の $H_2NNH_2 \cdot H_2O$ を使用した. Fig. 3.1.8 に H_2NNH_2 の構造式を示す.

(b) アミド PEG 化アルギン酸

当研究室ではこれまでにメトキシ PEG をコンドロイチン硫酸 C (Chondroitin sulfate C: CSC) に付加させた PEG 化 CSC の作製が行なわれてきた. この際, CSC が有するカルボキシル基 ($-C(=O)-OH$) とメトキシ PEG が有する水酸基に着目し, エステル化 (esterification) によってメトキシ PEG と CSC を縮合させることで合成が行なわれた. エステル化とはカルボン酸とアルコールを反応させ, カルボキシル基一つと水酸基一つから水分子一つが失われて (脱水縮合) エステルを形成させる反応であり, このとき生成する $-C(=O)-O-$ の結合をエステル結合と呼ぶ. Fig. 3.1.9 (a) に一般的なエステル化の反応式を示す. しかし, エステル化は主に有機溶媒中で用いられる反応であるため, 水溶媒の生体材料として用いる際に, エステル結合部分では加水分解の進行による高分子と PEG 誘導体の分離が懸念される. そこで, 先行研究では CSC と PEG 誘導体の結合部分における加水分解が進行しにくい

合成方法が採用された。すなわち、CSC が有するカルボキシル基と新たに作製したメトキシPEG アミンが有するアミノ基に着目し、アミド化 (amidation) によってメトキシPEG アミンと CSC を縮合したアミドPEG 化 CSC の合成が行なわれた²⁰⁾。本研究では、カルボキシル基を有するアルギン酸が CSC 同様、アミド化に有効な高分子であると考え、メトキシPEG アミンによる材料の修飾を試みた。アミド化とはカルボン酸のカルボキシル基と第一級アミンのアミノ基または第二級アミンのイミノ基 ($-\text{NH}-$, $=\text{NH}$) を脱水縮合してアミドを形成させる反応であり、このとき生成する $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}=\text{}$ の結合をアミド結合と呼ぶ。Fig. 3.1.9 (b)にカルボキシル基と第一級アミンの一般的なアミド化の反応式を示す。以下にアミドPEG 化アルギン酸を得る際に用いた試薬について述べる。

(i) アルギン酸 (Alginic acid)

広義としてはグルコサミノグリカン (酸性ムコ多糖) に含まれる。褐藻等に含まれる多糖類で食物繊維の一種である。β-D-マンヌロン酸 (M)、α-L-グルロン酸 (G) という2種類のウロン酸から成る直鎖重合体であり、MとGの2種ユニットはアルギン酸の鎖状構造中にランダムで存在し、3種のブロックを構成しながら共存している。それらの構成比と配列パターンによってアルギン酸塩の挙動と性状に影響を及ぼす。Fig. 3.1.10にアルギン酸の構造式を示す。純粋のアルギン酸は白色ないし淡黄色で、粉末、顆粒または繊維状の固体であり、水には不溶である。一般に「アルギン酸」と呼ばれるものは、可溶性塩であるアルギン酸ナトリウムを指す場合が多く、本研究においてもアルギン酸ナトリウムを使用してPEGとのグラフト共重合体の合成を試みた。分子量は10000~600000程度である。通常の試薬は粘度によって区別されることが多く、本研究では和光純薬(株)製の第一級試薬であるアルギン酸ナトリウム300~400(1wt%水溶液の粘度範囲300~400cps)を用いた。

(ii) 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩

(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)

分子式 $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{ClN}_3$ ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$)、分子量 191.70。 $-\text{N}=\text{C}=\text{N}-$ で表される官能基およびそれを含む化学物質の総称をカルボジイミドと呼ぶ。カルボジイミドはエステル、ペプチド、カルボン酸無水物、ラクトンなどの合成における脱水縮合試薬として広く用いられている。本研究で用いた1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩が水に可溶であることから1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(分子式 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$ 、分子量 155.24)はWSCD (Water soluble carbodiimide)とも略される。しかし、塩酸塩でないWSCDは水にほとんど溶けないため、本論文では1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩をWSCD・HClと表記する。WSCD・HClの製法を以下1)~3)に示す。

- 1) 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)チオ尿素と次亜塩素酸塩を、水と相溶性のない有機溶媒との二相系下で水酸化カリウム存在下に脱硫することによりWSCDを得る。
- 2) 得られたWSCDを芳香族炭化水素やハロゲン化炭化水素、エーテル基を有するアルコール類のどれかを溶媒として、塩化水素ガスを導入する。これにより塩酸塩が生成する。
- 3) 2)の系に脂肪族や脂環式炭化水素の溶媒と、エーテル類やエステル類の溶媒を結晶溶媒

として添加することにより、結晶化した WSCD・HCl を得る。

WSCD・HCl は結晶性固体であり、水に可溶、メタノールやエタノールに微溶、ジメチルホルムアミドや CH_2Cl_2 に可溶。融点 $111\sim 114^\circ\text{C}$ 。反応の過程で有機溶媒に不溶な 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)尿素を副生する。また、初期に用いられていたカルボジイミドであるジシクロヘキシルカルボジイミド (DiCyclohexylCarbodiimide, DCC) は人によっては皮膚や粘膜につくと激しい炎症を起こすことがあったが、WSCD・HCl は DCC にみられるアレルギー反応を引き起こしにくい。本研究では (株) ペプチド研究所製の WSCD・HCl を用いた。Fig. 3.1.11 に WSCD の構造式を示す。

(iii) 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (1-Hydroxybenzotriazole)

略称 HOBt。分子式 $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$ 、分子量 135.13。DCC を用いた縮合反応の際に併用することでその反応活性を高める活性剤の役割を担う。o-クロロニトロベンゼンに $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を作用させて合成する。融点 160°C 、有機溶媒によく溶け、水に可溶。無水の HOBt は爆発性があり融点近くまで加熱すると強い爆発を起こすことがある。そのため、HOBt の水和物である 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物 (分子式 $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{O} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、分子量 153.14, HOBt・ H_2O) がよく用いられている。本研究でも東京化成工業 (株) 製の HOBt・ H_2O を使用した。Fig. 3.1.12 に HOBt の構造式を示す。

3.1.2 アミド結合によるアルギン酸と PEG 誘導体の複合化

前述したように、アルギン酸をアミド結合によって PEG 化するためにはアミノ基を有する PEG 誘導体を作製する必要がある。そこで、本研究では片末端が水酸基、もう一方がメチル基であるメトキシ PEG の水酸基にアミノ化処理を施すことにより、片末端がアミノ基、もう一方がメチル基のメトキシ PEG アミンの作製を試みた。その際に三段階にわたる有機合成を行ったので、次の(a)~(c)にメトキシ PEG アミンの作製方法を記す。なお、メトキシ PEG は平均分子量 2000, 5000, 10000 の三種類の試薬を用いた。

(a) メトキシ PEG アミン作製手順

(i) メトキシ PEG のトシル化

まず、脱離性の良い置換基であるトシルオキシ基を導入するため、メトキシ PEG の水酸基と TsCl を縮合 (トシル化, Tosylation) させたトシル化 PEG を作製した。作製手順を以下 1)~4) に記す。また、フローチャートを Fig. 3.1.13 (a) に、トシル化 PEG の構造式を Fig. 3.1.13 (b) に示す。

- 1) メトキシ PEG と TsCl を THF 溶媒のもとで混合し、15 wt% の水酸化ナトリウム (NaOH) 水溶液を加えて塩基性雰囲気にした後、一日間攪拌する。
- 2) 得られた溶液に DCM を有機層として、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) の飽和水溶液を水層としてそれぞれ適量加え、分液ロートを用いて下層の有機層を抽出する。
- 3) 得られた有機層に MgSO_4 を適量加えて残存した水分を取り除いた後、濾過して濾液を得る。

- 4) 得られた濾液をエバポレータにかけて溶媒を除いた後、少量の DCM を加えてから多量の Et₂O を注いで白色固体を再沈殿させ、吸引濾過して濾物を得る。そして、得られた濾物を一日間真空デシケータにて保存することにより溶媒を除去し、トシル化 PEG の白色粉末を得る。

(ii) PEG フタルイミドの作製

次に、求核置換反応によりトシル化 PEG のトシルオキシ基をフタルイミド基へと置換した PEG フタルイミドを作製した。求核置換反応とは反応の中心となる求電子剤に対して電子豊富な反応種（求核剤）が電子不足の炭素原子を求核攻撃し、脱離基が脱離する反応である。求核置換反応の生成物は求電子剤と求核剤の結合物と脱離した脱離基である。すなわち、本合成方法では求核剤としてのフタルイミドカリウムがトシル化 PEG のトシルオキシ基（TsO-）と結合している炭素原子を求核攻撃することにより、トシルオキシ基が脱離してフタルイミド基と置換し PEG フタルイミドが生成する。作製手順を以下 1)~4)に記す。また、フローチャートを Fig. 3.1.14 (a)に、PEG フタルイミドの構造式を Fig. 3.1.14 (b)に示す。

- 1) トシル化 PEG とフタルイミドカリウムを AcNt 溶媒のもと、80~90℃の温度で一日間還流する。
- 2) 得られた溶液をエバポレータにかけて溶媒を除いた後、DCM を有機層として、蒸留水を水層としてそれぞれ適量加え、分液ロートを用いて下層の有機層を抽出する。
- 3) 得られた有機層に MgSO₄ を適量加えて残存した水分を取り除いた後、濾過して濾液を得る。
- 4) 得られた濾液をエバポレータにかけて溶媒を除いた後、少量の DCM を加えてから多量の Et₂O を注いで白色固体を再沈殿させ、吸引濾過して濾物を得る。そして、得られた濾物を一日間真空デシケータにて保存することにより溶媒を除去し、PEG フタルイミドの白色粉末を得る。

(iii) PEG フタルイミドの還元

最後に、PEG フタルイミドを還元してメトキシPEG アミンを作製した。本合成方法では強い還元性をもつ H₂NNH₂・H₂O を用いた還元を行った。作製手順を以下 1)~5)に記す。また、フローチャートを Fig. 3.1.15 (a)に、メトキシPEG アミンの構造式を Fig. 3.1.15 (b)に示す。

- 1) PEG フタルイミドにエタノール (EtOH) 溶媒のもとで H₂NNH₂・H₂O を加え、80~90℃の温度で 2~3 時間還流する。
- 2) 得られた溶液をエバポレータにかけて溶媒を除いた後、DCM を有機層として、5wt% の NaOH 水溶液を水層としてそれぞれ適量加え、分液ロートを用いて下層の有機層を抽出する。
- 3) 得られた有機層に MgSO₄ を適量加えて残存した水分を取り除いた後、濾過して濾液を得る。

- 4) 得られた濾液をエバポレータにかけて溶媒を除いた後、少量の DCM を加えてから多量の Et₂O を注いで白色固体を再沈殿させ、吸引濾過して濾物を得る。そして、得られた濾物を一日間真空デシケータにて保存することにより溶媒を除去し、メトキシ PEG アミンの白色粉末を得る。

(b) アルギン酸と PEG によるグラフト共重合体の合成

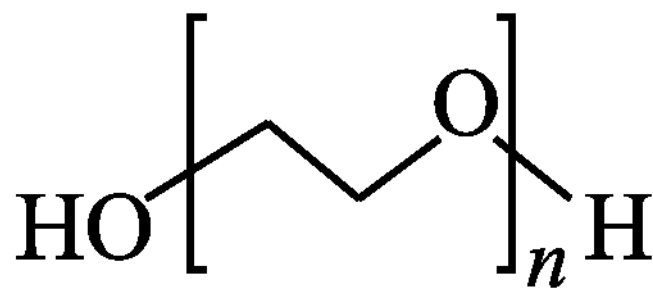
(i) アミド PEG 化アルギン酸の合成手順

アルギン酸のカルボキシル基をメトキシ PEG アミンのアミノ基と脱水縮合させてアルギン酸をアミド結合により PEG 化させたアミド PEG 化アルギン酸を作製した。アミド化を行う方法はいくつかあるが、本研究では脱水縮合剤を用いたアミド化を行った。従来、エステル結合にて CSC を PEG 化する際には水に不溶な試薬を用いており有機溶媒中で合成していたため、残存する有機溶媒の除去が困難であった。そこで、本合成方法では生体への毒性を低減させるため水溶性の脱水縮合剤や反応活性剤を用いることにより、蒸留水溶媒での合成を行った。Fig. 3.1.16 に具体的な反応機構を示し、作製手順を以下 1)~3)に記す。また、フローチャートを Fig. 3.1.17 に示す。なお、本研究では平均分子量 2000, 5000, 10000 のメトキシ PEG をそれぞれアミノ化したメトキシ PEG アミンを使用した。

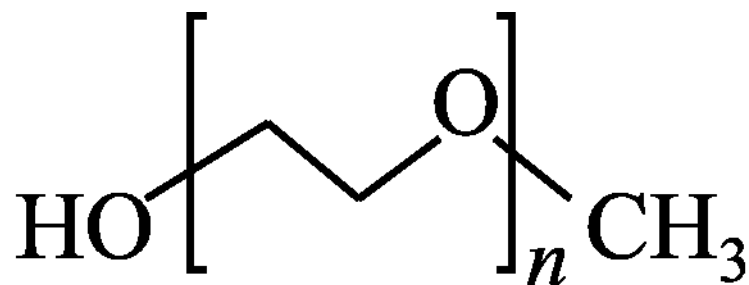
- 1) アルギン酸のナトリウム塩であるアルギン酸ナトリウムとメトキシ PEG アミンに、蒸留水溶媒のもとで反応活性剤 HOBt · H₂O を混合した後、脱水縮合剤 WSCD · HCl を加え、一日間攪拌する。
- 2) 得られた溶液を透析膜 (Seamless cellulose tubing : UC-36-32-100, エーディア (株) 製, 分画分子量 : 14000~16000) を用いて 4 日間透析することにより、副生成物である尿素誘導体や未反応物のモノマーを除去する。
- 3) 得られた溶液を液体窒素で急冷した後、凍結乾燥装置 (FZ-1(77400)型, ラブコンコ (株) 製) を用いて試料を凍結乾燥する。これにより、アミド PEG 化アルギン酸の粉末試料を得る。

(ii) アミド PEG 化アルギン酸合成時の mol 比率

本研究では平均分子量 2000, 5000, 10000 のメトキシ PEG をアミノ化したメトキシ PEG アミンを用いてアミド PEG 化アルギン酸を作製したが、その際のアルギン酸中のカルボキシル基とメトキシ PEG アミン中のアミノ基の mol 比率を設定する必要がある。これは、アルギン酸中のカルボキシル基は糖被膜型 MF を形成する際に微粒子と吸着する役割を担っているためである。そこで、アルギン酸中のカルボキシル基を意図的に残しつつ、アルギン酸のアミド結合による PEG 化を行うため、合成時に仕込むアルギン酸中のカルボキシル基とメトキシ PEG アミン中のアミノ基の mol 比率を 60:1 とした。

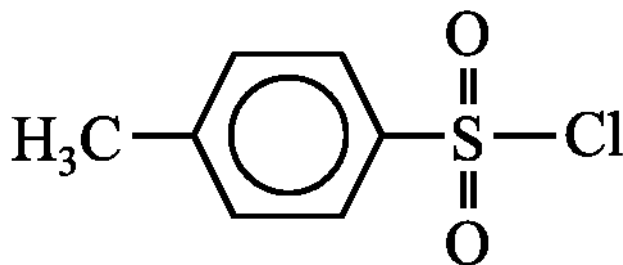


(a)



(b)

Fig. 3.1.1 (a) Polyethylene glycol (b) Methoxy polyethylene glycol

Fig. 3.1.2 *p*-Toluenesulfonyl chloride

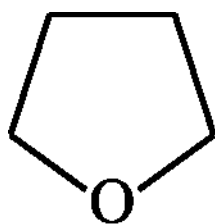


Fig. 3.1.3 Tetrahydrofuran

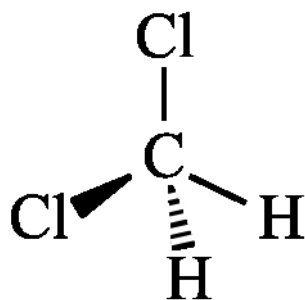


Fig. 3.1.4 Dichloromethane

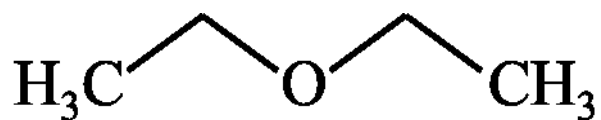


Fig. 3.1.5 Diethyl ether

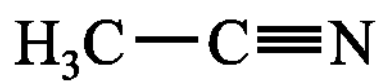


Fig. 3.1.6 Acetonitrile

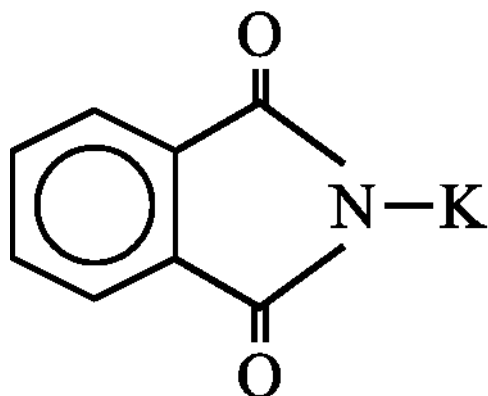


Fig. 3.1.7 Phthalimide Potassium Salt

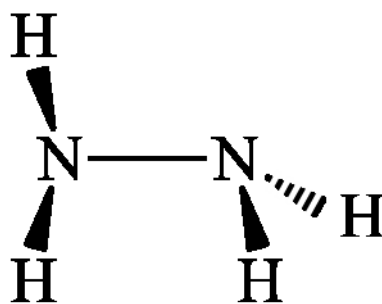
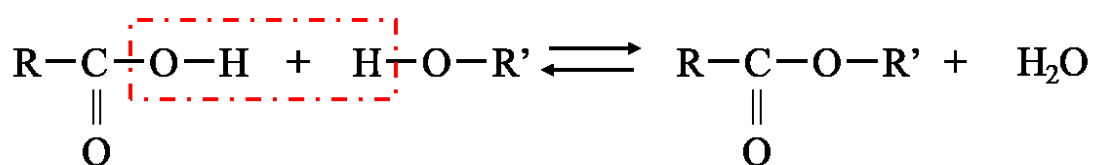
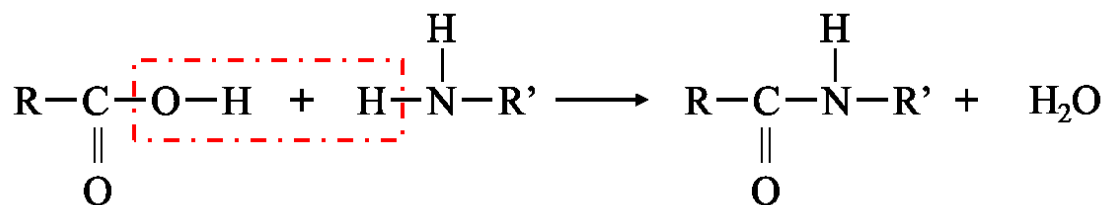


Fig. 3.1.8 Hydrazine



(a)



(b)

Fig. 3.1.9 (a) Esterification reaction (b) Amidation reaction

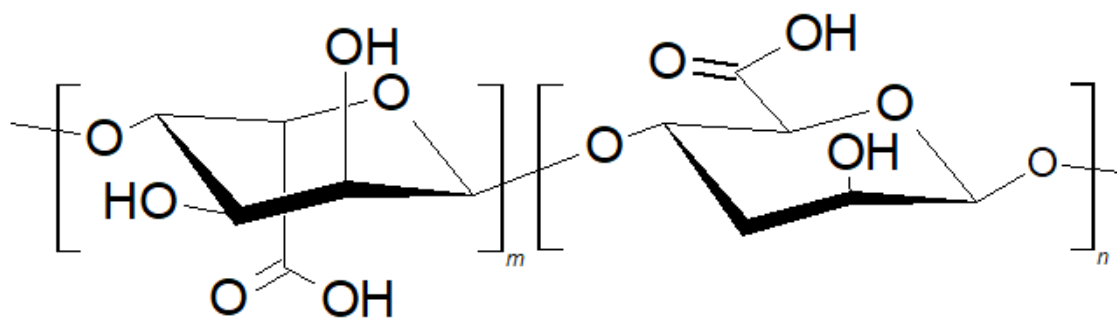


Fig. 3.1.10 Alginic acid

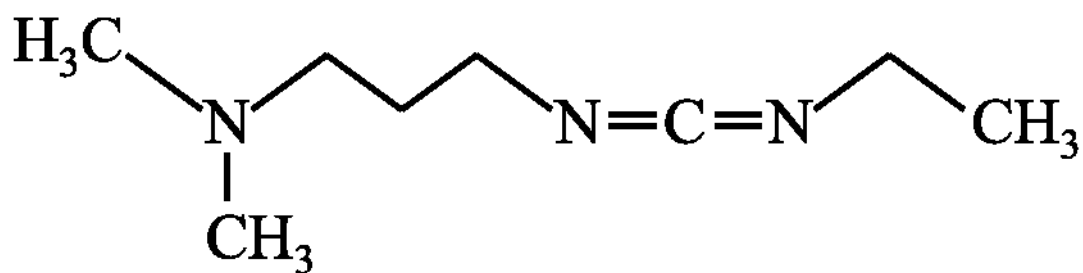


Fig. 3.1.11 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide

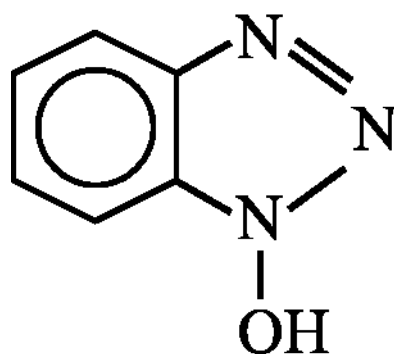


Fig. 3.1.12 1-Hydroxybenzotriazole

Methoxy PEG (Mn=2000 or 5000 or 10000)

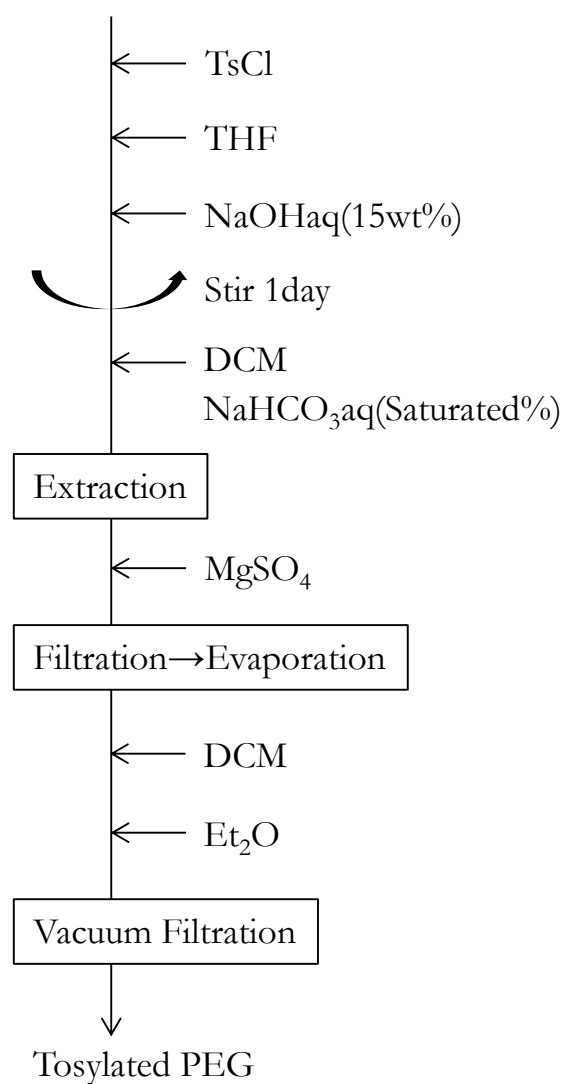


Fig. 3.1.13 (a) Synthesis process of tosylated PEG.

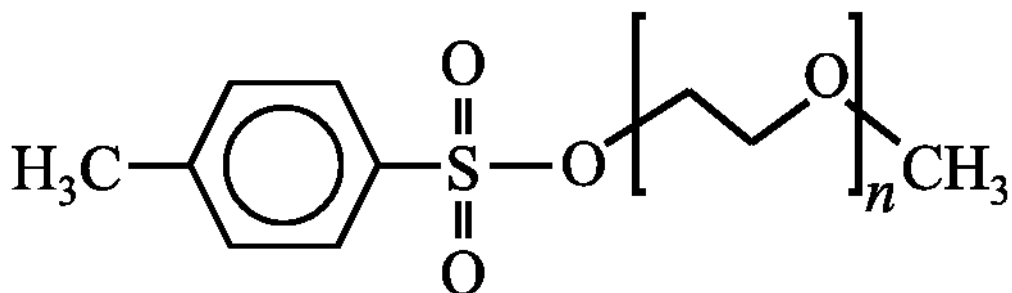


Fig. 3.1.13 (b) Tosylated PEG

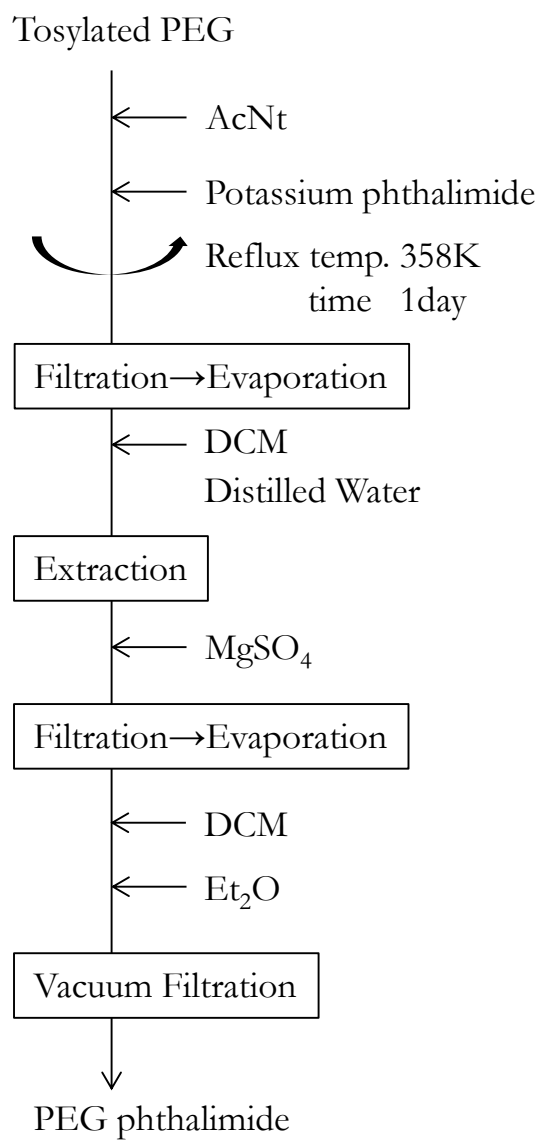


Fig. 3.1.14 (a) Synthesis process of PEG phthalimide.

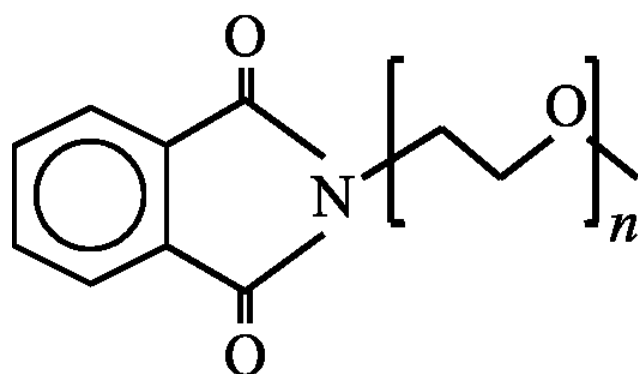


Fig. 3.1.14 (b) PEG phthalimide

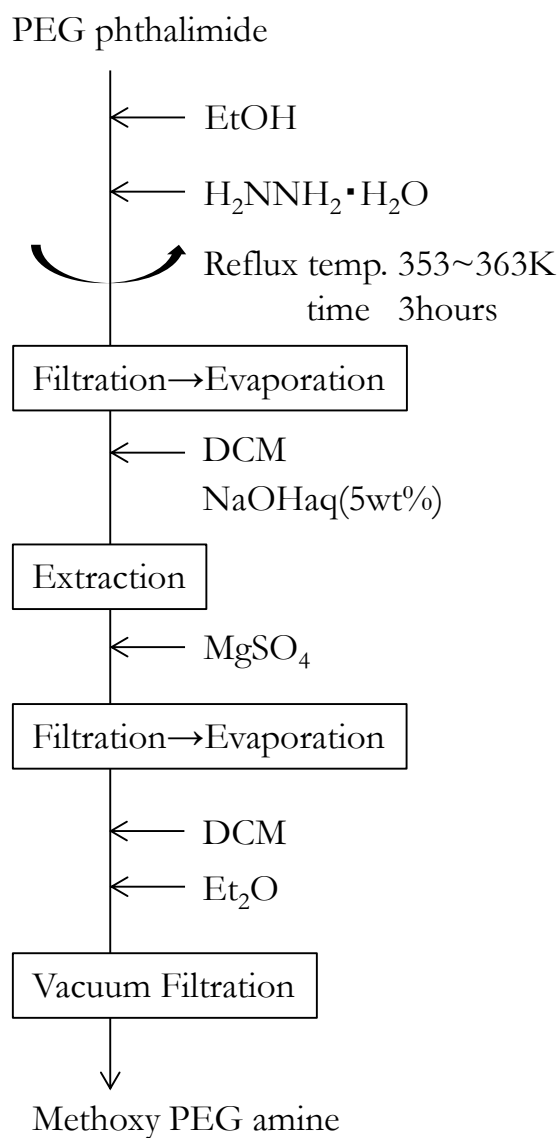


Fig. 3.1.15 (a) Synthesis process of methoxy PEG amine.

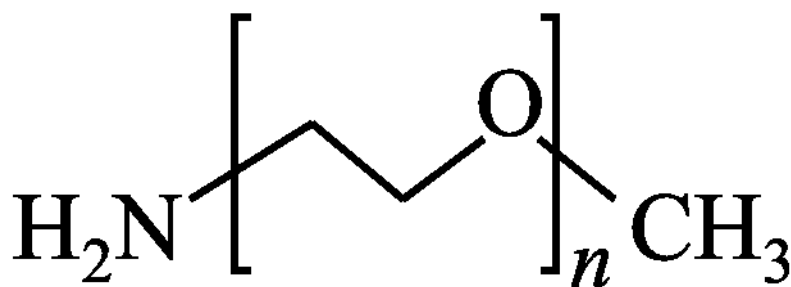


Fig. 3.1.15 (b) Methoxy PEG amine

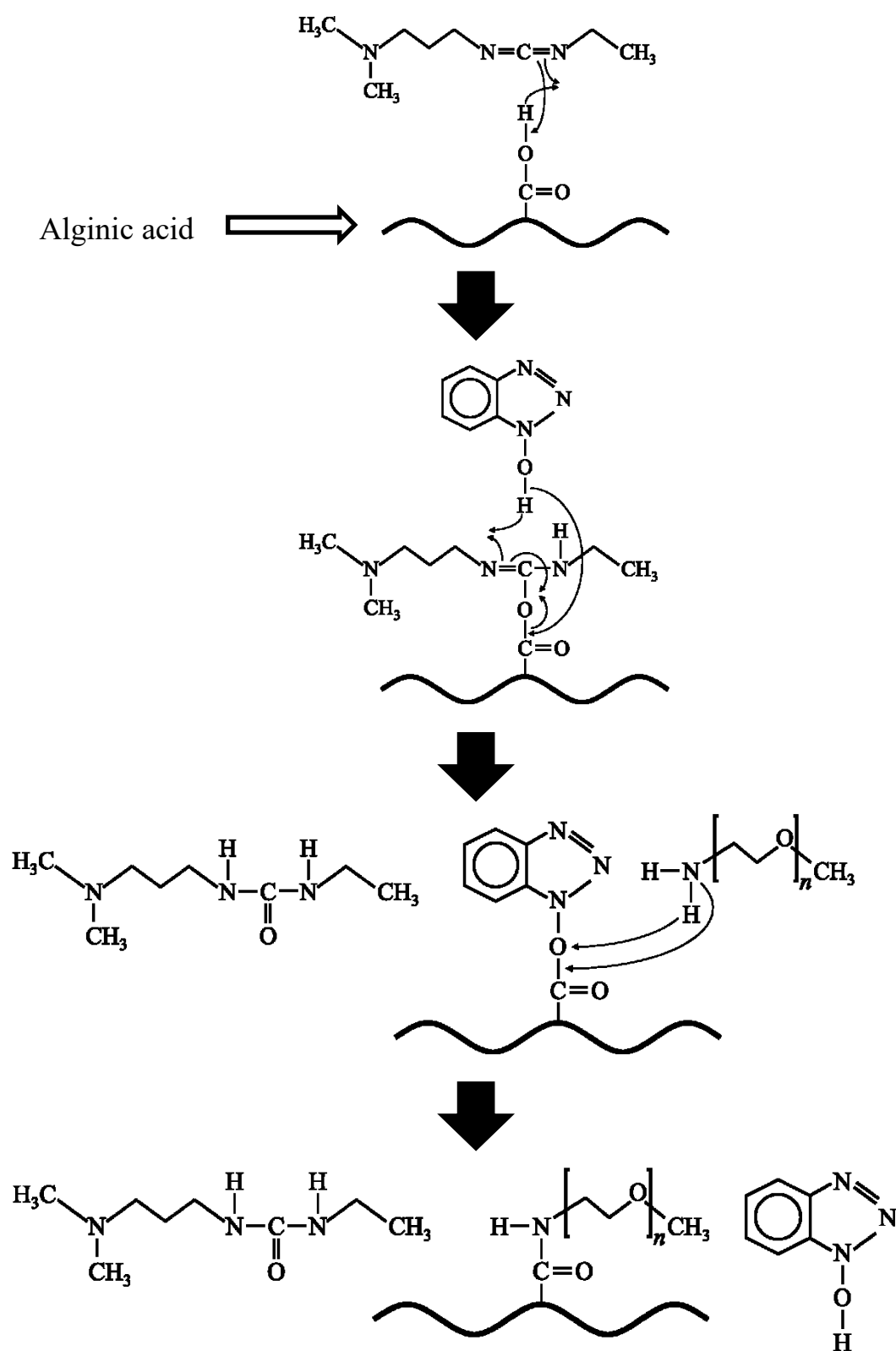


Fig. 3.1.16 Generative mechanism of amide pegylated Alginic acid.

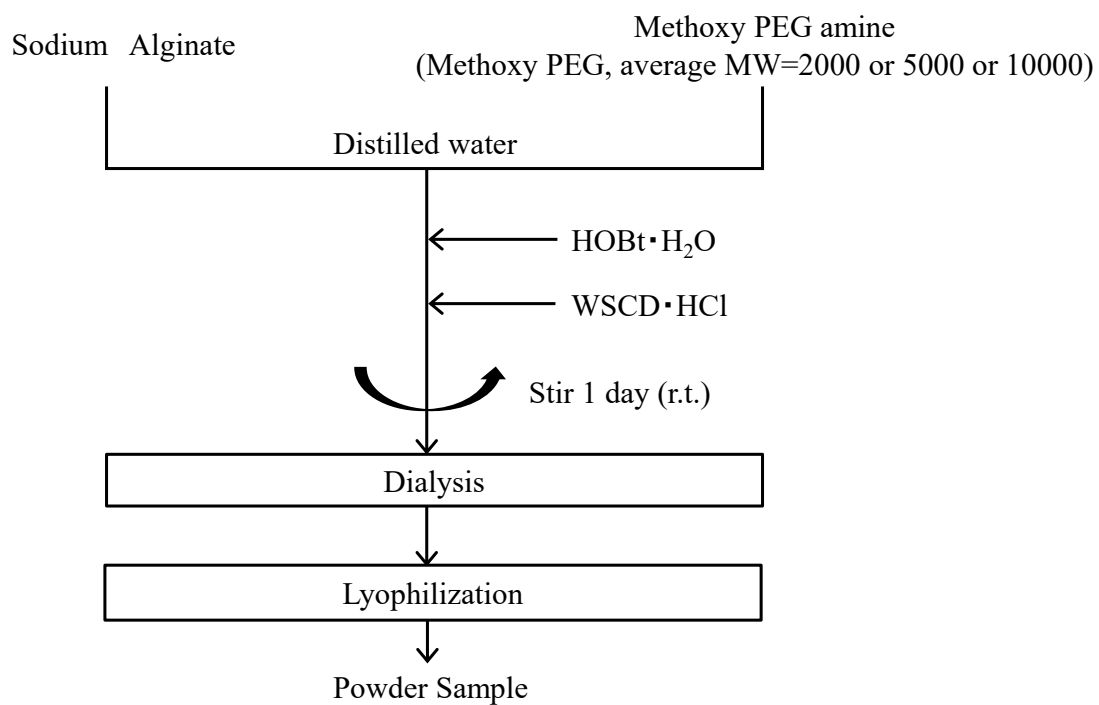


Fig. 3.1.17 Synthesis process of amide pegylated alginic acid.

3.2 PEG化アルギン酸被膜 MF

アミドPEG化アルギン酸を分散剤に用いたPEG化アルギン酸被膜MFを作製するにあたり、磁気特性を決定づける磁性微粒子には $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Maghemite)を用いた。 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ は酸化鉄の一種であり、工業的に幅広く利用されている。また、生体に対しても比較的安全とされているため医療分野でも利用されている。結晶構造はスピネルフェライトと呼ばれる構造を持ち、磁性はフェリ磁性となる。また、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ は $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ (Magnetite)の欠陥構造をもつ²¹⁾。試料作製方法には共沈法を応用した化学合成を用いた。共沈法は、金属塩溶液から微粒子を生成させる方法の一つで、組成の制御が容易であり、化学的均一性と反応性の高い微粒子が得られる。また、大規模な実験装置を必要とせず比較的簡素な方法で合成を行うことが可能であり、短時間に大量生産が可能であることが挙げられる。また、この合成プロセスは微粒子をナノオーダーの粒径に制御して形成することができる。以下にスピネルフェライト、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子の生成に用いた金属塩化合物と試料の作製手順について述べる。

3.2.1 MFのコア材について

(a) スピネルフェライト

スピネルフェライトはフェライトの一種である。フェライトの組成は $\text{M}^{2+}\text{O} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ または $\text{M}^{2+} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_4$ の一般式で表され、その結晶構造はスピネル型の立方晶系に属する、 M^{2+} にはFeの他にMn, Co, Ni, Cu, Mg, Zn, Cd, などがある。スピネル型構造の単位胞は8分子より成っている。すなわち上記の一般式の8倍の個数である32個の O^{2-} が面心立方最密充填構造を作り、8個の M^{2+} と16個の Fe^{3+} は O^{2-} の間隙に入っている。これは O^{2-} のイオン半径が約 0.8\AA であり、 O^{2-} の方が大きいためである。Fig. 3.2.1にフェライトのスピネル型構造の単位胞を示す。

M^{2+} が Zn^{2+} または Cd^{2+} の時、 M^{2+} は4個の酸素に囲まれた格子点位置 (A位置) を占め、 Fe^{3+} は6個の酸素で囲まれた格子点位置 (B位置) を占める。このような金属イオン分布のフェライトを正スピネル型のフェライトと呼ぶ。

M^{2+} が Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , などの場合には、 M^{2+} はB位置を占め、 Fe^{3+} の半数はB位置を、残りの半数の Fe^{3+} はA位置を占める。このようなフェライトを逆スピネル型のフェライトと呼ぶ。

スピネル型フェライトのうちで強磁性を示すのは逆スピネル型で、正スピネル型は常磁性を示す。逆スピネル型フェライトでは、A位置を占める金属イオンとB位置を占める金属イオンとの相互間に最も強力な超交換相互作用が働く。すなわちA, B位置に存在する金属イオンの磁気モーメントを $\overline{\text{Fe}^{3+}} \left| \overline{\text{M}^{2+}} \overline{\text{Fe}^{3+}} \right|$ のように互いに反平行に結合する作用であり、その結果両位置にある Fe^{3+} の磁気モーメントは打ち消され、B位置に残存する M^{2+} だけが差し引きの自発磁化として現れる。これをフェリ磁性 (ferrimagnetism) と呼ぶ。正スピネル

型フェライトでは A 位置を非磁性体が占めるため、AB 間の超交換相互作用は存在せず、B 位置の 2 個の Fe^{3+} は $\text{M}^{2+} \left| \text{Fe}^{2+} - \overline{\text{Fe}^{3+}} \right|$ のように互いに反強磁性結合をするため、磁気モーメントは完全に相殺されて自発磁化を示さない²²⁾。

(b) スピネルフェライトの生成素材

(i) 第一塩化鉄 (FeCl_2 : ferric chloride)

式量 126.75。無水物のほかに一、二、四、六水和物も知られている。無水物は、鉄を乾燥塩化水素中で赤熱するか、水和物を塩化水素中で脱水すると得られる。淡緑色の六方晶結晶（塩化カドミウム型構造）。密度 2.99g/cm^3 屈折率 1.567。融点 674°C 。水、エタノールに易容、アセトンに可溶、エーテルに不溶。湿った空気中では色が変わり、最後には赤褐色となる。水 100g に 10°C で 64.4g, 100°C で 105.7g 溶ける。鉄、水酸化鉄あるいは炭酸鉄 (II) などを真空条件下にて塩酸に溶かすと水和物が得られる。ふつうには四水和物 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ がえられ、これは淡緑色の単斜晶系晶で、密度は、 1.926g/cm^3 で潮解性がある。エタノールに可溶。水 100g に 10°C で 37.6g, 70°C で 45g 溶ける。

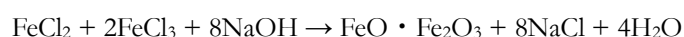
(ii) 第二塩化鉄 (FeCl_3 : ferrous chloride)

式量 162.21。無水物のほかに水和物 $\text{FeCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n=12, 2.5, 5.3, 5.6$) も知られている。無水物は、鉄粉を塩素気流中で熱するか、酸化鉄 (III) を塩化水素、塩化カルボニル、あるいは四塩化炭素などの中で熱すると得られる。また、水和物を濃硫酸上で脱水してもよい。透過光で紫赤色、反射光では暗緑色の六方晶系晶（ヨウ化ビスマス (III) 型構造）。密度 2.804g/cm^3 (11°C)。融点 300°C 、沸点 317°C 。溶液は、赤色、液体は赤色、気体は黄褐色。気体は $322\sim 448^\circ\text{C}$ で Fe_2Cl_6 分子からなる。 Fe_2Cl_6 は四面体 Fe_2Cl_4 の稜共有の複核錯体。 750°C 以上では Fe_2Cl_3 となる。エタノール、エーテル、アセトンに易溶。有機溶媒中では単量体として存在する。水 100g に 74.4g (0°C)、535.8g (100°C) 溶ける。酸化鉄 (III) または水和酸化鉄 (III) を塩酸に溶かした溶液に塩化水素を飽和させると六水和物 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ が得られる。六水和物は黄褐色の斜方晶系柱状晶または単斜晶系板状晶。潮解性。融点 36.5°C 、沸点 280°C 。構造は *trans*- $[\text{FeCl}_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{-Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。水 100g に 246g (0°C) 溶ける。水溶液は強酸性でタンパク質凝固作用がある。

3.2.2 PEG 化アルギン酸被膜 MF の作製

(a) 共沈法による MF 作製手順

以下に、本研究における共沈法の化学反応式を示す。



上記の反応式では 2 つの式に分割されているが、 $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子の生成と糖類の吸着は同時に行われている。また、実際は $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ の欠陥構造をもつ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子が生成して

いると考えられている²³⁾。この際の溶液温度、鉄塩濃度、アルカリの中和過剰量、反応時間により、コロイドサイズをコントロールすることができる。

以下 1)~6)にアルギン酸被膜 MF の具体的な作製手順を示す。またフローチャートを Fig. 3.2.2 に、合成装置を Fig. 3.2.3 に示す。

i) 金属塩溶液の作製

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を Fe^{2+} , Fe^{3+} の比率が 1:2, 合計が 0.14 mol/l となるよう秤量し, Ar ガス雰囲気下にて蒸留水に溶かす。これにより, Fe^{2+} , Fe^{3+} の金属塩混合溶液を得る。

ii) 分散剤溶液の作製

PEG 化アルギン酸を設定した分散剤濃度となるよう秤量し, 蒸留水に溶かす。これにより, 分散剤溶液を得る。

iii) 合成及び還流加熱

1)で作製した金属塩混合溶液と 2)で作製した分散剤溶液をサーモマグネスター (Thermo magnestir : MGH-110, SHIBATA 社製) を用いて攪拌しながら設定した合成温度に達するまで加熱する。合成温度に達した後に分散剤溶液を金属塩混合溶液に加え, pH を調整するため NaOH 水溶液を適量滴下する。その後, 30 分間還流加熱して反応を進ませた後, 常温にて徐冷する。

iv) 遠心分離

得られた溶液を遠心機 (Centrifuge-5010, KUBOTA 社製) にて 3000 rpm で 15 分間遠心分離を行い粗大粒子を除去する。遠心機を Fig. 3.2.4 に示す。

v) 透析

その後, 透析膜を用いて透析を行う。なお, 透析は透析膜外の蒸留水を繰り返し交換し, PEG 化アルギン酸被膜 MF の pH が蒸留水と同等になるまで行う。これにより, MF の液体試料を得る。得られた液体試料は透過型電子顕微鏡観察に使用した。

vi) 凍結乾燥

IR 測定や磁気測定, X 線回折には粉末状試料を要する。そのため, MF の液体試料を液体窒素に浸けて凍結し, 凍結乾燥装置を用いて試料を粉末状にする。これにより, MF の粉末試料を得る。凍結乾燥とは水溶液及び水分を含む物質を急速に氷点下の温度で凍結させ, その凍結物の水蒸気圧以下に減圧して水を昇華させて除去し, 物質を乾燥させる方法である。凍結の際に急冷することで結晶は微細になる。特に生体試料の乾燥には適しており, 凍結乾燥された試料は, 形態的・機能的にもその生体試料が本来持っている性質をできるだけ失わずに保存できる利点がある。Fig. 3.2.5 に水溶液の圧力-温度状態図, Fig. 3.2.6 に凍結乾燥法の概念図, Fig. 3.2.7 に凍結乾燥装置を載せる。

以上i)~vi)が本研究における MF の作製手順となる。

(b) MF 合成条件の設定**(i) 分散剤濃度**

本研究で作製したアミド PEG 化アルギン酸はアミド化の際にカルボキシル基が反応して変化するため、アルギン酸と比べてカルボキシル基が減少している。前項で述べたように、カルボキシル基は微粒子との吸着点であるので、従来作製してきた PEG 化 CSC を使用した MF とその材料特性を参考に濃度条件の設定を行った。本研究ではグラフト共重合体作製時にアミノ化が 100%進行したものと仮定して、アルギン酸との複合化を施した PEG の平均分子量を基に分散剤濃度を設定した。

(ii) 合成時温度

従来作製してきた MF の合成時温度は 85 °C が最適であった。これは、溶媒の沸点付近における安定的な合成が困難であることに加えて、85 °C より高い合成時温度においても材料特性に有意な差が見られず、コロイド径のばらつきの少ない安定した MF が作製できたためである¹⁵⁾。本研究で作製した MF についても、従来の研究から糖被膜型 MF の最適合成温度とされる 85 °C を基に合成時温度を設定した。

(iii) 合成時 pH 雰囲気

過去の研究において、糖被膜型 MF では作製条件を種々変化させるとその特性も種々変化することが判明している。中でも顕著に影響を及ぼすのが合成時の pH 雰囲気である²⁴⁾。

この要因の一つに溶液 pH 環境の変化に伴う微粒子の組成の変化が挙げられる。 γ -Fe₂O₃ と類似した FeO・Fe₂O₃ 微粒子において、塩化鉄 (II)、塩化鉄 (III) を用いた場合には、強アルカリによって Fe(OH)₂、Fe(OH)₃ とした段階で、Fe(OH)₂、Fe(OH)₃ が徐々に酸化されて FeO・Fe₂O₃ が生じる。このときの酸化反応の条件により、化学組成や結晶構造が異なる (Fig. 3.2.8)²⁵⁾。そのため、 γ -Fe₂O₃ 微粒子の合成に関しても合成時の pH 雰囲気によって微粒子の組成や結晶構造に違いが生じ、特性も変化する可能性がある。

もう一つの要因として分散剤の糖が有する官能基の影響が挙げられる。糖を被膜した場合、糖が有する官能基が変化すると合成時の pH 雰囲気による飽和磁化値や、分散状態の変化に違いが生じることが判明している²⁶⁾。本研究で新たに作製する糖被膜型 MF では、分散剤にアミド PEG 化アルギン酸を用いていることから通常のアルギン酸を用いたものと比べ合成時の pH 雰囲気に対する影響が変化している可能性がある。

そこで、本実験では合成時の pH 雰囲気を種々変化させた試料を作製し特性の変化を調査した。合成時の pH 雰囲気の調整は分散剤溶液と金属塩溶液を混合した後の NaOH 滴下量を調整して行った。

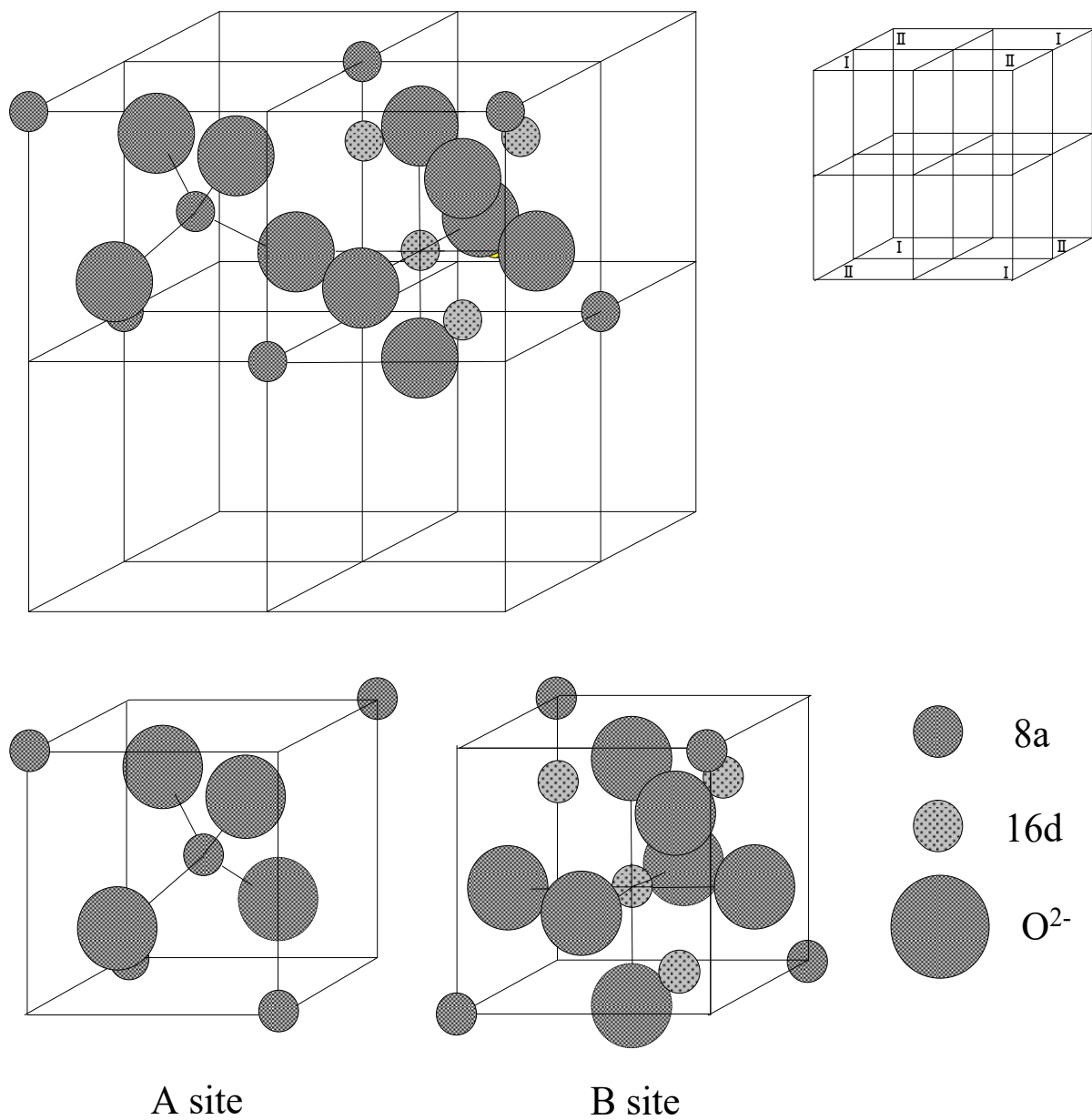


Fig. 3.2.1 Structure of spinel ferrite.

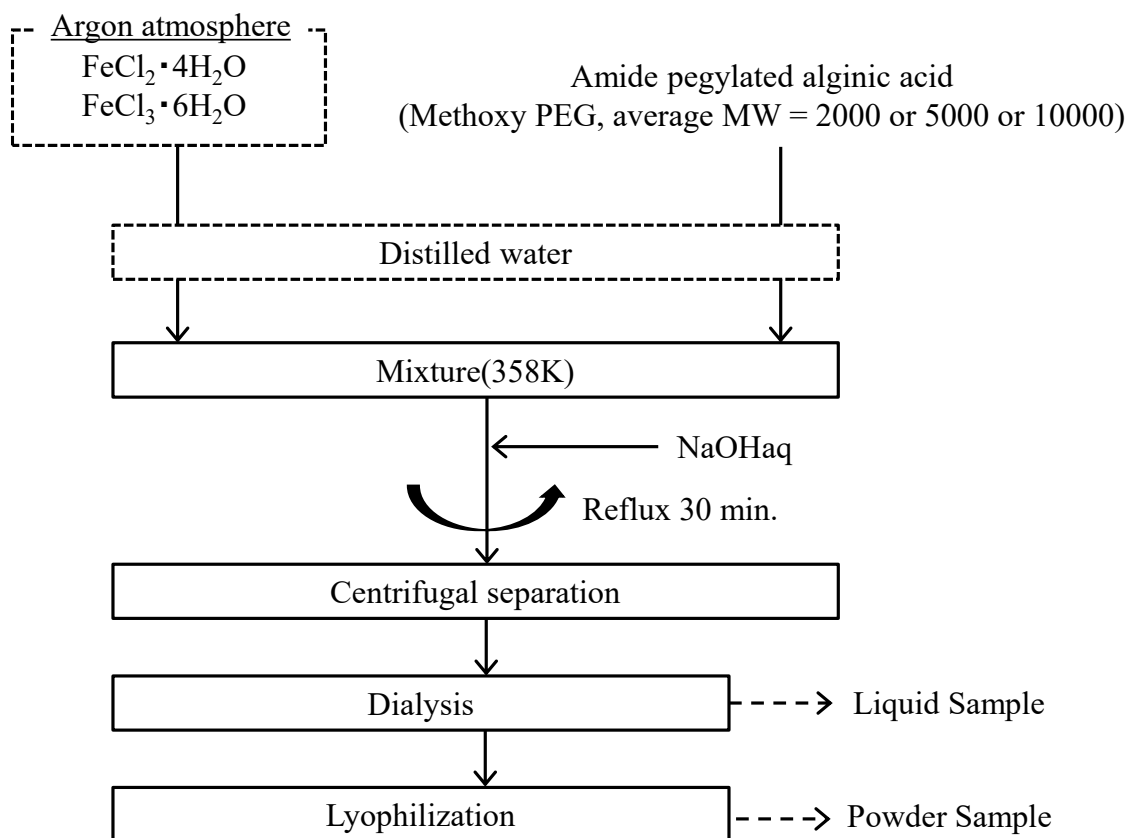


Fig. 3.2.2 Synthesis process of magnetic particle coated with saccharide.

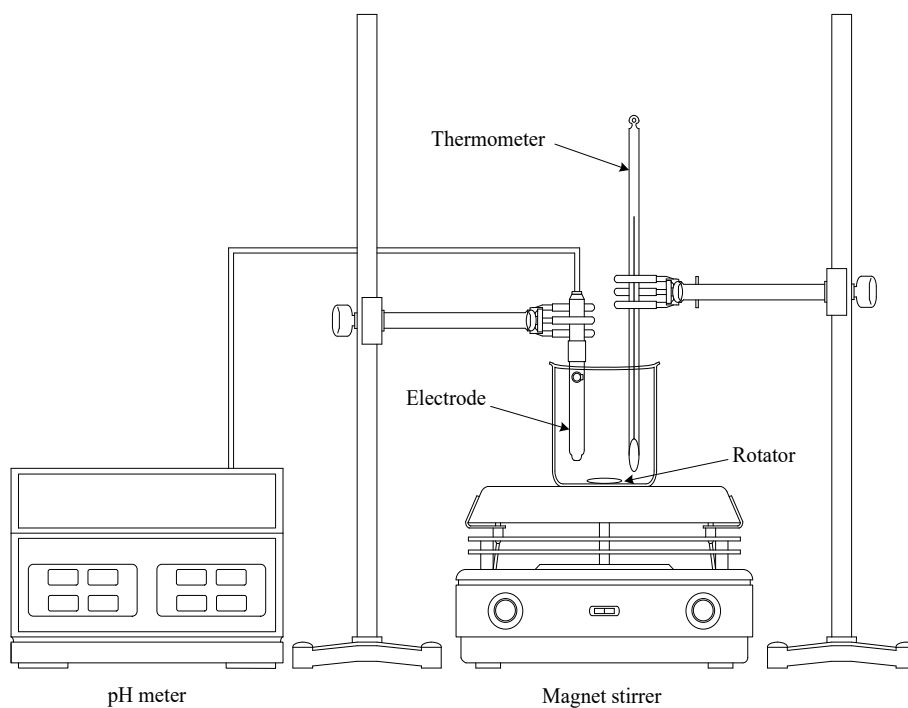


Fig. 3.2.3 Synthesis device of magnetic particle coated with saccharide.

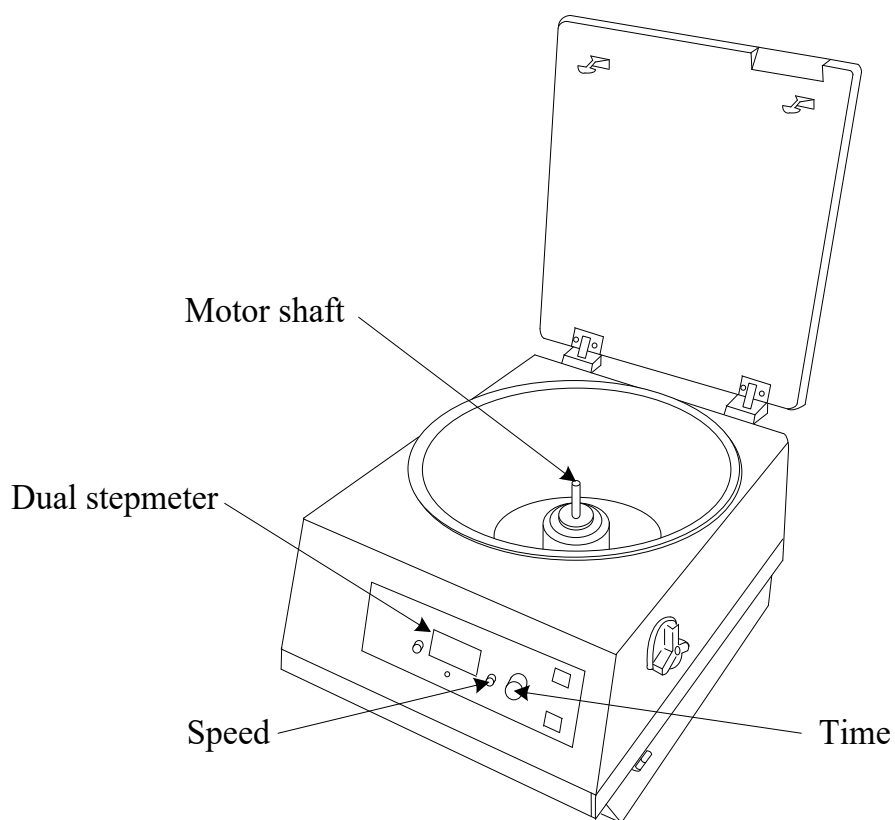


Fig. 3.2.4 Centrifuge separator.

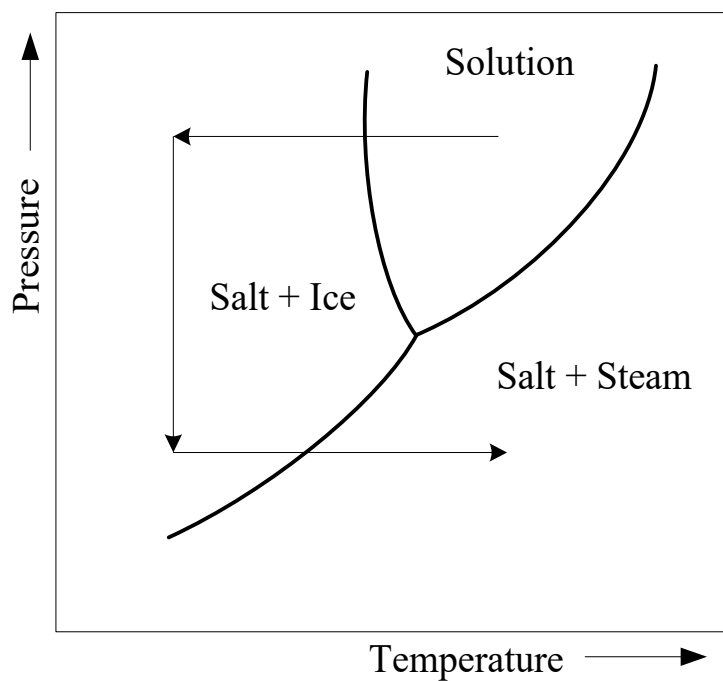


Fig. 3.2.5 Pressure - temperature diagram of aqueous solution.

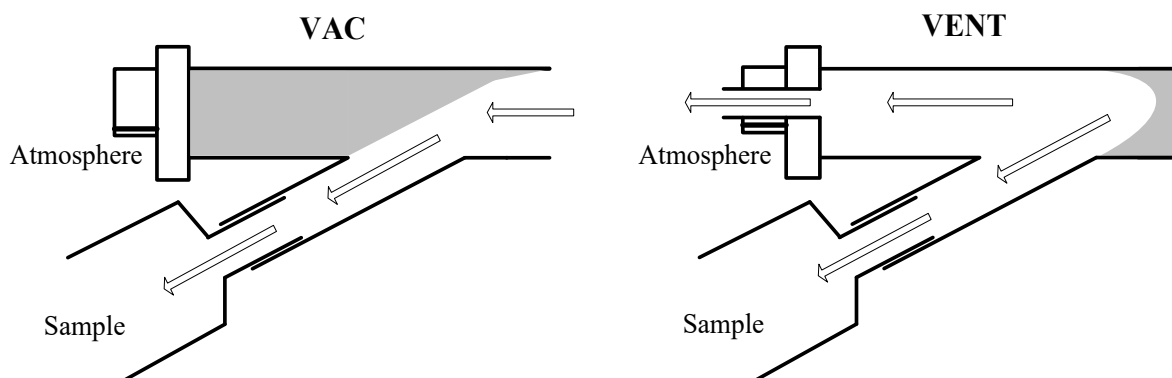


Fig. 3.2.6 Conceptual diagram of freeze-drying.



Fig. 3.2.7 Freeze drier

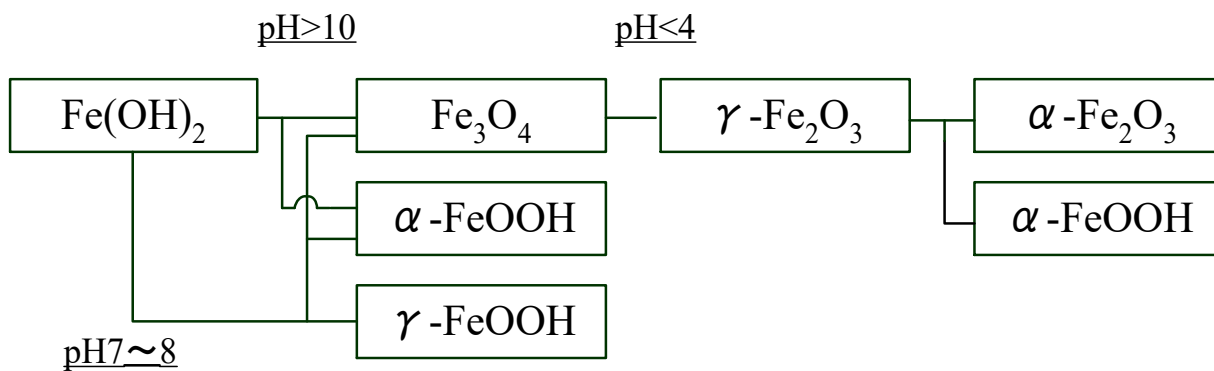


Fig. 3.2.8 Variation of iron hydroxide.

3.3 PEG 化アルギン酸カルシウム

3.3.1 PEG 化アルギン酸カルシウムの作製に使用した試薬

(a) 塩化カルシウム (Calcium chloride)

式量 110.98. 密度 1.68g/cm³. 融点 772°C. 沸点 1935°C. CaCl₂ の分子式で示されるカルシウム塩化物. 水に対して溶けやすく, エタノール, グリセリンに対して可溶. 石灰石に塩酸を加え, 濃縮・加熱して得られる水溶性の白色結晶であり, 水溶液は中性を示す. 天然には海水中に 0.15% 程度の割合で含まれている. 常温では二, 四, 六水和物として存在しており, 試薬としては二水和物が汎用される. 本研究においても CaCl₂・2H₂O を試薬として使用しており, 二水和物としての式量は 147.01 である. 塩化カルシウム二水和物は 0°C 水 100g に対して 100g 溶ける. 本研究においては, アルギン酸または PEG 化アルギン酸の架橋試薬として, ナカライテスク (株) 製の特級試薬である塩化カルシウム二水和物を使用した.

(b) システイン (Cysteine)

式量 121.16. 化学式は HSCH₂CH(NH₂)COOH と示される. 含硫アミノ酸の一種で 2-amino-3-sulfanylpropionic acid のことを指す. C あるいは Cys と略記されることもある. シスチンをスズと塩酸とで還元して得られる物質であり, 酸性条件下では安定して存在するが, 中性, アルカリ性条件下では容易に酸化されるためシスチンとは相互転換をする. 常温では板状結晶又は結晶性粉末状の白色固体であり, 水, アルコールに対して易溶である. 天然には L 体として存在しており, 本研究においてもナカライテスク (株) 製の特級試薬である L-Cysteine を使用している. Fig. 3.3.1 に L-Cysteine の構造式を示す. また, 生体分子として広く知られるインスリン (Fig. 3.3.2) は, システイン架橋から成るペプチドであり, 本研究においてはインスリンの代替試薬としてシステインを使用した.

3.3.2 PEG 化アルギン酸カルシウムの合成

前章にて記述した通り, アルギン酸のゲル化プロセスは, アルギン酸の繰り返しユニット中に存在するカルボキシル基に対して, 他の多価金属塩が反応することによって二つの物質間に金属錯体が形成されることに由来する. そのため, アルギン酸のゲル化プロセス自体は非常に簡潔なものであり, アルギン酸と多価金属塩とが溶媒中にて接触することで完了する. 本研究においては, 多価金属塩としてカルシウムを採用しているため, アルギン酸又は PEG 化アルギン酸とカルシウム塩の架橋反応によって形成される Egg box junction は Fig. 3.3.3 に示すような構造をとる. 本研究では, Fig. 3.3.4 に示したモデルを使用してアルギン酸カルシウム及び PEG 化アルギン酸カルシウムの作製を行った. 加えて, インスリンの代替として L-システインを使用し, システイン内包型 PEG 化アルギン酸カルシウムのカプセル体モデルを作製した.

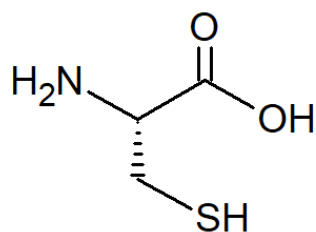
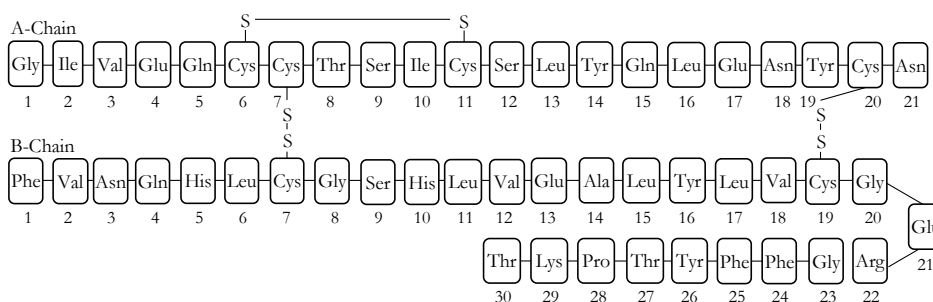


Fig. 3.3.1 L-Cysteine.



[Gly : Glycine, Ser : Serine, Gln : Glutamine, Phe : Phenylalanine, Glu : Glutamic acid, Ala : Alanine, Thr : Threonine, Tyr : Tyrosine, Pro : Proline, His : Histidine, Val : Valine, Cys : Cysteine, Ile : Isoleucine, Lys : lysine, Leu : Leucine, Asn : Asparagine, Arg : Arginine]

Fig. 3.3.2 Amino acid sequence of human insulin²⁷⁾.

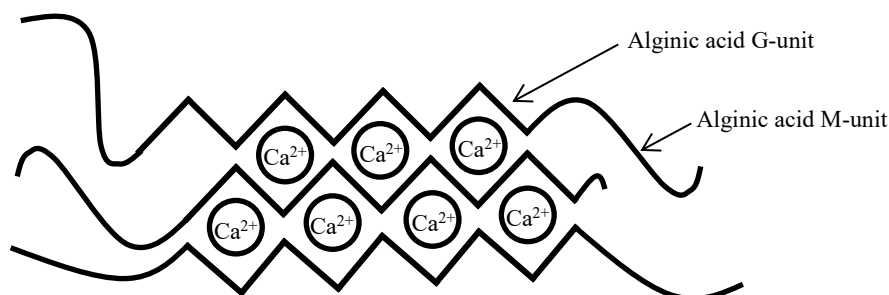


Fig. 3.3.3 Crosslinking reaction between alginic acid and calcium.

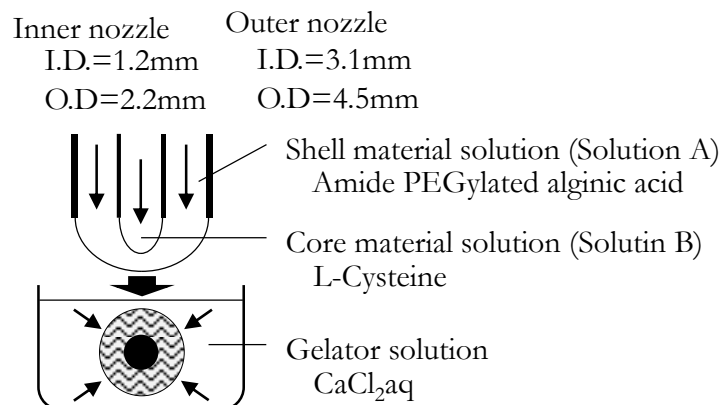


Fig. 3.3.4 Synthetic model of calcium alginate capsule.

4. 評価方法

4.1 アミド PEG 化アルギン酸

本研究で作製したアミド PEG 化アルギン酸について、平均分子量 2000, 5000 及び 10000 の PEG 誘導体をそれぞれ側鎖として複合した各試料に対し、母材と側鎖の化学結合状態の確認を行った。化学結合状態の確認には赤外分光法 (Infrared Spectroscopy, IR) を採用した。作製した試料の分析を行った。以下に IR について述べる。

4.1.1 赤外分光法 (IR)

試料の測定について、分析装置にはフーリエ変換赤外分光光度計 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) として Jasco 製 FT/IR-4100 (Fig. 4.1.1 (a)) を使用した。

共有結合を有する多くの化合物は赤外領域の光エネルギーを吸収するという特性を持つ。IR はこの赤外領域の光を吸収させることによって励起される伸縮振動や変角振動といった原子・分子間結合の固有振動状態の変化に基づいて、有機化合物の分子構造を推定する手法である。物質を構成する分子中の原子団、つまり官能基は熱エネルギーによって絶えず振動している。そのため、赤外光が照射されると分子の他の部分の構造とは無関係に原子団の振動数と同一の振動数、またはそれに近い振動数の吸収帯を生じる。これらの特性的な吸収帯の位置は不変であるので得られた赤外スペクトルを解析することで試料の構造を解析することができる。FT-IR はフーリエ変換方式を取り入れた赤外分光光度計であり、光学干渉計で干渉させた全波長光を対象物質に照射し、透過または反射した光を測定し、フーリエ変換することでスペクトルを得ることができる。FT-IR では、実際の対象物質の有無状態のスペクトル比を測定して赤外スペクトルをとる。

IR スペクトルは縦軸に透過率 (%T)、反射率 (%R) または吸光度 (Abs) をとり、横軸は振動数を [cm^{-1}] という波数で表す。測定領域は電熱線を赤外光源として普通赤外線と呼ばれる 400 cm^{-1} から 4000 cm^{-1} の波数領域で測定が可能である。

IR では対象物質から成る薄膜に対して赤外光を照射し、測定を行う。液体試料の場合は岩塩板に試料を塗布して測定を行う。固体試料の場合は試料のみの薄膜形成が困難なため、別の物質を加えて測定用の薄膜を作製するのが一般的である。固体試料の測定法はいくつか存在するが本研究では KBr 錠剤法を用いた。KBr 錠剤法は試料と KBr 結晶を乳鉢で粉末化して混合し、金属製の型に入れて圧縮し、薄膜錠剤を形成して測定する方法である。Fig. 4.1.1 (b), (c) に型および圧縮機を示す。また、Fig. 4.1.1 (d) に装置の模式図を示す。



Fig. 4.1.1 (a) IR (FT/IR-4100)



Fig. 4.1.1 (b) Mold of making pellet



Fig. 4.1.1 (c) Compactor

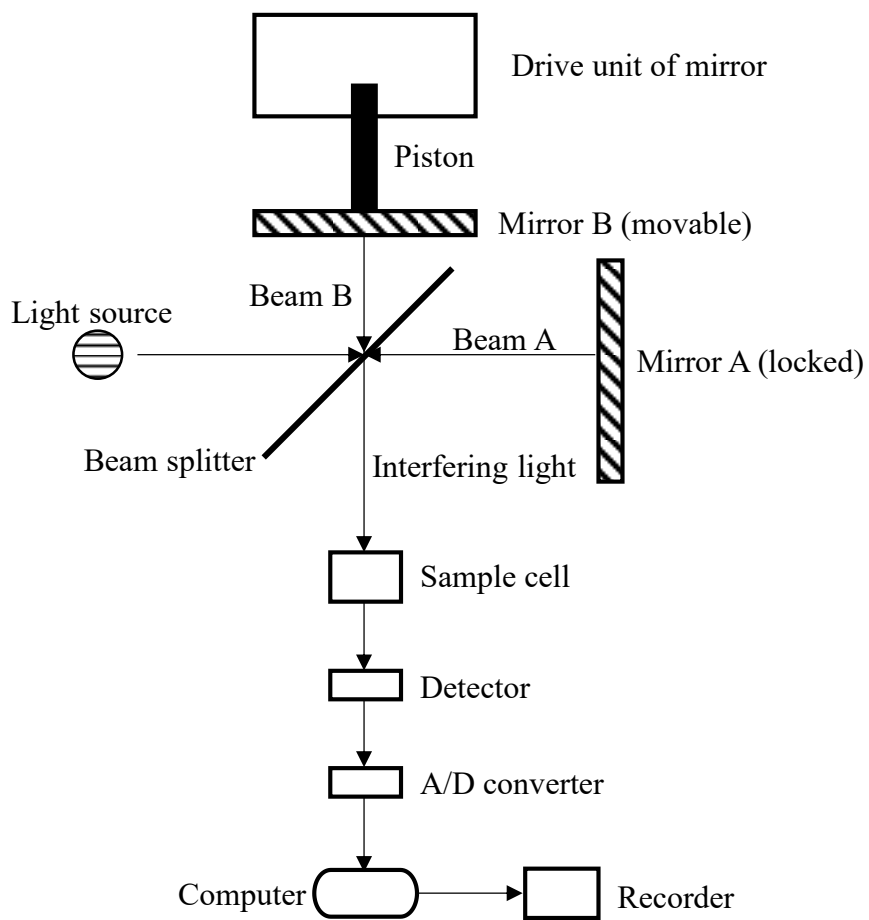


Fig. 4.1.1 (d) Conceptual diagram of IR

4.2 PEG化アルギン酸被膜 MF

本研究で作製した MF について、分散剤としてアルギン酸を使用した Alg/MF 及びアミド PEG化アルギン酸を使用した PEG-Alg/MF を IR にて分析、比較することにより、PEG-Alg/MF 中の PEG の化学結合状態を調査した。また、PEG-Alg/MF の磁気特性、結晶構造及びコア粒子径は材料の作製条件により変化するものと考えられる。よって、各測定を行うことにより、各試料の特性挙動について調べ、合成条件との関係を明らかにし、合成条件による材料特性制御を評価した。

4.2.1 磁気測定

測定装置は試料振動型磁力計 (Vibrating Sample Magnetometer, VSM) として東英工業 (株) 製 VSM-5 (Fig. 4.2.1 (a)) を用いた。試料を一定の振動数で振動させることにより、試料の持つ磁気能率が空間的に振動し、それが検出コイル内で磁気能率に比例し、振動周波数と同一周波数の信号を誘起することを利用する。この装置は磁気能率を直接測定するので、外磁場は試料を磁化するためのみに用いられるのであって、残留磁気も測定できる。そのほかにも、比較的丈夫で扱いやすいこと、試料を固定して異方的な性質をはかれること、強い磁性から弱い磁性まで電気的な回路の調節のみで数桁の範囲をカバーできること等、多くの特徴を有している。

測定の前準備として凍結乾燥で得られた粉体をシリンダー型のサンプル容器に隙間なく詰め込み、試料の質量を測定する。東英工業 (株) 製のシリンダー型 Ni 標準試料 (飽和磁化 $M_s = 5.0 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{kg}$) を用いて装置の校正を行った後、室温中で試料の測定を行い、M-H 曲線を描く。最大印加磁場 1080~1140 kA/m 付近における試料の飽和磁化値を求め、あらかじめ求めておいた質量で除することにより、単位質量あたりの飽和磁化を得る。Fig. 4.2.1 (b) に VSM の概念図を示す。

4.2.2 X線回折解析による結晶構造の同定

粉末 X 線回折装置 (Powder X-Ray Diffractometer, XRD) としてリガク (株) 製 Ultima IV (Fig. 4.2.2 (a)) を用いて本試料の定性分析を行った。測定に用いた試料は、凍結乾燥により得られた粉末試料である。X 線回折装置は単結晶または粉末試料による単色 X 線の回折角を変えながら回折線の強度を計数管で測定し、強度と角度を自動的に記録する装置である。封入管の X 線管を用い、スリットを組み合わせ、適当な開き角のビームをつくる。試料と計数管を連動するゴニオメーターが試料を Fig. 4.2.2 (b) のように角運動 ω で回転すると同時に計数管を 2ω で回転し、その回転軸と平行な線焦点を用いて、回折線を計数管の直前で集める。これらの回折ピークからコア粒子の組成を定性的に求めることができる。試料水平型は試料を水平に設置して測定を行うことができ、従来の装置では測定が困難な試料も測定可能である。

4.2.3 コア粒子観察

(a) 観察装置

共沈法により作製した試料を電子顕微鏡観察し、その直径を求める。測定には透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope, TEM) として、日立 (株) 製 H-500 (Fig. 4.2.3 (a)) および日本電子 (株) 製 JEM-1011 (Fig. 4.2.3 (b)) を用いた。電子顕微鏡用試料として試料溶液にフォルムバル膜張り銅メッシュを浸漬後、乾燥したものを用いた。ゾルや沈殿などの粒子懸濁液を顕微鏡観察するときは、支持膜を張ったメッシュ上によく攪拌した試料懸濁液を一滴乗せて乾燥する。そのときに予め減圧濃縮により適当な粒子濃度にしておく必要がある。また、粒子同士の凝集を防ぐために超音波振動装置による分散を行うほか、乾燥時における凝集を防ぐために凍結乾燥することもある。Fig. 4.2.3 (c)に TEM の構造を示す。

(b) 粒子径測定方法

透過型電子顕微鏡より得られた画像から Fig. 4.2.3 (d)のように各微粒子の粒子径を測定し、次式のように平均粒子径 \bar{d} を算出した⁹⁾。平均化については $n \approx 100$ とした。

$$d_i = \frac{a_i + b_i}{2} \quad \left(\begin{array}{l} a : \text{長軸径} \\ b : \text{短軸径} \end{array} \right)$$

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i$$



Fig. 4.2.1 (a) VSM (VSM-5)

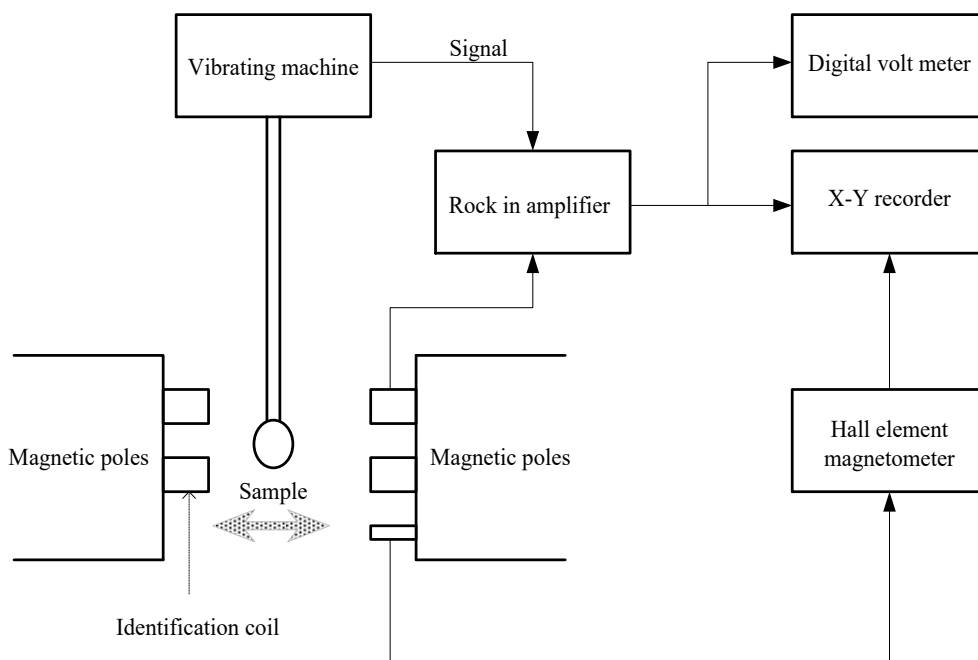


Fig. 4.2.1 (b) Conceptual diagram of VSM.



Fig. 4.2.2 (a) Powder X-ray diffractometer (Ultima IV)

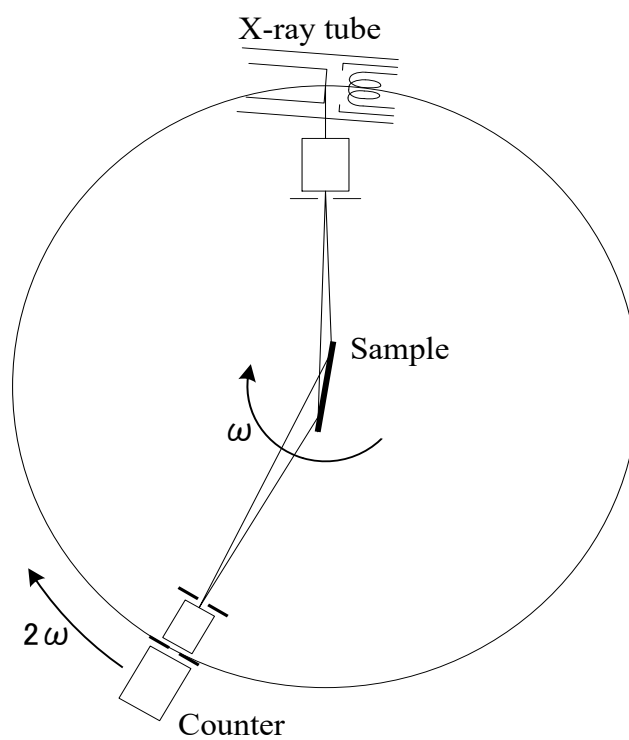


Fig. 4.2.2 (b) Diffraction of X-ray.



Fig. 4.2.3 (a) TEM (H-500)



Fig. 4.2.3 (b) TEM (JEM-1011)

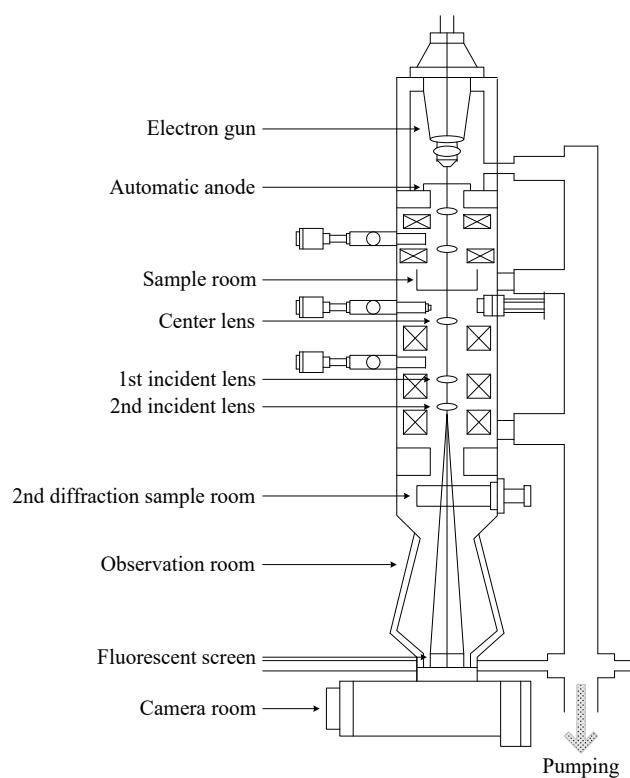


Fig. 4.2.3 (c) Conceptual diagram of TEM.

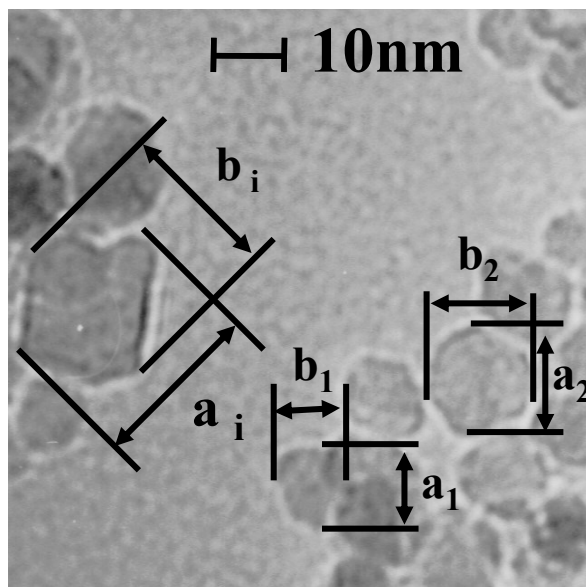


Fig. 4.2.3 (d) Measure of particle diameter.

5. 結果

5.1 アミド PEG 化アルギン酸の分子結合状態

合成の過程で試料の官能基が変化すると、得られる IR のスペクトルは変化する。そこで、各試料に対して IR による測定を行い、それぞれを比較することにより、各試料の化学構造の推定を行った。以降、測定に使用した各試料の名称は次の表記名にて記述する。メトキシ PEG アミンに関しては、基としたメトキシ PEG の平均分子量に応じて a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 と表記する。純粋なアルギン酸は Alg と表記する。アミド PEG 化アルギン酸に関しては、複合化に際して基としたメトキシ PEG の平均分子量に応じて PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg と表記する。

5.1.1 各試薬の IR スペクトル解析

IR スペクトルは縦軸に赤外線の透過度 (%T) をとり、横軸に波数[cm^{-1}]をとる。このスペクトルの形状は一見複雑ではあるが、物質固有の反応を示したものであり、吸収が起こる波数や透過度を詳しく解析することで官能基や結合の種類など基本的な構造を同定することが可能である。

まず、a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 の IR スペクトルを Fig. 5.1.1, Fig. 5.1.2, Fig. 5.1.3 にそれぞれ示す。各試料ともに 1450 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} 付近に吸収がみられる。これは PEG の繰り返し単位中のメチレン基に由来する吸収である。また、 1100 cm^{-1} 付近にも吸収がみられる。これは、PEG の繰り返し単位中のエーテル基に由来する吸収である。

次に、Alg の IR スペクトルを Fig. 5.1.4 に示す。測定結果から 2900 cm^{-1} 付近にカルボキシル基の O-H 伸縮に由来する吸収がみられる。また、 1720 cm^{-1} 付近における吸収帯はカルボキシル基中の C=O 伸縮に由来するものである。

5.1.2 アミド PEG 化アルギン酸の IR スペクトル解析

まず、PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg の IR スペクトルを Fig. 5.1.5, Fig. 5.1.6, Fig. 5.1.7 にそれぞれ示す。各試料の IR スペクトルについて、 3400 cm^{-1} 付近に広い吸収帯が見られる。これは、水酸基に由来する吸収である。また、 2900 cm^{-1} 付近に PEG 鎖の繰り返し単位中に存在するメチレン基、若しくはカルボキシル基の O-H 伸縮に由来する吸収がみられる。また、新たな吸収帯として観測された 1650 cm^{-1} 付近における吸収帯はアミド基由来の C=O 伸縮である。

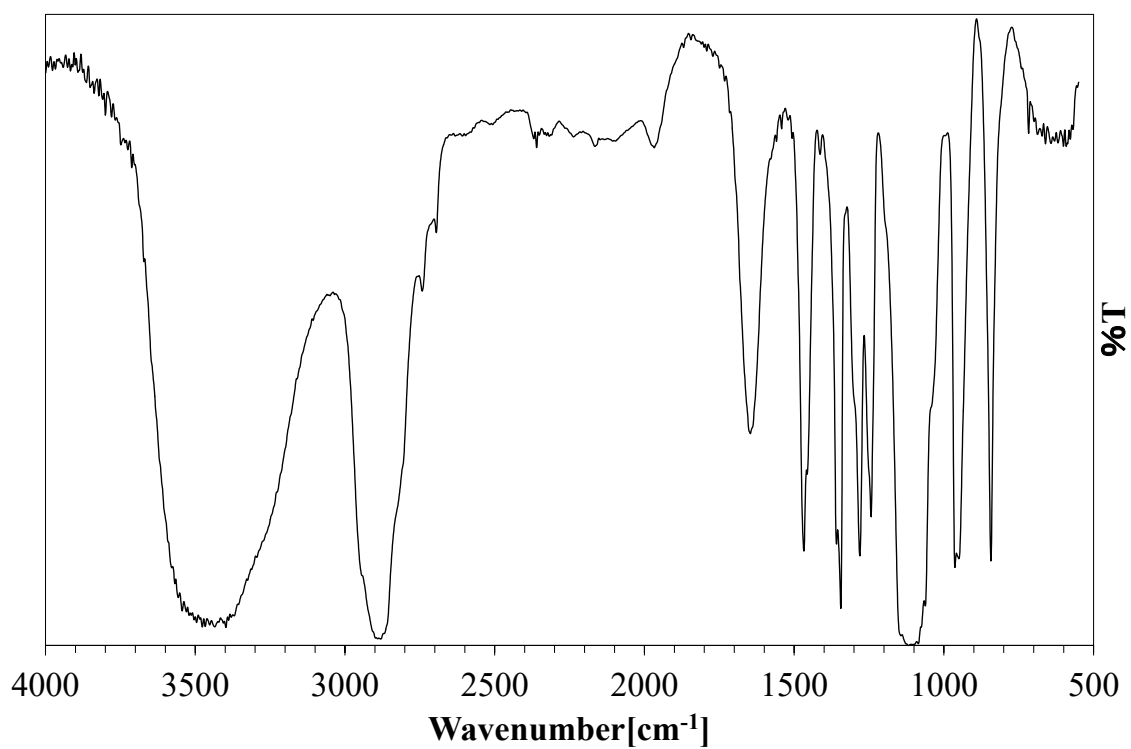


Fig. 5.1.1 IR spectrum of a/m-PEG2000.

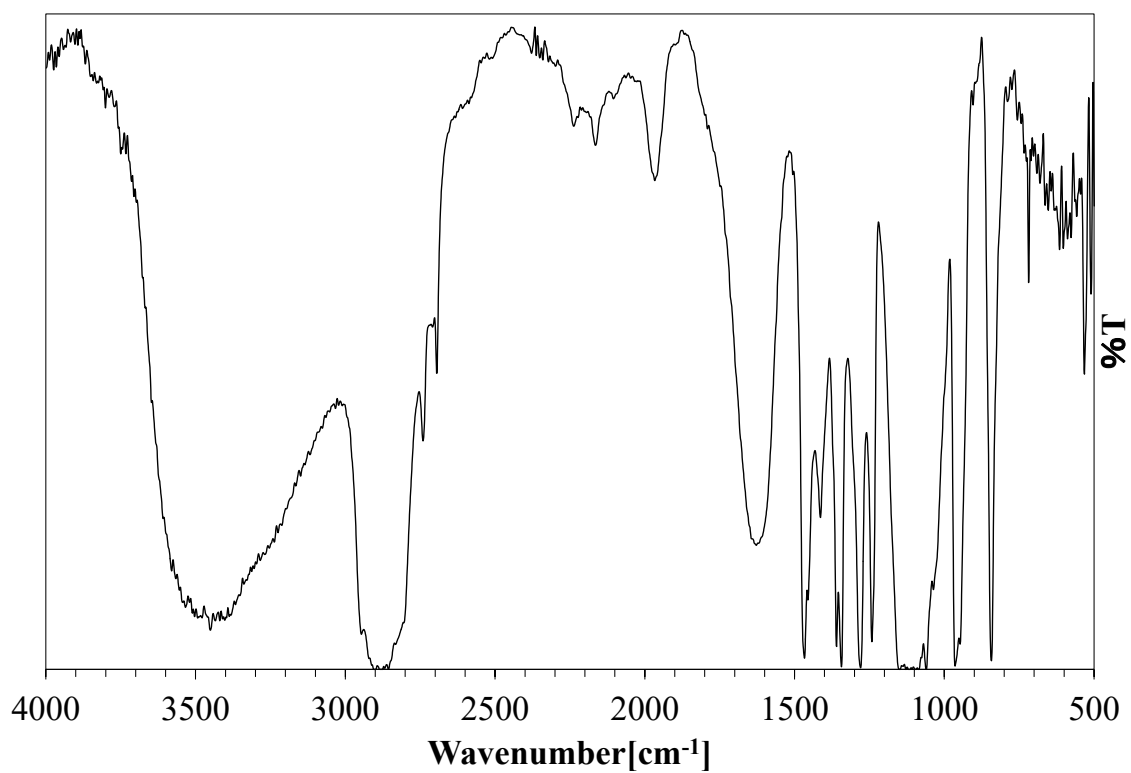


Fig. 5.1.2 IR spectrum of a/m-PEG5000.

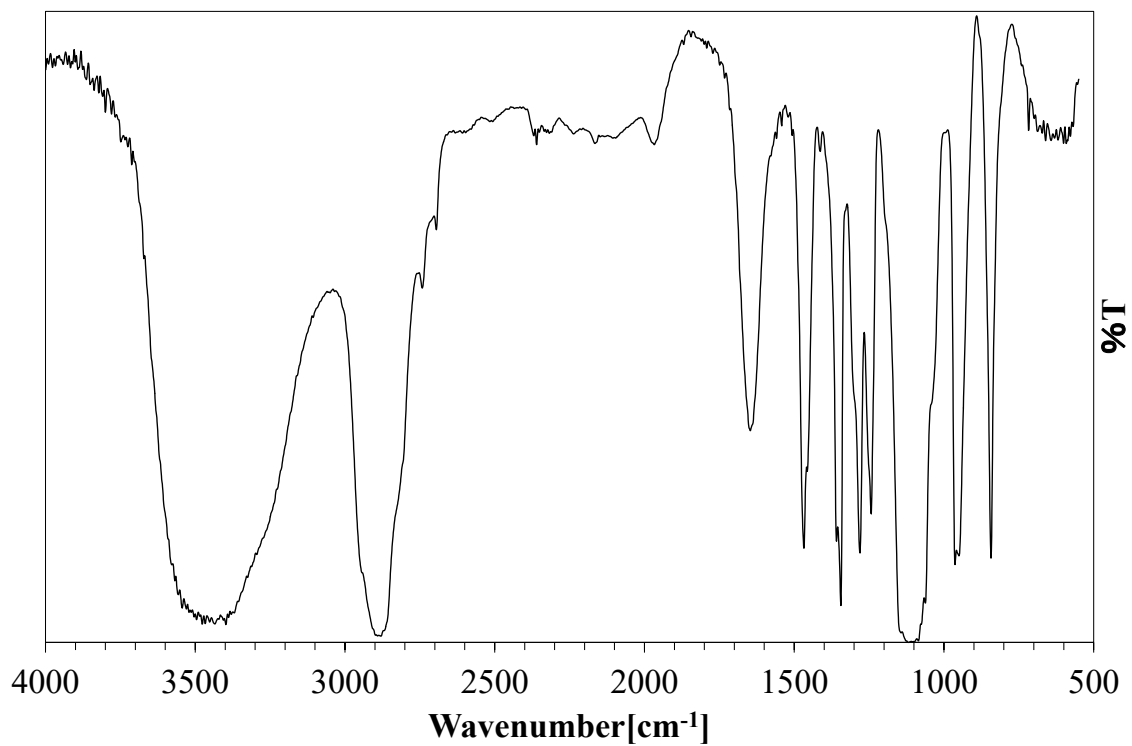


Fig. 5.1.3 IR spectrum of a/m-PEG10000.

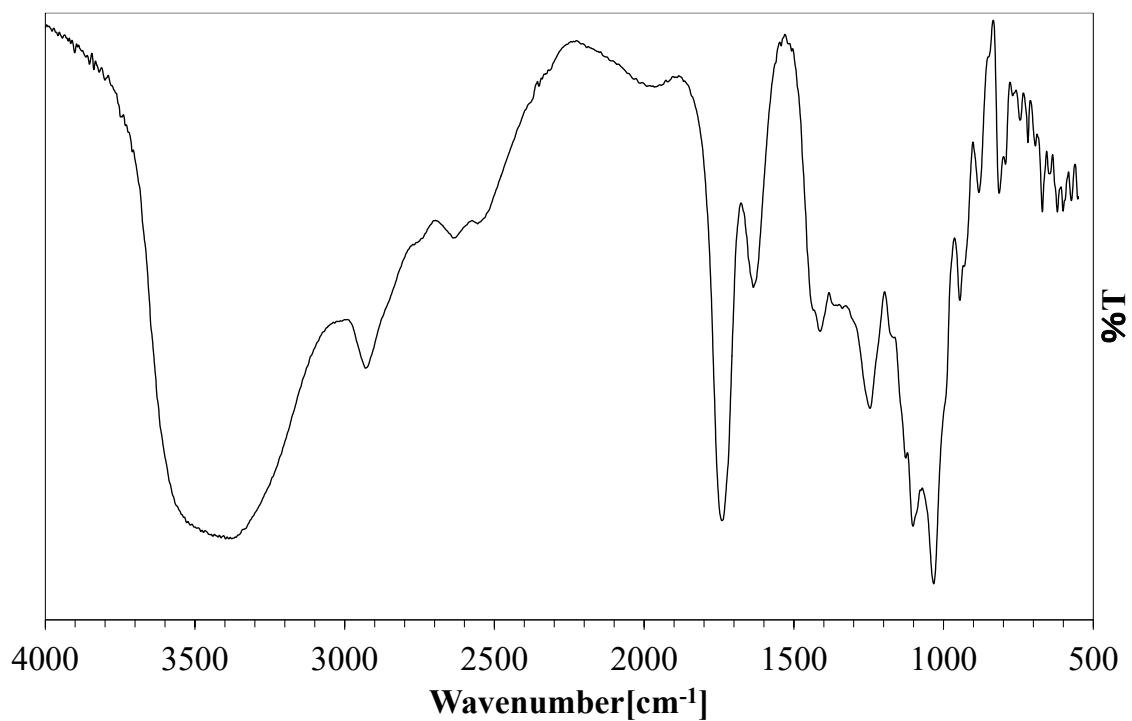


Fig. 5.1.4 IR spectrum of Alg.

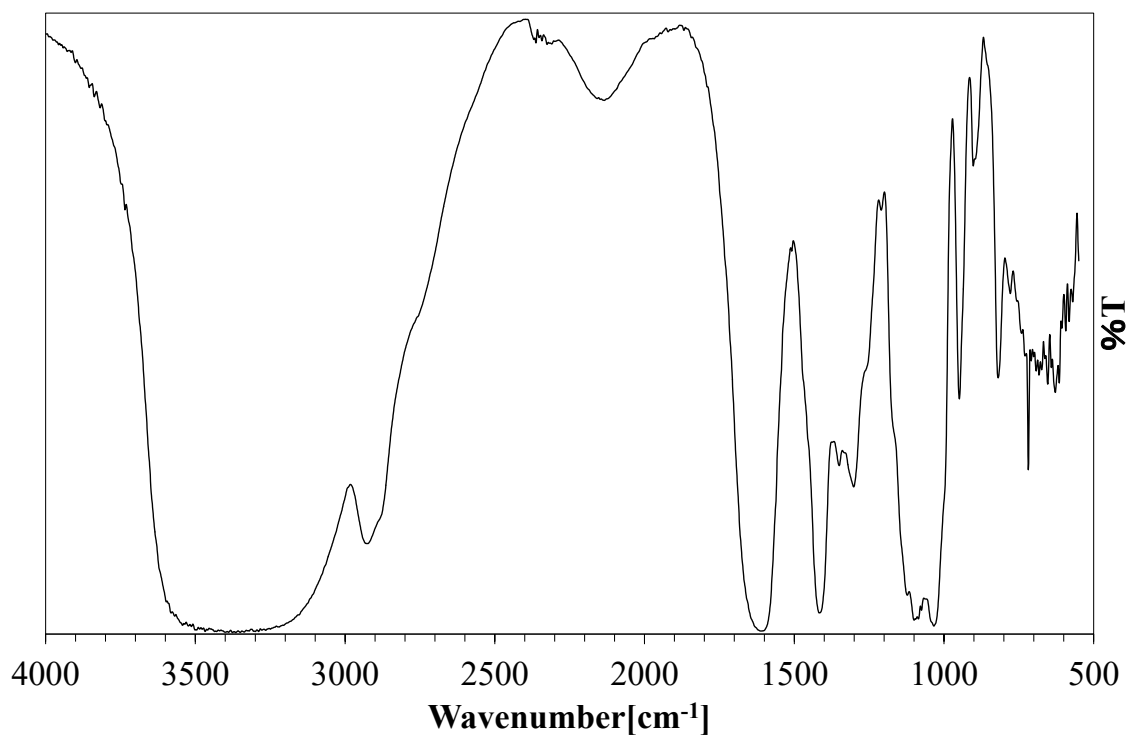


Fig. 5.1.5 IR spectrum of PEG2000-Alg .

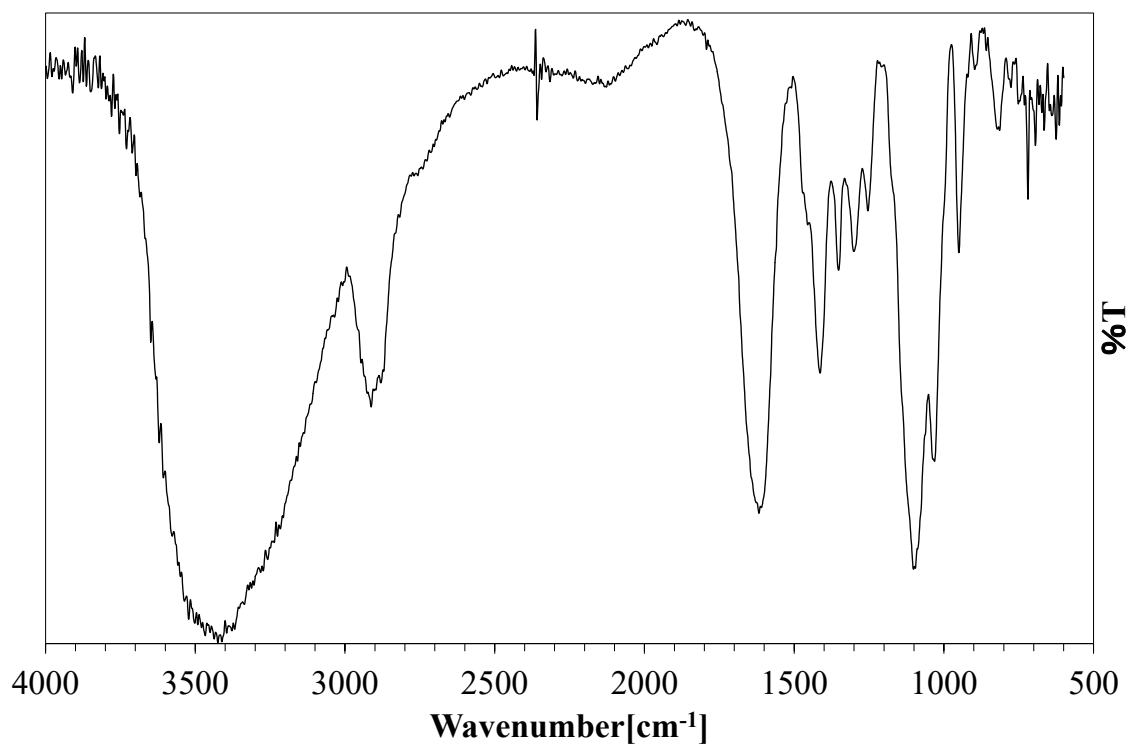


Fig. 5.1.6 IR spectrum of PEG5000-Alg.

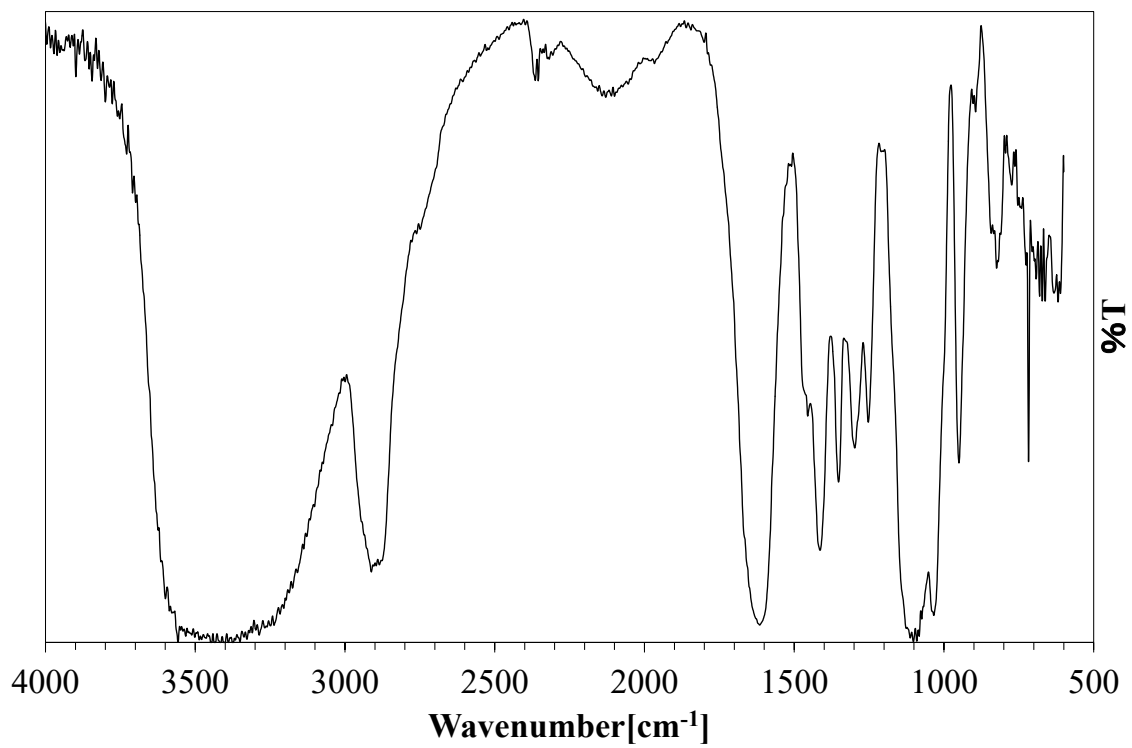


Fig. 5.1.7 IR spectrum of PEG10000-Alg.

5.2 PEG 化アルギン酸被膜 MF の特性

本節以降, 5.1 節において記述した試料 PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg をアミド PEG 化アルギン酸と仮定する. 当研究室において, 従来扱われてきた糖被膜型 MF の外殻被膜材の材料特性から, 合成時に使用する分散剤の性質等は作製した MF の材料特性に多大な影響を及ぼす傾向が認められる. 本研究では, 試料として作製した MF の分散剤として Alg, PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg をそれぞれ使用している. 分散剤に用いたアミド PEG 化アルギン酸は, 同様に分散剤として使用した純粋なアルギン酸に対し, PEG 誘導体が複合された割合に比例して分子量が増大しているため, 作製した MF の磁気特性に与える影響が変化する可能性がある.

さらに, 糖被膜型 MF では糖が有する官能基が変化すると合成時の pH 雰囲気による飽和磁化や, 分散状態の変化に違いが生じることが確認されている. 本研究で作製する MF では, アルギン酸の官能基を置換操作した PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg を分散剤に用いている. そのため, 各種アミド PEG 化アルギン酸を分散剤として使用した MF では, 純粋なアルギン酸を分散剤に用いた MF と比較して合成時の pH 雰囲気に対する影響が変化している可能性がある.

そこで, Alg, PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg を分散剤として使用するにあたり, 合成時 pH 雰囲気を種々変化させた試料を作製し, 特性の変化を調査するとともに, 各種の分散剤を使用した試料の磁気特性について比較を行った. なお, 3.1.2 (b)-(ii)でも述べたように, PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg については, 合成時に仕込んだアルギン酸中のカルボキシル基とメトキシ PEG アミンの mol 比率を 60:1 として複合化操作を行っている.

また, 作製した各試料の名称は次の表記名にて記述する. 分散剤にアルギン酸を用いた試料を Alg/MF, アミド PEG 化アルギン酸を用いたものを PEG-Alg/MF と表記し, PEG-Alg/MF に関しては場合に応じて, 分散剤とした PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg に応じて, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF と限定して表記する. 加えて, 何れの試料についても, 合成時の pH 雰囲気を限定する場合は文中の試料名直後に記載する.

5.2.1 PEG 誘導体の分子結合状態に関する IR スペクトル解析

Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF について作製した試料の IR スペクトルを Fig. 5.2.1, Fig. 5.2.2, Fig. 5.2.3, Fig. 5.2.4 にそれぞれ示す. 以下本節各項にて, それぞれの試料から得られた測定結果について述べる.

(a) Alg/MF の IR スペクトル

Fig. 5.2.1 に測定対象とした Alg/MF (合成時 pH=11.57) の IR スペクトルを示す. 得られた IR スペクトルは Alg/MF の分散剤に用いた Alg の IR スペクトル (Fig. 5.1.4) と酷似していた. Alg の IR スペクトルと Alg/MF の IR スペクトルを比較したところ, 1720 cm^{-1} 付近に

おける吸収帯の透過率について特徴的な差異が確認された。

(b) PEG2000-Alg/MF の IR スペクトル

Fig. 5.2.2 に測定対象とした PEG2000-Alg/MF (合成時 pH=11.42) の IR スペクトルを示す。得られた IR スペクトルは PEG2000-Alg/MF の分散剤に用いた PEG2000-Alg の IR スペクトル (Fig. 5.1.5) と酷似していたが、 1650 cm^{-1} 付近にみられる吸収帯の幅が PEG2000-Alg のものと比較して狭くなっていた。

(c) PEG5000-Alg/MF の IR スペクトル

Fig. 5.2.3 に測定対象とした PEG5000-Alg/MF (合成時 pH=11.06) の IR スペクトルを示す。得られた IR スペクトルは PEG5000-Alg/MF の分散剤に用いた PEG5000-Alg の IR スペクトル (Fig. 5.1.6) と酷似していたが、PEG2000-Alg/MF と同様、 1650 cm^{-1} 付近にみられる吸収帯の幅が PEG5000-Alg のものと比較して狭くなっていた。

(d) PEG10000-Alg/MF の IR スペクトル

Fig. 5.2.4 に測定対象とした PEG10000-Alg/MF (合成時 pH=10.70) の IR スペクトルを示す。得られた IR スペクトルは PEG10000-Alg/MF の分散剤に用いた PEG10000-Alg の IR スペクトル (Fig. 5.1.7) と酷似していたが、他のアミド PEG 化アルギン酸を使用した試料と同様、 1650 cm^{-1} 付近にみられる吸収帯の幅が PEG10000-Alg のものと比較して狭窄していた。

以上より、作製した PEG-Alg/MF について 1650 cm^{-1} 付近にみられる吸収帯形状が狭窄する傾向を示した。

5.2.2 磁気特性の変化

Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF について、酸性領域、中性領域及びアルカリ性領域の pH 雰囲気下において合成した各試料の磁化曲線をそれぞれ Fig. 5.2.5～Fig. 5.2.7 に示す。これらのグラフは横軸に印加磁場の強さ H [kA/m] をとり、縦軸に単位質量当たり磁化 M [$\text{A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$] をとったものである。

(a) 酸性領域での合成

Fig. 5.2.5 より、酸性領域の pH 雰囲気下で合成された各試料の磁化曲線に関して、Alg/MF (pH=5.81), PEG2000-Alg/MF (pH=5.01) 及び PEG5000-Alg/MF (pH=5.82) は各試料とも残留磁化および保磁力を有しておらず超常磁性を示した。しかしながら、磁化曲線の形状に関しては Alg/MF に対して PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF との間で違いが確認された。Alg/MF の磁化挙動については、磁場を印加した直後から磁化の顕著な上昇が確認でき、 500 kA/m 付近で概ね飽和に達した。その後、最大印加磁場までは緩やかな磁化の上昇が認められた。一方で、PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF の磁化挙動については、磁化曲線の形状が直線的となり印加磁場の変化に対して磁化は緩やかに変化した。その後、磁化が飽和する現象は認められなかった。これは、Alg/MF に対して PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF が常磁性体の特性に近い磁化曲線となり、磁化され難いことを示している。また、PEG10000-

Alg/MF (pH=4.60) の試料に関しては、酸性領域の pH 雰囲気下において試料の合成をした際、生成された金属微粒子が分散状態を十分に維持することが出来なかったことを示している。

(b) 中性領域での合成

Fig. 5.2.6 より、中性領域の pH 雰囲気下で合成された各試料では磁化曲線の形状に関して、Alg/MF (pH=7.94), PEG2000-Alg/MF (pH=8.32), PEG5000-Alg/MF (pH=8.24) 及び PEG10000-Alg/MF (pH=8.40) の間で差異は無く、各試料とも超常磁性を示した。また、各試料の磁化挙動については、磁場を印加した直後から磁化の顕著な上昇が確認でき、500 kA/m 付近で概ね飽和に達した。その後、最大印加磁場までは緩やかな磁化の上昇が認められた。すなわち、中性領域の pH 雰囲気下で合成された各試料は、磁気ヒステリシスを殆ど持っておらず、磁化されやすいことを示しており、磁化曲線の形状は軟磁性材料特有の磁気特性を有することが確認された。

(c) アルカリ性領域での合成

Fig. 5.2.7 より、アルカリ性領域の pH 雰囲気下で合成された各試料では磁化曲線の形状に関して、Alg/MF (pH=11.57), PEG2000-Alg/MF (pH=11.42), PEG5000-Alg/MF (pH=11.06) 及び PEG10000-Alg/MF (pH=10.70) の間で差異は無く、それぞれの試料とも超常磁性を示した。各試料の磁化挙動については、中性領域の pH 雰囲気下で合成された各試料と同様、磁場を印加した直後から磁化の顕著な上昇が確認でき、500 kA/m 付近で概ね飽和に達した。その後、最大印加磁場までは緩やかな磁化の上昇が認められた。これは、中性領域の pH 雰囲気下で合成された試料と同様、アルカリ性領域の pH 雰囲気下で合成された各試料が磁気ヒステリシスを殆ど持っておらず、磁化されやすいことを示しており、磁化曲線の形状は軟磁性材料特有の磁気特性を有することが確認された。

5.2.3 飽和磁化の変化

本研究では、Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF について、合成条件として合成時 pH 雰囲気を酸性領域からアルカリ性領域まで種々設定することで、合成時 pH 雰囲気が試料の飽和磁化に及ぼす影響を調査した。Alg/MF 及び PEG-Alg/MF について、合成時 pH 雰囲気と単位質量あたりの飽和磁化との関係を Fig. 5.2.8 ~ Fig. 5.2.11 に示す。これらのグラフは横軸に合成時 pH 雰囲気を取り、縦軸に、本研究で使用した VSM での最大の印加磁場である 1350~1400kA/m 付近において測定された試料の単位質量あたりの飽和磁化 M_s [$A \cdot m^2/kg$]をとったものである。

(a) Alg/MF の飽和磁化特性

Fig. 5.2.8 より Alg/MF は pH=9~12 のアルカリ性領域にて合成した試料について、単位質量あたりの飽和磁化が高いことが確認された。また、単位質量あたりの飽和磁化が最も高かった試料は、合成時 pH=11.57 であり、飽和磁化は $33.64 A \cdot m^2/kg$ であった。さらに、pH=12 付近の強アルカリ領域における合成となると、生成された微粒子の大半が沈殿し、分散状態

が維持されない傾向が顕著に現れた。一方で、pH=5 付近となる酸性領域において、合成時 pH 雰囲気は酸性に寄っている程、生成された試料の単位質量あたりの飽和磁化は低い傾向にあり、最も低い飽和磁化を示した試料は、合成時 pH=4.21 であり、飽和磁化は $5.80 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ であった。

(b) PEG2000-Alg/MF の飽和磁化特性

Fig. 5.2.9 より PEG2000-Alg/MF については、Alg/MF と比較して、中性領域からアルカリ性領域におけるやや低 pH 側にかけて合成した試料について、単位質量あたりの飽和磁化が高いことが確認された。また、およそ同一の pH 雰囲気下で合成した Alg/MF のものと比較して、飽和磁化はやや低い傾向にあり、単位質量あたりの飽和磁化が最も高かった試料は、合成時 pH=11.42 であり、飽和磁化は $23.69 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ であった。さらに、pH=12 付近の強アルカリ領域における合成となると、生成された微粒子の大半が沈殿し、分散状態が維持されない傾向が顕著に現れた。一方で、pH=5 付近となる酸性領域において、合成時 pH 雰囲気が酸性に寄っている程、生成された試料の単位質量あたりの飽和磁化は低い傾向にあり、最も低い飽和磁化を示した試料は、合成時 pH=5.01 であり、飽和磁化は $3.33 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ であった。

(c) PEG5000-Alg/MF の飽和磁化特性

Fig. 5.2.10 より PEG5000-Alg/MF は、Alg/MF と比較して、中性領域からアルカリ性領域におけるやや低 pH 側にかけて合成した試料について、単位質量あたりの飽和磁化が高いことが確認された。また、およそ同一の pH 雰囲気下で合成した Alg/MF のものと比較して、飽和磁化は半分近くまで低い傾向にあり、単位質量あたりの飽和磁化が最も高かった試料は、合成時 pH=10.64 であり、飽和磁化は $19.88 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ であった。さらに、pH=12 付近またはそれ以上の領域における合成となると、生成された微粒子の大半が沈殿し、分散状態が維持されない傾向が顕著に現れた。一方で、pH=5 付近となる酸性領域において、合成時 pH 雰囲気が酸性に寄っている程、生成された試料の単位質量あたりの飽和磁化は低い傾向にあり、最も低い飽和磁化を示した試料は、合成時 pH=5.82 であり、飽和磁化は $4.35 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ であった。

(d) PEG10000-Alg/MF の飽和磁化特性

Fig. 5.2.11 より PEG10000-Alg/MF についても、Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF と同様に、アルカリ性領域において合成した試料について、単位質量あたりの飽和磁化が高いことが確認された。また、単位質量あたりの飽和磁化が最も高かった試料は、合成時 pH=10.70 であり、飽和磁化は $14.47 \text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg}$ となった。さらに、Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF と比較して、PEG10000-Alg/MF については何れの pH 領域についても、生成された微粒子が沈殿する傾向が著しく強く、結果として微粒子の分散状態を維持できた試料は僅かであった。

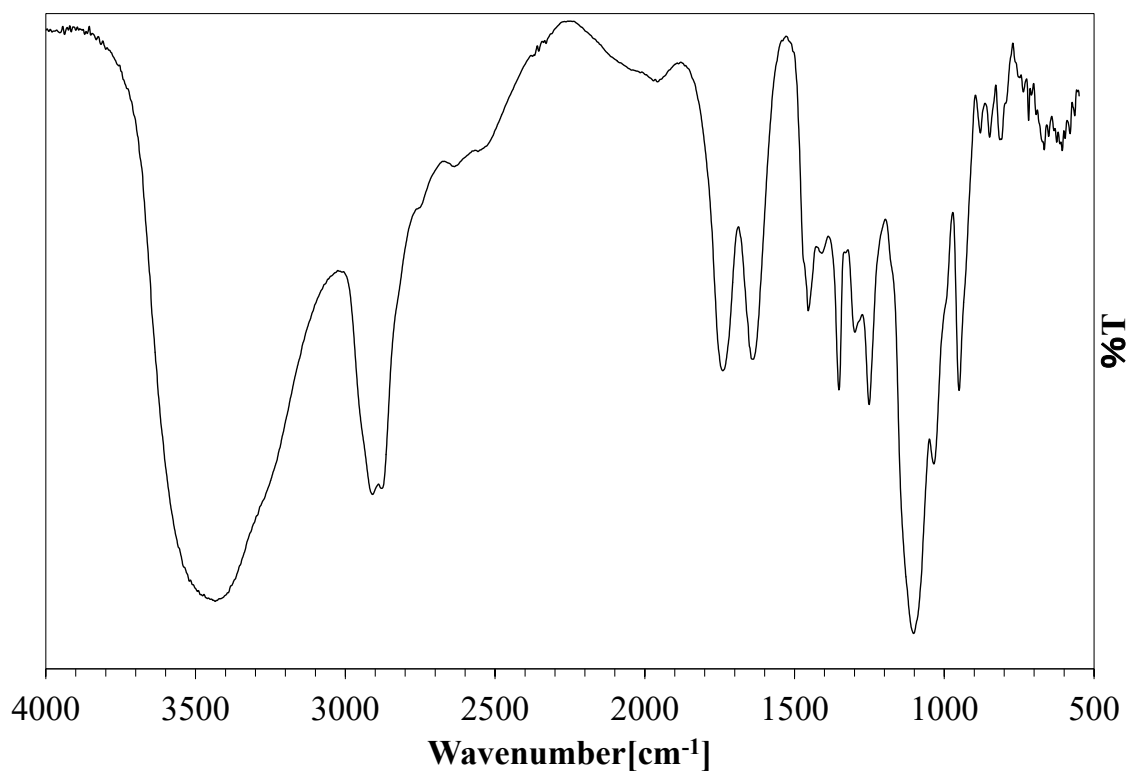


Fig. 5.2.1 IR spectrum of Alg/MF.

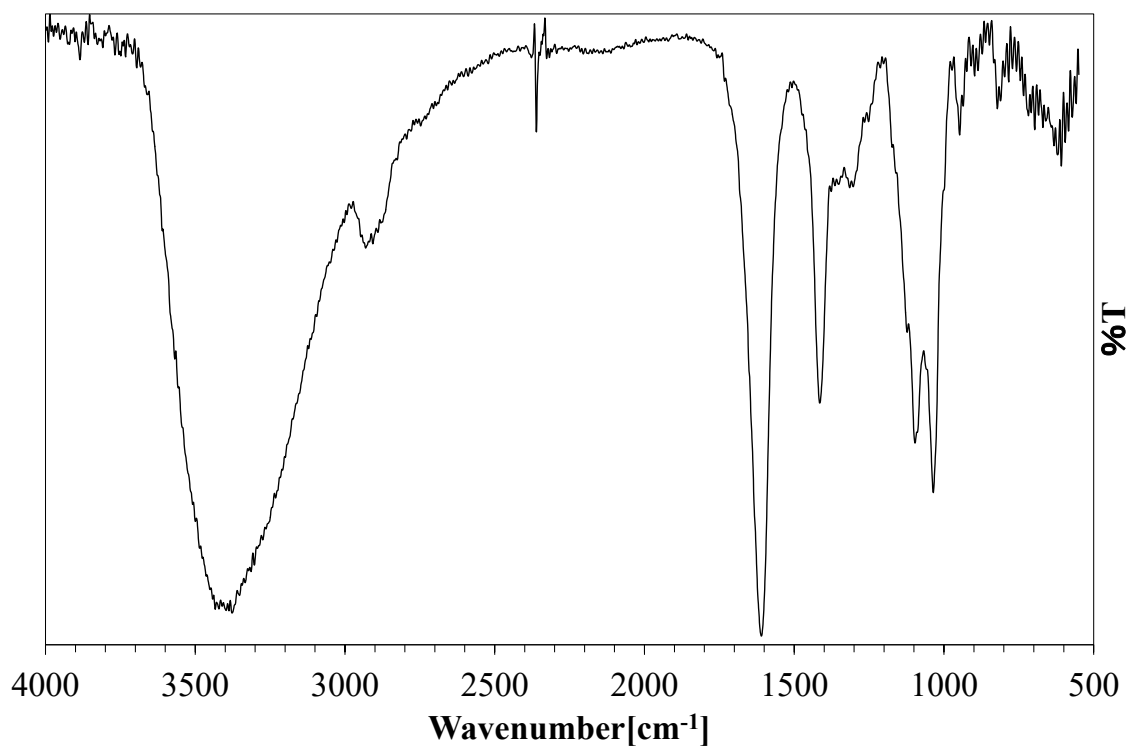


Fig. 5.2.2 IR spectrum of PEG2000-Alg/MF.

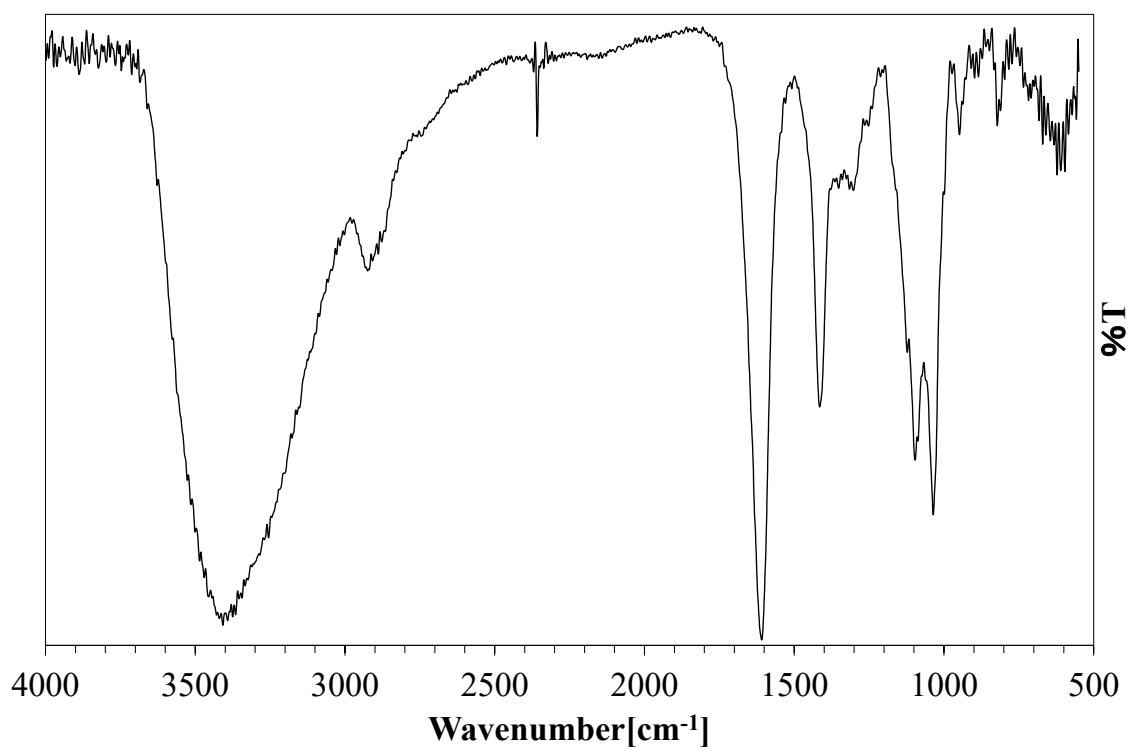


Fig. 5.2.3 IR spectrum of PEG5000-Alg/MF.

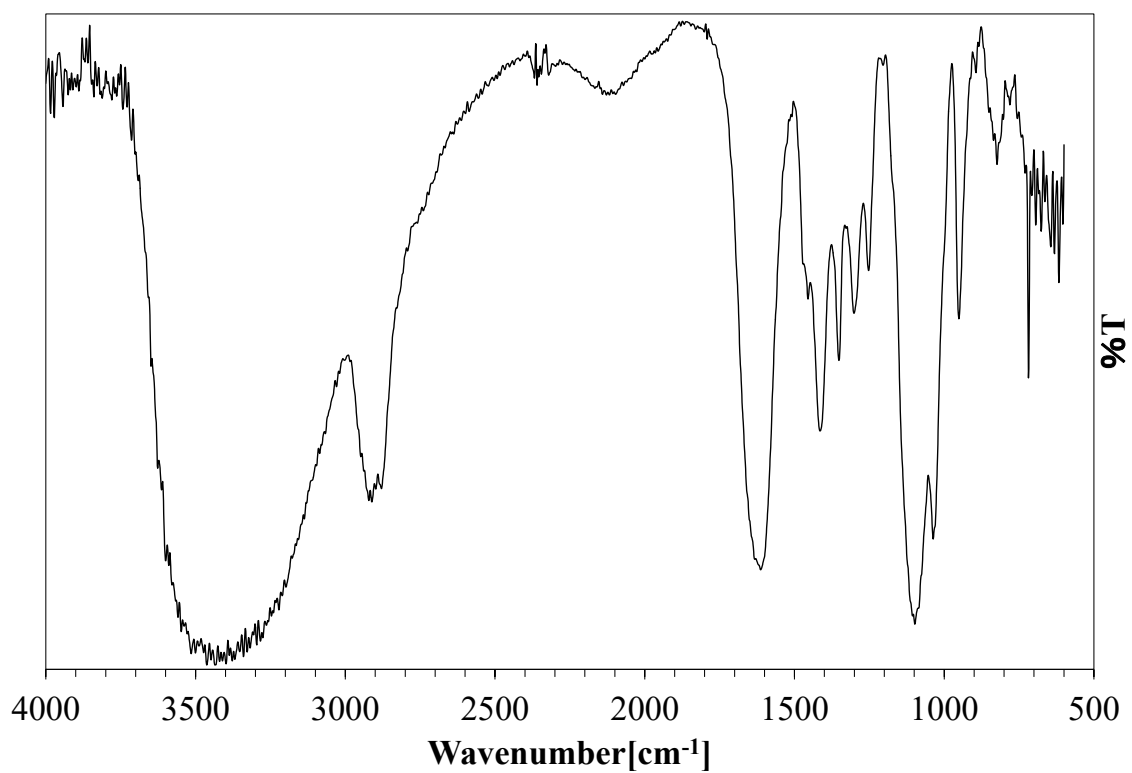


Fig. 5.2.4 IR spectrum of PEG10000-Alg/MF.

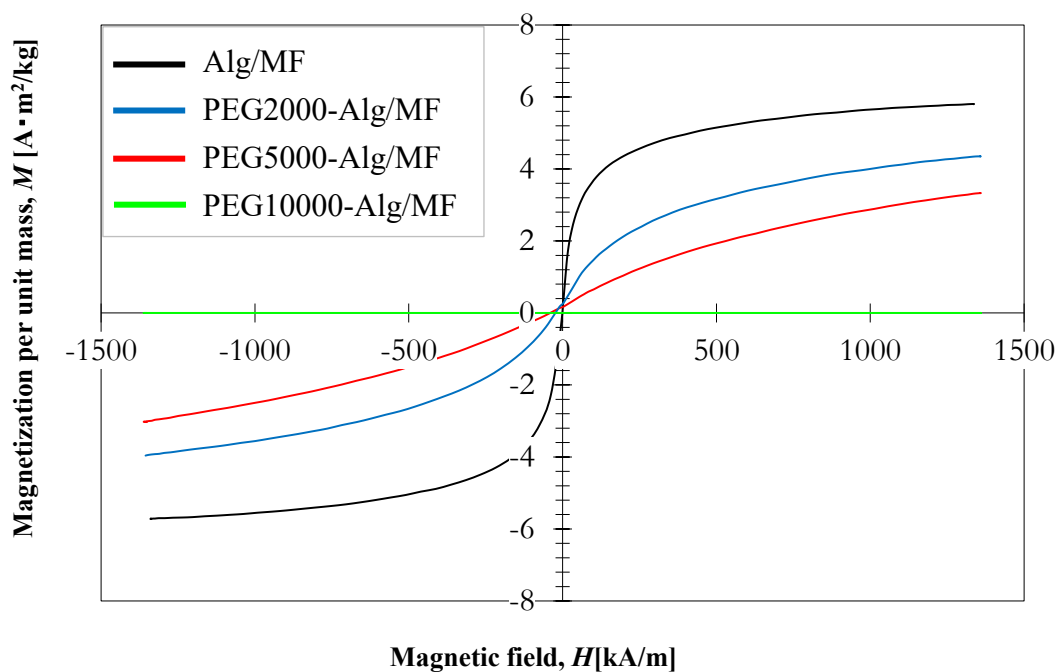


Fig. 5.2.5 Magnetization curves of samples synthesized at acid pH atmosphere.

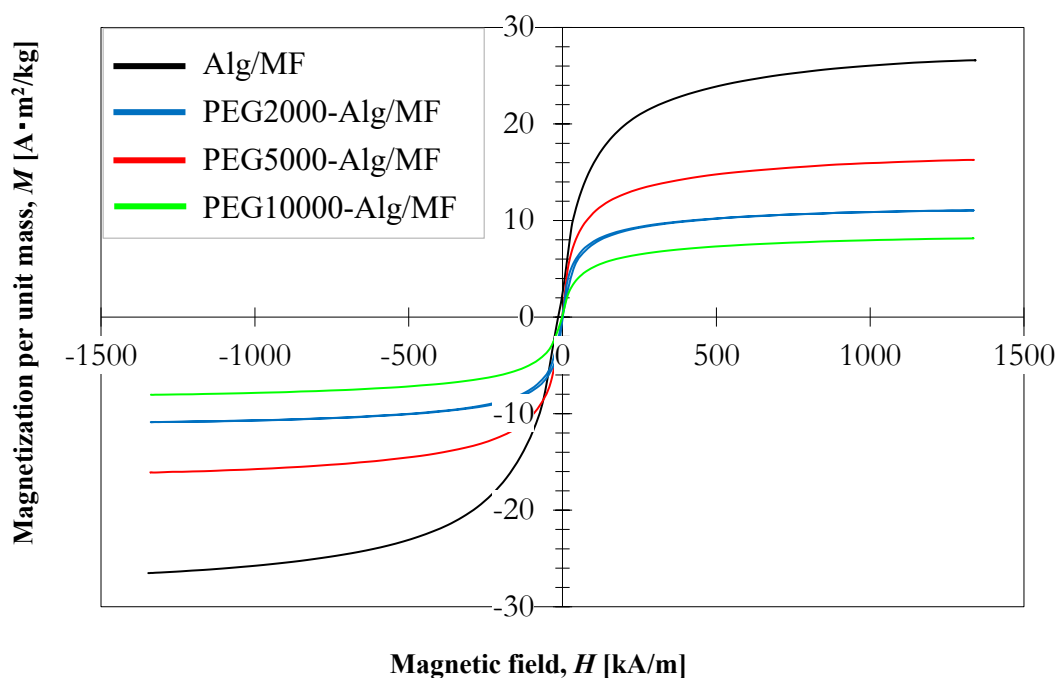


Fig. 5.2.6 Magnetization curves of samples synthesized at neutral pH atmosphere.

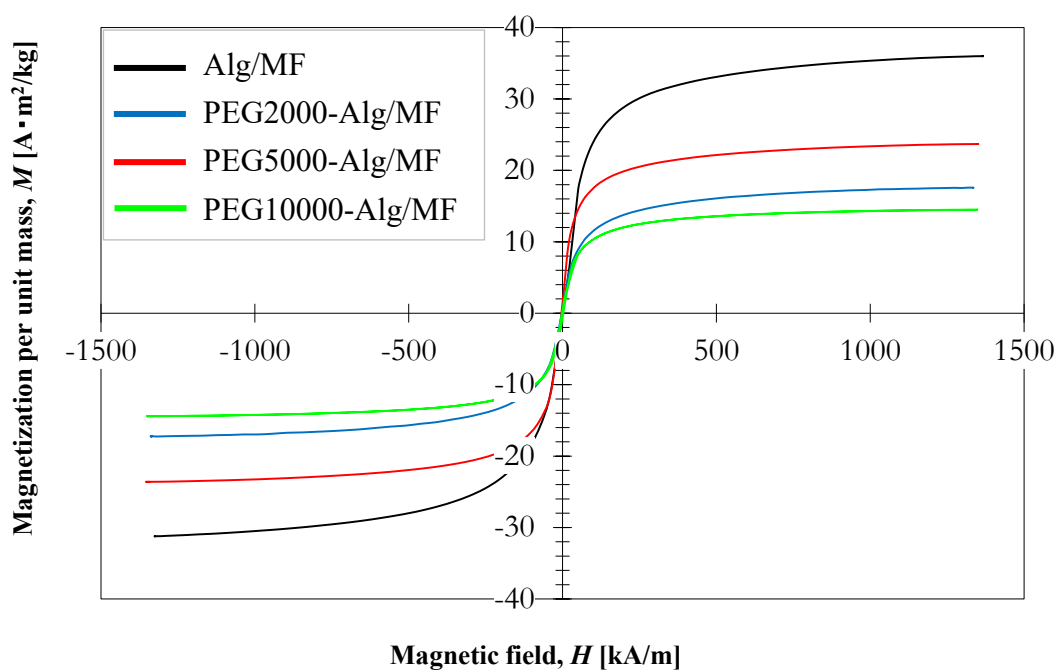


Fig. 5.2.7 Magnetization curves of samples synthesized at alkaline pH atmosphere.

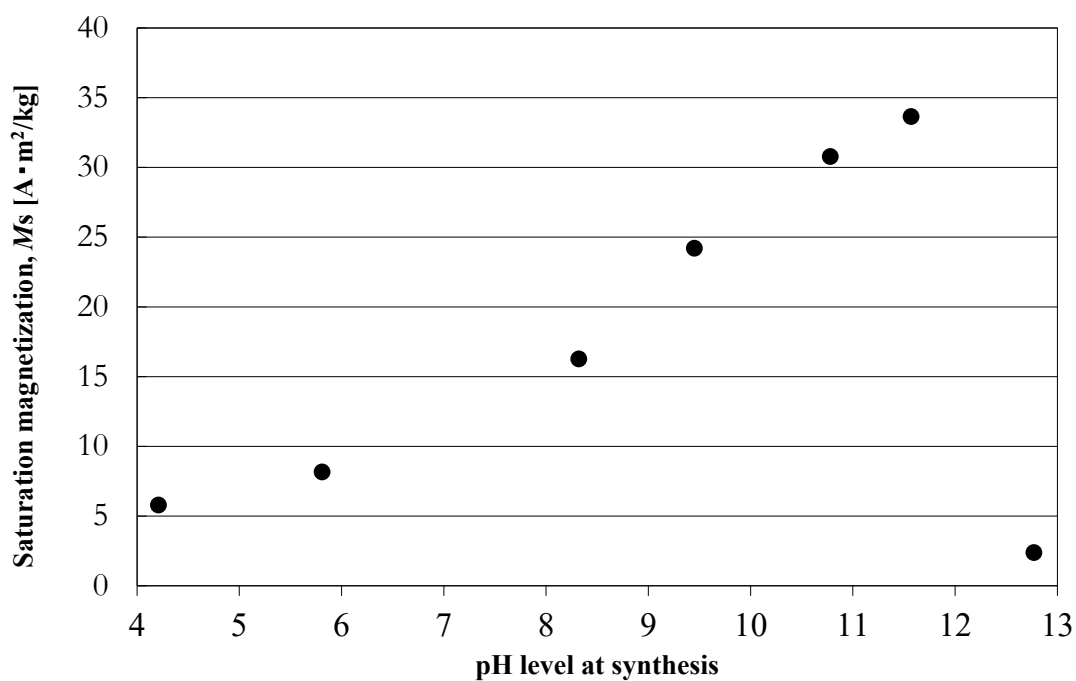


Fig. 5.2.8 Relation between synthesis pH level and saturation magnetization for Alg/MF.

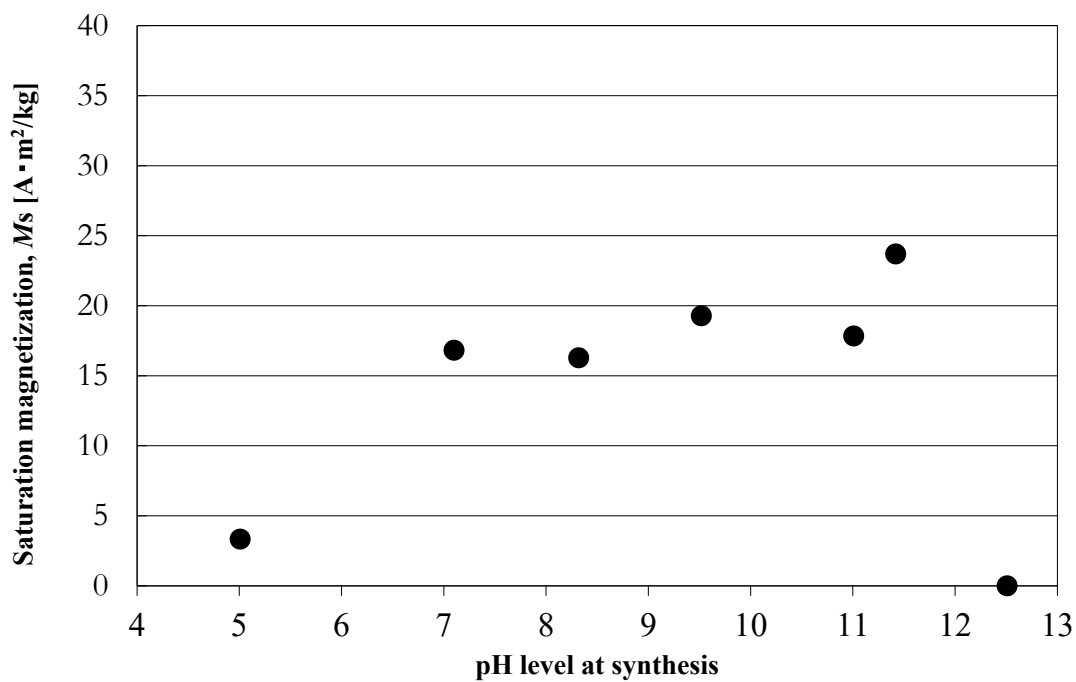


Fig. 5.2.9 Relation between synthesis pH level and saturation magnetization for PEG2000-Alg/MF.

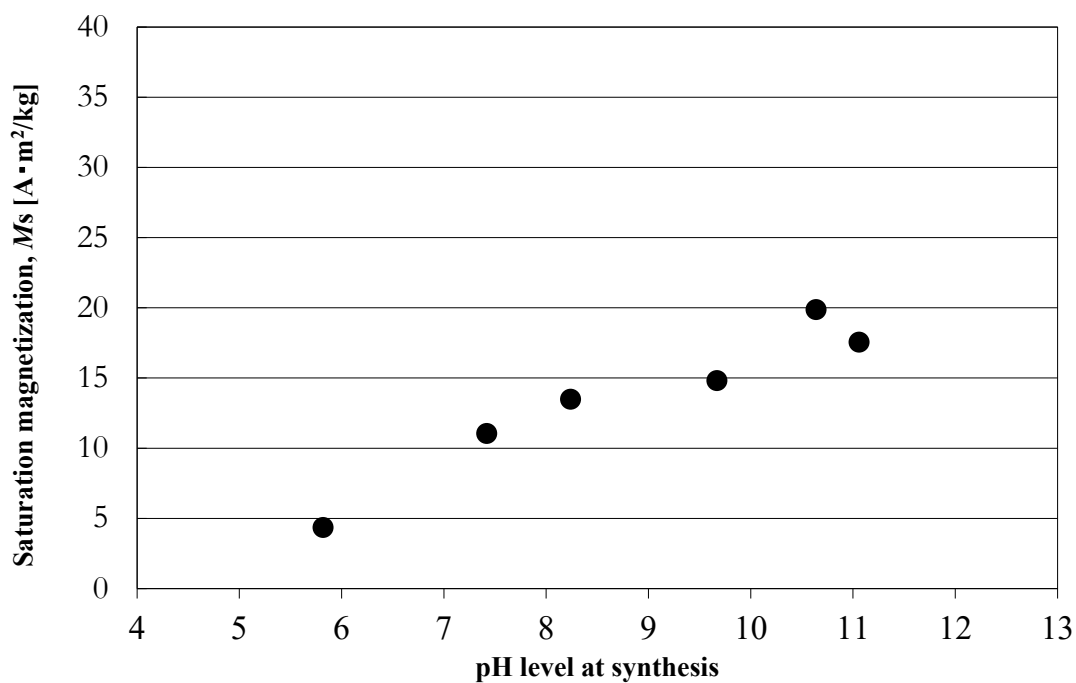


Fig. 5.2.10 Relation between synthesis pH level and saturation magnetization for PEG5000-Alg/MF.

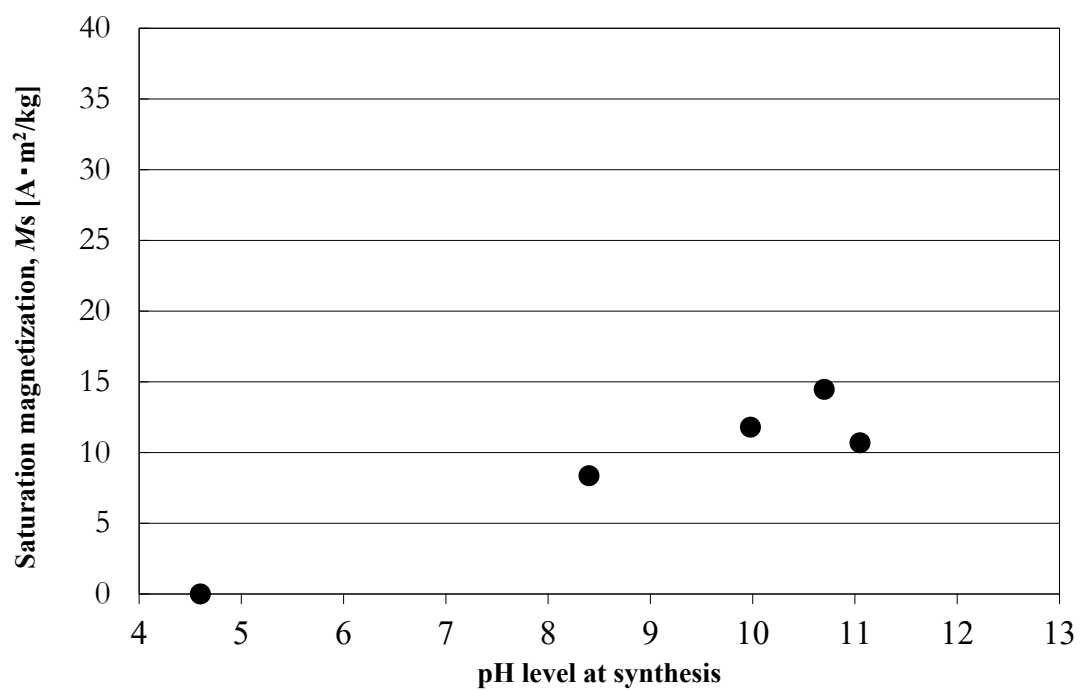


Fig. 5.2.11 Relation between synthesis pH level and saturation magnetization for PEG10000-Alg/MF.

5.3 内包カプセル化のための複合体作製

3.3.2 項にて記述した通り，本研究において，Alg, PEG2000-Alg, PEG5000-Alg 及び PEG10000-Alg を利用したシステイン内包型アルギン酸カルシウムのカプセル体モデルは，Alg の繰り返しユニット中に存在するカルボキシル基に対して，カルシウム塩を反応させることによって作製した．ここで，アミドPEG化AlgはAlgに対し，PEG誘導体が複合された割合に比例して分子量が増大しているため，カプセル体の作製に際して与える影響が異なる可能性がある．なお，PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg については，合成時に仕込んだアルギン酸中のカルボキシル基とメトキシPEGアミンのmol比率を60:1として複合化操作を行っている．また，作製した試料の表記名として，母材にアルギン酸を用いた試料を Alg/gel，アミドPEG化アルギン酸を用いたものは，PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg に応じて，PEG2000-Alg/gel, PEG5000-Alg/gel, PEG10000-Alg/gel をそれぞれ使用する．

5.3.1 カプセル体の作製に伴う母材の影響

Alg/gel, PEG2000-Alg/gel, PEG5000-Alg/gel について，作製した試料の外観写真を Fig. 5.3.1(a), (b), (c)にそれぞれ示す．また，各試料のゲル化プロセスに関して，母材の違いによってカプセル体の粒子径及び形状に差異が生じた．以下本節各項にて，それぞれの母材を使用したカプセル体の形状と粒子径の違いについて述べる．

(a) Alg/gel の作製

Fig. 5.3.1 (a)に作製した Alg/gel の試料外観を示す．得られた試料は白色の球形粒子であった．また，生成されたカプセル体について，測定対象数 $n=20$ とした場合の平均粒子径は $3.76\pm 0.12\text{mm}$ であり，比較的均一な粉体の粒子が形成された．

(b) PEG2000-Alg/gel の作製

Fig. 5.3.1 (b)に作製した PEG2000-Alg/gel の試料外観を示す．得られた試料は白色であり，楕円形を含む球形粒子であることが確認された．また，生成されたカプセル体について，測定対象数 $n=20$ とした場合の平均粒子径は $4.12\pm 1.35\text{mm}$ であり，Alg/gel と比較して粒子径，形状ともに不均一なものとなった．

(c) PEG5000-Alg/gel の作製

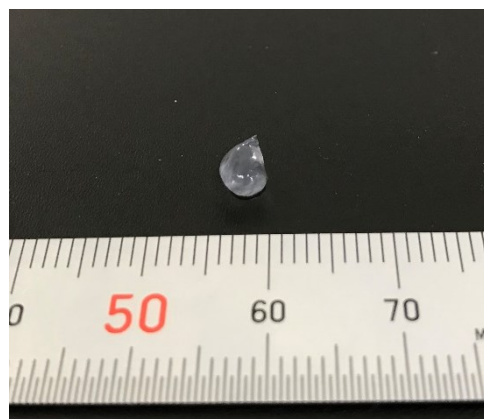
Fig. 5.3.1 (c)に作製した PEG5000-Alg/gel の試料外観を示す．得られた試料は白色であり，楕円の球形を形成していることが確認された．また，Alg/gel, PEG2000-Alg/gel のカプセル体と比較して粒子径，形状ともに非常に不均一なものとなり粒子径の測定は困難であった．

(d) PEG10000-Alg/gel の作製

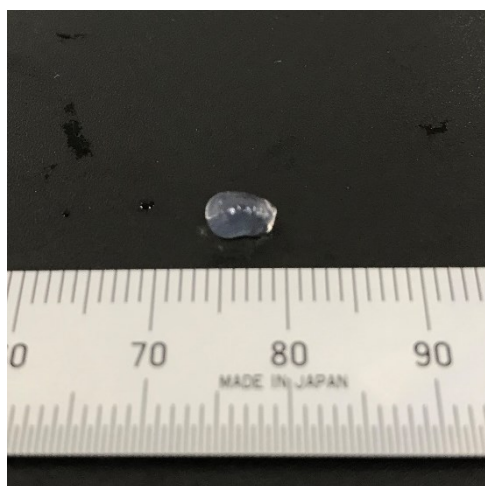
PEG10000-Alg を母材として PEG10000-Alg/gel の作製を試みたところ，カルシウム塩溶液に対して PEG10000-Alg を滴下した際，形成されたゲルは球状を維持することが出来ず，溶液中に薄膜状のゲルが浮遊する形で生成された．



(a) Alg/gel



(b) PEG2000-Alg/gel



(c) PEG5000-Alg/gel

Fig. 5.3.1 Photograph of sample (a) Alg/gel (b) PEG2000-Alg/gel
(c) PEG5000-Alg/gel.

6. 考察

6.1 アミド PEG 化アルギン酸の複合化

PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg のそれぞれの IR スペクトルから, 各試料の側鎖に導入した a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 の存在を示すメチレン基 (1450 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} 付近) 及びエーテル基 (1100 cm^{-1} 付近) に由来する吸収が確認された. 加えて, PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg のそれぞれの IR スペクトルについて, 3400 cm^{-1} 付近の吸収帯が a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 のそれと比較して拡大していた. これは, Alg の繰り返し単位中に存在する水酸基の影響と思われる. さらに, PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg では, a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 と比較して, 1650 cm^{-1} 付近の吸収が強く表れている. 一方で, 純粋な Alg 試薬から検出された 1720 cm^{-1} 付近のカルボニル基由来の C=O 伸縮と思われる吸収帯は PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg の何れの IR スペクトルからも確認されなかった. これは, Alg に対して, a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 がアミド結合を形成したために, 吸収帯が低波数側へシフトした可能性が考えられる. 一般に, アミド結合 -C(=O)-NH- をもつ化合物は, $1630\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ 付近に C=O の伸縮に由来する吸収 (アミドI吸収帯), $1515\sim 1570\text{ cm}^{-1}$ 付近に N-H の変角に由来する吸収 (アミドII吸収帯) および 1250 cm^{-1} 付近に N-H の変角と C-N の伸縮の相互作用に由来する吸収がみられる. よって, 形成されたアミド結合に関して, アミドI吸収帯 ($1630\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ 付近) は 1650 cm^{-1} 付近において, Alg 中のカルボキシル基に由来する吸収帯と重なり合っていると同定できる. また, PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg については, 微弱ながらも 1550 cm^{-1} 付近と 1250 cm^{-1} 付近に吸収帯が確認できた. これらの吸収帯はそれぞれアミド結合部分のイミノ基に由来する吸収と, N-H の変角と C-N の伸縮の相互作用に由来する吸収であると解析した. よって, IR 分析結果により, 各試料には予期したアミド結合が形成している可能性が示唆された.

以上の考察から, PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg は Alg と a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 がそれぞれアミド結合により生成したグラフト共重合体であるアミド PEG 化アルギン酸が作製されたと推定する.

6.2 PEG化アルギン酸被膜 MF の特性

6.2.1 PEG 誘導体の結合状態の変化

作製した Alg/MF の IR スペクトルは分散剤に用いた純粋な Alg 試薬から得られた IR スペクトルと酷似していた。ここで、IR 測定では有機化合物の結合による情報が得られるので、酸化鉄のような無機化合物の存在そのものを示す吸収は得られない。つまり、測定対象とした Alg/MF 中の有機化合物、すなわち分散剤の IR スペクトルが得られることとなる。したがって、Alg/MF は Alg が分散剤として機能していることが確認された。加えて、Alg/MF と Alg から得られた IR スペクトルを比較すると、 1720 cm^{-1} 付近にみられる吸収帯が弱くなっていた。これは、Alg/MF の作製時に Alg 中に存在する一定数のカルボキシル基が、生成された磁性微粒子に対して吸着を起こしたためと考えられる。

また、作製した PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF、PEG10000-Alg/MF の IR スペクトルは、試料の分散剤として使用した PEG2000-Alg、PEG5000-Alg、PEG10000-Alg のそれぞれの IR スペクトルとおおよそ同一であったので、Alg/MF と同様に PEG2000-Alg、PEG5000-Alg、PEG10000-Alg がそれぞれ分散剤として機能していることが確認された。つまり、作製した PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF、PEG10000-Alg/MF には、Alg/MF には確認されない PEG 誘導体の存在が示された。さらに、PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF、PEG10000-Alg/MF のアミド結合の存在を示すスペクトル吸収に変化はみられなかった。このことから、PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF、PEG10000-Alg/MF を作製する際のアミド結合部分での PEG 誘導体の分離はなかったと考えられる。また、PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF、PEG10000-Alg/MF は 1600 cm^{-1} 付近の吸収帯がそれぞれの分散剤の IR スペクトルと比較して狭窄している。6.1 節に記述した通り、PEG2000-Alg、PEG5000-Alg、PEG10000-Alg のそれぞれの IR スペクトルにみられる 1600 cm^{-1} 付近の吸収帯は Alg 中のカルボキシル基を由来としたピークを含んでいる可能性が高い。そして、Alg/MF と同様、作製時に PEG2000-Alg、PEG5000-Alg、PEG10000-Alg 中にそれぞれ存在する一定数のカルボキシル基が、生成された磁性微粒子に対して吸着を起こしたと考えられる。そのため、PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF、PEG10000-Alg/MF の IR 測定ではカルボキシル基を由来とした吸収が弱まり、 1600 cm^{-1} 付近の吸収帯が狭窄した形状となって検出されたと考えられる。

6.2.2 磁気特性の変化

合成時の pH 雰囲気によって、試料の磁気特性が変化した要因の一つとしてコア材の特性変化が挙げられる。磁性流体の磁気特性を決定づける因子はコア材である磁性微粒子のみである。そのため、コア材の組成、結晶構造、及び粒径や形状などに変化が生じると、磁性流体の磁気特性にも大きな影響を与えられと考えられる。そこで、本研究では PEG 化による磁気特性の変化の要因を調査するため、Alg/MF、PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF について

- (a) 透過型電子顕微鏡 (TEM) によるコアの観察
- (b) X線回折によるコアの定性分析
- (c) 外観の観察

を実施した。測定対象には、Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, 及び PEG10000-Alg/MF のそれぞれの試料中において、磁化曲線形状に明確な差異が確認できた低 pH 領域および高 pH 領域の試料を採用した。それぞれの試料について上記(a)~(c)の測定結果を基に磁気特性について比較検討した。

(a) 透過型電子顕微鏡 (TEM) によるコアの観察

合成時 pH の変化に伴うコアの変化を確認するため TEM にて粒子の観察を行った。Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF のそれぞれに関して、pH 雰囲気が高 pH 領域である pH=5 付近、高 pH 領域である pH=10 付近にて合成した試料を観察した結果について以下に示す。

(i) 高 pH 領域にて合成した試料の観察

Alg/MF (合成時 pH=11.57), PEG2000-Alg/MF (合成時 pH=11.42), PEG5000-Alg/MF (合成時 pH=10.64) 及び PEG10000-Alg/MF (合成時 pH=10.70) に関して、TEM による撮像の結果をそれぞれ Fig. 6.2.1 (a), (b), (c), (d) に示す。

Fig.6.2.1 (a), (b), (c), (d) から、各試料とも分散状態にあった粒子は球形に近い形状であることが確認された。過去の研究において γ -Fe₂O₃ 微粒子の観察がされた際に、同様の形状が確認されている²³⁾。また、得られた写真から各試料中のコア材の平均粒子径を算出した結果、Alg/MF では 6.8±1.4 nm, PEG2000-Alg/MF では 7.1±1.4 nm, PEG5000-Alg/MF では 6.9±1.3 nm, PEG10000-Alg/MF では 7.0±0.9 nm であった。一般に γ -Fe₂O₃ は粒子径が 10 nm より小さくなると超常磁性を示すことが報告されている¹⁴⁾。つまり、Fig.5.2.7 において、高 pH 領域にて合成した試料が超常磁性を示したことは、各試料中のコア粒子径が 10 nm 以下であったことに由来している。

以上の考察から、Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF に関して、高 pH 領域にて合成した試料は、コアとなる磁性微粒子として超常磁性体であり磁気特性に優れた γ -Fe₂O₃ 微粒子が生成していると推測される。

(ii) 低 pH 領域にて合成した試料の観察

Alg/MF (合成時 pH=4.21), PEG2000-Alg/MF (合成時 pH=5.01) 及び PEG5000-Alg/MF (合成時 pH=5.82) に関して、TEM による撮像の結果をそれぞれ Fig. 6.2.2 (a), (b), (c) に示す。

Fig.6.2.2 (a), (b), (c) から、各試料とも分散状態にあった粒子の形状は球形に近いものと、それとは別に針状を形成しているものがあることが確認された。針状の粒子は高 pH 領域にて合成された試料のコア粒子形状とは明確に異なるものであった。さらに、粒子の大きさは高 pH 領域にて合成された試料から確認されたものと比較して非常に大きなものとなった。

これは、低 pH 領域で作製した試料のコアが高 pH 領域で作製した試料のものとは変化している可能性を示している。その形状からこの粒子は反強磁性体で磁化率が低い $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Hematite) であることが推測される²⁸⁾。すなわち、何れの試料に関しても、主となるコア材には $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ が生成していると考えられる。つまり、低 pH 領域での合成における $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の生成は、PEG 修飾による影響ではないと推測される。

(b) X 線回折によるコアの定性分析

TEM による撮像の結果から、合成時 pH 雰囲気コア材に与える影響が顕著にみられたため、X 線回折を用いて定性分析を行った。Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF のそれぞれについて、pH 雰囲気が低 pH 領域である pH=5 付近、高 pH 領域である pH=10 付近にて合成した試料の X 線回折による結果を以下に示す。これらのグラフは横軸に回折角 2θ [°] をとり、縦軸は回折強度 [cps] をとったものである。また、図中の◆は $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の標準ピーク (JCPDS: 25-1402) 位置を表している。

(i) 高 pH 領域にて合成した試料の分析

Alg/MF (合成時 pH=11.57), PEG2000-Alg/MF (合成時 pH=11.42), PEG5000-Alg/MF (合成時 pH=10.64) 及び PEG10000-Alg/MF (合成時 pH=10.70) の X 線回折パターンを Fig. 6.2.3 に示す。

グラフより、各試料のピーク位置は $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ のものと一致し、回折強度の高低も $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ のものと酷似していることが分かる。このことから、各試料のコア材の組成に違いは無く、いずれの試料とも $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ がコア材として生成していることが確認された。先述した通り、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ は強磁性の一種であるフェリ磁性を示し高い磁化率を有する。すなわち、高 pH 領域にて合成した試料では、いずれの試料においてもコアに強磁性体の $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ が生成していたため磁化値は磁場を印加した直後から顕著に上昇し、比較的弱い磁場で飽和に達する磁気特性になったと考えられる。

また、PEG 修飾を施した試料の X 線回折解析では Alg/MF の回折パターンと比較して $2\theta = 20 \sim 30$ [°] の範囲にわたってベースラインが高くなっていることがわかる。これは、PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF に関して、PEG 修飾によって分散剤分子量および分散剤濃度が増大しているため、それに伴って試料中の高分子濃度が増大したことに起因したものと考えられる。

(ii) 低 pH 領域にて合成した試料の分析

Alg/MF (合成時 pH=4.21), PEG2000-Alg/MF (合成時 pH=5.01) 及び PEG5000-Alg/MF (合成時 pH=5.82) の X 線回折結果を Fig.6.2.4 に示す。

各試料の回折ピークは、高 pH 領域にて合成した試料のものと比較して、それぞれブロードとなり、確認できたピークは微弱なものであった。しかしながら、各試料の回折ピークは $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の回折ピーク位置の近辺に発現していた。これは、5.2.3 の結果より、合成時の pH 雰囲気が低 pH 領域であった各試料に関しても、わずかながら磁化を示したことに起因すると

考えられる。加えて、6.3.2(a)の TEM 観察においても、高 pH 領域にて合成した試料のコア材と似た球形の粒子が各試料中に少なからず確認されている。すなわち、わずかではあるが $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ がコア材として生成していた可能性がある。つまり、低 pH 領域で作製した試料では高 pH 領域で作製したものよりもコアの結晶性が低下し非晶質に近づいたことを示している。

また、低 pH 領域にて合成された試料は、いずれの試料にも磁化率が極めて低い非晶質の $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ が大半のコア材として生成していたと考えられる。そのため、各試料とも磁化され難くなり、高 pH 領域にて合成した試料と比較して、飽和磁化の低下に加えて、外部磁場に対して磁化が緩やかに上昇するような磁化挙動を示したと考えられる。

(c) 外観の観察

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ と $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ は性質のみならず、その外観も異なる。そこで、Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF について、pH 雰囲気が高 pH 領域である pH=5 付近、高 pH 領域である pH=10 付近にて合成した試料に関して試料外観からの考察を行った。

(i) 高 pH 領域の観察

Alg/MF (合成時 pH=11.57), PEG2000-Alg/MF (合成時 pH=11.42), PEG5000-Alg/MF (合成時 pH=10.64) 及び PEG10000-Alg/MF (合成時 pH=10.70) の外観写真を Fig.6.2.5 (a), (b), (c), (d)にそれぞれ示す。外観写真より、高 pH 領域にて合成した試料は分散剤に関わらず黒色の液体であった。ここで、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ は磁赤鉄鉱とも呼ばれ、通常粉末では黒色を示す。このことから、各試料のコア材に $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ が生成していると考えられる。しかしながら、合成時の pH 雰囲気が 12 付近またはそれ以上となるとの作製した試料は薄い黄色の液体となった。これは磁性微粒子が液中にほとんど分散しておらず、微粒子濃度が低いことを示している。

(ii) 低 pH 領域の観察

Alg/MF (合成時 pH=4.21), PEG2000-Alg/MF (合成時 pH=5.01) 及び PEG5000-Alg/MF (合成時 pH=5.82) の外観写真を Fig. 6.2.6 (a), (b), (c)にそれぞれ示す。外観写真より、低 pH 領域で作製した各試料はいずれも赤褐色の液体であった。ここで、 $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ は赤鉄鉱とも呼ばれ、通常粉末では赤褐色を示す。このことから、両試料ともに $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ がコア材として生成していると考えられる。

6.2.3 飽和磁化の変化

合成時の pH の変化に伴い、飽和磁化は中性領域で最も高くなり、それよりも低 pH もしくは高 pH になるに従い低下傾向を示した要因について各領域での考察を行った。

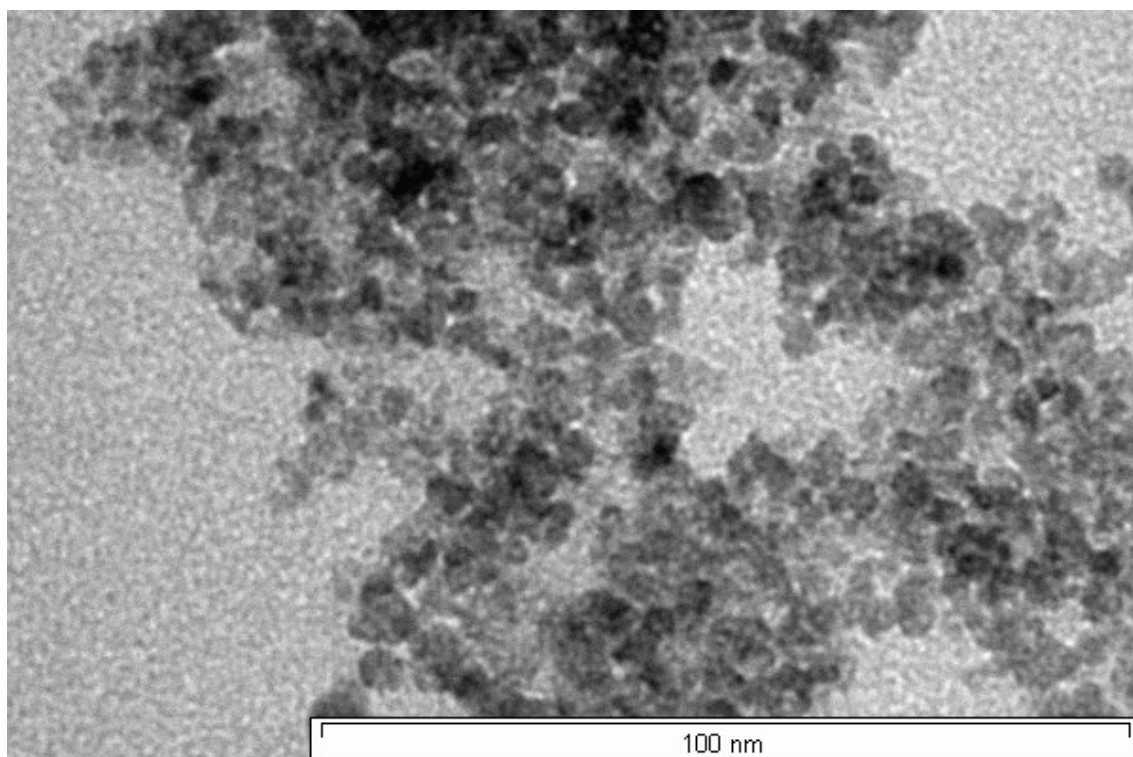
(a) 高 pH 領域での変化

Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF に関して、6.2.2(a), (b)の TEM による撮像及び X 線回折解析から得られた結果より、高 pH 領域では各試料のコア材に強磁性体で高い磁化率を有する $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ が生成しており、その結晶性も低 pH 領域に

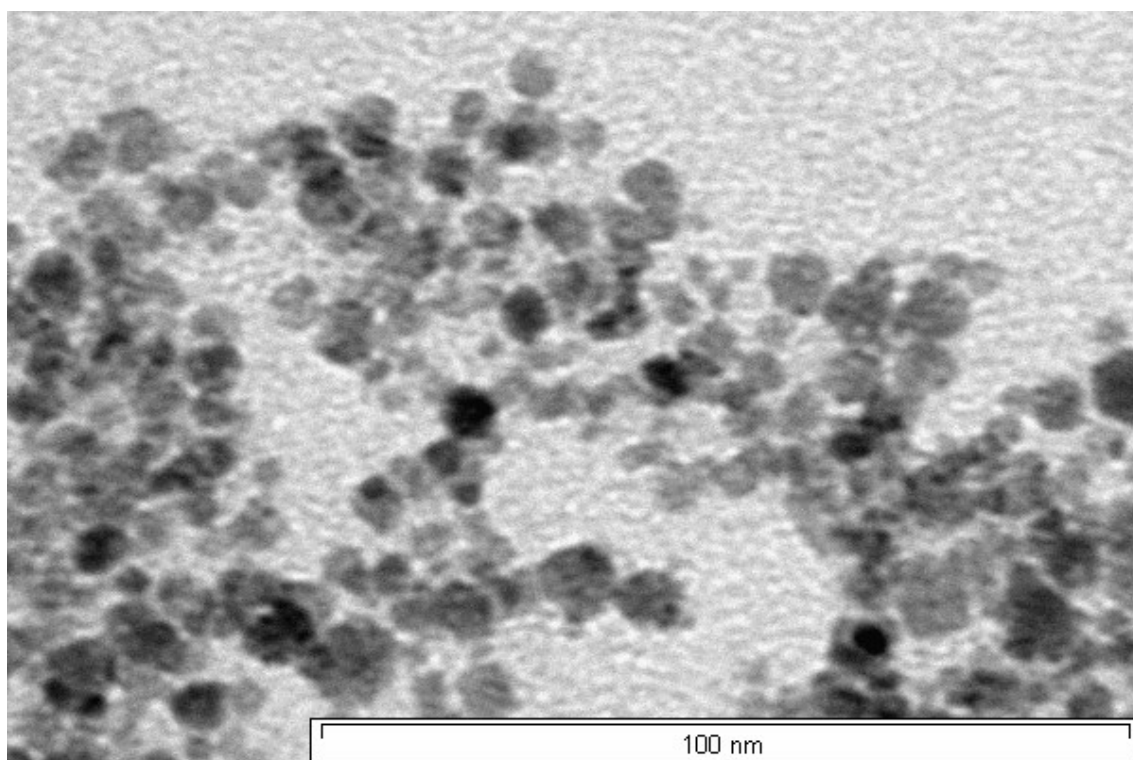
て合成した試料と比較して高いことが確認されている。すなわち、低 pH 領域にて合成した試料と比較してコア材の磁気特性が優れているため、高 pH 領域において単位質量あたりの飽和磁化が最大となったものと推測される。しかしながら、高 pH 領域で作製した PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF の単位質量あたりの飽和磁化は Alg/MF のものよりも低い値を示しており、基としたメトキシ PEG の分子量に比例して低下率も大きくなる傾向がみられた。これは、PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF に関して、Alg の PEG 化により分散剤分子量が増大し、かつ、Alg/MF とカルボキシル基の濃度を同じにするため、分散剤濃度を増大させたことに起因すると考えられる。通常、高 pH 領域であるアルカリ雰囲気中では $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子表面は負に帯電し、電気二重層を形成するため表面には正の電荷が集まる。一方、Alg と Alg を母材としたアミド PEG 化 Alg は官能基にカルボキシル基を有するため水溶液中では負に帯電する。そのため、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子の正の電荷と分散剤のカルボキシル基による負の電荷との静電引力で両者は吸着する。加えて、アミド PEG 化 Alg に関しては、PEG 化の際に Alg 中の一定数のカルボキシル基を非イオン性であるメトキシ PEG アミンに置換する操作を行っている。そのため、単位質量あたりに存在するカルボキシル基の割合が減少してカルボキシル基に由来する負の電荷は少なくなる。したがって、高 pH 領域で作製した PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF は Alg/MF と比較して、分散剤の吸着力が低下したことで、分散維持に必要となるコロイド中の分散剤割合が増加したと考えられる。つまり、作製した試料中の非磁性体濃度が、分散剤分子量及び濃度に比例して増大したために、相対的に単位質量あたりの飽和磁化が低下したと考えられる。

(b) 低 pH 領域での変化

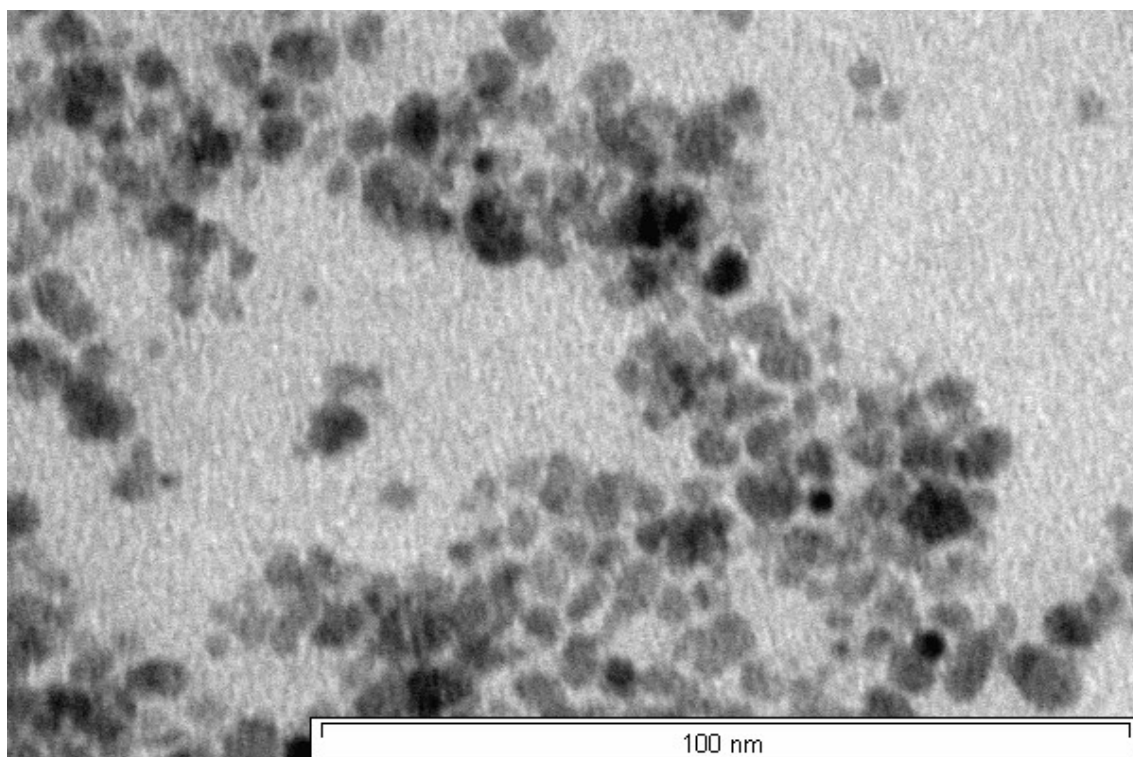
6.2.2(a), (b)の TEM による撮像及び X 線回折解析から得られた結果より、低 pH 領域での合成時 pH の低下に伴う飽和磁化の低下は磁化率の低い $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の生成およびコアの結晶性の低下に伴うものであると考えられる。加えて、過去の研究報告より、共沈法を用いたフェライト超微粒子の生成において、生成時の pH 雰囲気が低 pH 側に推移することに伴い、微粒子の結晶性が低下することが確認されている²⁹⁾。このことから、Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF に関して、合成時 pH が低 pH 側へ推移することに伴うコアの結晶性の低下によって、飽和磁化が低下したものと考えられる。



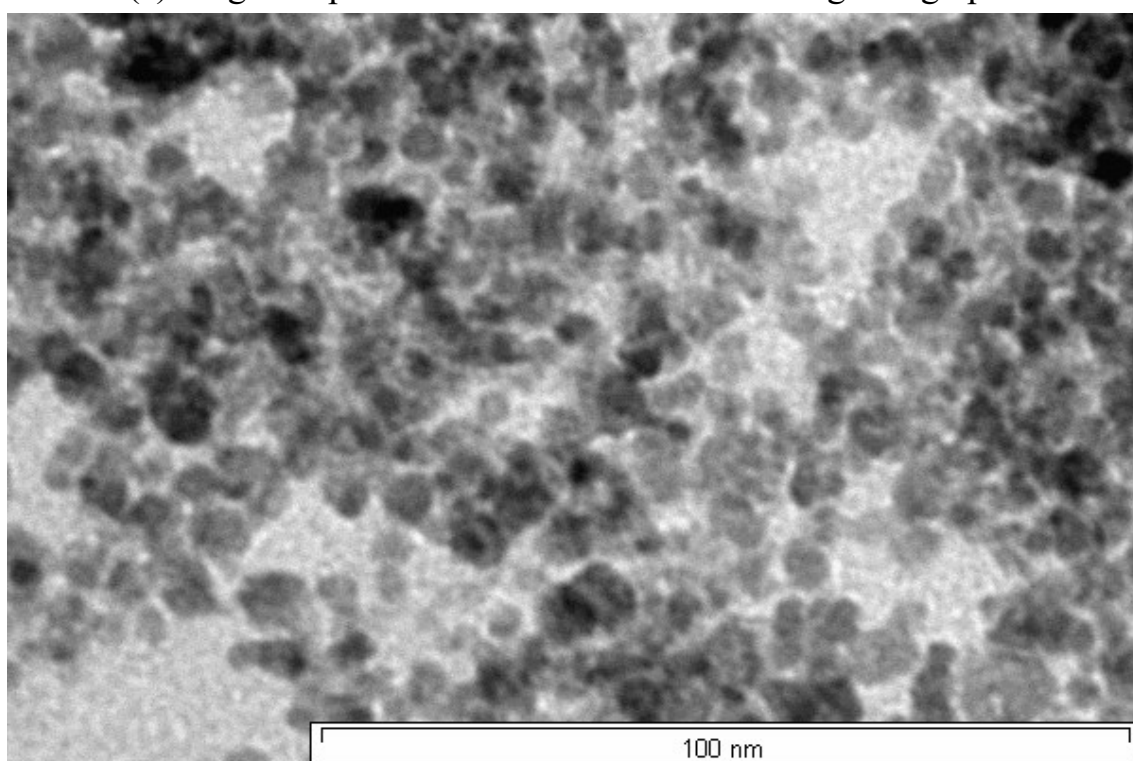
(a) Magnetic particle coated with Alg at high pH.



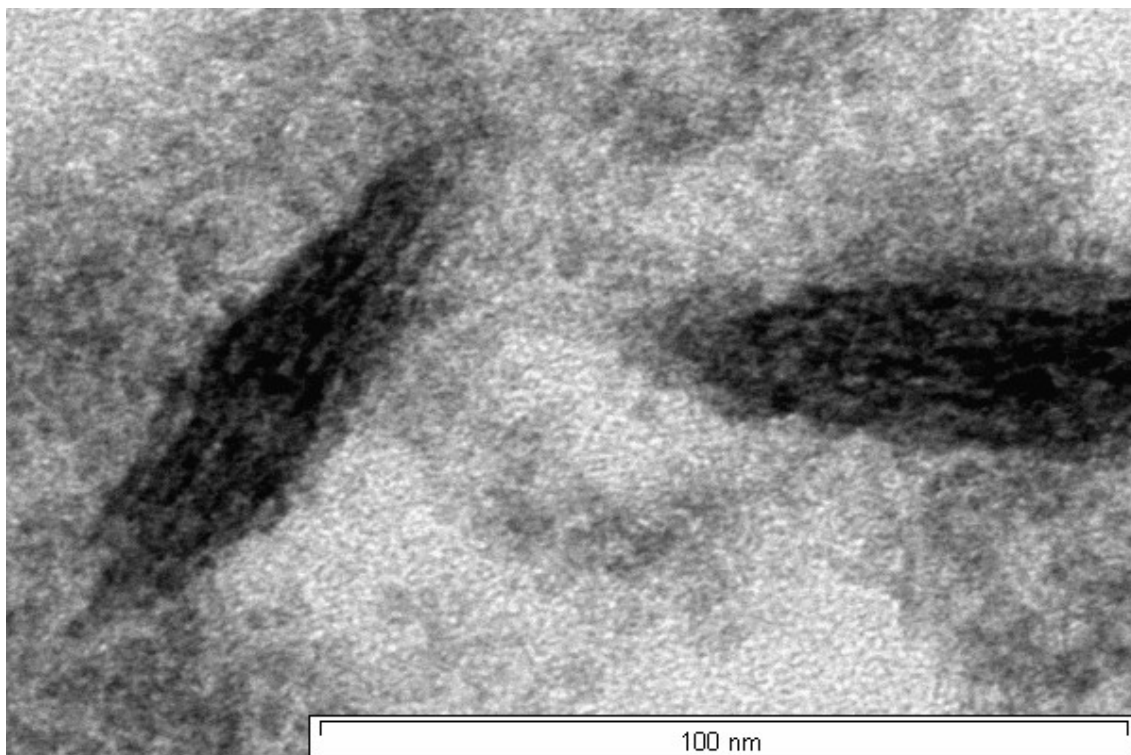
(b) Magnetic particle coated with PEG2000-Alg at high pH.



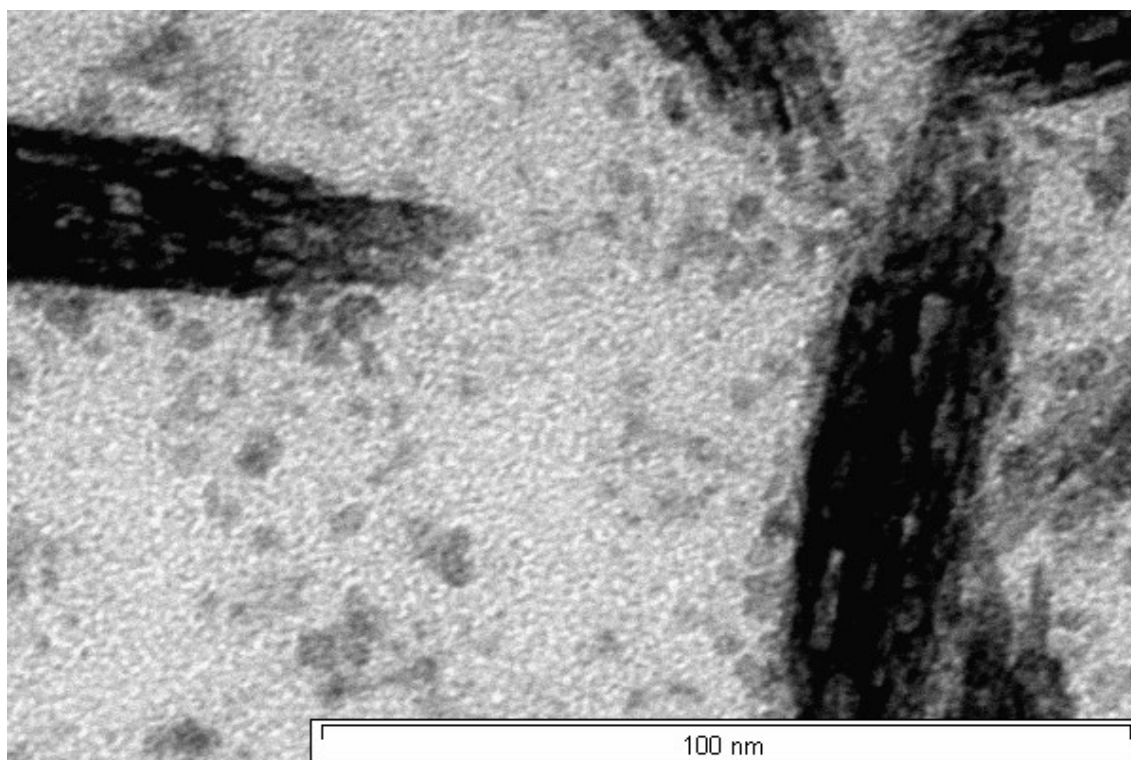
(c) Magnetic particle coated with PEG5000-Alg at high pH.



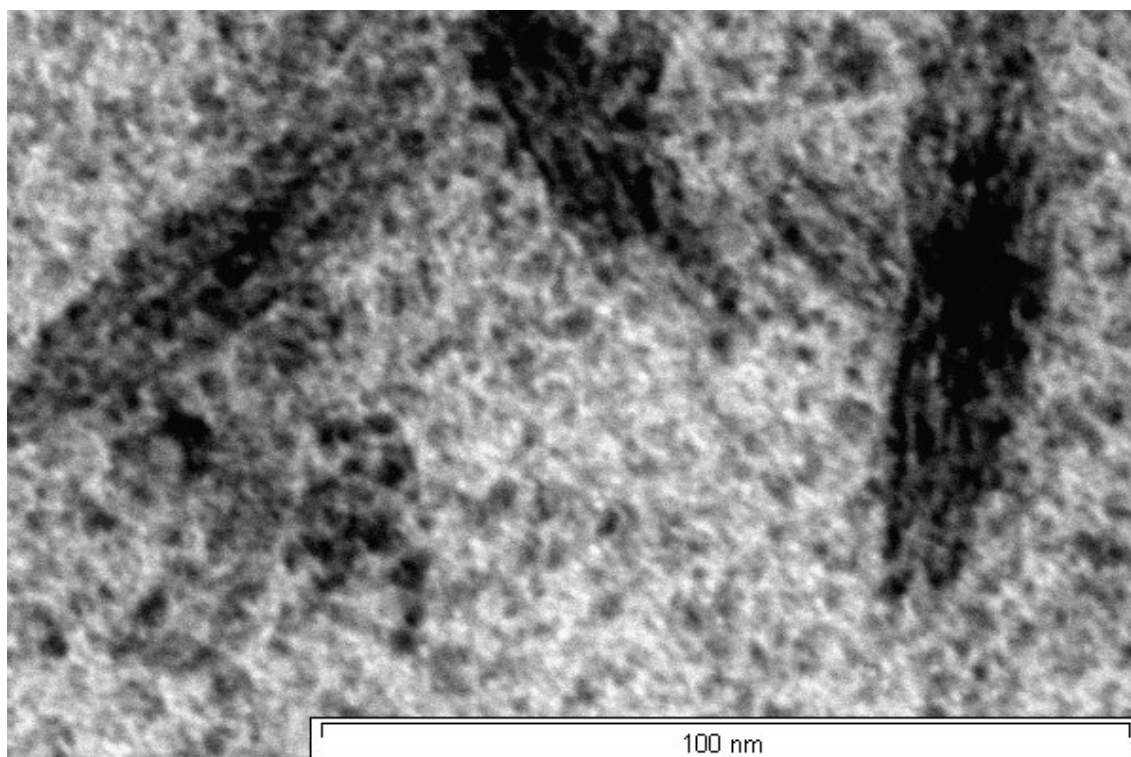
(d) Magnetic particle coated with Alg PEG10000-Alg at high pH
Fig. 6.2.1 Magnetic particle coated with (a) Alg (b) PEG2000-Alg
(c) PEG5000-Alg (d) PEG10000-Alg at high pH.



(a) Magnetic particle coated with Alg at low pH.



(b) Magnetic particle coated with PEG2000-Alg at low pH.



(c) Magnetic particle coated with PEG5000-Alg at low pH.

Fig. 6.2.2 Magnetic particle coated with (a) Alg (b) PEG2000-Alg
(c) PEG5000-Alg at low pH.

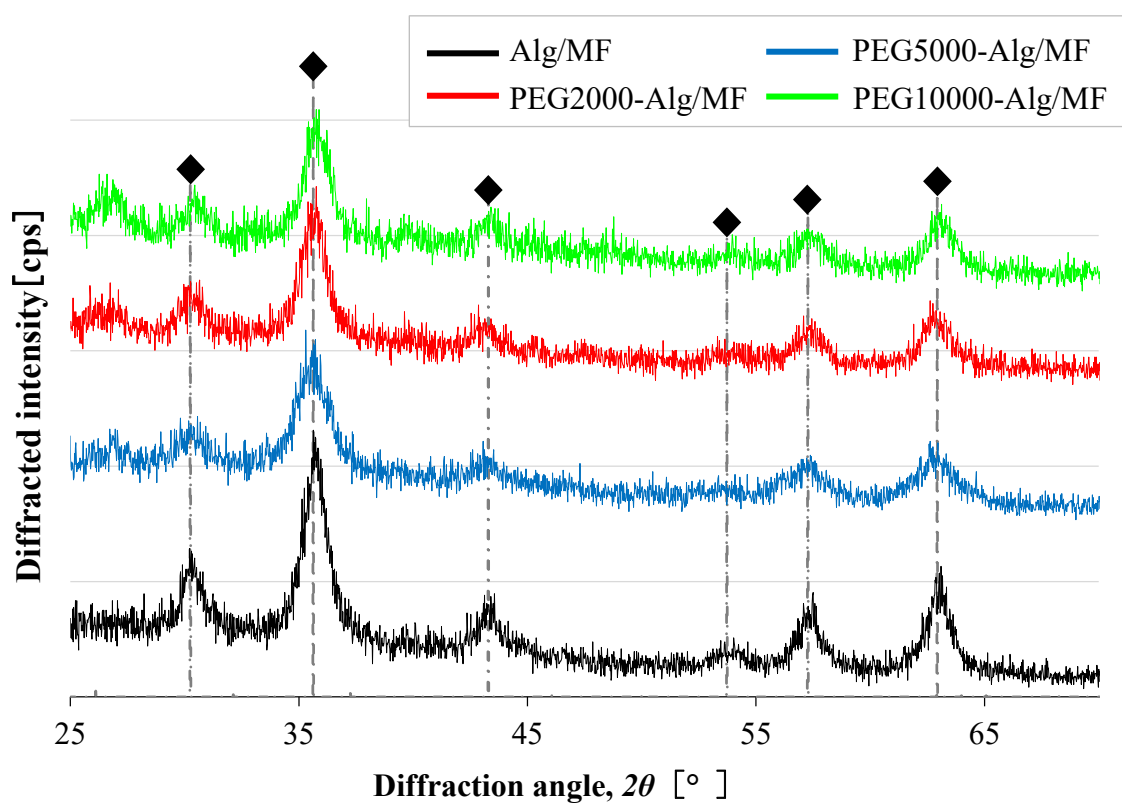


Fig. 6.2.3 XRD patterns at high pH.

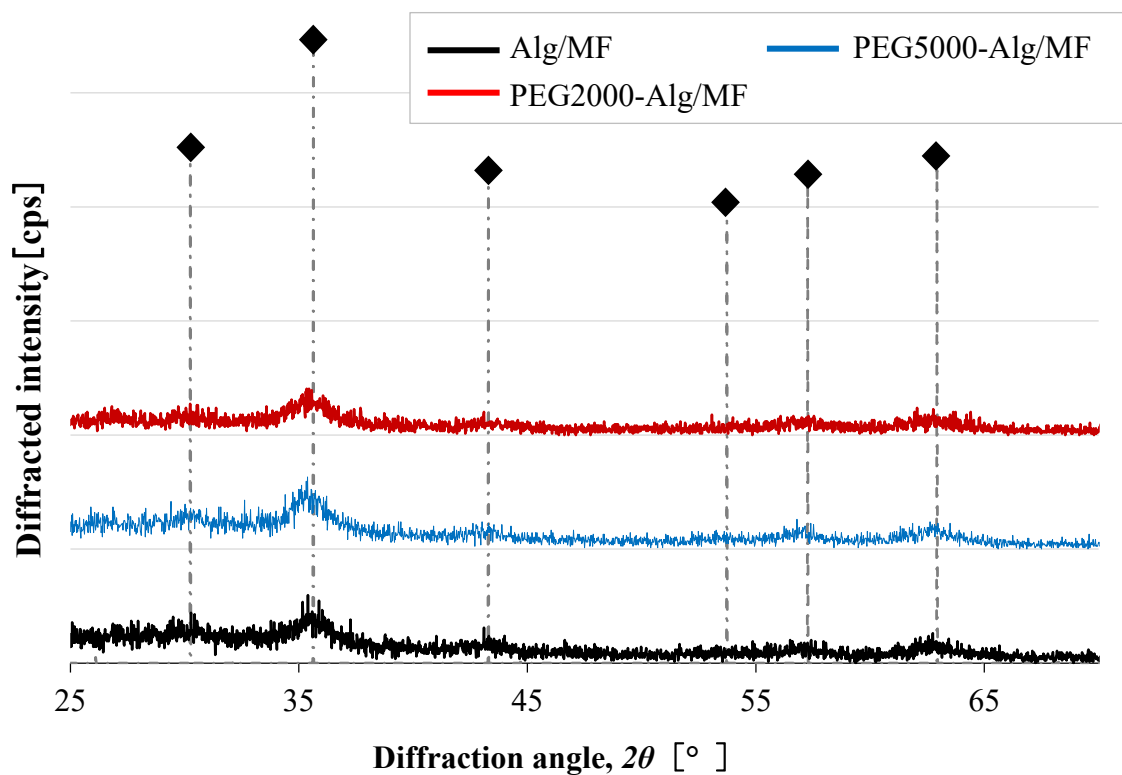


Fig. 6.2.4 XRD patterns at low pH.

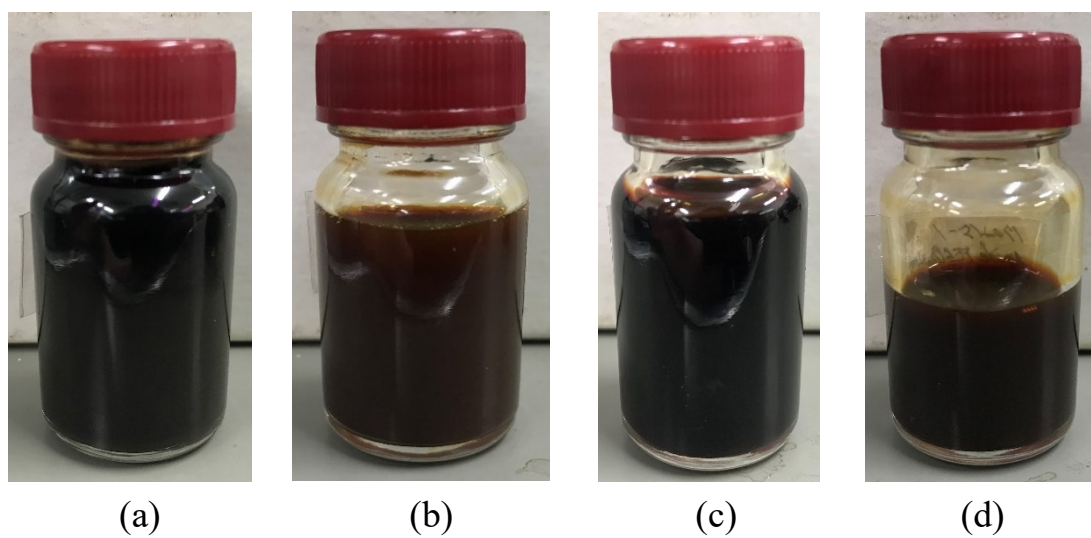


Fig. 6.2.5 Photograph of sample at high pH (a) Alg/MF (b) PEG2000-Alg/MF (c) PEG5000-Alg/MF (d) PEG10000-Alg/MF.

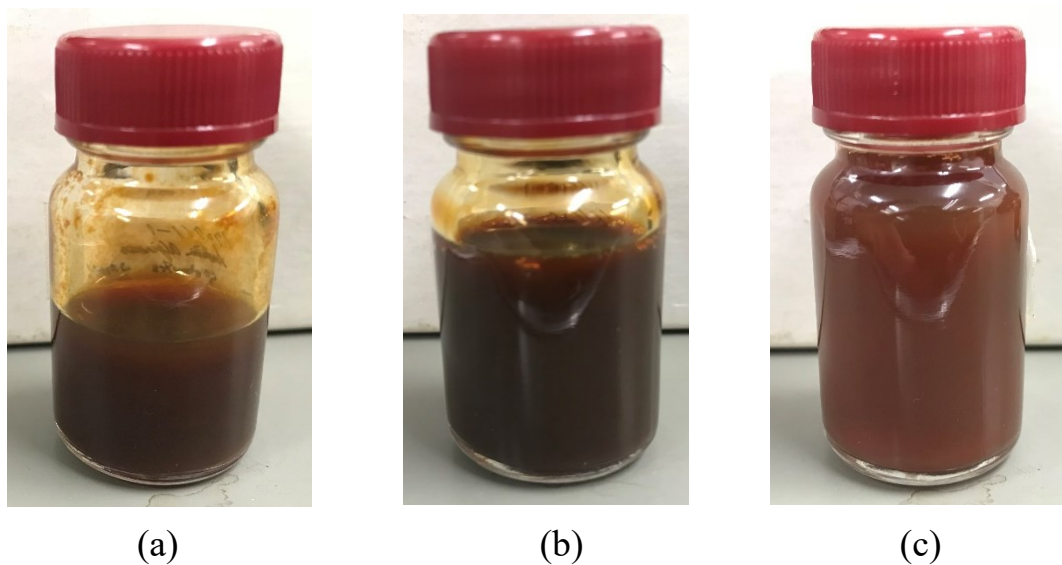


Fig. 6.2.6 Photograph of sample at low pH (a) Alg/MF (b) PEG2000-Alg/MF (c) PEG5000-Alg/MF.

6.3 内包カプセル化のための複合体作製

Alg のゲル化プロセスは, Alg の繰り返しユニット中に存在するカルボキシル基に対して, 他の多価金属塩が架橋反応を生じることによって二つの物質間に金属錯体が形成されることに由来する. また, Alg のゲル化プロセス自体は非常に簡潔なものであり, Alg と多価金属塩とが溶媒中にて接触することで瞬時に架橋反応を生じる. そのため, 生成されるゲルの性状は母材または架橋点となる金属塩の性質に大きく依存したものとなる. 本研究においては, 多価金属塩としてカルシウム塩のみを採用しているため, 生成したゲルの粒子形状, サイズに差異が生じた要因としては母材官能基の変化が最も大きな影響を与えたものと考えられる.

2.3 節で述べた通り, Alg とカルシウム塩の架橋反応によって形成されるゲルは Egg box junction と呼ばれる構造をとる. また, Alg を母材としたグラフト共重合体である PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg に関しても, ゲル化に際して同様の構造をとることが考えられる. Alg は官能基にカルボキシル基を有するため水溶液中では負に帯電する. そのため, 水溶液中において正の電荷を示すカルシウム塩との間で吸着反応が生じる. 一方で, アミド PEG 化 Alg に関しては, PEG 化の際に Alg 中の一定数のカルボキシル基を非イオン性であるメトキシ PEG アミンに置換する操作を行っている. そのため, 単位質量当たり存在するカルボキシル基の割合が減少しており, 水溶液中において, カルボキシル基に由来する負の電荷は純粋な Alg と比較して少なくなる. したがって, アミド PEG 化 Alg を母材としてゲル化を行う際, カルシウム塩に対する反応性は同質量の Alg と比較して低下していると考えられる. 加えて, 実験結果から, 母材としたアミド PEG 化 Alg の分子量の増加に伴って, 形成されるゲルが不均一なものとなる傾向が認められた. このことから, アミド PEG 化 Alg が Egg box junction 構造を形成する際, Alg の側鎖に導入した PEG 鎖がカルシウム塩との架橋反応を物理的に阻害した可能性も考えられる.

7. 結言

本研究では、生体材料の素材において多様な展開を考慮した材料として、アルギン酸を母材とした PEG 複合型グラフト共重合体の作製を試みた。また、アルギン酸と PEG 誘導体の複合化に関して、化学結合部分における加水分解による PEG 誘導体の脱離を回避するために、アミド結合によるアルギン酸の PEG 化を試みた。加えて、作製したグラフト共重合体である PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg を素材に使用して、DDS 基材となる PEG 化アルギン酸被膜型磁性流体及びシステイン内包型 PEG 化アルギン酸カルシウムによるカプセル体モデルの作製を行った。以下①～④に実験概要を記述する。

- ① 平均分子量 2000, 5000, 10000 のメトキシ PEG について、それぞれの水酸基をアミノ化した a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 の作製
- ② Alg に対して a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 をそれぞれアミド結合により複合化した PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg の作製
- ③ PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg をそれぞれ分散剤として使用した PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF の作製
- ④ PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg をそれぞれ母材として使用した PEG2000-Alg/gel, PEG5000-Alg/gel, PEG10000-Alg/gel の作製

また、過去の研究より糖被膜型磁性流体の諸特性は分散剤が有する官能基の違いに大きく依存することが明らかとなっている。そこで、PEG 化された糖被膜型磁性流体は純粋なアルギン酸を用いて作製したものと比較して諸特性が変化している可能性がある。そのため、それぞれの分散剤を使用して作製した試料の磁気的特性について比較検討を行った。その結果以下の知見が得られた。

① メトキシ PEG アミンの作製

Alg に対してアミド結合によって PEG 誘導体の複合化をするため、三段階にわたる有機合成を行うことにより、メトキシ PEG の水酸基にアミノ化処理を施したメトキシ PEG アミンの作製を試みた。メトキシ PEG は平均分子量 2000, 5000, 10000 の三種類を用いた。メトキシ PEG にアミノ化を施した各平均分子量の試料の IR スペクトル解析によって、Alg 及びメトキシ PEG の存在が確認されたため、分子量が異なる a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 の作製に成功した。

② アミド PEG 化アルギン酸の作製

Alg のカルボキシル基と a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 のアミノ基に着目し、

それぞれの PEG 誘導体をアミド結合によって Alg に複合化したアミド PEG 化アルギン酸の作製を試みた。縮合反応を施す際の溶媒には蒸留水，脱水縮合剤には WSCD・HCl，反応活性剤には HOBt・H₂O を採用した。また，Alg と PEG 誘導体の複合化に伴い，Alg 中のカルボキシル基と a/m-PEG2000, a/m-PEG5000, a/m-PEG10000 中それぞれのアミノ基との mol 比率は 60:1 とした。合成を行った各試料の IR スペクトル解析によって，Alg，アミドの形成及び PEG 鎖の存在が確認されたため，分子量が異なる PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg それぞれの作製に成功した。

③ PEG 化アルギン酸被膜型 MF の特性

合成時の pH 雰囲気を変化させた試料を作製することで PEG 化が材料の磁気特性に及ぼす影響を調査した。

(a) PEG 誘導体の分子結合状態の変化

FT-IR から得られた PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF, PEG10000-Alg/MF のそれぞれの IR スペクトルより，Alg，アミド形成及び PEG 鎖の存在が確認された。また，Alg 中のカルボキシル基に由来すると考えられる吸収帯については，分散剤に使用した PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg それぞれの IR スペクトルとの比較において変化が確認された。このことから，PEG2000-Alg, PEG5000-Alg, PEG10000-Alg がすべて分散剤として機能していることが判明した。

(b) 磁気特性の変化

(i) 高 pH 領域

Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF について，各試料が示した磁化挙動からそれらの磁氣的性質に大きな差異は認められなかった。また，各試料とも TEM による撮像及び X 線回折解析より得られた結果からコア材には γ -Fe₂O₃ が生成され，磁性超微粒子特有の超常磁性が確認された。

(ii) 低 pH 領域

Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF について，各試料が示した磁化挙動からそれらの磁氣的性質に大きな差異は認められなかった。また，各試料とも TEM による撮像及び X 線回折解析より得られた結果からコアには磁化率の低い α -Fe₂O₃ が主成分として生成されており，磁化されにくい特性であることが確認された。

(c) 飽和磁化値の変化

(i) 高 pH 領域

Alg/MF, PEG2000-Alg/MF, PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF について，各試料とも低 pH 領域にて合成された試料と比較して単位質量あたりの飽和磁化は上昇する傾向が示された。これは，各試料に関して，コア材に強磁性体で高い磁化率を有する γ -Fe₂O₃ が生

成されており、XRD 測定結果より、その結晶性も低 pH 領域にて合成された試料と比較して向上したためである。一方で、PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF の単位質量あたりの飽和磁化は Alg/MF のものよりも低く、PEG 化を施した各試料間においても、PEG の平均分子量が大きい程、試料の飽和磁化が低い傾向が確認された。これは、PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF について、PEG 化によって分散剤分子量と分散剤濃度が増大したことに起因する。すなわち、作製した試料中の非磁性体濃度が、分散剤分子量及び濃度に比例して増大したために、相対的に単位質量あたりの飽和磁化が低下傾向を示した。

(ii) 低 pH 領域

Alg/MF、PEG2000-Alg/MF、PEG5000-Alg/MF 及び PEG10000-Alg/MF について、各試料間に大きな差異は認められなかった。合成時 pH が酸性側に推移するに伴い、試料の結晶性は徐々に低下していき、コア材にも磁化率の低い α -Fe₂O₃ が主成分として生成されたため、単位質量あたりの飽和磁化は低下傾向を示した。

④ PEG 化アルギン酸を使用した内包カプセル体の特性

生成されたカプセル体は母材としたアミド PEG 化 Alg の分子量が大きい程、ゲル化反応の進行速度が低下し、粒径と形状がともに不均一なものとなる傾向が認められた。これは、PEG 化の際に Alg 中の一定数のカルボキシル基がメトキシ PEG アミンに置換されたことで、単位質量あたりに存在するカルボキシル基の割合が減少したことに起因する。試料のゲル化において、母材中のカルボキシル基の割合が低下したことに伴い、カルシウム塩に対する反応性も低下した。加えて、アミド PEG 化 Alg が Egg box junction 構造を形成する際、Alg の側鎖に導入した PEG 鎖がカルシウム塩との架橋反応を物理的に阻害したものと考えられる。

本研究より、生体材料の素材において、体内における血中滞留性、血中走行性の観点に基づき、多様な展開を考慮した材料として、アミド PEG 化アルギン酸の複合化に成功した。加えて、DDS 基材を指標した PEG 化アルギン酸被膜型 MF に関しては、ナノ材料として優れた磁気特性を有する材料の作製に成功した。このことから、アミド PEG 化アルギン酸被膜磁性流体について、磁性超微粒子の磁気特性を利用した、生体内における優れたトレーサー効果の発現が期待できる新材料の作製に成功したと言える。また、PEG 化アルギン酸カルシウムに関しては、アミド PEG 化アルギン酸を母材としたゲル化の発現が確認されており、生体材料としても利用が認められるアルギン酸に対して応用範囲拡大に寄与する可能性が示唆された。

本研究で得られた結果は、今後の医療材料分野に関して、新材料の提案として診断剤や治療剤等の開発の基礎となる可能性があり、新材料開発への一助になると考えられる。

参考文献

- (1) 特許庁 ; 平成 22 年度 特許出願技術動向報告書 ドラッグデリバリーシステム (DDS) .
- (2) 青木 伊知男, Rumiana Bakalova ; DDS による MR 分子イメージングへ, *Drug Delivery System*, Vol. 23, No.1, pp.61-68, (2008).
- (3) KAWASHIMA, Yoshiaki ; Design of a Nanocomposite Particulate Drug Delivery System, *岐阜薬科大学紀要*, pp.1-11, (2005).
- (4) 中林 宣男, 石原 一彦, 岩崎 泰彦 ; 日本エム・イー学会編/ME 教科書シリーズ E-1 バイオマテリアル, pp56-65, (1999).
- (5) 田上 辰秋, 尾関 哲也 ; ナノ・マイクロ粒子の DDS 技術と臨床応用, *Organ Biology*, Vol.24, No.1, (2017).
- (6) Yukio Nagasaki ; Construction of a Poly(ethyleneglycol) Chain Tethered on a Surface, *The Society of Polymer Science*, (2012).
- (7) 奥 直人 ; リポソームの作成と実験法 廣川書店, pp.72-75, (2000-1).
- (8) Needham D, McIntosh TJ, Lasic DD, Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1108, pp.40-48, (1992).
- (9) Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G, “Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles”, *Biochemica et Biophysica Acta*, Vol.1062, pp.77-82, (1991).
- (10) Klibanov AL, Maruyama K, Beckerleg AM, Torchilin VP, Huang L, Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target, *Biochemica et Biophysica Acta*, Vol.1062, pp142-148, (1991).
- (11) 武富 荒, 近角聡信著 ; 磁性流体 : 基礎と応用.
- (12) 片岡 一則 ; 生命材料工学, 生命工学シリーズIII, (1991).
- (13) Takahiro Sato ; Thermodynamic Properties of Polymer Solutions, *Netsu Sokutei*, Vol.30, No.4, pp.173-179, (2003).
- (14) 加藤 昭夫, 荒井 弘通 ; 超微粒子---その化学と機能---, 朝倉書店, (1993).
- (15) 筑波微粒子・界面・環境研究会, (2004).
- (16) 吉田 亮, 高分子学会-編集; 高分子ゲル, 高分子先端材料 One Point 2, 共立出版, (2004).
- (17) 池田 篤哉 ; 修士論文 (三重大) , PNIPAAm ハイドロゲルの材料特性に DMAAm 添加が及ぼす影響, (2015).

- (18) 山内 愛造, 廣川 能嗣, 高分子学会-編集 ; 機能性ゲル, 高分子新素材 One Point 24, 共立出版, (1996).
- (19) 広瀬 美治 ; 電場応答性ゲル, 特集=高分子ゲル, Vol.37, No.10, (1988).
- (20) Strehin I, Nahas Z, Arora K, Nguyen T, Elisseeff J, A versatile pH sensitive chondroitin sulfate-PEG tissue adhesive and hydrogel, *Biomaterials*, Vol.31, pp. 2788-2797, (2010)
- (21) 加藤 誠軌 ; X線回折分析, (1997).
- (22) 川村 清 ; 超微粒子とは何か 丸善, (1992).
- (23) 杉本 聖一 ; 博士論文 (三重大), 糖類を被膜したスピネル系フェライトナノ微粒子の合成と磁気特性に関する研究.
- (24) Seiichi Sugimoto, Kazuo Yagi, Masataka Tokuda, Effects of various coating materials on magnetic properties of saccharide-iron oxide nanoparticles, *Journal of the Society of Materials Science, Japan*, Vol.56, No.10, pp.938-944, (2007).
- (25) 大木 道則, 大沢 利昭, 田中 元治, 千原 秀昭 ; 化学辞典 東京化学同人社.
- (26) Seiichi Sugimoto, Kazuo Yagi, Masataka Tokuda, Effects on Particle Diameter and Magnetic Force of Magnetic Ultra-Fine Particle that Depend on Surface-Active Agents and pH Condition in Its Synthesis, *IEEE Proceeding of the 2004 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science*, pp.213-218, (2004).
- (27) 栗田 卓也 ; インスリン製剤の変遷をたどる, 株式会社メディカルジャーナル社, (2013).
- (28) Tadao Sugimoto, Yinsheng Wang, Hiroyuki Itoh, Atsushi Muramatsu, Systematic control of size, shape and internal structure of monodisperse α -Fe₂O₃ particles, *Colloids and Surfaces A*, Vol.134, pp265-279, (1998)
- (29) 原田 雄二郎 ; 修士論文 (三重大) 共沈法を用いた MxMyO · Fe₂O₃ 微粒子の作製と特性評価, (2006).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、毎週遠方から三重に足を運び、終始懇切丁寧にご指導いただいた首都大学東京 八木一夫教授に深く感謝致します。八木教授からの鶴の一声なくして本研究の完遂はありえませんでした。幅広い分野から本研究の核心をついた指導をしていただいた稲葉忠司教授に心より感謝致します。実験試薬・器具の購入の際に何度もご協力頂いた吉川高正助教に深く感謝いたします。様々な機器の操作についてご助言、ご協力頂いた中村昇二技官に深く感謝します。本学卒業後も豊富な知識を活かして毎週パソコンの向こうから指導して頂いた都立産業技術高等専門学校 杉本聖一助教に深く感謝致します。

修士論文発表会にて副査を引き受けて下さった小竹茂夫准教授にも心より御礼申し上げます。非常に拙い論文にも関わらず、ご丁寧に指導して頂いたことで修士論文の執筆を終えることが出来ました。

本研究の化学の分野を中心にご協力頂いた本学地域イノベーション学研究所 久保雅敬教授に心より感謝致します。久保教授は化学の知識に乏しい私に多彩なアイデアを授けてくださるとともに、他学科の生徒である私に種々の実験器具を提供して頂き、さらには機器の操作や有機合成の方法についてまでもご助言、ご協力して頂きました。改めて、久保教授に厚く御礼申し上げます。加えて、本学分子素材工学科 高分子設計化学研究室の皆様には機器の操作や有機合成の方法について細部にわたるところまで実演していただき、時には相談にも乗って頂きました。この場をお借りして御礼申し上げます。

本研究は磁気工学や生体材料工学等の境界分野に属し、多くの研究者の方々に協力していただきました。振動試料型磁力計を使用させて頂いた本学物理工学科 ナノエレクトロニクス研究室の前田浩二技官に深く感謝致します。透過型電子顕微鏡を使用させて頂き、装置の操作について終始懇切丁寧にご指導いただいた本学大学院医学系研究科医学部電子顕微鏡室の小川覚氏に深く感謝致します。また、原子吸光光度計を使用させて頂いた国際環境教育研究センターの鈴木透助教授に深く感謝いたします。

研究室の先輩方、後輩たちには研究のアドバイスや励ましなど様々な角度から支えられました。特に直属の先輩である水谷大地先輩には度々助言頂き、誠に感謝しております。また同期である伊藤遼太君、北村優季さん、中川愛海さん、浜田智章君は苦楽を共にし、様々な感情を共有し合った仲です。ここに感謝の意を表します。これから先もお互い頑張っていきましょう。

最後に、あらゆる面から支え、応援してくれた家族に厚く御礼申し上げます。

平成三十年弥生吉日
篠田 直史