

福岡大学

博士學位論文

超臨界流体を用いた機能性  
マイクロ・ナノカプセルの製造

令和4年3月

徳永 真一

工学研究科 情報・制御システム工学専攻

## 目次

第1章 序論 .....	5
1.1 緒言 .....	5
1.2 本研究の目的 .....	9
1.3 本論文の構成 .....	10
第2章 原理および理論 .....	12
2.1 緒言 .....	12
2.2 二酸化炭素について .....	12
2.2.1 二酸化炭素の特徴 [51] .....	12
2.2.2 超臨界流体について [80] .....	12
2.2.3 超臨界二酸化炭素の特性 [80] .....	13
2.3 マイクロ・ナノカプセルについて .....	14
2.4 二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノ粒子製造方法 .....	15
2.4.1 RESS/RESS-N 法 .....	15
2.4.2 RESAS 法 .....	17
2.4.3 CAN-BD 法 .....	18
2.4.4 GAS 法 .....	19
2.4.5 SAS/ASES/PCA 法 .....	20
2.4.6 SEDS 法 .....	22
2.4.7 PGSS 法 .....	22
2.4.8 SFEE 法 .....	24
2.4.9 PIPS 法 .....	25
2.4.10 気液ナノ界面拡張法 .....	26
第3章 腸溶性マイクロカプセルの製造 .....	28
3.1 第3章の緒言 .....	28
3.1.1 背景 .....	28
3.1.2 目的 .....	29
3.2 第3章の研究基礎 .....	29
3.2.1 Eudragit シリーズについて .....	29
3.2.1.1 Eudragit L100 (S100) について .....	30
3.2.1.2 Eudragit E100 について .....	31
3.2.2 攪拌翼について .....	32

3.3 実験.....	33
3.3.1 試薬類.....	33
3.3.2 高圧攪拌における異なる形状の攪拌翼がもたらす高圧セル内流体挙動の目視 観察 .....	33
3.3.3 数値流体力学 (Computational fluid dynamics; CFD) を用いた異なる形状の攪 拌翼がもたらす攪拌槽内の流体挙動の解析 .....	36
3.3.4 異なる形状の攪拌翼を用いた PGSS 法による微粒子製造 .....	38
3.3.5 超臨界二酸化炭素－エタノール混合液中における Eudragit L100 の溶解度測定	39
3.3.6 Eudragit L100 をコーティング材とした PGSS 法によるフェニルアラニン内包 マイクロカプセル製造 .....	40
3.3.7 マイクロカプセルの分析方法 .....	41
3.3.7.1 マイクロカプセルの粒度分布測定法 .....	41
3.3.7.2 マイクロカプセルの形態観察法 .....	41
3.3.8 異なる pH 環境におけるマイクロカプセルからのフェニルアラニンの放出速 度の測定 .....	41
3.4 結果および考察.....	42
3.4.1 異なる形状の攪拌翼における高圧攪拌による高圧セル内流体挙動の比較 .....	42
3.4.2 CFD による高圧セル内流体の数値解析結果.....	45
3.4.3 異なる形状の攪拌翼を用いた PGSS 法により製造された微粒子の比較 .....	48
3.4.4 異なる形状の攪拌翼を用いた PGSS 法による微粒子形成メカニズムの考察....	50
3.4.5 二酸化炭素－エタノール混合液中での Eudragit L100 の溶解度 .....	52
3.4.6 マイクロカプセルの分析結果 .....	54
3.4.7 異なる pH 環境におけるマイクロカプセルからのフェニルアラニンの放出速 度 .....	56
3.5 第 3 章の結言 .....	58
第 4 章 二酸化炭素溶媒に超音波を併用した医療用ナノカプセルの調製 .....	60
4.1 第 4 章の緒言 .....	60
4.1.1 背景 .....	60
4.1.2 目的 .....	61
4.2 第 4 章の研究基礎.....	61
4.2.1 リポソームについて .....	61
4.2.2 リポソームの種類.....	62
4.2.3 超音波ホーン内臓型高圧装置の概要 .....	63
4.2.4 直接超音波照射による高圧セル内への影響 .....	65

4.3 実験.....	66
4.3.1 試薬類.....	66
4.3.2 リン脂質懸濁液調製法 .....	67
4.3.3 高圧二酸化炭素および大気圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法.....	67
4.3.4 高圧二酸化炭素と間接超音波照射を併用したリポソーム調製法.....	68
4.3.5 Bangham 法を用いたリポソーム調製法 .....	69
4.3.6 リポソームの分析.....	69
4.3.6.1 リポソームの形態観察.....	69
4.3.6.2 リポソーム液の粒度分布測定 .....	69
4.3.6.3 リポソームに内包されたシクロスポリン A の薬剤負荷率とカプセル化効率 算出法 .....	69
4.4 結果および考察.....	70
4.4.1 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して調製したリポソームの形態観察 結果 .....	70
4.4.2 各方法で調製されたリポソームの比較.....	71
4.4.3 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法における超音 波照射時間の影響.....	73
4.4.4 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法における仕込 みリン脂質量の影響.....	75
4.4.5 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法における操作 温度と操作圧力の影響 .....	76
4.4.6 高圧二酸化炭素中でのリポソーム調製における高圧セル内の視覚的観察結果	77
4.4.7 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法におけるリポ ソーム生成メカニズム .....	78
4.4.8 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して調製したリポソームの薬剤負荷 率およびカプセル化効率.....	80
4.5 第 4 章の結言 .....	80
第 5 章 結 論 .....	82
参考文献.....	86
APPENDIX .....	100
数値流体力学 (CFD) を用いた攪拌槽内および攪拌翼周辺の流体挙動解析法 .....	100
1. 流体領域と固体領域の作成・分割 .....	100

2.	メッシュの生成・編集 .....	102
3.	Fluent による流体領域の解析 .....	105
	謝 辞 .....	109

## 第 1 章

### 序論

#### 1.1 緒言

近年、科学技術の急速な発展と高度化に伴い、マイクロ・ナノサイズのカプセル製造技術の需要が高まってきている。マイクロ・ナノカプセルは電子機器分野 [1-3]、医薬品分野 [4,5]、化粧品分野 [6,7]、食品分野 [8]、繊維材料分野 [9,10]、農業分野 [11,12]、土木分野 [13,14]、エネルギー材料分野 [15]など、多岐にわたる分野で必要とされている。

マイクロ・ナノカプセルを製造する技術としては、既に多数の方法が報告されている。代表的な製造法の一例を Table 1.1 に示す。

Table 1.1 代表的なマイクロ・ナノカプセル製造方法

種類	マイクロ・ナノカプセル製造法の名称
物理的手法	パンコーティング [16-18]
	流動造粒法 [19,20]
	Centrifugal extrusion 法 [21,22]
	振動ノズル法 [23,24]
	スプレードライ法 [25-27]
物理化学的手法	イオンゲル化法 [28-34]
	コアセルベーション法 [35-41]
化学的手法	界面重合法 [42,43]
	界面重縮合法 [44,45]
	In-situ 重合法 [46,47]
	懸濁重合法 [48]

マイクロ・ナノカプセル製造法の種類としては、Table 1.1 のように主に物理的手法、物理化学的手法、化学的手法の大きく 3 つに分けられる。物理的手法は、パンコーティング [16-18]、流動造粒法 [19,20]、Centrifugal extrusion 法 [21,22]、振動ノズル法 [23,24]またはスプレードライ法 [25-27]のように、温度、圧力、攪拌速度などの物理的条件を操作することにより、マイクロ・ナノカプセルを製造する方法である。物理化学的手法は、イオンゲル化法 [28-34]またはコアセルベーション法 [35-41]のように、二液混合した際の凝固、析出などのように、化学反応以外の経路でカプセル壁を形成する方法である。化学的手法は、界面重合

法 [42,43]、界面重縮合法 [44,45]、In-situ 重合法 [46,47]または懸濁重合法 [48]のように、重合、重縮合などの化学反応を利用してカプセル壁を形成し、マイクロ・ナノカプセルを製造する方法である。

Table 1.1 に示した方法は、実用化例も報告されており、様々な分野で有効的な利用が検討されているマイクロ・ナノカプセル製造技術である。しかし、マイクロ・ナノカプセルを医薬品、化粧品、食品のような人体への適用が想定される分野で使用する場合、環境負荷が小さく大量生産かつ高品質で安価なマイクロ・ナノカプセル製造方法が求められる。物理的手法の多くは有機溶媒を使用せずにマイクロ・ナノカプセルを製造できる利点があるが、操作条件によっては内包する目的物質が操作に適さないこと [49]がある。物理化学的手法は物理的な操作条件が穏やかであるが、使用する有機溶媒が有害な場合 [49]がある。化学的手法はカプセル壁の膜厚の制御が容易であるなど、高品質なマイクロ・ナノカプセルの製造が可能であるが、界面活性剤や有機溶媒を使用するため、生体適用が困難 [49]とされる。このように、Table 1.1 のマイクロ・ナノ粒子製造技術では、医薬品、化粧品、食品のような人体への適用が想定される分野における実用化が困難であるのが現状である。

我々の研究室では、有機溶媒に代わる溶媒として、生体毒性が非常に低い二酸化炭素 [50-52]の利用を試みてきた。二酸化炭素は、近年、SDGs (Sustainable Development Goals、持続可能な開発目標) などの環境問題に対する社会的な関心の高まりにともない、その有効利用法の開発が求められている物質の一つである。二酸化炭素を利用した技術として、特に超臨界二酸化炭素は、臨界温度・臨界圧力を超えた気体と液体の両方の性質を持ち合わせた高密度流体であり、操作温度が 35 °C から 70 °C、操作圧力が 8 MPa から 20 MPa と生体関連物質に対しては比較的穏和な条件で難燃性であることから、グリーンケミストリーが実現可能な機能性溶媒 [51,52]として着目されている。超臨界流体技術は、有害な有機溶媒を用いないクリーンな生体適合型プロセスであり、かつ、蒸留などの他の化学プロセスに比べてエネルギー消費が極めて少ない省エネルギー型プロセスであるため、工業実用化が可能なプロセスとして期待されている。

複合粒子製造法として先行研究が報告されている物理的手法での超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造技術の一例を Table 1.2 に示す。

Table 1.2 超臨界二酸化炭素を用いた物理的手法でのマイクロ・ナノカプセル製造方法

種類	マイクロ・ナノカプセル製造法の名称
急速膨張法 (超臨界二酸化炭素が良溶媒)	RESS/RESS-N 法 [51]
	RESAS 法 [53]
	CAN-BD 法 [54]
貧溶媒析出法 (超臨界二酸化炭素が貧溶媒)	GAS 法 [51,55,56]
	SAS/ASES/PCA 法 [57]
	SEDS 法 [51,58-60]
その他の手法 (相分離や界面挙動を利用)	PGSS 法 [61-63]
	SFEE 法 [64-67]
	PIPS 法 [68]

物理的手法での超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造法の種類としては、Table 1.2 のように急速膨張法、貧溶媒析出法、その他の手法の3つに大別される。急速膨張法は、超臨界二酸化炭素が被膜物質に対して良溶媒なマイクロ・ナノカプセル製造法であり、主に RESS/RESS-N 法 [51]、RESAS 法 [53]、CAN-BD 法 [54]に分けられる。貧溶媒析出法は超臨界二酸化炭素が被膜物質に対して貧溶媒なマイクロ・ナノカプセル製造法であり、主に GAS 法 [51,55,56]、SAS/ASES/PCA 法 [57]、SEDS 法 [51,58-60]に分けられる。その他の手法は、相分離や界面挙動を利用してマイクロ・ナノカプセルを製造しており、主に PGSS 法 [61-63]、SFEE 法 [64-67]、PIPS 法 [68]にそれぞれ分けることができる（これらの手法の詳細は第2章に後述する）。しかし、これらの超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造法は、高品質、高収率のマイクロ・ナノカプセルの製造が可能であるとされているにもかかわらず、実際に企業に導入されたケースはほとんどない。この理由の一つとして、急速な科学技術の発展により、マイクロ・ナノカプセルへの機能性の付与が求められるようになり、製造工程でのナノレベルの表面構造改質が必要とされていることが考えられる。例えば、医療分野での機能性ナノカプセル活用事例としては、DOXIL (liposomal doxorubicin) [69,70]が挙げられる。DOXIL は、抗悪性腫瘍剤のドキソルビシンを内包した直径 100 nm から 500 nm のリポソーム体であり、ヒトの細胞膜と似た構造をもつリン脂質二重層からなる閉鎖小胞構造 [71]を有することから、優れた薬物キャリアとしての Drug Delivery System (体内薬剤配送システム) 体として知られている。しかし、DOXIL のようなナノ製剤を人体に投与する場合、免疫機構を担う肝臓や脾臓を中心とする細網内皮系組織の貪食細胞からの捕捉を回避するために、ナノカプセル表面に PEG (ポリエチレングリコール) のような親水



性高分子を修飾 [72,73]することによるナノ粒子の表面構造改質が必要であるとされている。

微粒子製造に関して、攪拌操作がマイクロ・ナノカプセルの表面構造などの物性に影響を与えることは古くから知られている。Zhang ら [74]は、n-オクタデカンを内包したメラミン-ホルムアルデヒドのマイクロ・ナノカプセル製造に関して、攪拌操作を検討することにより、カプセルの直径、形態、相変化特性および熱安定性の影響を報告をしている。しかし、微粒子製造の際に用いる溶媒が二酸化炭素の場合は、マイクロ・ナノカプセル製造に関して攪拌操作の影響を検討した研究報告は少ない。これは、二酸化炭素は高压容器全体に満たされた低密度の流体であるため、攪拌の影響が小さくなるためであると思われる。我々は、高压攪拌槽内流体の目視観察中に、高压下において、二酸化炭素の密度が高くなると、水のような液体に近い挙動をとる現象を確認した。シリカ粒子を仕込んだ高压容器内に二酸化炭素を送液し、温度 40 °C、圧力 4.0 MPa の状態（二酸化炭素は気体状態）において、マグネチックスターラーにより攪拌速度 100 rpm で攪拌したときは、Fig. 1.1 (a2)のようにシリカ粒子が沈降している様子がわかる。一方、温度 40 °C、圧力 10 MPa の状態（二酸化炭素は超臨界状態）において、マグネチックスターラーにより攪拌速度 100 rpm で攪拌したときは、Fig. 1.1 (b2)のようにシリカ粒子が超臨界二酸化炭素中に一瞬で巻き上がり、高压セル内が黒くなる様子がわかる。筆者らはこの事象に基づき、マイクロ・ナノカプセル製造に関して、使用する溶媒が超臨界二酸化炭素であれば、攪拌操作が製造粒子の物性に影響を与えうると考えた。

以上の背景から本研究では、超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造において、超臨界流体プロセスの攪拌操作に着目し、攪拌操作条件を変えることにより、マイクロ・ナノカプセルの粒子径や製造粒子形状、収率を検討することで近年の科学技術に求められる、より高機能・高収率のマイクロ・ナノカプセル製造プロセスの開発が可能になるのではないかと考え、実施した。

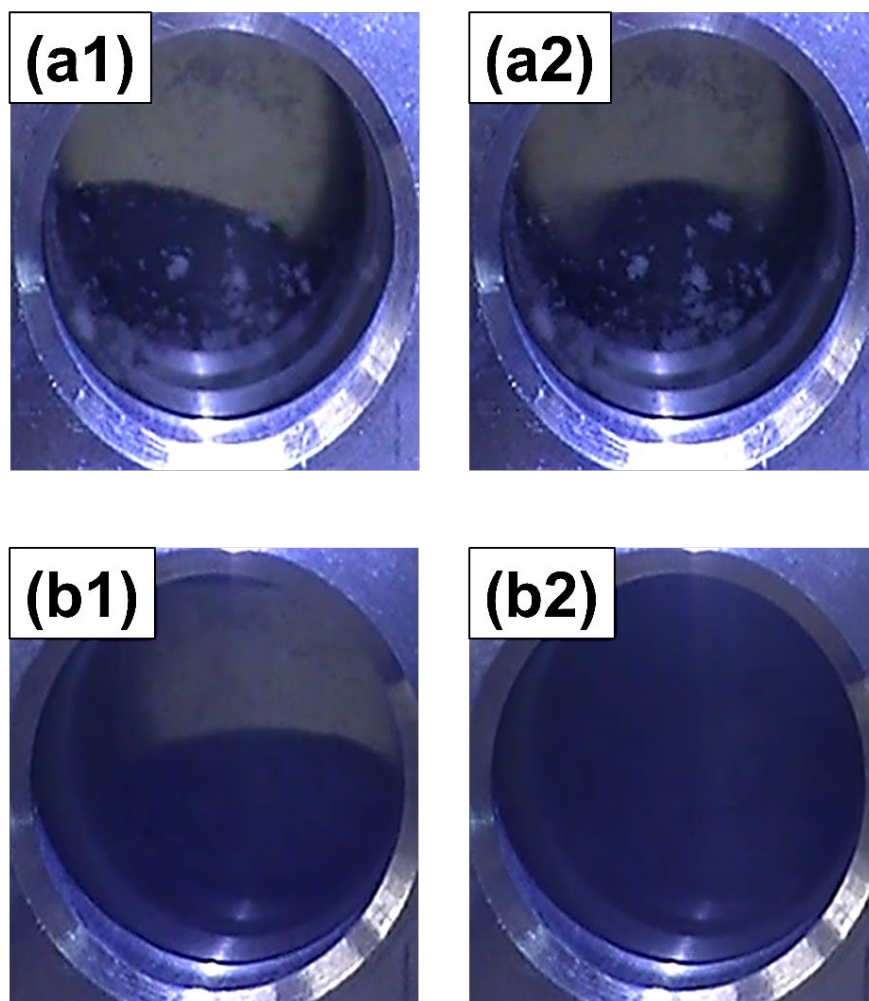


Fig. 1.1 異なる操作条件におけるシリカ粒子と二酸化炭素のマグネチックスターラーによる攪拌時の高圧容器内の様子。(a1) 温度 40 °C、圧力 4.0 MPa、攪拌速度 0 rpm (二酸化炭素は気体状態、静止)、(a2) 温度 40 °C、圧力 4.0 MPa、攪拌速度 100 rpm (二酸化炭素は気体状態、攪拌)。(b1) 温度 40 °C、圧力 10 MPa、攪拌速度 0 rpm (二酸化炭素は超臨界状態、静止)、(b2) 温度 40 °C、圧力 10 MPa、攪拌速度 100 rpm (二酸化炭素は超臨界状態、攪拌)。

## 1.2 本研究の目的

本研究の目的は、超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造において、攪拌操作に着目することにより、従来よりも粒度分布が狭く、高カプセル化効率かつ高収率な機能性マイクロ・ナノカプセル製造プロセスを開発することである。そのために本研究では、以下に示す2つのプロセスを実施することにより、高圧下における機械的攪拌およ

び超音波照射が高圧容器内混合物におよぼす流動特性の比較検討を試みた。

- 1) 超臨界二酸化炭素のガス飽和溶液懸濁 (Particles from Gas Saturated Solutions; PGSS) 法において、高圧下での機械的攪拌における異なる形状の攪拌翼が及ぼす高圧セル内流体挙動を目視観察および数値流体力学 (Computational fluid dynamics; CFD) 技術により解析することで、従来よりも粒度分布が狭く、形態が球状であるマイクロ粒子の製造を試みた。さらに製造したマイクロカプセルの機能性の確認として、異なる pH 環境、特に腸環境における時間的薬剤徐放性を検討した。
- 2) 高圧二酸化炭素と超音波を複合させた技術を用いた有機溶剤未使用の新規カプセル調製法の開発のために、超音波未使用、高圧容器外からの間接超音波照射、高圧容器内に内蔵されたホーンからの直接超音波照射の様子を目視観察することにより、迅速で高収率かつ粒子径が最も小さくなるナノリポソームの調製を試みた。

### 1.3 本論文の構成

本論文は、超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造において、攪拌操作に着目することにより、従来よりも粒度分布が狭く、高カプセル化効率かつ高収率な機能性マイクロ・ナノカプセル製造プロセスを開発することを目的として全 5 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、マイクロ・ナノカプセル化技術の現状と、従来技術の問題点について述べる。さらに、近年注目されている食品、医薬品および化粧品分野のような人体への適用が想定される分野におけるマイクロ・ナノカプセル活用事例を述べ、二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル化技術発展の重要性から、本研究の目的を示す。

第 2 章は原理および理論であり、二酸化炭素の物理的および化学的特徴を述べた後、物理的手法での超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造技術を示す。物理的手法での超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造技術を、超臨界二酸化炭素を良溶媒として用いた急速膨張法、超臨界二酸化炭素を貧溶媒として用いた貧溶媒析出法、相分離や界面挙動を利用したその他の手法の大きく 3 つに分け、各手法の詳細をそれぞれ述べる。

第 3 章から第 4 章は実験である。第 3 章では、PGSS 法を用いて、超臨界二酸化炭素が貧溶媒である腸溶性ポリマーの Eudragit L100 をコーティング材とした、フェニルアラニン内包マイクロカプセルの製造を述べる。まず、機械的攪拌時に、異なる形状の攪拌翼 (4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼) を用いて、高圧容器内の超臨界二酸化炭素溶媒中に、芯物質およびポリマー溶液滴を均一に分散させるような条件を、高圧容器内流体挙動の目視観察および数値流体力学 (CFD) による解析により検討することで、従来よりも粒度分布が狭く、形態が球状であるマイクロ粒子の製造を試みる。次に、温度 50 °C での、異なる圧力の二酸化炭素-エタノール混合溶液に対して、Eudragit L100 が完

壁に溶解する系を目視観察により検討する。さらに、温度 50 °C、異なる圧力 (8 MPa、10 MPa、12 MPa) において PGSS 法でマイクロ粒子を製造することにより、粒子形態が球状で、粒子サイズ (粒度分布) が最小となり、カプセル化効率 (%) と生産収率 (%) が最大となる操作条件を模索する。最後に、経口薬物送達システムとしてのマイクロカプセルの機能性を確認するために、異なる pH 条件におけるマイクロカプセルからの持続的薬物放出アッセイを実施する。

第 4 章では、高圧二酸化炭素と超音波直接照射技術を併用 (高圧超音波直接処理) することにより、水-高圧二酸化炭素の気液ナノ界面を拡張することによる有機溶剤未使用かつ迅速で高収率かつ粒子径が最も小さくなるナノリポソームの調製について述べる。まず、リポソームを異なる手法 (Bangham 法、大気圧超音波直接処理法、高圧超音波未使用法、高圧超音波間接処理法、高圧超音波直接処理法) により調製することで、粒子径が最小かつ高収率となるリポソーム調製法を検討する。次に、高圧超音波間接処理または高圧超音波直接処理を用いたリポソーム調製において、異なる操作条件 (超音波照射時間: 0 秒 - 250 秒、仕込みリン脂質量: 0.04 wt% - 0.40 wt%、操作温度: 25 °C - 60 °C) の範囲にてリポソーム収率が最大かつ粒子径が最小となる系を模索する。さらに、高圧超音波直接処理で疎水性薬剤であるシクロスポリン A を内包したリポソームを製造し、薬剤負荷率 (%) およびカプセル化効率 (%) を算出し、従来 (Bangham) 法と比較することで、高圧超音波直接処理により調製したリポソームが実用化可能なものであるかを検討する。最後に、機能性リポソームの調製として、高圧超音波直接処理で PEG 修飾リン脂質を用いたリポソーム調製を実施する。

最後に、第 5 章において本研究での結論を示している。

## 第 2 章

### 原理および理論

#### 2.1 緒言

我々の研究室では、機能性マイクロ・ナノカプセルの製造に用いる溶媒として二酸化炭素を使用し、研究を実施してきた。本章では、溶媒として二酸化炭素を用いることの利点や、薬剤をマイクロ・ナノカプセル化することの重要性を示した後、現在報告されている二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノ粒子製造方法について述べる。

#### 2.2 二酸化炭素について

##### 2.2.1 二酸化炭素の特徴 [51]

二酸化炭素は、化学式  $\text{CO}_2$  で表される無機化合物である。モル質量は 44.01 g/mol、常圧での沸点（昇華点）は  $-78.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  である。あらゆる炭素化合物の燃焼によって容易に発生し、常温常圧では無色無臭の気体として安定している。二酸化炭素は大気中に約 0.04 % ほど存在し、低濃度であれば人体や環境に害を及ぼすことはない。二酸化炭素の水への溶解度は  $0.145\text{ g}/100\text{ cm}^3$  ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $100\text{ kPa}$ ) であるが、二酸化炭素は無極性化合物であり、二酸化炭素が水中に溶解し飽和水溶液となると、水と二酸化炭素は相分離する。二酸化炭素は、極性の高い親水性物質よりも、極性の低い疎水性物質を対象とした溶媒として用いられる。そのため、二酸化炭素を溶媒として工業的に利用した技術としては、主に油相成分の洗浄 [75]、抽出 [76,77]、塗装 [78]、微小材料製造 [79] などが報告されている。

##### 2.2.2 超臨界流体について [80]

超臨界流体は、温度と圧力が気液の臨界点を越えた非凝縮性流体と定義されるものの一つである。Fig. 2.1 に示すように、臨界点（臨界温度）を超えているため分子の熱運動が激しく、密度を理想気体に近い希薄な状態から液体に近い濃密度な状態まで連続的に変化させることが可能である。このことは温度・圧力等の外部因子により、その特性を変化させることが可能であることを意味している。さらに、液体相当の溶解力と気体相当の拡散性を持ち合わせているため、従来の液体溶媒にはみられない効果が期待できるとされる。

超臨界流体の代表的な物性値を、液体及び気体と比較した結果を Table 2.1 に示す。超臨界流体の密度は液体に近く、粘度や拡散係数は気体に近い値を示している。溶媒の密度が大きいほど物質に対する溶解力が大きくなることから、超臨界流体は液体並みの溶解力を持っていると期待される。一方、粘度や拡散係数から気体並みの大きな流動性を持っている。これらの物性から、超臨界流体は気体と同程度の大きな運動エネルギーを持ち、液体並みの

密度と溶解力を持った機能性溶媒と言える。

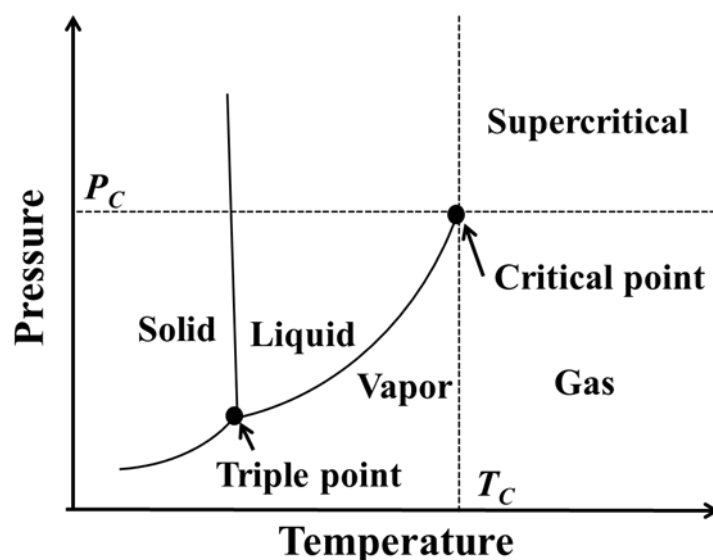


Fig. 2.1 物質の三相図。縦軸が圧力、横軸が温度を表す。あらゆる物質は、臨界圧力  $P_c$ 、臨界温度  $T_c$  を超えると、超臨界状態となる。

Table 2.1 気体、超臨界流体、液体の物性値の比較 [81] [82]

物性	気体	超臨界流体	液体
密度 [kg/m <sup>3</sup> ]	0.6~1	200~900	1000
粘度 [Pa · s]	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup> ~10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>
拡散係数 [m <sup>2</sup> /s]	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup> ~10 <sup>-8</sup>	<10 <sup>-9</sup>

### 2.2.3 超臨界二酸化炭素の特性 [80]

代表的な物質の臨界値を Table 2.2 に示す。Table 2.2 に示すように、二酸化炭素の臨界温度、臨界圧力はそれぞれ 31.1 °C、7.38 MPa であり、他物質と比較して容易な条件で超臨界状態になる。また、二酸化炭素は非常に毒性が低く、不燃性であり、回収・再利用が容易であるため運転に必要なエネルギーコストの抑制が可能である。さらに、二酸化炭素の臨界温度は常温近傍であることから、タンパク質などの高温に弱い生体関連物質を対象とすることも可能であり、特にそれらが利用されやすい医療・医薬・化粧品・食品などの分野での応用が期待されている。

Table 2.2 各物質の臨界点 [83,84]。  $T_c$ 、  $P_c$  はそれぞれ臨界温度、臨界圧力を表す。

物質	$T_c$ [°C]	$P_c$ [MPa]
二酸化炭素	31.1	7.38
水	374.2	22.064
メタン	-82.4	4.599
エタン	32.3	4.872
プロパン	96.7	4.248
メタノール	239.6	8.097
エタノール	240.9	6.148

超臨界流体に対する溶解度は、溶質－溶媒間の相互作用に支配されている。溶解度の曲線と密度の曲線が類似していることが多く、溶解度は超臨界流体の密度に大きく影響を受ける。超臨界二酸化炭素の場合では、高圧であるほど密度が大きくなる傾向があり、拡散係数も溶解度に依存している。一般的には超臨界流体と溶質の混合体の拡散係数は、圧力一定の下で温度の上昇とともに増加し、温度一定の下で圧力の減少に伴い増加する。しかし、低圧では拡散係数の与える影響が非常に小さく、一方で密度の増加は大きく影響する。また、溶質の拡散係数は溶質の分子が大きいほど減少し、さらに、溶質と溶媒の分子サイズが大きく異なれば、分子の移動度は妨害される。

### 2.3 マイクロ・ナノカプセルについて

マイクロ・ナノカプセルとは、芯となる物質をポリマーのような膜で覆い、マイクロ・ナノメータの大きさを持つ微小な球に成形したもので、Fig. 2.2 のように芯物質の保護や酸化防止の役割[85]がある。溶媒に溶解する物質を芯物質として用いた場合 [85]は、芯物質の大きさに関わらず、物質をマイクロ・ナノカプセル化することができる。一方、溶媒に溶解しない物質を芯物質として用いた場合[85]は、生成するマイクロ・ナノカプセルの粒子サイズは芯物質の大きさに依存するため、芯物質が製造時に使用する溶媒に可溶かどうかを事前に検討しておく必要がある。

マイクロ・ナノカプセル製造で使用するコーティングポリマーを機能性ポリマー（例えば、pH 応答性ポリマー）とすると、コーティングポリマーの機能性を有したマイクロ・ナノカプセルが製造可能 [86]となるため、食品、工業、農業、医薬、化粧品などのあらゆる分野で注目されている。既に、多くのマイクロ・ナノカプセル製造法に関する報告が行われており、直径  $500\text{ }\mu\text{m}$  程度の粒子製造法としては、流動層コーティングやスプレードライコーティング法などが適している。しかし、これらの方法では、直径  $200\text{ }\mu\text{m}$  – 数 nm の微小粒子を製造する場合、微粒子同士の癒着などの原因から粒子径制御が困難となる。直径  $200\text{ }\mu\text{m}$  – 数 nm の微小粒子を製造するためには、従来は in-situ 重合法や界面重合法などが用いられてき

たが、環境に有害な有機溶媒や界面活性剤を多量に使用するため、生体または環境への悪影響が懸念されている。二酸化炭素は、無毒で環境負荷が小さい。さらに、二酸化炭素は常温常圧で気体であり、マイクロ・ナノカプセル製造時に液体状態になりにくいという特徴から、製造した微粒子同士の癒着が起こりにくい。これらの特徴から、特に、人体への適用を想定とした食品、医薬および化粧品分野では、人体に有害な有機溶媒や界面活性剤を使用することなく、有効成分をマイクロ・ナノカプセル化できる二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造技術が注目されている。2.4 項からは、現在報告されている二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノ粒子製造方法を述べる。

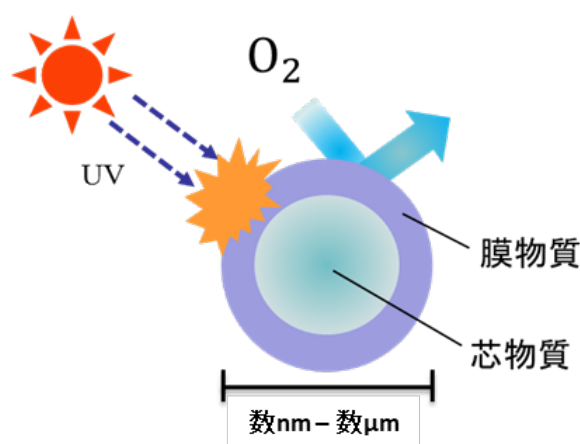


Fig. 2.2 マイクロ・ナノカプセルの構造および特徴。芯物質の周りをコーティングポリマー（膜物質）で被覆することにより、芯物質の保護や酸化防止の機能を付与することができる。

## 2.4 二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノ粒子製造方法

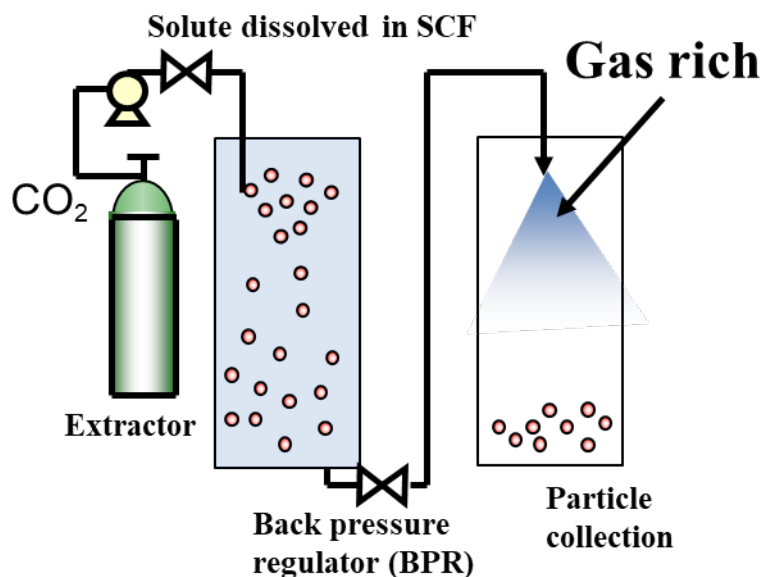
本項では、超臨界二酸化炭素を溶媒として用いた代表的なマイクロ・ナノ粒子製造技術を述べる。超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノ粒子製造技術としては、超臨界二酸化炭素を反応場として利用した化学的手法と、二酸化炭素の圧力変化に伴う密度・溶解度変化を利用した物理的手法の二つに大別される。ここでは、複合粒子製造法として先行研究が報告されている物理的手法でのマイクロ・ナノ粒子製造技術について述べる。

### 2.4.1 RESS/RESS-N 法

まず、超臨界二酸化炭素を良溶媒として用いるマイクロ・ナノ粒子製造技術である RESS/RESS-N (Rapid Expansion of Supercritical Solution (with Non-solvent)、日本語では超臨界



溶液急速膨張) 法について述べる。RESS/RESS-N 法 [51,87]は、Fig. 2.3 に示すように、ポリマーや脂質などの溶質を超臨界二酸化炭素中に溶解させ、それを微細ノズルを通じて高圧下から大気圧下まで急速に膨張(減圧)させることにより、超臨界二酸化炭素中に溶解していた溶質を析出させるという溶質の溶解度の違いを利用したマイクロ・ナノ粒子製造技術である。高圧流体中に溶質を溶解させ、急速膨張により溶質を微粒化させる現象は、1879 年に Hannay と Hogarth [88]によって発見され、これを超臨界流体に置き換えた技術を 1984 年に Krukoni s [89]が開発した。その後、Matson ら [90]により RESS 法と命名された。超臨界二酸化炭素を用いた RESS 法は古くから実施されており、多くの知見(レビュー)があるが、適用できる溶質の種類が限られていること [87]や、多量の超臨界流体を使用すること [87]などから、効率的な製造が困難とされてきた。これらの欠点の解決のために、例えばエタノールやトルエンなどの助溶媒を予め添加し、二酸化炭素と助溶媒の混和液を溶媒とすることにより、溶質の溶解度を高め、生産効率の増加を狙った RESS-N 法 [51]が報告されている。



## RESS/RESS-N

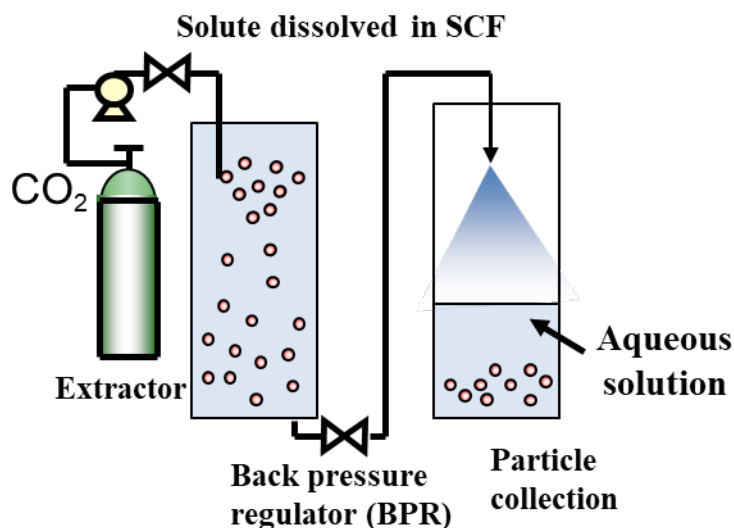
### (Rapid Expansion of Supercritical Solution (with Non-solvent))

Fig. 2.3 RESS/RESS-N (Rapid Expansion of Supercritical Solution (with Non-solvent)) 法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。ポリマーや脂質などの溶質を超臨界二酸化炭素中に溶解させ、それを微細ノズルを通じて高圧下から大気圧下まで急速に膨張（減圧）させることにより、超臨界二酸化炭素中に溶解していた溶質を析出させるという溶質の溶解度の違いを利用してマイクロ・ナノ粒子を製造する。

#### 2.4.2 RESAS 法

超臨界二酸化炭素を良溶媒として用いるマイクロ・ナノ粒子製造技術としては RESS/RESS-N 法の他に、RESAS (Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution) 法 [53] が報告されている。RESAS 法のマイクロ・ナノ粒子形成原理として、ポリマーや脂質などの溶質を超臨界二酸化炭素中に溶解させ、それを微細ノズルを通じて噴霧するということは RESS/RESS-N 法と同様である。RESS/RESS-N 法と異なる点としては、Fig. 2.4 に示すように、溶質が溶解しない水のような溶媒に溶液を直接噴霧することにより、溶質を析出させ、マイクロ・ナノ粒子化を可能とするところである。RESAS 法は、Young ら [91] によって提案されたマイクロ・ナノ粒子製造技術であり、噴霧する水中に界面活性剤を溶解させ、

溶解させた界面活性剤の種類および濃度を操作することにより、生成微粒子形の制御が可能であるとされている。一方、欠点は RESS/RESS-N 法と同様に、適用できる溶質の種類が限られていることや、多量の超臨界流体を使用する必要があることであるとされている。



## **RESAS**

### **(Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution)**

Fig. 2.4 RESAS (Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution) 法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。ポリマーや脂質などの溶質を超臨界二酸化炭素中に溶解させ、それを微細ノズルを通じて溶質が溶解しない水のような溶媒に溶液を直接噴霧することにより、溶質を析出させ、マイクロ・ナノ粒子を製造する。

#### 2.4.3 CAN-BD 法

超臨界二酸化炭素を良溶媒として用いるマイクロ・ナノ粒子製造技術としては、他に CAN-BD (Carbon dioxide-Assisted Nebulization with a Bubble Dryer、日本語では超臨界噴霧乾燥) 法も挙げられる。CAN-BD 法 [54]は、Fig. 2.5 に示すように、水中に溶解させた溶質を超臨界二酸化炭素中に溶解・混合させ、それを微細ノズルを通じて高温の乾燥室または空気中へ高压下から大気圧下まで急速に膨張(減圧)させることにより、溶体を微小な液滴とし、さらに高温乾燥により溶媒が除去され微粒化されるというマイクロ・ナノ粒子製造技術

である。CAN-BD 法は Sievers ら [92]によって提案され、超臨界二酸化炭素を良溶媒として用いる他の手法と異なり、高温乾燥気体を用いることにより、速やかな粒子形成が起こり、凝集が起こりにくい [54]という利点がある。しかし、CAN-BD 法は主に水溶液の噴霧乾燥に適用されることが多く、系が限定されることが課題とされている。

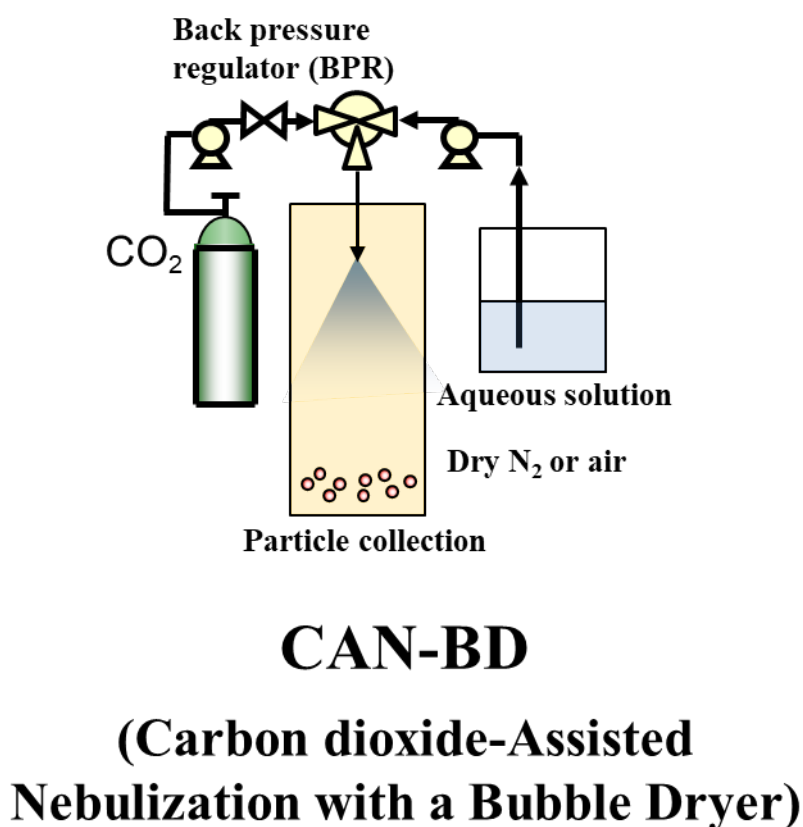


Fig. 2.5 CAN-BD (Carbon dioxide-Assisted Nebulization with a Bubble Dryer) 法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。水中に溶解させた溶質を超臨界二酸化炭素中に溶解・混合させ、それを微細ノズルを通じて高温の乾燥室または空気中へ高圧下から大気圧下まで急速に膨張（減圧）させることにより、溶体を微小な液滴とし、さらに高温乾燥により溶媒を除去してマイクロ・ナノ粒子を製造する。

#### 2.4.4 GAS 法

2.4.1 項から 2.4.3 項までは、超臨界二酸化炭素を良溶媒として用いるマイクロ・ナノ粒子製造技術について述べた。ここからは、超臨界二酸化炭素を貧溶媒とした貧溶媒析出法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造技術について述べる。貧溶媒析出法 [93]は、液体溶媒に溶解し

た化合物を超臨界流体（超臨界二酸化炭素）に接触させることで、液体溶媒に対する溶質の溶解度を低下させ、溶質を析出させてマイクロ・ナノ粒子を製造する技術である。GAS (Gas Antisolvent) 法 [51,55,94]は、Fig. 2.6 に示すように、貧溶媒析出法の中でも液体溶媒に溶解した化合物中に超臨界二酸化炭素を導入させ、マイクロ・ナノ粒子を製造する技術である。GAS 法は Gallagher ら [56]によって最初に提案されたマイクロ・ナノ粒子製造技術であり、RESS 法に比べて適用できる薬剤や化合物の範囲が広く [55]、均一な粒度分布の粒子が得られやすい [55]という利点が報告されている。一方、高压容器内部の溶質の析出により粒子を形成するために凝集体が得られやすいこと [94]、GAS 法実施後に高压容器内に残留した溶媒を完全に除去することが難しいこと [94]などが課題として挙げられる。

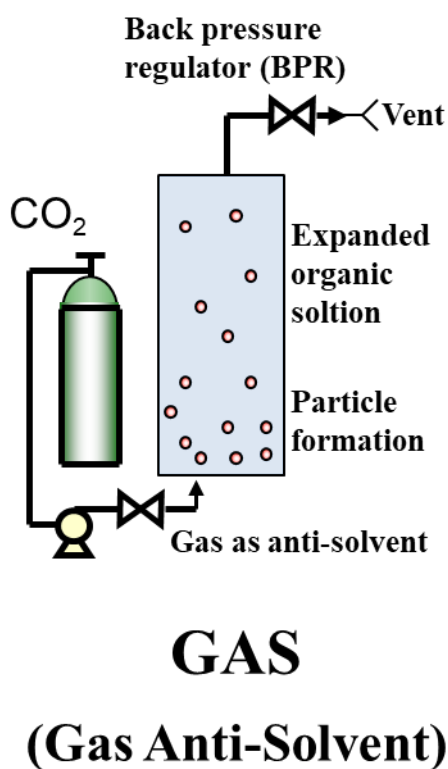
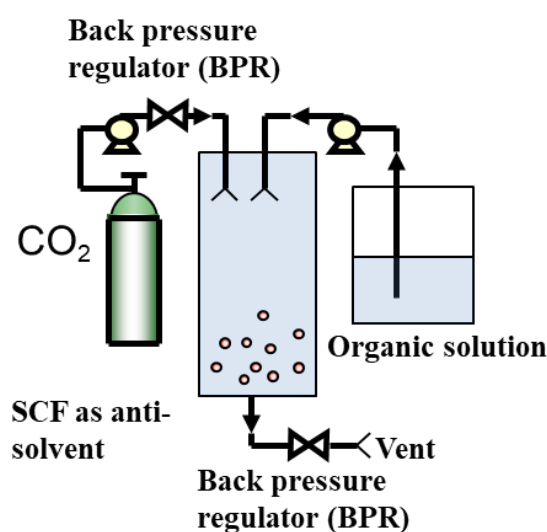


Fig. 2.6 GAS (Gas Antisolvent) 法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。液体溶媒に溶解した化合物中に超臨界二酸化炭素を導入することで、液体溶媒に対する溶質の溶解度を低下させ、溶質を析出させてマイクロ・ナノ粒子を製造する。

#### 2.4.5 SAS/ASES/PCA 法

二酸化炭素を貧溶媒とした貧溶媒析出法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造技術として、GAS 法の他に SAS/ASES/PCA (Supercritical Anti-Solvent/Aerosol Solvent Extraction

System/Precipitation with a Compressed Anti-solvent) 法が挙げられる。GAS 法が溶液中に超臨界二酸化炭素を導入する技術であるのに対して、SAS/ASES/PCA 法 [57]は、Fig. 2.7 に示すように、超臨界二酸化炭素中に液体溶媒に溶解した化合物を導入させることで、マイクロ・ナノ粒子を製造する技術である。SAS/ASES/PCA 法は GAS 法に比べ、液体溶媒の使用量が少ないことから、実施後に高压容器内に残留した溶媒の除去が比較的容易であること [57] が利点とされている。一方、SAS/ASES/PCA 法はマイクロ・ナノ粒子製造量に対して使用する二酸化炭素量が多いこと [52]や、噴霧ノズル中に二酸化炭素が逆流し、噴霧ノズル内部で液体溶媒に溶解した化合物が析出し、噴霧ノズルの閉塞が頻繁に起こること [52]などが課題とされる。

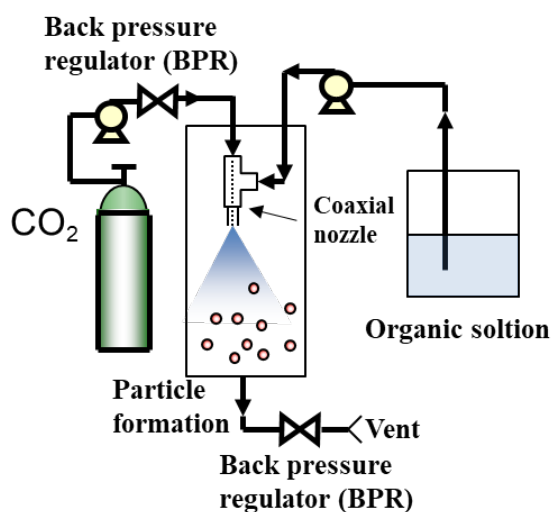


## SAS/ASES/PCA (Supercritical Anti-Solvent/ Aerosol Solvent Extraction System/ Precipitation with a Compressed Anti-solvent)

Fig. 2.7 SAS/ASES/PCA (Supercritical Anti-Solvent/Aerosol Solvent Extraction System/Precipitation with a Compressed Anti-solvent) 法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。超臨界二酸化炭素中に液体溶媒に溶解した化合物を導入することで、液体溶媒に対する溶質の溶解度を低下させ、溶質を析出させてマイクロ・ナノ粒子を製造する。

#### 2.4.6 SEDS 法

二酸化炭素を貧溶媒とした貧溶媒析出法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造技術として、GAS 法、SAS/ASES/PCA 法の欠点を改善するために SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluid) 法が提案された。SEDS 法 [51,58-60,95]は、Fig. 2.8 に示すように、液体溶媒に溶解した化合物と超臨界二酸化炭素を同軸ノズルから同時に噴霧することで結晶を析出させ、マイクロ・ナノ粒子を製造する技術である。SEDS 法での粒子形成は、噴霧された液滴相への超臨界流体の物質移動速度および超臨界相への溶媒の物質移動速度によって決定 [95]され、特に物質移動速度が大きいほど核形成が素早くなるため、サイズが小さく、凝集が少ない粒子が形成されやすい [59]とされている。SEDS 法は York ら [60]によって提案され、高压容器内に残留する液体溶媒の量が少なく、均一な粒度分布の粒子が得られやすいことが利点とされている。



## SEDS

### (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluid)

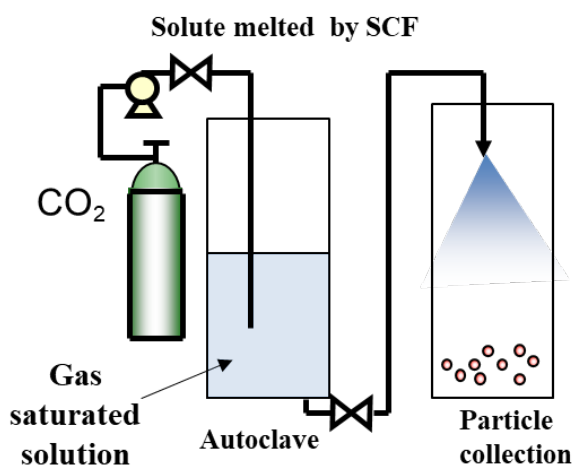
Fig. 2.8 SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical fluid) 法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。液体溶媒に溶解した化合物と超臨界二酸化炭素を同軸ノズルから同時に噴霧することで結晶を析出させ、マイクロ・ナノ粒子を製造する。

#### 2.4.7 PGSS 法

2.4.1 項から 2.4.6 項までは、超臨界二酸化炭素を良溶媒または貧溶媒として用いるマイクロ・ナノ粒子製造技術について述べた。超臨界二酸化炭素を用いたその他重要なマイクロ・

ナノ粒子製造技術として、PGSS 法、SFEE 法、PIPS 法、気液ナノ界面拡張法が挙げられる。

PGSS (Particles from Gas Saturated Solution、日本語ではガス飽和溶液懸濁) 法 [61-63]は、Fig. 2.9 に示すように、ポリマーや脂質などの基質が溶解または懸濁した溶液中に超臨界二酸化炭素を送液し形成されたガス飽和溶液を、微細ノズルを通じて高圧下から大気圧下まで急速に膨張(減圧)させることにより、圧力低下および温度低下により固体微粒子を生成させるマイクロ・ナノ粒子製造技術である。PGSS 法の原理図は RESS/RESS-N 法と類似している。RESS/RESS-N 法では、ポリマーや脂質などの溶質が超臨界二酸化炭素中に直接溶解する必要があるのに対し、PGSS 法では、ポリマーや脂質などの基質が溶解または懸濁した溶液と超臨界二酸化炭素が混合され、ガス飽和溶液が形成されればマイクロ・ナノ粒子が製造できるため、PGSS 法の方が適用範囲が広いことが挙げられる。PGSS 法は、Weidner ら [63]により提案され、助溶剤との組み合わせを変えることにより様々な基質の微粒化が可能であること [61]が利点とされており、PGSS 法を利用したマイクロコーティング技術の実用化例 [62]も既に報告されている。



## PGSS

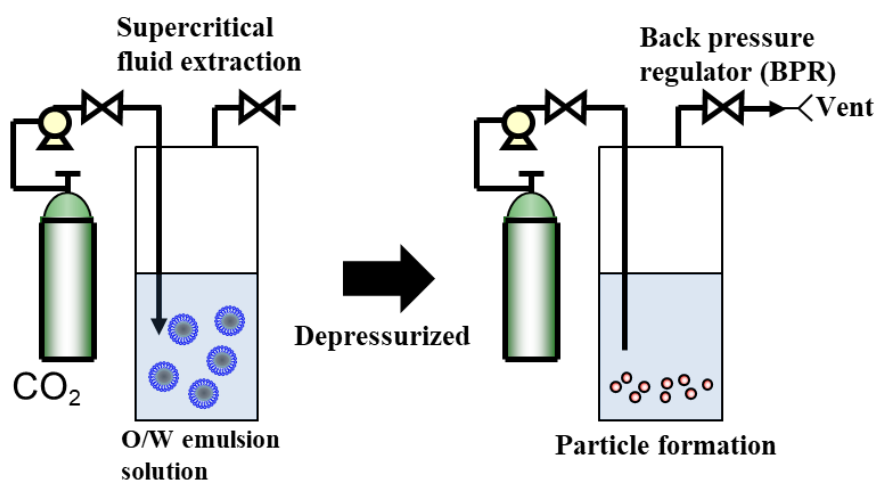
### (Particles from Gas-Saturated Solution)

Fig. 2.9 PGSS (Particles from Gas Saturated Solution、日本語ではガス飽和溶液懸濁) 法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。ポリマーや脂質などの基質が溶解または懸濁した溶液中に超臨界二酸化炭素を送液し形成されたガス飽和溶液を、微細ノズルを通じて高圧下から大気圧下まで急速に膨張(減圧)させることにより、圧力低下および温度低下により固体微粒子を生成させ、マイクロ・ナノ粒子を製造する。



#### 2.4.8 SFEE 法

SFEE (Supercritical Fluid Extraction of Emulsions、日本語では超臨界流体エマルション抽出) 法 [64-67]は、Fig. 2.10 に示すように、水などの極性溶媒中に分散した低極性溶媒（油相）および基質（ポリマーや脂質）が界面活性剤により安定化された O/W エマルション溶液中に、超臨界二酸化炭素を送液することにより、ミセル中の油相と超臨界二酸化炭素が親和し、二酸化炭素排出（減圧）時に油相が抽出され、油相中に溶解していた基質がミセル中で析出することにより固体微粒子を生成させるマイクロ・ナノ粒子製造技術である。SFEE 法で微粒子を形成させるためには、基質が油相中に完全に溶解しておくこと、O/W エマルション溶液を安定化させるための組成比を事前に検討しておくこと、超臨界二酸化炭素との親和性が高い油相を選択することなどが重要となる。また、油相との親和性が高い薬剤や粒子を O/W エマルション溶液中に添加しておくこと、それらを芯物質としてマイクロ・ナノカプセル化も可能であること [64]が報告されている。SFEE 法は、Chattopadhyay ら [66]より提案され、エマルション技術の問題点 [67]であった多量の有機溶媒除去工程を省いたことにより高い生産技術性が期待されている。また、ミセル中で基質を析出させ固体微粒子を生成させるため、粒子同士の癒着が少なく [65]、粒度分布が均一な粒子が得られやすいこと [65]が利点とされる。一方、SFEE 法でマイクロ・ナノカプセルを製造する際の芯物質として、薬剤や粒子が油相との親和性が高いことが重要であり、適用できる系が限定されてしまうことが欠点とされる。



## SFEE

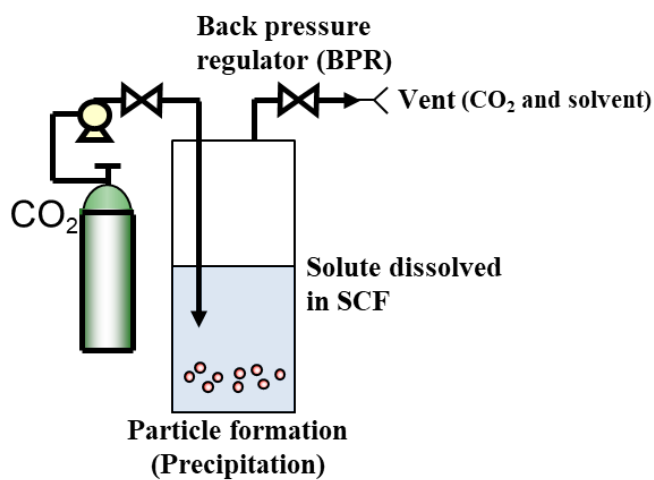
### (Supercritical Fluid Extractions of Emulsion)

Fig. 2.10 SFEE (Supercritical Fluid Extraction of Emulsions、日本語では超臨界流体エマルジョン抽出) 法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。水などの極性溶媒中に分散した低極性溶媒（油相）および基質（ポリマーや脂質）が界面活性剤により安定化された O/W エマルション溶液中に、超臨界二酸化炭素を送液することにより、ミセル中の油相と超臨界二酸化炭素が親和し、二酸化炭素排出（減圧）時に油相が抽出され、油相中に溶解していた基質がミセル中で析出することにより固体微粒子を生成させ、マイクロ・ナノ粒子を製造する。

#### 2.4.9 PIPS 法

PIPS (Pressure-Induced Phase Separation、日本語では圧力誘起相分離) 法 [68,96]は、Fig. 2.11 に示すように、芯物質が分散およびポリマーや脂質などの基質が完全に溶解した超臨界二酸化炭素と助溶媒の混合液から、二酸化炭素を排出（減圧）することにより、ポリマー相と二酸化炭素相を相分離させ、その際に発生したポリマーのコアセルベートと、ポリマーの晶析を利用して固体微粒子を生成させるマイクロ・ナノ粒子製造技術である。Matsuyama ら [68]は、常温常圧時にエタノール中にはほとんど溶解しない poly(methylmethacrylate) (PMMA) と二酸化炭素、エタノールの三相系の相平衡データの取得および溶解メカニズムを解明することにより、PIPS 法を用いた平均粒子径約  $1\mu\text{m}$  の PMMA 微粒子の製造を報告している。PIPS 法では、超臨界二酸化炭素と助溶媒の混合液中に対するポリマーの溶解度が重要であるとされ、アクリル系やポリエステル系のような、超臨界二酸化炭素における常温近傍の比

較的溫度の低い領域では溶解しづらい汎用高分子では粒子製造が困難であることが欠点とされる。



## PIPS (Pressure-Induced Phase Separation)

Fig. 2.11 PIPS (Pressure-Induced Phase Separation、日本語では圧力誘起相分離) 法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。芯物質が分散およびポリマーや脂質などの基質が完全に溶解した超臨界二酸化炭素と助溶媒の混合液から、二酸化炭素を排出（減圧）することにより、ポリマー相と二酸化炭素相を相分離させ、その際に発生したポリマーのコアセルベートと、ポリマーの晶析を利用して固体微粒子を生成させ、マイクロ・ナノ粒子を製造する。

### 2.4.10 気液ナノ界面拡張法

気液ナノ界面拡張法は、Fig. 2.12 に示すように、相分離した無極性溶媒である高密度二酸化炭素相と水などの極性溶媒相の気液界面を、超音波照射のような大きな剪断力がかかる方法で攪乱し、界面積が増大したナノ界面中に両親媒性物質を溶解させて、微粒子を形成させるマイクロ・ナノ粒子製造技術である。本研究室では、第4章にも述べているように、気液ナノ界面拡張法を利用して、高密度二酸化炭素-水の気液ナノ界面にリン脂質を高濃度に溶解させることにより、有機溶媒を全く使用せずに、他の手法と比較して高収率かつ迅速に小胞体であるリボソームを調製すること [97]に成功している。気液ナノ界面拡張法では、超音波の直接照射のような気液界面を大きく攪乱する技術が必要であり、現状では装置の大

型化および実用化が困難である。今後、剪断力が大きな攪拌翼を用いた気液ナノ界面拡張手法の提案など、さらなる技術の開発が期待される。

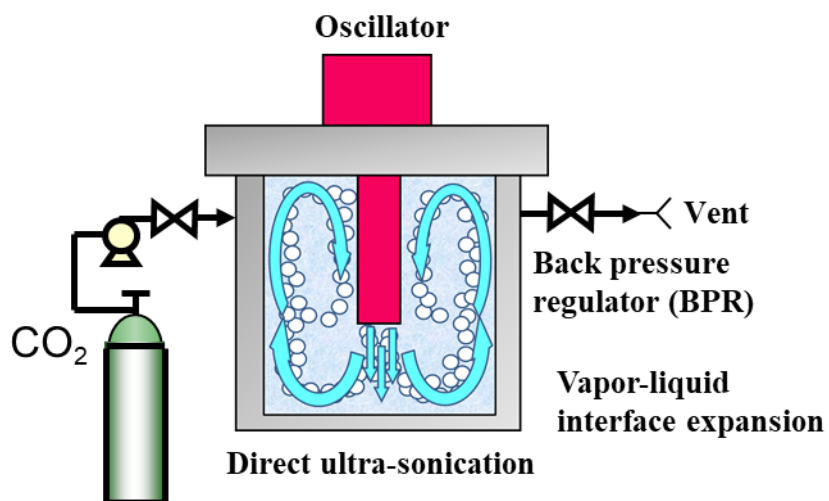


Fig. 2.12 気液ナノ界面拡張法を用いたマイクロ・ナノ粒子製造に関する装置原理図。相分離した無極性溶媒である高密度二酸化炭素相と水などの極性溶媒相の気液界面を、超音波照射のような大きな剪断力がかかる方法で攪乱し、界面積が増大したナノ界面中に両親媒性物質を溶解させて、微粒子を形成させ、マイクロ・ナノ粒子を製造する。

## 第 3 章

### 腸溶性マイクロカプセルの製造

#### 3.1 第 3 章の緒言

##### 3.1.1 背景

第 3 章では、機能性マイクロカプセルの製造として、超臨界二酸化炭素を溶媒としたガス飽和溶液懸濁 (particles from gas saturated solutions; PGSS) 法を用いて、腸環境 (中から高 pH 環境) においてコーティングポリマーが溶解し、内部から薬剤が徐放する腸溶性マイクロカプセルの製造を検討した。

腸溶性ポリマーをコーティング材としたマイクロカプセル製造技術は、胃のような低 pH 環境下での内包薬剤の分解や変質を防ぐ能力があるため、特に経口投与用の医薬品の分野で注目を集めている [98]。Eudragit L100 は、メタクリル酸メタクリレートをベースとするアニオン性コポリマー [99]であり、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) によって医薬品での使用が承認された腸溶性ポリマーの 1 つ [100]である。Eudragit L100 は、他の腸溶性ポリマーよりも酸性環境下での劣化の影響を受けにくい [101]ため、経皮 [102]または経口 [103,104]経路でのドラッグデリバリーシステムの腸溶性コーティングポリマーとして頻繁に使用される。

Eudragit L100 を微粒化する技術 [105-108]として、無毒で環境負荷の小さい超臨界二酸化炭素 [109]を用いた超臨界流体貧溶媒化 (Supercritical fluid Anti-Solvent; SAS) 法 [106-108]が用いられている。SAS 法は、溶媒に溶解したポリマーを、そのポリマーにとって貧溶媒となる超臨界流体中に噴霧することにより、高压容器内部でポリマーを析出させてポリマー微粒子を製造する技術である。Eudragit L100 にとって超臨界二酸化炭素は貧溶媒となるため、超臨界二酸化炭素を用いた Eudragit L100 微粒化技術としては、SAS 法が研究されてきたが、SAS 法で製造された Eudragit L100 微粒子は凝集体を形成しやすいと報告 [106]されている。医薬品にとって薬剤の凝集化は、薬剤の分散度 [110,111]や溶解度を低下 [112,113]させ、薬剤効率の低下 [114]を引き起こすため、ドラッグデリバリーシステムとして不適とされている。ガス飽和溶液懸濁 (Particles from Gas Saturated Solutions; PGSS) 法 [115-119]は、超臨界二酸化炭素を用いて凝集のない粒子を製造することができる技術 [116,117]として知られている。PGSS 法でのポリマー微粒子生成過程は次の通りである。所定温度に加温されたポリマー溶解液が入った高压容器内に、二酸化炭素を充填し圧力を高め、ポリマーと超臨界二酸化炭素の相平衡状態とする。このとき、ポリマーや溶媒中に超臨界二酸化炭素が飽和溶解していることが重要であるため、超臨界二酸化炭素が貧溶媒とならないポリマーが選択される。この高压混合溶液を高压容器下部からノズルを通して大気圧に急速に開放減圧することにより、高压容器外でポリマーを析出させ、ポリマー微粒子を製造する。PGSS 法を用いた Eudragit L100 をコーティング材とした微粒子製造およびマイクロカプセル製造は

報告されていない。これは、Eudragit L100 と超臨界二酸化炭素の親和性が低い [120]ためであると思われる。Perinelli ら [121]は超臨界二酸化炭素が貧溶媒となるポリマーである PLA-PEG-PLA を用いて、高压容器に取り付けられたサファイアガラス窓から PLA-PEG-PLA の溶解度を測定し、温度、圧力およびポリマー濃度などの操作条件を選択することで、PGSS 法によるタンパク質マイクロコーティングを報告している。Perinelli らの研究により、著者らは超臨界二酸化炭素-エタノール-Eudragit L100 系での PGSS 法を用いたマイクロカプセル製造が可能ではないかと考え、実施した。さらに、より均一な粒度分布を有した粒子群を製造するために、異なる形状の攪拌翼を使用し、製造粒子の比較検討を実施した。

### 3.1.2 目的

本研究の目的は、ガス飽和溶液懸濁 (PGSS) 法を用いて、超臨界二酸化炭素が貧溶媒である腸溶性ポリマーの Eudragit L100 をコーティング材とした、フェニルアラニン内包マイクロカプセルの製造である。まず、機械的攪拌時に、異なる形状の攪拌翼 (4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼) を用いて、高压容器内の超臨界二酸化炭素溶媒中に、芯物質およびポリマー溶液滴を均一に分散させるような条件を、高压容器内流体挙動の目視観察および数値流体力学 (CFD) による解析により検討することで、従来よりも粒度分布が狭く、形態が球状であるマイクロ粒子の製造を試みる。次に、温度 50 °C での、異なる圧力の二酸化炭素-エタノール混合溶液に対して、Eudragit L100 が完璧に溶解する系を目視観察により検討する。さらに、温度 50 °C、異なる圧力 (8 MPa、10 MPa、12 MPa) において PGSS 法でマイクロ粒子を製造することにより、粒子形態が球状で、粒子サイズ (粒度分布) が最小となり、カプセル化効率 (%) と生産収率 (%) が最大となる操作条件を模索する。最後に、経口薬物送達システムとしてのマイクロカプセルの機能性を確認するために、異なる pH 条件におけるマイクロカプセルからの持続的薬物放出アッセイを実施する。

## 3.2 第 3 章の研究基礎

### 3.2.1 Eudragit シリーズについて

Eudragit シリーズは、ドイツの Evonik Nutrition & Care GmbH 社で製造されており、主に薬剤の安定性を向上させるための被膜剤 [122]として用いられている。3.1.1 項で述べたように、医薬品としての使用がアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) で認可 [100]されており、日本においても医薬品添加剤としての使用 [123]が認められている。Eudragit シリーズは、Fig. 3.1 に示すようなメタクリル酸共重合体の化学構造を基本骨格とし、官能基の種類に応じて、ドラッグデリバリーシステムにおける様々な特性 (長期保護コーティング [124]、即時徐放性 [122]、pH 応答性 [125]など) を選択的に付与し、制御することが可能である。Eudragit シリーズの中でも、官能基がカルボキシル基 (-COOH) の Eudragit

L100 (S100) と、アミノアルキル基 ( $-\text{CO}-\text{OCH}_2-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) の Eudragit E100 は、それぞれ異なる pH で溶解性を示すポリマーとして、様々なカプセル製造研究に用いられている。

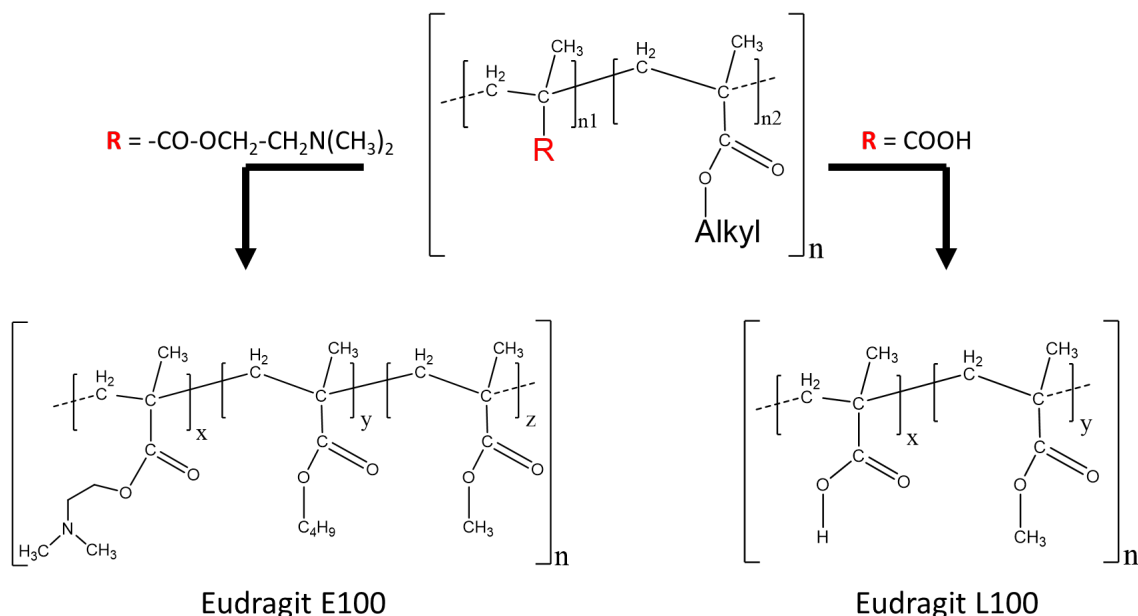


Fig. 3.1 Eudragit シリーズの化学構造の基本骨格および異なる官能基の付与によるポリマーの一例。R にカルボキシル基 ( $-\text{COOH}$ ) が付与されている場合、Eudragit L100 (S100) と呼ばれるポリマーとなる。R にアミノアルキル基 ( $-\text{CO}-\text{OCH}_2-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) が付与されている場合、Eudragit E100 と呼ばれるポリマーとなる。

### 3.2.1.1 Eudragit L100 (S100) について

Eudragit L100 (S100) は、官能基にカルボキシル基 ( $-\text{COOH}$ ) を有するメタクリル酸共重合体をベースとする、アニオン性コポリマー [99]である。Eudragit L100 (S100) は、分子量約 125,000 のランダム共重合体であるが、遊離カルボキシル基とエステル基の比率が 1 : 1 のポリマーが Eudragit L100、1 : 2 のポリマーが Eudragit S100 と呼ばれている。Eudragit L100 と Eudragit S100 は、似た構造であるが、遊離カルボキシル基とエステル基の比率により、pH 値に対する溶解性が異なる。Eudragit L100 は、pH 6 以上での溶解性を示すため、経口型ドラッグデリバリーシステムの中でも、特に空腸に対する薬剤送達 [122]が有利であると言われている。一方、Eudragit S100 は、pH 7 以上での溶解性を示すため、回腸および結腸に対する薬剤送達 [126]が有利であると言われている。Eudragit L100 (S100) の pH 値に対する溶解性のメカニズムは Fig. 3.2 の通りである。官能基のカルボキシル基は、pH 1.0 から pH 5.0 ではプロトンが解離せず、カルボキシル基同士の水素結合が起こり、ポリマー全体が収

縮し、固化している。pH 値が 6.0 以上では、カルボキシル基のプロトンが解離し始め、カルボキシル基は負の電荷を帯びたイオン形となり、液中に溶解しやすくなる [127]。また、Eudragit L100 (S100) をコーティングポリマーとして用いた場合、高 pH 環境では、負電荷の反発により、ポリマー同士が膨張し、カプセル内部から薬剤が徐放されやすくなる。

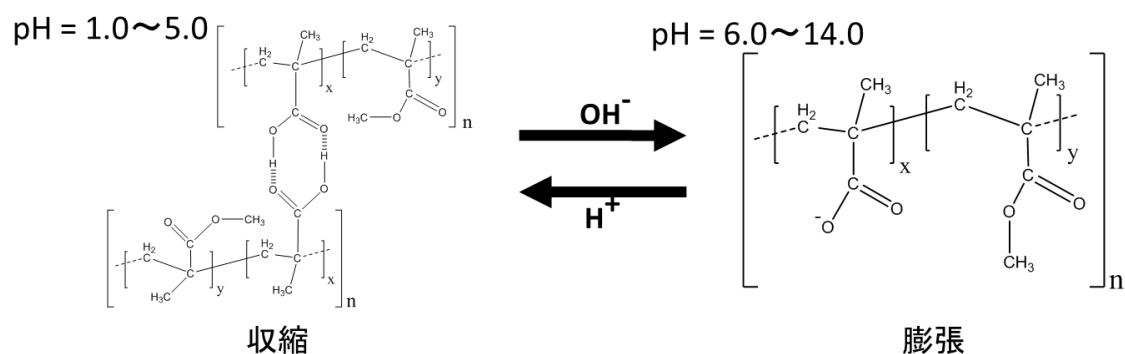


Fig. 3.2 Eudragit L100 (S100) の異なる pH に対する化学構造変化。x : y = 1 : 1 で Eudragit L100、x : y = 1 : 1 で Eudragit S100 と呼ばれる。pH 1.0 から pH 5.0 では、プロトンが解離せず、カルボキシル基同士の水素結合が起こり、ポリマー全体が収縮し、固化している。pH 6.0 以上では、カルボキシル基のプロトンが解離し始め、カルボキシル基は負の電荷を帯びたイオン形となり、液中に溶解しやすくなる。

### 3.2.1.2 Eudragit E100 について

Eudragit E100 は、官能基にアミノアルキル基 ( $-\text{CO}-\text{OCH}_2-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) を有するメタクリル酸共重合体をベースとする、カチオン性コポリマー [128]である。Eudragit E100 は、分子量約 47,000 のランダム共重合体であるが、ジメチルアミノエチルメタクリレート、ブチルメタクリレートおよびメチルメタクリレートの比率がそれぞれ 2 : 1 : 1 である。Eudragit E100 は、取り扱われる形状により名称が異なる。顆粒状固体のものは、Eudragit E100 と呼ばれ、粉末状固体のものは Eudragit E PO と呼ばれる。また、60 % イソプロピルアルコールと 40 % アセトン (w/w) の混合液中に 12.5 wt% の Eudragit E100 が溶解したものは、Eudragit E 12.5 と呼ばれている。Eudragit E100 は、pH 5.0 以下での溶解性を示すため、経口ドラッグデリバリーシステムの中でも、口腔内または胃中での即時徐放カプセルの製造 [128]に有利であると言われている。Eudragit E100 の pH 値に対する溶解性のメカニズムは Fig. 3.3 の通りである。Eudragit E100 は、pH 6.0 以上ではポリマー全体が収縮し、固化している。pH 値が 5.0 以下になると、官能基のアミノアルキル基にプロトンが付与され、正の電荷を帯びたイオン形となり、液中に溶解しやすくなる [129]。また、Eudragit E100 をコーティングポリマーとして用いた場合、低 pH 環境では、正電荷の反発により、ポリマー同士が膨張し、カプセル内



部から薬剤が徐放されやすくなる。

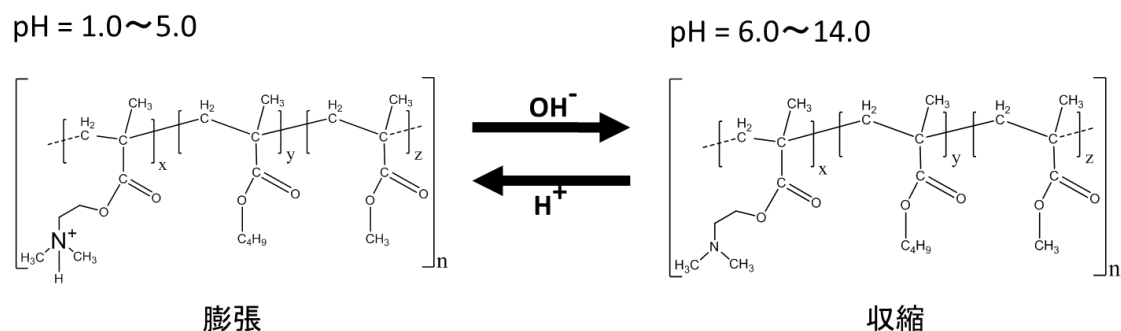


Fig. 3.3 Eudragit E100 の異なる pH に対する化学構造変化。x : y : z = 2 : 1 : 1。pH 6.0 以上では、ポリマー全体が収縮し、固化している。pH 5.0 以下では、官能基のアミノアルキル基にプロトンが付与され、正の電荷を帯びたイオン形となり、液中に溶解しやすくなる。

### 3.2.2 攪拌翼について

攪拌翼は、攪拌装置の中で最も重要な構成要素である。攪拌翼は、モーターによる回転エネルギーを、槽内に流れを形成する「吐出能力 (Q)」と、せん断力を与えて分散させる「せん断能力 (H)」の二つの作用に転換する能力 [130]を有する。攪拌翼を選定するためには、液粘度、攪拌目的、実験条件などを考慮する必要がある。Fig. 3.4 に各種攪拌翼の性能と適応攪拌目的を示す。液粘度が高く、液の混合を目的とする場合は、アンカー翼 [131]やヘリカルリボン翼 [132]を用いる。液粘度が低く、液の混合や固液攪拌などが目的である場合は、プロペラ翼 [133]、パドル翼 [134]、アキシアルフロータービン翼 [135]などを用いる。一方、液粘度が低く、乳化分散、気泡、液滴の微細化が目的である場合、エッジタービン翼または鋸歯ディスクタービン翼 [136]を用いる。しかし、この液粘度や攪拌目的での攪拌翼の選定は、常温常圧下の場合であり、高圧下などの特殊な条件での攪拌は検討が必要な分野である。

攪拌槽内全体に流動を起こすためには、レイノルズ数と邪魔板（バッフル）が重要となる。攪拌翼に関するレイノルズ数は、Fig. 3.4 に示すとおり、攪拌翼半径、液密度、回転数および液粘度により決定 [137]される。攪拌槽内に邪魔板（バッフル）を取り付けた場合は、横方向の流れは邪魔板（バッフル）により分割され、上下方向の流れが発生し、槽内で乱流が発生 [137]しやすくなる。一般的に、低粘度液を攪拌する際は、槽内に邪魔板（バッフル）が取り付けられるが、加圧容器など、内部容積に余裕がない場合は邪魔板（バッフル）なしで攪拌を行う必要がある。

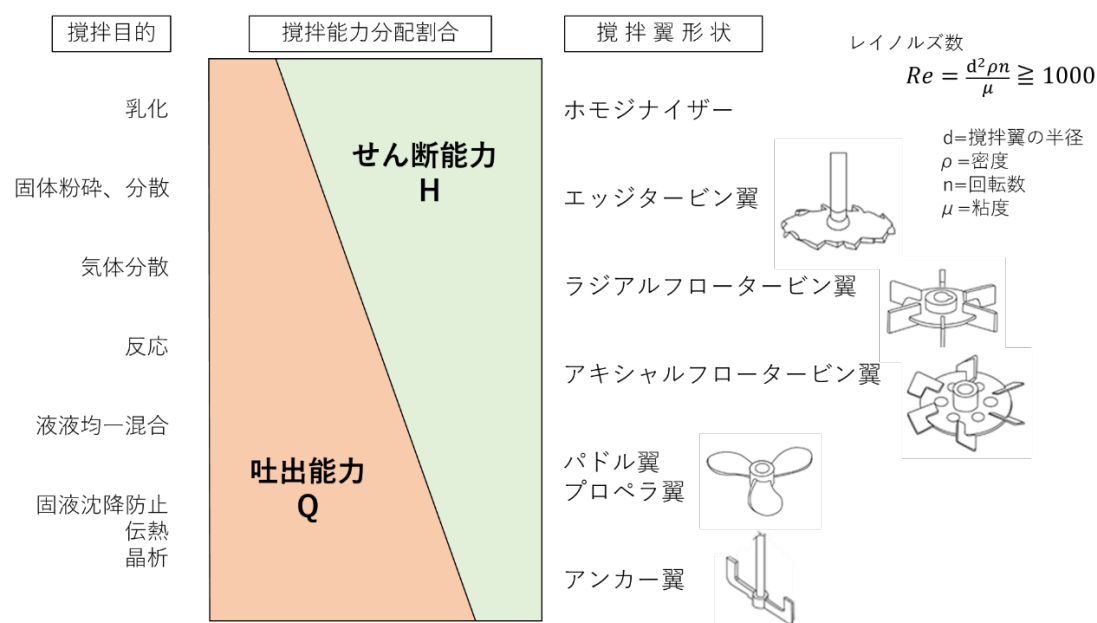


Fig. 3.4 各種攪拌翼の性能と適応攪拌目的

### 3.3 実験

#### 3.3.1 試薬類

フェニルアラニン（純度 99.0 wt%以上）およびエタノール（純度 99.5 wt%以上）は富士フィルム和光純薬㈱から、Eudragit E100（純度 99.0 wt%以上）および Eudragit L100（純度 98.5 wt%以上）はエボニックジャパン㈱から、液化炭酸ガス（純度 99.9 wt%以上）は福岡酸素㈱から、多孔質炭酸カルシウム粒子（純度 99.9 wt%以上）は白石カルシウム㈱からそれぞれ購入し、購入品をそのまま使用した。

#### 3.3.2 高圧攪拌における異なる形状の攪拌翼がもたらす高圧セル内流体挙動の目視観察

異なる形状の攪拌翼（4枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼）を用いたときの高圧攪拌における高圧セル内流体挙動の目視観察は、Fig. 3.5の装置により実施した。本実験のマイクロカプセル製造において使用されるコーティングポリマーである Eudragit L100は、超臨界二酸化炭素が貧溶媒であるため、高圧攪拌における高圧セル内流体挙動の目視観察に用いるポリマーとして不適であった。そのため、Eudragit L100と構造が類似し、低 pH 環境において溶解性を示すカチオン性コポリマーの Eudragit E100 [128]を用いて高圧攪拌における高圧セル内流体挙動の目視観察を実施した。本実験で用いた高圧攪拌槽は、Fig. 3.6のように内部に邪魔板（バッフル）のない円筒構造となっている。

まず、エタノール（25 g）中に Eudragit E100（5 g）を恒温水槽（SBW-35、SHIMADZU 製）

で液を加熱 (50 °C) し、マグネチックスターラーで攪拌 (300 rpm) して完全に溶解させた。高圧セル (SCE-500、内容積 : 500 cm<sup>3</sup> (槽径  $D = 55$  mm、槽高  $L = 220$  mm)、(株)AKICO 製) 内に Eudragit E100 を溶解させたエタノールを仕込んだ。セル内温度はヒーター (WPS-110RL、(株)鹿島製作所) で加温された恒温水槽で 50 °C に制御された。高圧セル内に液化炭酸ガスが送液 (流速 20.0 ml / min) され、所定の操作圧力 (8 MPa) に達するまで加圧された。セル内圧力は、マグネットポンプ (MD-6ZK-N、(株)イワキ製) および背圧レギュレーター (26-1721-24 モデル、(株)テスコム製、精度  $\pm 0.1$  MPa) によって制御され、圧力計 (DD-501 モデル、(株)親和電機製、精度  $\pm 0.3$  %) によって確認された。このとき、高圧セル内の Eudragit E100 溶解エタノール中には、二酸化炭素が溶解し、液高  $H = 72$  mm となっていた。高圧セル内の混合物は、モーター動力の高速攪拌システム (最大攪拌速度 : 700 rpm) により、攪拌速度 500 rpm にて二酸化炭素と混和された。本実験で用いた攪拌翼 (翼径  $d = 40$  mm、アズワン(株)製) を Fig. 3.7 に示す。攪拌前および攪拌途中の様子は高圧セルに取り付けられた一対のサファイアガラス窓 (縦 : 95 mm、横 : 10 mm) を通して視覚的に観察され、カメラ (Everio、Victor 製) にて撮影された。

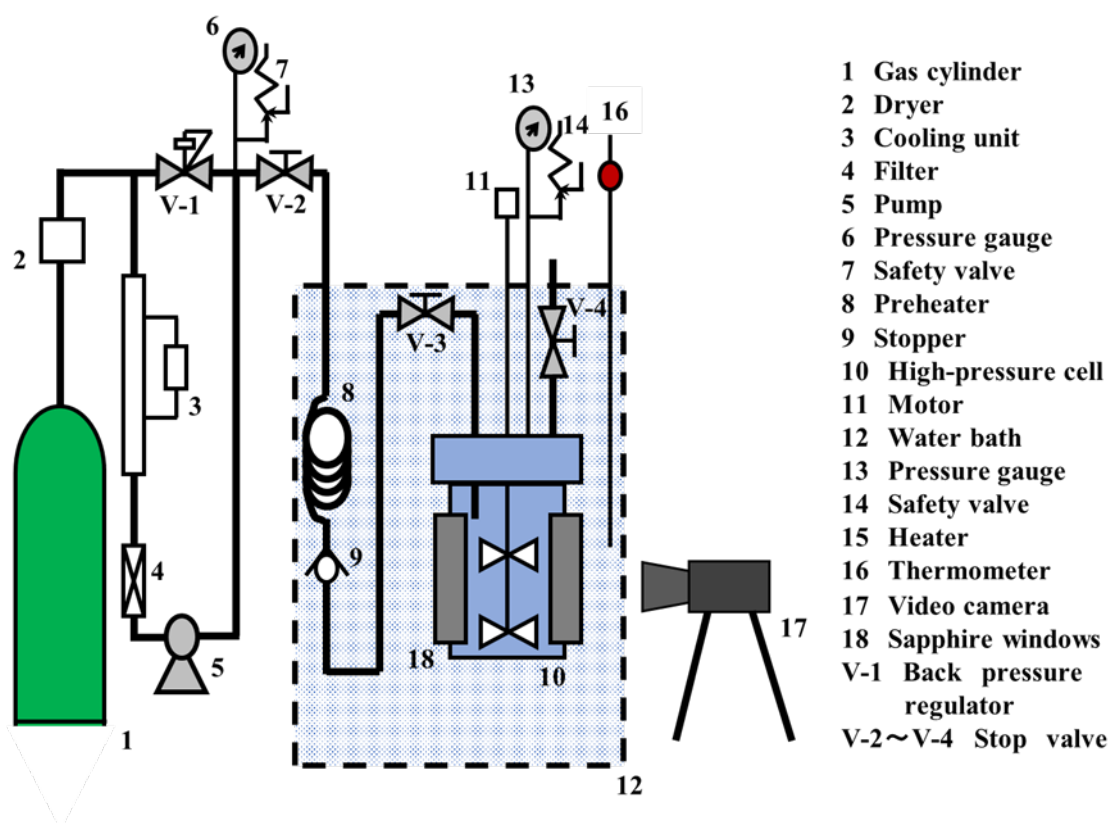


Fig. 3.5 高圧攪拌における高圧セル内流体挙動の目視観察での実験装置図

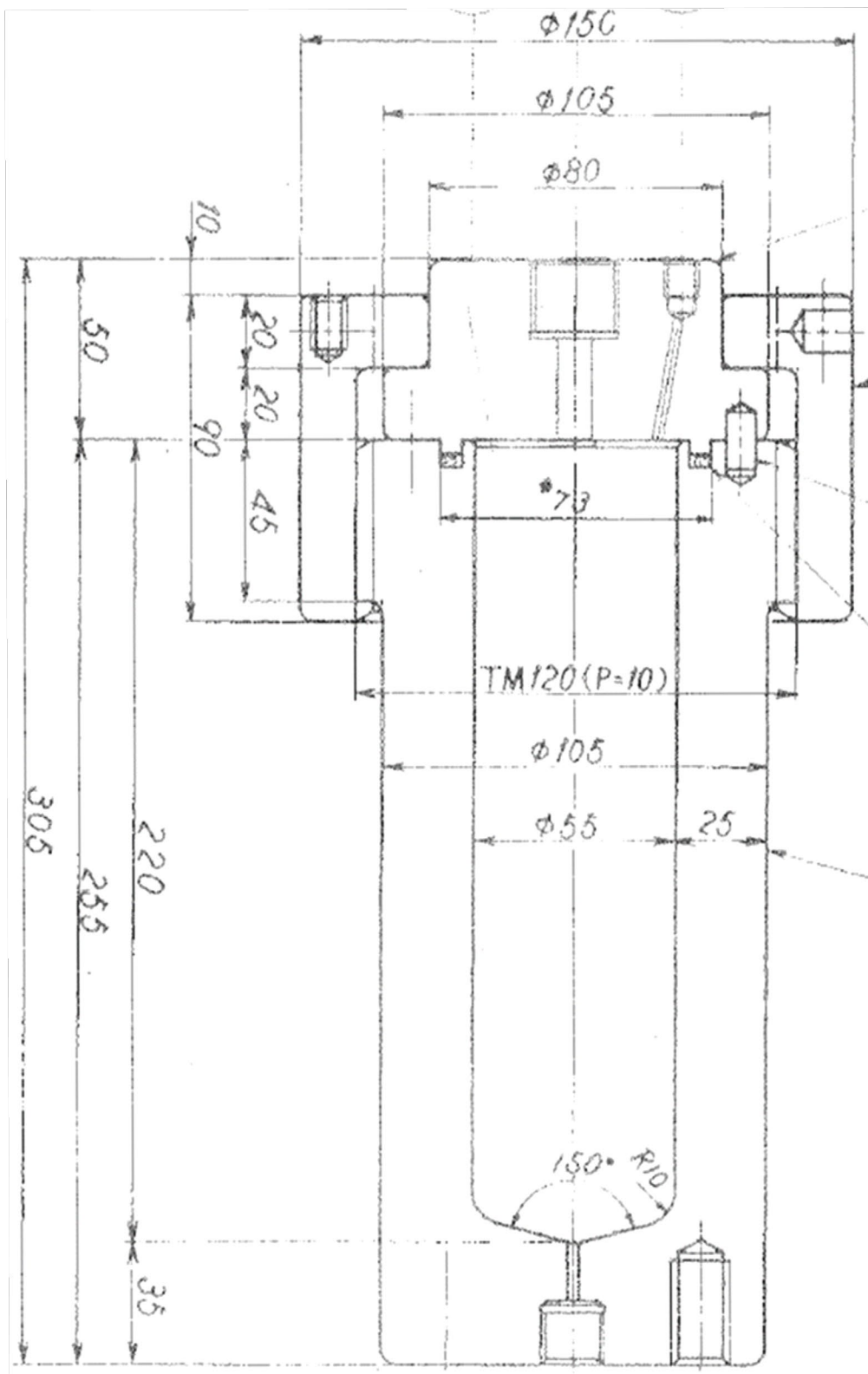


Fig. 3.6 高圧攪拌槽の図面

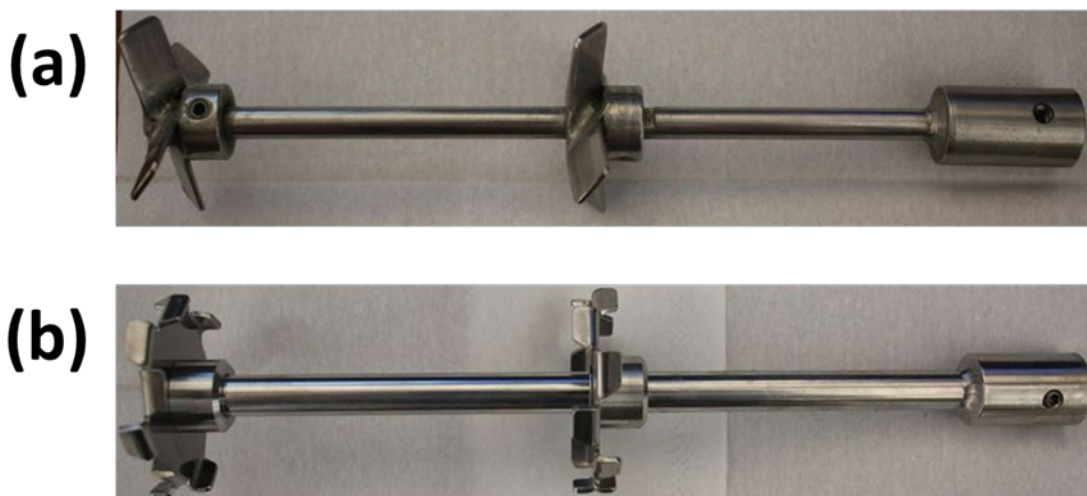


Fig. 3.7 本実験で用いた攪拌翼。(a) 4枚ピッチドパドル翼、(b) 鋸歯ディスクタービン翼。(a)、(b)のいずれも翼径 40 mm、軸高 193 mm。

### 3.3.3 数値流体力学（Computational fluid dynamics; CFD）を用いた異なる形状の攪拌翼がもたらす攪拌槽内の流体挙動の解析

高圧攪拌槽内の混合流体挙動の目視観察の他に、数値流体力学（Computational fluid dynamics; CFD）を用いた攪拌槽内の流体解析を実施した。まず、Fig. 3.6、Fig. 3.7 に示した攪拌槽部および攪拌翼部を除いた流体領域の 3D モデルを CAD（Computer-aided design、Autodesk Inventor Professional）を用いて Fig. 3.8 のようにそれぞれ作成した。攪拌槽全体の流れの解析を行うために、作動流体は攪拌槽全体に満たされているとした。数値解析には、汎用の数値解析ソフトである ANSYS Workbench の Fluent を使用した。本解析においては、攪拌翼形状による攪拌槽内流体の基本的な流れの特性を把握するために、単相非圧縮性流体を対象とした。物理モデルとして Navier - Stokes 方程式の有限体積法を用いた。乱流の数値計算法として、レイノルズ平均モデルである RANS を用いた非定常乱流 SMM（Sliding mesh model）解析を行った。作動流体として水単相流（密度:  $998.2 \text{ kg/m}^3$ 、粘度:  $0.001003 \text{ kg/m-s}$ ）、乱流モデルとして標準  $k-\varepsilon$  モデルを使用した。CAD にて作成した流体領域を、SMM 解析のために、攪拌翼周りの移動領域と静止領域に分けた。それぞれの流体領域を四面体メッシュにて分割したが、このときのメッシュ点数は約 26 万点であった。境界条件として攪拌槽壁面は non-slip とし、攪拌槽上部の大気と触れていると想定した箇所は slip とした。移動領域および攪拌軸の攪拌速度は 500 rpm とした。

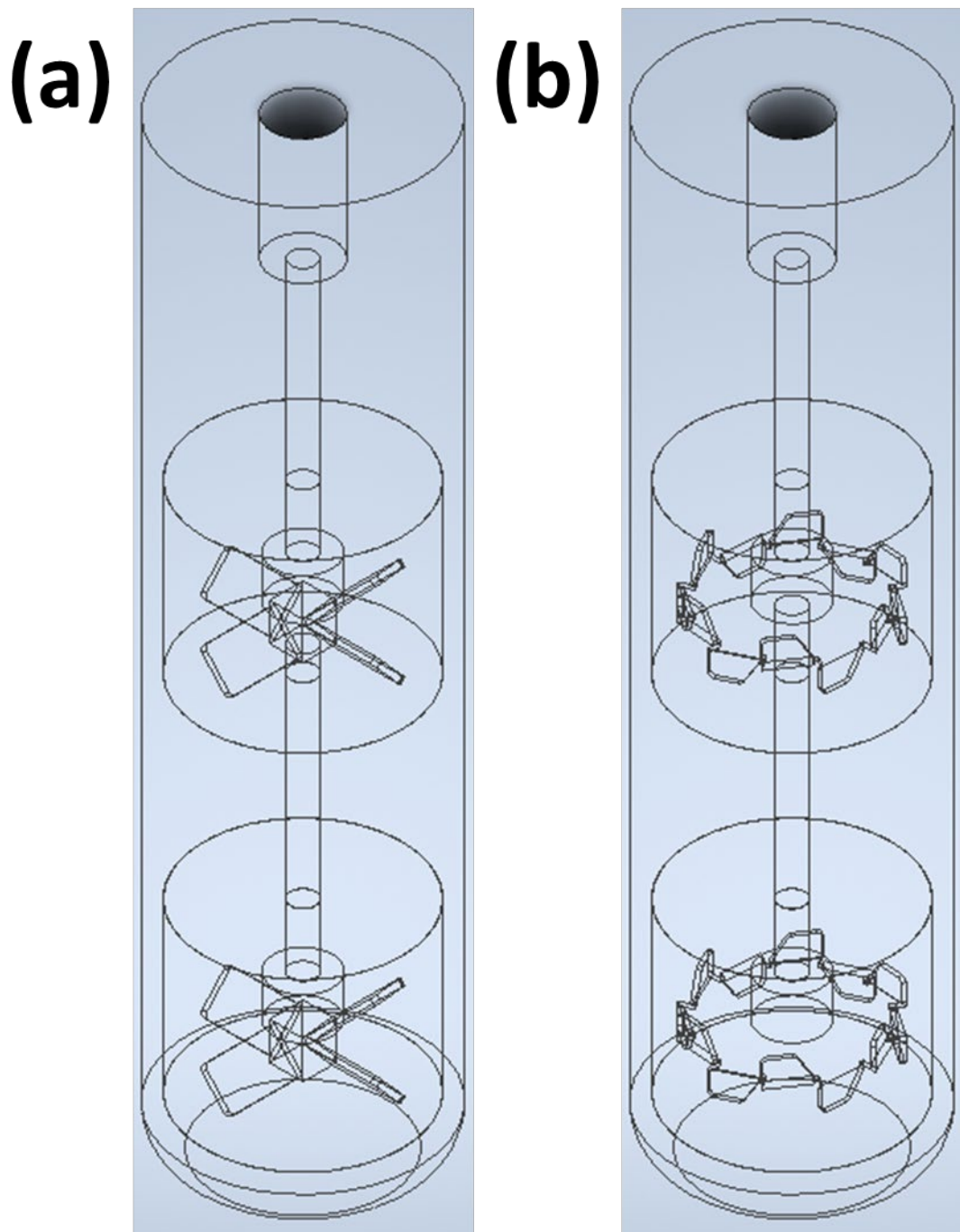


Fig. 3.8 CAD (Computer-aided design, Autodesk Inventor Professional) により作成した攪拌槽部および異なる形状の攪拌翼部を除いた流体領域の 3D モデル。(a) 4 枚ピッチドパドル翼、(b) 鋸歯ディスクタービン翼。(a)、(b)のいずれも槽径  $D = 55 \text{ mm}$ 、槽高  $L = 220 \text{ mm}$ 、翼径  $40 \text{ mm}$ 、軸高  $193 \text{ mm}$  として作成した。SMM 解析のために、攪拌翼周りを移動領域と静止領域に分けている。

### 3.3.4 異なる形状の攪拌翼を用いた PGSS 法による微粒子製造

異なる形状の攪拌翼（4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼）を用いて、超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液の PGSS 法による微粒子製造を Fig. 3.9 に示す装置を用いて実施した。

まず、エタノール中に Eudragit E100 (16.7 wt%) を添加し、恒温水槽 (SBW-35、SHIMADZU 製) で液を加温 (50 °C) し、マグネチックスターラーで攪拌 (300 rpm) して完全に溶解させた。次に、高压セル (SCV500A、内容積 : 500 cm<sup>3</sup>、(株)AKICO 製) 内に Eudragit E100 溶解エタノール (2.5 mL) および炭酸カルシウム粒子 (0.10 g、平均粒子径 : 49.2 μm ± 3.3 μm) を仕込んだ。セル内温度はヒーター (WPS-110RL、(株)鹿島製作所) で加温された恒温水槽で 50 °C に制御された。高压セル内に液化炭酸ガスを徐々に送液 (流速 20.0 ml/min) し、圧力 8 MPa にまで加圧した。セル内圧力は、マグネットポンプ (MD-6ZK-N、(株)イワキ製) および背圧レギュレーター (26-1721-24 モデル、(株)テスコム製、精度 ± 0.1 MPa) によって制御され、圧力計 (DD-501 モデル、(株)親和電機製、精度 ± 0.3 %) によって確認された。所定の温度、圧力にまで達した後、高压セル内混合物を高速攪拌システム (最大攪拌速度 : 940 rpm) を用いて攪拌速度 500 rpm で攪拌し、相平衡状態とした。1 時間攪拌後、再び高压セル内に液化炭酸ガスを送液し、圧力 10 MPa にまで加圧した。高压セル下部のストップバルブ (V-4、V-5) を開くと、高压セル内の二酸化炭素、エタノール、Eudragit E100 および炭酸カルシウム粒子の混合物が、ヒーターで一定温度 (50 °C) に維持されたステンレス配管 (1 / 8 インチ) を通じて、ノズル (ノズルアスペクト比 : 2.0、内径 0.46 mm) からテフロンシートを貼った大気コレクター内に噴霧された。このとき、噴霧された高压セル内混合物のうち、エタノールが二酸化炭素とともに気化することにより、Eudragit E100 が析出し、カプセルが形成された。テフロンシート上に得られた固体粒子を回収し、分析操作を行った。



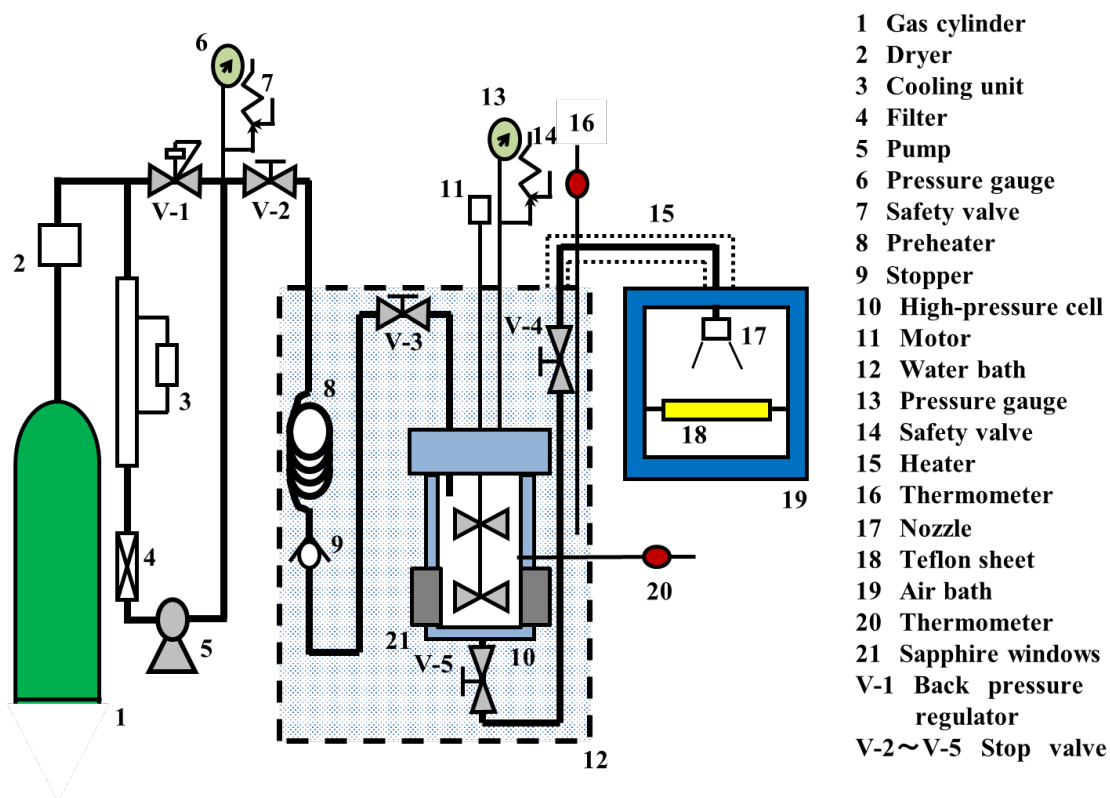


Fig. 3.9 超臨界二酸化炭素を溶媒としたガス飽和溶液懸濁（particles from gas saturated solutions; PGSS）法を用いた粒子製造実験装置図

### 3.3.5 超臨界二酸化炭素－エタノール混合液中における Eudragit L100 の溶解度測定

異なる圧力の二酸化炭素－エタノール混合溶液への Eudragit L100 の溶解度は、Fig. 3.9 に示すようなサファイアガラス窓を備え付けた実験装置を用いて、クラウドポイントを観察することにより決定された。

まず、既知量のエタノール中に既知量の Eudragit L100 を恒温水槽（SBW-35、SHIMADZU 製）で液を加温（50℃）し、マグネチックスターラーで攪拌（300 rpm）して完全に溶解させた。高压セル（SCV500A、内容積：500 cm<sup>3</sup>、(株)AKICO 製）内に Eudragit L100 を溶解させたエタノールを仕込んだ。セル内温度はヒーター（WPS-110RL、(株)鹿島製作所）で加温された恒温水槽で 50℃に制御された。高压セル内に液化炭酸ガスを徐々に送液（流速 20.0 ml / min）し、高压セルに取り付けられたサファイアガラス窓を通して観察し、高压セル内部の Eudragit L100 が析出するまで加圧された。セル内圧力は、マグネットポンプ（MD-6ZK-N、(株)イワキ製）および背圧レギュレーター（26-1721-24 モデル、(株)テスコム製、精度±0.1 MPa）によって制御され、圧力計（DD-501 モデル、(株)親和電機製、精度±0.3 %）によって確認された。二酸化炭素の密度は、Huang らの状態方程式 [138]により決定した。



### 3.3.6 Eudragit L100 をコーティング材とした PGSS 法によるフェニルアラニン内包マイクロカプセル製造

Eudragit L100 をコーティング材とした PGSS 法によるフェニルアラニン内包マイクロカプセル製造は、Fig. 3.9 に示すような装置を用いて実施された。マイクロカプセルの芯物質は、多孔質の無機材料に薬剤を吸着させるという Wang らの方法 [139] に従い作製された。多孔質無機材料の中でも、食品 [140] や医療 [141] の分野で頻繁に使用されている多孔質炭酸カルシウム ( $\text{CaCO}_3$ ) 粒子を使用した。モデル薬剤としては、フェニルアラニン [142-144] を使用した。フェニルアラニンは、人体で生合成することができない必須アミノ酸の一種 [145,146] である。フェニルアラニンの経口投与は、GLP-1 (グルカゴン様ペプチド-1) 分泌を増加させ、食物摂取を抑制すること [147] が報告されている。しかし、フェニルアラニンは胃酸中の酵素によって分解劣化する [148] ため、経口投与用薬剤とするためには、フェニルアラニンをポリマーで被覆することが重要となる。

まず、既知量のエタノール中に既知量の Eudragit L100 を恒温水槽 (SBW-35、SHIMADZU 製) で液を加温 ( $50^\circ\text{C}$ ) し、マグネチックスターラーで攪拌 (300 rpm) して完全に溶解させた。高压セル (SCV500A、内容積:  $500\text{ cm}^3$ 、(株)AKICO 製) 内に Eudragit L100 溶解エタノールおよびフェニルアラニン吸着炭酸カルシウム粒子 (吸着量:  $26\text{ mg/g}$ 、平均粒子径:  $49.2\text{ }\mu\text{m} \pm 3.3\text{ }\mu\text{m}$ ) を仕込んだ。セル内温度はヒーター (WPS-110RL、(株)鹿島製作所) で加温された恒温水槽で  $50^\circ\text{C}$  に制御された。高压セル内に液化炭酸ガスを徐々に送液 (流速  $20.0\text{ ml/min}$ ) し、所定の圧力 ( $8\text{ MPa}$  から  $12\text{ MPa}$ ) にまで加圧した。セル内圧力は、マグネットポンプ (MD-6ZK-N、(株)イワキ製) および背圧レギュレーター (26-1721-24 モデル、(株)テスコム製、精度  $\pm 0.1\text{ MPa}$ ) によって制御され、圧力計 (DD-501 モデル、(株)親和電機製、精度  $\pm 0.3\%$ ) によって確認された。所定の温度、圧力にまで達した後、高压セル内混合物を高速攪拌システム (最大攪拌速度:  $940\text{ rpm}$ ) によって攪拌し、相平衡状態とした。1 時間攪拌後、高压セル下部のストップバルブ (V-4、V-5) を開くと、高压セル内の二酸化炭素、エタノール、Eudragit L100 およびフェニルアラニン吸着炭酸カルシウム粒子の混合物が、ヒーターで一定温度 ( $50^\circ\text{C}$ ) に維持されたステンレス配管 ( $1/8$  インチ) を通じて、ノズル (ノズルアスペクト比: 2.0、内径  $0.46\text{ mm}$ ) からテフロンシートを貼った大気コレクター内に噴霧された。このとき、噴霧された高压セル内混合物のうち、エタノールが二酸化炭素とともに気化することにより、Eudragit L100 が析出し、カプセルが形成された。ここで、回収固体の質量 ( $W_1$ ) を、テフロンシートの正味重量増加とした。そのあと、回収固体を超純水 ( $5\text{ mL}$ ) に分散させ、濾紙 (孔径:  $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 、Omnipore、MERCK 社製) で濾過し、濾液と固体を得た。固体を  $40^\circ\text{C}$  で 24 時間乾燥させ、これを微粒子と定義した。微粒子の分析と形態観察は、3.3.6 項で説明する DLS と SEM によって実施された。濾液中のフェニルアラニンの濃度は、紫外可視分光光度計 (V-550、Jasco 社製) を用いて波長  $255\text{ nm}$  で測定された。生産収率 (Production yield; PY) とカプセル化効率 (Encapsulation efficiency; EE) は、Wang らの方法 [149] の修正版に従い、それぞれ式 (1)、(2) によって算出された。

$$\text{Production yield (PY) (\%)} = W_1 / (W_2 + W_3) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Encapsulation efficiency (EE) (\%)} = ((W_4 - W_5) / PY \times 100) / W_4 \times 100 \quad (2)$$

ただし、 $W_1$  は回収固体総重量、 $W_2$  はフェニルアラニン吸着炭酸カルシウムの合計重量、 $W_3$  は仕込み Eudragit L100 重量、 $W_4$  は仕込みフェニルアラニン重量、 $W_5$  は濾液中のフェニルアラニン重量をそれぞれ表す。

### 3.3.7 マイクロカプセルの分析方法

#### 3.3.7.1 マイクロカプセルの粒度分布測定法

超臨界二酸化炭素を溶媒とした PGSS 法により製造した微粒子の平均粒子径および粒度分布は、レーザー回折式粒度分布測定装置 (SALD-2000、SHIMADZU 製) を用いて動的光散乱 (Dynamic Light Scattering; DLS) 法により測定された。分散媒には超純水を用いた。測定パラメーターを次に示す。レーザー波長 680 nm、測定温度 25 °C、溶媒粘度 0.89 mPa・s、溶媒屈折率 1.33、粒子屈折率 1.59、粒子密度 1.05 g/ml、分散時間 10 分。溶媒に分散した試料 (微粒子) を石英マイクロキュベットに入れて測定した。測定は 3 回行い、平均値を記録した。粒度分布に関連する数学的値である *span* [150] は、式 (3) によって計算された。

$$\text{span} = (d(90\%) - d(10\%)) / d(50\%) \quad (3)$$

ただし、 $d(90\%)$ 、 $d(50\%)$ 、 $d(10\%)$  はそれぞれ、粒子の比率が 90 %、50 %、および 10 % よりも小さくなる粒子径のことを表す。

#### 3.3.7.2 マイクロカプセルの形態観察法

超臨界二酸化炭素を溶媒とした PGSS 法により製造した微粒子の形態は、走査型電子顕微鏡 (SEM、JSM6060、JEOL 製) を使用して評価した。SEM 分析用のサンプルは、製造した微粒子を導電性カーボンテープ (7311、日新 EM 株製) を貼った銅グリッド上に乗せ、オートファインコーター (JFC-1600、JEOL 製) を使用して薄膜プラチナコーティングを行い作製された。

### 3.3.8 異なる pH 環境におけるマイクロカプセルからのフェニルアラニンの放出速度の測定

*In vitro* 放出試験における、異なる pH 環境でのマイクロカプセルからのフェニルアラニンの徐放速度の測定は、Fig. 3.10 のような垂直型ガラス製拡散セル (フランツ型拡散セル、Permeagear 製) を使用して実施された。拡散セルの上部と下部液溜を隔てる膜として、0.8  $\mu\text{m}$  の微孔性膜 (分子カットオフ 12,400 Da、Arthur Thomas 製) を用いた。拡散セルの下部液溜に仕込む緩衝液としては、0.05 w/v% の Tween80 添加酢酸緩衝液 (pH 2.1、pH 4.1 用) および 0.05 w/v% の Tween80 添加リン酸緩衝生理食塩水 (pH 6.8、pH 8.0 用) をそれぞれ用いた。

拡散セルの下部液溜に、緩衝液を膜と接触するように仕込んだ。3.3.5 項に記載の洗浄、乾燥させた微粒子（10 mg）を膜上に配置し、拡散セルの上部と下部液溜をピンチクランプで挟み固定した。このとき、拡散セル上部は液の蒸発を防ぐために密封された。拡散セル下部に仕込んだ緩衝液をマグネチックスターラーで 300 rpm の一定速度で攪拌しながら、任意の時間毎（0、3、5、10、15、30、60、90、120、150、180 分）に下部液溜から溶液を 2 cc サンプルングし、紫外可視分光光度計（V-550、日本分光㈱製）により波長 255 nm として測定した。測定後のサンプル溶液は、拡散セルに戻し、実験を行った。測定は各 pH 毎に 3 回ずつ実施した。

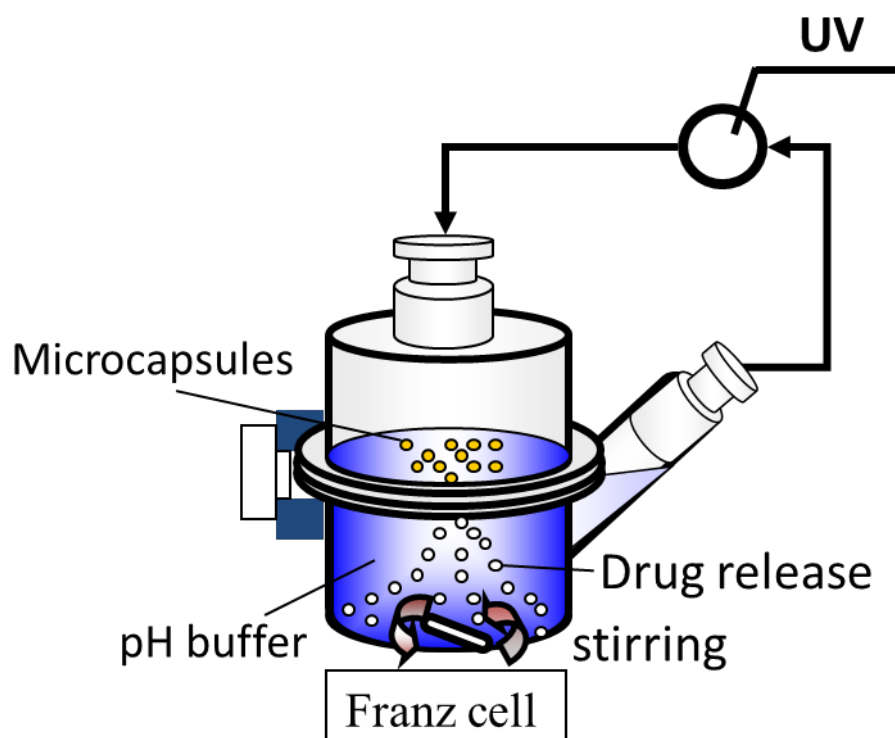


Fig. 3.10 超臨界二酸化炭素を溶媒としたガス飽和溶液懸濁（particles from gas saturated solutions; PGSS）法を用いて製造されたマイクロカプセルからのフェニルアラニン徐放速度測定試験図

### 3.4 結果および考察

#### 3.4.1 異なる形状の攪拌翼における高圧攪拌による高圧セル内流体挙動の比較

高圧攪拌槽内に Eudragit E100 溶解エタノールを仕込み、温度 50 °C、二酸化炭素により圧力 8.0 MPa とした状態で、モーター動力による攪拌システムにより高圧攪拌槽内流体を攪拌（500 rpm）した。4 枚ピッチドパドル翼における高圧攪拌における高圧セル内流体挙動の

様子を Fig. 3.11 に、鋸歯ディスクタービン翼における高圧攪拌における高圧セル内流体挙動の様子を Fig. 3.12 に示す。Fig.3.11 (a)、Fig. 3.12 (a)はいずれも攪拌前状態（静止状態）を表すが、温度 50 °C、圧力 8.0 MPa では、Eudragit E100 溶解エタノール中に二酸化炭素が溶解したため、下相（Eudragit E100 溶解エタノールリッチ相）の体積が増しており、このときの液高は 72 mm であった。この状態で攪拌を開始すると、攪拌翼が 4 枚ピッチドパドル翼の場合（Fig. 3.11 (b)）、攪拌によりセル内混合液がかき乱され、液面が上昇しているが、上相の高密度二酸化炭素リッチ相中への下相の Eudragit E100 溶解エタノールリッチ相の分散は確認できない。一方、攪拌翼が鋸歯ディスクタービン翼の場合（Fig. 3.12 (b)）、攪拌によりセル内混合液がかき乱されると、上相の高密度二酸化炭素リッチ相と下相の Eudragit E100 溶解エタノールリッチ相の境がなくなり、均一な混合がなされていることがわかる。これは、鋸歯ディスクタービン翼を用いた攪拌により、上相の高密度二酸化炭素リッチ相中へ、下相の Eudragit E100 溶解エタノールリッチ相が高分散しているためである。

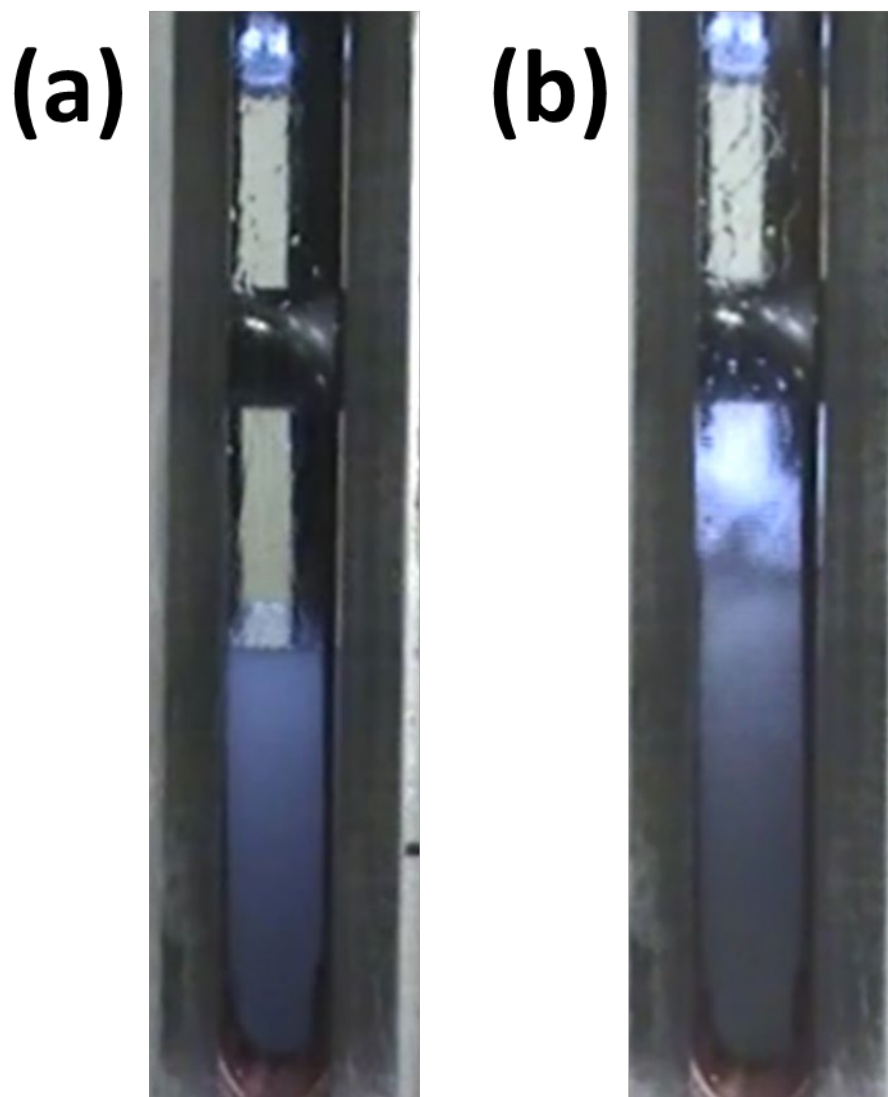


Fig. 3.11 4枚ピッチドバドル翼における高圧攪拌における高圧セル内流体挙動の様子。(a) 攪拌前、(b) 攪拌後を表す。実験条件：エタノール: 25 g、Eudragit E100 : 5 g、温度 50 °C、圧力 8.0 MPa、攪拌速度 500 rpm。

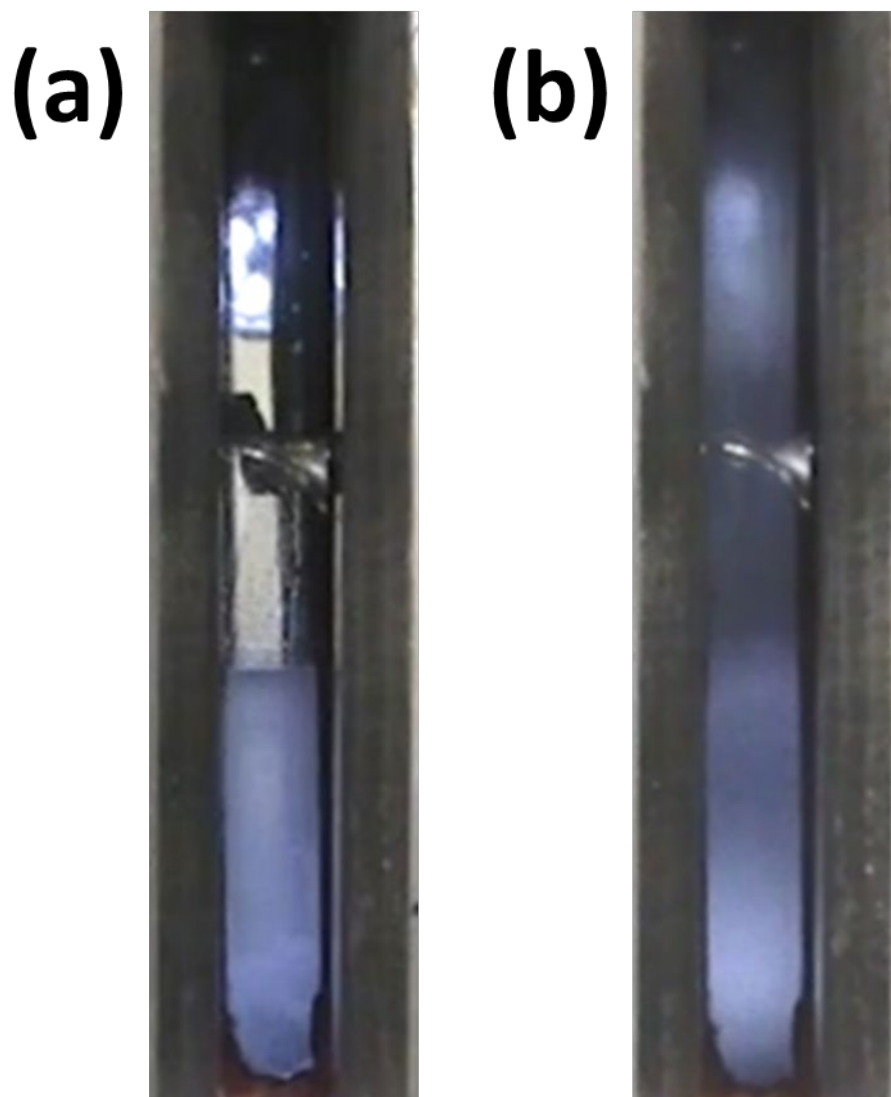


Fig. 3.12 鋸歯ディスクタービン翼における高圧攪拌における高圧セル内流体挙動の様子。(a) 攪拌前、(b) 攪拌後を表す。実験条件：エタノール: 25 g、Eudragit E100 : 5 g、温度 50 °C、圧力 8.0 MPa、攪拌速度 500 rpm。

#### 3.4.2 CFD による高圧セル内流体の数値解析結果

異なる攪拌翼による流体挙動の検討のために、CFD を用いて、非定常乱流 SMM 解析の攪拌槽全体に満たされた水単相流の速度分布数値解析を行った。異なる攪拌翼における CFD による流体の数値解析結果を Fig. 3.13 に示す。攪拌翼が 4 枚ピッチドパドル翼の場合 (Fig. 3.13 (a))、邪魔板（バッフル）のない攪拌槽での流れの速度分布は攪拌翼周辺、攪拌翼下部および軸周りのみに発生しているが、攪拌翼から離れた場所には流れが発生してい

ないことがわかる。一方、攪拌翼が鋸歯ディスクタービン翼の場合 (Fig. 3.13 (b))、邪魔板 (バッフル) のない攪拌槽での流れの速度分布は攪拌槽全体に発生していることがわかる。本解析の作動流体は水であり、ニュートン流体 [151]であるため、時間的な粘度変化は考慮していない。一般的に、ポリメタクリル酸メチルのような不規則性螺旋非電解巨大分子の溶液は非ニュートン流体 [152]であるとされている。しかし、本実験の作動流体はポリマー溶解エタノール中に高密度二酸化炭素が溶解しており、混合物の粘性が低下していると考えられる。そのため、高圧攪拌槽内において、水と同様の流体挙動をとると考えられる。この解析結果より、バッフル (邪魔板) のない攪拌槽において、攪拌により高密度二酸化炭素-ポリマー溶液混合系の流体を攪拌槽全体に強分散させるような攪拌翼としては、鋸歯ディスクタービン翼が適することが明らかとされた。

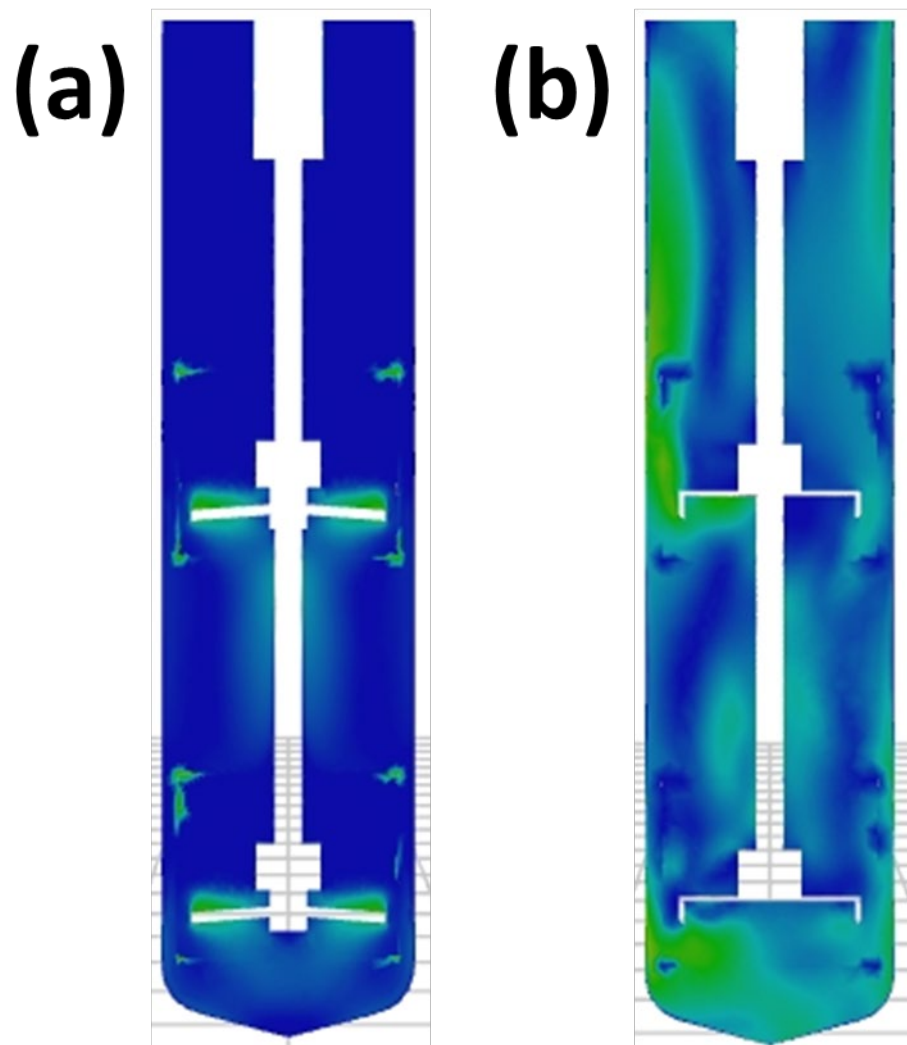


Fig. 3.13 異なる攪拌翼における CFD による流体の数値解析結果。(a) 4 枚ピッチドパドル翼、(b) 鋸歯ディスクタービン翼での流体の速度分布解析結果を表す。解析条件：非定常乱流 SMM 解析、水単相流（密度:  $998.2 \text{ kg/m}^3$ 、粘度:  $0.001003 \text{ kg/m-s}$ ）、標準  $k-\varepsilon$  モデル、四面体メッシュ（メッシュ点数 26 万点）、攪拌槽壁面 non-slip、攪拌槽上部 slip、攪拌速度 500 rpm。作動流体は攪拌槽全体に満たされている。



### 3.4.3 異なる形状の攪拌翼を用いた PGSS 法により製造された微粒子の比較

Table 3.1 異なる形状の攪拌翼（4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼）を用いて、温度 50 °Cにおける超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液のガス飽和溶液懸濁（PGSS）法により製造された Eudragit E100 コーティングマイクロカプセルの d (90%)、d (50%)、d (10%)。ただし、高压セル内の二酸化炭素、エタノール、Eudragit E100 および炭酸カルシウム粒子の混合物が圧力 8 MPa の状態で 1 時間攪拌された後、圧力 10 MPa でセル内混合物が噴霧され、マイクロカプセルが製造された。

Blade shape	d (90%) ( $\mu\text{m}$ )	d (50%) ( $\mu\text{m}$ )	d (10%) ( $\mu\text{m}$ )
4 pitched paddle	1108.8	307.6	85.4
Sawtooth disc turbine	543.0	175.2	56.5

異なる形状の攪拌翼（4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼）を用いて、超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液の PGSS 法により製造された Eudragit E100 - 炭酸カルシウム微粒子の d (90%)、d (50%)、d (10%)を Table 3.1 にそれぞれ示す。また、異なる形状の攪拌翼（4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼）を用いて、超臨界二酸化炭素の PGSS 法により製造された Eudragit E100 - 炭酸カルシウム微粒子の粒度分布（particle size distribution; PSD）を Fig. 3.14 に示す。d (90%)、d (50%)、d (10%)の全てにおいて、4 枚ピッチドパドル翼よりも鋸歯ディスクタービン翼を用いる方が、PGSS 法で製造されたマイクロカプセルの粒子径が減少していた。また、粒度分布も鋸歯ディスクタービン翼を用いて PGSS 法により製造したマイクロカプセルの方が狭くなっていたことが確認できる。さらに、異なる形状の攪拌翼（4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼）を用いて、超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液の PGSS 法により製造された Eudragit E100 - 炭酸カルシウム微粒子の SEM 画像を Fig.3.15 に示す。Fig.3.15 (a)から、4 枚ピッチドパドル翼を用いて PGSS 法により製造された微粒子は多くがシート状であることが確認できる。一方、Fig.3.15 (b)から、鋸歯ディスクタービン翼を用いて PGSS 法により製造された微粒子は、表面が丸みを帯びた球形であることが確認された。

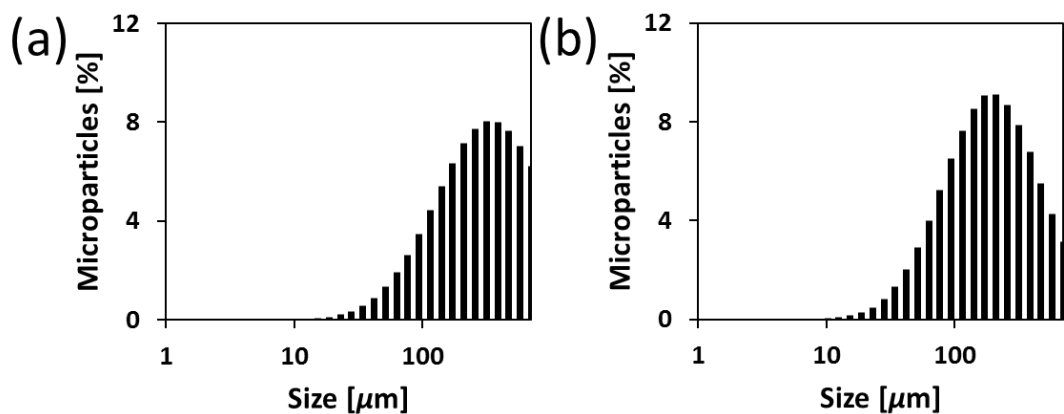


Fig. 3.14 異なる形状の攪拌翼を用いて、温度 50 °Cにおける超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液のガス飽和溶液懸濁 (PGSS) 法により製造された Eudragit E100 コーティングマイクロカプセルの粒度分布。(a) 4 枚ピッチドパドル翼を用いて製造された微粒子の粒度分布、(b) 鋸歯ディスクタービン翼を用いて製造された微粒子の粒度分布を表す。ただし、高压セル内の二酸化炭素、エタノール、Eudragit E100 および炭酸カルシウム粒子の混合物が圧力 8 MPa の状態で 1 時間攪拌された後、圧力 10 MPa でセル内混合物が噴霧され、マイクロカプセルが製造された。

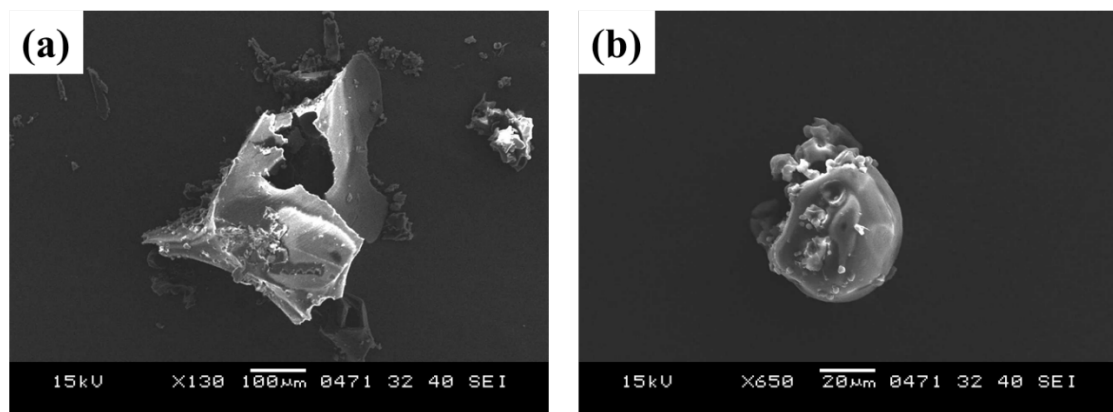


Fig. 3.15 異なる形状の攪拌翼を用いて、温度 50 °Cにおける超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液のガス飽和溶液懸濁 (PGSS) 法により製造された Eudragit E100 コーティングマイクロカプセルの SEM 画像。(a) 4 枚ピッチドパドル翼を用いて製造された微粒子の SEM 画像、(b) 鋸歯ディスクタービン翼を用いて製造された微粒子の SEM 画像を表す。ただし、高压セル内の二酸化炭素、エタノール、Eudragit E100 および炭酸カルシウム粒子の混合物が圧力 8 MPa の状態で 1 時間攪拌された後、圧力 10 MPa でセル内混合物が噴霧され、マイクロカプセルが製造された。

### 3.4.4 異なる形状の攪拌翼を用いた PGSS 法による微粒子形成メカニズムの考察

Fig. 3.11 と Fig. 3.12 の異なる形状の攪拌翼（4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼）における高圧攪拌による高圧セル内流体挙動の目視観察結果から、邪魔板（バッフル）のない高圧攪拌槽内では、4 枚ピッチドパドル翼よりも鋸歯ディスクタービン翼の方が攪拌槽全体に流れを形成し、槽内の混合液が高分散し、安定化することが明らかとされた。この結果は、Fig. 3.13 の数値流体力学（CFD）を用いた高圧セル内流体の数値解析結果とも一致していた。さらに、Table 3.1 および Fig. 3.14 の粒度分布と Fig. 3.15 の SEM 画像から、4 枚ピッチドパドル翼を用いて超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液の PGSS 法により粒子を製造すると、粒子の形はシート状となりやすく、粒子径が大きく粒度分布のバラつきが広くなりやすいということが明らかとされた。一方、鋸歯ディスクタービン翼を用いて超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液の PGSS 法により粒子を製造すると、粒子の形は球状となりやすく、粒子径が小さく粒度分布のバラつきも狭くなりやすいということが明らかとされた。

これらの結果から、異なる形状の攪拌翼（4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼）を用いて、超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液の PGSS 法によりマイクロ粒子を製造したときの粒子形成メカニズムを Fig. 3.16 のように考察した。ポリマー溶解エタノールと炭酸カルシウム微粒子を仕込んだ温度 50 °C に維持された高圧攪拌槽内に、二酸化炭素を送液し、圧力を 8 MPa まで加圧すると、Fig. 3.11 (a)、Fig. 3.12 (a) から確認できるような、二酸化炭素リッチ相とポリマー溶解エタノールリッチ相の二相が形成される (Fig. 3.16 (a))。この状態で、攪拌速度 500 rpm で高圧攪拌槽内の流体を攪拌する。攪拌翼形状が 4 枚ピッチドパドル翼の場合 (Fig. 3.16 (b1)) には、Fig. 3.11 (b) のように、槽内の混合液は高圧攪拌槽全体にまで流れを形成できず、ポリマー溶解エタノールと炭酸カルシウム微粒子との混和が不均一となり得る。ここで、圧力を 10 MPa として高圧攪拌槽内混合物が大気開放されると、ポリマー溶解エタノールは液状のままノズルから噴霧され、Table 3.1、Fig. 3.14 (a) および Fig. 3.15 (a) のような粒度分布が広いシート状の粒子が形成されることが考えられる。一方、攪拌翼形状が鋸歯ディスクタービン翼の場合 (Fig. 3.16 (b2)) には、Fig. 3.12 (b) のように、槽内の混合液が高圧攪拌槽全体にまで高分散する。また、鋸歯ディスクタービン翼はせん断力が大きい [136][153] ことから、ポリマー溶解エタノールが、炭酸カルシウム微粒子の周りを覆うと考えられる。ここで、圧力を 10 MPa として高圧攪拌槽内混合物が大気開放されると、ポリマー溶解エタノールに包まれた状態で炭酸カルシウム微粒子がノズルから噴霧され、Table 3.1、Fig. 3.14 (b) および Fig. 3.15 (b) のような粒度分布が狭い球形の粒子が形成されることが考えられる。以上より、超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液の PGSS 法によりマイクロ粒子を製造する際の攪拌翼形状としては、4 枚ピッチドパドル翼よりも鋸歯ディスクタービン翼の方が適するとわかる。

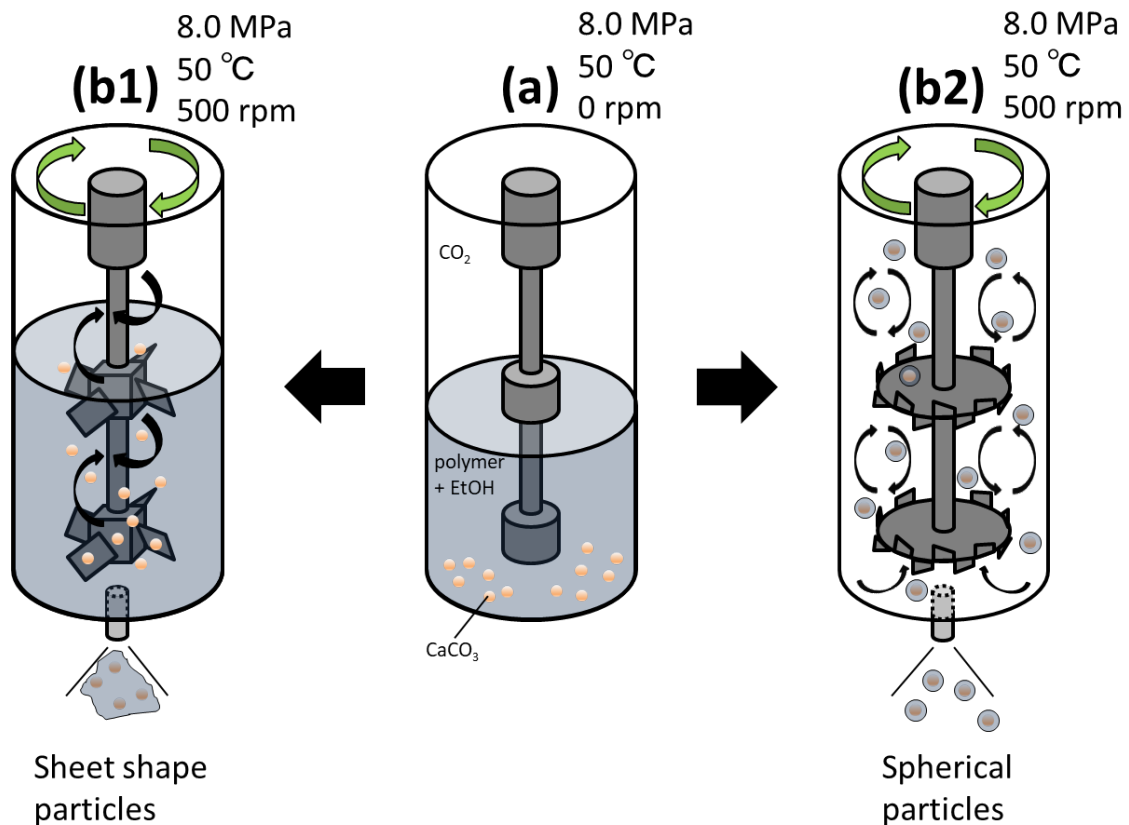


Fig. 3.16 異なる形状の攪拌翼を用いて、超臨界二酸化炭素 - エタノール混合液の PGSS 法によりマイクロ粒子を製造したときの粒子形成メカニズム。(a) 攪拌前の状態。ポリマー溶解エタノールと炭酸カルシウム微粒子を仕込んだ温度 50 °C に維持された高压攪拌槽内に、二酸化炭素を送液し、圧力を 8 MPa まで加圧すると、二酸化炭素リッチ相とポリマー溶解エタノールリッチ相の二相が形成される。(b1) 4 枚ピッチドパドル翼により 500 rpm で攪拌し、高压攪拌槽内混合液が噴霧されたときの状態。槽内の混合液は高压攪拌槽全体にまで流れを形成できず、ポリマー溶解エタノールと炭酸カルシウム微粒子との混和が不均一となり、ノズルから噴霧された混合液はシート状となり得る。(b2) 鋸歯ディスクタービン翼により 500 rpm で攪拌し、高压攪拌槽内混合液が噴霧されたときの状態。槽内の混合液は高压攪拌槽全体に高分散し、炭酸カルシウム微粒子はポリマー溶解エタノールに包まれ、ノズルから噴霧された混合液は球状となり得る。

### 3.4.5 二酸化炭素－エタノール混合液中での Eudragit L100 の溶解度

Table 3.2 温度 50 °Cにおける異なる操作圧力での二酸化炭素－エタノール混合液中の Eudragit L100 の溶解度測定における各材料組成

Operating pressure [MPa]	Amount of material [wt %]		
	Eudragit L100	Ethanol	CO <sub>2</sub>
0.1	60.0	40.0	0
5	35.5	46.6	18.4
8	17.7	35.4	46.9
10	5.64	11.3	83.1
12	0.071	2.00	97.9

二酸化炭素－エタノール混合液中における温度 50 °Cでの Eudragit L100 の溶解度を Table 3.2 および Fig. 3.17 に示す。気液平衡データ [154]によると、ポリマーを含まないエタノールと二酸化炭素の混合物は、温度 50 °Cでは単一の超臨界流体相を形成すると報告されている。Eudragit L100 のエタノール (0.1 MPa) への溶解度は 50 °Cで 60.0 wt%であった。Eudragit L100 の溶解度は、エタノールに二酸化炭素が添加するにつれて減少していくことが Table 3.2 から確認できる。高圧セル内に 18.4 wt%の二酸化炭素 (5 MPa) が添加されると、Eudragit L100 の溶解度は 35.5 wt%になった。高圧セル内二酸化炭素量が 46.9 wt% (8 MPa) となると、Eudragit L100 の溶解度は 17.7 wt%となった。高圧セル内二酸化炭素量が 83.1 wt% (10 MPa) となると、Eudragit L100 の溶解度は 5.64 wt%となった。最終的に、高圧セル内二酸化炭素量が 98.0 wt% (12 MPa) となると、Eudragit L100 の溶解度は 0.071 wt%にまで減少した。これらの結果は、エタノール中に溶解した Eudragit L100 の溶解度は二酸化炭素の添加とともに減少することを示すが、一方で二酸化炭素－エタノール混合液中の Eudragit L100 の濃度がクラウドポイントを下回るときは、高圧セル内に Eudragit L100、エタノールおよび超臨界二酸化炭素の均一相が形成されることも表している。

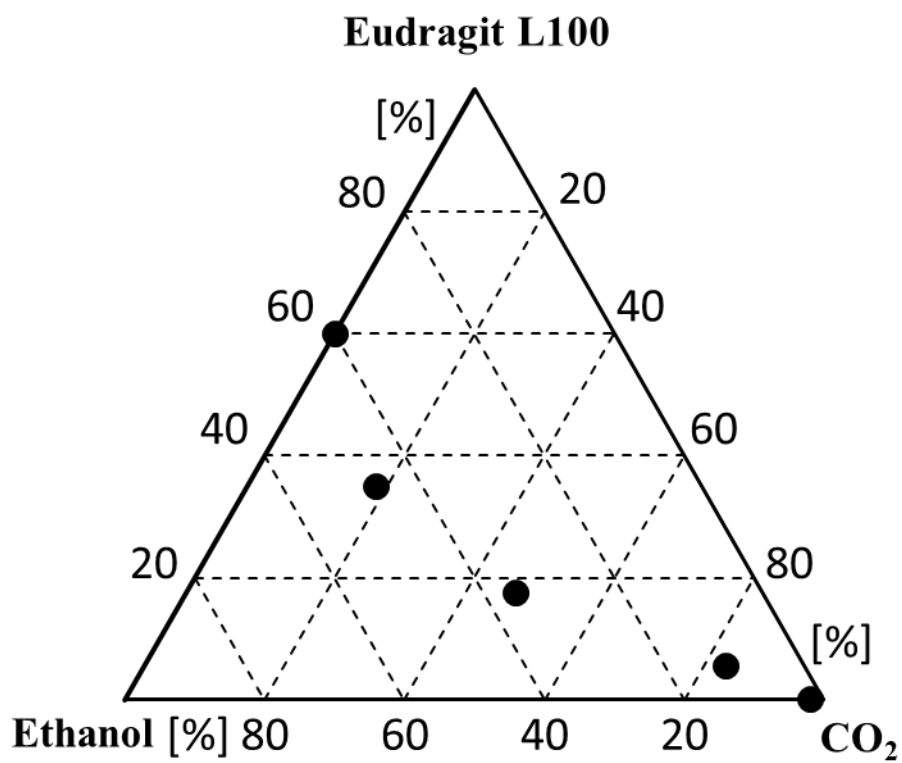


Fig. 3.17 温度 50 °Cにおける二酸化炭素－エタノール混合液中への Eudragit L100 溶解度測定結果

### 3.4.6 マイクロカプセルの分析結果

異なる予備膨張圧力 ((a) 8MPa、(b) 10 MPa、(c) 12 MPa) で温度 50 °Cにて PGSS 法により製造された微粒子の SEM 画像を Fig. 3.18 に示す。Fig. 3.18 (a)から、予備膨張圧力 8 MPa にて製造された微粒子がシート状の形態であることが確認できる。予備膨張圧力 10 MPa にて製造された微粒子は、Fig. 3.18 (b)に示すように、球状で滑らかな表面形態の粒子であった。予備膨張圧力 12 MPa にて製造された微粒子 (Fig. 3.18 (c)) は、さまざまなサイズの粒子の凝集体が確認された。

Table 3.3 異なる予備膨張圧力 (8 MPa、10 MPa、12 MPa) で温度 50 °Cにて超臨界二酸化炭素－エタノール混合液のガス飽和溶液懸濁 (PGSS) 法により製造された Eudragit L100 コーティングマイクロカプセルの平均粒径 (*APS*)、*span*、カプセル化効率 (*EE*)、生産収率 (*PY*)

Pre-expansion pressure [MPa]	<i>APS</i> [ $\mu\text{m}$ ]	<i>span</i>	<i>EE</i> [%]	<i>PY</i> [%]
8	$200.9 \pm 20.5$	2.03	$41.8 \pm 8.8$	$32.7 \pm 4.3$
10	$181.4 \pm 15.6$	1.54	$68.6 \pm 6.7$	$37.5 \pm 8.5$
12	$140.6 \pm 40.1$	2.38	$24.5 \pm 5.5$	$28.0 \pm 2.6$

Table 3.3 に異なる予備膨張圧力 (8MPa、10 MPa、12 MPa) で温度 50 °Cにて PGSS 法により製造された微粒子の平均粒径 (*APS*)、*span*、カプセル化効率 (*EE*)、生産収率 (*PY*) をそれぞれ示す。また、異なる予備膨張圧力 ((a) 8MPa、(b) 10 MPa、(c) 12 MPa) で温度 50 °C にて PGSS 法により製造された微粒子の粒度分布 (particle size distribution; PSD) を Fig. 3.19 に示す。本実験条件範囲内での生産収率 (*PY*) は、最小  $28.0 \% \pm 2.6 \%$  から最大  $37.5 \% \pm 8.5 \%$  であった。この低い *PY* の値は、PGSS 法の減圧過程において、高压容器や配管内に Eudragit L100 などの材料が接着したことが原因であると考えられる。微粒子の平均粒径 (*APS*) は、予備膨張圧力が 8 MPa から 12 MPa に増加するにつれて、 $200.9 \mu\text{m} \pm 20.5 \mu\text{m}$  から  $140.6 \mu\text{m} \pm 40.1 \mu\text{m}$  にまで減少した。これは、過去の文献の報告 [155]通り、高压セル内の二酸化炭素量が増加することにより、予備膨張圧力が増加し、高压容器内混合物噴霧時の霧化が誘発され、より小さな液滴が形成されたためである。粒子の均一性を示す *span* は、予備膨張圧力 10 MPa で最小値 (1.54) を示し、予備膨張圧力 8 MPa および 12 MPa でそれぞれ 2.03 および 2.38 に増加した。これより、予備膨張圧力 10 MPa のときの微粒子が最も均一性が高いことが示された。微粒子のカプセル化効率 (*EE*) は、予備膨張圧力 10 MPa で  $68.6 \% \pm 6.7 \%$  の最高値を示し、予備膨張圧力 8 MPa および 12 MPa でそれぞれ  $41.8 \% \pm 8.8 \%$  および  $24.5 \% \pm 5.5 \%$  の低い値を示した。

予備膨張圧力 8 MPa および温度 50 °Cにて PGSS 法により製造された微粒子は、形態がシート状 (Fig. 3.18 (a)) で、*APS* が大きく ( $200.9 \mu\text{m} \pm 20.5 \mu\text{m}$ )、*EE* が低い ( $41.8 \% \pm 8.8 \%$ ) という経口投与型薬剤として非効率的な結果であった。これは、他の予備膨張圧力 (10 MPa、

12 MPa) と比較して、低い二酸化炭素圧と比較的高い Eudragit L100 濃度 (17.7 wt%) が原因であると考えられる。予備膨張圧力 12 MPa および温度 50 °Cにて PGSS 法により製造された微粒子は、他の予備膨張圧力結果と比較して APS は最も小さかった ( $140.6 \mu\text{m} \pm 40.1 \mu\text{m}$ ) が、さまざまなサイズの粒子の凝集体が確認 (Fig. 3.18 (c)) され、EE が低い ( $24.5 \% \pm 5.5 \%$ ) という結果であった。予備膨張圧力 12 MPa および温度 50 °Cでの超臨界二酸化炭素-エタノール混合液中への Eudragit L100 の溶解度はかなり低く (0.071 wt %)、非効率的または未コーティングの芯物質が多く存在し、そこからフェニルアラニンが露出し、ろ液に放出され、EE が低下したと考えられる。予備膨張圧力 10 MPa および温度 50 °Cにて PGSS 法により製造された微粒子は、形態が球状 (Fig. 3.18 (b)) で、サイズ ( $181.4 \mu\text{m} \pm 15.6 \mu\text{m}$ ) が均一 (span : 1.54)、EE が高い ( $68.6 \% \pm 6.7 \%$ ) という結果であった。これらの結果より、予備膨張圧力 10 MPa および温度 50 °Cの操作条件が、PGSS 法によりフェニルアラニンの Eudragit L100 コーティングマイクロカプセル製造にとって最適値であると考えた。次項では、経口ドラッグデリバリーシステムでの適用性を検討するため、予備膨張圧力 10 MPa および温度 50 °Cでの PGSS 法により製造された微粒子からのフェニルアラニン放出制御試験を実施した。

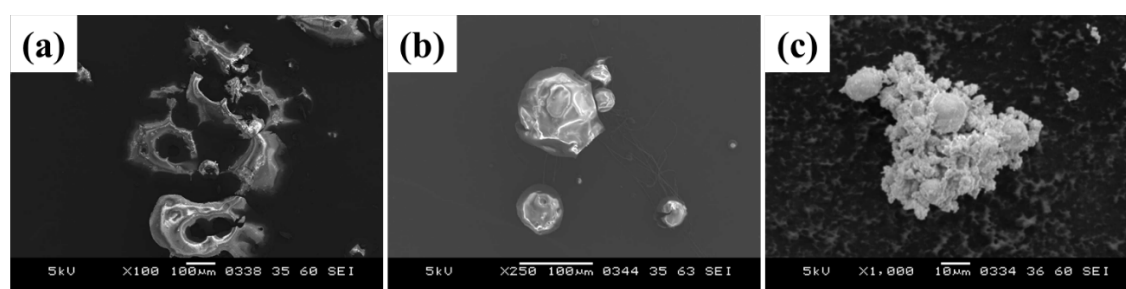


Fig. 3.18 異なる予備膨張圧力で温度 50 °Cにて超臨界二酸化炭素-エタノール混合液のガス飽和溶液懸濁 (PGSS) 法により製造された Eudragit L100 コーティングマイクロカプセルの SEM 画像。予備膨張圧力(a) 8MPa、(b) 10 MPa、(c) 12 MPa での結果を表す。



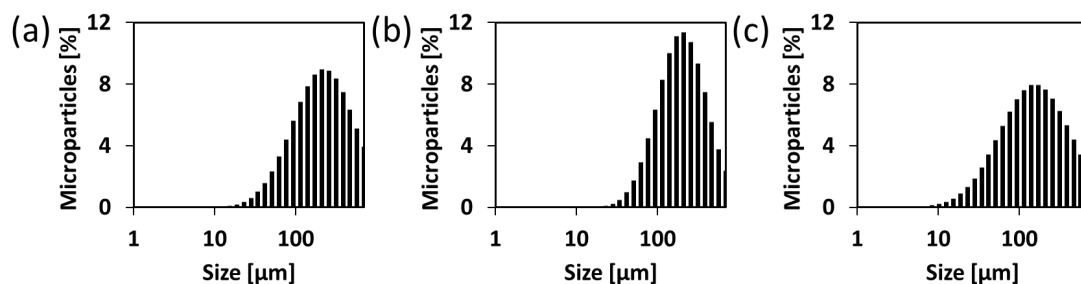


Fig. 3.19 異なる予備膨張圧力で温度 50 °Cにて超臨界二酸化炭素－エタノール混合液のガス飽和溶液懸濁（PGSS）法により製造された Eudragit L100 コーティングマイクロカプセルの粒度分布（PSD）。予備膨張圧力(a) 8MPa、(b) 10 MPa、(c) 12 MPa での結果を表す。

### 3.4.7 異なる pH 環境におけるマイクロカプセルからのフェニルアラニンの放出速度

予備膨張圧力 10 MPa および温度 50 °Cでの PGSS 法により製造された微粒子からの異なる pH 環境（pH 2.1–8.0）におけるフェニルアラニン放出速度結果を Fig. 3.20 に示す。さまざまな pH 緩衝液中（pH 2.1–8.0）でのフェニルアラニンの紫外可視分光光度計を用いて作成された検量線の結果を Fig. 3.21 に示す。Fig. 3.20 から、pH が中性から塩基性付近の条件（pH 6.8–8.0）では、150 分以内に放出速度がピークに達していることがわかる。一方、酸性条件（pH 2.1–4.1）では、フェニルアラニンの最大放出率は 20 %未満にまで減少した。これらの結果は、フェニルアラニンが体内の循環期間にわたってゆっくりと放出されることを明らかにしている。また、フェニルアラニンの放出速度は、PGSS 法を用いて腸溶性ポリマー Eudragit L100 でフェニルアラニン吸着炭酸カルシウムをコーティングすることによって制御できることを明らかにしている。

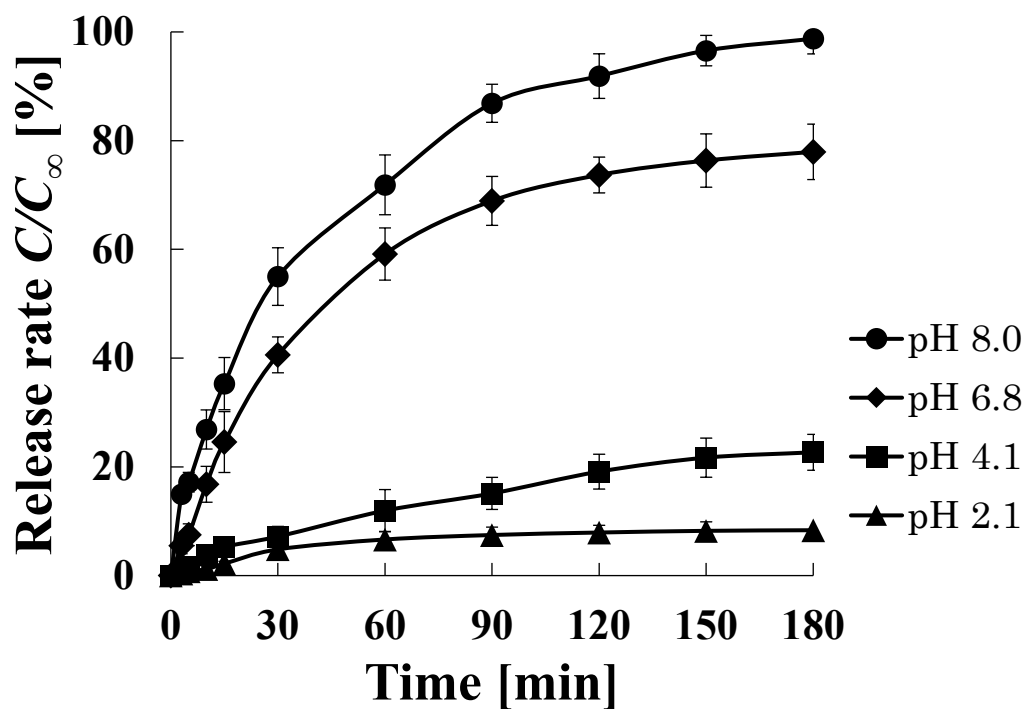


Fig. 3.20 予備膨張圧力 10MPa および温度 50 °Cにて超臨界二酸化炭素－エタノール混合液のガス飽和溶液懸濁（PGSS）法により製造された Eudragit L100 コーティングマイクロカプセルからの異なる pH 環境におけるフェニルアラニン放出速度結果。pH 8.0 (●)、pH 6.8 (◆)、pH 4.1 (■)、pH 2.1 (▲) での結果を表す。

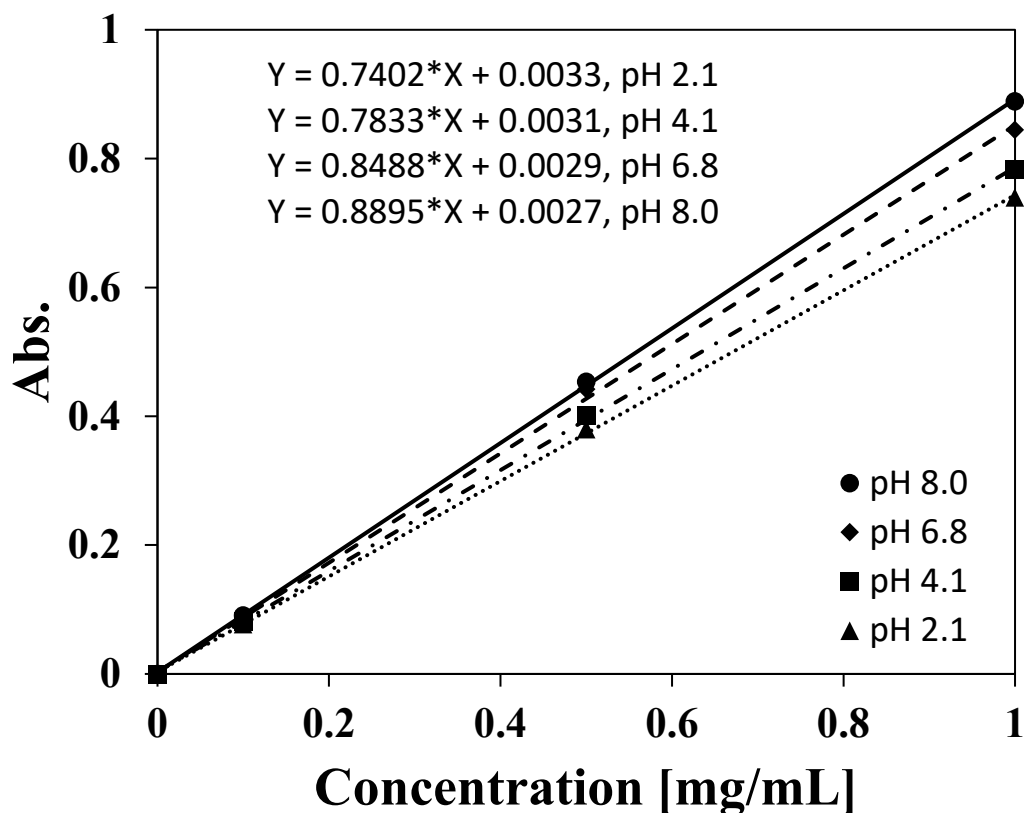


Fig. 3.21 さまざまな pH 緩衝液中でのフェニルアラニンの紫外可視分光光度計を用いて作成された検量線結果。pH 8.0 (●)、pH 6.8 (◆)、pH 4.1 (■)、pH 2.1 (▲) での結果を表す。

### 3.5 第3章の結言

第3章では、ガス飽和溶液懸濁 (PGSS) 法を用いて、超臨界二酸化炭素が貧溶媒である腸溶性ポリマーの Eudragit L100 をコーティング材とした、フェニルアラニン内包マイクロカプセルの製造を試みた。まず、機械的攪拌時に、異なる形状の攪拌翼 (4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼) を用いて、高压容器内の超臨界二酸化炭素溶媒中に、芯物質およびポリマー溶液滴を均一に分散させるような条件を、高压容器内流体挙動の目視観察および数値流体力学 (CFD) による解析により検討することで、従来よりも粒度分布が狭く、形態が球状であるマイクロ粒子の製造を試みた。その結果、邪魔板 (バッフル) のない高压攪拌槽内では、4 枚ピッチドパドル翼よりも鋸歯ディスクタービン翼の方が攪拌槽全体に流れを形成し、槽内の混合液が高分散することが明らかとされた。また、攪拌翼を鋸歯ディスクタービン翼として PGSS 法を実施すると、4 枚ピッチドパドル翼よりも平均粒径が小さく、球状のマイクロカプセルが得られやすいことが明らかとなった。次に、温度 50 °C で

の、異なる圧力の二酸化炭素－エタノール混合溶液に対して、Eudragit L100 が完璧に溶解する系を目視観察により検討した。さらに、温度 50 °C、異なる圧力 (8 MPa、10 MPa、12 MPa) において PGSS 法でマイクロ粒子を製造することにより、粒子形態が球状で、粒子サイズ (粒度分布) が最小となり、カプセル化効率 (%) と生産収率 (%) が最大となる操作条件を模索した。その結果、超臨界二酸化炭素－エタノール混合液中への Eudragit L100 の完全な溶解と、ガス飽和溶液の噴霧による高压容器外での Eudragit L100 の析出を組み合わせることにより、マイクロカプセル製造が可能であることが明らかとされた。マイクロカプセルの平均粒径は、予備膨張圧力を操作することにより制御可能であったが、本実験の操作範囲で高い EE のマイクロカプセルを製造するためには、温度 50 °C、予備膨張圧力 10 MPa の操作条件が最適であることが明らかとなった。最後に、経口薬物送達システムとしてのマイクロカプセルの機能性を確認するために、異なる pH 条件におけるマイクロカプセルからの持続的薬物放出アッセイを実施した。その結果、*In vitro* でのフェニルアラニン放出挙動は、放出速度を低下させるだけでなく、オンデマンドの薬物放出のリアルタイム制御にも有益であることが示された。これらの結果は、このマイクロカプセル化技術により、下部腸送達を目的とした、胃消化からの保護を必要とする水溶性生物活性成分送達に対して大きな可能性を有することを示唆している。

## 第 4 章

### 二酸化炭素溶媒に超音波を併用した医療用ナノカプセルの調製

#### 4.1 第 4 章の緒言

##### 4.1.1 背景

第 3 章では、超臨界二酸化炭素が貧溶媒となる pH 応答性高分子の Eudragit L100 を被覆剤としたマイクロカプセルの製造を、ガス飽和溶液懸濁 (particles from gas saturated solutions (PGSS)) 法を用いて試みた。その際、二酸化炭素－エタノール混合液中の Eudragit L100 の溶解度の測定、および機械的攪拌時における異なる攪拌翼形状による高压セル内流体 (二酸化炭素－エタノール－高分子) の混合特性を検討することにより、高压セル内に均一に混合流体を充填させ、マイクロカプセルの製造に成功した。第 4 章では、高压セル内にかかる攪拌の代わりに直接超音波処理を行うことで、機能性ナノカプセルの調製を試みた。水とリン脂質が仕込まれた高压セル内に二酸化炭素を充填し、そこに直接超音波を照射することによりナノリポソームの調製を検討する。

リポソームは、ヒトの細胞膜と似た構造をもつリン脂質二重層からなる閉鎖小胞構造 [71,156]をしており、その形態から優れた薬物キャリアとしての Drug Delivery System (体内薬剤配送システム) 体として知られている直径 100 nm から 2000 nm 程度のナノマシン [156]である。生体適合性に優れているという特徴から、注射剤、経皮吸収剤、経口投与剤及び化粧品などの幅広い分野 [157,158]で有効性が期待されている。リポソーム調製の従来法としては、thin-film hydration 法 [159]、organic solvent injection 法 [160,161]、reverse phase evaporation 法 [162]などが挙げられる。しかし、これらの方法は有害な有機溶剤を使用しており、調製したリポソームの人体に対する安全性が懸念されている。そこで近年、有害な有機溶媒の代わりに二酸化炭素を用いてリポソームを調製する方法が報告されている。二酸化炭素は無害で不燃性の物質であり、温度と圧力の条件を調整することで有機物の溶解力を制御可能である [163]。高压二酸化炭素や超臨界二酸化炭素を用いたリポソーム調製法としては、supercritical reverse phase evaporation (scRPE) 法 [164-168]、continuous anti-solvent (CAS) 法 [169]、supercritical assisted liposome formation (SuperLip) 法 [170-175] や supercritical assisted injection in a liquid anti-solvent (SAILA) 法 [176]などが挙げられる。ただし、これらの方法は、SuperLip 法を除いてリポソーム調製の際に有機溶媒の追加が必要であるとされている。高压二酸化炭素や超臨界二酸化炭素を用いたリポソーム調製法の中には、有機溶剤未使用でリポソームを調製する方法 [168,177,178]も報告されている。有機溶剤未使用でリポソームを調製する方法では、連続的に加圧と減圧を行い容器内圧力を一定に保つ [177]ことにより、比較的小さく均一なリポソーム ( $214 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ ) が生成される。しかし、リポソーム径を小さくするためにはより圧力を高くし、リポソーム径の均一性を高めるためには減圧速度を上げる必要があるため、高い収率と再現性を達成するこ

とが困難であると報告 [177]されている。高圧二酸化炭素や超臨界二酸化炭素を用いて有機溶剤未使用でリポソームを調製する方法において、収率と再現性を高めるためには、高圧セル内流体に強い攪拌が必要であると報告 [168]されている。乳化技術として注目されている超音波処理は、液液非混和性二相系における誘導キャビテーションを介して物質移動を促進させる [179,180]。Goto ら [181]は、高圧セル外から超音波を照射（間接超音波照射）して有機溶剤未使用でリポソームを調製する方法を報告しているが、高圧セル内に内蔵されたホーンより、セル内に直接超音波を照射（直接超音波照射）してリポソームを調製する方法は報告されていない。著者らは、水－高圧二酸化炭素－リン脂質が仕込まれた高圧セル内に、直接超音波を照射することにより、従来よりも高効率でリポソームを調製できるのではないかと考え、実施した。

#### 4.1.2 目的

本研究の目的は、高圧二酸化炭素と超音波直接照射技術を併用（高圧超音波直接処理）することにより、水－高圧二酸化炭素の気液ナノ界面を拡張することによる有機溶剤未使用かつ迅速で高収率かつ粒子径が最も小さくなるナノリポソームの調製である。まず、リポソームを異なる手法（Bangham 法、大気圧超音波直接処理法、高圧超音波未使用法、高圧超音波間接処理法、高圧超音波直接処理法）により調製することで、粒子径が最小かつ高収率となるリポソーム調製法を検討する。次に、高圧超音波間接処理または高圧超音波直接処理を用いたリポソーム調製において、異なる操作条件（超音波照射時間：0 秒 - 250 秒、仕込みリン脂質量：0.04 wt% - 0.40 wt%、操作温度：25 °C - 60 °C）の範囲にてリポソーム収率が最大かつ粒子径が最小となる系を模索する。さらに、高圧超音波直接処理で疎水性薬剤であるシクロスポリン A を内包したリポソームを製造し、薬剤負荷率（%）およびカプセル化効率（%）を算出し、従来（Bangham）法と比較することで、高圧超音波直接処理により調製したリポソームが実用化可能なものであるかを検討する。

## 4.2 第 4 章の研究基礎

### 4.2.1 リポソームについて

リポソームとは、Fig. 4.1 のように、大きな親水基と二本の長い疎水基（C18）から成るリン脂質が脂質二分子膜（Lipid bilayer）を形成し、水相を閉じ込めた閉鎖小胞構造体のことを指す。リポソームの特徴としては、①膜組成やサイズの選択が可能で、その膜上に抗原、抗体、糖などの特異的リガンドを結合できること、②生体膜類似構造であるため、細胞内へ相互作用により薬剤を伝達可能であること、③生体膜由来の脂質を用いるため生分解性があり、生体適用性があること、④その構造上、親水部と疎水部を併せ持つため、親水疎水いずれの薬剤も内包可能であること、⑤生体内分解酵素などによる薬物の失活を防

げること、⑥薬物自体の毒性低減、薬効増強が期待できることなどがあげられる [182-186]。以上の特長により、1964 年に英国の Bangham [161]によって発見されて以来、主に医薬、化粧品分野にて大きな注目を集めている。

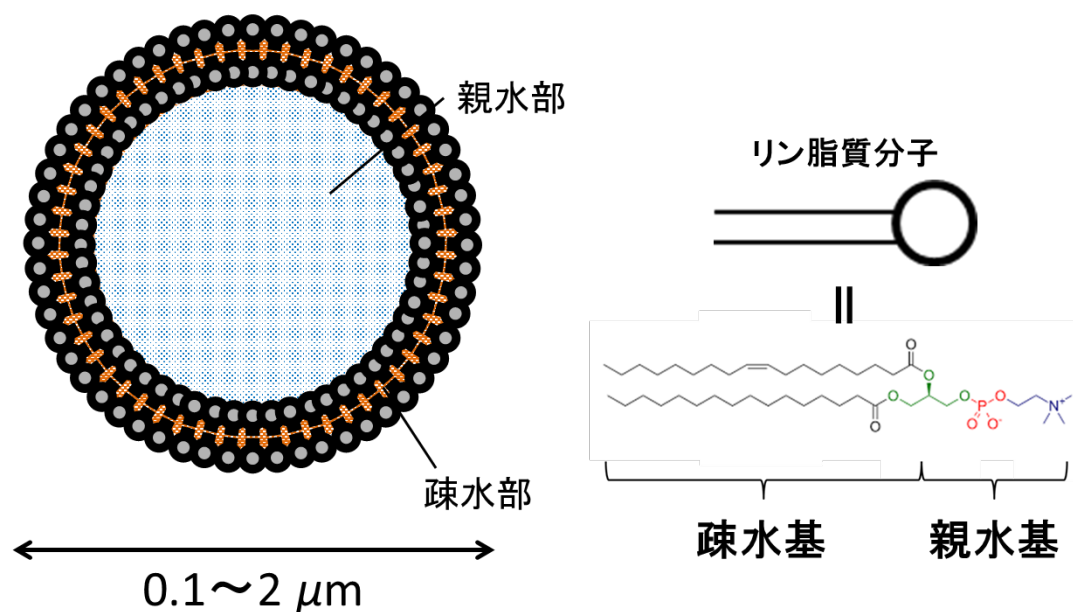


Fig. 4.1 リポソームの構造

#### 4.2.2 リポソームの種類

リポソームは、Fig. 4.1 の構造の他にも、Fig. 4.2 のようにその形態から様々な種類に分類される。Fig. 4.2 のように、リン脂質二分子膜一枚で形成された単層リポソーム（直径 100 nm - 200 nm）、リン脂質二分子膜が二枚以上で構成された多重層リポソーム（直径 200 nm - 500 nm）、大きなリポソーム内に小さなリポソームが内包されたオリゴメラリポソーム（直径 200 nm - 500 nm）に分けられる [187,188]。本研究においても、調製されたリポソームが Fig. 4.2 のいずれかの形態をとっていると考えられる。

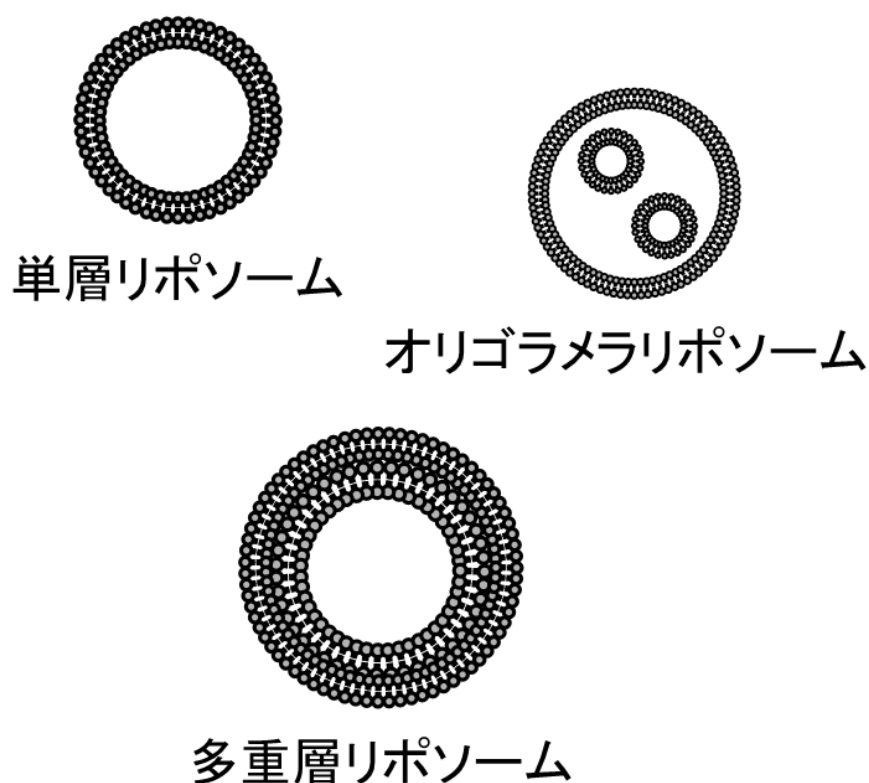


Fig. 4.2 様々なリポソームの形態

#### 4.2.3 超音波ホーン内蔵型高圧装置の概要

本研究では、高圧二酸化炭素を用いた有機溶剤未使用のリポソーム調製法において、高圧セル内の超音波ホーンから高圧セル内流体に直接超音波を照射するプロセスを考案した。本研究における実験装置図を Fig. 4.3 に示す。実験装置としては、既に本研究室で先行研究が存在するものと同じのものを使用した [189]。12 の高圧セル内に予めリン脂質、水、(薬剤) を仕込んでおき、セル内に機能性溶媒として二酸化炭素を送液することによりリン脂質を溶解させる。通常、水と二酸化炭素だけではリン脂質は溶解しづらいが、セル内に超音波振動ホーンが内蔵されており、超音波による強力な攪拌作用でリン脂質を溶解させることが可能である。減圧操作により、セル内にて油相として存在していた二酸化炭素は除去され、セル内のリポソームを回収可能である。thin-film hydration 法のような従来法にて必要となる溶媒除去や乾燥工程を含まないため、リポソーム調製プロセスの簡略化にも期待できる。

Fig. 4.3 の高圧セルは、体積約 150 mL のものを使用した。(内径 34 mm×縦 165 mm (株東洋高圧)。チタン製の超音波発生器は、高圧セルの上部に設置し、超音波プロセッサ (VC-750、Sonic and Materials Inc.) から、電気信号によって動かした。



超音波処理装置は、20 kHz の周波数で超音波を生成し、750 W の最大電力能力のものを使用した。超音波照射は、一定振幅の波長を自動的に調整され超音波処理装置から送られた。最大振幅は  $61\ \mu\text{m}$  であり、振幅制御は 100 % に設定した。リポソーム調製実験は、 $15.3\ \mu\text{m}$  (振幅制御 25 %) の一定振幅で行った。超音波照射によるシステムの急激な温度上昇を防止するために、超音波照射を断続的 (5 秒オン、10 秒オフ) に行い、超音波ホーンは冷却ジャケットを用いて冷却した。二酸化炭素は、サイフォン式二酸化炭素ポンプを使用し、HPLC ポンプ (SCF-get、JASCO 製) より高压セルに一定の流量 ( $2\ \text{cm}^3/\text{min}$ ) で供給した。高压セル内温度は、熱電対によって測定した。ポンプヘッドは、ガスボンベからの二酸化炭素を液化するために冷却ユニットにより冷却した。システム圧力は、 $\pm 0.1\ \text{MPa}$  の圧力制御精度で一定圧力に維持するため背圧調整器 (880-81、JASCO 製) を使用し、 $\pm 0.3\ %$  精度のデジタル圧力計 (DD-50、シンワエレクトロニクス社製) によってモニターした。実験前に水及びリン脂質を直接高压セルに装填した。そして超音波照射を高压セルに対し実施した。

高压セルは、温度を制御しモニターするため水恒温槽にとりつけた。高压セル中の温度は、 $\pm 0.1\ ^\circ\text{C}$  の精度でコントロールした。高压セルの圧力と温度が指定の値に達した後、超音波の照射を超音波発生装置を使用して指定回数行った。超音波照射後、セルをゆっくりと大気圧にもどした。

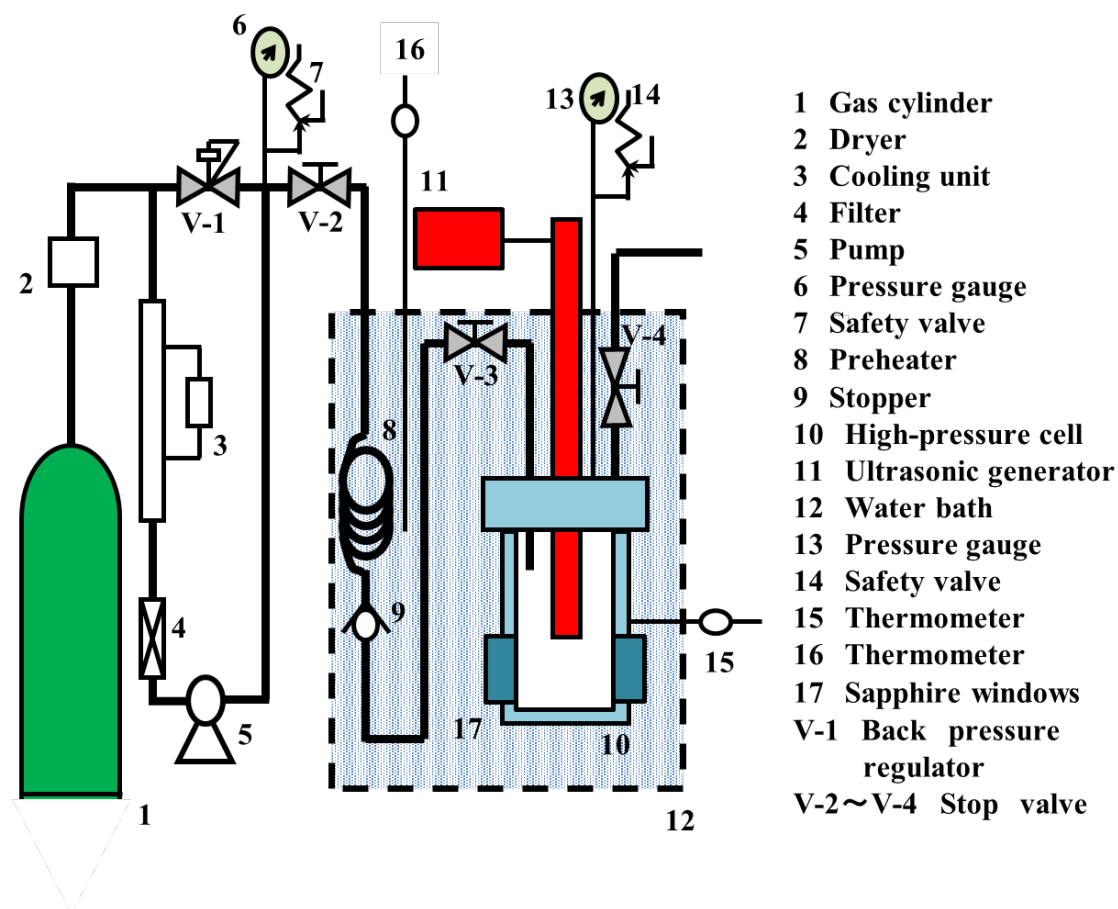


Fig. 4.3 直接超音波照射での高圧二酸化炭素を用いた有機溶剤未使用のリポソーム調製法実験装置図

#### 4.2.4 直接超音波照射による高圧セル内への影響

本実験にて用いた高圧セルは、耐圧ガラスにより内部の様子を観察できるように設計されている。水とガラスビーズを仕込んだ状態における超音波照射中のセル内の様子及び、水と液体二酸化炭素とガラスビーズが内包された状態における超音波照射中のセル内の様子を Fig. 4.4 に示す。水とガラスビーズを仕込んだ状態における超音波照射では、超音波の縦波の振動によりセル内のガラスビーズが上下に動いている様子が観察できる。一方、水と液体二酸化炭素とガラスビーズが内包された状態における超音波照射では、セル内が懸濁し黒く見える。これは、通常下相と上相に分かれる水と液体二酸化炭素が、超音波振動によりミクロなレベルで無数の相分離を起こしたためである。これにより、水と二酸化炭素界面の接触点数が増加し、通常溶解しないリン脂質が水-二酸化炭素界面に溶解すると考えられる。

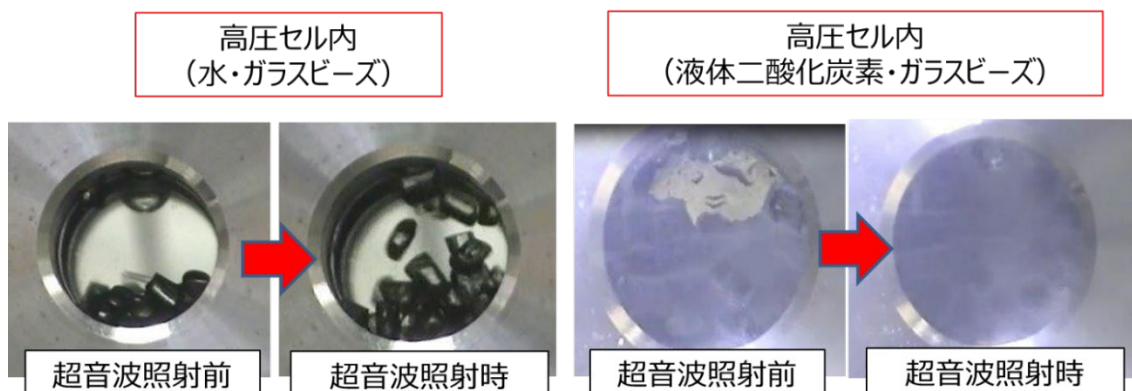


Fig. 4.4 超音波照射中のセル内の様子。水とガラスビーズの入ったセル内ではガラスビーズが超音波振動によりセル内で対流している様子が観察できる。一方、内部に液体二酸化炭素が封入されると、超音波振動により生じた水-液体二酸化炭素間のマイクロ相分離によりセル内が黒く懸濁している様子が観察される。

### 4.3 実験

#### 4.3.1 試薬類

大豆由来レシチンおよびシクロスポリン A（純度 97.0 %以上）は、富士フイルム和光純薬工業㈱から購入し、そのまま用いた。超純水は、日本ミリポア㈱製の Simpli Lab により精製した。液化炭酸ガス（純度 99.9 %以上）は福岡酸素㈱から購入した。

本研究において使用した大豆由来レシチンの構造式を Fig. 4.5 にそれぞれ示す。

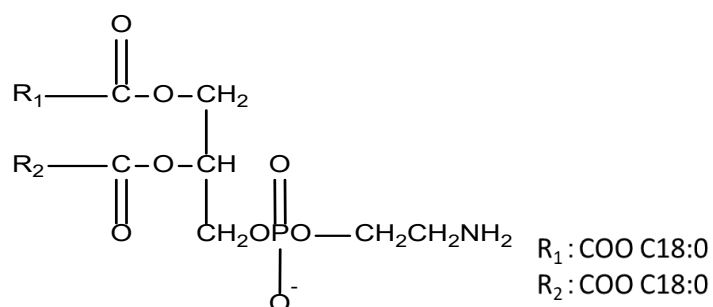


Fig. 4.5 大豆由来レシチンの構造式

#### 4.3.2 リン脂質懸濁液調製法

本研究では、リポソームを調製するために、まず、水中にリン脂質を分散させたリン脂質懸濁液を調製した。リン脂質懸濁液は、大豆由来レシチン (0.01 g - 0.1 g) を水 (25 ml) に 25 °C で 20 分間、超音波洗浄機 (SU-3T、柴田科学(株)製) により超音波処理して分散させて調製した。

#### 4.3.3 高圧二酸化炭素および大気圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法

高圧二酸化炭素および大気圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製では、Fig. 4.3 に示した装置を用いた。高圧セル (150 cc) 内に、4.3.2 で調製したリン脂質懸濁液 (0.04 wt% - 0.4 wt%)、シクロスポリン A (0.01 g) および赤色蛍光染色剤である Rhodamine B (0.1 mM) を予め仕込んだ。ただし、シクロスポリン A に関しては、薬剤負荷率およびカプセル化効率算出時のみ高圧セル内に仕込んだ。また、Rhodamine B に関しては、細胞試験を行うときにのみ添加している。このとき、超音波ホーン先端は水-二酸化炭素界面から 6.2 cm 上にあった。試料を仕込み終わった高圧セルを予め反応温度

(25 °C - 60 °C) に制御された恒温槽内の所定の位置に接続し、高圧セル内が反応温度となるまで静置させた。次にストップバルブ V-3 を開け、高圧セル内に液化二酸化炭素を送液し、セル内を高圧状態 (6.8 MPa) とした。このとき、大気圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製では、目標温度に達し、二酸化炭素を送液後、高圧セル内圧力は 0.1 MPa にまで減圧され、維持された。この状態で、ホーン型超音波プロセッサを用いて 15.3  $\mu\text{m}$  (振幅制御 25 %) の一定振幅の超音波照射を複数回行った。直接超音波処理はそれぞれ 0 秒、25 秒、50 秒、75 秒、125 秒、200 秒、250 秒間実施され、超音波処理時間として定義した。ここで、超音波処理時間 0 秒の条件は、超音波処理せずに高圧二酸化炭素でリポソームを調製する方法とする。所定の超音波処理時間が経過した後、ストップバルブ V-4 を開け、減圧操作 (減圧速度 : 1.4 MPa/min) を行いセル内から二酸化炭素ガスを取り除き、高圧セル内を大気圧とした。高圧セルの減圧に必要な合計時間は約 7 分であった。高圧セルを恒温槽から取り出し、室温に冷却し、高圧セルの上蓋を開き、セル内の調製液を全て回収した。回収した調製液は 0.45  $\mu\text{m}$  シリンジフィルタ (ADVANCED MICRO DEVICES 製) に通すことにより固体成分と液体成分に分離した。固体を未反応リン脂質、ろ液をリポソーム液と定義した。リポソーム液を分析し、粒子形態観察および粒度分布測定を行った。濾過後に得られた固形物を真空下で 40 °C で 24 時間乾燥させ、計量して反応器に残っているリン脂質の質量を得た。調製したリポソームの収率 (Liposome yield) は、(4.1) 式から算出した。

$$\text{Liposome yield (\%)} = (1 - C_{\text{remain}} [\text{g}] / C_{\text{initial}} [\text{g}]) \times 100 \quad (4.1)$$

ただし、 $C_{\text{initial}}$  は仕込みリン脂質量であり、 $C_{\text{remain}}$  はリポソーム調製実験後に反応器内に残

存した未反応リン脂質を指す。

#### 4.3.4 高圧二酸化炭素と間接超音波照射を併用したリポソーム調製法

高圧二酸化炭素および大気圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製と比較のために、高圧二酸化炭素および間接超音波照射を併用したリポソーム調製を行った。高圧二酸化炭素および間接超音波照射を併用したリポソーム調製の実験手順は、超音波処理が高圧セルの外側から与えられたことを除いて、4.3.3 で記した方法と同一である。高圧二酸化炭素および間接超音波照射を併用したリポソーム調製の実験装置図を、Fig. 4.6 に示す。Fig. 4.3 と異なり、高圧セル超音波照射部（SU-3T、Sibata Scientific Technology Ltd.）が高圧セル外に配置されている。超音波処理は 34 kHz、40 W で行った。超音波洗浄機内の水の温度は、水循環装置（CCN-1000、GL Science Inc.）を使用して循環させることにより、目標温度（25 °C）に制御した。超音波処理は、間隔モード（5 秒オン、10 秒オフ）で合計 15 秒から 125 秒の間で実施した。

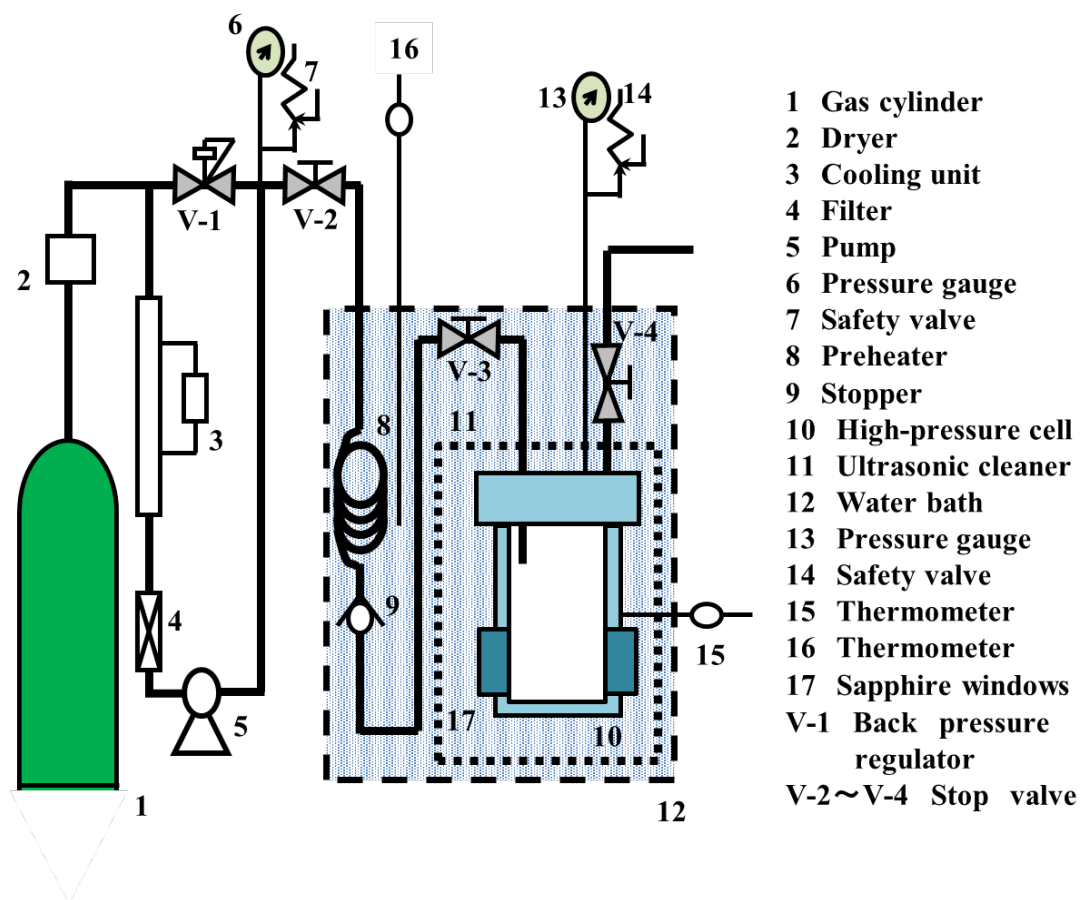


Fig. 4.6 高圧二酸化炭素および間接超音波照射を併用したリポソーム調製実験装置図

#### 4.3.5 Bangham 法を用いたリポソーム調製法

高圧二酸化炭素および大気圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製と比較のために、有機溶媒を使用してリポソームを調製する方法 (Bangham 法) を実施した。大豆由来レシチン (0.05 g) をクロロホルム (3 ml) およびメタノール (6 ml) に溶解し、丸底フラスコに移した。次に、この丸底フラスコをロータリーエバポレーターに接続し、45 °C の真空下でクロロホルムを除去して、容器壁面に乾燥脂質薄膜を作成した。乾燥した脂質薄膜を、50 °C の 10 mL の水で 10 分間水和させた後、1 分間ボルテックス攪拌して懸濁液を調製した。

#### 4.3.6 リポソームの分析

##### 4.3.6.1 リポソームの形態観察

高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して調製したリポソームの形態は、走査型電子顕微鏡 (SEM、JSM6060、JEOL 製) と透過型電子顕微鏡 (TEM、JEM-2100F、JEOL 製) を使用して評価した。SEM 分析用のサンプルは、最初にリポソーム溶液を銅グリッド上に置き、室温で乾燥させた後、オートファインコーター (JFC-1600、JEOL 製) を使用して薄膜プラチナコーティングを行い作製した。TEM 分析用のサンプルは、カーボングリッド (HRC-C10、応研商事(株)製) にリポソーム懸濁液を 1 滴垂らし、10 分間グリッドに付着させた後、液滴を吸い取り乾燥させて作製した。2 % (w/v) のリンタングステン酸 (PTA、純度 > 99.8 %、富士フイルム和光純薬工業(株)製) をネガティブ染色剤として使用した。グリッドを 10 秒間染色し、すぐに拭いて乾燥させた。調製サンプルを TEM を使用して観察した。

##### 4.3.6.2 リポソーム液の粒度分布測定

調製液に含まれる粒子の粒度分布および平均粒子径は、レーザー回折式粒度分布測定装置 (Microtrac UPA 150、MicrotracBEL 製) を用いて動的光散乱法により測定された。分散媒には超純水を用いた。測定パラメーターを次に示す。レーザー波長 780 nm、測定温度 25 °C、溶媒粘度 0.89 mPa · s、溶媒屈折率 1.33、粒子屈折率 1.43、粒子密度 1.05 g/ml、分散時間 10 分。溶媒に分散した試料を石英マイクロキュベットに入れて測定した。測定は 3 回行い、平均値を記録した。

##### 4.3.6.3 リポソームに内包されたシクロスポリン A の薬剤負荷率とカプセル化効率算出法

リポソームに内包されたシクロスポリン A の薬物負荷とカプセル化効率を、文献の手順 [190] に従い評価した。高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して調製した 1 mL のリポソーム溶液をマイクロ遠心チューブに入れ、15,000 rpm で 4 °C で 60 分間遠心分離をして、リポソームと遊離シクロスポリン A である固体残留物を含む水溶液を分離した。水

溶液（リポソーム）と固体残留物（シクロスポリン A）をメタノールにそれぞれ溶解し、シクロスポリン A の濃度を紫外可視分光光度計（V-550、Jasco 製）を用いて UV/Vis 分光法で測定した。リポソームに内包されたシクロスポリン A の薬剤負荷率（Drug loading (DL)）およびカプセル化効率（Encapsulation efficiency (EE)）は、それぞれ式（4.2）および（4.3）を用いて計算された。

$$\text{Drug loading (DL \%)} = (W_{\text{total}} - W_{\text{free}}) / W_{\text{lipid}} \times 100 \quad (4.2)$$

$$\text{Encapsulation efficiency (EE \%)} = (W_{\text{total}} - W_{\text{free}}) / W_{\text{total}} \times 100 \quad (4.3)$$

ただし、 $W_{\text{free}}$  は上澄み中の遊離薬物（シクロスポリン A）の分析重量、 $W_{\text{total}}$  はリポソーム分散液中の薬物（シクロスポリン A）の分析重量、 $W_{\text{lipid}}$  は調製に使用したリン脂質の理論重量である。

#### 4.4 結果および考察

##### 4.4.1 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して調製したリポソームの形態観察結果

高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して調製した固体粒子の(a) SEM および(b) TEM 観察結果を Fig. 4.7 に示す。SEM では、液中に含まれる粒子の全体像を観察し、TEM では、液中に含まれる粒子 1 個の拡大像を観察した。SEM 画像 (Fig. 4.7 (a)) から、得られた液中には大きさが比較的揃った固体粒子が多く存在していることがわかる。また、TEM 画像 (Fig. 4.7 (b)) から、液中に含まれる粒子は大きさが 100 nm 程度の球状のナノ粒子であることがわかる。これより、高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して調製した液中には、多くのリポソームと思われるナノサイズの固体粒子が存在していることが明らかとされた。

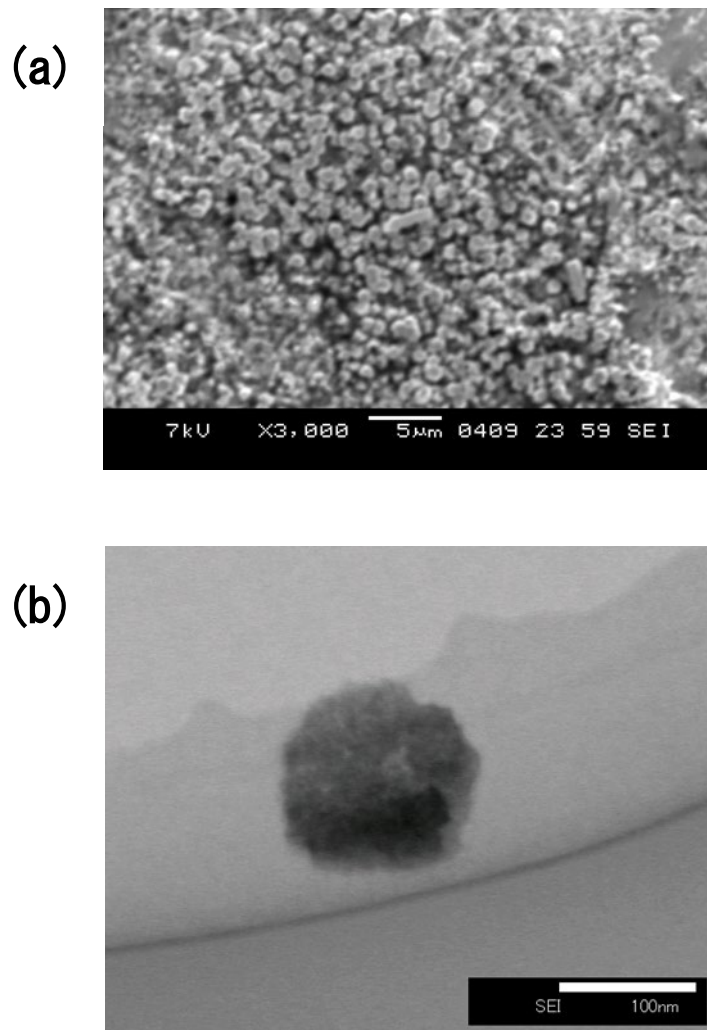


Fig. 4.7 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して水性リン脂質懸濁液を処理して得られたリポソームの(a) SEM 画像および(b) TEM 画像。実験条件として、温度 25 °C、圧力 6.8 MPa、超音波処理は間隔（5 秒オン、10 秒オフ）を置いて、合計 125 秒実施された。

#### 4.4.2 各方法で調製されたリポソームの比較

異なる方法（Bangham 法、大気圧二酸化炭素と直接超音波処理（APC-D; atmospheric pressure carbon dioxide with direct ultrasonication）、高圧二酸化炭素のみ（HPC; high pressure carbon dioxide）、高圧二酸化炭素と間接超音波処理（HPC-I; high pressure carbon dioxide with indirect ultrasonication）および高圧二酸化炭素と直接超音波処理（HPC-D; high pressure carbon dioxide with direct ultrasonication））で調製されたリポソームにおける、リポソーム収率（Liposome yield）および平均粒子径（Particle size）の比較を Table 4.1 に示す。また、(a) 高圧二酸化炭素のみ、(b) 高圧二酸化炭素と間接超音波処理、(c) 高圧二酸化炭素と直接超音



波処理および(d)Bangham 法で調製されたリポソーム液の粒度分布を Fig. 4.8 に示す。

Table 4.1 異なる方法 (Bangham 法 [159]、大気圧二酸化炭素と直接超音波処理 (APC-D)、高圧二酸化炭素のみ (HPC)、高圧二酸化炭素と間接超音波処理 (HPC-I) および高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D)) で調製されたリポソームにおける、リポソーム収率 (Liposome yield) および平均粒子径 (Particle size) の比較。

Method	Treatment Conditions				Product Liposome	
	$T$ [°C]	$P$ [MPa]	$U_s$ [kHz]	$t$ [s]	Yield [%]	Particle size [nm]
Bangham	50	0.1	-	600	$27.7 \pm 0.6$	$438 \pm 1$
APC-D	25	0.1	20	125	$50.8 \pm 2.9$	$298 \pm 1$
HPC	25	6.8	-	125	$30.0 \pm 2.0$	$273 \pm 4$
HPC-I	25	6.8	34	125	$80.86 \pm 1.8$	$230 \pm 15$
HPC-D	25	6.8	20	125	$71.9 \pm 6.5$	$159 \pm 2$

Table 4.1 から、大気圧二酸化炭素と直接超音波処理 (APC-D)、高圧二酸化炭素のみ (HPC)、高圧二酸化炭素と間接超音波処理 (HPC-I) および高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) のような二酸化炭素を利用するリポソーム調製法の方が、従来の有機溶媒を利用する Bangham 法と比較して、よりリポソーム収率が高く、より平均粒子径が小さくなることからわかる。Bangham 法に超音波処理を併用してリポソームを調製することで、100 nm 未満のリポソームが得られること [191]が報告されている。しかし、二酸化炭素を利用する方法の方が、Bangham 法と比較して操作温度が低く、有機溶剤未使用であるという利点 [192]がある。高圧二酸化炭素と超音波処理を併用する方法の比較 (HPC、HPC-I および HPC-D) では、高圧二酸化炭素中に超音波処理を行うことにより、リポソーム収率はより増加し、平均粒子径はより小さくなることからわかる。平均粒子径が減少するに伴いリポソーム収率は増加しているが、これは超音波照射により形成されたリポソームが、再び超音波照射されることによりそのリポソーム構造が崩壊し、再形成されたことが原因であると考えられる。大気圧二酸化炭素と直接超音波処理 (APC-D) と高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) を比較すると、高圧二酸化炭素の方が、大気圧二酸化炭素を用いる方法よりも、よりリポソーム収率がより高く、リポソーム粒径がより小さいことがわかる。高圧二酸化炭素と間接超音波処理 (HPC-I) および高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) を比較して、直接超音波処理の方がリポソーム径が小さいのは、混合効率と超音波処理の力の違いによるものであると考えられる。高圧二酸化炭素と直接超音波処理

(HPC-D) に関する詳細な検討を次項より行う。

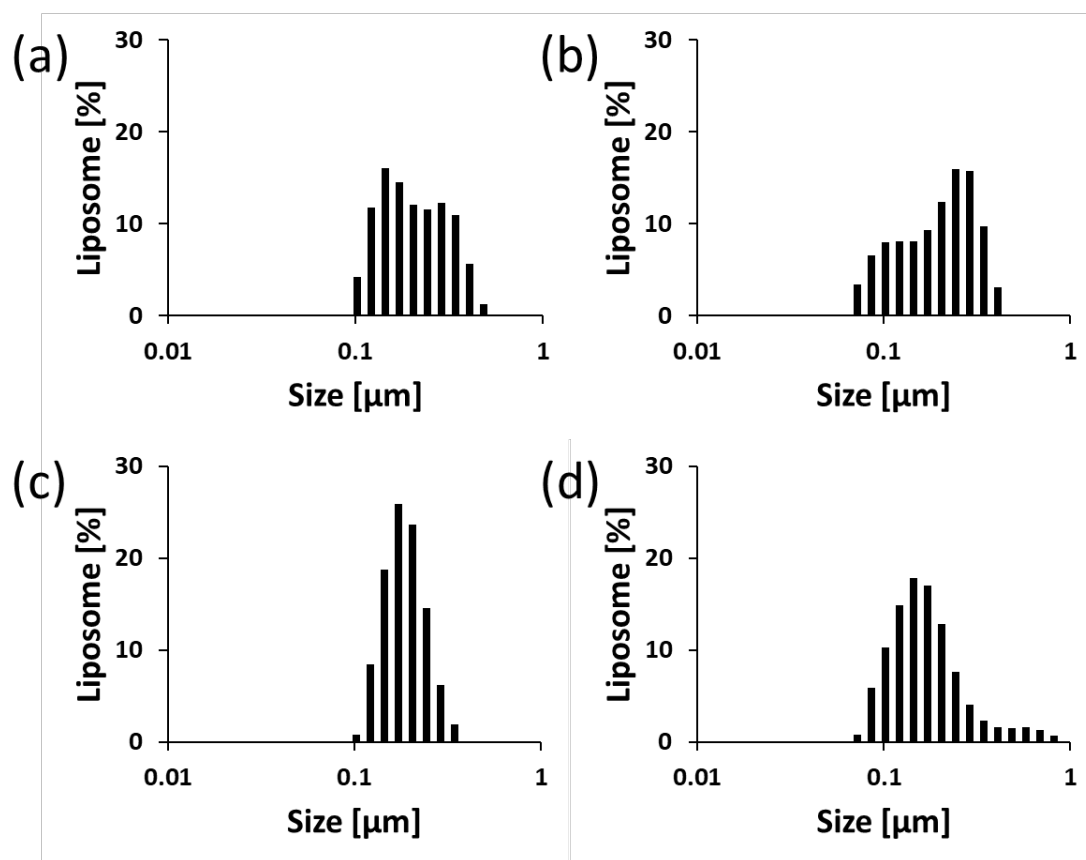


Fig. 4.8 異なる方法 ((a)高圧二酸化炭素のみ、(b)高圧二酸化炭素と間接超音波処理、(c)高圧二酸化炭素と直接超音波処理および(d)Bangham 法 [159]) で調製されたりポソーム液の粒度分布の比較。(a)高圧二酸化炭素のみは温度 25 °C、圧力 6.8 MPa で調製された。(b)高圧二酸化炭素と間接超音波処理および(c)高圧二酸化炭素と直接超音波処理は温度 25 °C、圧力 6.8 MPa、超音波処理は間隔 (5 秒オン、10 秒オフ) を置いて、合計 125 秒実施された。測定は、レーザー回折式粒度分布測定装置 (Microtrac UPA 150、MicrotracBEL 製) を用いて動的光散乱法により実施された。

#### 4.4.3 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したりポソーム調製法における超音波照射時間の影響

Fig. 4.9 に、高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) および高圧二酸化炭素と間接超音波処理 (HPC-I) における超音波処理時間 (Ultra-sonication time) に対するリポソーム収率と平均粒子径を示す。高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) では、超音波処理時間が 0 秒から 250 秒まで増加すると、平均粒子径が  $273 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$  から  $146 \text{ nm} \pm 8 \text{ nm}$  に

減少した。一方、リポソーム収率は、超音波処理時間が 0 秒から 75 秒まで増加すると、 $30\% \pm 2\%$  から  $66\% \pm 0.5\%$  に増加した。超音波処理時間の増加に伴うリポソーム粒径の減少は、対称キャビテーション中に形成される衝撃波や、非対称キャビテーション中に形成されるマイクロジェット [193,194] によりリポソームの粒径を減少させたと考えられる。高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) では、間接超音波処理よりも直接超音波処理の方が超音波処理時間に対する混合効率が高いため、高圧二酸化炭素と間接超音波処理 (HPC-I) よりもリポソーム粒径が減少したと思われる。

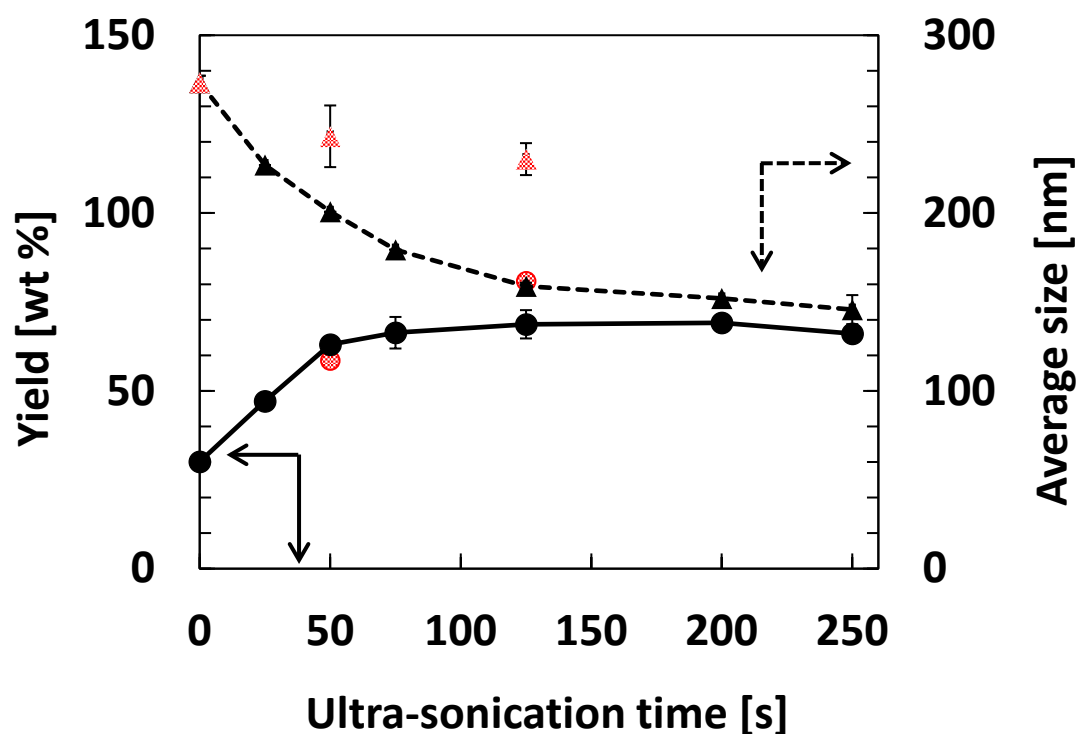


Fig. 4.9 温度 25 °C、圧力 6.8 MPa で実施された高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) および高圧二酸化炭素と間接超音波処理 (HPC-I) における超音波処理時間 (Ultra-sonication time) に対するリポソーム収率 (●) と平均粒子径 (▲)。黒：高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D)、薄黒：高圧二酸化炭素と間接超音波処理 (HPC-I) を指す。超音波処理は間隔 (5 秒オン、10 秒オフ) を置いて実施された。ただし、超音波処理時間はオンとオフのサイクルの合計時間である。

#### 4.4.4 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法における仕込みリン脂質量の影響

Fig. 4.10 に、高圧二酸化炭素と直接超音波処理（HPC-D）における仕込みリン脂質量（Phospholipid loading）に対するリポソーム収率と平均粒子径を示す。仕込みリン脂質量が 0.04 wt% から 0.4 wt% に増加すると、リポソーム収率は  $95.3\% \pm 4.6\%$  から  $46.4\% \pm 2.5\%$  にまで低下した。一方、仕込みリン脂質量が 0.04 wt% から 0.4 wt% に増加すると、リポソーム径は  $163\text{ nm} \pm 6\text{ nm}$  から  $187\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$  にまでわずかに増加した。仕込みリン脂質量の増加に伴うリポソーム径の増加は、超臨界貧溶媒化（supercritical anti-solvent (SAS)）法の研究 [195] でも報告されている。水性リン脂質懸濁液中でのリン脂質の濃度が高いと、高圧セル内底に未分散のリン脂質塊が形成され、リポソーム収率が低下すると考えられる。

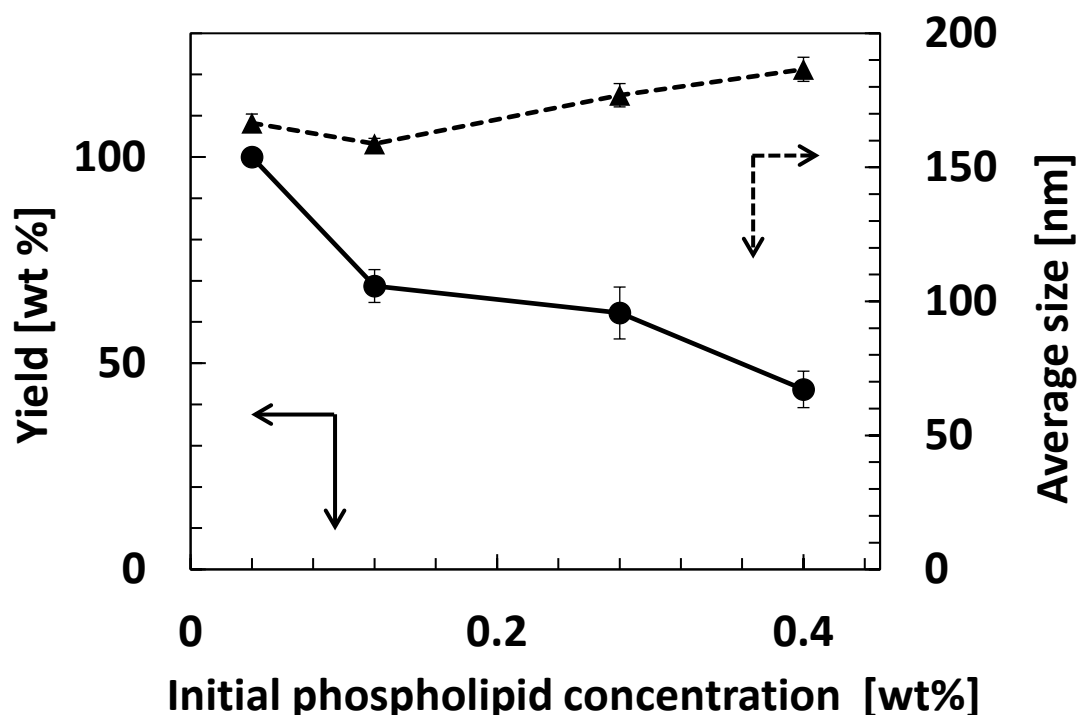


Fig. 4.10 温度 25 °C、圧力 6.8 MPa で実施された高圧二酸化炭素と直接超音波処理（HPC-D）における仕込みリン脂質量（Phospholipid loading）に対するリポソーム収率（●）と平均粒子径（▲）。超音波処理は間隔（5 秒オン、10 秒オフ）を置いて合計 125 秒で実施された。リン脂質懸濁液は、25 mL の超純水に 0.01 g - 0.1 g のリン脂質を添加して調製した。

#### 4.4.5 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法における操作温度と操作圧力の影響

Fig. 4.11 に、高圧二酸化炭素と直接超音波処理（HPC-D）における操作温度（Temperature）と操作圧力に対するリポソーム収率と平均粒子径を示す。

一定の圧力条件下では、温度が 25 °C から 60 °C に増加するにつれて、リポソーム収率が増加したことがわかる。これは、超音波未処理の水-二酸化炭素系での高温でのリポソーム形成に関する文献 [177] で行われた実験結果と一致する。温度増加に伴い、リン脂質分子の柔軟性と移動性は増加し、リン脂質相が粘性の大きなラメラゲル相から粘性の小さな流動液晶相 [177,196] へと変化しやすくなる。これにより、リン脂質からミセルが形成され、最終的にはリポソームが形成されやすくなったため、リポソーム収率が増加したと考えられる。

一定の温度条件下では、圧力の増加に伴い、平均粒子径が減少していることがわかる。この傾向は、超音波未処理の超臨界二酸化炭素を使用したリポソーム調製法を実施した Nakamura ら [178] の報告と一致する。一定温度下では、二酸化炭素圧の増加は水相における二酸化炭素の溶解度を増加させる。水相に溶解した二酸化炭素は、水相でのリン脂質の分散性と移動性を増加させることにより、リン脂質の疎水性部分に影響を与えと考えられる。また、一定温度下では、二酸化炭素圧の増加は二酸化炭素相の密度を増加させるため、リポソームの形成につながる W / CO<sub>2</sub> エマルションの生成に適していると考えられる。

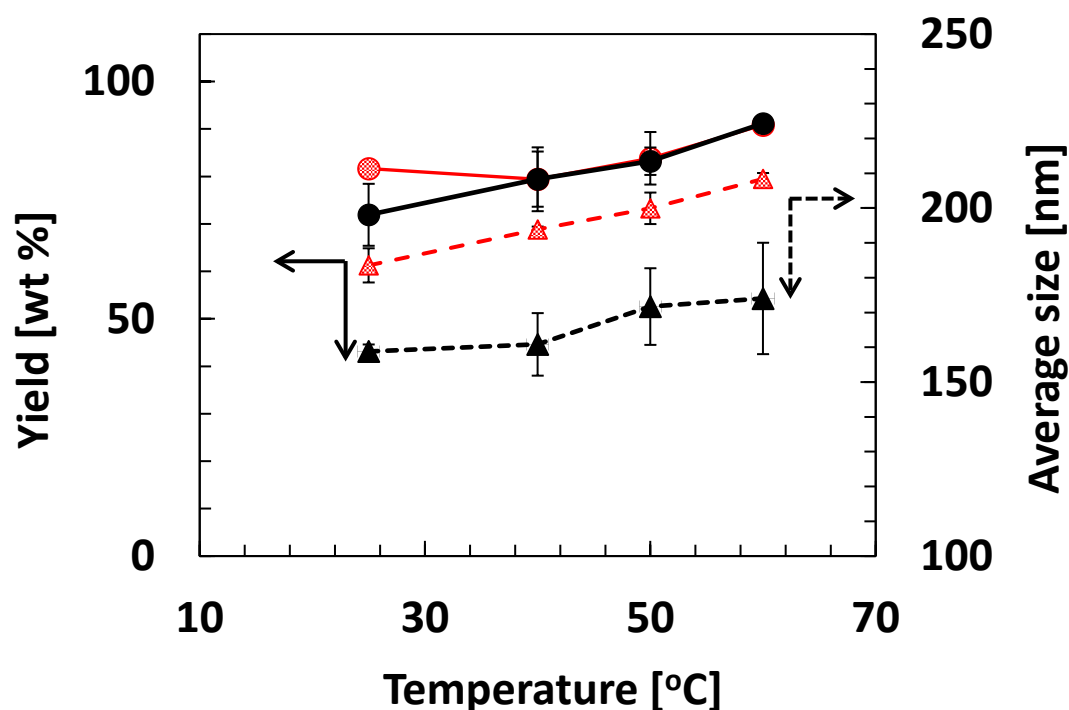


Fig. 4.11 高圧二酸化炭素と直接超音波処理（HPC-D）における操作温度（Temperature）と操作圧力に対するリポソーム収率（●）と平均粒子径（▲）。黒：操作圧力 6.8 MPa、薄黒：操作圧力 4 MPa で実施を指す。超音波処理は間隔（5 秒オン、10 秒オフ）を置いて合計 125 秒で実施された。リン脂質懸濁液は、25 mL の超純水に 0.03 g のリン脂質を添加して調製した。

#### 4.4.6 高圧二酸化炭素中でのリポソーム調製における高圧セル内の視覚的観察結果

Fig. 4.12 に、(a) 高圧二酸化炭素のみ（HPC）および(b) 高圧二酸化炭素と直接超音波処理（HPC-D）におけるリポソーム調製中の高圧セル内の視覚的観察の様子を示す。高圧二酸化炭素のみ（HPC、Fig. 4.12 (a)）の目視観察では、水相に気泡が生じた様子は観察されなかった。一方、高圧二酸化炭素と直接超音波処理（HPC-D、Fig. 4.12 (b)）では、高圧セル内における激しい攪拌により、水-二酸化炭素相がかき乱され、多くの気泡の生成が観察された。直接超音波処理により、水-二酸化炭素間の界面は大幅に増加し、ナノ界面を形成しており、ミクロ相分離が生じていた。二酸化炭素相から水相への W/CO<sub>2</sub> エマルションの物理的移動も超音波処理のオンオフサイクル中に発生しており、このときに一時的なリポソームの形成が起きていると考えられる。

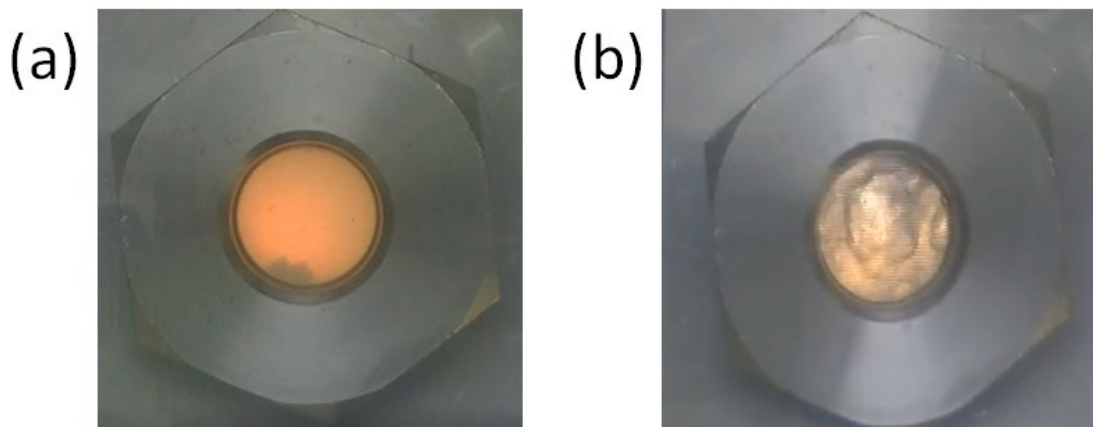


Fig. 4.12 (a) 高圧二酸化炭素のみ (HPC) および(b) 高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) におけるリポソーム調製中の高圧セル内の視覚的観察の様子。このとき、温度 25 °C、圧力 6.8 MPa であった。リン脂質懸濁液は、25 mL の超純水に 0.03 g のリン脂質を添加して調製した。

#### 4.4.7 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法におけるリポソーム生成メカニズム

Fig. 4.13 に、高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法 (HPC-D) におけるリポソーム生成メカニズムを示す。高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) におけるリポソーム生成のメカニズムは、過去に提案された超音波未処理の超臨界二酸化炭素を利用したリポソーム生成メカニズム [167,168,170,178]に類似していると考えられる。まず、(a) 高圧セル内に仕込まれた水性リン脂質懸濁液は、温度が上昇するにつれて柔軟になり、水相に分散する。次に、(b) 二酸化炭素が高圧セルに送液され、圧力が上昇すると、水相におけるリン脂質およびエマルションの分散性が向上する。リン脂質は両親媒性であるため、水-二酸化炭素界面に界面活性剤 [178]のようにリン脂質が配列する。それから、(c) 直接超音波処理により、水-二酸化炭素間にマイクロ相分離が誘起され、水-二酸化炭素界面積が増加し、ナノ界面が形成される。これにより、リン脂質が小さなマイクロエマルションとリポソームに再編成することが可能となる。さらに、(d) 超音波処理が停止すると、二酸化炭素相から水相へ W / CO<sub>2</sub> エマルションが物理的に移動することにより、W / CO<sub>2</sub> エマルションがリポソームへ再編成され、水相でリポソームが生成される。本研究での直接超音波処理は、合計超音波処理時間に達するまで、間隔 (5 秒オン、10 秒オフ) を開けて実施されていたため、オンオフサイクル中は(c)と(d)のメカニズムが連続で生じていたと思われる。一度生成したリポソームに超音波が照射されると、リポソームの脂質二重膜構造が一度破壊され、再編成されることにより、リポソーム径はより小

さくになると考えられる。最後に、(e) 高压セル内から二酸化炭素が排出され、減圧されることにより、 $\text{CO}_2/\text{W}$  エマルションがリポソームに再編成 [167]される。二酸化炭素が排出され、減圧されることにより、リポソーム内部の二酸化炭素が膨張し、リポソームが破裂し、より小さいリポソームに再編成されることがあると報告 [168]されている。高压二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) と SuperLip 法 [170]でのリポソーム形成メカニズムの違いは、SuperLip 法では重力効果により  $\text{W}/\text{CO}_2$  エマルションが水相に移動することによってリポソームが形成されるのに対し、高压二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) では、マイクロ相分離を含む水-二酸化炭素相間の高エネルギーかつ迅速な物理的混合により、直接超音波処理によるリポソーム形成が促進されることである。

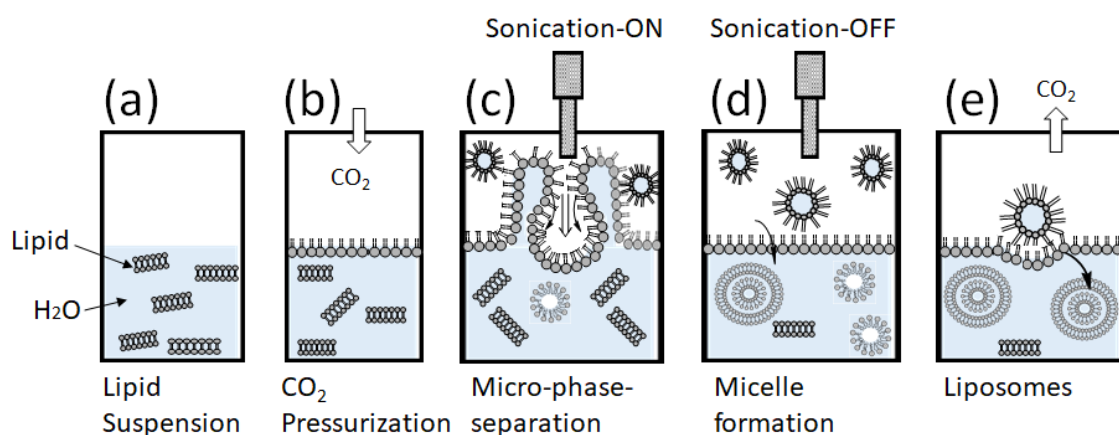


Fig. 4.13 高压二酸化炭素と直接超音波照射を併用したリポソーム調製法 (HPC-D) におけるリポソーム生成メカニズム。(a) 水性リン脂質懸濁液の状態。(b) 高压セル内に二酸化炭素を送液し、加圧された状態。分散したリン脂質は水と二酸化炭素の中間相 (界面) に移動し、極性のある頭部を水中に保ち、無極性の尾部を二酸化炭素相 [178]に向ける。(c) 高压セル内に直接超音波処理を実施した状態。超音波照射は、界面破壊、ナノ界面におけるミクロ混合およびミクロ相分離、二酸化炭素相での  $\text{W}/\text{CO}_2$  ミセルおよび水中での  $\text{CO}_2/\text{W}$  ミセルの生成を引き起こす。(d) 直接超音波処理が停止した状態。水-二酸化炭素相間のミセルの物理的移動により、単層または多重層リポソーム [167]が形成される。本研究での直接超音波処理は、合計超音波処理時間に達するまで、間隔 (5 秒オン、10 秒オフ) を開けて実施されていたため、オンオフサイクル中は(c)と(d)のメカニズムが連続で生じていたと考えられる。(e) 高压セルから二酸化炭素を排出し、減圧された状態。 $\text{CO}_2/\text{W}$  エマルションからの単層リポソームまたは多重層リポソームの再形成や、二酸化炭素相の  $\text{W}/\text{CO}_2$  エマルションの水相への移動による単層リポソームまたは多重層リポソームの形成が生じる。



#### 4.4.8 高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して調製したリポソームの薬剤負荷率およびカプセル化効率

高圧二酸化炭素と直接超音波照射を併用して調製したリポソームのシクロスポリン A の薬剤負荷率 (*DL*) とカプセル化効率 (*EE*) を評価した。高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) によって調製されたリポソームの *DL*、*EE*、平均粒子径はそれぞれ  $37.37 \% \pm 3.4 \%$ 、 $79.74 \% \pm 2.50 \%$ 、 $224 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  であった。薬物内包リポソーム径 ( $224 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ ) は、薬物内包していない同一の高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) 条件で得られたリポソーム径 ( $159 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ ) よりも増大していた。

異なる方法で調製された疎水性薬剤を内包したリポソームの *DL* および *EE* は、Karn ら [196] の超臨界二酸化炭素法 ( $DL = 20.99 \% \pm 0.84 \%$ 、 $EE = 92.20 \% \pm 1.36 \%$ ) および Bangham 法 ( $DL = 20.47 \% \pm 0.94 \%$ 、 $EE = 90.24 \% \pm 1.37 \%$ ) であると報告されている。他の方法と比較して高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) の *DL* が高いのは、超音波のオンオフサイクルによるマイクロ相分離中に、形成されたリポソームに疎水性薬剤が選択的に遷移したためであると考えられる。

#### 4.5 第 4 章の結言

第 4 章では、高圧二酸化炭素と超音波直接照射技術を併用 (高圧超音波直接処理) することにより、水-高圧二酸化炭素の気液ナノ界面を拡張することによる有機溶剤未使用かつ迅速で高収率かつ粒子径が最も小さくなるナノリポソームの調製を試みた。まず、リポソームを異なる手法 (Bangham 法、大気圧超音波直接処理法、高圧超音波未使用法、高圧超音波間接処理法、高圧超音波直接処理法) により調製することで、粒子径が最小かつ高収率となるリポソーム調製法を検討した。その結果、高圧超音波直接処理法を用いた場合、他の手法と比較して比較的高い収率 ( $71.9 \pm 6.5 \%$ ) および粒子径が最小 ( $159 \pm 2 \text{ nm}$ ) となることが明らかとなった。次に、高圧超音波間接処理または高圧超音波直接処理を用いたリポソーム調製において、異なる操作条件 (超音波照射時間: 0 秒 - 250 秒、仕込みリン脂質量: 0.04 wt% - 0.40 wt%、操作温度: 25 °C - 60 °C) の範囲にてリポソーム収率が最大かつ粒子径が最小となる系を模索した。その結果、超音波照射時間が長い (最大 250 秒) ほどリポソームの粒子径は小さく (最小  $146 \pm 8 \text{ nm}$ ) なり、仕込みリン脂質量が少ない (最少 0.04 wt%) ほどリポソームの収率が大きく (最大  $95.3 \pm 4.6 \%$ ) となることが明らかとなった。また、リポソームの収率は操作温度にも関係しており、操作温度が高い (最大 60 °C) ほどリポソーム収率が大きく ( $91.2 \pm 1.5 \%$ ) なることが明らかとなった。高圧二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) における超音波処理工程は、高圧セル内の水-二酸化炭素間のナノ界面を拡張し、マイクロ相分離を誘起することにより、リポソームが形成されることが明らかとなった。さらに、高圧超音波直接処理で疎水性薬剤であるシクロスポリン A を内包したリポソームを製造し、薬剤負荷率 (%) およびカプセル化効

率 (%) を算出し、従来 (Bangham) 法と比較することで、高圧超音波直接処理により調製したリポソームが実用化可能なものであるかを検討した。その結果、高圧超音波直接処理により調製したシクロスポリリン A 内包リポソームの薬剤負荷率 ( $DL$ ) およびカプセル化効率 ( $EE$ ) はそれぞれ  $DL = 37.37 \pm 3.4 \%$ 、 $EE = 79.74 \pm 2.50 \%$  であり、従来法と比較しても高い薬剤効率を有していると言える。これらの結果より、高圧超音波直接処理を併用したリポソーム調製法は、効率的な薬剤負荷率とカプセル化効率を有したサブミクロンからナノサイズのリポソームを高収率に、そして迅速に生成することができる方法であると言える。最後に、機能性リポソームの調製として、高圧超音波直接処理で PEG 修飾リン脂質を用いたリポソーム調製を実施した。その後、調製したリポソームを実際に貪食細胞であるマクロファージに与えることにより、マクロファージのような貪食細胞からの捕捉を回避可能なステルスリポソームが高圧超音波直接処理により調製可能かどうかを検討した。その結果、高圧超音波直接処理を併用して調製された DSPE-PEG 混合リポソームは、マクロファージのような貪食細胞からの活性を回避可能であるステルスリポソームであり、注射剤、経皮吸収剤および経口投与剤などの幅広い分野で高い有効性が期待できる。

## 第 5 章

### 結論

本章では、本研究によって得られた研究結果について論じ、本研究を総括する。

本研究の目的は、超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造において、攪拌操作に着目することにより、従来よりも粒度分布が狭く、高カプセル化効率かつ高収率な機能性マイクロ・ナノカプセル製造プロセスを開発することである。そのために本研究では、以下に示す 2 つのプロセスを実施することにより、高圧下における機械的攪拌および超音波照射が高圧容器内混合物におよぼす流動特性の比較検討を試みた。

1) 超臨界二酸化炭素のガス飽和溶液懸濁 (Particles from Gas Saturated Solutions; PGSS) 法において、高圧下での機械的攪拌における異なる形状の攪拌翼が及ぼす高圧セル内流体挙動を目視観察および数値流体力学 (Computational fluid dynamics; CFD) 技術により解析することで、従来よりも粒度分布が狭く、形態が球状であるマイクロ粒子の製造を試みた。さらに製造したマイクロカプセルの機能性の確認として、異なる pH 環境、特に腸環境における時間的薬剤徐放性を検討した。

2) 高圧二酸化炭素と超音波を複合させた技術を用いた有機溶剤未使用の新規カプセル調製法の開発のために、超音波未使用、高圧容器外からの間接超音波照射、高圧容器内に内蔵されたホーンからの直接超音波照射の様子を目視観察することにより、迅速で高収率かつ粒子径が最も小さくなるナノリポソームの調製を試みた。

第 1 章は序論であり、本論文の緒言および目的を述べた。

第 2 章は原理および理論であり、二酸化炭素の物理的および化学的特徴を述べた後、物理的手法での超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造技術を示した。物理的手法での超臨界二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造技術を、超臨界二酸化炭素を良溶媒として用いた急速膨張法、超臨界二酸化炭素を貧溶媒として用いた貧溶媒析出法、相分離や界面挙動を利用したその他の手法の大きく 3 つに分け、各手法の詳細をそれぞれ述べた。

第 3 章から第 4 章は実験を述べた。第 3 章では、ガス飽和溶液懸濁 (PGSS) 法を用いて、超臨界二酸化炭素が貧溶媒である腸溶性ポリマーの Eudragit L100 をコーティング材とした、フェニルアラニン内包マイクロカプセルの製造を試みた。まず、機械的攪拌時に、異なる形状の攪拌翼 (4 枚ピッチドパドル翼、鋸歯ディスクタービン翼) を用いて、高圧容器内の超臨界二酸化炭素溶媒中に、芯物質およびポリマー溶液滴を均一に分散させるような条件を、高圧容器内流体挙動の目視観察および数値流体力学 (CFD) による解析により検討することで、従来よりも粒度分布が狭く、形態が球状であるマイクロ粒子の製造を試みた。その結果、邪魔板 (バッフル) のない高圧攪拌槽内では、4 枚ピッチドパドル翼よりも鋸歯ディスクタービン翼の方が攪拌槽全体に流れを形成し、槽内の混合液が高分散することが明らかとさ

れた。また、攪拌翼を鋸歯ディスクタービン翼として PGSS 法を実施すると、4 枚ピッチドパドル翼よりも平均粒径が小さく、球状のマイクロカプセルが得られやすことが明らかとなった。次に、温度 50℃での、異なる圧力の二酸化炭素－エタノール混合溶液に対して、Eudragit L100 が完璧に溶解する系を目視観察により検討した。さらに、温度 50℃、異なる圧力 (8 MPa、10 MPa、12 MPa) において PGSS 法でマイクロ粒子を製造することにより、粒子形態が球状で、粒子サイズ (粒度分布) が最小となり、カプセル化効率 (%) と生産収率 (%) が最大となる操作条件を模索した。その結果、超臨界二酸化炭素－エタノール混合液中への Eudragit L100 の完全な溶解と、ガス飽和溶液の噴霧による高压容器外での Eudragit L100 の析出を組み合わせることにより、マイクロカプセル製造が可能であることが明らかとされた。マイクロカプセルの平均粒径は、予備膨張圧力を操作することにより制御可能であったが、本実験の操作範囲で高い EE のマイクロカプセルを製造するためには、温度 50℃、予備膨張圧力 10 MPa の操作条件が最適であることが明らかとなった。最後に、経口薬物送達システムとしてのマイクロカプセルの機能性を確認するために、異なる pH 条件におけるマイクロカプセルからの持続的薬物放出アッセイを実施した。その結果、*In vitro* でのフェニルアラニン放出挙動は、放出速度を低下させるだけでなく、オンデマンドの薬物放出のリアルタイム制御にも有益であることが示された。これらの結果は、このマイクロカプセル化技術により、下部腸送達を目的とした、胃消化からの保護を必要とする水溶性生物活性成分送達に対して大きな可能性を有することを示唆している。

第 4 章では、高压二酸化炭素と超音波直接照射技術を併用 (高压超音波直接処理) することにより、水－高压二酸化炭素の気液ナノ界面を拡張することによる有機溶剤未使用かつ迅速で高収率かつ粒子径が最も小さくなるナノリポソームの調製を試みた。まず、リポソームを異なる手法 (Bangham 法、大気圧超音波直接処理法、高压超音波未使用法、高压超音波間接処理法、高压超音波直接処理法) により調製することで、粒子径が最小かつ高収率となるリポソーム調製法を検討した。その結果、高压超音波直接処理法を用いた場合、他の手法と比較して比較的高い収率 ( $71.9 \pm 6.5\%$ ) および粒子径が最小 ( $159 \pm 2\text{ nm}$ ) となることが明らかとなった。次に、高压超音波間接処理または高压超音波直接処理を用いたリポソーム調製において、異なる操作条件 (超音波照射時間: 0 秒 - 250 秒、仕込みリン脂質量: 0.04 wt% - 0.40 wt%、操作温度: 25℃ - 60℃) の範囲にてリポソーム収率が最大かつ粒子径が最小となる系を模索した。その結果、超音波照射時間が長い (最大 250 秒) ほどリポソームの粒子径は小さく (最小  $146 \pm 8\text{ nm}$ ) なり、仕込みリン脂質量が少ない (最少 0.04 wt%) ほどリポソームの収率が大きく (最大  $95.3 \pm 4.6\%$ ) となることが明らかとなった。また、リポソームの収率は操作温度にも関係しており、操作温度が高い (最大 60℃) ほどリポソーム収率が大きく ( $91.2 \pm 1.5\%$ ) なることが明らかとなった。高压二酸化炭素と直接超音波処理 (HPC-D) における超音波処理工程は、高压セル内の水－二酸化炭素間のナノ界面を拡張し、ミクロ相分離を誘起することにより、リポソームが形成されることが明らかとなった。さらに、高压超音波直接処理で疎水性薬剤であるシクロスポリン A を内包したリポソーム

を製造し、薬剤負荷率 (%) およびカプセル化効率 (%) を算出し、従来 (Bangham) 法と比較することで、高圧超音波直接処理により調製したリポソームが実用化可能なものであるかを検討した。その結果、高圧超音波直接処理により調製したシクロスポリン A 内包リポソームの薬剤負荷率 ( $DL$ ) およびカプセル化効率 ( $EE$ ) はそれぞれ  $DL = 37.37 \pm 3.4 \%$ 、 $EE = 79.74 \pm 2.50 \%$  であり、従来法と比較しても高い薬剤効率を有していると言える。これらの結果より、高圧超音波直接処理を併用したリポソーム調製法は、効率的な薬剤負荷率とカプセル化効率を有したサブミクロンからナノサイズのリポソームを高収率に、そして迅速に生成することができる方法であると言える。

これらの実験結果と考察から、本研究の今後の展望を述べる。

本研究の二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造実験から、微粒子製造の際に用いる溶媒が常温常圧では低密度流体である二酸化炭素であっても、臨界点に近い高密度二酸化炭素 (液体・超臨界状態) であれば、攪拌および超音波照射の影響を強く受けることを確認した。そして本研究の目的である、従来よりも粒度分布が狭く、高カプセル化効率かつ高収率な機能性マイクロ・ナノカプセル製造プロセスの開発に成功した。

本実験では、攪拌操作を検討することで仕込み原料と高密度二酸化炭素の混合状態を操作し、次に示すような従来困難とされてきたマイクロ・ナノカプセル製造を可能とした。まず、高圧下での機械的攪拌における異なる形状の攪拌翼が及ぼす高圧セル内流体挙動を目視観察および数値流体力学 (CFD) 技術により解析することで、PGSS 法を用いた超臨界二酸化炭素が貧溶媒である腸溶性ポリマーの Eudragit L100 をコーティング材とした、フェニルアラニン内包マイクロカプセルの製造を可能とした。次に、超音波未使用、高圧容器外からの間接超音波照射、高圧容器内に内蔵されたホーンからの直接超音波照射の様子を目視観察し、比較検討することにより、高圧二酸化炭素と直接超音波の複合技術を用いた有機溶剤未使用の生体適用型ナノデバイスであるリポソームの迅速で高収率な調製プロセスの開発に成功した。以上の研究結果は、高密度二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノ粒子製造において攪拌は重要な操作因子であり、上記以外の系でのマイクロ・ナノカプセル製造においても、同様に攪拌操作を制御することにより、製造が可能になることを示唆している。

本研究の今後の展開として、高圧二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノカプセル製造の大規模・大量生産化が挙げられる。本研究の研究成果は、企業が製造した機能性物質を芯材とし、企業が目的とする機能性 (耐熱性、腸溶性、耐光性など) をさらに付与した高機能微粒子の製造に利用できると期待される。このとき、工業実用化を行うためには、装置稼働コストに対する製品生産量を向上させる必要があるため、高圧装置の容積に対する粒子生産量が重要視される。これは、二酸化炭素の使用量を抑え、二酸化炭素を回収・精製するためのコストを低下させる意味も含まれる。これらの課題は、本研究で明らかとなった新規マイクロ・ナノカプセル製造プロセスを応用し、鋸歯ディスクタービン翼を利用した機械的攪拌操作や、直接超音波照射操作を用いて、例えば二酸化炭素 - 助溶媒の混合溶液中に溶解させるコーティングポリマー量を増大させることにより解決できる可能性があり、本研究の技術が

今後の実用化研究において活用されていくことが期待される。

## 参考文献

- [1] J. Gao, Q. Yan, X. Tan, L. Lv, J. Ying, X. Zhang, M. Yang, S. Du, Q. Wei, C. Xue, H. Li, J. Yu, C.-T. Lin, W. Dai, N. Jiang, Surface Modification Using Polydopamine-Coated Liquid Metal Nanocapsules for Improving Performance of Graphene Paper-Based Thermal Interface Materials, *Nanomaterials*, 11 (2021) 1-10.
- [2] Y. Wu, R. R. Gaddam, C. Zhang, H. Lu, C. Wang, D. Golberg, X. S. Zhao, Stabilising Cobalt Sulphide Nanocapsules with Nitrogen-Doped Carbon for High-Performance Sodium-Ion Storage, *Nano-Micro Lett.*, 12 (2020) 1-12.
- [3] P. Rai, N. Gautama, H. Chandra, V. Kumar, Generation of Micro/Nano Scale Particles and Capsules by Electro hydrodynamic Atomization (EHDA) Process, *Mater. Today: Proc.*, 18 (2019) 4374-4383.
- [4] A. Moorianian, N. Zamani, M. Mikov, S. Goloc̣orbin-Kon, G. Stojanovic, F. Arfuso, B. Kovacevic, H. Al-Salami, A second-generation micro/nano capsules of an endogenous primary un-metabolised bile acid, stabilized by Eudragit-alginate complex with antioxidant compounds, *Saudi Pharm. J*, 28 (2020) 165-171.
- [5] I. L. Liakos, F. Iordache, R. Carzino, A. Scarpellini, M. Oneto, P. Bianchini, A. M. Grumezescu, A. M. Holban, Cellulose acetate - essential oil nanocapsules with antimicrobial activity for biomedical applications, *Colloids Surf. B*, 172 (2018) 471-479.
- [6] G. Fytianos, A. Rahdar, G. Z. Kyzas, Nanomaterials in Cosmetics: Recent Updates, *Nanomaterials*, 10 (2020) 1-16.
- [7] A. Hameed, G. R. Fatima, K. Malik, A. Muqadas, M. Fazal-ur-Rehman, Scope of Nanotechnology in Cosmetics: Dermatology and Skin Care Products, *J. Med. Chem. Sci*, 2 (2019) 9-16.
- [8] E. Alehosseini, S. M. Jafari, Micro/nano-encapsulated phase change materials (PCMs) as emerging materials for the food industry, *Trends Food Sci. Technol.*, 91 (2019) 116-128.
- [9] H. Saade, R. D. d. León-Gómez, M. E. Treviño, O. S. Rodríguez-Fernández, F. Soriano-Corral, J. J. Borjas, F. Castellanos, F. J. Enríquez-Medrano, J. A. Valdez, Performance of Cotton, Cotton-Polyester, and Polyester-Elastane Fabrics Impregnated with Ultrafine Polymeric Nanoparticles Loaded with Lavender Oil R. G. López, *J. Nanomater.*, (2021) 1-10.
- [10] J. Ma, W. Xu, X. Kou, Y. Niu, Y. Xia, Y. Wang, G. Tian, Y. Zhao, Q. Ke, Green Fabrication of Control-Released, Washable, and Nonadhesives Aromatic-Nanocapsules/Cotton Fabrics via Electrostatic-Adsorption/In Situ Immobilization, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 8 (2020) 15258-15267.
- [11] H. Joshi, Somdutt, P. Choudhary, S. Mundra, Future prospects of nanotechnology in agriculture, *Int. J. Chem. Stud.*, 7 (2019) 957-963.
- [12] R. Prasad, A. Bhattacharyya, Q. D. Nguyen, Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives, *Front. microbiol*, 8 (2017) 1-13.
- [13] P. Sikora, M. Chougan, K. Cuevas, M. Liebscher, V. Mechtcherine, S. H. Ghaffar, M. Liard, D.

- Lootens, P. Krivenko, M. Sanytsky, D. Stephan, The effects of nano- and micro-sized additives on 3D printable cementitious and alkali-activated composites: a review, *Appl. Nanosci.*, (2021) 1-19.
- [14] P. Zhang, S. Han, G. Golewski, X. Wang, Nanoparticle-reinforced building materials with applications in civil engineering, *J. Adv. Mech. Eng*, 12 (2020) 1-4.
- [15] Q. Shi, T. He, C. Lee, More than energy harvesting – Combining triboelectric nanogenerator and flexible electronics technology for enabling novel micro-/nano-systems, *Nano Energy*, 57 (2019) 851-871.
- [16] W. Chen, S.-y. Chang, S. Kiang, A. Marchut, O. Lyngberg, J. Wang, V. Rao, D. Desai, H. Stamato, W. Early, Modeling of Pan Coating Processes: Prediction of Tablet Content Uniformity and Determination of Critical Process Parameters, *J. Pharm. Sci.*, 99 (2010) 3213-3225.
- [17] P. Pandey, Y. Song, F. Kayihan, R. Turton, Simulation of particle movement in a pan coating device using discrete element modeling and its comparison with video-imaging experiments, *Powder Technol.*, 161 (2006) 79-88.
- [18] C. Gendre, M. Genty, M. Boiret, M. Julien, L. Meunier, O. Lecoq, M. Baron, P. Chaminade, J. M. Péan, Development of a Process Analytical Technology (PAT) for in-line monitoring of film thickness and mass of coating materials during a pan coating operation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 43 (2011) 244-250.
- [19] P. Frake, D. Greenhalgh, S. M. Grierson, J. M. Hempenstall, D. R. Rudd, Process control and end-point determination of a fluid bed granulation by application of near infra-red spectroscopy, *Int. J. Pharm.*, 151 (1997) 75-80.
- [20] J. T. Rantanen, S. J. Laine, O. K. Antikainen, J.-P. Mannermaa, O. E. Simula, J. K. Yliruusi, Visualization of fluid-bed granulation with self-organizing maps, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24 (2001) 343-352.
- [21] G. C. Steenkamp, H. W. J. P. Neomagus, H. M. Krieg, K. Keizer, Centrifugal casting of ceramic membrane tubes and the coating with chitosan, *Sep. Purif. Technol.*, 25 (2001) 407-413.
- [22] S. Han, J. Derksen, J.-H. Chun, Extrusion Spin Coating: An Efficient and Deterministic Photoresist Coating Method in Microlithography, *IEEE Trans. Semicond. Manuf.*, 17 (2004) 12-21.
- [23] K. Shimano, O. Kondo, A. Miwa, Y. Higashi, I. Koyama, T. Yoshida, Y. Ito, J. Hirose, S. Goto, Evaluation of Uniform-Sized Microcapsules Using a Vibration-Nozzle Method, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 21 (1995) 331-347.
- [24] Y. Zhang, D. Rochefort, Comparison of emulsion and vibration nozzle methods for microencapsulation of laccase and glucose oxidase by interfacial reticulation of poly(ethyleneimine), *J. Microencapsul.*, 27 (2010) 703-713.
- [25] T. Kristmundsdottir, O. S. Gudmundsson, K. Ingvarsdottir, Release of diltiazem from Eudragit microparticles prepared by spray-drying, *Int. J. Pharm.*, 137 (1996) 159-165.
- [26] S. H. Anwar, B. Kunz, The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying, *J. Food Eng.*, 105



(2011) 367-378.

- [27] C. Giroto, Barry P. Rand, Jan Genoe, P. Heremans, Exploring spray coating as a deposition technique for the fabrication of solution-processed solar cells, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 93 (2009) 454-458.
- [28] S. M. Hosseini, H. Hosseini, M. A. Mohammadifar, A. M. Mortazavian, A. Mohammadi, K. Khosravi-Darani, S. Shojaei-Aliabadi, S. Dehghan, R. Khaksar, Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process, *Int. J. Biol. Macromol.*, 32 (2013) 582-588.
- [29] T. Gomathi, P. N. Sudha, J. A. K. Florence, J. Venkatesan, S. Anil, Fabrication of letrozole formulation using chitosan nanoparticle through ionic gelation method, *Int. J. Biol. Macromol.*, 104 (2017) 1820-1832.
- [30] A. L. d. P. Neves, C. C. Milioli, L. Müller, H. G. Riella, N. C. Kuhnen, H. K. Stulzer, Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation technique, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 445 (2014) 34-39.
- [31] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, H. Ni, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids Surf. B*, 90 (2012) 21-27.
- [32] M. R. Avadi, A. M. M. Sadeghi, N. Mohammadpour, S. Abedin, F. Atyabi, R. Dinarvand, M. Rafiee-Tehrani, Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method, *Nanomed.: Nanotechnol. Biol.*, 6 (2010) 58-63.
- [33] S. Kunjachan, S. Jose, T. Lammers, Understanding the mechanism of ionic gelation for synthesis of chitosan nanoparticles using qualitative techniques, *Asian J. Pharm.*, 4 (2010) 148-153.
- [34] Ș. Racoviță, S. Vasiliu, M. Popa, C. Luca, Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems, *Rev. Roum. Chim*, 54 (2009) 709-718.
- [35] J. M. Irache, L. Bergougnoux, I. Ezpeleta, J. Gueguen, A.-M. Orecchioni, Optimization and in vitro stability of legumin nanoparticles obtained by a coacervation method, *Int. J. Pharm.*, 126 (1995) 103-109.
- [36] X.-Y. Qv, Z.-P. Zeng, J.-G. Jiang, Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability, *Food Hydrocoll.*, 25 (2011) 1596-1603.
- [37] Y.-I. Huang, Y.-H. Cheng, C.-C. Yu, T.-R. Tsai, T.-M. Cham, Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin-acacia coacervation method: A formaldehyde-free approach, *Colloids Surf. B*, 58 (2007) 290-297.
- [38] C. Dima, M. Cotârlet, P. Alexe, S. Dima, Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 22 (2014) 203-211.

- [39] J. Lazko, Y. Popineau, J. Legrand, Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method, *Colloids Surf. B*, 37 (2004) 1-8.
- [40] J. Hao, F. Wang, X. Wang, D. Zhang, Y. Bi, Y. Gao, X. Zhao, Q. Zhang, Development and optimization of baicalin-loaded solid lipid nanoparticles prepared by coacervation method using central composite design, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 47 (2012) 497-505.
- [41] J.-F. Su, Z. Huang, L. Ren, High compact melamine-formaldehyde microPCMs containing n-octadecane fabricated by a two-step coacervation method, *Colloid Polym. Sci.*, 285 (2007) 1581-1591.
- [42] X.-H. Ma, Z. Yang, Z.-K. Yao, H. Guo, Z.-L. Xu, C. Y. Tang, Interfacial Polymerization with Electrospayed Microdroplets: Toward Controllable and Ultrathin Polyamide Membranes, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 5 (2018) 117-122.
- [43] V. Marturano, P. Cerruti, M. Giamberini, B. Tylkowski, V. Ambrogi, Light-Responsive Polymer Micro- and Nano-Capsules, *Polymers*, 9 (2017) 1-19.
- [44] C. Cai, X. Ouyang, L. Zhou, G. Liu, Y. Wang, G. Zhu, J. Yao, J. Militky, M. Venkataraman, G. Zhang, Co-solvent free interfacial polycondensation and properties of polyurea PCM microcapsules with dodecanol dodecanoate as core material, *J. Sol. Energy*, 199 (2020) 721-730.
- [45] S. Beher, A. K. Suresh, Kinetics of interfacial polycondensation reactions e Development of a new method and its validation, *Polymer*, 127 (2017) 28-44.
- [46] Y. Tan, Y. Zhang, L. Kong, L. Kang, F. Ran, Nano-Au@PANI core-shell nanoparticles via in-situ polymerization as electrode for supercapacitor, *J. Alloys Compd.*, 722 (2017) 1-7.
- [47] H. Singh, D. Kumar, H. Singh, Development of magnesium-based hybrid metal matrix composite through in situ micro, nano reinforcements, *J. Compos. Mater.*, 55 (2020) 109-123.
- [48] 岸本琢治, 懸濁重合法カプセルトナー, *日本画像学会誌*, 43 (2004) 33-39.
- [49] H. J. Imran, K. A. Hubeatir, K. A. Aadim, D. S. Abd, Preparation Methods and Classification Study of Nanomaterial: A Review, *J. Phys. Conf. Ser.*, (2021) 1-9.
- [50] 三島健司, 松山清, 古川敦史, 藤井卓, 志田純, 野尻尚材, 久保英明, 片田直樹, 超臨界二酸化炭素のコソルベンシーを利用した無機微粒子マイクロカプセルに対するポリマーコーティング厚みの制御, *化学工学論文集*, 27 (2001) 700-706.
- [51] K. Mishima, Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60 (2008) 411-432.
- [52] 三島健司, 松山清, 超臨界流体を用いた表面コーティング技術, *表面技術*, 56 (2005) 86-91.
- [53] Y. Miyazaki, H. Sugihara, A. Nishiura, K. Kadot, Y. Tozuka, H. Takeuchi, Application of combinational supercritical CO<sub>2</sub> techniques to the preparation of inhalable particles, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 36 (2016) 1-9.
- [54] E. K. Silva, M. A. A. Meireles, Encapsulation of Food Compounds Using Supercritical Technologies: Applications of Supercritical Carbon Dioxide as an Antisolvent, *Public Health Nutr.*, 4

(2014) 247-258.

[55] K. Chen, X. Zhang, J. P. T. W. Zhang, W. Yin, Gas antisolvent precipitation of Ginkgo ginkgolides with supercritical CO<sub>2</sub>, *Powder Technol.*, 152 (2005) 127-132.

[56] P. M. Gallagher, M. P. Coffey, V. J. Krukonis, N. Klasutis, Gas antisolvent recrystallization: new process to recrystallize compounds insoluble in supercritical fluids, *Supercrit. Fluid Sci. Technol.*, 406 (1989) 334-354.

[57] P. Subra, P. Berroy, A. Vega, C. Domingo, Process performances and characteristics of powders produced using supercritical CO<sub>2</sub> as solvent and antisolvent, *Powder Technol.*, 142 (2004) 13-22.

[58] E. Franceschi, A. M. D. Cesaro, S. R. S. Ferreira, J. V. Oliveira, Precipitation of  $\beta$ -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Food Eng.*, 95 (2009) 656-663.

[59] S. Palakodaty, P. York, J. Pritchard, Supercritical fluid processing of materials from aqueous solutions: the application of SEDS to lactose as a model substance, *Pharm. Res.*, 15 (1998) 1835-1843.

[60] A. D. Edwards, B. Y. Shekunov, A. Kordikowski, R. T. Forbes, P. York, Crystallization of Pure Anhydrous Polymorphs of Carbamazepine by Solution Enhanced Dispersion with Supercritical Fluids (SEDS), *J. Pharm. Sci.*, 90 (2001) 1115-1124.

[61] F. S. Mandel, J. D. Wang, Manufacturing of specialty materials in supercritical fluid carbon dioxide, *Inorganica Chim. Acta*, 294 (1999) 214-223.

[62] V. Aredo, G. M. Bittencourt, E. M. d. J. A. Pallone, F. E. C. Guimarães, A. L. d. Oliveira, Formation of edible oil-loaded beeswax microparticles using PGSS –Particles from Gas-Saturated Solutions, *J. Supercrit. Fluids.*, 169 (2021) 1-9.

[63] E. Weidner, Z. Knez, Z. Novak, PGSS (particles from gas saturated solutions): a new process for powder generation, 3rd international symposium on supercritical fluids, (1994) 229-234.

[64] S. K. Luther, A. Braeuer, High-pressure microfluidics for the investigation into multi-phase systems using the supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE), *J. Supercrit. Fluids.*, 65 (2012) 78-86.

[65] A. L. Ajiboye, V. Trivedi, J. C. Mitchell, Preparation of polycaprolactone nanoparticles via supercritical carbon dioxide extraction of emulsions, *Drug Deliv. and Transl. Res.*, 8 (2018) 1790-1796.

[66] P. Chattopadhyay, B. Y. Shekunov, J. S. Seitzinger, R. W. Huff, Particles from supercritical fluid extraction of emulsion, US Patent, (2004) 0026319 A0026311.

[67] M. T. M. S. Gomes, D. T. Santos, M. A. A. Meireles, Trends in Particle Formation of Bioactive Compounds Using Supercritical Fluids and Nanoemulsions, *Food and Public Health*, 2 (2012) 142-152.

[68] K. Matsuyama, K. Mishima, Coacervation Microencapsulation of Talc Particles with Poly(methyl methacrylate) by Pressure-Induced Phase Separation of CO<sub>2</sub>-Expanded Ethanol Solutions, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 46 (2007) 6244-6250.

- [69] S. M. Haftcheshmeh, M. R. Jaafari, M. Mashreghi, A. Mehrabian, S. H. Alavizadeh, P. Zamani, J. Zarqi, M. H. Darvishi, F. Gheybi, Liposomal doxorubicin targeting mitochondria: A novel formulation to enhance anti-tumor effects of Doxil® in vitro and in vivo, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 62 (2021) 1-13.
- [70] Y. Schilt, T. Berman, X. Wei, E. Nativ-Roth, Y. Barenholz, U. Raviv, Effect of the ammonium salt anion on the structure of doxorubicin complex and PEGylated liposomal doxorubicin nanodrugs, *BBA - General Subjects*, 1865 (2021) 1-11.
- [71] A. D. Bangham, R. W. Horne, Negative Staining of Phospholipids and their Structural Modification by Surface-active Agents as observed in the Electron Microscope, *J. Mol. Biol.*, 8 (1964) 660-668.
- [72] M. L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential, *Int. J. Nanomedicine*, 1 (2006) 297-315.
- [73] T. M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, A. Yau-Young, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo, *BBA*, 1066 (1991) 29-36.
- [74] X. X. Zhang, Y. F. Fana, X. M. Tao, K. L. Yick, Fabrication and properties of microcapsules and nanocapsules containing n-octadecane, *Mater. Chem. Phys.*, 88 (2004) 300-307.
- [75] D. J. Morris, Cleaning of diamond nanoindentation probes with oxygen plasma and carbon dioxide snow, *Rev. Sci. Instrum.*, 80 (2009) 1-3.
- [76] B. Diaz-Reinoso, A. Moure, H. Dominguez, J. C. Parajo, Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity, *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 2441-2469.
- [77] E. Reverchon, C. Marrone, Modeling and simulation of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of vegetable oils, *J. Supercrit. Fluids.*, 19 (2001) 161-175.
- [78] M. R. D. Giorgi, E. Cadoni, D. Maricca, A. Piras, Dyeing polyester fibres with disperse dyes in supercritical CO<sub>2</sub>, *Dyes Pigm.*, 45 (2000) 75-79.
- [79] N. I. Di Li, S. Shimazu, T. Uematsu, Hydrogenation of CO<sub>2</sub> over sprayed Ru/TiO<sub>2</sub> core particles and strong metal-support interaction, *Appl. Catal. A: Gen.*, 180 (1999) 227-235.
- [80] K. Matsuyama, K. Mishima, Preparation of poly(methyl methacrylate)-TiO<sub>2</sub> nanoparticle composites by pseudo-dispersion polymerization of methyl methacrylate in supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Supercrit. Fluids*, 49 (2009) 256-264.
- [81] H.-J. Song, M.-G. Lee, H. Kim, A. Gaur, J.-W. Park, Density, Viscosity, Heat Capacity, Surface Tension, and Solubility of CO<sub>2</sub> in Aqueous Solutions of Potassium Serinate, *J. Chem. Eng. Data*, 56 (2011) 1371-1377.
- [82] P. R. Sassiati, P. Mourier, M. H. Caude, R. H. Rosset, Measurement of diffusion coefficients in supercritical carbon dioxide and correlation with the equation of Wilke and Chang, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1164-1170.

- [83] 佐古猛, 岡島いずみ, 超臨界流体のはなし, 日刊工業新聞社, (2001) 14-18.
- [84] 佐古猛, 超臨界流体, アグネ承風社, (2001) 123-126.
- [85] S. J. Risch, Encapsulation: Overview of Uses and Techniques, *J. Am. Chem. Soc.*, (1995) 1-6.
- [86] A. Poshadri, A. Kuna, Microencapsulation technology: A REVIEW, *J. Res. ANGRAU*, 38 (2010) 86-102.
- [87] C. Pando, A. Cabanas, I. A. Cuadra, Preparation of pharmaceutical co-crystals through sustainable processes using supercritical carbon dioxide: a review, *RSC Adv.*, 6 (2016) 1-17.
- [88] J. B. Hannay, J. Hogarth, On the Solubility of Solids in Gases, *Proc. Roy. Soc. London*, 29 (1879) 234.
- [89] V. J. Krukonis, M. A. McHugh, A. J. Seckner, Xenon as a supercritical solvent, *J. Phys. Chem.*, 88 (1984) 2687-2689.
- [90] D. W. Matson, R. C. Petersen, R. D. Smith, Production of powders and films by the rapid expansion of supercritical solutions, *J. Mater. Sci.*, 22 (1987) 1919-1928.
- [91] T. J. Young, S. Mawson, K. P. Johnston, Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution to Produce Submicron Suspensions of Water-Insoluble Drugs, *Biotechnol. Prog.*, 16 (2000) 402-407.
- [92] R. E. Sievers, E. T. S. Huang, J. A. Villa, G. Engling, P. R. Brauer, Micronization of water-soluble or alcohol-soluble pharmaceuticals and model compounds with a lowtemperature Bubble Dryer, *J. Supercrit. Fluids*, 26 (2003) 9-16.
- [93] O. R. Davies, A. L. Lewis, M. J. Whitaker, H. Tai, K. M. Shakesheff, S. M. Howdle, Applications of supercritical CO<sub>2</sub> in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60 (2008) 373-387.
- [94] 綿野哲, 超臨界二酸化炭素を利用した吸入用ナノ粒子設計, *Drug Delivery System*, 24 (2009) 492-498.
- [95] 山邊麻衣子, 内田博久, 松岡正邦, 超臨界晶析技術の医薬品製造への応用, 高圧力の科学と技術, 12 (2002) 331-336.
- [96] 松山清, 三島健司, 高圧二酸化炭素を用いたマイクロ・ナノ粒子の表面改質, 高圧力 m 科学 g 技術, 20 (2010) 50-56.
- [97] S. Tokunaga, H. Tashiro, K. Ono, T. Sharmin, T. Kato, K. Irie, K. Mishima, T. Satho, T. M. Aida, K. Mishima, Rapid production of liposomes using high pressure carbon dioxide and direct ultrasonication, *J. Supercrit. Fluids*, 160 (2020) 1-7.
- [98] S. H. Yuk, S. H. Cho, H. B. Lee, pH-sensitive drug-delivery system using O/W Emulsion, *J. Control. Release*, 37 (1995) 69-74.
- [99] M. Z. I. Khan, Z. Prebeg, N. Kurjakovic, A pH-dependent colon targeted oral drug delivery system using methacrylic acid copolymers I. Manipulation of drug release using Eudragit L100-55 and Eudragit S100 combinations, *J. Control. Release*, 58 (1999) 215-222.
- [100] J. Dai, T. Nagai, X. Wang, T. Zhang, M. Menga, Q. Zhang, pH-sensitive nanoparticles for

- improving the oral bioavailability of cyclosporine A, *Int. J. Pharm.*, 280 (2004) 229-240.
- [101] S. Y. Lin, Y. L. Tzan, C. J. Lee, C. N. Weng, Preparation of enteric-coated microspheres of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with cellulose acetate phthalate: I. Formation condition and micromeritic properties, *J. Microencapsul.*, 8 (1991) 317-325.
- [102] P. Dong, F. F. Sahle, S. B. Lohan, S. Saeidpour, S. Albrecht, C. Teutloff, R. Bodmeier, M. Unbehauen, C. Wolff, R. Haag, J. Lademann, A. Patzelt, M. Schäfer-Korting, M. C. Meinke, pH-sensitive Eudragit® L 100 nanoparticles promote cutaneous penetration and drug release on the skin, *J. Control. Release*, 295 (2019) 214-222.
- [103] M. Sharma, R. Sharma, Implications of designing a bromelain loaded enteric nanoformulation on its stability and antiinflammatory potential upon oral administration, *R. Soc. Chem.*, 8 (2018) 2541-2551.
- [104] M. Sharma, V. Sharma, A. K. Panda, D. K. Majumdar, Development of enteric submicron particle formulation of papain for oral delivery, *Int. J. Nanomedicine*, 6 (2011) 2097-2111.
- [105] I. A. Cuadra, A. Cabañas, J. A. R. Cheda, M. Türk, C. Pando, Cocrystallization of the anticancer drug 5-fluorouracil and coformers urea, thiourea or pyrazinamide using supercritical CO<sub>2</sub> as an antisolvent (SAS) and as a solvent (CSS), *J. Supercrit. Fluids*, 160 (2020) 1-12.
- [106] I. Garay, A. Pocheville, L. Madariaga, Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation, *Powder Technol.*, 197 (2010) 211-217.
- [107] Á. Arango-Ruiza, Á. Martínb, M. J. Coserob, C. Jiménez, J. Londoñoc, Encapsulation of curcumin using supercritical antisolvent (SAS) technology to improve its stability and solubility in water, *Food Chem.*, 258 (2018) 156-163.
- [108] A. Montesa, M. D. Gordilloa, C. Pereyra, D. M. D. I. Santosb, E. J. M. d. I. Ossa, Ibuprofen–polymer precipitation using supercritical CO<sub>2</sub> at low temperature, *J. Supercrit. Fluids*, 94 (2014) 91-101.
- [109] K. Mishima, K. Matsuyama, D. Tanabe, S. Yamauchi, Microencapsulation of proteins by rapid expansion of supercritical solution with a nonsolvent, *AIChE J.*, 46 (2000) 857-865.
- [110] J. Liu, P. J. Stewart, Deaggregation during the dissolution of benzodiazepines in interactive mixtures, *J. Pharm. Sci.*, 87 (1998) 1632-1638.
- [111] B. Alway, R. Sangchantra, P. J. Stewart, Modelling the dissolution of diazepam in lactose interactive mixtures, *Int. J. Pharm.*, 130 (1996) 213-224.
- [112] P. J. Stewart, F.-Y. Zhao, Understanding agglomeration of indomethacin during the dissolution of micronised indomethacin mixtures through dissolution and de-agglomeration modeling approaches, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59 (2005) 315-323.
- [113] F.-Y. Zhao, P. J. Stewart, Modeling the deagglomeration of micronized benzodiazepines from powder mixtures added to dissolution media, *J. Pharm. Sci.*, 93 (2004) 1618-1627.
- [114] K. Kale, K. Hapgood, P. Stewart, Drug agglomeration and dissolution – What is the influence

of powder mixing?, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72 (2009) 156-164.

[115] J. Kerc, S. Srcic, Z. Knez, P. Sencar-Bozic, Micronization of drugs using supercritical carbon dioxide, *Int. J. Pharm.*, 182 (1999) 33-39.

[116] M. Rodrigues, N. Peiriço, H. Matos, E. G. d. Azevedo, M. R. Lobato, A. J. Almeida, Microcomposites theophylline/hydrogenated palm oil from a PGSS process for controlled drug delivery systems, *J. of Supercritical Fluids*, 29 (2004) 175-184.

[117] S. Varona, S. Kareth, Á. Martín, M. J. Coceroa, Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture, *J. Supercrit. Fluids*, 54 (2010) 369-377.

[118] M. Vijayaraghavan, S. Stolnik, S. M. Howdle, L. Illum, Suitability of polymer materials for production of pulmonary microparticles using a PGSS supercritical fluid technique: Preparation of microparticles using PEG, fatty acids and physical or chemicals blends of PEG and fatty acids, *Int. J. Pharm.*, 441 (2013) 580-588.

[119] C. A. García-González, A. Argemí, A. R. S. d. Sousa, C. M. M. Duarte, J. Saurina, C. Domingo, Encapsulation efficiency of solid lipid hybrid particles prepared using the PGSS® technique and loaded with different polarity active agents, *J. Supercrit. Fluids*, 54 (2010) 342-347.

[120] S. Zhan, L. Cui, Q. Zhao, J. Wang, S. Chen, S. Ding, Formation of PLLA-PEG-PLLA microparticles by supercritical antisolvent process, *Particul. Sci. Technol.*, 32 (2014) 61-69.

[121] D. R. Perinelli, G. Bonacucina, M. Cespi, A. Naylor, M. Whitaker, G. F. Palmieri, G. Giorgioni, L. Casettari, Evaluation of P(L)LA-PEG-P(L)LA as processing aid for biodegradable particles from gas saturated solutions (PGSS) process, *Int. J. Pharm.*, 468 (2014) 250-257.

[122] A. Sonje, A. Chandra, Comprehensive review on Eudragit polymers, *Int. Res. J. Pharm*, 4 (2013) 71-74.

[123] 宮本公人, 新規医薬品添加剤と最近の動き, *薬剤学*, 65 (2005) 98-105.

[124] R. I. Moustafine, E. B. Margulis, L. F. Sibgatullina, V. A. Kemenova, G. V. d. Mooter, Comparative evaluation of interpolyelectrolyte complexes of chitosan with Eudragit L100 and Eudragit L100-55 as potential carriers for oral controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70 (2008) 215-225.

[125] J. Breitzkreutz, T. G. Gan, B. Schneider, P. Kalisch, Enteric-coated solid dosage forms containing sodium bicarbonate as a drug substance: an exception from the rule?, *J. Pharm. Pharmacol.*, 59 (2007).

[126] M. D. Arco, A. Fernandez, C. Martin, V. Rives, Solubility and release of fenbufen intercalated in Mg, Al and Mg, Al, Fe layered double hydroxides (LDH): The effect of Eudragits S 100 covering, *J. Solid State Chem.*, 183 (2010) 3002-3009.

[127] M. Kanamala, W. R. Wilson, M. Yang, B. D. Palmer, Z. Wu, Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review, *Biomaterials*, 85 (2016) 152-167.

[128] R. I. Moustafine, T. V. Kabanova, V. A. Kemenova, G. V. d. Mooter, Characteristics of

- interpolyelectrolyte complexes of Eudragit E100 with Eudragit L100, *J. Control. Release*, 103 (2005) 191-198.
- [129] J. Wei, X.-J. Ju, R. Xie, C.-L. Mou, X. Lin, L.-Y. Chu, Novel cationic pH-responsive poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) microcapsules prepared by a microfluidic technique, *J. Colloid Interface Sci.*, 357 (2011) 101-108.
- [130] R. A. Ghotli, A. A. A. Raman, S. Ibrahim, S. Baroutian, Liquid-Liquid Mixing in Stirred Vessels: A Review, *Chem. Eng. Comm.*, 200 (2013) 1-33.
- [131] P. Prajapati, F. Ein-Mozaffari, CFD Investigation of the Mixing of Yield-Pseudoplastic Fluids with Anchor Impellers, *Chem. Eng. Technol.*, 32 (2009) 1211-1218.
- [132] H. Ameer, Y. Kamla, D. Sahel, Performance of Helical Ribbon and Screw Impellers for Mixing Viscous Fluids in Cylindrical Reactors, *ChemE.*, 2 (2018) 1-9.
- [133] Y. Kato, Y. Tada, Y. Takeda, Y. Hirai, Y. Nagatsu, Correlation of Power Consumption for Propeller and Pfaudler Type Impellers, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 42 (2009) 6-9.
- [134] S. M. Shekhar, S. Jayanti, CFD study of power and mixing time for paddle mixing in unbaffled vessels, *Trans IChemE*, 80 (2002) 482-198.
- [135] R. A. Ghotli, M. S. Shafeeyan, M. R. Abbasi, A. A. A. Ramand, S. Ibrahim, Macromixing study for various designs of impellers in a stirred vessel, *Chem. Eng. Process.*, 148 (2020) 1-15.
- [136] H. Unadkat, C. D. Rielly, Z. K. Nagy, PIV study of the flow field generated by a sawtooth impeller, *Chem. Eng. Sci.*, 66 (2011) 5374-5387.
- [137] T. Xia, H. Dong, L. Yang, S. Liu, Z. Jin, Investigation on flow structure and aerodynamic characteristics over an airfoil at low Reynolds number—A review, *AIP Adv.*, 11 (2021) 1-14.
- [138] F.-H. Huang, M.-H. LI, L. L. LEE, K. E. STARLING, F. T. H. CHUN, An accurate equation of state for carbon dioxide, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 18 (1985) 490-496.
- [139] C. Wang, C. He, Z. Tong, X. Liu, B. Ren, F. Zeng, Combination of adsorption by porous CaCO<sub>3</sub> microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 308 (2006) 160-167.
- [140] M. Abebe, N. Hedin, Z. Bacsik, Spherical and porous particles of calcium carbonate synthesized with food friendly polymer additives, *Cryst. Growth Des.*, 15 (2015) 3609-3616.
- [141] J.-F. Chen, H.-M. Ding, J.-X. Wang, L. Shao, Preparation and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug deliveryapplication, *Biomaterials*, 25 (2004) 723-727.
- [142] V. Jayawarna, A. Smith, J. E. Gough, R. V. Ulijn, Three-dimensional cell culture of chondrocytes on modified di-phenylalanine scaffolds, *Biochem. Soc. Trans.*, 35 (2007) 535-537.
- [143] L. Adler-Abramovich, E. Gazit, The physical properties of supramolecular peptide assemblies: from building block association to technological applications, *Chem. Soc. Rev.*, 43 (2014) 6881-6893.
- [144] P. Tamamis, L. Adler-Abramovich, M. Reches, K. Marshall, P. Sikorski, L. Serpell, E. Gazit, G. Archontis, Self-Assembly of Phenylalanine Oligopeptides: Insights from Experiments and



Simulations, *Biophys. J.*, 96 (2009) 5020-5029.

[145] F. J. v. Spronsen, M. J. d. Groot, M. Hoeksma, D.-J. Reijngoud, M. v. Rijn, Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice, *J. Inherit. Metab.*, 33 (2010) 671-676.

[146] J. J. Mitchell, Y. J. Trakadis, C. R. Scriver, Phenylalanine hydroxylase deficiency, *Genet. Med.*, 13 (2011) 697-707.

[147] M. Norton, Y. Cao, R. Amarsi, I. F. Freitas, A. Alamshah, K. G. Murphy, Rectal and oral administration of L-Phenylalanine suppresses food intake and modulates neuronal activation in appetite-regulating brain regions in rodents, *Endocrinology*, 50 (2017) 321.

[148] H. Mokrane, H. Amoura, N. Belhaneche-Bensemra, C. M. Courtin, J. A. Delcour, B. Nadjemi, Assessment of Algerian sorghum protein quality [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using amino acid analysis and in vitro pepsin digestibility, *Food Chem.*, 121 (2010) 719-723.

[149] S.-B. Wang, A.-Z. Chen, L.-J. Weng, M.-Y. Chen, X.-L. Xie, Effect of drug-loading methods on drug Load, encapsulation efficiency and release properties of alginate/poly-L-arginine/chitosan ternary complex microcapsules, *Macromol. Biosci.*, 4 (2004) 27-30.

[150] J. M. Nadal, M. L. S. Gomes, D. M. Borsato, M. A. Almeida, F. M. Barboza, S. F. Zawadzki, C. C. Kanunfre, P. V. Farago, S. M. W. Zanin, Spray-dried Eudragit® L100 microparticles containing ferulic acid: Formulation, in vitro cytoprotection and in vivo anti-platelet effect, *Mater. Sci. Eng. C*, 64 (2016) 318-328.

[151] A. Nazari, A. Z. Derakhshi, A. Nazari, B. Firoozabadi, Drop formation from a capillary tube: Comparison of different bulk fluid on Newtonian drops and formation of Newtonian and non-Newtonian drops in air using image processing, *Int. J. Heat Mass Transf.*, 124 (2018) 912-919.

[152] W.-T. Wu, M. Massoudi, Recent Advances in Mechanics of Non-Newtonian Fluids, *Fluids*, 5 (2020) 1-4.

[153] R. Guadarrama-Perez, V. E. Marquez-Banos, A. D. D. L. Concha-Gomez, J. J. Valencia-Lopez, A. Vengoechea-Pimienta, G. M. d. Jesus, J. Ramirez-Munoz, Hydrodynamic Performance of a Ring-Style High-Shear Impeller in Newtonian and Shear-Thinning Fluids, *Chem. Eng. Technol.*, 43 (2020) 2325-2335.

[154] D. W. Jennings, R.-J. Lee, A. S. Teja, Vapor-liquid equilibria in the carbon dioxide + ethanol and carbon dioxide + 1-butanol systems, *J. Chem. Eng. Data*, 36 (1991) 303.

[155] R. Couto, V. Alvarez, F. Temelli, Encapsulation of Vitamin B2 in solid lipid nanoparticles using supercritical CO<sub>2</sub>

*J. Supercrit. Fluids*, 120 (2017) 432-442.

[156] 熊井浩一郎, 多田隼卓史, 保田立二, リポソームを担体とした DDS による癌治療, *Drug Delivery System*, 6 (1991) 415-421.

[157] A. Sharma, U. S. Sharma, Liposomes in drug delivery: progress and limitations, *Int. J. Pharm.*, 154 (1997) 123-140.

- [158] Y. Malam, M. Loizidou, A. M. Seifalian, Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends Pharmacol. Sci.*, 30 (2009) 592-599.
- [159] A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 238-252.
- [160] S. Batzri, E. D. Korn, Single bilayer liposomes prepared without sonication, *BBA*, 298 (1973) 1015-1019.
- [161] D. Deamer, A. D. Bangham, Large volume liposomes by an ether vaporization method, *BBA*, 443 (1976) 629-634.
- [162] J. Francis Szoka, D. Papahadjopoulos, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 (1978) 4194-4198.
- [163] T. T. Ngo, D. Bush, C. A. Eckert, C. L. Liotta, Spectroscopic Measurement of Solid Solubility in Supercritical Fluids, *AIChE Journal*, 47 (2001) 2566-2572.
- [164] M. Li, C. Du, N. Guo, Y. Teng, X. Meng, H. Sun, S. Li, P. Yu, H. Galons, Composition design and medical application of liposomes, *Eur. J. Med. Chem.*, 164 (2019) 640-653.
- [165] K. Otake, T. Imura, H. Sakai, M. Abe, Development of a New Preparation Method of Liposomes Using Supercritical Carbon Dioxide, *Langmuir*, 17 (2001) 3898-3901.
- [166] P. Trucillo, R. Campardelli, M. Scognamiglio, E. Reverchon, Control of liposomes diameter at micrometric and nanometric level using a supercritical assisted technique, *J. CO2 Util.*, 32 (2019) 119-127.
- [167] T. Imura, K. Otake, S. Hashimoto, T. Gotoh, M. Yuasa, S. Yokoyama, H. Sakai, J. F. Rathman, M. Abe, Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 27 (2002) 133-140.
- [168] K. Otake, T. Shimomura, T. Goto, T. Imura, T. Furuya, S. Yoda, Y. Takebayashi, H. Sakai, M. Abe, One-Step Preparation of Chitosan-Coated Cationic Liposomes by an Improved Supercritical Reverse-Phase Evaporation Method, *Langmuir*, 22 (2006) 4054-4059.
- [169] L. Lesoin, C. Crampon, O. Boutin, E. Badens, Development of a continuous dense gas process for the production of liposomes, *J. Supercrit. Fluids*, 60 (2011) 51-62.
- [170] I. E. Santo, R. Campardelli, E. C. Albuquerque, S. V. d. Melo, G. D. Porta, E. Reverchon, Liposomes preparation using a supercritical fluid assisted continuous process, *Chem. Eng. J.*, 249 (2014) 153-159.
- [171] P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon, Supercritical CO2 assisted liposomes formation: Optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading, *J. CO2 Util.*, 18 (2017) 181-188.
- [172] P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon, Production of liposomes loaded with antioxidants using a supercritical CO2 assisted process, *Powder Technol.*, 323 (2018) 155-162.

- [173] R. Campardelli, P. Trucillo, E. Reverchon, Supercritical assisted process for the efficient production of liposomes containing antibiotics for ocular delivery, *J. CO<sub>2</sub> Util.*, 25 (2018) 235-241.
- [174] R. Campardelli, P. Trucillo, E. Reverchon, A Supercritical Fluid-Based Process for the Production of Fluorescein-Loaded Liposomes, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 55 (2016) 5359-5365.
- [175] P. Trucillo, R. Campardelli, B. Aliakbarian, P. Perego, E. Reverchon, Supercritical assisted process for the encapsulation of olive pomace extract into liposomes, *J. Supercrit. Fluids*, 135 (2018) 152-159.
- [176] P. Trucillo, R. Campardelli, Production of solid lipid nanoparticles with a supercritical fluid assisted process, *J. Supercrit. Fluids*, 143 (2019) 16-23.
- [177] L. Zhao, F. Temelli, Preparation of liposomes using a modified supercritical process via depressurization of liquid phase, *J. Supercrit. Fluids*, 100 (2015) 110-120.
- [178] H. Nakamura, S. Taguchi, K. Suga, K. Hayashi, H.-S. Jung, H. Umakoshi, Characterization of the physicochemical properties of phospholipid vesicles prepared in CO<sub>2</sub>/water systems at high pressure, *Biointerphases*, 10 (2015) 1-6.
- [179] J. J. John, S. Kuhn, L. Braeken, T. V. Gerven, Ultrasound assisted liquid–liquid extraction in microchannels—A direct contact method, *Chem. Eng. Process.*, 102 (2016) 37-46.
- [180] R.-S. Juang, K.-H. Lin, Ultrasound-assisted production of W/O emulsions in liquid surfactant membrane processes, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 238 (2004) 43-49.
- [181] C. Uemori, T. Katsube, S. Machmudah, Wahyudiono, H. Kaneda, K. Yasuda, M. Goto, Production of liposome from sphingomyelin by ultrasonic device under supercritical carbon dioxide, *Asian J. Appl. Sci.*, 5 (2017) 1042-4048.
- [182] S. Vemuri, C. T. Rhodes, Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review, *Pharm. Acta Helv.*, 70 (1995) 95-111.
- [183] M. Sherry, C. Charcosset, H. Fessi, H. Greige-Gerges, Essential oils encapsulated in liposomes: a review, *J. Liposome Res.*, (2013) 1-8.
- [184] D. A. Balazs, W. Godbey, Liposomes for Use in Gene Delivery, *J. Drug Deliv.*, (2011) 1-12.
- [185] C. R. Dass, W. Jessup, Apolipoprotein A-I, Cyclodextrins and Liposomes as Potential Drugs for the Reversal of Atherosclerosis. A Review, *J. Pharm. Pharmacol.*, 52 (2000) 731-761.
- [186] Y. Fishman, N. Citri, L-asparaginase entrapped in liposomes: Preparation and properties, *FEBS Letters*, 60 (1975) 17-20.
- [187] 菊池寛, 井上圭三, リポソーム 基礎と応用, *油化学*, 34 (1985) 784-798.
- [188] J. S. Dua, P. A. C. Rana, D. A. K. Bhandari, Liposome: Methods of preparation and applications, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, (2012) 14-20.
- [189] H. Kawamura, K. Mishima, T. Sharmin, S. Ito, R. Kawakami, T. Kato, M. Misumi, T. Suetsugu, H. Orii, H. Kawano, K. Irie, K. Sano, K. Mishima, T. Harada, S. Mustofa, F. Hasanah, Y. D. I. Siregar, H. Zahroh, L. S. E. Putri, A. Salim, Ultrasonically enhanced extraction of luteolin and apigenin from

the leaves of *Perilla frutescens* (L.) Britt. using liquid carbon dioxide and ethanol, *Ultrason. Sonochemistry*, 29 (2016) 19-26.

[190] B. Du, Y. Li, X. Li, Y. A. C. Chen, Z. Zhang, Preparation, characterization and in vivo evaluation of 2-methoxyestradiol-loaded liposomes, *Int. J. Pharm.*, 384 (2010) 140-147.

[191] R. Silva, H. Ferreira, C. Little, A. Cavaco-Paulo, Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation, *Ultrason. Sonochemistry*, 17 (2010) 628-632.

[192] L. Lesoin, O. Boutin, C. Crampon, E. Badens, CO<sub>2</sub>/water/surfactant ternary systems and liposome formation using supercritical CO<sub>2</sub>: A review, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 377 (2011) 1-14.

[193] T. Yamaguchi, M. Nomura, T. Matsuoka, S. Koda, Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome, *Chem. Phys. Lipids*, 160 (2009) 58-62.

[194] S. Zhao, Z. Dong, C. Yao, Z. Wen, G. Chen, Q. Yuan, Liquid–Liquid Two-Phase Flow in Ultrasonic Microreactors: Cavitation, Emulsification, and Mass Transfer Enhancement, *AIChE Journal*, 64 (2018) 1412-1423.

[195] L. Lesoin, C. Crampon, O. Boutin, E. Badens, Preparation of liposomes using the supercritical anti-solvent (SAS) process and comparison with a conventional method, *J. Supercrit. Fluids*, 57 (2011) 162-174.

[196] P. R. Karn, W. Cho, H. J. Park, J. S. Park, S. J. Hwang, Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method, *Int. J. Nanomed. Nanosurg.*, 8 (2013) 365-377.

## APPENDIX

数値流体力学（CFD）を用いた攪拌槽内および攪拌翼周辺の流体挙動解析法

この章では、攪拌槽内および攪拌翼周辺の流体挙動について、数値流体力学

（Computational fluid dynamics; CFD）を用いた解析手順について記す。大まかな解析手順としては、①CAD で固体部分（攪拌翼、バッフルなど）の作成→②CAD で流体部分の作成（攪拌翼周りの流体部分とそれ以外の流体部分を別に作成）→③CAD で流体部分から固体部分を切り取る→④CAD で攪拌翼周りの流体部分とそれ以外の流体部分を切り分ける→（Workbench にて CFD）→⑤メッシュにて固体領域と流体領域の分割の後にメッシュ生成→⑥Fluent で流体解析、となる。ソフトは、CAD（Computer-aided design）に関しては、Autodesk Inventor Professional を使用し、Fluent に関しては、ANSYS Workbench を使用した。

※Workbench は毎年新しいバージョンの再インストールが必要となる。

※名前の入力、基本的には半角英数字のスペースなしとする。

### 1. 流体領域と固体領域の作成・分割

流体領域と固体領域の作成・分割は全て CAD を用いて行う。まず、攪拌翼およびシャフト部分のような攪拌槽内における固体部分を Fig. 1 (a)のように作成する。このとき、攪拌槽の壁面の作成をする必要はない。次に、攪拌槽に入れる流体と同体積の流体部分を作成する。今回の系では、攪拌槽内全体に高密度二酸化炭素が充填するので、流体部分は Fig. 1 (b)のように攪拌槽体積と同様の円柱状として作成した。攪拌翼周辺では複雑な流体挙動をとるため、攪拌翼周辺の流体領域を全体の流体領域とは別に Fig. 1 (c)のように円柱型で作成する。このとき円柱の大きさは、径は攪拌翼の周径と槽径の中間程度で、高さは攪拌翼を覆うことができる程度にすると良い。作成した流体領域から固体領域の切り取りを、CAD の結合・切り取りの機能を用いて行う。今回の系では、「攪拌槽内全体の流体領域」と「攪拌翼周辺の流体領域」を分割し、それぞれから「攪拌翼およびシャフト部分の固体領域」を切り取った。最後に、ファイルの書き出しにより拡張子を.igs 形式としてファイルを保存する。

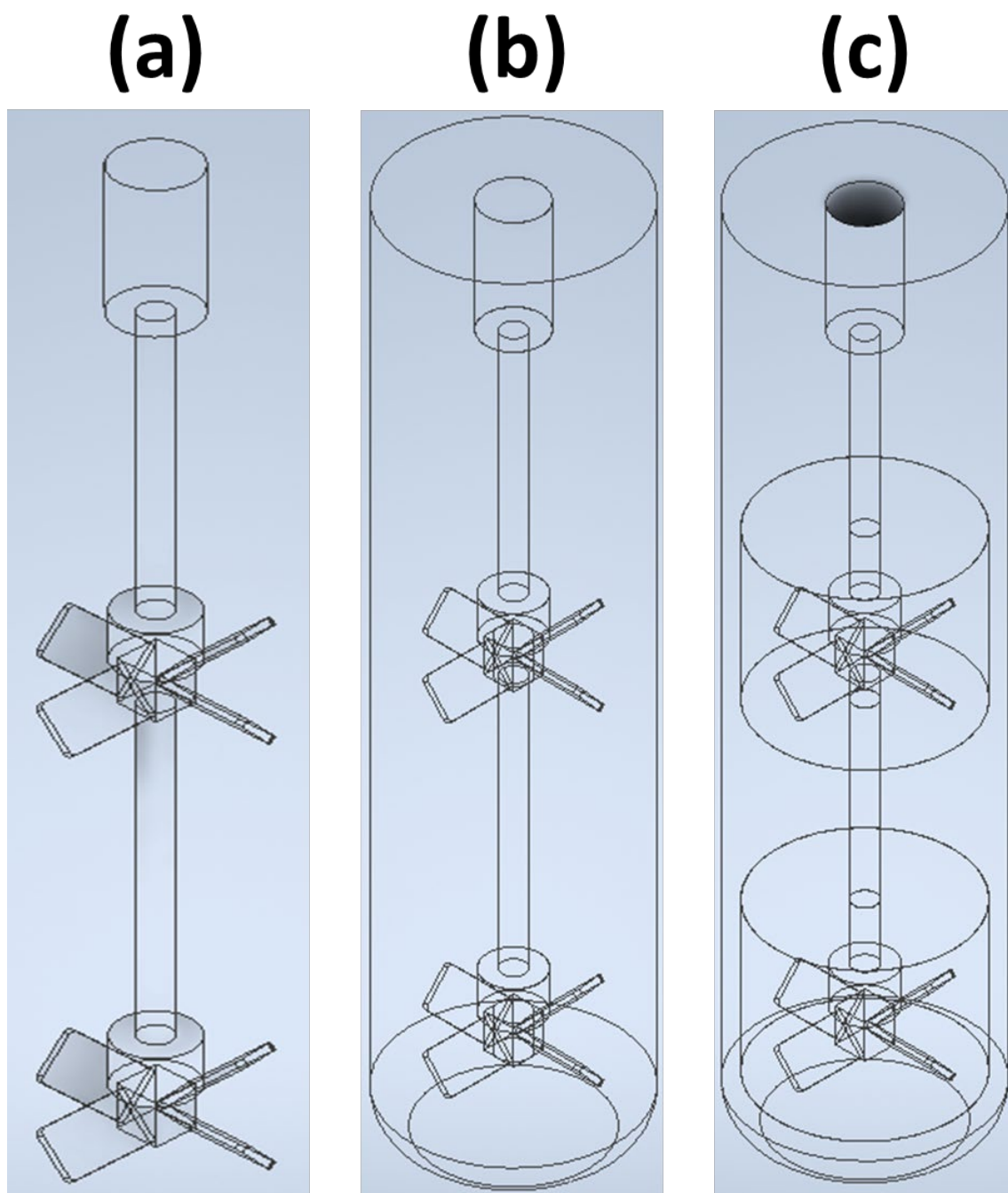


Fig. 1 CAD で作成した固体領域と流体領域。(a)攪拌翼およびシャフト部分のような攪拌槽内における固体部分、(b)(a)に攪拌槽体積と同様の攪拌槽内全体の流体領域を追加、(c) (b)に攪拌翼周辺の流体領域を追加し、流体領域から固体領域を切り取り。

## 2. メッシュの生成・編集

メッシュの作成・編集は **Workbench** を用いて行う。まず、**Workbench** を起動し、画面左の「コンポーネントシステム」から「メッシュ」をプロジェクト概念図に Fig. 2 のようにドラッグアンドドロップで緑の枠内に移動させる。次に、プロジェクト概念図のメッシュ内のジオメトリを右クリックし、「ジオメトリをインポート」→「参照」を選択する。

**Autodesk Inventor** にて作成した CAD モデル (.igs ファイル) を選択する。プロジェクト概念図のメッシュ内の「メッシュ (A3)」を右クリックし、「編集」を選択すると、メッシュが起動する。プロジェクト (画面左部) のジオメトリの田をクリックして、展開すると、各パーツが表れるので、名前を半角英数字でそれぞれ付ける。また、「材料 (画面左下)」の「流体/ソリッド」の欄を流体に変える。

ここから、解析で重要となる境界条件を決定していく。画面上部右側の「面」を選択する。クリックすると、面の部分を選択できるので、選択した状態で右クリック→「名前選択の作成」を選択する。「選択グループから名前選択:」の名前を英語表記で記入する。境界となる全ての面に名前を付けていく。特に、全体の流体領域側の攪拌翼周りの流体領域の面は、「interface\_out」とし、攪拌翼周りの流体領域側の攪拌翼周りの流体領域の面は、「interface\_in」と入力する必要がある。全ての面に名前を付けた状態を Fig. 3 に示す。ここで、「アウトライン」内の「接続」の田をクリックし、「接触」を展開させて、接触を右クリックにて削除しておく。

ここから、メッシュ生成を行う。「アウトライン」内の「メッシュ」をクリックする。壁面近傍の速度分布の再現するために、「"メッシュの詳細"」内の「インフレーション」を編集する。ここでは、「自動インフレーション」をプログラムによるコントロールに選択、最大層数を 3 層とした。「デフォルト」内の「解析分野の選択」内の「メカニカル」を「CFD」に変更する。「アウトライン」内の「メッシュ」を右クリック→「挿入」→「手法」を選択する。画面上部右側の「ボディ」を選択する。クリックでボディとしたい場所を選択する。ここでは、fluid\_out、fluid\_in1、fluid\_in2 をそれぞれ選択した。「手法の詳細」内の「ジオメトリ」の「適用」を選択し、3 ボディとする。「手法の詳細」内の「手法」の「四面体」を選択する。これは、分割するメッシュの形を指定するもので、ここでは四面体型でメッシュを生成した。次に、分割するメッシュの大きさを指定する。ここでは、「アウトライン」内の「メッシュ」をクリックし、「"メッシュの詳細"」内の「デフォルト」内の要素サイズを 0.08、「サイズコントロール」の「最大サイズ」を 0.1 とした。これは、メッシュの大きさを小さくしすぎると学生版の **Fluent** では実行できなかったためである。「"メッシュの詳細"」内の「アドバンスド」をクリックし、「三角形サーフェスマッシュャー」を「アドバンシングフロント」とする。これにより、外側から三角形が形成され、内部が四面体で構成されるようになる。「アウトライン」内の「メッシュ」を右クリックし、「メッシュ生成」を選択すると、Fig. 4 のように指定した流体領域にメッシュが生成される。最後に、「ファイル」→「Meshing を閉じる」を選択し、メッシュ編集を終了す

る。

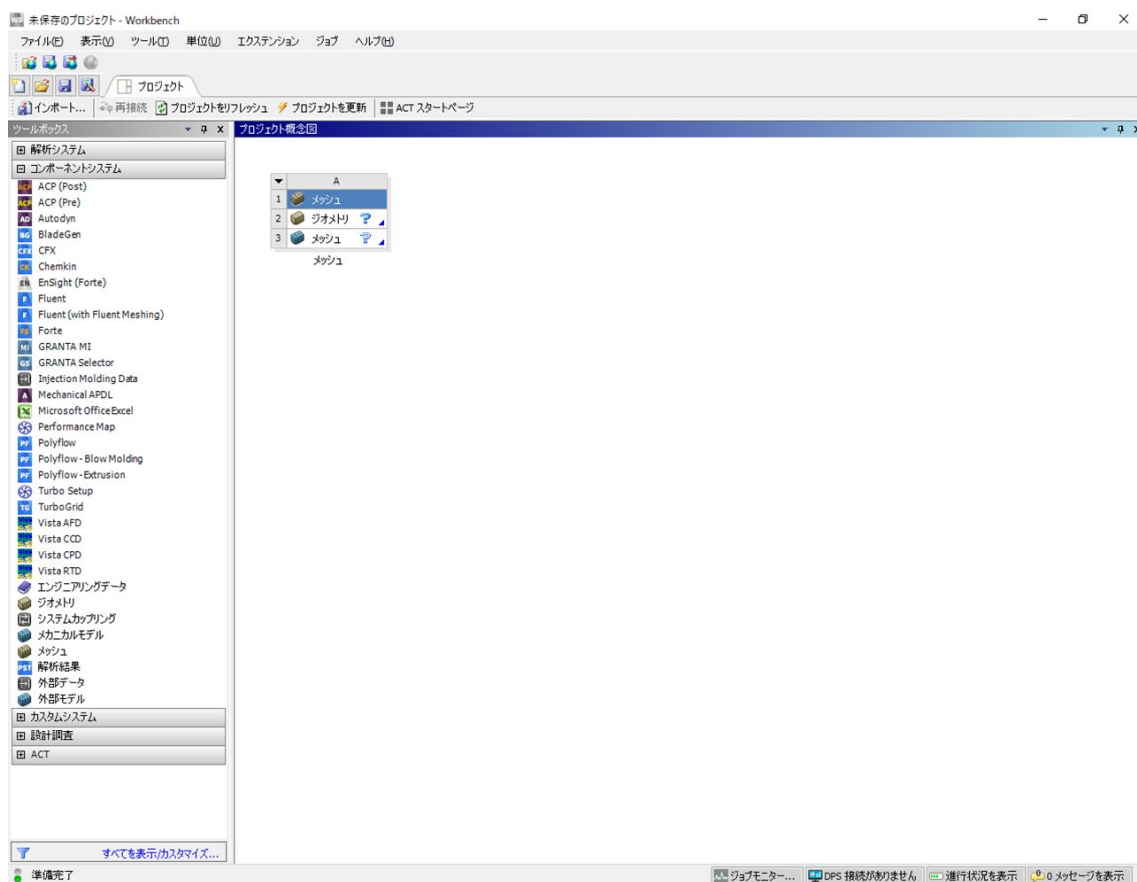


Fig. 2 Workbench を起動し、プロジェクト概念図内にメッシュをドラッグアンドドロップで移動させたときの様子



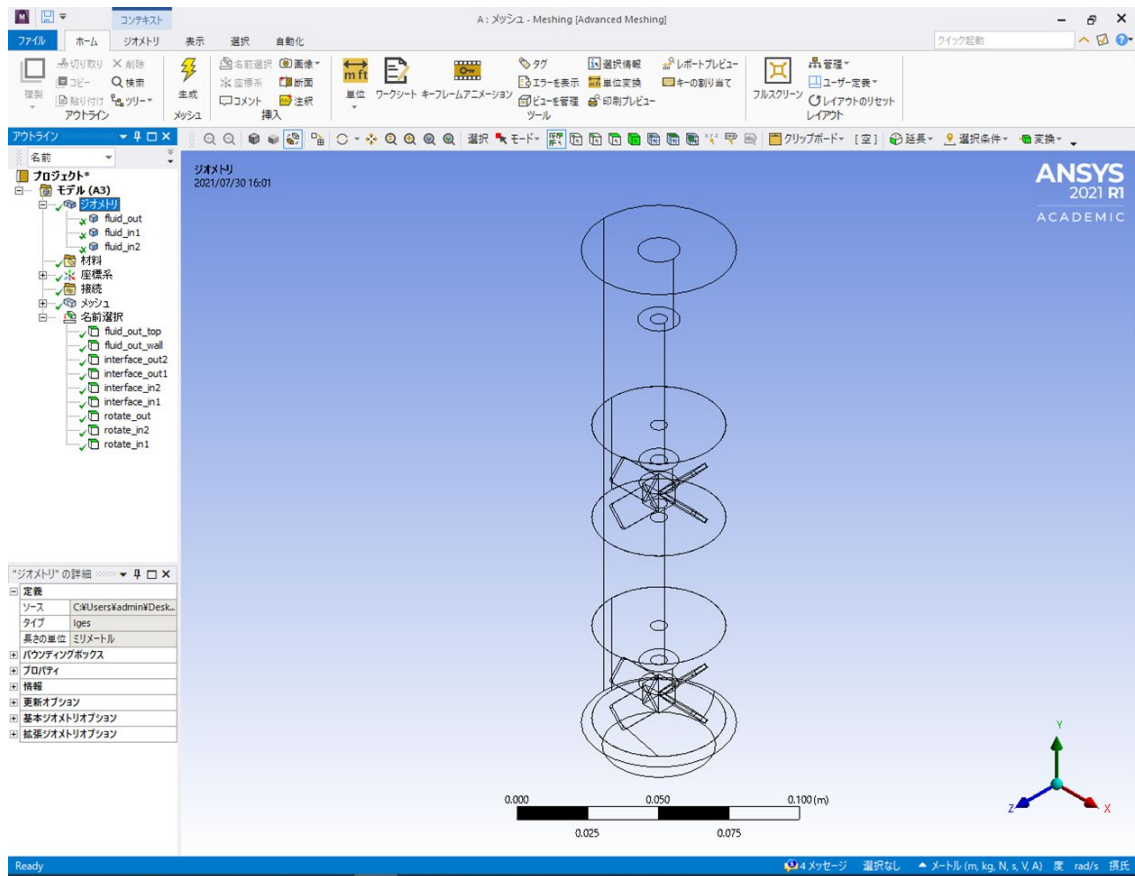


Fig. 3 メッシュを起動し、流体領域に各境界条件を付与したときの様子。

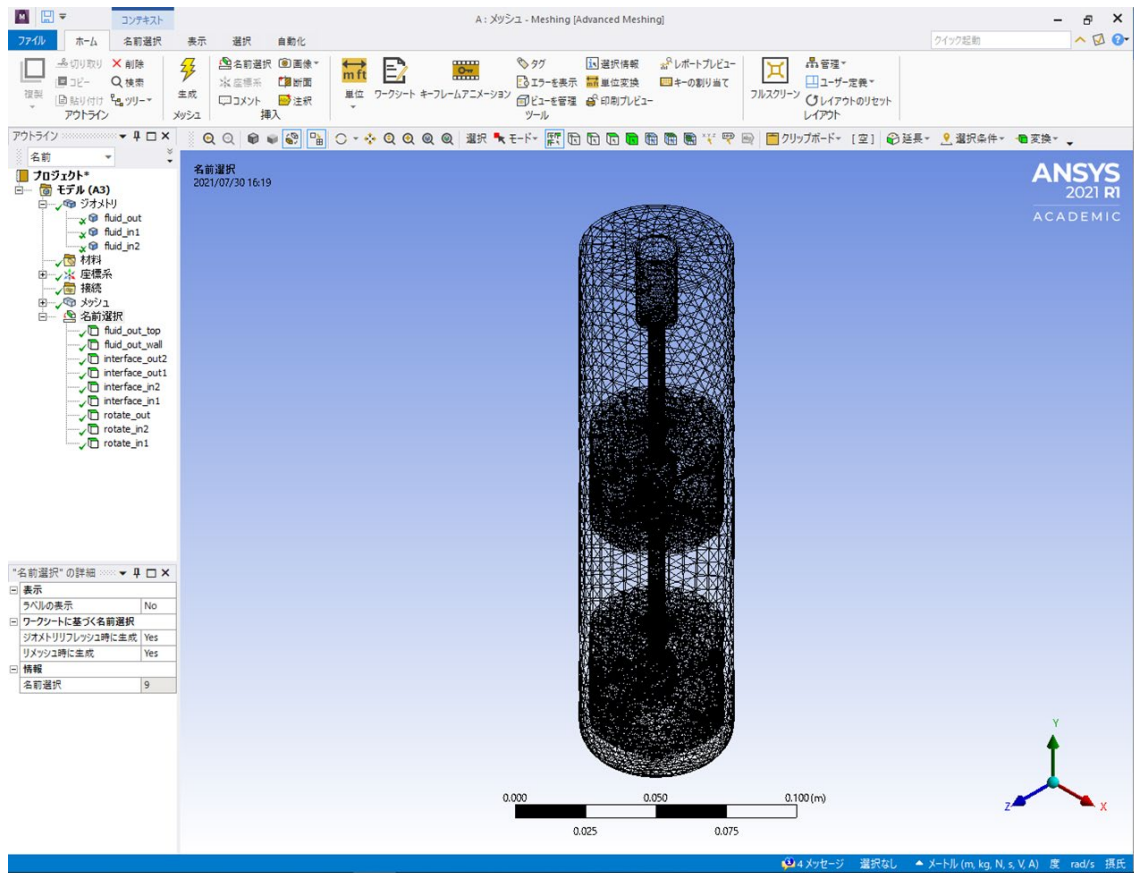


Fig. 4 各条件を設定し、流体領域にメッシュを分割・生成したときの様子

### 3. Fluent による流体領域の解析

Fluent による流体領域の解析は Workbench を用いて行う。まず、Workbench 内の「コンポーネントシステム」から、「Fluent」をプロジェクト概念図にメッシュの隣の大きな緑の四角い枠までドラッグ&ドロップする。次に、メッシュ内の「メッシュ」と Fluent 内の「セットアップ」を Fig. 5 のようにつなぐ。メッシュ内の「メッシュ (A3)」を右クリックし、「更新」を選択する。Fluent 内の「セットアップ (B2)」を右クリックし、「編集」を選択すると、別のウィンドウが表示される。そのウィンドウ内の「Options」の「Double Precision」を選択し、「Parallel (Local Machine)」の「Solver Processes」を PC のコア数を最大値として任意で選択する。今回の系では、コア数の最大値は 6 であったが、余裕を持たせてコア数を 4 とした。その後、「Start」を選択する。

ここから、Fluent の操作を行う。まず、3D モデルの編集を行う。Fluent が起動したら、3D モデル右下のレポートマークをクリックして情報を表示する。次に、CFD の設定を行う。画面左側の「アウトラインビュー」内の「設定」を編集する。「一般」をクリック

し、編集する。「単位」の「angular-velocity」を rpm に変換する。また、「ソルバー」の「時間」を非定常に変える。「モデル」をダブルクリックする。今回の系は単相流と仮定したため、粘性モデルの「k-epsilon」を選択した。「物性」内の「流体」を選択する。Air をダブルクリックし、「Fluent データベース」をクリックする。系に流す流体を 1 つだけ選択し、「コピー」をクリックする。「Fluent データベース」を閉じ、「変更／作成」をクリックする。すると、Fluid に選択した流体が追加される。今回の系における作動流体はポリマー溶解エタノール中に高密度二酸化炭素が溶解しており、混合物の粘性が低下していると考えられる。そのため、高圧攪拌槽内において、作動流体は水と同様の流体挙動をとると考え、モデル流体として、「water-liquid」を選択した。セルゾーン条件を選択する。一般的に、攪拌翼周りの流体領域は回転領域、全体の流体領域は静止領域として考える。今回の系では、fluid\_in1、fluid\_in2（攪拌翼周りの流体領域）に関しては、物質名を「water-liquid」、「メッシュの運動」に✓を付け、回転軸の方向を X が 0、Y が-1、Z が 0 となるようにした。また、回転移動の速度を 500 (rpm)とした。fluid\_out（全体の流体領域）に関しては、物質名を「water-liquid」にし、回転軸の方向を X が 0、Y が-1、Z が 0 となるようにした。「境界条件」をダブルクリックする。ここでは、各面に関して必要な情報を与える必要がある。今回の系では、fluid\_out\_top では、「せん断条件」を「指定せん断」とした。fluid\_out\_wall では、そのまま用いた。rotate\_out では、「壁の運動」を「移動壁」とし、運動を「回転」とし、「絶対座標系」とした。さらに、回転軸の方向を X が 0、Y が-1、Z が 0 とし、速さを 500 (rpm)とした。rotate\_in1、rotate\_in2 では、攪拌翼周りの流体領域ごと移動するので、「壁の運動」を「移動壁」とし、運動を「回転」とし、「隣接セルゾーン基準」とした。さらに、回転軸の方向を X が 0、Y が-1、Z が 0 とし、速さを 0 (rpm)とした。「メッシュインターフェース」を選択する。(Meshing の際に、interface という項目を作成した場合に表示される。) 移動領域と静止領域の境界のメッシュを作成する。今回の系では、interface\_in1 と interface\_out1 をそれぞれクリックし、「自動作成」をクリックした。また、interface\_in2 と interface\_out2 をそれぞれクリックし、「自動作成」をクリックした。「解析」内の「手法」をダブルクリックする。特に、「圧力」、「運動量」を編集する。ここでは、計算の簡易化のために、「圧力」に関しては、Standard を選択、「運動量」に関しては First Order Upwind を選択した。「初期化」をダブルクリックする。「基準座標」を「絶対」とし、「初期値」の「乱流運動エネルギー」を 0.001、「乱流散逸率」を 0.001 など微小な値を入力し、「初期化」をクリックする。「計算実行」をダブルクリックする。「パラメータ」の「時間ステップ数」を大きな値 (10~5000)、「時間刻み幅」を小さな値 (0.005~0.01 など) とする。時間刻み幅×時間ステップ数秒分だけ計算が進行する。「計算実行」内の「計算」をクリックすると、上記の条件にて計算が開始される。(計算中は、グラフが表示されるが、全ての値が 0 に近い値に収束されれば計算成功となる。) 計算が終了したら、「ファイル」→「プロジェクトを保存」より、現在の状態を保存する。

ここからは、計算結果の表示方法について述べる。タブ内の「結果」の「サーフェス」

→「作成」→「平面」をクリックする。そこで、YZ Plane の平面で「作成」する。画面左の「結果」の「グラフィックス」内の「コンター」をダブルクリックする。その画面内の「表示する量」を「Velocity」などにし、「サーフェス」を「plane-○」とし、「保存／表示」をクリックする。「ファイル」→「画像を保存…」→「保存…」と選択すると、Fig. 6 のように JPEG として画像を保存可能である。

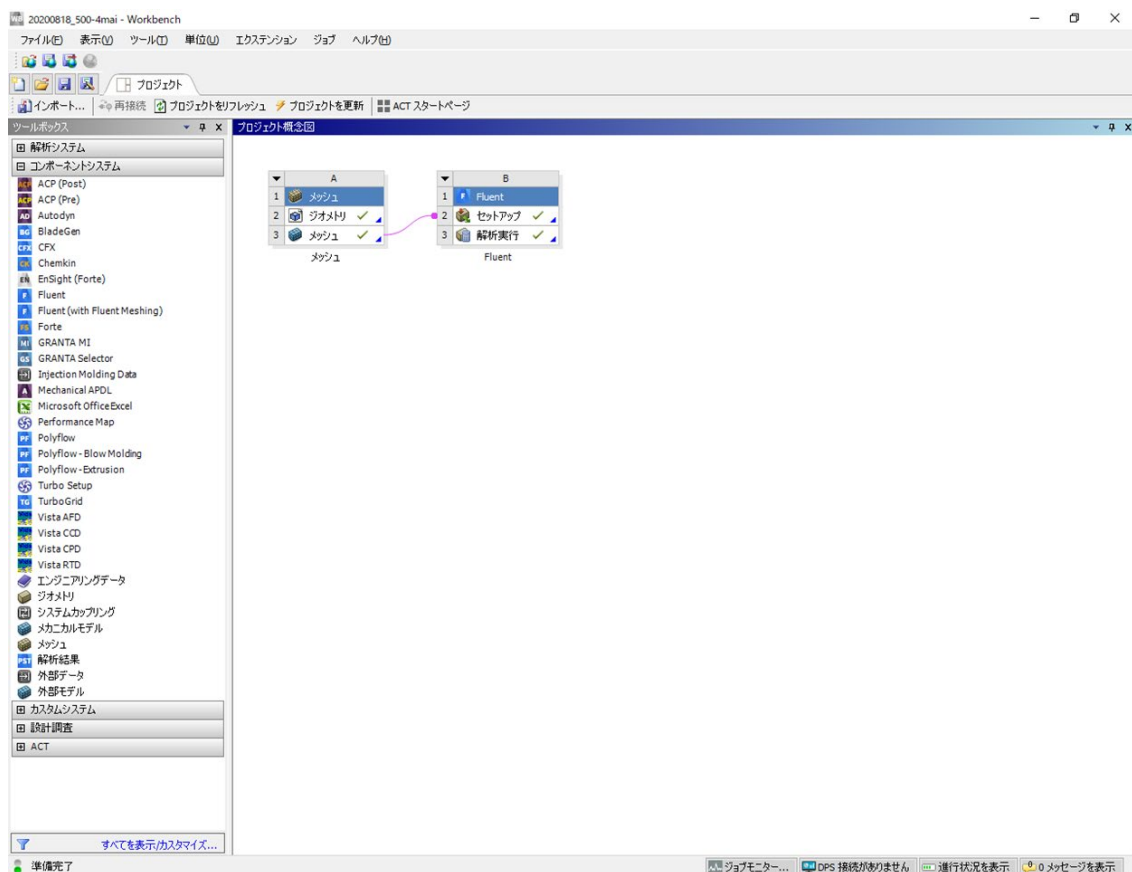


Fig. 5 プロジェクト概念図内に Fluent をメッシュの隣にドラッグアンドドロップで移動させたときの Workbench の様子

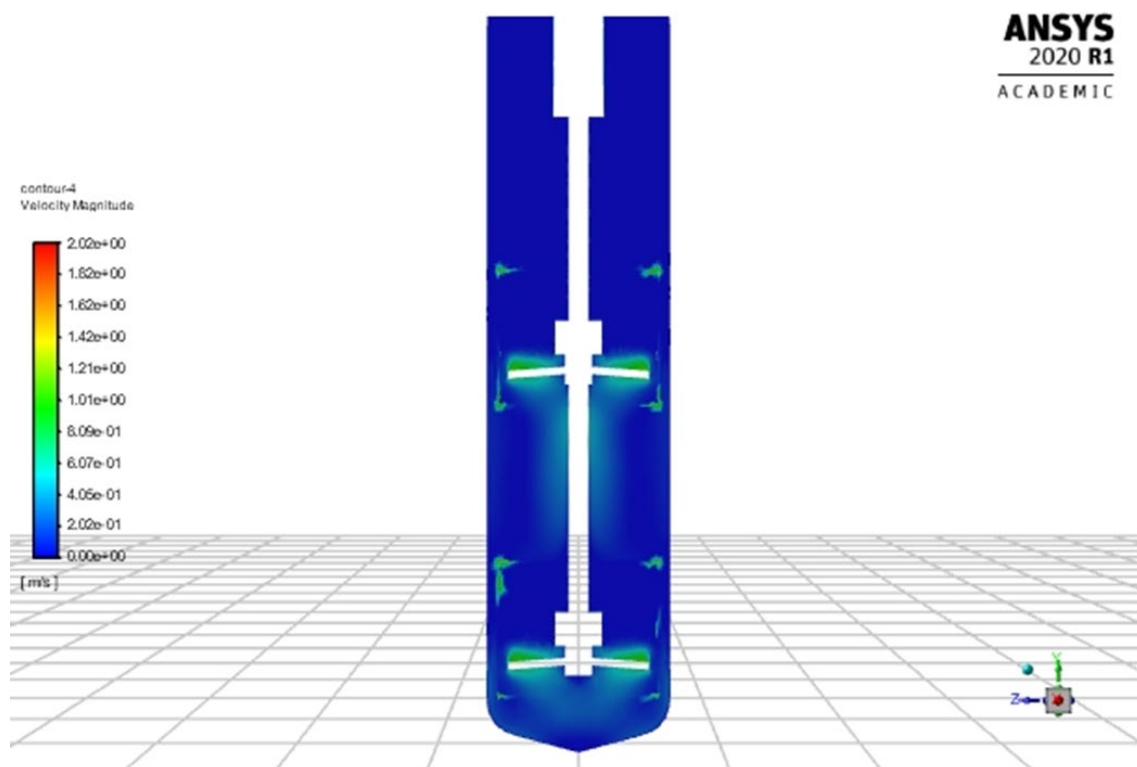


Fig. 6 Fluent による、4 枚ピッチドパドル翼における攪拌槽内流体の速度分布解析結果

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、多くの方々より多大なる御支援、御指導を頂きました。様々な御指導、御助言を頂きました三島健司 教授、相田卓 助教、シャルミンタンジナ 助教に心から御礼を申し上げます。研究を進めるにあたり、他大学、他研究室および他学科から御支援頂いた、大内先生、吉鶴先生、入江先生、塩井先生、松永先生、田中様に感謝申し上げます。

講義その他で多くの御助言、知識を与えて下さいました福岡大学工学部化学システム工学科の諸先生方に深く御礼申し上げます。共に研究を行った、小野君、秋山君、岡村君、五嶋君、柴田君、矢田君、浅尾君、江間さん、玉置君、中元君、八嶋さん本当にありがとう。経理その他書類申請等でお世話になりました中村美由紀 様に御礼申し上げます。また、公私にわたりお世話になりました三島研究室の皆様にも深く感謝し、御礼申し上げます。

この 9 年間は、様々なことがありましたが皆様のおかげで無事に乗り越えることができました。

学部・博士前期・博士後期の 9 年間わがままを聞き、温かく見守ってくださった両親ならびに家族、親戚の方々に心より感謝し、御礼を申し上げます。

最後に、福岡大学の皆様方の益々のご清栄を心よりお祈り申し上げます。

以上