

平成 23 年度研究助成報告（兼、終了報告）

研究題名	食品栄養物質マイクロカプセルを安定に乾燥粉末化させるプロセス技術開発
研究期間	平成 22 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日
研究機関・所属 研究者名	兵庫県立大学工学部ナノ・マイクロ構造科学研究センター 中川 究也

1. 平成 23 年度研究成果の概要

医薬・食品分野で様々な応用展開が期待されているハイドロゲル微粒子を安定に乾燥させる技術に関し、主として既存プロセス（凍結乾燥）の操作因子に関して凝集、破壊、活性成分の失活の程度を定量予測することを目指した研究を平成 22 年度に実施した。その研究成果を基盤として新たに得た着想は、「乾燥・脱水プロセスそのものに微粒子形成のメカニズムを付与すること」であった。そこで中川は、凍結を利用したハイドロゲル微粒子創製プロセスの新規コンセプトを提案した。凍結により生じる氷晶は、溶質成分や分散質を排斥し、凍結濃縮相と呼ばれる高濃度空間を形成する。この凍結濃縮相内部における濃度上昇を利用し、ゲル化剤濃度の上昇を誘起させれば、凍結濃縮相内部でゲル形成が実現できると考えられる。本手法によれば、ハイドロゲル微粒子の特性を化学的手法によらず、プロセスエンジニアリング的な手法にて制御することが期待できる。平成 23 年度はゼラチン・アカシアガムのコアセルベーションと凍結を組み合わせたナノ粒子乾燥粉末作製について研究を実施した。

2. 助成期間内での研究成果の概要

1. はじめに

ハイドロゲルをベースとしたナノ・マイクロ微粒子（ナノ・マイクロカプセル）は、食品栄養物質や薬剤をカプセル化し、体内へ適切に運搬・放出するキャリアとして有用であり、これまでに多くの研究成果が報告されている。ハイドロゲル微粒子にデリバリーキャリアとしての機能性を付与するためには、ハイドロゲルの特性に起因する様々な性質を付与することが肝要である。例えば、内包物質を適切な速度にて放出するためには、ゲルの物質透過性を適切に設計する必要がある。食品や医薬への応用を考える場合には、生体適合性や雑菌の繁殖抑制なども重要な課題となる。これまでのハイドロゲル微粒子開発は、主にドラッグデリバリーを目標に、化学・薬学分野における研究が大いに先行しており、薬剤の徐放能にすぐれ、患部細胞への選択的取り込みが可能な新しい化学物質の開発といったアプローチが数多く報告されてきた。これら新しいハイドロゲルは、細胞毒性が検証され、それが疾病リスクよりも低いと判断されたものは実用化に向けた製品開発へとステップアップが試みられている。一方、食品分野におけるハイドロゲル微粒子開発も広く行われている。食品利用を考える場合、カプセル化によって不安定な栄養物質の貯蔵性を向上させ、栄養

成分の消化性をコントロールし(腸で吸収されるべき成分を胃で消費させない等)、生体への取り込みを向上させることなどがマイクロカプセル開発の原動力となる。ただし、食品の場合、食品認可された物質を用いることが一つの制約となり、薬剤用ハイドロゲルよりも複雑な天然ハイドロゲルを巧みに制御することが求められる。

さて、ナノ・マイクロ微粒子の作製に関し、工業生産に関わるエンジニアリング研究の進展が急務といわれている。ハイドロゲル微粒子を利用した機能的な物質運搬・放出制御を実現する製品を、シンプルかつ無菌的なプロセスで安価に生産することは(特に製品単価の低い食品分野では)製品を上市するための一つのハードルである。我々の研究グループでは、第6回粉体工学情報センター助成を受け、2010年度から2年間に渡り、マイクロカプセルを乾燥させる工程において、凝集、破壊、活性成分の失活の程度を予測・低減するための手法開発を目的として研究を行ってきた。初年度において、主として凍結乾燥マイクロカプセルの安定化保持に関して検討し、一定の成果を得た。この成果を基軸とし、次年度においてはマイクロカプセル乾燥粉末を得るための全く新しい着想を得た。それは、いったん作製したハイドロゲル微粒子を安定に粉末化するための乾燥条件を探索するのではなく、乾燥(脱水)プロセスを経ることによって微粒子形成を引き起こすための工夫である。本講演においては、これらの双方の研究に関して現段階までに得られた成果概要を報告する。

2. マイクロカプセルの凍結乾燥による安定化

2.1 実験方法

ビタミン E(トコフェロール)を内包するコアシェルタイプのマイクロカプセルを、Emulsion-Diffusion 法を用いて作製した。オレイン酸とパルミチン酸の 1:1 混合油に約 1000ppm のトコフェロールを溶解させた。水と酢酸エチルが互いに飽和になった溶液をそれぞれ水相、油相溶媒として調整した。水相 60ml に Pluronic F-68 を 0.75g、酢酸エチル(油相)30ml に試料油 0.45g とポリカプロラクトン(PCL)0.3g を加えて溶解させ、これらの溶液を混合して高速ホモジナイザーにより乳化した。この調整したエマルジョン 30ml に過剰量の水を加えて、分散相内の PCL を析出させ、カプセル化した。得られたカプセル分散液はロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮した。こうして作製した分散液に、ゼラチン溶液(保護物質として添加, ゲル化速度の異なる Sigma 製、Samchun 製の 2 種類のゼラチンを使用)を 1:1(体積比)の割合で加え、凍結乾燥させた。凍結乾燥条件を変えて作製した乾燥物を水に再分散させた後のマイクロカプセルの凝集度の変化とビタミン E の活性変化の測定を行った。

2.2 実験結果と考察

まず、透過型電子顕微鏡(TEM)による観察結果を示す。

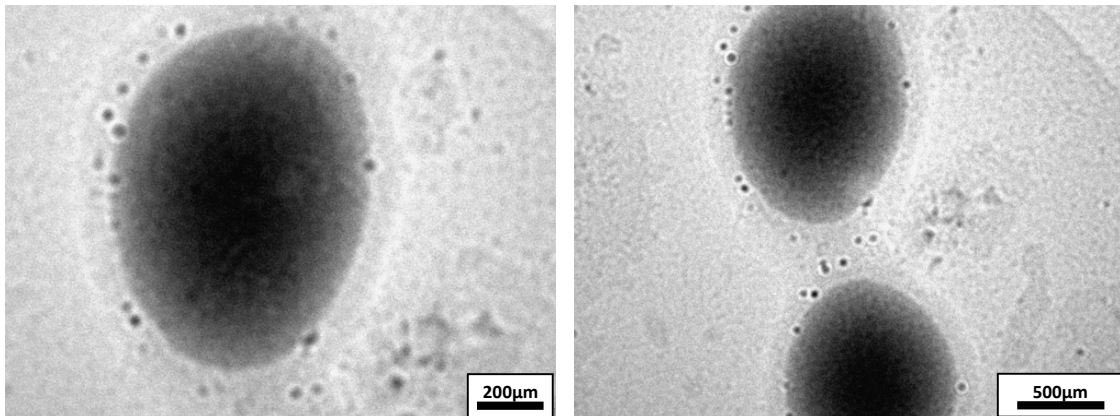


図1 作製したマイクロカプセルの透過型電子顕微鏡写真

作製したマイクロカプセルは図1に示すようにコア(核)とシェル(殻)の形成が確認できた。このコア部に有用物質を内包させれば、酸化等による失活を低減させることができる。ただし水中分散のままでは長期貯蔵時の安定性確保は難しく、実際今回作製したマイクロカプセルも、乾燥させなかった場合には1ヶ月間で内包するビタミン E 成分の 20%以上が失活してしまうことが確認された(図 2)。また、マイクロカプセルの明らかな凝集も視認され、乾燥物を作製することの重要性が再確認された。

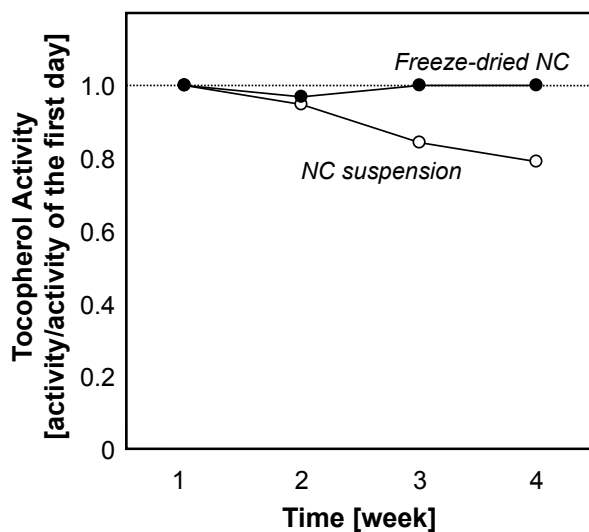
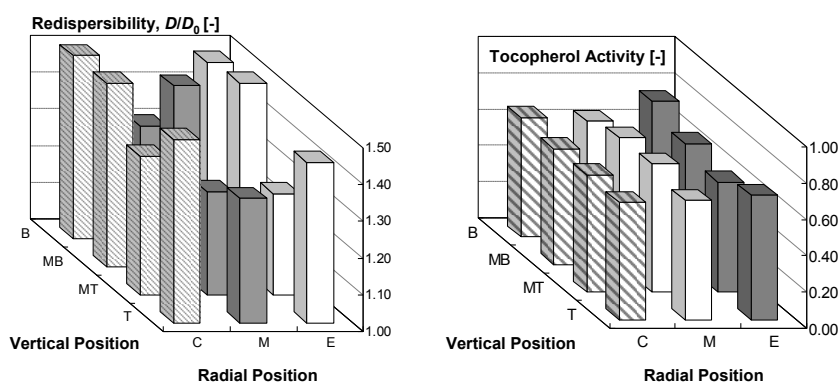


図2 水中分散カプセルと、凍結乾燥物の一ヶ月貯蔵における内包物質の活性変化

今回行った微粒子作製によって、初期油中に含まれるトコフェロールの約 70%をカプセル化することが出来ていることを確認した。作製したカプセルの平均粒径は約 300nm であり、その粒径はホモジナイザーの攪拌速度を大きくすることで約 200nm まで小さくすることが出来た。凍結乾燥サンプルを再水和させた場合、平均粒径は Sigma 製ゼラチンを用いた場合で約 400nm、Samchun 製ゼラチンで約 250nm であった。両サンプルの結果を比較すると、

Samchun ゼラチンを用い凍結速度が速い条件で作製した試料ほど粒子の凝集を抑えられることが確認できたが、ビタミン E の活性保持に関しては、Sigma ゼラチンの方が優れていた(図 3)。この差は凍結条件を緩慢にした場合にさらにはっきりと現れた。これは凍結過程におけるゼラチンのゲル化挙動が、再水和後のマイクロカプセル分散性や活性成分の失活と強く結びついているためである。これらのパラメータは凍結プロセスによって制御可能であり、品質の高い乾燥マイクロカプセル製品を作製する際の大きな指標となり得る。例えば凍結過程においてゲル化が進行し、凍結界面の進行速度が遅いほど再分散性には有利との結果が得られたが、この条件はビタミン成分の失活を導く条件であることも確認されており、最適な操作の存在を示している。最適化のアプローチとして考えられるのは、凍結乾燥バルクの場所に応じて、その場所が凍結した時の凍結界面の進行速度(脱水速度に相当)、凍結界面が到達する直前の粘度を別途推測し、それらの値とその場所から得られる試料の再分散性との相関を取ることなどが挙げられる。

A (stabilized by Sigma gelatin)



B (stabilized by Samchun gelatin)

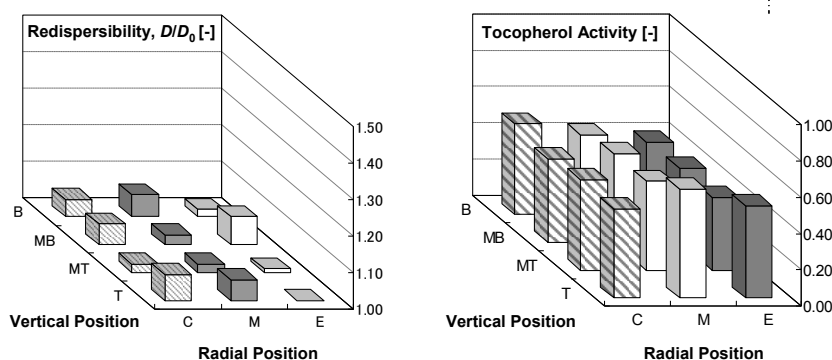


図3 マイクロカプセル凝集度とトコフェロール活性 (乾燥前と再水和後の粒径比および比活性)

3. 凍結を利用したマイクロカプセル作製

凍結により生じる氷晶は、溶質成分や分散質を排斥し、凍結濃縮相と呼ばれる高濃度空間を形成する。この凍結濃縮相内部における濃度上昇を利用し、ゲル化剤濃度の上昇を誘起させれば、凍結濃縮相内部でゲル形成が実現できると考えられる。この手法が実現すれば、単一の化学組成を持つ原料から、凍結というプロセスの制御のみによって、カプセル殻の特性を制御でき、「消化性」、「生体取り込み能」、「物質放出能」を制御できる可能性があると考えている。いったん凍結した試料は、そのまま凍結乾燥プロセスへと移行させることも、いったん解凍して噴霧乾燥プロセスにて乾燥させることもできる(図4)。

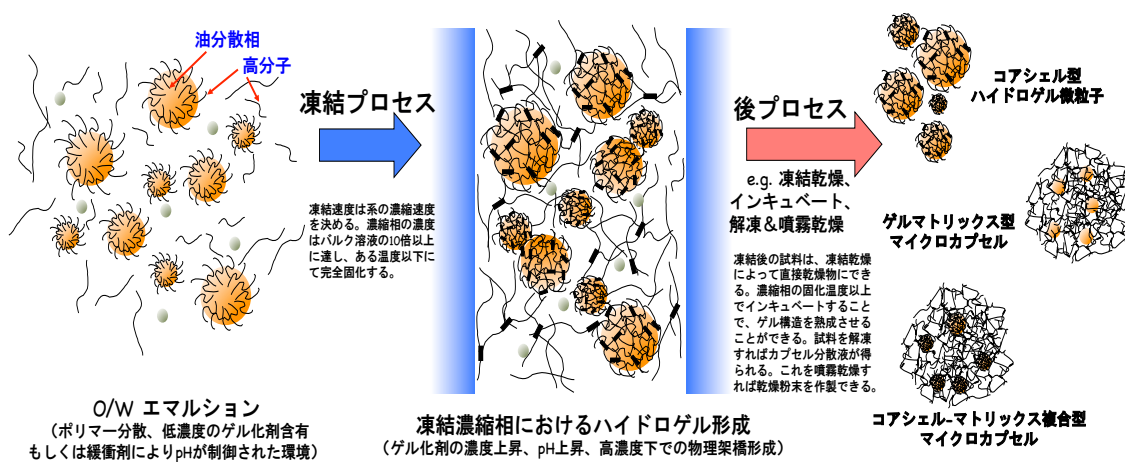


図4 凍結を利用したハイドロゲル微粒子の作製 (コンセプト)

3.1 実験方法

2wt%ゼラチン溶液90mLにβカロテンを1000ppm溶解させたトリオレイン溶液10mLを加え、高速ホモジナイザを使用し、18000rpm、3分間の条件にて乳化させた。得られた乳液に対し、アカシアガムを5wt%となるように加え、60°Cで加温しながら溶解、混合させた。このタンパク質と多糖からなる乳液に酢酸を一定量加え溶液のpHを様々に調整し、その後の検討に使用した。溶液0.5mLをバイアル瓶に移し、棚板式凍結乾燥器にて凍結乾燥させた。凍結時の冷却条件を変化させ(急冷:-40°Cの予冷済み冷媒を流通、徐冷:-1°C/minにて25°Cから-40°Cまで冷却、遅冷:-0.25°C/minにて-40°Cまで冷却)、最終的に得られる乾燥試料の特性を制御することを試みた。

3.2 実験結果と考察

得られた凍結乾燥試料は、多糖マトリックス内にコアシェル型のナノ粒子が埋包される形態にて得られた。乾燥試料を破碎し再水和させると、ナノ粒子が液中に分散することを確認できた。溶液中のタンパク質/多糖の分散状態は溶液の酸性度に強い依存性があり(図5)、ゼラチン分散液の等イオン点以下のpHになると急速にコアセルベート形成が進行する。調整したエマルジョンのpHを3程度まで下げると、分散油滴の表面にてコアセルベートが形

成し、分相が開始、ナノ粒子分散相として回収できる(図6)。これはコアセルベート法によるハイドロゲルナノ粒子の一般的な作製法である。本研究に用いたエマルジョン(pH=4.8)では、このコアセルベート形成は常温バルクでは進行せず、凍結過程において凍結濃縮相内におけるpH上昇によって形成したと考えられる。またここでは、静電相互作用によるナノ粒子形成も進行すると考えられる(pH=5以上にて室温放置した場合、20時間程度を要して分相が進むことを確認している。)先に述べたように、凍結濃縮相内における濃度変化速度は凍結速度の制御によって調整可能である。

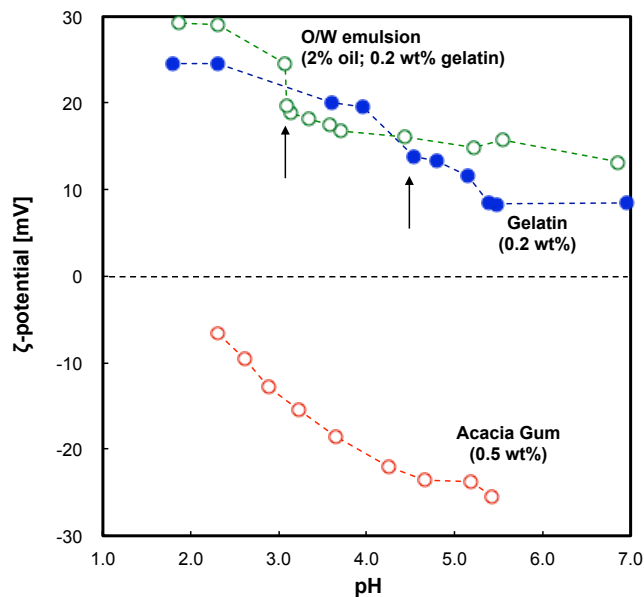


図5 ゼータポテンシャルと pH の関係

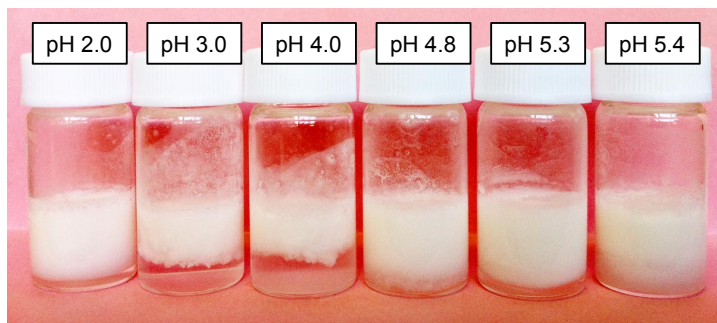
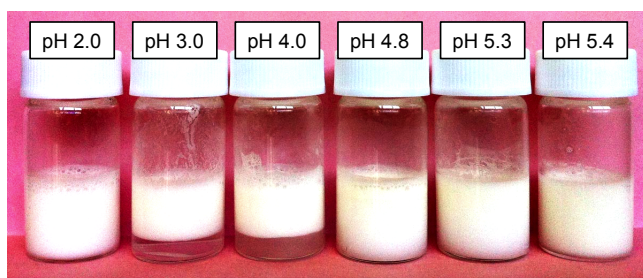


図6 ゼラチン- アカシア o/w エマルジョン; 凍結前 (写真上)、凍結後 (写真下)

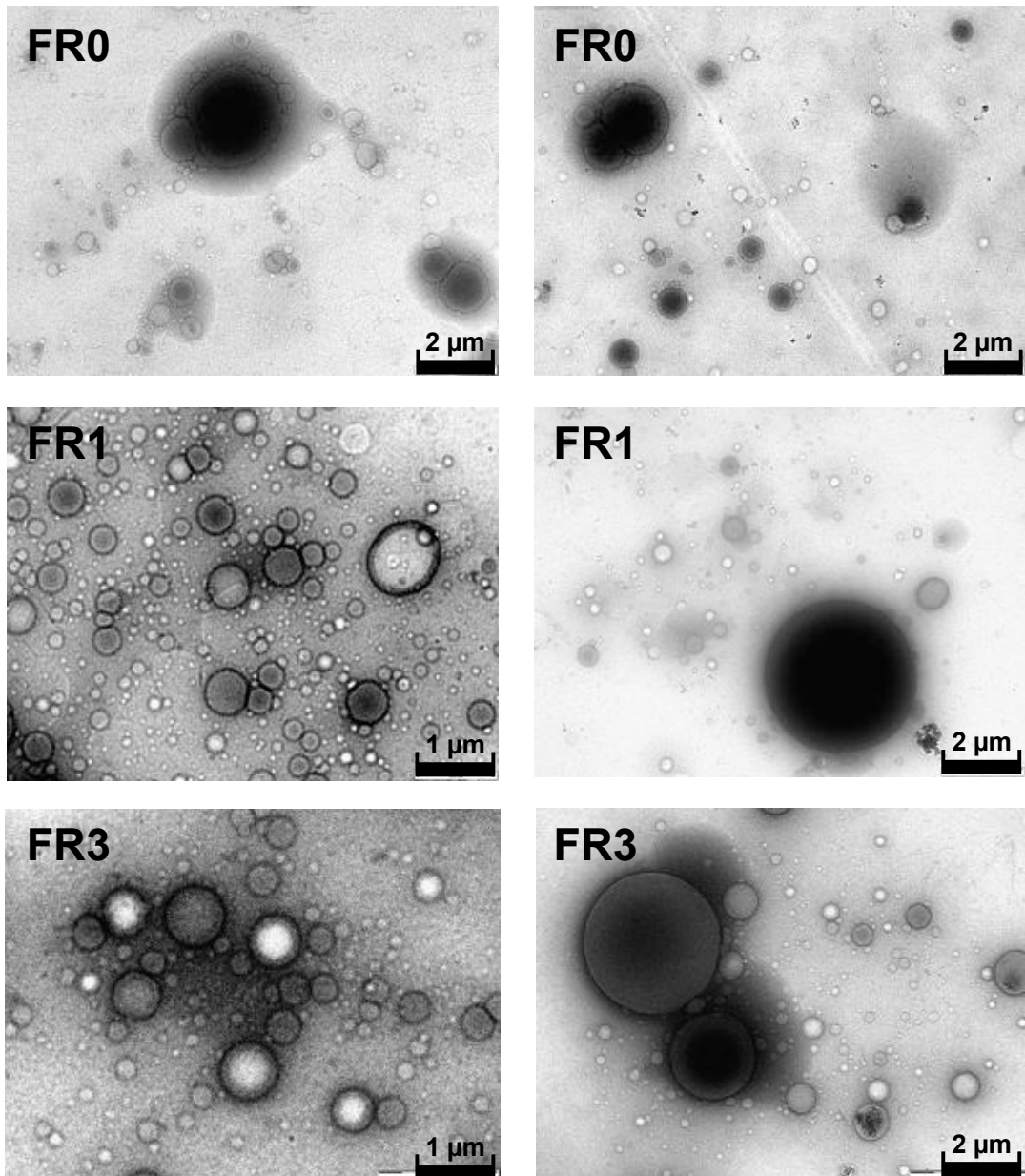


図7 作製したナノ粒子の透過型電子顕微鏡写真; 酸添加無し (FR0)、pH4.8 (FR1)、pH4.0 (FR2)

凍結によって作製したナノ粒子の電子顕微鏡写真を図7に示す。初期溶液の酸性度を、コアセルベート形を数時間程度では引き起こさないレベル (pH4.8程度) に設定した場合においても、凍結を経ることでカプセル形成が達成できていることが確認できた。初期酸性度の違いによるシェル厚みなどの視認可能な特性の変化を見て取ることは難しいが、いずれの場合においても、明確なコアシェル構造を有していることが分かる。このシェル膜の特性に生じる差異を見出すために、作製した乾燥カプセル粉末をエタノール中に投入し、油相コア中に溶解した β カロテンの放出挙動を測定した。図8より明らかなように、凍結条

件を変化させることによって、放出速度が大きく変化していることが伺える。これをあらかじめコアセルベート形成を引き起こさせた場合と比較すると、その差異は明確である。すなわち、凍結に起因したナノ粒子形成を引き起こすことによって、凍結プロセスによるシェルメンブレンの特性制御を実現できることが分かる。例えば最適化された組成に基づいてナノ・マイクロカプセル製造を実施する場合、不確定要因によって従来通りの製品特性が得られない場合などにおいて、プロセスの微調整(この場合では凍結速度)によって製品特性を最適化できることはエンジニアリング上極めて重要な意味を持つ。今後、本技術を更に発展させるために、その現象理解、適用物質の検討、応用事例の検討などを研究していきたい。

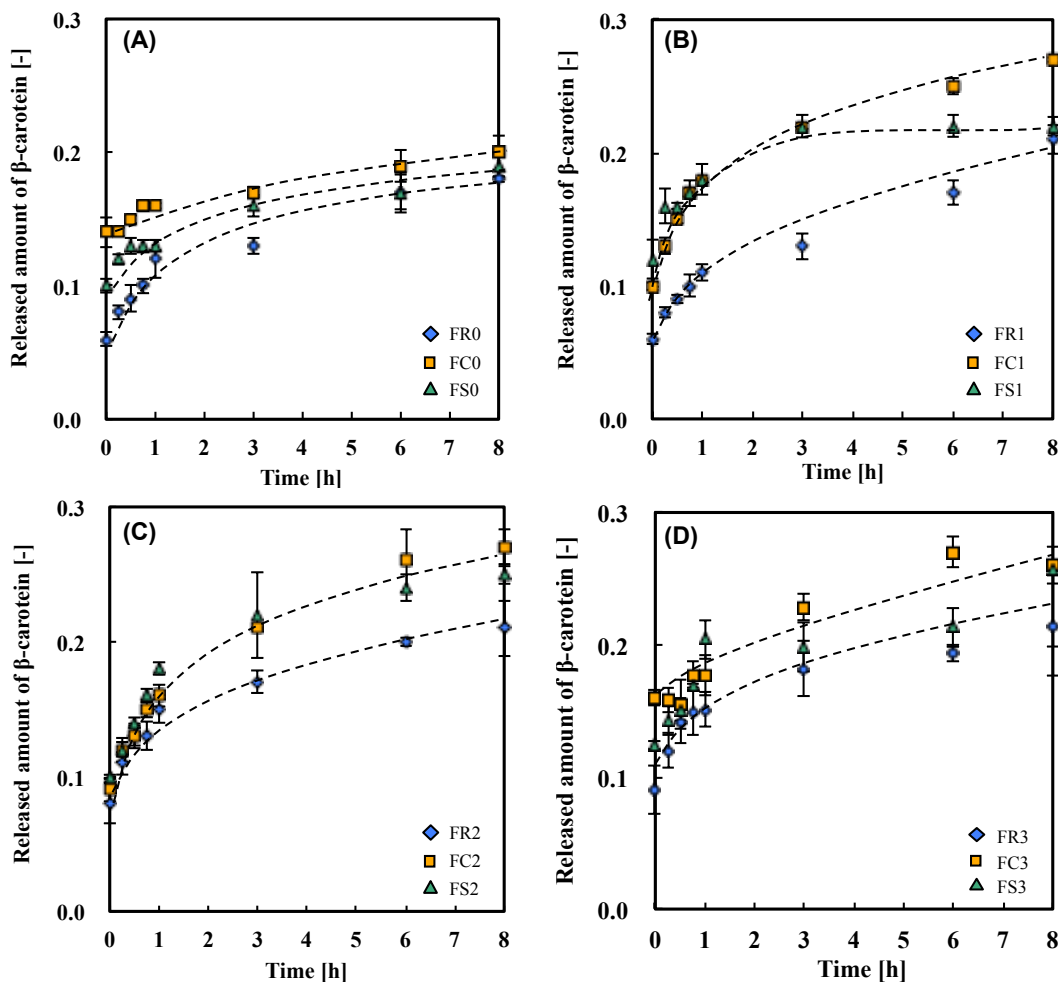


図 8 ナノ粒子に内包された β カロテンの放出挙動；急冷条件 (FR1)、除冷条件 (FC1)、遅冷条件 (FS1)、pH5.1 にて作製 (A)、pH4.8 にて作製 (B)、pH4.0 にて作製 (C)、pH3.1 にて作製 (D)

3. 研究発表

■論文発表

K. Nakagawa, H. Nagao

Microencapsulation of Oil Droplets Using Freezing-Induced Gelatin-Acacia Complex Coacervation
Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **submitting (2012)**

K. Nakagawa, H. Nagao, S. Surassmo, S.G. Min and M.J. Choi

Stabilization of Microcapsules by Freeze-Dried Gelatin Matrix: Aqueous redispersibility and the ingredient activity.
Drying Technology, 30 (4): 416-424 (2012).

K. Nakagawa, S. Surassmo, S.G. Min and M.J. Choi

Dispersibility of Freeze-Dried Poly(epsilon-caprolactone) Nanocapsules Stabilized by Gelatin and the Effect of Freezing
Journal of Food Engineering, 102: 177-188 (2011).

■学会発表

中川 究也、長尾 裕充、影本 真之「凍結を利用したコアシェル型ハイドロゲルナノ粒子の新規作製法」化学工学会第77年会（東京、2012年3月）

中川 究也、長尾 裕充、Nataporn Sowasod 「凍結によるゲル化を利用した新規マイクロカプセル作製法」第4回化学工学3支部合同福井大会（福井、2011年12月）

長尾 裕充、中川 究也「凍結を利用した新規マイクロカプセル作製法の開発」第4回化学工学3支部合同福井大会（福井、2011年12月）

Kyuya Nakagawa, Suvimol Surassmo, Mi-Jung Choi, Sang-Gi Min

Nanocapsule Agglomeration in Aqueous Polymeric Suspension during Freeze-Drying Process
17th International Drying Symposium 2010, Magdeburg, Germany 3-6 October (2010)

長尾 裕充、中川 究也、「ビタミンEを内包する凍結乾燥マイクロカプセルの安定性と再分散性」化学工学会第42回秋季大会、（京都、2010年9月）