

# ナノダイヤモンド微粒子に対する超音波照射条件が 粒子径におよぼす影響

Effect of ultrasound irradiation conditions to nano-meter sized diamond particles  
on their particle sizes

遠田 リキ、池上 和志、竹内 真一

桐蔭横浜大学大学院工学研究科医用工学専攻

(2016年3月28日 受理)

## 1. はじめに

近年、ナノテクノロジーを用いたドラッグデリバリーシステム“Drug Delivery System”の研究が多く行われている<sup>1-3)</sup>。DDSとは、薬物を作用発現させるべき対象部位に望ましい濃度や時間パターンで選択的に送達する事で、最高の治療効果を得る事を目的とした薬物投与技術である。血管を通して薬剤を送る際に、毛細血管等の細い血管では、直径が約5  $\mu\text{m}$ 程度となっている。そのため、薬剤は直径1  $\mu\text{m}$ 以下が良いとされている。また、癌組織や炎症部位では、血管新生が活発であり、血管壁の透過性が亢進している。つまり、数10 nm ~ 200 nm程度の粒子は正常組織では、血管壁を通過する事が困難であるが、癌組織や炎症部位では血管壁を透過しやすくなっている。そのため、血管透過性の違いを利用することで、癌組織や炎症部位に集積しやすくなる事が知られており、EPR効果(Enhanced Permeability and Retention)と呼ばれている<sup>4)</sup>。このEPR効果を利用してナノテクノロジーをDDSに用いる

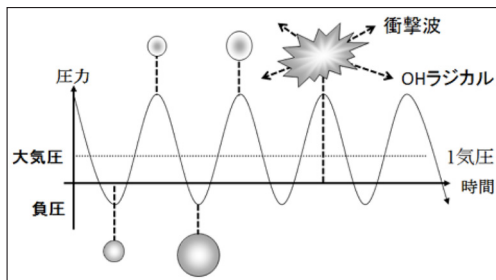
事で、目的の治療部位に薬物送達ができるとされる。しかし、現状の抗癌剤の多くは全身投与を行っており、目的部位に到達するまでの間の溶出等によって副作用が強くなる。そのため化学療法の継続に大きな支障をきたす場合がある。

本研究は、DDSを生体適合性が良いとされているナノダイヤモンド微粒子と非侵襲的な超音波を利用する事で、薬剤の副作用を低減することを目的としている。

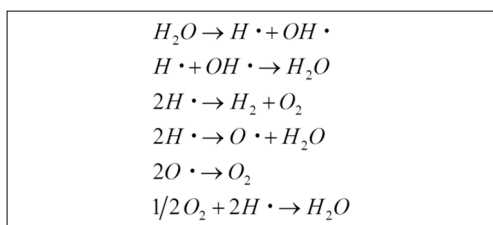
液中に強力超音波を照射した際に、局所的に高圧域(正圧)と低圧域(負圧)の圧力変動が発生する。この圧力変動が溶媒物質の分子間力を上回り、負圧による外向きの力が液体の表面張力や粘性による内向きの力を上回る事で空洞が発生させ気泡を形成する。この気泡は超音波の圧力変動に合わせて膨張と収縮を繰り返す。音圧が正の半サイクル時に気泡は、急激に断熱圧縮され圧壊する。これが音響キャビテーションである<sup>5,6)</sup>。音響キャビテーションバブルの発生から圧壊までの模式図を第1図に示す。音響キャビテーションによって発生した気泡が圧壊した際に、衝

TOHDA Riki, IKEGAMI Masashi and TAKEUCHI Shinichi

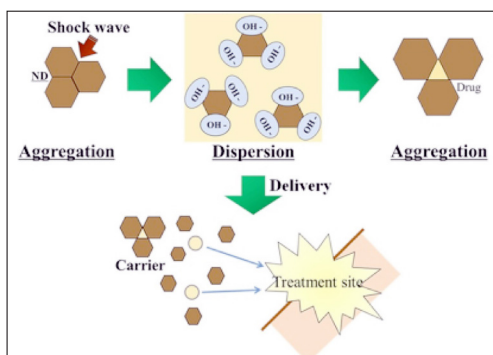
Graduate school of engineering, Toin University of Yokohama, 1614 Kurogane-cho, Aoba-ku, Yokohama 225-8503, Japan



第1図 キャビテーションバブルの発生から圧壊までの模式図

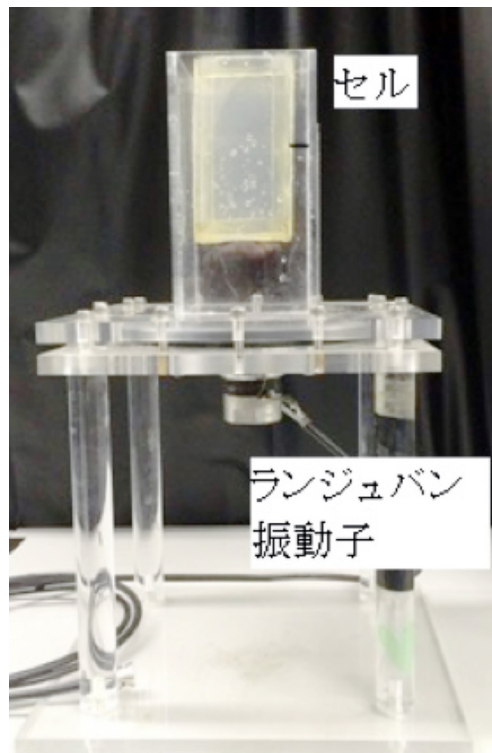


第2図 超音波による水分子の解離



第3図 ナノダイヤモンド微粒子を用いたDDSの構想

撃波と活性酸素が発生する。超音波照射時の水分子の解離について第2図に示す。発生した衝撃波で凝集しているナノダイヤモンド微粒子を分散させ、活性酸素を利用する事で、ナノダイヤモンド微粒子を表面改質して分散を行う事ができる<sup>7)</sup>。薬液中のナノダイヤモンド微粒子を凝集させる事で、ナノダイヤモンド微粒子の微粒子間のできる隙間に薬液を留める。そうする事でナノダイヤモンド微粒子を薬剤カプセルの代わりとしてDDSに利用する事ができると考えている。また、超音波でナノダイヤモンド微粒子の粒径分布をコ



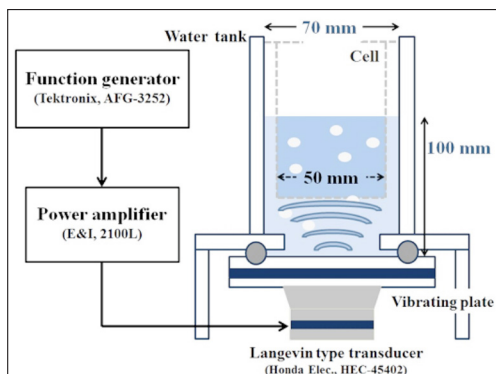
第4図 本研究で使用している超音波照射システム

ントロールする事で、目的の治療部位に薬剤をトラップし易くする事を目的としている。本研究で考えているDDSの形を第3図に示す。

## 2. 超音波照射条件が粒度分布に及ぼす影響

### 2.1 実験方法

本研究で使用する超音波照射システムを第4図に示す。この超音波照射システムは、縦70 mm、横70 mm、高さ150 mmの水槽底部に共振周波数40 kHzのポルト締めランジュバン型振動子(HEC-45402、本多電子)を付けた厚さ2 mm、直径180 mmのステンレス振動板を装着している。超音波照射システムの水槽内に作製したナノダイヤモンド懸濁液入れ、そこにファンクションジェネレータ(AFG-3252、Tekutronix)の出力信号を増幅度50 dBのパワーアンプ(2100L、E&I)で増幅して超音波を印加した。超音波照射シ



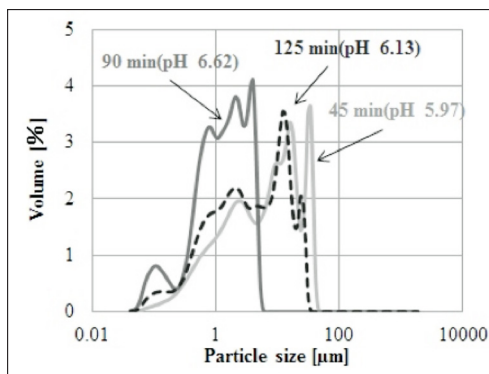
第5図 本研究で使用する超音波照射システム図

システムの構成を第5図に示す。

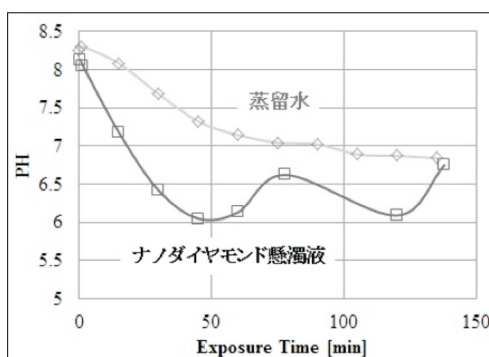
本研究で使用しているナノダイヤモンド微粒子は、TNT火薬による爆轟法で生成されている東京ダイヤモンド工業の一次粒子径5 nmのナノダイヤモンド微粒子である。このナノダイヤモンド微粒子30 mgを溶媒である蒸留水500 mlに入れて攪拌することにより、懸濁液を作製した。超音波照射時の条件として、周波数150 kHz、印加電圧50 V<sub>pp</sub>で超音波を照射した。超音波照射時間を45分、90分、125分とした際の、照射前後におけるナノダイヤモンド懸濁液中の粒度分布を粒度分布測定装置 (LS230、Beckman Coulter) を使用して測定した。また、その時のpH値をpHメーター (SK-620PH、sk-SATO) で測定した。

## 2.2 実験結果

測定結果を第6図に示す。超音波の照射時間90分に比べ、135分の方が粒子径の増加を観測できた。このことから、ナノダイヤモンド微粒子の凝集が行われたと考えた。その際のpHの値に微小ながら変化が生じている。超音波照射により音響キャビテーションを発生させると、水分子は解離し、活性酸素の一種であるOHラジカルを発生させることが知られている。ナノダイヤモンド微粒子の分散では、このOHラジカルがナノダイヤモンド微粒子の表面改質を担っている事が知られている。そのため、ナノダイヤモンド微粒



第6図 超音波照射時間がナノダイヤモンド微粒子に及ぼす変化

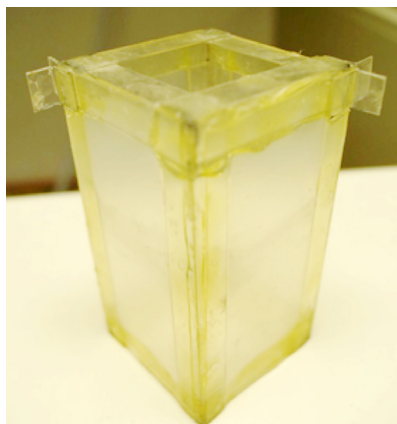


第7図 超音波照射時間がナノダイヤモンド懸濁液内のpHに及ぼす変化

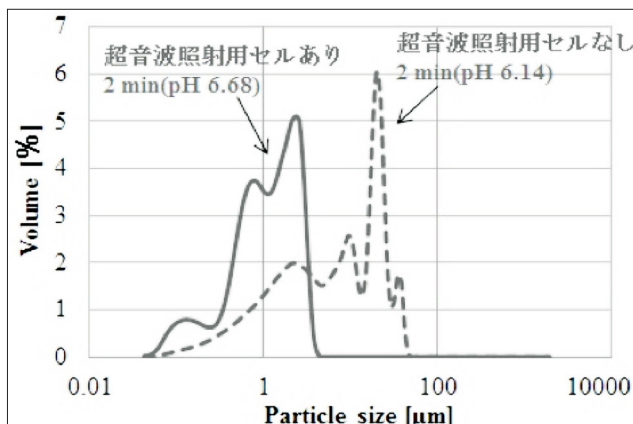
子の分散後にpHに変化があると考え、pHの測定も行った。

超音波照射時間が蒸留水とナノダイヤモンド懸濁液それぞれのpHに及ぼす影響について測定した。測定結果を第7図に示す。蒸留水の場合、空気中の二酸化炭素が蒸留水に溶ける事で、時間をかけてpHが酸性に傾く事が知られている。ナノダイヤモンド懸濁液のpHを測定した結果、pHが変化している事がわかった。

今回の実験では、ナノダイヤモンド微粒子と超音波のみを使用している為、pHが変化する要因として音響キャビテーションがナノダイヤモンド微粒子に及ぼす影響であることが考えられる。したがって、超音波照射のみで分散と再凝集を行う事が可能なのではないかと期待している。



第 8 図 本研究で使用するシリコンゴム製超音波照射用セル



第 9 図 シリコンゴム製超音波照射用セルがナノダイヤモンド懸濁液の粒径分布に及ぼす影響

### 3. 溶媒の pH 調整が超音波照射時のナノダイヤモンド微粒子に及ぼす影響

#### 3.1 実験方法

本実験で使用する超音波照射システムの構成を第 5 図に示す。この超音波照射システムの水槽内にシリコンゴム製超音波照射用セルを宙ぶりに挿入して、セルの中にナノダイヤモンド懸濁液を入れた状態で超音波を照射した。シリコンゴム製超音波照射用セルの厚さは約 0.3 mm である。シリコンゴムは水とほぼ等しい固有音響インピーダンスを有するので、セルによる超音波の反射や減衰の影響を極小にできる<sup>8)</sup>。本研究で使用しているシリコンゴム製超音波照射用セルを第 8 図に示す。

ナノダイヤモンド微粒子 30 mg を溶媒である蒸留水 150 ml、に入れて攪拌することにより懸濁液を作製した。この懸濁液の pH を強酸性または、強アルカリ性に調整するので、振動板に影響があると考えシリコンゴム製超音波照射用セルを用いた。水槽内にナノダイヤモンド懸濁液を入れた際に、水槽底部にナノダイヤモンド微粒子が沈殿する。そのため、音響キャビテーションの効果を十分に受けられない事が考えられる。シリコンゴム製超音波照射用セルを用いてナノダイヤモンド

微粒子が沈殿する底部の高さを調節することで、音響キャビテーションの効果を受けやすい箇所にナノダイヤモンド微粒子を沈殿させることができる。

周波数 150 kHz、印加電圧 126 V<sub>pp</sub> で超音波を照射した。超音波照射時間を 2 分とした際の粒径分布を測定した。超音波を照射前後のナノダイヤモンド懸濁液を粒度分布測定装置 (LS230、Beckman Coulter) を使用して、照射前後の粒度を測定した。また、その時の pH 値を pH メーター (SK-620PH、skSA-TO) で測定した。

#### 3.2 測定結果

シリコンゴム製超音波照射用セルの有無がナノダイヤモンド微粒子の粒径分布に及ぼす影響を測定した。測定結果を第 9 図に示す。測定結果より超音波照射後のナノダイヤモンド微粒子の粒径が小さくなっていくことがわかる。シリコンゴム製超音波照射用セルを使用していないとナノダイヤモンド微粒子は、超音波による活性酸素の少ない水槽底部に沈殿してしまう。シリコンゴム製超音波照射用セルを使用すると、ナノダイヤモンド微粒子は水槽底部からある高さに設置されたシリコンゴム製超音波照射用セルの底部にとどまる。そのため、超音波によって多量の活性酸素が発生する場所でナノダイヤモンド微粒子が分

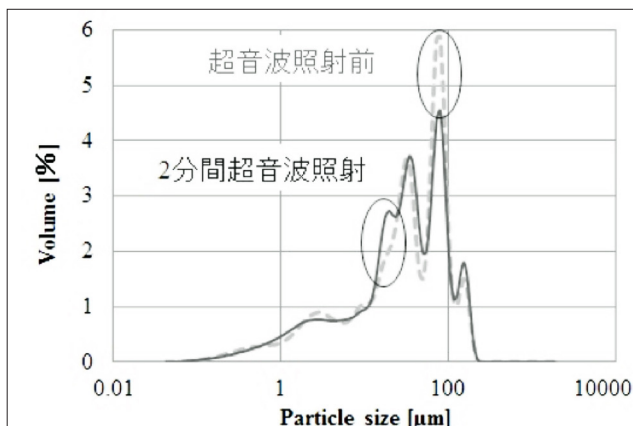
散され、このような結果になったと思われる。

次に、作製したナノダイヤモンド懸濁液の溶媒の pH を高く、もしくは低くして、超音波照射前後の粒径分布と平均粒子径の測定を行った。

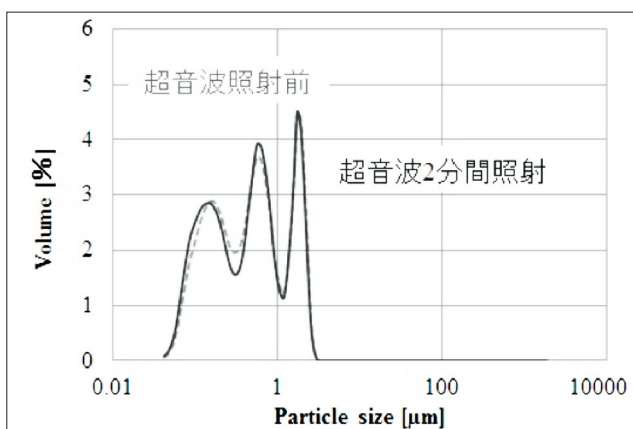
pH を 2.6 に調整した懸濁液に超音波を照射して、その前後の粒径分布を **第 10 図** に示す。また pH を 9.5 に調整した懸濁液に超音波照射する前後の粒径分布の結果を **第 11 図** に示す。溶媒の pH 値を pH 2.6 と pH 9.5 に調整して超音波照射を行ったが、照射後の粒子径に明確な変化が現れなかった。本研究内で pH の調整を行っていない蒸留水での超音波照射後の pH は、現状 6 から 7 前後にとどまっている状態である。その為、溶媒の pH による微粒子の表面電位への影響が強すぎて超音波による効果がマスクされてしまったものと考えている。**第 10 図** の結果を見た時、超音波照射前のピークが超音波照射後に下がっており、その分が左で表れている。これは pH が酸性側に傾いている場合、中性に近づこうとするので活性酸素の発生量が増えているのではないかと考えている。そのため、超音波照射を続けていれば分散が起こる可能性があると考ええる。しかし、pH を 9.5 に調整したものは変化が見られなかった。

#### 4. まとめ

超音波の照射時間によってナノダイヤモンド微粒子が分散した後に、凝集が起こったのを確認できた。音響キャビテーションによって水分子は解離し、活性酸素の一種である OH ラジカルを発生させることが知られている。ナノダイヤモンド微粒子の分散では、この OH ラジカルがナノダイヤモンド微粒子の



**第 10 図** 懸濁液内の pH を 2.6 に調整した場合に超音波照射がナノダイヤモンド微粒子の粒径分布に及ぼす影響



**第 11 図** 懸濁液内の pH を 9.5 に調整した場合に超音波照射がナノダイヤモンド微粒子の粒径分布に及ぼす影響

表面改質を行っている為、pH の値に変化が見られる。また、凝集が起きた際には、ナノダイヤモンド微粒子の表面に吸着されたフリーラジカルが何らかの要因によって解離された為、pH が減少したと考えられる。超音波照射のみで分散と再凝集を行う事が可能なのではないかと期待している。

溶媒の pH を 2.6 と 9.5 に調整してナノダイヤモンド懸濁液に超音波を照射した際の結果について述べる。結果として pH による表面改質の影響が強すぎた為、超音波による影響がほとんど見られなかった。若干ながら pH を 2.6 に調整した結果の方では、超音波照射前のピークが超音波照射後に下がってお

り、その分が左に上昇している箇所がみられる。そのため、超音波を照射し続けていたら分散が行われる可能性が考えられる。pHが酸性側に傾いている場合、中性に近づこうとするので音響キャビテーションによるOHラジカルの発生量が増加しているのではないかと考えている。

## 5. 今後の展望

今回の測定では、溶媒のpHの値を極端に変えた状態での測定を行った。しかしながら、結果として明確な変化は得られていない。今後、測定を行う場合には、pHを6や8といった中性からあまり離れていない状態で測定を行う。また、ナノダイヤモンド懸濁液のpHを酸性にして、溶液内でのOHラジカルの絶対数が少ない状態で超音波を照射する事で、何らかの影響を見る事ができると考えられる。

現在のpHの測定方法では、空気中にある二酸化炭素の影響を考慮していない状態である。空気中の二酸化炭素が溶液中に溶け込む事で、pHが時間をかけて酸性に傾く事が知られている。今回のpHの変化がナノダイヤモンド微粒子と超音波のみによる結果であると限定する事ができない状態である。そのため、懸濁液の溶存気体を抜いた状態で測定をする事で超音波が懸濁液内に及ぼす影響のみを見る事ができると考えている。しかし、溶存気体の量が減る事で音響キャビテーションが発生しにくくなることも考えられるので、超音波の照射条件を変更する事で更に検討する事が重要である。

### 【参考文献】

- 1) 田畑泰彦：“ドラックデリバリーシステム DDS 技術の新たな展開とその活用法” メディカルドゥ, p13
- 2) 小松直樹：“ナノダイヤモンドのドラッグキャリアへの応用” 滋賀医大誌 26 (2013),

p3-4

- 3) 小松直樹：“生物・医療応用を目指したナノダイヤモンド粒子のサイズ分離と表面化学修飾” 表面科学 Vol.30, No.5, pp.273-278, 2009, 特集「ナノダイヤモンドの基礎と最近の展開」
- 4) J. Rao: ACS Nano 2, 1984 (2008)
- 5) S.J. Putterman: “音響ルミネッセンス” 日経サイエンス, No.4, pp.56-63, April 1995
- 6) HG Flynn: “Physics of Acoustic Cavitation”, J. Acoust. Soc. Am. Vol.31, Issue 11, 1582.
- 7) T.G. Leighton: “The Acoustic Bubble”, Academic Press, 1997
- 8) Takeyoshi Uchida, Tsuyoshi Takatera, Toshio Sato, Shinichi Takeuchi, Naimu Kuramochi, Norimichi Kawashima; 2001 IEEE Ultrasonic symposium pp.431-434, 2001.10
- 9) Shinichi TAKEUCHI, Takeyoshi UCHIDA, Takahiro Aoki and, Norimichi KAWASHIMA: “Study on disaggregation and surface modification of nano meter size diamond particle by ultrasound exposure — Relationships between US exposure time and particle distributions, zeta potential and effect of avoidance from acoustic streaming —” IEICE Technical Report US2009-46 (2009-9)