

分子分画法を利用した高分子複合体の特性評価



櫻井和朗

北九州市立大学国際環境工学部
[808-0135] 北九州市若松区ひびきの1-1
教授、理学博士。
専門は生体高分子、DDS、散乱、高分子物性。
sakurai@kitakyu-u.ac.jp
www.sakurai-lab.jp/index.php/

1. はじめに

混合物の性質を理解するのは実に難しい。成分間に相互作用がある場合などは分離して個々の成分を調べてももとの混合物のことはよくわからない。それでも、第一歩は混合物を分離して単一成分を取り出すことから始まる。高分子科学の分野で使われているクロマトグラフィーも雑多な混合物である生体試料を分けることから始まったようである。“chromatography”は“chromo”というギリシャ語を語源とする「色(color)」と関係していると想像できる。調べてみると、やはり、植物のクロロフィルの成分を含んだ溶液を炭酸カルシウムの粉を詰めた管に流して分離した手法が最初に“chromatography”と名づけられた。直訳をすると「色の記録法」のような意味があるが、確かにクロロフィルを分画した写真を見ると白い炭酸カルシウム上にさまざまな色に染まったバンドが展開されている。その後1950年代に多糖から作ったゲルを分離剤として使ってタンパク質を大きさで分離できることが示され、今日のゲルろ過クロマトグラフィー(GPC)に発展してきた¹⁾。GPCは高分子やタンパク質の分離や精製にきわめて有用であるが、分離剤のゲルに溶質が吸着するような場合には使えない。ゲルなどの分離剤を用いることなく高分子などを大きさで分離する方法は、非対称の流動場(FFF Field-Flow Fractionation)を用いて初めて実現された。最初の実験は1960年代に報告されているが、使いやすい装置で汎用的になったのは最近のことである²⁾。GPCやFFFの検出器として多角度光散乱光度計を使うことで、各フラクションの分子量や分子の回転半径(後述)が正確に求めることができる。さらには粘度計を接続して固有粘度を測定することも可能となった。このようにして得られた回転半径や固有粘度の分子量依存性から分子の形態に関する多くの情報が得られる。筆者が学生時代には数グラムの試料が必要で1年以上かかったこれらのデータが、数ミリグラムの試料から1時間以内で得られる。まさに隔世の感がある。

溶液に溶けている成分を分離して分析することは実用的にはきわめて重要な技術である。とくに注射製剤

の開発や品質管理では重要である。安全性保証や薬事申請において製品が審査に合格した物と同じであること:「同等性の保証」は根幹となる大切な事項である。薬のレギュラトリーサイエンスは「同等性」と安全性の証明のためにあると言っても過言ではない。薬では人の体に生理活性物質を直接的に作用させるので工業材料のそれとは比較にならない高い安全性や品質管理が求められる。低分子化合物の化学的な「同等性の保証」は、高分解能のNMRと質量分析計が接続された高速液体クロマトグラフィーがあれば純度も含めた化合物の構造決定ではほぼ完結される。しかし、高分子医薬やミセル医薬などのナノメディシンになると途端に「同等性の保証」は難問となる。粒子の大きさや成分に分布があるナノメディシンの場合なにをもって「同等」と言うのかは悩ましい問題である。製剤の業界では動的光散乱(DLS)による流体力学的半径 R_h の測定が物性評価のほぼ唯一の方法として用いられてきた。しかし、DLSは混合物の測定には決定的に向かないし、そもそも求められる大きさはモデルに依存していて絶対値ではない。最近では、薬の審査をする国の機関もそのことによりようやく気が付いたようであり、DLSに代わる分析方法を求めているようだ。溶液中に溶けているナノサイズの粒子の物性測定は高分子溶液論が本来得意とする分野であり、ナノメディシンの正確な特性評価は高分子溶液論が活躍するべき分野だと思う。

2. 溶液散乱法: 分子量と回転半径の決定

FFFやGPCは検出器として多角度光散乱光度計が備わっている。また、最近では放射光の強力なX線を用いた小角X線散乱を組み合わせたこともある。溶液散乱の測定では散乱光強度を散乱角 θ もしくは $q = (2\pi/\lambda) \sin(\theta/2)$ で定義される散乱ベクトルの絶対値の関数として測定する。ここで λ は光の波長である。測定対象の大きさが $1 - 10^3$ nm程度の場合、光散乱では全角度範囲で、X線小角散乱では数度以下の小角の範囲で測定を行う。この角度の違いは光とX線の λ の差から来ている。粒子間の干渉が無視できる程度の希薄溶液からの光散乱やX線小角散乱の強度 $I(q)$ は以下の式で重量平

均分子量 M_W と関係づけることができる。

$$I(q) = N(\rho V)^2 S(q) = \frac{M_W}{N_A} (\rho v)^2 S(q) \quad (1)$$

ここで N 、 V 、 ρ 、 $S(q)$ 、 N_A 、 C 、 v はそれぞれ単位体積中の散乱体の数、一つの散乱体の体積、散乱体の平均電子密度、形状因子、アボガドロ数、重量濃度、比容である。 $S(q)$ は角度零で1となるように規格化されている。小さな q における $S(q)$ の漸近挙動から回転半径 $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ が求まり、大きな q の $S(q)$ から散乱体の内部構造に関する情報が得られる。光散乱では ρv の積が溶質の屈折率増分として独立に決定できるため M_W が正確に求められるが、 $S(q)$ からは粒子の大きさの指標である $\langle S^2 \rangle$ が求められるのみである。一方、X線小角散乱では ρ に関して仮定が必要であるため M_W の決定に不確かさが残るが、 $S(q)$ からは原子レベルに至るまでの内部構造に関する情報が得られる。ここで強調しておきたいのは、分子量も回転半径も溶質が溶液中に分散しているならばなんの仮定もなく求まる絶対値であることである。この点、DLSから求まる R_h と異なる。溶液散乱法に関して日本語の素晴らしい教科書が最近出版された。それらをぜひ参考にして欲しい^{3),4)}。

3. 分画装置と連結した光散乱法の利用⁵⁾

天然多糖の一つである β 1,3グルカンは核酸と複合体を形成する。 β 1,3グルカンが免疫細胞に取り込まれることから、この複合体によって核酸を免疫細胞に選択的に送り届けることができる。核酸として CpG モチーフやアンチセンスなどの生理活性のある配列を選ぶと免疫系を制御することができ、現在これを使った医薬品の開発が進んでいる^{6),7)}。複合体の調整方法はきわめて簡単である。中性水溶液中では3重らせんを形成している β 1,3グルカンはアルカリ性では1本鎖となり、pHを中性に戻すと3重らせんが再生する。その中和の過程に核酸があると複合体が優先的に形成される。

図1Aにデオキシアデニンの60量体 (dA_{60}) と β 1,3グルカンの一つである3重らせんのシゾフィラン (tSPG) それぞれのGPC溶出曲線と複合体 (dA_{60}/SPG) の溶出曲線を比較して示す。波長260 nmの紫外線を核酸は吸収するが多糖はしない。図1A下段のUV吸収で観測した溶出曲線が示すように複合化によってUVの吸収は高分子量側にずれ、分布が広がる。未反応の dA_{60} もわずかに残っている。ピーク面積の比から複合化率は95%と算出される。一方、平均分子量が47万であった tSPG と比較すると複合体は半分程度の平均分子量となる。複合化によりもとの tSPG のピークはほぼ消滅している。別の測定から、多糖の主鎖グルコース2分子と核酸塩基1分子が結合し全体としては長い2本のSPG鎖に数本の核酸が結合した複合体ができることがわかつ

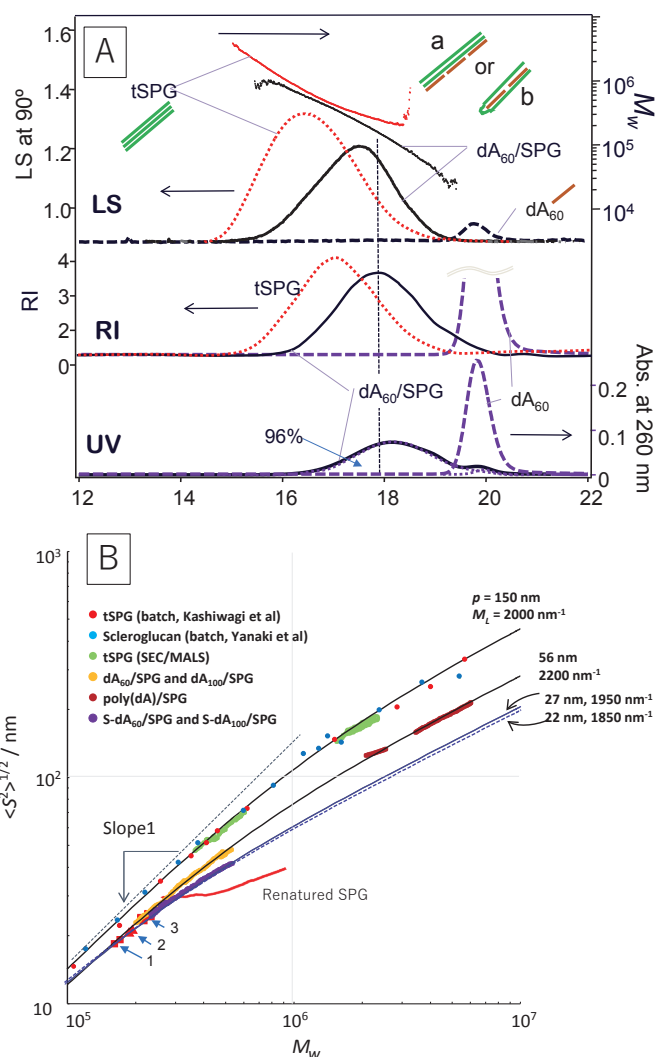


図1 GPCによる多糖核酸複合体の分画とその溶離液を光散乱 (上段) 屈折率 (中断) 260 nmの紫外線吸収で測定したときの溶離曲線 (A) と多角度光散乱光度計の角度依存性から求めた回転半径 ($\langle S^2 \rangle^{1/2}$) を同じく光散乱から求めた重量平均分子量 (M_w) に対して両対数プロットした図 (B)。tSPGは3重らせんのシゾフィラン。図B中の黒の実線はBenoit-Dotyの式から、表示してある持続 (p) と単位長さ当たりの分子量 (M_L) の値を使って計算したミズ鎖モデルに対する回転半径の計算値。

ている。tSPGを構成している1本の糖鎖が数本の dA_{60} と置き換わって、ほかの2本の糖鎖がそのまま複合体ができるなら (図1Aのa)、置き換わった核酸の分子量から考えて複合体の平均分子量は基のtSPGより大きくななければならない。この矛盾を説明するためには、糖鎖1本がU字型に折れ曲がってその間に核酸が入ったような複合体 (図1Aのb) を考える必要があるが、明確な説明は今のところない。

tSPGは溶液中では比較的硬い半屈曲性の棒状分子として振る舞う。光散乱から求めた $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ を分子量に対してプロットしたConformation plotを図1Bに示す。図中のさまざまな色の丸印は、則末らが分別沈殿法で

分画した試料に対して光散乱測定で得たデータである。緑色の線は筆者らがGPCを使って得たデータである。これらのデータ点は、持続長 $p = 150 \text{ nm}$ 、単位長さ当たりの分子量 $M_L = 2,000 \text{ nm}^{-1}$ として計算したBenoit-Dotyの式と2桁の分子量範囲できわめてよい一致をしている。 $M_w < 3 \times 10^5$ の範囲では $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ が M_w に比例 ($\langle S^2 \rangle^{1/2} \propto M_w^\alpha$ であらわしたときの指数 $\alpha = 1$) しており、剛直な棒として振る舞っている。天然型のdA₆₀やdA₁₀₀などから調整した複合体はオレンジ、核酸のホスホジエリテル結合の酸素原子の一つがイオウに置き換わった核酸類似体(S-dA₆₀)との複合体を紫の印で示す。これらも低分子量側ではほぼ傾きが1となり剛直な棒状の形態をとっているが、tSPGと比較をすると右に並行移動したような関係:「同じ拡がりを与える分子量は複合体のほうが大きい」にあるように見える。棒状の分子では $\langle S^2 \rangle^{1/2} = (M/M_L)/\sqrt{12}$ の関係が成立する。多糖核酸複合体の化学量論比から M_L を見積もると10%程度増加してよく、この並行移動の関係は上手く説明できる。ここで M は分子量であり、計算では重量平均分子量を使った。

高分子量のS-dA複合体は天然型と比較して小さい $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ を示す。これはS-dA複合体が柔らかい(持続長が短い)ようにも見えるが、高分子量側でわずかに分岐している可能性もある。再生されたSPG(複合化の過程を核酸なしで行う)は局所構造としては3重らせんを保持しているが分子全体の形態としてはもとの直鎖上の棒状ではなく枝分かれや網目構造ととることが顕微鏡観察などからわかっている。その形態は再生時の糖鎖の濃度に強く依存して、濃度が上がるとともに、形態は環状から枝分かれ、網目へと変化していく。そのような場合は $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ の分子量依存性は再生時の濃度に依存するが多くの場合、指数 α がランダムコイル鎖に期待される値0.5より小さくなる。図1Bに示したデータは再生されたSPGの典型的な例である。再生SPGを作る場合と同じ操作にもかかわらず、核酸が存在すると再生時の糖鎖の濃度には依存しないで図1Bに示したデータが再現良く得られる。このことや、Benoit-Dotyの式でよく説明できることから、複合体ではほぼ枝分かれがない直鎖上の形態をとっていると結論できる。

複合体のRIやUVの溶出曲線を注意してみると18分の極大値の長時間側に肩がある。この傾向は原料のSPGの分子量が低くなると顕著になる(図2A)。ピークを無理やり複数の正規分布を用いて分離すると、最低でも四つの成分が低分子量側に出てくる。低分子量側から1~4と番号をふった。UVは核酸のみ、RIは核酸と多糖の両方の濃度を反映していることに注意して各フラクションにおけるSPGの主鎖グルコースと核酸塩基のモル比 ($[mG]/[dA]$) をVUとRIの測定値から見積もることができる。それを図2Bに示した。興味深いのは $[mG]/[dA]$ が極小となる24.2分や23分は

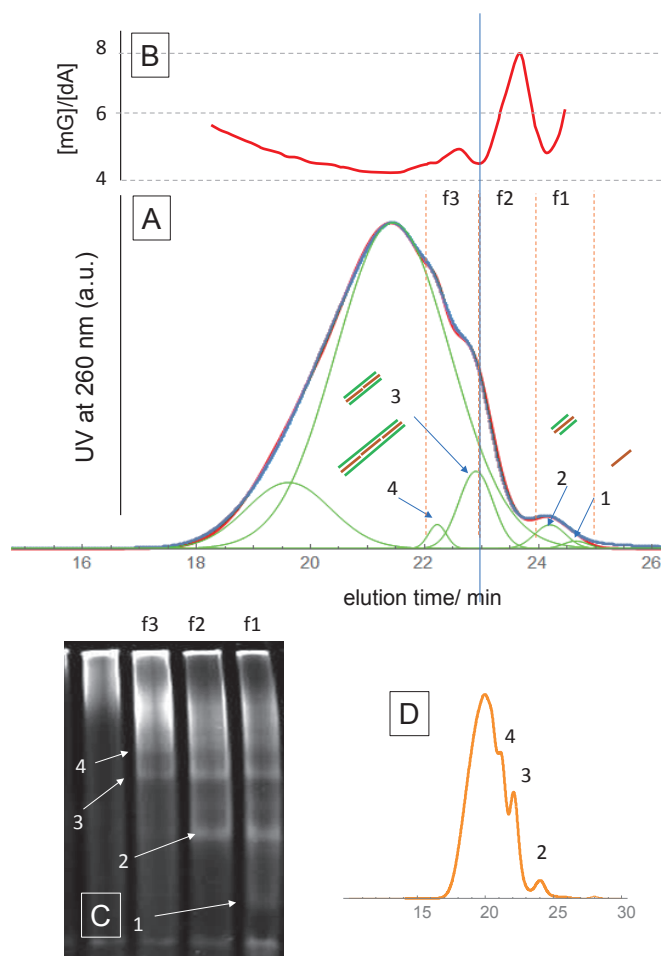


図2 GPCによって分画した多糖核酸複合体のUV溶離曲線(青)とピークを複数の正規分布で分離したときの書く分布(緑)とその合成曲線(赤)(A). UVとRIから求めた各フラクションにおける多糖主鎖と塩基のモル比 ($[mG]/[dA]$) (B) と溶離曲線を分画採取して得た溶液のゲル電気泳動パターン (C). 電気泳動のバンドとピーク分離したそれぞれのピークとの対応を数字で示した. SPGや核酸配列は図2Aとは異なり(未公開, 特許と論文は作成中), したがって図1と図2で溶離時間の直接の比較はできない. (D) は低分子量用カラムで分画したときのパターン.

ピーク分離した正規分布の極大値の位置に一致する。 $[mG]/[dA]$ が小さいということは核酸が多いということであることから、分離した小さいいくつかの正規分布は核酸の分布を反映していると考えられる。

図2Aに示した間隔で溶離液を集め、それをゲル電気泳動で展開した後に核酸が染色できる色素で染めたのが図2Cである。分画f1やf2において特定位置にバンドが観測されている。光散乱で測定した分子量などからこのゲル電気泳動のバンドはピーク分離した複数の正規分布と対応することができる。また、#1は未反応の核酸、2~4は複合体で#2は核酸1分子、#3は核酸2分子、#4は核酸3分子を含んでいると考えられる(図中にはこれを模式図で示してある)。分子量の関係がおおよそ、 $M_{w\#2} : M_{w\#3} : M_{w\#4} = 1 : 2 : 3$ となっている。

また、光散乱から得られた $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ を分子量に対してプロットすると (図1B) と先ほど述べた複合体の低分子量側の曲線と一致する。以上のことからきわめて興味深いことが示唆される。核酸分子は複合体形成過程で自分と過不足なく複合化が可能なちょうどよい分子量の1本鎖のSPGを選んで複合体を形成する。おそらく、長さが釣り合わないSPGと複合化しても熱力学的に不安定で鎖の入れ替わりなどが起こるのであろう。このために複合体の低分子量側では分子量が連続的に変化しないで特定の値の頻度が高くなるために肩があらわれると考えられる。GPCの利点はカラムと実験系の相性が良いと分画の精度がきわめて高くなることである。とくに低分子量側ではHPLCと同じくらいの精度で分子分画が可能となる。その例として、図2DにAの低分子量側だけを分画した例を示す。全く同じ試料であるが、図2Aのクロマトグラムでは主ピークの左側にわずかな肩として見えていた成分がそれぞれ独立したピークとして観測される。このとき高分子量側の分画精度は落ちていますが、複数個のカラムをタンデムで接続することで広い範囲で細かい分画が可能となる。FFFではここまでの分画能を出すのは難しい。

4. FFFを用いた高分子ミセルの 会合数決定^{8)~10)}

高分子ミセルは薬物送達に使えるということもあって膨大な数の論文がでている。しかし、水中での正確な会合数を測定している研究例はわずかである。これは水溶液の散乱測定の技術的困難さに加えて高分子ミセルどうしが容易に会合して二次凝集体を作るからである。このような凝集体が存在すると従来のバッチ法(分画をしない)の光散乱においては大きな誤差の原因となる。高分子ミセルは内殻鎖の緩やかな凝集力で結合しているのでGPCのゲルに吸着することが多いためGPCが使えない。FFFは図3Aに示すように二つの流動場を用いて粒子の大きさによって分画する。分画にゲルを用いていないので高分子ミセルの分画に向いている。注意しなくてはならないのは“focusing”操作によって溶質分子の構造が変化することである。この操作は分画を始める前に二つのInflowの流量を調整して溶質を半透膜上の一定の位置に止めることであり、半透膜を通過していく流れで溶質分子の局所濃度は急激に上がり溶質は半透膜の上に押し付けられる。このため溶質が吸着して二度と遊離してこないこともある。

図3Bは、同一の試料から異なる方法(青：透析、赤：超音波)で調整した高分子ミセルのFFF溶離曲線を比較する。青の透析法では長時間(高分子量側)に高分子ミセルがさらに会合した二次凝集体のピークが光散乱で見えるが、その組成は屈折率から2%以下であるとわかる。式(1)に示されているように散乱強度は散乱

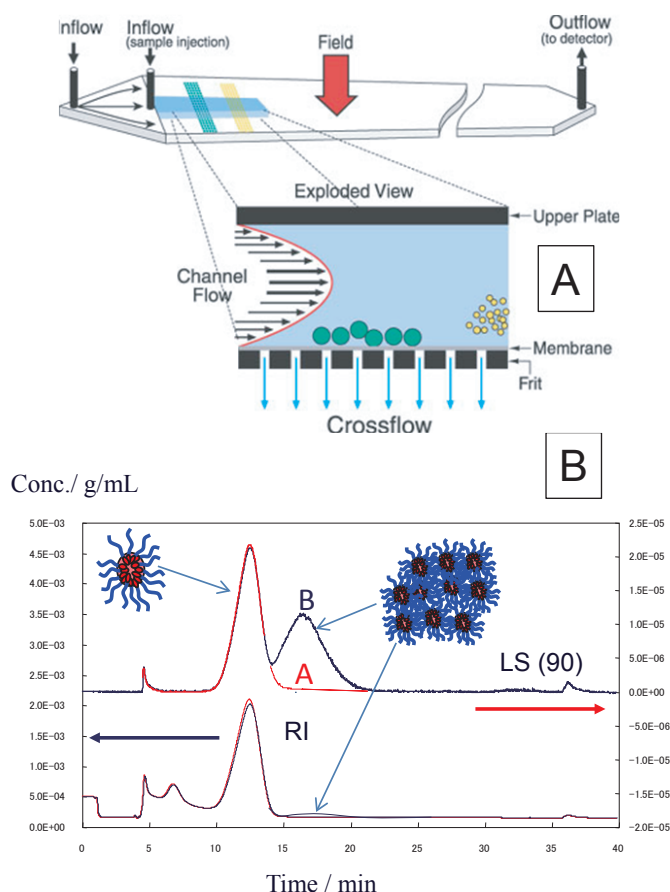


図3 流動場分画法(FFF)の原理の模式図(A)と高分子ミセルを分画したときの溶離曲線(B)。下に半透膜を敷いた台形上の流路を溶質が流れていくとき垂直方向の流れと水平方向の流れができる。溶質は垂直方向の流れに抗してブラウン運動をする。拡散係数の大きな粒子ほど粒子は中央に近づく。水平方向の流れは中央ほど流速が速く、核酸係数が大きな粒子から流出する。全く同じ試料から異なる方法で高分子ミセルを調整した(青：透析、赤：超音波)ときの流出曲線の比較。

体の体積の2乗に比例する。したがって大きな散乱体が共存するとたとえそれがわずかでも散乱強度には大きく寄与する。したがってこのような二次凝集体がある系の分子量の決定は分画操作なしでは困難となる。

5. 正多面体と同じ会合数をもつ カリクサレン系両親媒性化合物の集合体¹¹⁾

ミセルは多くの分野に使われているきわめて身近な存在である。ミセルの形状には、球状から、棒状や板状、ベシクル状があり、とくに球状ミセルは多くの化合物がとる形状で古くから研究が行われてきた。100年近く前の1913年にイギリスの化学者McBainによってミセルの概念が提唱された後、モデルの精密化と理論構築やミセルの実験的な研究が盛んに行われてきたし、現在も物理化学の中心的な課題の一つである。これらの研究はDebyeやTanfordらによって開始され、Israelachvili

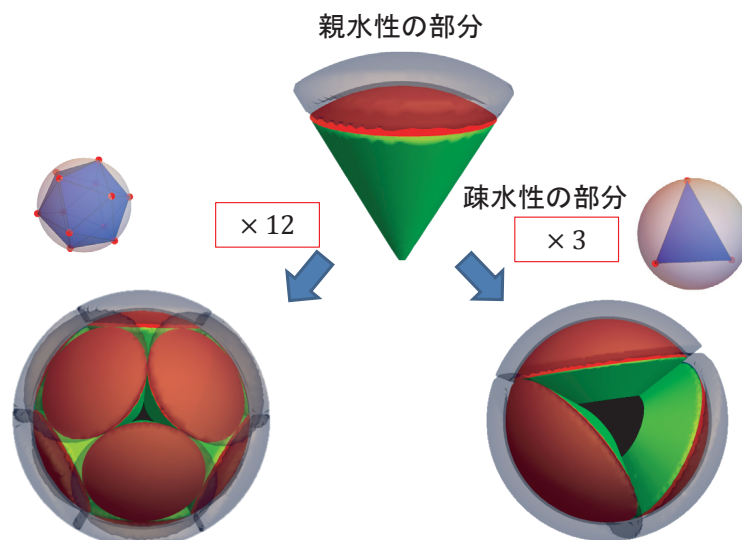


図4 界面活性剤を円錐形のモデルとして扱い、その会合形態を考察した図。円錐が12個集まって球状の会合を作る場合、最も疎水性の部分を隠す配置は（頂点の立体角は自由に動かせると仮定）同じ大きさの12個の球帽で球の表面を細密充填する問題と数学的に同等である。球帽の中心が正20面体の頂点の位置に来たときに被覆率が最大となる。このときの被覆率は90%。一方、3個が集まって球状の形態を作るとき、正三角形の頂点に球帽の中心が配置した場合に被覆率が最大となる。このときの被覆率は75%。

らによってほぼ完成された¹²⁾。これによると、球状ミセルは数十～百数十の分子が集まって形成され、その会合数は、疎水性の部分と、親水性の部分のバランスによって決まり、溶媒や濃度、ミセルの化学構造が変われば、連続的に変化するとされる。この理論はパッキングパラメーター理論としてよく知られている。球状ミセルのモデルは高校の化学の教科書に必ず解説図付きで載っている高校化学の必須事項である。筆者らは、ミセルを形成する分子の個数(会合数)を小さくしていったところ、従来の考え方では説明ができない現象を発見した。会合数が30程度以下になると、球状ミセルである限り会合数は、2、4、6、8、12、20、24から選ばれる数字のどれかである。たとえば、会合数が5とか、7、17などの値はとりえない。溶媒条件などを連続的に変化させて、従来のミセルの概念では会合数が連続的に変化しうる条件にしても、6→8→12と不連続にしか変化しない。筆者らが見つけた会合数のほとんどは、プラトンの正多面体の面の数と一致する。このことから、この不思議なミセルを「プラトニックミセル」と名付けた。

球状ミセルを作る分子の大雑把な形状は円錐状と考えることができる。水は疎水性の部分との接触を嫌うため、このような円錐形の分子は疎水性の部分がお互いに寄り集まって親水性の部分で疎水性の部分を覆い隠すように球状の集合体を作る。従来は会合数が十分に大きいとして理論的に作られてきた。これによると、分子の数が多くなるほど疎水性の部分の露出が少なくなる（すなわち、被覆率が高くなる）、しかし分子の数が多いと混みあってきて反発が大きくなる。会合数はこの二つの因子のバランスで決まるとされてきた。しかし、会合数が少なくなると特定の数のときに被覆が

高くなる。これは球の表面を同一の大きさの球帽（球の表面を円で切り取った図形）で覆う場合の最密充填の問題である¹³⁾。たとえば会合数12と3の場合を比較する（図4）。12の場合は球帽の中心が球に内接する正20面体の頂点になるように配置したときに被覆率が最大となり、その値は90%である。一方、3の場合は球帽の中心が球に内接する正三角形の頂点になるように配置したときに、被覆率が最大75%になる。円錐の数が少ないときは、数によって最大となる被覆率が大きく異なる。この被覆率が高くなる球帽の数と筆者らが見つけたプラトニックミセルの会合数はほぼ一致する。

図5にその一例を示す¹⁴⁾。カリクサレンと呼ばれる芳香族環状化合物の一端に親水性のポリエチレングリコール（PEG）鎖、他方に疎水性のアルキル鎖をもつ両親媒性化合物（図5A）を水溶液に分散させると自己集合をしてミセルを作る。このミセルの分子量と分布を測定するためにFFFで分画した各フラクションの光散乱測定をした（図5B）。この系はGPCのゲル層に吸着したりゲル層がミセルを壊すためGPCに向かない。PEGの分子量が550と1,000のときは溶出曲線は一定の幅をもっているがその分子量はどこの位置でも同じである。光散乱から求めた分子量から会合数は12と8となる。この値は、超遠心やX線小角散乱から求めた値と一致した。またPEGの分子量が550と1,000の系の単分散性は超遠心測定からも確かめられた（図5C）。一方、分子量が2,000のPEG鎖を結合させた場合は流出曲線がきわめて幅広くなり分子量も 8×10^3 から 10^5 までの広い分布を示す。パッチ測定やX線小角散乱からはこれほど広い分布が観測されない。したがってPEG2000のFFFの結果は“focusing”操作による不可逆な会合体の

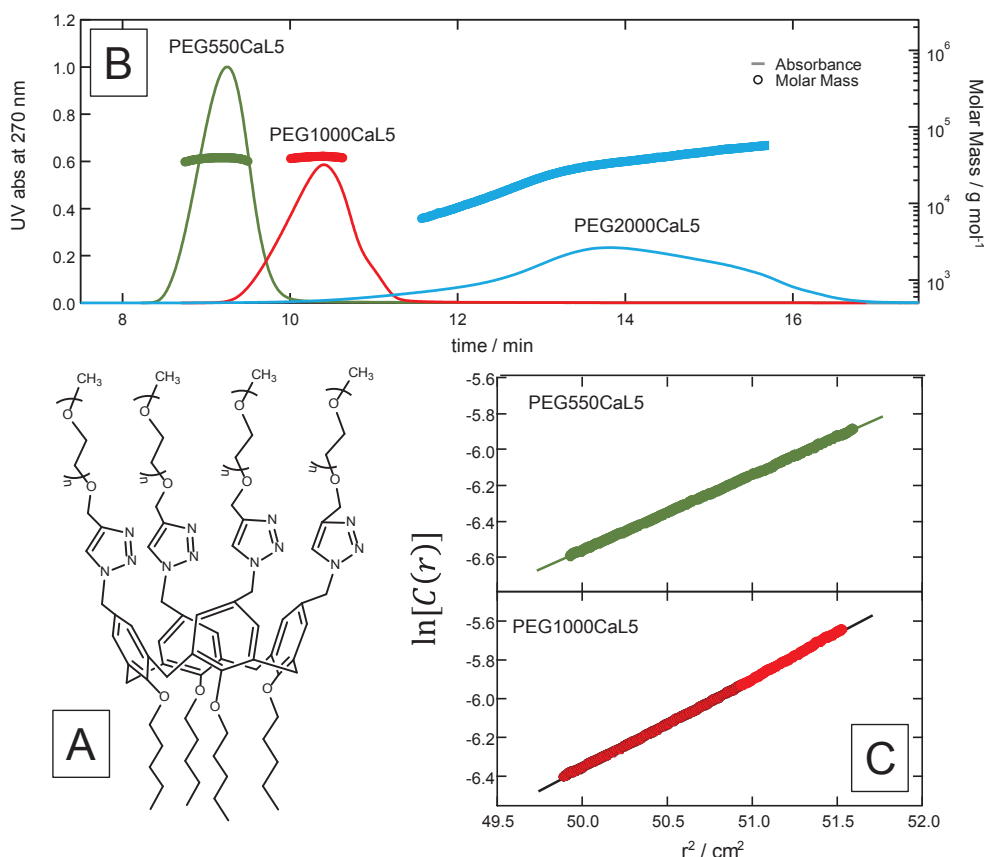


図5 (A) 親水性としてポリエチレングリコールをもったカリクサレン系両親媒化合物の構造. (B) 3種の異なるPEG鎖のミセルをFFFで分画したときの流出曲線の比較 (C) 単分散性を確認するために測定した超遠心のデータ. セル内の中心からの距離の2乗 r^2 に対して溶質の濃度の対数を目盛っている. 分子量に分散がなく分子間相互作用の寄与が小さい場合はこの関係が直線になる.

形成と推測される。PEGの分子量が高くなるにつれてミセルの凝集力が弱くなり臨界ミセル形成濃度が1桁上昇していることが確かめられている。このように比較的弱い凝集力で集まっていてGPCのカラムでは構造が壊れしまうような分子集合体でもFFFで分画することができる。ただし、流分の精度はどうしてもGPCに劣る。

6. おわりに

FFFは数nmから上限は μm の粒子まで“focusing”さえできれば分画することができる。最近ではセルロースナノファイバーなどの分画にも使われている¹⁵⁾。一方、GPCでは系と相性が良いカラムが見つければきわめて精度の高い分画が可能となる。この意味で二つの方法は相補的な手法と言えるだろう。

溶液中のナノ粒子の解析としてDLSが大流行している。おそらく「ボタンを押したら何も考えなくても結果が出る」簡便さがその大きな要因であろう。確かに試料溶液を穴に入れたら一瞬にして粒径と粒径の分布まで綺麗な色付きのグラフで表示される簡便さは魅力である。かつて研究者は中身がわからないブラックボッ

クスが出すデータは信用しないように教育されてきた。しかし、携帯電話に代表されるようにわれわれの身の回りにはブラックボックスがあまりに増えて、先人からの教えを忘れてしまったようだ。人工知能に仕事を奪われないためにも、大切なデータだけは測定の中身を理解して測定をしたいものである。

文 献

- 1) E. Lundanes, L. Reubsaet, and T. Greibrokk, “Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods”, Wiley-VCH (2013)
- 2) S. K. R. Williams and K. D. C. Caldwell, “Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis”, Springer (2011)
- 3) 柴山充弘, *et al.*, “光散乱法の基礎と応用”, 講談社, 東京 (2014)
- 4) 橋本竹治, “X線・光・中性子散乱の原理と応用”, 講談社, 東京 (2017)
- 5) Y. Sanada, *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 87 (2012)
- 6) N. Miyamoto, *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **28**, 565 (2016)
- 7) H. Izumi, *et al.*, *Int. J. Oncol.*, **48**, 2472 (2016)
- 8) K. Shiraishi, *et al.*, *J. Control. Release*, **234**, 59 (2016)
- 9) K. Shiraishi, *et al.*, *J. Control. Release*, **203**, 77 (2015)
- 10) Y. Sanada, *et al.*, *Kobunshi Ronbunshu*, **69**, 346 (2012)
- 11) S. Fujii, *et al.*, *Sci. Rep.*, **7**, 44494 (2017)
- 12) B. Vincent, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **203**, 51 (2014)
- 13) Y. Teshima and T. Ogawa, *Forma*, **15**, 347 (2000)
- 14) K. Yoshida, *et al.*, *Langmuir*, **33**, 9122 (2017)
- 15) A. Mukherjee and V. A. Hackley, *Analyst*, **143**, 731 (2018)