

流体デバイスを用いた高分子ベシクル形成法と物質保持特性評価

Development and Membrane Characterization of Polymer Vesicles Formation Using Fluidic Device

096845 守永睦貴
指導教員 鷲津正夫 教授

概要：ポリエチレングリコールとポリカチオンあるいはポリアニオンからなるブロック共重合体を用いて調製したポリイオンコンプレックス(PIC)は、高塩濃度溶液下では凝集し、ドロップレットを形成する。しかし、このドロップレットは塩濃度が低下することで膜構造を形成する。本研究では、この現象に注目し、PICの塩濃度特性を利用して単一膜ベシクル形成法の開発を試みた。次いで、このベシクルの物性を検討することで、アプリケーションを模索した。

1. はじめに

ベシクルは微量の物質を保持、運搬することができるため、ドラッグデリバリーやマイクロリアクタでの応用が期待される。これまで、両親媒性分子からなるリポソームがベシクルの代表として汎用されてきた^[1]。しかし、リポソームは、溶液調製時に有害な有機溶媒を使用するため、バイオマテリアルとして好ましくない。また、高度に疎水的な膜は水溶性物質をほとんど透過せず、徐放機能を必要としたドラッグデリバリーでは大きな問題となる。これらの問題は、全て疎水基に起因するため、疎水基に依らないベシクルが今後必要になる。そのような中で、東京大学片岡研究室にてポリイオンコンプレックスを利用した新規ベシクルが開発された^[2]。

親水性であるポリエチレングリコール(PEG)とポリカチオンあるいはポリアニオンからなるブロック共重合体を水中で混合すると、静電相互作用により、ナノサイズを中心としたポリイオンコンプレックス(PIC)型ベシクルが形成される^[2]。このとき、PEG鎖がベシクル内外に配向しているため、水中で安定した構造になっている^[2]。このベシクルは、PIC膜に起因した特徴的な物性を示すと考えられるが、未だ、物性の多くはわかっていない。そこで、本研究では、光学顕微鏡下で挙動を追跡できるミクロンサイズの単一膜ベシクルを用いて、PICベシクルの物性を把握することを目指す。

ミクロンサイズのPICを形成するためには、PEGと荷電性部からなるブロック共重合体に加えて、PEGを持たないホモポリマーを添加すればよい^[3]。一方で、この場合、PICは混合しただけではベシクルにならず、図1に示すような凝集構造のドロップレットを形成する。興味深いことに、このドロップレットは塩濃度が低下すると膜構造を形成することがわかっている。しかし、この現象のメカニズムは明らかになっておらず、単一膜ベシクルを形成できる条件もわかっていな

い。そこで、本研究では、まず、ドロップレットから膜構造ができる様子をリアルタイムで追跡することで、メカニズムを把握する。その上で、単一膜ベシクル形成法を確立する。次いで、形成した単一膜ベシクルを用いて、PIC膜の物性を評価し、アプリケーションを模索する。

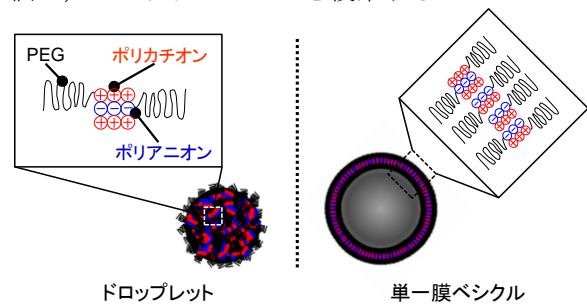


図1 PIC型微粒子

2. 流体デバイス

PICの塩濃度低下に応じた挙動をリアルタイムで観察するためには、観察場内にPICを固定したまま、溶液条件を制御しなければならない。しかし、通常、溶液条件を変える際は液置換を行うため、PICは観察場から流されてしまい、リアルタイムで挙動を観察できない。そこで、本研究では、観察場に粒子を固定したまま、溶液条件を制御できるPDMS製の流体デバイスを作製した。

流体デバイスの模式図を図2に示す。主流路の端に微小な台形型ポケットを設けた。微小ポケット部には流線がない(図2(a))。そのため、PICを予めポケット内に導入しておけば、拡散しにくいPICのような巨大粒子はポケット部から流出することはない。一方で、主流路に低分子溶液を流した場合、低分子は拡散しやすいため、ポケット部へも容易に流入する(図2(b))。以上の原理から、このデバイスでは、ポケット内にPICを固定したまま、PIC周りの溶液条件を制御できる。

ポケット内に、予めPICを導入する際には、PDMSのガス透過性を利用した。通常、ポケッ

ト内には流線がないため、溶液は導入できない。しかし、PDMS デバイスを予め脱気しておく、デバイスに溶液導入後、ポケット内に溜まった空気は PDMS に吸収され、速やかに PIC 溶液をポケット部内に導入できる (図 2 (c))。

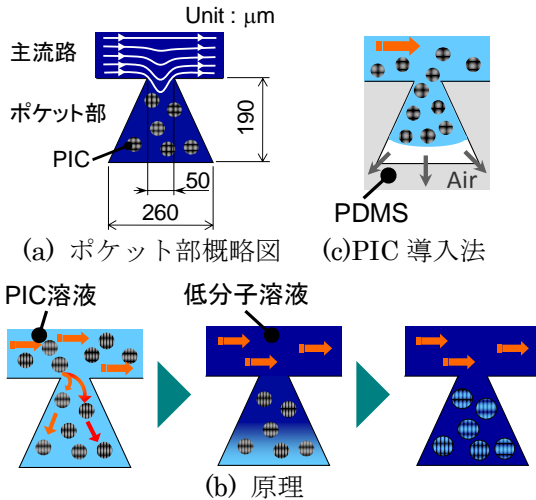


図 2: 流体デバイス

3. ベシクル形成過程のリアルタイム観察

3.1 実験方法

図 3 に示すようなカチオン性ブロックコポリマー-PEG-(DAP)₇₀ ($M_w = 15950$)とホモポリマー-homo-(DAP)₈₂ ($M_w = 16410$)を電荷比 1:1 で混合し、そこに、アニオン性ブロックコポリマー-PEG-(Asp)₇₀ ($M_w = 10060$)を電荷が釣り合うように混合すると、高塩濃度溶液下(150 mM NaCl)では PIC 型ドロップレットが得られる。

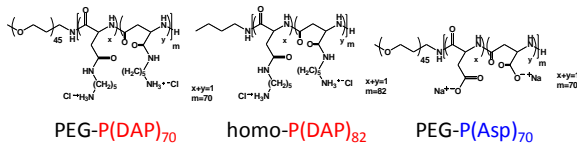


図 3: PIC を構成するポリマー

流体デバイスにドロップレットを導入後、低塩濃度溶液(0 ~ 10 mM NaCl)を導入することでドロップレットから膜構造ができる様子をリアルタイムで位相差観察した。

3.2 実験結果及び考察

塩濃度低下に伴う PIC の挙動を観察した結果を図 4 に示す。塩濃度を 150 mM から 10 mM まで低下させた場合、ドロップレットの外表面だけがわずかに膨張し、ドロップレット-ベシクル中間体を形成している。一方で、5 mM あるいは 0 mM まで低下させた場合、ドロップレットが全体的に膨張している。その結果、5 mM NaCl 溶液下では多層膜ベシクル、0 mM NaCl 溶液下では単一膜ベシクルを形成している。

以上の結果を踏まえると、塩濃度の低下量が大きいほど、浸透圧が大きく作用し、ドロップレットが全体的に変化してベシクルを形成しやすくなる可以考虑。また、単一膜ベシクルを得るためには、塩濃度を 150 mM から 0 mM まで低下させればよいことがわかる。

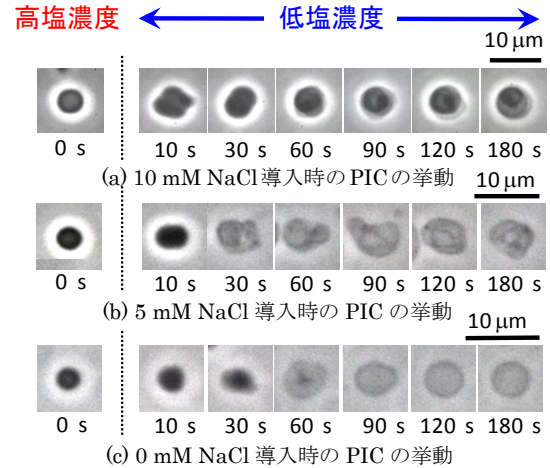


図 4: 塩濃度低下に応じた PIC の挙動

4. PIC ベシクルの物質保持特性評価

4.1 実験概要

PIC ベシクルは塩濃度を制御するだけで簡単に形成できた。そこで、次に、ベシクルに物質を内包・保持させることができるか検討した。ただし、PIC 膜は親水性高分子だけで構成されるため、水溶性物質は PIC 膜を透過する。そのため、ベシクルに物質を内包させられるかは内包物質の大きさより異なると考えられる。そこで、内包物質の分子量の違いによるベシクルの物質保持能の比較を行った。

4.2 実験方法

ベシクルに物質を内包させるために、高塩濃度の PIC ドロップレット溶液に、予め封入したい物質 (Rhodamine B or RITC-dex: Rhodamine B isothiocyanate-dextran) を混合した。次に、塩濃度を低下させることでベシクルを形成させる。そして、ベシクル形成 30 min 後、ベシクルに物質が内包・保持されているかを蛍光観察した。なお、内包物質の分子量は 400, 40000 の 2 種類を用いた。

4.3 実験結果及び考察

分子量 40000 の物質を用いて、ベシクルに物質が内包されているか位相差及び共焦点顕微鏡で観察した結果を図 5 に示す。図 5 はベシクルの断面像を示したもののだが、この図より、ベシクル内部には一様な蛍光が見られ、ベシクルに物質が内包されていることが分かる。

一方で、図 6 には分子量 400 の物質を用いてベシクルを位相差・蛍光観察した結果を示す。こ

の場合、ベシクル内には蛍光が見られなく、物質が内包・保持されていないことが分かる。

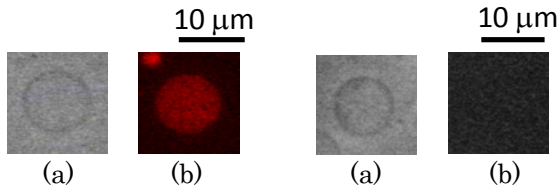


図 5 : $M_w = 40000$ 図 6 : $M_w = 400$
((a) : 位相差観察像, (b) : 蛍光観察像)

以上のように、PIC ベシクルは分子量の違いにより、物質保持能が異なる。この結果は、分子量 40000 程度の巨大分子の場合は PIC 膜を透過できないため、ベシクル内に保持できる。一方で、分子量 400 程度の小分子は PIC 膜を透過してしまうため、ベシクル内に保持できないことを示唆している。

5. PIC 膜の架橋

5.1 実験概要

PIC 膜の構造を変えることで、物質保持特性が変化するか検討した。PIC 膜はポリカチオンが持つアミノ基とポリアニオンが持つカルボキシル基が静電相互作用により結合してできたものだが、両官能基を架橋（アミド結合）することで膜構造を変えた。

物質保持特性の検討を行う前に、架橋の効果を確認するために、架橋の有無による PIC の塩濃度に対する挙動の相違を確認した。極端な例ではあるが、PIC ベシクルは、1 M NaCl 溶液下では図 7 に示すように、ベシクルが崩壊してしまう。そこで、架橋後、PIC の挙動が変化するかを検討してみた。また、架橋の有無で PIC 膜の剛性に違いがあるかを確認するために、高浸透圧下でのベシクルの挙動を確認した。

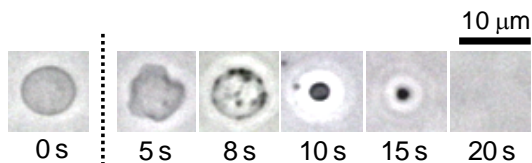


図 7 : 150 mM NaCl 溶液下でのベシクルの挙動

5.2 実験方法

架橋は、0 mM NaCl 溶液下で、PIC が持つアミノ基とカルボキシル基を EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)を用いて、アミド結合を形成させることで行った。そして、架橋後、1 M NaCl 溶液下あるいは 1 M $C_6H_{12}O_6$ 溶液下で、架橋前と塩濃度、浸透圧に対する挙動に違いがあるか検討した。

架橋の有無によるベシクルの物質保持特性の相違を検討する際は、分子量 400, 4000, 40000 の蛍光ゲスト分子(Rhodamine B or FITC-dex,

FITC-dex: Fluorescein isothiocyanate-dextran)を用いた。

5.3 実験結果

架橋後のベシクル(0 mM NaCl)と 1 M NaCl 溶液下でのベシクルの様子を図 8 に示す。図 8 (a) 及び図 4 (c)より、架橋後のベシクルは架橋前と同様に球形の形態を維持している。また、図 8 (b)より、そのベシクルは 1 M NaCl 溶液下でも図 7 のように崩壊することなく、形態を維持している。

架橋の有無による高浸透圧下でのベシクルの様子を図 9 に示す。図 9 より、架橋の有無でベシクルの形状に違いがある。架橋後のベシクルは局部的に凹んでいるが、これは架橋前に比べて PIC 膜が硬くなったことを示している。

以上のように、架橋の有無で PIC 膜の性質が変わったことから、架橋により PIC 膜の構造が変わったことがわかる。

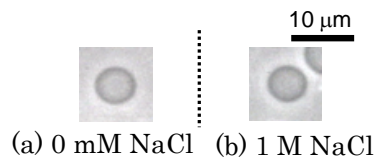


図 8 : 高塩濃度下でのベシクルの挙動

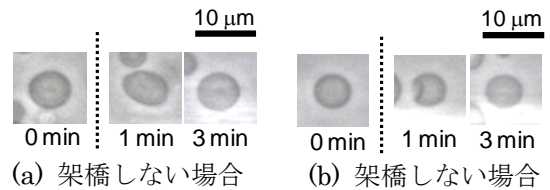


図 9 : 高浸透圧下でのベシクルの挙動

架橋の有無による物質保持特性の相違を検討した結果を表 1 に示す。表 1 から、分子量 400 あるいは 4000 の物質を用いた場合は、架橋の有無で物質保持特性に相違はない。一方で、分子量 4000 の物質を用いた場合、架橋したことで物質保持能が増している。これは、PIC 膜を架橋したことで、膜の透過性が低下したためである。この結果より、膜の架橋することで、物質保持能を高められることを見出した。

表 1 : 架橋による物質保持特性の相違

蛍光ゲスト分子 分子量 M_w	物質保持能	
	架橋なし	架橋あり
400	×	×
4000	×	△
40000	○	○

○ : 24 hourベシクル内に保持可

× : 1 hour以内にベシクル外へ透過

△ : 徐放

(1hourは保持できるが、24 hour後はベシクル外へ透過)

6. アプリケーション

6.1 実験概要

ベシクルに物質を内包後、ベシクル間で内包させた物質のやり取りができればマイクロリアクタとして有用である。そこで、物質を内包したベシクル同士を融合できないか試みた。

通常、ベシクル同士は融合しない。これは、図 10 に示すように、ベシクル外に配向する PEG 鎖がベシクル同士の接触を阻害するためである。逆にいえば、PEG 鎖の配列を乱れさすことで融合が可能になるはずである。

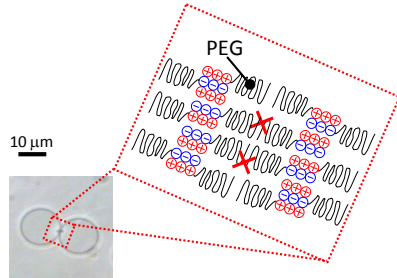


図 10 : PEG 鎖の融合阻害

図 7 に示したように、高塩濃度溶液下ではベシクルは不安定化し、PIC 膜の構造が変わる。つまり、この状態は PEG 鎖の配列が乱れた状態と考えることができる。そこで、高塩濃度溶液下でベシクル同士の融合ができないか検討した。

6.2 実験方法

ベシクル形成後、溶液条件を 150 mM NaCl とした。この条件下でベシクルに、集光した赤外線レーザーを照射して補足(光ピンセット効果)し、移動させることでベシクル同士を接触させた。さらに、その後、溶液条件を 0 mM NaCl にして、ベシクル同士を接触させて融合するか検討した。

6.3 実験結果及び考察

150 mM NaCl 溶液下でベシクル同士を接触させたときの結果を図 11 に示す。図 11 からわかるように、高塩濃度溶液下ではベシクル同士を接触させると、融合させることができる。



図 11 : 150 mM NaCl 溶液下での融合

次に、再度、溶液条件を 0 mM NaCl 溶液下にしてベシクル同士を接触させたときの結果を図 12 に示す。図 12 からわかるように、このとき、ベシクル同士を接触させても融合しなかった。

以上の結果から、高塩濃度溶液下では PEG 鎖の配列が乱れることでベシクル同士の融合が可能になる。一方で、低塩濃度溶液下になると、

PEG 鎖が規則的に再配列するため、ベシクル同士は融合できない。したがって、塩濃度制御を通じて PEG 鎖の配列をコントロールでき、その結果、ベシクルの融合を制御できることがわかった。



図 12 : 0 mM NaCl 溶液下での融合不可

7. まとめ

PIC は塩濃度条件によって構造が大きく変わる。本研究では、この現象に注目し、塩だけで単一膜ベシクルを形成できる手法を確立した。その際には、溶液条件の変化に応じた粒子の挙動をリアルタイムで追跡することが重要であり、そのために、流体デバイスを作製した。このデバイスは観察場の溶液条件を制御できるため、物質保持特性評価、ベシクルの融合といった全ての実験に関与し、本研究の最大の特徴となった。

PIC ベシクル形成法を確立した後は、マイクロンサイズという大きさを活かし、光学顕微鏡下で物質保持特性を評価した。物質保持特性を検討した結果、PIC 膜に由来する物質透過性があることを確認した。この透過性は、架橋によりある程度調節できるため、物質を徐放することもできる。したがって、PIC ベシクルは徐放を必要とするドラッグデリバリーで有効といえる。その他のアプリケーションとしては、マイクロリアクタとして有用である。理由の一つに、膜の透過性を利用してベシクル内外の物質を反応させることができる点が挙げられる。もう一つの理由はベシクル同士の融合を制御することで、ベシクル内の物質同士を自在にやり取りできることである。これらの点は、PIC ベシクルならではの特徴である。

参考文献

- [1] 秋吉一成, 辻井薫, 『リポソーム応用の新展開』, NTS (2005)
- [2] A. Koide, A. Kishimura, K. Osada, W. D. Jang, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Semipermeable Polymer Vesicle (PICsome) Self-Assembled in Aqueous Medium from a Pair of Oppositely Charged Block Copolymers: Physiologically Stable Micro-/Nanocontainers of Water-Soluble Macromolecules, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5988-5989 (2006)
- [3] H. Oana, A. Kishimura, K. Yonehara, Y. Yamasaki, M. Washizu, K. Kataoka, Spontaneous Formation of Giant Unilamellar Vesicles from Microdroplets of a Polyion Complex by Thermally Induced Phase Separation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 4613-4616 (2009)