

マイクロ流体デバイスを用いたベシクル形成に関する研究

Study on the Formation of Vesicles Using Microfluidic Device

玉木大介 指導教員 小穴英廣 准教授

Daisuke TAMAKI (Associate Professor Hidehiro OANA)

Keywords : Dialysis, Microfluidic device, Polyion complex, Polymer vesicle

1. はじめに

1.1 研究背景

ベシクルとは、球殻状に膜構造を有するカプセルのことであり、特に内部に液相を含むものを指す。ベシクルの内部には周囲と異なる溶液を保持することが可能である[1]。そのため、ベシクルは微量の物質を保持、運搬することが可能であり、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ている。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、溶液調製時に生体に有害な有機溶媒を使用するため、残存する溶媒の毒性により生体適合性に疑問が残る。こういった問題点は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、水溶性の反対荷電を持つブロック共重合体からなる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 PIC 溶液を調製する際に、高塩濃度下で PEG 鎖と荷電性部からなるブロック共重合体に加えて、PEG 鎖を持たないホモポリマーを添加すると、PIC はベシクルにならず、図 1(a)に示すような PIC 粒子を形成する。この PIC 粒子の形態は塩濃度と相関があり、溶液の塩濃度を低下させることで膜構造を形成することが分かっている。

本研究では、先行研究によって、PIC を観察場に留めたまま溶液条件を制御することのできるマイクロ流体デバイスを用いて、150 mM NaCl 溶液下で得られた PIC 粒子を 0 mM NaCl 溶液下に置換することで、PIC 粒子から単一膜ベシクルへと形態が変わっていくことを明らかにした[3]。さらには PIC 粒子からベシクルへと変化していく際に、周囲に存在する物質を取り込み、最終的には物質を内包したベシクルを形成できることも分かった[3]。これによって、薬物を患部にまで保持・運搬するキャリアが必要なドラッグデリバリーにおいて、この PIC ベシクルを応用できる可能性が大きく広がった。

PIC ベシクルを実用的に用いるためには、形成されたベシクルを外部的に取り出す必要がある。しかしながら、これまで形成されたベシクルはマイクロ流体デバイスのポケット内にあり、ポケット構造は PIC を観察場に留めることを目的としているので、ここからベシクルを取り出すことは容易ではない。

また、これまでの研究では塩濃度変化と PIC がとる形態との関係が明らかになっておらず、これが明らかになれば単一膜ベシクルを効率よく形成する方法の確立に役立つであろう。

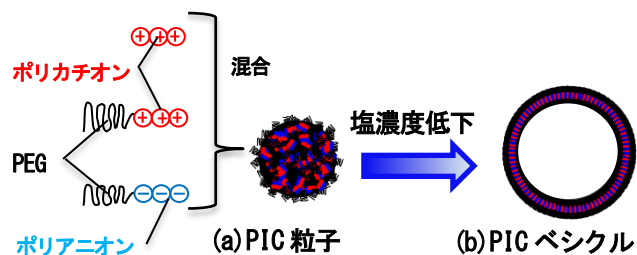


Fig. 1 Polyion complex polymersome

1.2 研究の目的

本研究では、形成されたベシクルを簡単に取り出すことのできるデバイスを作製し、これを用いて単一膜ベシクルの形成方法を確立することを目的とする。さらに、塩濃度測定を行いながら形成されるベシクルの形態変化を観察することで、各塩濃度における PIC の形態を明らかにする。これによって、塩濃度変化と PIC の形態との関係を把握し、効率よく単一膜ベシクルを得られる方法の確立も目指す。

2. マイクロ流体デバイスの作製

マイクロ流体デバイスは微小空間で実験を行うことのできるデバイスである。これを用いれば、試料の微量化や反応・処理速度の向上、分析システムの集積化ができるなどのメリットがある。本研究では、PIC 粒子からベシクルを形成でき、形成されたベシクルを簡単に回収できる新たなマイクロ流体デバイスを作製した。デバイスの概要については図 2 に示してあるが、このデバイスは透析膜を隔てて純水チャンネルとベシクル形成チャンネルがある。ベシクル形成チャンネルの上流から PIC 粒子を導入し、透析膜によってベシクル形成チャンネルに PIC を留めたまま塩濃度の希釈を行ってベシクルを形成し、形成されたベシクルは下流で回収できるようになっている。

先行研究において、単一膜ベシクルが形成される際の塩濃度変化の時定数を見積もったところ、およそ時定数 $\tau = 16$ s となっていたので、今回作製したデバイスでも同程度の条件で実験を行えるように設計した。具体的には、時定数 τ は、ベシクル形成チャンネルの高さ h [m] と透析膜の透過係数 K [m/s] から $\tau = d / K$ と見積もることができ、PIC 溶液を導入する流路の高さは $h = 35 \mu\text{m}$ とし、透過係数 $K = 3.5 \times 10^{-6}$ m/s の透析膜を用いた。

このデバイスには塩濃度変化を測定するため、ガラス基板に電極間ギャップ $60 \mu\text{m}$ のアルミ電極を蒸着した。これによって PIC 溶液の導電率を測定することができ、そこか

ら塩濃度変化を求めた。これによって各塩濃度における PIC の形態を観察し、両者の関係を明らかにした。

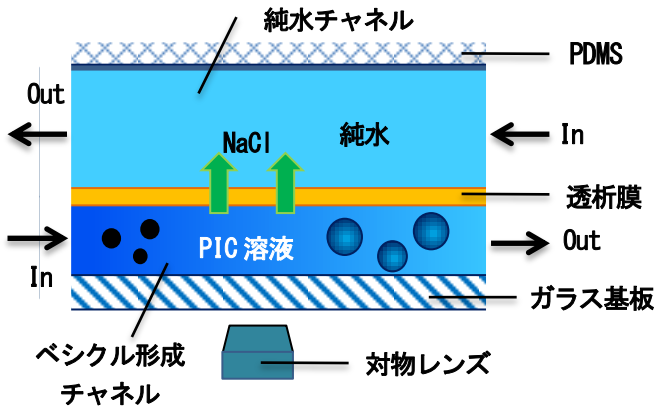


Fig. 2 Microfluidic device

3. マイクロ流体デバイスの評価

3.1 実験概要

作製したデバイスを用いて、塩濃度変化を制御できるかを評価した。本実験では、PIC 溶液の塩濃度変化をモニタリングするために、ベシクル形成チャンネルに PIC 粒子を導入後は、新たな PIC 溶液が供給されないように流れを止めて観察を行った。純水チャンネルの容積は 2.8 μl であり、純水の流量を 0.42 $\mu\text{l/s}$ 、0.28 $\mu\text{l/s}$ 、0.14 $\mu\text{l/s}$ の三通りで塩濃度の測定を行った。

3.2 結果・考察

測定された塩濃度変化をプロットしたものが図 3 であり、純水の流量によって塩濃度変化に違いがあることが分かる。これによって、純水の流量を制御することで、様々な塩濃度変化における PIC の形態を観察することが可能になった。

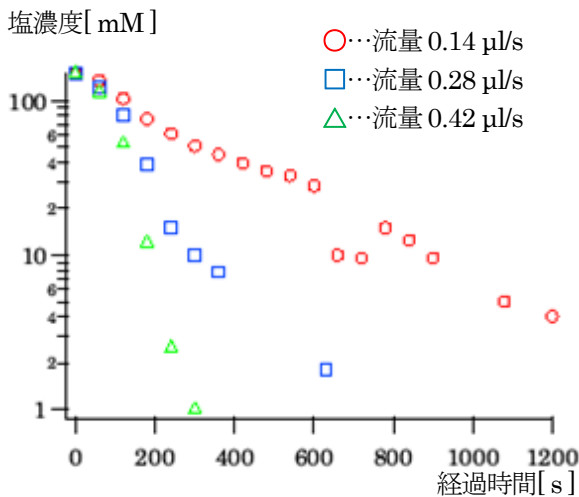


Fig. 3 Change in salt concentration

4. 塩濃度変化と形成されるベシクルの関係

4.1 実験概要

純水チャンネルに流す流量が 0.42 $\mu\text{l/s}$ 、0.28 $\mu\text{l/s}$ では、PIC 溶液に流れが生じ、PIC が観察場から流されてしまったが、流量 0.14 $\mu\text{l/s}$ では、流れを抑えることができ、PIC の形態変化を観察できた。

4.2 結果・考察

図 4 は塩濃度希釈開始からの時間と各塩濃度における PIC の形態を示したものである。塩濃度が 120 mM になると粒子の周囲が膨潤し始め、60 mM に達したときには PIC が膜構造を形成し、中空の粒子になっていることが分かる。その後も膜を形成しながら膨潤していくが、図 4 に示した PIC はその途中で二つに分裂し、最終的には、それぞれが矢印で示すようにベシクルへと変化した。一方は、単一膜ベシクルになっているが、もう一方は多重膜になっている。塩濃度が 1 mM 程度まで下がった状態でも、形成されたベシクルは単一膜と多重膜が混在していた。

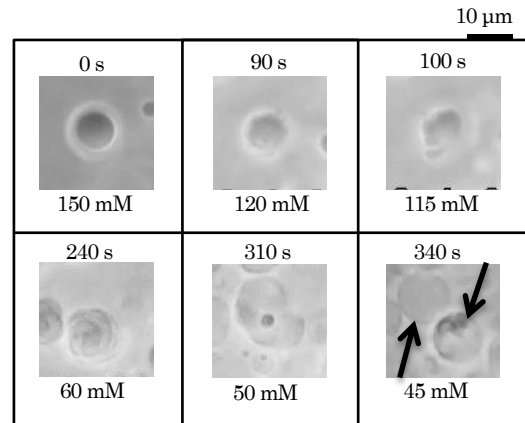


Fig. 4 Morphological change of PICsome

5. 結論

透析膜を用いたマイクロ流体デバイスによってベシクルを形成することに成功した。このデバイスを用いれば、ベシクル形成チャンネルで形成されたベシクルを下流で回収することができ、マイクロデバイス外にベシクルを取り出すことができる。

また、塩濃度変化と形成されるベシクルの関係を明らかにしたことで、効率の良い単一膜ベシクル形成に近づいたと言える。しかし、未だ多重膜ベシクルも混在しており、今後は多重膜ベシクルを取り除くことや単一膜ベシクルのみが形成される条件を明らかにすることが課題となる。

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] 守永睦貴, “流体デバイスを用いたポリイオンコンプレックス型ベシクル形成とその物性評価”, 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 修士論文 (2011)