

令和元年6月11日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04916

研究課題名(和文) マイクロ流路デバイスによる薬剤内包多糖類ハイドロゲル粒子の形態制御

研究課題名(英文) Microfluidic synthesis of shape-controlled polysaccharide hydrogel drug microcarriers

研究代表者

西迫 貴志 (Nisisako, Takasi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：10431983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルギン酸カルシウムに代表される天然由来の多糖類ハイドロゲル微粒子は、高い生体適合性や生分解性から、食品、化粧品、農業や再生医療用途等、幅広い分野での応用が期待されている。そこで本研究ではマイクロ流路を用い、サイズ・形状がともに揃った真球状および非球状ゲル粒子の作製試験を行った。マイクロ流路内部にて単分散アルギン酸ナトリウム含有水滴を油相中に生成し、カルシウムイオンを含む油中水型エマルジョンと反応させ、サイズ・形状の均一性に優れた各種ゲル粒子を得た。また作製したゲル粒子からの薬剤放出挙動を分光測定により評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の製造法では得られるゲル微粒子のサイズ・形状ともばらつきが大きく、粒子機能の十分な制御に至っていない。対して本研究は、均一形状ゲル粒子を得る簡便な手法の確立を目指す、前例のない研究である。近年、バイオ応用を目的としたナノ・マイクロ粒子の形態設計、特に形態が細胞・組織応答に与える影響が新たに注目されている。ゲル粒子に細胞をカプセル化して三次元組織培養に用いる、再生医療関連の研究も多い。ゲル微粒子の形態設計法の確立を目指す本研究は、こうした新たな学問分野の開拓・発展を支える基盤技術になり得る。

研究成果の概要(英文)：Hydrogel microparticles of natural polysaccharides, e.g., calcium-alginate hydrogel, have numerous potential applications in food, cosmetics, agriculture, tissue engineering, etc. In this study, we demonstrated microfluidic synthesis of spherical and nonspherical hydrogel microparticles having uniform sizes and shapes and carrying drugs. Water-in-oil droplets containing sodium-alginate aqueous solution and drug particles were generated in a microfluidic channel and were subsequently merged with a fine emulsion containing calcium ion to produce hydrogel particles having uniform sizes and shapes. UV-Vis spectroscopy was employed to evaluate release kinetics of the encapsulated drugs.

研究分野：マイクロ流体デバイス

キーワード：ナノマイクロ化学システム

1. 研究開始当初の背景

(1) アルギン酸カルシウム(Ca-alginate)ゲルは天然由来の多糖類ハイドロゲルの1種であり、アルギン酸ナトリウム(Na-alginate)水溶液にカルシウムイオン(Ca^{2+})水溶液を添加すると容易に形成される(外部ゲル化法)。従来のCa-alginateゲル粒子作製法として、Na-alginate水溶液を塩化カルシウム(CaCl_2)水溶液に滴下する、人工イクラの作製法がよく知られる。より小径の粒子作製法には、噴霧法や、攪拌や膜乳化法により生成したNa-alginate水溶液と CaCl_2 水溶液のエマルション滴を互いに合一させてゲル化する手法があるが、そのサイズ・形状のばらつきは大きい。

(2) そうした中、マイクロ流路を用いた液滴生成法によるCa-alginateゲル粒子生成例が近年多く報告されている。この液滴生成法は、T字や十字といったマイクロ流路の交差部にて水相と油相を一定流量にて合流させ、単分散(注:一般に直径のCV値(標準偏差÷平均)が5%以下のもの)液滴を連続生成する手法である。本手法を用いて生成したNa-alginate液滴を CaCl_2 水溶液に滴下してゲル粒子を得る手法、流路内でNa-alginate液滴と CaCl_2 液滴を生成、合体させてゲル粒子を得る手法が過去に報告されているが、形状のばらつきは大きい。一方、 CaCO_3 粒子を含むNa-alginate液滴を生成し、その後液滴内部のpHを変化させて Ca^{2+} を生じさせる内部ゲル化法や界面活性剤二分子膜を介して Ca^{2+} を送り込む手法等も報告されているが、それぞれpH操作に材料追加が必要、作製に数時間が必要といった課題があった。

(3) 一方近年、バイオ応用を目的としたナノ・マイクロ粒子の形態設計、特に形態が細胞・組織応答に与える影響が新たに注目されている。例えばマクロファージが選択的に貪食する粒子形態の存在や、球状・非球状粒子に暴露された際の細胞代謝物(サイトカイン)の相違、球状・非球状粒子の体内臓器における捕捉度の違いについての報告がある。ゲル粒子に細胞をカプセル化して三次元組織培養に用いる、再生医療関連の研究も多い。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究ではマイクロ流路を用い、サイズ・形状がともに揃った真球状および非球状ゲル粒子の作製法を確立する。また、作製した粒子からの薬剤の放出挙動を分光測定により確認・評価する。

(2) 現在実用化されている噴霧法や攪拌処理を介した製造法では、得られるCa-alginateゲル微粒子のサイズ・形状ともばらつきが大きく、粒子機能の十分な制御に至っていない。近年報告の多いマイクロ流路を用いた研究では均一体積のゲル粒子は得られるが、通常その形状のばらつきは大きい。対して本研究は、球状・非球状の両方において、均一形状ゲル粒子を得る簡単な手法を確立し、究極的な製造法としての普及を目指す、申請者の独自手法をさらに発展させる研究である。

3. 研究の方法

(1) 球状・非球状ゲル粒子作製用マイクロ流路の作製: Na-alginate液滴を生成する上流部の浅い流路と、真球状とした当該液滴の周囲に Ca^{2+} 含有ナノエマルションを供給、合一させる下流部の深い流路から成る、球状Ca-alginateゲル粒子連続生成用マイクロ流路を作製する(図1)。高い化学的安定性から、流路基板として合成石英ガラスを選択する。幅100-200 μm 、深さ100-200 μm の微細溝を100 μm 、200 μm のダイヤモンド軸付砥石を用いて加工し、送液・排出用の貫通孔を1mmの工具により加工する。段差構造は、2枚の溝基板の貼り合わせか、位置合わせが難しい場合は単一基板への段差溝加工と密封処理で実現する。深溝部で真球状態にするのが困難な場合、せん断応力を緩和するよう段差に加えて幅も広くなる。ガラス流路はシラン化処理剤により疎水化して使用する。また同様に、Na-alginate水溶液を半球成分とするJanus状液滴を生成する上流部の流路と、当該Janus液滴の周囲に Ca^{2+} 含有ナノエマルションを供給し、合一させるための下流部の流路からなる、非球状Ca-alginateゲル粒子連続生成用マイクロ流路も作製する。一方、Na-alginate液滴生成時に副産物としてできるサテライト滴を主滴と分離するためのマイクロピラーアレイデバイスを、シリコーン樹脂(PDMS)を用いたソフトリソグラフィ法によって作製して試験に用いる。

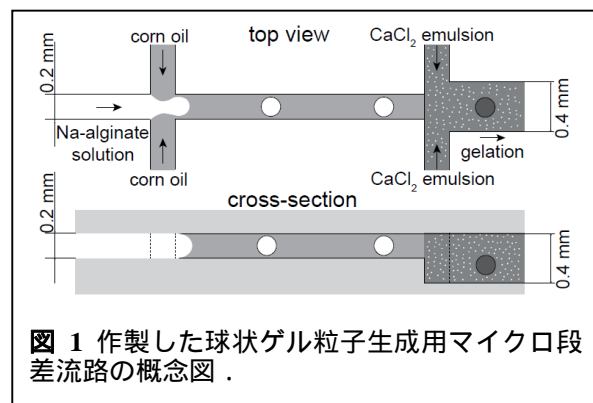


図1 作製した球状ゲル粒子生成用マイクロ段差流路の概念図。

(2) 球状・非球状ゲル粒子の作製と形状評価: 上記のガラス製マイクロ段差流路を用い、球状

(あるいは非球状)ゲル粒子を作製する。分散相として Na-alginate 水溶液 (2wt%) に、モデル薬剤/補強剤 (ファイバ) を添加したもの、連続相としてコーン油に界面活性剤 (レシチン) を加えて用いる。レシチンによる分散安定性が不十分な場合、ポリグリセリン縮合リシノールエステルで代用する。ゲル化反応用ナノエマルジョンとして、CaCl₂ 水溶液 (5wt%) をコーン油中に超音波乳化して用いるが、大量に必要な場合は、ホモキキサにて乳化する。液滴生成部で生成した直径 100–200 μm の Na-alginate 滴の列に対し、下流域にてゲル化反応液を緩やかに合流・接触させ、真球状ゲル粒子を作製する (図 1)。合流液の流量が、生成粒子の形状に与える影響を評価する。作製したゲル粒子を油中から純水中に置換し、水を含んだ膨潤状態の形状を光学顕微鏡により観察するとともに、乾燥粉体の形状を電子顕微鏡により確認する。同様に、非球状ゲル粒子作製用マイクロ段差流路を用い、Na-alginate 水溶液をセグメントとして含む Janus 液滴を生成し、半球状ゲル粒子を作製する。

(3) UV-Vis 分光測定によるゲル粒子からの薬剤徐放性評価: マイクロ流路を用いて作製したゲル粒子からの薬剤放出特性を UV-Vis 分光測定によって評価する。乾燥ゲル粉体を超純水に分散し、一定時間経過後に遠心分離して上澄み液 1–2mL を採取し、石英製キュベットに入れて近紫外～可視光領域における吸収スペクトルを測定し、校正曲線との比較により薬剤濃度を得る。この試験を経過時間を変化させ 6–10 回行い、経過時間と薬剤放出量の関係をグラフ化する。薬剤の種類、含量、および粒子サイズを変化させ、薬剤放出特性の相違を確認する。

(4) 生産量スケールアップ装置の開発: 将来的な産業応用に向け、ゲル粒子の生産量をスケールアップするため、マイクロ流路を複数並列化 (ナンバリングアップ) した液滴量産装置を作製する。作製した装置を用いて油中水滴の生成試験を行い、生成滴の単分散性について評価を行う。

4. 研究成果

(1) 球状・非球状ゲル粒子作製用マイクロ流路の作製: Na-alginate 液滴を生成する上流部の流路と、真球状とした当該液滴の周囲に Ca²⁺ 含有ナノエマルジョンを供給し、合一させるための下流部の流路から成る、球状 Ca-alginate ゲル粒子連続生成用マイクロ流路の作製を行った。高い化学的安定性から、流路基板として合成石英ガラスを選択し、各種径のダイヤモンド軸付砥石を用いた機械加工によって、幅 100–400 μm、深さ 50–400 μm の段差構造を有する微細溝の加工を行った (図 2)。その後、熱溶着にて密封されたマイクロ流路を形成した。ガラス流路はシラン化処理剤により疎水化して使用した。同様に、上流部に Janus 状液滴を生成する流路、下流部にゲル化を行う流路を有する非球状ゲル粒子作製用マイクロ流路も作製した。

(2) 球状・非球状ゲル粒子の作製と形状評価: 上記のマイクロ流路を用い、球状ゲル粒子を作製した。分散相として Na-alginate 水溶液 (2wt%) にモデル薬剤を添加したものを、連続相としてコーン油に界面活性剤を加えたものを用いた。液滴生成部で生成した直径 100–200 μm の Na-alginate 液滴に対し、下流域にてゲル化反応液を接触させ、真球状ゲル粒子を作製した (図 3)。作製したゲル粒子の光学顕微鏡による観察および乾燥ゲル粉体の電子顕微鏡観察を行った (図 4)。さらに得られるゲル粒子の真球度に影響を及ぼす因子について検討を行った結果、Ca²⁺ を含有する W/O エマルジョンにおける油相と水相の体積比率の影響が大きいことが判明した。これを最適な値に設定することで、例えば平均径 163 μm、CV 値 3.9%、真球度 0.96 の単分散且つ高真

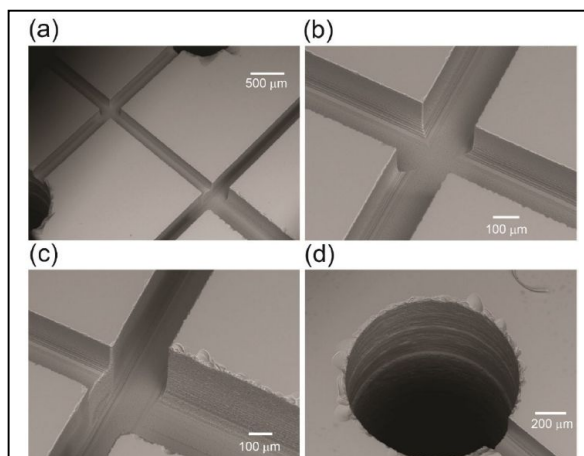


図 2 軸付砥石を用いた機械加工によってガラス面に加工した微細溝の電子顕微鏡写真。

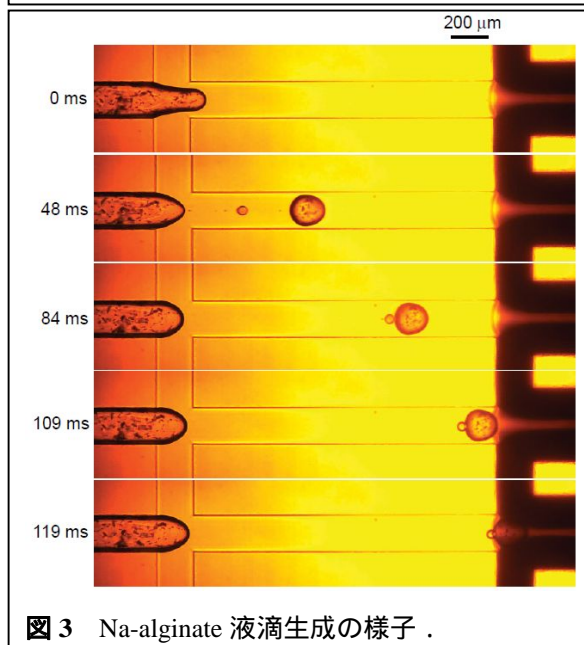


図 3 Na-alginate 液滴生成の様子。

球度のゲル粒子が得られた。またマイクロ流路内にて Na-alginate 水溶液の液滴の両脇から供給される Ca^{2+} 含有 W/O エマルション滴に、 Fe_3O_4 ナノ粒子を分散しておくことで、生成される球状ゲル粒子の表面を Fe_3O_4 ナノ粒子で被覆することを試みた。得られた球状ゲル粒子を光学顕微鏡および電子顕微鏡にて観察したところ、ゲル粒子の表面近傍のみに Fe_3O_4 ナノ粒子が固定化されている様子を確認することができた。さらに、両脇から供給する Ca^{2+} 含有エマルションの片側のみ Fe_3O_4 ナノ粒子を分散することで、およそ半球のみが Fe_3O_4 ナノ粒子で被覆された球状ゲル粒子が得られた。これらの Fe_3O_4 ナノ粒子を表面に担持したゲル粒子は外部磁場の印加により移動させることが可能であった。一方、上記の非球状ゲル粒子作製用マイクロ流路を用いて Janus 状液滴を生成し、サイズ・形状の揃った非球状ゲル粒子の作製を試みた。先ず、Na-alginate 水溶液 (2-3wt%) を片側に、ポリエチレングリコールおよびグリセリンにより粘度調整した水溶液をもう一方として用い Janus 液滴の生成を試みたところ、粘度比が 1 に近いほど Janus 状の液滴が得られることを確認した。また 2 つの水溶液の流量調整により、異なる体積比率の Janus 液滴が生成されることを確認した。下流部に Ca^{2+} を含む W/O エマルションを導入してゲル化を行い、洗浄の後に光学顕微鏡にて観察を行ったところ、非球状ゲル粒子が得られていることを確認した。

(3) UV-Vis 分光測定によるゲル粒子からの薬剤徐放性評価：乾燥ゲル粉体からのモデル薬剤の放出挙動を UV-Vis 分光測定によって評価した。石英製キュベットに入れて近紫外～可視光領域における吸収スペクトルを測定し、別途得た校正曲線との比較により薬剤濃度を算出し、放出挙動の経時評価を行った (図 5, 6)。

(4) 球状ゲル粒子量産を目的とした油中水型エマルション滴量産装置の作製：ゲル粒子の前駆体である W/O エマルションの生成量をスケールアップさせる装置の作製を行った。ソフトリソグラフィ法を用いて 100-1000 本の流路を行列あるいは円状に高密度に並べた PDMS チップとステンレス製の液体供給装置の組合せにより、CV 値 15% 以下の液滴の生成を確認した。また液滴生成部にマイクロピラーアレイを連結した主滴・サテライト滴分離流路を 8 個並列化した PDMS 製デバイスを作製し、CV 値 2% 未満の単分散 Na-alginate 滴を連続的に得られることを確認した。

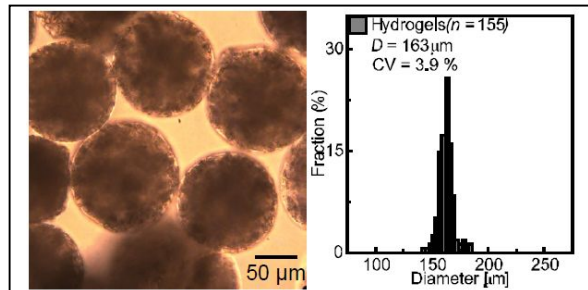


図 4 生成したゲル粒子とサイズ分布の一例。

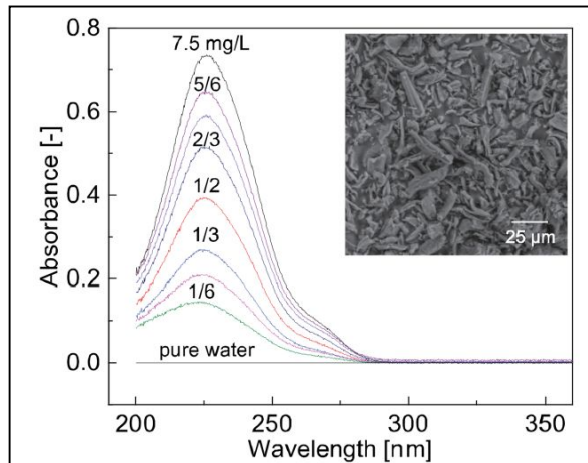


図 5 モデル薬剤 (Irgarol1071) 含有水溶液の吸収スペクトル。

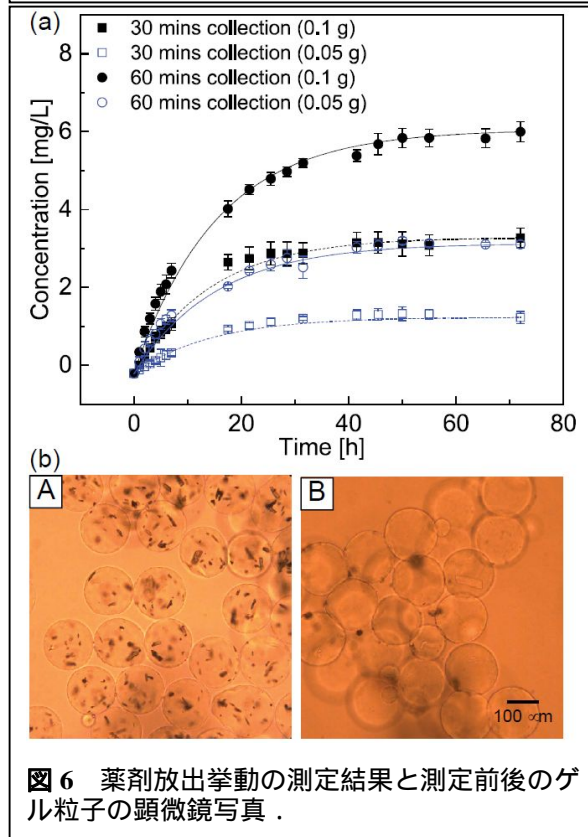


図 6 薬剤放出挙動の測定結果と測定前後のゲル粒子の顕微鏡写真。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yingzhe Liu, Naotomo Tottori, Takasi Nisisako, Microfluidic synthesis of highly spherical calcium alginate hydrogels based on external gelation using an emulsion reactant, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 査読有, Vol. 283, 2019, pp. 802-809, DOI: 10.1016/j.snb.2018.12.101

Naotomo Tottori, Takasi Nisisako, High-throughput production of satellite-free droplets through a parallelized microfluidic deterministic lateral displacement device, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 査読有, Vol. 260, 2018, pp. 918-926, DOI: 10.1016/j.snb.2018.01.112

Naotomo Tottori, Takeshi Hatsuzawa, Takasi Nisisako, Separation of main and satellite droplets in a deterministic lateral displacement microfluidic device, *RSC Advances*, 査読有, Vol. 7, 2017, pp. 35516-35524, DOI: 10.1039/c7ra05852g

鳥取 直友, 西迫 貴志, 柳田 保子, 初澤 毅, 主滴とサテライト滴の分離のための DLD マイクロ流路デバイス, *化学とマイクロナノシステム*, 査読無, Vol.15, 2016, pp. 22-23

〔学会発表〕(計 13 件)

Takasi Nisisako, Yingzhe Liu, Microfluidic synthesis of spherical calcium-alginate hydrogels for antifouling herbicide application, EMN Hawaii Meeting 2019, Honolulu, Hawaii, USA, March 26-30, 2019

Yingzhe Liu, Takasi Nisisako, Microfluidic synthesis of highly spherical hydrogels for encapsulation and sustained release of antifouling drug, 2019 年度精密工学会春季大会学術講演会,

Seungman Choi, Naotomo Tottori, Takasi Nisisako, Mechanically and directionally tunable soft step emulsification, 22th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018), pp. 216-217, Kaohsiung, Taiwan November 11-15, 2018.

Naotomo Tottori, Yingzhe Liu, Takasi Nisisako, Functional particles design using deterministic lateral displacement, 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences(MicroTAS2018), pp.2181-2182, Kaohsiung, Taiwan, November 11-15, 2018.

Yingzhe Liu, Naotomo Tottori, Takasi Nisisako, Microfluidic external gelation of shape-controlled calcium-alginate hydrogels for drug encapsulation and sustained release, 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences(MicroTAS2018), pp.2183-2184, Kaohsiung, Taiwan, November 11-15, 2018.

Yingzhe Liu, Naotomo Tottori, Takasi Nisisako, Spherical calcium alginate microgels synthesized via in-situ emulsion-based external gelation, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 37 回研究会 (Cheminas37th), p.58, 産業技術総合研究所つくばセンター (つくば), 2018 年 5 月 21 日~22 日.

劉 英哲, 鳥取 直友, 西迫 貴志, Spherical calcium alginate microgels synthesized using a microfluidic chip, 2018 年度精密工学会春季大会, pp. 487-488, 東京, 2018 年 3 月 15 日~17 日.

Takasi Nisisako, Naotomo Tottori, Microfluidic separation of main and satellite emulsion droplets through micropillar arrays, EMN Orlando Meeting 2017, pp. 87-88, Orlando, FL, USA, December 4-8, 2017.

Seungman Choi, Naotomo Tottori, Rui Zhang, Takasi Nisisako, A soft and disposable step-emulsification device for generating monodisperse emulsions and particles, The 7th International Conference of Asian Society for Precision Engineering and Nanotechnology (ASPEN2017), Seoul, KOREA, November 14-17, 2017.

Naotomo Tottori, Takasi Nisisako, Yasuko Yanagida, and Takeshi Hatsuzawa, In situ separation of main and satellite droplets using a deterministic lateral displacement microfluidic device, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (MicroTAS2016), pp. 140-141, Dublin, Ireland, October 9-13, 2016.

Naotomo Tottori, Takasi Nisisako, Yasuko Yanagida, and Takeshi Hatsuzawa, Microfluidic generation of satellite-free droplets through deterministic lateral displacement array, 16th International Conference on Precision Engineering(ICPE2016), Hamamatsu, Japan, November 14-16, 2016.

鳥取 直友, 初澤 毅, 西迫 貴志, DLD マイクロ流路デバイスによる主滴とサテライト滴の分離, 第 33 回センサ・マイクロマシンと応用システム, 長崎, 2016 年 10 月 24 日~26 日.

鳥取 直友, 初澤 毅, 西迫 貴志, 並列化 DLD マイクロ流路デバイスを用いた主滴とサテライト滴の分離, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 34 回研究会, 幕張, 2016 年 9 月 6 日~7 日.

〔図書〕(計1件)

西迫 貴志 他, 技術情報協会, 化学プロセスのスケールアップ、連続化, 2019, 532

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nis.first.iir.titech.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。