

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20985

研究課題名(和文) マイクロ空間での界面カップリング反応を利用した免疫隔離ハイドロゲルカプセルの開発

研究課題名(英文) Microfluidic formation of hydrogel microcapsules using coupling reaction in emulsion droplets

研究代表者

渡邊 貴一 (Watanabe, Takaichi)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：60743979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では環境低負荷なハイドロゲルマイクロカプセル調製法として、マイクロ流体デバイスを利用したフロー系のプロセスによる四分岐ポリエチレングリコール(tetra-PEG)ハイドロゲルマイクロカプセルの連続調製法を構築した。マイクロ流路で形成される単分散水滴内での「相分離(水性二相形成)」とtetra-PEGマクロモノマーの自発的な「末端カップリング反応」を制御することによって、原料溶液をマイクロ空間で混合するだけで 粒径の均一なハイドロゲルマイクロカプセルを連続生産することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a simple continuous process to prepare tetra-arm poly(ethylene glycol) (tetra-PEG) hydrogel microcapsules consisting of a single aqueous core and a hydrogel shell by combining aqueous two phase system formation and end-coupling reaction of tetra-PEG macromonomers in aqueous droplets. Different from the conventional process, our process enables the production of monodisperse hydrogel microcapsules with controlled structures just by feeding solutions into a microfluidic device, without the use of any external stimuli for cross-linking reaction.

研究分野：界面化学，化学工学

キーワード：マイクロカプセル ゲル粒子 マイクロ流体デバイス 水性二相 液滴内相分離

1. 研究開始当初の背景

マイクロサイズで半透膜性を有するマイクロゲル微粒子は、栄養素や酸素などの低分子を透過し、抗体や酵素などの巨大分子や細胞を浸透しないため、細胞療法における細胞のカプセル化材料として使われている。

細胞療法に用いられるマイクロゲル材料の多くは、生体適合性に優れ、かつ常温下で速やかにゲル化するアルギン酸に代表される天然由来の高分子である。しかし、天然由来の高分子はロット毎に組成が異なるため、ロットが変わる度に調製条件を最適化する必要がある。また、アルギン酸系マイクロゲルは、イオン架橋でゲル化するため、調製時と異なるイオン環境に曝される生体内において分解が進行しやすく、長期間の使用が困難である。

一方で、近年、アルギン酸系マイクロゲルの代替材料として、力学的強度が高く、非イオン性で生体適合性も高いポリエチレングリコール (PEG) をベースとしたマイクロゲルが注目されている。これまで PEG 系マイクロゲルの多くが二官能性の PEG をモノマーとした光重合で調製されている。しかし、その重合時の紫外線照射や反応で生じるラジカルには高い細胞毒性があり、ゲル化反応も数分に及ぶため、PEG 系マイクロゲルの用途はバルクゲルとしての利用が多く、細胞などの生体組織のカプセル化材料としてはほとんど使われていない。もし PEG 系マイクロゲルを球状のコアシェル構造に精密成形し、内包したい物質をそのコア周辺に集積できれば、薬物輸送や細胞療法への応用が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロ空間での液液界面を利用した環境低負荷なゲル化反応によって、コアシェル型の PEG 系マイクロゲルカプセルの創製を目指す。コアシェル型の PEG 系マイクロゲルカプセルを得る手法として、反応性四分岐 PEG (tetra-PEG) マクロモノマーとデキストラン (DEX) 混合水滴内での「相分離 (水性二相, APTS)」と tetra-PEG マクロモノマー末端基間の「カップリング反応」を用いたマイクロゲルカプセル調製法を提案する。

図 1 に示すように、まずマイクロ流路内で tetra-PEG マクロモノマー/DEX 混合水滴を調製する。次に、水滴内で相分離を誘起し、tetra-PEG マクロモノマー濃厚相を液滴のシェル層に集積する。その後、自発的なカップリング反応により速やかにシェル層のみを選択的に架橋する。このような戦略で DEX 濃厚相をコア、tetra-PEG ハイドロゲルをシェルとするマイクロカプセルの連続調製が実現できると考えた。この手法では、常温常圧下で水相、油相を二重管型マイクロ流体デバイスへ送液するだけで自発的にマイクロゲルマイクロカプセルが調製できるため、従来法に比べて環境低負荷で迅速なプロセスとなることが期待される。最終的には、tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルの膜透過性を評価する

ことで新規なマイクロカプセル型移植材料としての可能性を見いだすことを目的とする。

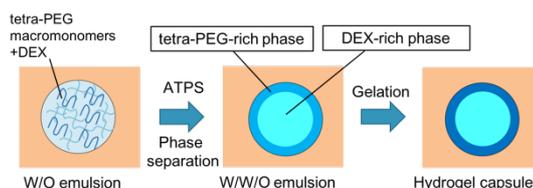


図 1 本研究で提案する tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセル調製法の模式図

3. 研究の方法

(1) tetra-PEG マクロモノマーと DEX の APTS 相図の作製

tetra-PEG マクロモノマーを溶解したリン酸緩衝水溶液 (PBS, pH = 7.4) と DEX を溶解したリン酸緩衝水溶液 (PBS, pH = 7.4) をそれぞれ調製した。調製した 2 種類の水溶液を混合後、全重量を量った。二相系から一相系へ転移するまでマイクロピペッターを用いて 10 μ L ずつ PBS を加えた。再度、全重量を量ることで PBS の重量を算出し、tetra-PEG マクロモノマーと DEX の最終濃度 (wt%) をグラフにプロットした。実験は 25°C でおこなった。

(2) マイクロ流体デバイスを用いた単分散 APTS 液滴の調製

tetra-PEG マクロモノマーを溶解したリン酸緩衝水溶液 (PBS, pH = 7.4) と DEX を溶解したリン酸緩衝水溶液 (PBS, pH = 7.4) をそれぞれ調製した。これらの水溶液を分散相とした。連続相として 3 wt% の Solsperser 19000 / Tridecane 溶液を調製した。各溶液をシリンジに充填し、シリンジポンプを用いてガラス製マイクロ流体デバイスに送液した。マイクロ流路内の乳化部を高速カメラにより観察した。得られた液滴の構造を光学顕微鏡により観察した。

(3) tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルの調製

末端構造の異なる tetra-PEG マクロモノマー (2 種類) をそれぞれ溶解した 2 種類のリン酸緩衝水溶液 (PBS, pH = 7.4) と DEX を溶解したリン酸緩衝水溶液 (PBS, pH = 7.4) を調製した。これら 3 種類の水溶液を分散相とした。各溶液をそれぞれシリンジに充填し、マイクロ流路に送液した。3 種類の水溶液を十字型混合部で混合した後、混合水溶液をガラス製マイクロ流路内で 3 wt% の Solsperser 19000 / Tridecane 溶液 (連続相) によって乳化することで単分散水滴を調製した。水滴内で自発的に相分離とカップリング反応が起こり、tetra-PEG ハイドロゲル微粒子を得た。生成物を連続相と同じ組成の回収溶液に回収した。

エマルジョン調製時の流量、水溶液の組成や pH を変えることで、マイクロゲルカプセルの構造制御をおこなった。

4. 研究成果

(1) tetra-PEG マクロモノマーと DEX の ATPS 相図の作製

図2に本実験結果をもとに作製した tetra-PEG マクロモノマーと DEX 間の相図を示す。図2より, tetra-PEG マクロモノマーと DEX を溶解した水溶液は破線以上の高濃度域において水性二相を形成することがわかった。

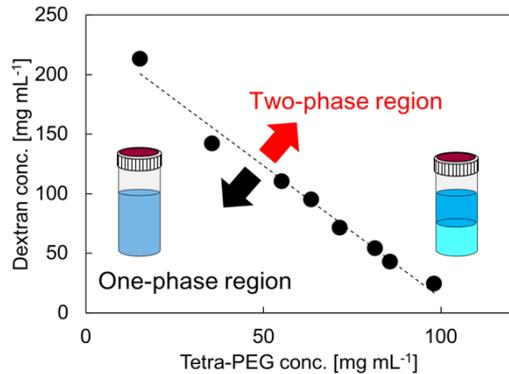


図2 tetra-PEG マクロモノマーと DEX 混合水溶液の相図

(2) マイクロ流体デバイスを用いた単分散 ATPS 液滴の調製

分散相が水性二相系を形成する高分子濃度域で, マイクロ流路を利用した単分散液滴調製を検討した。この検討では, 単分散液滴が得られる流量条件を調べるために, ゲル化反応が起きない実験系, すなわち 1 種類の tetra-PEG マクロモノマーを使用した。tetra-PEG マクロモノマー水溶液と DEX 水溶液をそれぞれ異なる流入口からマイクロ流路に送液し, 流路内で合流・混合することで分散相を調製した。続いてオリフィス部において分散相を連続相によってせん断することで液滴を調製した。図3(a), (b)には, 連続相(Q_c)および分散相(Q_d)の流量が液滴せん断様式に及ぼす影響をまとめた。Dripping で液滴が生成させる流量条件では周期的な液滴生成が確認され, 結果として単分散な液滴が得られた。一方で, Jetting で液滴生成が起こる条件では多分散な液滴が得られた。これらの結果より, 単分散液滴が得られる流量条件が明らかとなった。次に, 相分離後の液滴内構造を明らかにするために, tetra-PEG マクロモノマー相を青色に着色し, Dripping 条件で液滴を調製し, 光学顕微鏡を用いて生成した ATPS 液滴の観察をおこなった。その結果, tetra-PEG 濃厚相は ATPS 液滴のシェル層に優先的に配置されることがわかった。この配置は, 各界面の界面張力を基に算出した拡張係数から予測される平衡配置と一致した。この結果から, ATPS 液滴の構造は, 系の界面張力から予測できることが示唆された。これらの検討から, 本手法を用いて tetra-PEG マクロモノマー濃厚相をシェル層とする単分散な ATPS 液滴を連続的に調製できることがわかった。

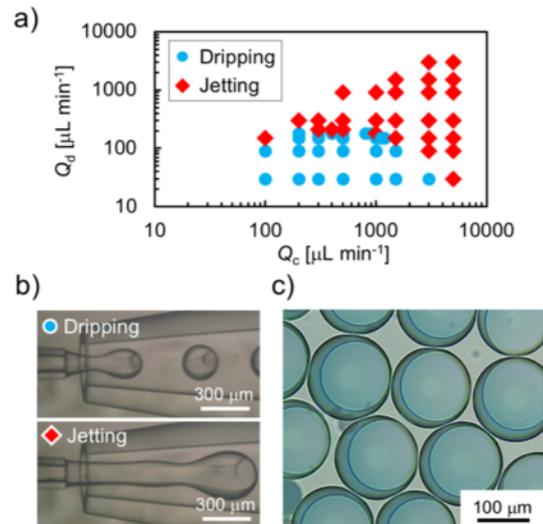


図3 (a, b) マイクロ流路内の送液条件 [連続相流量(Q_c)と分散相流量 (Q_d)] が液滴せん断様式に及ぼす影響 (c) Dripping 条件で得られた ATPS 液滴の光学顕微鏡写真(tetra-PEG マクロモノマー濃厚相を青色着色した)

(3) tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルの調製

ハイドロゲルマイクロカプセルを調製するために, 2 種類の tetra-PEG マクロモノマー水溶液と DEX 水溶液を異なる流入口から送液してマイクロ流路内で混合した。続いて混合水溶液から構成される分散相を連続相によって Dripping 条件で乳化することによって単分散液滴を調製した。液滴内で ATPS が形成されるとともにシェル層で tetra-PEG マクロモノマーが反応し, ハイドロゲルマイクロカプセルが得られた。

図4(a)には油相に回収したマイクロカプセルの光学顕微鏡写真を示す。得られたマイクロカプセルは球状で平均粒径 $213 \mu\text{m}$ ($CV = 5.3\%$)であった。粒径の変動係数を示す CV 値が 10%未満であったことから, 得られたマイクロカプセルは粒径が単分散であることがわかった。ゲル層の有無を確認するために, マイクロカプセルを洗浄後, 水中に分散したところ, マイクロカプセルは速やかに膨潤し, 平均粒径が $213 \mu\text{m}$ から $305.9 \mu\text{m}$ に増加した。この結果より, ATPS 液滴を形成後, tetra-PEG マクロモノマー濃厚相で末端カップリング反応が進行し, シェル層でハイドロゲルが形成されたことが示唆された。

図5にはハイドロゲルマイクロカプセル膜の分子区画能を共焦点レーザー顕微鏡観察によって定性評価した結果を示す。ハイドロゲルマイクロカプセルを分子量 25 万の FITC-DEX 水溶液に分散した場合, 実験開始 24 時間以内にマイクロカプセル内部の蛍光強度が増大した。一方で, ハイドロゲルマイクロカプセルを分子量 50 万の FITC-DEX 水溶液に分散した場合, 実験開始 24 時間後においてもマイクロカプセル内の蛍光強度の増加がほとんど観察されなかった。これらの結果より, この

ハイドロゲルマイクロカプセルは半透膜性を有しており、分子区画 (MWC0) はおよそ 50 万であることが示唆された。

図 6 には、異なる連続相流速でマイクロカプセルを調製した結果を示す。分散相流速を固定した条件において、連続相流速を増加させるにつれて得られるハイドロゲルマイクロカプセルの直径は減少する傾向を示した。いずれの条件においても粒径の CV 値は 6% 以下であったことから、本調製手法では流速を変えることで単分散性を維持したまま粒径制御が可能であることがわかった。

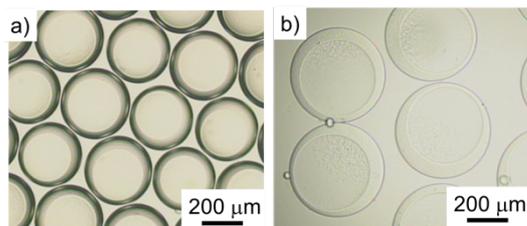


図 4 tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルの光学顕微鏡写真 (左図: 油中, 右図: 水中)

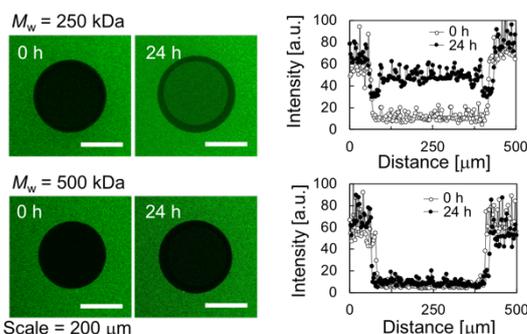


図 5 異なる分子量を有する FITC-DEX の tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセル膜への透過性の違い (FITC-DEX の分子量 上段: 250 kDa, 下段: 500 kDa)

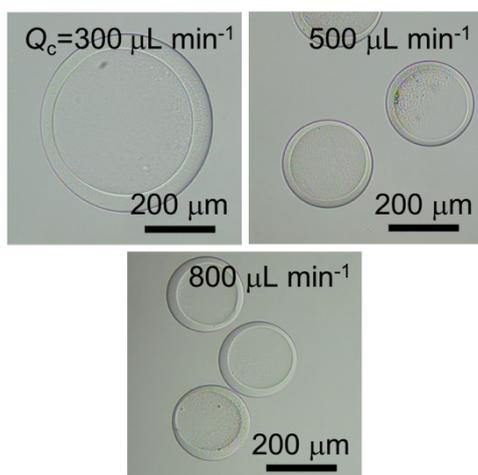


図 6 異なる連続相流速 (Q_c) で調製された tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルの光学顕微鏡写真

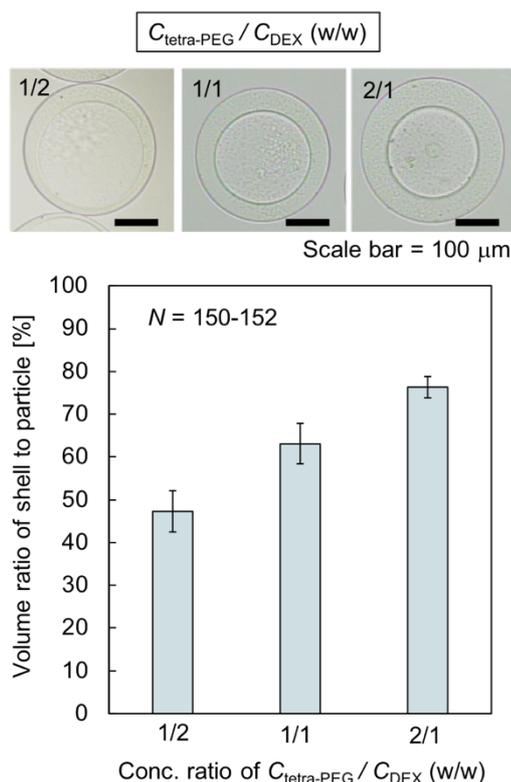


図 7 異なる高分子濃度比で調製された tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルの光学顕微鏡写真とカプセルの組成比

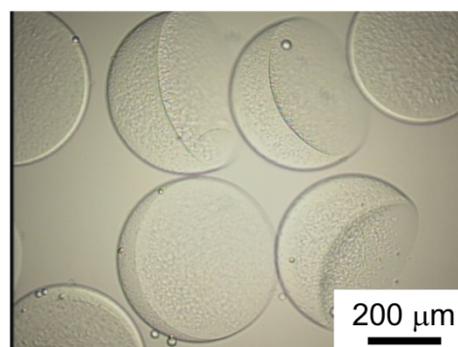


図 8 pH 6.0 で調製された tetra-PEG ハイドロゲル微粒子の光学顕微鏡写真

図 7 には異なる分散相組成で tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルを調製した結果を示す。分散相の DEX 濃度に対する tetra-PEG マクロモノマー濃度を増加させるにつれて得られる tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルの膜厚が増大する傾向がみられた。この結果より、分散相の高分子濃度比を変えることでハイドロゲルマイクロカプセルの膜厚を制御できることが明らかとなった。

図 8 には分散相の pH を 7.4 から 6.0 に変更して tetra-PEG ハイドロゲル微粒子を調製した結果を示す。pH を下げることで、tetra-PEG マクロモノマーの反応速度が低下する。得られた ATPS 水滴の構造は core-shell 型であったが、ゲル化が進行するにつれて構造が core-shell 型からヤヌス型に変化した。得られた微粒子を水中に分散させると DEX が溶出し、半

球状のハイドロゲル微粒子が得られた。ゲル化過程における液滴内の構造変化は、tetra-PEG ハイドロゲル濃厚相と油相との界面張力が増加したことに起因すると考える。この結果より、本調製手法では tetra-PEG マクロモノマーの反応速度によって、ハイドロゲル微粒子の構造を制御できることが示唆された。

以上の結果から、本調製手法は原料をマイクロ流路に送液するだけで単分散な tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルを連続的に製造でき、送液条件によって構造制御も可能であることがわかった。このハイドロゲルマイクロカプセルはコアに水溶液を内包しており、シェルは半透膜性を有することから、再生医療における細胞のカプセル化材料や新規なバイオリアクターとしての利用が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Takaichi Watanabe, Ibuki Motohiro, Tsutomu Ono 「Structural Control of Hydrogel Microparticles Using Aqueous Two Phase Separation within Emulsion Droplets」 The 6th Asian Symposium on Emulsion Polymerization and Functional Polymeric Microspheres, 2018年3月8日, Fukui
- ② Ibuki Motohiro, Takaichi Watanabe, Tsutomu Ono 「Microfluidic fabrication of monodisperse Tetra-PEG hydrogel microcapsules using controlled phase separation in water-in-water-in-oil double emulsion droplets」 10th World Congress of Chemical Engineering, 2017年10月3日, Barcelona
- ③ 元廣伊吹, 渡邊貴一, 小野努 「水性二相系を利用した Tetra-PEG ハイドロゲルマイクロカプセルの開発」化学工学会第49回秋季大会, 2017年9月21日, 名古屋
- ④ Takaichi Watanabe, Junya Masuda, Tsutomu Ono 「Design of coaxial microfluidic devices for controlled droplet formation」 14th International Conference on MicroReaction Technology, 2016年9月13日, Beijing
- ⑤ 渡邊貴二, 小野努 「Coaxial 型マイクロ流体デバイスを用いた単分散高分子微粒子の調製」化学工学会第48回秋季大会, 2016年9月8日, 徳島

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 貴一 (WATANABE TAKAICHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：60743979