

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560701

研究課題名(和文) マイクロ流体力による生体ナノ微細構造形成機構の解明

研究課題名(英文) Study on the Formation Mechanism of Bio-Nanostructures by a Micro-Fluidic Force

研究代表者

鈴木 洋 (SUZUKI HIROSHI)

神戸大学・大学院工学研究科 教授

研究者番号：90206524

研究成果の概要(和文)：

生体自己組織化構造リポソームのマイクロ流路生成法に関して、リポソーム生成機構に関する実験的検討を行った。稼働ステージを用いたラグランジュ的な観察およびマイクロ PTV による速度場の測定を行った。その結果、壁面にあらかじめ付着させた膜状リン脂質は一旦気液界面に取り込まれ、壁面との間に棒状リポソームを形成し、それが球状リポソームとなること、棒状リポソームは気液界面近傍の強い逆流によって液体中に引き出され、連続的に生成することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the formation mechanism of liposomes in a micro-channel, an experimental study has been performed. The Lagrangian observations and velocity field measurements by a micro-PTV were carried out by use of a movable stage. From the results, it was found that the lipid film pre-coated on the wall were taken into the liquid/air interface and the rod-like liposomes were formed between the interface and the wall and that the rod-like liposomes becomes spherical liposomes in a flow. It was also found that the rod-like liposomes serially induced from the interface by the strong reverse flow existing near the interface

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2400,000	720,000	3,120,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学工学

科研費の分科・細目：化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：化学工学, 生物・生体工学, マイクロ・ナノデバイス, 自己組織化, ナノ材料

## 1. 研究開始当初の背景

生体自己組織化構造であるリポソームは、リン脂質の2重膜によって外郭を覆われたナノサイズのベシクル構造である。その中空部に薬剤等を内包することができ、生物由来の物質であるため、ドラッグデリバリーシステム等に用いる輸送カプセルの素材として期待されている。

従来リポソームはフラスコ内面に平面リ

ン脂質膜(擬似ラメラ構造)を形成させ、乾燥させたのち内包物を入れて、超音波等によって膜構造を破壊することによって製造されてきた。しかしながらこの方法ではリポソームサイズが均一とはならない。一方でドラッグデリバリーシステム等への応用を考える場合、毛細血管内の流動性また細胞間への進入性から限られた径のリポソームのみが使用される。そこでゲルろ過等によってさら

に使用したい径のリポソームを抽出するプロセスを必要とした。しかしながらその場合利用できないリポソームを再利用することができないため、利用する径のリポソームの収率が著しく悪く、1%程度であった。リポソームの原材料は約10,000円/gと高価であるため、このことが実用化への妨げとなっていた。

筆者らは、マイクロ流路のサイズ制限効果を利用して、リポソーム径を制御する方法を提案した。この方法ではまずマイクロ流路内にリン脂質膜を形成させ、流路に内包物を流動させる。この方法で図4に示すように、非常に狭い粒子径分布を示す結果を得た。その場合の収率は最大で25%であり、このことによりリポソームの低価格化を実現させ、ドラッグデリバリーシステムの大いなる普及が期待される。またこの方法では半連続プロセスの構築が可能であり、従来のバッチ式で製造していた方法に比して、大量生産が可能となる。

しかしながらマイクロ流路内でいかにしてリポソームが形成されるかについてはこれまでの検討では明らかになっていなかった。リポソーム径はマイクロ流路内の流速を変化させることによって変化するため、明らかに流体力学的作用によってリポソーム径が規定されるものと考えられたが、せん断応力から決まる壁面スケールや、エネルギー消散率から決まるマイクロ渦スケールより明らかに小さなリポソームが形成されていたのである。

## 2. 研究の目的

そこで本研究ではこのマイクロ流路内でのリポソーム形成機構について明らかにすることを目的とした。当初考えられるのは、1) 強せん断によって膜あるいは壁面からリン脂質がはく離した時点でリポソーム径が決定される、2) 一旦大きなサイズで形成され、流動中にせん断力を受けることによって破壊し、リポソーム径が決定される、3) まず分子レベルで液中に取り込まれ、自己組織化作用によって流動中にリポソームが形成される、などであった。

本研究では矩形の2次元マイクロ流路を作成し、ラグランジュ的にリポソーム形成過程を観察することによって、マイクロ流路内のリポソームがいかにして同一サイズで形成されるかについて検討した。同時にマイクロPIVの手法を用いて、リポソーム形成時に付加される流体力の測定を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料

リポソーム生成試料には卵黄由来のリン脂質を用いた。1mlのクロロホルムに3.16mgのリン脂質と0.28mgのリポソーム安定化剤DCP (dicetyl phosphate)を溶解させ、流路に封入した。吸引乾燥させ、リン脂質膜を流路壁に形成させたのち、生理食塩水を流入させた。その際、生理食塩水および流路の温度はリン脂質の融解温度以上の60°Cに調節した。

### (2) 流動装置

本研究では稼働ステージを用いて、リポソームの生成挙動をラグランジュ的に観察した。図1にラグランジュ観察を可能とする顕微鏡システムを示す。

当初流体力学的に滑らかな矩形ダクトの作成ができなかったため、まず円形断面を有するキャピラリーチューブでリポソーム生成の観察を行った。チューブ径は直径320 $\mu\text{m}$ および540 $\mu\text{m}$ とした。また、そのうち530 $\mu\text{m}$ のものについて主としてリポソーム観察に用いた。

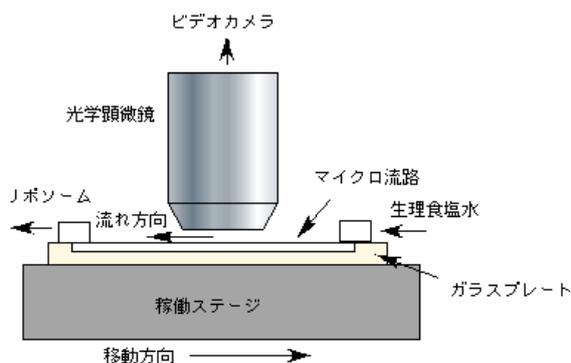


図1 リポソーム観察装置の概念図

その後、矩形ダクトに切り替えて、レンズ効果のない観察を行った。ダクト型流路には170x80 $\mu\text{m}$ 、250x120 $\mu\text{m}$ および410x200 $\mu\text{m}$ の三種類を用いた。いずれも流路直線部は10cmである。本装置によって、リポソーム生成観察およびマイクロ速度場の測定を行った。

### (3) 粒度測定

マイクロ流路出口から流出する溶液を回収してリポソーム径および収率を測定した。粒度測定には動的光散乱法を用いた。

### (4) リポソーム生成過程の観察

リポソームの生成過程の観察は、稼働ステージを用いてラグランジュ的に行った。ステージ速度は50~200 $\mu\text{m}/\text{s}$ とした。それに対応して、シリンジポンプの流量を調節して、流速を制御した。

### (5) マイクロPTV

当初PIV (Particle Image Velocimetry)によってマイクロ流動測定を行う予定であったが、大量に粒子を混入する必要があるため、それらが流動状態に影響を与える懸念が生

じたため、より少ない粒子で流動測定が可能となるPTV (Particle Tracking Velocimetry) の手法を採用することとした。PTV 測定には410x200 $\mu\text{m}$  の矩形ダクト流路を用いた。またトレーサー粒子には2 $\mu\text{m}$  のポリスチレン粒子を用い、0.2wt%の割合で混入した。流路内の流速は100 $\mu\text{m/s}$ とした。

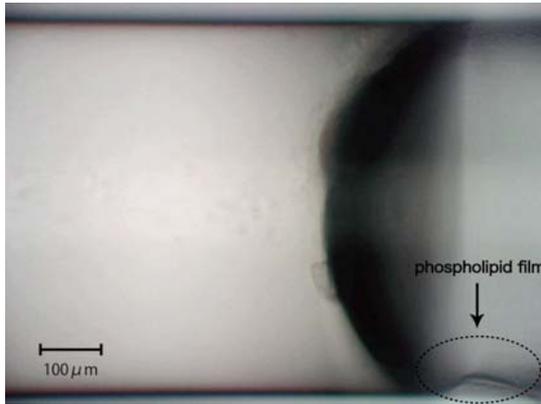
#### 4. 研究成果

##### (1) リポソーム生成機構

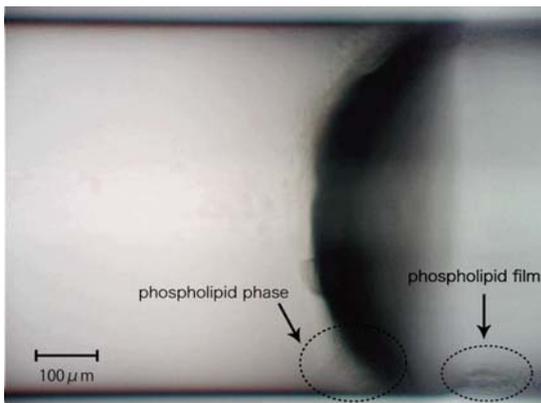
まず、径530 $\mu\text{m}$ のキャピラリーチューブを用いて、リポソーム生成過程を観察した。

図2 (a)および(b)に流速100 $\mu\text{m/s}$ とした場合の気液界面付近の観察写真を示す。図で生理食塩水は左から右に移動している。

図には気液界面と壁面に付着したリン脂質膜が撮影されている。気液界面は、濡れ性によって液側が凹となる形状をしている。図に撮影されているリン脂質の凸状塊は、(a)図の1秒後に気液界面に取り込まれ、界面に広がっているのがわかる。



(a) 初期



(b) 1秒後

図2 気液界面近傍の写真

図3に気液界面と壁面近傍の拡大写真を示す。図より気液界面から下流側に向かって

伸びる棒状のマイクロ構造を有するリン脂質構造体が観察される。これは明らかにリン脂質によって形成されており、以下棒状リポソームと称す。この棒状リポソームの一端は壁面に付着しており、気液界面が移動することによって伸長する。

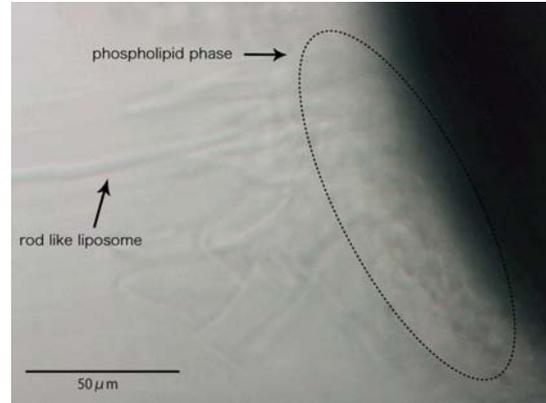


図3 気液界面の拡大図

この棒状リポソームの径の流速による変化を図4に示す。図には同じ実験で、流路流出溶液から得られた球状リポソーム径を同時に示した。

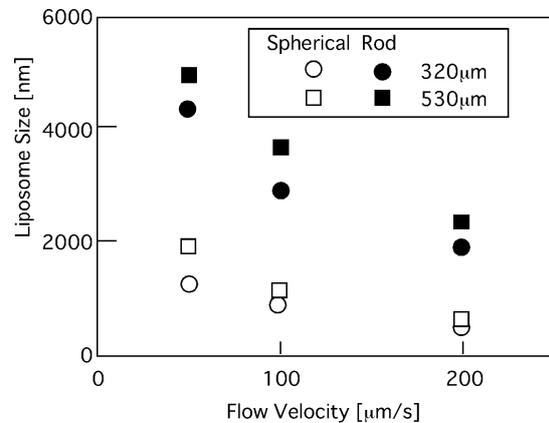


図4 棒状リポソームのサイズ

棒状リポソームの径は球状リポソームと比較して大きな値を有するが、流速に対する傾向が球状リポソームと同様であること、球状リポソームに対して一定の割合であること、また断面形状が円であるキャピラリーチューブを用いており、レンズ効果があることを考慮すると、この棒状リポソームが分裂して球状リポソームが生成されると考えられる。当初、リン脂質膜がマイクロ流体力によって壁面から剥離され、球状リポソームが形成されると予測されていたが、これとは全く異なり、壁面に付着したリン脂質の多くが、

一端気液界面に吸着し、その一端が壁面に付着して、気液界面から連続的にリン脂質が供給されることによって、棒状リポソームが形成し、その後、マイクロ流体力によって分裂して球状リポソームが形成されることがわかった。

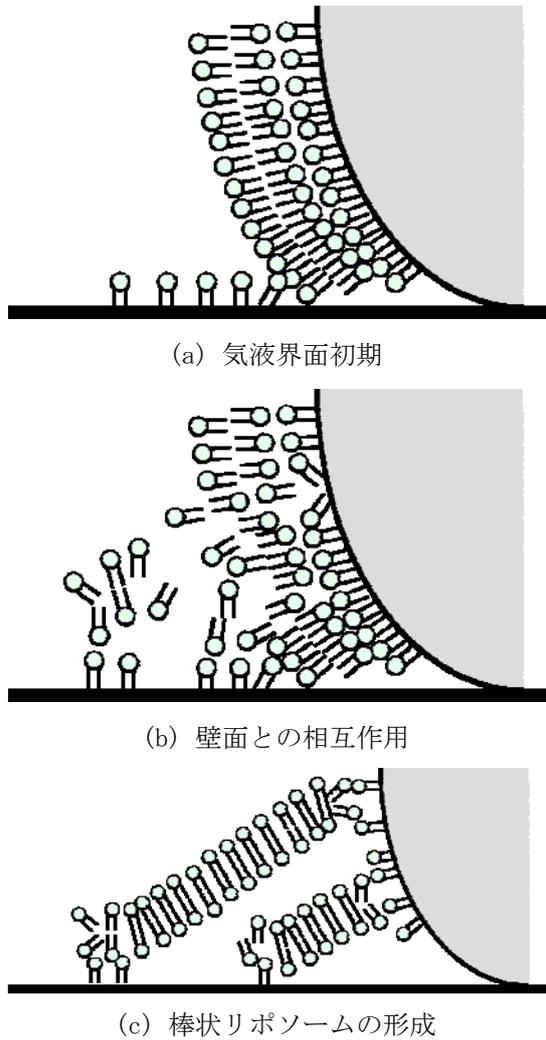


図5 リポソーム形成機構

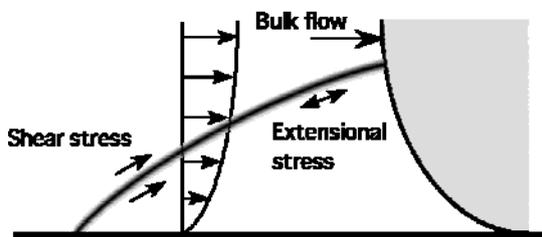


図6 関与するマイクロ流体力

図5に棒状リポソームの形成機構を図解する。図で○印はリン脂質の親水基である。リン脂質は気液界面の存在によって配向し、層状構造を形成する(図5(a))。その後壁面

に付着したリン脂質との相互作用(図5(b))によって一端を壁面に有する棒状リポソームが形成される(図5(c))。

図6に棒状リポソームに加えらるる流体力を示す。気液界面は流動によって移動するが、それによって一端を壁面上に有する棒状リポソームは伸長される。また同時に棒状リポソームは粘性せん断力を受ける。気液界面の移動は流体の慣性力によって規定され、粘性力は管径と速度勾配によって規定される。これまでの研究によって、リポソーム径はマイクロ流路内を流動する生理食塩水のレイノルズ数によって決まることを報告したが、レイノルズ数は慣性力と粘性力の比であり、本機構によって形成される棒状リポソームの生成機構と対応する。

### (2) 流路形状の影響

マイクロ流動場を測定する流路は、レンズ効果が微小である矩形断面を有するダクト流路としたが、まず流路形状が異なる場合の影響について議論する。

図7に矩形ダクト流路と円形断面を有するキャピラリーチューブで得られたリポソーム径を示す。図の横軸は水力相当直径 $D_h$ [m]基準のレイノルズ数 $Re[-]$ とし、縦軸はリポソーム径 $D_p$ [m]を $D_h$ で規格化したものを示す。図には円形チューブを用いた以前の研究で得られた高流速での実験結果を同時に示す。

図より、矩形ダクトで形成されたリポソームは円形チューブで形成されたものより若干大きな値を示している。しかしながら、粒径は円形チューブのものと同様にレイノルズ数によって規定されており、リポソーム生成機構に関しては、マイクロ流路の断面形状の影響はないと判断できる。

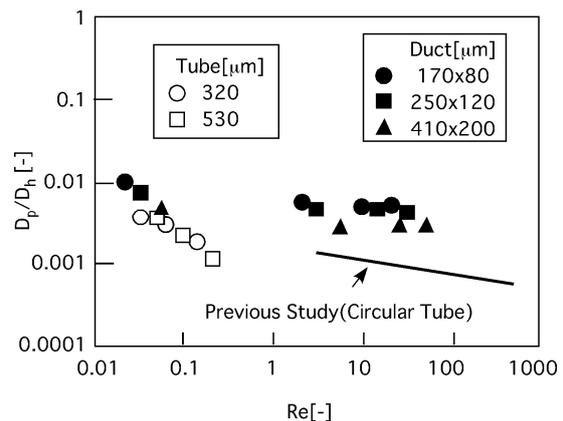


図7 流路形状の影響

### (3) マイクロ流動

マイクロPTVによってリポソーム形成時におけるマイクロ流動場の測定を行った。流路は矩形ダクト流路(410x200μm)とし、平均流速は100μm/sと固定した。

図8に顕微鏡写真を示す。また写真の瞬間でのマイクロPTVを用いたラグランジュ的速度場を図9にベクトル線で示す。また平均速度を減じてオイラー観察場としたベクトル線図を図10に示す。

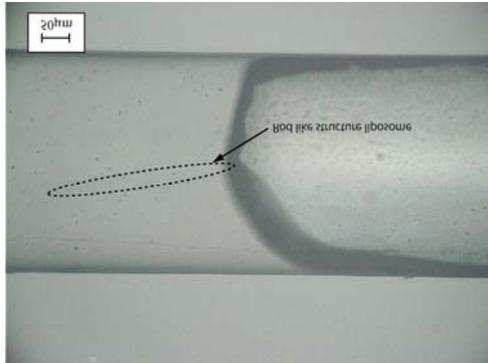


図8 ダクト流路内可視化写真

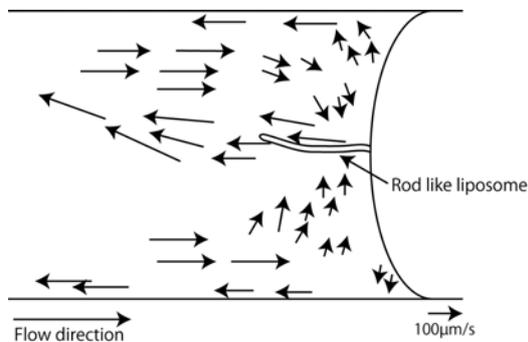


図9 マイクロ流動場(ラグランジュ観察)

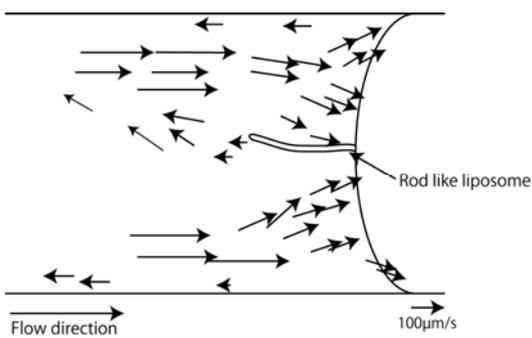


図10 マイクロ流動場(オイラー観察)

写真より気液界面がいびつな形状となっていることがわかる。これはリン脂質が気液界面に吸着したことにより、気液界面の局所的粘度および表面張力が変化していることによる。またベクトル線図から棒状リポソームが形成される周辺において強い逆流が存在することがわかる。この逆流はオイラー的観測においても有意に観測される。この逆流が棒状リポソーム生成を助長する原因とな

ると予測される。

図11に棒状リポソームが観察される気液界面近傍のマイクロ流動場をベクトル線図で示す。なお、ラグランジュ観察による結果である。

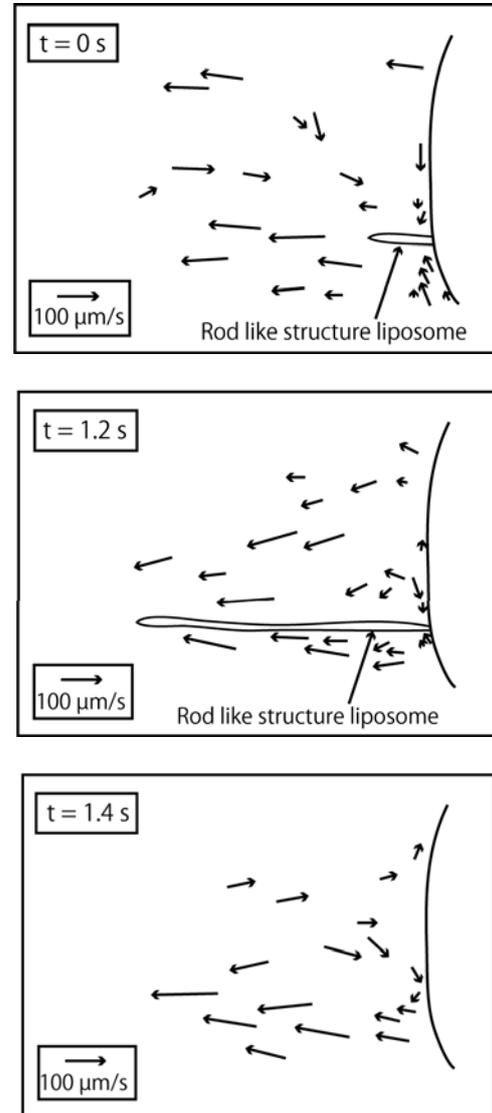


図11 気液界面周辺のマイクロ流動変化

図より、前述したように棒状リポソーム周辺に流れ方向とは反対向きの強いマイクロ流動が観察されることがわかる。時間  $t=0s$  において見られるように、強い逆流は棒状リポソーム側面のみではなく、下流側先端部より下流域においても観察され、棒状リポソームを気液界面から引き出すことを促進しているのがわかる。その後、強い逆流場は棒状リポソーム側面部に移動し、棒状リポソームを粘勢力で伸長する作用を与え、同時に気液界面からの剥離を促進する。棒状リポソームが剥離した  $t=1.4s$  における流動場から、この強い逆流は気液界面周辺に残存しており、

これがさらに新たな棒状リポソームの生成を促進する方向に作用することが伺える。

以上のことから棒状リポソームの生成は棒状リポソーム生成に伴って生ずる強い逆流域によって引き起こされることが明らかとなった。

#### (4) まとめ

マイクロ流路を利用したリポソーム生成に関して、稼働ステージを用いたラグランジュ的観察およびマイクロPTVを用いたマイクロ流動場の測定によって、以下のことが明らかとなった。

1. 壁面に付着したリン脂質は一端気液界面に吸着し、その後気液界面から棒状にリポソームが形成される。
2. 棒状リポソームは形成されたのち、下流に向かって気液界面から剥離し、その後球状リポソームを形成する。
3. 気液界面近傍には強い逆流のマイクロ流動が存在し、そのマイクロ流動によって、連続的に棒状リポソームが形成される。

以上の結果より、本研究によって特異なマイクロ流動場によって棒状リポソームが形成され、リポソームの形成に流れの慣性力および粘性力が関与するために、リポソーム径がレイノルズ数によって規定されることが明らかとなった。また、本研究によりリン脂質膜を壁面に形成させる必要はなく、気液界面に吸着させることが可能であれば、リポソームをより簡便に生成させることが可能であることが示差され、興味深い。なお、棒状リポソーム周辺の逆流が非常に強いため、球状リポソームの生成については確認することができなかった。今後検討したい。

#### 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)

[学会発表] (計5件)

- ① Jun-ya HAMAMURA, Hiroshi SUZUKI, Tomohisa KATSUDA, Yoshiyuki KOMODA, Shigeo KATOH and Hiromoto USUI, “Liposome Formation Characteristics with a Micro-Reactor”, Proceedings of 11<sup>th</sup> Liposome Research Days Conference, (2008), #P95Y, Yokohama
- ② 藤原淳, 濱村準矢, 鈴木洋, 勝田知尚, 菰田悦之, 薄井洋基, “マイクロ流路内におけるリポソーム生成機構”, 化学工学会第74年会, (2010), D114, 横浜
- ③ Atsushi FUJIWARA, Hiroshi SUZUKI, Tomohisa KATSUDA, Yoshiyuki KOMODA, Shigeo KATO and Hiromoto USUI, “Visualization of Liposome Production in a Micro-Tube” Proceedings of Asia Pacific Biochemical Engineering

Conference '09, (2009), #BP-03, Kobe

④ 藤原淳, 鈴木洋, 菰田悦之, 勝田知尚, “マイクロ流路内におけるリポソーム生成時のマイクロ流体挙動に関する研究”, 化学工学会第42回秋季大会, (2010), #N106, 京都

⑤ Atsushi FUJIWARA, Hiroshi SUZUKI, Tomohisa KATSUDA, Yoshiyuki KOMODA, “Micro-Fluidic Behavior on Liposome Production in a Micro-Channel”, 13<sup>th</sup> Asia Pacific Confederation of Chemical REngineering Congress, (2010), #10338, Taipei

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 洋 (SUZUKI HIROSHI)  
神戸大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：90206524

##### (2) 研究分担者

菰田 悦之 (KOMODA YOSHIYUKI)  
神戸大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：50335460

勝田 知尚 (KATSUDA TOMOHISA)  
神戸大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：00397796