

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32678

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22760613

研究課題名（和文）液晶性微小カプセルを利用した生体高分子デリバリーシステムの開発

研究課題名（英文）Development of a biopolymer delivery system using liquid crystalline fine capsules

研究代表者

黒岩 崇 (KUROIWA TAKASHI)

東京都市大学・工学部・准教授

研究者番号：60425551

研究成果の概要（和文）：

核酸やタンパク質などの生体高分子薬剤のドラッグデリバリーに適したキャリアー素材の開発に向けて「液晶性微小カプセル」の作製技術を検討した。液晶性生体分子（リン脂質、コレステロールおよび長鎖脂肪酸の混合物）を利用し、マイクロチャネル乳化法と液中乾燥法を組み合わせた独自の作製プロセスを採用した結果、80%を超える高い内包率で水溶性高分子を内包でき、粒径制御も可能な液晶性微小カプセル作製法を開発できた。

研究成果の概要（英文）：

Efficient preparation method of “liquid crystalline fine capsules” for a carrier material in biopolymer delivery system was investigated. A mixture of liquid crystalline biomolecules such as phospholipids, cholesterol and long-chain fatty acids was used for a capsule-constituting material. Liquid crystalline fine capsules were successfully obtained with controlled diameters and high entrapment efficiencies (>80%) for water-soluble biopolymers using the novel combined methods of the microchannel emulsification and the solvent evaporation techniques.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物化学工学、生物材料化学、分子集合材料工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：ドラッグデリバリー、マイクロカプセル、生体高分子、マイクロ・ナノデバイス、マイクロバイオプロセス

## 1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発では、薬理成分を患部に送達する「キャリアー」の性能が決め手となる。これまで、両親媒性分子の会合体であるベシクル(リポソーム)やミセルの利用が広く検討されてきた。

これらは両親媒性分子が水溶液中で異方的に配向して形成される「リオトロピック液晶」であり、同じく天然のリオトロピック液晶である生体膜との親和性が非常に高いのが特徴である。このような液晶性DDSキャリアーの問題点は、親水性物質の内包効率が低

いことである。特に、近年注目されている核酸系・タンパク質系薬剤のような水溶性の生体高分子に対する内包効率は極めて低く、遺伝子治療や免疫療法でのDDS開発を妨げる一因となっている。

上記の液晶性キャリアーへの水溶性物質の内包効率が低い理由は、その形成メカニズムにある。すなわち、水溶液中に溶解・分散している両親媒性分子が濃度や温度の変化あるいは剪断場、電場などの外部刺激によって互いに寄り集まって会合体を形成する際に、内包したい物質が周囲の水とともに“たまたま”キャリアー内部に取り込まれるにすぎない。通常、水溶液全体に対する液晶性キャリアーの内部体積の割合は数%程度なので、偶発的に取り込まれる内包物質の割合(=内包率)もこの程度にとどまってしまう。

研究代表者は、これまでにベシクルに生体触媒である酵素を内包させて新しい生化学反応素子として利用する「ベシクルバイオリアクター」に関する研究を行い、それまで数〜十数%程度であった酵素類のベシクルへの内包効率を50%程度にまで高めることに成功した。また、マイクロデバイスを活用して生体分子の配向を制御し、様々な生体適合性微粒子材料を開発してきた。これらの研究で修得した知識・実験技法を駆使し、微細空間での生体分子の配向挙動および界面や相の挙動を適切に制御することで、新規かつ効率的な液晶性微小カプセルの作製方法を提供できるとの着想を得て、本研究を始めるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体高分子を高効率で内包できる液晶性微小カプセルの作製法を開発し、新しいDDSキャリアーとしての可能性を検証することを目的とした。具体的には、以下の2点について検討を行った。

(1) 多相エマルジョンを利用した液晶性微小カプセルの作製と生体高分子の効率的内包化

既存の液晶性DDSキャリアーの作製法では、両親媒性分子を水溶液中に溶解・分散させた状態から、濃度変化、温度変化、および電場や剪断場などの外部刺激によって自己組織化的に会合体を形成させる方法が一般的である。しかし、この方法では水溶性分子を高い効率でキャリアー内部に封入することはできず、得られる会合体のサイズも不均一である。

本研究では、まずマイクロ流体デバイスを活用して生体由来の液晶性分子を構成成分とするWater-in-Oil-in-Water型(W/O/W)多相エマルジョンを作製し、これを出発物質として液晶性微小カプセルの作製を試みた。この方法によれば、W/O/Wエマルジョンの内

部水滴に包含した生体高分子の外部水相への漏出を最小限にとどめながら液晶性微小カプセルを形成させることが可能となり、内包効率の向上が期待できる。基材とするW/O/Wエマルジョンの内部水滴径を適切に制御することで、最終的に得られる液晶性微小カプセルの粒径も制御できると期待される。

(2) 液晶性微小カプセルの特性評価とDDSキャリアーとしての利用可能性検証

上記で得られた液晶性微小カプセルの微細構造を解明するとともに、機能性分子の内包特性を調べることでDDSキャリアーとしての利用可能性を検証した。各種機器分析手法を駆使して液晶性微小カプセルの微細構造を評価するとともに、生体高分子の内包化を試みその効率を調べた。

## 3. 研究の方法

(1) 核酸やタンパク質を高効率で内包できる液晶性微小カプセルの高効率作製技術の開発

本研究では、生体高分子の効率的内包化を実現できるDDSキャリアーを開発するために、生体高分子を含む微小水滴の周りに液晶性分子を配向させることで自己組織的に液晶性カプセル壁を形成させる方法を考案した(図1)。

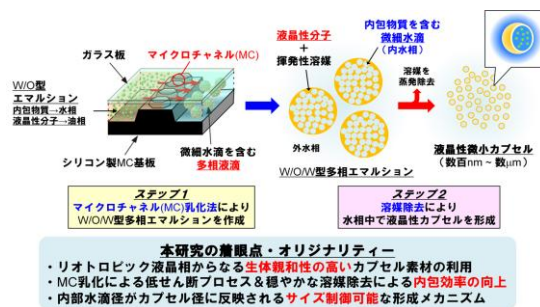


図1. 本研究における液晶性微小カプセル作製法の概要と着眼点。

まず、内包したい物質を含む水溶液と、リン脂質、コレステロールおよび長鎖脂肪酸などの生体由来の液晶性分子を含む揮発性有機溶媒を用いてWater-in-Oil型(W/O)エマルジョンを作製した。このW/Oエマルジョンをマイクロチャネル(MC)と呼ばれるシリコン基板上の微細流路に圧入して、微小水滴を含む油滴が水相中に均一に分散したWater-in-Oil-in-Water(W/O/W)型の多相エマルジョンを作製し、液晶性微小カプセル作製のためのテンプレートとして用いた。MC乳化法で作製したW/O/Wエマルジョンに含まれる有機溶媒を蒸発除去することで、有機溶媒相に溶解していた液晶性分子が内部水滴周りに配向し液晶性微小カプセルを作製した。この形成機構によれば、W/O/Wエマルジョンの内部水滴に含まれる内包物質はそのまま

カプセル内に保持されることになり、内包率の飛躍的な向上が期待できる。さらに、内部水滴径がそのまま最終カプセル径に反映されると予想されるため、内部水滴径を制御することにより、最終的に得られる液晶性微小カプセルの粒径制御が達成されると期待できる。

(2) 液晶性微小カプセルへの内包物質の保持特性および機器分析的手法によるカプセルのナノレベル微細構造の評価

上記(1)の検討で得られた液晶性微小カプセルの物質内包特性および微細構造を明らかにするための検討を行った。水溶性の蛍光色素であるカルセインおよびモデル生体高分子としてデキストランを用い、これらのカプセル中への内包効率を評価した。また、得られた液晶性カプセルに対し、電子顕微鏡などを駆使してその微細構造を調査した。

#### 4. 研究成果

初年度(平成22年度)の検討では、まず、シリコン基板上に微細加工された微小流路を活用した液滴作製技術である「マイクロチャンネル乳化法」により、W/O/W エマルションの作製を検討した。カプセル作製に適した生体由来の液晶性分子および乳化剤の選定を行い、W/O/W エマルションを作製できた。さらに、これをテンプレートとした液晶性微小カプセルの作製方法を検討した結果、室温、大気圧下という穏やかな条件下で多相エマルション中の有機溶媒を除去するプロセス(「液中乾燥」)により、水溶性分子を封入した微小カプセルを作製することに成功した。図2には各工程で得られたW/O エマルション、W/O/W エマルションおよび液晶性微小カプセルの顕微鏡写真を示す。カプセルの作製条件を種々検討することにより、水溶性蛍光色素であるカルセインを83%の高い内包率(既存のキャリアー作製法では数%程度)でカプセル内に封入することができ、目標値であった80%の内包率を達成することができた。

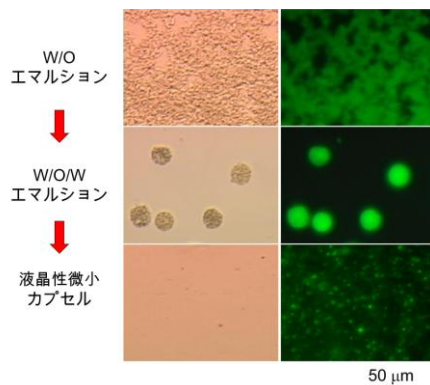


図2. 各工程で得られたW/O エマルション、W/O/W エマルションおよび液晶性微小カプセルの顕微鏡写真。内包物質としてカルセイ

ンを用いた。(左列)明視野画像、(右列)蛍光画像。

続く平成23年度の検討では、カプセルのテンプレートとなるwater-in-oil-in-water型(W/O/W)多相エマルションの作製に利用する乳化剤の影響について調べた。その結果、W/O/W多相エマルションの外部水相に添加する乳化剤の種類が、得られるカプセルへの水溶性物質の内包効率に顕著な影響を及ぼすことを明らかにした。初年度に利用していたカゼインナトリウムに加えて、アルブミンおよびポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール(Pluronic F-68 および F-127)などの高分子乳化剤を用いた際には水溶性分子であるカルセインに対して70~90%の高い内包率が得られたのに対し、低分子乳化剤であるポリオキシエチレンソルビタンモノオレートをを用いた場合にはカルセインの内包率は30%程度にとどまり、本法において使用する乳化剤としては高分子系の乳化剤が適していることが示唆された(図3)。

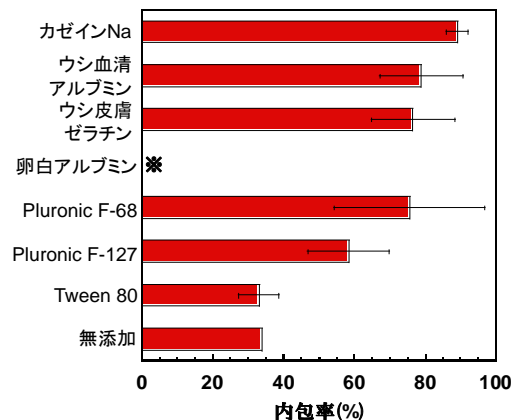


図3. 粒径約200 nmの液晶性微小カプセルへのカルセインの内包率に対する分散剤の影響。※卵白アルブミンを用いた場合はW/O/Wエマルションが安定的に作製できず、液晶性微小カプセルが得られなかった。

続いて、カプセル作製の第1段階で得られるwater-in-oil型(W/O)エマルション中の微小水滴のサイズを変化させてW/O/W多相エマルションを作製し、これをテンプレートとして微小カプセルを作製した。その結果、平均径約1.7 μmの水滴からは平均径約1.1 μmのカプセルが、また平均径約200 nmの水滴からは平均径約200 nmのカプセルが得られ、カプセル作製に用いたW/O型エマルションの水滴径が最終的に得られるカプセルの大きさに反映されることが示された(図4)。以上の検討により、液晶性微小カプセルの作製において、「内包効率の向上」と「カプセルの

サイズ制御」の2つを実現するための工学的指針を与える有意義な成果を得ることができた。

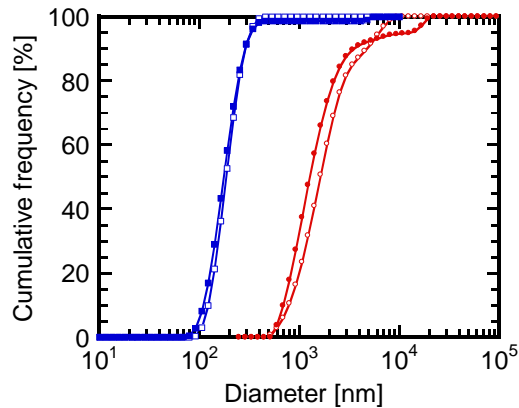


図4. 第1段階で作製したW/Oエマルジョンの水滴径と最終的に得られた液晶性微小カプセルの粒径の比較. 白抜シンボルはW/Oエマルジョンの水滴径、中塗シンボルは液晶性微小カプセルの粒径の分布を示す. 丸および四角のシンボルはそれぞれ平均水滴径1.7  $\mu\text{m}$ および200 nmのW/Oエマルジョンを用いた場合の結果である.

得られた液晶性微小カプセルの微細構造を電子顕微鏡により観察した結果、平均径約1.1  $\mu\text{m}$ および約200 nmのいずれのカプセルにおいても粒径分布に対応したサイズの粒子像が観察された(図5)。さらに詳細にカプセル表層の微細構造を調べた結果、本液晶性微小カプセルは、生体脂質からなる二分子膜の厚さに相当する数ナノメートル程度の厚みをもつラメラ構造を有していることが明らかとなった。

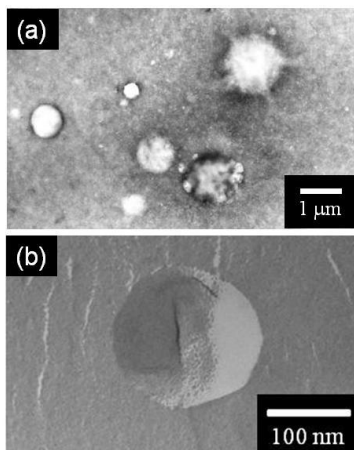


図5. 液晶性微小カプセルの電子顕微鏡画像. (a)および(b)はそれぞれ平均液滴径1.7  $\mu\text{m}$ および200 nmのW/Oエマルジョンを利用して作製したカプセルである. (a)ではネガティブ染色法、(b)では凍結活断レプリカ法により観察用試料を作製した。

最終年度(平成24年度)の検討では、カプセル作製に最適な乳化剤の選定指針を得ることを目指して、外水相に添加する乳化剤による内包物漏洩抑制効果に注目し、親水性蛍光色素であるカルセインを内包物質として、微小カプセルの作製過程でカルセインが漏出する過程およびそのメカニズムについて調べた。液晶性微小カプセルのテンプレートになるwater-in-oil-in-water型多相エマルジョンの油相中に可溶化された水分量およびカルセイン量を測定した結果、油相中の逆ミセルにより内包物質が外部水相に輸送されることで漏出が起きている可能性が示された。逆ミセルを介した油相-水相界面での物質輸送を抑制するような性質をもつ乳化剤が高い漏出抑制効果を有するのではないかと考え、種々の乳化剤を用いてW/O/Wエマルジョンから有機溶媒を除去する液中乾燥プロセスにおけるカルセイン漏出量を評価した結果、最終的に高い内包率が得られたケースでは、W/O/Wエマルジョンから有機溶媒を除去する際に外部水相に漏出するカルセイン量が大幅に減少していることが明らかとなった(図6)。これらの結果は、乳化剤の効果に関する機構的背景の解明につながる有意義な成果であるといえ、この成果により効果的な乳化剤の選定指針を得ることができた。

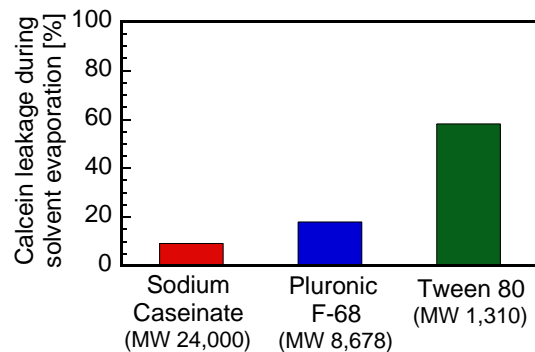


図6. 液中乾燥中におけるカルセインの漏出割合に対する乳化剤種の影響.

さらに、生体高分子の内包化への本法の適用可能性を検証するため、微小カプセルへのデキストランの内包化を試みた。カゼインナトリウムおよびPluronic F-68を乳化剤として用い、平均分子量4,000および40,000のデキストランの内包化を試みた結果、いずれの場合も内包分子に甚大な損傷を与えることなく、80%以上の内包効率を達成することができた(図7)。

以上、本研究により生体高分子の内包化を達成するための技術的基盤を与える有意義な成果が得られた。

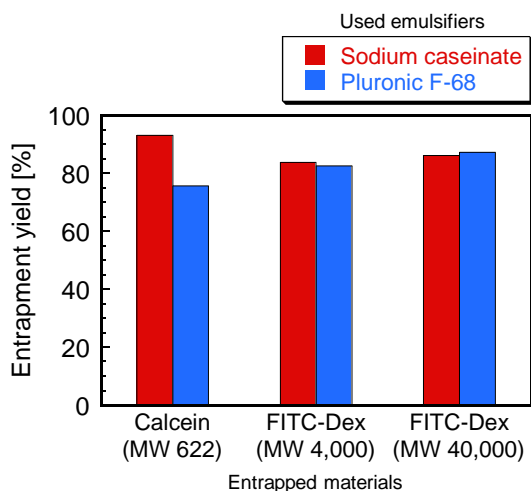


図7. 液晶性微小カプセルへの種々の水溶性分子の内包率.

#### 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2件)

- ① Takashi Kuroiwa, Ryoji Fujita, Isao Kobayashi, Kunihiko Uemura, Mitsutoshi Nakajima, Seigo Sato, Peter Walde, Sosaku Ichikawa: Efficient preparation of giant vesicles as biomimetic compartment systems with high entrapment yields for biomacromolecules. *Chem. Biodiversity*, **9** (11), 2453-2472, 2012. [査読あり] DOI: 10.1002/cbdv.201200274
- ② Ai Mey Chuah, Takashi Kuroiwa, Isao Kobayashi, Mitsutoshi Nakajima: The influence of polysaccharide on the stability of protein stabilized oil-in-water emulsion prepared by microchannel emulsification technique. *Colloids Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects*, in press (2012年11月オンライン公開). [査読あり] DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.09.051

[学会発表] (計35件)

- ① 堀越要, 黒岩崇, 市川創作, 金澤昭彦: 「W/O/W エマルションを基材とするベシクル作製法における高分子乳化剤の添加効果」, 日本膜学会第35年会, 早稲田大学(東京都新宿区), 2013年5月.
- ② 大塚祐哉, 寺澤潤基, 黒岩崇, 佐藤誠吾, 市川創作: 「膜乳化法により作製したW/O/W エマルションを基材としたベシクルの作製」, 日本膜学会第35年会, 早稲田大学(東京都新宿区), 2013年5月.
- ③ 大塚祐哉, 黒岩崇, 佐藤誠吾, 市川創

作: 「膜乳化による多相エマルションを基材とした脂質ベシクルの作製とそのサイズ制御」, 化学工学会第78年会, 大阪大学(大阪府豊中市), 2013年3月.

- ④ 牧野大介, 黒岩崇, 小林功, 植村邦彦, 金澤昭彦: 「イオン性多糖被膜の形成による外場応答性ゼラチンマイクロカプセルの作製と徐放特性」, 第61回高分子討論会, 名古屋工業大学(愛知県名古屋市), 2012年9月.
- ⑤ 大塚祐哉, 黒岩崇, 佐藤誠吾, 市川創作: 「多相エマルションを基材とした脂質ベシクルの高内包率化を目指した操作因子の検討」, 化学工学会第44回秋季大会, 東北大学(宮城県仙台市), 2012年9月.
- ⑥ 西田由香里, 小林裕幸, 黒岩崇, 佐藤誠吾, 市川創作: 「脂質被覆水滴水和法によるジャイアントベシクル形成機構のフローサイト解析」, 化学工学会第44回秋季大会, 東北大学(宮城県仙台市), 2012年9月.
- ⑦ Chuah Ai Mey, Takashi Kuroiwa, Isao Kobayashi, Mitsutoshi Nakajima: The influence of polysaccharide on the stability of protein stabilized oil-in-water emulsion prepared by microchannel emulsification technique. The 10th International Symposium on Electrokinetic Phenomena, University of Tsukuba (Tsukuba, Japan), May 2012.
- ⑧ Sosaku Ichikawa, Shunsuke Nakano, Takashi Kuroiwa, Seigo Sato: Nanoparticles Entrapments inside Giant Vesicles by Controlling the Electrostatic Interaction with Lipid Membrane. The 10th International Symposium on Electrokinetic Phenomena, University of Tsukuba (Tsukuba, Japan), May 2012.
- ⑨ Takashi Kuroiwa, Takatoshi Saito, Akihiko Kanazawa: Formulation of novel lipid-based materials via molecular assembly in phospholipid/cholesterol/water system. Asian International Symposium -Materials Chemistry-, Annual Meeting of Chemical Society of Japan, Keio University (Yokohama, Japan), Mar. 2012. [招待講演]
- ⑩ Takashi Kuroiwa, Yuya Otsuka, Seigo Sato, Sosaku Ichikawa: Lipid vesicles with controlled size and high entrapment efficiency prepared by using multiple emulsions. The 9th International Congress on Separation Science and Technology, Jeju Grand

- Hotel (Jeju, Korea), Nov. 2011.
- ⑪ Yukari Nishita, Hiroyuki Kobayashi, Takashi Kuroiwa, Seigo Sato, Sosaku Ichikawa: Flow cytometric analysis and sorting of giant vesicles prepared by lipid-coated ice droplet hydration method. The 9th International Congress on Separation Science and Technology, Jeju Grand Hotel (Jeju, Korea), Nov. 2011.
- ⑫ 黒岩崇, 小林功, 植村邦彦, 市川創作: 「マイクロチャネル多相乳化における液滴形成と物質内包挙動に対する水溶性高分子の影響」, 化学工学会第43回秋季大会, 名古屋工業大学(愛知県名古屋市), 2011年9月.
- ⑬ 大塚祐哉, 黒岩崇, 佐藤誠吾, 市川創作: 「多相エマルジョンを基材としたサイズ制御可能な高内包率脂質ベシクルの作製法」, 化学工学会第43回秋季大会, 名古屋工業大学(愛知県名古屋市), 2011年9月.
- ⑭ 牧野大介, 黒岩崇, 小林功, 植村邦彦, 金澤昭彦: 「高分子電解質多重層を利用した均一径ゼラチンマイクロカプセルの表面特性制御」, 日本膜学会第33年会, 産業技術総合研究所臨海副都心センター(東京都江東区), 2011年5月.
- ⑮ 小林裕幸, 黒岩崇, 佐藤誠吾, 市川創作: 「脂質被覆水滴水和法により作製したジャイアントベシクルのフローサイトメーターによる個別評価と分取」, 日本膜学会第33年会, 産業技術総合研究所臨海副都心センター(東京都江東区), 2011年5月.
- ⑯ 黒岩崇, 小林功, 植村邦彦, 市川創作: 「高分子乳化剤を利用したマイクロチャネル乳化によるW/O/Wエマルジョンの作製特性」, 化学工学会第76年会, 東京農工大学(東京都小金井市), 2011年3月.
- ⑰ 中野俊介, 黒岩崇, 佐藤誠吾, 市川創作: 「脂質被覆水滴水和法によるジャイアントベシクルへの効率的な物質内包化条件の検討」, 化学工学会第42回秋季大会, 同志社大学(京都府京都市), 2010年9月.
- ⑱ 黒岩崇, 小林功, 植村邦彦, 市川創作: 「マイクロチャネルを利用したW/O/Wエマルジョン作製におけるタンパク質系乳化剤の添加効果」, 日本食品工学会第11回年次大会, 東京海洋大学(東京都品川区), 2010年8月.
- ⑲ Takashi Kuroiwa, Chuah Ai Mey, Isao Kobayashi, Mitsutoshi Nakajima: Preparation of multilayer biopolymer coatings on uniformly-sized alginate microspheres via the layer-by-layer

electrostatic deposition. The 10th International Hydrocolloids Conference, Shanghai Jiao Tong University (Shanghai, China), Jun. 2010.

〔図書〕(計5件)

- ① Takashi Kuroiwa, Jun Watanabe, Sosaku Ichikawa: Chapter 30, Formulation and Characterization of Nanospersions Composed of Dietary Materials for the Delivery of Bioactive Substances. Bio-nanotechnology-A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 519-530, 2013. [分担執筆]
- ② Isao Kobayashi, Marcos A. Neves, Sosaku Ichikawa, Takashi Kuroiwa: Chapter 32, Production of Monodisperse food-grade fine dispersions by micro/nanochannel emulsification. Bio-nanotechnology-A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 542-556, 2013. [分担執筆]
- ③ Isao Kobayashi, Sosaku Ichikawa, Marcos A. Neves, Takashi Kuroiwa, Mitsutoshi Nakajima: Chapter 5, Formulation of lipid micro/nanodispersion systems. Lipids in Nanotechnology, AOCS Press, Urbana, pp. 95-134, 2011. [分担執筆]
- ④ 市川創作, 黒岩崇: リポソームを利用したマイクロバイオリアクションシステム。『酵素利用技術大系～基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで～』, エヌ・ディー・エス, 東京, pp. 474-480, 2010. [分担執筆]

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ese.tcu.ac.jp/labs/bio>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒岩 崇 (KUROIWA TAKASHI)  
 東京都市大学・工学部・准教授  
 研究者番号: 60425551

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし