

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24656466

研究課題名(和文)赤血球と同じ形状の扁平な柔らかい微粒子をつくる

研究課題名(英文) Making the concave soft micro particles with the same shape as red blood cell

研究代表者

山本 辰美 (yamamoto, tatsumi)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・助教

研究者番号：60220480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球サイズ(直径7～8 $\mu\text{m}$ )の均一な微粒子を作製する技術は希少であるが、予備段階としてインクジェット法で空気中にアルギン酸ナトリウム水溶液滴を打ち出し乾燥させる手法により、それを可能にした。しかし、この手法で作製される粒子はほぼすべて球形であり、赤血球の凹んだ形状とは異なる。内径が数 $\mu\text{m}$ の毛細血管を赤血球が通過することができるのは、赤血球の凹んだ形状に由来するとされており、次の段階として、赤血球様の形状をした人工微粒子の作製法にチャレンジした。コーヒーステイン現象に着目し、水溶液滴の吐出・着床条件、乾燥条件を工夫することによって、赤血球サイズの凹んだ柔らかい微粒子を作製できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Although the technique to make uniform fine particles of the red blood cell size (7-8 $\mu\text{m}$  in diameter) was rare, we made it possible by drying the droplets of sodium alginate aqueous solution injected in the air by the ink-jet method. However, the particles produced by this technique are spherical, and different from the concave shape of the red blood cells. The red blood cells could pass the blood capillary having the inner diameter of a few  $\mu\text{m}$  by the concave shape. As the next step, we tried the production method of artificial soft particles which had the shape and size as red blood cell, and had the prospect by using the coffee-stain phenomenon when the aqueous alginate droplets ejected from the fine nozzle landed on water-shedding plate.

研究分野：化学工学

キーワード：人工赤血球 コーヒーステイン現象 アルギン酸ゲル微粒子

## 1. 研究開始当初の背景

① 人工赤血球の必要性：輸血用血液は、一般に献血で血液センターに集められ、保管され、病院からの要請に応じて配給される。しかし、適合する血液型の人にしか使えず、長期保存はできず、突然の災害や事故に備えるのは難しい。また、血液製剤は、たとえスクリーニングを経たとしても未知の病原体感染のリスクが伴い、滅菌もできない。そこで、どんな血液型の人にも使えて、保存に耐え、感染のリスクのない「人工赤血球」の研究開発が必要とされている。

② ヘモグロビン分離精製技術の進歩：安全性の問題から、ヒトや動物由来の赤血球から抽出したものをそのまま用いるのではなく、イオン交換カラムや遠心限外濾過分離によるヘモグロビン単離精製や、フォームト秒レーザーによりヘモグロビンを結晶化する研究も進んでおり、そのように精製されたヘモグロビンを用いて人工赤血球の開発が望まれる。

③ 人工赤血球の研究開発：欧米ではヘモグロビンを加工して、2量体、4量体を作製して応用する研究が古くから進められてきたが、剥き出しのヘモグロビンの毒性を除去することは困難で、現在ではリン脂質分子の二重層膜でつくられたヘモグロビン内包リポソーム小胞体の開発が行われ、2010年現在で赤血球の数十分の一の大きさ(直径数百ナノメートル程度)のヘモグロビン内包リポソーム小胞体が動物実験で短期的には効果を認められるところまで開発が進んでいる。しかし、リポソームは、赤血球に比べてかなり小さく、そのため組織内漏出や長期残留などの課題がある。

④ 扁平な軟らかい微粒子：赤血球は、ヘモグロビンを含み、酸素や二酸化炭素の運搬に特化した細胞で、直径が7-8 $\mu\text{m}$ 、厚さが2 $\mu\text{m}$ 強の両面中央が凹んだ円盤状を呈している。その独特の形状のため、同じ体積の球に比べ表面積が30-40%大きく、酸素・二酸化炭素の交換に有利と考えられている。また赤血球は、軟らかく変形能に富み、自身の直径の半分以下の径の狭い毛細血管にも入り込み通過することができる。この変形能も、体積に比べ表面積に余裕がある両面が凹んだ円盤状の形状であるため、変形のひずみ力に対して細胞膜にかかる力が少なくなるためと考えられている。しかるに、このような形状の軟らかい微粒子を作る工学技術は未だ確立されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、微細ノズルより吐出されたポリマー溶液滴から、赤血球と同じサイズでかつ同形状の軟らかいゲル微粒子への変形挙動を把握し、より赤血球に近い人工赤血球の

工学生産への足がかりを得ることを目指した。

研究分担者中村らは、微量液滴の吐出が可能なインクジェット技術を応用して、均一な大きさのアルギン酸ゲル微粒子作製技術(インクジェットドライ法)を研究開発しているが、本研究では、人工赤血球の開発を念頭にして、そのゲル微粒子へのヘモグロビンの含有を試みた。また、中村らはフォトリソグラフィを用いた印刷技術で、毛細血管のパターニングにも成功しており、この印刷技術は赤血球状微粒子の大量生産にも有効であると考えられ、本研究では、アルギン酸溶液着床時のコーヒーステイン現象を応用して、球状ではない凹んだ赤血球様のゲル微粒子の作製を試み、その過程における問題点などを把握し、印刷技術による大量生産法の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

(1) インクジェットドライ法によるヘモグロビン含有アルギン酸ゲル球状微粒子(球状人工赤血球)の作製

5%アルギン酸ナトリウム水溶液(共成製薬製「アルロイドG」)を蒸留水で1.6%に希釈したものとヘモグロビン(和光純薬製、ウシ血液由来)の10%水溶液の等量混合溶液をインクジェット吐出システム(クラスターテクノロジー社製)により空気乾燥筒中に吐出し、空中乾燥することにより、ヘモグロビンを含む球状ゲル微粒子を作製し、その大きさ、酸素運搬能およびヘモグロビン漏出を検証した。

(2) 赤血球と同じ大きさの凹んだアルギン酸ゲル微粒子(凹み人工赤血球)の作製とそのゲル化乾燥過程の把握

ステンレス製極微細針およびインクジェット吐出装置より、撥水面上に吐出したアルギン酸水溶液滴が、コーヒーステイン現象によって、赤血球状ゲル微粒子へと乾燥変形していく過程を記録計測し、シミュレーション等により、その機構を検証した。

テフロンコーティング(ソマール(株)のフッ素樹脂溶解液A1-6.0%使用)を施して撥水性にしたスライドガラス(松波製)と、液クロ用マイクロシリンジに接続されたステンレス製極微細針((株)伊藤製作所、内径30 $\mu\text{m}$ 、先端部90°カット)を用意し、濃度調整したアルギン酸ナトリウム水溶液を極微細針ノズルより所定の大きさまで吐出した液滴を、撥水処理したスライドガラス上に静かに置き、空気中で水分の蒸散により縮小変形する液滴の経時変化をデジタル顕微鏡カメラにより観察記録した(図1)。その際、温度制御したホットプレートを用いて、スライドガラス着床面の温度を制御した。

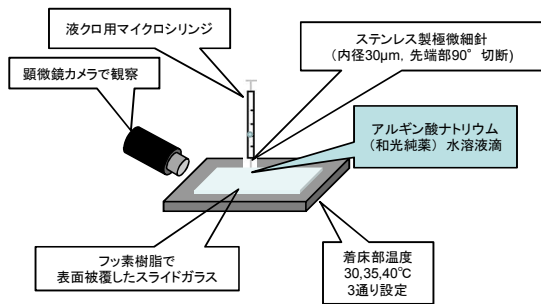


図1. ゲル化乾燥過程観察用装置

更に、インクジェット制御システム（クラスタテクノロジー(株), Wave Builder)に連結した吐出ヘッド（クラスタテクノロジー(株)製 PulseInjector, 吐出口内径  $40\mu\text{m}$ )を用いて、アルギン酸ナトリウム水溶液を撥水スライドガラス上に滴下し、着床後の液滴を観察記録した。ここで、ノズルから着床面までの落下距離は  $10\text{mm}$  程度とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 球状人工赤血球(ヘモグロビン含有球状ゲル微粒子)の作製

周波数  $500\text{Hz}$ 、電圧  $10\text{V}$  の条件で溶液を乾燥筒内に吐出し、空气中で自由落下させて乾燥したヘモグロビン含有微粒子を  $2\%$  塩化カルシウム溶液に浸漬することで、図1に示すように直径が  $6.03 \pm 0.71\mu\text{m}$  で、ヒト赤血球(直径  $7 \sim 8\mu\text{m}$ ) とほぼ同じ球状微粒子を得ることができた。

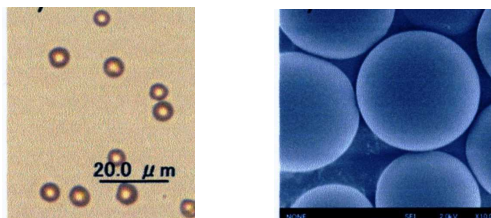


図2. 乾燥ヘモグロビン含有ゲル微粒子の光学顕微鏡写真(左)と電顕写真(右)

しかし、ここで使用したヘモグロビンはメトヘモグロビンであるため酸素運搬能は期待できない。そこで、ウシ血液の溶血溶液を調製し、同様の手法で溶血溶液含有ゲル微粒子を作製し、ヘモグロビン漏出と酸素運搬能の試験を試みた。その結果、ヘモグロビンがゲルの網目構造から漏れているのが観察され、更に、空気乾燥中に多量の酸素と接触するため、メト化して酸素運搬能が低下することがわかった。

乾燥過程での酸素との接触については、窒素ガスを用いて酸素分圧をコントロールすることにより改善される可能性を確認した。また、乾燥微粒子を  $0.25\%$  poly-1-lysine 溶液(シグマアルドリッチジャパン)と  $2\%$  塩化

カルシウム溶液の混合溶液に浸すことで poly-1-lysine コートを試み、漏出が若干抑えられることが確認された。

##### (2) 凹み人工赤血球(ゲル微粒子)の作製とそのゲル化乾燥過程の把握

極微細針を用いて滴下した液滴径の着床後の経時変化例を図3に示した。ここで、アルギン酸ナトリウム水溶液の濃度は  $0.1\text{wt}\%$  で、着床面の温度は  $303\text{K}$  である。

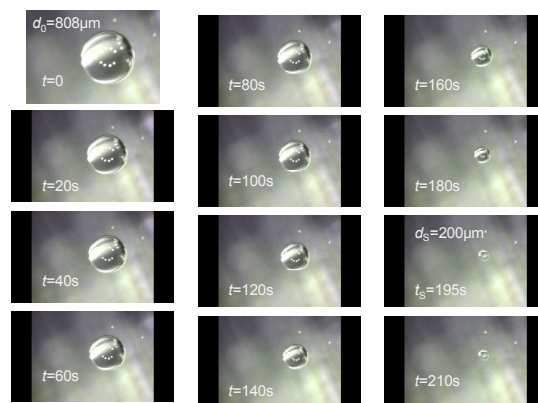


図3 着床後の液滴ゲル化経時変化例

撥水性ガラス面に着床したアルギン酸ナトリウム水溶液滴は、面との接触角が高く ( $70^\circ \sim 90^\circ$ )、ピンニングによってその接触面を保ったまま、水分の蒸散に伴い体積は減少したが、やがて接触角が後退角に転じ、液滴は一樣に収縮した。溶質濃度が上昇し、接触線で濃縮された溶質が接触面を固定する(セルフピンニング)と、液滴の半径は変わらずに接触角が減少し、中央部が凹む状態で滴全体が安定化した。後半の2過程がいわゆるコーヒースティン現象である。図4に模式図を、図5に測定値の例を各々示した。

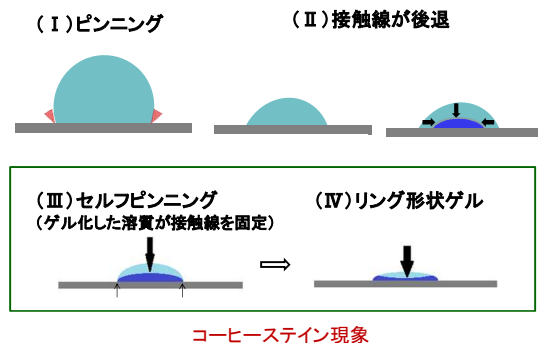


図4 撥水面上に着床した滴の乾燥過程

更に、着床時液滴径 ( $d_0$ ) とセルフピンニング開始時間 ( $t_s$ ) は図6のようにリニアな関係にあり、滴径を  $d_0$  で、経過時間を  $t_s$  で基準化すると、図5のデータは図7のようになり、滴径は着床時の  $20\%$  にまで減少していた。

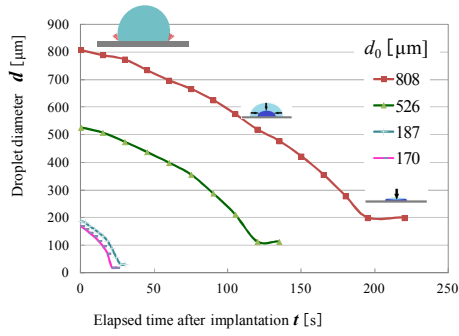


図5 撥水面に着床した滴径の経時変化 (0.1wt%, 3.84mPa·s, 303K)

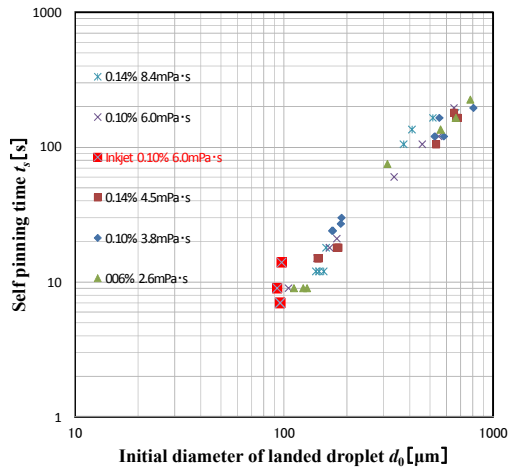


図6 着床時液滴径 ( $d_0$ ) とセルフピンニング開始時間 ( $t_s$ ) の関係

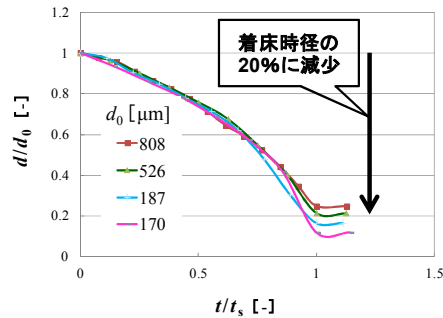


図7 基準化表現した滴径の経時変化 (0.1wt%, 3.84mPa·s, 303K)

同様に、インクジェットシステムを用いた場合の例を図8に示す。この場合、吐出操作パラメータを同じにすれば  $d_0$  はほぼ同じにすることができたが、 $t_s$  にはバラツキも認められた。

どちらの方法でも、最終的に直径  $10\mu\text{m}$  程度の凹んだ形状で、赤血球に近い微粒子を得ることができ、カルシウム水溶液に浸すことでゲル化することができる。しかし、滴径が小さくなると、着床面の影響を受けてきれいな形状にならないことが多く、今後の検討課題のひとつである。

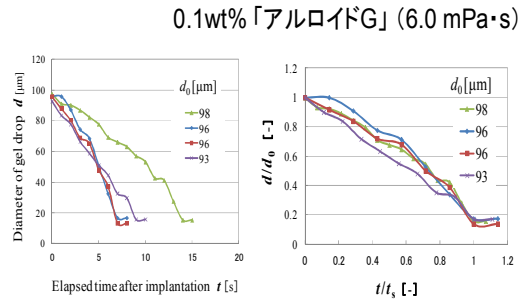


図8 インクジェットシステム使用時の着床滴経時変化

一方、図9に示すように着床面の温度を上昇させると  $t_s$  は短くなり、ゲル滴径の減少が抑えられる傾向がみられた。これは、温度の上昇に伴って、液滴表面の蒸気濃度も上昇するためと考えられる。水蒸気拡散モデルに基づくシミュレーション結果の例を図10に示すが、この乾燥過程における滴体積の経時変化をよく表現できていた。

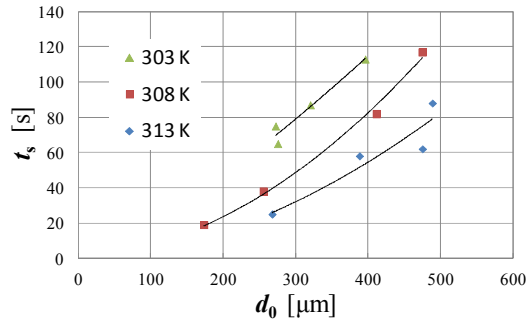


図9 セルフピンニング開始時間 ( $t_s$ ) におよぼす着床面温度の影響

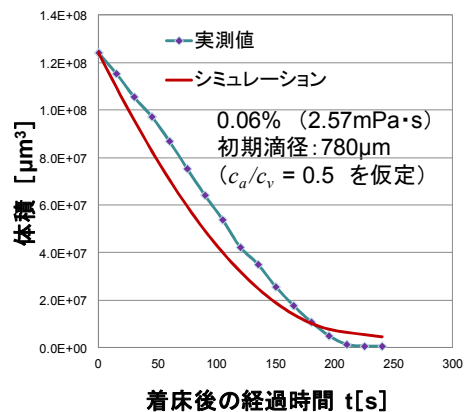


図10 水蒸気拡散モデルによる着床滴体積変化のシミュレーション例  
 $c_v$ : 液滴表面の蒸気濃度 [ $\text{g}/\mu\text{m}^3$ ]  
 $c_a$ : 雰囲気蒸気濃度 [ $\text{g}/\mu\text{m}^3$ ]

更に、図11に示すように、アルギン酸ナトリウム濃度が小さい場合は、凹みの面積が大きくなりクレーター状になるが、逆に

0.8wt%程度まで大きくすると、セルフピンニング開始前に厚い表面膜が形成されるため、複数の凹みを有する複雑な形状になった。



(左)0.06wt% 2.6 mPa·s (右)0.8wt% 6.0 mPa·s

図11 アルギン酸ナトリウム濃度による乾燥ゲル滴の形状変化  
(着床面温度 303K)

### (3) 成果のまとめと今後の方針

球状のゲル微粒子については、赤血球と同じ大きさでヘモグロビン含有粒子の作製も可能であることが確かめられた。今後は、ヘモグロビンのメト化や漏出を防ぐ方法を改良していく予定である。一方、凹みを持つゲル微粒子については、コーヒーステイン現象を利用して赤血球と同じ大きさのものができるとは確認できたが、今の研究段階では、着床面を平面にした場合、原理的に粒子は底面がフラットの帽子状になり、そのままでは印刷技術に移行できない。また、粒子の着床面からの効率的な剥離技術も重要になるので、今後は超音波などの外力の利用も含めて、多角的な視点で検討していく予定である。

## 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)

[学会発表] (計 3件)

- 1) T. Takeda, S. Iwanaga, N. Saitou, M. Nakamura, Production of hemoglobin-containing micro-gel beads as oxygen carriers for cell culture, TERMIS World congress, Wien, Austria, Sep. 2012
- 2) 竹田朋恵、岩永進太郎、齋藤典彰、中村真人、ヘモグロビン含有アルギン酸ゲルビーズの作製：培養用酸素運搬体としての評価、第1回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会、2012年12月、金沢
- 3) 山本辰美、若槻俊平、早苗秀敏、中村真人、赤血球状ゲル微粒子作製についての基礎的検討、化学工学会第80年会、2015年3月、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 辰美 (YAMAMOTO TATSUMI)  
富山大学大学院理工学研究部 (工学) 助教  
研究者番号：60220480

### (2) 研究分担者

中村 真人 (NAKAMURA MAKOTO)  
富山大学大学院理工学研究部 (工学) 教授  
研究者番号：90301803