

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25600058

研究課題名(和文)ナノリットル水滴間の人工脂質二分子膜を用いたハイスループット薬剤透過性測定

研究課題名(英文)High-throughput measurement of drug permeability through artificial lipid bilayers between nanoliter aqueous droplets

研究代表者

西迫 貴志(Nisisako, Takasi)

東京工業大学・精密工学研究所・助教

研究者番号：10431983

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、微細加工技術によって基板上に作製した微細な流路(マイクロ流路)を用いた、人工脂質二分子平面膜の作製および薬剤透過性の計測に関する研究を行った。マイクロ流路のT字、十字といった分岐構造を利用して、薬剤を含む数ナノリットルサイズの水滴(ドナー滴)および含まない水滴(アクセプタ滴)を脂質を含む有機相中に連続生成し、流路下流域において有機相のみを選択的に吸引・除去することで、水滴同士を接触させドナー滴とアクセプタ滴の間に脂質二分子平面膜を形成することができた。また形成された二分子膜を介した薬剤分子の受動輸送性能を迅速に測定することができた。

研究成果の概要(英文)：We studied formation of artificial planar lipid bilayers and their application in drug permeability assay by using microfluidic channels fabricated on a planar substrate. Nanoliter-sized aqueous donor and acceptor droplets were continuously formed at T- or cross-shaped channels into a lipid-containing organic stream. At the downstream, selective aspiration of the organic phase brought the aqueous donor and acceptor droplets into contact, thereby creating droplet interface bilayers (DIBs). Furthermore, we could rapidly measure passive membrane permeability of drug molecules across the formed DIBs.

研究分野：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：ナノバイオ マイクロ・ナノデバイス 流体工学

1. 研究開始当初の背景

(1)

創薬のための薬剤スクリーニング(網羅的条件探索)の初期段階において、薬剤候補化合物の細胞膜透過性能の評価のため、単層状に培養した細胞シートや人工脂質膜が用いられている。しかしこれらには、高コスト、長時間を要する、測定値の信頼性が低い、等の問題がある。

(2)

今日の薬剤膜透過性試験では、Caco-2 細胞を単層シート状にしたものが透過膜として広く用いられている。しかしこの手法は、(a)細胞培養に数週間を要する、(b)拡散による受動輸送とチャネルによる能動輸送が混在し、個別の輸送経路の評価が困難、といった問題がある。

(3)

一方、受動輸送のみを測定・評価できる手法として、PAMPA 法 (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, 図 1) の利用が近年拡大している。PAMPA 法は、脂質溶液を含ませた多孔質フィルタを人工脂質膜として用いる手法であり、装置を短時間で準備可能という長所がある。しかし PAMPA 法の人工脂質膜は通常厚さ 100 μm 強であり、厚さ 5 nm の脂質二分子膜で構成される細胞膜とは物理的、化学的に明らかに異なる。またこの膜厚を一因として、測定に数時間以上(2~16 時間)を要する。

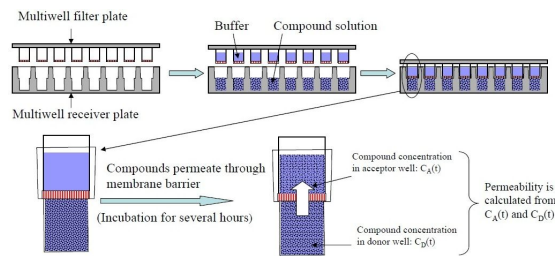


図 1. PAMPA 法概念図(BD 社ウェブサイトより引用)

(4)

近年、脂質の単分子膜で覆われた微小水滴同士を接触させ脂質二分子膜を形成する手法が、その簡便さから、各種電気生理学試験に用いられている (Mol. Biosyst. 2008, 4)。しかし、こうした人工脂質二分子膜を薬剤分子の膜透過性能の定量的測定に用いた事例は報告されていない。

2. 研究の目的

(1)

そこで本研究では、マイクロ流路分岐を用いた微小液滴生成法を用いてナノリットル

サイズの微小液滴間に脂質二分子平面膜を並列形成し、形成した二分子膜を介した薬剤分子の受動輸送性能を迅速に測定できる手法の確立を目指す。

(2)

本研究は、薬剤分子の受動透過性計測に人工脂質二分子膜を用いる、前例のない試みである。これにより、厚さ 100 μm 強の脂質膜を用いる従来の PAMPA 法に比べて、遥かに細胞膜に似た環境で測定を行うことができ、より妥当な透過性の測定値の取得が可能となると考える。さらに、その脂質二分子膜をマイクロ流路内のナノリットルサイズの微小液滴の間に作製(図 2)することで、理論上、当該微小液滴内の薬物濃度の変化を迅速に生じさせることができる。これにより、透過性計測に要する時間を従来の時間(2-16 時間)から数分~数十分に著しく短縮させられると考えられる。

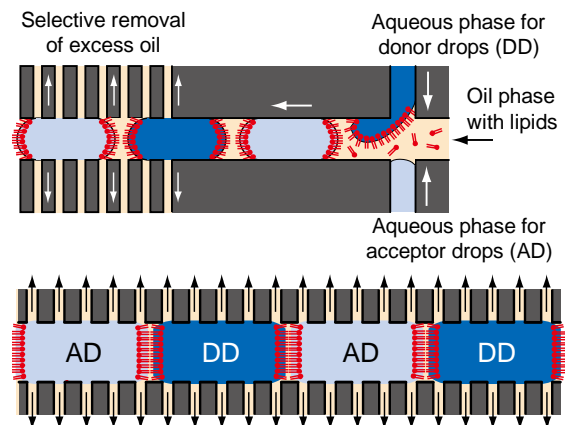


図 2. マイクロ流路を用いた脂質二分子膜アレイの作製法 AD: アクセプタ、DD: ドナー。

(3)

本研究で提案する、薬剤分子の受動透過性測定法の有効性が実証された場合、PAMPA 法に代わるスクリーニング技術として多大な需要が見込まれる。また、本技術は、薬剤分子に限らず様々な分子の擬似細胞膜透過性を測定することができ、細胞膜を介した物質移動の機構を解明するための強力なツールとして、新しいサイエンスを展開する可能性を秘めていると考えられる。

3. 研究の方法

(1)

【薬物透過試験用マイクロ流路デバイスの制作】

脂質二分子平面膜アレイの作製および薬物透過試験を行うためのマイクロ流路を製作する(図 3)。ガラス(合成石英)チップに加え、より安価に作製可能な樹脂製チップ(アクリル, PDMS)の利用を検討する。微細溝の作製にはソフトリソグラフィ、レーザ加工、切削加工を用いる。Ag/AgCl 電極の

微細パターンをガラス基板上に設け、微細溝を転写した樹脂チップと貼り合わせて用いる。

(2)

【脂質二分子平面膜アレイの作製】

上記のマイクロ流路を用い、脂質二分子膜アレイを形成する。数ナノリットルサイズの水滴を互いに接触させた後、静電膜容量の測定を介して膜厚を算出し、二分子膜の存在を確認する。電気測定が困難な場合、チャンネル形成物質 ( $\alpha$ -hemolysin, magainin-2) を脂質膜に埋め込み、蛍光分子カルセインの移動の蛍光観察により、脂質二分子膜の有無を確認する。

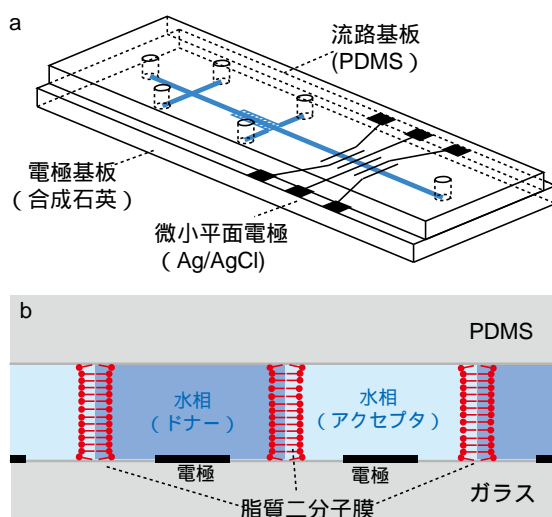


図 3. 本研究で作製する薬物透過試験用マイクロ流路デバイスの概念図。(a) マイクロ流路チップ。(b) 流路内側面図。

(3)

【UV 吸収スペクトル測定による薬物透過性測定試験】

マイクロ流路内に作製した脂質二分子膜アレイを用い、薬物透過性測定試験を行う。既に測定実績のある Caffeine に加え、迅速に測定可能と考えられる非イオン性の薬剤分子を測定し、その後、カチオン性、アニオン性の薬剤分子の測定を行う。測定データを用いた数値計算により、各薬剤の膜透過係数の算出を行う。

(4)

【脂質二分子膜内包ダブルエマルジョンの作製】

有機相の液滴の内部にドナー水滴、アクセプタ水滴をともに内包させた直径 100  $\mu\text{m}$  前後のダブルエマルジョンを二段階のマイクロ流路分岐を用いて生成し、ドナー滴とアクセプタ滴を接触させることで脂質二分子平面膜を作製し、薬物透過性試験に用いる。本手法の長所として、(a)アクセプタ滴とドナー滴の接触をカプセル滴によって自発的に促すことができる、(b)カプセルをマイクロ流路

外部に取り出し、UV 吸収スペクトル測定を行うことができる、といった点が期待される。生成するダブルエマルジョンの構造として、最外相が水相で構成される water-in-oil-in-water (W/O/W)型、および最外相が有機相で構成される water-in-oil-in-oil (W/O/O)型の作製を検討する。いずれにおいても、最外相に界面活性剤を添加して使用し、カプセル内部の薬剤の最外相への漏れが抑制できるかを確認する。静電膜容量の電気測定による脂質二分子膜形成の確認は困難と予想されるため、チャンネル形成物質と蛍光分子カルセインの移動の測定により脂質二分子膜の存在の有無を確認する。マイクロ流路デバイスは、既に申請者が所持している合成石英製マイクロ流路を必要に応じて表面処理して用いる。

(5)

【脂質二分子膜内包ダブルエマルジョンを用いた薬物透過性試験】

上記の手法で作製したダブルエマルジョン滴を用い、薬物透過性試験を行う。使用する脂質および薬剤の種類、および膜透過係数の数値計算法は前年度と同様のものを使用する。UV 吸収スペクトルの測定をマイクロ流路の外部と内部の双方で行い、ともに測定が可能であるか確認する。

(6)

【薬物濃度測定用 UV 分光測定機を組み込んだマイクロ流路デバイス試作】

UV 分光測定機が内蔵された顕微鏡は高価であるため、より安価に微小液滴内の薬物濃度を測定できる装置として、ファイバ型の UV 分光測定機をマイクロ流路デバイスに組み込んだ装置の試作を行う。作製した装置を用い、薬物透過性試験を行う。

4. 研究成果

(1)

【薬物透過試験用マイクロデバイスの制作】

脂質二分子平面膜アレイの作製および薬物透過試験を行うためのマイクロ流路を作製した。既存のガラス (合成石英) チップに加え、より安価に作製可能な樹脂製チップとして、PDMS 製およびアクリル (PMMA) 製チップの利用を検討した。微細構造の作製には転写型としてネガ型フォトリソ SU-8 を用いたソフトリソグラフィおよび CO<sub>2</sub> レーザ加工を用いた。Ag/AgCl 電極の微細パターンをガラス基板上へのスパッタリングとリフトオフにより設け、微細溝を転写した樹脂シート片と貼り合わせ、流路デバイスを構成した。

(2)

【脂質二分子平面膜アレイの作製】

上記のマイクロ流路デバイスを用い、薬剤

を含む水滴（ドナー滴）と含まない水滴（アクセプタ滴）によってはさまれた脂質二分子平面膜の並列構造の形成試験を行った。数ナノ～数十ナノリットルサイズのドナー滴およびアクセプタ滴を十字型流路にて交互に作製した後、マイクロ流路内で互いに接触させた。その後、交流電圧を膜を隔てて印加し、膜の電気応答の測定を行った。測定波形から単位膜面積あたりの静電容量の値を算出し、文献値と比較することで二分子膜が形成されていることの確認を行った。またチャンネル形成物質（ $\alpha$ -hemolysin）を脂質膜に埋め込み、蛍光分子カルセインの移動を蛍光観察により確認した（図4）。

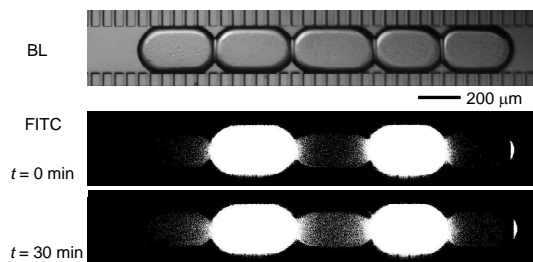


図4. 蛍光分子 Calcein の $\alpha$ -hemolysin を介した膜透過測定。

(3)

【UV 吸収スペクトルの測定による薬物透過性測定試験】

マイクロ流路内に作製した脂質二分子膜アレイを用い、薬物透過性測定試験を行った。モデル薬剤分子として、既に測定実績のある Caffeine（図5）のほか、Naproxen, Metoprolol 等のイオン性薬剤分子の測定を行った。測定データを用いた数値計算により、各薬剤の膜透過係数の算出を行った。

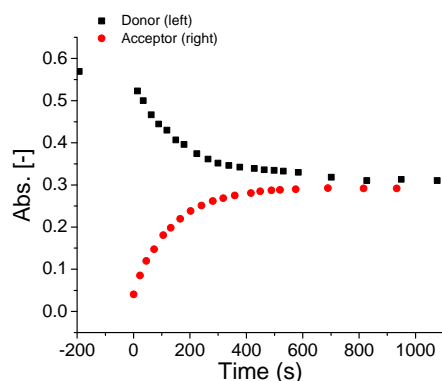


図5. ドナー滴、アクセプタ滴における Caffeine 濃度の経時測定例。

(4)

【脂質二分子膜内包ダブルエマルジョンの作製】

有機相の液滴の内部にドナー水滴、アクセプタ水滴とともに内包させた直径 100  $\mu$ m 前後のダブルエマルジョンを二段階のマイクロ流路分岐を用いて生成し、ドナー滴とアクセプタ滴の接触を促すことで単一の脂質平

面膜をダブルエマルジョン液滴内部に作製することができた。ダブルエマルジョンの構造として、最外相が水相で構成される W/O/W 型、および最外相が有機相で構成される W/O/O 型の作製試験を行った。水相、有機相の流量比率を変化させることで、ダブルエマルジョン滴内部に形成される脂質平面膜の面積を増減させられることを確認した。チャンネル形成物質とチャンネル透過蛍光分子（カルセイン）を用い、作製された脂質平面膜が二分子膜構造を含んでいることを確認した。マイクロ流路デバイスは、すでに申請者が合成石英製マイクロ流路表面を局所的に疎水化処理して用いたほか、ソフトリソグラフィにて作製した PDMS 製マイクロ流路を局所的に親水化処理して用いた。

(5)

【脂質二分子膜内包ダブルエマルジョン滴を用いた蛍光分子透過性測定試験】

上記の手法で作製したダブルエマルジョン滴を用い、分子透過性試験を行った。薬剤モデル分子として、水溶性蛍光分子のフルオレセインを用い、蛍光顕微鏡を用いた観察により、ダブルエマルジョン滴内のドナー滴とアクセプタ滴間の濃度勾配による蛍光分子の受動輸送を確認した。

(6)

【薬物濃度測定用 UV 分光測定機を組み込んだマイクロデバイスの試作】

UV 分光測定機が内蔵された顕微鏡装置は非常に高価であるため、より安価に微小液滴内の薬物濃度を測定できる装置として、光ファイバ接続型の UV 分光測定機をマイクロデバイスに組み合わせたマイクロデバイスの試作を行った。合成石英基板（厚さ 1-2 mm）の上に、ドナー滴とアクセプタ滴をセットし且つそれらの間に人工脂質二分子平面膜を作製するための微小チャンバー対を、アクリル樹脂 (PMMA) への CO<sub>2</sub> レーザ加工、あるいはシリコン樹脂の微細加工によって作製した。UV 分光機に接続された測定用光ファイバと UV 光源に接続された UV 光照射用光ファイバをコリメータレンズを介してマイクロデバイスに組み込み、透過型の吸収率測定を行える装置の試作を行った。

(7)

【UV 分光測定組み込み型マイクロデバイスを用いた薬物膜透過性の測定試験】

上記の作製したマイクロデバイスを用い、薬物膜透過性測定のための試験を行った。これまでに行った測定試験と同様に、既に測定実績のある Caffeine を薬剤モデルとして用いたところ、アクセプタ滴側において、時間経過とともに、Caffeine 分子による吸収スペクトルの増大が認められた。別途測定した校正曲線を用いて時間濃度データ（図6）を得た後、膜透過係数を算出したところ、過去に

得られた値および文献値と非常に近い値が得られた。また、従来技術である PAMPA 法と比べ、はるかに短時間で測定を行えることを確認した。

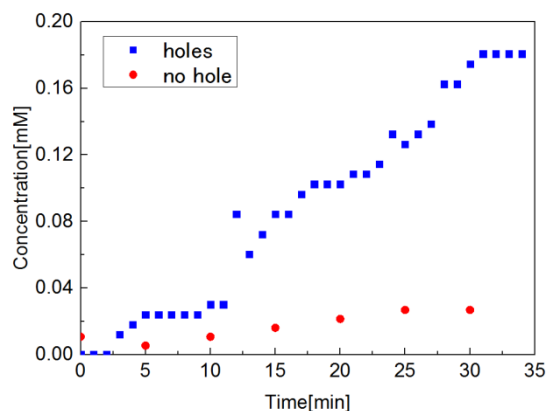


図 6. アクセプタ側における Caffeine 濃度の経時変化。

## 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1件)

Takasi Nisisako, Shiva A. Portonovo, and Jacob J. Schmidt, Microfluidic passive permeability assay using nanoliter droplet interface lipid bilayers, *Analyst* **2013**, *138*, 6793–6800 (査読有)。

[学会発表](計5件)

Takasi Nisisako, Yuta Miyagawa, and Takeshi Hatsuzawa, Assay for measuring passive drug permeability through artificial planer lipid bilayers in a microfluidic chamber, 16<sup>th</sup> International Conference on Precision Engineering (ICPE2016), Hamamatsu, Japan, Nov.14–16, 2016, accepted as oral presentation.

Takasi Nisisako, Microfluidic droplets for materials production and bio analysis, 東京工業大学 東京医科歯科大学 スイス連邦工科大学ローザンヌ校 (EPFL) 国際ワークショップ, 東京医科歯科大(東京), 2016年4月19日

宮川雄太, 初澤毅, 西迫貴志, シリコーン樹脂を用いた薬物受動透過測定用人工脂質膜デバイス, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第29回研究会, 日本女子大(東京), 2014年5月23日。

宮川雄太, 初澤毅, 西迫貴志, 薬物の受動透過分析用マイクロ人工脂質膜デバイスの開発, 第16回化学工学会学生発表会(東京大会), 東京工業大学大岡山キャンパス, 2014年3月1日。

Takasi Nisisako, Microfluidic droplet-based drug permeability assay, 2013 International Conference on Small Science (ICSS2013), Las Vegas, NV, USA, Dec. 15, 2013.

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

西迫 貴志 (NISISAKO, Takasi)

東京工業大学・精密工学研究所・助教

研究者番号：10431983