

マイクロ流路チップを用いたドラッグデリバリー用ナノ粒子作製技術の開発

生活資材開発課 高田耕児、横山義之、寺田堂彦

1. 緒言

私たちの細胞膜の主成分であるリン脂質は、疎水部を内側にして 2 分子膜を形成する。疎水部の炭素の数が多い 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC)は安定な膜を形成するため、ドラッグデリバリー用脂質ナノ粒子の材料としてよく用いられる。しかし DSPC は凝集性が高く、小さい粒子の作製が難しいという欠点がある。私たちは、3 つの入口から 1 つの混合流路に合流させて微小渦を発生させるシンプルなマイクロ流路を利用し、脂質ナノ粒子作製を検討する中で、流量の増加により微小渦が自発的に非対称化して乱流混合が誘起される現象を発見し、Asymmetrized microvortex-induced turbulence (AMT) 法と命名した²⁾。また、AMT 法により、DSPC を材料として 10 nm 程度と極めて小さい脂質ナノ粒子である High-density lipoprotein (HDL)を作製できることを示した。

本研究では、AMT 法の有用性・汎用性をさらに検証し、応用展開するため、大豆由来リン脂質である Hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC)を用いたリポソームの作製検討を行った。HSPC は DSPC と構造が近く安価であり、HSPC を用いたリポソームは高級化粧品として注目されている。その微小なサイズ(100 nm 程度)から経皮吸収性が期待されており、皮膚外用剤等への応用も可能と考えられる。また、下限臨界溶液温度(LCST)を有する温度応答性高分子である Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)を含むリポソームの検討を行った。温度応答性を有するリポソームは、患部を局所的に加熱する方法と組み合わせることで、有用なドラッグデリバリー手段となりうる。

2. 実験方法

DSPC と HSPC は NOF から、Cholesterol と PNIPAAm (Mn = 40,000)は Sigma-Aldrich から、その他の試薬は FUJIFILM Wako Pure Chemical から購入した。

Fig. 1 に今回使用したマイクロ流路の概略図を示す。純水または PNIPAAm 水溶液を Inlet 1 と Inlet 3 から合わせて 50 mL/min で、DSPC または HSPC と Cholesterol(脂質の一種で球状粒子を形成するため添加)を含むエタノール溶液を Inlet 2 から 5 mL/min で、それぞれシリンジポンプ (Fusion 6000X and Fusion 200, Chemyx)を用いてマイクロ流路チップに導入した。Mixing channel で AMT 法による混合が起こり、Outlet から回収される。回収液について、動

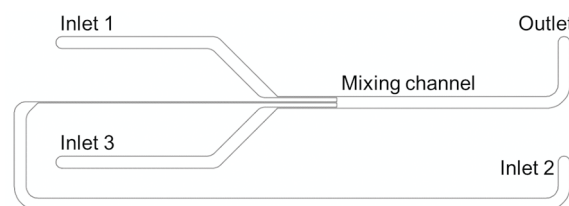


Fig. 1 Schematic diagram of a microchannel

的光散乱法(Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical)による粒度分布測定を行った。PNIPAAm を用いた実験では、回収液 10 mL を分画分子量が 10 万の遠心式フィルターユニット(Amicon Ultra-15, Millipore)に入れて 2,900×g、15℃で 30 分間遠心してリポソームを濃縮した後、7.3 wt%エタノール水溶液で総量 10 mL となるように希釈するという操作を 12 回繰り返す、余分な PNIPAAm を除いた後、LCST より高い 40℃に加熱する前と後の粒度分布測定を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 大豆由来リン脂質を用いたリポソームの作製検討

0.6 wt% HSPC と 0.3 wt% Cholesterol を含むエタノール溶液と純水とをマイクロ流路を用いて室温で混合した液の粒度分布を Fig. 2 に示す。主ピークの平均粒径は約 36 nm であり、多分散度を表す Polydispersity Index (PDI)は 0.05 であった。PDI が 0.1 以下となるのは標準試料レベルの分布(単分散)であることを示しており、AMT 法によって粒径が小さく単分散な HSPC/Cholesterol リポソームを作製できることがわかった。HSPC の代わりに DSPC を用いて同じ条件で混合した場合、主ピーク平均粒径は約 37 nm、PDI は 0.03 であり、HSPC と DSPC は、同等のリポソームを形成すると考えられる。

次に、より濃度の高い HSPC と Cholesterol を含むエタノール溶液と純水とをマイクロ流路を用いて混合した。脂質は濃度が上がると室温で溶解しないので、脂質のエタノール溶液は 55℃に加熱してからシリンジに充填し、

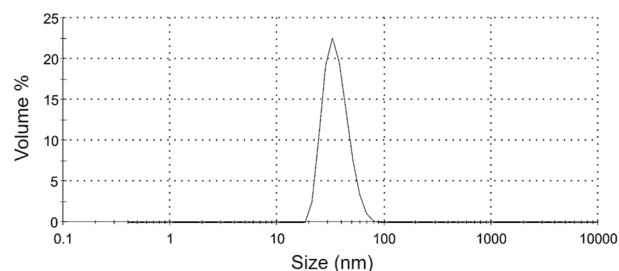


Fig. 2 Size distribution of HSPC/Cholesterol liposome

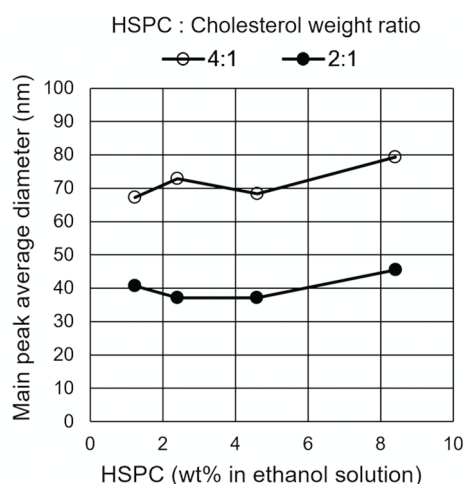


Fig. 3 Relationship between HSPC/cholesterol weight ratio, HSPC concentration and particle size

マイクロ流路も 55℃に加温して混合した。結果を Fig. 3 に示す。HSPC と Cholesterol の重量比が 4:1 の場合、70 nm 程度のリポソームが、重量比が 2:1 の場合、40 nm 程度のリポソームが生成した。これは、化粧品分野でよく用いられている 100 nm より十分に小さい。さらに濃度を上げると PDI が高くなり良い結果が得られなかったが、HSPC 濃度、HSPC と Cholesterol の重量比、温度によって PDI を調節できることがわかった(データ記載せず)ので、これらの条件を最適化すれば、より高濃度で粒径の小さい粒子を作製できる可能性がある。

3.2 温度応答性リポソームの検討

0.6 wt% DSPC と 0.3 wt% Cholesterol を含むエタノール溶液と 0.5 wt% の PNIPAAm 水溶液を室温で混合した。遠心式フィルターユニットの 1 回目の素通り液は 40℃に加温することで白濁した。一方、12 回目の素通り液(20 万倍希釈相当)は 40℃に加温してもほとんど白濁しなかった (Fig. 4)。また、12 回目の保持液は室温(RT)では白濁していないが、加熱すると白濁した(Fig. 4)。これらのことから、リポソームの外側に存在する余分な PNIPAAm は希釈に

より少なくなり、リポソームに取り込まれた PNIPAAm が加温により不溶化したと考えられた。室温のままの保持液と 40℃に加熱した後の保持液の主ピーク平均粒径を測定したところ、それぞれ約 73 nm (PDI = 0.17)、約 74 nm (PDI = 0.17)であり、加温前後で、粒径に顕著な変化は見られなかった。このことから、PNIPAAm はリポソーム内で加温により不溶化した後、リポソーム内で再び溶解した可能性が考えられる。その他、サイズの大きい PNIPAAm が保持液に残っている可能性も考えられるが、いずれにせよ PNIPAAm の加温による不溶化はリポソームの不安定化や崩壊にはつながらなかったと考えられる。0.5 wt% の代わりに 1 wt% の PNIPAAm 水溶液を用い、同じ条件で実験したが結果は同様であった。

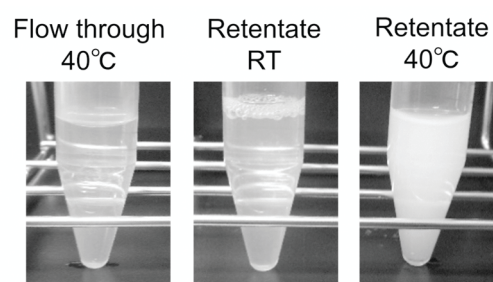


Fig. 4 Photos of the final flow-through and retentate after processing a liposome solution containing temperature-responsive polymers with a centrifugal filter

4. 結言

AMT 法を用いて大豆由来リン脂質の利用を検討し、サイズの小さいリポソームを作製できることを示した。また、温度応答性高分子をリポソームに含ませた場合、リポソームの安定性は損なわれなかった。今後はこれらの知見を利用してさらなる開発を進める。

参考文献

- 1) Y. Kim *et al.*: *ACS Nano*, **7** (2013) 9975-9983
- 2) K. Takata *et al.*: *Lab Chip*, **24** (2024) 3276-3283

キーワード：マイクロ流体デバイス、マイクロ流路、脂質ナノ粒子、リポソーム

Development of a Nanoparticle Preparing Method for Drug Delivery Applications Using a Microchannel

Life Materials Development Section; Koji TAKATA, Yoshiyuki YOKOYAMA and Dohiko TERADA

Asymmetrized microvortex-induced turbulence (AMT) method can produce small lipid nanoparticles from aggregation-prone phosphatidylcholine. To verify the usefulness and versatility of the AMT method, we conducted an experiment using hydrogenated soy phosphatidylcholine, and demonstrated that small-sized liposomes could be produced by the AMT method. Furthermore, the inclusion of a temperature-responsive polymer, poly(*N*-isopropylacrylamide), in liposome did not impair the stability of the liposomes. We will continue to use these findings to further develop the method.