

# 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の作製

生活資材開発課 高田耕児 生活科学課 牧村めぐみ 公立大学法人富山県立大学 村上達也

## 1. 緒言

ドラッグデリバリーシステムは、薬の効用を高め、副作用を軽減することで、薬物治療の可能性を広げる重要な技術である。その中で、高密度リポ蛋白質(HDL)のナノ粒子は、サイズが 10nm 程度と小さいため癌組織等に送達し易い可能性があり、様々な機能改変手段があり、HDL そのものの薬効がある等、ドラッグキャリアとして利点を有している。しかし従来の界面活性剤を利用する作製方法は、多くの時間と手間がかかる、スケールアップが困難である等の問題があった。そのような問題を解決するため、本研究ではマイクロ流路チップによる材料の急速混合によって HDL ナノ粒子を作製するための研究を行った。

## 2. 実験方法

チップの構造を Fig. 1 に示す。3本の流路から1本の流路に合流させることでマイクロボルトテクス<sup>1)</sup>により急速混合する構造を採用した。出口も3つに分かれる構造<sup>2)</sup>とし、混合流路の流路幅は1mm、長さは10mmとした<sup>3)</sup>。混合流路の下流側構造は幅0.1mm、長さ6mmの5本の流路となっており、Fig. 1における上部の2本がOutlet 1に、中央の1本がOutlet 2に、下部の2本がOutlet 3に接続される。

チップ作製は、フォトマスク<sup>3)</sup>を使ってシリコンウェハにフォトレジストをパターンニングした。次にフォトレジストをマスクとして、ICPドライエッチング装置によりエッチングを行った。適切な大きさにカットし、フォトレジストを除去することにより、シリコン鑄型とした。シリコン鑄型を既存の金型にセットし、射出成形により樹脂チップを作製した。またチップのフタについても射出成形により作製し、流路と貼り合わせた。貼り合わせたチップにコネクタを挿入し、アクリル板で挟んで固定したものを実験に用いた。

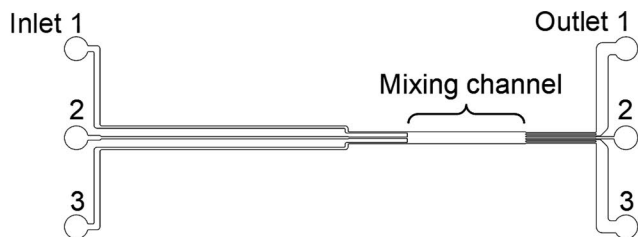


Fig. 1 Schematic of the microfluidic chip

蛋白質として HDL を構成する蛋白質の一種であるアポリポ蛋白質 A-I の N 末端 43 残基を除いた変異体を用いた。脂質は 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC)を用いた。

Inlet 1 と Inlet 3 からは、40  $\mu\text{g/mL}$  の蛋白質を含む水溶液(2 M の尿素を含むリン酸緩衝生理食塩水)をそれぞれ 2.5 mL/min の流量でシリンジポンプ(シリンジ 2 本掛け)により送液した。Inlet 2 からは 1 mg/mL の脂質を含むエタノール溶液を 1 mL/min の流量でシリンジポンプにより送液した。混合時チップは恒温水槽により 55°C に加温した。

混合後の溶液を透析し、遠心した上清をとサイズ排除クロマトグラフィーと動的光散乱法で分析した。蛋白質濃度は Lowry 法により測定した。

## 3. 実験結果および考察

Outlet 2 から回収された溶液と Outlet 1 および 3 から回収された溶液のサイズ排除クロマトグラフィーの結果を Fig. 2 に示す。Outlet 2 から回収された溶液は保持時間 46 min にピークがあり、ナノ粒子を主に含むことが示唆された。Outlet 1 および 3 から回収された溶液は保持時間 79 min にピークがあり、蛋白質を主に含むことが示唆された。動的光散乱法で Outlet 2 から回収された溶液中の粒子の流体力学的径を測定すると約 21.9 nm であり、10 nm の HDL よりも大幅に大きい粒子であり、この条件では

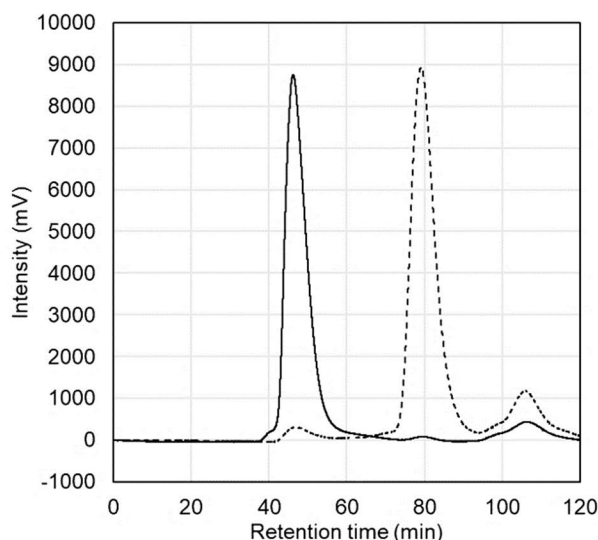


Fig. 2 Size-exclusion chromatograms of solution collected from Outlet 2 (solid line) and solution from Outlet 1 and 3 (dashed line)

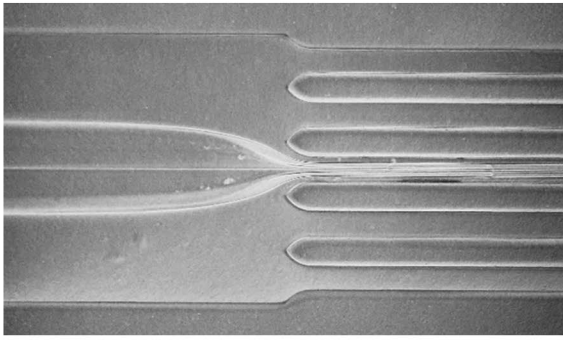


Fig. 3 Photograph of downstream region of the mixing channel in the case that Outlet 1 and 3 were stopped

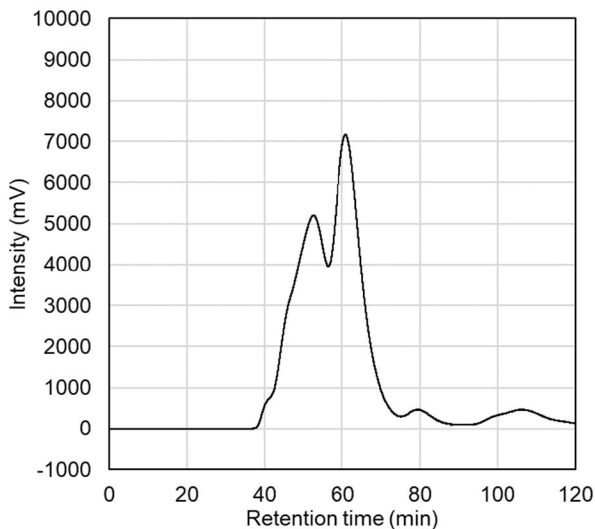


Fig. 4 Size-exclusion chromatogram of solution collected from Outlet 2 in the case that Outlet 1 and 3 were stopped

HDL を作製することができないことが示唆された。また、Outlet 2 からは主にナノ粒子が、Outlet 1 および 3 からは主に蛋白質が回収されることから、中央部と両端部の混合が十分ではないことが示唆された。

キーワード：マイクロ流路デバイス、DDS、ナノ粒子

## Microfluidic Preparation of Nanoparticles for Drug Delivery System

Life Materials Development Section; Koji TAKATA, Human Engineering Section; Megumi MAKIMURA  
Toyama Prefectural University; Tatsuya MURAKAMI

High-density lipoproteins are nanoparticles with diameter of about 10 nm, and have a potential to be used as drug delivery carriers. We tried to develop microfluidic channels for continuous production of high-density lipoproteins which could be prepared by rapid mixing of lipids and proteins. We prepared a silicon mold by micromachining technology and then prepared plastic chips by injection molding. Nanoparticles of about 10 nm could not be produced by mixing with the previously reported microvortex in our condition. On the other hand, nanoparticles of about 10 nm were successfully produced by narrowing the channel to 0.1 mm wide after mixing with the microvortex. The yield of the nanoparticles was still insufficient, and it should be increased for practical use.

次に、中央部と両端部の混合を促進するために Outlet 1 および 3 をせき止めて、Outlet 2 のみから回収する方法を検討した。これにより Fig. 3 に示すように混合流路の下流で溶液の流れが幅 0.1 mm、長さ 6 mm の 1 本の流路に絞られ、この流路で混合が促進される。回収された溶液のサイズ排除クロマトグラフィーの結果を Fig. 4 に示す。保持時間 53 min と 61 min にピークが見られたため、保持時間 49-58 min と保持時間 58-73 min を分取した。動的光散乱法で保持時間 49-58 min、58-73 min の溶液中の粒子の流体力学的径を測定するとそれぞれ 14.0 nm、9.0 nm であり、この方法により HDL と同様のサイズの粒子を生成できることが示唆された。一方で、保持時間 49-58 min、58-73 min の溶液中の蛋白質濃度を測定して収率を計算するとそれぞれ 10.8%、14.7% という低い値となった。2 つをあわせた収率は 25.5% であり、既報<sup>1)</sup>と比べても低い値である。今後、収率を高めるための検討を行う。

### 4. 結言

マイクロボルトテックスによる急速混合を行うためのマイクロ流路チップを試作し、HDL ナノ粒子の作製を検討した。今回の条件では、マイクロボルトテックスによる混合では 10 nm 程度の粒子は作製できなかった。そして、マイクロボルトテックスによる混合の後に幅 0.1 mm の細い流路に絞ってさらに混合を促進することで 10 nm 程度の粒子を作製することができた。

### 参考文献

- 1) Kim et al. *ACS Nano* 7(2013) 9975-9983
- 2) 富山県産業技術研究開発センター研究報告 34(2020) 54
- 3) 富山県産業技術研究開発センター研究報告 34(2020) 55