HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of Microfluidic Devices for Production of Size-Controlled Lipid Nanoparticles and Application to Nanomedicines [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	木村, 笑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第14467号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81273
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KIMURA_Niko_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（工学）　氏名　木村　笑

学 位 論 文 題 名

Development of Microfluidic Devices for Production of Size-Controlled Lipid Nanoparticles and Application to Nanomedicines
（脂質ナノ粒子作製用マイクロ流体デバイスの開発とナノ医薬品作製への応用）

薬剤の体内動態を制御するドラッグデリバリーシステムにおいて、脂質ナノ粒子に薬剤を搭載したナノ医薬品は、高い生体適合性・副作用の軽減・薬理効果の向上が期待され開発が進んでいる。これまでに、抗がん剤や抗生物質を搭載したリポソーム製剤や、カチオン性の合成脂質分子を利用して核酸を搭載したナノ医薬品が開発され、がん治療や感染症治療、遺伝子治療などに臨床応用されている。また、近年は細胞外小胞であるエクソソームに着目した創薬研究も行われており、細胞から回収したエクソソームやその模倣粒子（人工エクソソーム）は、新たなナノ医薬品として開発が進んでいる。ナノ医薬品による治療では、粒径が体内動態制御に重要なファクターの一つである。数十ナノメートルの粒径の違いが生体内挙動に影響を与えるため、高効率な薬剤送達にはナノ医薬品の粒径を精密制御する必要がある。粒径制御性の高い脂質ナノ粒子の作製方法に、有機溶媒注入法をマイクロ流体デバイス内で行うマイクロ流路法がある。マイクロ流路法とは、有機溶媒中に脂質を溶解させた脂質溶液と緩衝液を原料溶液とし、マイクロメートルスケールの微小流路に導入し、脂質ナノ粒子を作製する方法である。流路内で、両親媒性の脂質分子が溶媒濃度の低下に伴って自己組織化し粒子を形成する。微小流路内では拡散距離が短く、溶媒の希釈過程がバッチに比べ均一であるため、サイズ均一性の高い粒子を作製でき、押出法や超音波分散法による粒径調整を必要としない。また原料溶液の総流量と、脂質溶液の流量に対する緩衝液の流量の比（流量比）を変化させることで生成粒子の粒径を制御できる。これまでに、高総流量、または、高流量比の条件下では粒径が小さくなることが報告されている。また、マイクロ流路法の中でも、カオティックミキサー（CM）デバイスを用いた研究例が最も多く、実用化が進んでいる。CM デバイスは、マイクロ化学分野で広く用いられているデバイスの 1 つであり、流路内部に左右非対称の屈曲型の凹凸を有し、他のマイクロ流路よりも短時間で均一に溶液を完全混合できる。

脂質ナノ粒子作製技術開発において、マイクロ流路法の実用化が進む一方で、三つの大きな課題がある。まず、CM デバイスによる粒径の制御範囲が狭いことである。粒子形成時の希釈速度が粒径を決定し、希釈過程の均一性が生成する粒子のサイズ均一性を決定する。CM デバイスは溶液の完全混合に特化したデバイスであり、希釈過程の均一性に優れるが、粒子形成時の希釈速度は流量条件に関係なくある程度一定と考えられる。次に、マイクロ流路法で作製した粒子懸濁液には、高濃度の有機溶媒が残留する。そのため、透析や緩衝液による希釈などの有機溶媒除去の後処理が必要であるが、それらの操作の多くがオフデバイスで行われていることである。オフデバイスの操作は、オンデバイスに比べて溶媒の除去過程が制御されておらず、操作中に粒子構造変化や粒径変化が生じる場合がある。最後に、非カチオン性脂質系での核酸搭載粒子作製において、精密な粒径制御と高効率な核酸搭載が達成されていないことである。核酸を搭載した非カチオン性脂質ナノ粒子は、人工エクソソームの開発に貢献できる。リポソームと似た構造を持つエクソソームは、内部に核酸を含む生体由来の非カチオン性核酸キャリアであり、一部は第二相試験に進んでいる。特に人工エクソソームは量産性に優れるほか、高い生体適合性や腫瘍・細胞への選択的送達が期待され、カチオン性脂質キャリアに変わる新たな核酸ナノ医薬品として注目されている。しかし、従来の作製法では粒径の精密制御と高効率な核酸搭載は困難であった。そこで本研究では、広い範囲での粒径精密制御を目的とした新たなマイクロ流体デバイス開発と脂質ナノ粒子作製プロセス全体のオンデバイス集積化、核酸を搭載した非カチオン性脂質ナノ粒子の粒径の精密制御と高効率な核酸搭載、の三つの課題の解決に取り組んだ。

第 1 章は、序論であり、本研究の背景と目的について述べた。

第 2 章では、広い範囲で精密な粒径制御が可能な新たなマイクロ流体デバイスを開発した。液-液界面の溶媒希釈速度制御に適した構造としてバッフル（邪魔板）構造に着目し、流体シミュレーションによって流路構造を最適化した。ソフトリソグラフィーで作製したバッフルデバイスは、CM デバイ

スよりもダイナミックにエタノール希釈速度が変化し、CM デバイスの制御範囲が 40–60 nm であるのに対しバッフルデバイスでは 20–120 nm と広い範囲での粒径制御を達成した。

第 3 章では、2 章で開発したバッフルデバイスの低流量条件下での粒径制御性の改善に取り組んだ。バッフルデバイスは、低流量条件では希釈過程でエタノールの濃度勾配が生じ、平均粒径は大きいがサイズ均一性に改善の余地があった。そこで、CM デバイス中の 3 次元的な流体挙動が均一な希釈に重要であることに着目し、三次元化バッフルデバイスを設計した。三次元化バッフルデバイスによって、低流量での均一な希釈による粒径制御性改良と 20–100 nm の広い範囲での粒径制御性の両方を達成することに成功した。

第 4 章では、作製した粒子の後処理過程のオンデバイス集積化に取り組んだ。残留エタノールの希釈速度は最終粒径に影響を与え、オフデバイスの後処理では 80 nm の粒子がオンデバイスの希釈処理によって 25 nm まで小さくなることを発見した。この結果は、粒子懸濁液中に残存する高濃度のエタノールによって、粒子同士が不安定な状態にあり、周囲のエタノールを迅速に除去することで凝集や融合を抑制したためと考えられた。そのため、集積化デバイス中で粒子生成直後に高速に後処理希釈することで、通常の 5 倍高濃度の脂質条件においても生成粒子の融合・凝集を抑制し、精密な粒径制御と粒子製造のスループット向上を達成した。

第 5 章では、バッフルデバイスを人工エクソソームの作製に応用した。強い負電荷を持つ核酸の電荷を相殺するためにプロタミン-核酸複合体形成法と塩化カルシウム添加法を利用して粒子を作製した。二種類の中性脂質で構成された脂質系で流量条件やデバイスの影響を検討した結果、バッフルデバイスによる希釈挙動が精密な粒径制御と高効率な核酸搭載に適していることを明らかにした。そこで、エクソソームの脂質組成を模倣した脂質系へ応用した。バッフルデバイスによって 40, 110 nm の模倣粒子の作製に成功し、上述の中性脂質系の場合と同様にバッチや CM デバイスよりも精密な粒径制御と 2 倍以上の高い核酸搭載率を達成した。さらに作製粒子は細胞毒性を示さず、大小の粒子間のノックダウン活性に差があることを明らかにした。したがって、人工エクソソーム開発においても粒径制御は重要であり、バッフルデバイスによってサイズを作り分ける技術は大いに貢献できると考えられる。

第 6 章では、本論文の総括と将来性について述べた。本論文で提案する希釈挙動制御に着目した流路設計コンセプトは脂質ナノ粒子に限らず、生体適合性ポリマーなど両親媒性分子の自己組織化を利用したナノ粒子作製に応用が期待される。さらに、核酸以外の生体分子を搭載した人工エクソソーム作製への応用も期待でき、組成や粒径が異なる人工エクソソームを作り分けることで、創薬・バイオ分析・医療診断技術など幅広い分野へ貢献できると考えられる。