

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：12601
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23656145
 研究課題名（和文） マイクロ流動場の制御による均一巨大単層リポソームの高効率生成法の開発
 研究課題名（英文） Development of highly-efficient process for producing giant unilamellar vesicles (GUV) by controlling microscopic flow field
 研究代表者
 高野 清 (TAKANO KIYOSHI)
 東京大学・生産技術研究所・助教
 研究者番号：60302626

研究成果の概要（和文）：カバーガラス，あるいは微小な穴パターンを有する単結晶シリコン製のモールドにリン脂質溶液を塗布し，支持液中で振動させると特定の周波数でリポソームの成長速度が高くなることを示した．また，支持液に導電性がある場合，リポソームの生成が極端に阻害されることが判明したため，支持液の導電率とリポソームの生成密度の関係が比較的良く整理できることを示した．さらに，リポソーム周囲の流動場がリポソームの生成に重要であることを明らかにした．

研究成果の概要（英文）：We have found that the growth rate of liposomes produced by rehydrating a dried phospholipid layer on a silicone substrate is enhanced by applying the oscillating flow of specific frequency. It has also been found that the initial number of budding liposome from dried phospholipid layer is very sensitive to the electric conductivity of rehydrating solution, although the fluid flow around the initial budding liposome enhances the growing of liposome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：リポソーム，振動流

1. 研究開始当初の背景

数 μm 以上の直径をもつ単膜のリポソーム(以下 GUV: Giant Unilamellar Vesicle)は，電解質水溶液に種々の物質を混在させた溶液を内包させることで擬似細胞やドラッグデリバリーシステム(以下 DDS)に応用することが期待されている．これまでに国内外で水和置換法やエレクトロフォーメーション(以下 EF: Electroformation)法など，多くの製造法の研究が提案されているが，前者は多重膜になりやすい上に作製に時間がかかり，後者は単膜・短時間で作製できるが，電解質濃度が高いと生成しないという問題があり，いまだに適切な製造法が確立されていない．こ

れまでに著者は，EF法による GUV の生成過程を観察実験・解析することで，生成には GUV に到る前のリポソームの振動が主要な役割を担っていること，電解質が電場分布に影響を与えるため高導電率の水溶液 1mS/cm 以上では GUV が生成しないこと等をつきとめ，電気力もちいずに振動流を GUV の生成過程で印加する着想にいたった．さらに，EF法で用いる平板電極上に GUV の材料であるリン脂質をマイクロスケールでドットパターンニングすることで，均一サイズの GUV が生成できることが報告されていることから，両者を組み合わせることで，GUV に内包する水溶液の導電率にまったく依存しない，任意の大きさの

GUV を高効率で作成する方法が成立するとの着想にいたった。

2. 研究の目的

非膜透過性の凍結・乾燥保護物質を高効率で細胞内に導入する手法の開発は、これまで長期高品位保存が不可能であった細胞を大量かつ安価に乾燥状態で保存できる可能性を有する。細胞とほぼ同程度の大きさのリポソームに凍結・乾燥保護物質を内包させ、細胞とリポソームとを融合させることにより凍結・乾燥保護物質を細胞内に導入させることが可能となる。しかしながら、細胞とほぼ同程度の均一サイズのリポソーム、特に高い電解質水溶液を内包したリポソームを大量・高効率で作製する技術が未開発であることが実用化への障害となっている。そこで本研究では、振動流により高電解質濃度の水溶液を内包した均一なリポソームを大量かつ高効率に生成させる手法を提案し、その生成機序を解明し、プロセス設計ができる理論的背景を構築することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)実験装置および実験方法

白樫らが行った先行研究により、電場を利用する Electroformation 法では、高導電率の溶液が使用できないという欠点を有することが明らかになったため、振動流によるリポソームの生成方法を考案した。振動流の発生は、超音波振動子（積層圧電アクチュエータ：NEC/TOKIN AE1010D44H40F）を用い、ファンクションジェネレータ（Tabor Electronics 8557）、高速パワーアンプ（NF 回

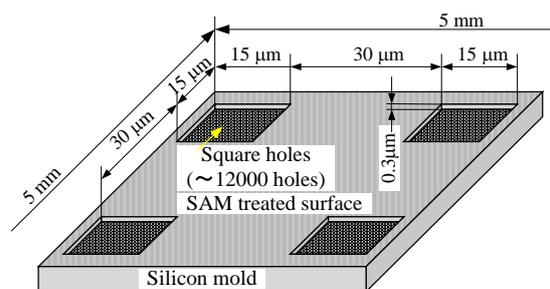


図1 シリコンモールドの寸法

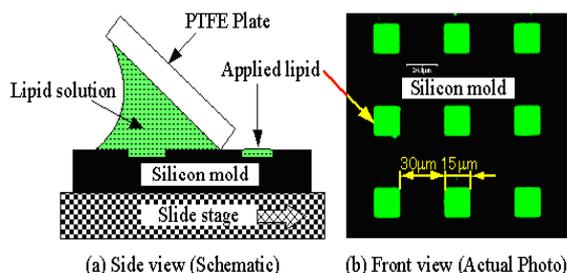


図2 リン脂質のシリコンモールドへの塗布

路 4020) を用いて振動の周波数、振幅を変化させた。また、リポソームは、リン脂質溶液 L- α -Phosphatidylcholine (SIGMA P3556-1G, CAS 8002-43-5) を 5 mg/ml となるようにクロロホルムに溶解させ、蛍光色素 DiA(4-Di-16-ASP; Molecular Probe; Abs. =491 nm, Ems. =613 nm) を 0.025 mM 添加し、リン脂質溶液とした。そして、このリン脂質溶液を直径 ϕ 22mm のカバーガラス、および単結晶シリコン製のモールド上に塗布し、真空乾燥させて使用した。

図1に使用した単結晶シリコンモールドの詳細寸法を示す。縦 5mm x 横 5mm の単結晶シリコンウェハー上に縦 15 μ m x 横 15 μ m x 深さ 0.3 μ m の正方形の角穴を約 12,000 個設け、穴以外の表面を SAM (Self Assembled Monolayer: 超撥水性) 処理を施した。

図2にリン脂質溶液のシリコンモールドの穴への塗布方法を示す。シリコンモールドをスライドステージ上に固定しリン脂質溶液 30 μ l を角穴群があるシリコンモールドの 5 mm x 5 mm の領域に滴下する。次に、スライドステージを毎秒 20 μ m 程度の速度でスライドさせテフロン板で余剰のリン脂質溶液を拭き取り、図2の写真に示すように角穴内だけにリン脂質溶液を塗布する。そして、リン脂質が塗布されたシリコンモールドを真空デシケータ内で最低5時間以上乾燥させた。

図3に単結晶シリコンモールドを用いた場合の超音波振動子の設置状況、顕微鏡による観察方法を示す。シリコンモールドを超音波振動子端面に取り付け、上部より 80 μ l の支持液を滴下する。この際、PDMS 製フェンスを装着することにより支持液をシリコンモールド上にプールすることが可能になり、対物レンズを液浸した状態で振動実験前後のリン脂質の挙動を蛍光観察した。

リポソームの観察はレーザー共焦点顕微鏡 (OLYMPUS, BX50WI : FLUOVIEW) により行った。また、粒子計測は、粒子計数分析装置 (Sysmex, CDA-500) を用い、1 回に回収できるリポソーム懸濁液量が 60 μ l 程度とわずかなため、装置で測定可能な限界の希釈液量から

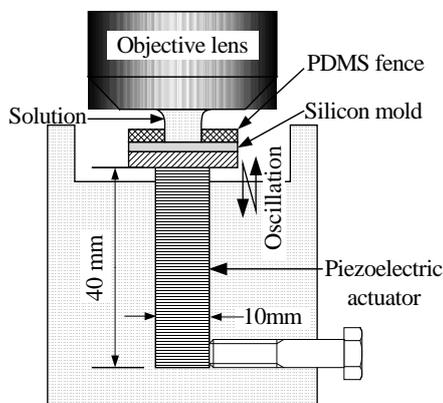


図3 超音波振動子とモールドの設置状況

逆算し、50 μl のリポソーム懸濁液を 3 ml の PBS 溶液 (300 mOsmol/kg) に懸濁させ、希釈率を 60 として測定した。

(2) 周波数に対するリポソームの成長率の測定 (PDMS 製スタンプを用いた場合)

直径 $\phi=10\mu\text{m}$ 、高さ $2\mu\text{m}$ の穴が周期的にパターンニングされた単結晶シリコンモールドを用い、PDMS (Polydimethylsiloxane) 製のスタンプを作製した。このスタンプにリン脂質溶液を塗布し、カバーガラス表面にリン脂質のドットパターンを転写し乾燥させた。このカバーガラスを超音波振動子端面に装着し支持液に浸漬させ 10 分間振動を印加し、リポソームの成長率を測定した。振動の周波数は 1Hz, 10Hz, 100Hz, 1kHz, 10kHz の 5 種類で、振幅は片振幅 $1\mu\text{m}$ 一定とした。成長率は、1 回の観察で 10 個のリポソームのデータを取得し、各周波数 10 回ずつ、100 個のリポソームについて計測を行った。振動を印加している間、実時間レーザー共焦点顕微鏡に接続したビデオカメラによって、リポソームの様子を観察した。リン脂質ドットパターンを水に浸漬させた段階でいくつかのリポソームが生成した。その中からあるリポソームに着目し、振動前の状態を撮影した後、振動を加え、加振後の状態も撮影した。撮影したリポソームの画像を、画像解析ソフト ImageJ (ver. 1.42q, National Institutes of Health, USA) によって解析し、加振前後の各リポソームの直径を計測した。成長率は、特定のリポソームの加振前後の直径比と定義し算出した。

(3) リポソームの生成阻害の確認

実験 (1) の方法でリポソームの生成・成長に関し、周波数、振幅、支持液の導電性など様々な影響を詳細に調べる過程で、支持液の導電性により生成されるリポソームの生成密度が大きく変化する可能性があることが

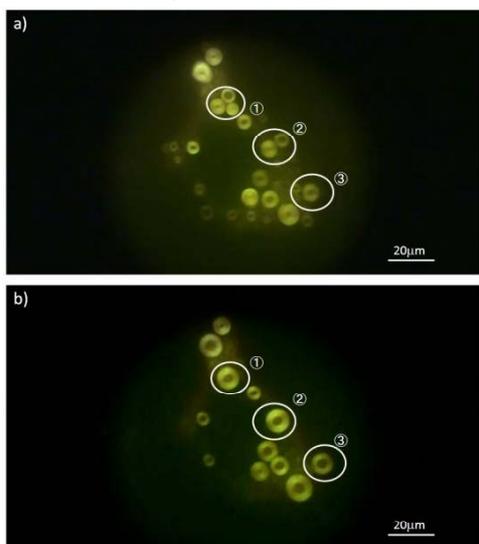


図 4 加振前後のリポソームの状況(水)

判明した。そこで、リポソームの生成に及ぼす導電性の影響を調べた。実験はまず、コントロールとして導電性の低い D-マンニトール水溶液 (300 mOsmol/kg) を用いたリポソームの生成実験を行った。次に、浸透圧は変化させず導電率を様々に変化させた支持液を作製し、それぞれのリポソームの生成密度、平均直径などを測定し比較した。実験では、D-マンニトール水溶液におけるリポソーム生成数が常に一定となるようシリコンモールドを用い、周波数 1kHz、片振幅 $1\mu\text{m}$ 、加振時間 10 分一定とした。

4. 研究成果

(1) 周波数に対するリポソームの成長率の測定 (PDMS 製スタンプを用いた場合)

図 4(a), (b) に支持液を水、周波数 1kHz、片振幅 $1\mu\text{m}$ で 10 分間振動を加えた場合の加振前後のリポソームの生成・成長状況の変化を示す。図 4(a) では、小さいリポソームが図 4(b) では融合してひとつのリポソームになる状況 (①②) や、多重膜のリポソームが成長し、単膜に変化する状況 (③) が確認できる。

図 5 に支持液として水を用いた場合のリポソームの成長率の周波数依存性を示す。測定は 100 サンプルについて行い、平均値を●印、最大・最小値をエラーバーで示した。成長速度は、周波数 1kHz で最大となり、その他の周波数ではほとんど変化は見られなかった。

(2) リポソームの生成に及ぼす導電性の影響

図 6 に KCl 混合液、PBS 混合液の導電率とリポソームの生成密度 (左軸)、平均直径 (右軸) の測定結果を示す。KCl 水溶液 300 mOsmol/kg の導電率は 17.2 mS/cm、PBS 水溶液 300 mOsmol/kg の導電率は 14.0 mS/cm で、D-マンニトール水溶液 300 mOsmol/kg に上述の KCl 水溶液を 1% 混入させると混合液の導電率は約 200 $\mu\text{S/cm}$ となる。測定は、同一濃度で基本的に 3 回以上行った。図中の x 印は D-マンニトール水溶液 100% の結果で、3 回の測定結果を平均して示した。図中の○印は

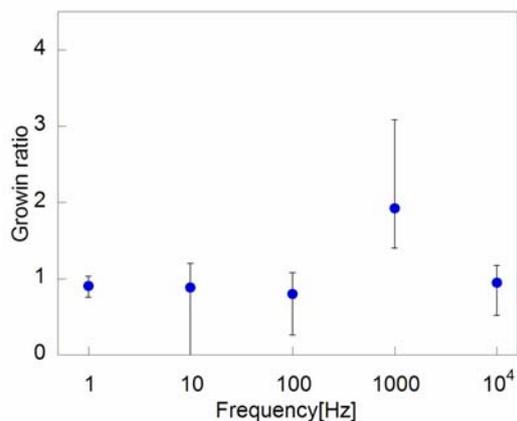


図 5 リポソーム成長率の周波数依存性(水)

KCl 混合液, ▲印は PBS 混合液の測定結果で, 最小二乗近似をした結果を一点鎖線で示した. リポソームの生成密度, 平均直径共に支持液の種類によらず支持液の導電率で比較的良く整理できることが明らかになった. リポソームの生成密度は導電率が増加するに従い急激に減少している. すなわち, KCl 水溶液を 1% 混入させると導電率は約 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ になることから, D-マンニトール水溶液のみの場合に比べ生成密度は約 1/10 以下になる. わずかなイオンの混入によりリポソームの生成が極端に阻害されることが明らかになった. 以上の事実より, エレクトロフ

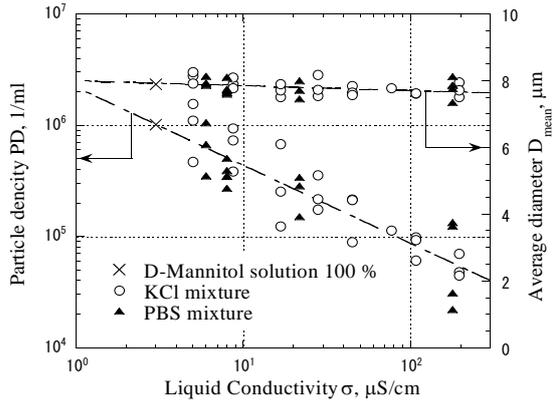


図 6 支持液の導電率に対するリポソームの生成密度, 平均直径の測定結果

オメーション法以外の方法においても電解質濃度が高いとリポソームが生成されることが判明した. 一方, 平均直径は支持液の導電率が変化してもほとんど変化せず, 8 μm 程度であった.

図 7 に KCl 混合溶液の濃度を变化させ, 周波数 1kHz, 片振幅 1 μm , 10 分間加振させた場合のリポソームの生成状況の変化を示す. 図 7(1)は, KCl 水溶液 100%の場合で, リポソームの生成が顕著に阻害されている. 図 7(2)は KCl 混合液の濃度比が 100 : 1, すなわち濃度 $C = 0.99 \text{ vol.}\%$ の場合の結果で, KCl 水溶液の濃度がかなり低いにもかかわらずリポソームの生成阻害の影響が顕著に現れている. その後濃度比が (3) 200 : 1, (4) 1000 : 1 になるに従いリポソームの生成阻害の影響は徐々に緩和され, (5) 10000 : 1 では, (6) D-マンニトール水溶液 100 % の場合とほぼ変化がなくなった.

図 8 は KCl 混合液の場合に測定した粒子分布で, 3 回以上の実験結果を算術平均してプロットした. KCl 混合液の濃度が 10000 : 1 ($= 0.010 \text{ vol.}\%$) では, D-マンニトール 100 % の場合と粒子数の絶対値, ピーク直径共に一致しており図 6 の結果を裏付けている. 混合液の濃度が増加すると生成粒子数は減少するが, ピークの粒子径はほとんど変化しない.

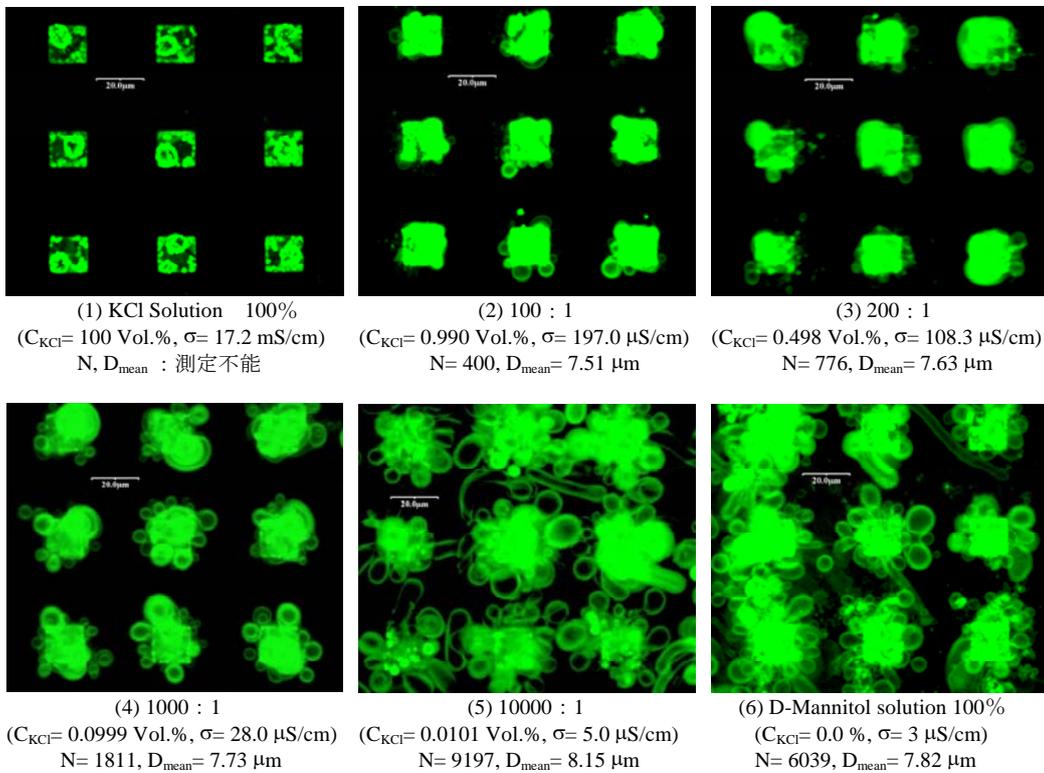


図 7 KCl 混合液の濃度によるリポソーム生成状況の変化
(周波数 1kHz, 片振幅 1 μm , 加振時間 10 分)

(3) リポソームの生成機序

これまでの実験により、リン脂質を塗布したカバーガラスや単結晶シリコン板を導電性が低い支持液中で振動させると、リポソームが多数生成することを確認した。また、この生成過程において、加振を行う前、すなわちリン脂質が支持液と接触した段階ですでに微小なリポソームが生成していることも確認した。そこで、リポソームの生成がリン脂質の乾燥状態、振動の周波数や振幅など、どのようなパラメータが重要となるかを調べた。図9(1)は顕微鏡下でリン脂質を塗布した単結晶シリコン板上にD-マンニトール水溶液(300 mOsmol/kg)を静かに滴下し60分間静置させた場合の結果である。リポソームの生成はほとんど確認されなかった。次に、図9(2)は、(1)の状態から瞬時に顕微鏡の対物レンズを移動させ、支持液内にマクロな流動を発生させた場合である。チューブ状のリポソームが多数生成していることが確認された。以上の結果より、リポソームの生成において支持液のマクロな流動や壁面せん断流れの存在が重要であることがわかる。したがって、振動の印加は、支持液に流動を発生させ、球形リポソームを生成させる効果があると考えられる。

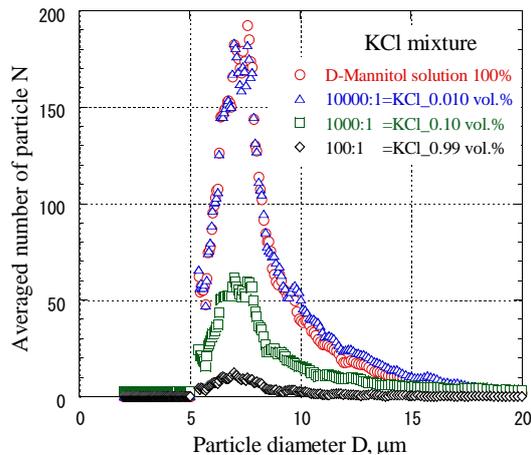
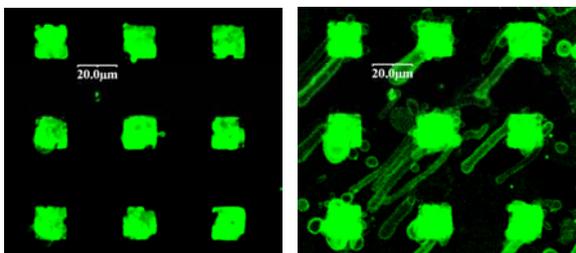


図8 KCl 混合液の濃度と粒子分布



(1) 支持液滴下後60分間静置 (2) 対物レンズによる流動発生後

図9 流動によるリポソームの生成状況

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 清 (TAKANO KIYOSHI)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：60302626