

## 立教大学学術推進特別重点資金(立教SFR)

## 個人研究

## 2023年度研究成果報告書

研究代表者	所属部局・職名	氏名
	理学部化学科・助教	章 逸汀
研究課題	マイクロ流路を用いた均質で定性的なリポソーム作製法に関する検討	
研究期間	2023年度	
研究経費 (1円単位)	(支出金額) 999,992円 / (採択金額) 1,000,000円	

## 研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフは使用しないこと。)

脂質二分子膜小胞体であるリポソームは細胞研究や医薬品開発などでその有用性が認められている。近年ではマイクロ流路技術を用いたリポソーム作製法が提唱され、均一なサイズと物質内包性に優れた作製法として報告されるようになった。しかしながら、リポソームを作製する上での諸条件は未だ報告例が十分でなく、均質で定性的な作製手法については明らかでない。特に脂質二分子膜の形成では、作製過程に用いる油が膜間に残留することでできるW/O/Wエマルションは、膜表面の修飾分子の機能阻害等が想定される。本研究では、リポソーム作製に用いるマイクロ流路の構造とリポソームを形成する脂質組成に着目してリポソーム作製法の検討を行った。

## キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[ リポソーム ] [ マイクロ流体デバイス ] [ 物質放出モデル ]

**研究成果の概要** (図・グラフ等は使用しないこと。)**(1) マイクロ流体デバイス作製について**

フォトリソグラフィにより、シリコンウエハ基盤上に SU-8 をフォトレジストとするマイクロ流体デバイスの鋳型を作製した。作製後は測定顕微鏡を用いて流路厚みについて計測を行った。その後ポリジメチルシロキサン(PDMS)で型取りを行い、流路側の凹み面をガラスとプラズマ接合してマイクロ流体デバイスを作製した。本研究で作製したデバイスは以下の二つ。

**① リポソームを作製するデバイス**

デバイスデザインは予備検討時のものとは異なり、先行研究で報告されている流路直交型形状のフローフォーカスタイプのものを作製した。デバイスの作製に用いる鋳型は流路厚み  $56.4 \pm 2.0 \mu\text{m}$  のものが得られた。顕微鏡観測下で作製したマイクロ流体デバイスに圧力制御式送液ポンプによる通液を行ったところ、溶液が流路から漏れることなく通液可能なことを確認した。次にデバイスの流路壁面の一部を塩酸-過酸化水素混合液の通液処理後、カチオン(ポリジアリルジメチルアンモニウムクロリド)/アニオン(ポリスチレンスルホン酸)ポリマーでそれぞれ親水化コーティングを行い、リポソームを構成する内水相と油相、外水相を別々に通液したところ、特定範囲の送液圧条件下(内水相:8kPa 程度、油相 100 mbar 程度、外水相:300 mbar 程度)で油中水滴が形成され、その後油水界面を通過する過程でカプセル状粒子の形成を高速カメラ撮像下(2500fps)で観測した。リポソームの膜と内部水溶液の構造を解析するため、油相(脂質膜)と内水相の溶液にはそれぞれローダミン DHPE とカルセインを溶解し、波長帯が異なる蛍光画像で観測・区別可能である。したがって、マイクロ流体デバイスから回収した分散液を蛍光顕微鏡観察画像から解析したところ、リポソーム様の粒子形成が確認された。

**② 多数同時観測デバイス**

後述の経時観測を行うため、リポソームを捕捉することが可能であり、同一のリポソームについて経時的かつ多数観測可能なデバイスの作製を行った。作製した鋳型の流路厚みは最終的に  $73.0 \pm 3.2 \mu\text{m}$  のものを用いた。前実験的に①で作製した粒子を無動力送液法で送液したところ、粒子の捕捉を確認し、最長 13 時間程度の同一箇所粒子の経時観測に成功した。なお、長時間計測後の粒子を蛍光顕微鏡と位相差顕微鏡とで観測を行ったところ、粒子サイズが 10~50%小さくなるものや、脂質膜が消失したもの等が確認された。現段階では最も捕捉された領域で、一視野 3 割程度の粒子捕捉率であり、全体の個数の半減期を計測できるほどのデバイスデザインには至っていない。そのため、粒子の性状を系統的に評価できない状況である。現在は一視野あたりの粒子捕捉率が向上するようなデザインを検討中である。

**(2) 脂質種別に形成したリポソームの単分散性と膜厚の画像解析評価**

リポソームを構成するリン脂質について、脂肪酸上の炭素の二重結合数の違いによるリン脂質分子間距離の違いを期待し、リン脂質種別で形成したリポソームの膜厚を画像解析評価した。本検討では 1-パルミトイル-2 オレオイル-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(POPC)と 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(DOPC)、1,2-パルミトイル-sn-グリセロ-3-フォスフォコリン(DPPC)3 種で検討した。これらをそれぞれ 0.1 mol%の蛍光脂質のローダミン DHPE とともに 1-オクタノールに溶解して油相とした。内外水相では 100 mM フルクトース水溶液を使用し、さらに内水相には蛍光色素であるカルセインを 0.05mol%配合した。それぞれの条件で作製した粒子のサイズは顕微鏡観測による取得画像から画像処理ソフト ImageJ を用いて画像解析を行ったところ、平均径が DOPC: $61.0 \pm 5.3 \mu\text{m}$ 、POPC: $56.4 \pm 4.6 \mu\text{m}$ 、DPPC: $57.0 \pm 1.8 \mu\text{m}$  であることが明らかとなった。いずれの粒子径も変動係数が 1-5 %程度であったことから、単分散な粒子が得られた。一方で顕微鏡から得られた蛍光画像上の「粒子の領域面積」から「内水相の蛍光領域面積」を割り引いた「脂質膜の蛍光領域面積」を算出したところ、それぞれ DOPC:15.4 %、POPC:13.4 %、DPPC:11.1 %であった。それぞれを統計比較したところ、統計学的な有意差はいずれ脂質種でも確認できなかった。一方で、リポソームの安定性を向上させる手法として、フォスファチジルグリセリン脂質とステロール系脂質を配合することが知られている。混合組成の脂質膜の場合どのような特性を示すか確認するため、DOPC に対して 1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホ-rac-1-グリセリンナトリウム(DOPG)とコレステロールを 9 対 1 対 1 の mol 比で配合したものを作製してみたところ、平均粒子サイズは  $58.1 \pm 2.0 \mu\text{m}$  で変動係数が 1-4%程度であった。膜厚についても 12.9 %であり、単一の DOPC 組成の場合と統計比較すると、それぞれの粒子で有意差は見られなかった。現状 POPC と DPPC についても同様な混合脂質組成を用いた検討には至っていないものの、脂質種や脂質組成で膜厚について差が見られない

**研究成果の概要 (つづき)**

可能性が示唆される結果であった。予備実験時では脂質膜領域の面積は 20%程度であり、デバイスのデザインが油中水滴と側面から流れる外水相の流路合流部では傾斜角が付いていたことから、リポソームの膜厚を決定する要素として、マイクロ流体デバイスのデザインも影響することが推定される結果となった。POPC と DPPC の混合脂質組成の評価には至っていないものの、より直接的な膜厚評価を行う手法確立のため、先に膜孔形成物質を用いた脂質膜厚の評価を行う実験系の確立に取り組んだ。

**(3) 膜孔形成物質を用いた膜厚の解析**

先の画像解析に基づく膜厚の評価で、同種脂質の DOPC を用いた組成の異なるリポソームでも有意差が見られなかったことから、リポソームの二分子膜の形成状況を明らかにするため、サイズ指標となる分子を用いた膜厚の相対評価を行うとした。先行研究ではステロール系脂質に特異的に結合し、細胞膜上で複合体を形成して、膜孔を作るアムホテリシン B (AmB: 構造全体の長さは 2 nm 程度でリン脂質分子と同程度) を用いた研究報告例が多数ある。先の DOPC-DOPG-ステロール混合脂質組成のリポソームについて、エルゴステロールを脂質総量の 50 mol% 配合してリポソームの作製を行い、AmB 添加による膜孔形成を試みた。実験としては作製用デバイスから回収した粒子を多数同時観測デバイスに無動力送液法で送液し、粒子を捕捉後に AmB を送液して経時観察した。結果 AmB 送液 12 分後で内包しているカルセインの蛍光強度の減衰が観測された。蛍光分子の自己消光を踏まえて、同様の実験条件で AmB を添加していないサンプルでも検討したところ、最長 13 時間は粒子内でカルセインの蛍光が変化なく経時観測できたことから、AmB 由来の膜孔貫通による蛍光分子の流出が起こったと考えられた。したがって、DOPC および DOPC-DOPG-エルゴステロールの構成のリポソームについては脂質二分子膜上で膜孔形成が達成されていることが実証された。

**(4) ステロール系脂質を用いた物質放出制御に関する評価**

先の検討でステロール系脂質の割合が 50 % であることから、コロイドとして粒子表面の分子配列上、リポソームとは異なる性状の可能性があるため、DOPC-DOPG 脂質組成に対してエルゴステロールの配合濃度が総量の 10 % と 30 % の場合の蛍光流出についても経時観測を行なった。結果、10 % のものは 115 分後、30 % のものは 37 分後からカルセインの蛍光低減が観測され、結論として本組成で作製した粒子はリポソームであることが明らかになった。

マイクロ流路で作製するリポソームについては画像解析結果から脂質種別ごとの膜厚に関する有意差がないことが明らかとなり、AmB による膜厚評価では脂質膜に AmB を貫通させられたことから、リポソームの形成が確認された。今年度の研究の取り組みで、デバイスデザインの違いによるリポソームの膜厚について AmB を用いた評価には至らなかったものの、予備実験のデータとの比較から、脂質構成のみならず、マイクロ流体デバイスのデザインがリポソームの形成に影響を及ぼす可能性が推察された。脂質種別ごとの膜厚の違いについても AmB による評価には至っておらず、これらは現在検討中の内容となる。一方で、これまでの取り組みは本課題で用いられた脂質構成以外でも二分子膜状態を評価可能な実験系の確立に至っており、今後様々な脂質特性を評価する上で有用である。また、本研究課題に取り組む中で、エルゴステロールの濃度依存でリポソームの物質放出について制御的に取り行うことが可能な知見が得られた。このことは物質放出モデルのキャリア粒子として用いた様々な実験用途に応用が可能であると考えている。本研究課題は今後引き続き検討を進める予定である。

※この(様式2)に記入の、成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差控え期間等を記入した調書(A4縦型横書き1枚・自由様式)を添付すること。

**研究発表** (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い

場合は主要なものを抜粋してください。)

- ① 雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ② 図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③ シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④ その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① 雑誌論文  
該当なし

② 図書  
該当なし

③ シンポジウム・公開講演会等の開催  
日本分析化学会第 6 回生体膜デザインコンファレンス、2024 年 1 月 31 日、大田  
区産業プラザ PiO 特別会議室

④ その他  
該当なし