

単一膜細胞サイズリポソーム形成法の開発

機械工学専攻 46163 河合正明 指導教員: 鷺津正夫 教授

1. 研究の背景

近年、化学計測や生化学計測において、測定時間の短縮や高効率化、試薬量の削減といったメリットから生化学実験システムをマイクロ化することが注目されている。マイクロ化された化学分析システム (Micro/Miniaturized Total Analysis Systems: μ TAS) は、微細加工技術を利用してガラスやプラスチックの基板の上に溶液が流れる微小な溝 (チャンネル) のネットワークを作成し、実験室で行うような生化学・化学の操作や検出を1枚のチップ上に集積化・小型化したものである。これらのシステムとは異なり、細胞と同様の脂質の二重層膜からなる閉鎖小胞体、リポソームを微小化学反応場として用いる研究も提案されている。リポソームとは、生体膜由来の両親媒性分子であるリン脂質が水中で疎水性部分を内側に向け、親水性部分を外側に向けて二重層を形成し、その末端が閉じて小胞となったものである。リポソームは内側と外側の両方が水溶液で、脂質の二重層がしきりになっている構造で、その二重層の疎水部分が障壁となりリポソーム内部に溶液を封入できる。また脂質二重層は分子間力で結合しているので、容易にリポソーム同士を融合させることができる。従って2個別々のリポソームに異なる溶液を封入して融合させることで、化学反応場として利用できる。リポソームは壁面が脂質二重層であるため、リポソーム内に DNA やビーズ等を封入しても壁面に吸着しないという利点がある。しかしながら、このような用途に適したリポソームを形成する技術は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究ではマイクロ化学システムにて微小反応場として利用することのできるリポソームの形成方法の開発を試みた。その手法は、図1のように、まずリポソーム内に封入する液滴を形成し、その後液滴表面に脂質二重層を一層ずつ形成していくという手法をとった。具体的には、まず水相の上に脂質を分散させた油相をのせて界面を作製し、脂質の両親媒性という特性を利用して界面に脂質の分子層を構築する。次に油相へ液滴をいれると水と油の比重差により液滴が沈降する。液滴が油相を沈降する過程で油相に分散した脂質分子が液滴表面へと吸着し、これがリポソーム脂質二重層の内側の層となる。このときリン脂質は外側に疎水基を向け、液滴側に親水基を向けている。液滴が水・油界面へ到達、通過する過程で、界面に構築された油相側に疎水基を向けている脂質分子層を、そのまま液滴表面に維持したまま水相へと移動することで、リポソーム脂質二重層の外側の層が形成され最終的に水相にてリポソームが得られる、という手法である。

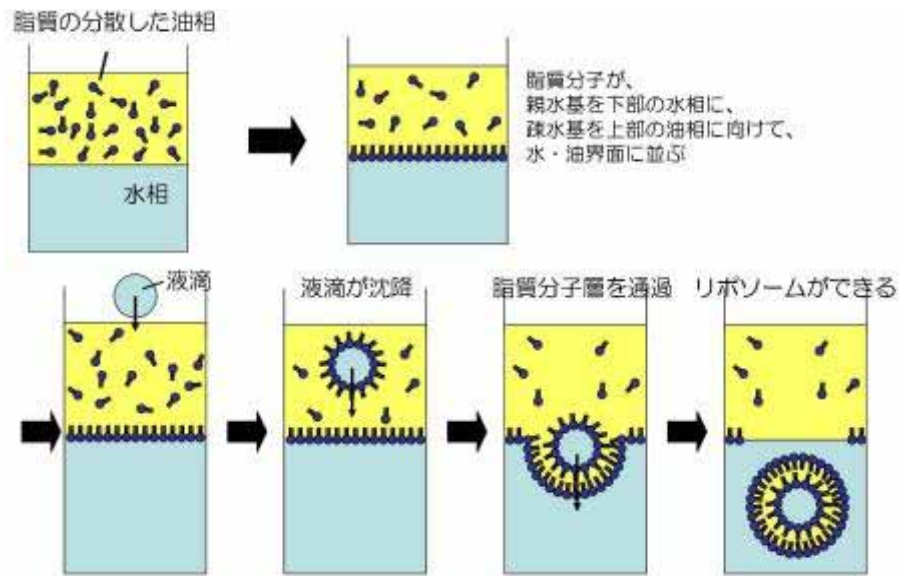


図1 リポソーム形成手法

3.液滴からのリポソーム形成

大きな液滴を脂質の分散した油相へと入れて沈降させることで、リポソームができるものかどうか試した。界面を作製するためのガラス容器は、図2のように横から界面を観察し易くするため、幅25mm×高さ26mm×奥行き3mmのガラス容器を用いた。実験の手順は、1.ガラス容器に水相となる純水を入れる。2.油相となる脂質溶液(脂質はDOPC、溶媒はdocecaneを用いた)を1の水相の上に静かに入れる。3.界面に脂質分子が稠密に並ぶまで静置する(2時間)。4.液滴をピペットで落とし(直径500 μ m程度)、図2のように液滴が界面を通過する過程を観察した。

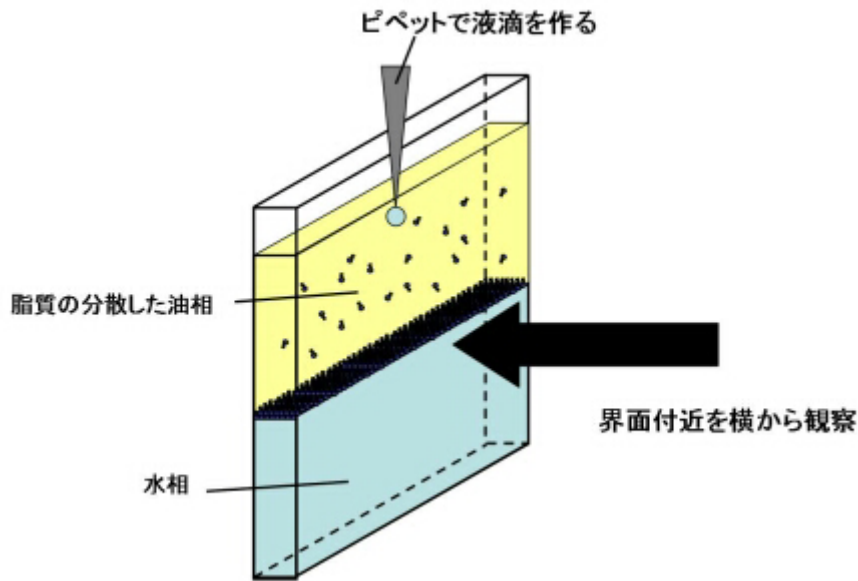


図2 液滴からのリポソーム形成実験図

その結果、液滴は水相と融合してしまった。液滴が油相を沈降して界面に到達するまでの時間が、液滴表面に脂質分子が稠密に吸着する時間に比べて短いために、液滴表面に脂質が稠密に吸着していない可能性が考えられる。この問題を解決するために、また、マイクロリアクターとしての応用を考えた場合に、液滴の粒径がより小さい方が好ましいこともあり、液滴を小さくすると同時に、液滴が長時間脂質の分散した油相中に存在できるように、微小な液滴を脂質溶液中で形成できる装置を製作することにした。

4.微小液滴の形成

脂質溶液中に微小液滴(本研究では細胞サイズ程度で直径 $20\ \mu\text{m}$)を形成すると共に、その粒径もある程度制御できる(直径を数 μm まで小さくできる)デバイスの開発を行った。以下、微小液滴とは直径 $20\ \mu\text{m}$ 程度の液滴を指す。微小液滴を形成するため、フォトリソグラフィーを用いた微細加工技術を利用し、T字路形状を持った微細流路の作製を行い、その微細流路を用いて微小液滴の形成を行った。水相(液滴)には純水を、油相(脂質溶液)には DOPC ドデカン溶液を用いた。

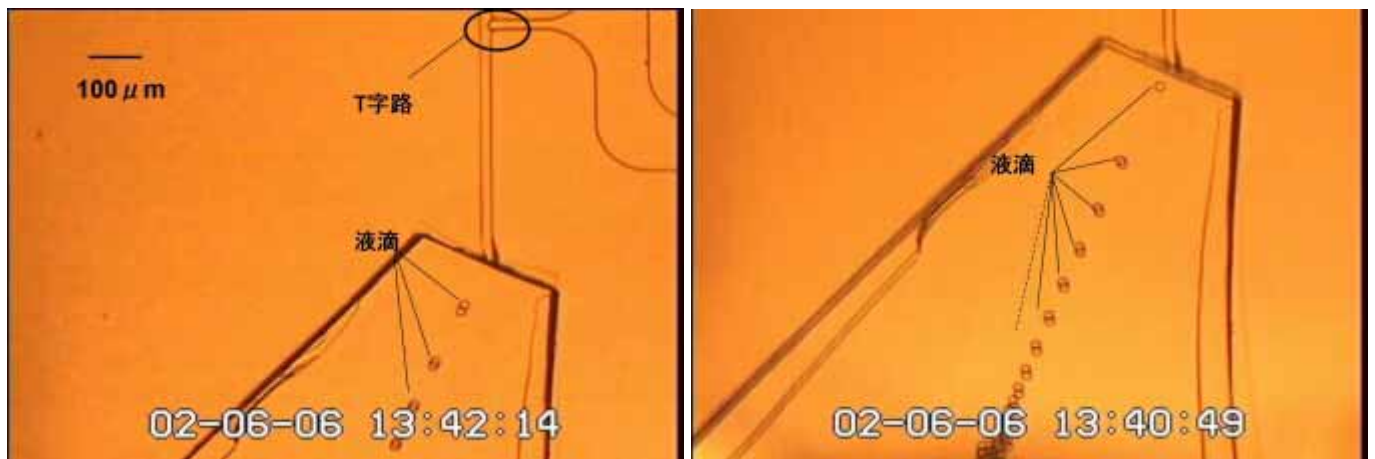


図3 T字路において微小液滴が形成される様子

微小液滴を形成している様子が図3の連続写真で、T字路で形成された液滴が油相の流れに乗って下流に流れているのがわかる。また水と油の流速の比(水/油)を変えることで液滴の粒径を制御できるか試したところ、比を小さくすると20 μm程度だった粒径が5 μmまで小さくなることを確認した。

5.微小液滴からのリポソーム形成

微小液滴の形成を行えたので、前章と同様、油相を水相の上に静かにのせて静置して脂質単分子層の形成を行い、界面に稠密に並んだと思われる時間が経過したところ(前回までと同様2時間静置した)で、微小液滴をいれて沈降させた。その様子が以下の図4である。



図4 微小液滴を水・油界面へと沈降させた様子

図4左は画面左右に白い点線部分にあるのが界面で、点線より下側が水相、上側が油相である。界面上に無数に微小液滴が静止している様子が観察され、図4右のように界面に静止したまま壊れない様子が観察された。しかし長時間経過すると、やはり微小液滴は壊れているように観察された。

液滴が界面で静止している状態というのは次の図5のように、液滴と水・油界面では脂質二重層になっているのかもしれないが、液滴の上部は脂質二重層となっておらず、一層しか形成されていない。さらにその液滴上部の脂質分子は流動的で、絶えず油相中の脂質分子と入れ替わっていることが考えられる。従って界面に静止している微小液滴は、通常のリポソームに比べて不安定なものであるため、長時間界面上に静置しておくで壊れてしまうのだと考えられる。

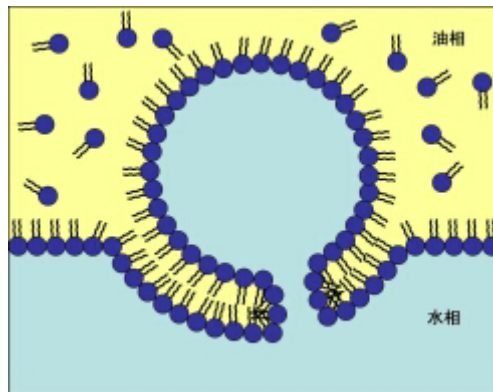


図5 液滴が壊れる様子

6.まとめ

水相の上に油相(脂質溶液)をのせて界面に脂質分子層を形成し、上方から大きな液滴を落として油相を沈降させ、その沈降過程で液滴表面に二重層の一層目を形成、界面通過時に二層目を形成されるよう試みたが、液滴と水相が融合してしまった。液滴への脂質の吸着率及び液滴の大きさが問題となったので、T字路構造を持った微細流路を用いて水相の流れを油相の流れによるせん断力を用いて引きちぎり、脂質溶液中に直径 20 μm の微小液滴を形成した。微小液滴を水・油界面に形成した脂質分子層へと沈降させてリポソームの形成を試みたが、界面に長時間静止するだけだった。そのまま放置しておくと液滴と水相が融合してしまい、リポソームの形成には至っていない。その原因として、液滴は準安定的ではあるものの、液滴上部が脂質二重層で覆われておらずリポソームに比べて不安定であり、脂質分子の流動性も高いため、長時間界面上に静置させておくと壊れてしまうことが考えられる。リポソーム形成のためには、微小液滴を長時間界面上に静止させず壊れる前に、例えばガラスピペットなどを用いて液滴を油相から水相へと移動させる必要がある。

