

# 均一径リポソームと細胞の融合のためのマイクロ流路デバイスの作成

東京大学生産技術研究所

竹内 昌治

This report describes a method for preparation of monodisperse giant liposomes from patterned lipid films using electroformation. The lipid films were patterned successfully on an indium tin oxide (ITO) electrode by a Parylene lift-off process. We found that the coefficient of variation (CV) of diameters of liposomes improved from 34 % to 7.6 % by using the patterned lipid films for liposome formation.

Giant liposomes (10 - 100  $\mu\text{m}$  in diameter) are cell-sized spherical lipid membranes and can enclose bio-functional materials (e.g DNA, proteins); they can be used as an artificial cell or biological reactor. In our previous work, we have succeeded in enclosing different types of nano/micro materials in giant liposomes efficiently using microfluidic channels with electroformation method. In order to control the volume of materials enclosed in the liposomes, it is important to prepare uniform-sized liposomes. The size is also an important factor determining the success for cell-liposome fusions. Micro-contact printing of lipids using PDMS stamp to achieve size control of liposomes was reported. However, in general, PDMS tends to swell when in contact with organic solvents. Here, we have used a Parylene sheet instead of PDMS for preparing lipid patterns in order to avoid such a swelling problem. Also, the Parylene sheet has advantages that it can be patterned by standard photolithography and peeled off from the substrate easily.

Two indium tin oxide (ITO) glasses were used as electrodes and separated by a silicone spacer chamber filled with degassed water. The lipid films were patterned on the bottom ITO glass using a Parylene sheet. When AC signal (10 Hz, 0.5 - 2.5 Vpp) was applied to the top and bottom ITO electrodes, the giant liposomes were formed from the patterned lipid films. Fluorescent images of the lipids with squares of 20  $\mu\text{m}$  showed clear edges of the patterned lipids on the ITO glass. Patterned lipids of 50 x 50  $\mu\text{m}^2$  square swelled and became round after applying electric field.

The size of the liposomes became larger as the size of patterned lipid films increased. When the liposomes were produced without the patterned lipid films, the size of the liposomes were widely distributed (CV = 34 %). In contrast, our preliminary experiment shows that the CV became narrow to 7.6 % when the patterned lipid films were used. These results imply that this method — electroformation of giant liposomes from lipid patterns — is useful to produce uniform-sized giant liposomes.

Finally we fabricate a device that combines microfluidic and electrical manipulation of cells or artificial vesicles in order to perform well controlled electrofusion. The actual device allows immobilizing cells or vesicles by suction onto an array of microholes and aligning different vesicles over the holes by dielectrophoresis.

## 1. 緒言

近年、消費者のニーズは、高度化・複雑化し、多機能性を持った化粧品を求められるようになってきている。近い将来には、細胞に直接作用する多機能性化粧品に対する要求が今後ますます拡大すると思われる。細胞内に、物質を高効率・低侵襲な方法で導入するために、物質を含んだリポソームを細胞に融合させる方法がある。リポソームとは、リン脂質を主体に形成される二重膜の水溶液を包含した球形の小胞である。細胞膜と同様の構造を持っているため、細胞との適合性があるマイクロカプセルとして使うことができる。物質を均一な量を大量に細胞内に導入するためには、体積の揃った（直径の揃った）マイクロサイズのリポソ

ームを作成することが要求されている。本研究の目的は、直径の揃ったリポソームを効率的に作成し、リポソームと細胞と融合させることができる集約化されたマイクロ流路デバイスを実現することである。

本研究では、均一径リポソームを作成するために、筆者らの得意とするマイクロ流体デバイスを利用することに注目した。マイクロ流体デバイスを利用することによって、少量の試料で、実験に必要なさまざまな条件を変化させることができる。さらに、顕微鏡下で観察・操作を可能とするデバイスと集積化できる。具体的には以下のような機能をもつマイクロ流体デバイスを実現する。

- 1) 均一直径リポソームの作成機能：マイクロ流路内でマイクロエレクトロフォーメーション法を利用することによって、均一径のリポソームを効率よく生産する。
- 2) リポソームの操作機能（位置制御、融合）：流路内に、マイクロ電極アレイを置くことで、リポソームの位置を制御する。また細胞とリポソームに電圧をかけることにより、融合させることができるような機能を付加する。

リポソームの中でも近年、直径10から100ミクロンと大



Fabrication of microfluidic devices for the production of monodisperse liposomes and the fusion of cells

Shoji Takeuchi

Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

大きい“ジャイアント”リボソームの応用が注目されている<sup>1)</sup>。その大きさから、直接顕微鏡下で観察できることが一番の利点であり<sup>2)</sup>、細胞と同様の大きさであることから人工細胞のモデルとして用いることができる<sup>3)</sup>。さらに、リボソーム内には、薬剤やDNAを包み込むことができ、マイクロサイズの容器として用いることもできる<sup>4)</sup>。

ジャイアントリボソームの生成法に、リン脂質膜で覆われた基板に電圧を印加することによって、膜を剥離させ、単層の脂質二重膜で構成させるエレクトロフォーメーション法がある<sup>1)</sup>。他の方法に比べて、単一膜構造を得られやすい特徴があるが、水和法<sup>5)</sup>など他の方法と同様に、作製されたジャイアントリボソームの径には、ばらつきがある。リボソーム内に薬品やDNAを閉じ込め、人工細胞やマイクロカプセルとして用いるためには、リボソームの粒径は、知っておかなければならない重要なパラメーターであり、均一な大きさのリボソームを作製することで、リボソーム内に決まった用量の試薬を注入することが可能になる。ここでは、本プロジェクトでは、まず、均一な直径のリボソームの作製に必要な検討を開始した。続いて、リボソームや細胞の位置や固定操作が可能なデバイスを実現する。

これまでに、均一なリボソームを作製する方法として、Taylorらは、PDMS (polydimethylsiloxane) でできたスタンプを利用し、リン脂質フィルムをパターンニングする技術とエレクトロフォーメーション法を利用する方法を試みている<sup>6)</sup>。ここでは、PDMSのスタンプを使用する代わりに、マイクロ加工技術を利用して作製されたパリレン樹脂

の微細穴あきシートを用いて、リン脂質膜のパターンニングする方法を試みた。一般的にPDMSは、有機溶媒中で膨潤してしまうという問題があるが、パリレンでは、起こらない。また、パリレン樹脂は、ガラス基板に蒸着し、一般的なフォトリソグラフィの方法を用いて、簡単にマイクロサイズのパターンニング作製することができる。さらに、蒸着したパリレンは、容易に基板から剥がすことができるという利点がある<sup>7)</sup>。

以降、パリレンパターンシートを用いてリン脂質膜をパターンニングし、エレクトロフォーメーション法を用いることにより、均一径のジャイアントリボソームを基板上にアレイ状に作製する方法について検討した結果を報告する。

## 2. 実験

図1 (a) に実験に使用したデバイスの実験系と、図1 (b) に断面からみたプロセス図を示す。厚さ0.5mmのシリコンスペーサーの上下に電極 (ITOガラス、大きさ: 30×40mm, 厚さ0.55mm, 10Ω/sq, 新得硝子) を配置し、内部にリン脂質の薄膜のパターンを作製する。

パリレン樹脂を用いた脂質膜のパターンニング方法とは、図1 (b) に示すように、(i) パリレン樹脂をガラスプレートに蒸着し、O<sub>2</sub>プラズマによりパターン化された穴あきシートを作る。その上から(ii) リン脂質と有機溶媒を混ぜた溶液を流し込み、1時間ほど乾燥させる。するとITOガラスプレートが露出している穴の部分にリン脂質膜ができ、(iii) パリレンを剥がすとリン脂質膜のパターンが

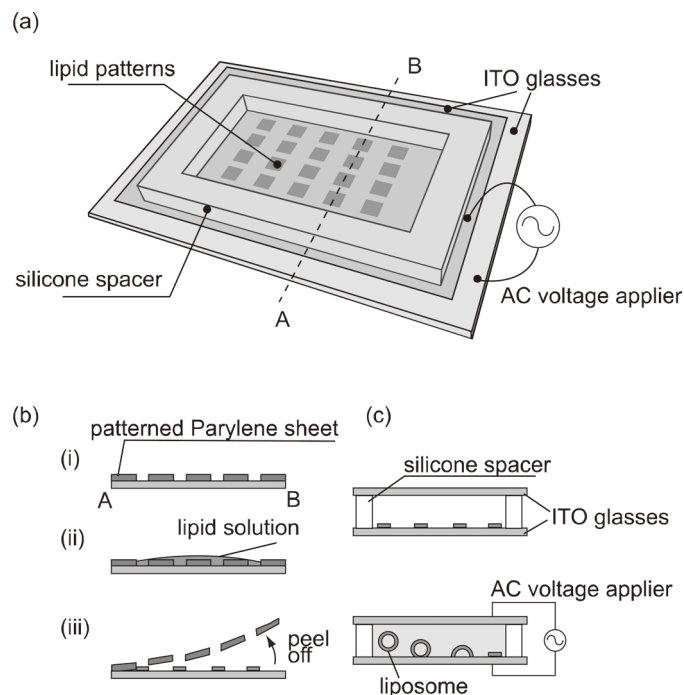


図1 (a) 均一径リボソームを作製するためのマイクロデバイスの概略図。 (b) パリレンシートによるリン脂質のパターンニング法のプロセス図。 (c) その基板を利用したマイクロチャンネル内でのエレクトロフォーメーション法。

できる。有機溶媒を完全に蒸発させるため、真空中で2時間以上乾燥させる。その後、図1(c)のように、リポソーム形成のため、シリコンチャンバー内に水溶液 (Milli-Q system; Millipore, pH=6.0) を導入し、電圧を印加することで、チャンバー内で、均一径のジャイアントリポソームの作製を試みた。

リン脂質は、ホスファチジルコリン (EPC) とホスファチジン酸 (EPA) (Sigma-Ladrich) をクロロホルムとメタノール、または、ホスファチジルコリン (EPC) をメタノールのみで溶かしたものを使用した。また、蛍光観察を行うことができるように、リン脂質を、蛍光色素 DiI (1,1'-dihexadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, ex/em: 549/564 nm) で染色した。

パターンされたリン脂質膜やリポソームの観察は、倒立顕微鏡 (IX-70, Olympus) を用いて、蛍光観察または微分干渉観察し、CCDカメラ (ExwaveHAD, Sony, または C2741-79, Hamamatsu) を用いて撮影、ビデオで録画した。特に静止画像は、イメージプロセスソフト AquaCosmos (Hamamatsu) を用いて撮影した。ジャイアントリポソームの直径は、Image-Box software (Library Co.) を使用して計測した。

### 3. 結果と考察

穴あきパリレンシート上に、リン脂質溶液を流し込み乾燥させる際に、シートがITOガラス基板から剥がれてしまうことはなく、シートは、ピンセットを使い基板の端から持ち上げると簡単に剥がすことができた。図2(a)に、パリレンシートを剥がす前と後の蛍光写真をそれぞれ示す。シートを剥がす前には、基板の全体が蛍光でひかり、リン脂質が全体に付着しているのがわかる。図2(b)に示すように、シートを剥がすと、リン脂質膜パターンがITO基板上に作製されていることがわかる。正方形のパターンサイズは、 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ で、パターン間隔は $30\mu\text{m}$ である。図2(c)にそれぞれのパターンの蛍光強度を示す。これより、パターンのエッジの境界がはっきり確認できる。以上の結果より、マイクロ加工を用いて作製された微細穴のパリレンシートを用いて、リン脂質をITOガラスの基板上にパターンすることできた。

作製されたリン脂質膜からエレクトロフォーメーション法によりジャイアントリポソームを作製することを試みた。周波数10 Hz, 電圧0.5 Vの交流電場 (正弦波) を印加するとリン脂質膜が振動している様子を確認することができた。その後、電圧を1.5Vまで次第に上げていく。それに伴い脂質膜の振動も増幅した。電場を印加してから、5 min 以内にリポソームが形成されており、図3に示すように電場による振動によりリポソーム同士が融合したり、小さなりポソームがジャイアントリポソームへと成長する様子を確認することができた。

図4に、大きさ $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ の正方形のリン脂質膜に

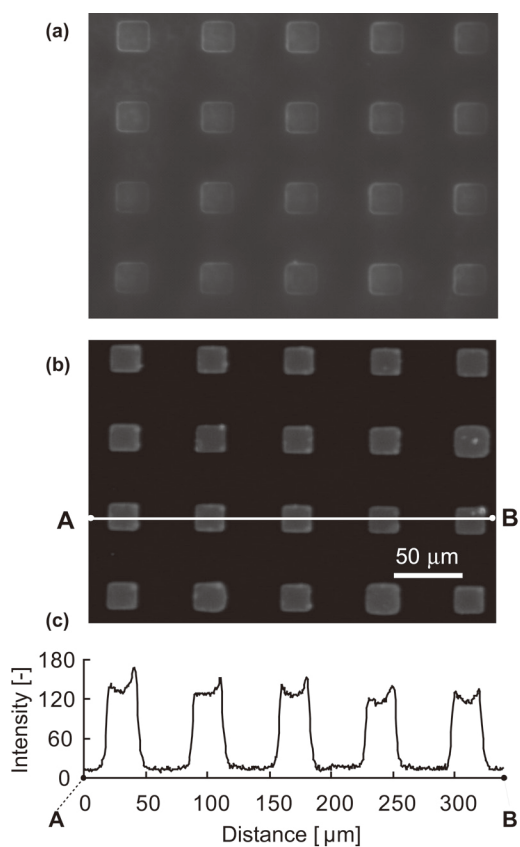


図2 (a) パリレンパターンを剥がす前の蛍光写真、(b) リン脂質膜 (正方形  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ ) をパターンした蛍光写真、(c) 断面 A-B の蛍光強度。

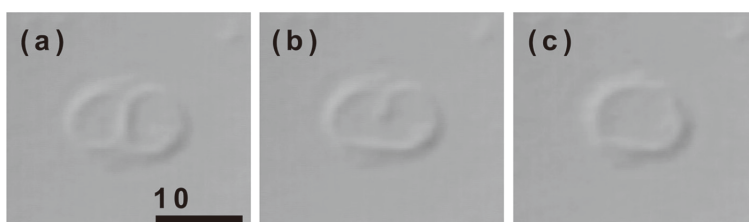


図3 リン脂質膜に電圧 AC field (1.5V, 10Hz) 印加した後のリポソームの (a) 融合前、(b) 融合中、(c) 融合後の微分干渉像。

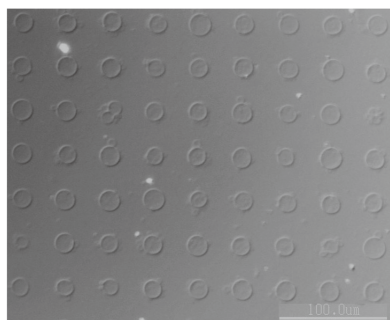


図4 脂質パターン  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$  を用いて、エレクトロフォーメーション法により作製されたりポソームアレイの微分干渉像。



電圧を印加してから20min後の結果を示す。作製されたジャイアントリボソームは、その径が一番大きくなる位置で観察し、本微分干渉像は、基板の底辺から7 $\mu\text{m}$ 高さで撮影されたものである。それぞれのリン脂質膜パターン上に、1つのジャイアントリボソームが形成されたが、2つ以上のジャイアントリボソームが脂質パターン上に形成されていたものもあった。ジャイアントリボソームは、アレイ状に作製され、基板上に固定されていた。ジャイアントリボソームが基板上にアレイ状に固定されていることで、例えば、ジャイアントリボソームに一種類の膜タンパク質を再構築する場合には、膜タンパク質の機構解析を効率的に行うことができるスクリーニングデバイスに応用することができる。固定されているリボソームを基板から浮遊させ、回収するには、例えば、高電圧を印加し外的な力を加えるなど、検討が必要である。

図4のジャイアントリボソームの直径を測り、直径分布を図5に示す。比較として、リン脂質パターンを使用しなかった場合の結果も図5に示す。パターンを用いた場合のリボソーム径の変動係数(CV: Coefficient of Variation)値は、脂質パターンを用いなかった場合に作製されたリボソームのCV値34%から7.6%に減少した。これより、均一径ジャイアントリボソームを作製するためには、リン脂質のパターンを使用することが有用であることが確認できた。

最後に、実際にマイクロ流体デバイス内で作成されたリボソームを操作可能な機能を実現した。具体的には、リボソームの位置制御、2種のリボソームの融合が可能なマイクロ電極アレイを組み込んだ。位置制御に関しては、誘電

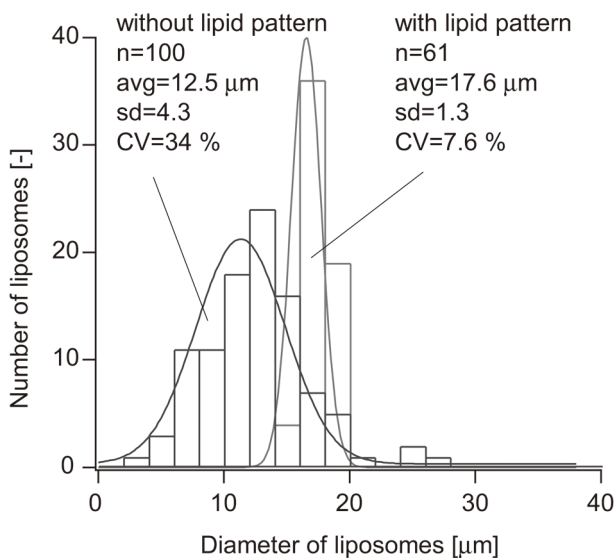


図5 エレクトロフォーメーション法により作製されたリボソームの数 vs. 直径。パターンしたリン脂質を使用しない場合と使用した場合。パターンサイズ: 10 $\mu\text{m}$ ×10 $\mu\text{m}$ 。変動係数 CV: 標準偏差値を平均値で割り%表示した値。

泳動などの現象を利用して、リボソームを動かした。このとき、多チャンネル信号発生装置によって、マイクロ電極間に正確に選択的な電圧を印加することにより、位置決めを効率的に実行した。図6は、パターンした電極のある流路にリボソームを導入し、写真のA-A'に電圧を印加することにより、リボソームの位置を移動させた実験の写真である。

また、移動制御させたリボソームを基板上へ整然と配置する方法として、図7のようなデバイスを開発した。このデバイスはマイクロ小孔が基板上に形成されており、その上下に流路が設置してある。上側流路にリボソームを導入し、下側流路を吸引すると、陰圧がかかり、上のリボソームが、マイクロ小孔を塞ぐようにして固定化される。このようにして、小孔の位置の設計どおりに、リボソームをアレイ化させることが可能である。写真Eは、本研究で製作したリボソーム固定用の基盤である。これを用いて、多くのリボソームや細胞を2列に配置することに成功した。

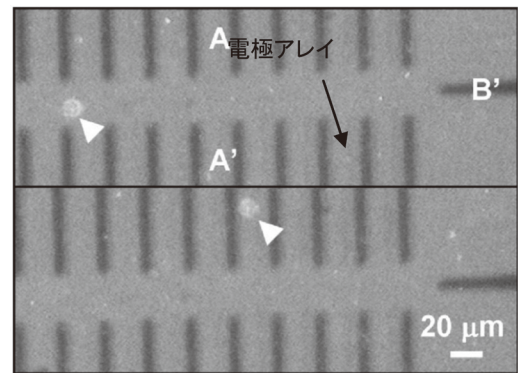


図6: 電極アレイによるリボソームの位置制御

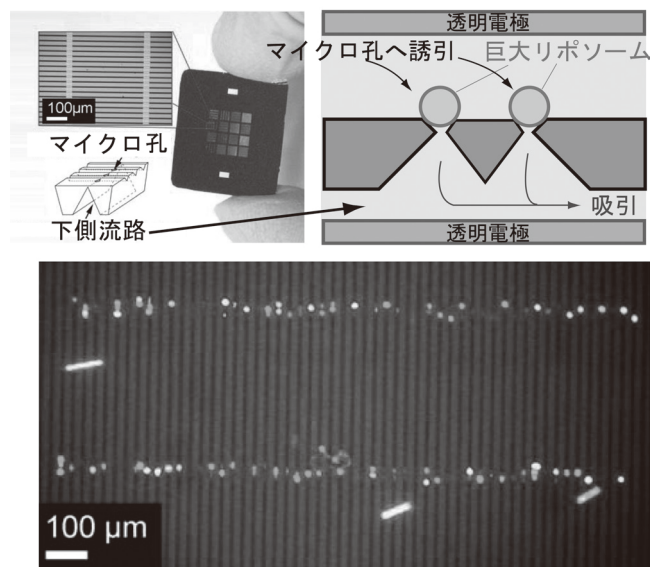


図7 リボソームや細胞の固定用基板。リボソームを固定し細胞を導入することで、リボソームと細胞の融合を試みる。この写真は細胞を固定している顕微鏡映像。

#### 4. 総括

本研究では、マイクロ加工技術を用いて作製されたパリレンシートにより、リン脂質膜をパターンニングすることができた。また、パターンされたリン脂質と、エレクトロフォーメーション法により、より直径分散の小さいジャイアントリポソームを基板上にアレイ状に作製することができた。さらに、マイクロ加工技術を利用してリポソームや細胞の移動や固定が可能なデバイスを実現した。これらの研究を通じて、均一直径のリポソームを得て、細胞等と融合させるためには、微細加工技術やマイクロ流体技術が有効であることが示された。

#### 謝辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援いただきました財コスメトロジー研究振興財団および共同研究者に深く感謝いたします。

#### (文献)

- 1) P. L. Luisi and P. Walde: 「Why Giant Vesicles? Giant Vesicles.」, John Wiley & Sons, LTD. pp. 3-9 (2000)
- 2) M. I. Angelova and D. S. Dimitrov: 「Liposome Electroformation.」, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81, pp. 303-311 and 345 (1986).
- 3) Y. Yoshikawa, T. Kanbe, and K. Yoshikawa: 「Daunomycin Triggers Membrane Blebbing and Breakage of Giant DNA Encapsulated in a Cell-Sized Liposome.」, *Chemical Physics Letters*, 366, pp. 305-310 (2002)
- 4) G. Tresset and S. Takeuchi: 「Utilization of Cell-Sized Lipid Containers for Nanostructure and Macromolecule Handling in Microfabrication Devices.」, *Analytical Chemistry*, 77, pp. 2795-2801, (2005).
- 5) J. P. Reeves and R. M. Dowben: 「Formation and Properties of Thin-Walled Phospholipid Vesicles.」, *J Cell Physiol*, 73, pp. 49-60 (1969)
- 6) P. Taylor, C. Xu, P. D. Fletcher and V. N. Paunov: 「A Novel Technique for Preparation of Monodisperse Giant Liposomes.」, *Chem Commun*, 14, pp. 1732-3 (2003)
- 7) K. Atsuta, H. Noji, and S. Takeuchi: 「Micro Patterning of Active Proteins with Perforated PDMS Sheets (PDMS Sieve) .」, *Lab on a Chip*, 4, pp. 333-336, (2004)