

博士論文

粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスを用いた
ジャイアントベシクル動態の同時並列計測

風山 祐輝

目次

第 1 章 本研究の背景と目的	1
1.1 はじめに	2
1.2 生体分子動態のスクリーニング基盤技術	3
1.3 人工細胞の動態解析	4
1.4 分子の化学反応に基づく情報通信技術の構築	6
1.5 本研究の目的	8
1.6 本論文の構成	10
1.7 参考文献	11
第 2 章 粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイス	14
2.1 はじめに	15
2.2 決定論的横置換法に基づく粒径選別	17
2.3 流路設計	20
2.4 マイクロ流体デバイスの作製方法	23
2.5 ジャイアントベシクルの調製法と送液システム	24
2.6 観察条件と粒径評価のための画像解析の手順	27
2.7 ジャイアントベシクルの粒径選別と空間配置	28
2.8 形状や柔らかさを利用した分離、選別手法	33
2.9 膜の柔らかさの推定	36
2.10 捕捉効率	39
2.11 デバイスのリセット	44
2.12 まとめ	46
2.13 参考文献	47
第 3 章 浸透圧刺激に対するジャイアントベシクルの形態変化	50
3.1 はじめに	51
3.2 ジャイアントベシクルの調製法と送液システム	53
3.3 観察条件と形態変化測定の手順	53

3.4	バルブ操作に対する外部溶液濃度の応答特性	54
3.5	連続的な浸透圧刺激に対する GV の形態変化測定	55
3.6	GV の形態変化に対する考察	59
3.7	まとめ	63
3.8	参考文献	65
第 4 章 ドメイン形成ジャイアントベシクルの粒径選別と同時並列観測		66
4.1	はじめに	67
4.2	ジャイアントベシクルの調製法と送液システム	69
4.3	観察条件	72
4.4	バルブ操作に対する外部溶液濃度の応答特性	72
4.5	ドメイン形成 GV の捕捉	73
4.6	アネキシン V の効果の検証	76
4.7	まとめ	78
4.8	参考文献	79
第 5 章 ジャイアントベシクルの膜上における DNA 反応の追跡		80
5.1	はじめに	81
5.2	DNA-コレステロール複合分子	82
5.3	DNA 担持ベシクルの調製法	84
5.4	送液システム	85
5.5	観察条件と蛍光強度測定の手順	85
5.6	バッファー条件の検討	86
5.7	膜挿入効率の評価	90
5.8	GV 膜上における連続的な二重鎖形成反応の追跡	91
5.9	まとめ	97
5.10	参考文献	99
第 6 章 総括		101
謝辞		105

第 1 章

本研究の背景と目的

1.1 はじめに

人工の袋状脂質二分子膜であるリポソームの発見は1960年代にさかのぼる。Banghamらは、レシチン（卵黄ホスファチジルコリン）の懸濁液を電子顕微鏡で観察し、層状構造の二分子膜から成る小胞が形成されることを見出した[1]。リポソームは、細胞膜の主要な構成分子であるリン脂質などからつくられ、典型的には図1のような構造で表される。リン脂質は、分子内に親水性と疎水性の部位を併せ持つ両親媒性分子の一つであり、水中で疎水性の部位を互いに向い合わせるように配向し、閉鎖小胞を形成する。この閉鎖小胞がリポソームであり、これまでに生体膜モデルとして多くの研究が行われてきた。また、例えば脂質二分子膜の物性を基礎検討した研究成果から、加温により内包薬物を放出する温度応答性リポソームも開発され[2,3]、薬物送達システム (drug delivery system: DDS) を目指した応用研究が活発に行われている[4]。

Banghamらが最初に行った薄膜膨潤法に始まり、リポソーム調製法は凍結乾燥法[5]、エレクトロフォーメーション法[6]、油中水滴遠心沈降法[7,8]等に代表される多くの手法が知られており、実験目的に合わせてリポソームのサイズや形状を制御して調製する研究が最近盛んである[9]。中でも、直径1–100 μm の閉鎖小胞は、構成分子がリン脂質に限らないものが報告されるようになり、総じてジャイアントベシクル (giant vesicle: GV) と呼ばれる。GVはそのサイズと構造が細胞膜と類似しているため、細胞サイズの反応容器として注目されている。光学顕微鏡下でその動態を直接観察可能であることから、自ら成長分裂し、進化する化学反応系を構築することで人工細胞や原始細胞モデルの創成を目指す研究に欠くことのできない存在となっている。

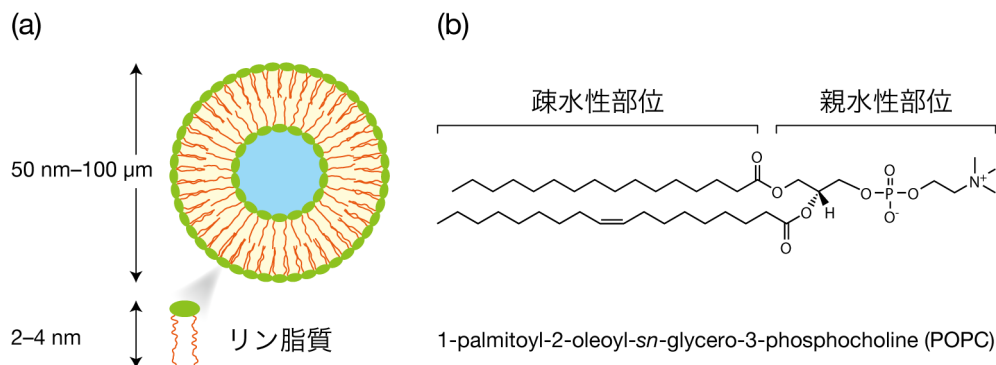


図1：リポソームの構造の模式図(a)とリポソームを構成するリン脂質の例(b)。

本研究は、そのような GV の新たな解析基盤となり得るマイクロ流体デバイスの開発を目的とする。マイクロ流体デバイスは、ガラスやプラスチック基板に微細な流路やチャンバーを造り込み、化学反応や分離精製、検出などの機能を集積したものであり、近年急速に発展してきた。特筆すべきは、装置全体の小型化によって、細胞や GV 等のマイクロメートルサイズの対象に対して新たな実験手法がうみだされる点である。特に細胞に対する適用例が多く、細胞融合の同時並列制御や、細胞種による分離、1 細胞の内包物を対象とした抗原抗体反応等への応用において著しい成果を上げている[10-12]。従来の GV 研究にマイクロ流体デバイスを導入する意義について、ここでは、生体分子動態のスクリーニング基盤技術、人工細胞の動態解析、及び分子の化学反応に基づく情報通信技術の構築の3つの観点から述べる。

1.2 生体分子動態のスクリーニング基盤技術

従来、脂質分子間の相互作用や、脂質-タンパク質間の相互作用の解析に対し、直径 100 nm 未満の一枚膜ベシクル (smaller unilamellar vesicle: SUV) が格子状に並列配置された系 (アレイ) が広く用いられてきた。タンパク質どうして強い結合を形成することで知られるストレプトアビジン-ビオチン複合体等を介してガラス基板上に SUV を固定することで、SUV のアレイを生成することが可能である[13,14] (図 2)。Stamou らは、チャネルタンパク質の一種であるグラミシジン A を外水相から添加すると、SUV 膜上に挿入されたグラミシジン A がイオンチャネルを形成することで内包溶液の pH 変化が引き起こされることを SUV の同時並列計測により確認している。その他にも、このような SUV のアレイを利用することで、生体分子の脂質膜に対する吸着能や、従来法で調製された SUV の脂質膜組成の不均一性、内包分子の 1 分子計測を通じた酵素活性の温度依存性等が詳細に解析されている[15-17]。しかし一方で、マイクロメートルサイズの巨大な生体高分子複合体と脂質膜間の相互作用や、それによって引き起こされる形態変化などの動態の解析には、SUV ではなく GV が用いられている。GV 内部にアクチン-ミオシンネットワークから成る細胞骨格を封入した例や、内包した微小管の重合成長により GV の変形を誘導した例、細胞分裂に関わる Z リングを GV 膜上に再構成することでくびれを有する GV を作

製した例、脂質ドメイン（第4章を参照）を形成するGVの作製例等が知られている[18–21]. このようなGVに対する解析は、主にGV分散液を直接顕微鏡観察し一つ一つを個別計測することによって行われてきたため、スループットが低いのが課題であった. 例えば、特異的であるが低頻度で起こる形態変化を見落とす可能性や、平均的な挙動とばらつきの関係を議論し難いという問題があった. そこで、均一粒径のGVのアレイを用いることで解析のスループットを向上させることを目的として、粒径選別と並列配置が可能なマイクロ流体デバイスを構築できれば、GVを用いた新しい生体分子動態のスクリーニング基盤技術になり得る点で意義深い. 不均一性も含めたGVの物理化学的特性の統計解析や、生体分子によって引き起こされる形態変化等の動態に対する理解が深まれば、次に述べる人工細胞研究にとっても有力な知見となるだろう.

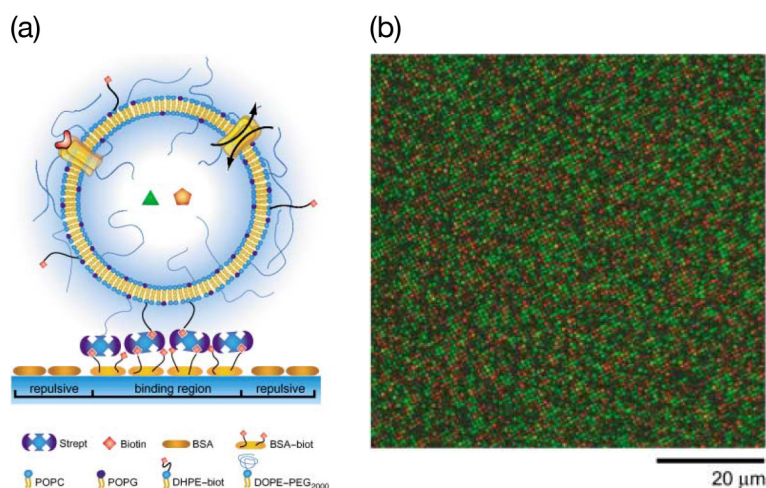


図2：ガラス基板上に作製されたSUVのアレイ. 文献[14]より引用. 模式図(a)と共焦点蛍光顕微鏡像(b).

1.3 人工細胞の動態解析

生命の本質に迫る研究には、大きく分けてトップダウン型とボトムアップ型の2つのアプローチがある[4]. 前者は、目的の細胞機能に不必要な分子群を生細胞から除去していき、本質的な要素のみを残すというアプローチである. 後者のアプローチは、有機分子の集合体という細胞より低い階層から、細胞機能を発現する分子集合体（人工細胞と呼ばれる）の構築を目指す試みであり、物理学、化学、生物学の手技を駆使して、既知の物質から多様な機能を自在に設

計できるという特徴を有する[22–24].

人工細胞研究はまさに、細胞のように高度な機能を備えた分子集合体をボトムアップ的に創成しようとする試みであるが、依然として大きな課題の一つは、自発的に成長分裂し、進化できる化学反応系の構築である。Szostak らによって提案されている人工細胞の成長分裂と進化の概念図を図 3 に示す[22]. 外部より膜分子、もしくは膜分子の前駆体を取り込み、自発的に成長分裂できる分子集合体は、最も簡単な原始細胞モデルとなり得る。さらに、恒常的に成長分裂できる系が構築されれば、内包分子の分子数の不均一性等に由来する生存競争が化学反応系全体の進化を引き起こすと期待される。このような人工細胞に関する先駆的な研究は 1990 年代に Wick らによってなされた。Wick らは、高級脂肪酸の一つであるオレイン酸から成る GV の分散液に、加水分解により 2 分子のオレイン酸に変換される無水オレイン酸を添加すると、膜内でオレイン酸が生産されることで GV が成長分裂し、増殖することを顕微鏡観測により発見した[24]. しかしこの系では、無水オレイン酸の加水分解が GV 内外で誘起されるため、どこまでが GV の「自己」であるか区別するのが難しい[25]. そこで、触媒分子を膜に担持することでほぼ膜内でのみ膜分子の生産が起こるように改良された、人工の膜分子を用いた GV の成長分裂系が構築された[26]. さらに近年では、膜分子の生産に必要な触媒分子の内包率の不均一性に由来してベシクル間で競争が起き、触媒濃度の高いベシクルのみが成長する系や、内包 DNA のポリメラーゼ連鎖反応による増幅と、膜分子の生産に伴う GV の成長分裂を連動した系などが報告されている[27,28].

しかし、恒常的に何世代にもわたって成長分裂できる人工細胞系は未だ構築されておらず、その平均的な挙動やばらつきに関する物理・化学の面からの議論や現存の細胞増殖との関係を探る試みは達成されていない。その背景には、人工細胞研究における GV 動態の評価の難しさがある。GV 動態の従来研究は、GV 分散液の直接顕微鏡観察によるものが多い。サイズや形状、膜組成の不均一性に由来する動態そのものの不均一性の問題に加え、膜分子の添加などに代表される化学刺激を、顕微鏡観察下で行うことが困難であるという問題もある。Tomita らは、GV 懸濁液を封入したチャンバーの上部にセルロース半透膜を取り付けた灌流型のデバイスを用いて、精確に界面活性剤水溶液の流量を制御した灌流下における GV の形態変化を詳細に解析し、脂質膜組成の差異による変

形様式の違いを明らかにした[29]. ゆえに、高精度な粒径選別と並列配置が可能なことに加え、このような自由度の高い溶液操作が可能なマイクロ流体デバイスを実現できれば、それこそが人工細胞研究の中で果たす役割は大きいと期待される.

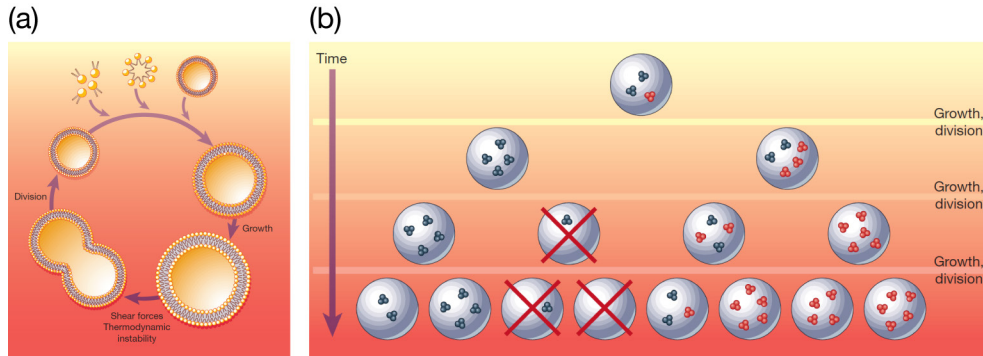


図3：ベシクルの成長分裂(a)と進化(b)の概念図. 文献[22]より引用.

1.4 分子の化学反応に基づく情報通信技術の構築

前節で述べた人工細胞研究の特徴は、様々に設計された分子をGVに内包又は膜上に担持することで、GVに次々と新しい機能（成長分裂と進化）を付与することにある。このようにGVを作り込んでいく手法は、いわば単細胞生物のモデル化に相当する。対して自然界においては、様々な機能を持つ細胞が集積して多細胞系を構築し、相互に情報交換する中で全体として高度な機能を実現しているものもある。そこで近年、GVどうしの相互作用の研究や、GV-細胞間相互作用の研究に注目が集まっている。分子の化学反応に基づくウェットな情報通信技術は *biochemical-based information and communication technologies (bio/chem-ICT)* と総称され、近年の人工細胞研究における新しい潮流を形成している[30]. Kanedaらは、細胞どうしの直接接触コミュニケーションチャンネル分子であるコネキシン43 (Cx43)を導入したGVを、同じくCx43を発現させた培養細胞と接触させることで、ギャップジャンクションと呼ばれる直径約2 nmの孔を介してGV-細胞間で物質の送達が可能であることを示した[31]. また Gardnerらは、海洋性発光細菌である *Vibrio harveyi* (*V. harveyi*) とホルムアルデヒドを内包するベシクルを共存させた系を用いて、ベシクル内部でのホルモース反応で生成され放出された糖が *V. harveyi* のクオラムセンシン

グ機構を正しく刺激することを明らかにした[32]. また, Carrara らは, オレイン酸とポリ-L-アルギニンの静電相互作用を利用して形成した GV の凝集体に対し, 初めて GV colony という呼称を与えた[33]. Hadorn らは, GV どうしの接合に DNA を用いることで, 配列依存的に凝集体が形成されることを示した[34].

人工細胞研究がボトムアップ的アプローチであることは先にも述べたが, GV に相互作用や情報通信の仕組みを導入する上で, 性質の既知で, 配列設計の自由度が高い DNA の利用は極めて有力である. Beales らは, それぞれ異なる化学反応系を内包したモジュール型ベシクルを DNA の二重鎖形成反応によってつなぎ合わせることで細胞のような高度な情報処理が可能になるという提言を行った[35] (図 4). また, ベシクル内外で DNA の二重鎖形成反応, 鎖置換反応, 酵素反応などに基づく情報処理を行い, その出力を分子モーターの制御に連動させることで, 高機能なアメーバ型分子ロボットの創成を目指す研究が進められている[36]. 従来, このような研究における主要な解析手法は, 顕微鏡下でのランダムな対生成や集合体形成, あるいはガラスキャピラリー等を用いて顕微鏡下で 1 つずつ GV を接触させるスループットの低い操作に頼っていた[37]. 細胞融合の同時並列制御の例に見るように, マイクロ流体デバイスには, 簡単な操作で十分な数の GV を精確に空間配置できるだけの潜在能力がある. 対生成や集合体形成も含めた空間配置のための設計を容易にする粒径選別技術を同時並列制御技術に組み合わせることができれば, GV ベースの bio/chem-ICT の研究に広く活かされると期待される.

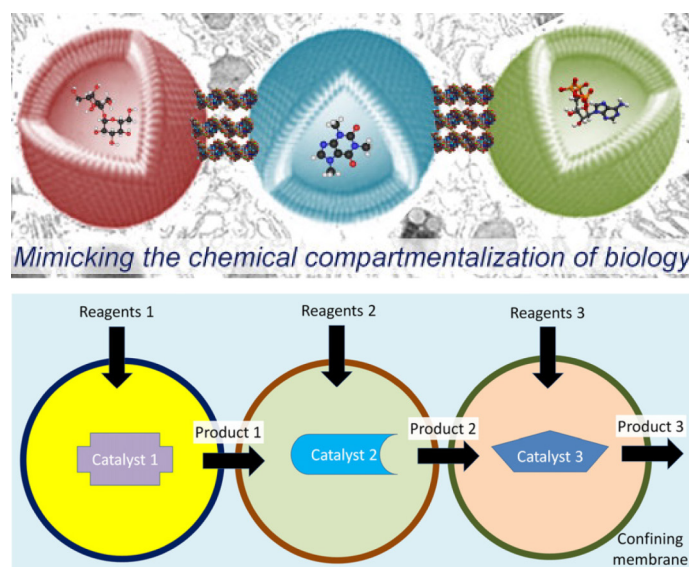


図4：モジュール型ベシクルの接続による情報処理の模式図。文献[35]より引用。

1.5 本研究の目的

生体膜モデルとしてのみならず、人工細胞や原始細胞モデル創成の観点からも興味深いGV研究に対し、マイクロ流体デバイスを導入する意義について3つの観点から述べた。第一に、生体分子動態のスクリーニング基盤技術として有用である。従来のSUV研究に加え、GVに対しても粒径選別と並列配置の技術が確立できれば、不均一性も含めたGVの物理化学的特性の統計解析や形態変化等の動態に対する理解が深まるだろう。第二に、人工細胞研究における強力な解析手段となり得る。粒径選別と並列配置が可能なことに加え、顕微鏡観察下で自由度の高い溶液操作も可能なマイクロ流体デバイスを用いれば、サイズや形状、膜組成の不均一性に由来する動態そのもののばらつきの問題に対し、積極的にアプローチできる。最後に、分子の化学反応に基づく情報通信技術への応用が期待される。簡単な操作で十分な数のGVを精確に空間配置できるマイクロ流体デバイスは、GV研究に相互作用や情報通信の概念を導入する上で、新たな解析手段を与える。

以上で述べた研究背景を受け、本研究ではデバイス上流でGVを望みの粒径に絞り込み、下流で均一粒径のGVを複数空間配置することでGV動態の観測や化学反応計測を容易とすることを目指し、粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスの開発に取り組む。数あるマイクロ流体デバイスの利点の中から、

本デバイスの特徴としてここでは次の 3 点を強調したい。1. 粒径選別, 2. 空間配置, 3. 外部溶液環境の制御である。そこで本研究では, GV 動態の同時並列計測を通じて, 1. 粒径依存の現象の解明, 2. 不均一性を考慮した統計解析, 3. 精確に制御された溶液環境下での履歴も含めた応答計測への応用可能性を実験的に示すことを目的とした。

1.6 本論文の構成

第 1 章では本論文の背景や目的と共に、研究の意義やそれによってもたらされる波及効果について述べた。

第 2 章では、GV のための粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスの設計指針と、その性能評価のための実験について述べる。GV の柔らかさや膜組成がデバイス内部における GV の挙動に与える影響についても考察する。

第 3 章では、連続的な浸透圧刺激に対する GV の応答特性の評価実験について述べる。

第 4 章では、脂質ドメインを形成する GV の流れ場中における挙動と、ホスファチジルセリン含有 GV 及びホスファチジルセリン非含有 GV それぞれに対して捕捉後にアネキシン V により摂動を加えた場合の応答特性の評価実験について述べる。

第 5 章では、DNA-コレステロール複合分子を用いた、GV 膜上での連続的な DNA の二重鎖形成反応の同時並列計測の実験について述べる。

第 6 章では本論文を総括し意義づけを行い、今後の展望を論じる。

1.7 参考文献

- [1] A. D. Bangham and R. W. Horne, *J. Mol. Biol.*, 1964, **8**, 660–668.
- [2] K. Kono, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **53**, 307–319.
- [3] 河野健司, 高分子加工, 2003, **52**, 174–180.
- [4] (監修) 秋吉一成, 辻井薫, リポソーム応用の新展開 人工細胞の開発に向けて, NTS, 2005.
- [5] L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis and A. S. Janoff, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **817**, 193–196.
- [6] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 1986, **81**, 303–311.
- [7] V. Noireaux and A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 17669–17674.
- [8] S. Pautot, B. J. Frisken and D. A. Weitz, *Langmuir*, 2003, **19**, 2870–2879.
- [9] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel and P. Stano, *ChemBioChem*, 2010, **11**, 848–865.
- [10] A. M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch and J. Voldman, *Nat. Methods*, 2009, **6**, 147–152.
- [11] J. A. Davis, D. W. Inglis, K. J. Morton, D. A. Lawrence, L. R. Huang, S. Y. Chou, J. C. Sturm and R. H. Austin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 14779–14784.
- [12] K. Eyer, S. Stratz, P. Kuhn, S. K. Küster and P. S. Dittrich, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 3280–3287.
- [13] M. Bally, K. Bailey, K. Sugihara, D. Grieshaber, J. Vörös and B. Städler, *Small*, 2010, **6**, 2481–2497.
- [14] D. Stamou, C. Duschl, E. Delamarche and H. Vogel, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2003, **42**, 5580–5583.
- [15] N. Ehrlich, A. L. Christensen and D. Stamou, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 8169–8176.
- [16] J. Larsen, N. S. Hatzakis and D. Stamou, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 10685–10687.

- [17] Y. Ishitsuka, B. Okumus, S. Arslan, K. H. Chen and T. Ha, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 9694–9701.
- [18] F.-C. Tsai, B. Stuhmann and G. H. Koenderink, *Langmuir*, 2011, **27**, 10061–10071.
- [19] 本田誠, 瀧口金吾, 金子智行, 宝谷紘一, 生物物理, 1999, **39**, 14–17.
- [20] M. Osawa, D. E. Anderson and H. P. Erickson, *Science*, 2008, **320**, 792–794.
- [21] T. Baumgart, S. T. Hess and W. W. Webb, *Nature*, 2003, **425**, 821–824.
- [22] J. W. Szostak, D. P. Bartel and P. L. Luisi, *Nature*, 2001, **409**, 387–390.
- [23] K. Takakura, T. Toyota and T. Sugawara, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 8134–8140.
- [24] R. Wick, P. Walde and P. L. Luisi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1435–1436.
- [25] (編集) 竹内昌治, 上田泰己, 細胞を創る・生命システムを創る, 羊土社, 2011.
- [26] K. Takakura and T. Sugawara, *Langmuir*, 2004, **20**, 3832–3834.
- [27] K. Adamala and J. W. Szostak, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 495–501.
- [28] K. Kurihara, M. Tamura, K. Shohda, T. Toyota, K. Suzuki and T. Sugawara, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 775–781.
- [29] T. Tomita, T. Sugawara and Y. Wakamoto, *Langmuir*, 2011, **27**, 10106–10112.
- [30] P. Stano, G. Rampioni, P. Carrara, L. Damiano, L. Leoni and P. L. Luisi, *BioSystems*, 2012, **109**, 24–34.
- [31] M. Kaneda, S. M. Nomura, S. Ichinose, S. Kondo, K. Nakahama, K. Akiyoshi and I. Morita, *Biomaterials*, 2009, **30**, 3971–3977.
- [32] P. M. Gardner, K. Winzer and B. G. Davis, *Nat. Chem.*, 2009, **1**, 377–383.
- [33] P. Carrara, P. Stano and P. L. Luisi, *ChemBioChem*, 2012, **13**, 1497–1502.
- [34] M. Hadorn, E. Boenzli, K. T. Sørensen, D. De Lucrezia, M. M. Hanczyc and T. Yomo, *Langmuir*, 2013, **29**, 15309–15319.
- [35] P. A. Beales and T. K. Vanderlick, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2014, **207**, 290–305.
- [36] M. Hagiya, A. Konagaya, S. Kobayashi, H. Saito and S. Murata, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 1681–1690.

- [37] Y. Sakuma, M. Imai, M. Yanagisawa and S. Komura, *Eur. Phys. J. E Soft Matter Biol. Phys.*, 2008, **25**, 403–413.

第 2 章

粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイス

2.1 はじめに

第1章でも述べてきたが、近年、マイクロ流体デバイスを活用した細胞の融合制御や長期観測、1細胞計測などの研究が急速に発展してきている[1,2]. GV に対しても、融合制御や膜タンパク質による内包物の漏出特性解析などの観点から、マイクロ流体デバイスを適用した研究が進展しつつある. しかし、細胞の場合と異なり、数マイクロメートルから数十マイクロメートルの範囲でのサイズ不均一性がデバイスの性能を下げる要因となっていた[3–6](図5). 実際に、文献[7]においてエレクトロフォーメーション法で作製されたGVの粒径の変動係数 (coefficient of variation: CV) は94%であり、サイズ不均一性が極めて大きい.

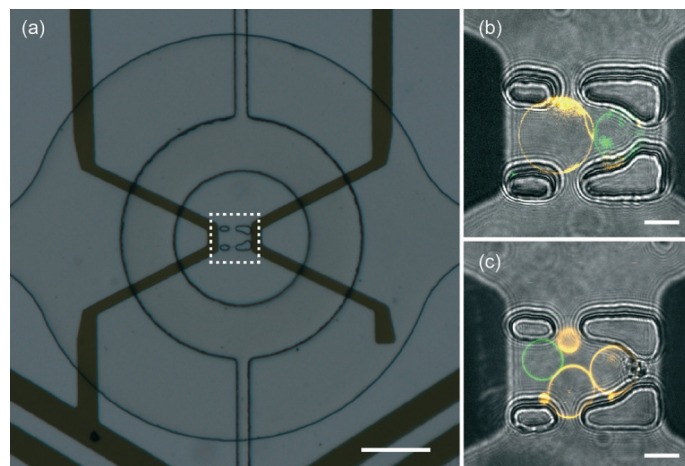


図5：マイクロ流体デバイスを用いたGVの融合制御. 文献[5]から引用. GVのサイズ不均一性により捕捉領域にて2個だけのGVを捕捉する効率は低い. スケールバー = 100 μm (a), 20 μm (b, c).

また、均一粒径GVをマイクロ流体デバイスで作製する手法も極めて多く報告されている[8–10]ものの、粒径を均一にする必要不可欠な条件として流れを安定に保つために試薬の使用条件が限られることから、GVの研究で用いるには適用範囲が限られる. 一方、多分散の粒子の分散液から目的の大きさを持つ粒子を選び取る操作は化学工学の分野で重要視されている. 中でも少量サンプルに対しては、マイクロ流体デバイスを用いて高精度な粒径選別や成分分離を行う手法が発展してきた[11]. 例えば、血液成分の迅速な分離の観点から、赤

血球や白血球に対する分離系が報告されている[12]。そこで本研究は、デバイス上流でGVを望みの粒径に絞り込み、下流で均一粒径のGVを複数空間配置することで、GV動態の観測や化学反応計測を容易とすることを着想した。

要となる粒径選別手法に関しては、外部より電場や磁場の印加が必要なアクティブな手法に比べ、それらを必要としないパッシブな手法の方が流路機能の複合化の観点から有利である。そのようなパッシブな粒径選別手法の一つとして、ピンチド・フロー・フラクショネーション法が知られている[13] (図6)。選別対象の粒子が含まれた溶液と、粒子を含まないバッファー溶液とをはじめに上流において狭い流路内 (Pinched segment) で混合した後、次の下流で急激に広い流路 (Broadened segment) へと導く。流路内に形成した層流の中で、粒子はその重心が位置する流れに沿って進行するが、Pinched segment 内では壁面との接触を通じてその重心位置が強制的に変位させられる。その変位をBroadened segment で拡大することにより、粒子を粒径に応じて異なる出射位置に導くことが可能である。このように、層流中における粒子の運動と、流路内壁や障害物との接触による重心変位を巧みに利用した粒径選別手法は、実装が簡便な粒径選別手法として利用価値が高い。一方、本研究では、GVの柔らかさを考慮して、流路内に形成された障害物との複数回の衝突を通して極めて高精度な粒径選別を実現する決定論的横置換法を採用し、粒径選別・空間配置複合型流路を設計した。

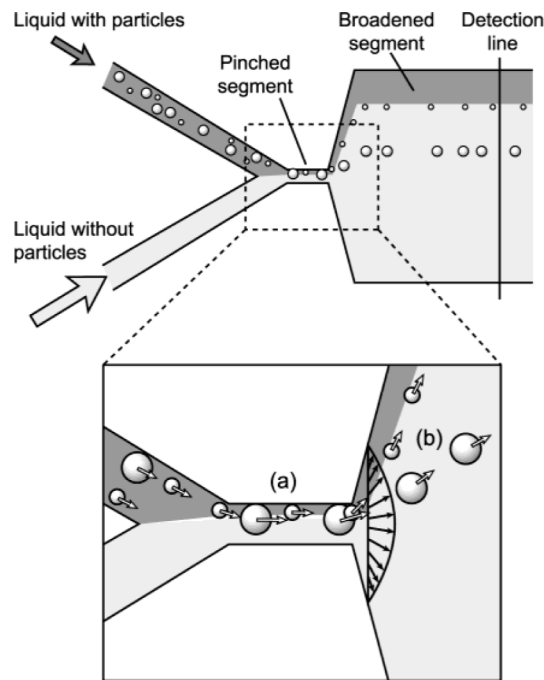


図6：ピンチド・フロー・フラクショネーション法の模式図。文献[13]より引用。

2.2 決定論的横置換法に基づく粒径選別

先に述べた決定論的横置換法 (deterministic lateral displacement: DLD) は, Huang らにより報告された粒径選別手法である[14]. 実装の簡便さと精度の高さを特徴とする流体力学的粒径選別手法であり, 剛体球であるポリスチレンビーズを用いた実験においてサブミクロンオーダーの分解能が達成されている. 概要を図7に示す.

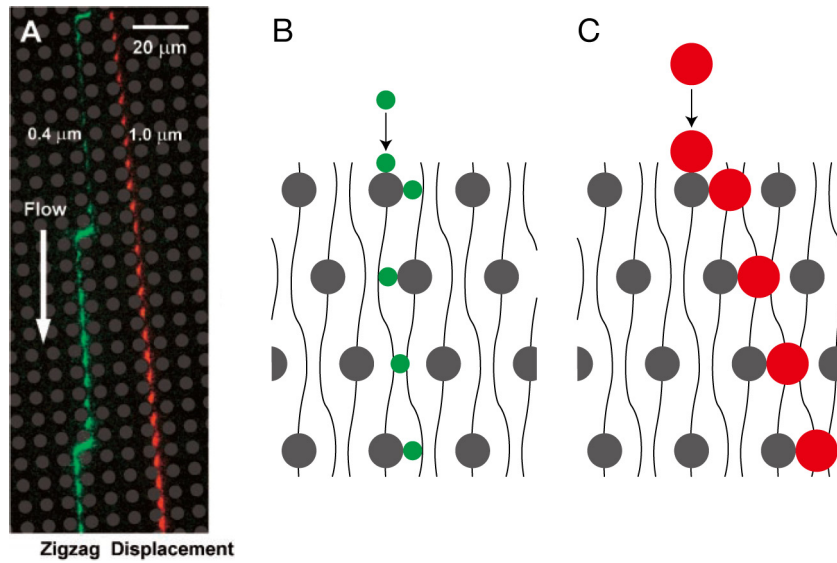


図7：決定論的横置換法(DLD)の模式図。文献[14]をもとに作成。粒径に応じて2つの進行モードが生じる(A)。境界粒径未満の粒子の進行モード(B)と境界粒径以上の粒子の進行モード(C)。

DLDは、対称な層流形成と、障害物との衝突による決定論的な重心移動を利用した粒径選別手法である。周期配置された微小柱（マイクロポスト）の中を進行する粒子の軌道は、大きく次の2つに分かれる。粒径が小さい場合、粒子はマイクロポストを迂回しながら流路への導入方向と平行に進行する。これをzigzag modeと呼ぶ（図7B）。一方で粒径が大きい場合、粒子はマイクロポストとの衝突を繰り返しながら、ポスト配置に沿って入射方向に対してある角度を持って進行する。これをdisplacement mode又はbump modeと呼ぶ（図7C）。2つの進行モードが分岐する境界の粒径（critical particle diameter: D_c ）は、マイクロポストの幾何学的な配置条件によって決定され、その理論値はInglisらによって示されている[15]。配置条件は次の通りである。空間配置の対称性から、マイクロポスト壁間には図8に示すように対称な流れ場が生成する。マイクロポストの中心間距離 λ に対する1列あたりのずれの割合をシフト率 ε と定義すると、生成する流れ場は $n = 1/\varepsilon$ 本の層流に分けて考えることができ、zigzag modeとbump modeの境界となる境界粒径 D_c はマイクロポスト壁面から最初の層流の境界までの距離 β を用いて

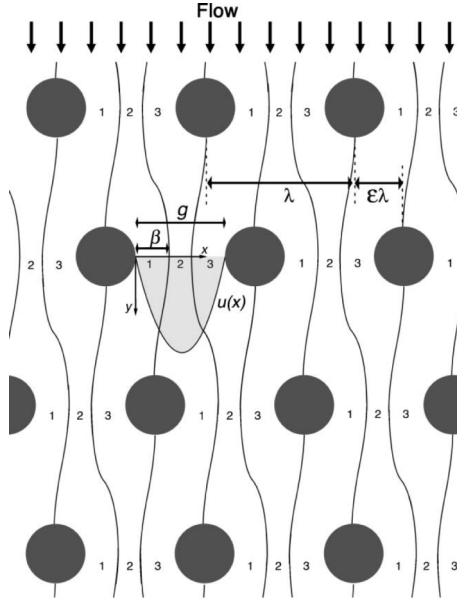


図8：マイクロポスト配置とポスト間の流れ場の模式図. 文献[15]より引用.

$$D_C = 2\beta \quad (1)$$

で与えられる．壁間に2次元の流速分布 $u(x)$ を仮定すると， n 本の各層流が運ぶ流量は一定であることから，壁間距離 g を用いて次の式が成り立つ．

$$\int_0^\beta u(x) dx = \epsilon \int_0^g u(x) dx \quad (2)$$

ただし，

$$u(x) = \left[\frac{g^2}{4} - \left(x - \frac{g}{2} \right)^2 \right] \quad (3)$$

とする．この式を β について解くことにより，

$$D_C = g \left[1 + 2w + \frac{1}{2w} \right], \quad (4)$$

$$w = \left[\frac{1}{8} - \frac{\epsilon}{4} + \sqrt{\frac{\epsilon}{16}(\epsilon - 1)} \right]^{1/3} \left(-\frac{1}{2} - i\frac{\sqrt{3}}{2} \right)$$

を得る．即ち， D_C は壁間距離 g とシフト率 ϵ を用いて一意に予測することが可能である．

2.3 流路設計

前節の DLD の設計指針を踏まえ、粒径選別と空間配置が可能な流路を図 9 のように設計した。

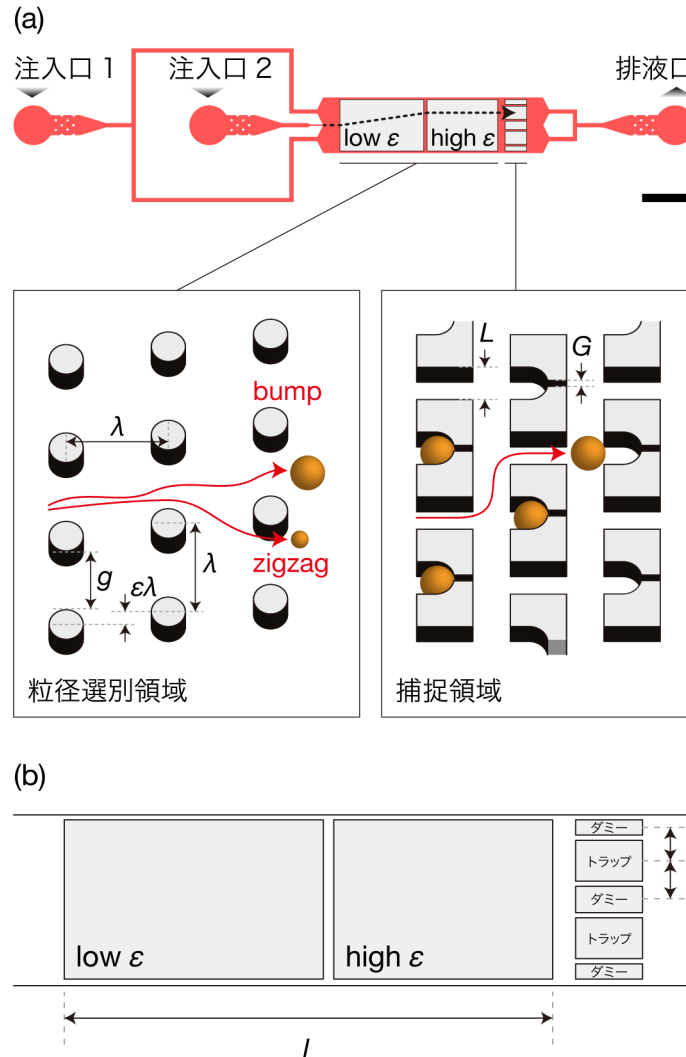


図 9：粒径選別・空間配置複合型流路の模式図。全体像(a)と流路内部のマイクロポスト配置の拡大図(b)。標的粒径の GV の軌道を破線矢印で示した。また、トラップとダミートラップの配置をそれぞれトラップ、ダミーで示した。スケールバー = 2 mm。

流路は、DLD の原理に基づき粒径選別を行う前段部（粒径選別領域）と、底部間隙を有する U 字型マイクロポスト（トラップ）により GV の捕捉を行う後段部（捕捉領域）より構成される。2 つの注入口を利用した層流形成を利用して、GV を流路中央から導入する。粒径選別領域には、配置周期の異なる 2 つ

のマイクロポスト列を張り合わせて配置した。これにより、特定の粒径範囲の GV のみが、bump mode から zigzag mode へと進行モードを変化させ、捕捉領域に導かれる。本研究では、12, 16, 20 μm の3種類を標的粒径に設定した。GV が流路内部で詰まらないように壁間距離を $g = 40 \mu\text{m}$ に固定し、式(4)よりシフト率 ε の設計指針を得た。表1に設計値を記す。本設計において、捕捉領域に導かれる GV の粒径範囲の理論値は、式(4)より標的粒径 12, 16, 20 μm の流路に対してそれぞれ 11.8–12.2, 15.7–16.6, 19.0–20.7 μm となった。

表1：粒径選別領域の設計値.

標的粒径 (μm)	low ε	high ε	g (μm)	粒径範囲の理論値 (μm)
12	1/17	1/16	40	11.8–12.2
16	1/10	1/9	40	15.7–16.6
20	1/7	1/6	40	19.0–20.7

一方で捕捉領域は、標的粒径の GV を捕捉するための U 字型マイクロポストから成る。DLD の原理から考えると、流路の中心軸に対して流れ場が対称になるように構造物を配置することが重要である。そこで、GV の捕捉用ではないが、流路の中心軸に対して対称な位置にも同様のトラップ構造を配置した。さらに、それらトラップ間、及びトラップと流路壁面の間には同じく U 字型マイクロポストから成るダミートラップを配置した (図 9b)。ダミートラップは流路全体で流体抵抗のバランスをとる観点から重要だと考えられる。例えばダミートラップがない場合、捕捉領域に流入した標的粒径の GV が、より流体抵抗の低い領域を通ることでトラップを迂回する確率が高くなり、捕捉効率の低下を招くと推測される。本設計では、標的粒径未満の GV および標的粒径以上の GV が実際に流入していることを捕捉により確認する目的で、ダミートラップの形状は標的粒径の GV 捕捉用トラップに類似の、底部間隙を有する U 字型とした。

トラップ設計においては、次の点が重要である。まず、捕捉された GV が変形を伴いながらすり抜けてしまわないように、底部間隙 G は小さく、かつ捕捉効率を高める目的でトラップ内部に流れ込む流量を一定量確保する必要がある。そこで、標的粒径 x に対して $G = x/5 - x/4$ とした。次に、粒径の大きな GV による捕捉領域の詰まりを防止しつつ、かつ前段を迂回した GV の重心が後段のト

ラップ内部に流れ込む層流に乗る確率を高くする必要がある．従って配置間隔 L は狭すぎても広すぎても不都合であり， $L = x+2$ とした．図 10 及び表 2 に，本研究で採用したトラップとダミートラップの設計値を示す．

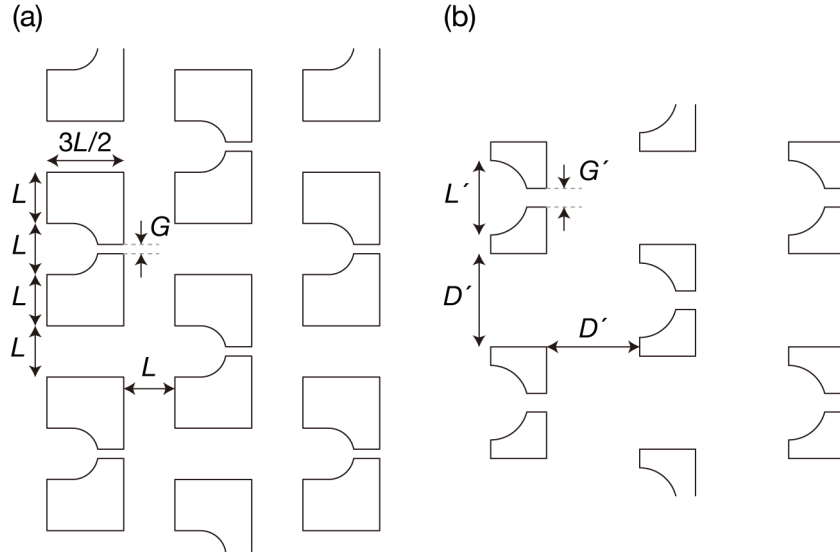


図 10：トラップの設計(a)とダミートラップの設計(b).

表 2：配置間隔，底部間隙の設計値.

標的粒径 (μm)	L (μm)	G (μm)	L' (μm)	G' (μm)	D' (μm)
12	14	3	32	8	40
16	18	4	32	8	40
20	22	4	32	8	40

また，図 9b の配置について，標的粒径の GV のみを精度よく選別するためには，流路中央のダミートラップからトラップまでの距離 m や，流路内壁近くのダミートラップからトラップまでの距離 n をなるべく大きくする必要がある．なぜなら，元の懸濁液に含まれている GV の粒径は連続的に分布しており，かつ柔らかさの影響もあり DLD において軌道が大きく分散し得るからである．一方で m や n は上流の粒径選別領域におけるポストの配置数，すなわち l に依存しており， l が大きくなり過ぎると流路長が長くなり，デバイス作製そのものが困難になる問題がある．そこで今回の設計では，標的粒径に関わらず $n = m \sim 8\lambda = 480 \mu\text{m}$ とし， $l \sim 6.24 \text{ mm}$ (標的粒径 = $20 \mu\text{m}$)， 9.12 mm (標的粒径 = $16 \mu\text{m}$)， 15.84 mm (標的粒径 = $12 \mu\text{m}$) に設定した．

2.4 マイクロ流体デバイスの作製方法

流路の設計図は MEMS 設計ソフトウェアである L-Edit MEMS (Mentor Graphics) を用いて作成した。マイクロ流体デバイスは、スタンダードなフォトリソグラフィ技術[16,17]を利用して作製した。図 11a に典型的なマイクロ流体デバイスの外観を示す。

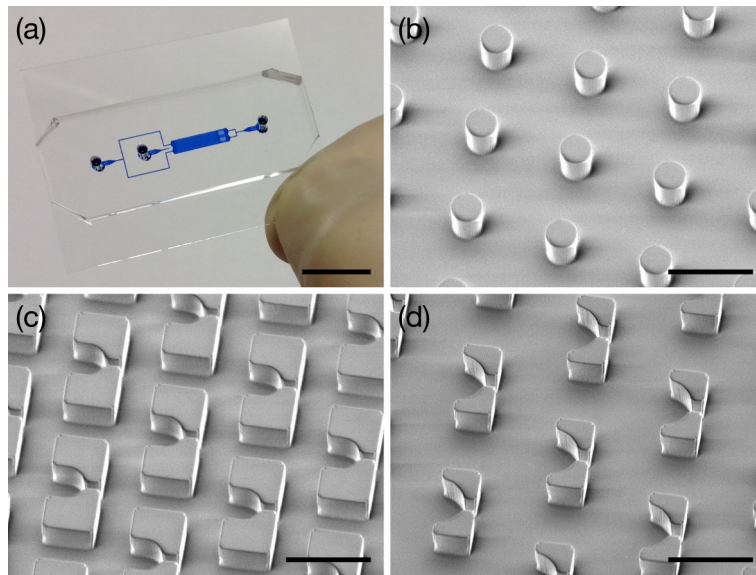


図 11：作製したマイクロ流体デバイスの外観(a)と PDMS マイクロポストの SEM 画像(b-d). スケールバー = 1 cm (a), 50 μm (b-d).

マスクレス露光装置 (Nano System Solutions, D-light DLS-50) を用いて、流路パターンに応じて透過部を有するフォトマスクを作製した。シリコンウエハー上に、エポキシ樹脂ベースのネガティブフォトレジストである SU8-25 (MicroChem) をスピコートし、熱硬化させた後に、フォトマスクから流路パターンを転写した。スピコート時の回転数（最高速度）は標的粒径に応じて設定し、標的粒径 12, 16, 20 μm に対してそれぞれ 2100, 1700, 1300 rpm とした。現像後、流路パターンに応じて微細な凹凸形状を持つ silicon/SU8-25 の鋳型が得られる。

注入口 2 のシリコンウエハー表面から測った高さを代表高さとし、鋳型の厚みを接触式表面形状測定器 (ULVAC, Dektak 6M) により測定したところ、実測値は標的粒径 12, 16, 20 μm に対してそれぞれ 14.4, 18.2, 23.0 μm となった。

作製した鋳型に対してポリジメチルシロキサン (PDMS, Dow Corning Toray) を流し込み、硬化させることで型をとった。PDMS で作製されたマイクロポストが鋳型を反映した形状であることは、走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscopy: SEM) (KEYENCE, VE-7800) を用いて確認した。典型的な SEM 画像を図 11b-d に示す。

得られた PDMS の薄片に対し、注入口、排液口を設ける穴あけ加工を施したのち、顕微鏡観察用のカバーガラス (Matsunami Glass Ind., 0.25–0.35 mm) と接合することで目的のデバイスを得た。接着は、エッチング装置 (SAMCO, FA-1) を用いて接着面に酸素プラズマを照射し、活性化することでカバーガラスと PDMS を直接接合する手法を用いた。はじめにカバーガラスのみ出力 25 W で 65 秒間プラズマ照射し、次にカバーガラスと PDMS の接合面を同時に 25 W で 5 秒間プラズマ照射した。カバーガラスと PDMS を張り合わせ、75°C で 1 時間静置することで強固に接合した。

2.5 ジャイアントベシクルの調製法と送液システム

ここでは GV の調製法を述べる。GV の構成成分には、リン脂質である 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) と 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (POPG) に加え、コレステロールを用いた。GV の膜を蛍光標識する目的で、緑色蛍光脂質である 2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (BODIPY-HPC) を用いた。POPC と POPG は日油株式会社から、コレステロールは Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から、BODIPY-HPC は Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) からそれぞれ購入した。また、フルクトース、クロロホルム、メタノールは和光純薬工業株式会社から購入した。POPC, POPG, コレステロール, BODIPY-HPC の分子構造を図 12-15 に示す。

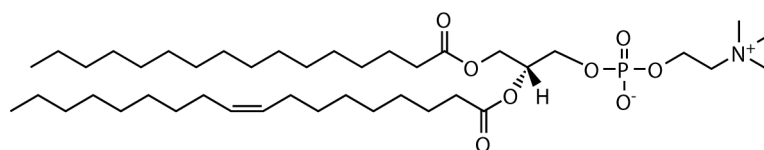


図 12 : POPC の分子構造.

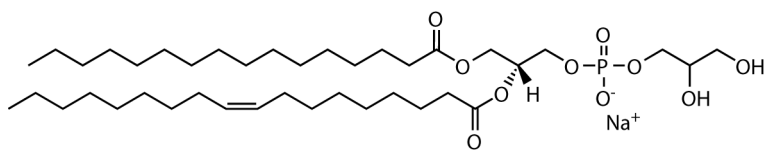


図 13：POPG の分子構造.

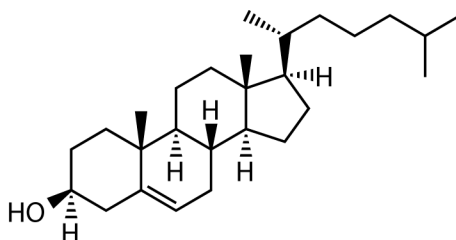


図 14：コレステロールの分子構造.

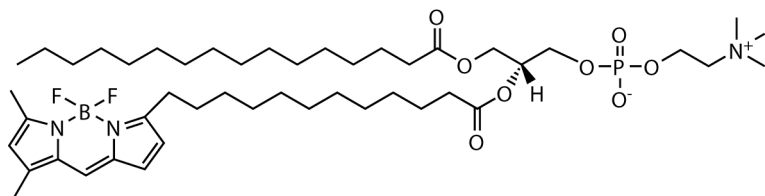


図 15：BODIPY-HPC の分子構造.

GV 懸濁液は、二分子膜の膨潤に糖を併用する Tsumoto 法[18]により調製した。GV 懸濁液を調製するための最も一般的な従来法である薄膜膨潤法[19]においては、容器壁に堆積させた脂質二分子膜の薄膜を、水を加えて膨潤させ、さらに機械的振動を加えることによりせん断することでGVを生成する(図16)。Tsumoto 法では前述の脂質薄膜に糖をドープすることにより脂質分子間の反発力を増し、一枚膜のGVが形成されやすいという利点がある。

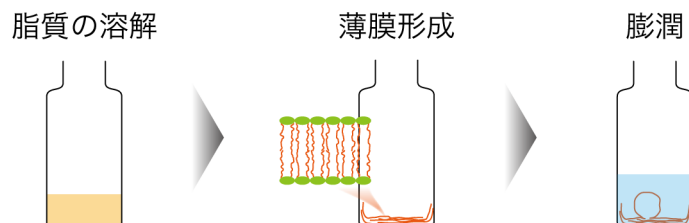


図 16：薄膜膨潤法によるGV形成の模式図.

典型的な作製プロトコルを以下に述べる。POPC, POPG, コレステロール

(Chol), BODIPY-HPC をクロロホルムに溶解したストック溶液と、フルクトース (Fru) をメタノールに溶解したストック溶液から 6 mL バイアル中に混合溶液 500 μ L を調製した (クロロホルム/メタノール = 9:1 (v/v)). ロータリーエバポレーター (EYELA, N1110V) を用いて溶媒を減圧留去し、バイアルの底部に脂質二分子膜の薄膜を形成した. その後常温で 2 時間以上減圧乾燥した.

Milli-Q 水 (Millipore reagent water system, Bedford, MA, USA) 2 mL を静かに流し入れ, 40°C に保ったインキュベーター (WAKENYAKU, MODEL 2290) 内で 20 分間静置した. その後, 弱い機械的振動を 1 時間加えることで GV の形成を促した. 膨潤後の各成分の終濃度は POPC/POPG/Chol/BODIPY-HPC/Fru = 1 mM/0.11 mM/0.11 mM/5 μ M/1 mM とした. 図 17 に本手法で作製した GV の位相差及び共焦点蛍光顕微鏡観察の結果を示した. 視野中の多くの GV (粒径 1–14 μ m) が一枚膜のものと認められ, 中には多重膜や入れ子型の GV も観察された.

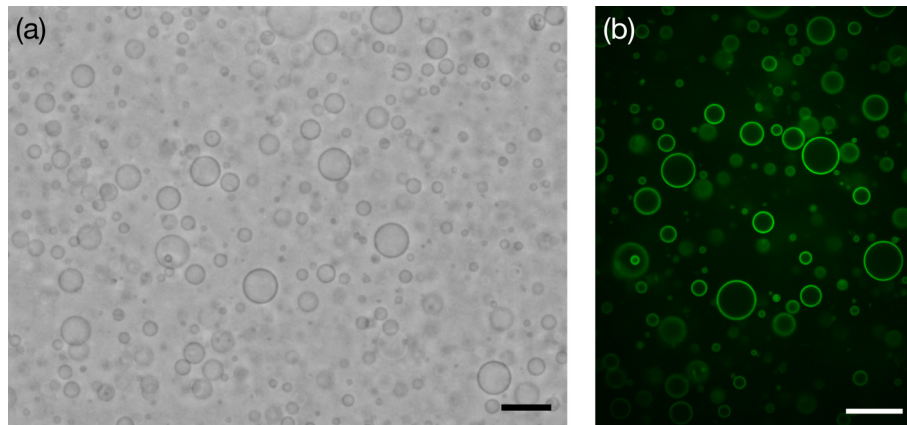


図 17: Tsumoto 法により調製した GV の観察像. 明視野像 (位相差) (a) と共焦点蛍光顕微鏡像 (b). スケールバー = 20 μ m.

得られた GV の懸濁液は, ナイロン製プレフィルター (Millipore) を用いてフィルトレーションしてから流路導入に使用した. 標的粒径 12, 16 μ m のデバイスに対しては孔径 20 μ m, 標的粒径 20 μ m のデバイスに対しては孔径 30 μ m のナイロン製プレフィルターを用い, 大きな粒径の GV を予め取り除くことで流路内での詰まりを防いだ.

マイクロ流体デバイスを中心とした送液システムの概要を図 18 に示す. GV の流路導入にあたっては, 2 台のシリンジポンプ (Harvard Apparatus, Pump

11 Pico Plus Elite) を用いて, GV 懸濁液とバッファー溶液 (外部溶液) それぞれの流量を独立に制御した. シリンジポンプ 1 に外部溶液を封入した 2.5 mL ガラスシリンジを, シリンジポンプ 2 に GV 懸濁液を封入した 250 μ L ガラスシリンジをそれぞれ取り付けた. 外部溶液は GV 懸濁液と等張な条件のフルクトース水溶液 (1 mM) とし, 各シリンジ-デバイス間の接続には内径 0.50 mm の ETFE チューブ (株式会社島津ジーエルシー, JR-T-082-M10) を使用した.

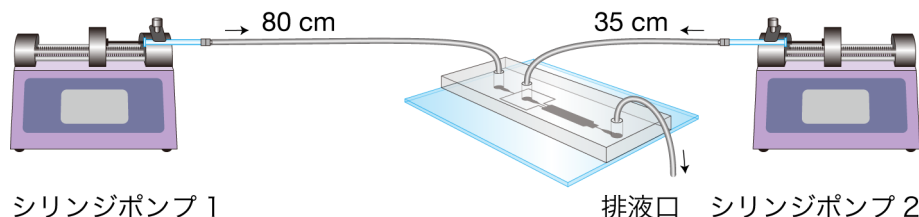


図 18: 送液システムの全体像.

2.6 観察条件と粒径評価のための画像解析の手順

GV の観察には倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus, IX71) を用いた. 捕捉された GV の粒径解析には冷却 CCD カメラ (Olympus, DP72) により取得した落射蛍光顕微鏡像を用いた (Ex. 460–495 nm, Em. 510–550 nm). また, ダミートラップに捕捉された標的粒径未満の GV の粒径解析には共焦点スキャナユニット (Yokogawa Electric, CSU22) と sCMOS カメラ (Andor, Zyla) によって取得した共焦点蛍光顕微鏡像を用いた (Ex. 488 nm DPSS Laser, Em. 500–550 nm).

粒径解析には, オープンソースの画像処理ライブラリである OpenCV[20]を利用し, 作成したプログラムを用いた. プログラムを含めた解析のワークフローは次の通りである. まず, 撮影画像に対し, 2 値化処理を適用することで膜を含む GV の内部領域を抽出した. 次に, OpenCV の輪郭抽出関数によって輪郭を抽出し, その輪郭によって囲まれる面積から平均粒径を算出した. マイクロポストに付着した蛍光脂質などの影響でプログラムによる輪郭抽出が正しく働かない数例に対しては, Photoshop (Adobe, CS6) の長方形選択ツールを使用し, 手作業により GV の直径を計測した.

画像解析の手法の違いによる算出粒径の差異を調査する目的で, Image J を用いた手作業での粒径解析も同時に行った. その場合には, 捕捉された各々の GV に対し, 目視により最外膜になるべく peak to peak でフィットするよう楕

円ツールを利用して輪郭を描き、その輪郭によって囲まれる面積から平均粒径を算出した。

マイクロポスト衝突時の GV の変形率の計測には、倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus, IX71) に搭載した高感度高速度カメラ (Photron, Focuscope) により 2000 fps で取得した落射蛍光顕微鏡像を用いた (Ex. 460–495 nm, Em. 510 nm). 低 ε の粒径選別領域前段部を bump mode で進行する GV のうち、標的粒径近傍の GV を対象に、取得画像からその変形率を評価した。GV の進行方向に対して垂直な方向を代表高さとし、マイクロポストへの衝突前の GV の粒径と、マイクロポスト迂回時のポスト壁面から GV の外膜にかけて測った実効粒径をそれぞれ Photoshop (Adobe, CS6) の長方形選択ツールを使用し計測した。ここでは、マイクロポスト衝突前の GV の粒径に対する迂回時の粒径の減少分の割合を変形率と定義した。

2.7 ジャイアントベシクルの粒径選別と空間配置

Tsumoto 法[18]を用いて調製した粒径の不均一な GV を用いて、3 種類の標的粒径に対する原理確認と性能評価を行った。高流量での導入は、捕捉後の GV の破裂を引き起こす。そこで、はじめに外部溶液と GV 懸濁液の設定流量（それぞれ Q_1, Q_2 とする）を $(Q_1, Q_2) = (1300 \mu\text{L/h}, 300 \mu\text{L/h})$ に設定して導入を開始したのち、徐々に $(Q_1, Q_2) = (330\text{--}350 \mu\text{L/h}, 30 \mu\text{L/h})$ に減少させることで捕捉後の GV の安定化を図った。

$(Q_1, Q_2) = (330\text{--}350 \mu\text{L/h}, 30 \mu\text{L/h})$ において安定な層流が形成した時刻を 0 分として、捕捉領域の経時変化を追ったところ、次々に均一粒径の GV が流入し、トラップを占有していく様子が観察された。そこで、トラップと 1 対 1 対応する GV が最も多くなった時刻において粒径解析を行うことで、本デバイスにおける粒径選別の精度を評価した。

OpenCV を用いて粒径解析を行ったところ、標的粒径 12, 16, 20 μm に対してそれぞれ平均粒径 13.8, 17.7, 22.1 μm , CV は 5% ($n = 154$), 10% ($n = 105$), 12% ($n = 67$)を得た。各標的粒径に対応する蛍光顕微鏡像を図 19a, c, e に、粒径分布を図 19b, d, f に示した。

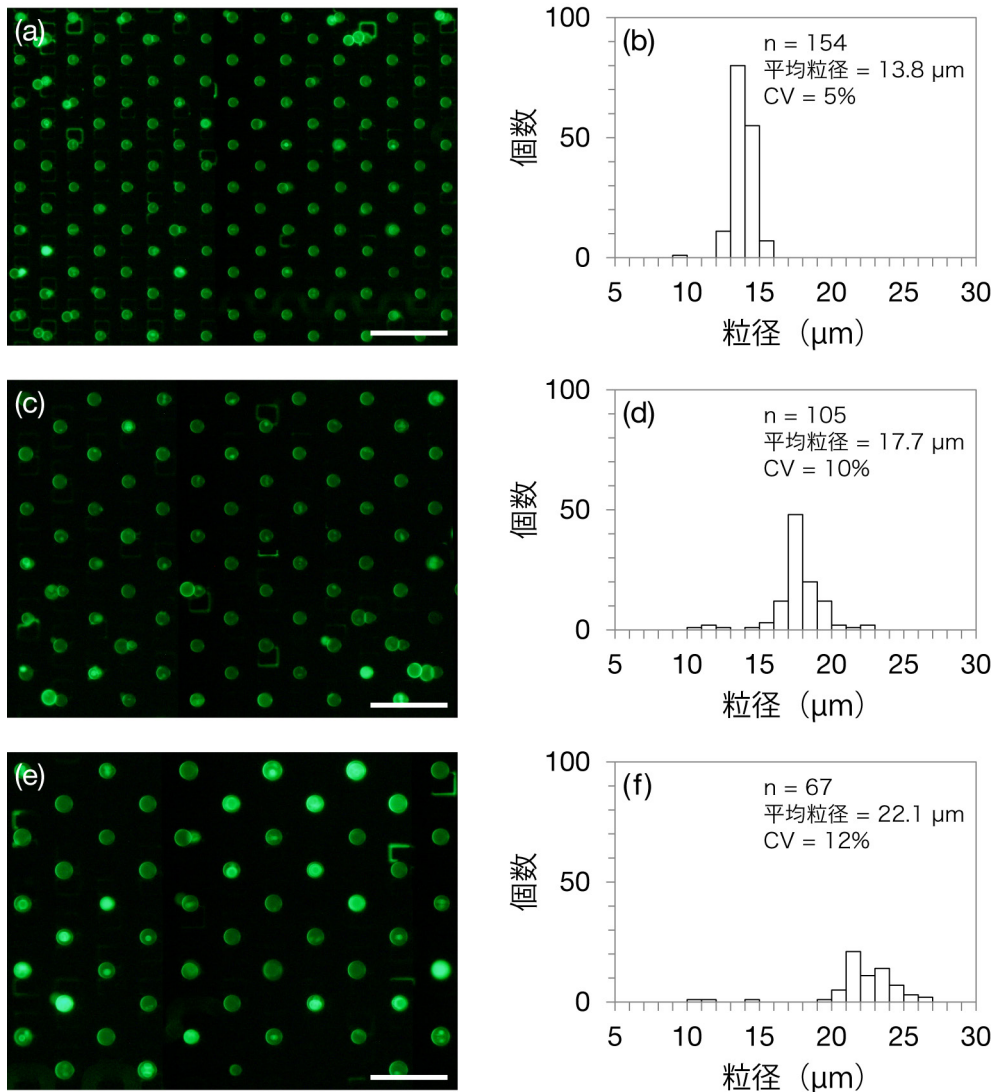


図 19：捕捉された GV の蛍光顕微鏡像と粒径分布（OpenCV による）。標的粒径 = 12 μm (a, b), 16 μm (c, d), 20 μm (e, f). スケールバー = 100 μm.

粒径解析の結果をまとめたものが表 3 である．表 3 には，評価時刻や流路の高さ，捕捉効率の情報も併記した．blank traps, successful traps, error traps はそれぞれ GV が含まれないトラップ，GV が 1 つだけ捕捉されたトラップ，2 つ以上の GV が捕捉されたトラップの数を表し，トラップの配置数に対する successful traps の割合から捕捉効率を算出した．評価時刻は GV 導入を行う時間の長さに対応し，捕捉効率に大きな影響を与えることが分かった．GV 捕捉数や捕捉効率の時間変化については第 10 節において改めて詳細に議論する．さらに，捕捉効率と流路の高さも密接な関係にあることが分かった．標的粒径に

比べて流路の高さが十分に高いデバイスを用いたところ、GV がトラップ内部で上下方向に積み重なるエラーが多く観察された。従って、流路の高さ H は GV がトラップ入射部で詰まらない程度に低いことが望ましく、ここでは標的粒径 x に対して $H = x+2-x+3$ とした。ところで、このような設計のもとでは、粒径が H 以上の大きな GV による流路導入直後の詰まりが懸念される。実際に、剛体球であるポリスチレンビーズを用いて実験したところ、流路導入直後の領域において粒径が H 以上のビーズによる詰まりを生じ、デバイスは機能しなかった。しかし GV を用いた実験において、このような詰まりは観察されなかった。これは、粒径が H 以上の GV についてはパンケーキ型の形状で押しつぶされながら流路内部を進行できることを示している。つまり、次節以降でも述べる GV の柔らかさが利点となり、本デバイスにおいては GV の捕捉効率を第1に考慮した、粒径選別と空間配置の簡便な複合化が達成されたと解釈できる。

表3：粒径解析結果のまとめ。

標的粒径	12 μm	16 μm	20 μm
評価時刻	20分	70分	40分
流路の高さ	14.4 μm	18.2 μm	23 μm
トラップの配置数	240	160	96
blank traps	14	15	13
successful traps (捕捉効率)	154 (64%)	105 (66%)	67 (70%)
error traps	72	40	16
平均粒径 (CV)	13.8 μm (5%)	17.7 μm (10%)	22.1 μm (12%)

一方で、算出粒径の差異を調べるため、Image J を用いて粒径解析を行ったところ、標的粒径 12, 16, 20 μm に対してそれぞれ平均粒径 13.1, 17.0, 21.3 μm , CV は 5% ($n = 154$), 10% ($n = 105$), 12% ($n = 67$)を得た。各標的粒径に対応する粒径分布を図 20a, b, c に示した。OpenCV での解析結果に比べ、同一の CV が得られた一方、平均粒径はやや小さい方向へシフトする結果が得られた。これは、OpenCV が2値化によって最外膜のやや外側を検出しているのに対し、ImageJ を用いた場合は目視によってなるべく peak to peak になるように膜の部分を検出していることが原因と考えられる。しかしながら、捕捉された GV の粒径が理論値より大きくなる傾向は変わらなかった。捕捉された GV の粒径がなぜ理論値より大きくなったかについては、次節より詳細に議論する。

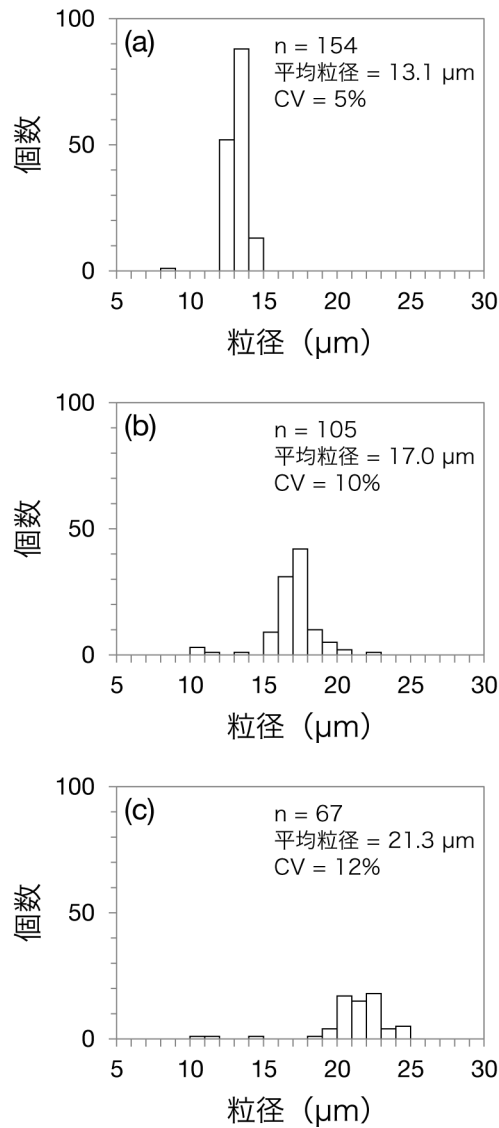


図 20：捕捉された GV の粒径分布 (Image J による). 標的粒径 = 12 μm (a), 16 μm (b), 20 μm (c).

DLD が設計通りに機能していることを確認するため、ダミートラップによって捕捉された GV の粒径を計測した. 捕捉された標的粒径未満, 標的粒径以上の GV の蛍光顕微鏡像を図 21 に示す. 図 21 には, 典型例として標的粒径 12 μm のデバイスを用いた場合の撮影像を示した. 図 22, 図 23 に標的粒径未満, 標的粒径以上の GV の粒径分布をそれぞれ示す.

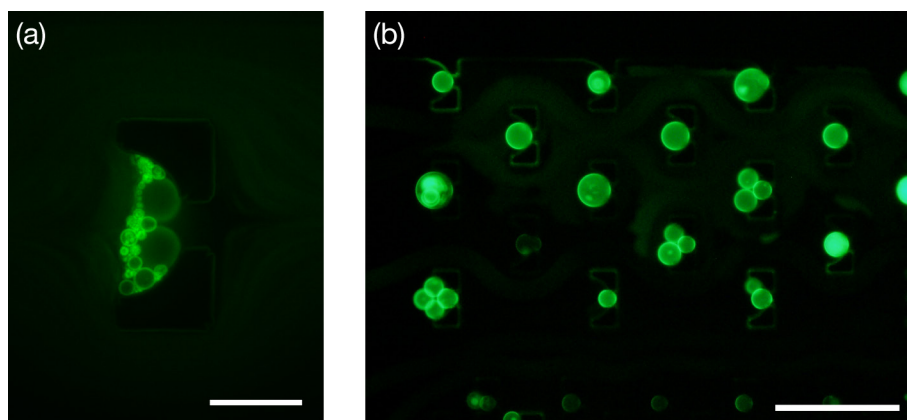


図 21：ダミートラップに捕捉された標的粒径未満(a)と標的粒径以上(b)の GV. スケールバー = 20 μm (a), 100 μm (b).

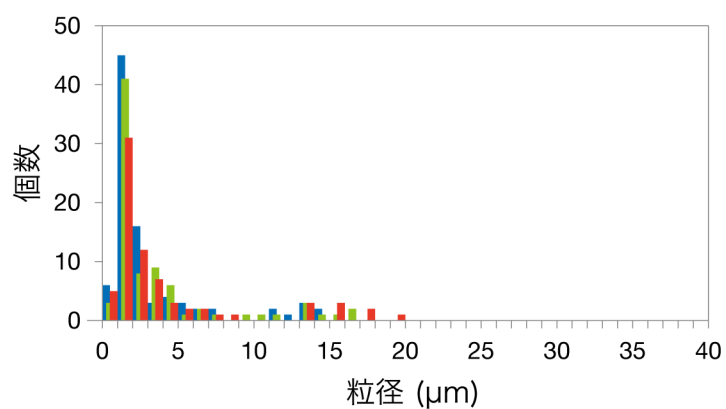


図 22：標的粒径未満の GV の粒径分布. 標的粒径 = 12 μm (青), 16 μm (緑), 20 μm (赤).

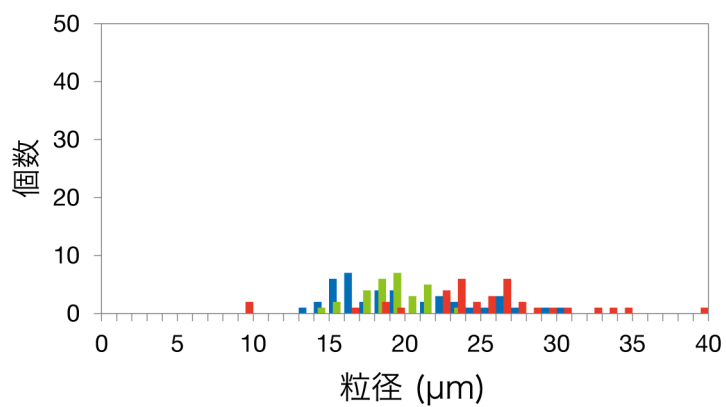


図 23：標的粒径以上の GV の粒径分布. 標的粒径 = 12 μm (青), 16 μm (緑), 20 μm (赤).

図 22, 図 23 より, 流路中央の層流が通過する領域において標的粒径未満の GV が, 中央の層流から最も離れた領域において標的粒径以上の GV が捕捉されており, DLD による粒径選別がほぼ設計通りに行われていることが確認できた. 標的粒径が 20 μm の場合に 30 μm を超える大きな GV が観測されたが, これは孔径 30 μm のナイロン製プレフィルターを用いたことを反映している.

以上の結果は, 連続的な DLD により GV を高精度で粒径選別可能であることを示している. 均一直径の孔を有するフィルターを使用し, GV をふるいにかける従来の方法で得られる CV が 15–30% 以上[21,22]であることを考慮すると, 本デバイスを用いることで GV において 12% 未満の CV を達成したことは意義深い. 特に, 標的粒径 12 μm のデバイスにおいて単分散の指標でもある 5%[23]の CV を達成したことから, 均一粒径の GV を用いた統計解析等のアプローチに対し, 本デバイスは有力なツールになることが期待される.

2.8 形状や柔らかさを利用した分離, 選別手法

以上の実験結果から, GV についてもマイクロ流体デバイスを用いて高精度な粒径選別を行う手法を構築できたとと言える. トラップに捕捉された GV の平均粒径は, 3 種類の標的粒径のデバイスについていずれも設計値より大きくなる傾向であった. 第 1 の要因として, マイクロ流体デバイスの製造誤差が挙げられる. 明視野顕微鏡像をもとに, マイクロポストの壁間距離 g を測定したところ, ほぼ設計通りの値であることが確認できた (表 4). この結果は, マイクロ流体デバイスの製造誤差は GV の選別粒径のずれの主要因ではないことを示す.

表 4: マイクロポストの壁間距離 g の実測値 ($n = 20$).

標的粒径 (μm)	g (μm)
12	39.9 ± 0.1
16	39.7 ± 0.2
20	39.7 ± 0.2

そこで次に, 高感度高速度カメラを用いてマイクロポスト衝突時の GV の変形挙動を観察し, その変形率から粒径選別に関する実験結果を考察した. マイ

クロポスト衝突前後の典型的な GV の顕微鏡像を図 24 に示す。マイクロポストへ押し付けられるようにして GV の膜の一部が変形し、つぶれた形状をとりながら迂回する様子が観察された。流量に対する変形率の違いを計測する目的で、 $(Q1, Q2) = (600 \mu\text{L/h}, 90 \mu\text{L/h}), (900 \mu\text{L/h}, 180 \mu\text{L/h}), (1300 \mu\text{L/h}, 300 \mu\text{L/h})$ の 3 種類の設定流量のもと測定を行った。3 種類の設定流量に対し、それぞれ 10 個の GV について変形率を算出した結果を表 5 に示す。流量が大きくなるほど変形率が増加する傾向が得られた。特に、 $(Q1, Q2) = (1300 \mu\text{L/h}, 300 \mu\text{L/h})$ に設定した際の変形率は $10.1 \pm 3.2\%$ に達し、GV の変形が DLD に大きく寄与し得ることが分かった。粒径評価の実験結果より、同じ標的粒径 $12 \mu\text{m}$ のデバイスに対し、OpenCV による解析では $13.8 \mu\text{m}$ 、ImageJ による解析では $13.1 \mu\text{m}$ を平均粒径とする GV が捕捉されている。標的粒径が $12 \mu\text{m}$ であることを考慮すると、ここから粒径選別領域通過時の変形率が推定でき、それぞれ 13.0% 、 8.4% となった。これを表 5 の変形率と比べると、比較的高流量での変形率に相当することが分かった。粒径評価の実験においては初期に流量を $(Q1, Q2) = (1300 \mu\text{L/h}, 300 \mu\text{L/h})$ に設定して GV の導入を開始したのち、徐々に $(Q1, Q2) = (330\text{--}350 \mu\text{L/h}, 30 \mu\text{L/h})$ に減少させることで捕捉後の GV の安定化を図った。今回の変形率の測定結果から、捕捉領域に観察された GV の多くが高流量条件のもと捕捉されたものであることが分かった。これは、捕捉効率の評価実験において、測定開始時に既に多くのトラップが GV によって占有されていた事実と整合する。つまり、本デバイスの特徴として、次の事実が明らかになった。まず、GV の膜の柔らかさは DLD の原理に確かな影響を及ぼしており、より正確な標的粒径の設定のためには、その柔らかさによる補正因子も加味した粒径選別領域の設計が必要である。さらにその補正因子は、GV 捕捉時の設定流量に依存して変化する。定常的に低流量条件のもとデバイスを運用することで、GV の変形の影響を抑制することは可能であるが、均一粒径 GV のアレイ生成までに長時間を要する。一方で高流量条件のもと GV を捕捉することにより短時間で GV のアレイを生成できるが、流量の増加に伴い GV の変形率も増大するため、注意が必要である。

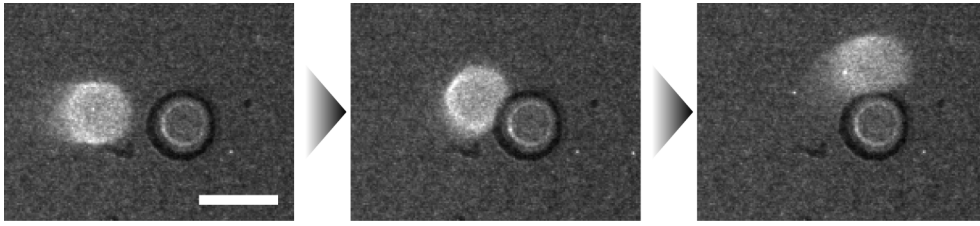


図 24：マイクロポスト衝突前後の GV の顕微鏡像。2.5 ms 毎の連続写真を示した。
標的粒径 = 12 μm のデバイスを用いた。スケールバー = 20 μm 。

表 5：3 種類の設定流量に対する GV の変形率 ($n = 10$)。

(Q1, Q2)	変形率 (%)
(600 $\mu\text{L/h}$, 90 $\mu\text{L/h}$)	4.2 ± 1.9
(900 $\mu\text{L/h}$, 180 $\mu\text{L/h}$)	6.0 ± 2.1
(1300 $\mu\text{L/h}$, 300 $\mu\text{L/h}$)	10.1 ± 3.2

一方で、この実験結果は次のような意義も持ち合わせている。例えば、柔らかい細胞のみがマイクロポストの間をすり抜けられることを利用した細胞選別手法が提案されている[24,25]。Preira らは、徐々に間隙が小さくなる多段階のフィルター構造をマイクロポストを用いて作製し、固い細胞と柔らかい細胞を分離した。本研究において採用した決定論的横置換法についても、マイクロポストへの衝突時に細胞がその形状や柔らかさの差異により異なる挙動を示すことが、実験と理論の両面から指摘されてきた[26–29]。特に、Beech らによる赤血球を用いた研究が興味深い。図 25 にその概要を示した。正常赤血球 (Discocyte) に加え、薬剤処理により形状や柔らかさが異なるウニ状赤血球 (Echinocyte) と有口赤血球 (Stomatocyte) を作製した (図 25B)。マイクロポスト迂回時の変形により、柔らかい赤血球は実効粒径が変化する (図 25C)。また、形状の非対称性から、流路の高さによってもマイクロポスト迂回時の実効粒径が変化する (図 25D)。重要なことは、粒径の差異を利用して軌道を分離する従来の DLD に対し、形状や柔らかさの差異を反映した新たな選別の概念を追加し、提唱していることである。

赤血球に比べ、GVの方が膜の曲げ弾性係数がおよそ1桁小さいことが知られている[30,31]。即ち、GVの膜の柔らかさもDLDの原理に対して十分作用し得ることを本実験結果で明らかにできたと言える。粒径のみならず形状や柔らかさを利用したGV選別系の構築に向け、有用な知見となるだろう。

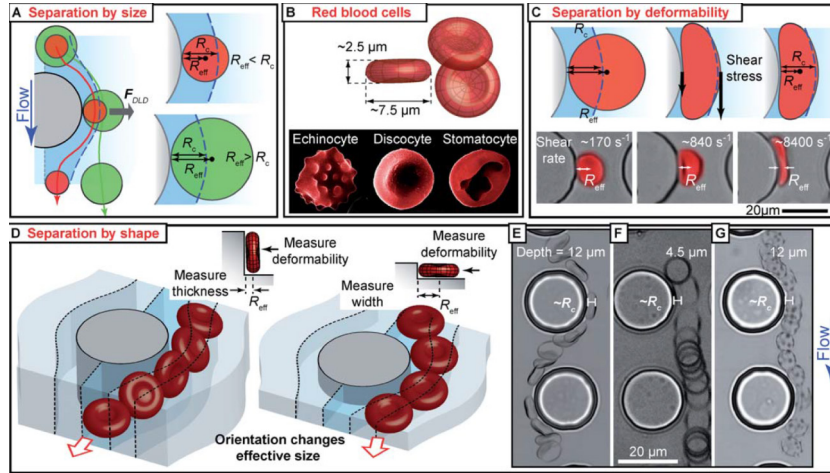


図 25：形状と柔らかさの差異を利用した赤血球の分離. 文献[26]より引用. 粒径の差異を利用した従来法の模式図(A). 赤血球の形状の模式図(B). 柔らかさの差異を利用した分離の模式図(C). 形状の差異を利用した分離の模式図(D). マイクロポスト迂回時の赤血球の高速度カメラ画像(E-G).

2.9 膜の柔らかさの推定

マイクロポスト衝突時に細胞や GV のような弾性体がどのような変形挙動を示すかについては、数値計算による研究例が多い. 例えば Zhu らは、マイクロポスト衝突時の変形挙動がキャピラリー数 Ca によって特徴付けられることを示し、 Ca に応じて弾性体がマイクロポスト迂回後に異なる軌道をとることを数値計算により示した[28] (図 26). ここで、 Ca は次の式で表される無次元数であり、 μ , U , G_s はそれぞれ粘性抵抗、流れ場の速度、弾性体のせん断弾性係数である.

$$Ca = \mu U / G_s \quad (5)$$

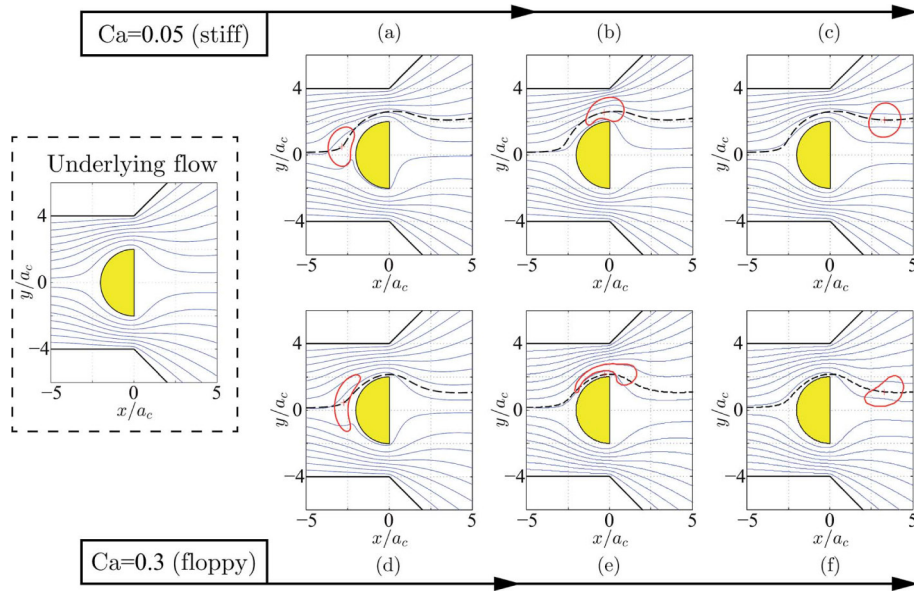


図26：キャピラリー数 Ca の差異によるマイクロポスト迂回時の変形挙動の違い．文献[28]から引用．

細胞や GV の柔らかさの指標として，多くの文献では膜の曲げ弾性係数 G_b が用いられるが， G_s と G_b の間には次の関係がある．

$$G_b = C_b a_c^2 G_s \quad (6)$$

ここで， a_c は弾性体の半径， C_b は定数であり，GV や赤血球の場合の典型値は 0.01–0.36 である[32]．

そこで，今回観測されたマイクロポスト衝突時の GV の変形率から GV のせん断弾性係数を推定し，その結果をもとに式(6)より GV の膜の曲げ弾性係数を見積もることでその柔らかさを評価した．

図26b より $Ca = 0.05$ の弾性体がポストを迂回する時の変形率は約27%と見積られた．本研究で用いた GV は変形率がこれより小さかったため， $Ca < 0.05$ と推測される．図24に示した典型的な GV について，高感度高速度カメラの撮影像から GV の進行速度を求めると， $U = 6.8 \text{ mm/s}$ であった．従って，式(5)より GV のせん断弾性係数 G_s が推定でき，少なくとも

$$G_s > 1.4 \times 10^{-4} \text{ N/m}$$

が成り立つ．ただし，水の粘性抵抗として $\mu = 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ を用いた[32]．GV の平均半径として $a_c = 7 \text{ }\mu\text{m}$ を用いると，式(6)より

$$G_b > 7 \times 10^{-17} \text{ N}\cdot\text{m}$$

が成り立つ。ただし、 $C_b = 0.01$ とした。これは、一般的に報告されている GV の文献値[30]が 10^{-19} – 10^{-20} のオーダーであることを考慮すると、異常に大きな値である。これは、負電荷を持つ POPG とマイクロポストとの間の静電相互作用に基づく反発力が原因だと推測した。そこで次に、Yamazaki 法[33]を用いて作製した POPG を含まない GV について、粒径選別領域通過時の顕微鏡像を用いて同様に曲げ弾性係数 G_b を見積もった。Yamazaki 法は、Tsumoto 法が糖を用いるのに対し、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を担持した脂質を用いることで、PEG どうしの立体反発力を利用して一枚膜の GV が形成されやすくする。Yamazaki 法で作製した GV に対して測定を行ったところ、 $a_c = 11 \mu\text{m}$, $U = 88 \mu\text{m/s}$ の条件の下、変形率は約 18%であった。従って、

$$G_b > 2 \times 10^{-18} \text{ N} \cdot \text{m}$$

と推定され、下限の値は Tsumoto 法で作製した GV より 1 桁小さい値となった。以上の結果から、Tsumoto 法で作製した GV とマイクロポストの間には静電相互作用に基づく反発力が生じており、見かけ上の曲げ弾性係数が異常に大きくなっている可能性が示唆された。実際に、POPC で作製された直径 100 nm 未満の一枚膜ベシクル (smaller unilamellar vesicle: SUV) はガラス表面で自発的に破裂展開されて脂質二分子膜を形成するのに対し、POPG のように負電荷を持つ脂質を用いた SUV はガラス表面との静電相互作用のため容易には破裂展開されないことが知られている[34]。Wang らは、POPG を含む GV に対して、基板表面との静電相互作用を適切に調節することで接触時の力学的ストレスを緩和できることを示した[35]。ガラスとの接合時の酸素プラズマ照射に伴い、PDMS 表面にガラス表面に類似の SiO_x 構造が生じる[36]ことと考え合わせると、GV とマイクロポストの間にも同様の静電反発力が働くことが推測される。本研究では、決定論的横置換法 (DLD) に基づき粒径選別領域を設計した。そのため、GV は捕捉領域に導かれるまでに何度もマイクロポストと衝突することになる。これは、GV にとっては強い力学的ストレスとなり、一般に曲げ弾性係数の小さい GV はそのほとんどが粒径選別時に破裂する可能性が高い。対して上記の結果は、負電荷を持つ脂質を混合し、脂質膜とマイクロポスト間の静電相互作用を高めることで、見かけ上の曲げ弾性係数を著しく向上できることを示している。様々な膜組成の GV とマイクロポスト表面との相互作用を更に詳細に研究することで、マイクロ流体デバイスを用いて GV を取り扱

う上での重要な知見が得られるだろう。

2.10 捕捉効率

均一粒径の GV を用いた各種測定を効率よく進める上で、トラップと 1 対 1 対応する GV のアレイを高効率で生成することが極めて重要である。ここでは、全配置トラップの内、GV と 1 対 1 対応するものの割合を捕捉効率とし、これを最大にすることを考える。Skelley らは、1 対の細胞ペアのアレイを、マイクロ流体デバイスを用いることで大量に生成し、その融合過程を同時並列に観測することに成功した。その報告の中で、トラップの幾何学的配置条件と捕捉効率との関係について論じている[1]。細胞や GV 等の対象物を効率よく捕捉するためには、トラップの配置間隔をなるべく密に設定することが望ましい。しかし、密に配置することで細胞や GV がトラップ間に詰まるリスクは増大する。Skelley らは、捕捉効率の向上とトラップ間における詰まりの抑制の双方の要求を満たすために、図 27 右の配置条件を採用した。前段のトラップを迂回した細胞が後段のトラップに捕捉されやすくするために細胞の導入方向に対して垂直な方向の配置間隔を狭くし、かつトラップ間における詰まりを抑制するために細胞の導入方向に対して平行な方向の配置間隔は大きくした。本研究では細胞よりも柔らかい GV を捕捉対象とするため、捕捉効率の向上を優先した最も密な配置条件を採用した。実際に、図 10 および表 2 の配置条件でトラップ間に定常的な詰まりが生じないことは実験によって確認された。本研究ではさらに、捕捉効率が観察時刻によっても変化することを見出し、その特性を評価した。

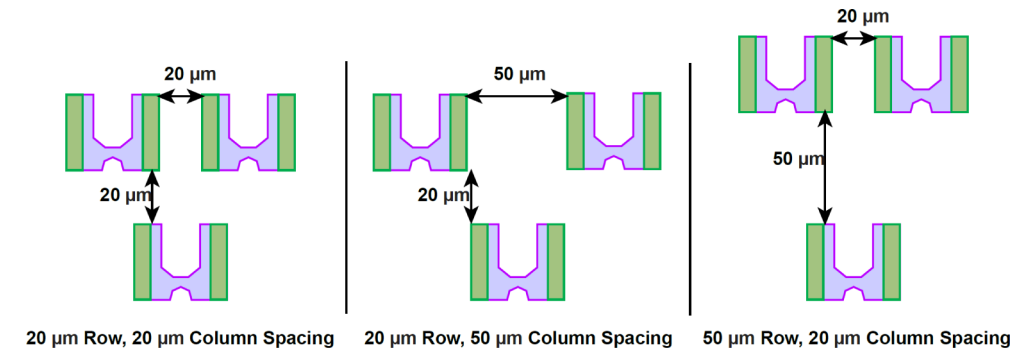


図 27：Skelley らが検証した 3 種類のトラップ配置条件。文献[1]より引用。

デバイスへのGV導入を開始したのち、 $(Q1, Q2) = (330\text{--}350\ \mu\text{L/h}, 30\ \mu\text{L/h})$ の流量条件に設定した時刻を0分とし、捕捉領域の時間変化を追跡した。各トラップの状態を次の3種類に分類してグラフに表したものが図28である。

1. GVが含まれないトラップ (blank traps, 三角, 破線).
2. GVが1つだけ捕捉されたトラップ (successful traps, 丸, 実線).
3. 2つ以上のGVが捕捉されたトラップ (error traps, 四角, 実線).

青, 緑, 赤の各色は, それぞれ標的粒径 12, 16, 20 μm のデバイスを用いた実験結果に対応する。また, 第7節の粒径解析は図28中白丸で示した時刻における撮影画像を用いて行った。

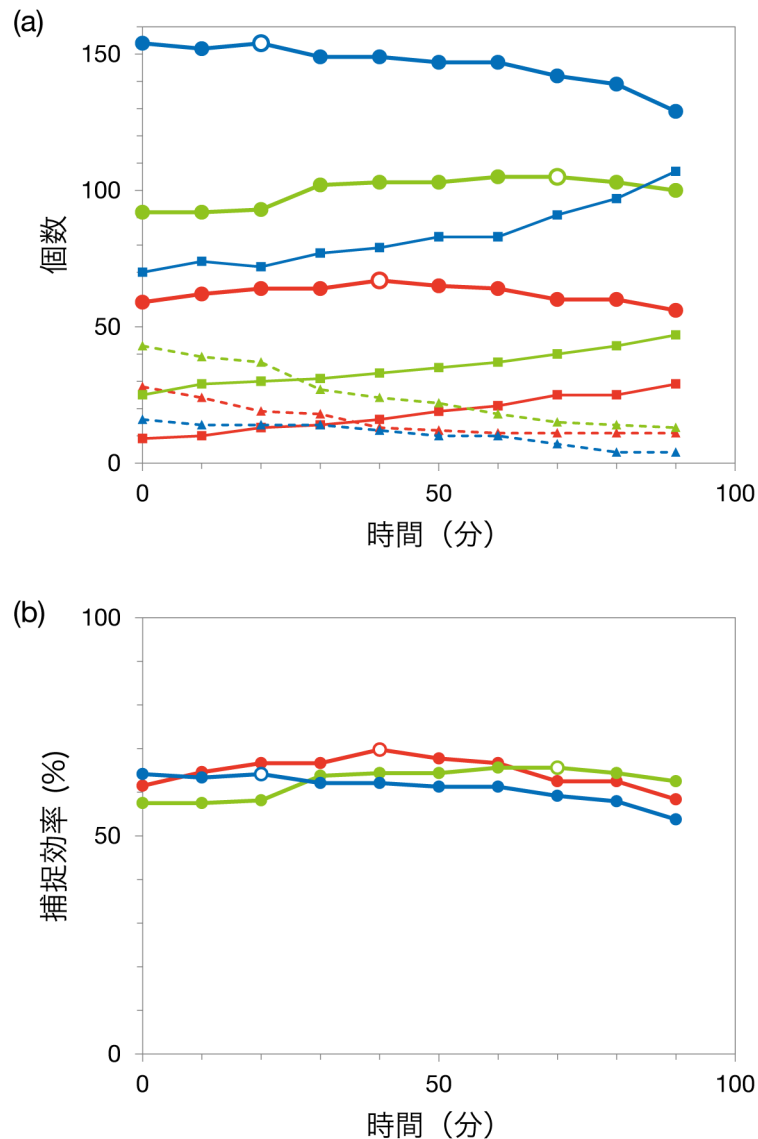
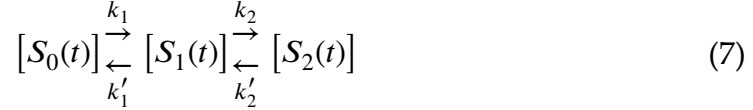


図 28 : GV 捕捉数の時間変化(a)と捕捉効率の時間変化(b). 標的粒径 = 12 μm (青), 16 μm (緑), 20 μm (赤). 破線 (三角), 実線 (丸), 実線 (四角) はそれぞれ blank traps, successful traps, error traps に対応する.

図 28 より, 時間経過に伴い blank traps の数は単調に減少し, error traps の数は単調に増加することが分かった. successful traps の数もまた観察時刻に依存して変化し, 標的粒径 12 μm のデバイスにおいては観察時間内において減少傾向であり, 標的粒径 16 μm のデバイスにおいては増加傾向であった. 一方で標的粒径 20 μm のデバイスにおいては, はじめ増加したのち減少に転じる挙動が見られた. 総じて観察開始から 70 分以内に捕捉効率は最大値を取り, 標的粒

径が12, 16, 20 μm のデバイスに対して最大捕捉効率はそれぞれ64, 66, 70%であった。

各トラップの状態の変遷をより詳細に理解するために、式(7)に示すモデルを立てその挙動を検証した。



ここで、 $[S_0(t)]$, $[S_1(t)]$, $[S_2(t)]$ はそれぞれ blank traps, successful traps, error traps の各状態にあるトラップの割合を表す。すなわち、 $[S_0(t)]$ から $[S_1(t)]$ を経て $[S_2(t)]$ に遷移し、その遷移は可逆な過程であると仮定する。この仮定の下、各状態の割合の時間変化率は式(8)により定まるとする。

$$\begin{aligned} \frac{d[S_0(t)]}{dt} &= -k_1[S_0(t)] + k'_1[S_1(t)], \\ \frac{d[S_1(t)]}{dt} &= k_1[S_0(t)] - k'_1[S_1(t)] - k_2[S_1(t)] + k'_2[S_2(t)], \\ \frac{d[S_2(t)]}{dt} &= k_2[S_1(t)] - k'_2[S_2(t)]. \end{aligned} \quad (8)$$

比例定数 k_1, k'_1, k_2, k'_2 は実験結果から見積もることが可能である。図28の10点の観測点における撮影画像について、個々のトラップの状態遷移を追跡し、隣り合う撮影画像の組に対して比例定数 k_1, k'_1, k_2, k'_2 を算出した。計9個の画像の組に対して平均をとったところ、表6の値が得られた。なお、表6は各比例定数 k_1, k'_1, k_2, k'_2 の比で表した。標的粒径が20 μm の場合について得られた値の組 $(k_1, k'_1, k_2, k'_2) = (90, 0, 44, 52)$ を用い、式(9)の条件のもと式(8)の解を数値計算により求めた。後退オイラー法を用いて各状態の時間発展を予測したグラフが図29である。ただし、各状態の割合と時間についてそれぞれ規格化した。

$$\begin{aligned} [S_0(0)] &= 1, \quad [S_1(0)] = [S_2(0)] = 0, \\ [S_0(t)] + [S_1(t)] + [S_2(t)] &= 1. \end{aligned} \quad (9)$$

表6：3種類のデバイス（標的粒径 = 12, 16, 20 μm ）に対する比例定数の比.

標的粒径 (μm)	k_1	k_1'	k_2	k_2'
12	160	0.8	60	62
16	120	1	39	44
20	90	0	44	52

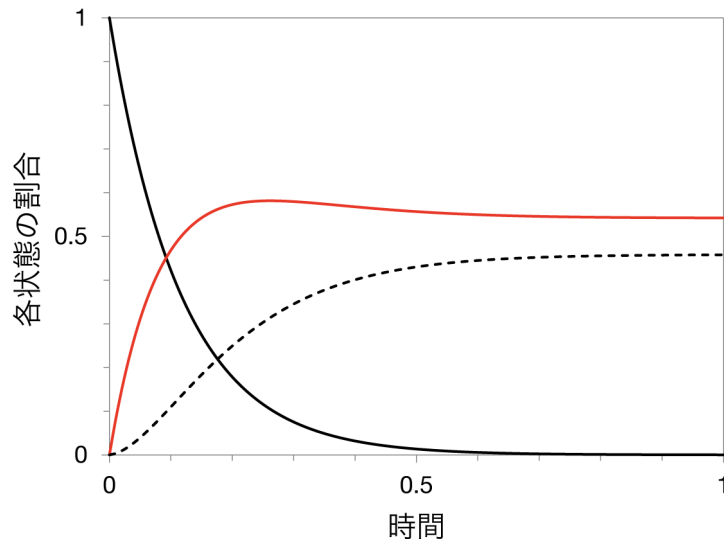


図29：式(8), (9)から導かれるトラップの状態の時間発展. 黒実線, 赤実線, 黒破線はそれぞれ blank traps, successful traps, error traps の割合を表す.

表6より、本研究で用いたデバイスには次の特性があることが示唆された。まず、 S_1 から S_0 への遷移はほぼ起こらない過程と言える。これは、本研究におけるトラップの構造が、トラップ内部に安定的にGVを保持できる設計になっていることを示す。対して、 S_1 から S_2 への遷移、及び S_2 から S_1 への遷移はどちらも起こる。すなわち、第2、第3のGVがトラップ前部に一時的に捕捉されては流れ場によって洗い流されるという過程が頻繁に起こっていることを示す。以上の知見をもとに、トラップの幾何学的構造の観点から次のような改善策が考えられる。例えば、多段階の微細加工工程を通じて底部中央に円形の小孔を備えたトラップを構築し、第1のGVによってその孔を確実に塞ぐことで第2のGVがトラップ内部に引き込まれないように改善できるだろう。あるいは、トラップの深さを浅くすることで、第2、第3のGVがトラップ前部に捕捉されにくくなると推測される。

図29における各状態の挙動は、図28の実験結果を良く再現している。実験

においては、観察開始時に既に GV の捕捉が始まっていたことを考慮すると、標的粒径 $12\ \mu\text{m}$, $16\ \mu\text{m}$ のデバイスを用いた実験結果においては図 29 のグラフ後半の plateau 部を、標的粒径 $20\ \mu\text{m}$ の結果においては極大値近傍を観察していたと解釈することができる。また、図 29 は、観察時刻を考慮することで捕捉効率の最大値を得ることには限界があることを示している。本質的な捕捉効率改善のためには、前述のトラップの幾何学的構造の改善等により、 k_2 を k_2' に対して十分小さくすることが重要である。

2.11 デバイスのリセット

GV の柔らかさを利用することで、細胞の場合には困難であった、流量制御のみによる簡便な洗浄と再配置を試みた。流量を一時的に増加させることで GV の破裂を誘起し、デバイスのリセットを行った。標的粒径が $12\ \mu\text{m}$ の流路を用い、はじめ $(Q1, Q2) = (330\ \mu\text{L/h}, 30\ \mu\text{L/h})$ の条件で GV を捕捉した。捕捉後、 $(Q1, Q2) = (4000\ \mu\text{L/h}, 0)$ の条件に変更することで、5 分以内にすべての GV が洗い流されることを確認した。再び $(Q1, Q2) = (1300\ \mu\text{L/h}, 300\ \mu\text{L/h})$ を経て $(Q1, Q2) = (330\ \mu\text{L/h}, 30\ \mu\text{L/h})$ の条件に設定することで、GV の再捕捉に成功した (図 30)。

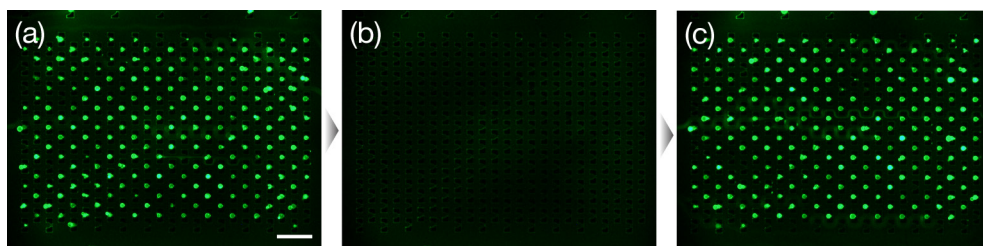


図 30 : GV の柔らかさを利用したデバイスのリセット。 $(Q1, Q2) = (330\ \mu\text{L/h}, 30\ \mu\text{L/h})$ で GV を捕捉後(a), $(Q1, Q2) = (4000\ \mu\text{L/h}, 0)$ の流量条件で GV を破裂させた(b). さらに $(Q1, Q2) = (330\ \mu\text{L/h}, 30\ \mu\text{L/h})$ に戻すことで GV を再配置できた(c). スケールバー = $100\ \mu\text{m}$.

細胞の大きさよりやや小さい開口部に細胞を 1 対 1 で捕捉し、捕捉後に流量を増加させることで細胞が変形することを利用して細胞を開口部からトラップ内部に移動させる技術が報告されている[37] (図 31)。Dura らの報告では、開

口部に捕捉した細胞をトラップ内部に移動させるために必要な流量は初期捕捉時の50倍以上であった。対して、本デバイスの場合には流量をたった12倍に増加させることでGVの変形、破裂を誘起し、洗い流すことが可能であった。先に述べたように、赤血球に比べてGVの方がおよそ1桁曲げ弾性係数が小さいことが知られている[30,31]。GVが細胞に比べて柔らかく、力学的に不安定であることがデバイスのリセットを可能にしたと推測される。このリセット能により、1度のセットアップで複数回の計測が可能となり、機能性タンパク質を担持したGVや人工細胞といった精緻なGVサンプル、又は高価な膜活性物質といった希少なサンプルについて、短時間で多くの同時並列計測が実行でき、スループットの更なる向上を期待できる。

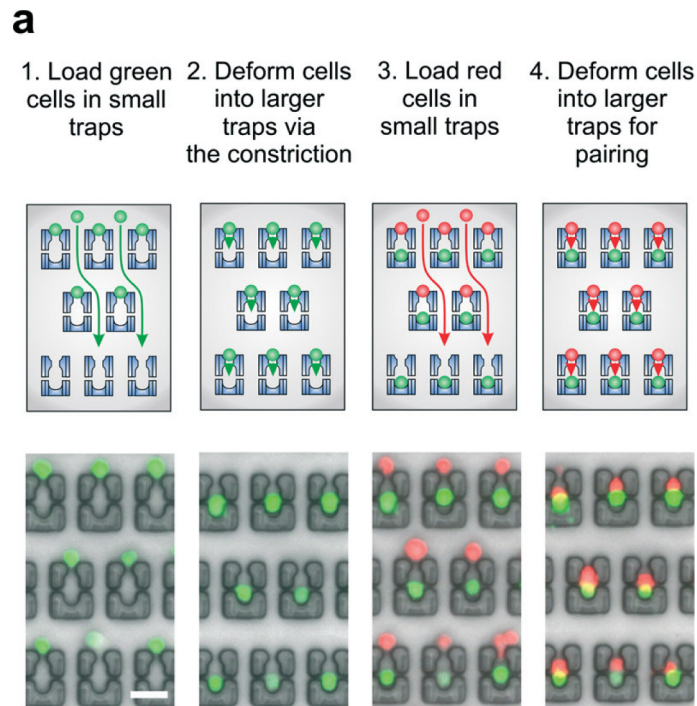


図31：変形能を利用した細胞の精確なペアリング。文献[37]より引用。はじめにトラップ開口部にトラップと1対1対応するように細胞を捕捉し、次に流量を増加させることで変形を誘起して細胞をトラップ内部に導く。スケールバー = 50 μm 。

2.12 まとめ

本章では、GVのための粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスの設計指針と、その性能評価のための実験について述べた。

マイクロ流体デバイスを用いたGV研究の現状を踏まえ、GVのサイズ不均一性がデバイスの性能を下げているという課題を解決すべく、従来の空間配置型のマイクロ流体デバイスに粒径制御を併用した手法を提案した。本研究で粒径選別の手法として採用した決定論的横置換法 (DLD) について、その基本原理を示し、解決法としての有用性を述べた。粒径選別領域と捕捉領域それぞれの設計指針及びそれらを組み合わせて配置する際の注意点として、ダミートラップ等を利用して流路全体で流体抵抗のバランスをとることの重要性に着目して、フォトリソグラフィー技術を利用したマイクロ流体デバイスの作製を行った。その結果、12, 16, 20 μm の3種類の標的粒径に対し、総じて変動係数12%未満で均一粒径GVを67個以上空間配置することに成功した。曲げ弾性係数に関する実験結果と考察から、実際に捕捉されたGVの粒径が約10%大きくなることは、GVの変形能及びPOPGの静電相互作用に基づく反発力が見かけ上の曲げ弾性係数を高くしていることが原因と考察できる。次に、捕捉効率の観点から本デバイスを評価した。トラップと1対1対応したGVを高効率で得るためには、トラップの配置条件に加え、観察時刻やトラップの幾何学的構造そのものにも配慮が必要であることを示した。さらにGVが細胞に比べて柔らかいことが利点となり、流量制御のみによる極めて簡便なデバイスのリセットを実現できたことを示した。1度のセットアップで複数回の計測が可能となり、解析の更なる効率向上が期待できる。

本手法を用いることで、極めて高精度に均一粒径のGVのアレイを生成可能である。粒径に依存したGVの応答計測や、不均一性も含めた統計解析等の応用に対し、本デバイスは強力な解析手段となる。

2.13 参考文献

- [1] A. M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch and J. Voldman, *Nat. Methods*, 2009, **6**, 147–152.
- [2] K. Eyer, S. Stratz, P. Kuhn, S. K. Küster and P. S. Dittrich, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 3280–3287.
- [3] H. Nuss, C. Chevallard, P. Guenoun and F. Malloggi, *Lab Chip*, 2012, **12**, 5257–5261.
- [4] D. J. Paterson, J. Reboud, R. Wilson, M. Tassieri and J. M. Cooper, *Lab Chip*, 2014, **14**, 1806–1810.
- [5] T. Robinson, P. E. Verboket, K. Eyer and P. S. Dittrich, *Lab Chip*, 2014, **14**, 2852–2859.
- [6] S. M. Nomura, L. Liu, Y. Chen, H. Maruyama and F. Arai, *Micro-NanoMechatronics and Human Science*, 9–11 Nov. 2009, 620–622.
- [7] T. Robinson, P. Kuhn, K. Eyer and P. S. Dittrich, *Biomicrofluidics*, 2013, **7**, 044105.
- [8] D. van Swaay and A. deMello, *Lab Chip*, 2013, **13**, 752–767.
- [9] S. Ota, S. Yoshizawa and S. Takeuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 6533–6537.
- [10] S. Matosevic and B. M. Paegel, *Nat. Chem.*, 2013, **5**, 958–963.
- [11] P. Sajeesh and A. K. Sen, *Microfluid. Nanofluid.*, 2014, **17**, 1–52.
- [12] J. A. Davis, D. W. Inglis, K. J. Morton, D. A. Lawrence, L. R. Huang, S. Y. Chou, J. C. Sturm and R. H. Austin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 14779–14784.
- [13] M. Yamada, M. Nakashima and M. Seki, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 5465–5471.
- [14] L. R. Huang, E. C. Cox, R. H. Austin and J. C. Sturm, *Science*, 2004, **304**, 987–990.
- [15] D. W. Inglis, J. A. Davis, R. H. Austin and J. C. Sturm, *Lab Chip*, 2006, **6**, 655–658.
- [16] T. Osaki, S. Yoshizawa, R. Kawano, H. Sasaki and S. Takeuchi, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 3186–3191.

- [17] J. C. McDonald, D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. A. Schueller and G. M. Whitesides, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 27–40.
- [18] K. Tsumoto, H. Matsuo, M. Tomita and T. Yoshimura, *Colloids Surf., B*, 2009, **68**, 98–105.
- [19] A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 1965, **13**, 238–252.
- [20] An open source computer vision and machine learning software library.
Available: <http://opencv.org/>
- [21] T. F. Zhu and J. W. Szostak, *PLoS One*, 2009, **4**, e5009.
- [22] Y. Tamba, H. Terashima and M. Yamazaki, *Chem. Phys. Lipids*, 2011, **164**, 351–358.
- [23] C. Crowe, M. Sommerfeld and Y. Tsuji, MULTIPHASE FLOWS with DROPLETS and PARTICLES, CRC PRESS, 1997.
- [24] S. M. McFaul, B. K. Lin and H. Ma, *Lab Chip*, 2012, **12**, 2369–2376.
- [25] P. Preira, V. Grandné, J.-M. Forel, S. Gabriele, M. Camara and O. Theodoly, *Lab Chip*, 2013, **13**, 161–170.
- [26] J. P. Beech, S. H. Holm, K. Adolfsson and J. O. Tegenfeldt, *Lab Chip*, 2012, **12**, 1048–1051.
- [27] T. Krüger, D. Holmes and P. V. Coveney, *Biomicrofluidics*, 2014, **8**, 054114.
- [28] L. Zhu, C. Rorai, D. Mitra and L. Brandt, *Soft Matter*, 2014, **10**, 7705–7711.
- [29] S. Ye, X. Shao, Z. Yu and W. Yu, *J. Fluid Mech.*, 2014, **743**, 60–74.
- [30] W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham and E. Evans, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 328–339.
- [31] G. Tomaiuolo, *Biomicrofluidics*, 2014, **8**, 051501.
- [32] H. Noguchi and G. Gompper, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 14159–14164.
- [33] Y. Yamashita, M. Oka, T. Tanaka and M. Yamazaki, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1561**, 129–134.
- [34] E. T. Castellana and P. S. Cremer, *Surf. Sci. Rep.*, 2006, **61**, 429–444.
- [35] D. Wang, Z. Wu, A. Gao, W. Zhang, C. Kang, Q. Tao and P. Yang, *Soft Matter*, 2015, **11**, 3094–3099.

- [36] P. Lenz, C. M. Ajo-Franklin and S. G. Boxer, *Langmuir*, 2004, **20**, 11092–11099.
- [37] B. Dura, Y. Liu and J. Voldman, *Lab Chip*, 2014, **14**, 2783–2790.

第 3 章

浸透圧刺激に対するジャイアントベシクルの形態変化

3.1 はじめに

浸透圧変化や界面活性剤添加に伴う GV の形態変化は、脂質膜の透過性や流動性、柔らかさ等の物理化学的特性の観点から興味を持たれる。Boroske らは、レシチン（卵黄ホスファチジルコリン）から構成した GV に対して浸透圧刺激を与え、その収縮速度を顕微鏡像から測定することで水の膜透過率を見積もった[1]。Olbrich らは、細いガラス管の先端を細胞膜や GV 膜の一部に直接接触させて吸引するマイクロピペット吸引法と呼ばれる方法を用いて、水の膜透過率が GV の構成脂質により変化することを示した[2]。Hamada らは、脂質ドメイン（第4章を参照）を形成する GV に浸透圧や界面活性剤による刺激を与えた際、膜が波打ち運動を経て内部陥入する様子を顕微鏡下で詳細に追跡し、その変形機構を膜の線張力と曲げ弾性係数の観点から論じている[3]。理想的には、GV の中でも特に一枚膜の GV (giant unilamellar vesicle: GUV) を用いた解析が望ましい。そこで、このような1個の GUV の構造や物理量の時間変化を、光学顕微鏡を用いてリアルタイムで測定し、同じ条件での実験を多くの“1個の GUV”に対して行い、それらの統計的な解析をする手法は、Yamazaki らにより単一 GUV 法 (single GUV method) [4,5]と呼称され、これまでの GV 研究における解析手法の根幹を成してきた。GV の形態変化における膜の変化量やその時間発展を詳細に追える一方、手動追尾による解析のスループットは低く、希少なイベントまで含めた同時並列観察とその解析は難しい。

近年、細胞の統計的解析に用いられてきたフローサイトメトリーの技術を GV の解析に適用する試みが進められてきた。フローサイトメトリーには一般に図32のような装置を用いる。層流と流体力学的絞り込みを利用して、細胞が流れ場の中心に整然と列を成して流れている状態を形成する。個々の細胞に対してレーザー光を照射し、検出部で前方散乱光や蛍光の強度を測定する。前方散乱光からは粒径に関する情報が得られ、多重蛍光標識された細胞については蛍光強度からそれぞれの標的分子の構成比に関する情報が得られる。得られた情報をもとに、ノズルから引き出された細胞含有液滴を静電相互作用等を利用して振り分けて、特定の細胞のみを分取することも可能であることから、細胞集団の特性の評価や細胞種の選別等の用途に適している。これまでに、フローサイトメトリーを GV 解析に適用した例として、粒径変化を伴う GV の融合や

分裂を追跡した報告例[6,7]や、GV の調製法の違いによる粒径分布や膜多重度の差異を評価した報告例が知られている[8]. これらフローサイトメトリーを応用した GV 研究においては、GV 集団の特性に関して統計的な知見が得られる一方、融合や分裂といった複雑なダイナミクスを個々の GV に対して追跡することや、GV 膜の波打ち運動等の複雑な形態を反映した情報を得ることは極めて困難である.

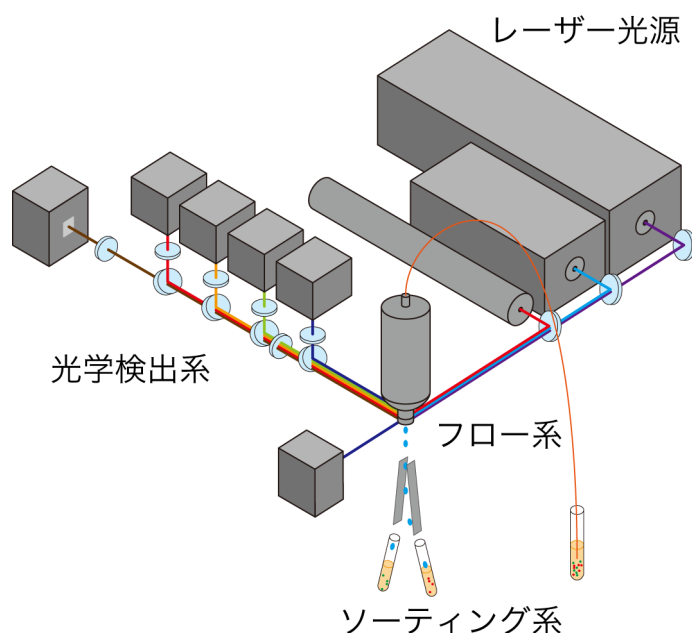


図 32：フローサイトメトリー装置の模式図。細胞 1 個ずつの流れを形成するフロー系、前方散乱光や蛍光測定のための光学検出系、分取のためのソーティング系より成る。

以上の背景から、マイクロ流体デバイスを用いた GV の形態変化計測は、顕微鏡観察に基礎を置きつつ、解析のスループットを統計解析の域にまで高め得る第 3 の解析手法として意義がある。例えば、GV の融合をマイクロ流体デバイスにより制御し、脂質混合と内包物混合の過程を詳細に観察した研究があるが、GV のサイズ不均一性によりそのスループットは低い[9]. そこで本研究では、均一粒径の GV のアレイを用いて形態変化の同時並列計測を行い、連続的な浸透圧刺激に対する GV の応答特性を評価した。標的粒径の異なる 2 種類のデバイスを用いることで、その応答が粒径に依存して変化することを見出した。

3.2 ジャイアントベシクルの調製法と送液システム

第2章5節と同様の膜組成及び手法を用いてGVを調製した。また、本章の実験においては、GVの捕捉後に外部溶液を切り替えるため、次の図33に示す送液システムを用いた。

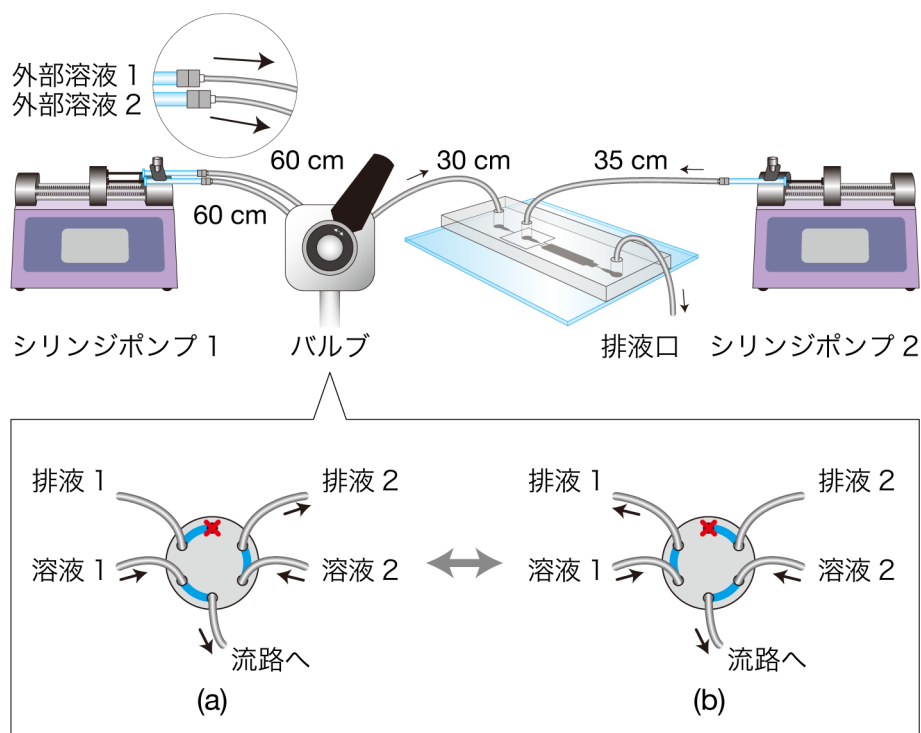


図 33：送液システムの全体像と外部溶液切り替えの模式図。バルブ操作により、外部溶液1が流入する状態(a)と外部溶液2が流入する状態(b)を切り替えることができる。

2台のシリンジポンプ (Harvard Apparatus, Pump 11 Pico Plus Elite) を用いて、GV 懸濁液とバッファー溶液（外部溶液）それぞれの流量を独立に制御した。濃度の異なるフルクトース水溶液を予め2本の2.5 mL ガラスシリンジにそれぞれ準備し、シリンジからデバイスまでの途中に設けたHPLC用のマニュアルインジェクションバルブ (Rheodyne, Model 7000) により流路を切り替えることで溶液置換を実現した。

3.3 観察条件と形態変化測定の手順

浸透圧刺激に対するGVの形態変化測定には、倒立型リサーチ顕微鏡

(Olympus, IX71) に搭載した共焦点スキャナユニット (Yokogawa Electric, CSU22) と sCMOS カメラ (Andor, Zyla) によって取得した共焦点蛍光顕微鏡像を用いた (Ex. 488 nm DPSS Laser, Em. 500–550 nm).

画像解析にはオープンソースの画像処理ライブラリである OpenCV[10]を利用した。まず、カーネルサイズ 5×5 の中央値フィルターを適用して取得画像の平滑化を行った。次に、背景ノイズの平均値を μ , 標準偏差を σ とした時, $\mu + 12\sigma$ を閾値にとって2値化を行うことでGVの最外膜を判別した。最外膜の位置をもとに, GVの長軸方向に測った長径を代表長さとして利用した。また, $\mu + 6\sigma$ を閾値にとって2値化, 輪郭検出を行うことでGVの内部領域を検出し, $\mu + 36\sigma$ を閾値にとって2値化を行うことで蛍光輝度の特に高い, GV内部の分子構造体を識別した。GVの内部領域の面積に対する内包分子構造体の面積の比を膜多重度とし, 内部の膜の混み具合の指標とした。

3.4 バルブ操作に対する外部溶液濃度の応答特性

バルブ操作時におけるデバイス内の外部溶液濃度の応答特性を調べるため, 外部溶液1としてMilli-Q水を, 外部溶液2として蛍光分子であるウラニンの水溶液 (100 μM) を取り付け, 2液を交互に流路へ導いた。図34に相対蛍光強度の時間変化とその増減率を示す。バルブ操作から相対蛍光強度が80%に達するまでに, $(Q1, Q2) = (330 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ 及び $(Q1, Q2) = (105 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ の条件下でそれぞれ12分と36分を要した。ここで, $Q1, Q2$ はそれぞれ外部溶液とGV懸濁液の設定流量とする。流量を大きく設定することで迅速な外部溶液置換が可能であるが, 一方, 流れ場から受けるストレスを最小限に抑えつつ形態変化を観察するためには流量は小さいことが望ましい。そこで次節の実験においては, バルブ操作から初期の8分間は流量を330 $\mu\text{L/h}$ に設定し, その後105 $\mu\text{L/h}$ に減少させることで外部溶液置換にかかる時間を抑えつつ, 低流量条件下でGVの形態変化を観察するという手法を用いた。この流量条件の下で, バルブ操作から19分で相対蛍光強度が80%に達することが分かった。

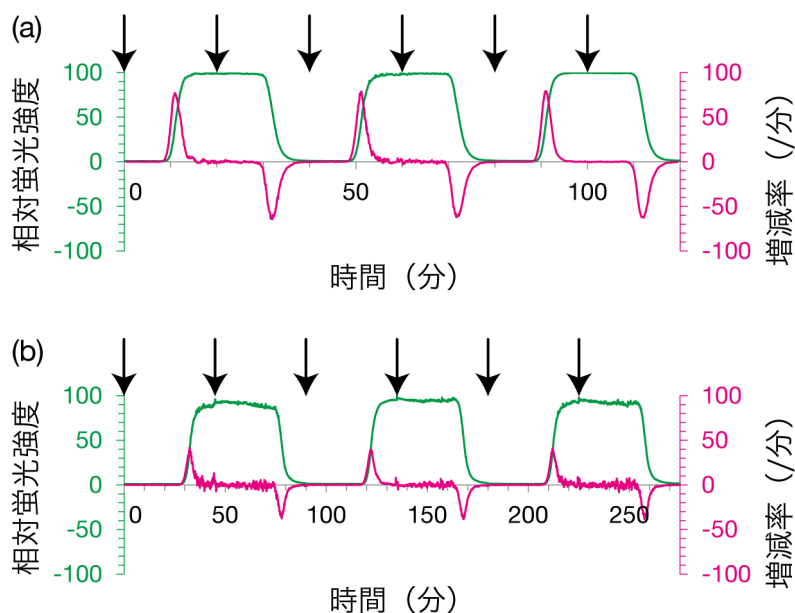


図 34: バルブ操作時の外部溶液濃度の応答特性. バルブ操作により外部溶液を切り替えた時刻を矢印で示した. $(Q1, Q2) = (330 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ (a), $(Q1, Q2) = (105 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ (b).

3.5 連続的な浸透圧刺激に対する GV の形態変化測定

標的粒径 $12 \mu\text{m}$ のデバイスを用いて均一粒径の GV を捕捉し、外部溶液を等張液から高張液に変更したのち、もとの等張の環境に戻すことで GV の応答を測定した. はじめに、等張である 1 mM フルクトース水溶液環境下で捕捉領域に GV を捕捉し、GV 懸濁液の導入を停止したのちバルブ操作により外部溶液を 3 mM フルクトース水溶液に変更した. バルブ操作時刻を 0 分とし、長軸方向にとった長径の時間変化を解析したところ、GV が内部に余剰膜を陥入させながら徐々に収縮する様子が観察された. さらにバルブを操作し、元の 1 mM フルクトース水溶液に戻したところ、GV の最外膜が再膨張した. 図 35 に共焦点蛍光顕微鏡像を、図 36 に長径及び膜多重度の時間変化の測定結果をそれぞれ示す. 高張液の導入に伴い、GV の粒径が $2\text{--}3 \mu\text{m}$ 収縮すること、また、再度低張液にさらされることで GV の最外膜が約 $1 \mu\text{m}$ 膨張することが分かった. 膜多重度については、高張液の導入に伴い GV 内部に分子集合体を形成するために全体に増加する傾向が観察され、再度低張液にさらされることで減少した.

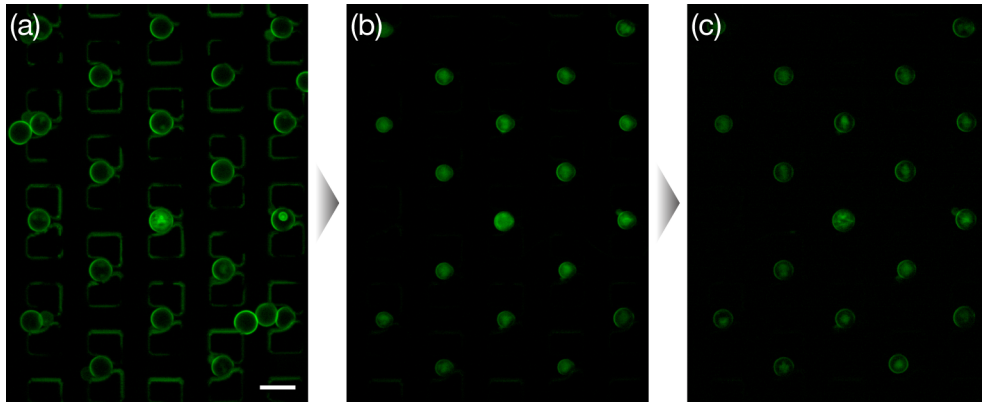


図 35：連続的な浸透圧刺激に対する GV の収縮と再膨張. 標的粒径 = $12\ \mu\text{m}$ のデバイスを用いた. 1 mM フルクトース水溶液(a), 3 mM フルクトース水溶液(b)及び 1 mM フルクトース水溶液(c)環境下での GV の形態. スケールバー = $20\ \mu\text{m}$.

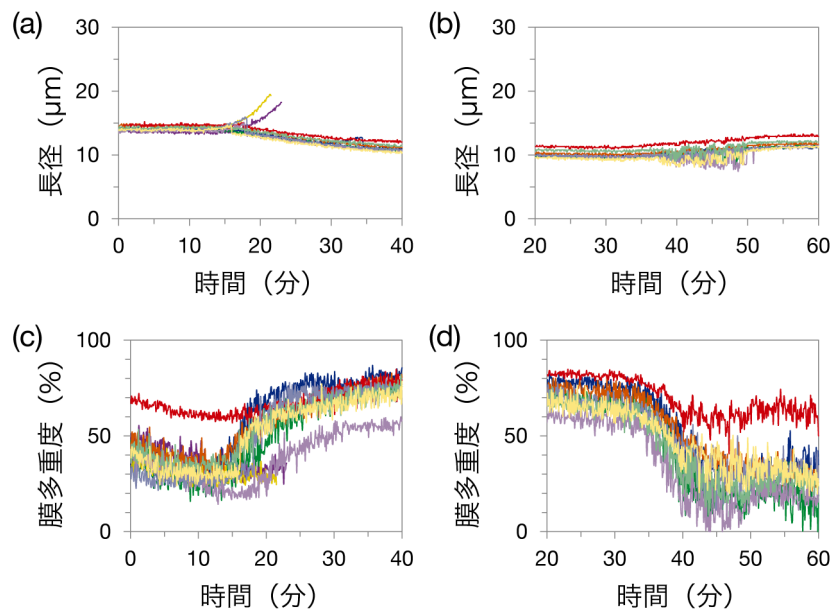


図 36：連続的な浸透圧刺激に対する GV の長径の時間変化(a, b)と膜多重度の時間変化(c, d) ($n = 10$). 標的粒径 = $12\ \mu\text{m}$ のデバイスを用いた. 1 mM フルクトース水溶液から 3 mM フルクトースへ置換時の応答(a, c)と再度 1 mM フルクトース水溶液に戻した際の応答(b, d).

次に、再膨張の過程が履歴に依存する特徴的な現象であることを検証するため、1 mM フルクトース水溶液環境下で GV を捕捉領域に捕捉したのち、外部

溶液を Milli-Q 水に置換する実験を行った。バルブ操作時刻を 0 分とし、長軸方向にとった長径の時間変化を解析したところ、GV はほぼその粒径を変化させることなく破裂してしまうことが分かった。図 37 に共焦点蛍光顕微鏡像を、図 38 に長径及び膜多重度の時間変化の測定結果をそれぞれ示す。全 14 観察例中、バルブ操作から 45 分以内にすべての GV が破裂する結果となった。また、2 例で破裂後に GV 内部から娘 GV が放出され、捕捉される現象が観察された。図 38 から、長径や膜多重度はほとんど変化せず破裂に至っていることが分かる。これは、高張液導入後の再膨張の過程とは挙動が異なる。従って、再膨張時に観測された最外膜の応答は、一度 GV が収縮を経験したことにより初めて現れた特徴的な応答だと推測される。

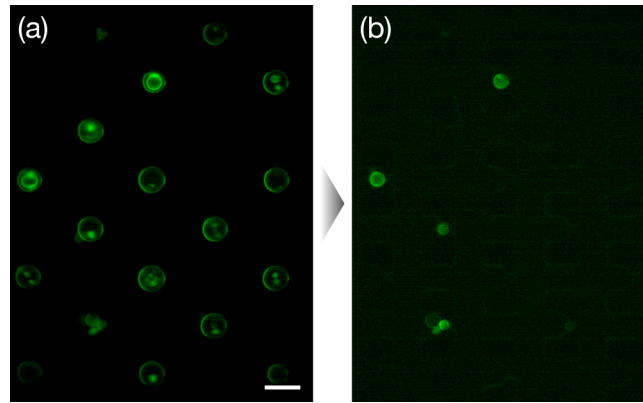


図 37: 低張液導入に対する GV の形態変化. 標的粒径 = 12 μm のデバイスを用いた. 1 mM フルクトース水溶液(a)から Milli-Q 水(b)への外部溶液置換. スケールバー = 20 μm .

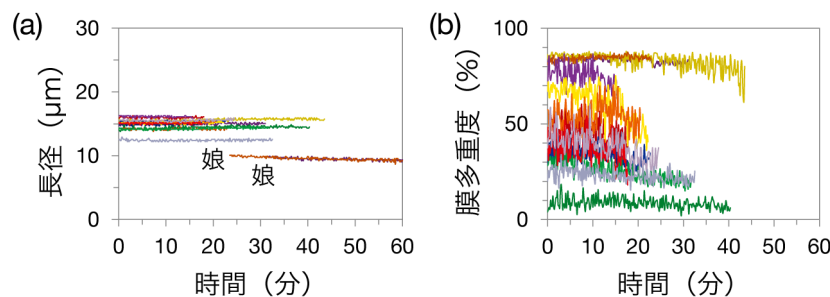


図 38: 低張液導入に対する GV の長径の時間変化(a)と膜多重度の時間変化(b) ($n = 14$).

さらに、初期粒径に対する応答様式の違いを検証するため、標的粒径 $20\ \mu\text{m}$ のデバイスを用いて連続的な浸透圧刺激に対する応答測定の実験を行った。はじめに、等張の $1\ \text{mM}$ フルクトース水溶液環境下で捕捉領域に GV を捕捉し、GV 懸濁液の導入を停止したのちバルブ操作により外部溶液を $3\ \text{mM}$ フルクトース水溶液に変更した。バルブ操作時刻を 0 分とし、長軸方向にとった長径の時間変化を解析したところ、標的粒径 $12\ \mu\text{m}$ のデバイスを用いた実験結果と同様、GV が内部に余剰膜を陥入させながら徐々に収縮する様子が観察された。さらにバルブを操作し、元の $1\ \text{mM}$ フルクトース水溶液に戻したところ、全 10 観察例中、バルブ操作から 70 分以内に 9 例の GV が破裂した。図 39 に共焦点蛍光顕微鏡像を、図 40 に長径及び膜多重度の時間変化の測定結果をそれぞれ示す。高張液の導入に伴い、GV の粒径が $5\text{--}6\ \mu\text{m}$ 収縮すること、また、再度低張液にさらされることで GV の最外膜はほとんど膨張せずに破裂に至ることが分かった。膜多重度については、標的粒径 $12\ \mu\text{m}$ のデバイスを用いた測定結果と同様、高張液の導入に伴い GV 内部に分子集合体を形成するために全体に増加する傾向が観察され、再度低張液にさらされることで減少した。初期粒径の違いにより、再膨張の過程が異なる結果となったことは興味深い。次節では、初期粒径と初期膜多重度が、GV の収縮率や溶液環境の復帰に伴う粒径回復率にどのように関連しているかについて検証を行う。

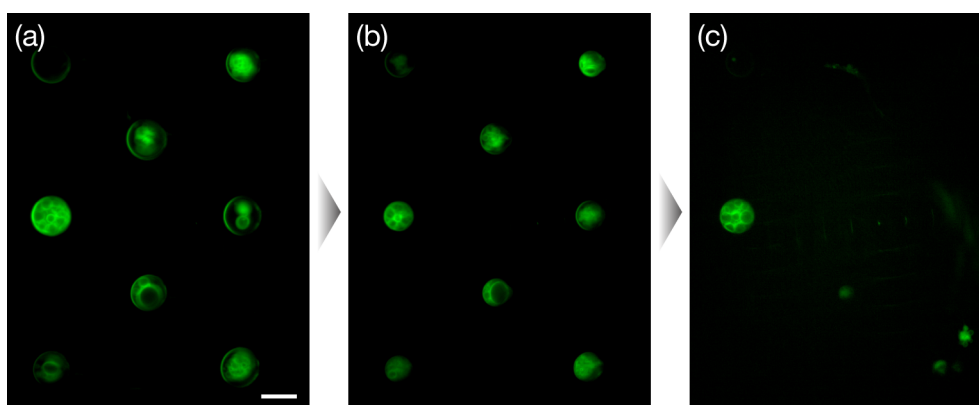


図 39：連続的な浸透圧刺激に対する GV の収縮と再膨張。標的粒径 = $20\ \mu\text{m}$ のデバイスを用いた。 $1\ \text{mM}$ フルクトース水溶液(a), $3\ \text{mM}$ フルクトース水溶液(b)及び $1\ \text{mM}$ フルクトース水溶液(c)環境下での GV の形態。スケールバー = $20\ \mu\text{m}$ 。

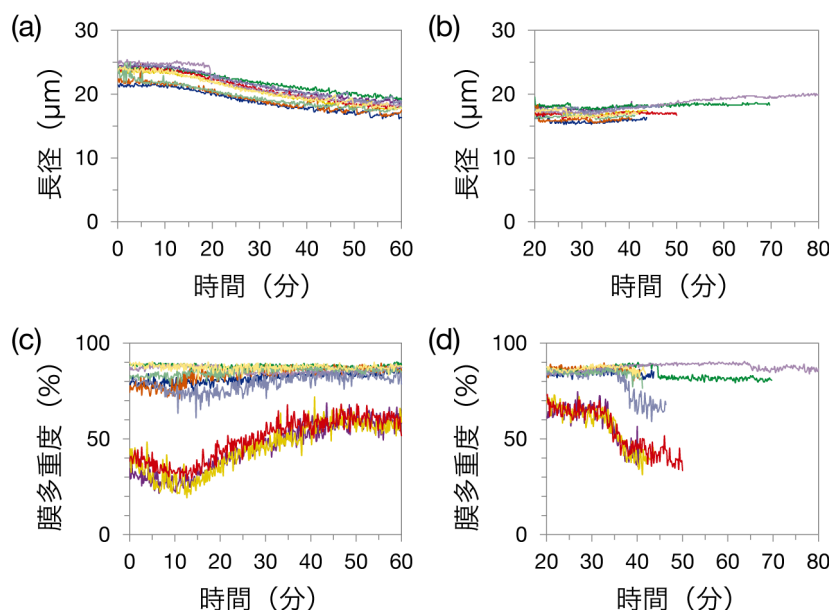


図 40：連続的な浸透圧刺激に対する GV の長径の時間変化(a, b)と膜多重度の時間変化(c, d) ($n = 10$). 標的粒径 = $20\ \mu\text{m}$ のデバイスを用いた. $1\ \text{mM}$ フルクトース水溶液から $3\ \text{mM}$ フルクトースへ置換時の応答(a, c)と再度 $1\ \text{mM}$ フルクトース水溶液に戻した際の応答(b, d).

3.6 GV の形態変化に対する考察

粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスを用いることで、粒径に依存した GV の収縮と膨張のダイナミクスを追跡することに成功した. 標的粒径 $12\ \mu\text{m}$ の場合と $20\ \mu\text{m}$ の場合では、最外膜の内部陥入速度に差異があり、収縮後の最外膜の張力が異なることが推測される. 図 41 に収縮と再膨張の模式図を示した. 外部溶液環境が高張の $3\ \text{mM}$ フルクトース水溶液に置換されることで、GV 内部から膜を通じて水が外部に流出し、GV は収縮する. このとき、生じた余剰膜により膜の張力が減少する. 今回の観察においては、生じた余剰膜を内部陥入させて GV 内部に複数の娘 GV を形成することで膜張力の回復を図る挙動が観察された. さらに収縮後に外部溶液が低張の $1\ \text{mM}$ フルクトース水溶液に置換されることで、再び膜を通じて水が GV 内部に流入する. 一度内部陥入した娘 GV の膜が再度最外膜に戻ることはないが、流入した水の影響で最外膜が若干膨張する様子が観察された. 粒径毎の観察結果より、粒径の小さな GV

の場合には収縮後に最外膜に残留した余剰膜を利用して再膨張が可能になるが、粒径の大きな GV の場合には収縮後の最外膜に余剰膜が少ないためか、外部溶液環境の復元に伴う浸透圧刺激に耐えられず70分以内にほぼ全ての GV が破裂したと考えられる。

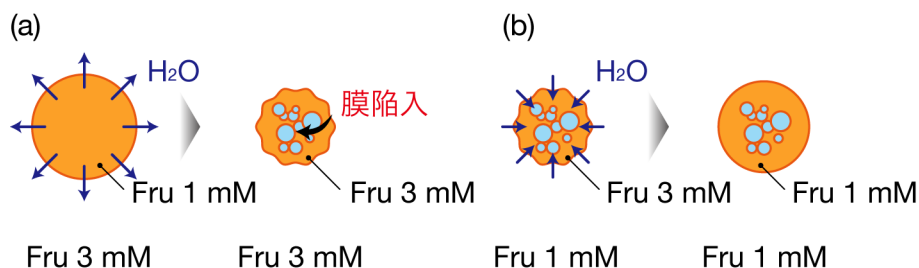


図 41：連続的な浸透圧刺激に対する GV の収縮と再膨張の模式図. 高張液導入に伴う GV の収縮(a)と低張液導入に伴う GV の再膨張(b).

これまでも、Tsumoto 法を用いて調製した GV が、単分散液中で高張な溶液環境にさらされることで同様の収縮挙動を示すことが報告されている[3]. 実際に、外部より膜を引っ張る力等が働かないストレスフリーな系において、GV から外部に向かって突出したチューブは不安定であり、対して GV の内部に向かって突出したチューブは安定であることが示されている[11]. 糖は脂質膜に相互作用し得る要因であるが、[12]に報告されているように、脂質の極性基に直接糖が作用しないと考えられるので、浸透圧による水の流出入が本実験結果の直接の要因となっていると考えられる。標的粒径 $12\ \mu\text{m}$ と $20\ \mu\text{m}$ の GV の粒径は、20 分から 40 分の間は線形に減少した。Boroske らによれば、GV の収縮や膨張の速度から水の膜透過率を次の式から見積もることができる[1].

$$\frac{dR}{dt} = -\alpha P \Delta c \quad (1)$$

ここで、 R , α , P , Δc はそれぞれ GV の半径、水のモル体積、水の膜透過率、膜内外の溶質のモル濃度の差である。式(1)より水の透過率を算出したところ、標的粒径 $12\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m}$ のそれぞれの場合について $50 \pm 3\ \mu\text{m/s}$ ($n = 8$), $57 \pm 7\ \mu\text{m/s}$ ($n = 10$)であった。一般に水の膜透過率は、GV の膜組成等によっても変動する。文献値[1,2]と比較したところ、いずれもオーダーとしては整合したものの、本デバイスによる測定値の方がやや大きい傾向があった。これは、流れ場により常に一定濃度の外部溶液にさらされることで、GV 内外の濃度差が大

きく保持されている影響と考えられる。また、標的粒径 $12\ \mu\text{m}$ の GV については、フルクトース濃度を再度下げると膨張し、35 分から 60 分で線形に増加した。ここから水の膜透過率を見積もったところ、 $27 \pm 4\ \mu\text{m/s}$ ($n = 8$) となった。これは収縮時の膜透過率と比較して小さい値であり、収縮に伴い膜多重度が大きくなることで膜多重度が低い状態に比べて水透過率が小さくなったことが原因と推測される[1]。標的粒径 $20\ \mu\text{m}$ の GV について、外部溶液環境を元に戻すとほぼ全て破裂してしまったことは、詳細は不明であるが、浸透圧による粒径変化と余剰膜面積の増大が時間に対して連続にならなかったためと推定される。特に、粒径が大きい GV については膜が硬いことが知られており[13]、水透過率が異常に高いことで、再膨張時に破裂する挙動が観察されたと考えられる。一方で、本デバイスの GV は流れ場やマイクロポストから力学的ストレスを受けるが、これらは流速を遅くなどすれば、GV の変形モードや脂質膜の物理化学的特性を大きく変化させるものではないと分かったことは重要である。

次に、十分に時間が経ったあとの粒径の測定値をもとに、GV の収縮率、粒径回復率を求め、初期粒径と初期膜多重度がそれらとどのように関連しているかについて検討を行った。膜多重度が特に高い 3 例、及び膜多重度が低い 3 例について収縮率、粒径回復率を算出した結果が図 42 である。収縮過程における時刻 0 分の粒径と再膨張過程における時刻 20 分の粒径をそれぞれ 100% とし、収縮後と再膨張後の粒径から相対的な収縮率と粒径回復率を求めた。また、標的粒径が $20\ \mu\text{m}$ の場合ほぼ全ての GV が観測時間内に破裂してしまったため、破裂直前の長径から粒径回復率を算出した。その結果、初期の膜多重度に依存せず GV は一定の収縮率で収縮することが分かった。その傾向は標的粒径 $12\ \mu\text{m}$ の場合にも $20\ \mu\text{m}$ の場合にも見られた。これは、初期に GV 内部にある分子構造体は、最外膜の水の透過率にほとんど影響を及ぼしていないことを示唆している。本研究では GV 断面の共焦点蛍光顕微鏡像をもとに、分子構造体の GV 内部に占める割合を膜多重度として定義したが、実際にはこれらの分子構造体は GV 内部の実効体積の減少に対してそれほど寄与していない可能性が考えられる。一方で粒径回復率についても、初期膜多重度への依存は認められなかった。しかし初期粒径には依存する傾向があり、標的粒径 $20\ \mu\text{m}$ の場合に、膜多重度の高低に応じてそれぞれ $100 \pm 1\%$ ($n = 3$, high lam.), $102 \pm 1\%$ ($n = 3$, low lam.) の値が得られたのに対し、標的粒径 $12\ \mu\text{m}$ の場合には膜多重度の高

低に応じてそれぞれ $115 \pm 2\%$ ($n = 3$, high lam.), $113 \pm 1\%$ ($n = 3$, low lam.) の値を得た。膜多重度が高い場合、低い場合の双方について、標的粒径 $12 \mu\text{m}$ の GV の方が $20 \mu\text{m}$ の GV より有意に大きな粒径回復率を示した ($P < 0.05$, t 検定による)。本デバイスを用いることで、連続的な浸透圧刺激に対する GV の応答が粒径に依存して異なることを初めて見出し、複数の GV に対して同時並列計測を行うことでその差異を収縮率と粒径回復率の観点から評価することに成功した。

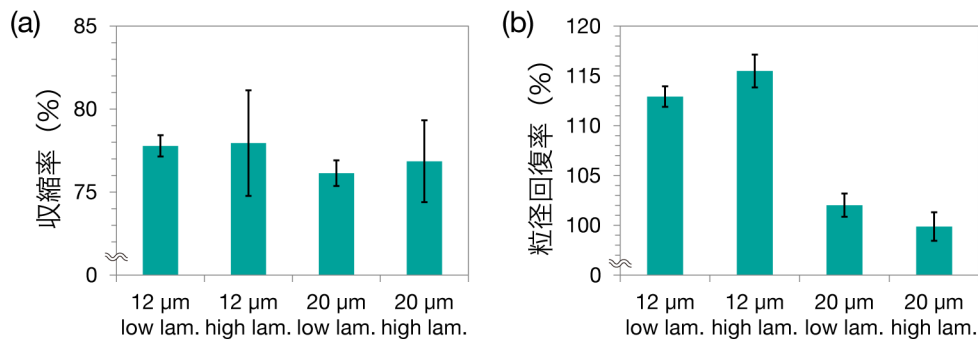


図 42：収縮率と粒径回復率の初期粒径、及び初期膜多重度への依存性。high lam.は特に膜多重度が高かった 3 例についての測定結果を表し、low lam.は膜多重度が低かった 3 例についての測定結果を表す。

3.7 まとめ

本章では、連続的な浸透圧刺激に対する GV の応答特性の評価実験について述べた。均一粒径の GV を用いた同時並列計測を実現したことで、その応答が粒径に依存して変化することを初めて見出した。

はじめに、従来の顕微鏡観察法による GV の形態変化追跡や脂質膜の物理化学的特性評価の現状と課題について述べた。顕微鏡観察法は、1 個の GV の構造や物理量の時間変化を詳細に追える一方、複数の GV を対象にした同時並列観察とその解析が困難である。スループットの高い解析手法としてフローサイトメトリーを適用した研究例も報告されているが、個々の GV の形態やその時間変化まで反映した情報は得られにくい。そこで、従来の顕微鏡観察に基礎を置きつつ、解析のスループットを統計解析の域にまで高め得る手法として、マイクロ流体デバイスを用いた同時並列計測の重要性を述べた。第2章で作製したマイクロ流体デバイスに加えて新たに HPLC 用のマニュアルインジェクションバルブを導入し、GV の捕捉後に外部溶液の切り替えが可能な送液システムを構築した。標的粒径 12 μm のデバイスを用いて均一粒径の GV を捕捉し、外部溶液を高張液、低張液の順に切り替えところ、GV は収縮後、再膨張した。一方で高張液を経由せず、直ちに低張液に切り替えたところ、すべての GV が破裂した。これらの結果から、GV の膨張は高張液を経由したときにのみ現れる履歴依存的な応答であることが分かった。次に、標的粒径 20 μm のデバイスを用いて均一粒径の GV を捕捉し、外部溶液を高張液、低張液の順に切り替えたところ、GV は収縮後、ほぼ再膨張することなく破裂した。この結果から、連続的な浸透圧刺激に対する GV の応答は初期の粒径に依存して異なることが分かり、標的粒径 12 μm の GV と標的粒径 20 μm の GV では浸透圧変化に対する粒径変化と余剰膜面積の増大の仕方に差異があることが示唆された。また、収縮時の水の膜透過率を算出したところ、文献での報告値と整合する結果を得た。従って、本デバイスの GV は流れ場やマイクロポストから力学的ストレスを受けるが、これらは流速を遅くするなどすれば、GV の変形モードや脂質膜の物理化学的特性を大きく変化させるものではないことが分かった。

本手法により、粒径や履歴に依存した GV の応答特性を、複数の均一粒径 GV を対象にした同時並列計測を通じて評価することが可能になった。GV という

第3章 浸透圧刺激に対するジャイアントベシクルの形態変化

分子集合体を基盤とする脂質膜の物理化学的性質の測定への応用が期待できる.

3.8 参考文献

- [1] E. Boroske, M. Elwenspoek and W. Helfrich, *Biophys. J.*, 1981, **34**, 95–109.
- [2] K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham and E. Evans, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 321–327.
- [3] T. Hamada, Y. Miura, K. Ishii, S. Araki, K. Yoshikawa, M. Vestergaard and M. Takagi, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 10853–10857.
- [4] Y. Tamba and M. Yamazaki, *Biochemistry*, 2005, **44**, 15823–15833.
- [5] Y. Tamba and M. Yamazaki, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 4846–4852.
- [6] T. Sunami, F. Caschera, Y. Morita, T. Toyota, K. Nishimura, T. Matsuura, H. Suzuki, M. M. Hanczyc and T. Yomo, *Langmuir*, 2010, **26**, 15098–15103.
- [7] K. Kurihara, K. Takakura, K. Suzuki, T. Toyota and T. Sugawara, *Soft Matter*, 2010, **6**, 1888–1891.
- [8] K. Nishimura, T. Hosoi, T. Sunami, T. Toyota, M. Fujinami, K. Oguma, T. Matsuura, H. Suzuki and T. Yomo, *Langmuir*, 2009, **25**, 10439–10443.
- [9] T. Robinson, P. E. Verboket, K. Eyer and P. S. Dittrich, *Lab Chip*, 2014, **14**, 2852–2859.
- [10] An open source computer vision and machine learning software library.
Available: <http://opencv.org/>
- [11] R. Lipowsky, *Faraday Discuss.*, 2013, **161**, 305–331.
- [12] P. Westh, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, **10**, 4110–4112.
- [13] K. H. de Haas, C. Blom, D. van den Ende, M. H. G. Duits and J. Mellema, *Phys. Rev. E*, 1997, **56**, 7132–7137.

第 4 章

ドメイン形成ジャイアントベシクルの

粒径選別と同時並列観測

4.1 はじめに

第2章, 第3章では, 膜構造が均質な GV を対象にした実験について述べた. 実際の細胞膜には, 脂質ラフトやカベオラと呼ばれる局所構造(脂質ドメイン)が存在することが知られている[1,2]. 脂質ドメインの模式図を図43に示す. 脂質ラフトは, スフィンゴ脂質とコレステロールの会合により形成された脂質ドメインに, 特定のタンパク質や分子が会合したものである. 一方カベオラはスフィンゴ脂質及びコレステロールに結合性を持つカベオリンと呼ばれるタンパク質が百数十分子会合することにより形成され, 細胞膜上で直径 50–100 nm のフラスコ状の陥入構造をとる. これら脂質ドメインには情報伝達分子が局在することが知られている. 特定の伝達経路に関わる分子を近傍に集積できることや, 異なる伝達経路に関わる分子をそれぞれ別の脂質ドメインに配置することで不要なクロストークを防ぐこともできることから, 脂質ドメインは特に情報伝達の効率向上に大きく寄与している[3]. GV 研究においても, ゲル相–液晶相転移温度の異なる分子を混合して用いることにより, 脂質ドメインを形成することが可能である[4]. 実際に, スフィンゴミエリンや 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), コレステロールは配向秩序の高い L_o 秩序液体相 (liquid-ordered phase) を形成しやすく, 一方で 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) は配向秩序の低い L_d 無秩序液体相 (liquid-disorderd phase) を形成しやすいことが知られている[5]. GV の高機能化を図る上で, このような脂質ドメインを形成する GV の利用価値は高いと考えられるが, それには力学的ストレスや化学的ストレスに対する脂質ドメインの物理化学的特性を明らかにする必要がある. これまでに, ポリジメチルシロキサン (PDMS) の柔らかさを利用した空気圧バルブを統合したマイクロ流体デバイスによって捕捉後の GV を押しつぶし, 形態変化を追跡した研究が知られている[6] (図44). そこで本研究では, 作製したデバイスがドメイン形成 GV に対しても設計通り機能することを確認し, 捕捉された GV の流れ場中における挙動を顕微鏡観察により明らかにした. 加えて, 捕捉された GV に対して外部から摂動を与え, 形態変化を追跡した.

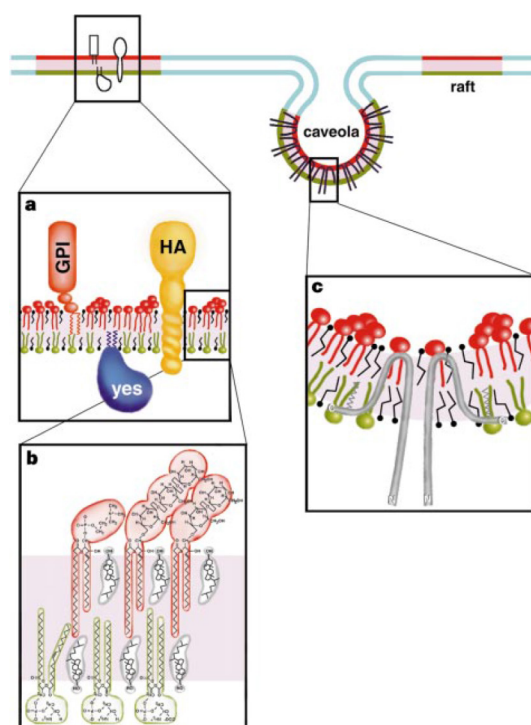


図 43：脂質ラフトとカベオラの模式図. 文献[1]より引用.

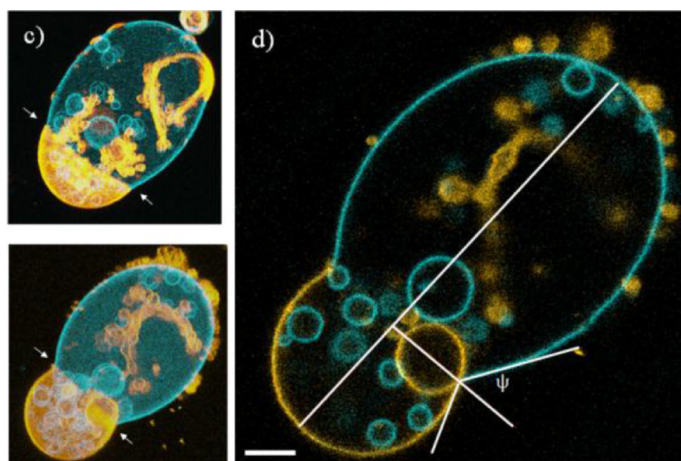


図 44：ドメイン形成 GV に対し、デバイス上壁から力をかけた場合の形態変化. 文献[6]より引用. (c, top)の状態からさらに力をかけた状態(c, bottom)及び(d). L_o 相を青色蛍光, L_d 相を黄色蛍光でそれぞれ標識した. 力をかけるに従い, GV の膜が内部陥入する様子が観察されている.

捕捉後の GV に対して摂動を与えるため, 本研究ではアネキシン V を用いた. アネキシン V は, 主にホスファチジルセリン (PS) を認識して結合するタンパ

ク質である。カルシウムイオンと結合することで活性を持ち、PS を介して脂質膜と結合する性質が知られている。また、脂質膜どうしを結合し、凝集させる作用も持つ[7-9](図 45)。生体内では、PS への結合による血小板の凝集阻害や、アポトーシスした細胞において表面に露出した PS への結合によるマクロファージの貪食促進等の機能を果たしていると考えられている[2]。そこで、標的粒径 12 μm のデバイスを用いて PS 含有 GV と PS 非含有 GV をそれぞれ捕捉し、外部溶液にアネキシン V を添加することでその応答を観察する実験を行った。



図 45：アネキシン V の構造。文献[7]より引用。カルシウムイオンの結合部位を黄色で示した。

4.2 ジャイアントベシクルの調製法と送液システム

GV の膜組成と調製法について述べる。GV の構成成分には、リン脂質である 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) と 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS) , スフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリン (SM) に加え、コレステロール (Chol) を用いた。GV の膜を蛍光標識する目的で、赤色蛍光脂質である Texas Red 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Texas Red-DHPE) を用いた。DOPC と DOPS は日油株式会社から、コレステロールは Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) から、Texas Red-DHPE は Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) からそれぞれ購入した。また、アネキシン V (ALX-209-250-T020) は Enzo Life Science (Farmingdale, NY, USA) から購入した。DOPC, DOPS, スフィンゴミエリン, Texas Red-DHPE の分子構造を図 46-49 に示す。

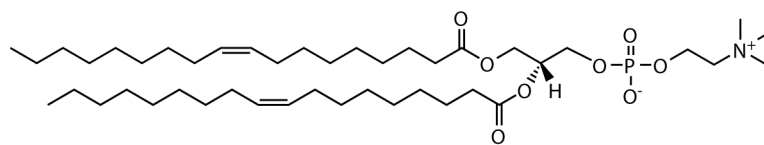


図 46 : DOPC の分子構造.

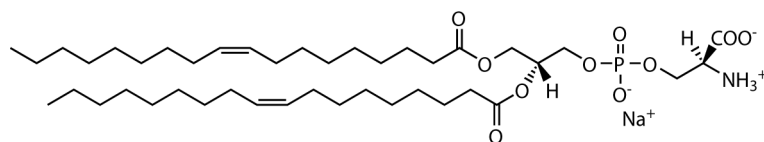


図 47 : DOPS の分子構造.

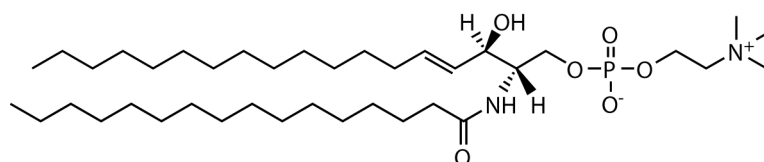


図 48 : スフィンゴミエリンの分子構造.

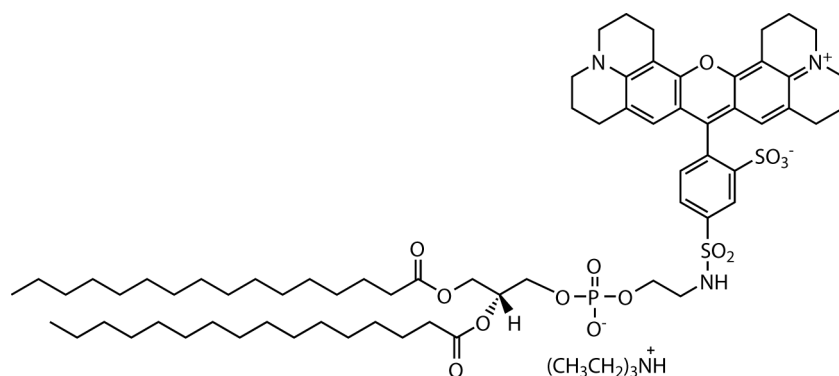


図 49 : Texas Red-DHPE の分子構造.

GV は第 2 章 5 節の方法に従って調製した. 膨潤後の各成分の終濃度は DOPC/DOPS/SM/Chol/Texas Red-DHPE/Fru = 0.72 mM/0.69 mM/0.96 mM/0.63 mM/1.8 μ M/6 mM とした. 図 50 に本手法で作製した GV の蛍光顕微鏡観察の結果を示した. 視野中の多くの GV において蛍光脂質の局在が確認でき, 脂質ドメインを形成していることが示唆された. 配向秩序の高い SM と Chol が L_o phase を, 配向秩序の低い DOPC, DOPS, Texas Red-DHPE が L_d phase をそれぞれ構成していると推測される.

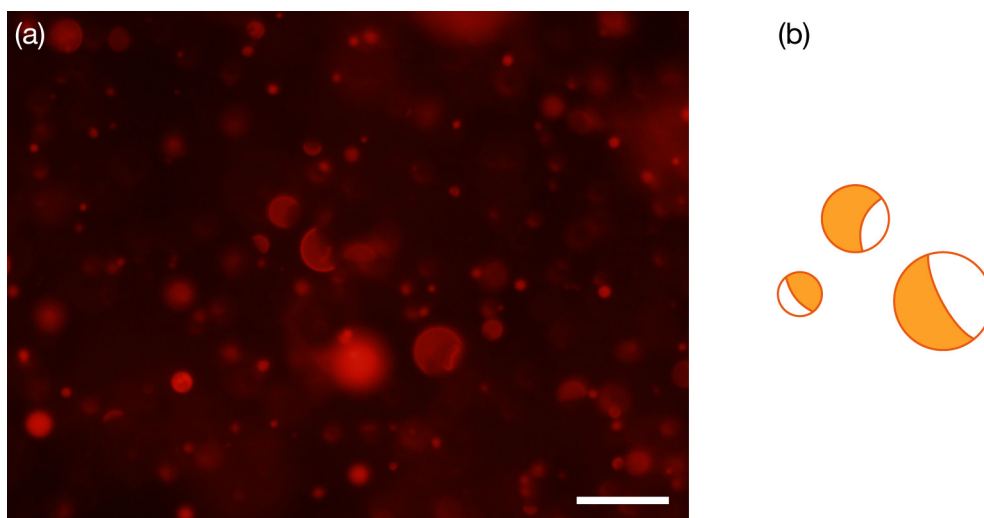


図 50: Tsumoto 法により調製したドメイン形成 GV の蛍光顕微鏡像(a)と模式図(b).
スケールバー = 20 μm .

第3章2節に示した2液を完全に切り替える方式の送液システムは、濃度が既知の外部溶液を用いて長時間の観測が行える反面、予め必要量以上の外部溶液をシリンジに準備しておく必要がある。この系は、タンパク質等の希少な試料を用いる実験には不向きである。そこで、GVの捕捉後にアネキシンVを微量添加する実験においては、外部溶液を封入した5 mL ガラスシリンジからデバイスまでの途中に設けた HPLC 用のマニュアルインジェクションバルブ (Rheodyne, Model 7000) 上のサンプルループ (5 μL) にアネキシンVの水溶液を満たし、バルブ操作により流路に注入する方式を採用した。外部溶液は GV 懸濁液と等張な条件のフルクトース水溶液 (6 mM) とした。図 51 に送液システムの概要と注入操作の模式図を示す。希少な試料を効率よく流路内に導入することが可能であり、さらにこの系は3種類以上の試料溶液を用いた連続的な応答計測にも拡張可能である。

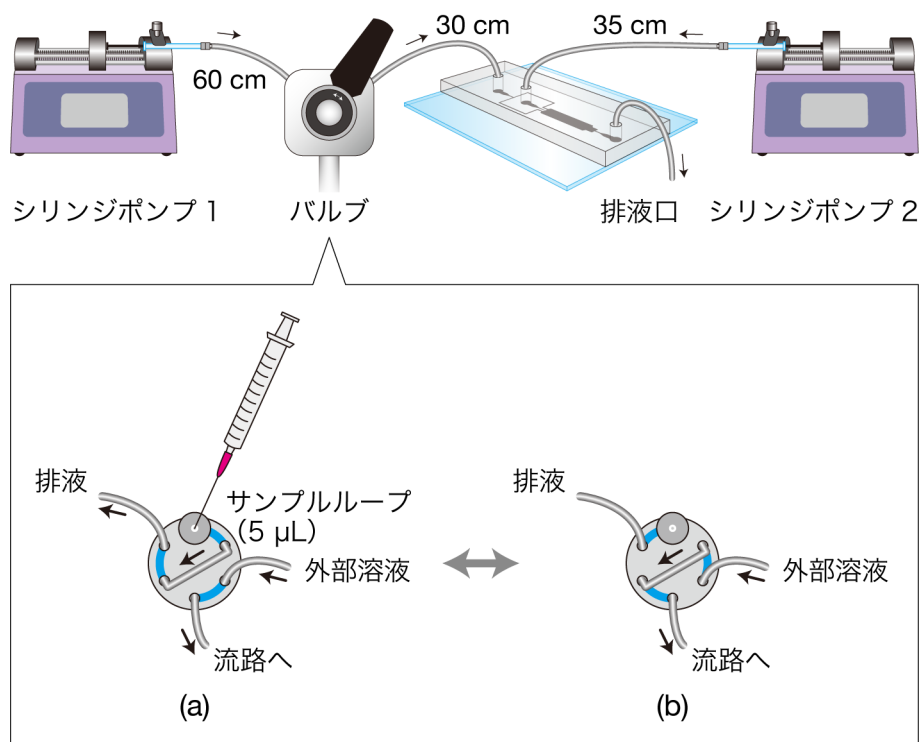


図 51：送液システムの全体像と注入操作の模式図. サンプルループに試料溶液を満たし(a), バルブ操作により流路へ注入する(b).

4.3 観察条件

GV の観察には、倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus, IX71) に取り付けられた冷却 CCD カメラ (Olympus, DP72) により取得した落射蛍光顕微鏡像を用いた (Ex. 565–585 nm, Em. 600–690 nm).

4.4 バルブ操作に対する外部溶液濃度の応答特性

バルブ操作時の外部溶液濃度の応答特性を調べるため、外部溶液として Milli-Q 水を用い、蛍光分子であるウラニンの水溶液 (100 μM) を繰り返し注入した. 図 52 に蛍光強度の時間変化とその増減率を示す. 注入操作に対して高い再現性があること、また、溶液拡散の影響により流量が小さくなるに従いピーク濃度が下がることが分かった. アネキシン V の添加実験においては、注入操作にかかる時間を抑えつつ、流れ場から受けるストレスの少ない低流量条件下

で GV の形態変化を観察する目的で、バルブ操作から初期の 8 分間は流量を $(Q1, Q2) = (330 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ に設定し、その後 $(Q1, Q2) = (105 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ に減少させる手法を用いた。ここで、 $Q1, Q2$ はそれぞれ外部溶液と GV 懸濁液の設定流量とする。流路内を $100 \mu\text{M}$ のウラニン水溶液で満たした場合の蛍光強度の測定結果との比較から、この流量条件の下でピーク濃度が元の溶液の約 18%に相当することが分かった。

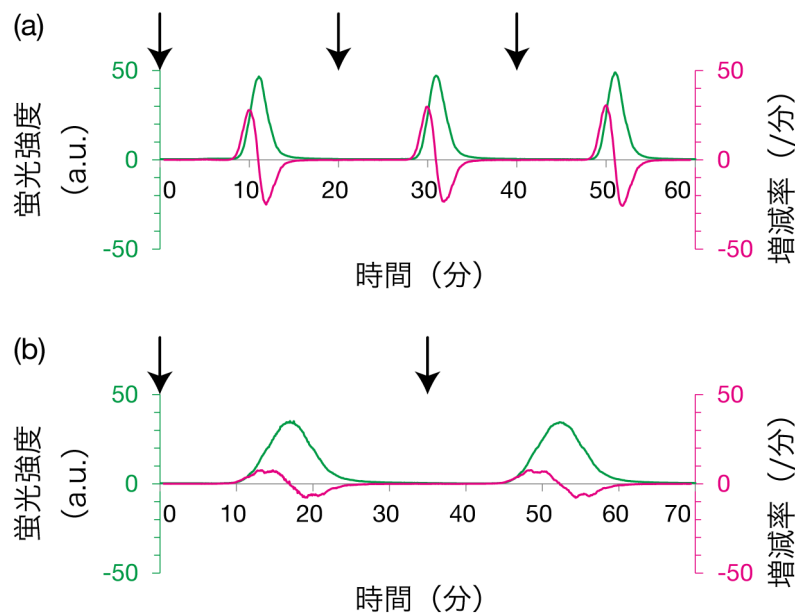


図 52：注入時の外部溶液濃度の応答特性。バルブ操作によりウラニン水溶液を注入した時刻を矢印で示した。 $(Q1, Q2) = (330 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ (a), $(Q1, Q2) = (330 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ (8 min) \rightarrow $(Q1, Q2) = (105 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ (b).

4.5 ドメイン形成 GV の捕捉

ドメイン形成 GV に対しても本デバイスが設計通り機能することを確認するため、標的粒径 $12 \mu\text{m}$ の流路に対してドメイン形成 GV を導入する実験を行った。はじめに流量を $(Q1, Q2) = (1300 \mu\text{L/h}, 300 \mu\text{L/h})$ に設定して導入を開始したのち、徐々に $(Q1, Q2) = (300 \mu\text{L/h}, 30 \mu\text{L/h})$ に減少させることで捕捉後の GV の安定化を図った。捕捉領域に捕捉された GV の蛍光顕微鏡像を図 53 に示す。ドメイン形成 GV に対しても粒径選別が設計通り機能しており、均一粒径の GV が捕捉されていることが確認できたのに加え、脂質ドメインが特徴的に

局在することが分かった. 図 50 において半球状の脂質ドメインが多く観察されたのに対し, 流れ場に沿う方向に縞状の脂質ドメインを持つ GV が多く確認された. 流れ場からの力学的ストレスが脂質ドメインの構造に与える影響については, 数値シミュレーションによる研究例が多い[10,11]. それによると, 流れ場の方向に沿ってドメイン構造が伸長することで縞状のパターンが現れること, 特に高流量になるにつれその構造が顕著になることが指摘されている. ポリブタジエン, ポリスチレン及びフタル酸ジオクチルから成る高分子混合溶液中で, 流れ場からの力学的ストレスにより相分離と縞状パターン形成が起こることが実験的に示されているものの[12], GV についての報告例はない. GV においても, 流れ場からの力学的ストレスにより縞状のパターン形成が起こることを実験的に示すことができた.

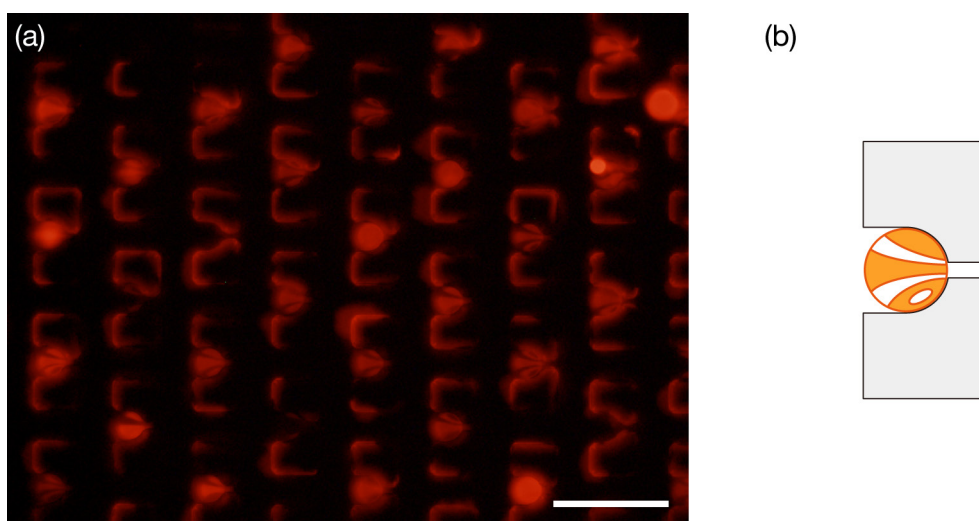


図 53：トラップに捕捉されたドメイン形成 GV の蛍光顕微鏡像(a)と模式図(b). 標的粒径 12 μm のデバイスを用いた. スケールバー = 50 μm .

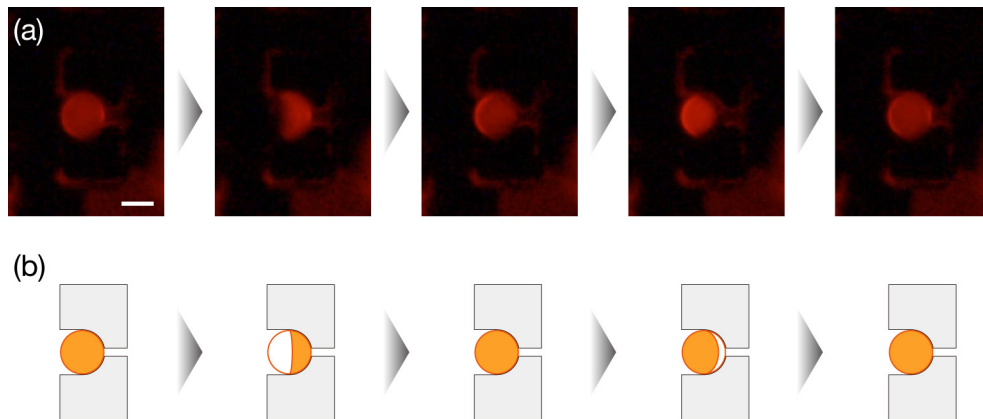


図 54：トラップ内部で回転するドメイン形成 GV の蛍光顕微鏡像(a)と模式図(b).
791 ms 毎の連続写真を示した. スケールバー = 10 μm .

そこで次に、流量を $(Q1, Q2) = (65 \mu\text{L/h}, -30 \mu\text{L/h})$ に減少させたところ、縞状の脂質ドメインが解消し、半球状の脂質ドメインを持つ GV が多く観察された。さらに、視野中の複数の GV について、トラップ内部で回転する挙動が観察された。トラップ内部で回転する GV の典型的な蛍光顕微鏡像を図 54 に示す。以上の結果は、流量を減少させることでマイクロポストとの接触状態を緩和でき、GV にかかる力学的ストレスを十分小さくできることを示唆している。GV が回転した理由については、詳細は不明であるが、流路の上面と底面で摩擦力が異なることが原因だと推測される。流路の上面が PDMS であるのに対し、底面はガラスであるため、図 55 に示したように両者の濡れ特性の違い等により GV を 1 方向に回転させる不均一な流れ場が生じている可能性がある。実際に、流路壁面に設けた空洞内部に形成される微小渦を利用して細胞や微粒子を捕捉し、空洞内部で回転させる技術が知られている[13]。本観察結果においては、低流量時にマイクロポストと GV 間の摩擦が緩和されることではじめて GV の回転挙動が現れたと推察できる。

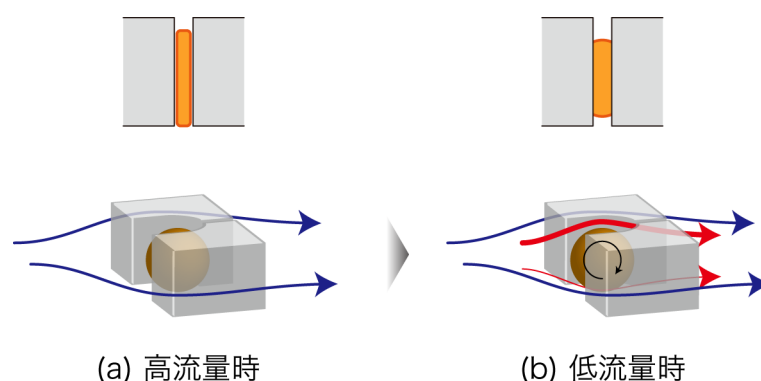


図 55：高流量時(a)と低流量時(b)の GV 周りの流れ場の模式図。トラップを迂回する流れを青矢印で、トラップの底部間隙を通過する流れを赤矢印で示した。

4.6 アネキシン V の効果の検証

先に述べたように、アネキシン V はホスファチジルセリン (PS) に結合する性質を持つ。DOPS を含むドメイン形成 GV に対して、アネキシン V を含む水溶液を添加することで脂質膜との相互作用を計測する実験を行った。また、アネキシン V の活性にはカルシウムイオンが必要である。そこで、アネキシン V を含む水溶液の組成は市販品の 50 倍希釈水溶液で、かつ終濃度で 0.2 mM の塩化カルシウムを含むように調製した。GV の捕捉後、第 4 節の流量条件で外部溶液にアネキシン V を含む水溶液を注入したところ、バルブ操作から 9 分以内に全 10 観察例中すべての GV が破裂した。図 56 にアネキシン V の添加前後の捕捉領域の蛍光顕微鏡像を示した。アネキシン V が PS に結合することで GV の膜張力が低下し、破裂に至ったと推定される。破裂に至るまでの時間はバルブ操作より 7 ± 2 分 ($n = 10$) であった。市販のアポトーシス検出キットの 600 分の 1 未満という極めて低濃度にも関わらず、GV の場合は膜の破裂に至るほどの鋭敏な応答を示すことが分かった。

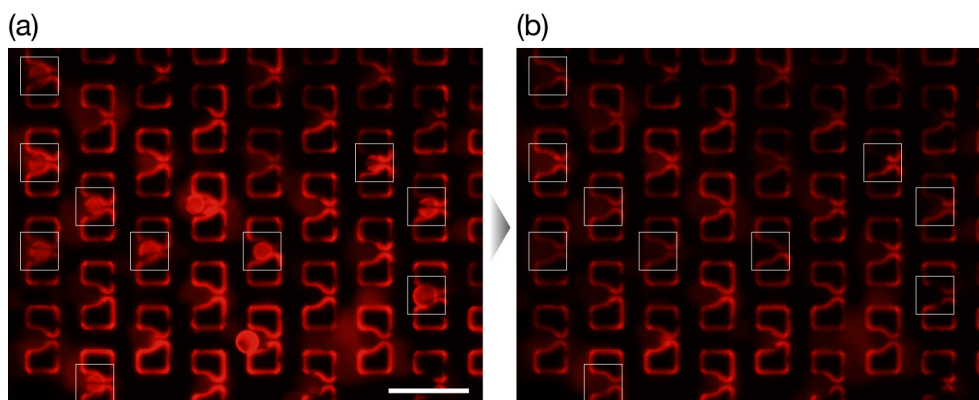


図 56 : DOPS 含有 GV に対するアネキシン V の効果検証. バルブ操作直後(a)と 9 分後(b)の捕捉領域の蛍光顕微鏡像. 観察対象を白枠で示した. スケールバー = 50 μm .

次に, DOPS を含まない GV に対して, 同様にアネキシン V を含む水溶液を添加する実験を行った. ここでは DOPS を含まない GV として, 終濃度が DOPC/SM/Chol/Texas Red-DHPE/Fru = 1.41 mM/0.96 mM/0.63 mM/1.8 μM /6 mM である GV を作製した. GV の捕捉後, 第 4 節の流量条件で外部溶液にアネキシン V を含む水溶液を注入したところ, 浸透圧差に由来すると見られる GV のわずかな収縮が観察されたものの, 60 分以内の破裂例は全 14 観察例中 1 例であった. 図 57 にアネキシン V の添加前後の捕捉領域の蛍光顕微鏡像を示した. この結果は, PS を含まない GV の膜に対して, アネキシン V はほぼ作用しないことを示している.

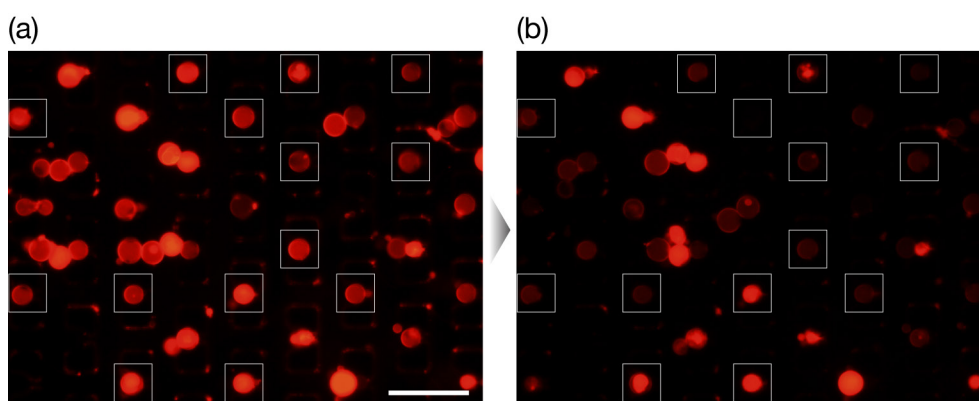


図 57 : DOPS 非含有 GV に対するアネキシン V の効果検証. バルブ操作直後(a)と 60 分後(b)の捕捉領域の蛍光顕微鏡像. 観察対象を白枠で示した. スケールバー = 50 μm .

4.7 まとめ

本章では、脂質ドメインを形成する GV の流れ場中における挙動と、ホスファチジルセリン (PS) 含有 GV 及び PS 非含有 GV それぞれに対して捕捉後にアネキシン V により摂動を加えた場合の応答特性の評価実験について述べた。

細胞膜には脂質ラフトやカベオラと呼ばれる局所構造（脂質ドメイン）が存在し、特定のタンパク質や分子が会合することで特に情報伝達の効率向上が図られている。GV 研究においても、その高機能化を図る上で脂質ドメインの利用は有意義であるが、そのためには力学的ストレスや化学的ストレスに対する脂質ドメインの物理化学的特性を明らかにすることが重要であると述べた。そこで、DOPC, DOPS, スフィンゴミエリン, コレステロールの混合膜から構成されたドメイン形成 GV を作製し、第2章で作製したマイクロ流体デバイスに導入することでその挙動を観察した。その結果、ドメイン形成 GV に対しても本デバイスは設計通り機能し、捕捉領域に均一粒径の GV が捕捉されることが確認できた。さらに流量設定に応じて脂質ドメインの局在パターンが変化することが分かった。高流量時には、流れ場から受ける力学的ストレスの影響だと思われる、縞状の脂質ドメインを持つ GV が多く観察されたのに対し、低流量時には単純分散液の観察結果と同様の半球状の脂質ドメインを持つ GV がトラップ内部で回転する挙動が観察された。これらの結果から、GV においてもドメイン構造のパターン形成が起こること、流量を減少させることでマイクロポストとの接触状態を緩和でき、GV にかかる力学的ストレスを十分小さくできることが示された。次に、アネキシン V を用いて捕捉後の GV に対して外部から摂動を加える実験を行った。PS 含有 GV については、アネキシン V の導入に伴い全 10 観察例中すべての GV が破裂した。一方で PS 非含有の GV については、観察時間内における破裂例は全 14 観察例中 1 例であった。以上の結果から、市販のアポトーシス検出キットの 600 分の 1 未満という極めて低濃度にも関わらず、GV の場合は膜の破裂に至るほどの鋭敏な応答を示すことが分かった。

本手法により、脂質ドメインを形成する GV に対しても、均一粒径の GV のアレイを生成可能である。GV の高機能化に関する研究や、生体分子と脂質膜の相互作用等を対象にした薬剤動態の解析に応用が期待される。

4.8 参考文献

- [1] K. Simons and E. Ikonen, *Nature*, 1997, **387**, 569–572.
- [2] (編)梅田真郷, 生体膜の分子機構 リピッドワールドが先導する生命科学, 化学同人, 2014.
- [3] T. Harder, C. Rentero, T. Zech and K. Gaus, *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, **19**, 470–475.
- [4] T. Baumgart, S. T. Hess and W. W. Webb, *Nature*, 2003, **425**, 821–824.
- [5] O. Bakht, P. Pathak and E. London, *Biophys. J.*, 2007, **93**, 4307–4318.
- [6] T. Robinson, P. Kuhn and P. S. Dittrich, 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 27–31 October 2013, Freiburg, Germany.
- [7] V. Gerke and S. E. Moss, *Physiol. Rev.*, 2002, **82**, 331–371.
- [8] G. Lee and H. B. Pollard, *Anal. Biochem.*, 1997, **252**, 160–164.
- [9] C. Pigault, A. Follenius-Wund, M. Schmutz, J. M. Freyssinet and A. Brisson, *J. Mol. Biol.*, 1994, **236**, 199–208.
- [10] X.-B. Chen, L.-S. Niu and H.-J. Shi, *Biophys. Chem.*, 2008, **135**, 84–94.
- [11] R. Yamamoto and X. C. Zeng, *Phys. Rev. E*, 1999, **59**, 3223–3230.
- [12] T. Hashimoto, K. Matsuzaka, E. Moses and A. Onuki, *Phys. Rev. Lett.*, 1995, **74**, 126–129.
- [13] J. P. Shelby and D. T. Chiu, *Lab Chip*, 2004, **4**, 168–170.

第 5 章

ジャイアントベシクルの膜上における DNA 反応の追跡

5.1 はじめに

GV 膜上に膜タンパク質や DNA を担持することで GV の高機能化を目指す研究が盛んである。例えば、チャネルタンパク質の一種である α -ヘモリシンは GV 膜上においても正しく機能し、膜孔を形成することが知られている[1]。また、DNA を折り畳むようにして高次構造体を形成させる DNA 折り紙法を応用し、脂質膜上に人工の膜孔を作製した報告例もある[2]。DNA は、このような高次構造体を直接利用可能なことに加え、情報担体として自由度の高い配列設計が可能な点が特徴である。中でも、DNA を利用したベシクルどうしの凝集制御や融合制御の研究進展が顕著である。Chan らは、細胞膜の融合過程に関与する SNARE タンパク質を模した DNA-脂質複合分子を作製し、ベシクルどうしの融合促進に用いた。互いに相補な配列を持つ 2 種類の DNA をそれぞれ異なるベシクル膜上に担持し、接触させることで DNA の二重鎖形成を介してベシクルどうしを融合し、その過程を詳細に解析した。その結果、DNA の二重鎖形成の配向性や、直接二重鎖形成に関与しない DNA-脂質間のリンカー配列の有無が融合効率に与える影響が明らかになった[3,4]。Stengel らは、zipper 型の DNA 構造を用いた融合法を提案した[5,6]。図 58 に模式図を示した。zipper 型の DNA 構造を用いることにより DNA の脂質膜への局在性が向上し、ベシクルの融合効率が向上すること、また、1 本鎖どうしの二重鎖形成による融合の場合にも、DNA 末端にコレステロールを 2 分子結合させたダブルアンカー型の構造を用いることで融合効率が向上することが示された。このような研究の多くは、直径 100 nm 未満の一枚膜ベシクル (smaller unilamellar vesicle: SUV) を用いて、凝集体生成の有無を分光学的手法により検出することでなされてきたが、近年、GV に対しても膜上に DNA を担持することにより GV どうしの接合を制御できることが報告されている。GV 分散液を直接顕微鏡観察することで、配列依存的に GV どうしの接合が起こることが確認された[7]。このように、配列に依存した分子認識能を有し、かつ配列設計により容易に多様性を生み出すことのできる DNA は、GV の高機能化を目指す今後の研究の中で極めて重要な位置を占めると期待される。GV どうしの相互作用の研究は、GV どうしの接合状態の研究を経て、人工多細胞系構築の研究へとつながるだろう。そのためには、GV 膜上での DNA の挙動を精確に捉えることが肝要で

ある．マイクロ流体デバイスを用いることで，均一粒径の DNA 担持 GV のアレイを生成でき，反応の不均一性も含めた計測が可能になると期待される．また，捕捉後に DNA 水溶液を逐次流し込むことで，前段の反応における未反応物の影響を抑えつつ，連続反応における履歴も含めた計測が可能である．加えてマイクロ流体デバイスは，1 対 1 の GV ペアを並列操作で大量に生成し得る．そこで，第 2 章で作製したデバイスを用いて均一粒径の DNA 担持 GV のアレイを生成し，GV 膜上での連続的な DNA の二重鎖形成反応を同時並列に追跡した．

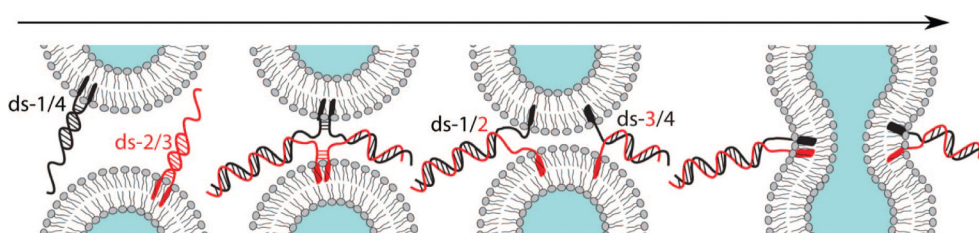


図 58 : zipper 型 DNA 構造を用いたベシクル融合法. 文献[5]から引用.

5.2 DNA-コレステロール複合分子

DNA-コレステロール複合分子は文献[5]を参考に設計し，合成にはつくばオリゴサービス株式会社の DNA 受託合成サービスを利用した．DNA を脂質膜表面に担持するため，末端にはリンカーとしてトリエチレングリコールを介してコレステロール (Chol) を結合させた．また，DNA の二重鎖形成反応及び鎖置換反応を可視化する目的で，緑色蛍光分子として 6-carboxyfluorescein (6-FAM) を，消光分子として Black Hole Quencher-1 (BHQ-1) を導入した．DNA-コレステロール複合分子の模式図を図 59 に，配列情報を表 7 にそれぞれ示した．分子構造及び結合様式は図 60–63 の通りである．

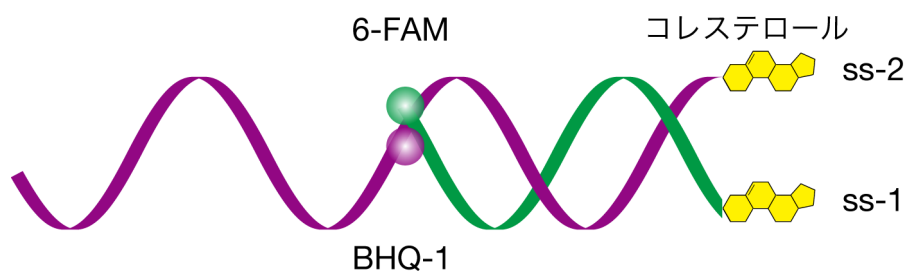


図 59 : DNA-コレステロール複合分子の模式図.

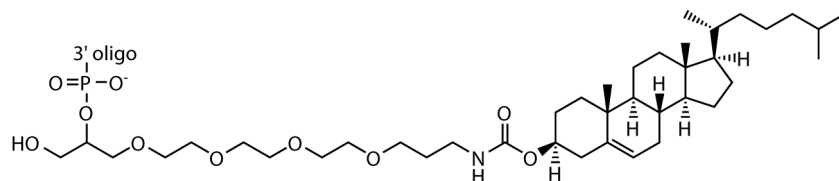


図 60 : 3'-Cholesteryl-TEG の分子構造.

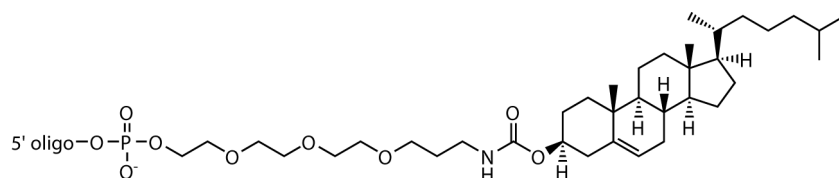


図 61 : 5'-Cholesteryl-TEG の分子構造.

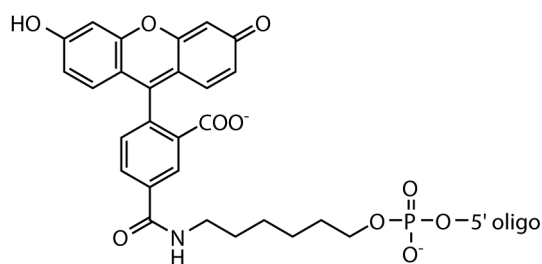


図 62 : 6-FAM の分子構造.

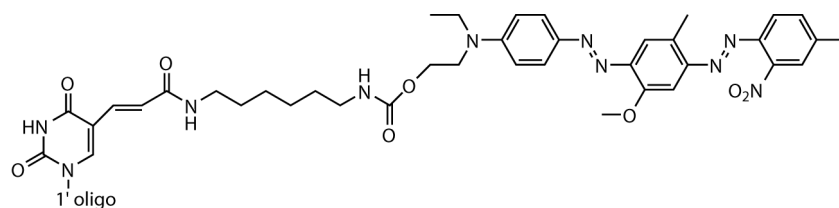


図 63 : BHQ-1 の分子構造.

表 7: 使用した DNA の配列と蛍光分子, 消光分子, コレステロール(Chol)の修飾位置.

DNA鎖	配列
ss-1	5' 6-FAM-AGG CAC GAC GGA-Chol 3'
ss-2	5' Chol-TCC GTC GTG CC(T-BHQ-1) TAT TTC TGA TGT CCA 3'
ss-3	5' TGG ACA TCA GAA ATA AGG CAC GAC GGA 3'

5.3 DNA 担持ベシクルの調製法

ここでは，GV の調製法を述べる．GV の構成成分には 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) と 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-*rac*-(1-glycerol)] (POPG)，コレステロール (Chol) を用いた．DNA-コレステロール複合分子が脂質膜に挿入されていることを Förster 共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer: FRET) により確認する目的で，緑色蛍光脂質である N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (fluorescein-DHPE) と赤色蛍光脂質である Texas Red 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (Texas Red-DHPE) を用いた．fluorescein-DHPE は Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) から購入した．fluorescein-DHPE の分子構造を図 64 に示す．緩衝液調製のための 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris) と塩酸 (0.1 M) は和光純薬工業株式会社から，エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム四水和物 (EDTA) は関東化学株式会社からそれぞれ購入した．また，水溶性の緑色蛍光分子であるウラニンは和光純薬工業株式会社から購入した．

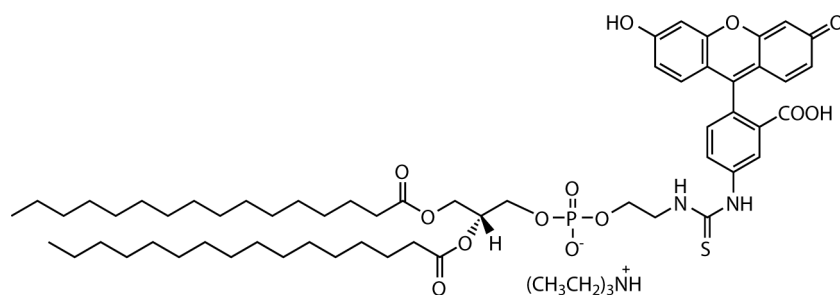


図 64 : fluorescein-DHPE の分子構造.

GV は第 2 章 5 節と同様の手法を用いて調製した．ただし，DNA の二重鎖形成反応の効率を上げるため，膨潤液としてトリス塩酸緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を用いた．このような塩濃度の高い条件では，脂質分子間の反発が抑制され，一枚膜の GV の形成が阻害される恐れがある．そこで，脂質薄膜にドープするフルクトース (Fru) の量を増加させた．膨潤後の各成分の終濃度は，実験の目的に応じてそれぞれ POPC/POPG/Chol/Fru = 1 mM/0.11

mM/0.11 mM/10 mM (組成 A), POPC/POPG/Chol/Texas Red-DHPE/Fru = 2 mM/0.22 mM/0.22 mM/10 μ M/20 mM (組成 B), POPC/POPG/Chol/fluorescein-DHPE/Texas Red-DHPE/Fru = 2 mM/0.22 mM/0.22 mM/0.5 μ M/10 μ M/20 mM (組成 C) とした. 組成 B,C の GV に関しては, 調整後さらに 50°C で 1 時間超音波処理することにより粒径を減少させ, small vesicle (SV) とした. GV の外水相に添加された DNA-コレステロール複合分子は, 自発的に脂質膜に移行することが知られている[3,5]. そこで, 作製した GV もしくは SV の懸濁液に DNA (ss-1) を添加し, 60°C で 1 時間以上静置することにより DNA 担持 GV を作製した. ss-1 の終濃度は, 組成 A の GV 懸濁液について 10 μ M とし, 組成 B, C の SV 懸濁液について 0.5 μ M とした.

5.4 送液システム

GV 捕捉後の連続的な DNA 水溶液の添加には, 第 4 章 2 節に示した注入型の送液システムを用いた. ただし, バルブ-デバイス間の接続には内径 0.17 mm の ETFE チューブ (株式会社島津ジーエルシー, JR-T-078-M10) を使用し, 損失体積を抑制した. これにより, バルブ操作から DNA 導入にかかる時間の短縮が期待できる. また, サンプルループの容量は 20 μ L とした.

5.5 観察条件と蛍光強度測定の手順

GV 膜上での連続的な DNA の二重鎖形成反応の追跡には, 倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus, IX71) に取り付けた冷却 CCD カメラ (Olympus, DP72) により取得した落射蛍光顕微鏡像を用いた (Ex. 460–495 nm, Em. 510–550 nm). この顕微鏡像は, 露光時間を 0.5 秒として, 5 秒毎に撮影した.

オープンソースの画像処理ライブラリである OpenCV[8]を利用し, GV 膜上の蛍光強度変化を解析するプログラムを作成した. プログラムを含めた解析のワークフローは次の通りである. まず, 各々の GV について, マイクロポストによる散乱の影響を受けにくい, トラップ入射部の最外膜を含む 9 ピクセルを選定した. ノイズの影響も考慮し, その範囲内における最大値を膜上蛍光強度の代表値とした.

SV の膜上における Förster 共鳴エネルギー移動の評価、及び DNA の単純分散溶液中での二重鎖形成反応の効率の測定には、分光蛍光光度計（株式会社日立ハイテクノロジーズ, F-2500）により取得した蛍光スペクトルを使用した (Ex. 488 nm, バンド幅: 2.5 nm). 6-FAM, fluorescein 及びウラニンについては 512 nm 近傍のピーク値を, Texas Red については 601 nm 近傍のピーク値をそれぞれ蛍光強度の代表値として用いた. FRET 効率 (E) として, ここでは次の式で表される指標を用いた [9]. I_{donor} はエネルギー供与体である 6-FAM, fluorescein 又はウラニンの蛍光強度であり, I_{acc} はエネルギー受容体である Texas Red の蛍光強度である.

$$E = I_{\text{acc}} / (I_{\text{acc}} + I_{\text{donor}}) \quad (1)$$

5.6 バッファー条件の検討

ナトリウムイオン等のカチオンの濃度を高くすることで鎖間の静電反発力を抑制でき, 2 本鎖 DNA の安定性は高くなる. 従って, GV 膜上での二重鎖形成反応の効率を向上させるためには, 塩濃度の高いバッファーを用いることが望ましい. 一方で, 塩濃度の高い条件では脂質分子間の反発が抑制され, 一枚膜の GV の形成が阻害される恐れがある. そこで, DNA の二重鎖形成反応と一枚膜の GV 形成の双方の要求を満たすバッファー条件を検討した. まず, 表 8 に示した 4 種類のトリス塩酸緩衝液を調製した. 2 価のカチオンの存在下で一枚膜の GV の形成が促進されるという報告はあるものの [10], 1 価のカチオンと 2 価のカチオンの共存下では却って脂質膜どうしの接着が起こり, 脂質の凝集体 (脂質塊) が生成することで一枚膜の GV の形成が妨げられるという報告がある [11]. そこで, 2 価のカチオンをキレートし, 系内から除去する作用を期待して EDTA を加えた. なお, 10 mM Tris-HCl + NaCl は文献 [5] で使用実績のあるものであり, Tris に加え高濃度のナトリウムイオンも含んでいる. これらの緩衝液それぞれに対し, ss-1 のみを溶解したもの (ss-1), ss-1 と ss-2 を溶解後 25°C で 30 分静置することにより二重鎖形成させたもの (ss-1 + ss-2), ss-1 と ss-2 の二重鎖形成後さらに ss-3 を加えて 25°C で 30 分静置することにより二重鎖形成の組み換え (鎖置換反応) をさせたもの ((ss-1 + ss-2) + ss-3) の 3 種類の試料溶液を調製し, 分光蛍光光度計を用いて 6-FAM の蛍光強度を測定した.

各 1 本鎖 DNA の終濃度は、濃度誤差を許容するため ss-1/ss-2/ss-3 = 0.5 μ M/1.5 μ M/2.0 μ M とした。各緩衝溶液中での 6-FAM の蛍光スペクトルの測定結果を図 65 に示す。ss-1 の蛍光強度を 100%としたときの ss-1 + ss-2, 及び(ss-1 + ss-2) + ss-3 の相対蛍光強度は図 66 に示す。ss-1 + ss-2 の測定結果より、塩濃度の低下に伴い二重鎖形成の効率が低下することが分かった。鎖置換反応により再度蛍光が回復したが、消光状態と回復状態における蛍光強度の比は、それぞれ 12.3 (10 mM Tris-HCl + NaCl), 9.94 (100 mM Tris-HCl), 8.54 (50 mM Tris-HCl), 3.98 (10 mM Tris-HCl) となった。10 mM Tris-HCl + NaCl に効率で劣るものの、10 mM Tris-HCl, 50 mM Tris-HCl, 及び 100 mM Tris-HCl 中でも DNA が設計通り機能することが確認できた。

表 8：調製したトリス塩酸緩衝液の略称と組成。

略称	組成及び液性
10 mM Tris-HCl + NaCl	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0
100 mM Tris-HCl	100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
50 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

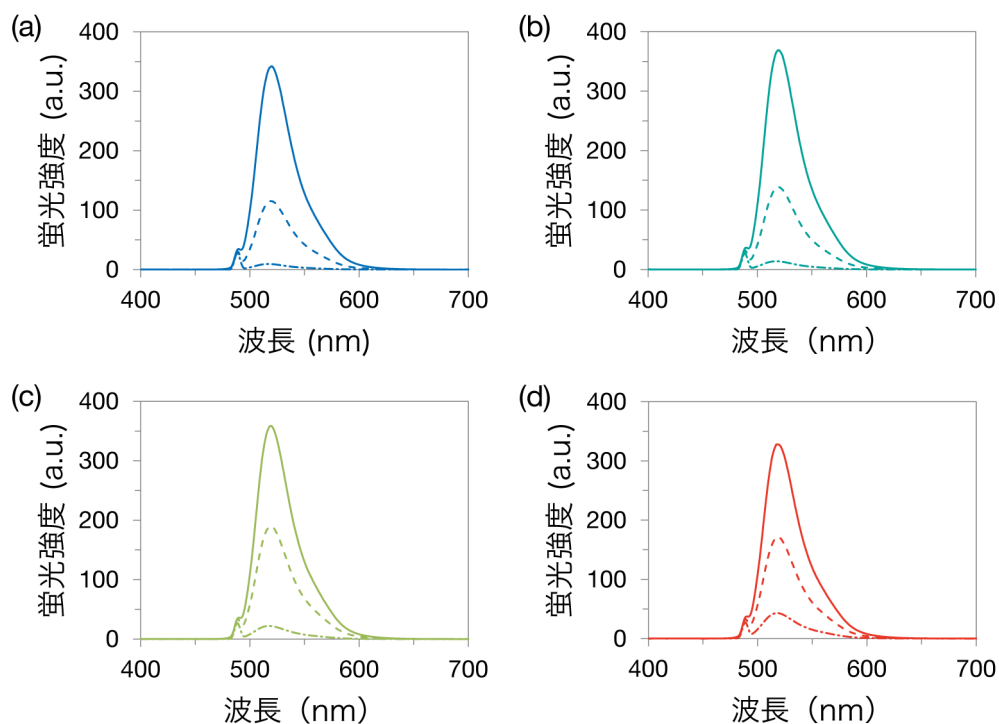


図 65：各緩衝溶液中での蛍光スペクトルの測定結果。10 mM Tris-HCl + NaCl(a), 100 mM Tris-HCl(b), 50 mM Tris-HCl(c)及び 10 mM Tris-HCl(d)中での蛍光スペクトル。初期状態(ss-1)を実線, 消光状態(ss-1 + ss-2)を一点鎖線, 回復状態((ss-1 + ss-2) + ss-3)を破線で示した。

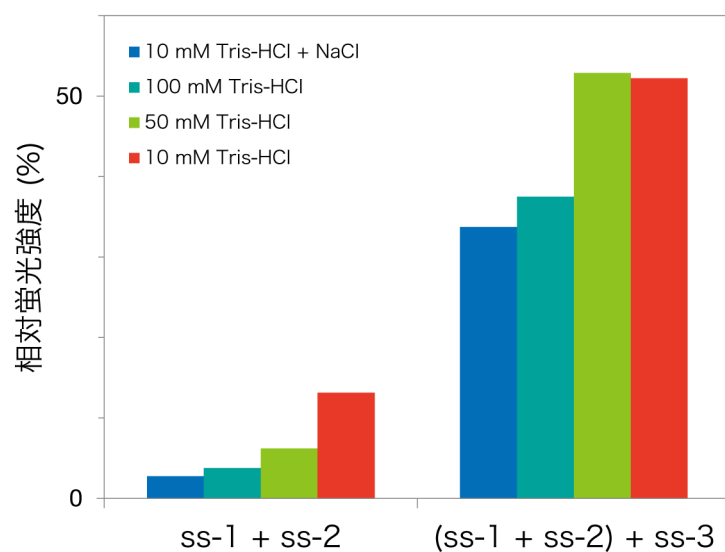


図 66：各種緩衝液中での二重鎖形成反応の効率。

次に、10 mM Tris-HCl, 50 mM Tris-HCl 及び 100 mM Tris-HCl 中で GV を形成し、その違いを顕微鏡観察により調査した。図 67 に作製した GV の位相差顕微鏡像を示す。Milli-Q 水で膨潤した場合と異なり、一枚膜のものと認められる GV が観察された一方で、多重膜や入れ子型の GV、脂質塊が多く観察された。特に、多重膜や入れ子型の GV、脂質塊は Tris の濃度が高いほど多くなる傾向があった。

以上の結果から、DNA の二重鎖形成反応と一枚膜の GV 形成の双方の要求を満たすバッファー条件として、本研究では 50 mM Tris-HCl を用いることとした。

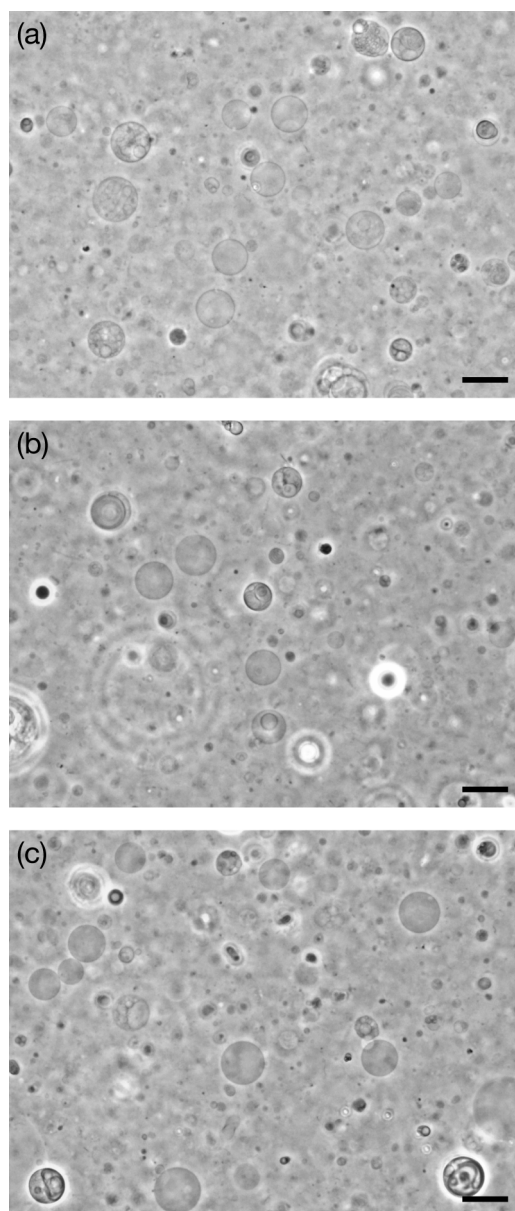


図 67 : 10 mM Tris-HCl(a), 50 mM Tris-HCl(b), 100 mM Tris-HCl(c)中で作製された GV の位相差顕微鏡像. スケールバー = 20 μm .

5.7 膜挿入効率の評価

DNA-コレステロール複合分子が脂質膜に移行することを FRET により確認する実験を行った. 第3節の手順で作製した組成 B の SV に対し, 外水相から ss-1 もしくはウラニンを添加し, 25°C で 60 分静置した. ss-1 及びウラニンの終濃度は 0.5 μM とした. ss-1 については, 温度による脂質膜への移行特性の

違いを計測する目的で、40°C 及び 60°C で 60 分静置した試料も作製した。また、組成 C の SV に関しては何も添加せず、参照試料として用いた。fluorescein-DHPE は 6-FAM と同等の蛍光特性を持ち、かつ強く脂質膜に局在していると考えられるため、高い FRET 効率を示すと期待される。それぞれの試料に対する FRET 効率の測定結果を図 68 に示す。Texas Red-fluorescein の FRET 効率が最も高く、約 0.47 であった。これは、fluorescein-DHPE が強く脂質膜に局在していることを示す。一方で Texas Red-Uranine の FRET 効率が最も低く、0.13 であった。ウラニンは親水性が高く、GV の外水相に均一に分散しているためと考えられる。Texas Red-6-FAM の FRET 効率はこれらの中間の値をとり、0.26 (25°C), 0.26 (40°C), 0.27 (60°C) であった。以上の結果から、DNA-コレステロール複合分子はその一部が脂質膜に移行していることが示唆された。また、温度依存性はほとんど示さなかったものの、高温側で僅かに上昇傾向が見られたため、本研究では 60°C, 60 分静置の条件で DNA 担持 GV を調製することとした。

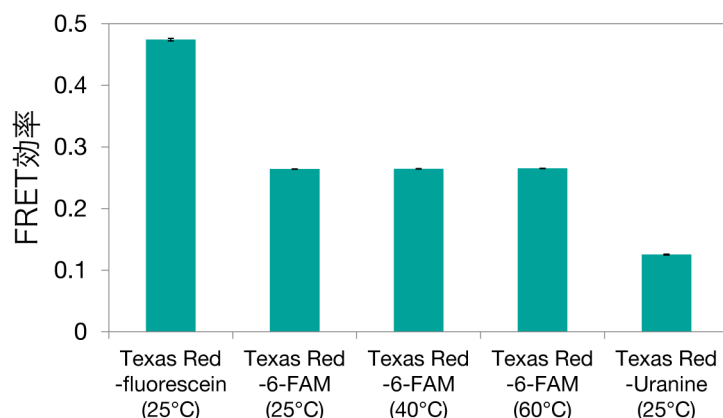


図 68：試料毎の FRET 効率 ($n = 3$)。DNA-コレステロール複合分子の一部が脂質膜に移行していることを示す。

5.8 GV 膜上における連続的な二重鎖形成反応の追跡

第 3 節の手順で作製した組成 A の GV に対して外水相から ss-1 を添加し、60°C で 1 時間静置することで DNA 担持 GV を調製した。標的粒径 12 μm のデバイスに DNA 担持 GV を導入し、捕捉後、外部溶液に DNA 水溶液を逐次添加することにより膜上で連続的な二重鎖形成反応を誘起し、その挙動を蛍光強

度から評価する実験を行った。GV 膜上での反応の模式図を図 69 に示した。

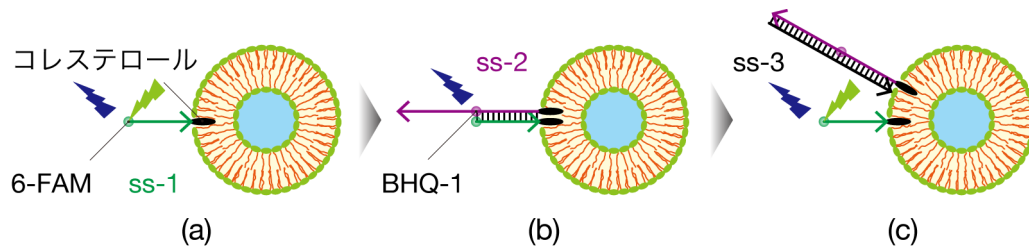


図 69: GV 膜上における連続的な二重鎖形成反応の模式図. ss-1 が GV 膜に担持された初期状態(a)から, ss-2 を導入することで二重鎖形成反応が起こり, 消光状態へ遷移する(b). ss-3 を導入することで鎖置換反応が起こり, 再度発光状態へ戻る(c).

外部溶液は GV 懸濁液と等張の糖含有トリス塩酸緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM Fru) とした. 流量を $(Q1, Q2) = (1000 \mu\text{L/h}, 100 \mu\text{L/h})$ に設定したところ, 導入開始から 10 分で捕捉領域に均一粒径の DNA 担持 GV のアレイを生成できた. ここで, $Q1, Q2$ はそれぞれ外部溶液と GV 懸濁液の設定流量とする. これは, 第 3 章での設定値の約 3 倍の流量条件である. 高流量にも関わらず安定して DNA 担持 GV が粒径選別・空間配置された理由の一つとして, DNA のポリアニオンとしての性質があると考えられる. 第 2 章での考察に従い, DNA 担持 GV 膜とマイクロポストとの静電相互作用により見かけ上の曲げ弾性係数が大きくなっていることが推測される. 次に, 外部溶液に ss-2 の水溶液 (30 μM ss-2, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM Fru) を注入したところ, バルブ操作から約 90 秒で DNA 担持 GV の膜上蛍光強度が著しく減少した. さらに, 続けて外部溶液に ss-3 の水溶液 (40 μM ss-3, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM Fru) を注入したところ, バルブ操作から約 90 秒で膜上蛍光強度が上昇した. 図 70 に落射蛍光顕微鏡像を示す.

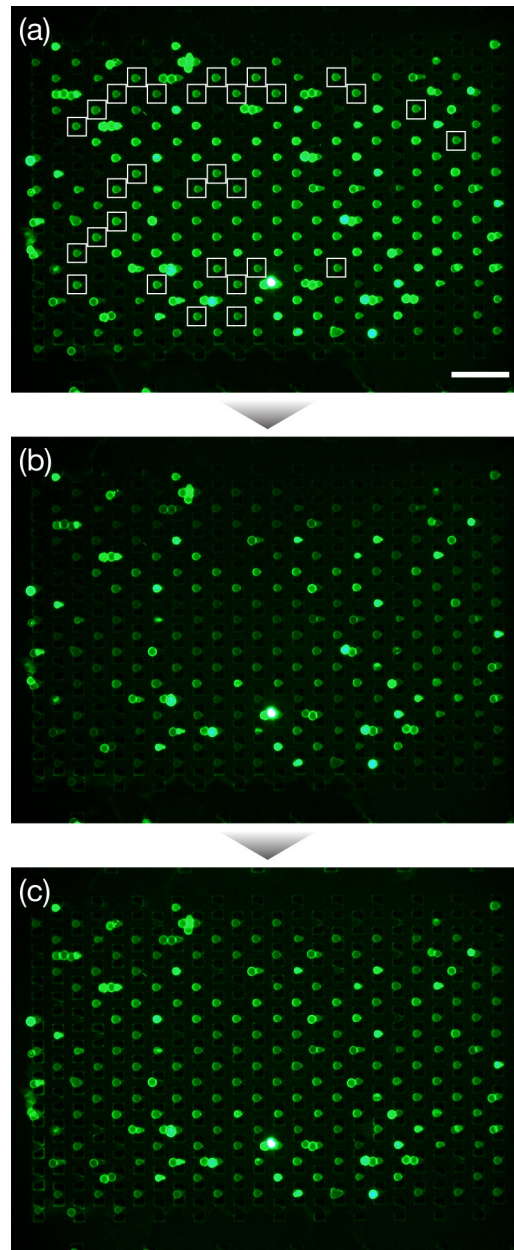


図 70 : GV 膜上での連続的な DNA 反応の追跡. 初期状態(a), 1 回目のバルブ操作から 90 秒後(b), 及び 2 回目のバルブ操作から 90 秒後(c)の捕捉領域の蛍光顕微鏡像. 観察対象を白枠で示した. スケールバー = 100 μm .

取得された蛍光顕微鏡像の中から, ss-1 が最外膜に取り込まれている GV を 30 個選定し, 膜上蛍光強度の時間変化を追跡した結果を図 71a に示す. 選定した全ての GV について, ss-2 の導入に伴う蛍光強度の減少と, ss-3 の導入に伴う蛍光強度の増加が見られたことから, ss-1 が GV 膜上で ss-2 と二重鎖形成反

応し、その後に ss-2 が ss-3 と鎖置換反応して ss-1 が再度生成したと言える。加えて、これら DNA が反応している間にも緩やかに GV の蛍光強度が減少していた。これは、DNA の親水性が高いため、DNA-コレステロール複合分子の脂質膜からの脱離を反映している可能性も考えられるが[6,12,13]、6-FAM の蛍光部位が蛍光顕微鏡観測によって徐々に退色したことに因ると考えられる。実際、Song らの報告によれば、本研究と同様のセットアップの落射蛍光顕微鏡で 6-FAM と同じ蛍光部位を持つフルオレセインを担持させたビーズ粒子を蛍光観測する場合、半減期約 1 分間で指数関数的に蛍光強度が減少するという[14]。これは、励起された一重項状態のフルオレセインからの蛍光のほかに、無輻射遷移及び分解が起きたり、励起一重項状態から項間交差で生じた三重項状態のフルオレセインの無輻射遷移や分子衝突による分解、水中の酸素による励起三重項状態のフルオレセインの基底状態への遷移や分解といういくつかの反応経路があるためである。本研究でも、参照実験として fluorescein-DHPE を 1 mol% 含む GV を Tsumoto 法によって作製し、同マイクロ流体デバイスで粒径選別・空間配置後蛍光顕微鏡観測して GV の蛍光強度が減少する過程を計測したところ、合計 27 秒の観測時間（5 秒おきに 0.15 秒の露光時間で 180 回撮影）に 3 割程度まで蛍光強度が指数関数的に減少した。一方、図 71a において GV 膜上 ss-1 の 6-FAM が蛍光を発していると思われる 8 分から 16 分の蛍光強度変化を 1 次の指数関数でフィッティングすると、タイムラプス観測としていたにも関わらず蛍光強度の半減期は約 8 分と見積られ、徐々に蛍光分子が退色していることが確認された。この減衰速度が fluorescein-DHPE の GV よりも遅くなっているのは、fluorescein-DHPE は脂質に対して 1 mol%であるのに対し、図 68 より膜上にある ss-1 の実効濃度はそれより低くなっており、濃度消光の影響が抑えられているためと推測される。

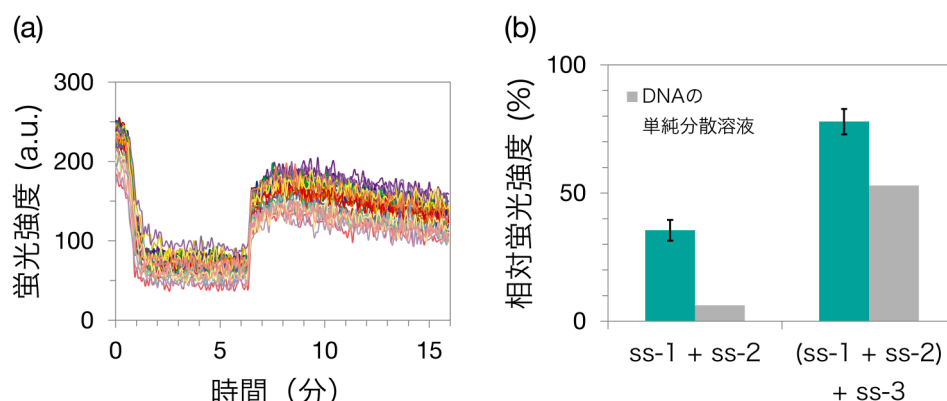


図71:GV膜上蛍光強度の時間変化(a)と消光状態と回復状態における相対蛍光強度(b) ($n = 30$). DNAの単純分散溶液中での測定結果を灰色の棒グラフで併記した.

図71aの測定結果をもとに、30秒（初期状態）、1分30秒（消光状態）、7分30秒（回復状態）の時刻における蛍光強度を代表値として用い、DNAの動作効率を算出した。図71bには、初期状態の蛍光強度を100%とした場合の、消光状態と回復状態のそれぞれの相対蛍光強度を示した。第6節で示した、DNAの単純分散溶液中での測定結果も併せて示した。デバイスを用いた実験においては、元のGV懸濁液に含まれるGVのうちごく一部を捕捉領域に捕捉し、順にDNA水溶液を添加するため、混合したss-1, ss-2, ss-3の全てが同一水溶液中にあるDNAの単純分散溶液の測定結果と直接比較することは難しい。しかし、図71bの結果を次のように解釈できるだろう。まず、ss-2の導入に伴う二重鎖形成反応は進行するものの、反応効率は悪く、相対蛍光強度は $35 \pm 4\%$ に留まった。蛍光強度がそれほど大きく減少しなかったのは、流路内壁に付着するなどして2本鎖DNAとならなかったss-1に由来する背景光が原因と推測される。次に、ss-3の導入に伴う鎖置換反応の反応効率は高く、蛍光分子そのものの退色が起こっている中で、結果として、初期の蛍光強度の $78 \pm 5\%$ まで回復した。これは、二重鎖形成反応が十分に進行しなかったss-1がss-3導入後に大きく蛍光強度を回復することと、未反応のss-2が洗い流されることでss-3が効率よく膜上の2本鎖DNA(ss-1/ss-2)と反応できることなどが原因として推測される。

次に、GV膜上のDNA反応について、図71aから読み取れる時間発展の特徴を議論する。GV膜の蛍光強度測定では、トラップ入射部の最外膜を含む9ピクセル（ $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ ）を選定して行い、ノイズの影響も考慮し、その範囲

内における最大値を膜上蛍光強度の代表値とした。このような GV 膜の一部の領域での蛍光分子に由来する蛍光強度の経時変化は、その領域に蛍光分子が出たり入ったりする揺らぎ（吸着脱離と側方拡散）や、その領域内の蛍光脂質の蛍光団そのものの揺らぎ（本実験では、GV 膜上での DNA 二重鎖形成反応や鎖置換反応によって引き起こされるエネルギー移動が要因となる蛍光強度変化）などの情報を持つ[15]。そこで30個のGVの蛍光強度に対し、GV膜上でのDNAの鎖置換反応に関わる8分から16分について、図71aにある蛍光強度の時系列に対し1分間の強度平均をとることで平滑化し、さらに蛍光退色による減衰を指数関数でフィッティングすることで補正して、その自己相関関数を解析したのが図72である。自己相関関数が高い時定数 τ は、30個のGV間でばらついていることがわかった。この結果は、8分から16分の間で、自己相関解析の時刻をずらしつつ平均をとった場合にも見られた。また、捕捉領域におけるGVの位置別に自己相関関数を解析したところ、位置によるパターンの偏在は確認できなかった。以上の結果から、いずれのGVでも、分というオーダーで蛍光強度が特徴的に変化していることが示唆され、鎖置換反応によって引き起こされる、脂質膜上の分子の側方拡散やドメイン形成よりも非常にゆっくりとした時間スケールの形態変化の可能性が考えられる[16]。この結果は、本マイクロ流体デバイスによって、1個1個のGVの不均一性[17]とDNAのGV膜上鎖置換反応との新たな相関を提案するものであり、大きな意義を持つと言える。

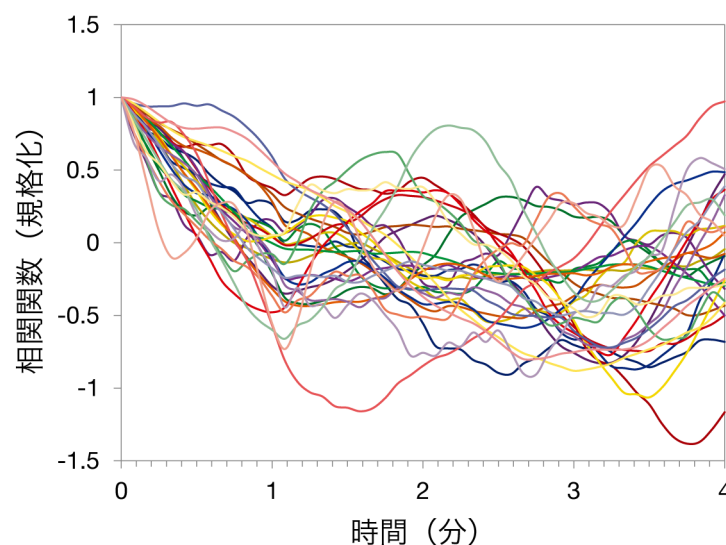


図72：GV膜上蛍光強度の自己相関関数 ($n = 30$).

5.9 まとめ

本章では、DNA-コレステロール複合分子を用いた、GV 膜上での連続的な DNA の二重鎖形成反応の同時並列計測の実験について述べた。

配列に依存した分子認識能を有し、かつ配列設計により容易に多様性を生み出すことのできる DNA は、GV の高機能化や GV どうしの相互作用の研究の中で重要な位置にあることを述べた。マイクロ流体デバイスを用いれば、DNA を膜上に担持した GV に対して逐次 DNA 水溶液を流し込むことができ、未反応物の影響を抑えた連続反応の計測も可能になる。このような計測を実現するためには、DNA の二重鎖形成反応が正しく進行し、かつ一枚膜の GV の形成を阻害しないバッファー条件が要求される。分光蛍光光度計を用いた DNA の反応効率測定と、形成された GV の顕微鏡観察の結果から、50 mM Tris-HCl が好適であるという知見を得た。GV の分散液に外水相より DNA-コレステロール複合分子を添加することで DNA 担持 GV を調製した。添加した DNA-コレステロール複合分子が脂質膜に移行することを確認するため、Förster 共鳴エネルギー移動による確認を行った。その結果、添加した DNA-コレステロール複合分子の一部が設計通り脂質膜に挿入されていることが示唆された。第2章で作製したデバイスに DNA 担持 GV を導入したところ、第3章での設定値の約3倍の流量条件にも関わらず、安定して DNA 担持 GV が粒径選別され、捕捉された。第2章の考察も考慮すると、DNA のポリアニオンとしての性質が、GV 膜の見かけ上の曲げ弾性係数を大きくしていることが推測される。次に、GV 膜の消光状態と発光状態を切り替えるための1本鎖 DNA を外部溶液より順に導入したところ、バルブ操作から約90秒で状態が遷移するという結果を得た。30個のGVに対する膜上蛍光強度の時間変化の解析から、2回目の二重鎖形成反応の後、いずれのGVも膜上蛍光強度は初期強度の $78 \pm 5\%$ まで回復することが分かった。一方、蛍光強度の時間変化の自己相関関数を解析すると、その特徴的な時定数 τ にばらつきがみられた。これは、GV 膜上での化学反応が個々のGV膜の状態からの影響を受けてばらつくことを示しているものとして大きな意味を持つ。

本手法により、DNA 担持 GV に対して逐次 DNA 水溶液を流し込みつつ、その応答を履歴も含めて同時並列に追跡することが可能になった。GV 膜上での

連続的な DNA 反応を通じて高次の DNA 構造を作製する研究等への応用が期待される.

5.10 参考文献

- [1] T. Robinson, P. Kuhn, K. Eyer and P. S. Dittrich, *Biomicrofluidics*, 2013, **7**, 044105.
- [2] M. Langecker, V. Arnaut, T. G. Martin, J. List, S. Renner, M. Mayer, H. Dietz and F. C. Simmel, *Science*, 2012, **338**, 932–936.
- [3] Y.-H. M. Chan, B. van Lengerich and S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 979–984.
- [4] Y.-H. M. Chan, B. van Lengerich and S. G. Boxer, *Biointerphases*, 2008, **3**, FA17–FA21.
- [5] G. Stengel, L. Simonsson, R. A. Campbell and F. Höök, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 8264–8274.
- [6] G. Stengel, R. Zahn and F. Höök, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 9584–9585.
- [7] M. Hadorn, E. Boenzli, K. T. Sørensen, D. De Lucrezia, M. M. Hanczyc and T. Yomo, *Langmuir*, 2013, **29**, 15309–15319.
- [8] An open source computer vision and machine learning software library.
Available: <http://opencv.org/>
- [9] S. M. Christensen, P.-Y. Bolinger, N. S. Hatzakis, M. W. Mortensen and D. Stamou, *Nat. Nanotechnol.*, 2012, **7**, 51–55.
- [10] N. Magome, T. Takemura and K. Yoshikawa, *Chem. Lett.*, 1997, **26**, 205–206.
- [11] K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh and K. Kinoshita, *Biophys. J.*, 1998, **74**, 2973–2982.
- [12] P. A. Beales and T. K. Vanderlick, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2014, **207**, 290–305.
- [13] C. Dohno, K. Matsuzaki, H. Yamaguchi, T. Shibata and K. Nakatani, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 10117–10121.
- [14] L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young and H. J. Tanke, *Biophys. J.*, 1995, **68**, 2588–2600.
- [15] N. L. Thompson, X. Wang and P. Navaratnarajah, *J. Struct. Biol.*, 2009, **168**, 95–106.
- [16] E. Karatekin, O. Sandre, H. Guitouni, N. Borghi, P.-H. Puech and F.

Brochard-Wyart, *Biophys. J.*, 2003, **84**, 1734–1749.

[17] T. Tomita, T. Sugawara and Y. Wakamoto, *Langmuir*, 2011, **27**, 10106–10112.

第 6 章

総括

第1章では本論文の背景や目的と共に、研究の意義やそれによってもたらされる波及効果について述べた。生体膜モデルとしてのみならず、人工細胞や原始細胞モデル創成の観点からも興味深いGVに対し、マイクロ流体デバイスを導入した研究の意義について述べた。GVを用いた生体分子動態のスクリーニング基盤技術や、近年注目が集まっている人工細胞の動態解析、分子の化学反応に基づく情報通信技術への応用可能性を説明した。

以上で述べた研究背景を受け、本研究では、デバイス上流でGVを望みの粒径に絞り込み、下流で均一粒径のGVを複数空間配置できる粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスの開発と、それを用いたGV動態の同時並列計測を目的とした。

第2章では、GVのための粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスの設計指針と、その性能評価のための実験について述べた。本研究で粒径選別の手法として採用した決定論的横置換法 (DLD) について、その基本原理を示し、解決法としての有用性を述べた。作製したデバイスを用いて、12, 16, 20 μm の3種類の標的粒径に対し、総じて変動係数12%未満で均一粒径GVを67個以上空間配置することに成功した。曲げ弾性係数に関する実験結果と考察から、実際に捕捉されたGVの粒径が設計よりも約10%大きくなったことは、GVの変形能及びPOPGの静電相互作用に基づく反発力が見かけ上の曲げ弾性係数を高くしていることが原因と考察した。次に、捕捉効率の観点から本デバイスを評価した。トラップと1対1対応したGVを高効率で得るためには、トラップの配置条件に加え、観察時刻やトラップの幾何学的構造そのものにも配慮が必要であることを示した。

第3章では、連続的な浸透圧刺激に対するGVの形態変化を同時並列観察する実験について論じた。はじめに、従来の顕微鏡観察に基礎を置きつつ、解析のスループットを統計解析の域にまで高め得る手法として、マイクロ流体デバイスを用いた同時並列計測の重要性を述べた。標的粒径12 μm のデバイスと標的粒径20 μm のデバイスを用いた実験から、連続的な浸透圧刺激に対するGVの応答は初期粒径に依存して異なることが分かり、浸透圧変化に対する粒径変化と余剰膜面積の増大速度に差異があることが示唆された。また、収縮時の水の膜透過率を算出したところ、文献での報告値と整合する結果を得た。従って、本デバイスのGVは流れ場やマイクロポストから力学的ストレスを受けるが、

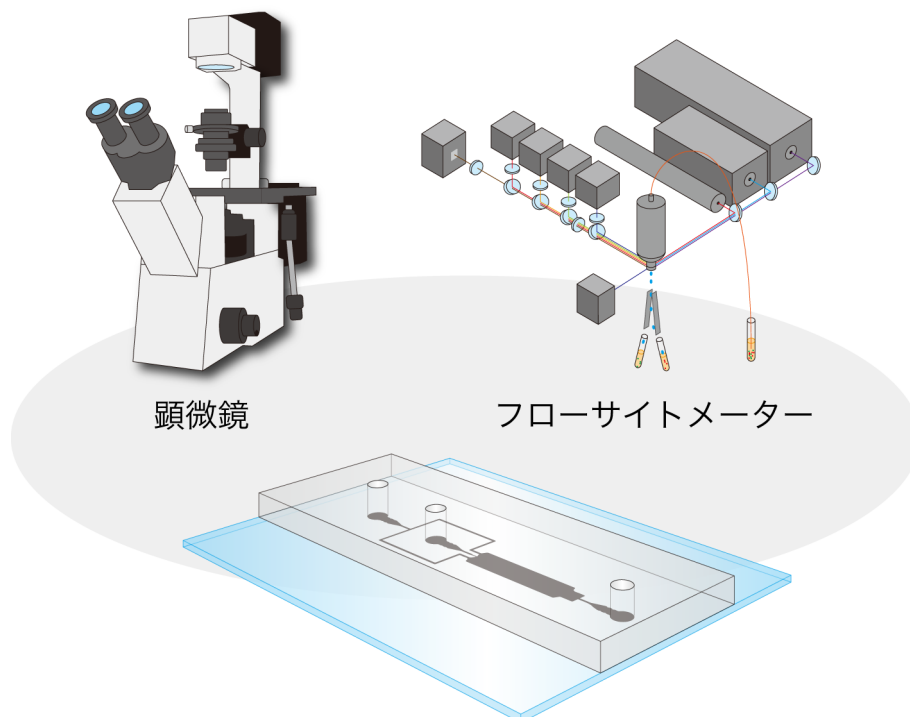
これらは流速を遅くするなどすれば、GV の変形モードや脂質膜の物理化学的特性を大きく変化させるものではないことが分かった。

第4章では、脂質ドメインを形成するGVの流れ場中における挙動と、ホスファチジルセリン (PS) 含有GV及びPS非含有GVそれぞれに対して捕捉後にアネキシン V により摂動を加えた場合の応答特性の評価実験について述べた。DOPC, DOPS, スフィンゴミエリン, コレステロールの混合膜から構成されたドメイン形成GVを作製し、デバイスに導入することでその挙動を観察した。その結果、高流量時には、流れ場から受ける力学的ストレスの影響だと思われる、縞状の脂質ドメインを持つGVが多く観察されたのに対し、低流量時には単純分散液の観察結果と同様の半球状の脂質ドメインを持つGVがトラップ内部で回転する挙動が観察された。次に、アネキシン V を用いて捕捉後のGVに対して外部から摂動を加える実験を行ったところ、市販のアポトーシス検出キットの600分の1未満という極めて低濃度にも関わらず、PS含有GVの場合は膜の破裂に至るほどの鋭敏な応答を示すことが明らかになった。

第5章では、DNA-コレステロール複合分子を用いた、GV膜上での連続的なDNAの二重鎖形成反応の同時並列計測の実験について述べた。配列に依存した分子認識能を有し、かつ配列設計により容易に多様性を生み出すことのできるDNAは、GVの高機能化やGVどうしの相互作用の研究の中で重要な位置にあることを述べた。デバイスにDNA担持GVを導入し、GV膜の消光状態と発光状態を切り替えるための1本鎖DNAを外部溶液より順に導入したところ、バルブ操作から約90秒で状態が遷移するという結果を得た。30個のGVに対する膜上蛍光強度の時間変化の解析から、2回目の二重鎖形成反応の後、いずれのGVも膜上蛍光強度は初期強度の $78 \pm 5\%$ まで回復することが分かった。一方、蛍光強度の時間変化の自己相関関数を解析すると、その特徴的な時定数 τ にばらつきがみられた。これは、GV膜上での化学反応が個々のGV膜の状態からの影響を受けてばらつくことを示しているものとして大きな意味を持つ。

以上、粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスの開発を通じて、GVに対しても粒径選別と並列配置が可能であることを示せたとともに、GVの柔らかさや膜組成がデバイスの性能に与える影響について明らかにできた。デバイスを用いたGVの同時並列計測の実験から、粒径に依存した現象や、連続的

な化学刺激に対する応答を明らかにした。従来の GV 研究においては、顕微鏡下でマニピュレーションしながら個々の GV の動態を詳細に追跡すること（単一 GUV 法など）と十分な観測数を得て統計的な解析を行うこと（フローサイトメトリーなど）はトレードオフの関係にあった。対して、本研究で構築した粒径選別・空間配置複合型マイクロ流体デバイスは、その双方の要求を満たす第3の GV 解析手法として位置づけられる（図 73）。さらに、捕捉領域の設計変更により容易にその仕様を拡張できる利点もある。複数の GV が任意の位置や形状で捕捉されるようにトラップの構造を変更することで、精確に制御された個数の GV から成る GV 集団の挙動が解析でき、多細胞モデル構築への足掛かりとなることが期待される。また、GV とトラップ内壁との接着性をうまく制御できれば、接着細胞のモデル構築へつながる研究が期待できる。本手法を用いることで、これまで困難であった複雑な解析が初めて可能になり、GV 研究に新たな視点を与える点で、本研究は大きな意義がある。



本研究で構築したマイクロ流体デバイス

図 73：第3の GV 解析手法としてのマイクロ流体デバイス。

謝辞

本研究を進めるにあたり，多くの方々にお世話になりました．ここに深く感謝の意を表します．

三年間の研究活動全般にわたり，格別なる御指導と御高配を賜りました東京大学大学院総合文化研究科 豊田太郎准教授に甚大なる謝意を表します．

マイクロ流体デバイスの作製法をはじめ，研究の指針に関して多くのご助言と御指導を賜りました東京大学生産技術研究所 竹内昌治教授，大崎寿久特任助教，手島哲彦博士，小貫真委子様，吉田寛文様に心より感謝致します．

2015 年より慶應義塾大学へ栄転された伴野太祐助教，2015 年より着任された本多智助教には，常日頃より多くの知識や示唆を頂きました．深く感謝致します．

東京大学大学院総合文化研究科 庄田耕一郎助教には，第 5 章の DNA-コレステロール複合分子の設計やバッファー条件の検討に際し，多くの有意義なご助言を頂きました．深く御礼申し上げます．

研究室の皆様我心から感謝しつつ，豊田研究室の尚一層の発展をお祈り申し上げます．

これまでお世話になった全ての方々にあらためて謝意を表し，ここに謝辞と致します．

平成 27 年 12 月 風山 祐輝