

光重合性リン脂質ジャイアントベシクルの作製と 共焦点レーザー走査型顕微鏡分析

松本 仁¹⁾・米田幸志郎²⁾・白上 努³⁾・保田昌秀⁴⁾

Preparation of Giant Vesicle of Photopolymerizable Phospholipid and the Confocal Laser Scanning Microscope Analysis

Jin MATSUMOTO, Koshiro YONEDA, Tsutomu SHIRAGAMI, Masahide YASUDA

Abstract

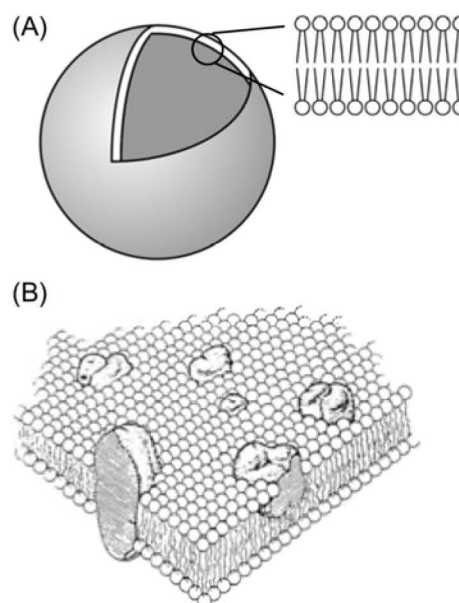
Giant vesicles (GV) of a phospholipid containing a photopolymerizable diacetylene group, 2-di(10,12-tricosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DTPC), were prepared by a film rehydration technique under the controlling conditions such as the concentration, the incubation temperature, and the time of the DTPC solutions. The prepared GV were irradiated at 254 nm to form the polymer GV. Analysis by a confocal laser scanning microscope showed that the polymer GV prepared under the optimized conditions were a hollow sphere with 3–5 μm in diameter and $< 1.0 \mu\text{m}$ thickness which consisted of a fluorescent polydiacetylene moiety of DTPC.

Key words:

Giant vesicles, Diacetylene, Phospholipid, Photopolymerization, Confocal laser scanning microscope

1. 緒言

ベシクルは、両親媒性脂質分子が二分子膜構造をとって集合した閉鎖小胞体である。二分子膜ベシクル構造は生体膜中で見られ、タンパク質と複合化することで細胞膜が構築されている (Scheme 1)¹⁾。また、生体由来の両親媒性脂質分子を水中に分散すると、二分子膜構造を有するベシクルを形成する。この天然脂質から構成されるベシクルは特にリポソームと呼ばれ、物理化学的性質の解明や物質の膜透過性などの生体膜機能の模倣の観点からリポソームの研究がなされている²⁾。しかし、リポソームの利用用途を工学、薬学あるいは医学などの分野へ展開する際、安定性などの点で問題があった。1977年、国武、岡畑らは、長鎖



Scheme 1. Schematic images of (A) a vesicle and (B) a fluid-mosaic model of biologic bilayer membrane referred from ref. 1.

1) 物質環境化学科助教

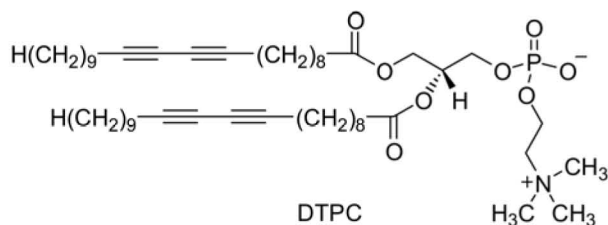
2) 物質環境化学専攻大学院生

3) 物質環境化学科准教授

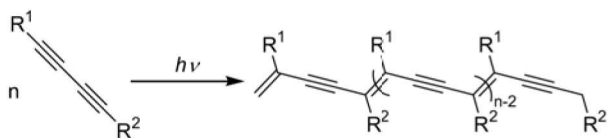
4) 物質環境化学科教授

ジアルキルアンモニウム塩を水中に分散することで、二分子膜構造を有し、リポソームよりも安定なベシクルを形成することに成功した³⁾。これを契機に、様々な両親媒性化合物が合成され、ベシクルの形成が報告されている。例えば、ジアルキル型^{4,5)}あるいはA-Bブロック共重合体両親媒性高分子²⁾を水中に分散させた高分子ベシクルの形成が報告されている。また、ジアセチレンやブタジエンなどの重合基をアルキル基の中央部または末端部に導入した両親媒性化合物からベシクルを形成し、高分子化によって両親媒性分子間を共有結合で結合させている^{4,5)}。これらの方法によって、ベシクルの力学的強度や安定性の増大が図られている。

O'Brien らは、長鎖アルキル基の中央に光重合性のジアセチレン基を導入したリン脂質、1,2-ビス(10,12-トリコサジイノイル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DTPC, Scheme 2) を水中に分散させ、紫外線照射によって高分子ベシクルを作製した⁶⁾。重合物であるポリジアセチレン (Scheme 3) は可視光領域に吸収を持つことから、その色調変化によって重合反応を確認している。しかし、水中でのベシクルの直接観察には成功しておらず、透過型電子顕微鏡観察によってベシクルの大きさは25-120 nmのサブミクロンサイズであると報告している。もし、数ミクロンのベシクル (GV) が形成されれば、ベシクルが形成される環境と同じ水溶液状態での光学顕微鏡観察が可能となる。また、重合物のポリジアセチレンは蛍光を生じるため、得られた高分子ベシクルの形態を蛍光顕微鏡を用いて観察することができる。



Scheme 2. Chemical structure of DTPC.



Scheme 3. Photopolymerization reaction of diacetylene monomer.

そこで、本研究では、DTPC を用いた蛍光性高分子 GV の調製と蛍光観察による解析法の確立を目的として研究を行った。

2. 実験

2.1 試料および器具

光重合性ジアセチレン基を有するリン脂質 DTPC は Avanti Polar Lipids 社から購入し、精製せずに使用した。膜親和性を有する蛍光プローブであるオクタデシルローダミン B 塩化物 (RhB) は Invitrogen 社から購入した。4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペリジンエタンサルホン酸 (HEPES) 緩衝溶液 (10 mmol dm⁻³, pH 7.0) の調製は、Milipore 製 Elix3 で精製した純水を用いて行い、孔径 0.20 μm のメンブレンフィルターを通して不純物を取り除き、アルゴン通気して使用した。CHCl₃ および MeOH は同仁化学製のスペクトロゾールを使用した。

ベシクル調製に使用する試料瓶および観察用のスライドガラスなどのガラス器具は、以下の方法で洗浄した。ガラス器具を濃硝酸に浸して 90 °C で 2 h 加熱洗浄し、冷却後に純水で洗浄した。さらに、これを 1 mol dm⁻³ KOH 水溶液に 12 h 浸し、純水中にて超音波照射を行って洗浄した。洗浄後のガラス器具は純水中にて保管した。

2.2 装置

共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) は、レーザー光を励起光として使用する蛍光顕微鏡であり、対物レンズの焦点と共役する位置にピンホールを設けることで、深さ方向に高い解像度での顕微鏡観察を行うことができる。ベシクルの CLSM 観察は、オリンパス製 CLSM FV-300 を用いて行った。100 倍の対物レンズ (開口数 1.3, 作動距離 0.10 mm) を使用し、HeNe レーザー (波長 543 nm) による光励起によって得られた蛍光 (> 565 nm) から共焦点蛍光像を得た。また、対物レンズを下方に移動させることでベシクルの断面蛍光像を得た。移動距離を z とし、ベシクル最上面を $z = 0 \mu\text{m}$ とした。

紫外可視吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルの測定は、それぞれ日本分光製分光光度計 V-550 および島津製作所製蛍光分光光度計 RF-5300PC を用いて行った。

3. 結果と考察

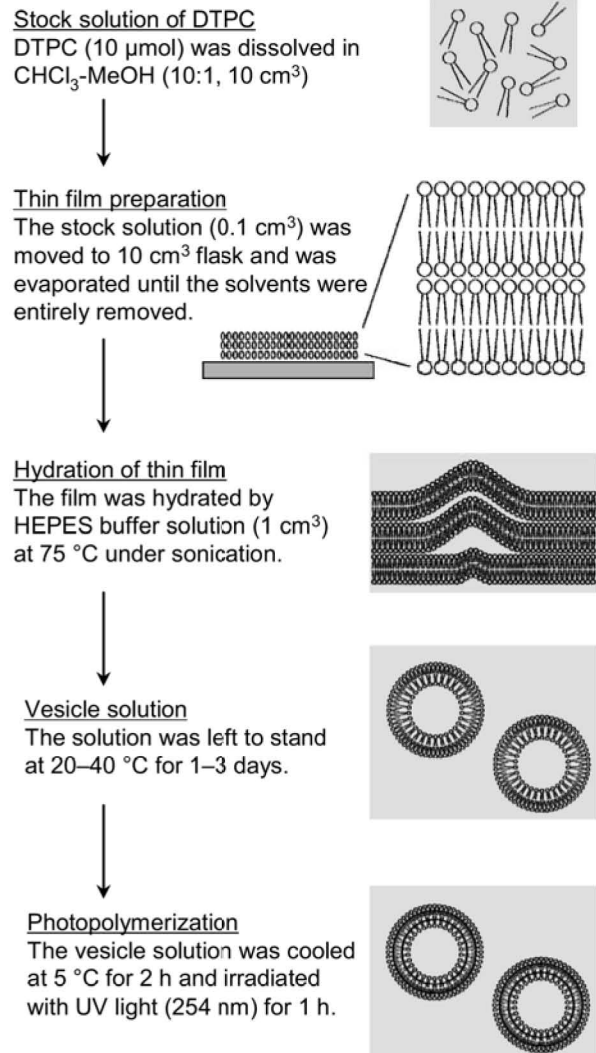
3.1 DTPC ベシクルの調製

GV の調製はこれまでに数多くの方法が報告されており、両親媒性脂質分子の薄膜の水和（薄膜法）、エマルジョンからの有機溶媒除去、界面活性剤の除去、および、溶媒置換による方法に大別される¹⁾。ここでは薄膜法を採用した。薄膜法とは、ベシクルの原料となる両親媒性化合物を有機溶媒に溶解させ、フラスコを回転させながら溶媒を留去することでフラスコの内壁に薄膜を形成させ、これを水和させることでベシクルを形成させる方法である。O'Brien²⁾らは、薄膜の水和を室温で行うことでサブミクロンサイズの DTPC ベシクルを得ている⁶⁾。我々は、DTPC の主相転移温度である $38.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ⁷⁾ よりも高温の $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ で超音波照射することで、水和を促進させた。この場合、水和直後に形成されるベシクルのサイズは小さいと予想されることから、GV 形成時には、初期段階で形成された小型のベシクルを融合させる必要がある。そこで、薄膜水和時の DTPC 濃度 ([DTPC])、水和後の放置温度 (T)、および、放置時間 (t) の三つの調製条件について検討した。

ベシクル調製手順を Scheme 4 に示す。CHCl₃-MeOH (10:1) 混合溶媒に DTPC を溶解してストック溶液 (1 mmol dm^{-3}) を調製した。10 cm³ の試料瓶にストック溶液から $0.05\text{--}1\text{ cm}^3$ を採取し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を完全に留去して、DTPC の薄膜を得た。得られた薄膜は $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 3 h 真空乾燥させた。次に HEPES 緩衝溶液 (1 cm^3) を薄膜に加え、 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて 1 h 超音波照射を行なった。得られた溶液の [DTPC] は $0.05\text{--}1.0\text{ mmol dm}^{-3}$ である。この溶液を $20\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ の一定の T にて、1-3 day の各 t の間恒温放置し、ベシクル溶液を得た。DTPC ベシクル溶液を $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて 1 h 冷却し、石英セルに移して紫外線 (254 nm) を 1 h 照射して DTPC ベシクルを光重合させた。

3.2 ベシクルの CLSM 観察

CLSM 観察試料の作製は、以下の方法で行った。厚さ $50\text{ }\mu\text{m}$ 、一辺 2 cm のシリコンフィルムの中央に一辺 1 cm の正方形の穴を開け、これをスライドガラスに密着させた。ベシクル溶液をスライドガラス上の凹みに滴下し、空気が入らないようにカバーガラスを掛けた。得られた観察試料を CLSM のステージに設置した。紫



Scheme 4. Preparation procedure of polymer GV of DTPC.

外線照射前の DTPC ベシクル溶液の観察には、蛍光プローブとして RhB ($1\text{ mol}\%$) を添加して同様の方法で観察試料を調製した。

GV の紫外線照射によって得られた DTPC 高分子ベシクルの 485 nm を励起波長として測定した蛍光スペクトルを Figure 1 に示す。 548 nm に発光極大を有する自家蛍光が確認されたことから、CLSM を用いた蛍光像観察が可能となったことが分かった。 T および t をそれぞれ $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ および 2 day に固定し、 $0.05\text{--}1.0\text{ mmol dm}^{-3}$ の [DTPC] で調製したベシクルの形状を観察した (Figure 2)。 0.05 mmol dm^{-3} において、直径 $3\text{ }\mu\text{m}$ までの大きさの GV が観察されたが、数は少ないものであった。[DTPC] が 0.5 mmol dm^{-3} では、直径 $1\text{ }\mu\text{m}$ ほどの多くの GV が観察されたが、CLSM によるベシクルの形態観察には大きさが不十分であった。[DTPC] が 0.1

mmol dm^{-3} では、 0.5 mmol dm^{-3} の場合よりもベシクルの数は減ったものの、直径 $3\text{--}5 \mu\text{m}$ のGVが観察され、CLSMによる形態観察には十分な大きさとなった。しかし、[DTPC]が 1.0 mmol dm^{-3} ではベシクルの形成が確認されなかった。したがって、 0.1 mmol dm^{-3} を[DTPC]の最適条件とした。

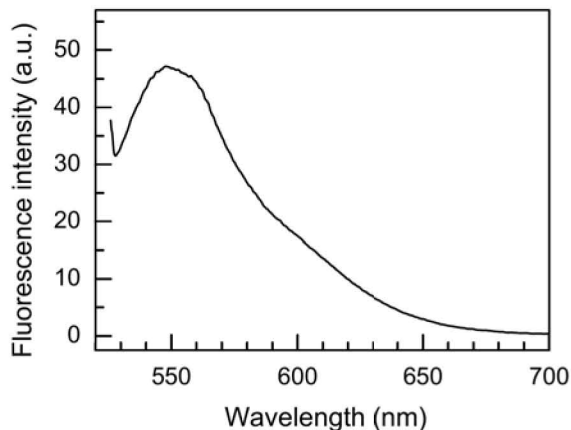


Figure 1. Fluorescence spectrum of the polymer GV of DTPC under 485 nm-excitation.

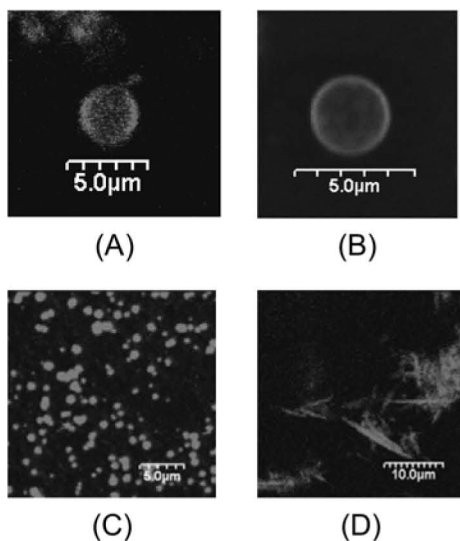


Figure 2. CLSM images of polymer GV of DTPC prepared from various [DTPC] in the aqueous buffer solution: [DTPC] = (A) 0.05, (B) 0.1, (C) 0.5, and (D) 1.0 mmol dm^{-3} .

次に、[DTPC]が 0.1 mmol dm^{-3} において、 T および t を変化させて調製した高分子GVのCLSM像をFigure 3に示す。 T が $40 \text{ }^\circ\text{C}$ の場合、1 dayの t では $4\text{--}5 \mu\text{m}$ ほどの中空ベシクルが得られたものの、多数の小粒径の

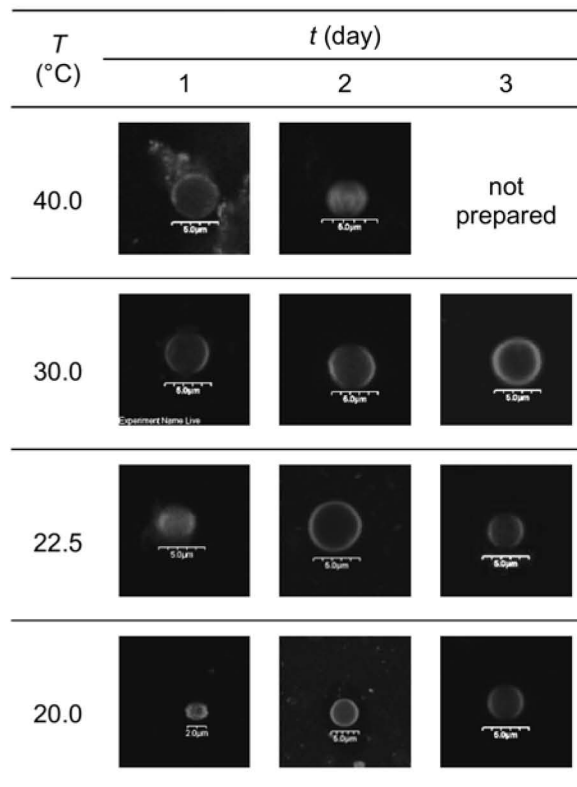


Figure 3. CLSM images of polymer GV of DTPC prepared under various hydration conditions.

ベシクルの混在が観察された。2 dayの t ではベシクル内部からも重合したDTPCの蛍光像が観察され、3 dayの t では中空ベシクル構造が得られなかった。 T が $30 \text{ }^\circ\text{C}$ の場合、3 dayの t では、ベシクルの二分子膜が多層となったマルチラメラ構造をとるものがあった。 T が 22.5 あるいは $20 \text{ }^\circ\text{C}$ の場合、いずれの t においても直径 $3\text{--}5 \mu\text{m}$ の中空ベシクルが多数観察されたが、 T が $22.5 \text{ }^\circ\text{C}$ の方が大きな直径のGVが得られる傾向があった。以上の検討から、[DTPC] = 0.1 mmol dm^{-3} 、 $T = 20\text{--}30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、および、 $t = 2\text{--}3 \text{ day}$ においてGVが得られることが分かり、[DTPC] = 0.1 mmol dm^{-3} 、 $T = 22.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 、および、 $t = 2 \text{ day}$ を最適条件に設定した。

上記の最適条件で得られたDTPC高分子GVについて、 z を変化させて測定したCLSM断層像をFigure 4Aに示す。円形の蛍光像が得られ、その輪郭部に強い蛍光が確認された。さらに詳しく解析を行うため、 $z = 2.8 \mu\text{m}$ にて取得したCLSM断層像上の直線に沿った蛍光強度分布の解析を行った (Figure 4B)。その結果、二つの蛍光強度極大点が見られ、その間隔は $5.5 \mu\text{m}$ であることから、この値をベシクルの直径とした。また、中心部からの発光が弱いことから、ベシクルの内部には重合体DTPCが存在しないと考えられる。さらに、

蛍光強度分布のピークの半値幅から発光部分の厚みは、可視光を用いた蛍光顕微鏡の分解能に近い約 1 μm 以下であると見積られた。そこで、ベシクル調製時の薄膜形成の段階で RhB を添加して、得られたベシクルの CLSM 解析を行った結果、ベシクル内部からの発光は確認されなかったことから、ベシクル内部は空洞であることが確認された。以上のことから、最適条件で調製した DTPC 高分子 GV は、3–6 μm の直径を有する中空球状ベシクルであることが明らかとなった。

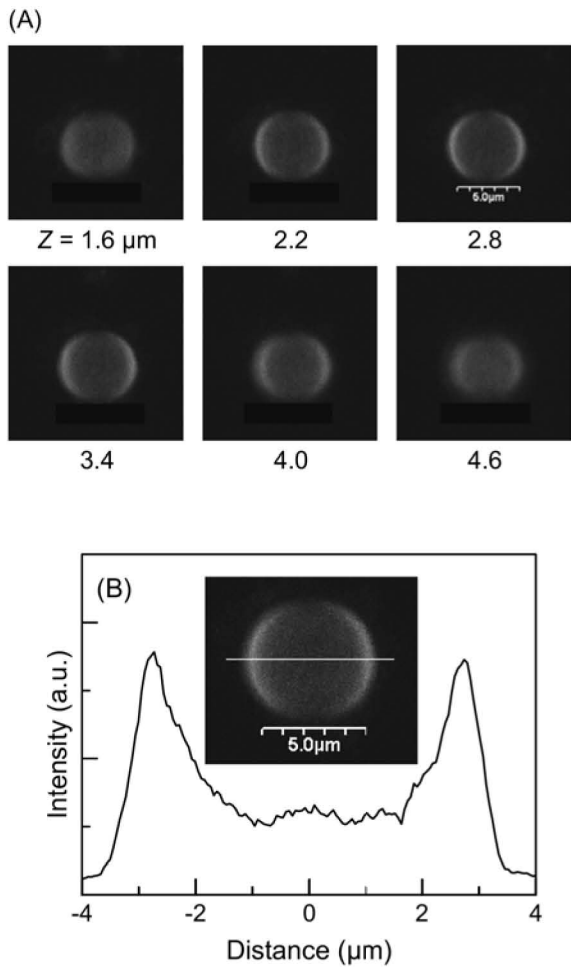


Figure 4. (A) CLSM images of polymer GV of DTPC obtained at the specified z and (B) the distribution of fluorescence intensity along a line on the image at $z = 2.8 \mu\text{m}$.

3.3 吸収スペクトル測定によるベシクルの重合挙動の解析

最適条件で調製したベシクル水溶液に紫外線を照射して得られる高分子 GV の吸収スペクトルを測定した。紫外線を 5–60 分間照射して重合させた場合、ポ

リジアセチレンに由来する 485 nm の極大吸収と 600 nm 付近のショルダーを有するスペクトルが得られた。ジアセチレンの重合は固相重合であることから⁸⁾、重合前の DTPC 分子の会合状態がジアセチレンの重合挙動に大きく影響を与える。そこで、485 nm の吸光度 (A_{485}) と 600 nm の吸光度 (A_{600}) を紫外線照射時間に対してプロットして、重合過程でのスペクトル変化を検討した。その結果、 A_{485} および A_{600} 共に直線的に増加することが分かった (Figure 5)。485 nm の吸収帯は、ポリジアセチレンのエン–イン主鎖骨格の有効共役長が短い成分に、600 nm の吸収帯は長い成分にそれぞれ対応している^{9–12)}。このことから、得られた DTPC 高分子 GV の光重合では、有効共役長の長い成分と短い成分とが光照射初期から一定の割合を保ったまま重

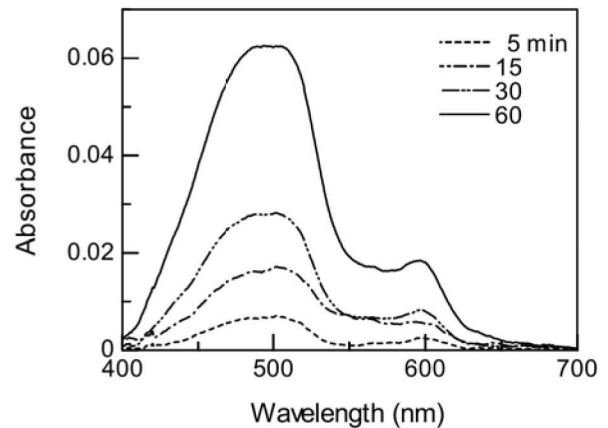


Figure 5. Absorption spectral change of polymer GV of DTPC prepared under a given UV irradiation time.

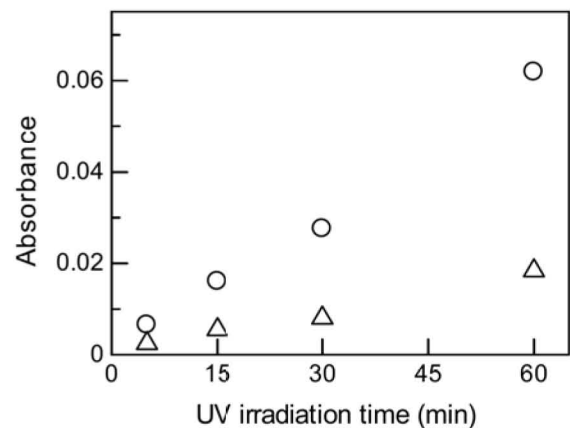


Figure 6. Dependence of absorbance at 485 nm (○) and 600 nm (△) of the polymer GV of DTPC on the UV irradiation time for the polymerization.

合したものと考えられる。また、DTPC 高分子 GV の吸収スペクトルが、O'Brien らのサブミクロンサイズのベシクルの場合⁶⁾と一致したことから、ベシクル内での DTPC 分子の会合状態が、ベシクルのサイズによって変化していないことが明らかとなった。

4. まとめ

DTPC ベシクルの調製について、O'Brien らのサブミクロンサイズの粒径にとどまったベシクル調製方法を再検討し、調製条件を最適化することで数ミクロン程度の大きさの高分子 GV の形成に成功した。

得られた高分子 GV は、蛍光プローブを用いずに可視化されたことから、二分子膜のドメイン観察や形態変化などのその場観察によってベシクルの機能化の研究に役立つことが期待される。また、観察においては CLSM が有効な分析装置であることが示された。さらに、他の高分子ベシクルと同様、安定性と強度の点で優れていると期待され、GV のサイズを生かしたマイクロカプセルおよびマイクロ反応器としての応用が期待される。

参考文献

- 1) S. J. Singer, L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720.
- 2) 秋山恵里, 秋吉一成, “リポソーム応用の新展開”, 秋吉一成, 辻井 薫 監修, エヌ・ティー・エス (2005).
- 3) T. Kunitake, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3860.
- 4) H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzmer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 113.
- 5) A. Mueller, D. F. O'Brien, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 727.
- 6) D. F. O'Brien, T. H. Whitesides, R. T. Klingbiel, *J. Polym. Sci.* **1981**, *19*, 95.
- 7) D. S. Johnston, S. Sanghera, M. Pons, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *602*, 57.
- 8) G. Wegner, *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49*, 443.
- 9) R. H. Baughman, R. R. Chance, *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **1976**, *14*, 2037.
- 10) R. R. Chance, *Macromolecules* **1980**, *13*, 96.
- 11) M. F. Rubner, D. J. Sandman, C. Velasquez, *Macromolecules* **1987**, *20*, 1296.
- 12) C. Kollmar, J. Sixl, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 1343.