

マイクロ流路を用いた均一細胞模擬反応器の高効率製造法

Highly efficient microfluidic-based production method of cell-mimetic bioreactors

精密工学専攻 7号 牛山諒太
Ryota Ushiyama

1. 緒言

リポソームは、生体細胞と同じ脂質二重膜で区画された人工閉鎖小胞である。中でも、直径が $1\ \mu\text{m}$ 以上の一枚膜小胞は、巨大一枚膜小胞 (Giant Unilamellar Vesicle: GUV) と呼ばれ、その大きさゆえに顕微鏡観察や操作が容易であり、生体分子等を合成するための細胞模擬反応器 (バイオリアクター) としても利用される⁽¹⁾。この用途では、反応の定量性や再現性の確保の観点から、GUV の均一性が重要なパラメータとなる。従来、GUV の作製法は静置水和法やエレクトロフォーメーション法、液滴界面通過法などのバルクでの方法が主流である⁽²⁾。これらの方法は操作が簡単な一方、作製された GUV はしばしば多層膜であり、サイズも多分散である。

近年、マイクロ流路を用いた GUV 作製法がいくつかのグループから報告されており、高い単分散性、スループット、サイズ制御性が達成されている^(3,4)。これらの研究では、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 製またはガラスキャピラリー製のマイクロ流路を用いて、フローフォーカシング法によって GUV の前駆体としての水中油中水滴 (water-in-oil-in-water: W/O/W) 液滴を作製している。しかし、これらの技術にはいくつかの制約があり、幅広い研究者に利用されていないのが現状である。キャピラリーデバイスでは、ガラス細管の同軸性が W/O/W 液滴の作製の可否に大きく影響しているが、その組立は手作業で行われており⁽⁵⁾、再現性に難がある。また、PDMS マイクロ流路を用いた方法では、W/O/W 液滴の油層が流路壁面に濡れるのを防ぐために、流路内を部分的に親水化する必要がある、熟練の技術を要する。さらに、これらのアプローチでは、脂質二重膜形成を誘発するのに W/O/W 液滴のオイル層が十分薄い必要がある、複数の流体の流量の精密な調整が不可欠である。また、マイクロ流路を用いた別の均一 GUV 作製法として、油中水滴 (water-in-oil: W/O 液滴) に W-O 界面を通過させる方法がある⁽⁶⁾。この方法は、流路の部分的な表面処理を行う必要がない一方で、液滴界面通過成功率が 5% と低いことが報告されている。

本研究では、熟練した製造技術や流路の部分的な表面処理、および精密な流量調整を必要としない液滴界面通過法を採用し、W-O 界面を形成する溶液組成を検討することで、高い液滴通過成功率の達成を目指した。また、作製した GUV の特性評価によって人工細胞模擬反応器としての利用可能性を検討した。

2. マイクロ流路を用いた均一 GUV の作製

2.1 実験方法

本研究で使用したマイクロ流路は、ソフトリソグラフィ技術によって鋳型の構造を PDMS へ転写することで作製した。始めに、フォトリソグラフィによってシリコンウエハ上にレジスト (SU-8 3025) を高さ $37\ \mu\text{m}$ になるようパターニングし鋳型を作製した。次に、PDMS に構造を転写し、マ

イクロ流路の入口と出口に直径 $0.75\ \text{mm}$ の穴を開けた。PDMS をスピンコートしたスライドガラスとマイクロ流路上に酸素プラズマ処理を施して接合した。こうして作製されたマイクロ流路は、流路内部の壁面がすべて疎水的な PDMS であるため、水が濡れ広がりにくくなっている。本研究では、複数の流体を PC からの入力信号で容易に操作できる利点から、圧力ポンプを使用してマイクロ流路内へ送液した。印加した圧力値はデバイスの個体差によって異なるため、顕微鏡画像を見ながらリアルタイムで圧力を制御した。また、GUV の収量を上げるために、マイクロ流路をガラスヒーター上に置き、 $38\ ^\circ\text{C}$ に維持しながら送液した。

本研究では、二種類の水溶液 (GUV の内液: $600\ \text{mM}$ スクロース, $100\ \mu\text{M}$ カルセイン (緑色蛍光色素)・外液: $600\ \text{mM}$ グルコース, $1\ \text{w/v}\%$ Pluronic F-68) と脂質溶液 ($2\ \text{mg/ml}$ DOPC, $20\ \text{v/v}\%$ 1-octanol in squalene) を使用した。スクロースとグルコースを等モル濃度で使用することで、GUV の内外を等張に保ちつつ比重差を設け、マイクロ流路出口から回収された GUV が試験管の底に沈降するようにした。また、回収した GUV は倒立顕微鏡または共焦点顕微鏡で観察した。

2.2 マイクロ流路内液滴界面通過法の概要

Fig. 1 にマイクロ流路内での W/O 液滴界面通過による W/O/W 液滴作製と、W/O/W 液滴のオイル層の逆濡れ (dewetting) による GUV 形成の過程を示す。はじめに、フローフォーカシング法によって内液をオイルでせん断し、均一サイズの W/O 液滴を作製する。リン脂質はその両親媒性から水-オイル (W-O) 界面に配列する特性があるため、W/O 液滴は脂質によって安定化される。次に、マイクロ流路の中間部から外液を導入することで、脂質が配列した W-O 層流界面を作製する。下流でマイクロ流路幅が狭まることで、W-O 層流のオイル層も狭まり、W/O 液滴が W-O 界面に押し付

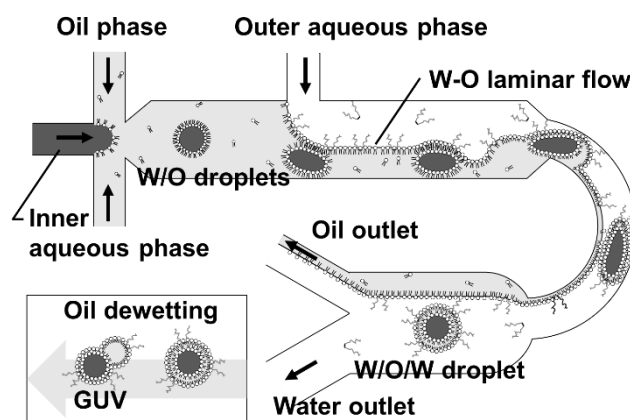


Fig. 1 Schematic of the production of monodisperse GUVs in the microfluidic channel by W/O droplet transfer followed by oil dewetting.

けられる。屈曲部において、W/O 液滴が W-O 層流界面を通過し W/O/W 液滴が形成される。W/O/W 液滴とオイルはマイクロ流路後方の分岐によって分離され、W/O/W 液滴を含む外液は試験管へ回収される。最後に dewetting 現象によって、W/O/W 液滴のオイル層がカ所に凝集すると、オイルがなくなった部分に脂質二重膜が形成される。

2.3 W-O 界面の安定性

マイクロ流路内で安定した W/O 液滴の界面通過を引き起こすために、従来法であるバルク遠心界面通過法でよく使用されるオイルの中から、比較的粘度が低いスクアレンをオイルの主成分として選定した。脂質を溶解させたスクアレンを使用した場合、W/O 液滴は作製可能であったが、W-O 層流の水相が流路内壁面に濡れ広がり、W-O 界面が不安定になることがわかった (Fig. 2a)。そこで、スクアレンにオクタノールを添加することで、W-O 界面の安定性が大幅に改善されることを見出した。スクアレン中のオクタノール濃度が 10~30 v/v% の時、水相は壁面に濡れ広がることなく W-O 界面が安定であった (Fig. 2b)。さらに、この濃度範囲で外液に 1 w/v% の高分子界面活性剤 (Pluronic F-68) がある場合は、W/O 液滴が安定的に W-O 界面を通過し W/O/W 液滴が形成された。また、この W/O 液滴が安定して W-O 界面を通過する状態を少なくとも一時間維持することが可能であった。一方で、スクアレン中のオクタノール濃度が 40 v/v% 以上の場合、W-O 層流界面は安定であったが W/O 液滴は W-O 界面を通過することなくオイル層に残留したままであった (Fig. 2c)。これらの結果より、液滴界面通過のために、安定的な W-O 層流界面を形成することが不可欠であることが分かった。

W-O 界面が不安定になった要因は、マイクロ流路壁面上に水が一度濡れることによる濡れのヒステリシスの影響だと考えられる⁷⁾。実際に、ペンダントドロップ法を用いて W-O 界面張力を測定したところ、オクタノールの添加に伴って W-O 界面張力が低下することが分かった。ヤングの式に基づく、W-O 界面張力の低下によって PDMS 表面での水の濡れが抑制されると予想される。これらのことから、オクタノ

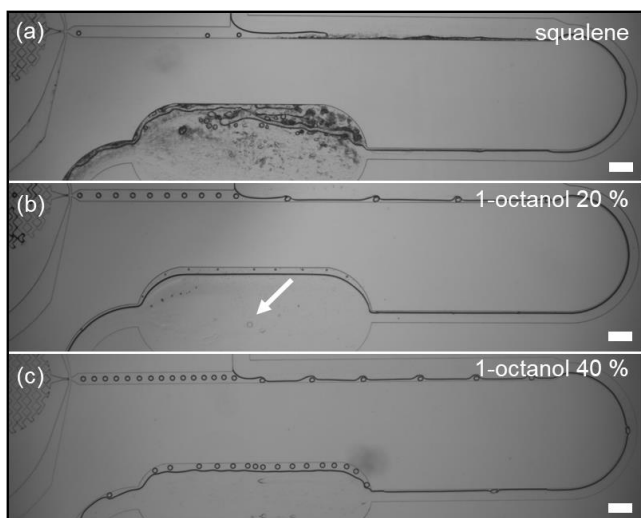


Fig. 2 Dependence of the stability of the W-O interface on 1-octanol concentration in squalene. The white arrow shows the W/O/W droplets being transferred across the W-O interface. Scale bars, 200 μm .

ールの添加によって流路内壁面に対する水の濡れが抑制され、W-O 層流界面が安定化されたと考えられる。

2.4 界面通過率の改善

次に、W-O 界面安定時の外液中の Pluronic F-68 濃度と界面通過成功率の依存性を調べた。Pluronic F-68 はトリブロック共重合体界面活性剤であり、脂質膜を安定化させる作用とその生体適合性の良さから、しばしば GUV 作製に使用される^(3,5)。本実験では、W/O 液滴の界面通過成功率を、(界面通過によって作製された W/O/W 液滴の数/フローフォーカシング部で作製された W/O 液滴の数)として定義し、一分間の顕微鏡観察より測定した (Fig. 3)。Pluronic F-68 濃度が 0% の時、W/O 液滴は W-O 界面を通過せずオイル層に残留したままであった。しかし、Pluronic F-68 濃度を 1% まで上昇させると、界面通過成功率は平均 94.2% に達した。次に、Pluronic F-68 が W-O 界面に与える影響について、HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) 値の異なる Pluronic 系界面活性剤を比較することで調査した。HLB 値の高い界面活性剤は W-O 界面に正の曲率を与えるため、O/W 液滴を形成する傾向にある。外液中に含まれる HLB 値の異なる Pluronic 系界面活性剤を比較すると、HLB 値の高いものほど界面通過成功率が増加した。これは、親水性の高い界面活性剤が W-O 層流界面の外液相側から挿入され、界面に正の曲率を与えることで W/O 液滴が W-O 界面を通過しやすくなったと考えられる。

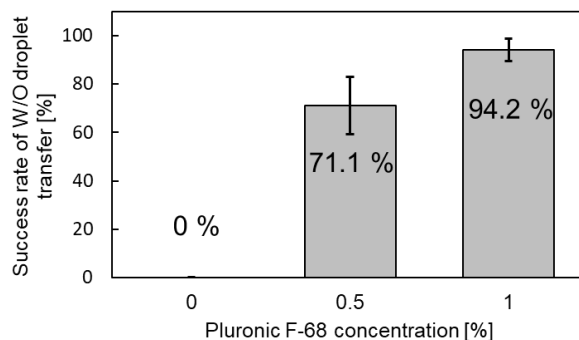


Fig. 3 Dependence of the success rate of W/O droplet transfer across W-O interface on the concentration of Pluronic F-68 surfactant in the outer aqueous phase.

2.5 Dewetting による脂質二重膜の形成

本システムでは、マイクロ流路内の流量を精密に制御せずに薄いオイル層 ($\sim 1 \mu\text{m}$) を有する W/O/W 液滴が作製された。マイクロ流路の出口から W/O/W 液滴を回収してから数分後、W/O/W 液滴の脂質の単層同士が接触し、脂質二重膜が形成された。三つの界面張力 ($\gamma_{\text{IA-O}}$, $\gamma_{\text{OA-O}}$, $\gamma_{\text{IA-OA}}$) のバランスによって W/O/W 液滴のオイル層が dewetting し、上部にオイル液滴の付いた GUV が形成された (Fig. 4a)。界面張力測定からオイル相の脂質膜上での拡張係数が負 ($S = -0.1$) であったことから dewetting が起こると予想された。また、作製される GUV の大きさはマイクロ流路内での内液の流量を調整することで程度制御することができた。異なる圧力条件で作製した GUV の直径を内液の蛍光画像を粒子解析すると、直径の変動係数が 2.2~3.1% の単分散な GUV が作製されたことが分かった (Fig. 4b)。

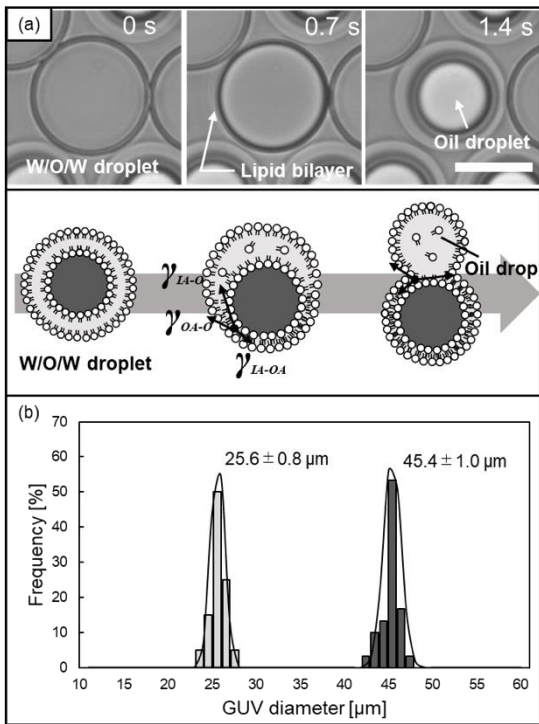


Fig. 4 Formation of lipid bilayer by oil dewetting. (a) Sequential closeup images and schematic of the dewetting process. Scale bar, 40 μm . (b) Histograms of GUV diameters showing the monodispersity of GUVs generated under two flow conditions.

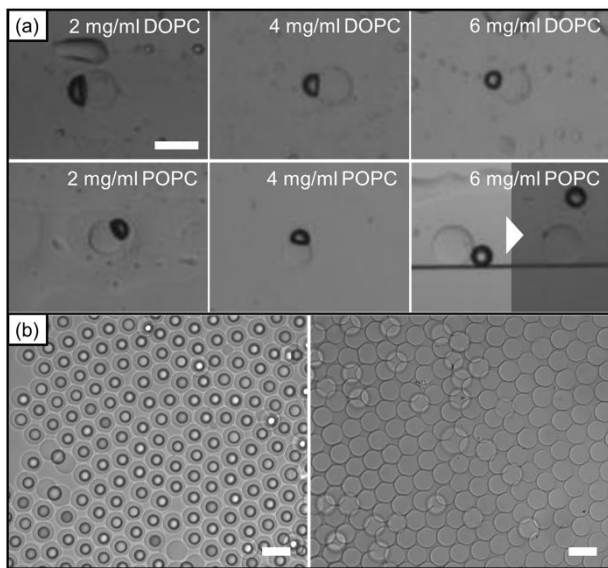


Fig. 5 Microscopic images of GUVs. (a) Dependence of the contact angle of the oil pocket on the concentrations of the POPC and DOPC. At 6 mg/ml POPC, the GUV before (left) and after (right) tapping the device are shown. (b) GUVs formed with 6 mg/ml POPC and collected from the outlet. Before (left) and after pipetting (right). Scale bars are 50 μm .

GUV 上部に付いているオイル液滴は、用途によっては GUV から分離されることが好ましい。先行研究では、オイル中の脂質濃度の増加と共にオイル液滴の dewetting 度合いも促進された⁽⁸⁾。マイクロ流路内でオイル液滴が横に付いた

GUV を観察すると、脂質 (POPC, DOPC) の濃度が高くなるにつれて、dewetting の度合いも上昇した (Fig. 5a)。特に 6 mg/ml POPC では dewetting の度合いが最大となり、マイクロ流路を指圧するとオイル液滴が GUV から分離された。さらに、6 mg/ml POPC で作製した W/O/W 液滴をマイクロ流路出口から試験管へ回収しピペッティングすると、チューブ内でもオイル液滴が GUV から分離されることを確認した (Fig. 5b)。これは、脂質濃度の増加と共に脂質の単層中の脂質密度が上昇し、脂質の単層間の疎水性相互作用が増加したためだと考えられる。

3. GUV の機能評価

3.1 膜タンパク質による一枚膜性の評価

GUV の一枚膜性は膜タンパク質の機能研究などの生化学的応用に不可欠である。そこで、本研究では α -hemolysin (α HL) による物質輸送を観察することで GUV の一枚膜性を確認した。 α HL は脂質二重膜に直径 1.5 nm ほどの小孔を形成し、小さな分子を透過させる。作製した GUV に蛍光分子 (Alexa 488) を封入し、外液中に 0.1 mg/ml α HL を添加した場合、40 分間で徐々に蛍光輝度が減少することを確認した (Fig. 6a,c)。また、GUV 内に封入されたスクロースも小孔を透過したことにより、内液と外液との比重差が減少し GUV が浮上した。一方、対照実験として α HL が含まれていない溶液を外液へ添加した場合は、内液の蛍光輝度はほぼ一定であった (Fig. 6b,c)。これらの結果より、作製された GUV の一枚膜性が確認された。

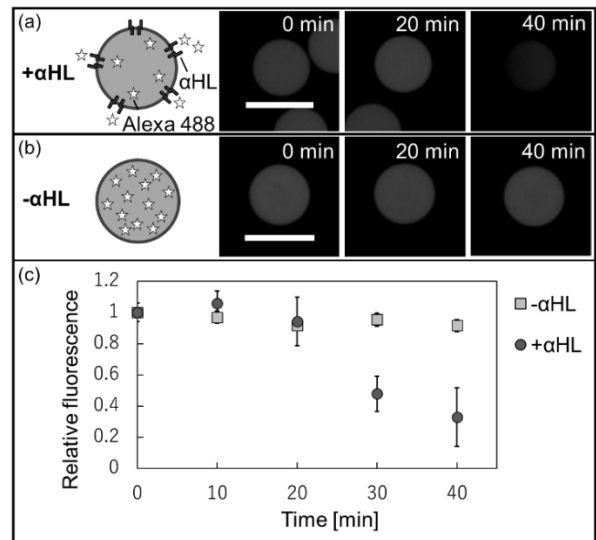


Fig. 6 Membrane-protein insertion assay. (a) Leakage of the fluorescent marker (10 μM Alexa 488) encapsulated in the inner aqueous phase induced by 0.1 mg/ml α HL in the outer aqueous phase. (b) Negative control without α HL. (c) Time-dependent leakage of fluorescent marker (circles, with 0.1mg/ml α HL; squares, without α HL; $n = 3$). Scale bars, 50 μm .

3.2 浸透圧差による半透膜性の評価

脂質二重膜のもう一つの重要な性質は半透膜性である。本研究では、作製した GUV に対し浸透圧差を設けることで半透膜性を確認した。外液に高濃度のグルコースを含む溶液を加えると、浸透圧差によって GUV 内の水が外液へ排出され

て GUV は収縮し、内液蛍光の濃度が上昇した (Fig. 7a) . 作製された GUV にはオイル液滴が付いているため、脂質二重膜中の余分な脂質はオイル液滴中へ吸収され GUV は球形を維持しながら収縮した. そして、収縮した GUV の直径は浸透圧差から予測される理論値と一致した (Fig. 7b) . よって、作製された GUV を使用して内液成分の濃度を制御可能であることを示した.

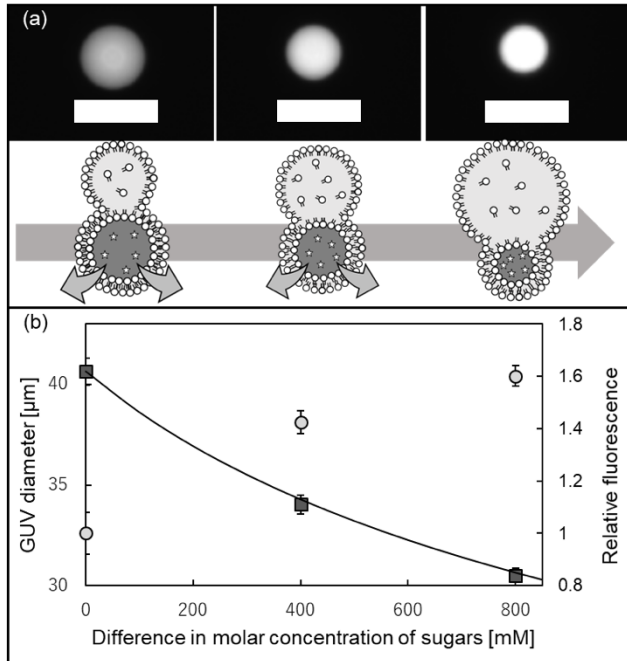


Fig. 7 Osmotic shrinkage of GUVs with oil pockets. (a) Microscopic images of the GUV shrunk by osmotic pressure; difference in the molar concentration, 0 mM (left), 400 mM (center), and 800 mM (right). Scale bars are 50 μm . (b) Dependence of the GUV diameter (squares) and the relative fluorescence (circles) on the difference in molar concentration of sugars between the inner and the outer aqueous phases of GUVs ($n > 15$).

3.3 GUV 内タンパク質合成の評価

最後に、作製した GUV 内で DNA からタンパク質を合成する反応を行うことで、生体細胞を模擬したバイオリクターとしての適性を評価した. GUV 内に無細胞タンパク合成系 (PUREflex 1.0) と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の塩基配列を有する DNA を内封した. また、アミノ酸などの低分子は脂質膜を透過するため、低分子の成分を外液にも内液と同じ濃度で添加した. GUV を 37°C でインキュベートすると、内液の GFP 蛍光輝度が増加し、3 時間で以降で一定となった (Fig. 8) . 生化学反応は塩や金属イオンを含む溶液を利用するが、このような環境では一般的に脂質二重膜が不安定化する. 本研究では、GUV の外液に 0.5% PVA を添加することで脂質膜が安定化し、5 時間にわたる GFP の合成過程で 80% 以上の GUV が崩壊や合一することなく GFP を合成することが可能であった. よって、作製した GUV のバイオリクターとしての適性を示した.

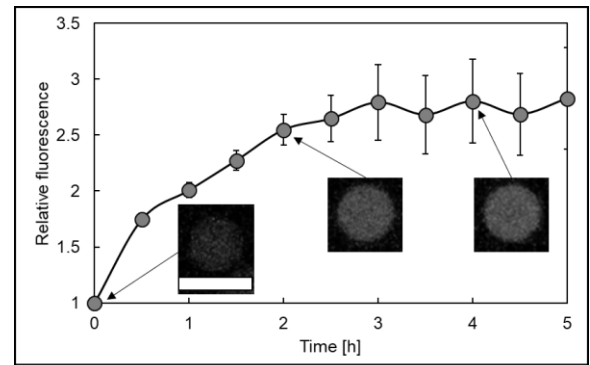


Fig. 8 GFP synthesis in the GUV produced by the present microfluidic device. Time-dependence of the relative fluorescence and fluorescent images of GFP being synthesized in GUVs. Scale bar, 50 μm .

4. 結言

本研究では、マイクロ流路を用いた簡便で再現性の高い単分散 GUV 作製法を開発した. 本手法はマイクロ流路内の部分的な表面処理や、W/O/W 液滴の薄いオイル層作製のための精密な流量調整が不要であるため、デバイス作製後短時間で W/O/W 液滴を作製することが可能だった. 流量調整時に消費される溶体量が抑えられるため、内液の容量が 20 μL 程度で GUV を作製することができた. さらに、作製した GUV の生化学実験に対する適正を示したことから、本手法が脂質膜や定量的な生化学研究の主要なプラットフォームになると期待される.

5. 参考文献

- (1) Tsugane, M., Suzuki, H., Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Giant Unilamellar Vesicles, *Sci. Rep.*, **8**-1 (2018) pp. 1–11.
- (2) Walde, P., Building Artificial Cells and Protocell Models: Experimental Approaches with Lipid Vesicles, *BioEssays*, **32**-4 (2010) pp. 296–303.
- (3) Deshpande, S., Caspi, Y., Meijering, A. E. C., Dekker, C., Octanol-Assisted Liposome Assembly on Chip, *Nat. Commun.*, **7** (2016) pp. 1–9.
- (4) Karamdad, K., Law, R. V., Seddon, J. M., Brooks, N. J., Ces, O., Preparation and Mechanical Characterisation of Giant Unilamellar Vesicles by a Microfluidic Method, *Lab Chip*, **15**-2 (2015) pp. 557–562.
- (5) Deng, N. N., Yelleswarapu, M., Huck, W. T. S., Monodisperse Uni- and Multicompartment Liposomes, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**-24 (2016) pp. 7584–7591.
- (6) Matosevic, S., Paegel, B. M., Stepwise Synthesis of Giant Unilamellar Vesicles on a Microfluidic Assembly Line, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**-9 (2011) pp. 2798–2800.
- (7) Cubaud, T., Mason, T. G., Capillary Threads and Viscous Droplets in Square Microchannels, *Phys. Fluids*, **20**-5 (2008).
- (8) Bao, P., Paterson, D. A., Peyman, S. A., Jones, J. C., Sandoe, J. A. T., Gleeson, H. F., Evans, S. D., Bushby, R. J., Production of Giant Unilamellar Vesicles and Encapsulation of Lyotropic Nematic Liquid Crystals, *Soft Matter*, **17**-8 (2021) pp. 2234–2241.