

均質な脂質-タンパク質構造のハイスループット生産に向けた フェムト秒レーザープロセス開発

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 電子光基礎技術研究部門
研究員 Serien Daniela
(2021年度 重点研究開発助成 課題研究 AF-2021202-A2)

キーワード：レーザー転写、フェムト秒レーザー、バイオ材料

1. 研究の目的と背景

グローバリゼーションが進む社会において、新型コロナウィルスなどの新たな病原体が大きな脅威となり、その迅速で正確な診断/治療法開発の重要性が再認識されている。また、高齢化が急速に進む中、健康長寿社会の実現に向けて、必要な薬物や栄養素を必要な時に、必要な疾患部位に届けることができるドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System、以下、DDS) は、効率的で健康な部位への副作用の少ない、人々の QOL を向上させる優れた治療/健康増進手法として研究開発が進められている。これらの疾患研究や DDS の発展を支える重要な物質に脂質二重層とタンパク質からなるリポソームがあり、健康長寿社会の実現に向けて医療から身近な化粧品など日用品まで応用が広がっている¹⁻⁴⁾。

リポソームは、サイズに応じて small(直径 20-100 nm)、large(100-1000 nm)、giant (1 μm 以上) に分類される。工業的製造における課題は、物理化学的特性の僅かな差が有効性と安全性に影響を及ぼす可能性があるため、「サイズ均一性」の確保や、残留する有機溶媒や微生物の「汚染フリー・無菌化」である。またハイスループットの実現に加えて、患者など個々の利用者へのカスタマイズを可能とする「原料の多様化」が重要となる。従来のリポソーム製造法は、生物医学分野で確立されているが、高度な技術と長い生産期間が必要であり、その量産は一般に困難である。また、最終的な無菌化工程としての濾過滅菌を使用する場合、無菌濾過膜を通過できないサイズの giant リポソームの製剤化は極めて困難であり、製造プロセス自体の簡略化と無菌化が求められる⁵⁻⁸⁾。近年、マイクロ流体および電子マイクロデバイスを利用した代替手法が開発されているが、確立された方法と比較してリポソームの均質性に欠け、特定の脂質に限定されることが多く、生産性が低いという課題がある⁹⁻¹¹⁾。

また、タンパク質を含むリポソームは、特に DDS や人工細胞の製造、疾患システムの研究において有用である。カスタマイズされたタンパク質をリポソームに導入することは、高濃度のタンパク質によりリポソームが不安定になるため難しい^{12, 13)}。

そこで本提案では、ハイスループットで均一なサイズ分布を有する多様なタンパク質-脂質複合体リポソームを製

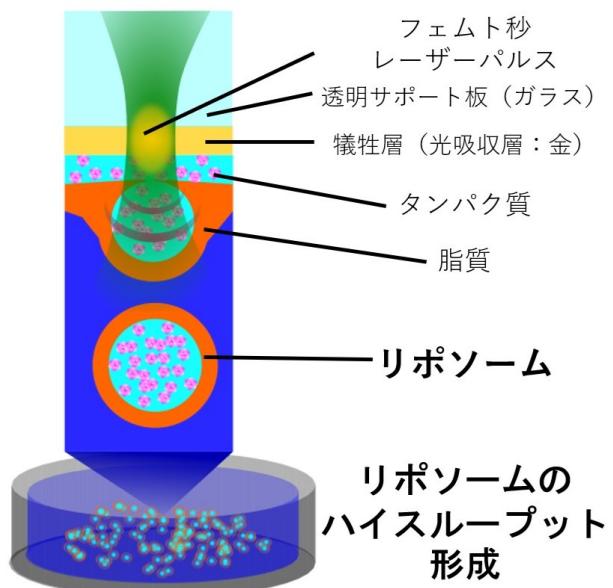


図1 本研究の目的

レーザー誘起転写法による高濃度タンパク質導入
リポソームのハイスループット生産技術開発。

造する革新的な生産技術の開発を目指す。

具体的には、提案者が所属する産業技術総合研究所（産総研）先進レーザープロセスグループのポテンシャル技術である Laser-Induced Forward Transfer (LIFT) 技術を駆使した図 1 の手法開発に挑戦した¹⁴⁾。本手法では、レーザー光を高効率に吸収する光吸収層をガラスなどの透明サポート板に犠牲層として設け、この犠牲層のフェムト秒レーザー照射により、タンパク質と脂質層を同時にレシーバー（図 1 の場合 液体）に射出し、リポソーム（脂質-タンパク質複合体）を生成する（図 1）。この際、フェムト秒レーザーパルスを用い、犠牲層のアブレーションを利用してことで、脂質やタンパク質へのレーザー直接照射をできる限り避け、その機能を維持した形でのリポソーム形成を試みる。本手法では、単一パルスで单一のリポソームを生成することが可能であり、高パルス繰り返しスキヤンによって、従来法に比べ、高度なサイズ制御ならびにハイスループットのリポソーム製造が期待される。

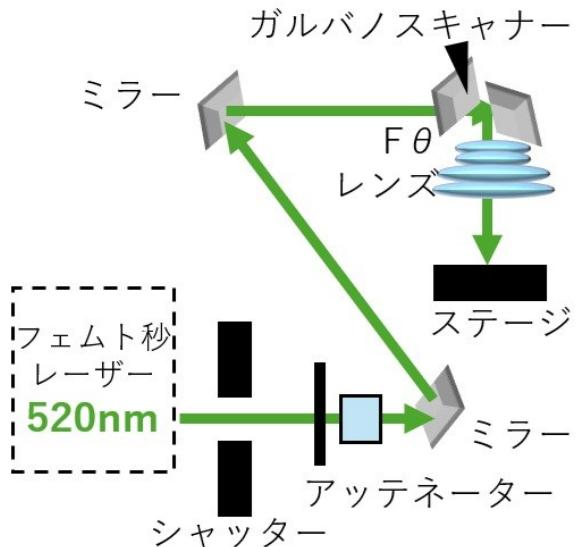


図2 本実験のLIFTシステム

2. 実験方法

2・1 実験装置の概要

LIFTシステムの光源には、中心波長520 nm、パルス繰り返し周波数100 kHz、パルス幅350 fsのフェムト秒レーザー (Spectra Physics, Spirit 1040-16-HE-SHG) を利用した。

実験では、メカニカルシャッターとパワー・アッテネーターによりタイミングと平均レーザー出力を制御し、ガルバノスキャナー/F-θレンズ用いて、集光ビームを高速にエリアスキャンした。

2・2 材料

転写原料（ドナー）となるバイオマテリアルとして、牛血清アルブミン(BSA, 017-21273, Fujifilm)、L- α -ホスファチジルコリン(L- α -PC, 44924, Sigma Aldrich)を使用した。生成したリポソームの凝集を避けるため、レシーバーとなる溶液にはトリトンX-100(591-12191, Fujifilm)を混合した。

2・3 サンプルの準備

透明サポート板としてガラス板を利用し、犠牲層として約100nm厚の金膜を堆積させた。さらに、金のアブレーションによる転写物の汚染をさけるべく、金膜の上にポリマーをコーティングした。次に、タンパク質膜と脂質膜をスピンドルコート法により堆積させ、LIFT用ドナーサンプルを調製した。その後、ドナーサンプルはガラス面を上にし、ガラスと金属層を入射レーザービーム側、バイオマテリアル層がレシーバーとなる溶液と接触するよう静置した。

2・4 試料観察

LIFT後の試料について、光学顕微鏡VHX-7000(Keyence)およびBX-53(Evident)を用いて観察を行った。得られた

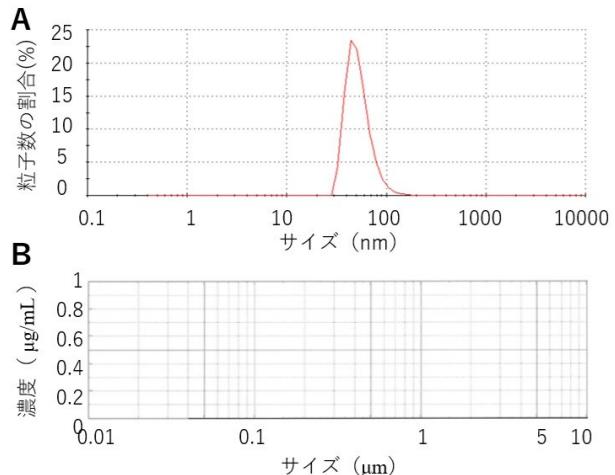


図3 ポリマー層導入の効果

A) 金犠牲層/ガラスサンプルについて、金犠牲層をレシーバーに直接コンタクトさせてレーザー照射を行った場合（バイオマテリアルなし）のレシーバー液中の金粒子の分布。B) ポリマー層/金犠牲層/ガラスサンプルに、Aと同一のレーザー条件で照射した場合のレシーバー液中の粒子計測結果。

レシーバー溶液中の粒子サイズ評価については、レーザー回折・散乱法に基づく粒子径分布測定装置 Zetasizer (Malvern) および Aggregates Sizer (Shimadzu) を用いて実施した。

3. 研究成果

3・1 金犠牲層とポリマー層

本研究では、前述のように、レーザー光を高効率に吸収してアブレーションを起こし転写の推進力を得るための金属層を設けており、これは一般的な犠牲層と言える¹⁶⁾。一方で、アブレーションにより生じる金ナノ粒子等が転写対象材料に混入することが問題となる場合は、本手法の適用は難しい。そこで、金の犠牲層の上にポリマー層を新たに設けることで、金のアブレーションによる汚染を回避しつつ、アブレーションによるガス化で生じた体積変化を機械的衝撃として、その上部のドナー物質を射出し転写するという新手法開発を行った。

この開発経緯として、金属犠牲層のみでレシーバーとなる溶液に接触させた配置でLIFT実験を行ったところ、レシーバー溶液中に100 nm以下の粒子生成が観察された（図3A）。そこでこの様な金粒子が目的のバイオマテリアルに混入することを防ぐため、ポリマー層を導入した。この際重要なポイントとして、金のアブレーションによりポリマー層が瞬時に変形（凸部形成）を起こすとともに、膜破断は起こさないようなポリマー物質・厚さを選択した。この条件において、図3Aと同様のレーザーパラメータで照射実験を行ったところ、レシーバー液中への金ナノ粒子混入がないことも確認した（図3B）。

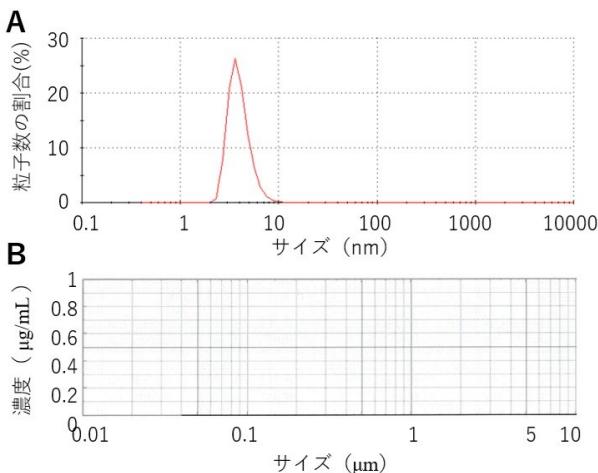


図4 表面活性剤濃度の効果
トリトン-X 100 濃度とミセル生成の関係。
A) 0.1% トリトン-X 100 濃度では、水中にミセルが観察される。B) 0.0001%の場合、ミセルは観察されない。

3・2 表面活性剤濃度

我々の初期実験において凝集した粒子が多数観察されたため、先に示すようにレシーバーとなる水槽中に表面活性剤としてトリトンX-100を添加することとした。この表面活性剤濃度を決定するにあたり、0.1%のトリトンX-100を添加した。図4Aに示すように、0.1%のトリトンX-100溶液には約10 nmの粒子が含まれている。これらは表面活性剤によって形成されるミセルと推察される。

また巨大リポソームは表面活性剤濃度が0.01%付近で不安定化すると報告があることから¹⁵⁾、トリトンX-100の濃度を0.0001%に減少させたところ、これら粒子が消失する様子が確認でき(図4B)、以下の実験は本濃度で行った。

3・3 水中のLIFTによるリポソーム形成

以上に基づき、準備したドナーサンプルをレシーバーとなる水に直接コンタクトでき、さらにコンタクト面積を大きくかつ水量は微量とすることで、高精度分析に必要な粒子の高濃度化を図れるよう、図5Aに示すガラス製のチャンバーを製作した。

このチャンバーを用いると、計算上150 μLの水中に約90,000個の粒子をLIFT形成可能であり、濃度600,000個/mLを達成できることから粒子サイズを測定するのに十分であると考え採用した。

図5Bに本チャンバーを用いてLIFT法を実施したレシーバーとなる水中の粒子分布について代表的な結果を示す。図5Bでは、直径数nmから本装置で測定できる上限値である10 μmまで幅広い分布をもった粒子が観測された。また図5Bの上限値での急激なカットオフは、より大きな粒子の存在を示唆している。

これらの粒子がLIFT法で直接形成された粒子であるかを確認するため、ドナーサンプルをレシーバーとなる水に

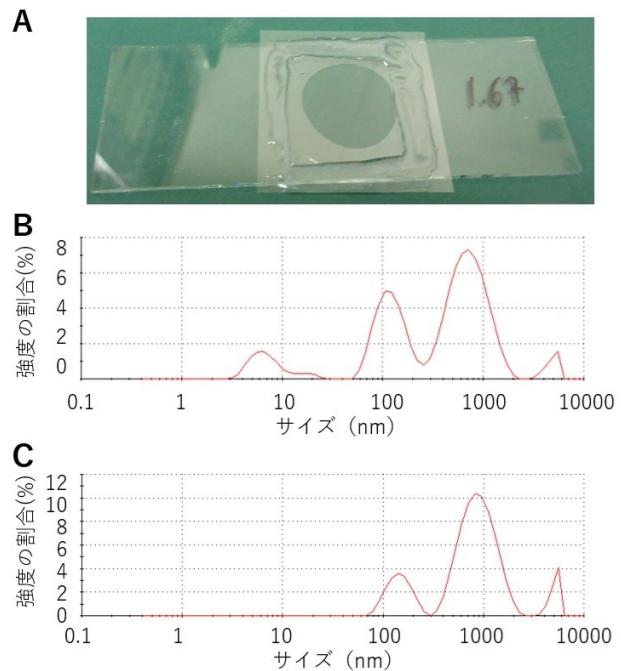


図5 A)LIFT用ガラス製チャンバー。B)チャンバーを用いたLIFT実験後の水中の粒子分布計測データ。C)参考のために、LIFT実験前(レーザー未照射)の水中の粒子分布計測データ。

コンタクトさせただけでレーザー照射を行わない場合の試料についても、同様の粒子分布計測を行った結果を図5Cに示す。レーザー照射を行わない場合も同程度のサイズ分布を有する粒子が観測されることから、ドナーサンプルを水にコンタクトさせた際の振動などにより、幅広いサイズ分布を有するリポソームが生成されてしまった結果と考えている。レーザー未照射の段階でのリポソーム形成は、LIFT法によりサイズ制御したgiantリポソームを形成するという我々の目的からは好ましくない。そこで、ドナーを水へコンタクトさせた状態でLIFTを行いリポソーム形成する当初のシステムではなく、次章で示す新たなシステムを検討した。

3.4 固体基板へのLIFTと再水和によるリポソーム形成

我々は3.3節で見出した課題解決に向け、レシーバーとして水を用いたLIFTではなく、あらたに固体基板を用いたLIFTに着目した。その結果、図6Aに示すように、脂質-タンパク質構造の転写に成功した。この際、転写の推進力となるポリマー層には、レーザー集光スポットに相当する箇所に凸部が形成され、アブレーションされた金はこの凸部とガラスの内部にある空間に閉じ込められている様子が観察されており、アブレーションされた金による汚染はないことをSEM-EDX測定より確認している。

図6Bでは、LIFTにより得られた脂質-タンパク質構造(左)に0.001%トリトンX-100を含む水を滴下することで再水和(中央)を行った様子を示す。水中の緑色蛍光色素とBSAの青色自己蛍光の融合蛍光画像(右)では、緑

色背景に対してリポソームの外膜と、高濃度のタンパク質からなる青色中心部が観察できる。このことから、本手法による giant リポソーム形成を基礎実証できたと考えている。

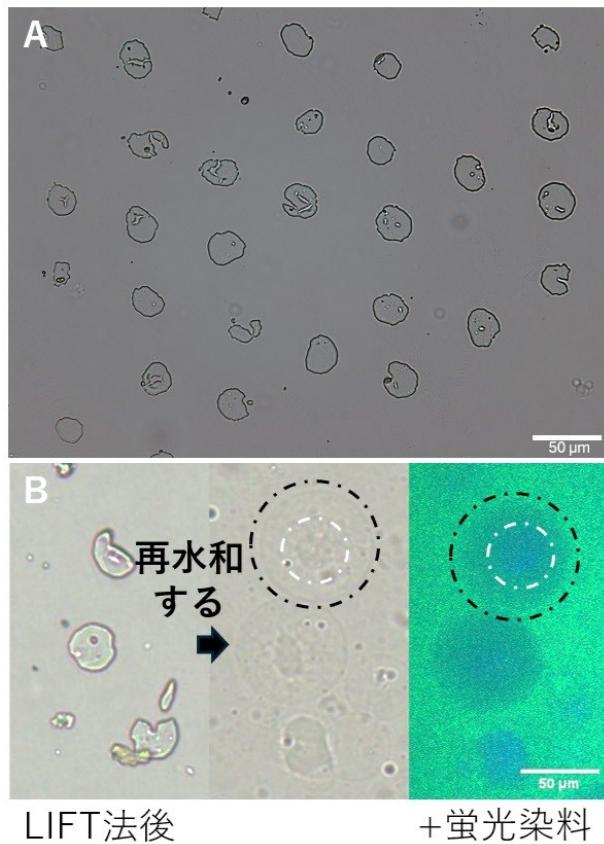


図6 LIFTにより転写した脂質-タンパク質構造とその再水和によるリポソーム形成

A) 固体基板上に LIFT 法により転写形成した脂質-タンパク質構造の光学顕微鏡イメージ。B) 左: LIFT 後の脂質-タンパク質転写構造。中央: 再水和したサンプル。右: 水中の緑色蛍光色素と BSA タンパク質の青色自己蛍光の観察像。黒点線の円がリポソームの外膜を示し、白点線の円が高濃度タンパク質に相当。図中のスケールバーは 50 μm を表す。

本方法によれば、例えば、30 mm 角のドナーサンプルを用意するだけで、約 250,000 粒子の giant リポソーム形成が可能であり、現実的な再水和の体積からの単純な試算では、達成可能なリポソーム密度は 500,000 から 2,500,000 粒子/mL となる。もちろん形成されるリポソームの安定性に大きく依存するが、将来のハイスクープット合成に向けて、本レーザープロセスの有用性を基礎実証することができた。

4. 結論

本プロジェクトでは、フェムト秒レーザー誘起前方転写(LIFT)法によるタンパク質を含むリポソームのハイスクープット生産を目指し、その基礎実証に取り組んだ。その

結果、金属とポリマー層からなる特殊な犠牲層を設けたドナーサンプルの開発と、固体基板上への LIFT の適用により、脂質-タンパク質複合体をパターン転写することに成功した。さらに、これらを再水和させることで、タンパク質を含む giant リポソームが形成できることをデモンストレーションできた。本手法を用いれば、1 mL 当たり 50 万から 250 万個の giant リポソーム粒子が作製可能であると推定され、LIFT プロセスだけを試算するなら 1 分も要しない工程となり、ハイスクープットな生産手法としての可能性を秘めている。

謝 辞

本研究開発を進めるにあたり、産業技術総合研究所(産総研)電子光基礎技術研究部門先進レーザープロセスグループ奈良崎愛子研究グループ長には、共同研究者として、LIFT 法のシステム設計・実施について協力いただきました。また、同グループ黒崎諒三博士には、LIFT 実験のためのデバイス製作を、亀山智子氏には、日本語の資料作成サポートをいただきました。産総研バイオメディカル研究部門志賀翔多博士には、液中粒子計測のご支援をいたしました。島津サイエンス東日本㈱には、アグリゲートサイザ装置でのデモ計測をいただきました。ここにあらためて感謝の意を表します。

参考文献

- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., & Akbarzadeh, A.: Application of liposomes in medicine and drug delivery, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44 (2016), 381.
- Allen, T.M., & Cullis, P.R.: Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2012), 36.
- Ross, C., Taylor, M., Fullwood, N., & Allsop, D.: Liposome delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease, *International Journal of Nanomedicine*, 13 (2018), 8507.
- Ahmadi Ashtiani, H.R., Bishe, P., Lashgari, N., Nilforoushzadeh, M.A., & Zare, S.: Liposomes in Cosmetics, *Journal of Skin and Stem Cell*, 3 (2016), e65815.
- Sha, S., Dhawan, V., Holm, R., Nagarsenker, M.S., & Perrie, Y.: Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154–155 (2020), 102.
- Favaro-Trindade, C.S., de Matos Junior, F.E., Okuro, P.K., Dias-Ferreira, J., Cano, A., Severino, P., Zielińska, A., & Souto, E.B.: Encapsulation of Active Pharmaceutical Ingredients in Lipid Micro/Nanoparticles for Oral Administration by

- Spray-Cooling, *Pharmaceutics*, 13 (2021), 1186.
- 7) Wang, Y., Kho, K., Cheow, W.S., & Hadinoto, K.: A comparison between spray drying and spray freeze drying for dry powder inhaler formulation of drug-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 424 (2012), 98.
 - 8) Leitgeb, M., Knez, Ž., & Primožič, M.: Sustainable technologies for liposome preparation, *The Journal of Supercritical Fluids*, 165 (2020), 104984.
 - 9) Ran, R., Middelberg, A.P.J., & Zhao, C.X.: Microfluidic synthesis of multifunctional liposomes for tumour targeting, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148 (2016), 402.
 - 10) Osaki, T., Kamiya, K., Kawano, R., Kuribayashi-Shigetomi, K., & Takeuchi, S.: Integrated Microfluidic System for Size-Based Selection and Trapping of Giant Vesicles, *Small Structures* (2024), 2300543
 - 11) Matosevic, S.: Synthesizing artificial cells from giant unilamellar vesicles: State-of-the-art in the development of microfluidic technology, *Bioessays*, 34 (2012), 992.
 - 12) Chen, Z., Atefi, E., & Baumgart, T.: Membrane Shape Instability Induced by Protein Crowding, *Biophys J*. 111 (2016): 1823.
 - 13) Colletier, J.-P., Chaize, B., Winterhalter, M., & Fournier, D.: Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer, *BMC Biotechnology* 2 (2002): 9.
 - 14) Narazaki, A., Oyane, A., Komuro, S., Kurosaki, R., Kameyama, T., Sakamaki, I., Araki, H., & Miyaji, H.: Bioactive micropatterning of apatite immobilizing cell adhesion protein by laser-induced forward transfer with a shock absorber, *Optical Materials Express*, 9 (2019) 2807.
 - 15) Abdul-Hussain, M.A., Jaleel, Q.N., Hammadi, M.E. et al. Thermal simulation of laser-induced forward transfer for Au donor film. *J Opt* (2024).
 - 16) Tamba, Y., Tanaka, T., Yahagi, T., Yamashita, Y., & Yamazaki, M.: Stability of giant unilamellar vesicles and large unilamellar vesicles of liquid-ordered phase membranes in the presence of Triton X-100, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1667 (2004), 1.