

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4840906号  
(P4840906)

(45) 発行日 平成23年12月21日(2011.12.21)

(24) 登録日 平成23年10月14日(2011.10.14)

(51) Int.Cl. F I  
**B 0 1 J 13/04 (2006.01)** B 0 1 J 13/02 A

請求項の数 8 (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2005-293274 (P2005-293274)                  (22) 出願日 平成17年10月6日(2005.10.6)                  (65) 公開番号 特開2007-98323 (P2007-98323A)                  (43) 公開日 平成19年4月19日(2007.4.19)                  審査請求日 平成20年10月2日(2008.10.2)</p> <p>特許法第30条第1項適用 2005年(平成17年)8月1日「日刊工業新聞」に発表</p>	<p>(73) 特許権者 801000049                  財団法人生産技術研究奨励会                  東京都目黒区駒場四丁目6番1号                  (74) 代理人 100089635                  弁理士 清水 守                  (72) 発明者 竹内 昌治                  東京都渋谷区上原1丁目10番8号                  (72) 発明者 栗林 香織                  東京都新宿区西新宿8-13-15 プレール西新宿402号室</p> <p>審査官 福井 美穂</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂質パターンを用いたリポソームの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- (a) 導電性基板上に複数の均一な穴が形成される耐膨張高分子樹脂シートを用意し、
- (b) 該耐膨張高分子樹脂シート上に脂質溶液を塗布し、
- (c) 前記耐膨張高分子樹脂シートを前記基板から剥がすことにより、該基板上に均一な形のパターン化された脂質フィルムを形成し、
- (d) 前記均一な形のパターン化された脂質フィルムを有する導電性基板を底部電極とし、絶縁性スペーサを介して上部に導電性基板からなる上部電極を配置したチャンバー内を水溶液で満たし、
- (e) 前記上部電極と底部電極との間に電界を印加し、
- (f) 均一な形のリポソームを形成することを特徴とする脂質パターンを用いたリポソームの製造方法。

10

【請求項2】

請求項1記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記耐膨張高分子樹脂シートがパリレン樹脂シートであることを特徴とする脂質パターンを用いたリポソームの製造方法。

【請求項3】

請求項1記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記導電性基板がITO基板であることを特徴とする脂質パターンを用いたリポソームの製造方法。

【請求項4】

20

請求項 1 記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記絶縁性スペーサがシリコンであることを特徴とする脂質パターンを用いたリポソームの製造方法。

【請求項 5】

請求項 1 記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記均一な形のリポソームが  $10 - 100 \mu\text{m}$  の直径を有する巨大リポソームであることを特徴とする脂質パターンを用いたリポソームの製造方法。

【請求項 6】

請求項 1 記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記電界を印加をするために、前記上部電極と底部電極との間に  $10 \text{ Hz}$  で  $0.5 - 2.5 \text{ V}_{pp}$  の交流を印加することを特徴とする脂質パターンを用いたリポソームの製造方法。

10

【請求項 7】

請求項 1 記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記リポソームのサイズの偏差係数が  $1 - 15\%$  であることを特徴とする脂質パターンを用いたリポソームの製造方法。

【請求項 8】

請求項 1 記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記耐膨張高分子樹脂シートにリソグラフィーによって複数の均一な穴を形成することを特徴とする脂質パターンを用いたリポソームの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、脂質パターンを用いたリポソームの製造方法に係り、特に、リピート脂質パターンを用いた単分散巨大リポソームの製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

リポソームとは、図 6 に示すように、リン脂質を主体に形成される二重膜からなる水溶液を包含した球形の小胞であり、細胞膜と同様の構造を持っている。図 6 において、リポソーム 100 は、脂質二重膜 101 からなり、その二重膜 101 は親水性のヘッド 102 と疎水性のテール 103 からなっている。

【0003】

30

このような構造のリポソームの中でも近年、直径が十から百マイクロンと大きい“ジャイアント（巨大）”リポソームの応用が注目されている（非特許文献 1 参照）。巨大リポソームは、その大きさから、直接顕微鏡下で観察できることが一番の利点であり（非特許文献 2 参照）、また、細胞と同様のサイズであり人工細胞のモデルとして用いることができる（非特許文献 3 参照）。さらに、リポソーム内には、薬剤や DNA を包み込むことができ、マイクロサイズの容器として用いることもできる（非特許文献 4 参照）。

【0004】

図 7 はタンパク質を膜に組み込んだリポソームを示す図、図 8 はその薬品の輸送効率を示す図である。

【0005】

40

図 7 に示すように、リポソーム膜に膜タンパク質 104 を導入することで、各種の膜タンパク質の挙動を個別に解析するデバイスを実現することができると考えられる。例えば、膜タンパクの含まれるリポソームに外部から薬品をかけ、内部に取り込まれた量をリポソーム内の濃度変化として蛍光強度で計測することで、薬剤の輸送効率を解明することができる。

【非特許文献 1】 Liisi, P. L., Giant Vesicles, pp. 3 - 9 (2000)

【非特許文献 2】 Angelova, M. I., Giant Vesicles, pp. 27 - 36 (2000)

【非特許文献 3】 Y. Yoshikawa, Chemical Physics Let 50

ters, 366, pp. 305 - 310 (2002)

【非特許文献4】G. Tresse, Analytical Chemistry, (in press)

【非特許文献5】B. Illic and H. G. Craighead, Biomedical microdevices, pp317 - 322, 2000

【非特許文献6】R. N. Orth et al Biophysical Journal Vol. 85, November 2003. 3066 - 3073

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、従来法で用意されたりポソームは、図8(a)に示すように大きさが多様であり、内容積が異なれば、単位時間当たりの濃度変化も異なるため(大きいものほど濃度変化は少ない=蛍光輝度が低い)、結果として、薬品の取り込みは分散の大きい、あいまいなデータを取り扱うしかないのが現状である。

【0007】

このような状況から当該分野では、体積の揃った(直径の揃った)均一な形のリポソーム〔図8(b)〕を効率的に製造する方法が渴望されている。

【0008】

また、従来法で用意されたりポソームは、図8(a)に示すように大きさが多様であり、フィルターを通過させて粒径をそろえるなど後処理を行わなければ、均一径のリポソームは得られない。また、これまで、Taylorら(P. Taylor and et al., PCCP, pp4918 - 4922, 2003)により、シリコーンゴム製PDMS(polydimethylsiloxane)でできたスタンプを利用し、リン脂質フィルムをパターンニングする技術とエレクトロフォーミングを利用して、均一なりポソームを製造する試みがなされているが、PDMSのスタンプは有機溶媒をつけると膨張し、スタンプが押される際に歪んでしまい、得たいサイズのリポソームが作れないという欠点が指摘されている(上記非特許文献5参照)。

【0009】

また、PDMSのスタンプに代わってパリレン樹脂シートを用いるようにしたものが開示されている(下記非特許文献6)が、これを用いて脂質溶液からエレクトロフォーメーションによりリポソームを作製することについては何ら示されてはいない。

【0010】

本発明は、上記状況に鑑みて、エレクトロフォーメーションにより均一な形のパターン化された脂質フィルムから均一な形のリポソームを効率的に形成することができる脂質パターンを用いたりポソームの製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、上記目的を達成するために、

〔1〕脂質パターンを用いたりポソームの製造方法において、導電性基板上に複数の均一な穴が形成される耐膨張高分子樹脂シートを用意し、この耐膨張高分子樹脂シート上に脂質溶液を塗布し、前記耐膨張高分子樹脂シートを前記基板から剥がすことにより、この基板上に均一な形のパターン化された脂質フィルムを形成し、前記均一な形のパターン化された脂質フィルムを有する導電性基板を底部電極とし、絶縁性スペーサを介して上部に導電性基板からなる上部電極を配置したチャンバー内を水溶液で満たし、前記上部電極と底部電極との間に電界を印加し、均一な形のリポソームを形成することを特徴とする。

【0012】

〔2〕上記〔1〕記載の脂質パターンを用いたりポソームの製造方法において、前記耐膨張高分子樹脂シートがパリレン樹脂シートであることを特徴とする。

【0013】

〔3〕上記〔1〕記載の脂質パターンを用いたりポソームの製造方法において、前記導

10

20

30

40

50

電性基板がITO基板であることを特徴とする。

【0014】

〔4〕上記〔1〕記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記絶縁性スペーサがシリコンであることを特徴とする。

【0015】

〔5〕上記〔1〕記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記均一な形のリポソームが10 - 100 μmの直径を有する巨大リポソームであることを特徴とする。

【0016】

〔6〕上記〔1〕記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記電界を印加をするために、前記上部電極と底部電極との間に10 Hzで0.5 - 2.5 V<sub>pp</sub>の交流を印加することを特徴とする。

10

【0017】

〔7〕上記〔1〕記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記リポソームのサイズの偏差係数が1 - 15%であることを特徴とする。

【0018】

〔8〕上記〔1〕記載の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法において、前記耐膨張高分子樹脂シートにリソグラフィーによって複数の均一な穴を形成することを特徴とする。

【発明の効果】

20

【0019】

本発明によれば、以下のような効果を奏することができる。

【0020】

〔1〕エレクトロフォーメーションにより均一な形のパターン化された脂質フィルムから均一な形のリポソームを効率的に形成することができる。

【0021】

〔2〕均一で、かつ10 - 100 μmの直径を有する巨大リポソームを製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

30

本発明の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法は、導電性基板上に複数の均一な穴が形成される耐膨張高分子樹脂シートを用意し、この耐膨張高分子樹脂シート上に脂質溶液を塗布し、前記耐膨張高分子樹脂シートを前記基板から剥がし、均一な形のパターン化された脂質フィルムを形成し、前記均一な形のパターン化された脂質フィルムを有する導電性基板を底部電極とし、絶縁性スペーサを介して上部に導電性基板からなる上部電極を配置したチャンバー内を水溶液で満たし、前記上部電極と底部電極との間に電界を印加し、均一な形のリポソームを形成する。

【実施例】

【0023】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

40

【0024】

図1は本発明の実施例を示す脂質パターンを用いたリポソームの製造装置の模式図、図2はそれを用いた均一サイズのリポソームの製造工程を示す図であり、ここではパリレン樹脂シートパターンの形成方法について説明する。

【0025】

図1は、均一直径リポソーム作成用デバイスを示している。この図において、2枚のITOガラス板1, 8が電極として用いられており、シリコンスペーサー7により隔てられチャンバー9が形成されている。チャンバー9内は脱気水(degassed water) (ただし、通常の水溶液であってもよい)で満たされている。また、2枚のITOガラス板1, 8を介して電源10からAC電圧をチャンバー9内に印加して、均一サイ

50

ズの巨大リボソーム (10 - 100  $\mu\text{m}$ ) を形成する。

【0026】

(1) まず、図2(a)に示すように、ITOガラス板1上に耐膨張高分子樹脂シートとしてのパリレン樹脂を蒸着し、パリレン樹脂シート2を積層する。

【0027】

(2) 次に、図2(b)に示すように、ITOガラス板1上のパリレン樹脂シート2を $\text{O}_2$  プラズマによりパターン化し、穴あきシート3を作製する。その際、穴あきシート3の穴4が正確に所定の面積となるようにする。

【0028】

(3) 次に、図2(c)に示すように、その所定の面積の穴4が形成された穴あきシート3上にリン脂質とクロロホルムとメタノールを混ぜた溶液からなる脂質溶液5を塗布し、真空中で乾燥させる。

【0029】

(4) 次に、図2(d)に示すように、所定の面積の穴4が形成された穴あきシート3を剥がすと、ITOガラス板1には所定の面積の脂質パターン6が転写されて残る。このITOガラス板1が下部に配置され、シリコンスペーサー7を介して上部にITOガラス板8が配置される。

【0030】

(5) 次に、図2(e)に示すように、リボソーム製造のためのチャンバー9内に脱気水11を導入し、エレクトロフォーメーションにより、ITOガラス板8, 9に電界を印加すると、チャンバー9内で単一サイズの巨大リボソーム12が製造される。

【0031】

上記したように、エレクトロフォーメーションにより均一な形のパターン化された脂質フィルムから均一な形のリボソームを効率的に形成することができる。

【0032】

図3(a)には20  $\mu\text{m}$  のリボソームの蛍光イメージが示されている。図3(b)は脂質パターンのA - B線に沿った強度分布を示す図であり、このパターンの強度プロファイルからITOガラス板上のパターン化された脂質フィルムの明確なエッジが確認できる。

【0033】

図4には実験における工程を示している。

【0034】

図4(a)には50  $\times$  50  $\mu\text{m}$  のパターン化された脂質フィルムが示されており、図4(b)には電界が印加されて膨張したパターン化された脂質フィルム、図4(c)には巨大リボソームが形成された状態が示されている。比較例として図4(d)には20  $\times$  20  $\mu\text{m}$  のパターン化された脂質フィルムから形成された小さなリボソームが示されている。

【0035】

図5は本発明と従来の方法により形成されたリボソームのサイズ分布を示す図である。図5(a)はパターン化された脂質フィルムを用いずにリボソームを形成した場合のリボソームのサイズ分布を示しており、ここでは、リボソームのサイズは広範囲に分布しておりその偏差係数は70%と高い。これに比べて、本発明のパターン化された脂質フィルムを用いた場合には、その偏差係数は15%であり、大幅に低い偏差係数となっている。さらに、開発を進めた結果、偏差係数は1%レベルまで向上させることができた。これにより、本発明により形成されたリボソームのサイズがほぼ均一であることが分かる。

【0036】

なお、本発明は上記実施例に限定されるものではなく、本発明の趣旨に基づき種々の変形が可能であり、これらを本発明の範囲から排除するものではない。

【産業上の利用可能性】

【0037】

10

20

30

40

50

本発明の脂質パターンを用いたリポソームの製造方法は、細胞膜と同様の構造を持っている巨大リポソームの製造に好適である。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】本発明の実施例を示す脂質パターンを用いたリポソームの製造装置の模式図である。

【図2】本発明の実施例を示す脂質パターンを用いたリポソームの製造装置を用いた均一サイズのリポソームの製造工程を示す図である。

【図3】本発明にかかる20 $\mu$ mのリポソームの蛍光イメージが示す図である。

【図4】本発明の実験における工程を示す図である。

10

【図5】本発明と従来の方法により形成されたりポソームのサイズの分布を示す図である。

【図6】二重膜を持つリポソームの模式図である。

【図7】二重膜を持つリポソームへの膜タンパク質の組み込み状態を示す図である。

【図8】薬剤を取り込むリポソームの模式図である。

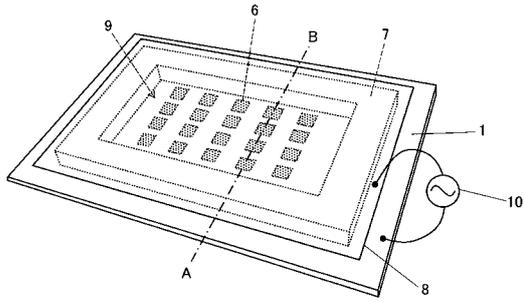
【符号の説明】

【0039】

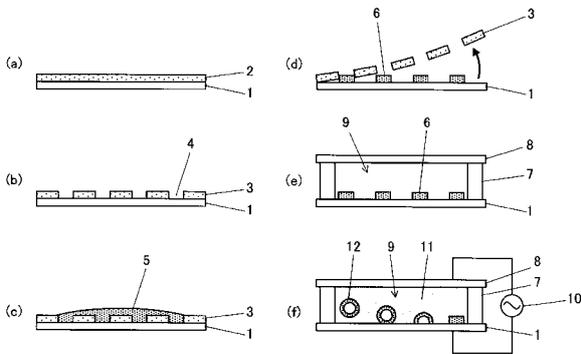
- 1, 8 ITOガラス板
- 2 パリレン樹脂シート
- 3 穴あきシート
- 4 穴
- 5 脂質溶液
- 6 所定の面積の脂質パターン
- 7 シリコーンスペーサー
- 9 チャンバー
- 10 電源
- 11 脱気水
- 12 単一サイズの巨大リポソーム

20

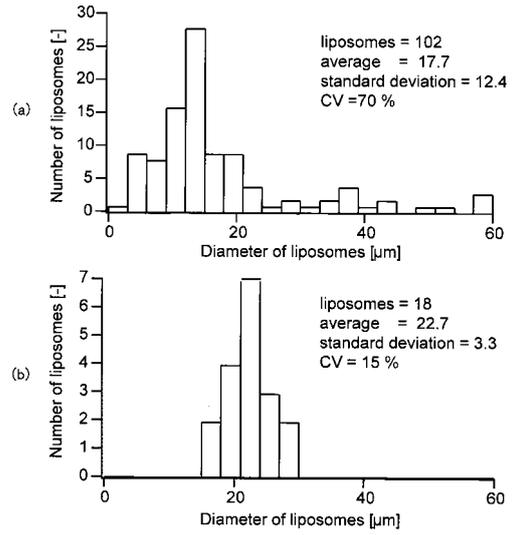
【図1】



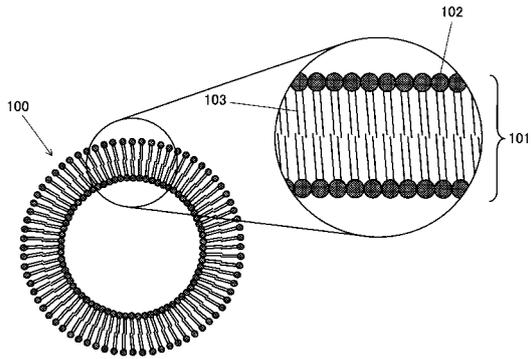
【図2】



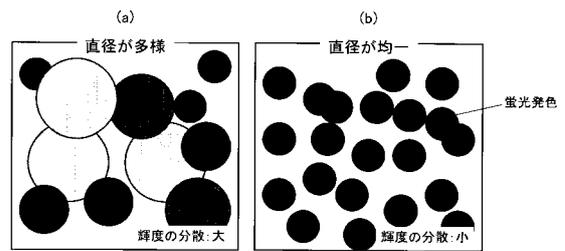
【図5】



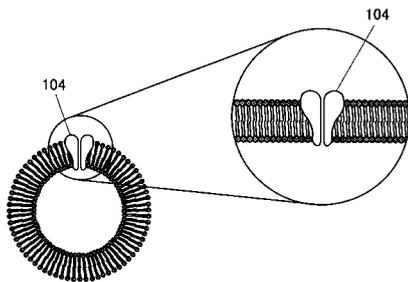
【図6】



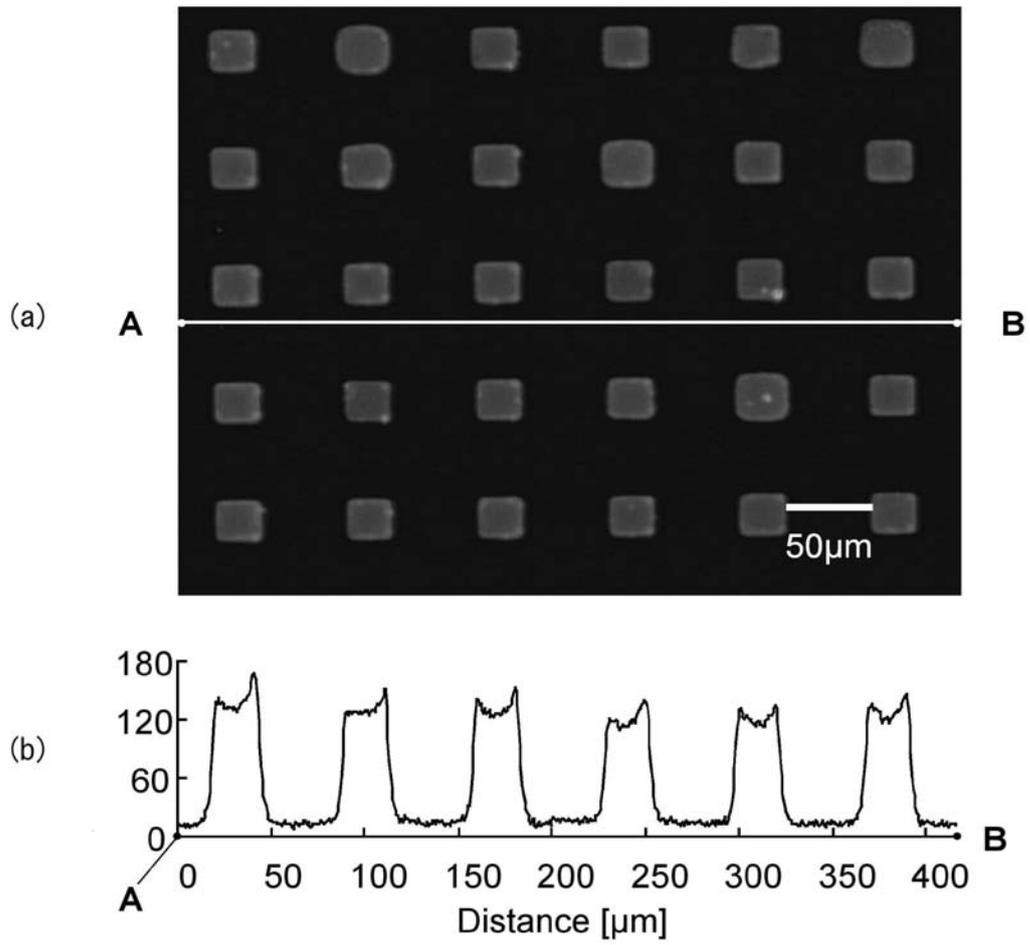
【図8】



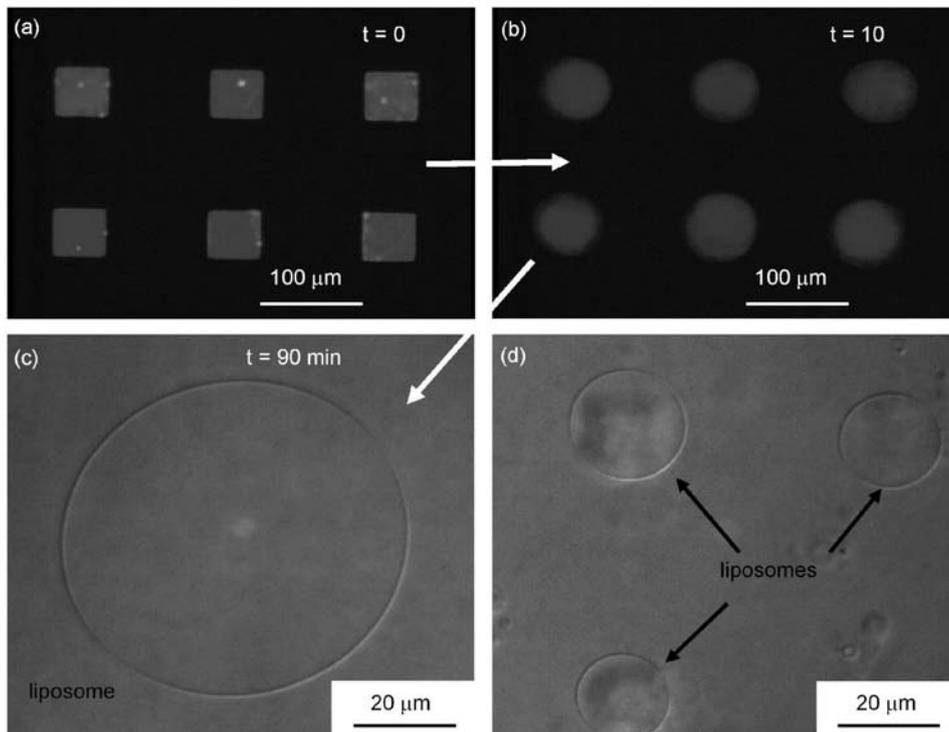
【図7】



【 図 3 】



【 図 4 】



---

フロントページの続き

(56)参考文献 日本機械学会年次大会講演論文集, 2005年, Vol.7, p55-56

Angelova M. I. et al, Swelling of Charged lipids and formation of liposomes on electrode surfaces, Molecular Crystals and Liquid Crystals, 1987年, Vol.152, p89-104

Angelova M. I. et al, Liposome Electroformation, Faraday Discuss. chem. Soc., 1986年, Vol.81, p303-311

Dimitrov D.S. et al, Lipid swelling and liposome formation on solid surfaces in external electric fields, Progress in Collid & Polymer Science, 1987年, Vol.73, p48-56

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

B01J 13、A61K 9

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)