

4P074

超解像顕微鏡による蛍光標識化したリポソームの観察

(オリンパス (株)¹、片山化学工業 (株)²、北里大学³)

○池滝 慶記^{1, 3}、大谷 敬亨²、安達昌城²、熊谷 寛³、

Observation of stained liposome by super-resolution microscopy

(Olympus¹, Katayama Chemical Industrial², Kitasato University³)

○Yoshinori Iketaki, Takayuki Otani, Masaki Adachi, Hiroshi Kumagai

【序】

リポソームは薬学および生理学において極めて重要な役割を果たしている。例えば、薬学においては、リポソームの内部親水基領域に薬剤を格納し、患部まで輸送する手段（ドラッグデリバリー）に用いている。また、生理学・医学の分野では、リポソームを癌組織の破壊手段として用いる試みが始まっている。一般に、透明なリポソームの輸送状態や形態をトレースする手段として、可視化のためのラベリング化技術は不可欠である。本研究では、ナイルレッド蛍光色素分子を脂質 2 重膜内部の保持したリポソームを調整した。今回、その調製状態を確認するために、蛍光抑制効果を用いた超解像顕微鏡により調整したリポソームの形状観察を行った[1]。

【リポソームの作製】

蛍光色素分子ナイルレッド ($C_{20}H_{18}N_2O_2$) は疎水部に選択的に吸着し、界面活性剤の無極性部位で保持出来る。この分子を脂質 2 重膜内部に保持したリポソームを逆相蒸発法により作製した。具体的には、下記の 1) から 5) の行程処理を行なった。

- 1) DPPC、DPPE、DCP、GM3、Cholesterol をメタノール-クロロホルム溶液に溶解
- 2) 溶媒を蒸留による脂質フィルムの形成
- 3) ジエチルエーテルにナイルレッドを溶解後、脂質フィルムに添加
- 4) 超音波処理後、HEPES 緩衝液(pH7.2)を添加
- 5) 減圧下でジエチルエーテルを留去後、リポソームを回収

1/150 の飽和条件でリポソームを作製すると、最終的なリポソームの平均粒径分布は 100nm であり、水溶液中では波長 600nm 前後で蛍光強度ピークをもつ。最後に、アクリルポリイミドゲルに分散し、これをスライドガラスに展開し顕微鏡観察試料とした。

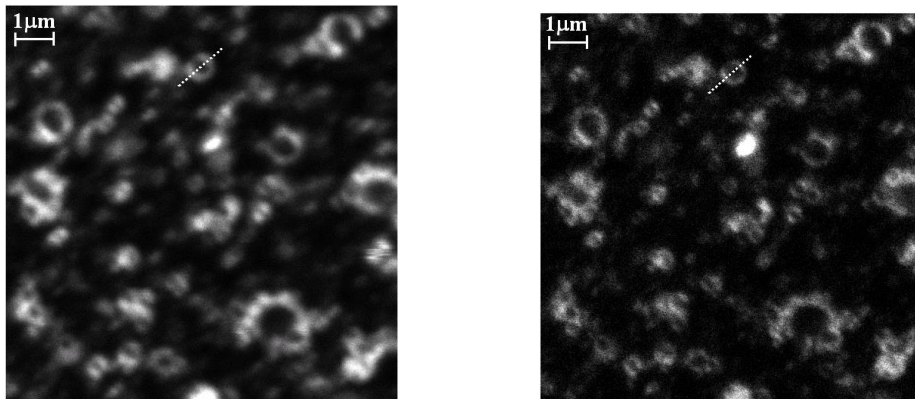
【リポソームの超解像顕微鏡観察】

超解像顕微鏡装置は、既存のレーザー顕微鏡（オリンパス：FV1000）に 2 波長対応の超解像位相板を装着して構築した。本装置は、蛍光励起用の光源（ポンプ光）としてNd:YVO₄レーザー（波長：532nm）と、蛍光抑制用の光源（イレース光）としてファイバーレーザー（波長：647nm）を備えている。この 2 種類の光源により、凝集相中のナイルレッドに対して蛍光抑制効果を誘導できる[2]。本観察実験では、少なくとも70nmよりも高い横分解能を提供することができるスパイラル型の位相板を用いた[3]。リポソームを分散したアクリルポリイミドゲルをスライドガラスに展開して観察試料とした。図 1 (a) は、通常のレーザー走査型顕微鏡画

像（通常計測）を示す。それによれば、示す動的光散乱法により測定した粒径分布に従い、最大700nmから50nmまでのサイズのリポソームが分散されていることが分かる（図2）。一方、図1（b）は、イレーズ光を同時照射したときの超解像画像（超解像計測）を示すが、各リポソームの輪郭が精細になり、その中空構造が明瞭に分かる。また、100nm以下のリポソームが会合し、ジャイアントリポソームを形成している様子も分かる。図3は、図1の破線部における蛍光強度分布を示すが、超解像観察時には半値幅50nmの脂質2重膜の蛍光像が得られており、超解像顕微鏡装置の結像性能と矛盾しない結果を与えている。従来、リポソームにおける微細構造の観察においては、凍結乾燥したリポソームを電子顕微鏡を用いて計測していた。しかし、ウェットな状態で超解像顕微鏡法を用いれば、ウェットな状態で、かつ非破壊で観察評価が可能なことを示している。

【謝辞】

本研究は、科学技術振興機構の研究成果展開事業：先端計測分析技術・機器開発プログラム「汎用・普及型超解像顕微鏡の開発」において実施されました。



(a) Normal measurement

(b) Super-resolution measurement

Fig.1 Observation of liposome dyed with Nile red using super-resolution microscopy

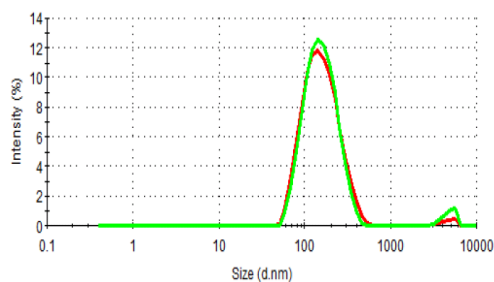


Fig.2 Particle size distribution

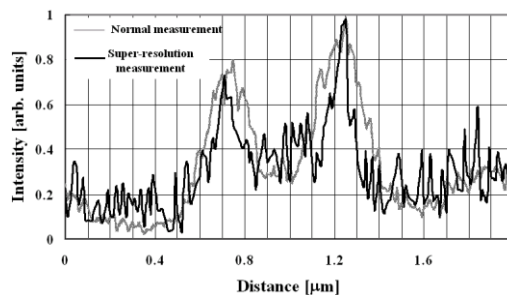


Fig.3 Cross sectional profile along dashed line in Fig.1

[1] Y. Iketaki, T. Omatsu, O. Sato, T. Suzuki, M. Fujii, Trends in Optics and Photonics OSA Proceedings Series (TOPS), 39 (2000) 167.
 [2] Y. Iketaki, Appl. Phys. Express, 3 (2010) 085203.
 [3] N. Bokor and Y. Iketaki: Appl. Spectroscopy. 68(2014) 353.