

あり、患者への負担が大きい。また、ウイルスを利用すると、そのゲノムを患者の染色体に導入する可能性があり、予測不可能な副作用の危険性がある。実際、アメリカやフランスで臨床試験中の事故が報告されるなど、ウイルスベクターの安全性への懸念が広がっている^{2,3)}。さらに、その製造においても安全性の確保が大きな問題となる。

こうしたことから、高機能で安全な非ウイルス性の人工的なキャリアの開発が強く求められている。人工キャリア(あるいはナノ粒子化法)として検討されてきた代表的なものを図1に示す⁴⁾。ポリカチオンあるいはポリカチオン+ターゲティング用のリガンドによってDNAをロッド状や球状に凝縮する方法(図1a)、ブロックコポリマーによりポリマーミセルを形成させる方法(図1b)、正電荷を持ったリポソームや微粒子に結合させる方法(図1c)などが考えられている。この場合、遺伝子の導入効率をいかに高められるかが大きなポイントである。

近年、ヒトゲノムの概要が明らかにされており、遺伝子治療に利用可能な遺伝子群が多数見いだされると予想され、安全で有効な遺伝子治療法を早急に確立する必要がある。そのために、ピンポイントDDSを可能とするナノキャリアが必須である。

中空バイオナノ粒子

まず、中空バイオナノ粒子のもとになるHBVの構造について述べる。

HBVは、直径約42 nmの球状ウイルスである。図2aに示すように、HBVは、そのゲノムが、蛋白質(ウイルス表面抗原蛋白質という：図では楕円形で示す)と脂質からできた外殻(エンベロープ：蛋白質間を宿主由来の脂質の膜が埋める形で形成されたカプセルで厚さは7 nm)とコアで二重に包まれた構造をとっている。コアの中には、ウイルス本体の不完全二本鎖のHBV DNA(約3,200塩基)や遺伝子を複製するのに必要なDNAポリメラーゼが存在している。

HBVは、L蛋白質の標的細胞への結合と、引きつづいての標的細胞との膜融合によって感染する。HBVは、微量のB型肝炎患者血液を指に刺しただ

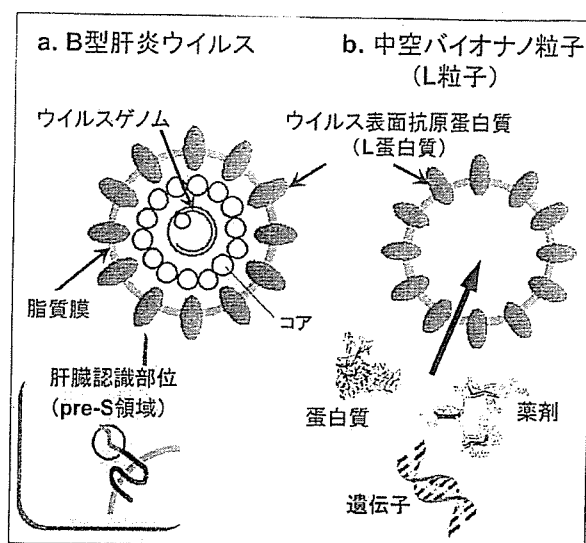


図2 B型肝炎ウイルス(a)と中空バイオナノ粒子(b)

けでも感染することでもわかるように、極少量のウイルス粒子でもヒト肝臓に到達して選択的に感染して複製するすぐれた能力を持つ。

外殻をつくるL蛋白質は、226アミノ酸残基のS蛋白質のN末端側にpre-S領域(55アミノ酸残基のpre-S2領域と108または119アミノ酸残基のpre-S1領域からなる)が付加した形になっており、分子量約52kDaの糖蛋白質である。pre-S1については、肝細胞と特異的に結合する部位を含んでおり、HBVが感染する際に中心的な役割を担っていることが明らかになっている^{5,6)}。また、pre-S1領域の作用により、HBVのトロピズム(感染する宿主域、細胞指向性)はチンパンジーとヒトの肝細胞に厳格に限定されている⁷⁾。ウイルスは、その構造や感染から複製といった機能をみると、蛋白質、脂質、DNAといったバイオ分子群のパーツから組み上げられたきわめて精巧なナノマシンを連想させる。

中空バイオナノ粒子とは、HBVのL蛋白質と脂質からなる外殻のみを、人工的かつ安全な形で生産したナノカプセルである(図2b:L粒子とよばれる)。L蛋白質は肝臓を分子認識するpre-S1領域を持つため、この粒子はウイルスが本来持つ肝臓への高い感染力を保持すると考えられる。また、HBVの表面抗原蛋白質が形成する中空バイオナノ粒子は、脂質膜と糖蛋白質からなる柔軟な構造を有して

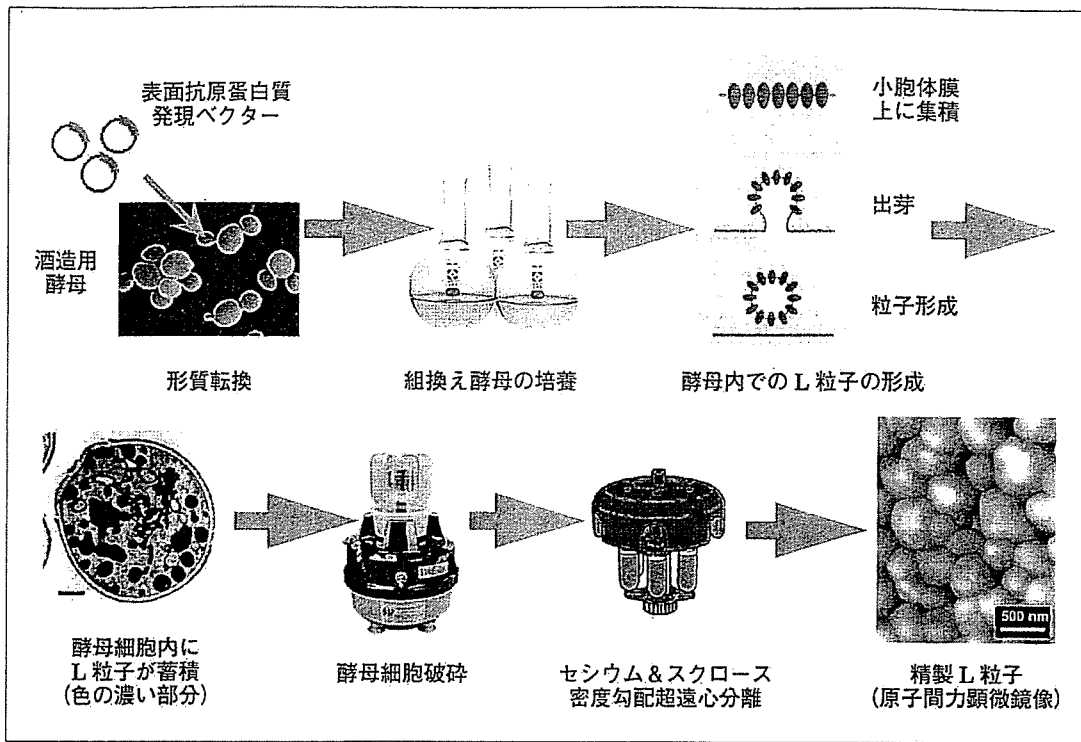


図3 中空バイオナノ粒子の生産および精製法

いることから、薬剤、遺伝子、蛋白質などを包含させることで、これら広範囲な物質のピンポイントDDSに利用できると期待される。中空バイオナノ粒子は、蛋白質と脂質からなる最もシンプルで安全なバイオナノマシンともいえる。

酵母における中空バイオナノ粒子形成および形成された粒子の精製について図3に示す。HBVのL蛋白質遺伝子を酵母細胞で発現させると、L蛋白質は互いに分子認識を行い、小胞体膜に集積し、出芽形式で小胞体ルーメン側に粒子として放出される。形成されたL粒子は、酵母内のトランスゴルジネットワーク上の膜状器官内に顕著に蓄積する⁸⁾。このように、中空バイオナノ粒子は、蛋白質と脂質が自己組織化して形成される機能性バイオ粒子である。

このL粒子を蓄積した酵母細胞を破碎し、細胞破碎物などを遠心分離で除去したあとに、セシウムおよびスクロースを利用した密度勾配超遠心分離を繰り返すと、高純度のL粒子を精製できる。収量としては、酵母の培養液1L当たり約20mg程度である。L粒子は球状であり、50~500nm程度の粒径を持ち、中空であることが確認されている。こ

の粒子の平均的な粒径は80nmであり、約110個のL蛋白質から構成される⁹⁾。また、L粒子の組成は80%(重量比)が蛋白質、10%が糖質、残り10%がリン脂質(酵母小胞体膜由来)である。

L粒子は、昆虫細胞を用いて、適当な分泌シグナルとプロモーターを組み合わせることで、粒子の形で効率よく細胞外に分泌生産することも可能である¹⁰⁾。どのような生産法が最適かは、利用方法により異なるため、選択することが可能である。

中空バイオナノ粒子を用いた遺伝子のピンポイントデリバリー^{11~13)}

中空バイオナノ粒子を遺伝子のピンポイントデリバリーに用いるには、まず粒子内に遺伝子を封入する必要がある。現在のところ、封入は二つの方法で行われている。すなわち、エレクトロポレーションによる方法とリポソームを用いた方法である。

エレクトロポレーションでは、高電圧パルスが付加することで、粒子膜の構造を瞬間乱して遺伝子を粒子内に取り込ませる¹¹⁾。リポソームを用いた方法では、まずリポソームに遺伝子を取り込ませ

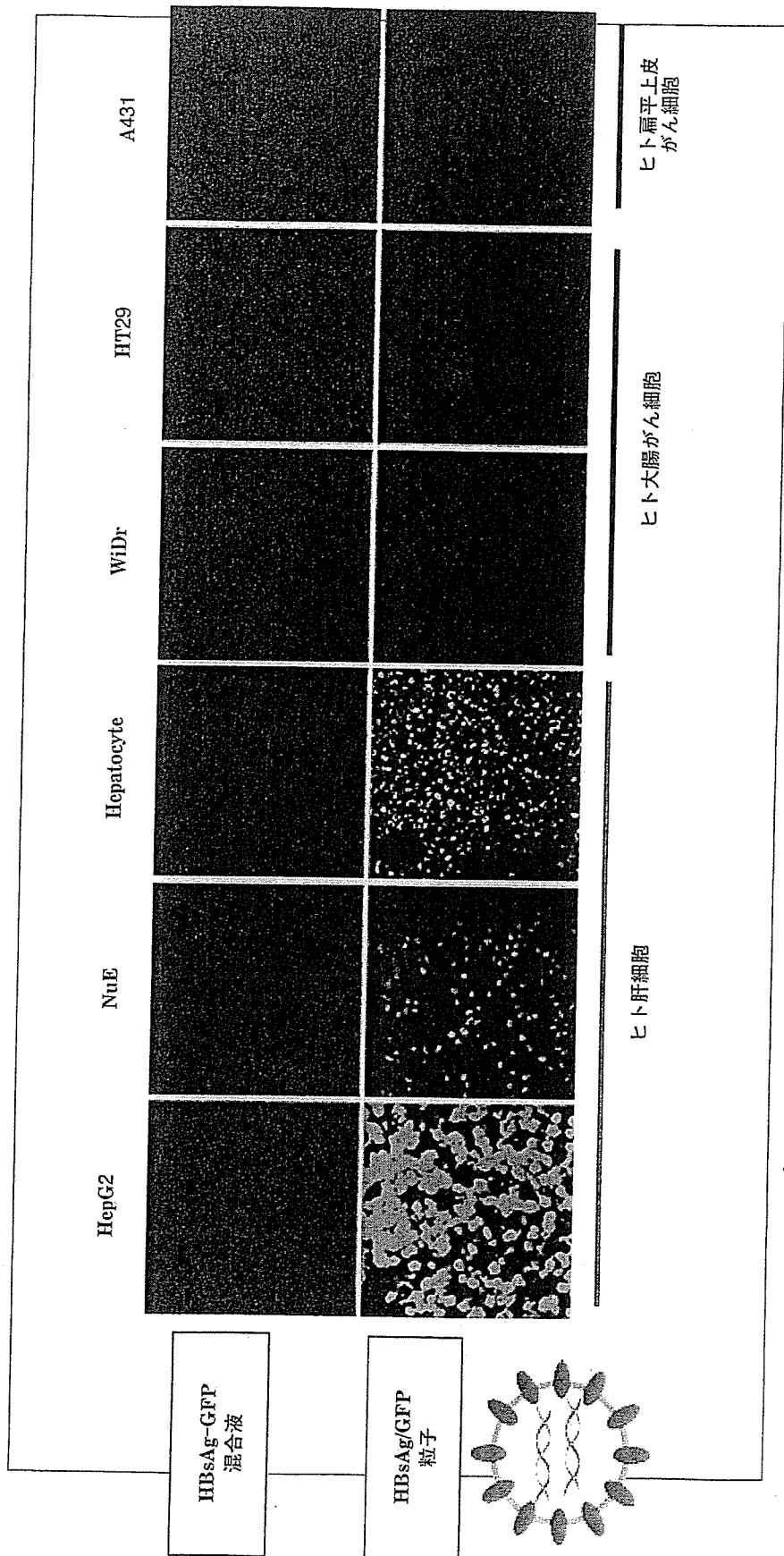


図4 培養細胞レベルでのGFP遺伝子のヒト肝細胞特異的導入

たあと、L粒子と融合させることで封入が可能である¹⁴⁾。リポソーム法では、微粒子を含む巨大な物資の封入も可能である。

遺伝子封入L粒子による特異的な遺伝子導入について、まずモデル系としてクラゲの緑色蛍光蛋白質(GFP: 遺伝子導入により蛋白質が生産されると緑色蛍光が観察できるため、判定がしやすい)の遺伝子を用いて検討した。遺伝子封入L粒子を各種の培養細胞に血清存在下で添加して導入実験を行ったところ、図4に示すように、ヒト肝細胞培養株およびヒト肝がん由来細胞株(HepG2やNuE)でのみGFPの発現による緑色蛍光が観察された。このようにL粒子は、肝細胞特異的かつ高効率な遺伝子導入を行えることが明らかとなった。

そこで、つぎのステップとして、生体内でL粒子による遺伝子のピンポイントデリバリーが可能か、実験動物を用いて検討した。すなわち、1匹のヌードマウス背部皮下にヒト肝細胞がん由来の細胞株(NuE: 標的)とヒト大腸がん由来細胞株(WiDr: 対照)を一つずつ移植し、GFP遺伝子封入L粒子を尾静脈より注射して(局注でなく経静脈的な投与を行うことで、遺伝子封入L粒子の標的化能力を明らかにするため)、L粒子が移植ヒト肝細胞がんの特異的に遺伝子導入できるかを蛍光観察により判定した。投与2週間後に、腫瘍を切除して組織内の蛍光を観察すると、ヒト肝細胞がん由来の組織内においてGFPに由来する緑色蛍光が観察された。一方、移植した大腸がん組織や、ヌードマウスの正常組織では緑色蛍光はいっさい観察されなかった。

こうした結果は、中空バイオナノ粒子が生体内で、HBVのようにヒト肝細胞を特異的に認識していることを示す。また、移植した腫瘍は本来の肝臓の存在位置とは別の部分に存在するにもかかわらず、標的化できたことから、遠方からの能動的な標的化が可能であると考えられる。

上記の基礎的な知見をもとに、具体的な遺伝子治療への適用の試みとして、遺伝性疾患を取り上げた。遺伝性疾患は、単一蛋白質発現の欠損が原因の場合が多い。今回は遺伝病である血友病を取り上げて検討した。血友病にはA型とB型があるが、それぞれ血液凝固因子ⅧもしくはⅨの投与で治療でき

ることがわかっている。

そこで、血友病B型の遺伝子治療を想定して、血液凝固因子Ⅸを発現するベクターをL粒子に封入し、ヒト肝細胞がんを移植したヌードマウスに投与した。経時的に採血して血中の血液凝固因子Ⅸの濃度をELISA法で測定したところ、重度血友病Bの治療が可能レベルの発現が1カ月にわたり確認された。そもそも、血友病の治療遺伝子は巨大なものが多いので、標準的なアデノウイルスベクターに搭載することが難しい。このような大きな遺伝子でも中空バイオナノ粒子が効率よく標的化できたことは、その有効性を強く示す成果といえる。

今回は、本来肝臓でつくられる血液凝固因子Ⅸを肝臓でつくらせたが、他の臓器由来の蛋白質でも、血中に分泌されて機能するものであれば、肝臓に発現させて治療を行うことが可能であろう。

中空バイオナノ粒子を用いた治療を従来技術と比較すると、中空バイオナノ粒子はウイルスと同様に高い遺伝子導入効率を示すとともに、人工系であることからリポソームや合成高分子ミセルと同様に安全であり、両者のよい点を併せ持つといえる。量産化に関しても、すでに実績を持つ。さらに高い標的化能力を持つことから、遺伝子治療において待ち望まれていたキャリアである。

中空バイオナノ粒子の薬剤デリバリーへの利用

以上、中空バイオナノ粒子の利用に関して、遺伝子治療を例に述べてきた。中空バイオナノ粒子は、先にも述べたように、蛋白質と脂質からなるナノカプセルであるため、粒子内には薬剤も封入可能である。たとえば、上述した遺伝子の場合と同様に、エレクトロポレーション法やリポソーム法によって薬剤を粒子内部に簡単に封入できる。実際にモデル化合物として蛍光物質カルセインを封入したL粒子は、肝細胞にのみ選択的に取り込まれ、カルセインを細胞内に導入可能であった¹¹⁾。したがって、治療効果は高いが副作用が強い医薬品の患部へのピンポイント投与に応用できると考えられる。

たとえば、抗がん剤などでは、がん細胞以外の全身で副作用が出るため、投薬濃度を抑えざるをえ

ず、限定的な効果になっている。もし、抗がん剤を高濃度に封入した中空バイオナノ粒子でピンポイントな投薬が可能になれば、標的がん細胞における薬剤濃度のみを上げることが可能となるため、注射のみで飛躍的な治療効果を上げられると期待される。また、先にも述べたように、多臓器転移がんなども網羅的に治療可能であると期待される。

中空バイオナノ粒子の蛋白質デリバリーへの利用¹⁵⁾

蛋白質をデリバリーする場合は、目的蛋白質をL蛋白質のC末端側に遺伝子レベルで融合して発現するアプローチもとれる。この場合、融合法を適切に選ぶことで、粒子内部に目的蛋白質を封入できる。たとえば、モデル蛋白質として緑色蛍光蛋白質であるEGFPをL蛋白質のC末端側に融合して発現させると、EGFPを粒子内部に包含する形で中空バイオナノ粒子が形成された。さらに培養細胞を用いた実験で、このEGFP融合粒子は肝細胞特異的に取り込まれることが明らかとなった。

したがって、インターフェロンをはじめとする医薬蛋白質をL蛋白質のC末端側に融合した中空バイオナノ粒子の各種疾患の治療への利用も有効であろう。通常のインターフェロンをウイルス性肝炎治療に用いた場合、その投与により重篤な全身性の副作用と中和抗体の生産などが問題となっている。このような全身投与では副作用が出る医薬蛋白質の場合、粒子内に包含して能動的なピンポイントDDSが可能となれば、その副作用を大きく低減できると期待される。

中空バイオナノ粒子のリターゲティング

中空バイオナノ粒子を構成するL蛋白質においては、肝臓細胞を分子認識する部位がpre-S1領域にあることがわかっている。したがって、この肝細胞認識部位を削除して、そこに他の臓器を特異的に認識する分子を挿入することで、任意の臓器に遺伝子や薬剤を標的化することが可能となると期待される。このように、L粒子を任意の臓器に再標的化するように改造する(リターゲティング)試みも進んで

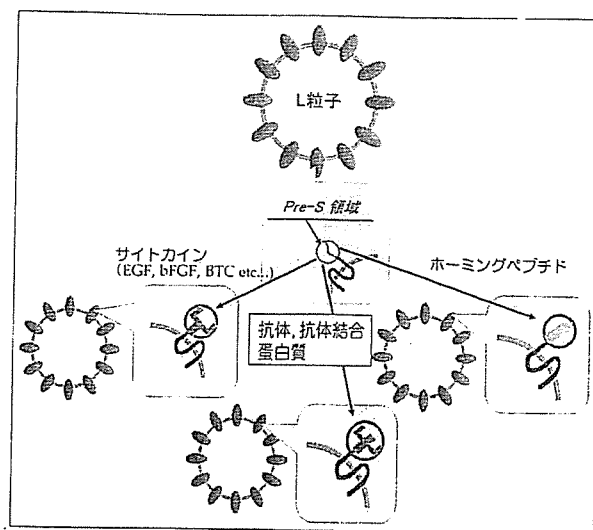


図5 中空バイオナノ粒子のリターゲティング

いる。

このためにまず、pre-S1領域のどの部分を置き換えるかについて検討を行った。適切な部分を選択しないと粒子形成量が大幅に低下するなど問題が生じるためである。L蛋白質において選択したpre-S1の適切な領域を、ヒトEGF (epidermal growth factor)と置き換えて酵母で発現させたところ、L粒子の場合と同程度の中空バイオナノ粒子(EGF提示粒子)が生産され、L粒子と同様な手法で精製できた。得られたEGF提示粒子にエレクトロポレーションでカルセインを封入し、ヒト肝がん由来細胞株および扁平上皮がん細胞株A431(EGFレセプターを大量に発現している)に加えたところ、A431細胞においてのみ著しい蛍光が観察された¹¹⁾。この結果は、pre-S1領域をEGFに変換したEGF提示粒子は、肝細胞への特異性を失ってA431への特異性を獲得したことを示す。したがって、分子認識部位を置換することで、中空バイオナノ粒子のターゲットを変更できる、すなわちリターゲティングが可能であることを実証できたものといえる。

筆者らは、現在、より一般的な意味で、リターゲティング技術の開発を精力的に進めている。図5に示すように、各種のサイトカイン、抗体分子、抗体結合分子(各種細胞や組織に特異的な抗体を粒子に結合できる)を用いたリターゲティングが期待されるが、これらに関しても筆者らはすでに成功して

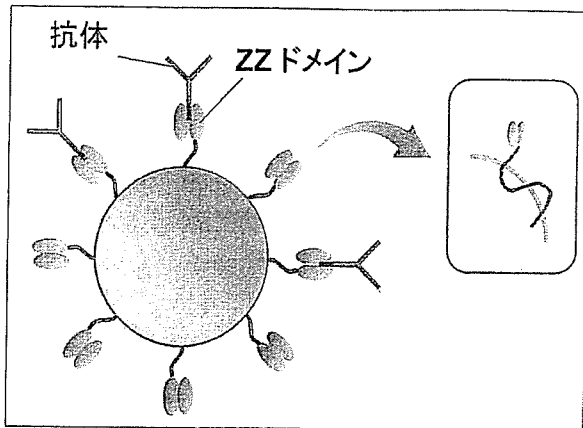


図6 ZZ提示粒子による、抗体の特異性に応じたターゲティング

いる。

抗体結合リガンドZZ(protein AのBドメインからつくられたリガンドで、分子量14,000程度)を提示した粒子の概念図を図6に示す。このZZ提示粒子は抗体を結合できるため、抗体の特異性に応じて、目的の細胞に薬剤や遺伝子を導入できることが明らかになっている。

さらに最近、短いペプチドでも細胞や組織特異性を持つことが示された(ホーミングペプチドとよばれている)ことから¹⁶⁾、その利用も有望である。特異性を示す“荷札”となる新しいホーミングペプチドを効率よく探索するうえでは、最近大きな進展をみせているコンビナトリアル・バイオエンジニアリングの手法がきわめて有効であろう¹⁷⁾。L粒子をリターゲティングした中空バイオナノ粒子を用いれば、望みの臓器・組織へのピンポイントな遺伝子・薬剤の送達が出来ると期待される。

産業化の試み

筆者らは、中空バイオナノ粒子に関する基礎的な研究に加えて、その実用化に向けた研究開発についても大学発ベンチャー(株)ビークル(本社：岡山市：www.beacle.com)を設立して進めている。当面、ビークルではつぎのような課題について、重点的な研究開発を行い、一部は数年以内に臨床試験を開始することを目標としている。

- ① L粒子内部に高濃度の抗がん剤を封入して

肝細胞特異的に投与を行うことで、肝がん治療を目指す。

- ② L粒子により、インターフェロンあるいは遺伝子を肝細胞特異的に投与することで、安全なウイルス性肝炎治療を目指す。
- ③ L粒子により、欠損蛋白質遺伝子を肝臓に導入することで、遺伝子補充療法(血友病やフェニルケトン尿症など)を目指す。
- ④ さまざまな重篤な感染症治療においては、感染細胞と非感染細胞を区別して薬物を特異的に投与することが重要である。感染細胞のみを特異的に認識する改変型L粒子を用いた安全な感染症治療を目指す。

すなわち、L粒子が持つ肝臓へのターゲティング機能を利用した治療の実用化を、最優先課題としている。さらに、各種の特異性改変型粒子を用いた、さまざまな患部へのターゲティングによる治療法を実用化することで、中空バイオナノ粒子をDDSプラットフォーム技術として産業化することを目指している。また、L粒子や改変型L粒子は、研究用試薬やイメージング用試薬としても有望であることから、さまざまな分野への波及効果の高い技術であると考えて実用化を急いでいる。

おわりに

中空バイオナノ粒子は、ウイルス表面抗原蛋白質の自己組織化によって形成される中空ナノ粒子を利用する、という新しい概念による革新的なDDS用キャリアである。問題点として、中空バイオナノ粒子の免疫原性や、ウイルス感染などでB型肝炎ウイルスに対する抗体をすでに持っているヒトへの中空バイオナノ粒子の投与が難しいことがあったが、現在、HBVのエスケープミュータントを模倣する形で免疫系に認識されないステルス粒子を創生することを試み、有望な結果を得つつある。

このようなことから、中空バイオナノ粒子を用いたDDSは、画期的な先進医療技術に発展すると考え、基礎および産業展開の両面から研究開発を進めている。

文 献

- 1) Verma IM, Somia N : Gene therapy-promises, problems and prospects. *Nature* 389 : 239-242, 1997.
- 2) Marshall E : Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science* 298 : 34-35, 2002.
- 3) Savulescu J : Harm, ethics committees and the gene therapy death. *J Med Ethics* 27 : 148-150, 2001.
- 4) Gao X, Huang L : Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2 : 710-722, 1995.
- 5) Neurath AR, Kent SB, Strick N, Parker K : Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 46 : 429-436, 1986.
- 6) Le Seyec J, Chouteau P, Cannie I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P : Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* 73 : 2052-2057, 1999.
- 7) De Meyer S, Gong ZJ, Suwandhi W, van Pelt J, Soumillion A, Yap SH : Organ and species specificity of hepatitis B virus (HBV) infection : a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes. *J Viral Hepat* 4 : 145-153, 1997.
- 8) Kuroda S, Otaka S, Miyazaki T, Nakao M, Fujisawa Y : Hepatitis B virus envelope L protein particles. Synthesis and assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, purification and characterization. *J Biol Chem* 267 : 1953-1961, 1992.
- 9) Yamada T, Iwabuki H, Kanno T, Tanaka H, Kawai T et al. : Physicochemical and immunological characterization of hepatitis B virus envelope particles exclusively consisting of the entire L(pre-S1+pre-S2+S) protein. *Vaccine* 19 : 3154-3163, 2001.
- 10) Shishido T, Muraoka M, Ueda M, Seno M, Tanizawa K et al. : Secretory production system of bio-nanocapsules using a stably transfected insect cell line. *Appl Microbiol Biotechnol*, (in press).
- 11) Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, Iwabuki H, Chuah M et al. : Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nature Biotechnol* 21 : 885-890, 2003.
- 12) Lawrence D : Nanotechnology takes another small step forward. *Lancet* 362 : 48, 2003.
- 13) Russel SJ : Rise of the nanomachines. *Nature Biotechnol* 21 : 872-873, 2003.
- 14) 鄭 周姬, 山田忠範, 妹尾昌治, 上田和政・他 : 化学工学会 第 37 回秋季大会. E2072, 2005.
- 15) Yu D, Amano C, Fukuda T, Yamada T, Kuroda S et al. : The specific delivery of proteins to human liver cells by engineered bio-nanocapsules. *FEBS Journal* 272 : 3651-3660, 2005.
- 16) Arap W, Kolonin MG, Trepel M : Lahdenranta J, Cardoso-Vila M et al. : Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nature Medicine* 8 : 121-127, 2002.
- 17) 植田充美, 近藤昭彦・編 : コンビナトリアル・バイオエンジニアリング. 化学同人, 2003.

4. 熱応答性磁性ナノ粒子による高速磁気分離

近藤昭彦¹⁾/大西徳幸²⁾

[KEYWORDS] 磁気分離, 熱応答性高分子, 磁性ナノ粒子

はじめに

金属ナノ粒子を含むナノ粒子と生体物質の複合粒子を、バイオ分離や各種アッセイ、診断などの幅広い領域で利用することが活発に試みられている¹⁾。特に近年、ナノテクノロジーを医療やバイオテクノロジーへ応用するナノバイオテクノロジーの展開への期待が高まるなか、研究開発が活発化している。微粒子をナノサイズにすると、相互作用に利用できる表面積を大きくできるため、分離のための吸着量を大きくでき、分析の感度が著しく向上する。したがって、より短時間に高感度診断ができるシステムの構築が可能であり、さらにトランスクリプトームやプロテオーム解析に代表される多品種、多品目のRNAや蛋白質のハイスループットな分析システムを構築するうえでも有効な材料である。本稿では、筆者らが開発と実用化を進めている熱応答性磁性ナノ粒子について、その基本コンセプト、調製法やバイオ分離・分析や医療診断への応用について述べる。

革新的な磁性ナノ粒子

微粒子材料の中でも、磁性微粒子材料は、バイオ領域において幅広く利用されてきている²⁾。例

えば、抗体などを共有結合で固定化した磁性微粒子は免疫診断に利用されてきている。抗体固定化磁性微粒子を用いると、抗原を認識させた後、磁石によるB/F〔結合型(bound; B)と遊離型(free; F)〕の抗原分離が可能である。図1に示すように、抗原および標識抗体で認識させ、磁石を用いて分離濃縮することで標識免疫測定(サンドイッチ法)が行える。一般的な磁性微粒子の合成法としては、磁性体としてマグネタイトあるいはフェライトの微粒子が使用され、その磁性体の表面に官能基(アミノ基、カルボキシル基、エポキシ基など)を有する高分子を固定化し、その官能基を利用して抗体が固定化されている。市販品としては均一な粒子径(1~数 μm 程度)を持つポリスチレンビーズの粒子中に、一様にフェライト粒子が分散したダイナビーズがあり³⁾、広く利用されてきている。こうした磁性微粒子のサイズが μm オーダーであるのは、磁石への応答性をよくするためである。ただ粒子径が大きいため蛋白質などの分離目的には利用しにくく、分析感度も十分なものとは言えなかった。このため、粒子径を小さくしながらも、磁気応答性のよい微粒子材料の開発が続けられてきた。ここで、もし磁性ナノ粒子材料を合成するうえで、微粒子に外部刺激(温度、光、電場、pHなど)応答性を付与できれば、粒子径を小さくして、かつ磁気応答性をよくすることができる(図2)。例えば、磁性ナノ粒子材料を熱応答性高分子で被覆した熱応答性磁性ナノ粒子では、温度変化によって、高分子が脱水和

1) KONDO Akihiko 神戸大学工学部応用化学科・教授
2) OHNISHI Noriyuki マグナビート株式会社

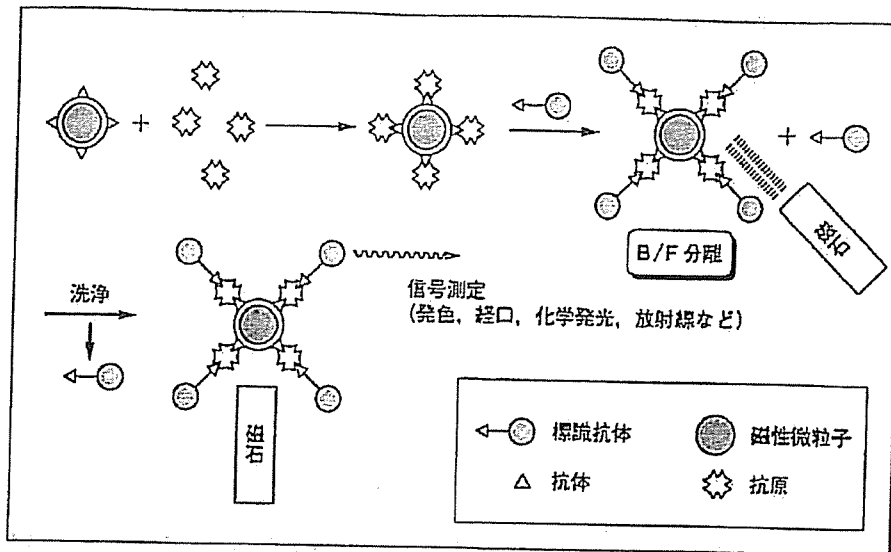


図1 磁性微粒子を活用した免疫測定

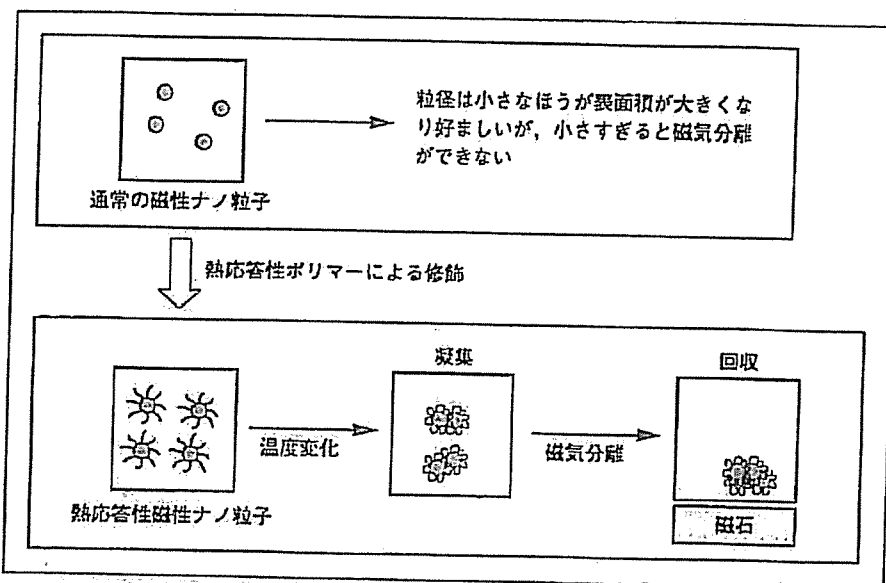


図2 熱応答性磁性ナノ粒子

する、あるいはポリマー間の相互作用が変化することにより、凝集・分散状態が刺激によって変化する。したがって、磁性ナノ粒子を温度変化で凝集させることにより、磁石によって迅速に集めることが可能となる。すなわち、この熱応答性磁性/高分子複合体はナノサイズの磁性粒子でありながら、極めて高速な磁気分離が可能な革新的な材料となる⁴⁻⁶⁾。

熱応答性高分子とは

近年、外部刺激に応答して機能や物理的性質が変化する刺激応答性高分子は、感知、判断、運動、認識といった高度機能を兼ね備えたインテリジェント材料として数多く研究されている。また材料自身がソフトで、かつ柔軟な動きを示すため、生体機能模倣材料としても期待されている。なかでもわずかな温度変化で物理的性質が変化する熱応答性高分子は温度変化という汎用的な刺激

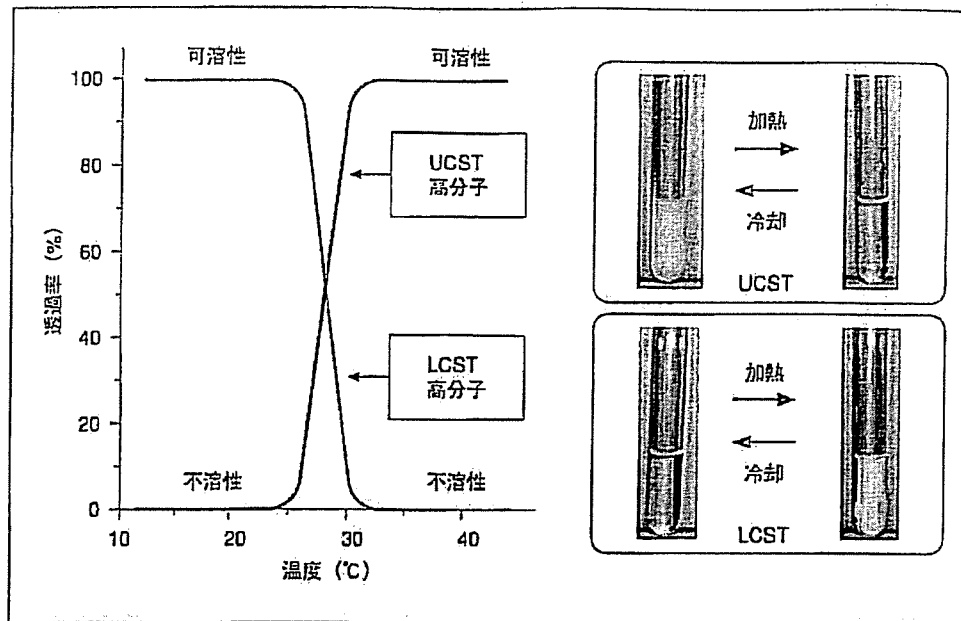


図3 UCST and LCST ポリマーの熱応答挙動

で応答するため、アクチュエーター、分離剤、DDS (drug delivery system, ドラッグデリバリーシステム) 製剤など、多くの研究がなされ、その一部は実用化されている。熱応答性高分子として、以前から下限臨界溶液温度 (lower critical solution temperature; LCST) を示すものが知られていた。これらの高分子は LCST 以上の温度で水に不溶化し、以下で溶解する (図 3)。代表的な高分子としては、*N*-イソプロピルアクリルアミド (*N*-isopropylacrylamide; NIPAM) のラジカル重合により得られるポリ-*N*-イソプロピルアクリルアミド⁷⁾がある。この高分子の LCST は 32°C であり、分子量に依存しない。また、NIPAM はほかの機能性モノマーと共重合することも容易である。共重合ポリマーは、温度変化による応答のほか、光、電場、pH、有機溶媒などを認識する部位を共重合などにより固定化することにより、それぞれの刺激に対しても応答する。

一方、上限臨界溶液温度 (upper critical solution temperature; UCST) を示す高分子は、LCST 型のものとは逆に水溶液の温度が UCST 以上で水に溶解し、以下で不溶化する (図 3)。緩衝液中で UCST を示す高分子は特定蛋白質を認識する抗体などのリガンドを固定化することによ

り、蛋白質など、熱に不安定な化合物を分離する際、低温下で不溶化して分離精製を行うことが可能なため待望視されていた材料であった。最近、われわれは緩衝液中でも UCST を有する熱応答性高分子の開発に成功した⁸⁾。これはノニオニックな *N*-アクリロイルグリシンアミドとビオチン誘導体 (*N*-メタクロイル-*N'*-ビオチニルプロピレンジアミン: *N*-methacroyl-*N'*-biotinyl propylenediamine; MBPDA) との共重合体を主成分とした高分子であり、低温側で高分子鎖間の水素結合により不溶化し、高温側で水素結合の解離により溶解する。

LCST および UCST 高分子のどちらの場合も、モノマーの共重合比率を変えることにより、様々な転移温度を有する熱応答性高分子が合成可能である。

■

熱応答性磁性ナノ粒子の合成

上述したように、多彩な LCST や UCST を示す高分子材料が開発されたため、これを用いて磁性ナノ粒子材料をコートすることで、図 2 に示したように、熱により凝集・分散の制御が可能な磁性ナノ粒子 (以下 Therma-Max[®] と呼ぶ) の合成が可能になった。特に UCST を示す Therma-

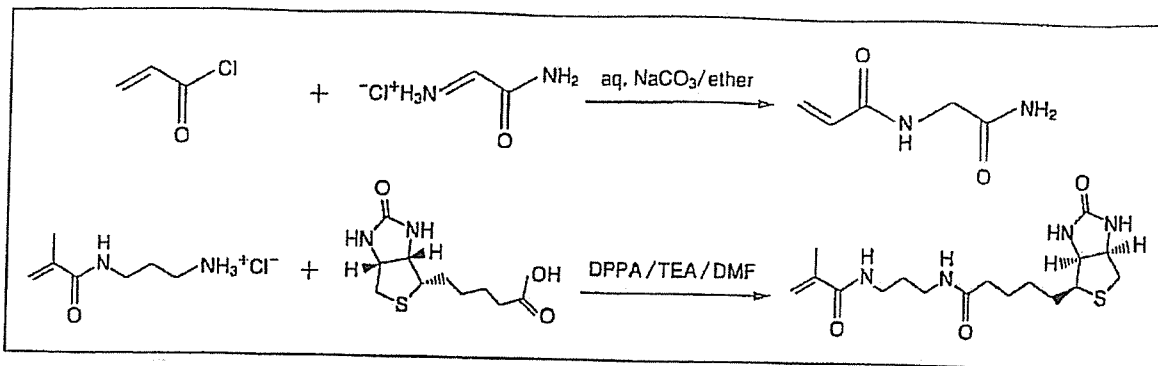


図4 *N*-acrylylglycineamide およびビオチン誘導体の合成

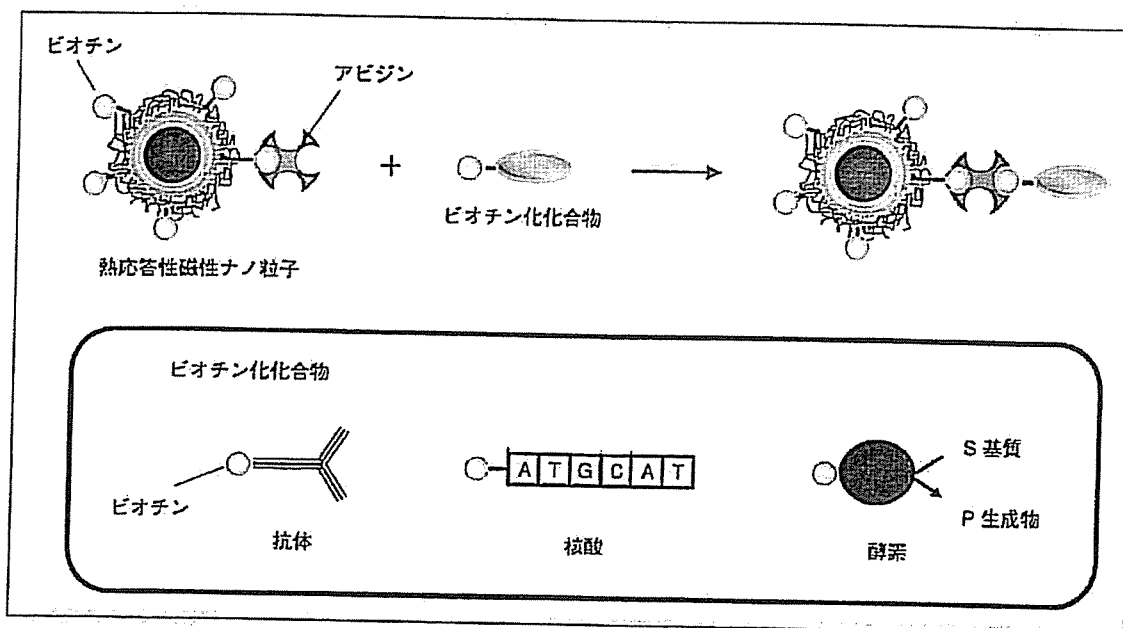


図5 ビオチン-アビジン相互作用を利用した生体分子の熱応答性磁性ナノ粒子への固定化

Max[®]は、熱に不安定な蛋白質などを短時間かつ高収率で分離するのに有効である。Therma-Max[®]の1例として、*N*-アクリロイルグリシンアミド(*N*-acrylylglycineamide; NAGAm)とビオチン誘導体による UCST を有する熱応答性磁性ナノ粒子の合成法について具体的に述べる。NAGAm とビオチン誘導体 MBPDA は、図4に示す合成法により一段で収率よく合成できる。ビオチンはアビジン(分子量 66,000 の4量体の糖蛋白質でビオチンに対する結合部位が4か所ある)と特異的かつ非常に強い親和性で結合する($K_a = 1.3 \times 10^{15}$)リガンドであると同時に、高い水素結合性を有する化合物である。この NAGAm と MBPDA を共重合して得られるポリマー(NAGAm/MBPDA 共重合体)は、水溶液中で

は、温度を下げるとう強まる水素結合によって凝集を起こし、UCSTを示す。この NAGAm/MBPDA 共重合体を、デキストランで被覆・分散させたマグネタイトのナノ粒子(平均粒子径が 20~50 nm 程度)に固定化することにより、水溶液中で UCST を持つ熱応答性磁性ナノ粒子が合成できる(平均粒子径 70 nm 程度)。さらに NAGAm/MBPDA 共重合体は、ビオチンを含むため、熱応答性磁性ナノ粒子は、この粒子表層ビオチンを介してアビジン、そして種々のビオチン化蛋白質や DNA などの生体分子を特異的に結合できる(図5)。また、デキストランとマグネタイトは非常に強く結合しているため、ポリマーと磁性ナノ粒子は安定な複合体粒子を形成する。

この熱応答性磁性ナノ粒子は室温下の分散状態

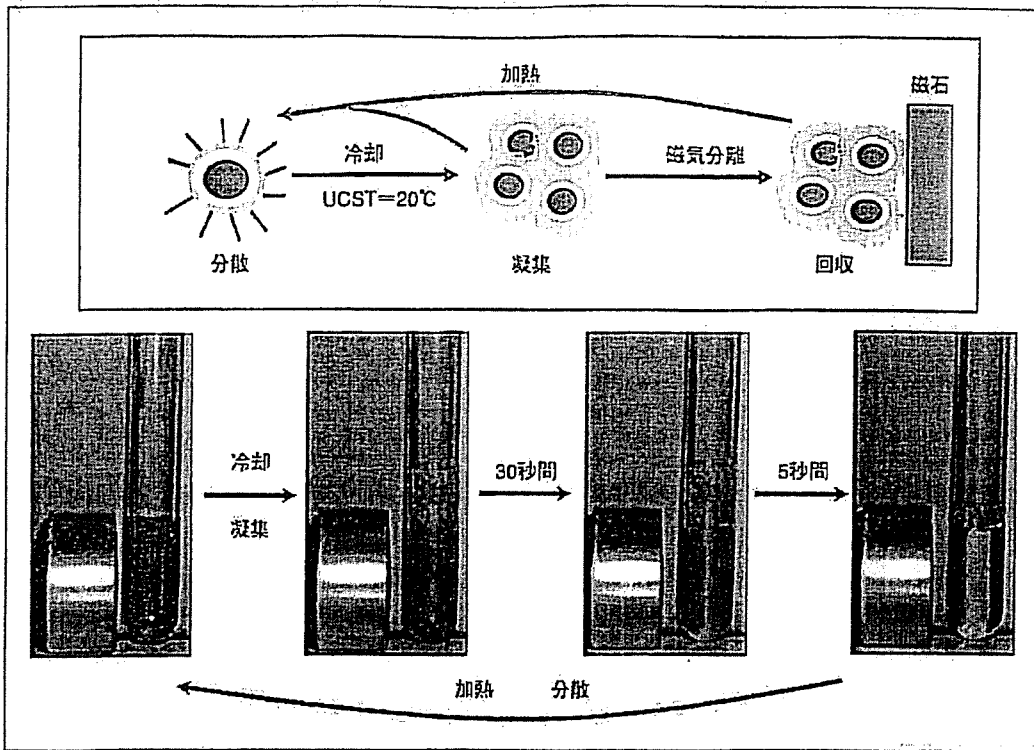


図6 熱応答性磁性ナノ粒子の凝集・磁気分離

では磁性体に由来する茶色がかった透明な溶液のようであり、かなり強力な磁石でも全く磁気分離できない。これを氷浴に入れると瞬時に凝集を起こして容易に磁石分離ができる(図6)。また、凝集した粒子は温度を上げることで、元通り完全に分散させることが可能である。このように保存中は、完全に均一溶液状で、かつ熱応答により迅速に凝集・磁気分離可能な温度応答性磁性ナノ粒子 Thermo-Max[®] は、各種迅速自動化分析にも適した材料である。

図5でビオチン-アビジン相互作用を介しての生体分子の磁性ナノ粒子への固定化について示したが、生体分子を粒子に直接共有結合で固定化することが良い場合も多い。粒子表面にカルボキシル基やアミノ基を持たせることで、生体分子を共有結合固定化することが可能となる。こうした粒子はカルボキシル基やアミノ基を持つモノマーを共重合することで調製可能であるが、固定化用の官能基を持たせても熱応答性を保持させることができる。このようにモノマー組成を制御したポリマーを磁性ナノ粒子に結合させることで、多様な性質を持った Thermo-Max[®] を調製することが

できる。

以下に、Thermo-Max[®] のバイオ領域への応用の具体例をいくつか紹介する。

蛋白質分離やプロテオーム解析への応用

蛋白質のような生体分子の分離においては、ナノサイズを持つ微粒子が必須である。磁性ナノ粒子は、表面積を大きく取れることから有効である。また、微粒子表面で吸着が起こるために、極めて早く平衡に達し、数分程度以内にすべての吸着操作を完了できる。まず、熱応答性磁性ナノ粒子にアビジンを結合させたところ、粒子1mg当たり約0.5mgのアビジンが吸着されたことから、その吸着容量は非常に大きいと言える⁹⁾。また、図7はこのアビジン結合 Thermo-Max[®] を用いて、ビオチン化IgGとウシ血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA)の混合物からビオチン化IgGを吸着分離した結果を示す。吸着後の Thermo-Max[®] をそのまま電気泳動(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electro-

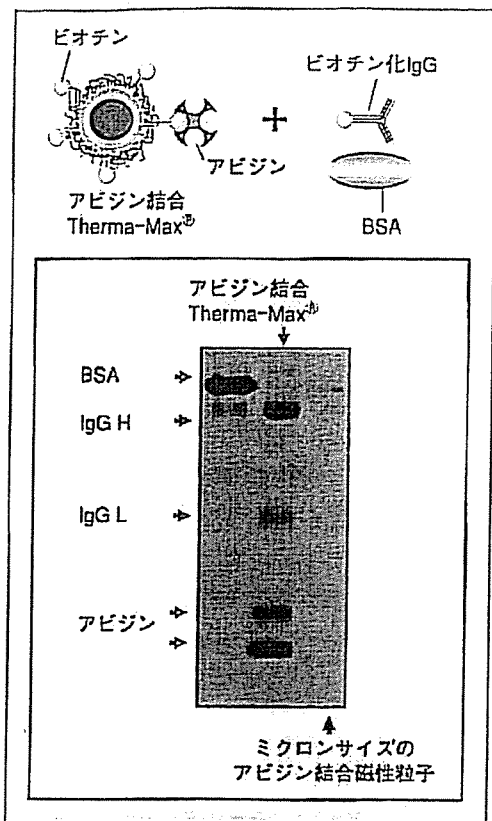


図7 アビジン結合熱応答性磁性ナノ粒子による、BSAとビオチン化IgG混合物からのビオチン化IgGの選択的な吸着
磁性ナノ粒子とミクロンサイズ磁性粒子を用いた場合の比較。

phoresis ; SDS-PAGE)で解析した結果であるが、ビオチン化IgGとアビジンのバンドが確認できる。したがって、左端のレーンに示される混合物から、ビオチン化IgGのみをアビジン-ビオチン相互作用によって特異的に吸着していることがわかる。またBSAのバンドが確認できないことから、粒子の表面への非特異的な吸着はほとんどみられず、Therma-Max[®]は極めて高い特異性で目的蛋白質を吸着分離できると言える。また粒子径数 μm の市販の磁性微粒子を用いて同様の操作を行った結果も比較して示すが、蛋白質がほとんど確認できないことから、ナノ粒子を使うことによる吸着量の著しい増加が明らかである。

さらに、図8に示すように、各種のアフィニティ分離用の微粒子が開発されており、各種の組換え蛋白質の精製に利用できる。すなわち、目的蛋白質をGST (glutathione S-transferase), アビジン, 6残基ヒスチジン(各々グルタチオン, ビ

オチン, メタルキレートとアフィニティ結合する)といったアフィニティタグ(特定のリガンドと選択的に結合する蛋白質やペプチド)と融合して生産することで、図8の熱応答性磁性ナノ粒子を汎用的な分離剤として利用することができる。

磁性ナノ粒子はプロテオーム解析においても、その重要な柱の1つである蛋白質相互作用解析において極めて有効であると期待される。その代表的な方法がプルダウン法と呼ばれるものである。簡単に言うと、アフィニティタグを融合させた蛋白質を細胞に発現させ、対応するアフィニティ磁性ナノ粒子で分離する。このときに、発現した蛋白質と相互作用する細胞内の分子は、結合した状態で同時に分離されるために、これを1つ1つ同定するといった手法である。このような基礎的な研究成果が集積されていくなかで、プロテオームと病態などの関連が明らかになり、各種の診断に利用されていくと考えられるが、ここでも磁性ナノ粒子は大きな役割を果たすものと期待される。

各種イムノアッセイへの応用

図1に示すような標識免疫測定(サンドイッチ法)などのイムノアッセイを行う場合も、抗原または抗体を固定化したTherma-Max[®]は極めて有効である。Therma-Max[®]では極めて迅速な磁気分離が可能であることから、実際の血液サンプルなどから迅速にB/F分離を行うことで、アッセイ時間の短縮が可能である。実際の分析システムにおける実績からは、1分間程度での完全磁気分離が可能である。また、ナノサイズであることから、先に述べたように極めて迅速に平衡に達し、また大きな表面積を持つことから感度を上げることが可能である。また、非特異的な吸着も少ないことから精度の高いアッセイ系を構築することが可能である。多様なイムノアッセイシステムの開発が期待されている。

細胞分離・アッセイへの応用

細胞のような大きなターゲットを分離するうえでも、熱応答性磁性ナノ粒子は極めて有効である。ここでは1例として、大腸菌に対する抗体

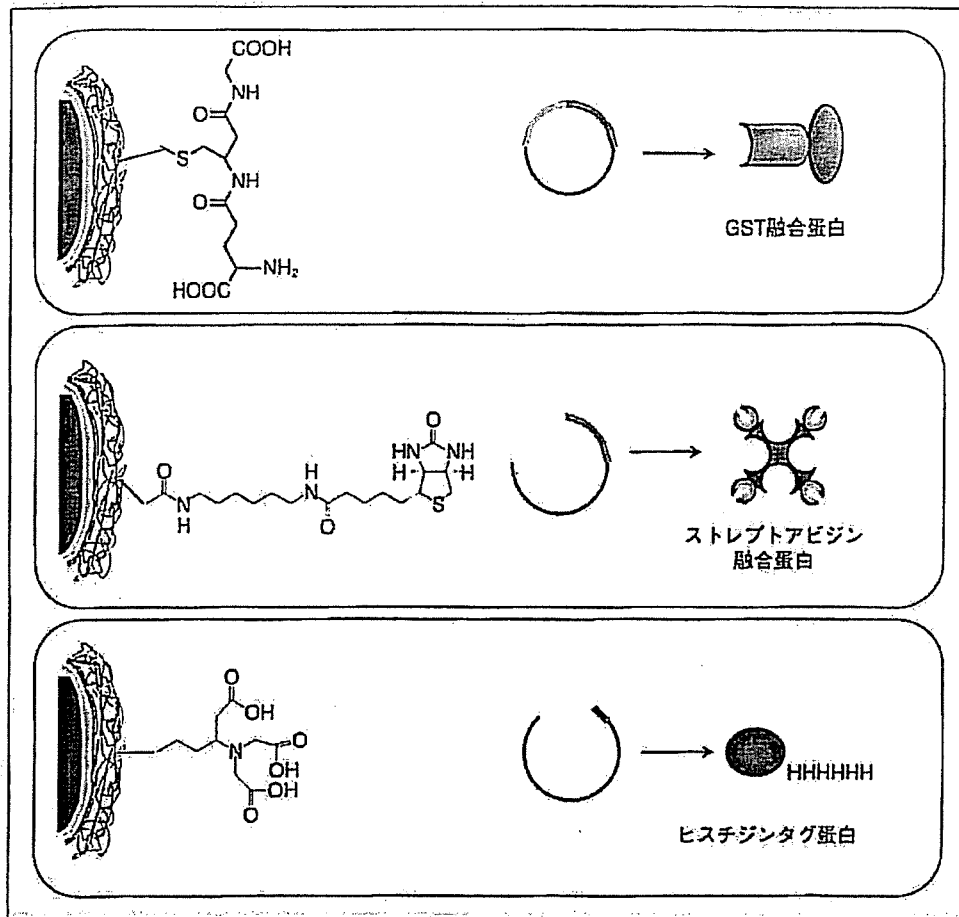


図8 各種汎用リガンドを固定化した熱応答性磁性ナノ粒子

(ビオチン化したもの)を用いて、大腸菌の分離を行う方法(図9a)および結果(図9b)を示す。粒子径数 μm の市販の磁性微粒子を用いて行った結果も比較して示す。磁気分離を行った後の上澄み中の大腸菌と磁性微粒子に結合した大腸菌数をプレート法で測定した。ミクロンサイズの磁性微粒子の場合、分離後の上澄みに多数の大腸菌が残って回収率は低かったが、熱応答性磁性ナノ粒子を用いた場合には、大腸菌をほぼ完全に磁気分離できた。また、より大きな細胞である酵母や植物細胞、動物細胞分離においてもその有効性が示されている⁹⁾。このように、細胞分離やアッセイにおいても、ナノサイズの磁性微粒子が極めて有効であると言える。

④

遺伝子工学・遺伝子診断への応用

遺伝子工学分野は、磁性微粒子の利用が進みつ

つある領域の1つと言える。すなわち磁性微粒子表面にDNAを固定化して、mRNAや一本鎖DNAの分離、DNA結合蛋白質の分離等、遺伝子工学や遺伝子診断の広範な領域に活用するものである⁹⁾(図10)。ここでも磁性ナノ粒子の利用が分離精度の向上に極めて有効である。また、ビオチン化DNAの調製はルーチン的に行われていることから、ビオチンをもつ熱応答性磁性ナノ粒子にアビジンを介して簡便に固定化でき(図5)、極めて有効である。

2000年、米国のバイオ企業セレーラ・ジェノミクスと日米欧の国際共同チームがそれぞれ、ヒトゲノム(人間の全遺伝情報)の解読に成功したと発表した。しかし、ゲノムのどの部分が実際に意味を持ち、どのような機能を持つかが解明されたわけではなく、ポストゲノムの大きな課題として、世界的に熾烈な競争が繰り広げられている。また、一塩基多型(single nucleotide polymor-

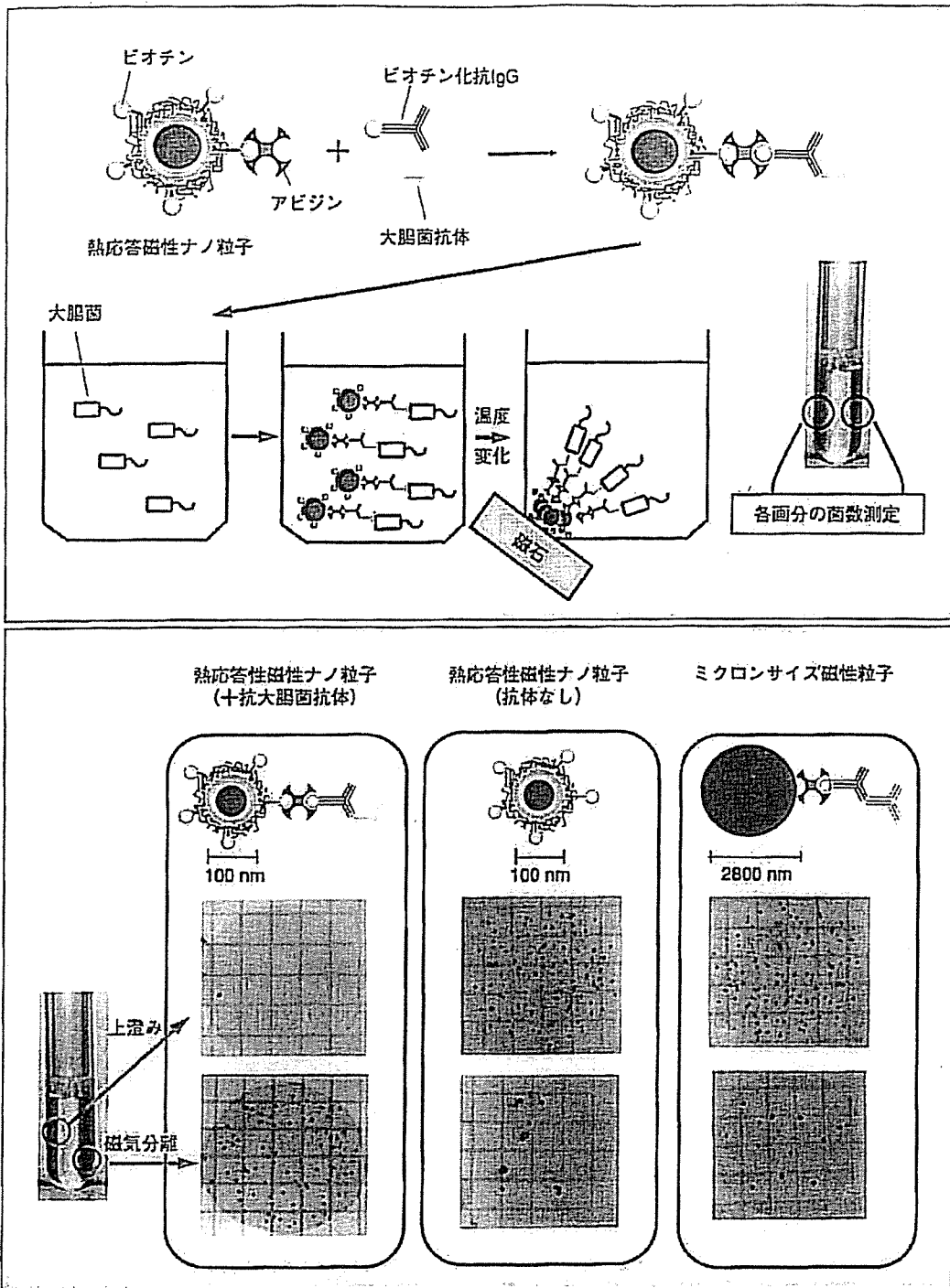


図9 大腸菌の磁性ナノ粒子およびミクロンサイズ粒子を用いての分離特性の比較

$\frac{a}{b}$

phisms ; SNPs, スニップス) タイピングによる特定の病気への危険率予測や薬剤の効きやすさや副作用予測などもオーダーメイド医療実現において重要な課題である。このため mRNA からの網羅的遺伝子発現解析(トランスクリプトーム解析)や, SNPs 解析などをベースとする診断は, ポス

トゲノムの重要な技術として位置付けられている。特に mRNA のような発現量が少なく不安定な分子を単離する場合, 熱応答性磁性ナノ粒子は有効であると考えられる。筆者らは, 熱応答性磁性ナノ粒子を用いた mRNA の迅速分離を行っている。具体的には, アビジンを介してオリゴ

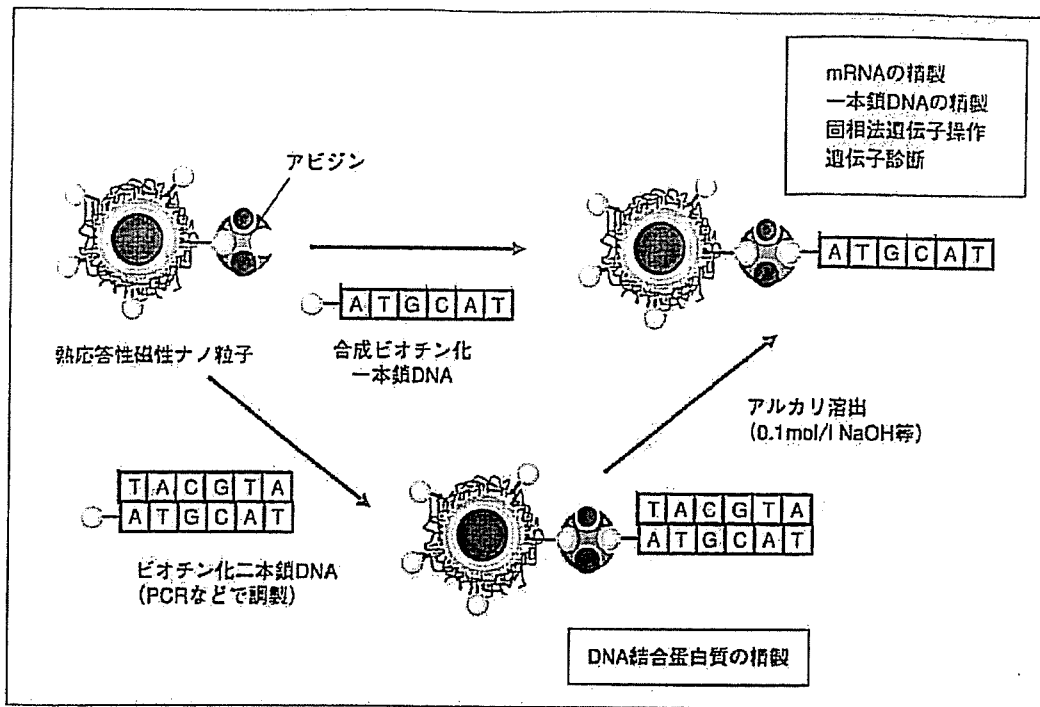


図10 熱応答性磁性ナノ粒子の遺伝子工学・遺伝子診断への応用

(dT)25 を固定化した UCST 型熱応答性磁性ナノ粒子を調製し、グリーンモンキー由来の不死化細胞(COS-1)から得られたトータル RNA から mRNA の分離を試みた。COS-1 細胞から得られた mRNA は、PR-PCR により効率よく増幅可能であった。しかも分離した mRNA は、磁性ナノ粒子に固定化した状態で RT-PCR 増幅が可能であり(粒子が完全に分散しているため)、その有効性が明らかとなった。

医療分野への応用

磁性ナノ粒子は、医療分野においても、MRI 診断などにおける造影剤や癌の温熱療法(ハイパーサーミア)などにおいても、その有効性が示されてきており、今後の展開が期待されている。また、DDS などへの展開も期待されるが、磁性ナノ粒子に薬剤を包含させた場合、検出と薬剤送達と同時に可能となる。また、磁場などの外部力による温熱療法効果と薬物放出による DDS を同時に行うことでよりいっそう高い効果を期待することもできる。生体内に微粒子を注入した場合、通常は主に肝臓のマクロファージによる取り込みと

いう生体防御機構によって排除されてしまう。このマクロファージによる取り込みを回避して、ターゲット臓器に粒子を送り込むには、粒子がナノサイズであることが極めて重要である。また、100 nm 以下の微粒子は脾臓への蓄積も少なく、血管壁を透過して目的の組織の細胞に到達しやすく、細胞への取り込みも行われやすいため極めて有効である。ナノ粒子に薬物等を包含させた DDS 製剤の研究は、1986 年に EPR 効果(enhanced permeation and retention effect)が提唱され¹⁰⁾、さらに大きく前進した。癌組織ではリンパ管による高分子化合物の回収機構が不完全なため、高分子化合物は癌組織内に滞留しやすい。これを EPR 効果という。通常の薬剤では容易に到達できない患部に薬剤を送り込むことが可能であり、EPR 効果を利用した DDS 製剤は画期的な癌治療薬として期待されている。現在、EPR 効果は実証されており、アドレマイシン(抗癌剤)を含む「直径 50 nm の高分子ミセル」は、癌治療を目的とした DDS 製剤として実用化されつつある¹¹⁾。このようなことから、さらに、微粒子の表面に標的臓器の細胞に特異的に結合するリガンドを固定化できれば、特異性の高い薬剤や遺伝子

の導入が可能となる。このように、複合磁性体のサイズをナノレベルにし、表面特性をコントロールして標的組織特異的なリガンドを固定化した微粒粒子に薬剤を包み込むことで、生体防御機構をくぐりぬけて、通常の薬剤では到達できない患部に特異的に薬剤や遺伝子を送り込むことができると期待されている。

産業化への展開

Therma-Max[®]の産業化はすでに始まっている。マグナビート株式会社(ホームページ: <http://www.magnabeat.com/>)は、Therma-Max[®]を実用化するために設立された(チッソ株式会社と神戸大学のジョイントベンチャーである)。マグナビート株式会社では多様な粒子群の開発およびその製造、販売を行っている。各種官能基を表層に持ち、熱応答性の異なる LCST タイプおよび UCST タイプの開発に成功している。すでにアビジン固定粒子、カルボキシル基やアミノ基を持つ粒子、プロテイン A やプロテイン G を共有結合固定した粒子などの販売を開始している。また今後も、熱応答領域の異なる粒子や、多様なアフィニティ分離や診断に対応した粒子の販売を予定している。したがって、こうした Therma-Max[®]を試薬として利用する、あるいはそれを用いた新しい診断システムの開発を行うことが可能となっている。

将来展望

温度応答性磁性ナノ粒子 Therma-Max[®]はその粒径がナノサイズと小さいため、従来使用されているミクロンサイズの磁性微粒子やラテックスビーズに比べて、水溶液中での分散性および分子認識性が格段に向上する。さらにわずかな温度変化で素早く凝集するため磁石による回収も容易に行うことが可能である。その結果、従来の分析法で使用されている磁性微粒子やラテックス担体などを Therma-Max[®]に置き換えるだけで大幅な

感度アップと測定時間の短縮(ハイスルーブット化)が見込まれる。Therma-Max[®]はポストゲノムの課題である SNPs 解析やプロテオーム解析、あるいは極微量の環境ホルモンの分析など、21世紀のキーワードとなる分析法において大きく貢献できる材料であると期待される。また、各種医療診断分野においても、大きな展開があるものと期待されている。

文献

- 1) 近藤昭彦: バイオ領域における高分子マイクロスフェアの応用. 静電気学会誌 23: 16-22, 1999
- 2) 近藤昭彦: 磁性微粒子の開発とそのバイオプロセスへの応用. ケミカルエンジニアリング: 80-86, 1994
- 3) Lea TF, Vertdal K, Nustad S, et al: Monosized magnetic polymer particles: their use in separation of cells and subcellular components, and in the study of lymphocyte function in vitro. J Mol Recognit 1: 9-18, 1988
- 4) Kondo A, Kamura H, Higashitani K: Development and application of thermo-responsive magnetic immunomicrospheres for antibody purification. Appl Microbiol Biotechnol 41: 99-105, 1994
- 5) Furukawa H, Shimojo R, Ohnishi N, et al: affinity selection of target cells from cell surface displayed libraries: a novel procedure using thermo-responsive magnetic nanoparticles. Appl Microbiol Biotechnol 62: 478-483, 2003
- 6) Ohnishi N, Furukawa H, Hata H, et al: High-efficiency bioaffinity separation of cells and proteins using novel thermoresponsive biotinylated magnetic nanoparticles. Nanobiotechnology: (in press)
- 7) Heskins M, Guillet JE: Solution properties of poly (N-isopropyl acrylamide). J Macromol Sci Chem A 2: 1441-1445, 1968
- 8) 大西徳幸, 古川裕考, 片岡一則, 他: Polym Prepr Jpn 47: 2359, 1998
- 9) Uhlen M: Magnetic separation of DNA. Nature 340: 733-734, 1989
- 10) Matsumura Y, Maeda H: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res 46: 6387-6392, 1986
- 11) Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y: Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. Adv Drug Delivery Rev 47: 113-131, 2001

バイオナノキャリアの開発と がん遺伝子治療への応用

近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和

B型肝炎ウイルスの外殻Lタンパク質から形成され、約80 nmの平均径をもつL粒子を酵母で豊産することに成功した。この粒子はウイルスゲノムを含まない中空のバイオナノ粒子であることから、遺伝子などを肝臓にピンポイント送達する安全かつ高効率なナノキャリアとし利用できる。さらにLタンパク質の肝細胞認識部位(pre-S領域)を各種のターゲティングペプチドやリガンドに置き換えることで、任意の組織・臓器に再標的化された粒子も構築できるため、広範なピンポイント遺伝子治療への応用が期待される。まず、第一歩として、バイオナノ粒子の肝臓がん遺伝子治療への応用を試みた。

はじめに

近年の創薬技術のめざましい進展により、有望な医薬品候補を効率よく探索することが可能になってきている。また、薬物としては、主流である低分子化合物に加えて、タンパク質や核酸も使用されるようになってきている。さらに近年のライフサイエンスの進展や、分子レベルでの発症機構の解明は、新しい治療法としての遺伝子治療を可能にしつつある。遺伝子治療は、遺伝子を目的の細胞に送達・導入して、治療効果をもつタンパク質を作り出そうとするものである。遺伝子治療においてはピンポイントな送達が不可欠である。これは、生体内で分解を受けやすい遺伝子を目的臓器に効率よく送達できなければ十分な治療効果を出すことが難しく、逆に遺伝子が他の部位に導入されると思わぬ副作用が生じる可能性があるためである。

現在までに、実験的に行われている遺伝子治療の多くは、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスなどのウイルスゲノムに目的の遺伝子を組み込んだ感染性ウイルスを利用したものである¹⁾。これらのウイルスは高い遺伝子導入効率をもつ大きな利点があるが、組織・細胞に対して非特異的に感染してしまう。このため、目的臓器に送達するために手術などにより患部に直接投与する必要があり、患者への負

担が大きい。また、ウイルスを利用すると、そのゲノムを患者の染色体に導入する可能性があり、予測不可能な副作用が生じる可能性がある²⁾。したがって、より安全で高機能な非ウイルス性の人工的なキャリアの開発が強く求められている。人工キャリア(あるいはナノ粒子化法)として検討されてきた代表的なものとしては、①ポリカチオンあるいはポリカチオン+ターゲティング用のリガンドによってDNAをロッド状や球状に凝縮する方法、②ブロックコポリマーによりポリマーミセルを形成させる方法、③正電荷をもったりボソームや微粒子に結合させる方法などが考えられている³⁾。この場合、遺伝子の導入効率をいかに高められるかが大きなポイントである。

われわれは、全く新しいタイプのピンポイント遺伝子治療用ナノキャリアとして、ウイルス由来のタンパク質を利用した中空バイオナノ粒子を考案した。ウイルスのなかでも、B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus, 以下HBV)が肝臓のみに特異的かつ効率よく感染する能力を有することに着目し、B型肝炎ウイルス表面抗原からなるタンパク質のナノ粒子(「中空バイオナノ粒子」と呼ぶ)を目的臓器への能動的なピンポイント遺伝子導入を可能とするナノキャリアとして利用しようというものである。本稿では、中空バ

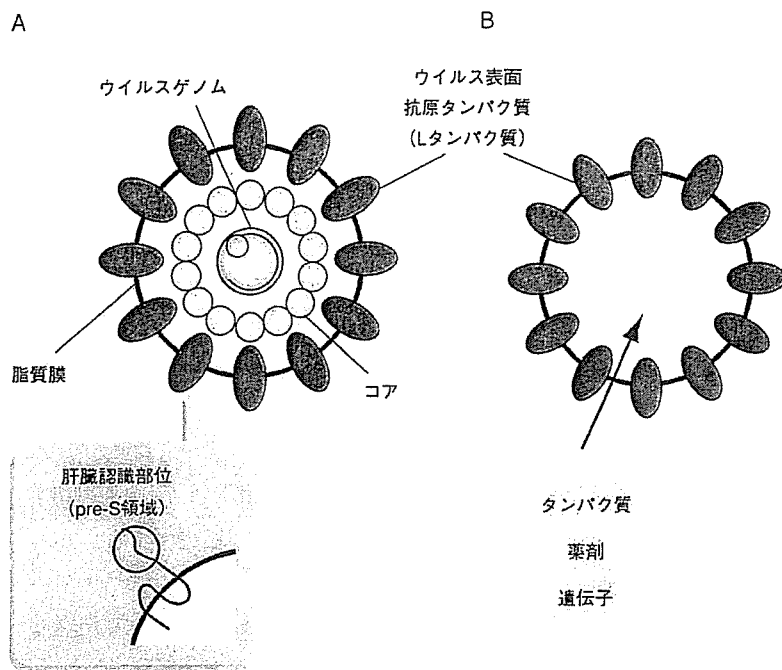


図1 ● B型肝炎ウイルス (A) と中空バイオナノ粒子 (B)

中空バイオナノ粒子 (L粒子) は、Lタンパク質 (膜タンパク質) と脂質からなる中空の粒子であり、遺伝子や薬剤、タンパク質の封入が可能である。またLタンパク質のPre-S領域には肝臓認識部位があるため、L粒子を用いると、封入した遺伝子などを肝臓にピンポイントデリバリーできる

イオナノ粒子の概念、その製造や物性と、がん遺伝子治療への応用について紹介する。

1. 中空バイオナノ粒子とは

まず中空バイオナノ粒子の基になるHBVの構造について述べる。HBVは、直径約42 nmの球状ウイルスである。図1-Aに示すように、HBVは、そのゲノムが、タンパク質 (ウイルス表面抗原タンパク質という：図では楕円形で示す) と脂質からできた外殻とコアで二重に包まれた構造をとっている。コアの中には、ウイルス本体のDNA (約3,200塩基) や遺伝子を複製するのに必要なDNAポリメラーゼが存在している。外殻を作るLタンパク質は、226アミノ

酸残基のSタンパク質のN末端側にpre-S領域 (55.アミノ酸残基のpre-S2領域と108または119アミノ酸残基のpre-S1領域からなる) が付加した形になっており、分子量約52 kDaの糖タンパク質である。pre-S1については、肝細胞と特異的に結合する部位を含んでおり、HBVが感染する際に中心的な役割を担っていることが明らかになっている⁵¹⁻⁷¹。HBVは、肝細胞への結合と細胞膜との融合によって感染する。微量のB型肝炎患者血液を指に刺しただけでもウイルス感染することでもわかるように、HBVはヒト肝細胞に選択的かつ高効率に感染して複製する優れた能力をもつ。

中空バイオナノ粒子とは、HBVのLタンパク

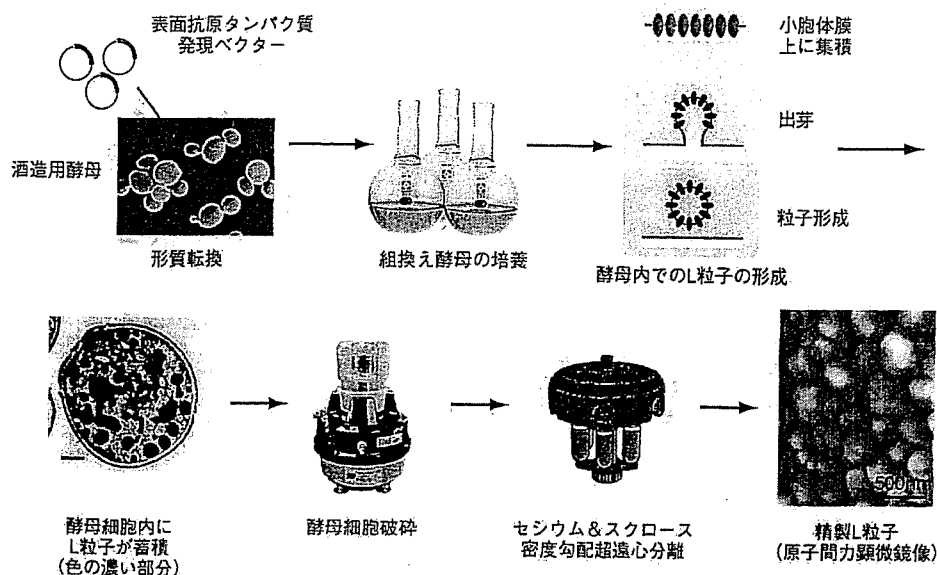


図2 ●中空バイオナノ粒子の生産法

Lタンパク質発現プラスミドを酵母に導入し培養を行なうと、発現したLタンパク質は酵母の小胞体膜に集積し、出芽して、粒子を形成し、細胞内に蓄積する。酵母を回収し破碎後、セシウムおよびスクロース密度勾配超遠心分離を繰り返すことで精製L粒子を得ることができる。

質と脂質からなる外殻のみを、人工的かつ安全なかたちで生産したナノカプセルである(図1-B: L粒子と呼ばれる)。Lタンパク質は肝臓を分子認識する pre-S1 領域をもつため、この粒子はウイルスが本来もつ肝臓への高い感染力を保持すると考えられる。また、HBVの表面抗原タンパク質が形成する中空バイオナノ粒子は、脂質膜と糖タンパク質からなる柔軟な構造を有していることから、薬剤、遺伝子、タンパク質などを包含させることで、これら広範囲な物質のピンポイントDDSに利用できると期待される。中空バイオナノ粒子は、タンパク質と脂質からなる最もシンプルで安全なバイオナノマシンともいえる。

2. 中空バイオナノ粒子の生産

図2は、酵母における中空バイオナノ粒子形成および形成された粒子の精製について示す。

HBVのLタンパク質遺伝子を酵母細胞で発現させると、Lタンパク質は互いに分子認識を行い、小胞体膜に集積し、出芽形式で小胞体ルーメン側にL粒子として放出される⁹⁾。L粒子は、タンパク質と脂質が自己組織化して形成される機能性バイオ粒子である。このL粒子を蓄積した酵母細胞を破碎し、細胞破碎物などを遠心分離で除去した後、セシウムおよびスクロースを利用した密度勾配超遠心分離をくり返すと、高純度のL粒子を得ることができる。精製は、クロマトグラフィー法を用いても可能である。収量としては、酵母の培養液1l当たり約20mg程度である。L粒子は球状であり、50~500nm程度の粒径をもち、中空であることが確認されている。この粒子の平均的な粒径は80nm(約110個のLタンパク質から構成される)であり⁹⁾、B型肝炎ウイルス粒子より大きい。また、L粒子の組成は80%(重量比)がタンパク質、10%が糖質、