報 文

脂質二分子膜中におけるリン脂質と
脂溶性物質の相互作用阿部 正彦^{*,**}・高尾 芳子^{*}・山本 卓也^{*}・権 敬玉^{*}・山内 仁史^{***}・荻野 圭三^{**}^{*} 東京理科大学・理工学部・工業化学科

(〒278 千葉県野田市山崎 2641)

^{**} 東京理科大学・界面科学研究所

(〒162 東京都新宿区神楽坂 1-3)

^{***} 第一製薬(株)開発研究所

(〒134 東京都江戸川区北葛西 1-16-13)

Molecular Interactions between Phospholipid and
Lipophilic Substances in a Lipid BilayerMasahiko ABE^{*,**}, Yoshiko TAKAO^{*}, Takuya YAMAMOTO^{*},Kyung Ok KWON, Hitoshi YAMAUCHI^{***}, and Keizo OGINO^{*,**}^{*} Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo

(2641, Yamazaki, Noda-shi, Chiba-ken, 〒278)

^{**} Institute of Colloid and Interface Science, Science University of Tokyo

(1-3, Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo, 〒162)

^{***} Developmental Research Laboratories, Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd.

(1-16-13, Kita-Kasai, Edogawa-ku, Tokyo, 〒134)

Molecular interactions between dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and lipophilic substances in a lipid bilayer were investigated by measurements of the encapsulation efficiency of glucose, micropolarity and microfluidity.

The encapsulation efficiency of glucose in liposomes decreased rapidly with an increase in concentrations of polar aliphatic substances such as 1-octanol and octanoic acid, but was almost independent of the non-polar hydrocarbon octane. The micropolarity of the lipid bilayer decreased with increasing concentration of octane (and/or 1-octanol), but was independent of octanoic acid. The microfluidity of the lipid bilayer and rates of glucose leakage for several lipophilic substances varied in the order, 1-octanol > octanoic acid > octane.

The permeability of liposomes was found to depend on the position of lipophilic substance in membranes and hydrophobic interactions between lipid and lipophilic substances in the lipid bilayer.

1 緒 言

リポソーム, 脂肪乳剤 (リピッドマイクロソフェアー), エマルション, 混合ミセル, マイクロカプセル, マイクロソフェアーなどのコロイド次元分子集合体は, ドラッグデリバリーシステムのキャリアーとして注

連絡者: 阿部正彦

目されている^{1)~3)}。特に, 脂質二分子膜からなるリポソームは, その分子集合体中に水相と疎水性相 (二分子膜中の疎水基部) を兼ね備えており, 他のコロイド次元分子集合体にはない特性を有している。近年, 医薬品の多様化に伴い種々の脂溶性薬物の利用が期待されている。しかし, リポソームの薬物保持に関する研究は, 水溶性薬物に関するもの^{4)~6)}や生化学的見地からのもの⁷⁾

が多い。リポソームは、その脂質二分子膜中の疎水基部に種々の脂溶性薬物を取り込むことができるにもかかわらず、脂溶性物質と脂質の相互作用に関する物理化学的研究は少ない。

そこで本研究では、リポソーム膜に取り込む脂溶性薬物のモデル物質として、親水基を持たない脂溶性物質（オクタン）と親水基の異なる脂溶性物質（1-オクタノール、オクタン酸）を用い、これらがジパルミトイルホスファチジルコリンからなるリポソーム膜の物性に及ぼす影響を、リポソームの内水相マーカー並びに蛍光プローブを用いて検討した。

2 実 験

2.1 試 料

2.1.1 リポソーム形成脂質

リン脂質としてL- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン〔DPPC、日本油脂（株）製〕は、試薬特級品（純度99.6%以上）をそのまま用いた。

膜を安定にするために加えたコレステロール（シグマ社製）は、試薬特級品（純度99%以上）をそのまま用いた。

また、リポソーム膜に負荷電を与えるために加えたリン酸水素ジヘキサデシル（DCP、シグマ社製）は、試薬特級品（純度97%）をそのまま用いた。

2.1.2 脂溶性物質

脂溶性物質として用いたオクタン（純度97%）、1-オクタノール（純度95%）、オクタン酸（純度98%）は、東京化成（株）の試薬特級品を硫酸洗浄した後、試料に供した。

2.1.3 リン酸緩衝生理食塩水（PBS）

PBSは、市販特級品の塩化ナトリウム（8000 mg）、塩化カリウム（200 mg）、リン酸水素二ナトリウム（無水物；1150 mg）、リン酸二水素カリウム（無水物；200 mg）を、日本薬局方注射用蒸留水〔大塚製薬（株）製〕1 Lに溶解することにより調製し、pH 7.4の等張溶液とした。

2.1.4 内水相マーカー物質

内水相マーカー物質として用いたグルコースは、日本理化学薬品（株）の試薬特級品をそのまま用いた。

2.1.5 蛍光プローブ

リポソーム膜の蛍光プローブとして用いたピレンは、和光純薬工業の試薬特級品（純度98%）を、エタノールで再結晶した後、シリカゲルのカラムクロマトグラフィーにより精製し試料に供した。純度は示差走査熱量計により確認した。

2.2 実験方法

2.2.1 リポソームの調製

DPPC：コレステロール：DCP=7：4：0.7（モル

比）の割合でクロロホルムに溶解した後、Banghamら⁸⁾の方法に準じて Multilamellar Vesicle (MLV) を調製した（全脂質濃度、10 mM）。これを約50℃で1 h以上超音波照射（Branson社、B-220型125 W）した後、0.2 μ m ポリカーボネートメンブランフィルターでサイジングした。

2.2.2 脂質二分子膜への脂溶性物質添加

本研究で用いた脂溶性物質はいずれも常温で液体である（融点が-56.8~16.5℃⁹⁾）ため、2.2.1項であらかじめ調製したリポソームに所定量の脂溶性物質をマイクロシリンジを用いて添加し、単振動型インキュベーター（EYELA製、EI-10）を用い、30℃恒温下で所定時間振とうすることにより脂質二分子膜に取り込ませた。

2.2.3 吸光度測定

溶液の吸光度は島津製作所（株）製吸光分光光度計（MPS-2000型）を用い、試料を光路長10 mmの石英製角型セルに封入し、660 nmで行った。なお、測定は30±0.1℃の恒温水槽中で行った。

2.2.4 保持効率測定

リポソームの内水相に保持されたグルコース（内水相マーカー物質）は、島津製作所（株）製吸光分光光度計（MPS-2000型）を用い、フェノール硫酸法¹⁰⁾に準じて測定した。まず、グルコースを硫酸を用いてフルフルール誘導体にした後（脱水）、フェノールと反応させて呈色し、その吸光度（波長492 nm）を測定することにより、グルコースを定量した。なお、試料溶液として用いたグルコース（0.28 M）溶液は浸透圧を考慮して調製した¹¹⁾。

2.2.5 蛍光スペクトル測定

リポソーム膜の炭化水素鎖近傍の微視的な構造変化（微視的極性、微視的流動性）を、蛍光プローブ法^{12~14)}により検討した。測定は、2.2.1項で調製した各リポソーム溶液を試料とし、励起波長335.0 nmにおける蛍光スペクトルの蛍光強度を、島津製作所（株）製吸光分光光度計（RF-540型）を用いて行った。なお、測定に際して、ピレンのモノマーの濃度を十分に考慮し、微視的極性の測定にはその濃度が 1.25×10^{-5} M、微視的粘性の測定にはその濃度が 1.5×10^{-4} Mになるように調製した¹⁵⁾。

3 結果及び考察

3.1 リポソームによる脂溶性物質の可溶性

リポソームによる脂溶性物質の可溶化量の測定は、通常、界面活性剤の可溶性の測定に用いられている濁度法に準じた。すなわち、所定濃度のリポソーム溶液に任意量の脂溶性物質を添加し、インキュベーターを用いて十分に振とうを行い、その溶液の吸光度の変化から求めた。Figs.-1, -2に、オクタン及びオクタン酸を添加し

Fig.-1 Variation of absorbance with incubation time for octane added-systems.

Fig.-2 Variation of absorbance with incubation time for octanoic acid added-systems.

たりリポソーム溶液の振とう時間と吸光度の関係を示す。

Figs.-1,-2 から明かなように、オクタンあるいはオクタン酸を添加したリポソーム溶液の吸光度は、脂溶性物質の種類にかかわらず、その添加量の増加に伴い増加した。また、オクタン添加系リポソーム溶液の吸光度は、オクタン添加量の増加に伴い極大値を示し(90 mMを除く)、さらに、極大値と一定となった値との差は、添加量の増加に伴い減少した。なお、図には示していないが、1-オクタノール添加系リポソーム溶液の場合は、オクタンの場合ほど顕著ではないが極大値を示す傾向にあった。本研究の場合、振とうすることにより分散系に強制的なエネルギーを与えているため、いったんリポソーム膜中に過剰量のオクタンが取り込まれ、吸光度が増加する。しかし、時間の経過とともに過剰のオクタンがバルク中に放出されると吸光度が減少し、そのリポソーム膜中とバルク相中の分配平衡のため、一定値を示すようになったものと考えられる。

これらの脂溶性物質によるリポソーム溶液の吸光度の

Fig.-3 Relationship between absorbance and incubation time of liposomes incorporating various lipophilic substances (30 mM).

変化をより明確にするため、各種脂溶性物質濃度 30 mM における振とう時間と吸光度の関係を検討した (Fig.-3)。

同一濃度で比較すると、1-オクタノール添加系リポソーム溶液の吸光度の極大値と一定値との差は、オクタン添加系の場合よりもかなり小さくなった。また、吸光度が一定になるために要する時間は、親水性の大きい脂溶性物質ほど短時間であった(オクタン>1-オクタノール>オクタン酸)。我々は、界面活性剤ミセルによるこれら化合物の可溶化現象を検討したところ、非極性物質であるオクタンはミセルの疎水部に可溶化されることを報告した^{16),17)}。一方、極性物質である1-オクタノールやオクタン酸はミセルの表面付近の親水基部に可溶化され、また親水基の極性がより強いオクタン酸の方がよりミセル表面に配向していること^{16),17)}、また、水との親和性が強い物質(極性物質)ほど水分子との相互作用が強いミセルへの分配が小さくなることを見いだした¹⁸⁾。さらに、水溶液中において界面活性剤と共存する適量のアルコールや脂肪酸は、コーサーファクタントとしての機能を発現するため、界面活性剤分子と共に分子集合体を形成することも報告した¹⁹⁾。つまり、リポソーム(分子集合体)を形成する際、DPPCなどの界面活性物質と協同効果を有する脂溶性物質(すなわち、親水性の大きな物質)ほど、分子集合体の内外における分配平衡に達する時間が短く、また、単に被可溶化物質として認識される物質(オクタン)は分配平衡に達する時間が長くなるものと考えられる。

次に、脂質二分子膜の形態に及ぼす脂溶性物質の濃度の影響を検討するため、リポソーム溶液の内水相(グルコース)の定量を行った。Fig.-4に、脂溶性物質濃度とグルコースの保持率の関係を示す。ここで、保持率は脂溶性物質無添加リポソームの保持量に対する添加リポソームの保持量の比として表す。

Fig.-4 The relation between encapsulation efficiency in liposomes and concentration of lipophilic substances.

いずれの脂溶性物質の場合も、添加量の増加に伴いグルコースの保持率は減少した。また親水基を持たないオクタン添加系の場合は、その濃度が約 100 mM から保持率が一定となった (0.6) が、親水基を有する 1-オクタノール及びオクタン酸添加系の場合は、濃度が約 100 mM 以上になると保持率がゼロとなった。保持率がゼロであるということは、その分子集合体内部に水相が存在していないことを示唆している。また、前報¹⁹⁾で述べたように、適量のアルコールや脂肪酸の界面活性剤溶液への添加は、単分子膜構造である分子集合体 (マイクロエマルジョン) を形成する。さらに、親水基を有する 1-オクタノール及びオクタン酸は逆コーン型分子であるため、脂質二分子膜に添加されると膜の曲率が変化する。特に、膜の内側 (二分子膜の内水相側) の曲率が変化するすると、二分子膜としての形態を保てなくなるものと考えられる。したがって、本研究における脂溶性物質の高濃度領域 (100 mM 以上) での分子集合体は、二分子膜構造から単分子膜構造へと変化するため内部に水相が存在しなかったものと考えられる。

3・2 脂溶性物質の存在位置

脂溶性物質の脂質二分子膜内での存在位置を検討するため、脂溶性物質を添加した膜の微視的環境を蛍光プローブ法を用いて検討した。蛍光プローブであるピレンのモノマーはリポソームなどの炭化水素鎖部 (二分子膜中の疎水基部) に分配し、5本の蛍光スペクトルピークを

Fig.-5 The relation between I_1/I_3 ratio of pyrene in liposomes and concentration of lipophilic substances.

示す。ピレン近傍に極性物質が存在すると、禁制遷移によるピーク (I_1) は影響を受けるが、許容遷移によるピーク (I_3) は影響を受けないため、その比 (I_1/I_3 比) を膜の微視的極性の指標とすることができる¹⁴⁾。Fig.-5 にピレンを可溶化したリポソームの I_1/I_3 比と脂溶性物質の濃度の関係を示す。

オクタン酸添加系の場合、二分子膜内の極性は添加濃度によってほとんど依存しなかったが、1-オクタノール添加系の場合、添加濃度の増加に伴い若干減少し、やがて一定となった。一方、オクタン添加系の場合、その濃度増加に伴い極性はかなり減少した。また、脂溶性物質を含むリポソーム二分子膜中に存在するピレンの I_1/I_3 比は、デカン中 (水を含まない系) に存在する場合の I_1/I_3 比 (0.581) よりかなり大きくなった。このことより、リポソーム二分子膜中の疎水基部に存在するピレンは水の影響を大きく受けているものと考えられる。したがって、リポソーム二分子膜中の疎水基部に可溶化されているピレンの I_1/I_3 比に及ぼす影響は、少なくとも以下に示す 2 つの因子が挙げられる。一つは、ピレン分子周囲の雰囲気の変化と、もう一つは外水相や内水相に存在する極性物質 (水) の影響変化による場合である。つまり、疎水性物質がリポソーム二分子膜中の疎水基部に取り込まれたり、水の影響がシールドされると、ピレンの I_1/I_3 比、すなわち、リポソーム二分子膜中の疎水基部の極性は減少するものと考えられる。これらのことから、脂溶

Fig.-6 The relation between I_E/I_M ratio of pyrene in liposomes and concentration of lipophilic substances.

性物質の二分子膜中における存在位置を考察すると、オクタン添加系の場合、その濃度の増加に伴い I_1/I_3 比（極性）は減少したことから、オクタンは二分子膜の中央付近に取り込まれているピレン分子の近傍に存在しているものと考えられる。一方、1-オクタノールの場合、 I_1/I_3 比はオクタンほど減少しなかったことから、リポソーム形成脂質の間に疎水基を割り込ませて比較的分子膜の表面付近に存在するものと考えられる。また、オクタン酸の場合は、 I_1/I_3 比がその濃度増加に依存しなかったこと、及び1-オクタノールに比べて親水基が大きいことから、1-オクタノールの場合より膜への割り込みが少なく膜表面付近に存在するものと考えられる。

さらに、脂溶性物質の存在位置を確かめるために、脂溶性物質を添加した脂質二分子膜の微視的流動性（粘性の逆数）を検討した。蛍光プローブであるピレンのエキサイマーの形成速度は、プローブの衝突回数に比例し、その拡散速度によって決まるため、モノマーの蛍光強度 (I_M) に対するエキサイマーの蛍光強度 (I_E) の比 (I_E/I_M) を膜の流動性の指標とすることができ^{20, 21)}。Fig.-6 に、ピレンを添加したリポソームの I_E/I_M 比と脂溶性物質の濃度の関係を示す。

Fig.-6 から明らかなように、いずれの場合も脂溶性物質の取り込み量の増加に伴い膜の流動性は増加し、その傾向はオクタン<オクタン酸<1-オクタノールの順であった。このことより、脂溶性物質を添加すると、二分

Fig.-7 Schematic model of molecular assemblies with lipophilic substances.

子膜中における炭化水素鎖の密度は減少し、その度合いは、1-オクタノール<オクタン酸<オクタンの順になることが分かった。したがって、脂溶性物質添加系リポソームは、その粒子径分布が大きいこと、確かなことは言えないが、極性基を持つ1-オクタノール及びオクタン酸の場合、 I_E/I_M 比は増加したことから、その疎水基が二分子膜中に入り込むことにより膜は押し広げられ、炭化水素鎖の密度が減少したものと思われる。また、オクタン酸の場合、 I_E/I_M 比は1-オクタノールの場合よりも小さいことから、膜への割り込みが1-オクタノールより少ないため、膜の押し広げ方が小さく、リポソーム形成脂質の炭化水素鎖の密度の減少が小さかったものと考えられる。一方、極性基を持たないオクタンの場合、 I_E/I_M 比は小さく、また、オクタンの添加によりほとんど増加していないことから、オクタンは二分子膜の中心部に入り込んでしまうため、炭化水素鎖の密度の減少が小さくなったものと考えられる。

I_1/I_3 比 (Fig.-5) と I_E/I_M 比 (Fig.-6) の結果から、リポソーム膜中における脂溶性物質の存在位置は、Fig.-7 に示すように、疎水性の高いものほど膜内部に、親水性の高いものほど膜表面に存在するものと考えられる。

3.3 脂質二分子膜の膜透過性

リポソームは、水溶性物質と脂溶性物質を同時に保持できる長所を有している。しかし、脂溶性物質を取り込むことにより内水相に保持されている水溶性物質の膜透過性がかなり影響されることも考えられる。そこで、脂溶性物質を添加したリポソームの内水相から水溶性マーカー物質（グルコース）の放出を検討した。Fig.-8 に、脂溶性物質添加リポソームのグルコース放出の経時

Fig.-8 The time course of glucose leakage from liposomes (Conc. of lipophilic substance, 30 mM)

変化を示す。ここで、添加した脂溶性物質の濃度は、二分子膜形態を保てる濃度 (30 mM) とした。また比較のために、脂溶性物質無添加リポソームについても示す。

脂溶性物質の種類にかかわらず、いずれの場合も時間の経過に伴いグルコースの放出量は増加した。また、その増加の度合いは、オクタン<オクタン酸<1-オクタノールの順となり、膜の微視的流動性の傾向と一致した。

これらのことから、脂質二分子膜中に脂溶性物質を添加することにより、二分子膜の炭化水素鎖近傍の微視的流動性が増加するため、内水相に保持されているグルコースの放出を引き起こしやすくなるものと考えられる。また、本報で用いた脂溶性物質は、いずれも炭素鎖長が同じであることから、内水相マーカー物質の放出率

は、各脂溶性物質の存在位置や、リン脂質と脂溶性物質の相互作用に依存するものと考えられる。したがって、内水相に水溶性物質を保持したりリポソームを種々の分野に応用する際には、これらのパラメーターに注目して、二分子膜中の流動性を減少させるなどの工夫も必要となると考えられる。

〔平成3年(1991年)10月25日受理〕

文 献

- 1) 山内仁史, 菊池 寛, フレグランスジャーナル, 15, 68 (1987)
- 2) 北野博己, 表面, 25, 233 (1987)
- 3) 平野二郎, 日比野英彦, 油化学, 37, 864 (1988)
- 4) 菊池 寛, 井上圭三, 油化学, 34, 784 (1985)
- 5) 砂本順三, 白仁田正春, 表面, 17, 357 (1979)
- 6) 阿部正彦, 平松 剛, 内山浩孝, 山内仁史, 荻野圭三, 油化学, 41, 136 (1992)
- 7) 野呂俊一, 石井文由, 油化学, 31, 782 (1982)
- 8) 菊池 寛, 井上圭三, 細胞工学, 12, 1136 (1983)
- 9) 化学便覧—基礎編—改訂2版, 丸善, (1975)
- 10) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamifon, P.A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.*, 28, 550 (1956)
- 11) T.M. Allen, "Liposome Technology—targeted Drug Delivery and Biological Interaction—" G. Gregoriads, vol. 3, CRC Press, Inc., Florida (1984) p. 177
- 12) N.J. Turro, M. Gratzn, A.M. Braun, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19, 675 (1980)
- 13) N.J. Turro, P.L. Kuo, P. Somasundaran, K. Wong, *J. Phys. Chem.*, 90, 287 (1986)
- 14) K. Kalyanasundaram, J.K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, 30, 2039 (1977)
- 15) 加納航治, 表面, 26, 244 (1988)
- 16) M. Abe, A. Shimizu, K. Ogino, *J. Colloid Interface Sci.*, 88, 319 (1982)
- 17) M. Abe, K. Ogino, *Yukagaku.*, 31, 569 (1982)
- 18) 阿部正彦, 徳岡由一, 内山浩孝, 荻野圭三, 油化学, 39, 565 (1990)
- 19) 仲前昌人, 阿部正彦, 荻野圭三, 石油学会誌, 31, 466 (1988)
- 20) G.P. L'Heureux, M. Fragata, *Biophys. Chem.*, 30, 293 (1988)
- 21) A.K. Soutar, H.J. Pownall, A.S. Hu, L.C. Smith, *Biochemistry*, 13, 2828 (1974)