総説

リポソームと界面活性剤
とのかかわり

上野 雅晴・柏木 寛

富山医科薬科大学薬学部

(〒930-0194 富山県富山市杉谷 2630)

Interaction of Liposomes with Detergents

Masaharu UENO and Hiroshi KASHIWAGI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(2630, Sugitani, Toyama-shi, Toyama-ken 930-0194)

Abstract: Interactions of liposomes with detergents and physicochemical properties of liposomes were reviewed. Several amphiphiles that produce liposomes by themselves or form liposomes only by mixing two amphiphiles are initially discussed and then solubilization of liposomes by detergents, formation of liposomes from mixed micelles on removal of the detergents, mechanism of micelle-vesicle transition, and method for regulating vesicular size are considered in regard to the micelle-vesicle transition mechanism. ESR spectroscopy, hyperfine splitting of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl dissolved in octylglucoside-containing vesicles and order parameters of 5-doxylstearic acid incorporated in vesicles, was useful for obtaining the properties of detergent-containing liposomes. ^1H NMR spectra of the choline N-methyl group in internal and external monolayers of phosphatidylethanolamine/lysophosphatidylcholine (LPC) vesicles indicated LPC to possibly prefer external monolayers of lipid and the presence of internal monolayers to be essential for vesicle stabilization.

Key words: liposomes, amphiphiles, lipids, vesicles, micelles, detergents, micelle-vesicle transition, four-stage model, size regulation, ESR, spin labeling, ^1H NMR

1 はじめに

リポソームはリン脂質の作る閉鎖小胞体でリン脂質ベシクルとも呼ばれる。水に難溶の両親媒性物質は、水中で自己会合により2分子膜を幾重にも重ねたラメラ層を形成して水相から分離する。リポソームはラメラ層の浮遊系とも言える。1960年代に、Sundersら¹⁾、Dervivhan²⁾、Banghamら³⁾により見出され、Huangら⁴⁾によりその性質が詳細に調べられた。リポソームは2分子膜からなり、生体膜の基本骨格として生化学の分野で、また大きな内水相を持つため、新しい薬物担体としての期待から、その後爆発的に研究が行われ、毎年千件を越す報告があるといわれている。これらを網羅することは

到底不可能で、またそれぞれの立場から書かれた優れた総説⁵⁾や成書⁶⁾も数多くあることから、ここではリポソームと界面活性剤とのかかわりについて我々の研究を中心に述べる。

2 リポソームを形成しやすい脂質とリポソームの性質

水に不溶で極性基と疎水鎖の有効断面積に近い両親媒性化合物は、水を極性基間にはさんだらメラ状の凝集体を形成する。水過剰において、ラメラ層が相分離する。ラメラ層が何らかの方法で水に分散したとき、ベシクル状の凝集体を形成する。ベシクルを形成する代表的なリン脂質はホスファチジルコリン (PC) である。ホスファチジルコリンは生体膜の主要な構成脂質である。一般に2本鎖を有するリン脂質はベシクルを形成しやすい。リ

ン脂質以外にも、例えば、トコフェロールのコハク酸誘導体⁷⁾や両親媒性ムラミルジペプチド誘導体^{8),9)}また医療用に用いられている3本鎖を有する非イオン性界面活性剤であるHCO-10^{10)~13)}も容易にベシクル状の凝集体を形成する。非イオン性界面活性剤で作られるベシクルをリポソームに対してNSVs (non-ionic surfactant vesicles) またはニオソームと呼ぶこともある^{6a)}。Fig. 1に典型的な脂質、界面活性剤の集合状態を示す。生体膜を構成するもう一つの主要なリン脂質にホスファチジルエタノールアミン (PE) がある。PEの極性部分はPCより小さく、単独ではベシクルを形成せずヘキサゴナルII型凝集体を作りやすい。ヘキサゴナルII型構造は膜融合に関与するといわれている^{14),15)}。1本鎖のリソホスファチジルコリン (LPC) は水に可溶のリン脂質で、人工2分子膜や細胞膜に損傷を与え、大量のLPCは膜を可溶化する。しかし少量のLPCは逆に2分子膜の構成成分として膜を安定化することもある。PEは単独ではベシクルを形成しないが適量のLPCが存在すると安定なベシクルを形成する^{16),17)}。Table 1にはPE/LPC混合ベシクルの膜のCl⁻イオンまたはカルセインの透過

性をPCのそれと比較してある。PE/LPC混合ベシクルは、小さいCl⁻イオンについてはPCよりもかなり透過速度は大きい、カルセインに対しては、PCに匹敵する高いバリアー能を有している¹⁷⁾。一般にリポソームに界面活性剤を加えていくと、膜が可溶化されるよりもずっと低い界面活性剤濃度で膜のバリアー能は消失する^{18),19)}が、PE/LPC混合ベシクルではミセルとベシクルが共存する領域においてもなお高いバリアー能を有することは驚異である。リポソームは大きさや形態によって、多重膜ベシクル (MLV)、大きな1枚膜ベシクル (LUV)、小さな1枚膜ベシクル (SUV) に分類される。また逆相蒸発法で調製された大きな1枚膜 (またはオリゴラメラ) ベシクルは特にREVと呼ばれる。最近、数ミクロン以上のリポソームを調製する方法が開発され、セルサイズリポソームまたは巨大リポソームと呼ばれている^{20),21)}。

3 リポソームと界面活性剤

ベシクルに界面活性剤を加えると、ベシクルが界面活性剤ミセルに可溶化されて混合ミセルができる。逆に混

Fig. 1 Shape of Amphiphiles and Their Aggregation States.

Table 1 Permeation of Cl⁻ and calcein from PE/LPC and PC vesicles.

Vesicles	Permeation k (S ⁻¹) or p (cm s ⁻¹)	PE : LPC				PC
		5 : 1	5 : 2	5 : 3	5 : 4	
extruded	k for Cl ⁻	1.2 × 10 ⁻³	3.8 × 10 ⁻³	4.1 × 10 ⁻³	4.7 × 10 ⁻³	2.0 × 10 ⁻⁴
	k for calcein	2.7 × 10 ⁻⁵	1.7 × 10 ⁻⁵	1.5 × 10 ⁻⁵		2.7 × 10 ⁻⁵
sonicated	k for Cl ⁻	8.9 × 10 ⁻⁴	9.6 × 10 ⁻⁴	6.0 × 10 ⁻⁴	8.2 × 10 ⁻⁴	1.1 × 10 ⁻⁴
	p for Cl ⁻	3.6 × 10 ⁻¹⁰	3.5 × 10 ⁻¹⁰	2.0 × 10 ⁻¹⁰	3.7 × 10 ⁻¹⁰	5.3 × 10 ⁻¹¹

合ミセルから界面活性剤を除くとベシクルが形成することはよく知られている。後者は界面活性剤除去法として、膜タンパク質の可溶化、人工膜上への再構成の際のリポソーム調製法として生化学の分野でよく用いられている。

界面活性剤によるベシクルの形成や破壊のプロセスには複雑な現象が観測され、少なくとも区別できる4段階を経て進行すると考えられる^{22)~24)}。例えば、LUVにオクチルグルコシド(OG)を加えていったとき、OG低濃度ではOGは単純に膜中に分配し、それに伴ってベシクルサスペンションの濁度はゆるやかに増加し、ベシクルサイズは分配された界面活性剤の分だけ大きくなる。すなわち、ベシクルサイズは膜中界面活性剤濃度(または水相中平衡濃度)の関数であらわされる(第1段階)。第2段階では、全OG濃度が増加しても膜中濃度はほとんど変化せず、水相中濃度のみ増加する。したがって見かけの分配率が低下する領域である。この領域では濁度、サイズともに低下するが、ESRより得られたオーダーパラメーターの変化は小さく、ラメラ層が保持されていると考えられる²⁵⁾。電子顕微鏡でこの領域にLUVでない小さいベシクルが観測される²⁴⁾。我々はこの界面活性剤を大量に含む小さいベシクルを、超音波法などで調製されるSUVと区別するためにSUV*と呼んでいる。もとのベシクル(LUV)が崩壊してあらたに小さいベシクルが再構成されたと考えられる。これは極性基の大きな界面活性剤が組み込まれることにより、曲率の大きいベシクル、従ってサイズの小さいベシクルの方が安定になるためと考えられる。このとき極性基の大きい界面活性剤はベシクル2分子膜の外葉により多く分布していると考えられる。実際、小さいサイズの混合ベシクル中で、リソレソチンなどは外葉に多く存在することが実験的にも確かめられている¹⁷⁾。SUVから出発したときは、この領域でむしろサイズ増加が観測されることは興味深い²⁶⁾。第3段階では、界面活性剤を加えても水相濃度は変化せず、ほぼ一定に保たれている。濁度と見かけのサイズは増加する。ベシクルが破壊して、巨大シートまたは棒状凝集体(intermediate transition structure 中間状態)が生成する。この領域の粘性挙動は降伏値を示し、弱い相互作用をもつ足場構造の形成を示唆する²⁷⁾。第4段階では、濁度、見かけのサイズは急激に低下し、透明な混合ミセルに移行する。Fig. 2にLUV可溶化のプロセスに観測される物理的性質を模式的に示しておいた。種々の方法で測定した物理的性質の屈曲点は各段階の転移点にほぼ対応している。第2段階と第3段階は、リン脂質の濃度、界面活性剤の種類、放置時間に大きく依存する。混合ミセルから界面活性剤除去のプロセスにおおまかに逆対象²⁸⁾の現象が観測される。しかし基本的な違いは、界面活性剤添加によるベシクル破壊では最終的に

Fig. 2 Schematic Representation of Physical Properties in the Solubilization Process of LUV by Detergent.

形成する混合ミセルの形態や性質はプロセスに依存しない。一方、混合ミセルから界面活性剤除去により最終的に形成するベシクルはプロセスに依存する。このことは、ベシクルは一般に準安定に存在していることを意味する。安定な状態にあるミセルから準安定にあるベシクルに移るプロセスにおいて、どのようにして最終的に得られるベシクルのサイズが決定されてくるか、物理化学的に興味があり、また実用的な意味においても重要な課題である。Table 2, Table 3には用いた界面活性剤の種類、除去方法と形成したベシクルサイズを示す。表からいくつかの特徴が読みとれる。まず、界面活性剤の除去方法が同じであればSDSやコール酸塩のようなイオン性界面活性剤を用いたとき最終的に生成するベシクルは小さいが、オクチルグルコシドのような非イオン性界面活性剤を用いたときサイズは大きくなるようである。またオクチルグルコシドを用いた場合、多孔性ビーズなどで短時間で界面活性剤を除去したときサイズは小さく、透析などで時間をかけて除くと大きいベシクルが生成するようである。イオン性界面活性剤では除去方法によりあまりサイズは変わらない。すなわち、界面活性剤の種類と除去方法が互に関連して、最終的なベシクルサイズを決定しているようである。混合ミセルから界面活性剤を除去して形成するベシクルのサイズ決定因子として大きく2つの考え方がある。一つは転移領域に現れる巨大シートの大きさに支配される^{5b)}という考え方である。も

Table 2 Vesicle Size Prepared by Detergent Removal by Dialysis.

Detergent(mM)	PC(mM)	Initial(Det/PC)	Final(Det/PC)	Size(nm)
Octylglucoside				
150	10	15	< 0.01	240
175	15	12	< 0.01	210
Heptylglucoside				
100	13	8		141
Sodium cholate				
28	17	1.6	< 0.01	55
150	10	15		30
Cholic acid				
86	20	4.3	0.06	45
SDS				
150	10	15		40

Table 3 Vesicle Size and Detergent-Removal Method.

Detergent(mM)	PC(mM)	Initial(Det/PC)	Size(nm)	Method
Octylglucoside				
175	15	12	210	dialysis
175	15	12	100	XAD-2
Sodium Cholate				
28	17	1.6	55	dialysis
28	10	2.8	65	SM-2
C ₁₂ E ₈				
150	15	10	55	XAD-2
Triton X-100				
3.2	1.33	2.4	100-150	G-25,-50,SM-2

Amberlite XAD-2, Bio-beads SM-2, Sephadex G-25, G-50

う一つは、はじめに生成するベシクルは小さいが、融合または脂質交換によって成長するという考え方 (post vesiculation size growth)^{18), 26), 28)}である。これを解明するために先に述べた、第2段階と第3段階が検討された。LUVが可溶化される前、また混合ミセルからLUVが形成される前に小さいベシクルが一時的に生成することが知られている^{24), 29)}。この界面活性剤を大量に含む小さいベシクル SUV* の性質が詳細に調べられた³⁰⁾。超音波法で調製したベシクルに OG を加えたとき、混合比がある範囲のとき、時間依存的な SUV* の融合成長が観測され、30 nm から出発して約 200 nm 付近まで成長することが認められた。一方、界面活性剤としてコール酸塩を用いたとき融合成長は限られていた。これはコール酸塩の荷電による SUV* 間の反発と考えられ、コール酸塩と同じ骨格を持っているが正味荷電をもたない CHAPS で検討したところ、オクチルグルコシドの場合と同様融合成長が認められた。また、Ca イオン存在下でコール酸塩を用いたとき同様に融合成長が観測された³¹⁾。これらのことより、SUV* の融合が最終的なベシクルサイズを決定する重要な因子であることが明らかに

なった。転移過程に SUV* を認めることにより、ミセル-ベシクル転移に観測される複雑な現象をすべて説明できただけでなく、界面活性剤除去法により調製されるベシクルのサイズを調製段階で制御する手段を示している。

4 膜物性の分光学的研究

リポソームの物理化学的性質の研究には、NMR 法、ESR 法 (主としてスピラベル法)、蛍光法 (蛍光異性性、蛍光寿命など)、FTIR 法など多くの分光学的手法が用いられる。ここではそれらのうち、スピラベル法と ¹H NMR 法を用いた我々の研究を中心に紹介する。

4-1 ESR 法 (スピラベル法)

スピラベル法はリポソーム中に添加したスピラベル剤 (スピンプローブ) の ESR スペクトルを測定し、その挙動を解析して膜の物性や運動性を推定する方法である。ESR 法の理論、実験、スピラベル法に関する一般的な記述の詳細は成書^{32), 33)}に委ねる。また、スピラベル法のリポソームの物性研究への応用についても過去に何度か述べられている^(6c), 6d), 34)。

4.1.1 TEMPOを用いた例

ここではまず、2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシル (TEMPO) を用いた研究例について述べる。TEMPO は水にも脂質にも溶解するスピンラベル剤である。一般に超微細分裂定数 (A) は溶媒の極性が大きいほど大きいので、超微細分裂幅は膜中の TEMPO より水中の TEMPO の方が大きい。このために実際、超微細分裂吸収帯の最も高磁場側 ($I = -1$) 成分は Fig. 3A に示すように二つの吸収帯の重ね合わせになる。Fig. 3A に見られる高磁場側 (右側) の極小は水、低磁場側 (左側) の極大は膜に溶解した TEMPO に帰属される。この型のスペクトルの解析には従来 TEMPO パラメーター (f) が用いられてきた³⁵⁾。これは TEMPO の膜中への分配の程度をパラメーター化したもので、Fig. 3A のスペクトルを用いると $f = (\text{膜成分の強度}) / [(\text{膜成分の強度}) + (\text{水成分の強度})]$ で定義される。ただし、強度は基線から膜成分の極大または水成分の極小までの長さで測られる。TEMPO パラメーターの応用の一例として、ジエライドイルホスファチジルコリンのリポソームを用いて f の温度依存性を測定すると TEMPO は高温では膜中に、低温では水相に多く分配され、f と温度のプロットの屈曲点はリポソームの相転移温度とほぼ一致した³⁶⁾。

界面活性剤オクチルグルコシド (OG) を含む卵黄ホスファチジルコリン (EPC) の LUV 懸濁液 (脂質濃度: 40 mM) 中の TEMPO の超微細分裂吸収帯のうち最も高磁場側成分は Fig. 3 に示すように OG 濃度に依存して形が変化する³⁷⁾。この現象に関するその後の解析結果を要約すると、(i) TEMPO の ESR スペクトルは水 (OG を含まない LUV 懸濁液での $g = 2.0065$, $A = 1.75$ mT), ラメラ構造の EPC (既知の膜成分で m_1 と呼ぶ。OG を含まない LUV での $g = 2.0069$, $A = 1.64$ mT), 非ラメラ構造の EPC (新しい膜成分で m_2 と呼ぶ。OG を含まない LUV での $g = 2.0065$, $A = 1.63$ mT) の三成分で構成される。(ii) Fig. 3 のスペクトルのカーブフィッティングにより、 m_2 成分はベシクル破壊が起

Fig. 3 $I = -1$ Hyperfine Splitting Bands of TEMPO Dissolved in LUV Suspension Containing (A) 0, (B) 40, (C) 70, (D) 100, (E) 130, (F) 180, and (G) 240 mM OG.

こらない OG 濃度 (約 50 mM 以下) では出現しない。 m_2 成分はベシクル破壊が始まる OG 濃度 (約 50 mM) 以上で次第に増加し、OG 濃度約 120 mM 以上では主成分であった。(iii) Fig. 3 のスペクトルから水成分を除去して得られた全膜成分について A 値、半値幅 (δH), および膜中 TEMPO のモル率の OG 濃度依存性を Fig. 4 に示す³⁸⁾。Fig. 4 中の縦線は OG によるベシクル破壊の相転移点 (上述) である。OG 濃度が約 50 mM 以下で A 値が減少しているのは添加された OG により TEMPO が極性の比較的小さい部分に移動するため、OG 濃度が約 50 mM 以上で A 値が増加するのは膜破壊に伴って TEMPO が極性の大きい部分に次第に移動するためと推測される。また、OG 濃度が約 50–90 mM で見かけの δH が増加するのは g 値の異なる二つの膜成分が共存するため、OG 濃度が約 90 mM 以上で δH が減少するのは m_2 成分が主成分となり、その運動性が増加するためと推定される。また、全膜成分のモル率は

Fig. 4 Dependence of (A) A, (B) δH , and (C) Molar Fractions of Total Membrane Components on OG Concentrations.

TEMPO パラメーターに代わる分配のパラメーターとして相転移点の検出などに有効であった³⁸⁾。

4.1.2 オーダーパラメーター

容易に入手できるドキシルステアリン酸系のスピラベル剤には5-ドキシルステアリン酸 (5-DS), 7-DS, 12-DS, 16-DS などのドキシル基の位置の異なる異性体があり, これらを用いると膜の炭化水素鎖の異なる位置の流動性を比較することができる。Fig. 5 には EPC の LUV 中の 5-DS の ESR スペクトルを示す。このスペクトルには A 値の異方性が観測され, 通常は Fig. 5 に示すように A 値の膜面に垂直成分 ($A_{\perp}$) と平行成分 ($A_{\parallel}$) を読みとり, (1), (2) 式によってオーダーパラメーター (S) を算出する (Gaffney 法³⁹⁾。

$$S = (A_{\parallel} - A_{\perp} - C) / (A_{\parallel} + 2A_{\perp} + 2C) \times 1.723 \quad (1)$$

$$C = 0.14 - 0.0053 \times (A_{\parallel} - A_{\perp}) \quad (2)$$

膜流動性のパラメーターは 0-1 の範囲の値を持ち, 流動性が高い (膜が柔らかい) ほど小さく, 粘度が小さくプローブが溶液中で自由回転できるとき 0 である。

オーダーパラメーターを用いた研究の一例として, 5-DS を含む EPC の LUV のオーダーパラメーターの界面活性剤濃度依存性を測定し, ミセル-ベシクル転移機構を検討した結果を紹介する³⁸⁾。Fig. 6 は LUV (脂質濃度: 5 mM) 中の 5-DS のオーダーパラメーターの界面活性剤 (OG, コール酸ナトリウム (Na-chol), または $C_{12}E_8$) 濃度への依存性を示す。Fig. 6 のグラフの変化は単調ではなく, 屈曲点を持つ。この屈曲点は別の方法 (電子顕微鏡像, 粒子径, 濁度など) で得られた相転移点 (上述, Fig. 6 中に破線で示す) とほぼ一致した。Fig. 6 を見ると, ベシクル破壊の第 2 段階ではオーダーパラメーターの減少が緩やかなので系はまだラメラ構造を有すると考えられ, 第 3 段階でオーダーパラメーターが急激に減少するのは, この間で膜の破壊が顕著に進行することと対応する。さらに, Na-chol を含む LUV の炭化水素部の膜流動性が小さいのはステロイド骨格による凝集効果のため, $C_{12}E_8$ を含む LUV で流動性が大き

Fig. 5 ESR Spectrum of 5-DS in EPC Liposomes.

いのは疎水部から膜破壊が起こるためと思われる。また, Na-chol を含む LUV では混合ミセルが出現する界面活性剤濃度 (第 4 段階の開始点) でオーダーパラメーターが大きく, 界面活性剤濃度の低い混合ミセルの構造は比較的秩序を持つことなどが推測された。このように, オーダーパラメーターの界面活性剤の濃度依存性を調べることによって, ミセル-ベシクル転移の界面活性剤の種類による差異を比較できる。なお, 混合ミセル中の 5-DS のスペクトルのように超微細分裂の異方性が出現しにくくオーダーパラメータを求めにくい場合には, 膜流動性のパラメーターとして回転相関時間^{32), 33)}がよく用いられる。

4.1.3 その他

スピラベル法のリボソームの研究への応用はこれ以外にも多数ある。いくつかの例を挙げると, スピラベル剤の超微細分裂は濃度が十分に低いときには強度比が 1:1:1 の幅の狭い三本線であるが, 濃度が高くなるのに従って次第に線幅が太くなり, ついには超微細分裂が観測されないで幅の広い一本線になる (スピン-スピン緩和)。リボソームの一部に高濃度のスピンプローブを封入し, 経時的に濃度が減少するのを追跡することにより, 側方拡散運動⁴⁰⁾, 相分離⁴¹⁾, 膜融合⁴²⁾などに関する知見を得ることができる。さらに, スピラベル剤の超微細分裂の中央のピーク強度の減少を経時的に追跡し, 脂質の酸化剤による酸化, 抗酸化剤の添加効果を調べるような研究が現在広く行われている⁴³⁾。

4.2 ^1H NMR 法

Fig. 6 Dependence of Order Parameters on (A) OG, (B) Na-chol, or (C) $C_{12}E_8$ Concentrations.

Fig. 7 ^1H NMR Spectra of Choline $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ Bands for PC SUV (A), PE/LPC (PE : LPC=5 : 2) SUV with (a) and without (b) Pr^{3+} (B), and PE/LPC (PE : LPC=5 : 2) SUV Added by 4.2 (a), 6.0 (b), and 8.0 (c) mM LPC (C).

最近のNMR法による脂質研究では、 ^{31}P や、天然存在比の低い同位体(^2H , ^{13}C , ^{15}N など)で標識した脂質試料を用いる固体NMR法がよく用いられる^{(6c), (6d), (34)}。しかし、溶液(懸濁液)の高分解能 ^1H NMR法は現在でもリポソームの物性研究に有益である。

Fig. 7には超音波法で調製したPC SUV (Fig. 7A)とPE/LPC (モル比で5/2) SUV (Fig. 7B)のコリンのN-メチル基の ^1H NMRスペクトルを示す。Fig. 7Aと7Bに示すように、シフト剤(硝酸プラセオジウム)を添加すると、右側の吸収帯は変化せずに、左側のそれはシフトするので、それぞれは膜内葉と外葉中のコリンに帰属される。膜外葉と内葉のコリン吸収帯の面積比を計算するとPC SUVでは2.94, PE/LPC=5/2のSUVでは4.05であったので、PCベシクルと比較してPE/LPCベシクルではLPCが膜外葉に多く分布している。このように曲率の大きいSUVでは、両親媒性分子の親水部と疎水部の形状とバランスが集合体の形態や性質を決定する主要な因子であり、形の異なる構成脂質の非対称分布による立体的相補性によりベシクルの形態が安定に保持される。さらに、Fig. 7CにはPE/LPC=5/2のSUVにLPCをさらに添加したときの ^1H NMRスペクトルを示す。また、Fig. 8には、PE/LPC=5/2のSUVにさらにLPCを添加したとき膜内葉と外葉の

化学シフトの分裂幅のLPCの添加量への依存性を示す⁽¹⁷⁾。Fig. 7Cで左側の吸収強度がLPC添加量とともに増加するのは、ベシクルの外葉とミセル中のコリンの吸収位置が近く、両者の間でLPCの交換が起こるためであり、この組成でミセルとベシクルが共存することを意味する。化学シフトの分裂幅はLPC添加量が4 mMまでは急激に増加し、8 mM(ベシクルとミセルが共存状態)以上では一定になる。Fig. 8とFig. 7Cの結果と総合すると、PE/LPC系ではLPCの添加量の増加に伴って膜内葉コリンの吸収位置は変化しないで、外葉コ

Fig. 8 Chemical Shift Splitting of Choline $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ Bands in Internal and External Monolayers When LPC Solution was Added to PE/LPC (PE : LPC=5 : 2) Vesicles.

Fig. 9 Dependence of Chemical Shift of Choline $N(CH_3)_3$ Bands in Internal (○) and External (●) Monolayers of EPC Vesicles on Na-cholesterol Concentration.

リンの吸収帯が分離している。特に、8 mM の LPC 添加においてもなお、膜内葉と外葉のシグナルが区別して観測されるのはバリエーションを有するベシクルの形態が保持されていることを支持する。なお、PE/LPC の混合比が 5/3 以上の系でミセルとベシクルが共存することは、カルセインを含むベシクルのゲル濾過法によっても確認された¹⁷⁾。

Fig. 9 には 1H NMR 法で求めた EPC の SUV の外葉と内葉中のコリンプロトンの化学シフトの Na-cholesterol 濃度依存性を示す⁴⁴⁾。EPC/Na-cholesterol 系の場合、Na-cholesterol を添加するほど内葉コリンと外葉コリンの吸収位置が近づき、ついには両者の区別が付かなくなり、Na-cholesterol 濃度が約 4 mM のとき一本のピークが観測される。このように、膜内葉が外葉と区別できなくなることと、Na-cholesterol がベシクルの破壊を引き起こすことが関連するものと思われる。

5 おわりに

本稿ではリポソームと界面活性剤の相互作用および膜物性研究への分光学的利用を中心に述べてきた。リポソームは反応の場として工業的な利用、生体膜の基本骨格として生化学的な応用、また新規なドラッグキャリアーとして医療への応用など、様々な分野で応用研究が盛んに行われてきた。我々もがん化学塞栓療法の塞栓材料としてのリポソームの利用^{45), 46)}や、膜タンパク質の膜間移行の受け手としてのリポソームの応用研究^{47), 48)}を行ってきたが、これらについて最近別の総説^{49)~51)}で述べたので、ここでは全く触れなかった。リポソームが発見されてすでに 30 年以上経ち、また膨大な研究が行われてきたが、現在のところ実用化は多くない。医療応用においても、化粧品など外用剤としてかなり成功しているが内用剤としての利用は限られている。共通する問題点は安定性のようである。そのため安定性を高める種々の方法が開発され、中には極めて有効なものもある。

例えば現在では凍結乾燥による長期保存も可能になった。しかし、リポソームは不安定であるということを初めから認め、経済的論理ではなく、壊れやすく、分解されやすいからこそ環境にやさしいというリポソーム本来の性質を積極的に活かすという発想の転換も 21 世紀に向けて必要ではなかろうか。

(受付: 2000 年 6 月 13 日, 受理: 2000 年 7 月 14 日)

文 献

- 1) L. Saunders, J. Perrin, D. Gammack, *J. Pharm. Pharmacol.*, **14**, 567 (1962).
- 2) D.G. Dervichian, *Prog. Biophys. And Mol. Biol.*, **14**, 263 (1964).
- 3) A.D. Bangham, M.M. Standish, J.D. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965).
- 4) C. Huang, *Biochemistry*, **8**, 344 (1969).
- 5) 例えば, a) C. Huang, J.T. Mason, *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 423 (1986), b) D.D. Lasic, *Biochim. J.*, **256**, 1 (1988), c) J.L. Rigaud, B. Pitard, D. Levy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1231**, 223 (1995).
- 6) 例えば, a) G. Gregoriadis (ed), "*Liposome Technology* (2nd ed)", CRC Press (1993), b) G. Gregoriadis (ed), "*Liposomes as Drug Carriers*", Wiley (1988), c) 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 (編) "リポソーム" 南江堂 (1988), d) 寺田 弘, 吉村 哲郎 (編) "ライフサイエンスにおけるリポソーム" シュプリンガー・フェアラーク (1992).
- 7) M.Z. Lai, *Biochemistry*, **24**, 1646 (1985).
- 8) M. Ueno, C. Matsumoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2066 (1993).
- 9) S. Ando, H. Tsuge, A. Miwa, *Colloid Polym. Sci.*, **272**, 1281 (1995).
- 10) K. Tajima, T. Horiuchi, M. Tanaka, *Proc. ISF-JOCS World Cong.*, **2**, 74 (1988).
- 11) T. Horiuchi, K. Tajima, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **41**, 1197 (1992).
- 12) C. Sun, M. Ueno, *Colloid Polym. Sci.*, **275**, 155 (1997).
- 13) C. Sun, M. Ueno, *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **106**, 281 (1997).
- 14) J.A. Lucy, *Nature*, **227**, 815 (1970).
- 15) F.M. Goni, J.L. Nieva, G. Basanez, G. Fidelio, A. Alonso, *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 839 (1994).
- 16) T.D. Madden, P.R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, **684**, 149 (1982).
- 17) C. Sun, A. Hanasaka, H. Kashiwagi, M. Ueno, *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- 18) M. Ueno, C. Tanford, J.A. Reynolds, *Biochemistry*, **20**, 833, (1984).
- 19) M. Ueno, *Biochim. Biophys. Acta*, **904**, 140 (1987).
- 20) H. Hotani, *J. Molecular Biol.*, **178**, 113 (1984).
- 21) K. Akashi, H. Miyata, H. Itoh, K. Kinoshita Jr.,

- Biophys. J.*, **74**, 2973 (1998).
- 22) 上野雅晴, “(総説) ミセル-ベシクル転移のプロセス”, 膜, **18**, 96 (1993).
- 23) M. Ueno, *Biochemistry*, **28**, 5631 (1989).
- 24) M. Ueno, Y. Akechi, *Chem. Lett.*, **1991**, 101.
- 25) 嵯峨崎伸二, 富山医薬大学位論文, (1992).
- 26) S. Almog, B.J. Litman, W. Wimley, J. Cohen, E.J. Wachtel, Y. Barenholz, A. Ben-Shaul, D. Lichtenberg, *Biochemistry*, **29**, 4582 (1990).
- 27) M. Ueno, K. Tanaka, I. Horikoshi, *The 1987 International Congress on Membrane and Membrane Processes*, Tokyo (1987), Abstract 713.
- 28) D. Levy, A. Guilic, M. Seigneuret, G.L. Rigaud, *Biochemistry*, **23**, 3070 (1990).
- 29) S. Almog, T. Kushnir, S. Nir, D. Lichtenberg, *Biochemistry*, **25**, 2597 (1986).
- 30) M. Ueno, H. Kashiwagi, N. Hirota, *Chem. Lett.*, **1997**, 217.
- 31) C. Sun, M. Ueno, *Colloid Polym. Sci.*, in press.
- 32) 石津和彦編 “実用ESR入門 生物化学へのアプローチ” 講談社 (1981).
- 33) 桐野 豊, 小沢俊彦, “エッセンス ESR” 廣川書店 (1991).
- 34) 例えば, a) 日本膜学会編 “膜学実験シリーズ第1巻生体膜編” 共立出版 (1994), b) 村上幸人監修 “超分子科学の基礎と応用” エヌ・ティー・エス (1996).
- 35) R.D. Kornberg, H.M. McConnell, *Biochemistry*, **10**, 1111 (1971).
- 36) S.H. Wu, H.M. McConnell, *Biochemistry*, **14**, 847 (1975).
- 37) H. Kashiwagi, K. Aizawa, M. Ueno, *Chem. Lett.*, **2000**, 134.
- 38) H. Kashiwagi, S. Sagasaki, M. Tanaka, K. Aizawa, C. Sun, M. Ueno, *International Conference on Colloid and Surface Chemistry*, Tokyo, 2000, 予稿集 (CP-47).
- 39) B.J. Gaffney, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 664 (1975).
- 40) P. Devaux, H.M. McConnell, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4475 (1972); H. Traube, E. Sackmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4499 (1972).
- 41) S. Ohnishi, T. Ito, *Biochemistry*, **13**, 881 (1974).
- 42) A.E. Gad, B.L. Silver, G.D. Eytan, *Biochim. Biophys. Acta*, **690**, 124 (1982).
- 43) 西川弘泰, 吉川敏一編, “ESRとフリーラジカル” 日本医学館 (1989) pp.3-18.
- 44) C. Sun, H. Kashiwagi, M. Ueno, *J. Colloid Interface Sci.*, submitted.
- 45) Y. Zou, M. Yamagishi, I. Horikoshi, M. Ueno, X. GU, R. Perez-Soler, *Cancer Res.*, **53**, 3046 (1993).
- 46) E. Viroonchatapan, M. Ueno, H. Sato, I. Adachi, K. Nagae, K. Tadawa, I. Horikoshi, *Pharm. Res.*, **12**, 1176 (1995).
- 47) K. Kogure, C. Nakamura, O. Okuda, K. Hayashi, M. Ueno, *Biochim. Biophys. Acta*, **1329**, 174 (1997).
- 48) K. Kogure, O. Okuda, C. Nakamura, K. Hayashi, M. Ueno, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1117 (1999).
- 49) 小暮健太郎, 上野雅晴, 寺田 弘, *Fragrance J.*, **1996**, 66.
- 50) 上野雅晴, 薬学研究的の進歩, **15**, 11 (1999).
- 51) 上野雅晴, 小暮健太郎, 生物物理, 印刷中.

[総説]

界面活性剤の HLB と自己組織体形成

國枝博信^{*1}・荒牧賢治^{*2}^{*1} 横浜国立大学大学院工学研究科人工環境システム学専攻

(〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5)

^{*2} 横浜国立大学工学部物質工学科

(〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5)

水／ポリオキシエチレン型非イオン界面活性剤系において一定温度でポリオキシエチレン (EO) 鎖の重合度を減少させると正の曲率から負の曲率を持つ自己組織体への相転移が観察される。自己組織体の界面における分子専有面積も EO 鎖長が短くなることにより減少する。この相転移機構を修正パッキングパラメータ理論により考察した。界面膜の曲率変化は油の種類によって異なり、これは油分子の界面膜への penetration 効果、自己組織体内部への swelling 効果によるものである。また両者の効果によって油が多量に含まれた系においては相挙動が単純化され、HLB 温度 (PIT) が現れる。

(連絡者：國枝博信) Vol.49, No.10, 1123 (2000)

[総説]

リポソームと界面活性剤とのかかわり

上野雅晴・柏木 寛

富山医科薬科大学薬学部

(〒930-0194 富山県富山市杉谷 2630)

この総説では、リポソームと界面活性剤の相互作用、および ESR 法と ¹H NMR 法により得られたリポソームの物理化学的性質についてまとめる。まず、単独でリポソームを形成する両親媒性物質、および二種類を混合することによりリポソームを形成する両親媒性物質の例を挙げる。次に、リポソームの界面活性剤による可溶化過程、混合ミセルから界面活性剤を除去することによるリポソームの形成、ミセル-ベシクル転移、およびベシクルサイズの制御法について概説する。次に、オクチルグルコシドを含むベシクル中に溶解した 2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン-N-オキシルの超微細分裂、ベシクル中の 5-ドキシルスチアリン酸のオーダーパラメータについて、ミセル-ベシクル転移機構との関連から概説する。さらに、ホスファチジルエタノールアミン／リソホスファチジルコリン (LPC) ベシクルの外葉と内葉に存在するコリンの N-メチル基 ¹H NMR スペクトルより、LPC は主として膜外葉に存在すること、膜内葉の存在がベシクルの安定性のために重要なことなどが示唆された。

(連絡者：上野雅晴) Vol.49, No.10, 1131 (2000)