コレステロール-プルラン誘導体によって形成される O/W-エマルジョン

(1991 年 8 月 27 日 受理)

山口 茂彦[†]・福井 洋樹・秋吉 一成・佐藤 智典・砂本 順三^{*}

分子量 30000, 50000, および 137000 のプルランに 100 単糖あたり 2~6 個のコレステロール残基を置換したコレステロール-プルラン誘導体 (CHP) とトリオクタノイルグリセリド (TriC₈) から形成される O/W-エマルジョンのコロイド安定性について検討した。CHP 存在下, TriC₈ は超音波処理することにより容易にエマルジョン化され, 粒径 100~200 nm の O/W-エマルジョンが得られた。CHP 中のコレステロール置換度と得られるエマルジョンの粒径との関係を調べたところ, コレステロール残基の置換度にかかわらず, 形成されるエマルジョンの粒径は, ほぼ一定となることがわかった。しかし, コレステロール残基の置換度の高い CHP ほど, より少量の CHP 添加量で安定なエマルジョンを得ることができた。また, コレステロールの置換度が同程度の CHP の場合, 分子量が大きいほど, より微細なエマルジョンが得られた。CHP 安定化エマルジョンは, 生理条件下濃度の Ca²⁺ イオンの存在下でも非常に安定であった。さらに CHP は, 抗腫瘍効果を示す α -リノレン酸をエマルジョン化し得ることも明らかとなり脂溶性薬物の新しい運搬体としての利用が期待された。

1 緒 言

抗がん剤などの薬物の副作用の軽減と薬効の向上を目的とした種々の薬物運搬システム (DDS) の研究が活発に行われている。特に水溶性薬物の運搬体としては, 物理的・化学的に安定で, しかも細胞特異性を示すリポソームが開発されている^{1)~3)}。しかし, 衆知のようにリポソームは内水相を持つため, 多量の水溶性薬物を内包するには適しているが, 脂溶性薬物の内包には脂質層の容量が小さいため, その内包量に限界がある。そこで最近では, 脂溶性薬物の運搬体として O/W-エマルジョンが検討され始めた。例えば, 水島らは, 静脈注入脂肪栄養剤として治療に利用されているレシチンエマルジョンに注目し, このものにステロイドホルモン⁴⁾やプロスタグランジン⁵⁾などの脂溶性薬物をカプセル化したり製剤を開発している。

脂溶性薬物の運搬体としての O/W-エマルジョンには, 薬物内包時はもちろん生体内における構造安定性に優れ, 同時に組織・細胞特異性が要求される。この問題を解決するために著者らが既

にリポソームにおいて成功している多糖被覆法¹⁾を O/W-エマルジョンにも適用して成功している⁶⁾⁷⁾。通常のレシチンエマルジョンは, 生理的濃度の Ca²⁺ イオン存在下でその安定性を失い相分離をきたす。しかし, コレステロール残基を有する水溶性多糖でこれを被覆すると, エマルジョン表面に形成された多糖層による立体的効果によって, 生理条件下でもコロイド安定性がいちじるしく向上する⁸⁾。また, レシチンエマルジョン自身は細胞特異性を示さないが, 細胞特異性多糖で被覆することにより, ミサイル療法での利用も可能となることが示唆された⁷⁾。

一般にレシチンなどの低分子の界面活性剤のみならず両親媒性のポリマーによってもエマルジョンを安定化しうることが知られている⁹⁾¹⁰⁾。コレステロール-多糖誘導体は, それ自身水溶液中で安定な集合体を形成し, 種々の疎水性物質を強く取り込みうる¹⁰⁾。すなわち, 多糖-コレステロール誘導体は, 水中でそれ自身が形成する疎水場に油を取り込むことにより一種の O/W-エマルジョンを形成し, 新しいエマルジョン化剤としての機能が期待される。

本研究では, 分子量の異なるプルラン (重量平均分子量: 30000, 50000, および 137000) にコレステロール残基を置換した

京都大学工学部高分子化学教室, 606 京都市左京区吉田本町

[†] 現在 日本油脂株式会社 筑波研究所, 300-26 つくば市東光台 5-10

- 1) 砂本順三, 佐藤智典, 日化, 1989, 169.
- 2) 高分子学会編, “高分子新素材便覧”, 丸善 (1977).
- 3) 竹本喜一, 砂本順三, 明石 満編, “高分子と医療”, 三田出版会 (1989).
- 4) Y. Mizushima, Y. Yamagawa, K. Hoshi, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 666(1983).
- 5) Y. Mizushima, J. Hamano, K. Yokayama, *Ann. Rheum. Dis.*, **41**, 263(1982).

6) A. Carlsson, T. Sato, J. Sunamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 791(1989).

7) K. Iwamoto, T. Kato, M. Kawahara, N. Koyama, S. Watanabe, Y. Miyake, J. Sunamoto, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 219(1991).

8) D. H. Napper, “Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions”, Academic Press (1983).

9) 遠藤正行, 鷲谷広道, 油化学, **40**, 133(1991).

10) K. Akiyoshi, S. Yamaguchi, J. Sunamoto, *Chem. Lett.*, 1991, 1263.

コレステロール-プルラン誘導体で被覆した O/W-エマルジョンの形成条件およびその安定性について、多糖の構造および油の種類などの面から検討した。

油相には、まずトリオクタノイルグリセリド (以後、TriC₈ と略記する) を用いた。これは、食用および静脈注入用脂肪乳剤の油相としても利用されており、生体に対する安全性が高い¹¹⁾。また、TriC₈ はダイズ油よりも極性が高いため、脂溶性ビタミン、抗生物質、および脂溶性薬物などを多く溶解することもよく知られている¹²⁾。そこで本研究では脂溶性薬物として種々の生理作用を示す α -リノレン酸 (以後、ALA と略記する) を TriC₈ に加えたときの O/W-エマルジョン形成の可能性についても検討した。

2 実 験

2.1 試 料

コレステロール-プルラン誘導体 (CHP-X-Y) は、既に報告した方法によって合成した (図 1)¹⁰⁾。本実験に用いた CHP 類を表 1 に示す。CHP-X-Y における X はプルラン部位の重量平均分子量 (1000 単位) を、Y はプルランの 100 単糖あたりのコレステロール残基の置換度をそれぞれ示している。

トリオクタノイルグリセリド (TriC₈, 日本油脂株式会社) は、日本薬局方外医薬成分規格品で、酸価 0.02, ヨウ素価 0.1, および過酸化価 0.10 のものであった。ALA はシグマ社から購入した特級試薬である。その他の試薬は、すべて市販の特級品をそのまま用いた。水は MilliQ (ミリポア製) で精製したものをを用いた。

2.2 エマルジョンの作製

TriC₈ のエマルジョンは、1.0~5.0 mg の CHP を含む水 (1.0 ml) に 10.0 mg の TriC₈ を加え、0~70 °C, 窒素気流下、5~60 分間超音波照射 (20 W, TOMY 製 UD-201) することにより作製した。ALA の場合は、0.8 mg の CHP を含む PBS 水溶液 (0.80% NaCl, 0.02% KCl, 1.14% Na₂HPO₄, 0.02% KH₂PO₄, pH=7.4) の 1.0 ml に、1.6 mg の ALA を加え、0 °C で 10 分間、窒素気流下超音波照射 (40 W) した。また同様の方法で ALA と TriC₈ の混合系のエマルジョンも作製した。このときには、0.8 mg の CHP を含む PBS 水溶液の 1.0 ml に種々の重量組成比の ALA と TriC₈ の混合物の 1.6 mg を加え、窒素気流下、0 °C で 10 分間超音波照射 (40 W) することにより調製した。

2.3 エマルジョンの安定性

エマルジョンの保存安定性は、低温 (4 °C) あるいは常温 (25 °C) で静置した試料の粒径変化を経時的に追跡することで評価した。エマルジョンの油滴の粒径測定は、動的光散乱計 (大塚電子製, DLS700) を用いた。測定は常に 3 回以上行った。このときの試料としては、作製したエマルジョンを水でさらに 100 倍に希釈後、ポアサイズ 1.2 μ m のフィルター (ミリポア製) を用いて濾過したものをを用いた。またコロイド安定性に対する Ca²⁺ イオンの影響は、1.0 ml のエマルジョン (CHP-50-1.8/TriC₈/H₂O=5.0 mg/10.0 mg/1 ml) に 1 mM CaCl₂ 溶液の 10 μ l を添加して (最終 CaCl₂ 濃度=10 mM) 評価した。

Fig. 1 Structure of pullulan derivative

Table 1 Cholesterol-bearing pullulan derivatives (CHP)¹⁰⁾ employed in this work

Code	Molecular weight of pullulan	Substitution degree of cholesterol moieties per 100 glucose units
CHP-30-2.2	30000	2.2
CHP-50-1.8	50000	1.8
CHP-50-4.1	50000	4.1
CHP-50-5.5	50000	5.5
CHP-137-2.2	137000	2.2

3 結果と考察

砂本らは既に、CHP によってリポソーム¹¹⁾やレシチンエマルジョン^{6,7)}の表面を効率よく被覆できることを報告している。さらに CHP は、ある濃度以上で水溶液中、疎水場を有する自己集合体を形成し、ANS (sodium 8-anilino-1-naphthalenesulfonate) や PNA (N-phenyl-1-naphthylamine) のような疎水性の化合物を取り込むことができ¹⁰⁾、また、水溶性タンパク質類とも強く相互作用することが報告されている¹³⁾。そこで本研究では、この多糖集合体の疎水場に単純な油を取り込ませた O/W-エマルジョン形成の可能性を検討した。期待どおり、CHP 存在下 TriC₈ は超音波照射により容易にエマルジョン化され、比較的安定な O/W-エマルジョンの形成されることがわかった。そこで、CHP-50-1.8 の存在下で TriC₈ のエマルジョンを作製したときの温度および超音波照射時間と形成されるエマルジョンの油滴の粒径との関係を調べた (図 2)。0 °C および 70 °C のいずれの場合でも超音波照射 (20 W) を 30 分以上行くと、ほぼ一定の粒子径のものが得られた。しかし、70 °C の方が、粒子径が小さくかつ比較的安定なエマルジョンがより短い超音波照射時間で形成された。エマルジョン作成時の温度と得られるエマルジョンの粒径との関係については、現時点では明らかではない。しかし、氷様 (ice-berg) 構造の融解する温度 (約 70 °C) では、0 °C の場合と比較して多糖の分子運動性も大きくなり、バルク水との相互作用も低

11) D. Sailer, G. Berg, *FET. SEI. ANS.*, 79, 143 (1977).

12) U. S. P. 3591689.

13) 西川雄大, 秋吉一成, 佐藤智典, 砂本順三, 高分子学会予稿集, 40, 913 (1990).

Fig. 2 Particle size change of CHP-TriC₈ emulsion after sonication

A given amount of trioctanoyl glyceride (10.0 mg) was sonicated in water (1.0 ml) in the presence of CHP-50-1.8 (5.0 mg) at 0°C (—●—) and 70°C (—○—)

下し、また多糖の糖鎖間相互作用（水素結合、疎水結合、および極性相互作用など）も低下するためより会合数の少ない多糖会合体が形成され、結果としてエマルジョンにおいても粒子径が小さくなったことが一因とも考えられる。いずれにせよ、0°C よりも 70°C の方がより小さな粒子径をもつエマルジョンが得られることがわかったので、以下の実験では特に断らない限りいずれも超音波照射温度は 70°C とした。比較のためにコレステロール残基を持たないプルラン（分子量 5 万）を用いた系では、超音波照射後直ちに相分離を起こし、安定な O/W-エマルジョンは得られなかった。すなわち、CHP での疎水性コレステロール残基が、O/W-エマルジョンの安定化に重要な機能を果たしていることがわかる。そこで、各種 CHP の濃度と形成されるエマルジョンの粒径との関係を 70°C で 20 分間超音波照射して調べた（図 3）。図 3-a には CHP-50-Y 系列でのコレステロール残基の置換度と得られたエマルジョンの粒径との関係を示す。用いたすべての CHP において、[CHP]/[TriC₈] 比が約 0.5（重量比）では、約 140 nm 程度の粒径のエマルジョンが得られた。また、コレステロール残基の置換度が高いほど、より少量の CHP で安定なエマルジョンが得られた。このことは、コレステロール置換度の高い CHP ほど、より疎水性物質を取り込みやすいというこれまでの結果¹⁰⁾に矛盾しない。ついで、コレステロール置換度が同程度の CHP について CHP の分子量の影響を調べた（図 3-b）。CHP の分子量が大きいほど、得られるエマルジョンの粒径は小さくなった。Lankveld らも、2% アセチル化ポリビニルアルコールを用いた O/W-エマルジョン系の検討を行い、ポリマーの分子量が増大するほど小さなエマルジョンが形成されると報告している¹⁴⁾。今回の著者らの結果も彼らの結果とよく一致している。一方、著者らは、多糖-コレステロール誘導体が、条件によっては水中で自己会合体を形成する事を別に見いだしていたので¹⁰⁾、このポリマーのコロイド粒子径への影響の理由を考察するための一助として、油の存在しない CHP のみの水溶液中の挙動を検討した。す

Fig. 3 Particle size of CHP-TriC₈ emulsion as affected by the amount of CHP employed relating with (a) substitution degree of cholesterol group and (b) molecular weight of CHP

A given amount of TriC₈ (10.0 mg) was sonicated in water (1.0 ml) in the presence of CHP-50-1.8 (—○—), CHP-50-4.1 (—●—), CHP-50-5.5 (—□—), CHP-30-2.2 (—△—) or CHP-137-2.2 (—▲—)

なわち、CHP-50-1.8 と CHP-137-2.2 をそれぞれエマルジョン形成時と全く同じ条件下（70°C，20 分間）水中で超音波照射し、その多糖自己会合体の粒子径を測定した。ほぼ同じ程度のコレステロール置換度をもつ両多糖では分子量の大きい方が、小さい粒径の会合体を与えた（CHP-50-1.8 では、 177 ± 10 nm，CHP-137-2.2 では、 117 ± 20 nm）。現時点では、その理由は全く不明であるが、エマルジョンでのコロイド粒子径も多糖誘導体そのものの自己会合体形成因子と関係しているのかも知れない。この点の詳細についてはさらに検討中である。

エマルジョンの安定性をさらに粒径の経時変化からも評価した。またそのとき、コロイド安定性に対する Ca²⁺ イオンの影響についても調べた。CHP-50-1.8 を用いて作製した TriC₈ エマルジョンの水中および 10 mM CaCl₂ 水溶液中での粒径の変化を表 2 に示す。得られたエマルジョンの粒径は、時間とともに徐々に増大するものの、相分離にはいたらず比較的安定なエマルジョンが形成されていることがわかる。また、生理的濃度に相当する Ca²⁺ イオンの共存下でもその安定性にまったく変化は認められず、レシチンエマルジョンを多糖被覆した場合⁶⁾と同じ結果が得られた。一般に、安定な O/W-エマルジョンを得るための指針

14) J. M. G. Lankveld, J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.*, 41, 475(1972).

Table 2 Effect of Ca^{2+} -ion and storage temperature on the particle size of emulsion

Storage	Particle size (nm)			
	In the absence of Ca^{2+} -ion		In the presence of 10 mM Ca^{2+} -ion	
	4.0 °C	25.0 °C	4.0 °C	25.0 °C
Just after preparation	136±1	136±1	136±1	136±1
After 2 d	152±2	170±1	156±1	175±1
After 10 d	190±5	221±5	193±4	223±2

として、古典的には安定化剤の HLB 値がよく用いられる¹⁵⁾。CHP-50-2.0 の場合、50 単糖にコレステロール残基が1つ存在する単位を考え、既に知られている方法¹⁶⁾によりこの多糖誘導体の HLB を見積ると約 27 であった。通常の乳化剤としての適正值 (8~18) にくらべると CHP はかなり親水性が大きいことを示している¹⁵⁾。それにもかかわらずこの多糖誘導体の存在下、比較的安定な O/W-エマルジョンが得られることから、油と CHP 間の単純な親水性・疎水性バランス (HLB) のみならず、糖鎖の立体的な効果などもその安定化に重要な寄与を果たしていることを示唆しているものといえる。

ALA は、制がん効果¹⁷⁾¹⁸⁾、アレルギー抑制効果¹⁹⁾、ウイルスに対する免疫力の増進²⁰⁾などの様々な薬理作用があり、しかも生体系に広く分布していることから安全性の高い薬物として期待される。しかしこのものは水溶性が乏しく、また薬効発現にはかなりの投与量が要求されることから、適切な投与方法の開発が望まれている。そこで、コレステロール-多糖誘導体を ALA のキャリアーとして利用することについて検討した。ALA のみを生理的条件下または緩衝液中、超音波照射下に分散させても安定なエマルジョンはもちろん得られなかった。しかし、この場合も CHP を添加することにより比較的安定なエマルジョンが得られた。また既に比較的安定なエマルジョンが形成することがわかっている

Fig. 4 Effect of TriC_8 content on particle size and colloidal stability of CHP-ALA emulsion in PBS at 25 °C (see text)

TriC_8 をこの CHP-ALA 系にさらに添加すると、得られるエマルジョンの安定性は一層向上した。そこで CHP 存在下に種々の割合の TriC_8 -ALA 混合エマルジョンを作成し、そのコロイド粒子径と安定性を検討した。結果を図 4 に示す。 TriC_8 と ALA の混合比を変えると、エマルジョンの粒径および安定性が共に影響を受けた。 TriC_8 および ALA それぞれ単独系にくらべて、両者を適当な比で混合すると粒径も比較的小さく、またかなりの安定なエマルジョンが形成された。より安定な O/W-エマルジョンを得るには、当然のことながら油と CHP のような両親媒性分子との相互作用の強さが重要な因子となる¹⁴⁾。物性の異なる 2 種の油の混合系では、その混合比に応じて油相の微視的極性、粘度、および比重が変化し、同時に CHP との相互作用の強さも変化することは十分考えられる。これらの因子が、エマルジョンの粒径および安定性に何らかの形で微妙に影響を与えるものと考えられる。

著者らはこの多糖誘導体による ALA の O/W-エマルジョンが、*in vitro* および *in vivo* いずれの場合にも高い抗腫瘍効果を示すことも最近見いだしている²¹⁾²²⁾。このことは、多糖誘導体により形成される O/W-エマルジョンが脂溶性薬物のための細胞・組織指向性運搬体として利用できることを示唆するものである。

- 15) 北原文雄, 古澤邦夫, “分散, 乳化の化学”, 工学図書(1979) p.60.
- 16) 甲田善雄, “有機概念図—基礎と応用—”, 三共出版(1984) p.11.
- 17) 沼田光弘, 磯田好弘, 化学と工業, 39, 763(1986).
- 18) 成澤富雄, 高橋正弘, 日下尚志, 山崎好日児, 小山裕文, 小棚木均, 西澤幸雄, 小番美恵子, 磯田好弘, 平野二郎, 医学の歩み, 153, 103(1990).
- 19) A. Hashimoto, K. Katagiri, S. Torii, H. Okuyama, *Prostaglandins*, 36, 3(1988).
- 20) K. L. Fritsche, P. V. Johnston, *Lipids*, 24, 305(1989).

- 21) 福井洋樹, 秋吉一成, 佐藤智典, 砂本順三, 山口茂彦, 高分子学会予稿集, 39, 2598(1991).
- 22) 福井洋樹, 秋吉一成, 佐藤智典, 砂本順三, 山口茂彦, 高分子学会予稿集, 40, 645(1991).

O/W-Emulsion as Formed by Cholesterol-Bearing Pullulan

Shigehiko YAMAGUCHI, Hiroki FUKUI, Kazunari AKIYOSHI,
Toshinori SATO and Junzo SUNAMOTO*

*Department of Polymer Chemistry, Kyoto University; Sakyo-ku,
Yoshida Hommachi, Kyoto-shi 606 Japan*

Colloidal stability formed from trioctanoylglyceride(TriC_8) and cholesterol-bearing pullulans (CHP) has been investigated. Pullulans (M_w , 30000, 50000, and 137000) were substituted in part by cholesteryl groups, and the substitution degree of the cholesterol moieties was 2-6 per hundred glucose units. When TriC_8 was emulsified with a given amount of CHP under sonication, a very stable O/W-emulsion was obtained. The hydrodynamic diameter determined by DLS was approximately 100-200 nm. The particle size of oil droplets was due to the temperature, the duration, and the power of sonication. The higher the substitution degree of cholesterol of CHP employed was, the more stable the emulsion obtained was, and the less the amount of CHP required was to obtain relatively stable emulsion. Similarly, the larger the molecular weight of CHP was, the smaller the particle size was. The O/W-emulsion so obtained was stable enough even in the presence of the Ca^{2+} ion of physiological concentration. Using this technique, a lipophilic antitumor drug, α -linolenic acid (ALA), also was able to be well emulsified by mixing with a suitable amount of TriC_8 in the presence of CHP. These newly developed O/W-emulsion stabilized by cholesterol-bearing pullulan derivative was promising in making a potent carrier of lipophilic drugs.