Recent Studies on Liposomes

Toru Takagishi

1. 緒 言

生体膜の構成成分である脂質によって形成される二分膜に囲まれ、内部に水層を有する閉鎖小胞はリポソームまたはベシクルとよばれ、界面活性剤の形成するミセルと異なって比較的安定に存在することから、各方面でその利用が注目されている。最近、特に薬学、医学、工学、農学関係においてその応用が期待されている。

薬学関係においては、ドラッグデリバリーシステム(DDS、薬物送達システム)と関連して、特に関心がはられている。DDSとは薬物の生体への適用方法において、有効性、安全性、信頼性に関して最も高い保証を与えるように、薬物投与の最適化をはかることを目的とする新しい投与システムであり¹⁾、薬物投与に伴う種々の問題、例えば疼痛、面倒さ、飲み忘れ、反復大量投与に伴う副作用、感染などを少しでも軽減しようとして開発されたものである。リポソームは医薬品以外に化粧品に対しても応用され、既に製品は市場に出されている²⁾。化粧品に応用されつつあるリポソームの最近の動向については、鈴木、左近ら³⁾によって詳しく紹介されている。また、リポソームは食品、塗料、農業への応用も研究されている。

リポソームは種々の長所と可能性をもっているが、実用化には克服しなければならない問題も数多く残されている。

本稿では、リポソームに関する最近の研究動向、特に高度に機能化されたリポソームおよび脂質膜被覆マイクロカプセルを中心にして、最近の研究を紹介するとともに、その問題点を述べてみたい。

2. リポソームの特性

リポソームには次の1)~8)のような特性がある。

- 1) 天然の脂質を用いるため生体適合性があり、細胞膜と親和性がある
- 2) 親水性・疎水性部分から構成されているため、親水性・疎水性物質を取り込むことができる
- 3) 脂質成分として代謝される
- 4) 生体内で特異的分布挙動をする
- 5) 表面電荷を変えることができる
- 6) 粒子径を変えることができる
- 7) 脂質成分を変えたり、コレステロールなどの添加によって、膜の硬さ、膜流動性を変えることができる
- 8) 膜内外の pH を変えることができる

リポソームは特に 1), 2), 3) の特性のために、ドラッグキャリアーとしての観点からよく研究されており、最近ではさらに高度の機能をもたせることが盛んに行われている。その一つはリポソームに組織、細胞特異性を付与する、すなわち特定組織、細胞へのターゲティング(標的指向性)であり、もう一つはリリースコントロール(薬物徐放)である。ターゲティングに関しては、5), 6), 7) の特性をコントロールすることによる受動的標的指向性の他に、ターゲティングをさらに積極的、高度に行う、能動的標的指向性の観点からの研究が最近注目されている。このような高度に機能化されたリポソームは、医薬のみならず化粧品の分野においても、今後ますます重要になってくるものと思われる。

また、リリースコントロールを指向したアプローチもある。リポソームは界面活性剤の形成するミセルに比べると安定であるが、膜中の脂質分子間には共有結合が形成されていないために、物理的、化学的に弱い構造であり、それを補強する目的およびリリースコントロールをより高度化する、すなわち外部刺激に対してすばやく応

大阪府立大学工学部応用化学科：堺市百舌鳥梅町 4
Department of Applied Chemistry, University of
Osaka Prefecture: Mozu-Umemachi 4, Sakai,
Osaka 591, Japan

答し、物質透過をコントロールする目的から、マイクロカプセルへの脂質の被覆化が注目されてきている。このような被覆化によって生体適合性も得られる。光（紫外線）、熱、pH などによって応答する脂質膜被覆化マイクロカプセルは、化粧品への応用も可能になるのではないかと考えられる。湿度、水分に対しても応答可能ならば、保湿機能と関連して化粧品としてさらに有効性は増すであろう。

3. リポソームの調製法

リポソームの調製法としては、次のような方法が試みられている。代表的な方法をあげると³⁾、

- 1) ガラスビーズかくはん (Vortexing) 法
- 2) 超音波法
- 3) コール酸 (界面活性剤) 除去法
- 4) 逆相蒸発 (REV, Reverse Phase Evaporation) 法
- 5) 有機溶媒 (エタノール, エーテル) 注入法
- 6) フレンチプレス法
- 7) Ca^{2+} 融合法
- 8) クロロホルム-エーテル小球法
- 9) 光重合法

これらの方法によって得られるリポソーム(ベシクル)の種類は異なる。すなわち、大きな一枚膜リポソーム (LUV), 多重層リポソーム (MLV), 小さな一枚膜リポソーム (SUV) の3種類であり、調製法によって形成されるベシクルの種類は異なってくる。また、リポソーム内部に封入物質を入れる場合、Fig-1 に示すような方法によって行うことができる。封入物質としては、薬剤はもとよりホルモン、酵素、遺伝子、タンパク質、生体

高分子、ビタミン、ウイルス、塩類、キレート剤等低分子から高分子にわたって、種々の物質を封入することが可能である。その場合に封入物質の分子量とベシクルのサイズは関係し、高分子量の物質は SUV には内包できない。

最近化粧品においても、ビタミンC, E, コラーゲン, エラスチン, ヒアルロン酸, ソルブルコラーゲン, プラセンタ, リン酸-L-アスコルビルマグネシウム, γ -オリザノール, UVフラビン, 牛血清除タンパク抽出物などを内包したリポソームを配合することが試みられている²⁾。

一定脂質量当たり保持できる内水層の体積を保持容積といい、仕込んだ溶質の量に対してリポソームに保持された溶質量をトラップ効率というが、保持容積, トラップ効率ともに LUV が一番大きく SUV が最も小さい。

4. リポソームと細胞との相互作用

リポソームが細胞と相互作用する場合、リポソームを形成する脂質組成、脂質の表面荷電、ベシクルのサイズ、膜の流動性、2価カチオン (Ca^{2+} , Mg^{2+} など) の存在などによって様式は異なってくる。すなわち、

- 1) エンドサイトシス
- 2) 融合
- 3) 吸着
- 4) 膜構成成分の交換反応

などがある⁴⁾。このうち特に重要であるのが1)および2)の機構である。1)は中性物質で硬い(ゲル状態)リポソームでおこり、2)は正または負の荷電をもつ脂質で軟らかい、流動性の大きい液晶状態のリポソームで起こるといわれている。3)の場合、細胞膜などの特定吸着座席と相互作用する特異的吸着と、そうでない非特異的吸着がある。

リポソーム配合化粧品では、表皮および真皮において1)が起こる可能性は非常に小さく、2), 3)の可能性が大きいものと推定される。リポソーム配合化粧品では、活性物質を内包したリポソームが皮膚表面に到達した際、皮膚界面においてリポソームの吸着あるいは崩壊をへて、リポソーム自体は経皮吸収されることなく、内包活性物質を表皮に放出することにより、活性物質濃度の増大をもたらすとともに、活性物質の吸収量を高めるという作用機構が示唆されている⁵⁾。実際、 ^{14}C -ジバルミトイルホスファチジルコリンでは、皮膚投与部位に ^{14}C 活性がみられるのみで、体内への移行は認められないが、 ^{14}C -ブチルパラベンを経皮吸収後体内移行するという結

リポソーム調製法

Fig-1 Preparation of liposome

果が報告されている⁶⁾。

リポソームの皮膚表面における挙動は化粧品において非常に重要であるが、それを推定するための一助として、lipid mixing, content mixing, content leakage について詳しく説明する⁶⁾⁻⁹⁾。融合機構はケイ光物質のケイ光強度および消化によって調べられている。二つの方法があり、ホスファチジルエタノールアミン (PE) などのヘッドグループにケイ光物質を共有結合させる方法と、ケイ光物質および消光物質をリポソーム中に取り込ませて測定する方法である。**Fig.-2** に示すように lipid mixing では、N-NBD および N-Rh を化学修飾した PE からリポソームを形成させそのケイ光を測定すると、N-NBD-PE を励起した場合、そのエネルギーは膜構成成分として近傍に存在する N-Rh-PE に容易に移動し、N-Rh-PE の発光スペクトルが観測される。このようなリポソームを他のリポソームと融合すると、lipid mixing の結果 N-NBD-PE と N-Rh-PE は分離され、N-NBD-PE の励起エネルギーは N-Rh-PE に容易にエネルギー移動できなくなり、N-Rh-PE の発光スペクトル強度は減少し、N-NBD-PE の発光スペクトル強度が増大する。このようにして、lipid mixing が起こったことがわかる。

しかしながら、lipid mixing しても必ずしも content mixing しているとは限らない。そこで content mixing の測定法として、次のような方法が行われている。すなわち、ケイ光物質 (ANTS) と消光物質 (DPX) をそれぞれ別個のリポソーム中に封入する。融合前は ANTS を励起すると ANTS の発光が見られるが、DPX の封入されたリポソームと融合すると、融合リポソーム中では ANTS と DPX は塩を形成し、ANTS のケイ光は消光される。このようにして、ANTS および DPX をそれぞれ含むリポソームが融合した結果、content mixing が起こっていることがわかる。

また、リポソーム中に封入された物質は必ずしも内部に留まっているとは限らないで、リポソーム系中から外部へ漏れてくる可能性もある。これを content leakage という。測定方法としては、ANTS と DPX を同一リポソーム中に封入しておく、ANTS は DPX と結合することによって消光され発光スペクトルは観測されないが、封入物質である ANTS および DPX がリポソーム内部から外部に漏れると、バルク中に ANTS と DPX が存在することになり、その結果 ANTS と DPX は離れて存在する確率が増大し、そのため ANTS の発光スペクトルが認められるようになる。このような方法によって

Fig.-2 Schematic drawing of fusion (lipid mixing, content mixing, and content leakage)

測定して得られた、融合におよぼす Ca^{2+} , Mg^{2+} の効果を **Table-1** に示す⁹⁾。この表から明らかなように、 Mg^{2+}

Table-1 Effects of divalent-cations on the interactions of DEPS/DEPE (Analogue) vesicles

中性脂質成分	Ca ²⁺ しきい値 (mM)	Ca ²⁺ 添加			Mg ²⁺ しきい値 (mM)	Mg ²⁺ 添加			T _H (°C) ^a
		lipid mixing	contents mixing	leakage		lipid mixing	contents mixing	leakage	
DEPE	1.7	107	32.6	3.2	3.0	76	14.1	1.7	63.5
DEPP	2.0	143	15.1	0.9	3.5	93	6.5	0.46	88.5
DEPB	2.0	152	9.3	0.45	4.2	89	6.4	0.14	>95
<i>N</i> -Methyl DEPE	7.0	160	15.6	1.45	11.0	118	5.3	0.24	>95
<i>N</i> -Ethyl DEPE	18.2	54.1	52.1	1.35	23	28.7	5.2	0.06	>95
C-2-Methyl DEPE	4.0	267	47.7	24	7.3	179	18.9	5.2	57.5
C-2-Dimethyl DEPE	5.0	181	145	78	9.5	158	70	39	55.5
C-2-Ethyl DEPE	4.8	175	181	23	9.5	180	242	10	<47.8
C-2-Isopropyl DEPE	4.0	122	122	73	7.0	200	162	67	<62.0
Dipalmitelaidoyl PE	1.9	154	10.6	1.75	3.0	143	8.1	0.45	92.5

^a ラメラヘキサゴナル II 転移温度

DEPE	Dielsaidoylphosphatidylethanolamine
PE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$
PP	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$
PB	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$
N-Methyl PE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_2-\text{CH}_3$
N-Ethyl PE	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
C-2-Methyl PE	$\begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
C-2-Dimethyl PE	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
C-2-Ethyl PE	$\begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_3 \end{array}$
C-2-Isopropyl PE	$\begin{array}{c} -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}-\overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$

よりも Ca^{2+} の方がしきい値（融合が起こりはじめる添加イオン濃度）が小さい。また，リボソームを構成する脂質のヘッドグループの化学構造によって，lipid mixing, content mixing, content leakage の値がかなり異なり，C-2-Dimethyl DEPE, C-2-Isopropyl DEPE のように，バルキーなヘッドグループをもつ脂質では，封入物質の leakage がかなり起こることがわかる。

5. リポソームへの分子認識機能の付与

先にも触れたように、リポソームの機能化が近年盛んに行われている。その一つにリポソームへの標的指向性の付与がある。指向性も受動的指向性から能動的指向性に研究方向は進んでいる¹⁰⁾。前者は、単純な脂質およびコレステロールから形成されるリポソームのサイズ、コ

レステロール含量、脂質の化学構造、表面の電荷状態などを変えることによって、リポソームの構造特性を変え、これらの変化が組織分布に影響をおよぼすことを利用して、目的とする組織にリポソームが集中的に相互作用するように、上記因子を変えて標的指向性を出そうとするものである。一方後者は、標的とする細胞表面のリセプターや決定因子を特異的に認識するリガンドを、リポソームの表面に修飾する方法である。例えば、抗原-抗体反応の極めて高い特異性を利用する方法、および糖鎖が細胞の認識機能をもっていることを利用しようとするものである。すなわち、

- 1) 天然由来または合成糖脂質を利用する
- 2) 膜糖タンパクを用いて再構成する
- 3) 多糖誘導体によってリポソーム表面を被覆する
- 4) 抗体などのリガンドを二重層膜中に組み込む
- 5) 抗原または抗体（またはそのフラグメント）を共有結合した脂質を利用する
- 6) リポソーム表面を被覆している多糖またはタンパクへ抗原または抗体を共有結合させる

などが進められている¹¹⁾。

一例として、デキストラン、プルラン、アミノペクチン、アミロース、マンナンなどにコレステロール、長鎖アルキル基などを結合させ、これらリポソーム中に組み込むことによって、リポソーム外水層全体を多糖類で被覆する研究が行われている¹⁰⁾。また、これらの多糖類にモノクロナル抗体を結合させ、さらに細胞認識性を高める試みもなされている¹²⁾。しかしこのように抗体またはそのフラグメントを化学修飾することによって、リポソーム全体の生体適合性も悪くなるという結果も出されており、細胞認識性と生体適合性を両立させるように分子設計することが今後重要な課題になる。

6. リポソームの安定性、保存性

リポソームを種々の目的に用いる場合に、物理的、化学的安定性および保存性が重要な因子になる。リポソーム配合化粧品においても、長期保存性が大きな問題になる。すなわち、

- 1) 脂質の化学的安定性
- 2) サイズ、構造の安定性および保持
- 3) トラップした封入物質の保持
- 4) 生体成分から受ける影響およびそれに対する安定性

などである。特に2)に関しては、リポソームを形成する脂質間には共有結合が存在しないため、サイズ、構造の

保持は劣る。その対策として、リポソームを多糖類で被覆し構造強化させる方法が考えられている¹¹⁾。これは植物細胞、細菌では細胞膜の外側にセルロース、ポリグルカンの細胞壁が存在し、細胞を安定させていることによる。また、合成二分子膜と関連して、脂質の疎水基または親水基中に重合基を導入して、膜形成と同時に隣り合う脂質間に共有結合を形成させ、膜構造を安定化させる研究も行われている¹³⁾。

7. 外部刺激による内包物放出のコントロール

リポソームをドラッグキャリアーとして用い、目的の細胞へ移行したのち内包物を放出する際、外部刺激によってその放出をコントロールすることができれば、有効性はさらに増大する。外部刺激としては、温度、pH、光、磁場、電場、超音波などがある。

7.1 温度によるコントロール

リポソームはゲル-液晶相転移をおこす。構成する脂質の種類、添加するコレステロール含量、荷電物質などの存在によって、相転移温度(T_c)は変化する。例えば、脂肪酸残基のアルキル基が長く、不飽和度の低い脂質の T_c は高温になる。ホスファチジルコリンではジミリス Toil, ジパルミトイル, ジステアロイルとアルキル基が長くなると、 T_c は24, 41, 58°Cと高くなり、アルキル基の炭素数が同じでも、不飽和度の大きいジオレオイルでは T_c は-22°Cに低下する。

この現象を利用して、ジパルミトイルホスファチジルコリン($T_c=41^\circ\text{C}$)のリポソーム内部に制ガン剤を内包させて、温度感受性をもつ制ガン剤保持リポソームの温熱療法が試みられている¹⁴⁾。体温ではこのリポソームはゲル状態であり、内包物である制ガン剤は放出されないが、41°C以上に昇温すると相転移が起こって液晶状態になり、制ガン剤は容易に放出されて効果が現れる。

7.2 pHによるコントロール

pH 応答リポソームについても研究が行われている。例えば、N-パルミトイルホモシステインをリポソームの構成成分の一つとしていれ、このホモシステインのpHによる環化を利用した例がある¹⁵⁾。ホモシステインは酸性状態では環状構造をとるため、リポソームの二分子膜は不安定になり内包物は放出される。一方、アルカリ性ではホモシステインは環状構造をとらないために膜は安定であり、内包物は内部にトラップされたままになる。このようにして、pH変化でリポソームを不安定にすることによって、内包物の放出コントロールが可能になる。

7.3 光によるコントロール

アゾ基のシス・トランス互変異性化を利用して、光による放出コントロールが行われている。アゾベンゼンのようなアゾ基をもつ低分子を二分膜中に組み込むことによって、紫外光を照射するとアゾ基はシス型をとり、脂質間の間隙は広げられ、内包物は放出される。暗所または 420nm 以上の光ではアゾ基はトランス型をとり、脂質間の間隔は狭くなり放出は抑制される。化粧品においても、紫外線に応答するリボソームを配合することによって、より機能化することができるのではないかと考えられる。

他の外部刺激としては、磁場、電場、超音波などが研究されている。

8. 脂質膜被覆マイクロカプセル

リボソームを調製後、長期間安定に保存する方法として、多糖類で被覆および脂質分子中に重合基を入れ高分子化することが試みられていることはすでに述べたが、これに関連して、脂質膜被覆マイクロカプセルも研究されている¹⁰⁾。物理的、化学的に安定なマイクロカプセルとリボソームのもつ生体適合性の特性を利用しようとする試みである。マイクロカプセルとしてはナイロン、ポリスチレンなどが用いられており、その内部に薬物などを内包させる。マイクロカプセル自身の生体適合性は乏しく、また内包物が自由に透過できる空孔があるため、この欠点をカバーするため脂質膜で外部を被覆する。この場合においても、光、熱、pH などの外部刺激応答機能をもつリボソームを用いる試みが行われている。

最近、河野、木村、今西ら¹⁷⁾は新しいタイプの pH 応答性の脂質膜被覆マイクロカプセルを開発している。その方法は、ナイロンマイクロカプセルにヘリックス形成能のあるポリペプチドをまず被覆し、さらに最外層を脂質二分子膜でカバーする。このようなマイクロカプセルは pH 変化に応答して、中間層にあるポリペプチドがヘリックス・ランダムコイル転移をする。ヘリックス状態では最外層の脂質二分子膜は乱れることなく規則正しく配列しているため、内包物は外部に透過しないが、ランダムコイルになると、規則正しく配列していた膜は乱れて内包物は透過するようになる。リシン残基をもつポリペプチドでは、酸性領域でランダムコイル状になるため、内包物の透過は容易になるという結果を得ている。

9. おわりに

本稿では、リボソームに関する最近の研究の流れを概観した。リボソーム配合化粧品においても、高度に機能化されたリボソームの利用が、今後ますます盛んになるのではないかと考えられる。

文 献

- 1) 瀬崎 仁編 “ドラッグデリバリーシステム” (1986) 南江堂
- 2) 鈴木一成, 左近健一, フレグランスジャーナル, 15, 60 (1987)
- 3) 坂野喜子, 野沢義則, 膜 (Membrane), 10, 235 (1985)
- 4) R.E. Pagano and J.N. Weinstein, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 7, 435 (1978)
- 5) 特 開 昭 60-152410
- 6) D.K. Struck, D. Hoekstra, and R.E. Pagano, Biochemistry, 20, 4093 (1981)
- 7) H. Ellens, J. Bentz, and F.C. Szoka, Biochemistry, 23, 1532 (1984)
- 8) H. Ellens, J. Bentz, and F.C. Szoka, Biochemistry, 24, 3099 (1985)
- 9) P.M. Brown and J.R. Silvius, Biochim. Biophys. Acta, 980, 181 (1989)
- 10) 砂本順三, 佐藤智典, 日化, 1989, 161
- 11) 砂本順三, ファルマシア, 21, 1229 (1985)
- 12) J. Sunamoto, T. Sato, M. Hirota, K. Fukushima, K. Hiratani, and K. Hara, Biochim. Biophys. Acta, 898, 323 (1987)
- 13) K. Dorn, S. Kobayashi, and H. Ringsdorf, “人工細胞へのアプローチ” (国武, 田伏, 土田編) p. 153 (1983) 化学同人
- 14) J.N. Weinstein, R.L. Magin, R.L. Cysyk, and D.S. Zaharko, Cancer Res., 40, 1388 (1980)
- 15) M.B. Yatvin, W. Kreutz, B.A. Horwitz, and M. Shinitzky, Science, 210, 1253 (1980)
- 16) Y. Okahata, Acc. Chem. Res., 19, 57 (1986)
- 17) K. Kono, S. Kimura, and Y. Imanishi, Polym. Prepr. Jpn., 37, 3535 (1988)

(平成1年10月2日受理)