脂質分子集合体間の平衡とそれらのミクロな表面環境に関する界面化学的研究

半田哲郎

京都大学薬学部, 〒606 京都市左京区吉田下阿達町

Equilibrium among Lipid Molecular Assemblies and Their Surface Microenvironment

Tetsuro HANDA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,
Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

Various lipid molecular assemblies, monolayer, bilayer, emulsion particle, hexagonal II phase and micellar particle, are in dynamic equilibrium in an animal body. Monolayer-bilayer equilibrium of a mixture of phospholipid and neutral lipid is influenced by the phase state of bilayer and molecular interaction of lipids. Neutral lipids, such as triglyceride, cholesteryl ester, ubiquinone-10 and α -tocopherol acetate form an emulsion structure with phosphatidylcholine (PC). Stable emulsion particles (neutral lipid core covered with PC monolayer) are in equilibrium with liposome particles (PC bilayers). This kind of equilibrium is important in catabolism of triglyceride-rich lipoprotein particles and artificial emulsion particles, Intralipid, in the plasma. Some other neutral lipids, such as diglyceride, menaquinone-4 and α -tocopherol induce a formation of intra- and inter-bilayer particles in PC bilayer, and finally transform it to hexagonal II phase. This type of neutral lipids has been implicated in several cellular processes: vesiculation, fusion, endocytosis and exocytosis *etc.* More hydrophilic lipid, such as cholate, or protein with amphipathic helix, such as apoA-1, strongly interact with PC bilayer and transform it to micellar particles; mixed disk micellar or high density lipoprotein particles. Phospholipid bilayer, therefore, converts into various nonbilayer structures by interaction with neutral lipid and protein in an animal body.

Keywords—phospholipid; neutral lipid; apolipoprotein; monolayer; bilayer; emulsion particle; hexagonal II phase; micelle particle; lipid dynamic equilibrium; lipoprotein catabolism

1. はじめに

動物体内の脂質分子集合体として、細胞膜などの2分子膜 (bilayer) がよく知られている。しかし、肺胞の表面で bilayer と動的平衡を保ちながら呼吸機能に参与しているのは脂質単分子膜 (monolayer) である。さらに、血液中で高カロリー源のトリグリセライド (TG) を運ぶ chylomicron (CM) や very low density lipoprotein (VLDL), コレステリルエステル (CE) を運搬する low density lipoprotein (LDL) などのエマルジョン (emulsion) 粒子, またミセル (micelle) 様の high density lipoprotein (HDL) の存在も知られている。¹⁾ Emulsion 粒子は, 表面に吸着したリン脂質 (PL) の単分子膜により, 中性脂質, TG や CE のコアが水溶液中に安定化されたものである。血液中の脂質分子集合体の異化 (catabolism) は代謝エネルギーを必要とせず, 脂質分子の物理化学的ポテンシャルにより支配されている。また, 種々の分子集合体の間で, 脂質分子の交換が起こっている。¹⁾ 薬学的に有用な脂肪乳剤やリポソーム (liposomes) などのいわゆるリポ製剤は血漿中で, CM や VLDL と類似の異化を受ける。²⁾

さて, 消化管に見出される胆汁酸塩ミセル (bile salt micelle) は脂肪の吸収に不可欠である。さらに, bilayer 内部や bilayer 間にしばしば見出されるミセル状の intra あるいは inter bilayer particle (IBP) は膜の融合, 膜の小胞化また逆ヘキサゴナル相 (hexagonal II, H_{II}) の形成と関係して近年, 高い関心が持たれている。³⁾

本総説は, 平成3年度日本薬学会奨励賞の受賞業績を中心に記述したものである。

Fig. 1 にこれらの脂質分子集合体間の平衡を示した。体内でのリン脂質の一般的な集合状態は bilayer であり、これに他の脂質成分や蛋白成分が加わって, emulsion, micelle や H_{II} が生成する。

このように体内での種々の脂質分子集合体の重要な働きが明らかになりつつある。しかし、これらの平衡についての研究は少ない。本稿では、おもに、界面化学的手段によりその平衡を研究し、体内での脂質分子集合体の異化を生物物理化学的に検討する。また、この結果は、人工の脂質分子集合体をリ

ポ製剤として薬学的に応用するとき、その体内動態を制御するうえでも重要であろう。

さらに、脂質分子集合体の表面のミクロな環境に関する測定法と一般的な注意について記し、集合体の構造との関係も簡単に議論する。

2. 単分子膜と2分子膜の平衡

Fig. 2 に示されるように、気/水あるいは油/水界面に phosphatidylcholine (PC) の2分子膜をおくと、これより PC 分子が界面に単分子膜として拡張 (spreading) する。界面張力は、初めの値 γ_0 より γ に低下する。この低下分は単分子膜の横方向の圧力、すなわち、界面圧 (interfacial pressure, F) と考えることができる。 F の値は二分子膜から単分子膜が形成するにつれて増大するが、ある一定値になると bilayer と monolayer の間で平衡が成立し、それ以後は変化しない。この F の値を bilayer の拡張圧 (spreading pressure) という。一方、界面の単分子膜を圧縮すると F は増大し、ある一定値に達すると2分子膜を析出する。このときの F の値を単分子膜の崩壊圧 (collapse pressure) という。Monolayer-bilayer の変化が平衡を保ちながらおこるとき、spreading pressure は collapse pressure と一致する。単分子膜はそれ自身1つの脂質分子集合体であるが、このように bilayer (あるいは micelle, H_{II} や emulsion) から生じる2次元の蒸気とも考えることができる。拡張圧はその蒸気圧に相当し、その測定から脂質分子集合体内での脂質分子間の相互作用を一般的に議論できる。したがって、単分子膜は脂質研究において、特別の位置を占めている。

Table I に PC の spreading pressure を示す。25°C では DMPC 2分子膜は液晶状態 (L_α) にあり、気/水界面での拡張圧は 44.5 mN/m と高い値である。15°C では2分子膜はゲル状態 (P_β') にあるが、拡張圧は極めて低い。同様に、DLPC, DOPC, EY-PC (卵黄 PC) は L_α 状態で 46—47 mN/m の拡張圧を、DPPC, DSPC は L_β' (ゲル状態) にあり極めて低い拡張圧を示す。このように、体内の monolayer-bilayer で脂質が円滑に移動するには bilayer は L_α の必要がある。⁴⁾

脂質は一般に含水量や温度により複雑な多形を示すが、これに応じ拡張圧も変化する。Phosphatidylethanolamine (PE) のゲル状態は L_β である。このとき、脂質分子の長軸は bilayer 面にはほぼ垂直に配向し、この軸での回転は束縛される。PE の bilayer はゲル状態でも比較的に高い拡張圧を示すのは、このためである。⁴⁾

哺乳類の肺胞表面には PC を主成分 (特に DPPC が多い) とする単分子膜が形成されており、肺胞内の水面の界面張力を低下させ、air space を安定化している。呼吸と吸気に応じ、単分子膜と2分子膜の間に脂質が移動する。⁵⁾ 体温付近では DPPC はゲル状態であるが、肺胞表面の脂質には液晶状態にある PC 種も含有されており、

Fig. 1. Equilibrium of Lipid among Various Molecular Assemblies in Animal Body

Fig. 2. Monolayer-Bilayer Equilibrium

TABLE I. Spreading Pressure of Phosphatidylcholine

DMPC	25°C	L_α	44.5 (mN/m)
DMPC	15°C	P_β'	<0.1 (mN/m)
DLPC	26°C	L_α	47.4 (mN/m)
DPPC	25°C	L_β'	<0.1 (mN/m)
DSPC	25°C	L_β'	<0.1 (mN/m)
DOPC	25°C	L_α	46.4 (mN/m)
EY-PC	25°C	L_α	46.0 (mN/m)

肺胞の収縮に応じて界面圧をコントロールし、その運動にはずみを与えている。この肺胞の PC が欠けると呼吸困難に陥る。これに対し、DPPC を主成分とするレシチンを肺に投与する治療法が実用化されている。

3. 脂質混合物の単分子膜-2分子膜平衡

体内の脂質分子集合体は複数の脂質成分より構成されている。その脂質成分間の相互作用は、後述もするよ
うに、分子集合体の構造に強く影響する。脂質分子集合体である単分子膜や2分子膜での成分の相互作用は、
monolayer-bilayer 平衡、すなわち、拡張圧や崩壊圧にも影響する。したがって、逆に、脂質混合物の拡張圧や
崩壊圧の測定結果より単分子膜や2分子膜での相互作用、さらには分子集合体の構造をも検討することができる。
拡張圧や崩壊圧を組成に対して示せば、monolayer-bilayer 平衡に対する相図を得ることができる。相図は
単分子膜と2分子膜での脂質成分の相互作用の仕方により、おもに次の4種に分類される。⁶⁾

3-1. 単分子膜でも2分子膜でも脂質が混合する Fig. 3 の a に示すように、2分子膜 (B) でも単分子膜
(M) でも脂質成分がよく混ざり合う場合は、拡張圧 (破線) と崩壊圧 (実線) の組成変化から得られる平衡相図
は葉まき型になる。(B+M) で示される範囲では2分子膜と単分子膜が共存する。平衡にある2分子膜の拡張圧
と単分子膜の崩壊圧は等しいので、水平にひかれたタイラインと葉まきの右左の交点により、それぞれの組成が
与えられる。

卵黄レシチン (EY-PC) は分子内の脂肪酸の異なる PC の混合物である。25°C では L_α 状態にあり、いず
れの成分も 45—46 mN/m 程度の拡張圧をもつ (Table I)。したがって、葉まきは、ほとんど水平で近接した2本の
線により表される。EY-PC が PC 混合物であるにもかかわらず、拡張圧は 46.0 mN/m で崩壊圧は 45.5 mN/m
と一成分のように挙動するのはこのためである。⁶⁾

中性脂質の triglyceride の混合物、triolein-tricaprylin 系は葉まき型の平衡相図を示す。しかし、この場合に混
合単分子膜 M と平衡にあるのは2分子膜ではなく、triglyceride 混合物の液滴 L である。単分子膜でも液滴で
も脂質はよく混合する。⁷⁾

3-2. 単分子膜だけで脂質が混合する 単分子膜 M では脂質成分は混ざり合うが、2分子膜 B では完全に
混合せず脂質の分離がおこる場合で、多くの PL と中性脂質 (NL) の混合系にあてはまる。拡張圧 (破線) と崩壊
圧 (実線) により描かれる平衡相図は b-1 あるいは b-2 となる。PL の2分子膜 B に対する NL の溶解度は b 点
で、中性脂質液滴 L (あるいは固体 S) への PL の溶解度は 1 点で示される。b-1 の場合、脂質混合物は単分子
膜-2分子膜平衡に関して共融混合物を形成し、共融点 (eutectic point) e を有する。この組成の崩壊圧と拡張圧

Fig. 3. Miscibility of Lipids and Monolayer-Bilayer Equilibrium

PL, phospholipid; NL, neutrallipid. B, bilayer; M, monolayer; L, liquid.

は混合系であるにもかかわらず一致する。⁶⁾ b-1 型の平衡を示す脂質混合物としては、気/水界面の DMPC-cholesteryl acetate (CA) 混合系をあげることができる。⁶⁾ Fig. 4 に示されるように、CA も含め CE は一般に PC の 2 分子膜への溶解度は小さい (数モル%)。一方、単分子膜ではよく混ざり合い、共融点を持つ相図が得られる。PC の 2 分子膜 B と、これから分離した過剰の CE 相 S、さらに、これらと平衡にあって共融組成 (PC: 95—98 モル%, CE: 2—5 モル%) をもつ単分子膜の共存は、後述もするが、CE-rich な emulsion 様リポ蛋白 LDL や HDL の形成に重要である。⁸⁾

Fig. 5 a に示すように、ウシ脳より分離した phosphatidylserine (PS) の 2 分子膜 B には CA はわずかしき溶けず、過剰量は固相 S として分離する。一方、気/水界面の単分子膜では PS と CA はよく混ざる。この結果、単分子膜 M と 2 分子膜 B の平衡は b-1 (Fig. 3) 型となり、共融点を持つ。単分子膜の下層の水溶液に Ca^{2+} の塩を添加すると PS 分子が会合し、クラスターを単分子膜中で形成する。このとき、CA は分離して PS と CA の単分子膜が別々に存在するようになる。PS と CA の単分子膜は互に独立に崩壊して B_{PS} や S_{CA} を形成する (Fig. 5 b)。この結果、平衡は Fig. 3 の d (後述) で示されるようになる。⁶⁾

Palmitic acid の ω 位に (9-anthroyloxy) 基の導入された 16-(9-anthroyloxy)palmitic acid (16-AP) は ω 位の残基とカルボキシル基の 2 つの極性残基を炭化水素鎖の両端にもつ脂質である。気/水界面では両方の残基を水面に接し、ほぼ水平に配向する。この水平に配向した脂質は PC などの flexible な脂質分子と単分子膜でよく混ざり合うが、cholesterol のような rigid な分子とは混ざり合わない。⁹⁾

また、気/水界面での TG と PC, PE あるいは PS の単分子膜-2 分子膜平衡はすべて Fig. 3 の b-1 型となる (data は示さない)。さらに、TG/saline 界面での PC, PE や PS の monolayer-bilayer 平衡も b-1 型で表され

Fig. 4. Monolayer-Bilayer Equilibrium of DMPC and Cholesterylacetate (CA) Mixture

Fig. 5. Monolayer-Bilayer Equilibrium of Phosphatidylserine (PS) and CA Mixture

(a) Without Ca^{2+} in aqueous subphase. (b) With Ca^{2+} in aqueous subphase.

る。これについては、後に emulsion 粒子形成と関連させ詳しく論じる。

コレステロールとそのエステルは気/水界面の monolayer では互によく混ざり合う。しかし固相 S (この場合, bulk 相は bilayer ではない) では分離する。したがって b-1 と類似な相図が得られ, 共融点 e も出現する。¹⁰⁾ また, モノヘキサデシルリン酸 (HDP) と CE は尿素水溶液表面の単分子膜中で混ざり合うが, S 相では混ざり合わず b-1 型の平衡を示す。¹¹⁾ 水溶液中の尿素を除き, 塩酸酸性とすると HDP 分子間に水素結合が形成され, 単分子膜でも CE と分離する。この結果, Fig. 3 d 型の平衡の相図を得る。¹¹⁾

脂溶性ビタミンは中性脂質として分類される。動物細胞のミトコンドリアの電子伝達に参与する ubiquinone-10 (Q_{10}), 血液凝固に参与する menaquinone-4 (VK_2), 脂質の酸化をコントロールする α -tocopherol (VE) 及びその acetate (VE acetate) と PC の混合系の単分子膜-2 分子膜平衡を研究した。いずれの中性脂質も PC の bilayer では完全には溶け合わないが, monolayer では完全に混ざり合い b-2 型の平衡を示す。しかし, 後述もするように, 中性脂質と PC の相互溶解性の大小は, これらの混合物によって形成される分子集合体の構造に大きな影響を与えた。

3-3. 2 分子膜だけで脂質が混合する 単分子膜 M では脂質は相分離するが, 2 分子膜 B で完全に混ざるとき, monolayer-bilayer 平衡は Fig. 3 の c で示される。しかし, 今までのところ, c 型に分類される脂質混合系は見出されていない。⁶⁾

3-4. 単分子膜でも 2 分子膜でも脂質が相分離する この場合, 単分子膜-2 分子膜の平衡は Fig. 3 の d により示される。単分子膜を形成する脂質成分は別々に崩壊し, 2 分子膜 B や中性脂質相 (液滴 L, 固相 S) を形成する。この崩壊圧 (collapse pressure) は組成により変化しない。このような例としては, すでに, Ca^{2+} 水溶液表面の PS と CA の混合系 (Fig. 5b) や,⁶⁾ 酸性水溶液表面の HDP と CA の例を示した。¹¹⁾

4. リン脂質と中性脂質混合物の分子集合体

動物体内の脂質分子集合体はリン脂質と中性脂質の混合物で形成される。リン脂質, 特に PC と種々の中性脂質との混合物を水中に分散し, その構造を研究した。PC のみでは 2 分子膜を基本構造とする liposomes が形成される。これに中性脂質が添加されると, 中性脂質のコアを PC の単分子膜がおおった emulsion 粒子が生成する場合と,^{6b)} 2 分子膜の内部に逆ミセル状の inter あるいは intra bilayer particle が形成され, bilayer のヴェンクル化, 融合や H_{II} 形成にまで進展する場合とがあった。^{6b)} Fig. 6 にこの 2 つの場合を模式的に示した。Emulsion 粒子を形成する中性脂質を A, H_{II} を形成する中性脂質を B とした。

4-1. PC と TG による Emulsion 粒子の形成 Triglyceride (TG) の一種 triolein (TO) と saline の界面で卵黄レシチン (PC) の単分子膜の界面圧を測定した。単分子膜と 2 分子膜の平衡は Fig. 7A に示される。PC の 2 分子膜 B には TO はモル分率で 0.03 しか取込まれない (fg)。過剰の TO は液滴 L として分離する。L 中の PC の溶解度もモル分率で 0.001 以下であり, PC と TO の相互溶解性は極めて小さい。TO 液滴 L の表面は PC 2 分子膜 B より拡張した PC の単分子膜 M (組成は e) により覆われ, emulsion 粒子として saline 中に安定化される。2 分子膜 B (組成 g) と TO 液滴 L (組成 b) と平衡にある単分子膜 M (組成 e) は共融組成を持っており, B と L が共存する限り一定である。共融点 eutectic point の組成は PC のモル分率 0.95, TO のモル分率 0.05 である。TO 液滴中の PC 溶解度は小さいが, PC の含量が 0.001 以下になると, PC の過剰

Fig. 6. Structural Change from Bilayer

A: TG, CE, Q_{10} and α -tocopherol acetate. B: DG, VK_2 and α -tocopherol.

Fig. 7. (A) Monolayer-Bilayer Equilibrium of Triolein (TO) and PC. (B) Coexistence of Emulsion and Liposome Particles in Intralipid

(A) Emulsion particle (core, b, + monolayer, e) is in equilibrium with liposome particle (bilayer, g).

相である2分子膜Bが消失する。この結果、TO液滴表面の単分子膜のPC組成は $e \rightarrow c$ と低下し、界面圧も低下する。Emulsion粒子はもはや安定でなく、TOがsaline中から分離する。したがって、TG-PCのemulsion構造が安定であるためには、emulsion粒子(L+M)に2分子膜(B)より形成されるliposome粒子が共存する必要がある。¹²⁾

安定なTG-PC emulsion, 例えば脂肪乳剤中にはこの共存が実際に観察されることが内外の研究より知られている。¹³⁾ 筆者は、この共存が粒子の安定性に必要なものであることを強調した。¹²⁾ 実際、emulsion粒子表面の単分子膜のPCとTOの組成が研究され、ここで示したeutectic組成と常に一致することも示された。¹⁴⁾ Fig. 7Bに、このemulsion粒子とliposome粒子の共存を示した。¹²⁾ このemulsion粒子表面の単分子膜とliposome粒子の2分子膜の平衡は、粒子の安定化のみならず、emulsion様リポ蛋白、CMやVLDLの体内の異化過程にも密接な関係を持っている。^{20,14)} これについては後述する。

さて、TO/saline界面で測定されるPC、PE及びPS単分子膜の界面圧(F)-分子当り面積(A)曲線をFig. 8に示した。PCはこの界面で凝縮した単分子膜を形成するが、PEやPSは膨張膜となる。これは単分子膜中でPC分子間に強い引力が作用することを示している。¹²⁾

水溶液中のemulsion粒子は常に衝突し、球形からの変形を受ける。衝突部付近の界面は拡張しPC分子の表面濃度も低下する(Fig. 9)。Fig. 8から予想されるように、凝縮膜PCは、わずかの表面積増大に対しても大きな界面圧Fの変化が起こる。衝突部とその周辺の間形成されるFの大きな勾配のため、PC分子が衝突部に速やかに移動し、単分子膜を安定化する。この作用はPEやPSでは弱い。TGをemulsion粒子として安定化能力を有するのはPCのみで、PSやPEでは乳化分散がなされない。¹²⁾ また、体内のTG-richなemulsion様リポ蛋白粒子表面単分子膜はPSやPEを含有せずPCを主成分とする。¹⁾

このような単分子膜-2分子膜共存による中性脂質のemulsion化や、その安定化は、その他の中性脂質(CEなど)でも見出される。⁸⁾ Fig. 10に、血漿中のTG-richなリポ蛋白、CMとVLDLの異化を示した。TGが全身の細胞により消化され取り除かれると、表面のPC単分子膜は過剰になり崩壊して2分子膜を形成する。ふつう、この2分子膜は速やかにミセル様のHDLに異化される。これはHDLのアポリポ蛋白、apoHDLの作用による。このミセル化が何らかの症状で遅れると、血漿中にliposome様の2分子膜(LP-X)が蓄積される。²⁾ ま

Fig. 8. Interfacial Pressure-Molecular Area Curve of PC, PE and PS at TO/Saline Interface

た、病的でなくても、人工の脂肪乳剤を大量に投与すると、TGの消化が速やかに進行するので、単分子膜より変化したPC 2分子膜 (すなわち、liposomes) が蓄積される。²⁰⁾ このように、emulsion 表面の単分子膜と liposomes の 2分子膜の平衡は、脂質粒子の血漿中の異化においても重要である。

4-2. PC と Q₁₀ による粒子形成 Fig. 11a に Q₁₀ の構造を示した。Q₁₀ と PC の monolayer-bilayer 平衡を Fig. 12 に示した。脂質混合物の拡張圧, e f b a, が示すように、卵黄の PC と Q₁₀ は 2分子膜ではわずかしき溶解し合わず、過剰の Q₁₀ は S 相として分離する。2分子膜 B (組成 f) と S 相 (組成 b) と平衡にある単分子膜 M (組成 d) が S 相の表面を覆い、これを水中に安定な emulsion 様粒子として分散する。この機構は TG-PC による粒子形成と同じである。しかし、PC-Q₁₀ の平衡図は Fig. 3 の b-2 型になる。¹⁵⁾

Fig. 13 に PC と Q₁₀ の混合物の水中の超音波分散粒子の陰染色電子顕微鏡写真を示す。a は PC と Q₁₀ の等モル混合物より、b は PC 30 モル % と Q₁₀ 70 モル % 混合物より形成される粒子で、それぞれ、平均粒径は 60 と 70 nm である。凍結割断レプリカ法で観察すると、これ等の粒子は、内部が中空の liposome 粒子と内部のつまった emulsion 粒子の混合物であることが分かる。¹⁵⁾ PC-Q₁₀ の混合物により形成される粒子内部水相の体積を蛍光色素を用いて求めることができる。Fig. 14 に示すように、Q₁₀ が混在しない small unilamellar liposomes (SUV) では PC 1 mol 当たり約 0.41 の水相が内包される。Q₁₀ 含量を増大すると、そのモル分率 0.5 以上で内水相の体積が急減することが分かる。これは、liposome 粒子に emulsion 粒子が混在してくることを示し

Fig. 9. Collision and Deformation of Emulsion Particles

Induction of a large restoring force for the monolayer expansion requires the high interfacial elasticity.

Fig. 10. Catabolism of TG-Rich Emulsion Particle (VLDL, CM and Intralipid Particle) in Plasma

apo HDL, apolipoprotein of high density lipoprotein (HDL).

Fig. 11. Ubiquinone-10 (Q₁₀, a) and Menaquinone-4 (VK₂, b)

ている。また、核磁気共鳴スペクトル (NMR) 法により、粒子表面の PC と内部の PC を分別定量すると、 Q_{10} 含量が増大するに伴い、内側に向けた PC が減少することも明らかとなった。¹⁵⁾ これらの方法は、その他の PC と中性脂質混合物が形成する分散粒子についても用いられた。

このように 4-1 の TG や 4-2 の Q_{10} は Fig. 6 のタイプ A に相当する中性脂質である。他に A 型に分類される中性脂質として、CE や VE acetate がある。^{3c)} TG-PC 系は血漿中の CM や VLDL など粒子の基本構造を、他方、CE-PC 系は血漿中の LDL や HDL などの粒子の基本構造を形成する。実際、これらのリポ蛋白粒子表面の TG や CE の組成は、単分子膜-2 分子膜平衡における共融点 (eutectic point) の組成に固定されており、2 分子膜との平衡あるいは動的平衡の重要性が指摘される (Fig. 3, b-1).^{1,2,13,14)}

4-3. PC と中性脂質による H_{II} 相形成 Fig. 6 の B に相当する中性脂質として VK_2 が見出された。¹⁶⁾ 界面化学的にえられる PC- VK_2 混合系の monolayer-bilayer 平衡相図より、PC 2 分子膜に VK_2 はかなりよく取り込まれることが分かった。このことは、混合物の DSC や X 線小角散乱測定からも認められた。この混合物の粒子内包体積は、中性脂質 VK_2 含量を増大してもあまり低下しない。これは、PC- Q_{10} 混合系と異なる点である。電子顕

Fig. 12. Monolayer-Bilayer Equilibrium of PC and Q_{10} Mixture

(a)

(b)

Fig. 13. Electron Microscopic Pictures of PC- Q_{10} Nanospheres

(a) PC : Q_{10} = 1 : 1 (mol/mol). (b) PC : Q_{10} = 3 : 7 (mol/mol).

Fig. 14. Trapped Aqueous Volume Inside Dispersed Particles of PC-Q₁₀ Mixture

(1) Volume of inner space of particles per mol of PC, (2) volume of inner space of particles per total mol of (PC+Q₁₀).

微鏡写真より, PC:VK₂=7:3 (モル比) では分散粒は SUV であることが分かった. PC:VK₂=2:8 でも, 分散粒子は multi lamellar vesicle (MLV) であることが判明した. しかし, 後者の場合, MLV の 2 分子膜の各所に, ミセル状の intra あるいは inter bilayer particle (IBP) が確認された. これらの IBP は 2 分子膜の融合やヴェシクル化, さらに H_{II} の形成を誘導する構造である. 電子顕微鏡写真では, PC:VK₂=2:8 の粒子にはその内部の 2 分子膜多重層が完全にヴェシクル化したものも見出された. また, X 線小角散乱測定により, 同じ脂質組成で H_{II} 相が含有されていることも判明した.¹⁶⁾

同様の intra 及び inter bilayer particle の形成は, PC への VE の添加によっても見出された. しかし, VE acetate は A 型の中性脂質であり, 安定な emulsion 粒子を形成した. TG は A 型で emulsion 粒子を形成したが, これより脂肪酸を 1 分子除いた diglyceride (DG) は, TG とは異なり, B 型の中性脂質である.^{3b)} TG などの B 型の中性脂質は 2 分子膜の融合, ヴェシクル化 (endocytosis, exocytosis) と関連し, 細胞活動に重要な役割を演じている.³⁾

Fig. 15 に PC と B 型の中性脂質により intra bilayer particle が形成されることを示した. IBP の内側には親油性の高い中性脂質が濃縮され则认为られており, この内部の逆ミセルが直接に集合すると H_{II} 相が形成される.

5. PC 2 分子膜のミセル化

今まで述べた事からを界面化学, コロイド化学のより一般的立場より見なおすと以下のようになる. Fig. 16 に示されるように, 脂質あるいは脂質混合物の分子集合体は, その構成脂質分子の親水性 (hydrophilic) 及び親油性 (lipophilic) のバランスにより種々の構造を形成する.¹⁷⁾ 親油性と親水性のバランスのとれた PC により, 水中に 2 分子膜 (あるいは, これが層状に重なった lamellar 相) が形成される. VK₂, VE や DG は PC 2 分子膜によく取り込まれ, そのバランスを親油性に傾けて H_{II} を形成する. この変化の中間にてヴェシクル化や融合を引き起こす. 一方, TG, Q₁₀, CE や VE acetate は PC 2 分子膜には, わずかしき取り込まれず, 過剰量は分離して emulsion 粒子を形成する.

Fig. 15. Intrabilayer Particle (IBP) Formation by Addition of Neutral Lipid (NL) to Phosphatidylcholine (PC) Bilayer

NL is of the B type in Fig. 6.

Fig. 16. Hydrophilic-Lipophilic Balance of Lipid and Structure of Lipid Molecular Assembly

Fig. 17. Mixed Micelle of PC and Cholate

一方, bilayer に親水性の高い脂質や蛋白を添加すると, そのバランスは親水性に傾き, 水中にミセル状構造が出現する. これからは, この PC 含有ミセル形成について述べる.

5-1. PC-Cholate によるミセル形成 胆汁酸塩, cholate は親水性の高い脂質で, その親水性-親油性バランス (HLB) は 20—25 である.¹⁸⁾ PC の HLB は 7—9 であり 2 分子膜を形成する. PC 2 分子膜に cholate を添加すると, Fig. 17 に見られるような円板状の混合ミセルを形成する. この板状ミセルの研究は国際的にも広く行われている. 筆者等もこの混合ミセルについて, 分光学的プローブを用い, ミクロな極性や粘性の検討を行った. この結果, 混合ミセル中で cholate 近傍に存在する PC 分子は 2 分子膜中に存在するより分子運動が抑制されていることが明らかとなった.¹⁹⁾

Fig. 17 に示した円板状ミセルと類似の構造は血漿中のアポリポ蛋白, apo A-1 や apo E と PC の混合物でも形成される.¹²⁾ このとき, アポリポ蛋白は PC 2 分子膜を親水性側にバランスを傾ける作用を持っている.

5-2. PC と apo A-1 による HDL 形成 Fig. 18a に示すように, PC-TG により形成される emulsion 粒子 (平均粒径 35 nm) に apo A-1 を添加すると, ミセル様の再構成 HDL (r-HDL) が形成される (Fig. 18b, 平均粒径 9 nm).²⁰⁾ このようなミセル形成の機構は種々に論じられているが完全には明らかにされてはいなかった.

Fig. 18. Electron Microscopic Picture of Emulsion Particles

(a) PC:TO=3:2 (mol/mol), average diameter=35 nm. (b) PC:TO:apo A-1=3:2:0.1 (mol/mol/mol), average diameter=9 nm.

筆者らは、TG/saline 界面で PC と apo A-1 による混合単分子膜や cholesterol (CH) と apo A-1 の混合単分子膜を研究した。この結果、apo A-1 と PC の間には強い横方向の引力が作用していることが判明した。この引力の強さは水素結合相互作用のそれにも匹敵した。一方、apo A-1 と CH の間には、ほとんど引力が作用しないことも分かった (第 33 回日本脂質生化学研究集会要旨, 京都 1991)。

これらの結果より、PC と apo A-1 によるミセル状の超微粒子、HDL 形成について考察する。Fig. 19 に示すように、粒子表面の PC と apo A-1 は強

Fig. 19. Schematic Structure of HDL₂

く結合している。apo A-1 は再構成された状態でも水溶液中に溶けた状態でも、60—70% の α -helix 構造を含有する。²⁰⁾ この α -helix は図示されるように、親水性アミノ酸残基と親油性アミノ酸残基が、それぞれ、helix 軸の反対の側に集まる両親媒性 helix である。 α -Helix は 12—15 ケのアミノ酸により形成され、apo A-1 分子中に 6—7 本存在する。これら両親媒性 helix は親水性に強く傾いている。したがって、PC と強く相互作用し、PC の HLB を増大させて親水基が外に向って凸に出た表面を形成する。これにより超微小粒子化する。さて、CH の HDL 中での存在状態も、種々に論じられているが、本研究の結果より、表面の PC 分子間に存在することが予想される。apo A-1 に PC が直接結合する確率が CH のそれより数十倍も高い。CH 含量を増すと、成分間の相互作用が弱まり、HDL 粒子は崩壊する可能性がある。実際、PC に CH が一定量以上含有されると、HDL 粒子が崩壊したり形成されなかったりする。²¹⁾

この apo A-1 と PC や CH の相互作用は、単に HDL のようなミセル形成に重要であるばかりでなく、血漿中のリポ蛋白の異化過程全体にとっても大きな影響をもっている。Fig. 20 の CM は、血漿中で内部の TG が消化されていく間に全身の細胞や LDL より CH を受け取り表面に蓄積する。この結果、表面に結合していた apo A-1 や apo C は脱着して HDL 形成に利用される。¹⁾ 表面の apolipoprotein の変化により、TG 消化は停

Fig. 20. Schematic Representation of Lipoprotein Catabolism in Animal Plasma

止し、CMやVLDLはremnantやLDL化する。一方、TG消化により、過剰のPC monolayerは崩壊してbilayer化する。このbilayerが速やかにapo A-1などの作用によりミセル化(HDL化)しないと、再び、CHが蓄積しapo A-1などが結合しにくくなる。この結果、CH richなPL liposome粒子が異常リポ蛋白LP-Xとして血中に蓄積される。^{2a)} PCのみで形成されるliposomesに比べ、CHを多く含有するliposomesは血中で長く残存するのはこの理由による。^{2c)}

このアポリポ蛋白と脂質の相互作用の研究をさらに拡大することにより、血漿中のリポ蛋白粒子の異化、さらに人工的に調製される脂質粒子(リポ製剤)の体内動態の制御に関する検討を展開したいと考えている。

Fig. 1に示されるように、リン脂質の体内での最も一般的な分子集合状態は2分子膜bilayerであろう。しかし、これに種々の中性脂質や蛋白などが相互作用することにより、emulsionや H_{II} 構造を形成したり、monolayerを拡張したりする。このように動物体内では種々の脂質分子集合体が動的平衡を保っており、それにより広範な生命活動に関与している。薬学的に応用されるリポ製剤も、このような脂質の動的平衡のネットワークに投与されることを理解する必要がある。

6. 脂質分子集合体のマイクロな環境

6-1. ミクロな極性 ミセルやliposomesの内部や表面のミクロ誘電率あるいはミクロ極性という言葉がしばしば用いられている。ふつう、これらは種々の分光学的方法により測定され、微視的な分子間相互作用に基づく測定量と考えることができる。一方、誘電率は巨視的な物理量であり、これによって分子間相互作用を一義的に論じるには困難がある。²²⁾

筆者らは、ミセルやliposomes(2分子膜)の表面極性を評価するため、R. W. Taftらの一般化された極性パラメーター(generalized polar parameter, π)と一般化されたプロトン供与性パラメーター(generalized proton donor parameter, α)を用いた。²³⁾ Table IIに示されるmethylenesblue(MB)はミセルやliposomeの表面電位に従い表面に結合する色素である。²⁴⁾ また、MBの吸収スペクトルの溶媒依存性は、それぞれの溶媒の π と α により決まることを示した。^{24,25)} 他の色素と異なり、 π と α に対する吸収極大波長(λ)の変化は、互に反対方向である。Table IIに示す各溶媒の π と α に応じ、ほぼ実測値に近い λ の値が計算される。ミセルやliposome表面に結合したMBの λ は662—663 nmである。この値を、直接的に水中の値664 nmと比較すると、脂質分子集合体表面のミクロ誘電率は75程度と水溶液中に近いくらい高くなってしまふ。²⁵⁾

一方、両イオン性プローブ、2,6-diphenyl-4-(2,4,6-triphenyl-1-pyridino)-phenoxide(DTPP)や陽イオン性プ

ローブ, pyridinium iodide (PI) はミセルや liposome の表面の研究によく用いられている。²⁶⁾ これらのプローブの吸収極大波長の溶媒の π と α による依存性は Taft らにより詳しく研究されている。そこで, ミセルや liposome 表面の DTPP と MB の λ の測定値を用い, π と α を連立方程式より算出した。この結果, 脂質分子集合体表面では, π は 1.1—0.9, α は 0.65—0.4 となった。脂質分子集合体表面には極性基が密に充填されており, 双分子間相互作用や双分子—分極相互作用を示す π の値は水中と同程度であることが分かった。²⁶⁾ 水素イオン供与性 α の方は水中の約半分であり, ミセルや liposome 表面は polar and less protic な環境といえる。メタノールなどのアルコール中は less polar and protic で異なることも理解された。メタノールと水の混合溶媒を基準にして, ミセルや liposomes の MB 結合部位周辺の誘電率を評価すると, 75 程度の異常な値をもたらす。また, この π と α の値をその他の分光学的プローブに代入し, ほぼ実験値と一致するミセルや liposome 表面のスペクトルを得た。²⁶⁾

誘電率を用いると, しばしば, 混乱を招くマイクロ極性も π と α により合理的に説明できる。また, ミセルと liposome 表面では α の値に差があり, ミセル表面がより protic である。^{25,27)} これらの結果は, 脂質分子集合体表面構造や, そこでの反応性を解明するうえで重要である。²⁸⁾

6-2. ミクロな粘性 ミセルや liposomes でのミクロな粘性という言葉もしばしば用いられている。分光学的に得られる測定値を, 本来は巨視的な物理量である粘性として評価するには困難がある。また, 脂質分子集合体内での運動の異方性を理論的に simulation し, 分光学的実測値との一致をみる方法も任意性が皆無とはいえない。

筆者らは, 3,3'-dialkyl-2,2'-carbothiacyamine の励起状態の安定性が分子内ねじれ運動の強さに依存することを示した。また, この運動は結合している 2 本のアルキル鎖を経由してプローブ周辺の流動性に応答することも示した。²⁹⁾ 励起状態の安定性は蛍光量子収率や光増感電子移動反応に影響する。したがって, ミセルや liposomes の流動性と反応性は相関する。⁸⁰⁾ Liposomes はミセルに比べても流動性が低く, 蛍光量子収率は高い。²⁹⁾

しかし, ミクロ粘性の評価は, 用いたプローブ, 分光学的方法に依存するので, 巨視的粘性のように一義的に考えるには問題が残る点も指摘した。²⁹⁾

π や α を用いた脂質分子集合体の研究はまだ, 限られた範囲でしかなされていない。糖脂質 (α が大きいと予想される) や蛋白をも含有した脂質分子集合体について詳細に測定し, 集合体形成機構や安定性について研究を進展させたい。

謝辞 本研究を遂行するにあたり温かい御指導, 御鞭撻を賜りました京都大学薬学部教授 宮嶋孝一郎先生, また, 学生時代より界面化学の研究法を御指導いただきました京都大学名誉教授 中垣正幸先生に心より御礼申し上げます。本研究は京都大学薬学部薬品物理化学教室並びに岐阜薬科大学製剤学教室 (川島嘉明教授) の多くの皆様の熱心な御協力により行われたものであり感謝の意を表します。

引用文献

- 1) a) A. M. Gotto, Jr., H. J. Pownall, R. J. Havel, *Methods Enzymol.*, **128**, 3 (1986); b) D. Atkinson, D. M. Small, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **15**, 403 (1986); c) J. C. Fruchart, J. Shepherd, "Human Plasma Lipoproteins," ed. by W. de Gruyter, Berlin, 1989.

TABLE II. Generalized Polarity (π) and Generalized Proton Donor (α) Parameters in Various Solvents, Micelles and Liposomes

MB
$\lambda = 17.0\pi - 5.0\alpha + 650$ (nm)	
H_2O ($\epsilon=79$) $\pi=1.09$ $\alpha=1.13$ $\lambda=664$ nm	$n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ ($\epsilon=1.7$) $\pi=0$ $\alpha=0$ $\lambda=649$ nm
CH_3OH ($\epsilon=33$) $\pi=0.60$ $\alpha=0.98$ $\lambda=653$ nm	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ($\epsilon=47$) $\pi=1.00$ $\alpha=0$ $\lambda=669$ nm
Micelles, liposomes $\lambda=662\text{--}663$ nm $\rightarrow \pi=1.1\text{--}0.9$ $\rightarrow \alpha=0.65\text{--}0.4$	

Wave-length of absorption maximum of methyleneblue (MB) is represented as a function of α and π .

- 2) a) J. B. Brainard, E. H. Cordes, A. M. Gotto, Jr., J. R. Patsch, J. D. Morrisett, *Biochemistry*, **19**, 4273 (1980); b) K. J. Williams, V. P. Werth, J. A. Wolff, *Prospec. Biol. Med.*, **27**, 417 (1984); c) S. H. Untracht, *Biochim. Biophys. Acta*, **711**, 176 (1982).
- 3) 例えば, a) P. R. Cullis, B. De Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 399 (1979); b) S. Das, R. P. Rand, *Biochemistry*, **25**, 2282 (1986); c) K. Nakajima, H. Utsumi, M. Kazama, A. Hamada, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1 (1990).
- 4) T. Handa, C. Ichihashi, M. Nakagaki, *Prog. Colloid. Polymer Sci.*, **71**, 26 (1985).
- 5) M. Nakagaki, T. Handa, M. Kajiyama, *Yakugaku Zasshi*, **95**, 367 (1975); J. Egberts, H. Sloot, A. Mazure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1002**, 109 (1989).
- 6) a) T. Handa, M. Nakagaki, *Colloid Polymer Sci.*, **257**, 374 (1979); b) T. Handa, M. Nakagaki, *Adv. Colloid Interface Sci.*, in press (1991).
- 7) M. Nakagaki, N. Funasaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **47**, 2482 (1974).
- 8) J. M. Smaby, H. L. Brockman, *J. Biol. Chem.*, **262**, 8206 (1987).
- 9) a) T. Handa, K. Tomita, M. Nakagaki, *Colloid Polymer Sci.*, **265**, 250 (1987); b) M. Nakagaki, K. Tomita, T. Handa, *Biochemistry*, **24**, 4619 (1985).
- 10) M. Nakagaki, T. Handa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 880 (1976).
- 11) T. Handa, M. Nakagaki, *Yakugaku Zasshi*, **96**, 912 (1976).
- 12) T. Handa, H. Saito, K. Miyajima, *Biochemistry*, **29**, 2884 (1990).
- 13) P. K. Hansrain, S. S. Davis, M. J. Groves, *J. Parent. Sci. Tech.*, **37**, 145 (1983); M. Badr, D. R. Kodali, T. G. Redgrave, *J. Colloid Interface Sci.*, **113**, 414 (1986).
- 14) K. W. Miller, D. M. Small, *J. Biol. Chem.*, **258**, 13772 (1983); R. J. Deckelbaum, J. A. Hamilton, A. Moser, G. B-Olivecrona, E. Butbul, Y. A. Carpentier, A. Gutman, T. Olivecrona, *Biochemistry*, **29**, 1136 (1990).
- 15) T. Handa, Y. Asai, K. Miyajima, Y. Kawashima, M. Kayano, K. Ida, T. Ikeuchi, *J. Colloid Interface Sci.*, **143**, 205 (1991).
- 16) 第 43 回コロイド及び界面化学討論会要旨 3G03, 松山, 1990 年 10 月.
- 17) 中垣正幸, “膜物理化学,” 喜多見書房, 1987.
- 18) H. Kunieda, K. Ohyama, *J. Colloid Interface Sci.*, **136**, 432 (1990).
- 19) K. Matsuzaki, T. Yokoyama, H. Komatsu, T. Handa, K. Miyajima, *Biochim. Biophys. Acta*, **980**, 371 (1989).
- 20) T. Handa, H. Komatsu, A. Kakee, K. Miyajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2079 (1990).
- 21) S. Lund-Katz, M. C. Phillips, *Biochemistry*, **23**, 1130 (1984).
- 22) P. Mukerjee, C. Ramachandran, R. A. Pyter, *J. Phys. Chem.*, **86**, 3189, 3198 (1982).
- 23) M. J. Kamlet, J. L. Abboud, R. W. Taft, *Prog. Phys. Org. Chem.*, **13**, 485 (1981).
- 24) T. Handa, C. Ichihashi, I. Yamamoto, M. Nakagaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 2548 (1983); M. Nakagaki, I. Katho, T. Handa, *Biochemistry*, **20**, 2208 (1981).
- 25) T. Handa, M. Nakagaki, K. Miyajima, *J. Colloid Interface Sci.*, **137**, 253 (1990).
- 26) K. A. Zachariasse, N. Van Phuc, B. Kozankiewicz, *J. Phys. Chem.*, **85**, 2676 (1981); P. Mukerjee, A. Ray, *ibid.*, **70**, 2144 (1968).
- 27) T. Handa, K. Matsuzaki, M. Nakagaki, *J. Colloid Interface Sci.*, **116**, 50 (1987).
- 28) T. Handa, M. Sakai, M. Nakagaki, *J. Phys. Chem.*, **90**, 3377 (1986); *idem*, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4241 (1984); T. Handa, H. Takeuchi, H. Takagi, S. Toriyama, H. Komatsu, M. Nakagaki, *Colloid Polymer Sci.*, **266**, 745 (1988).
- 29) T. Handa, H. Komatsu, K. Matsuzaki, M. Nakagaki, *Chem. Soc. Japan*, **1984**, 8; T. Handa, H. Komatsu, M. Nakagaki, *Prog. Colloid. Polymer Sci.*, **68**, 33 (1983).
- 30) M. Nakagaki, H. Komatsu, T. Handa, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4486 (1986); *idem*, *Arch. Biochim. Biophys.*, **249**, 388 (1986).