

# ヒアルロン酸で表面を修飾したリポソームからの 内容物の温度による放出制御

東京理科大学薬学部  
牧野 公 子

We prepared liposomes containing 5,6-CF, the surface of which was coated with carboxymethyl cellulose or hyaluronic acid. Above the phase transition temperature of the lipids composing the liposomes, almost 100% of 5,6-CF was released from the liposomes within 30mins, although little release of 5,6-CF was observed at and below the phase transition temperature. Surface charge density of the liposomes was changed by the adsorption of hyaluronic acid or carboxymethyl cellulose on liposome surface. Also, we measured the zeta potential values of DMPC, DPPC or DSPC liposomes at various temperatures. Neutral liposomes were found to exhibit non-zero zeta potentials in an external electric field even when dispersed in solution at pH7.4. A model for the orientation of lipid head groups was proposed to explain the observed non-zero zeta potentials. The dependence of the zeta potential on temperature and ionic strength was analyzed via this model to obtain the information on the direction of the lipid head groups in the liposome surface region. The direction of the lipid head group was found to be sensitive to the temperature and the ionic strength of the medium. At low ionic strengths, the phosphatidyl groups locate at the outer portion of the head group region. With increasing ionic strength, the choline groups move outward to the outer region of the bilayer surface. At constant temperature, as the ionic strength decreases, the choline group approaches the surface while the phosphatidyl group hides behind the surface. At the phase transition temperature of the lipid, the phosphatidyl group lies in the outer-most region of the surface and the choline group is in the inner-most region.

## 要 旨

カルボキシメチルセルロースまたはヒアルロン酸を表面に吸着させたリポソームに5,6-CFを内包して種々の温度において5,6-CFの放出挙動を検討した。このリポソームはそれを構成するリン脂質の相転移温度付近以下の温度ではほとんど5,6-CFを放出しないが、相転移温度以上では30分以内に放出量はその最終値のほぼ100%に達した。この時、表面に多糖類を持たないリポソームと表面にカルボキシメチルセルロースまたはヒアルロン酸を吸着させたリポソームからの5,6-CF放出

量を比較すると、ヒアルロン酸の表面への吸着によってリポソームからの5,6-CF放出が抑制されることが明らかになった。次に、リポソームのゼータ電位を測定した結果、カルボキシメチルセルロースまたはヒアルロン酸が表面に吸着することによって表面電荷密度が変化するという結果を得た。さらに我々はこのリポソームからの温度に依存した内容物の放出挙動を知るために、リン脂質の動きの温度依存性に注目して種々の温度におけるゼータ電位の値からリポソームのリン脂質の頭部の運動性を見積った。その結果、リン脂質の相転移温度付近でリン脂質の頭部は最も広がった

Temperature-controlled release from hyaluronic acid-coated liposomes.

Kimiko Makino

形を取りうると考察された。

## 1. 緒言

リポソームからの内容物の放出制御は薬物放出あるいは化粧品へのリポソームの配合に関連して多くの研究者によって検討されてきた。その1つはリポソームの安定性の制御の問題であり、我々の研究室において多糖類でリポソーム表面を被覆することによってリポソームの安定性を増すという結果を得た。即ち、リン脂質リポソームを界面活性剤を含む溶液中に再分散すると、界面活性剤によってリポソームからの内容物放出は促進されるが、表面をカルボキシメチルキチン、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸(ヒアルロン酸は刺激性が低く、保湿性が高いことから医薬品、化粧品の原料として注目されている。)で被覆するとリポソームからの内容物放出は抑制される。一方、温度に依存したリポソームからの内容物の放出制御の点に関して、1980年代にリポソームの内容物(例えば5,6-CFのような蛍光物質)の放出速度がリポソームの相転移温度付近で急に大きくなるかあるいは最大値を示すことが報告されている。我々はこの結果はリポソームの構造が温度に依存して変化することを示唆すると考え、このリポソームの構造を制御することによってリポソームの内容物の放出制御が可能になると推察した。

本研究は、リポソームリン脂質の頭部および炭素鎖の運動性が温度によって受ける影響を知り、さらにこのリポソーム表面に吸着しているカルボキシメチルセルロースとヒアルロン酸の吸着量とこれらの多糖類の構造とリポソーム全体の構造の温度依存性を検討して、これらの多糖類がリポソームを補強する機構と内容物の放出機構を解明することを目的としている。

## 2. 実験

### 2.1 リポソームの調製

水または5,6-CF水溶液を内包し、ジミリストイルフォスファチジルコリン(DMPC)または、ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)または、ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC)を構成成分とするリポソームを調製した。

DMPC, DPPC, DSPCをクロロホルムに溶解し、この溶液に各リン脂質の相転移温度の10度下の温度において蒸留水または5,6-CF水溶液を乳化分散してW/Oエマルジョンを調製した後、リン酸緩衝液中(pH7.4, イオン強度0.154)にこのエマルジョンを加え、10分間攪拌し、さらにリン酸緩衝液を加えて3時間攪拌してクロロホルムを蒸散させた。調製されたリポソームを遠心機上で3回リン酸緩衝液で洗浄してサンプルとした。

調製中にカルボキシメチルセルロース(CMC)溶液またはヒアルロン酸(HA)溶液を加えることによって表面にこれらの多糖類を吸着したDMPC, DPPC, DSPCリポソームを調製した。

### 2.2 5,6-CFの放出速度の測定

5,6-CFを含むヒアルロン酸またはカルボキシメチルセルロースで表面を被覆したリポソームをpH7.4のリン酸緩衝液中に分散後、リポソームを構成しているリン脂質の相転移温度の前後5, 10度と相転移温度において振盪し、経時的にサンプリングして10000rpmで遠心して上澄の蛍光強度を測定した。対照として10mM SLSを含有するリン酸緩衝液中に分散して相転移温度において3時間振盪したリポソームの上澄の5,6-CF濃度を100%とした。

2.3 DMPCリポソーム, DPPCリポソーム, DSPCリポソーム, CMC-DMPCリポソーム, CMC-DPPCリポソーム, CMC-DSPCリポソーム, HA-DMPCリポソーム, HA-DPPC

リポソーム、HA-DSPCリポソームを調製し、種々のイオン強度のリン酸緩衝液中にリポソームを再分散し、種々の温度においてゼータ電位を測定した。測定にはPEN KEM System 3000を用いた。ゼータ電位の値から表面電荷密度の温度依存性を評価した。

## 2.4 リポソーム表面に吸着したCMCとHAの量の測定

DMPCリポソーム、DPPCリポソーム、DSPCリポソームをCMC水溶液とHA水溶液中に分散し、種々の温度における吸着量を分散液中に残ったCMC濃度とHA濃度を液体クロマトグラフィーを用いて評価した。

## 結果

### 1. 経時的な5,6-CFの放出

経時的な5,6-CFの放出率を次式によって求めた。

$$\text{放出率(\%)} = \frac{H_t - H_0}{H_{100\%} - H_0} * 100$$

$H_t$  : 時間tにおけるサンプルの蛍光強度

$H_0$  : 時間0におけるサンプルの蛍光強度

$H_{100\%}$  : SLSで処理したサンプルの蛍光強度

図1に示すようにDSPCリポソームからの5,6-CFの放出率は45度と50度では低いが、55度以上では30分以内にはほぼ100%に達している。ヒアルロン酸で表面を被覆することによって5,6-CFの放出率は45度と50度において低下した。カルボキシメチルセルロースによる被覆は5,6-CFの放出率に影響を与えない。このような5,6-CFの放出率の温度依存性はDSPCリポソームの相転移温度が55度付近にあることと対応している。他のDPPC、DMPCリポソームおよび、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸で表面を被覆したDPPC、DMPCリポソームからの5,6-CFの放出に関しても同様の傾向が見られた。

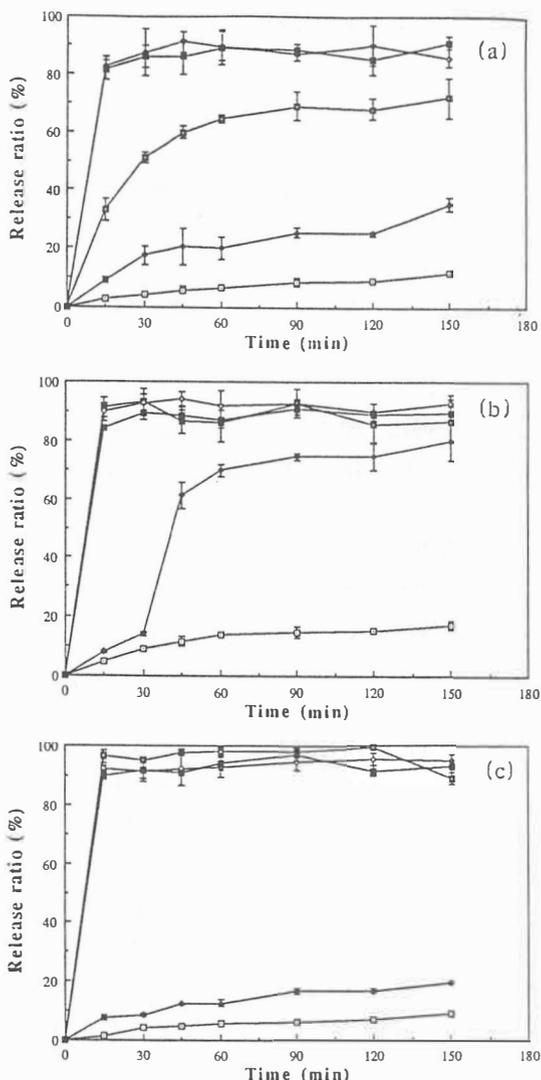


Fig. 15,6-CF leakage from DSPC liposomes (a), from DSPC liposomes coated with carboxymethyl cellulose(b), and from DSPC liposomes coated with hyaluronic acid(c) at various temperatures:(□)45°C, (◆)50°C, (□)55°C, (◇)60°C, (■)65°C

### 2. リポソーム脂質の頭部構造の温度、イオン強度依存性

DMPC、DPPC、DSPCで調製したリポソームはこれらのリン脂質が電気的に中性であるにもかかわらず、pH7.4のリン酸緩衝液中で0でないゼータ電位を示した。また、このゼータ電位の値はイオン強度と温度を変えると変化した。こ

のように中性リン脂質リポソームの表面の電荷分布は温度とイオン強度に依存する。リポソーム表面の脂質頭部の向きが温度とイオン強度に依存して変化すると考え、この現象を説明するモデルを提出した。

図2に示すように DSPC リポソームのゼータ電位はイオン強度と温度に依存して変化した。イオン強度が低いときにはより大きな負の値を示すがイオン強度の増加に伴いゼータ電位の絶対値は減少して、あるイオン強度で0を通り、それ以上高いイオン強度の溶液中では電位が反転して正の値を示した。また、温度に関しては50度で最も低い値を示した。DMPC, DPPCのゼータ電位に関しても同様のイオン強度および温度依存の傾向が示された。

この実験に用いた脂質が電氣的に中性であるにもかかわらず、0でないゼータ電位を示し、かつその値がイオン強度の増加に伴って反転したことを説明するために、我々は、図3に示すような2枚の電荷層を持つモデルを作った。このモデルではゼータ電位のイオン強度および温度依存性をリポソーム表面のリン脂質頭部の構造変化として説明した。フォスファチジル基の負電荷からコリン基の正電荷に向かう電気双極子がイオン強度に依存して変化すると考察した。個々のリン脂質分子については、双極子の長さを $l$ とし、膜面に垂直な

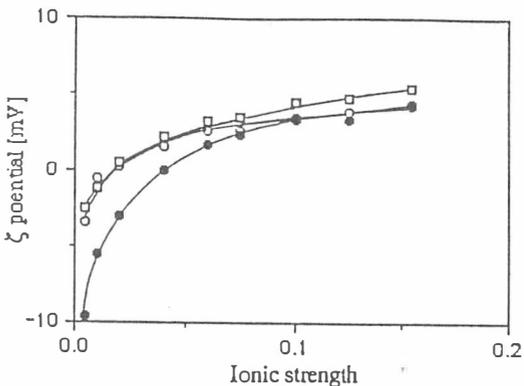


Fig. 2 Ionic strength dependence of the zeta potential of DSPC liposomes at several temperatures: (○)45°C, (●)50°C, (□)55°C

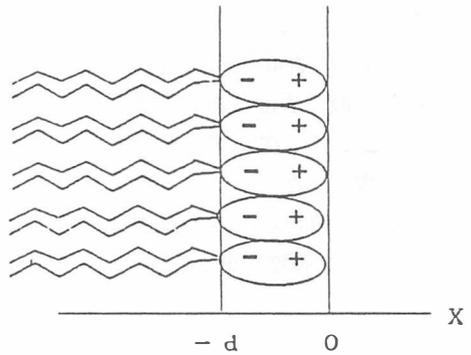


Fig. 3 Schematic representation of the head group region.

方向へのこの双極子の写影を $d$ 、リポソームの表面における脂質1個当たりの表面積を $S$ とする(図4)リポソーム表面に対する頭部の傾きは $d$ で表される。ここで $-l < d < +l$ であり、頭部がフォスファチジル基の負電荷が最も表面にありコリン

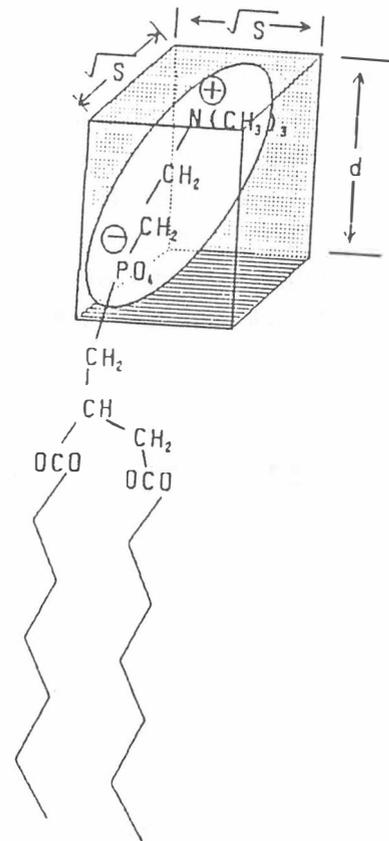


Fig. 4 Lipid head group region.

基の正電荷が最も内側にあるとき  $d = -l$ 、フォスファチジル基の負電荷が最も内側に入りコリン基の正電荷が最も表面にあるときに  $d = +l$  となる(図5)。ここで、次式で与えられるパラメーター  $d/\sqrt{S}$  を導入した。

ゼータ電位の値から  $d/\sqrt{S}$  を見積り、図6を得た。図6より、イオン強度が低いとき、フォスファチ

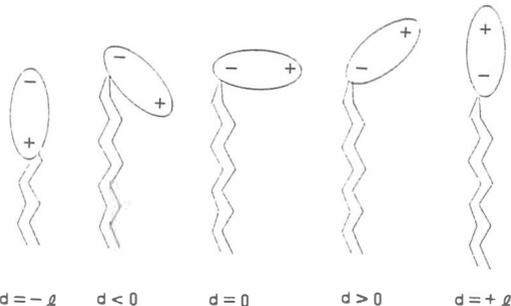


Fig. 5 Model for the conformation of lipid head groups.

ジル基が頭部の外側に位置し、イオン強度が高くなるとコリン基がリポソーム外側に位置する傾向が見られた。一定の温度において、イオン強度が増加すると、コリン基が表面に位置し、フォスファチジル基が内側を向くと推定した。リン脂質の相転移温度付近の他の温度における状態に比べて、フォスファチジル基が外側にコリン基が内側にあると考えられる。

また、カルボキシメチルセルロース、ヒアルコ

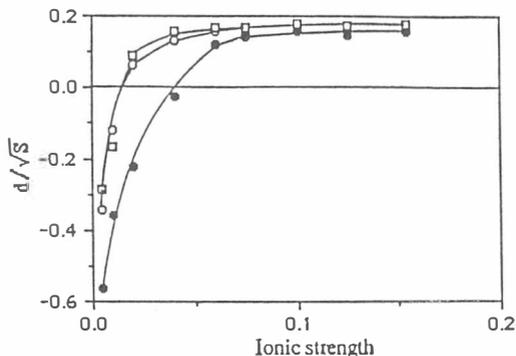


Fig. 6 Ionic strength dependence of  $d/S$  of DSPC liposomes at several temperatures: (○)45°C, (●)50°C, (□)55°C

ン酸で表面を被覆することによって、どの温度においてもリポソームのゼータ電位の絶対値は減少した。

3. リポソーム表面へのカルボキシメチルセルロースおよびヒアルロン酸の吸着量は現在検討中である。

以上の結果は以下の学会で報告し、かつ学術誌に発表した。

“Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes.” K. Makino, H. Ohshima and T. Kondo, 7th International Conference on Surface and Colloid Science, July 7-13, '91 Compiègne, France.

“リポソーム脂質の頭部構造-温度 イオン強度依存性” 牧野公子, 山田 武, 木村真理子, 岡隆史, 大島広行, 近藤 保, 第44回コロイドおよび界面化学討論会 9月27日-29日 埼玉大学

“Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data.” K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, T. Oka, H. Ohshima and T. Kondo, Biophys. Chem., 41(1991)175-183.