

脂質-高分子界面活性剤混合系による新規分散系 “液晶エマルジョン”の形成

京都大学大学院 薬学研究科

中 野 実

Aqueous dispersions of lyotropic liquid crystalline phases were prepared by high-pressure emulsification using lipid mixtures, monoolein (MO) and oleic acid (OA), and emulsifier Pluronic F127 with changing their composition. The size and internal structure of the prepared particles were characterized by dynamic light scattering and small-angle X-ray scattering, respectively. In MO/F127/buffer system with 8 wt % F127 to MO, particles with a diameter of ca.180 nm and including bicontinuous cubic phases (cubosomes) were formed. The lipid ratios strongly affected the morphology of the internal structure of the particles. By increasing the weight fraction of OA in the lipid mixtures, the internal structure transformed in the order of bicontinuous cubic-inverted hexagonal-inverted cubic.

^{13}C NMR experiments with paramagnetic shift reagent showed that the signal of carbonyl carbon of oleic-1- ^{13}C acid mixed in the cubosomes readily shifted to a lower magnetic field by addition of europium ion (Eu^{3+}), indicating high accessibility of the ion into the water channel inside the particles.

The cubosomes were stable in buffer, but collapsed in the presence of serum albumin or plasma. Gel filtration experiments revealed that albumin has the ability to extract MO from cubosomes and subsequently disintegrate the particles.

1. 緒 言

脂質分子の多くは水中で自己会合し、ラメラ、逆ヘキサゴナル、逆キュービックなどの多様な集合構造（リオトロピック液晶）を形成する。両連続キュービック、逆ヘキサゴナル液晶などの非ラメラ液晶構造は、生体内で過渡的、部分的に形成され、蛋白質の活性を制御すると考えられており、この構造の特徴と機能についての物理化学的あるいは生化学的関心が持たれている¹⁻³⁾。特に、脂質 monoolein (MO) は、両連続キュービック液晶相を形成する典型的な脂質であり^{4, 5)}、非ラメラ構造研究に多く用いられている。これらの非ラメラ相は水和により形成されるわけであるが、疎水的な相であり、過剰な水の存在下では水相とは相分離して存在する。

一般の疎水性液体（油）を界面活性剤によって水中に乳化できるのと同様に、この水に不溶な液晶相も分散安定化できれば、粒子内部に液晶構造を有する脂質ナノパーティクル（液晶エマルジョン）が得られると考えられる。これはエマルジョン（液体分散系）やサスペンション（固体分散系）、あるいはリボソームなどとは異なる特性を有した、新規微粒子分散系となることが期待される。しかしながら、このような分散微粒子の調製は困難であるとされてきた。それは、微粒子の分散安定化に寄与する界面活性剤が、

同時に液晶構造を壊してしまうためであった。しかし、高分子の界面活性剤はこれらの構造に対する相溶性が低いため、このような微粒子の調製に有効であると考えられる。そこで、本研究では、高分子乳化剤 Pluronic が液晶相との相溶性が低いこと、及び、液晶相の分散微粒化剤として有効であることを実証し、得られた微粒子の構造、機能性を評価した^{6, 7)}。

2. 実 験

2.1 微粒子の調製

脂質 monoolein (MO)、oleic acid (OA) の混合物に対し 8 wt% の Pluronic F127 を混合後、脂質濃度が 10 g/L となるようにリン酸緩衝液 (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH7) を加え約 80℃ で水和した。Vortex ミキサーやホモジナイザーを用いて試料を粗分散させた後、高圧乳化機 (Nanomizer, 吉田機械興業) により 35 MPa、60℃、30 min の条件で分散微粒化を行った。得られた微粒子の粒径は動的光散乱 (DLS) (Photal LPA-3000/3100、大塚電子) により測定した。

2.2 X線小角散乱 (SAXS)

分散後に限外濾過により濃縮した試料、および、分散させていない水和試料を測定用ガラスキャピラリーに封入し測定した。測定はX線小角散乱装置（理学電機）を用い、出力 200kV-50mA、波長 1.54 Å、カメラ長 505 mm の条件で行った。回折パターンから非分散試料が形成する液晶相、および、分散微粒子の内部構造を同定した。

2.3 ^{13}C NMR

カルボニル炭素を ^{13}C 標識した OA (^{13}C -OA) を、MO



Formation of the Novel Dispersion System
“Liquid Crystalline Emulsion” with Lipid-
Polymer Surfactant Mixtures

Minoru Nakano

Graduate School of Pharmaceutical
Sciences, Kyoto University

に対し 5 % 混合して微粒子を調製し、濃縮後 ^{13}C NMR 測定 (Varian Gemini 300) を行った。常磁性シフト試薬 EuCl_3 添加前後における標識炭素のケミカルシフトの変化を観察し微粒子内部へのイオン透過性を評価した。

2.4 ゲル濾過クロマトグラフィ

調製微粒子をウシ血清アルブミン (BSA) あるいはラット血漿と 30min インキュベーション後、アガロースゲルカラムにより微粒子画分とタンパク画分とに分離し、それぞれのタンパク量、脂質濃度を酵素法により定量した。

3. 結果

3.1 非分散試料の液晶相形成

MO/OA/F127/buffer 混合非分散試料 (lipids/buffer = 10g/L, F127/lipids = 0 および 8wt%) は、液晶相の形成を示す明瞭な SAXS パターンを与えた。Figure 1 に MO:OA がそれぞれ 10:0、5:5、0:10 における SAXS プロファイルを示す。10:0 では、F127 が存在しない場合、6 次までの回折 ((110), (111), (200), (211), (220), (221/300)) が観察され、 $Pn3m$ 型の両連続キュービック相が形成されていることが判明した。8% F127 の存在下では (110), (200), (211), (310), (222), (321) の回折より $Im3m$ 型の両連続キュービック相であることが判明した。一方、5:5 においては、F127 の有無によらず同一の回折パターン ((10), (11), (20)) が得られ、逆ヘキサゴナル (H_{II}) 相の形成が確認された。また、0:10 においても、回折パターンは F127 によって変化せず、(111), (220), (311), (222), (400), (331) の回折ピークから、 $Fd3m$ 型の逆ミセルキュービック相が形成されていることが判明した。

3.2 液晶相を有する分散微粒子の調製

高圧乳化法により微粒子の調製を行い、その粒径と内部構造をそれぞれ DLS、SAXS により評価した。F127 を全脂質の 8wt% とし、脂質混合比 (MO:OA) を変えて微粒子を調製した。その結果、粒径は OA の割合の増加により、いったん減少し、その後増加するという傾向を示した (Figure 2)。このようにして調製した微粒子の SAXS プロファイルを Figure 3 に示す。OA の無い場合 (MO:OA = 10:0)、両連続キュービック液晶相を有する微粒子、キューボソームの形成が明らかになった。この際、 $Pn3m$ の明瞭な第 1, 第 2 ピークと、より小角側に $Im3m$ の第 1 ピークが出現し、2 種類の両連続キュービック構造の共存が示唆された。9:1 から 6:4 においては、不明瞭ながら $Im3m$ の回折ピークが観察された。この範囲においては、OA の増加によりピークが小角側に移動する傾向が見られた。5:5 から 2:8 においては H_{II} 構造を示唆する回折パターンが得られ、逆ヘキサゴナル液晶相を有する微粒子、ヘキサソームの形成が明らかになった。1:9 および

0:10 では、 $Fd3m$ の回折パターンが得られ、逆ミセルキュービック相を内部に有する微粒子の形成が確認できた。 H_{II} および $Fd3m$ 構造の組成範囲では、OA の増加によりピークが広角側に移動した。またこの範囲においては F127 濃度を増加させると粒子径は減少したが、回折パターンは変化せず、内部構造が F127 濃度によって変化していないことが判明した。

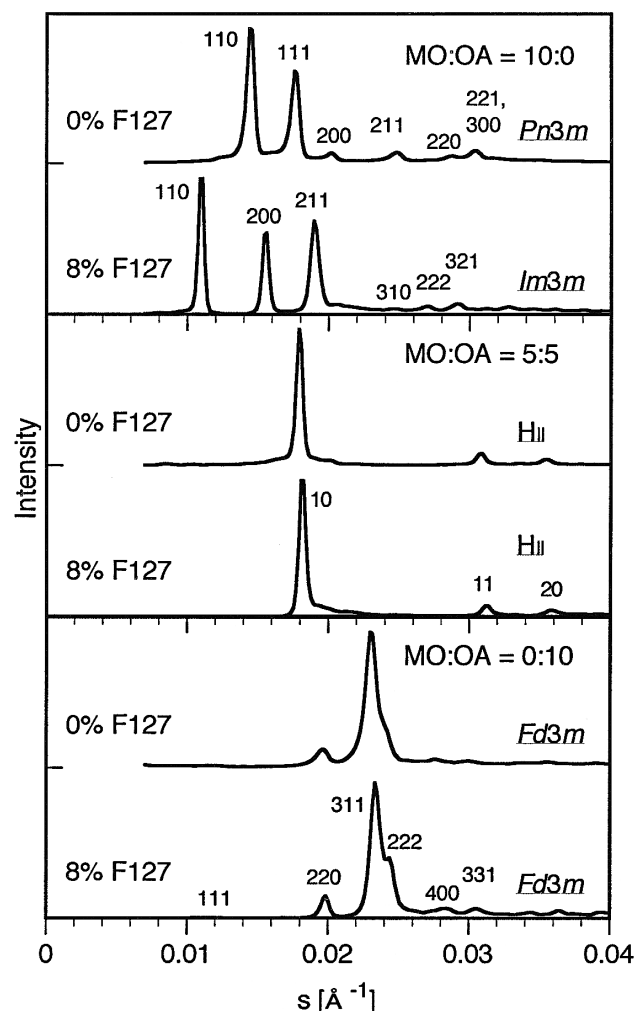


Figure 1 SAXS profiles of nondispersed MO/OA mixtures in phosphate buffered saline with different weight ratios in the presence and absence of F127.

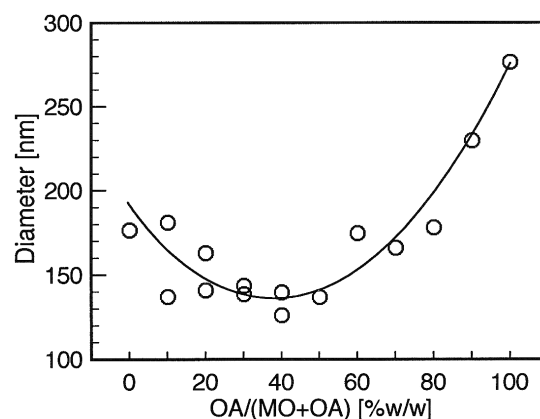


Figure 2 Mean diameter of particles prepared in MO/OA/F127/buffer system with 8% F127 and different MO/OA ratios.

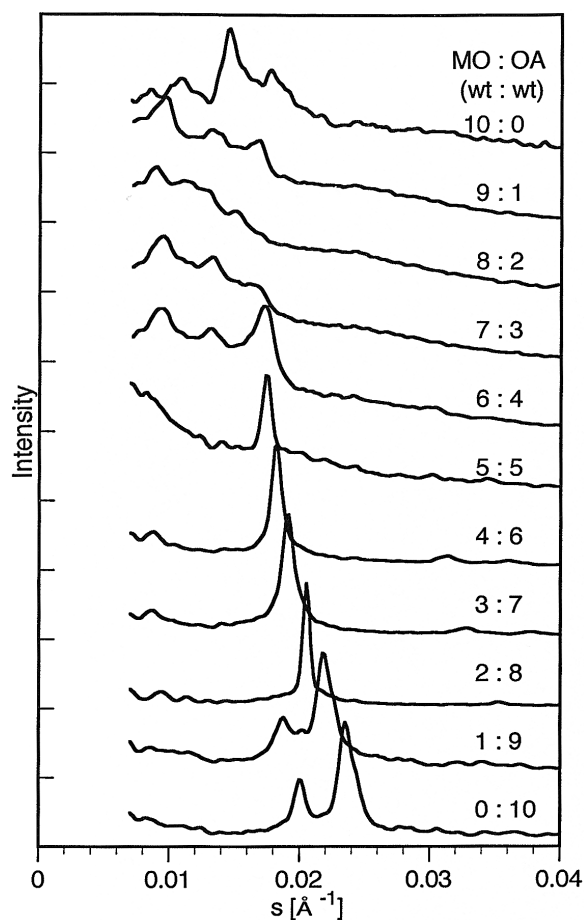


Figure 3 SAXS profiles of MO/OA/F127/ buffer dispersed system with 8% F127 and different MO/OA ratios.

3.3 キュボソーム内部へのイオン透過性

^{13}C -OA を 5% 含むキュボソームを調製し、濃縮後 ^{13}C NMR 測定を行った。低磁場領域に 2 本のピーク (176, 179ppm) が観察され、それぞれ MO、OA カルボニル炭素と帰属された (Figure 4 下)。このうち、カチオンと相互作用しう OA カルボニルの方に注目すると、シフト試薬である Eu^{3+} 添加後、ピークは速やかに低磁場シフトし、元の位置にはシグナルが観察されなかったことから、微粒子内部の全ての OA が外部から添加された Eu^{3+} の影響を受けたことが判明した (Figure 4 中、上)。OA は微粒子内部に分布していることから、イオンは微粒子内部に容易に浸入できることが明らかになった。

3.4 キュボソームと血清アルブミン及び血漿との相互作用

キュボソームを BSA あるいはラット血漿と 30min インキュベーション後、ゲル濾過クロマトグラフィにより微粒子画分とタンパク画分とに分離した。その結果、微粒子画分における MO 濃度の低下、およびタンパク画分の MO 濃度の上昇が観察され、逆に、微粒子画分にはアルブミンは検出されなかった。このことから、キュボソーム中の

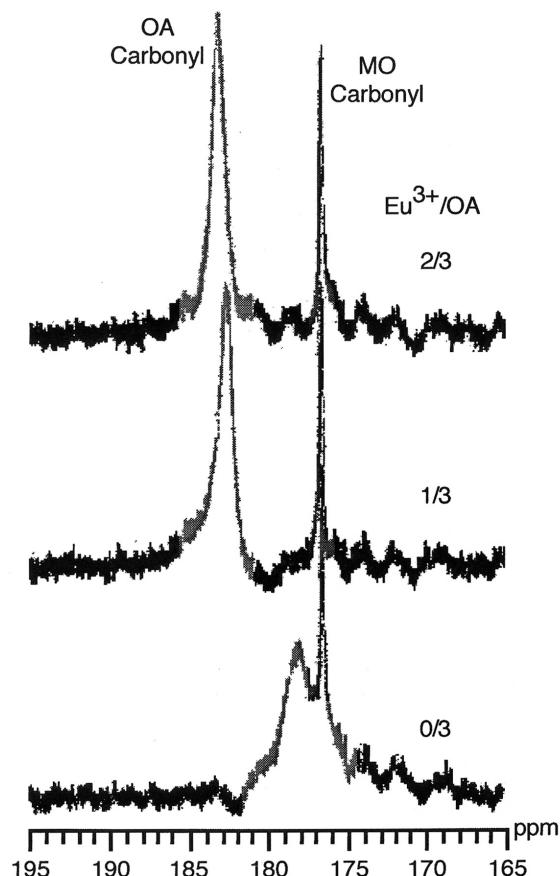


Figure 4 ^{13}C NMR spectra of MO/ ^{13}C -OA/F127/buffer dispersed system with 8% F127 and 5% ^{13}C -OA before and after addition of shift reagent (Eu^{3+}).

MO がアルブミンによって引き抜かれることが判明した。また、血漿とのインキュベーションによって MO は引き抜きに続いて加水分解を受けることも判明した。

4. 考 察

4.1 非分散試料の液晶相形成と Pluronic F127 の効果

脂質は水中で疎水性相互作用によって会合し、種々の液晶相を形成する。その会合様式は分子の持つ親水、疎水基の大きさのバランスによって決まる。例えば、レシチンは曲率の無いラメラ相を形成するが、MO はやや負の自発曲率を有し、両連続キュービック液晶相を形成する。両連続キュービック相は水相、脂質相それぞれが連続相である立方晶であり、脂質二分子膜によって隔てられた水のチューブが規則正しく三次元的に繋がった構造をしている。3 種類の両連続キュービック相 Q^{224} (Figure 5 (a))、 Q^{229} (Figure 5 (b))、 Q^{230} が知られており、それぞれ $Pn3m$ 、 $Im3m$ 、 $Ia3d$ の回折パターンを与える²⁾。OA は MO と同じアシル鎖を有するが親水基が小さいため、膜に負の曲率を誘起する⁸⁾。従って、MO に OA を添加すると両連続キュービックから、逆ヘキサゴナル、逆ミセルキュービックへと相が転移する (Figure 1)。Figure 5 にはこれらの相

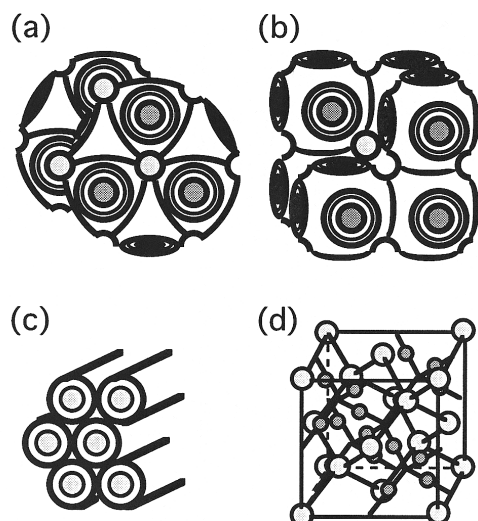


Figure 5 Schematic representation of nonlamellar liquid crystalline phases. (a) Bicontinuous cubic phase of $Pn3m$, (b) $Im3m$, (c) inverted hexagonal phase, and (d) inverted micellar cubic phase of $Fd3m$.

の模式図を示した。逆ミセルキュービック相は両連続キュービック相とは異なり、不連続 (discrete) 型のキュービック相であり、大小2種類の球状逆ミセルが配列し面心立方晶を形成していると考えられている⁹⁻¹¹⁾。脂質の種類や混合組成を変えることで膜の曲率を変化させ、これらの非ラメラ相を形成させることが出来る。

F127の添加により、両連続キュービック相の場合のみ相変化が生じた。これらのことから、F127は $Pn3m$ 相に対しては混合して $Im3m$ 相へと変化させるが、 H_{II} 相および $Fd3m$ 相に対してはほとんど相互作用しないことが明らかとなった。このことはこれらの液晶相の分散を行う上で重要な知見を与える。水に溶解しないこれらの液晶相を分散させるためには、用いる分散剤 (乳化剤) として、比較的親水性の高い界面活性剤が要求される。しかしそれらは高い正の自発曲率を持っているため、液晶相とよく混ざり合うならば膜の曲率を大きく変化させてしまう。低分子の界面活性剤ではその傾向が強いに対し、高分子界面活性剤では脂質との相溶性が低い¹²⁾ため、分散剤として有効であると考えられる。実際に、F127は、 H_{II} 相および $Fd3m$ 相に対する相溶性は非常に低く、また $Pn3m$ 相に対してはある程度の相溶性はあるものの別の両連続キュービック構造 ($Im3m$) を保っているため、分散に用いることが出来ると結論づけられた。

4.2 液晶相を有する分散微粒子の調製

F127を用いて高压乳化法を行った結果、MO/OA混合物が形成する液晶相を保持した微粒子 (液晶エマルジョン) が得られることが判明した。OAの割合の増加により、微粒子内部の構造が、両連続キュービック (キューボソーム)

から、 H_{II} (ヘキサソーム)、そして $Fd3m$ へと変化した。これは、OAが膜に負の曲率を与えるためである。しかし、OAが低濃度 (脂質の40%以下) においては、OAの増加によりピークが小角側に移動する傾向が見られた。これは、低濃度においてはOAの解離度が高く、膜に正の曲率を与えるためと考えられる。この範囲における、OAの増加による粒径の減少も、OAの解離によって親水性が高まるためと解釈できる。逆に、OAが高濃度であれば疎水性が増加し、粒径は増加する (Figure 2)。

OAが高濃度 (脂質の50%以上) においては、F127濃度によって微粒子の内部構造は変化しなかった。これは上述のように、F127は H_{II} 相および $Fd3m$ 相に対する相溶性が非常に低いために、微粒子の分散安定性のみに寄与し、内部構造に影響を与えないことを表している。

4.3 キューボソーム内部へのイオン透過性

リン脂質リポソームの場合、イオンの膜透過性は非常に低いことが知られており、このことは ^{31}P NMRにおいてシフト試薬の添加によってピークのスプリットが観察されることから確認できる。これは、リポソーム外葉のリン脂質のみがカチオンであるシフト試薬と相互作用しケミカルシフトの変化が生じるのに対し、内葉のリン脂質はシフト試薬の影響を受けないためである¹³⁻¹⁵⁾。

キューボソームにも同様の手法を適用し、イオンの粒子内部への透過性を評価した。この際、微粒子の構成脂質であるMOは電荷を持たず、シフト試薬によるケミカルシフトの変化が起こらないので、5%の ^{13}C -OAを導入し、OAカルボニルピークの変化を観察した。その結果、ピークは完全にシフトしたことから、シフト試薬が容易に粒子内部に浸透したことが判明した。イオンは微粒子表面のF127の層を透過した後、内部キュービック相の水のチャンネルを自由に移動するものと考えられる。このことから、水溶性物質を微粒子に封入するのは困難であることが示唆された。

4.4 キューボソームと血清アルブミン及び血漿との相互作用

微粒子のDDSへの応用を考える上で、血漿タンパク質との相互作用を明らかにする必要がある。その中でも血清アルブミンはMOやOAと結合することが知られており^{16, 17)}、この微粒子の代謝挙動を左右する可能性がある。実際、微粒子中のMOは血清アルブミンや血漿により速やかに微粒子外へ引き抜かれることがゲル濾過クロマトグラフィーにより明らかとなった。このことはこの微粒子が血中において急速に崩壊することを示しており、微粒子からの薬物のsustained releaseを想定するとこの特性は不利であると考えられる。しかしながら、調製、保存時には安定でありながら、血中投与後速やかに薬物が放出されるという

メカニズムは、場合によっては一つの投与形態として有効であると考えられる。

今後、キューボソーム、ヘキサソームの液晶担持微粒子としての特性を最大限に生かすためには、血漿タンパク質による構成脂質の引き抜きという微粒子崩壊メカニズムを回避させなければならない。そのためには、微粒子の構成脂質を変える必要がある。脂肪酸やモノグリセリドはアルブミンに対して高い親和性を有するが、二本鎖の脂質は結合しないので、ジグリセリドやリン脂質などを加えることでこの崩壊メカニズムを軽減あるいは回避できると考えられる。液晶構造を維持したまま脂質組成をどこまで変化させられるかがこれからの課題である。

5. 総 括

高分子界面活性剤を用いることで、液晶エマルションの調製、すなわち液晶構造を維持したまま安定に分散微粒子化することが可能となった。微粒子の薬物キャリアとしての性能を考えると、水溶性物質に関してはその保持は困難であることが示唆されたが、疎水性あるいは膜結合性のある物質は、微粒子内部の広大な脂質-水界面を利用してトラップすることができると考えられる。血中での微粒子の早い崩壊挙動を改善すれば、液晶としての性質を生かした新規 DDS の構築が可能であると考えられる。

References

- 1) Mariani P, Luzzati V, Delacroix H: Cubic phases of lipid-containing systems, *J. Mol. Biol.*, 204, 165-189, 1988.
- 2) Lindblom G, Rilfors L: Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids - possible biological relevance, *Biochim. Biophys. Acta*, 988, 221-256, 1989.
- 3) Seddon JM: Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, 1031, 1-69, 1990.
- 4) Hyde ST, Andersson S, Ericsson B et al.: A cubic structure consisting of a lipid bilayer forming an infinite periodic minimum surface of the gyroid type in the glyceromonooleate-water system, *Z. Kristallogr.*, 168, 213-219, 1984.
- 5) Qiu H, Caffrey M: The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects, *Biomaterials*, 21, 223-234, 2000.
- 6) Nakano M, Sugita A, Matsuoka H et al.: Small-angle X-ray scattering and ¹³C NMR investigation on the internal structure of "cubosomes", *Langmuir*, 17, 3917-3922, 2001.
- 7) Nakano M, Teshigawara T, Sugita A et al.: Dispersions of liquid crystalline phases of the monoolein/oleic acid/Pluronic F127 system, *Langmuir*, 18, in press, 2002.
- 8) Borne J, Nylander T, Khan A: Phase Behavior and Aggregate Formation for the Aqueous Monoolein System Mixed with Sodium Oleate and Oleic Acid, *Langmuir*, 17, 7742-7751, 2001.
- 9) Luzzati V, Vargas R, Gulik A et al.: Lipid polymorphism: a correction. The structure of the cubic phase of extinction symbol Fd $\bar{3}$ consists of two types of disjointed reverse micelles embedded in a three-dimensional hydrocarbon matrix, *Biochemistry*, 31, 279-285, 1992.
- 10) Luzzati V, Vargas R, Mariani P et al.: Cubic phases of lipid-containing systems. Elements of a theory and biological connotations, *J. Mol. Biol.*, 229, 540-551, 1993.
- 11) Cribier S, Gulik A, Fellmann P: Cubic phases of lipid-containing systems. A translational diffusion study by fluorescence recovery after photobleaching, *J. Mol. Biol.* 229, 517-525, 1993.
- 12) Kunieda H, Uddin MH, Furukawa, H et al.: Phase behavior of a mixture of poly (oxyethylene) -Poly (dimethylsiloxane) copolymer and nonionic surfactant in water, *Macromolecules*, 34, 9093-9099, 2001.
- 13) Barsukov LI, Victorov AV, Vasilenko IA et al.: Investigation of the inside-outside distribution, intermembrane exchange and transbilayer movement of phospholipids in sonicated vesicles by shift reagent NMR, *Biochim. Biophys. Acta.*, 598, 153-168, 1980.
- 14) Ivanov NN, Rykov SV, Isakova OL et al.: Estimation of liposome integrity by ¹H-NMR spectroscopy, *Anal. Biochem.*, 147, 280-284, 1985.
- 15) Saito H, Nishiwaki K, Handa T et al.: Comparative study of fluorescence anisotropy in surface monolayers of emulsions and bilayers of vesicles, *Langmuir*, 11, 3742-3747, 1995.
- 16) Hamilton JA, Era S, Bhamidipati SP et al.: Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2051-2054, 1991.
- 17) Thumser AEA, Buckland AG, Wilton DC, Monoacylglycerol binding to human serum albumin: Evidence that monooleoylglycerol binds at the dansylsarcosine site, *J. Lipid Res.*, 39, 1033-1038, 1998.