

抗酸化物質から成る Cubosome の開発 およびマイクロ・メソ・マクロ特性の評価

大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻化学工学領域

菅 恵嗣

Cubosomal self-assemblies, composed of monoolein (MO) and fatty acid, were prepared by the pH titration method. The assemblies including 25–50 mol% of MO showed gel-like high viscosity at pH 5.0. Various kind of self-assemblies were systematically characterized by Raman spectroscopy and fluorescent probe analyses. The membrane property of cubosomal assembly was highly packed and less hydrated state. As application, cubosomal self-assembly could be prepared using functional lipids, e.g. linoleic acid (anti-oxidant), polymerizable lipid (precursor of polydiacethylene).

1. 緒言

脂肪酸は、生体内で脂肪組織を形成し栄養源として活用されている。また、脂肪酸の両親媒性構造は、脂質膜の骨格を形成するのに適しており、生体膜や始原細胞系をモデル化するための研究として注目されている¹⁾。一般的には、オレイン酸のような脂肪酸は水にとけませんが、pH滴定等の所定の手順によって分子集合体を形成し水中に分散可能となる²⁾。このような脂質分子集合体は、薬剤分子や栄養素の輸送担体としての活用が期待されている³⁾。目的物質が水溶性分子の場合、ベシクル(あるいはリポソーム)をキャリアとして活用できるが、脂溶性分子の輸送においては、疎水場体積に限りがあり、担持できる物質の容量に限界がある。ベシクル同様に2分子膜構造を有し、かつ膨大な疎水場を形成する自己組織系として、共連続相を有するCubic相が報告されており、物質輸送や物質分離への応用が期待されている^{4, 5)}。一方、Cubic相やCubosomeの「膜」に着目した研究例は少なく、物理化学的な膜特性に関する知見は乏しい。

本研究では、脂肪酸を基本骨格とする膜材料の開発を目的とし、Cubosomeの調製手法ならびに評価手法の開発を行った。不飽和脂肪酸であるオレイン酸やリノール酸は、分子自体が酸化されやすいため、radical補足剤として働く。即ち、高濃度で不飽和脂肪酸を担持させた膜材料には抗酸化能力があり、なおかつ物質輸送に活用できると期待される。これまでに脂質Cubic相やCubosomeの膜に着目した研究例は少なく、基礎的な集合体の物性を俯瞰的に解析するための方法論について検討した⁶⁾。

2. 方法

2.1. Cubosome調製

超純水にオレイン酸(OA)、リノール酸(LiA)、重合脂肪酸(10,12-Tricosadiynoic acid (TCDA))およびモノオレイン(MO)を添加し(総脂質濃度:100mM、OA/MO=(1/1))、40℃で24時間攪拌した。1M NaOHで鹼化した後、HClを用いてpHを調整した。

2.2. 脂質膜パッキング密度の解析

共焦点ラマン顕微鏡を用いて、各pHにおける脂質分子集合体のラマンスペクトルを測定した。CH₂対称伸縮振動に由来するピーク(2850cm⁻¹)およびCH₂非対称伸縮振動に由来するピーク(2890cm⁻¹)を測定し、脂質分子のパッキング密度 $R (=I_{2890}/I_{2850})$ ⁷⁾を解析した。

2.3. 膜界面の極性環境解析

蛍光プローブLaurdanは周囲の水分子との相互作用により蛍光特性が変化する⁸⁾。10μLの脂質分子集合体(総脂質濃度100mM)を純水で希釈し、10μLのLaurdan溶液(1mM (inEtOH))を1mLのサンプルに添加した。暗所で5分間静置した後、励起波長は $\lambda_{ex}=340$ nm、400–600nmの波長範囲において蛍光スペクトルを測定した。さらに、Laurdanの蛍光スペクトルをPeakfit (Systat Software Inc., CA, USA)を用いて2つのスペクトルにデコンボリューションした。1つは無秩序相(500nm付近のピーク、親水性環境、A₁)に局在するLaurdanに由来し、もう1つは秩序相(450nm付近のピーク、疎水性環境、A₂)に局在するLaurdanに由来する。ピーク面積から、次式により膜界面の親水性を算出した。

$$\Phi_m = A_1 / (A_1 + A_2)$$

3. 結果および考察

3.1. OA/MO集合体の相挙動

OA/MO集合体についてpH滴定を行い、相挙動を解析



Micro-, Meso-, and Macro-scope
Characterization of Cubosomal Self-
Assemblies Composed of Antioxidants

Keishi Suga

Division of Chemical Engineering,
Graduate School of Engineering
Science, Osaka University

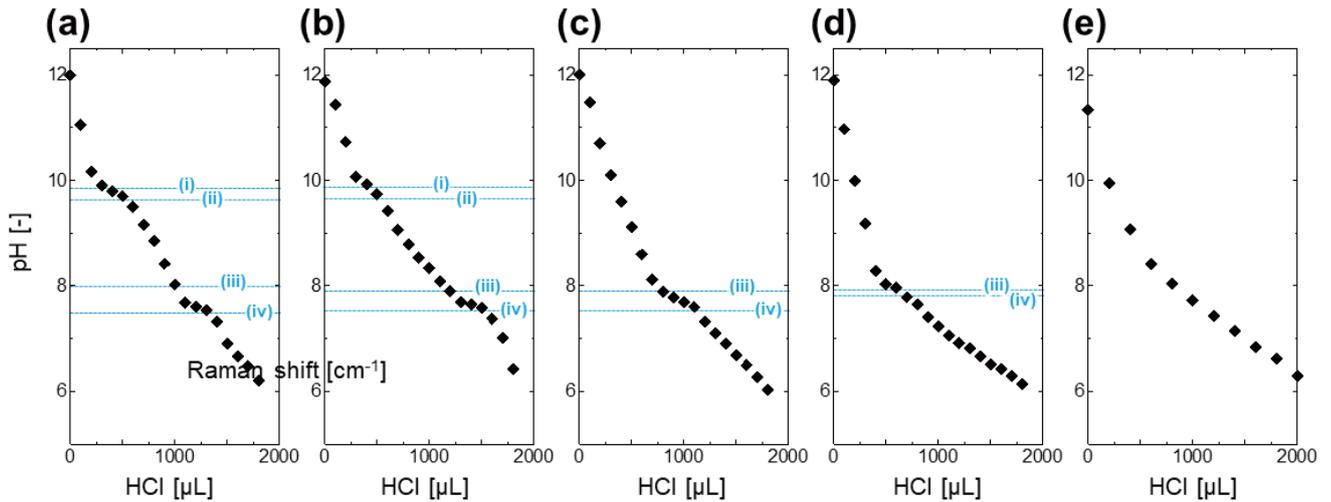


Figure 1 OA/MO 分散液の pH 滴定曲線。(a) [OA+Oleate]、(b) [OA+Oleate]/MO= (3/1)、(c) [OA+Oleate]/MO= (1/1)、(d) [OA+Oleate]/MO= (1/3)、(e) MO のみ。(i)、(ii)、(iii) および (iv) は、滴定曲線の変曲点を示す。

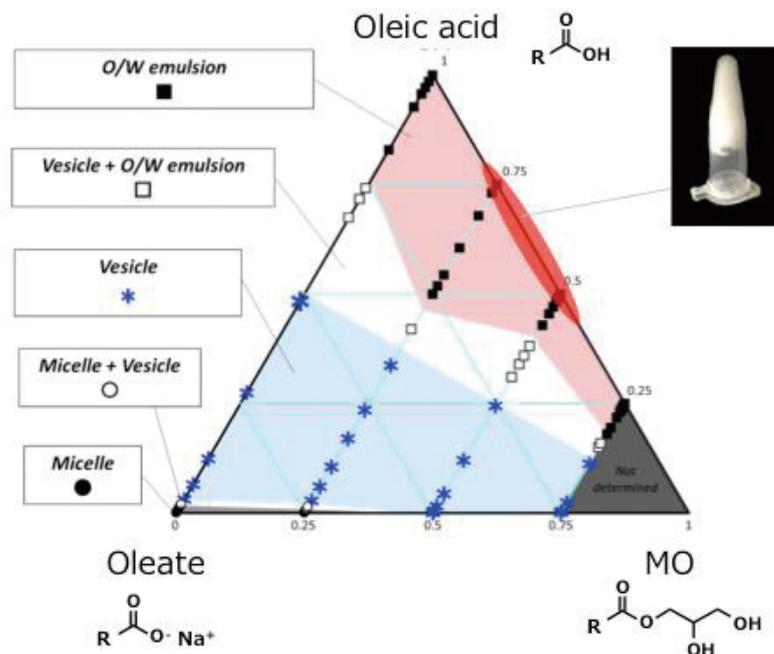


Figure 2 OA/Oleate/MO 自己集合系の相図

した (Figure 1)。pH 滴定曲線における変曲点近傍では集合体の相転移が起こる。MO 25 mol% では 4 つの変曲点が観察され、pH に応じてミセル⇌ベシクル⇌O/W エマルジョンへと相転移したと考えられる。一方、MO 50 mol% および 75 mol% ではベシクル⇌エマルジョンの変曲点のみが観察された。MO の headgroup は小さく、集合体においてコーン型分子と同様の役割を果たすと考えられる。

ここで、オレイン酸 (OA、R-COOH) は $\text{pH} > \text{pK}_a$ にお

いて電離した状態 (Oleate、R-COO⁻) である。従って、集合体の相挙動は OA/Oleate/MO のモル比によって記述できる (Figure 2)。ここでは、ミセル、ベシクル、O/W エマルジョンの 3 状態を示している。[OA+Oleate]/MO = (1/1)、pH 5.0 の条件下で、ゲル状集合体の形成が確認された。O/W emulsion 領域内に存在するが、懸濁液の粘性に大きな差がみられた。この粘性の増加は、cubic 相の形成を示唆している⁹⁾。

3.2. 分子集合体の物理化学的特性評価

脂質膜の物理化学的特性として、i) ラマン分光解析に基づく脂質膜パッキング密度、ii) 蛍光プローブLaurdanを用いた膜極性を検討した。ラマン分光解析では、炭化水素鎖(2800-3000 cm^{-1})由来のピーク強度より脂質膜のパッキング密度を評価可能である。ゲル状集合体([OA+Oleate]/MO=1:1、pH5.0)において、顕著なパッキング密度の増大が観察された($R>1$) (Figure 3)。リポソーム2分子膜

においては、ゲル相(solid-ordered相)において $R>1$ となる⁷⁾。従って、ゲル状分子集合体においては、脂質分子が秩序高く密にパッキングされた状態であるといえる。また、蛍光プローブLaurdanスペクトル解析により、膜内部の親水性度 Φ_m について評価した (Figure 4)。ベシクルやミセルでは親水的な膜特性を示した($\Phi_m>0.5$)一方、ゲル状集合体やCubic相の場合、比較的疎水的な膜界面を有することがわかった($\Phi_m<0.5$)。

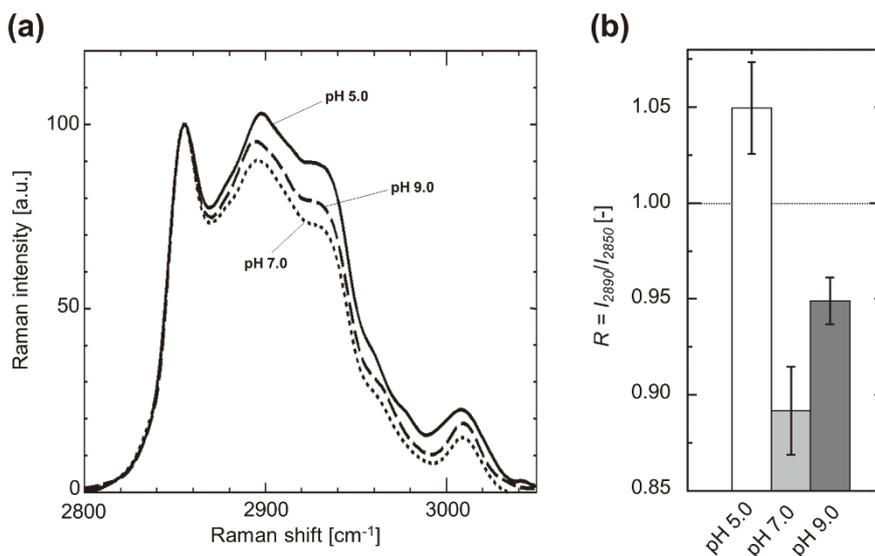


Figure 3 (a) [OA+Oleate] /MO= (1/1) 分子集合体のラマンスペクトル。破線：pH9.0 (vesicle)、点線：pH7.0 (vesicle)、太線：pH5.0 (gel)。 (b) R 値の pH 依存性。

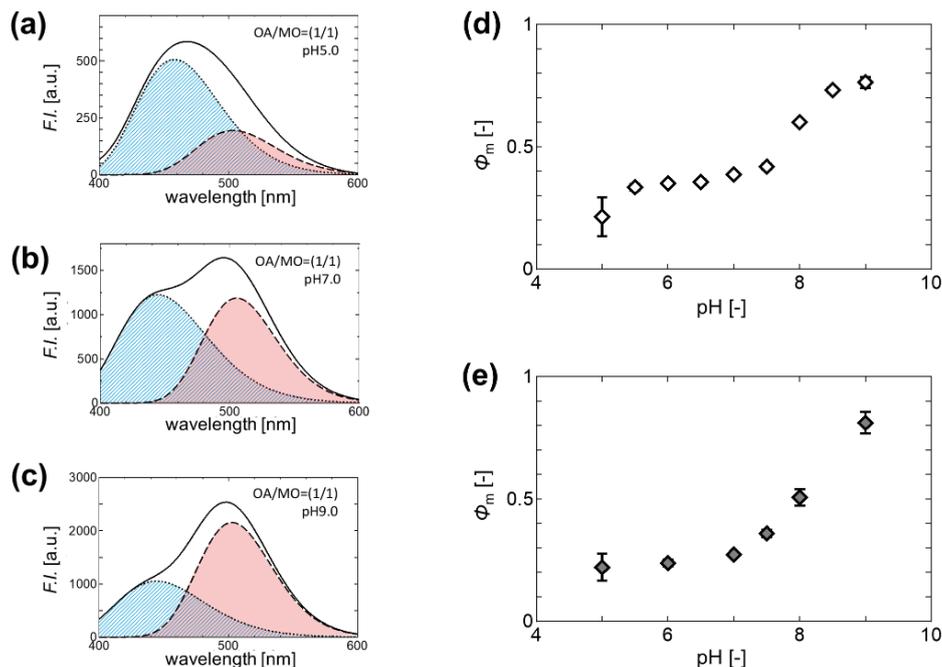


Figure 4 [OA+Oleate] /MO 分子集合体の Laurdan スペクトル(a-c) ならびに親水性度 Φ_m (d: [OA+Oleate]、e: [OA+Oleate] /MO= (1/1))。

3.3. 俯瞰的な膜特性解析に基づく分子集合体の評価

上述のとおり、分子集合体の相転移に伴い膜特性 (R 、 Φ_m)は変化する。特に、 $R > 1$ かつ $\Phi_m < 0.5$ を満たす集合体は粘性が高くゲル状である。既報の知見と合わせると、ゲル状集合体は Cubosome (Cubic 相) と考えられ、その膜特性は水溶液中に形成される 3 次元ネットワーク構造を反映している。ここでは、既報に基づき構成する脂質が異なる Cubosome を調製し^{10, 11)}、各種の分子集合体について、俯瞰的に R 値および Φ_m 値を比較した (Figure 5)。興味深いことに、一般的に認知されている Cubosome 集合体はいずれも $R > 1$ かつ $\Phi_m < 0.5$ を満たすことがわかった。従来では Cubic 相構造を評価する方法は Cryo-TEM 観察あるいは X 線散乱解析に限定されていた。本研究の知見より、脂質膜の物理化学的な特性に基づき Cubic 相形成を観察できる可能性が示された。

3.4. 不飽和脂質および重合脂質を導入した Cubosome の調製

MO 分子は Cubic 相形成において重要な役割を担う。所定量の脂肪酸 (オレイン酸 (OA)、ラウリン酸 (LaA)、リノール酸 (LiA)) と混合し pH を調製することで戦略的に Cubosome を調製できることがわかった (Figure 6)。特に、リノール酸は複数の C=C 結合を有する多価不飽和脂肪酸であり、食品や化粧品分野でも活用できる抗酸化物質として期待されている。従来では、リノール酸は油状または乳液状で製品化される場合が多かったが、Cubosome を調製することでゲル状物質 (Figure 6, Entry 12, 13) として取り扱うことが可能となる。

一方、Cubosome ゲルは温度および pH 変化により簡単に sol 化するため、bulk 材料として活用するためには機械的特性の改善が課題となる。そこで重合脂質 TCDA を

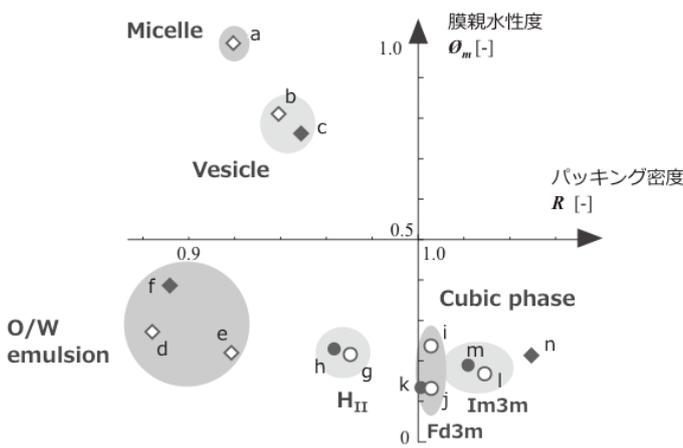


Figure 5 分子集合体の俯瞰的な膜特性解析。

- a) [OA+Oleate], pH11.0、
 - b) [OA+Oleate], pH7.0、
 - c) [OA+Oleate] /MO=1/1, pH7.0、
 - d) [OA+Oleate], pH5.0、
 - e) [OA+Oleate], pH7.0、
 - f) [OA+Oleate] /MO=1/1, pH7.0、
 - g) [OA+Oleate] MO=1/1, pH6.6, 500mM+stabilizer¹⁰⁾、
 - h) [OA+Oleate] /MO=1/1, pH7.0, 270mM+stabilizer¹¹⁾、
 - i) [OA+Oleate] /MO=4/1, pH6.5, 340mM+stabilizer¹⁰⁾、
 - j) [OA+Oleate] /MO=1/1, pH5.5, 500mM+stabilizer¹⁰⁾、
 - k) [OA+Oleate] /MO=9/1, pH7.0, 270mM+stabilizer¹¹⁾、
 - l) [OA+Oleate] /MO=1/9, pH7.5, 273mM+stabilizer¹⁰⁾、
 - m) [OA+Oleate] /MO=1/9, pH7.0, 270mM+stabilizer¹¹⁾、
 - n) [OA+Oleate] /MO=1/1, pH5.0。
- これら集合体のうち i, j, k, l, m, n は Cubic 相である。

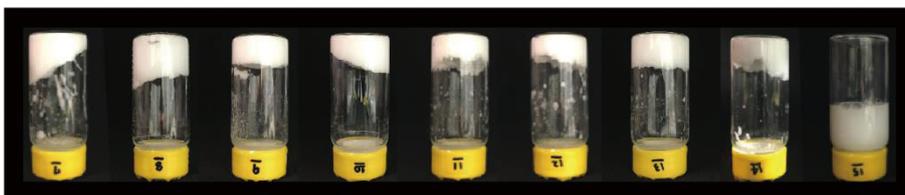
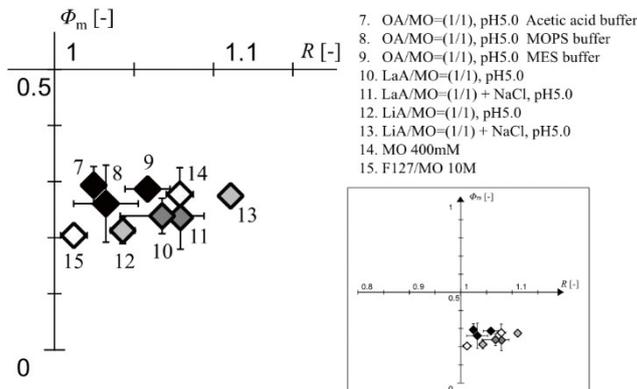


Figure 6 各種の脂質から成る Cubosome の膜特性 (Top) および写真 (Bottom)⁶⁾。

修飾し、集合体内部に化学架橋を導入することでゲル安定性を向上させることができる (Figure 7)。UV照射により形成されるポリジアセチレンは、刺激応答性材料としてセンサー等へ応用が可能であり、本研究で開発したCubosome調製手法は各種の機能性脂質を担持できる材料設計戦略としても期待される。

4. 総括

本研究では、モノオレイン (MO) と各種脂肪酸を混合した分子集合体の調製手法について検討し、戦略的にCubic相 (Cubosome) を設計できる可能性を示した。ラマン分光

法ならびに蛍光プローブ (Laurdan) 法に基づき、集合体の“ソフトな”膜特性を体系的に評価することで、メソスケールの脂質膜特性と集合体の相挙動の相関を明らかにした (Figure 8)。Cubosome集合体は、水溶性物質・脂溶性物質の双方を輸送できる担体として期待される。ゲル状集合体はbulk材料としても活用できる。用途に合わせて物質性状を設計することにより、Cubosome集合体が医療、食品、化粧品各分野へと応用されることを願う。

謝辞

本研究の遂行にあたりご尽力いただきました大塚葉子氏

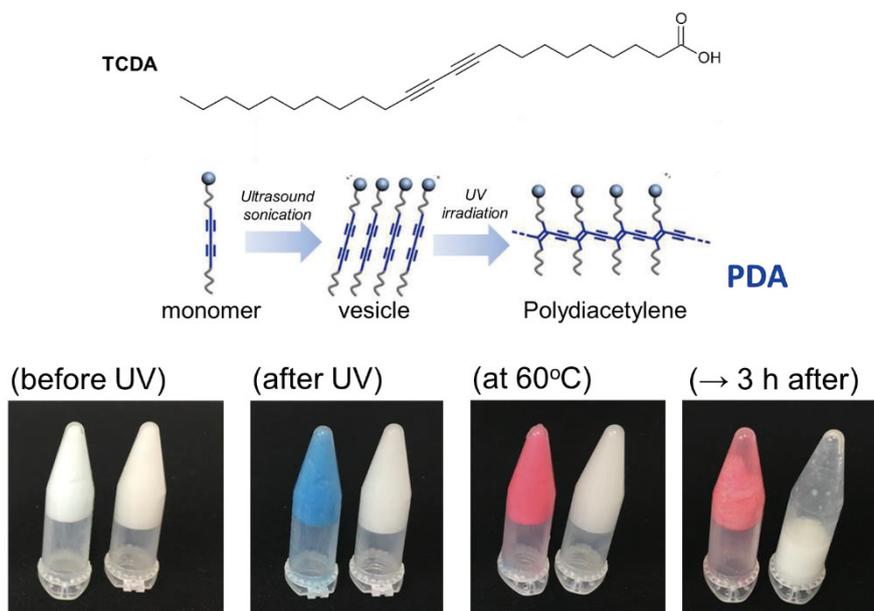


Figure 7 重合成脂質 TCDA を導入した Cubosome の熱安定性¹¹⁾。(Left) TCDA/MO1/1pH5.0、(Right) [OA+Oleate] /MO=1/1、pH5.0。

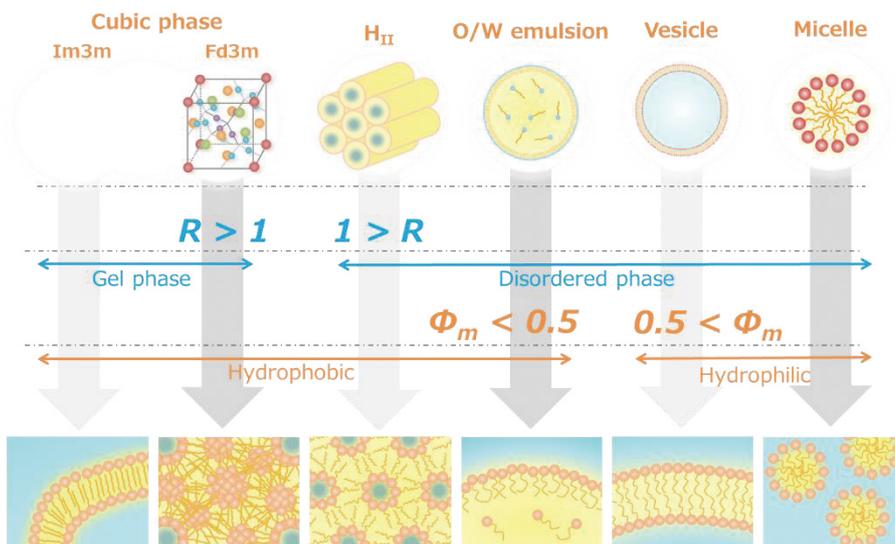


Figure 8 メソスケール膜特性と各種集合体の相挙動。

(大阪大学)、吉田健悟氏(大阪大学)、小嶋一輝氏(大阪大学)に心より感謝申し上げます。また、研究設備の提供ならびに研究評価にご協力いただきました馬越大教授(大阪大学)に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご助成いただきましたことを心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Walde P., Building artificial cells and protocell models: Experimental approaches with lipid vesicles, *BioEssays*, 32, 296-303, 2010.
- 2) Morigaki K., Walde P., Fatty acid vesicles, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 12, 75-80, 2007.
- 3) Cyrus S.R., Kai E.L., Materials chemistry: Liposomes derived from molecular vases, *Nature*, 489, 372-374, 2012.
- 4) Barriga H.M.G., Holme M.N., Stevens M.M., Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles?, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58(10), 2958-2978, 2019.
- 5) Deshpande S., Venugopal E., Ramagiri S., Bellare J.R., Kumaraswamy G., Singh N., Enhancing cubosome functionality by coating with a single layer of poly- ϵ -lysine, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6, 17126-17133, 2014.
- 6) Suga K., Otsuka Y., Okamoto Y., Umakoshi H., Gel Phase-Like Ordered Membrane Properties Observed in Dispersed Oleic Acid/1-Oleoylglycerol Self-Assemblies: Systematic Characterization Using Raman Spectroscopy and a Laurdan Fluorescent Probe, *Langmuir*, 34(5), 2081-2088, 2018.
- 7) Fox C.B., Uibel R.H., Harris J.M., Detecting Phase Transitions in Phosphatidylcholine Vesicles by Raman Microscopy and Self-Modeling Curve Resolution, *J. Phys. Chem. B*, 111, 11428-11436, 2007.
- 8) Parasassi T., Gratton E., Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence, *J. Fluoresc.*, 5, 59-69, 1995.
- 9) Kulkarni C.V., Wachter W., Iglesias-Salto G., Engelskirchen S., Ahualli S., Monoolein: a magic lipid?, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13, 3004-3021, 2011.
- 10) Salentinig, S., Sagalowicz, L., Glatter, O., Self-assembled Structures and pKa Value of Oleic Acid in Systems of Biological Relevance, *Langmuir*, 26, 11670-11679, 2010.
- 11) Nakano M., Teshigawara T., Sugita A., Leesajakul W., Taniguchi A., Kamo T., Matsuoka H., Handa T. Dispersions of Liquid Crystalline Phases of the Monoolein/Oleic acid/Pluronic F127 System, *Langmuir*, 18, 9283-9288, 2002.
- 12) Suga K., Otsuka Y., Yoshida K., Umakoshi H., Smart Preparation of Polydiacetylene Hydrogel Based on Self-Assembly of Tricosadiynoic Acid and 1-Oleoylglycerol (Monoolein), *J. Chem. Eng. Japan.*, 52(3), 311-316, 2019.