

氏名	小玉 泰史
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第883号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	蛍光プローブ法によるベシクルと界面活性剤との相互作用
論文審査委員(主査)	宮岸 重好(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副主査)	上田 一正(自然科学研究科・教授), 中本 義章(自然科学研究科・教授), 浅川 毅(自然科学研究科・助教授), 太田 明雄(自然科学研究科・助教授)

This paper describes interaction between vesicles and surfactants using some fluorescence probes. In the first chapter, we investigated vesicle and micelle formation by binary systems of single-tailed and double-tailed surfactant. Phase diagram of these systems were obtained from fluorescence measurements by a combination of two fluorescence probes. In the region with a composition rich in the single-tailed surfactant, a vesicle was formed at first, and then a vesicle-micelle transition occurred at a higher concentration close to the critical micelle concentration of the single-tailed surfactant. On the other hand, in the DDAB-rich region, small micelles appeared at lower concentrations, and micelle-vesicle transition occurred at a higher concentration. In the second chapter, interaction between phospholipid vesicle and amino acid-type surfactants was investigated. It was cleared that amino acid-type surfactants adsorbed cooperatively and located on part of the vesicle membranes at concentrations just below the CMC. From the viewpoint of the difference on the functional groups in the surfactant molecules, cooperative adsorption and affinity to the vesicle membrane were influenced by amide group in the amino acid-type surfactant. These results suggested that amino acid-type surfactant formed surfactant domain.

ベシクルは両親媒性分子が形成する2分子膜状の分子集合体であり、その構造が生体膜と類似であることから生体膜モデルとして多大な注目を受け、特に DDS (ドラッグデリバリーシステム) への応用価値が高い。そのベシクル形成は、例えばリン脂質から成るベシクル (リポソーム) や界面活性剤混合系で多くの研究例が見られる。

界面活性剤のベシクル形成については、アニオン-カチオン界面活性剤系や1鎖型-2鎖型界面活性剤系を中心に多く研究されている。中でも1鎖型界面活性剤や2鎖型界面活性剤は水溶液中において、単独でそれぞれ球状ミセル、ベシクルを形成し、これらの混合系はその濃度や組成の変化によって複雑な会合体の形状転移を示すことが予想される。しかしながら、これらの挙動は1鎖型界面活性剤の臨界ミセル濃度(CMC)よりもはるかに高い濃度でしか調べられておらず、非常に希薄な領域の会合体挙動については十分な研究がなされていない。そこで1鎖型-2鎖型界面活性剤2成分系によるベシクル・ミセル形成を、会合体のベシクル-ミセル (ミセル-ベシクル) 転移とそれに伴う対イオンの分布状態、さらに1鎖型界面活性剤の疎水鎖長の違いによる混合ベシクル形成への影響の観点から、主に数種の蛍光プローブを用いて検討した。

また我々はこれまでにアミノ酸系界面活性剤について研究を重ね、数多くの知見を得てきた。アミノ酸系界面活性剤は肌にマイルドで生分解性に優れていることから、生体を構成する細胞膜との相互作用の理解が不可欠となっている。しかしながら、一般的な界面活性剤とリン脂質ベシクルとの相互作用については国内外を通じて数多くの報告があるにもかかわらず、アミノ酸系界面活性剤を用いて検討した例は極めて少ない。特に、アミノ酸系界面活性剤が生体膜へ作用するメカニズムについては詳細には明らかにされていない。そこで、リン脂質ベシクルとアミノ酸系界面活性剤との相互作用を界面活性剤分子内の官能基の違いという視点から捉え、ベシクル内包物の放出挙動やその速度論的解析、ベシクル膜流動性・極性などのベシクル膜特性、さらに界面活性剤の膜表面への吸着挙動とそれに伴うアミノ酸系界面活性剤のドメイン形成の可能性について、数種の蛍光プローブを用いて評価した。

まず1鎖型界面活性剤-2鎖型界面活性剤2成分系の *n*-dodecyltrimethylammonium bromide(DTAB)-didodecyltrimethylammonium bromide(DDAB)系について、DTAB-DDAB

系の相図を数種の蛍光プローブを用いた蛍光プローブ法により作成した。DTAB-DDAB系の相図は2つの蛍光プローブ、*N,N,N',N'*-tetramethyl-4,4'-diamino-diphenylketimine (auramine)と pyrene を組み合わせて用いることで得、この相図において $X_2 = 0.4$ を境に界面活性剤濃度の増加に伴う会合体の転移が大きく異なった。すなわち1鎖型界面活性剤に富む組成の領域では、初めにベシクルが形成し、それから1鎖型界面活性剤の臨界ミセル濃度に近い高濃度で、ベシクル-ミセル転移が起こった。また lucigenin を用いた蛍光プローブ法から、ベシクル形成によるバルクの対イオンのベシクル表面への吸着が起こり、界面活性剤濃度の増加によりベシクル-ミセル転移に伴う臭化物イオンのバルクへの放出が起こることが示唆された。一方 DDAB に富む領域では、微小層状会合体(ラメラ)が低濃度で現れ、その後ミセル-ベシクル転移が高濃度で起こった。この低濃度側で現れた会合体は、DTAB に富む領域のミセルに比べて非常に小さいことが、対イオン解離度や会合体の偏光度、さらに会合数の結果から予想された。次に1鎖型界面活性剤の疎水鎖長の影響を明らかにするため、DTAB の代わりに

n-decyltrimethylammonium bromide (DeTAB), *n*-tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB)を2成分系に用いて検討した。DTAB-DDAB系を含めたこれら3つ

の系の相図において、小さい DDAB 組成と大きい界面活性剤濃度での、ベシクル-ミセル転移に伴う相境界が大きく異なった(Fig.1)。この結果は1鎖型界面活性剤の CMC 値がアルキル鎖長に大きく依存することが示唆された。さらにこの3種類の系の混合ベシクルの偏光度が $X_2 = 0.8$ で最大値を持ったことから、DDAB ベシクルに少量の1鎖型界面活性剤を加えることで、ベシクル膜の分子パッキングをより堅くすることが明らかになった。一方、1鎖型界面活性剤の疎水鎖の長さの影響はほとんど見られなかった

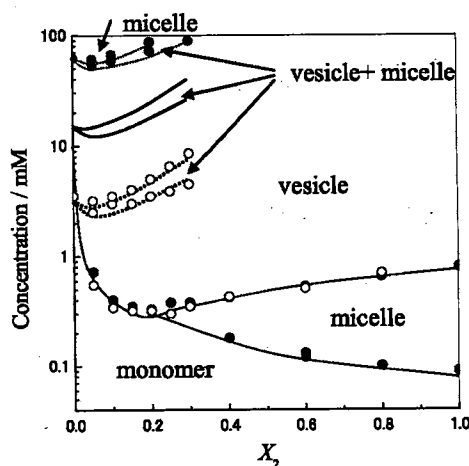
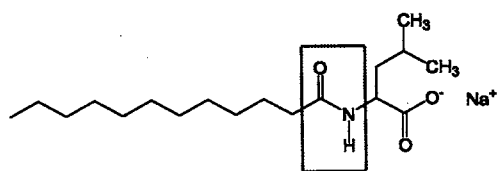


Fig.1 Comparison of the phase diagrams obtained for DeTAB-DDAB, DTAB-DDAB and TTAB-DDAB systems. Solid lines DTAB-DDAB system, open circles and broken lines TTAB-DDAB system, full circles and dotted lines DeTAB-DDAB system.

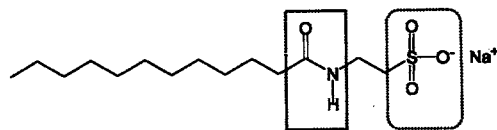
が、1鎖型界面活性剤に富む領域にのみ影響を与え、アルキル鎖長の増加に伴い偏光度が増加する結果を示した。

次にリン脂質ベシクルとアミノ酸系界面活性剤との相互作用について、数種の蛍光プローブを用いて検討した。まず2種類のアミノ酸系界面活性剤を含む4種類のアニオン界面活性剤を用い、ベシクル膜への作用の相違を散乱光測定、界面活性剤の吸着とそれに伴うベシクル内包物の放出挙動、さらに内包物放出挙動の速度論的解析から比較検討した。その結果、いずれの界面活性剤分子もリン脂質ベシクルとの混合ミセル形成によりリン脂質ベシクルを破壊したが、ベシクル膜の内包物放出挙動がスルホン型界面活性剤とアミノ酸系界面活性剤で大きく異なった。すなわち、スルホン型界面活性剤は低濃度からベシクル表面へ吸着し、内包物の緩やかな放出を引き起こしたのに対し、アミノ酸系界面活性剤は低濃度では内包物の放出がほとんど無く、CMC付近で急激な放出が起こった。また界面活性剤のベシクル膜への吸着について、アミノ酸系界面活性剤はスルホン型界面活性剤に比べて吸着速度が速く、ベシクル膜への作用が弱いことが明らかになった。さらにこれらのベシクル膜内包物の放出挙動のほとんどは漏出によるものであり、ベシクル崩壊による寄与は相対的に小さいことが示唆された。これらの結果を踏まえ、アミノ酸系界面活性剤のベシクル膜への作用のメカニズムを詳細に検討するため、界面活性剤分子内の官能基の違いという視点からリン脂質ベシクル-アミノ酸系界面活性剤間の相互作用について検討した。アミノ酸系界面活性剤として *N*-dodecanoyl

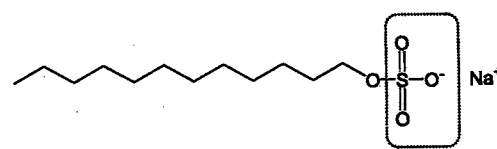
-leucinate (SDL), sodium *N*-dodecanoyl taurinate (SDT) を、比較対象として sodium dodecyl sulfate (SDS) を用い (Fig.2)、ベシクル膜内包物の放出挙動や界面活性剤の吸着挙動、ベシクル膜流動性・極性、さらにプローブのエキシマー形成によるアミノ酸系界面活性剤のドメイン形成から検討を行った。ベシクル内包物の放出挙動から、アミノ酸系界面活性剤系は CMC 付近で急激な放出を示したが、SDT 系は低濃度からもわずかな放出を示し、結果としてアミノ酸系界面活性剤のベシクル膜への吸着の協同性が大きいことを示した。



sodium *N*-dodecanoyl glutamate (SDL)



sodium *N*-dodecanoyl taurinate (SDT)



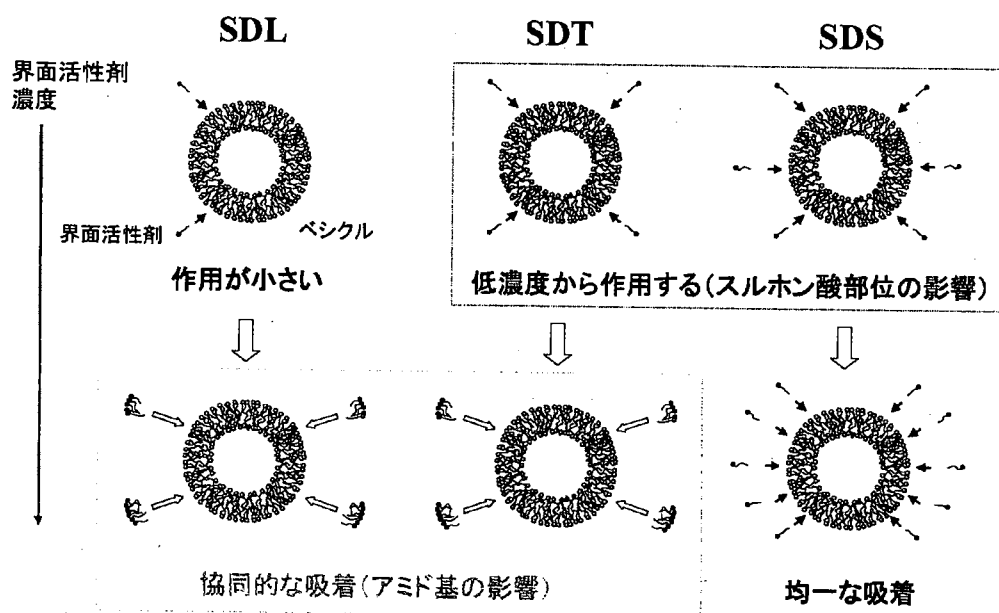
sodium dodecyl sulfate (SDS)

Fig.2 Chemical structures of surfactants.

またベシクル膜流動性について、アミノ酸系界面活性剤系は CMC 付近でベシクル膜の流動性を急激に増加させる挙動を示したのに対し、SDS 系は CMC よりも非常に低い濃度から緩やかに増加させたことから、アミノ酸系界面活性剤のベシクル膜への親和性が低いことが示唆された。これらの結果は、界面活性剤のベシクル膜への吸着の協同性やベシクル膜への親和性が界面活性剤分子内のアミド基に依存し、界面活性剤分子の低濃度からの吸着がスルホン酸部位に依存することを示した。なお、界面活性剤のベシクル膜への吸着モデルを Scheme 1 に示す。さらにアミノ酸系界面活性剤がベシクル表面へ吸着する際にドメインを形成することが示唆され、このアミノ酸系界面活性剤のドメイン形成は、蛍光プローブに Prodan や pyrene 型プローブを用いた蛍光測定の結果により強く支持された。すなわち SDL 系では SDL 分子がベシクル膜上にドメインを形成し、そのドメイン上へプローブが優先的に分配された。また SDT 系ではプローブがドメインから排斥される結果を示した。一方 SDS 系では、プローブが系内に比較的均一に分布し、膜の平均的な環境を反映していることが示唆された。

最後に、今回ベシクル - 界面活性剤系に適用した蛍光プローブ法は非常に簡便で検出

感度が高いことが利点であり、その組み合わせによっては、より多くの情報を引き出すことが可能であった。本研究においても、第 1 章のベシクル・ミセル相図の作成に auramine と pyrene を組み合わせて用いた結果、DDAB に富む組成での希薄領域のミセル（ラメラ）領域の存在を見出した。また第 2 章では複数の蛍光プローブを利用することで、アミノ酸系界面活性剤が協同的に吸着する際のドメイン形成を強く支持した。したがって、今回用いた蛍光プローブのベシクル - 界面活性剤系への適用が非常に有用であることが確認された。



Scheme 1. Model of the adsorption of each surfactant on DPPC vesicles.

学位論文審査結果の要旨

当該申請論文について、個別審査を行うと共に、1月31日に公聴会後引き続き審査会を開き以下の結論に達した。

本論文は両親媒性分子が形成するベシクル（2分子膜の分子集合体）サイズを主体に、界面活性剤混合によるベシクル形成と性質、リン脂質ベシクルと界面活性剤との相互作用について、それぞれ蛍光プローブ法により明らかにすることを目的としている。先ず、2成分カチオン界面活性剤混合系におけるベシクル形成については、混合組成と濃度に依存して会合状態の性質（マイクロ粘性とマイクロ極性）が異なる4領域の存在を明らかにした。また、リン脂質ベシクルへの界面活性剤の影響を検討した結果、界面活性剤分子内の官能基に大きく依存し、特にアミノ酸系界面活性剤はベシクルに協同的に作用してドメインを形成し、代表的な洗剤成分であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)とは異なる様式で作用することによりベシクル膜物性に影響を与えることを見いだした。即ち SDS は低濃度から細胞膜に作用するのに比べ、アミノ酸系活性剤では作用を開始する閾値濃度が存在し、それ以下ではほとんど影響を与えないことを明らかにしたことは、生体への界面活性剤の影響を知る上で興味ある知見であり、生体にマイルドな界面活性剤の開発と作用機序を解明する上でも重要な研究成果である。

従って慎重審議の結果、以上の論文は十分に博士（工学）に値すると本審査委員会は判断するに到った。