

人工生体膜のソフトナノテクノロジー

松木 均^{1*}, 後藤優樹^{1*}, 玉井伸岳^{1*}, 安澤幹人²

Soft Nanotechnology of Artificial Biological Membranes

by

Hitoshi MATSUKI, Masaki GOTO, Nobutake TAMAI, Mikito YASUZAWA

Soft nanotechnology is technology that treats soft and wet materials such as self-assembly systems in a living body under a relatively moderate condition. We focus our attention on the size control of liposomes, namely lipid bilayer membranes and performed the soft nanotechnology in sizing of liposomes under high pressure. Two high-pressure sizing techniques, a method of continuous pressure relaxation using a phase transition between gel and liquid crystalline phases of the bilayer membrane and that of a pressure-induced gel phase using a phase transition between bilayer and nonbilayer membranes, were applied to liposomes of distearoylphosphatidylcholine, and the effects of the both methods were considered. Further, the application of giant liposomes controlled by high-pressure sizing to microsensor was briefly described.

Keywords: Bilayer Membrane, Liposome, Microsensor, Phospholipid, Pressure

1 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
ライフシステム部門生命機能工学講座
Division of Biofunctions Engineering
Department of Life System
Institute of Technology and Science
The University of Tokushima

2 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部
ライフシステム部門物質機能化学講座
Division of Functional Material Chemistry
Department of Life System
Institute of Technology and Science
The University of Tokushima

* 連絡先: 〒770-8506 徳島市南常三島町 2-1
徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

1. はじめに

ナノテクノロジーは現代の科学に必要な不可欠な技術になりつつある。このナノテクノロジーは用いる素材によって2つに大別できる。一つは「硬い材料」である半導体、金属、セラミックスなどの材料を高温・真空下のような条件下で加工する技術であり、ハードナノテクノロジーと呼ばれる。例えば、精密微細加工・リソグラフィーやナノインプリント加工などが挙げられ、情報処理や通信技術にとっては必須の技術である。もう一つは「柔らかい材料」である生体内自己集合系(タンパク質、核酸、脂質など)を常温・常圧下のような比較的穏やかな条件下で加工する技術であり、ソ

フットナノテクノロジーと呼ばれる。例えば、人工臓器、バイオチップ、ドラッグデリバリーシステム (DDS) などはその代表する技術である。これらは再生医療や治療・診断薬としてすでに実社会で役立っている。本研究においては、ソフトでウェットな代表的な材料である脂質二分子膜の粒子径の制御技術を開発し、生体モデル膜のソフトナノテクノロジーを実践する。

2. リポソームとその粒子径

脂質分子を水中に分散させると自発的に自己会合し、ベシクルあるいはリポソームと呼ばれる閉鎖型の二分子膜小胞体を形成する。この二分子膜構造は生体膜の基本骨格構造であるため、リポソームは生体膜モデルとして見なすことができ、現在、様々なサイズのリポソームが生命科学研究において使用されている。リポソームはその粒子径により、小さな一枚膜リポソーム (SUV: 10 nm – 100 nm)、大きな一枚膜リポソーム (LUV: 50 – 200 nm)、多重層リポソーム (MLV: 100 – 1000 nm)、巨大一枚膜リポソーム (GUV: > 1000 nm) に分類することができる⁽¹⁾。リポソームの粒子径は多くの物理化学的要因により影響を受けるが、粒子径に顕著な影響を与える主要因としては以下の3つが挙げられる。

(1) 脂質の分子構造：調製後のリポソームは、超音波などの外部摂動を与えない場合、使用した脂質分子の分子構造（疎水鎖長や疎水鎖中の二重結合の有無、極性基サイズなど）により決定される因子、臨界充填パラメーター (CPP) によりエネルギー的に安定な形状（自発曲率が0の状態）となり、その粒子径が決まる⁽²⁾。(2) リポソームの調製方法：粒子径はリポソームへの外部摂動（超音波照射や膜押し出しなどのエネルギー変化）の与え方によっても顕著に異なる。例えば超音波は照射する時間が長ければ長い程、粒子径は小さくなり、膜押し出しの場合には使う膜目のサイズに依存して粒子径分布が異なってくる。(3) 粒子の分散・安定性：正負荷電を有する脂質分子が含まれる場合には溶液内 pH や添加する塩などの影響を強く受ける。粒子の分散とその安定性は DLVO 理論により定性的には予測可能であるが、粒子径に関しては不能である。これらのことから粒子径のほぼ揃った均一なリポソームを作製することは一概に難しい。

正確なリポソームの粒子径制御は多くの利点をもたらす。例えば、リポソームは生体適合性が高く且つ優れた生体内分解性を有するため、中でも SUV あるいは LUV は DDS の輸送担体としても使用されている。DDS

において、血中投与されたりリポソームには最適な粒子径が存在し、50 nm 以下の小さな粒子径のリポソームでは実質細胞への漏洩が起り、逆に 300 nm 以上の大きな粒子径のリポソームでは血中の白血球（マクロファージ）にほとんどが貪食されてしまう。従って、100 nm から 200 nm の LUV となるように粒子径を揃えること（粒子径均一化：サイジング）が、高い血中滞留性をもたらす、DDS における薬物の高効率な機能発現につながる⁽³⁾。また、生物物理的な実験によく用いられる MLV の場合、熱量測定で観測される相転移ピークはリポソームの大半が MLV ならば、リポソーム内の隣り合う多重層間の高い共同性により鋭いピークが観測されるが、MLV と LUV や SUV が混在すると共同性が低下し、ピークは幅広くなる⁽⁴⁾。二分子膜内部の極性環境に敏感な蛍光プローブの膜中における配向位置は粒子径の影響を極めて顕著に受け、粒子径が大きくなるとプローブ分子が膜のより外側に配向し易くなる⁽⁵⁾。さらに、光学顕微鏡を用いて1個体のリポソームの構造や物性変化を直接観察することができる GUV は細胞モデルとして見なすことができ、タンパク質や DNA 分野における1分子研究に相当した脂質分野の新しい研究方法として注目を集めているが⁽⁶⁾、顕微鏡観察下、一度の測定毎に同じ粒子径や同じ多重度を有している GUV を見つけ出すのはなかなか困難である。従って、SUV から GUV に至るまで、どのサイズにおいてもリポソームの正確な粒子径制御が実現することには大きな意義がある。

3. 脂質二分子膜の相状態と構造変化

生体膜中に含まれている脂質は様々な種類が存在するが、その大部分を占めるのがグリセロリン脂質である。グリセロリン脂質はグリセロールを基本骨格にし、2種類の脂肪酸と種々の極性基を有するリン酸が脱水結合した構造をとる。脂肪酸とリン酸に結合する極性基の組み合わせにより、無数のグリセロリン脂質が存在するが、生体膜中の主要脂質は極性基がコリン基およびエタノールアミン基であるジアシルホスファチジルコリン (PC) およびジアシルホスファチジルエタノールアミン (PE) である。特に前者は生体膜研究はもとより、その鎖同族列混合物であるレシチンは食品から医療分野まで幅広く使用されている。

脂質二分子膜の大きな特徴は、その周囲の環境変化（温度、圧力、塩濃度、溶媒置換など）に鋭敏に反応し、相転移と呼ばれる集合体の構造変化を引き起こす

ことである。Fig. 1 に炭素数 18 の脂肪酸であるステアリン酸を疎水鎖として有する代表的な飽和対称型の PC 脂質、ジステアロイル PC (DSPC) の分子構造 (Fig. 1A)、DSPC が形成する二分子膜が温度、圧力に依存して取りうる相状態の模式図 (Fig. 1B) を、そして Fig. 2 に DSPC 二分子膜の相状態を温度および圧力の関数として表した温度-圧力相図を示す⁽⁷⁾。常圧下、昇温に伴い観測される相状態は、水和結晶あるいはサブゲル (L_c) 相、ラメラゲル (L_{β}') 相、リップルゲル (P_{β}') 相および液晶 (L_{α}) 相の 4 種類である。低温から順に起こる L_c/L_{β}' 、 L_{β}'/P_{β}' および P_{β}'/L_{α} の相転移を副転移、前転移および主転移と呼び、それぞれ極性基頭部における水和状態変化、膜充填構造のゆらぎ、疎水鎖の融解に起因する。さらに長鎖飽和 PC 二分子膜において特徴的なことは、高圧下において、非二分子膜構造の一種で、膜内で隣り合う脂質分子が互い違いに相互貫入した指組み構造ゲル ($L_{\beta}I$) 相が誘起されることである。PC 二分子膜において観測される 3 種類のゲル相 (L_{β}' 相、 P_{β}' 相および $L_{\beta}I$ 相) はゲル相の多形現象である。 L_c 相と 3 種類のゲル相においては脂質の疎水鎖のコンフォーメーション

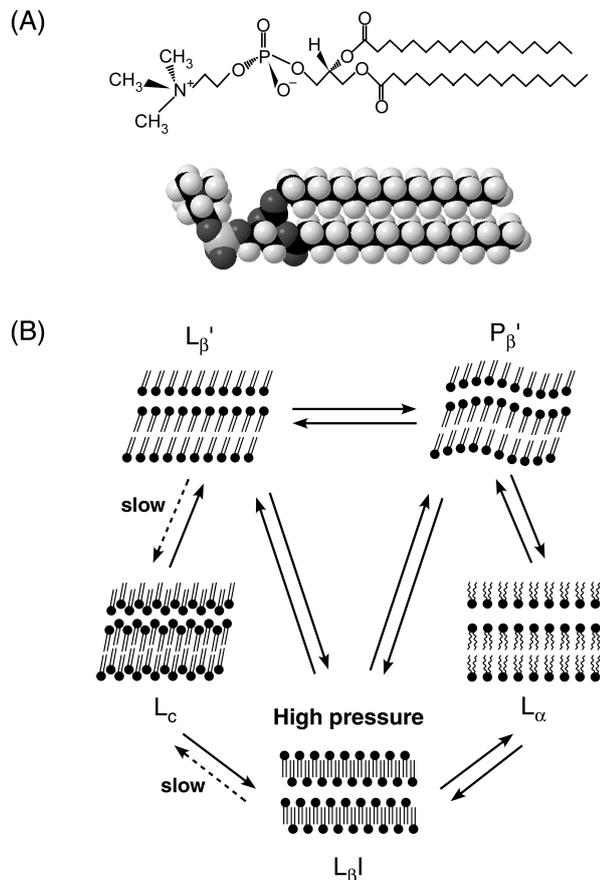


Fig. 1. (A) Molecular structure of DSPC and (B) phase states of DSPC bilayer membrane.

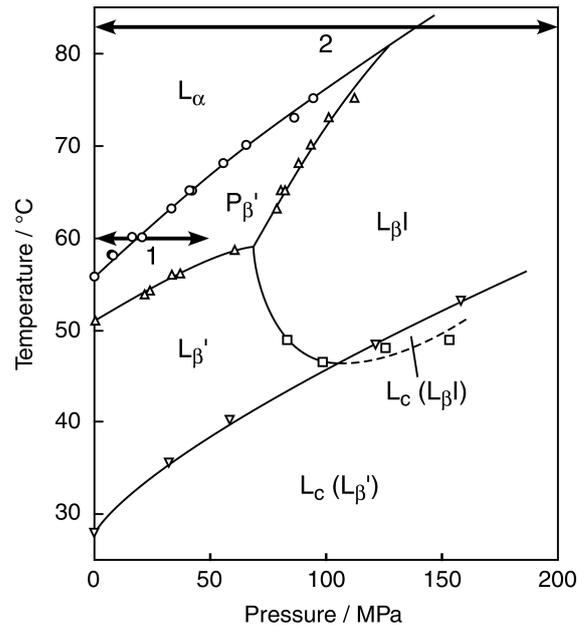


Fig. 2. Temperature-pressure phase diagram of DSPC bilayer membrane. Two arrows represent the processes of high-pressure treatments: (1) continuous pressure relaxation method, (2) pressure-induced gel phase method.

は全てトランス型で秩序性の高い膜であり、膜の流動性は低い。他方、 L_{α} 相では疎水鎖のコンフォーメーションに回転異性体のゴーシュ型が増しアシル鎖が融解するため、鎖はゆらぎ秩序性の低い膜となり膜の流動性が増加する。

4. 高圧力を用いたリポソームの粒子径制御

SUV から GUV までの各サイズにおいて、静置水和法、溶媒置換法、逆相蒸発法、電場形成法など様々なリポソーム調製方法が存在する。しかし、どの方法で調製された各サイズのリポソームにおいても広い粒子径分布が存在し、比較的粒子径の揃った均一なリポソームの作製はゲルろ過や遠心分離などの二次的な分離方法を導入しなければ不可能である。従来なされてきたリポソーム調製方法の主流は超音波処理法と細孔膜からの押し出し法である。両者は共に外部摂動により大きなサイズのリポソームを小さなサイズのリポソームに転換する方法であり、膜の分裂がその駆動力となっている。両者の方法において、超音波処理法ではその出力と照射時間を制御しても正確にある特定の粒子径を持つリポソームを得ることは難しく、押し出し法では膜目のサイズ以下の粒子径のリポソームは必ず存在するので、狭い分布を持つリポソームを得ることは難しい。

我々はリポソームの母体である脂質二分子膜の高圧力下における物性研究を継続的に行ってきたり、これまでに得られている結果を利用して高圧力によるリポソーム粒子径の制御を試みることにした。Fig. 1 に示したように脂質二分子膜は圧力の影響を受けて、柔らかい（液晶）状態から硬い（ゲル）状態へと変化したり、通常見られる二分子膜が非二分子膜状態へと変化する二分子膜と非二分子膜間の相転移が起こる。このような加圧による脂質二分子膜の変化を利用してリポソームの粒子径制御を行うことにした。ここではバンガム法⁸⁾と超音波照射（60°C、5分）を用いて、あらかじめ一定の初期粒子径（数平均粒子径約 80 nm）に調製した脂質濃度 1 mmol kg⁻¹ の DSPC 二分子膜に対して行った実験の結果について述べる。

4.1 連続圧力緩和法による粒子径制御

まず、二分子膜がゲル相から液晶相へ転移すると膜が柔らかくなるため膜融合が促進され、また逆に液晶相からゲル相へ転移すると膜が硬くなるために膜分裂が促進されることから、ゲル-液晶の相転移を横切る圧力ジャンプによる膜構造制御、連続圧力緩和法を考えてみた。この方法は温度を変化させてリポソームの粒子径を調節する方法として知られている凍結融解法の変数を温度から圧力に置き換えて適用したものである。圧力はパスカルの原理により、均一且つ等方的に作用し、水の融点を下げるために溶媒凝固を回避することができ、また瞬間的に作用させることも可能であることから凍結融解法に比べて多くの長所を持ち合わせている。

Fig. 2 中の矢印 1 で示した経路で加圧と減圧を繰り返して行い、ゲル-液晶の状態変化を反復し、粒子径の変化を調べた。ここで、圧力処理は温度 60°C において 1 分間で 50 MPa まで加圧して L_α相から P_β'相へ転移させ、その状態で 5 分間保持後に常圧まで減圧する過程を 1 サイクルとして、そのサイクルを最大 20 回繰り返した。粒子径は、大塚電子社製の動的散乱光度計（DLS-7000）を用いて角度 90°における散乱光強度から粒子径分布を計算して評価した。Fig. 3 にこの圧力粒子径制御法で得られた粒子径変化を初期粒子径（R₀）に対する処理後の粒子径（R）の比としてサイクル数（n）に対して表した。粒子径比の値はサイクル数にはほとんど依存せず、実験したサイクル数ではほぼ一定値となった。凍結融解法においては、サイクル数の増加に伴い MLV が LUV に変化することが知られていることから、連続圧力緩和法でもリポソーム 1 個内の膜間融合が起

こり、MLV が SUV や LUV へと変化している可能性はあるが、粒子径はほとんど変化しないことがわかった。

4.2 圧力誘起ゲル相法による粒子径制御

PC 分子は大きなコリン基を有するために CPP 値が 1/2 から 1 の間となり、分子の臨界充填形が接頭円錐となる。この場合には、曲率をもった屈曲性二分子膜を形成する。前述したように DSPC 二分子膜は加圧により L_βI 相を誘起する。L_βI 相では膜厚および分子体積は減少するが、頭部面積は逆に増加する。従って、L_βI 相における CPP 値は 1 に近い値となり、分子の臨界充填形が円筒になるため、平面状の非二分子膜となる。平面状非二分子膜では屈曲性二分子膜よりも小さな曲率となり、二分子膜相から L_βI 相への転移に伴い、粒子径の増大が期待される。そこで次に、加圧による DSPC 二分子膜の指組み構造化を利用して粒子径制御、圧力誘起ゲル相法を行って見た。

Fig. 2 中の矢印 2 で示した経路で加圧と減圧を繰り返して行い、二分子膜-非二分子膜の状態変化を反復し、粒子径の変化を追跡した。ここで、圧力処理は加圧により L_α相から L_βI 相への直接の転移が起こる温度 83°C において 1 分間で 200 MPa まで加圧して L_α相から L_βI 相へ転移させ、その状態で 5 分間保持後に常圧まで減圧する過程を 1 サイクルとして、そのサイクルを前述した実験同様に最大 20 回繰り返した。この圧力粒子径制御法で得られた粒子径変化を R₀/R 値として n 値にプロットした図を Fig. 4 に示す。こちらの手法では 5 サイクル程度までは若干の粒子径増加が観測されたが、10

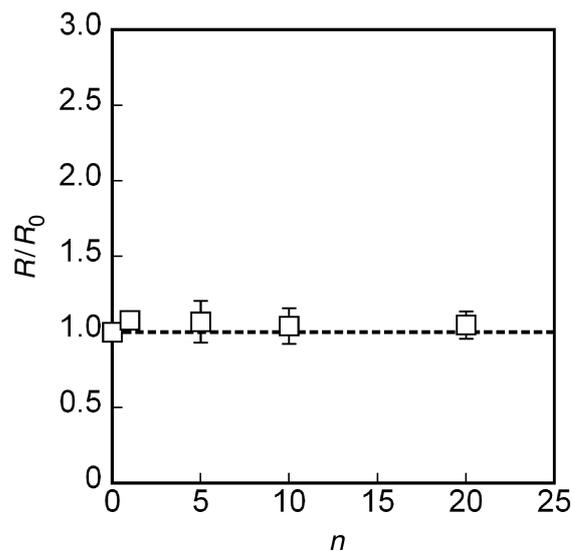


Fig. 3. Change in average diameter of DSPC liposome by applying a sizing method using continuous pressure relaxation.

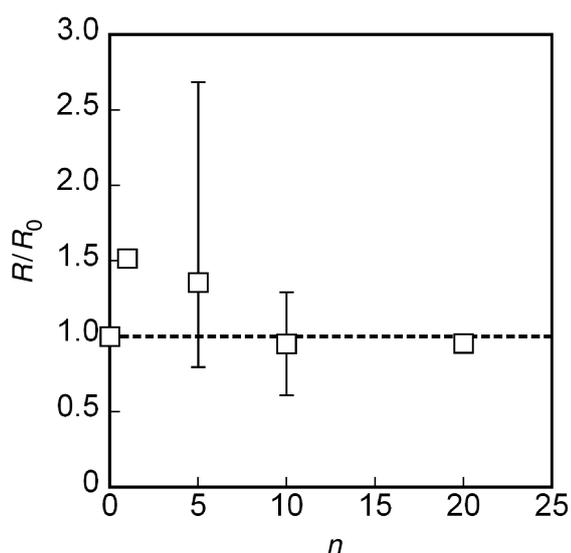


Fig. 4. Change in average diameter of DSPC liposome by applying a sizing method using a pressure-induced gel phase.

サイクル以上の高サイクル下では初期値とほぼ同値であった。圧力誘起 $L_{\beta}I$ 相形成は、二分子膜からの $L_{\beta}I$ 相形成圧力が $L_{\beta}I$ 相から二分子膜に戻る場合の圧力と一致しない圧力ヒステリシスが存在することが知られており⁹⁾、圧力処理による R_0/R 値の増大を期待したが、変化は見られなかった。圧力処理後に粒子径測定までにある程度の時間がかかることに加え、二分子膜-非二分子膜間の状態変化は可逆的に起こるために加圧時では大きくなった粒子径が減圧時には元に戻ってしまうものと推察している。

これら2つの高圧力処理方法ではリポソームの粒子

径制御をうまく行うことができなかったが、現在は脂質二分子膜の他の性質を利用して高圧力下におけるリポソームの粒子径制御を行い、良好な結果が得られている。特許の関係上、その方法については本稿では割愛させていただく。

5. 微小センサを用いた応用研究

高圧力により制御を行ったリポソームを用いた応用研究の一つとして微小センサによるリポソーム内部および外部におけるリアルタイムな濃度測定の可能性の是非を検討してみた。微小センサは先端径 $0.5 \mu\text{m}$ のタングステンプローブを芯材として用いたものである。この微小センサを圧力制御を施した GUV 中へ挿入できるかどうか確かめた。Fig. 5 に光学顕微鏡下において観察した微小センサを GUV に挿入前後の写真を示す。微小センサはリポソーム外部から内部へ問題なく挿入することができ、またその操作を繰り返して行うこともできた。この結果は、リポソーム内部および外部におけるリアルタイムな濃度測定が十分に可能であることを明確に示しており、細胞1個体の内外濃度差測定も可能であることを示唆する。現在はこの微小センサに酵素を固定化する微小バイオセンサを開発中で、酵素の安定した固定化条件を検索しているために GUV 内外の濃度測定までは行うことができなかったが、酵素反応や薬物反応のリアルタイムモニタリングが可能になれば、基質の代謝経路や薬物の作用機序の解明に大きな役割を果たすことができると期待される。このような研究の遂行時に粒子径が揃った GUV を調製し、提供

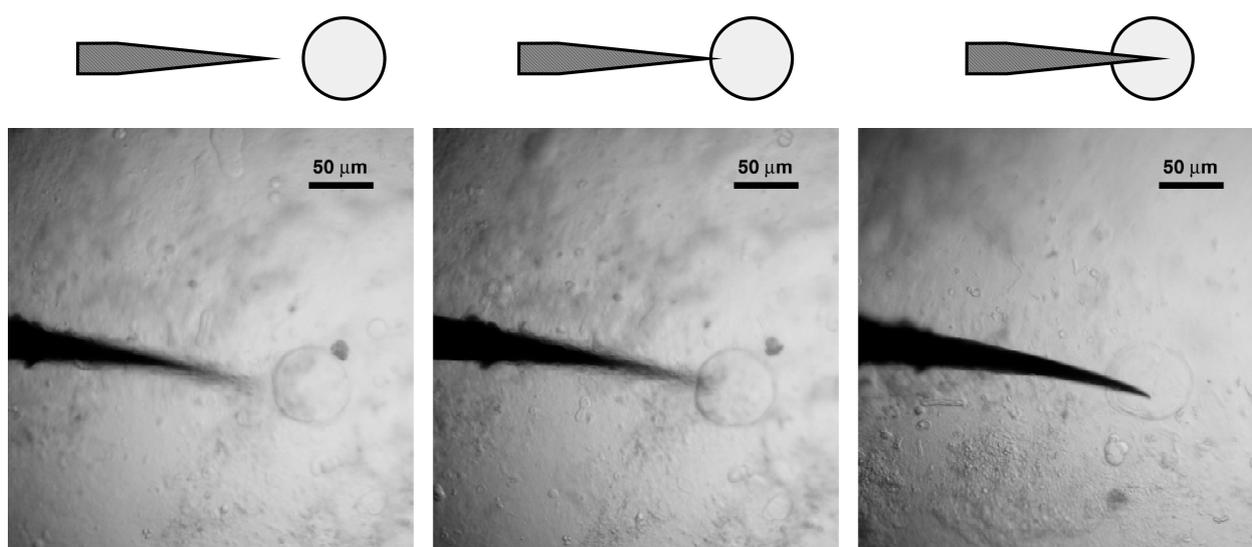


Fig. 5. Schematic drawing and optical microscope photograph of insertion process of a microsensor to GUV .

することができれば、研究の進展をさらに加速することが可能になるだろう。

6. おわりに

リポソームの作製方法は様々な方法があり、またその粒子径制御技術に関してもこれまでに非常に多くの特許が取得されている。これはリポソームの粒子径制御が食品、化粧品、医療など関連する様々な分野において必要とされているが、粒子径の正確な制御がいかにかに難しいことであるかを物語っている。我々が行っている高圧力を用いたリポソームの粒子径制御技術は、今までの調製方法とは原理的に異なる全く新規の調製方法である。本稿においては、脂質二分子膜の相転移現象を利用した方法と応用研究例について述べた。今後はさらに調製条件の検討と制御データの蓄積を行い、粒子径制御技術を確立し、リポソームが有効である様々な領域においてソフトナノテクノロジーを実施していきたい。

謝辞

本研究は、平成 20 年度大学院ソシオテクノサイエンス研究部研究プロジェクトによる研究成果の一部をまとめたものです。研究助成を賜りました関係各位に深く感謝の意を表します。また、本研究の一部は徳島大学と大鵬薬品工業株式会社との間の包括的研究連携（癌研究支援事業）の資金的な援助を受け、遂行されました。関係各位の方々に厚く御礼申し上げる次第です。

参考文献

- 1) 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編 : リポソーム, 南江堂, 1988, pp. 21-40.
- 2) J. N. イスラエルアチヴィリ (近藤 保, 大島広行訳) : 分子間力と表面力 第 2 版, 朝倉書店, 1996, pp. 367-370.
- 3) 秋吉一成, 辻井 薫 監 : リポソーム応用の新展開, NTS 出版, 2005, pp. 521-527.
- 4) 高市恭弘, 橘高茂治, 児玉美智子 : 生体膜モデル・リン脂質ベシクルの熱特性と熱力学安定性に関する研究, 熱測定, 19, 103-112 (1992).
- 5) M. Goto, H. Sawaguchi, N. Tamai, H. Matsuki and S. Kaneshina : Effect of vesicle size on the Prodan fluorescence of diheptadecanoylphosphatidylcholine bilayer membrane under atmospheric and high pressures, submitted for publication.
- 6) Y. Yamashita, M. Oka, T. Tanaka and M. Yamazaki : A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them, *Biochim. Biophys. Acta* 1561, 129-134 (2002).
- 7) H. Ichimori, T. Hata, H. Matsuki and S. Kaneshina : Barotropic phase transitions and pressure-induced interdigitation on bilayer membranes of phospholipids with varying acyl chain-lengths, *Biochim. Biophys. Acta* 1414, 165-174 (1998).
- 8) A. D. Bangham, J. DeGier and G. D. Grevill : Osmotic properties and water permeability of phospholipids liquid crystals, *Chem. Phys. Lipids* 1, 225-246 (1967).
- 9) L. F. Braganza and D. L. Worcester : Hydrostatic pressure induces hydrocarbon chain interdigitation in single-component phospholipid bilayers, *Biochemistry* 25, 2591-2596 (1986).