

生体適合性逆型ベシクルの生成・安定化と応用に関する研究

横浜国立大学工学部
国枝博信

We have found that reverse vesicles can be formed by mixing biocompatible surfactants such as lecithin-lysolecithin, N^α-lauroyl arginine methylester hydrochloride (LAM)-lecithin, LAM-glycerol monolaurylether, sucrose monoalkanoate(DKE)-hexanol, DKE-hexaethyleneglycol hexadecyl ether (R₁₆EO₆).

We have investigated the structure of reverse vesicles with the help of phase diagrams, small-angle X-ray scattering, video enhanced microscopy, freeze-fractured transmission electron microscopy. We have confirmed that reverse vesicles form from lamellar liquid crystal swelling a large amount of oil. We have also determined and reported spontaneous formation of reverse vesicles from an isotropic solution in a DKE/R₁₆EO₆/decane system. The effect of the mixing ratio of surfactants and water content on the stability of reverse vesicles was also investigated in the DKE system.

1. 緒言

リン脂質などの両親媒性分子を水に分散させると生体膜の基本構造¹⁾と同様の親水基を外側に向けた2分子膜が閉じたベシクルあるいはリポソームと呼ばれる小胞体を形成する。ベシクルは1964年の発見以来²⁾、基礎・応用の両面から広く研究され、現在も物理化学、生物化学(物理)などの分野の主要な研究対象の一つである^{3, 4)}。それに反して、炭化水素など非極性溶媒中に分散する親水基が内側を向いた逆2分子膜からなる小胞体、逆ベシクルは知られていなかった。一般に界面活性剤などの両親媒性分子を単に油と混合すると分子分散溶液、逆ミセル溶液、または溶けずに固体が分散あるいは沈澱するのみである。このため、通常のベシクルと比較して発見が遅れたものと考えられる。

逆ベシクルは新しい自己組織体であり、界面活性剤の会合原理に新たな知見を与えたり、生体膜

の安定性に対する知識を加えることができ、さらに非極性溶媒中の分散系の安定性に関する研究対象になるなど基礎研究にとって極めて重要な意味を持つ。それだけでなく、油中での有用物質の保持、放出制御、マイクロカプセル化など化粧品を初めとする広い分野で応用が考えられる。

我々は従来の発想と異なり、逆ベシクル生成には親水基間の相互作用を調節することが必要であるとの認識から少量の水を添加することにより、通常のポリオキシエチレン型非イオン界面活性剤を用いて世界で初めて逆ベシクルを発見することに成功した⁵⁻⁷⁾。さらに同様の考えで、イオン性界面活性剤あるいは非イオン-イオン混合界面活性剤系においても逆ベシクルを生成することができた^{8, 9)}。ところが、今まで発見された逆ベシクルは何れも極めて不安定であり、すぐ沈降、分離してしまう。

本研究は逆ベシクルの基礎・応用に関する継続的研究の第一段階として、化粧品などの分野に用

いることのできる生体適合性の良い界面活性剤を使用して逆ベシクル生成の可能性を検討し、その構造を確認し、さらに生成・安定条件を明らかにして粒径を制御する手段を見いだすことにある。将来的には逆ベシクルの基礎研究のみならず応用研究に発展させる考えである。

本報告においては最初、種々の生体適合性界面活性剤系における逆ベシクル生成について述べた後、安定な逆ベシクルを生成するショ糖エステル系における詳しい研究結果を報告する。

2. 実験

2.1 試料

レシチンはLucus Meyer社製の精製大豆レシチン(Epicron 100)を用いた。塩酸N-ラウロイルアルギニンメチルエステルはスペイン国立化学技術繊維研のInfante博士により提供された試料である。リゾレシチン、ヘキサエチレングリコールヘキサデシルエーテル($R_{16}EO_6$)は日光ケミカルズ(株)製である。ショ糖エステルは第一工業製薬(株)製である。モノ脂肪酸含量は95%以上であり、脂肪酸の鎖長分布は C_{14} 10%, C_{16} 40%, C_{18} 50%である。

2.2 実験方法

2.2.1 光学顕微鏡観察

逆ベシクルの観察にノマルスキー型微分干渉顕微鏡(ニコンX2F-NTF-21)に画像処理装置, Argus10(浜松ホトニクス)を用いるVideo Enhanced Microscopy (VEM)を使用した^{10, 11)}。蛍光顕微鏡はオリンパス製(BH2-RFC)を用い、高感度テレビカメラをつかい、水溶性蛍光物質Calceinを添加し、逆ベシクルのベシクル膜を観察した。

2.2.2 電子顕微鏡

凍結切断法で試料を調製し、透過型電子顕微鏡で観察した¹²⁾。試料ホルダーに逆ベシクル分散液を載せ、液体窒素で153Kまで冷却した。凍結

した試料を切断装置(Eiko FA-2/2A)を用い 2.7×10^{-5} Paの高真空下で切断した。切断試料を白金および炭素でShadowingを行いレプリカを作製した。レプリカを透過型電子顕微鏡(日本電子, JEOL JEM-1200EX)で観察した。

2.2.3 小角X線散乱(SAXS)

液晶あるいは遠心分離機で沈降させた逆ベシクルをX線用毛細管(直径1.5mm)に詰め熔封した。2分子膜の面間隔を出力18kWの小角X線装置(理学, RU-300)で測定した⁶⁾。

2.2.4 FT-PGSE NMR法

スウェーデン, ルント大学(Lindman教授, およびOlsson博士)の協力により, フーリエ変換パルス磁場勾配スピネコーNMR法により溶液中の界面活性剤の拡散係数を測定した¹³⁾。

3. 結果と考察

3.1 生体適合性界面活性剤による逆ベシクル生成(成果1)

逆ベシクルは通常のベシクル, リポソームと全く対称的な自己組織体であるから, その生成条件も逆になる。即ち, 通常のベシクルにおいては疎水基間の相互作用が2分子膜形態を維持し, 親水基は水との親和性に寄与していると考えられる。一方, 逆ベシクルの場合は, 疎水基(親油基)は溶媒との親和性に寄与するため, 通常の炭化水素鎖で充分であり, 親水基は逆2分子膜構造を維持するため強い相互作用が必要であると考えられる。従って, 通常のベシクル生成には比較的親油性の両親媒性物質が用いられるのに対して, 逆ベシクルの場合は親水性の必要がある。ただし, 油中の両親媒性分子は液体状態でなければ逆ベシクルを形成しない。

以上の考え方を基に, レシチン-リゾレシチン系LAM-系, ショ糖エステル-ヘキサノール系, リゾレシチン-モノグリセリド系で逆ベシクルを生成し, VEM, 蛍光顕微鏡で逆ベシクル構造を明らかにした。このように, 逆ベシクルの一部の

特殊な界面活性剤系で生成するのではなく、一般的な現象であることが分かった。

3.2 逆ベシクルの微細構造(成果2)

ショ糖エステル-ヘキサノール系において、安定な逆ベシクルが生成することが明らかになったのでその構造を検討した。脂肪酸が一つついたショ糖エステルは極めて親水性の強い界面活性剤であり、特に脂肪酸が直鎖の飽和炭化水素鎖からなる場合、油には溶解しない。したがって、ヘキサノールのような両親媒性物質を加えて膜を柔軟にする必要がある。図1に相平衡図を示す。図のようにある混合比率でラメラ液晶相が出現し、低濃度側では液晶と油相の2相系が得られた。ここで系を攪はん、超音波処理すると、図2の写真に示すように、逆ベシクルが生成する。この系に、水溶性の色素Calceinを添加して、蛍光顕微鏡で観察すると(図3)ベシクル膜だけ輝いて見え、確かに内外相が油であることが確認された。さらに、

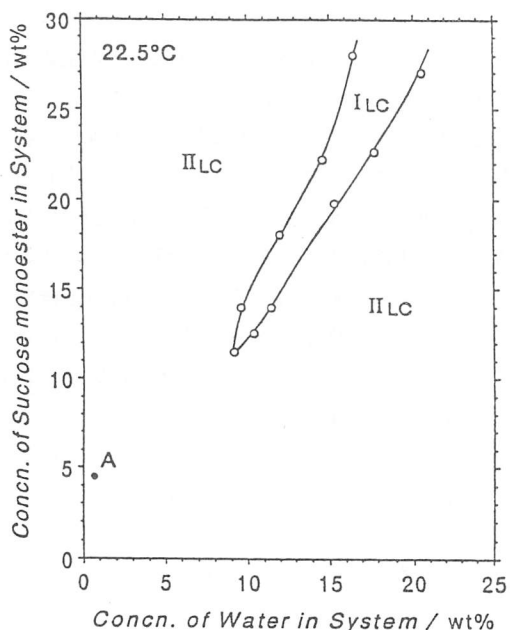


図1 ショ糖エステル/ヘキサノール/水/デカン系の相図。ヘキサノール濃度は系に対して9%一定である。ILCはラメラ液晶1相領域を表し、IILCは液晶を含む2相領域を示す。

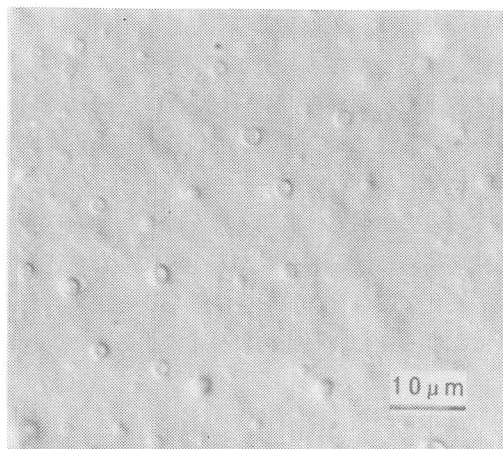


図2 図1中のA点において生成した逆ベシクルのVEM写真。

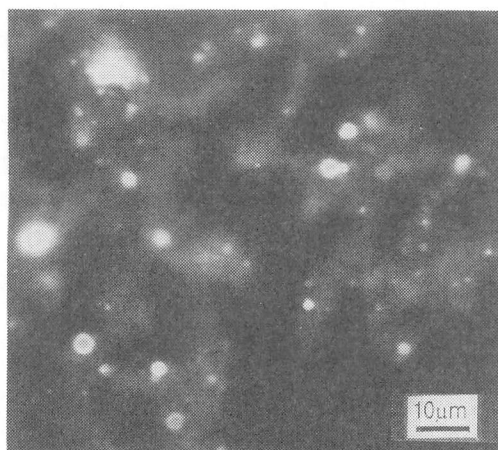


図3 図2の系に蛍光色素Calceinを添加した蛍光顕微鏡写真。

微細な逆ベシクルに関しては凍結切断法でレプリカを調製し、透過型電子顕微鏡で観察した。結果を図4に示す。図中に比較的大きい逆ベシクルが3つある。上のベシクルはちょうど中程を切断されており、内相、外相とも同じ模様を示し、両相が油であることが分かる。一方、下の右側にあるベシクルは下の部分で切断されており、内相の油は取り除かれている。ベシクルの縁にそって、多重膜が観察される。この厚さを測定すると約10nm

である。この厚さが妥当なものか確認するため、ベシクルを遠心分離機で沈降させ、小角 X 線散乱測定を行ったところ、面間隔が10.9nmであり、電頭の結果と良い一致を見た。すなわち、図4のベシクルの膜は2分子膜に相当している。CPKモデルによるとショ糖エステル(ステアリン酸エステル)2分子の伸びきった長さは約6.5nmであり、2分子膜は油を層間に膨潤し、親水基間がついている逆2分子膜である。このように、ショ糖エステルが油中で生成する分散系は逆ベシクルであることが確認された。

3.3 逆ベシクルの自発的生成(成果3)

以上述べてきたように、ショ糖エステルなど種々の生体適合性界面活性剤系で逆ベシクルが生成することが明らかになった。ここでは、ショ糖エステル/ヘキサエチレングリコールヘキサデシルエーテル($R_{16}EO_6$)/デカン系で、水を添加しなくても逆ベシクルを生成することを見いだしたので報告する。

図5は30°Cにおける上記3成分系の相平衡図である。 $R_{16}EO_6$ が多い領域では等方性の1液相が得

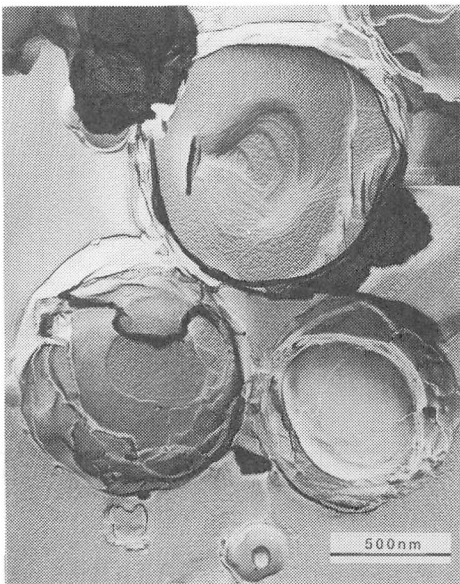


図4 逆ベシクルの凍結断面法による透過電顕写真。

られる。一方、ショ糖エステルの多い領域では液晶が出現する。偏光顕微鏡の観察でラメラ液晶であることが分かった。通常、ラメラ液晶は水の多い領域で形成され、水無しの系で生成するという報告はショ糖エステル系を除いて殆どない¹⁴⁾。このラメラ液晶は親水基間がついており、炭化水素鎖間が離れた構造であると考えられ、いわば逆ラメラ液晶と言え。液晶相の構造をより明らかにするため小角 X 線散乱で面間隔を測定した。

図6は典型的な SAXS 曲線を示す。2つのピークが観測され、その比は1:2であり、ラメラ液晶であることが分かる¹⁵⁾。このラメラ液晶の模式図を図7に示す。SAXSで求められる面間隔は図中の d である。もし、逆2分子膜の長さ、 d_s がデカンの含有量に依存せず、また、各分子の部分モル容積が純粋の場合と同じと仮定すると、次の式が成立する⁶⁾。

$$d = d_s / \phi_s$$

ここで ϕ_s は界面活性剤の容量分率である。界面活性剤の密度を1.0としたときの面間隔と容量分率の逆数との関係を図8に示す。図のように直線関係が得られ、逆2分子膜の厚さはほぼ4.4nm

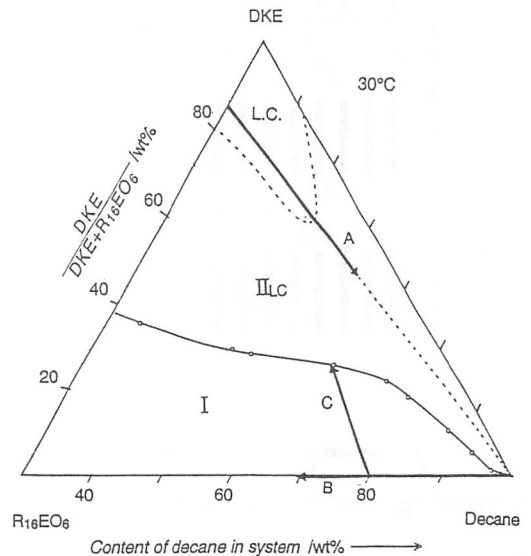


図5 ショ糖エステル/ $R_{16}EO_6$ /デカンの相平衡図。

である。前に述べたように伸びきったシヨ糖ステアリン酸エステル2分子の長さは6.5nmであり、液晶中ではかなり短くなっていることが分かる。液晶状態では炭化水素鎖は融解状態にあるため、この結果は妥当であると考えられる。また、図から分かるように油の含有量増大と共に面間隔は大きく広がっており、この液晶が逆ラメラ液晶であることは明らかである。

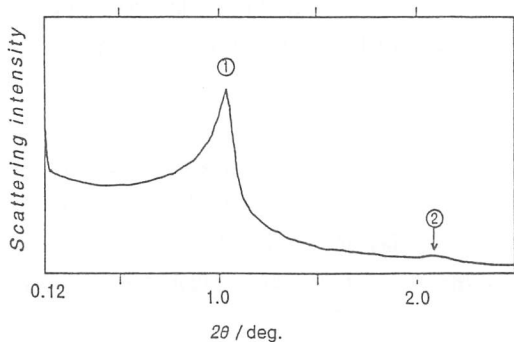


図6 典型的なSAXS曲線。組成はシヨ糖エステル48%, $R_{16}EO_6$ 12%, デカン40%である。

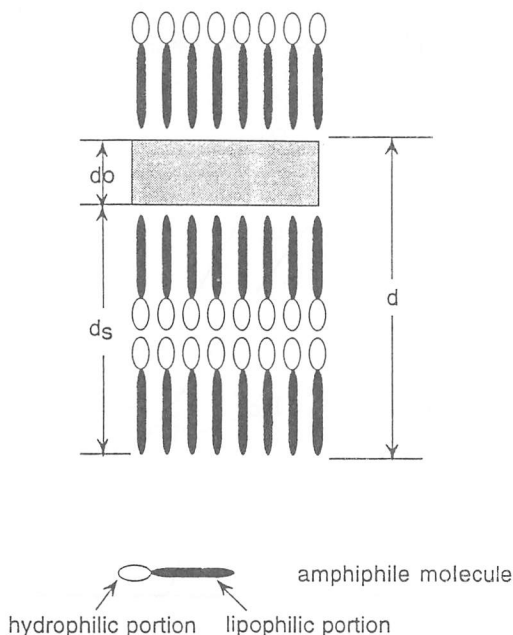


図7 “逆”ラメラ液晶の模式図。SAXSでは図中のdが求められる。

一方、等方性溶液の構造をフーリエ変換磁場勾配スピネコーNMR (FT-PGSE)法で拡散係数を求めることから推定した。 $R_{16}EO_6$ などポリエチレングリコール型非イオン界面活性剤油溶液(水を含まない)では、ほとんど逆ミセルを形成していないことが知られている¹⁶⁾。図9に $R_{16}EO_6$ のエチレングリコール部分をシグナルを利用してNMRで求めた $R_{16}EO_6$ の拡散係数の結果を示す。測定した組成は図5に示してある。シヨ糖エステ

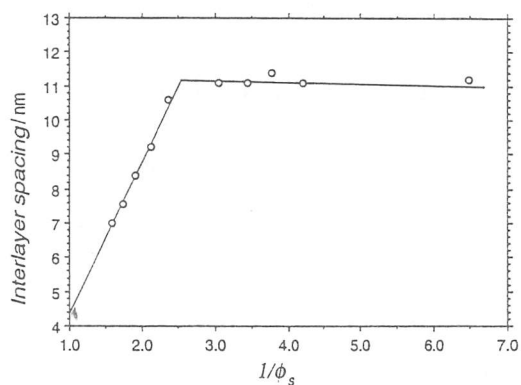


図8 “逆”ラメラ液晶の面間隔と界面活性剤の容積分率との関係。測定は図5中のA線で行っている。

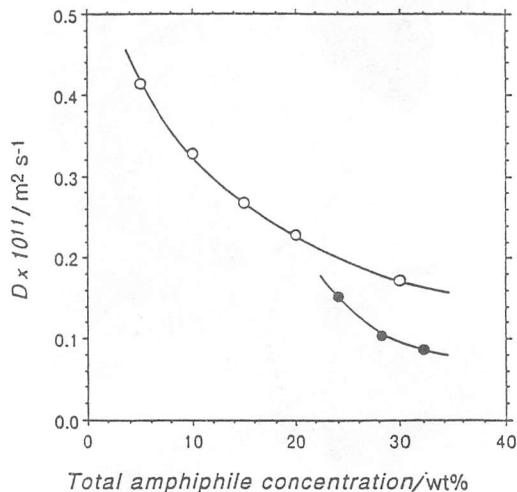


図9 等方性溶液中の $R_{16}EO_6$ の自己拡散係数。白丸はシヨ糖エステルを含まない系で図5のB線に相当する。黒丸は図5のC線に相当する。

ルが存在しない場合、拡散係数は大きな値を示し、界面活性剤はほぼ単分散溶解していると考えられる。シヨ糖エステルが加わると拡散係数は大きく低下し、逆ミセル形成が起きていると推定できる。NMRのシグナルを比較しても、シヨ糖エステルを含まない場合、鋭いピークが得られるのに対し、含む場合はブロードなピークが得られ、界面活性剤分子の配向性が高まっていることが分かった。

逆ベシクルは図5の液晶を含む2相領域(特に界面活性剤低濃度)で生成する。この場合、逆ベシクルの生成法は2つ考えられる。1)図5の逆ラメラ液晶を調製し、それをデカン中に細かく分散する方法と、2)最初等方性の逆ミセル溶液を調製しておいて、それをデカンで希釈する方法である。

1)は通常のベシクル生成法であり、大きな塊の液晶をVortex Mixerあるいは超音波などを用いて機械的に細かくする方法である。一方2)はシヨ糖エステルと $R_{16}EO_6$ の油に対する溶解度の差を利用する方法である。すなわち、前者の油への単分散飽和濃度は極めて小さく(例えばヘプタンに対して0.01%以下)^{17, 18)}、逆に $R_{16}EO_6$ は100倍程度大きいと推定できる。したがって、図5の等方性溶液を調製して、それをデカンで希釈すると、最初に存在していた逆ミセルから $R_{16}EO_6$ が油中に拡散していき、逆ミセル中ではシヨ糖エステルの割合が増していき、最後にラメラ液晶(逆ベシクル)として、分散すると考えられる。したがって、2)の方法では1)と比較してより細かい逆ベシクルが生成すると予想される。図10に両者の方法で生成した逆ベシクルのVEM写真を示す。予想どおり、2)の方法では細かい逆ベシクルが生成していることが分かる。2)の方法は逆ベシクルが希釈により自発的に生成すると言う意味で極めて重要なものとする。

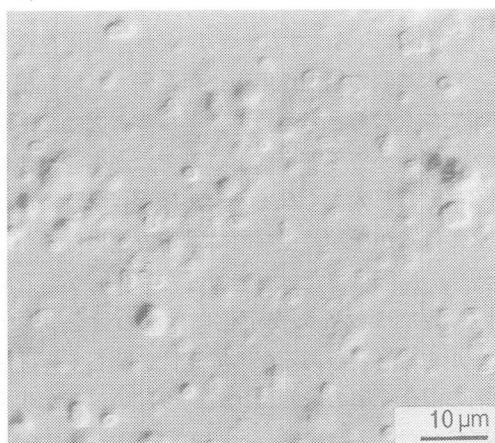
3.4 逆ベシクルの安定性(成果4)

シヨ糖エステル- $R_{16}EO_6$ 系の逆ベシクルの安定性は水の添加量に大きく依存する。図11に両界面活性剤の混合比率と水の添加量を変えた相図を

示す。相図上には逆ベシクルの安定・不安定の領域も同時に示す。逆ベシクルの調製法は次のように行った。所定の組成の試料をVortex Mixerで攪はんした後、水浴型の超音波処理装置で30-60分程度、超音波をあてた後、 $0.6\mu\text{m}$ の穴を持つポリカーボネイトフィルターで濾過して逆ベシクルを得た。

$R_{16}EO_6$ の割合の多い領域では少量の水が加わるにより等方性の逆ミセル溶液相が広がる。一方、シヨ糖エステルの多い領域では液晶を含む2液相が広がっている。水を多量に加えて上の境界に達すると液晶は消え、等方性の2液相からな

1)



2)

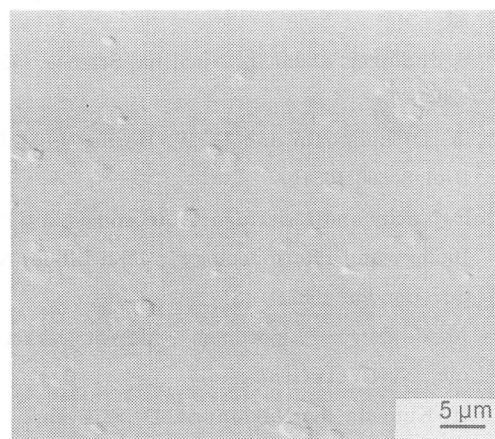


図10 1)の方法により生成した逆ベシクルと2)の方法により生成した逆ベシクルのVEM写真。

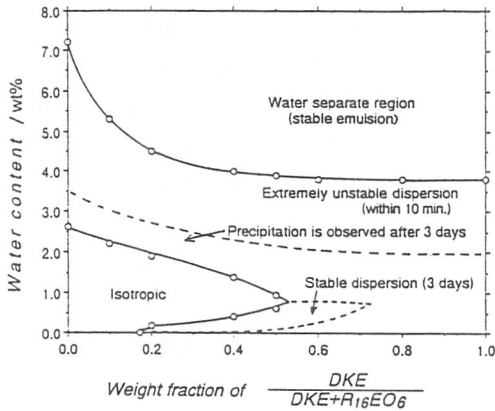


図11 逆ベシクルの安定性に及ぼす水の添加効果。界面活性剤濃度は3%一定である。

る2相領域に入る。すなわち、水が過剰に存在すると親水基間の相互作用を作用を弱め、液晶構造を保てなくなると考えられる。事実、図中の逆ベシクルの極めて不安定なところでは逆ベシクルはすぐに融合し大きくなる現象が観察された。逆ベシクルは水が極端に少なくても不安定になるがこの現象の原因はまだはっきりしない。しかし、図より、逆ベシクルの安定化には水の量をコントロールする必要があるが、安定性に関して界面活性剤の混合比率の影響は比較的少ないことが明らかになった。

文献

- 1) S. J. Singer, and J. L. Nicolson, *Science*, 175, 720(1972).
- 2) A. D. Bangham and R. W. Horne, *J. Mol. Biol.* 8, 660(1964).
- 3) P. Machy and Leserman, "Liposomes in Cell Biology and Pharmacology", John Libbey & Co., London(1987).
- 4) M. J. Ostro, "Liposomes", Marcel Dekker, Inc., New York(1987).
- 5) H. Kunieda, K. Nakamura, D. F. Evans, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1051(1991).
- 6) H. Kunieda, K. Nakamura, H. T. Davis, and

D. F. Evans, *Langmuir*, 7, 1915(1991).

- 7) H. Kunieda and M. Yamagata, *J. Colloid Interface Sci.*, 140, 277(1992).
- 8) H. Kunieda, S. Makino, and N. Ushio, *J. Colloid Interface Sci.*, 147, 286(1991).
- 9) 中村和吉, 町山美昭, 国枝博信, *油化学*, 41, 480 (1992).
- 10) B. Kachar, D. F. Evans, and B. W. Ninham, *J. Colloid Interface Sci.*, 100, 287 (1984).
- 11) D. D. Miller, J. R. Bellare, D. F. Evans, Y. Talmon, and B. W. Ninham, *J. Phys. Chem.*, 91, 674(1987).
- 12) W. Jahn and R. Strey, *J. Phys. Chem.*, 92, 2294(1988).
- 13) P. Stilbs and M. E. Mosely, *Chem. Scr.*, 15, 176(1980).
- 14) T. M. Herrington and S. S. Sahi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1677(1988).
- 15) P. Ekwall, L. Mandell, K. Fontell, *Mol. Lig. Cryst.*, 8, 157 (1969)
- 16) A. Kitahara, *J. Phys. Chem.*, 69, 2788(1965).
- 17) H. Kunieda and M. Yamagata, *Colloid Polym. Sci.*, accepted.
- 18) H. Kunieda, N. Ushio, and M. Miura, *J. Colloid Interface Sci.*, submitted.

研究成果

成果1) Reversed Vesicles from Biocompatible Surfactants. H. Kunieda, K. Nakamura, M. R. Infante, and C. Solans, *Advanced Materials*, 4, 291-293(1992).

成果2) Reverse Vesicles: Counter Structure of Biological Membranes. H. Kunieda, M. Akimaru, N. Ushio, K. Nakamura, *J. Colloid Interface Sci.*, in press.

成果3) Spontaneous Formation of Reverse Vesicles. K. Nakamura, H. Kunieda, U. Olsson, and B. Lindman, in preparation.

成果4) Stability of Reverse Vesicles. H. Kunieda, K. Nakamura, A. Uemoto, N. Azemar, and C. Solans, 研究継続中.