

圧力誘起膜融合リポソームの安定性評価

(徳島大院先端技術科学教育部¹・同ソシオテクノサイエンス研究部²)

○茨木孝司¹・後藤優樹²・玉井伸岳²・松木 均²

1. 緒言 脂質分子を水中に分散させると自発的に自己会合し、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。リポソームは生体適合性や生分解性に優れているため、薬物や生理活性物質の運搬キャリアとして医療分野での応用が期待されている。これまでに、ポリエチレングリコールをジアシルホスファチジルエタノールアミンの親水基に付加した粒子径 100～150 nm のリポソームが、抗がん活性を有するリポソーム製剤として調製、市販されている。本研究室では近年、高圧力下において脂質二分子膜の膜融合が促進され、不可逆的に球状のリポソームが形成されることを見出した(本討論会の口頭発表要旨を参照)。そこで、加圧により膜融合が促進されるリポソーム(圧力誘起膜融合リポソーム)の薬物封入時の安定性を評価し、薬物送達系(DDS)のキャリアとしての適性を調査することにした。本研究においては、まず、圧力誘起膜融合が起こる脂質混合リポソームを用いて蛍光物質封入リポソームを作製し、常圧下、蛍光物質の封入効率とその保持安定性を調べた。次に脂質試料に高圧力処理を施し、粒子径変化と融合率についての検討を行った。

2. 実験 2 種類の不飽和リン脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)およびジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)を組成比 1 : 1 で種々の濃度(0～50 mol%)のコレステロール(Cho)を添加してリポソームを作製後、60 mM の蛍光色素ウラニン¹を封入した。このリポソームに、超音波照射、凍結融解、細孔押し出し処理およびゲルろ過クロマトグラフィーを行い、均一な粒子径を有するリポソームを調製した。封入効率は分光蛍光光度計 F-3010(HITACHI 社製)を用いて界面活性剤添加前後の蛍光強度変化を測定することにより決定し、同時に封入効率の時間変化も追跡した。リポソームの粒子径は光散乱光度計 DLS-7000(大塚電子社製)を用いて高圧力処理前後の試料溶液に対して実施した動的光散乱測定から算出した。

3. 結果と考察 DOPC/DOPE/Cho 混合リポソーム(以下、混合リポソームと表記する)におけるウラニンの封入効率は Cho 濃度に比例して増加した。この封入効率の増加は Cho 添加により、液晶相状態の柔らかい膜構造が硬くなることに起因する。封入効率は時間経過により大幅に減少したが、72 時間後においても Cho 濃度との相関関係は成立した。次に、混合リポソームを 250 MPa にて 24 時間加圧したところ、Cho 添加濃度の増加に伴い粒子径変化率が減少したことから Cho 含有率と加圧膜融合率は、互いに拮抗する要因であることがわかった。さらに、ウラニン封入リポソームを加圧処理したところ、粒子径の増大およびリポソーム内ウラニンの保持を確認し、ウラニン封入リポソームも同様に加圧膜融合を引き起こすことを結論づけた。しかしながら、ゲルろ過時におけるリポソーム絶対数の減少のためか、ウラニン封入リポソームの融合率は非内包リポソームのものと比べて、顕著に低下した。DDS に適した圧力誘起膜融合リポソームを調製するためには、Cho 含有率に依存した物質の保持効率および物質内包状態での加圧膜融合率を考慮する必要がある。

Stability Evaluation of Liposome Prepared by Pressure-induced Membrane Fusion

K. IBARAKI¹, M. GOTO², N. TAMAI², H. MATSUKI² (¹Grad. Sch. of Advan. Technol. & Sci. and ²Inst. of Technol. & Sci., The University of Tokushima, k-ibarak@bio.tokushima-u.ac.jp)

The stability of liposomes prepared by pressure-induced membrane fusion was evaluated by means of fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. The encapsulation efficiency of a fluorescent dye uranine in the liposomes consisted of dioleoylphosphatidylethanolamine/dioleoylphosphatidylcholine/cholesterol mixture increased with increasing the cholesterol concentration, which is attributable to the change in membrane fluidity by the cholesterol incorporation. On the other hand, the membrane-fusion rate of the liposomes containing uranine under high pressure decreased in proportion to the cholesterol concentration, indicating that cholesterol antagonizes the pressure-induced membrane fusion. We concluded that the encapsulation efficiency of a drug and the membrane-fusion rate in the presence of the drug under high pressure depending on the cholesterol concentration must be taken into account for the preparation of the liposome suitable for drug delivery systems.