

単分散エマルジョンを基材とした新規ベシクル調製法による サイズ制御と内包率の向上

市川 創作,^{*,a} 黒岩 崇^{a,b}

Novel Method for Preparing Vesicles from a Monodisperse Emulsion Aimed at Controlling the Size and Improving the Entrapment Yield

Sosaku ICHIKAWA^{*,a} and Takashi KUROIWA^{a,b}

^aGraduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai,
Tsukuba City 305-8572, Japan, and ^bNational Food Research Institute,
2-1-12 Kannondai, Tsukuba City 305-8624, Japan

(Received November 1, 2007)

A vesicle is a compartment composed of lipid bilayer of amphiphilic molecules. The vesicle is applied to carriers of drugs, cosmetics and functional food ingredients in industries. Vesicles are also applied as a model for artificial cell membrane and expected as micro- and nano-reactors. They are generally prepared by the hydration of dry lipid film, but there is no method to prepare vesicles of a controlled size and high entrapment yield of hydrophilic materials inside them. In this article, a microchannel (MC) emulsification method was applied to prepare vesicles aimed at controlling the size and improving the entrapment yield. Firstly, monodisperse water-in-oil (W/O) emulsions were prepared by the MC emulsification method. In this process, hydrophilic materials to be entrapped were contained inside the water droplets of the emulsions. Keeping the water droplets frozen, the emulsifier was replaced by a bilayer-forming lipid mixture, and then the oil phase was evaporated. After hydration of lipid layers surrounding the water droplets, vesicles were formed. We call this preparation “lipid-coated ice droplet hydration method”. The final sizes of the prepared vesicles were comparable to the original emulsion droplet sizes. This means that the size of vesicles can be controlled by controlling the size of original water droplets of the W/O emulsions. Furthermore, calcein as a hydrophilic fluorescent marker and biopolymers, such as enzyme and polysaccharide, were entrapped into the internal water phases of vesicles. The method proposed in this study enables the formation of vesicles with a controlled size and high entrapment yields, potentially useful for expanding the application fields of vesicles as biocompatible carriers and micro- and nano-reactors for biochemical reactions.

Key words—vesicle; water-in-oil emulsion; microchannel emulsification; entrapment yield; micro-nano carriers; micro-nano reactors

1. はじめに

ベシクルは、リン脂質などの両親媒性分子により形成される二分子膜が、その内側に微小な水相を取り込んで閉鎖小胞構造を形成したナノからマイクロメートルオーダーの分子集合体である (Fig. 1). Bangham¹⁾により、ベシクルの形成が見い出されて以降、その構造上の類似性から生体膜のモデル

や、生物の機能を模倣した人工細胞の構築に向けたツールとして検討が進められている。²⁾ また、天然あるいは人工の両親媒性分子により、様々な大きさや構造のベシクルの調製、並びにその表面修飾が行われるようになり、医薬品や化粧品、食品などの産業分野で生理活性物質のキャリアとして、広範な分野で多岐に渡る利用法が検討されている。²⁾ 特に医療分野では、その高い生体適合性から DDS キャリアとして実用化され、医薬品として上市されている。また、細胞に遺伝子を導入する非ウイルスベクターとしてベシクル試薬が市販されており、イムノアッセイを利用したウイルスなどの高感度診断法も検討されている。さらには、ベシクルに酵素を内包

^a筑波大学大学院生命環境科学研究科 (〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1), ^b農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所 (〒305-8624 つくば市観音台 2-1-12)

*e-mail: sosakui@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S31 で発表した内容を中心に記述したものである。

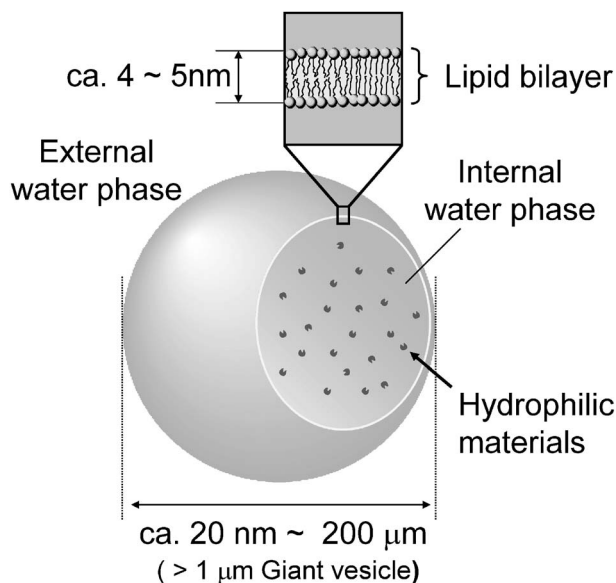


Fig. 1. Schematic Representation of a Spherical Unilamellar Vesicle Entrapping Hydrophilic Materials inside the Inner Aqueous Phase

し、診断や治療に利用する検討も進められており、³⁾例えば酵素内包ベシクルを体内で治療のために働くナノサイズの反応器、すなわち、メディカル・ナノリアクターとして利用する提案・検討が行われている。⁴⁻⁶⁾

ベシクルに物質を担持させる場合、水難溶性の抗腫瘍性物質など疎水的な物質は、疎水相互作用によりベシクルの脂質膜に組み込まれる形で保持されるため、比較的容易に担持できる。また、ベシクルの脂質膜と静電相互作用、あるいはアフィニティー相互作用を有する物質であれば、効率的に担持できる。しかし、脂質膜と相互作用しない親水的な物質をベシクル内の微小な水相に内包化することで担持させる場合、その内包効率は一般的に極めて低い。上述のようにベシクルを微小な反応場として利用し、診断や治療などを目的としたバイオリアクションシステムを構築するためには、高価な酵素をベシクル内に効率的に内包化する必要がある。また、ベシクルの大きさはキャリア及びリアクターとしての特性に大きく影響すると考えられるため、調製時にその粒径を制御できれば、最適なシステムの構築に有利である。さらに、ベシクルに疎水性及び水溶性の機能物質を効率よく同時に担持できるようになれば、新たな機能を有するベシクル製品の開発も期待される。このような背景から、親水性物質を効率的

に内包化するとともにサイズも制御できるベシクル調製法の開発を目指し、マイクロチャネル (MC) 乳化法で調製した単分散エマルジョンを基材とする新しいベシクル調製法について検討を行ったので本稿で紹介する。

2. 単分散エマルジョンを基材としたベシクルの新規調製法

本調製法の概念図を Fig. 2 に模式的に示した。はじめに、マイクロチャネル (MC) 乳化法により、ベシクルに内包したい親水性物質を含む大きさが均一の油中水滴型 (W/O) エマルジョン (乳化懸濁液) を調製する。次に、この親水性物質を包含した水滴を脂質膜で覆うとともに、外側の油相を水相に置き換える操作を行い、水滴がそのまま内部水相となるようにベシクルを調製する。この方法が実現できれば、物質を包含したエマルジョン水滴がベシクルの内部水相となるため、高い内包率が期待される。また、形成されるベシクルの大きさはエマルジョン水滴の大きさを反映するため、均一なサイズのエマルジョン水滴を基材として使えば、大きさの揃ったベシクルを調製できると考えられる。このようなコンセプトに基づき、下記の手順でベシクルの調製を試みた。

2-1. マイクロチャネル乳化法による単分散 W/O エマルジョンの調製

マイクロチャネル (MC) とは、微細加工技術によって作製したマイクロメートルスケールの微小流路のことである。本研究では、均一なチャネルを多数有するシリコン製の MC 基板⁷⁻⁹⁾を利用し、この MC 基板を介して分散相を連続相中に圧入することで単分散な親水性物質包含 W/O エマルジョンを調製した。乳化の様子の一例を Fig. 3 (a) に示した。分散相として水溶性内包物のモデル蛍光物質であるカルセインを溶解した水相を、連続相としてソルビタンモノオレエート (Span 80) を溶解した油相 (ヘキサン) を使用した。



市川創作

筑波大学大学院生命環境科学研究科准教授。1995年東京大学大学院工学系研究科博士課程修了。同年農林水産省食品総合研究所特別研究員。1997年筑波大学応用生物化学系助手。2007年現職。この間2000年スイス連邦工科大学留学。分子の協調や集合化による機能発現を化学工学的に利用したバイオプロセス開発を進めている。

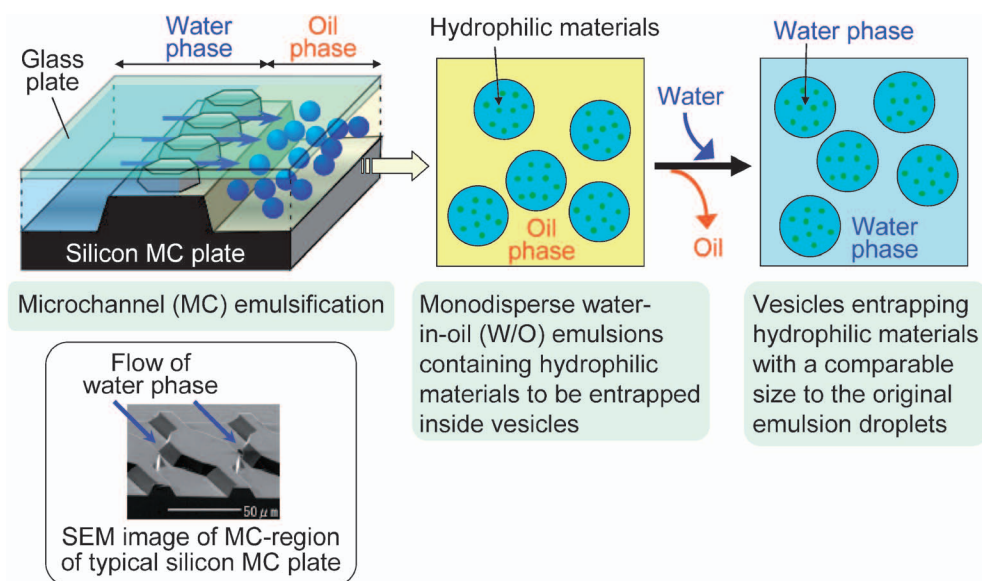


Fig. 2. Schematic Illustration of the Strategy of the “Lipid-coated Ice Droplet Hydration Method” for Preparing Vesicles from a Monodisperse Water-in-oil (W/O) Emulsion Aimed at Controlling the Size and Improving the Entrapment Yield

In this process, a monodisperse W/O emulsion obtained by the microchannel (MC) emulsification is converted to vesicles by exchanging outer phase from oil to water. In principle the obtained vesicles are expected to have a comparable size with the size of the starting emulsion droplets and to entrap hydrophilic materials inside their internal water phase with a high entrapment yield.

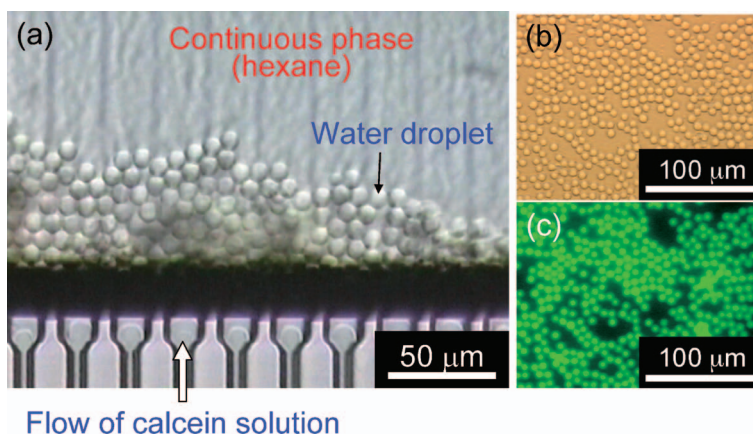


Fig. 3. Preparation of Monodisperse W/O Emulsion by the MC Emulsification Method

(a) Microphotograph of typical emulsification behavior using an MC plate width MC width, MC depth and terrace length of 5 μm, 2 μm and 24 μm, respectively. (b) Bright-field and (c) fluorescent microphotographs of the obtained monodisperse W/O emulsions containing calcein in the dispersed water phase.

表面に疎水化処理を施した均一なサイズの MC (チャンネル幅 5 μm, チャンネル深さ 2 μm, テラス長さ 24 μm) を介して, 分散相を連続相中に圧入することで大きさの揃った W/O エマルジョン (平均粒径 6.6 μm, 変動係数 10.4%) を調製することができた [Fig. 3(b), (c)].

MC 乳化法では, Span 80 などの乳化剤を連続相 (油相) に添加すると安定的にエマルジョンを調製することができる. しかし, W/O エマルジョンを基材としてベシクルを調製する過程で, この Span

80 を洗浄除去し, ベシクル脂質二分子膜を形成するリン脂質へと置換しなければならない (Fig. 4). そこで, リン脂質 egg PC を乳化剤とした MC 乳化法による W/O エマルジョンの調製についても検討した. その結果, 適切な条件の下で単分散な親水性物質包含 W/O エマルジョンを調製できることが分かった. このように, 乳化剤としてリン脂質を使ってエマルジョンを調製すれば, 合成界面活性剤である Span 80 の洗浄・置換操作を省略できるため, ベシクル調製プロセスを簡略化することができる.

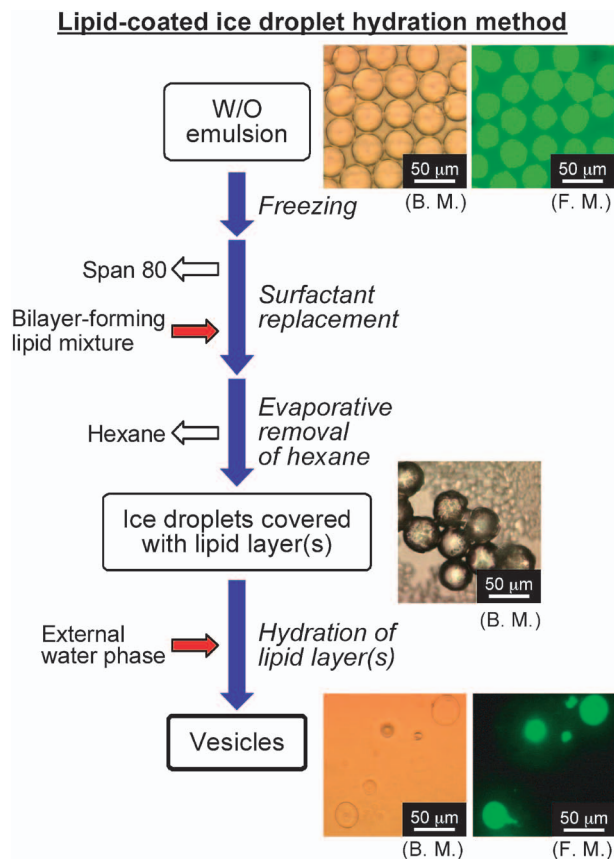


Fig. 4. Schematic Illustration of the Procedure of the “Lipid-coated Ice droplet Hydration Method” for Preparing Vesicles from a Monodisperse W/O Emulsion

Firstly, water droplets in a W/O emulsion prepared by the microchannel emulsification method were frozen immediately to prevent droplet coalescence. And then Span 80 in the continuous oil phase was replaced to bilayer-forming lipids. With keeping water droplets frozen, the oil phase was removed by evaporation. After hydration of lipid layers surrounding water droplets, vesicles entrapping hydrophilic materials were formed. Microphotographs taken at bright-field mode (B. M.) and fluorescence mode (F. M.) show that the final sizes of the prepared vesicles were comparable to the original emulsion droplet sizes and calcein was entrapped inside the internal water phase of the vesicles.

W/O エマルジョンの生産性を向上させるため、シリコン基板に非対称構造の貫通孔を作製した非対称貫通型 MC 基板¹⁰⁾によるエマルジョンの調製についても検討した。5 インチサイズのシリコン基板には、基板 1 枚当たり数百万個の貫通孔を作製できるため、W/O エマルジョン生産性の大幅な向上につながる。この MC 基板により、基板 1 枚当たり最大で約 0.11/h 程度の分散水滴を生産することができた。この基板を複数集積化したモジュールの開発により実用レベルの生産性が達成できると期待される。

2-2. W/O エマルジョンを基材としたベシクルの調製

MC 乳化法により調製した W/O エマルジョンを基材として、ベシクルを調製した。W/O エマルジョンからのベシクル調製手順を Fig. 4 に模式的に示した。まず、MC 乳化法により作製した W/O エマルジョン [Fig. 4(上段)] を液体窒素で凍結させたのち、これを 0°C 以下に保つことで、水相であるエマルジョン水滴が固体化した水滴が、液体状態の油相 (ヘキサン) に分散した懸濁状態を得た。続いて、水相を凍結させたまま油相の一部を除去し、ここにベシクル構成脂質を溶解した油相を添加する操作を繰り返すことで、連続相中に含まれる Span 80 を希釈・洗浄すると同時に、ベシクルの形成に必要な脂質を含む連続相へと置換した。この操作により Span 80 は希釈・洗浄の倍率に応じた割合で除去される。通常の操作では 1000 倍に希釈・洗浄し、Span 80 の 99.9% が除去されるため、ベシクル形成に対する残存 Span 80 の影響はないと考えられる。ベシクルを構成する脂質としては、主に egg PC, コレステロール及びステアリルアミンの混合物を使用した。また、上述のようにリン脂質を乳化剤として使用して W/O エマルジョンを調製し、これを基材としてベシクルを調製する場合、この Span 80 の洗浄・置換操作を省略することができる。

次に、サンプルの温度を 0°C 以下に保ったまま油相のヘキサンを蒸発・除去することで、ヘキサンに溶解していた脂質を水滴の周囲に析出させ、水滴の周囲を脂質膜の層で覆った [Fig. 4(中段)]。これに外水相溶液を添加して脂質膜を水和することで、ベシクルを調製することができた [Fig. 4(下段)]。¹¹⁻¹³⁾ 調製されたベシクルの内水相が蛍光を発していることから、水溶性のモデル内包物であるカルセインを内包したベシクルが形成されていることが分かった。また、ベシクルの平均粒径は 36.3 μm (変動係数 31.4%) であり、基材としたエマルジョンの平均粒径 37.3 μm (変動係数 11.9%) を反映した大きさのベシクルが調製できた。この結果、本調製手順により親水性物質を内包し、かつ粒径が制御されたベシクルを調製できることが分かった。

ベシクル調製法の基材として使用する W/O エマルジョンの液滴サイズは、MC 乳化に使用する MC 基板のチャンネルサイズや形状などにより制御するこ

とができる。様々な大きさの単分散 W/O エマルションを基材として用いてベシクルの調製を行った結果、各エマルション液滴の大きさを反映した様々な大きさのベシクルを調製することができた。なお、Fig. 4 に示したベシクルの形成プロセスを踏まえ、本ベシクル調製法を“脂質被覆氷滴水和法 (lipid-coated ice droplet hydration method)”と呼んでいる。

3. 内包率の向上と生体高分子の内包化

上記のベシクル調製法により種々の水溶性物質をベシクルに効率的に内包化する手法について検討した。水溶性の蛍光物質カルセインをモデル内包物質として用い、ベシクル調製時に使用する脂質量、内水相量及び外水相量を変化させてベシクルを調製した結果、ベシクルへのカルセインの内包率はこれらの操作因子の影響を受けることが分かった。そこで、ベシクル調製時の [(脂質量)/(内水相量)] 比率に着目し、内包率に及ぼす影響を系統的に調べたところ、この比率の増加に伴い内包率が向上することが分かった。

その一方で、この [(脂質量)/(内水相量)] 比率が高すぎると、脂質膜の水和操作を行った際にベシクルが凝集する傾向が観察され、均一なベシクルを作製することが困難になった。そこで、過剰な脂質を使用せずにさらに高い内包率を達成できる操作条件について検討した。その結果、脂質膜の水和に用いる外水相溶液に粒径 100 nm 以下の小さなユニラメラベシクルを共存させておくことや、水和操作を行う際に内壁を疎水化処理したガラス容器を用いることにより、内包率が向上することを見出した。これらの検討の結果、カルセインに対して 43% という高い内包率を達成することができた。

さらに、生体関連高分子であるデキストラン、ウシ血清アルブミン及び α -キモトリプシンも本調製法により効率的にベシクルに内包することができた。内包率は 20-50% 程度であり、内包効率が比較的高い方法として知られている逆相蒸発法¹⁴⁾や凍結融解法¹⁵⁾などの既往の調製法に匹敵する高い内包率を達成できた。本ベシクル作製法は、このような高い内包率に加えて、ベシクルのサイズ制御を同時に達成できる点が大きな特長である。特に、マイクロメートルオーダーのジャアントベシクル¹⁶⁾への内包率としては極めて高い値を実現できる調製法であることが分かった。^{12,13)}

本調製法でベシクルに内包された α -キモトリプシンの反応性を評価するため、脂質膜透過性の基質であるベンゾイル-L-チロシン-p-ニトロアニリドをベシクル外水相に加え、¹⁷⁾ベシクル内で加水分解により生じる p-ニトロアニリンの生成濃度を吸光度により測定した。その際、外水相にはキモトリプシンインヒビターを加え、外水相での反応を阻害した。その結果、p-ニトロアニリンの生成が観測され、その濃度は経時的に増加した。これは、外水相に添加した基質がベシクル脂質膜を透過してベシクル内水相に入り、ベシクル内でキモトリプシンにより加水分解されたことを示す。この結果、本調製法により α -キモトリプシンは活性を保持した状態でベシクルに内包化されていることが分かった。また、本法で調製したベシクルの脂質膜は既存法で調製されたベシクルと同様の物質透過能/バリア能を有することが示唆された。

4. おわりに

本調製法では、上述の親水性の生体関連高分子のみならず、微粒子などの懸濁液を内水相としたベシクルの調製も可能と考えられ、ベシクルを生理活性成分のキャリア、あるいは、微小なリアクターとした新たなシステムの開発に向けた有用な基礎技術である。取り分け、ベシクルが細胞類似の特殊な閉鎖環境を提供できるという特徴を活かし、酵素などの生体機能性分子を組み込んだマイクロあるいはナノサイズのバイオリアクターを作製し、通常の *in vitro* 環境下では行えない反応系を構築することができれば、有用物質の生産や分析・診断などに応用できると考えられる。

ベシクル 1 つの内水相は数フェムト-ピコリットルという極微量である一方、数ミリリットルのベシクル懸濁液には 10^6 から 10^{12} 個程の莫大な数のベシクルが存在する。個々のベシクルをリアクターと捉えて反応を行い、その結果を分析・評価して分別することができれば、スクリーニング検査などの網羅的な分析・診断技術の飛躍的な効率化が期待される。その際、本稿で紹介したベシクルの調製技術が応用できると考えられる。また、ベシクル内で反応を行うためには、ベシクル内で反応物質を混合する必要がある。脂質膜を透過する物質の場合は、上述の α -キモトリプシン内包ベシクルのように外水相に添加する方法が考えられる。一方、膜を透過しな

い物質の場合は、ベシクル同士を融合させて内水相を混合する方法が考えられる。¹⁸⁾

以上、マイクロチャネル (MC) 乳化法で単分散エマルジョンを調製し、これを基材としてベシクルを調製することで親水性物質を効率的に内包化するとともにサイズも制御できる新規なベシクル調製法について紹介した。両親媒性分子の集合化により形成されるベシクルは、分子間のミクロな相互作用が系のマクロな挙動を引き起こし、単独の分子では発揮し得ない機能をダイナミックに発現する。それは、生物が分子の組織化と連携により高度な機能を体現するかのようである。このミクロとマクロ両方の視点で現象をみつめながら、今後、更なる検討・改善を進め、広く実用に供せられるベシクル調製技術となるよう知識と技術を系統的に集積していきたい。

謝辞 本研究は NEDO 産業技術研究の助成を受けて行いました。また、研究推進に当たって、杉浦慎治氏、籠田哲朗氏、Peter Walde 氏、小林 功氏、中嶋光敏氏、向高祐邦氏他多くの方々の協力を得ました。謝意を表します。

REFERENCES

- 1) Bangham A. D., Horne R.W., *J. Mol. Biol.*, **8**, 660–668 (1964).
- 2) “Riposomu Oyo no Shintenkai,” eds. by Akiyoshi K., Tsujii K., NTS, Tokyo, 2005.
- 3) Walde P., Ichikawa S., *Biomol. Eng.*, **18**, 143–177 (2001).
- 4) Petrikovics I., Hong K., Omburo G., Hu Q. Z., Pei L., McGuinn W.D., Sylvester D., Tamulinas C., Papahadjopoulos D., Jaszberenyi J. C., Way J. L., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **156**, 56–63 (1999).
- 5) Petrikovics I., McGuinn W. D., Sylvester D., Yuzapavik P., Jiang J., Way J.L., Papahadjopoulos D., Hong K., Yin R., Cheng T.-C., DeFrank J., *J. Drug Deliv.*, **7**, 83–89 (2000).
- 6) Leduc P. R., Wong M. S., Ferreira P. M., Groff R. E., Haslinger K., Koonce M. P., Lee W. Y., Christopher L. J., Mccammon J. A., Monteiro-Riviere N. A., Rotello V. M., Rubloff G. W., Westervelt R., Yoda M., *Nat. Nanotechnol.*, **2**, 3–7 (2007).
- 7) Kawakatsu T., Kikuchi Y., Nakajima M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 317–321 (1997).
- 8) Sugiura S., Nakajima M., Iwamoto S., Seki M., *Langmuir*, **17**, 5562–5566 (2001).
- 9) Nakajima M., *Jpn. J. Food Eng.*, **5**, 71–81 (2004).
- 10) Kobayashi I., Mukataka S., Nakajima M., *Langmuir*, **21**, 7629–7632 (2005).
- 11) Ichikawa S., Kuroiwa T., JP Patent 4009733 (2007).
- 12) Kuroiwa T., Nakajima M., Sato S., Mukataka S., Ichikawa S., *Membrane*, **32**(4), 229–233 (2007).
- 13) Sugiura S., Kuroiwa T., Kagota T., Nakajima M., Sato S., Mukataka S., Walde P., Ichikawa S., *Langmuir* (accepted).
- 14) Szoka F., Papahadjopoulos D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4194–4198 (1978).
- 15) Kirby C., Gregoriadis G., *Bio/Technology*, **2**, 979–984 (1984).
- 16) “Giant Vesicles: Perspectives in Supramolecular Chemistry, Vol. 6,” eds. by Luisi P.L., Walde P., John Wiley & Sons Inc., New York, 2000.
- 17) Blocher M., Walde P., Dunn I. J., *Biotechnol. Bioeng.*, **62**, 36–43 (1999).
- 18) Ichikawa S., Walde P., *Langmuir*, **20**, 941–949 (2004).