

## 学生実習における卵黄を用いたリポソーム調製の試み

杉山育美\*, 佐塚泰之

## Preparation of Liposome Using Egg Yolk

Ikumi SUGIYAMA\* and Yasuyuki SADZUKA

*School of Pharmacy, Iwate Medical University, 2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, Japan*

(Received January 24, 2011; Accepted July 20, 2011; Published online July 26, 2011)

In this study, 162 students in the 6 year Pharmacy Program at the School of Pharmacy, Iwate Medical University were asked to prepare liposomal preparations using chicken egg yolk and to evaluate their properties with the aim of developing novel liposomes. High-purity lecithins are generally used for preparing liposomes but they are expensive. On the other hand, egg yolk has various components, including lecithin and cholesterol, which are important components for the formation of liposomes, so it was hypothesized that liposomes prepared from egg yolk may participate in the formation of cell membrane in chicks. Both liposomes from egg yolk (YL) and from lecithin (LL) exhibited Maltesian crosses using a polarizing microscope and multilamellar vesicles were observed, confirming that liposomal preparations from egg yolk were useful. The particle size of YL was about 100 nm with one peak. Furthermore, the YL are believed to be viable under different conditions because the particle size did not change when they were prepared in buffers having different pH values. The results of these experiments indicate that liposomal preparations from egg yolk can serve as natural materials, although some obstacles remain. This is a unique approach for carrying out practical training in our 6 year pharmaceutical science program.

**Key words**—liposome; egg yolk; polarized light; Maltesian cross

## 緒 言

リポソームはリン脂質とコレステロールよりなる閉鎖小胞構造をしており、その形態から優れた薬物キャリアとして Drug Delivery System (DDS) 技術に用いられている。<sup>1-3)</sup> わが国においては深在性真菌症治療にアムビゾーム®点滴静注用 50 mg (2006 年～) が、HIV 由来のカポジ肉腫治療 (2007 年～) や再発卵巣がん治療 (2009 年～) にドキシル®注 20 mg が承認され治療成績をあげている。

現在、DDS キャリアとしてのリポソームは注射剤だけでなく経皮吸収型製剤<sup>4,5)</sup> や化粧品<sup>6)</sup> としての有用性も期待され様々な研究が行われている。医薬品として生体内への適応を目指す場合、製剤材料においても高い純度が求められるが、化粧品やサプリメントとして能力を発揮することを目的とした場合にはかならずしも高い純度を必要としない。すなわ

ち、現在はすべての研究においてリポソームの調製には高純度のリン脂質 (ホシファチジルコリン, レシチン) が使用されているが、化粧品としてリポソームを研究・開発する場合には安価かつ容易な方法での調製が適応範囲や使用頻度の拡大につながるものと考えられる。

一方、薬学部は 6 年制となり臨床薬学教育の充実とともに高度な基礎教育がモデル・コアカリキュラムにより求められている。薬学教育協議会平成 20 年度薬剤学教科検討委員会資料にて各大学における薬剤学関連実習内容が報告されており、各大学において特色ある実習を行っている。本学では 6 年制教育に求められるアドバンスド教育を実践するにあたり、近年、製薬メーカーでの需要が高まっている DDS 技術を習得すること、すなわちリポソームのような最先端のキャリアの調製や物性の解析に取り組みせることが理想であると考えた。さらに、研究という視点においてより高い教育効果を得ることを目的とし、既に結果が明らかになっていることでは

岩手医科大学薬学部

\*e-mail: isugiym@iwate-med.ac.jp

なく未知の事象を研究し結果及び考察させることが望ましいという結論に至った。しかしながら、学生実習として160人の学生がリポソーム調製の技術を習得するためには多くのリン脂質が必要となりコスト面からも実施が困難であることは明確であった。そこでリポソーム研究で使用される高純度のリン脂質ではなく未精製の卵黄を用いた場合にもリポソームの調製が可能であると考えた。卵黄から抽出した高純度のレシチンはリポソーム研究の初期より現在に至るまでリポソームの構成脂質として一般的に用いられているが、<sup>7,8)</sup> 鶏卵の卵黄のみを簡易操作により分離しリポソームの調製に用いるという研究はこれまでに行われていない。しかしながら、卵黄中にはリポソームの構成に必要なもう1つの脂質であるコレステロールも含まれていること (Table 1),<sup>9)</sup> リポソームは細胞膜モデルとして使用されるほど細胞膜と類似していることなどの理由より、リポソーム膜の形成に優れていることが期待された。すなわち、本論文はリポソームの調製に使用する高純度のリン脂質の代替試料としての卵黄の可能性を評価するとともに、薬学実習で最先端の研究を実施することによる学生の研究力向上を目指し行った結果を報告したものである。実習における学生の理解度や教育効果は学生により導かれた結果及び考察を教員が検証することにより評価した。

## 実験方法

**1. 試料及び試薬** レシチン (Lecithin from Egg) は和光純薬より購入した。鶏卵は一般的に販売されているものを購入した。本論文中では卵黄より抽出した高純度のリン脂質を“レシチン”、鶏卵の黄身のみを分離したものを“卵黄”と記した。リ

Table 1. Nutritional Value per 100 g of Raw Chicken Egg-yolk<sup>9)</sup>

Composition	Volume (g)
Water	48.2
Protein	16.5
Fat	33.5
saturated fatty acid	9.2
unsaturated fatty acid	9.2
cholesterol	1.4
Carbohydrate	0.1
Others	1.7

ポフラビン及びアスコルビン酸は和光純薬より購入した。その他の試薬はすべて特級を用いた。

**2. リポソームの調製** 卵黄を用いたリポソームを調製するため、鶏卵の卵黄のみを分取し激しく攪拌した。攪拌した卵黄に9倍容のクロロホルム/メタノール (4/1, v/v) 混液を添加することにより希釈し、卵黄を均一に分散させるためにバス型超音波洗浄機 (US-4R: アズワン, 高周波出力 80 W) を用いて 50°C, 40 kHz で 10 分間の超音波処理を行った。その後、1750×g で 10 分間遠心分離を行い、変性したタンパク質と卵黄を分離した。分離した卵黄希釈液 1.0 g をナス型フラスコに分取しクロロホルム/メタノール (4/1, v/v) 混液を約 50 ml 加えた。その後ロータリーエバポレーターを用いて有機溶媒を除去しナス型フラスコに脂質薄膜を形成した。ここに 9.0% スクロース 10 mM 乳酸緩衝液 (pH 4.0) 若しくは 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を 7.0 ml 加え、65°C の水浴中で再水和し卵黄リポソーム懸濁液 (Egg Yolk-liposome: YL) を得た。再水和に 9.0% スクロース 10 mM 乳酸緩衝液 (pH 4.0) を用いたものを YL4, 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いたものを YL7 とした。

コントロールとしてレシチンを用いてリポソームを調製した。レシチン 1.0 g に 9 倍容のクロロホルム/メタノール (4/1, v/v) 混液を加え溶解した後、ナス型フラスコに分取し卵黄リポソームと同様の操作を行いレシチンリポソーム懸濁液 (Lecithin-liposome: LL) とした。LL においても再水和には 9.0% スクロース 10 mM 乳酸緩衝液 (pH 4.0) 若しくは 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用い、それぞれ LL4 及び LL7 と表記した。

**3. ビタミン含有リポソームの調製** 内封する薬物の物性によるリポソームの形態や安定性への影響を評価するため、モデル薬物としてビタミン B<sub>2</sub> であるリボフラビン及びビタミン C のアスコルビン酸を用いた。リボフラビンは薄膜調製時に用いるクロロホルム/メタノール (4/1, v/v) 混液に 0.05 mg/ml となるように添加及び溶解し、アスコルビン酸の添加は再水和に用いる緩衝液に 0.05 mg/ml となるように溶解して用いた。

各リポソームは以下の通りに表記した。

リボフラビン添加卵黄リポソーム (pH 4) : YL4-B<sub>2</sub>

リボフラビン添加卵黄リポソーム (pH 7) : YL7-B<sub>2</sub>

アスコルビン酸添加卵黄リポソーム (pH 4) : YL4-C

アスコルビン酸添加卵黄リポソーム (pH 7) : YL7-C

リボフラビン添加レシチンリポソーム (pH 4) : LL4-B<sub>2</sub>

リボフラビン添加レシチンリポソーム (pH 7) : LL7-B<sub>2</sub>

アスコルビン酸添加レシチンリポソーム (pH4) : LL4-C

アスコルビン酸添加レシチンリポソーム (pH7) : LL7-C

**4. リポソームの観察** リポソームの形成は偏光顕微鏡 (BX51: OLYMPUS) にて観察し、マルタの十字を有する球形の存在により確認した。<sup>10-13)</sup> なお、複屈折を利用して観察するため、上下の偏光フィルターはクロスニコルとなるよう設置した。

**5. 粒度分布測定** 各リポソームは 40 kHz で 20 分間超音波照射した後、Zetasizer Nano-ZS (Sysmex) を用いて粒度分布を測定した。3 サンプルの平均値を算出し、各条件におけるリポソームの粒子径とした。

## 結 果

**1. リポソーム調製時の観察所見** 薄膜形成時の脂質膜の様子を観察した結果、YL, LL ともに黄色透明の均一な薄膜が得られた。アスコルビン酸を添加したりポソーム群はこの時点では空リポソームと同条件であるため、YL, LL は同様の薄膜を形成した。リボフラビンを添加した場合、構成脂質としてレシチンを用いた群で均一な黄色薄膜が形成された。一方、卵黄を用いた群は、黄色薄膜が認められたがフラスコの底には濃黄色の膜、若しくは粘性の高い濃黄色液が残存していた。

次に、再水和後のリポソーム懸濁液の様子を肉眼で観察した結果、いずれも薄い黄色を帯びた乳白色の懸濁液であった。また懸濁液中には多少の違いがあったが、白色若しくは黄色の浮遊物が観察された。

**2. 偏光顕微鏡を利用したりポソームの形成確認** 調製したりポソームを偏光顕微鏡にて観察した。一般的なりポソーム調製にて用いられるレシチンで

調製した LL7 を偏光顕微鏡で観察した結果、Fig. 1 (a) に示すように円形の中が黒く十字に抜けた像が認められたことより、多重膜リポソームが形成されていることが明らかとなった。さらに、卵黄より調製した YL7 についても同様に円形の内部が黒く十字に抜けたマルタの十字が認められた。以上の結果より、卵から精製された高純度のレシチンと同様のリポソームが未精製の卵黄からも調製可能であることが明らかとなった。

調製時に各モデル薬物を添加したりポソームを観察した結果、リボフラビン、アスコルビン酸のいずれを添加した場合にもマルタの十字を観察することができた。しかしながら、これらマルタの十字は Fig. 1 で示したようなものばかりでなく様々な形態が観察された。円光が二重になっておりリポソームが重なっているような形態 [Fig. 2 (a)], 強い円光の中に光の十字がみられる形態 [Fig. 2 (b)], 4 ッ葉のような形態 [Fig. 2 (c)], 一重の円光を有する形態 [Fig. 2 (d)], 中心が大きく抜けた形態 [Fig. 2 (e)] という 5 形態が多く認められた。このような形態の種類及び比率は脂質組成や緩衝液の種類による相違は認められなかった。

また、薬物としてリボフラビンを添加した場合、未添加時と同様のマルタの十字を観察することができたが、円形をとっていなかったり、十字の部分が歪んでいたりしているものが存在しリポソームの形成率が低下している可能性が考えられた。さらに、他のサンプルに比べて対象物が暗く見えたことから吸収スペクトルを有するリボフラビンが光を遮断していることが示唆された。一方、アスコルビン酸を

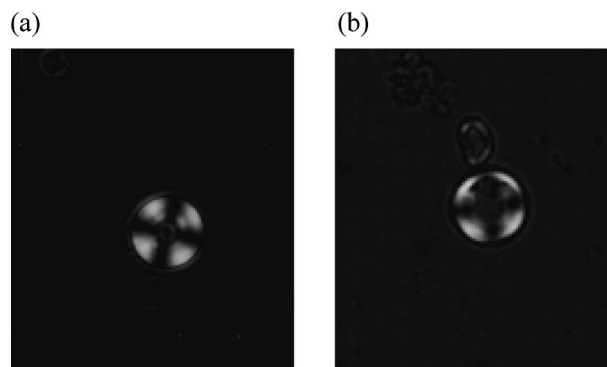


Fig. 1. Malthesian Crosses of Plane Liposomes

(a) Plane liposome from egg lecithin. (b) Plane liposome from egg yolk.

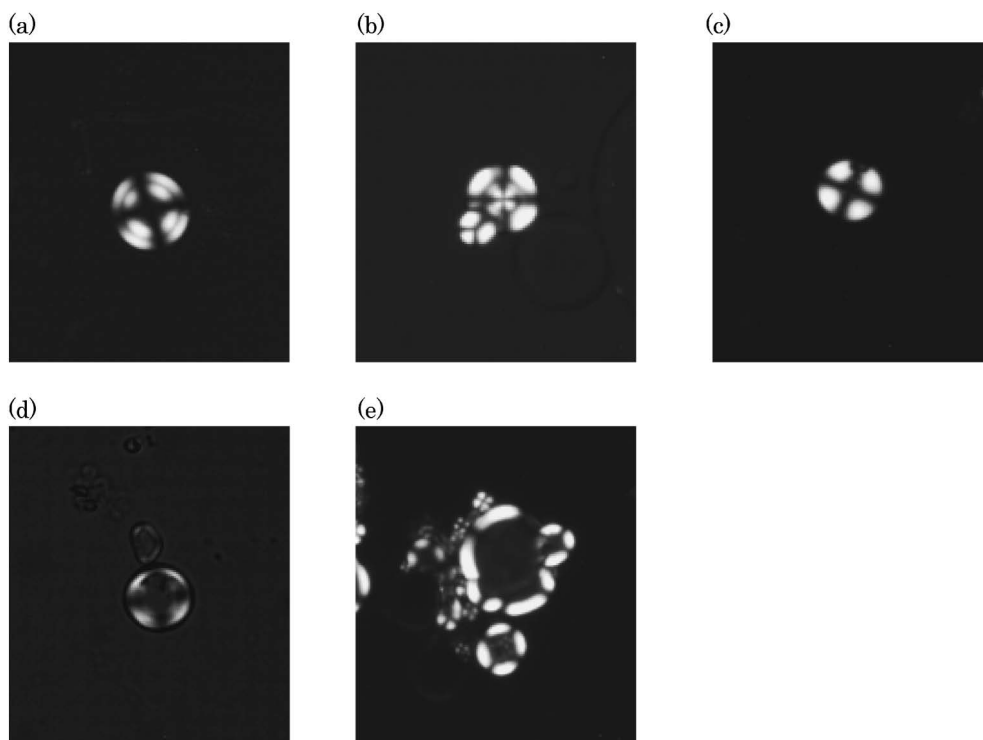


Fig. 2. Malthesian Crosses of Various Types

(a) Double halo. (b) Conspicuous cross in strong halo. (c) Four leaves shape. (d) Single halo. (e) Elimination center of sphere.

添加したサンプルにおいてはビタミン未添加リポソームと同様に円形の中に十字が抜けたマルタの十字を観察することができ、高い確率でリポソームを調製できていることが確認された。しかしながら、偏光顕微鏡で観察している途中、ビタミンを添加した YL はマルタの十字が変形・消失する場合があります、リポソームとしての安定性が悪いことが考えられた。

**3. 粒度分布測定** 各サンプルの粒子径の測定結果を Table 2 に示した。いずれのサンプルも偏光顕微鏡観察後に 20 分間の超音波処理を行ったため、粒子径は約 100 nm であった。レシチンを用いた LL の粒子径は YL に比べると大きい傾向が認められた。緩衝液の pH による粒子径に大きな差は示されなかったが、アスコルビン酸添加レシチンリポソームで pH 4.0 の 9.0% スクロース 10 mM 乳酸緩衝液を使用した場合 (LL4-C) に粒子径が増大する傾向が認められた。YL ではこのような傾向がなく、いずれの条件においても同程度の粒子径が得られた。LL と YL の代表的なヒストグラムを比較すると、LL は鋭いピークを有する一方で、YL の粒度分布は広くなだらかであることが明らかとなった

Table 2. Particle Size of Each Liposome

Lipid	Contained drug model	Buffer pH	Sample name	Particle size (nm)
Egg Yolk	—	4.0	YL4	88.0 ± 17.7
		7.0	YL7	66.7 ± 13.4
	Riboflavin	4.0	YL4-B <sub>2</sub>	90.1 ± 15.6
		7.0	YL7-B <sub>2</sub>	94.1 ± 29.8
	Ascorbic acid	4.0	YL4-C	85.3 ± 30.1
		7.0	YL7-C	65.8 ± 20.7
Lecithin	—	4.0	LL4	120.3 ± 32.4
		7.0	LL7	79.1 ± 24.1
	Riboflavin	4.0	LL4-B <sub>2</sub>	106.2 ± 26.6
		7.0	LL7-B <sub>2</sub>	152.7 ± 44.8
	Ascorbic acid	4.0	LL4-C	244.9 ± 176.0
		7.0	LL7-C	95.1 ± 14.4

Mean ± S.D. (n=3).

(Fig. 3).

## 考 察

リポソームは優れた薬物キャリアの 1 つとして多くの研究が行われており、現在は遺伝子導入<sup>14)</sup>や経皮吸収型製剤<sup>7,8)</sup>、経粘膜吸収型製剤<sup>15)</sup>等への応用

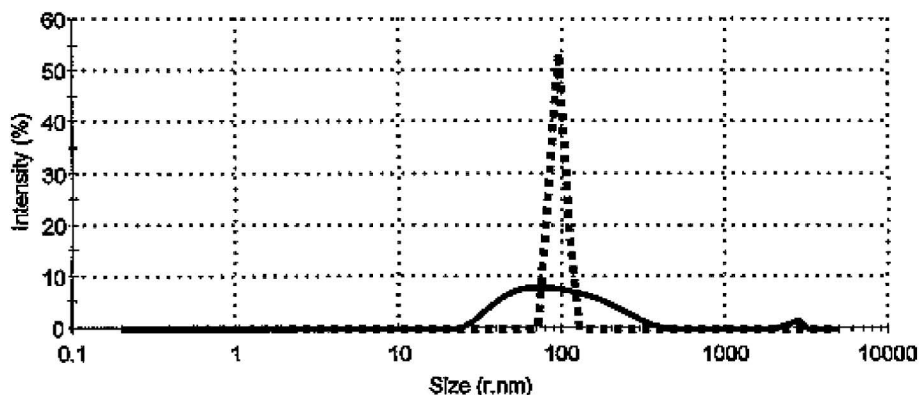


Fig. 3. Size Distribution of Liposomes by Intensity  
Solid line and dotted line express YL and LL, respectively.

が試みられている。その一方、リポソーム製剤は原材料が高価であることや多額の研究開発費が必要であること、特別な製剤技術を有すること等の理由より高い薬価がつけられており、重症度の低い疾患や予防には応用し難いことが現状である。そこで、本研究では原材料費が安価な卵黄を使用しリポソームの調製を試みた。また、本研究の実施により薬学部6年制教育で求められているアドバンスド教育の一環として学生実習におけるリポソーム調製や評価といった最先端の研究を実施できることが期待できると考えた。本論文の結果及び考察は学生が提出した実習レポートより抜粋し、教員が検証したものであり、学生の理解度の高さが窺える内容となった。

本研究は、卵黄中にはリポソームの構成に必要なレシチンとコレステロールが含まれておりヒヨコの細胞を形成するためにこれらが適切な割合で含有されていることに着目し、卵黄成分がリポソーム膜の形成に優れていることを期待し検討した (Table 1).<sup>9)</sup>

卵黄を使用したリポソームの調製を試みたところ、調製工程において高純度のレシチンを使用した場合と同様に懸濁液を得ることができた。また、これら懸濁液を偏光顕微鏡で観察した結果、マルタの十字を確認することができた。マルタの十字とは、ラメラ構造の液晶に視覚的な異方性があることを利用した現象であり、偏光顕微鏡でラメラ構造を有する物質を観察した場合に液晶部分が強い光を発するものである。多重膜リポソームが形成されている場合、マルタの十字を持った球形が観察されることが報告されている。<sup>10)</sup> すなわち、本検討においてマル

タの十字が観察できたことより、卵黄からリポソームの調製が可能であることが証明された。モデル薬物として添加したりボフラビン及びアスコルビン酸はリポソームの観察中にマルタの十字を変形させたり消失させたりしたことより、卵黄リポソームを不安定化させてしまう傾向が示唆された。なお、本検討では添加薬物がリポソーム形成に与える影響を評価することを目的としているため、リポソームへのモデル薬物の導入量は測定しなかった。

調製したサンプルの粒子径を測定した結果、いずれも約 100 nm の粒子径であった。本検討では、超音波処理を行うのみでエクストルージョン法による粒子のサイジングを行っていないため、医薬品として適切な粒子径を得ることは期待できないと考えられる。しかし、超音波照射のみでも約 100 nm の粒子径を得られたことより製造工程における整粒操作において微小粒子を簡便に得られることが期待された。また、LL と YL のヒストグラムを比較すると LL に比べ YL の粒度分布はブロードを示すことが明らかとなり (Fig. 3)、これは卵黄中の脂質がレシチンのみではなく複数の脂質が含まれていることに基づくものと考えられた。その一方、YL は緩衝液による粒子径への影響がみられず、いずれの条件でも同程度の値を得ることができた。すなわち、卵黄中には多くの成分が存在しているため、レシチンを使用する場合よりも内封可能な薬物の種類や緩衝液の種類など様々な条件に柔軟に対応できるものとも考えられ、その有効性が期待された。

以上の結果より、卵黄を用いたリポソームの調製が可能であることが明らかとなった。偏光顕微鏡に

よる観察の結果、マルタの十字として複数の異なる形態が観察され、このような形態の違いはリポソームの膜構造や薬物の局在などを示している可能性が示唆された (Fig. 2)。YL を偏光顕微鏡で観察した際、LL では観察されなかったリポソームの変形や崩壊が認められた。また、わずか 20 分間の超音波照射により YL の粒子径は 100 nm 以下になったことより YL はリポソーム膜が柔らかく不安定である可能性が考えられ、安定性を含めさらなる検討の必要性が考えられた。天然物である卵黄を精製することなく、目的以外の物質を含んだままりポソームの調製に使用することについては多くの問題が存在することが明らかである。しかしながら、安価で簡便に DDS 技術を使用できることは、経皮吸収型製剤や化粧品など様々な分野での応用が可能となり人々の生活を豊かにするだけでなく、学生実習における DDS 技術の習得も可能であると考えられる。本実習においては学生の結果及び考察を教員が検証した結果、いずれも同等の結果が得られたことより十分な教育的効果があったと言える。この効果は定期試験等にて出題されたキャリアに関する問題の正答率の高さからも窺うことができ、学生実習における学生の目標到達度及び理解度は予想以上に高いと考えられた。

卵黄を用いてリポソームの調製が可能であることを明らかにした本研究は初期の有用なデータであることが示唆されるとともに、薬学部が 6 年制となり臨床薬学教育の充実とともに求められる基礎分野でのアドバンスド教育を実施するために有効でユニークな手段であると考えられた。

**謝辞** 本論文は岩手医科大学薬学部の第 1 期生、以下 162 名が創剤学実習で行ったデータに基づき作成したものである (敬称略)。

青木さゆり、秋田智康、浅沼優美、浅利達大、阿南如子、阿部直人、安部 望、阿部みずほ、安楽早希、飯塚一平、井澤理枝、石川 祐、石田理美、石田 舞、泉澤 満、伊藤由佳、稲垣学人、井上範昭、猪股千枝、岩田迪彦、岩間杏奈、上田未希、上田佑毅、白井健裕、采澤亜希子、梅木香里、海老澤真里奈、遠藤希美加、及川慎吾、及川嵩人、大宮麻美、大村麗美、岡田瑞樹、丘村航史、押切勇樹、小野晴章、小野玲佳、柏崎郁美、加藤大器、釜石圭

子、上山裕人、川井由貴、川村宗右、菅野美紅、菊池秋桜子、菊池光太、菊池里美、菊地 望、菊池喜裕、城戸直人、工藤彩花、工藤有未、工藤祥洋、久保田絵里花、熊谷裕介、黒田英介、黒田啓希、小泉恵莉香、小西 芳、小林大祐、小林哲郎、小松豊徳、今野拓哉、坂本健太郎、櫻井一成、佐々木佳奈子、佐藤 彩、佐藤龍彦、佐藤友美、佐藤 史、佐藤良香、佐藤麻理、佐藤佑樹、佐藤ゆう美、佐藤佑香、佐野祐子、澤口紗希、志賀香奈絵、庄司明日菜、城内亜沙子、白鳥裕佳、菅原由人、杉澤隆幸、鈴木駿人、鈴木ひとみ、鈴木 綾、瀬川奈美子、瀬戸勇輝、瀬野尾香澄、柚悠華子、反田佐紀子、高木はるか、高橋歩衣、高橋久美子、高橋慧成、高橋紗世、高橋翔太、高橋美緒、高橋 翠、高橋悠真、高村詩織、高谷真一、武石竜弥、田代翔平、多田有花、立川知英、立谷太一、田邊麻莉、田村宏明、千田泰太郎、千葉祥江、寺澤莉紗子、照井裕貴、中里美樹、中館弘多郎、長野満帆、成田拓弥、南場龍彦、西村俊輔、西村忠晃、布川真希、野上友希、野崎奈央、信田磨亮、畑中大知、濱名邦智、平賀彩江子、藤岡志保、藤嶋明日香、藤村哲雄、藤邑優希、戸来菜摘、星 和也、星 さわか、松浦広大、松岡絢子、松元 茜、松本成華、松本典子、松本幸乃、丸本慎太郎、三浦友希恵、三浦 僚、三上琴加、三田地沙織、皆川知未、村田佳子、森岡広記、八重樫千晶、谷地龍平、矢内忠輔、山内麻里、山口英美、山口由太、横林恵理子、吉池比香里、吉田このみ、吉田秀成、吉野聡信、若林 港、渡辺さつき、割寄由子

## REFERENCES

- 1) Hashida M., Takakura Y., "Seitainai Yakubutsu Soutatsu Gaku," ed. by Ikada Y., Sangyo Tosho, Tokyo, 1994, pp. 34-93.
- 2) Inoue K., Nojima S., "The Liposomes," eds. by Nojima S., Sunamoto J., Inoue K., Nankodo Co., Ltd., Tokyo, 1988, pp. 1-19.
- 3) Yasuda T., "The Liposomes," eds. by Nojima S., Sunamoto J., Inoue K., Nankodo Co., Ltd., Tokyo, 1988, pp. 246-276.
- 4) Fang J. Y., Sung C. K., Lin H. H., Fang C. L., *J. Control. Release*, **60**, 1-10 (1999).
- 5) Cevc G., Vierla U., *J. Control. Release*, **141**, 277-299 (2010).

- 6) Betz G., Aeppli A., Menshutine N., Leuenberger H., *Int. J. Pharm.*, **296**, 44–54 (2005).
- 7) Sunamoto J., Sato T., Hirota M., Fukushima K., Hiratani K., Hara K., *Biochim. Biophys. Acta*, **898**, 323–330 (1987).
- 8) Massing U., Cicko S., Ziroli V., *J. Control. Release*, **125**, 16–24 (2008).
- 9) Clinical Nutrition Research Institute, “Jouyoryo Meyasu Shokuhin Seibun Hayamihyo,” 3rd ed., Ishiyaku Publishers, Inc., Tokyo, 2006, pp. 384–385.
- 10) Shinoda K., Friberg S., “Emulsions and Solubilization,” A Wiley-Interscience, New York, 1986, pp. 159–169.
- 11) Hato M., Minamikawa H., *Lungmuir*, **12**, 1658–1665 (1996).
- 12) Hato M., Minamikawa H., Tamada K., Baba T., Tanabe Y., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **80**, 233–270 (1999).
- 13) Niraula B. B., Seng N. T., Misran M., *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **236**, 7–22 (2004).
- 14) Li D. S., Chono S., Huang L., *J. Control. Release*, **126**, 77–84 (2008).
- 15) Takeuchi H., Yamamoto H., Kawashima Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 39–54 (2001).