

両親媒性物質の自己組織化が造る世界 —ベシクル形成を中心に—

上野 雅晴

The World Constructed by Self-organization of Some Amphiphils —with a Focus on Vesicle Formation—

Masaharu UENO

Graduate School of Pharmacy, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

(Received September 9, 2011)

The world constructed by self-organization of some amphiphils was discussed on the basis of micelle formation, vesicle formation, and oriented-nano-wire formation. First, the micelle formation of a both water- and oil- soluble surfactant, Aerosol OT, was discussed. Solution states of micelles and monomer were discussed on the basis of thermodynamic and NMR spectroscopic analyses of micelle formation. Next, micelle-vesicle transition was discussed. It was proposed that the phospholipid LUV formation by removing detergents and destruction by adding detergents occurred *via* 4 stages. The 4 stage model instead of the 3 stage model could not only elucidate the complicated phenomena observed during micelle-vesicle transition, but predicted the size and properties of the vesicles formed by detergent removal from mixed micelles. Next, the vesicle formation of a fatty acid with a single hydrophobic chain different from phospholipid, which has two hydrophobic chains, was discussed. The vesicle formation was strongly affected by the presence of preformed vesicles and the size was biased on the preformed vesicles. It was shown there exist two pass ways in the process of micelle-vesicle transition by pH jump. One is fission of the preformed vesicles after transfer of monomers from newly added oleate micelles and the other is transition from the mixed micelles after partial solubilization by the oleate micelles. Then, the vesicle formation of HCO-10, which has 3 hydrophobic chains, the mixed vesicle formation of phosphatidylethanolamine and lysophosphatidylcholine, which can not form vesicles, and the phospholipid vesicle formation and destruction by removing and adding PEG-lipid, were discussed. Lastly, oriented nano wire formation of mulamylidipeptid-conjugated lipids with *ca* 5 nm of diameter was discussed.

Key words—self organization; amphiphil; phospholipid; micelle; vesicle; oriented nano wire

はじめに —両親媒性物質—

両親媒性物質は1つの分子に親油基（疎水基）と親水基（極性基）を有し、水、油両方に親和性を持つ1群の化合物の総称である。その中で界面に吸着して、界面（表面）張力を著しく下げる物質を界面活性剤と呼ぶ。ここでは、生命科学において重要な水中における集合体形成を中心に述べる。

界面活性剤はある固有の濃度を超えると、疎水部分が水を避けるように集まり凝集体をつくる。分子量が数百程度の単純な分子が、分子の形状と親水基、親油基の違いで、種々の集合体を形成し、種々

の機能を持つようになる。この集合体の構造は多くの場合コロイド次元の大きさを持ち会合コロイドとも呼ばれる。集合体又は高次構造形成は基本的には外部からの人工的な力は必要なく、疎水部分が水を避けるという原理に従って、ミクロな配列やマクロな構造が決まってくるので、自己組織化と呼ばれる。¹⁾ 生命出現以前の原始の世界にあって、単純な両親媒分子の自己組織化が生命の起源に重要な役割を果たしたであろうことを Luisi は主張する。²⁾ Kauffman は、“At Home in the Universe”の中で、自己組織化が秩序の発生源であることを述べている。³⁾ 両親媒性物質の自己組織化による秩序形成の駆動力は疎水部分の吸引力ではなく、水の構造破壊に伴うエントロピーの増大によることが特徴である。油性界面活性剤の有機溶媒中におけるミセル

富山大学薬学部（〒930-0194 富山市杉谷 2630）

e-mail: mueno@pha.u-toyama.ac.jp

本総説は、平成22年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

形成とその機構は基本的に異なる。後者は大きなエンタルピーの減少が駆動力である。例えば四塩化炭素中における AerosolOT のミセル形成エンタルピーは $\Delta H^0 = -30 \sim -50 \text{ kJmol}^{-1}$ である。⁴⁾ 一方水中においては $\Delta H^0 = +2.4 \text{ kJmol}^{-1}$ である。⁴⁾

1. 界面活性剤のミセル形成

1-1. ミセル形成の熱力学 界面活性剤のつくるミセルはモノマー分子と動的な平衡関係にある。相律的には 1 相系として扱われる。

界面活性剤モノマーの化学ポテンシャルを μ_s 、ミセルの化学ポテンシャルを μ_{mic} とすれば

$$\mu_s = \mu_s^0 + RT \ln X_s f_s \quad (1)$$

$$\mu_{\text{mic}} = \mu_{\text{mic}}^0 + RT \ln X_{\text{mic}} \quad (2)$$

ここで、 μ_s^0 、 μ_{mic}^0 はそれぞれモノマー及びミセルの標準化学ポテンシャルである。ミセルの会合数を m とすれば、平衡では、 $m\mu_s = \mu_{\text{mic}}$ として、次式を得る。

$$\mu_{\text{mic}}^0 - m\mu_s^0 = mRT \ln X_s f_s - RT \ln X_{\text{mic}} \quad (3)$$

ミセルを構成している界面活性剤のモノマー換算濃度を X_m 、モノマーあたりの標準化学ポテンシャルを μ_m^0 とすれば Eq. (3) は Eq. (4) に書き直される。

$$\mu_m^0 - \mu_s^0 = RT \ln X_s f_s - (RT/m) \ln X_m + (RT/m) \ln m \quad (4)$$

会合数 (又は平均会合数) は Eq. (4) に顕わに含まれ、熱力学的に定まる。Tanford は疎水性効果による吸引力と極性部分の反発力より分布関数として最適会合数を求めた。⁵⁾ 例えばイオン強度 0.10 で、SDS では、理論値は 93、実験値は 95 と極めてよく一致する。一方 c.m.c. は界面活性剤の特性を示す実用的には重要なパラメータであるが Eq. (1) から明確に定まらない。普通、界面活性剤溶液の物性—濃度曲線の屈曲点から実験的に得る。したがって測定方法により任意性があるが、会合数が大きい場合は比較的狭い範囲である。例えば、 $X_{\text{mic}}/X_w = 0.05$ とおくと c.m.c. の理論値は $0.0018 \text{ molkg}^{-1}$ で実験値は $0.0015 \text{ molkg}^{-1}$ とよく一致する。

Equation (4) で会合数を無限大にすると Eq. (5) が得られ、古典的なミセル形成の相分離モデル (又は溶解度) 式になる。

$$\mu_m^0 - \mu_s^0 = RT \ln X_s f_s \quad (5)$$

c.m.c. の温度変化又は直接的な熱測定よりミセル形成の熱力学的量が計算される。最もよく研究されてきたのは、典型的なアニオン性界面活性剤である

SDS である。例えば 25°C におけるミセル形成の熱力学パラメータは、 $\Delta G^0 = -39.3 \text{ kJmol}^{-1}$ (モル分率表示)、 $\Delta H^0 = -1.25 \text{ kJmol}^{-1}$ 、 $\Delta S^0 = 127.7 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (モル分率表示) で、⁶⁾ エントロピーが支配的である。ミセル形成は炭化水素鎖のまわりの疎水的水和構造の破壊によるエントロピーの増大がすなわち疎水性効果が駆動力であると解釈されている。複数の枝を持つ AerosolOT の熱力学パラメータは、 $\Delta G^0 = -32.3 \text{ kJmol}^{-1}$ 、 $\Delta H^0 = 2.1 \text{ kJmol}^{-1}$ 、 $\Delta S^0 = 117.2 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ で⁷⁾ 同様、エントロピー支配であるが、C、H の数からみて、SDS に比べて相対的に疎水性効果は小さい。もっと顕著な違いはミセル形成に伴う熱容量変化にみられる。

熱測定より得られた AerosolOT のミセル形成に伴う熱容量変化は $-630 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ で、モノマーの状態で炭化水素鎖が水にさらされているとして計算される熱容量変化 $-924 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ と合わない。一方 SDS のように 1 本の鎖からなる界面活性剤ではこの両者が一致する。この違いは、AerosolOT の 2 本の主鎖が、単量体の状態においても分子内会合し、炭化水素と水との接触面積が少なくなっているためと推定した。⁷⁾ NMR で $-XCH-CH_2-$ のまわりの 2 面体角の解析から、2 本鎖が互いに接触するコンフォメーション [Fig. 1(3)] に固定されていることが確認された。一方、有機溶媒中ではゴーシュとトランス [Figs. 1(1)-(3)] の間で素早く交換していることがわかった。⁸⁻¹⁰⁾

1-2. ミセルの構造 ミセルの内部構造は、例えば、アルカンの水相からミセルへの移行の熱力学的パラメータが有機溶媒への移行の熱力学的パラメータに近いこと¹¹⁾ や、分光学的に得られた緩和時間からミセル内部の運動性が液体中のそれに近いこと^{10,12)} などから、有機液体状態にあると考えられている。また、ミセルはベシクルと異なり中に空間 (水相) を取り得ないため、幾何学的な考察から、



上野雅晴

富山大学名誉教授、東京理科大学客員教授。1945 年和歌山県生まれ。京都大学薬学部卒業。京都大学大学院薬学研究科中退。1969 年名古屋市立大学助手。1980 年富山医科薬科大学附属病院助教授。1990 年富山医科薬科大学教授。2005 年富山大学大学院教授。2011 年定年退職。この間、デューク大学博士研究員、スイス連邦工科大学 (ETH) 客員教授、フランス CNRS 客員教授。

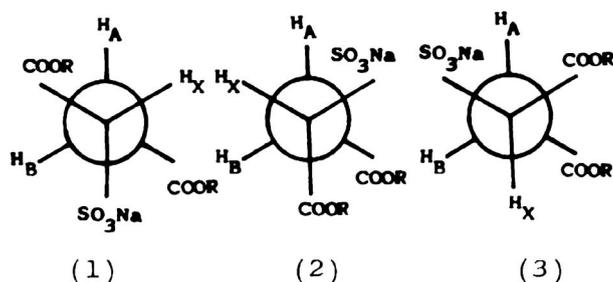


Fig. 1. Rotational Isomers about the C-C Bond in the CH-CH₂COOR Fragment

Table 1. Rotational Correlation Times Calculated from Eq. (6) and Eq. (7) in Context

Solvent	n	$\tau_R(T_1)$	Rad (Å)	$\tau_R(\eta)$
D ₂ O	22	1.6×10^{-10}	8.2 6.7	3.8×10^{-10} 2.0×10^{-10}
CD ₃ OD	1	9.5×10^{-11}	5.5	8.5×10^{-11}
CDCl ₃	5	4.1×10^{-10}	10	4.5×10^{-10}
C ₆ D ₆	13	8.1×10^{-10}	11	7.5×10^{-10}

会合数が大きい場合、短軸が鎖の長さで固定された楕円体（扁平楕円体又は偏長楕円体）となる。

2本の主鎖と2本の側鎖を持つ AerosolOT の NMR の緩和時間測定より得られたミセルの回転の相関時間（extreme narrowing limits を仮定して）[Eq. (6)] と粒子半径から算出される回転相関時間 [Eq. (7)] を Table 1 に示す。¹³⁾

$$\frac{1}{NT_1} = \frac{\hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2}{r^6} \tau_R \quad (6)$$

$$\tau_R = \frac{4 \pi \eta a^3}{3kT} \quad (7)$$

ベンゼン中で鎖が伸びた状態で球形を仮定すれば両者はほぼ一致する。クロロフォルム中では会合数は5個と小さく鎖が伸びた状態では両者が全く異なり、鎖が縮まり、半分程度と仮定すれば両者はほぼ一致する。水中では一般に鎖の長さは結晶構造の75%程度といわれている。8.2 Å として計算すると両者は全く合わない。^{4,10)} AerosolOT の副鎖は主鎖よりメチレンが4個少ないので中に空間ができないことを考慮して半径を見積もると6.7 Å となる。これをミセルの半径として Eq. (6) より計算すると 2.0×10^{-10} s となり緩和時間より求めた回転の相関時間に近い。これらのことから水中において Aer-

osolOT は、比較的球に近い楕円体と推定した。

2. ミセル-ベシクル転移

両親媒性物質の中で、一定の長さの疎水鎖を持ちその断面積と極性部分の断面積に近い構造を持った分子（シリンダー型分子）はベシクル状の凝集体をつくる。^{14,15)} Israelachvili¹⁶⁾ は充填パラメータを $v/a^0 l_c$ （ここで、 v は炭化水素鎖の体積、 a^0 は炭化水素鎖の最適面積、 l_c は臨界鎖長）で定義し、これが $1/2-1$ の範囲にあるときベシクルをつくるとしている。その典型的なものに生体膜の主要構成成分のフォスファチジルコリンなどがある。

リン脂質を水溶性界面活性剤で可溶化し、混合ミセルから界面活性剤を除くと可溶化限界を超えたときミセルからベシクルへの転移が起きる。

2-1. ベシクル膜と界面活性剤の相互作用 リン脂質ベシクルに界面活性剤を加えていくと、濃度が薄いとき、界面活性剤は膜に単純に分配し、分配平衡が成立する。濃度が増すと膜が可溶化され、混合ミセルが形成する。この逆のプロセスは、界面活性剤除去法として知られている大きな1枚膜ベシクル（LUV）を調製する1つの方法である。¹⁷⁾ かつては膜タンパク質の再構成によく用いられた。両プロセスは、現象的には opposite symmetry と言われている。両プロセスの基本的な違いは、混合ミセルは動的平衡状態にあるので、そのサイズや形態、性質はプロセス（界面活性剤の加え方）には依存しない。一方リポソームは準安定の状態で存在し得るので、その形態、サイズ、性質は界面活性剤除去のプロセスに依存する。

界面活性剤による膜破壊のプロセスは単純ではなく、いくつかの区別できる段階を経て進行する。¹⁸⁾

2-2. 界面活性剤によるベシクルの可溶化

2-2-1. 界面活性剤の膜への分配挙動^{19,20)} ベシクルとしてサイズ200 nm のLUVを用い、オクチルグルコシド濃度が十分低いとき、分配挙動はほぼ線形で、25°C での見かけの分配係数は 80 M^{-1} である。この値は Parernostre ら²¹⁾ が REV を用いて得た値 90 M^{-1} に近い。一方 Almog ら²²⁾ による SUV（直径30 nm）を用いた値、 33 M^{-1} 、と著しく異なる（この違いについて後に議論する）。オクチルグルコシド濃度が増加すると、膜相への界面活性剤の移行が減少し、水相中の濃度が増加する。水相中の濃度が一定に達すると、膜相の濃度が急激に増

加する。膜相の濃度が一定に達すると再び膜相，水相の濃度が単調に増加する (Fig. 2)。類似の現象は他の界面活性剤についても共通して観測される (Fig. 3)。²³⁻²⁵⁾

2-2-2. 濁度及び見かけのサイズ^{26,27)} LUV にオクチルグルコシドを加えていった場合，濃度が薄い場合，サイズは単調に増加する。このサイズ増加は分配した界面活性剤の断面積だけによると仮定すれば，膜中の界面活性剤/リン脂質のモル比を R として次式で表すことができる。

$$D_R = D_0(1 + 1/2 \cdot R)^{1/2} \quad (8)$$

$$D_R/D_0 = (1 + 1/2 \cdot R)^{1/2} \quad (9)$$

ここで D_0 は界面活性剤を含まないときのベシクルのサイズ， D_R は膜中の界面活性剤のモル比が R のときのベシクルサイズである。R は水相中の界面

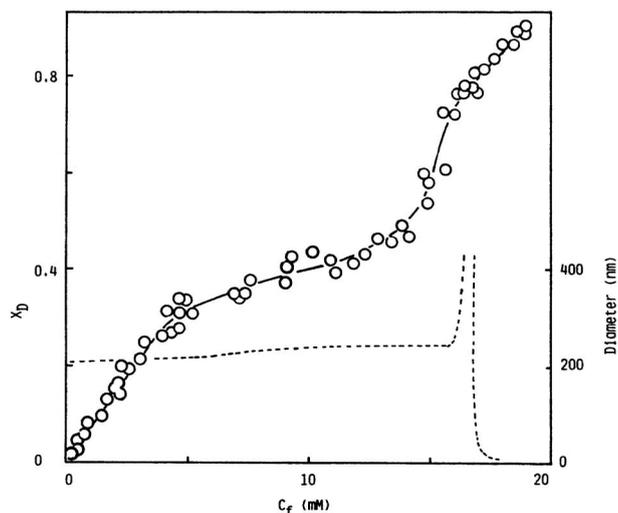


Fig. 2. Partition Behavior of Octylglucoside between Membrane and Water Phases

活性剤の平衡濃度 (C_f) の関数であるから，横軸に平衡濃度を取り縦軸に D_R/D_0 (又は D_x/D_0) をとれば，はじめのベシクルサイズ，界面活性剤の濃度に関係なく 1 本の曲線に乗ることが期待される。ここでは 2 本鎖のリン脂質の断面積を 70 \AA とし，1 本鎖のオクチルグルコシドの断面積をその半分とした (Fig. 4)。

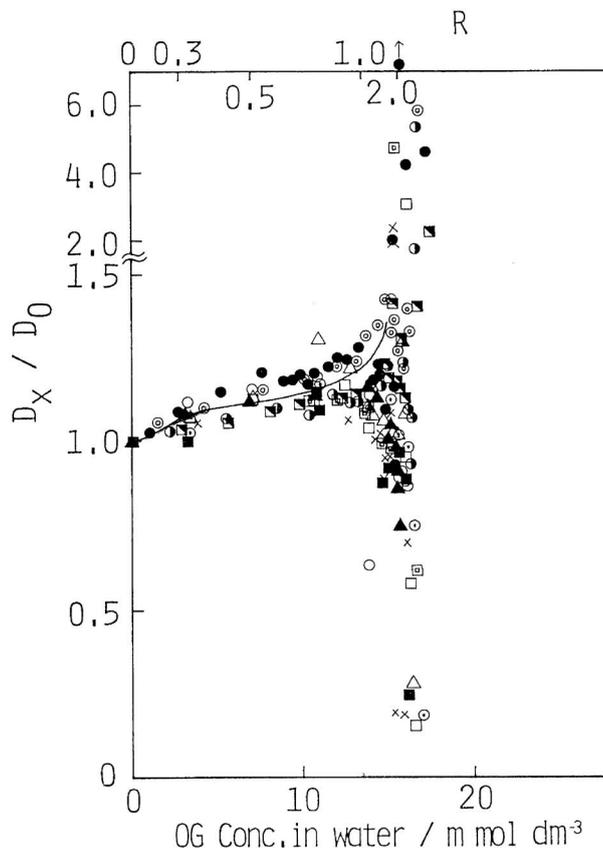


Fig. 4. D_x/D_0 vs. C_f Plots
Solid line represents calculated curve from Eq. (9).

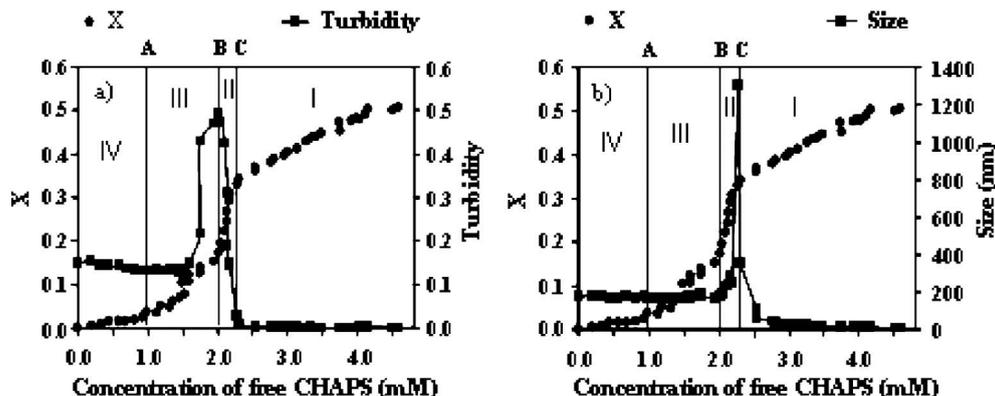


Fig. 3. Partition Behavior of CHAPS between Membrane and Water Phases, Particle Size and Turbidity

実際、オクチルグルコシドを界面活性剤として用いた場合この曲線に乗ることから、オクチルグルコシドでは、この領域では特別なことは何も起こっておらずサイズ増加は単純に膜に入った界面活性剤の断面積分だけであると考えられる。Almog ら²²⁾は SUV を用いて類似の解析を行ったが、実験値は理論値より大きく両者は一致しない。これについては、後に考察する。

一方ステロイド骨格を有する CHAPS やタウロコーレート^{24,25)}では、この領域での挙動は全く異なる (Fig. 3)。界面活性剤濃度が十分低いとき、すなわちベシクルの破壊や再構成の起こらない領域においてサイズ減少が観測される。これは、この領域において、界面活性剤の部分モル断面積分 (このような定義があるとすれば) が負であることを意味し興味深い。

もう少し濃度を増すとサイズは減少し、さらに濃度を増加させると、濁度及び見かけのサイズは急激

に増加し、ピークを経て急激に減少する。ESR 測定から算出したオーダーパラメータは最初のサイズの減少に対応する変化はなくこの領域ではラメラ相が保持されていると推定される (Fig. 5)。^{27,28)} 電子顕微鏡によればこの領域にはじめのベシクル (約 200 nm) とは異なる 30 nm 程度の小さいベシクルが観測される。²⁷⁾ われわれは、この界面活性剤を大量に含んだ小さいベシクルを超音波等で調製された SUV と区別するために SUV* とした。2 番目の見かけのサイズの急激な増加、続いて起きる急激な減少に対応して、ESR においてオーダーパラメータは急激に落ち、TEMPO 分布に 2 成分が観測され、²⁹⁾ ラメラ相の破壊、続いて混合ミセル形成が推定される。この時点でサイズは非常に小さくなり、濁度はほぼ 0 となる。濁度のピークは、分配の急激に立ち上がる点に一致し、見かけのサイズのピークは分配の急激な立ち上がりの終点に一致する。^{24,27)}

ラメラ構造が壊れる直前において見かけの分配率

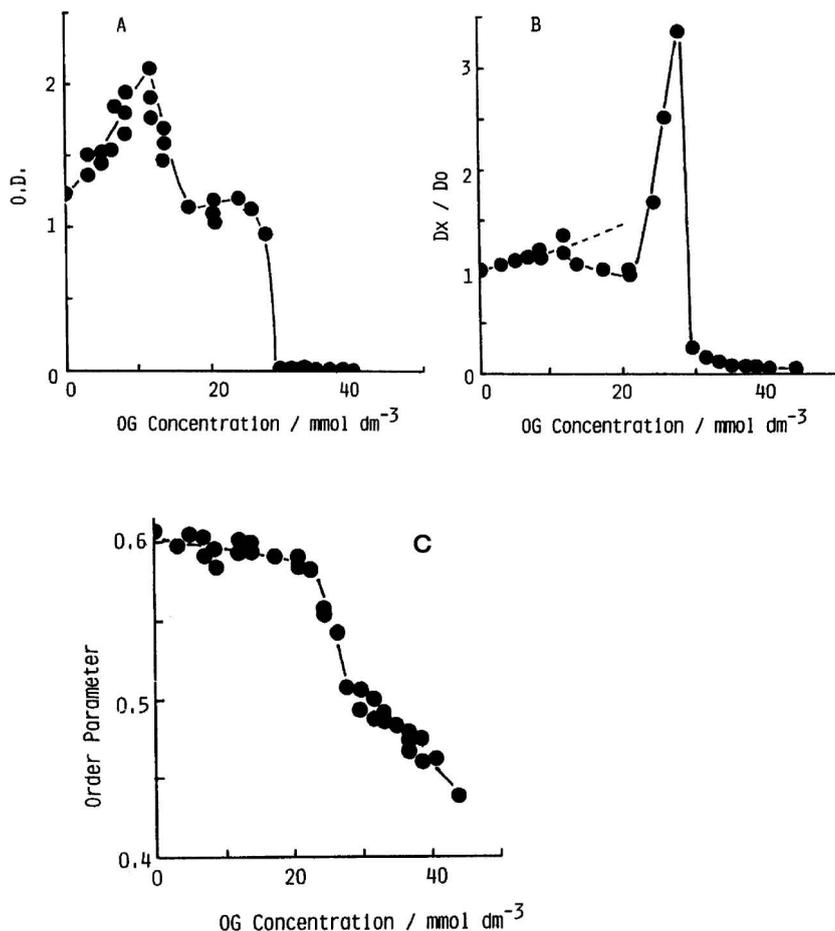


Fig. 5. A: Optical Density (OD) at 500 nm, B: Relative Particle Diameter (D_x/D_0) and C: Order Parameter vs. Total Octylglucoside Concentration

は 33 M^{-1} で Almog らが SUV について得られた分配率²²⁾ に一致する。サイズ、濁度の急激な立ち上がりは荷電を持った界面活性剤では観測されないが、²⁵⁾ サイズ、濁度の変化点(急激な減少の開始点)と分配挙動の変化点はすべての界面活性剤でよく対応している。また、すべての変化点は種々物性の変化点と一致する。^{15,20,27)} この領域(SUV*–ミセル転移領域)において、光散乱の解析、³⁰⁾ 電子顕微鏡観察³¹⁾ からシリンダーミセルの存在が示唆される。棒状ミセル又はシリンダーミセルの出現は Miguel *et al.*³²⁾ 及び Walter *et al.*³³⁾ により指摘されていた。またこの領域ではマクロな粘性は著しく大きくなり、ニュートン流動からはずれ、降伏値を持つ。³⁴⁾

ここで強調することは大きなベシクルが界面活性剤により可溶化されるとき、界面活性剤を大量に含む小さいベシクル SUV* に再構築した後 SUV* が可溶化されるという共通したステップを経ることである。³⁵⁾

2-2-3. ベシクル成長の時間依存性^{27,31,36)} SUV にオクチルグルコシドや CHAPS を加えたとき、ベシクルの融合、成長が起きる。オクチルグルコシドを加えた場合は膜中の界面活性剤・リン脂質のモル比が 1 付近で融合成長が最大になる。オクチルグルコシドの場合数時間から数日かけて成長が観測される。一方アニオン性界面活性剤であるコール酸ナトリウムではこのような成長は観測されない。しかし Ca^{2+} 存在下でコール酸ナトリウムのモル比を 0.3 付近に保つとゆっくり 1 日以上かけてベシクルが成長する。ステロイド骨格を持ち、両イオン性の CHAPS では数分以内にベシクルの成長が観測される。SUV に一定量の界面活性剤(オクチルグルコシドや CHAPS など界面活性剤除去法によるベシクル調製で LUV が形成することが知られている界面活性剤)を加え放置するとベシクルが時間依存的に成長し、その後界面活性剤を除くことにより、ミセルを経由することなく融合によりベシクルを成長させることができる (Fig. 6)。

先に、ベシクルにオクチルグルコシドを少量加えた際、LUV では加えた界面活性剤の断面積だけベシクルが大きくなるとしてサイズ成長をシミュレーションできたが、Almog らが指摘したように²²⁾ SUV では実験値は理論値より大きくなる。これは、SUV ではオクチルグルコシドなどの添加に

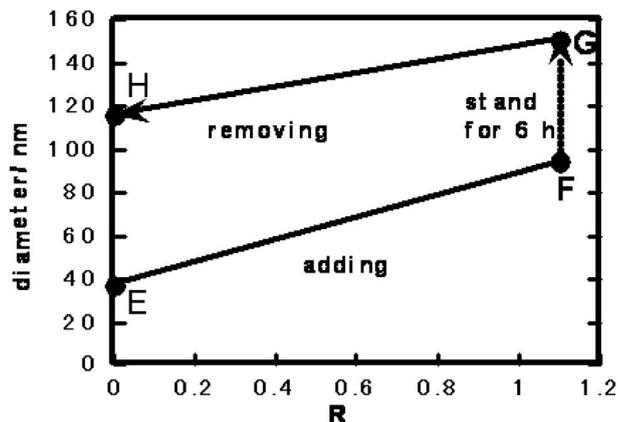


Fig. 6. Size Change of Vesicles in the Process of Adding Detergent, Standing, and Removing Detergent

よりベシクルが容易に融合成長することより矛盾なく説明できる。

2-2-4. ミクロな挙動とマクロな挙動^{37,38)} ESR の相関時間の解析から、ベシクルの水と接触している近傍では、界面活性剤の増加とともに運動性は上昇するが、膜の内側疎水領域は界面活性剤の骨格の影響を多く受ける。アルキル鎖を有する単純界面活性剤では、濃度の増加とともに運動性は増すが、ステロイド骨格を有する界面活性剤では濃度とともに運動性の減少することがわかる (Fig. 7)。ミクロな運動性は、分子の骨格構造の影響を大きく受け、一方ベシクルの融合成長などマクロな挙動は分子の骨格よりも荷電の影響を大きく受ける。またステロイド骨格を持った界面活性剤が膜に分配すると、界面活性剤濃度とともに運動性が減少することは、ステロイド骨格を持った界面活性剤が少量膜に分配したときその部分モル断面積が負になること(凝縮効果)と関係あると思われる。

以上得られた結果のすべては、界面活性剤による LUV (大きな 1 枚膜ベシクル) の破壊は区別できる 4 段階を経て起きていることを示している。第 1 段階は、界面活性剤が単純にベシクル膜に分配する領域。第 2 段階は、大きなベシクルが小さなベシクルに崩壊(又は転移)する領域。第 3 段階は、小さなベシクルが崩壊して中間構造体(又は巨大ミセル)が形成する領域、第 4 段階は、中間構造体から混合ミセルに移る領域である。種々の物性の変化点はそれぞれよく対応し、また電子顕微鏡による形態変化はこれを支持する。^{15,20,27,35,39)}

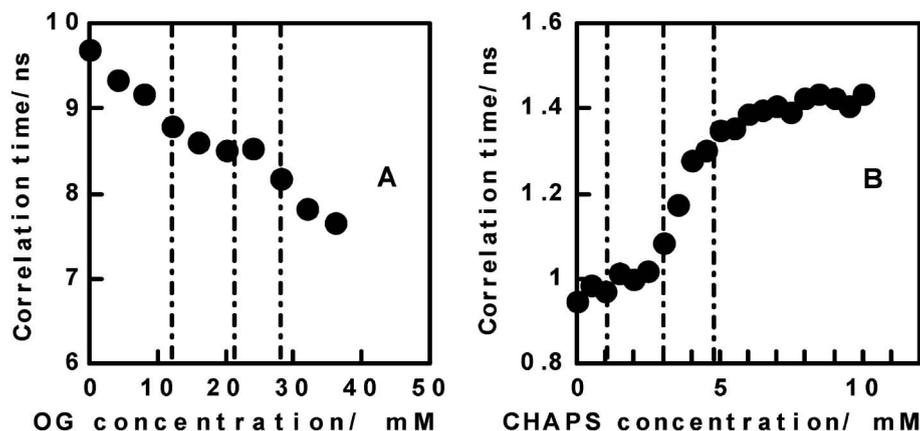


Fig. 7. Rotational Correlation Times of 16-DS Incorporated in PC/OG and PC/CHAPS Mixed Aggregates against Detergent Concentration

2-3. 混合ミセルから界面活性剤除去によるベシクル形成とサイズ制御^{18,39-41)} 混合ミセルから界面活性剤を除く方法としてビーズ法 (バイオビーズ SM2 やアンバーライト XAD-2 などによる吸着除去) 及び透析法を採用した。ビーズ法では、除去の段階におけるサイズや濁度の追跡は容易であるが、膜中の界面活性剤の濃度決定は困難である。一方、透析法では膜中の界面活性剤の濃度決定は可能であるが、各段階の追跡は困難である。それにもかかわらず両実験において共通していることは、界面活性剤添加のプロセスと逆対象の現象が観測されることである。すなわち界面活性剤除去に伴い、はじめ、粒子の見かけのサイズが急激に上昇しピークの後一旦減少し、その後徐々にサイズの上昇が観測される。それに伴い濁度が上昇する。はじめの急激なサイズ上昇はミセルの巨大化 (又は中間構造体の形成) に対応し、濁度の上昇はベシクルの形成を反映している。すなわちミセルの成長がベシクルサイズを決定するのではなく、最初にできるベシクルは小さい (可溶化プロセスにあらわれる SUV* に対応) が、界面活性剤除去に伴う時間依存的なベシクルの融合、成長がベシクルサイズ決定の主要な因子であることがわかる。これは、ベシクル形成の3段階モデル^{42,43)}に基づき今まで受け入れられてきたミセルの成長がベシクルサイズを決定する^{44,45)} という考えを覆すものであった。3段階モデルにベシクルの成長という段階を加えた4段階モデルにより初めて説明できるものである (Fig. 8).³⁵⁾ 4段階モデルによれば、ミセルベシクル転移のプロセスに観察され

Table 2. Size of Vesicles Prepared by Detergent Removal

Detergent	Removal method	Diameter (nm)
octylglucoside	dialysis	200
octylglucoside	adsorption	100
SDS	dialysis	40
C ₁₂ E ₈	adsorption	50
sodium cholate	dialysis	55
sodium cholate	adsorption	60
sodium cholate+Ca	dialysis	150
sodium cholate+Ca	multi-steps dilution	45
sodium cholate+Ca	one-step dilution	40
sodium taurocholate	dialysis	50
CHAPS	dialysis	380
CHAPS	multi-steps dilution	335
CHAPS	one-step dilution	40

るすべての現象を説明できるだけでなく、界面活性剤除去法によるベシクル調製において、なぜ、界面活性剤としてオクチルグルコシドや CHAPS を用いたとき大きいベシクルが形成し、コール酸ナトリウムや SDS を用いたとき小さいベシクルが形成するか、また同じ界面活性剤を用いても除去の方法によりなぜサイズが異なるか説明できる。さらに界面活性剤の分配挙動の研究者間による違いもすべて説明できた。長い間議論の分かれてきた、ミセルベシクル転移におけるサイズ決定因子はミセルの成長^{44,45)}にあるのかベシクルの成長^{18,46)}にあるのかを解決した。^{35,47)}

Table 2 に界面活性剤除去法により調製されるベシクルのサイズをまとめておいた。^{17,20)}

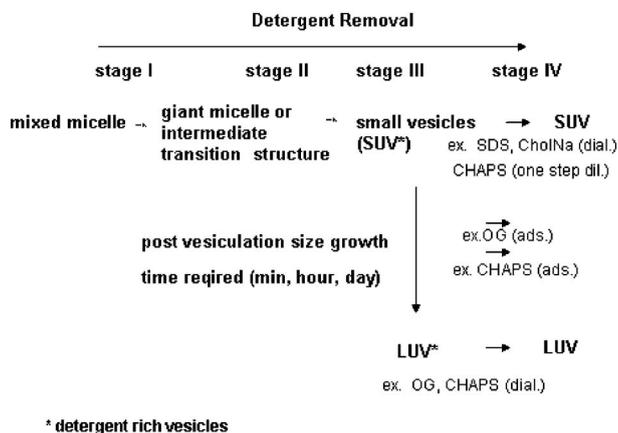


Fig. 8. Four Stage Model in the Process of Micelle-vesicle Transition

3. 脂肪酸ベシクルの自己増殖とマトリックス効果, ベシクル形成の熱力学的解析の試み

脂肪酸は pK_a 付近で閉鎖能を有するベシクル状の凝集体を形成する.⁴⁸⁾ ベシクル形成に長時間を要し, 完成するのに 20 分~1 時間を要し, 形成したベシクルは, 分布幅が広く, 数十 nm~数 μm におよぶ. 一方あらかじめベシクルが存在する状態で, ベシクルを調製すると, ベシクル形成速度が著しく短縮するとともに, 新たに形成するベシクルのサイ

ズはあらかじめ存在するベシクルに規定される. この効果はマトリックス効果と呼ばれ,^{49,50)} Luisi らはこの興味ある現象を生命の起源の観点から, 脂肪酸ベシクルの自己複製又は自己増殖として, “autopoietic self-reproduction” のモデル系を考案した.⁵¹⁾ またベシクルと平衡に存在するモノマー濃度が比較的高いことが, ベシクル形成の熱力学的解析を可能にする.

3-1. 脂肪酸ミセルからベシクルへの転移 オレイン酸ナトリウムは純水にミセルを形成して溶解する. このときの pH は 10~11 である. このミセル溶液を pH 7.5~9.3 (ルーチン的には 8.6) に落とすとミセルからベシクルに転移する. このときあらかじめベシクルが存在するとベシクル形成速度が著しく促進される (Fig. 9). 濁度を指標にベシクル形成をモニターすると 1/100 程度のベシクルの存在で既にベシクル形成速度は影響を受ける. 準弾性光散乱法で平均ベシクルサイズを評価すると, 新たに生成したベシクルのサイズはあらかじめ存在するベシクルに近い.⁵²⁾

一方, ゲル濾過で分取した後, 各フラクションのサイズを測定する. 150 nm にサイジングしたオレイン酸ベシクルに等モルのオレイン酸ミセル溶液を

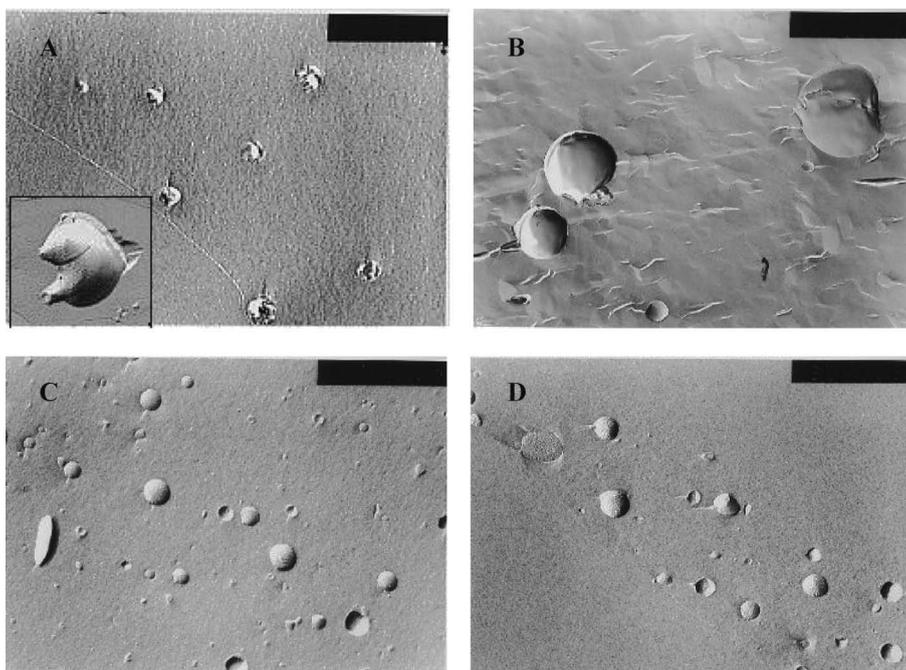


Fig. 9. Freeze Fracture Electron Micrographs of Oleate Vesicles 5 min (A) and 1 h (B) after Adding Oleate to Borate Buffer (pH 8.5) and 5 min (C) and 1 h (D) after Adding Oleate to Borate Buffer with Preformed Vesicles

加えた場合、新たにあらわれたベシクルはもとのベシクルより少し小さいベシクルと大きいベシクルが形成し、平均的にはもとのベシクルに近い。リン脂質ベシクルに等モルのオレイン酸ミセル溶液を加えるともとのベシクルともとのベシクルより少し小さい新しいベシクルが形成する。一方、加えるミセル溶液を1:9に増加すると状況は全く異なる。リン脂質ベシクルに加えた場合は小さいベシクルはそれに比例して増えるが、オレイン酸ベシクルに加えた場合小さい側のベシクルは消え、より大きいベシクルのみとなる (Fig. 10)。両者で新しいベシクル形成の機構は異なるようである。^{53,54)}

3-2. リン脂質ベシクル-オレイン酸ベシクルの相互作用 200 nm にサイジングしたリン脂質ベシクルに 200 nm にサイジングしたオレイン酸ベシクルを加える。この場合ベシクルを可溶化するミセルは存在しない。混合比が1:1の場合、オレイン

酸ミセルを加えた場合と同様、もとのリン脂質ベシクルのサイズとともに小さい側に新たにベシクルがあらわれる。それぞれのベシクル集団内のリン脂質:オレイン酸の濃度比はともに1:1である。この場合可溶化するミセルは存在しないから、ベシクル構成分子が移行してベシクル内で混合したことになる。オレイン酸のモノマー溶解度は 10^{-5} mM程度 (150 mM の NaCl 存在下) でリン脂質 (10^{-10} mM 以下) に比べて圧倒的に高いことから、オレイン酸がモノマーを通じてリン脂質ベシクルに移行し、混合ベシクルが分裂 (fission) して小さいベシクルが生じたものと考えられる。オレイン酸ベシクルを1:5で加えた場合も基本的には類似しているが大きいベシクルと小さいベシクルの分離がより明確になる。

一方オレイン酸ミセル溶液を1:5で加えた場合小さいベシクルが増加する。リン脂質とオレイン酸

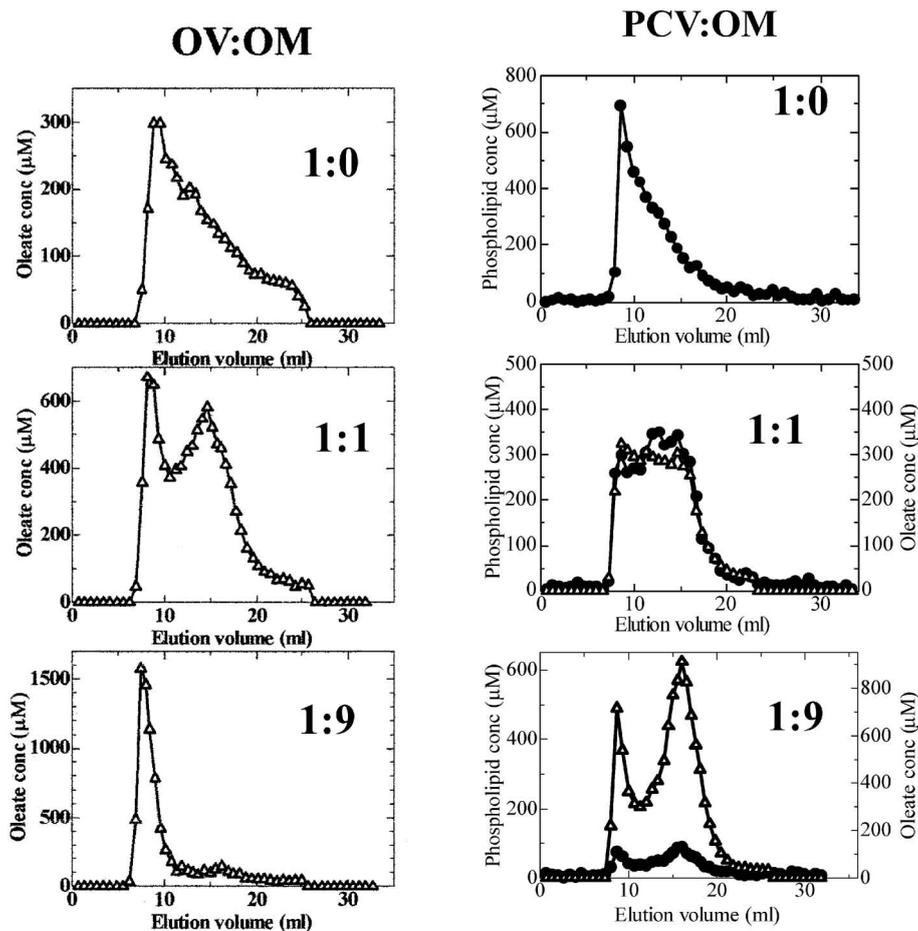


Fig. 10. Elution Profiles of Preformed Oleate Vesicles, Phospholipid Vesicles, and Mixed Vesicles after Addition of Oleate Micelles at Various Molar Ratios

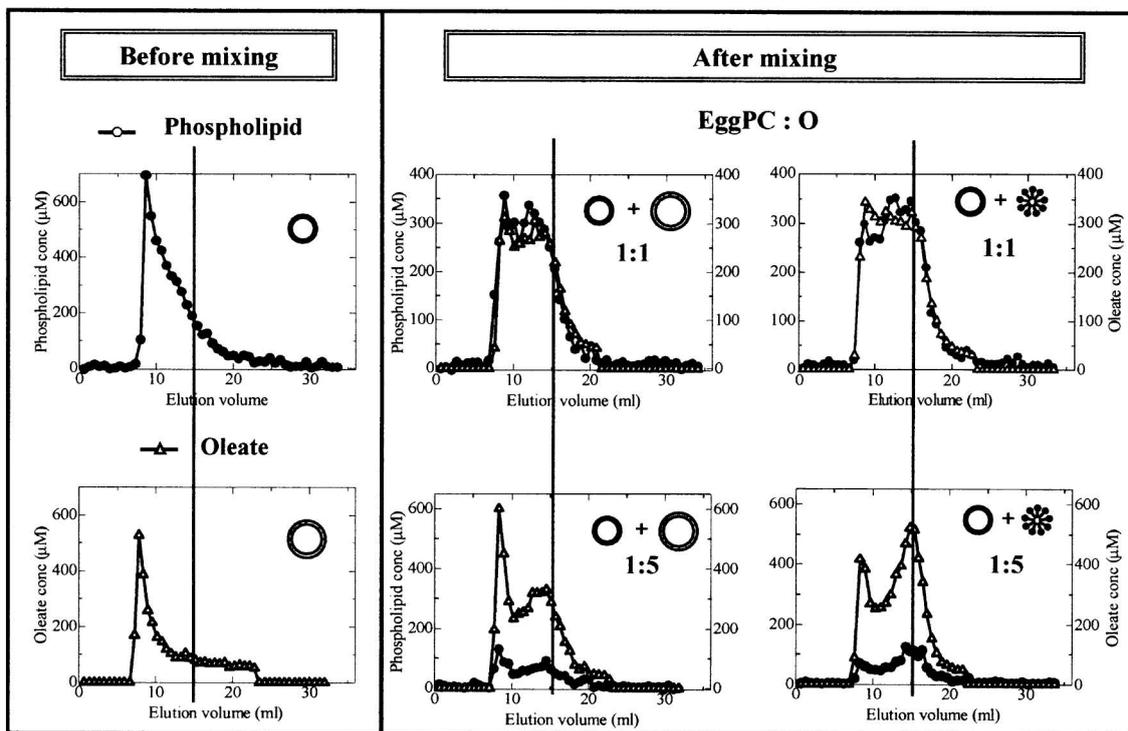


Fig. 11. Phospholipid Vesicles/Oleate Vesicles or Oleate Micelles Interaction

の混合ミセルは小さいベシクルをつくることは既に示していることから、ミセル溶液を多量に加えてできる小さいベシクルはオレイン酸により可溶化された混合ミセルからベシクルに転移したものである (Fig. 11).^{55,56)}

あらかじめベシクルが存在するとき、新たにできるベシクルはあらかじめ存在するベシクルにミセル溶液にあるオレイン酸が移り、ベシクルが分裂してできたものである。このプロセスはオレイン酸ミセルがベシクルに転移するプロセスより十分速い。また新たにできるベシクルはある程度もとのベシクルのサイズを反映している。一方多量のミセル溶液を加えた場合、ベシクルを一部可溶化しオレイン酸ミセル又はオレイン酸/リン脂質混合ミセルからベシクルに転移したものである。前者は遅いプロセスで大きなベシクルを形成し、後者は速いプロセスで小さいベシクルを形成する (Fig. 12).^{55,56)}

3-3. ベシクル形成の熱力学的解析の試み⁵⁷⁾

ミセル形成の熱力学的解析は古くから行われてきたが、ベシクル形成の熱力学的解析を試みた例はない。ベシクルはミセルに比べて会合数が大きく最も小さい SUV でも数万に達する。この場合ベシクルを含む系は 2 相系 (相分離) として扱うのが妥当で

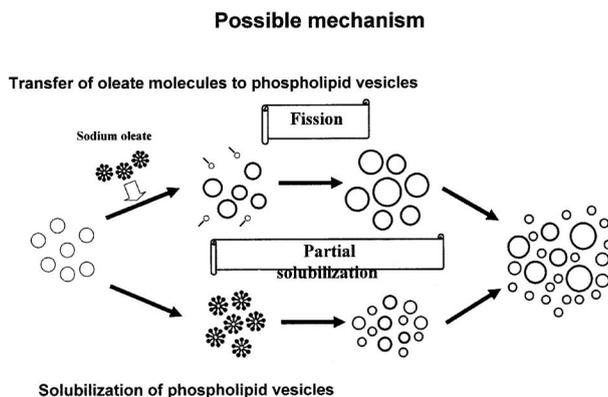


Fig. 12. Possible Mechanism of Self Replication of Oleate Vesicles

ある。結晶析出と同様ベシクルのサイズや多重度はベシクル調製のプロセスに依存する。また、一般にベシクルを形成する両親媒性物質のモノマー濃度は低いので活量係数を 1 とおける。

ベシクル相で

$$\mu_v = \mu_v^0 \tag{10}$$

溶液相で

$$\mu_m = \mu_m^0 + RT \ln C_m \tag{11}$$

平衡で

$$\mu_v = \mu_m \tag{12}$$

したがって

$$\Delta\mu^0 = \mu_m^0 - \mu_m^0 = RT \ln C_m \quad (13)$$

実験はベシクルを希釈することで行われた。表面張力の測定より臨界ベシクル形成濃度を見積もり少々荒っぽく（解離度の効果も考慮していない）熱力学量を算出したところ、25°Cにおいて $\Delta\mu^0 = -7.5 \text{ kJmol}^{-1}$ 、 $\Delta H^0 = 14.9 \text{ kJmol}^{-1}$ 、 $\Delta S^0 = 75 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ であった。 ΔH は吸熱であり、ミセル形成と同様、大きな正のエントロピーがベシクル形成の駆動力であることがわかる。

サイズの効果を調べたところ、LUVよりもSUVの方がモノマー溶解度が高いことからLUVの方が熱力学的により安定であることが理解できる。

4. その他興味ある両親媒性分子のベシクル形成

4-1. ホスファチジルエタノールアミン/リソホスファチジルコリンのベシクル形成⁵⁸⁾ ホスファチジルエタノールアミンは極性部分が小さく、ヘキサゴナルII型の凝集体を作り易い。一方、1本鎖のリソホスファチジルコリンは水中でミセルを形成し、膜を可溶化し又は生体に対して溶血作用を有することが知られている。しかしこの両者を混合して水に分散すると閉鎖能を有する2分子膜ベシクルを形成する。膜透過係数は、小さい分子、例えばCl⁻に対しては $10^{-10} \text{ cms}^{-1}$ のオーダーで、ホスファチジルコリンより一桁程度高いがカルセインのよう比較的大きい分子に対してはホスファチジルコリンと同程度の透過係数を、従って同程度の高いバリエー能を有する (Table 3)。NMRによれば、ベシクルの脂質の分布は非対称で、リソホスファチジルコリンは外側に多く分布する。

4-2. PEG-lipid によるベシクルの成長と破壊⁵⁹⁻⁶³⁾ ポリエチレングリコールは大きな水和層を持ち、リポソームをこれで被覆することにより細網内被系による捕獲を逃れ、血液中でのリポソーム寿命が著しく改善するのでリポソームのDDS利用

において広く用いられている。^{64,65)} ポリエチレングリコールで被覆する容易な方法として、脂質をアンカーにしたPEG-lipidがしばしば用いられる。PEG-lipidはそれ自身界面活性物質であり、リン脂質ベシクルの物理化学的な性質に大きな影響をおよぼす。約3割含まれると膜破壊を起こす。低濃度では逆にベシクル間の凝集を防ぎ安定性を高めているようである。リン脂質/PEG-lipid混合脂質を水に分散するとPEG-lipidの混合比に応じてベシクルのサイズが小さくなり、ベシクルがマルチラメラからオリゴラメラに移る。混合ベシクルを凍結-融解すると、サイズが小さくなると同時に新たにもとの混合ベシクルよりも大きいユニラメラベシクルが生成する (Fig. 13)。脱水和、再水和に伴う膜の不安定化、融合がPEGにより促進されたものと考えられる。膜バリエー能に対する影響は、アンカーとなる疎水鎖により異なる。DSPE-PEGでは濃度依存的に膜バリエー能を低下させるが、少量のcholesterol-PEGは膜のバリエー能を高める。cholesterol-PEGの量が増せばバリエー能は低下する。

4-3. HCO-10のベシクル形成 HCO-10 (Polyoxyethylene (10) hydrogenated castor oil ether) は3本鎖を有する油溶性非イオン界面活性剤である。水に分散するとベシクル状の凝集体を形成することがHoriuchiらにより報告された。^{66,67)} HCO-10は医療に用いられていることから、DDS応用の見地から、種々物性を調べ、リン脂質よりなるベシクルと比較した。HCO-10は攪拌により平均サイズが230 nmのベシクルを形成し、リン脂質の場合と同様加圧過程によりサイジングが可能であった。しかし、超音波照射するとベシクルが破壊され液滴として相分離した。Cl⁻イオンの透過速度定数は $k = 2.46 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、カルセインの透過速度定数は $k = 5.79 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ で卵黄レシチンベシクルのそれより速いが一定のバリエー能を有することがわかった。疎水鎖

Table 3. Permeation of Cl⁻ and Calcein from PE/LysoPC Mixed Vesicles and PC Vesicles

Vesicles permeation k (s ⁻¹) or p (cm s ⁻¹)	PE : LPC				PC
	5 : 1	5 : 2	5 : 3	5 : 4	
extruded k for Cl ⁻	1.2×10^{-3}	3.8×10^{-3}	4.1×10^{-3}	4.7×10^{-3}	2.0×10^{-4}
k for calcein	2.7×10^{-5}	1.7×10^{-5}	1.5×10^{-5}		2.7×10^{-5}
sonicated k for Cl ⁻	8.9×10^{-4}	9.6×10^{-4}	6.0×10^{-4}	8.2×10^{-4}	1.1×10^{-4}
p for Cl ⁻	3.6×10^{-10}	3.5×10^{-10}	2.0×10^{-10}	3.7×10^{-10}	5.3×10^{-11}

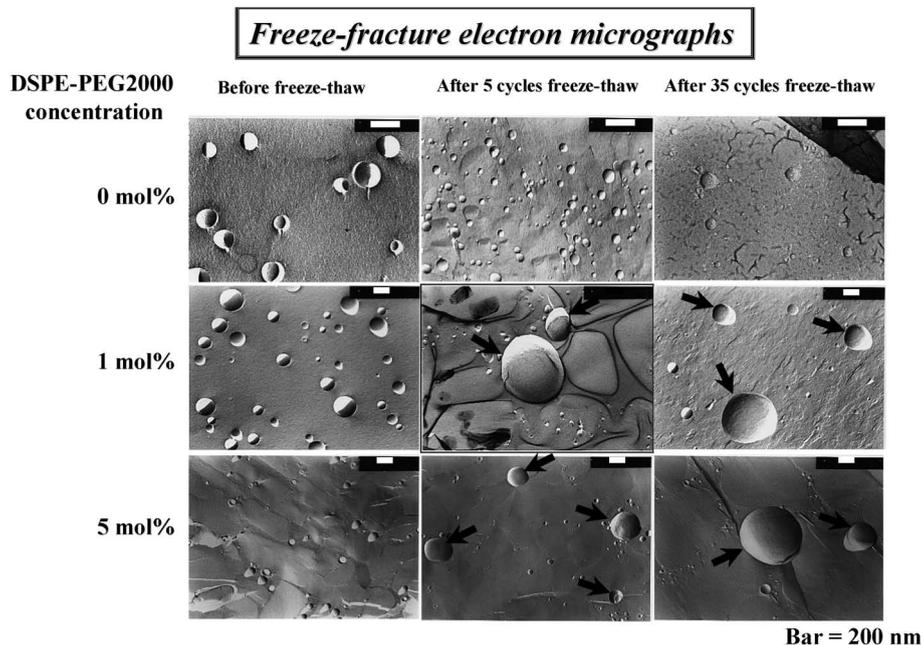


Fig. 13. Freeze-fracture Electron Micrographs of Egg-PC Vesicles Containing 0–5 mol% DSPE-PEG2000 before (a) and after 5 (b) and 35 (c) Cycles of Freeze-thawing

の中にエチレンオキシド鎖があり、疎水性を下げていることが親水性物質の透過を促進しているものと考えられる。⁶⁸⁾ 興味深いのは膜のバリアー能は温度依存性を示し、37°Cで最大になった。また37°C以上で小さいベシクル(50 nm)が電子顕微鏡で観察された。ポリオキシエチレンの脱水和が膜を不安定化したと考えられる。37°C以上に加温し、再び室温に戻すと融合して大きなベシクルが形成した。サイズ上昇は時間依存性を示し、ゆっくり戻すことによりサイズの均一な大きなベシクルが形成した。この性質を利用して、均一で大きな粒子径のベシクル調製が可能になった。⁶⁹⁾

5. MDP 誘導体のつくる配向性ナノ細線

ムラミルジペプチドは免疫作用を有する最小単位とされている。ムラミルジペプチドに2本の炭化水素鎖(又は1本)をつけた誘導体はワクチンのアジュバントとして合成されたもので、インフルエンザ人工膜ワクチンの試作に利用されてきた。⁷⁰⁾ 両親媒性を有し、水中で種々の興味ある集合体を形成する。B30-MDPは単独でオリゴラメラベシクルを形成し、リン脂質との混合で1枚膜ベシクルを形成する。一方そのアミド体であるDV-7401はヒモ状の凝集体を形成する。濃厚ではゲルを形成し、ほぐすと太さの異なる長いヒモ状の凝集体が観測される。

さらに10万倍程度まで拡大して観察すると直径5 nm程度の均一な太さのフィラメント(細線)が観察される(Fig. 14)。観測されるヒモは、均一な直径を持つフィラメントの束であることがわかる。分子の長さが2–3 nmであること及び水から析出したことを考えるとこのヒモはH₁型の集合体が無限に伸びた分散系とも考えられる。極性基で囲まれ、均一で無限に伸びた、直径数nmの油のトンネルができてことになる。ナノテクノロジーの分野においては、均一なナノ細線(一次元鎖)をつくることは非常に困難で、通常テンプレートを用いて行われている。ここでは、両親媒性物質の自己組織化によりテンプレートなしで、均一な配向性ナノ細線の作成が可能であることを示した。⁷¹⁾

おわりに

両親媒性物質の自己組織化による高次構造形成は、基本的には、構成する分子そのものの中に集合体の状態を決定する因子が含まれている。

集合体が動的平衡状態にあるとき、その構造や性質は組成、温度、圧力を規定すれば熱力学的に完全に決定される。一方動的平衡にない、又は準安定な状態にあるとき、その構造や性質は、平衡の熱力学だけでは決定されず、プロセスに依存し速度論的な考察を必要とする。ある準安定な状態からよりエネ

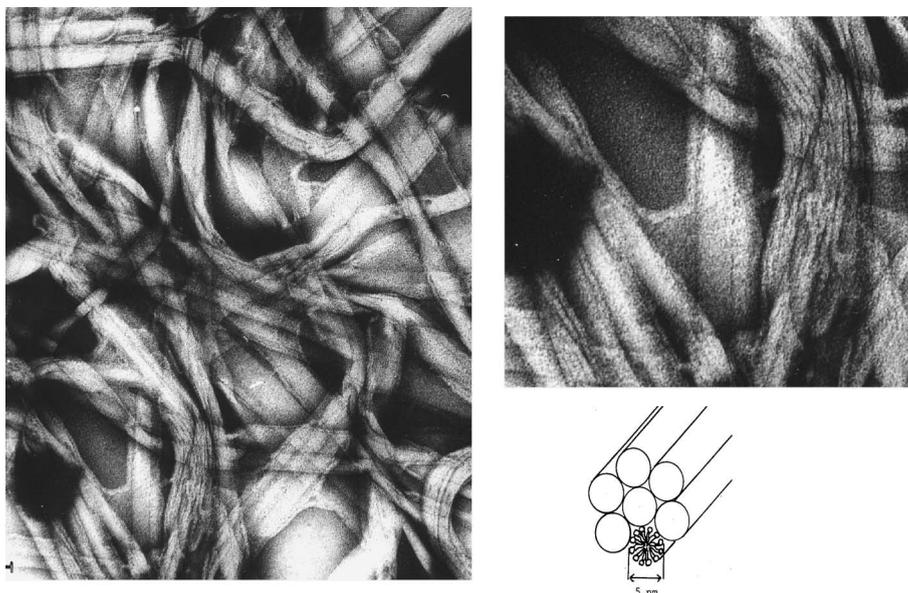


Fig. 14. Electron Micrograph of Nano Wire Formed of Mulamylidipeptid-conjugated Lipids and Possible Model of Molecular Organization

ルギーの低い状態に移るとき、転移に伴う活性化エネルギーが大きければ、実用的な意味で、ある時間の範囲でその構造や性質は変化せず、安定として扱われる。例えば、水相、集合体相の間で、見かけの分配平衡が成立する。

本論文では、はじめに、動的平衡状態にあるミセル溶液（相律的に1相）について扱い、次に、集合体が準安定に存在し得るベシクル分散系（相律的に2相）を取り上げ、ミセルからベシクルに転移する際ベシクルの構造や性質を決定する因子について考察した。続いて、ベシクル形成を相分離として扱い熱力学的解析を試みた。最後に、均一な無限に伸びた配向性のナノ細線が、自己組織化により形成し得ることを示した。

謝辞 本研究をまとめる機会を与えて頂いた日本薬学会薬学雑誌編集委員の先生方に感謝いたします。本研究は、恩師、中垣正幸先生、岸本 博先生、京極好正先生、Tanford 先生の温かい励まし、ご鞭撻、多くの先輩、仲間たちのご助言、学生、大学院生のご協力により行われました。この場を借りて謝意を表します。

REFERENCES

- 1) Ueno M., Handa T., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 667 (2008).
- 2) Luisi P. L., Walde P., Oberholzer T., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **4**, 33–39 (1999).
- 3) Kauffman S., “At Home in the Universe,” Oxford University Press, New York, 1995.
- 4) Ueno M., Kishimoto H., *Nippon Kagaku Kaishi*, 375–387 (1980).
- 5) Tanford C., “The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes,” 2nd ed, John Wiley & Sons Inc., New York, 1980.
- 6) Kishimoto H., Sumida K., *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 1108–1118 (1974).
- 7) Sato Y., Ueno M., Kishimoto H., *Yakugaku Zasshi*, **95**, 1286–1291 (1975).
- 8) Ueno M., Kishimoto H., Kyogoku Y., *Chem. Lett.*, **6**, 599–602 (1977).
- 9) Ueno M., Kishimoto H., *J. Phys. Chem.*, **87**, 850–856 (1983).
- 10) Ueno M., Kishimoto H., Kyogoku Y., *J. Colloid Interface Sci.*, **63**, 113–119 (1978).
- 11) Wishnia A., *J. Phys. Chem.*, **67**, 2079–2082 (1963).
- 12) Ueno M., Kishimoto H., Kyogoku Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 1776–1779 (1976).
- 13) Abragam A., “The Principles of Nuclear Magnetism,” Chap. 8, Oxford University Press, Oxford, 1961.

- 14) Ueno M., "Physical Chemistry and Pharmaceutical Formulation, Physico-Chemical properties of liposomes," eds. by Oshima H., Handa T., Nankodo, Tokyo, 1999, pp. 190–196.
- 15) Ueno M., Kashiwagi H., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **49**, 1131–1139 (2000).
- 16) Israelachvili J. N., "Intermolecular and Surface Forces," McGraw-Hill Publishing, Tokyo, 1991.
- 17) Ueno M., "Biocolloid, Vol. 2, Liposomes," Chap. 14, eds. by Shimabayashi S., Terada H., Okabayashi H., Hirokawa Shoten Co., Tokyo, 1990.
- 18) Ueno M., Tanford C., Reynolds J. A., *Biochemistry*, **23**, 3070–3076 (1984).
- 19) Ueno M., *Biochemistry*, **28**, 5631–5634 (1989).
- 20) Ueno M., *Membrane*, **18**, 96–106 (1993).
- 21) Parernostre M. T., Roux M., Rigaud J. L., *Biochemistry*, **27**, 2668–2677 (1988).
- 22) Almog S., Litman B. J., Wimley W., Cohen J., Wachtel E. J., Barenholtz Y., Ben-Shaul A., Lichtenberg D., *Biochemistry*, **29**, 4582–4592 (1990).
- 23) Ueno M., Akechi Y., Abstracts of papers, the 45th Divisional Meeting on Colloid and Interface Chemistry, Fukuoka, October 1992, p. 112.
- 24) Viriyaraji A., Kashiwagi H., Ueno M., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 1140–1146 (2005).
- 25) Viriyaraj A., Kashiwagi H., Ueno M., *Colloid Polym. Sci.*, **284**, 1131–1138 (2006).
- 26) Ueno M., Akechi Y., *Chem. Lett.*, **20**, 1801–1804 (1991).
- 27) Ueno M., Hirota N., Kashiwagi H., Sagasaki S., *Colloid Polym. Sci.*, **282**, 69–75 (2003).
- 28) Kashiwagi H., Ueno M., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 669–680 (2008).
- 29) Kashiwagi H., Aizawa K., Ueno M., *Chem. Lett.*, **29**, 134–135 (2000).
- 30) Sun C., Sano Y., Kashiwagi H., Ueno M., *Colloid Polym. Sci.*, **280**, 900–907 (2002).
- 31) Sun C., Ueno M., *Colloid Polym. Sci.*, **278**, 855–863 (2000).
- 32) Miguel M. G., Eidelman O., Ollivon M., Walter A., *Biochemistry*, **28**, 8921–8928 (1989).
- 33) Walter A., Vinson P. K., Kaplun A., Talmon Y., *Biophys. J.*, **60**, 1315–1325 (1991).
- 34) Ueno M., Tanaka K., Horikoshi I., Proceedings of the 1987 International Congress on Membranes and Membrane Processes, Tokyo, June 1987, p. 713.
- 35) Ueno M., Viriyaraj A., Proceedings of International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science, Makuhari, September 2010, p. 55.
- 36) Ueno M., Kashiwagi H., Hirota N., *Chem. Lett.*, **26**, 217–218 (1997).
- 37) Sun C., Kashiwagi H., Ueno M., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1145–1150 (2002).
- 38) Viriyaraj A., Kashiwagi H., Ueno M., *Chem. Lett.*, **34**, 1400–1401 (2005).
- 39) Ueno M., Kashiwagi H., "New Technology and Applications of Dispersion & Emulsion Systems, Physico-Chemical properties and function of liposomes," ed. by Furusawa K., Technosystem, Tokyo, 2006, pp. 956–966.
- 40) Viriyaraj A., Ueno M., *Asian J. Pharm. Sci.*, **3**, 184–192 (2008).
- 41) Aoyagi Y., Viriyaraj A., Ueno M., Abstracts of papers, the 131st Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Shizuoka, March 2011, Vol. 4, p. 103.
- 42) Ollivon M., Eidelman O., Blumenthal R., Walter A., *Biochemistry*, **27**, 1695–1703 (1988).
- 43) Lichtenberg D., Robson R. J., Denis E. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 285–304 (1983).
- 44) Lasic D. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **692**, 501–502 (1982).
- 45) Lasic D. D., *J. Theor. Biol.*, **124**, 35–41 (1987).
- 46) Levy D., Gulik A., Seigneuret M., Rigaud J. L., *Biochemistry*, **29**, 9480–9488 (1990).
- 47) Ueno A., Viriyaraj A., Proceedings of International Liposome Research Days & Lipids, Liposomes & Membrane Biophysics, Vancouver, August 2010, p. 92.
- 48) Morigaki K., Dallavalle S., Walde P., Colonna S., Luisi P. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 292–301 (1997).
- 49) Bolton C. D., Wattis A. D., *J. Phys. Chem. B*, **107**, 7126–7134 (2003).
- 50) Rasi S., Mavelli F., Luisi P. L., *J. Phys. Chem. B*, **107**, 14068–14076 (2003).
- 51) Walde P., Wick R., Fresta M., Mangone A.,

- Luisi P. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11649–11654 (1994).
- 52) Chungcharoenwattana S., Ueno M., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 1058–1062 (2004).
- 53) Chungcharoenwattana S., Ueno M., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 260–262 (2005).
- 54) Chungcharoenwattana S., Kashiwagi H., Ueno M., *Colloid Polym. Sci.*, **283**, 1180–1189 (2005).
- 55) Chungcharoenwattana S., Thesis for Doctor Degree, University of Toyama (2006).
- 56) Ueno M., Chungcharoenwattana S., Okuno T., Yoshida K., Proceedings of 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, December 2010, MATL, p. 1627.
- 57) Yoshida K., Sakurada T., Chaki K., Chungcharoenwattana S., Okuno T., Ueno M., Abstracts of papers, the 130th Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Okayama, March 2010, Vol. 4, p. 105.
- 58) Sun C., Hanasaka A., Kashiwagi H., Ueno M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1467**, 18–26 (2000).
- 59) Sriwongsitanont S., Ueno M., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1238–1244 (2002).
- 60) Sriwongsitanont S., Ueno M., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 641–642 (2004).
- 61) Sriwongsitanont S., Ueno M., *Colloid Polym. Sci.*, **282**, 753–760 (2004).
- 62) Sriwongsitanont S., Ueno M., *Polymer*, **46**, 1257–1267 (2005).
- 63) Sriwongsitanont S., Ueno M., *Open Colloid Sci. J.*, **4**, 1–6 (2011).
- 64) Klibanov A., Maruyama K., Torchilin V. P., Huang L., *FEBS Lett.*, **268**, 235–237 (1990).
- 65) Papahadjopoulos D., Allen T. M., Gabizon A., Mayhew E., Matthay K., Hung S. K., Lee K. D., Woodle M. C., Lasic D. D., Redemann C., Martin F. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1070**, 187–192 (1992).
- 66) Tanaka M., Fukuda H., Horiuchi T., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 55–60 (1990).
- 67) Horiuchi T., Tajima K., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **41**, 1191–1196 (1992).
- 68) Sun C., Ueno M., *Colloid Polym. Sci.*, **275**, 155–161 (1997).
- 69) Sun C., Ueno M., *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **106**, 281–286 (1997).
- 70) Ueno M., Hayashi K., *Open Antimicrob. Agents J.*, **3**, 17–22 (2011).
- 71) Ueno M., Matsumoto C., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2066–2068 (1993).