

による表面電位 ψ_x と粒子表面からの距離との関係式

$$\psi_x \approx \phi_0 \exp(-\kappa x) \quad (1)$$

から説明される¹⁵⁾。ここで、 ϕ_0 は $x=0$ のときの電位を表し、 κ はデバイパラメータである。 κ はイオン強度 I と

$$\kappa = \sqrt{\frac{2000 N_A e^2 I}{\epsilon_r \epsilon_0 kT}} \quad (2)$$

の関係にあり、NaClのような1:1電解質の場合、25℃では

$$\kappa = \sqrt{[\text{NaCl}]/0.304} \quad (3)$$

となる。したがって、NaCl濃度を変えてゼータ電位 ζ ($\approx \psi_x$) を測定することで

$$\ln \zeta = \ln \phi_0 - \kappa x \quad (4)$$

の関係から、粒子表面からすべり面までの距離 x 、すなわち固定水和層の厚さ (FALT) を求めることができる¹⁶⁾。なお、(3)式の κ の算出には、TrisのpKa (8.08) から解離型として存在するTrisの割合を求め、緩衝液 (pH 7.4) 中の10 mM Trisの寄与を考慮した。

2.4 Fluorescein および NBD 標識 PEG リン脂質の調製

PEG鎖末端がアミンで活性化されたDSPE-PEG2000-NH₂を50 mMホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解し、DSPE-PEG2000-NH₂の10倍量 (モル比) のNHS-FluoresceinあるいはNBD succinimidyl esterのdimethylsulfoxide溶液を加え、一晚攪拌して反応を進行させた。未反応のNHS-FluoresceinあるいはNBD succinimidyl esterはSephadex G-25カラムを用いたゲルろ過と透析により除去した。

2.5 ゲルろ過クロマトグラフィー

Fluorescein標識PEGリン脂質を1%の割合で混合したDSPE-PEG2000を用いてリポソームのPEG修飾を行った後、Sephadex CL-6Bカラム (直径1 cm × 長さ40 cm) を用いたゲルろ過によりリポソーム膜に挿入されたPEGリン脂質と未挿入のPEGリン脂質の分布を求めた。ゲルろ過は、流速1 mL/min、フラクション体積0.75 mL、溶離液は10 mM Tris-HCl bufferを用いて行った。各フラクションのfluorescein蛍光

は励起波長490 nm、蛍光波長535 nmで測定した。

2.6 NBD 消光実験

亜ジチオン酸ナトリウム (Na₂S₂O₄) によってNBD基が不可逆的に還元され蛍光消光が起こる現象¹⁷⁾ を利用し、DSPE-PEG2000-NBDの蛍光強度の減少率からリポソーム膜外層側に存在するPEGリン脂質の割合を求めた。PEGリン脂質に対して5 mol%の割合でDSPE-PEG2000-NBDを加えたDSPE-PEG2000を用いてリポソームを調製し、外水相に15 mMのNa₂S₂O₄を添加した後のNBD蛍光の消光挙動を励起波長460 nm、蛍光波長540 nmで観察した。

2.7 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 測定

アクセプター分子であるrhodamine-PEを全脂質に対して0.05 mol%を含むリポソーム膜に、ドナー分子であるDSPE-PEG2000-NBDを5 mol%含むDSPE-PEG2000をpost-insertion法により挿入し、未挿入のPEGリン脂質はSephadex CL-6Bカラムにより除去した。このNBD/rhodamine二重標識PEG修飾リポソームについて、NBDの励起波長である460 nmで励起したときのNBDの蛍光強度の減少とrhodamineの蛍光強度の増加からFRETを評価した。

ドナー分子単独での蛍光強度を F_D 、アクセプター分子存在下におけるドナー分子の蛍光強度を F_{DA} とすると、励起エネルギー移動効率 E は次式で表される。

$$E = 1 - (F_{DA} / F_D) \quad (5)$$

また、ドナー-アクセプター分子間距離を R 、励起エネルギー移動効率が50%となるドナー-アクセプター分子間距離を R_0 とすると、 E は次式のように表される。

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6) \quad (6)$$

ここで、ドナー分子とアクセプター分子がそれぞれNBDとrhodamineの場合の R_0 値として3.2 nmを用いた¹⁸⁾。

3. 結果および考察

3.1 ゼータ電位測定によるPEG修飾リポソームの固定水和層長 (FALT) の評価

Post-insertion法によって調製したPEG修飾リポソームのゼータ電位変化の挙動をFig. 1Aに示す。PEGリン脂質の添加量に依存してゼータ電位の絶対値は

Table 1 FALT for PEG-modified liposomes in post-insertion method

PEG lipid added /total lipid (mol%)	0.9	1.8	3.6	5.4	7.2	9.0
FALT (nm)	2.4 ± 0.2	3.2 ± 0.1	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1

Table 2 Insertion efficiency of PEG lipids into liposomes in post-insertion method at 60 °C

PEG lipid added /total lipid (mol%)	0.9	1.8	3.6	5.4	7.2	9.0
Insertion efficiency of PEG lipid (%)	90 ± 1	88 ± 1	86 ± 1	83 ± 2	82 ± 1	77 ± 2

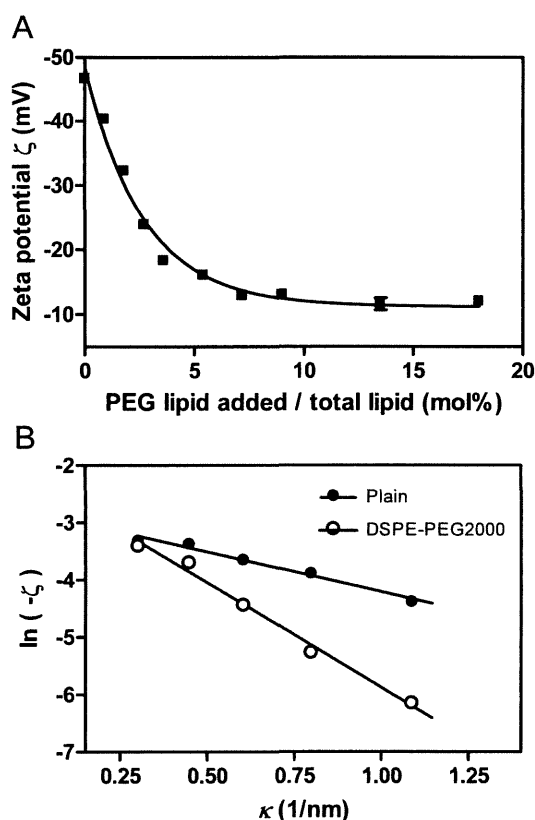


Fig. 1 (A) Change in zeta potential with addition of DSPE-PEG2000 to DSPC/DSPG/cholesterol (5:3:5) liposomes prepared post-insertion in Tris-HCl buffer (0 mM NaCl). (B) Linear relationship of $\ln(-\zeta)$ with Debye parameter (κ). Liposomes with (○) or without (●) modification of 3.6 mol% of DSPE-PEG2000 in the post-insertion method.

減少し、リポソーム表面 PEG 鎖による固定水和層の形成が示唆された。そこで、グイ-チャップマン理論を適用して PEG 修飾リポソームの FALT を求めた¹⁶⁾。Fig. 1B に未修飾 (plain) 及び DSPE-PEG2000 を 3.6

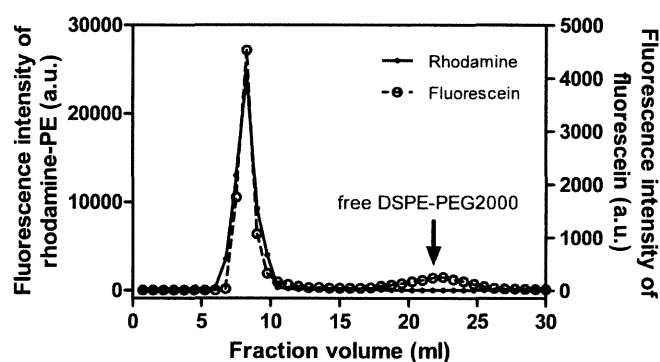


Fig. 2 Size exclusion chromatograph of DSPE-PEG2000-modified liposomes on a Sepharose CL-6B column. Liposomes were doubly labeled with rhodamine-PE (●) and DSPE-PEG2000-fluorescein (○). Liposomes were modified with DSPE-PEG2000 (3.6 mol% to total lipids) in the post-insertion method.

mol% 添加したりリポソームのゼータ電位とデバイパラメータ κ との関係を示す。この直線の傾きから、PEG 修飾によって FALT が 1.4 nm から 3.8 nm に増加していることが示された。なお、Fig. 1B の切片より求められる表面電位は PEG 被覆によって変化しているが、これは DSPE-PEG2000 が有するリン酸基部分の負電荷の影響と考えられる。Table 1 には post-insertion 法における PEG リン脂質の添加量と FALT との関係を示した。PEG リン脂質添加量に依存して FALT が増加すること、また添加量として 7 mol% 程度で FALT が一定に達することが示された。

3.2 リポソーム膜最外層における PEG リン脂質被覆率と FALT との相関

DSPE-PEG2000 のリポソーム膜に対する挿入効率を求めるために、リポソーム膜を rhodamine-PE で

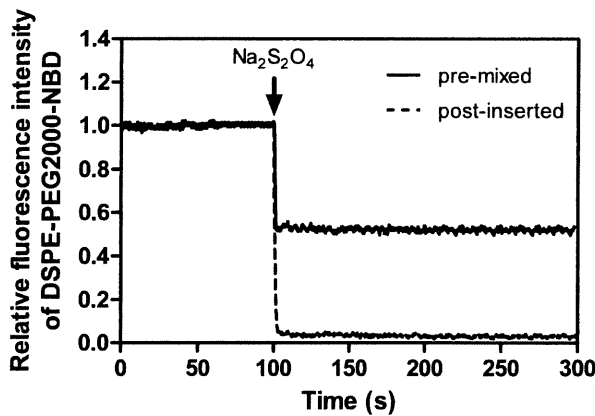


Fig. 3 Fluorescence quenching of NBD for estimating the fraction of NBD-labeled PEG lipids distributed in the outermost layer of PEG-modified liposomes. 15 mM of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ was added to PEG liposomes labeled with DSPE-PEG2000-NBD (3.6 mol% to total lipids).

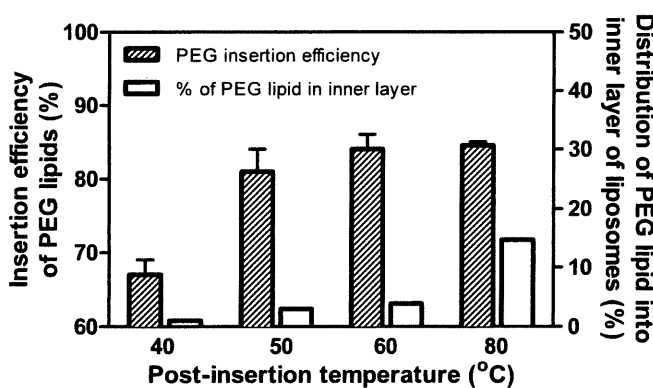


Fig. 4 Effects of post-insertion temperature on insertion and distribution of PEG lipids into liposome membranes. Liposomes were modified with DSPE-PEG2000 (3.6 mol% to total lipids) in the post-insertion method. PEG insertion efficiency was determined by size exclusion chromatography (Fig. 2). Distribution of PEG lipid into the inner layer of liposome membranes was estimated by NBD quenching experiments (Fig. 3).

DSPE-PEG2000をfluoresceinでそれぞれ標識し、それらの蛍光を指標にSepharose CL-6Bゲルろ過による分離分析を行った (Fig. 2)。Rhodamineとfluoresceinの蛍光が重なっているピークはリポソームに挿入されたPEGリン脂質を、低分子量側のfluorescein単独のピークはリポソームに挿入されていないPEGリン脂質をそれぞれ表している。この2つのピークの曲線下面積からpost-insertion法におけるリポソーム膜へのPEGリン脂質の挿入効率を求めた。Table 2にはpost-insertion法におけるPEGリン脂質の添加量と

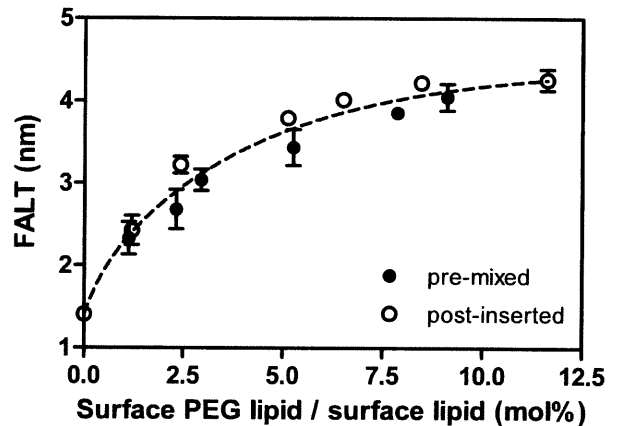


Fig. 5 Relationship of FALT with the surface coverage of liposomes with PEG lipid. Liposomes were modified with DSPE-PEG2000 in the pre-mixed (●) or post-insertion (○) methods.

PEGリン脂質のリポソーム膜への挿入効率の関係を示したが、PEGリン脂質添加量に依存してPEGリン脂質の挿入効率が低下していることがわかる。

次に、NBD基が亜ジチオン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) によって不可逆的に還元され蛍光消光する現象¹⁷⁾を利用して、リポソーム膜内外層におけるPEGリン脂質の分布を測定した。NBD標識PEGリン脂質を用いてpre-mixed法及びpost-insertion法でそれぞれ調製したPEG修飾リポソームの消光実験結果をFig. 3に示す。 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を外水相に添加するとリポソーム膜最外層に存在するNBD標識PEGリン脂質のみが消光を受けるため、蛍光強度の減少率からリポソーム膜内外層におけるPEGリン脂質の分布を求めることができる。Pre-mixed法で調製したリポソームにおいては約50%のPEGリン脂質が、post-insertion法では100%に近いPEGリン脂質が、リポソーム膜外層に存在することが確認された。一方、リポソームリン脂質膜をNBD-PEで標識し同様の実験を行ったところ、PEG未修飾リポソーム (plain) とPEG修飾リポソームのいずれにおいても約50%のリン脂質がリポソーム膜外層に存在することが示され、リポソームが一枚膜 (unilamellar) であることが確認された。

さらに、post-insertion法でのリポソーム膜に対するPEGリン脂質の挿入効率について、インキュベーション温度の影響を検討した (Fig. 4)。PEGリン脂質のリポソーム膜への挿入効率は50~60℃以上で一定値を示した。DSPC/cholesterol膜系のゲル-液晶相転移が50℃付近に存在することが報告されていることから¹⁹⁾、この結果は、リポソーム膜へのPEG脂質の挿入効率がリポソーム膜の相状態に依存していることを示唆する。また、post-insertion法ではリポ

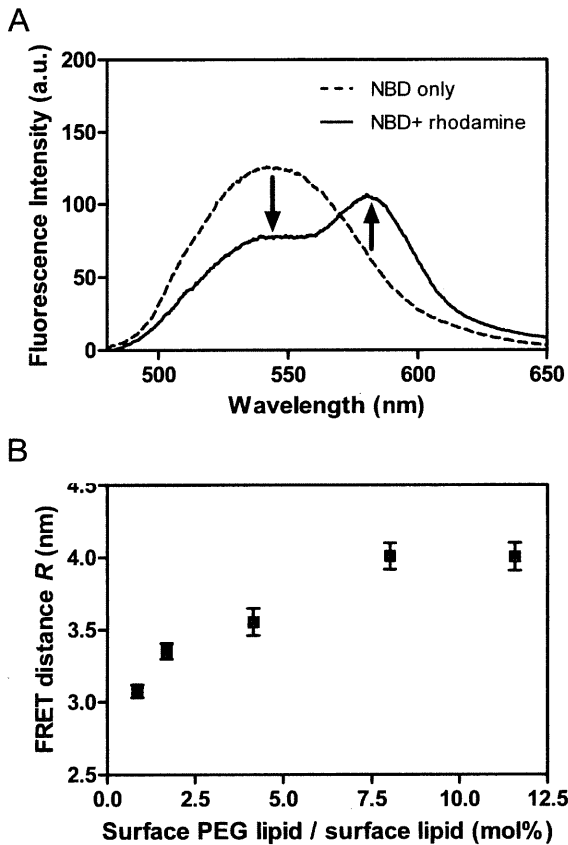


Fig. 6 (A) FRET between DSPE-PEG2000-NBD and rhodamine-PE in PEG-modified liposomes. Fluorescence emission spectra excited at 460 nm for NBD-labeled (dashed line) and NBD/rhodamine-labeled (solid line) PEG-modified liposomes. Liposomes were modified with DSPE-PEG2000 (1.0 mol% to total lipids) in the post-insertion method. (B) Change in FRET distance with increasing amount of surface PEG lipid.

ソーム膜調製後に PEG リン脂質を添加するため、PEG リン脂質はリポソーム膜外層にのみ存在すると予想されるが、post-insertion を行う際の温度条件によってはリポソーム膜内層側に PEG リン脂質が移行していることが NBD 消光実験より確認された。特に 80 °C のような高温で post-insertion を行うと 15 % 程度の PEG リン脂質が内層側に移行しており (Fig. 4)、高温での post-insertion には注意が必要であることが示唆された。これらの実験結果から、post-insertion の温度条件としては 50 ~ 60 °C が適当と考えられた。

以上の検討により、post-insertion 法及び pre-mixed 法で調製した PEG 修飾リポソームについて、PEG リン脂質のリポソーム膜への挿入効率および内外膜への分布挙動が明らかとなった。そこで、post-insertion 法と pre-mixed 法で調製した PEG リポソーム膜表面での PEG リン脂質の被覆率と FALT との関

係を比較したところ、FALT の表面 PEG リン脂質濃度に対する依存性は両修飾法で同じであることが示された (Fig. 5)。すなわち、PEG リポソームの表面物性は、修飾法の違いにかかわらず PEG 鎖の表面被覆率によって制御されていることが明らかとなった。

3.3 FRET によるリポソーム膜表面 PEG 鎖のコンフォメーション変化の観測

Fig. 5 に示された PEG リン脂質のリポソーム表面濃度の増加に伴う FALT の増大は、リポソーム膜表面での PEG 鎖コンフォメーションがマッシュルーム型からブラシ型へ変化するためと考えられている²⁰⁾。これは、PEG リン脂質濃度の増加が PEG 鎖の三次元的な横方向への広がりを抑制し、縦方向に伸長することにより水和層が増大するためである²¹⁾。この PEG 鎖のコンフォメーション変化を検出するため、リポソーム膜中のリン脂質頭部を rhodamine (アクセプター分子) で、DSPE-PEG2000 の PEG 鎖末端を NBD (ドナー分子) で標識し、NBD から rhodamine への FRET を観察した。

Fig. 6A は、PEG リン脂質を 1.0 mol% 添加した際の DSPE-PEG2000-NBD と rhodamine-PE の蛍光スペクトルを示す (リポソーム膜表面脂質に対する表面 PEG リン脂質濃度は約 1.7 mol%)。NBD の励起波長 460 nm で励起すると、PEG 鎖末端の NBD 基からリポソーム表面の rhodamine 基への FRET が起こり、NBD の蛍光極大波長である 540 nm 付近での蛍光強度の減少と rhodamine の蛍光極大波長である 580 nm 付近での蛍光強度の増大が観察された。そこで、540 nm 付近における NBD 蛍光強度の減少度から FRET 効率 E を、さらにその値を用いてドナー-アクセプター分子間平均距離 R を求めた。この場合の励起エネルギー移動効率とドナー-アクセプター分子間平均距離はそれぞれ $E = 0.39$, $R = 3.5$ nm であった。

Fig. 6B は、PEG リン脂質の表面濃度の増加による R の変化を示す。これより、PEG 修飾率の増加がリポソーム膜面から PEG 鎖末端までの平均距離の増大をもたらすことが明らかとなった。また、この変化は Fig. 5 の固定水和層長と同様な増加挙動を示し、PEG 修飾リポソームの表面固定水和層長の増大が表面 PEG 鎖のコンフォメーション変化に起因することを示唆した。Pre-mixed 法により調製した DSPE-PEG2000 修飾リポソームの場合、全脂質に対して 4 ~ 5 mol% (表面脂質あたり約 2 ~ 2.5 mol% に相当) 程度の PEG 脂質濃度でマッシュルーム構造からブラシ構造への PEG 鎖コンフォメーション変化が起こるといわれている^{20, 21)}。Fig. 5 や Fig. 6B で見られる低濃度側での FALT 及び R の増加は PEG 鎖のコンフォ

メーション変化を反映し、高濃度側でプラトーに達するのはPEG鎖のほとんどがブラシ構造を形成しているためと考えられる。

4. 結 言

本研究では、PEG修飾リポソームの表面物性として表面固定水和層長を求めるとともに、蛍光標識PEGリン脂質を用いたリポソーム膜表面でのPEG被覆率およびPEG鎖コンフォメーションに関する蛍光分光学的測定から、post-insertion法で作製したPEG修飾リポソームの物理化学的特性評価を行った。

PEG修飾リポソームの固定水和層長の変化をリポソーム膜表面に存在するPEGリン脂質濃度当たりで比較したところ、リポソーム膜最外層におけるPEGリン脂質被覆率と固定水和層長との相関はpre-mixed法とpost-insertion法でほぼ同じであることが示され、修飾法の違いにかかわらずPEGリポソームの表面物性がPEG鎖の表面被覆率によって制御されていることが明らかとなった。さらに、PEG修飾リポソームの固定水和層長の増大はPEG鎖のコンフォメーション変化に起因することが示唆された。

従来のリポソームPEG修飾法であるpre-mixed法は、リポソーム膜内層にもPEGリン脂質が存在するため、内水相容積を狭め薬物封入率を低下させるだけでなく、リポソームに内封した薬物の漏出性を増大させるという問題点が報告されている²²⁾。今回の結果は、生産効率や拡張性に優れたpost-insertion法が、pre-mixed法と同等の表面物性を有するPEG修飾リポソームの調製法であることを示した。

謝 辞

本研究に用いたDSPE-PEG2000-NH₂を日油株式会社よりご供与頂いたことに深く感謝致します。本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金（H22-医薬一般-005）の助成を受けたものである。

文 献

- 1) Devine DV, Marjan JM : *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **14**, 105-131 (1997)
- 2) Allen TM, Hansen C, Martin F, Redemann C, Yau-Young A : *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 29-36 (1991)
- 3) 石田竜弘, 際田弘志 : *薬学雑誌*, **128**, 233-243 (2008)
- 4) Dos Santos N, Allen C, Doppen AM, Anantha M, Cox KA, Gallagher RC, Karlsson G, Edwards K, Kenner G, Samuels L, Webb MS, Bally MB : *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1367-1377 (2007)
- 5) Satulovsky J, Carignano MA, Szleifer I : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9037-9041 (2000)

- 6) Matsumura Y, Maeda H : *Cancer Res.*, **46**, 6387-6392 (1986)
- 7) Gabizon A, Shmeeda H, Grenader T : *Eur. J. Pharm. Sci.*, **45**, 388-398 (2012)
- 8) Iden DL, Allen TM : *Biochim. Biophys. Acta*, **1513**, 207-216 (2001)
- 9) Moreira JN, Ishida T, Gaspar R, Allen TM : *Pharm. Res.*, **19**, 265-269 (2002)
- 10) Li CL, Cui JX, Wang CX, Zhang L, Li YH, Zhang L, Xiu X, Li YF, Wei N : *Int. J. Pharm.*, **391**, 230-236 (2010)
- 11) Nakamura K, Yamashita K, Itoh Y, Yoshino K, Nozawa S, Kasukawa H : *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 2801-2807 (2012)
- 12) Yoshino K, Nakamura K, Terajima Y, Kurita A, Matsuzaki T, Yamashita K, Isozaki M, Kasukawa H : *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 2901-2907 (2012)
- 13) Sugiyama I, Sadzuka Y : *Curr. Drug Discov. Technol.*, **8**, 357-366 (2011)
- 14) Bartlett GR : *J. Biol. Chem.*, **234**, 466-468 (1958)
- 15) J.N.イスラエルアチヴィリ : 「分子間力と表面力」 第2版, 朝倉書店, p.205-276, (1996)
- 16) Sadzuka Y, Nakade A, Hirama R, Miyagishima A, Nozawa Y, Hirota S, Sonobe T : *Int. J. Pharm.*, **238**, 171-180 (2002)
- 17) McIntyre JC, Sleight RG : *Biochemistry*, **30**, 11819-11827 (1991)
- 18) Liu R, Sharom FJ : *Biochemistry*, **37**, 6503-6512 (1998)
- 19) Tamai N, Uemura M, Takeichi T, Goto M, Matsuki H, Kaneshina S : *Biophys. Chem.*, **135**, 95-101 (2008)
- 20) Allen C, Dos Santos N, Gallagher R, Chiu GN, Shu Y, Li WM, Johnstone SA, Janoff AS, Mayer LD, Webb MS, Bally MB : *Biosci. Rep.*, **22**, 225-250 (2002)
- 21) Garbuzenko O, Barenholz Y, Prieve A : *Chem. Phys. Lipids*, **135**, 117-129 (2005)
- 22) Nikolova AN, Jones MN : *Biochim. Biophys. Acta*, **1304**, 120-128 (1996)

(Received 1 November 2012 ;

Accepted 19 December 2012)

