

Accounts of Materials & Surface Research

Physicochemical Properties of Liposome and Its Mass Production with Supercritical Carbon Dioxide Fluid

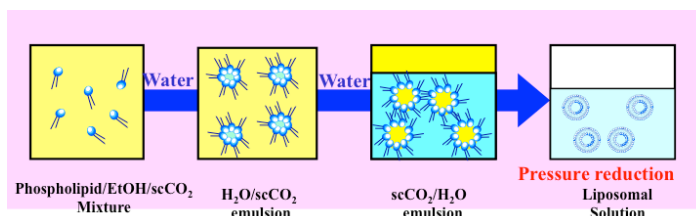
MASAHIKO ABE

*Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science
Noda, Chiba 278-8510, Japan.
abemasa@rs.noda.tus.ac.jp*

Liposome are colloidal structures formed by the self-assembly of phospholipid molecules in aqueous solution. It is widely accepted that liposomes, lipid bilayer membranes, are of great importance as models for biological membranes. Recently, widespread applications have been considered in the areas of drug delivery systems, food chemistry, cosmetics, and so on, because they can encapsulate both water- and lipid-soluble molecules or even macromolecules.

Many studies have been performed on the pharmacological aspects of liposomes in vivo and/or in vitro. However, only a few studies have been done on the physicochemical properties of liposomes, in particular the molecular interactions between phospholipid and its related substances in a lipid bilayer membrane. Investigation of these interactions is of great importance not only practically, but also theoretically. In this review, I describe the molecular interactions between phospholipid and related substances such as nonionic surfactants, lipophilic substances, steroids, glycolipids, mangostin, ceramides, water-soluble polymers, and proteins in an lipid bilayer.

Moreover, I describe a novel liposome preparation method that allows us to prepare the liposomes in a single step using supercritical carbon dioxide instead of a toxic organic solvent.



Keyword: Drug Delivery System; Liposome; Lipid; Super Critical Fluid;

Masahiko Abe received his PhD degree from University of Tokyo, long long time ago. He was retired from the Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science in 2014. He is currently the Professor of Institute for Science and Technology, the same university mentioned above. His research is oriented to surfactant sciences such as synthesis and properties of hybrid surfactant, Gemini surfactant, colloidal assemblies (Micro emulsion, Emulsion, Liposomes, Niosomes, Micro capsules, Liquid Crystals). He is now applying the Liposomes on Non-DDS fields (Upgrading of Various Polymers) and on Glucose Fuel Battery.



リポソームの物理化学的研究とその超臨界二酸化炭素流体を用いた短時間・大量製造

阿部 正彦

東京理科大学・総合研究院

1. はじめに

私がリポソームの物理化学的研究をスタートさせたのは、当研究室の卒業生である山内仁史博士の薦めによるものである。思い起こせば、1988年4月に東京理科大学・野田キャンパスの一角に、7つの企業(第一製薬、旭化成、味の素、エーザイ、塩野義製薬、田辺製薬、明治製菓)の共同体であるDDS研究所が設立された。第一製薬の社員だった山内氏が、リポソームの学術的研究を始めたかどうかと薦めてくれたからである。

私の知る限り、当時、日本におけるリポソーム研究の最先端の研究を行っていたのは第一製薬の研究グループ(広田貞雄博士、菊池寛博士、山内仁史博士)であり、特許の関係から他企業ではほとんど研究が行われていなかったと記憶している。

では、リポソームとは何であろうか。

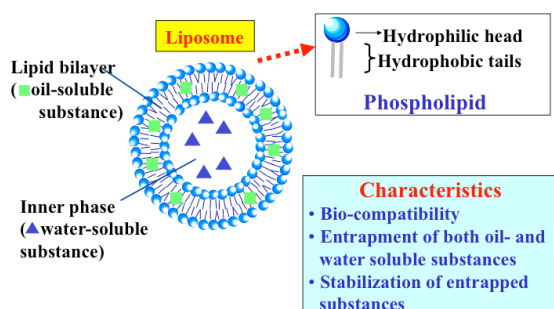


Fig. 1 Pattern Diagram of Liposome Structure

それは Fig.1 に示すように、生体膜由来のリン脂質によって形成される二分子膜の閉鎖小胞体であり、Bangham ら¹⁾によって発見されて以来、その生体膜と類似の構造を利用した人工生体膜・細胞膜モデルなどの研究材料として用いられてきた。またリポソームは、工学的にもその利用価値は極めて高く、近年では、薬物送達システム(DDS)のキャリアー(担体)や

遺伝子導入の基材として用いられる試みが盛んに行われている。私の研究グループでは、リポソームを DDS のキャリアーとして利用する時にはその“うつつわ”としての機能が極めて重要であり、器としての機能を十分に発揮するためにはその物理化学的性質が最も重要であると考えている。したがって、物理化学的観点からリポソームを構成するリン脂質とそれに関連する物質との相互作用に関する研究を実施してきており、リポソーム膜中におけるリン脂質と非イオン界面活性剤²⁾、脂溶性物質³⁾、ステロイド類^{4~6)}、糖脂質^{7,8)}、マンゴスチン⁹⁾、セラミド脂質^{10~12)}、金属イオン^{13~16)}、水溶性高分子^{17~20)}、タンパク質^{21,22)}等の多岐にわたる物質との相互作用を包括的に検討してきた。さらに、超臨界二酸化炭素流体を媒体とした新しいリポソーム調製法の開発^{23~26)}を行っており、有害な有機溶媒を用いることなく、かつ、大量に、短時間でリポソームを生産できることも見出している。本稿では、我々が取り組んできた物理化学的アプローチによるこれらのリポソームの研究について概説したい。

リポソームを DDS のキャリアーとして用いる場合の利点として、1) 生体由来の物質を用いるため毒性が少ない、2) 二分子膜中に抗体やレクチン、糖脂質などを組み込むことにより、特定の組織または細胞に対して指向性を持たせることが可能である。3) 構成脂質の種類や組成比、荷電などを容易に変えられることができるなどがあげられる。とりわけ、標的臓器や細胞に対して指向性を持つリポソームを調製するためには、両親媒性の認識素子が導入されることが多いが、その認識素子の構造および物性がリポソーム二分子膜に及ぼす影響についてあまり検討されていなかった。

そこで、我々はリポソームに取り込む認識素子モデル物質として種々の物質を取り上げ、リポソーム形成に及ぼすそれらと主要成分であるリン脂質との相互作用について、まず述べることにする。次に、予てより切望されていた有害有機物フリーで短時間、かつ大量のリポソームを製造できる新規方法についても述べることにする。

なお、この総説は、前報(井村知弘、横山祥子、阿部正彦、表面, 43(1), 10-28 (2005))をベースにしていることを明記しておきたい。

2. リポソーム膜形成に及ぼす各種物質の影響

2-1 非イオン界面活性剤

この物質を用いる利点としては、毒性が少ないこと、主原料であるリン脂質よりもかなり安価であること、指向性があること、構成脂質の種類や組成比、荷電などを容易に変えられることである。

結論を先に述べると、アルキル鎖長が 16 の L- α -dipalmitoylphosphatidyl choline(DPPC) に長鎖親水基を有する非イオン界面活性剤(Hexadecyl polyoxyethylene ethers ($C_{16}POE_n$; $n = 10, 20, 40$))を添加すると、形成する分子集合体の構造はその鎖長および濃度に依存し、ポリオキシエチレン鎖長の比較的短い $C_{16}POE_{10}$ 添加系の場合にはリポソームを形成するが、ポリオキシエチレン鎖長の比較的長い $C_{16}POE_{20}$ および $C_{16}POE_{40}$ 添加系の場合は、その濃度が高くなると二分子膜を形成できなかった。

詳細を述べることにする。

DPPC をクロロホルムに溶解した後、Bangham ら¹⁾の方法に準じて多重膜リポソームを調製した(脂質濃度 2 mM)。これを 50°C で 5 時間以上超音波照射(Branson 社、B-220 型 125W)し、小さな一枚膜リポソームとした後、種々の濃度の界面活性剤水溶液を添加して、50°C で 1 時間インキュベーションした後、30°C で 12 時間以上静置したものを試料溶液とした。

リポソームの粒子径に及ぼす非イオン界面活性剤添加の影響を Fig.2 に示す。

ポリオキシエチレン鎖長が比較的短い $C_{16}POE_{10}$ を添加した場合、その粒子径はほと

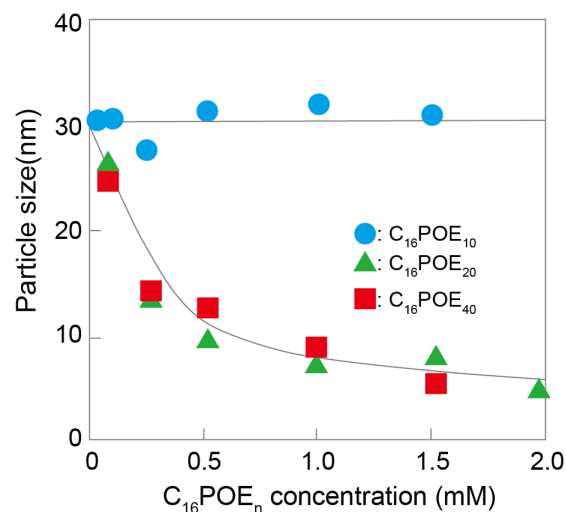


Fig. 2 Effects of the concentrations of various nonionic surfactants on the particle sizes of liposomes at 30°C.

んど変化せず一定(約 30 nm)であったが、ポリオキシエチレン鎖長が長い $C_{16}POE_{20}$ および $C_{16}POE_{40}$ 添加系の場合、粒子径は界面活性剤の添加濃度の増加に伴い 10 nm 以下まで減少した。

リポソームの大きさの理論的下限值は、約 20 nm であることから、長鎖のポリオキシエチレン鎖を有する非イオン界面活性剤をある添加濃度以上にすると、リン脂質との混合のリポソームは形成することができずに別の分子集合体が形成されているものと思われる。

では、ポリオキシエチレン鎖長が比較的短い $C_{16}POE_{10}$ リポソームの二分子膜中に取り込まれているのかを検討した(遠心分離(10^5G , 5 時間, 40°C)。沈殿物の定量²⁷⁾を行ったところ、リン脂質(DPPC)および $C_{16}POE_{10}$ はすべて沈殿物中に存在していた。さらに、リポソームのゲル-液晶転移温度を検討したところ、その転移温度は低温側にシフトしたが、これはリポソームの二分子膜に取り込まれた $C_{16}POE_{10}$ 分子によって分子同士の協同効果を低下させたものと考えられる。

DPPC のみで調製したリポソームは、表面電荷を有していないために凝集・沈殿を起こしやすいが、荷電物質を添加することにより凝集せずに安定化することが知られている²⁸⁾。

また、リポソームを生体内に投与する場合、生体内細胞と同様に負に帯電させた方が毒性が少なく異物として認識されにくいと考えられている²⁹⁾。そこで、リン脂質である DPPC 分子と同じ疎水基を有する dicetyl phosphate (DCP)を組み込んだリポソームを用い、リポソームのゼータ電位に及ぼす非イオン界面活性剤添加の影響を検討したところ、非イオン界面活性剤の添加濃度の増加に伴いゼータ電位の絶対値は著しく減少した。さらに、その減少傾向は、ポリオキシエチレン鎖長の増加に伴いより大きくなった。このことから、非イオン界面活性剤のアルキル鎖長(基)は DPPC と同様にリポソームの二分子膜中に配向するが、親水基であるポリオキシエチレン鎖はリポソームの表面を覆うように存在しているものと考えられる。

非イオン界面活性剤を混合したリポソームに関連した非常に興味深い報告が Matsumoto ら^{30,31)}によってなされている。彼らは、抗癌剤を含まなくても、dodecyl polyoxyethylene ethers を混合したアルキル鎖長が 14 のリン脂質(DMPC)リポソームが、それ自身に高い腫瘍細胞の増殖抑制効果があることを発見している。このようなリポソームが発現する生理活性には、リポソームの物理化学的性質が大きく寄与しているものと考えられる。

2-2 脂溶性物質³⁾

この物質を用いる目的は、モデル物質として用いた親水基を持たない脂溶性物質(octane)と親水基の異なる脂溶性物質(1-octanol や octanoic acid)とリン脂質との負に帯電したリポソーム二分子膜(DPPC:cholesterol:DCP=7:4:0.7)中における相互作用を検討できることである。

結論を先に述べると、脂溶性物質のリポソーム中における存在位置は、疎水性の強い脂溶性物質ほどリポソーム二分子膜の中央付近に可溶化され(取り込まれ)、親水性の強い脂溶性物質ほどリポソーム二分子膜の表面近傍に存在する。一方、過剰の脂溶性物質の添加は、リポソームの形成を阻害することになる。言い換えると、リポソーム二分子膜の疎水性

部位への取り込みには限界がある。

詳細を述べると、リポソームは、その分子集合体中に水相と疎水相(二分子膜中の疎水基部)を兼ね備えており、水溶性物質のみならず脂溶性物質の保持(取り込み)も可能である。一方、近年の医薬品の多様化に伴い種々の脂溶性薬物の利用が期待されているが、リポソームの薬物保持に関する研究は、水溶性薬物に関するものが多く、脂溶性薬物とリン脂質との相互作用に関する物理化学的研究は少ない。

まず、各種脂溶性物質(30 mM)を添加したリポソーム溶液の振とう時間と吸光度との関係を Fig.3 に示す。1-octanol 添加系リポソーム溶液の吸光度の極大値と一定値(矢印)との差は、octane 添加系の場合よりもかなり小さくなった。また、吸光度が一定になるために要する時間は、親水性の大きい脂溶性物質ほど短時間であった(octane>1-octanol>octanoic acid)。

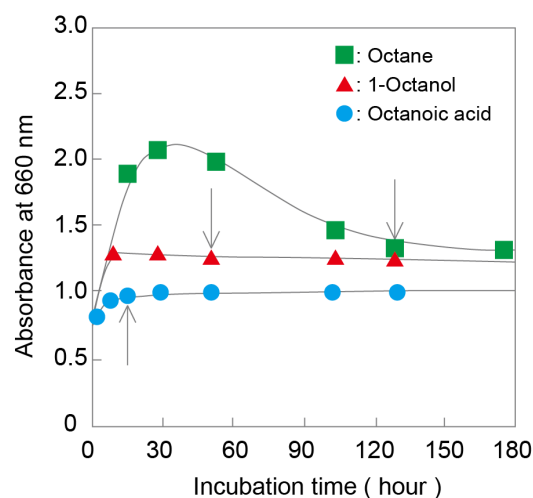


Fig. 3 Relationship between absorbance and incubation time of liposomes incorporating various lipophilic substances at 30°C.

つまり、リポソームを形成する際、リン脂質である DPPC などの界面活性物質と協同効果を有する脂溶性物質ほど(親水性の大きな物質)、分子集合体の内外における分配平衡に達する時間が短く、また、単に可溶化物質として認識される物質(octane)は、分配平衡に達する時間が長くなるものと考えられる。

次に、リポソームの形成に及ぼす脂溶性物質添加の影響を検討するため、glucose を内

水相マーカーとしてリポソームの保持効率を測定したところ、いずれの脂溶性物質を用いた場合も、添加量の増加に伴い glucose の保持効率は減少した。また親水基を持たない octane 添加系の場合は、その濃度が約 100 mM から保持効率が一定となったが、親水基を有する 1-octanol や octanoic acid 添加系の場合は、濃度が約 100 mM 以上になると保持効率がゼロとなったことから、脂溶性物質が高い濃度領域(100 mM 以上)になると、リポソームは二分子膜構造を維持できなくなるものと考えられる。

次に、脂溶性物質の二分子膜内における存在位置を検討した(蛍光プローブとして pyrene を用いた)ところ、pyrene のモノマーはリポソームの炭化水素鎖部(リポソーム二分子膜中の疎水基部)に分配し、5 本のスペクトルピークを示す。Pyrene 近傍に極性物質が存在すると、禁制遷移によるピーク(I_1)は影響を受けるが、許容遷移によるピーク(I_3)は影響を受けないため、その比 I_1/I_3 を膜の微視的極性の指標とすることができる³²⁾。Pyrene を可溶化したリポソームの I_1/I_3 比と脂溶性物質の濃度との関係を Fig.4 に示す。Octanoic acid 添加系の場合、二分子膜内の極性は添加濃度にほとんど依存しなかったが、1-octanol 添加系の場合、添加濃度の増加に伴い若干減少し、やがて一定となった。

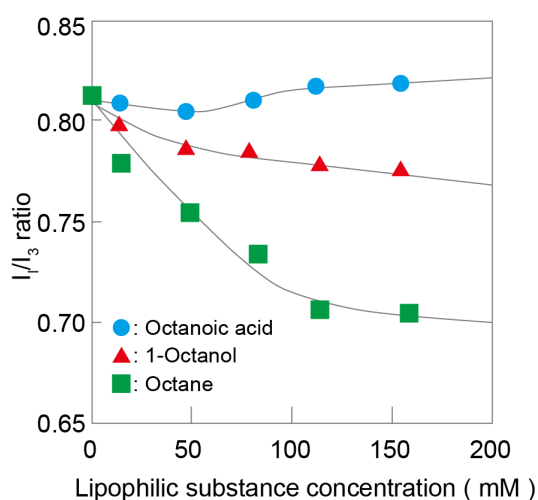


Fig. 4 Relationship between I_1/I_3 ratio of pyrene in liposomes and concentration of lipophilic substances at 30°C.

一方、octane 添加系の場合、その極性は濃度

増加に伴いかなり減少した。また、脂溶性物質を含むリポソーム二分子膜中に存在する pyrene の I_1/I_3 比は、decane(水を含まない系)に存在する場合の I_1/I_3 比(0.581)よりかなり大きくなった。つまり、リポソーム二分子膜中の疎水基部に存在する pyrene は水の影響をかなり受けているものと考えられる。つまり、脂溶性物質の二分子膜中における脂溶性物質の存在位置を考察すると、octane は二分子膜の中央付近に取り込まれている pyrene 分子の近傍に存在しているものと考えられる。一方、1-octanol の場合は I_1/I_3 比が octane ほど減少していなかったことから、リポソームを形成している脂質の間に疎水基を割り込ませて、比較的二分子膜の表面付近に存在しているものと考えられる。また、octanoic acid の場合は I_1/I_3 比がその濃度増加に依存しなかったこと、および 1-octanol に比べて親水基が大きいことから、1-octanol の場合より膜への割り込みが少なく膜表面付近に存在しているものと考えられる。

2-3 ステロイド類^{4~6)}

この物質を用いる利点としては、リポソームに内包した薬物のリークを抑制できることである。ちなみに、内包した薬物のリークを抑制するためには、荷電物質や cholesterol などのステロイドの添加が有効であることが知られている。しかし、各種ステロイド類の化学構造がリポソームの膜物性に及ぼす影響については詳細に検討されていない。

結論を先ず述べさせて頂くと、単分子膜状態における DPPC と各種ステロイド類との分子間相互作用の強さは、その分子構造に大きく依存して、cholesterol = β -cholestanol > β -sitosterol > stegmasterol となる。しかし、いずれのステロイド類を添加した場合でもリポソーム二分子膜は安定化し、もれ性は抑制される。さらに、その抑制効果はステロイド類の化学構造に大きく依存して、ステロイド環の分岐構造や二重構造の数が増大すると減少する。ちなみに、リポソームを形成する場合のリン脂質とステロイド類の最適混合割合は、動物性ステロイドと植物性ステロイドで異なり、

cholesterol: DPPC=3:7、stigmasterol:DPPC=5:5 であることがわかった。

詳細を述べると、ここで用いたリポソームは、逆相蒸発法³³⁾によって調製した。まず、リポソームを構成する脂質 (DPPC: steroids: DCP=7:3:1) を diethyl ether と ethanol の混合溶媒に溶解した後、0.28 mol/L の glucose 水溶液を添加した。次に、10~20 分程度超音波照射 (Branson 社、B-220型、125 W) することによって水/油エマルジョンを形成させた。さらに、溶媒を除去することによってゲルを形成させた後、ボルテックスで攪拌することによって大きな一枚膜リポソームを得た。

我々は、これまでにリポソーム二分子膜の横方向の分子間相互作用は、気/液界面における二次元の単分子膜の分子間相互作用と類似した傾向を示すことを報告している³⁴⁾。したがって、まず気/液界面上に形成させた DPPC/steroid 混合単分子膜の表面圧(π)-面積(A)等温線を測定した(Fig.5)。

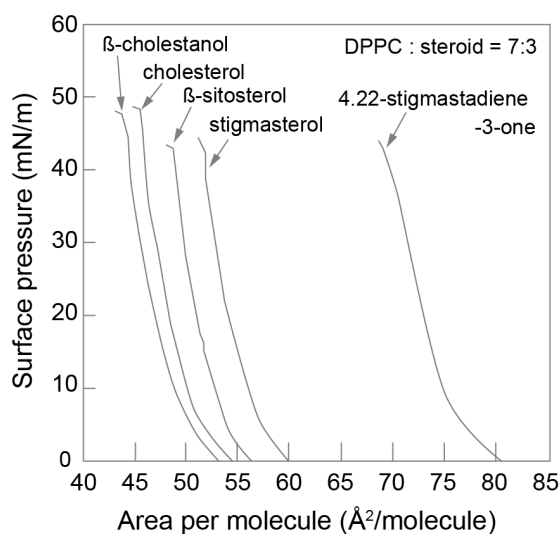


Fig. 5 Surface pressure (π)-area(A) curves (DPPC : steroid=7:3)

いずれのステロイド類の場合も、DPPC/steroid 混合単分子膜は液体凝縮膜を形成した。また、同じ親水基(水酸基)を有するステロイド類(cholesterol, β -cholesterol, β -cholestanol, stigmasteroid)の混合単分子膜の圧縮率はほとんど変わらなかったが、親水基にキノン基を有する 4,22-stigmasadien-3-one の圧縮率は他の場合よりも大きかった。なお、単分子膜の圧縮率

は、崩壊圧近傍の π -A 等温線の接線と X 軸との交点において決定した。

	Cholesterol	β -cholesterol	β -sitosterol	stigmasterol	4,22-stigmastadien e-3-one
Limiting area ($\text{\AA}^2/\text{molecule}$)	48.1	46.4	52.0	55.5	77.9
Collapse pressure (mN/m)	47	48	43	42	41
Compressibility (mN/m) $\times 10^3$	1.3	1.1	1.6	1.9	3.3

さらに、極限面積の結果(Table 1)から、親水基に水酸基を持つステロイド類(cholesterol, β -cholesterol, β -sitosterol, stigmasterol)は、界面に垂直に配向しているが、親水基にキノン基を有する 4,22-stigma-steroiden-3-one はキノン基とステロイド環との共役二重結合の形成によってかさ高い分子構造となるために界面に対して傾いて配向しているものと考えられる。

DPPC/steroid 混合単分子膜の崩壊圧は、同じ親水基(水酸基)を有するステロイド類で比較した場合、小さな側鎖を有する cholesterol および β -cholestanol の方が、分岐した側鎖を有する β -sitosterol および stigmasterol よりも大きかった。また、極限面積を比較した場合、ステロイド環の側鎖に二重結合を有する stigmasterol の方が、二重結合を持たない β -stigmasterol よりも大きかった。これは、側鎖に二重結合があると分子が密に配向できないことを意味している。一方、cholesterol と β -cholestanol の極限面積はほとんど同じであることも分かった。これらの結果から、DPPC と各種ステロイド類との分子間相互作用の強さは、その分子構造に大きく依存して、cholesterol = β -cholestanol > β -sitosterol > stigmasterol となった。これらのことから、いずれのステロイド類を添加した場合もリポソーム二分子膜は安定化して漏れ性は抑制されることが分かった。さらに、その抑制効果はステロイド類の化学構造に大きく依存して、ステロイド環の側鎖の分岐構造や二重結合の数が増大すると減少することが分かった。

また、cholesterol の添加は内包物質のリークを抑制すると言われているので、cholesterol

のリポソーム内における存在位置を小角X線散乱測定および Gift 法の適用により求めたところ、cholesterol の存在位置は予想に反して、リポソーム二分子膜の疎水基部分ではなくてリン脂質の親水基近傍であり、二分子膜中のリン脂質のアシル基のパッキング状態を歪めていることが分かった³⁵⁾。

2-4 糖脂質^{7,8)}

この物質を用いる利点は、臓器指向性の向上や galactose 残基を有する糖脂質は肝臓への標的指向性の付与などに効果的である³⁶⁾と言われているので検討する価値がある。

結論をまず述べさせて頂くと、糖脂質のリポソームへの添加は、二分子膜を安定化して内水相に保持されている glucose のもれ性を抑制させる。また、糖脂質をリポソームに含有させることによって、特定のレクチンを認識できる機能性リポソームを調製できる。

調製は、Bangham 法に準じた。用いた糖脂質は 1,2-diacyl[β -D-galactopyranosyl(1'-3)-sn-glycerol (monogalactosyl diglyceride; MG)および 1,2-diacyl[α -D-galactopyranosyl(1'-6') β -D-galactopyranosyl(1'-3)-sn-glycerol(digalactosyl diglyceride; DG)が用いられた、まず、リポソームの膜透過性に及ぼす糖脂質添加の影響を検討した。Fig.6から明らかのように、リポソームからの glucose のもれ性は時間とともに増大し、二段階の glucose の放出ステップが確認された。一段目の glucose の放出ステップは、二段目よりもその放出速度が著しく遅いことが分かった。また、Fig.6(a)と(b)を比較すると、cholesterol の添加はリポソームのもれ性を抑制した。

さらに、リポソームのもれ性は糖脂質の添加により抑制され、その効果は MG よりも DG の方が顕著であることが分かった。これらの結果は糖脂質の糖鎖が二分子膜の透過性を抑制していることを意味している。

レクチンは細胞表面の糖鎖を特異的に認識することが知られている。そこで *Ricinus communis* 由来の galactose 特異性レクチン(RCA₁₂₀)³⁷⁾を用いて調製した糖脂質含有リポソームとの相互作用を検討したところ、RCA₁₂₀ 存在下における粒子径の経時変化を Fig.7に示

す。添加系の場合、粒子径は変化せず一定であったが、糖脂質を添加した場合、粒子

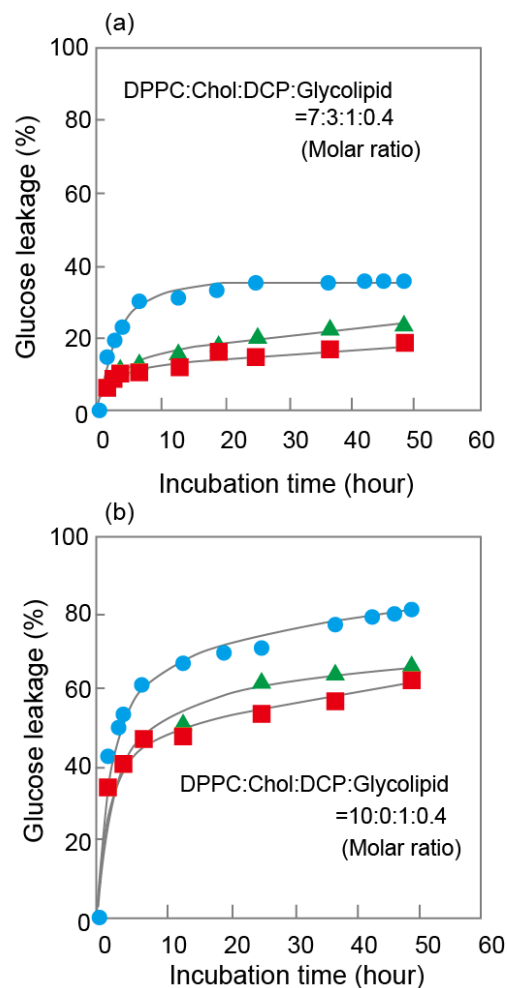


Fig. 6 Permeability of liposomes including glycolipids studied by the measurement of glucose leakage from the liposomes at 37°C. (a) DPPC/cholesterol/DCP/glycolipid, 7:3:1:0.4; (b) DPPC/cholesterol/DCP/glycolipid, 10:0:1:0.4. ●, without glycolipid; ▲, MG; ■, DG.

径は RCA₁₂₀ 濃度に依存して増大した。さらに、リポソームの粒子径は、添加した糖脂質の濃度に異存して増大することも分かった。これらのことから、糖脂質のリポソームへの添加は二分子膜を安定化にして glucose のもれ性を抑制することが分かった。また、糖脂質をリポソームに含有させることによって、特定のレクチンを認識できる機能性リポソームを調製できることが分かった。また、レクチンの結合によってリポソームの粒子径は増大し、この効果はリポソームのゼータ電位の減少効果の大きい DG 添加系の方が MG よりも顕著であった。ここで調製された末端 galactose 残基を有する糖脂質によって修飾したリポソームは、特に肝

臓へのターゲティングに効果的であるものと考えられる。

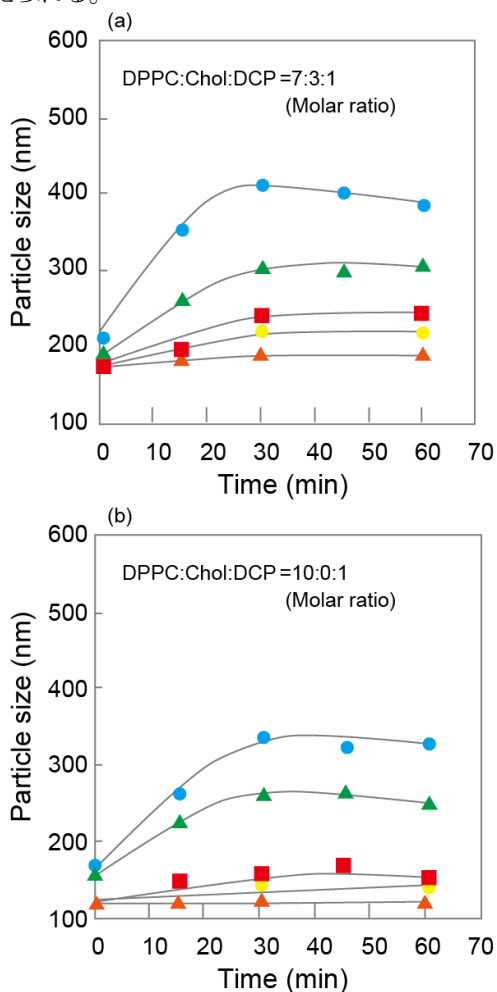


Fig. 7 Increasing particle size upon the addition of RCA₁₂₀ to liposomes at 37°C. (a) DPPC/Chol/DCP/glycolipid, 7:3:1:n; (b) DPPC/Chol/DCP/glycolipid, 10:0:1:n, where (▲) n=0; (●) n=0.4 (MG); (■) n=0.8(MG); (▲) n=0.4(DG); (●) n=0.8(DG).

2-5 マンゴスチン⁹⁾

ここで用いたマンゴスチン(有効成分: xanthone)は、強心作用、抗炎症作用などの薬理活性や抗生物活性を示すことから注目を集めている³⁸⁾。

結論を先ず述べると、種々の荷電を有するリポソームへのマンゴスチンの可溶化(取り込み)を試みたところ、添加量には最適値が存在して過剰のマンゴスチンの添加はリポソーム形成を阻害する。また、マンゴスチンの添加はリポソーム二分子膜の微視的粘性を増大させ、glucose のもれ性を抑制する。

詳細を述べると、電荷を持たないリポソーム(Unc. L., DPPC:cholesterol=1:1), 負に帯電するリポソーム(Neg. L., DPPC: cholesterol:

DCP=7:3:1), 正に帯電するリポソーム(Po. L., DPPC:cholesterol: stearyl amine (SA)=7:3:1)の三種類を Bangham 法により調製した。まず、リポソームの形成に及ぼすマンゴスチン(1,3,6-trihydroxy-7-methoxy-2,8-bis-(3-methyl-2-butyl)-9-xanthenone)添加の影響を検討したところ、荷電を持たないリポソーム(Unc. L)の場合、マンゴスチンの 5 wt%の添加量までのすべての DPPC 分子がリポソームの形成に寄与したが、これ以上のマンゴスチンの添加は、リポソームの形成を阻害することが分かった。一方、この濃度は負に帯電するリポソーム(Neg. L)の場合は 15 wt%となり、正に帯電するリポソーム(Pos. L)の場合は 10 wt%であった。このようにリポソームの荷電状態が、マンゴスチン含有リポソームの形成に大きく影響を及ぼすことが分かった。

次に、マンゴスチンの添加がリポソームに分子膜の微視的粘性に及ぼす影響を蛍光プロブ法によって検討した。用いた蛍光プローブは、palmitic acid の 2 番目の炭素に蛍光原子団を有する 2-(9-anthroyloxy)-palmitic acid(2-AP)および stearic acid の 12 番目の炭素に蛍光原子団を有する 12-(9-anthroyloxy)-stearic acid (12-AS)であり、蛍光原子団の位置により 2-AP は二分子膜疎水部のうちの親水基近傍部位の粘性を、12-AP はより疎水性の高い炭化水素中央部位の粘性を反映する³⁹⁾。また、蛍光プローブの蛍光偏光度(P)とプローブ近傍の微視的粘性は、Perrin-Weber の式によって相関することが知られており⁴⁰⁾、蛍光偏光度(P)が増大するほど微視的粘性も大きくなる。

各種プローブを用いたリポソームの微視的粘性(蛍光偏光度)とマンゴスチン添加量との関係を Fig.8の(a)(2-AP)および(b)(12-AP)に示す。すべてのリポソームにおいて、二分子膜の親水部近傍(2-AP)および炭化水素中央部位 (12-AP)の微視的粘性は、マンゴスチンの添加量の増加に伴い増加することが分かった。したがって、リポソーム二分子膜に可溶化されたマンゴスチンは、二分子膜の構成分子間のパッキングを蜜にして微視的粘性を増大

することが分かった。さらに、マンゴスチンの添加がリポソーム二分子膜の透過性に及ぼす影

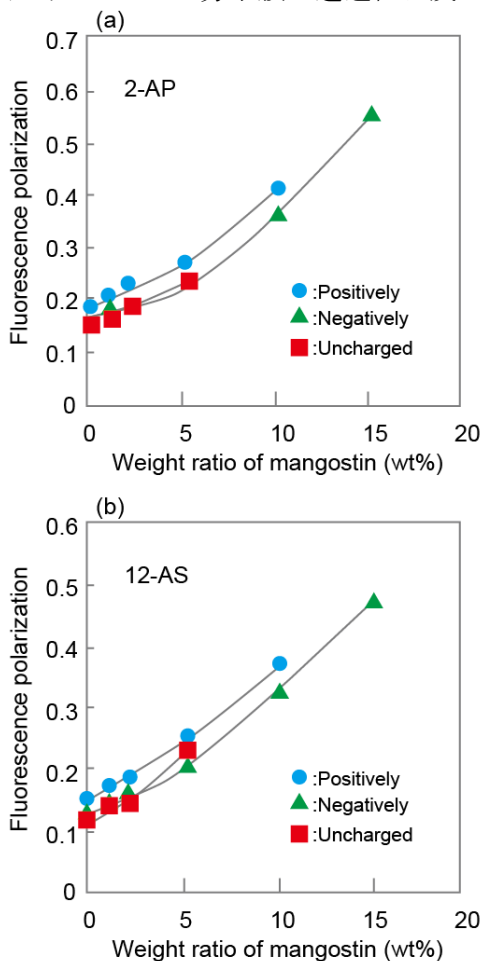


Fig. 8 Relationship between fluorescence polarization and amount of mangostin added at 37°C :
 (a) fluorescence polarization obtained with 2-AP;
 (b) fluorescence polarization obtained with 12-AS.

響を検討した。リポソームからの glucose の漏れ性とインキュベーション時間との関係を Fig9

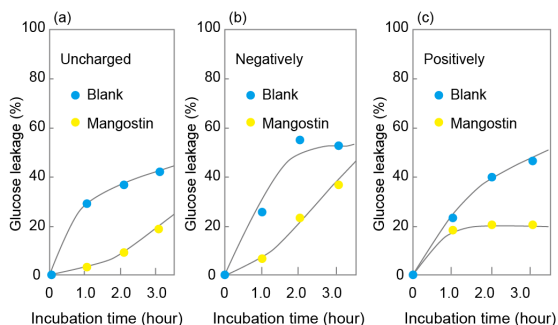


Fig. 9 Permeability of liposomes studied by measurement of glucose leakage from liposomes at 37°C :
 (a) uncharged liposomes; (b) negatively charged liposomes; (c) positively charged liposomes.

に示す。

まず、いずれのリポソームの場合も、時間とともにリポソーム二分子膜のもれ性は増大した。一方、マンゴスチンの添加によってリポソーム

二分子膜の漏れ性は抑制された。これは、マンゴスチンの添加が二分子膜の構成分子間のパッキングを密にしたためと考えられる。これらのことから、種々の荷電を有するリポソームへのマンゴスチンの可溶化を試みたところ、最適なマンゴスチン添加量が存在し、過剰のマンゴスチンの添加はリポソームの形成を阻害することが分かった。また、マンゴスチンの添加はリポソーム二分子膜の微視的粘性を増大させ、内水相に取り込まれている glucose のもれ性を抑制することが分かった。ここで調製されたマンゴスチン含有リポソームは難溶性のマンゴスチンの製剤化の一例として極めて興味深いことである。

2-6 セラミド脂質⁹⁾

この物質は、乾燥性皮膚疾患やアトピー性皮膚炎に有効である。つまり、この物質を含むリポソームが一度塗布されると皮膚上もしくは角質層中に滞在し、長時間にわたって有効量の薬物を放出続けるコントロールリリースが考えられる⁴¹⁾。また、生体の最外層を覆う皮膚は、有害物質の侵入防止、水分を含めた体内成分の損出の防止など生命維持に欠かせないバリア機能を有している。角質層細胞間において脂質バリアを構築しているセラミド脂質は、このバリア機能に重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。実際に、乾燥性皮膚疾患やアトピー性皮膚炎の患者の場合、角質層脂質中におけるセラミド脂質の含量は、健康者の皮膚と比較して著しく低下していることが確認されている⁴²⁾。ここで、セラミド脂質を含有したリポソームは、まず表皮のセラミド脂質の総量を増加させる利点がある。さらに、リポソームの構成脂質としてセラミド脂質を含有させることができれば、内包した薬物の経皮吸収促進などの可能性も期待できる。

結論を先に述べると、表皮中に最も多く存在するセラミド3(2S, 3S, 4R-2-stearoylamine-1, 3, 4-octadecanoetriol)のモル分率が 0.130 以下の場合には、Bangham 法で調製したセラミド3含有リポソーム(DPPC: Ceramide 3: DCP =10:(0~1.5):1)の調製は可能であった。また、セラミドの添加はリポソーム二分子膜のパッキ

ングを密にしてゲル-液晶転移温度を高温側にシフトする。

詳細を述べると、リポソーム二分子膜の微視的粘性に及ぼすセラミド脂質添加の影響を、蛍光プローブ (1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH)) を用いて検討した (Fig.10)。

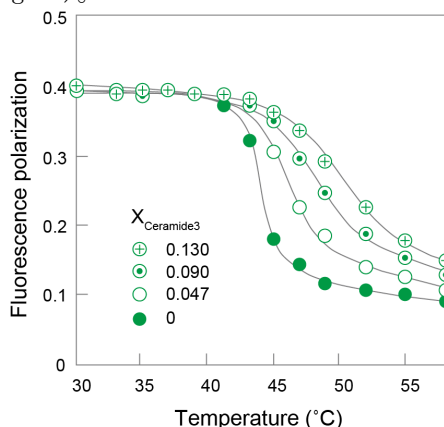


Fig. 10 Relationship between fluorescence polarization of DPH and temperature for liposomes including various amounts of Ceramide 3.

DPPC 単独系のリポソームの場合、微視的粘性はゲル状態から液晶状態へと変化する相転移温度である 41°C 付近で急激に低下した。一方、相転移温度以下のゲル状態の微視的粘性はセラミド脂質濃度に依存しなかったが、相転移温度以上の微視的粘度はセラミド脂質濃度に依存し、その濃度増加に伴い増加した。このことから、液晶状態ではセラミド脂質を添加すると分子間相互作用が強まり、膜構成分子のパッキングが密になることが分かった。

次に、リポソーム二分子膜のゲル-液晶転移に及ぼすセラミド脂質添加の影響を示差走査熱量測定 (DSC) により検討した。DPPC に対するセラミド脂質のモル分率を種々に変化させたところ、DPPC 単独の場合、ゲル状態から液晶状態への相転移によるシャープな吸熱ピークが 41°C 付近に認められたが、セラミド脂質のモル分率が増加するとピークが二つに分裂した。これは、セラミド脂質の添加によりリポソーム二分子膜が相分離することを意味している。また、リポソームのゲル-液晶相転移温度はセラミド脂質の添加に伴い高温側にシフトすることが分かった。リポソームに内包物質を保持させた場合の 1 番の問題点はこの相転移

である。すなわち、この相転移を経由するような温度変化がリポソームに与えられると、リポソームは速やかに内包物質をリリースしてしまう。したがって、化粧品として利用するには、このような環境 (41°C 以上) にさらされる可能性があり、このように相転移が高温側にシフトすることは大きなメリットである。また、気/液界面上に形成させた DPPC/Ceramide 3 混合単分子膜の表面圧-面積等温線解析や原子間力顕微鏡観察を行ったところ、混合により単分子膜がマイクロ相分離することや膜分子のパッキングが密になることを見出している¹¹⁾。

2-7 水溶性高分子^{17~20)}

この物質を用いるメリットは、リポソームと血中成分や細胞との相互作用を検討できるからである。

結論を先に述べると、水溶性であり生体膜の構成成分である酸性ムコ多糖の chondroitin sulfate (CS)⁴³⁾ の添加は、電荷を持たないリポソームや負に帯電するリポソームの微視的粘性は変化しなかったが、正に帯電するリポソームの微視的粘性は増大した。また、静電気相互作用によって吸着した CS は、正に帯電するリポソームのゼータ電位を大きく減少させる。

詳細に説明すると、電荷を持たないリポソーム (Unc. L, DPPC:Cholesterol = 7:3)、負に帯電するリポソーム (Neg. L, DPPC:Cholesterol:DCP = 7:3:0.7)、正に帯電するリポソーム (Pos. L, DPPC:Cholesterol:Stearyl Amine (SAA) = 7:3:0.7) の 3 種類の pH7.2 におけるリポソームのゼータ電位に及ぼす CS 濃度との関係を、Fig.11 に示す。

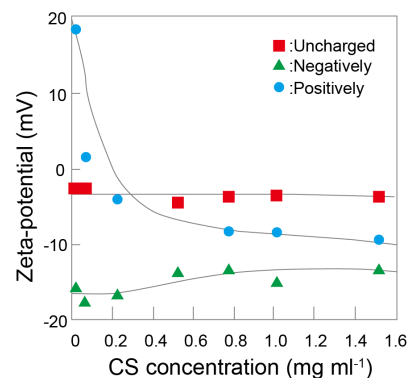


Fig. 11 Relationship between zeta-potential of liposomes and CS concentration at 37°C.

その結果、電荷を持たないリポソーム(Unc. L) および負に帯電するリポソーム(Neg. L)のゼータ電位は CS 濃度に依存しなかったが、正に帯電するリポソームのゼータ電位は CS 濃度に依存して、+18 mV から-10 mV へと減少した。このゼータ電位の劇的な変化は、静電相互作用により結合した CS によるものと考えられる。さらに、正に帯電するリポソーム(Pos. L)への CS の添加は、リポソーム水溶液の濁度上昇をもたらせた。このことから、CS の添加によりリポソームが凝集しているものと思われる。

一般に、デキストランなどの多糖類の血球への吸着は、血球の凝集を引き起こすことが知られている⁴⁴⁾。特に、Sunamoto ら⁴⁵⁾は、直鎖の多糖類が架橋構造の形成によって容易にリポソームの凝集が生じることを報告している。したがって、直鎖の多糖類である CS も静電相互作用でリポソームに吸着した後、架橋構造の形成によってリポソームの凝集を生じたものと考えられる。

次に、CS の添加がリポソーム二分子膜の微視的粘性に及ぼす影響を蛍光プローブ法によって検討した(Fig. 12)。なお、蛍光プローブとしては、2-AP ((a)) と 12-AS ((b))を用いた。

その結果、電荷を持たないリポソーム(Unc. L) および負に帯電するリポソーム(Neg. L)の場合、二分子膜の親水基近傍 (2-AP)の微視的粘性は CS 濃度に依存せず一定であったが、正に帯電するリポソーム(Pos. L)の場合、微視的粘性は CS 濃度に依存して増大することが分かった。また、炭化水素中央部位(12-AS)の微視的粘性も同様の傾向であった。このことから、CS の添加はリポソーム二分子膜のパッキングを密にして微視的粘性を増大することが分かった。さらに、DPPC リポソームの相転移温度に及ぼす CS 添加の影響を DSC 測定により検討した。

ここでは、ゲル液相転移に起因する吸熱ピークの検出のため、cholesterol 無添加系において実験を行った。その結果、電荷を持たないリポソーム(Unc. L)および負に帯電するリ

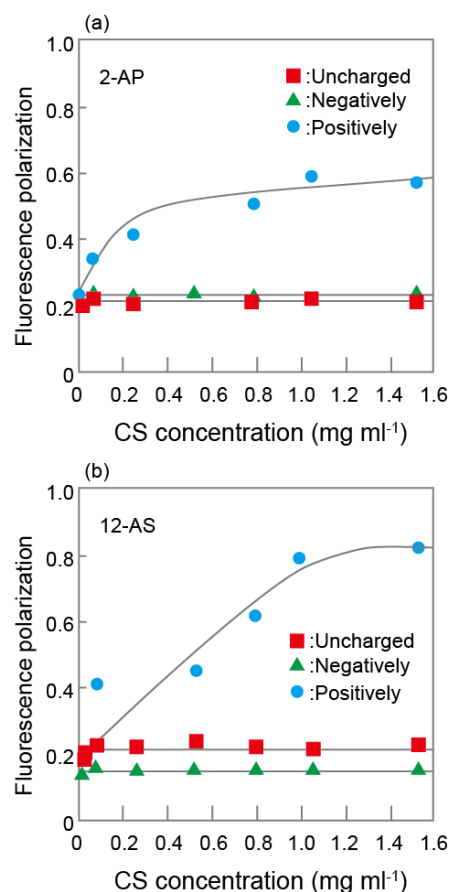


Fig. 12 Relationship between fluorescence polarization of lipid probes ((a) 2-AP, (b) 12-AS) and CS concentration at 37°C.

ポソーム(Neg. L)の場合、相転移温度は CS 濃度に依存せず一定であったが、正に帯電するリポソーム(Pos. L)の場合、相転移温度は CS 濃度に依存して高温側へとシフトすることが分かった。このことは、CS の添加によってリポソーム二分子膜のパッキングが密になることと矛盾しない。

以上より、種々の荷電を有するリポソーム(Unc. L, Neg. L, Pos. L)と CS との相互作用を検討したところ、電荷を持たないリポソーム(Unc. L)および負に帯電するリポソーム(Neg. L)の微視的粘性は変化しなかったが、正に帯電するリポソーム(Pos. L)の微視的粘性は CS の添加によって増大することが分かった。また、静電相互作用によって吸着した CS は、正に帯電するリポソーム(Pos. L)のゼータ電位を大きく減少させることが分かった。このことから、表面に吸着した CS は、二分子膜内部に侵入して膜のパッキング状態を変化させたものと考え

えられる。

2-8 タンパク質⁹⁾

この物質を用いるメリット:血中に投与されたリポソームは、血中に存在する各種の物質と相互作用すると言われている。この物質を用いると、その体内動態を調べることができる。

結論を先に述べると、2種類のタンパク質(血中の主要なタンパク質である bovine serum albumin (BSA)とその比較対象となるタンパク質として lysozyme (LSZ))を用いて、DPPG リポソーム中のリン脂質(DPPG)との相互作用について検討したところ、LSZ の飽和吸着量は BSA の 16 倍以上も大きかった。さらに、これらのタンパク質の添加は、リポソーム二分子膜の微視的粘性を増加させ、かつ、リポソームのもれ性を増大する。つまり、リポソーム表面に吸着したタンパク質はリポソーム内部に侵入して、

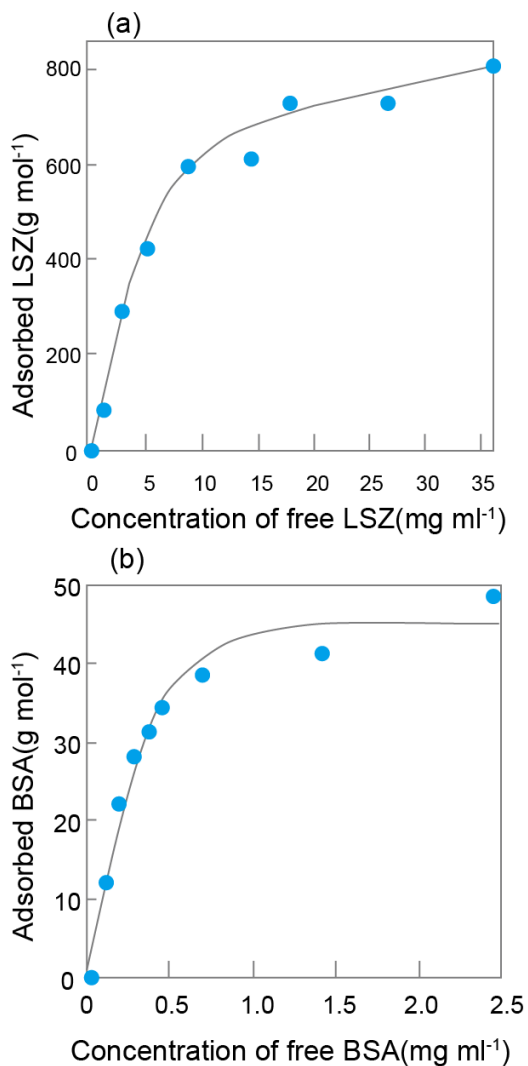


Fig. 13 Adsorption isotherms of LSZ (a) and BSA (b) on DPPG liposomes.

二分子膜の相分離を引き起こす。

詳細に記述すると、BSA と LSZ との大きな相違点は、それらの等電点であり、BSA は 4.8 であるが、LSZ は 11.1 である⁴⁶⁾ので、これらの電荷の違いが及ぼす膜物性の変化を検討した。なお、ここでは DPPC ではなくてアルキル鎖長が同じであるが、親水基部分が glycerol の DPPG を用いた。

DPPG リポソームへの BSA および LSZ の吸着等温線を Fig13(a)と Fig.13 の(b)に示す。図から明らかなように、LSZ は平衡濃度が 20 mg/ml の時に吸着平行に達し、その飽和吸着量は 700 mg/mol であったが、BSA は平衡濃度が 1 mg/ml の時にその飽和吸着量は 44 g/mol であった。このことから、LSZ の飽和吸着量は BSA より 16 倍以上も大きいことが分かった。これは、BSA が疎水性相互作用で

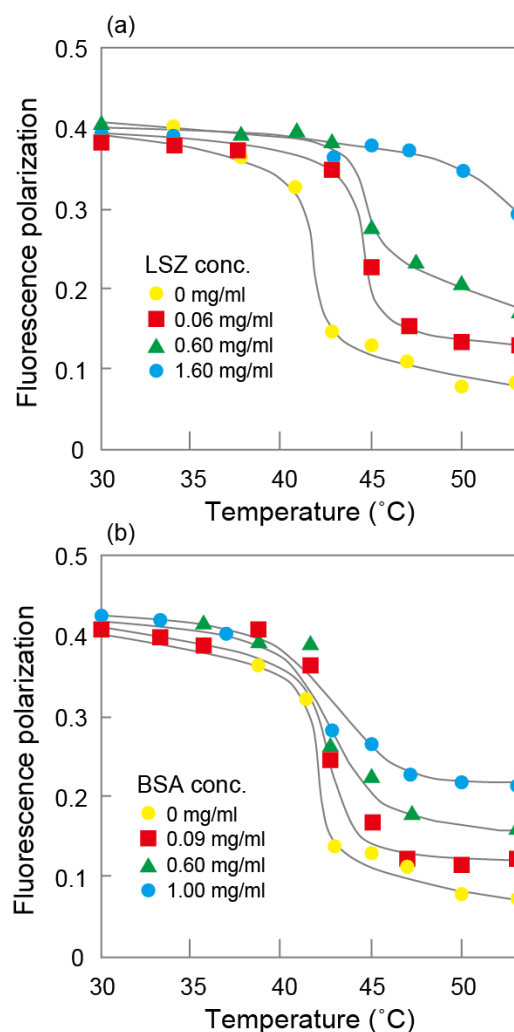


Fig. 14 Relationship between fluorescence polarization (microviscosity of liposomal bilayer membranes) and concentration of added LSZ (a) and BSA (b).

DPPG リポソームと相互作用するが、本実験条件 (pH 7.4)において、正に帯電するLSZは静電相互作用で DPPG リポソームと相互作用するものと考えられる。

次に、リポソーム二分子膜の微視的粘性に及ぼすタンパク質添加の影響を蛍光プローブとして DPH を用いた微視的粘性の温度変化を検討した(Fig.14)。

その結果、DPPG 単独のリポソームの場合、微視的粘性はゲル状態から液晶状態へと変化する相転移温度である 41℃付近で急激に低下した。一方、相転移温度以下のゲル状態の微視的粘性はタンパク質の濃度に依存しなかったが、相転移温度以上の微視的粘性はタンパク質濃度にかなり依存し、その濃度増加に伴い増加した。この効果はLSZの方がBSAよりも顕著であった。このような微視的粘性の増加は、吸着してから内部に侵入したタンパク質近傍の DPPG 分子の運動性が抑制されたためと考えられる。タンパク質によってその近傍

の分子の運動性が抑制されることは、phosphatidylserine (PS)や phosphatidic acid (PA)を混合した DPPC リポソームにおいても報告⁴⁷⁾されており、運動性が抑制された分子と自由な分子との相分離によって内包した水溶性物質のもれ性が増大することも知られている⁴⁸⁾。我々も、LSZ および BSA の添加によって、DPPG リポソームからの水溶性物質である calcein (リポソームを構成している分子の構造と水溶性物質の分子構造が区別が付かなくなる恐れがあるために、代替品を用いた)のもれ性が著しく増大することを確認しており、LSZ および BSA の添加は、リポソーム二分子膜の相分離を引き起こすことが示唆された。

3. 有機溶媒を一切用いないリポソーム水溶液の短時間・大量調製法^{23~26)}

Table 2 に示すように、リポソームの調製法には種々の方法が有る。Table の下方の 2 つが我々が開発した方法である。

Table 2 Preparation of Liposomes

Feature Method	Preparation Procedure	Liposomal Aspect	Particle Size	etc.
Bangham	1. Lipid dissolution in chloroform 2. Lipid film formation after removal of chloroform 3. Addition of water, swelling and vortexing	MLV	50nm~3000nm Homogeneous	<ul style="list-style-type: none"> Requirement of organic solvent removal Low repeatability Low trapping efficiency
Sonication	1. Same as above 2. Same as above 3. Addition of water, swelling and sonication	SUV	20nm~200nm Relatively-Homogeneous	<ul style="list-style-type: none"> Contamination of metal ion Low trapping efficiency
Organic Solvent Injection	Injection of lipid dissolved in organic solvent (diethyl ether, chloroform, ethanol) into water	SUV, LUV	Dependence on lipid concentrations and preparation conditions	<ul style="list-style-type: none"> Problem of residual organic solvent Low trapping efficiency
Surfactant Removal	1. Lipid dissolution in chloroform 2. Lipid film formation after removal of chloroform 3. Addition of water, swelling and mixed micelle formation 4. Removal of surfactant	SUV, LUV	Dependence on lipid concentrations and preparation conditions	<ul style="list-style-type: none"> Requirement of organic solvent removal Requirement of surfactant removal Low trapping efficiency
Freeze-Thaw	1. Addition of water, swelling and vortexing 2. Freeze with liquid nitrogen 3. Thawing at room temperature 4. Repeat above procedures	LUV	Dependence on lipid concentrations and preparation conditions	<ul style="list-style-type: none"> Requirement of organic solvent removal High trapping efficiency Require time
Reverse Phase Evaporation	1. Lipid dissolution in organic solvent 2. Addition of water, swelling and vortexing 3. Removal of organic solvent	LUV	Relatively-Homogeneous	<ul style="list-style-type: none"> High trapping efficiency Requirement of organic solvent removal
Supercritical Reverse Phase Evaporation	1. Lipid dissolution in supercritical carbon dioxide with ethanol 2. Injection of water and emulsion formation 3. Reduce pressure	LUV	~1500nm Relatively-Heterogeneous	<ul style="list-style-type: none"> High trapping efficiency No use toxic organic solvent Polydispersity of particle size
Novel Supercritical Reverse Phase Evaporation (with Chitosan)	1. Road lipid, water, and chitosan into cell 2. Pressurization and depressurization of cell using supercritical carbon dioxide	LUV	~1500nm Relatively-Heterogeneous	<ul style="list-style-type: none"> High trapping efficiency Short-term process

リポソームを広範囲に活用するためには、調製段階で不可欠であった有害有機溶媒を使

用しないことと、生産効率を向上させることである。そこで我々は、これまでに種々の調製方

法の検討を行ってきたが、リポソーム調製には使われていなかった超臨界流体をあえて用いることを試みた。乾燥している二酸化炭素流体にリン脂質を溶解させるために少量のエタノールを投入したあと、その系の超臨界状態に達するまで温度と圧力を増加させ、さらに水溶液を投入することにより減圧することで、短時間で、かつ、大量のリポソーム水溶液を調製することができた(Fig.15)。エタノールは有機溶媒であるが有害ではない。

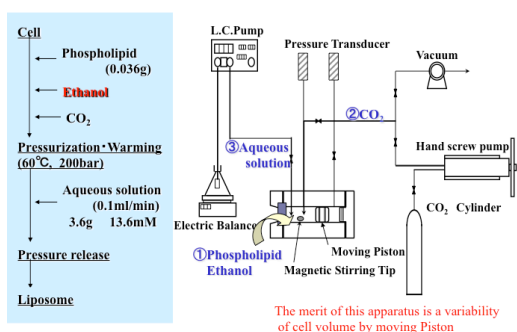


Fig.15 Apparatus for preparation of liposome by Supercritical Reverse Phase Evaporation Method(SRPE)

しかし、エタノールフリーが望まれる場合がある。そこで我々は、有機溶媒を一切含まないリポソームの調製法の開発を試みた。その結果、有機溶媒を一切使用することなく、かつ短時間で大量に製造できる超臨界状態の二酸化炭素流体を用いた超臨界逆相蒸発法を開発した。

開発したリポソーム製造装置の概略図を Fig.16 に示す。

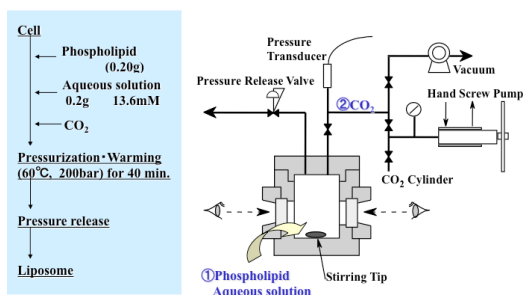


Fig.16 Apparatus for preparation of liposome by Improved supercritical reverse phase evaporation Method(ISCRPE)

この装置の特徴は、500 気圧まで耐圧可能であり、かつ、セル(Model HP-1, Tama Seiki Co.)内部の組成(DPPC, CO₂, ethanol)を一定に保ったまま温度や圧力を制御可能な点にあり、またセルの内部への水の導入も液体クロマ

トグラフィー用ポンプ(Shodex DS-4)を用いて自在に行うことができる点である。さらに、セル前方のガラス窓よりセルの内部を目視することができる。

リポソームの調製手順は、まずセルの内部の CO₂ 中に 0.3 wt% の DPPC を投入し、リン脂質の相転移温度(41℃)以上である 60℃まで加温し、同時に所定の圧力(200 barr)まで加圧して超臨界状態に達してから、水を導入して攪拌することにより水/CO₂ エマルジョンを形成させる。そのあと内部の二酸化炭素を注意しながら排出する(減圧する)と、水/CO₂ エマルジョンから反転してリポソーム水溶液がセル内部に残存することになる²³⁾。これをモデル化すると、Fig. 17 になる。

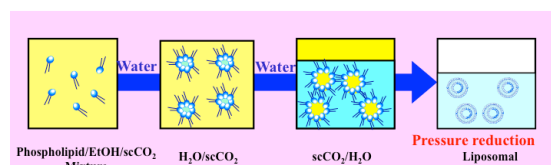


Fig. 17 Pattern Diagram of SCRPE Method

我々は、逆相蒸発法と類似したプロセスを経てリポソームが形成していることから、我々は超臨界逆相蒸発法(Supercritical Reverse Phase Evaporation Method: SCRPE method)と命名した。

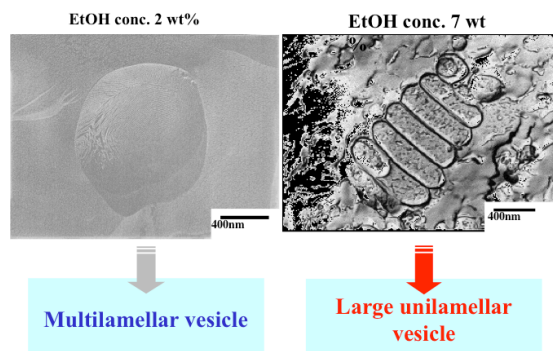


Fig. 18 FF-TEM Observation of Liposomes by SCRPE

Fig. 18 に、SCRPE で調製したエタノールを少量含むリポソームの FF-TEM 像を示す。エタノール濃度が約 2% の時は多重膜リポソームであったが、エタノールを約 7% 含むリポソームは大きな一枚膜リポソームであることが分かった。

水溶性薬物のモデル物質として用いたグルコ

ースのリポソーム内の保持効率とエタノールの添加濃度の関係を Fig.19 示す.

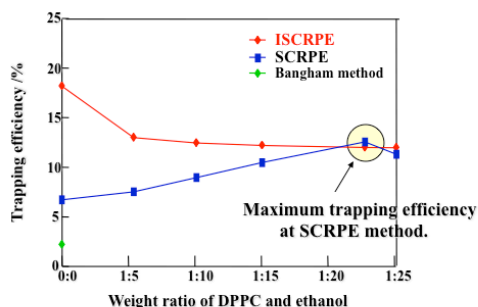


Fig. 19 The effect of ethanol on trapping efficiency (DPPC 13.6mM)

図から明らかなように、エタノールを含む調製法(SCRPE)は、エタノール濃度が約 7%の時、グルコースの保持効率が最大となったが、エタノールを含まない改良型調製法(ISCRPE)の場合には、エタノールの添加濃度が増加するとグルコースの保持効率は減少した。つまり、エタノールを含まない場合が最も保持効率が高いことが分かった。ちなみに、バンガム法(緑色)の場合には高々3%程度であった。

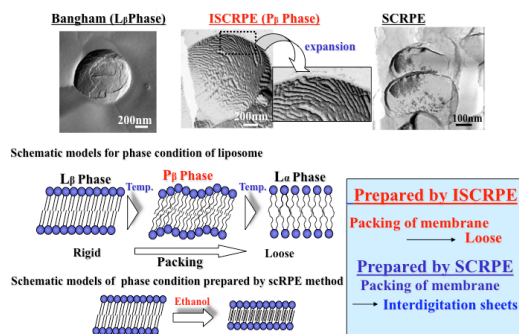


Fig. 20 TEM observation of liposomes prepared by various method and Schematic Models for Phase Condition of Liposomes

Fig.20 に、種々の方法で調製したリポソーム二分子膜の FF-TEM の撮影写真とそれらの構造を想定できるモデル図を示す。ISCRPE 法で調製したリポソームの写真には幾つもの筋が見えるが、エタノールを含む SCRPE 法で調製したリポソームには平面状が見え、Bangham 法で調製したリポソームの表面は階段状の平面が見える。これらをモデル化すると下段の模式図となり、ISCRPE 法で調製したリポソーム二分子膜はジグザグ構造をしているので膜構造の安定性が予測できる。

Fig. 21に、グルコースの保持効率と異なる調製法(Bangham 法, SCRPE 法, ISCRPE 法)

による種々のリン脂質(飽和アルキル鎖長が14(DMPC), 16(DPPC), 18(DSPC)と不飽和リン脂質(アルキル鎖長が 18)のリン脂質の濃度との関係を示す。図からは分かりにくいかも知れないが、いずれのリン脂質の場合も保持効率は、ISCRPE>SCRPE>Bangham となり、この中で最も保持効率が高かったのは、ISCRPE 法で調製した不飽和リン脂質のDOPCであった。

本法によって得られたリポソームの水溶性物

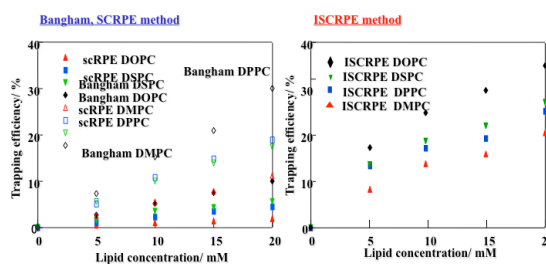


Fig.21 The relationship between trapping efficiency of liposomes (by Bangham Method, SCRPE Method, ISCRPE Method) and lipid concentration.

質の保持効率は、Banghamより10倍以上大きく、最高で約 22%にも及ぶことが分かった。

この超臨界二酸化炭素流体を用いた調製法の特徴として、減圧過程で水(または水溶液)を注入するが、超臨界二酸化炭素流体に接触している水溶液のpHは約 3(強酸性領域)にまで達する(Fig.22)。

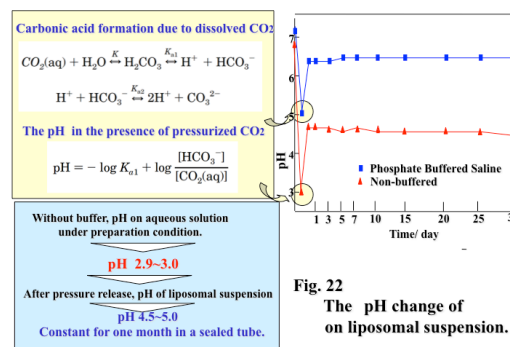


Fig. 22 The pH change of on liposomal suspension.

この条件の最大のメリットは、天然物由来のキトサン(毒性がない、プラスチックを有する生分解性のポリマー)は容易に溶解することができるので、正に帯電したリポソームを容易に調製することができる。

以上より、本リポソーム調製法によって、有害な有機溶媒を使用せずに水溶性薬物の保持効率の高い大きな一枚膜リポソーム(LUV)を一段階で調製できることが分かった。さらに

我々は、調製圧力やエタノールの添加量を変化させることによって、リポソームの粒子径や膜枚数なども制御できることも見出しているばかりでなく²⁵⁾、リポソームを連続生産可能なシステムの開発にも成功している²⁸⁾。

4. おわりに

リポソームを構成するリン脂質の代替として、リン脂質を一切を用いることなく非イオン界面活性剤だけで二分子膜閉鎖小胞体(ニオソーム)^{49~56)}の調製や低価格のコメヌカ(*Oryza sativa* bran)^{57,58)}を用いた二分子膜閉鎖小胞体の研究も超臨界逆相蒸発法に準じて行っており、幾つかの特徴的な性質を示しているが、紙面の関係もあるので別の機会に述べさせていただきます。

5. 謝 辞

本研究を切っ掛けを下さり、かつ、多くのご助言を頂いた山内仁史博士(現・ニプロパッチ)に感謝を申し上げます。また、本研究を遂行するに当たり多大なご協力を頂いた東京理科大学大学院理工学研究科工業化学専攻の酒井秀樹教授を始め、阿部／酒井研および酒井／酒井研の関係者の皆様方に感謝の意を表します。

さらには本総説をまとめるに当たり、山崎学氏(アクティブ(株))には図表の作成に関して多大な協力を頂いたので、ここに謝辞を表します。

参考文献

- 1) A. D. Bangham, M. M., Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **1965**, *13*, 238-252.
- 2) M. Abe, T. Hiramatsu, H. Uchiyama, H. Yamauchi, K. Ogino, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **1992**, *41*, 136-141.
- 3) M. Abe, Y. Takao, T. Yamamoto, K. OK. Kwon, H. Yamauchi, K. Ogino, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **1992**, *41*, 404-409.
- 4) H. Yamauchi, Y. Takao, M. Abe, K. Ogino, *Langmuir*, **1993**, *9*, 300-304.
- 5) Y. Takao, H. Yamauchi, J. Manosroi, A.

- Manosroi, M. Abe, *Langmuir*, **1995**, *11*, 912-916.
- 6) M. Abe, K. Hashizaki, Y. Yokouchi, Y. Takao, J. Manosroi, A. Manosroi, H. Sakai, S. Yokoyama, H. Yamauchi, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **1999**, *48*, 215-220.
- 7) A. Sekiguchi, H. Yamauchi, A. Manosroi, J. Manosroi, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **1995**, *4*, 287-296.
- 8) A. Sekiguchi, K. Ogino, H. Yamauchi, M. Abe, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **1995**, *44*, 184-191.
- 9) A. Yoshida, A. Manosroi, J. Manosroi, H. Yamauchi, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **1995**, *4*, 423-432.
- 10) T. Imura, H. Sakai, H. Yamauchi, C. Kaise, K. Kozawa, S. Yokoyama, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **2001**, *20*, 1-8.
- 11) T. Imura, H. Sakai, H. Yamauchi, K. Kozawa, S. Yokoyama, M. Matsumoto, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **2000**, *19*, 81-87.
- 12) T. Imura, H. Sakai, H. Yamauchi, C. Kaise, M. Matsumoto, K. Kozawa, S. Yokoyama, M. Abe, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **2000**, *49*, 373-377.
- 13) K. Ok. Kwon, M. J. Kim, M. Abe, T. Ishinomori, K. Ogino, *Langmuir*, **1995**, *10*, 1415-1420.
- 14) K. OK. Kwon, M. Abe, K. Ogino, M. J. Kim, H. Oshima, *Colloids Surfaces B*, **1994**, *3*, 25-30.
- 15) K. Ok. Kwon, M. Abe, K. Ogino, M. J. Kim, H. Oshima, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **1994**, *43*, 23-30.
- 16) K. Ok. Kwon, M. Abe, T. Ishinomori, K. Ogino, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **1994**, *43*, 403-408.
- 17) A. Yoshida, H. Yamauchi, H. Sakai, N. Kawashima, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **1997**, *8*, 333-342.
- 18) A. Yoshida, K. Hashizaki, M. E. Mahdy, H. Yamauchi, H. Sakai, S. Yokoyama, M. Abe, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **1998**, *47*,

- 1323-1329.
- 19) A. Yoshida, K. Hashizaki, H. Yamauchi, H. Sakai, S. Yokoyama, M. Abe, *Langmuir*, **1999**, *15*, 2333-2337.
 - 20) K. Hashizaki, C. Itoh, H. Sakai, S. Yokoyama, H. Taguchi, Y. Saito, N. Ogawa, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **2000**, *17*, 275-282.
 - 21) T. Tsunoda, T. Imura, M. Kadota, T. Yamazaki, H. Yamauchi, K. OK. Kwon, S. Yokoyama, H. Sakai, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **2001**, *20*, 155-163.
 - 22) Y. Yokouchi, T. Tsunoda, T. Imura, H. Yamauchi, S. Yokoyama, H. Sakai, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **2001**, *20*, 95-103.
 - 23) K. Otake, T. Imura, H. Sakai, M. Abe, *Langmuir*, **2001**, *17*, 3898-3901.
 - 24) T. Imura, L. Otake, S. Hashimoto, T. Gotoh, M. Yuasa, S. Yokoyama, H. Sakai, J. F. Rathman, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **2002**, *27*, 133-140.
 - 25) T. Imura, T. Gotoh, K. Otake, S. Yoda, Y. Takebayashi, S. Yokoyama, H. Takebayashi, H. Sakai, M. Yuasa, M. Abe, *Langmuir*, **2003**, *19*, 2021-2025.
 - 26) T. Imura, T. Gotoh, S. Yoda, K. Otake, H. Takebayashi, M. Yokosuka, H. Sakai, M. Abe, *Material Tech.*, **2003**, *21*, 30-35.
 - 27) M. Takayama, S. Itoh, T. Nagasaki, I. Tanimizu, *Clim. Chem. Acta*, **1977**, *79*, 93-98.
 - 28) P. R. Strom-Jensen, R. L. Magin, F. Dunn, *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, *769*, 179-186.
 - 29) D. A. Tyrrel, T. D. Heath, C. M. Colley, B. E. Ryman, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1976**, *457*, 259-302.
 - 30) Y. Matsumoto, C. Imamura, T. Ito, C. Taniguchi, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **1995**, *18*, 1456-1458.
 - 31) Y. Matsumoto, T. Kato, Y. Kemura, M. Tsuchiya, M. Yamamoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **1999**, 53-54.
 - 32) K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *30*, 2039.
 - 34) K. Ogino, M. Goto, M. Abe, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **1988**, *37*, 640-647.
 - 34) F. Szoka, Jr., D. Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, *75*, 4194-4198.
 - 35) K. Aburai, T. Ogura, R. Hyodo, H. Sakai, M. Abe, O. Glatter, *J. Oleo Sci.*, **2013**, *62*, 913-918.
 - 36) R. S. Spangler, R. L. Treadway, J. M. Higgins, *Diabetologia*, **1984**, *27*, 333-334.
 - 37) D. H. Boldt, S. F. Speckart, R. L. Richards, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1977**, *74*, 208-214.
 - 38) C. Gopalakrishnan, D. Shankaranarayanan, I. Kameswaran, S. K. Nazimudeen, *Indian J. Exp. Biol.*, **1980**, *18*, 843-846.
 - 39) T. Inoue, Y. Muraoka, K. Fukushima, R. Shimozawa, *Chem. Phys. Lipids*, **1988**, *46*, 107-115.
 - 40) K. Kinoshita, K. Mihashi, *Application of Fluorescence Spectrometry to Biochemistry Research*, Gakkai Shuppansha, Tokyo, **1988**, 19.
 - 41) P. Perugini, I. Genta, F. Paronetto, B. Conti, S. Scalia, A. Baruffini, *Int. J. Pharm.*, **2000**, *196*, 51-61.
 - 42) G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Hiugaki, M. Kaeashima, A. Hidano, *J. Invest. Dermatol.*, **1991**, *96*, 523.
 - 43) Q. Wang, J. S. Dordick, R. J. Linhardt, *Chem. Mater.*, **2000**, *14*, 3232-3244.
 - 44) M. Minetti, P. Aducci, V. Viti, *Biochemistry*, **1979**, *18*, 2541-2548.
 - 45) J. Sunamoto, K. Iwamoto, H. Kondo, S. Sinkai, *J. Biochem.*, **1980**, *88*, 1219-1226.
 - 46) H. Zhu, M. Nystrom, *Colloids Surfaces A*, **1998**, *138*, 309-321.
 - 47) A. Raudino, F. Castelli, *Colloid Polym. Sci.*, **1992**, *138*, 1116.

- 48) D. Kashchiev, D. Exerowa, *Biochim. Biophys.*, **1983**, 732, 133-145.
- 49) S. Batzni, E. D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta*, **1973**, 298, 1015-1019.
- 48) M. Poiana, R. Fresa, B. Mincine, *Flavour Fragrance J.*, **1999**, 14, 358-366.
- 49) A. Manosroi, P. Wongtrakul, J. Manosroi, H. Sakai, F. Sugawara, M. Yuasa, M. Abe, *Colloids Surfaces B*, **2003**, 30, 129-138.
- 50) K. Ri, S. Yamaguchi, P. Wongtrakul, S. Hashimoto, K. Otake, T. Ohkubo, H. Sakai, M. Abe, *Material Tech.*, **2005**, 23, 340-347.
- 51) K. Ri, T. Goto, P. Wongtrakul, S. Hashimoto, M. Abe, *Material Tech.*, **2005**, 23, 241-246.
- 52) T. Goto, K. Ri, T. Imura, H. Sakai, M. Abe, *Material Tech.*, **2007**, 25, 182-188.
- 53) A. Mnosroi, R. Chutoprapat, M. Abe, J. Manosroi, *International J. Pharm.*, **2008**, 352, 248.255
- 54) H. Sakai, T. Goto, T. Imura, K. Sakai, K. Otake, M. Abe, *Material Tech.*, **2008**, 26, 249-258.
- 55) A. Manosroi, W. Ruksiriwanich, M. Abe, H. Sakai, W. Manosroi, J. Manosroi, *J. Supercritical Fluids*, **2010**, 54, 137-144.
- 56) S. Yamaguchi, K. Tsuchiya, K. Sakai, M. Abe, H. Sakai, *J. Oleo Sci.*, **2016**, 65, 2126.
- 57) W. Ruksiriwanich, J. Manosroi, M. Abe, W. Manosroi, A. Manosroi, *J. Supercritical Fluids*, **2011**, 59, 61-71.
- 58) A. Manosroi, W. Ruksiriwanich, M. Abe, H. Sakai, K. Aburai, W. Manosroi, J. Manosroi, *Nanosci. Nanotech.*, **2012**, 12, 1-7.