

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790048

研究課題名（和文） リポソームおよび脂肪乳剤を用いる電気化学測定系の構築

研究課題名（英文） Electrochemical studies by using of liposome suspensions and micro emulsions as in vivo mimicked conditions

研究代表者

奥村 典子（OKUMURA NORIKO）

金城学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：00275091

研究成果の概要（和文）：通常脂溶性物質の酸化還元挙動測定には支持電解質を含む有機溶媒を用いる。しかし、リポソーム懸濁液あるいはマイクロエマルジョンとして水中に分散させることで、脂溶性物質を水系で電気化学測定可能であることを示した。また有機溶媒中での酸化還元挙動と水系懸濁液あるいは乳剤中での挙動は異なることが明らかとなった。これらの測定系は生体内環境を反映したデータを提供できるものと考えられ、また同時に有機溶媒の代替となると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was demonstrated that the electron-transfer reaction between an electrode and water-insoluble substances are able to progress in liposome aqueous suspension or o/w micro emulsion systems. These systems are able to indicate redox behaviors of water-insoluble compounds in water, which are different from those in organic solvents. It is presumed that these electrochemical systems provide redox data reflected in vivo mimicked conditions, also should be able to serve as organic solvents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学、電子移動反応解析、サイクリックボルタモンメトリー、リポソーム、脂肪乳剤、大豆レシチン、キノン

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、アセトニトリル、ジクロロメタン、THF、など種々の有機溶媒を用いた非水系電気化学測定を主なる手法として、有機化合物の酸化還元過程における水素結合能 (*J. Org. Chem.*, 65, 1448-1455 (2000).

他)、 π - π 結合能 (*J. Phys. Chem. A*, 104, 3064-3072 (2000). 他) に関する研究を行ってきた。これらの研究を遂行する中で、有機溶媒・支持電解質の種類による酸化還元電位の変化に驚き、同時に、「有機溶媒中での電気化学測定は、生体内での電子授受を再現できるモデルなのだろうか?」という疑問を持つ

ようになった。そして、水に不溶の物質を水中に分散させて電子移動反応を観測できないだろうか？、有機溶媒の代替となる媒体を用いて生体内により近い条件での測定は出来ないだろうか？と考えるようになり、エマルジョン・リポソーム懸濁液に着目した実験を開始した。

研究開始当初において、エマルジョン・懸濁液系電気化学測定に関する報告には、ニトロベンゼン-水のエマルジョン中でのフェロセン測定に関するもの (Chen, J., et al., *J of Electroanal. Chem.*, 496, 88-94 (2001). : 福井大学)、水と油と乳化層の3層状態での電気化学測定を行うもの (Yoshitake, S., et al., *Chem. Lett.*, 2002, 360-361.) があつたが、エマルジョンの安定性及び電極への拡散の再現性の問題・汎用性の点から改良すべき点が多かつた。その後の研究の流れは、ラテックス粒子懸濁液系電気化学測定 (Masanori, S.; Aoki, K.; Chen, J., *Langmuir* 24, 4364-4369 (2008). 他) などへ移行しはじめていた。

一方、国外においては水/油-エマルジョン系の電気化学測定法に関する最近の報告はなかつたが、リポソームを用いた分析系は国内外を通して注目されており、生体内での分配や酸化還元挙動を評価する際の媒体システムとして非常に興味深いと考えた。

このような背景から、申請者は本研究に関して準備実験を行ってきた。結果、リポソーム (MLV ; 多重膜) 膜中に導入したビタミン K 等の脂溶性化合物の懸濁水溶液を調製し、酸化還元応答が確認できることを見出し、さらに測定方法の検討に取り組むこととした。

2. 研究の目的

本研究は、「一生体内により近い条件での電気化学測定系の構築—水に不溶の薬物・有機物の酸化還元挙動を“水系”で観測する」を目的としている。具体的には、リポソーム懸濁液及び大豆油による脂肪乳剤 (マイクロエマルジョン) を有機溶媒の代替媒体とする電気化学測定・電子移動反応解析システムの構築を目的としている。

本研究の特徴は、リポソーム懸濁液及び大豆油によるマイクロエマルジョンを有機溶媒の代替媒体として、水に不溶の薬物・有機物の酸化還元挙動を水系で観測する点にある。DDS として知られるリポソーム・マイクロエマルジョンの技法を電気化学測定に応用するという点で、本研究は十分に未開拓の分野であると同時に、薬学分野にとどまらず、脂溶性薬物・化合物のリポソーム中での酸化還元挙動解析による生体内電子移動反応を理解するための基礎的なデータ提供が期待される。

以上の点から、本研究は、リポソーム・マ

イクロエマルジョンを有機溶媒の代替媒体・電気化学測定に応用する新しい試みであり、「有機溶媒を使わない=環境へ配慮する実験系の提案」、及び「生体内により近い状態での酸化還元挙動データ」を提供できるものと考えている。

3. 研究の方法

(1) 脂溶性薬物・化合物を導入したリポソーム懸濁液の調製方法の検討

安定性がよく、より良い酸化還元応答が得られるような薬物・化合物のリポソームへの導入方法を検討する。

リポソーム形成過程で導入する方法：リン脂質を脂溶性薬物・化合物と共にナスフラスコ中で微量のクロロホルムに溶解し、エバポレータで溶媒除去後薄膜を形成させ、緩衝液を加えてボルテックス処理により導入リポソーム懸濁液を調製する。

リポソーム形成後に導入する方法：リポソーム懸濁液を調製後、脂溶性薬物・化合物をインキュベーションし、その最適条件を検討する。

それぞれ、調製時に使用する緩衝液の pH を変化させたもの、および緩衝作用の無い KCl 溶液を用いたリポソーム懸濁液も調製する。併せて、導入する化合物 (脂溶性キノン類) の量も検討する。

(2) 電気化学測定に適した脂肪乳剤の調整方法の検討

安定性がよく、より良い酸化還元応答が得られる目的物質含有脂肪乳剤の調製方法を検討する。

脂肪乳剤形成過程で導入する方法：大豆油を使用したマイクロエマルジョンの調整を検討する。油脂 (大豆油または中鎖脂肪酸トリグリセリド)・乳化剤 (精製卵黄レシチン)・溶解補助剤 (グリセリン) の組み合わせでマイクロリピッドスフェアを合成し、その脂肪滴中に脂溶性薬物・化合物を導入する。そして、電気化学測定に最適な油脂・乳化剤・溶解補助剤の割合を検討する。

市販の脂肪乳剤に導入する方法：市販の脂肪乳剤 (大塚製薬・イントラリポソ輸液 20%) を用いて、測定対象物質 (脂溶性キノン類) をミセルに導入して試料溶液とする。導入には熱、超音波の他、導入補助剤として各種界面活性剤を検討する。

(3) リポソーム膜、脂肪乳剤中における脂溶性薬物・化合物の電気化学的挙動の観測

上記(1)(2)の方法を用いて調製した脂溶性薬物・化合物を導入したリポソーム懸濁液及び脂肪乳剤について、サイクリックボルタメトリー法 (CV) を用いて導入物質 (脂溶性

キノン類)の酸化還元挙動を観測する。同時に有機溶媒を用いて導入物質に対し同様の実験を行い、結果を比較して有機溶媒に対しての有用性を確認する。また、リポソーム懸濁液及びマイクロエマルジョンの pH を変化させ、電子移動反応への影響を測定する。電気化学測定には、BAS 社 ALS600 電気化学アナライザーを用いる。

(4) デジタルシミュレーションを用いた電気化学測定結果の解析

(3)で得られたボルタモグラムから、デジタルシミュレーションを用いて電子移動反応解析を行う。この解析により、メカニズム、電子移動反応速度、プロトン移動反応の速度論的パラメーターを評価する。また、有機溶媒を用いた比較実験のデータについてもシミュレーションを行い、相違点などを評価する。デジタルシミュレーションには ElchSoft 社製 DigiElch 7 を使用する。

4. 研究成果

(1) リポソーム (MLV) を用いた電気化学測定系の検討

リン脂質として大豆由来レシチン 200mg と脂溶性キノン類を少量のクロロホルムに溶解させ、半日以上蒸発乾固させ梨フラスコ内壁に薄膜を形成させる。そこにリン酸緩衝液 20 mL を加えて、50°C 以上でボルテックス処理をすることにより、キノン含有リポソーム懸濁液が得られる。同様の方法で脂溶性キノンを含まないリポソーム懸濁液を調製し、バックグラウンド溶液とした (Fig. 1)。

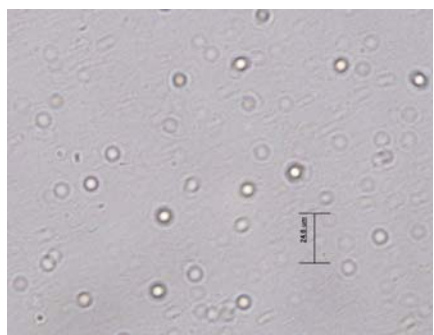


Fig. 1 リポソーム懸濁液 : 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7). 写真中目盛 24.6 μm.

天然物由来抗腫瘍活性キノンである Lapachol (Fig. 2) 含有リポソーム懸濁液 (赤線)、およびバックグラウンドリポソーム懸濁液 (青線) それぞれの溶液の CV を Fig. 3 に示す。この Lapachol 含有リポソーム溶液の CV (Fig. 3) は $2e^-/2H^+$ 反応を示し、ボルテックス処理を一定にすることで高い再現性が得られた。また、懸濁液調製時に導入する Lapachol 量増加に伴い cathodic peak current

は直線的に増加した。

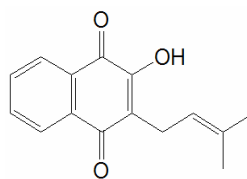


Fig.2 Lapachol

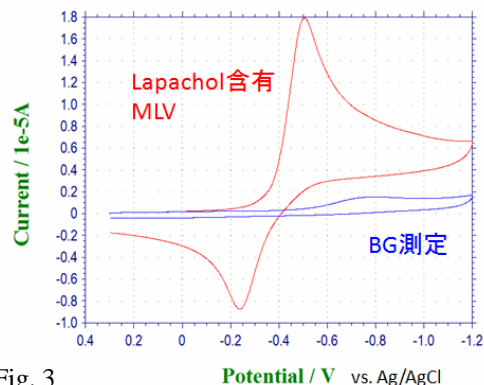


Fig. 3 Cyclic voltammogram of liposome suspension in the absence (blue line) and the presence of lapachol (red line) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7), recorded at 100 mV s^{-1} . [Lapachol] / 0.5 mM.

Lapachol 含有リポソーム懸濁液の CV を種々の scan rate で測定し、cathodic peak current を scan rate の平方根に対してプロットしたものを Fig. 4 に示した。Fig. 4 のとおり、両者にはよい相関が得られた。これはリポソームが電極表面に吸着して電子移動を起こすのではないことを示唆している。また測定後のグラシーカーボン電極を蒸留水でリンスして緩衝液中で CV 測定を行い、電極へのリポソーム吸着が無いことを確認した。

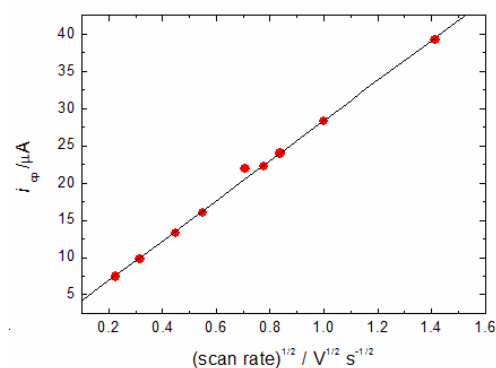


Fig. 4 Dependence of the cathodic peak current of liposome suspension consisting of 0.5 mM Lapachol on the square root of the sweep scan rate in 0.1 M phosphate buffer (pH 7).

ここで観測される $2e^-/2H^+$ 反応を、プロトンを引き抜いてから還元される経路と、還元体がプロトンを引き抜く経路の二通りを考慮し、プロトンドナーを溶媒である水として Lapachol 含有リポソーム懸濁液の CV のシミ

シミュレーション解析を行った。Fig. 5 に pH7 のリン酸緩衝液を用いて調整したリポソーム懸濁液の CV (青線) とシミュレーション結果 (青○) をそれぞれ示した。

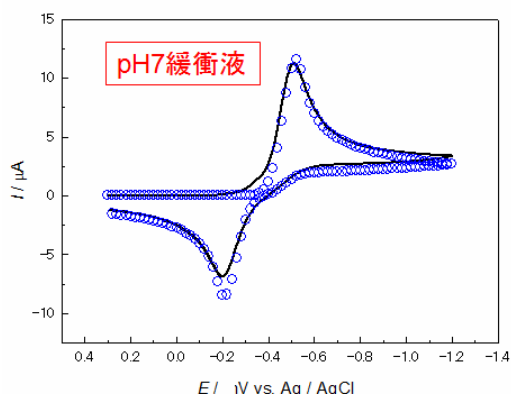


Fig. 5
Cyclic voltammograms of liposome suspension consisting of 0.5mM lapachol in 0.1 M phosphate buffer (pH 7), recorded at 100 mV s^{-1} . Open circles (blue) are simulations using parameter values as follows.

実測値との合致のために、シミュレーションは非常に速いプロトン移動反応速度を要求した ($k_f = 1 \times 10^8$)。次に pH12 のリン酸緩衝液を用いて調整したリポソーム懸濁液の CV に対して同様にシミュレーション解析を行った。

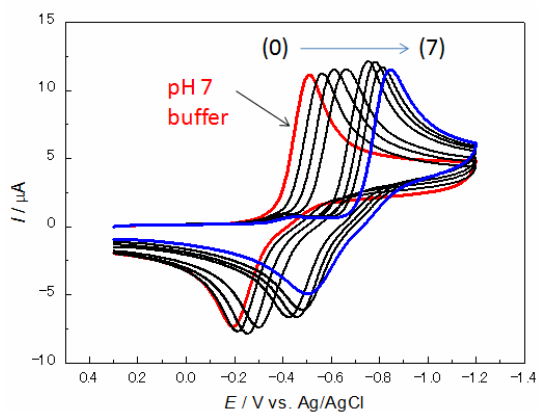


Fig. 6
Cyclic voltammograms of liposome suspension consisting of 0.5 mM lapachol in 0.1 M phosphate buffer (pH 7) in addition of various amount of 10% NaOH, recorded by GCE at 100 mV s^{-1} .

pH7 の Lapachol 含有リポソーム懸濁液に 10% 水酸化ナトリウム液を添加していくと得られる CV は pH 変化に伴いネガティブにシフトする (Fig. 6)。Fig. 6 中で青線で示す CV は pH12 のリン酸緩衝液を用いて調整したリポソーム懸濁液の CV と一致し、これは還元体

がプロトンを引き抜くというスキームでプロトン移動反応速度を遅く ($k_f = 1 \times 10^3$) することでシミュレーションにより再現できた。

これらの結果から、プロトン移動反応速度が酸化還元挙動に影響を及ぼさずと考えられたため、緩衝能をもたない 0.1M KCl 溶液を用いて同様の実験を行った。Fig. 7 に示すように (a) 0.1 M KCl (pH 6.86) と (b) 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) それぞれの Lapachol 含有リポソーム懸濁液はまったく異なる挙動を示した。溶液の pH はほぼ同じであることから、この結果は緩衝能の有無によるプロトン移動反応速度の違いによるものと考えられる。更なるシミュレーション解析と実験が今後の課題である。

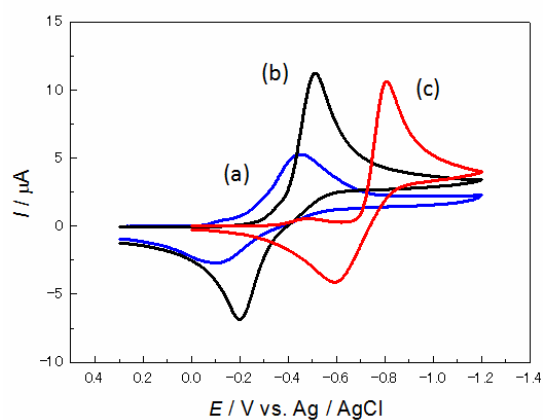


Fig.7
Cyclic voltammograms of liposome suspension consisting of 0.5 mM lapachol in (a) 0.1 M KCl (pH 6.86), (b) 0.1 M phosphate buffer (pH 7), (c) 0.1 M phosphate buffer (pH 12), recorded by GCE at 100 mV s^{-1} .

天然物由来の抗腫瘍活性を有する Lapachol は、そのナフトキノン骨格から酸化還元挙動が注目されている。これまでに Lapachol は有機溶媒中では self-protonation を伴う複雑な酸化還元挙動を示すことが知られており (P. A.L. Ferraz, et al., *J. of Electroanal. Chem.*, 507, 275 (2001).)、最近では支持塩と Lapachol を含むニトロベンゼン溶液を電極上に滴下して緩衝液 (pH 1-1.5) に浸漬し $2e^-/2H^+$ 反応を測定した報告があった (C. T. Ebelle, et al., *J. of Electroanal. Chem.*, 642, 61 (2010).)。しかし、ニトロベンゼンを用いる方法では強酸性条件下でしか測定が出来ず、膜を用いたとしても生体内条件とは程遠い。

Fig.8 にアセトニトリル中での Lapachol の CV とプロトンドナーとして酢酸を添加した時の CV 変化を示した。

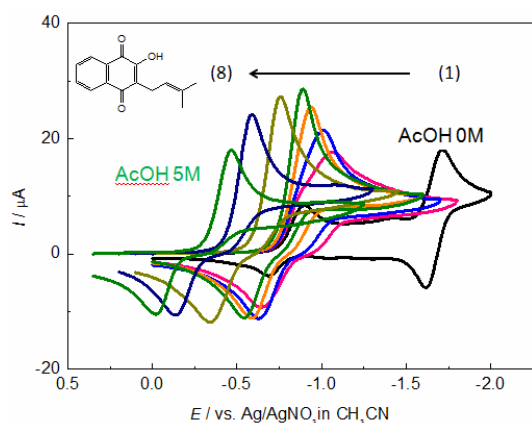


Fig.8

Cyclic voltammograms of 0.5 mM Lapachol in the absence and the presence of AcOH in dry acetonitrile with 0.1 M TPAPF₆, recorded with a GC electrode at a scan rate of 50 mV s⁻¹. [AcOH] / mM: (1) 0.0, (2) 1, (3) 2, (4) 5, (5) 10, (6) 100, (7) 1000, (8) 5000.

酢酸濃度の増加と共に CV 全体がポジティブシフトし、2e⁻/2H⁺ 反応を呈する。しかしリポソーム膜中での挙動と比較すると cathodic peak と anodic peak のセパレーションが 200mV 以上も大きい。詳細の解析は今後の課題であるが、有機溶媒を用いて水系リポソーム膜中での酸化還元挙動を再現することは難しいと考えている。同時に有機溶媒中では緩衝能の有無による効果は観測できない。

以上の点から、キノン類のようなプロトン移動を伴う電子移動反応を起こす化合物は、有機溶媒中で得られる情報と生体内での実際とに差異がみられると予想される。これはプロトン供給が有機溶媒中で再現できないことに起因し、リポソーム懸濁液測定系はより生体内に近い情報を提供できるといえる。

なお、リポソーム調製後に Lapachol 導入を試みたが、最適な条件を見出すには至っていない。

(2) 脂肪乳剤を用いた電気化学測定系の検討

前述した(1)と同様に、Lapachol を用いて電気化学測定可能なエマルションの調製を試みた。大豆油等に Lapachol を溶解し界面活性剤により乳化する方法では、十分な電気化学応答を得ることができなかった。そこで、市販の静注用脂肪乳剤：イントラリポス輸液 20%（大塚製薬）を利用した。o/w 型のイントラリポスを 0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 7）等で希釈後、熱・超音波処理にて Lapachol の導入を試みた。Lapachol 粉末をイントラリポス希釈液中で熱・超音波処理を施しても安定した電気化学的応答は観測されない。しかし、大豆由来レシチンを少量添加して熱・超音波処理をしたところ、2e⁻/2H⁺ 応答が安定に得

られた。これは脂肪乳剤を構成するレシチンがミセルへの導入を促進したためと考えられる。そこで導入補助剤として大豆レシチン、PEG 等界面活性剤を添加して導入方法を検討した。結果、大豆レシチンのみ導入促進に有効であった。脂肪乳剤測定溶液の調製最適化条件を検討し、Lapachol 5mg、イントラリポス 20% 2mL、大豆レシチン 100mg、0.1M リン酸緩衝液(pH 7) 20mL を熱（70℃）・超音波処理することとした。得られた Lapachol 含有脂肪乳液の CV を Fig. 9 に示した。

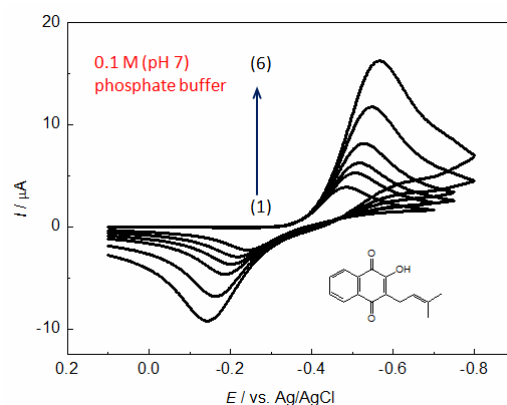


Fig.9

Cyclic voltammograms of lapachol (5mg/20mL) in micro emulsion solution diluted by 0.1 M phosphate buffer (pH 7), recorded with a GC electrode at several scan rate; (1) 0.01, (2) 0.02, (3) 0.03, (4) 0.05, (5) 0.1, (6) 0.2 V s⁻¹.

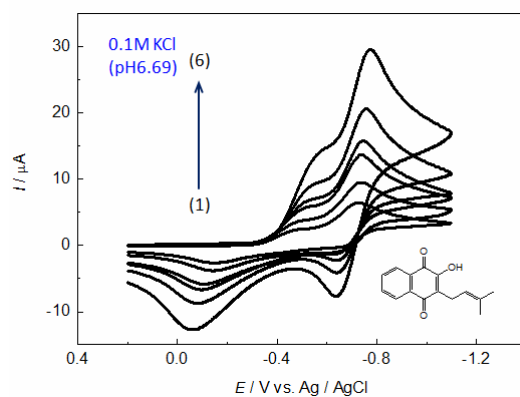


Fig.10

Cyclic voltammograms of lapachol (5mg/20mL) in micro emulsion solution diluted by 0.1 M KCl (pH 6.69), recorded with a GC electrode at several scan rate; (1) 0.05, (2) 0.1, (3) 0.2, (4) 0.3, (5) 0.5, (6) 1 V s⁻¹.

Scan rate の増加に伴い観測される電流値は増加した。この cathodic peak current は scan rate の平方根とよい相関があり、Lapachol を取り込んだ油滴が拡散して電極上で酸化還元が進行することが示された。

次に、0.1 M KCl を用いて Lapachol 含有脂

肪乳液 (pH6.86) を同様に調製し CV 測定を行った (Fig. 10)。得られた CV は明らかにリン酸緩衝液 (pH7) を用いた場合と異なり、1 電子 2 ステップの様相を呈した。そこで、シミュレーション解析に取り組んだ。

まず 1 電子還元の後には 1 プロトン移動反応がおこるスキームを 2 ステップとし、プロトンソースは水とした。結果、プロトン移動反応速度定数が非常に早ければ緩衝液乳剤の CV (Fig. 9) を与え、非常に遅ければ KCl 液乳剤の CV (Fig. 10) を与えることが明らかとなった。詳細はまだ解析中であるが、リポソーム膜中での酸化還元挙動と同様に、有機溶媒中では観測できない緩衝能の有無による挙動の違いが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 奥村典子, 古田佳奈, 平野裕美, 増子翠, 宇野文二; 脂肪乳剤を媒体とした脂溶性キノン類の電気化学測定と電子移動反応解析、日本薬学会第 132 年会 (札幌) (2012.03-28-31).
- ② 古田佳奈, 若松詩織, 石濱智子, 岩田麻里佳, 香村奈美, 辻井奈保, 中山辰史, 宇野文二, 奥村典子; 脂肪乳剤を用いた生体内により近い条件での電気化学測定系の構築、第 57 回日本薬学会東海支部大会 (金城学院大学, 2011.7.9)
- ③ 若松詩織, 辻井奈保, 古田佳奈, 石濱智子, 岩田麻里佳, 香村奈美, 中山辰史, 宇野文二, 奥村典子; リポソーム膜中化合物の電気化学的挙動の観測、第 57 回日本薬学会東海支部大会 (金城学院大学, 2011.7.9)
- ④ 奥村典子, 古田佳奈, 若松詩織, 平野裕美, 宇野文二; 生体内により近い環境での電気化学測定法の検討、第 35 回有機電子移動化学討論会 (九州大学) (2011.06.23-24).
- ⑤ 奥村典子, 若松詩織, 古田佳奈, 辻井奈保, 石濱智子, 岩田麻里佳, 香村奈美, 中山辰史, 宇野文二; 非水系電気化学の代替としてのリポソーム測定系構築に関する研究、日本薬学会第 131 年会 (静岡, 2011.03.28-31)
- ⑥ 奥村典子, 岩田麻里佳, 香村奈美, 辻井奈保, 若松詩織, 中山辰史, 宇野文二; 生体内により近い条件での電気化学測定系構築に関する研究、日本薬学会第 130 年会 (岡

山, 2010.03.28-30)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 典子 (OKUMURA NORIKO)
金城学院大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00275091

研究協力者

宇野 文二 (UNO BUNJI)
岐阜薬科大学・教授