

産業応用分野；医薬品、 研究対象；リン脂質二重膜、 中性子手法；小角散乱
 利用BL；BL15 大強度型中性子小角散乱装置(TAIKAN); Small and Wide Angle Neutron Scattering Instrument
 Used Beam Time; 1.0日 / Allocated Beam Time; 1.0日 / Requested Beam Time; 1.5 日
 課題番号；2012B0057

課題名	コントラスト変調SANS測定を利用したリポソームの構造解析 Structural study of liposomes utilizing contrast variation SANS	
実験代表者 ；杉島 明典	所属；富士フイルム(株)	

背景；医薬品開発においては、薬物搬送システム (DDS: Drug Delivery System) の概念に基づいた製剤設計が注目されている。なかでも、生体膜由来のリン脂質二重膜閉鎖小胞であるリポソームを薬剤キャリアとして用いる製剤は、有力なDDS 製剤の一つである。リポソームは、その表面への修飾基付与により、様々な機能化できることが知られており、修飾基付与は高機能なDDS製剤を開発するために必要不可欠な手法の一つである。その代表例の一つであるPEG 修飾は、リポソームの血中安定性や滞留性を飛躍的に向上させることが可能な、DDS 製剤開発にとって極めて重要な技術となっている。リポソーム表面のPEG鎖の構造を定量化することは、リポソーム製剤の表面設計・改良指針を得る上で、重要な構造的知見となることが期待される。

中性子実験の必要性；これまでX線を用いて、PEG修飾リポソームの構造解析を進めてきた。しかし、リポソーム及び修飾基は水とのコントラスト差が小さく、また1試料から1つの散乱データしか得られず情報量が少ないため、SAXSのみでは構造を詳細に把握することが難しかった。この問題を解決する方法として、重水と軽水の割合を変えることでコントラストを自在に変えることができる中性子散乱の利用が有効である。リポソーム分散媒を重水素化することでコントラスト変調測定により、1試料からH/D比の異なる複数の散乱データを得ることが可能となり、構造解析の確度を高めることが可能である。

試料；PEG修飾量および水溶媒のD₂O:H₂O比を変えたリポソームを乳化法により作成した。
 ・HSPC/DSPE-PEG2000 (PEG濃度1 mol.%) リポソーム (溶媒： D₂O:H₂O=100:0, 75:25, 50:50 の3種)
 ・HSPC/DSPE-PEG2000 (PEG濃度7 mol.%) リポソーム (溶媒： D₂O:H₂O=100:0, 75:25, 50:50 の3種)
 ・D₂O:H₂O=100:0, 75:25, 50:50 の混合溶媒
実験 試料はBL15 共用の厚み2mm の円筒形石英セルに充填し、波長 0.7~7.8 Å を利用し、小角バンクを用いて測定した。

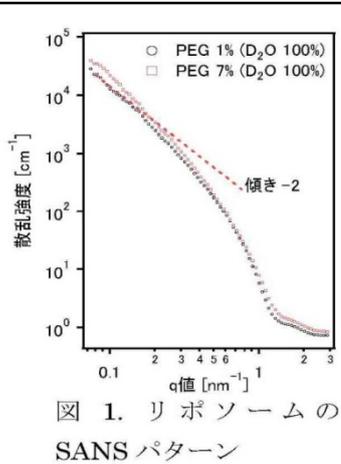


図 1. リポソームの SANS パターン

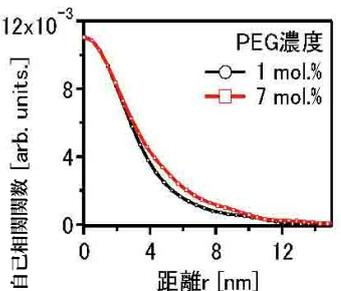


図 2. SANS パターンから得た リポソームの自己相関関数

結果と考察 図1にD₂O:H₂O=100:0 溶媒中のリポソームのSANS パターンを示す。両対数プロットのq~0.1nm⁻¹付近の傾きは平板状散乱体を特徴づける-2 に近く、リポソーム膜に由来した散乱であることが示唆された。膜構造情報を得るため、間接フーリエ変換法[1]によりSANSパターンから自己相関関数を導出した。得られた自己相関関数(図2)は単調減少で約12 nm で減衰したが、その減衰長は脂質二重膜の平均的な膜厚である約6nm よりも大きかった。約12 nmの減衰長はPEG修飾基を含めた膜厚に対応すると考えられ、これよりPEG鎖の厚みは約3nmと見積もられた。SANS では二重膜表面のPEG鎖を含めたリポソーム膜厚が得られ、PEG鎖の存在状態に関する有用な情報が得られることが明らかになった。

自己相関関数解析から得た、膜厚6nm、PEG鎖3nmの粗描像を精密化するため、H₂OとD₂Oの混合比を変えてコントラスト変調したパターンに対し、グローバルフィッティング解析を行った。フィッティングモデルには、4重のコアシェル構造を有する平板モデル[2]を使用し、フィッティング精度を向上させるため、グローバルフィッティングには同じリポソームから別途実験で得たSAXSパターンも加えた。PEG濃度1%の場合のフィッティング結果を図3に示す。二重膜及びPEG鎖の構造パラメータを用いて一連のデータはよくフィッティングできた。PEG鎖の厚みは濃度1%の場合には3.6 nm、7%の場合には4.5 nmと評価され、PEG濃度の上昇により鎖長がわずかに広がる様子が明らかになった。

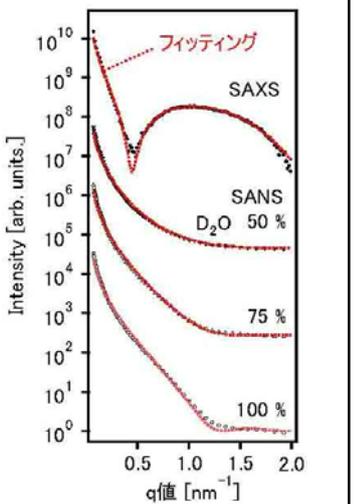


図 3. SANS/SAXS パターンのフィッティング解析結果。

[1] D. I. Svergun, J. Appl. Cryst., 25 (1992) 495-503.
 [2] O. Glatter and O. Kratky, "Small Angle X-ray Scattering", (London, Academic Press, 1982).