

博士論文

せん断流によるリポソームの構造変化を利用した

気泡塔内せん断速度の測定と酵素反応制御

(Measurement of shear rate in bubble columns and control of enzymatic reactions on the basis of shear flow-induced structural change of liposomes)

平成 27 年 3 月

夏 目 友 誉

山口大学大学院医学系研究科

学位論文の要旨

脂質二分子膜小胞であるリポソームは、内部の微小液滴に酵素をはじめとするバイオ分子を可溶化できる。リポソームは生体膜と同じ基本構造をもつため薬物担体やバイオセンサ等への応用が期待されている。リポソームの重要な機能として、脂質膜の透過選択性が挙げられる。リポソーム内に構築された酵素反応系では、酵素活性の安定性が著しく増大する場合があるが、親水性基質に対する脂質膜の高い透過抵抗のため触媒反応速度が著しく低下する。これまでに、脂質膜の透過性を低濃度の界面活性剤やペプチドにより増大させる手法が報告されている。一方、超音波や液体せん断ストレスのような機械的ストレスを利用した膜構造・透過性の制御も報告されている。流体の流れの速度勾配に起因するせん断ストレスの発生はバイオリアクター等の実用反応器において不可避であり、これを利用したリポソーム系酵素反応の制御が実現すれば多様な応用が期待できる。本研究では、せん断ストレスに基づくリポソームの構造と機能の制御法について明らかにするとともに、それらを利用した反応器内流動特性の測定法の開発と合理的な触媒反応プロセスの構築を目的とする。具体的には、これまで報告例が著しく少ない比較的小さな粒子径をもつリポソームの構造・機能とせん断ストレスの関係を明らかにする。さらに、従来法では困難であった気泡塔内混相流のせん断速度の測定及びせん断ストレスに対する酵素分子とリポソームの構造変化を複合利用した高効率酸化反応系の構築について検討する。本論文は緒論と結論を含め5章で構成される。各章の内容は下記のとおりである。

第1章では、脂質膜と酵素封入リポソームの基本的な特性、せん断ストレスに対する酵素分子と脂質膜の応答性に関する従来の知見、気泡塔バイオリアクターの応用におけるせん断速度の重要性及び本研究の背景・目的と論文の構成について述べている。

第2章では、リポソームの膜透過性に及ぼす液体せん断ストレスの効果について述べている。親水性蛍光色素 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) のリポソーム膜透過性を40-55 °C で負荷されたせん断ストレス条件下で実測した。定義されたせん断場を形成させるためにコーン・プレート型粘度計を使用した。温度、せん断速度、リポソーム径(101-323 nm) の各特性と CF の膜透過係数の関係を明らかにした。さらに、負電荷脂質を含有するリポソームをカルシウムイオン共存下でクラスター化させる手法を開発した。クラスター化リポソームは、せん断流中で柔軟に構造変化して、高い膜透過性を示すことを明らかにした。

第3章では、せん断ストレスに依存するリポソーム膜の透過性に基づいて、気泡塔内で発生するせん断速度を測定する方法について述べている。スケールと形状が異な

る外部循環式エアリフト型気泡塔及び標準型気泡塔に CF 封入りリポソームを懸濁して、CF の膜透過係数を実測した。この結果と第 2 章で明らかにしたせん断ストレスと膜透過係数の関係に基づき、各気泡塔内のせん断速度の測定を行った。この測定に有用なリポソームとして、気泡との相互作用が小さい負電荷リポソームを提案している。この手法に基づき、ライザー/ダウンカマー断面積比と塔高が種々異なる 3 種類の外部循環式気泡塔内のせん断速度を合理的に測定した。特に、気泡塔内では、せん断速度の分布が存在して、ガス分散板近傍におけるせん断速度の寄与がきわめて大きいことを明らかにした。

第 4 章では、微小円管内で形成される層流場を利用した酵素封入りリポソームの安定性と活性の制御について述べている。層流は $380\ \mu\text{m}$ 以下の内径をもつ円管中にグルコースオキシダーゼを内包させたリポソームの懸濁液を送液することで発生させた。この系では、第 3 章の気泡塔に比べて高いせん断ストレスが円管壁面近傍においてリポソーム膜に負荷される。その結果、脂質膜の著しい構造変化とリポソーム内包酵素の液本体への放出が起こることを明らかにした。さらに、リポソーム非共存下の層流において、酵素分子が構造変化して失活する傾向が認められたが、リポソームの共存下では静止液系よりも高い酵素活性が長時間維持されることを明らかにした。

第 5 章では、リポソームのせん断ストレス応答性に基づく気泡塔反応器内せん断速度の測定とリポソーム系酵素反応の連続的加速化に関する結論を述べている。本論文は、各種バイオリクター内の流動特性を活性制御因子とする生体触媒の開発、せん断ストレスに対する細胞の応答機構の解明及び血流応答性の薬物担体の開発等につながる重要な知見を与えている。

Abstract

Liposomes possess phospholipid bilayer membranes and water pool where biomolecules such as enzymes can be solubilized. Enzyme-containing liposomes are potentially applied to drug delivery systems, cosmetic materials and biocatalysts. Selectivity in permeability of lipid membranes is one of the crucial functions of liposomes. Biological activity of enzymes is potentially stabilized in liposomes, whereas the rate of catalytic reactions significantly decreases because of the permeation resistance to the hydrophilic substrate molecules. So far, the membrane permeability of liposomes was modulated with low concentrations of detergents and channel-forming membrane proteins. On the other hand, the structure and permeability of liposome membranes are controllable on the basis of mechanical stresses such as ultrasound and liquid shear stress. Since shear stress is generated in practical reactors including bioreactors, the stress would be useful for modulating the functions of liposomes. In this study, the shear flow-induced structural and functional changes of lipid membranes are examined using the small or large unilamellar liposomes with the diameter smaller than 500 nm, which were little employed previously in shear flow. Then, the measurement method is developed for the purpose of quantification of the shear rate in any bubble column bioreactors. The novel enzyme-catalyzed reaction, which is regulated with the applied shear stress, is also developed on the basis of the structural and functional changes of enzymes and liposomes. The present thesis consists of five chapters as described below.

In Chapter 1, characteristics and general properties of lipid membranes and enzyme-containing liposomes are described, focusing on the structural and functional responses of the enzyme molecules and the membranes to the shear stress, and the importance of shear rate in the application of bubble columns for microbial fermentation processes. The objective of this thesis is also described.

In Chapter 2, the effect of shear stress on the permeability of liposome membranes is clarified using the cone-and-plate geometry as a generator of defined shear flow. The permeability coefficient of hydrophilic fluorescence dye (5(6)-carboxyfluorescein (CF)) through liposome membranes is determined as a function of shear rate at 40-55 °C. The effect of size of liposomes on the structural stability is also clarified using the liposomes with mean diameter D_p of 101-323 nm. The CF-containing liposomes with the D_p values of 101-189 nm are structurally stable under the shear stress whereas larger ones are collapsed, as revealed with the dynamic light scattering measurements. Moreover, the clusters of negatively charged liposomes with diameter of about 1.5 μm are prepared by adding calcium ions. The membrane

permeability of clusters associated with structural flexibility is elucidated in the defined shear flow. The liposome clusters exhibit comparable permeability to the non-clustered liposomes under the shear stress.

In Chapter 3, a novel method to estimate shear rate in bubble columns is described on the basis of the shear-induced permeabilization of liposomes. The negatively charged liposomes encapsulated with CF, which are found to little interact with nitrogen bubbles, are suspended in the normal and external loop airlift bubble columns with different scale and configuration, and the rate of CF-release from the liposomes is measured. Then, the relationship between the permeability coefficient of CF and shear rate is determined, which allows estimating unknown shear rate in the columns. Based on this method, the distribution of shear rate in the normal bubble columns and the importance of the gas distributor on the shear rate are clarified. The average shear rate in the three types of external loop airlift bubble columns is also reasonably estimated.

In Chapter 4, the liposomal glucose oxidase-catalyzed reaction is controlled using the laminar shear flow generated in microtubes with inner diameter of 190 or 380 μm . In this flow, intense shear stress compared to the stress employed in Chapter 3 can be applied to liposome membranes, giving the maximum stress at the wall of microtubes. As a result, release of the enzyme molecules into the shearing bulk liquid is triggered by the shear-induced structural perturbation and partial disruption of lipid membranes. Moreover, the liposomes exhibit the chaperone-like function toward the shear-denatured enzyme molecules, which can stabilize the enzyme activity in shear flow. Based on the above phenomena, the glucose oxidation catalyzed by the liposomal glucose oxidase can be accelerated and also decelerated depending on the applied shear rate.

In Chapter 5, the general conclusion and perspective of this work are described. The measurement of shear rate in bubble columns using liposomes would be applicable to measure local shear rate through immobilizing the liposomes at any place in the columns. The results would also be applicable to develop blood flow-responsive drug carriers and to understand functions of cells and proteins in the flow.

目次

第1章 緒論.....	1
1-1. 研究の背景.....	1
1-1-1. リポソームの構造および酵素封入リポソームの特徴と応用.....	1
1-1-2. 機械的ストレスに対する酵素とリポソームの応答性.....	2
1-1-3. 気泡塔型バイオリアクターにおけるせん断速度の重要性.....	4
1-2. 本研究の目的・構成.....	5
第2章せん断流中のリポソームおよびクラスターリポソームの膜透過性と安定性..	10
2-1. 緒言.....	10
2-2. 実験.....	12
2-2-1. 材料.....	12
2-2-2. 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) 封入リポソーム (CFL) の調製.....	12
2-2-3. せん断流の形成.....	13
2-2-4. CF 封入リポソームからの CF 膜透過性の測定.....	13
2-2-5. コーンとプレートへの脂質の吸着の測定.....	14
2-2-6. リポソームの粒子径分布および ζ 電位の測定.....	14
2-2-7. 濁度測定.....	15
2-2-8. リポソームの膜流動性の測定.....	15
2-2-9. リポソームクラスターの理論解析.....	16
2-3. 結果及び考察.....	16
2-3-1. CFL と コーン・プレート鋼表面間の相互作用.....	16
2-3-2. コーン・プレート型粘度計内における液体せん断ストレスと熱ストレスの特徴.....	19
2-3-3. CFL 膜の透過性に対する液体せん断ストレスの影響.....	22
2-3-4. せん断流中の CFL 膜の安定性.....	22
2-3-5. せん断流中における脂質透過性に及ぼす CFL サイズの影響.....	25
2-3-6. Ca^{2+} に誘起される負電荷リポソームの凝集特性.....	28
2-3-7. Ca^{2+} に誘導されるリポソーム凝集体の構造上の特性.....	31
2-3-8. せん断ストレスに誘起されるクラスター化リポソームの膜透過性の増大.....	36
2-4. 結言.....	38

第3章 リポソームの構造変化を利用した気泡塔内の平均せん断速度の測定.....	41
3-1. 緒言.....	41
3-2. 実験.....	42
3-2-1. 材料.....	42
3-2-2. リポソームの調製.....	43
3-2-3. コーン・プレート型せん断装置.....	43
3-2-4. 実験に使用した気泡塔の特徴.....	44
3-2-5. 気泡塔内における気液二相流の形成.....	45
3-2-6. リポソームの粒子径分布の測定.....	45
3-2-7. リポソーム膜を介した CF の透過係数 P_{CF} の決定.....	46
3-3. 結果及び考察.....	46
3-3-1. せん断流中におけるリポソームの安定性.....	46
3-3-2. せん断速度とリポソーム膜透過性の関係.....	46
3-3-3. エアリフト型気泡塔におけるリポソーム膜の透過性.....	49
3-3-4. エアリフト型気泡塔内の平均せん断速度の推定.....	49
3-3-5. CFL-気泡間相互作用に及ぼす表面電荷の影響.....	51
3-3-6. CFL の膜透過性に及ぼす液深の影響.....	53
3-3-7. CFL の膜透過性におよぼす気泡塔形状の影響.....	54
3-4. 結言.....	56
第4章 人工シャペロンとしての機械的ストレス感受性リポソームによるせん断誘起型酵素触媒反応の加速化.....	58
4-1. 緒言.....	58
4-2. 実験.....	60
4-2-1. 材料.....	60
4-2-2. 酵素封入リポソームと CF 封入リポソームの調製.....	60
4-2-3. GO 活性の測定.....	61
4-2-4. Catalase 活性の測定.....	61
4-2-5. 平均粒子径と粒子径分布の測定.....	61
4-2-6. 外部循環式微小円管反応器中のグルコース酸化反応.....	62
4-2-7. せん断流中におけるリポソーム内封入酵素と遊離酵素の安定性の測定.....	63
4-2-8. リポソームからの GO 漏出の測定.....	64

4-2-9. せん断流中に懸濁したリポソームからの CF 漏出量の測定と分析	64
4-2-10. 外部循環式エアリフト型気泡塔内の H ₂ O ₂ 分解反応	64
4-3. 結果及び考察	65
4-3-1. せん断流中における GO 封入リポソーム反応の特性	65
4-3-2. リポソーム膜の機械的ストレス感受性	68
4-3-3. リポソームからの GO 分子の漏出	69
4-3-4. せん断流中の酵素分子に対するリポソームのシャペロン様機能	74
4-3-5. せん断流中のリポソーム系酵素反応のメカニズム	75
4-3-6. 実用的なモデル系としての catalase 封入リポソーム(CAL)の気液流動による活性化	79
4-4. 結言	79
第5章 結論	82
引用文献	85
研究発表論文	96
謝辞	98

第1章 緒論

1-1. 研究の背景

1-1-1. リポソームの構造および酵素封入リポソームの特徴と応用

分子内に親水部と疎水部が共存するリン脂質の乾燥膜に水溶液を加えると内部に微小水相を有する直径数百 nm の閉鎖二分子膜小胞 (リポソーム) が生成する (Bangham *et al.*, 1965)。リポソームのサイズは細孔の通過や超音波照射により調整できる。リポソームは生体膜と同じ基本構造をもつ。生体と親和性が高いリポソームは薬物輸送担体 (Holme *et al.*, 2012)、バイオセンサ (Liu and Boyd, 2013)、酵素反応制御 (Yoshimoto *et al.*, 2004) などに応用が期待されている。

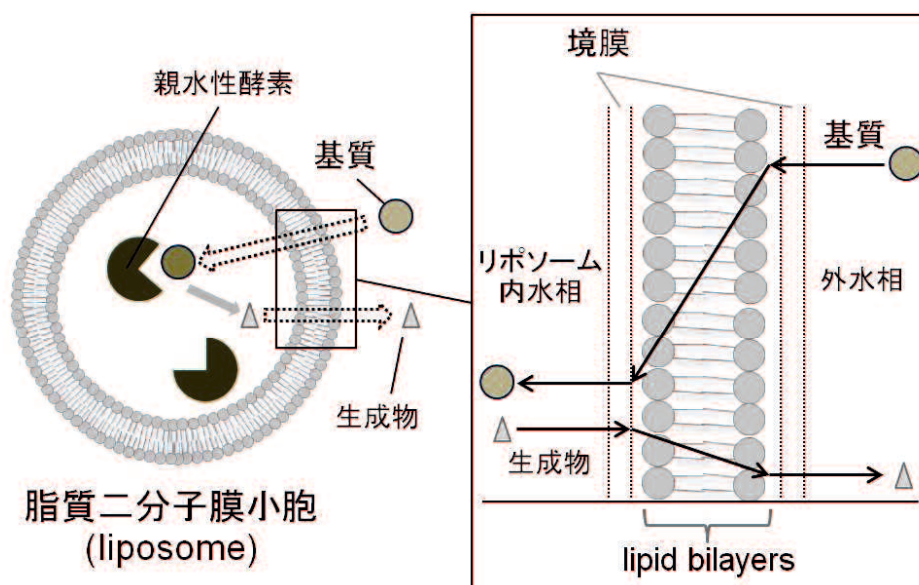


Figure 1-1 Schematic illustration of mass transfer in liposomal system.

リポソームの内水相に酵素を可溶化すると、外水相と隔離された条件で酵素反応が進行するナノスケールのバイオリクターが形成される (Figure 1-1)。リポソーム系酵素反応では、外水相に加えられた基質が脂質膜を透過して反応が進行する。直径が 100 nm 程度のリポソーム周囲の液境膜の物質移動抵抗は無視できるため、触媒反応は基質に対する脂質膜の透過抵抗に支配される。Yoshimoto *et al.* (2004) は Proteinase K を内封したリポソームに脂質膜を溶解しない低濃度の界面活性剤を添加することで、

基質に対する膜の選択的な透過性が変化することを報告した。Rokitskaya *et al.* (2011) は蛍光色素を封入したリポソームに抗微生物ペプチドの Indolicidin を添加するとペプチドが脂質膜の透過性を変化させることを報告した。Small *et al.* (2012) は2種類の脂質と Cholesterol から構成される蛍光色素封入リポソームの超音波に誘起される膜透過性の増大を報告した。彼らは、脂質膜組成により超音波に対するリポソームの感受性が著しく変化することを見出した。この報告は、機械的ストレスによりリポソーム膜の透過性を制御できることを示している。脂質膜-液相間の平衡関係で成立する界面活性剤修飾や大量生産が困難な膜タンパク質やペプチドによる修飾に比べて、機械的ストレスによる脂質膜の透過性変化は実用的に有用である。

1-1-2. 機械的ストレスに対する酵素とリポソームの応答性

高い基質特異性をもつ酵素は高効率かつ選択的に目的生成物の生成反応を触媒する。しかし、このような酵素の機能はペプチド鎖の立体構造に規定されるため、熱や機械的ストレスにより水素結合等の分子内相互作用が阻害されて酵素の変性・失活が起こる。Table 1-1 に酵素をはじめとするバイオポリマーの構造と機能に及ぼすせん断ストレスの影響に関するこれまでの知見を示す。Bekard *et al.* (2011) は Poly-L-lysine の水素結合がせん断流中で切断されて α -Helix 構造が崩壊することを報告している。また、酵素の3次構造は柔軟性をもつため、せん断流中ではある程度活性が維持される。van der Veen *et al.* (2104) は α -Amylase をコーン・プレート装置内で発生させたせん断流に懸濁すると 25 kPa のせん断ストレスまで失活しないが、それ以上のストレスを負荷すると不活性化することを報告した。

一方、高いせん断速度が発生するマイクロデバイス内の微小流路では酵素が活性化することが報告されている。Tanaka *et al.* (2001) は Horseradish peroxidase を微小流路内部で反応させると酵素活性が試験管内静止液系と比較して2倍に加速化されることを報告している。Kanno *et al.* (2002) は β -Galactosidase 触媒反応が微小流路系で加速されることを報告した。彼らは、この理由として拡散速度の変化を挙げている。また、Wang *et al.* (2013) は微小流路内で発生するせん断速度の異なる条件下において、Glucose oxidase 活性が静止液系と比較して3倍程度増加することを報告した。さらに、Yamashita *et al.* (2007) は微小流路内部の流速の増大により DNA が熱安定化されることを報告した。このようにバイオポリマーはせん断速度に依存して不活性化と活性化の相反する応答性を示す。

Table 1-1 Studies on the shear-induced activity and conformational changes of biopolymer.

Biopolymer	Device	Factor	Remarks	Reference
α -Helical poly-L-lysine (PLL)	Flow-cell	Shear rate (74-715 s ⁻¹)	Unfolding of the α -helix of PLL	Bekard <i>et al.</i> (2011)
α -Amylase	Cone-and-plate geometry	Shear stress (4.3-68.5 kPa)	Inactivation of α -amylase (α -Amylase had a shear resistance to approximately 25 kPa.)	van der Veen <i>et al.</i> (2004)
DNA	Nanochannel (Diameter = 800 μ m, Length = 600 mm)	Flow rate (0.67-33 cm ² ·s ⁻¹)	Thermal stability of DNA in microfluid was increased.	Yamashita <i>et al.</i> (2007)
Horseradish Peroxidase (HPR)	Microchannel (Depth = 100 μ m, Width = 250 μ m)	-	Activation of HPR (Reaction in the microchip was about 2 times faster than that in the bulk liquid.)	Tanaka <i>et al.</i> (2001)
β -Galactosidase (GA)	Microchip (Depth = 200 μ m, Width = 200 μ m, Length = 40 cm)	-	Activation of GA (The reaction in the microchip was about 5 times faster than the that in batch reaction)	Kanno <i>et al.</i> (2002)
Glucose oxidase (GO)	Nanochannel (Depth = 110 nm, Width = 200 μ m, Length = 8 mm)	Flow rate (15-400 μ m ² ·s ⁻¹)	Activation of GO (The value of Michaelis constant K_m value of GO in nanofluidics is nearly three times smaller than the value in the bulk system.)	Wang <i>et al.</i> (2013)

脂質二分子膜から構成されるリポソームは外部刺激に応答して膜の透過性が変化する (Giorgio and Yek, 1995; Bernard *et al.*, 2005; Kogan *et al.*, 2013)。液本体の流動が誘起するせん断速度に応答して、リポソームの膜透過性が増大することが報告されている。Giorgio and Yek (1995) は、コーン・プレート型装置内部で発生させたせん断流中 (せん断速度 γ 範囲: 27-2700 s^{-1}) にカルシウムイオンを封入したリポソームを懸濁して膜透過性を追跡した。彼らは、せん断速度が増大するほどカルシウムイオンの膜透過性が上昇することを報告した。また、せん断流中ではリポソームの膜融合や崩壊が起こる場合がある。Bernard *et al.* (2005) は、せん断ストレスと曲げ剛性の比で示される無次元数 C_a に基づきリポソームの変形について検討した。Kogan *et al.* (2013) は、高粘性の 40 wt% 以上のスクロース溶液中にリポソームを懸濁することで $\gamma = 3100 s^{-1}$ においてリポソームの融合が起こることを報告した。これらの研究は、ほとんどが直径 500 nm 以上のリポソームについて検討されており、100 nm 程度の小さなリポソームに関する知見は著しく不足している現状にある。

生体系では、せん断ストレスのような外部刺激に応答して細胞が機能発現するメカノトランスダクションが報告されている (Ando and Yamamoto, 2013)。Gudi *et al.* (1998) は、脂質膜内に配向させた G protein がコーン・プレート型装置内で発生させたせん断流中で活性化することを報告した。また、リポソームがせん断ストレスに反応して透過性を増大することを応用して、血管内部のプラーク領域におけるせん断ストレスの急激な増大を利用した薬物送達技術が報告されている (Holme *et al.*, 2012)。このような報告は、バイオリアクター内のせん断流中において、酵素封入リポソームの構造と機能を制御できる可能性を示している。

1-1-3. 気泡塔型バイオリアクターにおけるせん断速度の重要性

気相を連続的に供給して操作する気泡塔は、気液固の多相反応に適している (Chisti, 2010)。ミニスケールとパイロットスケールの気泡塔においてガスホールドアップや液循環速度が同一の関係式により予測可能であるため、スケールアップ・ダウンが容易である (Wang *et al.*, 2003)。気泡の供給により気泡塔内では液流動が生じる。液流動により発生するせん断速度は気泡から液本体への物質移動を促進する (Merchuk and Ben-Zvi, 1992)。したがって、気泡塔は酸素供給が必要とされる細胞培養や酵素反応操作に適した装置である (Nakao *et al.*, 1999; Yoshimoto *et al.*, 2006)。一方、せん断速度は培養細胞の死滅の要因となる。このため、せん断速度の測定は気泡塔を扱う上できわめて重要である (Chisti, 2010)。

これまでに報告されてきた相関式を **Table 1-2** および **Figure 1-2** に示す。Nishikawa *et al.* (1977) は、標準型気泡塔を使用して γ とガス空塔速度 U_G 間に $\gamma = cU_G$ の関係が成り立つことを報告した。c 値は気泡塔の形状やスケールにより変化するために装置特性に合わせていくつかの値が報告されてきた。また、外部循環式エアリフト型気泡塔にもこの関係式が適用されてきた。Shamiou *et al.* (1998) は単位体積あたりのせん断速度と U_G が誘起する液流動の関係を発展させて、非ニュートン流体における関係式を導き出した。Thomasi *et al.* (2010) はニュートン流体と非ニュートン流体のモデル系として Glycerol と Xanthan gum 溶液をそれぞれ使用して、内部循環式気泡塔内のせん断速度を推定した。ニュートン流体中の酸素移動容量係数 k_La はガス空塔速度と粘度の増大に依存して上昇する。一方、せん断速度は粘度とせん断ストレスの関数として表すことができる。彼らは両関係式の粘度を相関することで気泡塔内のせん断速度のガス空塔速度依存性を推定した。このように、気泡塔内のせん断速度の推定式は、気泡塔の形状やスケール、液相の組成、測定条件などにより大幅に異なる値を示すため適用性には限界がある (Chisti and Moo-Young, 1989)。また、気泡塔のガス分散板近傍では高い酸素移動容量係数 (Contreras *et al.*, 1999) とせん断ストレスが観測されており (Maveddat *et al.*, 2014)、分散板近傍で増大するエネルギーは細胞死滅速度と関連があることが報告されている (Liu *et al.*, 2013)。すなわち、気泡塔内部で発生するせん断速度には分布が存在する。これらより、気泡塔の装置特性、液相組成、操作条件に依存しないせん断速度の定量法が必要とされている現状にある。

1-2. 本研究の目的・構成

上述のように、リポソームの機能を規定する特性のひとつとして、脂質膜の透過選択性が挙げられる。リポソーム内に構築された酵素反応系では、酵素活性の安定性が著しく増大する場合があるが、親水性基質に対する脂質膜の高い透過抵抗のため触媒反応速度が著しく低下する。液体せん断ストレスの発生はバイオリクター等の実用反応器において不可避である。本研究では、せん断ストレスを利用したリポソームの構造と膜透過性をはじめとする諸機能の制御について明らかにするとともに、それらを利用した合理的な触媒反応プロセスの構築を目的とする。具体的には、これまで報告例が著しく少ない比較的小さな粒子径をもつ一枚膜リポソームの構造・機能と液体せん断ストレスの関係を明らかにするとともに、これに基づいて、従来法では困難であった気泡塔内混相流のせん断速度の実測及びせん断ストレスに対する酵素とリポソームの構造変化を利用した高効率触媒反応場の構築について検討する。本論文は緒

Table 1-2 Correlation equation of between gas superficial velocity and shear rate.

Bubble column	Correlation	Reference
Normal bubble column (NBC) (Diameter $D = 0.15$ m, Height $H = 1.8$ m)	$\gamma = 5000 U_G$ ($U_G = 0.04$ - 0.1 m/s)	Nishikawa <i>et al.</i> (1977)
NBC ($D = 0.14$ m, $H = 3.9$ m)	$\gamma = 1500 U_G$ ($U_G = 0.008$ - 0.064 m/s)	Henzler (1980)
NBC ($D = 0.14$ m, $H = 2.7$ m)	$\gamma = 2800 U_G$ ($U_G = 0.02$ - 0.08 m/s)	Schumpe and Deckwer (1987)
External loop airlift bubble column (ELBC) (Volume $V = 40$ dm ³ , diameter of riser $D_R = 0.194$ m and downcomer $D_D = 0.064$ m, $H = 1.4$ m)	$\gamma = 14800 U_G^2 - 351 U_G + 3.26$ ($U_G = 0.004$ - 0.06 m/s)	Shi <i>et al.</i> (1990)
ELBC ($V = 700$ dm ³ , $D_R = 0.225$ m, $D_D = 0.225$ m, $H = 6.2$ m)	$\gamma = 24392 U_G^2 - 11.1 U_G + 14.9$ ($U_G = 0.0018$ - 0.07 m/s)	Al-Masry (1998)
ELBC ($V = 35$ dm ³ , $D_R = 0.0095$ m, $D_D = 0.06$ m)	$\gamma = 8 U_G / (t(1-\epsilon))((1+3n)/(4n))$ ($U_G = 0.003$ - 0.025 m/s)	Shamiou <i>et al.</i> (1998)
NBC ($D = 0.125$ m, $H = 0.6$ m)	$\gamma = (7.38 \times 10^{-3} \times U_G^{0.11} \times K^{-0.389})^{(1/n-1)}$ ($U_G = 0$ - 0.23 m/s)	Thomasi <i>et al.</i> (2010)
Concentric-tube airlift bioreactor (CTA) ($D_R = 0.075$ m, $D_D = 0.125$ m, $H = 0.6$ m)	$\gamma = (6.65 \times 10^{-3} \times U_G^{0.227} \times K^{-0.432})^{(1/n-1)}$ ($U_G = 0$ - 0.23 m/s)	Thomasi <i>et al.</i> (2010)
Split airlift bioreactor (SA) ($D = 0.125$ m, $H = 0.6$ m)	$\gamma = (6.95 \times 10^{-3} \times U_G^{0.14} \times K^{-0.385})^{(1/n-1)}$ ($U_G = 0$ - 0.23 m/s)	Thomasi <i>et al.</i> (2010)

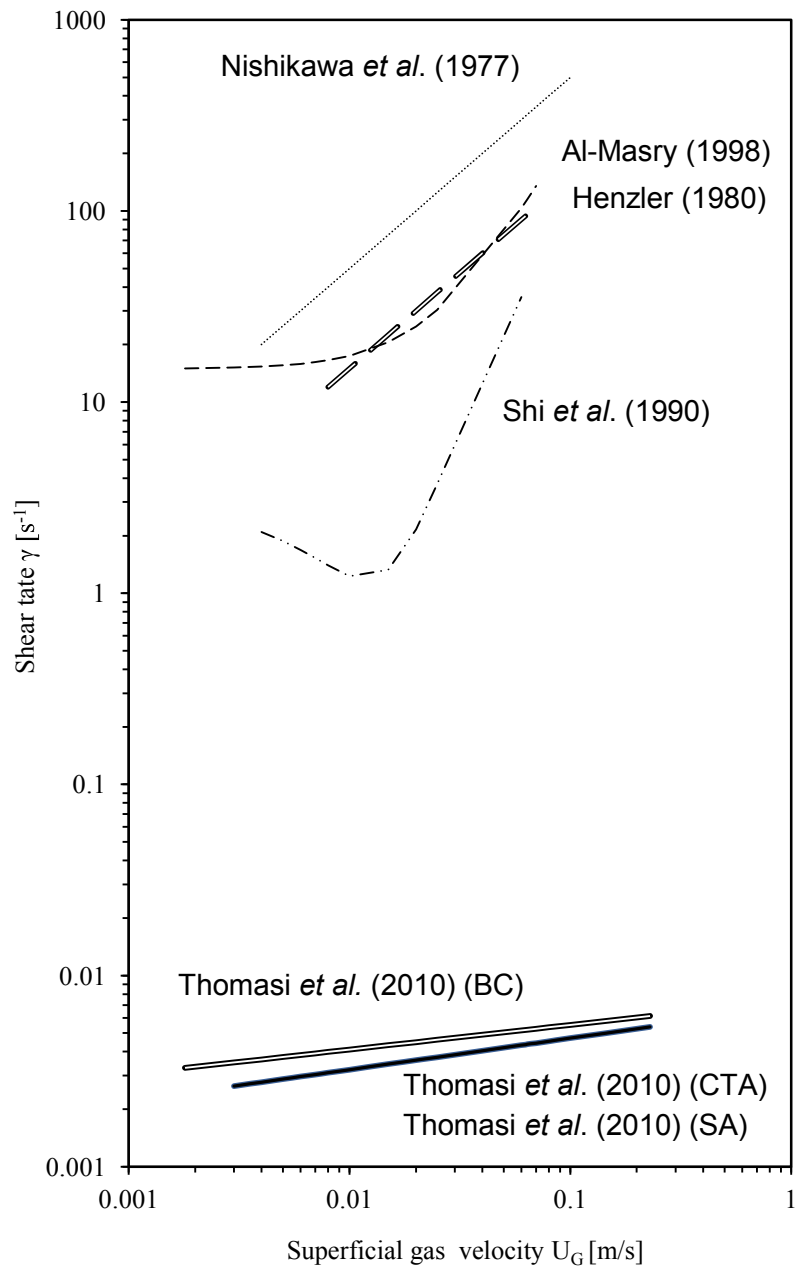


Figure 1-2 Shear rate γ as a function of the superficial gas velocity U_G .

論と結論を含めて5章で構成される。各章の関係を **Figure 1-3** に示す。各章の内容は下記のとおりである。

第1章では、脂質二分子膜と酵素封入りポソームの基本的な特性、せん断ストレスに対する酵素分子と脂質膜の応答性に関する従来の知見、気泡塔バイオリアクターの操作においてせん断速度を測定することの重要性及び本研究の背景、目的、論文の構成について述べている。

第2章では、直径400 nm以下のリポソームの膜透過性に及ぼす液体せん断ストレスの効果について述べている。リポソーム膜を介した親水性蛍光色素 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) の透過性を40-55 °Cで負荷されたせん断ストレス条件下で実測した。定義されたせん断場を形成させるためにコーン・プレート型粘度計を使用した。温度、せん断速度、リポソーム径(101-323 nm)の各特性とCFの膜透過係数の関係を明らかにした。さらに、負電荷脂質を含有するリポソームをカルシウムイオン共存下でクラスター化させる手法を開発するとともに、せん断ストレスがクラスターの構造と内部の脂質膜透過性に及ぼす影響を明らかにした。

第3章では、せん断速度に依存するリポソーム膜透過性に基づいて気泡塔内で発生するせん断速度を推定する方法について述べている。スケールと形状が異なる外部循環式エアリフト型気泡塔及び標準型気泡塔にCF封入りポソームを懸濁して、各気泡塔内のせん断速度の推定を行った。この推定に有用なリポソームとして、気泡との相互作用が小さい負電荷リポソームを提案している。この手法に基づき、ライザー/ダウンカマー断面積比と塔高が種々異なる3種類の外部循環式気泡塔内のせん断速度を合理的に推定した。

第4章では、微小円管内で形成される層流場を利用した酵素封入りポソームの安定性と活性の制御について述べている。せん断流は380 μm以下の内径をもつ円管中に酵素封入りポソーム懸濁液を送液することで発生させた。本層流場では、第3章の気泡塔に比べて高いせん断ストレスが円管壁面近傍においてリポソーム膜に負荷される。せん断流中における脂質膜の構造変化及びリポソーム内包グルコースオキシダーゼの液本体への漏出について検討した。

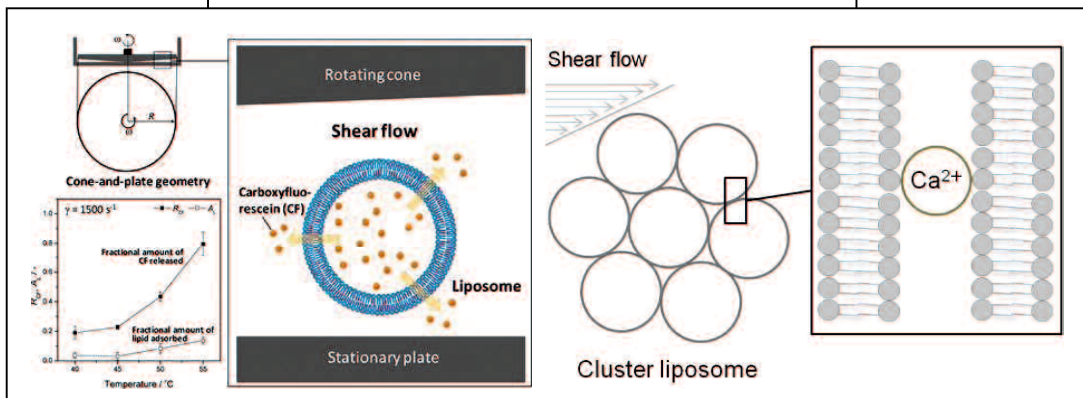
第5章では、リポソームのせん断ストレス応答性に基づく気泡塔反応器内せん断速度の定量とリポソーム系酵素反応の連続的加速化に関する結論を述べている。

本論文では、以上のように、酵素封入りポソームのせん断ストレス応答性に基づき、多様なバイオリアクター内の流動特性に応答して活性が制御される、新しい作動原理をもつ生体触媒の開発やせん断ストレスに対して細胞構成要素が示す機能的応答の理解にもつながる知見を述べる。

第1章
緒論

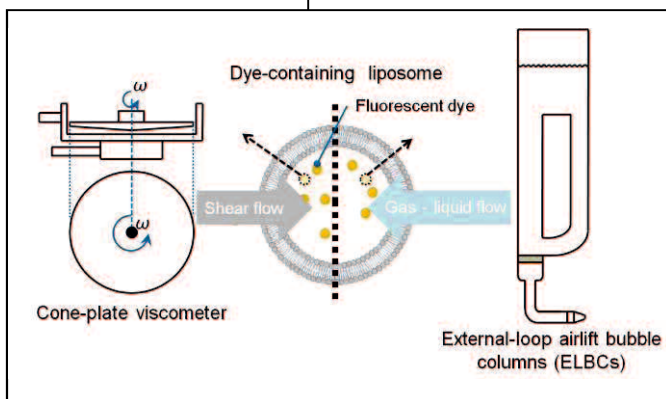
第2章

せん断流中のリポソームおよびクラスターリポソーム懸濁液の膜透過性と安定性



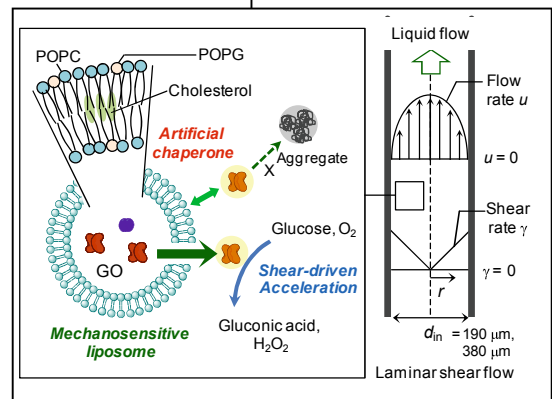
第3章

リポソームの構造変化を利用した
気泡塔内の平均せん断速度の測定



第4章

人工シャペロンとしての
機械的ストレス感受性リポソームによる
せん断誘起型酵素触媒反応の加速化



第5章
結論

Figure 1-3 本論文の構成

第2章 せん断流中のリポソームおよびクラスターリポソームの膜透過性と安定性

2-1. 緒言

生体は圧力 (Louhivuori *et al.*, 2010; Yoshimura *et al.*, 2008) やせん断ストレス (Makino *et al.*, 2006) のような機械的刺激を認識して、シグナル伝達経路を介して様々な生物学上の出力に変換する。このメカノトランスダクションプロセスにおいて脂質膜は重要な役割を担う (Zhang *et al.*, 2011; Gudi *et al.*, 1998)。例えば、膜に再構成されたグルタミンヌクレオチド結合タンパク質 (G-proteins) はせん断ストレスが引き金となる構造変化により活性化される (Gudi *et al.*, 1998)。また、せん断ストレスは血管内皮細胞を介した組織と血液間の溶質の移動を促進するために重要である (Tarbell *et al.*, 2010)。上記のように脂質膜は様々な生体现象の基盤として機能している。せん断ストレスは脂質膜が関連する生体材料の創製と機能制御における因子として重要となる。

リン脂質は水溶液中において集合して閉鎖二分子膜小胞 (リポソーム) を形成する。リポソームは薬物輸送担体 (Bailey and Berkland, 2009)、バイオセンサ (Liu and Boyd, 2013)、微粒子合成 (Tester *et al.*, 2011)、酵素触媒反応の制御 (Walde and Ichikawa, 2001; Yoshimoto *et al.*, 2004) などの多様な応用が期待されている。これらの応用では、直径が 50-500 nm であり粒子径分布が定義された単層ベシクル (Walde, 2004) が広く用いられている。リポソーム膜は高温条件下において酵素の構造と活性を安定化することが報告されている。この際リポソームのサイズが重要な役割を果たす (Yoshimoto *et al.*, 2007)。リポソーム内封入酵素触媒下の反応では、膜を介した基質の移動が律速過程となる (Chaize *et al.*, 2004; Yoshimoto *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007)。したがって、リポソームに内包された酵素は反応性と基質選択性が見かけ上変化する (Treyer *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2004; Yoshimoto *et al.*, 2005)。実用的には、リポソーム内封入酵素はせん断ストレスが発生する血流や多相バイオリクター内で機能発現する必要がある (Yeow *et al.*, 2002; Saki *et al.*, 2011; Yoshimoto *et al.*, 2010)。したがって、上記の粒子径範囲 (50-500 nm) のリポソームの膜透過性に及ぼすせん断ストレスの影響を理解することが重要となる。

リポソームを含む様々なベシクルのせん断ストレス条件下における構造的応答は、変形現象等に関して研究されている (Takagi *et al.*, 2009; Foo *et al.*, 2004; Shahidzadeh *et al.*, 1998; Robbins *et al.*, 2011; Noguchi and Gompper, 2005)。一方、せん断ストレスに誘起される脂質膜の透過性の増加は機能的な応答として報告されている (Chakravarthy

et al., 1992; Hallow *et al.*, 2008)。Chakravarthy and Giorgio (1992) はリポソーム膜を介したカルシウムイオンのような低分子量物質の移動が液体せん断ストレスにより促進されることを報告している (Giorgio and Yek, 1995)。上記の現象のほとんどは 500 nm から数 10 μm の粒子径をもつジャイアントベシクル (Walde, 2004) について報告されている。リポソーム内の酵素反応速度を制御して実用化的に有用なものにためには、より粒子径が小さなリポソームに対する親水性分子の膜透過性を増大させる必要がある。

リポソームは熱力学的に準安定な構造であることから、全自由エネルギーを低下させるために凝集する傾向がある。リポソーム懸濁系のこの特徴は生物医学的および生化学的応用において重要である。例えば、リポソームの凝集は、別々の薬物をカプセル化できる多区画キャリア (Paleos *et al.*, 2012) や薬物担体全体のサイズを増大させることによりマクロフェージへの標的化 (Sabín *et al.*, 2012) が可能な材料の開発へ応用できる。生物工学的な観点から、水相からのリポソームの回収は、それらの凝集体の形成により促進される。これは、実用的な反応プロセスにおける酵素封入リポソームの応用においてきわめて重要となる (Yoshimoto *et al.*, 2010)。

リポソーム系の応用では、脂質二分子膜の透過性は生体分子や薬物の取り込み、放出制御において重要な役割を果たす。リポソーム系酵素反応では、基質分子は脂質膜を透過して液本体からリポソーム内部へ到達する必要がある。したがって、リポソームは凝集状態であっても十分な膜透過性を示す必要がある。リポソーム凝集体の形成は膜の物理化学的状態やリポソーム懸濁系の見かけの比表面積を変化させるため脂質膜の透過性に影響を及ぼす。脂質膜透過速度はリポソーム分散溶液の総表面積に比例するため、比表面積の低下は透過性の減少を引き起こす (Sada *et al.*, 1990)。これまでに、リポソームのコロイド安定性の制御と予測については、イオン (Sabín *et al.*, 2007)、ポリイオン (Cametti, 2008)、合成ポリマー (Thevenot *et al.*, 2007)、タンパク質 (Dimitrova *et al.*, 1997; Kayal *et al.*, 2012) の共存下において広範に研究されている。しかしながら、リポソーム凝集体の形成を実用的な観点から検討した報告はほとんど知られていない。実用的な条件下でのリポソーム凝集体の特性を理解するために、リポソーム膜の構造および機能の機械的応答が重要となる。流れと混合による液体せん断ストレスの形成はリポソームの変形および透過を誘導する (Bernard *et al.*, 2005; Chakravarthy and Giorgio, 1992)。せん断ストレスにより誘起されるリポソームの構造や機能は興味深い点である。

本章では、リポソーム膜を介した親水性色素 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) の透過性を 40-55 °C で負荷されたせん断ストレス条件下で検討した。リポソーム懸濁液に対して異なるせん断速度を発生させるためにコーン・プレート型粘度計を使用した。CF 封入リポソーム (CFL) の直径は 101-323 nm として、リポソーム膜を介した CF の透過性をせん断ストレスによって制御する手法を明らかにした。さらに、リポソームクラスター生成およびせん断流または静止液中におけるクラスターリポソームの透過性にに基づき可逆的に形成された脂質膜凝集体の特性を検討した。Ca²⁺の添加によりリポソームのクラスター化を誘導するために双性脂質、負電荷脂質とコレステロールから構成されるリポソームを採用した。

2-2. 実験

2-2-1. 材料

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) は NOF (Tokyo, Japan) から購入した。Cholesterol と塩化カルシウム二水和物 (CaCl₂·2H₂O) は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。5(6)-Carboxyfluorescein (CF, Mr = 376.3) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO) から購入した。1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) は Invitrogen (Carlsbad, CA) から購入した。全ての試薬は購入した状態で使用した。水は水浄化システム Elix 3UV (Millipore, Billerica, MA) を用いて逆浸透膜で濾過、脱イオン、滅菌した。

2-2-2. 5(6)-Carboxyfluorescein (CF) 封入リポソーム (CFL) の調製

POPC (50 mg) はクロロホルム 4.0 mL によって 100 mL のナス型フラスコ内で溶解した後、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した。次に POPC をジエチルエーテル 4.0 mL に溶解し、溶媒を除去した。この操作を 2 回繰り返した。得られた POPC 膜は残留有機溶媒分子を除去するために凍結乾燥処理した。乾燥 POPC 膜は 100 mM CF を含む pH 7.4 の 50 mM Tris-HCl/50 mM NaCl 緩衝液 2.0 mL (Tris buffer) により水和した。水和後、凍結 (-80 °C、7 min)・融解 (37 °C、7 min) 処理 (7 サイクル) により粒子径が大きな多重層ベシクル (MLVs) を形成させた。MLV を単層ベシクルにするために、MLV 懸濁液を押し出し形成装置 LiposoFast-Basic Avestin Inc. (Ottawa, Canada) (MacDonald *et al.*, 1991) を使用して 50, 100, 200 or 400 nm の平均細孔径をも

つポリカーボネート膜を 11 回通過させた。リポソーム未封入の CF 分子は Sepharose 4B カラム (1.0 cm (i.d.) × 20 cm) によって CFL 懸濁液から分離した。CFL 懸濁液中の POPC 濃度は酵素法によって定量した (Takayama *et al.*, 1977)。負に帯電したリポソームを調製するために、POPC (50 mol%)、POPG (20 mol%)、Cholesterol (30 mol%) および、POPC (5 mol%)、POPG (65 mol%)、Cholesterol (30 mol%) の脂質混合物からなる乾燥脂質膜を 2.0 mL の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) で水和して使用した。

2-2-3. せん断流の形成

流体の流れの速度勾配 (せん断速度 $\dot{\gamma}$) により発生する単位面積当たりの力がせん断ストレス τ である。せん断ストレスをせん断速度で除した値が粘度 μ と定義されている ($\tau = \mu\dot{\gamma}$)。本論文では流動場を規定するために $\dot{\gamma}$ を用いている。 μ は流体の組成や温度で変化する。 τ はリポソームや酵素の構造変化を扱う場合に用いている。

せん断流はコーン・プレート型粘度計 DV-II+Pro (Brookfield Engineering Laboratories (Middleboro, MA)) を使用して発生させた。コーンとプレートはステンレス鋼製である。コーン (Model CPE-40) の角度 θ と半径 R はそれぞれ 1.40×10^{-2} rad と 2.4 cm である。CFL 懸濁液 (0.5 mL) はコーンとカップのプレート表面の間の空間に導入した。カップの温度は恒温水を循環させて制御した。粘度計内での角速度 ω は 0 から 20.9 rad/s の範囲で制御した。CFL 懸濁液は回転コーンと静止プレート間でせん断された。任意の半径 r における接線速度 v_t ($v_t = \omega r, r \leq R$) に及ぼす r の増加の影響は位置 r におけるコーンの高さ h の増加 ($h = r\theta$) によって補正される。このように、せん断速度 $\dot{\gamma} (= \omega/\theta)$ は、 r に無関係に均一となる。最大 ω では $\dot{\gamma} = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ が得られる。最大 $\dot{\gamma}$ においてせん断ストレス τ は 40 と 55 °C でそれぞれ 1.1 と 0.83 Pa である。

2-2-4. CF 封入リポソームからの CF 膜透過性の測定

CFL または CFL クラスター ([lipid] = 1.0 mM) を懸濁した Tris 緩衝液は恒温槽 (25 °C) で静置後 25 °C で 3 h、上記の粘度計においてせん断した。初期体積 V_0 の CFL 懸濁液を粘度計あるいはガラス製試験管内に入れた ($V_0 = 0.5$ mL (粘度計)、 $V_0 = 1.0$ mL (試験管))。初期 CF 濃度 C_0 と透過平衡時の CF 濃度 $C_{\infty,0}$ を蛍光分光光度計 FP-750 (JASCO, Tokyo, Japan) を用いて測定した。 $C_{\infty,0}$ はリポソームを 40 mM コール酸ナトリウムで溶解して測定した。励起波長と蛍光波長はそれぞれ 490 nm と 517 nm とした。測定温度は 25 ± 0.3 °C とした。CF 分子はリポソーム内に高濃度で封入されることに

より自己消光する。任意の時間 t に CFL 懸濁液を $50 \mu\text{L}$ 採取し、Tris 緩衝液で 20 倍または、100 倍希釈した。その後、CF 濃度 C_t を測定した。40 mM のコール酸を加えて任意の時間 t における全 CF 濃度 $C_{\infty,t}$ を測定した。高温条件下における水の蒸発による CFL 懸濁液の濃縮を補正するための係数 $f = C_{\infty,0}/C_{\infty,t}$ を用いて、CFL からの CF 漏出率 R_{CF} を $R_{CF} = (f C_t - C_0)/(C_{\infty,0} - C_0)$ として算出した。CF に関する非定常状態の物質収支は、漏出のための駆動力がリポソーム内外の CF 濃度差とすると $(dC_t/dt)V_L = P_{CF}a(C_{in} - C_t)V_S$ と記述できる。 P_{CF} は CF の膜透過係数を示し、 a はクラスター化していないリポソームの比表面積($a = 6/D_p$)である。 V_L および V_S は液本体およびリポソーム内部の水相の総体積を表す ($V_S \ll V_L$)。リポソーム周囲の液境膜物質移動抵抗はリポソームの粒子径がかなり小さいために無視することができる (Sherwood number $Sh \approx 2$) (Chakravarthy and Giorgio, 1992)。 C_{in} は $C_{\infty}(V_L + V_S) = C_t V_L + C_{in} V_S$ として C_t と相関できる。したがって、上記の物質収支より次の関係が得られる (Yoshimoto *et al.*, 2007)。

$$-\ln(1-R_{CF}) = P_{CF} a t \quad (1)$$

2-2-5. コーンとプレートへの脂質の吸着の測定

固体表面への CFL の吸着を定量した。CFL 懸濁液 (0.5 mL) は初期脂質濃度 $C_{P,0}$ で粘度計に導入した。1 h 後、CFL 懸濁液をマイクロピペットにより回収して脂質濃度 $C_{P,t}$ を測定した。固体表面への脂質の吸着率 A_L は脂質の物質収支に基づいて $A_L = 1 - f$ ($C_{P,t}/C_{P,0}$) より算出した。プレート鋼表面に吸着した脂質を回収するために、プレートを 2 分間 $400 \mu\text{L}$ の Tris 緩衝液で洗浄した。得られた脂質懸濁液について、粒子径 (下記参照) と脂質濃度をそれぞれ測定した。

2-2-6. リポソームの粒子径分布および ζ 電位の測定

リポソームの平均粒子径 D_p と粒子径分布は大塚電子 (Osaka, Japan) の測定装置 ELSZ-2 plus を使用して動的光散乱法 (DLS) により測定した。測定装置は光源として 160° の一定角度における 660 nm の波長の半導体レーザーを用いている。CFL の粒子径分布は Marquardt アルゴリズムを用いて得た。CFL の拡散係数と多分散指数 PI は、キュムラント解析を用いて決定した。 D_p 値は、屈折率 1.33 を用いて、Einstein-Stokes 式に基づき計算した。リポソームの ζ 電位は 15° の一定角度で上記機器を使用してレーザードップラー法により測定した。Smoluchowski 式は ζ 電位値を計算するために適

用した。リポソーム ([lipid] = 1.0 or 0.5 mM) と Ca^{2+} の混合系の測定は、系が平衡状態に達する混合 20 min 後に行った。測定は $25 \pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$ において 3 mL の体積をもつ石英セル中に行った。マイクロセルは脂質濃度が低濃度のサンプルを測定するために使用した。リポソーム懸濁液を希釈するために使用した Tris 緩衝液は $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ の細孔径を有する膜 (Milex PVDF, Millipore, Billerica, MA) を通して濾過した。全ての測定は 3 度行った。

2-2-7. 濁度測定

リポソーム凝集体の形成を評価するために、リポソームを懸濁させた Tris 緩衝液の波長 500 nm における濁度 (OD_{500}) を攪拌しながら $25 \pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$ で測定した。測定は Peltier 温度制御装置を装備した分光光度計 V-550 (Jasco, Tokyo, Japan) を用いて行った。全ての測定は 3.0 mL のサンプル体積で 1.0 cm の光路長を有する石英セル中において行った。リポソームとの相互作用の可逆性を検討するために、 CaCl_2 溶液 (1.0 M) を 40~80 mM の範囲で 20 min 毎に段階的に添加して、リポソーム懸濁液 ([lipid] = 1.0 mM) の Ca^{2+} 濃度を変化させた。さらに、リポソーム懸濁液の 1/2 体積 (1.5 mL) を Tris 緩衝液と交換して脂質濃度 0.5 mM、 Ca^{2+} 濃度 40 mM とした。

2-2-8. リポソームの膜流動性の測定

リポソーム膜中に組み込んだ DPH の定常蛍光偏光度 P は脂質の回転運動に関連したリポソームの膜流動性 (Blatt and Vaz, 1986) を評価するために次のように測定した。リポソーム懸濁液とジメチルホルムアミド (DMF) に溶解した DPH を混合して脂質濃度 (0.5 mM) と DPH 濃度 ($2.0 \text{ }\mu\text{M}$) の混合液とした。リポソーム膜へ DPH 分子が配向するまで、暗所で 15 h 静置した。混合液中の DMF 濃度は 0.4 v/v% であるため、膜特性に及ぼす DMF の影響は無視できる。次に、励起・分析偏光子を装備した蛍光分光光度計 (FP750, Jasco, Japan) で蛍光偏光を測定した。励起、蛍光波長はそれぞれ、360 と 430 nm である。上記のリポソーム-DPH 混合液を垂直偏光で励起して、平行蛍光強度 I_{\parallel} と垂直蛍光強度 I_{\perp} を測定した。同一の試料を平行偏光により励起して、平行蛍光強度 i_{\parallel} と垂直蛍光強度 i_{\perp} を測定した。 $P = (I_{\parallel} - GI_{\perp}) / (I_{\parallel} + GI_{\perp})$ として P 値を決定した。ここで補正係数 G は $G = i_{\perp} / i_{\parallel}$ として算出した。 P 値の逆数を膜流動性の指標とする。

2-2-9. リポソームクラスターの理論解析

近づいた2つのリポソームの距離 d の間の相互作用はファンデルワールス力と静電的相互作用および水和相互作用を含む修正された Derjaguin-Laudau-Verwey-Overbeek (DLVO) 理論を用いて解析した。3.7 nm の膜厚 l (Dorovska-Taran *et al.*, 1996) と半径 (97 nm) をもつ 2 つのリポソームの引力であるファンデルワールス力 $V_w(d)$ は次式で表される (Tadmor, 2001):

$$V_w(d) = -\frac{AR}{12} \left[\frac{1}{d+2l} - \frac{2}{d+l} + \frac{1}{d} \right] - \frac{A}{6} \ln \frac{d(d+2l)}{(d+l)^2} \quad (2)$$

ここで A は、Hamaker 定数で 2.5×10^{-21} J とした (Sabín *et al.*, 2007)。静電斥力 $V_e(d)$ は次式で与えられる (Zhang *et al.*, 2007):

$$V_e(d) = 2\pi\epsilon R\psi^2 \ln [1 + \exp(-\kappa d)] \quad (3)$$

ここで ϵ は絶対温度 $T = 298.2$ K における水の誘電率、 ψ は測定された ζ 電位を示す。 κ はデバイ長の逆数を表し $\kappa = [2N_A I e^2 \rho_0 / (\epsilon k_B T)]^{1/2}$ と計算できる。ここで、 N_A はアボガドロ数、 k_B はボルツマン定数、 e は電子の電荷、 ρ_0 は媒体の密度である。 I はイオン強度 ($I = (1/2)\Sigma(m_i z_i^2)$) を表し、 m_i はモル濃度、 z_i は電荷である。DLVO ポテンシャル $V_D(d)$ は $V_D(d) = V_w(d) + V_e(d)$ として得られる。さらに、水和斥力ポテンシャル $V_h(d)$ も考慮した (Molina-Bolívar *et al.*, 1997)。

$$V_h(d) = \pi R N_A C_h C_e \lambda^2 \exp(-d/\lambda) \quad (4)$$

Eq. (4) において、 C_h と C_e は水和定数と塩濃度を表す。 $N_A C_h$ 値は 2.5×10^5 J/mol を使用した。 λ は減衰長さ $\lambda = 0.26$ nm である (Sabín *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 1992)。総ポテンシャル $V_T(d)$ は $V_T(d) = V_w(d) + V_e(d) + V_h(d)$ のように上記3つのポテンシャルの和として計算される。

2-3. 結果及び考察

2-3-1. CFL とコーン・プレート鋼表面間の相互作用

コーン・プレート型粘度計内においてステンレス鋼表面は CFL 懸濁液に対して大きな接触面積を有する。CFL は流体とステンレス鋼表面の両方の影響を受けている。CFL とステンレス鋼表面間の相互作用を調べるために、静止した粘度計内において CFL 懸濁液を 40-55 °C で 1 h 静止して CFL の脂質吸着量 (A_L) と CFL からの CF 漏出率 R_{CF} を測定した。CFL の初期 D_p は 117 nm で単分散であった ($PI = 0.087$)。 A_L 値は温度上昇とともに増加して 55 °C において最大 A_L 値 0.31 を得た (**Figure 2-1**)。図では、 R_{CF} 値は温度に著しく依存しており、55 °C で $R_{CF} = 0.79$ となった。25 °C の少量の水を加えることによってプレート表面に吸着した脂質を再懸濁し、非吸着 CFL 懸濁液を回収した。このように得られた脂質懸濁液について DLS 測定を行った。この測定は非吸着 CFL、再懸濁脂質懸濁液共に再度せん断することなく行った。得られた結果を **Figure 2-2** に示す。再懸濁させた脂質は高い多分散指数 ($PI = 0.247$) を示し、大きな凝集体 ($4 \mu\text{m} <$) を含んでいることが示された。結果として、この脂質凝集体は未処理の CFL と比較して著しく異なる粒子径分布を示した。未吸着 CFL の主要な分布ピークの粒子径は未処理 CFL と比べて僅かに大きくなっている。ステンレス鋼に対する CFL 吸脱着の温度依存性については詳細に検討する必要があるが、CFL 膜の構造の崩壊は吸着によって生じる可能性が高いと考えられる。ステンレス鋼はリン脂質を含むリン酸化された有機化合物と相互作用することが知られている (Tuytten *et al.*, 2006)。ステンレス鋼とリン脂質の相互作用は、脂質分子のリン酸基と疎水性アシル鎖の両方が関与する。また、詳細なメカニズムは不明であるが、リン脂質は温度依存的に鉄と複合体を形成することが報告されている (Wang *et al.*, 2003)。本研究の結果は、高温条件下で誘起される脂質膜構造の変化により、POPC 分子のアシル鎖と疎水性のステンレス鋼表面との疎水性相互作用が促進されて、膜の構造崩壊につながることを示している。吸着した脂質を再懸濁することで、高い多分散性と大きな多重膜小胞を含む様々なサイズのリポソームが形成される。CFL の吸着により CF の漏出が完全に起こると仮定すると、未吸着 CFL からの CF 漏出率 (R_{CF}) が $R_{CF,B} = R_{CF} - A_L$ によって得られる。40、55 °C における $R_{CF,B}$ を **Table 2-1** に示す。試験管で決定した $R_{CF,B}$ 値も比較のために示す。40 °C で、 A_L 値はコーン・プレート形状において 0.092 (**Figure 2-1**) と低く、 $R_{CF,B}$ 値は試験管内における値 (**Table 2-1**) とほぼ一致している。一方、55 °C ($A_L = 0.31$) では、試験管内に比べてコーン・プレート系において著しく大きな $R_{CF,B}$ 値が得られている。上記の結果は、高温条件下のコーン・プレート粘度計内の静止液では、未吸着 CFL の特性がステンレス鋼表面から大きな影響を受けることを示している。

Table 2-1 The $R_{CF,B}$ values in the static liquid systems of cone-and-plate and test tube geometry.

Temperature / °C	$R_{CF,B} (= R_{CF} - A_L) / -$	
	Cone-and-plate ^a	Test tube ^b
40	0.061 ± 0.033	0.082 ± 0.012
55	0.49 ± 0.12	0.26 ± 0.01

^aThe values were calculated with the R_{CF} and A_L values shown in Figure 2-1.

^bPractically no adsorption of CFL was observed in the test tube geometry ($A_L \approx 0$).

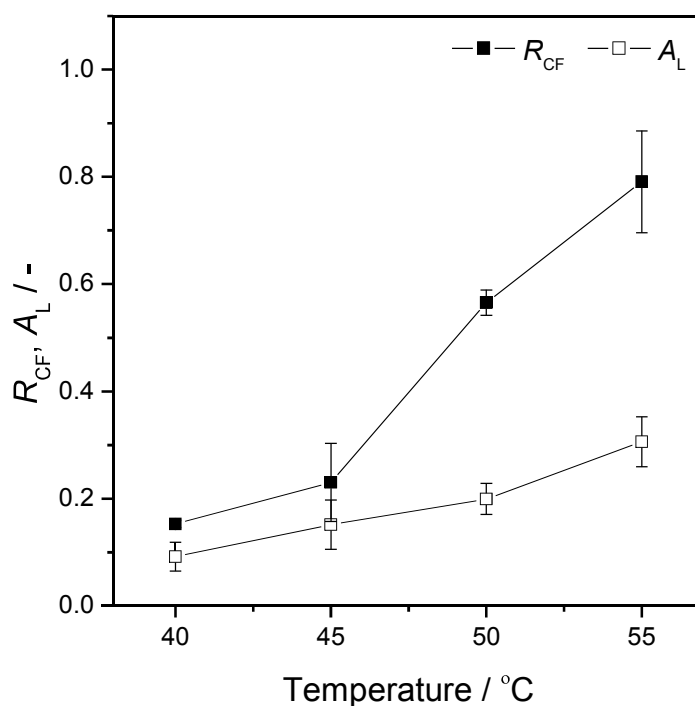


Figure 2-1 Fractional amounts of CF R_{CF} released from CFL and lipids A_L adsorbed to the surface of cone-and-plate, as a function of temperature obtained in the static liquid system ($\gamma = 0$) of non-rotating viscometer. Values are mean ± S.D. of three independent experiments.

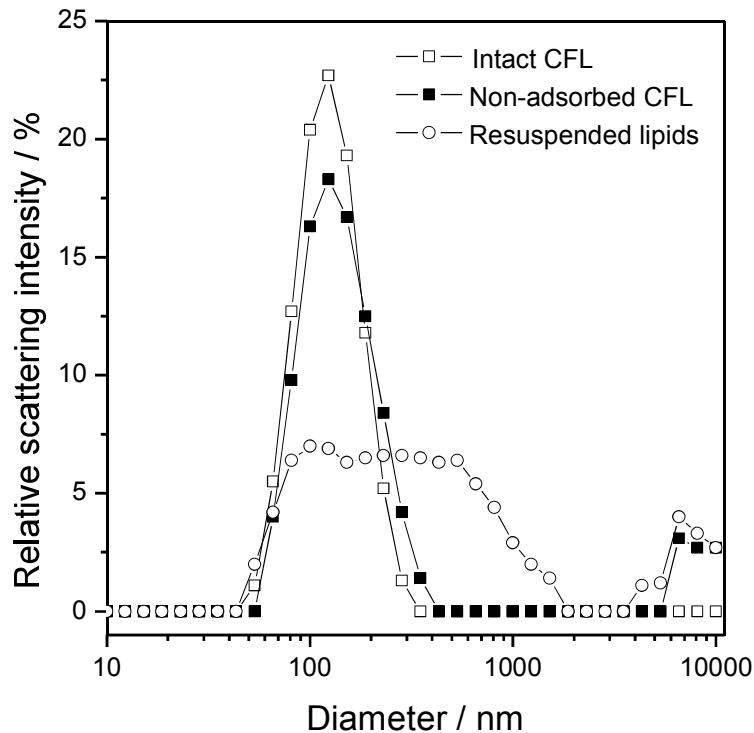


Figure 2-2 Representative size distribution of non-adsorbed CFL recovered from the viscometer and lipids adsorbed to the surface of cone-and-plate followed by being resuspended in the Tris buffer solution. The CFL was suspended at 55 °C in the non-rotating viscometer for 3600 s. The result for the CFL with neither shearing nor heat treatment (intact CFL) is also shown.

2-3-2. コーン・プレート型粘度計内における液体せん断ストレスと熱ストレスの特徴

流体せん断ストレスは回転コーンと静止プレートの間で発生する。せん断ストレスは 40-55 °C で CFL 懸濁液に負荷した。トルク M は、定常状態のせん断速度 ($\dot{\gamma} = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) において 1 h 測定された。任意の温度において、 M 値の初期の 5 min 間は $\dot{\gamma}$ 値がプログラムによって直線的に増加するために安定しない (**Figure 2-3**, inset)。5 ~ 60 min において高温領域では M 値はせん断時間の増加と共に次第に減少している。水の蒸発の影響がせん断ストレスに及ぼす影響を以下の様に解析した。粘度計では、水の蒸発が無視できる初期におけるせん断ストレス τ_{max} はコーン半径 ($r = 2.4 \text{ cm}$) のとき次式より得られる。

$$\tau_{\max} = \frac{M_{\max}}{(2/3)\pi R^3} \quad (5)$$

各温度での最大トルク M_{\max} は Figure 2-3 から得た。得られた τ_{\max} 値を Figure 2-4 に示す。一方、水の蒸発係数 f は CFL 懸濁液の 1 h における CF 蛍光の変化に基づき決定した。 f 値は 40 °C における 0.846 から 55 °C における 0.655 へ徐々に減少しており、初期体積 $V_0 (= 0.5 \text{ mL})$ の CFL 懸濁液では 34.5 % が 55 °C で蒸発していることがわかる。任意の f における液相に接触するコーン部の半径 $r (\leq R)$ は次式により与えられる。

$$r = \left\{ \frac{3(1-\nu)V_0 f}{2\pi\theta} \right\}^{1/3} \quad (6)$$

θ はコーンの角度 ($\theta = 1.40 \times 10^{-2} \text{ rad}$) そして、 ν はコーンとプレート中心の間の距離 13.3 μm を考慮した時の体積分率 ($\nu \sim 0.06$) である。この関係は総液相体積 fV_0 で最大の r 値を与えることに基づいている。例えば、 f が 0.655 のとき r 値は 2.19 cm になり、コーンの半径 ($R = 2.4 \text{ cm}$) より小さくなる。従って、コーンとプレートの間は CFL 懸濁液で満たされていない。1 h の連続操作時のとき、最小せん断ストレス τ_{\min} は次式で与えられる。

$$\tau_{\min} = \frac{M_{\min}\theta}{(1-\nu)V_0 f} \quad (7)$$

ここで、 M_{\min} は 1 h (Figure 2-3) で測定した最小トルクを示している。Eqs. (5) と (7) から決定される τ_{\max} と τ_{\min} を各温度で比較した (Figure 2-4)。 τ_{\min} 値は τ_{\max} 値に良く近似される。従って、高温において水の蒸発が生じてもほぼ一定のせん断ストレスが CFL 懸濁液に負荷され続けることがわかる。初期 5 min における R_{CF} 値はせん断下で 0.050、静止液で 0.040 ($\gamma = 0$ at 40 °C) であったことから、CF 漏出率は初期 5 min の不安定な状態 (Figure 2-3, inset) においてほぼ無視できることを確認した。

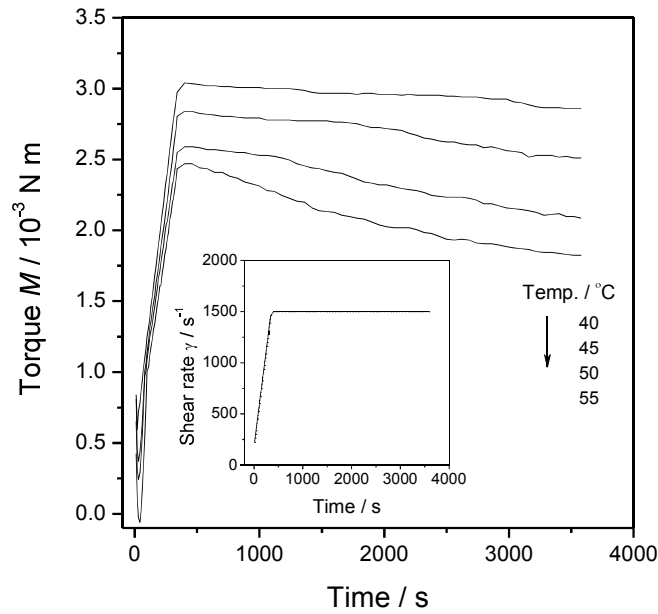


Figure 2-3 Representative time courses of torque M measured for CFL suspensions at 40, 45, 50 and 55 °C. Inset shows the programmed time course of shear rate at any temperatures.

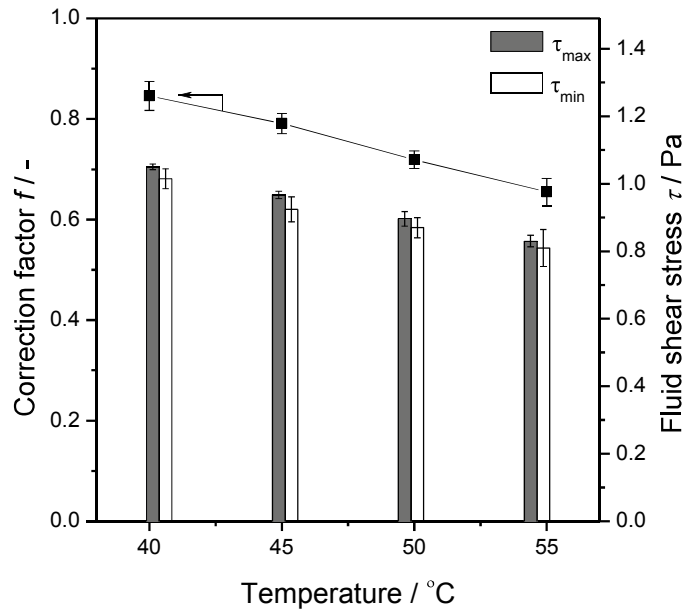


Figure 2-4 Correction factor f as a function of temperature. Values of shear stresses τ_{\max} and τ_{\min} , which are calculated with Eqs. (1) and (3), respectively are also shown as a function of temperature. Values are mean \pm S.D. of six independent experiments.

2-3-3. CFL 膜の透過性に対する液体せん断ストレスの影響

コーン・プレート粘度計は CFL 懸濁液に対して大きな接触面積を与える。CFL はステンレス鋼の固体表面と流体の両方の影響下に置かれる。流体のせん断速度 γ の効果は、55 °C において脂質の吸着 A_L と CFL からの CF 漏出 R_{CF} に基づき検討した。Figure 2-5 に結果を示す。 A_L と R_{CF} 値は 1 h の連続的なせん断処理後ただちに測定した。使用した CFL の初期 D_p は 101 nm であった。Figure 2-5 からせん断速度の上昇に伴い A_L 値は明らかに減少して、 $\gamma = 3.8 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ において最小の R_{CF} 値を示すことがわかる。CFL 膜の透過性は液体せん断ストレスとコーン・プレートとの相互作用の複合効果により決定される。一定温度での本実験においては、上記の 2 つの因子の相対的な重要性はせん断速度に依存して変化する。最大 $\gamma = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ において、表面への CFL 膜の吸着が明らかに減少した (Figure 2-5)。このことはせん断ストレスが CFL 膜の透過性を制御することを示している。一方、 $\gamma = 0$ に対応する静止液系では、 A_L 値が 0.31 となった。これは、コーン・プレート面と CFL の相互作用が膜構造を不安定化することを示している。計算された $R_{CF,B}$ 値をせん断速度の関数として Figure 2-5 の挿入図に示す。著しく大きな $R_{CF,B}$ 値 (0.92) が $\gamma = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ におけるせん断ストレス条件下で得られた。これらの結果はせん断ストレスが CFL の膜透過に影響することを明確に示している。CFL の吸着を最小限に抑制できる最大せん断速度において 40-55 °C における A_L と R_{CF} を決定した (Figure 2-6)。ここで使用した CFL は Figure 2-1 に示したものより僅かに大きい $D_p = 117 \text{ nm}$ をもつ。 R_{CF} 値は明らかに温度に依存して増加した。55 °C における R_{CF} 値は 40 °C における値より 4.2 倍大きい。これらの結果は CFL 膜の透過性に対するせん断速度の影響は高温条件ほど顕著になることを示している。40 °C において、コーン・プレート粘度計内で発生させたせん断ストレス条件下に CFL を懸濁して R_{CF} 値の経時変化を測定した (Figure 2-7)。図において、静止液系で得られた CF 漏出の時間経過を比較のために示した。 P_{CF} 値はせん断流条件下で 0.74 pm/s であった (Figure 2-3, inset)。試験管 (静止液) ではさらに小さな 0.13 pm/s の P_{CF} が得られた。

2-3-4. せん断流中の CFL 膜の安定性

せん断ストレス条件下における CFL 膜の物理的な安定性を調べるために、せん断流に懸濁後の非吸着 CFL について DLS 測定を行った (Figure 2-8)。初期と吸着した脂質を再懸濁した CFL についても同様の測定を行った。非吸着 CFL の粒子径分布は

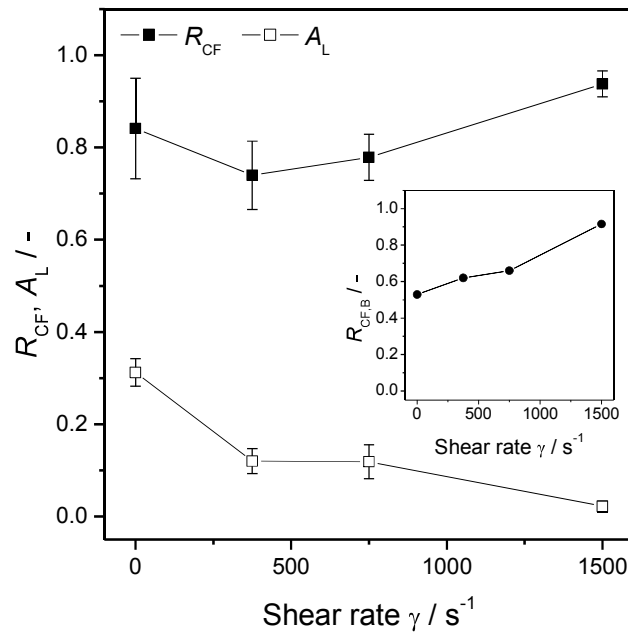


Figure 2-5 The A_L and R_{CF} values as a function of shear rate at 55 °C. Values are mean \pm S.D. of three independent experiments. Inset shows the $R_{CF,B}$ ($= R_{CF} - A_L$) value as a function of shear rate.

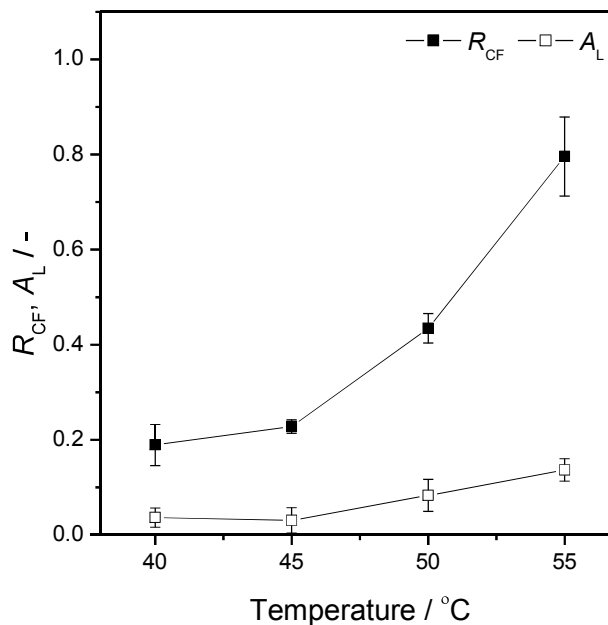


Figure 2-6 The A_L and R_{CF} values as a function of temperature obtained under the shear stress ($\gamma = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$). Values are mean \pm S.D. of three independent experiments.

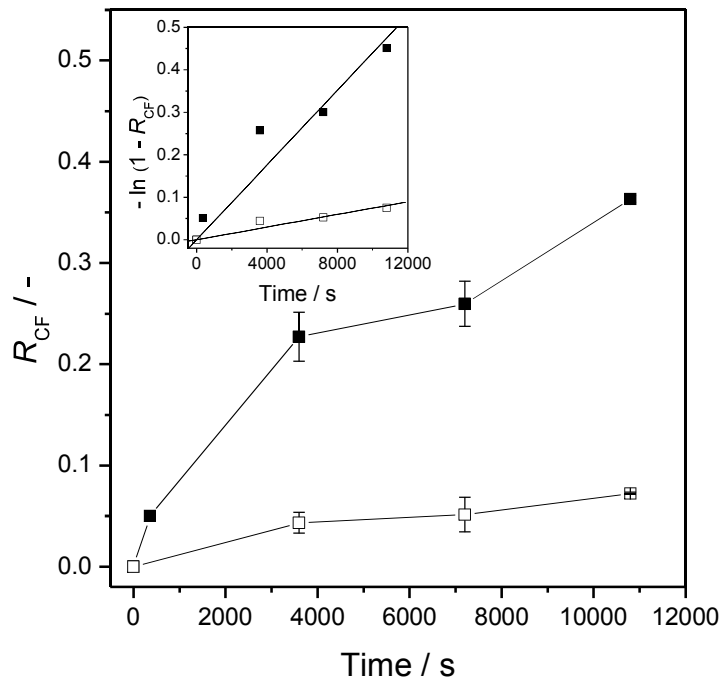


Figure 2-7 Time courses of R_{CF} for the CFL suspended at 40 °C in the shear flow at $\gamma = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ (closed squares) and in the static liquid system of test tube geometry (empty squares). Values are mean \pm S.D. of two or three independent experiments. Inset shows the plot of $-\ln(1 - R_{CF})$ as a function of time for the determination of permeability coefficient P_{CF} .

初期の CFL の分布とほぼ一致している。これより、CFL 膜はせん断ストレス負荷条件下でも安定に維持されていることがわかる。さらに、リポソーム懸濁液の水分の蒸発により誘起されるリポソーム内外の浸透圧の不均衡はリポソームのサイズにほとんど影響がないことがわかる。せん断処理中の CFL の粒子径分布を直接観察することは現在不可能であるが、非吸着 CFL の崩壊や合一は無視できると考えられる。一方、再懸濁脂質では 2 つの粒子径ピークがみられ、多分散性を示した (Figure 2-8)。せん断流によるリポソームの変形は液体せん断ストレスとリポソーム懸濁液の表面張力の 2 つの競合するストレス比率に対応するキャピラリー数 C_a に基づいて評価することができる (Bernard *et al.*, 2005)。 C_a 数は次式によって得られる。

$$C_a = \frac{\eta\gamma(D_p/2)^3}{\kappa} \quad (8)$$

ここで、 η と κ はそれぞれ、溶液粘度と脂質膜の曲げ剛性を表している。 κ 値を 30×10^{-20} J と仮定すると C_a 数を 5.0×10^{-4} J と推定することができる (Kaoui *et al.*, 2009)。 C_a 数が 1 よりはるかに小さいので、非吸着 CFL は、Figure 2-8 に示す結果からもわかるようにせん断流の中でほとんど変形しないことが示唆される。

脂質膜の構造的な秩序性と関係する物理的特性は膜の透過性に有意な影響をもつことが知られている (Xiang and Anderson, 1997)。Gudi *et al.* (1998) は流動性などの脂質膜の微小環境が液体せん断ストレスにより変化することを報告した。したがって、せん断流中における脂質二重層の局所的な構造変化が CFL の膜透過性に関与することが示唆される。Chakravarthy and Giorgio (1992) はカルシウムイオンのリポソーム膜透過はコーン・プレート粘度計内 ($\gamma = 27\text{-}2700 \text{ s}^{-1}$) のせん断ストレスにより促進されることを報告した。本研究の結果はカルシウムイオンよりもはるかに大きい分子量 ($M_r = 376$) をもつ CF 分子がせん断流中で脂質膜を透過することを実証した。

2-3-5. せん断流中における脂質透過性に及ぼす CFL サイズの影響

CFL からの CF の漏出挙動に及ぼす D_p 値の影響を検討した。 R_{CF} 値は初期 D_p の関数として Figure 2-9 にプロットした。せん断流は最大せん断速度 ($\gamma = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) で発生させたため粘度計への脂質の吸着は無視できる。CFL の D_p 値が 200 nm 以下では、 D_p 値の増加にともない CFL の比表面積 $a_s (= 6/D_p)$ が減少するため R_{CF} 値は減少する。323 nm の D_p をもつ CFL は $D_p < 200$ nm の CFL と異なる傾向を示す。CFL の粒子径分布は 55 °C、1 h のせん断流懸濁後に静止液系で測定した (Figures 2-10)。189 nm の初期 D_p をもつ CFL 懸濁液では、せん断流による粒子径分布の変化が著しく小さい (Figure 2-10A)。一方、323 nm の初期 D_p をもつ CFL 系では 187 nm と 1.9 μm の 2 つの粒子径ピークが確認でき、多分散である (Figure 2-10B)。55 °C でせん断流懸濁後、より大きな分布のピークが消滅して、単一のブロードな非対称のピークが確認できる。この結果は大きなサイズの CFL 膜はせん断ストレス負荷条件下では維持されないことを示している。このため 323 nm の D_p 値をもつ CFL が比較的大きな R_{CF} 値を示すものと考えられる (Figure 2-9)。

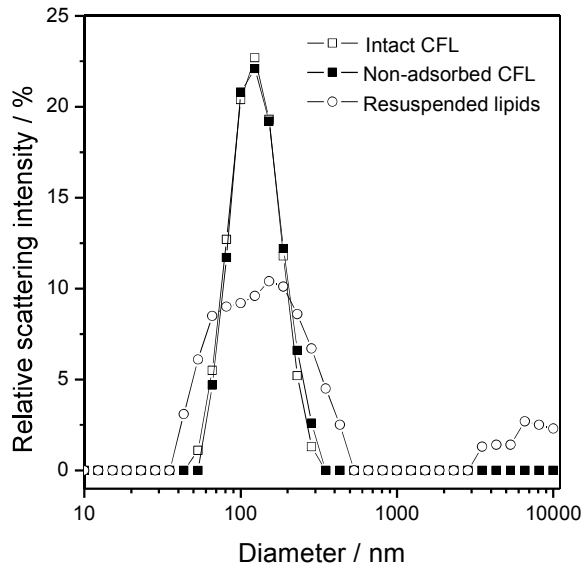


Figure 2-8 Representative size distribution of non-adsorbed CFL recovered from the viscometer and lipids adsorbed to the surface of cone-and-plate followed by being resuspended in the Tris buffer solution. The CFL suspension was sheared at $\gamma = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ for 1 h at 55 °C. The result for the intact CFL without shear treatment is also shown.

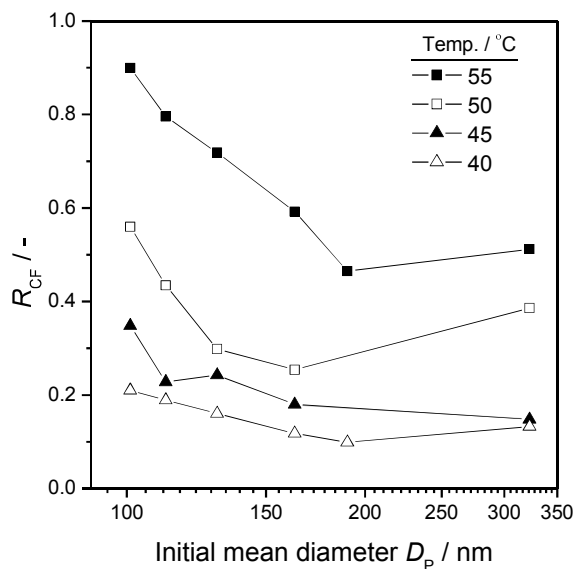


Figure 2-9 Effects of initial mean diameter D_p of CFL and temperature on the R_{CF} value at the fixed γ value of $1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$.

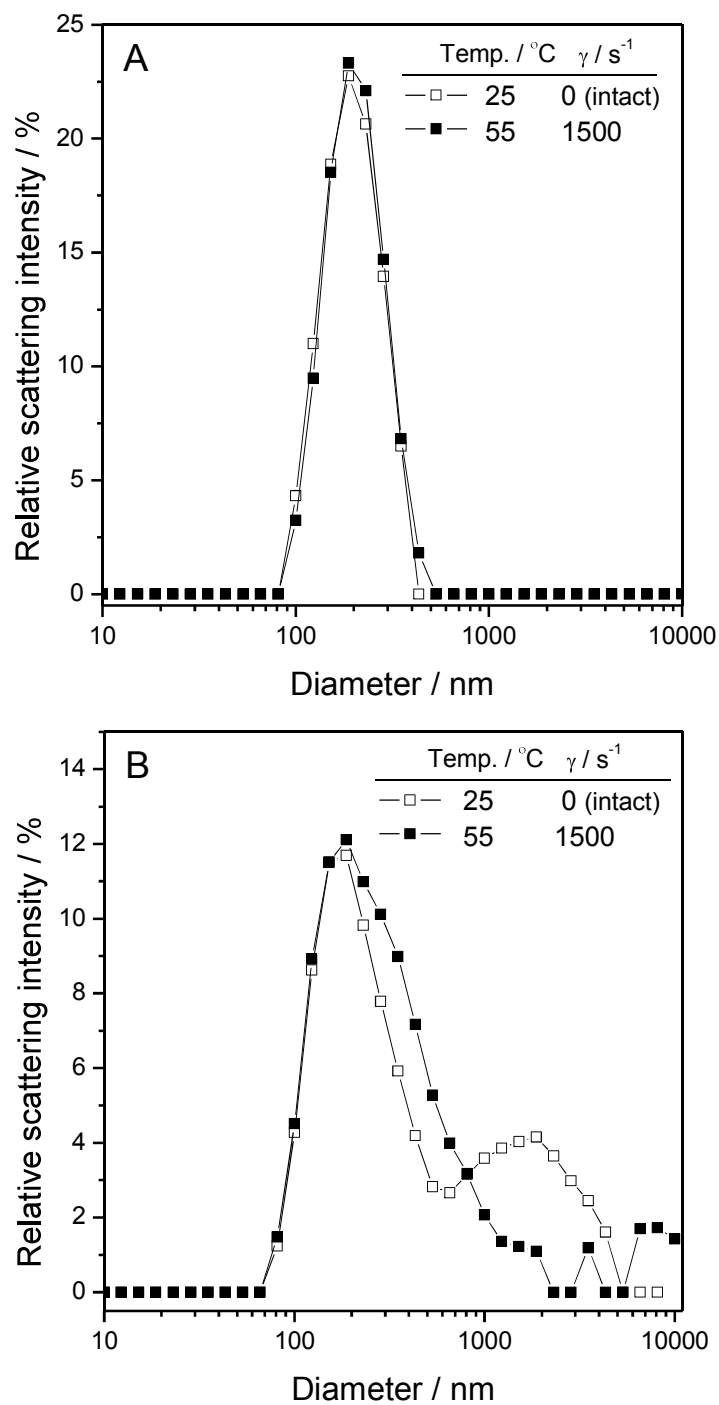


Figure 2-10 Representative size distribution of CFL with the initial D_p values of 189 nm (A) and 323 nm (B) with and without applying fluid shear stress ($\gamma = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, 55 °C).

2-3-6. Ca^{2+} に誘起される負電荷リポソームの凝集特性

Figure 2-11A に種々の Ca^{2+} 濃度条件下、25 °Cにおける POPC/POPG/Cholesterol (モル比 5:2:3) リポソーム懸濁液の濁度の経時変化を示す。リポソームの初期 D_p と PI はそれぞれ 193 nm と 0.14 であった。 $[\text{Ca}^{2+}] = 40, 60 \text{ mM}$ において濁度が急激に増加している。一方、 $[\text{Ca}^{2+}] = 80 \text{ mM}$ における濁度変化は小さい。**Figure 2-11B** にリポソームの体積基準の粒子径分布に及ぼす Ca^{2+} 濃度の影響を示す。 $[\text{Ca}^{2+}] = 40 \text{ mM}$ において、約 1.5 μm のピークに大きな凝集体が確認でき、 $[\text{Ca}^{2+}] = 60 \text{ mM}$ ではより小さな凝集体が確認できる。 $[\text{Ca}^{2+}] = 40 \text{ mM}$ において凝集したリポソームの粒子径は 1.0 μm より大きく、凝集していないリポソームの平均粒子径 (193 nm) よりも 5 倍程度大きい。対称的に 80 mM の Ca^{2+} では凝集体が形成されていない。これらの結果は濁度測定と良く一致する。リポソームの ζ 電位に対する Ca^{2+} 濃度の影響を **Figure 2-12** に示す。リポソームは塩が存在しない場合、負電荷 ($-64.8 \pm 3.4 \text{ mV}$) をもつ。リポソームの電荷の反転は $[\text{Ca}^{2+}] = 30\sim 40 \text{ mM}$ において生じる。この Ca^{2+} 濃度範囲において、リポソームは引力ポテンシャルを介して凝集する。高分子電解質および、荷電リポソーム間相互作用と類似性がある (Sennato *et al.*, 2005; Zuzzi *et al.*, 2008)。 $[\text{Ca}^{2+}] \geq 40 \text{ mM}$ において、 Ca^{2+} 濃度の増加に伴い ζ 電位が上昇して僅かにリポソーム表面が正に帯電する。Szekely *et al.* (2011) は、双性イオン Phosphatidylcholines (PCs) と Ca^{2+} 間の相互作用は PCs の疎水鎖の特性に影響を受けることを報告した。彼らは不飽和 POPC から形成される緩いパッキング状態の脂質膜中において回転運動する POPC と Ca^{2+} 間の結合はエネルギー的に不利であることを報告した。一方、パッキング密度の高い膜を形成する飽和 PCs は回転エントロピーが小さいために Ca^{2+} との相互作用がエネルギー的に有利となる。脂質膜に配向させた DPH の定常蛍光偏光 P の逆数に基づいて POPC/POPG/Cholesterol 膜における脂質の回転運動を推定した。結果を **Figure 2-13** に示す。25°C において上記の P^{-1} 値は以前に報告された POPC からなる膜 (Yoshimoto *et al.*, 2007) よりも小さいことが見出された。これは Cholesterol による濃縮効果と考えられる (Isaev *et al.*, 2010; Wydro *et al.*, 2011)。したがって、 Ca^{2+} は POPC のみの膜よりも効率的に POPC/POPG/Cholesterol 膜に吸着することができる。Mao *et al.* (2013) は Ca^{2+} が POPG 膜中の酸素に強固に結合することができると報告した。したがって、 Ca^{2+} との相互作用は POPC と POPG 分子の両方に誘起される可能性がある。本研究の結果は Ca^{2+} はリポソームの表面に吸着することを示している。POPC と Ca^{2+} 間の相互作用は高い Ca^{2+} 濃度で観測されたりポソーム表面電荷の転移 (**Figure 2-12**) の原因である。**Figure 2-13** において、 P^{-1} 値が温度の増加とともにほぼ単調に増加しておりリポソーム

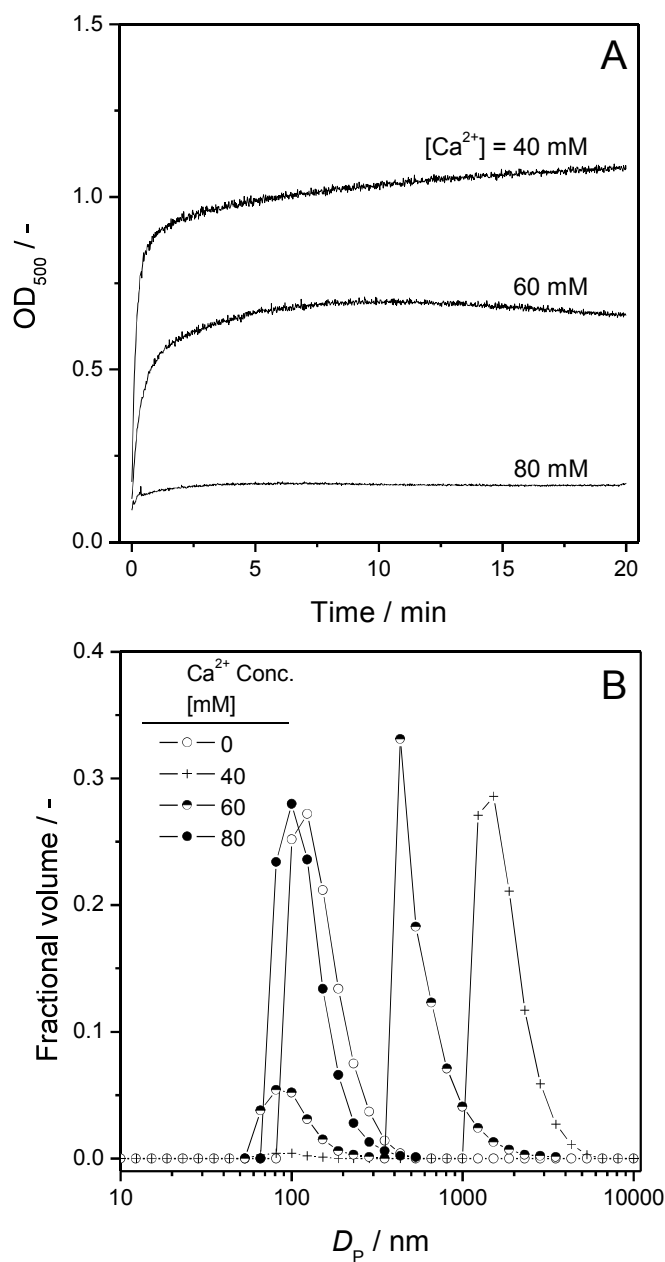


Figure 2-11 (A) Time courses of turbidity of the Tris buffer solutions (3.0 mL) suspending liposomes composed of POPC, POPG and cholesterol (5:2:3 in molar ratio) at the Ca²⁺ concentrations of 40, 60 and 80 mM. All measurements were performed at 25 ° C at the lipid concentration of 1.0 mM. (B) Size distribution of liposomes without salt and that at the Ca²⁺ concentrations of 40, 60 and 80 mM. The measurements were performed at 20 min after the addition of Ca²⁺ to the liposome suspension.

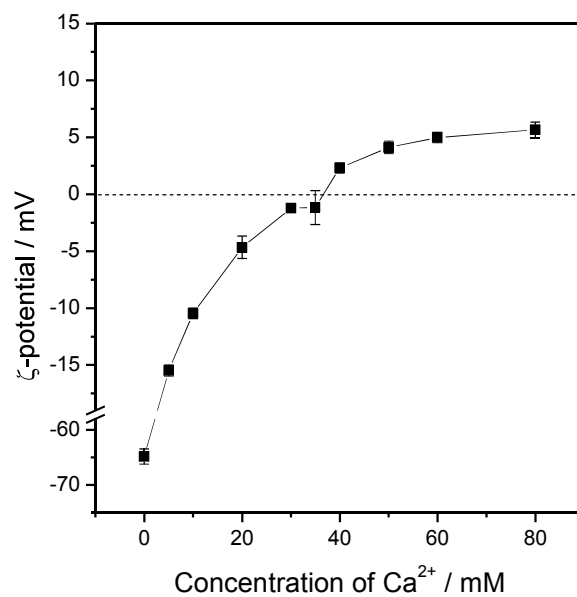


Figure 2-12 Effect of the Ca²⁺ concentration on ζ -potential of liposomes at the lipid concentration of 1.0 mM. Data are mean of 3–6 measurements. Errors represent standard deviation. When not indicated errors are smaller than symbols.

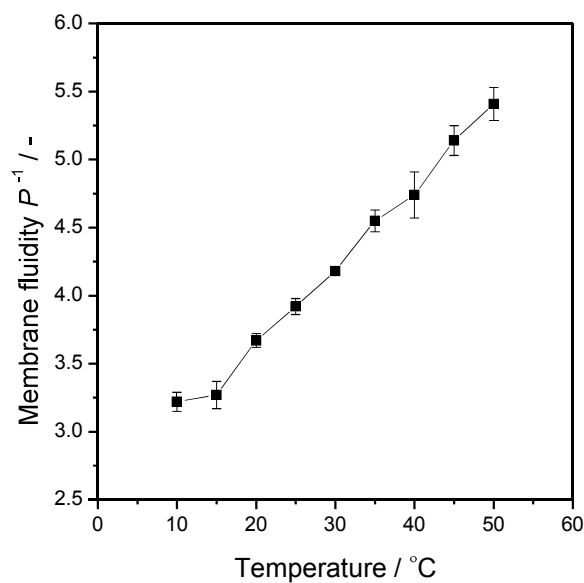


Figure 2-13 Reciprocal of steady-state fluorescence polarization P of DPH embedded in liposome membranes composed of POPC, POPG and cholesterol (5:2:3 in molar ratio). Errors represent standard deviation. When not indicated error is smaller than the symbol.

膜の相転移が 10~50 °C の温度変化でみられないことがわかる。POPC 膜の相転移温度は-2.5 °C (Koynova and Caffrey, 1998)、POPG は-5 °C (Borle and Seelig, 1985) である。以上より POPC/POPG/Cholesterol 膜は 25 °C において液晶相であることを示している。

2-3-7. Ca^{2+} に誘導されるリポソーム凝集体の構造上の特性

Ca^{2+} に誘起されるリポソーム凝集体の構造上の特徴を検討するために、 Ca^{2+} 濃度に依存したリポソーム- Ca^{2+} 間相互作用の可逆性を調べた。**Figure 2-14**の上図はリポソーム懸濁液の濁度の経時変化を示す。リポソームの初期粒子径分布を **Figure 2-14A** に示す。高濃度の Ca^{2+} 溶液は $[\text{Ca}^{2+}] = 40 \text{ mM}$ とするために 20 min でリポソーム懸濁液に添加した (矢印 1)。リポソーム凝集体の形成は上図 B で示される時間に測定した粒子径分布に基づき確認することができる (**Figure 2-14B**)。その後、 $[\text{Ca}^{2+}] = 80 \text{ mM}$ になるように Ca^{2+} 溶液を懸濁液に添加した (矢印 2)。追加された CaCl_2 溶液の量は初期のリポソーム懸濁液の 4 v/v% であるために脂質濃度は実質的に A, B, C で示される時間に 1.0 mM に保たれている。C で示される時間で得られる濁度が急激に減少した際の粒子径分布はリポソームが再分散したことを示している (**Figure 2-14C**)。Figure 2-14C において 433 nm の小さな粒子径をもつブロードな分布ピークがみられる。体積基準の粒子径分布から決定される凝集リポソームの割合は $6.4 \pm 4.9 \%$ であった。Figure 2-14 の上図の C で観測された濁度は部分的に凝集したリポソームから生じる可能性がある。80 mM の Ca^{2+} における分布ピーク (**Figure 2-14C**) は塩の存在下と比較して若干左にシフトしている (**Figure 2-14A**)。これは、リポソーム内外の浸透圧の不均衡によるものである (Sabin *et al.*, 2006)。リポソーム膜への Ca^{2+} イオンの吸着は脂質の分子運動を制限する (Szekely *et al.*, 2011)。これにより除去された水分子を介して脂質のパッキングを増大させる (Blatt and Vaz, 1986)。これらはまたリポソームの粒子径の減少を引き起こす。リポソーム懸濁液を 0.5 mM の脂質濃度とするために塩を含まない緩衝液で 2 倍に希釈した (矢印 3)。著しい希釈にもかかわらず懸濁液の濁度が減少していない。D で示された時間に得られた粒子径分布を **Figure 2-14D** に示す。ここでは **Figure 2-14B** に示した分布と良く類似している。すなわち、リポソームの形態は Ca^{2+} 濃度を 80 mM から 40 mM へ減少させることにより再度凝集することがわかった。

リポソームの凝集挙動に及ぼす脂質濃度の影響を明らかにするために、リポソームの粒子径分布と電位を種々の Ca^{2+} 濃度条件下 0.5 mM の脂質濃度において測定した。**Figure 2-15** に得られた結果を示す。リポソーム凝集体 (クラスター化リポソーム) の

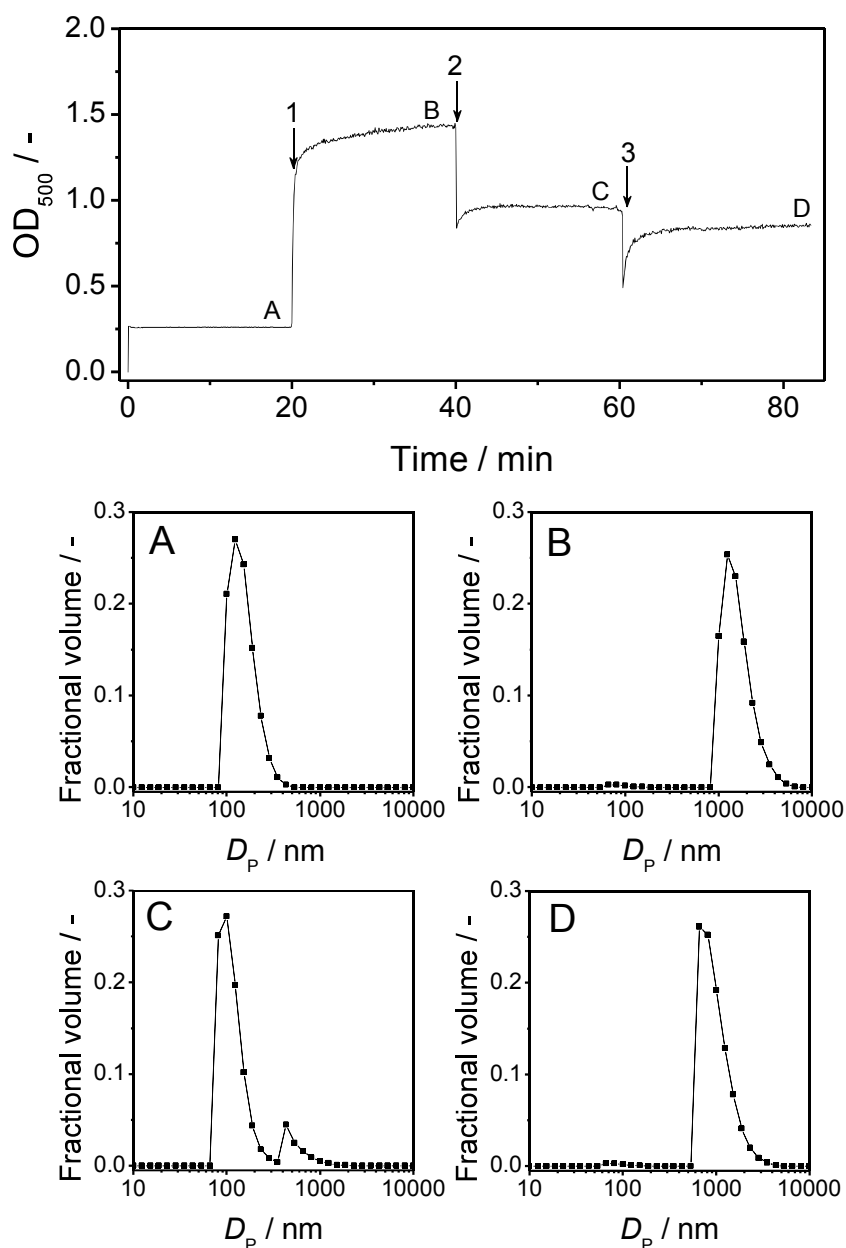


Figure 2-14 Time course of turbidity of the Tris buffer solution (3.0 mL) suspending POPC/POPG/cholesterol liposomes at 25 °C at the lipid concentration of 1.0 mM. CaCl₂ solutions ([CaCl₂] = 1.0 M) were stepwisely added to the suspension to give the final Ca²⁺ concentrations of 40 mM at the arrow 1 and 80 mM at the arrow 2. Then, the suspension was diluted two times with a salt-free Tris buffer solution at the arrow 3. Panels A, B, C and D show the size distribution of liposomes measured at the time indicated in the top panel as A, B, C and D, respectively.

形成の指標となるPI値 (Sabin *et al.*, 2007) は、 $[Ca^{2+}] = 20 \sim 40$ mM で増大している。リポソームの ζ 電位 (Figure 2-15, inset) よりリポソーム間の静電反発力は $[Ca^{2+}] = 30 \sim 40$ mMにおいて低下することを示す。したがって、リポソームの凝集は脂質濃度 0.5 mM と $[Ca^{2+}] = 40$ mM で起こり、Figure 2-14 の D の条件に対応している。濁度の経時変化 (Figure 2-14, top panel) より、リポソームの凝集、再分散プロセスが迅速に起きていることがわかる。

上記リポソームの凝集、再分散プロセスにおける脂質膜の安定性をリポソームに封入したCF分子の漏出特性に基づき検討した (Figure 2-16)。 Ca^{2+} 濃度を制御するための処理方法(矢印 1~3)は Figure 2-14 の場合と同一である。 Ca^{2+} 濃度に依存するCFL懸濁液の濁度および粒子径分布の変化は Figure 2-14 とよく類似していた (データ省略)。Figure 2-16 中の矢印 4 では内部のCF蛍光を決定するために 40 mM のコール酸ナトリウムを加えてリポソーム膜を完全に溶解することにより CF 分子を液本体に放出した。CF の漏出率 R_{CF} は脂質膜の攪乱またはリポソームの崩壊の程度を反映する。Figure 2-16 に示すように、矢印 1~3 の凝集、再分散プロセスにおいて CF の有意な漏出は生じない。これらの観測はリポソームが 40 mM Ca^{2+} の共存下でクラスターを形成していることを実証している。さらに、各リポソームの膜構造がクラスターの形成過程においても維持されていることを明らかにした。

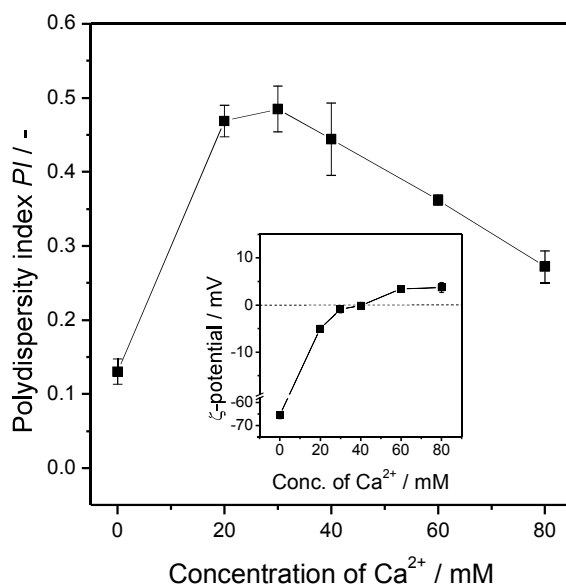


Figure 2-15 Polydispersity index PI and ζ -potential (inset) of liposomes composed of POPC, POPG and cholesterol (5:2:3 in molar ratio) as a function of the Ca^{2+} concentration. The total lipid concentration was fixed at 0.5 mM. Errors represent standard deviation. When not indicated errors are smaller than symbols.

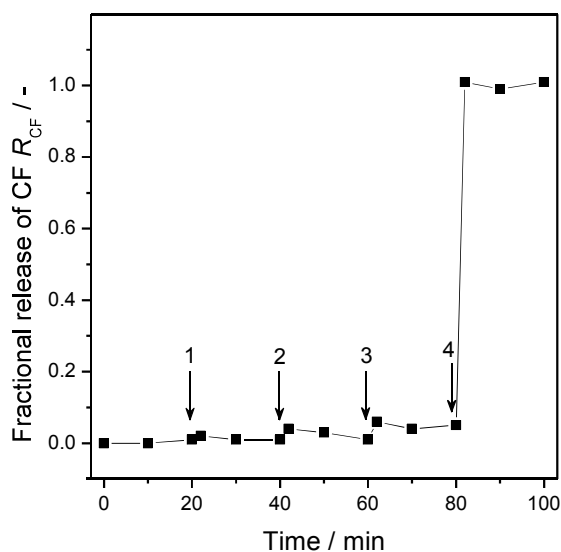


Figure 2-16 Time course of fractional release of CF R_{CF} from CFL. At the arrows 1, 2 and 3, the same treatments were performed as these shown in the top panel of Figure 2-14. At the arrow 4, liposome membranes were completely solubilized with 40 mM sodium cholate.

リポソーム間相互作用に関する膜中の POPC と POPG の含有率の影響を Ca^{2+} の存在下で検討した。使用したリポソームは 5 mol% POPC、65 mol% POPG、30 mol% Cholesterol をから構成される。リポソームの粒子径分布に及ぼす Ca^{2+} 濃度の影響を **Figure 2-17A** に示す。50 mol% POPC と 20 mol% POPG から形成される POPC 含有率の大きいリポソームとは対称的に、明らかに $[Ca^{2+}] = 5.0$ mM およびそれ以上の Ca^{2+} 濃度でもリポソームは凝集体を形成する (**Figure 2-11B**)。Figure 2-17B はリポソームの ζ 電位と Ca^{2+} 濃度に対するリポソーム凝集体の割合 (**Figure 2-17B, inset**) を示す。POPG 含有量が大きいリポソームは $[Ca^{2+}] = 10$ mM において凝集が確認できる。この場合、リポソームは負に帯電している (ζ 電位 -20.4 ± 1.0 mV)。リポソーム膜の ζ 電位は $[Ca^{2+}] = 80\sim 100$ mM においても負のままであった。これらの結果は負電荷 POPG と Ca^{2+} の強い相互作用がリポソームの凝集体形成に関与することを示している。以上より、リポソームの凝集体形成における可逆性のような相互作用は POPC と POPG の含有量に依存している。POPC/POPG/Cholesterol (モル比 5:2:3) リポソームでは、POPG は Ca^{2+} と強く結合する一方で、POPC とは弱く相互作用する。双性 POPC が一定量存在することはクラスター化リポソームの可逆的形成を達成するために重要な条件であることが示された。

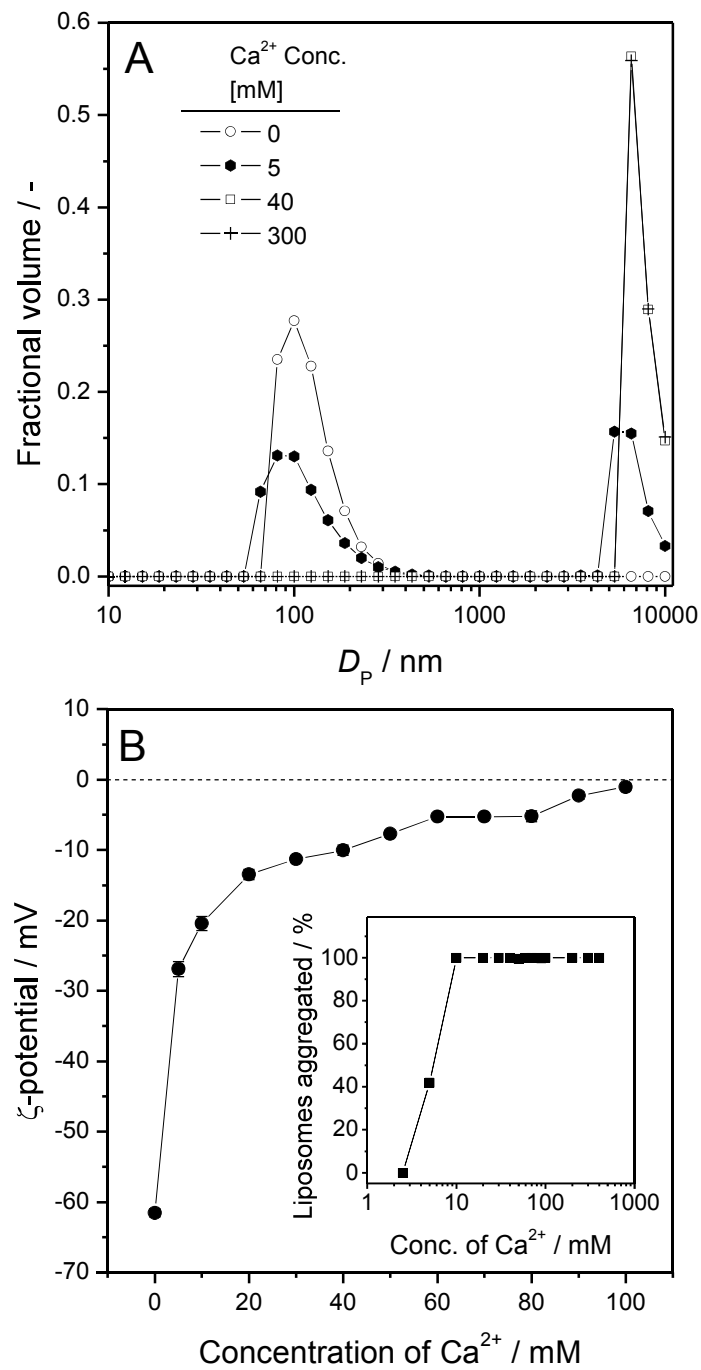


Figure 2-17 (A) Size distribution of POPG-rich liposomes composed of POPC, POPG and cholesterol (5:65:30 in molar ratio) at the Ca²⁺ concentrations of 0, 5, 40 and 300 mM. (B) ζ -potential of liposomes and fractional amount of liposomes aggregated (inset) as a function of the Ca²⁺ concentration. When not indicated errors are smaller than symbols. The lipid concentration was fixed at 1.0 mM in both figures.

2-3-8. せん断ストレスに誘起されるクラスター化リポソームの膜透過性の増大

Figure 2-18A は 25 °C におけるクラスター化していない CF 封入リポソーム (CFL) の R_{CF} の経時変化を示す。静止液系において、3 h の静置により著しく小さな R_{CF} 値 (0.015) が得られたことから、CF 分子は脂質膜に対して僅かに透過性を示すことがわかる。CF 漏出速度はコーン・プレート型粘度計で生成されたせん断ストレス負荷条件下で明らかに増大している。本条件下において、コーンとプレートのステンレス鋼表面への脂質膜の吸着は無視できる。Eq. (1)の線形プロットに基づいて決定した P_{CF} 値は $P_{CF} = 0.356 \pm 0.017$ pm/s (挿入図 Figure 18A) であった。**Figure 2-19A** に示すように CFL の平均粒子径および粒子径分布はせん断ストレスの負荷によりほとんど影響を受けなかった。したがって、リポソームの透過性はベシクル構造の崩壊が起らずに脂質膜の局所構造の変化によって誘導される。同様の現象はバイオリクター内のせん断流に懸濁したリポソームについて報告している (Yoshimoto *et al.*, 2010)。一方で、40 mM Ca^{2+} に誘起されるクラスター化リポソーム (Figure 2-18 B) においては CF の漏出が静止液系において完全に阻害される。リポソームの比表面積がクラスターの形成により減少するためと考えられる。リポソーム膜中のリン酸部位への Ca^{2+} の吸着は脂質の回転運動を制限して脂質膜のパッキングを増加させる。したがって、クラスター化リポソームの膜透過性の低下を引き起こす可能性がある。静止液系で得られた低透過率の結果とは明らかに対称的にせん断流において CF の漏出 ($R_{CF} = 0.097$) が 3 h においてみられる。 P_{CF} 値は 0.422 ± 0.019 pm/s であった (Figure 2-18B, inset)。これらの結果は、脂質膜を介する CF 透過の on-off の制御はクラスター化リポソームのせん断ストレスに誘起される膜透過性に基づいて実現できることを示している。**Figure 2-19B** に示すように、クラスター化させた CFL の粒子径分布は 3 h の測定において静止液系で影響をほとんど受けないがせん断流に懸濁することによって大きく異なる分布を示した。これは、クラスター化リポソームがせん断ストレス負荷条件下で構造的に再構成することを示唆している。クラスター化リポソームの粒子径分布はせん断後に静止状態で測定したためにせん断流中のクラスター化リポソームの分散状態は不明である。せん断流がリポソームの形状 (Bernard *et al.*, 2005; Kaoui *et al.*, 2009) と粒子の凝集構造 (Higashitani and Iimura, 1998; Oviden and Xiao, 2002; Xu *et al.*, 2005) に影響を及ぼすことが知られている。クラスター化リポソームの最外層はせん断ストレス負荷条件下で分裂と合体を通じて頻繁に更新されている可能性が高い。このことにより、CF の漏出を伴う十分な脂質膜-水界面領域の形成が可能になる。

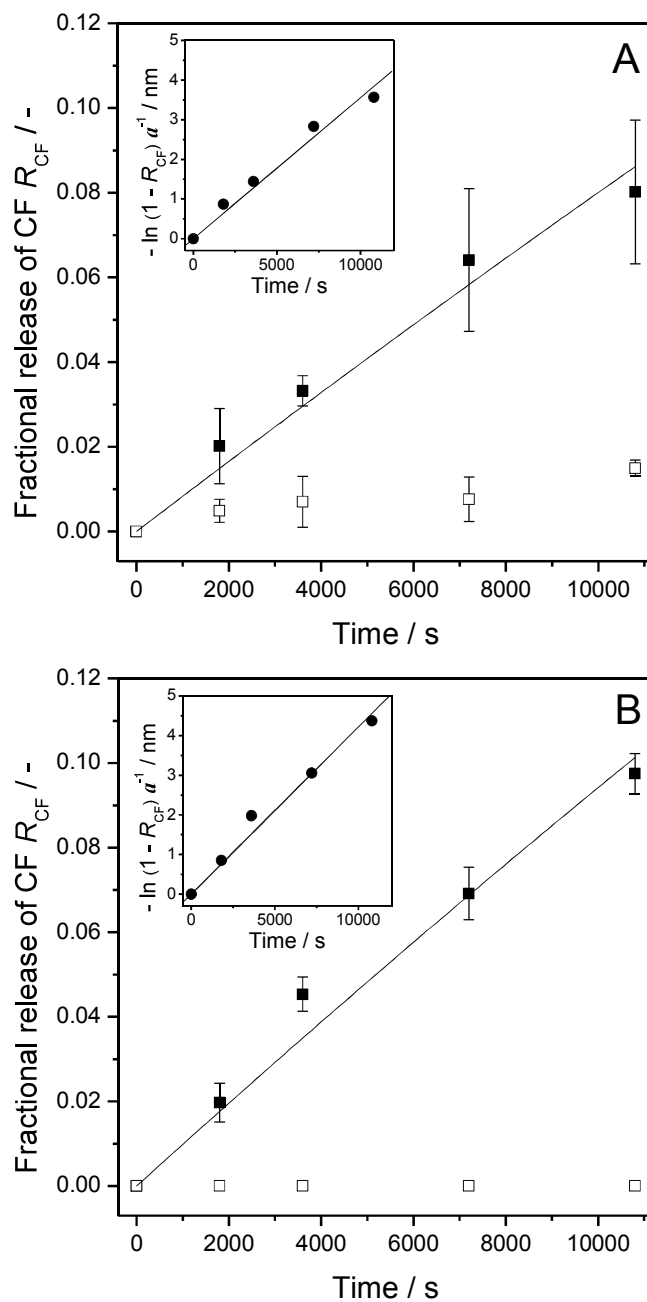


Figure 2-18 Time courses of RCF for non-clustered liposomes (A) and liposome clusters (B) suspended at 25 °C in the static liquid system (empty squares) and in the shear flow at the shear rate γ of $1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ (filled squares). Errors represent standard deviation ($n = 3$). Solid curves represent the calculated time courses, $R_{CF} = \{1 - \exp(-P_{CF}at)\}$ with the P_{CF} values determined as a slope of the straight lines shown in the insets.

クラスター化リポソームの構造におよぼすせん断流の影響を理解するために距離 d に伴う 2 つのリポソーム間の相互作用の総ポテンシャル $V_T(d)$ を $[Ca^{2+}] = 40, 60, 80$ mM で計算した(Figure 2-20)。計算ではリポソーム間の水和斥力ポテンシャルが古典的な DLVO 理論に含まれている。各 Ca^{2+} 濃度について、エネルギー障壁の高さは熱エネルギー $k_B T$ よりも高く、リポソームは不可的に凝集しない。 $[Ca^{2+}] = 40$ mM において、エネルギー状態の 2 次最小値(準安定状態)が $-2k_B T$ 以上の深さで確認できる。これはクラスター化リポソームの可逆的な形成に十分な値である (Zhang *et al.*, 2007)。 $[Ca^{2+}] = 60, 80$ mM において、2 次最小値の深さはクラスター化リポソームの形成のためには十分ではない。修正 DLVO ポテンシャルの計算結果は、実験的に決定することが困難な Hamaker 定数の変化に非常に敏感である。ポテンシャルの 2 次最小値は水和定数 4.2×10^{-19} J を一定としたとき Hamaker 定数が $3.5 \times 10^{-21} \sim 3.5 \times 10^{-22}$ J と得られたが二次最小値の深さは大きく変化した。一方で、Hamaker 定数を 2.5×10^{-21} J の固定値としたとき水和定数を $2.8 \times 10^{-19} \sim 2.8 \times 10^{-16}$ J と比較的広範に変化させても二次最小が得られた。本研究の計算は与えられたパラメータの組み合わせに対して有効である。これらの計算はこの論文で実験的に観測されたリポソームのコロイド挙動を予測している。計算の重要な特性として、クラスター化リポソーム間の距離 d が与えられる。 $[Ca^{2+}] = 40$ mM の二次最小値は $d = 0.95$ nm で得られ、これは Ca^{2+} の水和半径と同等である可能性がある (Sabín *et al.*, 2007)。上記の理論的検討はリポソーム間の相互作用が比較的弱く、せん断ストレスにより変化することを示している。このことは Figure 2-18 と Figure 2-19 で表記されるクラスター化リポソームの CF 漏出挙動と安定性から確認できる。せん断流中のクラスター化リポソームの動的挙動をより詳細に検討する必要があるが、得られた結果はせん断ストレスがクラスター化リポソームの膜透過性の制御因子として機能することを示している。

2-4. 結言

本章では、せん断流により比較的小さい粒子径 ($D_p = 101-189$ nm) をもつリポソーム膜の透過性が増大することを明らかにした。固体表面との相互作用の影響が無視できる状態で 101 nm と 117 nm の D_p をもつ CFL の CF に対する膜透過性は 55 °C において液体せん断速度 ($\gamma = 1.5 \times 10^3$ s⁻¹) の下で大幅に増大した。CFL の粒子径分布はせん断ストレスにほとんど影響を受けないことを示した。得られた結果は液体せん断ストレスが小さなリポソームの膜透過を引き起こす因子となることを明確に示している。

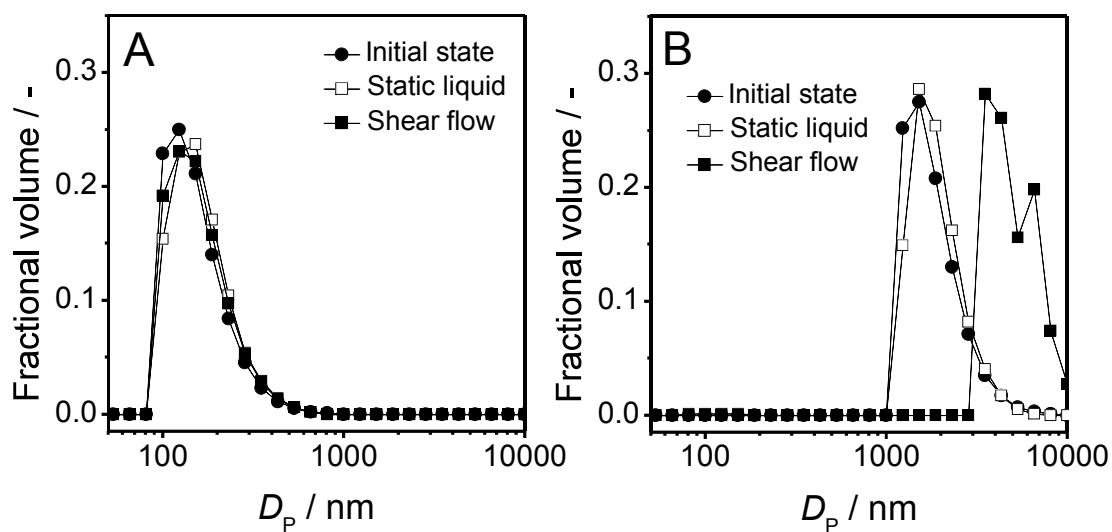


Figure 2-19 Effects of incubation in the static liquid system and shearing ($\gamma = 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) at 25 °C for 3 h on size distribution of non-clustered liposomes (A) and liposome clusters (B).

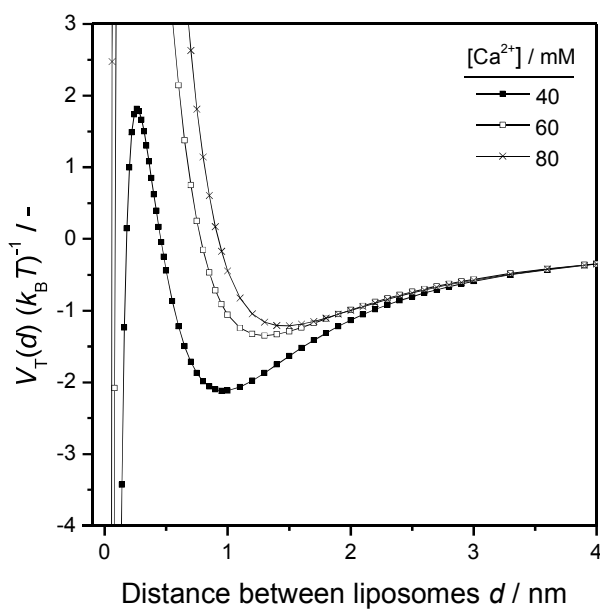


Figure 2-20 Total potential $V_T(d)$ of the interaction calculated for the liposomes with a distance d .

さらに、負電荷の POPC/POPG/Cholesterol (5:2:3) リポソームのクラスター化は Ca^{2+} 濃度を制御することにより可逆的に誘導された。脂質濃度 1.0 mM において 1.5 μm の直径をもつクラスター化リポソームは 40 mM Ca^{2+} により形成された。POPG 含有率が高いリポソームは Ca^{2+} の共存下で不可逆的に凝集体を形成するという観測に基づき、POPC と Ca^{2+} 間の相互作用はリポソームのクラスター化の可逆性の要因であることがわかった。クラスター化のプロセスにおいて、リポソームに封入した CF 分子は有意に液本体へ漏出しなかった。さらに修正 DLVO 理論に基づきクラスター化リポソーム間の距離が 0.95 nm であることが推定された。これらの特徴に基づき、コーン・プレート型粘度計内で発生したせん断ストレス負荷条件下ではクラスター化リポソームの構造が柔軟に変化することが示唆された。CF 分子に対するクラスター化リポソームの膜透過性は、静止液系ではみられなかったがせん断ストレス負荷条件下では誘導された。その結果、クラスター化リポソームはせん断ストレス負荷条件下でクラスター化していないリポソームに匹敵する膜透過性を示した。

せん断ストレスに誘発される膜透過と Ca^{2+} に誘導されるリポソームの可逆的クラスター化は医学および生物工学的な応用において重要である。例えば、リポソーム内封入酵素などのリポソーム関連の様々な生体模倣材料・システムにおける物質移動制御に有用である。

第3章 リポソームの構造変化を利用した気泡塔内の平均せん断速度の測定

3-1. 緒言

気泡塔は異なるスケールにおいて様々な化学・生化学反応のための多相反応器として有用である (Merchuk *et al.*, 1998; Nakao *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2006)。製薬関連プラントでは気泡の吹き込みにより十分に液が混合され、攪拌翼のような装置が不要なために滅菌処理が容易である気泡塔が培養槽として使用されている。せん断速度は気液界面近傍の流体力学特性に影響を及ぼし、気泡塔内の物質移動を支配する要因の一つである (Merchuk and Ben-Zvi, 1992; Contreras *et al.*, 1999)。気泡塔内のせん断速度を容易に特徴づけることはできないので、せん断速度を推算するためにいくつかの実験式がガス空塔速度 U_G の関数として報告されている (Schumpe and Deckwer, 1987; Nishikawa *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1990)。しかし、液相の物理化学的特性や形状が異なる任意の気泡塔のせん断速度を U_G 値に基づき推定することは困難である (Chisti and Moo-Young, 1989)。これに関連して、気泡塔内のせん断速度 (Merchuk and Ben-Zvi, 1992; Thomasi *et al.*, 2010; Grima *et al.*, 1997) と物質移動速度との相互関係 (Merchuk and Ben-Zvi, 1992; Grima *et al.*, 1997) を提示する機構モデルによりせん断速度を算出できることが報告された。一方、せん断速度を正確に推定することは気泡塔型バイオリアクターにおいて細胞の構造変化を最小限に抑えるために重要である (Ramírez and Mutharasa, 1990; Barbosa *et al.*, 2003; Al-Rubeai *et al.*, 1993; Sen *et al.*, 2001)。細胞培養プロセスに対するせん断速度の効果は、これまでに広く研究されている (Chisti, 2010)。しかし、多くの場合、上述のようにせん断速度は反応器のスケールや形状に依存するため、特定のバイオリアクターで得られたデータを異なる反応器に適用できない。したがって任意のバイオリアクターにおける機械的ストレスに対する細胞応答を予測することは困難である。せん断ストレスに対する細胞機能の応答をせん断ストレスの検出に応用することは、ストレス定量化のための新しい方法を開発する興味深いアプローチになる。しかしながら、この目的のために生細胞を使用することは適切ではない。なぜならば、細胞の物理化学的状态、成長速度、成長条件を含む様々な要因がせん断を受ける細胞の応答性に影響を与えるためである (Chisti, 2010)。一方、Ramírez and Mutharasan (1990) はハイブリドーマの形質膜の流動性がせん断流中における安定性に影響を及ぼすことを報告した。また、せん断ストレスが細胞膜の透過を引き起こし (Hallow *et al.*, 2008)、メカノトランスダクション (Gudi *et al.*, 1998) のための脂質膜の構造変化を誘導することが報告されている。これ

らの現象は、細胞の構成成分のうち、脂質膜が効果的にせん断ストレスを感知できることを示している。そのため、せん断ストレスに対する人工脂質膜の構造または機能的応答を正確に調整することができる場合には、膜の応答性に基づき未知の流体力学的特性を有するバイオリアクターにおける平均せん断速度の定量化が可能となる。

リポソームは水溶液中でリン脂質を分散させることにより調製することができる。リポソームの平均サイズ、サイズ分布、脂質濃度は制御可能である。せん断ストレスに対する変形や破裂などの脂質膜の応答は主に 500 nm よりも大きい直径のベシクルを用いて研究されてきた (Takagi *et al.*, 2009; de Haas *et al.*, 1997; Chakravarthy and Giorgio, 1992)。前章において、100~200 nm 程度の直径をもつリポソームの膜透過性がコーン・プレート型回転粘度計中で発生させたせん断流中で変化することを示した。せん断流中におけるリポソーム膜の応答性はリポソーム粒子径に依存した。したがって、最適な粒子径を有するリポソームはリポソーム懸濁液中の脂質膜透過性とせん断速度の関係に基づきバイオリアクター内のせん断速度を推定するためのプローブとしての応用が期待できる。

様々な液相の条件下せん断速度を推定するためにはリポソーム-気泡間の相互作用を低減する必要がある。気泡とポリマー間の静電相互作用が気泡浮上分離 (DAF) プロセスのために検討された (Oliveira and Rubio, 2011)。さらに、酸性 pH 以上で気泡は負に帯電しており、正電荷のカオリン粒子に吸着することが報告されている (Han and Dockko, 1998)。Yoshimoto *et al.* (2006) は、本章で使用した外部循環式エアリフト型気泡塔の 3 倍の容積をもつエアリフト中の気泡径分布を測定して、 $U_G = 0.94$ cm/s では平均気泡径が 1 mm であることを報告している。彼らは、リポソームが気泡の気液界面の安定性を増大させることを報告している。これらの現象はリポソームの電荷が気泡との相互作用を制御する上で重要であることを示している。

本章では、蛍光色素封入リポソームを調製し、コーン・プレート型粘度計と外部循環式エアリフト型気泡塔に懸濁したリポソーム膜の色素分子に対する透過係数を実測・相関することにより、気泡塔内の未知のせん断速度の定量を試みた。異なる電荷のリポソームを調製して気泡との相互作用を検討した。また、標準型気泡塔内の様々な液深におけるせん断速度分布を推定した。さらに、異なるライザー/ダウンカマー面積比と塔高をもつ 3 種類の外部循環式エアリフト型気泡塔内のせん断速度を測定して、スケールと形状の違いが内部で発生するせん断速度に与える影響を検討した。

3-2. 実験

3-2-1. 材料

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) 、 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) 、 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane chloride (DOTAP) は NOF (Tokyo, Japan) から購入した。Cholesterol、 コール酸ナトリウムは Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。5(6)-Carboxyfluorescein (CF) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO) から購入した。Carboxymethyl cellulose (CMC, Sunrose[®], type F01MC) は日本製紙株式会社 (Tokyo, Japan) から提供された。CMC の置換率は 0.65-0.75 であった。全ての試薬は精製や修飾をせず使用した。使用した水は浄水器 Elix 3UV (Millipore Corp., Billerica, MA) によって殺菌、脱イオン化した。水に対する最小抵抗は 15 MΩcm であった。

3-2-2. リポソームの調製

5(6)-Carboxyfluorescein 含有リポソーム (以下 CFL) は脂質の混合物 (50 mg POPC/20 mg POPG、 50 mg POPC/18.2 mg DOTAP、 50 mg POPC) から形成された乾燥脂質膜を水和した後、凍結融解を 7 回繰り返すことにより得られた多重層リポソームを押し出し形成して調製した。脂質の水和には 100 mM CF を含む pH 7.4 の 50 mM Tris-HCl/50 mM NaCl buffer (以下 Tris buffer) を使用した。押し出し形成は、200 nm の孔径を有するポリカーボネート膜を用いた。封入されなかった CF 分子は sepharose 4B カラムによるゲル濾過クロマトグラフィーにより CFL から分離した。CFL の既略図を **Figure 3-1** に示す。CFL 懸濁液中の POPC 濃度は酵素法で定量した。

3-2-3. コーン・プレート型せん断装置

コーン・プレート型粘度計 (DV-II+Pro, Brookfield Eng. Lab., Middleboro, MA) は定義されたせん断流を形成するために使用した。装置はソフトウェア Rleocalc (Brookfield Eng. Lab.) により操作するため PC に接続した。使用したコーンは、逆円錐型で 1.40×10^{-2} rad の角度 θ と半径 2.4 cm をもつ。0.3 wt% CMC を含む Tris buffer により調製された CFL 懸濁液 (0.5 mL, [lipid] = 1.0 mM) はプレートとカップの間に充填して、カップは循環恒温水で 40 °C に維持した。CFL 懸濁液中の CFL の体積分率は 6.8×10^{-3} であった。懸濁液は回転しているコーンと静止したプレートの間で最大 20.9 rad/s の角速度 ω においてせん断された。せん断速度 γ ($= \omega/\theta$) は粘度計内で均一である。静止液系として試験管を使用した。リポソームを含まない上記の CMC の粘度は種々のせん断速度で測定した。

3-2-4. 実験に使用した気泡塔の特徴

気泡塔の特徴を **Table 3-1** と **Figure 3-2** に示す。全ての気泡塔はガラス製である。ライザー径 D_R 8.0 mm、ダウンカマー径 D_D 4.8 mm、塔高 H 100 mm の ELBC Type A と、異なる塔高 (240 mm, Type B) およびダウンカマー径 (8.0 mm, Type C) をもつ ELBC 計 3 基を用いた。スパージャーとして、40-100 μm の公称孔径を有するガラスフィルターをライザーの底部に設置した。標準型気泡塔はガス分散板の影響を一定にするために各 ELBC のダウンカマーの液流動を遮断して使用した。

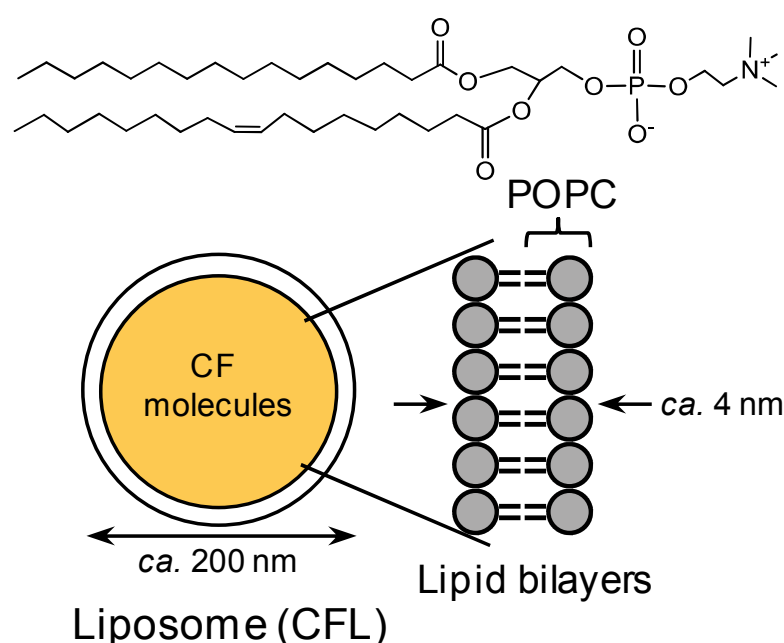


Figure 3-1 Schematic representation of the CFL prepared and chemical structure of POPC.

Table 3-1 Characteristics of the three external-loop airlift bubble columns (ELBCs) shown in Figure 3-1.

Type of bubble column	Liquid volume [mL] ELBC (NBC)	H [mm]	D_R [mm]	D_D [mm]
A	7 (3)	100	8	4.8
B	15 (10)	240	8	4.8
C	9 (3)	100	8	8

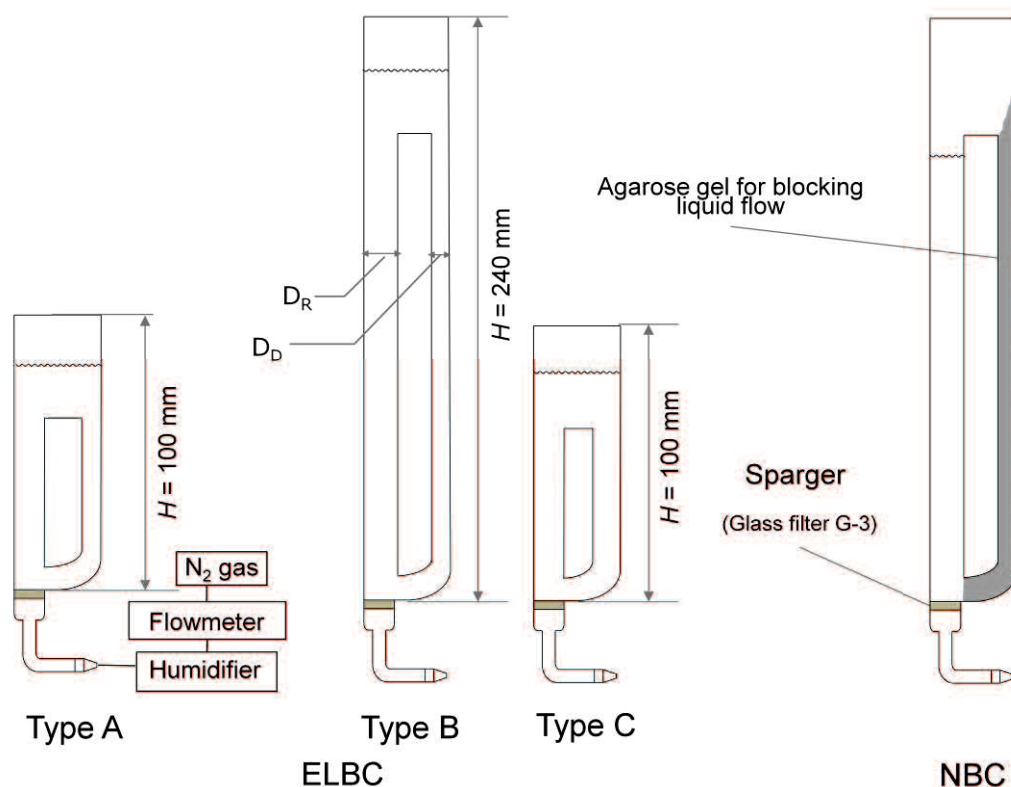


Figure 3-2 Schematic drawings of the external loop airlift bubble column (ELBC) and normal bubble column (NBC).

3-2-5. 気泡塔内における気液二相流の形成

0.3 wt% CMC を溶解させた Tris buffer 溶液で調製された CFL 懸濁液 ([lipid] = 1.0 mM) をエアリフトに加えた。エアリフトの温度は恒温水で 40 °C に維持した。濾過フィルターを通過させた窒素ガスを加湿器を介してライザーの断面積に基づくガス空塔速度 $U_G = 0.01-0.03$ m/s で供給して液循環を誘導した。

3-2-6. リポソームの粒子径分布の測定

CFL 懸濁液の粒子径分布は 160° の一定角において 660 nm の波長の半導体レーザーを搭載した動的光散乱 (DLS) 測定器 (ELSZ-2 plus, Otsuka Electronics, Osaka, Japan) によって決定された。CFL の平均直径 D_p は屈折率を 1.33 として Stokes-Einstein の関係に基づいて決定された。CFL サンプルは測定時に 50 倍に希釈を行ったため CMC の影響は無視できるほど小さい。全ての測定は 25 ± 0.3 °C において石英セル中で 3 回連続して行った。

3-2-7. リポソーム膜を介した CF の透過係数 P_{CF} の決定

リポソームからの CFL からの CF の漏出率 R_{CF} は $R_{CF} = (C_t - C_0)/(C_\infty - C_0)$ として決定された。ここで C_0 と C_t はそれぞれ、初期と任意の時間 t におけるリポソーム外水相の CF 濃度、 C_∞ は透過平衡時の CF 濃度である。リポソーム封入 CF は自己消光をしているため、液本体中の CF 分子は CFL から分離する必要がない。 C_∞ はリポソーム膜を可溶化する 40 mM のコール酸ナトリウムの共存下で測定した。CF 濃度はあらかじめ決定した CF 濃度と蛍光強度の関係に基づいて決定した。蛍光強度は蛍光分光光度計 (FP-750, JASCO, Tokyo, Japan) を用いて測定した。全ての測定は 25 ± 0.3 °C で行った。 P_{CF} は CF に対する非定常状態の物質収支に基づき $-\ln(1 - R_{CF}) = P_{CF} a_S t$ の関係から決定することができる (Yoshimoto *et al.*, 2007)。ここで、 a_S は CFL の比表面積である。

3-3. 結果及び考察

3-3-1. せん断流中におけるリポソームの安定性

使用した CFL は平均粒子径が 180 ± 1 nm であり、多分散指数が 0.104 ± 0.003 とほぼ単分散であった。CFL の物理的安定性はエアリフト型気泡塔内のせん断速度の定量に応用するために重要な因子である。Figure 3-3 にせん断速度 $\gamma = 1425$ s⁻¹、とガス空塔速度 $U_G = 0.03$ m/s において 40 °C の条件で 3 h 処理後の CFL 粒子径分布を示す。機械的な処理を行わずに測定された CFL の粒子径分布も比較のために図に示している。CFL の粒子径は上記の機械的処理によってほとんど影響を受けていない。これらの結果は、CFL はせん断流及び気泡群の存在下でリポソーム膜構造が安定であることを示している。

3-3-2. せん断速度とリポソーム膜透過性の関係

0.3 wt% の CMC を含む Tris 緩衝液を液本体として使用した。0.3 wt% の CMC を含む Tris 緩衝液はせん断速度 $\gamma = 262 \sim 1425$ s⁻¹ において一定粘度 $\eta = 1.45 \pm 0.01$ mPa·s を示すニュートン流体であった。これは、使用した CMC の低粘度特性に起因する。せん断ストレス τ は $\tau = \gamma \eta$ として計算される。CFL 膜の透過性はコーン・プレート型粘度計を使用して 40 °C、各せん断速度 ($\gamma = 375, 750, 1125, 1425$ s⁻¹) の条件下で検討した。

Figure 3-4A に R_{CF} の時間経過における γ の影響を示す。 γ 値の増加に伴い CF の漏出速度は明らかに増加している。静止液系 ($\gamma = 0$) において CFL 膜はほとんど透過性を示さない。 $-\ln(1 - R_{CF})$ と t の線形関係に基づき、脂質膜を透過する CF の透過係数 P_{CF} を決定した。**Figure 3-4A** 中の曲線は $R_{CF} = 1 - \exp(-P_{CF}ast)$ から計算した R_{CF} の時間経過を示す。 P_{CF} は γ 値の増大に伴い明らかに上昇して(**Figure 3-4B**)、 $\gamma = 1425 \text{ s}^{-1}$ において $P_{CF} = 5.2 \times 10^{-13} \text{ m/s}$ を示している。 $\gamma = 0$ における P_{CF} 値を基準とすると、 P_{CF} 値と γ 値にはほぼ直線関係があり、 $P_{CF} [\text{m/s}] = (3.1 \times 10^{-16} \text{ m}) \times \gamma [\text{s}^{-1}] + (0.8 \times 10^{-13} \text{ m/s})$ が得られる。せん断流下における CFL の物理的安定性(**Figure 3-3**)に基づき CF 分子の漏出はリポソーム膜の破壊ではなく膜を介する透過により起こる。これらの結果はリポソーム膜が高感度で液体せん断ストレスを感知して、膜の微細構造を変化させることを示している。

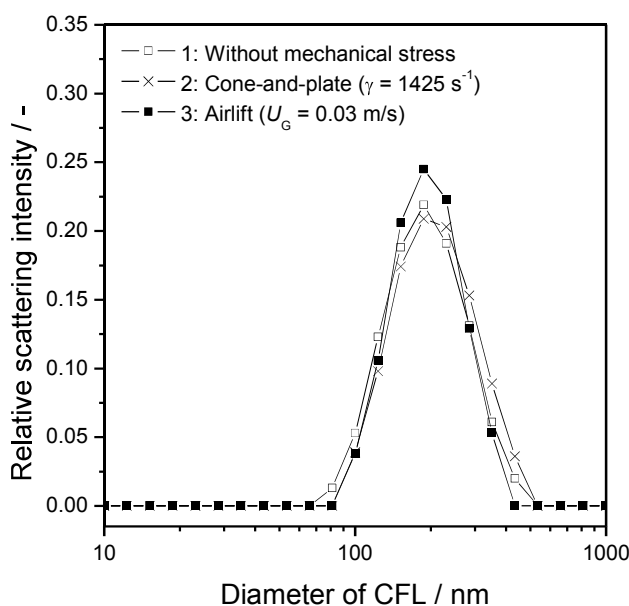


Figure 3-3 Size distribution of CFLs before (1) and after (2 and 3) suspending the CFLs in shear flow. Shear stress was applied to the CFL suspension in the cone-and-plate device (2) or airlift (3) for 3 h at 40 °C at the lipid concentration of 1.0 mM. Measurements were performed in triplicate (1 and 2) or duplicate (3) for each condition and the representative data are shown. The mean diameter D_p was 180 ± 1 , 190 ± 1 and 189 ± 8 nm for the conditions 1, 2 and 3, respectively. Polydispersity index PI was 0.104 ± 0.003 , 0.125 ± 0.004 and 0.129 ± 0.064 for the conditions 1, 2 and 3, respectively. Values represent mean \pm standard deviation.

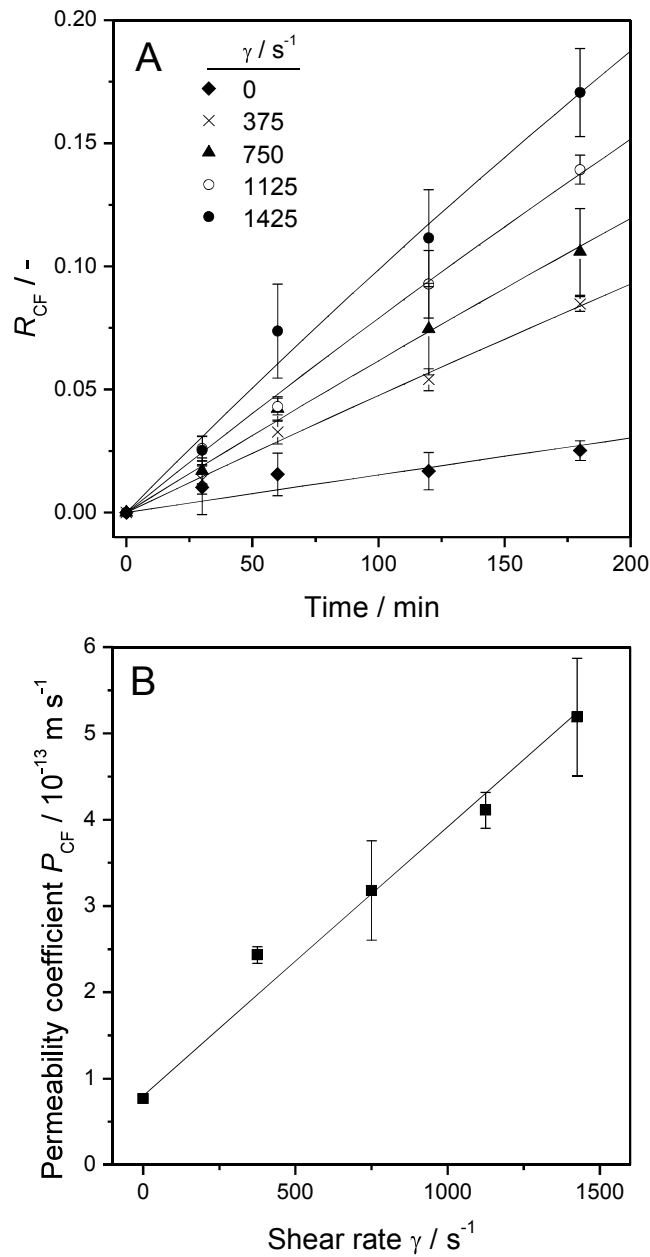


Figure 3-4 (A) Time courses of R_{CF} at various shear rates γ in a cone-and-plate device. Curves are calculated with $R_{CF} = 1 - \exp(-P_{CF}at)$. (B) Relationship between P_{CF} and γ . Data are mean of three independent experiments. Errors represent standard deviation. When not indicated error is smaller than the symbol. Slope of the straight line in the lower panel is determined as $(3.1 \pm 0.1) \times 10^{-16} m$.

3-3-3. エアリフト型気泡塔におけるリポソーム膜の透過性

外部循環式エアリフト型気泡塔内の気液流動場 ($U_G \leq 0.03$ m/s) に懸濁した CFL からの CF の漏出挙動を調べた。懸濁した CFL は粘度計と同一のものを使用した。**Figure 3-5A** には U_G が上昇するとリポソーム膜の透過係数が上昇することがわかる。 $-\ln(1 - R_{CF}) = P_{CF}ast$ に基づき P_{CF} 値を決定することができる。 P_{CF} 値は U_G 値に明らかに依存しており (**Figure 3-5B**)、 P_{CF} [m/s] = $(2.6 \times 10^{-11} [-]) \times U_G$ [m/s] + $(0.8 \times 10^{-13}$ m/s) の相関式が得られる。 $U_G = 0.03$ m/s において得られた $P_{CF} = 8.1 \times 10^{-13}$ m/s は、静止液で得られた値より 10 倍大きい。エアリフト中ではリポソームは液本体、気液界面、気泡周囲の液境膜に存在する可能性がある。CFL はエアリフト中で物理的に安定であるため (**Figure 3-3**)、CFL は気液界面への吸着により著しい膜構造変化を引き起こす可能性は無視できる。したがって、 U_G の上昇に伴い増加する気液二相流における平均せん断速度がエアリフト中に懸濁した CFL 膜の CF 透過係数に影響をお与える。外部循環式エアリフト型気泡塔において同様の現象を報告している (Yoshimoto *et al.*, 2007)。しかし、装置体積、液組成、CFL 濃度と U_G の範囲は本研究と異なっている。

3-3-4. エアリフト型気泡塔内の平均せん断速度の推定

上記のように決定した γ および U_G と P_{CF} の関係性に基づき γ と U_G の関係は γ [s^{-1}] = $(8.4 \times 10^4$ $m^{-1}) \times U_G$ [m/s] ($U_G \leq 0.03$ m/s) として得られた。例えば、 $U_G = 0.01$ と 0.03 m/s において γ 値は 8.4×10^2 と 2.5×10^3 s^{-1} と推定することができる。エアリフトにおいて $U_G = 0.03$ m/s では 3.5 Pa のせん断ストレスが発生することを示している。上記関係は実験で使用した気泡塔の流体と操作条件の組み合わせにのみ有効である点に注意する必要がある。せん断速度は、液体体積基準の入力エネルギー比と相関できる。これは気泡塔の幾何学的定数に依存している (Chisti and Moo-Young, 1989)。このように気泡塔のライザーとダウンカマー断面積が異なる場合、 γ と U_G の相関関係は異なると考えられる。せん断速度は気泡塔内で均一ではない。コロイド状のリポソームは液本体中で均一に分散しているため、本研究において用いた方法は特定の気泡塔内部で発生する平均せん断速度を得るために有効である。気泡塔について推定されたせん断速度は Contreras *et al.* (1999) によって報告されたものと同程度の大きさであった。彼らは本研究で使用した気泡塔のガススパージャーの細孔径に匹敵する標準型気泡塔内の気-海水系のせん断速度を報告した。彼らはエアリフトの底部領域は最大のせん断速度を示すことを報告しており、平均せん断速度の決定においてガススパージャー

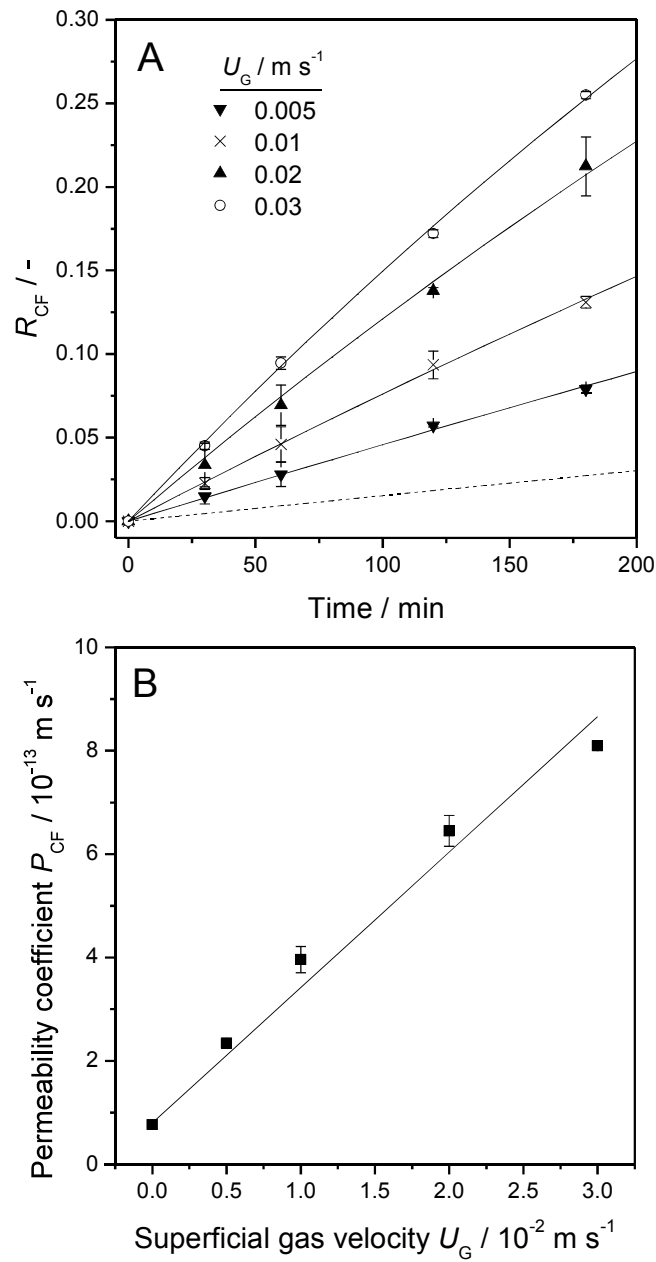


Figure 3-5 (A) Time courses of R_{CF} at various superficial gas velocities U_G in an external loop airlift bubble column. Curves are calculated with $R_{CF} = 1 - \exp(-P_{CF}ast)$. Broken curve shows the data at $U_G = 0$, which is identical to the data shown in Figure 3A at $\gamma = 0$. (B) Relationship between P_{CF} and U_G . Data are mean of two independent experiments. Errors represent standard deviation. When not indicated error is smaller than the symbol. Slope of the straight line in the lower panel is determined as $(2.6 \pm 0.1) \times 10^{-11} [-]$.

が重要であることがわかる。一方、本研究で推定されたせん断速度は Shi *et al.* (1990) によって報告された式 $\gamma[\text{s}^{-1}] = (14800 \text{ s/m}^2) \times U_G^2 [\text{m}^2/\text{s}^2] - (351 \text{ m}^{-1}) \times U_G [\text{m/s}] + (3.26 \text{ s}^{-1})$ と比較して著しく異なる。これは、ガススパージャーのタイプ、エアリフトの形状と液相の特性が大きく相異なるためと考えられる。CFL 膜の安定性が保証される場合、任意のバイオリアクターにおけるせん断速度は同じ CFL を用いて得られた P_{CF} と γ との関係に基づき推定することができる。本研究で使用した POPC 膜は比較的低い U_G 値 ($\leq 0.03 \text{ m/s}$) で気泡塔内のせん断速度を推定するのに適している。本研究の方法は U_G の変化に伴うせん断速度の変化を推定するために有効であることがわかった。細胞および酵素分子に損傷を引き起こすせん断速度の範囲は生体物質の性質および操作条件によって異なる (Chisti, 2010; Bekard *et al.*, 2011)。バイオリアクターの様々なせん断速度を推定するために、非ニュートン流体中の高いせん断速度におけるリポソームの適用性を明らかにする必要がある。

3-3-5. CFL-気泡間相互作用に及ぼす表面電荷の影響

POPC/POPG から構成される負電荷リポソームおよび POPC/DOTAP から構成される正電荷リポソームの表面電荷はそれぞれ -31.9 mV と 19.2 mV であった。Figure 3-6 に NBC ($D_R = 8.0 \text{ mm}$, Type A or C) に液深 $H_L = 40 \text{ mm}$ 、 $U_G = 2.0 \text{ cm/s}$ の条件下において正電荷と負電荷 CFL を懸濁したときの R_{CF} の経時変化を示す。DOTAP 含有 CFL は 120 min において $R_{CF} = 0.94$ とほぼ全ての CF を漏出している。Figure 3-7 には NBC に懸濁前後の粒子径分布を示す。DOTAP 含有 CFL の NBC 懸濁前の粒子径分布は平均粒子径 $D_p = 218 \text{ nm}$ の単分散を示す (Figure 3-7A)。NBC 懸濁後の粒子径分布は明らかに異なる多分散を示しており CFL と気泡の強い相互作用のために凝集や合一が起こっていることがわかる。一方、POPG 含有リポソームは 120 min において $R_{CF} = 0.08$ を示した (Figure 3-6)。NBC 懸濁後の平均粒子径は初期粒子径 $D_p = 184 \text{ nm}$ とほとんど変化が見られない (Figure 3-7 B)。この結果は、負電荷リポソームは正電荷リポソームと比較して気泡との相互作用が明らかに小さいことを示している。Oliveira and Rubio (2011) は気泡が負に帯電していることを報告した。Han and Dockko (1998) は正電荷のカオリン粒子は負電荷の気泡に良く吸着することを報告した。気泡塔内の液本体のせん断速度を定量するためには、気泡との相互作用の小さな負電荷リポソームを使用することが適していることが明らかとなった。

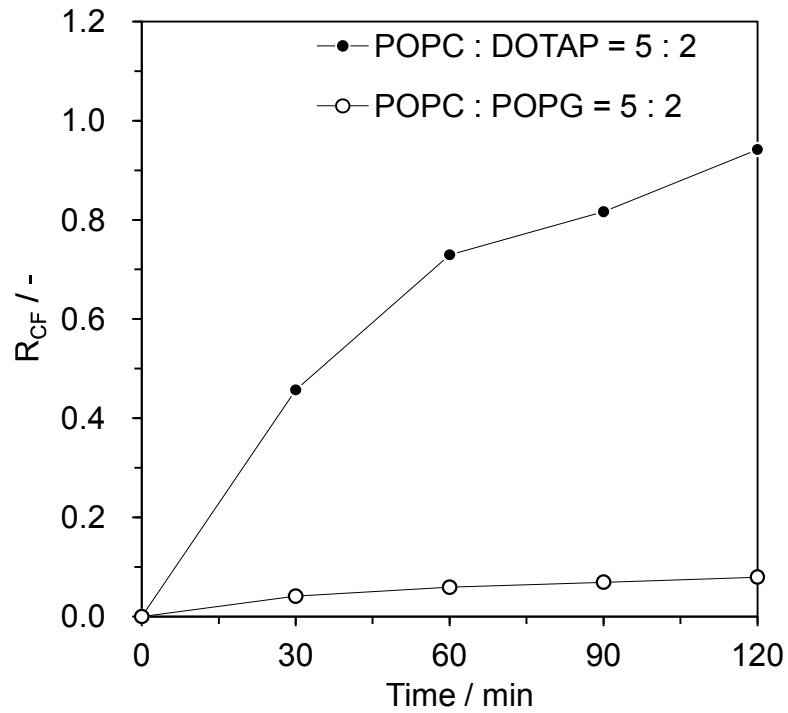


Figure 3-6 Time courses of R_{CF} for the CFLs composed of POPC and POPG (5:2 in molar ratio), and POPC and DOTAP (5:2).

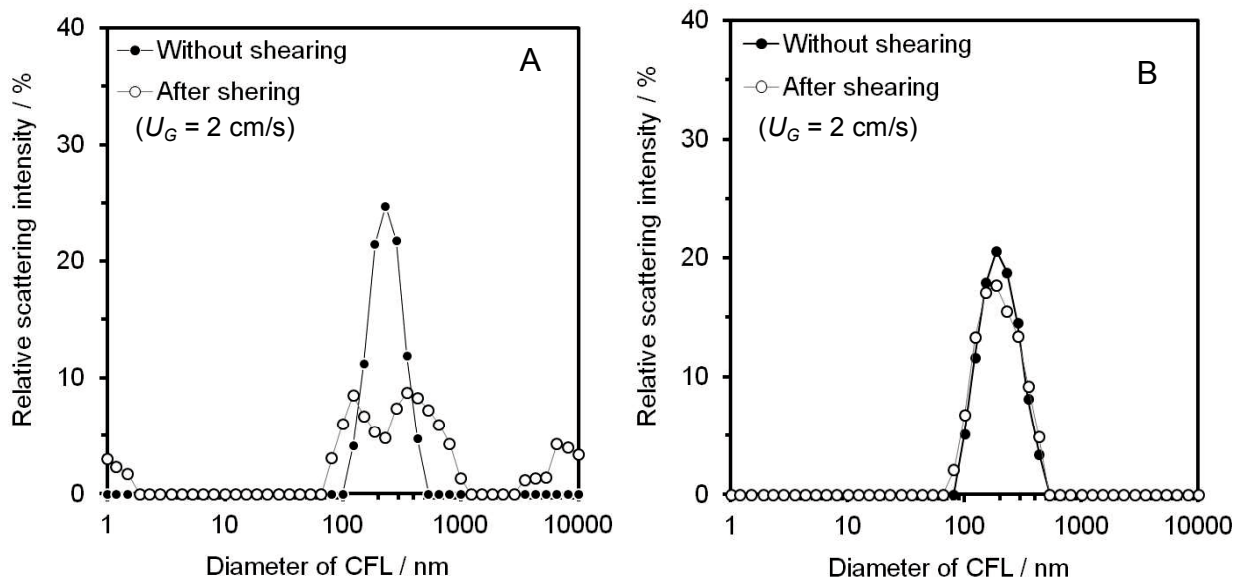


Figure 3-7 Size distribution of CFLs composed of POPC and DOTAP (5:2) (A), and POPC and POPG (5:2) (B).

3-3-6. CFLの膜透過性に及ぼす液深の影響

Figure 3-8A に NBC (type B) において $U_G = 2.0 \text{ cm/s}$ の条件下、様々な H_L (16~150 mm) で測定した R_{CF} の経時変化を示す。 $H_L = 150 \text{ mm}$ において 120 min では $R_{CF} = 0.03$ を示した。一方、 $H_L = 16 \text{ mm}$ において、 $R_{CF} = 0.18$ と 6 倍の値を示した。時間に依存して R_{CF} 値は増大しており、液深が低いほど高い R_{CF} 値を示す。この結果に基づき P_{CF} 値を算出して Figure 3-8B に示す。 P_{CF} 値は H_L の減少に伴い明らかに増大している。分散板近傍の影響が大きいと考えられたため液深に反比例すると仮定して、 $P_{CF} = P_{CFm}(H_{Lm}H_L^{-1})$ を計算した。ここで P_{CFm} は最も低い液深 H_{Lm} における P_{CF} 値を示す。Figure 3-8 において、 $H_L = 16 \text{ mm}$ の時の P_{CF} 値を使用した。計算値は Figure 3-8 の破線のようにになった。実測値と良く一致していることから分散板近傍で発生するせん断速度の寄与が大きいことがわかる。

Figure 3-9 には異なる H_L 範囲 (8~56 mm)、 $U_G = 3.0 \text{ cm/s}$ において得られた結果を示す。高い U_G のために同一 H_L においても Figure 3-8B より大きな P_{CF} 値を示す。Figure 3-8B と同様に低い液深 H_{Lm} における P_{CF} 値を基準とした計算値を図に示す。実測値は計算値と良い一致を示すが、高 H_L 領域では計算値より実測値が高いことが確認できる。この領域ではスラグ流が確認された。スラグ流による壁せん断速度の増大のためこのような結果を示したと考えられる。

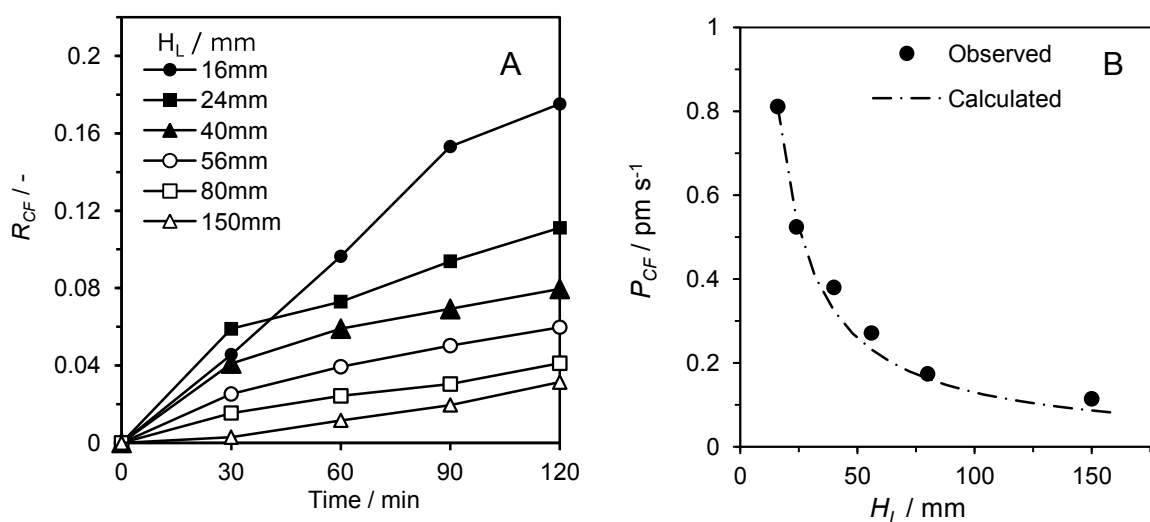


Figure 3-8 (A) Time courses of R_{CF} at various H_L in an external loop airlift bubble column. (B) Effect of H_L on P_{CF} . The broken curve is calculated with $P_{CF} = P_{CF16}(H_{L16}H_L^{-1})$.

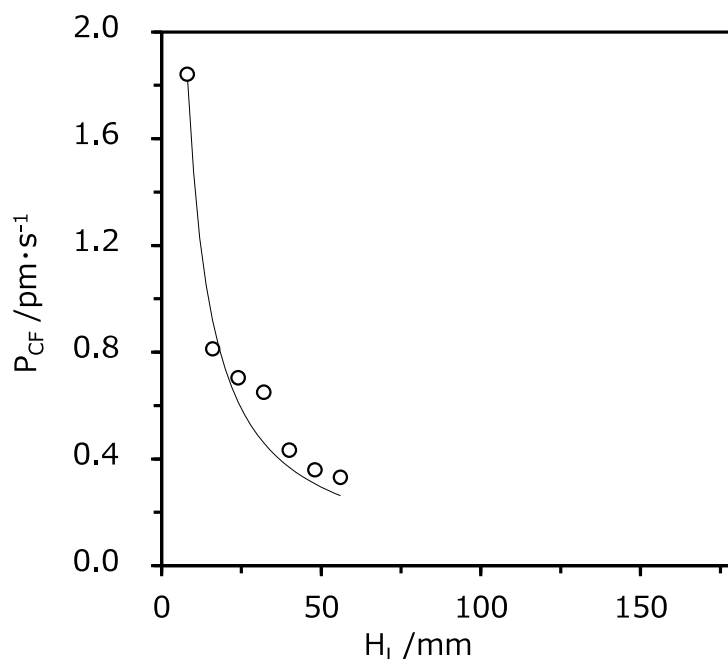


Figure 3-9 Effect of H_L on P_{CF} . The broken curve is calculated with $P_{CF} = P_{CF8}$ ($H_L \propto H_L^{-1}$).

3-3-7. CFL の膜透過性におよぼす気泡塔形状の影響

Figure 3-10 に各形状の ELBC (Type A, B or C) に CFL ([lipid] = 1.0 mM) を $U_G = 2.0$ cm/s の条件下、懸濁したときの P_{CF} を示す。Type A が 0.22 pm/s と最も高い透過係数を示し、Type B, C は 0.1 と 0.11 pm/s と Type A と比べて 50 % ほどの透過係数を示している。形状やスケールの違いが CF 膜透過係数に影響を与えることがわかる。これまでの P_{CF} に基づき各気泡塔内のせん断速度を第 3 節の方法を使用して明らかにした。コーン・プレート型粘度計を使用して求めたせん断速度と P_{CF} の関係を **Figure 3-11** に示す。気泡塔内気液流動が誘起するせん断速度は **Figure 3-12** に示すようになった。Type A の ELBC については $\gamma [s^{-1}] = 8.9 \times 10^4 [m^{-1}] \times U_G [m/s]$ と第 3 節で示した結果に近い相関式を示しており、リポソームを使用した定量法が有用であることを示している。Type B, C の相関式はそれぞれ $\gamma [s^{-1}] = 4.1 \times 10^4 [m^{-1}] \times U_G [m/s]$ 、 $\gamma [s^{-1}] = 4.5 \times 10^4 [m^{-1}] \times U_G [m/s]$ となった。Type A より大きな体積をもつ B は A より低いせん断速度を示す。体積に反比例している結果は NBC と傾向が類似している。すなわち本研究で使用したスケールの ELBC はスパージャー近傍で発生したせん断速度の影響が大きいといえる。また、ダウンカマー径が大きい Type C の ELBC はダウンカマーの液流速

の減少と体積の増大による平均せん断速度の低下により Type A より低いせん断速度を示したと考えられる。 以上の方法を使用することにより、形状の異なる気泡塔内部で発生するせん断速度を直接推定できることがわかった。リポソームを構成する脂質の組成比、粒子径を変えることにより膜の透過性を変化させることができる。すなわち、せん断速度に対する応答性を改変することができる。 気泡塔の形状や測定条件に適合したリポソームを調製することにより、様々な気泡塔において詳細にせん断速度を推定することができると考えられる。

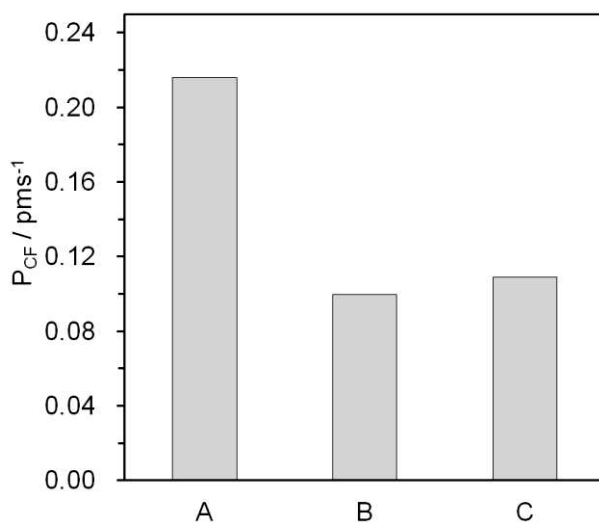


Figure 3-10 Permeability coefficient P_{CF} of CFLs suspended in the three types of ELBCs.

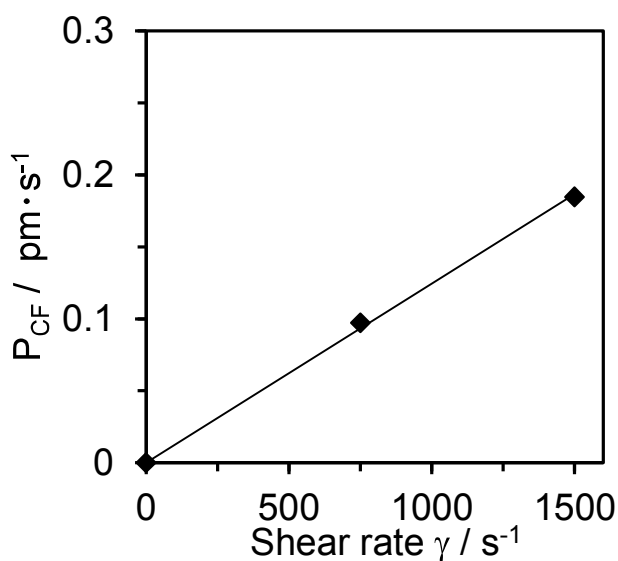


Figure 3-11 Relationship between P_{CF} and γ .

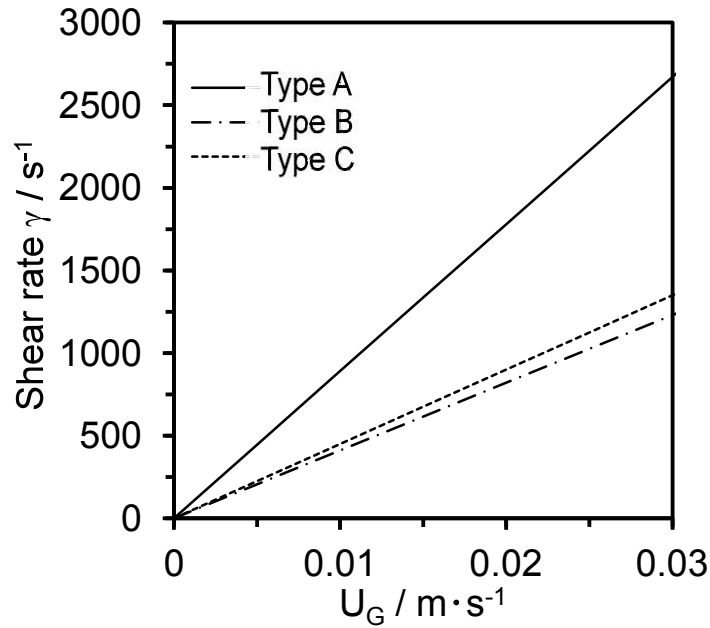


Figure 3-12 Relationship between γ and U_G .

3-4. 結言

新しいせん断感受性プローブとして 5(6)-Carboxyfluorescein 含有リポソーム(CFL)を使用することにより外部循環式エアリフト型気泡塔内の平均せん断速度を定量した。脂質膜を透過した色素分子の透過係数 P_{CF} は CFL を懸濁したコーン・プレート型粘度計内のせん断速度と相関することができ、エアリフト中の γ 値は $U_G \leq 0.03 \text{ m/s}$ における P_{CF} に基づいて推定した。この方法に基づき液深の違いによる標準型気泡塔内のせん断速度を測定することによりガス分散板近傍で発生するせん断速度の影響が大きいことを明らかにした。また、形状の異なる 3 種類の気泡塔内のせん断速度を測定することにより、ライザー/ダウンカマー断面積比や液深などの形状の違いがせん断速度に影響を与えることを明らかにした。CFL は様々なスケールおよび構造をもつ他のバイオリアクターのせん断速度を推定するために適用できる可能性がある。リポソームのベシクル構造がせん断流下において安定であるならば、CFL は非ニュートン流体にも適用できると考えられる。せん断速度を実験的に決定することは細胞培養プロセスにおける細胞損傷を最小限に抑制するとともに、合理的な細胞応答を理解することにつながる。さらに、リポソームをプローブとする方法は従来の理論的アプローチに代わる種々のバイオリアクター内のせん断速度の評価法として有用である。

本研究で使用したリポソームはせん断ストレスに対する応答性を増大させるために複合脂質膜を採用している。僅かな脂質組成の違いによりせん断ストレスに対する

リポソームの応答性が変化する可能性がある。この影響を排除するためには単一脂質からなるリポソームの利用が考えられる。例えば、合成脂質 *Amidophospholipids* から構成されるリポソームはせん断ストレスに対して高い応答性を示すことが報告されている (Holme *et al.*, 2012)。このようなリポソームを用いればせん断速度と膜透過係数の関係が一義的に規定できるため、リポソーム調製毎に粘度計を用いた応答性のチューニングが不要になる。

また、気泡塔内の気液分散板近傍は乱流で複雑な流れが発生している。さらに、気泡塔の各部位で異なるせん断速度が発生する。リポソームを用いて測定した気泡塔のせん断速度は気泡塔内の様々な部位で発生するせん断速度の平均を示す。リポソームを非多孔性粒子へ固定化して気泡塔内に設置することにより、気泡塔内の任意の位置のせん断速度を定量化するためのプローブとしてリポソームを応用することができる。

第4章 人工シャペロンとしての機械的ストレス感受性リポソームによるせん断誘起型酵素触媒反応の加速化

4-1. 緒言

流体運動によるせん断ストレスは細胞の構造変化および機能的応答を誘起する (Chisti, 2010)。血管内皮細胞は血液の流れによって生じるせん断ストレスを感知して細胞内機能を誘導することが報告されている (Ando and Yamamoto, 2013)。このような細胞メカノトランスダクションにおいて構造的な柔軟性をもち (Gudi *et al.*, 1998)、流体と直接的に接触する脂質二重膜は重要な役割をもつ。せん断ストレスは DNA (Yamashita *et al.*, 2007)やタンパク質 (Schneider *et al.*, 2007; Bekard *et al.*, 2012; Jaspe and Hagen, 2006) などの生体高分子の分子レベルの構造に影響を及ぼす。せん断ストレスに誘起される生物学的現象は実用的に有用である (Korin *et al.*, 2012; Hallow and Seeger, 2008)。Holme *et al.* (2012) はせん断誘起される Amidophospholipids (Fedotenko *et al.*, 2010) から構成されるリポソームの透過性を報告した。これは、血管のプラーク部位で発生する強いせん断ストレスに応答して薬物がリポソームから放出される機械的ストレス応答性の薬物送達に応用できる。せん断ストレスは様々なスケールで任意の流体により生成されるため、せん断誘起される生体分子、脂質膜、細胞の構造および機能がバイオリアクターの設計や操作のために利用できる可能性がある (Chisti, 2010)。

微小流体デバイスはさまざまな分析、分離、反応プロセスを高度に制御できる (Seong and Crooks, 2002; He *et al.*, 2013; Yamada *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2010)。興味深いことに、いくつかの酵素触媒反応は微小流路内の層流中で加速化される (Tanaka *et al.*, 2001; Kanno *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2013)。これは分析、合成化学において有用な現象である。一方、酵素分子はせん断流に暴露することで構造変化および不活性化する (Charm and Wong, 1970; Bekard *et al.*, 2011; Veen *et al.*, 2004; Ashton *et al.*, 2009)。酵素反応がせん断流中で加速されるメカニズムは完全に理解されていないが、上記の観測は静止液系と比較してせん断流は温和な pH や温度条件下において全く異なる反応環境を提供することを示している。

細胞システムでは、タンパク質のフォールディング中間体や熱により構造変化したタンパク質はシャペロン分子の介助により天然状態へ移行する (Hartl, 1996)。シャペロンタンパク質は凝集しやすいタンパク質の疎水性部位と効率的に相互作用する。一方、せん断ストレスは疎水性ドメインの暴露に繋がるタンパク質の構造変化を引き起

こす (Bekard *et al.*, 2011)。したがって、シャペロン様の機能を有する物質が存在することによりせん断流中におけるタンパク質の安定性は増加する。 α -Crystalline は流体流動に誘起される立体構造が変化したタンパク質のアミロイド繊維の形成を阻害する (Mangione *et al.*, 2013)。シャペロン分子やシャペロン様タンパク質は特に高いせん断ストレスにおいて不活性化する可能性があり、さらに高いコストのためにせん断流に適用する最適な材料ではない。この背景において、せん断流中の酵素活性を安定化するための候補として十分な機械的安定性をもつ人工シャペロンが挙げられる。これまでのところ、ナノゲルのような材料 (Takahashi *et al.*, 2011)、ソフトナノチューブハイドロゲル (Kameta *et al.*, 2012)、機能性ポリマー (Osaki *et al.*, 2007) がリフォールディングまたはタンパク質の熱変性過程で人工シャペロンとして機能することが報告されている。しかし、せん断流中で機能することができる人工シャペロンは報告されていない。リポソームは、化学的に変性させたタンパク質のリフォールディング過程において人工シャペロン様機能を発現する (Kuboi *et al.*, 1997; Yoshimoto and Kuboi, 1999)。第 2 章より、リポソームは制御可能な粒子径、物理的安定性、せん断応答性をもつことからせん断流中で利用できる人工シャペロンとして魅力的である。

本研究では、せん断流中の酵素活性を促進するための新規リポソームシステムを提案する。このシステムではせん断流中においてリポソームに封入された酵素を放出することができる脂質膜の機械的ストレス感受性を利用する。せん断流におけるリポソームのシャペロン様機能を評価するために酵素活性の安定性に対するリポソーム膜の効果を明らかにした。層流せん断流は $190\ \mu\text{m}$ と $380\ \mu\text{m}$ の内径をもつ微小円管を通る液体の流れに基づいて比較的高いせん断速度 γ ($\sim 7.8 \times 10^3\ \text{s}^{-1}$) において生成させた。モデル酵素反応として生成過酸化水素の同時分解を伴うグルコースオキシダーゼ触媒反応を採用した (Yoshimoto *et al.*, 2004; 2005)。せん断流中における制御された GO 触媒反応はグルコースの選択的検出 (Kim *et al.*, 2013) とグルコン酸の生成 (Nakao *et al.*, 1999) に有用である。

4-2. 実験

4-2-1. 材料

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)と 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) は NOF (Tokyo, Japan) から購入した。POPC と POPG はそれぞれ両性と負電荷脂質である。*Aspergillus niger* 由来の Glucose oxidase (GO; EC 1.1.3.4, $M_r \approx 180,000$) (Swoboda and Massey, 1965) は Toyobo (Osaka, Japan) から購入した。Cholesterol、 β -D-glucose, 3,3-dimethoxybenzidine dihydrochloride (*o*-dianisidine)、sodium cholate、horseradish peroxidase (HRP)、 H_2O_2 、牛肝臓由来の catalase (EC 1.11.1.6, $M_r \approx 240,000$) は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。5(6)-Carboxyfluorescein (CF) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。牛血清 albumin (BSA, IgG-free and protease-free) は Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) から購入した。全ての試薬は購入した状態で使用した。水は Elix 3UV (Millipore, Billerica, MA, USA) 装置を使用して脱イオン・滅菌した。水に対する最小抵抗は $15\text{ M}\Omega\text{cm}$ であった。

4-2-2. 酵素封入りポソームと CF 封入りポソームの調製

各脂質の混合物(POPC のみ、POPC:Cholesterol = 7:3、POPC:POPG:Cholesterol = 50:20:30、モル比) は 4.0 mL のクロロホルムで溶解した。ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した。クロロホルムの代わりにジエチルエーテルを加えて上記の操作を 2 回繰り返した。残留した有機溶媒分子を凍結乾燥機により除去した。形成された脂質膜は 5.0 g/L GO と 5.0 g/L catalase または、1.3 g/L catalase を含む 50 mM Tris-HCl/100 mM NaCl buffer (pH 7.4) を 2 mL 加えて水和した。多重層ベシクルと酵素の混合物は小さな小胞体を大きくするために 7 min 冷媒中 (ドライアイス/エタノール) で凍結して 37 °C の恒温槽で 7 min 温浴した。このようにして得られた小胞体懸濁液は Avestin (Ottawa, Canada) の押し出し装置 LiposofastTM (MacDonald *et al.*, 1991) を使用して細孔径 200 nm のポリカーボネート膜を通過させた。未封入酵素分子は sepharose 4B column (1.0 (id) \times 20 cm) を充填したゲル濾過クロマトグラフィーにより酵素封入りポソームから除去した。空のリポソームは酵素を含まない緩衝液で乾燥脂質膜を水和して上記と同じ手順で調製した。CF 封入りポソーム (以下、CFL) は上記押し出し法を用いて調製した (Yoshimoto *et al.*, 2013)。CFL のサイズ調整は 100 また

は 200 nm の細孔径をもつ膜を通過させた。POPC 濃度は和光純薬工業のリン脂質定量キットを使用して測定した (Takayama *et al.*, 1977)。

4-2-3. GO 活性の測定

GO 活性は、基質として 10 mM のグルコースを含むトリス緩衝液を使用して 25 °C において測定した。GO 反応はグルコースの酸化によりグルコン酸と H₂O₂ を生成する。H₂O₂ の初期生成速度は、HRP に触媒される H₂O₂ による *o*-dianisidine の酸化反応に基づき決定した。反応混合物(1.5 mL)中の HRP と *o*-dianisidine の初期濃度はそれぞれ 0.2 g/L と 0.33 mM とした。酸化型 *o*-dianisidine の濃度の増加は分光光度計 (V-630BIO, Jasco, Tokyo, Japan) を用いて 1.0 cm の光路長を有する石英セル中で 460 nm ($\epsilon_{460} = 11,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Hill *et al.*, 1977) の吸光度に基づいて追跡した。リポソーム系に含まれるカタラーゼ活性は上記の活性測定に干渉しないことを確認した。リポソーム系における内封 GO 活性は、リポソーム膜を 40 mM のコール酸ナトリウムで完全に溶解して測定した (Yoshimoto *et al.*, 2003)。

4-2-4. Catalase 活性の測定

Catalase 活性は 25 °C において基質として 10 mM の H₂O₂ を用いて測定した (Yoshimoto *et al.*, 2007)。H₂O₂ 濃度の経時変化はセル中において 240 nm の吸光度 ($\epsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Huggett and Nixon, 1957) に基づき分光光度計を用いて追跡した。リポソーム系における内封 catalase 活性はリポソーム膜を 40 mM のコール酸ナトリウムで完全に溶解して測定した。

4-2-5. 平均粒子径と粒子径分布の測定

リポソームの粒子径分布は光源として半導体レーザーを搭載した ELSZ-2plus 機器 (Otsuka Electronics, Osaka, Japan) を使用して動的光散乱(DLS)法により測定した。光の波長と角度はそれぞれ 660 nm および 160°であった。粒子径分布は Marquardt アルゴリズムを用いて計算した。リポソームの平均粒子径 (D_p) は屈折率 (1.33) を用いて Einstein-Stokes の関係により決定した。リポソームの多分散指数 (PI) は粒子径分布に基づき決定した。リポソーム懸濁液を希釈するために使用した Tris 緩衝液は細孔径

0.22 μm の膜 (Milex PVDF, Millipore, Billerica, MA) を通過させて濾過した。全ての測定は 25 $^{\circ}\text{C}$ において 3 度測定した。

4-2-6. 外部循環式微小円管反応器中のグルコース酸化反応

Figure 4-1 に実験で使用した石英セルと長さ $L = 0.40\text{ m}$ と内径 $d_{\text{in}} = 190, 380\ \mu\text{m}$ をもつ 4 つの並行 Tygon 管から構成される反応器の概略図を示す。円管を通る液流動は蠕動ポンプ ECOLINE VC-MS/CA4-12 (ISMATEC, Glattbrugg, Switzerland) を使用して誘起した。最大平均流量 u_{av} は $d_{\text{in}} = 190$ と $380\ \mu\text{m}$ においてそれぞれ $u_{\text{av}} = 0.37$ と 0.30 m/s である。円管内の流れの状態の指標となる無次元数であるレイノルズ数 Re は $Re = d_{\text{in}}u_{\text{av}}\rho/\mu$ から計算された。ここで、 ρ は流体密度、 μ は流体の粘度 ($\mu = 0.94\text{ mPa}\cdot\text{s}$) である。 Re 値は $Re \leq 75$ として計算された。これは各円管内が層流領域であることを意味する。リポソーム懸濁液はニュートン流体であるため、液体の流れ u は $u = \{\Delta P R^2 / (4\mu L)\} \{1 - (r/R)^2\}$ として放物線状の速度分布を示す。ここで r は円管中心からの距離、 R は円管半径 ($R = d_{\text{in}}/2$)、 ΔP は円管の入口と出口間の圧力差 ($\Delta P = 8\mu L u_{\text{av}} / R^2$) (Bird *et al.*, 2007) である。円管内のせん断状態の指標として平均せん断速度 γ_{av} を採用した。任意の r におけるせん断速度 γ は $\gamma = du/dr = \Delta P r / 2\mu L$ と示される。従って、線形せん断速度分布が円管内に形成され、 γ_{av} 値は $\gamma_{\text{av}} = \Delta P R / (4\mu L)$ at $r = R/2$ として与えられる。平均せん断ストレス τ_{av} は $\tau_{\text{av}} = \gamma_{\text{av}} \cdot \mu$ として計算できる。本研究の操作条件は $7.9 \times 10^2 \sim 7.8 \times 10^3\text{ s}^{-1}$ の γ_{av} 値を与える。最大せん断速度 ($\gamma_{\text{max}} = 2\gamma_{\text{av}}$) は円管の壁面において発生する。

グルコースの触媒酸化を開始するために、GO および catalase を封入したリポソーム ([lipid] = 1.0 mM) を懸濁した Tris 緩衝液をセルに仕込み、グルコースを初濃度 10 mM になるように添加した。液循環は速やかに開始した。反応混合物の全体積 ($V_{\text{T}} \leq 2.0\text{ mL}$) に対する円管の体積 (V_{M}) の値 ($V_{\text{M}}/V_{\text{T}} \approx 0.1$) は d_{in} の値に関係なく同一にした。一定時間毎にサンプルをセルから取り出し酵素法でグルコース濃度を定量した (和光純薬工業の測定キットを使用)。 H_2O_2 濃度も HRP 触媒酸化反応に基づき測定した (Yoshimoto *et al.*, 2007)。酸化反応は上記の空のリポソーム ([lipid] = 1.0 mM) 存在下で $3.3 \times 10^{-2}\text{ g/L}$ の遊離 GO と $5.0 \times 10^{-2}\text{ g/L}$ の遊離 catalase の触媒下で実行した。反応における円管内表面への酵素の吸着を評価するために、1.0 g/L の BSA で前処理した円管を用いて反応操作を行った。この処理は 30 min 間比較的低いせん断速度 $\gamma_{\text{av}} = 7.9 \times 10^2\text{ s}^{-1}$ で実施し、続いて Tris 緩衝液で 2 回すすいだ。リポソーム系における GO および catalase 活性は反応操作の前後に測定した。活性測定は 40 mM のコール酸ナトリウ

ム非共存下で実施した。円管内表面とリポソーム膜との相互作用を検討するために、空のリポソームを POPC の初濃度 1.0 mM で連続的に円管に通過させて、脂質濃度を追跡した。

4-2-7. せん断流中におけるリポソーム内封入酵素と遊離酵素の安定性の測定

GO 封入リポソームは Figure 4-1 に示す反応器を用いて、グルコースの非存在下で 1.0 mM の脂質濃度で円管を通過させることによりせん断処理した。その後、セル中の GO と catalase 活性を測定した。遊離酵素の安定性を測定するために、上記の測定は 1.0×10^{-2} g/L の遊離 GO と 7.6×10^{-2} g/L の遊離 catalase を含む Tris 緩衝液を使用して行った。遊離 GO の安定性は空のリポソーム ([POPC] = 1.0 mM) の存在下で上記と同様の酵素濃度で測定した。

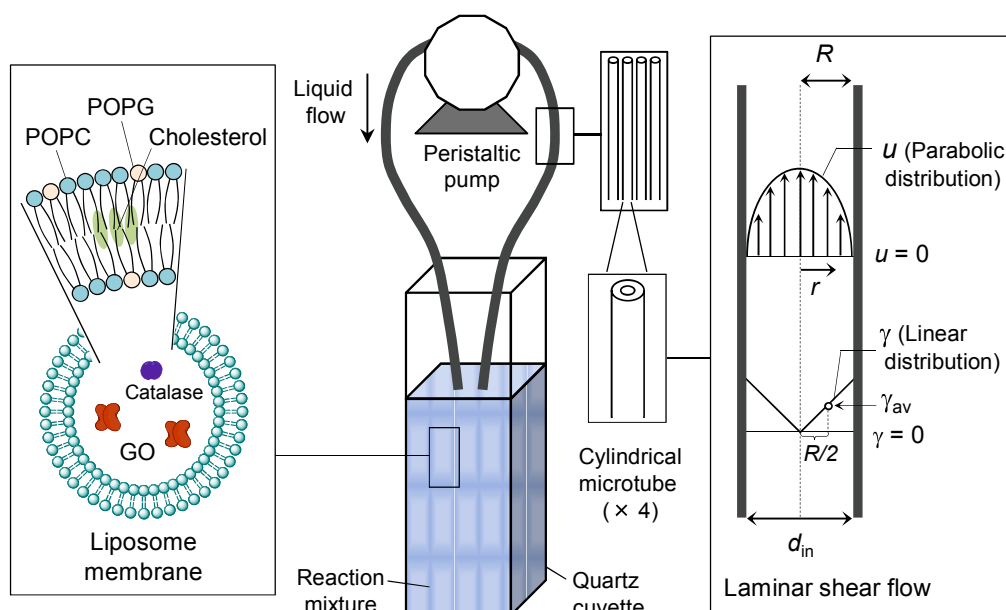


Figure 4-1 Schematic drawing of a reactor consists of a quartz cuvette suspending liposomes encapsulating GO and catalase with external liquid circulation through four parallel microtubes ($d_{in} = 190$ or $380 \mu\text{m}$). Dimension of the cuvette was $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm} \times 4.5 \text{ cm}$ in height. The length of each microtube was 0.40 m. The cuvette was bathed in a waterbath thermostatted at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The distribution of liquid flow rate u and shear rate γ within the microtube is also shown.

4-2-8. リポソームからの GO 漏出の測定

せん断ストレス負荷条件下でリポソーム内部から放出される遊離 GO 分子は GPC を使用してリポソーム封入 GO から分離した。GO と catalase 共封入リポソーム ([POPC] = 5.0 mM) は 180 min 円管を通過させることによりせん断処理 ($\gamma_{av} = 3.1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) した後、リポソーム懸濁液を sepharose 4B カラムで分析した。採取したサンプルの脂質濃度と酵素濃度を測定した。漏出した GO は後半の溶出ピークとして得られる漏出した GO 量を決定して全 GO 量に対する相対量として計算した (Yoshimoto *et al.*, 2003)。

4-2-9. せん断流中に懸濁したリポソームからの CF 漏出量の測定と分析

CFL は 25 °C において円管を使用してせん断処理した。一定量のサンプルは、Jasco の分光蛍光測定装置 FP-770 (Tokyo, Japan) を用いて 25 °C で蛍光強度 I_t を測定するために任意の操作時間 t においてセルから取り出した。測定の励起波長と蛍光波長はそれぞれ、490 と 517 nm である。透過平衡状態の蛍光強度 I_∞ は 40 mM のコール酸存在下の蛍光強度を測定することにより決定した。リポソームからの CF の漏出 R_{CF} は $R_{CF} = (I_t - I_0)/(I_\infty - I_0)$ として計算した。ここで、 I_0 は初期の CF 蛍光強度を示す。操作時間 t は第 2 章と本研究の CF 漏出の比較をするために有効せん断時間 $t_{eff} = t(V_M/V_T)$ として算出した。CF に関する物質収支に基づき (Yoshimoto *et al.*, 2007) 透過係数 P_{CF} を $P_{CF} = ka^{-1}$ として算出した。ここで、 a は CFL の比表面積 ($a = 6/D_p$)、 k は $-\ln(1 - R_{CF})$ vs. t_{eff} をプロットして得られる直線の傾きである。

4-2-10. 外部循環式エアリフト型気泡塔内の H_2O_2 分解反応

体積 15.0 mL の容量を有するミニスケールの外部循環式エアリフト型気泡塔をバイオリクターとして使用した。エアリフトのライザーとダウンカマー径はそれぞれ 15.0 mm と 9.0 mm であった。スパージャーとして、40-100 μm の公称孔径を有するガラスフィルターをライザーの底部に設置した。脂質濃度を 1.0 mM に調製した catalase 封入リポソームをエアリフトに加え 10 mM の H_2O_2 存在下、濾過フィルターを通過させた窒素ガスを加湿器を介してガス空塔速度を 0.47、1.9 cm/s の範囲で通気して反応させた。エアリフトの温度は恒温水で 40 °C に維持した。静止液系は試験管内に 10 mM H_2O_2 と catalase 封入リポソームを含む反応溶液を 1.5 mL 加えて行った。任意の反応

時間にエアリフトおよび試験管中の H_2O_2 濃度を 10 min 追跡した。 H_2O_2 濃度は 25 °C においてペルオキシダーゼにより触媒された *o*-dianisidine の酸化反応に基づいて測定した (Yoshimoto *et al.*, 2004)。

4-3. 結果及び考察

4-3-1. せん断流中における GO 封入リポソーム反応の特性

GO と catalase を共封入させたリポソームは単分散 (多分散指数 $\text{PI} = 0.062 \pm 0.024$) で平均粒子径 D_p は 149 ± 2 nm であった。リポソーム 1 個当たりの GO と catalase の平均分子数を脂質濃度 1.0 mM の GO/ catalase と共封入リポソームを懸濁した Tris 緩衝液中の固有活性を測定することにより計算した結果、内封入 GO と catalase 分子数はそれぞれ 12.8 ± 2.5 と 6.6 ± 0.4 と推定された (Table 4-1)。GO- catalase 共封入リポソーム触媒下の 10 mM グルコースの酸化反応を 25 °C においてせん断流中で行った。微細円管内の流動様式は、蠕動部位で強いせん断速度が発生するために部分的に層流から外れる。このような流動状態の局所的な変化はリポソームの構造に影響を及ぼす可能性がある。しかし、微小円管の入り口から出口の流体の平均滞留時間と比較して非層流領域の滞留時間は著しく短いことを考慮して、円管内のせん断ストレスを表すパラメータとして層流領域における平均せん断速度 (γ_{av}) を採用する。比較のために試験管内静止液 ($\gamma = 0$) での反応も実施した。Figure 4-2A に種々の γ_{av} におけるグルコース転化率の経時変化を示す。すべての反応において、グルコースの酸化により生成される H_2O_2 はリポソーム内の catalase 活性により検出されなかった。 $\gamma = 0$ において、リポソーム内封入 GO はグルコースに対する脂質膜の大きな透過抵抗により低い反応性を示す (Yoshimoto and Wang, 2003; Kuroiwa *et al.*, 2012; Yoshimoto *et al.*, 2004)。 $\gamma = 0$ において、酵素分子を遊離させるためにコール酸によりリポソームを溶解することにより得られたミセル系触媒下の酸化反応の経時変化を Figure 4-2A の破線に示す。ミセル系 GO 反応は物質移動抵抗を無視できるため、リポソーム系の $\gamma = 0$ の場合より大きな酸化速度を示している。リポソーム内封入 GO によって触媒されるグルコースの見かけの酸化速度 ($-r_{G,app}$) は γ_{av} の増加に伴い上昇する傾向にある (Figure 4-2B)。 $3.1 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \leq \gamma_{av}$ において得られた $-r_{G,app}$ 値はミセルの GO 反応より大きい。この結果は GO 触媒反応がせん断流により加速化されることを示している。上記の結果はリポソーム内封入 GO 触媒下の見かけのグルコース酸化反応速度がせん断流に基づき広い範囲で制御可能であることを示す。

Table 4-1 Estimation of average number of enzyme molecules per liposome.

Concentration of lipid C_L	1.0 mM
Mean diameter of liposomes D_p	149 nm
Average area per lipid head group ^a $A_{L,av}$	0.57 nm ²
Number of lipid molecules per liposome ^b N_L	2.3×10^5
Concentration of liposome ^c C_V	4.3 nM
Overall concentration of GO ^d C_{GO}	55 ± 11 nM
Overall concentration of catalase ^d C_{CA}	29 ± 2 nM
Number of GO molecules per liposome N_{GO} ^e	12.8 ± 2.5
Number of catalase molecules per liposome N_{CA} ^f	6.6 ± 0.4

^aThe $A_{L,av}$ value was calculated with the head group area of 0.72 nm² for POPC (Dorovska-Taran *et al.*, 1996), 0.66 nm² for POPG (Kučerka *et al.*, 2012) and 0.27 nm² for cholesterol (Hofsäb *et al.*, 2003) (POPC:POPG:cholesterol = 50:20:30 in molar ratio).

^bThe N_L value was calculated as $N_L = (4\pi/A_{L,av})\{(D_p/2)^2 + (D_p/2 - l)^2\}$, where l is the bilayer thickness of liposome membranes ($l = 3.7$ nm) (Dorovska-Taran *et al.*, 1996). Liposomes are assumed to be spherical.

^cThe C_V value was calculated as $C_V = C_L/N_L$.

^dThe concentrations of enzymes were determined based on their intrinsic activity. Values are mean of three measurements. Errors represent standard deviation.

^eThe N_{GO} value was calculated as $N_{GO} = C_{GO}/C_V$.

^fThe N_{CA} value was calculated as $N_{CA} = C_{CA}/C_V$.

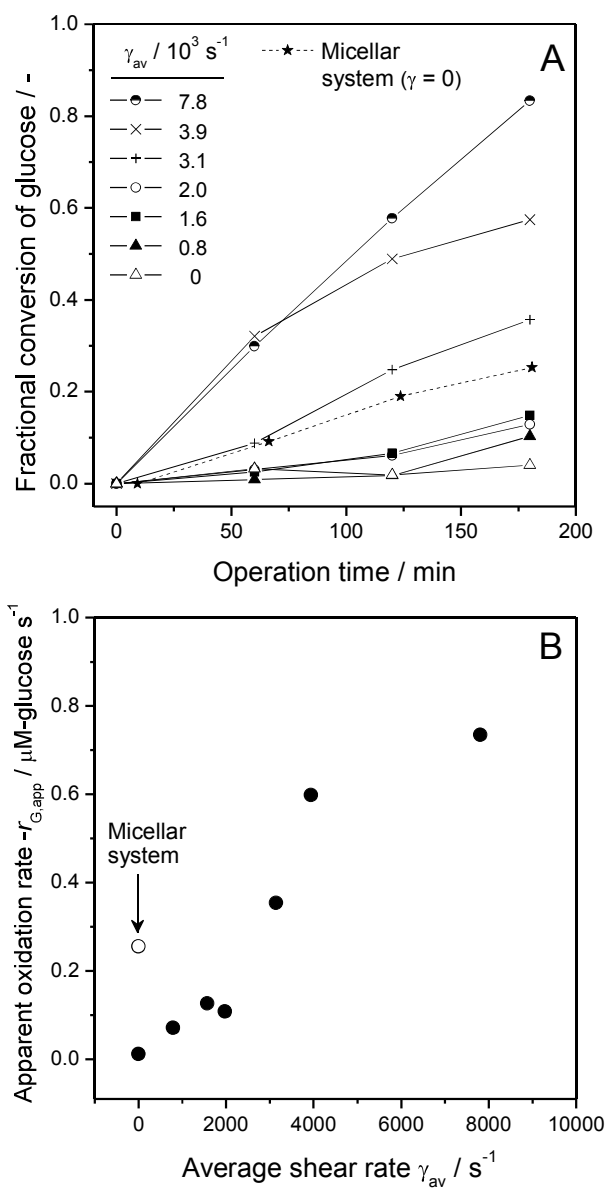


Figure 4-2 (A) Time courses of fractional conversion of 10 mM glucose catalyzed by liposomes encapsulating GO and catalase at various average shear rates γ_{av} at 25 °C. The total lipid concentration was 1.0 mM. The overall concentration of GO was 1.0×10^{-2} g/L. Broken curves and filled stars represent the data for the reaction catalyzed by micellar enzyme system at $\gamma = 0$. (B) Effect of γ_{av} on the apparent oxidation rate of glucose $-r_{G,app}$ catalyzed by liposomal GO. The rate for micellar enzyme-catalyzed reaction is also shown (empty circle).

4-3-2. リポソーム膜の機械的ストレス感受性

脂質膜の透過性およびリポソームの物理的安定性に基づいて POPC、POPG とコレステロールから構成されるリポソームの高せん断速度によって誘起される構造変化を評価した。比較的低いせん断速度 ($\gamma_{av} \leq 1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) および $25 \text{ }^\circ\text{C}$ においても上記の混合リポソームは構造変化を誘起することができる (Yoshimoto *et al.*, 2013)。一方、POPC のみから形成されるリポソーム膜透過性のせん断速度依存性は高温域で顕著となることを 2 章において示している。さらに、PG を組み込み負に帯電させたリポソームは陽イオンの存在下でクラスターを形成することができる (Sabín *et al.*, 2012; 2007)。このクラスターは薬物キャリアの開発 (Sabín *et al.*, 2012) やリポソームのせん断感受性を高める (第 2 章) ためには非常に有用である。親水性化合物の膜透過性は膜の構造変化の指標とすることができる (Yoshimoto *et al.*, 2007; Donato *et al.*, 2012)。

150 nm の粒子径をもつ 5(6)-carboxyfluorescein (CF) 封入リポソーム (CFLs) は $25 \text{ }^\circ\text{C}$ において 190 および 380 μm の内径をもつマイクロチューブを通過させて CF の漏出率 R_{CF} を測定した。試験管 $\gamma = 0$ において、180 min の測定時 $R_{CF} < 0.01$ と脂質膜はほとんど透過性を示さなかった。Figure 4-3 は有効せん断時間 t_{eff} に伴う R_{CF} 値の変化に対する γ_{av} の影響を示す。 $d_{in} = 190 \text{ } \mu\text{m}$ における CF 漏出速度は γ_{av} 値の増加とともに増大している (Figure 4-3A)。 $d_{in} = 380 \text{ } \mu\text{m}$ における CFL のせん断処理においても同様の結果となった (Figure 4-3B)。 $D_p = 188 \text{ nm}$ の CFL においても実験を行い同様の結果を得た (Figure 4-4)。CF 分子の透過係数 P_{CF} は CF に対する非定常物質収支式に基づき算出して (Yoshimoto *et al.*, 2007)、 γ_{av} の関数としてプロットした (Figure 4-5)。 $D_p = 188 \text{ nm}$ の CFL についてのデータも比較のために示す。 P_{CF} 値は CFL の粒子径に関係なく γ_{av} 値の増加に伴い明らかに増大している。また、 $D_p = 188 \text{ nm}$ の CFL は小さい粒子径の CFL と比較してより大きな P_{CF} 値を示している。 $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ におけるせん断処理の影響を $D_p = 150 \text{ nm}$ (Figure 4-6A) と 188 nm (Figure 4-6B) の CFL の粒子径分布に基づき検討した。負荷したせん断ストレスでは CFL の粒子径分布にほぼ変化がない。上述の結果は、リポソームの膜構造は維持された状態でリポソーム膜の疎水性部位の局所的な構造変化がせん断流により誘起されることを示している。Figure 4-6A を詳細にみると、せん断処理がリポソームの粒子径のわずかな減少を引き起こすことがわかる。液相中の脂質濃度に基づき微小円管内壁とリポソーム膜が相互作用する可能性を調べた (Figure 4-7)。リポソームと微小円管内壁間の相互作用は液相中の POPC 濃度を追跡して評価した。Figure 4-7 より $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ において 180 min の追跡では脂質濃度の減少は観測されないことからリポソームと微小円管の相互作用は無視

できることがわかる。以上の結果はリポソームの部分的な崩壊がせん断流中の流体ストレスにより進行することを示唆している。25 °C において POPC/POPG/cholesterol リポソームで得られた P_{CF} 値は POPC のみから構成されるリポソームを用いて 40 °C で得られた結果 (第 2 章) よりも大きい。せん断ストレスに対する本研究のリポソームの高い感受性はコレステロール含有膜の構造の不均一性に由来している可能性がある。

4-3-3. リポソームからの GO 分子の漏出

せん断流に懸濁したリポソームからの GO 分子の漏出を測定した。GO の分子量は CF より 480 倍大きい。活性利用率 E_{GO} は GO 活性に関して $E_{GO} = A_{L,S}/A_{I,0}$ として定義する。ここで、 $A_{L,S}$ は 180 min の操作時間においてリポソーム系で得られた GO 活性、 $A_{I,0}$ は初期の固有活性である。 $A_{I,0}$ 値はコール酸によりリポソームを溶解して得た。**Figure 4-8** は γ_{av} と E_{GO} 値の関係を示す。 $\gamma = 0$ において明らかに小さい E_{GO} 値が得られている。 E_{GO} 値は γ_{av} 値が $7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ まで増加するのに伴い 0.48 に増加しており、 $3.9 \times$

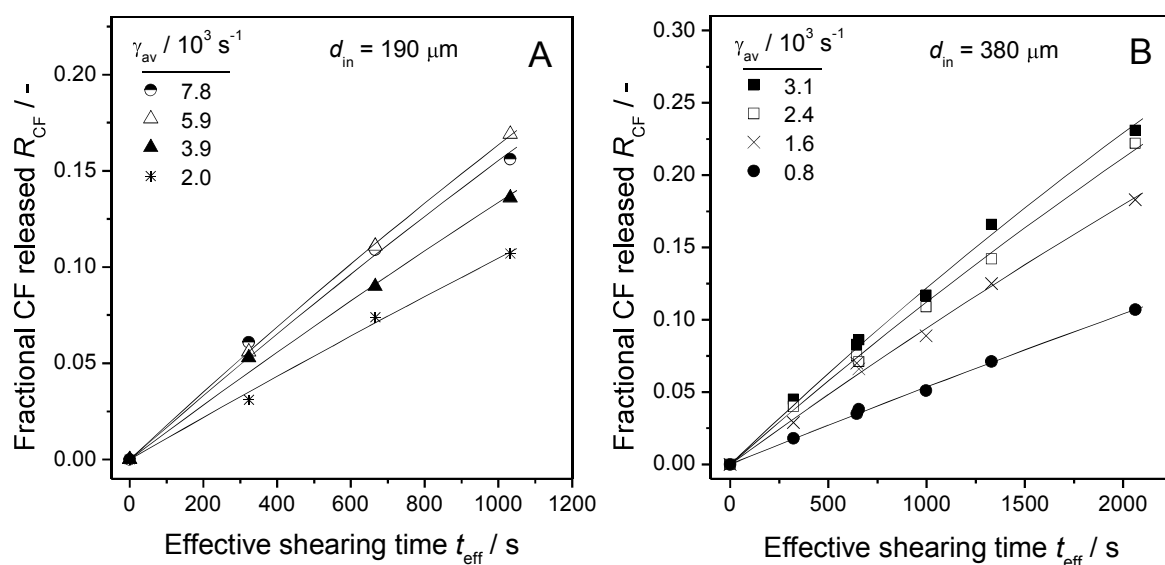


Figure 4-3 Time courses of fractional CF released R_{CF} from CFLs with $D_p = 150$ nm at various γ_{av} values at 25 °C. CFL suspension was sheared in the microtubes with $d_{in} = 190 \mu\text{m}$ (A) and $380 \mu\text{m}$ (B). Solid curves represent the calculated time courses, $R_{CF} = \{1 - \exp(-P_{CF}at_{eff})\}$. The value of $P_{CF}a$ corresponds to the slope of straight line obtained by plotting $-(1 - R_{CF})$ vs. t_{eff} .

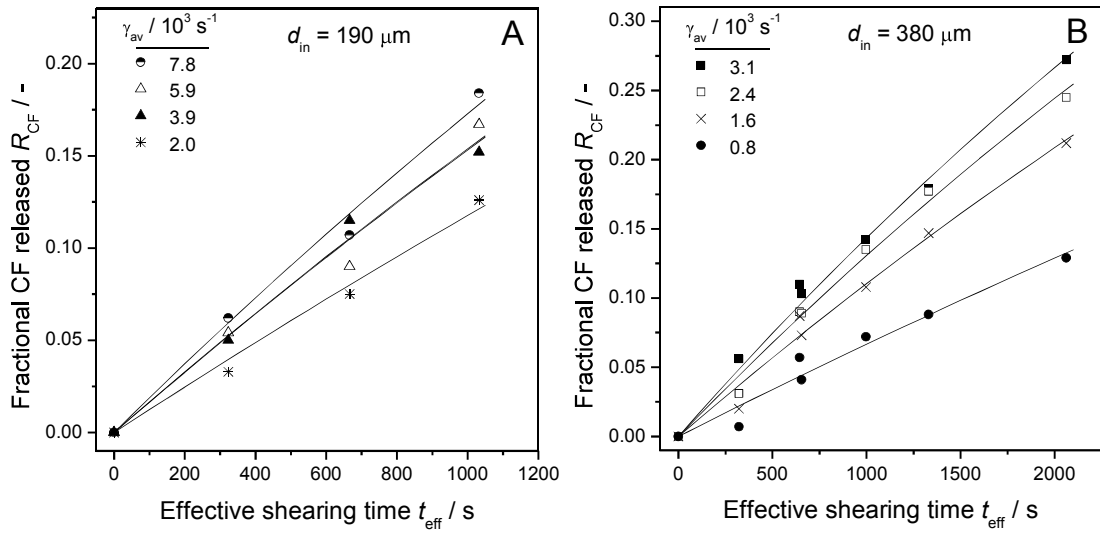


Figure 4-4 Effect of effective shearing time t_{eff} on the time courses of fractional CF released R_{CF} from CFLs with $D_{\text{p}} = 188 \text{ nm}$ at various average shear rates γ_{av} at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The CFL suspension was sheared in the microtubes with $d_{\text{in}} = 190 \mu\text{m}$ (A) and $380 \mu\text{m}$ (B). Solid curves represent the calculated time courses, $R_{\text{CF}} = \{1 - \exp(-P_{\text{CF}}at_{\text{eff}})\}$.

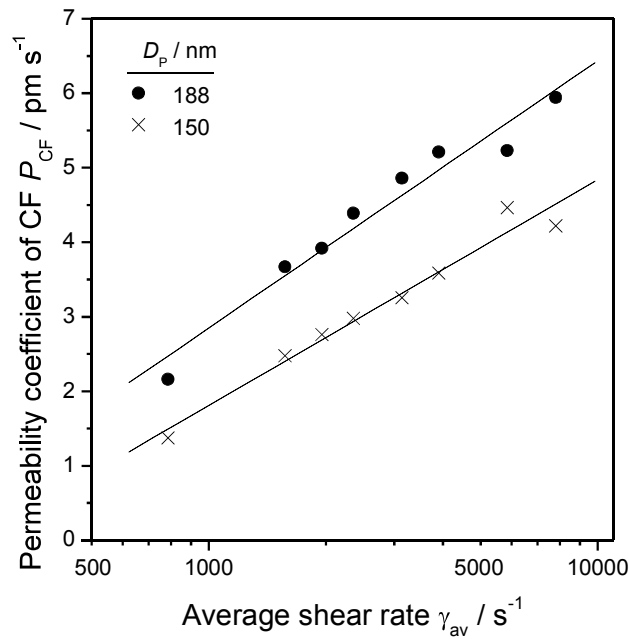


Figure 4-5 Effect of average shear rate γ_{av} on permeability coefficient P_{CF} of CF through liposome membranes.

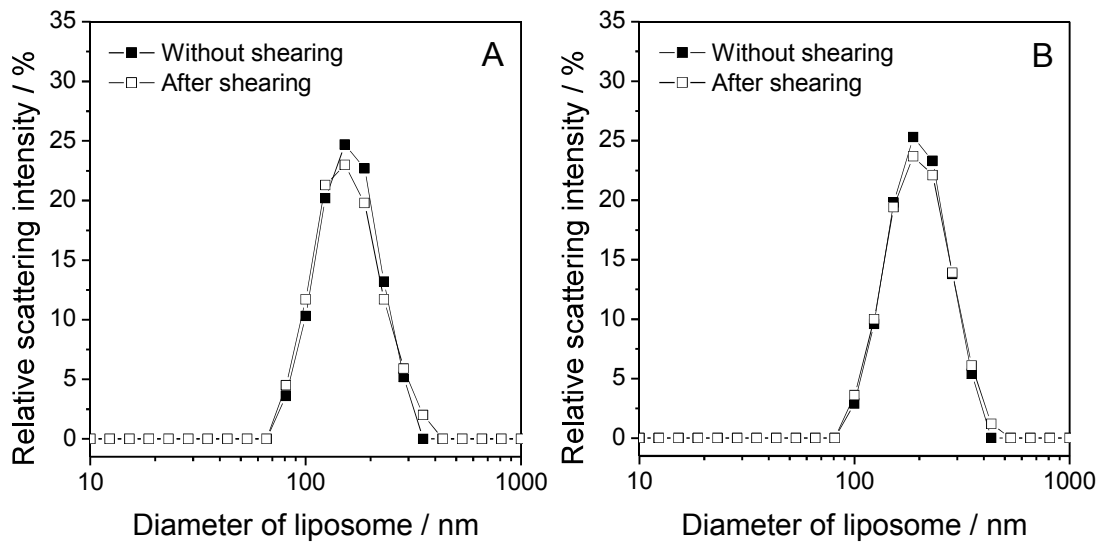


Figure 4-6 Effect of shearing on size distribution of CFLs with initial D_p of 150 nm (A) and 188 nm (B). Shearing was performed at $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ at 25 °C for $t_{eff} = 1.0 \times 10^3 \text{ s}$.

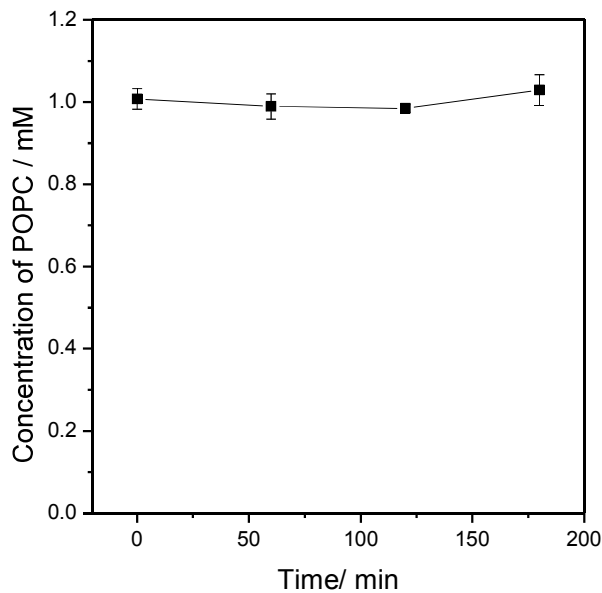


Figure 4-7 Time course of concentration of POPC in a cuvette with external liquid circulation through microtubes operated at $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ at 25 °C. “Empty” liposomes were used. Errors mean standard deviation ($n = 3$).

$10^3 \text{ s}^{-1} \leq \gamma_{\text{av}}$ で平衡値に達している。この結果は、GO 分子がせん断場でリポソーム内部から液本体へ漏出することを示唆している。 $\gamma_{\text{av}} = 3.1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ のせん断流に 180 min 懸濁した GO 封入リポソーム中の漏出した GO を分離するために Sepharose 4B カラムを使用した。この際の脂質濃度はグルコース酸化反応時より 5 倍高いため比較的低い E_{GO} 値(0.15)が得られた。**Figure 4-9** はゲル濾過クロマトグラフィーにおける脂質と GO 濃度の溶出挙動を示している。脂質濃度の no.7 の単一ピークはリポソームの溶出を示す。一方、GO 濃度は no. 7 と 15 にピークが確認できる。脂質の溶出挙動だけではなく、リポソームと遊離 GO 分子の大きさに差があることを考慮すると先に溶出したピークはリポソームに封入された GO 分子に対応し、後のピークは漏出した GO に対応している。GPC 分離処理自体は以下の観測に基づいて GO 分子の漏出の原因ではないことがわかった。酵素封入リポソームの調製では 4-2-2 節で説明したように遊離 (非封入) 酵素を分離するため同一の sepharose 4B カラムを使用した。回収されたりポソーム封入 GO について、みかけの活性は初期活性の平均 $3.8 \pm 0.6 \%$ (平均 \pm 標準偏差、 $n = 6$) であった。著しく低い活性はグルコースに対する脂質膜の大きな透過抵抗およびリポソーム懸濁液中の遊離 GO 分子は無視できることを示している。上記の結果は、Sepharose 4B はリポソーム封入 GO の漏出を促進しないことを明確に実証している。そのため、**Figure 4-9** で検出された遊離 GO 分子はせん断流中でリポソームから漏出していると結論できる。GO の漏出量は、溶出した GO の全量に対して 0.16 であった。この値は上記の $E_{\text{GO}} = 0.15$ と非常によく一致している。 E_{GO} 値はせん断により漏出した GO 分子の漏出量に相当することを示している。 $\gamma_{\text{av}} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ において 180 min せん断処理を行った酵素封入リポソームの粒子径分布を測定した (**Figure 4-10**)。リポソームの粒子径に若干の減少が確認できるが、せん断処理は粒子径分布に有意な差をもたらさない。リポソームの平均粒子径はせん断処理前後でそれぞれ $183 \pm 1 \text{ nm}$ と $177 \pm 2 \text{ nm}$ であった。せん断ストレス誘起の一部のリポソームの崩壊はリポソーム封入 GO の漏出の主要な要因であると考えられる。 $\gamma_{\text{av}} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ は 7.3 Pa の τ_{av} に対応する。微小円管の内壁では 14.6 Pa のせん断ストレスが生成しており、リポソームから巨大分子の GO の漏出を引き起こす可能性がある。

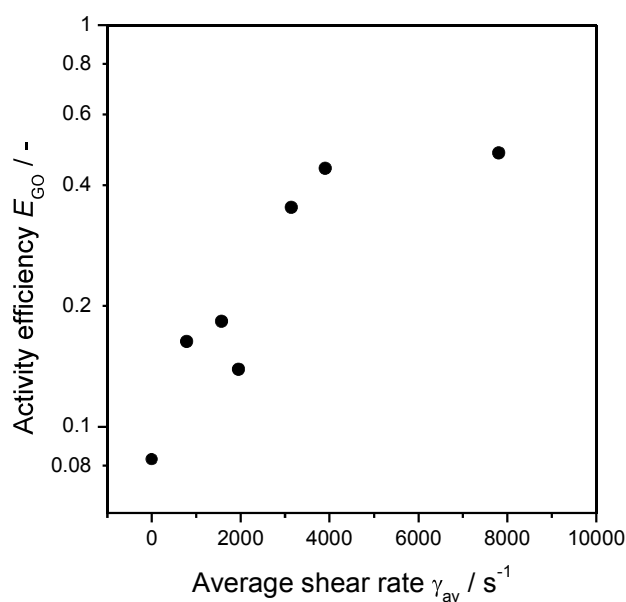


Figure 4-8 Effect of average shear rate γ_{av} on activity efficiency E_{GO} of liposome-encapsulated GO molecules. The E_{GO} value was determined at the operation time of 180 min at 25 °C.

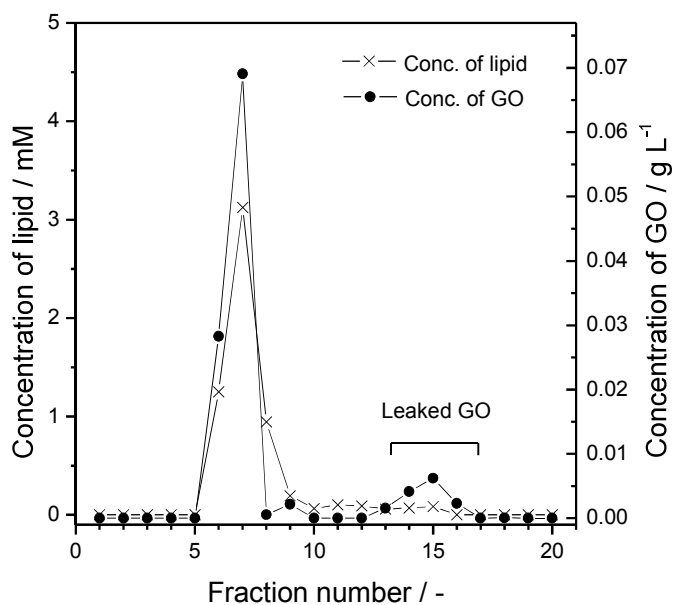


Figure 4-9 GPC profiles of liposomes encapsulating GO and catalase sheared at $3.1 \times 10^3 s^{-1}$ for 180 min at 25 °C at the total lipid concentration of 5.0 mM. The peak around fraction 7 corresponds to liposome-encapsulated GO and the peak around fraction 15 corresponds to free (leaked) GO.

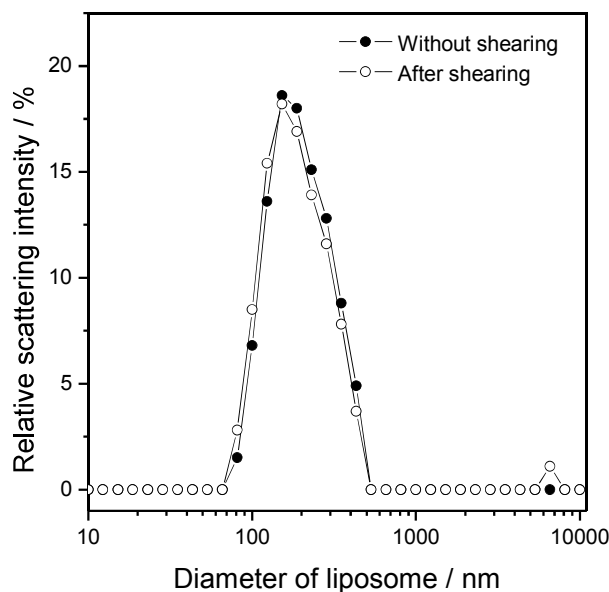


Figure 4-10 Size distribution of liposomes encapsulating GO and catalase with and without shearing at $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ for 180 min at 25 °C. The measurements were performed in triplicate and the representative data are shown.

4-3-4. せん断流中の酵素分子に対するリポソームのシャペロン様機能

上述の結果はリポソームからのGO分子の漏出がせん断速度に依存して誘発されることを示している。遊離GO分子はせん断流中で構造変化する。 $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ においてGO封入リポソームを微小円管内層流に通過させてGO活性を追跡した。360 minの操作時間で $E_{GO} = 0.31$ が得られた。これは、リポソーム内封入GO分子の31%がせん断流中で漏出したことを示している。得られた結果を**Figure 4-11**に示す。図では360 minにおいてGO活性の低下は確認できない。この結果は漏出したGO分子の酵素活性がせん断ストレス存在下においてほとんど影響を受けないことを示している。**Figure 4-11**にはせん断流中の遊離GO活性の安定性も比較のために示している。遊離GOの不活性化はリポソームの非存在下でせん断流中において進行して、360 minで59%の残存活性を示している。静止液系において失活が確認できないことから遊離GOの失活はせん断ストレスの負荷に起因すると考えられる。さらに、上記の遊離酵素系と同様の酵素濃度で空のリポソームの存在下における遊離酵素の安定性を調べた。リポソームは明らかにせん断流中で遊離GO分子に対してシャペロン様機能を示している。したがって、リポソーム膜はせん断流中においてGO活性を安定化することができる。遊離catalaseの構造は4量体であるために遊離GO分子と比較してせん

断流に対して敏感に変化すると考えられる (Yoshimoto *et al.*, 2007)。Figure 4-12 に 25 °C、 $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ のせん断流中におけるリポソームと遊離 catalase の安定性を示す。Catalase の熱変性は無視できるため、遊離 catalase について観測された有意な不活性化は負荷されたせん断ストレスによって誘起されたことがわかる。Catalase の 4 量体構造はせん断流中の遊離酵素の不安定性の要因である。リポソーム系においては、カタラーゼの活性が遊離酵素と比較して安定化しているため、カタラーゼに対してリポソーム膜がシャペロン様機能を発現することがわかる。リポソーム膜は疎水性の核と液相にさらされている親水性領域から構成されている。膜の局所的構造変化により疎水性領域がリポソーム膜界面で形成される。これは以前に POPC リポソームに対する疎水性プローブの結合に基づき解明されている (Kuboi *et al.*, 1997)。リポソームの表面は全体的に親水性であるが局所的に疎水性部位が豊富である。4-3-2 節で観測されたように、膜の構造変化の程度とリポソームの部分的な崩壊はせん断速度に依存している。リポソーム膜におけるこれらの構造変化は、リポソームの表面に局所的な疎水性部位の形成を引き起こし、これが立体構造が変化した酵素分子への結合部位となる可能性がある (Kuboi *et al.*, 1997)。一方、流体力学的せん断ストレスに起因するタンパク質の構造変化は、牛血清アルブミン (BSA) (Bekard *et al.*, 2012) や von Willebrand factor (Schneider *et al.*, 2007) について報告されている。また、せん断ストレスは酵素の不活性化を引き起こす (Charm and Wong, 1970)。Bekard *et al.* (2012) は BSA の分子内水素結合と二次構造間の相互作用はせん断流 ($\gamma_{av} < 500 \text{ s}^{-1}$) が原因となり不安定化すると報告した。これらの報告はせん断ストレスが不活性凝集体を形成する傾向がある、変性した GO や catalase 分子の形成を誘導することを示している。本章の結果は立体構造が変化した酵素分子が人工シャペロンとして機能する構造的に不安定なリポソームにより疎水性相互作用を介して安定化されることを示している。このようなメカニズムはいくつかの酵素のリフォールディング中間体に対するリポソームのシャペロン様機能に関して提案されたものと同様である可能性がある (Kuboi *et al.*, 1997; Yoshimoto *et al.*, 1999)。

4-3-5. せん断流中のリポソーム系酵素反応のメカニズム

上述の結果に基づき、せん断ストレスの負荷によりリポソームから漏出した遊離 GO 分子がせん断流中におけるグルコース酸化速度の加速化の要因であると仮定した。このメカニズムを確認するために、 $\gamma = 0$ と $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ において遊離 catalase と空のリポソームの存在下において GO 触媒反応を追跡した。また、リポソームの非

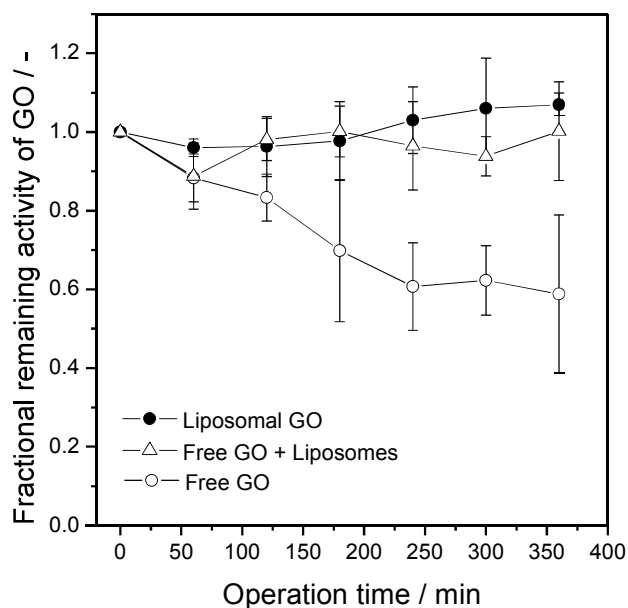


Figure 4-11 Time courses of fractional remaining activity of liposomal GO (filled circles), free GO plus empty liposomes ($[\text{lipid}] = 1.0 \text{ mM}$) (empty triangles) and free GO alone (empty circles) at $\gamma_{\text{av}} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The concentration of free GO was fixed at $1.0 \times 10^{-2} \text{ g/L}$. Data represent mean \pm standard deviation.

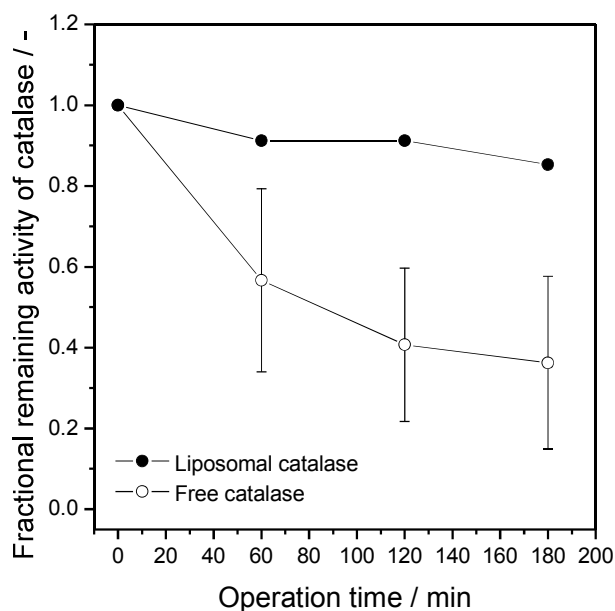


Figure 4-12 Time courses of fractional remaining activity of liposomal catalase (filled circles) and free catalase (empty circles) at $\gamma_{\text{av}} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Data for the free catalase represent mean \pm standard deviation.

存在下で $\gamma = 0$ における遊離 GO 反応を行った。得られた結果を **Figure 4-13** に示す。 $\gamma = 0$ において、リポソーム共存系の酸化反応はリポソーム非共存系よりもわずかに大きい。明らかに、せん断流 ($\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) における反応は静止液系よりも著しく大きな酸化速度を与えることがわかる。遊離 GO 反応はリポソームの存在下でせん断流により加速することを示している。せん断流に誘起されるリポソーム内封入 GO 反応の加速化の程度を推定するために、反応速度 $-r'_G$ [mmol-glucose/(s·g-GO)] を $-r'_G = -r_{G,app}/(E_{GO} \cdot C_{GO})$ として有効 GO 濃度 ($E_{GO} \cdot C_{GO}$) に基づき計算した。ここで C_{GO} は反応混合物中の GO の全濃度である。**Figure 4-14** に **Figure 4-2B** に示す $-r_{G,app}$ 値から計算された $-r'_G$ と γ_{av} の関係を示す。 $-r'_G$ と $\log \gamma_{av}$ のプロットはほぼ直線関係を与える (**Figure 4-14** ●)。使用した微小円管は内部体積に対して非常に大きな内表面積を提供しているため、固体表面に対する酵素分子の吸着特性を明確にする必要がある。BSA 溶液で処理した微小円管を用いてグルコース酸化反応を行った。得られた $-r'_G$ 値は γ_{av} の関数としてプロットした (**Figure 4-14** ×)。データはやや散乱しているが、2つのパラメータ間の関係は BSA 処理していない微小円管で得られたデータと同様の傾向を示している。そのため、せん断流中におけるリポソーム内封入 GO 触媒反応における酵素吸着の寄与は小さいと考えられる。**Wang et al. (2013)** は遊離 GO 活性が液本体中の活性と比較してナノ流体反応器で形成された層流中で増大することを報告した。同様の現象は他の酵素触媒反応について報告されている (**Yamashita et al., 2001; Kanno et al., 2002; Miyazaki et al., 2001**)。Tanaka et al. (2001) は西洋わさび由来のペルオキシダーゼ触媒反応が微小円管内で加速されることを報告した。Miyazaki et al. (2011) は、トリプシンの加水分解活性が微小円管反応器を使用することにより増大することを報告した。チャンネル内の層流による酵素分子の局在変化が酵素反応の加速化の要因である可能性を指摘している。また、速度論的解析に基づきトリプシン-基質間の親和性がせん断流中で増加することが報告されている (**Yamashita et al., 2009**)。上述で使用された微小流路デバイス(マイクロフルイディクス)では特異的な流動場を形成できるが流体の滞留時間が短い。本研究で用いた、外部循環式装置の微小円管内部の層流は、微小円管中心において最大速度 0.37 m/s の流速分布を与え、特異的流動混合を断続的に提供する。これは、せん断流中のリポソーム内封入 GO 触媒反応の効率に影響を与える可能性がある。さらに、GO 触媒反応のせん断誘起型の加速化の要因の一つとして GO の活性化状態の形成が挙げられる。立体構造が変化した GO 分子間の分子間相互作用はリポソーム-酵素間相互作用のために低下する。酵素分子の微小な構造変化はグルコースに対する親和性に影響を及ぼす可能性がある。これらの点については、さらに検討する必要があるが、リポソームの膜界面はせん断流中の GO の活性状

態を連続的に安定化することができる。

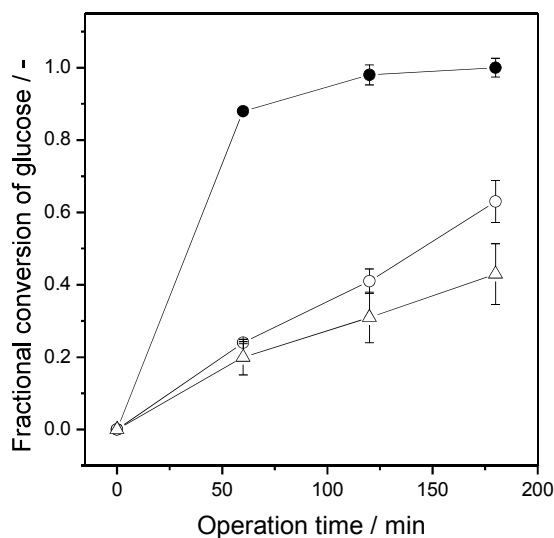


Figure 4-13 Time courses of fractional conversion of 10 mM glucose at 25 °C catalyzed by free GO with empty liposomes at $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ (filled circles) and at $\gamma = 0$ (empty circles). The time course is also shown for the oxidation of 10 mM glucose at 25 °C catalyzed by free GO at $\gamma = 0$ in the absence of liposome (empty triangles). Concentrations of free GO and free catalase were $3.3 \times 10^{-2} \text{ g/L}$ and $5.0 \times 10^{-2} \text{ g/L}$, respectively. Data represent mean \pm standard deviation.

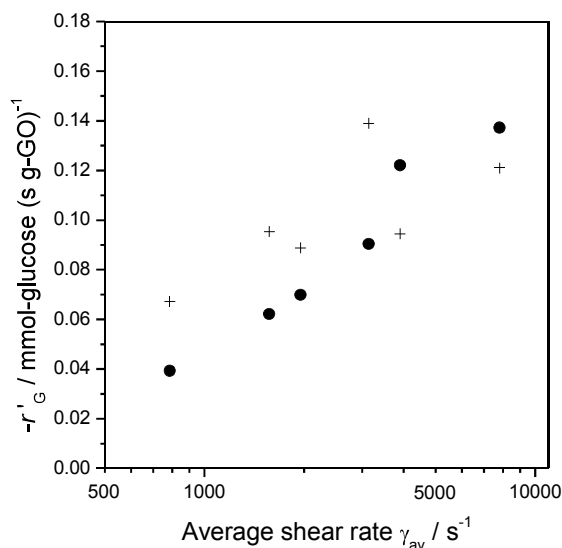


Figure 4-14 Effect of γ_{av} on the oxidation rate of glucose $-r'_G$ based on the effective amount of GO. Crosses represent the $-r'_G$ values obtained with the microtubes treated with a BSA solution prior to each reaction operation.

4-3-6. 実用的なモデル系としての catalase 封入りリポソーム(CAL)の気液流動による活性化

第5節までの結果で、酵素はせん断流中でリポソームがない場合と比較して安定性が著しく増大すること、および微小円管内のような特異な環境においては酵素が活性化することを示した。本節では実用的なプロセスとして外部循環式エアリフト型気泡塔内にモデル酵素として catalase を封入したリポソームを懸濁して気液流動が誘起するせん断流中における反応速度の追跡を行った。

H_2O_2 の酸素と水分子への分解はエアリフト内静止液系と気液流動場中で CAL を用いて行った。Figure 4-15 に CAL を使用して 40°C 、 $U_G = 0$ (静止液)、 0.47 、 1.9 cm/s の条件下で分解された H_2O_2 濃度の経時変化を示す。Figure 4-15A、B 共に H_2O_2 の分解速度初速度が U_G の増加に伴い明らかに増大していることがわかる。また、CAL の触媒反応速度は気液流動場中に懸濁することで増加している。液体せん断ストレスは脂質二重膜のパッキングに影響を及ぼしカルシウムイオンの透過性を増大させることが報告されている (Chakravarthy and Giorgio, 1992) ことから気液流動によって生じる液体せん断ストレスは脂質膜に一時的な細孔の形成を誘導すると考えられる。また、 30 mol\% の Cholesterol を含有する CAL (Figure 4-15B) は POPC のみから構成される CAL (Figure 4-15A) より H_2O_2 の分解速度が小さい。すなわち、 H_2O_2 に対する膜透過抵抗が増大していることがわかる。 100 nm 程度の粒子径をもつ CAL は $U_G = 1.9\text{ cm/s}$ で操作しても catalase 分子はほとんどリポソーム外水相へ漏れておらず安定に封入されていた。以上の結果より、気液流動場中の CAL 触媒反応においてはリポソーム内に catalase が安定に維持されたまま、 H_2O_2 分子が選択的に脂質膜を透過して反応が進行することがわかった。膜に形成された細孔の大きさは catalase 分子のサイズ ($9.9\text{ nm} \times 9.4\text{ nm} \times 7.1\text{ nm}$ (Yoshimoto *et al.*, 2009)) よりも小さいと考えられる。これらの結果は、リポソーム系酵素反応速度が気液流動特性に基づき制御可能であることを示している。脂質膜の組成を変化させることで、より広範なガス空塔速度において安定かつ高活性な CAL を調製できると考えられる。

4-4. 結言

機械的ストレスに対する感受性が高いリポソームを用いて GO 反応を加速化・制御することができた。POPC : POPG : Cholesterol (モル比 50:20:30) から構成されるリポソーム膜のせん断ストレスに誘起される構造変化と部分的な崩壊はせん断流中にお

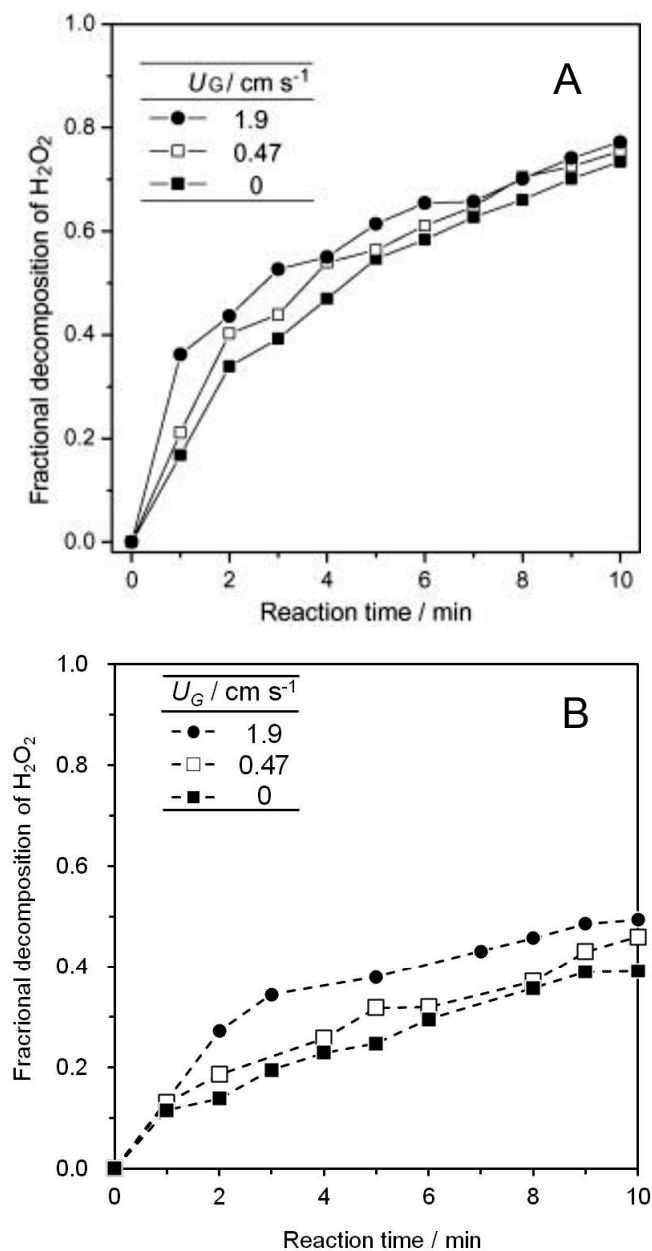


Figure 4-15 Time courses of H_2O_2 decomposition catalyzed by CAL composed of (A) 100 mol% POPC and (B) 70 mol% POPC and 30 mol% Cholesterol in the static liquid ($U_G = 0$) and in the airlift at 40 °C. Initial concentration of H_2O_2 was 10 mM. POPC concentration was 0.12 mM.

いて GO 分子の放出を引き起こした。放出した GO 分子触媒下のグルコース酸化反応は比較的高いせん断速度 $\gamma_{av} = 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ においてリポソーム存在下で加速化された。さらに、リポソームはせん断流中において GO 活性を安定化した。GO 封入リポソームは、静止液系においてせん断流中と比較してグルコースの膜透過抵抗のために著しく低い GO 活性を示した。一方、実用的なプロセスとしての外部循環式エアリフト型気泡塔へ catalase 封入リポソームを適用したところ、ガス空塔速度に依存して catalase をリポソームに内封したまま選択的に H_2O_2 の膜透過が促進されて触媒反応が進行することがわかった。酵素封入リポソームシステムは負荷されるせん断速度に応答して広範な酵素活性を示すことから、各種酸化反応の制御への応用が期待できる。

一方、血流で発生するせん断速度とせん断ストレス範囲は各々 $48\text{-}1200 \text{ s}^{-1}$ と $0.14\text{-}2.6 \text{ Pa}$ であることが報告されている (Kamiya *et al.*, 1984)。本章で使用した外部循環式装置では、上述の血流で発生するせん断速度とせん断ストレスを発生させることができる。本章で明らかとなった上記の現象は血流応答性の薬物担体の開発や血流に漂う細胞やタンパク質の機能の制御・解明に役立つ可能性がある。

第5章 結論

本論文では、せん断流がリポソーム膜の構造と機能に及ぼす影響について、脂質膜透過性の変化やリポソーム系酵素反応速度の変化を基に明らかにした。これらの知見に基づき、気泡塔内部で発生するせん断速度を定量する新しい手法を提案した。さらに、微小円管内せん断流中のリポソームの構造変化を利用した、酵素反応の連続的加速化現象を明らかにした。本論文で得られた具体的な結論は下記のとおりである。

第1章では、リポソームの基本的な構造と重要な特性である膜透過性及びリポソーム系の応用が期待できる気泡塔型バイオリアクターについて述べた。酵素の基質分子に対するリポソームの膜透過抵抗はリポソーム内水相に封入された酵素の反応性を低下させる。この膜透過抵抗を制御できれば、酵素封入リポソームをバイオリアクター等で高活性かつ安定な触媒として応用することが可能となる。本研究の目的として、比較的小さな粒子径をもつリポソームの構造と機能がせん断ストレスにより受ける影響を明らかにすること、この知見に基づきこれまで困難であった気泡塔内のせん断速度を実測する方法論の確立及び酵素・リポソームの構造変化を制御した高効率の触媒反応場の構築を挙げた。さらに本研究の意義と構成について述べた。

第2章では、リポソームの膜透過性に及ぼすせん断ストレスの影響を明かにした。平均直径 $D_p = 400 \text{ nm}$ 以下の蛍光色素(CF)封入リポソームを既知のせん断ストレスを発生するコーン・プレート型粘度計に懸濁して、色素の漏出挙動とリポソームの粒子径分布を追跡した。固体表面への吸着が無視できる高せん断速度条件下において $D_p = 101 \text{ nm}$ のリポソームでは、CFの膜透過係数が静止液系に比べて γ_{av} 値と依存的に増大した。55 °Cのせん断流中では、 $D_p = 101\text{-}189 \text{ nm}$ のリポソームのベシクル構造が崩壊することなく膜の透過性が増大した。一方、 $D_p = 323 \text{ nm}$ のリポソームはせん断流懸濁前後で大きく異なる粒子径分布を示した。これらの結果は、比較的大きな粒子径をもつリポソームはせん断ストレス負荷条件 (55 °C、 $\gamma_{av} = 1500 \text{ s}^{-1}$) により脂質膜構造が安定に維持されないことを示す。さらに、リポソームのクラスター化が脂質膜のせん断ストレス応答性に及ぼす効果を検討した。負電荷をもつ脂質膜から形成されるリポソームを Ca^{2+} 共存下において可逆的にクラスター化させる脂質、 Ca^{2+} の各濃度と脂質膜組成を明らかにした。初期粒子径 193 nm の負電荷リポソーム(POPC/POPG/Cholesterol (モル比 5:2:3)、[lipid] = 1.0 mM) に 40 mM Ca^{2+} を添加することにより 1.5 μm の直径をもつクラスター化リポソームが生成した。さらに $[\text{Ca}^{2+}] = 80 \text{ mM}$ とする

と、リポソームが再分散した。POPG の含有率が高いリポソームは不可逆的に凝集したことから、双性 POPC と Ca^{2+} 間相互作用が可逆的クラスター化に寄与することが示された。リポソームのクラスター化プロセスにおいて膜透過性に大きな変化は認められなかったことより、凝集・再分散においてリポソーム膜が安定に維持されていることが確認された。さらに、修正 DLVO 理論に基づきクラスター化したリポソーム間の距離が 0.95 nm であることが推定された。クラスターリポソームせん断流中に懸濁した結果、CF 透過係数 ($P_{\text{CF}} = 0.422 \text{ pm/s}$) は、クラスター前 ($P_{\text{CF}} = 0.356 \text{ pm/s}$) より高い値を示した。これより、せん断流を利用した脂質膜透過性の制御がクラスターリポソームに対しても適用できることを明らかにした。

第 3 章では、せん断流中におけるリポソーム膜の構造変化を利用した気泡塔内せん断速度の推定法を開発した。気泡塔を操作する上で重要な因子であるせん断速度を実測する手法はほとんど報告されていない。気泡塔内における CF の膜透過係数 P_{CF} と気泡塔の操作パラメータ（ガス空塔速度 U_G ）及び第 2 章で明らかにした P_{CF} とせん断速度 γ の関係に基づき気泡塔における P_{CF} と γ の関係式を得た。気泡との相互作用を検討するために、POPC/POPG から構成される負電荷リポソームおよび POPC/DOTAP から構成される正電荷リポソームを調製して、標準型気泡塔に懸濁した。リポソームからの CF 漏出挙動に基づき、負電荷リポソームは気泡との相互作用が小さく、液本体中のせん断ストレスの定量に適していることを示した。異なる液深 ($H = 8\sim 150 \text{ mm}$) において P_{CF} を追跡した結果、液深に反比例した P_{CF} 値が得られた。このことより、標準型気泡塔内部では、ガス分散板近傍で発生するせん断速度の影響が大きいことが明らかとなった。さらに、形状の異なる 3 種類の外部循環式気泡塔内のせん断速度を上述の方法で測定した。ライザー/ダウンカマー断面積比や液深などの形状の違いがせん断速度に及ぼす影響を示した。本研究で使用した外部循環式気泡塔においては、標準型気泡塔同様にガス分散板近傍で発生するせん断速度の影響が大きいことがわかった。以上の結果より、リポソーム膜の構造がせん断流中で安定に維持される場合、CF 封入リポソームは様々なスケールと形状をもつ他のバイオリアクターのせん断速度を定量できる可能性を示した。せん断速度の推定はバイオリアクター中のプロセスにおいて、細胞損傷を最小限に抑えるために合理的な装置設計をすることに繋がる。また、リポソームをプローブとするせん断速度推定法は従来の実験的に得られた各種相関式に代わる新しい手法として有用である。

第4章では、微小円管内で形成される層流せん断場を利用した酵素封入リポソームの安定性と酵素活性の制御方法について検討した。機械的ストレスに感受性が高いコレステロールと負電荷脂質を含有させたリポソーム(POPC/POPG/Cholesterol (モル比5:2:3)) にグルコースオキシダーゼ GO を内包させた。せん断流は 190 or 380 μm の内径をもつ円管にこのリポソーム懸濁液を送液することで発生させた。本章では第3章の気泡塔と比較してより高いせん断速度が負荷される。リポソームは負荷したせん断速度範囲 ($\gamma_{\text{av}} \leq 7.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$) において著しく構造変化して GO 分子の放出を引き起こした。静止液系では、グルコースの膜透過抵抗のために著しく低い GO 活性を示した。一方、リポソームを懸濁させたせん断流中において、液本体の GO 分子による触媒反応が加速化されることを示した。せん断流に誘起されるリポソーム内封入 GO 反応の加速化の指標として、液本体の単位 GO 量当たりの反応速度を算出することで、GO 活性のせん断速度依存性を明らかにした。また、せん断流中に懸濁させた遊離 GO と遊離 catalase 分子は失活をする一方、リポソームの共存により各酵素活性の失活が有意に抑制されることが示された。この理由として、せん断流中で高次構造が部分的に変化した酵素の分子間相互作用がリポソーム-酵素間相互作用のために抑制されることを示した。すなわち、酵素封入リポソームはせん断速度に応答して酵素を液本体に放出し、放出された酵素は失活が抑制された状態で静止液系よりも高い酵素活性が持続することが明らかとなった。さらに実用的なモデル系として、気泡塔内気液流動を利用した catalase 封入リポソームの活性化について示した。リポソームと過酸化水素の混合液を外部循環式エアリフト型気泡塔内に懸濁して、過酸化水素濃度の経時変化を追跡した結果、ガス空塔速度の増大に依存してリポソーム内 catalase の過酸化水素分解活性が増大することを明らかにした。以上より、酵素封入リポソームは負荷するせん断ストレスに基づいて活性制御される触媒として有用であることが示された。

以上のように、本論文ではリポソーム膜透過性のせん断速度に対する応答性を利用した気泡塔内せん断速度の測定法とリポソーム膜の構造変化を応用した高活性触媒プロセスについて述べた。これらの知見は、各種バイオリクターにおけるリポソーム系を利用した酵素反応の制御、装置形状や流動特性を考慮した合理的な細胞培養プロセスの開発、さらにはせん断ストレスに対する生体系の機能的応答の解明・制御につながることを期待される。

引用文献

- Al-Rubeai, M.; Emery, A. N.; Chalder, S.; Goldman, M. H. A flow cytometric study of hydrodynamic damage to mammalian cells. *J. Biotechnol.* **1993**, *31*, 161-177.
- Ando, J.; Yamamoto, K. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Res.* **2013**, *99*, 260-268.
- Ashton, L.; Dusting, J.; Imomoh, E.; Balabani, S.; Blanch, E. W. Shear-induced unfolding of lysozyme monitored in situ. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 4231-4236.
- Bailey, M.M.; Berkland, C.J. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 196–212.
- Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238-252.
- Barbosa, M. J.; Albrecht, M.; Wijffels, R. H. Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83*, 112-120.
- Bekard, I. B.; Asimakis, P.; Bertolini, J.; Dunstan, D. E. The effects of shear flow on protein structure and function. *Biopolymers* **2011**, *95*, 733-745.
- Bekard, I. B.; Asimakis, P.; Teoh, C. L.; Ryan, T.; Howlett, G. J.; Bertolini, J.; Dunstan, D. E. Bovine serum albumin unfolds in couette flow. *Soft Matter* **2012**, *8*, 385-389.
- Bernard, A.-L.; Guedeau-Boudeville, M.-A.; Marchi-Artzner, V.; Gulik-Krzywicki, T.; di Meglio, J.-M.; Jullien, L. Shear-induced permeation and fusion of lipid vesicles. *J. Colloid Interf. Sci.* **2005**, *287*, 298–306.
- Bird, R. B.; Stewart, W. E.; Lightfoot, E. N. *Transport Phenomena*, 2nd ed; John Wiley & Sons: New York, 2007.
- Blatt, E.; Vaz, W.L.C. The effects of Ca²⁺ on lipid diffusion. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *41*, 183–194.
- Bordi, F.; Cametti, C. Salt-induced aggregation in cationic liposome aqueous suspensions resulting in multi-step self-assembling complexes. *Colloid Surf. B* **2002**, *26*, 341–350.
- Borle, F.; Seelig, J. Ca²⁺ binding to phosphatidylglycerol bilayers as studied by differential scanning calorimetry and 2H- and 31P-nuclear magnetic resonance. *Chem. Phys. Lipids* **1985**, *36*, 263–283.
- Cametti, C. Polyion-induced aggregation of oppositely charged liposomes and charged colloidal particles: the many facets of complex formation in low-density colloidal systems. *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *155*, 63–73.

- Chaize, B.; Colletier, J. P.; Winterhalter, M.; Fournier, D. Encapsulation of Enzymes in liposomes: high encapsulation efficiency and control of substrate permeability. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* **2004**, *32*, 67-75.
- Chakravarthy, S. R.; Giorgio, T. D. Shear stress-facilitated calcium ion transport across lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1112*, 197-204.
- Charm, S. E.; Wong, B. L. Enzyme inactivation with shearing. *Biotechnol. Bioeng.* **1970**, *12*, 1103-1109.
- Chisti, Y. In Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, Vol. 7; Flickinger, M. C. Ed.; Wiley: New York, 2010; pp 4360-4398.
- Chisti, Y.; Moo-Young, M. On the calculation of shear rate and apparent viscosity in airlift and bubble column bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *34*, 1391-1392.
- Contreras, A.; García, F.; Molina, E.; Merchuk, J. C. Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer to sea water in a concentric-tube airlift bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 820-830.
- de Haas, K. H.; Blom, C.; van den Ende, D.; Duits, M. H. G.; Mellema, J. Deformation of giant lipid bilayer vesicles in shear flow. *Phys. Rev. E* **1997**, *56*, 7132-7137.
- Dimitrova, M.N.; Matsumura, H.; Neitchev, V.Z. Kinetics of protein-induced flocculation of phosphatidylcholine liposomes. *Langmuir* **1997**, *13*, 6516-6523.
- Donato, L. D.; Cataldo, M.; Stano, P.; Massa, R.; Ramundo-Orland, A. permeability changes of cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase induced by millimeter waves radiation. *Rad. Res.* **2012**, *178*, 437-446.
- Dorovska-Taran, V.; Wick, R.; Walde, P. A H nuclear magnetic resonance method for investigating the phospholipase d-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine in liposomes. *Anal. Biochem.* **1996**, *240*, 37-47.
- Foo, J.J.; Liu, K.K.; Chan, V. Viscous drag of deformed vesicles in optical trap: experiments and simulations. *AIChE J.* **2004**, *50*, 249-254.
- Fedotenko, I. A.; Zaffalon, P.- L.; Favarger, F.; Zumbuehl, A. The synthesis of 1,3-diamidophospholipids. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5382-5384.
- Giorgio, T.D.; Yek, S.H. The effect of bilayer composition on calcium ion transport facilitated by fluid shear stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1239*, 39-44.
- Grima, E. M.; Chisti, Y.; Moo-Young, M. Characterization of shear rates in airlift bioreactors for animal cell culture. *J. Biotechnol.* **1997**, *54*, 195-210.
- Gudi, S.; Nolan, J. P.; Frangos, J. A. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid

- shear stress and phospholipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 2515-2519.
- Hallow, D. M.; Seeger, R. A.; Kamaev, P. P.; Prado, G. R.; LaPlaca, M. C.; Prausnitz, M. R. Shear-induced intracellular loading of cells with molecules by controlled microfluidics. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 846-854.
- Hartl, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **1996**, *381*, 571-580.
- Han, M.; Dockko, S. Zeta potential measurement of bubbles in DAF process and its effect on the removal efficiency, *KSCE J. of Civil Eng.* **1998**, *2*, 461-466.
- He, J.; Wang, L.; Wei, Z.; Yang, Y.; Wang, C.; Han, X.; Nie, Z. Vesicular self-assembly of colloidal amphiphiles in microfluidics. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 9746-9751.
- Higashitani, K.; Iimura, K. Two-dimensional simulation of the breakup process of aggregates in shear and elongational flows. *J. Colloid Interf. Sci.* **1998**, *204*, 320–327.
- Hill, K. J.; Kaszuba, M.; Creeth, J. E.; Jones, M. N. Reactive liposomes encapsulating a glucose oxidase-peroxidase system with antibacterial activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1326*, 37-46.
- Hofsäb, C.; Lindahl, E.; Edholm, O. Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2192-2206.
- Holme, M. N.; Fedotenko, I. A.; Abegg, D.; Althaus, J.; Babel, L.; Favarger, F.; Reiter, R.; Tanasescu, R.; Zaffalon, P.- L.; Ziegler, A.; Müller, B.; Saxer, T.; Zumbuehl, A. shear-stress sensitive lenticular vesicles for targeted drug delivery. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 536-543.
- Huggett, A. S. T.; Nixon, D. A. Use of glucose oxidase, peroxidase, and *o*-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *Lancet* **1957**, *273*, 368-370.
- Inoue, T.; Minami, H.; Shimosawa, R.; Sugihara, G., Stability of DLPA/DLPC mixed vesicles against divalent cation-induced aggregation: importance of the hydration force. *J. Colloid Interf. Sci.* **1992**, *152*, 493–506.
- Isaev, N.P.; Syryamina, V.N.; Dzuba, S.A. Small-angle orientational motions of spin-labeled lipids in cholesterol-containing bilayers studied at low temperatures by electron spin echo spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9510–9515.
- Jaspe, J.; Hagen, S. J. Do protein molecules unfold in a simple shear flow? *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3415-3424.
- Kaoui, B.; Farutin, A.; Misbah, C. Vesicles under simple shear flow: elucidating the role of relevant control parameters. *Phys. Rev. E* **2009**, *80*, 061905-1-11.
- Kameta, N.; Masuda, M.; Shimizu, T. Soft nanotube hydrogels functioning as artificial

- chaperones. *ACS Nano* **2012**, *6*, 5249-5258.
- Kamiya, A.; Bukhari, R.; Togawa, T. Adaptive regulation of wall shear stress optimizing vascular tree function. *Bulletin of Mathematical* **1984**, *46*, 127-137.
- Kanno, K.; Maeda, H.; Izumo, S.; Ikuno, M.; Takeshita, K.; Tashiro, A.; Fujii, M. Rapid enzymatic transglycosylation and oligosaccharide synthesis in a microchip reactor. *Lab Chip* **2002**, *2*, 15-18.
- Kayal, T.A.; Nappini, S.; Russo, E.; Berti, D.; Bucciantini, M.; Stefani, M.; Baglioni, P. Lysozyme interaction with negatively charged lipid bilayers: protein aggregation and membrane fusion. *Soft Matter* **2012**, *8*, 4524-4534.
- Kim, J.; Khan, M.; Park, S.- Y. Glucose sensor using liquid-crystal droplets made by microfluidics. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 13135-13139.
- Kogan, M.; Feng, B.; Nordén, B.; Rocha, S.; Beke-Somfai, T. Shear-induced membrane fusion in viscous solutions. *Langmuir* **2014**, *30*, 4875-4878.
- Korin, N.; Kanapathipillai, M.; Matthews, B. D.; Crescente, M.; Brill, A.; Mammoto, T.; Ghosh, K.; Jurek, S.; Bencherif, S. A.; Bhatta, D.; Coskun, A. U.; Feldman, C. L.; Wagner, D. D.; Ingber, D. E. Shear-activated nanotherapeutics for drug targeting to obstructed blood vessels. *Science*, **2012**, *337*, 738-742.
- Koynova, R.; Caffrey, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 91-145.
- Kuboi, R.; Yoshimoto, M.; Walde, P.; Luisi, P. L. Refolding of carbonic anhydrase assisted by 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine liposomes. *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13*, 828-836.
- Kučerka, N.; Holland, B. W.; Gray, C. G.; Tomberli, B.; Katsaras, J. Scattering density profile model of POPG bilayers as determined by molecular dynamics simulations and small-angle neutron and X-ray scattering experiments. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 232-239.
- Kuroiwa, T.; Fujita, R.; Kobayashi, I.; Uemura, K.; Nakajima, M.; Sato, S.; Walde, P.; Ichikawa, S. Efficient preparation of giant vesicles as biomimetic compartment systems with high entrapment yields for biomacromolecules. *Chem. Biodivers.* **2012**, *9*, 2453-2472.
- Li, M.; Hanford, M.J.; Kim, J.-W.; Peeples, T.L. Amyloglucosidase enzymatic reactivity inside lipid vesicles. *J. Biol. Eng.* **2007**, *1*, 4.
- Liu, Q.; Boyd, B.J. Liposomes in biosensors. *Analyst* **2013**, *138*, 391-409.
- Liu, Y.; Li, F.; Hu, W.; Wiltberger, K.; Ryll, T.; Effects of bubble-liquid two-phase turbulent

- hydrodynamics on cell damage in sparged bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **2014**, *30*, 48-58.
- Louhivuori, M.; Risselada, H.J.; van der Giessen, E.; Marrink, S.J. Release of content through mechano-sensitive gates in pressurized liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19856-19860.
- MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Menco, B. P. M.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K.; Hu, L. R. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1061*, 297-303.
- Makino, A.; Prossnitz, E.R.; Bünemann, M.; Wang, J.M.; Yao, W.; Schmid-Schönbein, G.W. G protein coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2006**, *290*, C1633-C1639.
- Mangione, P. P.; Esposito, G.; Relini, A.; Raimondi, S.; Porcari, R.; Giorgetti, S.; Corazza, A.; Fogolari, F.; Penco, A.; Goto, Y.; Lee, Y.- H.; Yagi, H.; Cecconi, C.; Naqvi, M. M.; Gillmore, J. D.; Hawkins, P. N.; Chiti, F.; Rolandi, R.; Taylor, G. W.; Pepys, M. B.; Stoppini, M.; Bellotti, V. Structure, folding dynamics, and amyloidogenesis of D76N β_2 -microglobulin. Roles of shear flow, hydrophobic surfaces, and α -crystallin. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 30917-30930.
- Mao, Y.; Du, Y.; Cang, X.; Wang, J.; Chen, Z.; Yang, H.; Jiang, H. Binding competition to the POPG lipid bilayer of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , and K^+ in different ion mixtures and biological implication. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 850–858.
- Meng, A. X.; Hill, G. A.; Dalai, A. K. Hydrodynamic characteristics in an external loop airlift bioreactor containing a spinning sparger and a packed bed. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2002**, *41*, 2124-2128.
- Merchuk, J. C.; Ben-Zvi (Yona), S. A novel approach to the correlation of mass transfer rates in bubble columns with non-newtonian liquids. *Chem. Eng. Sci.* **1992**, *47*, 3517-3523.
- Merchuk, J. C.; Ben-Zvi (Yona), S.; Niranjana, K. Why use bubble-column bioreactors? *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 501-511.
- Miyazaki, M.; Nakamura, H.; Maeda, H. Improved yield of enzyme reaction in microchannel reactor. *Chem. Lett.* **2001**, *30*, 442-443.
- Molina-Bolívar, J.A.; Galisteo-González, F.; Hidalgo-Álvarez, R. Colloidal stability of protein–polymer systems: a possible explanation by hydration forces. *Phys. Rev. E* **1997**, *55*, 4522–4530.
- Nakao, K.; Harada, T.; Furumoto, K.; Kiefner, A.; Popovic, M. Mass transfer properties of bubble columns suspending immobilized glucose oxidase gel beads for gluconic acid

- production. *Can. J. Chem. Eng.* **1999**, *77*, 816-825.
- Nishikawa, M.; Kato, H.; Hashimoto, K. Heat transfer in aerated tower filled with non-newtonian liquid. *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Develop.* **1977**, *16*, 133-137.
- Noguchi, H.; Gompper, G. Shape transitions of fluid vesicles and red blood cells in capillary flows. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 14159-14164.
- Oliveira, C.; Rubio, J. Zeta potential of single and polymer-coated microbubbles using an adapted microelectrophoresis technique. *Int. J. Mineral Processing* **2011**, *98*, 118-123.
- Osaki, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. An artificial molecular chaperone: poly-*pseudo*-rotaxane with an extensible axle. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14452-14457.
- Ovenden, C.; Xiao, H.; Flocculation behavior and mechanisms of cationic inorganic microparticle/polymer systems. *Colloid Surf. A* **2002**, *197*, 225–234.
- Paleos, C.M.; Tsiourvas, D.; Sideratou, Z. Preparation of multicompartement lipid-based systems based on vesicle interactions. *Langmuir* **2012**, *28*, 2337–2346.
- Ramírez, O. T.; Mutharasan, R. The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *36*, 911-920.
- Robbins, G.P.; Lee, D.; Katz, J.S.; Frail, P.R.; Therien, M.J.; Crocker, J.C.; Hammer, D.A. Effects of membrane rheology on leuko-polymersome adhesion to inflammatory ligands. *Soft Mat.* **2011**, *7*, 769-779.
- Rokitskayaa, Tatyana I.; Kolodkinb, Nikolay I.; Kotovaa, Elena A.; Antonenkoa, Yuri N. Indolicidin action on membrane permeability: carrier mechanism versus pore formation. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 91-97.
- Sabín, J.; Prieto, G.; Ruso, J.M.; Hidalgo-Álvarez, R.; Sarmiento, F. Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces. *Eur. Phys. J.* **2006**, *E 20*, 401–408.
- Sabín, J.; Prieto, G.; Ruso, J.M.; Sarmiento, F. Fractal aggregates induced by liposome-liposome interaction in the presence of Ca²⁺. *Eur. Phys. J. E* **2007**, *24*, 201–210.
- Sabín, J.; Prieto, G.; Sarmiento, F. Stable clusters in liposomic systems. *Soft Matter* **2012**, *8*, 3212–3222.
- Sada, E.; Katoh, K.; Terashima, M.; Kawahara, H.; Katoh, M. Effects of surface charge and cholesterol content on amino acid permeation of small unilamellar vesicles. *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79*, 232–235.
- Sakai, H.; Okuda, N.; Takeoka, S.; Tsuchida, E. Increased viscosity of hemoglobin-based

- oxygen carriers retards NO-binding when perfused through narrow gas-permeable tubes. *Microvasc. Res.* **2011**, *81*, 169-176.
- Sabín, J.; Prieto, G.; Ruso, J. M.; Sarmiento, F. Fractal aggregates induced by liposome-liposome interaction in the presence of Ca^{2+} . *Eur. Phys. J. E* **2007**, *24*, 201-210.
- Sabín, J.; Prieto, G.; Sarmiento, F. Stable clusters in liposomic systems. *Soft Matter* **2012**, *8*, 3212-3222.
- Schneider, S. W.; Nuschele, S.; Wixforth, A.; Gorzelanny, C.; Alexander-Katz, A.; Netz, R. R.; Schneider M. F. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von willebrand factor fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7899-7903.
- Schumpe, A.; Deckwer, W. –D. Viscous media in tower bioreactors: Hydrodynamic characteristics and mass transfer properties. *Bioprocess Eng.* **1987**, *2*, 79-94.
- Seong, G. H.; Crooks, R. M. Efficient mixing and reactions within microfluidic channels using microbead-supported catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13360-13361.
- Sen, A.; Kallos, M. S.; Behie, L. A. Effects of hydrodynamics on cultures of mammalian neural stem cell aggregates in suspension bioreactors. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2001**, *40*, 5350-5357.
- Sennato, S.; Bordi, F.; Cametti, C.; Biasio, A. Di.; Diociaiuti, M. Polyelectrolyteliposome complexes: an equilibrium cluster phase close to the isoelectric condition. *Colloid Surf. A* **2005**, *270-271*, 138–147.
- Shahidzadeh, N.; Bonn, D.; Aguerre-Chariol, O.; Meunier, J. Large deformation of giant floppy vesicles in shear flow. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 4268-4271.
- Shi, L. K.; Riba, J. P.; Angelino, H. Estimation of effective shear rate for aerated non-Newtonian liquids in airlift bioreactor. *Chem. Eng. Commun.* **1990**, *89*, 25-35.
- Small, E.F.; Dan, N.R.; Wrenn, S.P. Low-frequency ultrasound-induced transport across non-raft-forming ternary lipid bilayers. *Langmuir.* **2012**, *28*, 14364-14372.
- Sun, B. J.; Shum, H. C.; Holtze, C.; Weitz, D. A. Microfluidic melt emulsification for encapsulation and release of actives. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2010**, *2*, 3411-3416.
- Swoboda, B. E. P.; Massey, V. J. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biol. Chem.* **1965**, *240*, 2209-2215.
- Szekely, O.; Steiner, A.; Szekely, P.; Amit, E.; Asor, R.; Tamburu, C.; Raviv, U. The structure of ions and zwitterionic lipids regulates the charge of dipolar membranes. *Langmuir* **2011**, *27*, 7419–7438.
- Tadmor, R. The London-ven der waals interaction energy between objects of various

- geometries. *J. Phys. Condens. Matter* **2001**, *13*, L195–L202.
- Takagi, S.; Yamada, T.; Gong, X.; Matsumoto, Y. The deformation of a vesicle in a linear shear flow. *J. Appl. Mechanics* **2009**, *76*, 021207-1-021207-6.
- Takahashi, H.; Sawada, S.; Akiyoshi, K. Amphiphilic polysaccharide nanoballs: a new building block for nanogel biomedical engineering and artificial chaperones. *ACS Nano* **2011**, *5*, 337-345.
- Takayama, M.; Ito, S.; Nagasaki, T.; Tanimizu, I. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin. Chim. Acta* **1977**, *79*, 93-98.
- Tanaka, Y.; Slyadnev, M. N.; Sato, K.; Tokeshi, M.; Kim, H.- B.; Kitamori, T. Acceleration of an enzymatic reaction in a microchip. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 809-810.
- Tarbell, J.M. Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *87*, 320-330.
- Tester, C.C.; Brock, R.E.; Wu, C.-H.; Krejci, M.R.; Weigand, S.; Joester, D. In vitro synthesis and stabilization of amorphous calcium carbonate (ACC) nanoparticles within liposomes. *CrystEngComm* **2011**, *13*, 3975–3978.
- Thevenot, J.; Troutier, A.-L.; David, L.; Delair, T.; Ladavière, C. Steric stabilization of lipid/polymer particle assemblies by poly (ethylene glycol)-lipids. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3651–3660.
- Thomasi, S. S.; Cerri, M. O.; Badino, A. C. Average shear rate in three pneumatic bioreactors. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2010**, *33*, 979-988.
- Treyer, M.; Walde, P.; Oberholzer, T. Permeability enhancement of lipid vesicles to nucleotides by use of sodium cholate: basic studies and application to an enzyme-catalyzed reaction occurring inside the vesicles. *Langmuir.* **2002**, *18*, 1043-1050.
- Tuytten, R.; Lemierc, F.; Witters, E.; Dongen, W. V.; Slegers, H.; Newton, R. P.; Onckelen, H. V.; Esmans, E. L. Stainless steel electrospray probe: a dead end for phosphorylated organic compounds? *J. Chromatogr. A* **2006**, *1104*, 209-221.
- van der Veen, M. E.; van Iersel, D. G.; van der Goot, A. J.; Boom, R. M. Shear-induced inactivation of α -amylase in a plain shear field. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1140-1145.
- Walde, P. Preparation of vesicles (liposomes), in: H.S. Nalwa (Ed.), *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 9, American Scientific Publishers, Los Angeles (2004) pp 43-79.
- Walde, P.; Ichikawa, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 143–177.

- Wang, C.; Ye, D. -K.; Wang, Y. -Y.; Lu, T.; Xia, X. -H. Insights into the “free state” enzyme reaction kinetics in nanoconfinement. *Lab Chip* **2013**, *13*, 1546-1553.
- Wang, Y.; Krull, I.; C.Liu, S.; Orr, J. D. Complexation with iron at sub-ppm levels in HPLC analyses of phospholipids. *Biomed. Chromatogr.* **2003**, *17*, 149-157.
- Wydro, P.; Knapczyk, S.; Łapczyn' ska, M. Variations in the condensing effect of cholesterol on saturated versus unsaturated phosphatidylcholines at low and high sterol concentration. *Langmuir* **2011**, *27*, 5433–5444.
- Xiang, T.-X.; Anderson, B.D. Permeability of acetic acid across gel and liquid-crystalline lipid bilayers conforms to free-surface-area theory. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 223-237.
- Xu, W.; Nikolov, A.; Wasan, D.T. Shear-induced fat particle structure variation and the stability of food emulsions. I. Effects of shear history, shear rate and temperature. *J. Food Eng.* **2005**, *66*, 97–105.
- Yamada, M.; Kasim, V.; Nakashima, M.; Edahiro, J.; Seki, M. Continuous cell partitioning using an aqueous two-phase flow system in microfluidic devices. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *88*, 489-494.
- Yamashita, K.; Miyazaki, M.; Yamaguchi, Y.; Nakamura, H.; Maeda, H. Thermodynamic properties of duplex DNA in microchannel laminar flow. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 1307-1310.
- Yamashita, K.; Miyazaki, M.; Nakamura, H.; Maeda, H. Nonimmobilized enzyme kinetics that rely on laminar flow. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 165-169.
- Yeow, Y.L.; Wickramasinghe, S.R.; Leong, Y.-K.; Han, B. Cis-acting noncoding RNAs: friends and foes. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1068-1075.
- Yoshimoto, M.; Kuboi, R. Oxidative refolding of denatured/reduced lysozyme utilizing the chaperone-like function of liposomes and immobilized liposome chromatography. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 480-487.
- Yoshimoto, M.; Miyazaki, Y.; Umemoto, A.; Walde, P.; Kuboi, R.; Nakao, K. Phosphatidylcholine vesicle-mediated decomposition of hydrogen peroxide. *Langmuir* **2007**, *23*, 9416-9422.
- Yoshimoto, M.; Miyazaki, Y.; Sato, M.; Fukunaga, K.; Kuboi, R.; Nakao, K. Mechanism for high stability of liposomal glucose oxidase to inhibitor hydrogen peroxide produced in prolonged glucose oxidation. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1055-1061.
- Yoshimoto, M.; Monden, M.; Jiang, Z.; Nakao, K. Permeabilization of phospholipid bilayer membranes induced by gas-liquid flow in an airlift bubble column. *Biotechnol. Prog.* **2007**,

23, 1321-1326.

- Yoshimoto, M.; Momodomi, C.; Fukuhara, H.; Fukunaga, K.; Nakao, K. Effect of suspended liposomes on hydrodynamic and oxygen transfer properties in a mini-scale external loop airlift bubble column. *Chem. Eng. Technol.* **2006**, *29*, 1107-1112.
- Yoshimoto, M.; Sakamoto, H.; Yoshimoto, N.; Kuboi, R.; Nakao, K. Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver catalase through encapsulation in liposomes. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 849-858.
- Yoshimoto, M.; Wang, S.; Fukunaga, K.; Treyer, M.; Walde, P.; Kuboi, R.; Nakao, K. Enhancement of apparent substrate selectivity of proteinase K encapsulated in liposomes through a cholate-induced alteration of the bilayer permeability. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *85*, 222-233.
- Yoshimoto, M.; Wang, S.; Fukunaga, K.; Fournier, D.; Walde, P.; Kuboi, R.; Nakao, K. Novel immobilized liposomal glucose oxidase system using the channel protein OmpF and catalase. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *90*, 231-238.
- Yoshimoto, M.; Wang, S.; Fukunaga, K.; Walde, P.; Kuboi, R.; Nakao, K. Preparation and characterization of reactive and stable glucose oxidase-containing liposomes modulated with detergent. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 695-704.
- Yoshimoto, M.; Yamashita, T.; Yamashiro, T.; Stability and reactivity of liposome-encapsulated formate dehydrogenase and cofactor system in carbon dioxide gas-liquid flow. *Biotechnol. Prog.* **2010**, *26*, 1047-1053.
- Yoshimura, K.; Usukura, J.; Sokabe, M. Gating-associated conformational changes in the mechanosensitive channel MscL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4033-4038.
- Zhang, Q.; Thompson, M.S.; Carmichael-Baranauskas, A.Y.; Caba, B.L.; Zalich, M.A.; Lin, Y.-N.; Mefford, O.T.; Davis, R.M.; Riffle, J.S. Aqueous dispersions of magnetite nanoparticles complexed with copolyether dispersions: experiments and theory. *Langmuir* **2007**, *23*, 6927-6936.
- Zhang, X.; Hurng, J.; Rateri, D.L.; Daugherty, A.; Schmid-Schönbein, G.W.; Shin, H.Y. Membrane cholesterol modulates the fluid shear stress response of polymorphonuclear leukocytes via its effects on membrane fluidity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2011**, *301*, C451-C460.
- Zuzzi, S.; Cametti, C.; Onori, G. Polyion-induced aggregation of lipidic-coated solid polystyrene spheres: the many facets of complex formation in low-density colloidal suspensions. *Langmuir* **2008**, *24*, 6044-6049.

研究発表論文

学位論文に関連する論文

(a) 査読のある雑誌等

1 . Makoto Yoshimoto; Tomotaka Natsume; Naoya Matsumoto; Hideyuki Sakamoto, Gas-liquid flow-induced permeabilization of phospholipid bilayer membranes for regulating catalytic performance of liposome-encapsulated bovine liver catalase. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, 360, 63-68. (本文第 4 章)

2 . Makoto Yoshimoto; Ryota Tamura; Tomotaka Natsume, Liposome clusters with shear stress-induced membrane permeability. *Chemistry and Physics of Lipids* **2013**, 174, 8-16. (本文第 2 章)

3 . Tomotaka Natsume; Makoto Yoshimoto, Membrane permeability and stability of liposomes suspended in shear flow. *Journal of Dispersion Science and Technology* **2013**, 34, 1557-1562. (本文第 2 章)

4 . Tomotaka Natsume; Makoto Yoshimoto, A method to estimate average shear rate in a bubble column using liposomes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2013**, 52, 18498-18502. (本文第 3 章)

5 . Tomotaka Natsume; Makoto Yoshimoto, Mechanosensitive liposomes as artificial chaperones for shear-driven acceleration of enzyme-catalyzed reaction. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, 6, 3671-3679. (本文第 4 章)

(b) 国際会議の会議録

1 . Tomotaka Natsume; Makoto Yoshimoto; Katsumi Nakao, Estimation of the shear rate in airlift and normal bubble columns on the basis of shear-dependent permeability of liposome membranes. *2nd International Symposium on Multiscale Multiphase Process Engineering*, P19, page 237-241, Hamburg, Germany, Sep. 24-27, 2014. (本文第 3 章)

参考論文 (国際会議の会議録)

1 . Makoto Yoshimoto; Yuki Sakakida; Ryota Tamura; Tomotaka Natsume; Tomoaki Ikeda, Clusters of phospholipid vesicles as platforms for glucose oxidase-catalyzed reaction in a bubble column bioreactor. *2nd International Symposium on Multiscale Multiphase Process Engineering*, page 36-41, Hamburg, Germany, Sep. 24-27, 2014.

謝辞

本研究は、平成 24 年 4 月より、山口大学大学院医学系研究科応用分子生命科学系専攻バイオプロセス工学研究室において、山口大学、吉本誠准教授のご指導のもとに行われたものであります。

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました、吉本誠准教授に深く感謝の意を表します。吉本誠先生には、テーマの決定から実験・分析方法、論文の執筆などを通して長期に渡り厳しくも熱意あるご指導をして頂きお礼申し上げます。

山口大学大学院医学系研究科、山本修一教授、赤田倫治教授、山口大学大学院理工学研究科、佐伯隆教授、通阪栄一准教授からは学位論文審査会を通して本論文に対する多くの有益なご教授を賜りました。深く感謝を致します。

気泡塔に関する研究におきまして多くのご指導と激励を頂きました山口大学、中尾勝實名誉教授に深く感謝します。

本研究を遂行するにあたり多くのご協力を頂きました、平成 26 年度バイオプロセス工学研究室所属の山口大学医学系研究科博士前期課程の小園遼平氏、榊田祐希氏、三穂野海氏、工学部生の大津豪志氏、蓮實紗弥氏、前島慶輔氏、山田純氏他、平成 22～25 年度に修了・卒業した同研究室の方々に感謝致します。

最後に、精神的にも経済的にも長い間支えて頂いた家族に感謝を申し上げます。ありがとうございました。

夏目友誉