

皮膚用 DDS としての高分子脂質リポソームの基礎研究

早稲田大学理工学部

西出宏之・土田英俊

Liposomes composed of polymerized phospholipids possess enormous stabilities against mechanical stress, detergents, long term storage, and phospholipases, and are one of the potential candidates for usage as a skin-drug delivery system (DDS). Formation profile of the polymerized phospholipids derived from 1,2-bis(2,4-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine was first described, and their molecular weight was estimated. Stability of the liposome structure was demonstrated by the addition test of detergent such as Triton X-100. Viscosity of the liposome solution coexisted with water-soluble polymers provided its rheological characteristics. Encapsulation efficiency by the liposome was studied in the view point of concentration of encapsulated material and lamellarity of the liposome by using hemoglobin as an example. The encapsulation profile was also influenced by pH and ionic strength of the solution. The liposomes could be freeze-dried with a small amount of sugar, suggesting that the liposome would be utilized as dry powder for skin-DDS.

1. 緒言

ここ十年來我々は、人工赤血球としてヘモグロビンを安定に含有するリポソーム(脂質小胞体: 粒径0.05~0.5 μ m 微小マイクロカプセル)に用いるリン脂質誘導体の合成化学的な研究を展開してきたが、その物質群の一つに高分子脂質リポソームがある¹⁻⁵⁾。1,2-Bis(2,4-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine を紫外光または γ 線照射重合して得られる高分子脂質リポソームであり、その特徴は次のように列挙できる。①リポソーム2分子膜がリン脂質分子間の共有結合(重合反応による架橋)により安定化されており、例えば界面活性剤によっても小胞体構造は破壊されない。②生化学的にも安定で、例えばホスホリパーゼAおよびDによっても直ちには加水分解されない。③しかも重合後脂質部には不飽和結合が残るので緩慢に代謝される。④リポ

ソーム作製の常法に従って内包物質をカプセル化後、照射重合して安定構造に誘導できる。⑤小胞体として物理的に強靱である。⑥相分離や小胞体間の融合なしに、高濃度の分散液が保持できる。

本研究ではこれら特性を有する新しい高分子脂質リポソームを、皮膚用 DDS(薬物運搬体)としてはじめて新しく展開するための基礎知見を得て、乳化化粧品とは全く異なる新しい運搬システムの可能性を明らかにしようとするものである。すなわち特徴①~⑥に対応して次の効果が期待される。(a)界面活性剤に対する強い抵抗性①に基づき、安定な皮膚用 DDSとして適用する。(b)生化学的安定性②により、急速な代謝や皮膚細胞との直接相互作用を抑制しながら、角層~表皮~真皮への浸透が可能。(c)③により毒性低減が計れる。(d)④・⑤に基づき内包物質の種類(油~水溶性)に制約がなく、また広い濃度範囲での内包が可能となる。(e)⑥に起因して、溶液物性(レオロ

Study on Polymerized Phospholipid Liposomes as a Drug Delivery System for Skin

Hiroyuki Nishide・Eishun Tsuchida

0.73Mrad)し、高分子脂質リポソームを得た。これを遠心濃縮(8wt%)、pH調整後(pH7.4)測定に用いた⁹⁾。

デキストラン(Mw 19,800)、ヒトアルブミンはSigma社製をそのまま使用した。ポリエチレンオキシド(PEO, Mw20,000, 和光純薬)は透析精製して用いた。

粘度(37°C)はE型回転粘度計(東機産業)を使用して、ズリ速度(D)が $7.5s^{-1}$ での値を取った。

2.5 ヘモグロビン溶液の調製

期限切れヒト赤血球を生理食塩水で二倍に希釈し、一酸化炭素雰囲気下振盪して赤血球中のヘモグロビン(Hb)を一酸化炭素化(HbCO)した。遠心洗浄後の濃厚赤血球([Hb]=25g/dl)にジクロロメタンを添加して溶血させ、ストローマ成分を遠心分離した。残留ジクロロメタンを減圧留去後、加熱処理(60°C)、変性した共存蛋白質を遠心分離した。透析後pH、イオン強度を調節して、限外濾過濃縮により高純度の濃厚Hb溶液を得た¹⁰⁾。

2.6 高分子脂質リポソームへの内包

混合脂質薄膜にHbCO溶液を添加して、多重層リポソームを得た。これをエクストルーダー処理して、粒径200nmφのHbを内包したリポソームとした。ゲル濾過(Sepharose CL-4B)によりリポソーム外水相の未内包Hbを除去、遠心分離により濃縮した。

リポソームを構成するDODPCの高分子化は、得られたHbリポソーム分散液をCO雰囲気下、4°C、0.75Mradのγ線(⁶⁰Co)照射して行った。重合率は約70%であった^{7, 11)}。

2.7 リポソームの被覆層数、内水相濃度の測定法

1個のリポソームの内水相体積 V_{in} と構成脂質分子数 N は、各々式(2)、(3)により層数 n の関数として表すことができる¹²⁾。ここでリポソーム半径(r)=100nm、無水状態の二分子膜厚(d)=

5nm、二分子膜間水層(d_w)=1.3nm、平均分子占有面積(S)=0.36nm²とした。

$$V_{in}(\text{cm}^3) = \frac{4}{3}\pi \{r-n(d+d_w)+d_w\}^3 \times 10^{-21} \quad \text{-----}(2)$$

$$N = \frac{4\pi}{S} \sum_{i=1}^n [\{r-(i-1)(d+d_w)\}^2 + \{r-i(d+d_w)+d_w\}^2] \quad \text{-----}(3)$$

単位脂質重量当りのリポソーム体積 $V_{c.a.i.c}(\text{cm}^3/\text{g})$ は(4)式にて表せられる。ここで M は平均分子量、 N_A はアボガドロ数である。

$$V_{c.a.i.c}(\text{cm}^3/\text{g}) = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3 \times 10^{-21}}{M \times \frac{N}{N_A}} \quad \text{-----}(4)$$

他方、添加脂質重量を $m(\text{g})$ 、リポソーム総体積を $V(\text{cm}^3)$ とすると、単位脂質重量当りのリポソーム体積の実測値である $V_{m.o.s.}$ は、以下で求められる。リポソーム分散液にグルコース $m'(\text{g})$ を添加し、 $V'(\text{g})$ に定容すると見かけのグルコース濃度 C_{app} は $m'/V'(\text{g}/\text{cm}^3)$ となるが、グルコースはリポソームの外水相にのみ存在しているのでリポソームの遠心分離後にこの濃度を定量する。 C_{app} との差はリポソームの総体積分になるので、(5)式により $V_{m.o.s.}$ が算出される。

$$V_{m.o.s.}(\text{cm}^3/\text{g}) = \frac{V}{m} = \frac{V'(1-C_{app}/C)}{m} \quad \text{-----}(5)$$

被覆層数(n)は、 $V_{m.o.s.} = V_{c.a.i.c}$ から N を計算して(6)式から算出される。リポソームのHb内包効率は、単位脂質重量当りのHb重量比([Hb]/[Lipid]比)として表される。Hbリポソーム分散液中のリン脂質濃度とHb濃度は各々Allen法、シアノメト法にて定量した。

リポソーム内のHb溶液の濃度([Hb]_{in})は、(6)式から算出される。

$$[\text{Hb}]_{in}(\text{g}/\text{dl}) = \frac{[\text{Hb}]}{[\text{Lipid}]} \frac{M \times \frac{N}{N_A}}{V_{in}} \times 100 \quad \text{-----}(6)$$

2.4 リポソーム粉末の調製

Hb リポソーム分散液(脂質濃度 $1\text{g}/\text{dl}$)にショ糖($50\sim 150\text{mM}$)添加し、冷媒(メタノールドライアイス)により速やかに凍結し、減圧乾燥してリポソームの粉末を得た。これに粉末に純水を添加し、元の成分濃度に調整した後、フィルター($0.8\mu\text{m}\phi$)を通過させ、粒径と内包Hbの漏出量をゲル濾過で分離、定量し、漏出率を測定した⁷⁾。

3. 結果と考察

3.1 高分子脂質リポソームの生成

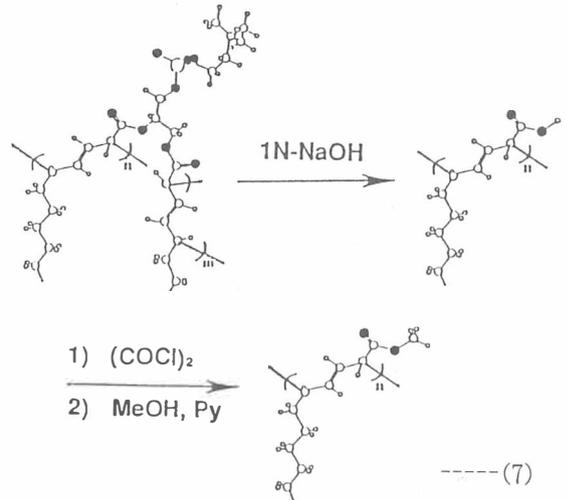
DODPC(式1)はアシル鎖の各々に重合活性の高いジエン基をもつ脂質である。水に分散後、超音波照射すると容易に2分子膜小胞体リポソームを生成する。これに紫外光を照射すると脂質分子内のジエン基の一部が励起されるが、脂質分子は2分子膜内で配向しているので近接するジエン基間で共有結合を生じ易く、連鎖的に重合が進む(Fig.1)。 γ 線照射では、水の分解により生じたOHラジカルが、親疎水界面に存在するジエン基を攻撃して重合が開始される。どちらの方法でも、重合に際し小胞体の形状はそのまま保たれるので、高分子脂質リポソームに変換される。

生成した高分子脂質は、式1のように分子内に2つのジエン基を有することから一種の架橋体であり、正確な分子量測定は困難とされていた。そのため後述のような特性がありながら、高分子脂質の分子量(重合度)は知られていなかった。特に医薬用に高分子脂質を利用するためには、分子量の把握は不可欠である。そこで高分子脂質のグリセロホスホコリン部を除去し、メチルエステル化する



Fig.1 Polymerization of DODPC in a liposome.

ることにより有機溶媒に可溶性高分子へ誘導し(式7)、GPCにて分子量を測定した^{6, 7)}。紫外光照射により重合した高分子脂質の分子量は、 $M_n=5.4\times 10^3$, $M_w=6.9\times 10^3$, γ 線照射重合では $M_n=1.5\times 10^4$, $M_w=4.1\times 10^4$ であった。



紫外光の継続照射(半日)や大気下で長期保存(1週間)した試料では、分子量の低下が認められた。高分子脂質は重合(高分子化)後もアシル鎖部に不飽和結合を有するので、この部位が引き金となって高分子脂質の分解が生起していると示唆される。生化学的な代謝や毒性を考慮した場合、高分子脂質の一つの可能性を示している。

3.2 界面活性剤に対する安定性

オリゴエチレンオキシドモノオクチルフェニルエーテル(Triton X-100)など界面活性剤は脂質リポソームを容易に破壊する。通常の卵黄レシチンより作成したリポソームの水溶液にTriton X-100を加えていくと、光散乱強度はいったん増大そして減少した(Fig.2)。これは界面活性剤によるリポソームの破壊と脂質の可溶化に対応している。DODPCについても、重合前は卵黄レシチンと同じく、界面活性剤により小胞体は破壊された。それに対し、高分子リポソームではTriton X-100の添加によっても水溶液の光散乱度は

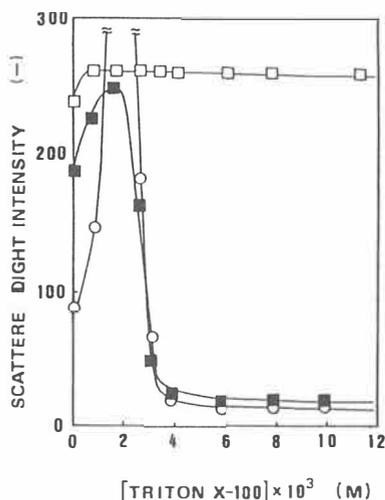


Fig.2 Scattered-light intensity change at 90° for liposomes induced by the addition of Triton X-100 with different concentration. (\square) DODPC polymerized by γ -irradiation, (\blacksquare) DODPC before polymerization, and (\circ) egg yolk lecithin liposomes (as reference).

変化せず、リポソーム構造を保っていることがわかった。

高分子脂質リポソーム水溶液は3ヶ月放置後も、相分離や沈澱を全く生じなかった。さらに後述のHbを内包した高分子脂質リポソームでは、Hbの漏出は認められなかった。これらの事実は、高分子脂質リポソームが保存時または界面活性剤共存下でも十分に内包物を保持して存在していることを示している。

3.3 水溶性高分子との相互作用

高分子脂質リポソームに種々の水溶性高分子を加え、溶液系の粘度を回転粘度計で測定した。この実験は皮膚組織での相互作用を推定するため、また分散液としての溶液物性(レオロジー触感)を調節するための一知見と考えた。

高分子脂質リポソーム8%水溶液に、PEO、多糖類デキストラン、ヒトアルブミンを添加し、溶液粘度の上昇をプロットした(Fig.3)。前2者の添加では、ある濃度から粘性は急激に増加したのに対し、後者での粘度上昇はわずかであった。前

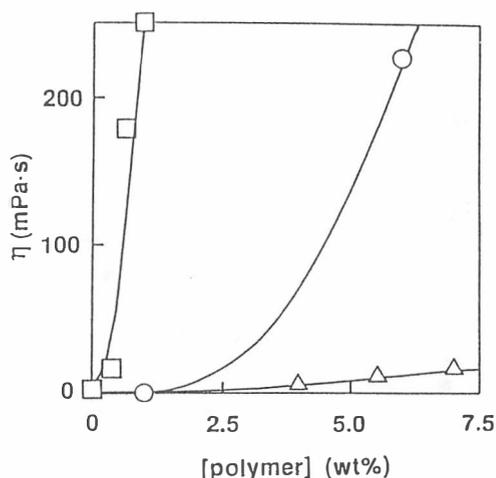


Fig.3 Changes in the solution viscosity of polymerized phospholipid liposomes by the addition of water-soluble polymers. PEO(\square), dextran(\circ), albumin(\triangle).

者では水溶性高分子との相互作用による微粒子の凝集が考えられる。これに対し、球状タンパク質は凝集を引起し難いことがわかった。

今後、リポソームの粒径および脂質構成成分による表面電荷を調整することにより、相互作用さらにはレオロジー物性を増減する知見が不可欠である。

3.4 機能物質内包における濃度と調整温度の影響

高分子脂質リポソーム内に機能物質を効率高く内包する要件を、機能物質としてHbを例に実験した。

原料Hb溶液を濃厚にするとリポソーム内Hb量も増大すると考えられる。Hb濃度を43g/dlまで増加させても、リポソームの被覆脂質層数n値はほぼ一定(1.4枚)であったが、リポソームに内包されたHbの濃度 $[Hb]_{in}$ は調製時のHb溶液の濃度とともに増大した(Fig.4)。しかし、原料Hb濃度が高くなると $[Hb] - [Hb]_{in}$ は大きくなってきた。高濃度になるとHb分子同士でfloculate(ゆるい会合体)が形成され、Hb溶液粘度は急激に増大し、内包効率が頭打ちになった

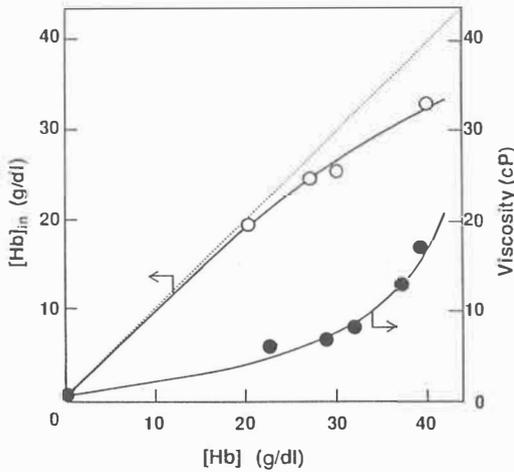


Fig.4 Encapsulation profiles of Hb into liposomes with increasing fed Hb concentration (○) and the solution viscosity (●) at shear rate = 11.5 sec^{-1} .

と考えられる。しかし高濃度溶液を用いることにより [Hb]/[Lipid] 比は確実に向上する。

次に熱安定性を有する HbCO を用い、高い温度で溶液粘度を下げ、カプセル化し、内包物質濃度 $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ の向上を試みた (Fig.5)。Hb 濃度一定 (31 g/dl) のもと 4°C から 10°C になると、溶液粘度の低下に対応して $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ は急激に増大した。しかし層数 (n) も温度とともに増加した。実際、内包後 $[\text{Hb}]/[\text{Lipid}]$ 比 (Fig.6) は、温度が高くな

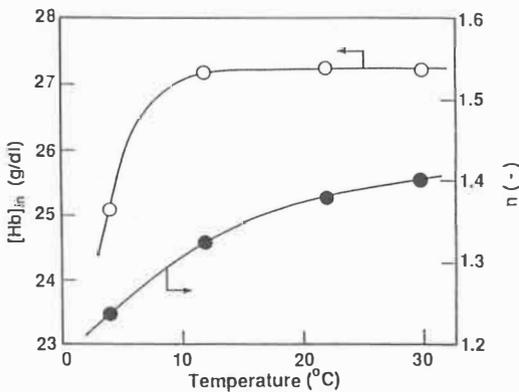


Fig.5 Influence of the preparation temperature on n and $[\text{Hb}]_{\text{in}}$. ($[\text{Hb}] = 31 \text{ g/dl}$, $[\text{NaCl}] = 0.6 \text{ g/dl}$, $\text{pH} = 7.0$)

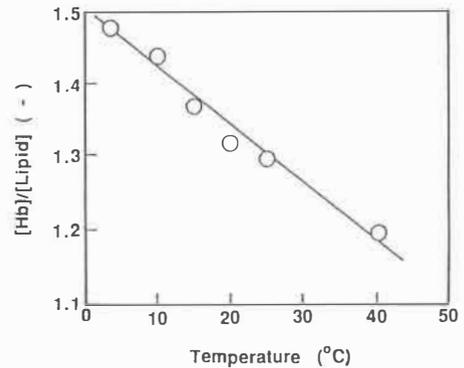


Fig.6 Influence of the preparation temperature on the $[\text{Hb}]/[\text{Lipid}]$ ratio. ($[\text{Hb}] = 40 \text{ g/dl}$, $[\text{NaCl}] = 0.57 \text{ g/dl}$, $\text{pH} = 6.9$)

るほどむしろ減少した。粒径調整に際して、フィルター細孔内でリポソームはズリ応力を受けて小さな粒径へと変化するが、膜構成分子の運動性が高くなると、より多重層単位での変形が容易となるため、層数の大きなリポソームが形成されたと考えられる。

従って、内包機能物質の変性防止も考えあわせ、リポソームの調製は低温で実施すべきと結論づけられた。

3.5 機能物質内包における pH, イオン強度の影響

膜構成成分として脂肪酸を導入して、リポソームの脂質分子膜表面を負に帯電させると、層間での静電反発によりリポソームの層数低下が期待できる。Hb 分子も等電点を $7.0 (25^\circ\text{C})$ に有する電荷を帯びた分子であり、脂質膜表面との相互作用については内包効率は pH によって変化するものと考えられる。

各 pH の Hb 溶液でリポソームを調製したところ、pH 上昇とともに脂質層数 (n) の減少が認められた (Fig.7)。高 pH では脂肪酸の解離度は高くなり ($\text{pK}_a = 7.4$)¹³⁾、脂質分子膜間の静電反発により層数の少ないリポソームが形成される。一方、Hb の等電点よりも低い pH では Hb は正に帯電し、負に帯電した脂質分子膜との親和性が増

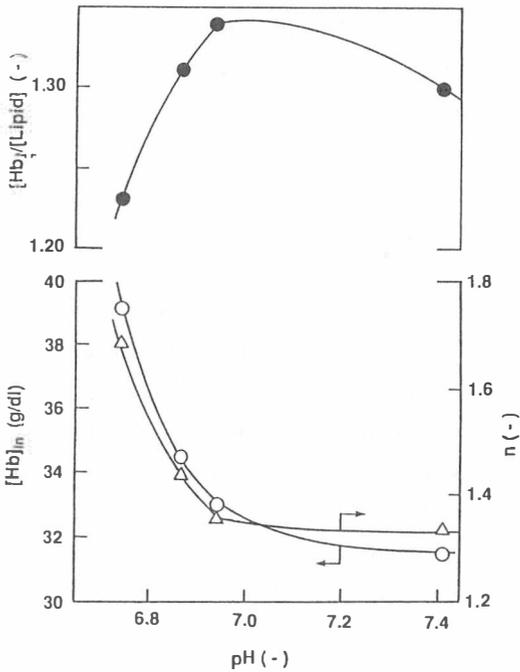


Fig.7 Influence of pH of Hb solutions on the [Hb]/[Lipid]ratio(●), n(Δ), and [Hb]_i(○). ([Hb]=40g/dl, [NaCl]=0.6g/dl, 4°C)

すため[Hb]_iは急激に増加する。このようにpHが低くなると、[Hb]_iは上昇nが増加し、高くなると[Hb]_iが低下nが減少するといった相殺する挙動となった。内包物質の等電点付近のpHでリポソーム調製することにより最も高い[内包物質]/[脂質]比が得られた。

溶液イオン強度が上昇すると電荷遮蔽効果により脂肪酸間の反発が低下、層数が増大した(Fig. 8)。[Hb]_iも塩濃度増大とともに減少したので、[内包物質]/[脂質]比は塩濃度の低い条件でのみ高く保てることがわかった。

3.6 高分子脂質リポソームの粉末化

高分子化リン脂質リポソームが凍結融解を繰り返しても粒径分布や内包物質の漏出が認められないことから¹¹⁾、リン脂質二分子膜が非常に強靱であることが明らかとされてきた。そこでさらに乾燥体としての形態保持能について検討した⁷⁾。

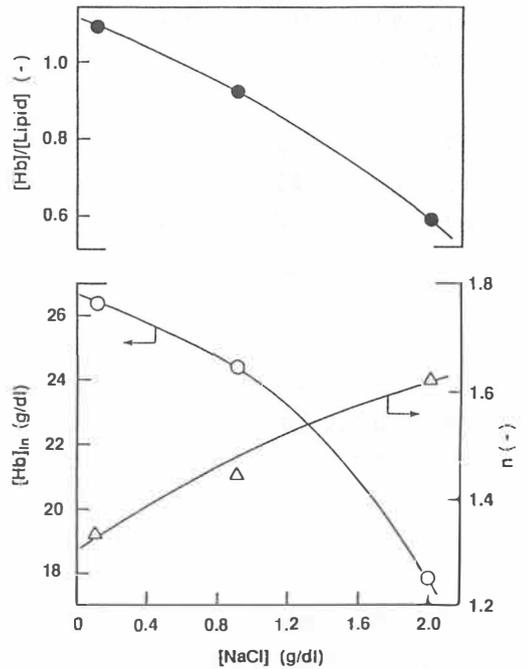


Fig.8 Influence of NaCl concentration in Hb solutions on the [Hb]/[Lipid]ratio(●), n(Δ), and [Hb]_i(○). ([Hb]=27g/dl, pH=7.1, 4°C)

高分子化脂質リポソームの分散液をそのまま凍結乾燥粉末としたあと、純水に再分散させると、粒径は増大するが、内包物質Hbの漏出は認められなかった(Fig.9)。従って粒径の増大はリポソーム構造が破壊されたのではなく、単に粉末化したリポソームが凝集し、分散し難くなっているため

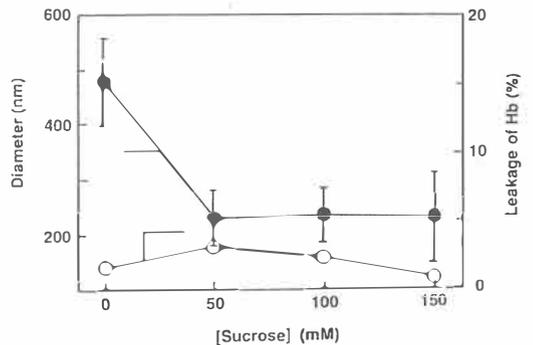


Fig.9 Changes in diameter and leakage of Hb from the polymerized phospholipid liposomes after freeze-drying and rehydration.

と考えられる。高分子化していないリポソームでは粒径が増大し、Hbの漏出も80%に達することから、高分子脂質による安定性の向上は明らかである。

分散性を向上させるために、一例としてショ糖を50mM添加して凍結乾燥を行い、純水に再分散させたところ、平均粒径約200nmのリポソーム分散液にきわめて容易に復元することができた。

このように機能物質の内包に際しては、内包物質の溶液特性や、脂質分子、脂質膜との相互作用を考慮した条件設定が重要となる。また、高分子脂質を用いることにより、乾燥粉末としてもリポソームは十分に安定性を保持していることが明らかとされた。リポソーム表面は生体膜を構成する脂質成分と同じであり、生体適合性や安全性に優れ、反面、高分子脂質であるために内包物質の漏出や急速な代謝さらには皮膚細胞との直接相互作用を抑制し、角層～表皮～真皮へ緩慢に浸透するといった、皮膚用DDSに備えるべき機能が期待される。

引用文献

- 1) E. Tsuchida and H. Nishide, "Liposomes as Drug Carriers", Ed. by G. Gregoriades, p569, John Wiley, New York (1988).
- 2) H. Ohno, Y. Ogata, and E. Tsuchida, *Macromolecules*, 20, 929, (1987).
- 3) S. Takeoka, H. Ohno, N. Hayashi, and E. Tsuchida, *J. Control. Rel.*, 9, 177 (1989).
- 4) Y. Matsushita, K. Eshima, T. Shindo, Y. Yamamoto, E. Hasegawa, H. Nishide, and E. Tsuchida, *Biochim. Biophys. Acta*, 901, 166 (1987).
- 5) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Yuasa, T. Babe, and M. Fukuzumi, *Macromolecules*, 22, 66 (1989).
- 6) S. Takeoka, N. Kimura, H. Ohno, and E. Tsuchida, *Polym. J.*, 22, 867 (1990).
- 7) H. Sakai, S. Takeoka, H. Yokohama, H. Nishide, and E. Tsuchida, *Polym. Adv. Tech.*, 3, 389 (1993).
- 8) H. Ohno, Y. Ogata, and E. Tsuchida, *J. Polym. Sci. Part A*, 24, 2959 (1986).
- 9) 牧野千里, 木村登, 長谷川悦雄, 土田英俊, 日化誌, 1991, 1102
- 10) 酒井宏水, 横浜裕明, 武岡真司, 西出宏之, 土田英俊, 輸血誌, 38, 322 (1992).
- 11) E. Tsuchida, *Biomat. Art. Cells Immob. Biotech.*, 20, 337 (1992).
- 12) S. Takeoka, K. Terase, H. Yokohama, H. Sakai, H. Nishide, and E. Tsuchida, *J. Macromol. Sci.*, (1993) in press.
- 13) J. F. Tocanne, and J. Teissie, *Biochim. Biophys. Acta*, 1031, 111 (1990).