

リポソーム封入薬物の皮膚吸収過程の解析と 皮膚内ラジカル消去への応用

九州大学 薬学部

内海 英雄

Transdermal absorption of drugs entrapped in liposomes and radical scavenging effects of antioxidants in skin were investigated with ESR spectroscopy. Spectral-spatial and spatial-spatial 2-D imaging system were developed for this purpose.

Spin-labeled compound entrapped in liposomes was applied on stripped hair-less mouse skin and release of the compound from liposomes was imaged by using spectral-spatial 2-D analysis system. Liposomes injected intravenously to mouse was measured non-invasively with a L-band ESR, but it was impossible to measure liposomes applied on skin of live mouse because of less sensitivity.

Anthralin radical was produced on hair-less mouse skin by treatment of anthralin and UV-irradiation. High resolution spectral-spatial imaging showed that anthralin radical was generated near skin surface. Intravenous administration of antioxidants prevented the generation of the radical. Ascorbic acid and glutathione decreased the generation of anthralin radical independent of irradiation period, but Trolox showed less effect during first 5 h irradiation. Action mechanism of these antioxidants seems to be different.

1 緒言

近年、化粧品分野においてリポソームは、保湿効果並びに経皮吸収の向上効果を狙って積極的に用いられるようになった。しかし、リポソームを薬剤の吸収担体として用いた場合、皮膚における薬物の吸収過程についての詳細はまだ分かっていないのが現状である。それは、リポソーム製剤の吸収評価を行うには、薬物のリポソームからの放出と組織での吸収という2つの過程を解析しなければならず、皮膚におけるリポソーム封入薬物のこれらの過程を同時に解析するための適切な手段がまだ存在しないからに他ならない。

リポソームからの薬物の放出・吸収過程を解析するためには、皮膚におけるリポソーム内薬物の挙動を遊離薬物のものと区別して解析する必要がある。スピン標識化合物は、溶液中に高濃度に存在するときには1本のブロードな電子スピン共鳴(ESR)スペクトルを与えるが、希釈されるとシャープな3本線へと変化する。従って、リポソームに高濃度に封入しておけばそのESRスペクトルの変化から薬物のモデルとしてリポソームからの放出を解析することが可能である。また、ESRは試料を破壊せずにスペクトルを得ることが可能であるため、皮膚表面におけるリポソーム封入薬物の変化を経時的に調べることができる。皮膚におけるリポソームからの放出・吸収過程を同時に解析するためには、更に皮膚のどの部分のスピン標識化合物が如何なるスペクトルを与えるかを μm の空間分解能で知ることが必要となる。そのため、本研究では高分解能スペクトル-空間画像化解析法を開発する。スペクトル-空間画像化解析は、Maltempoら¹⁻³⁾、Herrlingら^{4, 5)}により既に行われているが、本研究ではこれを皮膚におけるリポ

Imaging analysis of transdermal absorption of liposome-entrapped drugs and application to radical scavenging in skins

Hideo Utsumi

Faculty of Pharmaceutical Sciences
Kyushu University



ソームの解析に適応できるように改良を加えた。また、近年生体計測用に開発されL-バンドESRにより、リポソーム製剤の挙動の無侵襲解析についても検討した。

一方、皮膚では紫外線によりメラニン色素沈着、アレルギー誘発、皮膚癌生成などが起こることが知られている。これらの成因には紫外線が皮膚で生成する活性酸素やフリーラジカルが係わっていることが示唆されているが、それを *in vivo* で証明した例やフリーラジカルの抗酸化剤による消去を *in vivo* で解析した例は未だない。本研究では、上記リポソーム製剤の放出・吸収過程の解析に加え、紫外線照射により生成するラジカルの皮膚内存在位置を高分解能スペクトルー空間画像化法を用いて調べた。また更に、皮膚のラジカル生成におよぼす抗酸化剤の *in vivo* における効果を調べた。

2 実験

2.1 実験材料

ヘアレスマウス (HR-1, 5週齢, 雌性) は、星野試験動物飼育所より、マウス (ddY, 3週齢, 雌性) は成和実験動物研究所よりそれぞれ購入した。プレソームC-1は、日本精化より恵与されたものを用いた。4-trimethylammonium-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl iodide (CAT-1) は Molecular Probes, Inc. より購入した。アンスラリンはSigma Chemical. Co. より購入した。

2.2 リポソームの調製

プレソームC-1 (水素添加卵黄レシチン/コレステロール(1:1)) 50mgに150mM CAT-1水溶液 500 μ lを加え、水和させたのち、凍結融解を5回繰り返し、ポリカーボネート膜 (ポアサイズ 400nm, 2枚重ね) を10回通過させた。リポソームに取り込まれなかったCAT-1を遠心分離 (100,000 \times g, 60分, 20 $^{\circ}$ C) により除き、リポソームの沈澱を脂質濃度が70-80mMになるように生

理食塩水で懸濁した。

2.3 皮膚におけるアンスラリンラジカルの生成

ヘアレスマウスに50mMアンスラリンのアセトン溶液500 μ lを塗布後、紫外線ランプによりUV-AあるいはUV-Cを照射した。

2.4 ESR測定

X-バンドESRはJEOL JES RE-1Xにより測定した。L-バンドESRはL-バンドマイクロ波ユニットとループギャップ共振器 (幅5mm, 内径33mm) を装備したJEOL JES PE-1Xにより測定した。

2.5 ESR画像

磁場勾配 $G = \tan(\theta) \cdot \Delta H / \Delta L$ (ΔH , ΔL はそれぞれ得ようとするスペクトルー空間画像のスペクトル軸, 空間軸の大きさ) で投影角度 θ の射影スペクトルを得、filtered-backprojection法により画像を再構成した。ミッシングアングル (磁場勾配装置の限界から射影スペクトルを得ることのできない正負の限界投影角度から90 $^{\circ}$ までの角度) に由来する画像のアーティファクトは代数的再構成法により取り除いた。

3 結果および考察

3.1 スペクトルー空間2次元画像化システムの開発

3.1.1 高分解能スペクトルー空間2次元画像化システムの開発

皮膚においてスペクトルー空間画像を得るためには μ mオーダーでスペクトルを空間分離することが必要である。このために非常に強力な磁場勾配コイルと専用キャビティを制作メーカーに依頼し、用いた結果、数百 μ mの解像度を持つ高分解能スペクトルー空間2次元画像化システムの構築に成功した。

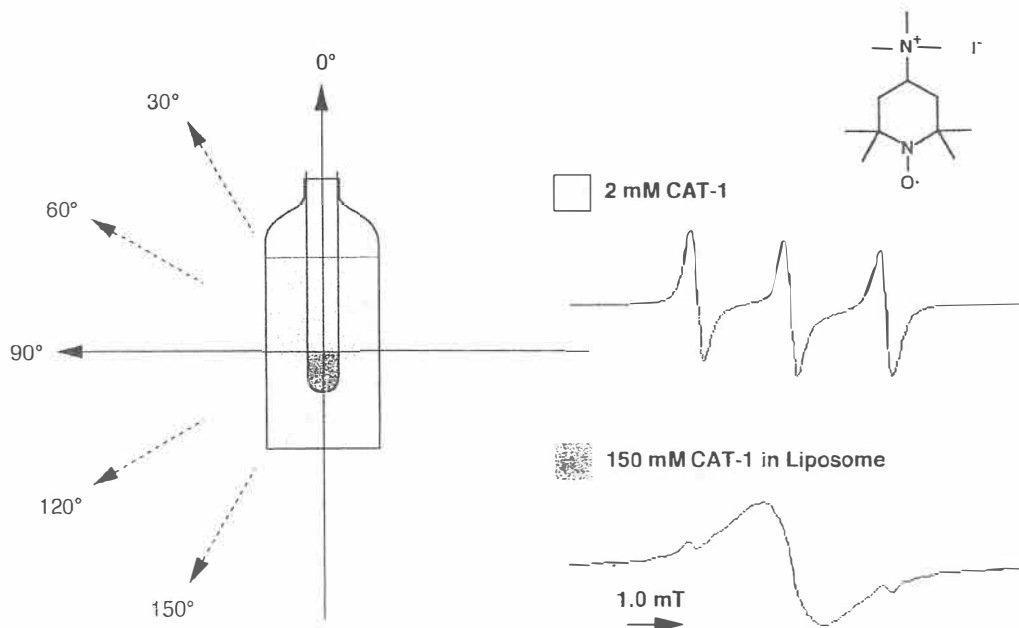


図1 リポソーム封入CAT-1と遊離CAT-1とからなるファントム
2mM CAT-1水溶液（シャープな3本線スペクトル）と150mM CAT-1 を封入したリポソーム（ブロードな1本線スペクトル）をそれぞれ内径1.6cmのバイアルびんと内径0.5cmの試験管に入れ、左図のファントムを作成した。図中に示す6方向はスペクトル-空間画像の空間軸の方向を示す。

3.1.2 異種スペクトルを与えるラジカルの2次元空間画像化システムの開発

異種スペクトルを与えるラジカルの分布が1次元空間に限定される場合にはスペクトル-空間2次元画像化法によりスペクトル分布が解析できる。しかし、分布が2次元へと広がった場合にはスペクトル情報をのせた2次元空間画像を得る必要がある。そこで、スペクトル-空間2次元画像から異種スペクトルの空間情報を抽出して、異なるスペクトルを与えるラジカル種の2次元空間画像を得る方法を開発した。図1に示すようにスピン標識化合物CAT-1を封入したリポソームと遊離のCAT-1とからなるファントムを作成し、図中に示す6方向を空間軸として6つのスペクトル-空間2次元画像を得た。得られた画像は、図2に示すように2種のスペクトルが分離されている部分と混在している部分が存在する。この画像から2種スペクトルの位置情報を得るために、まず空間軸上

の各位値でスペクトルの積分値を求め、全CAT-1の空間分布を得た。遊離CAT-1の空間分布は3本線のうちベースライン補正した低磁場側ピークの積分値より得、全CAT-1の空間分布からこの寄与を差し引いて、リポソーム封入CAT-1の空間分布とした。6方向のスペクトル-空間画像より得た2種スペクトルの空間情報をそれぞれ別々に再構成し、リポソーム封入CAT-1、遊離CAT-1の2次元空間画像を得ることができた(図3)。

3.2 リポソーム製剤の放出・吸収過程の解析

3.2.1 リポソーム製剤の *in vivo* 無侵襲解析

皮膚に塗布したリポソームを *in vivo* 無侵襲測定する前段階として、まず、リポソームの体内動態を *in vivo* で無侵襲解析できるか否かを検討した。

スピン標識化合物CAT-1を封入したリポソームをマウスに尾静脈内投与し、頭部から下腹部まで

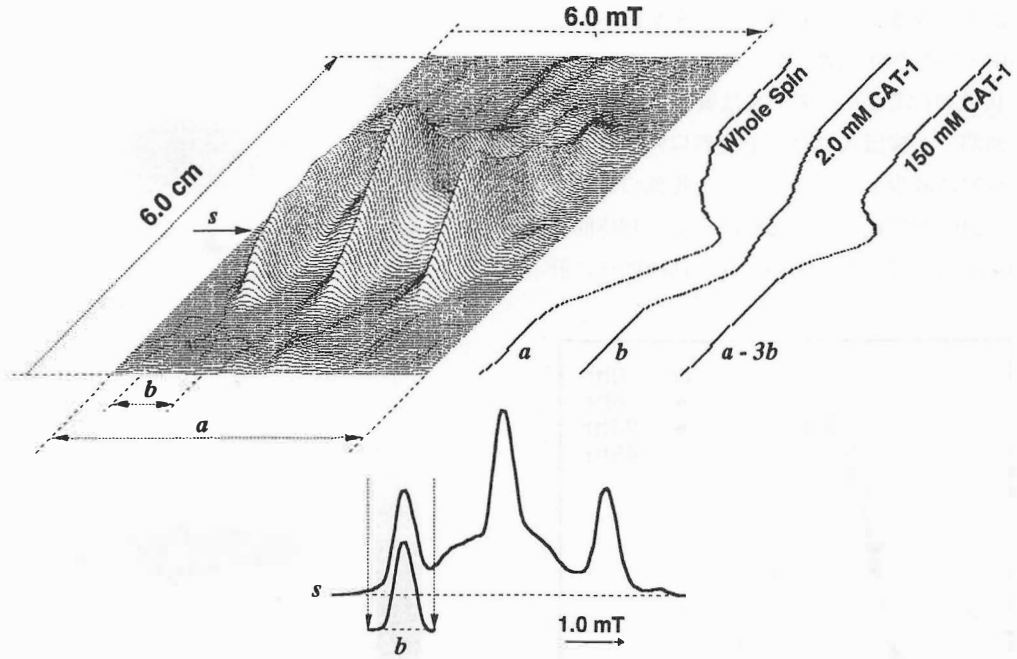
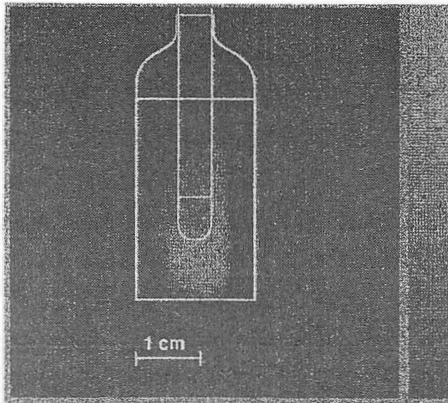


図2 リポソーム封入CAT-1と遊離CAT-1とからなるファントムより得たスペクトル-空間画像と2つのスペクトル成分の空間分布の抽出

図1の0°方向を空間軸としたスペクトル-空間画像(左上)の空間軸上の各ポイントでスペクトルの積分値を得、0°方向の全CAT-1の分布とした(右上a)。下に示すように、スペクトルの低磁場側のシャープなピークのベースライン補正をし、その積分値の空間分布を0°方向の2mM CAT-1の分布とした(右上b)。全CAT-1の分布から2mM CAT-1の分布の寄与を差し引いて150mM CAT-1の0°方向の分布とした(右上a-3b)。

Free Spin Probes



Liposomal Spin Probes

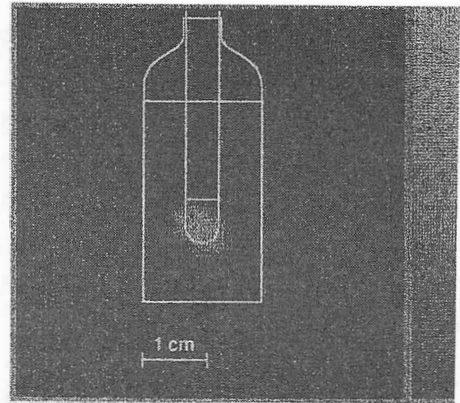


図3 リポソーム封入CAT-1と遊離CAT-1の分離2次元分布画像

図2に示す方法で6方向のスペクトル-空間画像からリポソーム封入と遊離のCAT-1の6方向の空間分布を得、それぞれ別々に2次元空間画像を再構成した。

の各部位におけるシグナル強度の分布をL-バンド ESRを用いて経時的に調べた。リボソームに封入された状態のCAT-1のシグナルは胸部、上腹部で高く、頭部でも検出された。上腹部以外のシグナルが経時的に減少したのに対し、上腹部のシグナル強度は24時間ではほとんど変わらず、48時間後でも70%が残っていた(図4)。投与6時間後に肝

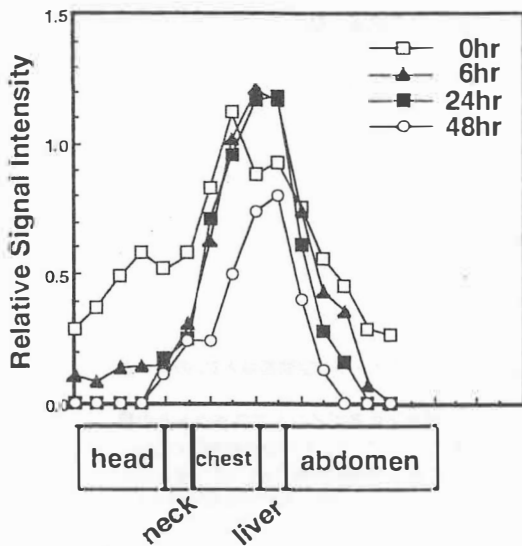


図4 L-バンドESRにより非侵襲的に測定したマウス静脈内投与リボソームの体内分布の経時変化 CAT-1封入リボソームをマウスに尾静脈内投与し、幅5mmの共振器を5mm間隔にずらしてリボソーム封入CAT-1のシグナル強度を経時的に求めた。

臓、肺、心臓、胃を摘出し、ESR測定したところ、シグナルは肝臓のみに検出され、このリボソームが肝臓に長期滞留することが示された。以上のように、L-バンドESRを用いることによりリボソームの体内動態を無侵襲で解析することに成功したが、皮膚に塗布したリボソームの *in vivo* 検出は塗布量が限られているため現在のところ成功していない。

3.2.2 剥離皮膚表面におけるリボソーム崩壊

皮膚塗布リボソームの *in vivo* 検出ができなかったため、剥離皮膚を用いてリボソーム崩壊を解析した。図5は、ヘアレスマウス皮膚切片表面

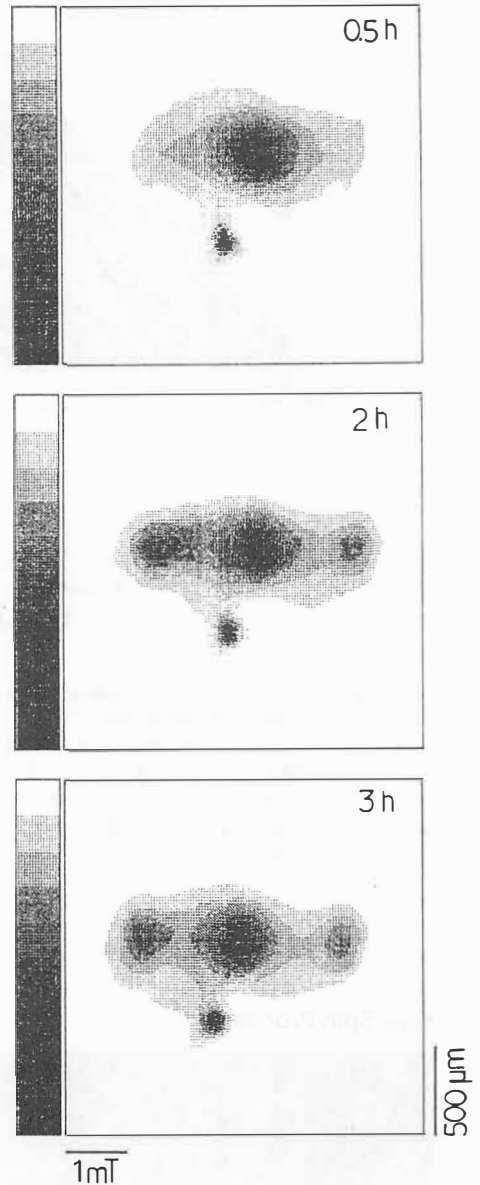


図5 皮膚表面におけるリボソーム崩壊の高分解能スペクトル-空間画像
ヘアレスマウスの剥離皮膚に綿糸に染み込ませたCAT-1封入リボソーム懸濁液を置き、皮膚の深さ方向を空間軸として高分解能スペクトル-空間画像を経時的に得た。リボソーム添加0.5時間後にブロードな1本線であったスペクトルが時間の経過と共にシャープな3本線へと変化した。中央下の小さなシグナルは皮膚切片の皮下組織側に皮着させた標準物質(DPPH)のものである。

に綿糸に染み込ませたCAT-1封入リボソームを密着させ、そのシグナルの変化を高分解能スペクトル-空間2次元画像化システムにより経時的に調べた結果である。CAT-1のシグナル下側の小さなシグナルは皮膚の皮下組織側に付着させたDPPHのものである。リボソーム添加直後にCAT-1のシグナルはブロードな単一ピークとして検出されたが、時間が経過するに従いシャープな3本線ピークへと変化していく様子が確認された。これは、CAT-1を封入したリボソームが皮膚表面で崩壊していくことを意味する。しかし、CAT-1が皮膚へ浸透していく様子を示す空間軸に沿ったDPPH方向への広がりには残念ながら確認できなかった。

3.3 皮膚生成ラジカルと抗酸化剤

3.3.1 皮膚におけるアンスラリンラジカルの生成

アンスラリンは抗尋常性幹せん治療薬として古くから用いられているが、一方、光増感作用があり炎症や発癌等を引き起こすことも知られている。皮膚にアンスラリンを塗布したヘアレスマウスを紫外線照射し、その皮膚切片をX-バンドESRで測定するとg値が2.003の単一ピークのシグナルが検出された。このシグナルは、Packerら⁶⁾により報告されているアンスラリンラジカルのものと一致した。アンスラリンラジカルのシグナル強度は紫外線照射時間の延長に伴い増加した(図6)。また、シグナル強度はUV-A照射時に比べUV-C照射時の方が大きかった(図6)。

図7は、高分解能スペクトル-空間2次元画像化システムを用いて、アンスラリンラジカルの皮膚における生成位置解析を行った結果である。ヘアレスマウスにアンスラリンを塗布したのち紫外線照射し、剥離した皮膚切片をテフロン支持体に付着させて皮膚の深さ方向のスペクトル-空間画像を得た。表皮を支持体側にして皮膚切片を付着させるとアンスラリンラジカルのピークは支持体側に接近した。このことより、アンスラリンラジカルが皮膚の表面付近で発生していることが確認さ

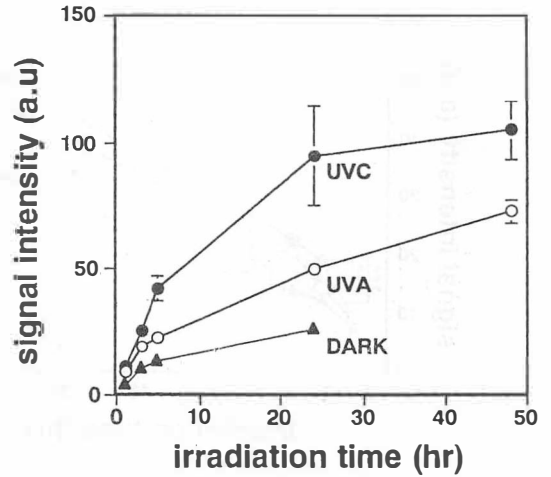


図6 皮膚におけるアンスラリンラジカル生成に及ぼす紫外線照射の影響
アンスラリンのアセトン溶液を塗布したヘアレスマウスをUV-A照射下(○)、UV-C照射下(●)あるいは暗所(▲)で飼育し、経時的に剥離皮膚をESR測定した。

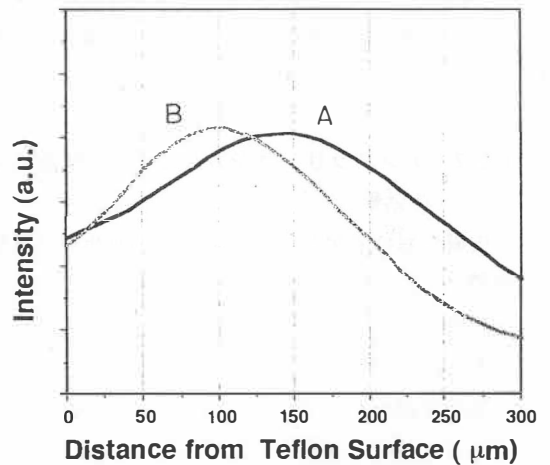


図7 スペクトル-空間画像より得たアンスラリンラジカルの皮膚内分布
アンスラリンを塗布し紫外線照射したヘアレスマウスの剥離皮膚を皮下組織側(A)あるいは表皮側(B)をテフロン支持体に付着させ、皮膚の深さ方向を空間軸としてスペクトル-空間画像を得、アンスラリンラジカルのシグナルの積分値よりその空間分布を得た。

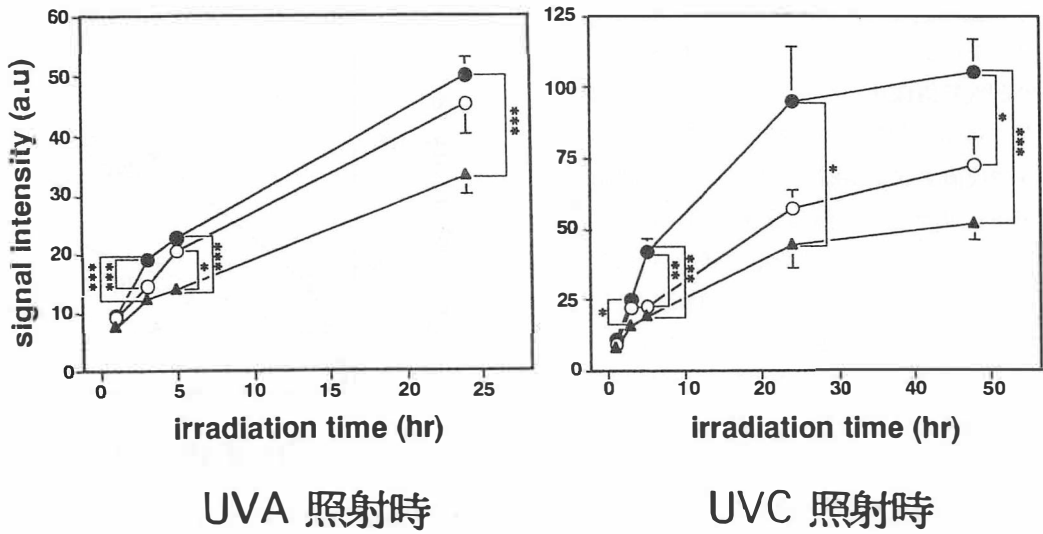


図8 アンスラリンラジカル生成に及ぼすアスコルビン酸静脈内投与の影響
 アンスラリン塗布マウスに紫外線照射5分前に0mmol/kg (●)、0.2mmol/kg (○)あるいは2mmol/kg (▲)のアスコルビン酸を尾静脈内投与し、紫外線照射して、経時的に剥離皮膚をESR測定した。
 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005

れた。本システムでは数百 μm の解像度を得ることができたが、シグナルの線幅の寄与を取り除くことができなためこれ以上の詳細な解析は困難であった。

3.3.2 アンスラリンラジカルに及ぼす抗酸化剤の効果

皮膚におけるアンスラリンラジカル生成に抗酸化剤が*in vivo*で如何に働くかを調べる目的で、マウスにアンスラリンを塗布する前に種々の抗酸化剤を投与し、アンスラリンラジカル生成に及ぼす効果を調べた。アンスラリン塗布5分前にアスコルビン酸を静脈内投与しておくこと、投与量依存的にアンスラリンラジカル生成が抑制された(図8)。この抑制効果は照射した紫外線の種類によらず見られた。同様な抑制効果はグルタチオン(0.2mmol/kg体重)の静脈内投与でも見られた。皮膚におけるラジカル生成に及ぼす抗酸化剤の効果を*in vivo*で評価できたのはこれが初めてである。

抗酸化剤としてビタミンEの水溶性アナログで

あるTroloxを用い同様に実験を行った結果を図9に示す。アスコルビン酸やグルタチオンが短時間照射(5時間以内)において長時間(24時間)と同様に有効にラジカル生成を抑えていたのに対し、Troloxでは短時間照射ではあまり効果が現れず、長時間でアンスラリンラジカルの生成を抑制した。

アンスラリンは光酸化あるいは自動酸化で9-anthron-10-ylラジカルやアンスラリンダイマーとなりこれがアンスラリン・ブラウンラジカルへと変化するとされているが^{7,8)}、皮膚でのアンスラリンラジカルの生成過程は不明の部分が多い。今回生体に投与した抗酸化剤でラジカル生成が抑えられたことより、アンスラリンラジカル生成過程にこれら抗酸化剤により消去される活性種が係わっていることが示唆される。Troloxは、脂質のラウリル硫酸ナトリウムミセル中でペロキシラジカルを効果的に消去することが報告されている⁹⁾。一方、アスコルビン酸やグルタチオンは種々の水溶性酸化物を還元するほか活性酸素種を直接消去したり、グルタチオン-アスコルビン酸-

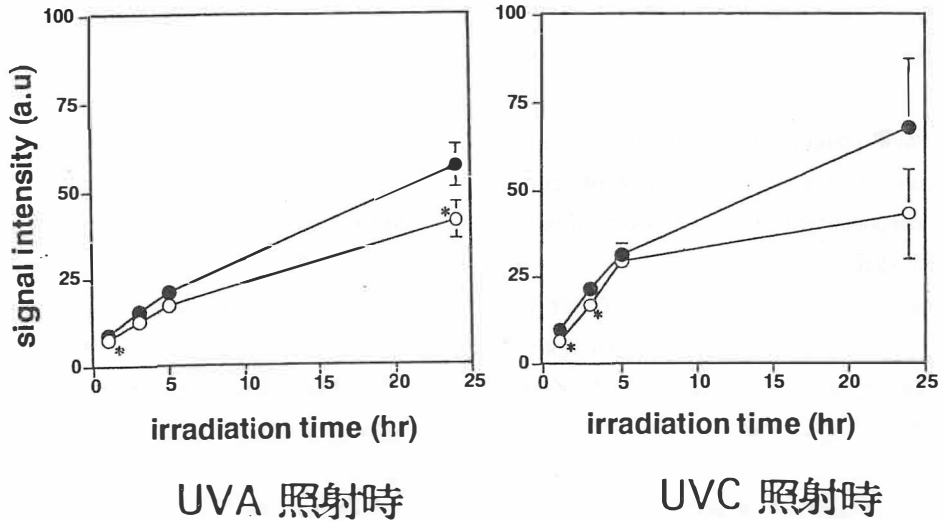


図9 アンスラリンラジカル生成に及ぼすTrolox静脈内投与の影響
 アンスラリン塗布マウスに紫外線照射5分前に0mmol/kg (●)あるいは0.2mmol/kg (○)のTroloxを尾静脈内投与し、紫外線照射して、経時的に剥離皮膚をESR測定した。 *p<0.05

ビタミンEドックス鎖を通して油相のペロキシラジカルの消去に係わっていることが知られている。Troloxの効果を発揮するまでの時間がアスコルビン酸やグルタチオンと異なった理由として、これら抗酸化剤により消去される活性種の違い、これら抗酸化剤がアンスラリンラジカル生成部位へ到達するまでの時間の違い、といったことが考えられる。これらのどちらによるかは、生体に投与した抗酸化剤のアンスラリンラジカル生成抑制機構と共に今後の課題である。

4 総括

ESRをリボソーム製剤の皮膚吸収過程並びに皮膚生成ラジカルの解析に応用するにあたり、数百μmの空間分解能を持つスペクトル空間画像化システムの開発に成功した。また、スペクトル情報に基づく2次元空間画像化法の開発にも成功した。高分解能スペクトル空間画像化システムを用いて皮膚切片表面におけるリボソームの崩壊を解析することができた。リボソーム製剤の挙動をLバンドESRにより*in vivo*で解析することを試

みたところ、静脈内投与したりボソームの挙動の解析には成功したが、皮膚に塗布したりボソームの検出は感度の制約からできなかった。皮膚表面における*in vivo*測定は、今後のLバンドESRの感度の向上あるいは共振器の改良に委ねなければならない。

皮膚で紫外線照射により生成したアンスラリンラジカルの生成部位をスペクトル空間画像化システムにより調べることができた。このラジカルの生成における抗酸化剤の効果を*in vivo*で検討した結果、抗酸化剤の種類により効果が現れるまでの時間が異なることが分かった。この抗酸化剤のラジカル生成抑制機構については今後の研究課題としたい。

引用文献

- 1) Maltempo MM, :Differentiation of spectral and spatial components in EPR imaging using 2-D image reconstruction algorithms, *J. Magn. Reson.* 69 156-161 1986
- 2) Maltempo MM, Eaton SS, Eaton GR, :Spectral-spatial two dimensional EPR imaging,

J. Magn. Reson. 72 449-455 1987

- 3) Maltempo MM, Eaton SS, Eaton GR, :Reconstruction of spectralspatial two dimensional EPR images from incomplete sets of projections without prior knowledge of the component spectra, *J. Magn. Reson.* 77 75-83 1988
- 4) Herrling T, Klimes N, Karthe W, Ewert U, Ebert B, :EPR zeugmatography with modulated magnetic field gradient, *J. Magn. Reson.* 49 203-211 1982
- 5) Fuchs J, Groth N, Herrling T, Milbradt R, Zimmer G, Packer L, : Electron paramagnetic resonance (ESR) imaging in skin. Biophysical and biochemical microscopy, *J. Invest. Dermatol.*, 98 713-719 1992
- 6) Fuchs J, Packer L, : Investigations of anthralin free radicals in model systems and skin of hairless mice, *J. Invest.*

Dermatol., 92 677-682 1989

- 7) Se E Malo T, Dubertret L, Prognon P, Gond A, Mahuzier G, Santus R, : Physicochemical properties and stability of anthralin in model systems and human skin, *J. Invest. Dermatol.*, 80 1-6 1983
- 8) Reichert U, Jacques Y, Grangeret M, Schmidt R, : Antirespiratory and antiproliferative activity of anthralin in cultured human keratinocyte, *J. Invest. Dermatol.*, 84 130-134 1985
- 9) Castle L, Perkins MJ, : Inhibition kinetics of chain-breaking phenolic antioxidants in SDS micelles. Evidence that intermicellar diffusion rates may be ratelimiting for hydrophobic inhibitors such as α -tocopherol, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 6381-6382 1986