

膜透過性ナノ集合体を封入した固体エマルションの開発

山口大学大学院理工学研究科

通 阪 栄 一

A transdermal administration on drugs has been limited due to very low permeability of drugs across skin. Especially, it is generally regarded that hydrophilic macromolecules such as proteins, peptides, and vaccines cannot penetrate across skin. In this study, a solid emulsion containing membrane permeability nanoassembly was developed for the transdermal delivery of the protein drugs. The nanoassembly was formed by the complex of surfactant and protein. The usage of a solid fat and gel-vegetable oil as oil phase of the emulsions was examined. Moreover, the surface of oil droplets was coated by the layer-by-layer method with polymer electrolyte. These methods made the stability of the emulsion enhance. In addition, the membrane permeability of protein was evaluated using the artificial epidermal membrane. In this study, the acceleration of protein transport was largely induced by the compatibility of the nanoassembly with the hydrophobic epidermal membrane. It is thus possible that the emulsion containing the nanoassembly resulted in the acceleration of protein transport across the epidermal membrane.

1. 緒 言

近年、動物細胞や微生物を利用して、ペプチドやタンパク質などのバイオ医薬品の製造が活発に行われている。これらバイオ医薬品は、低分子医薬品に比べ効果が大きく副作用も少ないため、期待は非常に大きい。これらの分子の大部分は確実に体内へ導入できる注射により投与されているが、患者の苦痛を回避し、患者自身が簡便に投与できる、塗る製剤の開発が望まれている。

塗るタンパク質製剤において最大の障壁は、表皮最外層の角質層のバリアーである。角質層は死細胞からなる疎水性の高い多層膜であり、外部物質の皮膚浸透において高いバリアー機能を示す。特に、親水性高分子であるタンパク質は、この疎水性膜の通過が困難である。これまでに、親水性高分子のタンパク質の吸収性改善を目指して物理的な方法や化学的手法が検討されている。

例えば、物理的な方法として、マイクロニードルにより角質層だけに小孔を開ける手法や、エレクトロポレーションで脂質に揺らぎを与える、あるいはソノフォレシスでキャビテーションを与えることで一過性の小孔を形成させる手法がある¹⁻³⁾。

また、化学的な方法としては、角質層に存在する脂質に作用し薬物の浸透性を向上させる低分子化合物が利用される⁴⁾。また、エマルションやリポソームは脂質から形成さ

れるため、角質層の脂質に浸透しやすい微粒子であり、キャリアとしての利用も検討されている^{5,6)}。

このように、タンパク質の経皮投与が試みられているが、体内取り込み量は、注射で投与した場合と比べて極端に低く、また安全性の面で使用が制限されるものもあり、十分な成果は得られていない。

我々は、これまでに膜透過性に優れた脂質集合体を開発した⁷⁻⁸⁾。この膜透過性ナノ集合体は、界面活性剤でタンパク質をコーティングすることで形成され、表面を脂溶性に改質することで、細胞膜との親和性が高くなり、タンパク質の細胞への導入を促進することが確認されている。この膜透過性ナノ集合体は、調製が簡便、薬物封入率が高い、安定性が高い、タンパク質の大きさ・化学的特性に関係なく封入でき、内封後の活性維持も可能といったタンパク質キャリアに適した特徴を持っており、化粧品への利用価値も高い技術である。そこで本研究では、このナノ集合体を油に分散させ乳化したSolid-in-Oil-in-Water (S/O/W) エマルションをタンパク質のキャリアとして応用し、皮膚透過性に優れた製剤の開発を目指している。

塗るタンパク質製剤の開発のために、まず不安定なコロイド粒子であるエマルションを安定化し長期保存可能な皮膚透過性の高いS/O/Wエマルションの調製が不可欠である。本報告では、S/O/Wエマルションの安定化のため固体エマルションの調製法について検討した結果を報告する。また、S/O/Wエマルションの皮膚透過性を確認する前段階として、人工膜をモデルとし、S/Oサスペンションを用いたときの膜透過性についても検討を行った。

2. 実 験

2. 1. S/O/Wエマルションの調製

ウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液 (10 mL) とショ糖エル



Development of solid emulsions containing membrane permeability nanoassembly

Eiichi Toorisaka

Graduate school of science & engineering,
Yamaguchi University

カ酸エステル (ER-290) 含有ヘキサン溶液 (20 mL) をホモジナイザー (ULTRA-TURRAX T25: IKA Labortechnik) (24000 rpm, 2 min) で高速攪拌後、一晚凍結乾燥し (FREEZE DRYER FD-1000: EYELA), 界面活性剤-薬物集合体を得た。その後、複合体を大豆油 (10 mL) と混合し、超音波発振機を用いて分散させることで、S/O サスペンションを調製した。

調製したS/Oサスペンション (5 mL) と1 wt% 水溶性界面活性剤 (コール酸ナトリウムとTween20) 含有水溶液 (10 mL) をホモジナイザー (ULTRA-TURRAX T25: IKA Labortechnik) (13500 rpm, 1 min) で高速攪拌し、S/O/W エマルションを調製した。その後、親水性シラス多孔質ガラス膜 (SPG) を用いて膜乳化を行うことで、エマルションの油滴粒子径の制御を試みた。

2. 2. 油相の固体化

2. 1. の大豆油の代わりにカカオ脂を用いて同様に調製したS/O/W エマルションを調製した。また、2. 1. と同様にS/Oサスペンションを調製した後、1 wt% 植物 (唐ゴマ) 抽出の天然油脂系脂肪酸を油滴のゲル化剤としてS/Oサスペンションに添加し、同様の方法で乳化したS/O/W エマルションを調製した。

2. 3. 交互積層法による高分子コーティングエマルションの調製

スターラーで攪拌した高分子溶液 (10 mL) に、S/O/W エマルション溶液 (5 mL) を滴下 (1 mL/min) した。滴下後、そのまま10分間攪拌した。高分子溶液としては、カチオン性であるキトサン溶液とアニオン性であるアルギン酸ナトリウム溶液を交互に用いてコーティングを行った (図1)。

2. 4. エマルション特性評価

2. 4. 1. 安定性評価

調製したS/O/W エマルション及び粘膜附着性微粒子を4℃で静置し、エマルション内へのタンパク質の封入量の経時変化を評価した。封入量は、外水相に漏洩したタ

ンパク質の濃度を、吸光光度計 (280 nm), あるいはDC Protein Assayにより測定した。

2. 4. 2. 粒子特性評価

レーザー回折/散乱式粒度分布測定装置 (LA-920: HORIBA) を用いての粒度分布測定及び光学顕微鏡を用いての観察を行った。

また、エマルション表面電荷の測定のため、ゼータ電位測定を行った。

2. 5. 膜透過性評価

2. 5. 1. 評価用パッチの調製

5 wt% エチルセルロースのアセトン溶液を調製し、円形 (外枠: 厚さ1.0 mm, 直径6.0 mm, 内枠: 厚さ1.0 mm, 直径4.8 mm) の型に0.04 mL滴下し、室温下で乾燥させた。次に、3 wt% ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を、エチルセルロース層上に0.1 mL滴下し、一昼夜凍結乾燥させHPC多孔質層をもつパッチを調製した。その後、HPC層にS/Oサスペンション0.02 mLを含浸させ、パッチ製剤を調製した。S/OサスペンションにはFITC修飾インスリン (FITC-Ins) を封入した。脂溶性集合体中の界面活性剤としては、ショ糖エルカ酸エステル (ER-290), ショ糖オレイン酸エステル (O-170), ショ糖ラウリン酸エステル (L-195), ポリグリセリンエルカ酸エステル (ER-60D), ポリグリセリンオレイン酸エステル (O-50D) を使用した。

2. 5. 2. 人工角質層膜を用いた膜透過性評価

水平拡散セルを用いて膜透過実験を行った。膜透過性の評価には、人工膜 (疎水性メンブレンフィルターに10 wt% レシチンと0.5 wt% コレステロールを含むドデカン溶液を含浸させたもの) を用いた。パッチ製剤を人工膜に貼り付け、セル中にリン酸緩衝液を入れ、膜透過実験を行った。このとき、恒温槽 (EYELA BATH SB-9, EYELA) を用いてセルの温度を37℃に保った。時間毎に溶液を採取し、FITC-Insを蛍光分光光度計 (VersaFluor™ Fluometer, BIO-RAD) (励起波長490 nm, 蛍光波長520 nm) で測定した。

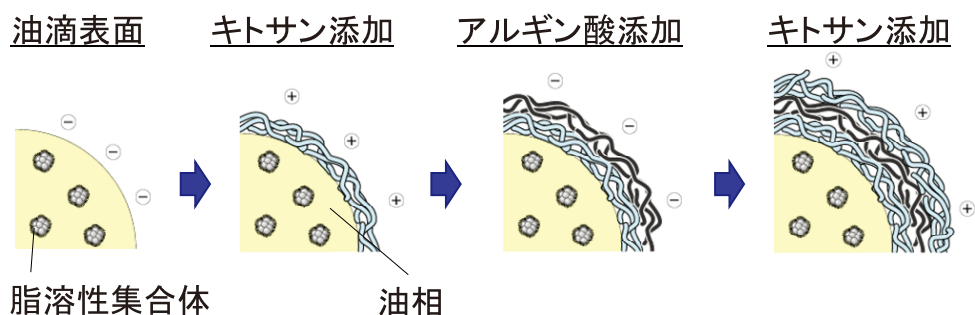


図1 交互積層法概念図

3. 結果と考察

3.1. エマルションの粒子径制御

一般に、エマルションの粒子径が細かく均一であるほど、エマルションは安定化する。また、粒子径を小さく揃えることで、皮膚との接触面積の向上により、より迅速で効率的なタンパク質の吸収が望め、また、使用感の向上にも繋がると考えられる。

そこで、膜乳化による粒子径の制御を試みた。図2に、調製したS/O/Wエマルションの粒度分布及び光学顕微鏡写真を示す。ホモジナイザー攪拌後、膜乳化を行うことで膜の細孔径に沿った粒子径にエマルションを制御できることが確認された。

3.2. 油相の固体化

安定な固体エマルションを得るため、油相の固化を試み

た。油相を固めることにより、内部に封入した膜透過性ナノ集合体の移動が阻害され、安定性が向上すると考えた。

固化する方法として、固体脂であるカカオ脂を利用する方法と、天然油脂系脂肪酸をゲル化剤として油滴をゲル化する方法を試みた。

安定性の結果を図3に示す。カカオ脂を用いたときも、ゲル化剤を用いたときも、封入率に減少が見られた。特にカカオ脂で、初期の漏洩が多い傾向がみられた。カカオ脂を用いた場合、粒子の調製中に固化と融解を繰り返すことにより膜透過性ナノ集合体が不安定化したため、より多くのタンパク質が漏洩したと考えられる。

3.3. 高分子コーティングエマルション

油滴の固化では十分な安定性が得られなかったことから、油滴表面を高分子コーティングすることで固体化することを試みた。

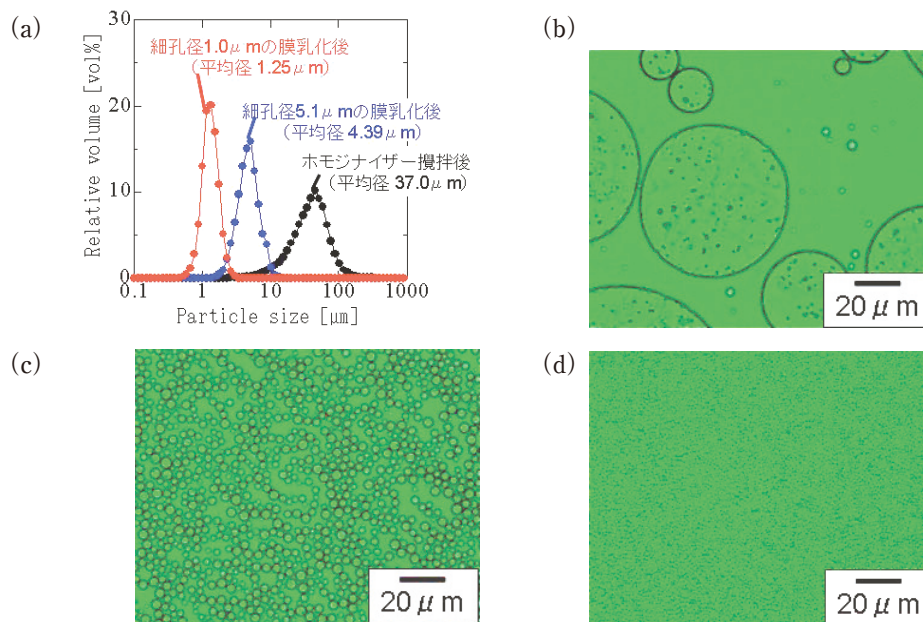


図2 S/O/W エマルションの粒度分布及び光学顕微鏡写真
(a) 粒子径分布 (b) ホモジナイザー攪拌後
(c) 膜乳化後(細孔径 5.1 μm) (d) 膜乳化後(細孔径 1.0 μm)

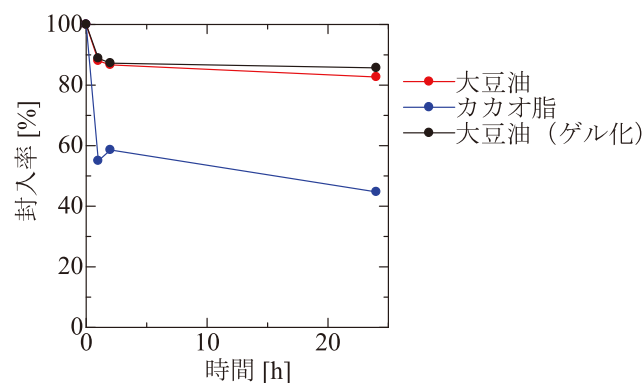


図3 油種によるBSA封入率の経時的変化

アニオン性界面活性剤でS/O/Wエマルジョンを調製し、そのエマルジョンをカチオン性高分子の溶液に加えることで、油滴表面を高分子コーティングすることを試みた。さらに、エマルジョン表面に対してカウンターイオンとなるイオン性高分子溶液を、交互に用いることで多層コーティングを試みた。

3.3.1. 水溶性界面活性剤の影響

交互積層法では、粒子表面と高分子間の静電的相互作用によって、粒子に高分子コーティングを行う。そのため、表面電荷の制御が良好な粒子調製に重要である。そこで、はじめにノニオン性界面活性剤であるTween20 とアニオン性界面活性剤であるコール酸ナトリウムを用い、その割合を変化させた場合の粒子特性への影響を検討した(図4,5)。

Tween20 のみを用いたエマルジョンの場合、電解質高分子溶液中での粒子径に、ほとんど変化は見られなかった。また、コール酸ナトリウムの割合が0.1 の時も、粒子径の変化は少なかった。しかし、コール酸ナトリウムの割合が

0.25 より大きくなると電解質高分子溶液中が大きく増加した。

ノニオン性のTween20 のみのエマルジョンは、電解質高分子との相互作用がないため、電解質高分子溶液中でも粒子径に変化がなかったと考えられる。一方でアニオン性のコール酸ナトリウムの割合が大きい場合、カチオン性のキトサンと相互作用も大きくなると考えられる。その結果、エマルジョン同士の凝集がおき、最終的にエマルジョンの融合が生じ粒子径が大きく増加したと考えられる。

結果として、エマルジョン表面の電荷が大きすぎると安定な粒子を調製できず、水溶性界面活性剤として0.1wt% コール酸ナトリウムと0.9wt% Tween20 の条件でエマルジョン調製を行うと、エマルジョンの安定性が維持できることが確認された。

続いて、この条件で実際に、電解質高分子がコーティングされているか調べるため、エマルジョンのゼータ電位を測定した(図6)。カチオン性のキトサンとアニオン性のア

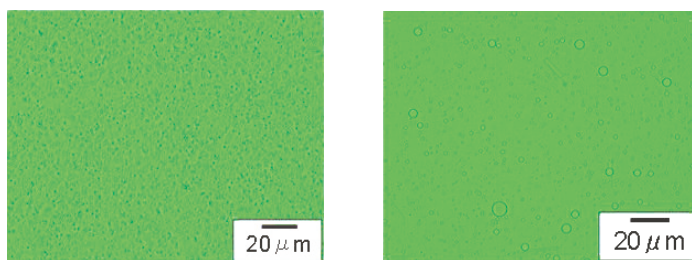


図4 キトサンコーティングエマルジョンの光学顕微鏡写真
(a) 条件②(コール酸割合 0.1) (b) 条件③(コール酸割合 0.25)

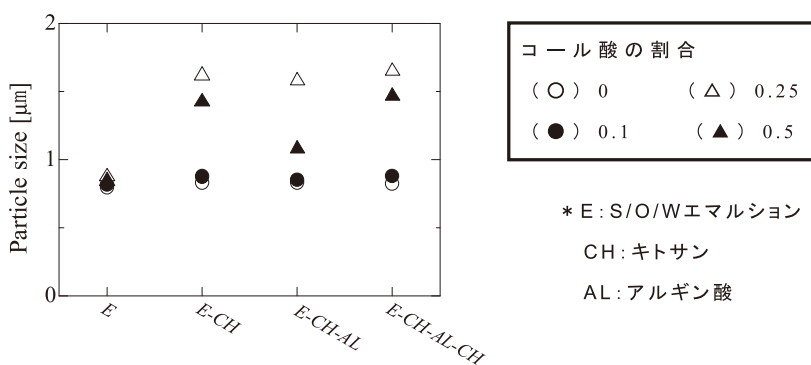


図5 高分子コーティング後の粒子径変化

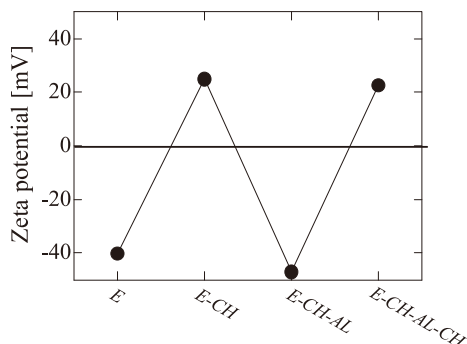


図6 高分子コーティングエマルジョンのゼータ電位変化

ルギン酸ナトリウムの水溶液にエマルションを交互に浸すことにより、ゼータ電位が大きく変化していることから、エマルション表面にそれぞれの高分子がコーティングされていることがわかる。これらの結果から、この条件で調製した粒子を以下の検討で用いた。

3.3.2. 安定性評価

高分子コーティングにより、タンパク質の漏洩を防ぐことができるかを検討した(図7)。コーティングしていないエマルションでは、24時間後にはBSAの封入率は80%以下にまで減少した。一方、高分子をコーティングしたエマルションでは、タンパク質の漏洩は減少した。また、多層コーティングしたエマルションでは、より漏洩を防ぐことが可能であり、キトサン-アルギン酸-キトサンと3重にコーティングした場合は、24時間後でも95%以上の安定性を示した。

3.4. 膜透過性評価

本研究ではタンパク質を界面活性剤でコーティングした膜透過性集合体により疎水性バリアとなっている皮膚表面

角質層の透過性を向上させることを目指している。ここでは、集合体の効果を確認するためにエマルション中の油相(S/Oサスペンション)を用いた疎水膜透過性評価を行った。

角質層のモデルとして、疎水性メンブレンフィルターに10 wt%レシチンと0.5 wt%コレステロールを含むドデカン溶液を含浸させた人工膜を用い、S/Oサスペンションの膜透過性を評価した。脂質集合体による膜透過性改善効果の確認と、その組成の最適化を行った。

はじめに脂質集合体の効果を確認した(図8)。インスリン水溶液、およびインスリンを油に分散させたものでは、ほぼ透過しなかった。一方でS/Oサスペンションでは、膜透過が確認された。脂質集合体が人工膜へ分配することで膜透過したものと考えられる。疎水性の細胞膜のモデルとして用いた人工膜においてタンパク質の透過が確認できたことから、外部物質の皮膚浸透において高いバリア機能を示す角質層も脂質集合体を用いることで効果的に透過できる可能性は高いと考えられる。

続いて、界面活性剤の種類の影響について検討を行った。結果を図9に示す。ER-290が最も透過性が低く、ER-60DやO-50Dのようなポリグリセステルを用いた脂質集合体

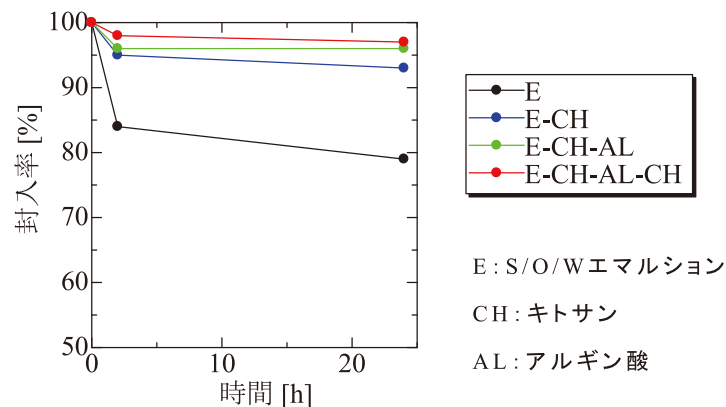


図7 高分子コーティングエマルションのBSA封入率の経時的変化

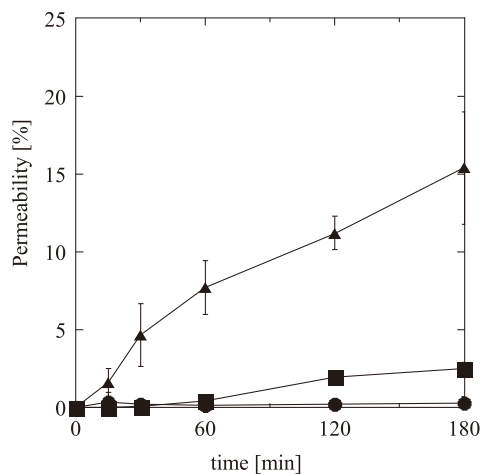


図8 インスリンの膜透過挙動

(●) インスリン水溶液, (■) インスリンを分散させた大豆油, (▲) S/O サスペンション

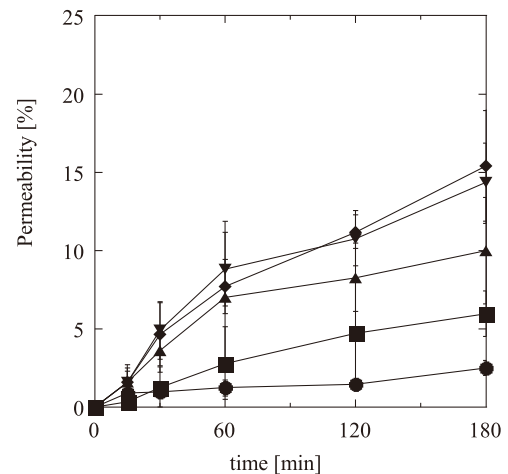


図9 界面活性剤の影響

(●) ER-290, (■) O-170, (▲) L-195, (◆) ER-60D, (▼) O-50D

において透過性が向上することが分かった。また、界面活性剤のアルキル鎖を比較すると、アルキル鎖の短い界面活性剤を用いたパッチの場合に透過性が向上することが確認された。したがって、膜透過性を改善する界面活性剤としては、ポリグリエステルでなおかつアルキル鎖長の短いものが適していると考えられる。

続いて、膜透過挙動への界面活性剤濃度の影響を検討した。図10に各界面活性剤濃度での180分後の透過率を示す。界面活性剤濃度1 wt%で調製したS/Oサスペンションの場合に著しく膜透過率が低いことが確認された。これは、タンパク質の周囲を界面活性剤が十分にコーティングすることが出来なかったためだと考えられる。また、界面活性剤濃度が5 wt%以上になると、膜透過率が低下した。これは、界面活性剤濃度が高くなるにつれて粘性も高くなり、複合体の拡散の妨げになるためだと考えられる。

以上から、S/Oサスペンションを用い効率的にタンパク質を皮膚透過させるためには、適した界面活性剤の選択と、安定な脂質集合体の調製が重要であると考えられた。また、透過速度には脂質集合体の拡散が大きく寄与していると考えられた。S/O/W エマルションは、パッチより微粒子化することにより表面積が拡大し、より速やかな拡散が起これると考えられることから、皮膚透過に有利な剤型であると予測される。

4. 総括

本研究では、固体化S/O/W エマルションの調製法について検討を行った。エマルションの固体化により、安定性の向上を予測したが、油滴の固化という方法では、十分な安定性が得られず、カカオ脂を用いた場合は、固体化した場合の方が、安定性が減少するという結果が得られた。調製時のカカオ脂の状態変化が、膜透過性ナノ集合体の不安定要因になったのではないかと推察される。

エマルション表面を高分子コーティングする方法では、エマルション表面の電荷の制御が、安定した粒子調製のために重要であることが確認された。また、多層コーティングしたエマルションにおいて、安定性の向上も確認された。

また、人工膜を用いたS/Oサスペンションの膜透過性について検討した。その結果、脂質集合体にすることでタンパク質を効果的に膜透過させることができることが確認された。またタンパク質にコーティングする界面活性剤の種類により透過に大きな違いがあること、油相中での集合体拡散速度が透過速度に大きく影響することが確認された。

今後は、さらにエマルションのコーティング基材の検討を行い、安定性に優れ、ハンドリングの良い粒子の開発を目指して検討を続ける予定である。タンパク質の低侵襲投与法としての経皮デリバリー技術の確立を実現したいと考える。

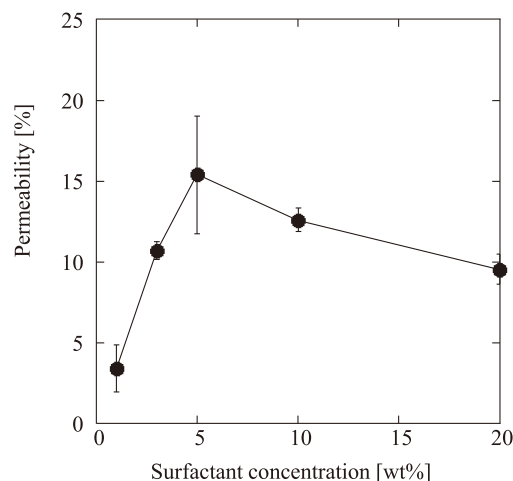


図10 界面活性剤濃度における透過率の変化(180min経過後)

(引用文献)

- 1) Tokumoto S, Higo N, Sugibayashi K, : Effect of electroporation and pH on the iontophoretic transdermal delivery of human insulin.
- 2) Wu X-M, Todo H, Sugibayashi K, : Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis, J. Control. Release, 118, 189-195, 2007.
- 3) Paliwal S, Mitragotri S, : Ultrasound-induced cavitation: Applications in drug and gene delivery, Expert Opin. Drug Deliv., 3, 713-726, 2006
- 4) Williams A, Barry B, : Penetration enhancers, Adv. Drug Deliv. Rev., 64, 128-137, 2012.
- 5) Kajimoto K, Yamamoto M, et al. : Noninvasive and persistent trans follicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis, Int. j. Pharm., 403, 57-65, 2011.
- 6) Korr F, Lademann J, et al. : Follicular transport route- Research progress and future perspectives, Eur. J. Pharm. Biopharm., 71, 173-180, 2009.
- 7) Toorisaka E, Ono H, et al. : Hypoglycemic effect of surfactant-coated insulin solubilized in a novel solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion, Int. J. Pharma., 252, 271-274, 2003.
- 8) Toorisaka E, Watanabe K, et al., : Intestinal patches with an immobilized solid-in-oil formulation for oral protein delivery, Acta Biomater., 8, 653-658, 2012.