

# 積層型ナノカプセルを用いたコスメティックデリバリーシステムの開発

慶應義塾大学理工学部

福井 有香

In this research, we carried out internal and surface modifications of liposomes to prepare nanosized capsules with various functional properties including improved incorporation of active agents and controlled release of cargo in response to external stimuli. For internal modification of liposomes, anionic polymers were generated within liposomes by living radical polymerization. The obtained nanocapsules showed good absorption and retention of chemical substances depending on the binding ability to the incorporated polymers, and the absorption capacity could be controlled by the length and dissolved state of the polymer chains. In addition, surface modification of liposomes was carried out by the layer-by-layer deposition of enzymes and polysaccharides to prepare capsule walls with enzymatic degradability. First, lysozyme (Lyso) and phosphorylated chitosan ( $P_{CHI}$ ), which is cleavable by Lyso, were deposited over the liposome. Then, hyaluronic acid (HA) was deposited as an outermost layer. The degradation of the inner layer consisting of  $P_{CHI}$  allowed the release of the outermost layer consisting of HA. Also, degradation of the  $P_{CHI}$  layer led to the exposure of the lipid membrane, which facilitated the release of cargo from the inner cavity of the liposome. We expect that polymer-deposited nanocapsules would open up application potential as a carrier for delivery of active agents to the targeted skin region.

## 1. 緒言

ナノサイズのカプセルは、組織への浸透性に加えて、カプセル層と内部のキャビティへの物質の保持能を有しており、細胞、組織、皮膚、頭皮、毛髪などをターゲットとしたキャリア素材として注目されている。中でも、リン脂質分子からなる閉鎖小胞(リポソーム)は、生体安全性に優れ、中空部(水相)には水溶性の物質と脂質膜部には脂溶性の物質を同時に封入可能で、医薬品、化粧品および食品用のカプセル素材として応用研究が行われている。これまでに申請者らは、リポソーム表面に天然物質(ポリマーおよびミネラル)を積層(layer-by-layer, LbL)することで、全てバイオ由来素材からなるカプセル素材(リポナノカプセル)の開発を行ってきた<sup>1,2)</sup>。この方法は、ポリマーの種類や吸着の量・形態・分布の調節から、吸着層の厚み、組成など、ナノスケールにおける積層構造の精密なデザインが可能であり、膜安定性、分散安定性、物質保持能、標的指向性などの機能を組み込むこと(機能プログラミング)も可能である。また、この積層構造に着目した機能設計として、カプセル層の分解・剥離による担持物質の放出、表面性状の変化、および内包物の放出について検討を始めている。実際に、カプセル層にバイオポリマーとその分解酵素を組み合わせることで、酵素によるバイオポリマーの分解と剥離に

よって、カプセルの表面状態を段階的に変化できることを報告している<sup>3)</sup>。この研究から、カプセル層の環境に応答した再構築によって、物質放出の促進や目的部位に対するアフィニティの表面提示といった新しい機能発現の可能性が示された。

本研究では、リポソームとポリマーの複合ナノカプセル(リポナノカプセル)の化粧品用キャリア素材への応用展開に向けて、リポナノカプセルの①表面と②内部の改質による機能開拓に挑戦した。図1に示すように、まず、①リポソーム表面にバイオポリマーとその分解酵素を積層化することで、皮膚近傍の環境に応答して、積層膜の分解・剥離を起こすことによって、リポソーム内部とカプセル層からの有効成分の放出について検討を行った。さらに、②リポソームの内部にポリマーを複合化することで、ポリマーとのアフィニティを利用した有効成分の保持能の付与を行った。

## 2. 方法

### 2.1. リポソーム表面への積層膜の構築膜の構築

アニオン性リン脂質である Dilauroyl phosphatidylacid (DLPA) と中性リン脂質である Dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) を用いて、単純水和法とエクストルージョン法(pore size: 100nm)により、アニオン性のリポソーム(Lipo)を作製した。カチオン性多糖であるキトサン(MW:8.2 × 10<sup>4</sup>Da, pKa=6.5)にリン酸基を導入するために、メタンスルホン酸存在下で五酸化二リンを反応させてリン酸化キトサン( $P_{CHI}$ )を合成した。次に、 $P_{CHI}$ がカチオン性を示すpH3.0において、アニオン性リポソーム(Lipo)の表面に $P_{CHI}$ の吸着を行った(Lipo- $P_{CHI}$ )。  $P_{CHI}$ の吸着量は、アミノ基の定量法であるフルオレスカミン法を用いて測定した。



Preparation of Polymer-deposited Nanocapsules for Cosmetic Delivery System

Yuuka Fukui

Faculty of Science and Technology, Keio University

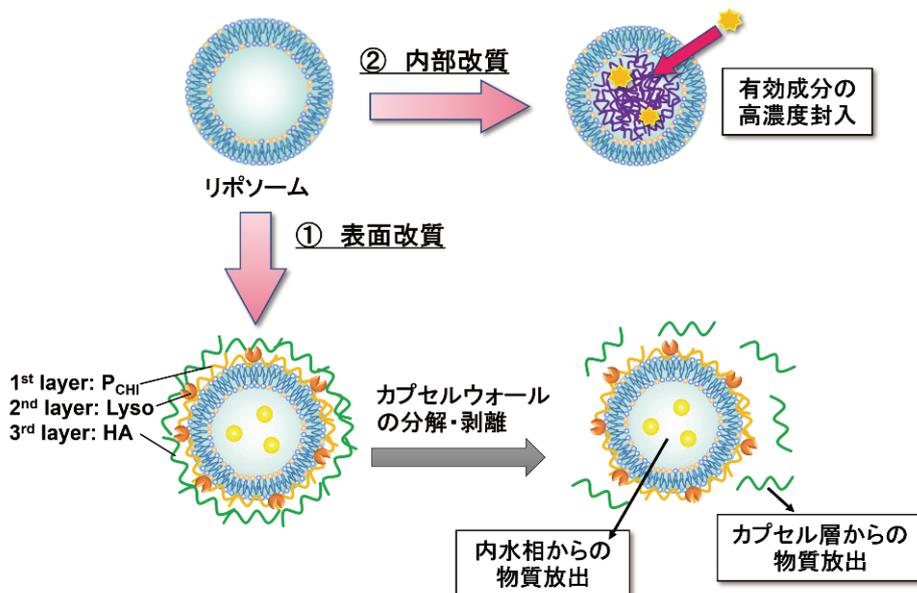


図1 リポソームの表面と内部へのポリマー複合化によるリポナノカプセルの作製とコスメティックデリバリーシステムへの応用

次に、P<sub>CHI</sub>の分解酵素としてリゾチーム (Lyso) を選択し、pH7.4において、Lipo-P<sub>CHI</sub>の表面にLyso (pI:11.10~11.35) の吸着を行った (Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso)。Lysoの吸着量は蛍光ラベル化したLysoによって定量した。さらに、この表面が正電荷を示す条件において、アニオン性のヒアルロン酸 (HA) の吸着を行った (Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HA)。得られたカプセルについて、動的光散乱法による水中粒径測定、電気泳動光散乱法によるゼータ電位測定、さらに透過型電子顕微鏡 (TEM) による形状観察を行った。

## 2.2. 積層膜の分解・剥離に伴う物性の変化と内包物質の放出

LysoによるP<sub>CHI</sub>の酵素分解性を評価するため、Lipo-P<sub>CHI</sub>-LysoとLipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HAを種々のpH条件下 (pH5.0, 6.2, 7.4) において、37℃で24時間インキュベートした。その後、分解によって生じたP<sub>CHI</sub>断片を回収し、フェリシアン化カリウムを用いてP<sub>CHI</sub>の還元末端を検出した。また、酵素分解後にLipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HAの分散液を透析することで、剥離したHAを回収し、ゲル浸透クロマトグラフィ法 (GPC) によって分子量の測定を行った。次に、酵素分解前後の膜物性評価として、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を用いて、蛍光偏光消滅測定により脂質膜の流動性を評価した。次に、アニオン性の蛍光物質のHPTSを封入したLipoを作製し、その表面にP<sub>CHI</sub>、LysoおよびHAを積層化した後、種々の条件下で酵素分解を行い、放出されたHPTSの蛍光強度測定より、放出量を算出した。

## 2.3. リポソーム内部へのポリマー複合化と物質保持機能の付与

2.1.項と同様の方法でアニオン性のリポソーム (Lipo) を作製した。次に、リポソーム内部に光リビング開始剤であるイニファーターとアニオン性モノマーである2-acrylamido-2-methyl-sulfonic acid (AMPS) を封入し (AMPS-in-Lipo)、UV照射 (高圧水銀灯) による光リビングラジカル重合を行った。得られたAMPSポリマー (PAMPS) 内封リポソーム (PAMPS-in-Lipo) について、水中粒径測定、ゼータ電位測定、およびTEMによる形状観察を行った。次に、内部のPAMPSを利用した物質の吸収と保持について検討を行った。まず、吸収挙動を検討するために、PAMPS-in-Lipo分散液にカチオン性物質 (Rhodamine 6G (Rho6G)、Acridine Orange (AO)) とアニオン性物質 (Hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonic acid (HPTS)) を加え、種々の条件でインキュベーションを行った。遠心分離によってPAMPS-in-Lipoを回収した後、界面活性剤を加えてPAMPS-in-Lipoを崩壊させて、封入された各蛍光物質の定量を行った。

## 3. 結果

### 3.1. リポソーム表面への積層膜の構築

作製したP<sub>CHI</sub>は両性 (pI=5.0) であり、低pHで正電荷、高pHで負電荷を帯びる。そこで、アニオン性のLipo (粒径: 90 ± 31 nm) に対して、P<sub>CHI</sub>が正電荷を帯びるpH条件において吸着を行ったところ、仕込みのP<sub>CHI</sub>濃度に応じて、吸着量が増大した (Lipo-P<sub>CHI</sub>)。飽和吸着となるように作製したLipo-P<sub>CHI</sub>の粒径は、90 ± 31 nm から 141 ± 30 nm と大

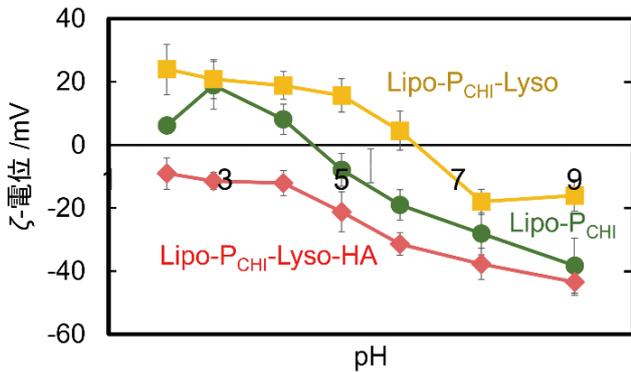


図2 異なる pH 条件下における各種ナノカプセルのゼータ電位

きくなった。また、ゼータ電位は pH とともに正から負へと変化し、両性を示すことがわかった(図2、緑色)。そこで、Lipo-P<sub>CHI</sub> が負電荷を帯びる条件 (pH7.4) において、Lyso の吸着を行ったところ、Lyso の仕込み濃度に応じて吸着量が増加することがわかった (Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso)。カプセル表面の 100nm<sup>2</sup> 当たりには 1.4 個の Lyso が吸着した Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso において、粒径は 169 ± 32nm となり、等電点は Lipo-P<sub>CHI</sub> よりも高 pH 側にシフトすることがわかった(図2、黄色)。次に、Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso が正電荷を示し、Lyso の至適 pH より低い pH2.0 において、アニオン性の HA の吸着を行ったところ、粒径は 124 ± 62nm となり、ゼータ電位は負に反転した (Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HA)。また、得られた Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HA は、いずれの pH 環境においても HA 由来の負電荷を呈するようになった(図2、赤色)。これより、表面が HA で覆われたことが示された。TEM 観察より、作製したナノカプセルはリポソーム由来の球形で中空構造を維持していた。

### 3.2. 積層膜の分解・剥離に伴う物性的変化と内包物質の放出

次に、酵素によるカプセル層の分解を確認するため、Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso と Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HA を種々の pH 条件下

で 24 時間静置したところ、Lyso の至適 pH (pH5.0-6.0) 付近においてともに P<sub>CHI</sub> の分解が促進された。Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso については、ゼータ電位 (pH6.2) が +4.5 ± 4mV から -45 ± 2mV と正から負に反転した。これは、表面から P<sub>CHI</sub> 断片が剥離して、脂質膜が露出したことによると考えられた。次に、Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HA については、酵素分解によって HA 断片が剥離し、低分子量化していることが確認された。HA は分子内に、Lyso の基質である N-アセチルグルコサミン残基を有しているため、Lyso によって分子が切断される。これらの結果から、酵素分解によってカプセル層に担持した物質の放出が可能であることを見出した。

次に、3.1.項で作製したナノカプセルの酵素分解に伴う膜物性評価を行った。脂質膜の流動性による影響について、蛍光プローブである DPH を用いて、蛍光偏光解消測定により検討した。DPH は長い棒状の分子であるため、脂質分子の分子軸に沿って配向する。脂質の運動が束縛されている場合は、DPH の蛍光偏光 (蛍光異方性) は保たれ、脂質の流動性が上がると蛍光偏光は素早く解消される。各種ナノカプセルに DPH を加えて、蛍光偏光解消を測定したところ、リポソームでは、昇温すると 35-45°C で蛍光異方性の急激な減少が見られた(図3)。これは、この温度領域で脂質膜のゲルから液晶への転移が起こり、膜内の DPH の運動性が上がったことによると考えられる。一方、Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso (酵素分解前) と Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HA (酵素分解前) については、広い温度領域において蛍光異方性は高い値となり、リポソームと比較して膜流動性が低い状態となっていることがわかった。これは、脂質膜表面へポリマーが吸着することで、脂質膜の流動性が低下したことによると考えられる。さらに、Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso と Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HA について、Lyso の至適条件 (pH6.2, 37°C) 近傍において 24 時間インキュベートを行ったところ、脂質膜のゲル-液晶相転移が明確に観察されるようになり、蛍光異方性が低下した。このことから、カプセル層の酵素分解によって膜流動性が增大することが示された。

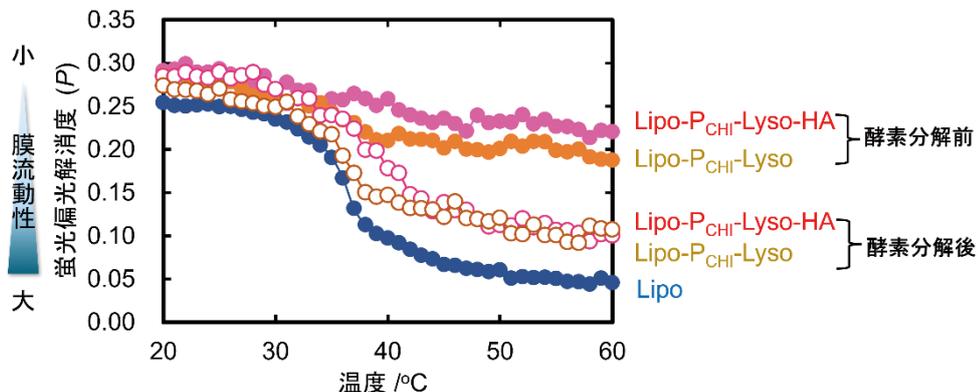


図3 蛍光偏光解消測定による各種ナノカプセルの膜流動性の評価

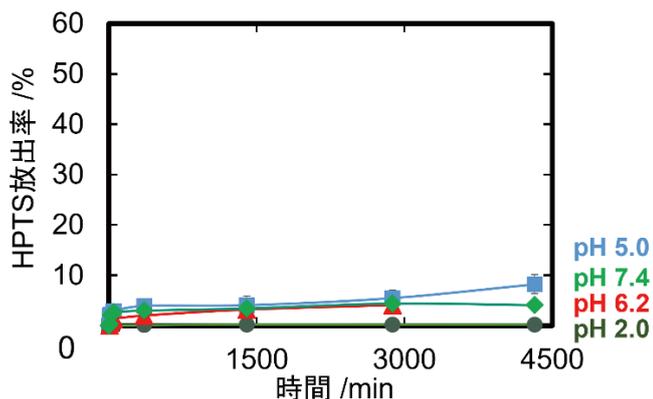


図4 異なる pH 条件下における Lipo-P<sub>CHI</sub> からの HPTS 放出挙動

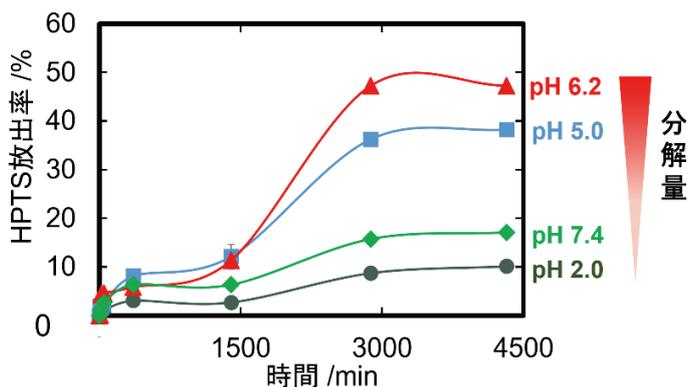


図5 異なる pH 条件下における Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso からの HPTS 放出挙動

次に、カプセル層の酵素分解に伴う物質の放出について検討を行った。Lipoに蛍光物質であるHPTSの封入を行った後、カプセル層の構築を行った。Lipoの場合には素早い放出が見られ、24時間後には放出率が60%に達した。一方、Lipo-P<sub>CHI</sub>ではpHによらず放出は5%以下に抑制された(図4)。上述したように、リボソーム表面にポリマーを被覆することで、脂質膜の流動性が低下するため(図3)、内封物質の物質透過性が低下したことによると推察している。Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lysoについては、Lysoの至適条件(pH5.0-6.0)近傍において放出の促進が見られ、pH6.2では、24時間後に10%、48時間後に約50%の放出が観察された(図5)。同様に、Lipo-P<sub>CHI</sub>-Lyso-HAについても、放出の促進が見られた。酵素分解によるP<sub>CHI</sub>とHAの分解と剥離に伴って脂質膜の流動性が増大し(図3)、カプセル層の物質透過性が増大したことによると考えられる。

### 3.3. リボソーム内部へのポリマー複合化と物質保持機能の付与<sup>4)</sup>

次に、リボソーム内部においてリビングラジカル重合によってポリマーを生成し、このポリマーとのアフィニティを利用した物質のカプセル内への封入を行った。リビングラジカル重合は、開始点(開始剤)の数と重合時間により、ポリマーの数、鎖長および化学組成を精密に制御することが可能である。<sup>1</sup>H NMR測定よりPAMPSの生成が確認でき、重合時間が300分の場合の分子量は36,000 g/molと算出された。また、重合前後においてカプセルの粒径は84 ± 26 nmから84 ± 29 nm、ζ-電位は-46 ± 6 mVから-42 ± 4 mVとなり、TEM観察から球形で中空構造を維持したままであることが確認された。

作製したPAMPS-in-Lipoへのアニオン性のHPTSの吸収については、未処理のリボソームよりもPAMPS-in-Lipoの方が低い値となった。これは、内部のPAMPSによる静電反発によってHPTSの吸収が抑制されたと考えている。一方、カチオン性物質の吸収については、未処理のリ

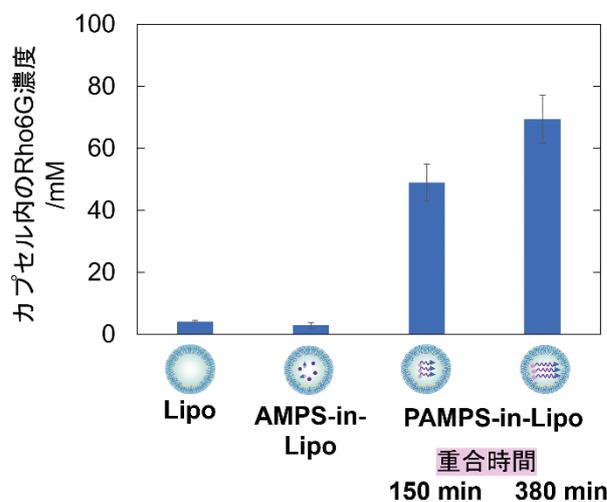


図6 各種ナノカプセルの Rho6G 封入量

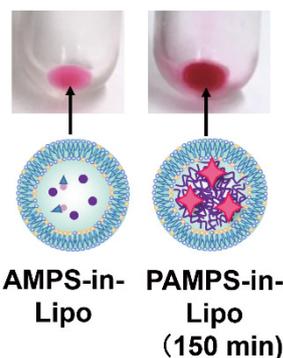


図7 Rho6G 封入ナノカプセルを遠心濃縮した後の写真

ボソームと重合する前のリボソーム(AMPS-in-Lipo)と比較して、PAMPS-in-Lipoへの吸収量は高い値となった(図6)。また、重合時間(ポリマー鎖長)を150分から380分にする事で吸収量が増加することもわかった。AMPS-in-Lipoに比べてPAMPS-in-Lipoの方が濃く染まる事が観察できた(図7)。また、図6より、PAMPS-in-Lipo(重合時間:380min)内部のRho6G濃度は、外水相の約70倍となり、内部のポリマーによって物質を高濃度に封入できることがわかった。

## 4. 総括

本研究では、リボソームの表層と内部にポリマーを複合化することで、カプセル層の分解と剥離による表面性状の変化と物質の放出を可能とする機能性ナノカプセルの創製、さらに内部への有効成分の濃縮を行った。すなわち、リボソーム表面にバイオポリマーとその分解酵素を積層化することで、皮膚表面の弱酸性環境に応答して、封入物質の放出とカプセル層からの有効成分(HA)の放出を調節することが可能となった。また、粒径約100nmのリボソーム内部において、アニオン性ポリマーを複合化することで、外水相に添加したカチオン性の化合物を内部に濃縮可能であることを見出した。以上のように、リボソームと複合化するポリマーの種類と組み合わせを選択することで、目的・用途に応じたカプセル素材の構築が可能であり、皮膚内の目的部位に有効成分を効果的にデリバリー可能なコスメテ

ィックデリバリーシステムの開発が期待できる。

## 謝辞

本研究にご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く御礼申し上げます。

## (引用文献)

- 1) Fujimoto, K., Toyoda, T., Fukui, Y., *Macromolecules*, 40, 5122-5128 (2007).
- 2) Fukui, Y., Fujimoto, K., *Langmuir*, 25, 10020-10025 (2009).
- 3) Fukui, Y., Otsuka, H., Fujimoto, K., *Polymer Journal*, 51, 1223-1230 (2019).
- 4) Fukui, Y., Fukui, A., Fujimoto, K., *Polymer Journal*, published online.