

# 優れた安全性・安定性を有する経皮吸収型イオン液体の創製と コスメトロジー素材への応用

和歌山県立医科大学薬学部薬剤学研究室

福田 達也

Ionic liquids (ILs) have attracted attention in the drug delivery fields since ILs achieve solubilization, stabilization, and enhancement of transdermal absorption of a variety of compounds. However, some species of ILs have been reported to exhibit high toxicity when applied to the skin, which poses a major challenge for application to the cosmetology field. Hence, development of new ILs with good performance with safety has been required. In this study, we aimed to prepare new ILs that allows for promotion for transdermal absorption without toxicity. We could prepare ILs by using amine having polyethylene-glycol moieties and geranic acid as cation and anion, respectively. The ILs achieved solubilization of some poorly water-soluble compounds, and also enabled efficient delivery of a macromolecule into the skin without skin damage. These results suggest that these ILs would be applied for cosmetology materials with safety. Also, we could develop ILs composed of an antioxidative compound, edaravone, in which interaction had been formed between edaravone anion and cation molecules. Through *in vitro* and *in vivo* experiments, the edaravone-ILs were shown to exhibit high antioxidative activity similar to edaravone regardless of forming ILs, suggesting that the ILs have a potential to exhibit antioxidative effect for beauty and anti-aging. In conclusion, use of ILs should be a safe and useful approach for transdermal drug delivery and development of new cosmetology materials.

## 1. 緒言

皮膚内の水分蒸発を防ぎ、かつ外部からの異物侵入を防ぐ最大のバリア機能を有する皮膚角質層は、生体の恒常性維持に必要な不可欠な組織部位である一方、化粧品などを適用する場合、その有効成分の皮内への輸送はバリア機能には阻まれ、十分な効果を得ることができない。これまでに創薬の分野では、マイクロニードル、超音波、イオントフォレシスなどの物理的な刺激を利用する手法が提案されており、低分子化合物のみならず高分子化合物の経皮送達が可能となり、その有用性が報告されている<sup>1-2)</sup>。しかし、化粧品に適用するにはデバイスを用いずに使用できるといった簡便性が必要であり、コストや実用性の観点からも、新たな経皮吸収システムの開発が課題と考えられる。

近年、創薬の研究領域では「イオン液体 (Ionic Liquids: ILs)」が新規経皮吸収促進溶媒として注目を集め、世界中で研究が盛んに行われている<sup>3)</sup>。ILsは、カチオン分子とアニオン分子から構成される100℃以下の融点を有する塩と一般的に定義されており、組み合わせによってはイオン結合を保持した状態で室温にて液体で存在できるものもあり、任意の機能性を付与することができる。一般の分子性液体 (水や有機溶媒) と異なり、難揮発性や高い熱安定性、

イオン電導性などの性質を有すること、また構成成分の組み合わせによりその性質を制御できることから、“第三の液体”として化学、工学、材料科学の分野でもともと広く使用されてきた。初めてのILsに関する報告は、1914年にWaldenらにより作製された、室温で液体の(融点13-14℃)の硝酸エチルアンモニウムであり、100年以上前の話である。医薬領域におけるILsの適用は、1990年代後半から2000年代初期から始まり、酵素やタンパク質の熱安定性の改善や、抗菌剤、抗がん剤の合成に用いる触媒としての利用が主であった。その後、難水溶性化合物の可溶化や、薬物放出システム構築への利用、低分子/高分子医薬の経皮吸収促進作用、などといった薬物送達システム(DDS)・製剤研究における多くの有益な機能が報告され、新たなDDSマテリアルとして盛んに研究され始めた。

当研究室ではこれまでに、ILを用いたDDS研究を展開しており、重炭酸コリン(カチオン)およびゲラン酸(アニオン)からなるイオン液体、Choline And Geranate (CAGE)が多くの難水溶性低分子化合物に対して優れた可溶化能を示し、加えて低分子から高分子化合物(タンパク質や核酸医薬)を経皮送達できることを報告してきた。具体的には、CAGEをフラボノイドであるノビレチンやBovine serum albumin (BSA)、インスリンと混合し皮膚へ塗布することで高い経皮吸収促進作用を示し、血糖降下作用を有するノビレチンやインスリンを経皮送達した場合には、一過的な作用を示す皮下注射と比較して持続的な作用を得られることを見出してきた<sup>4-5)</sup>。また、糖鎖からシアル酸を脱離させる酵素シアリダーゼを、CAGEを利用して老化促進モデルマウスの真皮に送達したところ、皮膚のエラスチン量が増加し、老化で失われた皮膚の弾力を回



Development of ionic liquids with safety and stability for transdermal absorption and their application to cosmetology materials

Tatsuya Fukuta

Department of Physical Pharmaceutics,  
School of Pharmaceutical Sciences,  
Wakayama Medical University

復できることが示唆される結果を得た<sup>6)</sup>。これらのことから、医薬領域だけでなく、コスメトロジー領域においても、ILsの応用展開が強く期待されている。

一方で、ILsの種類によっては、皮膚に適用した際に高い毒性を示すものも報告されており、コスメトロジー領域への応用を考える際には大きな課題となる<sup>7)</sup>。先述したCAGEは、それ自身がバイオフィilm除去能や中和活性により幅広い抗菌活性を示すことが明らかとなっており、そのメカニズムとしてCAGEの構成成分であるコリンが負に帯電した菌脂質膜LPS domainに作用し、静電的相互作用によるイオン複合体を形成すること、また膜に埋め込まれたコリンの安定化の際に、ゲラン酸が脂質膜中にスパイクされ、それにより膜構造が破壊されることが報告されている<sup>8)</sup>。一方、皮膚などの正常細胞の脂質二重膜には構造上ゲラン酸がスパイクされにくく、菌体に比べて正常細胞への毒性は低いとされているものの、コスメトロジー領域への応用に向けた新たなILsの開発が期待される。

そこで本研究では、コスメトロジー素材として応用可能な、優れた安全性・安定性を有する経皮吸収型ILsの創製を目的として、①皮膚への刺激性や毒性がほとんど認められないことから化粧品成分として広く使用されるポリエチレングリコール (PEG) を骨格として有するIL、②シミの形成に関与する活性酸素の除去作用をもつ抗酸化剤を成分とするIL<sup>9)</sup>、を開発したため、報告させていただく。

## 2. 方法

### 2.1. イオン液体の調製

アミノ基、およびPEGを骨格として有する3種の化合物をカチオンとして、ゲラン酸をアニオンとして任意のモル比で混合し、30分室温で攪拌混合させた。その後、60℃で30分間エバポレーションに供し、60℃で48時間、減圧下にて真空乾燥させた。ILの形成を60℃および室温に戻したのちに目視で観察するとともに、Nuclear Magnetic Resonance (NMR) にて確認した(論文投稿準備中により詳細は割愛させていただく)。

抗酸化剤を成分とするILの調製時には、ラジカルスカベンジャーとして脳梗塞急性期や筋委縮性側索硬化症の治療薬として認可されているエダラボンを用い、薬物自身をカチオンあるいはアニオンとして構成されたIL、すなわちActive Pharmaceutical Ingredient (API)-ILの作製を行った。エダラボンをアニオンとして、またカチオンとして過去にAPI-ILのカチオン成分として使用された実績のある重炭酸コリン、1-デシル-3-メチルイミダゾリウムクロライド、1-ブチル-1-メチルピロリジニウムクロライド、テトラブチルホスホニウムクロライドの4種を選択した。各カチオンとエダラボンを1:1(モル比)で室温にて1時間攪拌混合後、溶媒をエバポレーターにより留去した後、

60℃にて48時間真空乾燥させた。エダラボンILの形成を目視、NMRおよびフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) にて評価した。

### 2.2. PEGモチーフを有するILによる高分子医薬の皮内送達

2.1. に従って作製したPEGモチーフを有するILを、FAM標識NF-κBデコイオリゴDNAと混合し、HOS:HR-1ヘアレスマウスの背部皮膚へ塗布した。一定時間後、ILを塗布した部分の皮膚を回収し、OCTコンパウンド中で凍結固化させたものをクライオスタットにより凍結切片とした。得られた切片中の核酸由来の蛍光を蛍光顕微鏡にて観察した。

### 2.3. 抗酸化物質を構成成分とするILの物性評価

化合物のIL化は水への溶解性を向上させることが報告されている。そこで、エダラボン、および2.1. で作製できたエダラボンILを過剰量秤量し、水と混合、室温で24時間反応させた。得られたサンプルを遠心分離(1,000g, 10min)し、上清中のエダラボン濃度をHPLCにて評価した。また、室温におけるエダラボンILの粘度を、粘度計MicroVISC (Rheosense, San Ramon, CA, USA)を用いて評価した。また、エダラボンILの融点を示差走査熱量計(DSC)にて測定した(Hitachi DSC7000X instrument; Hitachi High-Tech Science Corporation, Tokyo, Japan)。また、エダラボンILを水中に分散させた後、得られた懸濁液中におけるエダラボンILの粒子径、表面電荷をZetasizer Pro (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)を用いて評価した。

### 2.4. 抗酸化物質を構成成分とするILの抗酸化活性評価

エダラボンおよびエダラボンILの抗酸化活性を、2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルアッセイを用いて*in vitro*にて評価した。具体的には、96-wellプレート中に最終濃度としてDPPHが50μM、エダラボンおよびエダラボンILが0、10、20、40μMとなるように混合した。そして、DPPHおよび各サンプルを20分間反応させた後の、DPPHラジカルの吸光度(λ=540nm)をマイクロプレートリーダーにて測定した。各サンプルの抗酸化活性は、コントロール群(エダラボン0μM)と比較した際のDPPHラジカルの消去率を、得られた吸光度を基に算出することで評価した。また、エダラボンをIL化することにより、*in vivo*における抗酸化活性が損なわれていないことを確認すべく、エダラボンの適応疾患の一つである脳梗塞のモデル動物として頻用される、transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) ラットを用いて評価した<sup>10)</sup>。

### 3. 結果

#### 3.1. PEGモチーフを有するILの作製と高分子医薬の皮内送達

これまでに当研究室にて用いていたCAGEのアニオン成分であるゲラン酸をアニオンとし、PEGモチーフを有するアミンをカチオンとしてILの作製を行った。PEGアミンについては、異なる末端基（メトキシ基、ヒドロキシ基等）およびPEG鎖長（分子量）の分子種をいくつか選定し、異なるアニオン：カチオン比率でILを調製した。その結果、室温で固体のものも一部得られたが、処方最適化により室温で液体のILsを見出した。これらPEGアミン骨格を有するILs（PEG-ILs）は、難水溶性薬物の可溶化を可能とするCAGEと同様に高い薬物溶解性を示した。さらに、ある種のPEG-ILは、蛍光標識オリゴ核酸と混合してマウス背部皮膚へ塗布した際に、高い皮膚吸収促進効果を示すとともに、皮膚刺激性を示さないことが明らかとなった。PEG-ILsの物性評価として、中間水に着目し検討を行った。その結果、CAGEでは水と混合することでゲル構造を示し、さらに水を添加すると相分離を起こすが、ある種のPEG-ILsにおいては、体積比として90%まで水を添加した場合でも均一な溶液を維持し、水の添加による顕著な溶解度低下も認められなかった。DSC測定から中間水の存在が示唆されており、これにより高い水分含量においても相分離せず、ILsの形態を維持していた要因であると考察される。以上より、PEGアミンを用いて作製した新規ILsは高分子医薬の皮膚吸収促進を可能とするとともに、高い安全性を有するILsであることが示唆された（論文投稿準備中）。

#### 3.2. エダラボンILの物性・機能性評価

3.1.の検討と並行して、抗酸化活性を有し、美容や炎症性皮膚疾患への応用が可能なILsの作製に着手した。抗酸化剤として、高いラジカル捕捉能により脳梗塞や筋萎縮性側索硬化症の治療薬として使用されているエダラボンをアニオンとして使用した。エダラボンと混合するカチオンとして、過去にAPI-ILsのカチオン成分として使用された実績のある重炭酸コリン、1-デシル-3-メチルイミダゾリウムクロライド、1-ブチル-1-メチルピロリジニウムクロライド、テトラブチルホスホニウムクロライドの4種を選択した。各カチオンとエダラボンを1:1（モル比）で室温にて1時間攪拌混合後、溶媒をエバポレーターにより留去した後、60℃にて48時間真空乾燥させることで、エダラボンILの形成を評価した結果、重炭酸コリンを用いた場合では析出しILが形成されなかったが、他の3つのカチオンを用いた場合ではILの形成が目視において確認でき（図1）、NMRやFT-IRによりカチオン・アニオン間の相互作用を観察できた。一方で、1-デシル-3-メチル

イミダゾリウムクロライドで作製したILは60℃では液体であったものの、室温では固体となってしまうこと、また1-ブチル-1-メチルピロリジニウムクロライドで作製したILは水に懸濁した際に容易に析出した。テトラブチルホスホニウムをカチオンとして作製したILは室温において液体であり、かつ水中で析出しなかったことから、今後の経皮製剤としての取り扱いやすさの観点から、テトラブチルホスホニウムをカチオンとし作製したILを“エダラボンIL”とし、以降の検討で使用した。エダラボンILの水への飽和溶解度をHPLCにて評価したところ、エダラボンの飽和溶解度が $1.96 \pm 0.05$  mg/mLであったのに対し、エダラボンILは $3.47 \pm 0.35$  mg/mL（エダラボンとして）であり、約1.8倍に増加した。さらに、エダラボン粉末は水に溶けにくく長時間の攪拌混合を必要とする一方で、エダラボンILは水中にて約10秒間攪拌混合するのみで速やかに溶解した。また、エダラボンILの粘度および融点をそれぞれ測定したところ、粘度は $7753.7 \pm 61.3$  mPa·S（20.7℃において）、融点は $-41.3$ ℃であった。ILを水に懸濁した際に、IL自身でナノ粒子を形成し、それがILの皮膚や粘膜の透過促進に有効に働くことが示唆されている<sup>11)</sup>。そこで、エダラボンILを水に懸濁させた際の粒子径およびζ電位を測定したところ、粒子径が $199.2 \pm 68.0$  nm、ζ電位が $-26.6 \pm 1.2$  mVと、負電荷のナノ粒子を形成していることが明らかとなった。

次に、エダラボンをIL化したことによる抗酸化活性への影響を*in vitro*および*in vivo*において評価した。DPPHラジカルアッセイによってラジカル捕捉活性を評価した結果、エダラボンILは濃度依存的な抗酸化活性を示し、またその活性はエダラボン原薬と同程度であった（図2）。このことから、IL化によってエダラボンの抗酸化活性が変化しないことが示唆された。さらに、*in vivo*における抗酸化活性を評価するため、エダラボンの適応疾患である脳梗塞のモデルラットに対してエダラボンILを尾静脈内投与した結果、エダラボンILはエダラボン溶液と同程度の脳細胞死の抑制と運動機能不全の改善を示し、*in vivo*においてもエダラボン原薬と同様に高い抗酸化活性を発揮することが明らかとなった<sup>9)</sup>。

### 4. 考察

ILsは難水溶性化合物の可溶化や、低分子・高分子医薬の経皮吸収促進を可能とすることから、医薬領域において経皮薬物送達を実現する技術として近年盛んに研究が行われている。一方で、ILsの種類によっては皮膚に適用した際に高い毒性を示すものも知られており、コスメトロジー領域への応用を考えた際には、化合物の経皮吸収促進作用を有し、かつ高い安全性を有するILsの開発が望まれている。そこで本研究では、皮膚への刺激性や毒性がほとんど



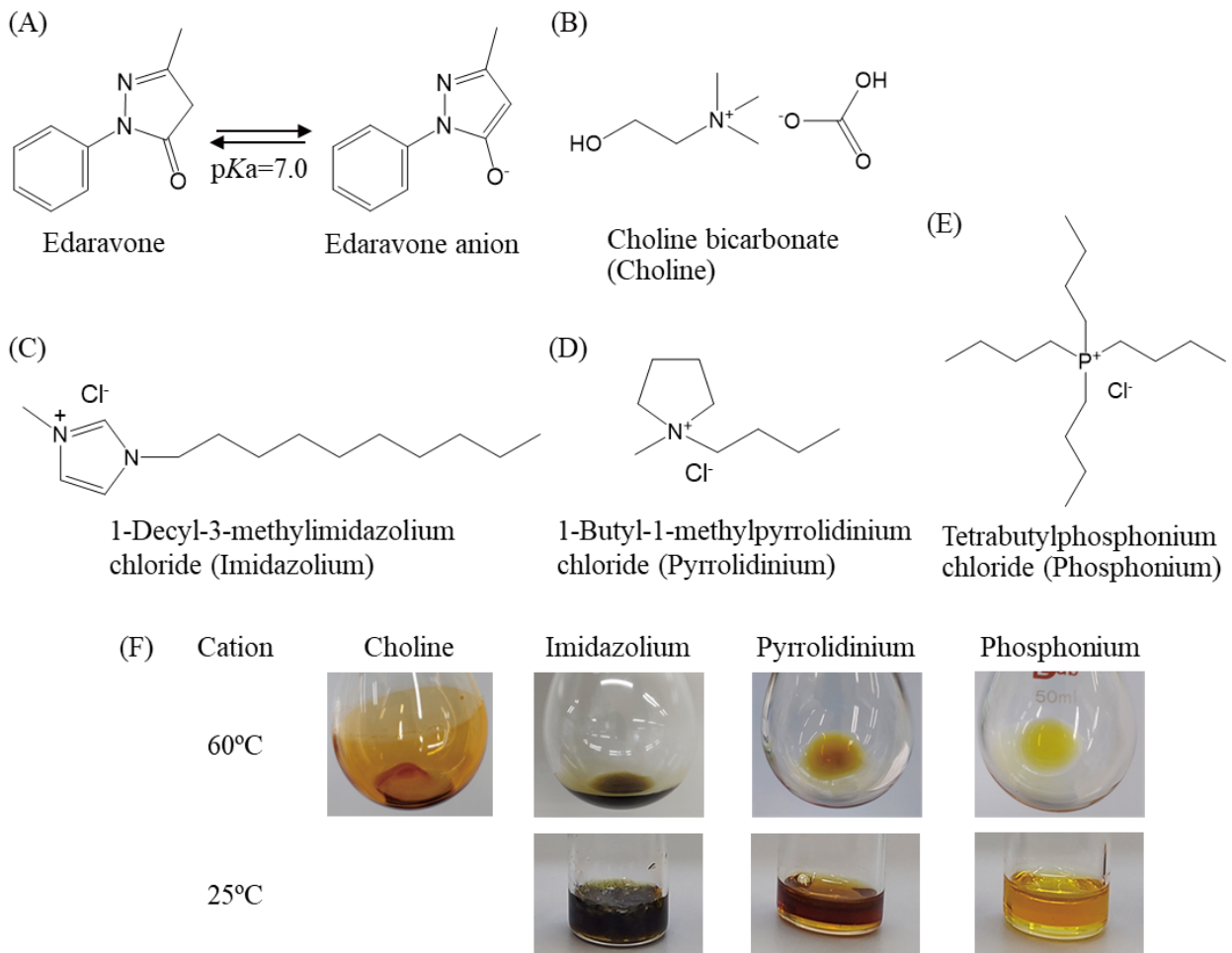


図1 エダラボンイオン液体の材料 (A-E) と 25°C および 60°C における各イオン液体の様子

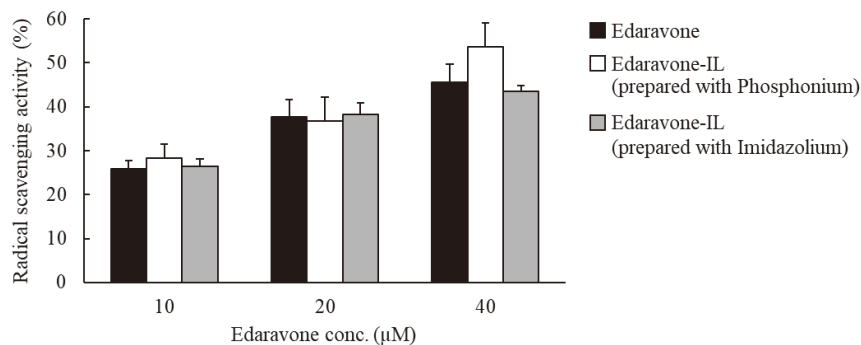


図2 DPPHラジカルアッセイによるエダラボンおよびエダラボンILの抗酸化活性評価

認められず、化粧品成分として広く使用されるPEG、およびシミ予防等により美容へ応用できる可能性を有する抗酸化剤としてエダラボンに着目し、研究を実施した。

PEGアミン骨格を有する化合物をカチオン分子としていくつか選定し、経皮DDSのILsとして多くの実績・報告のあるCAGEのアニオン成分であるゲラン酸と反応させることでILsの作製を行った。処方最適化の結果、室温で

液体のILsをいくつか見出すとともに、CAGEと同様に高い薬物溶解性を示すことが明らかとなった。さらに、モデル高分子として蛍光標識オリゴ核酸とPEG-ILをマウス皮膚へ塗布したところ、皮膚へ顕著な傷害を示すことなく核酸を皮内へ送達できている様子が観察された。高分子医薬である核酸の皮内送達が可能であったことから、多くの化粧品成分の経皮吸収促進剤として本PEG-ILが応用可能で

あることが期待される。一方で、本PEG-ILによる経皮吸収促進の詳細なメカニズムや、頻回投与時の安全性などが未だ明らかでないため、今後更なる検討が必要である。

抗酸化剤は、シミ予防やアンチエイジング効果を有することから、コスメトロジーの素材として注目されている。本研究では、高い抗酸化活性を有するエダラボンに着目し、いくつかのカチオンと反応させることで、薬物(API: Active Pharmaceutical Ingredient)自身をIL化させた「API-IL」の開発に成功した。さらに、エダラボンはIL化させた場合においても高い抗酸化活性を維持していることが*in vitro*、*in vivo*の検討から示された。このことから、皮膚に適用した場合においても高い抗酸化活性を発揮することが期待される。今後、メラニン保有ヘアレスマウスを用いたシミ予防に関する検討や、酸化ストレスが病態進行に関与するアトピー性皮膚炎や乾癬のモデル動物にエダラボンILを応用することで、皮膚の健康を維持するコスメトロジー素材としてエダラボンILが応用可能であるか明らかとしていきたい。

本検討により、皮膚への刺激性を示すことなく高い経皮吸収促進作用を示す新規ILの開発、および高い抗酸化作用を有するILを見出すことができた。今後、これらILsを皮膚へ適用した際の皮膚への影響や、安全性に関する知見を蓄積することで、コスメトロジー素材としての有用性を実証したいと考えている。

#### (引用文献)

- 1) Sun T., Dasgupta A., Zhao Z., Nurunnabi M., Mitragotri S. Physical triggering strategies for drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 158, 36-62 (2020).
- 2) Fukuta T., Oshima Y., Michiue K., Tanaka D., Kogure K. Non-invasive delivery of biological macromolecular drugs into the skin by iontophoresis and its application to psoriasis treatment. *J. Control. Release*, 323, 323-332 (2020).
- 3) Curreri AM., Mitragotri S., Tanner EEL. Recent advanced in ionic liquids in biomedicine. *Adv. Sci.*, 8, e2004819 (2021).
- 4) Banerjee A., Ibsen K., Iwao Y., Zakrewsky M., Mitragotri S. Transdermal protein delivery using choline and geranate (CAGE) deep eutectic solvent. *Adv. Healthc. Mater.*, 6, 1601411 (2017).
- 5) Hattori T., Tagawa H., Inai M., Kan T., Kimura S., Itai S., Mitragotri S., Iwao Y. Transdermal delivery of nobiletin using ionic liquids. *Sci. Rep.*, 9, 20191 (2019).
- 6) Minami A., Fujita Y., Goto J., Iuchi A., Fujita K., Mikami Y., Shiratori M., Ishii A., Mitragotri S., Iwao Y., Kanazawa H., Kurebayashi Y., Takahashi T., Otsubo T., Ikeda K., Suzuki T. Enhancement of elastin expression by transdermal administration of sialidase isozyme Neu2. *Sci. Rep.*, 11, 3302 (2021).
- 7) Uddin S., Islam MR., Moshikur RM., Wakabayashi R., Kamiya N., Moniruzzaman M., Goto M. Transdermal delivery of antigenic protein using ionic liquid-based nanocarriers for tumor immunotherapy. *ACS Appl. Bio. Mater.*, 5, 2586-2597 (2022).
- 8) Ibsen KN, Ma H., Banerjee A., Tanner EEL., Nangia S., Mitragotri S. Mechanism of antibacterial activity of choline-based ionic liquids (CAGE). *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4, 2370-2379 (2018).
- 9) Fukuta T., Ikeda-Imafuku M., Iwao Y. Development of edaravone ionic liquids and their application for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Mol. Pharm.*, 20, 3115-3126 (2023).
- 10) Yoneda S., Fukuta T., Ozono M., Kogure K. Enhancement of cerebroprotective effects of lipid nanoparticles encapsulating FK506 on cerebral ischemia/reperfusion injury by particle size regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 611, 53-59 (2022).
- 11) Shi Y., Zhao Z., Gao Y., Pan DC., Salinas AK., Tanner EEL., Guo J., Mitragotri S. Oral delivery of sorafenib through spontaneous formation of ionic liquid nanocomplexes. *J. Control. Release*, 322, 602-609 (2020).