

界面化学的知見からの新規経皮ドラッグデリバリーシステムの開発

Development of New Transdermal Drug Delivery System based on Interfacial Chemistry

山下 裕司・坂本 一民

Yuji YAMASHITA and Kazutami SAKAMOTO

認知症や大震災の避難生活で精神的に疲弊している女性が、口紅などの化粧品施術で顕著な自意識の改善や生活の張りを取り戻す事が認められている。このように化粧品のQOL向上への効果が実証され薬粧 (Cosmeceutical) と呼ばれる新領域が注目されているが、未だ臨床的知見にとどまり基盤となる科学技術の確立が求められている。そこで、これまで薬学中心に進められていた経皮吸収研究を化粧品科学として展開し、皮膚の持つ外部からの有害物質侵入を防ぐ生体防御機能を損なうことなく、美白等の薬効成分を有効に生細胞に到達させることが可能な新しいDDS技術の基盤構築について報告する。

1. はじめ

生命維持の基本は細胞質 (Cytosol) が細胞膜によって外界と隔てられ、物質の膜内外への移動の制御と細胞内での代謝が恒常的に調節されている事にある。ところが、近年チャネルやレセプターなどの関与なしに直接細胞内に透過する物質として、種々の膜透過性ペプチドドメイン (PTD) が見出されてきた。これは、生体膜のバリア機能を超越する現象で、新たなDDSキャリアとしての期待から多くの研究がなされている。PTDは塩基性アミノ酸に富むペプチドでHIVウイルス由来のTATペプチド¹²やそのモデル物質としてのArgの8量体 (R8)³など多種の存在が知られている。PTDはそれ自身あるいはタンパク質や種々の薬物さらにはリポソームなどを結合させても、さまざまな細胞膜を透過することが実証されているが、その機構についてはいまだに定説がない。PTDの膜透過方式には小胞体として内包化されるタイプの種々のEndocytosis (E透過) と、膜を越えて直接細胞質に移行するCytosolysis (C透過) が知られ、前者は一般の吞食現象と同様、細胞内部でさらに細胞質への移行を必要とする。一方、C透過は直接的な透過故

にDDSキャリアとしてより有効である。

皮膚は、表面から表皮、真皮、皮下組織の三層からなり、表皮の最表層には角層と呼ばれる死んだ細胞層が存在する。さらに、角層の細胞間隙にはセラミド、コレステロール、脂肪酸などの脂質を構成成分とした角層細胞間脂質膜 (SCLP, 図1) が存在し、これらの成分が多重ラメラ層を形成することによってバリア機能を果たしている。角層からの薬物透過が主な経皮吸収経路と言われており、元来バリア機能として働くSCLPを透過しなければならない。このような頑丈なSCLPを透過するために、一般にイオントフォoresisやソノフォoresis、マイクロニードルといった物理的な構造破壊をもって薬物の吸収促進が行われ

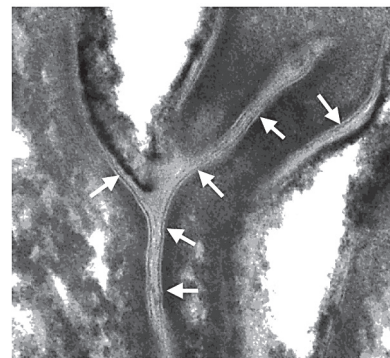


図1. 角層の透過型電顕写真。矢印部分が細胞間脂質で、その他は角層細胞

連絡先：山下裕司 yyamashita@cis.ac.jp

千葉科学大学薬学部生命薬科学科

Department of Pharmaceutical and Life Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2012年9月28日受付, 2012年12月12日受理)

ている⁴。これらの手法は生体防御機能の損傷が緩和であるものの、万人が使用する化粧品において頻回塗布（使用）による安全性保証やハンドリングの簡便性に疑問がもたれる。

このような背景の下、筆者らは数年来経皮デリバリーに関わる研究を推進してきた^{5,6}。本報では、物理化学（界面科学）的視点からそれらの研究成果に対して仮説を立て、理論的に解析・実証し、PTDの膜透過性を随意に制御できるインテリジェント薬物送達システム（DDS）開発の研究基盤確立に関して斬新な提案を示す。

2. SCLP構成成分の組成とその流動性

細胞間脂質にはおよそ50%のセラミドが含有されており、セラミドの組成およびそれに由来する配向がバリア機能に関与することが示唆されている。内田らは、皮膚科学的視点からバリア疾患と言われるアトピー性皮膚炎（AD）において角層のセラミド組成が重要な因子であることを明らかにしており、ADマウス角層中のセラミド1とセラミド3が健常マウス皮膚に比べて有意に低下していることを実証した^{7,8}。さらに、セラミドの代謝産物であるスフィンゴシン（So）とスフィンガシン（Sa）についてADマウス皮膚の研究をすすめ、AD角層中のスフィンゴイド塩基総量およびSo/Sa比が顕著に変化していることを明らかにした。

筆者らは、So/Sa比が変化した時の2分子膜構造の違いおよびモデル薬物の膜透過性について物理化学的手法を用いて検証を行った⁵。興味深いことに、So/Sa比を5.4から14.3に変化しても2分子膜の面間隔や分子の配列に違いは見られなかった。一方で、リポソームに内包したモデル薬物の漏洩にはSo/Sa比が関係しており、So/Sa比の増加（AD皮膚モデル）に伴い薬物の漏洩量が増加することが示されている。すなわち、現行機器の分析感度では検出できないレベルで膜を介した物質移動が生じており、時間的（動的）もしくは局所的な構造変化を膜組成によって制御できると予想される。他方で、筆者らは角層細胞間脂質膜（SCLP）の配向構造と運動性がバリア性の鍵である事を電子スピン共鳴法（ESR）で明らかにしている^{9,10}。

3. PTDの界面科学的研究

筆者らは、膜を越えて直接細胞質に移行するC透過の現象を両親媒性物質である生体膜の相変化に関連する挙動として界面化学的に捉え、図2の構造を有するR8の膜透過性について検討を行った⁶。モデル膜として所定サイズの一重膜巨大リポソーム（GUV）を用いた。まず、モデル膜を構成するリン脂質水溶液にR8を混合した時の相状態変化（熱力学的平衡系）を観察し、R8がリン脂質2分子膜の曲率を正の方向に変化させることが分かった。つまり図3に示す構造転移が生じており、2分子膜の不安定化を誘起するこ

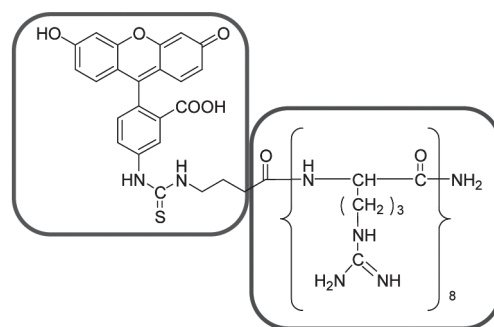


図2. FITC修飾アルギニン（Arg）8量体（R8）。左部分が修飾部（図はFITC）、右部分がR8

とが推測される。このような相転移現象を分子レベルで記述するため、充填パラメーター（CPP）という概念がある。CPPは無次元の数値であり、親水基頭部の有効表面積（ a ）、疎水基の鎖長（ l ）、および疎水基体積（ v ）を用いて下式で表される¹¹。

$$CPP = \frac{v}{a \cdot l}$$

ラメラ（ $L\alpha$ ）構造では $CPP \sim 1$ 、キュービック（ V_1 ）では $1/2 < CPP < 2/3$ 、ヘキサゴナル（ H_1 ）では $CPP \sim 1/2$ となる。このようにR8がもたらす正の曲率変化はCPPの低下と言い換えられ、CPPの式から有効表面積の増加が寄与していると考えられる。これは、膜を構成するリン脂質頭部の負電荷とR8アルギニン部位の正電荷が静電的相互作用を起こし、コンプレックスを作ることで高高い親水基を形成したためと推察される。

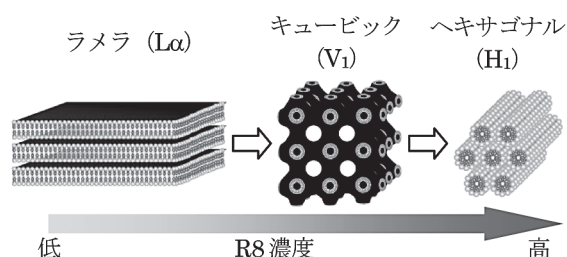


図3. 平衡系でのリン脂質が形成する自己組織体の構造転移

さらに、GUVを用いたR8の膜透過性を検証したところ、Hela細胞の実験¹²同様にR8の膜透過性が観察されたが、その透過量はバルク相の浸透圧に依存した。予想に反して、浸透圧の増加に伴いR8透過量は低下し、R8の透過性がGUV内外の液体移動に関係していないことが示唆された。また、事前にGUV中に内包したR8は浸透圧に関係なくバルクに漏洩しないことも明らかにされており、同一の膜を透過する場合でも膜の内外でR8の透過挙動は異なる。曲率の観点から述べると、浸透圧依存の結果と膜内外からの透過性の結果は一致している。GUVの外側から見ると、膜は

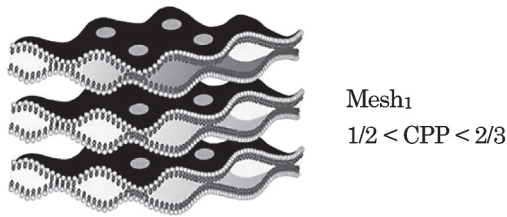


図4. メッシュ構造。二分子膜中に細孔（水色の楕円箇所）を形成し、その細孔を介して物質は膜の表裏に移動できる

バルク相に対して凸（正の曲率）となるが、一方で、内側からは凹（負の曲率）となる。浸透圧を低下した場合はGUVの内圧が上昇し、膜の曲率はより高くなる。これらから、R8の透過挙動には膜曲率の選択性があり、正の曲率（実際には非常に僅かな正の曲率）をもった膜にしか作用しないことが明らかにされている。

この透過挙動を解明するために、上記の構造相転移をヒントに仮説を立てた。低濃度のR8が膜表面に吸着した時、局所的にリン脂質のCPPは低下する。この時界面の曲率は一時的に増加し、図4に示すように二分子膜がピンスされたようなメッシュ構造（Mesh₁）を形成する。このメッシュ構造の存在は、界面科学的に実証されており¹³、一般に $1/2 < CPP < 2/3$ の範囲（キュービクと同一）で形成されることが知られている。このように形成された細孔がR8の透過経路として利用され、あたかも親水性R8が疎水性領域を透過したかのようにGUV内に移行すると推測される（図5）¹⁴。また、最近の研究からは、膜を構成するリン脂質の疎水鎖がエントロピー的にR8透過性を支配していることが示唆されており¹⁵、メッシュ構造形成機構と膜の弾性エネルギーとの関係解明を進めている。

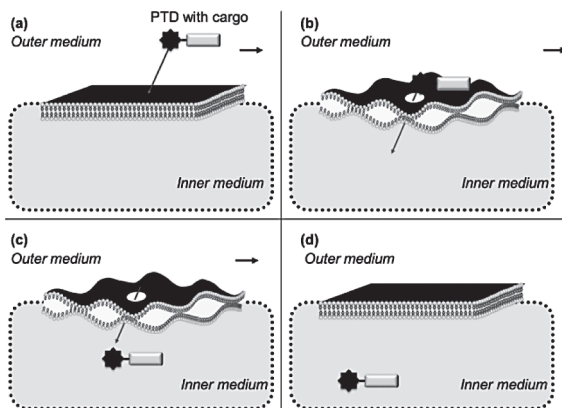


図5. PTDの膜透過機構。(a) PTDの膜表面吸着、(b) 細孔形成（メッシュ構造への転移）、(c) PTDの膜透過、(d) PTDの膜（リポソーム）内移行

4. 2分子膜構造制御に基づくTDDS設計

直接膜透過（C透過）と言う生命にとっては本来抑制すべき現象（生体膜のバリア機能喪失）が起こる原因を、コロイド界面科学の観点からせまる学際的アプローチを紹介してきた。その特徴は熱力学的に安定な平衡系では界面活性剤の幾何学構造（CPP）が自己組織体の曲率と全体構造を規定するとの考えを、生体膜とPTDとの相互作用による膜透過現象にあてはめる事にある。すなわち、現象論の吟味とその応用が主なために見過ごされてきたPTDの膜透過が「何故おこるか」を、PTDと生体膜の相互作用による動的・局所的な自己組織体の構造変化の現象と捉えることで、生体膜の構造と機能の本質の探索を目指すことが可能になる。さらに、この成果に基づきC透過およびE透過の選択およびそれぞれの透過性を制御する方法の開発に着手し、TDDSへの発展に貢献する。

具体的には、図6に示したロードマップに則って、研究を展開する。筆者らは、既にベースとなる現象を解明しつつあり、これまでに提言されなかった新しい仮説を立て、新規TDDSの確立に取り組む。第一に、SCLPの流動性に関する知見について議論する。経皮吸収を目的とした製剤には、膜の流動性を誘発する材料選定の必要性が認知されている。しかしながら、膜の流動性を誘起する物質は、一時的ではなく半永久的（平衡状態）に構造を変化させてしまう可能性がある。これはADをもたらし原因ともなり、当然ながら皮膚のバリア機能にとって好ましい状態ではない。“一時的”というキーワードがこの点で重要と思われる。ここで、第二ステップであるPTDの一過的现象に着目する。PTDは膜の揺動（perturbation）を引き起こすが、それ自身膜に留まらず、内部へ浸透していく。プロドラッグとしてPTDに標的薬物を積載すれば、表皮ないし真皮、さらには皮下組織への薬物送達を達成できることが期待される。PTDの曲率変化に基づいた経皮デリバリーシステムは皮膚本来のホメオスタシスを損なわず、薬物を皮内に届ける理想のデリバリーシステムと言える。

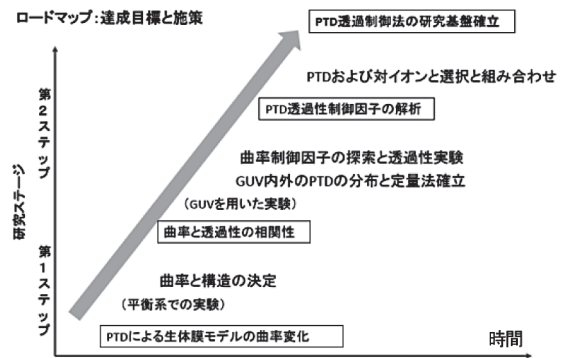


図6. 経皮ドラッグデリバリーへの展開目標と関連する研究課題の道程

5. おわりに

“平衡”、“非平衡”という物理化学でしばしば使用される言葉を多用してきたが、生体システムの恒常性維持（ホメオスタシス）の基本である動的定常性（非平衡挙動）を解明するために、平衡系の概念を取り入れてきた。非平衡現象を解明するにあたり、これまで培われた平衡系理論を展開できつつあることは研究レベルで新しい発見であり、未知の課題への礎になることが期待される。

本報は、ナノサイズの一分子膜に対して関係する界面科学の見解を適用し、平衡系理論に基づいて1つの生命現象の「なぜ」を解きほぐしてきた。さらに、その因果関係を利用して、類似の2分子膜構造を有する角層中のSCLPに発展し、予見として薬物送達システムの創製を見据えている。これらの一連の研究が各々散逸するのではなく、1つの新しい実用的成果として創出できればと思う。

謝辞

本研究の実施にあたりPTDをご提供頂きました京都大学化学研究所の二木史朗教授、ならびに本研究にご尽力頂きました東京理科大学理工学研究所の油井博士研究員に、感謝の意を申し上げます。最後に、研究全般にご支援下さいました東京理科大学理工学部の阿部正彦教授と酒井秀樹教授に御礼申し上げます。

引用文献

1. A.D.Frankel, *et al.*, *Cell* **55**, 1189 (1988)
2. M.Green, *et al.*, *Cell* **55**, 1179 (1988)
3. S. Futaki, *Adv Rev Drug Deliv.* **57**, 547 (2005)
4. P. M. Elias, *et al.*, *Semin. Dermatol.* **11**, 176 (1992)
5. K. Aburai, *et al.*, *J. Oleo Sci.* **60**, 197 (2011)
6. K. Sakamoto, *et al.*, *Chem. Lett.*, in press
7. M. Q. Man, *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* **128**, 79 (2008)
8. N. Loiseau, *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* **129**, S68 (2009)
9. J. Nakagawa, *et al.*, *Spectrochimica. Acta. Part A.* **63**, 816 (2006)
10. E. Yagi, *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* **127**, 895 (2007)
11. J.N. Israelachvili, *et al.*, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. II* **72**, 1525 (1976)
12. S. Futaki, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **276**, 5836 (2001)
13. S. Hyde, *et al.*, “*The Language of Shape (Chapter4)*” pp.141-176, Elsevier, Amsterdam (1997)
14. K. Sakamoto, *et al.*, ICAMN2011 keynote講演 Oct.23 (2011)
15. K. Sakamoto, *et al.*, ECIS 2012, P1:109, Sep.2-7 (2012)