

細胞間脂質モデル充填構造の解析および新規経皮薬物送達キャリアの開発

Analysis of Packing Structure of Intercellular Lipid Model and Development of Novel Transdermal Drug Delivery Carriers

令和5年度 論文博士申請者 寺山涼子 (Terayama, Suzuko)

皮膚は体外への水分の損失抑制およびウイルスや化学物質など外界からの刺激に対する防御を行う生体バリアとしての必要な役割を持っている。また皮膚を利用した薬物送達は経口投与や皮下注射に比べ非侵襲的であり、投与の容易さから患者の受容性が高いなどの利点がある。しかし薬物が皮膚のバリアを透過する必要があり、これが経皮薬物送達システム (Transdermal drug delivery system: TDDS) の課題となっている¹⁾。

皮膚のバリア機能の本体は角層の細胞間脂質であると考えられている。細胞間脂質の主成分はセラミド、遊離脂肪酸およびコレステロール (CHOL) であり、これらの成分がラメラ構造を形成しながら角層細胞の間を満たしている。またラメラ内の脂質の横方向の充填構造は、密で秩序ある orthorhombic 構造 (Ort)、密度が低く秩序ある hexagonal 構造 (Hex)、あるいは無秩序な liquid 相の三種の構造を取るとされており、バリア機能にはこれらの充填構造の状態が大きく関わっている。

すなわち経皮吸収型製剤の最適設計のためには皮膚バリア機能の理解を深め、製剤が角層脂質の構造に及ぼす影響を解明するこ

とが重要となる。しかし微量成分を含むヒトの細胞間脂質の脂質組成は複雑であるため、その特性の解明は非常に困難であった。そこでこれまでに角層の細胞間脂質を模倣したモデル (LM) が作られ、充填構造の研究に多く用いられてきた。またバリア機能克服のためにテルペンや脂肪酸、界面活性剤などの透過促進剤が提案され、それらの脂質への影響を調べるため透過促進剤に曝露した角層および LM の熱分析や X 線散乱による構造解析が行われてきたが、脂質への浸透促進剤の影響はいまだ完全な解明にはいたっていない²⁾。

本研究ではまず細胞間脂質を模したモデルを構築し、X 線回折およびラマンスペクトル解析により脂質組成比と脂質充填構造との関係を明らかにすることを試みた。さらに皮膚バリアに影響を与えない新規 TDDS キャリアの開発を目的として保湿成分および細胞間脂質成分からなるベシクルを作製し、皮膚透過試験および三次元培養表皮モデル (表皮モデル) のダメージ回復試験を通してその有用性を検討した。

1. 細胞間脂質モデル (LM) の作製と充填構造の評価³⁾

脂質の組成が充填構造に及ぼす働きを調べるため、セラミド ADS (CER)、パルミチン酸 (PA) および CHOL からなる LM および三種の脂質のうち単一成分を減少させた脂質減少モデルを作製した。示差走査熱量測定およびラマンスペクトル解析により脂質三成分あるいは二成分の共融混合物のドメインが存在するモデルができたことが確認された。また LM および脂質減少モデルの粉末 X 線回折 (PXRD) 測定により、流動性の指標となる充填構造内の Ort に対する Hex 比 ($R_{\text{Hex}/\text{Ort}}$) と LM 中

の CHOL 量との間に高い逆相関関係があることがわかった (図 1).

生体膜では CHOL が持つ硬いステロール骨格が膜透過性や流動性に影響を与えることが知られているが, LM においても CHOL が脂質の流動性に関与していると考えられた (図 2). これまでの研究で $R_{Hex/Ort}$ の増加が肌のバリア機能の乱れと相関することが知られており, CHOL が皮膚バリア機能に重要な役割を持つ可能性が示唆された.

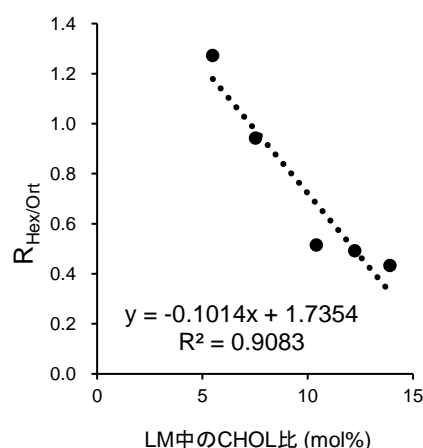


図 1 LM 中の CHOL 含有量と $R_{Hex/Ort}$ の逆相関関係.

さらに LM と表皮モデルに界面活性剤を添加し HPLC を用いて脂質溶出量を分析した結果, 両者の脂質溶出傾向は類似しており, LM が角層からの脂質溶出評価系として応用できる可能性が見出された. また界面活性剤による CHOL 流出量と LM の $R_{Hex/Ort}$ 値に高い相関性が見られたことから, $R_{Hex/Ort}$ 値の測定により界面活性剤の脂質溶出能の測定が簡便に行える可能性が示された.

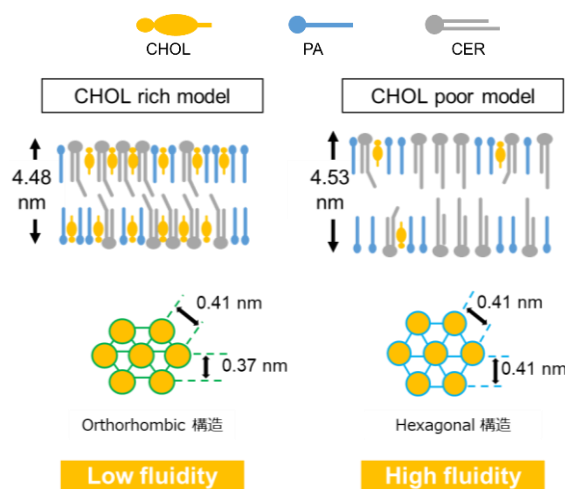


図 2 LM 中の CHOL 含有量と充填構造の模式図.

2. 新規 TDDS キャリアの開発⁴⁾

安全性の高い新規 TDDS キャリアの開発を目的として, 保湿剤成分として用いられる sodium dilaureamidoglutamide lysine (DLGL), mannosyl erythritol lipid-B (MEL-B) および細胞間脂質成分である CHOL をジプロピレングリコール (DPG) に分散

させベシクルを作製した。各サンプルの粒子径，多分散指数，ゼータ電位を測定し，5℃，室温および50℃で1か月保管したサンプルの安定性を評価した。その結果，DLGLおよびMEL-Bの混合物はミセルや巨大な多分散ベシクルを形成したが，CHOLの添加によって単分散ベシクルが生じた。さらに5℃および50℃での安定性に優れたDLGL:MEL-B:CHOL=1:2:1の配合比で調製したベシクル(DMC 121 vesicle)を透過電子顕微鏡で観察した結果，50-300 nmのマルチラメラベシクルの存在が確認された(図3)。また，ベシクル中のCHOL量を変化させた際のラマンスペクトルを測定した結果，CHOL量の増加に伴い膜構造の秩序を示す I_{2888}/I_{2852} 値が減少し，二重膜が流動的になっていることが明らかとなった。以上の

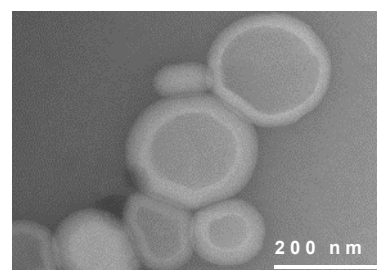


図3 DMC 121 vesicleの透過電子顕微鏡観察図。

ことからDLGLおよびMEL-Bが作る疎水性二重膜にCHOLが疎水性相互作用して流動性を向上させ，柔軟な二重膜を持つ安定な小粒子ベシクルを形成すると考えられた。

ベシクルの有用性を確認するため4-biphenylacetic acid (BAA)をモデル薬物としてヘアレスマウス皮膚を用いた皮膚透過試験を行った。その結果，BAAを含有したDMC 121 vesicle (DMC-BAA)の透過速度は 2.62 ± 0.35 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)であり，コントロールであるBAA含有DPG溶液(DPG-BAA)の透過速度 0.62 ± 0.08 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)の4倍以上となった(図4a)。またDMC 121 vesicleをLMに添加しPXRDおよびラマンスペクトル解析により充填構造に及ぼす影響を解析した結果，DMC 121 vesicleはDPGと比較しLM中の $R_{\text{Hex}/\text{O}_{\text{rt}}}$ 値およびゴーシュ構造の指標と

なる $I_{1097/(1062+1128)}$ 値を増加させた (図 4b, 4c). すなわち LM の流動性を増加させ脂質充填構造の秩序を乱す傾向にあった. 以上のことから, DMC 121 vesicle は角層の細胞間脂質に作用しその横方向の充填構造を乱して薬物の浸透を促進していると考えられた.

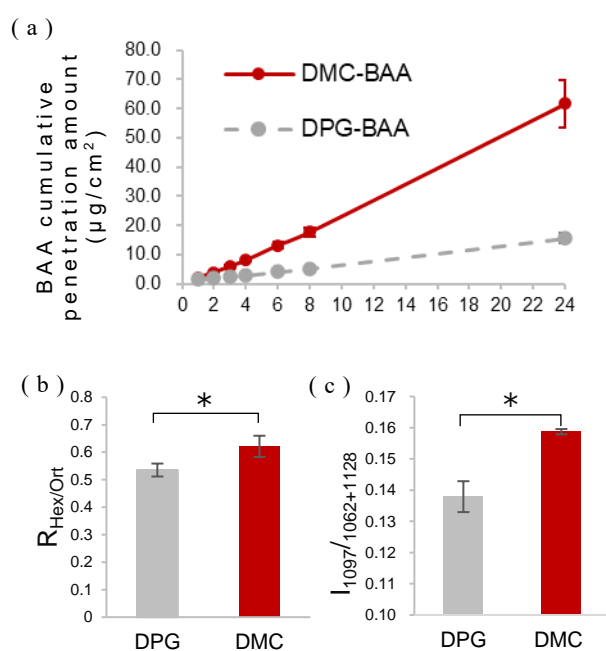


図 4 (a) DMC-BAA およびコントロールの皮膚透過試験の結果. (b) DMC 121 vesicle およびコントロールを添加した LM の $R_{Hex/Ort}$ 値 (c) $I_{1097/(1062+1128)}$ 値.

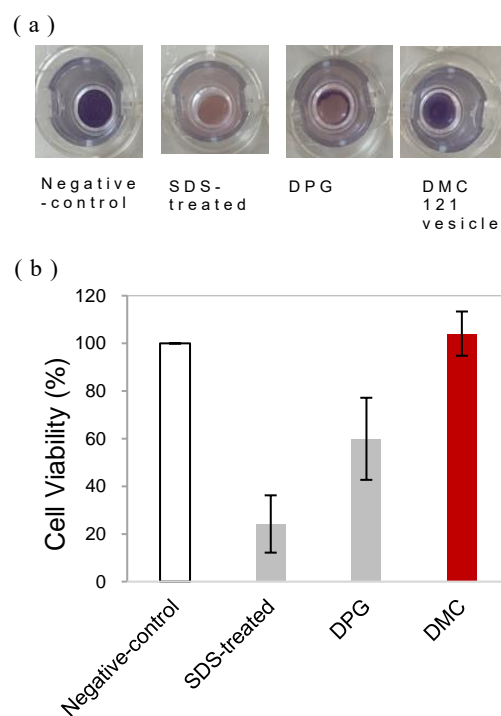


図 5 ダメージ皮膚に対する回復作用 (a) 外観 (b) 細胞生存率.

さらに DMC 121 vesicle の皮膚への作用を評価するため, ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で損傷させた表皮モデルにベシクルを添加し, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイにより算出した細胞生存率に基づいて皮膚バリア修復効果を評価した. その結果 DMC 121 vesicle を添加した細胞では SDS 処理を行わなかったネガティブコントロールと同程度の細胞生存率を示した (図 5).

以上の結果から DMC 121 vesicle は, 細胞間脂質の横方向の充填構造を乱す一方で, 化学的ダメージを与えた表皮モデルの細胞

死を防いだことがわかった。これは DMC 121 vesicle がセラミド様の構造を持つ MEL-B や細胞間脂質成分である CHOL を含むことなどから角層細胞間隙に容易に浸透し、ラメラ構造を形成しバリア機能を回復させたためではないかと推測される。

総括

本研究では皮膚刺激試験の代替となりうる LM を開発し、それを用いて皮膚バリア機能保全における CHOL の重要性に新たな知見を示した。さらに CHOL および保湿剤成分として用いられる原料から安定なマルチラメラベシクルを作製することに成功し、そのベシクルが薬物の皮膚透過性を向上させダメージ皮膚の細胞死の抑制機能を持つことを明らかにした。本研究で得られた知見は有効なドラッグデリバリーキャリアの開発への応用が期待できる。

《参考文献》

- 1) Pilgram G. S., Vissers D. C., Van der Meulen H., Pavel S., Lavrijsen S.P., Bouwstra J.A., Koerten H. K., *J. Invest Dermatol.*, **117**, 710–717 (2001).
- 2) Pham Q. D., Björklund S., Engblom J., Topgaard D., Sparr E., *J. Control. Release.*, **232**, 175-187 (2016).
- 3) Terayama S., Goto Y., Fukami T., *Chem. Eng. Sci.*, **259**, 117814 (2022).
- 4) Terayama S., Tamura R., Fukami T., *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **84**, 104499 (2023).