

## 温度応答性リポソームを用いた経皮吸収型キャリアの開発

## Development of Temperature-responsive Liposome for Transdermal Drug Delivery

○渡辺沙央里<sup>1</sup>、荒井美智子<sup>1</sup>、綾野絵理<sup>1</sup>、金澤秀子<sup>1</sup>、岡野光夫<sup>2</sup><sup>1</sup>慶應義塾大学薬学部、<sup>2</sup>東京女子医科大学Michiko ARAI, Saori WTANABE, Eri AYANO, Hideko KANAZAWA, Keio University  
Teruo OKANO, Tokyo Women's Medical University

**Abstract:** We prepared poly (*N*-isopropylacrylamide-co-*N*, *N*-dimethylaminopropylacrylamide) (PNIPAAm-co-DMAPAAm)-modified with the cationic liposomes prepared from 2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium Propane (DOTAP), and their temperature-dependent release behaviors were investigated. The enhancement of the drug release from the liposomes was observed above the lower critical solution temperature (LCST) of the copolymers. The fixed aqueous layer thickness (FALT) of PNIPAAm-co-DMAPAAm modified liposome increased at lower temperature than LCST, compared to that at higher temperature than LCST. The contents release behavior, surface properties, and cell affinity of these liposomes can be controlled in a temperature-dependent manner. In vitro permeability studies of liposome were conducted in a Franz diffusion cell. The results showed that the cationic liposomes had good stability, high entrapment efficacy, increased skin permeation. The PNIPAAm-co-DMAPAAm modified liposome will be efficacious carriers for the transdermal drug delivery.

**Key Words:** Temperature-responsive Liposome, Transdermal Drug Delivery, Poly (*N*-isopropylacrylamide), DOTAP

## 1. 目的

DDSは、血管内投与や経口投与を中心に発展してきたが、近年DDSという考え方が拡大し、経皮吸収システム、TTS製剤がDDSの一つと認識されるようになった。TTS製剤の利点は肝臓もしくは消化管での初回通過効果を回避できる、副作用に応じて投与中止が可能である、経口投与が困難な患者へ投薬が可能であり、注射等と比べて患者の負担が少ないなどが挙げられる。中でも皮膚親和性や安全性向上の理由から生体由来成分であるリン脂質を用いたリポソームが多く使用されている。リポソームは生体内の細胞膜と同じ二重膜構造を持ち、脂溶性薬物を膜内の疎水性部分に、水溶性薬物を内水相に封入することや、二重膜表面に荷電性物質や高分子などの修飾により、特定の性質を付与することが可能である。

また、当研究室ではこれまで温度応答性高分子であるpoly *N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm) をDDSキャリアへ応用し、温度により内封薬物の放出制御可能なインテリジェント型DDSナノキャリアを開発してきた。PNIPAAmは水中において下限臨界溶解温度 (LCST) である32℃を境に、低温側では高分子鎖は水和・進展しコイル状の構造を取り親水性、高温側では脱水和を生起し、疎水性相互作用により高分子鎖が凝集したグロビュール状態となり疎水性を示す物質で、この親水/疎水性の相変化は可逆的かつ鋭敏に起こる。このユニークな性質のため、PNIPAAmを修飾したリポソームはLCST以下の温度ではリポソーム膜表面に水和層を形成することでPEGと同様に安定化、また肝臓や脾臓といった細網内皮系による取り込みを回避し血中滞留性を向上させることが期待できる。更に、LCST以上の温度ではPEGとは異なり、PNIPAAmが脱水和することによりリポソーム膜表面が疎水性となり標的細胞への取り込み促進や内封薬物の迅速な放出が可能であると考えられる。この温度応答性高分子をリポソームに修飾する方法として、PNIPAAmの片末端のカルボキシ基を活性エステル化し、膜融合性脂質であるPhosphatidylethanolamine, Dioleoyl

(DOPE)の末端アミノ基と結合させることにより、温度応答性高分子をリポソームに導入することができる。

本研究では、温度応答性高分子を修飾した機能性リポソームの生体への応用を視野に入れ、LCSTを37℃以上に持つ温度応答性高分子を用いた機能性リポソームを作製し、経皮吸収型キャリアを開発した。そこで、リポソームの表面電化による皮膚透過性の違い、さらにリポソームに封入した抗酸化物質の安定性についても検討を行った。

## 2. 実験

[1] 温度応答性高分子のDDSキャリアへの応用：NIPAAmとカチオン性モノマーである*N*, *N*-dimethylaminopropylacrylamide (DMAPAAm)から成り、体温以上にLCSTを持つ温度応答性高分子poly (NIPAAm-co-DMAPAAm 3%) 設計・合成した。膜融合性脂質のDOPEとpoly (NIPAAm-co-DMAPAAm 3%)を結合させ、カチオン性脂質の1, 2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium Propane (DOTAP)に修飾することで温度応答性リポソームを作製した。

[2] 温度応答性リポソームの物性評価：Zetasizer Nano ZSにより、温度を変化させながら、リポソームの粒子径と表面電位を測定した。さらに、Zetasizerを用いて、作製したリポソームの固定水和層の厚み(FALT)を算出し、評価した。また、内封薬物の薬物放出率について測定した。

[3] 経皮透過性評価：ヌードマウスの皮膚を用い、皮膚透過率について評価した。Franz cellを用い、Donor側にリポソーム製剤を入れ、定時的にサンプリングし、透過実験を行った。内封薬物の蛍光強度によって透過率を算出し、評価した。

## 3. 結果・考察

[1] NIPAAmとDMAPAAmを共重合し、39℃のLCSTを持つpoly (NIPAAm-co-DMAPAAm)を合成した (Fig.)。この温度応答性高分子にアンカーとしてDOPEを結合し、脂質膜

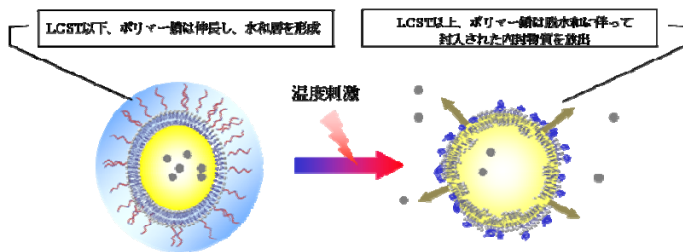


Fig.1 The image of temperature-responsive liposome

に組み込むことでリポソーム膜に温度応答性高分子を導入した。Extruder を用いたサイジングにより、粒子径が約 130nm、約 30 mV の表面電位を持つリポソームを作製した。また、リポソームの温度応答性を確認するために、25 °C ~45 °Cへ 2 °C ずつ温度を上昇させ、粒子径の変化を観察したところ、相転移温度付近(37 °C)において粒子径の増大が確認された (Fig. 2)。これは温度応答性高分子が LCST 以下の温度においては水和・伸展していることでリポソーム膜表面が水和層で覆われているため、リポソーム膜が安定化しているのに対し、LCST 以上の温度では高分子鎖の脱水和・収縮によりリポソーム膜表面の水和層が消失することによりリポソーム膜が不安定化し、リポソームが膨潤または凝集したために粒子径が増大したものと考えられる。

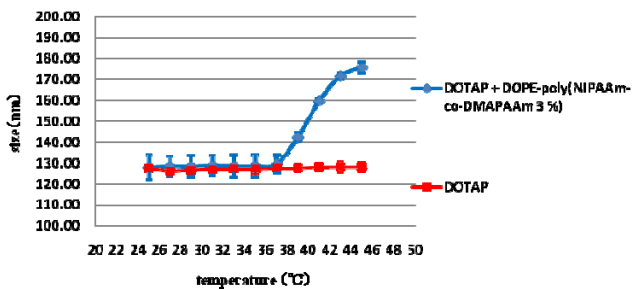


Fig.2 The particle size depend on temperature change in temperature-responsive liposome and unmodified liposome

[2] Zetasizer Nano ZS を用い修飾した DOPE-poly(NIPAAm-co-DMAAAm) 5 mol %により作製した固定水和層の厚さ FALT を測定した。ポリマー非修飾リポソームと比べ、ポリマーを修飾することにより FALT は増大した。また、DOPE-poly(NIPAAm-co-DMAAAm) の含有量を増やすことにより FALT も増加していく傾向が観察された。

[3] 温度応答性リポソームに 5-Carboxy Fluorescein (5-CF) を内封した。5-CF は PBS Buffer 中で解離し、カチオン性リポソームの脂質膜と結合しやすいため、高い封入率を得ることができた。また、薬物放出率を測定したところ LCST 以上において放出率が增大することを確認した。

[4] カチオン性リポソームとして DOTAP、中性リポソームとして Phosphatidylcholine (PC)、アニオン性リポソームは PC と Dihexadecyl phosphate (DCP)を PC:DCP=15:1 の組成比として、3 種類の異なるリポソームを作製し、各脂質組成による経皮吸収率の変化を観察するために、ヌードマウス皮膚と Franz cell (Fig.2) を用い皮膚透過実験を行った。

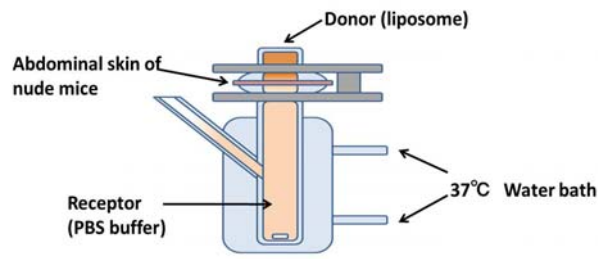


Fig.3 The experimental device

48 時間経皮透過実験後において、カチオン性 DOAP リポソームは、PC 及び PC/DCP リポソームより高い経皮吸収率を示した。

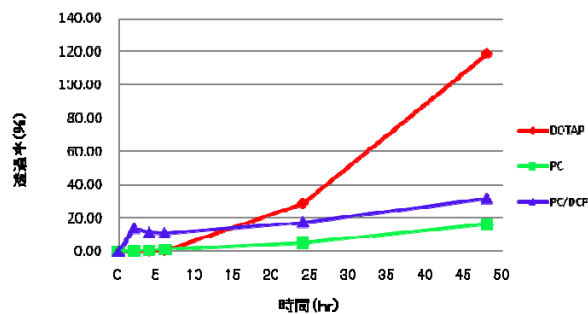


Fig. 4 The cumulative amount of Carboxylfluorescein penetrated through mouse skin *in vitro*.

#### 4. 結論

本研究では、39°Cに相転移温度持つ温度応答性リポソームを作製することができた。体温以上に相転移温度を設定できたことにより、生体への応用が可能なりポソームが作製できたと考えられる。ヒトの体温(37°C)では水和したポリマー鎖により膜表面は親水性となり、リポソーム膜は安定化する。ハイパーサーミアなどと併用することで標的部位がポリマーの LCST 以上の温度となり、リポソーム表面のポリマー膜が脱水和し疎水性となり、リポソーム膜の不安定化が誘起され、内封薬物の放出が起こると予想され、外部の温度刺激により内封物質を放出させる機能性キャリアの開発につながるものと示唆された。

さらに、今回の検討により、脂質と温度応答性高分子の最適混合比があり、温度応答性リポソームの膜安定性に大きく関与ことが考えられた。また、温度応答性リポソームの表面に荷電的な性質を持たせることにより、封入率に大きく影響を与えることが確認された。これらの結果より、本研究により新しい機構の皮膚透過促進法の構築が可能であると考えられる。今後、高分子設計やリポソームの脂質組成の検討により、経皮 DDS 製剤への更なる発展が期待される。

#### 参考文献

- (1) Yasuyuki Sadzuka et al., Yakugaku Zasshi, 125, 149-157(2005)
- (2) Vladimir P. Torchilin et al., Biochim. Biophys. Acta, 1195, 11-20, (1994)