

称号及び氏名	博士（工学） 山崎 奈穂子
学位授与の日付	平成 28 年 9 月 25 日
論文名	「化粧品への応用のためのシグナル応答性リポソーム の開発」
論文審査委員	主査 河野 健司 副査 久本 秀明 副査 長岡 勉 副査 松本 章一

論文要旨

近年、医療分野において注射や経口投与に代わる新しい薬物全身投与方法として経皮吸収製剤（Transdermal Therapeutic System : TTS）の開発に関心が寄せられてきた。一方で、化粧品の分野では、アンチエイジングの観点から、皮膚の状態を改善する手法が注目されている。皮膚は、生体と外界の境界線として存在し、外的環境から生体組織を守るため、恒常性を維持するための最大の臓器と考えられている。皮膚の最外層に存在する角質細胞（keratinocyte）は、細胞がレンガ塀のレンガのように整然と配列した階層構造をとり、その間に細胞間脂質が充填された構造をとっている。この強固な「ブロックモルタル構造」により、皮膚は、外部からのさまざまなアレルゲンや細菌の侵入を防ぎ、皮膚内からの水分蒸散を制御する「バリア機能」を発揮している。しかし一方で、そのバリア機能により、活性成分を外部から皮膚内部へと透過させることは難しく、それゆえ、さまざまな経皮吸収促進システムが検討されてきた。治療を目的とした医療分野では、局所治療では塗薬や貼付剤、全身の治療には口腔内崩壊錠や点鼻薬、ナノキャリアの開発が行われている。美容外科分野では、主にシミ、シワの改善を目的とした局所治療のため、イオントフォトレシス、エレクトロポレーション、マイクロニードルといった新しい経皮吸収システムの実用化検討や、経皮吸収の促進を目的としたナノキャリアや浸透促進物質を配合した医薬部外品や、化粧品の開発が検討されている。しかし、実際には、ビタミンや植物抽出液等の生理活性成分の経皮吸収は安全性や製剤安定性、また特殊なデバイスを要するなど使用性の観点から通常容易ではない。

近年、化粧品においてナノテクノロジーをはじめ新しい技術の発達により、それらの技術を

用いて、機能性の付与や使用性の向上が図られている。特にナノテクノロジーの化粧品への応用は、顔料・粉体の微粒子化、液晶乳化、リポソームを含めたナノカプセル製剤など多岐にわたっており、一部は新たな機能を持った製品として上市されている。古くから化粧品に利用されてきたリン脂質は、リポソームの主要構成成分であり、1964年 Bangham によって水溶液中において閉鎖型ベシクル（リポソーム）を形成することが報告されて以来、様々な研究がなされており、化粧品分野においても薬物送達システムとしての応用が期待されている。たとえば、活性酸素除去能に優れた薬剤を、皮膚内に深く浸透させ、メラノサイトなどの特定の皮膚細胞へ送り届けることができれば、メラニンの生成やシワの発生を防ぐことが期待できる。

化粧品におけるリポソームの有用性として、皮膚への保湿付与（水分蒸散抑制）とともに、浸透促進効果、皮膚滞留効果等の報告があり、一般的にリポソームの粒子径が小さいほど、皮膚浸透性が高いと考えられている。加えて、融合性や浸透性を高めるためには、膜流動性の高いリポソームが求められ、皮膚塗布後の水分蒸散抑制を考える場合には、内包する水性成分の保持のために膜流動性が低いリポソームが求められる。このように目的・用途によって、リポソームに求められる物性は様々である。しかし、化粧品は生理活性成分に加え、荷電物質、乳化剤や油剤、増粘剤、グリセリン等の多価アルコールといった数十種類の原料により構成されるため、それらとリポソームの相互作用により、製剤中での安定性が低下しやすい。たとえば荷電物質はリン脂質の加水分解に影響を与え、乳化剤は膜への吸脱着によるリポソーム膜の不安定化が起こるなど、リポソーム内に有効成分を保持した状態で皮膚へ効果的に浸透させることは困難であった。

この課題を解決する手段として、ポリエチレングリコール（PEG）の誘導体を用いて、リポソームの膜表面に水和層を形成させる技術が開発された。医薬品分野では、血中滞留性を高めるため、PEG 修飾リポソームや水溶性高分子修飾リポソームが検討されてきた。化粧品分野においても、PEG または水溶性高分子の修飾によって、製剤中の電解質成分との直接的な相互作用を抑制することができ、リポソームの安定性が飛躍的に向上した。

しかし、リポソームによる効果的な活性成分送達を実現するためには、安定性だけでなく内包成分の放出制御技術も求められる。化粧品が置かれる生活環境には、温度、湿度、紫外線等の様々な環境因子が存在する。さらに、皮膚細胞においては体温に加えて pH による影響も大きい。このような皮膚環境に応答して、内包成分を標的皮膚細胞へ直接作用させるための放出制御技術については、いまだ確立されていない。したがって、皮膚中の浸透性および貯留性を高めるだけでなく、皮膚内の目的の部位または標的細胞内で、最適なタイミングで内包した活性成分を放出できる放出制御技術がリポソーム製剤の有用性を高めるうえで重要である。

本論文では、化粧品への応用を指向したシグナル応答性リポソームの開発を目指し、角層浸

透性を高めたリポソームおよびアミノ酸の存在によって膜物性が変化するリポソーム、さらには機能性高分子および機能性脂質の新規合成を行い、温度及び pH に応じて物性を変化させるデュアル応答性リポソームの作製とその特性評価、及び皮膚細胞に対する相互作用について研究を行った。

第 1 章では、本論文の導入として、研究の背景と目的および本論文の概要について述べた。

第 2 章では、皮膚浸透に効果的なリン脂質の構造特性について検討を行った。ここでは、飽和度の異なるアシル基を有するリン脂質を用いてリポソームを作製し、その疎水基の微視的流動性と角層浸透性の相関について調べた。その結果、膜流動性が高いリン脂質は角層浸透性が高かったのに対し、膜流動性が低いリン脂質は角層浸透性が低く、皮膚表面にとどまることを確認した。さらに各リン脂質が角層細胞間脂質の膜流動性に与える影響を評価し、各リン脂質の疎水基部位の膜流動性と相関関係を見出した。一方で、アシル基に不飽和脂肪酸を有さず、膜流動性が低いリン脂質により構成されるリポソームは角層表面に貯留することが認められた。これらの結果は、リン脂質の角層浸透性と貯留性のコントロールに優れたリポソームの調製法として有用であることを示すものである。

第 3 章では、リポソームの微視的流動性と表面電荷がリポソームの刺激応答性に及ぼす影響について検討した。皮膚中に存在する天然保湿因子の一部であるアミノ酸は、溶液中において正負両方の電荷を持つ。そこで、リポソームの表面電荷をコントロールすることで、膜表面に存在するアミノ酸の持つ電荷との静電引力や静電反発により、膜物性が変化するリポソームを調製できると考え検討を行った。その結果、水素添加大豆リン脂質に酸性リン脂質を一定量含有させたリポソームが、内包成分の漏出促進に最も効果的であることを明らかにした。このリポソームは製剤中では安定であるが、皮膚表面ではアミノ酸の存在においてリポソーム膜の流動性がさらに高まり、水分蒸散を抑制して皮膚のバリア機能を高めるリポソームとして応用が期待できることを示した。

第 4 章では、リポソームの有効成分放出制御の観点から、温度および pH 刺激に応答するデュアル応答性リポソームの設計について検討した。エンドソーム内環境 (pH5 付近) で体温付近 (約 37°C) に相転移温度を有する温度及び pH 感受性高分子として、種々組成のメトキシジエチレングリコールメタクリレート (MD)、メタクリル酸 (MAA)、ラウロキシテトラエチレングリコールメタクリレート (LT) からなる poly(MD-MAA-LT) 共重合体を合成した。この共重合体で修飾したリポソームは、体温以下、中性 pH の環境では内包物を安定に保持するが、体温及び弱酸性環境において、共重合体が親水性から疎水性へと相転移することにより、急激に内包物の放出を引き起こすことを見出した。さらに、このリポソームはメラニンを生成する B16-F10 メラノーマ細胞に効率よく取り込まれ、エンドソーム内で有効成分の放出を促進する

ことを明らかにした。poly(MD-MAA-LT)共重合体組成の最適化を通して、リポソームの内包物放出温度及びpHを制御することができる高感度デュアル応答性リポソームの構築を実現した。

第5章では、poly(MD-MAA-LT)修飾リポソームと細胞との相互作用に及ぼす共重合体の分子構造の影響について検討した。共重合体水溶液の透過率の温度変化を様々なpHにおいて測定し、それらの曇点を決定し、さらに示差走査熱量測定によって共重合体の相転移挙動を明らかにした。続いて気液界面での π -A曲線測定により脂質膜と共重合体との相互作用について評価した。さらに共重合体修飾リポソームの抗ガン剤キャリアとしての応用を検討するため、ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞におけるリポソームの挙動を観察した。その結果、共重合体の組成を変化させ、オキシエチレンユニットの水和状態とカルボキシ基のイオン化状態のバランスを調整することで相転移挙動を制御できることがわかった。さらに加温下において細胞内への取り込みや内包物放出挙動の促進が認められたことから、本リポソームが局所加温製剤として応用できる可能性が示された。

第6章では、pH刺激に応答する新しい脂質として、カルボキシ基を有するpH応答性フィトステロールエステルを合成した。この脂質を含有するリポソームは、カルボキシ基のプロトン化とリン脂質の相転移温度に依存してpHおよび温度応答性を示し、内放物の放出が制御されることがわかった。さらに、このリポソームは同量のフィトステロールを含有したリポソームと比較してB16-F10メラノーマ細胞内への取り込みは抑制されるが、エンドソーム内では内包物の放出を促進することを明らかにした。さらに本脂質の含有によりリポソームの内包物保持能が向上したことから、高感度応答性および製剤安定性に優れたリポソームの構築を実現した。

第7章では、本論文で得られた結論の総括を行った。

審査結果の要旨

本論文では、化粧品の有効成分を標的皮膚細胞に作用させるための機能性リポソームとして、様々な皮膚環境のシグナルに応答性を示す機能性リポソームの設計と評価に関する研究成果をまとめたものであり、次のような成果を得ている。

- (1) 飽和度の異なるアシル基を有するリン脂質を用いてリポソームを作製し、その疎水基の微視的流動性と角層浸透性の相関について調べ、膜流動性が高いリン脂質は角層浸透性

が高かったのに対し、膜流動性が低いリン脂質は角層浸透性が低く、皮膚表面に留まることを明らかにした。このリポソームが、リン脂質の角層浸透性と貯留性をコントロールする化粧品として有用であることを明らかにした。

- (2) 皮膚中に存在する天然保湿因子であるアミノ酸に応答性を示すリポソームとして、水素添加大豆レシチンと酸性リン脂質ホスファチジン酸からなるリポソームを開発した。このリポソームでは、中性アミノ酸や塩基性アミノ酸の存在下において、内包物の放出が抑制されるが、酸性アミノ酸の存在下において内包物質の放出が著しく促進されることを明らかにした。
- (3) 皮膚表面と皮膚深部における温度と **pH** の違いを認識して皮膚深部の標的細胞内部で内包物質を放出するデュアルシグナル応答性リポソームとして、温度と **pH** に応答性を示す共重合体で修飾したリポソームを開発した。このリポソームの機能性化粧品としての有用性を明らかにした。
- (4) 温度と **pH** に応答性を示す共重合体と脂質膜との相互作用の解析によって、デュアルシグナル応答性リポソームの内包物質放出機構を解明した。また、このリポソームの薬物送達システムとしての有用性を明らかにした。
- (5) **pH** 刺激に応答する新しい脂質として、カルボキシル基を有する種々の **pH** 応答性フィトステロール誘導体を合成し、これらをゲル液晶転移を示すリン脂質と混合することで **pH** と温度に応答するデュアルシグナル応答性リポソームを開発した。このリポソームはフィトステロール誘導体とリン脂質を用いることから安全性が高く、化粧品への応用が可能な機能性リポソームとして有用である。

以上の諸成果は、化粧品への応用のための機能性リポソームの開発と実用化のための基盤となるものであり、化粧品技術の向上に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。