

# 紫外線応答型リポソームの膜融合性を用いた送達システムの開発

奈良工業高等専門学校物質化学工学科

宇田 亮子

Liposomes are microscopic spheroidal capsules composed of phospholipids, and they have been extensively used as drug nano-carriers. Ideal drug delivery systems contain interacting groups that can respond to environmental stimuli. Light can be remotely applied with high spatial and temporal precision and we have therefore designed a triphenylmethane derivative as a photoresponsive amphiphile which undergoes photoionization to become an amphiphilic compound consisting of a hydrophilic triphenylmethyl cationic head group and a hydrophobic long alkyl chain tail. Under dark conditions, the head group of the triphenylmethane derivative is less polar than after irradiation, and it is thus sufficiently lipophilic to be solubilized in the lipid membrane. We have found that photoionization of the triphenylmethane derivative induced fusion between liposome membranes. Fusion between lipid membranes is one of the most important events in living cells for fertilization, cell fusion, endo- and exocytosis, reconstruction of damaged organelles, and cell division. The purpose of this work is to prepare photofusogenic liposomes containing the triphenylmethane derivative and to investigate the liposomes for transdermal delivery sensitive to UVB light. The liposomes encapsulating calcein were prepared for characterization. The encapsulation efficiency and photoinduced release were evaluated from the fluorescence of calcein. The morphology of the liposomes was observed by using transmission electron microscopy. The morphological changes in the liposomes indicated that UVB irradiation induced fusion between the liposomes. NR assay using HaCaT cells showed that the triphenylmethane derivative in the liposomes was almost noncytotoxic up to a concentration of 220  $\mu$ M. From the observation of LabCyte EPI-Model treated with the liposomes encapsulating calcein, liposomes were permeated into the human skin model. We also found that the UVB irradiation promoted the permeation of the liposomes.

## 1. 緒言

リポソームは、リン脂質二分子膜から成る数十 nm ~ 数  $\mu$ m の大きさの閉鎖小胞体である。化粧品製剤またはドラッグキャリアとして盛んに開発が進められており、リポソームの更なる多機能化が望まれている。ところで膜融合は、リポソームを細胞に作用させる際の重要な現象であり、エンドサイトーシスといった細胞現象とも関係し、内包薬剤を細胞質内に導入させるための重要な役割を果たしている。しかし元来脂質二分子膜は安定であり、膜融合性を持たせるためにタンパク質やペプチドをリポソームに付与すると、それによりリポソーム自身が不安定化してしまうという矛盾が生じる。そこで必要となるのは、標的膜と相互作用するまで安定性を保つ仕組みである。本研究では、外部刺激として紫外線に反応するトリフェニルメタン誘導体を用い光照射でリポソームに膜融合性を誘起させ、このリポソームを用いた照射細胞への薬物送達を行うことを目的とした。過度に紫外線を浴びると表皮はダメージを受け、肌の健康は損なわれてしまう。本研究では、紫外線に反応し薬剤や有効成分を表皮の細胞に届ける仕組みづくりを目指すこと

とした。

これまでに我々は、暗時では脂溶性であるが紫外光照射によってカチオン性界面活性剤となるトリフェニルメタン誘導体 (Fig. 1) を開発し、この分子を脂質膜に僅かに加えるだけで光融合性をリポソームに付与できることを明らかにしている<sup>1)</sup>。トリフェニルメタン誘導体は親水基がかさ高い界面活性剤となるため、膜融合の中間体安定化に有利な構造を持つと言える<sup>2)</sup>。そこで本研究では、このトリフ

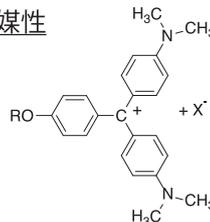
トリフェニルメタン誘導体

疎水性

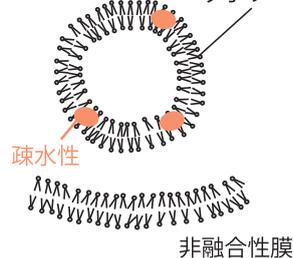


UV ↓

両親媒性



トリフェニルメタン誘導体含有リポソーム



UV ↓



Fig. 1 トリフェニルメタン誘導体の光イオン化反応と膜融合



Development of photofusogenic liposomes for delivery system

Ryoko Uda

Department of Chemical Engineering,  
National Institute of Technology, Nara  
College

フェニルメタン誘導体を経皮リポソームに展開し、基礎物性評価に加えて送達システムへの展開を検討した。

## 2. 方法

### 2.1. リポソームの調製

リン脂質に非イオン性界面活性剤を加えた経皮性リポソームが報告されており<sup>3)</sup>、この報告を基に本研究のリポソームを調製した。まず卵黄レシチン(最終濃度0.112M)、Tween(最終濃度13.1g/L)、トリフェニルメタン誘導体を含む薄膜を作製した。これにPBS緩衝液(pH7.4)を加えて懸濁させ、超音波処理を行い、孔径100nmのフィルターを装着したエクストルーダーを用いた処理を経てリポソームを調製した。内包や放出実験には、200 $\mu$ Mカルセインを含むPBS緩衝液を用いて調製し、透析によって内包されなかった物質を除去した。内包率は、透析後のリポソーム50 $\mu$ Lに950 $\mu$ LのPBSと界面活性剤であるdodecyl trimethyl ammonium chlorideを0.2g加えて完全にリポソームを破壊させ、カルセインの515nmにおける蛍光強度から算出した。測定は独立して調整した3つのリポソームについて行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。ただしトリフェニルメタン誘導体の割合が高く調製が困難であったリポソームに関しては、1回分のデータを示した。

### 2.2. 細胞毒性試験

ヒト表皮角化細胞(HaCaT)は、Dulbecco's Modified Eagle Mediumに10%の牛胎児血清とペニシリン、ストレプトマイシンを添加した培地を用い、炭酸インキュベーター(37 $^{\circ}$ C、炭酸濃度5.0%)において培養した。HaCaT細胞に対するサンプルの細胞毒性をNeutral red(NR)取込み法によって評価した。96well細胞培養プレートにHaCaT細胞を $2 \times 10^4$  cells/wellの細胞密度で播種し、炭酸インキュベーターで培養を行った。約24時間後、2.1.で得られたリポソームを含む培地に交換し曝露培養を行った。陰性対照群には、10% PBSと0.1% DMSOを含む培地を添加した。24時間後、細胞から培地をアスピレーターで除去し、100 $\mu$ LのPBSで1回リンスし33 $\mu$ g/mLのNRを含む培地100 $\mu$ Lを添加した。炭酸インキュベーターで2時間培養を行い、生細胞にNRを取り込ませた。100 $\mu$ LのPBSで2回リンスし、NR抽出液(1%酢酸を含む50%エタノール水溶液)を100 $\mu$ Lずつwellに添加して室温で20分間振盪し、生細胞に取り込まれたNRを抽出した。抽出液の570nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定して、陰性対照群の細胞生存率を100%とした場合の各試料濃度での細胞生存率を以下の式で求めた。独立した6回の試験を行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

$$\text{細胞生存率(\%)} = \left[ \frac{\text{(試料添加群でのOD}_{570})}{\text{(陰性対照群でのOD}_{570})} \right] \times 100$$

### 2.3. リポソームへの紫外光照射

光源にはUVB(312nm BLX UV tubes, コスモバイオ)を用いた。UVBの照射強度はトプコンUVR-3036/S2を用い305nmにて評価した。調整したリポソーム懸濁液800 $\mu$ LにUVBを照射し、そのリポソーム懸濁液を700 $\mu$ Lを取り出しこれを内液とし、3mLのPBSを外液として25 $^{\circ}$ Cの恒温槽にて透析を17時間行った。その後外液の515nmにおけるカルセインの蛍光強度から次に従いカルセインの放出率を測定した。測定は独立して調整した3つのリポソームについて行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

$$\text{放出率(\%)} = \left[ \frac{\text{(外液中のカルセイン量)}}{\text{(内液のリポソームに含有されたカルセイン量)}} \right] \times 100$$

### 2.4. クライオ透過電子顕微鏡観察

調製したリポソームをPBSで10倍に希釈したものをサンプルとした。紫外光照射サンプルには、307mJ/cm<sup>2</sup>のUVBを照射した。クライオ透過電子顕微鏡(JEOL-JEM 2200FS)観察は奈良先端科学技術大学院大学にて実施した。

### 2.5. 3次元皮膚モデルを用いた浸透試験

3次元皮膚モデルにはLabCyte EPI-MODEL24(J-TEC社製)を用いた。ガラスバイアルにマグネチックスターラーとPBSを19.0mLを入れて培養カップごと皮膚モデルを装着した。32 $^{\circ}$ Cで30分間馴化した後、角層面に2.1.で作製した100 $\mu$ Lのリポソーム懸濁液またはカルセイン溶液(濃度はリポソーム内包量に相当)を曝露し32 $^{\circ}$ Cで4時間静置した。その後マイクロピペットでサンプルを除去し、UVB(312nm BLX UV tubes, コスモバイオ)を50mJ/cm<sup>2</sup>を照射した。その後PBSを20 $\mu$ L添加し、32 $^{\circ}$ Cで4時間静置してからPBSで10回洗浄し、培養カップから3次元皮膚モデルを取り出して蛍光顕微鏡にて角層面の観察を行った。また3次元皮膚モデル切片蛍光顕微鏡観察も行った。この3次元皮膚モデル1枚に対してPBS 1.0mLを添加して超音波ホモジナイザーでホモジナイズし、暗所で1時間振とうし、遠心分離を行い上清を回収した。上清200 $\mu$ Lをブラックプレートに移して、蛍光(Excitation: 485/20, Emission: 528/20)を測定しカルセイン濃度を求めた。

## 3. 結果と考察

### 3.1. リポソームの基礎物性

Fig. 2に含有トリフェニルメタン誘導体濃度を変化させた場合のカルセイン内包率を示す。レシチンに対するトリフェニルメタン誘導体濃度が4mol%以下では内包率にほとんど違いはないが、この濃度を超えると内包率は著しく低下した。また、4mol%を超える濃度のトリフェニルメ

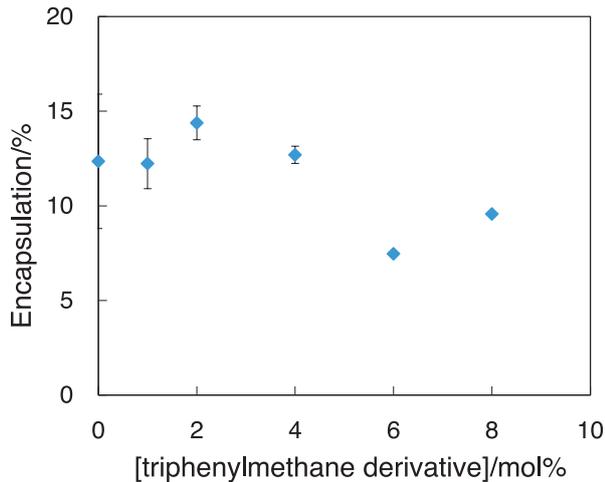


Fig. 2 リポソーム内包率のトリフェニルメタン誘導体濃度依存性  
レシチンに対するモル濃度で表記.

タン誘導体を含むリポソームは調整しにくく、内包率算出に至ったリポソームは少なかった。トリフェニルメタン誘導体は暗時では脂溶性物質であるため、リポソーム二分子膜に溶解させる必要がある。トリフェニルメタン誘導体の量が増えると、二分子膜中に収容しきれなくなりリポソーム構造を保つことが困難になったのではないかと考えられる。またこれまでの我々の研究から、膜融合に最適なトリフェニルメタン誘導体濃度は2mol%程度であることを明らかにしている<sup>2)</sup>。そこで以降の実験では、トリフェニルメタン誘導体濃度はレシチンに対して2mol%のリポソームを用いることとした。

次にリポソームを透過型電子顕微鏡にて観察したところ、直径が数十～数百nmの球状リポソームが観察された (Fig. 3)。加えてFig. 3に矢印で示すような、球の一部が窪んだまたは扁平形状のリポソームも観られた。一般的なリポソームは剛直であるが、経皮性リポソームには角層を通過するための弾力性や柔軟性が不可欠である。そのためFig. 3のような変形したリポソームが観られたと考えられる。

作製したリポソームの生体適合性について調べるため、HaCaT細胞を用いた細胞毒性評価を行った。リポソーム自体の細胞毒性は低いと考えられるが、光応答性をもたらすトリフェニルメタン誘導体の評価が必要である。そこで比較のために、トリフェニルメタン誘導体を1%のDMSOを含むPBS緩衝液に溶解させたサンプルについても試験を行った。HaCaT細胞の生存率をFig. 4に示す。1% DMSO溶液中ではトリフェニルメタン誘導体濃度4.5 $\mu$ Mの時にHaCaT細胞の生存率は90%であったが、リポソーム中ではトリフェニルメタン誘導体濃度22 $\mu$ Mの時に99%となった。トリフェニルメタン誘導体の細胞毒性はリポソームに含有されることで軽減され、本研究で作製したリポソームの細胞毒性はトリフェニルメタン誘導体濃度

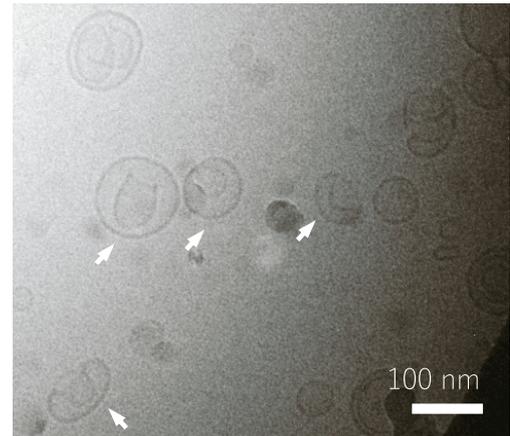


Fig. 3 調整したリポソームの cryo-TEM 像  
矢印は変形したものを示す.

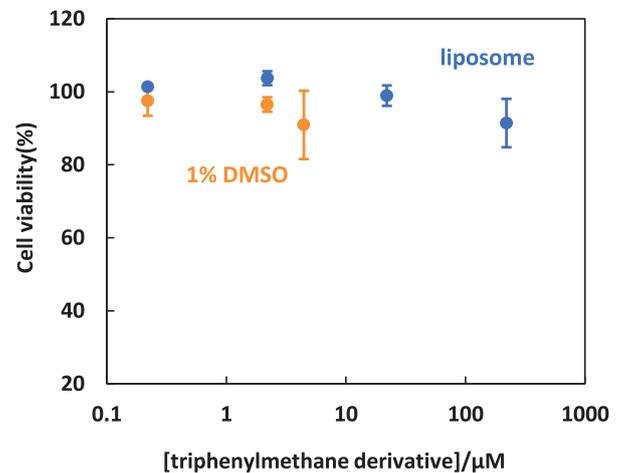


Fig. 4 トリフェニルメタン誘導体曝露時の HaCaT 細胞生存率

220 $\mu$ M以下では無視できる程度であることが分かった。

### 3. 2. 紫外光照射によるリポソームの変化

作製したリポソームの光化学反応について調べるために、UVB照射後の吸収スペクトルを測定した (Fig. 5)。積算光量が増加するとともに450nmと620nm付近の吸収ピーク強度が増大している。これらのピークはイオン化したトリフェニルメタン誘導体由来しており<sup>4)</sup>、UVB照射によってトリフェニルメタン誘導体のイオン化反応が促進したことが分かった。

次に内包したカルセインの紫外光照射による放出について検討した。Fig. 6に積算光量に対する放出率依存性を示す。UVB未照射でもリポソームからカルセインが漏出していることが分かる。UVB照射により放出率は増加したが、102mJ/cm<sup>2</sup>以上で放出率が飽和しており、これ以上照射を行っても放出されるカルセイン量にほとんど違いがないことが分かる。この結果はFig. 5の光イオン化反応が

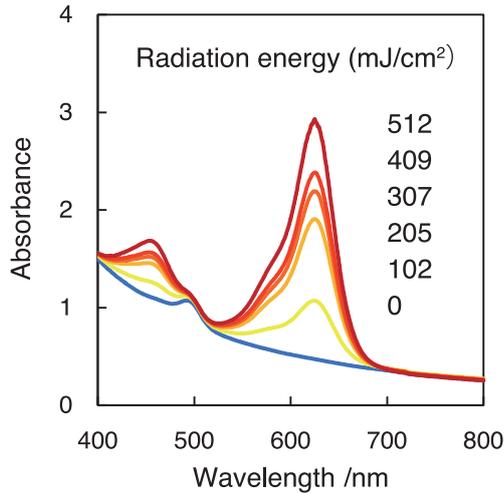


Fig. 5 UVB 照射によるリポソームの吸収スペクトル変化

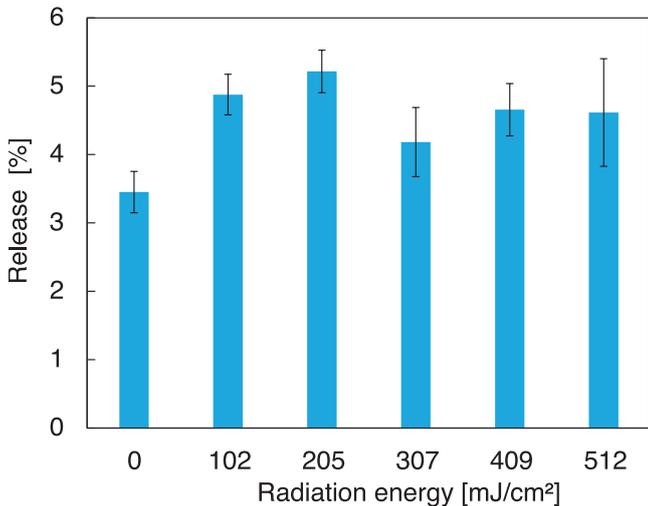


Fig. 6 UVB 照射によるリポソームからの内包カルセインの放出

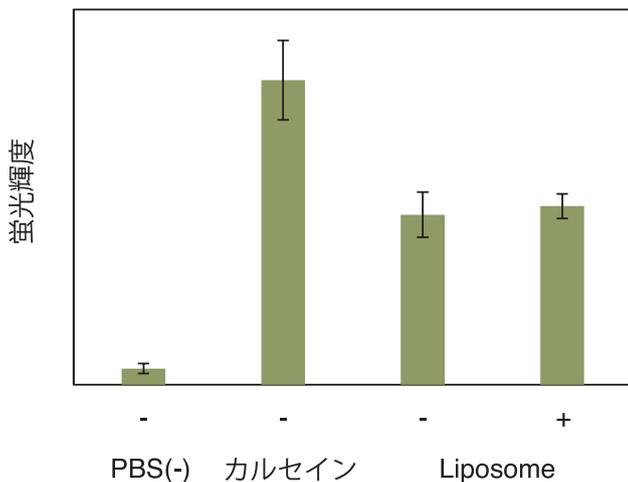


Fig. 8 3次元皮膚モデル角層面の蛍光強度

積算光量に対して明確な依存性を見せたのと対照的である。307mJ/cm<sup>2</sup>のUVBを照射したリポソームのクライオ電子顕微鏡像をFig. 7に示す。Fig. 3のUVB未照射時に比べると、リポソームサイズが大きくなっていることが分かる。以前我々は、トリフェニルメタン誘導体への紫外光照射が引き起こす膜融合とそれに伴うリポソームのマルチラメラ化や粒子径の増大を報告している<sup>5)</sup>。また膜融合時には内包試薬の放出は僅かであることも明らかとした。つまりこれらの結果から、光イオン化反応が促進されているにもかかわらず内包物があまり放出されないのは、膜融合が起こっているためと考えられた。

### 3. 3. 3次元皮膚モデルを用いたカルセイン内包リポソームの浸透試験

カルセイン内包リポソームを曝露させた3次元皮膚モデルの角層面蛍光強度をFig. 8に示す。リポソーム懸濁液よりカルセイン溶液を曝露した時の方が、カルセイン由来の蛍光強度が高くなっていることが分かる。またリポソーム懸濁液にUVBを照射しても3次元皮膚モデル内のカルセイン濃度に変化は観られなかった。そこで3次元皮膚モデル内のカルセイン濃度を調べた(Fig. 9)。Fig. 8と類

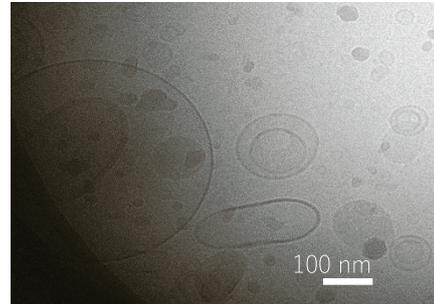


Fig. 7 UVB 照射後のリポソームの cryo-TEM 像

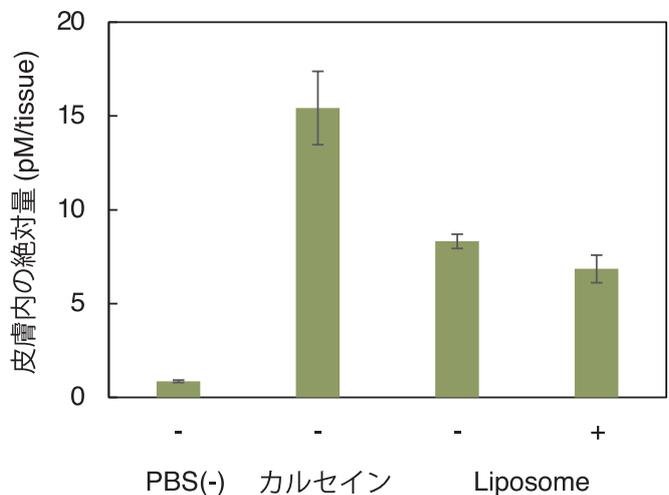


Fig. 9 3次元皮膚モデル内のカルセイン濃度

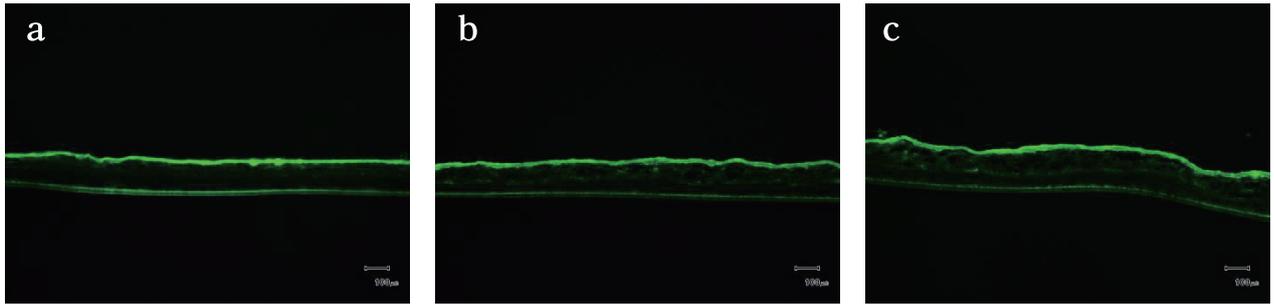


Fig. 10 3次元皮膚モデル切片の蛍光顕微鏡像  
a) カルセイン溶液曝露、b) カルセイン内包リポソーム曝露、c) カルセイン内包リポソーム曝露後 UVB を照射

似した結果となり、リポソームやUVB照射の効果は観られなかった。表面に存在するカルセインの影響を受けているためではないかと考え、3次元皮膚モデルの切片観察を行った。カルセイン溶液のみを曝露した場合 (Fig. 10a) は、Fig. 8・9の結果と対応するように3次元皮膚モデル表面に強い蛍光が観察されたが、内部への浸透はあまり観られなかった。それに対し、リポソーム懸濁液を曝露した場合 (Fig. 10b) は3次元皮膚モデル内部でも蛍光が観察された。これより Fig. 3の結果から示される弾力性や柔軟性をもった本研究のリポソームは、3次元皮膚モデルへの浸透性に優れていることが明らかとなった。さらにUVB照射を行った皮膚モデルにおいてはより深部でも蛍光が確認できた (Fig. 10c)。つまり Fig. 8にてカルセイン溶液曝露の蛍光が強く観察されたのは表面に吸着したカルセインに由来しており、リポソームを用いた方が3次元皮膚モデル内部への送達が促されること、さらにUVB照射によってその送達が促進されることが示された。

#### 4. 総括

本研究では、紫外光応答型経皮用製剤としての融合性リポソームの開発を目指し、トリフェニルメタン誘導体を含むリポソームを作製しその評価を行った。リポソームには、内包薬剤の皮膚透過を制御し、皮膚中に比較的高濃度で薬剤を留める働きがある。必要となるまでは皮膚の細胞間に薬剤を留めておき外部刺激を受けて薬剤を細胞に届けるリポソームには、医薬品に加えて医薬部外品や化粧品への展開が期待できる。今後は、本研究の紫外線応答型融合性リポソームを更に進展させコスメトロジーの発展に貢献したい。

#### 謝辞

本研究の実施にあたりご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く御礼申し上げます。

#### (引用文献)

- 1) K. Hayashi, M. Watanabe, T. Iwasaki, M. Shudou, R. M. Uda, Endosomal escape by photo-activated fusion of liposomes containing a malachite green derivative: A novel class of photoresponsive liposomes for drug delivery vehicles, *Photochemical & Photobiological Science* 18, 1471-1478 (2019).
- 2) R. M. Uda, Y. Yoshikawa, M. Kitaba, N. Nishimoto, Irradiation-induced fusion between giant vesicles and photoresponsive large unilamellar vesicles containing malachite green derivative, *Colloids and Surfaces B*, 167, 544-549 (2018).
- 3) Y.-K. Song, C.-K. Kim, Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes, *Biomaterials* 27, 271-280 (2006).
- 4) R. M. Uda, M. Oue, K. Kimura, Effective photocontrol of micelle formation by malachite green derivative carrying a long alkyl chain, *Chemistry Letters*, 33, 586-587 (2004).
- 5) R. M. Uda, E. Hiraishi, R. Ohnishi, Y. Nakahara, K. Kimura, Morphological changes in vesicles and release of an encapsulated compound triggered by a photoresponsive malachite green leuconitrile derivative, *Langmuir*, 26, 5444-5450 (2010).