

## Abstract

In the field of transdermal and topical drug delivery, vesicles have gained high interest in the past few decades. Vesicles could be used as a model skin membrane, *e.g.* stratum corneum lipid liposomes (SCLs), as well as drug delivery carriers, *e.g.* liposomes and niosomes. In the present study, these applications of vesicles were investigated.

In the first chapter, SCLs were prepared to serve as a model stratum corneum (SC) intercellular lipid to evaluate the effect of chemical penetration enhancers (CPEs) on the barrier function of SC lipid. A fluorescent probe; sodium fluorescein (FL) was entrapped in SCLs for investigation of the FL leakage from SCLs. Also, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH), *N,N,N*-trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenyl-ammonium *p*-toluenesulfonate (TMA-DPH) or 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt (ANS) were separately entrapped in SCLs for the measurement of SCL membrane fluidity. The preliminary study was performed using ethanol as a model CPE. The relationship between the conventional animal assay (skin permeation/ skin impedance test) on hairless rat skin and the test based on SCLs (FL leakage and SCL membrane fluidity test) was evaluated. Fair correlations were obtained from the increase in enhancement ratio (*ER*) of caffeine permeation with FL leakage and SCLs membrane fluidity measured using ANS probe with  $R^2$  of 0.8882 and 0.8993, respectively. FL leakage and SCLs membrane fluidity test measured using DPH probe were also performed with various types and concentrations of well-known CPEs. An effective concentration for promoting 10% FL leakage and increase in SCLs membrane fluidity ( $EC_{10, \text{leakage}}$  and  $EC_{10, \text{fluidity}}$ ) were calculated by interpolation from their concentration profiles. The lipophilic CPEs tends to exhibit lower  $EC_{10, \text{leakage}}$  and  $EC_{10, \text{fluidity}}$  than hydrophilic CPEs. In addition, the relationship between FL leakage and SCLs membrane fluidity were classified into five categories depending on the action on SCLs. This method using SCL as a model SC intercellular lipid could be utilized in investigating the effects of CPE on SC as an alternative high-throughput screening (HTS) technique in contrast to conventional animal testing.

In the second chapter, components of vesicles having high skin penetration-enhancing effect was selected to formulate new penetration-enhancing vesicles. The screening of phospholipids and non-ionic surfactants was performed using diffusion cell array system and abdominal skin of hairless rat. Caffeine was used as a hydrophilic model drug. The results showed a significant increase in *ER* from 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC),

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (DPPG), Brij 30, Span 20, Tween 20, Tween 40 and Tween 60, compared to the control solution. The liposomes and niosomes prepared from varying compositions influenced particle size, transition temperature, entrapment efficiency and zeta potential. The vesicles exhibiting high *ER* were DPPG, 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DLPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) liposomes and Span 20, Tween 85 niosomes. In addition, two kinds of experiments were done to clarify the possible mechanism of liposomes as follows: the excised skin was pretreated for 1 h with caffeine-free phospholipid dispersions and liposomes, and caffeine solution was added to determine its skin permeation. Separately, caffeine permeation experiments were done using physical mixture of blank liposomes and caffeine solution (caffeine-spiked liposomes) and caffeine-entrapped liposomes (caffeine was entrapped only in liposomes). As a result, DPPG was found to be a promising phospholipid candidate to develop liposome formulations since it could significantly enhance the skin permeation of caffeine as in the pretreatment experiments. In addition, DPPG liposomes could carry both non-entrapped and entrapped caffeine through the skin. Thus, selecting the compositions of liposomes and niosomes is a crucial factor to consider in improving the skin penetration of drugs from the drug delivery carriers.

## 論文審査の結果の要旨

Pajaree Sakdiset 氏から提出された論文「Potential of Vesicles to Optimize Topically Applied Formulations with Enhanced Skin Penetration of Drugs」は、リポソームやニオソームといったベシクルを薬物の皮膚適用に利用する研究に関するものである。本論文は、2つの章から構成されており、第1章では、経皮吸収における化学吸収促進剤 (Chemical penetration enhancer: CPE) のスクリーニングにおいて、ヒト角層脂質を用いて調製したリポソーム (Stratum corneum lipid liposome: SCLL) が、従来の動物の摘出皮膚を用いたスクリーニング系の代替えとなり得るかを評価している。第2章では、ベシクル自体を皮膚適用に用いるキャリア、もしくは透過促進剤としての機能を検討している。

第1章において、まず、ラット摘出皮膚における水溶性モデル薬物のカフェインの皮膚透過性は、CPEとして添加したエタノール量の増加に伴い上昇している。一方、スフィンゴ脂質類、コレステロール類、長鎖脂肪酸類から作成した SCLL に種々の蛍光プローブを包含させたものは、エタノール添加比率の増大に伴い、SCLL からの蛍光プローブの漏出と SCLL の膜流動性が増加している。以上の結果から、いずれも CPE として添加したエタノール量と正の相関を示した、ラット摘出皮膚におけるカフェインの透過性と、SCLL からの蛍光プローブの漏出性、SCLL の膜流動性との間に良好な相関が確認されている。すなわち、SCLL が皮膚代替品として利用できる可能性を示している。しかしながら、CPE としてはエタノールのみ、モデル薬物としてはカフェインのみから得られた結果であり、皮膚モデルとして普遍性、汎用性があるとまでは結論できないが、薬物皮膚透過性の新規 High-throughput screening (HTS) 系構築の足がかりを提示できたことは大いに評価できる。また、膜流動性に関しては、リポソームの外膜表面に局在する蛍光プローブ 8-anilino-1-naphthalensulfonic acid (ANS) が特に高い相関を示しており、これは、エタノールがリポソーム外膜表面の親水基に作用してリポソームを崩壊させることに起因すると考察している。本研究ではリポソームの特定部位に局在する他の蛍光プローブも用いていることから、エタノールとは作用機序が異なる CPE についても、SCLL による薬物皮膚透過性予測への利用が期待できる。ここまでの研究成果は、すでに *Journal of Pharmaceutics* (2017) に掲載されており、その内容の新規性、有用性は十分なものであると認められる。

さらに第1章では、約 30 種類の CPE について、先に構築した SCLL を用いた HTS 系への適応を試みている。その結果、各種 CPE の添加比率を増加させた際の SCLL からの蛍光プローブ漏出性と SCLL 膜流動性の相関プロファイルから、CPE を A~E の5つのカテゴリーに分類している。カテゴリーAは、膜流動性を上げてかつ漏出性を上げる CPE で、いくつかの非イオン性界面活性剤と脂肪酸およびその誘導体などが含まれる。カテゴリーBは、膜流動性は上げるがさほど漏出性は上がらない CPE で、主に疎水性の非イオン性界面活性剤とアニオン性界面活性剤が含まれる。カテゴリーCは、低濃度ではカテゴリーBと類似の挙動を示すが高濃度では急激に漏出性を高める CPE で、多くの非イオン性界面活性剤が含まれる。カテゴリーDは、SCLL を構成する脂質の疎水性側鎖の流動性には影響を与えずに漏出性を高める CPE で、アルコール類、グリコール類が含まれる。カテゴリーEは SCLL に影響を及ぼさない CPE である。以上のように、各カテゴリーの特性は CPE の物性からある程度説明することができ、薬物皮膚透過性に及ぼす CPE の効果の促進メカニズムについても推測できることを示している。本研究において SCLL の膜流動性を測定する際に用いた蛍光プローブは、SCLL の脂質二重膜の疎水性

側鎖に局在する 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene のみであり、ANS など極性部位に局在するプローブを用いた場合の流動性の情報が加わると、より正確な予測モデルとなり得ると考えられる。また、各カテゴリーを代表する CPE について、SCLL 系とラット摘出皮膚モデルにおける薬物透過性の相関を確認することが、SCLL 系による CPE の HTS をより汎用性の高いものにするためには必要であろう。以上のように、本研究により CPE の HTS の可能性とその実用化に向けた道筋が示されたことは、その新規性ならびに薬物経皮吸収分野への波及効果を鑑みて高く評価できる。ここまでの研究成果は、すでに *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (2017) に掲載されており、その内容の新規性、有用性は十分なものであると認められる。

第 2 章では、リポソーム、ニオソームといったベシクル自体に、薬物皮膚適用におけるキャリアあるいは透過促進剤としての機能を有するかを検討している。10 種類のリン脂質から作成したリポソームと、11 種類の非イオン性界面活性剤から作成したニオソームについて、ヘアレスラットの腹部皮膚を用いた拡散セル法によって、水溶性モデル薬物カフェインの皮膚透過性を評価している。その結果、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) を単に分散させた場合の薬物透過性は、コントロール溶液に比べて 1.93 倍の上昇であったが、リポソーム化した DPPG に薬物を包含した場合の薬物透過性は 5.43 倍にまで上昇している。同様に、1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DLPC)、1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) もリポソーム化することにより、薬物透過性を向上させている。一方、薬物透過性に影響を与えないものや、リポソーム化することにより薬物透過性を低下させるリン脂質も見られた。非イオン性界面活性剤においては、Span 20 や Tween 85 が単純分散およびニオソーム化で薬物透過性の向上を示している。本研究では、作成した各種リポソーム、ニオソームの相転移温度、封入効率、粒径、多分散指数値、ゼータ電位を測定しているが、各種ベシクルによる薬物透過性の変容を説明できるまでには至っていない。しかしながら、ベシクルの堅牢性や、ベシクルを構成する脂質と薬物の相互作用が関与する可能性があると考えられている。本研究では、特に顕著な薬物透過性を示した DPPG リポソームについて、その作用メカニズムを検討している。DPPG 自体が角質層のバリア機能を低下させることが、要因の一つであるとしている。これまでの薬物経皮吸収研究分野において、リポソームやニオソームといったベシクルと従来の製剤との比較研究はなされていたが、ベシクルの構成脂質の種類における比較は本研究により初めて検討されている。本研究では、リン脂質、非イオン性界面活性剤の多くが薬物皮膚透過性を向上させること、また、その種類により透過性に相違が見られることを見出している。特に、DPPG、DLPC、DMPC はリポソーム化することにより、更に薬物皮膚透過性が向上することを見出している。現在、ベシクル製剤の利用に関して新たな視点で研究を進め、ベシクル製剤の有用性の一端を見出した本内容を論文としてまとめ、*Chemical and Pharmaceutical Bulletin* に投稿準備中とのことであり、本章の新規性、有用性、また完成度は高く評価できるものである。

全体を通じて、モデル薬物がカフェインのみであるということで、断片的であるということ是否定できないが、実験計画はよく設定されており、得られた結果は経皮吸収型製剤の開発研究分野において極めて意義深く、内容も新規性および創造性に富んでいると判断される。また、論文の内容に関する質問等に関しても明確かつ詳細な説明がなされ、学識、見識の高さも窺えた。以上のことから、本論文は博士（薬科学）の論文として十分価値のあるものと判断した。