

化粧品としてのヒアルロン酸およびその誘導体の物性と 生理的安全性に関する研究

千葉大学大学院薬学研究院

戸井田 敏彦

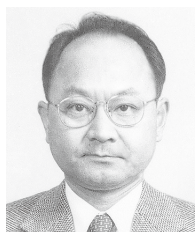
Hyaluronan (HA) is a non-sulfated glycosaminoglycan (GAG) that plays an important biological and physiological role in normal and pathogenic states. The physiological function of HA is highly dependent on its molecular weight (MW). As a normal constituent of the extracellular matrix (ECM), and in its native form, HA exists as a high MW polysaccharide, typically in excess of 106 Da, where it is associated with the structural fluid dynamic, homeostasis and maintenance of tissue connective tissue integrity. In biological fluids such as blood or lymph, or at sites of inflammation or disease, the molecular weight of HA is often significantly lower. Both intermediate (200–500 kDa) and smaller MW HA (<20 kDa) are involved in cellular processes, in particular as signaling molecules for angiogenesis, induction of inflammatory gene expression, wound repair, cell proliferation and migration. These processes are important in inflammation and tumor invasion. On the other hand, hyaluronan is very popular as one of cosmetic materials based on its physiological and physical property, however, the physical and chemical stability of hyaluronan which is used as cosmetics and/or functional food is still unclear. The objective of this work is: 1) to obtain the knowledge of the physical stability of hyaluronan under several pH conditions by using polyacrylamide electrophoresis (PAGE), capillary electrophoresis (CE) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy; 2) to investigate its physiological safety by orally administration to rats. We have found that the chemical stability of HA and the oral availability of hyaluronan by the grant. Interestingly, orally administered HA is existing as a complex with plasma proteins in blood circulation. The metabolic fate and function of the orally administered HA will be investigated in detail in the near future.

1. 緒言

グリコサミノグリカン (GAG) はヘキソサミン (D-グルコサミン (GlcN), D-ガラクトサミン (GalN)) とウロン酸 (D-グルクロン酸 (GlcA), L-イズロン酸) または D-ガラクトースとの二糖の繰り返し構造からなる、分子量数千から数万の枝分かれのない直鎖の酸性多糖類である¹⁾。GAG はその構成糖の種類や硫酸化修飾の部位、程度により、コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸 (HS)、ヘパリン (HP)、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸 (HA) に分類される²⁾。HA を除く GAG はコアタンパク質に結合したプロテオグリカン (PG) として生合成され、生体内に広く存在し、組織中の水分保持、イオン代謝を担っている。また、細胞外では細胞接着に関わるタンパク質とともに細胞外マトリックスと呼ばれる複合体を形成し、中枢神経系組織の発達および維持に関わり、細胞表面や細胞内では、各種細胞増殖因子と相互作用して、構造維持、細胞接着、細胞運動性、発生、血液凝固など、多くの生命現象に関わると考えられている³⁻⁵⁾。そのため

GAG を用いた新しい医薬品の創製、および化粧品も含めた生体工学への応用が期待されている。

HA はウシの眼球の硝子体成分として 1934 年 Karl Meyer 博士により発見され⁶⁾、皮膚、軟骨、腱、筋肉、血管、脳など広範囲に存在している⁷⁾。その構造は GlcA と N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が β-1, 3 結合した二糖の繰り返し構造を有し、硫酸基を含まず、タンパク質に結合していない遊離の多糖として、細胞膜で合成されるといって他の GAG とは一線を画す。HA はきわめて単純な構造であるにも関わらず、さまざまな HA 結合タンパク質や PG との相互作用を有することで免疫細胞の接着や細胞内シグナル伝達活性化など幅広い生物活性を示す⁸⁻¹⁰⁾。生体に存在する HA は分子量が 60 万～100 万と極めて大きく、高度に水和された分子として存在する。HA が溶液中で大量の水と水和する現象は、関節における潤滑剤やショック吸収剤として働くのに役立つ極めて特徴的な物理的性質である¹¹⁾。さらに HA はコラーゲン、フィブロネクチン、プロテオグリカンとともに細胞外マトリックスを構築するほか、特異的な受容体 CD44 を介して細胞の移動などを制御していることが知られている¹²⁾。また臨床面において HA は眼科手術補助剤や変形性関節症の治療薬として有用性が認められている^{13,14)}。最近では、腫瘍細胞の増殖や炎症反応への関与が認められており¹⁵⁾、医療現場での実用化への期待が高まっている。さらに近年、化粧品や洗髪剤にヒアルロン酸を含む製品が市販されている他、食用ヒアルロン酸の作用も注目されている。しかし、HA の



Study on physical property and physiological safety of hyaluronan and its derivatives as cosmetic materials

Toshihiko Toida

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

体内動態, すなわち腸管吸収の可能性および代謝経路などは未だ不明な点が多く, 実際に経口投与した HA の薬理的效果は定かでない。

現在, 米国 NIH (国立健康研究所) によって, グルコサミンおよびコンドイチン硫酸の経口投与と関節炎治療に関する大規模な臨床試験が実施されており近々吸収, 効果に関して明確な結論が出されるものとして期待されている¹⁶⁾。さらに, 生体内における GAG の生理活性とその機能が注目されており, 特に食用ヒアルロン酸などが健康食品として広く普及していることから, 経口投与した GAG の吸収に関する解明が必要であると考えられる。また, これまで GAG の体内動態を調べるため, GAG 分析を目的とした前処理法も検討されてきた。従来法である CPC 沈殿法は煩雑な操作に熟練を要し, 長時間を必要とする難点があった。

そこで本研究では, さまざまな条件下で一定期間 HA を保存し, その安定性を明らかにするとともに, 当研究室で新たに確立された限外濾過膜を用いた前処理法を用いて HA の体内動態を明らかにすることを目的とし, ヒアルロン酸を経口投与したラットの血清中 HA の定量を行った。

2. 実験

2-1 試料および試薬

① HA 標準品

HA (*Streptococcus zooepidemicus* 由来) は, 平均分子量 20,000 および 80,000 の試料を紀文フードケミファ株式会社から購入した。

②その他の試薬

試薬はすべて市販の特級品を使用した。水はミリポア超純粋装置により得られた精製水を用いた。

③実験動物

メスの 7 週令 Balb/c マウスを購入し, 1 週間予備飼育して実験に用いた。

2-2 装置および測定条件

①核磁気共鳴 (NMR) 装置

NMR 装置は JEOL JNM-ECP600 を使用した。¹H-NMR の化学シフト値は, トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウムのピーク ($\delta, 0$ ppm) を基準として示した。

②キャピラリー電気泳動 (CE)

キャピラリー電気泳動装置は Beckman 製 P/ACE 5010 (UV detector 装備) を使用した。キャピラリーはジェールサイエンス社製ヒューズドシリカカラム (75 mm i.d., 375 mm o.d.) を用いた。システムコントロールには Compaq 社製コンピュータ, プログラムは Beckman P/ACE Station ver.1.0 を用いた。

③ HA の HPLC 分析

血液中の HA の定量には, ヒアルロニダーゼにより分解して生成する不飽和二糖 (Δ Di-HA) をカーボンカラムを装着したポストカラム HPLC で分離定量した。血液試料の前処理は分子量分画用限外ろ過膜を装着した遠心チューブを用いて行った。

3. 結果

3-1 酸・塩基性条件下での HA の安定性

Table 1 に示す条件に従って HA を保存し, 保存 1 週間後, 2 週間後, 4 週間後, 8 週間後, 12 週間後に回収し, 凍結乾燥を行った。HA の保存濃度は 1000 ppm とした。

以下の図中では, Condition (保存条件) を C, 保存週を W と略し, Condition 1 で 1 週間保存したものを 1WC1 などと記載する。

3-2 ¹H-NMR による構造解析

各条件下にて一定期間保存した場合の HA のコンフォメーション変化を観察するため, 標準品の NMR スペクトルを Fig. 1 に, 保存 1 週目の Condition 1 ~ 6 の NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。保存温度によるスペクトルの変化は認められなかったが, 酸性条件である Condition 3 および 6 では標準品のスペクトルと比較し, 大きな変化が認められた。

また, Condition 3 におけるスペクトルの経時的変化を Fig. 3 に示す。保存 1 週目以降にスペクトルの変化が認められないことが確認できる。

また, Condition 3 においてみられたスペクトルの変化が, より緩和な酸性条件でも認められるかどうかを確認するため, Condition 7, 8 にて保存 1 週目の ¹H-NMR を測定した。その結果を Fig. 4 に示す。

3-3 キャピラリー電気泳動 (CE) による分子量測定

HA を各条件下にて一定期間保存した場合の分子量分布の変化を観察するため, CE によって分析を行った。分離は Normal polarity, 検出は UV200nm にて行った。Fig. 5 に標準品, Fig. 6 に保存 1 週目の Condition 1 ~ 6, Fig. 7 に NMR スペクトルに変化が認められた Condition 3 の CE 分析結果を, それぞれの NMR スペクトルと対比させて示す。CE 分析結果は再現性を考慮し n=3 で行った。標準品と比較すると, いずれのピークも分子量分布が広がっているものの, 保存条件による変化は明確には観察されなかった。

3-4 ゲル電気泳動による分子量測定

分子量分布の変化をより詳細に検討するため, ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。ゲル濃度は

Table1 Conditions of HA preservation.

pH	11	7	3	5
RT	Condition 1	Condition 2	Condition 3	Condition 7
4°C	Condition 4	Condition 5	Condition 6	Condition 8

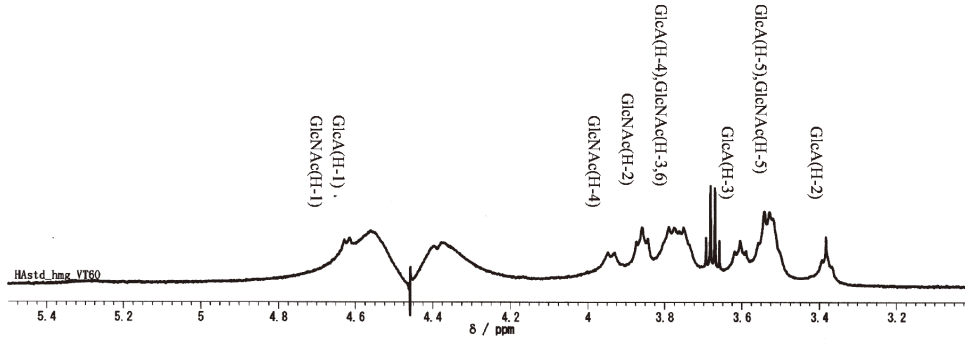


Fig.1 NMR spectrum of an HA standard.

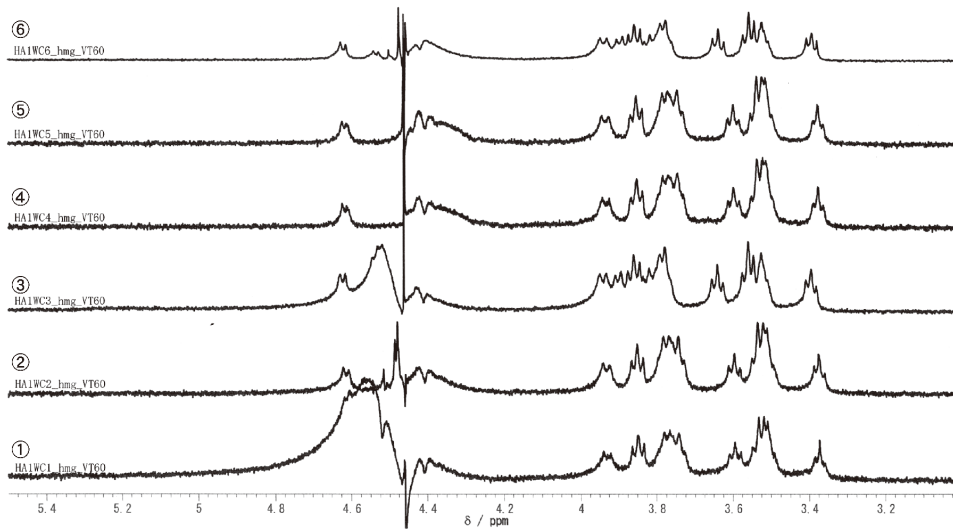


Fig.2 NMR spectra of HA in each condition.

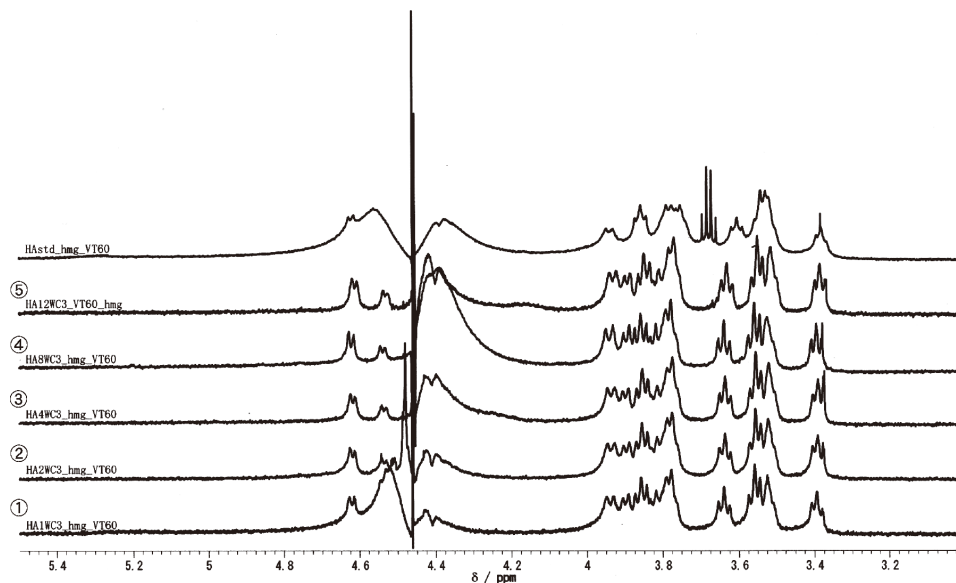


Fig.3 NMR spectra of HA in condition 3.

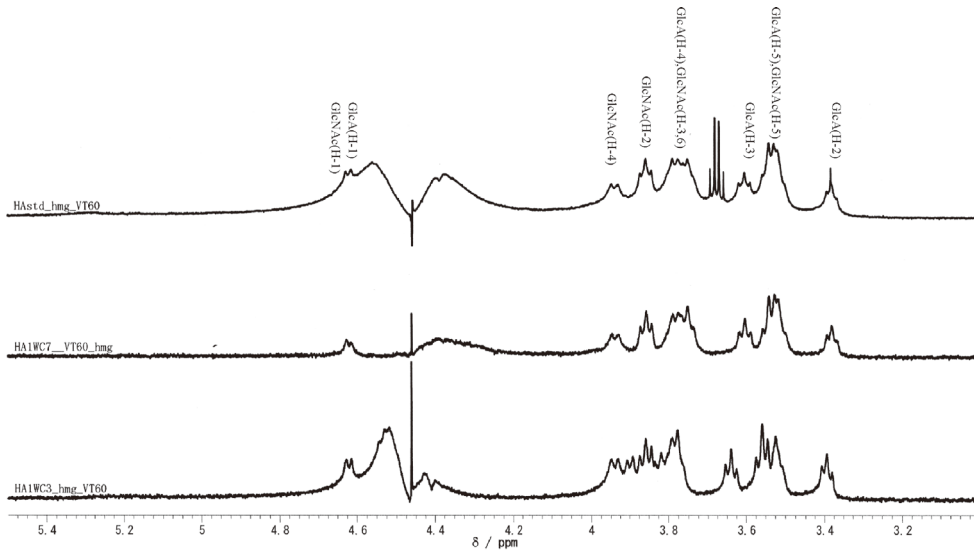


Fig.4 NMR spectra of HA.

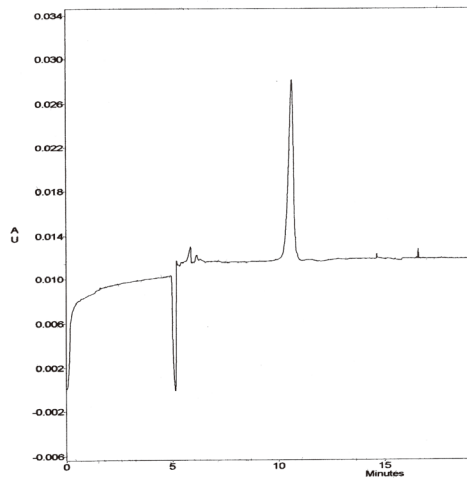


Fig.5 Capillary electropherogram of an HA standard.

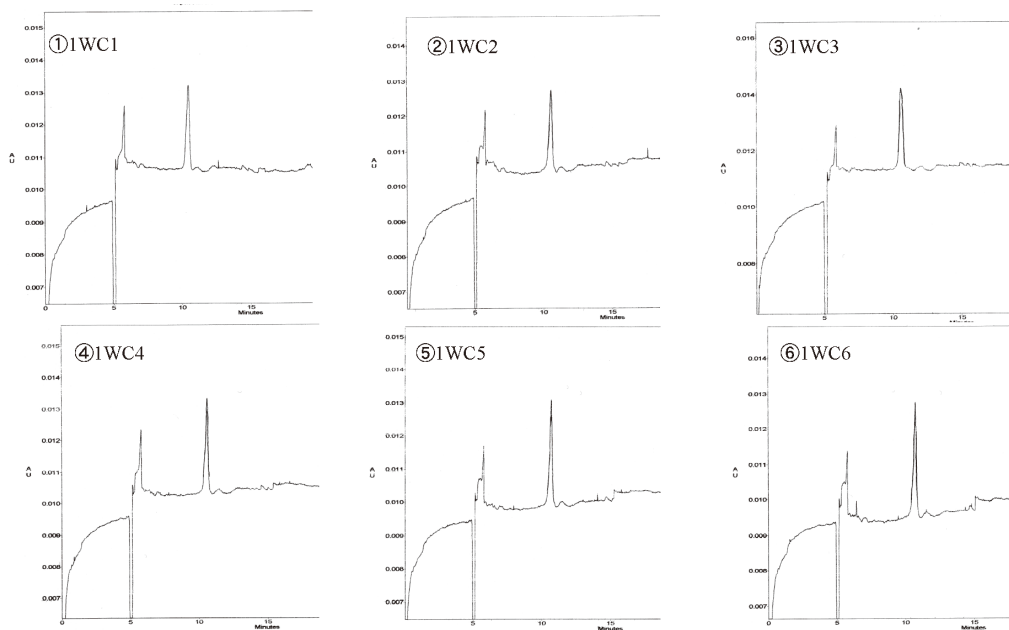


Fig.6 Capillary electropherogram of HA in each condition.

12.5%ゲルを用い、0.005% Stains-all in 50% EtOHで染色した結果をFig. 8に示す。中性で保存したものは標準品と同様の分子量分布を示したが、アルカリ性、中性、酸性の保存条件の違いにより、分子量分布は変化することが確認された。

また、アルカリ性および酸性条件にて保存したHAは濃縮ゾーンを通過しにくいという特徴が見られたため、試料のpH調整を行い、すべて中性条件で電気泳動を行ったが、変化は認められなかった。

3-5 経口投与したHAの血液中存在状態

HAの経口吸収の有無を明らかにするため、雄性 ddY マウス6週齢に対してHA 250 mg/kg (body weight)を単回経口投与し、5, 15, 30, 60, 120, 240分後に大静脈より採血を行った。HAは本来血漿中に僅かしか存在していないことが知られている。そこで、HA投与前後で血中HA濃度の挙動を分析することによって血中への吸収を観察した。消化管吸収の際の消化管膜通過を考慮し、比較的低分子量の20kDaのHAを用いて投与実験を行った。採取

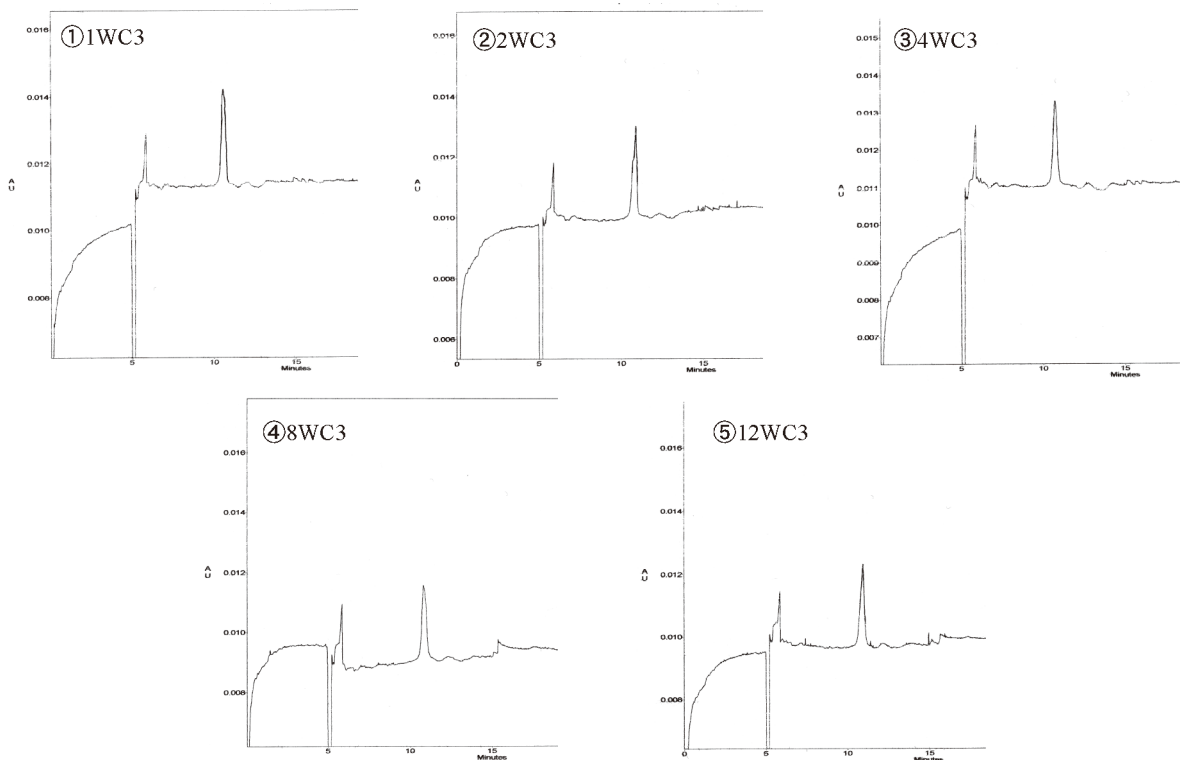


Fig.7 Capillary electropherogram of HA in condition 3.



Electric current; 30 mA,
Polyacrylamide gel concentration; 12.5%,
Load volume; ①5 μg, ②-⑨10 μg,
Staining; 0.005% stains-all in 50% EtOH.

- ① HA STD
- ② 4WC1
- ③ 4WC2
- ④ 4WC3
- ⑤ 4WC4
- ⑥ 4WC5
- ⑦ 4WC6
- ⑧メチルエステル化HA
- ⑨不完全メチルエステル化HA

Fig.8 SDS-PAGE patterns of HA in each condition.

した血漿は限外濾過膜を用いて前処理し、コンドロイチナーゼ ABC で特異的に分解される不飽和二糖のうち HA 由来の Δ Di-HA を HPLC により定量し、マウス血漿中 HA 分析を行った。その結果、HA は経口投与によって投与前よりも血中濃度が上昇し、経口吸収されることが明らかとなり、最高血中濃度は 120 分後であった。一般に、CS および HA を静注投与した際の消失は数分から十数分と比較的早いことが知られている。しかし経口投与では比較的長時間後に HA の上昇が観察された。採血時に偶然 HA が血中に存在することは考えにくく、投与した HA のままで血中に存在している可能性は低いと予想できる。すなわち、経口投与した HA が体内で何らかの修飾を受け、血中に存在している可能性が示唆される。

4. 考察

$^1\text{H-NMR}$ による構造解析の結果、保存 1 週目において、酸性条件 pH 3 で保存した Condition 3 では、標準品と比較し、3.6ppm 付近の GlcA の 3 位のシグナルが低磁場にシフトし、また 3.7 ~ 3.9ppm 付近の GlcA の 4 位と GlcNAc の 3 位と 6 位、GlcNAc の 2 位、GlcNAc の 4 位のシグナルが重なりあい、大きく変化している。それに対し、pH 5 で保存した Condition 7 の NMR スペクトルは、標準品とほぼ同様であった。このことから、酸性条件におけるコンフォメーション変化には、比較的厳しい酸性条件が必要であることが示唆される。また、Condition 3 において NMR スペクトルの経時的変化は認められないことから、酸性条件におけるコンフォメーション変化は HA 保存後すぐに起こるものであり、その後はそのまま変化しないと推定される。

CE による分子量測定の結果、各条件で保存した HA は、標準品と比較し、分子量分布が広がっていると考えられるものの、保存期間や保存条件の違いによる分子量分布の変化は明確には確認されなかった。そのため、分子量分布の変化をさらに詳細に検討すべく、ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、中性条件で保存した HA は標準品と同様の分子量分布を示したが、アルカリ性、酸性で保存した HA はそれぞれ異なる分子量分布を示した。さらに、試料を pH 調整し、すべての試料を中性条件において電気泳動を行ったが、結果は同様であった。このことから、保存条件の違いにより、分子量分布は変化することが示唆される。

一方、現在に至るまで、GAG の経口吸収についてはその詳細は明らかにされておらず、その生理的作用を期待する場合も、量的な変動と効果の相関はみられていない。しかし、HA が経口によって体内に吸収されることが判明した今、その存在量および存在様態を明らかにすることが

HA の生理機能の解明に重要であると考えられる。今後の検討が期待される。

(引用文献)

- 1) Kjellen L, Lindahl U.: "Proteoglycans, structures and interactions." *Ann. Rev. Biochem.*, 60, 443-75 (1991) .
- 2) Hook M, Kjellen L, Johansson S.: "Cell-surface glycosaminoglycans." *Ann. Rev. Biochem.*, 53, 847-869 (1984) .
- 3) Zako M, Iwaki M, Yoneda M, Miyaishi O, Zhao J, Suzuki Y, Takeuchi M, Miyake G, Ikagawa H, Kimata K. Molecular cloning and characterization of chick sialoprotein associated with cones and rods, a developmentally regulated glycoprotein of interphotoreceptor matrix. *J. Biol. Chem.*, 277, 25592-600 (2002) .
- 4) Taylor K. R., Gallo R. L.: "Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation." *FASEB J.*, 20, 9-22 (2006) .
- 5) Fuster M. M., Esko J. D.: "The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets." *Nat. Rev. Cancer*, 5, 526-542 (2005) .
- 6) Meyer K., Palmer J. W.: "The polysaccharide of the vitreous humor." *J. Biol. Chem.*, 107, 629-634 (1934) .
- 7) "The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives" (Laurent T. C., ed) Wenner-Gren International Series, Vol 72, Portland Press, London (1998) .
- 8) Scott J. E., Cummings C., Brass A., Chen Y.: "Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer." *Biochem. J.*, 274: 699-705 (1991) .
- 9) Scott J. E.: "Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, *in vitro* and in the tissues." *FASEB J.*, 6, 2639-2645 (1992) .
- 10) Toole B. P.: "Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation." In: Hay E., ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd edition. New York: Plenum Press, 1991:305-341.
- 11) Weissman B., Meyer K.: "The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord." *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 1753-1757, 1954.
- 12) Sherman L., Sleeman J., Herrlich P., Ponta H.: "Hyaluronate receptors; key players in growth,

- differentiation, migration and tumor progression.” *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 726-733 (1994) .
- 13) Gotoh S., Onaya J., Abe M., Miyazaki K., Hamai A., Horie K., Tokuyasu K.: “Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats.” *Ann. Rheum. Dis.*, 52, 817-822 (1993) .
- 14) Miller D., “Viscocalostomy procedures.” *Arch. Ophthalmol.*, 123, 1455-1456 (2005) .
- 15) Zeng C., Toole B. P., Kinney S. D., Kuo J. W., “Stamenkovic I: Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers.” *Int. J. Cancer.* 77, 396-401 (1998) .
- 16) <http://nccam.nih.gov/news/19972000/121100/qa.htm>