

# 能動的標的化技術を搭載した新規ドラッグデリバリーシステムキャリア「バイオナノカプセル」の次世代化粧品分野での応用可否の検討

名古屋大学

黒田 俊一

Bio-nanocapsule (BNC) is a hollow particle consisting of liposome and hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) L proteins. Due to the high similarity in surface structure between HBV and BNC, BNC is considered to harbor three functions like HBV: active targeting activity (originally to human liver), membrane fusogenic activity, and stealth activity (escaping from reticuloendothelial system in body). Recently, we have developed *in vivo* pinpoint drug and gene delivery system using BNC as a platform by replacing the human liver-specific recognition region (pre-S region) on BNC surface to the targeting molecules of interest. In this study, I have evaluated the applicability of BNC technology for the transdermal delivery, which would be useful technology in the forthcoming cosmetic field.

## 1. 緒言

化粧品は、有効成分を作用させる部位（標的部位）が皮膚や毛髪の細胞であり、それらが外部に直接露出するか、外部から至近距離にあることから、長年、有効成分の投与方法は表皮部分に直接塗布するのみで、特に大きな工夫はなされていなかった。しかし、その方法では、有効成分の物性（極性に基づく皮膚浸透性等）により非特異的に生体内に吸収されており、また、生体内に吸収された有効成分のごく一部のみが標的部位に到達すれば良しとされていた。正確な計測値は利用可能ではないが、皮膚表面での有効成分の捕捉、表皮及び真皮組織内での標的部位以外への有効成分のリーク（漏れ）などは当然起きるはずで、我々の医薬品の体内動態解析等の経験から、ベストコンディションでも有効成分の全投与量の数%程度しか標的部位に到達していないのではないかと考えている。

そこで我々は、2005年に *Fragrance Journal* 誌<sup>1)</sup>で指摘したように、近年著しく進歩している DDS (drug delivery system: 薬物送達) 技術を、世界に先駆けて化粧品分野に応用し、上記問題を改善し、次世代の化粧品開発に資することを目的としている。具体的には、我々が開発した B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染機構とヒト肝臓特異的な細胞及び臓器認識機構を有する非ウイルス性ベクターであるバイオナノカプセル (bio-nanocapsule, BNC) を用いる<sup>2)</sup> (Fig. 1)。BNC は HBV 表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) L タンパク質を出芽酵母内で過剰発現させることで得られる<sup>3)</sup> 直径約 70 nm の中空ナノ粒子である。BNC は



Evaluation of novel drug delivery system carrier "bio-nanocapsules" possessing active targeting machinery in the forthcoming cosmetics field

Shun'ichi Kuroda  
Nagoya University

酵母小胞体膜由来脂質二重膜に HBsAg L タンパク質約 100 分子が膜タンパク質として存在している。これは既に 30 年に亘って世界的に臨床応用されている B 型肝炎ワクチンの抗原と同様の構造であるため、ヒトにする安全性が高いと考えられており、実際に動物を用いた安全性試験でも安全性が認められている。また、近年では臨床応用されているガーダシルやサーバリスクという子宮頸部癌ワクチンの抗原提示用足場タンパク質としても用いられている。本キャリアは「リポソーム (liposome, LP) とウイルスベクターのハイブリッド (The Lancet 誌 (2003 年 7 月)、Nature Materials 誌 (2003 年 8 月))」と称され、今は複数の医薬品に搭載され、臨床研究に使用されている程、安全性と有効性が高い。本研究では、表皮、真皮、毛髪部位における任意の細胞に対して、外部から直接投与して効率よく到達する BNC の開発を行う。

## 2. 実験

### 2.1 実験材料

BNC は、HBsAg L タンパク質発現プラスミド pGLDLIIP39-RcT を保有する *Saccharomyces cerevisiae* AH22R-株<sup>3)</sup> から既報<sup>4)</sup>に従い精製し、凍結乾燥して保存した。

### 2.2 蛍光標識アニオン性 LP の作製

Cholesterol (SIGMA, St. Louis, MO, USA)、DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine, 日油株式会社、東京)、DPPE (Dipalmitoylphosphatidylethanolamine, 日油株式会社)、DPPGNa (Dipalmitoylphosphoglycerol, sodium salt, 日油株式会社)、NBD-PE (7-nitrobellzo-2-oxa-1, 3-diazole, dihexanooylphosphothanolamine, trithylammonium salt, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (励起光波長: 470 nm, 蛍光波長: 530 nm) を使用して水和法により (最終モル比は Cholesterol : DPPC : DPPE : DPPG = 40 : 15 : 13 : 30 : 2 (mol/mol)) NBD 標識アニオン性 LP を得た。

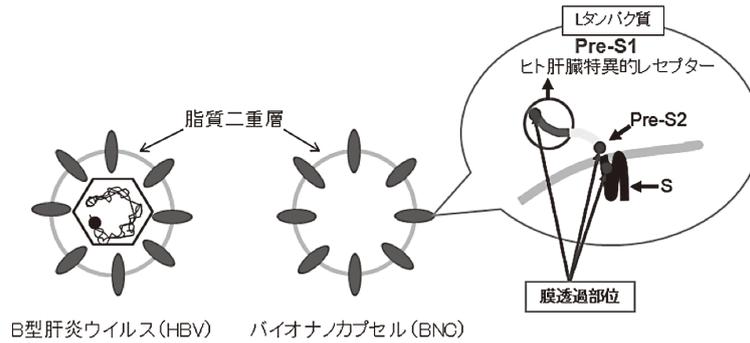


Fig.1 HBV と BNC の構造

### 2.3 第2.5世代BNC技術を用いたBNC-LP複合体の作製

LP溶液700 $\mu$ l (脂質量3mg分)を15mlファルコンチューブに分注し、Britton Robinson buffer (0.1 M ホウ酸, 0.1 M 酢酸, 0.1 M リン酸, 0.5 M NaOHにより pH 3 に調整)を800 $\mu$ l、BNCを300 $\mu$ l (タンパク質量として300 $\mu$ g)添加し、37 $^{\circ}$ C、30分間インキュベートした後、5%、10%、15%、20%、30%及び40% (w/v)の塩化セシウム溶液をそれぞれ6.5ml、6.5ml、5ml、5ml、5ml、5mlずつP28ST用遠心管(日立工機, 東京)に重層し、調製したサンプル溶液1800 $\mu$ lを重層して全量34.8mlとし、分離用超遠心機CP100MX(日立工機, 東京)を用いて24,000 rpm、室温、16時間の条件で塩化セシウム密度勾配超遠心を行った。超遠心終了後、上層から1mlずつ分取した各フラクションを0.1%(w/v)SDS(sodium dodecyl sulfate)を含む10%(w/v)ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)(ゲルサイズ10cm $\times$ 10cm)に負荷し、80V、80mA、30分泳動した後、160V、80mA、60分泳動した。電気泳動後、ゲルを銀染色してBNCが存在するフラクションを特定した。また、各フラクションのNBD蛍光標識LPの定量は、NBD由来蛍光強度(励起光波長:470nm, 蛍光波長:530nm)を1mg/mlのNBD蛍光標識LPを標準物質としてVarioskan(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)により評価し、BNCに約80%(重量比)含まれるタンパク質成分の定量はMicro BCA Protein Assay Kit(Thermo SCIENTIFIC, Rockford, IL, USA)を用いて1mg/mlのBSAを標準物質として定量した。目的のフラクションをまとめた後、500mlのPBS(Phosphate buffered saline; 140mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)を用いて室温で2時間透析した後、同量のPBSに交換して、さらに室温で一晩透析したものをBNC-LP複合体として、4 $^{\circ}$ Cで一晩保存した。

### 2.4 性状解析

BNC-LP複合体の粒子径と $\zeta$ 電位は、ゼータサイザーナノシリーズZS(Malvern Instruments Ltd.,Worcestershire,

UK)を用いて測定した。具体的には、ブラウン運動中の粒子群にレーザー光を当て、その散乱光を光電子倍增管にて検出するDLS法(動的光散乱法)による粒子径測定と、M3(mixed mode measurement)測定技術とPALS(Phase Analysis Light Scattering)法をあわせたM3-PALSによる $\zeta$ 電位測定を行った。

### 2.5 イオントフォレシス

ラット(8~10週齢のオスSprague-Dawley)背部皮膚の毛を剃り、首もとの脊柱を挟んで左右(1cm間隔)の皮膚表面において、BNC-LP複合体を不織布にHEPES(pH7.4)300 $\mu$ lを用いて含浸させ、銀-塩化銀電極を使用して、イオントフォレシス(TTIエルビュー, TCCR-3005, 東京)により0.3mA/cm<sup>2</sup>の条件で1時間行って皮膚内に投与した。イオントフォレシス後、3時間遮光して放置して、投与部位の凍結皮膚切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡FV1000D(オリンパス, 東京)により皮膚内におけるBNC-LP複合体の動態を評価した。

## 3. 結果

### 3.1 蛍光標識アニオン性LPとBNCとの複合体作製

第2.5世代型BNC技術は本来DNA送達の為に開発されたもので、カチオン性LPとDNAを複合体(lipoplex, LPX)化した後に、酸性条件下でBNCと融合させて、塩化セシウム密度勾配超遠心法でBNC-LPX複合体を精製した(Fig.2)。そこで、本研究では薬剤をアニオン性LPに封入して、第2.5世代型BNC技術により、酸性条件下でBNCを混合して融合を促し、塩化セシウム密度勾配超遠心法に供してBNC-LP複合体の生成を試みた。超遠心後、上層より1mlずつフラクションを回収し、全フラクションについてNBD(LP)の蛍光強度、BNCのタンパク質濃度、密度を測定した(Fig.3)。その結果、フラクション番号8においてLPの単一ピークが形成された。また、各フラクションをSDS-PAGEで展開して銀染色し、デンシトメトリ解析を行った結果、大部分のBNCはフラクション番号17をピークとして集約していたが、一部はフラクシ

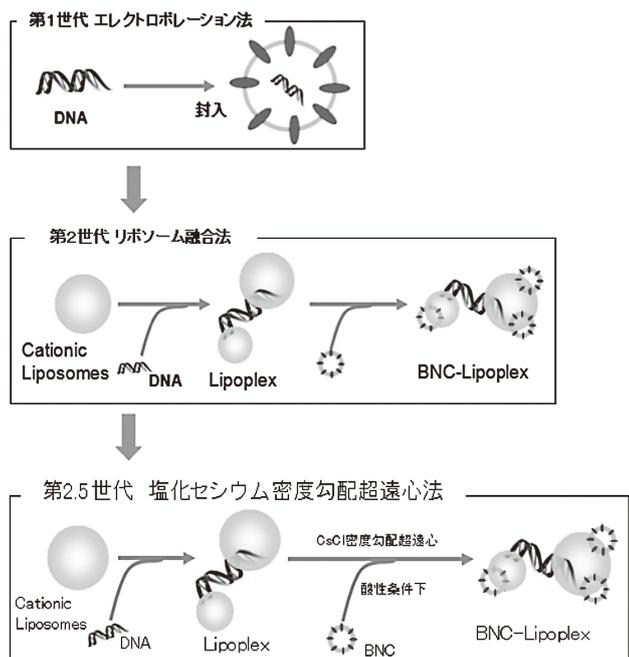


Fig. 2 BNC 内部への遺伝子封入法の変遷

ン番号8においてピークを形成していた。以上の結果から、酸性条件下でアニオン性LPはBNCと効率よくBNC-LP複合体を形成することが判明した。

### 3.2 BNC-LP 複合体の性状

得られたBNC-LP複合体は、薬剤をLP内に封入することが可能であり、本研究の目的に対してモデルキャリアとして考えることができる。そこで、DDS分野において重要な物性を決定した。まず、BNC濃度（タンパク質として）は200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、LP濃度は700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。第2世代型BNC作製法までのBNC-LP複合体はBNC濃度はLP濃度の5%程度であったことから、今回は30%程度なので幾分BNC濃度が高かった。また、粒子径はDLS法で測定すると200nm前後であった (Fig. 4)。ただし、PDI（多分散係数）は1であり、粒度分布が不均一であることを示していた。また、表面電荷（ $\zeta$ 電位）は-69.2mVであり、生体内での非特異的吸着が起こりにくいアニオン性であったが、粒度分布が不均一でないことにより電荷分布も均一でなかった。

### 3.3 イオンフォレシス

本来であれば、BNC自身が有する膜透過活性により、皮膚表面にBNC-LP複合体が接触すれば、ある程度は皮膚内に浸透するものと期待されたが、まずは強制的にどこまで皮膚内に浸透できるかイオンフォレシス<sup>5)</sup>を行ってみた。その結果、BNC-LP複合体の皮膚内への顕著な浸透は見られなかった（データ示さず）。そこで、BNC単体で皮膚内に浸透できるか検討するために、蛍光色素Cy5で標識した後、粒子径及び $\zeta$ 電位を測定した (Fig. 5)。その結果、

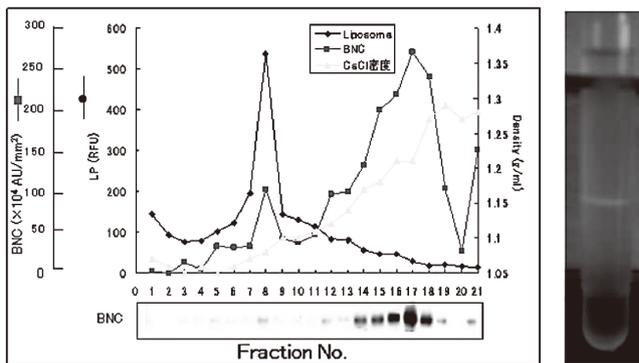


Fig. 3 第2.5世代型BNC作製法による蛍光標識アニオン性LPとBNCの融合パターン（左）及び塩化セシウム超遠心分離パターン（右）

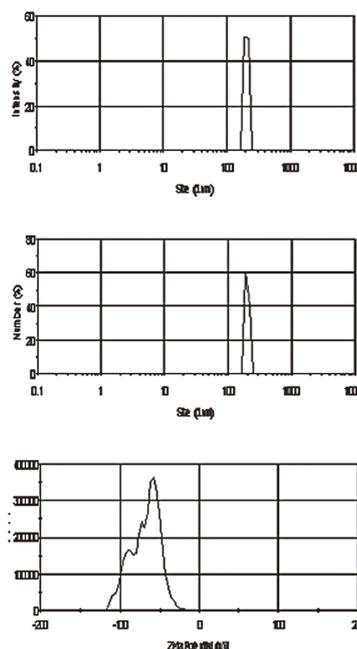


Fig. 4 BNC-LP 複合体の粒子径（上、Intensityモード；中、Numberモード）と $\zeta$ 電位（下）

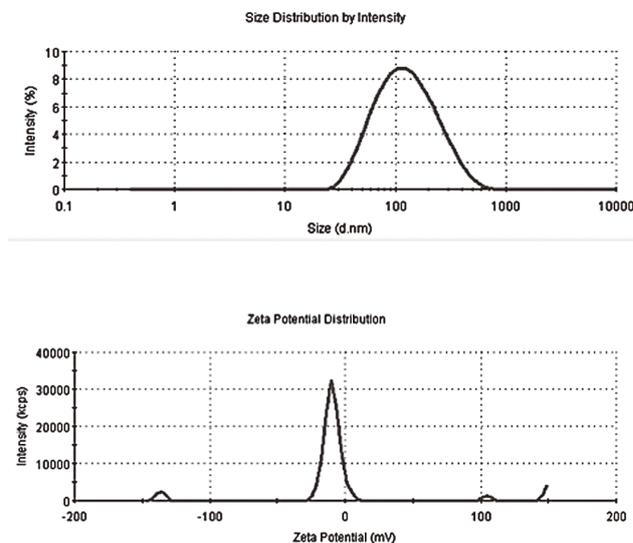


Fig. 5 Cy5 標識 BNC の粒子径（上、Intensityモード）と $\zeta$ 電位（下）

粒子径は102nmでPDIが0.228と均一な粒子を形成していた。次に、 $\zeta$ 電位を測定すると、粒度分布が均一なためにシャープな電位を示しており、 $-4.54\text{mV}$ と生体内投与に好適な弱アニオン性であった。

次に、Cy5標識BNC（タンパク質量として $833\mu\text{g/ml}$ ）溶液 $300\text{ml}$ を用いて同様にイオントフォーシスを1時間行い、3時間遮光放置して、皮膚切片を観察した（Fig.6）。その結果、BNCは皮膚表面から満遍なく入っており、浸透している領域は、表面から数 $10\mu\text{m}$ から $100\mu\text{m}$ 弱の「表皮層」であった。これは、カチオン性LPを投与した場合<sup>5)</sup>と同じ皮膚内浸透能力をBNCが有していることを示していた。

### 3.4 蛍光標識アニオン性LPとBNCとの複合体作製条件の再検討

BNC-LP複合体を皮膚内に一層浸透させるために、BNC-LP間の相互作用を高めて複合体の安定性を高めることが必要と考えた。そこで、再度複合体作成条件の検討を行うことにした。具体的には、3.1で記載した酸性条件下でのBNCとアニオン性LPとの融合に際して、脂質膜の流動性を高めるために高温条件（ $37^\circ\text{C}$  30分から、 $50^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$ 、 $70^\circ\text{C}$ で2時間に変更）で行い、BNC-LP複合体が効率よく形成されるか検討した（Fig. 7）。その結果、塩化セシウム密度勾配超遠心法により分離したBNC-LP複合体に含まれるBNC及びLPの回収率が高音になるに従って一段と向上した。また、同複合体のバンドも明確に視認できる

ようになった（Fig.8）。特に、 $60^\circ\text{C}$ で生成させたBNC-LP複合体を透過型電子顕微鏡で観察したところ、 $40^\circ\text{C}$  30分間（ $37^\circ\text{C}$ と同じ）で生成した同複合体と同じ形状を示していた（Fig.9上段）。また、 $60^\circ\text{C}$ 及び $70^\circ\text{C}$ で生成させたBNC-LP複合体の粒子径及び表面電荷を測定したところ、特に $60^\circ\text{C}$ で生成した分は粒子径及び表面電荷ともに生体内投与に適していた（Fig.9下段）。

## 4. 考察

今回、化粧品の有効成分を封入したナノキャリアを効果的に皮膚内に浸透させるために、我々の開発したBNCを用いて条件検討を行った。まず、最近、BNC内部に物質封入する方法が改良された（第2.5世代型BNC作製法）ので、同方法を用いてアニオン性LP内部にモデル化合物（今回は蛍光色素）を封入し、BNCと融合させ、BNC-LP複合体とした。今回は、能動的標的化は期待していなかったため、ヒト肝臓特異的BNCを使用した。その結果、同複合体の $\zeta$ 電位はアニオン性で生体内非特異的吸着が少ないことが期待されたが、粒子径が $200\text{nm}$ 程度となり、また、粒度分布が不均一なために、単純塗布でもイオントフォーシスでも皮膚内に効率的に侵入することはなかった。そこで、BNC単独で同様な検討を行ったところ、粒子径 $100\text{nm}$ で $\zeta$ 電位は弱アニオン性となり、単純塗布では難しかったが、イオントフォーシスでは効率よく皮膚内に浸透した。その経路は毛根を介して入っているように見えた。今回は、イオントフォーシスの作用時間は1時間であり、

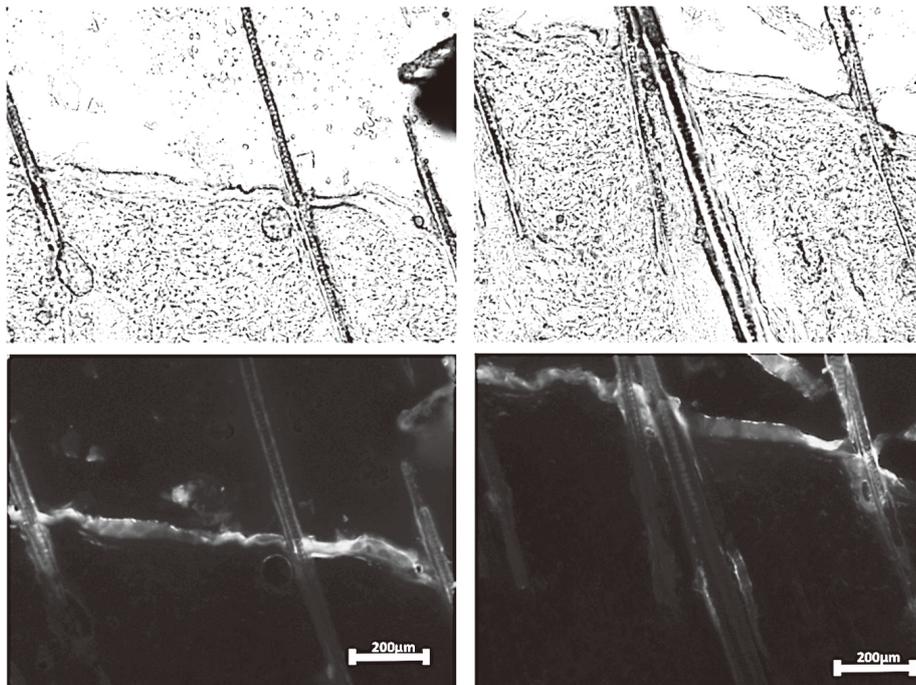


Fig. 6 Cy5 標識 BNC のイオントフォーシス結果 1  
（上、明視野；下、蛍光像）

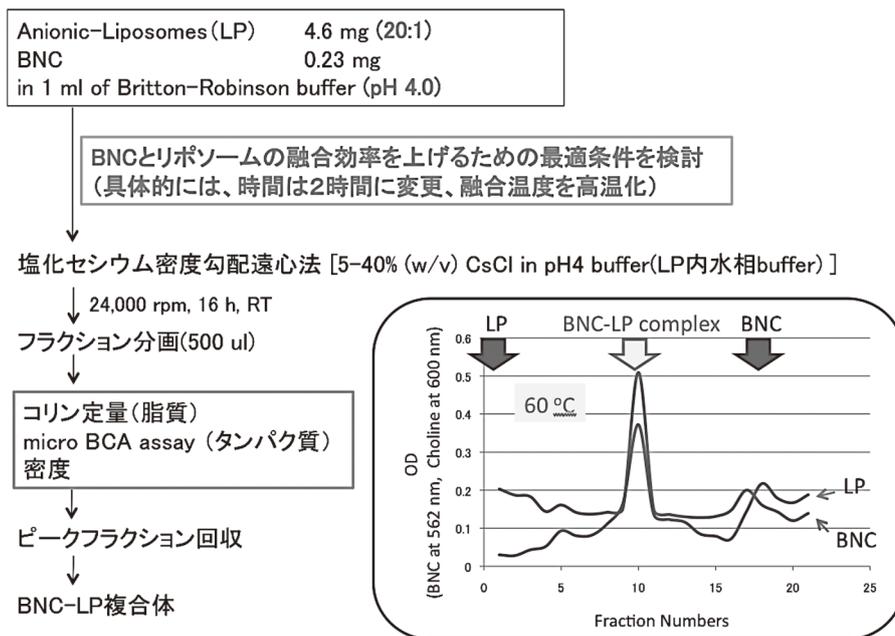


Fig. 7 BNC-LP 作製法の改良

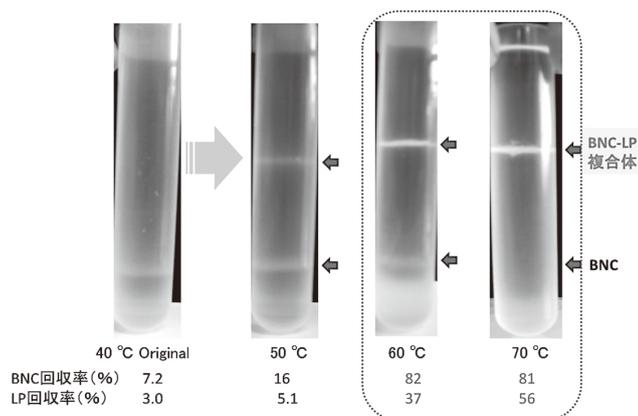
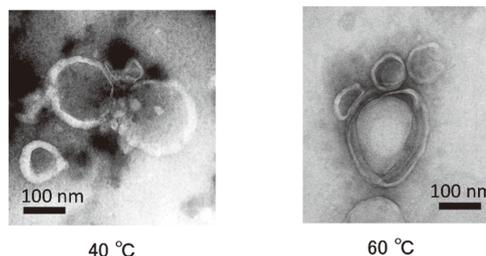


Fig. 8 BNC-LP 複合体形成効率に対する温度の影響

TEM (Transmission Electron Microscopy) 観察



DLS (Dynamic Light Scattering) 解析

融合温度	粒子径	表面電荷
40 °C	232 nm	-70.8 mv
60 °C	227 nm	-28.7 mv
70 °C	342 nm	-31.6 mv

Fig. 9 高温で形成された BNC-LP 複合体の性質

電流値も大きかった(これ以上長いと、皮膚に炎症が起こる可能性がある)ので、次回からは作用時間及び電流値も下げて検討を行う必要がある。また、膜透過活性の高いペプチドを提示させた改良型BNCについても同様な実験を行い、単純塗布でも皮膚内に侵入できるBNCの開発も行いたい。

その後、BNC-LP複合体の作製法を改良し、皮膚内投与しても崩壊しないような強固かつ粒子性状も好ましい複合体の作製に成功した。現在、本複合体のアッセイをおこなっており、皮膚内に安定かつ容易に浸透するか否か検討している。

5. 総括

従来血液中投与を目的として開発されたナノキャリアーであるBNCは、今回の検討により、少なくともイオントフォoresisにより皮膚内に浸透できることが判明した。今後は、BNC表層の改良、粒子径の改良、表面電荷の改良を行い、単純塗布でも皮膚内に浸透できるナノキャリアー化を目指したい。また、能動的標的化機構も搭載して、化粧品のみならず医薬品まで展開できるグレードのナノキャリアーを目指したい。

(引用文献)

- 1) 黒田俊一：バイオナノカプセルの開発と化粧品への応用, *Fragrance Journal*, 33, 22-28, 2005.
- 2) Yamada, T., Iwasaki, Y., Tada, H., Iwabuki, H., Chuah, M. K. L., VandenDriessche, T., Fukuda, H., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: Nanoparticles for the Delivery of Genes and Drugs to Human Hepatocytes, *Nature Biotechnology*, 21, 885-890, 2003.
- 3) Kuroda, S., Otaka, S., Miyazaki, T., Nakao, M., and Fujisawa, Y.: Hepatitis B Virus Envelope L Protein Particles: Synthesis and Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, Purification and Characterization, *J. Biol. Chem.*, 267, 1953-1961, 1992.
- 4) Yamada, T., Iwabuki, H., Kanno, T., Tanaka, H., Kawai, T., Fukuda, H., Kondo, A., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: Physicochemical and Immunological Characterization of Hepatitis B Virus Envelope Particles Exclusively Consisting of the Entire L (Pre-S1+Pre-S2+S) Protein, *Vaccine*, 19, 3154-3163, 2001.
- 5) Kajimoto K, Yamamoto M, Watanabe M, Kigasawa K, Kanamura K, Harashima H, and Kogure K.: Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis, *Int. J. Pharm.*, 403, 57-65, 2011.