

表面が制御された徐放性ナノチューブカプセルの化粧品への応用

産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・形態機能ナノシステムグループ

増田 光俊

We reported encapsulation of synthetic perfumes (eugenol and *d*-limonene) into cylindrical nanospace of organic nanotubes, so called "ONTs". ONTs are self-assembled from tube forming glycolipids, their hydrophobized analogues, and these mixtures. As results, we prepared ONTs with both -COOH, -COOMe, and hydrophobic carbobenzoxy groups localized on cylindrical nanochannels. The ONTs are able to capture the perfumes in their hollow cylinders by capillary force upon addition of ethanolic perfume solutions. The ONT having inner surface covered with -COOH or with -COOMe exhibited high encapsulation efficiency for eugenol. On the other hand, the ONT showed moderate encapsulation efficacy for limonene. These results indicated the efficiency should be relevant to hydrogen bond formation between -OH groups of eugenol and oxygen atoms of the -COOMe on inner surface. The release of eugenol from the ONT was accelerated by hydrophilic inner surface of the nanochannels and also by high humidity of atmosphere, indicating suitable for functional release of perfumes. All these results showed that ONTs with optimized inner surface are promising nanocapsules for cosmetic applications.

1. 緒言

化粧品をはじめ医療、製薬、食品、農薬、畜産などの幅広い産業分野において、有効成分を必要な場所で必要に応じて放出する技術の重要性が注目されはじめており、このための機能性ナノカプセルやマイクロカプセルなどが数多く報告されてきた¹⁾。このようなカプセルの多くは球状の微粒子やミセル、そして中空のリポソームなどであった。一方、我々は脂質が自己集合してチューブ状ナノ構造（有機ナノチューブ、Organic nanotube、以降「ONT」と記述）を形成することに着目した研究を行っている²⁻⁴⁾。このONTはナノカプセルとして理想的な中空ナノ空間と開端部を持つため、薬物の包接や放出に優れていると考えられ、これまでに以下の点について明らかにしている。

- ①水に良分散で長期安定性に優れる。
- ②外表面が異なる官能基で被覆された非対称なチューブ構造では、内径（約6～80nm）、長さ（約100nm～数 μ m）、内外表面の電荷（正負）や疎水性を制御できる。
- ③薬物、タンパク質、DNA等のゲストを混合するだけで静電相互作用などにより効率的にカプセル化し、これらを安定化する。
- ④上記③のカプセル化物において外部刺激等に応じてゲストを放出できる。

これらの特性は、香料等の化粧品有効成分のための機能

性ナノカプセルとしての利用にも期待できるものである。

本研究ではONTの化粧品用ナノカプセルへの用途の可能性を探るため、まずは香料成分のカプセル化特性を検討した。次に得られた香料／ONTカプセル体からの香料放出挙動について、ONT内表面の親水／疎水性、また放出雰囲気湿度とともに評価した（図1）。

従来のナノカプセルの代表例として界面活性剤が形成するミセルや大環状分子のシクロデキストリン（CD）が挙げられる。ミセルは流動的な集合体であり、化合物によっては低温で結晶化・沈殿するなどの課題がある。また厳密には中空構造を持たない。一方、CDは安定な空孔を持つが、そのサイズが1nm以下であるため、カプセル化される分子に限界があった。ONTは固体状のカプセルで、CDの約10倍以上のサイズを持つ。また用いる分子の構造によってチューブ口径やチューブ内表面も制御できるため、疎水性で水に難分散性の化粧品有効成分のカプセル化にも最適であると考えられる。

2. 実験

カプセル化する香料成分として*d*-リモネン（LN）、オイゲノール（EL）を用いた。またカプセル化に用いる有機ナノチューブ（ONT）として、チューブ形成脂質**1**、**2**、および**1**と**3**の混合物（モル比=10/2）の自己集合によってそれぞれONT-1、ONT-2、ONT-1/3を得た。用いた脂質は既報より合成した^{5,6)}。これらの脂質をジメチルスルホキシド（DMSO）に加熱溶解後、冷却することで自己集合によってONTを形成させた。得られた分散液を透析してDMSOを除去し、その後の凍結乾燥によってONTを単離し以降の実験に用いた。

香料カプセル化

香料成分のカプセル化はONTへの毛細管現象によって



Cosmetic application of sustained-release nanotubes capsules via surface control

Mitsutoshi Masuda

Morphofunctional Nanosystem Group,
Nanosystem Research Institute (NRI),
National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology (AIST)

行った⁷⁾。すなわち凍結乾燥したONT (0.03mmol) にLNあるいはELのエタノール溶液 (20 mmol/EtOH 0.3mL) を加え30℃で20時間、あるいは72時間放置した。遠心分離により過剰のエタノール溶液を除去し、残渣を真空乾燥しながらその重量をモニターした。この乾燥はEL (沸点254℃) の場合80℃で、LN (沸点176℃) は23℃ (室温) で行った。最終的に得られた香料/ONTカプセル体について、核磁気共鳴スペクトル測定によりそのカプセル化量を求めた。すなわち脂質分子と香料のプロトンシグナルの積分より両成分のモル比を求め、カプセル化量とした。なお測定時 (60℃、重DMSO中、5mg/mL) にONTが完全に溶解することを確認している。また上記カプセル化後の有機ナノチューブについて、走査型電子顕微鏡 (日立S-4800) を用いて形態観察した。つまりTEM用カーボングリッドにナノチューブを滴下乾燥後、pH5に調製したリタングステン酸 (2%) を滴下することでネガティブ染色し、透過像 (Scanning transmission electron microscopic image, STEM image) によってチューブ形態とその内空間などの微細構造を可視化した。

香料放出実験

香料としてELをモデル化合物として用いた。それぞれのONT (15 mg) にELのエタノール溶液 (5mmol EL/0.75 mL EtOH) を加え、室温で3日間放置しカプセル化を行った。その後、100nm孔のPC濾過膜上でろ過、エタノールを用

いてONTをよく洗浄し、外表面のELを除去した。これを22℃で湿度8%、55%に制御したデシケーターに入れ、一定時間毎にONTを取り出し、EtOHに分散し遠心分離によってONTを分離後、UVにより残存するELを定量した。以上により放出量を求めた。なおデシケーター内の相対湿度はそれぞれNaOH飽和水溶液と55% Ca(NO₃)₂水溶液によって制御した。

3. 結果

チューブ形成脂質 **1**、**2**、および **1** と **3** の混合物 (モル比=10/2) より、それぞれONT-1、ONT-2、ONT-1/3を得た (図1)。チューブ外表面はいずれも親水性の1-グルコサミド残基で被覆されている。チューブ内表面はONT-1ではカルボキシル基 (-COOH基)、ONT-2ではメチルエステル基 (-COOMe)、ONT-1/3では-COOH基とカルボベンゾキシ基 (-Cbz基) で被覆されていることが既報を参考にして明らかにした⁵⁾。

単離後のONT-1の走査型電子顕微鏡像を図2に示す。いずれのONTでも内空間が染色剤によって黒いコントラストを与え、既報通り内径約8nm、外径約12~15nm、壁厚約3~4nm、長さ約100nm~1μm程度のチューブ構造を形成することを確認した。また上記の壁厚が伸びきった脂質分子の長さに対応していることから、ONTは1枚の単分子膜で形成されていることが判った。

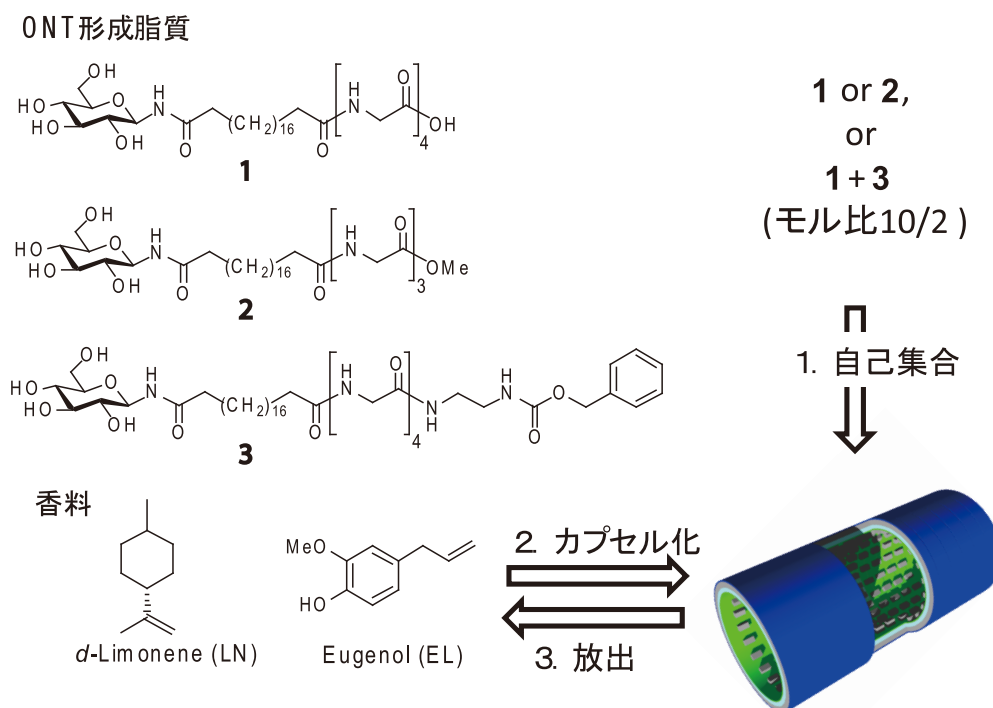


図1 左図：自己集合により内表面がカルボン酸性の有機ナノチューブを形成する脂質 **1**、内表面が疎水性のONTを形成する **2**、および **1** と混合して自己集合することで内表面を部分的に疎水性に変換する誘導体 **3**。右図：自己集合によるONT合成とカプセル化や放出に用いた *d*-リモネン (LN) とオイゲノール (EL)。

香料のカプセル化

毛細管現象を利用した香料成分のONTへのカプセル化を検討した。20時間のカプセル化工程によって香料成分導入後、真空下での重量減少特性を図3に示す。乾燥温度(LNは23℃、ELは80℃での真空乾燥)が異なるため比較は困難ではあるが、カプセル化量が比較的多いEL(図3右図。カプセル化の結果は表1)では、LNに較べてONTからの揮発による重量減少が遅いことがわかる。これはEL分子中の水酸基とONT内表面の-COOH基、-COOMe基とが水素結合を形成するためと考えられる。加

えてONT-1/3では、ELの芳香環とチューブ内壁のCbz基間の π - π 相互作用も寄与している可能性もある。

上述の減圧乾燥において重量がほぼ一定になった時点のカプセル化された香料として定量した。すなわち核磁気共鳴スペクトル測定により、それぞれのONTへのカプセル化量をチューブ形成脂質に対するLNとELのモル比やそれらを重量比に換算した値を表1に示した。いずれのONTでもELのカプセル化量が多い。特に内表面が疎水性の-COOMe基で被覆されたONT-2では、最大のカプセル化量(約1.4モル等量)を示した。一方、親水性のONT-1

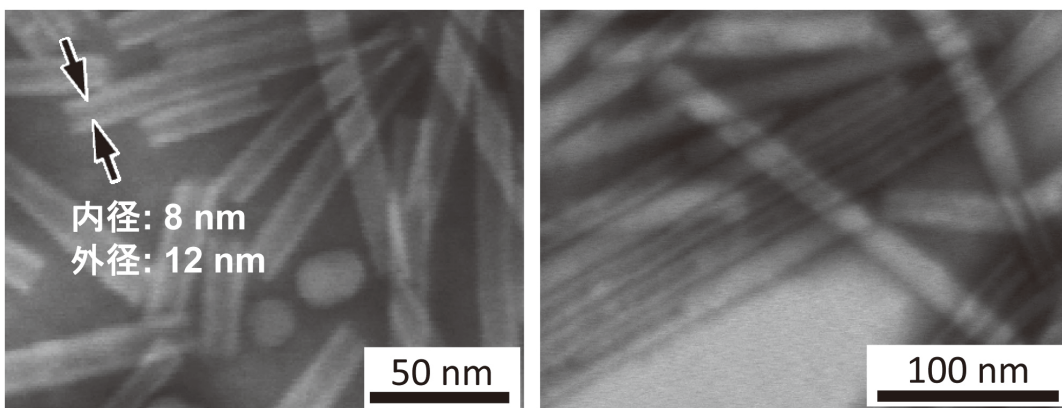


図2 左図:調製したONT-1(左図)およびELカプセル化後のONT-1/3の走査型透過電子顕微鏡像(右図)。いずれもネガティブ染色後の形態。

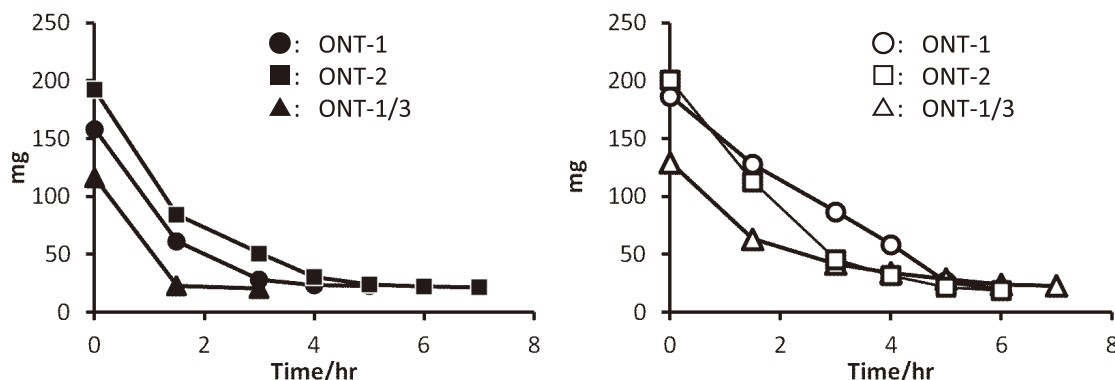


図3 リモネン(LN、左図)およびオイゲノール(EL、右図)の真空乾燥時の重量減少特性。LNは室温(23℃)、ELは80℃での乾燥。

表1 ONTにカプセル化されたLN、ELの量

ONT その脂質の分子量	ONT-1 731.4 g/mol		ONT-2 688.9 g/mol		ONT-1/3 760.8g/mol ^a	
香料	LN	EL	LN	EL	LN	EL
脂質に対する香料のモル比	0.37	0.83 (2.0)	0.18	1.39 (2.2)	0.10	1.10
ONTに対する香料の重量比	0.069	0.19 (0.46) ^b	0.036	0.33 (0.51) ^b	0.018	0.24

^a脂質1と3(907.5 g/mol)の混合モル比(10/2)より

^b括弧内の値は、カプセル化時間を72時間に変えた時のカプセル化率

(内表面が-COOH基)と部分的に疎水性のONT-1/3(内表面が-COOH基とCbz基)を較べると、後者のカプセル化が若干多いが、それでもチューブを形成している脂質分子に対し1.1モル等量、すなわち内表面に約1分子程度が吸着した量であった。なおカプセル化の前後での重量変化からカプセル化量を求めた場合も、上述のNMR法と良く一致していることを確認している。

またONT-1やONT-2について、カプセル化時間を20時間から、72時間にするとそのカプセル化量がさらに多くなった(表1、括弧内の値)。この様にカプセル化には、かなり長い時間を要することがわかる。

香料/ONTカプセル化体の形態についてSTEMによる観察を行ったところ、全ての場合においてカプセル化後もチューブ構造を保持していることが判った(図2、右図)。

オイゲノールの徐放

内表面が親水性のONT-1および疎水性のONT-2を用いてELの放出特性を異なる相対湿度下(5%、55%)で検討した(図4)。その結果、外部の相対湿度が低いほど、また内表面が疎水性であるほどその放出量が抑制されることがわかった。放出が一番早い親水性内表面のONT-1でも1週間で約90%のELを放出した。一方、徐放性に最も優れた疎水性内表面のONT-2では1週間後でも約50%、湿度が低い場合では約40%程度にまで放出が抑制されていた。

4. 考察

香料カプセル化ではエタノール溶液を凍結乾燥したONTに毛細管現象で導入することにより、特にELでは20時間のカプセル化でチューブ形成脂質に対し等モル量程度、さらにカプセル化時間を72時間にすると2モル等量程度までの封入が可能であった。これを質量比に換算す

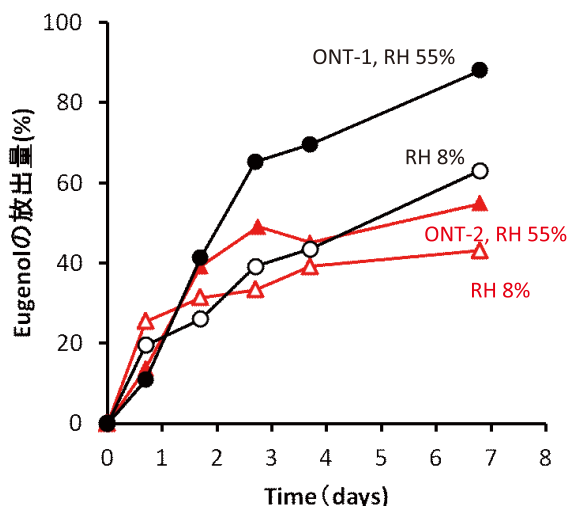


図4 ONT-1とONT-2からのELの放出特性の湿度依存性

ると、ONTに対してそれぞれ約33wt%、51wt%のELを保持できることになる。別途得られる類縁体の結晶構造から得た分子の充填パラメーターやSTEM像から得たチューブ径を基に、大まかな空孔率を求めると、1gの脂質からONTが形成できる内空孔の体積は0.3~0.5mLであった。もし脂質とELのモル体積(したがって密度)がほぼ同じであると仮定すれば、72時間のカプセル化ではほぼ全ての内空間をELで充填出来ていることが推測できる。また今回は固体として単離後のカプセル化量を求めたが、化粧品への用途を考えると水溶液中でのカプセル化量や保持能力の検討も今後必要であろう。

同様の検討例として吉井らは β -および γ -シクロデキストリン(β -および γ -CD)によるLNの包接で得られるカプセル化粉末において、1gのCDが保持できるLNは0.078g、0.126gであることを報告している⁸⁾。表1のONTに対するLNの重量比と比較すると、ONT-1が β -CDとほぼ同等(0.069g)であることが判る。一方、阿部らはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)からなるミセル水溶液への香料の可溶化を検討している⁹⁾。その結果、1モルのSDS水溶液に可溶化されるLNのモル量(本報告のモル等量と同義)は0.11(ONT-1では0.37モル量)、ELでは1.9(ONT-2では2.2モル量)となり、ONTが若干多い。しかし阿部らの可溶化は水溶液中であり、ONT系も同様な条件で検討すべきである。

一方、ONTからのELの放出はチューブ内表面を疎水性から親水性に変化させることによって放出速度を抑制することが出来た。また内表面が親水性のONT-1では外部雰囲気相対湿度の上昇と共にELの放出速度が加速されることがわかった。これはONT-1が毛管現象で雰囲気中の水分を取り込む結果、内包していたELを放出し易くなることに起因している可能性が考えられる。この特性は発汗時の香料の加速的放出につながるため、化粧品ナノカプセルとしても適している。

5. 総括

本研究ではONTの包接化を評価するため、毛細管現象によるオイゲノールやリモネンのカプセル化を検討し、効率的な香料のカプセル化を達成した。しかしその効率性はゲスト化合物や用いるONTの種類、またカプセル化条件によって大きく変化するため、他の化合物についても最適化を含めた検討が必要である。これら香料の放出では、発汗時を想定した高湿度下での香料の放出加速が出来た。今後は、使用前の香料保持技術が必要となるであろう。また今回はゲストカプセル化によるその安定化効果が未検討であり、これらの点も今後の課題である。

今回の研究では、ONTが香料をカプセル化し、その放出制御も出来ることを明らかにしてきた。化粧品への本格的

な実用化には、上述の保持技術に加え、安全性、安定性、コストなどの多くの課題を克服する必要がある。我々が開発してきた表面の特性やその内径サイズが異なる様々なONTの一部について、現在、試薬会社を通じた研究用試薬としての販売に加え、試料提供も行っている。これらと呼び水とした共同研究によって、化粧品分野への実用化を加速していきたい。

(文 献)

- 1) マイクロ/ナノ系カプセル・微粒子の応用展開. シーエムシー出版: 2003.
- 2) Kameta, N.; Minamikawa, H.; Masuda, M., Supramolecular organic nanotubes: how to functionalize the inner nanospace and the outer space. *Soft Matter* **2011**, 7, 4539-4561.
- 3) 亀田直弘; 増田光俊; 清水敏美, *高分子論文集* **2010**, 67, 560-573.
- 4) 亀田直弘; 増田光俊, 「第三章脂質ナノチューブの合成と応用、非対称型内外表面をもつ脂質ナノチューブと包接機能」、*有機・無機・金属ナノチューブ～非カーボンナノチューブ系の最新技術と応用展開～*, 清水敏美; 木島剛編, フロンティア出版: 東京, 2008.
- 5) Ding, W.; Kameta, N.; Minamikawa, H.; Wada, M.; Shimizu, T.; Masuda, M., Hybrid organic nanotubes with dual functionalities localized on cylindrical nanochannels control the release of doxorubicin. *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 1, 699-706.
- 6) Kameta, N.; Ding, W.; Masuda, M.; Minamikawa, H.; Wada, M.; Shimizu, T. PCT/JP2012/058724, 「内表面疎水化有機ナノチューブ、および同ナノチューブを用いた薬剤カプセル化物」.
- 7) Yui, H.; Shimizu, Y.; Kamiya, S.; Yamasita, I.; Masuda, M.; Ito, K.; Shimizu, T., Encapsulation of Ferritin within a Hollow Cylinder of Glycolipid Nanotubes. *Chem. Lett.* **2005**, 34, 232-233.
- 8) Ysohii, H.; Kometani, T.; Furuta, T.; Watanabe, Y.; Linko, Y.-Y.; Linko, P., Formation of inclusion complex of cyclodextrin with ethanol under anhydrous conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62, 2166-2170.
- 9) 徳岡由一; 阿部正彦, 香料を水に溶かすには. *表面* **1995**, 33, 397-404.