

ヘパリン導入コラーゲンからなる G/O エマルションの開発

九州大学大学院工学研究院化学工学部門

井 嶋 博 之

Heparin-collagen conjugate using heparin having affinity for various growth factors was prepared. Furthermore, a gel-in-oil (G/O) emulsion consists of this conjugate was developed. This G/O emulsion was able to immobilize various growth factors including bFGF. In addition, this G/O showed good permeability to the skin. Furthermore, activation of the cultured dermis model was suggested in the application test of bFGF-containing G/O. From the above, the effectiveness of the G/O emulsion as a novel skin care technology having good skin permeability, stabilization of the active ingredient and its sustained release property was expected.

1. 緒 言

シワやたるみ、シミや黒ずみ、ニキビ、ニキビ跡、髪の毛のダメージ・抜け毛などのトラブルは誰にでも起こる問題であり、精神衛生的観点からもこれら問題を解決することは重要である。近年、増殖因子が注目されており、上皮細胞増殖因子 (EGF) や線維芽細胞増殖因子 (FGF) などが配合された美容液が市販されている。しかしながら、増殖因子は不安定であり容易に失活するため、その安定性の向上が不可欠である。さらに、皮膚は優れたバリア性を有するため分子量数万の各種増殖因子の皮膚透過性は極めて低い。これに対してタンパク質薬物を Solid-in-Oil 化することで疎水性表面の直径数百 nm の微粒子が作製でき、劇的な皮膚浸透性の向上が報告されている¹⁻²⁾。

一方、ヘパリン導入コラーゲンは肝臓³⁻⁸⁾、血管⁵⁻⁶⁾、神経組織¹⁰⁾ に対する再生医療用基材としての有効性が実証されてきた。本基材は生体内コラーゲンと同様に中性近傍において自発的にゲル化し、高い生体親和性を示す。さらに本基材は EGF、FGF、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) などの各種増殖因子と高い親和性を有しており、自発的にそれら増殖因子を固体化保持できる⁴⁻¹⁰⁾。これにより、増殖因子の失活が阻害され、その細胞活性化効果を長期間良好に維持でき⁹⁻¹⁰⁾、かつ徐放性が付与される⁵⁻⁶⁾ ことにより、効果的な皮膚の活性化が期待される。

そこで本研究では、上記ヘパリン導入コラーゲンのナノゲルからなるエマルションを開発し、従来にないスキんケ

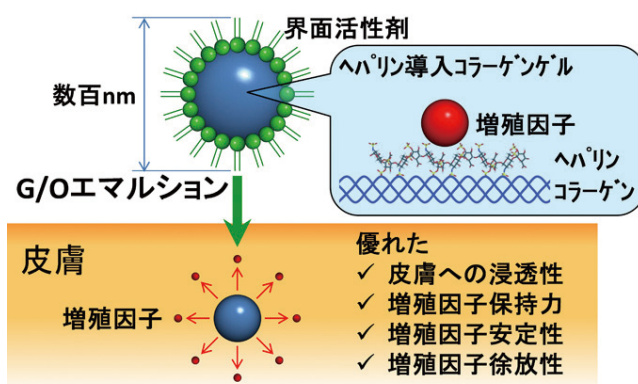


Fig. 1 Image of activation of skin by G/O emulsion

ア技術を創出することを目的とした (Fig.1)。

2. 方 法

2. 1. ヘパリン導入コラーゲンゲルへの増殖因子固定化と安定性評価

水溶性カルボジイミド塩酸塩 (EDC) および N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) を用いてコラーゲンゲルにヘパリンを導入した。作製したヘパリン導入コラーゲンゲルに塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を固定化し、ELISA 法によりゲル内の bFGF 量を評価した。また、ヘパリン導入コラーゲンゲルに bFGF を固定化して 1 日間インキュベーションした後、ELISA 法によりゲル内の bFGF 量を評価した。

2. 2. G/O エマルションの開発

ゼラチン溶液の水相と、ショ糖エルカ酸エステル (ER-290) を溶解したシクロヘキサンの油相を混合し、超音波ホモジナイザーを用いて乳化させた。ゲル化後油相を置換し、ミリスチン酸イソプロピル (IPM) に再分散させることで G/O を調製した。G/O 調製時の界面活性剤濃度、水相と油相の体積比、ゼラチン濃度について最適化を行った後、



Development of G/O emulsion consists of heparin-collagen conjugate

Hiroyuki Ijima

Dept. of Chemical Engineering, Graduate School, Kyushu University

ヘパリン導入ゼラチン溶液を水相に用いたG/O調製を試みた。G/Oの粒径分布は動的光散乱法(DLS)により測定した。また、G/O内水相のゲル化を動的粘弾性測定により評価した。

2.3. G/Oエマルションの皮膚浸透性評価

強化緑色蛍光タンパク質EGFPを含むゼラチン溶液の水相1mLと、IPM (ER-290 : 50mg/mL) の油相2mLを用いてEGFP含有G/Oを調製した。拡散セルにマウスの背中皮膚を挟み、PBSを皮膚下面がさらされる程度まで加えた。EGFP含有G/Oを皮膚上面に添加し、インキュベーター内で1日間静置した。その後、皮膚断面の凍結切片を作製して蛍光観察を行った。

2.4. 培養真皮モデルを用いたbFGF固定化G/Oの有効性評価

1% コラーゲン溶液と20% FBS添加2倍濃縮DMEMを1:1で混合した溶液にマウス線維芽細胞(L929細胞)を懸濁し (6.7×10^5 cells/mL)、37℃下でゲル化させることで培養真皮モデルを作製した。この培養真皮モデル表面にbFGF固定化G/Oエマルションを塗布し培養した。Hoechstを用いたDNAを定量により、培養真皮モデル内の細胞増殖を評価した。

3. 結果と考察

3.1. ヘパリン導入コラーゲングルへの増殖因子固定化と安定性評価

ヘパリン導入コラーゲングル内のbFGF量を評価した結果、有意に多くのbFGFが固定化されていることが確認された。その固定化効率は約71%であった。また、ヘパリン導入コラーゲングルに固定化したbFGFは、溶液中のbFGFと比較してその活性を良好に維持していることが期待された (Fig. 2)。これはbFGFが分子構造の比較的安定なヘパリンに結合し、立体構造が安定化したためだと考えられる。

3.2. G/Oエマルションの開発

ナノゲル粒子をIPMに再分散させたところ、均一に分散させることができ、G/Oの形成が示唆された。G/O調製時の組成について最適化を行った結果、界面活性剤濃度50mg/mL、水相と油相の体積比1:2、ゼラチン濃度5%の条件において、粒子径が小さいG/Oが得られた。この条件下において、ヘパリン導入ゼラチン溶液を水相に用いてG/Oを調製したところ、平均粒径が293nmのG/Oが得られた (Fig. 3 (A))。これより皮膚浸透可能なサイズのG/O作製が示唆された。また、IPM中に分散したG/Oエマ

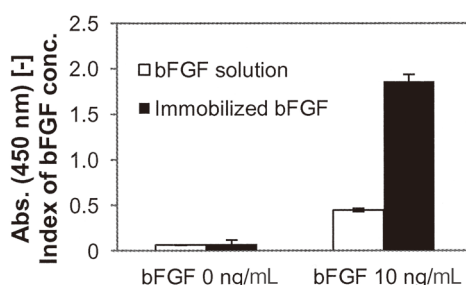


Fig. 2 Immobilized bFGF in heparin-collagen conjugate gel evaluated by ELISA; n=3. Bars represent S.D.

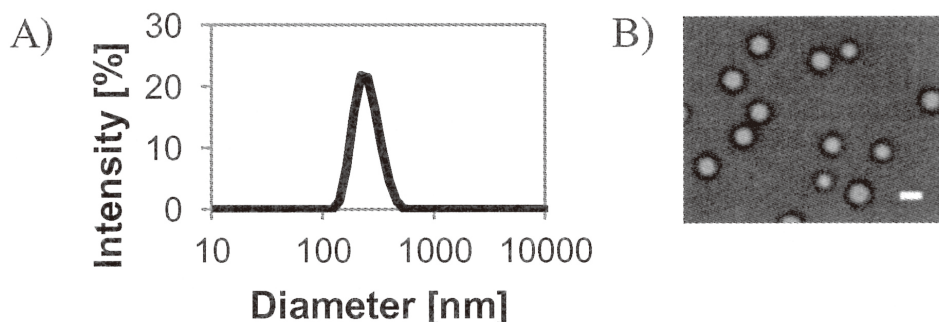


Fig. 3 Characteristics of G/O emulsion. (A) Size distribution of G/O emulsion evaluated with DLS; n=3. (B) Phase-contrast microscopic observation of G/O emulsion. Bar indicates 1 μm.

ルションは安定であり、経時的粒径変化は観察されなかった。さらに、G/O粒子の動的粘弾性測定を行った結果、同様に作製したW/Oエマルションと比較して硬いことが分かった。これより、G/O内水相のゲル化が期待された。

3.3. G/Oエマルションの皮膚浸透性評価

EGFP含有G/Oの皮膚浸透試験を行った後、皮膚断面の蛍光観察を行った。EGFPの皮膚浸透性は見られなかったが、G/O化することによりEGFPの皮膚内部への浸透が示された (Fig. 4)。また、G/O調製時にEGFPの活性は失われておらず、皮膚浸透後も活性を維持していることが示された。

3.4. 培養真皮モデルを用いたbFGF固定化G/Oの有効性評価

増殖因子不含培地と比較してbFGF含有培地の増殖促進効果は観察されなかった。これはbFGFの安定性の乏しさに起因するものである。また、bFGF固定化W/Oエマルションにより培養初期において細胞増殖促進効果が見られたものの、その効果は持続できなかった。一方、bFGF固定化G/Oエマルションにおいては他の条件と比較して有意な細胞増殖効果が確認され、少なくとも培養7日間その効果が持続した。よって、G/Oエマルションによる培養真皮モデルの活性化が期待された。

4. 総 括

ヘパリン導入コラーゲンゲルに増殖因子を固定化させることで、増殖因子の活性維持が確認された。また、内水相がヘパリン導入ゼラチンゲルであるG/O（粒径約293nm）

形成が示唆された。EGFP含有G/Oの皮膚浸透試験の結果、EGFPの皮膚浸透が示唆された。さらに、bFGF含有G/Oの塗布試験において培養真皮モデル活性化が示唆された。以上より、皮膚浸透性と有効成分の安定化および徐放性を有する新規スキンケア技術としてのG/Oエマルションの有効性が期待された。

謝 辞

G/Oエマルション作製および評価に尽力いただいた長尾征哉氏(九州大学)、山本恵美子氏(九州大学)に心よりお礼申し上げます。また、基材評価にご協力いただいた後藤雅宏教授(九州大学)、三浦佳子教授(九州大学)、小野文靖准教授(九州大学)に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご援助いただきましたことに深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Wakabayashi, R., Sakuragi, M., Kozaka, S., Tahara, Y., Kamiya, N., Goto, M., Solid-in-Oil peptide nanocarriers for transcutaneous cancer vaccine delivery against melanoma, *Mol. Pharm.*, 15, 955-961, 2018.
- 2) Tahara, Y., Honda, S., Kamiya, N., Piao, H., Hirata, A., Hayakawa, E., Fujii, T., Goto, M., A solid-in-oil nanodispersion for transcutaneous protein delivery, *J. Control. Release*, 131, 14-18, 2008.
- 3) Ye, J., Shirakigawa, N., Ijima, H., Hybrid organoids consisting of extracellular matrix gel particles and

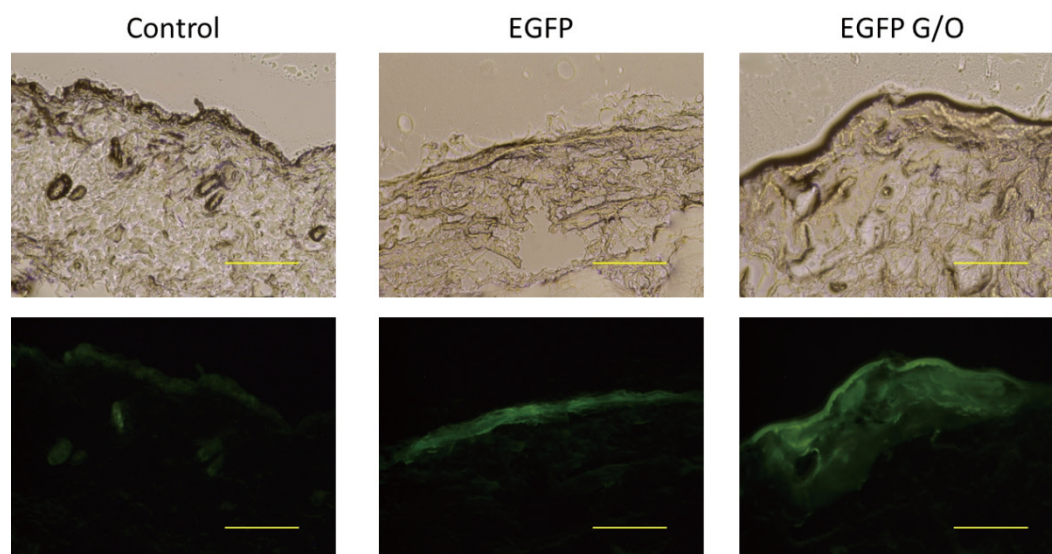


Fig.4 In vitro evaluation on skin permeability of G/O emulsion using mouse skin. Bars indicate 200μm.

- hepatocytes for transplantation, *J. Biosci. Bioeng.*, 120, 231-237, 2015.
- 4) Nakamura, S., Kubo, T., Ijima, H., Heparin-conjugated gelatin as a growth factor immobilization scaffold, *J. Biosci. Bioeng.*, 115, 562-567, 2013.
- 5) Hou, Y.-T., Ijima, H., Shirakigawa, N., Takei, T., Kawakami, K., Development of growth factor-immobilizable material for hepatocyte transplantation, *Biochem. Eng. J.*, 69, 172-181, 2012.
- 6) Hou, Y.-T., Ijima, H., Takei, T., Kawakami, K., Growth factor/heparin-immobilized collagen gel system enhances viability of transplanted hepatocytes and induces angiogenesis, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 265-272, 2011.
- 7) Hou, Y.-T., Ijima, H., Matsumoto, S., Kubo, T., Takei, T., Sakai, S., Kawakami, K., Effect of a hepatocyte growth factor/heparin-immobilized collagen system on albumin synthesis and spheroid formation by hepatocytes, *J. Biosci. Bioeng.*, 110, 208-216, 2010.
- 8) Ijima, H., Kubo, T., Hou, Y.-T., Primary rat hepatocytes form spheroids on hepatocyte growth factor/heparin-immobilized collagen film and maintain high albumin production, *Biochem., Eng. J.*, 46, 227-233, 2009.
- 9) Mizumachi, H., Ijima, H., Measuring stability of vascular endothelial growth factor using an immobilization technique, *Adv. Biomed. Eng.*, 2, 130-136, 2013.
- 10) Nagai, T., Ikegami, Y., Mizumachi, H., Shirakigawa, N., Ijima, H., Development of an in situ evaluation system for neural cells using ECM-modeled gel culture, *J. Biosci. Bioeng.*, 124, 430-438, 2017.