

ヒアルロン酸・コラーゲンのナノ粒子化による 新規皮膚浸透促進技術の開発とそのメカニズムの解明

佐賀大学

徳留 嘉寛

It is known that hyaluronic acid (HA) and collagen (COL) in the skin decrease with aging and environmental changes, causing wrinkles. It is important to add reduced HA and COL, but it is difficult to deliver water-soluble polymers from the skin into the body. Therefore, in this study, hyaluronic acid collagen nanoparticles were prepared by the poly-ion complex method. Particle size was increase, zeta potential did not change, and PDI was increase, depending on buffer concentration. Transmission electron microscopy images showed that the particles had a particle-like structure. Skin permeability was confirmed with nanoparticles made of fluorescently labeled collagen. As a result, fluorescence was observed in the skin with nanoparticulated collagen compared to non-particulated collagen. Hyaluronic acid collagen nanoparticles were shown to be a potential material for improving skin penetration of water-soluble polymers.

1. 緒言

ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid, HA) は皮膚や関節、脳、血液などに広く分布し、全身のHAのうち約50%が皮膚に存在している¹⁾。D-グルクロン酸とN-アセチル-D-グルコサミンの二糖単位が連結したアニオン性グリコサミノグリカンであり、生体で最大の水溶性高分子ポリマーである²⁾。コラーゲン (Collagen, COL) は皮膚、血管、骨組織など、体を構成するタンパク質の30%を占めており、真皮では約70%を占めている。COLを構成するアミノ酸はGly-Pro-Hypを中心としたGly-X-Yの繰り返し構造からなり、三本のポリペプチド鎖が三重らせん構造を形成している³⁾。COL線維に熱を加えることでタンパク変性を起こし、三重らせん構造が解離して一本鎖となる。変性後COLは酵素分解することで断片化され、コラーゲンペプチドへ変化することが知られている。COL線維の分子量は約300 kDaとされており、変性後COLの分子量は約100 kDa、COLペプチドは約0.1~10 kDaとされる。COLの種類は、皮膚の真皮や骨などに存在するI型COL、軟骨の主成分であるII型COLを代表として、現在約28種類のCOLが存在している⁴⁾。近年では人工臓器や人工皮膚などのバイオマテリアルとしての利用が増えている⁵⁾。

真皮中のHAやCOLは、加齢や紫外線暴露などの要因によって減少し、皮膚弾力性の低下を引き起こす^{6,7)}。これらの改善には、減少したHAやCOLを補充することが重要であるとされているが、HAやCOLは水溶性高分子

であるため受動拡散では角層を通過できない。現在、HAやCOLを皮膚に直接補充できる方法は、注入療法またはマイクロニードル⁸⁾を用いた場合のみとされている。また、現在多くの化粧品に配合されているHAやCOLは、皮膚の表面に留まることで水分蒸散を防ぎ、保湿機能を担っている。

著者らは、ポリイオンコンプレックス(polyion complex : PIC) 技術を用いたヒアルロン酸ナノ粒子 (HANP) によってHAの皮膚浸透性の向上を報告している^{9,10)}。

本課題ではHAとCOLの相乗効果を期待し、PIC技術によるヒアルロン酸・コラーゲンナノ粒子 (HACOLNP) による新規皮膚浸透促進技術の開発とそのメカニズムの解明を目的としている。特にこの研究課題ではHAとCOLから成るナノ粒子の調製と物性評価結果、また、本課題では特にCOLの皮膚浸透性を評価した。

2. 方法

2.1. 実験材料

ヒアルロン酸ナトリウム (平均分子量1,200 kDa) は化粧品グレードのものを入手し使用した。水溶性コラーゲンマリンジェンS-06 (PF) は新田ゼラチン株式会社 (大阪、日本) から供与された。蛍光標識コラーゲンはコスモ・バイオ (東京、日本) から購入した。試薬は特級グレードのものを精製せずにそのまま用いた。

2.2. ヒアルロン酸・コラーゲンナノ粒子の調製

ヒアルロン酸とコラーゲンの水溶液を調製し、それを攪拌混合することで粒子を得た。蛍光標識コラーゲンナノ粒子は同様に蛍光標識コラーゲン水溶液とヒアルロン酸水溶液を攪拌混合することで得た。

2.3. 粒子物性の測定

粒子径、多分散指数 (PDI) は動的光散乱法で、ゼータ



Development of novel skin penetration enhancement technology by nanoparticulation of hyaluronic acid and collagen and its mechanism

Yoshihiro Tokudome

Laboratory of Cosmetic Sciences, Saga University

電位はレーザードップラー電気泳動法により、ゼータサイザーウルトラ (Malvern、UK) により測定した。

2.4. 透過型電子顕微鏡観察

粒子の形態観察は透過型電子顕微鏡を用い、ネガティブ染色法で行った。ナノ粒子水溶液をカーボンコーティングされた銅グリッド (400 メッシュ) に吸収させ、2% タングステン酸溶液 (pH7.0) により 15 秒染色した。観察は JEM-1400 Plus (日本電子株式会社、東京、日本) により加速電圧 100 kV で測定した。画像は CCD カメラ (EM-14830RUBY2、日本電子株式会社) により撮影した。

2.5. 皮膚浸透性の確認

縦型拡散セル (有効透過面積 0.785 cm²) にヒト摘出皮膚を装着し、24 時間の皮膚透過試験を行った。拡散セルは 32℃ で保持し、開放系で、ドナー溶液はクエン酸 Buffer 群、非粒子コラーゲン、粒子化した HACOL 群または粒子化した FITC 標識コラーゲン・ヒアルロン酸とし、それぞれを 0.2 mL ずつ適用した。

試験開始 24 時間後に皮膚を採取し、表面をよく洗ったあとに凍結切片を作成した。FITC 標識 COLHA 粒子や FITC コラーゲンを適用した群は、蛍光顕微鏡で観察した。

3. 結果と考察

3.1. ナノ粒子の物性評価

1, 3, 15, 20, 30 そして 50mM のクエン酸緩衝液 (pH4) 中でヒアルロン酸・コラーゲンナノ粒子を調製した。調製する際のクエン酸緩衝液濃度が高くなるにつれてナノ粒子の粒子径は大きくなった (Fig. 1a)。ゼータ電位は調製する際の緩衝液濃度には大きな影響は受けなかった (Fig. 1b)。粒子径の分散を示す PDI は調製した緩衝液濃度が高くなるに従って大きくなり、特に 30 mM を超える濃度のときに PDI は大きくなった (Fig. 1c)。今回の試験で用いている粒子はイオンコンプレックスという技術により調製している。ポリイオンコンプレックスは陽または陰イオンを有する高分子を水溶液として混合した際に、互いのイオンを打ち消すように反応することで粒子化すると考えられている。イオン濃度が低いときはヒアルロン酸とコラーゲンのイオンが反応して粒子化していることが想定されるが、高い濃度の緩衝液中ではその緩衝液に含まれるイオンが粒子化を妨げている可能性が考えられる。我々の以前の検討で、ヒアルロン酸とポリリシンからなる粒子をリン酸緩衝液中に混合した際に、粒子が破壊されることを報告している¹⁰⁾ので、今回もそのようなメカニズムで粒子が不安定

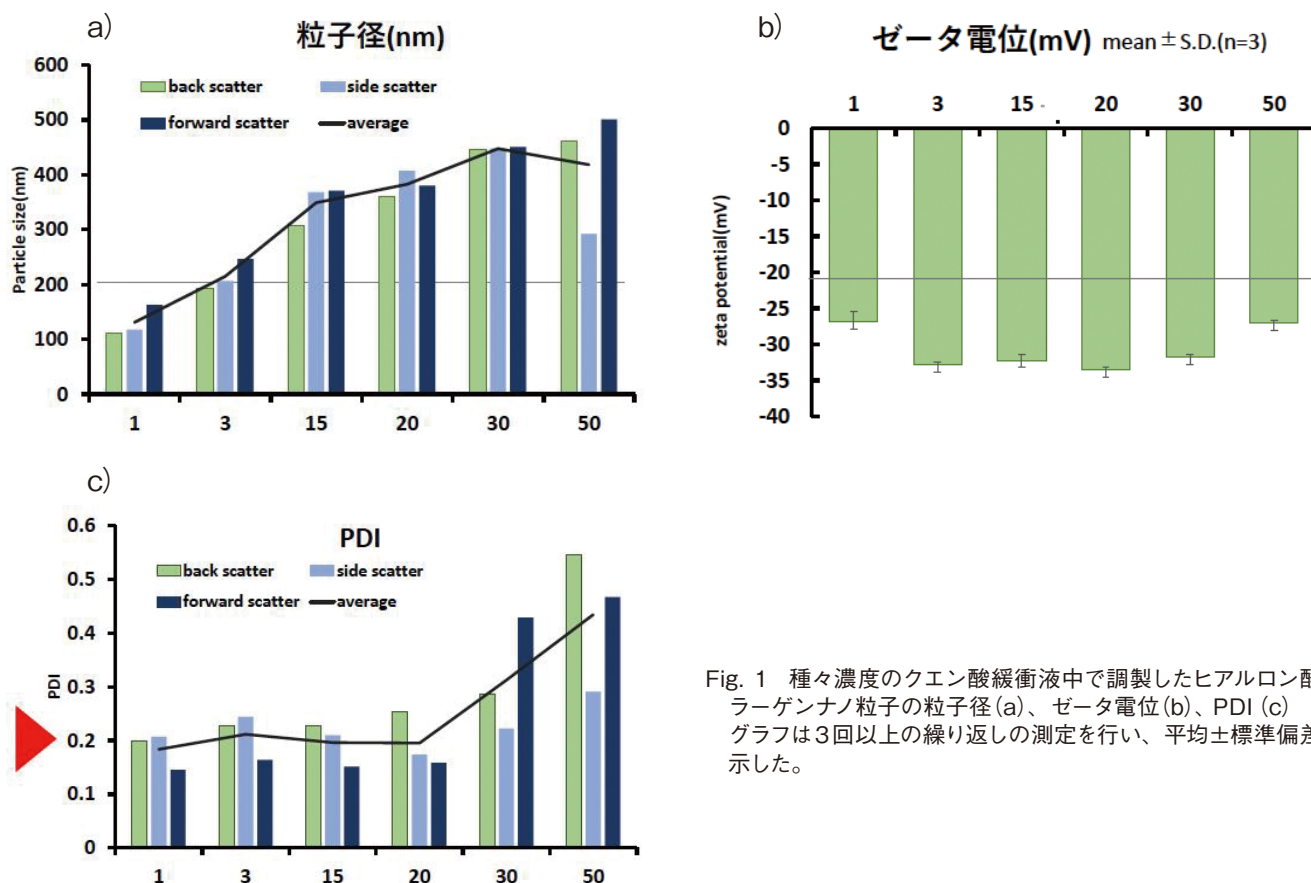


Fig. 1 種々濃度のクエン酸緩衝液中で調製したヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子の粒子径 (a)、ゼータ電位 (b)、PDI (c) グラフは3回以上の繰り返しの測定を行い、平均±標準偏差で示した。

Table 1 ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子と FITC コラーゲンヒアルロン酸の粒子径、ゼータ電位、PDI

サンプル	粒子径(nm)	PDI	ゼータ(mV)
HACOLNP	189.8±2.26	0.224±0.016	-32.86±0.44
FITC-COLHNP	178.6±8.13	0.264±0.01	-28.793±0.73

グラフは3回以上の繰り返しの測定を行い、平均±標準偏差で示した。

化している可能性がある。また、別に蛍光標識したコラーゲンを使用してヒアルロン酸コラーゲン粒子を調製した。その結果、非標識コラーゲンを使用したときと大きく変わらない物性をもつ粒子が調製された (Table 1)。

3.2. ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子の透過型電子顕微鏡観察

調製したナノ粒子を透過型電子顕微鏡で観察した。画像を Fig. 2 に示す。粒子は比較的球状であり、粒子の表面には斑点のような模様があることがわかった。今回行ったネガティブ染色の場合、水に親和性の高いところは黒く、水に親和性の低いところは白く観察される。今回はイオンコンプレックスで粒子を作成しているため、白く観察されているところは完全に陽イオンと陰イオンが電荷を打ち消し合っているところであり、黒い部分はイオンが遊離していることが推察される。このようにヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子の表面は均一な電荷状態ではないことが想定された。

3.3. ヒアルロン酸コラーゲン粒子の皮膚浸透性

蛍光標識されたコラーゲンを用いてヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子を調製し、ヒト皮膚を介した皮膚浸透試験を行った。24時間後に皮膚表面を洗浄、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡で皮膚中の蛍光を測定した (Fig. 3)。

調製した Buffer 液、非粒子化コラーゲンと比較して、ナ

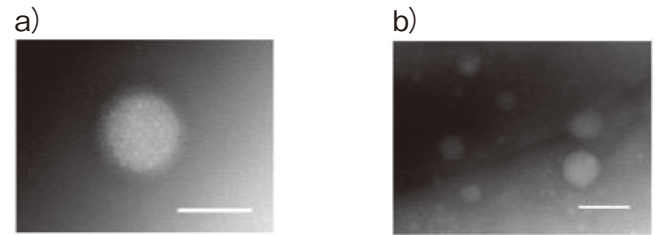


Fig. 2 ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子の透過型電子顕微鏡画像。粒子はネガティブ染色法で観察した。スケールバーは 200 nm を示した。

ノ粒子化したコラーゲンでは皮膚中に強い蛍光が観察された。興味深いことに非粒子化コラーゲンでは角層部分に強い蛍光が観察されたが、粒子化するとその蛍光は比較的弱くなった。これらのことからコラーゲンは粒子化することで効率的に皮膚内に浸透することが示唆される結果が得られた。我々は以前に粒子化したヒアルロン酸が皮膚内に浸透している可能性を報告しており、ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子はヒアルロン酸とコラーゲンを同時に皮膚内に送達可能な非常に興味深い材料であることが推察された。しかし、この蛍光画像の数値化ができておらず、定量的な評価ができていないことが今後の課題である。また、もう一つの課題として、この蛍光が蛍光標識コラーゲン由来であることを証明することが必要であり、サイズ排除クロマトグラフィーなどでの検討が必要である。こちらも現在検討を進めている。なぜ、粒子化することで高分子のコラーゲンが皮膚浸透するのかは議論の対象である。一般にイオン性化合物は皮膚浸透性が低いとされる。イオンコンプレックスを作ることで一部のイオンが打ち消されることで皮膚への浸透経路が変わり、皮膚浸透性が高まった可能性もあるが詳細は不明であり、今後の検討を要する。

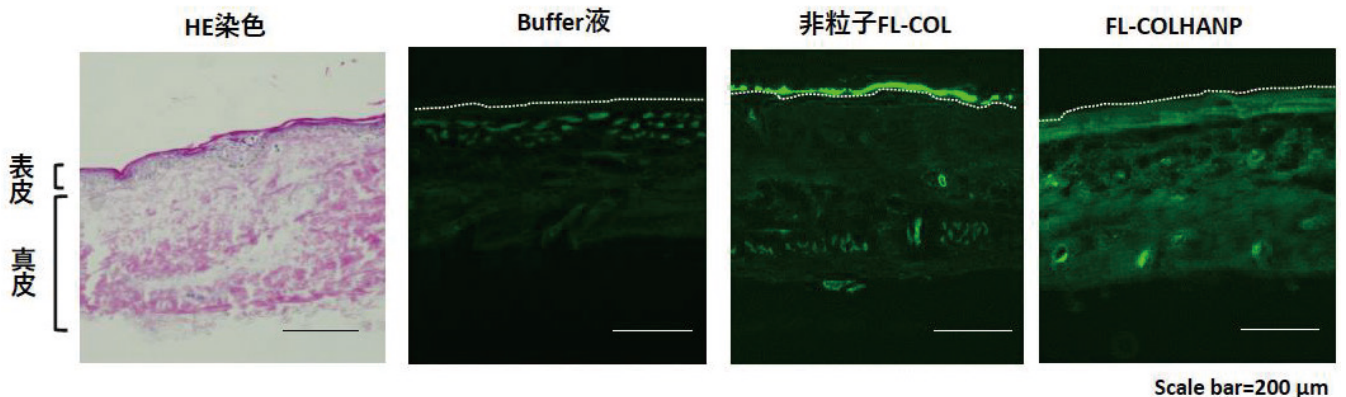


Fig. 3 FITC コラーゲンヒアルロン酸(ヒアルロン酸コラーゲン)ナノ粒子の皮膚浸透性。緑色は FITC コラーゲン由来である。スケールバーは 200μm を示した。

4. 総括

ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子を調製し、ヒト皮膚に適用したところ非粒子化コラーゲンと比較して粒子化したコラーゲンは皮膚浸透性が高い可能性が示された。また、以前の我々の検討とも合わせて考えると、ヒアルロン酸コラーゲンナノ粒子はヒアルロン酸とコラーゲンを同時に皮膚内に浸透させる画期的なマテリアルであることが推察された。

謝辞

本研究の遂行にあたりご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Susan S., Antonei B. C., Robert S., Hyaluronidase expression in human skin fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266, 268-273 (1999).
- 2) Weissmann B., Meyer K., Sampson P., Linker A., Isolation of oligosaccharides enzymatically produced from hyaluronic acid., *J. Biol. Chem.*, 208, 417-429 (1954).
- 3) Rich A., Crick F. H. C., The molecular structure of collagen, *J. Mol. Biol.*, 3, 483-506 (1961).
- 4) Kadler K. E., Baldock C., Bella J., Boot-Handford R. P., Collagens at a glance, *J. Cell Sci.*, 120, 1955-1958 (2007).
- 5) Lee C. H., Singla A., Lee Y., Biomedical applications of collagen, *Int. J. Pharm.*, 221, 1-22 (2001).
- 6) Morifuji M., The beneficial role of functional food components in mitigating ultraviolet-induced skin damage, *Experimental Dermatol.*, 28, 28-31 (2019).
- 7) Kon A., Hyaluronan in the skin and its correlation with dermatopathology, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 22, 68-79 (2010).
- 8) Henry S., McAllister D. V., Allen M. G., Prausnitz M. R., Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, 87, 922-925 (2008).
- 9) Tokudome Y., Komi T., Omata A., Sekita M., A new strategy for the passive skin delivery of nanoparticulate, high molecular weight hyaluronic acid prepared by a polyion complex method, *Sci. Rep.*, 8, 2336 (2018).
- 10) Shigefuji M., Tokudome Y., Nanoparticulation of hyaluronic acid: A new skin penetration enhancing polyion complex formulation: Mechanism and future potential, *Materialia*, 14, 100879 (2020).