

化粧品有効成分として的大豆ペプチドの皮膚透過性と その効果に関する研究

関根 孝*¹・藤堂浩明¹・横手よし子²・杉林堅次¹

¹城西大学大学院薬学研究科 ²城西大学理学部

Skin Permeation of Soy Derived Peptides as Cosmeceuticals

Takashi SEKINE¹, Hiroaki TODO¹, Yoshiko YOKOTE² and Kenji SUGIBAYASHI¹

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado 350-0295

²Faculty of Sciences, Josai University, Sakado 350-0295

ABSTRACT

Skin permeation of soy derived peptides (SP) and their production promotion effects of type I collagen were evaluated to examine the usefulness of SP as a cosmeceutical. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to examine a type I collagen production promotion effect showed a marked increase in type I collagen by SP application group and a further increase by simultaneous application with ascorbic acid phosphate magnesium (VC-PMg). In addition, the effect was dependent on the application concentration of SP. Amino acids such as glutamine (GLN) and glutamic acid (GLU) entrapped in SP were easily permeated through skin, whereas peptides (GLU-GLU and GLU-GLU-GLU) were seldom permeated through skin. However, adjustment of pH to pI of amino acids and/or addition of *l*-menthol markedly increased their skin permeation. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 127-131, 2008.

Key words: soy derived peptides, skin permeation, cosmeceutical, collagen production promotion

機能性ペプチドには大豆たん白質由来の大豆ペプチド (SP) の他、ゴマペプチド、サーディンペプチド等が存在し、これらは機能性食品 (特定保健用食品) として注目されている¹⁻³⁾。また、機能性食品の中には乳酸菌やオリゴ糖類の有効成分を含有するものがあり、それらは美容や健康に対する効果を謳う商品として特に注目されている^{4,5)}。美肌効果を期待する様々な

化粧品有効成分にコラーゲン産生による抗シワ効果が報告されており^{6,7)}、なかでも大豆たん白質を酵素分解処理することにより得られたSPは微量で多機能性であり、美肌効果⁸⁾やコレステロール低下¹⁾等の作用を有していると報告されている。SPを化粧品有効成分として効率よく、かつ目的に応じた量を送達するためには、有効成分のデリバリーシステムの構築が重要となる。たとえば、SPが化粧品有効成分として目的とする部位で十分な効果を発揮するためには、肝初回通過

*〒350-0295 坂戸市けやき台1-1

効果の回避等のメリットを有する経皮吸収によるデリバリーを考え、皮膚に透過もしくは浸透し生きた表皮や真皮へ必要量到達させなければならない^{9,10}。

そこで本研究ではSPの主な構成成分であるグルタミン (GLN)、グルタミン酸 (GLU)、グルタミン酸ジペプチド (GLU-GLU)、およびグルタミン酸トリペプチド (GLU-GLU-GLU) を皮膚に塗布し、各成分の皮膚透過性やSPの線維芽細胞からのコラーゲン産生効果について評価した。

方 法

SP含有アミノ酸の同定

10 mg/mLのSP溶液を、6 M蒸留塩酸により加水分解し、遊離したアミノ酸濃度を全自動アミノ酸分析装置 (JLC-300, 日本電子) により測定した (Table 1)。

I型コラーゲンの定量

細胞にはヒト真皮線維芽細胞 (HDF) を使用し、96穴wellプレートに 2×10^4 cells/wellで播種した。プレートを24時間37°C、CO₂インキュベート後、培地を吸引し、コントロールとして0.5%FBS含有DMEM、ポジティブコントロール (P.C.) としてコラーゲン産生に必須なビタミンC誘導体であるリン酸アスコルビルマグネシウム (VC-PMg) 含有培地を 1×10^{-3} %濃度で適用した。また、適用サンプルとして 1.92×10^{-4} 、 9.60×10^{-4} 、 4.80×10^{-4} %SP含有培地を使用し、ポジティブコントロールであるVC-PMgとの併用培地も同様に使用した。24時間37°C、CO₂インキュベート後、

Table 1. Relative proportions of the amino acid existence in SP

ASP	1.87
THR	0.62
SER	0.92
GLU	2.82
GLY	1.17
ALA	1.01
CYS	0.03
VAL	0.72
MET	0.16
ILE	0.54
LEU	1.00
TYR	0.37
PHE	0.54
H	0.35
LYS	0.90
TRP	0.27
ARG	0.95
PRO	0.91

培地 (上清) を採取し、直接法を用いたELISAでコラーゲン濃度の定量を行った。ELISAはウサギ由来の1次抗体およびヤギ由来の2次抗体を用いて発色した溶液をマイクロプレートリーダーにより測定した。

In vitro皮膚透過実験

ペントバルビタールナトリウム麻酔下の雄性ヘアレスラットの腹部からtape strippingにより角層を除去したstripped skinおよび角層を取り除かないintact skinとして摘出後、透過を遮るおそれがある皮下脂肪や血液等を除去し、Franz型拡散セルに挟んだ。このとき、セルは有効透過面積 1.77 cm^2 を有し、角層側のセルには2.5% GLN、0.5% GLUのpH7.4溶液、またそれぞれのpI付近pHの緩衝溶液、および0.5% GLU-GLU、0.5% GLU-GLU-GLUのpH7.4緩衝溶液、または促進剤として従来から使用されている*l*-mentholを3%含有したペプチド製剤、いずれか1.0 mL適用した。また、皮膚漏出アミノ酸を測定するためのコントロールとして、pH7.4リン酸緩衝液を角層側のセルに適用した。なお、真皮側にはpH7.4リン酸緩衝液を6.0 mL満たした。ウォータージャケットにより32°Cの水を環流させ、スターラーにより真皮側を攪拌状態に保った。適用後stripped skinでは0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6時間後、intact skinでは0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 22, 24時間後に1.0 mLずつ真皮側セルからサンプリングした。その後、遊離アミノ酸を全自動アミノ酸分析装置 (JLC-300) により測定し、皮膚透過量を算出した。ペプチドのサンプルについては6 M蒸留塩酸により加水分解し、遊離したGLUをJLC-300により測定した。

結果と考察

SP適用群におけるHDFからのI型コラーゲン産生量は、コントロールに比べ2倍程度増加した。さらに皮膚中のコラーゲン産生に必須であるビタミンC誘導体のVC-PMgとSPを併用することで、コラーゲン産出量はSP単独適用群に比べさらに増加し、SPの濃度依存的に有意に増加することが示唆された (Fig. 1)。

皮膚透過実験より、アミノ酸は皮膚から漏出し24時間経過後でもプラトーに達しないことがわかった (Fig. 2)。角層を取り除いたstripped skinにGLN、GLU、GLU-GLUおよびGLU-GLU-GLUを適用したところ、これらは顕著に皮膚を透過した (Fig. 3)。一方、intact skinに適用した場合、GLNおよびGLUはわずかながら透過していたもののジおよびトリペプチドでは皮膚透過が認められなかった。これらの結果から、ア

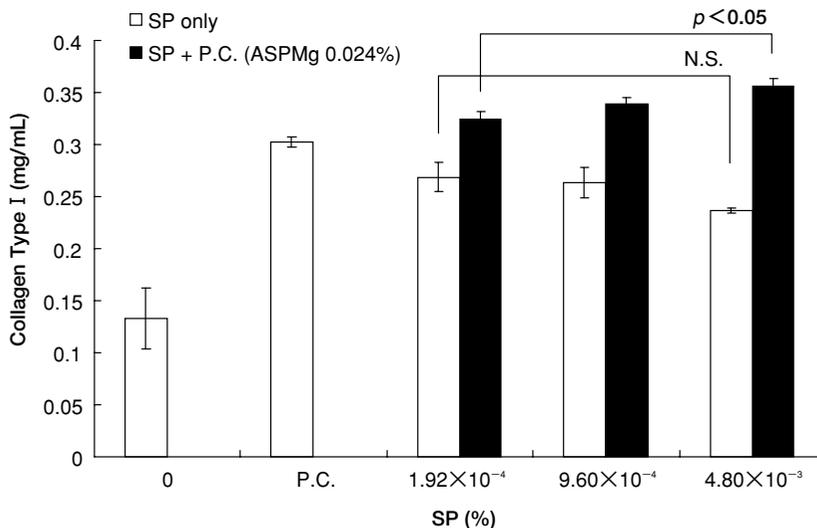


Fig. 1. Effect of SP and SP+P.C. on the collagen type I concentration in HDF (n=4).

ミノ酸やジ、トリペプチドの皮膚透過では角層が最大のバリアとなっていることが示唆された。したがって、特にジおよびトリペプチドの皮膚透過性を促進させるためには角層透過促進剤の使用が有効であると予測された。

なお、GLNおよびGLUについては緩衝液のpHをpI付近に合わせ、角層側に適用したところ皮膚透過量がわずかに増加した (Fig. 4)。すなわち、適用溶液中に分子型で存在するアミノ酸の量が増加すれば、皮膚透過が増進すると考えられた。また、GLU-GLUおよびGLU-GLU-GLUについては従来から透過促進剤として用いられている *l*-menthol を含有させたところ、確認できる程度に皮膚透過性が増加した (Fig. 5)。 *l*-menthol を適用することにより、細胞間脂質群にゆらぎが生じ角層細胞間脂質の極性ルートが開いたためだと考えられた^{11,12)}。

以上、得られた皮膚透過プロファイルのフラックスから permeability (cm/s) を算出した (Table 2)。Stripped skin は intact skin に比べ、permeability が 100 倍程度大きくなることがわかった。今後は、緩衝液の変更や *l*-menthol を加えて皮膚透過が促進した系を用いて繊維芽細胞からのコラーゲンの増殖性を評価する予定である。

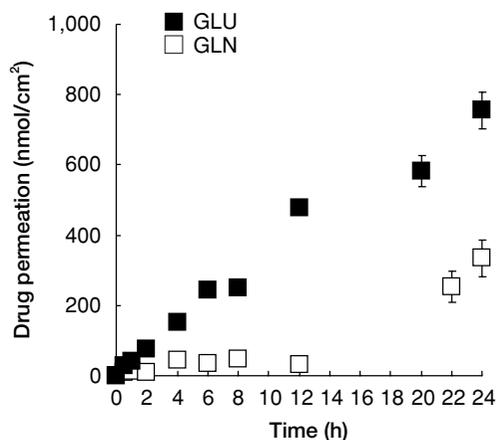


Fig. 2. Leakage profiles of GLU and GLN from hairless rat skin (n=9~15).

Table 2. Permeability coefficient (cm/s) of amino acids and peptides for stripped skin and intact skin

Donor solution		Stripped skin	Intact skin
GLN	pH7.40 buffer	1.02 × 10 ⁻⁵	8.75 × 10 ⁻⁸
	pH5.65 buffer	—	2.15 × 10 ⁻⁷
GLU	pH7.40 buffer	9.72 × 10 ⁻⁶	8.74 × 10 ⁻⁸
	pH3.22 buffer	—	1.19 × 10 ⁻⁷
GLU-GLU	<i>l</i> -menthol (-)	8.77 × 10 ⁻⁶	0
	<i>l</i> -menthol (+)	—	4.30 × 10 ⁻⁷
GLU-GLU-GLU	<i>l</i> -menthol (-)	7.76 × 10 ⁻⁶	0
	<i>l</i> -menthol (+)	—	3.65 × 10 ⁻⁷

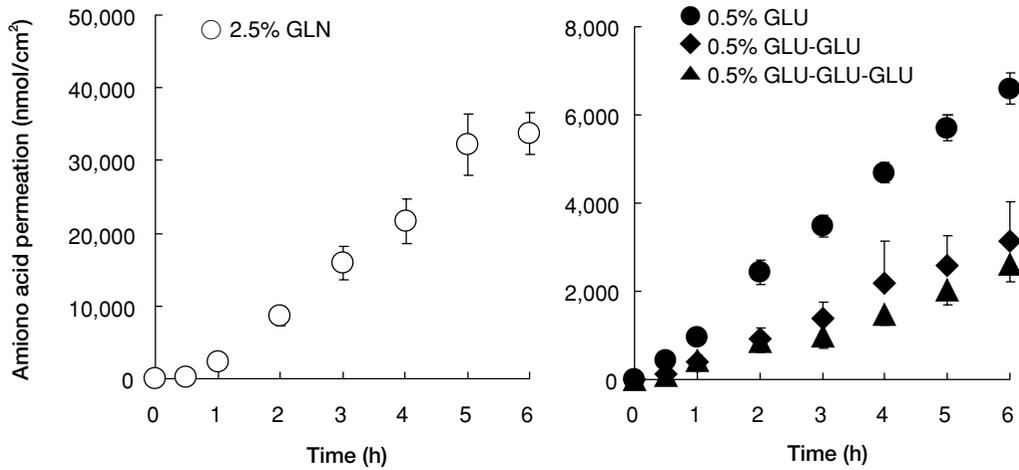


Fig. 3. Permeation profiles of amino acids and peptides through hairless rat stripped skin (n=6).

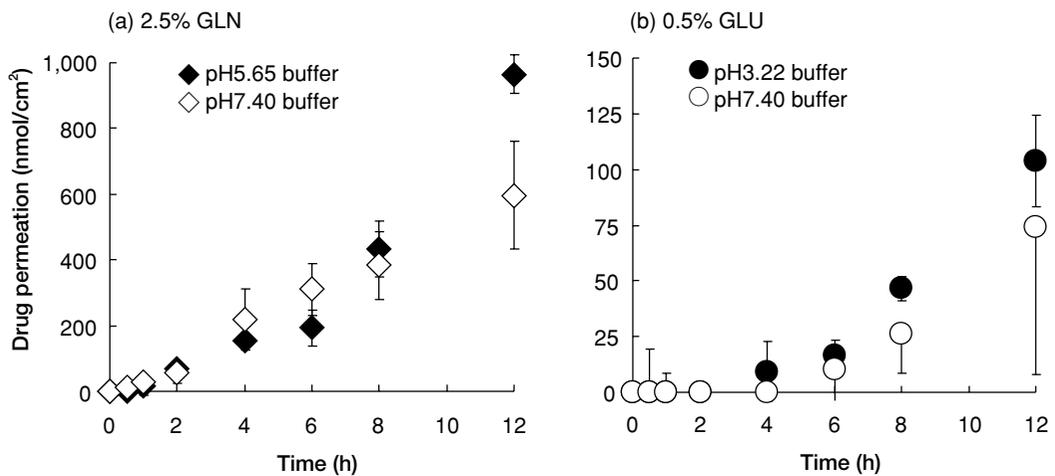


Fig. 4. Permeation profiles of GLN and GLU through hairless rat intact skin (n=3~6).

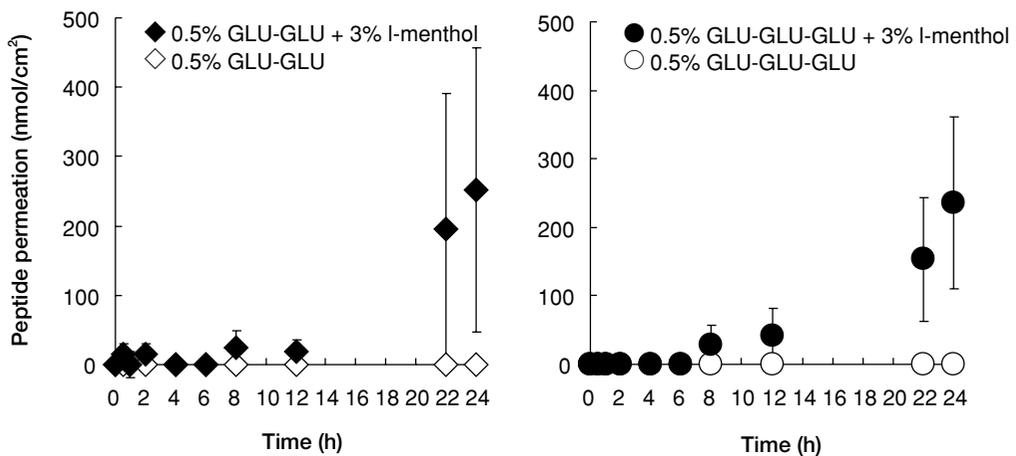


Fig. 5. Effect of 3% l-menthol on the permeation profiles of peptides through hairless rat intact skin (n=3).

要 約

SPの化粧品有効成分としての有用性をみるために、1型コラーゲン産生促進効果ならびに経皮吸収による皮膚透過性を評価した。1型コラーゲン産生促進効果をみるためにELISAを行った結果、SP適用群では1型コラーゲン量が顕著に増加することがわかり、P.C.であるVC-PMgと併用することでさらに増加し、SPの濃度依存的に有意に増加した。またSPの透過性を評価するために構成成分として多量に含まれるGLN, GLU, GLU-GLUおよびGLU-GLU-GLUの皮膚透過実験をおこなったところアミノ酸は健康な皮膚をわずかに透過したが、ペプチドは透過することがなかった。しかし、溶液のpHをアミノ酸pI付近に合わせ、ジ、トリペプチドには*l*-mentholを併用することで、それぞれの皮膚透過性が促進された。

文 献

- 1) Hori G, Wang MF, Chan YC, Komatsu T, Wong Y, Chen TH, Yamamoto K, Nagaoka S and Yamamoto S (2001): Soy protein hydrolyzate with bound phospholipids reduces serum cholesterol levels in hypercholesterolemic adult male volunteers. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65** (1), 72-78.
- 2) 森口盛雄, 飯野妙子, 楠本 晶, 柴田浩志, 太田裕見, 木曾良信, 横山一彦, 草野亜矢子, 小原孝男(2004): ゴマ蛋白質由来ペプチド添加茶飲料の正常高値血圧者および軽症高血圧者の血圧に対する影響と安全性. *健康・栄養食品研究*, **7** (1), 1-16.
- 3) 梶本修身, 関 英治, 箴島克裕, 土田 博, 松井利郎, 松本 清, 箴島 豊, 平田 洋, 藪根光晴, 川崎晃一 (2003): イワシ由来ペプチド含有食品の正常高値血圧, 高血圧に対する効果. *健康・栄養食品研究*, **6**, 65-82.
- 4) Canani RB, Cirillo P, Terrin G, Cesarano L, Spagnuolo MI, De Vincenzo A, Albano F, Passariello A, De Marco G, Manguso F and Guarino A (2007): Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. *BMJ*, **335**, 340.
- 5) Sung HY and Choi YS (2008): Fructooligosaccharide and soy isoflavone suppress colonic aberrant crypt foci and cyclooxygenase-2 expression in dimethylhydrazine-treated rats. *J Med Food*, **11** (1), 78-85.
- 6) Lee J, Jung E, Lee J, Huh S, Kim J, Park M, So J, Ham Y, Jung K, Hyun CG, Kim YS and Park D (2007): Panax ginseng induces human Type I collagen synthesis through activation of Smad signaling. *J Ethnopharmacol*, **109** (1), 29-34.
- 7) Koya-Miyata S, Okamoto I, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M and Kurimoto M (2004): Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68** (4), 767-773.
- 8) Jouandeaud M, Bordes S, Closss B, Viennet C and Humbert P (2006): Comparison of the biomechanical and biosynthetic behavior of normal human fibroblasts and fibroblasts from a forehead wrinkle. *Fragrance J*, **12**, 64-69.
- 9) Sugibayashi K (2007): Skin delivery and disposition of cosmetic ingredients from outside and/or inside. *Fragrance J*, **1**, 2-4.
- 10) Todo H and Sugibayashi K (2005): Skin-penetration enhancement and control of applied drugs. *Drug Delivery System*, **20-4**, 452-459.
- 11) Cornwell PA and Barry BW (1993): The routes of penetration of ions and 5-fluorouracil across human skin and the mechanisms of action of terpene skin penetration enhancers. *Int J Pharm*, **94**, 189-194.
- 12) Sugibayashi K, Morimoto Y (1995): Effect of *l*-menthol on skin permeation of drugs. *Aromatopia*, **4**, 56-59.