

高分子水溶性ナノ粒子の皮膚浸透挙動を題材とした高分子化合物の皮膚浸透メカニズムの解明

城西大学薬学部

徳留 嘉寛

Skin administration is a simple method of therapeutic and cosmetic application. However, the protective barrier provided by the skin makes it challenging to achieve delivery of high molecular weight compounds. Efforts to improve the penetration of hyaluronic acid (HA) have yielded nanoparticulate polyion complexes of HA with poly-L-lysine (HANP), which act as vehicles for delivering HA deeper into the skin. However, the mechanism for this effect and the response of HANP to the skin environment have not been explored. In this study, the penetration of HANP in skin is compared with that of HA, and differences in the pathways are identified. In addition, the properties of the particles in a simulated skin environment are assessed and HANP are found to show morphological changes in response to ions. These findings are expected to pave the way for future transdermal delivery of other high molecular weight ionic compounds such as proteins.

1. 緒言

皮膚を介する物質の皮膚透過は、投与の簡便さや中断の容易さ、肝初回通過効果の回避が可能であるといった点から注目されている。しかし、皮膚の最外層に存在する角層は、物質の透過に対してバリア機能を有しており、経皮吸収における最大の障壁となっている。一般的に受動拡散で皮膚を透過できる物質は分子量が500 Da以下で、比較的脂溶性の高い化合物とされている^{1,2)}。難皮膚浸透性化合物の浸透を向上させるために経皮吸収促進技術が多くの研究者により盛んに研究されている。経皮吸収促進技術は物理的促進法と化学的促進法に大別される。物理的促進法としては、マイクロニードル³⁾、イオントフォーシス⁴⁾等の技術が高分子化合物の皮膚浸透性を向上させるための研究として報告されている。しかし、これらにはわずかに皮膚を損傷させる、あるいは特別な機械を用いるため利便性に欠けるといった問題点がある。一方、化学的促進法として、良く知られているエタノール⁵⁾や α -メントール⁶⁾等が報告されている。しかしこれらは、比較的分子量が低い化合物の応用に限られ、高分子化合物には効果が低い。その他、最近では溶媒としてイオン液体を用いる手法⁷⁾等も報告されている。特に高分子化合物の皮膚浸透性の向上は多くの研究者にとって大きな課題である。九州大学の後藤先生らのグループでは、非侵襲的に化合物を皮膚内に浸透させるため、水溶性薬物をナノコーティングし油状基材中に分散させるOil-in-solid製剤⁸⁾が研究されている。しかし、S/O

製剤は調製の段階で凍結乾燥を行う必要があり、薬物の変性が懸念される。

本研究では調製が容易であり、有機溶媒や界面活性剤を使用せずにナノ粒子を形成できるPolyion complex (PIC)技術に着目した。PICは反対に帯電した高分子電解質間の強い静電的相互作用により、互いの電荷を打ち消し合って形成される集合体であり^{9,10)}、生体適合性の高い試薬を用いることで安全性の高いナノ粒子の調製が可能であると考えられている。また、水に溶解した化合物を加工せずに用いるため、温度による変性等を考慮する必要がない。

PICを用いた以前の研究で我々は、アニオン性化合物にHAを用いてHyaluronic acid nano particle (HANP)を調製することで、HAの皮膚浸透性が向上したことを報告している¹¹⁾。HAは分子量が約数百万の水溶性高分子であるため、一般的には受動拡散での皮膚内への浸透は困難であると考えられていた。皮膚の水分・弾力性維持に重要な役割を担っているHAの皮膚浸透性を向上させたHANPは、シワやたるみの改善といった皮膚機能改善効果が期待される。しかし、HANPが皮膚をどのような経路を介して通過しているのか、粒子の形態を保ったまま皮膚に浸透しているのかといった具体的な浸透のメカニズムはまだまだ解明されていない。

本研究課題では、アニオン性化合物にHA、カチオン性化合物にPoly-L-lysine hydrochloride (PLL)を用いてHANPを調製し、この粒子を用いて高分子水溶性ナノ粒子の皮膚浸透挙動を題材とした高分子化合物の皮膚浸透メカニズムの解明を目的に検討を行った。

2. 方法

2.1. 実験材料

ヒアルロン酸ナトリウム (FCH-120, M.W. 1,200 kDa, 純度:99.9%)はキッコマンバイオケミファ(東京、日本)を用いた。ポリリジン (PLL)、アセトアルデヒド、シクロ



The skin penetration mechanism of high molecular weight compounds based on the skin penetration behavior of hyaluronic acid nanoparticles

Yoshihiro Tokudome, Ph.D.

Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Josai University

ヘキサリソシアニド、コレステロール、パルミチン酸、コレステロール硫酸はシグマ製 (St. Louis, MO, USA) のものを使った。5-アミノフルオレセイン、ケラチンは東京化成工業 (東京、日本) から購入した。ジパルミトイルフォスファチジルコリンは日本精化 (兵庫、日本) から供与されたものを用いた。その他溶媒は、富士フィルム和光純薬工業 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬は特級グレード以上のものを精製せずに用いた。

2. 2. 蛍光標識ヒアルロン酸の調製

Fluorescence-labeled HA (FL-HA) は、アルデヒド、アミン、イソシアニド、カルボン酸の4成分縮合反応で調製した¹²⁾。調製したHL-HA中に未反応の5-FLの混入を除くためにセルロースチューブを用いて24時間透析を行った。FL-HA溶液を凍結乾燥し、FL-HA粉末とした。

2. 3. ヒアルロン酸ナノ粒子の調製

1mMのFL-HA水溶液と0.1mMのPLL水溶液をFL-HA:PLL = 1:2となるように混合し、室温で15分間攪拌することでFL-HANPを得た。また、0.1mMのHA水溶液と0.1mMのPLL水溶液をHA:PLL = 1:1となるように混合してHANPを得た。

2. 4. *In vitro* 皮膚浸透性試験

動物の取り扱いには城西大学動物実験管理委員会により承認された方法に従って実施した。6週齢の雄性ヘアレスマウスは、株式会社星野試験動物飼育所 (茨城、日本) から購入した。マウスから採取した全層皮膚と、採取後にテープストリッピングによって角層を除去した角層除去皮膚を使用した。縦型フランツ拡散セル (有効透過面積: 1.77cm²) に表皮側を上にして皮膚を装着した。レシーバ側を5mLの精製水で満たし、ドナー側にFL-HA水溶液またはFL-HANP水溶液を1mL適用した。セルの温度は32℃に保ち、24時間皮膚浸透性試験を行った。24時間後に、角層除去皮膚と全層皮膚からそれぞれ凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で皮膚中の蛍光を観察した。さらに全層皮膚からは角層を剥離し、顕微鏡で角層の表面を観察した。

2. 5. リン脂質リポソームへの吸着性の評価

Dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) をクロロホルムに溶解し、溶媒を留去することで薄膜を作製した。精製水で水和後、凍結融解後、超遠心機により、289,000×g、4℃の条件で15分間遠心分離した。得られた沈殿に精製水を1mL加えて再分散させたものをリン脂質リポソームとした。リン脂質リポソームとHA水溶液またはHANP水溶液が1:19の比率になるように混合し、24時間攪拌した。289,000×g、4℃の条件で15分間遠心分離し、上清のHA

をHPLCで定量した。

上清中のHAは、YMC-Pack Diol-300カラム (300×8.0 mm, S-5μm, 30nm) を用いたHPLCによって確認した。移動相は10mM酢酸アンモニウム:メタノール=8:2、流速は1mL/minに設定した。注入量は50μLとし、210 nmの波長で紫外線検出を行った。

2. 6. HAのケラチンへの吸着性の評価

ケラチンパウダーにHA水溶液、またはHANP水溶液を1mL添加し、24時間攪拌した。0.45μmのフィルタでケラチンパウダーを濾過し、(リン脂質リポソーム)と同様の条件でろ液中のHAを定量した。

2. 7. 角層細胞間脂質リポソーム (SCLL) への吸着性の評価

クロロホルムに溶解したセラミド(40%)、コレステロール(25%)、パルミチン酸(25%)、コレステロール硫酸(10%)を混合し、溶媒を減圧留去して薄膜を作製した。精製水で水和後、超遠心機により、289,000×g、4℃の条件で15分間遠心分離した。得られた沈殿に精製水を1mL加えて再分散したものをSCLLとした。SCLL分散液とHA水溶液またはHANP水溶液が1:19の比率になるように混合し、24時間攪拌した。289,000×g、4℃の条件で15分間遠心分離し、上清のHAをHPLCで定量した。

2. 8. 全反射型フーリエ変換赤外分光法による角層細胞間脂質の流動性の評価

ヘアレスマウスの全層皮膚を採取し、精製水、0.05mM HA水溶液、0.05mM PLL水溶液、HANP水溶液、FL-HANP水溶液に1、6、24時間浸漬させ、FTIRで測定を行った (測定条件: 積算回数: 40、分解能: 0.9 cm⁻¹、測定温度: 32℃)。

2. 9. HANPの形態観察

HANPの形態を2%リンタングステン酸溶液によるネガティブ染色を用いて、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope: TEM) (JEM-1400Plus、JEOL Ltd.、東京、日本) で観察した。また、PBSを最終濃度が150 mMとなるように添加したHANPの形態をTEMにより観察した。

2. 10. 統計分析

全てのデータは少なくとも3回の独立した結果からの平均±標準偏差 (SD) とした。Student's t-test、Dunnett's testで統計処理を行った。

3. 結果

3. 1. ヒアルロン酸ナノ粒子の調製

FL-HAとPLLからFL-HANPを、HAとPLLからHANPを調製した。FL-HANPは粒子径が 242.5 ± 22.7 nm、PDIが 0.58 ± 0.10 、ゼータ電位が -49.8 ± 3.9 mVのナノ粒子であった。HANPは粒子径が 92.2 ± 7.8 nm、PDIが 0.20 ± 0.03 、ゼータ電位が -29.5 ± 2.6 mVのナノ粒子であった(Table 1)。

3. 2. *In vitro*皮膚浸透性試験

角層除去皮膚を用いてFL-HA、FL-HANPの皮膚浸透

性を調査した。FL-HA適用群では皮膚表面にFL-HA由来の蛍光が観察された。FL-HANP適用群では非粒子のHAよりも皮膚深部へのFL-HAの浸透が観察された。この結果より、HAを粒子化することによる皮膚への浸透性の向上が示された(Fig. 1 a, b, c and d)。

また、全層皮膚にFL-HA水溶液またはFL-HANP水溶液を適用し、皮膚浸透性試験を行ったところ、FL-HANP適用群で角層に強い蛍光が確認された。しかし、角層以下へのFL-HAの浸透は見られなかった(Fig. 1 e, f, g and h)。皮膚表面から角層を剥離し、表面を観察したところ、FL-HA適用群では角質細胞に、FL-HANP適用群では角層細胞間脂質にFL-HA由来の蛍光が観察された(Fig. 2)。

Table 1 Physical properties of HANP and FL-HANP

Sample	Particle diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
FL-HANP	242.5 ± 22.7	0.58 ± 0.10	-49.8 ± 3.9
HANP	92.2 ± 7.8	0.20 ± 0.03	-29.5 ± 2.6

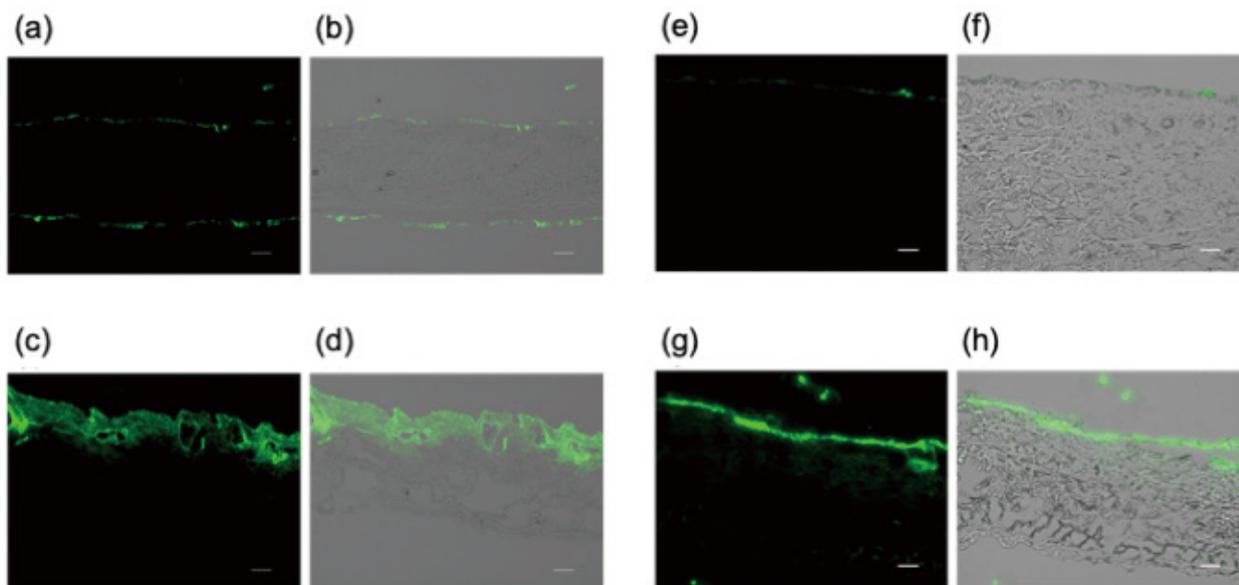


Fig. 1 Cross-sectional fluorescence image of hairless mouse skin.

(a) Stripped skin, fluorescence image, HA application, (b) Stripped skin, bright field image, HA application, (c) Stripped skin, fluorescence image, HANP application, (d) Stripped skin, bright field image, HANP application, (e) Full thickness skin, fluorescence image, HA application, (f) Full thickness skin, bright field image, HA application, (g) Full thickness skin, fluorescence image, HANP application, (h) Full thickness skin, bright field image, HANP application. Scale bars indicate 50 μ m.

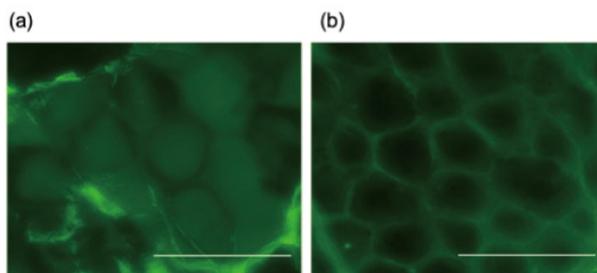


Fig. 2 Skin surface fluorescence image of hairless mouse. (a) Fluorescence image, HA application. (b) Fluorescence image, HANP application. Scale bars indicate 50 μ m.

これらの結果より、HAは細胞内経路、HANPは細胞間経路を通じて皮膚に浸透している可能性が示された。HAをナノ粒子化することで、透過経路が変化する可能性が示された。

3. 3. HANPの皮膚構成物の吸着性 (*in vitro*での検討)

角層除去皮膚を用いた皮膚浸透性試験の結果より、FL-HANP適用群でFL-HAの皮膚深部までの浸透が確認された。HAをナノ粒子化することで生体膜との相互作用が変化する可能性がある。ここでは、生体膜のモデルとしてリン脂質リポソームとの吸着を、角質細胞のモデルとしてケラチンとの吸着を、また、角層細胞間脂質のモデルとして、角層細胞間脂質から構成したりポソーム (SCLL) との吸着を確認した。

生体膜の代替としてリン脂質リポソームを用いることで、HANPと生体膜の間で起こる相互作用を推察した。HANP

はHAよりも有意に高い吸着率を示した (Fig. 3a)。したがって、HANPは生体膜と強く相互作用する可能性があることが想定された。

次に角質細胞の主成分であるケラチンを用いてHAと角質細胞の相互作用を調査した。HAはHANPよりも有意に高い吸着率を示した (Fig. 3b)。したがって、HAはHANPと比較して角質細胞と強く相互作用する可能性がある。

最後にSCLLとの吸着を確認した。HANPはHAよりも有意に高い吸着率を示した (Fig. 3c)。したがって、HANPは角層細胞間脂質と強く相互作用する可能性があることが想定された。

3. 4. ATR-FTIRを用いた検討

2850 cm^{-1} 付近に現れるCH₂対称伸縮振動、2920 cm^{-1} 付近に現れるCH₂逆対称伸縮振動由来のピークが高波数側へシフトすることで脂質の流動性が上昇することが知られているが、全ての群において、ピークの高波数側への有

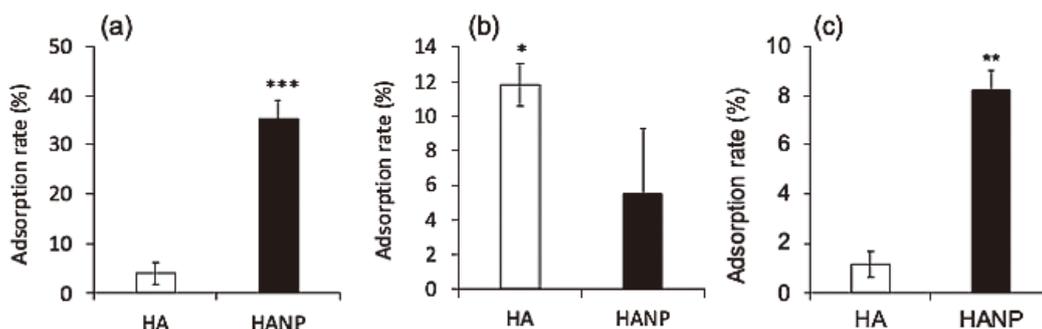


Fig. 3 Adsorption of HANP and HA on (a) phospholipid liposomes, (b) keratin, or (c) SC lipid liposomes. Values represent the mean and standard deviation (SD) of three independent results. Statistical processing was performed using Student's t-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Table 2 Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) measurements of CH symmetric (a) and asymmetric (b) stretching vibrations in the stratum corneum after 1, 6, and 24 h.

(a)	1 h	6 h	24 h
Control	2850.1 \pm 0.1	2849.9 \pm 0.1	2849.9 \pm 0.2
Distilled water	2850.0 \pm 0.0	2849.8 \pm 0.0	2849.8 \pm 0.2
HA	2849.8 \pm 0.2	2850.1 \pm 0.1	2849.9 \pm 0.1
PLL	2849.8 \pm 0.0	2849.8 \pm 0.1	2849.8 \pm 0.0
HANP	2849.9 \pm 0.1	2849.9 \pm 0.1	2849.8 \pm 0.0
FL-HANP	2850.1 \pm 0.2	2849.8 \pm 0.1	2849.9 \pm 0.1

(b)	1 h	6 h	24 h
Control	2917.6 \pm 0.3	2917.6 \pm 0.1	2917.3 \pm 0.2
Distilled water	2917.4 \pm 0.2	2917.4 \pm 0.1	2917.6 \pm 0.4
HA	2917.3 \pm 0.2	2918.0 \pm 0.3	2917.7 \pm 0.2
PLL	2917.3 \pm 0.2	2917.5 \pm 0.0	2917.6 \pm 0.1
HANP	2917.3 \pm 0.2	2917.5 \pm 0.4	2917.8 \pm 0.6
FL-HANP	2917.8 \pm 0.3	2917.6 \pm 0.2	2918.0 \pm 0.1

Samples: Control (stratum corneum only), Distilled water (vehicle), HA (hyaluronic acid), PLL (poly L-lysine), HANP (hyaluronic acid nanoparticle), FL-HANP (fluorescently labeled HANP). Values represent the mean and standard deviation (SD) of three independent results.

意なシフトは見られなかった (Table 2)。

3. 5. TEMによるHANPの形態観察

皮膚に適用されたHANPは、ナノ粒子の形態を保ったまま皮膚に浸透しているのか、結合がほどけてHAとして皮膚に浸透しているのかを調査するため、HANPにPBSを添加した。PBSの最終濃度が150mMとなるようにHANPに添加することで、皮膚に接触した後のHANPの形態を推測した。

HANPは粒子径200nmほどの球形の粒子であり (Fig. 4)、時間が経過しても変化しなかった (Fig. 4a, b)。共存

イオン存在下では形態の変化が観察された (Fig. 4c, d)。物性値も大きく変化した (Fig. 5)。

4. 考 察

本研究課題では、ヒアルロン酸ナノ粒子を用いて高分子水溶性ナノ粒子の皮膚浸透挙動を題材とした高分子化合物の皮膚浸透メカニズムの解明を目的に検討を行った。

1mMのFL-HAと0.1mMのPLLを1:2の比率で混合して調製したFL-HANPをヘアレスマウスの角層除去皮膚に適用し、24時間皮膚浸透性試験を行った。FL-HA適用群と比較し、FL-HANP適用群で皮膚深部へのFL-HAの

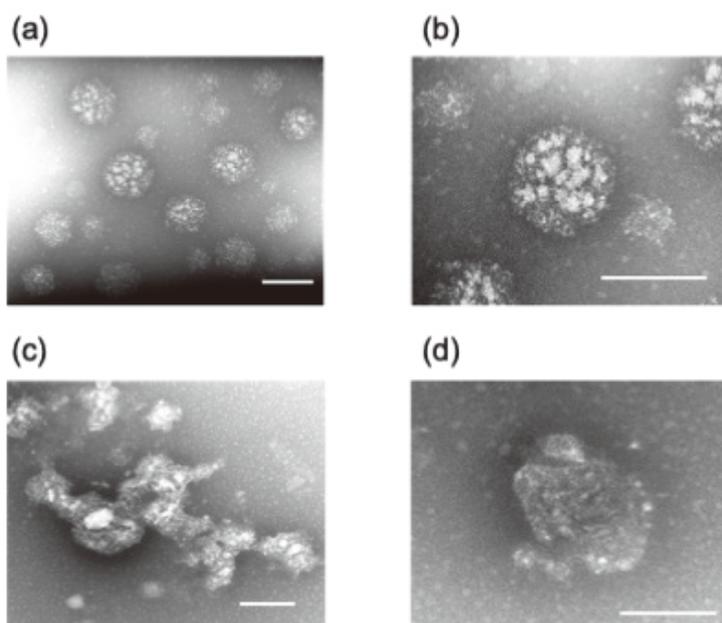


Fig. 4 Observation of HANP morphology by transmission electron microscopy (TEM)
 (a) HANP and distilled water, (b) HANP and PBS (final concentration: 150 mM), (c) HANP and distilled water (enlarged view), (d) HANP and PBS (final concentration: 150 mM) (enlarged view). Scale bar indicates 200 nm.

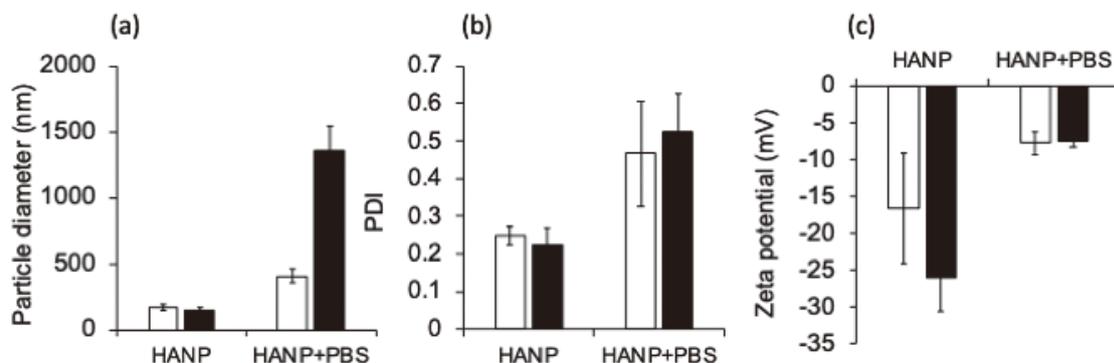


Fig. 5 Particle diameter, PDI, and zeta potential of HANP and HANP on addition of PBS (final concentration of 150 mM).
 (a) Particle diameter, (b) PDI, (c) zeta potential. Values represent the mean and standard deviation (SD) of three independent results.

浸透が確認された。この結果から、一般的に皮膚への浸透が困難であるとされている水溶性高分子化合物のHAをナノ粒子化することで、皮膚への浸透性が改善されることが示唆された。

次いで、角層を除去した皮膚へのHAまたはHANPの浸透メカニズムを解明することとした。角層除去皮膚の表面は、生細胞の細胞膜であると考えられるため、リン脂質リポソームを用いた疑似的な生細胞膜への吸着性を調査した。HA群と比較して、HANP群でリン脂質リポソームへの吸着性が有意に高かった (Fig. 3a)。この結果は角層除去皮膚を用いた皮膚浸透性試験により得られた切片画像と似た傾向を示しており、非粒子のHAよりもHANPの皮膚浸透性が高いことを支持する結果となった。このことから、HANPは生体膜へのより強い相互作用によって皮膚浸透性が高まると考えられる。

皮膚浸透性試験後の全層皮膚から角層を剥離し、皮膚表面から蛍光顕微鏡で観察すると、FL-HA適用群では角質細胞に、FL-HANP適用群では角層細胞間脂質に蛍光が確認された (Fig. 2)。このことから、HAとHANPでは角層を通過する経路が異なる可能性を考え、角質細胞および角層細胞間脂質に対して、それぞれがどのような相互作用をしているのかを調査することとした。まず、角質細胞の主成分であるケラチンへの吸着性から、HAまたはHANPと角質細胞の相互作用を調査したところ、HA群でケラチンへの吸着性が有意に高かった (Fig. 3b)。また、角層細胞間脂質と組成が類似しているSCLLへの吸着性から、HAまたはHANPと角層細胞間脂質の相互作用を調査したところ、HANP群で有意にSCLLへの吸着性が高かった (Fig. 3c)。これらの結果は、Fig. 2 (角層表面の顕微鏡画像) の画像を支持する傾向を示していた。水溶性高分子であるHAは角質細胞への吸着性が高いため皮膚深部まで浸透せずに表面で留まり、HANPは小さな粒子を形成しているほか、細胞間脂質への吸着性が高いことで細胞間脂質を介して皮膚に浸透することが示唆された。角質細胞を介する細胞内経路は少なくとも細胞膜を2回透過する必要がある。また、細胞間脂質の表面積を考慮すると細胞間経路を介する浸透の方が有利である。そのため、ナノ粒子化をすることによって、より浸透が有利な経路を介して水溶性高分子化合物を皮膚に浸透させることができる可能性が示された。また、リン脂質リポソームへの吸着性の結果から、HANPは角層を通過した後に、生細胞膜に対して高い吸着性を示すことが考えられる。よって、PIC技術によるナノ粒子は、非粒子の化合物と比較して、角層を通過した後により皮膚深部まで浸透する可能性が示された (Fig. 3a)。

HANP適用後の角層の流動性をATR-FTIRで調査した。角層に特異的に検出される 2850cm^{-1} 、 2920cm^{-1} 付近のピークは、それぞれ CH_2 対称伸縮振動、 CH_2 逆対称伸縮振

動由来のピークとされる。これらのピークの高波数側へのシフトは、トランス配座からゴーシュ配座への立体配座の変化を表しており、ゴーシュ配座が増加することで脂質の充填効率が低下する。つまり、赤外吸収の波数は脂質の流動性上昇に伴い高波数側にシフトする。Control群と比較してHANP、HANPの構成成分であるHA、PLL等の全サンプルで、ピークの高波数側への有意なシフトは確認されなかった (Table 2)。すなわち、角層流動性に大きな変化はなかったことから、HANPは脂質の流動性を乱して皮膚に浸透している可能性は低く、従来の浸透促進技術よりも皮膚バリア機能に対し大きな影響を与えないと考えられる。

最後に、皮膚に適用した後のHANPは、粒子化したまま皮膚に浸透しているのか、もしくは結合が崩壊してHAとPLL単体として浸透しているのかを調査するために、HANPにPBSを加えることで生体に接触したときと同条件 (PBS 150mM) を想定し、物性値を測定した。PBSを加えることで粒子径とPDIは増大、ゼータ電位の絶対値は減少した (Fig. 5)。また、TEM画像においても、PBSを加えることでHANPの形態が変化した (Fig. 4) ことから、HANPは共存イオンの影響によって崩壊した可能性がある。この現象はイオンによってPICの静電相互作用が乱れることが原因で誘発されると考えられるため、HANPを皮膚に適用した際に、皮膚中のイオンと反応して同様の現象が起こると推測した。このことから、皮膚浸透後にHANPは崩壊し、皮膚中でHA単体として水分・弾力性維持の機能を果たすことが期待できる。HANPとしての生体に対する安全性はいまだ不明であるため、粒子としての形態を保ったまま皮膚に浸透するよりも、皮膚中で崩壊して非粒子のHAとなることで安全性が高まると考えられる。しかし、HANPは角層に接触した際に皮膚表面で崩壊するのか、角層に浸透した後に皮膚中で崩壊するのかは定かではない。前述のようにHANPの崩壊にはイオンが大きく影響すると考えられることから、よりイオン強度の高いところで崩壊する可能性が高い。これらのことから、HANPは皮膚適用直後に崩壊するのではなく、皮膚に浸透する過程で徐々に崩壊することが予想されるが、引き続き調査が必要である。また、PLLの挙動についてもいまだ不明な点があるため、HANPとして皮膚に適用した後のPLLの局在を引き続き調査する必要がある。

以上の本研究課題結果から、水溶性高分子をナノ粒子化することで皮膚浸透経路が異なることで高分子の皮膚浸透性を向上させた可能性があることがわかった。

(引用文献)

- 1) Bos J.D., Meinardi M.M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs,

- Exp Dermatol.* **9**, 165-169 (2000).
- 2) Flynn G.L., S.H. Yalkowsky S.H., Correlation and prediction of mass transport across membranes I: Influence of alkyl chain length on flux-determining properties of barrier and diffusant, *J Pharm Sci.* **61**, 838-852 (1972).
 - 3) 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 (1998).
 - 4) Langkjær L., Brange J., Grodsky G.M., Guy R.H., Iontophoresis of monomeric insulin analogues in vitro: Effects of insulin charge and skin pretreatment, *J Control Release.* **51**, 47-56 (1998).
 - 5) Marjukka Suhonen T., Bouwstra J.A., Urtti A., Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations, *J Control Release.* **59**, 149-161 (1999).
 - 6) Kunta J.R., Goskonda V.R., Brotherton H.O., Khan M.A., Reddy I.K., Effect of menthol and related terpenes on the percutaneous absorption of propranolol across excised hairless mouse skin, *J Pharm Sci.* **86**, 1369-1373 (1997).
 - 7) Zakrewsky M., Lovejoy K.S., Kern T.L., Miller T.E., Le V., Nagy A., et al., Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **111**, 13313-13318 (2014).
 - 8) Kitaoka M., Wakabayashi R., Kamiya N., Goto M., Solid-in-oil nanodispersions for transdermal drug delivery systems, *Biotechnol J.* **11**, 1375-1385 (2016).
 - 9) Dautzenberg H., Polyelectrolyte complex formation in highly aggregating systems. 1. Effect of salt: Polyelectrolyte complex formation in the presence of NaCl, *Macromolecules.* **30**, 7810-7815 (1997).
 - 10) Schatz C., Lucas J.-M., Viton C., Domard A., Pichot C., Delair T., Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers, *Langmuir.* **20**, 7766-7778 (2004).
 - 11) 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).
 - 12) de Belder A.N., Wik K.O., Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate, *Carbohydr Res.* **44**, 251-257 (1975).