I·T·O CLI COS NEWS
Clinic Cosmetic News
クリニックのための化粧品原料情報誌
『クリ・コス・ニュース』
2011 VOLUME 21 6月

bFGFの皮膚への各種導入方法の検討

近年、美容を目的とした使用で様々な報告がなされている塩基性線維芽細胞増殖因子bFGF。しかしながら、分子量が約18KDaと非常に大きいため、皮膚への塗布のみでは経皮吸収されにくい。そこでbFGFの皮膚への効率良い導入方法の検討を行った。

第54回日本形成外科学会総会・学術集会ランチョンセミナー風景

浸透しにくいbFGFの皮膚への効率良い導入方法として エレクトロポレーション、超音波イオン導入、マイクロニードルの検討を行った

近年、EGFやbFGF等のグロスファクターに模倣させた機能性ペプチドが化粧品に利用されてきている。これらは従来の保湿材料、栄養源、pH調整剤、抗酸化目的で使用されていたコラーゲン酵素分解物等の天然物タンパク質を分解したものとは異なり、コラーゲン産生促進作用等の細胞に対して特異的な作用を有したものである。

しかしながら、塩基性線維芽細胞増殖因子のbFGFのように医薬品登録されているものは、化粧品では使用できない現状があり、注意が必要である。

科研製薬株式会社製の医薬品のフィブラスト®スプレー（bFGF 製剤）は、創傷治癒を促進するために用いられているもので、近年はこれを皮内注射により抗シワ等の美容目的に使用する試みが報告されている。しかしながら、注射療法では疼痛、皮下出血等の他に、長期的な局所の発赤や硬結形成等の副作用が報告されており、さらには製剤自体が注射用製剤ではないため、コンタミネーション等の安全性の点でも問題がある。そのため、できれば経皮的に投与させる方法が望まれていた。

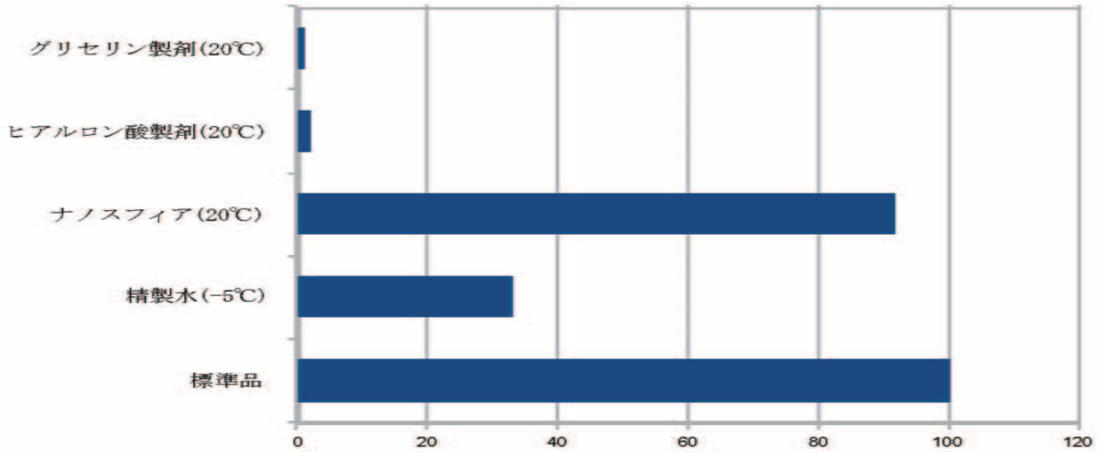
しかしながら、bFGFは分子量が約18KDaと非常に大きく、一般的に経皮吸収されるものは500Da以下のものといわれているため、単純に皮膚に塗布しただけでは皮膚内に浸透するとは考えにくい。可能であれば、イオン導入等のデバイスを用いた、簡便な方法での経皮投与方法の確立が必要であると考えられる。

そこで我々は、外用塗布、エレクトロポレーション（アクシダーム、次頁図1；株式会社 トレジャー社）、超音波イオン導入、マイクロニードル（コラーゲン及びヒアルン酸で作製された長さ800μmの針）の、4つの異なる導入方法を用いて、最適なbFGFの皮膚内への導入方法の検討を、基礎実験としてマウス皮膚片を用いて行い、さらには、臨床試験によるシワ改善効果等の評価を行った。

なお、本研究は第54回日本形成外科学会総会・学術集会で、クリニックモリ院長森文子先生により発表された内容である。

EGF等の不安定ペプチドの安定化にEPCナノスフィア

ビタミンC/E誘導体を利用したナノカプセル包摂体。包摂成分の浸透性、安定性の向上、徐放性等の特徴を有し、電荷を持たない成分でも包摂することによりイオン導入が可能になる。



HPLC 分析法を用いた bFGF製剤の安定性試験（一ヵ月後の bFGFの力価）

2011年学会

開催日	学会・展示会名	場所	地域
6/29（水）～7/1（金）	第2回国際化粧品開発展	東京ビッグサイト	東京
8/29（月）～31（水）	第63回日本産科婦人科学会学術講演会	大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪	大阪
9/9（金）～10（土）	第26回日本乾癬学会学術大会	大阪国際会議場	大阪
9/10（土）～11（日）	第29回日本美容皮膚科学会総会・学術大会	海峡メッセ下関	山口
9/17（土）～18（日）	第75回日本皮膚科学会東部支部学術大会	ベイシア文化ホール（群馬県民会館） 前橋商工会議所会館	群馬
9/29（木）～30（金）	第34回日本美容外科学会総会	グランド・ハイアット・福岡	福岡
10/8（土）～9日（日）	第63回日本皮膚科学会西部支部学術大会	沖縄コンベンションセンター	沖縄
11/9（水）～11（金）	COSMOPROF ASIA 2011	HONG KONG CONVENTION &EXHIBITION CENTER	香港

バックナンバーをご希望の方はお申しつけください

特集：IFSCC Congress/Exhibition
2010年12月号

特集：ITOユーザーズミーティング
2011年2月号

特集：パントエア菌糖脂質素材
2011年3月号

特集：ファンデーション用粉体
2010年4月号

特集：麹菌発酵大豆培養物
2010年5月号

vol.16　26th IFSCC Congress Exhibition 2010 Buenos Aires レポート
vol.17　ITOユーザーズミーティング 2010レポート
vol.18　「パントエア菌糖脂質素材」による生態恒常性維持と皮膚への応用
vol.19　スキンケア機能を有する天然由来のファンデーション用粉体の開発
vol.20　抗アレルギー効果を有するサプリ原料、「麹菌発酵大豆培養物」

I·T·O Provitamin
株式会社 アイ・ティー・オー
東京本社：〒180-0006 東京都武蔵野市中町1-6-7-3F
Tel 0422-60-3434 Fax 0422-60-3435
神戸支店：〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町5-5-2-352
Tel 078-304-7499 Fax 078-304-7599
Tel 0120-31-6588
E-mail ito@provitamin.jp

本誌内容の詳細・お問い合わせは上記へ。クリニックで活用されたい場合は追加でお送りいたします。

基礎実験：各種導入方法を用いて bFGFがマウス皮膚内に浸透するか否か

bFGFは分子量が約18KDaと非常に大きく、単純に皮膚に塗布しただけでは皮膚内に浸透するとは考えにくい。そこで、外用塗布、エレクトロポレーション、超音波イオン導入、マイクロニードルの各種導入方法を用いて評価を行った。

マウス皮膚片を用いた基礎試験評価

1）実験方法

実験には、4週齢、オスのヘアレスマウスを用いた。マウス背部から皮膚を2cm×2cm程度に採取した後、その中心部位に1%ヒアルロン酸溶液で溶解した科研製薬株式会社製のフィブラスト®スプレーを塗布し（最終濃度：bFGF 100μg/m L）、エレクトロポレーション、超音波イオン導入、マイクロニードルを用いて導入を行った後、37℃、5%CO2の条件下で24時間培養を行った。24時間後、皮膚片をPBSにて洗浄し、ELISA法（使用キット：FGF Basic, Human, ELISA Kit for Cell and Tissue Lysate, RayBio <bFGF, ELISA Kit>）を用いて皮膚内のbFGF濃度を測定した。

また、同様の方法で、bFGFよりも分子量の大きい緑色蛍光タンパク質（GFP、m.w.約27KDa）の導入をエレクトロポレーション、超音波イオン導入、マイクロニードルを用いて行い、共焦点レーザー顕微鏡にて皮膚内のGFPの分布の観察を行った。

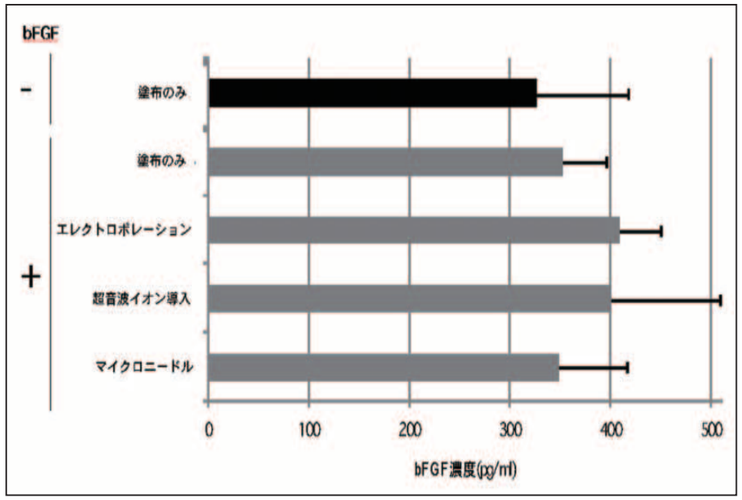


図2　ELISAによるマウス皮膚内bFGFの定量結果

図1　本研究で使用したエレクトロポレーション機器“アクシダーム”（株式会社トレジャー社）

2）結果及び考察

i ）各種導入方法におけるマウス皮膚内のbFGF濃度。

図2に、ELISA法によるマウス皮膚内bFGF濃度の定量結果を示した。

bFGF塗布のみ、エレクトロポレーション、超音波イオン導入、マイクロニードル全てにおいて、bFGF無塗布のControlと比較してbFGF濃度の上昇傾向がみられた。特にエレクトロポレーションと超音波イオン導入では、高いbFGF濃度の上昇傾向がみられており、この時点ではこの二つの導入方法がbFGFを効率良く皮膚内に導入する方法として最適なものと考えられた。

しかしながら、bFGFのレセプターは主に表皮ケラチノサイトよりも真皮線維芽細胞に存在しており、真皮までbFGFが到達していなければ意味をなさないと考えられ、今回のELISA法による解析は皮膚全体、つまり表皮と真皮両方を含んだbFGF濃度の定量であるため、実際にbFGFが真皮まで到達しているかどうかは定かではない。

そこで、bFGFが各種導入方法により真皮まで到達するか否かを検討するため、分子量がbFGFよりも大きいGFPの導入をエレクトロポレーション、超音波イオン導入、マイクロニードルにより行った後、24時間培養後のマウス皮膚内のGFPの分布の観察を共焦点レーザー顕微鏡にて行った。

ii ）共焦点レーザー顕微鏡観察によるマウス皮膚内のGFPの分布。

GFPは、オワンクラゲから単離された分子量約27KDaの蛍光タンパク質である。下村により発見・分離精製され、その発見の功績から下村は2008年にノーベル化学賞を受賞した。GFPは395nmの光で励起され、509nmの光を蛍光として発するため、今回の共焦点レーザー顕微鏡観察では緑色を呈する。また、対比染色として今回はDAPIにより核染色を行った（青色を呈している）。

図3は、GFP塗布のみの結果を示したが、GFP無塗布のControlと同様に表皮、真皮どちらにおいてもGFPは検出されなかった。一方で、エレクトロポレーション及びマイクロニードルでは、真皮内で多くGFPが検出された（図4右上、左下）。しかしながら、超音波イオン導入では表皮に強くGFPが検出されるのみで、真皮にはあまり検出されなかった（図4右下）。すなわち、エレクトロポレーション及びマイクロニードルによる導入ではGFPは真皮まで到達するが、超音波イオン導入では真皮まで到達せず表皮部位で留まってしまっていることが示唆された。

27KDaと比較的分子量の大きいGFPで、エレクトロポレーション及びマイクロニードルにより真皮内まで導入が可能であることから、GFPより若干分子量の小さいbFGFにおいても、この2つの導入方法により真皮部位まで到達させることは可能であると考えられる。しかしながら、超音波イオン導入ではGFPと同様にbFGFも真皮まで到達することは不可能だと考えられる。おそらく、表皮と真皮を隔てる基底膜を突破するのが困難であると推察され、表皮内で留まってしまうと考えられる。

よって、今回の検討では、エレクトロポレーションとマイクロニードルがbFGFを効率よく導入する方法、すなわち真皮まで導入する方法として有用なものであると示唆された。特にエレクトロポレーションでは、ELISA法によるbFGF濃度の定量結果においてマイクロニードルよりも高いbFGF濃度を示したことから、bFGFの最適な導入方法としてはエレクトロポレーションが特に有用であると考えられる。

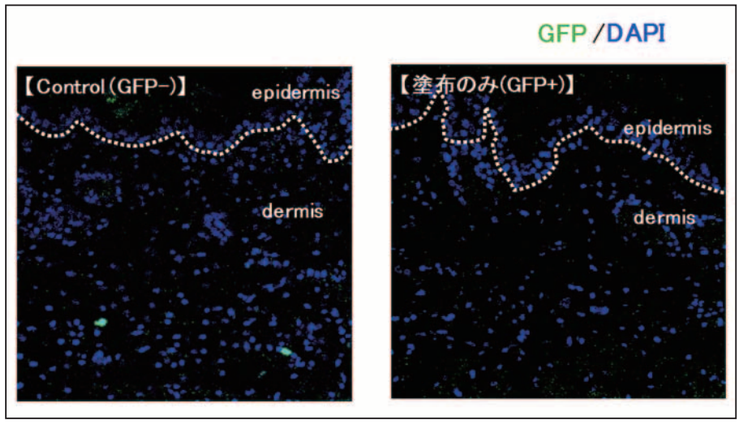


図3　共焦点レーザー顕微鏡観察によるマウス皮膚内のGFPの分布（GFP塗布のみ）

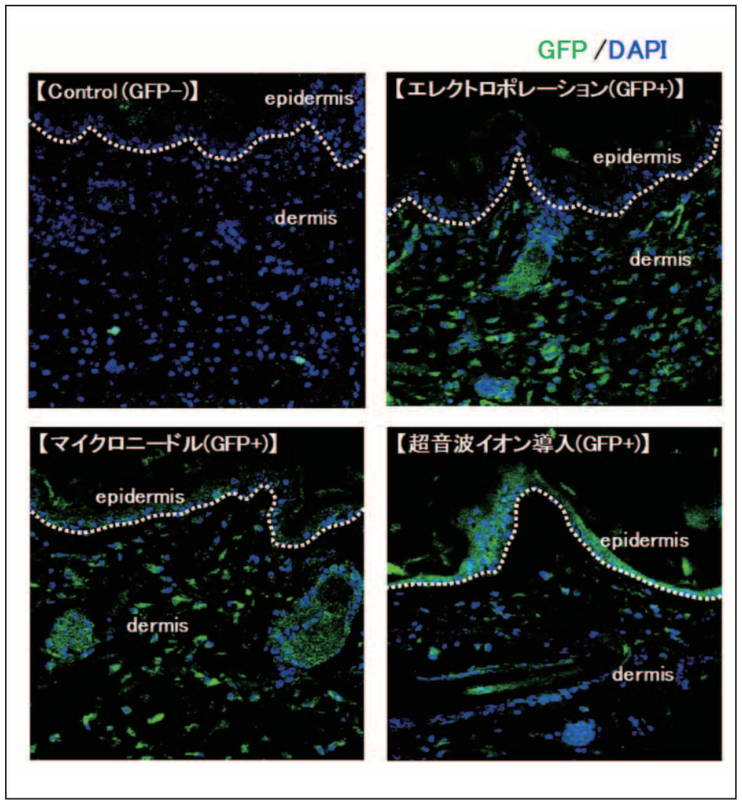


図4　共焦点レーザー顕微鏡観察によるマウス皮膚内のGFPの分布（エレクトロポレーション、マイクロニードル、超音波イオン導入）

臨床試験：bFGFの各種導入方法におけるシワ改善効果

マウス皮膚片を用いた基礎試験評価では、bFGFの皮膚への最適な導入方法としてエレクトロポレーションが最も有用なものだと考えられた。では、実際に臨床試験評価ではどの導入方法が最適なものなのであろうか。

各種導入方法における臨床試験評価

1）方法と対照

今回試験に用いたbFGFは、先の基礎実験と同様に科研製薬株式会社製のフィブラスト®スプレーであり、0.1%ヒアルロン酸製剤に溶解したものを用いて外用、エレクトロポレーション及び超音波イオン導入を行った。また、bFGFを含むマイクロニードルによる施術も行った。被験者は外用では67歳女性1名、エレクトロポレーションでは50～74歳女性（平均64.1歳）8名、超音波イオン導入では35～67歳女性（平均48.3歳）4名、マイクロニードルでは37～58歳女性（平均43.3歳）4名である。

2）結果及び考察

今回の試験では、被験者の数が少ないため結論付けることはできないが、外用及び超音波イオン導入においては目視におけるシワ改善効果はみられず、乾燥状態の改善のみにとどまった。しかしながら、エレクトロポレーション（図5）及びマイクロニードル（図6）では、比較的高いシワ改善効果が確認され、特にエレクトロポレーションでは施行回数を重ねるごとにシワ改善効果がさらに高くみられていた（図5下）。一方で、マイクロニードルでは注射手技同様に一回の施術でも効果がみられたが、その反面発赤等の副作用がみられていた（図6）。

よって、今回の臨床試験における検討では、効果及び副作用のバランスの観点から、最適なbFGF導入方法としてエレクトロポレーションが最も有効だと考えられ、これは先の基礎実験と同様の結果であった。

しかしながら、マイクロニードルにおいても発赤等の副作用はみられたがシワ改善効果は確認され、且つ基礎試験評価における結果でbFGFよりも分子量の大きいGFPを真皮まで導入することが可能であることから、針の長さやbFGF濃度の改良等を行うことにより、注射手技に比較して簡便で且つ安全な施術方法になりうると考えられる。

bFGFの最適な導入方法はエレクトロポレーション

マウス皮膚片を用いた基礎試験評価では、エレクトロポレーション及び超音波イオン導入がbFGFの皮膚内濃度の最も高い傾向を示した。しかしながら、各種導入方法を用いてbFGFよりも分子量の大きいGFPの導入を試みたところ、エレクトロポレーションでは真皮までGFPが浸透していたが、超音波イオン導入では真皮よりも表皮に強くGFPが分布していた。つまり、基礎実験評価ではエレクトロポレーションがより効率よく真皮までbFGFを導入する方法として最適なものであると示唆された。

また、臨床試験評価では、シワ改善効果はエレクトロポレーションが最も高く、副作用も全く確認されなかった。一方で、超音波イオン導入においては、乾燥状態の改善のみで、シワ改善効果は確認することはできなかった。これは、先程の基礎試験評価の結果から、bFGFが真皮まで浸透せずに表皮部位でとどまってしまっているためだと考えられる。また、マイクロニードルにおいては一回の施術で効果がみられたが、発赤等の副作用も見られたため、臨床試験評価においても、基礎試験評価と同様にエレクトロポレーションが最も有効な導入方法だと示唆された。

表1　臨床所見のまとめ（効果）

	外用（被験者：1人）	エレクトロポレーション（被験者：8人）	超音波イオン導入（被験者：4人）	マイクロニードル（被験者：4人）
変化なし	0人	0人	0人	0人
乾燥症状のみの改善	1人	3人	4人	2人
写真上他覚的な改善あり	0人	5人	0人	2人

表2　臨床所見のまとめ（副作用）

	外用（被験者：1人）	エレクトロポレーション（被験者：8人）	超音波イオン導入（被験者：4人）	マイクロニードル（被験者：4人）
重篤な副作用（不可逆的な変化）	0人	0人	0人	0人
軽微な副作用（不快症状出現のみ）	0人	0人	0人	2人

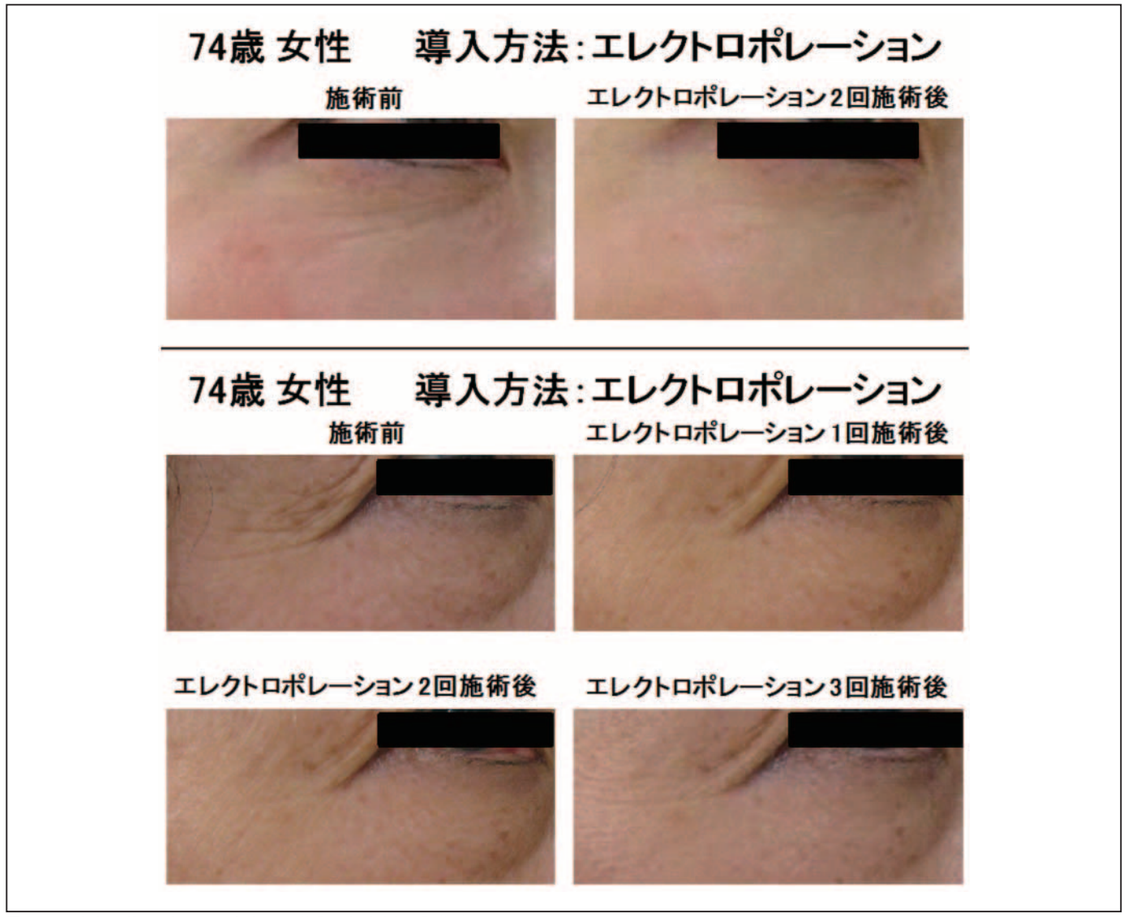


図5　エレクトロポレーションによるbFGF導入におけるシワ改善効果

図6　マイクロニードルによるbFGF導入におけるシワ改善効果

今後の展望

今回の検討により、bFGFの最適な導入方法としてエレクトロポレーションが最も有効であると考えられた。しかしながら、基礎実験においてはELISA法によるbFGF濃度の定量結果で有意差が見られなかった点が懸念される。これは、bFGFの安定性が非常に悪く、塗布後24時間には多少分解が進んでしまっている可能性が考えられるため、今後さらに時間のドーズをふって解析していく予定である。

さらに、今回は“浸透性”に焦点を置いて解析を行ったが、実際にⅠ型コラーゲンの合成促進が引き起こされているか否か等の効果の面でも解析を進めていく必要があると思われる。また、臨床試験においてはさらに被験者数を増やして解析を行っていく予定である。

最後に、今回の解析では超音波イオン導入はあまり効果がないという結論を下したが、あくまでもbFGFの導入方法における場合であり、ビタミンC誘導体等の導入においては全く効果がないというわけではないことを付け加えておきたい。