

「クリ・コス・ニュース」 ClinicCosmeNews 6月

CLINIC COSME NEWS 2012 Vol.27

b-FGFの皮膚への 各種導入方法の検討～第二報

去年の第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b-FGFの真皮への経皮的な導入方法としてエレクトロポレーションが最適なものであると発表された。今回、さらにレーザーと超音波イオン導入を併用した方法を用いて、Rejuvenation及び瘢痕改善効果の評価を行ったので報告する。

本報告は第55回日本形成外科学会総会・学術集会ランチョンセミナー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。

化粧品原料としてはb-FGFを含む医薬品成分は厚労省で特別に許可を取得しない限り化粧品の原料としては使用ができないので注意が必要である。

■b-FGFについて■

医薬品である科研製薬株式会社製のフィブラスト®スプレー(b-FGF製剤、以下「b-FGF」と略す)は主に創傷治癒を促進するために用いられているが、近年美容を行う医師によりこれをシワ改善などの美容目的で使用した報告が日本形成外科学会などでなされている。b-FGFの皮膚への導入方法の現状としては皮内注射が行われており、疼痛、皮下出血、長期的な局所の発赤や硬結形成等の副作用が懸念される。そのため、注射療法にかわる経皮的な投与方法が必要であると考えられる。しかし

b-FGFは分子量が約18kDaと大きいため、単純な外用塗布では皮膚内に浸透するとは考えにくい。

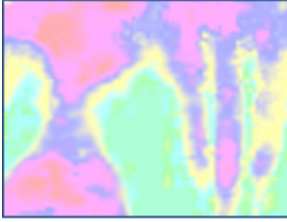
■前回までの研究経緯■

前回の第54回日本形成外科学会総会・学術集会同ランチョンセミナーにおいて、皮内注射にかわるb-FGFの真皮への経皮的な導入方法として、エレクトロポレーションや超音波イオン導入が有効なものになりうることを報告した。皮膚内のb-FGFの濃度はエレクトロポレーション及び超音波イオン導入が最も高い傾向を示した。一方、比較として行ったGFP(緑色蛍光タンパク)の皮膚内分布はエレクトロポレーションでは真皮まで分布していたのに対して、超音波イオン導入では真皮よりも表皮に多く分布していた。つまり、基礎実験評価ではエレクトロポレーションが最も有効性が高い可能性が示唆された。

また、臨床試験の方法としては、基礎実験と同様にb-FGFを用いて外用塗布、エレクトロポレーション、超音

波イオン導入、マイクロニードルにより施術を行い、Rejuvenation効果を評価した。その結果、外用塗布及び超音波イオン導入では乾燥状態の改善はみられたが、写真上他覚的な改善はみられなかった。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比較的高いRejuvenation効果が確認された。しかし、マイクロニードルでは注射手技同様に発赤等の副作用がみられたため、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。

エレクトロポレーションは高いRejuvenation効果はみられるものの、瘢痕改善効果においては硬い肌理の皮膚のためか十分な導入効果が得られていない印象があった。そこで、今回はb-FGFの導入をレーザーと超音波イオン導入を組み合わせた方法を用いて検討を行った。



分子量の大きいb-FGFの導入を エルビウムヤグフラクショナルレーザーと超音波イオン導入の併用に て行い、Rejuvenation効果及び瘢痕改善効果の評価を行った。

基礎試験評価 ～b-FGFの浸透性評価試験

■実験方法 ■

今回b-FGFの浸透性の評価を行うために2つの実験を実施した。1つ目は、ヒト3次元培養表皮皮膚モデルと線維芽細胞の共培養におけるb-FGF導入3日後の線維芽細胞の増殖率の測定である。3次元培養表皮の表面にレーザー照射後、b-FGFを溶解したヒアルロン酸溶液(250 μ g/mL b-FGF)を塗布し、超音波イオン導入を30秒行ったのち、この3次元培養表皮を含むカップをあらかじめ37 $^{\circ}$ C、5%CO₂の条件下で5%FBS含有D-MEMにて24時間培養した線維芽細胞(3T3 cell)のウェルにのせ、72時間共培養を行ったその後、Alamar Blueにより細胞増殖率の測定を行った。

この実験系では、b-FGFが3次元培養表皮を通過して浸透すれば、その下部に存在する線維芽細胞に作用し、線維芽細胞の細胞増殖率が高まることを予測して行ったものである。

また、2つ目の実験としては、前回と同様にヘアレスマウス(HR-1)の背部皮膚を用いて、緑色蛍光タンパク質(m.w.約27KDa、以下「GFP」と記載)を上記と同様の方法で導入し、24時間後のGFPの分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。なお、今回使用したレーザーは、サイトン・ジャパン社製のフラクショナルEr:YAG JOULEであり、3次元培養表皮において

は深度75 μ mの条件で、マウス皮膚片においては深度150 μ mの条件で行った。また、今回は凝固の設定は行っていない。

■結果及び考察 ■

図1にレーザーと超音波イオン導入の併用方法によるb-FGF導入72時間後の線維芽細胞の細胞増殖率の測定結果を示した。b-FGF塗布のみでは、b-FGF無塗布のControlと比較して細胞増殖率の上昇傾向がみられた。さらに、レーザーと超音波イオン導入の併用方法により、さらに細胞増殖率が上昇する傾向が確認された。塗布のみでも細胞増殖率の上昇傾向がみられたことから、これはおそらく表皮細胞ケラチノサイトにb-FGFがな

んらかの作用を及ぼし、線維芽細胞の増殖を促す因子を分泌した可能性が考えられる。そのため、レーザーと超音波イオン導入の併用方法により細胞増殖率の上昇傾向は、表皮を浸透し線維芽細胞に到達したb-FGFによる作用の可能性が高い。

では、実際にb-FGFはレーザーと超音波イオン導入の併用方法により真皮まで浸透しているのだろうか。

図2にレーザーと超音波イオン導入の併用方法によるGFP導入24時間後のGFPの分布の結果を示した。GFP無塗布及びGFP塗布のみの場合は、表皮と真皮どちらにおいてもGFPは観察されなかった。

一方で、レーザーと超音波イオン導入の併用方法においては、真皮内に多くのGFPが観察された。つまり、レーザーと超音波イオン導入の併用方法により、GFPを真皮まで浸透させることが可能であることが示唆されたのである。

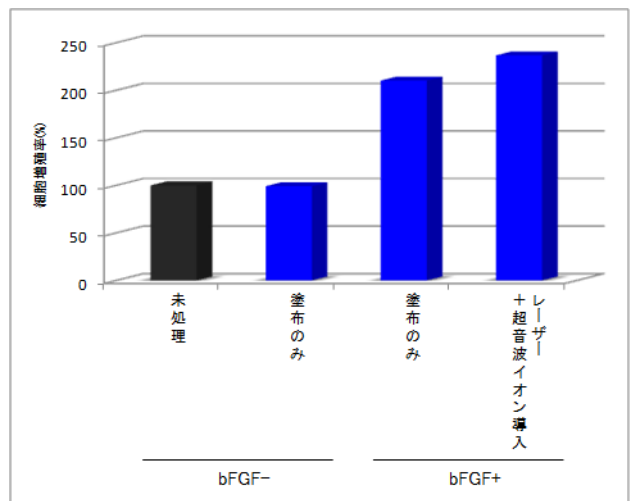


図1 レーザーと超音波イオン導入の併用方法によるb-FGF導入72時間後の線維芽細胞の細胞増殖率

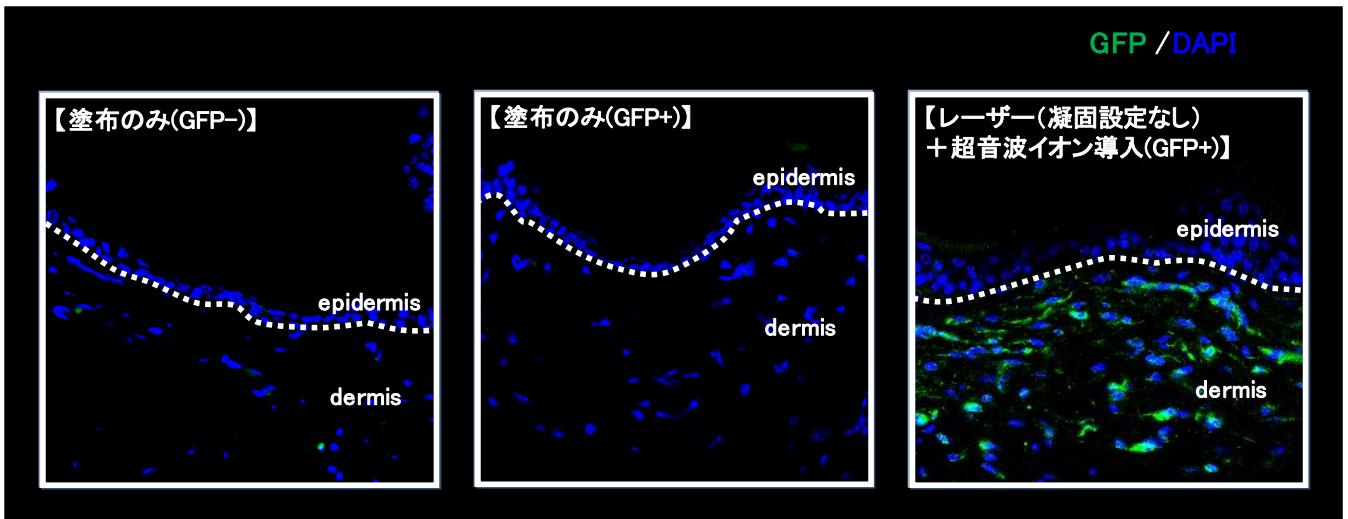


図2 レーザーと超音波イオン導入の併用方法によるGFP導入24時間後のGFPの分布

GFPはb-FGFよりも分子量は大きいため、b-FGFもGFPと同様の分布をしている可能性が十分考えられる。そのため、b-FGFもレーザーと超音波イオン導入の併用方法により真皮まで浸透している可能性は高い。

臨床試験評価 ～b-FGFによるRejuvenation 及び癬痕改善効果評価試験

■方法と対象■

試験に用いた製剤は、基礎試験評価のものと同様にヒアルロン酸溶液に溶解したb-FGFを用いた。まず、試験部位に麻酔クリームとして9.6%リドカイン配合クリームを25分間塗布した。その後、エルビウムヤグフラクショナルレーザー(フラクショナルEr:YAG JOULE)を深度175～200 μ mの条件で照射し、その直後にb-FGFを溶解したヒアルロン酸溶液(62.5 μ g/mL b-FGF)を塗布し、超音波イオン導入を顔面の場合には10分間、その他部位の場合には20分間行った。評価方法としては、術前及び施術4週間後の写真撮影による臨床上的他覚的変化により行った。

Rejuvenation評価における被験者数は、年齢30～70歳の女性18名、男性1名の計19名(平均54.2歳)であり、癬痕改善評価における被験者数は、年齢10～71歳の14名(平均40.7歳)・17部位(顔面11部位、上肢3部位、下肢3部位)である。

■結果及び考察 ■

図3に、レーザーと超音波イオン導入の併用方法によるb-FGF療法のRejuvenation効果の臨床試験結果を示した。

レーザーと超音波イオン導入の併用方法により、19名中15名の約78.9%の方において高いRejuvenation効果が確認され、前回のエレクトロポレーションの8名中5名の約62.5%の改善率と比較しても明らかに高い効果が確認された(図4)。

また、癬痕改善効果に関しても、17部位中13部位の約76.5%で高い改善効果がみられ(図5)、これらの結果は分子量が18kDaと大きいb-FGFを効率よく真皮内に浸透させることができたことに起因する可能性は考えられる。図6,7に臨床写真結果を示した。

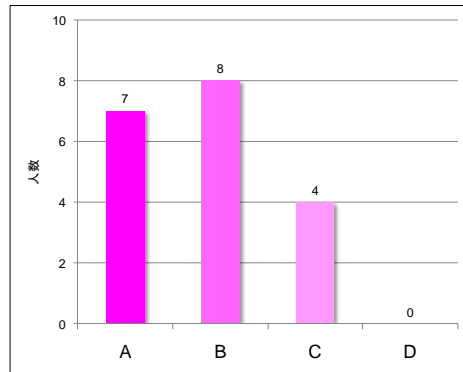


図3 レーザーと超音波イオン導入の併用方法によるb-FGF療法のRejuvenation効果の臨床試験結果

| | 外用 1名 | エレクトロポレーション 8名 | 超音波イオン導入 4名 | マイクロニードル 4名 | レーザー超音波イオン導入 19名 |
|-------------|----------|-------------------|----------------|----------------|---------------------|
| 変化なし | 0名 | 0名 | 0名 | 0名 | 0名 |
| 乾燥症状のみの改善 | 1名 | 3名 | 4名 | 2名 | 4名 |
| 写真上他覚的な改善あり | 0名 | 5名 | 0名 | 2名 | 15名 |

図4 レーザーと超音波イオン導入の併用方法と外用、エレクトロポレーション、超音波イオン導入、マイクロニードルとの比較データ

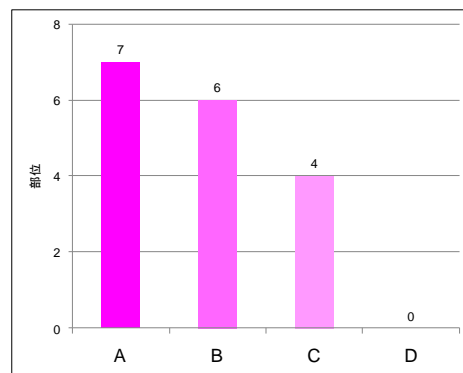


図5 レーザーと超音波イオン導入の併用方法によるb-FGF療法の癬痕改善効果



図6 レーザーと超音波イオン導入の併用方法によるb-FGF療法のRejuvenation効果(臨床写真)

本資料は、商品原料に関する資料であり、化粧品に配合されている成分の効能効果を保証するものではありません。

b-FGFの効果を 効率良く発揮させる レーザー併用超音波イオン導 入

今回検討したレーザーと超音波イオン導入を併用する方法は、基礎試験では真皮までb-FGFが浸透している可能性が高く、臨床試験評価においても非常に高い割合でRejuvenation効果及び瘢痕改善効果が確認された。この結果はエレクトロポレーションよりも効果が高いことから、b-FGFの導入方法としてはレーザーと超音波イオン導入の併用方法がb-FGFの効果を効率良く発揮させる方法として最も有効であると考えられた。

塗布のみで b-FGFを真皮まで浸透させる Nanosphere

今後の展望としては、今回確認されたレーザー併用超音波イオン導入によるbFGFのRejuvenation効果を塗布のみで発揮させたいと考えている。既に基礎試験のb-FGFの浸透性評価試験は実施しており、今回の基礎試験評価と同様の実験を行った。使用した溶媒はNanosphereであり、これは被膜が両親媒性ビタミンC誘導体により構成されているナノカプセル製剤である。今回はこのNanosphereにb-FGFを包摂させたものを用いて実験を行った。

その結果、b-FGFを包摂していない基材のみのNanosphereの塗布で、線維芽細胞の細胞増殖率の亢進がみられたのである(図8)。この効果はヒアルロン酸溶液ではみられなかった。

<41歳女性、手背外傷>

施術前



1回施術5週間後



図7 レーザーと超音波イオン導入の併用方法によるb-FGF療法の瘢痕改善効果(臨床写真)

もちろん、bFGFを包摂したNanosphereを塗布することにより、さらに細胞増殖率が上昇する傾向が確認された。

また、GFPを包摂したNanosphereを塗布し、24時間後のGFPの分布を観察したところ、真皮部位でGFPが観察された(図9)。

以上の結果から考察すると、Nanosphereは基材のみでもb-FGFと似た効果を発揮する可能性があり、さらには分子量の大きいb-FGFを塗布のみで真皮まで浸透させる効果を有している可能性が示唆されたのである。

また、Nanosphereは、包摂成分の安定化、さらには徐放性能も有している。

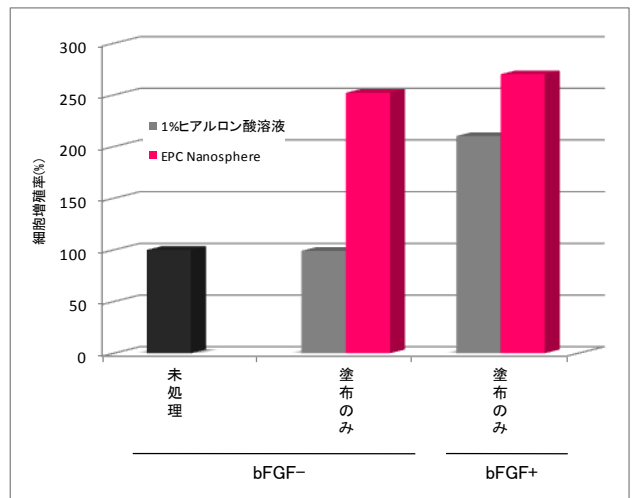


図8 b-FGF包摂Nanosphere塗布72時間後の線維芽細胞の細胞増殖率

これらの結果は、Nanosphereが、タンパク及びペプチド原料の経皮導入基材として有用である可能性を示唆するものである。

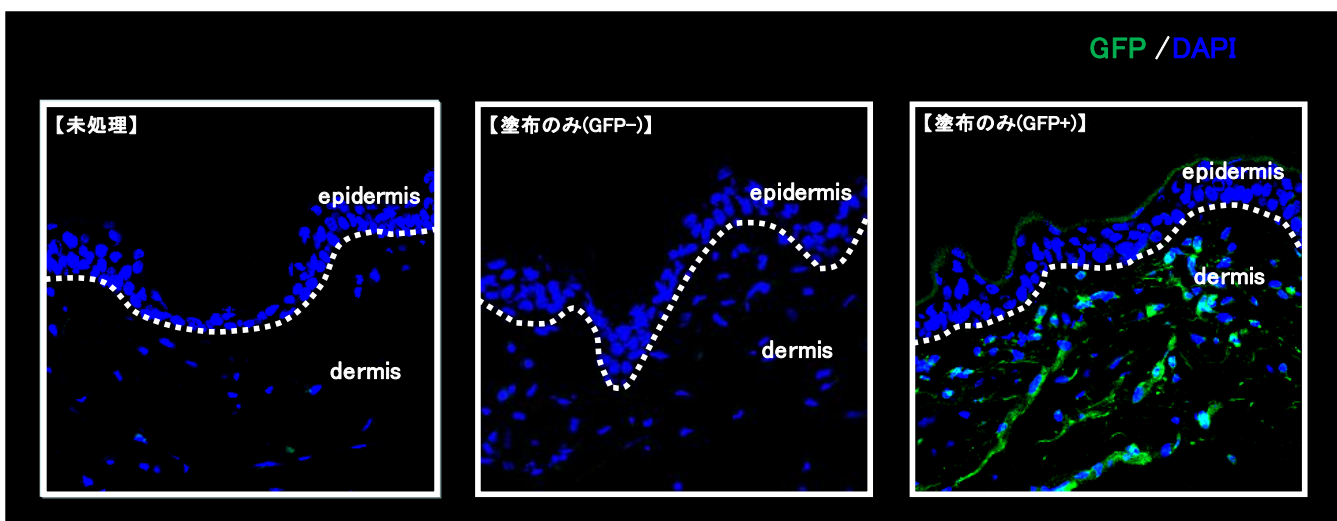


図9 GFP包摂Nanosphere塗布24時間後のGFPの分布