化粧品に活かすDDSテクノロジー

特集 DDS 産業の現状と未来

五十嵐理慧・山口葉子^{*1,2)}

DDS for functional cosmetics

We have developed two advanced nanotechnologies, NANOEGG[®] and NANOCUBE[™]. They are useful technologies for not only drug but also cosmetics. Today, we have long span of life because of advanced medical science. Therefore, anti-aging drugs, foods, and cosmetics strongly attract us. NANOEGG[®]-atRA, nanocapsuled all trans retinoic acid (atRA) with coated inorganic salts, showed enhanced pharmacological activity, compared with atRA as such. NANOEGG[®] methods could be applied to other cosmetic compounds.

The topical administration of lyotropic liquid crystal NANOCUBE[™] on stratum corneum rapidly broke down the lipid lamella structure which would be recognized as a wound without organ-change. This can activate a variety of biological processes. Using small angle X-ray scattering (SAXS) analysis, the response to the transient structural change of lipid was detected because it might result the diffusion of oil and/or water from NANOCUBE[™] liquid crystal towards lipid lamella phase. This method actually succeeded the improvement of photo-induced hyperpigmentation on human face.

These observations suggest that the structural change of lipid may stimulate to trigger recognition of a slight injury in the wound defense and repair response by homeostasis.

近年の高齢化社会においては、抗加齢(アンチエイジング)のための医薬品、化粧品、健康食品の需要が大きくなっていると同時に、情報流通の進歩により科学的根拠に基づいた医薬品、化粧品を求められるようになった。本稿では、筆者らの二つのナノテクノロジー(ナノエッグ、ナノキューブ)を導入した外用剤についてのデータを述べ、しみ・しわ改善のための機能性化粧品領域へのDDS技術の導入について言及する。

ナノエッグ(NANOEGG[®]-atRA)は、オールトランスレチノイン酸(atRA)を無機塩でナノカプセル化したもので、NANOEGG[®]-atRA 外用剤は、従来の atRA 外用剤に比較して atRA の保存安定性も高く、かつ薬理効果の増強がみられた。ナノキューブ(NANOCUBE[™])は油、水、界面活性剤の特定処方によって得られたリオトロピック液晶体で、角質の細胞間脂質に働きかけることで皮膚再生効果が得られることが証明され、薬物フリーの新しい概念の化粧品になりうると考えられる。

以上の二つの技術は、化粧品への応用が期待されるナノテクノロジーである。

Rie Igarashi・Youko Yamaguchi^{*1,2)}

key words : nanocapsulation, NANOEGG[®], NANOCUBE[™], atRA, lyotropic liquid crystal

近年、社会の高齢化が進み、多くの人が「いつまでも健康に、美しく」と願うようになり、抗加齢(アンチエイジング)のための医薬品、化粧品、健康食品の需要が非常な拡大をみせている。

一方、最近の消費者はメディアの進歩により、多くの科学的な情報を得ることが可能となったこともあり、科学的根拠に基づいた医薬品、化粧品を求めるようになった。一般消費者の側からの

“evidence based medicine”あるいは“evidence based cosmetics”の時代である。そのような時代において経皮吸収性を高め、化合物の安定性を高めるDDSを化粧品に導入することは自然な流れと考えられる。

本稿では、筆者らのナノテクノロジーを外用薬に導入したデータを中心に述べ、さらに美白・しみ改善のための化粧品領域への応用について記述する。

^{*1)} Institute of Medical Science, St Marianna University School of Medicine 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

^{*2)} Preventure Project, Japan Science and Technology Agency
独立法人 日本科学技術振興機構プレベンチャー事業

図1 高齢化社会の到来

医薬品, 医薬部外品, 化粧品

医薬品, 医薬部外品, 化粧品についてはいずれも薬事法第1章中に規定されている。以下に相違点を簡単に記述した。この内容に関しては, 薬剤学雑誌に藤井まきこ博士が詳細にかつわかりやすく述べられている¹⁾。

① 医薬品

人又は動物の疾病の診断, 治療又は予防に使用される。人又は動物の身体の構造又は機能に影響を及ぼすことが目的。

② 医薬部外品

人体に対する作用が緩和な物であり, 下記の目的で用いる。

吐き気その他の不快感又は口臭若しくは体臭の防止, あせも, ただれ等の防止, 脱毛予防, 育毛又は除毛, ねずみや蚊などの駆除や防止。

医薬部外品の中でも薬用化粧品と呼ばれるものは化粧品と使用目的・使用方法を持つ製品で, 緩和ながら薬理効果の示す成分が配合されている。

③ 化粧品

人の身体を清潔にし, 美化し, 魅力を増し, 容貌を変え, 皮膚や毛髪を健やかに保つ目的で使用する。人体に対する作用が緩和な物。化粧品に関しては「肌荒れを防ぐ」, 「毛髪に潤いを与える」, 「日やけを防ぐ」……など表示できる効能効果は限られている。

医薬品を化粧品に使用することは出来ない(過去承認実績のある医薬品は例外的に除く)。また効能表示がきざられている(医薬発1339号 厚生省12年12月28日)ことから期待できる効果には限界がある。それゆえこれまでは購買意欲を高める, 化粧

品会社のブランド力やイメージ, 宣伝だけで消費者は化粧品を選んでいく感否めない。

しかし化粧品業界に携わってきた研究者にうかがっても, やはり実感できる化粧品の寿命(売れる期間)は長いとのことで, 当然消費者は効果的な(機能性)化粧品の望んでいるのである。薬事法に規定されている化粧品でありながら筆者らも含めて多くの医薬学者は思いのほか, 化粧品について知らないことが多い。しかし, 前述したように, 高齢化社会においては生活の質(QOL)の向上を可能にする医薬品や化粧品が求められることから, 今後はDDS研究にとっても機能性化粧品のためのDDSが大きな領域になりうると考えられる(図1)。

ナノエッグ(NANOEGG®): NANOEGG®-atRA^{2,3)}

NANOEGG®-atRA は, オールトランスレチノイン酸(all trans retinoic acid: atRA)を無機炭酸塩でナノカプセル化したものである。atRA は再生医療研究においては未分化細胞の分化誘導に用いられ, 多彩な生理活性が報告されている。本邦ではatRA は急性前骨髄性白血病の治療に経口薬として認可されている。アメリカではatRA の分化誘導作用による皮膚再生(しみ・しわ)のための外用剤が認可されているが, 本邦では外用剤はいまだない。

高齢化社会の今日, しみ・しわ改善薬へのニーズが大きくなっており, 外国のatRA 外用剤を個人輸入したり, 形成外科・美容外科医や皮膚科医が院内処方での外用剤を処方しているのが現状である。atRA については分化誘導作用による催奇形性(妊娠初期)が問題にされるが, 外用剤として適切な量を塗布するかぎりには問題がないことを, 外国での10年以上の使用前例が物語っている。高齢化社会においてヒトのQOLを高めるための医薬品として大きな期待がかかっている。

atRA のNa 塩が水溶液中でミセルを形成することを利用し, ミセル形成後atRA 末端のカルボキシル基に炭酸カルシウム(CaCO_3)を吸着させ, ナノカプセル化した(図2~4)。atRA そのものをtemplate にしているため, いわば封入率は100%に近い。この粒子サイズを小角X線散乱測定およ

図2 Preparation of NANOEGG[®]-atRA

図3 NANOEGG[®]-atRA の粒子サイズ

図4 NANOEGG[®]-atRA の両親媒性

NANOEGG[®]-atRA is soluble both in oil (corn oil, left) and water (right).

図5 皮膚組織図

図6 NANOEGG[®]-atRA の表皮肥厚とヒアルロン酸の産生

び凍結割断透過型電子顕微鏡により検討したところ、直径約 15 nm で core shell 構造をしていることが判明した。黄色の atRA の周りに白い CaCO_3 の殻があるナノサイズの卵様のものということで NANOEGG[®] と名付けた。atRA 原体は不溶性の粉末であるが、NANOEGG[®] は両親媒性の性質を獲得し、水にも油にも溶解可能である。

この両親媒性ゆえに表皮角質組織を通過能が高まり、表皮内 atRA の効果を高めることになった。皮膚は表皮層と真皮層からなるが、表皮層は基底細胞層、有刺細胞層、顆粒細胞層、角質細胞層からなり、この表皮層が外界とのバリアーの役割を担っている(図5)。

皮膚が紫外線に暴露されると、基底細胞層にあるメラノサイトがメラニンを生成し紫外線から皮膚を守ろうとする。このメラニンはその後、有刺細胞、顆粒細胞、角質細胞とわたされて消失する。ターンオーバーが盛んなときはメラニン生成後、速やか

に消失されるが、加齢によりターンオーバーが低下したときはメラニンが沈着し、しみとなる。また加齢によって、メラニン生成抑制機構が低下しているときは紫外線の刺激がなくともメラニン生成が起こり、いつも同じ場所にしみが存在することになる。

atRA は、表皮細胞(ケラチノサイト)の分化・増殖作用によるターンオーバー促進能によって、しみ・しわの改善作用を示す。より細胞レベルにおいては基底細胞の atRA レセプター(RAR)に結合し、分化・増殖因子である HB-EGF(heparin binding epidermal growth factor)を産生し、ケラチノサイトの分化・増殖作用を発揮する。マウス背中に外用剤を塗布し HB-EGF の mRNA 量を RT-PCR で測定したところ、NANOEGG[®] 塗布群は atRA 塗布群に比較して有意に高い産生量を示した(図6)。

また、NANOEGG[®] 塗布群においては細胞間隙にヒアルロン酸の生成がみられ、しわ改善効果も期待される。このことは表皮内に入った NANOEGG[®] が

図7 UV照射によるメラニン生成に対するNANOEGG[®]-atRAの効果

a: UV照射のみ, b: Vehicle, c: NANOEGG[®]-atRA

有色モルモットWM(5週齢)に紫外線UVA+UVBをのべ10日間照射し, その後NANOEGG[®]-atRAを各部30 mg/day, 5日間塗布したときの薬理効果

徐々にatRAを放出することによる効果と考えられた。さらに, メラニン生成機構を持つ有色モルモットに紫外線を照射し, しみを作製し, NANOEGG[®]外用剤を塗布し, しみ改善効果を検討したところ, NANOEGG[®]塗布群は著明なしみ改善効果を示した(図7)。

以上の基礎データをもとに, 聖マリアンナ医科大学倫理委員会承認下にボランティアを募り, 臨床試験を進めた結果, 問題となる有害事象もみられず, しみ・しわ改善効果が得られ, NANOEGG[®]外用剤の有用性が示唆された。atRAについては皮膚再生以外にも臍臓β細胞再生や, 角膜上皮再生など多くの活性があり, NANOEGG[®]の他領域におけるDDS製剤としても楽しみである(図8)。

atRAは医薬品であり化粧品としては使用できないが, ナノエッグカプセル化の技術は水溶液中でセ

ルフミセルを形成することが可能な化合物に応用可能であり, 今後は化粧品に使用可能な化合物への応用も検討する予定である。

皮膚ホメオスタシスを利用した新しい皮膚再生概念, リオトロピック液晶NANOCUBETM塗布による色素沈着改善効果

生体は本来自然治癒を促す能力, ホメオスタシス(恒常性)を備えている。そのホメオスタシスを利用した皮膚再生を開発した。

たとえば皮膚が創傷した際, 器質的変化が生じた場合は, 生体は自然治癒するためさまざまなサイトカインやケモカインを細胞に産生させ, 細胞の修復や遊走が起こり治癒する方向に向かう。一方, 器質的変化が生じない場合の創傷については, 外観上の変化がないために詳細な検討はいまのところなされ

図8 NANOEGG[®]-atRA のしわ改善効果 (40 代女性) (聖マリアンナ医科大学皮膚科にて実施)

ていない。しかしながら、巨視的外観変化なしに皮膚再生を引き起こすことが出来れば、新たな化粧品概念となりうると考えられる。

そこで、ホメオスタシス誘導による皮膚再生を目指し、バリア機能を有する皮膚角質層に着目した。角質層の細胞間脂質の一過性のナノレベルでの物理的变化が、器質的变化なしの創傷に相当すると仮定し、新たな皮膚再生誘導法として研究を行った⁴⁾。

細胞間脂質はリオトロピックラメラ液晶構造を形成し、外界からの細菌の侵入や水分蒸散をコントロールしバリアーとしての機能を果たしている。筆者らは、この細胞間脂質と同様なりオトロピック液晶を作製し、皮膚に塗布した際の皮膚再生効果とその機序について検討した。その結果を報告する。

1. リオトロピック液晶塗布による皮膚再生効果

油、界面活性剤、水からなるある配合処方角質細胞間脂質類似のリオトロピックラメラ液晶

図9 Histological researches of topical administration of NANOECUBETM

The dorsal areas of ddY mice (male, 5-week) were used as *in vivo*. a : non-treatment. b : NANOECUBETM

(NANOECUBETM)を作製し、ddY mice(5-week, male)背部 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ に 30 mg を塗布し、2 日後に皮膚組織の肥厚評価、コロイド鉄染色(ヒアルロン酸検出染色法)によって皮膚再生効果を検討した(図9)。NANOECUBETM 塗布では明らかに表皮は肥厚しているが、NANOECUBETM の原成分のみではほとんど表皮肥厚効果はなかった。

図 10 Dose dependence of NANOCUBE™

The dorsal areas of ddY mice (male, 5-week) were used as *in vivo*.

a : NANOCUBE™ 0%. b : NANOCUBE™ 10%. c : NANOCUBE™ 20%. d : NANOCUBE™ 30%

図11 Expression of mRNA of several cytokines HB-EGF, TGF-β1 for the proliferation and differentiation of keratinocytes, and IL-1β, TNF-α for the inflammation

The expression of each cytokines was estimated the level of non-treatment sample as 100%, respectively. The NANOCUBE™ 30mg was administered on mice dorsal areas, and the tissue was taken at 2-day after one time treatment with NANOCUBE™.

つぎに、NANOCUBE™の表皮肥厚に対する濃度依存性について検討した結果(図10)、NANOCUBE™濃度に応じて表皮は肥厚し、30%配合では表皮基底および有棘細胞間隙にヒアルロン酸産生が確認された。増殖・分化マーカーの検討により、この肥厚は、基底細胞の増殖と、有棘細胞および顆粒細胞の分化の増強のためと判明した⁴⁾。

2. NANOCUBE™による皮膚再生メカニズム

創傷治癒時に細胞はヒアルロン酸を産生すると報告されている⁵⁾。NANOCUBE™塗布が創傷治癒と同じ状態を促しているならば、ヒアルロン酸の産生だけでなく、炎症性サイトカイン(tumor necrosis factor (TNF)-αや interleukin-1 (IL-1)βなど)量も増加しているはずである。図11はケラチノサイトの増殖・分化に大きく関わっているサイトカインである heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF)⁶⁾や transforming growth factor (TGF)-β⁷⁾の mRNA 産生量の測定結果である。無処置にくらべ、HB-EGFやTGF-β1の mRNA 産生は4倍以上であり、炎症性サイトカインである TNF-α⁸⁾や IL-1βの mRNA の産生も高かった。この結果は、NANOCUBE™塗布による皮膚再生は増殖・分化に関わるサイトカインの産生に大きく依存していることが理解されるが、同時にホメオスタシスに基づく自然治癒状態に近いと考えられた。

NANOCUBE™塗布による皮膚の変化を理解するために、マウスへのNANOCUBE™塗布群の transdermal water loss (TEWL) 値を測定した(図12)。塗布後6時間まで徐々にバリアー機能は

図12 Change of TEWL degree after the topical administration of NANOCUBE™ on the mouse dorsal area $2 \times 2 \text{ cm}^2$

50 mg of NANOCUBE™ was administered one time (n=5).

**p<0.01

崩壊し、1日後にはほぼもとに戻った。崩壊の程度は正常が $0.02 \text{ mg/cm}^2/\text{min}$ であることから大きくはなく、バリア機能崩壊は、バリア機能を中心的に担う角質層の細胞間脂質の構造変化に基づくものと考えられる。

NANOCUBE™ は細胞間脂質類似のリオトロピック液晶構造であり、塗布すると角質層の重層化に類似の状態になると考えられる。NANOCUBE™ に使用している各成分は、塗布と同時に細胞間脂質への受動拡散、もしくは細胞間脂質成分の NANOCUBE™ への拡散が起こり、その結果、細胞間脂質構造の相転移が引き起こされたと想定できる。塗布後短時間で細胞間脂質の秩序構造崩壊が誘導され、スピノーダル分解による chaotic structure に変化する。時間経過とともに本来の細胞間脂質構造であるラメラ構造は、おそらく bicontinuous cubic phase への転移が誘導されると考えられる。

しかしながら、この相転移は一過性で、塗布後24時間ではほぼもとの状態に戻ると考えられる。この仮説を TEWL 値変化(図12)および図13に示す SAXS データが裏付けている。塗布前の細胞間脂質は、ラメラ構造に起因する規則的ピークが検出されているが、塗布後10分という短時間にもかかわらず、散乱カーブのピーク位置は広角側に shift し、規則性ピークは消失している。これは NANOCUBE™ 塗布により細胞間脂質構造が規則性のないランダム細孔構造(chaotic structure)へ転移していることに起因すると考えられる。

図13 Small angle X-ray scattering of lipid in stratum corneum and that after the administration of NANOCUBE™ extracted by the tape-stripping method

The topical administration was carried out on the dorsal area of hairless mouse (male, 5-week), the extraction by the tape-stripping was carried out at 10 minutes later after the treatment.

3. NANOCUBE™ のヒトにおける効果

実際にヒト顔面への塗布を行った。42歳女性の顔面左側にプラセボを、右側に NANOCUBE™ 30%配合ローションを朝、晩1回ずつ2カ月間塗布した結果を図14に示した。プラセボ塗布ではほとんど変化はないが、NANOCUBE™ 塗布では、日光性色素斑と思われるしみおよび目下のくま、口横のしわの改善が顕著にみられた。明度を示す L^* 値も大きく変化(数値が大きいほど明るい)した。

以上のように、NANOCUBE™ による皮膚再生は、薬物を使用せずに生体の本来持つ自然治癒力を促して皮膚再生を実現するといった、従来にないまったく新しい概念である。皮膚のバリア機能を担う細胞間脂質の相転移能を利用し、表皮細胞にホメオスタシスに基づくシグナル伝達を送り細胞の活性化を誘導、結果として表皮層のターンオーバーを加速することに成功した。

現在、筆者らは、今回の研究成果に基づき、細胞間脂質の相転移を利用して脂溶性、水溶性薬物、低分子量から高分子量、さらには蛋白質や遺伝子に至るまでのさまざまな薬物の経皮吸収性向上のための研究をすすめている。

図 14 Pictures of photoaged hyperpigmentation on human faces (female, 42 years old)

The pictures showed before treatment and treatments of vehicle and NANOCUBE™ 30 % emulsion.

The external daily administration was carried out one time at night, continuously.

おわりに

しみやしわの改善に関しては、これまで化粧品会社が中心的に商品開発を行い、美白効果があるとするさまざまな化合物を発見・開発している。近年では、長期間使用しなければ効果が得られにくい化粧品や医薬部外品は、消費者の満足が得られにくくなってきたため、確実に効果が上がる形成外科や皮膚科におけるレーザー治療、医師主導で開発された化粧品(ドクターズコスメ)に人気が集まっている。

今後はますます機能性化粧品が期待される時代になると考えられ、化粧品領域は DDS 研究領域にとっても魅力的なターゲットとなると考えられる。一方、DDS 導入による経皮吸収促進効果によって化粧品中の防腐剤など多成分が表皮内に入るとはリスクとも考えられ、安全性とともに考察していくことが必要と思われる。医薬品の DDS 技術を化粧品へ、化粧品技術を DDS 医薬品へ、相互の行き来が今後ますます盛んになると考えられる。

文 献

- 1) 藤井まきこ：化粧品. 薬剤学 66(2)：143-147, 2006.
- 2) Yamaguchi Y, Nagasawa T, Nakamura N, Takenaga M, Igarashi R et al. : Successful treatment of photo-damaged skin of nano-scale atRA particles using a novel transdermal delivery. J Controlled Release 104 : 29-40, 2005.
- 3) Yamaguchi Y, Nakamura N, Nagasawa T, Kitagawa A, Igarashi R et al. : Enhanced skin regeneration by nanoegg formulation of all-trans retinoic acid. Die Pharmazie 61 : 117-121, 2006.
- 4) Yamaguchi Y, Nagasawa T, Kitagawa A, Nakamura N, Igarashi R et al. : New nanotechnology for the guided tissue regeneration of skin-potential of lyotropic liquid crystals. Die Pharmazie 61 : 112-116, 2006.
- 5) Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC et al. : Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. J Bio Chem 279 : 17079-17084, 2004.
- 6) Stoll SW, Elder JT : Retinoid regulation of heparin-binding EGF-like growth factor gene expression in human keratinocytes and skin. Exp Dermatol 7 : 391-397, 1998.
- 7) Jennings MT, Pietenpol JA : The role of transforming growth factor beta in glioma progression. J Neurooncol 36 : 123-140, 1998.
- 8) Hatano Y, Terashi H, Arakawa S, Katagiri K : Interleukin-4 suppresses the enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis. J Invest Dermatol 124 : 786-792, 2005.