

PLGA ナノ粒子によるシワ改善の有効性検証

Verification of Anti-wrinkle Effect by PLGA Nanoparticles

越智 綾香¹, 鈴木 貴弘¹, 笹井 愛子¹, 辻本 広行²

¹ ホソカワミクロン株式会社 マテリアル事業本部 製薬・美容科学研究センター

² 同 マテリアル事業本部長, 執行役員

Ayaka OCHI¹, Takahiro SUZUKI¹, Aiko SASAI¹, Hiroyuki TSUJIMOTO²

¹Pharmaceutical & Beauty Science Research Center, Material Business Division, Hosokawa Micron Corporation, JAPAN

²Operating Officer, Division Director, Material Business Division, Hosokawa Micron Corporation, JAPAN

抄 録

外出自粛による“おうち時間”の増加や長時間のマスク着用による肌荒れなどによってスキンケアへの関心が高まっている。シワやシミなどの肌症状の「根本治療」を目的に昨今再生医療から派生したスキンケア技術が注目を浴び、化粧品原料として卵殻膜やヒト幹細胞培養液が利用される。いずれの原料成分も組成が複雑で分子サイズも大きいため、皮膚へ塗布時に角質層バリアを通過し目的部位まで有用成分が十分に浸透できないと考えられる。

著者らは PLGA ナノ粒子 (PLGA NP) の優れた皮膚浸透性や持続性、細胞内への送達性等の特徴を応用し、PLGA NP に封入した様々な有用成分の肌深部での効果を最適化できることを報告してきた。

本稿ではその一例として、巨大分子成分である加水分解卵殻膜を封入した PLGA NP の真皮ジワの改善に対する有用性について記す。

ABSTRACT

Skincare has attracted public attention increasingly because of the increase in time spent at home due to refraining from going out and skin irritation caused by wearing masks for long periods. Attention is being paid to the next generation of skincare derived from regenerative medicine technologies to provide “curative therapy” for long-standing skin conditions such as wrinkles and blemishes. The raw materials for such cosmetics include eggshell membranes and human stem cell conditioned media. Because of the complexity of their constituents and their large molecular size, the problem with transdermal drugs is that they can't penetrate sufficiently through the stratum corneum barrier, the first barrier to skin penetration, to the target site.

We have shown that poly-lactide-co-glycolide acid nanoparticles (PLGA NP) have skin permeability, the prolonged action of nanoparticle-encapsulated contents by sustained release effect of PLGA base, and cellular uptake ability of encapsulated contents. It indicates that PLGA NP can optimize the efficacy of the encapsulated contents in various cases.

In this paper, we report on the effectiveness of PLGA NP in improving dermal wrinkles of hydrolyzed eggshell membranes consisting of polymers.

1 はじめに

外出自粛による行動範囲の制限等、コロナ禍の生活環境の急激な変化によるストレスや長時間のマスク着用による肌荒れによってスキンケアの関心が高まっている。シワやシミの肌ダメージについてはヒアルロン酸やセラミドなどの不足成分を肌に補う「対症療法」に対し、症状原因の細胞へ直接働きかける「根本治療」を指向するスキンケア技術が目される。これに用いられる有用成分は各種機能性ペプチドからなる卵殻膜エキスや細胞の成長因子や活性物質からなるヒト幹細胞培養上清液が挙げられる。

シワは皮膚の表皮のみで生じる小ジワ（乾燥によるシワ，ちりめんシワ）と真皮組織の変性による大ジワ（真皮ジワ）に大別される。前者は角質層の乾燥が原因であるため、水分や油分を補うことで比較的改善しやすい。他方、後者の大ジワは真皮層を構成するコラーゲンやエラスチンの減少による真皮組織の変形によるもので、保湿等の対症療法では改善できない。近年、医薬部外品の効果効能に「シワの改善」の項目が新たに認められ、真皮ジワをターゲットにした化粧品が多く上市されてきた。これらは真皮中で変性・減少したコラーゲンやエラスチンの新規産生を促し、肌土台を修復することによって真皮ジワを改善している。

図1に真皮ジワ改善のスキームを示す。線維芽

細胞に代表されるコラーゲン及びエラスチン産生細胞は基底層や真皮層に存在する。有用成分は角質層バリアを超え、この真皮層で線維芽細胞に取り込まれて初めてコラーゲンやエラスチンが産生される。これに対し前述の卵殻膜エキスやヒト幹細胞培養上清液は機能性タンパクや成長因子などの巨大分子を含むので、角質層バリアに阻まれ角質層を通過できず、成分単体では効果は発揮できない。

当社開発の PLGA（乳酸・グリコール酸共重合体）ナノ粒子（PLGA NP）は皮膚浸透性に優れた DDS（ドラッグデリバリーシステム）キャリアである。これまでに封入成分の皮膚浸透性向上や目的部位での作用持続化に有用なため、機能性化粧品や育毛剤へ応用された^[1-6]。

以下には加水分解卵殻膜封入 PLGA NP が真皮ジワ改善に有効であることを報告する。

2 PLGA NP

2.1 PLGA の特長

PLGA は乳酸とグリコール酸がエステル結合によってランダムに共重合した単鎖構造をもつ生体適合性ポリマーである。エステル結合部位は水存在下で加水分解し最終的には TCA 回路（Tri-Carboxylic Acid cycle）を経て水と二酸化炭素にまで分解され体外へ排出される。理論的に体内蓄積性がなく、また他のナノ粒子で懸念される細胞毒性なども無い安

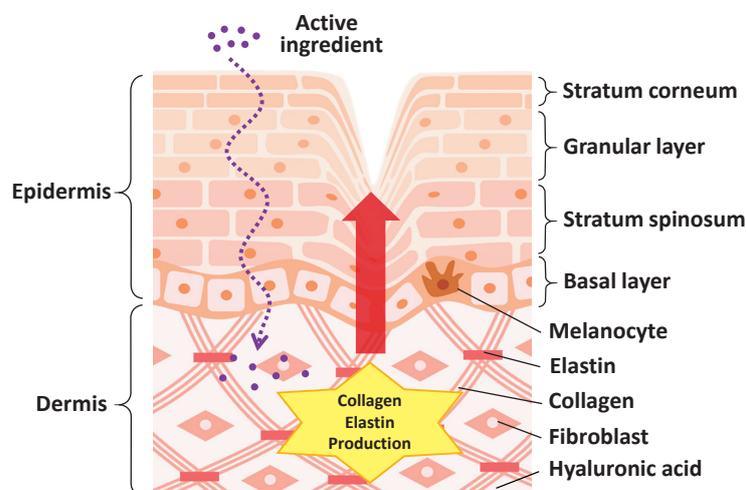


図1 シワ改善メカニズムのイメージ図

Fig. 1 Image of wrinkle improvement mechanism.

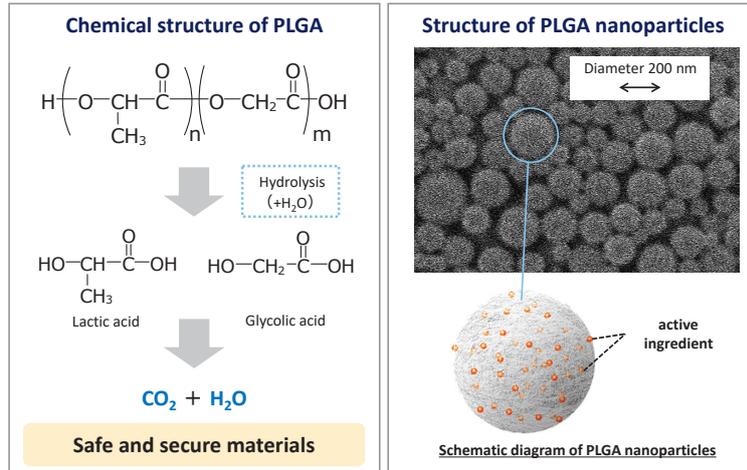


図2 PLGAの化学構造およびPLGAナノ粒子のSEM写真

Fig. 2 PLGA chemical constitution and SEM image of the PLGA nanoparticles.

心・安全な化粧品原料である^[7] (FDA 認可, 医薬部外品・添加剤として承認取得済) (図2)。特徴としてPLGA NPは加水分解することで封入成分を粒子外へ徐放でき内包有用成分の作用を持続させることができる。

2.2 皮膚浸透能

ヒトの皮膚摘出片を用いた脂溶性ビタミンC誘導体 (VC-IP: テトラヘキシルデカン酸アスコルビル) を封入したPLGA NP (VC-IP/PLGA NP, 平均粒子径215 nm) の皮膚浸透性^[8]では, 对照群のVC-IP乳化製剤 (従来技術) と比べVC-IPの真皮への浸透量は10倍以上向上している (塗布後4時間の累積値)。そして真皮へ浸透したVC-IPは乳化製剤塗布群で7時間以降は消失したが, VC-IP/PLGA NP塗布群は48時間後も検出された。これは角質層内に分配されたPLGA NPからVC-IPが徐放され継続的に真皮へと拡散していくためである。

巨大分子の浸透性評価として蛍光標識結合タンパク質 (蛍光標識-P, 分子量: 66,000) を封入した蛍光標識-P/PLGA NP (平均粒子径190 nm) の角質層テープストリッピング法を実施している。蛍光標識-P水溶液及び蛍光標識-P/PLGA NP水分散液を被験者前腕に塗布し, 30分後にテープストリッピング処理で角質層剝離 (10層) を行い, 各テープに付着した角質層を蛍光顕微鏡 (BZ-X800, KEYENCE社製) で観察すると (図3), 蛍光標識-P水溶液は角質層の蛍光観察が殆ど見られない。他方, 蛍光標識-P/

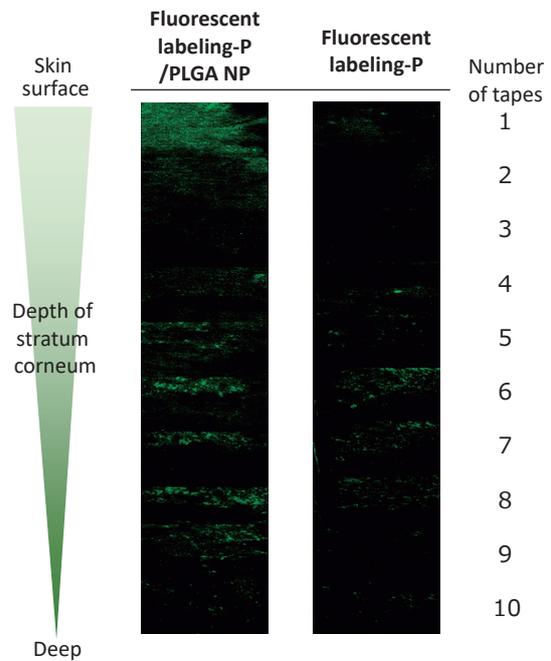


図3 PLGA NPの角質浸透性評価

Fig. 3 Permeability evaluation of PLGA NP into stratum corneum.

PLGA NP水分散液では角質層全体に蛍光が分布していて浸透量は蛍光標識-P水溶液よりも440%高かった。このように巨大分子の有用成分でもPLGAでナノ粒子化できれば角質層の深部への浸透が可能になり, 有用成分を肌深部へ供給できるようになる。

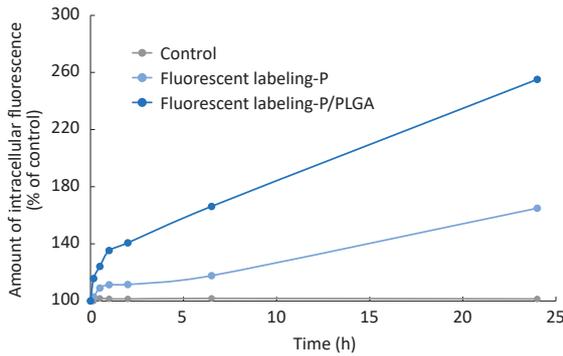


図4 蛍光標識 -P/PLGA NP の細胞内取り込み

Fig. 4 Intracellular uptake of Fluorescent labeling-P/PLGA NP.

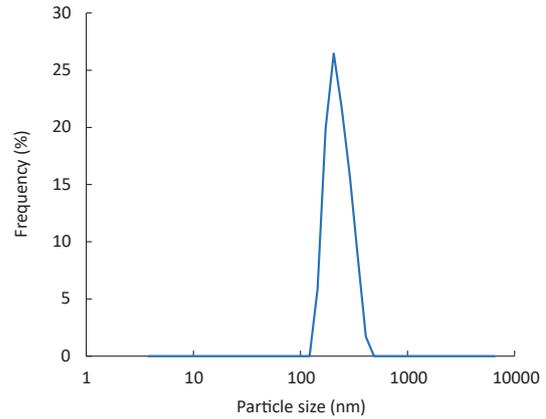


図5 HESM/PLGA NP の粒子径分布

Fig. 5 Particle size distribution of HESM/PLGA NP.

2.3 細胞内取り込み能^[9]

PLGA NP の細胞内取り込み能は 2.2 と同様の蛍光標識 -P/PLGA NP をヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF: Normal Human Dermal Fibroblasts) に添加後、一定時間培養させ細胞内の蛍光量を見ると、どちらも取り込み量が経時的に増大し、培養から 24 時間後の蛍光量は蛍光標識 -P/PLGA NP が成分単体に比べ約 1.5 倍高い値を示した (図 4)。

PLGA NP はエンドサイトーシスにより細胞内に速やかに取り込まれることが知られており細胞内への取り込み性に乏しい有用成分の細胞内送達を亢進することもできる。

以上のように PLGA NP は本来皮膚浸透が難しかった巨大分子の成分を真皮層や細胞内へ送達できる。

3 加水分解卵殻膜封入 PLGA NP によるシワ改善

卵殻膜は皮膚組織の再生機能を有し、古来より民間療法として傷の治療に用いられてきた。近年、加水分解卵殻膜溶液を塗布したマウスの 3 型コラーゲン遺伝子発現が有意に増加^[10]するなど、その作用機序や有効成分特定などの研究が盛んである。

3.1 線維芽細胞賦活

WST-1 評価法を用いて PLGA NP による NHDF 増殖促進効果を検証した。「加水分解卵殻膜 (HESM: Hydrolyzed Egg Shell Membrane, (株) キューピー製)」を封入した PLGA NP (HESM/PLGA NP, 平均粒子

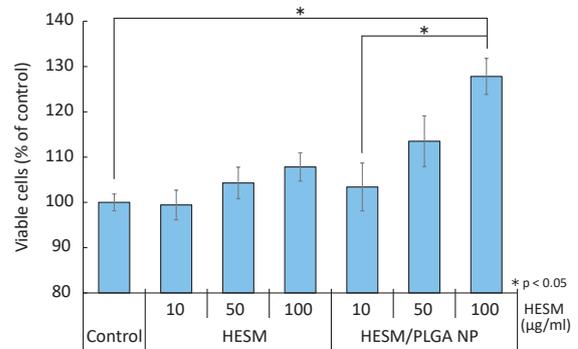


図6 PLGA NP による細胞増殖促進効果

Fig. 6 The amount of viable cells in NHDF cells by different HESM preparation. Viable cells were measured after incubation for 7 h.

径 201 nm (図 5)) を NHDF に添加し 7 時間曝露後、通常培地に交換しさらに 17 時間細胞培養した。培地除去後 WST-1 を添加し、4 時間のインキュベーションを行った後、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。

結果、HESM 単体群ではコントロールと比べてわずかに細胞増殖を示した (Max. 108%) (図 6)。他方、HESM/PLGA NP 群では顕著な細胞増殖が見られ PLGA NP による有意な細胞賦活作用が示された (Max. 127%)。

3.2 1 型コラーゲン産生促進

ELISA 法を用いて HESM/PLGA NP による I 型コラーゲン (COL1) 産生効果を検証した。3.1 と同様の方法で培養し、一次抗体 (抗 COL1 抗体) と酵素

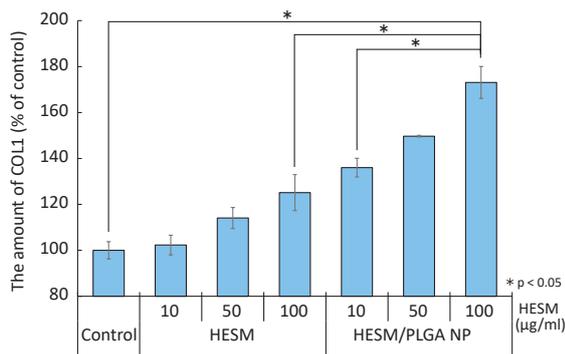


図 7 PLGA NP による 1 型コラーゲン産生促進効果
Fig. 7 The amount of COL1 produced by NHDF cells using different methods of HESM preparation. COL1 activity was measured after incubation for 7 h.

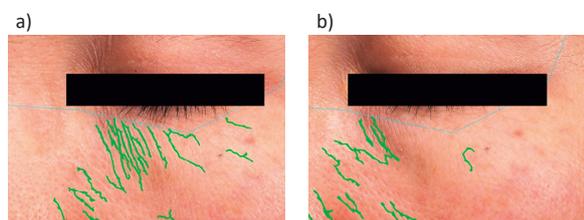


図 8 PLGA NP を用いた真皮ジワ改善効果
 a) 塗布前, b) 2 週間塗布 (HESM/PLGA NP 水溶液)
Fig. 8 Wrinkle effect using HESM/PLGA NP in human monitor test.
 a) Before use, b) After 2 weeks of continuous use

標識二次抗体を添加し、培地中の COL1 量を測定した (吸光度法)。結果, HESM 単体群ではコントロールと比較して最大 125%, HESM/PLGA NP 群では最大 173% の COL1 が産生された (図 7)。3.1 の細胞賦活試験の結果を考慮すると 1 細胞当たりの COL1 産生量が増大しており, PLGA NP による細胞賦活作用および COL1 産生促進作用が示されている。

3.3 ヒトモニター試験

HESM/PLGA NP による真皮ジワの改善検証をヒトモニター試験で評価した。被験者 4 名に HESM/PLGA NP 水溶液 (ブチレングリコール 20% 配合) を朝晩 2 回片顔に塗布し, 使用前後のシワを皮膚測定器 (VISIA®, Canfield Scientific 社製) のシワ判定モードで測定した^[11]。結果, 著効例ではわずか 2 週間の連用で目立つシワ (緑ライン) が顕著に減少しており, HESM/PLGA NP によるシワ改善効果が確認された (図 8)。

4 終わりに

本稿では抗シワ効果の特徴とした巨大分子成分を用い, 真皮送達能, 細胞内導入能を有する PLGA NP 技術を用いて有用成分の抗シワ効果の増大を示した。

細胞試験 (in vitro) により優れた機能性が示される成長因子や機能性ペプチドなどに代表される巨大分子成分を配合した化粧品 (in vivo) では所望の効果に乏しいケースが散見される。「角質層バリアを突破し vitro の結果を vivo に転写し得る技術」である PLGA NP は, 多様な巨大分子成分×スキンケア技術への応用が期待される。

References

- [1] 辻本 広行, 安武 愛子, 坂東 容平, 三羽 信比古, 川島 嘉明, “化粧品原料としての PLGA ナノ粒子の特徴”, *Cosme Tech Japan*, 1 (2011) 77–84.
- [2] Tsujimoto H., Hara K., Tsukada Y., Huang C.C., Kawashima Y., Arakaki M., Okayasu H., Mimura H., Miwa N., Evaluation of the permeability of hair growing ingredient encapsulated PLGA nanospheres to hair follicles and their hair growing effects, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17 (2007) 4771–4777. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.06.057>
- [3] 辻本 広行, 原 香織, C.C. Huang, 横山 豊和, 山本 浩充, 竹内 洋文, 川島 嘉明, 赤木 訓香, 三羽 信比古, “球形晶析法で調製した乳酸・グリコール酸共重合体ナノスフェア (PLGA NS) の経皮浸透性評価”, *粉体工学会誌*, 41 (2004) 867–875. <https://doi.org/10.4164/sptj.41.867>
- [4] 辻本 広行, 原 香織, 三羽 信比古, 川島 嘉明, “PLGA ナノ粒子の育毛剤への応用”, *Cosme Tech Japan*, 1 (2011) 79–85.
- [5] 辻本 広行, 坂東 容平, 三羽 信比古, 川島 嘉明, “スキンケア技術への応用”, *Cosme Tech Japan*, 1 (2011) 43–49.
- [6] 笹井 愛子, 辻本 広行, 山本 浩充, 川島 嘉明, 三羽 信比古, “DDS 機能をもつ PLGA ナノ粒子によるニキビ・毛穴トラブルの改善技術”, *Fragrance Journal*, 2 (2017) 32–38.
- [7] 川島 嘉明, “PLGA ナノスフェアの設計と DDS への展開”, *薬剤学*, 66 (2006) 224–238. <https://doi.org/10.14843/jpstj.66.224>
- [8] Tsujimoto H., Hara K., Yokoyama T., Yamamoto H., Takeuchi H., Kawashima Y., Akagi K., Miwa N., Huang C.C., Percutaneous absorption study of biodegradable PLGA nano-spheres via human skin biopsies, *Journal of the Society of Powder Technology, Japan*, 41 (2004) 867–875. <https://doi.org/10.4164/sptj.41.867>
- [9] Tahara K., Yamamoto H., Kawashima Y., Cellular uptake

mechanisms and intracellular distributions of polysorbate 80-modified poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres for gene delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75 (2010) 218–224.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.03.013>

[10] Fujita E., Shimizu M., Sano S., Kurimoto M., Yamazawa K., Atomi T., Sakurai T., Murakami Y., Takami T., Murakami

T., Yoshimura K., Hasebe Y., Atomi Y., Solubilized egg-shell membrane supplies a type III collagen-rich elastic dermal papilla, *Cell and Tissue Research*, 376 (2019) 123–135. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2954-3>

[11] 鈴木 貴弘, 笹井 愛子, 辻本 広行, “PLGA ナノ粒子を用いた真皮ジワの改善”, *粉砕 The Micromeritics*, 63 (2020) 102–106. <https://doi.org/10.24611/micromeritics.2020018>

著者紹介



越智 綾香 Ayaka OCHI

〔経歴〕2020年愛媛大学大学院農学研究科博士前期課程修了。同年ホソカワミクロン株式会社入社。2020年から現職。

〔専門〕PLGA ナノ粒子技術を応用した機能性化粧品の研究・開発。

〔連絡先〕aochi@hmc.hosokawa.com



鈴木 貴弘 Takahiro SUZUKI

〔経歴〕2017年神戸大学大学院工学研究科博士前期課程修了。同年ホソカワミクロン株式会社入社。2017年から製薬・美容科学研究センターにて勤務。

〔専門〕ナノ粒子のドラッグデリバリーシステム。最近では化粧品開発にも取り組んでいる。

〔連絡先〕tsuzuki@hmc.hosokawa.com



笹井 愛子 Aiko SASAI

〔経歴〕2009年岩手大学大学院博士後期課程修了，博士（工学）。同年ホソカワミクロン株式会社入社。2010年より製薬・美容科学研究センターにて勤務。副センター長。

〔専門〕ナノマテリアル。PLGA ナノ粒子の医薬品・化粧品開発業務に従事。

〔連絡先〕ayasutake@hmc.hosokawa.com



辻本 広行 Hiroyuki TSUJIMOTO

〔経歴〕1988年中央大学大学院理工学研究科博士前期課程修了。博士（工学）。同年ホソカワミクロン株式会社入社。粉体工学研究所，粉体システム事業部等を経て，マテリアル事業本部長，執行役員。

〔専門〕粉体工学，化粧品，育毛剤開発等 PLGA ナノ粒子の実用化開発の国家プロジェクト等多数。

〔連絡先〕htsujimoto@hmc.hosokawa.com