

毛根への薬物直接送達を可能とするナノ結晶ハイドロゲルの開発

近畿大学薬学部製剤学研究室

長井 紀章

In the present study, we designed a dermal formulation containing 5% minoxidil nanoparticles (MXD-NP) using the bead mill method, and investigated the hair-growth effect of MXD-NP and a commercially available MXD solution (CA-MXD). Hair growth and skin permeation studies were conducted using C57BL/6 mice. Moreover, we examined the MXD contents in the upper (hair bulge) and the lower hair follicle (hair bulb). The mean particle size of the MXD in the MXD-NP was 99 nm. The hair-growth effect of the MXD-NP was higher than that of CA-MXD, and the MXD content in the hair bulge of mice treated with MXD-NP was 7.4-fold of that in the mice treated with CA-MXD. On the other hand, the plasma MXD levels in the mice treated with MXD-NP was lower in comparison with CA-MXD. In conclusion, we showed that MXD-NP enable the accumulation of MXD in the upper hair follicles more efficiently than CA-MXD, leading the activation of hair growth.

1. 緒 言

Androgenetic alopecia (AGA) とは、成人男性によくみられる髪が薄くなる状態であり、これら薄毛対策はコスメトロジー分野において極めて大きな課題である。ミノキシジル (MXD) はこれら AGA の治療薬の 1 つであり、その薬効は毛乳頭細胞の増殖作用、上皮系毛組織細胞 (毛母細胞) などのアポトーシス抑制作用、毛組織血流改善作用に基づくことが報告されている。本 MXD を配合した日本で初めての発毛剤はリアップ® (大正製薬) であり、壮年性脱毛症における発毛、育毛および脱毛進行予防に効果を持つ第 1 類医薬品である。さらに近年では、リアップ® の他に、MXD を主成分とする医薬品が次々に販売され、発毛、育毛および脱毛進行予防を示す MXD 製剤の新たな処方設計や製剤技術が求められている。

一方、ナノ結晶化技術はこれら新剤型に繋がる製剤技術の 1 つであり、今日美容業界分野でも注目されている技法である。一般にナノ粒子とは、大きさが 200 nm 以下の粒子を指し、医薬品をナノ結晶化した際に、溶解速度、分散性、製剤安定性の改善が可能となる。また、粒子径 100 nm 程にすることでエンドサイトーシスを介して、角膜、腸膜、皮膚透過性といったドラッグデリバリーシステム (DDS) としての応用性も知られている¹⁾。申請者もまたこれらナノ結晶の製造や安全性、DDS への応用性について検討を行っており、超微細ナノ結晶化技術を用いることで、薬物

が皮膚吸収を介さず、直接毛根中に到達する製剤開発の可能性を示してきた²⁾。さらに、これら製剤は従来のようにアルコールなど刺激性を有する溶媒を使用することなく調製可能である。本研究では、このナノ結晶化技術を応用した MXD ナノ結晶ハイドロゲル製剤を作製し、毛根部への効果的な薬物送達を試みる。また、MXD ナノ結晶ハイドロゲル製剤をモデル動物に適用することで、本技術が現在市販されている製剤以上の発毛効果が得られる手法であることを証明する。

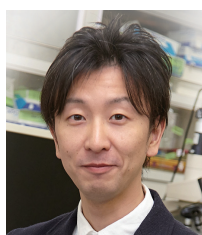
2. 方 法

2. 1. MXD-NP 製剤の調製

メチルセルロースおよびミノキシジル (MXD) を秤量し、乳鉢にて 30 分破碎を行い、それぞれ *p*-オキシ安息香酸メチル、*p*-オキシ安息香酸プロピル、D-マンニトールを含有した精製水で 5 mL にメスアップ後、スターラーにて一日攪拌を行った。その後、直径 2.0 mm のジルコニアビーズ 2.0 g を含む 2.0 mL チューブ中にてビーズミル破碎 (5,500 rpm、30 sec × 15 回、4℃) を行った後、シェイクマスターネオ (1,500 rpm) にて 2 時間破碎処理を施すことで MXD ナノ製剤 (MXD-NP) を調製した。これら製剤の組成は MXD 5%、パラ安息香酸メチル 0.026%、パラ安息香酸プロピル 0.014%、D-マンニトール 0.5%、メチルセルロース 8% とした。また比較対象として、MXD 粉末と同上添加剤を混合したものを MXD マイクロ製剤 (MXD-MP) とした。さらに、溶液型の従来型 MXD 製剤としてリアップ X5 (CA-MXD、大正製薬、東京、日本) を用いた。

2. 2. 薬物ナノ粒子の粒子径および粘度測定

MXD の粒子径測定には SALD-7100 (島津製作所、京都、日本) を用いた。SALD-7100 の測定条件は散乱光強度の最大値が 40 ~ 60% の範囲内、屈折率 $1.60 \pm 0.10i$ とした。



Design of Hydrogel Nanoparticles for
Direct Drug Delivery to Hair Follicles
Noriaki Nagai
Faculty of Pharmacy, Kindai University

また、音叉振動式粘度計SV-1A (株式会社エー・アンド・デイ、東京、日本)を用い、20℃および36℃のそれぞれの温度において粘度測定を行った。

2.3. HPLCを用いたMXD濃度の測定

MXD濃度は調製したMXDの試料50μLに内標 γ -オキシ安息香酸エチル(1μg/mL、溶媒:メタノール)100μLを加え、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)装置(島津製作所、京都、日本)にて測定した。試料注入量は10μLとし、試料の注入にはオートインジェクターSIL-20ACを用いた。HPLC測定条件は、移動相にメタノール/精製水/3mMドキュセートナトリウム(45/54/1 v/v/v)を用い、カラムInertsil ODS-3(2.1×50mm、ジエールサイエンス、東京、日本)、温度35℃(クロマトチャンバーCTO-20AC使用)、移動相の流速0.25mL/min、波長254nmとした。測定時間は16分とし、本研究では、MXDのピークが12~13分、内標のピークが4~5分の間に検出された。

2.4. 毛球、皮膚および血液への薬物移行性評価

薬剤投与前処置として、7週齢C57BL/6雄性マウスをイソフルラン麻酔下(流量1.0L/min、設定濃度2%)、背部の毛を電気バリカン(THRIVE、大阪、日本)にて剃毛し1日放置した。翌日、中央1cm²を切り取ったラミネートを背部に被せ、切り取った部分に各種MXD製剤を30μL塗布した。4時間後、イソフルラン吸入麻酔を行い、塗布部の毛髪をピンセットにて抜き、バルジおよび毛球部を採取した。また、製剤塗布部の皮膚組織を回収するとともに、頸動脈から血液を採取した。得られた血液は遠心分離(20,400g、20min、4℃)により、上清を分取した。これら各試料(バルジ、毛球部、皮膚、血液)をエタノール200μLにてホモジナイズし、遠心分離(20,400g、20min、4℃)後、上清を採取し、試料中のMXD濃度を上記に示したHPLC法にて測定した。またタンパク量の測定を行うことで、毛球滞留性(mol/μg protein)および皮膚滞留性(mol/g protein)を算出した。タンパク量測定にはBio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad、カリフォルニア、USA)を用いた。

用いた。

2.5. 発毛効果の測定

薬剤塗布前処置として、7週齢C57BL/6雄性マウス背面を剃毛後、脱毛クリーム(epilat、Kracie、東京、日本)にて脱毛し、1日放置した。翌日、中央1cm²を切り取ったラミネートを背部に被せ、切り取った部分に各種MXD製剤を1日1回30μL、15日間連日塗布を行った。測定は1日1回行い、イソフルラン吸入麻酔下(流量1.0L/min、設定濃度2%)、マウス背面をデジタルカメラで撮影し、画像解析ソフトImage Jにて塗布部発毛面積を得た。また、発毛面積-時間曲線下面積(AUC_{0-16d})を台形法にて導いた。

3. 結果

3.1. MXD-NP製剤の物性評価

ビーズミル破碎処理前のMXD粉末の粒度分布を測定したところ、平均粒子径は5.83μmとマイクロサイズであった(図1A)。一方、ビーズミル破碎処理によりMXDは微細化され、その平均粒子径は99nmと、ナノサイズの粒子が確認できた(図1B)。図1Cにはビーズミル破碎処理後におけるMXDの画像を示す。50nm~200nm程度のナノ超微粒子が混在しているため、これら製剤の白色分散液であった。さらに、適用時にゲル化し、持続性拡大を目的にメチルセルロースを8%添加したハイドロゲル製剤化について検討した。その結果、常温である20℃では粘度は約30mPa・sであったが、36℃では約120mPa・sと体温付近で粘性の増加が認められた(図1D)。これらMXD-NPの溶解度は18.5μMであり、MXD-MP(2.1μM)より顕著に高値であった。

3.2. MXD製剤塗布による毛球、皮膚および血液への薬物移行性評価

図2は塗布4時間後の皮膚、バルジ領域部、毛球部および血中のMXD薬物滞留性を示す。皮膚および毛球への滞留性においてMXD-NP塗布群は、MXD-MP塗布群と比較し高値であったが、CA-MXD塗布群のそれに比

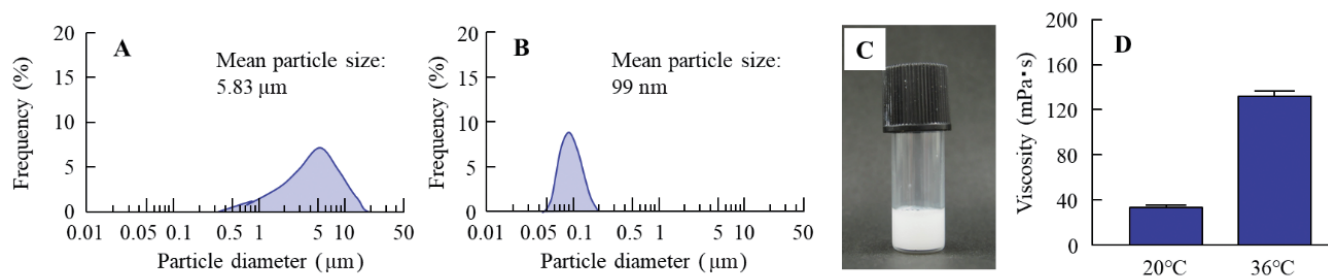


図1 ビーズミル処理前のMXD 粒度分布(A)、ビーズミル処理後のMXD 粒度分布(B)、ビーズミル処理後のMXD 画像(C)、20℃と36℃におけるMXD-NP 製剤の粘度(D)³⁾

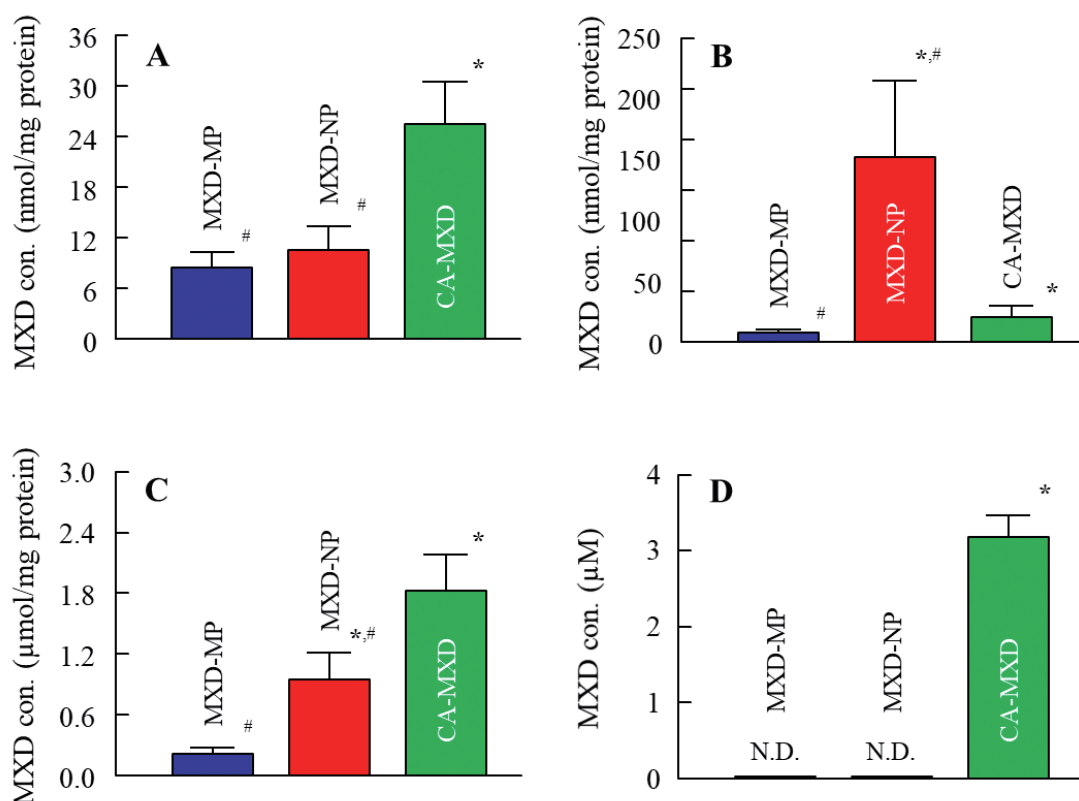


図2 MXD 製剤塗布 4 時間後の C57BL/6 マウスの皮膚組織 (A)、バルジ領域部 (B)、毛球部 (C) および血液 (D) 中の MXD 含有量³⁾
N.D. 検出限度以下。* $p < 0.05$ vs. MXD-MP. # $p < 0.05$ vs. CA-MXD.

べ、低値であった(図2AおよびC)。一方でバルジ領域部においては、MXD-NP塗布群はCA-MXD塗布群と比較し高値を示し、その値は約7.4倍であった(図2B)。これら結果から、MXD-NPはCA-MXDよりもバルジ領域へ吸収されやすいことが示唆された。一方、皮膚滞留性では、MXD-NP塗布群と比較しCA-MXD塗布群で高値を示し、その値は、約1.9倍であった(図2A)。また、CA-MXD塗布群では血中でMXDが検出されたが、MXD-NP塗布群では血中への薬物移行は見られなかった(図2D)。

3.3. MXD 製剤適用時における発毛促進効果

図3は各種MXD製剤塗布後の代表的発毛経過画像を示す。また、図4は各種MXD製剤塗布後日数別に撮影した写真をImage Jより解析した塗布部の発毛率(図3A)と実験16日後までの AUC_{0-16d} (図3B)を示す。Vehicle塗布群では塗布後11日から発毛が認められ、MXD-MP群でも同程度であった。一方、MXD-NPを塗布することで発毛開始が早まり、その時期は塗布後7日目であった。また、MXD-NP塗布群では、従来品であるCA-MXD塗布群よりも発毛時期が早く、 AUC_{0-16d} においてもMXD-NP塗布群は、CA-MXD塗布群と比較し有意に高値であった。

4. 考 察

臨床において、AGAの治療法としてMXDの外用剤が用いられており、5% MXD製剤の有効性は1%や2%のMXD製剤より有意に高いことが知られている^{4,5)}。しかし、これまでMXDを高濃度(5%)含有するMXD固体ナノ粒子製剤の設計は報告されていない。本研究では、分散状態を維持したMXDナノ粒子を5%含有する製剤処方を新たに開発するとともに、本製剤化がMXDを毛包(バルジ領域)に効果的に送達し、C57BL/6マウスの発毛効果増強に繋がることを明らかにした。

まず、研究で調製したMXD-NP(MXDを高濃度(5%)含有するナノ粒子製剤)の特性を測定した。MXD-NPの粒子径は50nm-200nm(平均粒子径、99nm、図1B)であり、MXD-NP中の固体MXDの比率は99%以上であった。一般に、薬物濃度を上げると、製剤中の分散粒子の凝集が促進されることがある。しかし、MXD-NP製剤では、22℃で14日経過しても凝集は検出されず、固体MXDの比率にも変化は見られなかった。MXD-NPの粘度は20℃で約30mPa・sとメチルセルロース8%含有による高い粘度がMXDナノ粒子の分散性を向上させたと考えられる。また、温度応答性ゲル化基剤であるメチルセルロースの性質

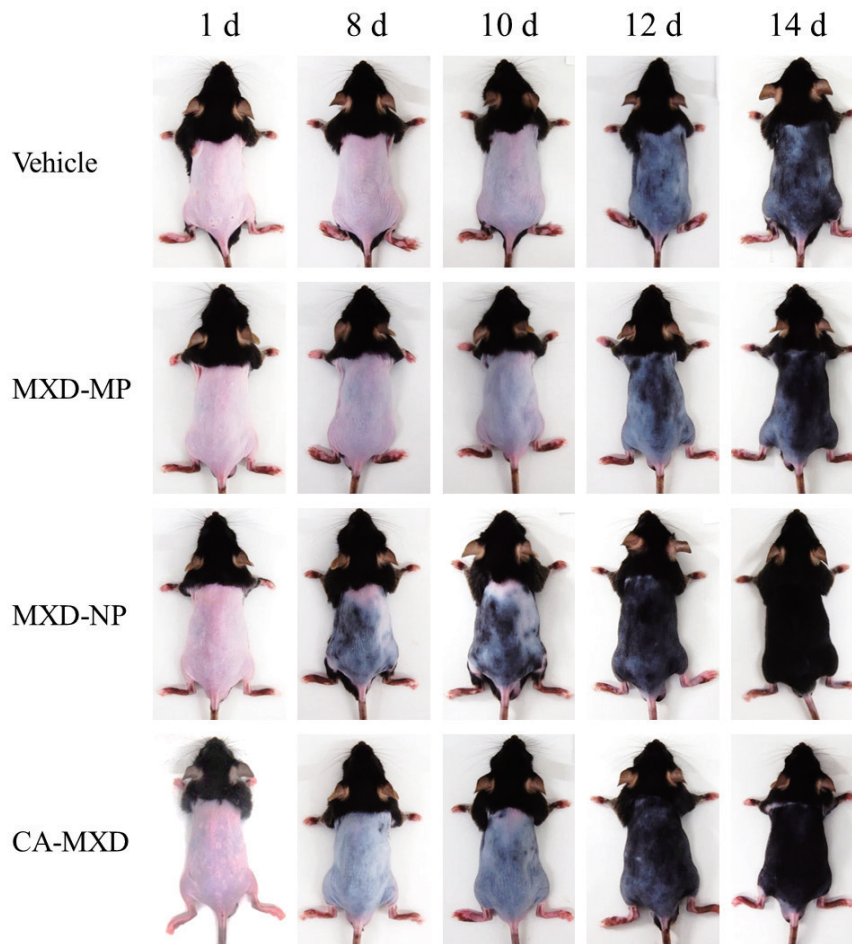


図3 MXD 製剤を反復投与(1日1回)した C57BL/6 マウスのデジタル写真³⁾

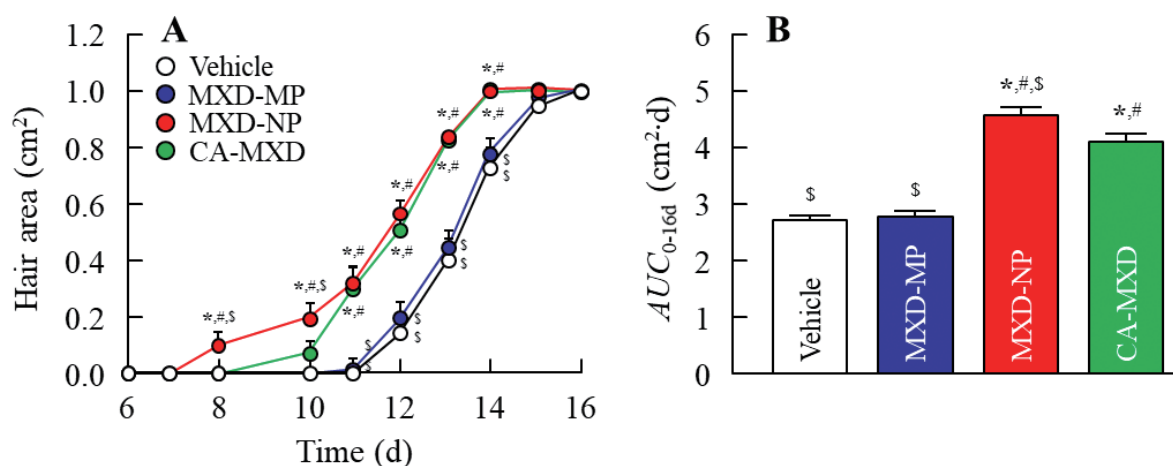


図4 C57BL/6 マウスにおける MXD 製剤の反復投与による毛髪成長への影響³⁾

(A) MXD 製剤を反復投与(1日1回)した C57BL/6 マウスの毛髪面積 (A) と AUC_{0-16d} の変化 (B)。* $p < 0.05$ vs. Vehicle. # $p < 0.05$ vs. MXD-MP. \$ $p < 0.05$ vs. CA-MXD.

上、体温付近の 36℃ における粘度は約 120mPa・s と、in situ ハイドロゲルとしての適応可能な製剤化に成功した。

次に、C57BL/6 マウスを用いて、MXD-NP の発毛効果を評価した。MXD-NP 塗布マウスは CA-MXD 塗布マ

ウスに比べ、毛髪の成長が早く、MXD-NP 群の AUC_{0-16d} は従来品の CA-MXD 群のそれとに比較し有意に高値であった(図3および4)。これらの結果は、MXD-NP の発毛効果が CA-MXD の効果よりも優れていることを示してい

る。さらに、皮膚組織や血液中のMXD含有量の評価に加え、毛包を上部(バルジ領域部)と下部(毛球部)に分割した際の、毛包送達経路についても評価した。MXD-NP塗布マウスのバルジ領域部のMXD濃度はCA-MXD塗布群よりも高値を示したが、MXD-NP投与マウスの毛球部および皮膚組織内の含有量はCA-MXD塗布群よりも低値であった(図2BおよびC)。また、従来のCA-MXD塗布時においては血中へのMXD移行が確認されたが、MXD-NP塗布群においては血液中への薬物移行は検出されなかった(図2D)。一般に薬物の皮膚吸収経路は、連続した角質層を経由するルート1と付属器官を介して皮膚内に浸透するルート2の2種が大きな経路として知られている⁶⁾。なかでも、その広い面積から角質層を透過し、皮膚組織の深部および血中へ浸透するのが一般的な溶液型薬物(溶媒和された薬物)の主経路と考えられる。一方、角質層は外部からの異物侵入に対し高いバリア機構を有していることから、粒子径約200nm以上の薬物は角質層を通過することができず、溶媒和された薬物で見られるようなルート1を介した薬物浸透が困難であることが報告されている⁷⁾。本研究で用いたMXD-NP製剤においても、MXD-NP中の99%以上のMXDが固体粒子として存在し、その固体粒子径は70nm-200nmであることから、これらのサイズでは角質層を通過することが難しいと示唆される。このことが、MXD-NPでは、従来型CA-MXDと比較し、皮膚組織および血液中のMXD含有量が低いことに繋がるものと考えられる。一方、MXD-NP塗布群ではバルジ領域部分への高いMXD輸送を示したのは、ルート2のような付属器官(毛包)を介したためではないかと示唆された。このように、今回調製したMXD-NP製剤は、毛包への直接的な薬物取り込みが認められ、毛包DDSに有用であるものと考えられた。さらに、これらは血中への薬物輸送を軽減できることから、全身性副作用の軽減など安全面においても極めて有用であるものと考えられた。一方で、MXD-NP製剤は皮膚表面側のバルジ領域部には高い薬物供給が可能であったが、毛包深部である毛球部への薬物輸送能は十分ではなかった。したがって、今後さらなる改良が必要と考えられる。また、従来品(CA-MXD)のように毛球部の濃度を高めるよりも、バルジ領域部でのMXD濃度を高めた製剤(MXD-NP)のほうが、高い発毛効果を示したという本研究成果は、MXDがバルジ領域部で何らかの発毛機序を示していることを示唆した。バルジ領域の細胞は幹細胞の性質を持ち、この細胞が無毛期発症時に新しい毛幹を生成することが知られている⁸⁾。したがって、バルジ領域部で高まったMXDは毛包上皮幹細胞の活性化を誘発するのではないかと考える。しかし、MXDがどのように発毛を促進するのか、現時点での理解は限られており、MXDと幹細胞の直接的な相互作用についてはほとんど分かっていない。

MXDが幹細胞に直接作用するかどうかについて、今後さらなる研究を進める予定である。

5. 総 括

MXDナノ結晶からなる高濃度(5%)MXD製剤の製造法を確立するとともに、メチルセルロースをベースとしたin situハイドロゲル処方を作成した。また、本MXD-NP製剤は従来品に比べ、毛穴を介した毛根中への薬物直接移行性が優れており、従来品より安全かつ高い薬効を有することを明らかとした。本成果を基盤とし、今後コスメトロジー分野における新たな技術ツールを生み出すとともに、国民の美容向上に貢献するような研究を進めていきたいと考える。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団のご支援をいただきましたことに心より感謝を申し上げます。

(引用文献)

- 1) Nagai, N. *et al.* Involvement of Endocytosis in the Transdermal Penetration Mechanism of Ketoprofen Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, E2138 (2018).
- 2) Nagai, N. *et al.* Drug Delivery System Based On Minoxidil Nanoparticles Promotes Hair Growth In C57BL/6 Mice. *Int. J. Nanomedicine*. **14**, 7921-7931 (2019).
- 3) Oaku, Y. *et al.* Minoxidil Nanoparticles Targeting Hair Follicles Enhance Hair Growth in C57BL/6 Mice. *Pharmaceutics* **14**, 947 (2022).
- 4) Olsen, E. A. *et al.* A randomized clinical trial of 5% topical minoxidil versus 2% topical minoxidil and placebo in the treatment of androgenetic alopecia in men. *J. Am. Acad. Dermatol.* **47**, 377-385 (2002).
- 5) Tsuboi, R. *et al.* Randomized clinical trial comparing 5% and 1% topical minoxidil for the treatment of androgenetic alopecia in Japanese men. *J. Dermatol.* **36**, 437-446 (2009).
- 6) Barry, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **14**, 101-114 (2001).
- 7) Nagai, N. *et al.* Design of a transdermal formulation containing raloxifene nanoparticles for osteoporosis treatment. *Int. J. Nanomedicine*. **13**, 5215-5229 (2018).
- 8) Garza, L. A. *et al.* Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. *J. Clin. Invest.* **121**, 613-622 (2011).