

Summary

Daisuke Horita

Introduction

Ethanol (EtOH), a percutaneous absorption enhancer, has been used to increase the efficacy of various drugs. As such formulations include both drug and EtOH, it is difficult to evaluate the enhancing effect of EtOH on the skin permeability affected by the structural change of the skin treatment with EtOH alone. Then the mechanism underlying EtOH-induced changes in the skin permeability remain unclear. EtOH can be used not only to enhance drug permeation and as a solubilization agent but also as a skin disinfectant or astringent. Thus, EtOH is frequently used as an ingredient in drug formulations. Elucidating the mechanism underlying effects of EtOH on the pathway of drug penetration in the skin will enhance the utility value of EtOH-containing products. The purpose of the present study was to characterize the relationship and mechanism between the drug permeability and structural changes in the EtOH-treated skin as a penetration barrier.

Chapter 1. The comparison of permeability of compounds through EtOH-treated skin

Effects of EtOH concentration on the permeability of the skin to various drugs via pig skin were examined. The skin pretreatment with aqueous EtOH could achieve the evaluation of the skin permeability without any effects of solubilization and solvent drag. The model drugs used in the study were selected based on their different molecular weights and log $K_{o/w}$ values.

Skin permeability of hydrophilic drugs (especially high-molecular-weight compounds) increased with low EtOH concentrations but decreased with high EtOH concentrations. A major factor influencing skin permeability was the penetrant's partition coefficient. However, pretreatment with EtOH had no effect on the skin permeability of lipophilic drugs. Thus, skin permeability of hydrophilic drugs is greatly influenced by the pretreatment with EtOH and its concentrations. It was thought that the cause of those effects was the change in the drug distribution induced by alterations in the structure of the skin.

Chapter 2. Effects of EtOH pretreatment and hair follicle (HF) plugging on skin permeability

2-1. Skin permeability of drugs through the stratum corneum (SC) or HFs

Elucidating the detailed mechanism of the effects of EtOH on the skin permeability of hydrophilic drugs requires evaluation of the contribution of skin appendages, such as HFs. Plugging of the infundibulum enabled us to indirectly evaluate penetration of drugs via the HFs.

The results showed that HFs contribute significantly to the permeation of hydrophilic drugs through the skin. The development of the new tool for evaluating skin permeation revealed that the follicular pathway plays an important role in the entry of hydrophilic drugs. Hydrophilic drugs show marked partitioning to the follicular pathway.

2-2. Evaluation of HF-mediated drug penetration through EtOH-treated skin

EtOH is expected to use as an enhancer of percutaneous absorption of the hydrophilic drug. Then the effect of EtOH on drug entry via the HFs was examined using HF plugging experiments.

It was revealed that EtOH-pretreatment affected both the aqueous pathway in the SC and HFs, resulting the change of the skin permeability of hydrophilic drugs. The primary penetration

pathway differed among the hydrophilic drugs examined. EtOH pretreatment had a greater effect on the permeability of hydrophilic drugs which mainly through HFs rather than SC.

It was demonstrated that there two major penetration pathways in the skin, and the contribution of each pathway to permeation of the drug depended on the character of chemical compounds. The follicular pathway may not be simply a pore route, because the skin permeability of high-molecular-weight compounds was varied with changes in EtOH concentrations.

Chapter 3. Effect of EtOH pretreatment on skin electrical conduction

It was suggested that the skin permeability of hydrophilic drugs using EtOH-treated skin was related to the distribution of drugs to the aqueous pathway. Effects of EtOH on the distribution of drugs to the aqueous pathway was examined by monitoring electrical conduction in the skin, providing an indication of the ease with which low-molecular-weight ions pass through the skin.

Although certain levels of ion passage were observed under every EtOH pretreatment condition, the skin permeability of the hydrophilic drugs of high molecular weight via aqueous pathway was dramatically decreased by the treatment with high concentrations of EtOH. The permeability of hydrophilic drugs of low molecular weight was highly correlated with skin electrical conduction. These results indicated that the skin electrical conduction capacity reflects the condition of the aqueous pathway involving the SC, and treatment with high concentrations of EtOH could reduce the size of the aqueous pathway in the skin.

Chapter 4. Effects of EtOH on the ordered structures of the SC

In the previous chapters, it was demonstrated that EtOH-pretreatment changed the permeability of hydrophilic drugs, and the alteration of the skin structure of the permeation pathway by EtOH-pretreatment may caused the changes. EtOH-induced modifications of skin structure were investigated at the molecular level using synchrotron X-ray diffraction.

EtOH markedly altered the short lamellar structures in the aqueous layer in intercellular lipids and the structure of keratin fibrils in corneocytes. Although the short lamellar structures were mostly changed by the middle concentrations of EtOH, the changes induced in the fibril structures were linearly proportional of the EtOH concentrations. Long lamellar structures and hydrocarbon chain packing structures were not affected by EtOH at any concentration. These results indicate that EtOH has specific effects on the ordered structure of the skin, which can take up hydrophilic drugs.

Conclusion

Application of low concentrations of EtOH to the skin induced a disordering of the short lamellar structures and a moderate loosening of the fibril packing structure. In contrast, application of high concentrations of EtOH not only reduced the size of the pathway for aqueous domains, but also ordered the short lamellar structures and denatured proteins in the corneocytes. The present study revealed that EtOH can alter the aqueous pathway in the skin, and it follows that the skin permeability of hydrophilic compounds changes as a result of alteration in drug distribution. These new findings concerning the effect of EtOH on the skin permeability of drugs and its effect on the structure of the skin barrier will be useful in further development of EtOH-containing drug formulations.

諸言

経皮吸収促進剤に含まれるエタノール (EtOH) は、製剤の薬効を高める目的で外用剤に配合されてきた。製剤中では溶媒として EtOH と薬物が共存するため、EtOH 単独による影響を受けた皮膚の変化に基づく透過促進効果についての評価は難しく、その詳細なメカニズムは解明されていない。EtOH は経皮吸収促進作用以外にも、溶剤、消毒剤、収斂剤としての有用作用を持つため、外用剤開発において配合頻度の高い成分である。皮膚透過経路に及ぼす EtOH の影響を明らかにすることは、EtOH 含有製剤の利用価値を更に高めるための技術発展に繋がる。そこで本研究では、EtOH を適用した皮膚における化学物質透過性変化と皮膚バリア構造変化の関係についての詳細なメカニズムの解明を目的とした。

第1編 種々濃度のエタノールで処理した皮膚の化学物質透過性の比較

化学物質の皮膚透過性に及ぼす EtOH 濃度の影響を評価した。EtOH 水溶液で皮膚を前処理することにより、基剤中での EtOH の可溶化効果や溶媒牽引効果などを除外して、皮膚透過実験を行った。モデル化合物は、分子量と $\text{Log}K_{ow}$ 値を考慮して選択した。

低濃度 EtOH の皮膚処理は水溶性化合物の皮膚透過性を上昇させるものの、高濃度ではむしろそれを減少させた。皮膚透過性の変化は、分子量が大きい化合物で顕著であり、水溶性化合物の皮膚への分配性の変化が要因となっていた。一方、EtOH の前処理は、脂溶性化合物の皮膚透過性にほとんど影響しなかった。

EtOH 水溶液による皮膚前処理は水溶性化合物の皮膚透過性に大きく影響し、その効果は EtOH 濃度によって異なることを明らかにした。このメカニズムとして、皮膚内で生じている複数の変化が複合して生じた、水溶性化合物の皮膚への分配性の変化が考えられた。

第2編 化学物質の皮膚透過性に及ぼすエタノール前処理と毛嚢プラグギング処理の影響**第1章 角層実質及び毛嚢を介した化学物質の皮膚透過性の評価**

水溶性化合物の皮膚透過における EtOH 前処理の影響について詳細な理解を得るには、皮膚付属器官を介する透過経路の評価が求められる。そこで、皮膚付属器官である毛嚢を介した化学物質の皮膚透過性の評価について検討した。

毛嚢漏斗部を物質透過の妨げとなる材料で埋めること (毛嚢プラグギング) により、化学物質の毛嚢透過性を間接的に評価することが可能になった。その結果、イオン形化合物や水溶性の高分子量化合物の皮膚透過において、毛嚢経路の寄与が高いことがわかった。

毛嚢プラグギング法の開発により、水溶性化合物の皮膚透過には、毛嚢経路が重要な役割を果たすことを明らかにした。その要因には、それら化合物の毛嚢部位への分配性の高さが考えられた。

第2章 エタノール処理皮膚を用いた化学物質の毛嚢透過性評価

経皮吸収促進剤としての役割を期待して使用される EtOH が、毛嚢経路を介する化学物質の皮膚透過性に与える影響を評価した。

EtOH は角層実質及び毛嚢のそれぞれの水性経路に影響し、水溶性化合物の皮膚透過性を変化させることがわかった。水溶性に分類される化合物間でも、主とする透過経路が異

なっていた。また、EtOH 水溶液の処理は、角層実質よりも主に毛嚢経路を透過する水溶性化合物の皮膚透過性により大きく影響した。

水溶性化合物の透過経路は複数存在し、その透過の寄与は透過物質の物理化学的性質に依存することを明らかにした。水溶性の高分子量化合物の透過が種々濃度の EtOH 処理によって多様に変化する事実は、毛嚢は単なる孔としては捉えられないことを示唆していた。

第3編 皮膚電気伝導性に及ぼすエタノール前処理の影響

EtOH 処理をした皮膚を用いた水溶性化合物の透過性は、皮膚の水性経路への移行性との関連が示唆された。そこで、低分子イオンの透過性を示す皮膚電気伝導性を測定し、皮膚中の水性経路に及ぼす EtOH の影響について評価した。

いずれの EtOH 濃度の皮膚前処理を施しても、低分子イオンの皮膚透過性は確保されていたが、水溶性の高分子量化合物においては、高濃度 EtOH の処理時に毛嚢部と角層実質の皮膚透過性が著しく低下した。一方、水溶性の低分子量化合物に関しては、皮膚透過係数と皮膚電気伝導性は良く似た傾向を示した。

皮膚電気伝導性は角層実質の水性経路の状態を反映していると考えられた。高濃度 EtOH は皮膚中の水性経路を狭めることが示唆されたものの、全体の現象をより良く理解するためには分子レベルでの解明が求められると思われた。

第4編 角層の秩序構造に及ぼすエタノールの影響

本編までの結果より、EtOH 処理による水溶性化合物の皮膚透過性の変化の主要因として、EtOH 水溶液による角層中の水性経路の構造的変化が重要であることが示唆された。そこで、放射光 X 線回折実験により、角層構造に及ぼす EtOH 濃度の影響を分子レベルで明らかにすることを試みた。

EtOH 水溶液は細胞間脂質の短周期ラメラ構造やソフトケラチンのフィブリル構造に影響を与え、それら構造を変化させた。短周期ラメラ構造の変化は中間濃度の EtOH の処理で極大を示したものの、フィブリル構造の変化は EtOH 濃度にほぼ比例した。一方、長周期ラメラ構造や炭化水素鎖の充填構造には EtOH の影響がほとんどみられなかった。

EtOH 水溶液は皮膚構造内で水を取り込みうる構造部分に影響を及ぼすことがわかった。また、それら水性経路の構造的変化の挙動についても初めて明らかとなった。

結論

低濃度 EtOH の皮膚適用は、短周期ラメラ構造を乱し、フィブリルの充填構造を適度に緩ませることがわかった。一方、高濃度 EtOH の皮膚適用は、水溶性化合物の皮膚透過経路を狭めるだけでなく、細胞間脂質の構造を秩序化させて更には角層細胞のケラチンタンパク質の変成を引き起こすことがわかった。このように、EtOH は皮膚中の水性経路の構造に影響し、水溶性化合物の皮膚分配性を複合的な要因によって変化させ、水溶性化合物の皮膚透過性を変化させることが明らかとなった。この透過性への寄与には、短周期ラメラ構造の影響が大きいと推察された。本研究で得られた、EtOH を適用した皮膚における化学物質透過性変化と皮膚バリア構造変化の関係についての知見は、EtOH 含有製剤の更なる技術発展に寄与すると思われる。

論文審査の結果の要旨

経皮吸収促進剤に含まれるエタノール (EtOH) は、製剤の薬効を高める目的で外用剤に配合されてきた。製剤中では溶媒として EtOH と薬物が共存するため、EtOH 単独による影響を受けた皮膚の変化に基づく透過促進効果についての評価は難しく、その詳細なメカニズムは解明されていない。皮膚透過経路に及ぼす EtOH の影響を明らかにすることは、EtOH 含有製剤の利用価値を更に高めるための技術発展に繋がる。

本研究では、EtOH を適用した皮膚における化学物質透過性変化と皮膚バリア構造変化の関係についての詳細なメカニズムの解明を 4 編構成で論述している。

第 1 編 種々濃度のエタノールで処理した皮膚の化学物質透過性の比較

本編では、化学物質の皮膚透過性に及ぼす EtOH 濃度の影響を評価している。EtOH 水溶液で皮膚を前処理することで、基剤中での EtOH の可溶化効果や溶媒牽引効果などを除外する条件下で検討しており、モデル化合物は、分子量と $\text{Log}K_{ow}$ 値を考慮して選択されている。

その結果、低濃度 EtOH の皮膚処理は水溶性化合物の皮膚透過性を上昇させるものの、高濃度ではむしろそれを減少させることが示された。皮膚透過性の変化は、分子量が大きい化合物で顕著であり、水溶性化合物の皮膚への分配性の変化が要因となるが、脂溶性化合物の皮膚透過性については、EtOH の前処理がほとんど影響しないとの結果を得ている。

本編では、EtOH 水溶液による皮膚前処理は水溶性化合物の皮膚透過性に大きく影響し、その効果は EtOH 濃度によって異なることを明らかにし、このメカニズムとして、皮膚内で生じている複数の変化が複合して水溶性化合物の皮膚への分配性が変化したことが考えらると論じている。

第 2 編 化学物質の皮膚透過性に及ぼすエタノール前処理と毛嚢プラグギング処理の影響

第 1 章 角層実質及び毛嚢を介した化学物質の皮膚透過性の評価

水溶性化合物の皮膚透過における EtOH 前処理の影響について詳細な理解を得るには、皮膚付属器官を介する透過経路の評価が求められることから、本編第 1 章では、皮膚付属器官である毛嚢を介した化学物質の皮膚透過性の評価について検討している。

検討方法として毛嚢漏斗部を物質透過の妨げとなる材料で埋めること (毛嚢プラグギング) により、化学物質の毛嚢透過性の間接的評価を可能にした。その結果、イオン形化合物や水溶性の高分子化合物の皮膚透過において、毛嚢経路の寄与が高いことを発見した。堀田氏は毛嚢プラグギング法を開発したことで、水溶性化合物の皮膚透過に毛嚢経路が重要な役割を果たすことを明瞭に提示し、その要因として、それら化合物の毛嚢部位への分配性の高さが考えられると論じている。

第 2 章 エタノール処理皮膚を用いた化学物質の毛嚢透過性評価

本章では、経皮吸収促進剤としての役割を期待して使用される EtOH が、毛嚢経路を介する化学物質の皮膚透過性に与える影響を評価している。

EtOH は角層実質及び毛嚢のそれぞれの水性経路に影響し、水溶性化合物の皮膚透過性を変化させ、また、水溶性に分類される化合物間でも、主とする透過経路が異なることを発見した。EtOH 水溶液の前処

理は、角層実質よりも主に毛嚢経路を透過する水溶性化合物の皮膚透過性により大きく影響することも明確に示されている。

本章の検討により、水溶性化合物の透過経路は複数存在し、その透過の寄与は透過物質の物理化学的性質に依存することが示された。堀田氏は、水溶性の高分子化合物の透過が種々濃度の EtOH 処理によって多様に変化する事実を踏まえると、毛嚢は単なる孔としては捉えられないことを提唱している。

第3編 皮膚電気伝導性に及ぼすエタノール前処理の影響

前編において、EtOH 処理をした皮膚を用いた水溶性化合物の透過性が、皮膚の水性経路への移行性と関連するとの結果を得たことから、本編では、低分子イオンの透過性を示す皮膚電気伝導性を測定し、皮膚中の水性経路に及ぼす EtOH の影響を詳細に評価した。

いずれの EtOH 濃度の皮膚前処理を施しても、低分子イオンの皮膚透過性は確保されていたが、水溶性の高分子化合物においては、高濃度 EtOH の処理時に毛嚢部と角層実質の皮膚透過性が著しく低下するとの結果を得ている。一方、水溶性の低分子量化合物に関しては、皮膚透過係数と皮膚電気伝導性は良く似た傾向が示された。

以上より、堀田氏は、皮膚電気伝導性は角層実質の水性経路の状態を反映していると論じ、高濃度 EtOH は皮膚中の水性経路を狭めるが、全体の現象をより良く理解するためには分子レベルでの解明が必要であると論じている。

第4編 角層の秩序構造に及ぼすエタノールの影響

本編までの結果より、EtOH 処理による水溶性化合物の皮膚透過性の変化の主要因として、EtOH 水溶液による角層中の水性経路の構造的変化が重要であることが示された。そこで、放射光 X 線回折実験により、角層構造に及ぼす EtOH 濃度の影響を分子レベルで明らかにすることを試みている。

EtOH 水溶液は細胞間脂質の短周期ラメラ構造やソフトケラチンのフィブリル構造に影響を与え、それらの構造を変化させることを示した。短周期ラメラ構造の変化は中間濃度の EtOH の処理で極大を示し、フィブリル構造の変化は EtOH 濃度にほぼ比例したが、長周期ラメラ構造や炭化水素鎖の充填構造には EtOH の影響がほとんどないことを示した。

本編の検討により、EtOH 水溶液は皮膚構造内で水を取り込みうる構造部分に影響を及ぼし、それら水性経路の構造的変化の挙動についても初めて明らかにされた。

以上、堀田氏は、低濃度 EtOH の皮膚適用は、短周期ラメラ構造を乱し、フィブリルの充填構造を適度に緩ませることを初めて明らかにした。一方、高濃度 EtOH の皮膚適用は、水溶性化合物の皮膚透過経路を狭めるだけでなく、細胞間脂質の構造を秩序化させて更には角層細胞のケラチンタンパク質の変性を引き起こすことも発見した。よって、EtOH は皮膚中の水性経路の構造に影響し、水溶性化合物の皮膚分配性を複合的な要因によって変化させ、水溶性化合物の皮膚透過性を変化させることを本論文で証明した。本研究で得られた、EtOH を適用した皮膚における化学物質透過性変化と皮膚バリア構造変化の関係についての知見は、EtOH 含有製剤の更なる技術発展に寄与するものと思われ、課程によらない博士（薬科学）の学位を授与するに値するものと判断する。