

水溶性化合物の皮膚透過経路に及ぼす
エタノール適用の影響に関する研究

堀田 大介

目次

略語と記号	1
緒言	3
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	7
第1節 実験方法	9
1. 実験材料	
2. 実験動物	
3. 皮膚の摘出法	
4. <i>In vitro</i> 皮膚透過実験法	
5. 種々化学物質の定量法	
第2節 理論	13
1. 皮膚透過パラメータの算出	
第3節 結果	16
1. D ₂ O の YMP 皮膚透過に及ぼす EtOH 前処理の影響	
2. FD-4 の YMP 皮膚透過に及ぼす EtOH 前処理の影響	
3. 種々化合物の YMP 皮膚透過係数に及ぼす EtOH 前処理の影響	
第4節 考察	23
第5節 小括	25
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	26
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	26
第1節 実験方法	29
1. 実験材料	
2. 実験動物	
3. 皮膚の摘出法	
4. 毛嚢プラグギング (HFP) 法	
5. <i>In vitro</i> 皮膚透過実験法	
6. 共焦点レーザー顕微鏡による皮膚組織切片観察法	
7. 種々化学物質の定量法	

第 2 節	理論	33
1.	皮膚透過パラメータの解析	
第 3 節	結果	34
1.	FD-4 適用後の皮膚切片の観察	
2.	イオン形及び分子形 LC のブタ耳皮膚透過性に及ぼす HFP 処理の影響	
3.	LC と FD-4 のブタ耳皮膚透過性に及ぼす HFP 数の影響	
第 4 節	考察	41
第 5 節	小括	43
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	44
第 1 節	実験方法	45
1.	実験材料	
2.	実験動物	
3.	皮膚の摘出法	
4.	HFP 法	
5.	<i>In vitro</i> 皮膚透過実験法	
6.	種々化学物質の定量法	
7.	TLC による脂質の分析法	
第 2 節	結果	48
1.	水溶性化合物の毛嚢透過経路に及ぼす EtOH 処理の影響	
2.	種々濃度 EtOH の処理によって抽出される脂質の分析	
第 3 節	考察	52
第 4 節	小括	55
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	56
第 1 節	実験方法	57
1.	実験材料	
2.	実験動物	
3.	皮膚の摘出法	
4.	<i>In vitro</i> 皮膚透過実験法	
5.	皮膚電気抵抗値の測定法	
第 2 節	理論	58
1.	皮膚電気伝導性の算出	
第 3 節	結果	59
1.	EtOH 処理後の皮膚電気伝導性	
2.	皮膚透過係数と皮膚電気伝導性の関係	

第4節	考察	61
第5節	小括	64
第4編	角層の秩序構造に及ぼすエタノールの影響	65
第1節	実験方法	67
	1. 実験材料	
	2. 実験動物	
	3. 角層組織の分離法	
	4. サンプル調製法	
	5. X線回折実験法	
第2節	理論	69
	1. 回折プロファイルの算出	
第3節	結果	71
	1. ヘアレスマウス角層の秩序構造に及ぼす EtOH 濃度の影響	
	2. 小角領域における回折ピークの解析	
	3. 広角領域における回折ピークの解析	
	4. 中角領域における回折ピークの解析	
	5. ブタ角層の秩序構造に及ぼす EtOH 濃度の影響	
第4節	考察	85
第5節	小括	91
	結論	92
	謝辞	98
	引用文献	100

略語と記号

略語	
CA	Calcein
Cl ⁻	Chloride Ion
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
DDS	Drug Delivery System
D ₂ O	Deuterium Oxide
EtOH	Ethanol
FD-4	Fluorescein Isothiocyanate-dextran 4 kDa
FL	Fluorescein
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
ISDN	Isosorbide Dinitrate
ISMN	Isosorbide Mononitrate
LC	Lidocaine
Na ⁺	Sodium Ion
PBS	pH 7.4 Phosphate Buffered Saline
HFP	Hair Follicle Plugging
HFP agent	Mixture of Silicone Grease, Cyanoacrylate Adhesive and Nile Red
TLC	Thin-Layer Chromatography
TTS	Transdermal Therapeutic System
YMP	Yucatan Micropig

記号	
A	有効透過面積
C_v	基剤中薬物濃度
d	格子面の間隔
D	拡散係数
D/L^2	拡散パラメータ
$flux$	定常状態時の薬物皮膚透過速度
H	有効透過面積に対する HFP 処理を施した部分の面積の割合
K	分配係数
$K_{o/w}$	n -オクタノール/水分配係数
$K \cdot L$	分配パラメータ
L	皮膚の厚み
P	透過係数
P_{des}	角層の落屑速度
q	波数ベクトル
Q	化学物質の累積皮膚透過量
Q_{hfp}	毛嚢プラグギングを施した場合の面積減少を補正した化学物質の累積皮膚透過量
R	皮膚電気抵抗
S	面間隔の逆数
θ	散乱角
λ	波長
ρ	電気抵抗率

緒言

日本薬局方（日局）は、医薬品の性状や品質を保証するための、薬事法第 41 条に基づく医薬品の規格基準書である。その歴史は古く、初めて日局が公布されたのは明治 19 年（西暦 1886 年）6 月 25 日にさかのぼる¹⁾。以降、医学や薬学の進歩に伴って、順次に改正が施されてきた。現在では第十六改正日局が施行（平成 23 年 3 月 24 日公布）され、製剤総則が全面的に改正されている。この改正の背景には、近年の様々な製剤開発と日局の枠組みを超えた製剤の臨床導入があり、製剤総則の再編が求められてきたことが挙げられる。このような背景から、新たな剤形分類が制定されるに至っている。特に外皮用薬は、第十五改正日局と比較すると 9 つもの剤形が新規に収載されており、製剤総則の中でも最も改正点が多かった項目である。これは、外皮用薬の種類と用途および薬効の関係が明確化してきたことなどが背景にある。

外皮用薬には、皮膚などに適用する製剤の大分類のもとに、外用固形剤、外用液剤、スプレー剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤といった中分類が存在し、さらに小分類として外用散剤、リニメント剤、ローション剤、外用エアゾール剤、ポンプスプレー剤、テープ剤、パップ剤が存在している。

外皮用薬は皮膚における炎症、発疹、痒み、創傷、細菌、真菌などの侵入に対する疾患に対して、製剤を皮膚に適用して有効成分を皮膚もしくは皮膚直下の組織に送達し、局所的な治療を施すためのものである。最近では、全身作用を期待した経皮治療も存在する。外皮用薬の歴史は古く、植物や動物などを原料にしたものが紀元前より使用されていたといわれる²⁾。現在の薬事法のもとで医薬品と認められる外皮用薬は、有効成分と基剤成分より成り立っている。有効成分とは、疾患治療のため生体内で生理活性を示す物質のことで、治療の目

的に応じて使い分けられる。一方、基剤成分は剤形を決める物質であり、様々な種類が存在する。例えば、炭化水素類、ロウ類、脂肪酸エステル類、高級脂肪酸、高級アルコールなどの油性成分や、水をはじめ、低級アルコール、多価アルコールなどの水性成分がある。さらには、界面活性剤、高分子量化合物、防腐剤、酸化防止剤、金属イオン封鎖剤、pH調節剤、香料なども添加剤として配合される。これらの中には、製剤からの有効成分の放出や生体が有効成分を吸収する速度を調節する作用を有するものもあり、薬物送達システム（Drug Delivery System、DDS）研究の一端として、より効果的な医薬品の開発のために様々な研究が行われている。

経皮吸収型製剤（Transdermal Therapeutic System、TTS）研究は、このようなDDS研究の一つとして位置付けられる。皮膚を介した薬物の投与は、肝初回通過効果がないほかにも、薬物の投与速度や血中濃度の制御さらには薬物供給の速やかな中断ができるなど、経口投与に比べて有益な点が多い。しかしながら、皮膚は本来、外来からの異物の侵入を防御するだけでなく、体内からの水分の蒸散を防止するための器官として強固なバリア機能を有しており、薬物に対しても例外ではない。皮膚は主に表皮と真皮から構成され、皮下組織に続く。また表皮の最外層は角層で覆われている。皮膚のバリア機能の主体はこの角層であり、薬物だけでなく様々な化学物質の皮膚透過性を著しく制限する。気管支喘息に対するツロブテロール³⁾、高血圧症に対するクロニジン⁴⁾、狭心症に対するニトログリセリン⁵⁾や硝酸イソソルビド⁶⁾、アルツハイマー型認知症に対するリバスチグミン⁷⁾のような、全身作用を期待した薬物を含有するTTSも開発されているが、これらの薬物は脂溶性かつ低分子量であり、低用量であることから、角層を透過しやすく、薬効を発現しやすい特徴を持っている。しかし、TTS開発において、薬効を発現させたい薬物が、必ずしも角層を透過しやすい性質

を有しているわけではない。このような薬物の経皮吸収の改善には、経皮吸収促進剤が使用される。

経皮吸収促進剤には、アルコール類^{8,9)}、脂肪酸類^{10,11)}、脂肪酸エステル類^{12,13)}、テルペン類^{14,15)}、ピロリドン類^{16,17)}、界面活性剤類^{18,19)}、Azone 類^{20,21)}など、様々な種類があるが、古くからの使用実績を考慮すると、最もよく用いられる成分としてエタノール (EtOH) がある。エストラジオールやフェンタニルパッチは EtOH の経皮吸収促進効果を利用して開発された TTS の代表例である²²⁻²⁴⁾。角層に及ぼす EtOH の影響については、脱脂、細胞間脂質の流動性亢進、細胞間脂質中への薬物の取り込み量の増大、皮膚水和状態の変化、想定される細孔経路への影響、ケラチンタンパク質の変性及び溶媒牽引などあり^{25,26)}、その結果として薬物の経皮吸収が促進されると考えられている。また、EtOH と水や*l*-メントールとの混合系の経皮吸収促進効果も報告されている²⁷⁻²⁹⁾。このように、薬物の経皮透過では角層のバリア能の克服が重要な課題として研究されてきた。これら EtOH に関する研究のほとんどは、薬物と EtOH を同時適用した場合にみられる現象について報告している。すなわち、溶媒として共存する EtOH そのものの効果と EtOH により影響を受けた皮膚の変化に基づく効果の切り分けが難しい現象を評価している。EtOH の経皮吸収促進効果を薬物の皮膚透過性で評価する場合、薬物と EtOH を同時適用すると、ドナー溶液中の薬物の熱力学的活量の変化³⁰⁾や、EtOH と薬物の共輸送が生じる³¹⁾ことが知られている。そのため、EtOH により影響を受けた皮膚の変化に基づく効果とその明確なメカニズムについては明らかにされていなかった。

そこで本論文では、EtOH で前処理した皮膚を用いて、化学物質の皮膚透過実験及び皮膚の放射光 X 線回折実験を行い、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

を目指した。本論文第 1 編では、種々化合物の皮膚透過性を前処理 EtOH 濃度ごとに比較し、EtOH 処理と化合物の皮膚透過性との関連について試験した。第 2 編では、化学物質の毛嚢透過性を間接的に評価する方法を応用し、皮膚表面に存在する角層と毛嚢のそれぞれの組織ごとの化学物質の透過性に及ぼす EtOH 処理の影響を評価した。第 3 編では、皮膚電気抵抗値から皮膚を介する低分子イオンの流れの情報を得ることにより、EtOH 処理した皮膚の水性経路の状態について推察した。最後に第 4 編では、放射光 X 線回折実験を行い、角層中の秩序構造に及ぼす EtOH 処理の影響について、その濃度ごとに分子レベルで評価した。このように本論文では、様々な方法を用いて、皮膚への EtOH 適用の影響を多角的に且つ詳細に研究した。

EtOH は経皮吸収促進効果以外にも、難溶性物質の溶解性向上剤、手指などの皮膚の消毒剤、製剤中の防腐剤、皮膚の収れん剤、皮膚上で製剤を早く乾燥させるための溶媒としての用途もあり、医薬品だけでなく医薬部外品や化粧品においても多岐にわたる目的で使用されている。それら商品の EtOH 含有率は数パーセントから数十パーセントであり、日常生活において様々な濃度の EtOH が皮膚に接触する機会がある。皮膚に対する EtOH の作用を明らかにすることは、高い薬効を持つ EtOH 含有製剤の開発や、その EtOH 含有製剤の安全な使用にも応用できる。このように、本研究の目的を達成することによって、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げることができると考えている。

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³²⁾

EtOH を含有する外皮用剤には、ローション剤、ゲル剤、リニメント剤などが知られている。これら外皮用剤中の薬物は、角層実質もしくは皮膚付属器官を経て皮膚透過し、薬効を発現する。一般に、皮膚付属器官経路を経た薬物の皮膚透過は、角層実質経路よりも単位面積当たりで比較した場合に高くなる。それは、汗腺や毛嚢といった皮膚付属器官が表皮から真皮までを貫いているためであると考えられている。しかし、皮膚付属器官の皮膚上での表面積は皮膚全体の0.1%程度であり³³⁾、経皮吸収に対するその寄与は無視できることから、角層が主な経皮吸収経路になるとされてきた。

角層は部位によって異なるものの、約20層の角層細胞層から成り立っており、それぞれの角層細胞の間を細胞間脂質が埋めている³⁴⁾。この角層は全体として、脂溶性で密な性質を持ち、化学物質の皮膚透過性を著しく制限する強固なバリア能を持つ。薬物の経皮透過においては角層のバリア能の克服が重要な課題として研究されており、問題解決手段のひとつとして、経皮吸収促進剤であるEtOHが多用されてきた。

皮膚に及ぼすEtOHの効果として、脂質の抽出、脂質流動性の増大、脂質中への薬物溶解性の増大、皮膚水和状態の変化、細孔経路への影響、ケラチンタンパク質の変性、溶媒牽引効果などが報告されている^{25,26)}。これらの効果はEtOH単味や薬物同時適用時に見られるものであるが、これらの各作用がどのように化学物質の皮膚透過促進に関わっているかは、EtOHの適用条件、すなわちその

濃度や適用方法により異なっていると推察される。実際、外用医薬品や化粧品市場には、数パーセントから数十パーセントの EtOH を含有した商品が多々存在している。しかしながら、化学物質の皮膚透過性に及ぼす様々な濃度の EtOH 処理の影響について、適用するドナー溶液が同じ条件で一律に評価した報告はない。薬効や安全性を考慮した EtOH 含有商品の開発には、そのような基礎情報が有用となる。

そこで本編では、皮膚に種々濃度の EtOH 水溶液を前処理適用し、化学物質の皮膚透過性への影響を調査することとした。前処理適用を選択することで、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ことが可能となる。モデル皮膚にはブタ皮膚を選択した。これは、ブタ皮膚での透過性評価の研究が多く³⁵⁻³⁸⁾、化学物質のブタ皮膚透過性やブタ皮膚の組織学的特徴についてはヒト皮膚に類似していることが報告されているためである³⁹⁻⁴²⁾。モデル化合物は、 $\text{Log}K_{ow}$ と分子量を考慮して、重水 (D_2O)、イソソルビド一硝酸エステル (ISMN)、イソソルビド二硝酸エステル (ISDN)、カルセインナトリウム (CA) 及びフルオレセインイソチオシアネート-デキストラン (FD-4) を選択した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

EtOH、D₂O は和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から購入したものをを用いた。ISMN、CA は東京化成工業株式会社（東京、日本）から購入したものをを用いた。ISDN は中国化薬株式会社（広島、日本）より提供されたものをを用いた。FD-4 は Sigma-Aldrich Co., Ltd. (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入したものをを用いた。その他の試薬及び溶媒は市販の特級もしくは HPLC 用のものを精製せずに用いた。Table 1 にモデル化合物の物理化学的パラメータを示す。

Table 1 Physicochemical properties of model compounds

Model compounds	<i>M.W.</i>	Log $K_{o/w}$ ^{a)}
Deuterium oxide (D ₂ O)	20	—
Isosorbide-5-mononitrate (ISMN)	191	-0.151 ⁴³⁾
Isosorbide dinitrate (ISDN)	236	1.22 ⁴⁴⁾
Calcein sodium (CA)	668	-3.5 ⁴⁵⁾
FITC-Dextran 4 kDa (FD-4)	3300–4400	-0.773 ⁴⁶⁾

a) Logarithm of octanol/pH 7.4 PBS partition coefficient at 37°C

2. 実験動物

ユカタンマイクロミニブタ（YMP）の背部皮膚は日本チャールス・リバー株式会社（東京、日本）から冷凍状態のものを購入した。購入した YMP 皮膚は実験開始まで-80°C で保管された。すべての実験は城西大学動物実験規定に従って行った。

3. 皮膚の摘出法

冷凍状態の YMP 背部皮膚を室温で解凍した。その後、表皮及び真皮上層部をダーマトーム (Acculan[®] 3Ti Dermatome : B.Braun, Tuttlingen, Germany) にて真皮下層及び皮下組織及び皮下脂肪と分離した。なお、表皮及び真皮上層部の厚みは 1.2 mm になるように設定した。

4. *In vitro* 皮膚透過実験法

摘出後の YMP 皮膚 (full-thickness skin または stripped skin) を有効透過面積 3.14 cm² の縦型拡散セル (Fig. 1) に装着し、レーザー側 (真皮側) に pH 7.4 リン酸緩衝液 (PBS) 18.0 mL を適用した。YMP stripped skin はセロテープ[®] (ニチバン株式会社、東京、日本) で角層側を剥離する操作を 50 回繰り返す、角層を完全に除去した皮膚とした。その後、0%、20%、40%、60%、80%、100% (v/v) に調製した EtOH 水溶液をドナー側 (表皮側) に 1.5 mL 適用し、12 時間の前処理を行った。前処理後に皮膚表面を精製水で 3 回洗浄し、レーザー溶液を 2 倍希釈した PBS (D₂O の透過実験時) もしくは PBS (ISMN、ISDN、CA、FD-4 の透過実験時) と入れ換えた。次に、55.2 mM の D₂O、700 mM ISMN、4.0 mM ISDN、1.0 mM CA、1.0 mM FD-4 をドナー側に適用した。なお、種々化学物質のドナー溶液は PBS に溶解して調製した。縦型拡散セル内は 32°C に保ち、スターラーで攪拌した。透過実験は 8 時間 (ISDN)、12 時間 (D₂O、ISMN)、30 時間 (CA、FD-4) 実施した。経時的に真皮側セルから 500 µL のレーザー溶液をサンプリングした後、一定量を保つために新しい 2 倍希釈した PBS もしくは PBS を同量戻した。

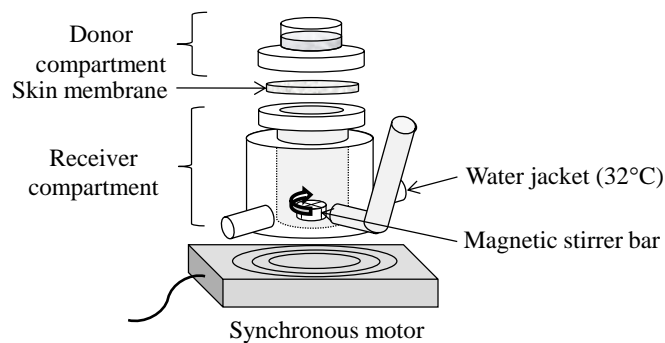


Fig. 1 Experimental set-up for *in vitro* skin permeation study using vertical-typed diffusion cell

5. 種々化学物質の定量法

D₂O の濃度は、サンプルを遠心分離（18,000×g、5 min、4°C）した後、得られた上清を CaF₂ セル（光路長：0.025 mm、窓板：30 mm×4 t）（ジーエルサイエンス株式会社、東京、日本）に入れ、フーリエ変換赤外分光光度計（IRAffinity-1；株式会社島津製作所、京都、日本）を用いて O-D 伸縮振動強度（2512 cm⁻¹）を測定して求めた。

CA 及び FD-4 の濃度は、サンプルを遠心分離（18,000×g、5 min、4°C）した後に得られた上清を、蛍光分光光度計（RF 5300PC；株式会社島津製作所）を用いて測定して求めた。測定条件は、励起波長が 488 nm（CA）及び 490 nm（FD-4）、蛍光波長が 515 nm（CA）及び 520 nm（FD-4）であった。

ISMN 及び ISDN の濃度は HPLC（Prominence；株式会社島津製作所）を用いて測定して求めた。ISMN の皮膚透過実験のレシーバーサンプル 200 μL にメタノールを同容量加え、同様の ISDN のサンプル 200 μL に内部標準物質を溶かした溶媒（1 μg/mL 4-ヒドロキシ安息香酸ブチル／メタノール）を同容量加え、それぞれを攪拌・遠心分離（18,000×g、5 min、4°C）した。得られた上清の 20 μL

を HPLC に注入して分析を行った。HPLC システムはポンプ (LC-20AS ; 株式会社島津製作所)、カラム (Unison UK-C18 3 μ m, 4.6 \times 75 mm ; インタクト株式会社、京都、日本)、オートインジェクター (SIL-20A ; 株式会社島津製作所)、UV 検出器 (SPD-M20A ; 株式会社島津製作所)、解析システム (LC solution ; 株式会社島津製作所) を用いた。ISMN の定量時の移動相には超純水/HPLC 用アセトニトリル (9 : 1) を、ISDN の定量時の移動相には超純水/HPLC 用アセトニトリル (3 : 2) を用い、流速は 1.0 mL/min、UV 波長は 220 nm とした。なお、カラムオーブンは 40°C に設定した。

第2節 理論

1. 皮膚透過パラメータの算出

皮膚透過実験から得られた、モデル化合物の累積皮膚透過量－時間プロファイルから、皮膚透過係数 P (permeability coefficient、cm/s) を算出した。

角層は部位によって異なるものの、約 20 層の角層細胞層からなり、厚みは約 20 μm である。角層は最外層より 1 日 1 層ずつ順次に落屑していくため、落屑層の厚みを 1 μm と仮定すると、落屑速度 (P_{des}) は約 1×10^{-9} cm/s となる。したがって、薬物が皮膚を透過するためには、 P_{des} 以上の P が必要となる。このように、 P は薬物の皮膚浸透力の指標となる。

薬物は Fick の第 1 法則に従い、皮膚（角層）中に生じる薬物の濃度勾配によって拡散・透過する。実際の皮膚は多層膜であるが、下層の生きた表皮・真皮はバリア能が低いことから、多くの化学物質の皮膚透過実験において、皮膚を 1 層膜と仮定して解析することができる。In vitro 皮膚透過実験では、拡散における皮膚中の薬物濃度が時間に対して変化するので、皮膚中の薬物の拡散は Fick の第 2 法則で解析される。ここで、ドナー濃度が一定に保たれ、レシーバー側で常にシンク条件が成立していると仮定し、Fick の第 2 法則の式を解くと、単位面積当たりの皮膚透過量 Q (mol/cm^2) は式 (1) のように導き出すことができる⁴⁷⁾。

$$Q = \frac{D \cdot K \cdot C_v}{L} \left(t - \frac{L^2}{6D} \right) - \frac{2K \cdot C_v \cdot L}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp \left(-\frac{D \cdot n^2 \cdot \pi^2}{L^2} t \right) \quad (1)$$

式中の D 、 K 、 C_v 、及び L は、それぞれ、透過物質の皮膚バリア中拡散係数 (diffusion coefficient、 cm^2/s)、同物質の皮膚バリア／基剤分配係数 (partition

coefficient)、適用薬物濃度 (mol/L)、及び皮膚バリアの厚み (cm) を示す。さらに、式 (1) を時間 t で微分し、単位面積当たりの皮膚透過速度 dQ/dt (mol/cm²/s) を表すと式 (2) のようになる。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D \cdot K \cdot C_v}{L} \left\{ 1 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp\left(-\frac{D \cdot n^2 \cdot \pi^2}{L^2} t\right) \right\} \quad (2)$$

dQ/dt が一定となる定常状態では、式 (2) の右辺第 2 項をゼロに近似でき、式 (3) に簡略化できる。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D \cdot K \cdot C_v}{L} = P \cdot C_v (= flux) \quad (3)$$

P は、定常状態時の薬物の皮膚透過速度 ($flux$) を適用物質濃度で除することにより算出し、式 (4) で表される。

$$P = \frac{D \cdot K}{L} = \frac{D}{L^2} (K \cdot L) \quad (4)$$

ここで、皮膚バリアの厚みを表す L は変化しないと仮定すると、 D/L^2 は拡散パラメータ (diffusion parameter、1/s)、 $K \cdot L$ は分配パラメータ (partition parameter、cm) として表すことができる。さらに、得られた薬物透過プロファイル (Fig. 2) から、time-lag method を用いて拡散遅延時間 T_{lag} (h) を算出した。なお、 T_{lag} は式 (1) について t が十分に大きい条件で得られる直線式に $Q = 0$ を代入することにより、式 (5) として表される。

$$T_{lag} = \frac{L^2}{6D} \quad (5)$$

得られた T_{lag} から D/L^2 を算出し、さらに式 (4) に導入することで $K \cdot L$ を算出した。

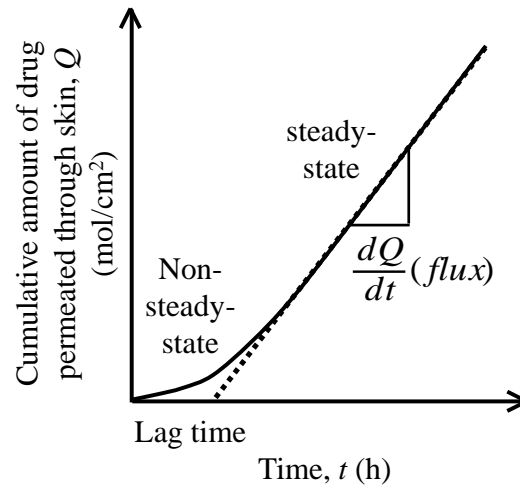


Fig. 2 Typical skin permeation profile

第3節 結果

1. D₂O の YMP 皮膚透過に及ぼす EtOH 前処理の影響

まず、D₂O の YMP full-thickness skin 透過性に及ぼす EtOH 前処理の影響について試験した。各濃度の EtOH 水溶液で前処理した皮膚を用いて、D₂O の皮膚透過実験を行った。Fig. 3 に D₂O の 12 時間に亘る YMP 皮膚透過量に及ぼす前処理 EtOH 濃度の影響を示す。前処理の EtOH 濃度に関わらず、D₂O の YMP 皮膚透過量にはほとんど差が見られなかった。つまり、EtOH 前処理はその濃度に関わらず、水の皮膚透過性にはほとんど影響しないことがわかった。

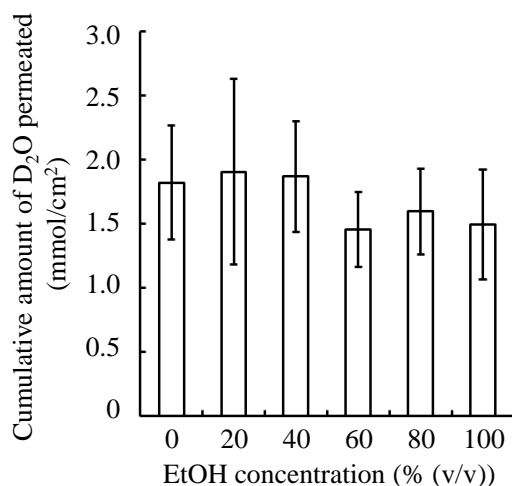


Fig. 3 Effect of different concentrations of EtOH pretreatment on the cumulative amounts of D₂O permeated through YMP skin over 12 h

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3-4$).

2. FD-4 の YMP 皮膚透過に及ぼす EtOH 前処理の影響

続いて、FD-4 の YMP 皮膚透過 (full-thickness and stripped skin) に及ぼす EtOH 前処理の影響について調査した。FD-4 の YMP full-thickness と YMP stripped skin 透過挙動をそれぞれ Fig. 4 に示す。FD-4 の YMP full-thickness skin 透過量は、低濃度 EtOH の前処理で増大したものの、高濃度 EtOH の前処理ではむしろ減少した。0%つまりは水単味での前処理時と 100%つまりは EtOH 単味での前処理時の 30 時間に亘る FD-4 の YMP full-thickness skin 透過量を比較すると、EtOH 単味で処理した場合は、水単味で処理した場合の約 20 分の 1 の透過量しか得られなかった。この現象が皮膚のどの部分に EtOH が作用することで引き起こされているかを調べるため、stripped skin にて同様に透過量を比較したところ、透過量の差は約 2 分の 1 まで縮まった。すなわち、EtOH 処理は full-thickness skin を介した透過実験の FD-4 の透過量に大きく作用した。したがって、EtOH は角層に作用することで、水溶性の高分子量化合物の皮膚透過性を変化させることがわかった。

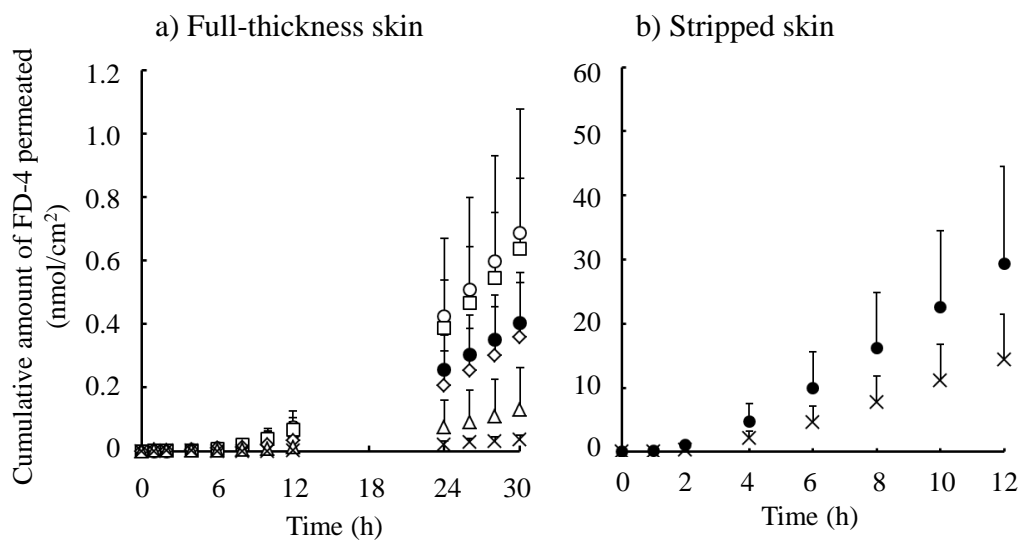


Fig. 4 Pretreatment effect of different concentrations on the time course of cumulative amount of FD-4 that permeated through full-thickness YMP skin (a) and stripped YMP skin (b)

Symbols: water (●), 20% EtOH (○), 40% EtOH (□), 60% EtOH (◇), 80% EtOH (△), 100% EtOH (×)

Each point represents the mean + S.D. (n=4-7).

3. 種々化合物の YMP 皮膚透過係数に及ぼす EtOH 前処理の影響

そこで次に YMP 皮膚透過性に及ぼす前処理 EtOH 濃度の影響を、分子量だけでなく脂溶性も異なるモデル化合物 (D₂O、ISMN、ISDN、CA、FD-4) 間で比較した。各前処理 EtOH 濃度に対する化学物質の皮膚透過係数を Table 2 に、水処理時の皮膚透過係数との比を Fig. 5 に、皮膚透過係数の対数との関係を Fig. 6 に示す。水溶性化合物である ISMN、CA、FD-4 の皮膚透過係数は、低濃度 EtOH の前処理で増大した。しかし、前処理 EtOH 濃度が 60% を超えると逆にそれら化合物の皮膚透過係数は減少した。特に、100% EtOH での前処理時の CA や FD-4 の皮膚透過係数は水処理時のそれに比べて著しく減少した。一方、極性物質である D₂O や脂溶性化合物の指標である ISDN の皮膚透過係数に対する EtOH 前処理の影響は小さく、EtOH 濃度の違いによるそれら化合物の皮膚透過係数の差はほとんどみられなかった。ISMN と ISDN の分子量は同程度にもかかわらず、皮膚透過係数に対する EtOH 前処理の影響については異なる挙動を示した。

Table 2 Permeability coefficient of model drugs that obtained from their skin permeation profiles

EtOH concentration (% (v/v))	0	20	40	60	80	100
P_{D_2O} (cm/s) $\times 10^{-6}$	1.46 \pm 0.50	1.67 \pm 0.19	1.78 \pm 0.30	1.49 \pm 0.32	1.52 \pm 0.45	1.46 \pm 0.70
P_{ISMN} (cm/s) $\times 10^{-7}$	1.46 \pm 0.36	2.70 \pm 0.35	3.44 \pm 0.88	2.61 \pm 0.34	1.92 \pm 0.93	0.97 \pm 0.62
P_{ISDN} (cm/s) $\times 10^{-6}$	2.77 \pm 0.05	3.32 \pm 0.69	2.99 \pm 0.42	2.65 \pm 0.77	2.58 \pm 1.06	2.57 \pm 0.82
P_{CA} (cm/s) $\times 10^{-8}$	4.99 \pm 1.10	11.6 \pm 4.26	8.82 \pm 1.74	3.87 \pm 0.06	2.67 \pm 1.20	0.29 \pm 0.07
P_{FD-4} (cm/s) $\times 10^{-9}$	7.97 \pm 2.99	13.9 \pm 7.03	13.1 \pm 8.51	7.68 \pm 3.40	2.92 \pm 2.50	0.73 \pm 0.66

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3-7).

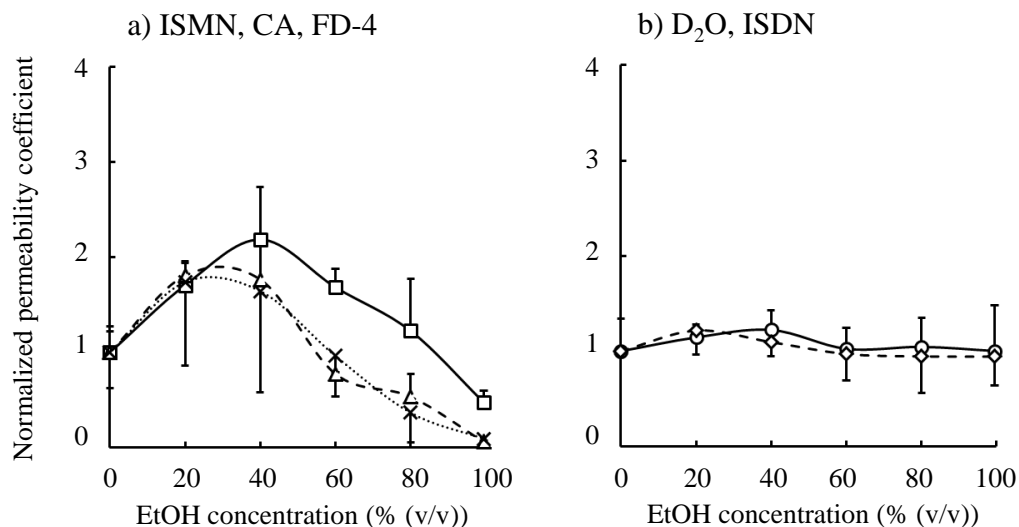


Fig. 5 Pretreatment effect of different concentrations of EtOH pretreatment on the normalized permeability coefficient of model compounds. The normalized data were calculated by dividing the value of permeability coefficients with EtOH treatments by those for 0% EtOH.

Symbols: D₂O (○), ISMN (□), ISDN (◇), CA (Δ), FD-4 (×)

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3-7$).

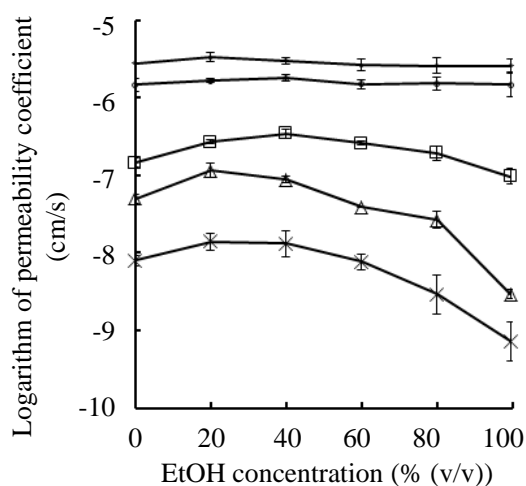


Fig. 6 EtOH-concentration profile of logarithm of skin permeability coefficients of model compounds

Symbols: D₂O (○), ISMN (□), ISDN (◇), CA (Δ), FD-4 (×)

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3-7$).

水溶性化合物の皮膚透過係数は前処理 EtOH 濃度によって変化した。EtOH 処理による水溶性化合物の皮膚透過係数の変化の要因を調べるため、透過プロファイルから拡散パラメータ及び分配パラメータをそれぞれ算出した。それらのパラメータはラグタイムより求めた。FD-4 と ISDN の皮膚透過における分配パラメータ及び拡散パラメータに及ぼす前処理 EtOH 濃度の影響を Fig. 7 に示す。水処理時の拡散パラメータ及び分配パラメータのそれぞれをコントロールとし、各 EtOH 濃度に対するそれぞれのパラメータを比で表した。FD-4 の拡散パラメータは EtOH 濃度によらずほぼ一定であったものの、分配パラメータは 40% までの EtOH 処理で増加し、60% 以上の EtOH 濃度では徐々に減少した。EtOH 濃度と分配パラメータの関係における挙動は、Fig. 5 で示した EtOH 濃度と皮膚透過係数の関係における挙動とよく似ていた。一方、前処理 EtOH 濃度によって皮膚透過係数がほとんど変わらなかった ISDN では、拡散パラメータ及び分配パラメータは EtOH 濃度によらず共にほぼ一定であった。

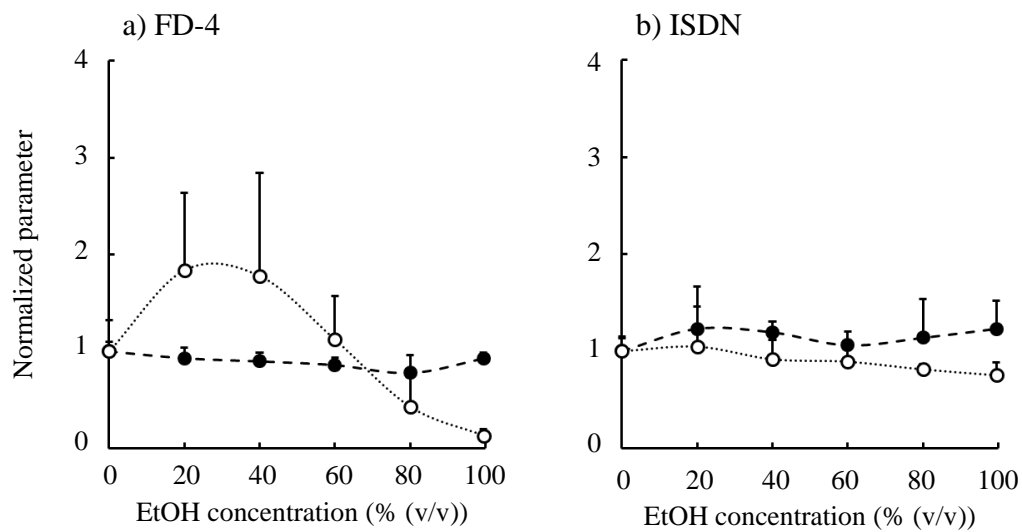


Fig. 7 Pretreatment effect of different concentrations of EtOH pretreatment on the normalized diffusion and partition parameter of FD-4 and ISDN. The normalized data were calculated by dividing the value of diffusion and partition parameter with EtOH treatments by those for 0% EtOH.

Symbols: diffusion parameter (●), partition parameter (○)

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=4-7$).

第4節 考察

本編における透過実験に用いた皮膚の厚みは 1.2 mm に設定しており、一般的な皮膚透過実験で用いられる膜よりも厚みがある。化学物質のブタ皮膚透過性は、年齢によって変化すると報告されており⁴⁸⁾、毛嚢組織の発達とともに *flux* の増加が観察されるのはダーマトーム使用時に毛嚢部をカットすることが原因だといわれている⁴⁹⁾。それらの要因による透過のばらつきを避けるには、ダーマトームでの皮膚摘出時に毛嚢部のできるだけ下部をカットすることが望ましく、本研究では皮膚膜を厚めに設定した。FD-4 の full-thickness skin 及び stripped skin 透過挙動の比較から、この条件においても角層透過が律速段階であり、皮膚を1層として仮定して解析することに問題はないと考えられた。

EtOH 水溶液による前処理は、水溶性化合物である ISMN、CA、FD-4 の皮膚透過係数を変化させた。FD-4 の full-thickness skin 及び stripped skin 透過挙動から、EtOH 水溶液による前処理は主に角層中の水溶性化合物の透過経路に影響すると考えられた。これら水溶性化合物の皮膚透過係数の変化は、拡散パラメータと分配パラメータの分離評価から、皮膚への分配性の変化に起因することが示されたが、その変化の本質については明らかではない。

EtOH の皮膚処理はさまざまな物質の皮膚透過に影響を及ぼすことが知られている。低濃度 EtOH は角層中の脂質の流動性を特に親水部分に作用して増大させるが、高濃度では脂質抽出作用が強くなり⁵⁰⁾、さらに 100% の濃度では脂質の固定化や皮膚からの脱水を引き起こし⁵¹⁾、薬物の皮膚透過性を変化させるといわれる。Hatta らは EtOH を角層に適用した際、斜方晶構造が乱されるだけでなく角層細胞中のソフトケラチンの構造が部分的に破壊され、細胞間脂質中に EtOH プールが形成されることから、EtOH は親水性物質が通る経細胞経路を作

ると提案している⁵²⁾。さらに、EtOHは角層や生きた表皮・真皮のタンパク質の変性を引き起こすかもしれない。今回の水溶性化合物の皮膚透過性の変化の結果は、これらのEtOHの作用が複合的に組み合わさり、例えば、ポア透過理論における空隙率（透過ルート占有率）の上昇のような変化が皮膚内で生じ、それが水溶性化合物の皮膚への分配性の変化として観察されたものと考えられる。

一方、水の指標として用いたD₂Oや脂溶性化合物の指標として用いたISDNのfull-thickness skin透過量に対するEtOH前処理の影響はEtOH濃度にかかわらずほとんどみられなかった。これは、EtOH前処理が水や脂溶性化合物の拡散性及び分配性にはほとんど影響しないことを示唆している。

水溶性化合物の皮膚透過性に及ぼすEtOH適用の影響に関し、化学物質の分子量の影響を考える必要があるかもしれない。その影響は、FD-4で最も大きく、D₂Oではほとんど見られない。その理由として、水溶性化合物の透過経路には大きさが異なる複数の経路が存在し、その存在比が変化していることが考えられる。水分子の皮膚内拡散性は、各大きさの経路で可能であるため、皮膚にEtOH処理を施してもほとんど変わらない。しかし、FD-4やCAのような大きな分子では、より太い経路でのみで拡散が可能⁵³⁾で、EtOHはその存在比を変化させると考えられた。他の水溶性化合物と水で異なる挙動を示した別の理由として、実験条件の違いがあるかもしれない。ドナー溶液はモデル化合物をPBSに溶解して調製し、レシーバー溶液にはPBSを用いている。D₂Oの場合、水の濃度としてはドナー溶液とレシーバー溶液でほとんど変わらないが、PBSが希釈されて塩濃度は他の化合物の条件と異なる。これらのことも考慮する必要があるかもしれない。

第5節 小括

本編では、ダーマトームにて剥離したブタ皮膚を用いて、種々濃度の EtOH で処理した皮膚の化学物質透過性の比較を行った。その結果、EtOH は角層に作用し、水溶性化合物の皮膚透過係数を変化させ、その変化は分子量が大きい化合物で顕著であることが明らかとなった。また、低濃度 EtOH の皮膚処理は水溶性化合物の皮膚透過係数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わかった。その変化は、水溶性化合物の角層への分配性の変化が要因となっていることが示されたが、それは、皮膚内で生じている複数の変化が複合して生じたものと考えられた。

一方、脂溶性化合物の皮膚透過性に EtOH はほとんど影響しなかった。以上の結果は、水溶性化合物を有効成分とするような医薬品外用剤の開発に有用な情報となるだろう。

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⁵⁴⁾

第1編にて、水溶性化合物の皮膚透過性は EtOH 前処理によって変化することを明らかにした。皮膚表面は主に角層実質が占めており、毛嚢や汗腺といった皮膚付属器官が点在する組織となっている。角層実質は角層細胞が細胞間脂質に包み込まれており、全体として脂溶性の性質を持つことが知られている。そのため、水溶性化合物は角層実質を透過しにくく、特に分子量が大きい化合物では、その皮膚透過には毛嚢や汗腺といった皮膚付属器官経路が重要になってくると考えられてきた。

Scheuplein は、水溶性化合物でも速い皮膚透過が見られることから、毛嚢はシャント pathway として働くと予測していた⁴⁷⁾。毛嚢の皮膚表面側は漏斗状の構造を有しており、上部はしっかりとした角層で覆われている。しかし、下部はゆるい構造となっており、化学物質の透過に対するバリア能が低いと考えられている。水溶性の高分子化合物はこの毛嚢組織を経て皮膚透過すると予測した報告が既にされている⁵⁵⁾。しかし、皮膚に適用された化学物質は同時に2つ以上の経路で皮膚透過する可能性があるため、角層実質と皮膚付属器官の両方を通る物質の透過経路の寄与率の算定は難しく、毛嚢を経た皮膚透過の寄与率などを報告した研究は少ない。化学物質の皮膚透過に及ぼす毛嚢の影響を検討

する実験手法に関してはいくつか報告されており、皮膚を傷つけた後に得られる毛嚢のない再生皮膚と無傷皮膚間で透過性を比較し毛嚢器官の影響を調べたもの⁵⁶⁾、生後間もないラット皮膚と生後数日のラット皮膚間の比較で透過性に及ぼす毛嚢器官の発達度合の影響を調べたもの⁵⁷⁾、毛嚢密度の異なる部位の皮膚間の比較で透過性に及ぼす毛孔の数の影響を調べたもの⁵⁸⁾、毛嚢が存在する動物皮膚と毛嚢が存在しない培養皮膚の透過性の比較により毛嚢の存在の有無の影響を調べたもの⁴⁶⁾などがある。しかしながら、これらの方法では、同じレベルのバリア能を示す角層を有する皮膚間で化学物質の透過性を比較しているとは言えず、化学物質の皮膚透過に及ぼす毛嚢の影響を正確に評価できていない可能性がある。最近、毛嚢漏斗部を処理剤で埋めて、化学物質の皮膚透過性を部位選択的に評価する方法が開発された⁵⁹⁻⁶³⁾。しかし、これらの方法を応用して、角層実質や毛嚢の皮膚透過性を詳細に解析した報告はまだない。前編において、EtOHの前処理により角層の水溶性化合物の透過性が変化することを示したが、水溶性化合物の皮膚透過においては皮膚付属器官も重要であり、水溶性化合物の皮膚透過におけるEtOHの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を評価する必要がある。

そこで本編第1章では、皮膚付属器官である毛嚢に着目し、毛嚢を経た化学物質の皮膚透過性を評価できないか検討した。シアノアクリレート系接着剤とシリコーングリスの混合物で毛嚢漏斗部を埋める方法を用いて、毛嚢を経た化学物質の皮膚透過を抑制し、毛嚢部分の透過性を間接的に評価した。なお、本編の実験にはYMP背部ではなく三元ブタ耳介部の外側皮膚を選択した。これは、三元ブタ耳介部の単位面積当たりの毛の本数がYMP背部のそれよりも多く、化学物質の毛嚢透過性評価に適していると考えたためである。また、ブタは汗腺が退化しており能動的なエクリン腺がない⁶⁴⁾上に、哺乳類の耳介は汗をかきに

くい箇所であるため汗腺の数も少ないと予想される。また、アポクリン腺は毛嚢の内側に繋がっている。そのため、ブタ耳の皮膚付属器官を介した化学物質の皮膚透過は、主に毛嚢漏斗部を介するものと推定できる。

第1節 実験方法

1. 実験材料

リドカイン塩酸塩 (LC) は Sigma-Aldrich Co., Ltd. から購入したものをを用いた。FD-4 は第1編と同様のものをを用いた。ナイルレッドは関東化学株式会社 (東京、日本) から購入したものをを用いた。その他の試薬及び溶媒は市販の特級もしくは HPLC 用のものを精製せずに用いた。Table 3 にモデル化合物の物理化学的パラメータを示す。

Table 3 Physicochemical properties of model compounds

Model compounds	<i>M.W.</i>	$\log K_{o/w}$ ^{a)}	<i>pKa</i> ^{e)}
Lidocaine hydrochloride (LC)	289	-0.93 ^{b)} 0.39 ^{c)}	7.9 ⁶⁵⁾
FITC-Dextran 4 kDa (FD-4)	3300-4400	-0.773 ^{d,46)}	6.4 ⁶⁶⁾

a) Logarithm of octanol/water partition coefficient at 37°C, b) determined with pH 5.0 phosphate buffer, c) determined with pH 10.0 carbonate buffer, d) determined with pH 7.4 PBS, e) acid dissociation constant

2. 実験動物

三元ブタ耳介は株式会社埼玉実験動物供給所 (杉戸、埼玉、日本) から冷凍状態のものを購入した。冷凍されたブタ耳介は実験開始まで-30°C で保管された。すべての実験は城西大学動物実験規定に従って行った。

3. 皮膚の摘出法

冷凍されたブタ耳介をジップ付きのポリ袋に密封し、37°C の温水で解凍した。解凍後、精製水で皮膚表面を軽く洗った。電動バリカン及び電動シェーバーにて剃毛後、メスを用いて皮膚を摘出し、さらに余分な脂肪をハサミで丁寧に取り除いた。その後、表皮及び真皮上層部をダーマトームにて真皮下層及び皮下組織及び皮下脂肪と分離した。なお、表皮及び真皮上層部の厚みが 1.0 mm になるように設定した。摘出したブタ皮膚は透過実験を開始するまで、PBS で湿らせたキムワイブ上に置き、生きた表皮・真皮側が乾かないようにした。

4. 毛嚢プラグニング (HFP) 法

適量のナイルレッドを溶かしたシアノアクリレート系接着剤 (アロンアルファゼリー状 : コニシ株式会社、大阪、日本) と同量のシリコングリス (Super Lube[®] Silicone Dielectric Grease: Synco Chemical Corp., Bohemia, NY, U.S.A.) を混合し、HFP agent を調製した。毛嚢を介した化学物質の皮膚透過を妨げるため、実体顕微鏡下 (SZ-61: オリンパス株式会社、東京、日本) にて、HFP agent を摘出したブタ皮膚の毛嚢漏斗部に適用した (Fig. 8)。HFP 処理を施した部分の面積は、実体顕微鏡のデジタルカメラ (DP21: オリンパス株式会社) で撮影して算出した。1つ毛嚢に対して HFP を施した場合の皮膚表面の処理面積は約 0.006 cm² となり、認識しうる全ての毛嚢を HFP 処理した場合は、有効透過面積 (1.77 cm²) 中の約 2 割の面積を占める。HFP 処理を施した皮膚は、角層側を上にして、PBS で湿らせたキムワイブ上に置き、約 30 分間放置した。

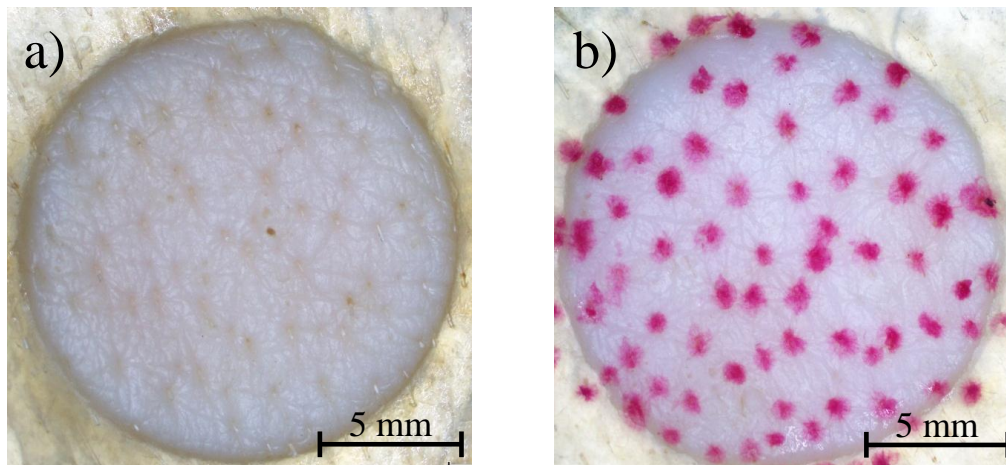


Fig. 8 Effective penetration area of pig ear skin before (a) and after (b) HFP treatment with HFP agent

5. *In vitro* 皮膚透過実験法

ブタ耳皮膚 (non-treatment skin または hair follicles-plugged skin) を有効透過面積 1.77 cm^2 の縦型拡散セル (Fig. 1) に装着し、レーザー側 (真皮側) に PBS を 6.0 mL 適用した。その後、ドナー側 (表皮側) に精製水を 1 mL 適用し、1 時間の水和処理を行った。1 時間後にドナー側の精製水を取り除き、 $\text{pH } 5.0$ に調整した 100 mM LC ($1/30 \text{ mM}$ リン酸緩衝液)、 $\text{pH } 10.0$ に調整した 10 mM LC ($1/30 \text{ mM}$ 炭酸緩衝液)、PBS に溶解した 5 mM FD-4 を 1.0 mL 適用した。LC は、 $\text{pH } 5.0$ ではイオン形、 $\text{pH } 10.0$ では分子形として存在する。縦型拡散セル内は 32°C に保ち、スターラーで攪拌した。透過実験は 8 時間 (LC)、12 時間 (FD-4) 実施した。経時的に真皮側セルから $500 \mu\text{L}$ のレーザー溶液をサンプリングした後、一定量を保つために新しい PBS を同量戻した。

6. 共焦点レーザー顕微鏡による皮膚組織切片観察法

FD-4 適用群に関しては、透過実験終了後、回収したブタ耳皮膚表面を PBS で洗浄し、凍結包埋剤 (Super Cryoembedding Medium、Leica Microsystems Inc.、Wetzlar、Germany) で包埋し、 -80°C イソペンタン中にて速やかに凍結させた。垂直方向の皮膚凍結切片 (厚さ $10\ \mu\text{m}$) をクライオスタット (CM3050: Leica Microsystems Inc.) により作製し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM、Fluoview FV1000: オリンパス株式会社) にて観察を行った。

7. 種々化学物質の定量法

LC の濃度は HPLC を用いて測定した。LC の皮膚透過実験のレシーバーサンプル $200\ \mu\text{L}$ に内部標準物質を溶かした溶媒 ($20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 4-ヒドロキシ安息香酸アミル/アセトニトリル) を同容量加え、攪拌・遠心分離 ($18,000\times\text{g}$ 、 $5\ \text{min}$ 、 4°C) した。得られた上清の $20\ \mu\text{L}$ を HPLC に注入して分析を行った。HPLC システム、カラムは第 1 編と同様のものを用いた。移動相には pH 6.5 に調整した $10\ \text{mM}$ リン酸緩衝液/HPLC 用アセトニトリル (1 : 1) を用い、流速は $1.0\ \text{mL}/\text{min}$ 、UV 波長は $230\ \text{nm}$ とした。なお、カラムオーブンは 40°C に設定した。

FD-4 の濃度は、第 1 編と同様の方法を用いて測定した。

第2節 理論

1. 皮膚透過パラメータの解析

皮膚透過実験で得られる化学物質の累積皮膚透過量－時間プロファイルでは、時間に対する単位面積あたりの皮膚透過量をプロットするため、HFP 処理を施した部分の面積が考慮される必要がある。このときの毛嚢プラグギングを施した場合の面積減少を補正した化学物質の皮膚透過量 Q_{hfp} (mol/cm²) は式 (6) のように表すことができる。

$$Q_{hfp} = Q / (1 - H) \quad (6)$$

式中の Q は実測の皮膚透過量であり、 H は有効透過面積に対する HFP 処理を施した部分の面積の割合を示す。今回の *in vitro* 皮膚透過実験で用いるブタ皮膚は、上層が角層と、毛嚢や汗腺等からなる皮膚付属器官、下層が生きた表皮・真皮で構成されている。上層の皮膚付属器官は皮膚全体の面積に占める割合が小さく、下層の生きた表皮・真皮はバリア能が低いことから、HFP 処理した皮膚でも前編と同様に皮膚を 1 層膜と仮定して解析することができると考えた。ドナー濃度が一定に保たれ、レシーバー側で常にシンク条件が成立していると仮定すると、1 層膜の P は、式 (7) のように表すことができる。

$$P = \frac{\text{flux}}{C_v} \quad (7)$$

第3節 結果

1. FD-4 適用後の皮膚切片の観察

まず、毛嚢漏斗部を HFP agent で埋めることにより、毛嚢を介した化学物質の皮膚透過性が妨げられているかどうかを確認することとした。HFP 処理を施した皮膚と未処理の皮膚に、蛍光物質である FD-4 をそれぞれ適用し、毛嚢付近の皮膚切片を共焦点レーザー顕微鏡にてそれぞれ観察した (Fig. 9)。未処理皮膚では、毛孔部から毛嚢峡部にかけて (角層表面から約 400 μm) FD-4 由来の蛍光が見られた。一方、HFP 処理を施した皮膚では、毛嚢中に FD-4 由来の蛍光は見られず、皮膚表面にのみ蛍光が観察された。このように、HFP 処理は化学物質の毛嚢への移行を妨げることが確認された。

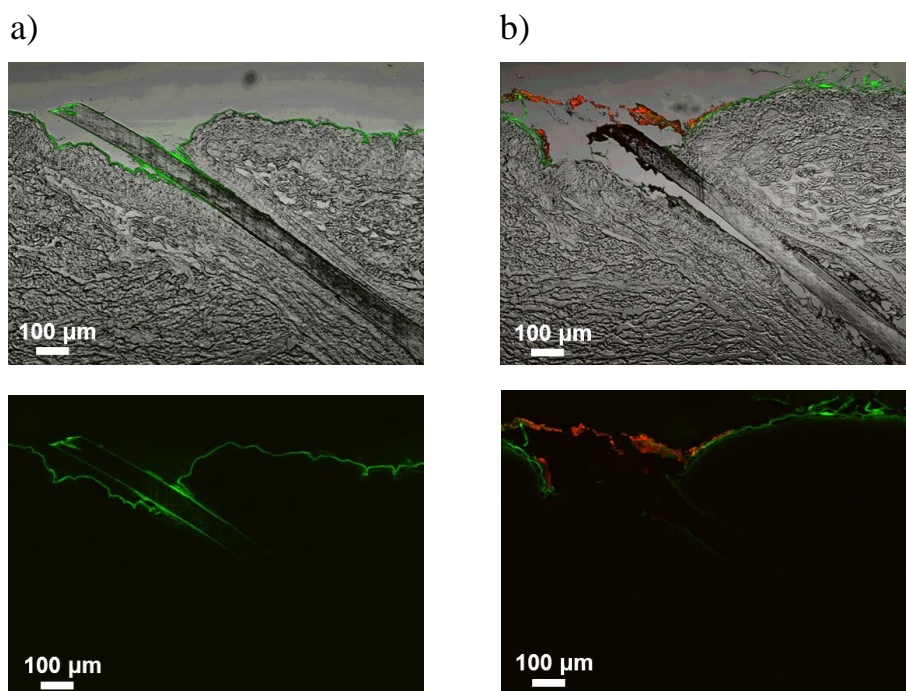


Fig. 9 Two typical CLSM images of pig ear skin after skin permeation test of FD-4 with (a) or without (b) HFP

Green color means distribution of fluorescent for FD-4 and red shows that of Nile red.

2. イオン形及び分子形 LC のブタ耳皮膚透過性に及ぼす HFP 処理の影響

続いて、イオン形及び分子形 LC のブタ耳皮膚 (full-thickness skin) 透過性に及ぼす HFP 処理の影響について調査した。HFP 処理を施した後、pH 5.0 もしくは pH 10.0 に調整した LC 水溶液を皮膚適用し透過実験を行い、 Q_{hfp} を算出した。LC は、pH5.0 ではイオン形として、pH10.0 では分子形として存在する。イオン形及び分子形 LC のブタ耳皮膚 (full-thickness skin) 透過挙動をそれぞれ Figs. 10a, b に示す。イオン形 LC の皮膚透過量は HFP 処理によって大きく減少した。8 時間後の累積透過量で比較すると、HFP を施すことでイオン形 LC の皮膚透過量は約 6 分の 1 まで低下した。一方、分子形 LC の皮膚透過量にはほとんど変化は見られなかった。また、皮膚全面に HFP agent を塗布した場合、イオン形及び分子形 LC は共に皮膚をほとんど透過しなかった。よって、LC は HFP agent で処理した部分の皮膚にほとんど浸透しないことも確認された。

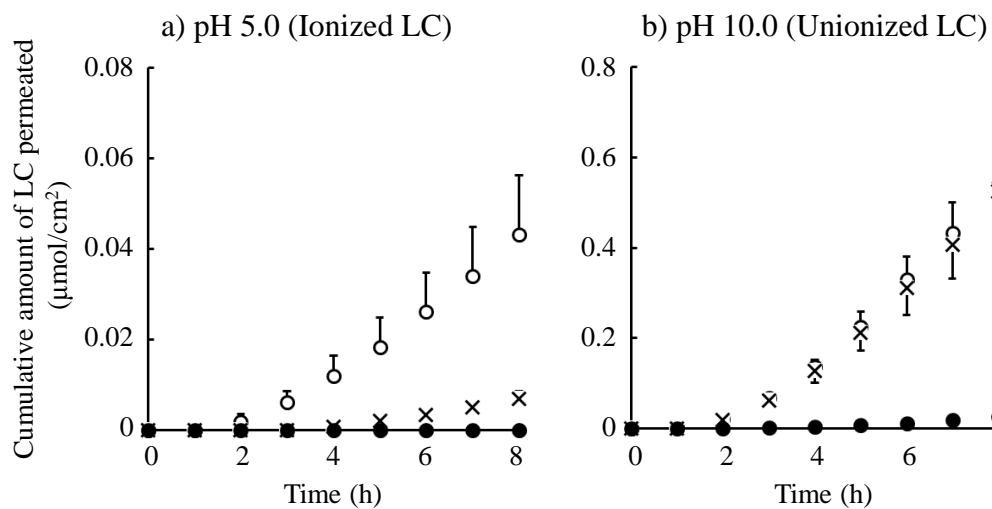


Fig. 10 Time course of changes in the cumulative fraction of LC that permeated through pig ear skin at pH 5.0 (a) and 10.0 (b). The cumulative amount of LC permeated through a unit area of skin was calculated using excluding the HFP agent treated area.

Symbols: non-treatment skin (○), recognizable all hair follicles-plugged skin (×), whole skin penetration area-blocked skin (●)

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3-6$).

3. LC と FD-4 のブタ耳皮膚透過性に及ぼす HFP 数の影響

ここまでに、HFP agent を用いた HFP 処理は化学物質の毛嚢を介した透過を妨げる有効な手段であることが確認された。イオン形 LC の皮膚透過性が HFP によって著しく抑制されたことを受け、イオン形 LC の皮膚透過性と毛嚢漏斗部を埋めた処理数の関係について試験した。ブタ耳透過実験の有効透過面積 (1.77cm^2) 中において、実体顕微鏡観察下で目視にて簡便に認識できる毛の数はおよそ 60 本であることが確認された。そこで、毛嚢漏斗部を埋める処理数を 0、10、20、30、40 に設定し、HFP 処理後に pH 5.0 に調整したイオン形 LC 水溶液の皮膚透過実験を行い、 Q_{hfp} を算出した。HFP を施したブタ耳皮膚を介したイオン形 LC の透過挙動を Fig. 11a に、その透過挙動から算出した皮膚透過係数と HFP 数との関係を Fig. 11b に示す。HFP 数の増加とともに LC の皮膚透過量は減少し、有意な直線性の相関 ($r = -0.95$) がみられた。

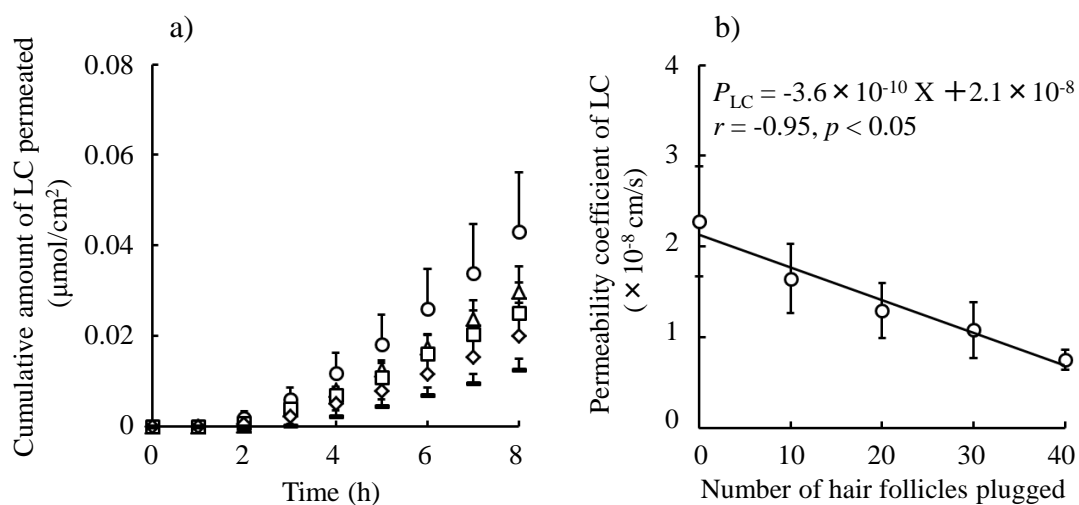


Fig. 11 Time course of the cumulative amount of LC that permeated through pig ear skin at pH 5.0 (a) and effect of number of hair follicles plugged on the skin permeability coefficient of LC (b). The cumulative amount of LC permeated through a unit area of skin was calculated using excluding the HFP agent treated area.

Symbols: number of hair follicles-plugged; 0 (\circ), 10 (Δ), 20 (\square), 30 (\diamond), 40 ($-$)

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3-6$).

次に高分子量化合物である FD-4 の皮膚透過性と HFP 数の関連を調べた。HFP 数を 0、10、20、30、40 に設定し、HFP 処理後に FD-4 水溶液のブタ耳皮膚透過実験を行い、 Q_{hfp} を算出した。HFP を施したブタ耳皮膚における FD-4 の皮膚透過挙動を Fig. 12a に、皮膚透過係数と HFP 数との関係を Fig. 12b に示す。HFP の増加とともに FD-4 の皮膚透過量は減少し、有意な直線性の相関 ($r = -0.93$) がみられた。

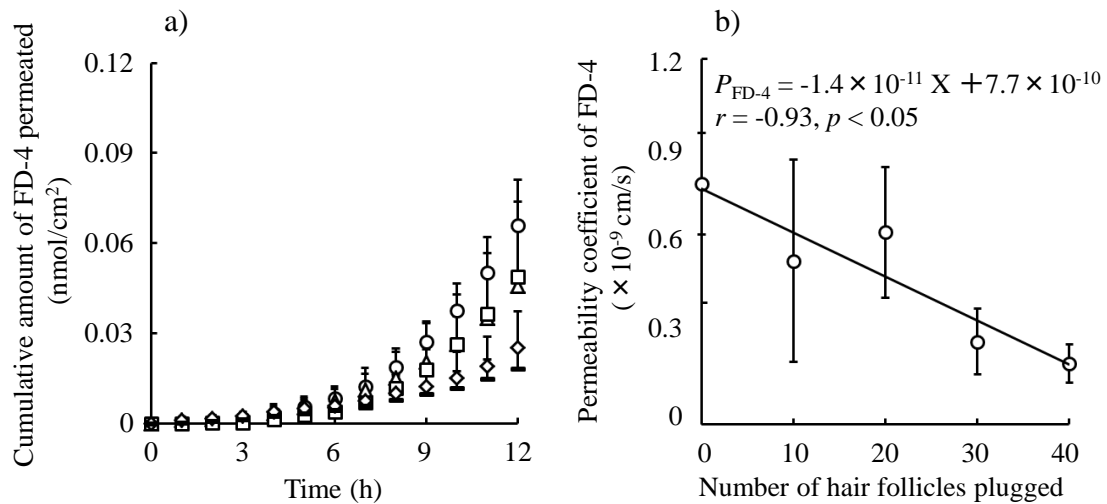


Fig. 12 Time course of the cumulative amount of FD-4 that permeated through pig ear skin (a) and effect of number of hair follicles plugged on the skin permeability coefficient of FD-4 (b). The cumulative amount of FD-4 permeated through a unit area of skin was calculated using excluding the HFP agent treated area.

Symbols: number of hair follicles plugged; 0 (○), 10 (△), 20 (□), 30 (◇), 40 (—)

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3-6$).

続いて HFP 処理によるイオン形 LC 及び FD-4 の皮膚透過性の減少に及ぼす分配性及び拡散性の寄与をそれぞれ調べた。それら化合物の皮膚拡散及び皮膚分配パラメータは、第 1 編と同様の方法を用いて計算した。HFP 未処理時の拡散パラメータ及び分配パラメータのそれぞれをコントロールとし、HFP 数に対するそれぞれのパラメータの比を Fig. 13 に示す。イオン形 LC 及び FD-4 共に、拡散パラメータにおいては HFP 数にかかわらずほとんど差が見られなかった。一方、イオン形 LC 及び FD-4 のそれぞれ分配パラメータは HFP 数と共に徐々に減少し、それぞれ有意な直線性の相関 ($r = -0.95$ 及び $r = -0.91$) がみられた。

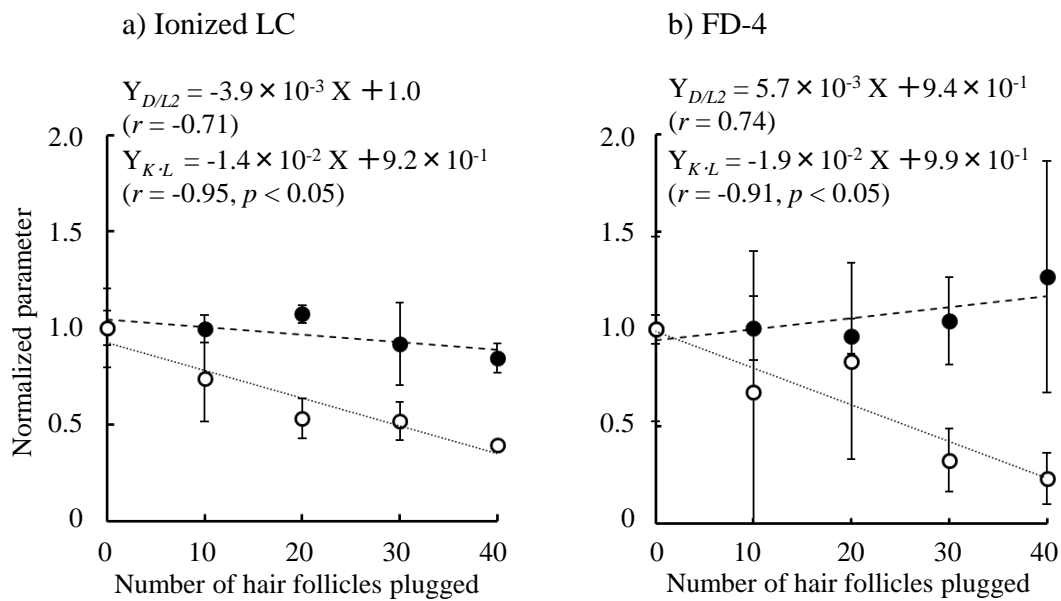


Fig. 13 Effect of number of hair follicles plugged on the normalized diffusion parameter and partition parameter of ionized LC (a) and FD-4 (b). The normalized data were calculated by dividing the value of diffusion and partition parameter with HFP treatments by those for 0-HFP.

Symbols: diffusion parameter (●), partition parameter (○)

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3-6$).

第4節 考察

HFP 処理が毛嚢を介した化学物質の皮膚透過を妨げるかを確認するため、HFP 処理を施した皮膚に蛍光物質である FD-4 を適用した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた皮膚切片画像を観察すると、角層表面でのみ FD-4 の蛍光が観察された。一方、intact skin では毛嚢の奥でも FD-4 由来の蛍光が観察された。したがって、HFP agent で毛嚢漏斗部を埋める処理は、毛嚢を介する化学物質の皮膚透過を妨げる有効な手段であることが視覚的に確認された。

そこで次に、EtOH 前処理を行っていない皮膚における、イオン形 LC 及び分子形 LC の皮膚透過への毛嚢経路の寄与について検討した。LC の pKa は 7.9 であるため⁶⁵⁾、pH 5.0 では 99.9%以上がイオン形 LC として存在し、pH 10.0 では 99%以上が分子形 LC として存在する。そこでイオン形 LC の皮膚透過性は pH 5.0 の LC solution 適用後の結果から、分子形 LC の皮膚透過性は pH 10.0 のその結果から評価した。HFP 処理は、イオン形 LC の皮膚透過性を抑制し、分子形 LC の皮膚透過性にはほとんど影響を与えなかった。また、イオン形及び分子形 LC は共に HFP agent を全面に塗布した皮膚を透過しなかったことから、シリコーングリスとシアノアクリレート系接着剤とナイルレッドによる処理は、LC の皮膚透過を防ぐ有効な材料であることも確認された。また、HFP 処理を用いた本研究から、イオン形 LC は主に毛嚢を経て皮膚透過すると考えられた。さらに、毛嚢漏斗部を埋める処理数の増加によってイオン形 LC の皮膚透過量は減少し、HFP 数と皮膚透過係数には良好な相関性が得られた。その皮膚透過係数の減少はイオン形 LC の皮膚への分配性の低下により説明された。すなわち、HFP 処理はイオン形 LC の透過経路を塞ぐことにより、イオン形 LC の分配できる部分が減ったことを示している。視覚的に観察可能な毛嚢漏斗部を全てプラグングした

場合においても、イオン形 LC の皮膚透過はわずかに観察された (Fig. 10a)。これは、イオン形 LC がプラグニングしていない角層実質、汗腺、未処理の毛嚢 (実顕微鏡下では視覚的に確認できなかった毛嚢) を経て透過したためであると考えられる。一方、pH 10.0 の場合は HFP 処理の有無に関わらず、LC の皮膚透過性は同じであり、このことから分子形 LC は主に角層実質を経て透過すると考えられた。また、皮膚透過係数は分配係数や拡散係数に大きく依存するので、角層と毛嚢における LC の皮膚透過係数の差は、それぞれの透過経路に対する LC の分配性や拡散性が大きく異なることを示すと考えられた。

続いて、FD-4 の皮膚透過性に及ぼす HFP 処理の影響について考察する。FD-4 のヘアレスラット皮膚透過性はこれまでも報告されており⁴⁶⁾、FD-4 は水溶性かつ高分子量であることから、前編で示したように EtOH で処理した場合には角層実質経路透過することが可能であるが、未処理の場合には毛嚢のような皮膚付属器官経路を主に透過すると考えられている。FD-4 においてもイオン形 LC の場合と同様に、HFP 処理によって皮膚透過量は減少し、皮膚透過係数と HFP 数には良好な相関性がみられた。これはイオン形 LC と同様、FD-4 が分配可能な部分、具体的には毛嚢の面積を減少させたことによると考えられた。よって、FD-4 の皮膚透過性に及ぼす毛嚢の寄与は高いことが示された。このように、水溶性の高分子量化合物が皮膚透過するには、毛嚢が重要な経路であることが推定される。FD-4 透過プロファイルから算出する皮膚透過係数、拡散パラメータ、分配パラメータのばらつきが LC のそれよりも大きいのは、FD-4 の皮膚透過量が少ないことや、さらには 12 時間では FD-4 の透過が定常状態に達していない可能性があげられる。

第5節 小括

本編第1章では、化学物質の皮膚透過性に及ぼす毛嚢の寄与を明らかにすることを目的に研究を実施した。シリコングリスとシアノアクリレート系接着剤とナイルレッドの混合物である HFP agent にて毛嚢漏斗部を埋める HFP 処理により、毛嚢を介した化学物質の皮膚透過性を妨げる方法を開発した。その結果、HFP 処理の有無間で化学物質の皮膚透過性を比較することにより、種々化学物質の皮膚透過性に及ぼす毛嚢の影響を間接的に評価できるようになった。さらに、水溶性化合物、イオン形化合物、高分子量化合物の皮膚透過において毛嚢が重要な役割を果たすことが示された。

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⁶⁷⁾

第1編では化学物質の皮膚透過性に及ぼす EtOH 処理の影響を、本編第1章では化学物質の皮膚透過経路ごとの透過性評価について述べた。これらの方法の併用は、化学物質の皮膚透過性に及ぼす EtOH の影響を皮膚透過経路ごとに評価することを可能にする。特に、毛嚢経路に焦点を当て、経皮吸収促進剤としての役割を期待して使用される EtOH の皮膚適用との関連についての報告はこれまでにみられない。薬物の皮膚透過経路ごとの透過性に及ぼす EtOH の影響が明らかとなれば、作用部位や薬物の物理化学的性質に応じた外用剤の開発において有用な情報を提供できる。

そこで本編第2章では、化学物質の皮膚透過性に及ぼす EtOH 前処理の影響を、角層実質及び毛嚢のそれぞれの透過経路ごとに個別に評価することを検討した。水溶性のモデル化合物として ISMN、イオン形 LC、フルオレセインナトリウム (FL)、FD-4 を選択し、EtOH の皮膚前処理と HFP 処理を施した後に *in vitro* 皮膚透過実験を行い、角層実質経路及び毛嚢経路の化学物質皮膚透過性をそれぞれ評価した。さらに、皮膚前処理に用いた EtOH 水溶液を回収して薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析することにより、既に EtOH の吸収促進機構の1つとして考えられている脱脂 (脂質抽出) の効果がどの程度であるのかを考察した。

第 1 節 実験方法

1. 実験材料

FL は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入したものをを用いた。EtOH、ISMN、FD-4 は第 1 編と同様のものをを用いた。LC、ナイルレッドは本編第 1 章と同様のものをを用いた。その他の試薬及び溶媒は市販の特級もしくは HPLC 用のものを精製せずに用いた。Table 4 にモデル化合物の物理化学的パラメータを示す。

Table 4 Physicochemical properties of model compounds

Model compounds	<i>M.W.</i>	$\log K_{o/w}$ ^{a)}	pK_a ^{d)}
Isosorbide-5-mononitrate (ISMN)	191	-0.151 ^{b,43)}	— ^{e)}
Lidocaine hydrochloride (LC)	271	-0.93 ^{c,43)}	7.9 ⁶⁵⁾
Fluorescein sodium (FL)	376	-0.62 ^{b,46)}	2.3、4.3、6.5 ⁶⁸⁾
FITC-Dextran 4 kDa (FD-4)	3300–4400	-0.773 ^{b,46)}	6.4 ⁶⁶⁾

a) Logarithm of octanol/water partition coefficient at 37°C, b) determined with pH 7.4 PBS, c) determined with pH 5.0 phosphate buffer, d) acid dissociation constant, e) electrically neutral compound

2. 実験動物

本編第 1 章と同様の動物を用いた。

3. 皮膚の抽出法

本編第 1 章と同様の方法を用いた。

4. HFP 法

本編第 1 章と同様の方法を用いて HFP 処理を施した。本章では HFP 数を 30 に設定した。1 つ毛嚢に対して HFP を施した場合の皮膚表面の処理面積は約 0.006 cm^2 となるので、30 の毛嚢を HFP 処理した場合は、有効透過面積 (1.77 cm^2) 中の約 1 割の面積を占める。

5. *In vitro* 皮膚透過実験法

ブタ耳皮膚 (non-treatment skin または hair follicles-plugged skin) を有効透過面積 1.77 cm^2 の縦型拡散セル (Fig. 1) に装着し、レーザー側 (真皮側) に PBS を 6.0 mL 適用した。その後、0%、20%、100% (v/v) に調製した EtOH 水溶液をドナー側 (表皮側) に 1.0 mL 適用し、12 時間の前処理を行った。前処理後、ドナー側の EtOH 水溶液を取り除き、角層側をキムワイプで軽く拭き取った。さらに、縦型拡散セルに装着された皮膚を取り外し、真皮側が乾燥しないように PBS で湿らせたキムワイプ上に置き、実体顕微鏡下にて 30 の HFP 処理を施した。HFP 処理後の皮膚は、再度、縦型拡散セルに装着し、レーザー側の PBS は入れ替えた。その後、PBS に溶解した 700 mM ISMN、1 mM FL、5 mM FD-4、そして 1/30 mM リン酸緩衝液にて pH 5.0 に調整した 100 mM LC をドナー側に 1 mL 適用した。縦型拡散セル内は $32 \text{ }^\circ\text{C}$ に保ち、スターラーで攪拌した。透過実験は 8 時間 (ISMN、LC) あるいは 12 時間 (FL、FD-4) 実施した。経時的に真皮側セルから 500 μL のレーザー溶液をサンプリングした後、一定量を保つために新しい PBS を同量戻した。

6. 種々化学物質の定量法

ISMN、FD-4 の濃度は、第 1 編と同様の方法を用いて測定した。

LC の濃度は、本編第 1 章と同様の方法を用いて測定した。

FL の濃度は、サンプルを遠心分離 (18,000×g、5 min、4 °C) した後、得られた上清は蛍光分光光度計 (RF 5300PC; 株式会社島津製作所) を用いて測定した。

測定条件は、励起波長が 485 nm、蛍光波長が 530 nm であった。

7. TLC による脂質の分析法

前処理によって抽出された脂質を TLC にて定性的に分析した。*In vitro* 皮膚透過実験時と同様に、ブタ耳皮膚を縦型拡散セルに装着し、レシーバー側に PBS を 6.0 mL 適用した。その後、0%、20%、100% (v/v) に調製した EtOH 水溶液、クロロホルム/メタノール (2 : 1、v/v) 溶液を角層側に 1 mL 適用し、12 時間の前処理を施した。12 時間後、各前処理溶液をマイクロチューブに回収し、窒素乾固した。その後、クロロホルム/メタノール (2 : 1、v/v) 溶液を 1 mL 加え、よく攪拌し、TLC 用試料とした。なお、標準溶液は、0.05% トリオレイン、0.05% コレステロール、0.05% パルミチン酸、0.05% セラミド III をクロロホルム/メタノール (2 : 1、v/v) 溶液に溶解して調製した。これらの試料を長さ 20 cm の薄層板 (HPTLC Silica gel 60 F254 ; Merck, Darmstadt, Germany) に 50 µL スポットし、展開溶媒にクロロホルム/メタノール/酢酸 (190 : 9 : 1) を用いて、展開溶媒の先端が原線から 10 cm まで達するまで展開した。なお、TLC の操作法は第十六改正日本薬局方解説書の一般試験法の項に則り実施した⁶⁹⁾。取り出した薄層板を風乾し、8% リン酸水溶液に溶解して調製した 10% 硫酸銅試薬に 10 秒浸し、180°C で 10 分加熱してスポットを検出し同定した。

第2節 結果

1. 水溶性化合物の毛嚢透過経路に及ぼす EtOH 処理の影響

まず、水溶性化合物である ISMN、イオン形 LC、FL、FD-4 のブタ耳の毛嚢透過経路に及ぼす EtOH 前処理の影響について調査した。0%、20%、100%EtOH で皮膚を前処理し、次に HFP 法を用いて、化学物質の皮膚透過経路のひとつである毛嚢経路を塞いだ。HFP 処理は、有効透過面積 (1.77 cm^2) 中に存在する約 60 の毛嚢の内の 30 に対して行った。その後、HFP 処理後にモデル化合物の皮膚透過実験を行った。

Fig. 14 に各モデル化合物の皮膚透過挙動を示す。ISMN の皮膚透過量は HFP 処理によってほとんど変化しなかった。イオン形 LC の皮膚透過量は 0%EtOH の前処理時に HFP 処理によって減少したものの、20%、100%EtOH の前処理時における減少量は少なかった。一方、FL や FD-4 の皮膚透過量は、どの EtOH 濃度においても HFP 処理により減少した。さらに、これらの結果から各化学物質の透過量の HFP 処理による減少率を評価した。Fig. 15 にそれぞれの EtOH 濃度における HFP 処理の有無間での累積皮膚透過量と、HFP 処理による累積皮膚透過量の減少率を示す。ISMN は EtOH 濃度に関わらず、HFP 処理による累積皮膚透過量の減少率は低かった。イオン形 LC は 0%EtOH の処理時において、その減少率は高かった。FL や FD-4 では、全ての条件下において高い減少率が観察されたが、100%EtOH の処理時の減少率は、0%、20%EtOH の処理時に比べ低かった。

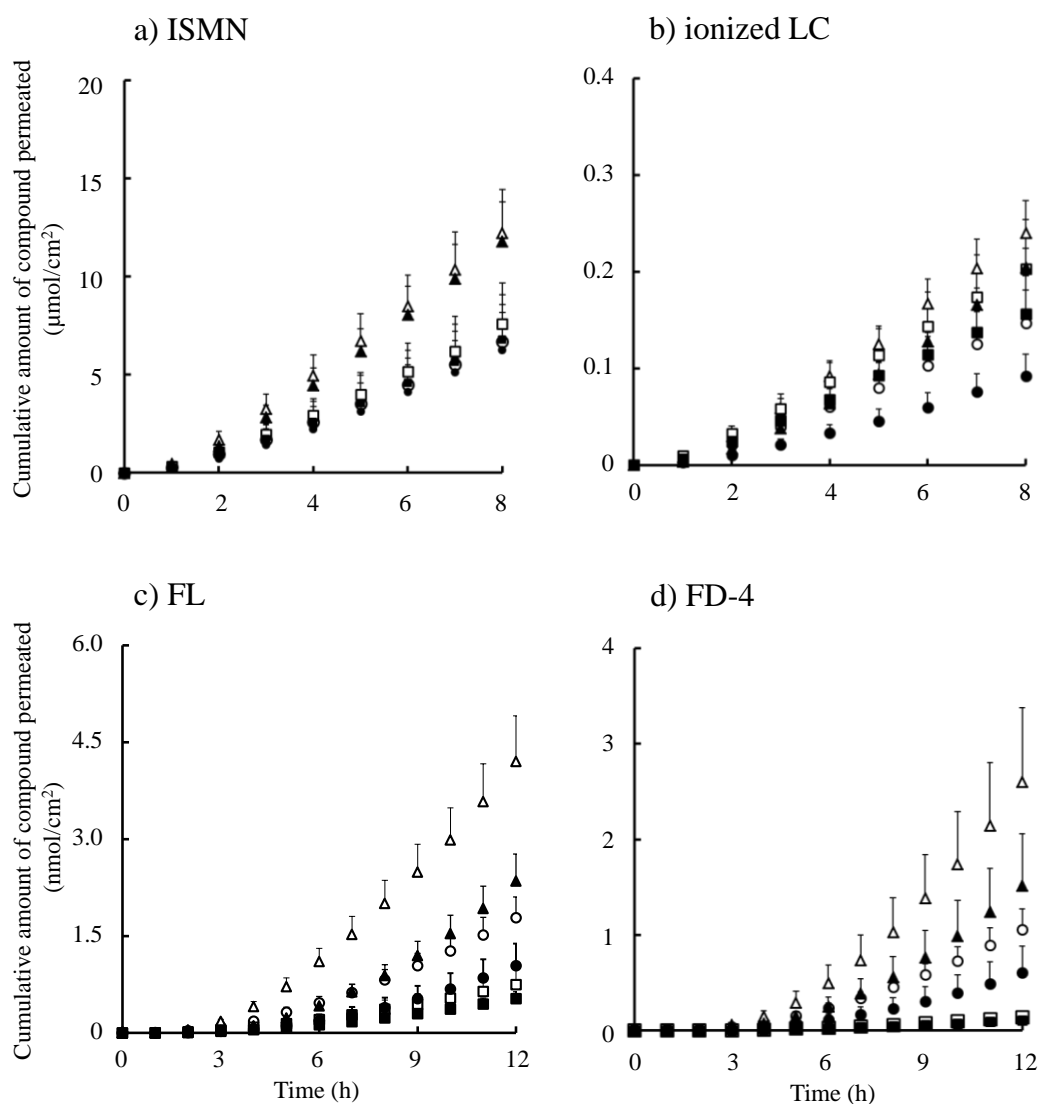


Fig. 14 Time course of changes in the cumulative fraction of ISMN (a), ionized LC (b), FL (c) or FD-4 (d) that permeated through different concentrations of EtOH treated-pig ear skin with or without 30-HFP. The cumulative amount of chemical compounds permeated through a unit area of skin was calculated using excluding the HFP agent treated area.

Symbols: water treated-skin without HFP (○), 20% EtOH treated-skin without HFP (Δ), 100% EtOH treated-skin without HFP (□), water treated-skin with 30-HFP (●), 20% EtOH treated-skin with 30-HFP (▲), 100% EtOH treated-skin with 30-HFP (■)

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=5$).

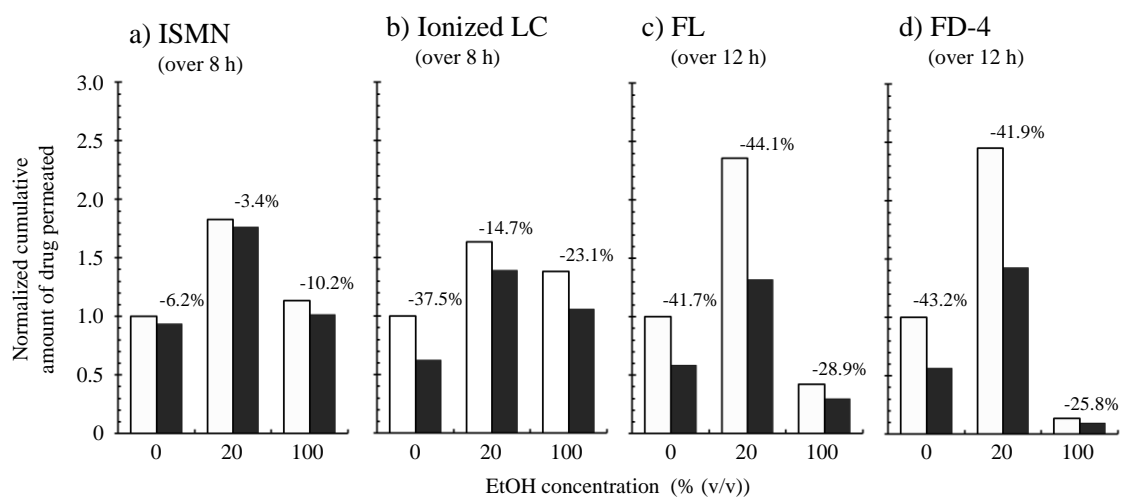


Fig. 15 Difference of normalized cumulative amount of compounds that permeated through each concentration of EtOH pretreated-skin with or without 30-HFP. The cumulative amount of chemical compounds permeated through a unit area of skin was calculated using excluding the HFP agent treated area. The normalized data were calculated by dividing the value of cumulative amount of drug permeated with EtOH and HFP treatments by those for 0% EtOH without HFP.

Symbols: without HFP (□), with 30-HFP (■)

2. 種々濃度 EtOH の処理によって抽出される脂質の分析

次に EtOH による脂質抽出作用の影響を調べるため、皮膚の前処理に用いた各種溶液を回収し、各種溶液中の脂質成分の種類及び抽出量を TLC 法にて定性的に分析した。ポジティブコントロールには皮膚の脂質抽出作用が強いクロロホルム/メタノール (2:1) を使用し、Fig. 16 に示した結果の通り、0%、20%EtOH の処理では脂質類のスポットは検出されなかった。100%EtOH の処理ではトリグリセリド類、コレステロール類、セラミド類の薄いスポットが確認されたものの、クロロホルム/メタノールに比較するとそれら脂質の抽出量は非常に少なかった。なお、EtOH 濃度にかかわらず、脂肪酸類のスポットは確認されなかった。

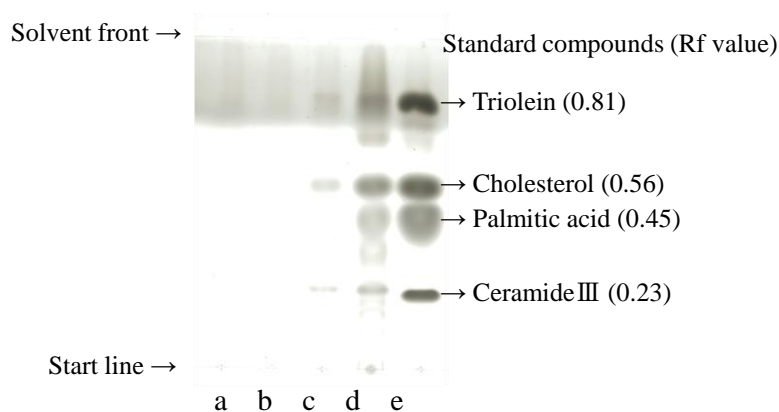


Fig. 16 Thin-layer chromatogram of skin lipid extracted with pretreated water (a), 20% EtOH (b), 100% EtOH (c), chloroform/methanol (d) and standard solution (e)

第3節 考察

本章の実験における EtOH 濃度は、本編第 1 章の実験結果より、最も皮膚透過性が変化すると予測される EtOH 濃度、すなわち、最も皮膚透過性が上昇すると予測される 20%と、最も皮膚透過性が減少すると予測される 100%に設定した。また、コントロールとして 0%EtOH (水処理) についても実施した。皮膚の EtOH 前処理後、本編第 1 章にて開発した HFP 処理を施し、水溶性化合物の皮膚透過実験を行った。なお、HFP 数は 30 に設定した。用いたブタ皮膚の有効透過面積 (1.77 cm^2) 中には約 60 本の毛が観察され、約半数である 30 の毛嚢漏斗部を埋めることで、毛嚢を介する薬物の皮膚透過量が 50%程度になると考えられ、その 50%の減少率と実際観察される減少率を比較することで毛嚢経路の透過性を推定することが可能であると考えたためである。HFP 数と皮膚透過係数には良好な相関が得られていることは既に前章にて示している。また、実体顕微鏡下では視覚的に認識しづらい毛嚢も存在しており、全ての毛嚢漏斗部を埋めることは困難であったことも HFP 数の設定理由に挙げられる。加えて、本編第 1 章で説明したように、ブタには機能的なエクリン汗腺はほとんど存在せず、角層表面に直接出ている汗腺自体も少ない。そのため、主な皮膚透過経路は角層実質と毛嚢の 2 つの経路に絞られる。

水溶性のモデル化合物として、ISMN、イオン形 LC、FL そして FD-4 を選択した。HFP 未処理の場合の EtOH 処理の影響をみると、20%EtOH によってそれら化合物の皮膚透過性は上昇し、100%EtOH によってそれらの皮膚透過性は減少した。これは本編第 1 章で示した結果と同様の傾向であった。これら化合物の中では $\text{Log}K_{ow}$ が高い ISMN や分子量が小さい LC は、分子量が大きい FL や FD-4 よりも皮膚透過性の変化が少ない傾向にあった。

毛嚢を主に透過する化学物質の場合、30のHFP処理によって、透過量は半減することになる。ISMNでは、前処理EtOH濃度に関わらず、HFPの透過に及ぼす影響は小さかった。すなわち、ISMNは主に角層実質を透過する化学物質であり、EtOH処理によって角層実質の状態が変化するために透過性も変化すると考えられた。一方、イオン形LCでは、水処理時における30のHFP処理によって、透過量が大きく減少した。これはイオン形LCの皮膚透過には毛嚢経路が重要であることを示す。しかしながら、20%及び100%EtOHで処理した場合、HFPによるイオン形LCの透過量の減少率は0%EtOH処理時よりも小さくなった。これはEtOHで処理することにより、イオン形LCの皮膚透過に及ぼす毛嚢経路の寄与が低くなり、角層実質経路の寄与が高まったためであると推定された。すなわち、EtOH処理はイオン形LCの角層実質の透過性を変化させると考えられた。FLとFD-4では、どの濃度においてもHFP処理によって透過量は大きく減少した。これは、EtOH処理はFLやFD-4の毛嚢透過性を変化させることを示す。Todoらは、FLやFD-4の3次元培養皮膚の透過性は、ヘアレスラット皮膚のそれに比べて非常に低いことを報告している⁴⁶⁾。その理由として、培養皮膚には皮膚付属器官が存在しないことを挙げている。このように、FLやFD-4の皮膚透過は、主に皮膚付属器官を介したものであると考えられ、本章の実験結果はそれをよく説明した。Alvarez-Románらは、皮膚に適用されたナノ粒子が毛嚢に高濃度で局在することを報告し⁷⁰⁾、適用された粒子の径が小さいほど毛嚢の奥まで到達することが確認されている^{71,72)}。また、皮膚マッサージを併用することで、粒子が毛嚢のより深部に到達することが確認されている⁷³⁾。このように、毛嚢は水溶性の高分子量化合物や粒子の透過あるいは貯留のために重要であることがわかる。しかし、これらの考察は、毛嚢を単なる孔として考察することで説明可能なものであるが、FLやFD-4の透過がEtOHの処理によって多様に変

化する事実は、毛嚢経路をより複雑なものとして捉える必要性を示唆している。100%EtOHの前処理により、毛嚢経路の透過性が著しく減少したために、FLやFD-4が角層実質を透過する割合が高まったのかもしれない。

種々濃度 EtOH の前処理は角層実質及び毛嚢に影響を及ぼし、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。これらの変化の要因には、EtOH が皮膚表面や毛嚢中の皮脂、角層中の細胞間脂質を抽出することによって引き起こされている可能性も考えられる。そこで、EtOH の脂質抽出性を TLC 法にて確認した。その結果、20%EtOH の前処理は皮膚の脂質をほとんど抽出しないにも関わらず、皮膚透過性を上昇させることが明らかとなった。100%EtOH の前処理においてはわずかに脂質の抽出が確認されたものの、クロロホルム/メタノールの結果と比較すると、その抽出量は非常に少なく、ほとんどの脂質が皮膚中に残存したままであると考えられた。Hatta らも EtOH の皮膚脂質抽出作用は非常に弱いことを報告している⁵²⁾。これらの結果は、EtOH が角層実質部や毛嚢部の水性経路の構造自体に何らかの影響を及ぼし、水溶性化合物の皮膚透過性を変化させることを示唆している。

第4節 小括

本章では、水溶性化合物の皮膚透過性に及ぼす EtOH 前処理の影響を、角層実質または毛嚢の皮膚透過経路ごとに評価することを目的に実験を行った。ISMN のように HFP 処理の影響をほとんど受けない水溶性化合物がある一方で、FL や FD-4 のように HFP 処理の影響を大きく受ける水溶性化合物も存在した。また、イオン形 LC のように、前処理 EtOH 濃度によって HFP 処理の影響が変化する場合もあった。

結論として本章では、水溶性化合物の透過経路は複数存在し、どの透過経路を介して皮膚透過するかは、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。また、経皮吸収促進剤としても使用される EtOH は、水溶性化合物の透過に重要な役割を果たす毛嚢経路にも影響することを示した。さらに、水溶性化合物の皮膚透過性を上昇させる他の促進剤についても、毛嚢の水性経路に影響するかもしれない。各種経皮吸収促進剤の効果が薬物の皮膚透過経路や薬物の物理化学的性質によって異なることを応用し、症状や作用部位に応じた外用剤の局所薬物送達が可能になるかもしれない。

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³²⁾

ここまでに、EtOHの前処理は脂溶性化合物よりも水溶性化合物の皮膚透過性に大きく影響を与えることを明らかにしてきた。その要因には水溶性化合物の皮膚分配性、すなわち水溶性透過経路への移行性との関連が示唆されている。水溶性化合物の皮膚透過経路には、細胞間脂質や皮膚付属器官を介する経路が知られている^{46,47,74)}。細胞間脂質を構成する主な成分はセラミド類、脂肪酸類、コレステロール類であり^{75,76)}、これらは全て脂溶性である。この細胞間脂質は角層細胞を包み込むように連続相として存在する。そのため、角層組織は全体として脂溶性の性質を持っている。しかしながら、細胞間脂質のラメラ構造中には、水で満たされた領域も存在し、さらにはある程度の水を抱え込むこともできるといわれている^{77,78)}。加えて、角層細胞自身も水によって膨らむことが知られている⁷⁹⁾。毛孔表面のような皮膚付属器官の上部はバリア性の高い角層で覆われているが、下部に入るにつれてバリア機能の低いルーズな角層となる。水溶性化合物はそれらの領域を介して透過すると考えられる。このように、角層組織は水溶性化合物を取り込みうる性質も持ち合わせている。

これらの領域の透過性を明らかにするための手法に、皮膚電気抵抗値の測定があげられる⁸⁰⁾。これは、電気と共に流れるイオンの透過性に対するインピーダンスを測定するものである。本編では、皮膚電気抵抗値の測定結果と化学物質の皮膚透過性を照らし合わせ、水溶性化合物の透過経路に対するEtOH前処理の影響について考察した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

第1編と同様の材料を用いた。

2. 実験動物

第1編と同様の動物を用いた。

3. 皮膚の摘出法

第1編と同様の方法を用いた。

4. *In vitro* 皮膚透過実験法

第1編と同様の方法を用いた。

5. 皮膚電気抵抗値の測定法

皮膚透過実験終了時に、表皮側及び真皮側セルに銀-塩化銀電極を入れ、皮膚インピーダンスをインピーダンスメーター（AS-TZ-1；株式会社アサヒテクノラボ、横浜、日本）を用いて測定した。なお、周波数は10 Hzとした。

第2節 理論

1. 皮膚電気伝導性の算出

皮膚インピーダンスは、皮膚における電気の流れやすさを示す指標のひとつである。インピーダンスはある周波数における交流電流の流れを妨げる量として定義される。本実験では、周波数を 10 Hz に固定しており、静電容量の影響は小さい。すなわち、みかけ上は直流抵抗と同様で、皮膚電気抵抗 R (Ω) は式 (8) のように表すことができる。

$$R = \rho \frac{L}{A} \quad (8)$$

ここで、 ρ は電気抵抗率 ($\Omega \cdot \text{cm}$)、 L は皮膚の厚み (cm)、 A は皮膚の断面積 (cm^2) である。*In vitro* 皮膚透過実験における皮膚インピーダンスの測定において、皮膚の有効透過面積と共に R は変動するので、皮膚電気抵抗は R に A を乗じて標準化して示すこととした。つまり、 $R \cdot A$ ($\Omega \cdot \text{cm}^2$) は皮膚を介する低分子イオンの流れに対する抵抗とみなすことができる。実験では、低分子イオンの流れやすさとして評価したいため、式 (9) のように逆数をとって表した。

$$\frac{1}{R \cdot A} = \frac{1}{\rho \cdot L} \quad (9)$$

なお、この逆数値は標準化したコンダクタンス ($1/\Omega/\text{cm}^2$) となり、本論文では皮膚電気伝導性と表記する。

第3節 結果

1. EtOH 処理後の皮膚電気伝導性

前処理 EtOH 濃度と各モデル化合物 (D_2O 、ISMN、ISDN、CA、FD-4) の透過実験後の皮膚電気伝導性の関係について試験した。透過実験は 8 時間 (ISDN)、12 時間 (D_2O 、ISMN)、30 時間 (CA、FD-4) 実施した。なお、これらの透過時間で各モデル化合物の皮膚透過は定常状態になっている。皮膚電気伝導性は、YMP を用いた皮膚透過実験後の皮膚インピーダンスより算出した。Fig. 17 に皮膚電気伝導性と EtOH 前処理濃度に対する関係を示す。脂溶性化合物の ISDN、水の D_2O 、水溶性化合物の ISMN、CA、FD-4 のいずれの化学物質の透過実験時においても、皮膚電気伝導性は 20%、40% の EtOH 前処理で高くなり、60% 以上では EtOH 濃度が高くなるにつれ、皮膚電気伝導性は低くなった。

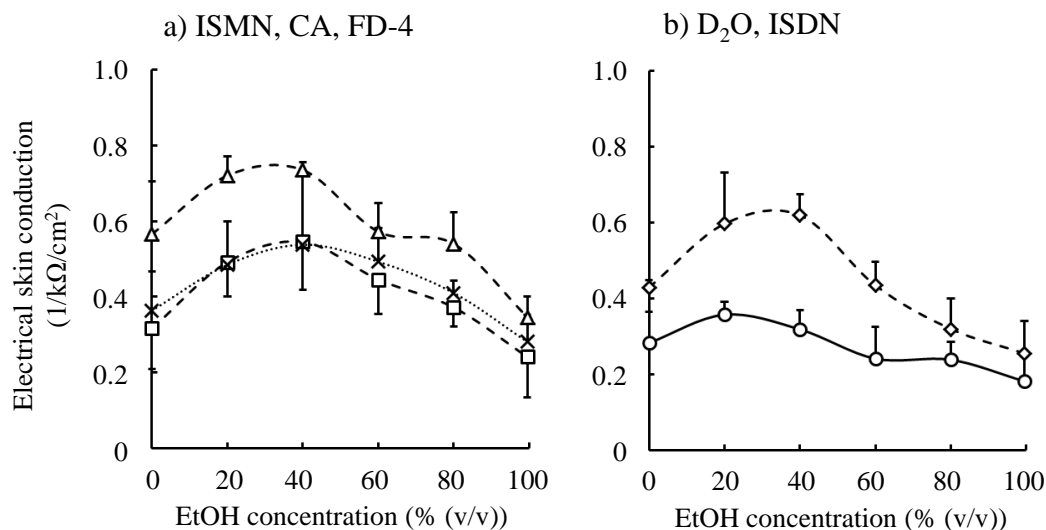


Fig. 17 Effect of EtOH pretreatment on the electrical skin conduction

Symbols: D_2O (○), ISMN (□), ISDN (◇), CA (Δ), FD-4 (×)

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3-7$).

2. 皮膚透過係数と皮膚電気伝導性の関係

続いて水溶性化合物である ISMN、CA、FD-4 の透過実験後の皮膚電気伝導性と各モデル化合物の皮膚透過係数との関係を Fig. 18 に示す。それぞれ 0% EtOH、つまり、水処理時の値を基準として、それぞれの化合物で EtOH 濃度を変化させたときのそれぞれの変化を比で表した。なお、皮膚透過係数は第 1 編で得られた結果を用いた。ISMN については、皮膚電気伝導性と皮膚透過係数の変化の傾向は同様であった。CA と FD-4 では皮膚透過性の変化の方が大きかった。特に 100% EtOH 処理後の皮膚電気伝導性は、水処理時よりもわずかに低いレベルであったにも関わらず、CA と FD-4 の皮膚透過係数は著しく低かった。

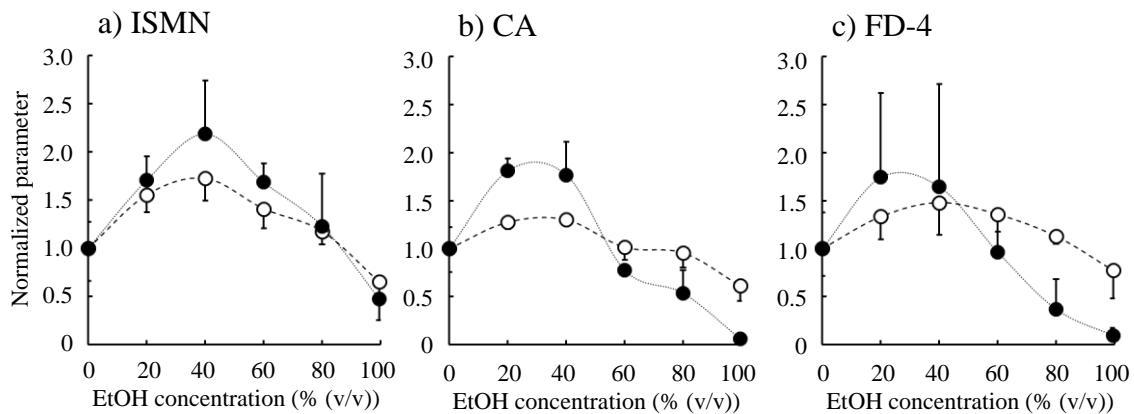


Fig. 18 Effect of EtOH pretreatment on the normalized electrical skin conduction (○) and permeability coefficient of hydrophilic compounds (●). The normalized data were calculated by dividing the value of electrical skin conduction and permeability coefficient with EtOH treatments by those for 0% EtOH.

Each point represents the mean \pm S.D. ($n=3-7$).

第4節 考察

水溶性化合物の皮膚透過経路は、水で満たされているまたは水が容易に浸入できる、もしくはその両方であると考えられる。本研究における *in vitro* 皮膚透過実験では、ドナーとレシーバーの溶媒として PBS を用いており、 Na^+ や Cl^- といった低分子イオンが水中に溶けている。皮膚インピーダンスメーターで皮膚膜間の電流の抵抗を測り逆数で表すことは、 Na^+ や Cl^- の皮膚間の移動のし易さ、すなわち、角層実質や毛嚢中の水溶性の皮膚透過経路の状態を示すことになる。つまりは、EtOH 前処理による皮膚電気伝導性の変化は皮膚を介する低分子イオンの流束が変化するというを示している。なお、皮膚電気抵抗値から推測できる Na^+ や Cl^- イオンの皮膚透過性は、透過物質の影響を受ける可能性を考慮し、皮膚電気抵抗値は各モデル化合物の皮膚透過実験後に測定することとした。

皮膚電気伝導性は、どの化合物の透過実験後においても、前処理 EtOH 濃度の上昇に伴い増加し、20%、40%EtOH の前処理で最も高かった。また、前処理 EtOH 濃度が 40%を超えると、EtOH 濃度の上昇に伴い皮膚電気伝導性は低下した。その変化は、 D_2O では 0.3–0.4 ($1/\text{k}\Omega/\text{cm}^2$)、CA では 0.3–0.7 ($1/\text{k}\Omega/\text{cm}^2$)、ISMN、ISDN 及び FD-4 では 0.2–0.6 ($1/\text{k}\Omega/\text{cm}^2$) となった。溶液中に含まれるイオンの濃度が、 D_2O 適用時には PBS を希釈していることから 1/2 であり、CA 適用時には化合物由来の Na^+ も含まれて高くなっているため、皮膚電気抵抗値の逆数の絶対値（電気伝導性）とその変化の幅が ISMN、ISDN、FD-4 のそれとは異なっていたが、EtOH 濃度との関連は、モデル化合物によらず同じ傾向であった。また、皮膚電気伝導性は前処理 EtOH 濃度にかかわらず、全ての条件下で一定値以上であることが確認され、いずれの EtOH 濃度での処理後においても、 Na^+ や Cl^- の皮膚透過性は担保されていることがわかる。ヒト皮膚においても EtOH の皮膚電気抵抗へ

の影響が既に報告されており、皮膚電気抵抗は 25–75%EtOH の処理で低く、0% や 100%EtOH の処理ではそれよりも高いことがわかっている⁷⁹⁾。本結果は、その報告と一致している。

そこで、水溶性化合物の皮膚透過性との関連について考察を試みた。ISMN では皮膚電気伝導性と皮膚透過係数の変化の傾向はほぼ同じであった一方、CA と FD-4 の場合の変化は中間濃度で極大を持つ特徴は一致したが、特に高濃度 EtOH の処理において皮膚電気伝導性と皮膚透過係数の挙動には大きな違いがみられた。100%EtOH 処理時において、CA や FD-4 の皮膚透過性は大きく低下するが、Na⁺や Cl⁻の一定の皮膚透過性は担保されている。これは、第 1 編でも述べたサイズの異なる複数の透過経路の存在を考慮することで説明できるかもしれない。すなわち、高濃度 EtOH の処理によって水溶性化合物の透過経路のうち、サイズが大きいものが減る一方、サイズが小さなものが増えるという変化が生じている可能性が考えられる。100%EtOH 処理による皮膚透過性の減少は CA よりも分子量の大きい FD-4 の方で影響がより大きく、Na⁺や Cl⁻が ISMN と同程度のサイズ特性を有するのに対して、より大きいサイズの CA やさらに大きい FD-4 では、100%EtOH 処理によって変化した角層構造に関係した透過経路のサイズの変化の影響を強く受けたと考えられる。ブタ皮膚においては、角層実質と毛嚢中に化学物質の水性経路が存在し、ISMN は主に角層実質を、FD-4 は主に毛嚢を透過することを第 2 編にてすでに明らかにしている。これらの実験結果を総合すると、皮膚中の水性経路は複数種類存在し、それぞれの透過経路に及ぼす EtOH 水溶液の影響が、その濃度によって異なるとともに、水溶性化合物の種類によってそれぞれの透過経路の寄与率が異なるため、皮膚透過性との挙動の関連性がかわってくると考えられる。Kim らは *N*-lauroyl sarcosine とペプチドの一種である magainin の適用は細胞間脂質の領域に細孔経路を形成し、FL の皮膚透過性

を上げるものの、分子量の大きな CA や FD-4 の皮膚透過性は大きく変化しないことを報告している^{81,82)}。これは、水溶性薬物の皮膚透過性はイオンの皮膚透過性と必ずしも一致せず、透過物の大きさを考慮する必要を示唆するものである。

今回の実験において、皮膚電気伝導性や ISMN の皮膚透過性に及ぼす EtOH 濃度の影響は同じ傾向を示した。Na⁺や Cl⁻は、ISMN と同様に主に角層実質を透過すると考えられる。よって、皮膚インピーダンスの測定は、角層実質を主に透過する比較的分子量の小さい水溶性化合物の皮膚透過性を予測するための手段に成り得ると考えられた。本研究では EtOH を前処理に用いているが、他の化学的促進剤の存在下でも同様な化学物質の皮膚透過は皮膚電気抵抗の間に相関が存在することが知られている⁸³⁾。

CA の皮膚透過性に及ぼす EtOH の影響は FD-4 のその場合と同様の傾向であったので、CA は FD-4 と同様に主に毛嚢部を透過すると考えられる。ただし、100%EtOH 処理時はそれら化合物の毛嚢部の透過性が著しく低下するため、角層実質経路の寄与が相対的に上昇すると思われる。100%EtOH による毛嚢部の透過性低下は、定性的には毛嚢の水性経路が狭まるとすることで説明可能であるが、CA、FD-4 の分子量はそれぞれ 668、3300–4400 であり、100%EtOH 処理によりどちらの分子量の化合物においても皮膚透過性がほとんど観察されないレベルまで低下する理由については十分説明できない。同様な 100%EtOH 処理による水溶性の高分子量化合物の透過性の低下は、角層実質部分においても生じていると考えられることから、全体の現象をより良く理解するためには、角層の構造が各濃度の EtOH 処理によってどのように変化するのか、分子レベルで解明する必要があると思われる。

第5節 小括

本編では、水溶性化合物の皮膚透過経路の状態に及ぼす EtOH 水溶液による皮膚前処理の影響を皮膚電気伝導性から調べた。皮膚の水性経路には、角層実質と皮膚付属器官を介する経路が考えられるが、 Na^+ や Cl^- といった低分子イオンは主に角層実質を介して拡散しうるので、電気伝導性の評価の結果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る。一方、水溶性化合物がどの経路を介して透過するかは、その化合物の物理化学的性質によって異なると思われる。さらに、EtOH 処理の影響もその適用濃度によって異なると考えられた。ここまでの研究により、水溶性化合物の皮膚透過経路に及ぼす EtOH 適用の影響について、皮膚透過係数の変化や透過経路の状態及び寄与などから考察してきたが、更なる理解のためには角層の構造を分子レベルで評価する必要があると思われる。

第4編

角層の秩序構造に及ぼすエタノールの影響⁸⁴⁾

第1-3編にて、水溶性化合物の皮膚透過性に及ぼす EtOH 適用の影響を、角層実質経路と毛嚢経路に分けた評価について述べた。その結果、EtOH 水溶液による皮膚処理の影響はその濃度によって異なり、水溶性化合物の大きさの違いによってもその皮膚透過性が異なることを明らかにした。そしてその根本的な要因として、EtOH 水溶液による角層中の水溶性物質の透過経路の構造的な変化が重要であることが示唆された。しかしながら、化学物質の皮膚透過性評価だけでは、EtOH が角層にどのような構造的変化を与えたのか明らかにすることはできない。また、EtOH の角層に対する分子レベルでの詳細な作用メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。

角層は主に角層細胞と細胞間脂質から成り立っている。その構造はレンガモデルと提唱されたように⁸⁵⁾、角層細胞は細胞間脂質の中に埋め込まれている。細胞間脂質は、セラミド類、脂肪酸類、コレステロール類、水などの多成分から成り立っており、それらはラメラ構造を形成している。また、角層細胞の中にはソフトケラチンと呼ばれるタンパク質が詰まっている。EtOH 適用時においてそれら構造を観察することにより、角層の構造変化に及ぼす EtOH の作用メカニズムを明らかにできると考えた。そこで本研究では、物質を分子レベルで詳細に評価できる放射光 X 線を用いた小角・広角 X 線回折実験を行い、角層の細胞間脂質構造やソフトケラチンのフィブリル構造に及ぼす EtOH 水溶液の影響についての詳細な解析を行った。

動物角層を用いた X 線回折実験の研究として、ヘアレスマウス角層の実験^{86,87)}、

ヘアスラット角層の実験⁸⁸⁾、ブタ角層の実験^{89,90)}が報告されており、周期的構造は共通の特徴を有している。特にヘアスマウスでは種全体に亘って共通な周期構造の X 線回折プロファイルが現れ、研究報告も多い。そこで、EtOH の角層構造への影響が種間で共通であるとの仮定のもと、各 EtOH 濃度が及ぼす角層構造の微小な変化を捉えることに主眼をおき、ヘアスマウス角層を主に用いることとした。また、透過実験に用いたブタ角層についても検討を試みた。なお、ヒト角層の X 線回折プロファイルも報告されているが^{91,92)}、ヒト角層とヘアスマウス角層では非常に近い構造が出現することがわかっている。

第 1 節 実験方法

1. 実験材料

EtOH は第 1 編と同様のものを用いた。トリプシン、トリプシンインヒビターは Sigma-Aldrich Co., Ltd.のものを用いた。その他の試薬及び溶媒は市販の特級もしくは HPLC 用のものを精製せずに用いた。

2. 実験動物

雄性ヘアレスマウス (HR-1, 8-9 週齢) 及び冷凍された三元ブタ耳介は、株式会社埼玉実験動物供給所から購入した。冷凍されたブタ耳介は実験開始まで -30°C で保管された。すべての実験は城西大学動物実験規定に従って行った。

3. 角層組織の分離法

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg , *i.p.*) 麻酔下の雄性ヘアレスマウスの腹部及び背部皮膚を摘出し、余分な脂肪を取り除いた。

冷凍されたブタ耳介はジップ付きのポリ袋に密封し、 37°C の温水で解凍した。解凍後、精製水で皮膚表面を軽くすすいだ。電動バリカン及び電動シェーバーにて剃毛後、メスを用いて皮膚を摘出した。その後、表皮及び真皮上層部をダーマトームにて真皮下層及び皮下組織及び皮下脂肪と分離した。

摘出後に処理したヘアレスマウス及びブタ皮膚は、PBS で調整した 0.1% (w/v) トリプシン溶液で満たし、 4°C で 16 時間放置した。その後、 37°C で 4 時間のインキュベーションを行い、皮膚から角層を丁寧に剥離した。剥離した角層は、 0.1% (w/v) トリプシンインヒビター水溶液で処理し、蒸留水で良く洗い流した。トリプシンインヒビター水溶液処理と蒸留水の洗い流しの工程は 3 回繰り返す。

た。その後、乾燥剤としてシリカゲルを用い、真空デシケーター内で一晩放置し、乾燥した角層組織を得た。

4. サンプル調製法

乾燥させた角層に、0%、20%、40%、60%、80%、100% (v/v) に調製した EtOH 水溶液を 2 時間適用した。EtOH 処理した角層は、窒素還流下で、角層中の EtOH 水溶液の含量が 20 wt% となるように調整した。得られた角層は、約 5 mg ずつガラス製のキャピラリーチューブに詰め、直ちにシールした。なお、EtOH 濃度ごとに $n = 13-16$ に及ぶサンプルを調製した。サンプル調製には複数個体の角層を使用するため、特定の EtOH 濃度の処理において、特定の部位や特定の個体由来した角層が偏りの無いように割り振られた。

5. X 線回折実験法

本実験は、課題番号 2012B1255 において SPring-8 (兵庫、日本) の BL40B2 にて小角・広角 X 線回折測定を行った。波長 (λ) 0.0709 nm (17.5 keV)、カメラ長 500 nm、300 mm 角のイメージングプレート (R-AXIS IV; 株式会社リガク、東京、日本) を用いて回折像を取得した。露光時間は 15 秒とした。散乱ベクトル $S (= (2/\lambda) \sin (2\theta/2))$ 、 θ は散乱角) はベヘン酸銀 (格子定数 $d = 5.838$ nm) を用いて校正を行った。得られた回折像を一次元化してから、それぞれの回折ピークをガウス関数にフィッティングして、ピーク位置及び半値幅を解析した。

第2節 理論

1. 回折プロファイルの算出

角層の X 線回折実験から得られた回折パターンは、円環平均で一次元強度プロファイルに変換した。このとき得られる波数ベクトル q (nm^{-1}) は式 (10) のように表される。

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (10)$$

ここで Bragg の法則の式を変換し、 q を 2π で除すると、面間隔の逆数 S (nm^{-1}) を式 (11) のように導き出すことができる。

$$S = \frac{1}{d} = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} = \frac{q}{2\pi} \quad (11)$$

式中の d は格子面の間隔 (nm) を示す。一次元化した回折プロファイルは、横軸に S 、縦軸に散乱強度をとって表した。

SPring-8 の BL40B2 では、 $S = 0.05\text{--}3.0 \text{ nm}^{-1}$ の範囲に及ぶ小角と広角の X 線回折同時測定を行った。小角領域に散乱強度の強い回折ピークがある場合、それよりも広角側に高次の回折ピークが検出される。小角領域には細胞間脂質を構成する炭化水素鎖の軸方向に周期性をもつ、層周期がおよそ 13 nm の長周期ラメラ構造及び層周期がおよそ 6 nm の短周期ラメラ構造に由来する回折ピークがあらわれ、 $S = 0.077 \text{ nm}^{-1}$ 及び $S = 0.167 \text{ nm}^{-1}$ 付近にそれぞれの 1 次回折ピークが検出される^{91,93)}。炭化水素鎖と直交する断面内で並ぶ炭化水素鎖の充填構造には六方晶と斜方晶が存在する。六方晶の格子定数は 0.41 nm であり、斜方晶の格

子定数は 0.41 nm と 0.37 nm であることから、 $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$ 付近に六方晶及び斜方晶由来の、 $S = 2.7 \text{ nm}^{-1}$ 付近に斜方晶由来の回折ピークが認められる⁹⁴⁾。中角領域の $S = 1.0 \text{ nm}^{-1}$ 付近には、角層細胞内でゆるく構造形成したソフトケラチンを形成するプロトフィブリルに由来する回折ピークが検出される⁸⁹⁾。

第3節 結果

1. ヘアレスマウス角層の秩序構造に及ぼす EtOH 濃度の影響

Fig. 19 に種々濃度の EtOH 水溶液を適用したヘアレスマウス角層の $S = 0.05\text{--}3.0\text{ nm}^{-1}$ の範囲の X 線回折プロファイルを示す。1 濃度につき、ほぼ同体積の十数個のサンプルの X 線回折像を取得し、平均プロファイルとして示した。小角領域には細胞間脂質を構成しているラメラ構造の周期に由来するピークが観察され、広角領域にはラメラ構造中の炭化水素鎖の充填構造に由来するピークが観察された。

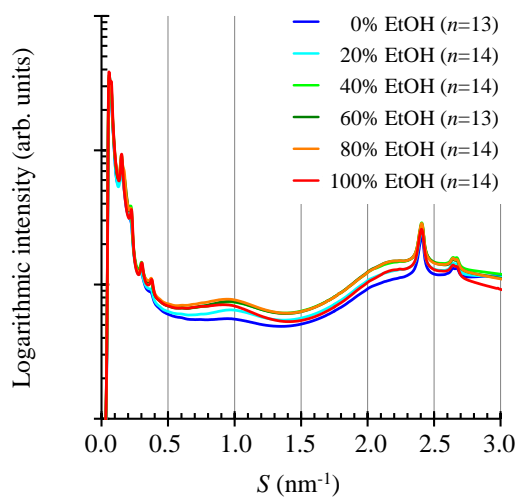


Fig. 19 X-ray diffraction profiles in the hairless mouse stratum corneum as a function of the concentration of EtOH, where n is the number of stratum corneum samples.

Fig. 20aに $S = 0.10\text{--}0.40 \text{ nm}^{-1}$ の範囲の小角領域の X 線回折プロファイルを示す。 $S = 0.12$ から 0.25 nm^{-1} にかけて、長周期及び短周期ラメラ構造に由来する 3 つの回折ピークが重なっているが、この領域のプロファイルが EtOH 濃度によって変化した。加えて、 $S = 0.30 \text{ nm}^{-1}$ 付近及び $S = 0.37 \text{ nm}^{-1}$ 付近に、長周期及び短周期ラメラ構造に由来する単一の回折ピークがそれぞれ確認された。Fig. 20b に $S = 2.0\text{--}3.0 \text{ nm}^{-1}$ の範囲の広角領域の X 線回折プロファイルを示す。 $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$ 付近の回折ピークは六方晶と斜方晶由来で、 $S = 2.7 \text{ nm}^{-1}$ 付近の回折ピークは斜方晶由来である。この角層試料では $S = 2.7 \text{ nm}^{-1}$ 付近の斜方晶由来の回折ピークが割れていた。

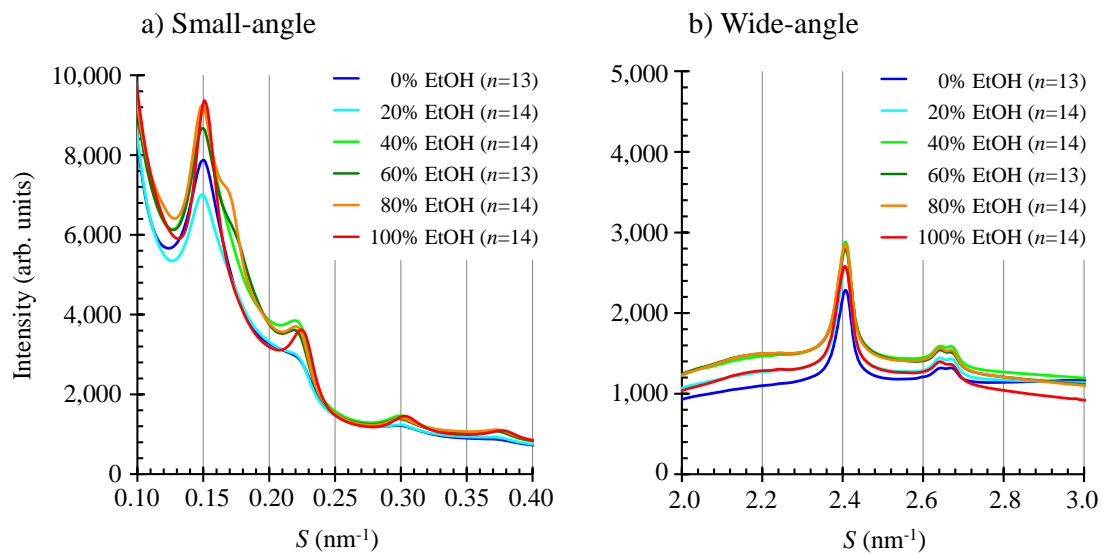


Fig. 20 Small-angle X-ray diffraction profiles (a) and wide-angle X-ray diffraction profiles (b) in the hairless mouse stratum corneum as a function of the concentration of EtOH, where n is the number of stratum corneum samples.

2. 小角領域における回折ピークの解析

さらに、Fig. 20a に示した小角領域で回折ピークが重なり合う部分 ($S = 0.12\text{--}0.25 \text{ nm}^{-1}$) のスペクトルデータにガウシアン関数を用いてフィッティングを行い、個々の回折ピークを解析した。典型例として、Figs. 21a, b に、60% 及び 100% EtOH 処理時のヘアレスマウス角層の小角領域の回折ピークに対するフィッティング解析の結果をそれぞれ示す。 $S = 0.12\text{--}0.25 \text{ nm}^{-1}$ の領域においては、長周期ラメラ構造の 2 次と 3 次の回折ピーク、短周期ラメラ構造の 1 次の回折ピークが測定されている。Figs. 21a, b で示されるように、小角領域の X 線回折プロファイルは 3 つのガウシアンカーブとバックグラウンド直線の合計に良く合致した。また、Fig. 21c に 100% EtOH 処理時の長周期ラメラ構造の 4 次の回折ピークのフィッティング解析の結果を示す。

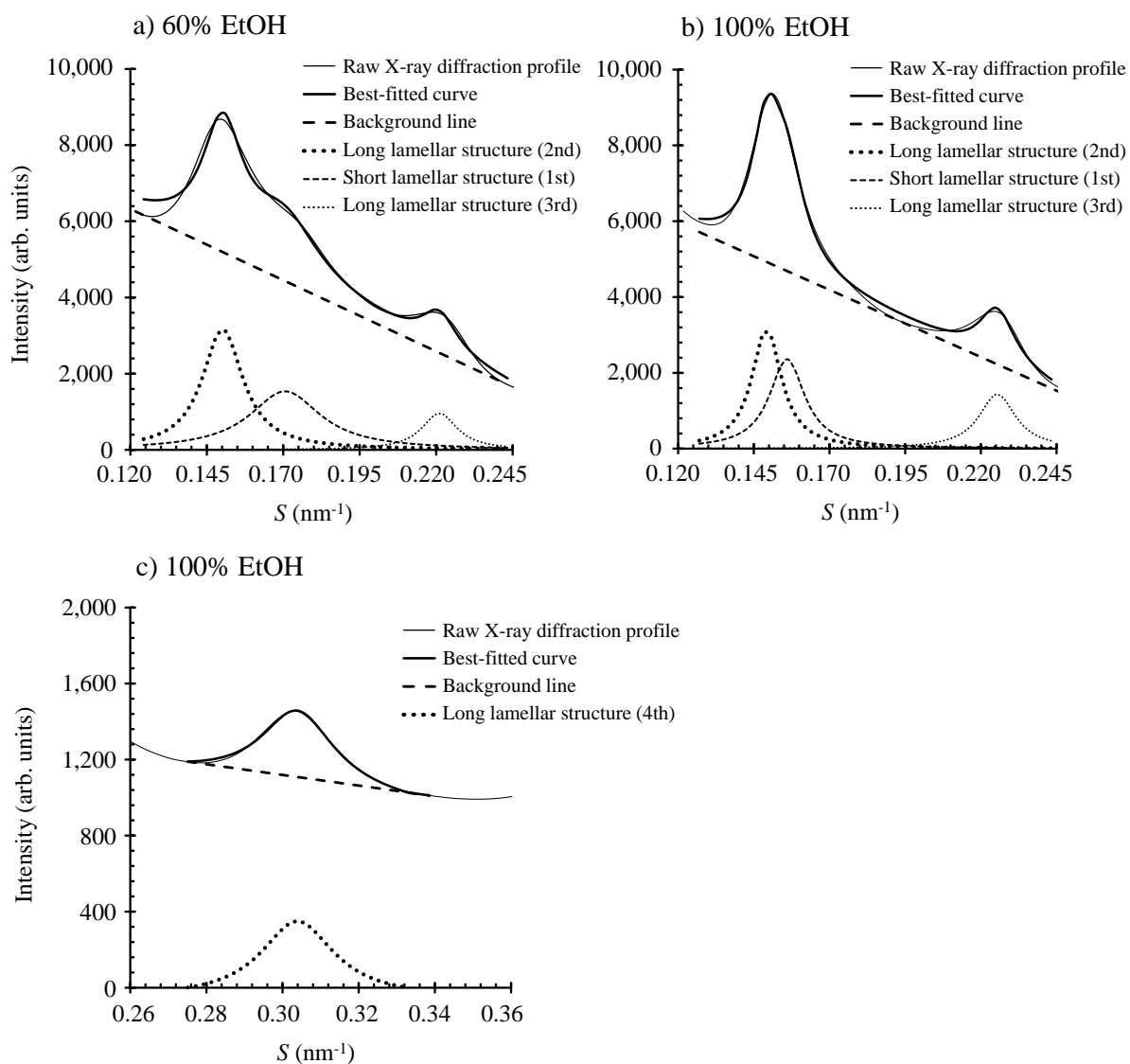


Fig. 21 Typical curve fitting analysis to small-angle X-ray diffraction profiles of the stratum corneum of hairless mice treated with 60% EtOH (a) and 100% EtOH (b, c). The thin solid line shows the mean of raw small-angle X-ray diffraction profiles. The thick solid line indicates the best-fitted curve composed of the sum of Gaussian dotted curves and a linear background dotted line.

Table 5a 及び b に種々濃度の EtOH 処理時における長周期及び短周期ラメラ構造由来の周期と半値全幅値を示す。短周期ラメラ構造の周期及び半値全幅値は 1 次の回折ピークから直接得たのに対して、長周期ラメラ構造の周期及び半値全幅値はバックグラウンドが平坦且つフィッティング解析のために十分な強度を有する 4 次の回折ピークから求めた。さらに、各 EtOH 処理濃度に対する水処理時の周期及び半値全幅値との比を Fig. 22 に示す。長周期ラメラ構造においては、周期やピーク幅に及ぼす EtOH 濃度の影響は小さかった。一方、短周期ラメラ構造に対しては 20–80%EtOH で周期が狭まり、20–60%EtOH でピーク幅が広がった。すなわち、EtOH は短周期ラメラ構造の秩序化と無秩序化の両方を引き起こす作用を持つことから、その作用は一義的でないことが分かった。

Table 5 The repeat distance (a) and full width at half maximum (b) obtained from the 4th order diffraction peak for the long lamellar structure and the 1st order diffraction peak for the short lamellar structure as a function of the EtOH concentration.

a) Repeat distance (nm)						
EtOH concentration (% (v/v))	0	20	40	60	80	100
Long lamellar structure	13.26	13.30	13.30	13.33	13.30	13.17
Short lamellar structure	6.29	6.13	6.13	5.86	5.95	6.42

b) Full width at the half maximum ($\times 10^{-2} \text{ nm}^{-1}$)						
EtOH concentration (% (v/v))	0	20	40	60	80	100
Long lamellar structure	0.93	0.89	0.89	0.91	0.85	0.88
Short lamellar structure	1.84	2.59	2.52	2.83	1.97	1.33

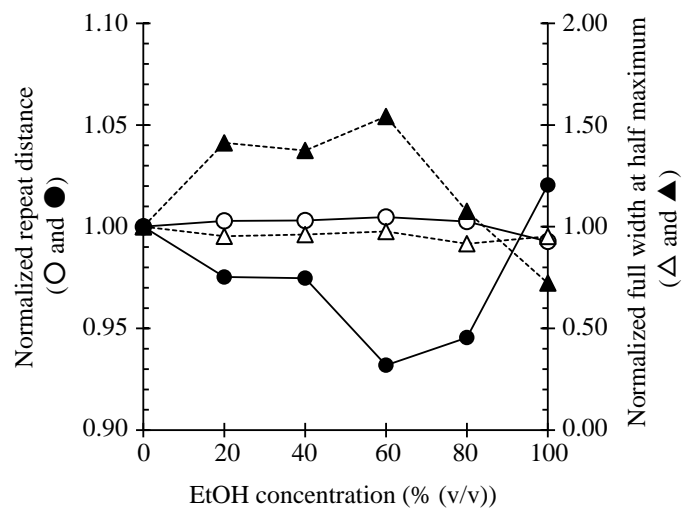


Fig. 22 Effects of EtOH treatment on the repeat distances (○ or ●) and the full widths at half maximum (△ or ▲) for the 4th order diffraction of the long lamellar structures and the 1st order diffraction of the short lamellar structures. The normalized data were calculated by dividing the values of repeat distances and full width at half maximum with EtOH treatments by those for 0% EtOH. The open circle or open triangle and the closed circle or closed triangle show the long lamellar structures and the short lamellar structures, respectively.

3. 広角領域における回折ピークの解析

Fig. 20b に示すように、広角領域には、 $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$ 付近に六方晶及び斜方晶由来の、 $S = 2.7 \text{ nm}^{-1}$ 付近に斜方晶由来の回折ピークが認められた。なお、 $S = 2.7 \text{ nm}^{-1}$ 付近の斜方晶由来の回折ピークが 2 つに割れていると仮定し、Fig. 21 と同様の解析を行い、 $S = 2.64 \text{ nm}^{-1}$ 付近と $S = 2.67 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークに分離した。 $S = 2.7 \text{ nm}^{-1}$ 付近の割れた回折ピークは 2 つのガウシアンカーブとバックグラウンド直線の合計に良く合致した。これらの回折ピークから求めた格子定数を Fig. 23 に、各 EtOH 処理濃度に対する水処理時の半値全幅値との比を Fig. 24 に示す。その結果、六方晶及び斜方晶の格子定数やピーク幅に及ぼす EtOH 濃度の影響は非常に小さいことが明らかになった。

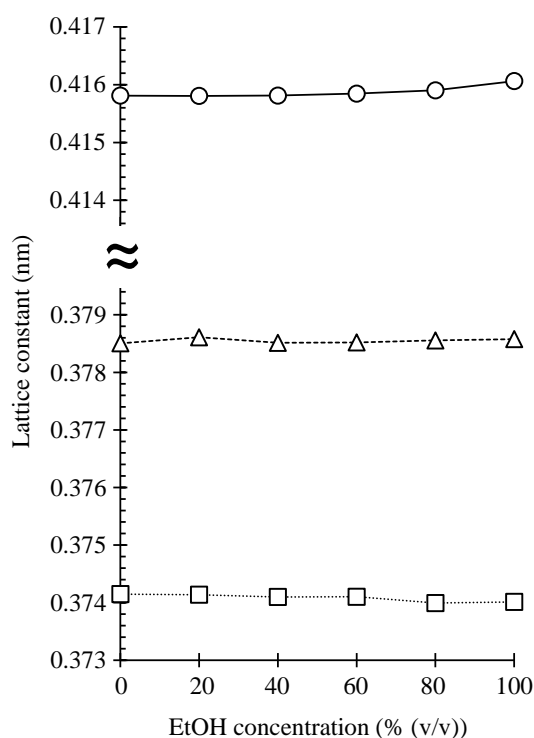


Fig. 23 Effects of EtOH treatment on the lattice constants for the diffraction peaks at $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$, $S = 2.64 \text{ nm}^{-1}$, and $S = 2.67 \text{ nm}^{-1}$. The open circle, open triangle, and open square show the diffraction peaks at $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$, $S = 2.64 \text{ nm}^{-1}$, and $S = 2.67 \text{ nm}^{-1}$, respectively.

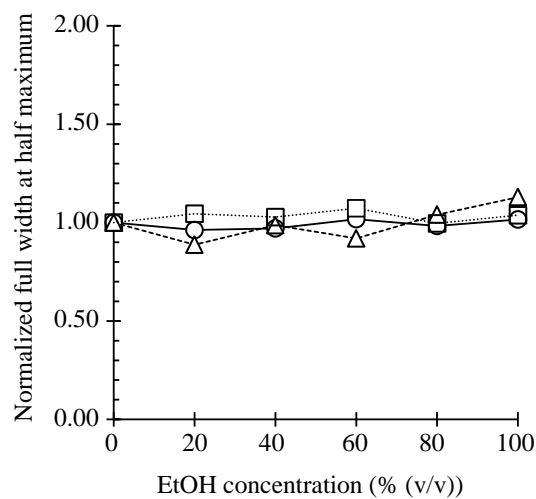


Fig. 24 Effects of EtOH treatment on the normalized full widths at half maximum for the diffraction peaks at $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$, $S = 2.64 \text{ nm}^{-1}$, and $S = 2.67 \text{ nm}^{-1}$. The normalized data were calculated by dividing the values of full width at half maximum with EtOH treatments by those with 0% EtOH. The open circle, open triangle, and open square show the diffraction peak at $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$, $S = 2.64 \text{ nm}^{-1}$, and $S = 2.67 \text{ nm}^{-1}$, respectively.

4. 中角領域における回折ピークの解析

次に、中角領域の $S = 1.0 \text{ nm}^{-1}$ 付近に観察される、ソフトケラチン由来の広い幅の回折ピークの解析を行った。Fig. 25 に種々濃度の EtOH 水溶液を適用したヘアレスマウス角層の X 線回折プロファイルを示す。

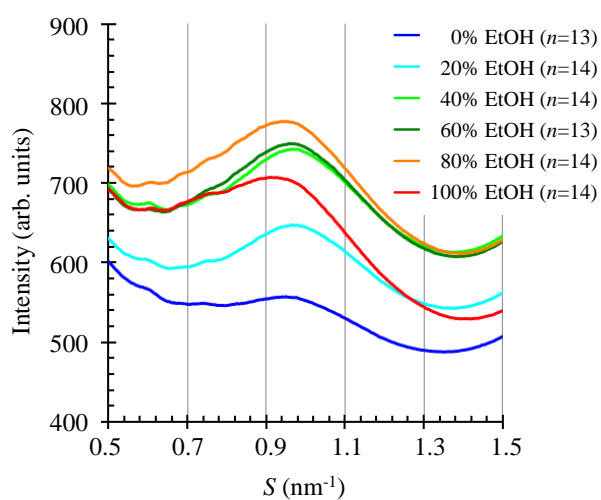


Fig. 25 Medium-angle X-ray diffraction profiles in the hairless mouse stratum corneum as a function of the concentration of EtOH, where n is the number of stratum corneum samples.

さらにそれぞれの回折ピークに対して Fig. 21 と同様の解析を行い、ピーク的位置とピーク幅の変化を求めた。Fig. 26 に種々濃度の EtOH 処理時におけるソフトケラチンのプロトフィブリル構造由来の回折ピーク位置の逆数（プロトフィブリル間距離）と半値全幅値の変化を示す。EtOH 濃度の上昇と共に、回折ピーク位置の逆数が広がり、ピークの幅は増大した。よって、EtOH は角層細胞中のソフトケラチンを構成するフィブリルのパッキングを緩ませることで構造を乱すことが分かった。

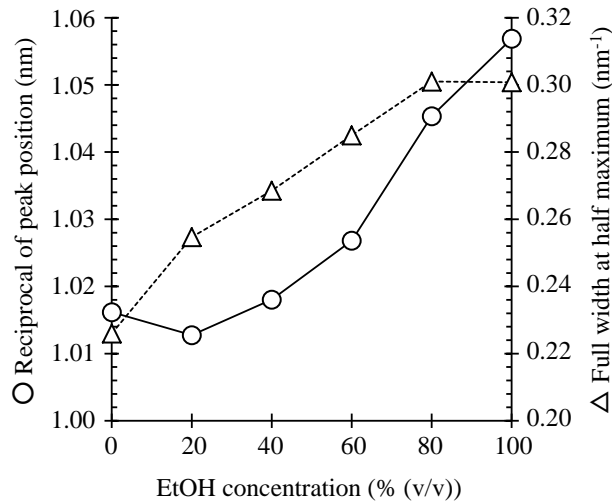


Fig. 26 Effects of the EtOH treatment on the reciprocal of the peak position (○) and the full width at half maximum (Δ) for the soft keratin

5. ブタ角層の秩序構造に及ぼす EtOH 濃度の影響

ここまでヘアレスマウス角層の構造に及ぼす種々濃度の EtOH 水溶液の影響を示したが、透過実験はブタ皮膚を用いていることから、ヘアレスマウス角層でみられた傾向がブタ角層においても確認されるかどうかを確認した。Fig. 27 にブタ角層の $S = 0.05\text{--}3.0 \text{ nm}^{-1}$ の範囲の X 線回折プロファイルを示す。1 濃度につき、ほぼ同体積の十数個のサンプルの X 線回折像を取得し、平均プロファイルとして示した。小角領域には細胞間脂質を構成しているラメラ構造の周期に由来するピークが観察され、広角領域にはラメラ構造中の炭化水素鎖の充填構造に由来するピークが観察されたものの、それらのピーク強度はヘアレスマウス角層の場合と比較して弱かった。

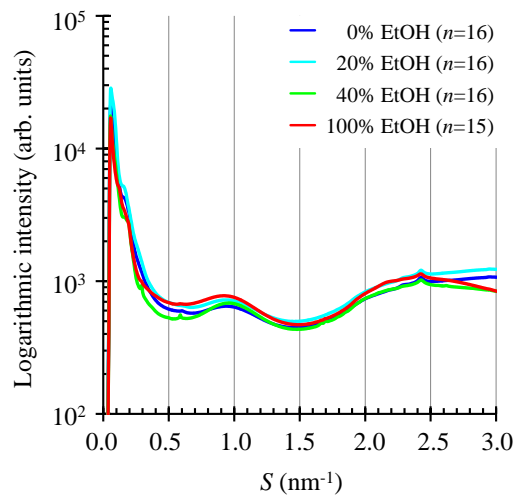


Fig. 27 X-ray diffraction profiles in the pig stratum corneum as a function of the concentration of EtOH, where n is the number of stratum corneum samples.

Fig. 28a に $S = 0.120\text{--}0.245 \text{ nm}^{-1}$ の範囲の小角領域の X 線回折プロファイルを示す。この領域では細胞間脂質中のラメラ構造の周期に由来する回折ピークが見られ、その挙動は EtOH 濃度によって異なったものの、ピーク強度が弱いため、ピーク分離による解析はできなかった。Fig. 28b に $S = 2.0\text{--}3.0 \text{ nm}^{-1}$ の範囲の広角領域の X 線回折プロファイルを示す。 $S = 2.4 \text{ nm}^{-1}$ 付近の回折ピークは六方晶由来の回折ピークであると思われ、その強度は弱い。一方、斜方晶由来の回折ピークは観察されなかった。

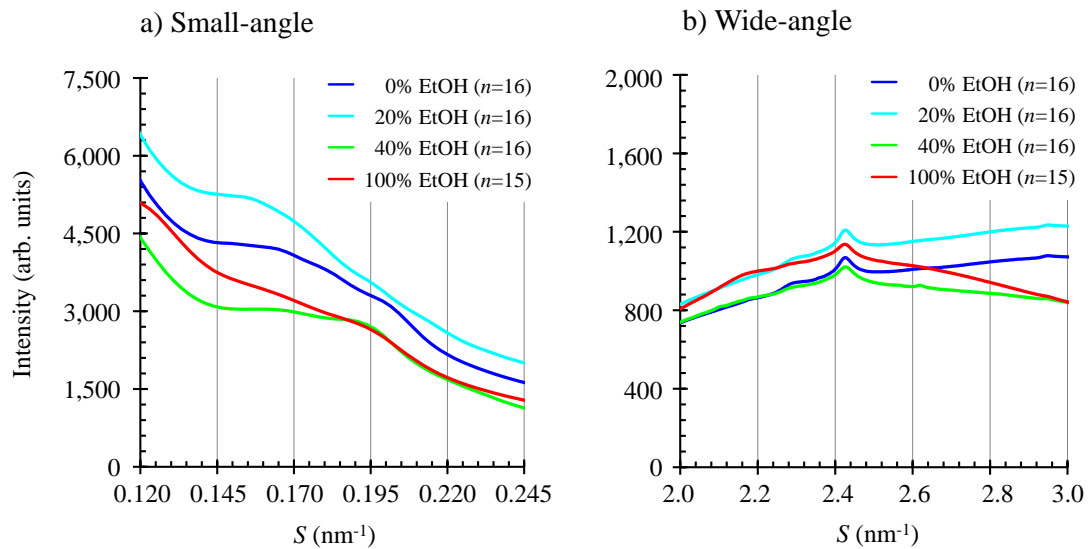


Fig. 28 Small-angle X-ray diffraction profiles (a) and wide-angle X-ray diffraction profiles (b) in the pig stratum corneum as a function of the concentration of EtOH, where n is the number of stratum corneum samples.

Fig. 29 に $S = 0.96 \text{ nm}^{-1}$ 付近に観察されるソフトケラチンによる回折ピークを示す。さらにそれぞれの回折ピークに対して Fig. 21 と同様の解析を行い、ピークの位置とピーク幅の変化を求めた。Fig. 30 に種々濃度の EtOH 処理時におけるソフトケラチンのプロトフィブリル構造由来の回折ピーク位置の逆数（プロトフィブリル間距離）と半値全幅値の変化を示す。EtOH 濃度の上昇と共に、回折ピーク位置の逆数が広がり、ピークの幅は増大した。よって、EtOH は角層細胞中のソフトケラチンを構成するフィブリルのパッキングを緩ませることで構造を乱すことが分かった。この挙動はヘアレスマウス角層とブタ角層で同様の傾向であった。

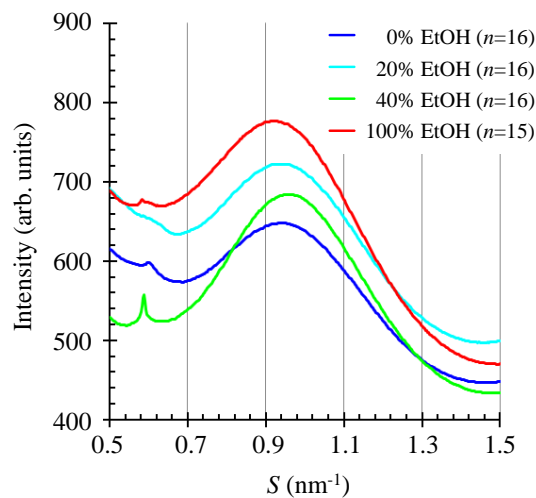


Fig. 29 Medium-angle X-ray diffraction profiles in the pig stratum corneum as a function of the concentration of EtOH, where n is the number of stratum corneum samples.

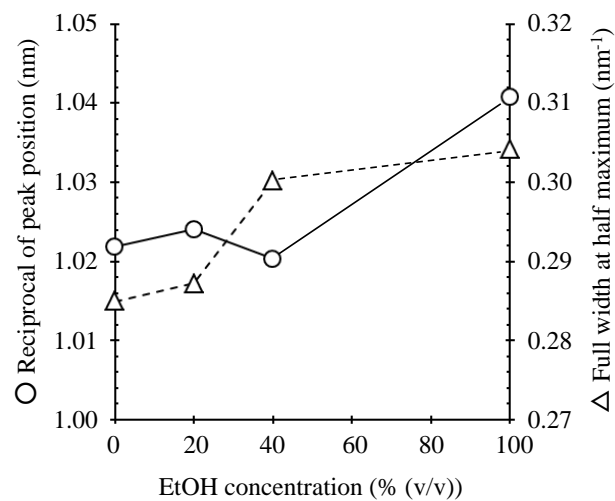


Fig. 30 Effects of the EtOH treatment on the reciprocal of the peak position (○) and the full width at half maximum (Δ) for the soft keratin

第4節 考察

SPring-8 の高輝度の放射光を用いた X 線回折測定は、多成分系で複雑な角層構造中の規則的構造部分を分子レベルにて詳細に観測するための有用な方法である。我々は、ヘアレスマウス角層に種々濃度の EtOH 水溶液を適用し、角層の X 線回折像がどのように変化するかを試験した。皮膚表面の水分量は 20–30 wt% であり⁹⁵⁾、20–30 wt% の水分量でラメラ構造が最も安定化する⁹⁶⁾ことがわかっている。そのため、本実験では、角層中の EtOH 水溶液の含量を 20 wt% に設定した。しかしながら、サンプル間の結果を比較することは非常に難しいことが知られている。ヘアレスマウスに限らず、ヒトやラットやブタ角層においても、X 線回折実験において部位差や個体差によるばらつきがあり、1 サンプル同士の結果の比較では、それらばらつきの影響を無視できないためである。そのため、皮膚角層構造に及ぼす EtOH 濃度とその濃度変化を分子レベルで詳細に解明した研究報告はこれまでにない。そこで今回の実験では、適用 EtOH 濃度毎に $n = 13-16$ にも及ぶ数多くのサンプルを用意し、得られた X 線回折プロファイルを平均して解析し、部位差や個体差のばらつきの問題をできるだけ減らすこととした。その結果、角層構造に及ぼす EtOH 濃度の影響をはじめて詳細に観察することができた。

細胞間脂質中に形成されている秩序構造には、炭化水素鎖の軸方向に周期性を持つ長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造があり、今回のヘアレスマウス角層においても、これらの構造に由来する回折ピークは小角領域にて検出された。Fig. 21a に示すように $S = 0.12$ から 0.25 nm^{-1} にかけて、長周期ラメラ構造及び短周期ラメラ構造に由来する 3 つの回折ピークが観察された。この領域で観察される 3 つの回折ピークは重なり合っているため、回折ピークから小さな構造変

化を捉えるのは非常に難しい。特に短周期ラメラ構造の回折ピークは、長周期ラメラ構造の回折ピークに比べて周期が短く強度も小さいため、構造を解析するには1次回折ピークを単離する必要があった。そこで、3つのガウシアンカーブとバックグラウンド直線を組み合わせたフィッティング解析を行ったところ、短周期ラメラ構造の周期と半値全幅値を割り出すことが出来た。一方、長周期ラメラ構造においては、2次と3次の回折ピークが他の回折ピークと重なっている上に、バックグラウンドも平坦な直線ではない。長周期ラメラ構造の4次回折ピークは、単一且つ平坦なバックグラウンドであるという特徴を持ち、フィッティング解析のための十分な強度も有している。そのため、長周期ラメラ構造の周期と半値全幅値は4次回折ピークから算出した。

その結果、EtOH水溶液はヘアレスマウス角層中の長周期ラメラ構造よりも短周期ラメラ構造に大きく影響を及ぼすことが明らかとなった。短周期ラメラ構造は水層を有するという報告があり^{96,97)}、角層中の水層を含む厚みが外部の極性溶媒によって変化することを明らかとした。本実験において観察された短周期ラメラ構造の周期の変化も、この水層にEtOHが入り込むことによって引き起こされたのかもしれない。短周期ラメラ構造中の水層領域はセラミドなどの分子の極性頭部が向かい合った構造をしており、その間の部分に水層を保持している。適用されたEtOHはその水層中で混ざり合うだけでなく、水層とセラミドなどの分子の極性頭部の境界面にEtOHの水酸基を水層側に向ける形で配向していると考えられる⁹⁸⁾。EtOHと水が混合している領域では、EtOH・水系の体積収縮が起こる可能性がある。周期がEtOH濃度依存的に狭まる挙動を見せなかったのは、それらのためかもしれない。一方、回折ピーク幅は、0%から60%までのEtOH濃度の増加と共に拡がり、80%以上の高濃度ではむしろ狭まった。すなわち、短周期ラメラの構造は、低濃度EtOHの処理で乱れるものの、高濃度

EtOH の処理では秩序化してくる。水層中では当然ながら、水分子と EtOH 分子のセラミド等の分子の極性頭部との相互作用の違いがあると考えられる。また、水の濃度が高い領域では水分子が構造化し、EtOH 濃度が高い領域では EtOH 分子が構造化しているが、それらの中間の領域では水分子とエタノール分子が構造化していない、すなわち、乱れた状態になっていることが考えられる。100%まで EtOH 濃度を上げると、短周期ラメラ構造の周期長やピーク幅が 0%EtOH 処理時の値に見かけ上は戻っているように見えるが、実際には異なる秩序構造、すなわちより周期が長く安定した構造をとっていると思われる。この特殊な構造が、FD-4 などの水溶性の高分子量化合物の透過性を極度に低下させていることが推察できる。以上のメカニズムによって起こる短周期ラメラ構造の変化のイメージを Fig. 31 に示す。

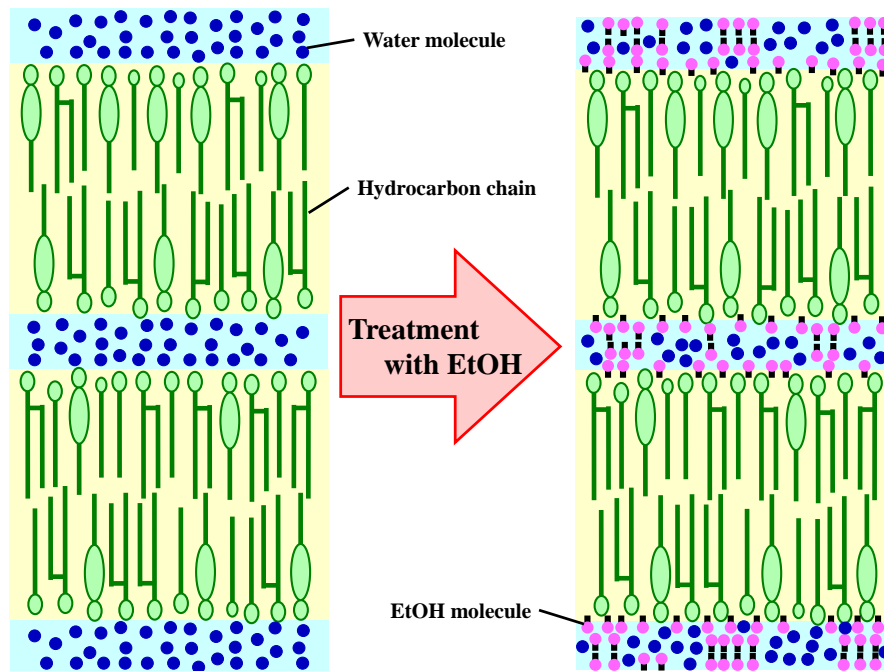


Fig. 31 Schematic model of change to the short lamellar structure in intercellular lipids with EtOH

なお、ブタ角層においても EtOH 濃度に応じてラメラ構造が変化することは確認されたが、ピーク強度が弱かったために詳細な解析はできなかった。なお、Kwak らはセラミドを含む人工の細胞間脂質モデル膜の構造に及ぼす種々濃度の EtOH 水溶液の影響を報告している⁹⁹⁾。その研究では、EtOH はセラミドよりもむしろ脂肪酸に影響を及ぼすことによって、人工の細胞間脂質モデル膜の構造が乱れている。我々の実験結果とあわせると、EtOH 水溶液の影響を受けやすい短周期ラメラ構造のセラミドの含有率は、その影響を受けにくい長周期ラメラ構造のそれよりも低いことが考えられる。

一方、炭化水素鎖と直交する断面内で並ぶ炭化水素鎖の充填には六方晶と斜方晶があり、これらの構造に由来する回折ピークは広角領域にて検出される。今回のヘアレスマウス角層の試料では、斜方晶に由来する $S = 2.7 \text{ nm}^{-1}$ 付近の回折ピークが割れていたが、割れたピークは 2 つのガウシアンカーブと良く一致したことから、ヘアレスマウス角層中の細胞間脂質には 2 種類の斜方晶が存在していることが考えられる。六方晶及び斜方晶に由来する格子定数やピーク幅に及ぼす EtOH 濃度の影響はほとんどみられなかった。ブタ角層では六方晶の回折ピークのみが見られ、ヘアレスマウス角層と同様に、格子定数やピーク幅に及ぼす EtOH 濃度の影響はほとんどみられなかった。

電子顕微鏡による角層断面の形態観察からわかるように、角層の構成比は細胞間脂質よりも角層細胞の方が断然に高く¹⁰⁰⁾、角層を形成する組織として、細胞間脂質に包み込まれた角層細胞も重要である。角層細胞内では、ケラチン繊維が凝集し、充満している。ソフトケラチン由来の回折ピークが中角領域の $S = 0.96 \text{ nm}^{-1}$ 付近に検出され、このピーク位置の逆数が角層細胞中のプロトフィブリル間距離を示すことになる。今回のヘアレスマウス角層やブタ角層の実験においても、 $S = 0.96 \text{ nm}^{-1}$ 付近に回折ピークが観察され、プロトフィブリル間距離

とピーク幅の解析を行った。その結果、どちらの角層においても、EtOH 濃度の上昇と共にプロトフィブリル間距離は拡がり、ピーク幅も拡がった。角層細胞中に EtOH が入り込む報告もあることから⁵²⁾、EtOH は濃度依存的に、角層細胞中のソフトケラチンを構成するフィブリルのパッキングを緩ませて構造を乱すと考えられた。この要因の一つに、EtOH によるケラチンタンパク質の変成作用が影響しているのかもしれない。これはソフトケラチンに対する EtOH 濃度依存的な作用と矛盾しない。

本編では、角層の秩序構造に及ぼす EtOH 水溶液の影響を明らかにした。EtOH 水溶液は角層の長周期ラメラ構造にはほとんど入り込まず、炭化水素鎖の充填構造にもほとんど影響しないが、短周期ラメラ構造やフィブリル構造に大きく影響することがわかった。EtOH 水溶液がもたらす角層構造の変化は、EtOH 含有外用剤を皮膚に適用した際の薬物皮膚透過性にも大きく関係することを示唆する。第 1 編にて、ブタ皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過実験により、種々化学物質の皮膚透過性に及ぼす EtOH 水溶液処理の影響を検討したところ、低濃度 EtOH の水溶液は水溶性化合物の皮膚透過性を上昇させたものの、高濃度 EtOH の水溶液ではむしろ水溶性化合物の皮膚透過性を減少させることを明らかにしている³²⁾。EtOH 水溶液の皮膚処理により、化学物質の角層への分配性や角層中での拡散性が変化することが予想されたものの、化学物質の皮膚透過性が変化するメカニズムまでは解明されていなかった。本編で明らかとなった、低濃度から中間濃度の EtOH 水溶液を角層に 20 wt% 含ませた条件で観察された短周期ラメラ構造の大きな乱れと、高濃度条件で観察された特殊な秩序化、そしてソフトケラチンの性質の濃度依存的変化は、前処理であるという点で条件は異なるものの、物理化学的性質が異なる各化学物質の皮膚透過性への EtOH の影響を説明する上で重要な知見である。特に、EtOH 濃度に比例して直線的な変化を示

さない短周期ラメラ構造の挙動は、第1編で報告した種々濃度 EtOH の皮膚処理による水溶性化合物の透過性変化の挙動との間において、中間濃度の EtOH で極大の変化を持つ共通の特徴を有している。化学物質が角層を透過する場合、皮膚透過性は、基剤から角層への化学物質の分配性と、角層中の化学物質の拡散性に大きく支配される。脂溶性化合物は細胞間脂質中の疎水性域に分配して拡散するが、一方、水溶性化合物は細胞間脂質中の水性域あるいは角層細胞中に分配して拡散すると考えられ、その場合の分配は脂質への分配ではなく空間への分配であり、分配パラメータの値は透過経路の数や大きさなどその構造に係る。すなわち、EtOH 水溶液によって短周期ラメラ構造が大きく乱れることは、水溶性化合物の水性域への分配性を変化させるだけでなく、水性域中の拡散性をも変化させる可能性がある。第1編の結果で、EtOH 処理により拡散パラメータの変化は認められなかったが、これは、分配パラメータが複合的な要因によって決定されるのと同様、拡散パラメータも複数の要因の影響を受けた結果であると考えられる。ほとんどが疎水性領域で構成される長周期ラメラ構造に及ぼす EtOH 水溶液の影響は小さかった本研究の結果から、脂溶性化合物の皮膚透過性への影響は水溶性化合物に比べて小さいことが推察される。ブタ角層の実験では、ラメラ構造に及ぼす EtOH の影響を詳細には解析できなかったものの、動物種を問わず角層の基本構造は同じであるため、EtOH 水溶液と角層構造の変化はヘアレスマウス角層の場合と同様の挙動を示すと考えられる。これらの推察は、我々が以前に報告したブタ皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過実験結果と一致するものの³²⁾、EtOH 処理した皮膚の角層構造と化学物質の皮膚透過性との関連については更なる調査が必要である。特に、長周期及び短周期ラメラ構造の相対量とそれに及ぼす EtOH の影響を明らかにすることは重要な課題である。

第5節 小括

本編までに、EtOH水溶液による皮膚処理は、皮膚角層実質や毛嚢経路の構造変化による水溶性化合物の皮膚透過性変化を生じさせ、その変化はEtOH濃度や化合物の分子量により異なることを述べた。すなわち、EtOH水溶液が角層中の水性経路の構造的変化をその適用濃度によって異なった形で引き起こす可能性を示唆した。そこで本編では、EtOH水溶液を共存させた条件で角層のX線回折実験を行った。その結果、角層構造に及ぼすEtOH濃度の影響を放射光X線実験によって分子レベルで初めて明らかにした。EtOH水溶液は皮膚構造内で水を取り込みうる構造部に影響を及ぼし、さらにその構造がどのように変化するかを確認することができた。これらの構造、特に短周期ラメラ構造の変化は、EtOH水溶液の皮膚前処理による水溶性化合物の皮膚透過性の変化と関連性があるのではないかと推察された。

結論

EtOH は経皮吸収促進剤としての機能が期待され、古くから外用医薬品に配合されてきた。製剤に配合する EtOH の有無で薬物の皮膚透過性を比較すると、EtOH 配合製剤の方が高い透過性を得られることが多い。しかしながら、EtOH は難溶性物質の溶解剤としての用途もあることから、EtOH を製剤に配合すると、当然、薬物の熱力学的活量が変化する。すなわち、溶媒として共存する EtOH そのものの効果と EtOH により影響を受けた皮膚の変化に基づく効果の切り分けが難しかった。そのため、EtOH により影響を受けた皮膚の変化に基づく効果とその明確なメカニズムについては明らかにされていなかった。EtOH は薬物の経皮吸収促進や難溶性物質の溶解性向上の作用以外にも、消毒性や収斂性の効果といった多くの有用作用を持つことから、外用剤の開発において配合頻度の高い成分となっている。皮膚に対する EtOH の作用メカニズム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 の前処理適用により、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ることが明らかとなった。その変化は、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

なっていることが示された。一方、脂溶性化合物の皮膚透過性に EtOH はほとんど影響しなかった。

このように、EtOH 水溶液の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。これらのメカニズムに関しては、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と考えられた。

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。すなわち、毛嚢プラグギングを施した場合の変化から、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。

このように、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。同じ水溶性の分類となる化合物間でも、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、角層実質よりも毛嚢経路を主に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。

このように、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。特に、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から、毛嚢は単なる孔ではなく、より複雑なものとして捉える必要性を示唆していた。

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る一方、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。

このように、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、角層の構造が各濃度の EtOH 処理によってどのように変化するのか、分子レベルで解明する必要があると思われた。

第 4 編 角層の秩序構造に及ぼすエタノールの影響

EtOH による皮膚処理は、水溶性化合物の皮膚透過性を変化させることを明ら

かにした。そしてその根本的な要因として、EtOH 水溶液による角層中の水溶性物質の透過経路の構造的な変化が重要であることが示唆された。そこで、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。

放射光 X 線回折実験により、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及ぼすことがわかった。短周期ラメラ構造の変化は中間濃度の EtOH 水溶液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 濃度に比例的であった。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。

このように、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。

以上より、EtOH 水溶液による皮膚前処理は、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、その皮膚透過性を変化させると考えられた。水溶性化合物の皮膚透過性は低濃度 EtOH の水溶液の前処理では促進され、高濃度のそれではむしろ低下した。これらの変化は、EtOH 水溶液が皮膚構造中の水を取り込みうる構造部に影響を及ぼしたことに起因すると推定された。すなわち、EtOH 水溶液の皮膚処理による水溶性化合物の皮膚透過性の変化は、皮膚中の水性経路の構造変化によって生じた、水溶性化合物の皮膚への分配性の変化に強く寄与することが示唆された。特に、透過促進剤としても用いられる EtOH を高濃度で皮膚適用した場合に、水溶性化合物の皮膚透過性をむしろ低下させたことは非常に興味深い。この影響は高分子量の化合物でより大きい傾向であった。このことから、皮膚中の水性経路は複数存在し、その大きさや太さは経路によって異なり、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と

考えられた。さらに、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作用もあり、比較的分子量が大きい水溶性化合物が分配しにくい皮膚性質に変化させると推察される。一方、低濃度から中間濃度の EtOH の皮膚適用は、短周期ラメラ構造を乱し、更には角層細胞中のケラチンタンパク質を構成するプロトフィブリルのパッキングを適度に緩ませることによっても、水溶性化合物の皮膚取り込み量が増加し、その皮膚透過性を促進させると考察した。しかし、これら透過性変化の主となる要因には、特に、低濃度の EtOH と 100% の EtOH で逆の効果を示し、EtOH 濃度に依存する効果が一致する短周期ラメラ構造の寄与が大きいのではないかと推察される。

本研究の実験は、EtOH の皮膚への作用を明確にするため、極端な条件（無限系）で皮膚を EtOH 処理した。EtOH 含有製剤をパッチなどの閉塞状態にて適用する条件に近いかもしれないが、現実的な適用条件に近い実験も望まれるところである。有限系での検討においても、無限系での結果を把握しておくことは重要な課題であったと考えている。

本研究の結果、化学物質の皮膚透過性に及ぼす EtOH 前処理の影響について、詳細な作用とそのメカニズムが明らかとなった。特に、皮膚バリア構造に対して分子レベルで着目して評価した研究はこれまでになかった。EtOH は経皮吸収促進剤として経験的に外用剤に使用されてきたが、皮膚への作用の詳細が明らかになったことで、薬物の物理化学的性質に応じた外用剤の開発に応用できると考えられる。EtOH は水溶性化合物の毛嚢透過性を大きく変化させることから、DDS、特に、毛嚢デリバリー分野での活用が望ましいかもしれない。例えば、毛嚢周辺での薬効の発現を調節し、痤瘡や毛包炎、脱毛症などの治療に応用することが考えられる。また、毛孔周辺のトラブル対策や、脱毛、デオドラントといった化粧品分野でも活かせるだろう。このように、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関して有益な情報となる。

謝辞

本研究に際し、テーマの設定から結論に至るまで、ご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次 先生に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始有益なご指導、ご助言を賜りました城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座准教授 藤堂浩明 先生に厚く御礼申し上げます。

本論文作成、学位論文審査にあたり、ご教示とご校閲をいただきました城西大学薬学研究科生理学講座教授 加園恵三 先生、城西大学薬学研究科薬剤作用解析学講座教授 小林大介 先生、城西大学薬学研究科薬品物理化学講座教授 関俊暢 先生、城西大学薬学研究科薬剤学講座教授 従二和彦 先生ならびに城西大学薬学研究科医薬品化学講座教授 坂本武史 先生に感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、有益な御意見ならびに実験のご協力をいただきました名古屋産業科学研究所上席研究員 八田一郎 博士に厚く御礼申し上げます。

内地留学期間中ならびに論文執筆にあたり、マルホ株式会社 研究部 石井宏 博士の存在が研究を進めていく上で大きな励みとなったことをここに記すとともに、深く感謝いたします。

本研究の実施にご協力いただきました城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座の学生をはじめとする関係諸氏に深く感謝いたします。特に、吉元将人 修士、北尾勇樹 修士の熱心な協力を得たことを記すとともに心より感謝申し上げます。

また、本研究の機会を与えて頂くと共に、研究を支援していただきました、株式会社池田模範堂 代表取締役社長 池田嘉津弘 氏、取締役研究所長 小川和男 博士、研究所 中村光延 博士、開発部次長 小嶋善彦 氏、開発部 OTC グループ 扇原秀雄 氏、他、同社研究所員をはじめとする社員一同に深く感謝いたします。

また、研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力を頂きながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後になりますが、いつも心の支えになってくれた両親、祖母、兄弟達をはじめ、親族一同に心から感謝します。叔父の堀田久範 博士の研究や仕事に対するご助言も支えとなりました。そして、長期の単身赴任になるにも関わらず、内地留学を快く承諾し、どのような状況においても応援してくれた素晴らしい妻の琴美に精一杯の感謝を捧げます。

引用文献

- 1) 宇野豊三, 中嶋暉躬, 田中久, 柴崎正勝, 江島昭, 乾賢一, 福田英臣, 杉山雄一 (監修): 第十六改正日本薬局方解説書, 廣川書店, 東京, 33–70 (2011).
- 2) 菅原幸子, 経皮吸収システムの臨床応用-第2世代を迎える経皮吸収型非ステロイド抗炎症・鎮痛貼付剤. *Therapeutic Res.*, **8**, 1271–1281 (1988).
- 3) Iikura Y., Uchiyama H., Akimoto K., Ebisawa M., Sakaguchi N., Tsubaki T., Ishizu H., Kabayama H., Yagi K., Miura K., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tulobuterol patch, HN-078, in childhood asthma, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **74**, 147–151 (1995).
- 4) Shah V.P., Tymes N.W., Skelly J.P., *In vitro* release profiles of clonidine transdermal therapeutic systems and scopolamine transdermal patches, *Pharm. Res.*, **6**, 346–351 (1989).
- 5) Chien Y.W., Keshary P.R., Huang Y.C., Sarpotdar P.P., Comparative controlled skin permeation of nitroglycerin from marketed transdermal delivery systems, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 968–970 (1983).
- 6) Arra G.S., Arutla S., Krishna D.R., Transdermal delivery of isosorbide 5-mononitrate from a new membrane reservoir and matrix-type patches, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 489–492 (1998).
- 7) Oertel W., Ross J.S., Eggert K., Adler G., Rationale for transdermal drug administration in Alzheimer disease, *Neurology*, **69**, 4–9 (2007).
- 8) Liu P., Bergstrom T.K., Quantitative evaluation of aqueous isopropyl alcohol enhancement on skin flux of terbutaline (sulfate), 2, Permeability contributions of equilibrated drug species across human skin *in vitro*, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 320–325

(1996).

- 9) Duracher L., Blasco L., Hubaud J.C., Vian L., Marti-Mestres G., The influence of alcohol, propylene glycol and 1,2-pentanediol on the permeability of hydrophilic model drug through excised pig skin, *Int. J. Pharm.*, **374**, 39–45 (2009).
- 10) Naik A., Pechtold L.A.R.M., Potts R.O., Guy R.H., Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement *in vivo* in humans, *J. Control. Release*, **37**, 299–306 (1995).
- 11) Kim M.J., Doh H.J., Choi M.K., Chung S.J., Shim C.K., Kim D.D., Kim J.S., Yong C.S., Choi H.G., Skin permeation enhancement of diclofenac by fatty acids, *Drug Deliv.*, **15**, 373–379 (2008).
- 12) Okumura M., Nakamori Y., Yoshida Y., Niwa H., Sugibayashi K., Morimoto Y., Effect of monoglycerides on the percutaneous absorption of papaverine hydrochloride, *Drug Des. Deliv.*, **6**, 137–148 (1990).
- 13) Bhandari K.H., Lee D.X., Newa M., Yoon S.I., Kim J.S., Kim D.D., Kim J.A., Yoo B.K., Woo J.S., Lyoo W.S., Lee J.H., Choi H.G., Yong C.S., Evaluation of skin permeation and accumulation profiles of a highly lipophilic fatty ester, *Arch. Pharm. Res.*, **31**, 242–249 (2008).
- 14) Kararli T.T., Kirchoff C.F., Penzotti S.C., Enhancement of transdermal transport of azidothymidine (AZT) with novel terpene and terpene-like enhancers: *In vivo-in vitro* correlations, *J. Control. Release*, **34**, 43–51 (1995).
- 15) Song Y.H., Gwak H.S., Chun I.K., The effects of terpenes on the permeation of lidocaine and ofloxacin from moisture-activated patches, *Drug Deliv.*, **16**, 75–81 (2009).
- 16) Akhter S.A., Barry B.W., Absorption through human skin of ibuprofen and

- flurbiprofen; effect of dose variation, deposited drug films, occlusion and the penetration enhancer N-methyl-2-pyrrolidone, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 27–37 (1985).
- 17) Babu R.J., Pandit J.K., Effect of penetration enhancers on the release and skin permeation of bupranolol from reservoir-type transdermal delivery systems, *Int. J. Pharm.*, **288**, 325–334 (2005).
 - 18) Ashton P., Walters K.A., Brain K.R., Hadgraft J., Surfactant effects in percutaneous absorption effects on the transdermal flux of methyl nicotinate, *Int. J. Pharm.*, **87**, 261–264 (1992).
 - 19) Som I., Bhatia K., Yasir M., Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery, *J. Pharm. Bioallied. Sci.*, **4**, 2–9 (2012).
 - 20) Sugibayashi K., Hosoya K., Morimoto Y., Higuchi W.I., Effect of the absorption enhancer, Azone, on the transport of 5-fluorouracil across hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 578–580 (1985).
 - 21) Singh B.N., Singh R.B., Singh J., Effects of ionization and penetration enhancers on the transdermal delivery of 5-fluorouracil through excised human stratum corneum, *Int. J. Pharm.*, **298**, 98–107 (2005).
 - 22) Smith R.D., Robinson D.E., Delignieres B., Albertson B.D., Tomai T.P., Zinaman M.J., Simon J.A., Effects of vehicle supplementation on total estradiol absorption from a transdermal estradiol delivery system, *Fertil. Steril.*, **56**, 1029–1033 (1991).
 - 23) Good W.R., Powers M.S., Campbell P., Schenkel L., A new transdermal delivery system for estradiol, *J. Controll. Release*, **2**, 89–97 (1985).
 - 24) Berner B., Mazzenga G.C., Otte J.H., Steffens R.J., Juang R.H., Ebert C.D.,

- Ethanol: water mutually enhanced transdermal therapeutic system II: skin permeation of ethanol and nitroglycerin, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 402–407 (1989).
- 25) Williams A.C., Barry B.W., Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 603–618 (2004).
 - 26) van der Merwe D., Riviere J.E., Comparative studies on the effects of water, ethanol and water/ethanol mixtures on chemical partitioning into porcine stratum corneum and silastic membrane, *Toxicol. In Vitro*, **19**, 69–77 (2005).
 - 27) Obata Y., Katayama K., Machida Y., Nagai T., Combined effect of cyclic monoterpenes and ethanol on percutaneous absorption of diclofenac sodium, *Drug Des. Discovery*, **8**, 137–144 (1991).
 - 28) Katayama K., Takahashi O., Matsui R., Morigaki S., Aiba T., Kakemi M., Koizumi T., Effect of *l*-menthol on the permeation of indomethacin, mannitol and cortisone through excised hairless mouse skin, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3097–3099 (1992).
 - 29) Kobayashi D., Matsuzawa T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Kimura M., Analysis of the combined effect of *l*-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model, *Pharm. Res.*, **11**, 96–103 (1994).
 - 30) Pershing L.K., Lambert L.D., Knutson K., Mechanism of ethanol-enhanced estradiol permeation across human skin *in vivo*, *Pharm. Res.*, **7**, 170–175 (1990).
 - 31) Liu P., Kurihara-Bergstrom T., Good W.R., Cotransport of estradiol and ethanol through human skin *in vitro*: understanding the permeant/enhancer flux relationship, *Pharm. Res.*, **8**, 938–944 (1991).
 - 32) Horita D., Todo H., Sugibayashi K., Effect of ethanol pretreatment on skin permeation of drugs, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1–6 (2012).

- 33) Barry B.W., *Dermatological Formulations*, Marcel Dekker, New York, 95–126 (1983).
- 34) Elias P.M., Epidermal lipids, barrier function, and desquamation, *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 44–49 (1983).
- 35) Takeuchi H., Ishida M., Furuya A., Todo H., Urano H., Sugibayashi K., Influence of skin thickness on the *in vitro* permeabilities of drugs through Sprague-Dawley rat or Yucatan micropig skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 192–202 (2012).
- 36) Takeuchi H., Terasaka S., Sakurai T., Furuya A., Urano H., Sugibayashi K., Variation assessment for *in vitro* permeabilities through yucatan micropig skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 555–561 (2011).
- 37) Koizumi A., Fujii M., Kondoh M., Watanabe Y., Effect of N-methyl-2-pyrrolidone on skin permeation of estradiol, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 473–478 (2004).
- 38) Sekkat N., Kalia Y.N., Guy R.H., Porcine ear skin as a model for the assessment of transdermal drug delivery to premature neonates, *Pharm. Res.*, **21**, 1390–1397 (2004).
- 39) Sato K., Sugibayashi K., Morimoto Y., Species differences in percutaneous absorption of nicorandil, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 104–107 (1991).
- 40) Lademann J., Richter H., Meinke M., Sterry W., Patzelt A.. Which skin model is the most appropriate for the investigation of topically applied substances into the hair follicles?, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **20**, 47–52 (2010).
- 41) Dick I.P., Scott R.C., Pig ear skin as an *in vitro* model for human skin permeability, *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 640–645 (1992).
- 42) Robert M.L., Gang D., Peishu Z., George F.M., Hairless micropig skin, *Am. J. Pathol.*, **138**, 687–697 (1991).

- 43) Hatanaka T., Suzuki R., Katayama K., Koizumi T., Stereoselective skin permeation of organic nitrates: application of partitioning and porous transport theories, *Int. J. Pharm.*, **168**, 199–208 (1998).
- 44) Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y., Prediction of skin permeability of drugs. I. Comparison with artificial membrane, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3452–3459 (1990).
- 45) Yamada K., Yamashita J., Todo H., Miyamoto K., Hashimoto S., Tokudome Y., Hashimoto F., Sugibayashi K., Preparation and evaluation of liquid-crystal formulations with skin-permeation-enhancing abilities for entrapped drugs, *J. Oleo. Sci.*, **60**, 31–40 (2011).
- 46) Todo H., Kimura E., Yasuno H., Tokudome Y., Hashimoto F., Ikarashi Y., Sugibayashi K., Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1394–1399 (2010).
- 47) Scheuplein R.J., Mechanism of percutaneous absorption: transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration, *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79–88 (1967).
- 48) Fujii M., Yamanouchi S., Hori N., Iwanaga N., Kawaguchi N., Matsumoto M., Evaluation of Yucatan micropig skin for use as an *in vitro* model for skin permeation study, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 249–254 (1997).
- 49) Qvist M.H., Hoeck U., Kreilgaard B., Madsen F., Frokjaer S., Evaluation of Göttingen minipig skin for transdermal *in vitro* permeation studies, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 59–68 (2000).
- 50) Marjukka Suhonen T., Bouwstra J.A., Urtti A., Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations, *J.*

- Control. Release*, **59**, 149–161 (1999).
- 51) Thomas N.S., Panchagnula R., Transdermal delivery of zidovudine: effect of vehicles on permeation across rat skin and their mechanism of action, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **18**, 71–79 (2003).
 - 52) Hatta I., Nakazawa H., Obata Y., Ohta N., Inoue K., Yagi N., Novel method to observe subtle structural modulation of stratum corneum on applying chemical agents, *Chem. Phys. Lipids*, **163**, 381–389 (2010).
 - 53) Seki T., Hamada A., Egawa Y., Yamaki T., Uchida M., Natsume H., Kimura S., Ueda H., Evaluation of the effects of absorption enhancers on Caco-2 cell monolayers by using a pore permeation model involving two different sizes, *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1862–1866 (2013).
 - 54) Horita D., Yoshimoto M., Todo H., Sugibayashi K., Analysis on the hair follicle penetration of lidocaine and fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa using hair follicle-plugging method, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **40**, 345–351(2014).
 - 55) Lieb L.M., Liimatta A.P., Bryan R.N., Brown B.D., Krueger G.G., Description of the intrafollicular delivery of large molecular weight molecules to follicles of human scalp skin *in vitro*, *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1022–1029 (1997).
 - 56) Illel B., Schaefer H., Transfollicular percutaneous absorption. Skin model for quantitative studies, *Acta. Derm. Venereol.*, **68** 427–430 (1988).
 - 57) Illel B., Schaefer H., Wepierre J., Doucet O., Follicles play an important role in percutaneous absorption, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 424–427 (1991).
 - 58) Feldmann J.R., Maibach H.I., Regional variation in percutaneous penetration of ¹⁴C cortisol in man, *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 181–183 (1967).
 - 59) Stahl J., Niedorf F., Wohlert M., Kietzmann M., The *in vitro* use of the hair follicle

- closure technique to study the follicular and percutaneous permeation of topically applied drugs, *Altern. Lab. Anim.*, **40**, 51–57 (2012).
- 60) Blume-Peytavi U., Massoudy L., Patzelt A., Lademann J., Dietz E., Rasulev U., Garcia Bartels N., Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **76**, 450–453 (2010).
- 61) Trauer S., Lademann J., Knorr F., Richter H., Liebsch M., Rozycki C., Balizs G., Büttemeyer R., Linscheid M., Patzelt A., Development of an *in vitro* modified skin absorption test for the investigation of the follicular penetration pathway of caffeine, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **23**, 320–327 (2010).
- 62) Otberg N., Patzelt A., Rasulev U., Hagemester T., Linscheid M., Sinkgraven R., Sterry W., Lademann J., The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **65**, 488–492 (2007).
- 63) Teichmann A., Otberg N., Jacobi U., Sterry W., Lademann J., Follicular penetration: development of a method to block the follicles selectively against the penetration of topically applied substances, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **19**, 216–223 (2006).
- 64) Ingram D.L., Evaporative cooling in the pig, *Nature*, **207**, 415–416 (1965).
- 65) Okamoto H., Sakai T., Danjo K., Effect of sucrose fatty acid esters on transdermal permeation of lidocaine and ketoprofen, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1689–1694 (2005).
- 66) Gerasimenko J.V., Tepikin A.V., Petersen O.H., Gerasimenko O.V., Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes, *Curr. Biol.*, **8**, 1335–1338 (1998).
- 67) Horita D., Todo H., Sugibayashi K., Analysis on the pretreatment effect of ethanol

- on the stratum corneum- and hair follicular-penetration of drugs using the hair follicle-plugging method, *Chem. Pharm. Bull.*, **62**, 578–585 (2014).
- 68) Mota M.C., Carvalho P., Ramalho J., Leite E., Spectrophotometric analysis of sodium fluorescein aqueous solutions. Determination of molar absorption coefficient, *Int. Ophthalmol.*, **15**, 321–326 (1991).
- 69) 宇野豊三, 中嶋暉躬, 田中久, 柴崎正勝, 江島昭, 乾賢一, 福田英臣, 杉山雄一(監修): 第十六改正日本薬局方解説書, 廣川書店, 東京, 141-144 (2011).
- 70) Alvarez-Román R., Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., Fessi H., Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles, *J. Control. Release*, **99**, 53–62 (2004).
- 71) Toll R., Jacobi U., Richter H., Lademann J., Schaefer H., Blume-Peytavi U., Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles, *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 168–176 (2004).
- 72) Vogt A., Combadiere B., Hadam S., Stieler K.M., Lademann J., Schaefer H., Autran B., Sterry W., Blume-Peytavi U., 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1316–1322 (2006).
- 73) Lademann J., Richter H., Teichmann A., Otberg N., Blume-Peytavi U., Luengo J., Weiss B., Schaefer U.F., Lehr C.M., Wepf R., Sterry W., Nanoparticles--an efficient carrier for drug delivery into the hair follicles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **66**, 159–164 (2007).
- 74) Hayashi T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Calculation of skin permeability coefficient for ionized and unionized species of indomethacin, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3090–3093 (1992).
- 75) Mao-Qiang M., Feingold K.R., Wang F., Thornfeldt C., Elias P.M., A natural lipid

- mixture improves barrier function and hydration in human and murine skin, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **47**, 157–166 (1996).
- 76) Yardley H.J., Sumerly R., Lipid composition in normal and diseased epidermis, *Pharmacol. Ther.*, **13**, 573–578 (1981).
- 77) Imokawa G., Hattori M., A possible function of structural lipids in the water-holding properties of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, **84**, 282–284 (1985).
- 78) Nakazawa H., Ohta N., Hatta I., A possible regulation mechanism of water content in human stratum corneum via intercellular lipid matrix, *Chem. Phys. Lipids*, **165**, 238–243 (2012).
- 79) Bouwstra J.A., de Graaff A., Gooris G.S., Nijssse J., Wiechers J.W., van Aelst A.C., Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 750–758 (2003).
- 80) Kim Y.C., Park J.H., Ludovice P.J., Prausnitz M.R., Synergistic enhancement of skin permeability by N-lauroylsarcosine and ethanol, *Int. J. Pharm.*, **352**, 129–138 (2008).
- 81) Kim Y.C., Ludovice P.J., Prausnitz M.R., Transdermal delivery enhanced by magainin pore-forming peptide, *J. Control. Release*, **122**, 375–383 (2007).
- 82) Kim Y.C., Ludovice P.J., Prausnitz M.R., Optimization of transdermal delivery using magainin pore-forming peptide, *J. Phys. Chem. Solids.*, **69**, 1560–1563 (2008).
- 83) Karande P., Jain A., Mitragotri S., Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers, *J. Control. Release*, **110**, 307–313 (2006).

- 84) Horita D., Hatta I., Yoshimoto M., Kitao Y., Todo H., Sugibayashi K., Molecular mechanisms of action of different concentrations of ethanol in water on ordered structures of intercellular lipids and soft keratin in the stratum corneum, *Biochim. Biophys. Acta*, **1848**, 1196–1202 (2015).
- 85) Elias P.M., Lipids and the epidermal permeability barrier, *Arch. Dermatol. Res.*, **270**, 95–117 (1981).
- 86) Bouwstra J.A., Gooris G.S., van der Spek J.A., Lavrijsen S., Bras W., The lipid and protein structure of mouse stratum corneum: a wide and small angle diffraction study, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1212**, 183–192 (1994).
- 87) Hatta I., Ohta N., Ban S., Tanaka H., Nakata S., X-ray diffraction study on ordered, disordered and reconstituted intercellular lipid lamellar structure in stratum corneum, *Biophys. Chem.*, **89**, 239–242 (2001).
- 88) Obata Y., Hatta I., Ohta N., Kunizawa N., Yagi N., Takayama K., Combined effects of ethanol and *l*-menthol on hairless rat stratum corneum investigated by synchrotron X-ray diffraction, *J. Control. Release*, **115**, 275–279 (2006).
- 89) Bouwstra J.A., Gooris G.S., Bras W., Downing D.T., Lipid organization in pig stratum corneum, *J. Lipid Res.*, **36**, 685–695 (1995).
- 90) Fujii M., Takeda Y., Yoshida M., Utoguchi N., Matsumoto M., Watanabe Y., Comparison of skin permeation enhancement by 3-*l*-menthoxypropane-1,2-diol and *l*-menthol: the permeation of indomethacin and antipyrine through Yucatan micropig skin and changes in infrared spectra and X-ray diffraction patterns of stratum corneum, *Int. J. Pharm.*, **258**, 217–223 (2003).
- 91) Bouwstra J.A., Gooris G.S., van der Spek J.A., Bras W., Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering, *J. Invest. Dermatol.*,

- 97, 1005–1012 (1991).
- 92) Bouwstra J.A., Gooris G.S., Salomons-de Vries M.A., van der Spek J.A., Bras W., Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study, *Int. J. Pharm.*, **85**, 205–216 (1992).
- 93) Hatta I., Ohta N., Inoue K., Yagi N., Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum, *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 1830–1836 (2006).
- 94) Pilgram G.S., Engelsma-van Pelt A.M., Bouwstra J.A., Koerten H.K., Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature, *J. Invest. Dermatol.*, **113**, 403–409 (1999).
- 95) Blank I.H., Factors which influence the water content of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, **18**, 443–440 (1952).
- 96) Ohta N., Ban S., Tanaka H., Nakata S., Hatta I., Swelling of intercellular lipid lamellar structure with short repeat distance in hairless mouse stratum corneum as studied by X-ray diffraction, *Chem. Phys. Lipids.*, **123**, 1–8 (2003).
- 97) Charalambopoulou G.Ch., Steriotisa Th.A., Haussb Th., Stubosa A.K., Kanellopoulos N.K., Structural alterations of fully hydrated human stratum corneum, *Physica. B.*, **350**, 603–606 (2004).
- 98) Adachi T., Takahashi H., Ohki K., Hatta I., Interdigitated structure of phospholipid-alcohol systems studied by X-ray diffraction, *Biophys. J.*, **68**, 1850–1855 (1995).
- 99) Kwak S., Brief E., Langlais D., Kitson N., Lafleur M., Thewalt J., Ethanol perturbs lipid organization in models of stratum corneum membranes: An

investigation combining differential scanning calorimetry, infrared and ^2H NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 1410–1419 (2012).

- 100) Norlén L., Al-Amoudi A., Stratum corneum keratin structure, function, and formation: the cubic rod-packing and membrane templating model, *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 715–732 (2004).