

ABSTRACT

Cosmetics containing rhododendrol (RD) were voluntarily recalled after incidents of leukoderma related to their use. Users reported using up to five different RD products by layered application. It was hypothesized that layered application increased the skin permeation of RD, resulting in leukoderma. The role of tyrosinase inhibition and melanocyte cytotoxicity of RD was implicated, however, from a pharmaceutical point of view, these provide limited insights on the influence of formulations, and in-use conditions on skin permeation of RD.

In the 1st Chapter, we investigated the effects of layered application, formulations, and their components on the skin permeation of cosmetics containing RD. Experiments were designed to simulate actual in-use conditions, such as varying application volumes, physical mixing of formulations, sequence of cosmetics application and time interval between applications, to establish their effect on permeation. Milk and lotion RD-containing cosmetics (2%), 1% aqueous RD, and preparations of formulation components were applied as the first or second layers as finite doses of 10 or 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$. Permeation experiments were performed through excised porcine ear skin using Franz diffusion cells. Cosmetics applied by layered application exhibited lower skin permeation of RD compared with a single application despite having the same application dose. High initial volume (20 μL at 0 or 5 s) did not exhibit any significant reduction in the permeation of RD. Formulations and their components reduced RD permeation, probably due to changes in thermodynamic activity of the active component. Layered application, formulation components, application volume, time interval and sequence of application had significant influences on the skin permeation of the active component.

Rapid evaporation of solvents occurs from topically applied formulations in finite dose systems which alters the vehicle composition. The finite dose experiment represents clinical use wherein depletion of dose and evaporation of excipients may occur. In the 2nd Chapter, we attempted a mathematical approach for predicting skin permeation and concentration of RD, from complex vehicle-based formulations applied as finite dose. *In vitro* skin permeation and concentration studies of RD were conducted from formulations containing water and polyols with concentrations ranging from 10 – 100% under infinite and finite dose conditions. Observed data for skin permeation and the viable epidermis and dermis (VED) concentration of RD were estimated by the differential equations under Fick's second law of diffusion together with water evaporation kinetics and changes in the partition coefficient from vehicles to the stratum corneum. As a result, a goodness-of-fit was observed allowing accurate estimation of skin permeation and VED concentration of RD.

Finally, we investigated the effects of layered application and other finite dose conditions using an artificial membrane, Strat-M[®]. The use of artificial membranes designed to mimic animal skin offer a competent alternative to estimate skin permeation. However, its usefulness in the assessment of permeation from complex formulations under in-use conditions has not been clarified. Assessment of dermal absorption is ascribed to be performed using porcine skin, hence, it is imperative to establish the equivalency of Strat-M[®]. Permeation of drugs from formulation of high polyol content and residual formulation is increased with an increase in the permeability of the artificial membrane. Barrier integrity of Strat-M[®] is disrupted by high concentration of polyol as evidenced by reduction in electrical impedance. The use of Strat-M[®] in the assessment of dermal permeation may be limited to finite dose conditions and not in concurrent application of formulations and infinite dose conditions.

論文審査の結果の要旨

スキンケア製品は、医薬品や医薬部外品、化粧品に分類されており、近年、美白・しわなどの改善を期待した、いわゆる機能性化粧品が企業や大学により開発されている。

美白成分であるロドデノール (RD) を配合した医薬部外品が開発・販売されたが、使用者に白斑が生じる健康被害が報告され、大きな社会問題となった。白斑を生じた使用者の中には、最大 5 種類の異なる RD 含有製剤を同一部位に複数回適用していることが報告されており、複数回の適用、すなわち多層適用によって RD の皮膚透過量が増加し、その結果、白斑様症状が生じたと仮定された。白斑は、RD がチロシナーゼと結合することにより、過剰に生じた RD 代謝物が細胞傷害性を引き起こすことで生じることが明らかになったものの、RD 皮膚透過量に及ぼす多層適用の影響についての評価・考察はほとんど行われていない。

第 1 章では、RD を含有する医薬部外品製剤からの RD の皮膚透過性に及ぼす多層塗布、剤形、構成成分の影響について調査した。試験条件は、製剤適用量、混合量、適用順序や適用間隔など、実際の化粧品や医薬部外品製剤の使用条件を反映するよう設定した。RD を 2% 含有したローションや乳液および RD を 1% 含有した水溶液を 10 または 20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の有限用量系で多層適用し、フランツ型拡散セルを用い、豚耳皮膚を介した *in vitro* 皮膚透過試験により RD 皮膚透過性を評価した。その結果、同一製剤 10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ を 5 分間隔で 2 回多層適用した場合、20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ で単回適用した場合と比較して RD 皮膚透過量が低下した。一方、20 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の高用量を 5 分間隔で 2 回多層適用した場合は、40 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ で単回適用した場合と比較して透過性に差が認められなかった。また、化粧水の後に乳液を適用すると、同一用量および同一塗布間隔で乳液の後に化粧水を適用したときよりも RD 皮膚透過量が低くなることがわかった。以上の結果から、多層適用では、適用用量、適用間隔、適用順が RD の皮膚透過性に影響を与えることが明らかとなり、RD 透過性がこれらの条件により影響を受けたのは、製剤中の RD の熱力学的活動度の変化と関係していることが推察された。また、RD 皮膚透過量は、同一剤形の高用量適用時に高くなることが明らかとなった。適用量が実用量の 10~100 倍で、皮膚適用した物質濃度が時間の経過によって減少しない実験系、すなわち無限用量系の透過試験では、物質の皮膚透過量と皮膚中濃度の大小関係はほぼ一致し、皮膚透過プロファイルから得られた皮膚/基剤分配係数や皮膚中拡散係数などの皮膚透過パラメータから物質の皮膚中濃度が理論的に算出できる。一方、実用量を適用した有限用量系では、製剤を適用面積内に均一に塗布することの困難さや、基剤中に含まれる揮発成分の蒸発に伴う適用物質の濃度変化のため、無限用量系試験と比較すると皮膚中濃度や皮膚透過量データのばらつきが大きい。また、有限用量系試験では無限用量系とは異なり物質適用後数時間を経過しても皮膚中濃度が一定とならないため、皮膚中濃度推移を評価するには数多くの試験を行う必要がある。

第 2 章では、有限用量系試験で適用した物質の皮膚透過挙動および皮膚中濃度推移を、無限用量系試験より得られた皮膚透過パラメータと有限用量系での揮発成分の蒸発に伴う基剤中の物質の濃度変化を組み込んだ Fick の拡散第 2 法則を用いて予測し、実測値と比較した。RD 含有化粧水の *in vitro* 皮膚透過性および皮膚中濃度測定は、無限および有限用量系の条件下で実施した。有限用量系では化粧水からの水分蒸発に伴い、製剤中の多価アルコール組成比が上昇していくことから、ま

ず、無限用量系で RD 水溶液からの皮膚透過挙動から皮膚透過パラメータ（角層／製剤分配係数 (K_{sc}) 、生きた表皮／製剤分配係数 (K_{ved}) 、角層の拡散係数 (D_{sc}) および、生きた表皮の拡散係数 (D_{ved}) ）を求め、得られた K_{ved} 、 D_{sc} および D_{ved} の値を用いて、10～100%多価アルコール含有製剤からの RD 皮膚透過挙動から各多価アルコール濃度における K_{sc} を求めた。次に、有限用量系での多価アルコール濃度と時間の関係から、各時間における K_{sc} 値 $(K_{sc}(t))$ を得て、これと水分蒸発に基づく製剤中の RD 濃度の変化 $(C_v(t))$ の積を各時間における RD の皮膚分配濃度 $(C_{sc}(t))$ として皮膚透過性および皮膚中濃度予測を行った。有限用量系試験の RD 水溶液からの水の揮発は、1 次速度式で表すことができた。また、有限用量系試験の RD の皮膚透過挙動および皮膚中濃度-時間推移は、 $K_{sc}(t)$ および $C_v(t)$ を考慮することで非常に良好に予測することができた。以上の結果から、有限用量系試験での有効成分の皮膚透過挙動や皮膚中濃度は、無限用量系試験から得られた皮膚透過パラメータおよび基剤からの揮発成分の蒸発速度を考慮することで十分推測可能であると考えられた。

2013 年の EU 化粧品指令第七次改正により、化粧品に含有される新規有用成分および最終製品への動物実験の禁止および動物実験が実施された成分を含有する製剤の輸入・販売が禁止された。日本や海外諸国でも動物実験を行わない流れが加速している。そのため、動物を使用しない動物実験代替法の開発が急務である。経皮吸収の研究分野では、動物皮膚の代わりに使用することができる細胞培養皮膚や人工膜、コンピュータのシミュレーションで安全性を評価する *in silico* 手法の開発が行われている。無限系にて人工膜の Strat-M[®] を介した水基剤からの種々薬物の皮膚透過性はヒト皮膚と良好な相関を取ることが知られているものの、実際に販売されているような複雑な処方製剤からの透過性評価に関する研究は行われていない。そこで第 3 章では、動物実験代替膜として注目されている Strat-M[®] を使用して、有限用量系で単回および多層適用した時の RD および水溶性薬物であるカフェイン (CAF) の膜透過性について調査した。各種製剤からの Strat-M[®] を介した RD の膜透過性は、有限用量系および無限系のいずれの場合でも、豚皮膚透過性と比較して良好な関係が認められた。一方、CAF 透過性は有限用量系でのみ良好な関係が得られた。無限系で適用したときは、製剤中の多価アルコール濃度の増加に伴い CAF 透過量が上昇した。これは、Strat-M[®] の電気インピーダンスの低下から明らかのように、多価アルコールにより Strat-M[®] の透過バリア能を担っている脂質が抽出されたためと考えられた。この結果から、本検討では、有限用量系での評価は、Strat-M[®] でも可能であることが示されたものの、市販品やそれに近い製剤からの Strat-M[®] を介した有効成分の透過性は、製剤処方に含まれる成分の影響を受ける可能性があることがわかった。

以上より、RD の皮膚透過性は、剤形や使用方法の違いによる影響を受けることが明らかとなり、RD 透過性は同一成分の多層適用時に低くなることがわかった。また、化粧品の有効性・安全性を確保するためには、無限用量系で安全性を担保するための有用なデータを得ることおよび、有限用量系で実使用を意識した塗布量および塗布濃度を考慮し、皮内動態を正しく評価する必要があることが考えられた。皮膚代替膜を用いた試験では、試験条件は限られているものの、透過性の差異を十分評価できる可能性が示された。本成果は、近年更に求められている有効性や安全性に優れた化粧品や医薬部外品の開発に寄与するものと考えられた。

本論文は、その新規性および獨創性、研究意義の観点から、本研究科において課程による博士（薬科学）の論文として十分に値するものであると判断した。