

博士論文

グリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行に  
及ぼす基剤の影響因子の解析

平成 25 年度  
坂田 修



# 目次

緒言 .....	1
本論 .....	9
第1章 油剤がグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行に及ぼす 影響因子の解析 .....	11
第1節 Infinite 系および finite 系における油剤からのグリチル レチン酸ステアリルの皮膚移行 .....	12
第1項 Infinite 系における油剤からの SG の皮膚移行 .....	13
第2項 Finite 系における油剤からの SG の皮膚移行 .....	17
第3項 Infinite 系と finite 系の比較 .....	19
第2節 Finite 系におけるグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移 行に及ぼす基剤の影響因子の解析 .....	21
第1項 さまざまな油剤からの SG の皮膚移行 .....	23
第2項 基剤として用いた油剤の物理化学的性質が SG の 皮膚移行に及ぼす影響 .....	25
第3項 油剤の物理化学的性質と SG の皮膚移行との相関 .....	29
第4項 油剤の分子量と表面張力がグリチルレチン酸ステア リルの皮膚移行に及ぼす影響の検証 .....	31
第3節 小括 .....	35
第2章 O/W 型乳剤がグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行に 及ぼす影響 .....	37
第1節 Infinite 系及び finite 系における O/W 型乳剤からの グリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行 .....	38

第1項 Infinite 系における O/W 型乳剤からのグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行 .....	40
第2項 Finite 系におけるグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行及び infinite 系との比較 .....	42
第2節 Finite 系でのグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行に対する界面活性剤の影響 .....	44
第3節 グリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行に対する油相の影響 .....	47
第4節 小括 .....	52
第3章 薬物の性質と油剤の分子量と表面張力が皮膚移行に及ぼす影響 .....	53
第1節 Nile red の皮膚移行に及ぼす油剤の影響 .....	54
第2節 DiI の皮膚移行に及ぼす油剤の影響 .....	58
第3節 DiI の皮膚移行に及ぼす O/W 型乳剤の影響 .....	62
第4節 小括 .....	65
総括 .....	67
実験の部 .....	71
謝辞 .....	83
参考文献 .....	85
略語一覧 .....	91
学位論文を総括した論文 .....	93

# 緒言



## 緒言

皮膚適用製剤による皮膚上からの薬物の投与は薬物投与経路のひとつとして汎用されている。皮膚の構造は最外層から表皮（角層・顆粒層・有棘層・基底層）、真皮、皮下組織と層状の構造をしており(Fig. 1)、皮膚適用製剤として投与された薬物は、皮膚上から皮膚中に分配および拡散していく。皮膚に適用した薬物の皮膚への移行は主に受動拡散である。角層実質を透過していく場合、皮膚に適用された薬物は、①基剤中での拡散、②基剤から角層表面への分配、③角層中での拡散、④角層から顆粒層以下の表皮への分配、⑤生きた表皮・真皮中での拡散、⑥真皮中での血管への移行<sup>4)</sup>、といった経路を経て吸収される。皮膚は最外層の角層が外界からの異物の侵入や水分蒸散のバリアとなっている。さらに角層が脂溶性、顆粒層以下の生きている組織が水溶性であるため、皮膚に適用された薬物は、基剤から皮膚への分配・拡散だけでなく、皮膚中においても、脂溶性である角層と水溶性である顆粒層以下の生きている組織へ移行していく必要がある。皮膚適用製剤には塗布部位局所での作用を目的とする局所作用型製剤と、全身作用を目的とした経皮吸収型製剤があり、経皮吸収型製剤は Drug Delivery System (DDS) の投与方法の 1 つのアプローチとして近年広く使われてきている。皮膚適用製剤の利点として、投与が比較的簡単なことだけではなく、肝臓または消化管での初回通過効果を回避できることがある。さらに剤形による薬物放出制御で局所薬物濃度や血中薬物濃度の維持、副作用のコントロール、コンプライアンスの改善などがあることから、気管支拡張薬や麻薬性鎮痛薬などが実用化されている<sup>1-2)</sup>。また近年では、経皮ワクチンなどの研究も盛んに行わ

れてきている<sup>3)</sup>。他方、局所作用型製剤には、ステロイド外用剤、抗真菌剤、ヘパリン類似物質製剤など皮膚局所での作用を目的とした製剤がある。局所作用型製剤は角層・生きている表皮・真皮といった目的とした部位のみに作用することが望ましく、標的部位での濃度を高め、維持することが重要となる。こういった皮膚局所での作用を目的とした局所適用製剤の一種として化粧品・医薬部外品がある。化粧品・医薬部外品の標的部位は皮膚そのものであり、全身作用を目的としていないという特徴がある。そのため、化粧品・医薬部外品の開発においては、様々な物理化学的性質を持つ化合物をいかに皮膚に移行させるかということだけでなく、成分の血中までの移行を抑え、さらに副作用のない濃度範囲において局所での効果を発揮させるかということが必要となる。

一般的に薬物の経皮吸収は、薬物自身の分配係数( $P$ )と分子量に影響される。皮膚を透過しやすい薬物の物理化学的性質は、一般的に分子量 500 以下で  $\log P$  が 1 から 3 程度である<sup>5-7)</sup>。また、薬物の融点と薬物透過に相関関係があることが知られており、融点が高い薬物の方が皮膚透過がよい<sup>2)</sup>。したがって、これまで実用化されている経皮吸収型製剤に用いられている薬物は、分子量が 500 以下で  $\log P$  が 1 から 3 程度、また融点が高いという物理化学的性質を持つものが多い<sup>1)</sup>。しかし上記条件に当てはまらない化合物も皮膚に適用する製剤では用いられており、特に化粧品・医薬部外品において、極性が高い(水溶性)、低い(高脂溶性)、分子量が大きい、融点が高く溶解性が悪いなど経皮吸収に適さない物理化学的性質の化合物も多く使用されている。そのような皮膚に吸収されにくい化合物としては、ビタミン C 誘導体をはじめとしてフラボノイド類などがあるが、これらの皮膚に移行しにくい化合物の経皮吸収を促進するためにマイクロエマルジョンの利用やマイクロニードルなどの物理的経皮吸収促進法といった様々な研究が行われている<sup>8-10)</sup>。



このような、化粧品・医薬部外品に汎用され、皮膚に移行しにくい物理化学的性質を持っている薬物の 1 つとして、甘草由来成分がある。甘草は、奈良時代に唐から日本に伝来し、それ以来漢方薬の配合剤として広く用いられている<sup>11)</sup>。甘草の薬効成分であるグリチルレチン酸には、抗炎症作用や抗菌作用をはじめ、抗酸化作用など様々な効果が知られており<sup>12-14)</sup>、その誘導体は医薬品としてだけでなく、抗炎症成分として化粧品・医薬部外品に汎用されている。グリチルレチン酸誘導体には大きく分けて、配糖体のグリチルリチン酸類とそのアグリコンであるグリチルレチン酸類がある。グリチルリチン酸類は配糖体であるため、グリチルリチン酸ジカリウムに代表されるように、水溶性かつ高分子量(グリチルリチン酸ジカリウム分子量 899.11; 原子量を炭素 12.01078、水素 1.00783、酸素 15.99943、カリウム 39.09831 として計算)といった物理化学的性質をもつ。また他方、グリチルレチン酸は、難水溶性で高融点化合物(約 300 °C)であるため製剤に応用することが困難である(Fig. 2)。そのため、薬効や製剤への配合性を改善するためにグリチルレチン酸ステアシルが創製された。グリチルレチン酸ステアシル(以下、SG)は、グリチルレチン酸にステアシルアルコールをエステル結合した化合物で、高分子量(MW 723.16)かつ脂溶性(log *P* 15.6)の薬物である(Fig. 3)。SG は、グリチルレチン酸と比較して脂溶性で融点が約 75 °Cと低く、油剤、エタノールへの溶解性がよいため、クリームなど化粧品製剤に配合しやすいという特徴を持っている。そのため化粧品・医薬部外品に汎用されている。また、SG は、抗炎症効果がグリチルレチン酸の約 2 倍とグリチルレチン酸誘導体の中でも高い効果を持つことが知られている<sup>15)</sup>。これまでグリチルレチン酸やグリチルリチン酸の経皮吸収については、マイクロエマルジョンや Ethosome を用いた検討が報告されている<sup>16-18)</sup>が、SG の経皮吸収に関する報告はない。グリチルリチン酸類及びグリチルレチン酸は、化粧品・医薬部外品に汎用されるにも関わらず、経皮吸収に適した物

理化学的性質を持っていない。このため、SG の皮膚移行を制御できれば、より汎用性があり、効果を高めた製剤の開発が可能となる。

本研究では SG の皮膚移行に及ぼす基剤の影響を解明する目的で、Yucatan micropig 摘出皮膚を用いて油性基剤及び O/W 型乳剤からの SG の皮膚移行に関して検討を行った。以下、得られた知見に関して詳述する。

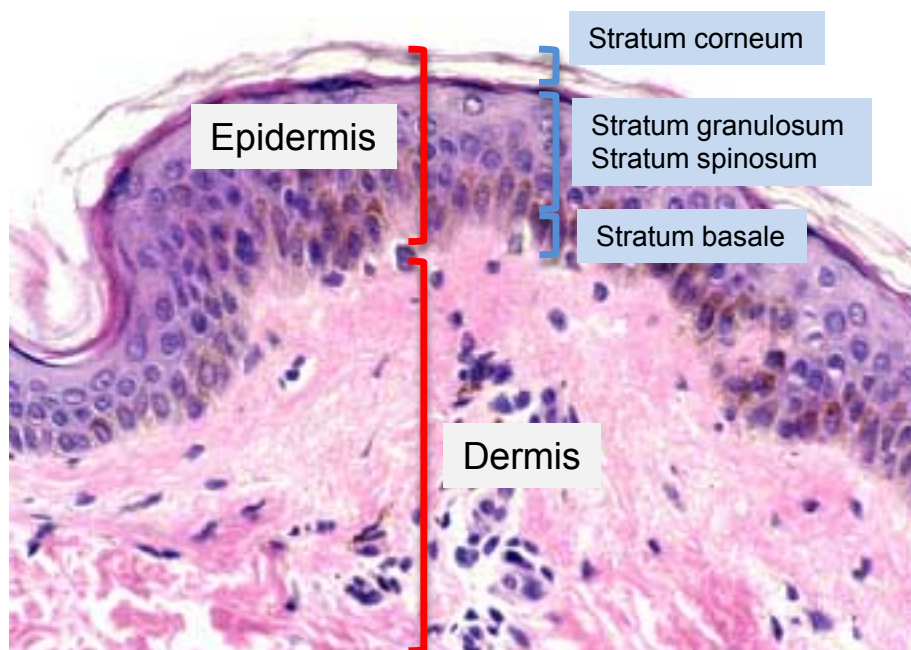
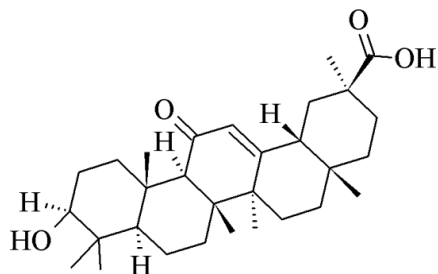


Fig. 1. Structure of the skin

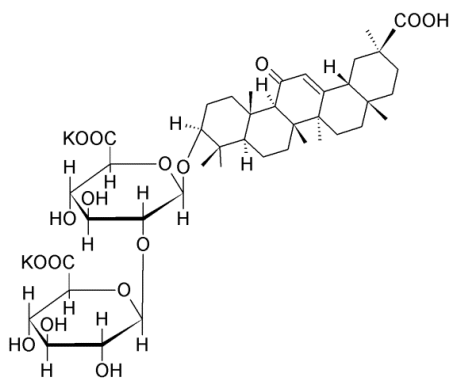
## Glycyrrhetic acid



molecular weight*	470.68
molecular formula*	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>
log <i>P</i> *	6.4
melting point	ca, 300 °C

\* NCBI PubChem Compound

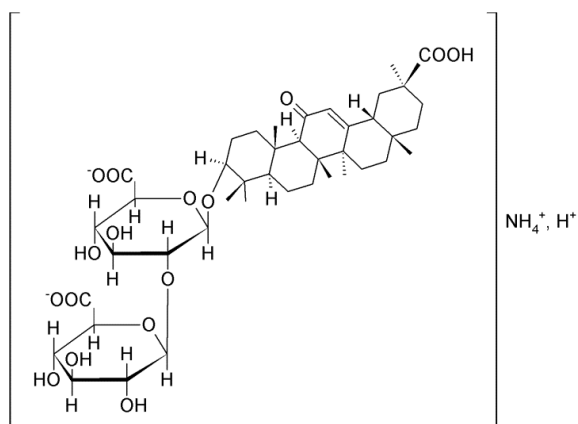
## Dipotassium glycyrrhizinate



molecular weight*	899.11
molecular formula*	C <sub>42</sub> H <sub>60</sub> K <sub>2</sub> O <sub>16</sub>
log <i>P</i> *	-
melting point	-

\* NCBI PubChem Compound

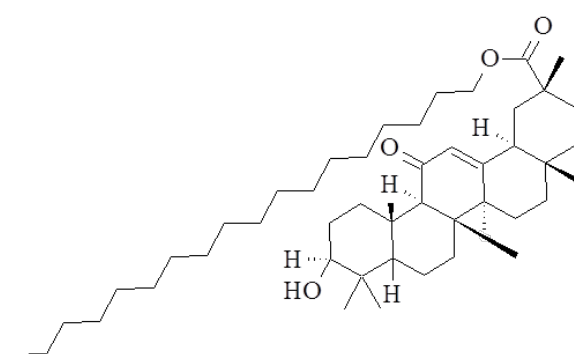
## Monoammonium glycyrrhizinate



molecular weight*	839.96
molecular formula*	C <sub>42</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>16</sub>
log <i>P</i> *	-
melting point	-

\* NCBI PubChem Compound

Fig. 2. Chemical structures and physicochemical properties of glycyrrhetic acid and its derivatives <sup>19)</sup>.



molecular weight*	723.16
molecular formula*	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>4</sub>
log <i>P</i> *	15.6
melting point	ca, 75 °C

\* NCBI PubChem Compound

Fig. 3. Chemical structure and physicochemical properties of stearyl glycyrrhetinate (SG) <sup>19)</sup>.

# 本論



# 第1章 油剤がグリチルレチン酸ステアリルの 皮膚移行に及ぼす影響因子の解析

グリチルレチン酸ステアリル(SG)は、分子量 723 で  $\text{Log } P$  15.6 の薬物であり、油、エタノールには溶解するが、水にはほとんど溶解しない。SG は高分子量かつ高脂溶性であるため、皮膚に移行しにくい物理化学的性質をもつと考えられる。また、SG の皮膚移行についてはこれまで報告がない。

皮膚適用製剤からの薬物の皮膚移行や吸収を検討する実験系としては、infinite 系と finite 系の実験方法がある。Infinite 系は無限用量系の実験方法であり、ドナー側に多量もしくは過剰の薬物を投与することで基剤中薬物濃度を常に一定にするとともに、皮膚内部側であるレセプター相をシンク条件(レセプター側の薬物濃度が無視できるほど小さいとした条件)と仮定した実験系である。この infinite 系では、理論的にはドナー側とレセプター側の濃度勾配が変わらないため、定常状態での薬物の皮膚透過を測定することで、薬物の皮膚への分配・拡散パラメータを Fick の拡散式を用いて算出することができる。

一方、finite 系は有限用量系であり、少量を皮膚に塗布する系のため、ドナー相の濃度が経時的に変化する。そのため、infinite 系と異なり、ドナー相濃度が一定という仮説が成り立たないため、皮膚透過パラメータの算出及び解析は、ラプラス次元や非線形過程を含む拡散モデルによる解析法などが知られているものの解析は困難である<sup>4, 20)</sup>。しかし、finite 系は実際の皮膚適用製剤の塗布条件にあった解析法であり、このため近年では、この finite 系での解析が多く試みられてきている<sup>21-23)</sup>。実際の薬物の塗布条件における挙動を解明すること

は、薬物の効果だけでなく安全性を評価する上でも重要であり、Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of chemicals, Test No. 428 (Skin Absorption: *in vitro* Method) においても、薬物の投与量はヒトの暴露と同等になるように固体は  $1\sim 5\text{ mg/cm}^2$ 、液体は最高  $10\text{ }\mu\text{L/cm}^2$  までと、finite 系での投与量が規定されている<sup>24)</sup>。

そこで、第 1 章では SG の基本的な皮膚への吸収および移行について明らかにする目的で infinite 系及び finite 系における SG の吸収及び皮膚への移行に関して検討を行った。次に、SG の皮膚移行に及ぼす油性基剤の影響を明らかにする目的で finite 系での油性基剤の SG 皮膚移行に対する影響と影響因子について検討した。

## 第1節 Infinite 系および finite 系における油剤からのグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行

SG の油性基剤からの皮膚移行に関して、基礎的な SG の皮膚移行特性を把握する目的で infinite 系および finite 系での SG の皮膚移行について検討を行った。SG の皮膚移行は、基剤として流動パラフィン(LP-C)、オレイルアルコール(B-OLA)を用いて検討した。B-OLA は薬物の角層への分配を増大させる経皮吸収促進効果が知られている油剤である。Infinite 系は無限系であるために基礎的な薬物の皮膚移行特性がわかるという特徴があるが、SG を配合した製剤の実際の使用条件は少量を塗布する系である。そこで、次に実際の使用条件に近い有限系である finite 系で SG の皮膚移行について検討した。さらに infinite 系と finite 系での結果を比較することで、油性基剤からの SG の皮膚移行特性について検討を行った。



## 第1項 Infinite 系における油剤からの SG の皮膚移行

SG の infinite 系での皮膚移行について、B-OLA に経皮吸収促進剤として知られている、*l*-メントール、*N*-メチル-2-ピロリドン (NMP)、エタノールをさらに添加した系<sup>25)</sup>の3種類の処方で検討を行った (Table 1)。*l*-メントールは角層細胞間脂質に作用し、角層での拡散の増大により経皮吸収促進作用を示すことが知られている。また NMP は薬物の溶解性の増大やケラチンへの作用により経皮吸収促進作用を示すことが知られている。Fig. 4 に結果を示す。SG の皮膚移行は皮膚を角層・角層を除いた表皮・真皮の各部位に分離し皮膚中への移行量を測定するとともに、レセプターへの透過量を測定した。24 時間の透過実験において、レセプターからは SG は検出されなかった。SG は高分子量かつ高  $\log P$  の化合物であるが、一般的にこれまで報告されている条件 (分子量 500 以下で  $\log P$  が 1~3 程度が吸収されやすい<sup>5-7)</sup>) から外れており、皮膚透過しにくい化合物であることが明らかとなった。24 時間 SG 適用後の SG の皮膚への移行量は、経皮吸収促進の報告があるオレイルアルコールを基剤として用いた B-OLA 処方と経皮吸収促進の報告がない流動パラフィンを用いた LP-C 処方では有意差がなかった。このことより、Infinite 系での SG の皮膚への移行に対しては、油剤の種類による差はないことが示された。

オレイルアルコールのみの処方である B-OLA とオレイルアルコールにさらに経皮吸収促進剤である NMP、*l*-メントール及びエタノールを添加した系である B-OLA(2)では、B-OLA と比較して皮膚への総移行量はほぼ同じであったが、B-OLA(2)の方が角層を除いた表皮での濃度が約 4 倍増加していた。このことより、NMP や *l*-メントールといった経皮吸収促進剤を使用することで、SG の皮膚移行総量を増やすことはできないが、皮膚の生きた組織への移行割合を増加さ

せることができる可能性が示唆された。しかし、これは経皮吸収促進効果が知られていない流動パラフィンでも同様の結果であり、さらに真皮以下での移行量に差がないことより、SG の皮膚移行に対する経皮吸収促進剤の効果は限定的であることが推察される。

また、すべての処方でSGの皮膚移行量は24時間適用においても投与量に対して皮膚への移行量は0.01%以下であった。このことよりSGは皮膚に移行しにくいことが明らかとなった。SGの油性基剤からのinfinite系での皮膚移行に関して検討を行った結果、SGは24時間の適用においてレセプター相からは検出されず、皮膚を透過しないことが示された。

Table 1. Formulation of SG vehicle.

Ingredient	LP-C	B-OLA	B-OLA(2)
SG	2	2	2
LP-C	98		
B-OLA		98	39
NMP			15
/-menthol			4
ethanol			40

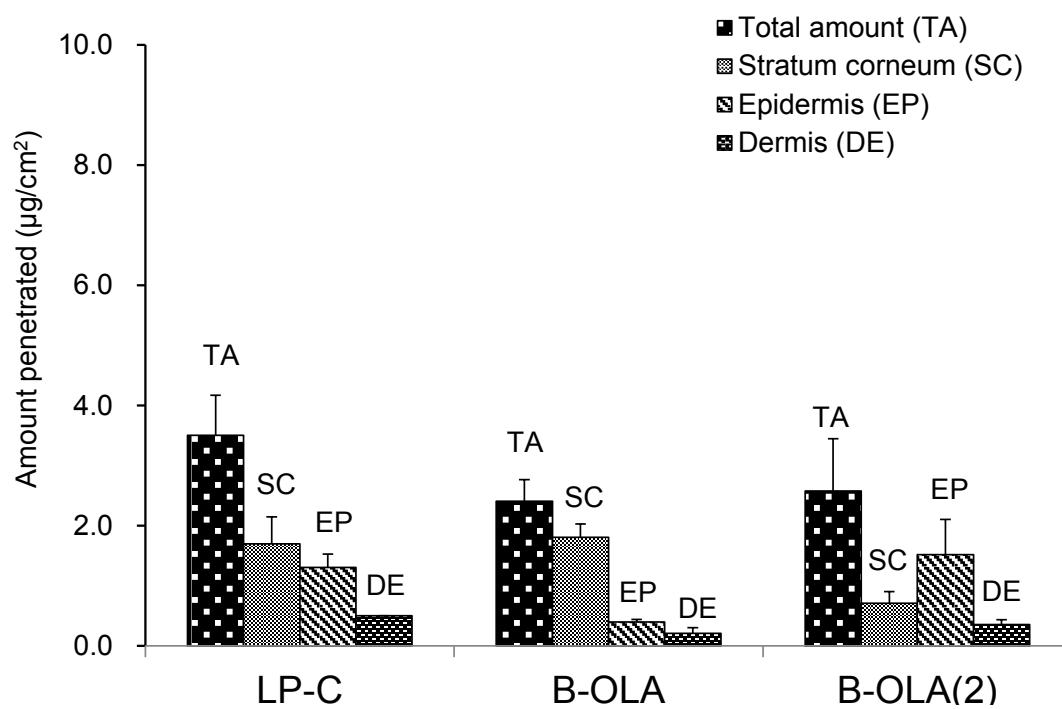


Fig. 4. Amount of SG in each skin section (stratum corneum, epidermis, dermis) after 24-h treatment under infinite dose condition.

Each column represents the mean  $\pm$ S.D. of at least 3 experiments.

## 第2項 Finite 系における油剤からの SG の皮膚移行

SG は infinite 系では、皮膚透過しないとともに皮膚移行量も少ないことが明らかとなった。SG を配合した製剤の実際の使用条件は少量を塗布する系である。そこで、本節では実際の使用条件に近い有限系である finite 系で、流動パラフィン (LP-C) 及びオレイルアルコール (B-OLA) をモデルとして 2% w/v の濃度の SG を  $2.5 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 、YMP 皮膚に適用し検討を行った (Fig. 5)。Finite 系においても SG はレセプターからは検出されなかった。さらに、SG は真皮中からも検出されなかった。LP-C と B-OLA を比較すると、SG の皮膚移行総量は LP-C 基剤の場合が  $6.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、B-OLA の場合が  $1.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  であり、経皮吸収促進作用が知られている B-OLA よりも経皮吸収促進作用が知られていない LP-C の方が約 3.6 倍皮膚移行量が多かった。実際の塗布条件に近い finite 系では、基剤として用いた油剤の種類により SG の皮膚移行量に差があることが示唆された。

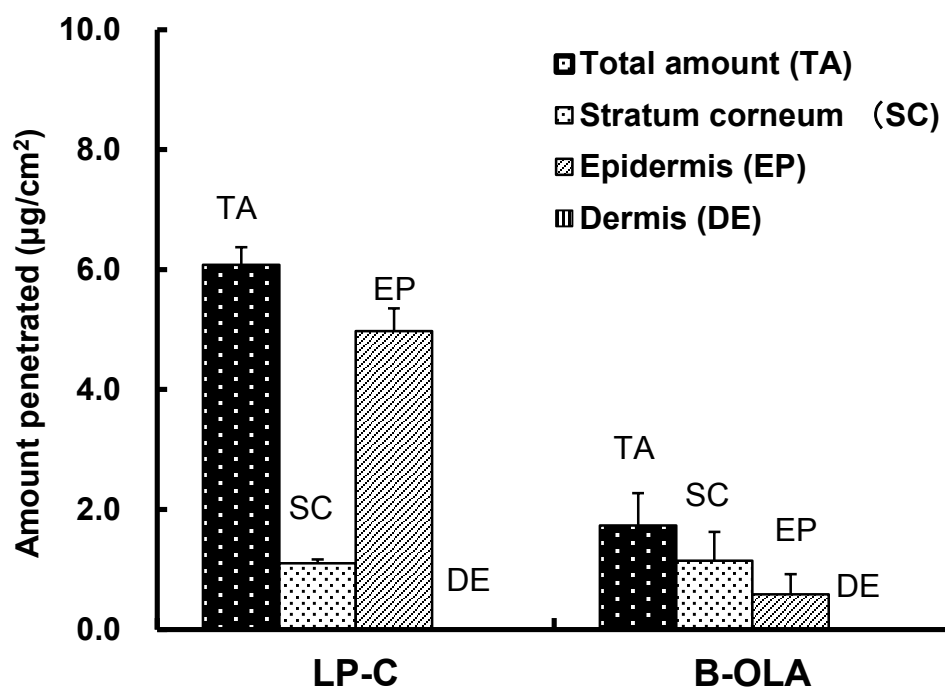


Fig. 5. Amount of SG in each skin section (stratum corneum, epidermis, dermis) after 24-h treatment under finite dose condition.

Each column represents the mean  $\pm$ S.D. of at least 3 experiments.

### 第3項      Infinite 系と finite 系の比較

SG の YMP 皮膚への移行量は、SG の投与量が少ない有限系である finite 系と無限系である infinite 系で比較を行った。Fig. 6 にその比較結果を示す。B-OLA では、infinite 系と finite 系を比較すると、infinite 系の方が約 1.4 倍 SG の皮膚移行総量が多い結果であった。LP-C では逆に、finite 系の方が、約 2 倍皮膚移行総量が多かった。一般的な経皮吸収理論では投与量が多い方が皮膚への移行量が多くなることが知られているが<sup>26)</sup>、LP-C の結果はこれまでの報告とは異なる結果であった。これまで、薬物の透過に関しては、理論的な解析が比較的容易である infinite 系での検討が数多くなされており、その検討に基づいて理論が構築されているが、LP-C での結果より、finite 系における SG という高分子量かつ高脂溶性の化合物の皮膚移行には、一般的に知られている経皮吸収理論とは違うメカニズムが関与していることが示唆された。

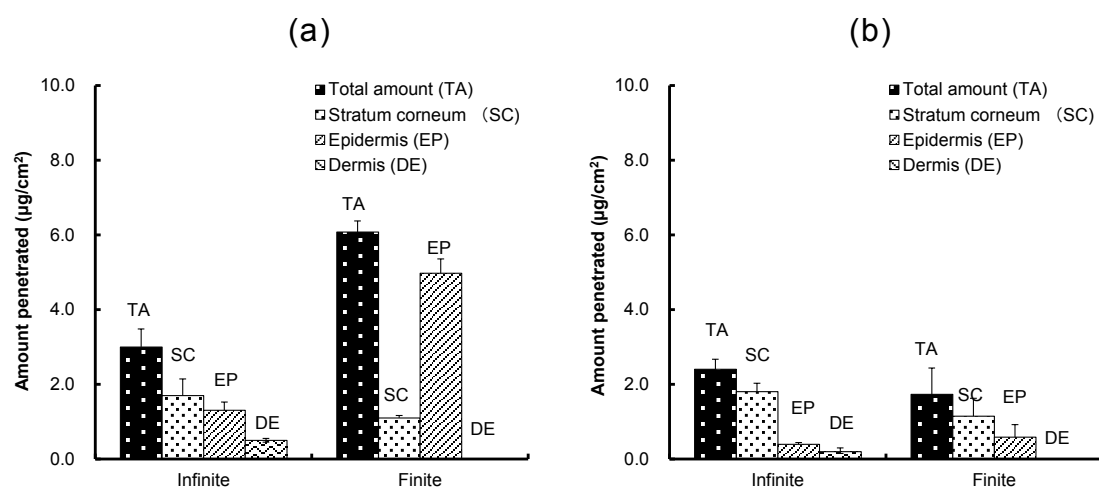


Fig. 6. Amount of SG in each skin section (stratum corneum, epidermis, dermis) after 24-h treatment of (a) LP-C and (b) B-OLA, under infinite and finite dose condition. Each column represents the mean  $\pm$ S.D. of at least 3 experiments.



## 第2節 Finite 系におけるグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行に及ぼす基剤の影響因子の解析

前節までの検討において、infinite 系及び finite 系での流動パラフィン(LP-C)及びオレイルアルコール(B-OLA)からの SG の皮膚移行は、基剤の種類によって異なるとともに、finite 系における SG の皮膚移行は油剤によって異なり、そこにはこれまで知られていないメカニズムが関与していることが示唆された。そこで、SG の皮膚移行に与える油剤の種類について検討する目的で、化粧品で一般的に使われる油剤の中から、脂肪酸、高級アルコール、エステル油、トリグリセライド、炭化水素に分類される油剤を 11 種類選択し、SG の皮膚移行について検討を行った。検討した油剤を Table 2 に示す。薬物の皮膚移行には、基剤中の薬物の活量が影響することが知られているため<sup>3,27)</sup>、SGを飽和溶解度以上(2~7%w/v)、油剤に添加し、懸濁状態で検討を行った。

Table 2. Classification of the various oils.

Oil	Abbreviation	Category
Oleic acid	A-OA	fatty acid
Isostearic acid	A-ISA	
Oleyl alcohol	B-OLA	higher(fatty) alcohol
Octyldodecanol	B-OCD	
Isononyl isononanoate	E-INN	ester oil
Isotridecyl isononanoate	E-IDN	
Cetyl ethylhexanoate	E-CEH	
Neopentyl glycol dicaprato	E-NGD	
Triethylhexanoin	G-THN	triglyceride
Caprylic/capric triglyceride	G-CTG	
Liquid paraffin	LP-C	hydrocarbon oil

## 第1項      さまざまな油剤からの SG の皮膚移行

11 種類の油剤からの SG の皮膚移行を finite 系で検討した。SG の皮膚移行総量を Fig. 7 に示す。SG の皮膚移行は基剤とした油剤の種類によって差があり、最も皮膚移行量の多いオレイン酸 (A-OA) と最も少ないカプリル/カプリン酸トリグリセリド (G-CTG) との間では約 3 倍の皮膚移行量の差があった。個々の油剤間では、SG の皮膚移行量に差があるものの、脂肪酸、高級アルコール、エステル油、トリグリセライド及び炭化水素といった検討した油剤の種類と SG の皮膚移行との間に関係は認められなかった。

また、ラウリン酸やオレイン酸といった脂肪酸、オクタノールやドデカノールといったアルコール、ミリスチン酸イソプロピルのようなエステル類は細胞間脂質の膜流動性の増大といった経皮吸収促進効果が報告されているが<sup>2,4)</sup>、今回検討した中では、これまで経皮吸収促進剤としての報告があるオレイン酸 (A-OA) では SG の皮膚移行量が多い一方、オレイルアルコール (B-OLA)) では少なく、経皮吸収促進が報告されている油剤の方が SG の皮膚移行量が多いという傾向はなかった。

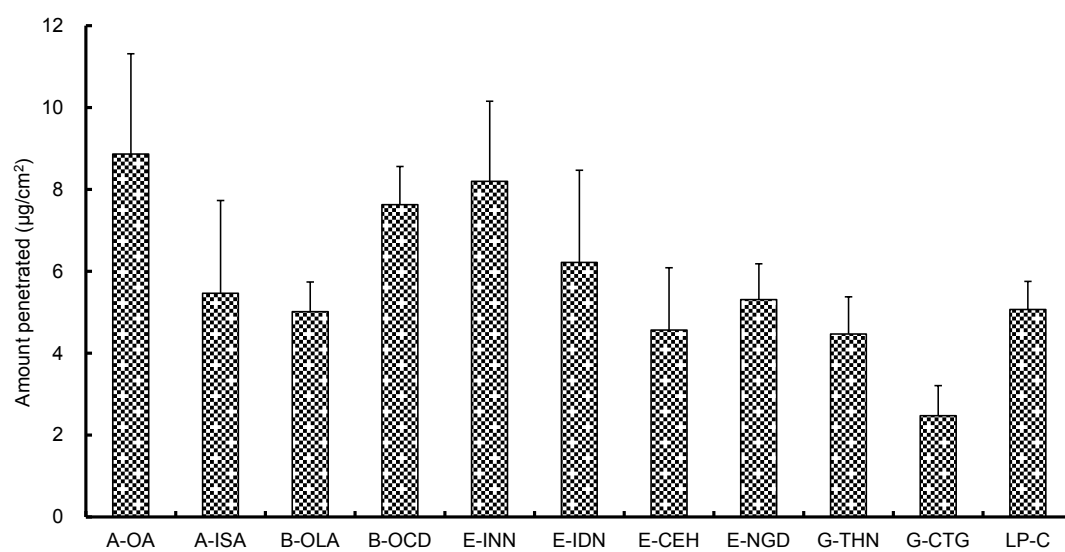


Fig 7. Amount of SG in the skin after a 24 h application using various oils. Each column represents the mean  $\pm$ S.D. of at least 3 experiments.

## 第2項 基剤として用いた油剤の物理化学的性質が SG の皮膚移行に及ぼす影響

SG の皮膚移行は基剤として用いた油剤によって差があった。 Infinite 系における経皮吸収理論は基剤が経皮吸収しないことを前提に構築されているが、実際の使用条件では、基剤も皮膚へ移行し、皮膚の物理化学的性質を変化させることにより、皮膚の透過パラメータを変化させ経皮吸収促進作用を示す可能性があり、基剤の皮膚への移行による影響について報告がなされている<sup>28-30)</sup>。 SG の皮膚移行は、高級アルコールやエステルといった油剤の分類での差は認められなかったため、SG の皮膚移行に影響を与えると考えられる油剤の性質として、分子量・極性・粘度・表面張力・SG の油剤への溶解度のパラメータに着目し、SG の皮膚移行について検討した油剤の物理化学的性質を測定した。 分子量と極性は、基剤である油剤自体の皮膚移行に関与するパラメータとして着目した。 また、基剤の粘度による経皮吸収への影響が報告されている<sup>31)</sup>ことから粘度と、finite 系においては粘度と同様に皮膚上での基剤の挙動に影響していると考えられる表面張力に着目した。 さらに基剤中での薬物の活動度が経皮吸収に影響することから、SG の基剤への溶解度にも着目した。 活動度は薬物の基剤からの逃散傾向の尺度として考えることが出来るパラメータで、活動度の値は物質が基剤中で飽和したときに最大となる。 薬物の経皮吸収は薬物の基剤中での活動度に比例することが知られている<sup>27)</sup>。

極性の評価には有機概念図論に基づいた物性値 (IOB 値) を使用した。 IOB 値の算出においては、主にファンデルワールス力による物性の程度を「有機性」とするとともに、主に電気的親和力による物性の程度を「無機性」と呼び、化合物の物性を「有機性」と「無機性」の組み合わせでとらえる。 IOB 値は、「IOB＝

無機性値(IV)／有機性値(OV)」で表現されるもので値が大きいほど油剤の極性が高い傾向がある<sup>32)</sup>。

検討した各油剤の物理化学的性質を Table 3 に示す。各油剤の物理化学的性質は分子量及び IOB 値は文献値を用いた。油剤の物理化学的性質(①分子量、②IOB 値、③粘度、④表面張力、⑤SG の溶解度)と SG の YMP 皮膚移行量との散布図を Fig. 8 に示す。油剤の物理化学的性質それぞれ単独での値と SG の皮膚移行量との単回帰分析した結果、SG の皮膚移行と油剤の物理化学的性質との間には、分子量のみ有意な相関があったが、これまで皮膚移行への関係が報告されている粘度<sup>31)</sup>など他の物理化学的性質との間には相関がなかった。

Table 3. Physicochemical properties of used oils.

Oil	Oil abbr.	MW <sup>*1)</sup>	IOB( $\alpha^\circ$ ) <sup>*2)</sup>	Viscosity (mPa s) 32 °C	Surface tension (mN/m)	SG solubility (wt %) 25 °C
Oleic acid	<b>A-OA</b>	<b>282</b>	<b>0.42</b>	<b>17.7</b>	<b>31.6</b>	<b>4.63</b>
Isostearic acid	<b>A-ISA</b>	<b>284</b>	<b>0.43</b>	<b>37.9</b>	<b>30.3</b>	<b>5.57</b>
Oleyl alcohol	<b>B-OLA</b>	<b>268</b>	<b>0.28</b>	<b>17.8</b>	<b>30.4</b>	<b>4.44</b>
Octyldodecanol	<b>B-OCD</b>	<b>298</b>	<b>0.26</b>	<b>27.7</b>	<b>28.1</b>	<b>3.39</b>
Isononyl isononanoate	<b>E-INN</b>	<b>284</b>	<b>0.20</b>	<b>4.1</b>	<b>24.8</b>	<b>1.79</b>
Isotridecyl isononanoate	<b>E-IDN</b>	<b>340</b>	<b>0.14</b>	<b>7.4</b>	<b>27.2</b>	<b>1.89</b>
Cetyl ethylhexanoate	<b>E-CEH</b>	<b>368</b>	<b>0.13</b>	<b>7.8</b>	<b>29.1</b>	<b>1.38</b>
Neopentyl glycol dicaprate	<b>E-NGD</b>	<b>412</b>	<b>0.25</b>	<b>11.5</b>	<b>29.1</b>	<b>2.14</b>
Triethylhexanoin	<b>G-THN</b>	<b>470</b>	<b>0.35</b>	<b>20.3</b>	<b>28.2</b>	<b>1.68</b>
Caprylic/capric triglyceride	<b>G-CTG</b>	<b>408</b>	<b>0.33</b>	<b>16.9</b>	<b>28.4</b>	<b>1.53</b>
Liquid paraffin	<b>LP-C</b>	<b>330</b>	<b>0</b>	<b>13.0</b>	<b>29.1</b>	<b>0.41</b>

\*1) NCBI PubChem Compound

\*2) Calculated value

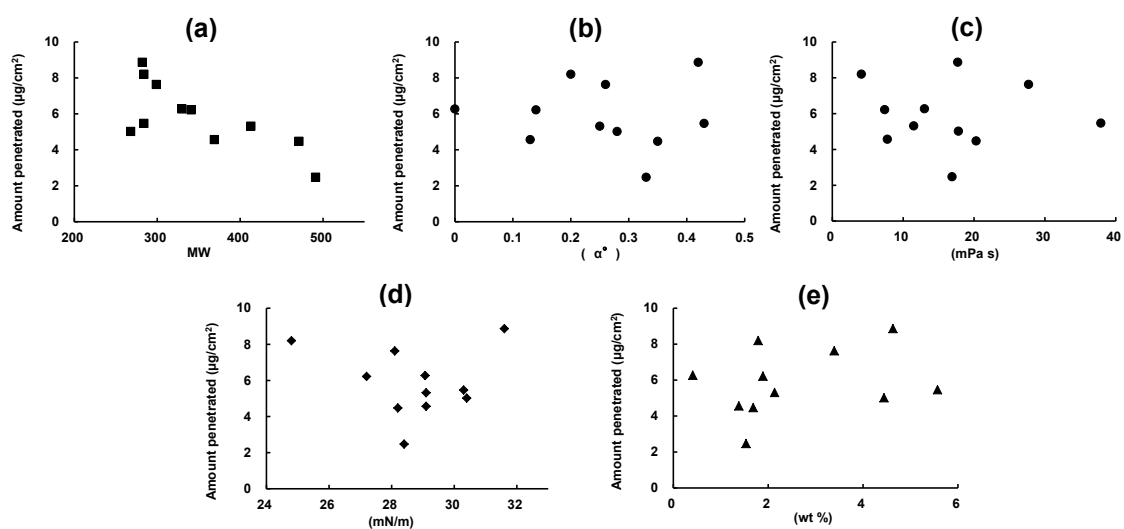


Fig. 8. Relationship between the skin penetration amount of SG and physicochemical properties of oils.

(a) molecular weight, (b) IOB value, (c) viscosity, (d) surface tension and (e) solubility of SG.



### 第3項 油剤の物理化学的性質と SG の皮膚移行との相関

油剤の物理化学的性質と SG の皮膚移行の関係はそれぞれ物理化学的性質の異なる油剤からの結果であり、有意な相関が認められた分子量においてもほぼ同じ分子量で約 2 倍の SG 皮膚移行量の差があった。そこで 1 つのファクターだけに着目するのではなく、SG の皮膚移行量に油剤の他の物理化学的性質も影響しているかを推定するために重回帰分析を行った。

重回帰分析は SG の皮膚移行量と物理化学的性質との間で、説明変数として先に用いた 5 種類の物理化学的性質を用いて変数増減法でステップワイズ法による解析を行った。その結果 SG の皮膚移行量 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) は、以下の予測重回帰式 (Eq. 1) で分子量と表面張力を説明変数として、決定係数  $R^2=0.57$  と比較的精度よく表すことができることが明らかとなった。

$$\begin{aligned} \text{Amount of SG that penetrated the skin } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) = \\ -0.0205 (\mu\text{g}/\text{cm}^2) \times (\text{MW}) - 0.274 (\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{mN}\cdot\text{m}) \times (\text{surface tension})(\text{mN}/\text{m}) \\ + 20.7 (\mu\text{g}/\text{cm}^2) \end{aligned} \quad (\text{Eq. 1})$$

本重回帰分析において、有意確率  $p$  の値は、分子量が  $p < 0.0001$  であり、また表面張力の  $p$  値が  $p < 0.01$  であった。分子量、表面張力ともに  $p$  値は 0.05 以下であり、分子量と表面張力が SG の皮膚移行に対して有意に関与していることが示された。一方、そのほかのパラメータの有意確率  $p$  は、IOB 値:0.11、SG 溶解度:0.48、粘度:0.69 と有意ではなかった。本重回帰分析における分散拡大係数 (variance inflation factor : VIF) は 1.03 であり、多重共線性は認められなかった。また標準化偏回帰係数 (standardised partial regression

coefficient)は、分子量が $-0.69$ であり、表面張力が $-0.19$ であった。このことより、SGの皮膚移行には油剤の分子量が最も強い影響を及ぼすことが明らかとなった。

重回帰分析によるSGの皮膚移行の解析結果より明らかになった影響因子の中で、分子量に関しては基剤自身が皮膚移行することによりSGの皮膚移行に影響を及ぼしたと考えられるが<sup>4)</sup>、表面張力に関しては報告がなく、本研究により基剤の皮膚移行に与える影響因子として新たに見出した可能性が示された。

Finite系において表面張力がSGの皮膚移行に影響する理由として、皮膚上に塗布した基剤は皮膚上へ拡張濡れとして広がっていくと考えられるが、Young-Dupréの式より、表面張力が低い方がより濡れが促進すると推測される<sup>33)</sup>。さらに皮膚の表面には細かな凹凸が存在するが、Wenzel's model<sup>34)</sup>により細かな凹凸が存在することで濡れが進行しやすくなると推測される。その結果、基剤が角層の微細な隙間に入り込むことによる皮膚との接触面積の増大がSGの皮膚移行に関与しているのではないかと推測される。

#### 第4項 油剤の分子量と表面張力がグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行に及ぼす影響の検証

11 種類の油剤からの SG の皮膚移行量と油剤の物理化学的性質を用いた重回帰分析により、SG の皮膚移行には油剤の分子量と表面張力が関与していることが示された。そこで、重回帰分析から得られた推定回帰式 Eq.1 で、SG の皮膚移行が推定できるかどうか、回帰に用いていない油剤を用いて SG の皮膚移行に関して検討を試みた。前項で解析に用いた 11 種類の油性基剤は、脂肪酸、エステル、アルコールなど様々な官能基を持っている。そのため、これら官能基の違いが SG の皮膚移行に影響を及ぼしている可能性も考えられた。そこで、官能基の違いによる影響を排除するため、官能基が同じで異なる物理化学的性質を持つ油剤を用いて検討を行うこととした。このような官能基が同じで異なる物理化学的性質を持つ油剤として、流動パラフィンに着目し、分子量の異なる 4 種類の流動パラフィンを選択した。Table 4 に流動パラフィンの物理化学的性質を示す。

4 種類の流動パラフィン(LP-A、LP-B、LP-C、LP-D)からの SG の皮膚移行について検討した結果を Fig. 9 に示す。その結果、SG の皮膚移行量は流動パラフィンの分子量と表面張力が低下するにつれて有意に増加しており、最も皮膚移行量の多い LP-A と最も少ない LP-D では約 3 倍の有意な皮膚移行量の差があった。この流動パラフィンからの SG の皮膚移行量と、流動パラフィンの分子量と表面張力の値から予測回帰式 Eq. 1 で予測した SG の皮膚移行量との相関を、Fig. 10 に示す。X 軸を予測値、Y 軸を実際の移行量として 4 種類の流動パラフィンの結果をプロットすると、予測値と実測値から得られた値は  $Y=X$  の直線上に並び、よく一致する結果となった( $R^2=0.94$ )。このことより油性基剤からの SG の皮膚移行は、油剤の分子量と表面張力で精度よく説明できる

ことが明らかとなった。

Table 4. Physicochemical properties of various liquid paraffin

Liquid paraffin	Average MW	Surface tension (mN/m)	Viscosity (mPa s) 32 °C	SG Solubility (wt%) 25 °C	IOB(α°)
LP-A	245	27.6	3.0	0.55	0
LP-B	285	28.3	5.7	0.46	0
LP-C	330	29.1	13.0	0.41	0
LP-D	495	30.7	78.2	0.23	0

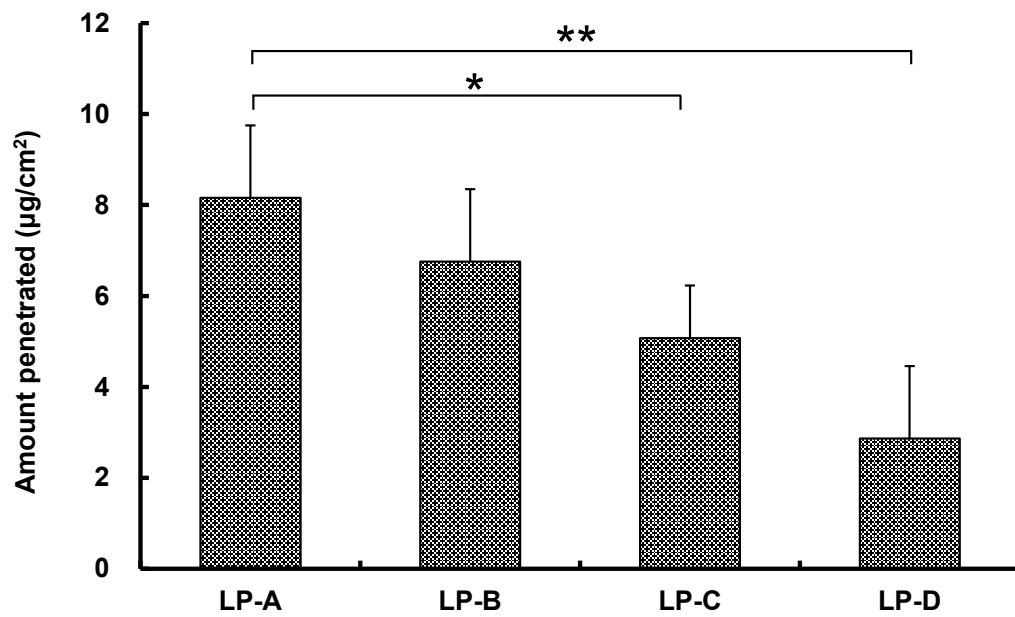


Fig. 9. Effect of various liquid paraffins on the permeation of SG after a 24 h application under finite dose conditions.

Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of at least three experiments.  $**p < 0.01$  and  $*p < 0.05$ , significantly different between each oil.

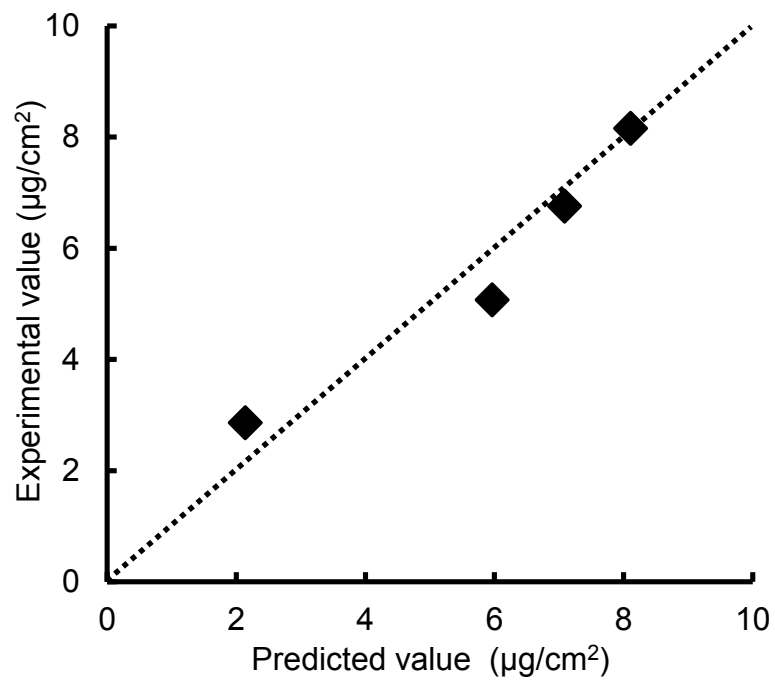


Fig. 10. Relationship between the experimental and predicted amounts of SG.

The predicted amount of SG was calculated using Eq. 1.

The dotted line represents  $Y = X$ .

### 第3節 小括

SG の油性基剤での皮膚移行に関して infinite 系及び finite 系で検討を行った。その結果、SG は 24 時間の適用においてレセプター相からは検出されず、皮膚を透過しないことが示された。SG は高分子量かつ高  $\log P$  の化合物であるが、一般的にこれまで報告されている理論から推察されるように皮膚透過しにくい化合物であることが明らかとなった。Infinite 系における SG の皮膚移行総量には、経皮吸収促進剤による影響はなかった。Finite 系での SG の皮膚移行は、検討した 2 種類の基剤間で 3 倍以上の差があり、基剤の種類によって SG の皮膚移行に差があることが示された。また infinite 系と finite 系での比較では、B-OLA では infinite 系の方が SG の皮膚移行量が多く、通常の間皮吸収理論と同様の結果を示したが、LP-C は finite 系の方が SG の皮膚移行量が約 2 倍多い結果であった。これまで薬物の透過に関しては、理論的な解析が比較的容易である infinite 系での検討が数多くなされており、その検討に基づいて理論が構築されているが、SG という高分子量かつ高脂溶性の化合物の皮膚移行には、通常の間皮吸収理論とは違うメカニズムが関与していることが示唆された。

Finite 系において 11 種類の異なる油剤からの SG の皮膚移行を検討した結果、SG の皮膚移行は基剤として用いた油剤の種類によって差があることが明らかとなった。SG 皮膚移行量と基剤として用いた油剤の物理化学的性質(分子量、IOB 値、粘度、表面張力、SG の溶解度)との間で重回帰分析を行った結果、SG の皮膚移行は分子量と表面張力を説明変数とした推定回帰式で予測できることが明らかとなった。さらにこの推定回帰式で SG の皮膚移行を説明できるか検証した結果、SG の皮膚移行は流動パラフィンの分子量と表面張力から得られる予測値とほぼ一致した。

このことより SG の油剤からの皮膚移行には、基剤として用いた油剤の分子量

と表面張力が関与していることが明らかとなった。薬物の皮膚移行に与える影響因子として分子量はこれまでも報告があったが、表面張力の関与に関してはこれまで報告がなく、SG の皮膚移行に影響を与える因子として新たに見出した。



## 第2章 O/W 型乳剤がグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行に及ぼす影響

第1章では、SGの皮膚移行について油性基剤を用いて検討を行い、SGの皮膚移行特性及び油剤がSGの皮膚移行に与える影響に関して検討を行った。第2章ではO/W型乳剤からのSGの皮膚移行について検討した。油性成分を含む化粧品・医薬部外品の剤形としては、第1章で検討を行った油剤のみで構成される剤形以外にクリーム剤やゲル剤など様々な剤形が用いられているが、その中の一つとしてO/W型の乳剤がある。O/W型の剤形は外相が水系成分、内相が油性成分で構成される剤形である。O/W型の剤形は、水溶性、油溶性両方の薬物を内包することができるとともに、内油相及び外水相に粘度調整剤を添加することで、ローション剤からクリームまで幅広い製剤を作ることが可能である。また化粧品・医薬部外品においても、様々な粘度、性状の製剤を調製可能であるだけでなく、化粧品として重要な塗布時の感触として、外相が水であることに起因するみずみずしい感触を演出することができ、さらに皮膚に塗布した後の感触も調整可能であるため、広く使用されている。

このような特徴を持つ化粧品・医薬部外品で汎用されるO/W型乳剤からのSGの皮膚移行を明らかにすることで、よりSGの皮膚移行を高めた実製剤の開発に応用できる可能性がある。第1章で、基剤として用いた油剤の分子量と表面張力がSGの皮膚移行に関与していることを明らかにした。そこで、さらに水相と油相で構成されるO/W型乳剤において内油相に用いる油剤の分子量と表面張力がSGの皮膚移行に及ぼす影響について検討を行った。

## 第1節 Infinite 系及び finite 系における O/W 型乳剤からのグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行

SG の O/W 型乳剤からの皮膚移行を infinite 系および finite 系で検討した。水と界面活性剤及び流動パラフィンを用いて O/W 型乳剤を調製した。O/W 型乳剤の調製には、高圧乳化を用いることでエマルションの平均粒径を約 200 nm まで微細化し、製剤の安定性を確保した。検討した O/W 型乳剤の処方を Table 5 に示す。乳化剤としてポリオキシエチレン硬化ヒマシ油を用い、内油相として、3 種類の流動パラフィン (LP-A、LP-C、LP-D) を用いた。また、SG の濃度は、第 1 章の油性基剤での検討と油相中の濃度を同じにするため、SG 濃度を 0.5% とした。

Table 5. Formulation of O/W type emulsions

Ingredient	OW-A	OW-C	OW-D
SG	0.5	0.5	0.5
PEG(40EO) monostearate	2	2	2
LP-A	20		
LP-C		20	
LP-D			20
Distilled water	77.5	77.5	77.5

## 第1項 Infinite系におけるO/W型乳剤からのグリチルレチン酸ステア ルの皮膚移行

SGのinfinite系におけるO/W型乳剤からの皮膚移行に関して検討を行った。その結果をFig. 11に示す。24時間の透過実験において、どの処方においてもSGは真皮及びレセプター相からは検出されなかった。また24時間O/W型乳剤適用後のSGの皮膚への移行総量は、3種類の流動パラフィン間で有意差はなかった。SG投与量と油剤分散系の結果と比較すると、SGの濃度が違うため単純比較はできないと考えられるが、皮膚移行総量は油剤分散系よりも少なかった。O/W型乳剤は外相が水であるため、無限系であるinfinite系では主に皮膚に接するのは水相である。外相の水にはSGが溶解しないため、油溶性であるSGの皮膚移行が油性基剤よりも低下したことが示唆される。

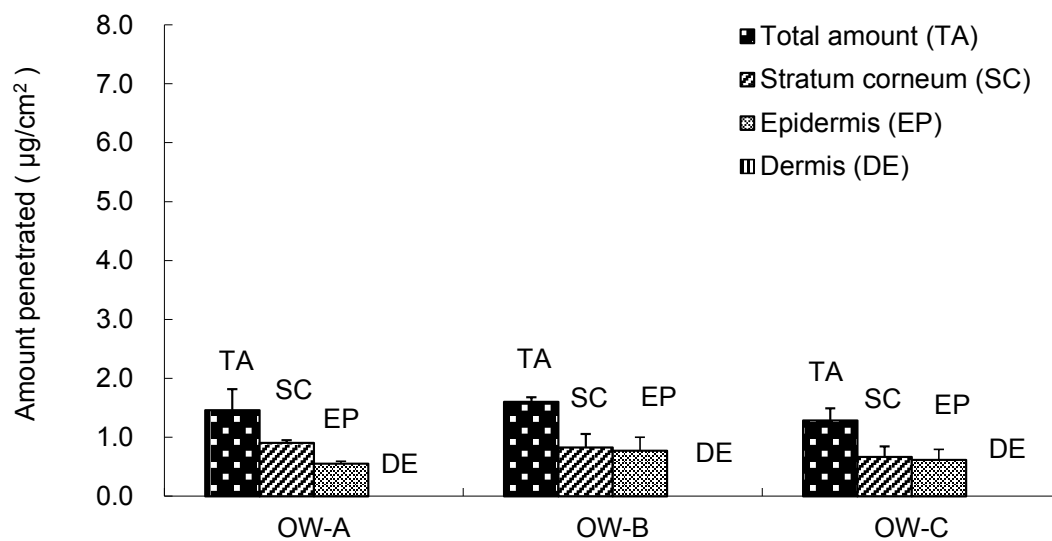


Fig. 11. Amount of SG in each skin section (stratum corneum, epidermis, dermis) after 24-h treatment under infinite dose condition.

Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of at least 3 experiments.

## 第2項      Finite 系におけるグリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行及び infinite 系との比較

SG の finite 系での皮膚移行に関して検討を行った。LP-C を内油相とした O/W 型乳剤 (OW-C) を用い、24 時間、 $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度で YMP 皮膚に適用した。結果を Fig. 12 に示す。Finite 系においても SG は真皮およびレセプター相からは検出されなかった。Finite 系では infinite 系と比較して約 3.8 倍 SG の皮膚移行量が増加していた。また、皮膚の部位ごとの移行量を比較すると、角層への移行量は finite 系と infinite 系でほぼ同様であったが、finite 系では表皮への SG 移行量が増加していた。これは油剤分散系での LP-C の結果と同様であった。このことより、O/W 型乳剤においても、SG の皮膚移行は油剤分散系と同様の挙動を示すことが示唆される。O/W 型乳剤の infinite 系に対する finite 系の SG 皮膚移行量の増加率は油性基剤の約 2 倍であり、O/W 型乳剤とすることで、より SG の皮膚移行を高めることができる可能性が考えられる。

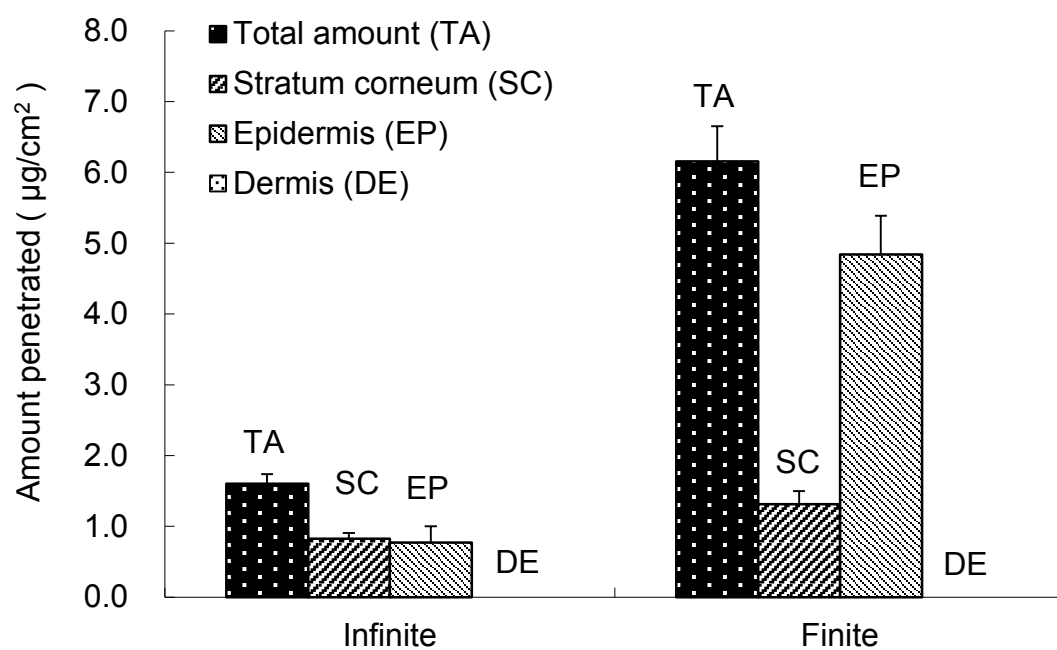


Fig. 12. Amount of SG in each skin section (stratum corneum, epidermis, dermis) after 24-h treatment of OW-C under finite and infinite dose conditions.

Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of at least 3 experiments.

## 第2節 Finite 系でのグリチルレチン酸ステアシルの皮膚移行に対する界面活性剤の影響

O/W 型乳剤は油性成分を界面活性剤を用いて水中に分散している。界面活性剤は通常 O/W 型乳剤を調製するにあたって必要である。しかし界面活性剤は、種類によって薬物の経皮吸収に影響を及ぼすことが知られており<sup>35)</sup>、SG の皮膚移行においても、界面活性剤の種類によって皮膚移行量が異なる可能性がある。そこで化粧品、医薬部外品に用いる 6 種類の界面活性剤を用いて、SG の皮膚移行に与える O/W 型乳剤の乳化に用いた界面活性剤の影響について検討を行った。

O/W 型乳剤の界面活性剤として、化粧品に使われる陰イオン(アニオン)系界面活性剤、非イオン(ノニオン)系界面活性剤、両性界面活性剤の中から、ステアロイルグルタミン酸 Na(SSG)、ショ糖脂肪酸スクロース(SMS)、ポリソルベート 80(PO80)、ステアリン酸ポリエチレングリコール(PMS)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(HCO)、水素添加大豆リン脂質(HSL)を選択し、O/W 型乳剤を調製した。検討した O/W 型乳剤の処方を Table 6 に示す。乳剤は高圧乳化を用いて調製し、それぞれ約 200nm にサイジングした。調製した乳剤はいずれも良好な安定性を示した。

6 種類の界面活性剤を用いて調製した O/W 型乳剤からの SG の皮膚移行総量を Fig. 13 に示す。界面活性剤として HCO、SSG および PMS を使用した乳剤の SG 皮膚移行量が比較的多かったが、それぞれの界面活性剤の違いによる SG の皮膚移行量には有意差がなかった。このことより、O/W 型乳剤からの SG の皮膚移行に乳化に用いた界面活性剤は影響しないことが示唆される。



Table 6. Formulation of O/W type emulsions with various surfactants.

Ingredient	Abbr.	SSG	SMS	PO80	PMS	HCO	HSL
SG		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Sodium N-stearoyl-L-glutamate	SSG	5					
Sucrose monostearate	SMS		5				
Polysorbate 80	PO80			5			
PEG(40EO) monostearate	PMS				5		
PEG-60 hydrogenated castor oil	HCO					5	
Hydrogenated soybean lecithin	HSL						5
LP-C	LP-C	20	20	20	20		20
Distilled water		74.5	74.5	74.5	74.5	74.5	74.5

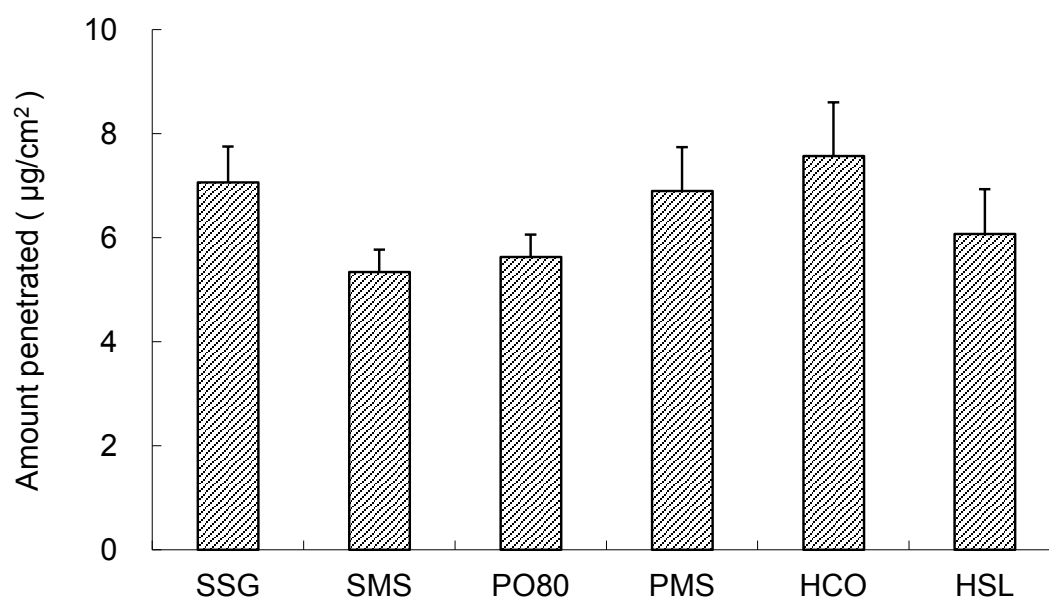


Fig. 13. Amount of SG in the skin after 24 h application with O/W emulsion emulsified by various surfactants under finite dose condition.

Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of 4 experiments.

### 第3節 グリチルレチン酸ステアリルの皮膚移行に対する油相の影響

第1章において、finite系における油性基剤からのSGの皮膚移行には、油剤の分子量と表面張力が影響を及ぼすことを明らかにした。O/W型乳剤においても、油性基剤での検討結果と同様に、SGの皮膚移行はinfinite系よりもfinite系において増加した。そこでO/W型乳剤からのSGの皮膚移行について、内油相の油剤の物理化学的性質の違いがどのように影響するか検討を行った。

O/W型乳剤の内油相として分子量及び表面張力が異なる流動パラフィン(LP-A、LP-C、LP-D)を用い、乳化剤としてポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(HCO)を用いてO/W型乳剤を調製した。Finite系におけるO/W型乳剤は皮膚に塗布した後、外相の水が蒸発もしくは皮膚に移行し、一定時間経過後には皮膚上に内油相が残ることが予測される。その結果、内油相に含まれるSG及びHCO、そして流動パラフィンが皮膚上に残ると考えられる。そこで、比較のために外相の水が蒸散した後に残る油相区分のみについてもoil residueとして皮膚移行を検討した。検討したO/W型乳剤および油相区分の処方をTable 7に示す。O/W型乳剤とoil residueでは、SGの濃度が違うためSGの投与量を同じにするために、O/W型乳剤は、OECDガイドライン<sup>24)</sup>を参考にし、一般的な塗布量の範囲である10  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の量で皮膚に適用し、oil residueでは2.5  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 皮膚上に塗布した。投与したO/W型乳剤の内油相の量はoil residueとほぼ同じであった。

内油相として、分子量及び表面張力が異なる流動パラフィン(LP-A、C、D)を用いたO/W型乳剤からのSGの皮膚移行量をFig. 14に示す。SGの皮膚移行量は、O/W型乳剤においても、油剤の結果と同様に油剤として用いた流動パ

ラフィンの分子量と表面張力が増加するにつれて皮膚移行量が減少しており (LP-A > LP-C > LP-D)、分子量及び表面張力の低い流動パラフィンを内油相に用いた方が、有意に皮膚移行量が多い結果であった。

次に O/W 型乳剤と O/W 型乳剤の油相部分との比較結果を Fig. 15 に示す。O/W 型乳剤の油相部分においても流動パラフィンの分子量と表面張力が増加するにつれて SG の皮膚移行量が減少していた (LP-A > LP-C > LP-D)。また、O/W 型乳剤と油相区分との比較では、O/W 型乳剤の方が有意に SG の皮膚移行量が増加しており、LP-A では約 1.5 倍 O/W 型乳剤の方が SG の皮膚移行量が多かった。

このことより、SG を油性製剤として投与するよりも、O/W 型乳剤とすることで SG の皮膚移行量を増加させることができることが示された。この O/W 型乳剤による SG 皮膚移行量の増加は、外相の水が角層に吸収されることによる皮膚の水和や、O/W 型乳剤の外水相が水和・蒸発する際に油相が皮膚に移行する pulling effect が影響している可能性が考えられる<sup>29)</sup>。

Table 7. Formulation of O/W type emulsions and oil residues.

Ingredient	Emulsion	Oil residue
SG	0.5%	2%
PEG-60 hydrogenated castor oil	5%	20%
LP-A	20%	q.s.
LP -C		
LP -D		
Distilled water	q.s.	

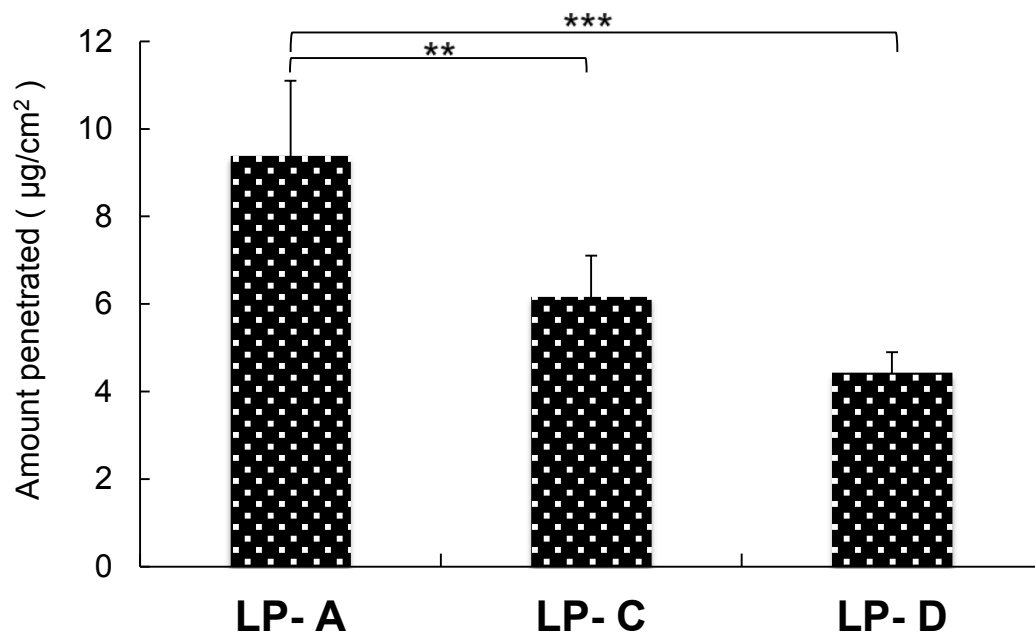


Fig 14. Amount of stearyl glycyrrhetinate (SG) penetration in the skin 24 h after application of an oil-in-water (O/W) emulsion by using 3 types of liquid paraffin (LP).

Emulsions (SG, 0.5% w/v) were applied at 10  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of 4 experiments. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

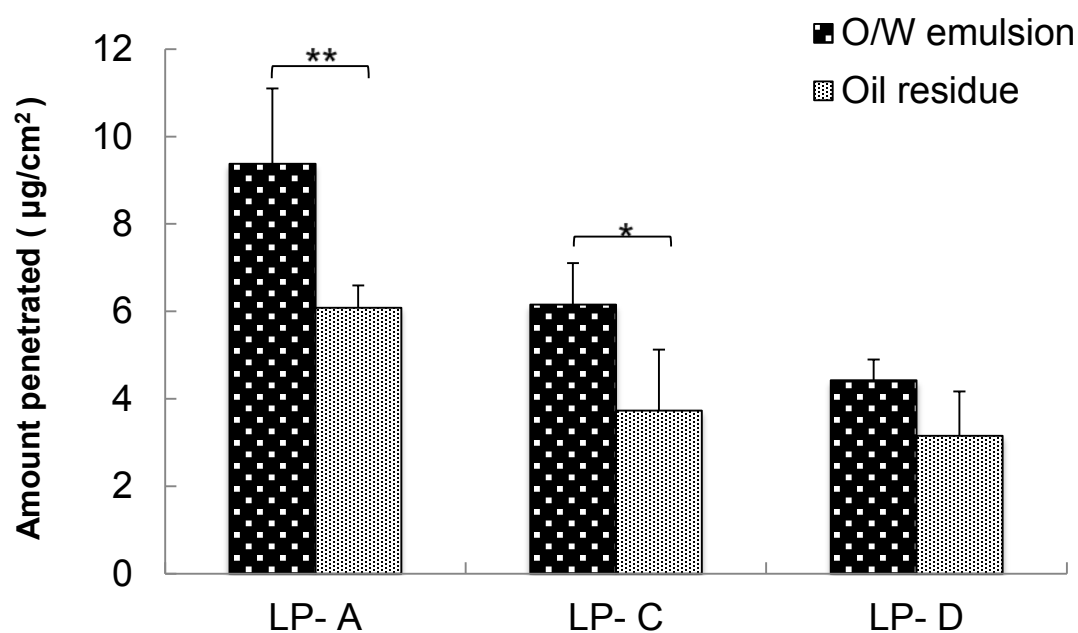


Fig 15. Amount of stearyl glycyrrhetinate (SG) penetration in the skin 24 h after application of an oil-in-water (O/W) emulsion or a corresponding oil phase preparation, by using 3 types of liquid paraffin (LP).

Emulsions (SG, 0.5% w/v) and oil phase preparations (SG, 2% w/v) were applied at 10 and 2.5  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , respectively (50  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  SG). Each column represents the mean  $\pm$  S.D. of 4 experiments. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 第4節 小括

SG の O/W 型乳剤からの皮膚移行に関して infinite 系及び finite 系で検討を行った。その結果、SG は 24 時間の適用において infinite 系及び finite 系のどちらからもレセプター相および真皮からは検出されず、皮膚を透過しないことが示された。皮膚移行量は、第 1 章で検討した油剤分散系と比較しても低い値であり、O/W 型乳剤の皮膚移行は infinite 系では、低いことが示唆される。また、finite 系での SG の皮膚移行の増加量は、油剤分散系では infinite 系の約 2 倍であったのに対し、O/W 型乳剤では、約 3.8 倍と油剤分散系と比較して 2 倍近く増加した。このことより O/W 型乳剤にすることにより、より SG の皮膚移行を高めることができることが示唆される。Finite 系における O/W 型乳剤からの SG の皮膚移行は、内油相の油剤として低分子量及び低表面張力の油剤を用いることで、有意に SG の皮膚移行量が増加した。これは油性基剤の結果と同様であり、外相の水が蒸散または皮膚に移行後、皮膚上に残った内油相の物理化学的性質が SG の皮膚移行に影響を及ぼしていることが示唆される。



## 第3章 薬物の性質と油剤の分子量と表面張力が皮膚移行に及ぼす影響

第1章及び第2章で、皮膚移行についてこれまで報告のないSGの皮膚移行について検討を行った。その結果、高分子量かつ高脂溶性の化合物であるSGの皮膚移行には、基剤として用いた油剤の分子量と表面張力が関与していることが明らかとなった。そこで第3章では、基剤として用いた油剤の分子量と表面張力がSG以外の薬物の皮膚移行に対してどのような影響を及ぼすのか検討を行った。

油剤が皮膚移行に及ぼす影響を可視化するために、モデル化合物として物理化学的性質の異なる蛍光物質を用い、皮膚移行に対する油剤の性質の影響を評価した。評価には、経皮吸収しやすいと考えられる物理化学的性質を持つ蛍光物質と、SGと同様に高分子量かつ高脂溶性で皮膚に移行しにくいと考えられる蛍光物質の2種類を用いた。分子量が500以下であり、 $\log P$ も3付近で皮膚に移行しやすいと考えられる物理化学的性質を持つモデル化合物として、Nile red（分子量: 318、 $\log P$ : 3.8）、SGと同様に皮膚移行しにくい化合物としてDiI（分子量: 834、 $\log P$ : 23.2）を選択し、分子量及び表面張力の異なる流動パラフィンを基剤として用いてそれぞれの蛍光物質の皮膚移行について検討を行った。

## 第1節 Nile red の皮膚移行に及ぼす油剤の影響

Nile red は赤色蛍光を持つ脂溶性の化合物であり、一般的には細胞内脂肪滴の染色などに用いられる。Nile red は分子量 318、 $\log P$  3.8 と皮膚に移行しやすい物理化学的性質を持つため、皮膚適用製剤として用いられる薬物のモデルとして選択し、infinite 系及び finite 系で検討を行った。Nile red の構造を Fig. 16 に示す。

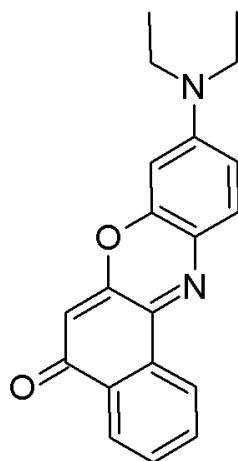


Fig. 16. Structure of Nile red.

Nile red を分子量及び表面張力が異なる流動パラフィン(LP-A、LP-B、LP-C、LP-D)に分散し、infinite 系および finite 系で 2 時間適用した。適用後、皮膚切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)で Nile red の皮膚への移行を観察した。Fig. 17 に皮膚切片画像を示す。Nile red は infinite 系、finite 系のどちらにおいても、LP-A 及び LP-D の両方で皮膚へ移行した。2 時間の適用時間において、Nile red は表皮にまで移行していたとともに、移行量に濃度勾配が観察された。Infinite 系と finite 系を比較すると、投与量の多い無限系である infinite 系の方が皮膚移行量は多かった。

さらに finite 系では、異なる分子量及び表面張力を持つ流動パラフィンからの Nile red の皮膚移行深度を測定した結果を Fig. 18 に示す。Nile red の皮膚への移行深度は、いずれも 12  $\mu\text{m}$  であり、基剤として用いた流動パラフィンの分子量及び表面張力に影響されなかった。これらの結果より、油剤の分子量及び表面張力は、Nile red の皮膚移行には影響しないことが示唆される。

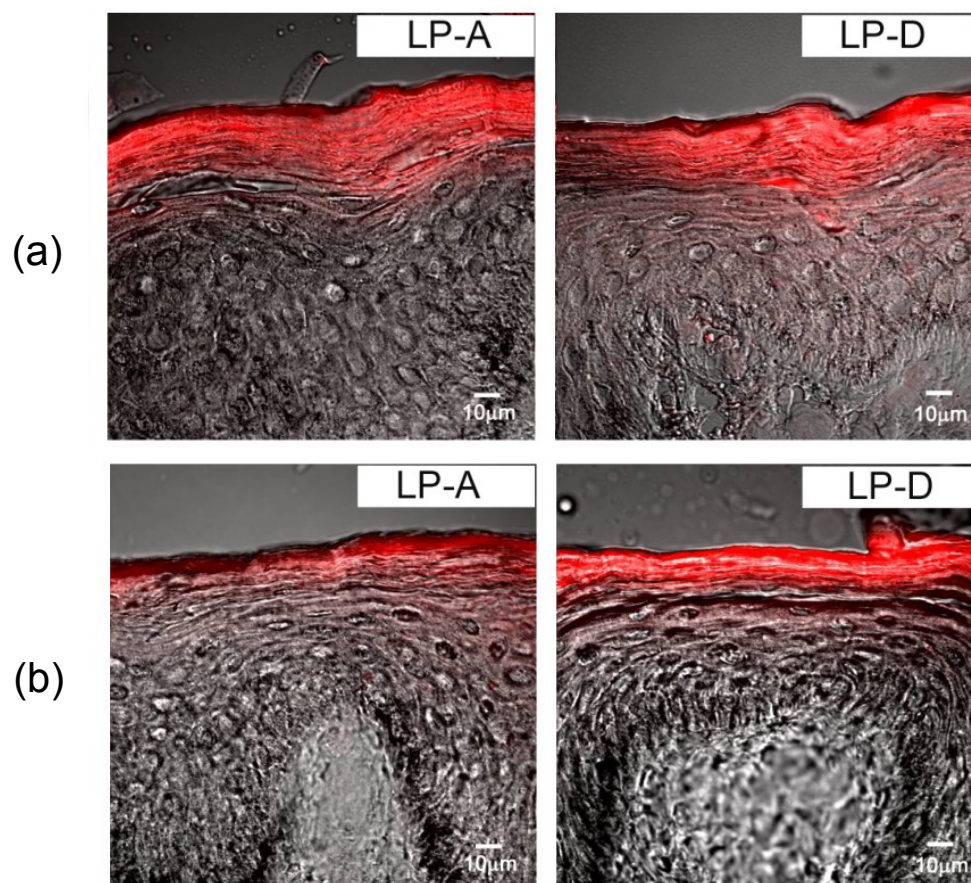


Fig. 17. Cross-section of YMP skin sample observed by CLSM after the application of the fluorescent dyes Nile red as a suspension in LP-A and LP-D under the infinite dose condition (a) and the finite dose condition (b).

Bar in the photographs, 10 μm.

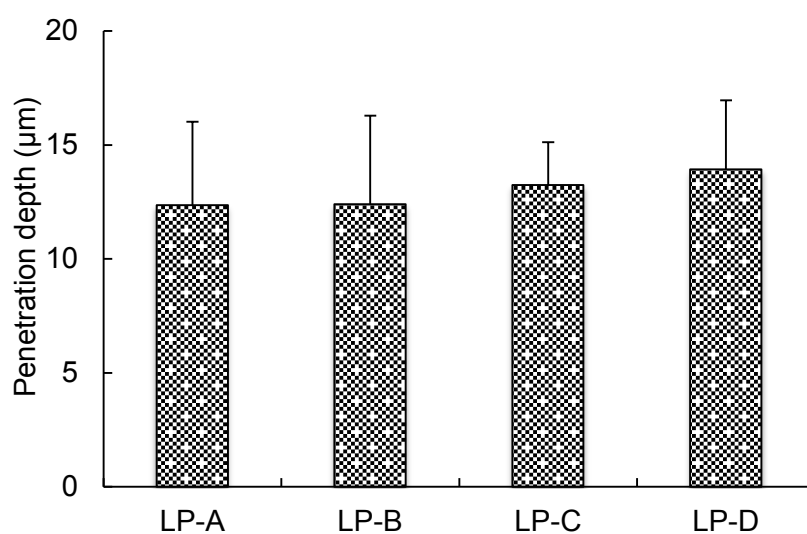


Fig. 18. Penetration depth of Nile red into YMP skin 2 h after application under the finite dose condition.

Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 100; 10 points  $\times$  10 areas)

## 第2節 DiI の皮膚移行に及ぼす油剤の影響

SG と同様に高分子量かつ高脂溶性を持つ化合物のモデルとして DiI の皮膚移行について infinite 系及び finite 系で検討を行った。DiI は Nile red と同様に赤色蛍光を持つ脂溶性カルボシアニン色素であり、脂質二重層を染色するため、細胞膜染色に使用される。DiI は分子量 834、 $\log P$  23.2 と SG と同様に分子量 500 以上で高脂溶性のため、皮膚に移行しにくい物理化学的性質を持つ化合物のモデルとして選択した。DiI の化学構造を Fig. 19 に示す。

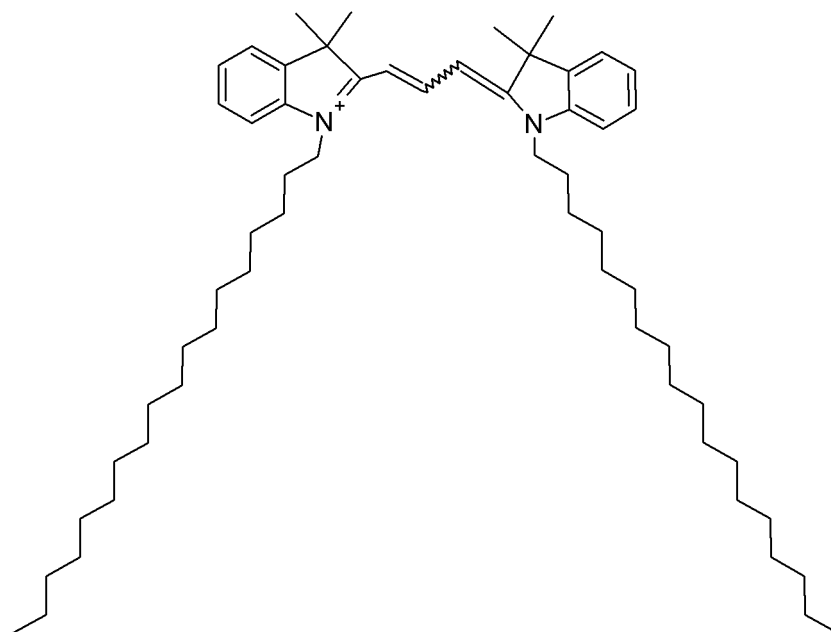


Fig. 19. Structure of DiI.

DiI は Nile red と同様に、分子量及び表面張力が異なる流動パラフィン(LP-A、LP-B、LP-C、LP-D)に分散し、YMP 皮膚に適用した。2 時間または 24 時間適用後、皮膚切片を作成し、CLSM で DiI の皮膚への移行を観察した。さらに finite 系では皮膚内部へ移行した深さを測定した。Fig. 20 に皮膚切片画像を示す。DiI は infinite 系では LP-A、LP-D の両方とも皮膚に移行しなかった。

Finite 系では LP-D では角層表面のみに DiI がとどまっているのに対し、LP-A では角層全層への移行が認められ、分子量・表面張力がより低い流動パラフィンである LP-A 方が DiI の皮膚移行量が多い結果であった。また、24 時間適用後の結果においても全体的に皮膚移行量が増えていたが、同様の結果であった。

次に finite 系での異なる分子量及び表面張力を持つ流動パラフィンからの DiI の皮膚移行深度を Fig. 21 に示す。DiI の皮膚への移行深度は、基剤として用いた流動パラフィンの分子量及び表面張力に影響され、流動パラフィンの分子量及び表面張力が低いほど皮膚への移行深度が深かった。

これらの結果は、分子量と表面張力が低い油剤の方が皮膚移行量が多いという油性基剤からの SG の皮膚移行と同様であり、分子量が 500 以上で高脂溶性である DiI の皮膚移行は基剤として用いた油剤の分子量と表面張力に影響されることが明らかとなった。

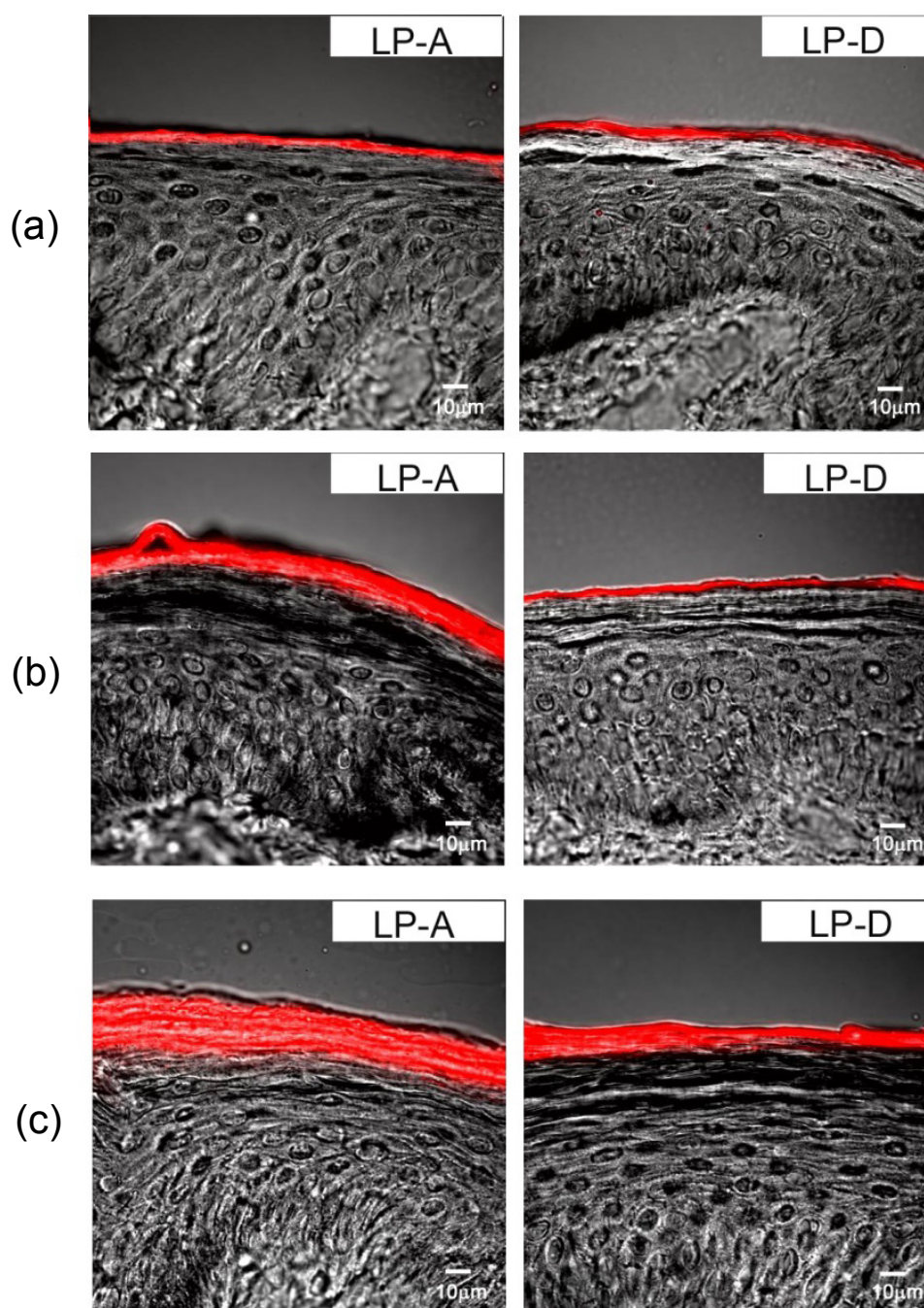


Fig. 20. Cross-section of a YMP skin sample observed by CLSM after the application of the fluorescent dyes DiI as a suspension in LP-A and LP-D under the infinite dose condition (a) and the finite dose condition (b), (c). (a), (b), 2 h application and (c), 24 h application.

Bar in the photographs, 10 μm.



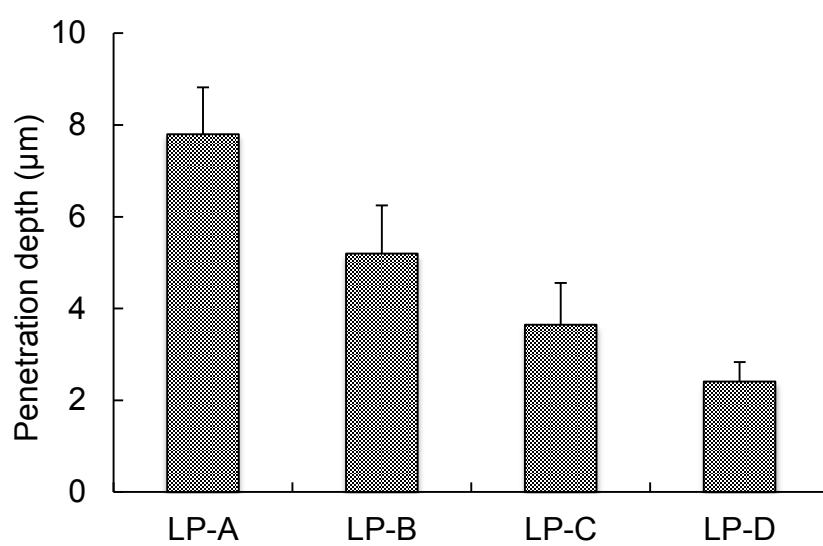


Fig. 21. Penetration depth of DiI into YMP skin 2 h after their application under the finite dose condition.

Each column represents the mean  $\pm$  S.D. (n = 100; 10 points  $\times$  10 areas)

### 第3節 DiI の皮膚移行に及ぼす O/W 型乳剤の影響

O/W 型乳剤における高分子量かつ高脂溶性化合物の皮膚移行及び皮膚移行に及ぼす油剤の影響を検討する目的で、DiI をモデル化合物として、分子量及び表面張力が異なる流動パラフィン(LP-A、LP-D)を用い、前章と同様に乳化剤としてポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(HCO)を用いて O/W 型乳剤を調製し、DiI の皮膚移行に対して内油相の油剤の物理化学的性質の影響について finite 系で検討を行った。Fig. 22 に皮膚切片画像を示す。O/W 型乳剤からの DiI の皮膚移行は、LP-D を内油相として用いた(b)では、ほとんど皮膚へ移行していなかったのに対し、内油相として分子量及び表面張力が低い LP-A を用いた(a)では、2 時間の適用において表皮内にまで DiI が移行した。この結果より、DiI の O/W 型乳剤からの皮膚移行は SG と同様に内油相として用いた油剤の分子量及び表面張力に影響を受けることが示唆される。さらに前節の油性基剤(LP-A)からの DiI の皮膚移行と比較すると、内油相として LP-A を用いた O/W 型乳剤では、油性基剤からの皮膚移行が角層にとどまっていたのに対し、DiI の表皮への移行が観察される。このことより DiI においても O/W 型乳剤とすることで、皮膚移行量が増えている可能性が考えられた。

O/W 型乳剤では外相が水であることが大きな特徴であるが、水を投与することによる角層の水和(角層への水の移行による含水量の増加)が薬物の皮膚移行に影響することが知られている<sup>4,36)</sup>。そこで、水による水和が DiI の皮膚移行に影響があるかを検討するために、あらかじめ水を塗布し皮膚を水和させることにより、DiI の皮膚移行に対する水和の影響について検討を行った。

水和の影響を検討するために、流動パラフィン LP-A に分散した DiI を、事前に水を塗布し水和させた YMP 皮膚及び無処理の YMP 皮膚に塗布し皮膚移行

の検討を行った。Fig. 23 に皮膚切片画像を示す。前処理をしていない皮膚 (a)と比較して、水を前塗布し角層を水和させた皮膚 (b)では、DiI の皮膚移行量が増加していた。このことより、水和により DiI の皮膚移行が促進されることが示唆される。

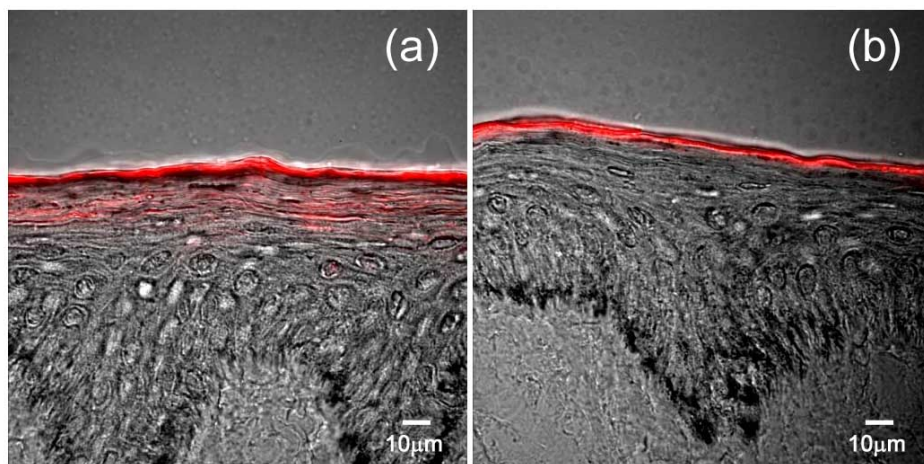


Fig. 22. Cross-section of YMP skin observed by CLSM after application of DiI as an O/W-type emulsion with (a) LP-A, and (b) LP-D. Bar indicates 10  $\mu\text{m}$ .

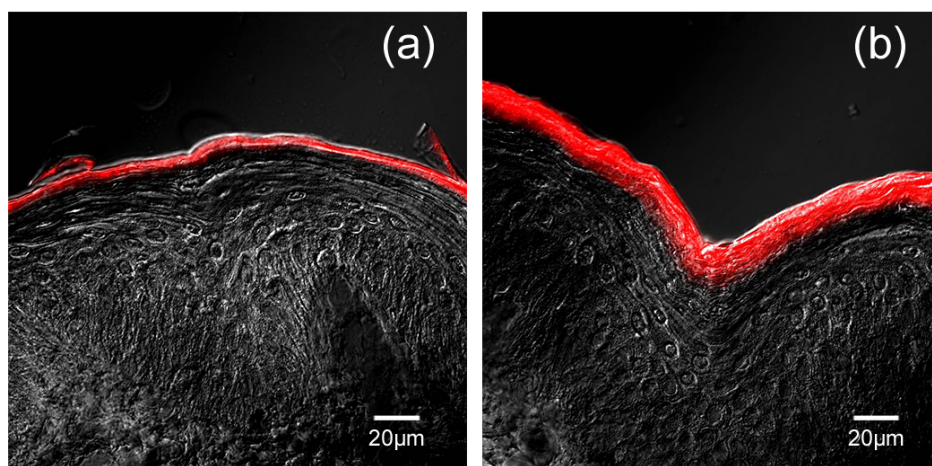


Fig. 23. Cross-section of YMP skin observed by CLSM after application of DiI with LP-A, (a) without pretreatment, and (b) with pretreatment of water before DiI application. Bar indicates 20  $\mu\text{m}$ .

## 第4節 小括

皮膚に移行しやすい物理化学的性質を持つ蛍光物質である Nile red、及び高分子量かつ高脂溶性で皮膚に移行しにくい物理化学的性質を持つ蛍光物質である DiI を用いて、分子量及び表面張力の異なる流動パラフィンからの Nile red および DiI の皮膚移行について検討を行った。その結果、Nile red は基剤として用いた流動パラフィンの分子量及び表面張力に関係なく皮膚に移行した。infinite 系と finite 系を比較すると、投与量の多い infinite 系の方がより多く Nile red が皮膚へ移行した。これらの結果より、皮膚に移行しやすい物理化学的性質を持つ化合物の皮膚移行に対しては、基剤として用いた油剤の分子量及び表面張力は影響しないことが示唆される。

一方、DiI は SG と同様に基剤として用いた流動パラフィンの分子量及び表面張力が低くなるにつれて皮膚への移行量が増加した。さらに infinite 系と finite 系を比較すると、finite 系では分子量及び表面張力が低い流動パラフィンにおいて DiI が皮膚に移行したのに対し、infinite 系では、どの流動パラフィンにおいても皮膚への移行は見られなかった。これらの結果はすべて SG の結果と同様であり、高分子量かつ高脂溶性の皮膚に移行しにくい物理化学的性質を持つ化合物の皮膚移行に対しては、基剤として用いた油剤の分子量及び表面張力が影響することが示唆される。

次に、DiI を用いて皮膚の水和の DiI の皮膚移行に対する影響について検討を行った。その結果、皮膚を水和させることにより DiI の皮膚移行量は増加した。このことより、O/W 型乳剤が油性基剤よりも DiI 及び SG の皮膚移行量が多い理由として、外相の水による皮膚の水和の影響が考えられる。



# 総括





## 総括

化粧品・医薬部外品には様々な物理化学的性質の薬物が用いられているがその中には経皮吸収に適さない物理化学的性質を持つ薬物も数多く使用されている。しかし、化粧品・医薬部外品の標的部位は皮膚そのものであるため、経皮吸収に適さない物理化学的性質の薬物においても、皮膚へ送達させることができれば効果を発揮させることができると考えられる。このような化粧品・医薬部外品で使用される化合物の一つとしてグリチルレチン酸ステアリル(SG)がある。SGはグリチルレチン酸の約2倍の抗炎症効果を持つ薬物であるが、分子量723、 $\log P$  15.6と経皮吸収しにくい物理化学的性質を持つ化合物であると予測された。また、SGの皮膚移行については報告がなく、皮膚移行特性についても不明であった。

本研究では、これまで報告がなかったSGの皮膚移行および皮膚移行に及ぼす基剤の影響について油性基剤及びO/W型乳剤を用いて明らかにし、さらに高分子量かつ高脂溶性の化合物の皮膚移行について検討した。以下に本研究において得られた結果について総括する。

油性基剤からのSGの皮膚移行をinfinite系及びfinite系において検討した結果、SGはYMP皮膚を透過しなかった。しかしSGの皮膚への移行量は、用いた基剤の種類によって差があり、流動パラフィンではfinite系の方がinfinite系と比較してSGの皮膚移行量が約2倍多く、一般的な経皮吸収理論から導かれる結果とは異なる結果が得られた。このためfinite系でのSGの皮膚移行には、通常の経皮吸収理論とは違うメカニズムが関与していることが示唆された。そこでfinite系でのSGの皮膚移行に油性基剤が与える影響について検討をおこなった結果、SGの皮膚移行は基剤として用いた油剤の種類によって最大約3

倍の差を認めた。SGの皮膚移行と油剤の物理化学的性質(分子量、IOB値、粘度、表面張力、SGの溶解度)との関係について重回帰分析を行い、SGの皮膚移行に与える油剤の影響因子の検証をおこなった。その結果SGの皮膚移行には基剤として用いた油剤の分子量と表面張力が関与していることを明らかにした。特に表面張力の関与に関してはこれまで報告がなく、皮膚移行に影響を与える因子として新たに見出した。また、この分子量と表面張力はSGと物理化学的性質が似ている蛍光化合物であるDiIの皮膚移行に対しても同様の影響を示したが、皮膚に移行しやすい物理化学的性質を持つNile redでは影響しなかった。このことから基剤の分子量と表面張力は、高分子量かつ高脂溶性の皮膚に移行しにくい物理化学的性質を持つ化合物の皮膚移行に対してのみ影響することが考えられる。

次に化粧品の剤形として汎用されているO/W型乳剤からのSGの皮膚移行及びSGの皮膚移行に対する油剤の分子量と表面張力の影響を検討した。その結果、SGは油性基剤と同様に皮膚透過しなかった。O/W型乳剤とO/W型乳剤の内油相を比較した結果、O/W型乳剤の方が有意に皮膚移行量が増加していた。このことより、O/W型乳剤にすることにより、よりSGの皮膚移行を高めることができる可能性が示された。さらにO/W型乳剤の内相の油剤の影響について物理化学的性質の異なる流動パラフィンを用いて検討を行った結果、内油相の油剤の分子量と表面張力が皮膚移行に関与していた。

以上、本研究で見出した上記の知見は、SGの皮膚移行メカニズムの解明の糸口となるとともに、SGの配合製剤を開発する上での有用な情報になり、産業への応用に役立つものと考えられる。

## 実験の部

# 実験の部

## 第 1 章

### 1. 実験材料

グリチルレチン酸ステアリル (SG) は、丸善製薬株式会社 (広島) から純度 95% 以上の医薬部外品原料規格に合致した原料を購入した。本研究に用いた油剤は、オレイン酸を除いてすべて化粧品・医薬部外品グレードのものを使用した。流動パラフィン (LP) は、カネダ株式会社 (東京) から医薬部外品原料規格及び食品添加物公定書に合致した原料を購入した。イソステアリン酸、カプリル/カプリン酸トリグリセリド、イソノナン酸イソトリデシル、ミリスチン酸イソプロピル:日光ケミカルズ株式会社 (東京), トリエチルヘキサノイン、ジカプリン酸ネオペンチレングリコール、イソノナン酸イソノニル:日清オイリオグループ株式会社 (東京), オレイルアルコール、イソノナン酸イソトリデシル:クロダジャパン株式会社 (東京), オクチルドデカノール、2-エチルヘキサン酸セチル:BASF ジャパン株式会社 (東京)。オレイン酸は、関東化学株式会社 (東京) の試薬特級を使用した。その他の試薬および溶媒は、市販の試薬特級または、高速液体クロマトグラフ用のものを使用した。

### 2. 油剤の物理化学的性質

実験に用いた油剤の粘度、表面張力及び SG の油剤への溶解度を測定した。

油剤の粘度:音叉型振動式粘度計 (Viscometer SV-10、株式会社エー・アン

ド・デイ、東京)を用いて 20 °C から 40 °C までの粘度を 3 回経時的に測定し、得られた粘度推移から 32 °C での粘度を算出した。表面張力:自動接触角計 (Dropmaster DM-500、協和界面科学株式会社、埼玉)を用いてペンダントドロップ法 20 °C での表面張力を 10 回測定し、その平均値とした。SG の油剤に対する溶解度:US environmental protection agency method<sup>37)</sup>を参考にしておこなった。すなわち、油剤を 10 mL 入れた遠沈管に SG を過剰量添加し、25 °C で 72 時間ゆっくり攪拌した。その後、SG 溶液は、遠心機で 13,000 rpm、30 min 遠心し、上清を PTFE 製の 0.22 µm メンブランフィルター(GE ヘルスケア・ジャパン株式会社、東京)を用いて濾過した。油剤に溶解した SG は、メタノールで希釈したのち HPLC で定量した。測定は、3 回繰り返し行った。

### 3. Yucatan micropig (YMP) 皮膚処理

皮膚移行実験には、ヒト皮膚と特性に近いことが報告されている YMP 皮膚を用いた<sup>38,39)</sup>。YMP 皮膚は 5 か月齢の雌性 YMP から採取後、-80 °C に凍結保存された Skin Set (日本チャールスリバー、神奈川)を用いた。凍結された皮膚は室温にて約 15 分間放置し、自然解凍した後、皮下脂肪および肉片を手術用はさみおよび包丁で除去し、さらに真皮層に付着している皮下脂肪をメスを用いて真皮層を傷付けないように除去した。

### 4. 皮膚移行試験

適用方法として無限系の実験系である infinite 系と有限系の実験系である finite 系の 2 種類の方法で実験を行った。

#### 4-1. Infinite 系皮膚移行試験

改良 Franz 型拡散セル(有効面積 1.1 cm<sup>2</sup>)に前処理済みの YMP 摘出皮膚を

約 2 × 2 cm に切断し、真皮側がレセプター相側になるように取り付けた。レセプター相には pH 7.1 等張リン酸緩衝液 (PBS、Kanamycin 0.01 %、シクロデキストリン 2%、エチルアルコール 5%含有) を充たし、恒温槽で 37℃ に保った。ドナー相に試料 2 mL を適用し、ドナー相上部をパラフィルムで閉塞した。レセプター相から適用 1、3、6、24 時間後にサンプリングし、SG 濃度を測定した 24 時間のサンプリング後に YMP 摘出皮膚を取り外した。皮膚表面に残った試料を紙ワイパー (キムワイプ、日本製紙クレシア株式会社、東京) で除去した。

皮膚は 4-3 に示した方法で、角層・表皮・真皮に分離し、それぞれの画分に含まれる SG を定量した。

#### 4-2. Finite 系皮膚透過試験

3 cm 角に切断した前処理済みの YMP 皮膚を pH 7.1 等張リン酸緩衝液 (PBS、Kanamycin 0.01 %含有) に浸した不織布ワイパー (ワイプオール X80、日本製紙クレシア株式会社、東京) の上に並べた。総面積のうち 4 cm<sup>2</sup> を試験面積として試料を 2.5 μL/cm<sup>2</sup> (油性基剤) 又は 10 μL/cm<sup>2</sup> (O/W 型乳剤) を適用した。この不織布ワイパーの上に載せた皮膚を 0.01 %カナマイシン含有 PBS で満たしたステンレストレイ上に静置し、皮膚表面が 32 °C になるように加温した。開放状態で 24 時間放置後、皮膚表面に残った試料を紙ワイパーを用いて除去した後にストリッピングを行い、皮膚表面・角層・表皮・真皮に分離し、それぞれの画分に含まれる SG を定量した<sup>18-20)</sup>。投与量に対して、回収率 80% 以上のサンプルをデータとして使用した。また、皮膚中で SG が分解しないことを確認した。

#### 4-3. 皮膚に移行した SG の定量

Infinite 系及び finite 系で透過試験を行った YMP 皮膚は、粘着テープ

(Scotch BH-18、3M、東京)を用いて10回ストリッピングを行った。テープは1、2枚目、3~6枚目、7~10枚目に分け、それぞれ2 mLのメタノールに浸した後に、卓上型超音波バスで30分間攪拌しSGを溶出させた。また、finite系ではストリッピングの前に試料を拭き取った紙ワイパーも角層1、2枚目画分に加えた。さらに、ストリッピング後の皮膚はヒートスプレット法を用いて表皮と真皮を分離した<sup>45)</sup>。60℃に加熱したホットプレートの上にストリッピングした後のYMP皮膚を静置し、真皮と表皮をピンセットで剥離した。剥離した表皮、真皮はそれぞれ2 mLのメタノールに浸し、手術用はさみで細かく切断した後に、卓上型超音波バス(日本エマソン株式会社、神奈川)で30分間攪拌し角層画分と同様にSGを溶出させ、HPLCにより溶出液のSG量を定量した。テープストリッピングで得られた角層の1、2枚目を皮膚表面<sup>43,44)</sup>、3~10枚目を角層と定義し、角層中のSG量を求めた。

## 5. HPLC 分析条件

SGの分析はHPLC(LC-2000Plus series:ポンプ PU-2080、オートサンプラ AS-2055、カラムオーブン CO-2065、PDA検出器 MD-2018, 日本分光株式会社、東京)で行った。カラムは、Mightysil RP-18GP C18 column (5 µm、4.6 mm × 250 mm, 関東化学株式会社、東京)を使用した。移動相の組成はメタノール : エタノール (75:25, v/v)とし、カラム温度は40℃、流速は、1.5 mL/min (250 mm カラム)、1.0 mL/min (150 mm カラム)とした。検出波長は254 nmとした。定量は絶対検量線法で行い、検出感度は0.1 µg/mLであった。

## 6. 統計解析

統計学的評価は、JMP 9.03 (SAS Institute Japan Inc., 東京)を用い

て解析を行った。すべてのデータは  $\pm$  S.D (標準偏差)で表した。データは分散分析(ANOVA)を行った後、Tukey–Kramer HSD test により  $p<0.05$  を統計学的に有意差有りとした。また、重回帰分析は全説明変数を対象としたステップワイズ法で行った。



## 第 2 章

すべての実験材料及び、実験方法は第 1 章の方法に準じて行った。以下に第 1 章と異なる点を記載する。

### 1. 実験材料

界面活性剤は化粧品・医薬部外品グレードのものを使用した。水素添加大豆リン脂質、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ステアリン酸ポリエチレングリコール：日光ケミカルズ株式会社（東京），ポリソルベート 80：日油株式会社（東京），ステアロイルグルタミン酸 Na：味の素株式会社（東京），ショ糖脂肪酸スクロース：第一工業製薬株式会社（京都）。

### 2. O/W 型乳剤の調製

O/W 型乳剤は、ホモミキサー（ホモミクサー MARK II、プライミクス株式会社、大阪）による予備乳化の後に高圧ホモジナイザー（マイクロフルイダイザー M-110EH、パウレック、兵庫）を用いて調製した。すなわち、SG、界面活性剤、油剤を混合し、70 °C に加温した。同様に 70 °C に加温した精製水に徐々に油相区分を添加しながら、ホモミキサーで 4000 rpm で 10 分予備乳化を行った。室温に冷却後、高圧ホモジナイザーを用いて粒径が約 200 nm になるように乳化分散を行った。

### 3. 粒径の測定

O/W 型乳剤の乳化滴の粒径の測定は、動的光散乱法粒子径分布解析装置（サブミクロン粒子アナライザー N5、ベックマン・コールター株式会社、東京）を

用いて測定を行った。O/W 型乳剤は、装置の測定可能濃度まで蒸留水で希釈し、測定した。測定は、3 回繰り返し行った。

#### 4. HPLC 分析条件

SG の分析カラムは、Mightysil RP-18GP C18 column (5  $\mu$ m、4.6 mm  $\times$  150 mm) (関東化学株式会社、東京) を使用した。

## 第 3 章

すべての実験材料及び、実験方法は第 1 章及び、第 2 章の方法に準じて行った。以下に第 1、2 章と異なる点を記載する。

### 1. 実験材料

Nile red 及び DiI はシグマアルドリッチ ジャパン合同会社（東京）から入手した。その他の試薬および溶媒は、市販の試薬特級または HPLC グレードのものを使用した。

### 2. O/W 型乳剤の調製

DiI および Nile red を含有した O/W 型乳剤は、プローブ式超音波ホモジナイザー（デジタル超音波ホモジナイザー、日本エマソン株式会社、神奈川）による予備乳化の後に、小型エクストルーダー（Mini-Extruder、Avanti Polar Lipids、USA）を用いて調製した。DiI または Nile red と、界面活性剤、油剤を混合し 70 °C に加温した。同様に 70 °C に加温した精製水に油相を添加し、超音波ホモジナイザーで予備乳化を行った。70 °C に加温したまま、小型エクストルーダー、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブランを通して、10 回サイジングを行った。DiI 及び Nile red を含む乳剤は、退色を防ぐため、すべての工程を遮光して行った。

### 3. 皮膚移行試験

皮膚移行試験は、1 mg/mL の濃度で調製した DiI 及び Nile red の流動パラフィン分散液及び O/W 型乳剤を用い、infinite 系と finite 系の 2 種類の方法で

実験を行った。

### 3-1. Infinite 系皮膚透過試験

Franz 型拡散セル(有効面積  $1.77\text{ cm}^2$ , PermeGear、USA)に前処理済みの YMP 摘出皮膚を真皮側がレセプター相側になるように取り付けた。レセプター相には pH 7.1 等張リン酸緩衝液 (PBS、Kanamycin 0.01 %) を充たし、恒温槽で  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  に保った。ドナー相に試料 2 mL を適用し、ドナー相上部をパラフィルムで閉塞した。2 時間後に YMP 摘出皮膚を取り外した。皮膚表面に残った試料を紙ワイパー(キムワイプ、日本製紙クレシア株式会社、東京)で除去した。

### 3-2. Finite 系皮膚透過試験

2 cm 角に切断した前処理済みの YMP 皮膚を pH 7.1 等張リン酸緩衝液 (PBS、Kanamycin 0.01 % 含有) に浸した不織布ワイパー(ワイプオール X80、日本製紙クレシア株式会社、東京)の上に並べた。総面積のうち約  $3\text{ cm}^2$  を試験面積として試料を  $2.5\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$  (油性基剤) 又は  $10\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$  (O/W 型乳剤) を適用した。この不織布ワイパーの上に載せた皮膚を 0.01 % kanamycin 含有 PBS で満たしたステンレストレイ上に静置し、皮膚表面が  $32\text{ }^{\circ}\text{C}$  になるように加温した。遮光しながら開放状態で 2 時間または 24 時間放置後、皮膚表面に残った試料を紙ワイパーを用いて除去した。水和実験においては、YMP 皮膚に、5% HCO 含有精製水を  $10\text{ }\mu\text{L}/\text{cm}^2$  塗布し、15 分静置した後、DiI の流動パラフィン分散液を塗布し、2 時間放置後、同様に処理を行った。

### 3-3. 皮膚に移行した DiI 及び Nile red の皮膚移行の測定

皮膚サンプルは、約  $7\text{ mm}\times 3\text{ mm}$  角に切断した後に、凍結包埋コンパウンド (FSC22、Leica Microsystems、東京)を用いて包埋皿(ティッシュテッククリオモルド、サクラファインテック株式会社、東京)に包埋し、試料凍結装置

(UT2000F、Leica Microsystems、東京)を用いて、ペンタン:ヘキサンの 1:2 溶液中で  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$  で凍結した。凍結皮膚サンプルは、クリオスタット (CM3050S、Leica Microsystems、東京) を用い  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  で  $20\text{ }\mu\text{m}$  の厚さに切断し、蛍光用包埋剤 (PermaFluor、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、神奈川県)を用いてスライドガラス上に包埋し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で観察した。

#### 4. CLSM 観察条件

CLSM は、FLUOVIEW FV-1000 (オリンパス株式会社、東京) を使用し、60 倍の PLAPON60×O (油浸) 対物レンズにより観察した。蛍光画像は  $543\text{ nm}$  He-Ne laser を用いて、DiI および Nile red の赤色蛍光を取得した。蛍光色素の皮膚への移行深度は、1 視野中の 10 点の深さを測定し、それを 10 視野測定し積算することにより、それぞれの条件での DiI または Nile red の皮膚移行深度を求めた<sup>44)</sup>。



## 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に際して終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました昭和薬科大学大学院(薬剤学研究室)教授 渡邊善照 先生、ならびに昭和薬科大学大学院(薬剤学研究室)准教授 藤井まき子 先生に心より感謝の意を表します。

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昭和薬科大学大学院(薬剤学研究室)講師 小泉直也 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研究の機会を下さった、株式会社コーセー 取締役研究所長 内藤 昇 博士、株式会社コーセー取締役 荒金久美 博士、株式会社コーセー研究所基礎研究室室長 亀山浩一 博士、株式会社コーセー研究所開発研究室室長 林 昭伸 博士に御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行にあたり、ご指導および多大なご配慮をいただきました株式会社コーセー研究所基礎研究室分析グループ長 中出正人 博士、ならびに株式会社コーセー研究所基礎研究室安全性品質グループ有用性ユニット長 成 英次 博士に御礼申し上げます。

最後に、本研究の実施にご協力いただきました昭和薬科大学薬剤学研究室、株式会社コーセー 基礎研究室安全性品質グループ員を始めとする関係諸氏に深く感謝いたします。





## 参考文献

- 1) N. Higo, Recent trend of transdermal drug delivery system development, *Yakugaku Zasshi*, **127**, 655-662 (2007)
- 2) 小木曾 太郎, 経皮吸収に適する薬物および構造活性相関による皮膚透過の予測, *薬剤学*, **61**, 119-127 (2001)
- 3) 岡田 直貴, 経皮ワクチン製剤(貼るワクチン)の基礎から臨床, *Yakugaku Zasshi*, **133**, 1363-1372 (2013)
- 4) 瀬崎 仁 監修, 「医薬品の開発 第 13 巻 薬物伝達法」, 廣川書店, 87-133, (1989)
- 5) J.D. Bos, M.M. Meinardi, The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000)
- 6) Q. Zhang, J.E. Grice, P. Li, O.G. Jepps, G.J. Wang, M.S. Roberts, Skin solubility determines maximum transepidermal flux for similar size molecules, *Pharm. Res.*, **26**, 1974-1985 (2009)
- 7) C. Surber, K. Wilhelm, H. Maibach, In vitro and in vivo percutaneous absorption of structurally related phenol and steroid analogs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**, 244-248 (1993)
- 8) S. Kitagawa, K. Inoue, R. Teraoka, S.Y. Morita, Enhanced skin delivery of genistein and other two isoflavones by microemulsion and prevention against UV irradiation-induced erythema formation, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 398-401 (2010)
- 9) Q. Tan, W. Liu, C. Guo, G. Zhai, Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery, *Int.*

*J. Nanomedicine*, **6**, 1621-1630 (2011)

- 10) Y. Ito, T. Maeda, K. Fukushima, N. Sugioka, K. Takada, Permeation enhancement of ascorbic acid by self-dissolving micropile array tip through rat skin, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 458-463 (2010)
- 11) 矢野三郎, 甘草に関する最近の研究, *Iryo*, **46**, 241-245 (1992)
- 12) C. Fiore, M. Eisenhut, E. Ragazzi, G. Zanchin, D. Armanini. A history of the therapeutic use of liquorice in Europe. *J. Ethnopharmacol.*, **99**, 317-324 (2005)
- 13) M.N. Asl, H. Hosseinzadeh. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. *Phytother. Res.*, **22**, 709-724 (2008)
- 14) T. Rossi, L. Benassi, C. Magnoni, A.I. Ruberto, A. Coppi, G. Baggio, Effects of glycyrrhizin on UVB-irradiated melanoma cells, *In Vivo*, **19**, 319-322 (2005)
- 15) 富沢摂夫、阿南一郎, グリチルレチン酸及びその誘導体の抗炎症作用について, *慶応医学*, **44**, 17-21 (1967)
- 16) J. Hao, Y. Sun, Q. Wang, X. Tong, H. Zhang, Q. Zhang, Effect and mechanism of penetration enhancement of organic base and alcohol on glycyrrhetic acid in vitro, *Int. J. Pharm.*, **399**, 102-108 (2010)
- 17) C. Puglia, L. Rizza, M. Drechsler, F. Bonina, Nanoemulsions as vehicles for topical administration of glycyrrhetic acid: characterization and in vitro and in vivo evaluation, *Drug. Deliv.*, **17**, 123-129 (2010)
- 18) D. Paolino, G. Lucania, D. Mardente, F. Alhaique, M. Fresta, Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: in vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity

- on human volunteers, *J. Control. Release*, **106**, 99-110 (2005)
- 19) NCBI PubChem compound, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
  - 20) D. Selzer, M.M. Abdel-Mottaleb, T. Hahn, U.F. Schaefer, D. Neumann, Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 278-294 (2013)
  - 21) D. Selzer, T. Hahn, A. Naegel, M. Heisig, K.H. Kostka, C.M. Lehr, D. Neumann, U.F. Schaefer, G. Wittum, Finite dose skin mass balance including the lateral part: comparison between experiment, pharmacokinetic modeling and diffusion models, *J. Control. Release*, **165**, 119-128 (2013)
  - 22) E.G. Samaras, J.E. Riviere, T. Ghafourian, The effect of formulations and experimental conditions on in vitro human skin permeation-Data from updated EDETOX database, *Int. J. Pharm.*, **434**, 280-291 (2012)
  - 23) H.F. Frasch, Dermal absorption of finite doses of volatile compounds, *J. Pharm. Sci.*, **101**, 2616-2619 (2012)
  - 24) OECD guideline for the testing of chemicals. Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method.; April 13 (2004)
  - 25) 藤井 まき子, 山内 静香, 長倉 和美, 武田 泰浩, 松本 光雄, メントキシプロパンジオールとメントールによるインドメタシンの Yucatan Micropig 皮膚透過促進作用, *Drug Deliv. Syst.*, **12**, 127-131 (1997)
  - 26) S.E. Cross, R. Jiang, H.A. Benson, M.S. Roberts, Can increasing the viscosity of formulations be used to reduce the human skin penetration of the sunscreen oxybenzone?, *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 147-150 (2001)
  - 27) K. Sugibayashi, Theoretical Consideration for Enhanced Transdermal Delivery, *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, **2**, 71-80 (1987)

- 28) C.M. Heard, D. Kung, C.P. Thomas, Skin penetration enhancement of mefenamic acid by ethanol and 1,8-cineole can be explained by the 'pull' effect, *Int. J. Pharm.*, **321**, 167-170 (2006)
- 29) J.L. Bowen, C.M. Heard, Film drying and complexation effects in the simultaneous skin permeation of ketoprofen and propylene glycol from simple gel formulations, *Int. J. Pharm.*, **307**, 251-257 (2006)
- 30) A. Pardo, Y. Shiri, S. Cohen, Percutaneous absorption of physostigmine: optimization of delivery from a binary solvent by thermodynamic control, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 573-578 (1990)
- 31) 田村 成, 武本 尚子, 鈴木 雄二, 澤田 嗣郎, 光音響分光法による in vitro 経皮吸収評価法の研究, *油化学*, **41**, 558-562 (1992)
- 32) A. Fujita, Prediction of organic compounds by a conceptional diagram, *Pharm. Bull.*, **2**, 163-173 (1954)
- 33) Y. Takata, Wetting and surface tension, *Jour. HTSJ.*, **43**, 43-48 (2004).
- 34) R. N. Wenzel, Resistance of solid surfaces to wetting by water, *Ind. Eng. Chem.*, **28**, 988-994 (1936)
- 35) A. Otto, J. du Plessis, J.W. Wiechers, Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **31**, 1-19 (2009)
- 36) T. Hikima, H. Maibach. Skin penetration flux and lag-time of steroids across hydrated and dehydrated human skin in vitro. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2270-2273 (2006)
- 37) EPA Chemical Fate Test Guidelines CG-1500, "Water Solubility" (1982)
- 38) M. Fujii, S. Yamanouchi, N. Hori, N. Iwanaga, N. Kawaguchi, M.

- Matsumoto, Evaluation of Yucatan micropig skin for use as an in vitro model for skin permeation study, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 249-254 (1997)
- 39) R.M. Lavker, G. Dong, P.S. Zheng, G.F. Murphy, Hairless micropig skin. A novel model for studies of cutaneous biology, *Am. J. Pathol.*, **138**, 687-697 (1991)
  - 40) H. Wagner, K.H. Kostka, C.M. Lehr, U.F. Schaefer, Human skin penetration of flufenamic acid: in vivo/in vitro correlation (deeper skin layers) for skin samples from the same subject, *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 540-544 (2002)
  - 41) C. Aguzzi, S. Rossi, M. Bagnasco, L. Lanata, G. Sandri, F. Bona, F. Ferrari, M.C. Bonferoni, C. Caramella, Penetration and distribution of thiocolchicoside through human skin: comparison between a commercial foam (Miotens) and a drug solution, *AAPS PharmSciTech*, **9**, 1185-1190 (2008)
  - 42) M. Fujii, M. Wakui, M. Hanada, Effect of 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine butylmethacrylate copolymer on the skin penetration of 2-ethylhexyl methoxycinnamate, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **31**, 1-7 (2007)
  - 43) EFSA, Guidance on Dermal Absorption, *EFSA Journal*, **10**, 2665 (2012).
  - 44) Y. Shimoyama, M. Fujii, Y. Kanda, A. Mizoguchi, H. Oda, N. Koizumi, Y. Watanabe, Effects of application method on skin penetration of carboxyfluorescein incorporated in liposomes, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 429-431 (2010), **58**, 429-431 (2010)
  - 45) A.M. Kligman, E. Christophers, Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum, *Arch. Dermatol.*, **88**, 702-705 (1963)



# 略語一覧

## 薬物及び蛍光物質

DiI	: 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine
Nile red	: 9-(Diethylamino)-5H-benzo[a]phenoxazin-5-one
SG	: グリチルレチン酸ステアリル

## 油剤

LP	: 流動パラフィン
A-OA	: オレイン酸
A-ISA	: イソステアリン酸
B-OLA	: オレイルアルコール
B-OCD	: オクチルドデカノール
E-INN	: イソノナン酸イソノニル
E-IDN	: イソノナン酸イソトリデシル
E-CEH	: 2-エチルヘキサン酸セチル
E-NGD	: ジカプリン酸ネオペンチレングリコール
G-THN	: トリエチルヘキサノイン
G-CTG	: カプリル/カプリン酸トリグリセリド

## 界面活性剤

HCO	: ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油
HSL	: 水素添加大豆リン脂質

PO80 : ポリソルベート 80  
PMS : ステアリン酸ポリエチレングリコール  
SSG : ステアロイルグルタミン酸 Na  
SMS : ショ糖脂肪酸スクロース

その他

CLSM : 共焦点レーザー顕微鏡  
O/W : oil in water  
YMP : Yucatan micropig  
OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development  
経済協力開発機構  
EFSA : European Food Safety Authority



## 学位論文を総括した論文

1. Osamu Sakata, Makiko Fujii, Naoya Koizumi, Masato Nakade, Koichi Kameyama, Yoshiteru Watanabe, Effects of the physicochemical properties of oil vehicles on the skin penetration of poor skin-penetrable materials under finite dose conditions in vitro, *Yakuzaigaku* **74**(1), 84-92 (2014)
2. Osamu Sakata, Makiko Fujii, Naoya Koizumi, Masato Nakade, Koichi Kameyama, Yoshiteru Watanabe, Effects of oils and emulsifiers on the skin penetration of stearyl glycyrrhetinate in oil-in-water emulsions, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**(3), 486-489 (2014)