

論文の内容の要旨

氏名：宮坂美行

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：レシチン逆紐状ミセルのレオロジー特性と水溶性薬物の毛包を介した皮膚浸透に関する研究

【序論】

化粧品・薬用化粧品（医薬部外品）等のスキンケア品は、期待される機能（有効性）を発揮することはもちろんだが、肌トラブルを起こさないこと（安全性）も同時に求められ、有効性と安全性の両立には機能発現部位において有効成分を適切な濃度に制御する必要がある。一方、機能発現部位における有効成分の濃度は、皮膚に塗布された有効成分が当該部位へ到達する速度と量に左右され、これらの制御には有効成分と投与基剤の物理化学的性質並びにそれらが皮膚浸透に及ぼす影響を明らかとすることが必須である。皮膚に塗布された有効成分は浸透ルートの影響も受ける。特に水溶性薬物は毛包などの皮膚付属器官等を介し皮膚深部まで浸透することは既に報告されているが¹⁾、有効成分と同時に適用された基剤の物理化学的性質が毛包浸透に与える影響に関する報告は少ない。

レシチン逆紐状ミセル（LRW）は、レシチンが油中で形成する分子集合体の一種で、レシチン、極性物質、油の3つの成分を混合することにより得られる。レシチンと極性物質が油中で結合して細長く柔軟な円筒形の逆ミセルを形成し、それらが絡み合っただ次元ネットワークを形成することで多量の油を含んだ粘弾性体となる。また、様々な薬物を可溶化できるため、LRWは経皮適用製剤として期待されている²⁾。

本研究は、LRWのレオロジー特性に着目し、水溶性薬物の毛包を介した皮膚浸透に及ぼす基剤の影響を明らかにすることを目的とした。様々な油中でLRWを形成することが報告されているが、皮膚適用可能な油での詳細な検討は少ない。そこでまず初めに、皮膚に塗布できる油剤の代表例として流動パラフィン（LP）を用いて、油剤の物理化学的性質やLRWの組成がLRWのレオロジー特性に及ぼす影響を調べた。次に、水溶性薬物のモデルとして蛍光物質である6-カルボキシフルオレセイン（CF）を配合したLRWのレオロジー特性と組成がCFの皮膚透過及び毛包浸透に与える影響を検討した。

第1章 レシチン逆紐状ミセルのレオロジー特性に及ぼす流動パラフィンの物理化学的性質の影響

LRWは極性物質や油の種類によって性質が異なることが知られている。皮膚適用製剤に用いられる代表的な油であるLPと代表的な極性物質である水からなるLRWの生成範囲とレオロジー特性について検討した。LPは、様々な粘度グレードのものが使用されている。動粘度が異なる5種類のLP（Table 1）を用い、レシチン/水/LP系のLRWを調製し、相状態の観察及びレオロジー測定を行った。

レシチン/水/LP系の部分相図を作成した（Fig.1）。LP-Aは少量の水でLRWを形成したが、LP-D及びLP-Eは水の濃度に関係なくLRWを形成しなかった。LPの動粘度は分子量の増加に伴い上昇する。LPへのレシチンの溶解度は分子量の小さなLPの方が高く、LP-Aでは5%であったが、LP-D及びLP-Eでは約0.1%であった。レシチンの油剤への溶解度はLRWの形成のしやすさに影響すると考えられる。

LRWのレオロジー特性を把握するため、レオメーターを用いて定常流粘度測定及び周波数分散測定を行った。定常流粘度測定（Fig. 2 (a)）の結果より、LRWの粘度（ η ）は特定のせん断速度までは一定であり

Table 1. Kinematic Viscosity of LPs at 37.8°C

Name of LP	Kinematic viscosity (mm ² /s)
LP-A	4.00 - 5.50
LP-B	5.80 - 8.90
LP-C	11.7 - 15.7
LP-D	34.0 - 37.5
LP-E	74.0 - 88.0

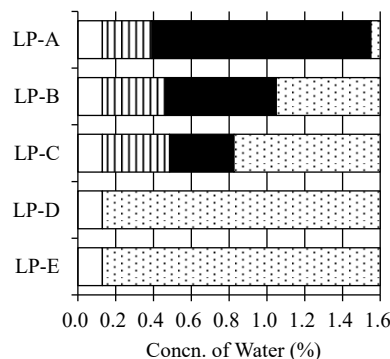


Fig. 1. Phase Diagrams of Lecithin/Water/LP Systems at 25°C
□: Not tested, ▨: Turbid, ■: LRW, ▨: two-phase.
The lecithin concentration was fixed at 20%.

ニュートン流動を示し、高いせん断速度では減少し非ニュートン流動を示した。この変化はシアシニングと呼ばれ、LRW で見られる特徴的な現象である。定常流粘度測定の結果から算出した LRW のゼロせん断粘度（静置状態の粘度を表す； η_0 ）は、水の濃度の増加とともに増加した後は減少し、最大となる時の水の濃度は LP-A > LP-B > LP-C の順であった (Fig. 2 (b))。このことから、LRW の形成に分子量の大きい LP を用いたときは、少量の水で三次元ネットワークの形成に十分な長さの LRW が生成していると考えられる。周波数分散測定 (Fig. 3) の結果より、弾性を反映する貯蔵弾性率 (G') と粘性を反映する損失弾性率 (G'') はある周波数で交差し、交点より低周波数側では粘性が優位となり、高周波数側では弾性が優位となる粘弾性体の挙動を示した。

以上のことから、LP の分子量が LRW の形成のしやすさとレオロジー特性に影響を与えることが明らかとなった。また、LRW は低周波数領域では粘性挙動を示し、高周波数領域では弾性挙動を示す。すなわち、容器からの取り出し時は固体の様であるが、皮膚に乗せた後は液体の様に振る舞うことが予想される。LRW は取扱のしやすさと皮膚上での広がりやすさを兼ね備えた製剤としてのポテンシャルを有していることを明らかにした。

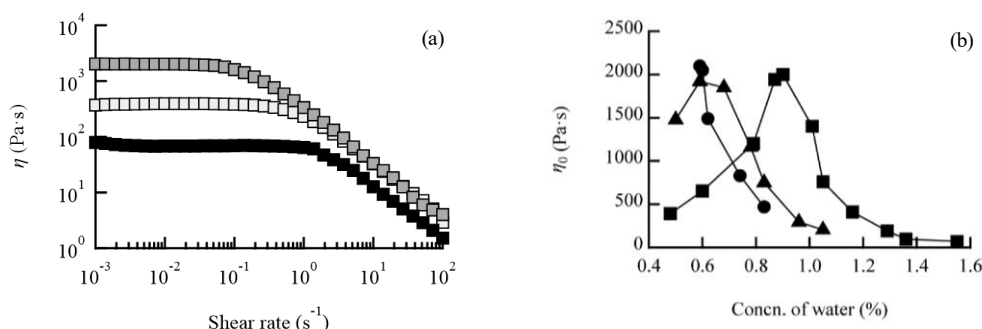


Fig. 2. Steady Flow-Viscosity Measurements (a) and Zero-Shear Viscosity (b) at 25 °C
 (a) Lecithin/water/LP-A system at water concentrations \square : 0.48%, \circ : 0.90%, \blacksquare : 1.55%.
 (b) Zero-shear viscosity (η_0) of LRW as a function of water concentration. \blacksquare : LP-A, \blacktriangle : LP-B, \bullet : LP-C.
 The lecithin concentration was fixed at 20%.

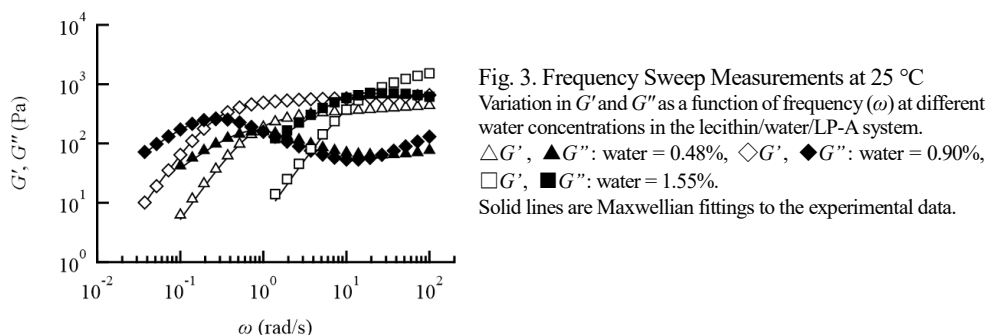


Fig. 3. Frequency Sweep Measurements at 25 °C
 Variation in G' and G'' as a function of frequency (ω) at different water concentrations in the lecithin/water/LP-A system.
 $\triangle G'$, $\blacktriangle G''$: water = 0.48%, $\diamond G'$, $\blacklozenge G''$: water = 0.90%,
 $\square G'$, $\blacksquare G''$: water = 1.55%.
 Solid lines are Maxwellian fittings to the experimental data.

第2章 水溶性薬物の皮膚透過に与えるレシチン逆紐状ミセルのレオロジー特性と組成の影響

水溶性薬物は通常、皮膚に塗布する際、ローションやクリームなどの含水製剤に組み込まれる。しかし、一部の薬物は水に不安定であるため、これらの薬物の安定性を確保するために、水を含まない製剤が必要である。そこで、水の代わりにグリセロール (GL) 及び D-リボース (RI) を極性物質とした LRW を調製した。なお、油には、皮膚透過促進作用の知られているミリスチン酸イソプロピル (IPM) と IPM と物理化学的性質が近く最も分子量の小さい LP-A を LP として用いた。皮膚透過試験には、水溶性薬物のモデルとして CF を、油のトレーサーとして脂溶性カルボシアニン色素 (DiI) を使用した。

CF 及び DiI を配合していないサンプルの観察から相図を作成した (Fig. 4 (a))。いずれの極性物質、油剤を用いた場合でも LRW の形成が確認された。また、CF を 0.1% 配合したとき、LRW 中に可溶化でき (Fig. 4 (b))、一年以上 CF の結晶生成は確認されなかった。

Fig. 4 (a) 中の a★、b★、c★に示す組成の LRW (GL2.4LP、GL5.6IPM、RI3.0IPM) 及び一般的な油性基剤であるワセリンに CF と DiI を各 0.1% 添加した製剤 (VA) についてレオロジー測定を行った。製剤保管時の温度として 25°C 及び皮膚表面の温度である 32°C における周波数分散測定の結果を Fig. 5 に示す。いずれの温度においても VA は周波数の増加に伴い複素粘度 (η^*) が減少する非ニュートン流動を示した。その他の試料は、ある周波数までは一定の η^* を示し、その後減少する LRW に特徴的な変化を示した。また、いずれの温度においても VA は測定範囲において弾性を反映する G' が優位である一方、LRW は低周波数領域で粘性を反映する G'' が優位であり、皮膚上ではシワや毛包などの細かな皮膚構造へ浸透しやすいと考えられる。

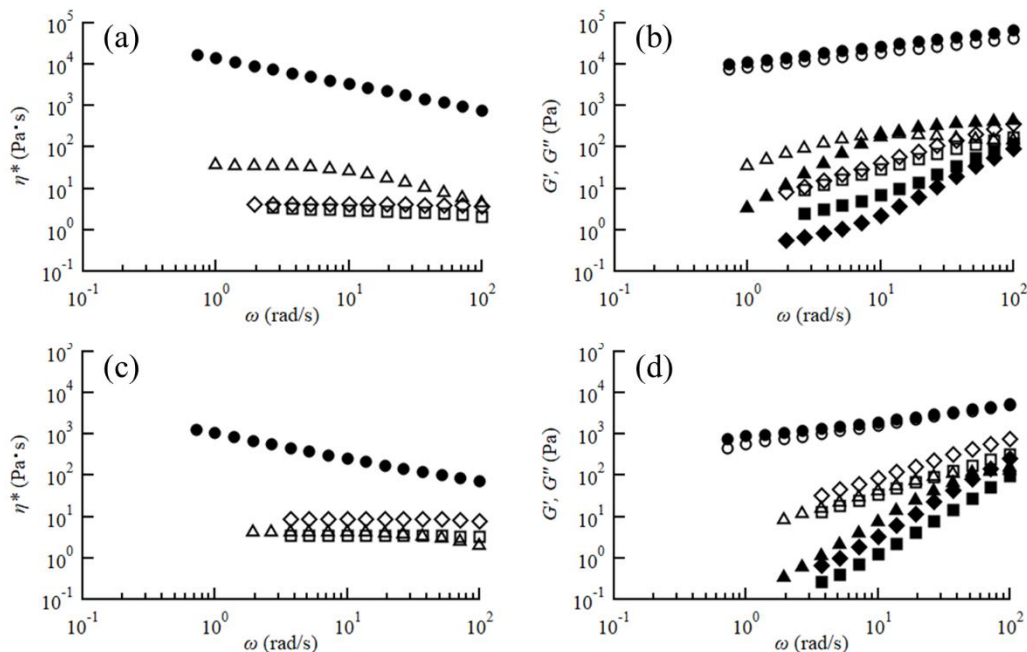


Fig. 5. Frequency Sweep Measurements at 25°C (a), (b) and 32°C (c), (d)
 (a), (c) Complex-viscosity (η^*) vs. angular frequency curves. ●: VA, ◇: GL2.4LP, □: GL5.6IPM, △: RI3.0IPM.
 (b), (d) Variation in G' and G'' as a function of angular frequency (ω).
 ● G' , ○ G'' : VA, ◆ G' , ◇ G'' : GL2.4LP, □ G' , □ G'' : GL5.6IPM, ▲ G' , △ G'' : RI3.0IPM.

GL2.4LP、GL5.6IPM、RI3.0IPM 及び VA をフランツ型拡散セルに装着した食用ブタ耳皮膚に 24 時間適用し、CF の累積透過量、皮膚内 CF 量を測定した。また、透過試験後の皮膚切片について共焦点顕微鏡観察を行った。適用後 24 時間における CF 透過量 (Fig. 6 (a)) は VA では $17.2 \pm 11.3 \text{ ng/cm}^2$ と低く、GL2.4LP においても VA と同様に低かった。RI3.0IPM ではやや改善はみられるものの有意差はなく、GL5.6IPM では $131 \pm 130 \text{ ng/cm}^2$ と有意な上昇がみられた。皮膚内 CF 量 (Fig. 6 (b)) は VA に比較して GL5.6IPM と RI3.0IPM が、また、GL5.6IPM と比較しても RI3.0IPM が有意に高く、GL5.6IPM は皮膚透過を促進し、RI3.0IPM は皮膚内に留まりやすいことが示された。LRW の組成の違いが、水溶性薬物の皮膚透過や皮膚内滞留性に影響することが考えられた。また、薬物の皮膚への分配と皮膚内の受動拡散で説明される一般的な皮膚透過理論では、皮膚へ分配しやすく皮膚内薬物濃度が高くなるほど皮膚透過速度は高くなる³⁾。しかし、CF の累積透過量と皮膚内濃度の順は一致せず、分配と拡散以外の他の透過ルートの寄与が示唆された。そこで、透過ルートを確認するため皮膚断面の共焦点顕微鏡観察を行った。

適用後 24 時間の皮膚断面の共焦点顕微鏡観察の結果 (Fig. 7)、GL5.6IPM 及び RI3.0IPM 適用群においては、角層に強い CF に由来する緑色及び DiI に由来する赤色の蛍光が認められ、表皮及び真皮において CF が認められた。さらに毛包内では CF 及び DiI が認められる。これらのことから、CF は IPM と共に角層に

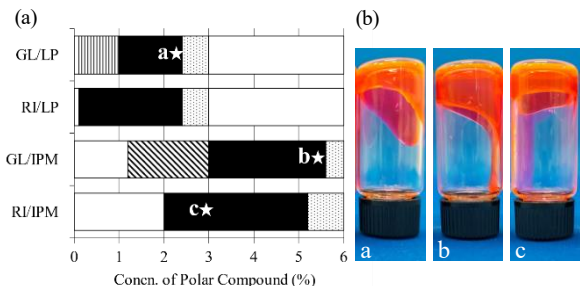


Fig. 4. Phase Diagrams of Lecithin/Polar Compound/Oil Systems (a) and Representative Visuals of CF and DiI Containing LRWs at 25°C (b)
 (a) □: Not tested, ▨: Turbid, ■: LRW, □: Two-phase, ▩: Solution. The lecithin concentration was fixed at 20%.
 (b) a: lecithin/GL2.4%/LP/CF0.1%/DiI0.1% (GL2.4LP),
 b: lecithin/GL5.6%/IPM/CF0.1%/DiI0.1% (GL5.6IPM),
 c: lecithin/RI3.0%/IPM/CF0.1%/DiI0.1% (RI3.0IPM).

浸透し、その後表皮と真皮に浸透したと考えられた。また、毛包内に CF 及び DiI の強い蛍光が認められたことから毛包ルートへの寄与が示唆された。毛包と類似した大きさである 70 μm の細孔を有する脂溶性の膜であるポリプロピレン (PP) フィルターを用いた透過試験を行った結果 (Fig. 8)、DiI の透過は、VA では全く認められなかったが、いずれの LRW でも認められ、 η^* が低いほど早いことが示された。しかし、高い毛包浸透性が予測される GL2.4LP の毛包浸透性は低く、レオロジー特性のみでは皮膚透過試験の結果を説明できなかった。毛包内には皮脂が分泌されており、基剤と皮脂との混和性が薬物の毛包への送達に影響することや、IPM は皮脂の相転移に大きく影響することが報告されている⁴⁾。これらのことから、IPM を用いた LRW は、IPM による角層ルートへの透過促進効果に加え、そのレオロジー特性及び皮脂との相互作用により、毛包へ浸透することを見出した。

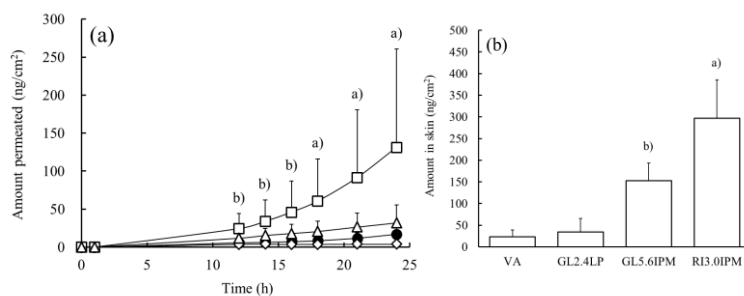


Fig. 6. Skin Permeation Profiles of CF (a) and Amount of CF in Skin at 24 h after Application of the Dosage

●: VA, ◇: GL2.4LP, □: GL5.6IPM, △: RI3.0IPM.

Each point represents the mean \pm S.D. (n = 6-8)

a) Significantly difference ($p < 0.05$) from other three samples.

b) Significantly difference ($p < 0.05$) relative to VA and GL2.4LP b).

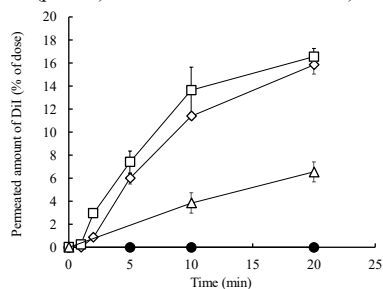


Fig. 8. PP Filter Permeation Profiles of DiI from samples at 25°C

●: VA, ◇: GL2.4LP, □: GL5.6IPM, △: RI3.0IPM.

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

【結論】

LRW のレオロジー特性及び油剤の皮脂との相互作用が、水溶性薬物の毛包を介した皮膚浸透に影響することを見出した。この知見は、LRW の経皮適用製剤としての有用性を示す一つの事例となる。それと同時に、化粧品や薬用化粧品等のスキンケア品に汎用される水溶性薬物の毛包を介した皮膚浸透メカニズムの一端を明らかにしたものであり、機能発現部位における有効成分の濃度の制御に繋がる。本研究の成果は、有効性と安全性を両立した経皮適用製剤の開発に有用な知見をもたらすものであると考えられる。

<参考文献>

- 1) Mohd F., Todo H., Yoshimoto M., Yusuf E., Sugibayashi K., *Pharmaceutics*, **8**, 1-12 (2016).
- 2) Kumar R., Katare O. P., *AAPS PharmSciTech*, **6**, E298-E310 (2005).
- 3) Scheuplein R. J., *Journal of Investigative Dermatology*, **67**, 31-38 (1976).
- 4) Motwani M. R., Rhein L. D., Zatz J. L., *Journal of Cosmetic Science*, **53**, 35-42 (2002).

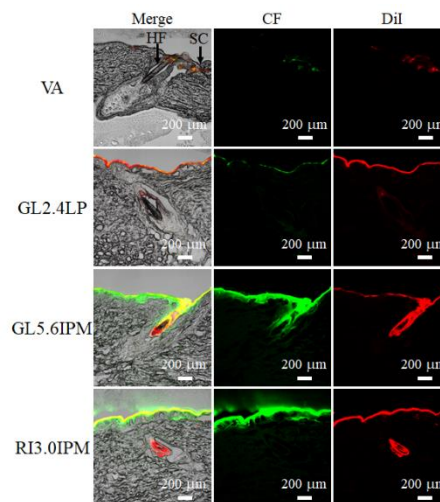


Fig. 7. Cross-Section of the Skin Samples, Observed by Confocal Microscopy at 24 h after Application

Green indicates the distribution of fluorescence from CF. Red indicates the distribution of fluorescence from DiI.

HF: hair follicle, SC: stratum corneum.