

博士論文

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

日本大学大学院薬学研究科
宮坂美行

2024

目次

序論	1
第 1 章 レシチン逆紐状ミセル (LRW) のレオロジー特性に及ぼす流動パラフィン (LP) の物理化学的性質の影響	6
第 1 節 LP の物理化学的性質が LRW の形成のしやすさに与える影響	8
1. 1. レシチン/水/LP 系の相状態	9
1. 2. 小角 X 線散乱解析	11
1. 3. レシチンの LP への溶解性	13
第 2 節 レシチン/水/LP 系 LRW のレオロジー特性	15
2. 1. LRW の粘度に及ぼす LP の影響	18
2. 2. LRW の粘弾性に及ぼす LP の影響	21
第 3 節 小括	23
第 2 章 水溶性薬物の皮膚透過に与える LRW のレオロジー特性と組成の影響	25
第 1 節 皮膚適用可能な成分を用いた LRW の調製と水溶性薬物の配合 ...	29
第 2 節 水溶性モデル薬物を配合した LRW のレオロジー特性	35
第 3 節 水溶性モデル薬物を配合した LRW の皮膚透過性	37
第 4 節 小括	48
総括	49
実験	51
謝辞	60
参考文献	61
原著論文	70

序論

皮膚は、体内と周囲の環境とを隔てる境界に位置し、体内の物質が外界に漏出するのを防ぐと同時に、外界から物質が体内へ侵入するのを防ぐ役割を果たしている。成人では表面積にして約 1.7 m²、体重の約 8%を占め、全血液の 1/3 が循環しているヒト最大の臓器である。表面側から表皮、真皮に分けられ、皮膚表面からは毛が生えており、汗腺なども開口している。毛を取り囲む組織のことを毛包といい、毛包上部には皮脂腺があり、内部は皮脂で満たされている¹⁾。皮膚の構造の概要を Fig. 1 に示す。最外側の表皮の上層は、角層と呼ばれる角化細胞が細胞間脂質で埋められたレンガとモルタルに例えられる層構造をなしており、体内への異物の侵入を防ぐ強固な物理的バリアをなしている。角層の下に生きた表皮には、酵素、ランゲルゲルハンス細胞が存在し、代謝、免疫反応を引き起こす^{2,3)}。このように生きた表皮は生物的バリアをなしている。表皮は最下層の基底層で、細胞が増殖と分化を繰り返しながら角化という生化学的変化を起こしながら上方の層へ移行し、やがて表面から垢となって剥がれ落ちる^{4,5)}。表皮の下には、真皮と呼ばれる数 mm の層が存在する。真皮には細胞の周囲を埋める物質である細胞外マトリックスを産生する線維芽細胞のほか、炎症・免疫反応に関与するマスト細胞、真皮樹状細胞、リンパ球が存在し、血管やリンパ管や神経がある。細胞外マトリックスは膠原繊維（コラーゲン）、弾力繊維（エラスチン）、親水性をもち皮膚にハリを与えるヒアルロン酸などの間質によって構成される³⁾。真皮には血管が存在し、血流による栄養の運搬、皮膚内の老廃物の除去を行うとともに、真皮は皮膚の物理的強度を担保している。このように皮膚は、物理的、生物的バリアが何層にも重なった強固なバリアである。

外用剤は皮膚疾患に適用される医薬品として汎用されてきた中で、1980 年代から経皮吸収型製剤（Transdermal Drug Delivery System; TDDS）が、肝臓による

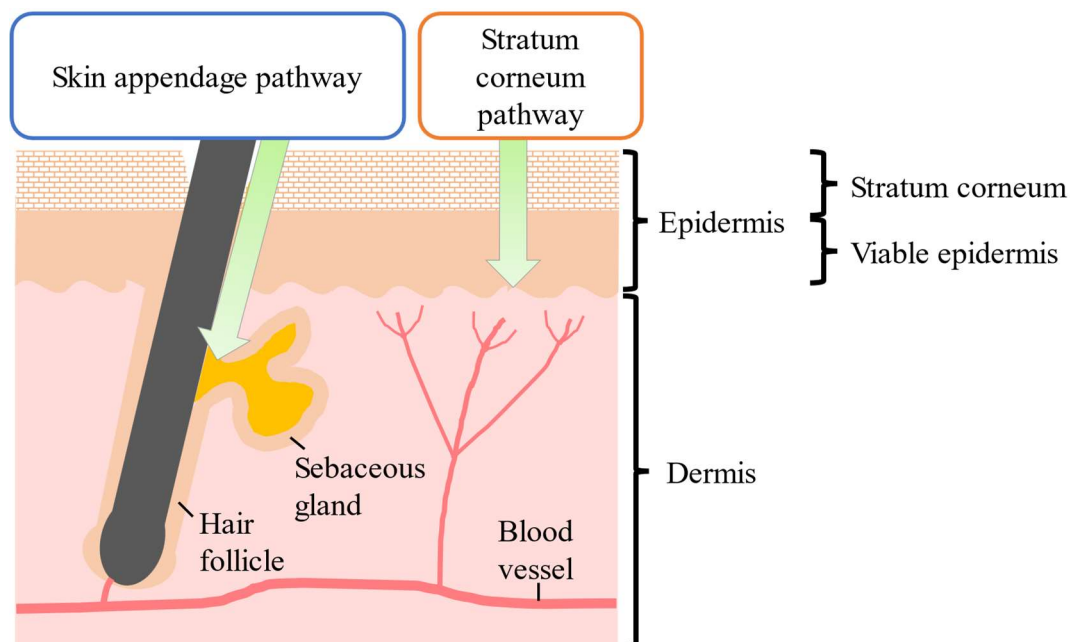


Fig. 1 Schematic Illustration of Skin and Permeation Pathway

初回通過効果を回避できる、薬剤の適用・中止が容易といった利点から注目され、皮膚は薬物の適用ルートとしても注目されるようになった¹⁾。

皮膚に適用された薬物は、浸透する過程で、様々な因子の影響を受ける。一つ目は薬物の性質の影響である。皮膚は親油性のバリアであるため一般的に親油性薬物の皮膚透過性が親水性薬物より高く、オクタノール/水分配係数 P の対数値 ($\log P$) が 3 付近⁶⁾が適していると報告されている。また、拡散しやすい薬物ほど皮膚透過性が高くなることから、分子量が大きくなれば経皮吸収性は減少することや⁷⁾、分子量が 500 Da を超える薬物は経皮吸収されにくい⁸⁾と言われており、適度な親油性を有し、分子量が小さいほど皮膚透過に適していると言える。しかし、皮膚に適用される医薬部外品の有効成分⁹⁾には、皮膚コンディショニング剤等として利用されるアスコルビン酸¹⁰⁾、ニコチン酸アミド¹¹⁾、保湿・

湿潤剤等として利用される D-パントテニルアルコール¹²⁾等の親水性のものも多く、皮膚浸透に適さない性質の薬物も、適切な浸透コントロールが望まれる。

皮膚に適用された薬物の浸透ルートは大きく二つ存在する。角層実質ルート（角層ルート）と皮膚付属器官ルートである（Fig. 1）。分子量が小さく適度な親油性を有している皮膚浸透に適した性質をもつ薬物のほとんどが角層ルートを通じて経皮吸収されると考えられている。一方、毛包などの付属器官は、体表面のわずか 0.1%であるうえ、内部も皮脂などで満たされており、角層ルートを通じて吸収される薬物の浸透への関与は低いといわれている^{13,14)}。しかし、毛包の深部はバリア能が低いとも考えられており、分子量が大きく、親水性の薬物、すなわち角層ルートでの皮膚浸透に適さない薬物の浸透ルートとして注目されている¹⁵⁻¹⁷⁾。

この毛包を介した皮膚浸透について、いくつかのモデル薬物を用いた検討で、薬物の毛包浸透性や毛包への沈着は基剤の影響を受けることは報告されているが¹⁸⁻²⁰⁾、基剤のもつレオロジー特性や、基剤中に含まれる油が、水溶性薬物の毛包浸透性にどう影響するのか詳細は分かっていない。

レシチンは、親水基と疎水基の両方を有する両親媒性物質である。レシチンは通常、単独で油に添加すると球形または楕円体の逆ミセルを形成する。しかし、この溶液に微量の極性物質（水など）を加えると、レシチン逆紐状ミセル（Lecithin Reverse Wormlike Micelle : LRW）を形成する^{21,22)}。

LRW は、油剤中で形成されるレシチンを主成分とした紐状の逆ミセルである。十分な量と長さの LRW が油剤中に存在するとき、これらは互いに絡まり合い 3 次元 (3D) 網目構造を形成して油剤を増粘・ゲル状化する (Fig. 2)。最初の系は、1988 年に Luisi らによってレシチン/水/油剤の 3 成分系として報告された²³⁾。

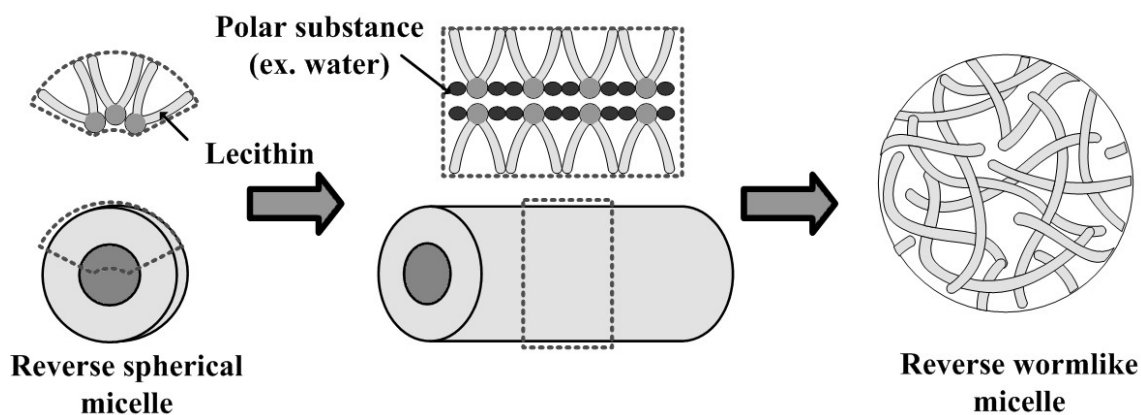


Fig. 2. Formation mechanism of lecithin reverse wormlike micelle²⁴⁾




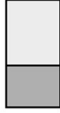

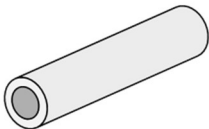

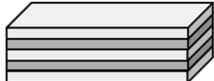
レシチンのような両親媒性物質が溶媒中で形成する分子集合体の形態は、臨界充填パラメータ（Critical Packing Parameter： CPP ）により説明され²⁵⁾、 CPP は、式（1）で表される。

$$CPP = \frac{v_{tail}}{a_{hg} \cdot l_{tail}} \quad (1)$$

(v_{tail} ：疎水部の体積、 a_{hg} ：親水基の断面積、 l_{tail} ：疎水部の長さ)

レシチンが単独で油剤中に存在するとき、レシチンの CPP は3以上であり、球状もしくは楕円状の逆ミセルを形成すると考えられる（Table 1）。ここにごく少量の水を添加すると、水分子がレシチンの親水基間に入り込んでリン酸基と水素結合し、親水基の断面積が見かけ上増加する。その結果、レシチンの見かけの CPP はわずかに減少して2~3程度となり、分子集合体の界面曲率が変化して球状から紐状の逆ミセルへと構造転移すると考えられる^{21,22)}。

Table 1. Relation of molecular assemblies and $CPP^{24)}$

CPP	≥ 3	$3\sim 2$	$2\sim 1$	1
Surfactant shape				
Structures formed	 reverse micelle	 reverse rodlike/wormlike micelle	 reverse vesicle	 lamellar

本研究では、LRW を用いて、水溶性薬物の毛包浸透に与える基剤のレオロジー特性及び基剤中の油剤の影響を明らかにすることを目的に、まず、皮膚適用可能な油の物理化学的性質が LRW のレオロジー特性に与える影響を調べた後、水溶性薬物の皮膚浸透に与える LRW のレオロジー特性と組成の影響を検討した。

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

LRW は、レシチン/極性物質/油の 3 成分系によって形成される高粘弾性体である。レシチンと極性物質は油中で水素結合を介して集合し、長くて柔軟な円筒形の逆ミセルを形成する。それらが絡み合って 3D 網目構造を形成し、ミセル間のギャップに多量の油を保持する²³⁾。LRW は容易に調製でき、室温で攪拌可能であり、熱力学的にも安定である。LRW は、スコポラミン²⁶⁾、プロキサテロール²⁶⁾、インドメタシン²⁷⁾、ジクロフェナク²⁷⁾、テストステロン²⁸⁾及びシクロスポリン²⁹⁾などの様々な薬物を可溶化でき、LRW は皮膚適用製剤として注目されている^{30,31)}。

極性物質は、LRW の形成の重要な成分である。Hashizaki らは、尿素³²⁾、ショ糖脂肪酸エステル³³⁾、D-リボース³⁴⁾、2-デオキシ-D-リボース³⁴⁾、ポリグリセロール³⁵⁾、アスコルビン酸³⁶⁾及び多価カルボン酸³⁷⁾などの極性物質が、各種油剤中で LRW の形成を引き起こすことを明らかにし、LRW の形成条件及びレオロジー特性に及ぼす極性物質の影響を詳細に報告している³⁸⁾。

LRW のもう 1 つの主成分は油剤である。LRW の形成には、直鎖アルカン、環状アルカン、脂肪酸エステル、アミンなどの多種多様な有機溶媒が有効であることが報告されている²³⁾。また、Hashizaki らによる、極性物質の探索研究、極性物質の物理化学的性質が LRW の形成条件及びレオロジー特性に与える影響の研究において、使用されている油剤は直鎖アルカンの *n*-デカンであり、皮膚に塗布できる油剤の物理化学的性質が LRW の相状態とレオロジー特性に与える影響についての詳細な報告はない。

流動パラフィン (LP) は、石油から得られる液体炭化水素の混合物であり、炭素数が 14 以上の長い炭素鎖長をもつ直鎖、分枝、環構造からなる。LP は、その

優れた皮膚耐性、高い保護効果、洗浄性能及び幅広い粘度により、外用剤、スキンケア及びリップケア化粧品に長年使用されてきた^{39,40)}。

LP は、医薬品、食品添加物、潤滑油等、様々なグレードものが使用されており、製品の粘度を調節するために使い分けられている。本検討では、皮膚に適用可能な油剤の物理化学的性質が、LRW の形成条件及びレオロジー特性に与える影響を明らかとすることを目的に、LP を油剤に選定し、詳細な検討を行った。LP は、多くの粘度グレードが設定されており、化粧品用途としても利用されている食品添加物グレードの LP を用いた。実験には、動粘度が 4.00 ~ 88.0 mm²/s の 5 種類の LP⁴⁰⁾ (Table 2) を用いた。動粘度と LP の平均分子量は相関しており、分子量が大きな LP ほど、動粘度が高くなる³⁹⁾。また、日本薬局方収載の流動パラフィン LP-E に相当し、その他の LP は軽質流動パラフィンに分類される。

Table 2. Kinematic Viscosity of LPs at 37.8°C⁴⁰⁾

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

第1節 LPの物理化学的性質がLRWの形成のしやすさに与える影響

LRWは、レシチン/極性物質/油剤の3成分からなる熱力学的平衡系であり、これらの成分の質量比によって相状態が変化することがある。また、使用する極性物質や油剤の種類によっても逆紐状ミセルの形成のしやすさは異なる。そこで、レシチン濃度を20%に固定し、極性物質に代表的な水を用いた場合の、レシチン/極性物質/LPの3成分系状態図を作成し、高粘弾性をもつLRWの形成領域を特定した。なお、相状態の判別は偏光板を用いた目視観察により行った。また、ミセルの形態は小角X線散乱(SAXS)測定により判別した⁴¹⁾。

1.1. レシチン/水/LP 系の相状態

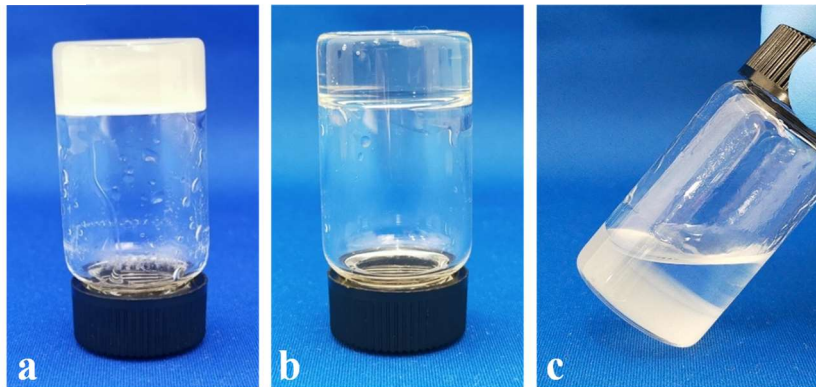
偏光板を用いた目視観察により相状態の判別を行った。ミセル相は、光学的に等方性であるため複屈折性は示さず、光を強く散乱しないので外観は透明である。一方、ラメラ液晶相などは、光学的に異方性であるため複屈折を示し、特徴的な偏光像を示す⁴⁾。

Figure 3 (a)に、異なる水の濃度でのレシチン/水/LP-C 系の外観写真を示す。水の濃度が 0.39% (a★) の場合、試料は濁り、偏光が見られた。偏光を示す半透明または曇った試料は、状態図では Turbid と判定した。水の濃度が 0.74% (b★) の場合、試料は透明で高粘弾性体で偏光が見られず、状態図では LRW とした。水の濃度が 1.50% (c★) の場合、試料は 2 相に分離し、状態図では two-phase とした。

25°Cにおけるレシチン/水/LP 系の相状態図を Fig. 3 (b)に示す。試料中の水の濃度を測定したところ、LP は水を含まなかったが、レシチン自体には約 0.65% の水が含まれていたため、水の濃度が 0.13%以下の試料を調製することができなかった。LP-A を用いた試料は、水の濃度が 0.39%未満の場合は白濁状態にあり、水の濃度が 0.39 ~ 1.55%の試料は LRW を形成し、水の濃度が 1.55%を超える試料は 2 相分離状態だった。LP-B 及び LP-C 系では、水の濃度が 0.46~1.05%及び 0.49 ~ 0.83%の試料がそれぞれ LRW 状態であった。LP-D 及び LP-E 系は水の濃度にかかわらず 2 相分離状態であった。LP-A 系は最も広い LRW 領域を示し、LP の動粘度が増加するにつれて、LRW の形成領域は狭くなった。以上のことから、分子量の小さな LP を使用する方が、LRW の形成領域が広いことが明らかとなった。

なお、LRW は熱力学的平衡状態にあるため高い安定性を有している。LP 種に関係なく、すべての LRW は 25°Cで 1 年以上、相状態に変化は認められなかった。

(a)



(b)

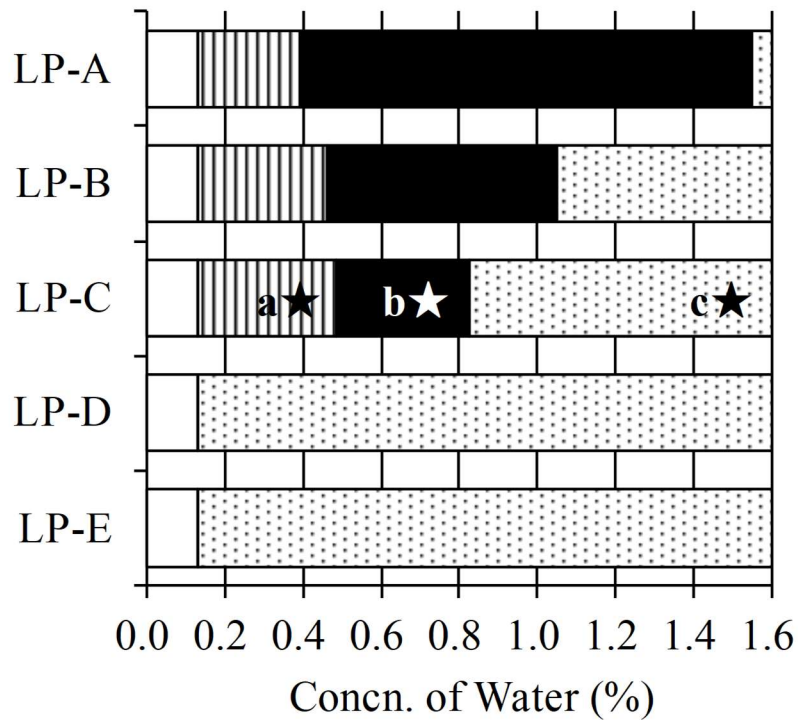


Fig. 3. Visual Observation and Phase Diagrams of Lecithin/Water/LP Systems at 25°C (a) Visual observation of lecithin/water/LP-C with a water concentration of (a★) 0.39%, (b★) 0.74%, and (c★) 1.50%. (b) Phase diagrams with different water concentrations. □: Not tested, ▨: Turbid, ■: LRW, ▩: two-phase. The lecithin concentration was fixed at 20%.

1.2. 小角 X 線散乱解析

SAXS 測定は、直径数ナノメートルから数十ナノメートルのミセル粒子の構造解析に役立つ。散乱ベクトル q は長さの逆数の次元をもつため、小さな q 領域のプロファイルは粒子サイズなどの大きな構造に関する情報が、中間の q 領域は粒子の形状などに関する情報が、大きな q 領域は粒子表面の凹凸などの小さな構造に関する情報が含まれている。なお、中間の q 領域の傾きが 0、-1、-2 の場合は、粒子形状がそれぞれ球状、円筒状、板状であることを示す⁴²⁾。

外観が均一な試料に対して SAXS 測定を実施し、試料中の微粒子の形状を分析した。

Figure 4 に、レシチン/水/LP-B 系の SAXS プロファイルの例を示す。水の濃度 0.43%（白濁状態）では明瞭な回折ピークが得られ、ラメラ液晶構造の形成が示唆された（Fig. 4 (a)）。回折ピークが最大強度を示したときの q の値を用いて、ラメラ液晶の層間距離 (d) を算出したところ、約 5.4 nm であった。対照的に、水の濃度 0.68%では、中間の q 領域 ($q=0.1\sim 1\text{ nm}^{-1}$) で、円筒形粒子（LRW の存在）を示す -1 の傾きが得られた。これは、LRW の形成を裏付けている（Fig. 4 (b)）。LRW の断面半径を算出したところ、1.5 nm であり、油剤に *n*-デカン、極性物質にショ糖脂肪酸エステル、尿素を用いた LRW と同等であった^{32,33)}。

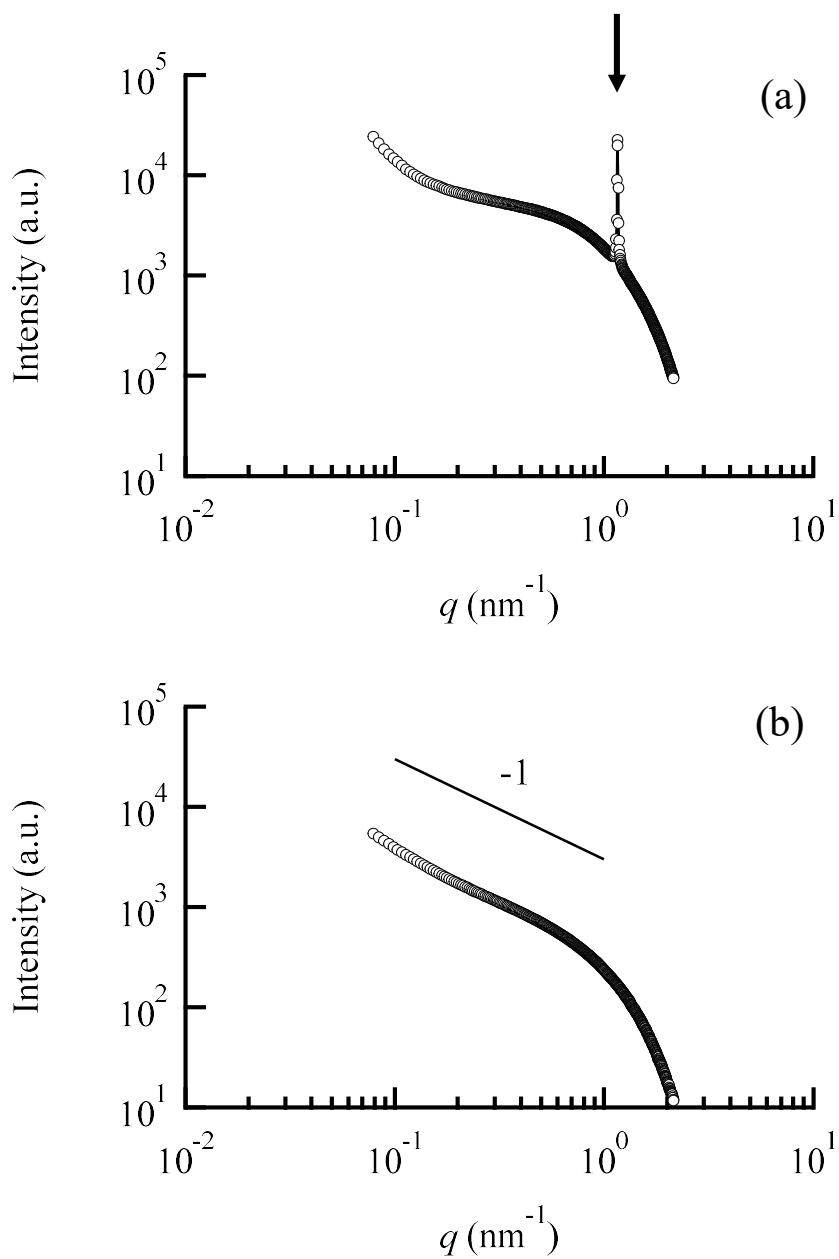


Fig. 4. SAXS Profiles (Scattering Intensity vs. the Wave Vector q) for the Lecithin/Water/LP-B System at 25°C

(a) Profile of the water concentration = 0.43% system. (b) Profile of the water concentration = 0.68% system. LRW samples were diluted ten times in LP for SAXS measurements, so (b) shows profile of sample with water concentration of 0.068%.

1.3. レシチンの LP への溶解性

レシチンが LP 中で形成する分子集合体の形態は、CPP に依存する。CPP は、レシチンモノマーと極性物質の水素結合の形成により変化するため、レシチンが LP 中でミセルを形成するためには、LP 中に溶解し、モノマーとして存在している必要がある。すなわち、レシチンの LP への溶解性がミセルの形成に影響することが考えられる。そこで、LP の物理化学的性質がレシチンの溶解性に与える影響を確認することを目的に、レシチンの LP への溶解度を調べた。

Figure 5 に、レシチンの LP への溶解度を示す。レシチンの溶解度は 5 種の中で最も分子量の小さな LP-A のとき、最も高く 5% であった。そして、LP の分子量の増加にともないレシチンの溶解度は減少し、分子量の大きな LP-D 及び LP-E では約 0.1% と低かった。

以上のことから、レシチンは分子量が大きな LP-D 及び LP-E に対する溶解性が低かったため、球状ミセルを形成せず、LRW は形成しないと考えられる。

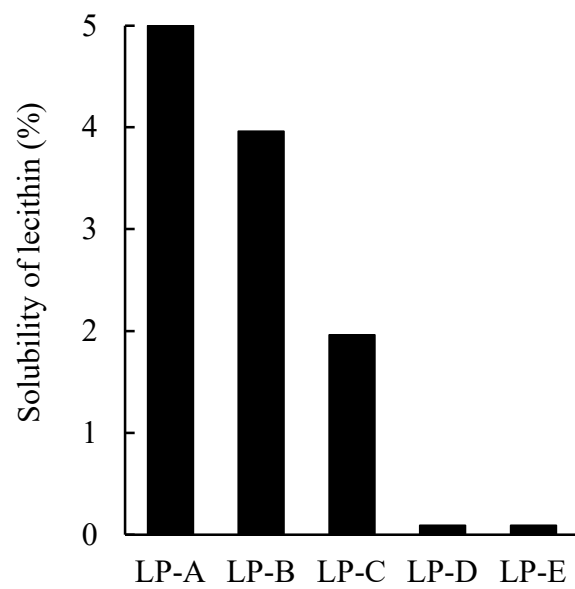


Fig. 5. Solubility of Lecithin in LPs at 25°C

第2節 レシチン/水/LP系LRWのレオロジー特性

レオロジーとは、物質の変形や流動を取り扱う技術領域であり、プラスチックの成形加工や高分子の力学特性、塗料やインキの塗りやすさ、化粧品の塗り心地、食品のテクスチャーなど、様々な分野での現象の理解と製品の設計に用いられている。多くの産業で流動の制御手段として用いられており、評価対象が多様であると同時に、評価方法も多様である^{43,44)}。

レオロジー特性を評価するための測定方法は、いずれの方法も、一定の条件下または条件を変えながら、物質を変形または流動させ、その力学的応答を測定する⁴⁵⁾。代表的な測定法に定常流粘度測定と動的粘弾性測定がある。

定常流粘度測定とは、試料を一定のひずみ速度で流動させ、定常状態になったときの粘度を測定するものであり、一定せん断下での流動挙動を与える。一方、動的粘弾性測定とは、試料にひずみあるいは応力を周期的（動的）に加えて行う測定方法で、物質の粘弾性は変形の角周波数（ ω ）によって変化する。なお、弾性（固体としての性質）は貯蔵弾性率（ G' ）、粘性（液体としての性質）は損失弾性率（ G'' ）として与えられる^{45,46)}。

LRWをはじめとする紐状ミセル系は、通常絡み合い高分子系とは異なり、その構造の違いから特異的なレオロジー特性を示すことが知られている。一般に、LRWの粘弾性挙動は、単一の緩和時間をもつMaxwellモデルに従うことが知られている。緩和時間（ τ ）とは、物体に一定のひずみを加え続けた際、初期応力値が37%（ $1/e$ ）まで減衰するのにかかる時間を示しており、LRWの絡み合いの解消にかかる時間を反映している。通常、鎖状高分子は単量体が共有結合によりつながっているため、流動によって分子鎖の切断は起こらない。そのため、レプテーションと呼ばれる運動様式により絡み合いを解消する。このレプテーションとは、絡み合った高分子が、それ自体のミクロブラウン運動によって末端から徐々に絡み合いを解す運動様式のことであり、緩和時間は広い分布をもち

分子量の 3 乗に比例する⁴⁷⁻⁵⁰。一方、LRW は、化学平衡により形成されるため、流動により切断されても放置すれば直ぐに再結合してもとの構造に戻る。このため、LRW は、レプテーションに加えて、切断と再結合を高速で繰り返すブレイキングと呼ばれる運動様式をもっている。従って、LRW の絡み合いの解消は、このブレイキングとレプテーションのバランスによって説明される。なお、ブレイキングによる緩和時間 (τ_b) がレプテーションによる緩和時間 (τ_{rep}) よりも十分に短い場合は単一 Maxwell モデル型の挙動を示し、式 (2) 及び式 (3) がフィットする。この場合 τ は、 τ_b と τ_{rep} の幾何平均で示され、ミセルの長さ (\bar{L}) を反映している (式 (4))^{51,52}。

$$G' = \frac{\omega^2 \cdot \tau^2}{1 + \omega^2 \cdot \tau^2} \cdot G_0 \quad (2)$$

$$G'' = \frac{\omega \cdot \tau}{1 + \omega^2 \cdot \tau^2} \cdot G_0 \quad (3)$$

$$\tau = (\tau_b \cdot \tau_{rep})^{1/2} \sim \bar{L} \quad (4)$$

ここで、 G_0 はプラトー弾性率と呼ばれ、高周波数側の G' が平坦になるときの弾性率の大きさを示している。 τ は G' と G'' の交点における周波数の逆数で与えられる。 G_0 は式 (5) のような関係式が成立する^{51,53}。

$$G_0 = v \cdot k \cdot T = \frac{k \cdot T}{\xi^3} \quad \xi = \Phi^{-0.75} \quad (5)$$

ここで、 ν は絡み合いの数密度、 k はボルツマン定数、 T は絶対温度、 ξ は絡み合い網目構造のメッシュサイズである。また、 Φ はLRWの体積分率であることから、 G_0 はLRWの量を反映している。これらの関係式を用いて、 τ からLRWの長さ、 G_0 からLRWの量について検討を行うことができる。また、ゼロシア粘度 η_0 はLRWの量と長さによって決定され、次の式で示される（式（6）⁵⁴）。

$$\eta_0 = G_0 \cdot \tau \quad (6)$$

そこで、LPの種類や水の濃度が、LRWの性質に及ぼす影響を、定常流粘度測定及び動的粘弾性測定により評価した。

2.1. LRW の粘度に及ぼす LP の影響

LRW 形成領域の試料に対して定常流粘度測定を実施した。

Figure 6 (a)に代表例として、LP-A を用いた水の濃度の異なる 3 つの試料の測定結果を示す。水の濃度が 0.48%のときの η は、せん断速度が 0.4 s^{-1} 程度までは一定のままでありニュートン流体の特徴を示したが、より高いせん断速度では減少し、非ニュートン流体の特徴を示した。水の濃度の異なる他の試料についても、同様のプロファイルが観察された。

一般に、LRW は化学平衡により形成されるため、流動により切断されても放置すれば直ぐに再結合してもとの構造に戻る。LRW の 3D 網目構造の再結合速度が加えられたせん断速度よりも早い場合、3D 網目構造構造は維持されるため粘度は一定値を示すが、3D 網目構造の再結合速度が加えられたせん断速度よりも遅い場合、3D 網目構造構造が崩壊し再構築できなくなるため、粘度は急激に低下する。この現象は、シアシニングと呼ばれている^{23,35,38})。LP-B 及び LP-C を使用しても同様のプロファイルが得られた (データ非表示)。

次に、せん断速度をゼロに外挿し、 η_0 を求めた。 η_0 は試料を静置したときの粘度を表す。Figure 6 (b)に、LP-A、B 及び C のそれぞれを油剤に使用した LRW の η_0 を、水の濃度に対してプロットした結果を示す。LP-A を用いた試料では、水の濃度の増加とともに η_0 が増加し、水の濃度 0.90%のときに最大となり、その後減少した。LP-B、C を用いた試料では、 η_0 は LP-A を用いた試料と同様の変化を示したが、最大値を示す水の濃度は異なり、いずれも水の濃度 0.59%で最大となった。これは、分子量の大きな LP を使用した場合、分子量の小さな LP を使用した場合よりも少量の水で、絡み合うのに十分な長さの LRW が生成したことを示している。Figure 5 からも明らかのように、レシチンは分子量の大きな LP には溶けにくいことから、臨界ミセル濃度 (cmc) が低く球状ミセルを形成しやすいと予想される。そのため、少量の水を添加しただけで、逆ミセルの構造が球状

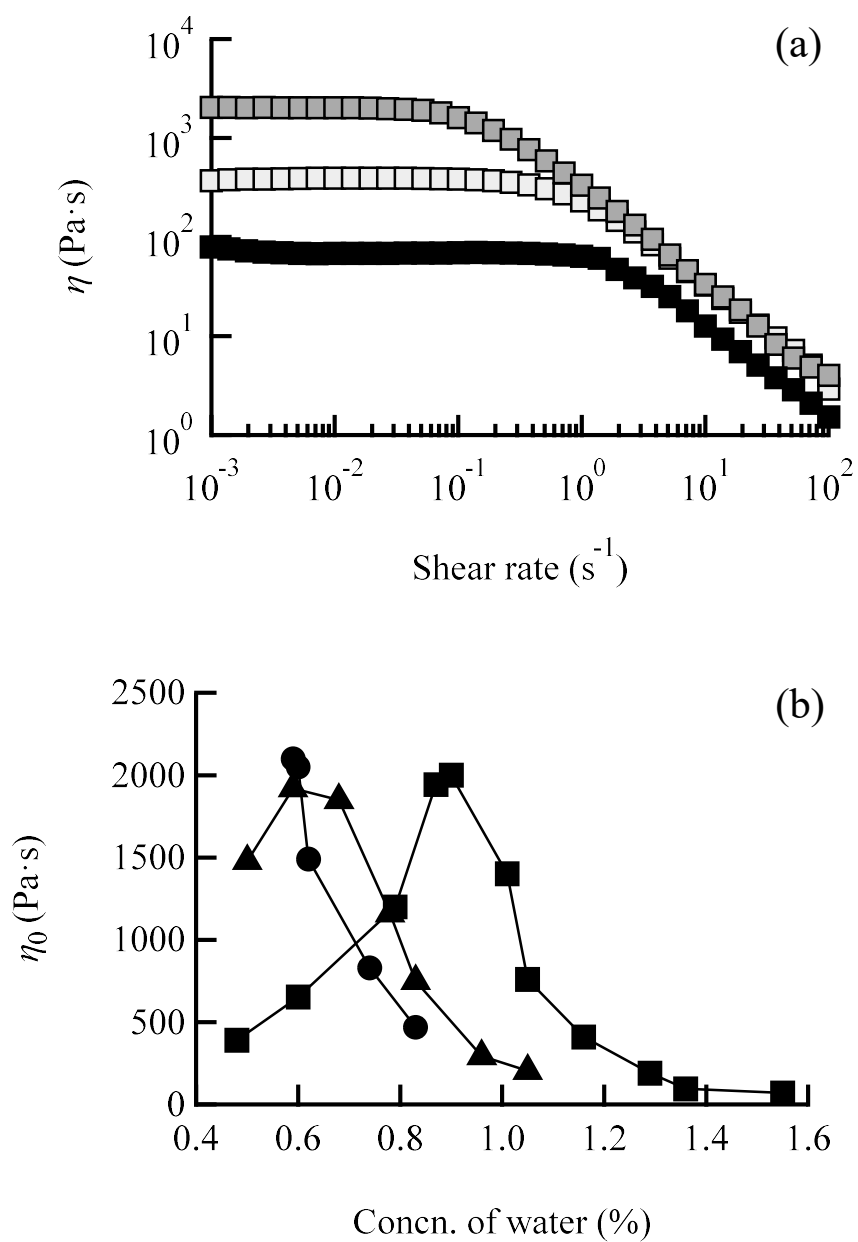


Fig. 6. Steady Flow-viscosity Measurements and Zero-shear Viscosity at 25°C

(a) Steady flow-viscosity (η) vs. shear-rate curves for the lecithin/water/LP-A system at various water concentrations. \square : water = 0.48%, \square : water = 0.90%, \blacksquare : water = 1.55%. (b) Zero-shear viscosity (η_0) of lecithin/water/LP systems as a function of water concentration. \blacksquare : LP-A, \blacktriangle : LP-B, \bullet : LP-C. The lecithin concentration was fixed at 20%.

から紐状に転移したと考えられる。また、 η_0 の最大値は、LPの分子量に関わらず、約2 kPa・sであった。

2.2. LRW の粘弾性に及ぼす LP の影響

LRW 形成領域の試料に対して周波数分散測定を行った。これにより、試料の粘弾性が変形速度（角周波数 ω ）に対してどのように変化するかを調べた。

Figure 7 (a)に、LP-A を用いた LRW の G' と G'' の ω に対する変化を示す。なお、Fig. 7(a)中の実線は、式 (2) 及び式 (3) に基づいて単一の Maxwell モデルでフィッティングした結果を示す。水の濃度 0.48% のとき、 G' と G'' は ω が 0.6 rad/s 付近で交差し、交点より低周波数側では粘性成分 G'' が、高周波数側では弾性成分 G' が優位であった。水の濃度が 0.90%、1.55% の試料の G' と G'' も同様に、特定の周波数で交わり、低周波数側では粘性成分 G'' が、高周波数側では弾性成分 G' が優位となった。

Figure 7 (b)に、フィッティングから算出した G_0 の水の濃度に対する変化を示す。LP-A を用いた LRW の G_0 は、水の濃度の増加と共に単調に増加し、1300 Pa 付近で一定となった。LP-B、LP-C を用いた LRW の G_0 も同様に単調に増加し、最大値は 1500 Pa 程度であった。 G_0 は試料中のミセルの量を反映したパラメータであるため、LRW のミセルの量は LRW 中の水の濃度と共に増加したことが示された。 G_0 の最大値は、LP の種類に関係なく類似しており、試料内で形成された LRW の最大量は LP の種類に関係なく同程度であると考えられる。さらに、同じ水の濃度で比較すると、 G_0 は LP の分子量が増加するにつれて増大した。これは、分子量が大きな LP は、より少ない水分でより多くの LRW を形成することを示唆している。

Figure 7 (c)に、フィッティングから算出した τ の水の濃度に対する変化を示す。LP-A を用いた LRW の τ は、水の濃度の増加に伴って増加し、水の濃度 0.90% のとき最大値 3.6 s を示した後減少した。LP-B を用いた LRW の τ も同様に、水の濃度の増加に伴い増大し、水の濃度 0.59% で最大値 2.8 s を示した後減少したが、 τ はより低い水の濃度で最大を示した。LP-C を用いた LRW の τ は、水の濃度が

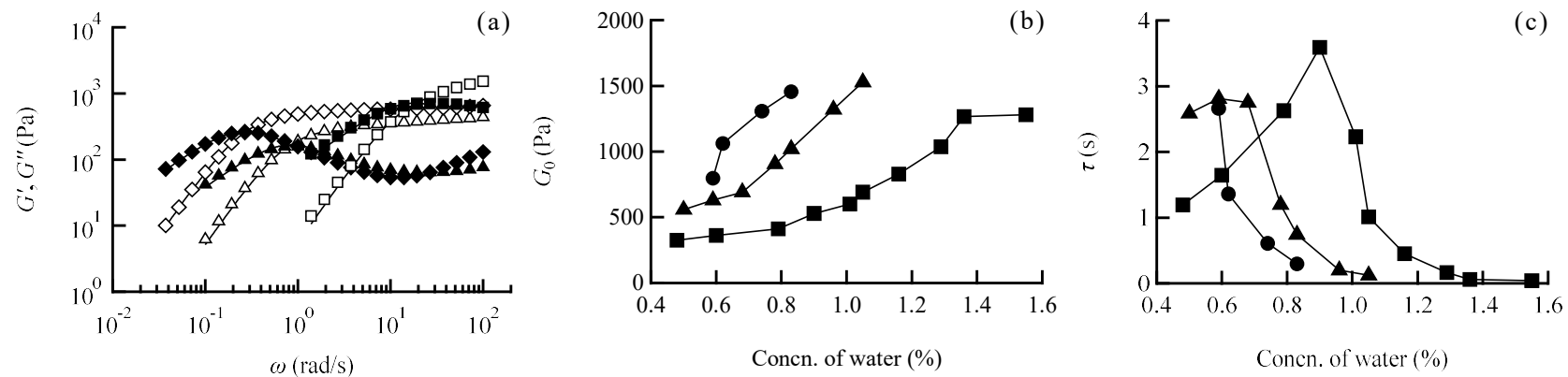


Fig. 7. Frequency Sweep Measurements, Plateau Modulus and Relaxation Time at 25°C

(a) 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. (b) Variation in plateau modulus (G_0) and (c) relaxation time (τ) at different water concentrations in lecithin/water/LP systems. \blacksquare : LP-A, \blacktriangle : LP-B, \bullet : LP-C. The lecithin concentration was fixed at 20%.

0.59%で最大値 2.7 s を示し、水の濃度が増加するにつれて減少した。LP-A、LP-B、LP-C の最大 τ における水の濃度は、それぞれ 0.90%、0.59%、0.59%であり、 τ の水の濃度に対する変化は、 η_0 の水の濃度変化と同様であった。これは式 (6) で示したように、 η_0 は G_0 と τ の積で表されるためである。 G_0 はミセルの量、 τ はミセルの長さを表すパラメータであることから、水の濃度の増加に伴いミセルの量が増加し、LRW 中の 3D 網目構造の強化により粘度は増加するが、ミセルの長さが伸長しなくなる水の濃度に達すると粘度が低下したことを示唆している。一般に、レシチン/水/油剤からなる LRW は、特定の水の濃度で最大の η_0 を示す⁵⁵⁾。これは、直鎖状であった LRW が、分岐構造へ移行するためと考えられる。分岐 LRW の分岐点は固定されたものでなく移動することができ、直線状 LRW よりも早く応力を緩和できるため、緩和時間が短くなり粘度が低下する⁵⁶⁾。

レオロジー測定から、LP の分子量は最大粘度が観察される水の濃度に影響を与えるが、最大粘度値には影響を及ぼさないことから、LP の分子量は LRW の分岐構造の形成に関連していると考えられる。

第 3 節 小括

分子量の異なる 5 種類の LP を使用して、LRW の形成と特性に対する油剤の物理化学的性質の影響を検討した。

LP の分子量が小さい場合、LP はレシチンを溶解しやすいため、LRW を形成しやすく広範囲の水の濃度で LRW を形成した。また、LRW の粘度は LP の分子量と水の濃度に依存した。これらのことから、LP の物理化学的特性は、LRW の形成条件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。異なる分子量の LP を用いることで、同一の水の濃度でも様々な粘度の LRW を調製できることが明らかとなった。

LP の分子量と水の濃度を選択することで、様々なレオロジー特性を備えた皮膚適用製剤の調製が可能であることが明らかとなった。

第 2 章 水溶性薬物の皮膚透過に与える LRW のレオロジー特性と組成の影響

薬物を皮膚に適用すると、基剤や基剤中に溶けた薬物は角層へ分配した後、拡散により皮膚内を浸透する。Figure 8 に、定常状態（薬物を無限用量で適用した後、一定の時間が経過し皮膚内の薬物濃度が一定となったとき）における薬物の濃度（ C ）と吸収方向の距離（ x ）とのプロファイルを示す。図は左から、基剤、皮膚、レシーバーを示している。基剤から皮膚に分配した薬物が基剤側からレシーバー側へ拡散するとき、基剤中の薬物濃度（ C_v ）がほぼ一定、かつ、皮膚とレシーバー界面でシンク条件（薬物濃度がほとんど 0）が成り立つとすると、皮膚中の薬物濃度は基剤と皮膚の界面から皮膚とレシーバーの界面まで一定の濃度勾配が生じる。基剤中の薬物濃度と薬物の皮膚への分配係数（ K ）より、基剤側の皮膚中濃度は $K \cdot C_v$ となり、レシーバー側の皮膚中濃度は 0 となる⁵⁷⁾。すなわち、濃度勾配（ dC/dx ）は、基剤中の薬物濃度と皮膚の厚さ（ L ）より、式（7）で表される。

$$\frac{dC}{dx} = \frac{K \cdot C_v}{L} \quad (7)$$

薬物の皮膚透過速度（Flux、 J ）は、Fick の第 1 法則より式（8）で表される⁵⁸⁾。

$$J = \frac{D \cdot K \cdot C_v}{L} \quad (8)$$

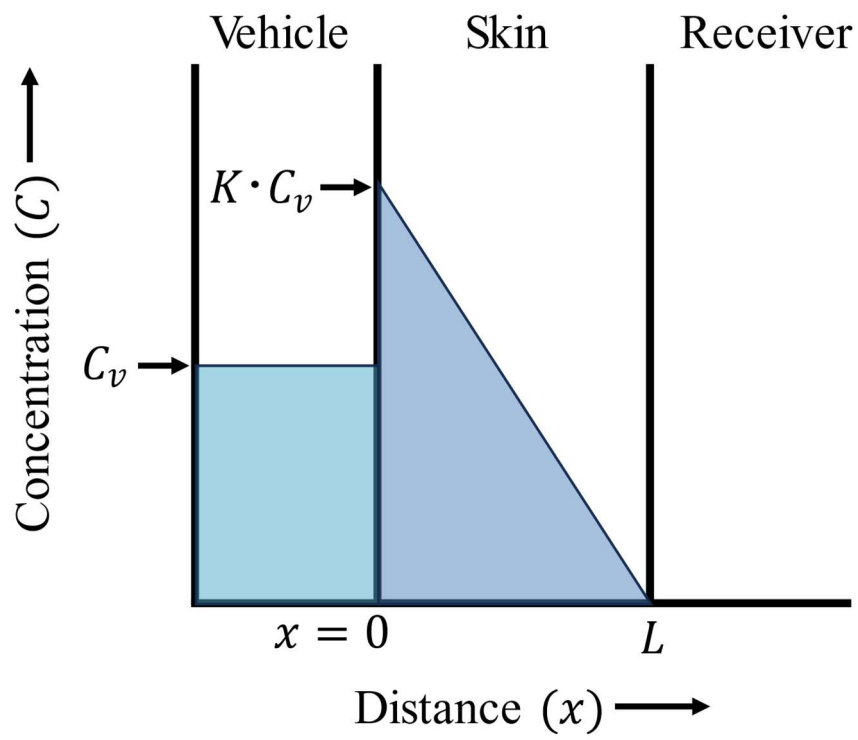


Fig. 8. Concentration-distance Profile of Drugs in the Skin by Infinite System

ここで D は皮膚中の薬物の皮膚中拡散係数である。さらに、単位面積当たりの皮膚中薬物量 (Q_{skin}) は、式 (9) で表される。

$$Q_{skin} = \frac{K \cdot C_v \cdot L}{2} \quad (9)$$

式 (8) 及び式 (9) より

$$J = \frac{2D \cdot Q_{skin}}{L^2} \quad (10)$$

となり、Fick の法則に従い、分配・拡散により皮膚を透過する薬物の J と Q_{skin} は比例する。

前章では、皮膚適用可能な油剤である LP を用いて、LRW を調製することができること、LP の分子量と水分量の選択により、様々なレオロジー特性を備えた皮膚適用製剤を調製できることを明らかとした。本章では皮膚適用可能な油剤を用いた LRW へ水溶性薬物を配合し、LRW のレオロジー特性と組成が、水溶性薬物の皮膚透過へ与える影響を検討した。

水溶性薬物は皮膚に塗布する場合、通常、乳剤などの含水製剤に組み込まれる。ただし、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は、水を含まない油性基剤を用いた製剤が使用される。油性基剤としてワセリンが汎用されるが、薬物の皮膚透過性が低いという問題があるため、水溶性薬物を均一に配合でき、皮膚への薬物浸透性が良好な油性製剤の開発が求められている。

LRW は油剤を増粘することができるうえ、極性物質に水を用いなくとも調製が可能である。本検討では、極性物質に水の代わりにグリセ

ロール (GL) と D(-)-リボース (RI) を、油剤にミリスチン酸イソプロピル (IPM) と IPM と物理化学的性質が類似した LP-A を選択し、LRW の調製を試みた。GL はポリオール的一种、RI は RNA の骨格をなす糖であり、いずれも保湿剤、皮膚保護剤として化粧品や医薬品に使用されている⁵⁹⁾。IPM は、水、RI、またはテトラグリセロールと LRW を形成すると報告されており²³⁾、皮膚適用剤にも汎用され、多くの医薬品や化粧品に配合されている皮膚透過促進剤である^{60,61)}。

水溶性のモデル薬物としてカルボキシフルオレセイン (CF、分子量 (MW) : 376、 $\log P$: -3.5⁶²⁾) (Fig. 9) を用いた。CF は、濃度消光を利用して、リポソームの融合や、水溶性で膜を透過しにくい性質を利用して、細胞間にチャンネルが形成されたかどうかの指標等に使用される蛍光物質である⁶³⁾。

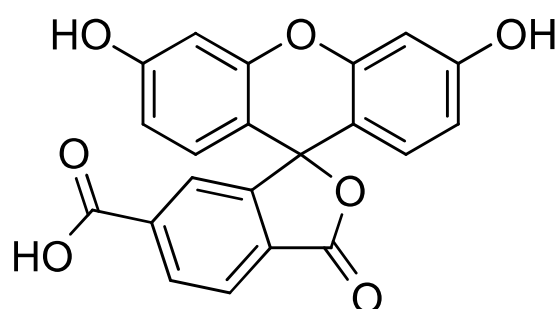


Fig. 9. Chemical structure of CF

第 1 節 皮膚適用可能な成分を用いた LRW の調製と水溶性薬物の配合

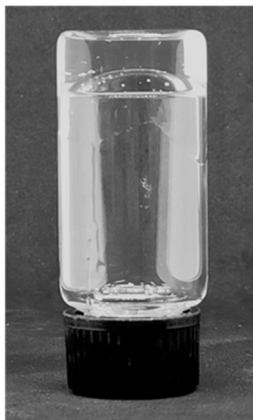
レシチン濃度を 20% に固定し、極性物質に GL または RI を、油剤に LP または IPM を使用し、レシチン/GL/LP (GL/LP) 系、レシチン/RI/LP (RI/LP) 系、レシチン/GL/IPM (GL/IPM) 系、レシチン/RI/IPM (RI/IPM) 系の相状態を確認した。

調製した試料を目視観察し、相図を作成した。Figure 10 (a) に 25℃ における LRW の代表例の写真を示した。バイアルを逆さまに置いた直後、LRW は半固形であるため流動しなかったが、放置しておくとうゆっくり流動する。これは、LRW の典型的な粘弾性特性である。Figure 10 (b) に、25℃ におけるレシチン/極性物質/油剤系の相図を示す。高粘弾性を有し、複屈折がない試料を LRW とした。油剤として LP を使用した場合、GL 濃度が 1.0 ~ 2.4%、RI 濃度が 0.1 ~ 2.4% のとき、LRW を形成した。油剤として IPM を使用した場合、GL 濃度が 3.0 ~ 5.6%、RI 濃度が 2.0 ~ 5.2% で LRW を形成した。LRW の形成範囲は、油剤に IPM を使用したときの方が LP を使用したときよりも広がった。

いずれの極性物質、油剤を使用しても LRW が調製できることを確認した。そこで、0.1% の CF 及び 1,1'-ジオクタデシル 1-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニン過塩素酸塩 (DiI, MW: 843, log P: 23.2⁶⁴) を含む LRW を調製した。DiI は赤色蛍光をもつ親油性カルボシアニン色素であり、脂質二重膜の染色や、細胞膜染色に使用される。親油性が高く分子量が大きいため、拡散による皮膚浸透はほとんどなく、油剤と共に皮膚に浸透する。そこで、DiI を油剤の動きを追跡する目的で使用した⁶⁵)。以下、CF 及び DiI を配合した LRW は、極性物質の種類と濃度、油剤の種類を組み合わせることで GL1.2LP のように表記する。

LRW 形成範囲の両端を含む複数の組成の LRW について、CF 及び DiI を配合した LRW を調製した。レシチン/GL/LP 系では、GL1.2LP、

(a)



(b)

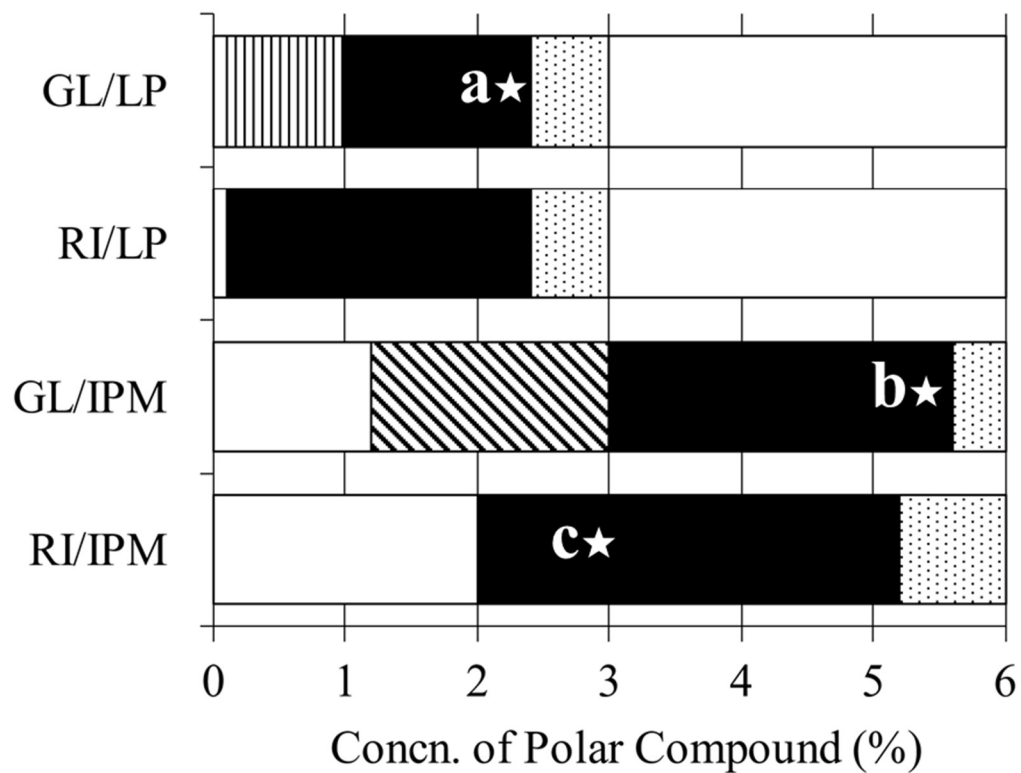


Fig. 10. Representative Photograph of LRW (a) and Phase Diagrams of Lecithin/Polar Compound/Oil Systems (b) at 25°C

(a) Lecithin/RI3.0%/IPM system, (b) □: Not tested, ▨: Turbid, ■: LRW, ▤: Two-phase, ▩: Solution. The lecithin concentration was fixed at 20%. a★, b★ and c★ correspond to GL2.4LP, GL5.6IPM and RI3.0IPM, respectively.

GL1.8LP 及び GL2.4LP を、レシチン/RI/LP 系では、RI0.1LP 及び RI0.9LP を、レシチン/GL/IPM 系では、GL3.4IPM、GL4.0IPM 及び GL5.6IPM を、レシチン/RI/IPM 系では、RI3.0IPM、RI4.0IPM 及び RI5.2IPM を調製した。目視観察の結果、いずれの試料においても LRW を形成したことから、CF 及び DiI の添加による影響はないものと考えられる。

Figure 11 に一例として、RI3.0IPM の SAXS プロファイルを示す。レシチン/水/LP 系の LRW と同様、中間の q 領域 ($q = 0.07 \sim 0.8 \text{ nm}^{-1}$) の傾きは-1 であり、円柱状粒子 (LRW の存在) を示しており、LRW の形成を裏付けた。LRW の断面半径を算出したところ、1.5 nm 未満であり、レシチン/水/LP 系の LRW と同程度であった。

以降の検討には、調製した LRW の中で中程度の流動性を有する GL2.4LP を中心に、油剤を IPM に変更した GL5.6IPM、極性物質を RI に変更した RI3.0IPM を使用した。また、ワセリンに CF 及び DiI をそれぞれ 0.1% 配合した (VA) をコントロール製剤とした。

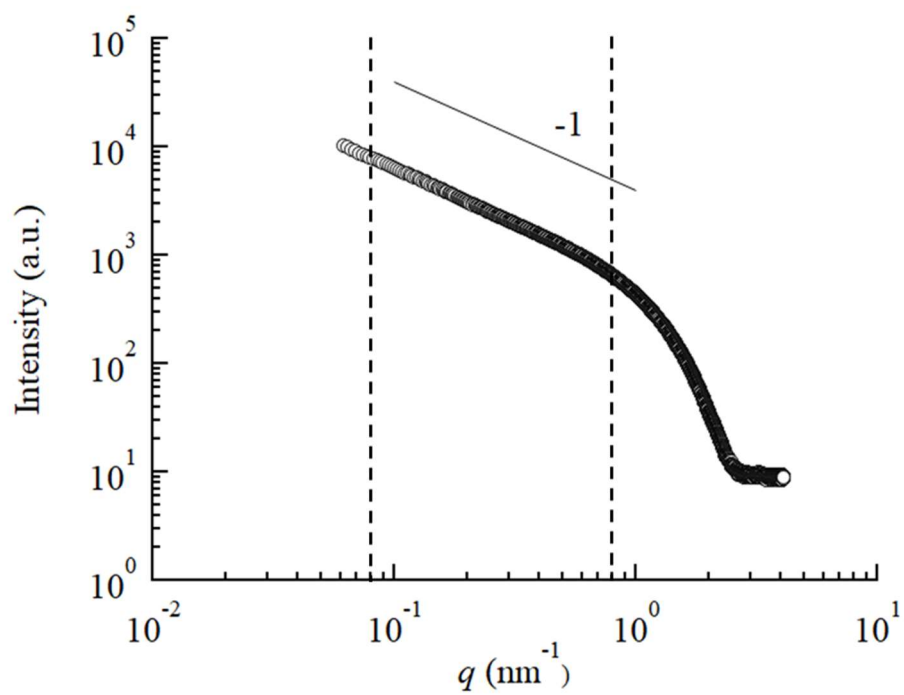


Fig. 11. SAXS Profile (Scattering Intensity vs. the Wave Vector q) for RI3.0IPM at 25°C

The area between the dotted lines indicates the intermediate q region.

Figure 12 に GL2.4LP、GL5.6IPM、RI3.0IPM 及び VA の偏光顕微鏡観察像を示す。基剤への CF の溶解性を確認したところ、VA では薬物の結晶が観察されたが LRW では観察されず、水を含まない油ベースの半固形基剤中に CF を可溶化できることが確認された。25°C で 1 年以上保存した LRW においても CF の結晶の生成は認められなかった。

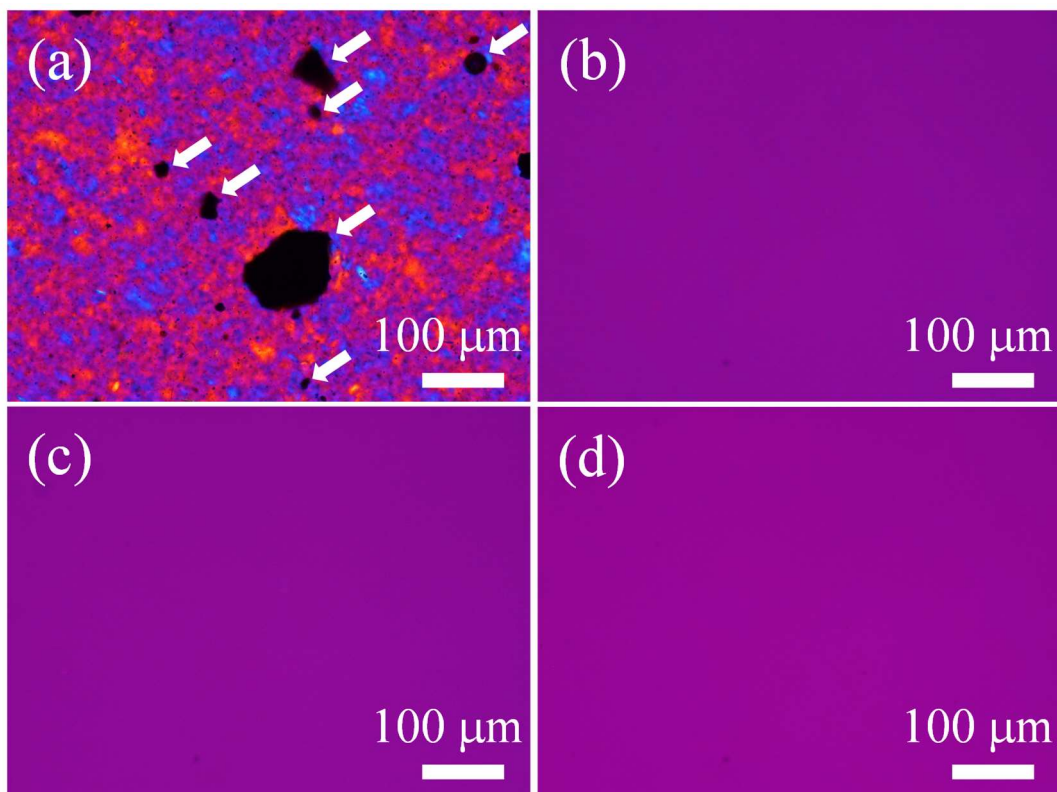


Fig. 12. Polarization Micrographs of Samples Stored at 25°C for More than a Year

(a) VA, (b) GL2.4LP, (c) GL5.6IPM, (d) RI3.0IPM. Arrows indicate crystals of drugs.

第 2 節 水溶性モデル薬物を配合した LRW のレオロジー特性

第 1 節では、皮膚適用可能な極性物質、油剤を用いて、水を含まない LRW を調製し、その中に水溶性モデル薬物である CF を配合できることを明らかにした。そこで、CF 配合 LRW のレオロジー測定を行った。測定は、保存中及び容器からの取り出し時の製剤の特性を評価するために 25°C、皮膚に塗布した後の特性を把握するために 32°C の 2 つの温度で行った。

Figure 13 (a) に VA 及び LRW の 25°C における複素粘度 (η^*) と角周波数 (ω) の関係を示す。VA の η^* は、 ω の増加とともに減少する非ニュートン流体の特徴を示した。RI3.0IPM の η^* は、 ω が 5 rad/s 程度までは一定でありニュートン流体の特徴を示したが、より高い ω では減少し、非ニュートン流体の特徴を示した。これは、レシチン/水/LP 系の LRW にも認められたシアニング現象である。GL2.4LP 及び GL5.6IPM では、低粘度のため、測定範囲内ではシアニングは認められなかった。 ω をゼロに外挿したときの GL2.4LP、GL5.6IPM 及び RI3.0IPM の粘度は、それぞれ約 4、4 及び 36 Pa·s であった。

Figure 13 (b) に 25°C での周波数分散測定の結果を示す。VA については、測定範囲全体にわたって弾性成分である G' が優位であった。対照的に、GL2.4IPM 及び GL5.6IPM では、測定範囲全体にわたって粘性成分 G'' が優位であった。RI3.0IPM では、 G' と G'' が 10 rad/s 付近で交差し、交点より低周波数側では粘性成分である G'' が、高周波数側では弾性成分である G' が優位であった。この挙動は、レシチン/水/LP 系の LRW でも認められ、粘弾性体の基本モデルである Maxwell モデルで観察される LRW の特徴である。

32°C では、特に VA と RI3.0IPM では温度の上昇に伴って η^* の減少が見られたが、 η^* と ω の関係は 25°C と同様の傾向であった (Fig. 13 (c))。LRW は、温度が上昇するとレシチンの極性部位の水素結合力が減少す

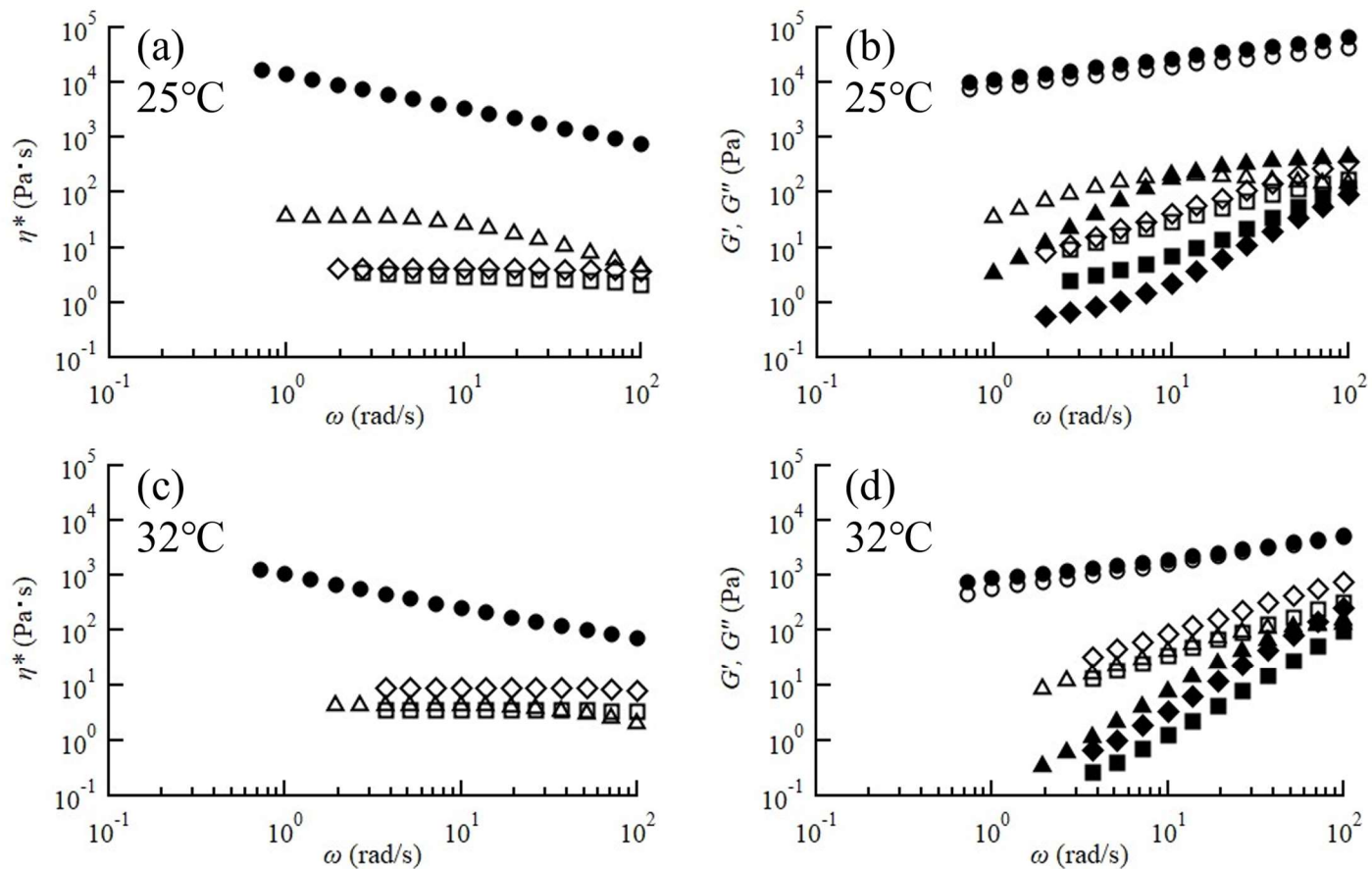


Fig. 13. Frequency Sweep Measurements at 25°C and 32°C

(a), (c) Complex-viscosity (η^*) vs. angular frequency (ω) curves. \bullet : VA, \diamond : GL2.4LP, \square : GL5.6IPM, \triangle : RI3.0IPM. (b), (d) Variation in G' and G'' as a function of angular frequency (ω). \bullet G' , \circ G'' : VA, \blacklozenge G' , \diamond G'' : GL2.4LP, \blacksquare G' , \square G'' : GL5.6IPM, \blacktriangle G' , \triangle G'' : RI3.0IPM.

るため、粘度が低下することが報告されている⁶⁾。32°Cにおける周波数分散測定の結果、VA では 25°Cと同様、 G' が優位であったが、RI3.0IPM を含むすべての LRW では測定範囲全体にわたって粘性成分である G'' が優位であった (Fig. 13 (d))。これらのことから、LRW は皮膚上では液体のように振る舞うと考えられる。

VA は、25°C、32°Cいずれの温度条件においても、測定範囲全体にわたって弾性成分が優位であったことから、容器からの取り出し時は固体の振る舞いをするため取り出しやすいが、皮膚上に塗布する際は力をかける必要がある。一方、LRW は、25°Cにおける ω が高いときは弾性成分が優位であり、32°Cにおいては粘性成分が優位であった。すなわち、容器からの取り出し時は固体の振る舞いをするため取り出しやすく、皮膚上に塗布した際は液体の振る舞いをするため微細な皮膚構造 (シワや毛包など) への浸透が可能になると考えられる。LRW は容器からの取り出しやすさと、皮膚上での広がりやすさを兼ね備えた、皮膚適用製剤に有用な粘弾性を有していることが明らかとなった。

第 3 節 水溶性モデル薬物を配合した LRW の皮膚透過性

皮膚適用可能な油剤ならびに水以外の極性物質を用いて調製した LRW に、水溶性モデル薬物である CF を配合できることを明らかにした。そこで、水溶性モデル薬物の皮膚浸透に与える LRW のレオロジー特性と組成の影響を明らかとすることを目的に、*in vitro* 皮膚透過実験を行った。

モデル皮膚として、食用として飼育されたブタの耳の皮膚を用いた。食用ブタ耳皮膚は形態的にヒト皮膚と類似しており、モデル皮膚として皮膚透過試験に使用されている^{16,67)}。水溶性薬物の透過は、皮膚電気抵抗値で測定できる皮膚バリア能が大きく影響し、皮膚バリア能が低い皮膚では透過性が高いことが知られている。皮膚バリア能を確認するための方法として皮膚電気抵抗値や経皮水分蒸散量 (Trans Epidermal Water Loss : TEWL) が用いられている⁶⁸⁾。本試験では、用いた皮膚の補正抵抗値 (電気抵抗値×有効透過面積) を皮膚バリア能の指標とした。本検討における解析には皮膚補正抵抗値が $10 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上のデータを用いた⁶⁹⁾。

Figure 14 に、CF 及び DiI を配合した製剤を皮膚に適用したときの、CF の累積透過量の時間変化を示す。24 時間の CF 累積透過量は、VA 適用群では $17.2 \pm 11.3 \text{ ng/cm}^2$ であった。一方、GL2.4LP 及び RI3.0IPM 適用群では、それぞれ 3.97 ± 0.80 、 $32.0 \pm 23.4 \text{ ng/cm}^2$ であり、VA と有意な差は認められなかった。対照的に、GL5.6IPM の適用群は、 $131 \pm 130 \text{ ng/cm}^2$ と他の製剤よりも有意に高い CF 累積透過量を示した。

Figure 15 (a) に、適用後 24 時間の皮膚中の CF 量を示す。VA 適用群では $22.9 \pm 15.7 \text{ ng/cm}^2$ であり、GL2.4LP 適用群でも同様に低かった。GL5.6IPM 適用群では、VA 及び GL2.4LP 適用群よりも有意に高かった。RI3.0IPM の適用群では、GL5.6IPM 適用群と比較して有意に高く、Fig. 14 に示した皮膚透過プロファイルの傾向とは順序が一致しなかった。

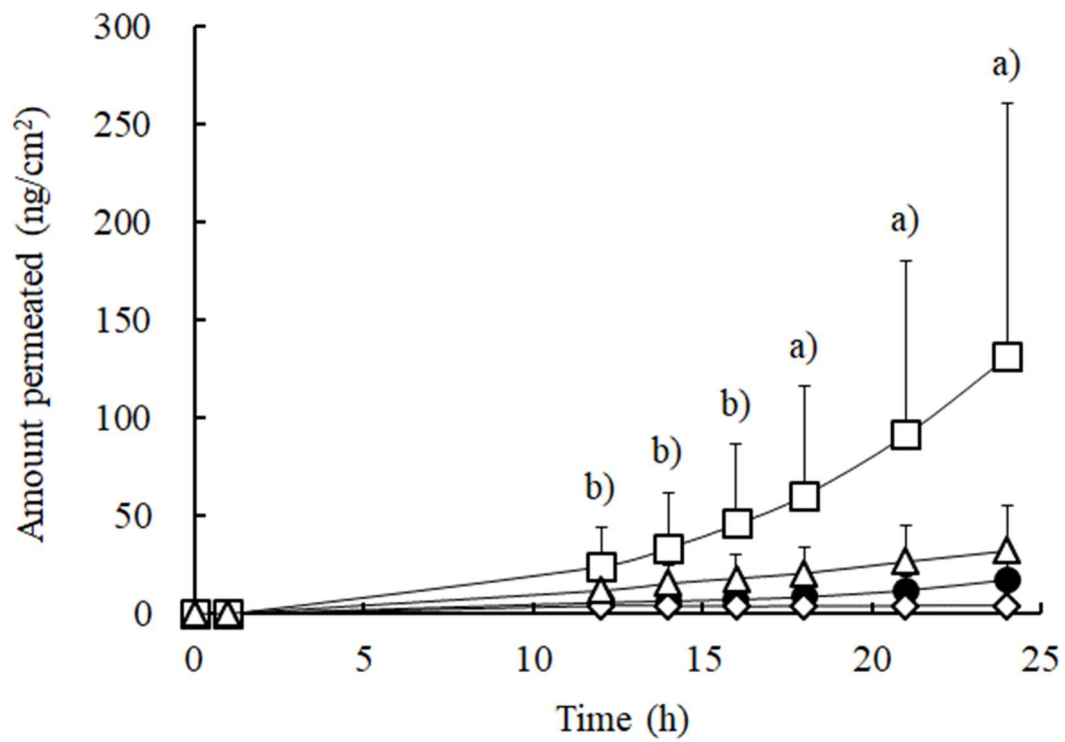


Fig. 14. Skin Permeation Profiles of CF from Samples at 32°C

●: VA, ◇: GL2.4LP, □: GL5.6IPM, △: RI3.0IPM. Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 6-8$) a) Significant difference relative to VA, GL2.4LP and RI3.0IPM. ($p < 0.05$) b) Significant difference relative to VA and GL2.4LP. ($p < 0.05$)

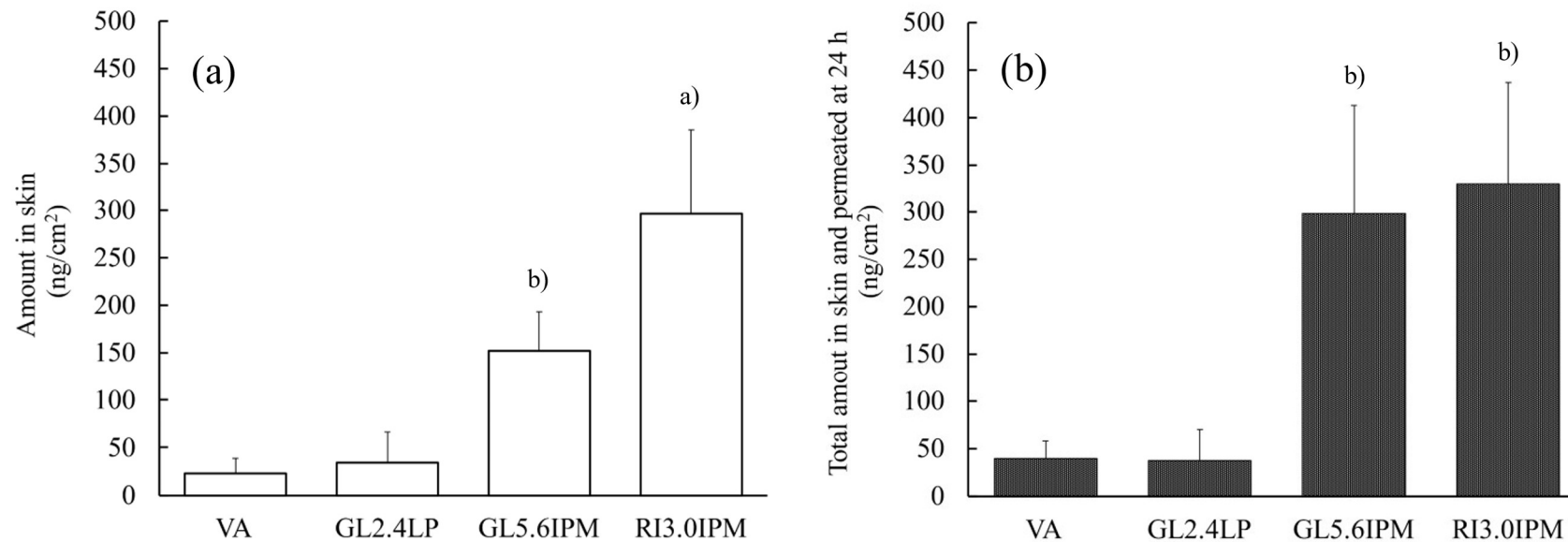


Fig. 15. Amount of CF Penetration at 24 h after Application of the Dosage

(a) Amount in the skin (b) Total penetrated amount of CF in the skin and receiver fluid. Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 6-8$) a) Significant difference relative to VA, GL2.4LP and GL5.6IPM. ($p < 0.05$) b) Significant difference relative to VA and GL2.4LP. ($p < 0.05$)

Figure 15 (b)に、適用後 24 時間の皮膚中及びレシーバー液中の CF 量の合計値を示した。VA 及び GL2.4LP 適用群では、いずれも約 40 ng/cm² と低値であった。GL5.6IPM 及び RI3.0IPM 適用群では、いずれも約 300 ng/cm² と高値であり、VA 及び GL2.4LP と比較すると有意に高かった。

角層ルートを通る薬物の皮膚透過は分配と拡散で説明され、透過速度は分配係数及び拡散係数と比例する (式 (8))。すなわち、薬物の皮膚中濃度が高いほど皮膚透過速度は高くなる (式 (10))。今回の結果は、RI3.0IPM 適用群の CF の皮膚中濃度は GL5.6IPM よりも高く、GL5.6IPM が最大となった CF 累積透過量と大小が一致しなかった。これらのことから、分配と拡散で説明される角層ルート以外の透過メカニズムの関与が示唆された。薬物の皮膚浸透は角層だけでなく毛包などの付属器官からも起こる^{15,16)}。そこで、適用後 24 時間の皮膚断面を観察することで浸透経路を検討した。

Figure 16 に、適用後 24 時間の皮膚垂直断面の共焦点顕微鏡観察画像を示す。まず、角層ルートに着目すると、VA 適用群では、角層の一部に CF (緑) と DiI (赤) の弱い蛍光が観察されたが、角層より深部の皮膚には CF の浸透はほとんど認められなかった。GL2.4LP 適用群では、角層に CF 及び DiI の蛍光が観察され、CF が LP とともに角層に浸透していることが確認されたが、角層より深部の皮膚には CF の浸透はほとんど認められなかった。GL5.6IPM 及び RI3.0IPM 適用群では、角層において強い CF 及び DiI の蛍光が認められ、表皮及び真皮においても CF が観察された。CF が IPM とともに角層に浸透し (Merge 画像で黄色)、その後分配と拡散によって表皮と真皮に浸透したと考えられる。角層ルートを介した CF の皮膚浸透は、IPM を油剤に用いた LRW を適用したとき、IPM の効果により促進されたと考えられる。

毛包に着目すると、VA では蛍光がほとんど観察されなかったのに対し、LRW では強度にばらつきはあるものの蛍光が観察された。GL2.4LP

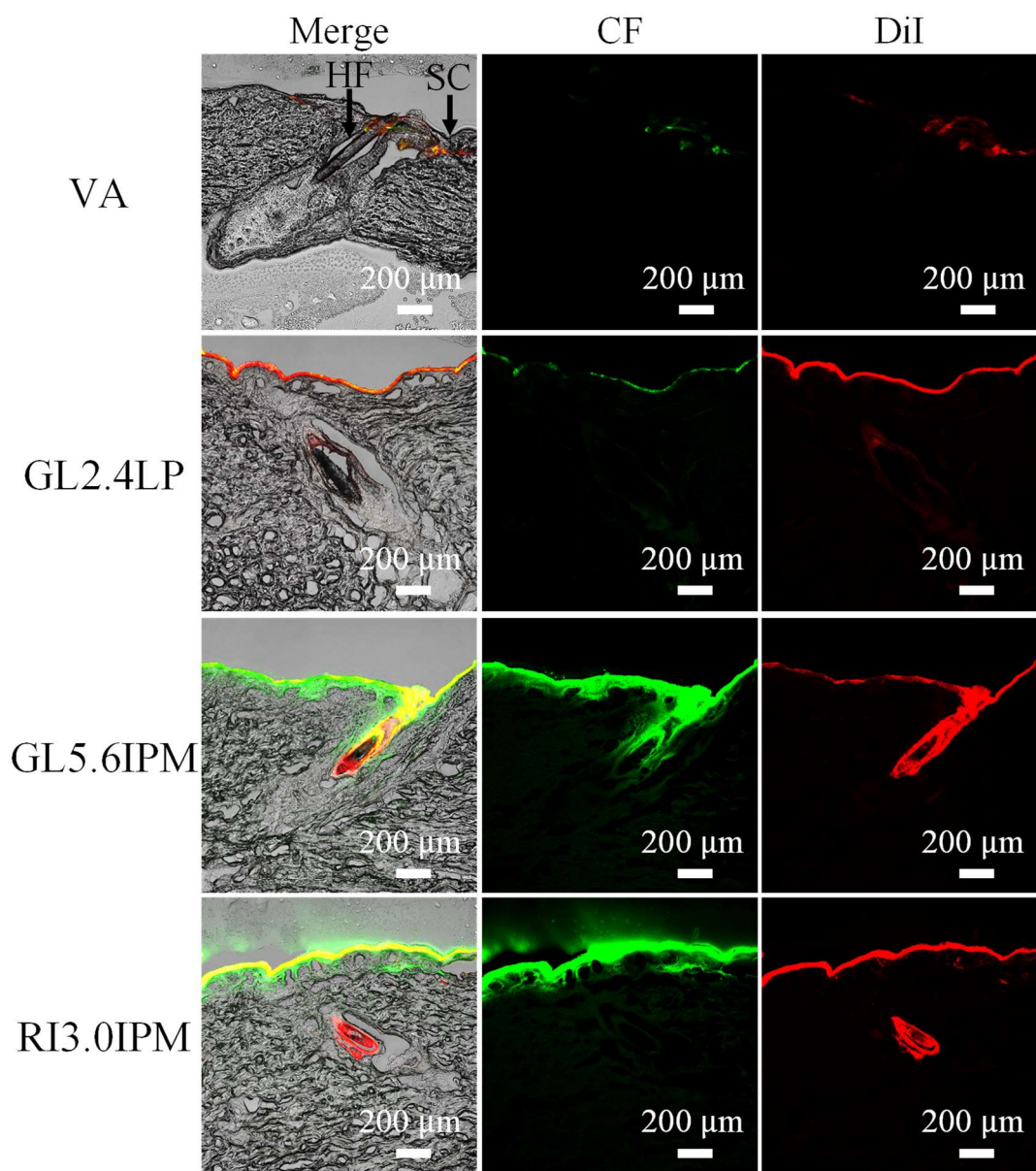


Fig. 16. Cross-Section of the Skin Samples, Observed by Confocal Microscopy at 24 h after Application
 Green indicates the distribution of fluorescence from CF. Red indicates the distribution of fluorescence from DiI. HF: hair follicle, SC: stratum corneum.

の場合、DiI の弱い蛍光のみが観察された。GL5.6IPM 及び RI3.0IPM の場合、毛包内に CF 及び DiI が観察され、LRW 自体が比較的深くまで浸透している可能性が示された。毛包ルートを経た CF の皮膚浸透は、IPM を油剤に用いた LRW を適用したときに促進されていた。以上のことから、GL5.6IPM 及び RI3.0IPM 適用後、CF は角層と毛包の両方の経路を通して皮膚に浸透したと考えられる。

Figure 17 (a)に、透過試験前の皮膚補正抵抗値と適用後 24 時間における CF の累積透過量との関係を示す。なお、皮膚補正抵抗値が低い ($10 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ 未満) ために解析に使用しなかったデータも含む全てのデータを示している。VA 及び GL2.4LP では皮膚補正抵抗値に関わらず CF の透過が低かったのに対し、油剤として IPM を用いた LRW (GL5.6IPM 及び RI3.0IPM) では、皮膚補正抵抗値が $10 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$ 未満の皮膚で高い CF 透過が認められた。皮膚補正抵抗値は角層のみならず毛包の状態も影響する。特に毛包は、真皮の下の皮下組織にまで及ぶものもあり、透過試験前の皮下脂肪除去時に毛包下部が切断される可能性があるため、皮膚補正抵抗値が低値であった皮膚では毛包のバリア能の低下が考えられる。なお、皮膚中の CF 量についても、同様の関係が観察された (Fig. 17 (b))。

上記の関係と皮膚切片の断面観察から、GL5.6IPM と RI3.0IPM の場合、毛包ルートを経た CF の浸透が促進されることが示された。DiI も毛包内で観察されたため、基剤自体が毛包に浸透したと考えられる。毛細管への物質の浸透は、物質の粘度、毛細管の直径、物質と毛細管の間の濡れ性に影響される。細孔への浸透性とレオロジー特性との関連を明らかにするため、モデル膜として孔径 $70 \mu\text{m}$ のポリプロピレン (PP) フィルターを用いた透過試験を行った。PP フィルターは、豚の耳の皮膚表面の毛包の直径がヒトの皮膚と同程度の $113 \pm 43 \mu\text{m}$ であり⁶⁷⁾、皮膚表面への製剤の湿潤性や接着に影響を与える表面自由エネ

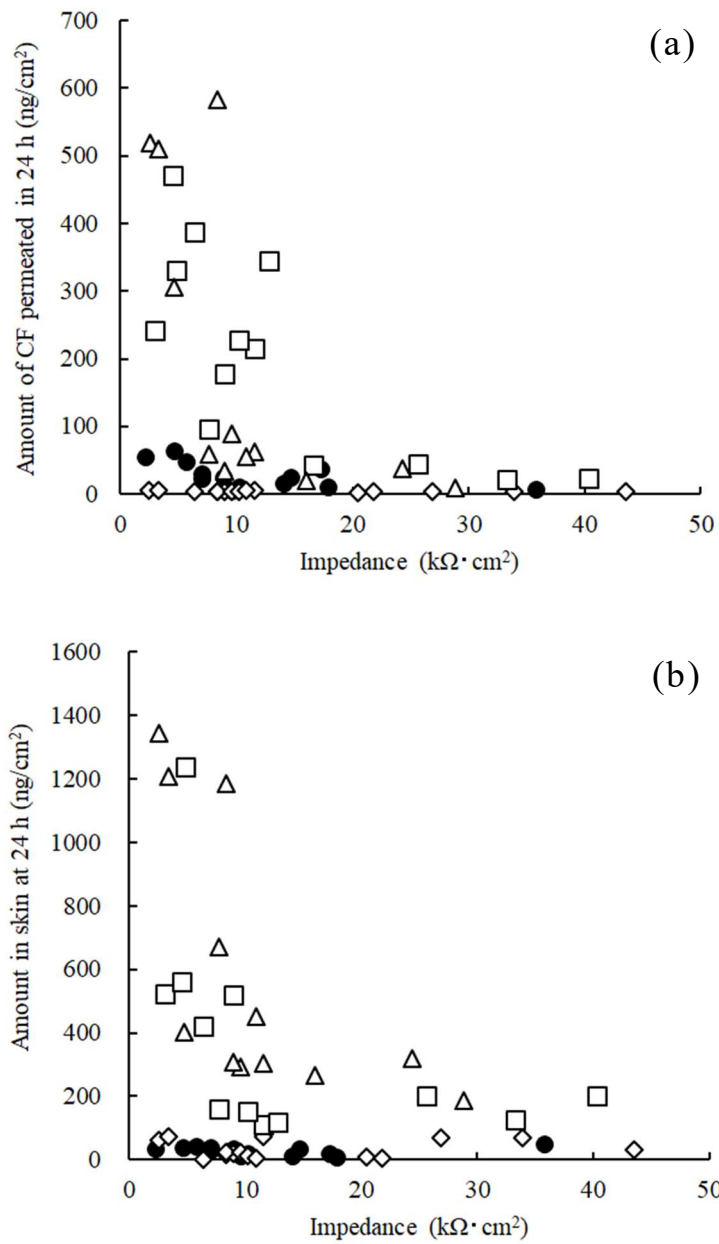


Fig. 17. Relationship between Skin Impedance before the Permeation Study and the Amount of CF Permeated in 24 h (a) and amount in skin at 24 h (b)
 ●: VA, ◇: GL2.4LP, □: GL5.6IPM, △: RI3.0IPM.

ルギーとその分散成分が PP ではおよそ $30 \text{ mN/m}^{70)}$ で、ヒトや豚の皮膚のおよそ 40 mN/m と類似している⁷¹⁾。

Figure 18 に、 25°C における DiI の PP フィルター透過率の経時変化を示す。IPM 溶液を対照として使用したところ、DiI は適用後すぐに浸透し、2 分以内に約 90%が透過した（データ非表示）。VA 適用時、DiI の透過は認められなかった。VA は弾性体であるため、PP の細孔を透過しなかったと考えられる。極性物質として GL を使用した LRW（GL2.4LP 及び GL5.6IPM）では、適用後 20 分で約 16%の DiI が透過した。これは、RI3.0IPM の透過率（約 7%）よりも高かった。DiI の 25°C における PP フィルター透過率の大小の順番は $\text{VA} \ll \text{RI3.0IPM} < \text{GL2.4LP} \approx \text{GL5.6IPM}$ であり、 25°C における η^* の順序 $\text{VA} \gg \text{RI3.0IPM} > \text{GL2.4LP} \approx \text{GL5.6IPM}$ の逆と一致し、 η^* が小さいほど高かった。LRW は弾性と粘性を併せもつ粘弾性体であるため、レオロジー特性に応じた速度で PP の細孔へ浸透したと考えられる。LRW の 32°C での η^* はいずれも類似しているため、 32°C での PP フィルター透過性はすべての LRW で同等になることが予測される。この予測に基づくと、全ての LRW は同様に毛包へ浸透すると考えられるが、GL2.4LP の毛包浸透性は低かった。このことから、LRW の毛包への浸透性は、PP フィルター透過試験の結果だけでは説明できなかった。LRW の油剤として用いた LP と IPM の皮膚に対する作用が異なる可能性が考えられた。毛包には皮脂腺が存在し、毛包内は皮脂で満たされている。この皮脂と皮膚に適用された製剤との相互作用が薬物の毛包透過性に影響を与える¹⁸⁾ことや、IPM が皮脂の相転移に大きな影響を与える⁷²⁾ことが報告されている。IPM を用いた LRW は皮脂と高い相互作用を起こす可能性があり、LRW 中の LP と IPM の皮脂との相互作用の違いが、毛包への浸透に影響を与えた可能性がある。IPM を油剤として使用する LRW

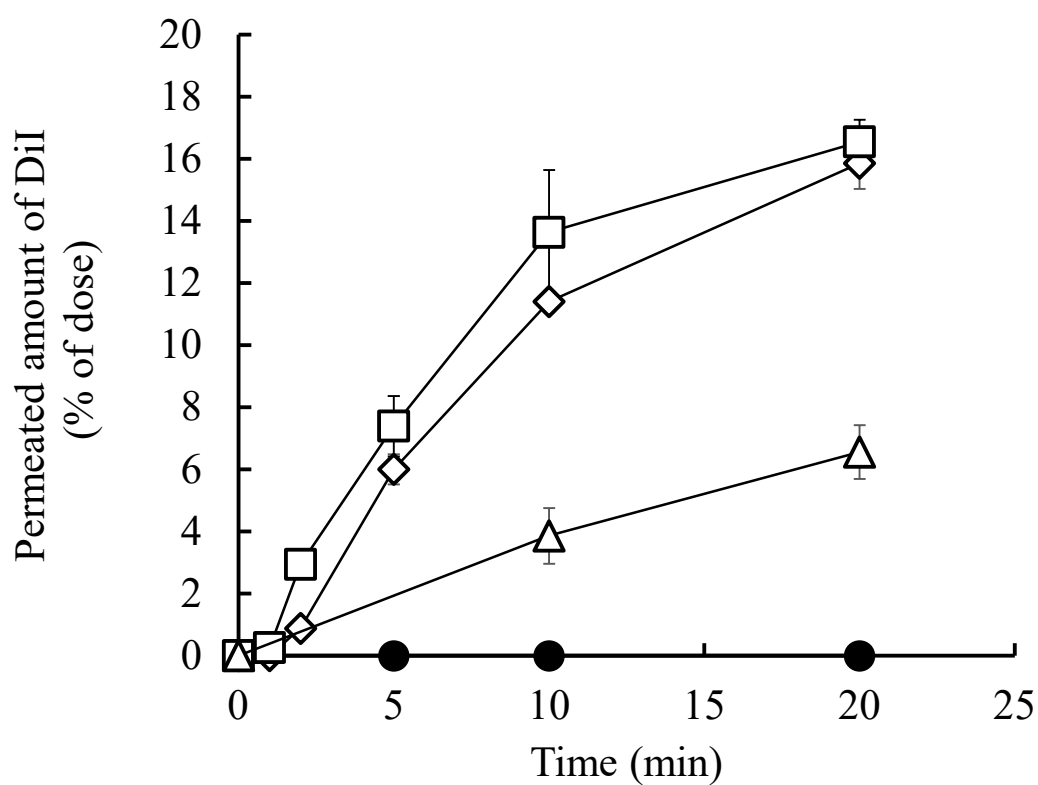


Fig. 18. PP Filter Permeation Profiles of DiI from Samples at 25°C
 ●: VA, ◇: GL2.4LP, □: GL5.6IPM, △: RI3.0IPM. Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 3-6$)

は、そのレオロジー特性と IPM と皮脂との相互作用により、毛包に浸透すると考えられる。

GL5.6IPM と RI3.0IPM の皮膚中及び透過した CF の総量 (Fig. 16 (b)) は同程度であった。これは、32°C における GL5.6IPM と RI3.0IPM の粘度が同程度 (Fig. 13 (c)) であることから、32°C における GL5.6IPM と RI3.0IPM の PP フィルター透過性は同程度であるという予測と一致した。しかし、これらの結果のみからでは、IPM を用いた LRW で角層ルートと毛包ルートの両方を促進することが明らかとなったが、両ルートの寄与率は明らかではなく、何故 GL5.6IPM が CF の皮膚透過を促進 (Fig. 14) するのか、また何故 RI3.0IPM が皮膚内で高い CF 濃度 (Fig. 15 (a)) を示すのかを説明することができなかった。GL5.6IPM と RI3.0IPM の違いの原因は明らかにできなかった。両ルートの寄与率に影響するレオロジー特性や組成が存在するのかなど、今回の研究では特定されていない要因が関与している可能性があり、さらなる研究が必要である。

第4節 小括

水中で不安定な薬物の配合と高い皮膚浸透性を両立できる水を含まない半固形油性基剤の開発を試みた。水の代わりに極性物質として GL と RI を、油剤として LP と IPM を使用し、水溶性薬物のモデルとして CF を配合した LRW を調製した。LRW は CF を可溶化し、25°C で 1 年以上の期間においても結晶の生成は認められず、水溶性薬物を均一に配合できる油性基剤を得ることができた。皮膚透過試験の結果、油剤として IPM を使用した LRW は、VA や LP を用いた LRW よりも高い CF 透過性を示すことが示され、CF の浸透が角層と毛包の両ルートで起こることが示された。毛包への CF の浸透は、基剤のレオロジー特性だけでなく、IPM と毛包内の皮脂との間の相互作用にも影響を受ける可能性が考えられた。

IPM を油剤に使用した LRW は、水溶性薬物の優れた半固形油性基剤となり、皮膚への良好な薬物浸透を担保することができた。

総括

本研究では、LRW を用いて、水溶性薬物の毛包浸透に与える基剤のレオロジー特性及び基剤中の油剤の影響を明らかにすることを目的とした。皮膚適用可能な油剤の物理化学的性質が LRW の生成とレオロジー特性に与える影響を検討した後、水溶性薬物の毛包浸透に与える LRW のレオロジー特性と組成の影響を検討し、以下の成果が得られた。

皮膚適用可能な油剤として LP に着目し、粘度グレードの異なる 5 種の LP を用いてその物理化学的性質が LRW の生成とレオロジー特性に与える影響を検討した。レシチン/水/LP 系での相状態を確認したところ、LRW の形成は、分子量の大きな LP を用いた場合は認められなかったが、分子量の小さな LP を用いた場合は認められ、LRW の形成範囲は分子量の小さな LP を用いた場合ほど広がった。レシチンの LP への溶解度を確認したところ、分子量の小さな LP ほど高かった。レシチンが油剤中でミセルを形成するには、油剤へ一度溶解する必要がある。これらのことから、LP の分子量はレシチンの溶解度及び LRW の形成のしやすさに影響することが明らかとなった。また、レオロジー測定から、油剤に LP を用いた LRW は、容器からの取り出し時は固体のように振る舞い、皮膚上に静置したときは液体のように振る舞う、取り扱いやすかつ皮膚上での広がりやすさを併せもつ性質を有することが明らかとなった。また、LP の分子量と水の濃度の選択により、粘度を調整可能であることも明らかとした。

次に、水溶性薬物の毛包浸透に与える基剤のレオロジー特性と基剤中の油剤の影響について検討した。水溶性薬物の中には水に不安定なものも存在し、そのような薬物の製剤への配合には水を含まない油性基剤が求められる。そこで、水溶性薬物を水を含まない LRW に配合可

能であるかを検討した。極性物質に GL または RI を、油剤に LP または IPM を用いた LRW に、水溶性薬物のモデルとして蛍光物質である CF を配合したところ、いずれの極性物質、油剤の組み合わせでも CF を配合可能であり、調製後の LRW を 25°C で 1 年間保存した後にも、CF の結晶生成は認められなかった。なお、LRW 中には油剤の動きを追跡する目的で親油性色素の DiI も配合した。油性基剤のワセリンに CF 及び DiI を配合した製剤をコントロール製剤 (VA) とした。VA 及び CF と DiI を配合した LRW のレオロジー特性を確認したところ、VA は弾性体であることが示されたが、LRW は CF を配合してもなお、粘弾性体の挙動を示し、取り扱い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であることが示された。皮膚透過試験を行ったところ、IPM を用いた LRW は、CF の角層ルートでの浸透を促進するのみならず、毛包ルートでの浸透も促進することが明らかとなった。毛包への浸透性は基剤のレオロジー特性のみならず、基剤と皮膚との相互作用が影響することが明らかとなった。以上のことから、LRW は取り扱いのしやすさと毛包浸透性に優れた製剤であることが示された。

本研究により、半固形製剤からの水溶性薬物の毛包への浸透は、製剤の粘弾性、すなわち固体の性質と液体の性質を併せもつことが重要であり、さらに、皮脂との相互作用に着目した油剤の選択が重要であることが明らかとなった。本研究で見出された知見は、水溶性薬物の毛包を介した浸透メカニズムの一端を明らかとしたものであり、今後の皮膚適用製剤の開発に有用なものとなることを期待する。

実験

第 1 章

1. 試薬

大豆レシチン（ホスファチジルコリン含量 94%以上）は H.Holstein Co., Ltd（Hamburg、Germany）製 PHOSPHOLIPON 90G をそのまま使用した。全ての LP はカネダ（株）（東京、日本）から提供を受けたもので、LP-A、B、C、D、E は、それぞれハイコール K-140N、ハイコール K-160、ハイコール K-230、ハイコール K-290、ハイコール K-350 に相当する。LP の 37.8℃における動粘度は、カネダから情報提供を受けた。水は注射用水を大塚製薬（株）（東京、日本）から購入したものを使用した。

2. 試料の調製

必要な量のレシチン、LP 及び水をバイアルに入れ、マグネチックスターラーを使用して、25℃にて 12 時間以上混合した。平衡化のため、バイアルは数日間 25℃に静置した。レシチンの濃度は 20%に固定した。

3. 試料中の水の濃度の測定

試料中の水の濃度は、カールフィッシャー水分計（MKV-710、京都電子工業（株）、京都、日本）を使用して測定した。滴定試薬には KEMAQUA Titrant TR-3（京都電子工業（株）、京都、日本）を、作動媒体には KEMAQUA Solvent OIL（京都電子工業（株）、京都、日本）を使用した。試料約 1 g に対して容量滴定法にて行った。

4. 外観の観察と相図の作成

バイアル中の試料について、濁度、粘弾性及び直行ニコル法による偏光性の有無を 25°C で目視評価し、レシチン/水/LP 系の相図を作成した。

5. レシチンの LP への溶解度

必要量のレシチンをバイアルに入れ、レシチン濃度が 0.5、1.0、2.0% となるように LP を添加した後、60°C に加熱しながらマグネチックスターラーを使用してよく攪拌（30 分程度）した。いずれの試料も均一で透明となった場合、2.0 ~ 5.0% まで 1.0% 刻みで同様に試料を調製した。いずれの試料も均一で透明とならなかった場合、0.1 ~ 0.5% まで 0.1% 刻みで同様に試料を調製した。調製後の試料を 25°C の恒温槽内に 1 週間静置した。1 週間後、均一で透明な試料の最大レシチン濃度を溶解度とした。

6. SAXS 測定

SAXS 測定は、SPring-8（兵庫、日本）の BL40B2 ビームライン（構造生物学 II ビームライン）を使用し、カメラ長 2 m、大面積型ピクセル検出器（PILATUS-3S 2M; Dectris, Baden, Switzerland）を使用して実施した。X 線の波長は 0.1 nm、露光時間は約 100 秒とした。データは散乱ベクトル q ($q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$ 、ここで λ は X 線の波長、 2θ は散乱角) に対する散乱強度の関係を示した。SAXS 測定に使用した LRW は、構造因子の影響を排除するために LP で 10 倍に希釈し $\phi 2$ mm の石英製キャピラリーに注入した。すべての測定は 25°C で行った。ラメラ液晶の層間距離 (d) は、Bragg の条件式 ($2d \sin \theta = n\lambda$)⁴¹⁾ と散乱ベクトル ($q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$) から、 $d = 2\pi/q$ で表されるため、回折ピークが認められたときの q から計算した。棒状粒子の断面半径は、SAXS プロファイルのクロスセクションプロットから計算した³²⁾。

7. レオロジー測定

レオロジー測定は、コーンプレートジオメトリー（直径 35 mm、コーン角度 1°）を用い、MCR302 モジュラーコンパクトレオメーター（Anton Paar GmbH、Glaz、Austria）で行った。温度は 25°C に維持した。

定常流粘度測定では、定常状態に達するのに十分な時間、試料に必要なせん断応力を加えた。

線形粘弾性領域は、角周波数 (ω) 分散測定の前に一定周波数 (1 Hz) でのひずみ分散測定によって取得した。次に、ひずみ分散測定で得られた線形粘弾性領域のひずみを使用して、 ω 分散測定を行い、貯蔵弾性率 (G') 及び損失弾性率 (G'') の ω 依存性を調べた。

第 2 章

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. 試薬

IPM は日油（株）（東京、日本）の化粧品グレードのものを、白色ワセリンは健栄製薬（株）（大阪、日本）の日本薬局方適合品を使用した。GL、RI 及び CF は東京化成工業（株）（東京、日本）から購入したものをを使用した。DiI は Sigma-Aldrich（St. Louis, MO, U.S.A.）から購入したものをを使用した。その他の試薬は、富士フィルム和光純薬（株）（大阪、日本）から購入したものをを使用した。

2. 試料の調製

レシチン、CF 及び DiI の濃度は、それぞれ 20%、0.1%、0.1% に固定した。Table 3 に主な処方の実計量を示した。極性物質に固体を用いた LRW の調製方法は、今井ら²⁸⁾の手順に従った。本研究で用いた具体的な方法を以下に示す。

レシチン/GL/LP 系：必要な量のレシチンと CF をバイアルに秤量し、これに 2 mL のメタノールを加えて溶液とした。メタノールをドラフトチャンバー内で 12 時間以上蒸発させ、続いて減圧デシケーター内で 48 時間以上乾燥させた。必要量の GL 及び LP（DiI を含む）をバイアル中の残留物に添加し、しっかりと蓋をし、混合物が均一になるまで（12 時間以上）マグネチックスターラーを使用して混合した。

レシチン/GL/IPM 系：必要な量のレシチン、GL、CF 及び IPM（DiI を含む）をバイアルに秤量し、しっかりと蓋をし、混合物が均一になるまで 12 時間以上マグネチックスターラーを使用して混合した。

Table 3. Composition of Samples

	GL2.4LP	GL5.6IPM	RI3.0IPM
Lecithin	2.00 g	2.00 g	2.00 g
GL	0.24	0.56	-
RI	-	-	0.30
LP	7.74	-	-
IPM	-	7.42	7.68
CF	0.01	0.01	0.01
DiI	0.01	0.01	0.01

Composition of GL2.4LP, GL5.6IPM and RI3.0IPM correspond to a★, b★ and c★ in Fig. 10, respectively.

レシチン/RI/LP 及びレシチン/RI/IPM 系：必要量のレシチン、RI 及び CF をバイアルに秤量し、2 mL のメタノールを加えて溶液とした。メタノールをドラフトチャンバー内で 12 時間以上蒸発させ、続いて減圧デシケーター内で 48 時間以上乾燥させた。必要量の DiI を含む LP または IPM をバイアル内の残留物に添加し、しっかりと蓋をし、混合物が均一になるまで 12 時間以上マグネチックスターラーを使用して混合した。

試料は平衡化するために数日間 25°C に静置した。

コントロール製剤 (VA) は、10 g のワセリン、0.01 g の CF 及び 0.01 g の DiI をガラスビーカーに秤量し、混合物が均一になるまでガラス棒を使用して 5 分間以上よく攪拌し調製した。

3. 外観の観察と相図の作成

相図の作成は、第 1 章と同様な方法で実施した。CF の結晶は、偏光顕微鏡（ECLIPSE E600 POL、（株）ニコン、東京、日本）を使用して観察した。倍率は 200 倍で観察した。

4. レオロジー測定

レオロジー測定は、コーンプレートジオメトリー（直径 35 mm、コーン角度 1°）を用い、MCR302 モジュラーコンパクトレオメーター（Anton Paar GmbH、Glaz、Austria）で行った。温度を 25°C または 32°C に維持した。

線形粘弾性領域は、角周波数 (ω) 分散測定の前に一定周波数 (1 Hz) でのひずみ分散測定によって取得した。次に、ひずみ分散測定で得られた線形粘弾性領域のひずみを使用して、 ω 分散測定を行い、貯蔵弾性率 (G') 及び損失弾性率 (G'') の ω 依存性を調べた。複素粘度 (η^*) は動的測定で得られた粘度であり、式 (11) を用いて算出した。

$$|\eta^*| = \frac{\sqrt{(G')^2 + (G'')^2}}{\omega} \quad (11)$$

5. 皮膚透過試験

試験には凍結食用豚耳皮膚（（株）ケーエーシー、京都、日本）を使用した。凍結ブタ耳をぬるま湯で解凍し、精製水で注意深く洗浄した。解凍後の豚耳の外表面を電気バリカンとシェーバーで注意深く剃り、皮膚を軟骨から切除した。余分な脂肪を注意深く除去し、レシーバー容積が約 5 mL のフランツ型拡散セル（有効拡散面積: 0.64 cm²、Perme Gear, Inc., Hellertown, PA, U.S.A.）上に皮膚を設置した。リン酸緩衝液（1/15 mol/L、pH 7.4、PBS）をレシーバーセルに添加し、実験中は 32°C の恒温槽に設置し、マグネチックスターラーで攪拌した。生理食塩水をドナーセルに加え、20 分後、インピーダンスメーター（AS-TZ1；

アサヒテクノラボ株式会社、神奈川、日本) を使用して皮膚抵抗値 ($k\Omega$) を測定し、有効面積 (0.64 cm^2) を乗じて皮膚補正抵抗値を求めた。生理食塩水の適用から約 60 分後、生理食塩水をドナーセルから除去し、実験室用ワイプ (キムワイプ、日本製紙クレシア (株)、東京、日本) で皮膚表面を注意深く拭いた。次に、CF 及び DiI を含む 0.2 mL の試料を皮膚上のドナーセルに置き、その後、所定の時間にレーザー液の 0.15 mL を採取し、すぐに新しい PBS を加えた。採取したレーザー液をポリテトラフルオロエチレンフィルター (PTFE) (Millex-LCR、 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 、Merck Millipore Ltd.、Burlington、MA、U.S.A.) でろ過し、ろ液中の CF 濃度を HPLC を使用して測定した。

適用後 24 時間のレーザー液を採取した後、皮膚表面を実験用ワイプで拭き、粘着テープ (セルローステープ、ニチバン (株)、東京、日本) を使用して皮膚表面を 2 回ストリッピングして、皮膚表面の残存製剤を除去した。皮膚の製剤適用部位をパンチで打ち抜き、皮膚補正抵抗値の高い皮膚試料について実体顕微鏡下で 2 つに分割した。分割した皮膚の半分は皮膚内の CF の定量に使用し、残りの半分は断面観察に使用した。定量用の皮膚試料を小さく切断し、皮膚内の CF を 0.5 mL のメタノールで 30 分間超音波処理して抽出した。抽出液を PTFE フィルターでろ過し、ろ液 $150\text{ }\mu\text{L}$ を遠心エバポレータで乾固し、残留物に $150\text{ }\mu\text{L}$ の PBS を加え、10 分間超音波処理することによって溶解した。溶液を PTFE フィルターでろ過し、ろ液中の CF 濃度を HPLC により測定した。単位面積当たりの皮膚内の CF 量 (ng/cm^2) の算出には、分割後の皮膚の面積を用いた。

6. HPLC 条件

CF 濃度は、蛍光検出器 (Acquity FLR; Waters Co. Ltd.) を備えた HPLC システム (Acquity UPLC H-Class; Waters Co. Ltd.、Milford、MA、U.S.A.)

を使用して測定した。カラムには Acquity BEH C18 (1.7 μm 、100 \times 2.1 mm i.d.、Waters Co. Ltd.) を用い、40 $^{\circ}\text{C}$ に維持した。移動相は 20 mM リン酸二水素カリウム水溶液-アセトニトリル(60 : 40、v/v)を使用して、流速は 0.2 mL/min とした。試料の 1 μL を注入し、CF は、492 nm の励起波長と 512 nm の蛍光波長を使用して検出した。

7. 共焦点顕微鏡観察

断面観察用の皮膚試料を包埋剤 (Tissue-Tek O.C.T. コンパウンド、サクラファインテックジャパン (株)、東京、日本) に包埋し、凍結組織切片作製装置 (Tissue-Tek POLAR-DM、サクラファインテックジャパン (株)、東京、日本) を用いて厚さ 20 μm にスライスした。スライスされた各皮膚試料を共焦点顕微鏡システム (LU-N4 レーザーユニットを備えた A1、(株) ニコン、東京、日本) を使用して観察し、CF (励起波長: 488 nm、検出波長範囲: 500 ~ 550 nm) 及び DiI (励起波長: 561 nm、検出波長範囲: 570 ~ 620 nm) の皮膚内局在を評価した。

8. PP フィルター透過試験

ガラス板上にろ紙 (定性ろ紙 No.2、東洋濾紙 (株)、東京、日本) を置き、その上に 2 \times 2 cm の PP フィルター (ポリプロピレン製フィルター板、濾過径 70 μm 、厚さ 2 mm、フロン工業 (株)、東京、日本) を置いた。拡散面積 0.28 cm^2 のフランチ型拡散ドナーセルを PP フィルター上に置き、クリップで固定した。0.2 mL の試料を PP フィルター上のドナーセルに適用した。所定の時間にろ紙を回収し、ガラスバイアルに入れ、適量のメタノール (5 ~ 12 mL) を加え、30 分間超音波処理した。メタノール中の DiI の濃度は、549 nm の励起波長及び 562 nm の蛍光波長で、蛍光分光光度計 (FP-8350 ; 日本分光 (株)、東京、日本) を使用して測定した。

9. 統計解析

皮膚透過試験のデータは、平均±標準偏差（S.D.）として表した。ANOVA の後、Tukey-Kramer の正確有意差検定を使用して群間の差を検定した。0.05 未満の p 値を統計的に有意であるとみなした。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多くのご助言並びにご指導を賜りました、日本大学薬学部薬品物理化学研究室教授 田口 博之 先生に深く感謝いたします。

本研究に際して、終始懇切なご助言並びに実験のご支援を賜りました、日本大学薬学部薬品物理化学研究室教授 橋崎 要 先生に深く感謝いたします。

本論文作成にあたり、有益なるご助言と審査の労を賜りました、日本大学薬学部薬剤学研究室教授 鈴木 豊史 先生に深く感謝いたします。

本研究に際して、終始懇切なご指導とご鞭撻を賜り、研究者としての心構えをご教授くださいました、日本大学薬学部薬品物理化学研究室前教授 藤井 まき子 先生に心より感謝の意を表します。

本研究の機会を与えていただき、研究遂行のためのご支援並びに多くの激励を賜りました、ポーラ化成工業株式会社フロンティア研究所の皆様心より感謝申し上げます。

また、本研究の実験の実施にあたり、有益なる技術的なご支援をいただきました、中張 漢卿 氏をはじめとする日本大学薬学部薬品物理化学研究室の皆様心から感謝いたします。

最後に、長年にわたる博士課程への挑戦に対して理解を示し、最後まで応援してくれた家族の皆に心から感謝いたします。

参考文献

- 1) Sugibayashi K., Transdermal Drug Delivery Systems: From the Dawn and Early Stage to the Development and Maturity Stage, and the Future, *YAKUGAKU ZASSHI*, **142**, 1227–1253 (2022).
- 2) 藤井まき子, 化粧品・薬用化粧品中の成分の経皮吸収, *皮膚と美容*, **51**, 20–24 (2019).
- 3) 田上八郎, “化粧品科学ガイド”, 田上八郎, 杉林堅次, 能崎章輔, 宿崎幸一, 神田吉弘 監, フレグランスジャーナル社, 東京, 2007, pp. 32-38.
- 4) 杉林堅次, 化学物質の経皮吸収経路, *COSME TECH JAPAN*, **1**, 39–41 (2011).
- 5) 宮地良樹, “化粧品・外用薬研究者のための皮膚科学”, 宮地良樹, 長沼雅子 編, 文光堂, 東京, 2005, pp. 2-5.
- 6) Singh P., Roberts MS., Skin Permeability and Local Tissue Concentrations of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs after Topical Application, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 144–151 (1994).
- 7) 杉林堅次, “化粧品科学ガイド”, 田上八郎, 杉林堅次, 能崎章輔, 宿崎幸一, 神田吉弘 監, フレグランスジャーナル社, 東京, 2007, pp. 63-68.
- 8) Bos JD., Meinardi MMHM., The 500 Dalton Rule for the Skin Penetration of Chemical Compounds and Drugs, *Exp. Dermatol.*, **9**, 165–169 (2000).
- 9) 厚生労働省医薬食品極審査管理課長, “いわゆる薬用化粧品の有効成分リスト.”: <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/yakuyou_kounou_1.pdf>, cited 18 December, 2023.

- 10) Cosmetic-info.jp. “アスコルビン酸.”: <<https://www.cosmetic-info.jp/>>, cited 18 December, 2023.
- 11) Cosmetic-info.jp. “ニコチン酸アミド.”: <<https://www.cosmetic-info.jp/>>, cited 18 December, 2023.
- 12) Cosmetic-info.jp. “D-パントテニルアルコール.”: <<https://www.cosmetic-info.jp/>>, cited 18 December, 2023.
- 13) Horita D., Yoshimoto M., Todo H., Sugibayashi K., Analysis of Hair Follicle Penetration of Lidocaine and Fluorescein Isothiocyanate-Dextran 4 kDa Using Hair Follicle-Plugging Method, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **40**, 345–351 (2014).
- 14) Walters KA., Robert MS., “Dermatological and Transdermal Formulations,” ed. by Walters KA., Marcel Dekker, Inc., New York, 2002, pp. 26-27.
- 15) Scheuplein RJ., Percutaneous Absorption After Twenty Five Years: or “Old Wine in New Wineskins”, *J. Invest. Dermatol.*, **67**, 31–38 (1976).
- 16) Mohd F., Todo H., Yoshimoto M., Yusuf E., Sugibayashi K., Contribution of the Hair Follicular Pathway to Total Skin Permeation of Topically Applied and Exposed Chemicals, *Pharmaceutics*, **8**, 1–12 (2016).
- 17) 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).
- 18) Lauterbach A., Müller-Goymann CC., Comparison of Rheological Properties, Follicular Penetration, Drug Release, and Permeation Behavior of a Novel Topical Drug Delivery System and a

- Conventional Cream, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **88**, 614–624 (2014).
- 19) Santos GA., Angelo T., Andrade LM., Silva SMM., Magalhães PO, Cunha-Filho M., Gelfuso GM., Taveira SF., Gratieri T., The Role of Formulation and Follicular Pathway in Voriconazole Cutaneous Delivery from Liposomes and Nanostructured Lipid Carriers, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **170**, 341–346 (2018).
- 20) Aljuffali IA., Sung CT., Shen F-M., Huang C-T., Fang J-Y., Squarticles as a Lipid Nanocarrier for Delivering Diphenacyprone and Minoxidil to Hair Follicles and Human Dermal Papilla Cells, *AAPS J.*, **16**, 140–150 (2014).
- 21) Scartazzini R., Luisi PL., Organogels from Lecithins. *J. Phys. Chem.*, **92**, 829–833 (1988).
- 22) 今井美湖, 高粘弾性を有するレシチン逆紐状ミセル系の探索とその皮膚適用製剤への応用に関する研究, 博士論文, 日本大学 (2016).
- 23) 坂本一民, “界面と界面活性剤 -基礎から応用まで-,” 日本油化学会編, 東京, 2005, pp. 95-100.
- 24) Israelachvili JN., Mitchell DJ., Ninham BW., Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2: Molecular and Chemical Physics*, **2**, 1525–1568 (1976).
- 25) Israelachvili JN., Mitchell DJ., Ninham BW., Theory of Self-Assembly of Lipid Bilayers and Vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 185–201 (1977).
- 26) Willmann HL., Luisi PL., Lecithin Organogels as Matrix for the Transdermal Transport of Drugs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**, 897–900 (1991).

- 27) Dreher F., Walde P., Walther P., Wehrli E., Interaction of a Lecithin Microemulsion gel With Human Stratum Corneum and Its on Transdermal Transport, *J. Control. Release*, **45**, 131–140 (1997).
- 28) Imai M., Hashizaki K., Yanagi A., Taguchi H., Saito Y., Motohashi S., Fujii M., Skin Permeation of Testosterone from Viscoelastic Lecithin Reverse Wormlike Micellar Solution, *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 532–9 (2016).
- 29) Miller R., Schick AE., Boothe DM., Lewis TP., Absorption of Transdermal and Oral Cyclosporine in Six Healthy Cats, *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **50**, 36–41 (2014).
- 30) Kumar R., Katare OP., Lecithin Organogels as a Potential Phospholipid-Structured System for Topical Drug Delivery: A Review, *AAPS PharmSciTech*, **6**, E298–E310 (2005).
- 31) Paolino D., Ventura CA., Nisticò S., Puglisi G, Fresta M. Lecithin Microemulsions for the Topical Administration of Ketoprofen: Percutaneous Adsorption Through Human Skin and in Vivo Human Skin Tolerability, *Int. J. Pharm.*, **244**, 21–31 (2002).
- 32) Hashizaki K., Chiba T., Taguchi H., Saito Y., Highly Viscoelastic Reverse Worm-Like Micelles Formed in a Lecithin/Urea/Oil System, *Colloid Polym. Sci.*, **287**, 927–932 (2009).
- 33) Hashizaki K., Taguchi H., Saito Y., A Novel Reverse Worm-Like Micelle from a Lecithin/Sucrose Fatty Acid Ester/Oil System, *Colloid Polym. Sci.*, **287**, 1099–1105 (2009).
- 34) Hashizaki K., Taguchi H., Saito Y., New Lecithin Organogels with Sugars of RNA and DNA, *Chem. Lett.*, **38**, 1036–1037 (2009).

- 35) Hashizaki K., Sakanishi Y., Yako S., Tsusaka H., Imai M., Taguchi H., Saito Y., New Lecithin Organogels from Lecithin/Polyglycerol/Oil Systems, *J. Oleo Sci.*, **61**, 267–275 (2012).
- 36) Hashizaki K., Watanabe N., Imai M., Taguchi H., Saito Y., Possibility of Vitamin C to Induce the Formation of Lecithin Organogel, *Chem. Lett.*, **41**, 427–429 (2012).
- 37) Imai M., Hashizaki K., Taguchi H., Saito Y., Motohashi S., A New Reverse Worm-Like Micellar System from a Lecithin, Multivalent Carboxylic Acid and Oil Mixture, *J. Colloid Interface Sci.*, **403**, 77–83 (2013).
- 38) Hashizaki K., Imai M., Yako S., Tsusaka H., Sakanishi Y., Saito Y., Fujii M., Highly Viscoelastic Reverse Wormlike Micellar Systems from a Mixture of Lecithin, Polyglycerol Fatty Acid Monoesters, and an Oil, *J. Oleo Sci.*, **66**, 997–1007 (2017).
- 39) Chuberre B., Araviiskaia E., Bieber T., Barbaud A., Mineral Oils and Waxes in Cosmetics: an Overview Mainly Based on the Current European Regulations and the Safety Profile of These Compounds, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **33**, 5–14 (2019).
- 40) 株式会社カネダ. “流動パラフィンについて.”:
<<https://www.kaneda.co.jp/jigyoku/whitemineraloil/whitemineraloil.html>>, cited 18 December, 2023.
- 41) Ochbaum G., Bitton R., “Self-assembled Biomaterials,” ed. by Helena SA, Ricard MPS., Woodhead Publishing, Ltd., Sawston, 2018, pp. 291-304.
- 42) Aramaki K., Self-Assemblies and Phase Behavior, *Oleosience*, **23**, 37–41 (2023).

- 43) 西村正樹, “レオロジーの基礎 I – ひずみ・応力の定義とひずみの代表的な与え方 –,” 大阪, 2016.
- 44) 上田隆宣, “測定から読み解くレオロジーの基礎知識,” 日刊工業新聞社, 東京, 2012, p. 4.
- 45) 西村正樹, “レオロジーの基礎 III -定常流粘度測定-,” 大阪, 2017.
- 46) Hashizaki K., Taguchi H., Fujii M., Possibility of Highly Viscoelastic Lecithin Reverse Wormlike Micelle as the Vehicle for Transdermal Therapeutic Application, *Acc. Mater.Surf. Res.*, **3**, 190–198 (2018).
- 47) Doi M., Edwards SF., Dynamics of Concentrated Polymer Systems. Part 1.-Brownian Motion in the Equilibrium State, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2: Molecular and Chemical Physics*, **74**, 1789–1801 (1978).
- 48) Doi M., Edwards SF., Dynamics of Concentrated Polymer Systems. Part 2.-Molecular Motion Under Flow, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2: Molecular and Chemical Physics*, **74**, 1802–1817 (1978).
- 49) Doi M., Edwards SF., Dynamics of Concentrated Polymer Systems. Part 3.-The Constitutive Equation, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2: Molecular and Chemical Physics*, **74**, 1818–1832 (1987).
- 50) Doi M., Edwards SF., Dynamics of Concentrated Polymer Systems. Part 4.-Rheological Properties, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2: Molecular and Chemical Physics*, **75**, 38–54 (1979).
- 51) Cates ME., Candau SJ., Statics and Dynamics of Worm-Like Surfactant Micelles, *J. Phys. Condens. Matter*, **2**, 6869–6892 (1990).

- 52) Tung SH., Huang YE., Raghavan SR., A New Reverse Wormlike Micellar System: Mixtures of Bile Salt and Lecithin in Organic Liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5751–5756 (2006).
- 53) Shchipunov YA., Shumilina EV., Ulbricht W., Hoffmann H., The Branching of Reversed Polymer-Like Micelles of Lecithin by Sugar-Containing Surfactants, *J. Colloid Interface Sci.*, **211**, 81–88 (1999).
- 54) Schurtenberger P., Scartazzini R., Luisi PL., Viscoelastic Properties of Polymerlike Reverse Micelles, *Rheol. Acta*, **28**, 372–381 (1989).
- 55) Shchipunov YA., Hoffmann H., Growth, Branching, and Local Ordering of Lecithin Polymer-Like Micelles, *Langmuir*, **14**, 6350–6360 (1998).
- 56) 杉林堅次, 化学物質の経皮吸収速度, *COSME TECH JAPAN*, **1**, 59–63 (2011).
- 57) 杉林堅次, “生物薬剤学,” 林正弘, 谷川原祐介 編, 南江堂, 東京, 2001, pp. 39-43.
- 58) Becker LC., Bergfeld WF., Belsito DV., Hill RA., Klaassen CD., Liebler DC., Marks JG., Shank RC., Slaga TJ., Snyder PW., Gill LJ., Heldreth B., Safety Assessment of Glycerin as Used in Cosmetics, *Int. J. Toxicol.*, **38**, 6S-22S (2019).
- 59) Santos P., Watkinson AC., Hadgraft J., Lane ME., Influence of Penetration Enhancer on Drug Permeation from Volatile Formulations, *Int. J. Pharm.*, **439**, 260–268 (2012).
- 60) Holzner G., The Use of Isopropyl Fatty Esters in Cosmetic Formulations, *Am. Perfum. Cosmet.*, **78**, 89–93 (1963).

- 61) Lahnstein K., Schmehl T., Rüsçh U., Rieger M., Seeger W., Gessler T., Pulmonary Absorption of Aerosolized Fluorescent Markers in the Isolated Rabbit Lung, *Int. J. Pharm.*, **351**, 158–164 (2008).
- 62) 富士フィルム和光純薬, “カルボキシフルオレセイン.”: <<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01LAMA-550.html>>, cited 18 December, 2023.
- 63) 坂田修, 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, 博士論文, 昭和薬科大学 (2013).
- 64) Sakata O., Fujii M., Koizumi N., Nakade M., Kameyama K., Watanabe Y., Effects of Oils and Emulsifiers on the Skin Penetration of Stearyl Glycyrrhetinate in Oil-in-Water Emulsions, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 486–489 (2014).
- 65) Tung SH., Huang YE., Raghavan SR., Contrasting Effects of Yemperature on the Rheology of Normal and Reverse Wormlike Micelles, *Langmuir*, **23**, 372–376 (2007).
- 66) Zambrano A., Klein AL., Patzelt A., Analysis of the Morphometric Parameters of Pig Ear Hair Follicles, *Skin Res. Technol.*, **27**, 730–738 (2021).
- 67) 厚生労働省医薬・生活衛生局薬品審査管理課長, “In vitro皮膚透過試験 (In vitro経皮吸収試験) を化粧品 ・ 医薬部外品の安全性評価に資するためのガイダンスについて.”: <<https://www.pmda.go.jp/files/000215068.pdf>>, cited 18 December, 2023.
- 68) Todo H., Adachi H., Imai N., Uenaka M., Uchida T., Otani M., Sawada M., Narita M., Nishijima T., Nomura Y., Miyasaka Y., Hatao M., Masunaga T., Yamaguchi M., Sasa H., Chiku M., Kawada H., Furuya R., Fujii M., Relationship between Skin Permeation and

- Concentration of Caffeine Obtained in Vitro Skin Permeation Experiments after Application of Various Formulations with an Infinite Dose: Verification Result for Utilization to Dose Setting Method Guideline for Human Long-Duration Trials (Safety), Part 2, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **43**, 183–190 (2019).
- 69) Kitazaki Y., Hata T., Extension of Fowkes' Equation and Estimation of Surface Tension of Polymer Solid, *J. Adhes. Soc. Jpn.*, **8**, 131–142 (1972).
- 70) Fujii M., Kato K., Imai M., Kuwabara H., Awano M., Hashizaki K., Taguchi H., The Comparison of Surface Free Energy of Human, Yucatan Micropig, and Hairless Mouse Skins and Influence of Surfactant on Surface Free Energy of the Skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 295–298 (2019).
- 71) Motwani MR., Rhein LD., Zatz JL., Influence of Vehicles on the Phase Transitions of Model sebum, *J. Cosmet. Sci.*, **53**, 35–42 (2002).

原著論文

1. Yoshiyuki Miyasaka, Kaname Hashizaki, Yumi Kono, Hiroyuki Taguchi, and Makiko Fujii, Effect of the Physicochemical Properties of Liquid Paraffin on the Phase State and Rheological Properties of Lecithin Reverse Wormlike Micelles, *Chem. Pharm. Bull.*, **70**, 52–56 (2022)
2. Yoshiyuki Miyasaka, Kaname Hashizaki, Kohsuke Shibasaki, Makiko Fujii and Hiroyuki Taguchi, Rheological Properties and Composition Affecting the Skin Permeation of a Model of a Hydrophilic Drug in Lecithin Reverse Wormlike Micelles, *Biol. Pharm. Bull.*, **47**, 245–252 (2024)