

付録

付録 1：ナノテクノロジー、ナノスケール及びナノ粒子についての選択定義の要約

<p>カナダ保健省ⁱ</p>	<p>カナダ保健省は、全製造物質や製品及び全成分材料、成分、機器又は構造が以下に該当する場合にナノ材料と考える。すなわち、</p> <p>a. (縦, 横, 高さのうち) 1方向以上の外部寸法がナノスケール又はそれ以内に入る場合、又はナノスケールの内部構造や表面構造を有する、又は、</p> <p>b. 全寸法がナノスケールより小さい又は大きく、1方向又は複数方向のナノスケールの特性/現象を示す。</p> <p>この定義の目的から、</p> <p>i.用語「ナノスケール」は1~100 nm を意味し、以下を含む。</p> <p>ii.用語「ナノスケールの特性/現象」は、粒子径に寄与する特性及びその効果を意味する。これらの特性は、個々の原子、個々の分子及びバルク材料の化学的又は物理的特性とは区別される。また、</p> <p>iii.用語「製造」には、工学的プロセス及び物質コントロールを含む。</p>
<p>EU化粧品規制 [第2条定義 (k)]ⁱⁱ 条項も参照のことⁱⁱⁱ</p>	<p>◆「ナノ材料」◆は不溶性又は生体内残留性の物質で意図的に製造され(縦, 横, 高さのうち)1方向又は複数方向の外部寸法、又は内部構造が1~100 nm の規模のものを意味する。</p>
<p>委員会勧告 (2011/696/EU) 2011年10月 18日、ナノ材 料の定義に関 して^{iv}</p>	<p>「ナノ材料」は、非結合状態又は凝集塊や凝集体として存在し、含有する粒子の50%以上が(縦, 横, 高さのうち)1方向又は複数方向の外部寸法が1~100 nm の範囲の、天然の、偶発的な又は製造材料を意味する。</p>

<p>EU 規制 1169/2011 消費者に対する食品情報の提供に関する規則 [第2条定義(2)(t)]^{iv}</p>	<p>「工業ナノ材料」は、(縦, 横, 高さのうち) 1方向又は複数方向の寸法が 100 nm 前後, あるいは内部又は表面のいずれかに明確な機能を示す部分 (その多くが 1方向又は複数方向の寸法が 100 nm 前後) を有する意図的に製造した全物質を意味する。構造体, 凝集体又は凝集塊も含む (その場合粒子径は 100 nm を上回ってもよいが, ナノスケールに特徴的な特性を維持しているもの)。</p>
<p>EU 新規食品に関する規則 [第3条定義(2)(f)]^v</p>	<p>「工業ナノ材料」は、(縦, 横, 高さのうち) 1方向又は複数方向の寸法が 100 nm 前後, あるいは内部又は表面のいずれかに明確な機能を示す部分 (その多くが 1方向又は複数方向の寸法が 100 nm 前後) を有する意図的に製造した全物質を意味する。構造体, 凝集体又は凝集塊も含む (その場合粒子径は 100 nm を上回ってもよいが, ナノスケールに特徴的な特性を維持しているもの)。</p>
<p>欧州医薬品庁 (EMA)^{vi}</p>	<p>約 0.2 nm (2 Å) の原子レベルから約 100 nm まで</p>
<p>FDA^{vii}</p>	<p>(縦, 横, 高さのうち) 1方向以上の寸法がナノスケール範囲 (約 1 ~ 100 nm) の工業材料又は最終製品, 又はナノスケールの寸法を原因とする物理特性や化学特性や生物学的効果などの特性又は現象を示す工業材料又は最終製品 (これらの寸法がナノスケールの範囲外, 1 µm までであってもよい)。</p>
<p>NNI^{viii}</p>	<p>ナノテクノロジーは、独自の現象が新たな適用を可能にする約 1 ~ 100 nm の寸法において物質を理解しコントロールする技術である...。約 1 ~ 100 nm の寸法はナノスケールとして知られている。ナノスケールでは、物質に独自の物理的, 化学的及び生物学的特性が表れる可能性がある。これらの特性は、重要な点でバルク材料や単独の原子や分子の特性と異なっている。</p>

^{iv} REGULATION (EU) No 1169/2011 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004; <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:EN:PDF>

<p>全米オーガニック認証基準委員会^{ix}</p>	<p>工業ナノ材料：ナノスケールでのみ表れる非常に特異的な特性や組成（形状、表面特性又は化学など）を得るためナノスケール範囲（約 1～300 nm）になるよう人が意図的に設計し操作し製造した物質のこと。ホモジナイズ、製粉、攪拌及び凍結などの従来の食品加工処理中に生成された偶発的なナノスケール範囲の粒子、及び自然発生したナノスケール範囲の粒子は、本定義に組み入れる意図はない。キャッピング試薬や他の合成成分を含有する全ナノ材料は、例外なくこの定義に組み入れる。</p>
<p>OECD^x</p>	<p>ナノテクノロジーは、非常に小さな（一般的に 100 nm 未満）構造や系の取扱い、研究又は探索を可能にする一連の技術である。</p>
<p>SCCP^{xi}</p>	<p>ナノ粒子は、（縦、横、高さのうち）1方向又は複数方向の寸法がナノスケールの粒子である（1方向以上の寸法<100 nm）。ナノ材料は、1方向又は複数方向の外部寸法、又は内部構造がナノスケールの物質で、ナノスケールの特性のない同一の物質と比較して新たな特徴を示すと考えられる。ナノ粒子は2群に分けられる。すなわち、i) 可溶性及び/又は生物分解性のナノ粒子で、皮膚への塗布により複数の分子成分に分解する（リポソーム、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョンなど）、及び ii) 不溶性粒子（TiO₂, フラーレン、量子ドットなど）。</p>
<p>米国家科学技術委員会 (NSTC) 技術委員会 のナノスケール科学 工学技術 (NSET) 小委員会 (2000年2月)^{xii}</p>	<p>長さが約 1～100 nm の範囲。[...] いくつかの特定例では、新たな特性や現象が表れるのに必須の長さスケールが 1 nm 未満（例えば、約 0.1 nm における原子の操作）又は 100 nm を超える（例えば、ナノ粒子と高分子化合物との間の局所的な架橋や結合の関数として、ナノ粒子強化高分子化合物は約 200～300 nm で独自の特徴を示す）。</p>
<p>英国王立協会 &英国技術者 連盟^{xiii}</p>	<p>一般的に 100 nm 以下原子レベル（約 0.2 nm）まで。</p>

ⁱ <http://www.hc-sc.gc.ca/sr-sr/pubs/nano/pol-eng.php>

-
- ii EU Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, OJ L 342, of 22.12.2009, p. 59, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:EN:PDF> Last checked April 15, 2012.
- iii *Article 2 Paragraph 3: "in view of the various definitions of nanomaterials published by different bodies and the constant technical and scientific developments in the field of nanotechnologies, the Commission shall adjust and adapt point (k) of paragraph 1 to technical and scientific progress and to definitions subsequently agreed at international level".
- iv <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/index.htm>
- v Position of the European Parliament adopted at first reading on 25 March 2009 with a view to the adoption of Regulation (EC) No .../2009 of the European Parliament and of the Council on novel foods, amending Regulation (EC) No 1331/2008 and repealing Regulation (EC) No 258/97
<http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+TA+P6-TA-2009-0171+0+DOC+XML+V0//EN&language=EN>
- vi European Medicines Agency. Reflection Paper on Nanotechnology-Based Medicinal Products for Human Use. EMEA/CHMP/79769/2006, p. 3 (2006); www.emea.europa.eu/pdfs/human/genetherapy/7976906en.pdf
- vii Draft Guidance for Industry, "Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology", http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm#_ftn1
- viii http://www.nano.gov/NNI_Strategic_Plan_2007.pdf
- ix National Organic Standards Board Meeting, Madison, Wisconsin, October 25 – 28, 2010
<http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5086584>
- x <http://www.oecd.org/sti/nano>
- xi Scientific Committee on Consumer Products, Opinion on Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products, Adopted 18 December 2007, http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_123.pdf
- xii www.nsf.gov/crssprgm/nano/reports/omb_nifty50.jsp
- xiii The Royal Society and the Royal Academy of Engineering, "Nanoscience and nanotechnologies". Chapter 2 "What are nanoscience and nanotechnologies?", 2004; <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担 研究年度終了報告書 (H24)

ナノ物質等を配合した化粧品及び医薬品部外品の安全性及び品質確保に係わる

試験法に関する研究

微粒子酸化チタンの経皮吸収性に関する研究

分担研究者 杉林 堅次 城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 教授

研究要旨：

皮膚に塗布したナノ材料は主に毛包開口部に集積することが知られている。しかしながら、毛包に集積したナノ粒子の毛嚢内動態や皮内移行の有無については十分にわかっていない。安全性や品質を確保するには、物質の暴露時間や暴露濃度を評価する必要があるため、ナノ粒子の皮内分布だけでなく、皮内動態の速度論解析が重要となる。しかしながら、皮内（角層内）動態解析法であるテープストリッピング法とは異なり、毛嚢内移行量の評価や毛嚢内へ移行した物質の皮内動態解析については十分な研究が行われていない。昨年までの研究より、ナノ材料は皮溝や毛嚢開口部などに集積しやすいことを報告している。また、物質の皮膚浸透・透過性は溶解・拡散モデルでのみ表すことができることを報告している。そこで、本年度の研究では、皮膚に塗布したナノ材料の毛嚢内動態および毛嚢移行性について調べた。

A. 研究目的

皮膚は外界からの異物侵入や体内からの水分蒸発を防ぐバリアであり、一般に他の上皮膜に比べ物質の透過性が低い¹⁻⁴⁾。物質の皮膚透過ルートとして角層を介する経角層ルートと毛嚢や汗腺などの付属器官を介する経付属器官ルートがある³⁻⁵⁾。毛嚢などを介する経付属器官ルートは皮膚表面積に対して約 0.1%程度であり、多くの物質の皮膚透過経路としてこのルートは無視されてきたが^{3,5-7)}、近年、経付属器官ルートがイオン性物質や水溶性高分子物質の主な皮膚透過ルートとして、Figure 1 に毛嚢断面図で示した外毛根鞘や脆弱な角層バリアを有する毛嚢バルジ部が注目され始めている⁸⁻¹⁰⁾。また、Weigmann らの調査によれば頭部や足のすね部分は毛嚢の密度が高く、皮膚表面積の 10%を超える場合もあるため、適用部位によっては毛嚢ルートを介した物質透過性を考慮する必要があると報告している¹¹⁾。物質やナノ物質の皮膚浸透における毛嚢の重要性については、様々なアプローチによる研究が行われており^{4,6-15)}、Barry らはトリプシン処理して得た角層シートを皮膚（角層）の上に重ねるサンドイッチ法により、物質の皮膚透過性に対して毛嚢ルートが無視できないことを報告している¹⁶⁾。また、Ulrike らは vanishing cream を毛嚢埋め剤として用い、毛穴を埋めた皮膚を介したミノキシジルの血中濃度の違いを評価している¹⁷⁾。しかしながら、これらの方法は、物質やナノ物質の皮膚浸透や透過に対する毛嚢ルートの関与が分かるものの、毛嚢ルー

トが物質やナノ物質の皮膚浸透や透過に占める寄与の解明にまでは至っていない。また、毛嚢に移行した物質の毛嚢内動態については未だ十分な検討が行われていない。物質の毛嚢を介する透過量を評価するため水溶性高分子物質を用いて予備検討を行ったところ、脱毛処理を施すことで水溶性高分子の毛嚢透過量が著しく増大することがわかった。これにより、ナノ化粧品の毛嚢内移行性が増大する可能性が考えられた。そこで、本研究では、脱毛処理後の物質の皮膚透過性を調べた。また、毛嚢に移行した物質の毛嚢内動態を明らかとするためには、毛嚢開口部へ微量の物質送達が必要となる。そこで、毛嚢開口部へのみ物質を微量適用し、水溶性高分子物質の毛嚢内動態評価システムの確立を行った。

予備試験にて脱毛処理を施した皮膚を介した水溶性高分子物質の皮膚透過量は、脱毛未処理皮膚を介した透過量に比べて増大したことを確認した。脱毛処理より増加した透過量は毛嚢を介した物質透過量と考えることができる。しかしながら、物理化学的性質の異なる物質の皮膚透過性に及ぼす脱毛処理の影響や物質透過性に及ぼす脱毛本数の影響などは分かっていない。そこでまず、難皮膚透過性の水溶性蛍光物質であるカルセイン適用後の毛嚢内分布について脱毛処理および脱毛未処理皮膚を用いて調べた。次に脂溶性モデル物質であるフルルビプロフェン、水溶性モデル物質として硝酸イソソルビド、フルオレセインナトリウムおよび分子量の異なる fluorescein

isothiocyanate-dextran (FDs) を用いて物理化学的性質の異なる物質の皮膚透過性に及ぼす脱毛処理の影響を調べた。脱毛本数の異なる皮膚を介した物質透過量より脱毛した毛嚢 1 本当たりの物質透過量の算出を試みた。脱毛による物質の経毛嚢ルートへの送達促進の有無はナノ化粧品の安全性を確保する上で重要な情報と成りうる。

B. 実験方法

1. 試薬及び実験材料

Isosorbide-5-mononitrate (ISMN)、Calcein disodium (Calcein-Na) は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。フルルビプロフェン (FP) はリードケミカル (富山、日本) から供与された。Fluorescein sodium (FL-Na) は和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4、FD-10、FD-20) は Sigma Aldrich (St. Louis、MO、U.S.A.) から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級または HPLC 用を用いた。これらの試薬は精製せずにそのまま使用した。Table 1 に本研究で使用した種々物質の分子量および n -オクタノール/水分配係数 ($\log K_{ow}$) を示す。

2. 実験動物材料

三元豚の耳 (ブタ耳) は株式会社埼玉実験動物供給所 (埼玉、日本) から食用の豚耳を購入した。

3. 皮膚の摘出および脱毛処理

ブタ耳は表面を傷をつけないよう丁寧に水洗いし、水分をよく拭き取り、メスを用いて必要面積を摘出し、真皮側の脂肪をハサミで丁寧に取り除いた。コルク台の上に皮膚を角層が上になるように固定し、毛抜き用ピンセットを用いて目視で角層を傷つけないように皮膚表面に出ている毛幹の下部 1/3 部分を摘み、毛 (20 本〜60 本) を抜き取った。

4. 毛嚢含有皮膚表面観察

摘出したブタ耳をコルク台の上に広げ、共焦点生体レーザー顕微鏡 (Vivasope[®]1500、Lucid、Rochester、NY、U.S.A.) を用いて波長 830 nm で毛嚢開口部を観察し、毛嚢開口部および毛幹の直径を測定した。

5. 蛍光マーカー適用直後の皮膚切片観察

脱毛および脱毛未処理皮膚にカルセイン水溶液 (10 mM、1 mL) を適用した。直後に、適用溶液を回収し、冷凍包埋剤 (Super Cryoembedding Medium、サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本) で皮膚を包埋し、 -20°C イソペンタン中で速やかに凍結させた。皮膚に対して垂直および水平方向に厚み 8 μm の皮膚組織切片をクライオスタット (CM3050、LEICA、東京、日本) により作成した。作成した皮膚組織切片は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM、FV1000、オリンパス株式会社、東京、日本) を用いて波長 473 nm で観察した¹⁸⁾。

6. 種々物質の *in vitro* 皮膚透過実験

脱毛未処理および脱毛前処理したブタ耳皮膚は、角層を上向け縦型拡散セル（有効透過面積 3.14 cm²）にセットした。皮膚からレシーバーに漏出する自家蛍光の影響の軽減および角層を水和するため、表皮側に 1 mL、真皮側に 18 mL の phosphate buffered saline (PBS、pH7.4) を適用し、1 時間放置した。その後、表皮側から PBS を回収し、真皮側より 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を真皮側に補充した。表皮側には PBS に溶解させた種々物質（10 mM FP, 500 mM ISMN, 1mM FL-Na, 1 mM FD-4, 1 mM FD-10, 1 mM FD-20）の水溶液を 1 mL 適用した。実験中、セル内の温度は 32 °C に保ち、真皮側のセル内をマグネティックスターラーで攪拌子を回転させることで常時攪拌した。経時的に真皮側から 0.5 mL サンプリングを行い、その都度、同量の PBS を補充した。得られたサンプル中の物質濃度は HPLC および蛍光分光光度計を用いて測定した。

7. 物質の定量法

透過実験より得られた FL-Na、FD-4、FD-10 および FD-20 のサンプル溶液を遠心分離（18800×g、5 min、4 °C）し、その上清 280 μL を蛍光分光光度計（RF-5300PC、株式会社島津製作所、京都、日本）にて測定した。Table 2 に蛍光分光光度計を用いた定量条件を示す。また、透過実験より得られた FP のサンプル溶液は内部標準物質を含んだアセトニトリルと同量混合した。また、ISMN のサ

ンプル溶液はアセトニトリルと同量混合した。その溶液を遠心分離（18800×g、5 min、4 °C）し、その上清 200 μL を HPLC に注入した。使用した HPLC システムを Table 3 に示す。また、FP および ISMN の HPLC 測定条件を Table 4 に示す。

7. 物質の透過係数の算出法：

物質は、皮膚（角層）中に生じる物質の濃度勾配に従って拡散・透過する。単位面積あたりの物質の皮膚透過速度 (dQ/dt) は、Fick の拡散式から定常状態時に導かれる (1)、(2) 式により表現される。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{C_d K D}{L} \quad \dots \dots (1)$$

$$P = \frac{K D}{L} \quad \dots \dots (2)$$

ここで、 C_d は適用物質濃度、 K は物質の皮膚/基剤分配係数、 D は物質の皮膚中拡散係数、 L は皮膚の厚み、 P は物質の透過係数である。

8. 皮膚表面の毛穴面積の算出

皮膚表面の毛穴面積は、皮膚測定用共焦点レーザー生体顕微鏡 (Vivasope®) の観察画像より得られた皮膚表面の毛穴の半径および毛幹の半径を用い、下記の式より算出した

$$S_{\text{外}} = \pi a^2 \quad \dots \dots (3)$$

$$S_{\text{内}} = \pi b^2 \quad \dots \dots (4)$$

ここで、 $S_{外}$ は皮膚表面毛穴の面積、 $S_{内}$ は毛幹の断面積、 a は皮膚表面の毛穴の半径、 b は毛幹断面部の半径を示す。なお、皮膚表面の毛穴および毛幹の半径はVivasope[®]にて観察し画像解析ソフト（Viva Scan）を用いて測定した。

10. 有意差検定

物質の脱毛本数の異なる場合（20・60本）の毛囊一本あたりの透過量の検定には、ノンパラメトリック検定であるKruskal Wallis H-testにより行った。脱毛する毛幹が太い群と細い群間の皮膚透過量の違いの検定はUnpaired t-testにより行った。危険率5%未満を有意と判定した。

C. 結果及び考察

1. 毛囊の形状

Table 5にVivasope[®]で観察した皮膚表面画像より測定した皮膚表面の毛穴の直径、毛幹の直径およびそれらを用いて算出した断面積を示す。この結果よりランダムに選択した毛幹6本の平均直径(67.0 μm)は皮膚表面の毛穴の平均直径(134 μm)の半分程度であることが分かった。また、面積を算出した結果では、毛幹の平均断面積は皮膚表面の毛穴の平均面積の約1/3であることが分かった。

2. 蛍光マーカーの皮膚分布

Figure 2に皮膚組織のCLSM観察画像を示す。脱毛未処理皮膚の場合は、毛囊漏斗部分にカルセイン由来の強い蛍光が認められた(Fig. 2a, b)。一方、脱毛処理

皮膚では、毛囊漏斗部から毛囊深部にかけてカルセイン由来の蛍光が確認された(Fig. 2c, d)。また、脱毛未処理の毛囊漏斗部の開口径は93.76 μm であるのに対し脱毛処理皮膚では188.9 μm であり、脱毛処理により毛囊漏斗部の開口径が約2倍大きく開いたことが確認された。

次に、脱毛未処理毛囊内の物質動態を明らかとするため、毛囊開口部だけにカルセイン水溶液を適用し、その皮内分布を調べた。Figure 3に皮膚組織垂直切片を示す。カルセイン適用1時間後は、カルセイン水溶液が毛囊漏斗部に分布していることが確認された。また、カルセインは毛囊バルジ部にも到達したことが確認された(Fig. 3a)。カルセイン適用6時間後は、カルセインが毛囊漏斗部だけでなく、毛囊深部にある毛根にも分布していることが確認された(Fig. 3b)。また、カルセイン6時間適用後の皮内分布は角層が染まっていないにもかかわらず、カルセイン由来の蛍光が皮内に多く認められた。この結果は、Ogisoらが報告しているように¹⁹⁾、外毛根鞘のバリア能が低いことに関係していると考えられた。したがって、毛囊に移行した水溶性物質は外毛根鞘を介して皮内へ浸透する可能性が示唆された。次に毛囊周辺の蛍光物質分布を皮膚水平切片画像観察により確認した。Figure 4に皮膚毛囊開口部にのみカルセイン水溶液を適用し、経過2時間後の皮膚組織水平切片を示す。得られた結果より、皮膚表面から深さが100 μm 付近ではカルセインが広く毛囊を中心に拡散したことが確認された(Fig. 4a, b)。さ

らに、深さ 120~170 μm では、毛嚢外にもカルセインの分布が確認された (Fig. 4c-f)。これらの結果より毛嚢に移行した水溶性物質は比較的浅い外毛根鞘より皮内へ移行する可能性が示唆された。水平切片に関しては、経時的な物質分布を調べていないため、さらに脂溶性蛍光マーカーやナノ素材を用いて検討を行うことでより毛嚢移行部位が明らかになると考えられた。皮膚浸透性は、溶解・拡散モデルで表すことができることから、ナノ粒子の構成成分が皮膚へ分配しない限り、ナノ素材が皮膚浸透・透過することは困難であると考えられる。

3. *In vitro* 皮膚透過性試験

Figure 5 に種々薬物の脱毛未処理皮膚および脱毛処理皮膚を介した透過プロファイルを示す。脂溶性薬物の FP や水溶性低分子薬物の ISMN は 20 本脱毛処理を行っても透過量に大きな差が見られなかった (Fig. 5a, b)。一方、分子量が 500 Da 付近もしくはそれ以上の水溶性薬物である FL-Na、FD-4、FD-10 および FD-20 では 20 本脱毛処理皮膚を介した 12 時間目の累積透過量は、脱毛未処理皮膚と比べ、それぞれ 2.5 倍、2.8 倍、2.8 倍、2.7 倍と高い値を示した (Fig. 5c-f)。この薬物透過量の差より、毛嚢を介した薬物透過量を算出することが可能であると考えられた。また、脱毛による透過促進メカニズムを明らかとするために、得られた透過プロファイルより、種々皮膚透過パラメーターを算出した。Table 6 に算出した種々皮膚透過パラメーターを示す。脱

毛処理皮膚を介した FP および ISMN の透過係数 (P)、分配係数 (K) および拡散係数 (D) は、脱毛未処理皮膚を介した各パラメーターと比べ差が見られなかった。一方、脱毛処理皮膚を介した FL-Na、FD-4、FD-10、FD-20 の P 、 K および D をみると、脱毛未処理皮膚を介した各パラメーターと比べ P と K が増大した。脱毛処理により増加した薬物の P と K は脱毛未処理皮膚の P と K に比べ、約 2 倍増大した。 P は K と D のパラメーターであるが、 P と K の増大比がほぼ同一であったことから脱毛処理は水溶性高分子薬物の分配性増大と関連していることが分かった。Fig. 5 に示した脱毛処理により皮膚表面の毛穴の直径比は約 2 倍に拡大した結果とほぼ一致した。したがって、皮膚表面の毛穴の面積は、毛嚢ルートを主な経皮透過ルートとする水溶性高分子薬物の皮膚透過性に強い関係性があると示唆された。

Figure 6 に異なる本数を脱毛処理した後の FD-4 の累積皮膚透過量を調べた結果を示す。FD-4 の皮膚透過量は、脱毛未処理皮膚を介した透過量に対し、20 本脱毛時には 2.90 倍、30 本脱毛時には 3.98 倍、40 本脱毛時には 6.86 倍、50 本脱毛時には 7.70 倍、60 本脱毛時には 7.38 倍であった。脱毛処理本数の増加に伴い、FD-4 の増加が認められたので脱毛本数と flux の関係について調べた。Figure 7 に FD-4 の未処理皮膚および各脱毛本数の異なる前処理皮膚の透過量から算出した flux を示す。10 本から 40 本脱毛までは脱毛本数の増加に伴い flux も増大した。

一方、50 および 60 本脱毛処理では累積透過量は増加するものの flux はほぼ同じとなった。50～60 本脱毛時は flux が変化しなかった理由は、今回用いた皮膚の毛嚢密度は 25～30 本/cm² の間であり、50～60 本脱毛時には細い毛が多かったためと考えられた。

Figure 8 に脱毛未処理皮膚の毛嚢および脱毛毛嚢一つ当たりの皮膚透過量を示す。なお、脱毛毛嚢 1 本当たりの皮膚透過量は脱毛本数の異なる皮膚の薬物透過量から脱毛未処理皮膚の薬物透過量を引いた値より算出した。40 本脱毛の 1 本当たりの皮膚透過量は高い傾向にあったが、脱毛本数の異なる他の 1 本当たりの皮膚透過量と比べ有意な差が見られなかった ($P > 0.05$)。20～60 本の脱毛処理では、毛嚢脱毛本数の違いによる薬物皮膚透過性に有意な差は認められなかったものの、毛嚢を介した薬物透過量は一定の値とならなかった。そこで、脱毛する毛幹の太さに着目し、平均毛幹太さ 61.6 μm と平均毛幹太さ 117.7 μm を脱毛処理した時の FD-4 の皮膚透過性を調べた。Figure 9 に脱毛 20 本の毛幹太さが FD-4 の皮膚透過に及ぼす影響について調べた結果を示す。平均毛幹が太い毛 (117.7 μm) を中心に脱毛処理した皮膚を用いた FD-4 の皮膚透過量は平均毛幹が細い毛 (61.6 μm) を中心に脱毛処理した場合の約 1.3 倍になり、これらには有意な差が認められた ($P < 0.05$)。しかしながら、脱毛した毛幹の平均太さには 2 倍の差があるにもかかわらず、薬物の皮膚透過係数および分配係数と一致しなかった (Table 7)。

これは毛嚢を介する薬物の皮膚透過は毛幹の太さだけでなく、hair cycle、脱毛により生じた毛嚢部分の組織変化やモデル薬物自体の物理的性質などが影響を及ぼしているためと考えられた^{4, 20-22}。

脱毛処理により水溶性高分子物質の経毛嚢ルートを介した皮膚透過量が増大した。この結果より、脱毛した毛嚢 1 本当たりの水溶性物質の皮膚透過性の算出が可能であることが分かった。透過プロファイルより算出したパラメーター、脱毛処理による物質の皮膚透過率の増加は水溶性高分子物質の皮膚/基剤分配係数の増加として算出された。皮膚/基剤分配係数の増加比は水溶性物質の分子量にかかわらず一定であり、脱毛処理により増加した皮膚表面の毛穴の直径比と一致した。また、脱毛する際に毛幹の太さによって物質の皮膚透過量が左右されることから、毛幹の太さが脱毛処理部の毛嚢を介した物質の透過量と関係することが分かった。このことから皮膚表面の毛穴の面積もしくは毛幹の太さは水溶性物質の皮膚透過性と強く関係することが示唆された。

以上の結果より、毛嚢を水で満たされた細孔透過ルートと仮定すると、ナノ粒子は脱毛により容易に毛嚢内に移行する可能性が示唆された。また、本手法は毛嚢への物質移行量を評価可能な新規実験方法となる可能性が示唆された。

D. 総括

本研究では、物質の毛嚢内動態および毛嚢移行評価を行った。ナノ粒子は、毛嚢

開口部に集積しやすく、皮内浸透ルートとして、毛嚢内物質動態を明らかとする必要があった。物質の毛嚢移行性は毛穴の開口部面積と関係があることが示されたことから、脱毛時には毛嚢内へのナノ粒子の侵入が示唆された。本年度の研究結果より、高分子水溶性物質は毛嚢移行後に分配・拡散して皮内へ浸透することが明らかとなったが、ナノ物質の場合においては、皮膚組織への分配が著しく低いことから、皮膚炎症などによる毛嚢内バリア機能の低下や遊走細胞などによる貪食が認められない限り、生きた表皮・真皮内へのナノ粒子の移行は困難であると考えられた。

E. 参考論文

- 1) Bos J.D., Meinardi M.M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp Dermatol.*, **9** 165-169 (2000).
- 2) Sugibayashi K., Morimoto Y., Transdermal therapeutic systems, 日本臨牀, **56**, 619-627 (1998).
- 3) 武岡 永里子, 育毛剤の皮膚透過性の研究, *Fragrance J.*, **35**, 17-21 (2007).
- 4) Cevc G., Vierl U., Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal, *J. Control. Release*, **141**, 277-299 (2010).
- 5) Sarheed O., Frum Y., Use of the skin sandwich technique to probe the role of the hair follicles in sonophoresis, *Int. J. Pharm.* in press.
- 6) Qvist M.H., Hoeck U., Kreilgaard B., Madsen F., Frokjaer S., Evaluation of Göttingen minipig skin for transdermal in vitro permeation studies, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 59-68 (2000).
- 7) Knorr F., Lademann J., Patzelt A., Sterry W., Blume-Peytavi U., Vogt A., Follicular transport route - research progress and future perspectives, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **71** 173-180 (2009).
- 8) Aarti N., Yogeshvar N.K., Richard H.G., Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **3**, 318-326 (2001).
- 9) Wosicka H., Cal K., Targeting to the hair follicles: current status and potential, *J Dermatol. Sci.*, **57**, 83-89 (2011).
- 10) Mark R. P., Samir M., Robert L., Current status and future potential of transdermal drug delivery, *drug discovery*, **3**, 115-124 (2004).
- 11) Weigmann H.J., Lademann J., Schanzer S., Lindemann U., Pelchrzim R.V., Schaefer H., Sterry W., Correlation of the local distribution of topically applied substances inside the stratum corneum determined by tape stripping to differences in bioavailability, *Skin Phys.*, **14** 93-103 (2001).
- 12) Toll R., Jacobi U., Richter H., Lademann J., Schaefer H., Blume-Peytavi U., Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles, *Invest. Dermatol.*, **123**, 168-176 (2004).
- 13) Patzelt A., Richter H., Knorr F., Schäfer U., Lehr C.M., Dähne L., Sterry W., Lademann J., Selective follicular targeting by

modification of the particle sizes, *J. Control. Release*, **150**, 45-48 (2011).

14) Sarheed O., Frum Y., Use of the skin sandwich technique to probe the role of the hair follicles in sonophoresis, *Int. J. Pharm.*, in press.

15) Lademann J., Jacobi U., Waibler E., Sterry W., *In vivo* Determination of the Long-Term Reservoir of the Horny Layer Using Laser Scanning Microscopy, *J. Biophotonics*, **15**, 565-569 (2005).

16) Barry B.W., Drug delivery routes in skin: a novel approach, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54** 31-40 (2002).

17) Blume-Peytavi U., Massoudy L., Patzelt A., Lademann J., Dietz E., Rasulev U., Garcia Bartels N., Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **76**, 450-453 (2010).

18) Bachhav Y.G., Summer S., Heinrich A., Bragagna T., Böhler C., Kalia Y.N., Effect of controlled laser microporation on drug transport kinetics into and across the skin, *J. Control. Release*, **146**, 31-36 (2010).

19) Gore A.V., Liang A.C., Chien Y.W., Comparative Biomembrane Permeation of Tacrine Using Yucatan Minipigs and Domestic Pigs as the Animal Model, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 441-447 (1998).

20) Otberg N., Richter H., Schaefer H., Blume-Peytavi U., Sterry W., Lademann J., Variations of hair follicle size and distribution in different body sites, *J. Invest. Dermatol.*, **122** 14-19 (2004).

21) Lademann J., Weigmann H.J., Rickmeyer C.h., Barthelmes H., Schaefer H., Mueller G., et al., Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **12** 247-256 (1999).

F. 学会発表

正木 涼介、藤堂 浩明、杉林 堅次、
画像解析による化学物質の生きた表皮・
真皮中における concentration-distance
profile 評価法の確立、第 56 回日本薬学会
関東支部大会

Table 1 Physicochemical properties of model compounds.

Various compounds	<i>M. W.</i>	log <i>K_{o/w}</i>
Isosorbide-5-mononitrate (ISMN)	191.14	-0.15
Calcein disodium (Calcein·Na)	625.25	-3.50
Flurbiprofen (FP)	224.27	2.18
Fluorescein sodium (FL·Na)	376.30	-0.62
Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4)	3400	-0.77
Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-10)	10000	-0.77
Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-20)	21200	-0.77

Table 2 Spectrofluorometric conditions for determination of model compounds.

	FL·Na	FD-4	FD-10	FD-20
Excitation wavelength (nm)	488	490	490	490
Emission wavelength (nm)	535	520	520	520
Excitation bandwidth (nm)	5	5	5	5
Emission bandwidth (nm)	5	5	5	5

Table 3 HPLC systems for determination of FP and ISMN.

Pump	LC-10AD	Shimadzu, Kyoto, Japan
UV detector	SPD-10AV	Shimadzu, Kyoto, Japan
System controller	SCL-10A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Auto injector	SIL-20A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser	DGU-12A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Column	TSK-GEL ODS-100 V 4.6 mm×75 mm	Tosho, Tokyo, Japan
Column oven	CTO-10AC	Shimadzu, Kyoto, Japan
Analysis software	Smart Chrom	KYA tech., Tokyo, Japan

Table 4 HPLC conditions for determination of model compounds.

Chemical	Mobile phase	Detection (nm)	Internal standard
FP	acetonitrile : 0.1 % phosphoric acid = 50 : 50	254	Isopropyl p-hydroxybenzoate
ISMN	acetonitrile : water = 10 : 90	210	Absolute calibration method

Table 5 Diameter and area of hair follicle surface or hair shaft section of pig ear skin. Values are the mean \pm S. E. (n = 6).

Diameter of hair follicle surface (μm)	Diameter of hair shaft (μm)	Surface area of hair follicle ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	Section area of hair shaft ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)
134.2 \pm 12.5	67.04 \pm 6.25	14.13 \pm 0.12	3.52 \pm 0.03

Table 6 Various permeation parameters of FP, ISMN, FL-Na, FD-4, FD-10 and FD-20 through pig ear skin. Values are the mean \pm S. E. (n = 4 - 7).

		$P (\times 10^{-8} \text{ cm/s})$	$D (\times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s})$	$K (\times 10^{-2})$
FP	No removal of hairs	105.35 \pm 14.03	1.89 \pm 0.14	81.94 \pm 7.90
	Removal of 20 hairs	116.42 \pm 6.00	2.19 \pm 0.12	79.82 \pm 1.90
ISMN	No removal of hairs	36.63 \pm 3.30	2.40 \pm 0.19	23.83 \pm 3.20
	Removal of 20 hairs	37.42 \pm 4.90	2.58 \pm 0.24	21.51 \pm 1.20
FL-Na	No removal of hairs	0.56 \pm 0.06	1.79 \pm 0.10	0.49 \pm 0.03
	Removal of 20 hairs	1.41 \pm 0.10	2.17 \pm 0.14	1.04 \pm 0.10
FD-4	No removal of hairs	0.26 \pm 0.03	2.35 \pm 0.10	0.18 \pm 0.02
	Removal of 20 hairs	0.75 \pm 0.08	2.16 \pm 0.11	0.56 \pm 0.07
FD-10	No removal of hairs	0.06 \pm 0.02	1.88 \pm 0.11	0.05 \pm 0.01
	Removal of 20 hairs	0.16 \pm 0.04	2.45 \pm 0.09	0.11 \pm 0.03
FD-20	No removal of hairs	0.03 \pm 0.01	2.21 \pm 0.67	0.03 \pm 0.01
	Removal of 20 hairs	0.08 \pm 0.01	2.07 \pm 0.08	0.07 \pm 0.01

Table 7 Various permeation parameters of FD-4 through pig ear skin and diameter of hair shaft of pig ear skin. Values are the mean \pm S. E. (n = 40).

	Diameter of hair shaft (μm)	$P (\times 10^{-9} \text{ cm/s})$	$D (\times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s})$	$K (\times 10^{-3})$
Small hair	61.6 \pm 1.71	8.57 \pm 0.74	1.79 \pm 0.04	7.52 \pm 0.63
Large hair	118 \pm 3.62	6.99 \pm 0.91	1.71 \pm 0.06	6.43 \pm 0.75

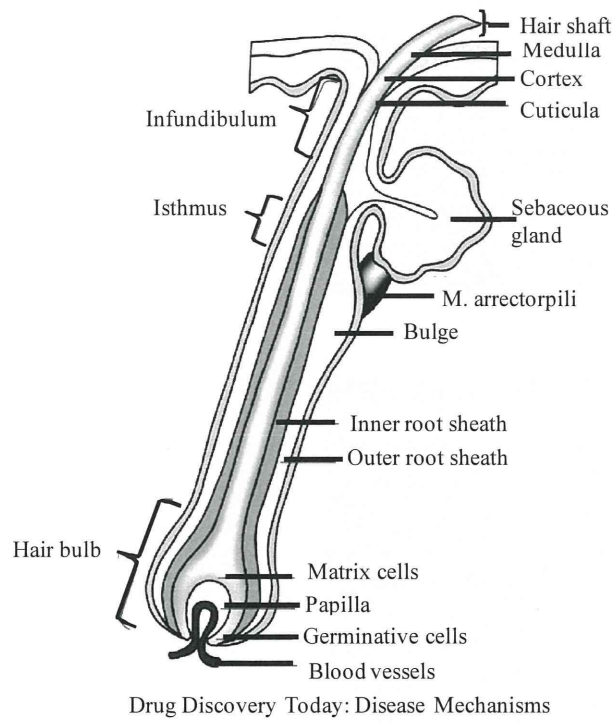


Fig. 1 Morphology of the human hair follicle.

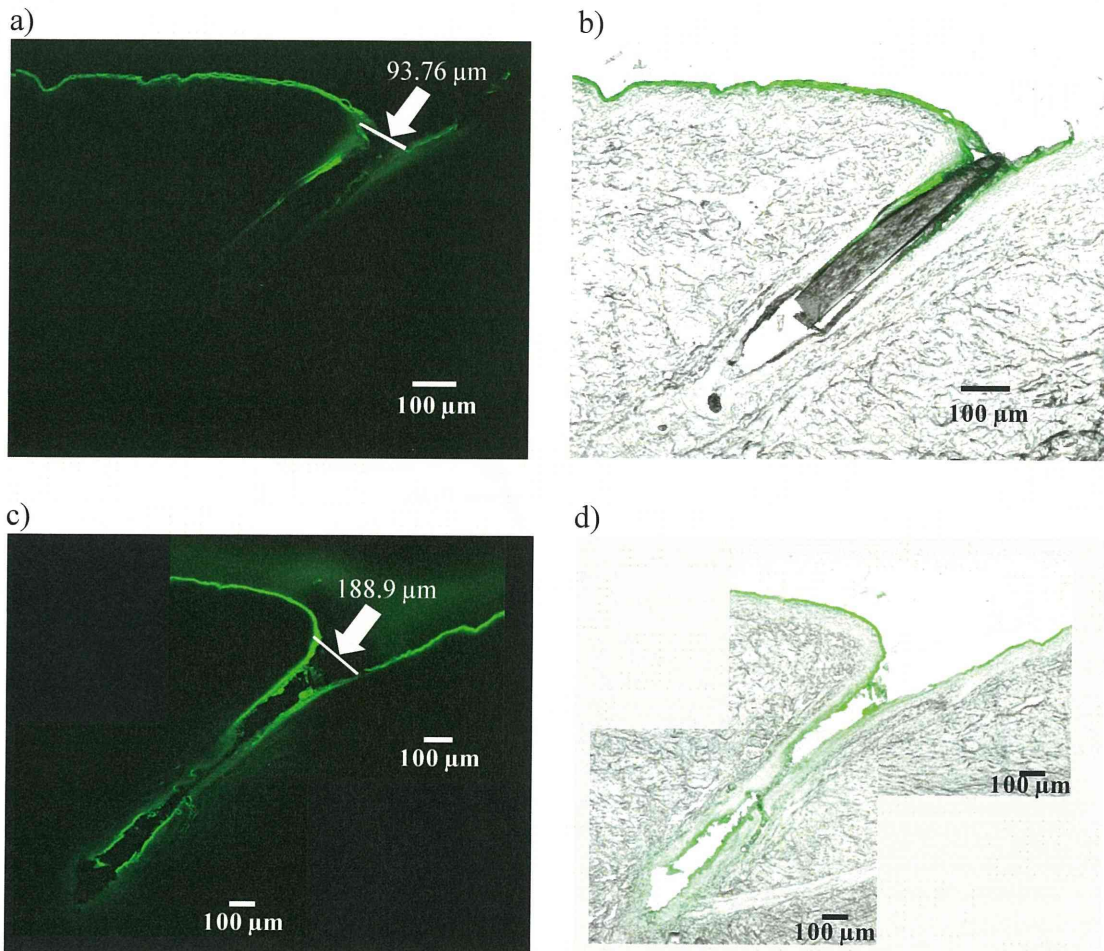


Fig. 2 Observation of fluorescence distribution in skin by CLMS
 a and b: fluorescence and merged bright-field and fluorescence images in no hair removal skin, respectively. c and d: fluorescence and merged bright-field and fluorescence images in no hair removal skin, respectively.

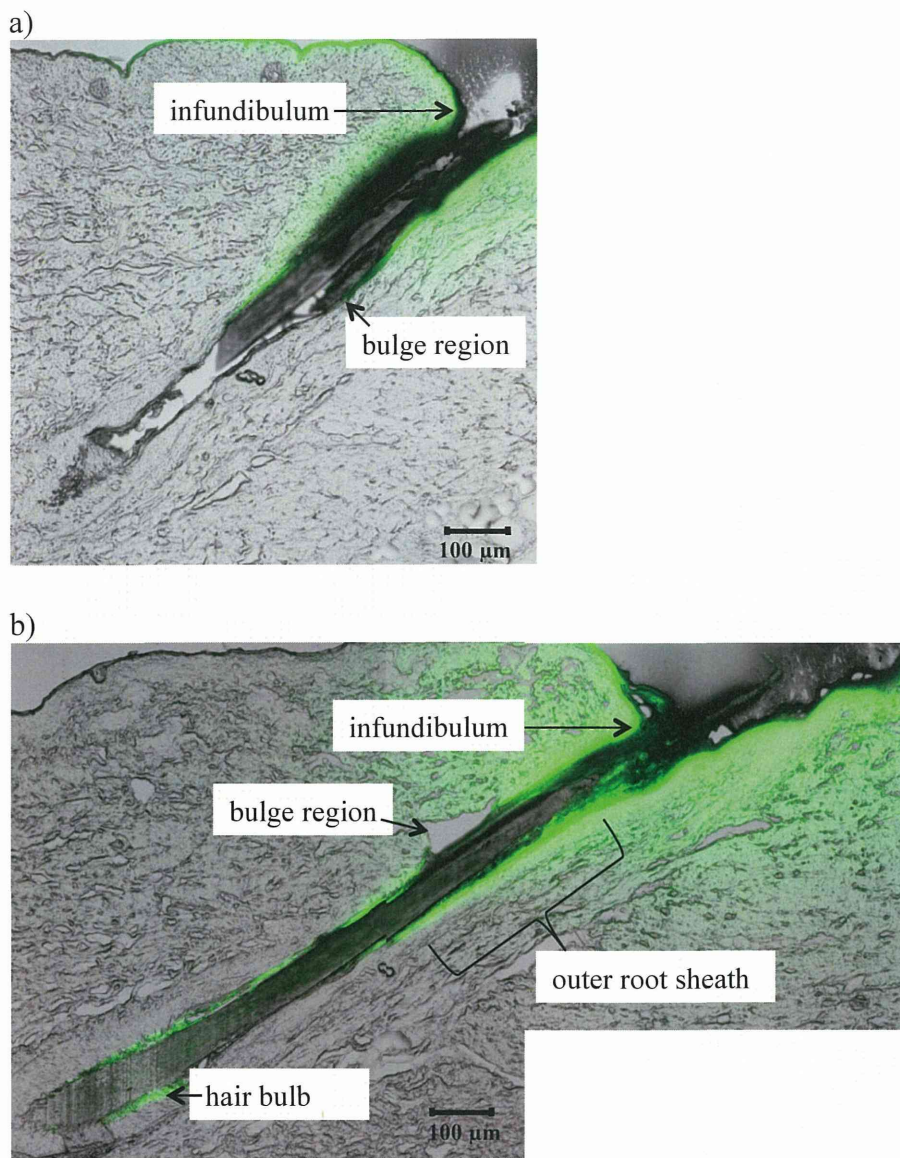


Fig. 3 Distribution of fluorescence marker in skin 1h (a) and 6h (b) after application of the calcein solution

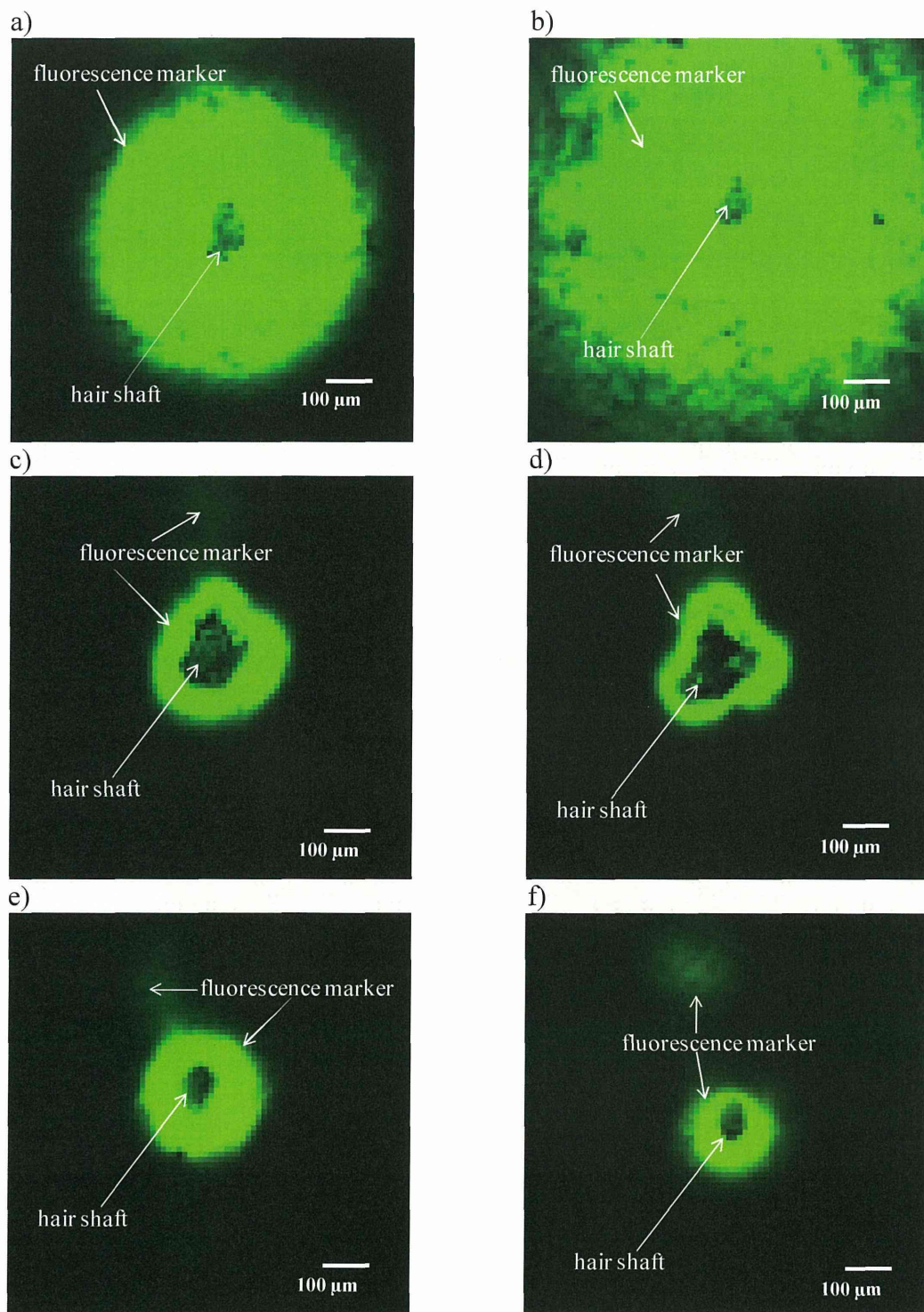


Fig. 4 Distribution of fluorescence marker at different depths (a): 100 μm, (b): 110 μm, (c): 120 μm, (d): 130 μm, (e): 140 μm, (f): 170 μm from skin surface of 2h after application of the calcein solution