

# ナノ粒子の物性の違いが角層作用過程におけるナノ粒子と角層の相互作用に与える影響の検討 —放射光 X 線を用いたアプローチ—

静岡県立大学薬学部臨床薬剤学分野

内野 智信

We have developed drug loaded nanoparticle formulations for the improvement of drug permeation across the skin. Recently, we have investigated drug permeation mechanism across the skin by synchrotron X-ray diffraction. In this study, phospholipid nanoparticles (PNs) containing vitamin C, 3-O-cetyl ascorbic acid (VCCE) were examined. Tocopherol acetate (TA) and sodium cholate (SC) were also loaded in PN formulations as model drug and charge inducer at a molar ratio of 20/80/5/6 (VCCE/Soya PC/SC/TA). Glycerol (GL) or diglycerol (DG) were also added to improve the skin accumulation of TA. Three TA loaded PNs (TA-PNs) were evaluated using a dynamic light scattering, Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Transmission Electron Microscope (TEM), skin accumulation test for TA, and small-angle X-ray diffraction (SAXD) analysis. TA-PN formulations (150 nm) were stable for two weeks and they encapsulated 1.8 mg/mL of TA. TEM and SAXD analysis revealed that the nanoparticles formed a spherical multilayer structure. <sup>1</sup>H-NMR spectra indicated that GL and DG enhanced the proton mobility of choline groups of soya PC molecules located on the membrane surface of TA-PNs. TA accumulation in the dermis was increased by adding GL and DG. SAXD analysis revealed that GL and DG promoted the formation of new lamellar structures on the stratum corneum, which contributed to improving the skin accumulation of TA.

## 1. 緒言

薬物が角層を浸透する場合、薬物は細胞間脂質間の分配を繰り返しながら浸透していく(細胞ルート)のではなく、細胞間隙を浸透している(細胞間隙ルート)と考えられている。

これまでにこの角層のバリア能を効率的に突破する手法の一つとして、100nm程度の粒子径をもったナノ粒子に薬物を封入することにより、封入された薬物の皮膚浸透性を向上させる検討が多数行われているが<sup>1-3)</sup>、薬物皮膚浸透性メカニズムの詳細は未だ議論の最中である<sup>4)</sup>。

本研究の最終的な目的は、薬物輸送担体として有効性があるといわれており、一方において角層に浸透するかどうかに関する議論のあるナノ粒子が角層に作用する際に角層構造にどのような影響を与えているかについて、放射光を用いた小角広角X線散乱の時間変化測定により明らかにし、皮膚浸透性機構、さらに有効性を解明し、この分野の発展に資することである。

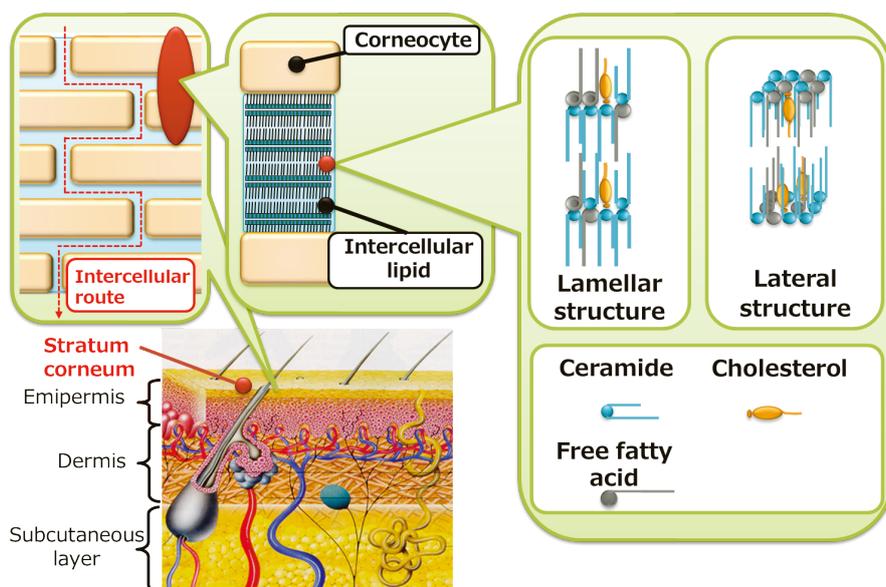


Fig. 1 Structure of stratum corneum and drug permeation route

角層の細胞間脂質は、主としてセラミド、脂肪酸、コレステロールからなり、自己組織化により規則性をもつラメラ構造を形成する。そのラメラ構造には周期が13nmの長周期ラメラ構造と6nmの短周期ラメラ構造が存在する。また、炭化水素の充填構造(ラテラル構造)として、六方晶(格子定数0.42nm)と直方晶(格子定数0.42nm, 0.37nm)が報告されている<sup>5)</sup>。

これまでに我々は、二重層構造をもったベシクルをヒト角層に作用させた後のX線散乱の時間変化測定を行ったところ、ナノ粒子は角層の細胞間脂質の短周期ラメラ構造と相互作用しており、角層浸透過程においてそれらの構造を乱すこと、ナノ粒子の弾力性が高いほうが短周期ラメラ構造の周期を伸長させる効果が大いことを報告した<sup>6)</sup>。封



Investigation of the effect of differences in physical properties of nanoparticles on the interaction between nanoparticles and the stratum corneum using X-ray diffraction

Tomonobu Uchino

Department of Clinical Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

入薬物の皮膚浸透性を改善するナノ粒子は、弾力性は同程度でも、用いる界面活性剤の物性により薬物の浸透性が異なることが明らかにされている<sup>3)</sup>。これは、ナノ粒子の構成成分によってナノ粒子が角層を浸透する過程におけるナノ粒子と角層の相互作用が異なることに由来すると推察されるが、その詳細は明らかとなっていない。

そこで本申請では、引き続き放射光 X 線の時間変化測定を用い、ナノ粒子の物性の違いが角層作用過程におけるナノ粒子と角層の相互作用に与える影響の検討を行うことを目的の中心として研究を行った。本報告書においては、ビタミン C 誘導体膜であるビタミン C セチルエーテル (VCCE) と大豆由来のホスファチジルコリン (Soya PC) からなるリン脂質ナノ粒子 (phospholipid nanoparticles: PNs) の構成成分として配合し、ビタミン E 誘導体であるトコフェロールアセテート (TA) を封入薬物に用いたナノ粒子、その粒子にグリセロール (GL) およびジグリセロール (DG) 粒子を添加した PNs を角層に作用させた事例について報告する。なお、報告する PNs の物性の違いを明確にするために、一部放射光 X 線回折測定以外のデータを紹介させていただくことをご容赦頂きたい。

## 2. 方法

### 2.1. 試料

ビタミン C 誘導体である VCCE は日光ケミカルズ株式会社より供与された。ビタミン E 誘導体である TA は Sigma-Aldrich より購入した。膜の構成成分として用いた Soya PC は、Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) より供与された。電荷誘起剤として用いた Sodium cholate (MW 431) は、和光純薬工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。ポリオールである GL および DG は、阪本薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) より供与された。その他の試薬は、特級品を用いた。

### 2.2. TA-PNs の調製方法

TA-PNs は、これまでの我々が用いてきた手法を改変し<sup>2,3,7)</sup>、薄膜法により調製した。あらかじめ調製した VCCE、Soya PC、SC、TA のエタノール溶液を VCCE/Soya PC/Sodium cholate/TA のモル比が 20/80/5/6 になるよう混合した後、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、40℃ で有機溶媒を除去した。得られた薄膜に 0.1% EDTA-2Na 含有 50mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を加えてバス型ソニケーターを用いて超音波処理を 5 分間行い、薄膜を懸濁させた後、Extruder を用いて懸濁液を孔径 100nm のポリカーボネートフィルターから押し出す操作を 10 回行い、TA-PNs を調製した。GL および DG を添加する場合は、再分散溶媒として 0.1% EDTA-2Na 含有 50mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) にそれぞれを 30% 添加し

たものを用いた。

### 2.3. TA-PNs の形状観察

各 TA-PNs の形状の観察を目的に、ネガティブ染色法にて透過電子顕微鏡 (TEM) (HT-7700, 日立製作所) 観察を行った。各 TA-PNs をフォルムバール膜貼付メッシュ (日新 EM 株式会社) に 5μL 滴下し、5 分間静置後水分を拭き取り、次に 1% モリブデン酸アンモニウム溶液を 5μL 滴下し、1 分間静置したのち 1 時間乾燥した後、TEM を用いて観察を行った。観察時の加速電圧は 80kV とした。

### 2.4. TA-PNs の平均粒子径、PDI、ゼータ電位の測定

各 TA-PNs の平均粒子径、PDI、ゼータ電位は、Zetasizer Nano ZX (Malvern Instruments Ltd.) を用いて動的光散乱法 (dynamic light scattering : DLS) により調製から 2 週間後に測定した。全ての製剤は、0.1% EDTA-2Na 含有 50mM クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を用いて 50 倍希釈した後、測定を行った。ゼータ電位は同一の機器を用いてレーザードップラー電気泳動法により測定した。

### 2.5. TA 封入率の決定

各 TA-PNs に封入されている VCCE および TA の封入率の測定には、0.1mL 用の Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device (カットオフサイズ : 2000, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。透析膜上部に各 TA-PNs を充填した。各 TA-PNs の透析液はそれぞれの製剤の再分散溶液 4.2mL を 5mL のポリプロピレンチューブに充填し、先の製剤を充填した Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device をセットし、室温で 2 時間透析処理を行った。透析後のそれぞれの溶液に含有している VCCE および TA を下記の HPLC 法により定量した。VCCE および TA の封入率は透析後薬物量 (the amount of drugs after dialysis) および透析前薬物量 (the amount of drugs before dialysis) を用いて、次式により算出した :

$$\text{薬物封入率 EE\%} = \left( \frac{\text{the amount of drugs after dialysis}}{\text{the amount of drugs before dialysis}} \right) \times 100$$

### 2.6. <sup>1</sup>H-NMR 測定

各 TA-PNs の <sup>1</sup>H-NMR は、JEOL ECA-500 (日本電子株式会社) を用いて、共鳴周波数 500 MHz で測定した。全ての測定は、ヒトの平均的な皮膚表面温度と同様の 32℃ で行った。Relaxation delay は 5 秒、積算は 100 回で測定した。Data point は 16384 とした。試料調製は 2.2. の方法に準じて行い、再分散溶液には軽水の代わりに重水を使用した。

## 2. 7. TAの*in vitro*皮膚浸透性試験および皮膚貯留性試験

*In vitro* 皮膚浸透試験にはユカタンマイクロピグ (YMP) を用いた、YMP皮膚膜は角層側をドナー側、真皮側をレシーバー側となるようにしてフランツ拡散セル (有効拡散面積:  $0.38\text{cm}^2$ ) に装着した。ドナーコンパートメントに各製剤  $500\mu\text{L}$  を適用し、レシーバー溶液として30%エタノール含有PBS (pH7.4)  $5.0\text{mL}$  を使用した。試験中、レシーバー溶液はスターラーで連続的に攪拌し、恒温送水ポンプを用いて温度を  $37^\circ\text{C}$  に保った。皮膚に製剤を適用した後、ドナーコンパートメントをパラフィルムで覆い、閉塞 (occlusive) 条件にした。皮膚透過性試験では、0、1、2、4、6、24時間ごとにレシーバー相より  $200\mu\text{L}$  溶液を採取し、採取後に同量のレシーバー溶液を補充した。貯留性試験では、24時間後の適用部位の皮膚 ( $0.38\text{cm}^2$ ) を使用した。実験後に皮膚上の適用製剤を十分にふき取った後、皮膚をスライドガラスに挟み、 $60^\circ\text{C}$  で12分間加温し、表皮と真皮に分離した<sup>8)</sup>。表皮と真皮をそれぞれチューブに入れ、内部標準物質を含むエタノール溶液 (Ergocalciferol  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を  $1.0\text{mL}$  加えた。その後、ホモジナイザー (IKA ULTRA-TURRAX<sup>®</sup>T10, IKA ジャパン株式会社) を用いてホモジナイズし、 $10000\text{rpm}$  で10min遠心分離を行い、上清を採取後フィルター (TORAST Disc SyringeFilter, 疎水性PTEEメンブレン, 直径  $13\text{mm}$ , 孔径  $0.45\mu\text{m}$ ) でろ過し、HPLCを用いてTA量を測定した。

## 2. 8. HPLCによるVCCEおよびTAの定量

HPLCシステムは、ポンプ (LC-20 AD, 島津製作所)、オートインジェクター (SIL-20 AC, 島津製作所)、UV検出器 (SPD-20 A, 島津製作所)、解析システム (CBM-20 A, 島津製作所) から構成されているものを使用した。カラムはTSK-gel ODS-100Z  $3\mu\text{m}$  ( $100 \times 2.0\text{mm}$ , 東ソー株式会社)、ガードカラムはTSK-gel guardgel ODS-100Z  $3\mu\text{m}$  ( $10 \times 2.0\text{mm}$ , 東ソー株式会社) を使用した。移動相は、メタノール (0.1% トリフルオロ酢酸) : 水 (0.1% トリフルオロ酢酸) を  $97 : 3$  (v/v) の比率で用いた。流速は  $0.2\text{mL}/\text{min}$ 、UV波長は  $285\text{nm}$  と設定し、カラム温度は  $40^\circ\text{C}$  とした。この条件におけるTAの保持時間は10minであった。内部標準物質としてErgocalciferol (測定波長  $245\text{nm}$ ) を用い、内部標準法によりTAの濃度を算出した。

## 2. 9. 放射光X線回折測定

測定は、兵庫県の大型放射光施設「SPring-8」のビームラインBL40B2 (構造生物学) を使用した。X線回折プロファイルは、 $30\text{cm} \times 30\text{cm}$  のイメージングプレートを使用した。

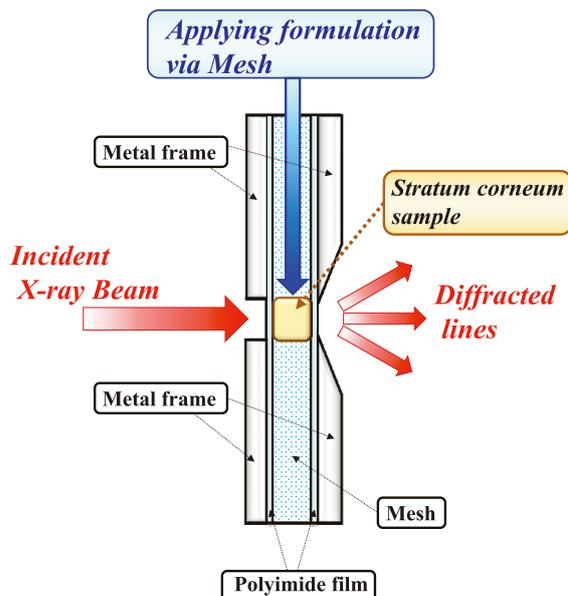


Fig. 2 Schematic image of sample measurement using solution cell

測定は、八田らの開発した「溶液セル」を使用した<sup>9)</sup> (Fig. 2)。

TA-PNsの処方X線回折測定の場合には、製剤を溶液セル内に注入し、TA-PNsのX線スペクトルの測定を行った。サンプルのX線の露光時間は5秒とした。

TA-PNsと角層の相互作用解析の場合、溶液セルの中央部に約  $1 \times 2\text{cm}$  の高水和 ( $78.8\% \text{ w/w}$ ) または低水和 ( $22.3\% \text{ w/w}$ ) のヘアレスマウス角層 (数mg) を充てん後、X線回折装置にセットした後、シリンジ部分に処方溶液を作用させ、適用から30分後までは1.5分ごと、30分後から123分後までは3分ごとX線を測定し、製剤適用後の経過時間に伴った角層および、ベシクルの構造変化を測定した。サンプルのX線の露光時間は5秒とした。なお、Fig. 8 (c) および(d)では、得られたプロファイルの  $S=0.1\text{nm}^{-1}$  のピークから、積分強度および半値幅を算出し、サンプル適用後の経過時間に対してプロットした。

## 3. 結果および考察

### 3. 1. TA-PNsのキャラクタリゼーション

Table 1に調製した3種類のTA-PNsの粒子特性を示した。調製したTA-PNsの平均粒子径は  $105.1 \sim 131.6\text{nm}$  で、PDIは0.13以下の値であったことから、調製したナノ粒子は均一な分散系として存在することが示された。また、調製した各製剤のゼータ電位は  $-0.04 \sim 0.22\text{mV}$  と、絶対値は小さいが調製直後と調製から2週間後の間に変化はなく、安定な粒子として存在することが示された。各TA-PNsのTA封入率は  $94.0 \sim 95.9\%$  と高値を示した。このことから、PNs中に薬物を十分に封入できたことが確認された。また、ポリオール未添加の系とくらべると、GLやDG

添加に伴い平均粒子径が小さくなっていった。このことから、ポリオールはTA-PNsの粒子径に影響を与えているものと推察された。

Fig. 3 に調製したTA-PNsのTEM写真、Fig. 4 にそれらのSAX測定の結果を示した。

Fig. 3 の結果から、粒子は球状の多重層構造をしている

ことが確認でき、Fig. 4 で示したSAX測定の結果もTEMの結果と一致していた。また、観察した粒子の粒子径は、動的光散乱法で測定した結果とはほぼ一致していた。次に、Table 1 で示したポリオールが各TA-PNsに与える影響について検討するため、各TA-PNsの<sup>1</sup>H-NMRスペクトル測定を行った。その結果をFig. 5 に示した。

Table 1 Particle characterization of TA-PNs formulation (n=3)

Formulation name	Composition (Soya PC/CA/SC/TA)	TA Concentration (mg/mL)	Z-average (nm) d.nm ± SD	PDI ± SD	Zeta potential (mV) ± SD	Entrapment efficiency (%) of TA
TA-PNs	80/20/5/5	1.8	131.6 ± 1.3	0.086 ± 0.005	-0.04 ± 0.15	95.9 ± 7.1
GL-containing TA-PNs	80/20/5/5	1.8	121.7 ± 3.6*	0.130 ± 0.027	0.22 ± 0.24	95.9 ± 5.1
DG-containing TA-PNs	80/20/5/5	1.8	105.1 ± 0.7**..***	0.096 ± 0.017	0.14 ± 0.13	94.0 ± 9.5

Values represent the mean ± SD (n = 3),

\*p < 0.05 versus TA-PNs, \*\*p < 0.05 versus DG-containing TA-PNs, \*\*\*p < 0.05 versus GL-containing TA-PNs

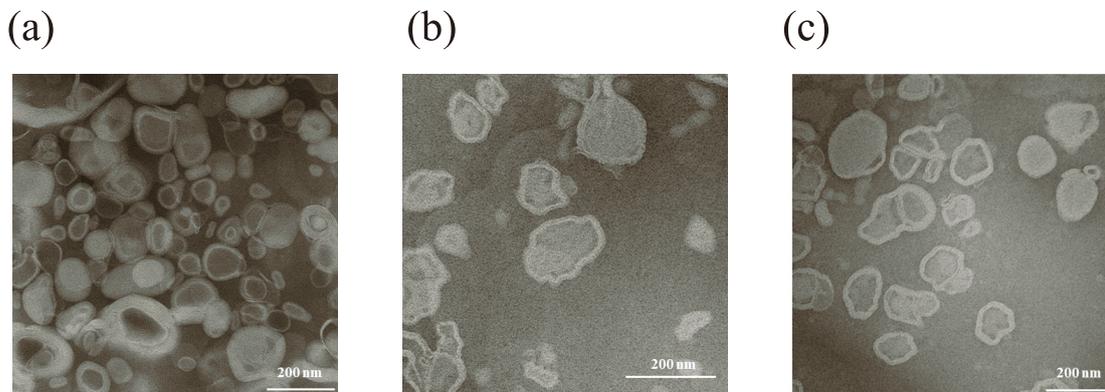


Fig. 3 TEM images for (a) TA-PNs, (b) GL containing TA-PNs, (c) DG containing TA-PNs.

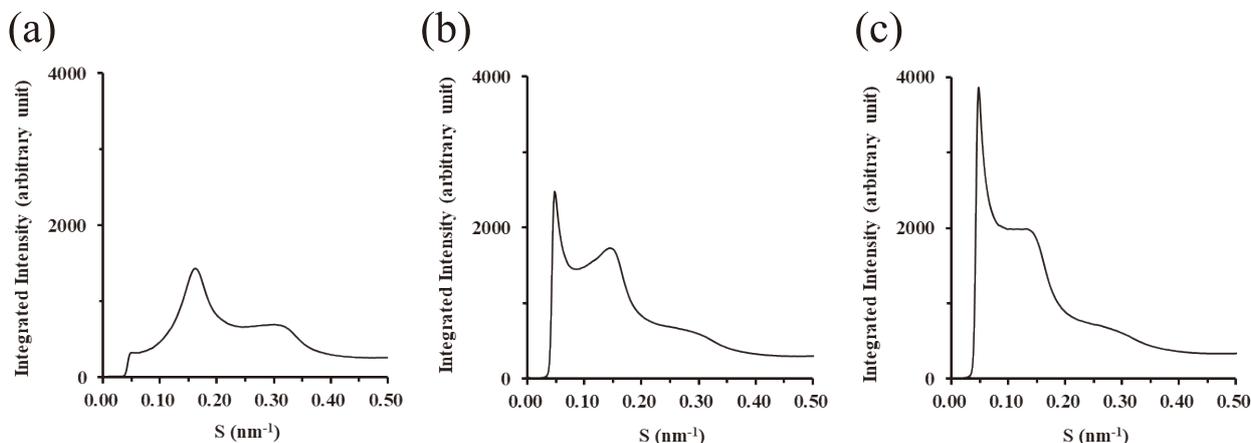


Fig. 4 Small angle X-ray diffraction (SAXD) profiles of (a) TA-PNs, (b) GL-containing TA-PNs, and (c) DG-containing TA-PNs

Soya PCのCD<sub>3</sub>OD各溶液のNMRスペクトルの結果から、3.2ppmのシグナルはSoya PCのコリン基の末端のメチル基のプロトン由来であるものと帰属された。各製剤でコリン基の末端のメチル基のプロトンのケミカルシフトは異なっており、GL添加TA-PNsおよびDG添加TA-PNsではシグナルがシャープになっていることが観察され、TA-

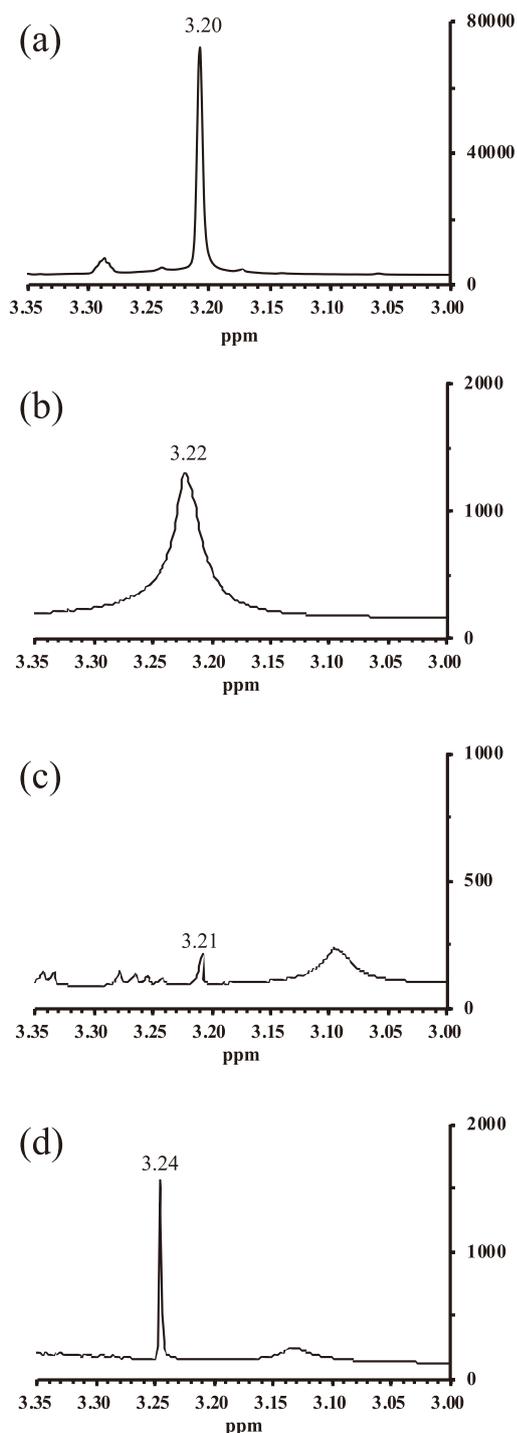


Fig. 5 <sup>1</sup>H NMR spectra of methyl region in (a) Soya PC CD<sub>3</sub>OD solution, (b) TA-PNs, (c) GL containing TA-PNs and (d) DG containing TA-PNs.

PNsとはメチル基のプロトンの運動性に違いがあることが認められた。また、DG添加TA-PNsはGL添加TA-PNsにくらべピーク強度が強く、DGの方がGLにくらべ、メチル基のプロトンに与える影響が強いことが推察された。

以上の結果から、TA-PNsの脂質膜表面で起こっている現象の模式図をFig. 6に示した。

Fig. 6に示したように、GLおよびDG分子はTA-PNsの膜表面においてSoya PCのO-P基と相互作用することにより、コリン基の末端のメチル基の運動性を高め、脂質膜表面の流動性を向上させることが推察され、またその効果はDGで特に強いことが推察された。

以上Table 1およびFig. 3～6の結果から、調製した3種のTA-PNsの物性はそれぞれ異なるものと推察された。

### 3. 2. 各TA-PNsからのTAのYMP皮膚貯留性評価

各製剤適用から0、1、2、4、6、24時間後の各レシーバー相のTAの濃度をHPLCによって測定したところ、全てのサンプルにおいてTAは検出されなかった。このことから、TAは脂溶性が高いため、24時間では皮膚透過が起こりにくいことが推察された。次に、皮膚重量で補正した適用24時間後のTAの真皮および表皮における皮膚貯留量を測定した。その結果をFig. 7に示した。

Fig. 7の結果から、TAの表皮への貯留量については各製剤間で有意差は見られなかった。しかし真皮への貯留量については、対照群に対し、GL添加TA-PNsおよびDG添加TA-PNsで有意差が見られたのに加え、TA-PNsとDG添加TA-PNsの間にも有意差が見られた。このことから、TA-PNsへのDGの添加により、封入薬物であるTA

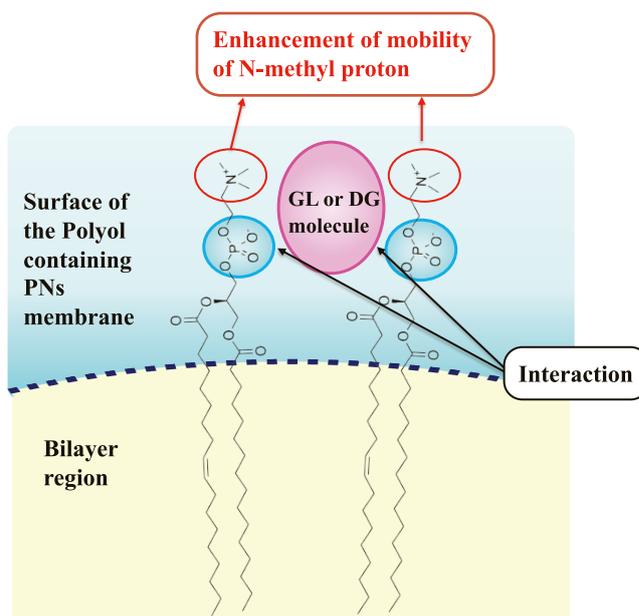


Fig. 6 Speculated interaction between GL or DG and PC molecules in TA-PNs formulations

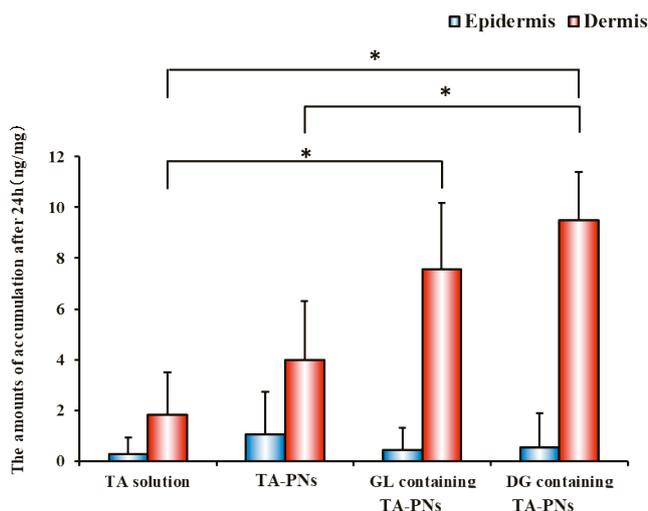


Fig. 7 TA amount in the epidermis and dermis of YMP skin after 24h of permeation study. (mean+S.D. (n=6), \*p<0.05)

の皮膚貯留性を向上させることが可能となった。Phamらは、GLを角層に作用させた場合、角層の細胞間脂質と角層細胞の両方に作用し、それぞれの構成成分の運動性を上昇させることで、薬物の皮膚浸透性を向上させることを報告している<sup>10)</sup>。DGに関しては、そのような報告はされていないが、DGはGLのダイマーであることから、類似の効果があるものと推察され、その効果はGLよりも強いものと示唆された。

### 3.3. 放射光 X 線を用いた角層浸透過程における TA-PNs と角層の相互作用評価

Fig. 8 にヘアレスマウス角層およびヘアレスマウス角層に各 TA-PNs を適用した後の SAX の時間変化測定の結果を示した。

Fig. 8(a) に示したように、◆で示した位置に、13.6nm の格子間隔をもつ長周期ラメラ構造の 1～5 次反射のピークが観察された。各 TA-PNs を強水和角層に適用した際の SAX 測定の結果を、Fig. 8(b)～(d) に示した。いずれの製剤を適用した際にも、青の矢印で示した  $S=0.16\text{nm}^{-1}$  付近のピーク強度が時間経過とともに減少していることが認められたが、この領域は長周期および短周期ラメラ構造に由来するピーク、そして赤で示した処方由来のピークがオーバーラップしているため、変化の解析は不可能であった。次に、緑の矢印で示した  $S=0.31\text{nm}^{-1}$  付近に長周期ラメラ構造の 4 次反射に由来するピークが認められた。また、製剤適用後に赤矢印で示した  $S=0.10\text{nm}^{-1}$  付近では、時間経過に伴いピーク強度の上昇が見られた。特に GL 添加 TA-PNs および DG 添加 TA-PNs ではその作用が強く、新たなピークが出現していた。我々は、これまでに sucrose-laurate ester を基盤としたベシクルを非閉塞系で YMP 皮

膚に適用した際、処方中の水分の蒸発に伴ってベシクル構造がラメラ構造に変化することを報告している<sup>3)</sup>。今回の事例は溶液セル中での実験であり、製剤適用後の水分の蒸発は伴わないものの各 TA-PNs をヘアレスマウス角層に作用させることによって角層上で多重層のベシクル構造がラメラ構造へ変化しているものと推察された。Fig. 8(c) および (d) における赤矢印で示した  $S=0.10\text{nm}^{-1}$  付近の積分強度および半値幅の時間経過に伴う変化を、Fig. 9 に示した。

Fig. 9(a) に示したように、積分強度については、123 分後のピーク強度は DG 添加 TA-PNs では GL 添加 TA-PNs に比べ、約 2 倍となっていた。このことから、角層と製剤の接触面が DG 添加 TA-PNs では GL 添加 TA-PNs にくらべ約 2 倍の広さになっていることが推察された。半値幅についてはどちらの製剤においても時間経過に伴う変化が見られなかった。このことから、角層上での製剤の積層の高さには差がないことが推察された。

Fig. 10 にヘアレスマウス角層に各処方適用後の広角 X 線の時間変化測定の結果を示した。

Fig. 10(a) においては、炭化水素の充填構造(ラテラル構造)として、 $S=2.4\text{nm}^{-1}$  および  $2.7\text{nm}^{-1}$  に六方晶(格子定数  $0.42\text{nm}$ ) と直方晶(格子定数  $0.42\text{nm}$ ,  $0.37\text{nm}$ ) に由来するピークが観察された。各 TA-PNs を角層に適用した場合、報告されている溶液セル中に処方が満たされることによってベースラインの上昇が認められたものの、ピーク位置や半値幅に変化は認められなかった。よって、これらの TA-PNs は、ラテラル構造に影響を与えないことが推察された。次に、TA の真皮への貯留に及ぼす角層の水和状態の影響について検討するために、低水和量ヘアレスマウスの角層を溶液セルに装着し、Fig. 8 と同様の実験を行った。その結果を Fig. 11 に示した。

しかし、高水和された角層に GL および DG 添加 TA-PNs で見られたベシクルからラメラ構造への転移は観察されなかった。このことから、Fig. 8 で見られた積層には角層表面の水分子が関与しているものと推察された。さらに、Fig. 12 に TA を封入していない各 PNs をヘアレスマウス角層に作用させた結果を示した。

いずれの系においても、ベシクルからラメラ層への相転移は観察されなかった。以上 Fig. 8～12 の結果から、TA-PNs のベシクル構造からラメラ構造への構造変化は角層上の水分と TA の浸透が関与しているものと推察され、Fig. 13 に示したような TA の角層への浸透メカニズムが推察された。

角層サンプルは水分含量が 25% (w/w) で水和されることが報告されていることから、Fig. 8 の高水和量の角層表面では多量の自由水が存在しているものと考えられる。よって、ベシクルが角層上に接触すると、角層上の自由水と

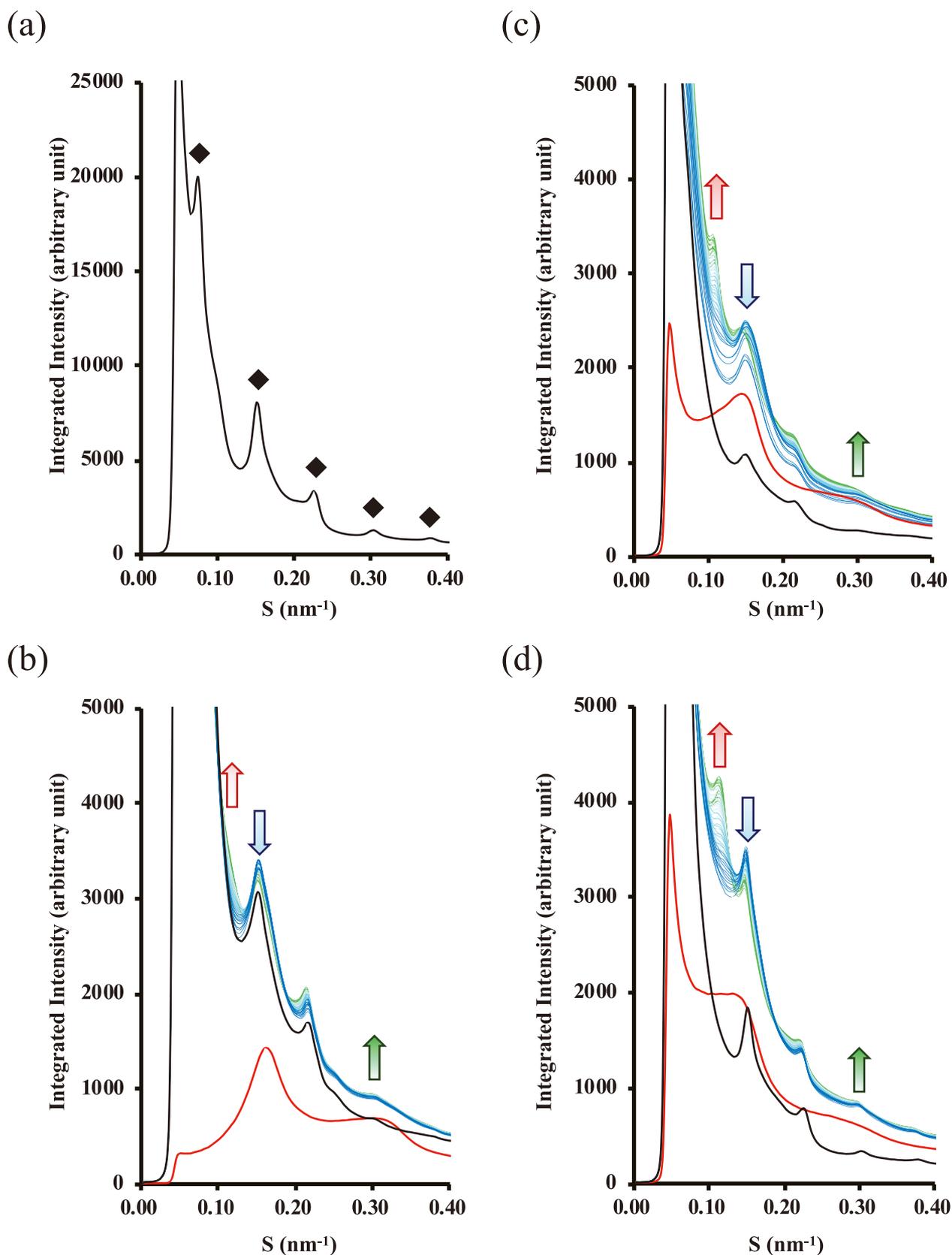


Fig. 8 SAXD profile by hairless mouse stratum corneum (a) and change in the SAX profiles after application of (b) TA-PNs, (c) GL containing TA-PNs and (d) DG containing TA-PNs for the strongly hydrated hairless mouse stratum corneum. Black and red line showed stratum corneum and each formulation, respectively. The change from dark blue to green indicate that of the SAX profile from 0 to 123 min.

Red arrow in Fig. 8 (b), (c) and (d) shows the structure due to the new lamellar phase.

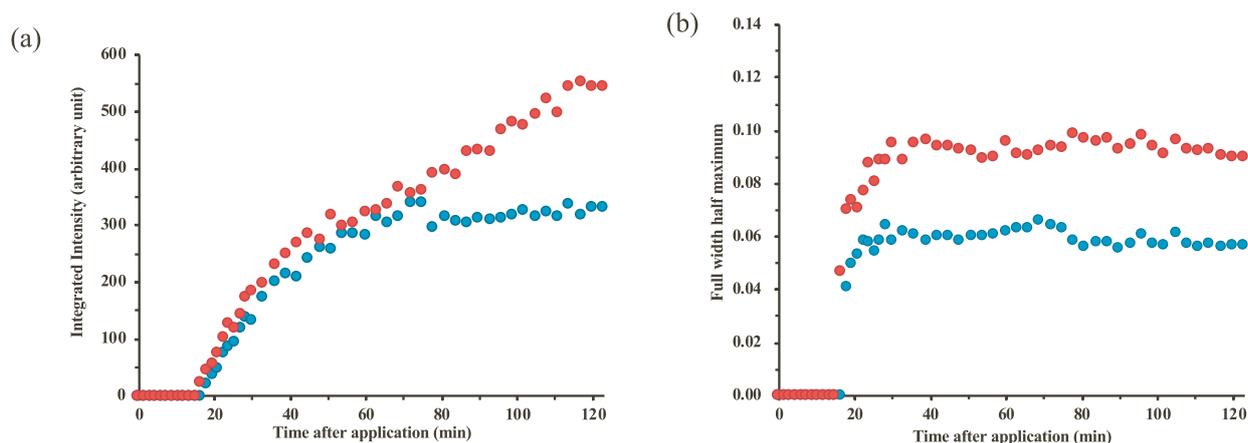


Fig. 9 Change in the (a) integrated intensity, and (b) full width half maximum for the peak at  $S=0.10 \text{ nm}^{-1}$  in the SAX profiles after GL containing TA-PNs (●) and DG containing TA-PNs (●) application.

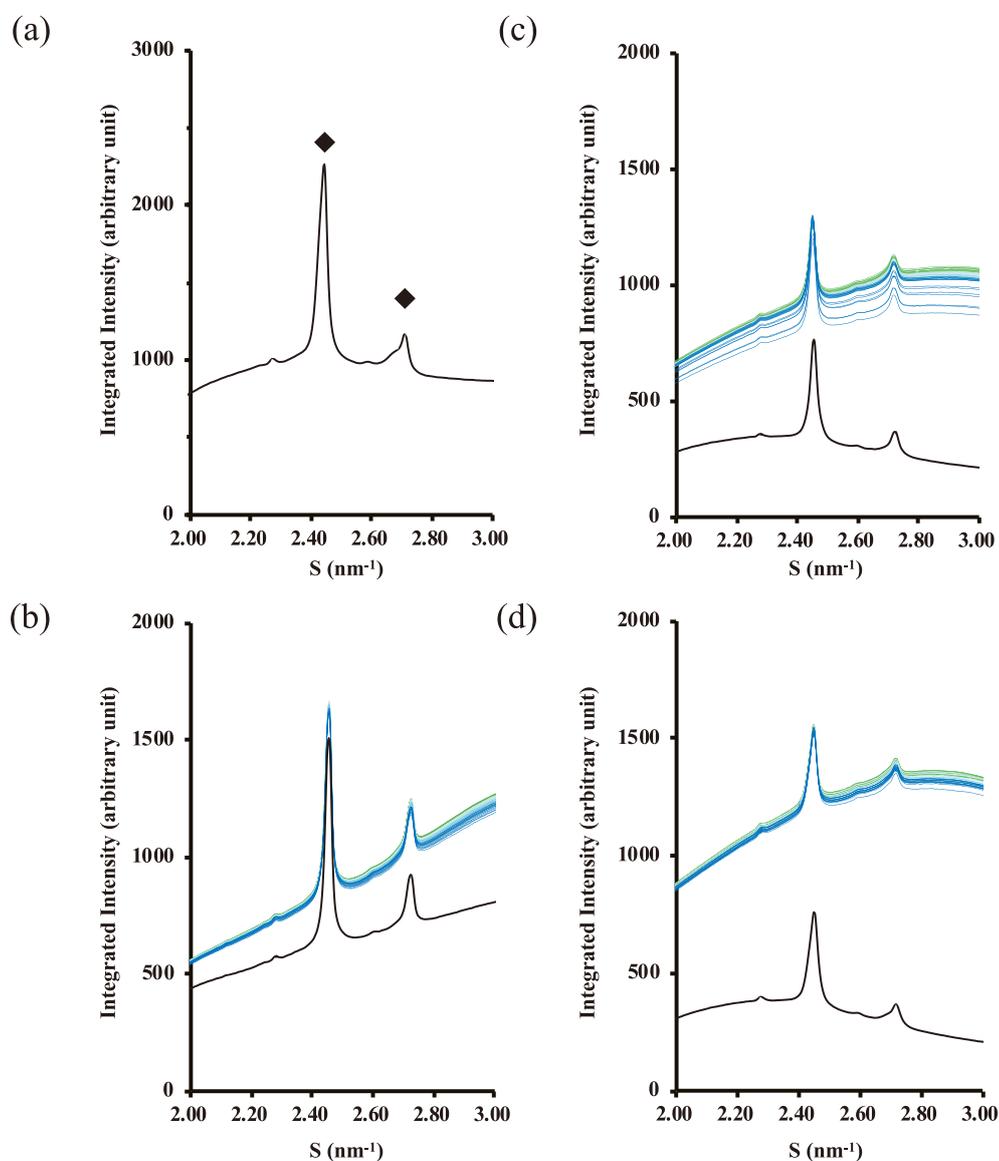


Fig. 10 Wide angle X-ray Diffraction(WAXD) profile by hairless mouse stratum corneum (a) and change in the WAX profiles after application of (b) TA-PNs, (c) GL containing TA-PNs and (d) DG containing TA-PNs for the strongly hydrated hairless mouse stratum corneum. The change from dark blue to green indicate that of the SAX profile from 0 to 123 min.

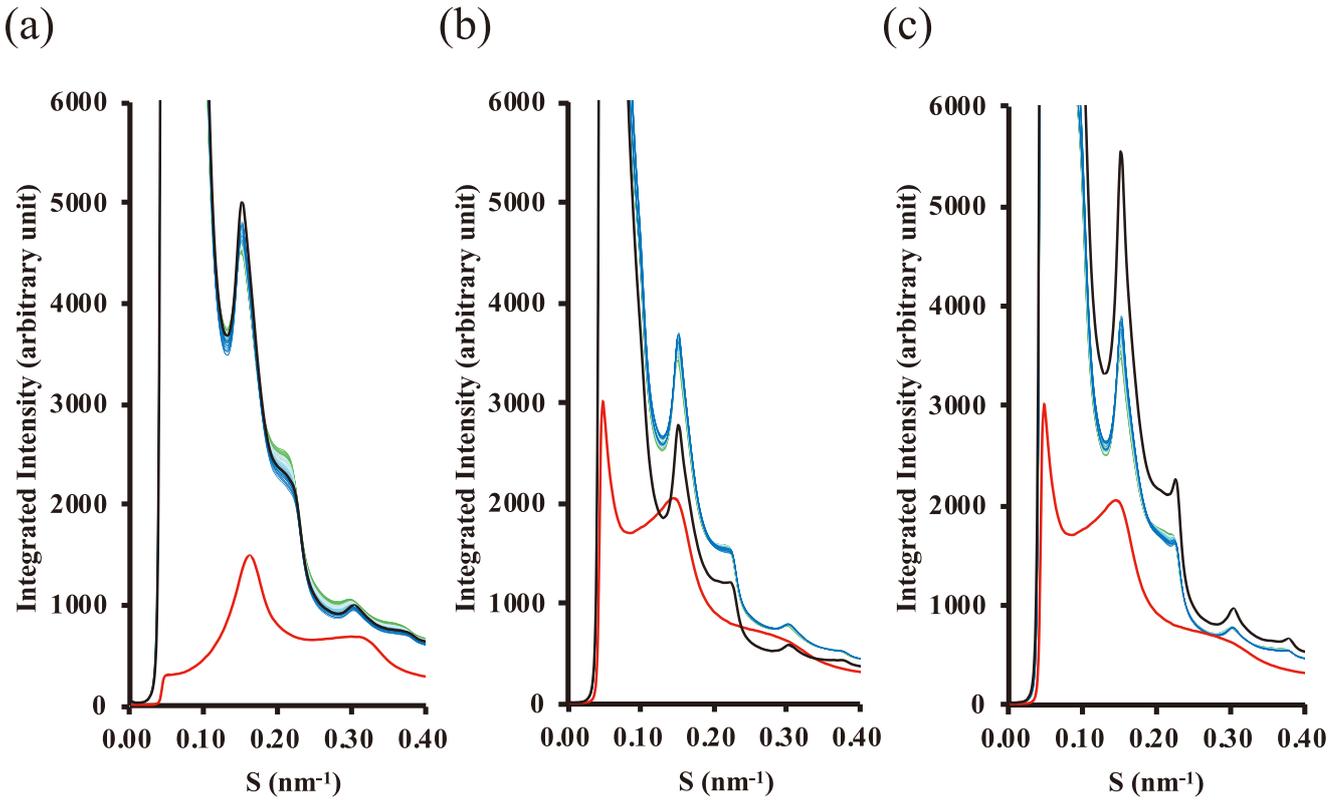


Fig. 11 Change in the SAXD profiles after application of (a) TA-PNs, (b) GL containing TA-PNs and (c) DG containing TA-PNs for the weakly hydrated hairless mouse stratum corneum . Black and red line showed stratum corneum and each formulation, respectively. The change from dark blue to green indicate that of the SAX profile from 0 to 123 min.

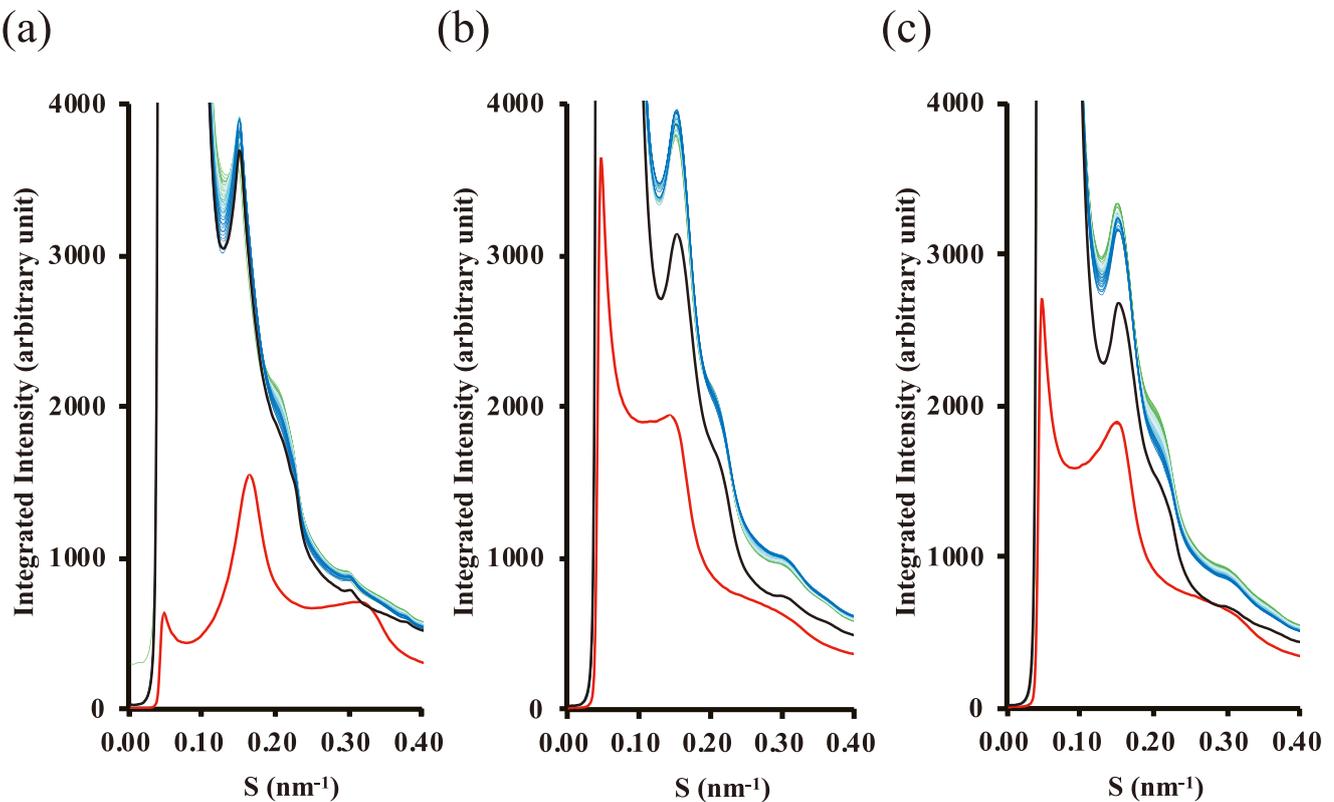


Fig. 12 Change in the SAXD profiles by (a) TA-PNs, (b) GL containing TA-PNs and (c) DG containing TA-PNs for the strongly hydrated hairless mouse stratum corneum. Black and red line showed stratum corneum and each formulation, respectively. The change from dark blue to green indicate that of the SAX profile from 0 to 123 min.

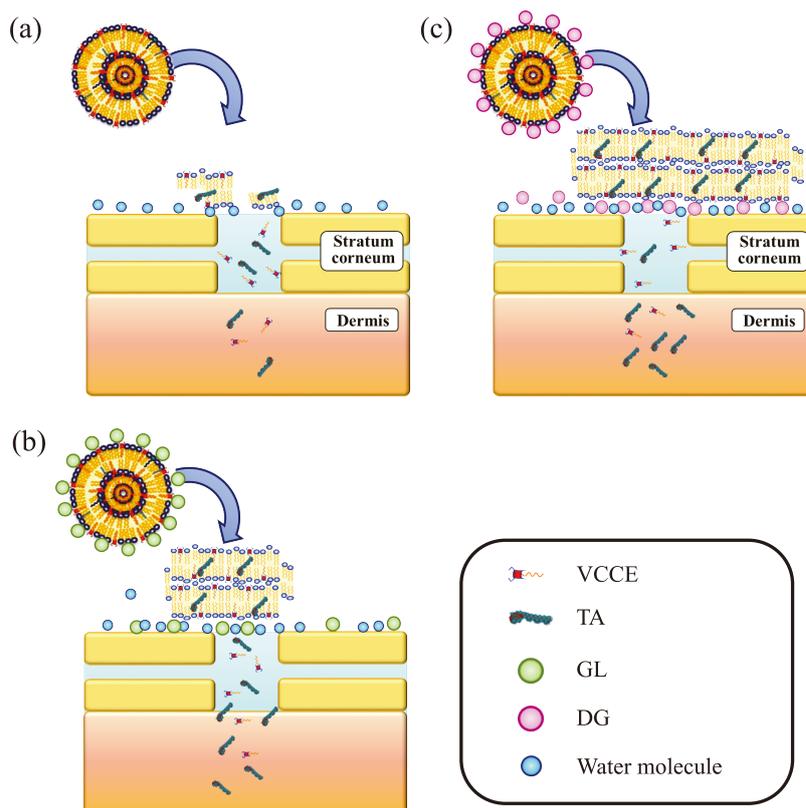


Fig. 13 Speculated mechanism for the effect of polyol in the TA-PNs formulation on the lamination forming (a) TA-PNs, (b) GL containing TA-PNs, (c) DG containing TA-PNs.

の相互作用により、ベシクル構造からラメラ構造への構造変化が起こり、角層上に積層することでTAの浸透が起こるものと推察された。<sup>1</sup>H-NMRの結果から、GLやDGはTA-PNsの表面に存在し、脂質膜の流動性に変化を与えていることが明らかとなっている。そのため、ポリオールはベシクル構造からラメラ構造への転移を促進する効果があるものと推察された。またFig. 7の解析結果から、 $S=0.10\text{ nm}^{-1}$ に出現したピーク強度がGLとDGで2倍となっていたこと、TAの真皮への浸透量はDG添加系の方が多かったことを考えるとDGの方がベシクル構造からラメラ構造への促進効果が高いものと考えられ、このベシクルからラメラ構造への構造変化のしやすさがDG添加系におけるTAの皮膚浸透性向上の一助となっているものと推察された。

#### 4. 総括

以上一連の結果から、放射光X線を用いることにより物性の異なるTA-PNsがTAの皮膚浸透を促進するメカニズムを明らかにすることが可能となった。この一連の研究成果は、コスメトロジー研究の発展の一助となると考えられる。

#### (引用文献)

- 1) Uchino T., Murata A., Miyazaki Y., Oka T., Kagawa Y., *Chem Pharm Bull.* **63**, 334-340 (2015).
- 2) Uchino T., Lefeber F., Gooris G., Bouwstra J., *Eur J Pharm Biopharm.* **86**, 156-166 (2014).
- 3) Uchino T., Matsumoto Y., Murata A., Oka T., Miyazaki Y., Kagawa Y., *Int J Pharm.* **464**, 75-84 (2014).
- 4) El Maghraby G. M. M., Williams A. C., Barry B. W., *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **58**, 415-429 (2006).
- 5) Ohta N., Ban S., Tanaka H., Nakata S., Hatta I., *Chem Phys Lipids.* **123**, 1-8 (2003).
- 6) Uchino T., Hatta I., Miyazaki Y., Onai T., Yamazaki T., Sugiura F., Kagawa Y., *Int J Pharm.* **521**, 222-231 (2017).
- 7) Uchino T., Lefeber F., Gooris G., Bouwstra J., *Int J Pharm.* **412**, 142-147 (2011).
- 8) Wester R. C., Christoffel J., Hartway T., Poblete N., Maibach H. I., Forsell J., *Pharm Res.* **15**, 82-84 (1998).
- 9) Hatta I., Nakazawa H., Obata Y., Ohta N., Inoue K., Yagi N., *Chem Phys Lipids.* **163**, 381-389 (2010).
- 10) Pham Q. D., Björklund S., Engblom J., Topgaard D., Sparr E., *Journal of Controlled Release.* **232**, 175-187 (2016).