不飽和脂肪酸とその過酸化生成物の皮膚角質層への作用に関する研究

大阪薬科大学
森本一洋

Effects of unsaturated straight-chain fatty acid and its oxidized products on skin stratum corneum were examined using rat skin permeation of drugs in *in vitro* and FT-IR method. We investigated that the effects of pretreatments of high purity oleic acid and its oxidation products on the permeations of indomethacin, as relatively lipophilic compound and 6-carboxyfluorescein (6-CF),as hydrophilic compound through rat skins. The skin permeations of indomethacin and 6-CF were very low (duffusivity;2.3×10^{-6} and 0.19×10^{-6} cm^2/h, respectively). Permeations of indomethacin and 6-CF were significantly increased by prepreatment with oleic acid or its first and second oxidation products.

The frequency of the asymmetric CH bond stretching absorbance (2919 cm^{-1}) on FT-IR spectra of stratum corneum was shifted to higher wavenumber (7.5 cm^{-1}) by the treatment of high purity oleic acid. Therefore, the perturbation increase of lipid domain in stratum corneum by oleic. acid The degree of shift was decreased by first and second oxidized products of oleic acid. On the other hand, the frequency of the α-helix NH deformation of amidell (1548 cm^{-1}) on FT-IR spectra of stratum corneum was shifted to higher wavenumber (2 cm^{-1}) by the treatment of high purity oleic acid. The shift significantly increased by first oxidized product with highest peroxide value (85.7meq/kg). Therefore, keratin cell in stratum corneum should be affected by first oxidized product with high peroxide value.

緒　言

経皮吸収型製剤は薬物の全身治療を目的とした新しい投与剤形として期待されている。しかし、皮膚の最表面に存在する角質層はケラチン、繊維状たん白、さらにはセラミドや中性脂質より成り(Fig. 1)、体内からの水の蒸発や外部からの物質の侵入に対し強いバリアーとして機能している。したがって、この角質層は皮膚表面からの薬物の吸収バリアーとなる[1)]。現在、薬物の皮膚吸収促進に関する様々な研究が進められており、数種類の吸収促進剤が見出されているが、それらの吸収促進剤の実用化には皮膚刺激性、安全性などが問題となる[2)]。オレイン酸などの不飽和脂肪酸類は高い薬物の皮膚透過促進効果を示すことが知られているが、これらは生体由来物質であることより実用化が期待されている[3)]。最近、高純度（99%以上）のオレイン酸が開発されているが、一般的に市販オレイン酸は酸化物を含み、また酸化されやすい欠点を有している。したがって、これらの酸化生成物の皮膚への影響を調べることは重要である。本研究では、高純度オレイン酸、酸化生成段階の異なる酸化物を含むオレイン酸による薬物の皮膚透過促進効果および皮膚角質層（ケラチノサイトおよび脂質層）への影響について検討した。

皮膚透過の検討には脂溶性モデル薬物として非ステロイド系消炎剤であるインドメタシンおよび水溶性モデル薬物として6-カルボキシフルオレセイン（6-CF）を用いた。皮膚角質層への影響はフーリエ変換赤外分光法(FT-IR)により解析した。

Effects of Unsaturated Fatty Acid and its Oxidized Products to Skin Stratum Corneum

Kazuhiro Morimoto

Osaka University of Pharmaceutical Sciences

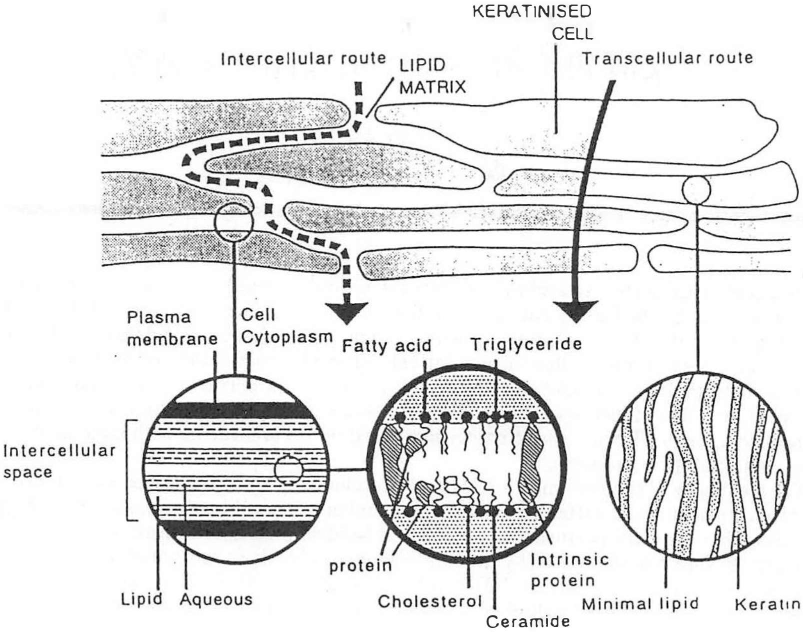

Fig.1 Route of Drug Permeation through Human Stratum Corneum[1)]

2 方 法

2-1 材料および試料の調整

吸収促進剤としては、高純度オレイン酸(EO-99;99.9%)、酸化生成物を含むオレイン酸(Table 1)は日本油脂(株)のものを、Azone(1-dodecylazacycloheptan-2-one)はNelson社のものを使用した。モデル薬物としては、インドメタシンと6-CFはSigma社のものを使用した。吸収促進剤溶液はプロピレングリコール(PG)またはプロピレングリコール(PG)/エタノール(EtOH)(1/2)混液に溶解させ調製した。製剤は水に溶解させた

Table 1 Peroxide values and carbonyl values of oleic acids of various grades

	peroxide value (meq/kg)	carbonyl value (meq/kg) saturated	unsaturated	total
High Purified Oleic Acid				
EO-99 (99.9%)a)	0	0.3	0	0.3
EO-90 (90%)a)	0.1	0.8	0.1	0.9
Low Grade Oleic Acid				
LL (60%)a)	1.7	6.9	0.9	7.8
Oxidized Oleic Acid				
First Oxidized b)				
SO-L	48.7	20.0	5.4	25.4
SO-H	5.4	27.4	12.1	39.5
PO-L	47.5	30.5	1.8	32.3
PO-H	85.7	64.7	3.7	68.4
Second Oxidized c)				
SO-LR	0.6	23.5	0	23.5
SO-HR	0.4	46.9	1.5	48.3

a) Purity of oleic acid(mol%)
b) O_2 bubbling(100°C) treated high purity oleic acid(EO-99)
c) Heat(200°C) treated first oxidized oleic acid

Carbopol 1342（1%w/w）にPG（12%w/w）およびEtOH(24%w/w）を加えて製したゲル基剤中に薬物（0.5mg/g)を溶解させ、アンモニア水を加えpH7.0とすることにより調製した。

2-2 In Vitro 皮膚透過実験

除毛したWistar系雄性ラット(体重200-250g）の腹部摘出皮膚表面を吸収促進剤溶液で前処理（1時間)し、その前処理液を皮膚表面から取り除いた後、薬物の皮膚透過実験に用いた。透過実験にはFranz型拡散セル(37℃)を用いた[4]。インドメタシンはHPLC法、6-CFは蛍光光度法により定量した。

2-3 FT-IR による皮膚角質層の解析

白色ウサギ（体重約2kg）の耳から剥離した皮膚角質層を用いた。吸収促進剤溶液で表面を処理（2時間）した皮膚角質層をFT-IR（Parkin Elmer,1720X）を用い測定しFT-IRスペクトルを得た。光源にはHe：Neレーザー（0.633μm）を使用し、出力は400mWとし、分解能2cm^{-1}、積算回数100回、室温で測定した。

3 結果および考察

3-1 皮膚透過性

高純度オレイン酸(EO-99）と強制酸化物を含むオレイン酸のインドメタシンと6-CFの皮膚透過に及ぼす影響について検討した。

Fig.2には高純度オレイン酸（EO-99）と強制1次酸化したオレイン酸(SO-L, SO-H, PO-L, PO-H)によるインドメタシンと6-CFの皮膚透過促進効果を示した。インドメタシンの皮膚透過におけるこれらの促進効果は、EO-99＜SO-H＜PO-L＜SO-L＜PO-Hの順に高いことが認められたが、EO-99と強制1次酸化したオレイン酸の透過促進効果の間には有意差は認められなかった。6-CFの皮膚透過におけるこれらの促進効果は、PO-L＜EO-99＜PO-H＜SO-H＜SO-Lの順に高いことが認められた。EO-99と強制1次酸化したオレイン酸の透過促進効果の間には有意差は認められなかったが、酸化過程の中間体であるSO-Lの6-CFへの吸収促進効果の高いことが示された。

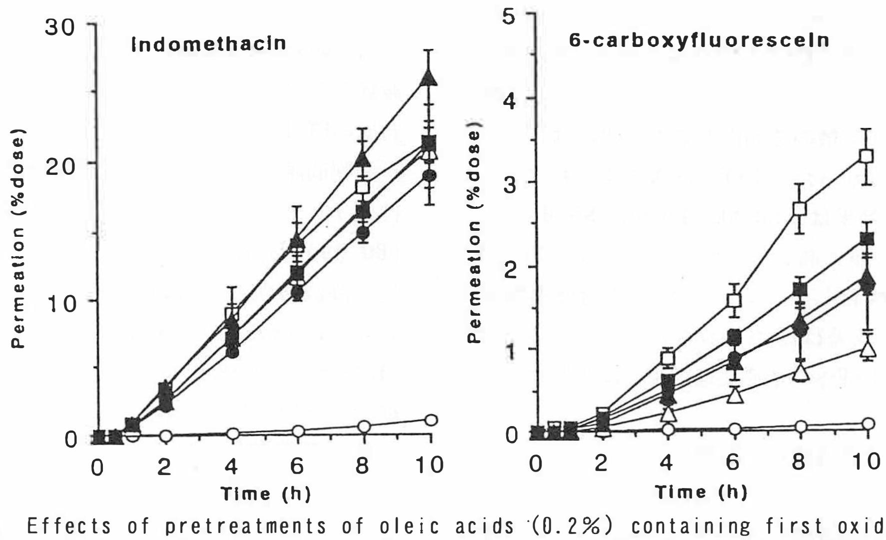

Fig.2 Effects of pretreatments of oleic acids (0.2%) containing first oxidation products on the permeations of indomethacin and 6-carboxyfluorescein through rat skins.
○ Control, High Purity Oleic Acid (● EO-99)
First Oxidized Oleic Acid (□ SO-L, ■ SO-H, △ PO-L, ▲ PO-H)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

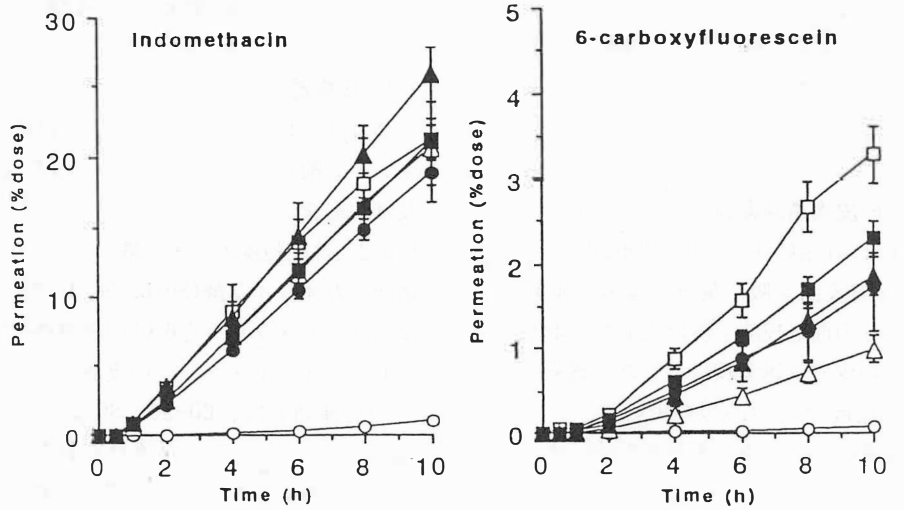

Fig. 3 Effects of pretreatments of oleic acids (0.2%) containing first oxidation products on the permeations of indomethacin and 6-carboxyfluorescein through rat skins.
○ Control, High Purity Oleic Acid (● EO-99)
First Oxidized Oleic Acid (□ SO-L, ■ SO-H, △ PO-L, ▲ PO-H)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

Fig. 3には高純度オレイン酸（EO-99）と強制2次酸化したオレイン酸（SO-LRはSO-Lを2次酸化したもの、SO-HRはSO-Hを2次酸化したもの）によるインドメタシンと6-CFの皮膚透過促進効果を示した。インドメタシンの皮膚透過におけるこれらの促進効果は、SO-HR＜EO-99＜SO-H＜SO-L＜SO-LRの順に高いことが認められたが、EO-99と強制2次酸化したオレイン酸の透過促進効果の間には有意差は認められなかった。6-CFの皮膚透過におけるこれらの促進効果は、SO-HR＜EO-99＜SO-H＜SO-LR＜SO-Lの順に高いことが認められた。EO-99と強制2次酸化したオレイン酸の透過促進効果の間には有意差は認められなかったが、強制2次酸化物の6-CFへの透過促進効果は減少した。

3-2 FT-IRによる皮膚角質層の解析

皮膚角質層の細胞間隙脂質流動性と細胞実質のたん白の立体構造に及ぼす高純度オレイン酸（EO-99）、強制酸化したオレイン酸、Azoneの影響を検討した。皮膚角質層の細胞間隙脂質流動性は、角質層のFT-IRスペクトルからGoldenらの方法を用い、細胞間隙脂質CH2逆対称伸縮振動（2919cm^{-1}付近）由来の波数のシフトにより評価した[5]。赤外吸収の波数は脂質流動性の上昇に伴い高波数側にシフトすることが報告されている。また、皮膚角質層のたん白変成はα-helixのペプチド結合のN-H deformation（1548cm^{-1}付近）由来の波数のシフトから評価した。ウサギの耳の皮膚角質層のFT-IRスペクトルをFig. 4に示した。

細胞間隙脂質CH_2逆対称伸縮振動（2919cm^{-1}付近）由来の赤外吸収は、高純度オレイン酸（EO-99）の処理によりコントロール（PG処理）に比べ高波数側に約7.5cm^{-1}シフトした。たん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation（1548cm^{-1}付近）由来の赤外吸収も高純度オレイン酸（EO-99）の処理によりコントロール（PG処理）に比べ高波数側に約2cm^{-1}シフトした。オレイン酸並びにAzoneで処理した皮膚角質層の脂質CH_2逆対称伸縮振動、並びにたん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation（1548cm^{-1}付近）由来の赤外吸収の波数をTable2に示した。

C-C二重結合を有するオレイン酸の2次酸化物で

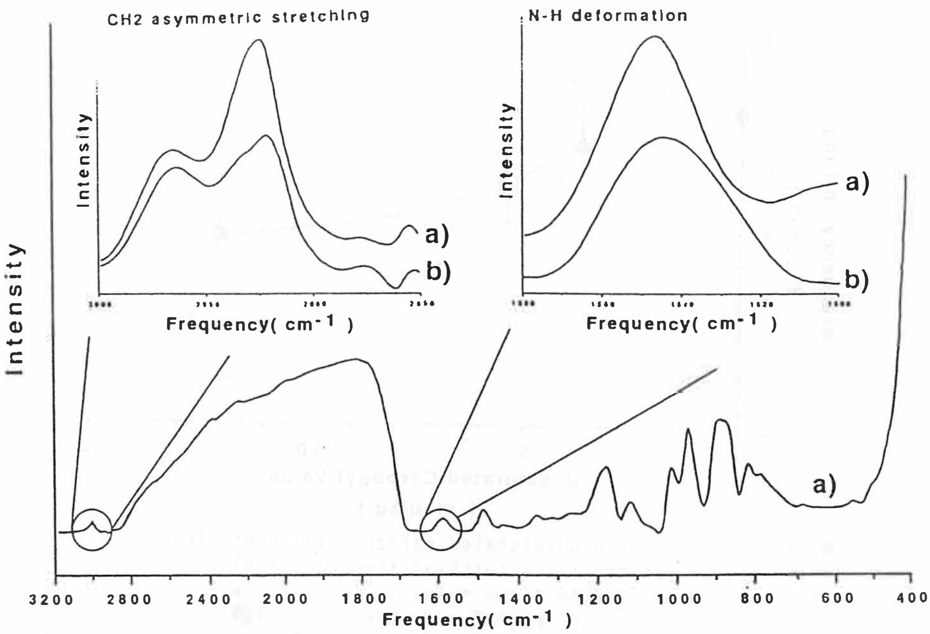

Fig.4 FT-IR spectra of stratum corneum of rabbit ear skins over the range 400-3200cm^{-1}
a) treatment with 0.2% high purity oleic acid (EO-99)
b) treatment with solvent (PG)

ある不飽和カルボニルに着目しその角質層細胞間隙脂質流動性に与える影響を評価した。Fig. 5に示すように高純度オレイン酸の処理により細胞間隙隙脂質CH_2逆対称伸縮振動(2919cm^{-1}付近)由来の赤外吸収はコントロール(PG処理)に比べ高波数側にシフト(約7.5cm^{-1})した。この効果は、オレイン酸の不飽和カルボニル価の増大に伴い低下し、その値が12meq/kgと2次酸化の進んだSO-H

Table 2 Effects of treatments with oleic acids and Azone on FT-IR frequency(cm^{-1}) of N-H deformation of amideII from proteins and CH_2 asymmetric stretching from lipids of stratum corneum of rabbit ear skins

	N-H deformation(Proteins) Frequency(Shifting)	CH_2 asymmetric(Lipids) Frequency(Shifting)
Control(PG)	1546.00±0.12 (0.00±0.12)b)	2918.00±0.40 (0.00±0.40)b)
High Purity Oleic Acid		
EO-99(0.2%)	1548.10±0.10 (2.10±0.10)a)	2925.50±0.33 (7.50±0.33)a)
First Oxidized Oleic Acid		
SO-L(0.2%)	1547.40±0.27 (1.40±0.27)a)	2923.33±1.20 (5.33±1.20)a)
SO-H(0.2%)	1547.95±0.03 (1.95±0.03)a)	2921.68±0.61 (3.68±0.61)a)b)
PO-L(0.2%)	1547.55±0.71 (1.55±0.71)a)	2925.45±0.92 (7.45±0.92)a)
PO-H(0.2%)	1550.04±0.89 (4.04±0.59)a)b)	2924.54±1.30 (6.54±1.30)a)
Second Oxidized Oleic Acid		
SO-LR(0.2%)	1548.35±0.22 (2.35±0.22)a)	2926.95±0.15 (8.95±0.15)a)b)
SO-HR(0.2%)	1547.85±0.12 (1.85±0.12)a)	2924.45±0.66 (6.45±0.66)a)
AZONE(0.2%)	1553.83±0.23 (7.83±0.23)a)b)	2923.83±0.69 (5.83±0.69)a)

Shifting=frequency shifting from control(treatment with PG)
a)Significant in comparison with control ($p<0.05$)
b)Significant in comparison with high purity oleic acid (EO-99 ;0.2%) ($p<0.05$)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

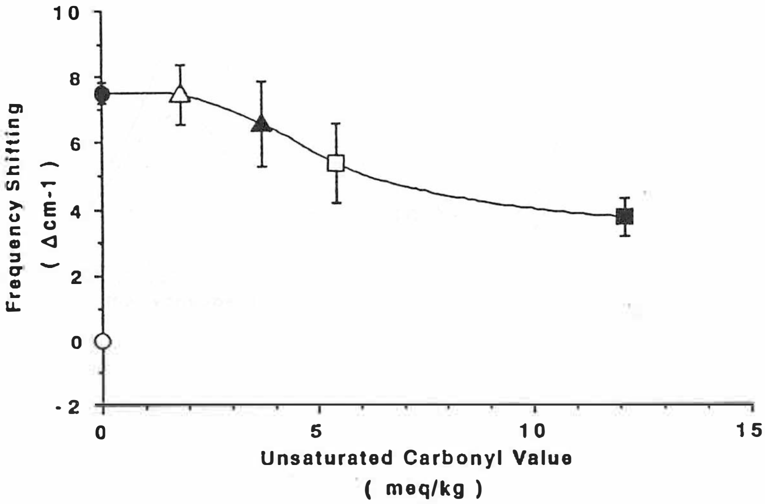

Fig.5 Relationship between unsaturated carbonyl value of oleic acids and CH_2 asymmetric stretching frequency (IR) of stratum corneum of rabbit ear skins
○ Control (PG), High Purity Oleic Acid (● EO-99)
First Oxidized Oleic Acid (□ SO-L, ■ SO-H, △ PO-L, ▲ PO-H)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

では高純度オレイン酸に比べ有意に低波数側にシフ(約4cm^{-1})した。

一方、Fig. 6にたん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation (1548cm^{-1}付近)由来の赤外吸収の波数のシフトとオレイン酸の過酸化物価の関係を示した。たん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation (1548cm^{-1}付近)由来の赤外吸収も高純度オレイン酸(EO-99)の処理によりコ

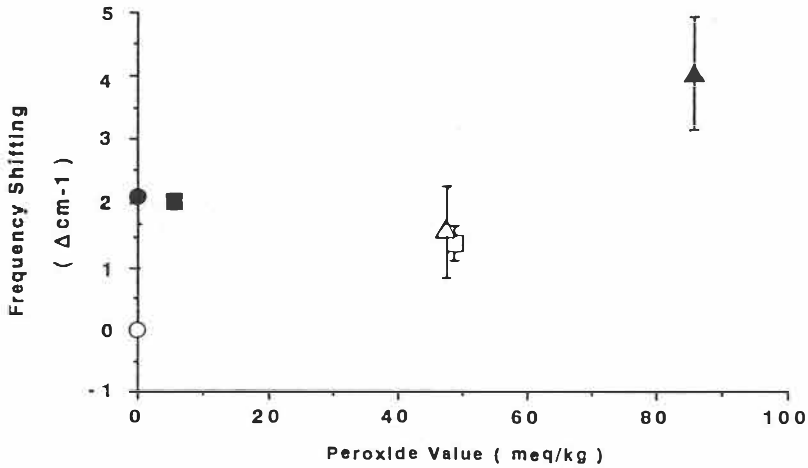

Fig.6 Relationship between peroxide value of oleic acids and shifting of N-H deformation frequency (IR) of stratum corneum of rabbit ear skins
○ Control (PG), High Purity Oleic Acid (● EO-99)
First Oxidized Oleic Acid (□ SO-L, ■ SO-H, △ PO-L, ▲ PO-H)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

ントロール(PG処理)に比べ高波数側に約2cm^{-1}シフトした。高純度オレイン酸と過酸化物価が約50meq／kgまでのものとたん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation(1548cm^{-1}付近)由来の赤外吸収のシフトの間には有意な差は認められなかったが、過酸化物価が80meq／kgと酸化が進んだオレイン酸（PO-H）では有意に高波数側へシフト(約4cm^{-1})した。

以上、FT-IRスペクトルの解析から高純度オレイン酸で処理をした場合、インドメタシンの主な透過経路と考えられる細胞間隙脂質の流動性が上昇することが認められ、その流動性の上昇効果はオレイン酸の２次酸化物である不飽和カルボニルの増加に伴い減少させることが示唆された。オレイン酸と比較して、鎖長の短い不飽和カルボニルが細胞間隙脂質構造を乱すと考えられる。一方、高純度オレイン酸の処理によりCFの主な透過経路と考えられる角質層実質細胞のたん白の構造変化がFT-IRスペクトルの解析から認められ、1次酸化したオレイン酸はさらにその変化を増加することが認められた。高純度オレイン酸と強制酸化したオレイン酸（1次、2次）によるインドメタシン並びにCFに対する経皮吸収促進効果には有意な差は認められなかった。これは強制酸化物は酸化過程でオレイン酸とその酸化物を共存するために、薬物の経皮吸収促進効果には直接的に影響しなかったと考えられる。

参考文献

1）B.W.Barry, *J. Controlled. Release.*, 6 85-97 (1987)

2）橋田充、岡本浩一、経皮吸収の改善、瀬崎仁編“医薬品の開発”第13巻、87-133頁、広川書店 (1987)

3）M.L.Francoeur, G.M.Golden, R.O.Potts, *Pham. Res.*, 7 621-627 (1990)

4）K.Morimoto, A.Nagayasu, S.Fukanoki, K.Morisaka, S.H.Hyon, Y.Ikada, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 16 13-29 (1990)

5）G.M.Golden, J.E.Mckie, R.O.Potts, *J. Pham. Sci.*, 76 25-28 (1987)