

皮膚ABC膜輸送体に及ぼす化粧品添加物の影響

金沢大学 医薬保健研究域薬学系 分子薬物治療学研究室

加藤 将夫

The skin represents physical and biochemical barrier between the body and the environment, serving to exclude xenobiotics and microorganisms and to prevent unregulated water loss from the body into the atmosphere. The physical barrier is mainly localized in stratum corneum (SC) whereas a biochemical barrier also exists in skin epithelial cells beneath the SC. The biochemical barrier includes metabolic enzymes and transporters that mediate detoxification and efflux of xenobiotics. This barrier has an important influence on absorption of xenobiotics, though the mechanisms of its effects on the absorption generally remain to be fully established. We have recently clarified the role of two ATP binding cassette (ABC) transporters, P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP), in transdermal absorption of a typical substrate *in vivo*. This finding may imply the possible interaction of these ABC transporters with cosmetic/pharmaceutical excipients, leading to the change in transdermal permeation of constituents/drugs. Therefore, the purpose of the present study was to clarify the inhibition potential of several cosmetic excipients on P-gp and BCRP. The inhibitory effect was assessed by the uptake study of a typical BCRP substrate Hoechst33342 in MDCKI cells stably transfected with *BCRP* gene (MDCKI/BCRP). In the presence of several excipients, uptake of Hoechst33342 in MDCKI/BCRP cells was higher than that in their absence, suggesting that BCRP is inhibited by those excipients. Such inhibition profile was found to be concentration-dependent for the excipients. The inhibition was further demonstrated by the transcellular transport study of Hoechst33342 in MDCKI/BCRP cells in the presence or absence of those excipients. It was found that the inhibition potential is partially correlated with a certain physicochemical parameter. Thus, our findings suggest that some of cosmetic excipients inhibit the function of BCRP. Further studies are required to clarify the relevance of such inhibition with the change in transdermal permeation of cosmetic constituents and pharmaceutical drugs.

1. 緒言

皮膚は表皮、真皮及び皮下組織から構成され、毛嚢、汗腺、脂腺などの付属器官が表皮から真皮を貫通する(図1)。皮膚は外界から体内への外因性物質の侵入を防ぐバリアと考えられている。表皮の中で最も外層の角質層は脂質とケラチンで満たされており、外因性物質の経皮吸収に対して最も高いバリア能を有する。角質層は、有害物質の侵入や物理的外傷、感染症から生体内の環境を守る働きがある^{1,2)}。

脂溶性の高い外因性物質は角質層に一部が分配(partition)し、分配した物質の一部はさらに単純拡散(passive diffusion)により血液方向へ移行しうる(図1)。角質層が物理的バリアであるのに対し、角質層より下層は生きた皮膚組織であり、生物的バリアとして働くと考えられている。生物的バリアには、皮膚に発現する代謝酵素や膜輸送体が挙げられる。実際、皮膚にはcytochrome P450などの代謝酵素が機能的に発現する³⁾。一方で膜輸送体については皮膚における発現の報告が散見されるものの、その皮膚内での機能は永らく不明であった。

我々は皮膚に膜輸送体が存在し、ある種薬物の表皮側から血液中への吸収や、血液中から皮膚への分布に関与することを示してきた⁴⁻⁷⁾。中でもP-glycoprotein (P-gp)とbreast cancer resistance protein (BCRP)は、ともにATPの加水分解で生じるエネルギーを駆動力として多種多様な物質を細胞内から細胞外へ排出するATP binding cassette (ABC膜輸送体)である。P-gpはマウス^{6,7)}およびヒト⁸⁾で真皮に存在し、マウスにおいては真皮の血管内皮に存在する⁷⁾。一方、BCRPはマウスにおいて真皮の血管内皮に、ヒトでは表皮の基底層や真皮の血管内皮に局在する⁷⁾。

興味深いことに、これらP-gpとBCRPはともに基質を表皮側から真皮側へ輸送する(図1)⁸⁾。このことは、基質である蛍光物質rhodamine 123 (R-123)を経皮投与した際に、皮膚内あるいは血液中へのR-123の透過が、P-gp欠損マウスあるいはP-gpとBCRP両方の欠損マウス(*mdr1a/1b/bcrp*^{-/-})において顕著に低下したことから示される^{6,7)}(図2のcontrol)。P-gpとBCRPはともに皮膚のみならず、小腸や腎臓の刷子縁膜、脳血管内皮細胞の血液側膜、肝臓の胆管側膜等に発現し、多くの薬物の排泄(小腸や脳においては吸収、分布の障壁)に働くことが示されている。従って、皮膚においてもこれら膜輸送体が、角質層に分配し表皮に到達した外因性物質の真皮・血液方向への移行に関与する可能性がある(図1)。

化粧品や医薬品には数千種類以上におよぶ添加物原料が用いられる。これらがP-gpやBCRPに影響した場合、結



Effect of Cosmetic Excipients on ABC transporters in the skin

Yukio Kato

Department of Molecular Pharmacotherapeutics, Faculty of Pharmacy, Kanazawa University

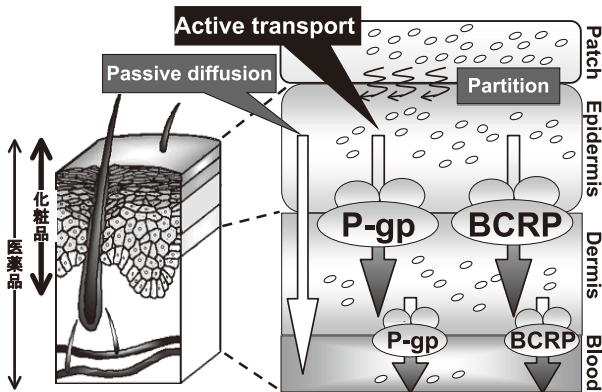


図1 皮膚における物質透過の概念図

果として経皮からの外因性物質の吸収や化粧品自身に含まれる成分の皮膚内動態に影響を及ぼす可能性がある。P-gp やBCRPが幅広い構造を認識する膜輸送体であることを考えると、この可能性は十分に考えられる。しかしこれまで、添加物が皮膚に発現するP-gpやBCRPにどのような影響を及ぼすかについて検討された例はほとんどない。本研究は、化粧品添加物の安全性の担保を目的として、P-gpとBCRPに及ぼす添加物の影響を解析した。

2. 実験

2.1 試薬および実験動物

R-123、Hoechst 33342 (H-33342) 及びKo143はSigma Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO) より、itraconazoleはLKT Laboratories Inc. (St. Paul, MN) より購入した。FVBマウス (FVB/NJcl、雄性、7~8週齢) は日本クレア (Tokyo, Japan)、*mdr1a/1b/bcrp*^{-/-} (FVB系統雄性、7~8週齢) はTaconic Farms Inc. (Germantown, NY) より購入した。動物はすべて標準食で飼育され、水及び食餌は自由に与えられた。すべての動物実験は金沢大学動物実験指針に従って行った。

In vivo 経皮投与実験(図3)

実験に用いたマウスは全て、実験を開始する72時間前に除毛を施した(図3)。ペントバルビタールを皮下投与して麻酔をかけ、動物用バリカンで胴体の毛を剃った後、除毛クリームを適量塗り、37℃の温水で丁寧に洗い流した。除毛72時間後、エチルエーテル吸入麻酔下で、セロテープを用いてマウス腹部皮膚の角質層を剥離した(図3)。その後、投与液100μLを均一に染み込ませたパッチを腹部に貼付し、パッチの上からエラストポアを巻き付けた。投与液はR-123またはR-123とitraconazoleをdimethyl sulfoxideに溶かし、さらにHBSSで希釈して調製した。投与後6時間に尾静脈から血液を採取し屠殺後、すばやく70%エタノールを含ませたティッシュで腹部皮膚を拭き

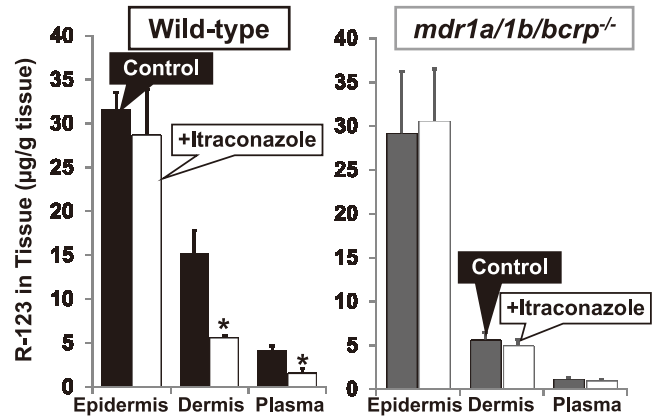


図2 P-gpとBCRP阻害剤Itraconazoleによる表皮から真皮へのR-123移行阻害

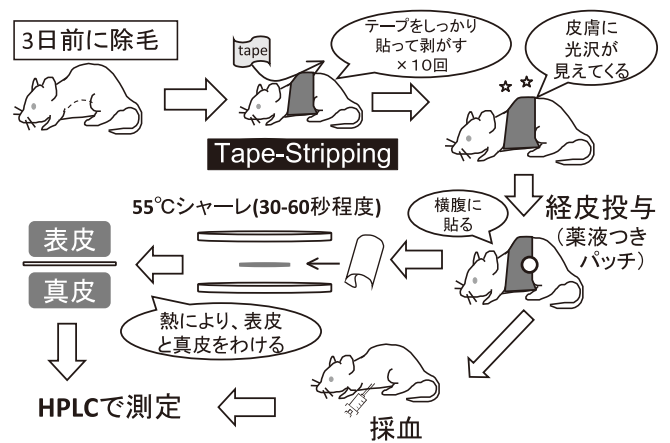


図3 In vivo 経皮吸収実験の概念図

取り皮膚を採取した。採取した皮膚をアルミで包み、ガラスシャーレに挟み1分間55℃で温めた。その後18 Gの針で表皮側をこそぎとった(図3)。

R-123の定量

皮膚サンプルはホモジネート後遠心分離し、上清を移動相で除タンパクした。血漿サンプルは酢酸エチルを用い液々抽出した。これらサンプル中R-123濃度はHPLCを用いて定量した⁷⁾。

BCRP安定発現MDCKI細胞による取り込み実験 (Dish法)

BCRPないし空ベクター安定発現MDCKI細胞(MDCKI/BCRP、MDCKI/mock)を4well plateに培養した。5分間のpreincubation後、種々の濃度の添加物を含む5μM H-33342溶液を添加し、20分後に蛍光観察した。画像解析ソフトImage Jを用い、蛍光の強さを10回繰り返して測定し、これを3preparationで行い数値化した。

3. 結果

3.1 膜輸送体阻害剤の in vivo での効果

添加物が皮膚の膜輸送体に影響するかを検討する前に、膜輸送体に対し阻害活性を有することが分かっている阻害剤 itraconazole を用い、in vivo において阻害剤による膜輸送体機能制御の有無を検討した。膜輸送体の機能を評価しやすい系として、角質層を剥離した系を用いた。R-123 のみを経皮投与後の表皮への分布は、wild-type (野生型) と *mdr1a/1b/bcrp*^{-/-} で同程度であった一方、真皮と血漿中への R-123 の移行は *mdr1a/1b/bcrp*^{-/-} で低下した (図 2)。一方、itraconazole を同時投与したところ、R-123 の皮膚分布と吸収は、表皮、真皮、血漿いずれも wild-type と *mdr1a/1b/bcrp*^{-/-} で同程度であった (図 2)。*mdr1a/1b/bcrp*^{-/-} では、itraconazole の影響がほとんど見られなかった (図 2)。

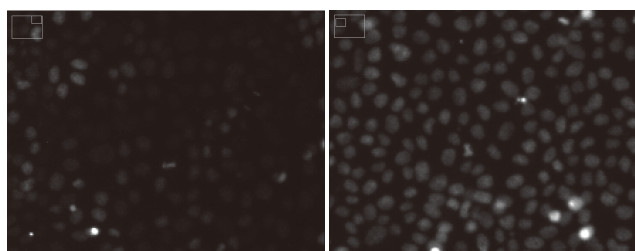
角質層を剥離しない系でも R-123 と itraconazole を併用投与し、6 時間後での皮膚中濃度を測定した。R-123 の皮膚への分布量は角質層を剥離した系の 1/10 程度であったが、角質層を剥離した系、しなかった系ともに、itraconazole 併用により R-123 の皮膚への分布は control の半分程度にまで低下した。

3.2 膜輸送体に及ぼす添加物の影響

添加物自身の皮膚への浸透性を考慮するため、膜透過性が良いと思われる電気的中性の物質、皮膚表面の電荷と比較的強く相互作用すると思われる極性物質など、幅広い極性を有する構造類似体を検討対象に加えた。これまでに 16 種類 (ベンジルアルコール、フェノキシエタノール、1,3-ブチレングリコール、サリチル酸エチレングリコール、オレイルアルコール、ポリエチレングリコール 400、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、イソステアリン酸、安息香酸、セバシン酸ジエチル、炭酸プロピレン、トリアセチン、アジピン酸ジイソプロピル) について阻害効果を検討した。

多数の添加物の膜輸送体への作用を、感度良く評価することを目的に、BCRP についてそのスクリーニング系を構築した。BCRP の典型的基質として H-33342 を用いた。MDCKI/BCRP 細胞に H-33342 を添加すると BCRP によって効率良く細胞外へ排出されるため、蛍光顕微鏡で観察しても H-33342 の蛍光はわずかしか検出されない (図 4 左、control)。一方、BCRP 阻害剤である Ko143 を同時に添加すると、BCRP の活性が低下するため H-33342 が細胞内に検出される (図 4 右)。一方、BCRP を発現していない MDCKI/mock 細胞を用いて同様の解析を行うと、control 条件下でも高い蛍光が細胞内に観察され、Ko143 同時添加による影響は見えなかった。以上より得られる画像を定量化することにより、BCRP の活性変化を可視的に解析することが可能となった。

次に、各添加物を種々の濃度で H-33342 とともに MDCKI/BCRP 細胞に添加し、同様な解析から添加物濃度依存的な蛍光強度の上昇を観察し、各添加物の BCRP に対する阻害定数 (K_i ; 50% 阻害を与えるのに必要な濃度) を求めた。図 5 には、阻害効果を示した各添加物の K_i 値と物理化学的パラメータとの相関を示した。ここで、 $xlogP$ はオクタノール/水分配の計算値であり、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/> より入手した。また、 α 値は有機概念図を利用して得られる極性の尺度 (有機性と無機性のバランス) である。その結果、阻害定数は分子量、 α 値とは明確な相関がなかった一方、 $xlogP$ とはやや相関



Control +1 μ M Ko143
図 4 Image J を用いた BCRP 阻害解析

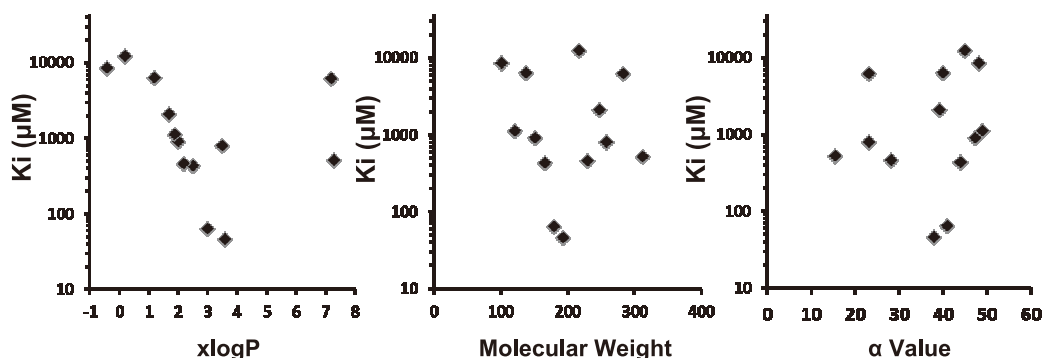


図 5 添加剤の物理化学的パラメータと BCRP に対する阻害定数 (K_i) との関係

関係が認められ、 $xlogP$ が3~4付近で最も強い阻害効果(低い K_i)が得られる傾向にあった(図5)。

続いて、BCRPに対する阻害効果をより明確に示す目的で、BCRPによるH-33342の経細胞輸送を評価し、添加物の効果を検討した。取り込み試験において阻害効果が認められた添加物を、H-33342とともにMDCKI/BCRP細胞のbasalもしくはapical側に添加後、反対側に出現したH-33342を測定したところ、controlにおいてはBCRPによる排出を反映してbasalからapical方向(BL-to-AP)が逆方向(AP-to-BL)よりも高かったのに対して、添加物共存下ではそのような方向性が低下した。同様な実験をMDCKI/mock細胞でも行い、efflux ratio-1 (BCRPを介した膜透過に比例する値)を算出したところ、controlで4.27、添加物存在下で1.75となり、半分弱にまで低下が認められた。以上より、経細胞輸送の系でも、添加物がBCRPを阻害することが示された。

現在、P-gpに及ぼすこれら添加物の影響についても、典型的基質であるR-123の細胞内への取り込みと経細胞輸送に対して評価しており、結果は現在執筆準備中の投稿論文に掲載予定である。

4. 考察

本研究で得られた興味深い知見の一つは、いくつかの添加物がBCRPを阻害したことである。これら添加物が、仮に表皮組織内へ K_i 値に近い濃度で分配した場合には、皮膚のBCRPを阻害しうることが示唆される。実際に皮膚に発現するBCRPを、添加物が阻害できるか否かについては、今回得られた K_i 値と、添加物自身の角質層への分配、表皮への拡散などの要因も影響するため、今回の結果からただちに皮膚BCRPの阻害が見られると結論づけることはできない。しかしながら、図2に示すように、少なくともP-gpやBCRPの阻害剤であるitraconazoleについては、角

質層の有無に関わらず、P-gp基質の皮膚透過をin vivoで抑制する。従って、添加物についても今後さらに詳細な検討を進め、皮膚の膜輸送体をどの程度阻害しうるかを解明する必要がある。

化粧品添加物がBCRPを阻害することが実際、生体にどのような影響を与えるかについても、さらに検討が必要である。BCRPは皮膚においては基質の吸収方向への輸送に関与するため、もしBCRPが全身作用を狙った外用剤に含まれる薬物の吸収に関与しているとすれば、添加物は当該薬物の効果に負の影響を与えうる。また、BCRPの遺伝子変異は抗悪性腫瘍薬スニチニブによる皮膚毒性と関係するとの報告がある⁹⁾。従って、BCRPへの阻害作用は同様な副作用とも関連する可能性がある。一方で、化粧品は一般に、角質層や表皮への作用が期待され、真皮や血漿中への成分の移行は望ましくない。その点、P-gpやBCRPを阻害することは、表皮から真皮への物質移行を妨げることに繋がり、化粧品自身の安全性の観点からは、阻害作用がむしろbeneficialかもしれない。今後さらなる検討を行うことで、皮膚組織内での添加物の影響を解明し、化粧品の安全性向上に発展できればと考える。

5. 総括

皮膚に発現するABC膜輸送体の一部が、添加物によって阻害されることが示唆された。一方で皮膚組織中での添加物の作用については、さらなる検討が必要である。添加物と膜輸送体との相互作用は、化粧品の安全性を考える上で今後さらに解明する必要がある。

謝辞

研究助成を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より御礼申し上げます。

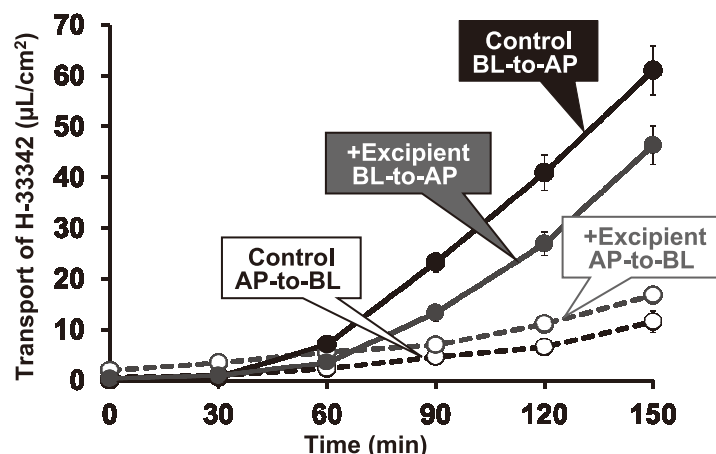


図6 BCRPによるH-33342経細胞輸送に及ぼす添加物の阻害効果

(引用文献)

- 1) Meguro S, : Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL), Arch. Dermatol. Res., 292, 463-468, 2000.
- 2) Cartledge P. : The epidermal barrier, Semin. Neonatal, 5, 273-280, 2000.
- 3) Ahmad N, : Cytochrome p450: a target for drug development for skin diseases, J. Invest. Dermatol., 123, 417-425, 2004.
- 4) Li Q, : Characterization of the transdermal transport of flurbiprofen and indomethacin, J. Control. Rel., 110, 542-556, 2006.
- 5) Ito K, : Involvement of organic anion transport system in transdermal absorption of flurbiprofen, J. Control. Rel., 124, 60-68, 2007.
- 6) Ito K, : P-Glycoprotein (Abcb1) is involved in absorptive drug transport in skin, J. Control. Rel., 131, 198-204, 2008.
- 7) Hashimoto N, : ATP binding cassette transporters in two distinct compartments of skin contribute to transdermal absorption of a typical substrate, J. Control. Rel., 165, 54-61, 2013.
- 8) C. Skazik, : P-glycoprotein (ABCB1) expression in human skin is mainly restricted to dermal components, Exp. Dermatol., 20, 450-452, 2011.
- 9) van Erp NP, Pharmacogenetic pathway analysis for determination of sunitinib-induced toxicity, J. Clin. Oncol., 27, 4406-4412, 2009.