

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 18 日現在

機関番号：31603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K14014

研究課題名(和文) 洗剤・化粧品に含まれる界面活性剤が皮膚に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Study on the effect of surfactants contained in detergents and cosmetics on the skin

研究代表者

久保田 耕司 (Kubota, Kouji)

医療創生大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：10626097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：界面活性剤の有用な機能性を安全に活用することを目的として、皮膚バリア機能に及ぼす界面活性剤の影響の分子メカニズムの解明と処方開発に取り組んだ。界面活性剤が皮膚バリア機能に及ぼす実際的な影響を迅速・簡便に評価するTransmission Index (TI) 法とタンパク質変性活性を組み合わせた指標を用いることにより、分子メカニズムの知見を得た。この指標を用いて検討した結果、混合により皮膚バリア機能への影響と皮膚組織障害性を同時に大きく緩和する処方が見出された。混合処方による皮膚バリア機能への影響の緩和のメカニズムの解明のため、熱力学的解析を試み、細胞間脂質の構造解析技術の基礎的な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

界面活性剤の機能性を安全に発揮するための、分子化学的、生理学的両面からの知見を得た。TI法の拡張により、イオン性によらず皮膚バリア機能への影響の評価を達成した。これに基づいて混合処方の効果を検討した結果、抗SARS-CoV-2活性が確認された第4級アンモニウム塩型界面活性剤へのイオン性の異なる界面活性剤の混合処方では、両者の皮膚バリア機能への影響と皮膚組織障害性の緩和に大きな効果が認められた。TI値とタンパク質変性活性を組み合わせた指標を用いた検討から、分子複合体の形成と細胞間脂質への影響によるものと考えられる。これにより、界面活性剤の有効活用によるCOVID-19対策の基礎的な知見を獲得した。

研究成果の概要(英文)：We worked on the elucidation of the molecular mechanism of the effect of surfactants on skin barrier function and the development of formulation for the purpose of safely utilize the useful function of surfactants.

The molecular mechanism was obtained by using the Transmission Index (TI) method, which quickly and easily evaluates the practical effect of surfactants on the skin barrier function, and the index that combines protein denaturing activity. As a result of examination using this index, a prescription was found that greatly alleviates the effect on the skin barrier function and the skin tissue damage by mixing.

In order to elucidate the mechanism of mitigation of the effect of the mixed formulation on the skin barrier function, thermodynamic analysis was attempted and basic knowledge of the structural analysis technique of intercellular lipids was obtained.

研究分野：物理系製剤学

キーワード：皮膚バリア機能 界面活性剤 処方開発 皮膚組織障害性 第4級アンモニウム塩型界面活性剤 抗SARS-CoV-2活性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

界面活性剤は、生活用品に多用され、洗浄や乳化等の様々な機能を担っている。しかし、界面活性剤による手荒れや、意図しない経皮吸収などの危険をはらみ、平成24年には「茶のしずく石鹸」によるコムギアレルギー発症事故、平成25年にはカネボウ美白化粧品による白斑発生事故が生じている。洗髪用洗浄剤では、皮膚刺激性の緩和にシリコン化合物が有効であることが知られているが、シリコン化合物は難分解性で環境負荷が大きいとため、シリコン化合物に頼らずに皮膚バリア機能への影響が抑制できる界面活性剤の探索と処方の開発が求められる。また、平成23年に発生した東日本大震災における福島第一原子力発電所事故では、長期にわたる放射能汚染被害が発生し、除染は喫緊かつ長期的な課題となった。放射能汚染の除染では、界面活性剤は重要であるが、放射性物質の経皮吸収の危険があつてはならないと同時に、環境への負荷を最小限にしなければならない。除染に適した洗浄剤の皮膚バリア機能への影響の評価法を確立し、安全で効果的な洗浄剤の開発のための知見を得ることは、放射能汚染被害の早期解決だけでなく、生活用品による環境破壊の抑制による持続可能な社会の発展に不可欠である。

界面活性剤は、医薬品においては経皮吸収促進剤として用いられることがある。しかし、界面活性剤が薬物の皮膚透過性を促進するメカニズムは未解明な部分が多い。界面活性剤と構造化学的に類似性が高い両親媒性物質であるイオン液体が薬物の皮膚透過性を著しく亢進する報告がある一方で、研究代表者の研究の結果、皮膚透過性を抑制するイオン液体の処方が見出されている(図1)。このことは、両親媒性物質による物質の皮膚透過性はコントロール可能であることを示す(Kubota et al. 2016)。本研究に先立ち、研究代表者らは、陰イオン界面活性剤が皮膚バリア機能に及ぼす影響を迅速・簡便に網羅的に評価する *Transmission Index (TI)* 法を開発した(Okasaka et al. 2019)。TI法は、界面活性剤を作用させた皮膚における薬物の定常透過速度を指標として界面活性剤が皮膚バリア機能に及ぼす影響の評価値である TI 値を求める方法である(図2)。

本研究は、これらの背景と技術基盤に基づいて開始した。

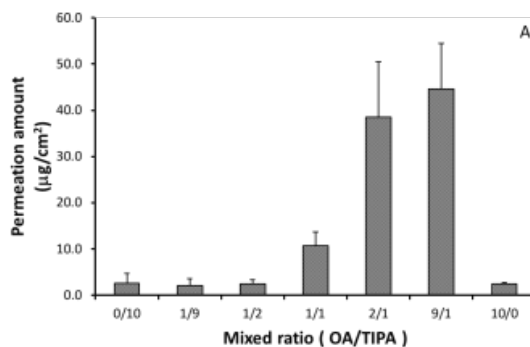
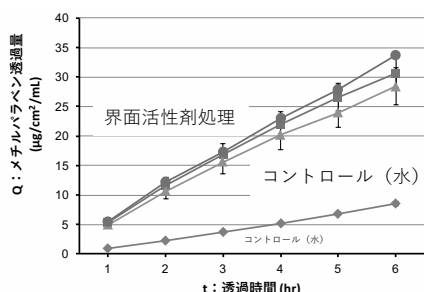


図1 脂肪酸カルボン酸と脂肪酸アミンの混合比を変化させたときの親水性フェノールレッドの皮膚透過量。OA/TIPA はオクタン酸/トリイソプロパノールアミンを示す。混合比はモル比。オクタン酸過剰処方ではモデル薬物の皮膚透過性が更新する一方で、アミン過剰状態では完全中和より抑制的に作用した。分子構造解析の結果、イオン液体がモデル薬物と形成する分子複合体の状態変化が観測された。



薬物の定常透過速度:  $Flux_{ss}$

$$Flux_{ss} = dQ/dt$$

*Transmission Index*

$$= \frac{Flux_{ss} \text{ (界面活性剤処理)}}{Flux_{ss} \text{ (コントロール処理)}}$$

図2 *Transmission Index* 法の概要

薬物の皮膚透過は受動拡散によるものであり、薬物の投与条件が一定であれば透過速度は皮膚のバリア機能の強さに依存する。したがって、薬物の一定条件下での薬物の皮膚透過速度を測定すれば、皮膚のバリア機能を測定することができる。*Transmission Index* 法は、指標薬物としてメチルパラベンを用い、水で処理した皮膚における薬物透過速度との比で皮膚バリア機能を評価する方法である。実験操作、評価計算ともに簡便で、スクリーニングに適した方法であることが特徴である。

## 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者ら独自の技術である TI 法を用いて、界面活性剤を網羅的に評価し、界面活性剤が皮膚バリア機能に及ぼす影響と界面活性剤の構造化学的特質の相関性を明らかにし、界面活性剤が皮膚バリア機能に及ぼす影響のメカニズムを解明することを目的とした。

界面活性剤が皮膚バリア機能に及ぼす影響が分子構造と関連することは経験的に知られていたが、網羅的に解析された例はほとんど無く、特定の処方間の比較にとどまるものであった。本研究の基盤技術となる TI 法は、これまでに報告された界面活性剤と薬物の皮膚透過性の相関を支持するものであり、評価法として適切であることが確かめられている (Okasaka et al. 2019)。本研究では、陰イオン性界面活性剤の評価方法として開発された従来の TI 法を拡張し、陽イオン性・両性・非イオン性のいずれの界面活性剤に対しても適用することを可能とすることを最初の目的とした。

## 3. 研究の方法

TI 法は、界面活性剤の皮膚バリア機能への実際的な影響を定量化するが、生理的影響や分子メカニズムに関する情報を提供しない。そこで、顕微鏡観察による組織障害性の評価と、マイクロプレートアッセイによるタンパク質変性活性の測定と組み合わせて評価を行った。

### 3.1. 試料

#### [ 界面活性剤 ]

陰イオン性界面活性剤として、ラウリン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、ラウロイルグルタミン酸ナトリウム、ラウロイルメチルタウリンナトリウム、ココイルアラニンナトリウム、ココイルサルコシンナトリウム、ココイルグルタミン酸ナトリウム、ココイルグルタミン酸カリウム、ココイルグルタミン酸トリエタノールアミン、ココイルメチルタウリンナトリウムおよびココイルメチルタウリンタウリンナトリウムを用いた。陽イオン性界面活性剤として、塩化ジステアリルジメチルアンモニウムおよび塩化ステアリルトリメチルアンモニウム。両性界面活性剤として、ラウロアンホ酢酸ナトリウム、ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタインおよびココミドプロピルベタイン。非イオン性界面活性剤として、イソステアリン酸 PRG-60 グリセリルおよび PEG/PPG-25/30 コポリマーを用いた。ステアリン酸、イソステアリン酸、オレイン酸およびリノール酸を用い、等モルの水酸化ナトリウムで鹸化し、自家調製脂肪酸石鹸を調製した。

#### [ 透過指標物質 ]

皮膚透過性測定試験における指標物質は、0.1 % メチルパラベン水溶液を用いた。

#### [ 透過性測定皮膚試料 ]

透過指標物質の皮膚透過性は、星野実験動物飼育所（茨城県、日本実験動物協会認証）の 7 週齢雄 Hos:HR-1 ヘアレスマウスの背部皮膚 (LabSkin) を用いた。

### 3.2. TI 法

フランツ拡散セルシステム (PermGear 製、垂直型、リザバー溶液 : 8mL、透過面積 : 1cm<sup>2</sup>) のリザバーに生理食塩水を充填し、37°C に保温して約 500rpm で攪拌した。ドナーカップにコントロール (精製水) または 1 % 界面活性剤水溶液 1 mL を入れ、皮膚試料表面を 1 時間処理した。処理後、皮膚表面とドナーカップを精製水で十分洗浄し、メチルパラベン水溶液 1 mL を皮膚表面に加えた。1 時間後より 6 時間後まで 1 時間毎にサンプリングポートからリザバー液を 200  $\mu$ L 採取し、同量の生理食塩水を補充した。採取したリザバー液は、正確に希釈したメチルパラベン水溶液を標準として ODS カラムを用いて HPLC で定量した。リザバー液中のメチルパラベン濃度の時間依存変化率が一定であることを確かめ、コントロール処理皮膚と界面活性剤処理皮膚でのメチルパラベンの定常皮膚透過速度 ( $Flux_{ss}$ ) の比から TI 値を求めた。

### 3.3. 皮膚組織障害性評価

コントロール (精製水) または 1 % 界面活性剤水溶液で表面を 1 時間処理した皮膚組織をパラホルムアルデヒドで固定し、凍結包埋して 10~30  $\mu$ m に薄切して、ヘマトキシリン-エオジン染色して光学顕微鏡で観察した。

### 3.4. タンパク質変性活性測定

各界面活性剤の段階希釈水溶液 100  $\mu$ L を、冷 PBS で調製した 0.05 % ヘモグロビン 100  $\mu$ L とマイクロプレートで混合し、界面活性剤の最終濃度を 1.25, 0.25, 0.05, 0.01, 0.002, 0.0004 % として 10 分間変性させた。405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、ブランクの吸光度を差し引いた各濃度における吸光度を Rodbard 関数にフィッティングし、測定値のプラトーの上限値と下限値の中間値を影響中間値として求めた。影響中間値における界面活性剤濃度を 50 % 影響濃度 (EC50) とした。

#### 4. 研究成果

##### 4.1. TI 法の拡張と、イオン特性ごとの界面活性剤の評価

研究開始時点では陰イオン性界面活性剤に対して適用可能であった TI 法は、本課題研究で、陰イオン性、陽イオン性、両性および非イオン性のすべての界面活性剤に対しての適用を確立した (図 3)。

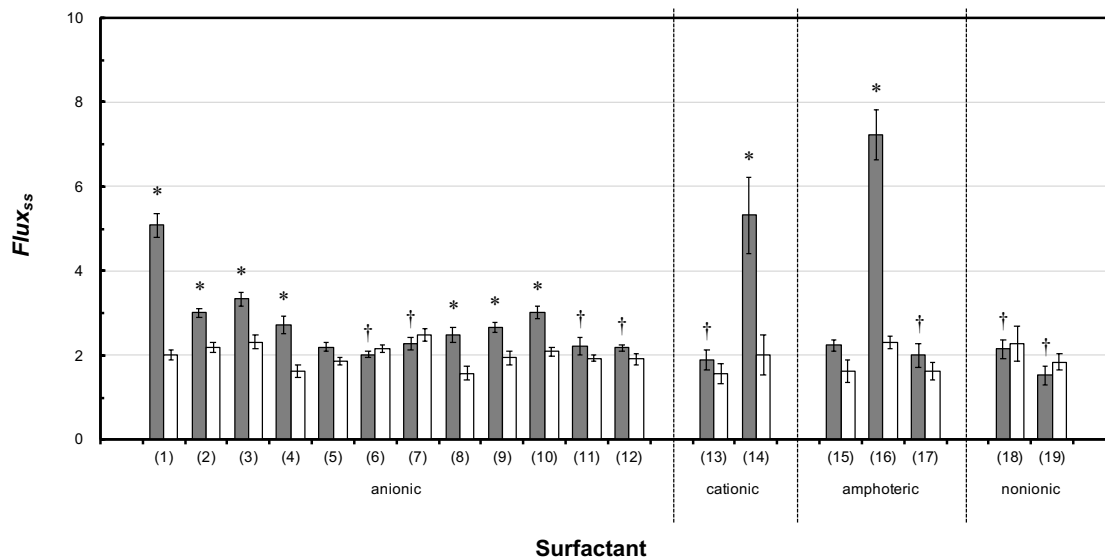


図3 陰イオン性、陽イオン性、両性および非イオン性界面活性剤の皮膚バリア機能への影響評価。縦軸は 1~6 時間におけるメチルパラベンの定常皮膚透過速度 (Fluxss) を示し、白色のバーはコントロール (精製水)、灰色のバーは各界面活性剤で処理した皮膚における Fluxss を示す。界面活性剤は、(1)ラウリン酸ナトリウム、(2)ラウリル硫酸ナトリウム、(3)ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、(4)ラウロイルグルタミン酸ナトリウム、(5)ラウロイルメチルタウリンナトリウム、(6)ココイルアラニンナトリウム、(7)ココイルサルコシンナトリウム、(8)ココイルグルタミン酸ナトリウム、(9)ココイルグルタミン酸カリウム、(10)ココイルグルタミン酸トリエタノールアミン、(11)ココイルメチルタウリンナトリウム、(11)ココイルメチルタウリンタウリンナトリウム、(13)塩化ジステアリルジメチルアンモニウム、(14)塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、(15)ラウロアンホ酢酸ナトリウム、(16)ラウリルジメチルアミノ酢酸ベタイン、(17)ココミドプロピルベタイン、(18)インステアリン酸 PRG-60 グリセル、(19)PEG/PPG-25/30 コポリマー

##### 4.2. 石鹸の原料脂肪酸の分子構造の皮膚バリア機能への影響

直鎖脂肪酸としてステアリン酸、分岐鎖脂肪酸としてイソステアリン酸、n1 不飽和脂肪酸としてオレイン酸および n2 不飽和脂肪酸としてリノール酸を用い、等モルの水酸化ナトリウムで鹸化して、脂肪酸構造の異なる C18 ナトリウム塩石鹸を調製し、TI 法によって皮膚バリア機能への影響を評価した。ステアリン酸ナトリウムは皮膚バリア機能にほとんど影響せず、不飽和脂肪酸ナトリウムの皮膚バリア機能への影響は、皮膚組織障害性を示すラウリン酸ナトリウムと同等であったが、皮膚組織障害性は無かった。このことから、ラウリン酸ナトリウムと C18 不飽和脂肪酸ナトリウムの皮膚バリア機能への影響は作用機序が異なることが推測された。C18 脂肪酸ナトリウムの TI 値は、直鎖 < 分岐鎖 < n1 不飽和 ≤ n2 不飽和であり、質的な観点から、この順序は脂肪酸の融点の順序と一致した (図 4)。従来、脂肪酸石鹸の皮膚刺激性は原料脂肪酸の炭素数と相関することが知られていたが、同一炭素数で構造の異なる脂肪酸石鹸の検討から、石鹸の皮膚刺激性に対する脂肪酸の炭素数の影響は、原料脂肪酸の融点とその影響を受ける石鹸の曇点および溶解性の影響に関する一側面であることが示された。

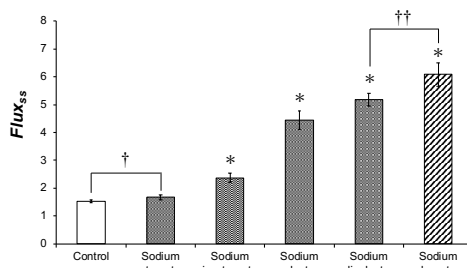


図4 脂肪酸構造の異なる C18 脂肪酸ナトリウムの 1~6 時間におけるメチルパラベンの定常皮膚透過速度 (Fluxss)。\*はコントロール (精製水) の Fluxss と有意に異なることを示し、++はラウリン酸ナトリウムと有意差が無いことを示す。

#### 4.3. 界面活性剤の皮膚バリア機能への影響とタンパク質変性活性の相関

ヘモグロビンタンパク質に対する変性活性をマイクロプレートアッセイで測定し、50% 影響中間濃度 (EC50) を求めた。TI 値と EC50 の間には明確な相関性はなかった。特に、アミノ酸系界面活性剤では、TI 値と EC50 の逆数 (指数化したタンパク質変性活性の強さ) の間は緩やかな逆相関であり、界面活性剤のタンパク質変性活性は皮膚バリア機能への影響の主要な要因ではないことが示唆された (図5)。TI 値あたりのタンパク質変性活性の強さは界面活性剤によって大きく異なり、皮膚バリア機能への影響のメカニズムは一樣ではないことが示された。

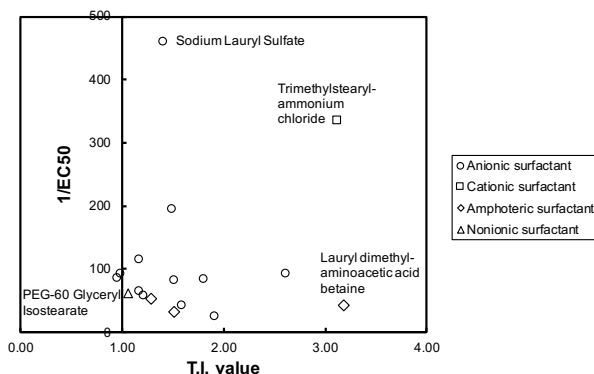


図5 各界面活性剤の TI 値とタンパク質変性活性の強度の分布

#### 4.4. 界面活性剤混合製剤の皮膚バリア機能への影響

皮膚バリア機能への影響が顕著な3種類の陰イオン性界面活性剤に対して、イオン性の異なる界面活性剤を混合したときの皮膚バリア機能への影響と皮膚組織障害性の変化を検討した。変化には、イオン特性と関連する明確な相関性はなく、処方によって異なった。一部の界面活性剤では、混合基剤それぞれの皮膚組織障害性と TI 値の緩和に大きな効果のある処方が見出された。一方で、単剤では見られなかった組織障害性が新たに生じる処方もあった。混合による皮膚への影響の変化には、TI 値あたりのタンパク質変性活性の強度と連動するものが見られ、混合処方における基剤界面活性剤の皮膚バリア機能への影響のメカニズムの違いの影響が示唆された (論文執筆中)。

#### 4.5. 総括

本研究では、当初目的の界面活性剤の構造化学的特性と皮膚バリア機能への影響との間の構造活性相関を見出すことはできず、TI 法を活用した個々の処方の評価を行なった。この結果、製品評価技術基盤機構と経済産業省の研究から抗 SARS-CoV-2 活性が明らかになっている第4級アンモニウム塩型界面活性剤において、他の界面活性剤との混合によって、皮膚組織障害性を緩和するだけでなく、自身の皮膚バリア機能への影響の強さも緩和されることを明らかにした。このことは、COVID-19 対策のための有効な消毒剤の開発や使用に有力な知見である。

また、TI 法とタンパク質変性活性測定を組み合わせ、TI 値あたりのタンパク質変性活性を新たな指標値をして評価することにより、界面活性剤が皮膚バリア機能に及ぼす影響に占めるタンパク質変性作用の割合を明らかにした。この指標値の相対的大小が、界面活性剤の混合処方における皮膚バリア機能への影響の変化に関与する可能性を見出した。界面活性剤の混合処方製剤の開発の手がかりとなることが期待できる。

一方、角質細胞間脂質への影響の解析は未達であり、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kubota Koji, Okasaka Mana, Kano Asami, Takata Sadaki	4. 巻 27
2. 論文標題 The involvement of protein denaturing activity in the effect of surfactants on skin barrier function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Skin Research and Technology	6. 最初と最後の頁 241 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/srt.12939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Koji	4. 巻 none
2. 論文標題 Precautions for using quaternary ammonium salt type surfactant on skin????????????	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AUTHOREA	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22541/au.159257657.76782328	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kubota Koji, Kakishita Akie, Okasaka Mana, Tokunaga Yuka, Takata Sadaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Alkyl Structure (Straight Chain/Branched Chain/Unsaturation) of C18 Fatty Acid Sodium Soap on Skin Barrier Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 4310 ~ 4320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app10124310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保田 耕司、岡坂 真奈、高田 定樹
2. 発表標題 界面活性剤の皮膚バリア機能への影響とタンパク変性活性の相関
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	高田 定樹  (Takata Sadaki)  (80563072)	大阪樟蔭女子大学・学芸学部・教授    (34409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------