

三次元ヒト培養皮膚モデルを用いた産業化学物質の 皮膚吸収・透過・蓄積性評価に関する検討

豊岡達士*1, 柏木裕呂樹*2, 柳場由絵*1, 王 瑞生*1

昨今、我が国の化学工場において、オルトトルイジン等、芳香族アミン類を取り扱う労働者らに職業性膀胱がんの発生が相次ぎ社会的な問題となった。本事例では、化学物質のばく露経路として、経皮ばく露の寄与が大きいことが明らかとなり、これを契機に産業化学物質の経皮ばく露が注目を集めることになった。一方で、産業化学物質の皮膚吸収・透過・蓄積性に関する知見は限定的である。本研究では、三次元ヒト培養皮膚モデル（3D 皮膚）に着目して、産業化学物質の皮膚吸収性等を簡便に評価できる系を構築し、オルトトルイジンをはじめ、約 30 種類の物質について、その皮膚吸収性等を検証した。その結果、物質の 3D 皮膚における皮膚吸収・透過・蓄積性は、その程度に応じて、いくつかのパターンに分類できることがわかり、この分類には物質の親水性(水溶性)・疎水性(脂溶性)を判断する物質特有の値であるオクタノール/水分配係数 (Log K_o/w) が強く影響することが判明した。本研究の結果は、物質の皮膚吸収性等を、Log K_o/w からある程度予測することができることを示すものであり、経皮ばく露が問題となる化学物質のリスク評価において、有用な情報になると考えられる。

キーワード: オルトトルイジン, 芳香族アミン類, 経皮ばく露, 皮膚吸収性, 皮膚透過性, 皮膚蓄積性

1. はじめに

昨今、我が国では、化学物質による経皮ばく露の寄与が大きいと考えられる職業性膀胱がんの発生事例が相次ぎ社会的な問題となった¹⁻⁴⁾。これを契機に職場における産業化学物質の経皮ばく露が注目を集めることになった。他方、近年の我が国における化学物質による健康障害事案（休業 4 日以上：がん等遅発性疾患除く）は年間 200～400 件ほどで推移しているが、その障害事案の半数以上は皮膚障害であり、吸入・経口ばく露による障害の発生件数の約 4 倍となっている⁵⁾。この皮膚疾患数は、化学物質の刺激性、腐食性、感作性に起因する皮膚障害であり、皮膚が化学物質に触れた際、即座に、もしくは比較的短時間で、ばく露を受けたことを認識することができた事例のみが主に数字として出てきているものと考えられるが、このことから、職場では化学物質の皮膚接触が頻繁に生じているであろうことが窺える。このことは、我が国に限ったことではなく、米国においても同様な傾向にある。米国労働統計局の 2018 年報告によると、化学物質ばく露による皮膚疾患発生数が 25,000 件（従業員 1 万人あたり 2.2 件）に対し、呼吸器疾患は 19,600 件（従業員 1 万人あたり 1.7 件）であり、皮膚疾患の発生数・発生率が呼吸器疾患を上回っている。米労働安全衛生庁（OSHA）は、化学物質ばく露において皮膚が、

肺よりも重要なばく露経路になることを注意喚起している⁶⁾。

化学物質に皮膚刺激性等があり、ばく露したことを直ぐに認識できれば、ばく露対策を講じる等の対応ができるが、皮膚刺激性等はないが、皮膚に吸収されうる物質は、作業者がそのばく露に気づくことがなく、ばく露が常態化するおそれがある。さらに、経皮ばく露が問題となる物質は、概して蒸気圧が低い傾向にあり、気中での検出が困難であるため、作業環境測定による管理も難しく、これが慢性的なばく露に拍車をかける可能性がある。このような皮膚吸収性物質に発がん性等の遅発性毒性がある場合は、後々、重大な健康障害に発展する恐れがある。実際に、膀胱がん発症の原因となったオルトトルイジン及び 3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン（MOCA）には、皮膚刺激性等は確認されておらず、蒸気圧も極めて低い。産業現場には、このような物質が少なからず存在するものと考えられる。

国内外の化学物質評価機関等では、上記のような皮膚から吸収され、健康障害を生ずるおそれがあることが判明している物質については、Skin Notation 物質として注意を促す表記がなされているものの、産業化学物質の経皮ばく露に関する疫学的知見、及び皮膚吸収性に関する実験的知見は概して不足しているのが現状である。他方、薬学分野では、固形薬剤（物質）をいかに皮膚から吸収させるかについての研究が従前より実施されており、薬剤の親油性を高めるための化学的修飾を施す方法や、薬剤を親油性基剤（ゲル、クリーム等）に分散させる方法等が考案されている^{7,8)}。これら方法はいずれも、親油性である表皮角層と馴染みやすく（吸収させやすく）するための工夫である。このように薬剤の皮膚吸収におい

*1 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター 有害性評価研究部

*2 元 労働安全衛生総合研究所 化学物質情報管理研究センター 有害性評価研究部

連絡先: 〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1

労働安全衛生総合研究所 有害性評価研究部 豊岡 達士

E-mail: toyooka@hjniosh.johas.go.jp

ては、物質の物性条件として、親水性・親油性を決定するオクタノール/水分配係数 (Log Ko/w) が重要なパラメータの一つになることが知られている^{9,10)}。Log Ko/w は、産業化学物質の皮膚吸収性を考える上でも重要な指標になると考えられるが、上述の通り、産業化学物質における皮膚吸収性に関する研究は不足しており、特に、物質物性と皮膚吸収性の関係について、体系的に整理した研究はない。Log Ko/w と皮膚吸収性との関係を見出すことで、Log Ko/w の値から、物質が皮膚に吸収されてから、全身循環に入る時間の予測等が可能になると考えられ、産業化学物質の経皮ばく露のリスク評価への応用が期待される。

本研究では、オルトトルイジンをはじめ、約 30 種類の物質について、その皮膚吸収性等を検証し、物質の Log Ko/w と皮膚吸収性等の関係を明らかにすることを目的とした。また、本目的を達成するために、まとまった数の化学物質について検証する必要があるため、動物経皮ばく露実験等に比して、簡便で効率的な評価が可能で、三次元培養ヒト (3D) 皮膚に着目し、検討することにした。

2. 実験材料及び方法

1) 被験物質

表 1 に本研究で使用した被験物質を示す。被験物質は全て、¹⁴C で放射性ラベルされたものである。MOCA (BlyChem) を除く被験物質は全て American Radiolabeled Chemicals から購入した。表中、分子量、蒸気圧、Log Ko/w は PubChem から情報を得た。

2) 3D 皮膚

3D 皮膚は LabCyte EPI-MODEL (J-TEC, Fuji Film) を用いた。LabCyte は、直径 10.5mm の培養カップ (Culture Insert, Corning) にヒト正常表皮細胞を重層培養したものであり、培養 14 日目のものを使用した。使用した 3D 皮膚は、表皮を構成する角質層、顆粒層、有棘層、基底層を有し、各層に特有の構造体、及び各種代謝酵素や炎症関連酵素の保持が確認されている¹¹⁾。

3) 3D 皮膚を用いた皮膚吸収性等評価

図 1 に示すように、3D 皮膚が入った培養カップを PBS (52 mL) が満たされたガラス瓶に装着し、そこに、0.1 μ Ci (3700 Bq) の放射性標識した被験物質を含む PBS を 200 μ L 添加した。既定時間 (0.5, 1, 2, 4, 8, 24 h) ごとに、「添加溶液」、「3D 皮膚」、「ボトル内の溶液」を回収し、それぞれの放射能を液体シンチレーションカウンター (Perkin-elmer: Tri-Carb 5110R) で測定した。各被験物質について、少なくとも 6 回以上の実験を実施し、結果を求めた。以下、「皮膚吸収」は、被験物質が 3D 皮膚内 (角層を含む表皮組織) に入ること、「皮膚透過」は、3D 皮膚内に入った化学物質が 3D 皮膚を透過し、ボトルへ移行すること (真皮層への移行に相当し、その

表 1 被験物質一覧

被験物質	分子量	Log Ko/w	蒸気圧 (mmHg)
トリエタノールアミン	149.19	-1.59	0.359x10 ⁻⁵
ジエタノールアミン	105.14	-1.43	0.28x10 ⁻⁴
ジメチルホルムアミド	73.09	-1.01	3.87
チミジン	242.23	-0.93	0.136x10 ⁻¹²
アクリツアミド	71.08	-0.67	0.01
パラフェニレンジアミン	108.14	-0.25	0.5x10 ⁻²
カフェイン	194.19	-0.07	0.9x10 ⁻⁶
オルトフェニレンジアミン	108.14	0.15	0.2x10 ⁻²
硫酸ジメチル	126.13	0.16	0.677
パラアミノ安息香酸	137.14	0.83	4.5x10 ⁻⁵
カテコール	110.11	0.88	0.147x10 ⁻³
アニリン	93.13	0.94	0.49
ベンジルアルコール	108.14	1.1	0.09
オルトアニジジン	123.15	1.18	0.08
オルトトルイジン	107.15	1.32	0.26
ベンジジン	184.24	1.34	0.71 x10 ⁻⁵
パラトルイジン	107.15	1.39	0.29
4,4'-メチレンジアニリン	198.26	1.59	0.20 x10 ⁻⁶
2,4-ジメチルアニリン	121.18	1.68	0.13
3-ニトロ安息香酸	167.12	1.83	3.71x10 ⁻⁵
オルトクロロアニリン	127.57	1.92	0.2
2,4-ジニトロトルエン	182.13	1.98	0.147x10 ⁻³
3,3'-ジメチルベンジジン	212.29	2.34	0.1x10 ⁻⁵
パラクロロニトロベンゼン	157.55	2.39	0.219x10 ⁻¹
パラクロロフェノール	128.55	2.39	0.87x10 ⁻¹
アトラジン	215.68	2.61	0.289x10 ⁻⁶
トルエン	92.14	2.73	28.4
クロロベンゼン	112.55	2.84	11.97
スチレン	104.15	2.95	6.4
ナフタレン	128.17	3.3	0.85x10 ⁻¹
MOCA	267.15	3.91	0.39x10 ⁻⁵
ノナン	128.25	5.65	4.45
パラニルフェノール	220.35	5.76	8.18x10 ⁻⁴
ヘキサクロロフェン	406.9	7.54	0.83x10 ⁻¹⁰

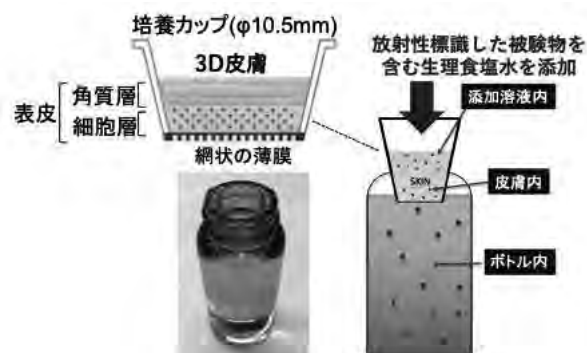


図 1 3D 皮膚を用いた化学物質の皮膚吸収性等評価手法

後、全身循環に入る)、「皮膚蓄積」は、3D 皮膚に入った被験物質が 3D 皮膚内に留まることと定義する。

3. 結果

1) 3D 皮膚における被験物質の皮膚吸収・透過・蓄積のパターンについて

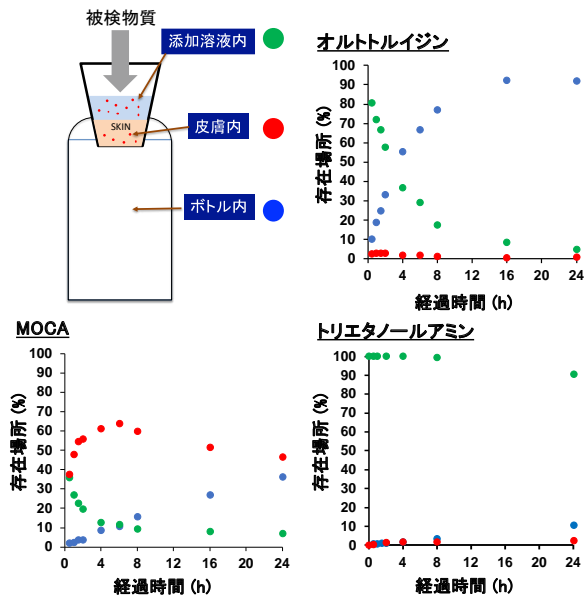


図 2

皮膚吸収性等のパターンが異なる代表的な 3 物質

図 2 に、皮膚吸収性等のパターンが異なる代表例として、オルトトリイジン、MOCA、トリエタノールアミンの結果を示す。グラフ縦軸は、3D 皮膚に添加した被験物質の量を 100% とし、添加後、既定時間における、添加溶液内、皮膚内、ボトル内に存在する被験物質の割合を示している。オルトトリイジンでは、添加後 30 分では、3D 皮膚の上に約 80% (皮膚に吸収されていない)、3D 皮膚を透過しボトルに移行したものが約 10% 存在している。時間が経つにつれて、添加溶液内のオルトトリイジンは減少し、ボトル内で増加していることより、オルトトリイジンは 3D 皮膚に吸収され、速やかに透過すると言える。一方で、皮膚内の変化は少なく、皮膚内への蓄積はほぼ無いことがわかる。他方、MOCA では、30 分後の添加溶液内と皮膚内での割合が 40% 近くあり、皮膚内では 6 時間程度でピークを形成している。これは、MOCA は急速に皮膚内に吸収されるが、透過速度が遅いため、皮膚に蓄積しているものと考えられる。皮膚内に蓄積した MOCA は、時間をかけて徐々に透過していくことがわかる。トリエタノールアミンでは、添加溶液内ほとんど変化していない。つまり、トリエタノールアミンは、皮膚に吸収されにくいということを意味している。その他の被験物質の結果は、上記代表例として示した 3 つのパターンのいずれかに大まかに分類することができ、どのパターンに近くなるかについては、物質の蒸気圧が十分に低い場合、 $\text{Log } K_{o/w}$ が強く影響するであろうことが示唆された (データ示さず)。

2) 3D 皮膚における被験物質の半量透過時間について

3D 皮膚に添加した被験物質の半量が 3D 皮膚を透過する時間を半量透過時間 ($T_{1/2}$) と定義し、各被験物質の透過性プロットがプラトーに達する前までの時間において、近似曲線を決定係数が最も高くなるように求め、 $T_{1/2}$ を算出した。結果を表 2 にまとめる。

3 考察

本研究では 3D 皮膚を用い、約 30 種類の化学物質について、皮膚吸収・透過・蓄積性を検証し、これら皮膚吸収等のパターンには、物質の $\text{Log } K_{o/w}$ の値が強く影響するであろうことを示した。化学物質の $\text{Log } K_{o/w}$ は、化学物質の皮膚吸収性に影響する代表的なパラメータの一つとして知られていたが^{9,10}、本研究のように皮膚に接触した後の動態を、皮膚吸収、透過、蓄積に分け、一連の化学物質を詳細に検討した研究は類を見ない。本研究の結果は、物質の $\text{Log } K_{o/w}$ が与えられれば、その物質の皮膚における動態をある程度予測できることを示すものである。すなわち、皮膚の最表面にある角層は全体として疎水性 (親油性) の膜のため、 $\text{Log } K_{o/w}$ が -1.5 より小さい場合は皮膚に弾かれ、「皮膚吸収性」自体がほとんどないと言える。 $\text{Log } K_{o/w}$: -1.5 から値が大きくなるにつれて、「皮膚吸収性」が高まる。図 2 に示すように、 $\text{Log } K_{o/w}$: 4 程度の物質 (例: MOCA) のばく露 30 分後における総皮膚吸収量 (皮膚を透過した分も加味した量) は、 $\text{Log } K_{o/w}$: -1 前後の物質 (例: トリエタノールアミン) の約 12 倍、 $\text{Log } K_{o/w}$: 1 前後の物質 (例: オルトトリイジン) の約 4 倍である。一方、 $\text{Log } K_{o/w}$ の値が大きくなると「皮膚吸収性」は高まるが、「皮膚透過性」が徐々に低下する。これは、物質が皮膚に吸収される量に対して、透過する量が少ない状態であり、結果として、皮膚内に物質が「蓄積」したものと考えられる。 $\text{Log } K_{o/w}$: 7 前後の物質になると (例: ヘキサクロロフェン), 速やかに皮膚に吸収されるが、「皮膚透過性」はほとんど認められず、ほぼ全てが皮膚内に蓄積した状態になる。 $\text{Log } K_{o/w}$: 4~5 程度のものは、図 2 の MOCA の例にも示すように、皮膚内に蓄積するが、その後、徐々に皮膚を透過していく。皮膚透過性は、 $\text{Log } K_{o/w}$: 4 程度から顕著に低下するため、 $\text{Log } K_{o/w}$: 1~2 程度が特に高くなると考えられる。実際に、皮膚透過性が $\text{Log } K_{o/w}$: 1~2 程度で特に高くなることは、半量透過時間 ($T_{1/2}$) を求めた表 2 の結果からも裏付けられる。

表 2 に示すように、物質の $\text{Log } K_{o/w}$ から皮膚透過性を予測することがある程度可能であると考えられるが、蒸気圧 (揮発性) が高い物質についての皮膚透過性は、本研究の評価システムでは評価が困難であると考えられた。例えば、トルエン ($\text{Log } K_{o/w}$: 2.73) や、クロロベンゼン ($\text{Log } K_{o/w}$: 2.84) は、 $\text{Log } K_{o/w}$ の値のみからは皮膚透過性が高いものと考えられたが、実験において皮膚透過性はほぼ認められず、ボトルの蓋部に被験物質が多

表 2 被験物質の半量透過時間と Log Ko/w

被験物質	Log Ko/w	半量透過時間 (T _{1/2})
トリエタノールアミン	-1.59	181.5
ジエタノールアミン	-1.43	90.2
ジメチルホルムアミド	-1.01	26.6±2.2
チミジン	-0.93	119
アクリゾアミド	-0.67	36.8±6.4
パラフェニレンジアミン	-0.25	21.9±2.7
カフェイン	-0.07	19.3±0.4
オルトフェニレンジアミン	0.15	644
硫酸ジメチル	0.16	/
パラアミノ安息香酸	0.83	/
カテコール	0.88	14.4±0.8
アニリン	0.94	4.5±1.1
ベンジルアルコール	1.1	4.3±0.8
オルトアニシジン	1.18	4.7±0.6
オルトトルイジン	1.32	4.5±0.6
ベンジジン	1.34	5.7±0.5
パラトルイジン	1.39	5.5±0.8
4,4'-メチレンジアニリン	1.59	6.1±2.8
2,4-ジメチルアニリン	1.68	5.3±0.3
3-ニトロ安息香酸	1.83	/
オルトクロロアニリン	1.92	5.6±0.7
2,4-ジニトロトルエン	1.98	6.5±0.4
3,3'-ジメチルベンジジン	2.34	7.2±0.6
パラクロロニトロベンゼン	2.39	7.3±0.5
パラクロロフェノール	2.39	2.9±0.4
アトラジン	2.61	8.1±1.3
トルエン	2.73	/
クロロベンゼン	2.84	/
スチレン	2.95	23.9±3.8
ナフタレン	3.3	23.3±3.1
MOCA	3.91	41±5.8
ノナン	5.65	82±7.3
パラニルフェノール	5.76	67±2.3
ヘキサクロロフェン	7.54	676

量に付着していることがスマイヤテストによって確認された。トルエンの蒸気圧は 28.4 mmHg、クロロベンゼンの蒸気圧は 11.97 mmHg であり、本研究の被験物質の中では蒸気圧が高い物質と言える。したがって、Log Ko/w から皮膚透過性を予測することができるのは、物質の蒸気圧が十分に低いものに限定されると考えられる。また、被験物質の中には、その化学的性質上、培養カップ（ポリスチレン）に付着する物質があり評価が困難な物質が存在した（硫酸ジメチル）。他方、蒸気圧は十分に低く、Log Ko/w の値も皮膚透過性が高いと考えられる範囲の値を有する物質であるに関わらず、実験においては皮膚透過性がほとんど認められず、培養カップへの付着もなかった物質として、チミジン、オルトフェニレンジアミン、パラアミノ安息香酸、3-ニトロ安息香酸があった。チミジンについては、DNA 合成に必要であり、細胞が分裂する際に DNA に取り込まれることが知られている。

したがって、3D 皮膚において細胞分裂が盛んな基底細胞の DNA に取り込まれ、皮膚透過が認められなかったと考えられる。また、オルトフェニレンジアミンについては、我々の別研究において、3D 皮膚を構成する細胞のタンパク質や DNA と結合することが示されており、このために皮膚透過が認められなかったものと推察される。パラアミノ安息香酸、及び 3-ニトロ安息香酸については、皮膚吸収自体がほぼ認められておらず、現時点ではその理由は明確にできていないが、添加溶液内における物質の解離が関係しているものと考えている。このように、Log Ko/w の値から予想される皮膚における動態から外れる物質が少なからず存在するが、今後その理由を明らかにしていくことは、3D 皮膚を用いた新たな化学物質毒性評価につながる可能性がある。例えば、感作性物質は、ペプチドやタクパク質と結合し抗原となる。また、DNA と結合する物質（DNA 付加体形成物質）は変異原性を示す可能性がある。したがって、3D 皮膚を用いた皮膚透過性試験において、Log Ko/w の値による予想から外れる物質に注目することで、感作性物質や変異原性物質を同時に検出することができる可能性がある。

本研究では 3D 皮膚を用いて、一連の化学物質の皮膚吸収性等を検証し、化学物質の皮膚における動態は Log Ko/w の値によってある程度パターン化できることを示した。一部の物質については、我々の別研究において、ヒトの皮膚に近いとされるブタ摘出皮膚でも検証しており、ブタ摘出皮膚における皮膚動態パターン自体は、3D 皮膚と同じであることが確認されている（ただし、物質が皮膚に吸収される時間や、透過に要する時間は、ブタ摘出皮膚では 3D 皮膚の 3~5 倍程度、長時間側にシフトする）。また、表 2 に示した各物質の T_{1/2} は、Log Ko/w を変数とした二次曲線： $T_{1/2} = 3.9186 (\text{Log } Ko/w)^2 - 11.468 (\text{Log } Ko/w) + 14.823$; $R^2 = 0.9118$ で近似できることがわかっている（ただし、大幅な外れ値は除く）。これらのことを考慮すると、経皮ばく露において、物質が皮膚を透過する時間や量は、物質の Log Ko/w から大まかに見積もることができる可能性がある。例えば、Log Ko/w が P の物質 A があり、A の蒸気圧が十分に低い場合は（目安として 10 mmHg 以下）、A がヒト皮膚に付着し、その付着量の半量が全身循環に入るまでの時間 T は、 $T = (3.9186P^2 - 11.468P + 14.823) \times (\text{付着面積}/0.785^{\text{註1}}) \times (\text{in vitro-in vivo 補正係数}^{\text{註2}})$ と見積もることができる（註 1: 培養カップの面積、註 2: ブタ摘出皮膚の実験から 3~5）。他方、薬学分野では、in vitro 皮膚透過予測として Potts and Guy モデルをはじめ、多くの予測式が考案されている¹²⁻²⁰⁾。薬学分野で考案された各予測式と、本研究で得られた予測式は、予測式を構築するために用いられた被験物質の種類を含め、様々な前提条件が異なるために単純な比較は難しいが、共通項を抽出した比較等、検証作業が必要であり、これは今後の課題である。本研究で得られた知見、特に、Log Ko/w の値により、産業化学物質の皮膚吸収性・透過性・蓄積性のパターンが異なることは、経皮ばく露が問題となる化学物

質の適切な管理や防護，リスク評価等を考える上で，有用な情報になるものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 福井県内の化学工場で発生した膀胱がんに関する災害調査. A-2015-07.
- 2) Nakano M, Omae K, Takebayashi T, Tanaka S, Koda S. An epidemic of bladder cancer: ten cases of bladder cancer in male Japanese workers exposed to ortho-toluidine. *J Occup Health*. 2018, 60(4), 307-311.
- 3) 埼玉県加須市の化学工場で発生した膀胱がんに関する災害調査. 2019.
- 4) 厚生労働省資料：3,3'-ジクロロ-4,4'-ジアミノジフェニルメタン (MOCA)を取り扱う業務における健康障害の状況と健康管理手帳における取扱について
<https://www.mhlw.go.jp/content/11201000/000428978.pdf>
- 5) 厚生労働省資料：化学物質による健康障害
<https://www.mhlw.go.jp/content/11303000/000632410.pdf>
- 6) OSHA Dermal exposure.
<https://www.osha.gov/dermal-exposure>
- 7) Sakamoto M, Kano T, Sadanaga M, Shimoda O, Morioka T, Mishima M, Nakano M. Dermal patch anaesthesia: comparison of 10% lignocaine gel with absorption promoter and EMLA cream. *Anaesthesia*. 1993, 48(5), 390-2.
- 8) Lee SG, Kim SR, Cho HI, Kang MH, Yeom DW, Lee SH, Lee S, Choi YW. Hydrogel-based ultra-moisturizing cream formulation for skin hydration and enhanced dermal drug delivery. *Biol Pharm Bull*. 2014, 37(10), 1674-82.
- 9) Moss GP, Dearden JC, Patel H, Cronin MT. Quantitative structure-permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. *Toxicol In Vitro*. 2002. 16(3), 299-317.
- 10) 押坂勇志, 藤堂浩明, 杉林堅次 (2012), 皮膚に浸透する物質の物理化学的パラメータを用いた有効性・安全性評価. *薬学雑誌*, 132, 1237-1243.
- 11) Katoh M, Hamajima F, Ogasawara T, Hata K. Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol. *J Toxicol Sci*. 2009, 34(3):327-34.
- 12) Potts RO, Guy RH. Predicting skin permeability. *Pharm Res*. 1992. 9(5), 663-9.
- 13) 畑中朋美, 片山和憲, 小泉 保, 杉林堅次, 森本擁憲, Single および $\text{parallel permeability pathway model}$ に基づく皮膚透過挙動の解析. *薬物動態*. 1993, 8, 699-702.
- 14) Pugh WJ, Roberts MS, Hadgraft J. Epidermal permeability-penetrant structure relationships: 3. The effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum, *Int. J. Pharmaceut.*, 1996. 138, 149-165.
- 15) Pugh WJ, Degim IJ, Hadgraft J. Epidermal permeability-penetrant structure relationships: QSAR of permeant diffusion across human stratum corneum in terms of molecular weight, H-bonding and electronic charge. *Int. J. Pharmaceut*. 2000. 197, 203-211.
- 16) Barratt MD. Quantitative structure-activity relationships for skin permeability. *Toxicol In Vitro*. 1995. 9(1), 27-37.
- 17) Abraham MH, Chadha HS, Mitchell RC, The factors that influence skin penetration of solutes, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1995. 47, 8-16.
- 18) Kirchner LA, Moody RP, Doyle E, Bose B, Jeffrey J, Chu I. The prediction of skin permeability by using physicochemical data, *ATLA*. 1997. 25, 359-370.
- 19) Cronin MTD, Dearden JC, Moss GP, Murray-Dickson M, Investigation of the mechanism of flux across human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationship, *Eur. J. Pharm. Sci*. 1999. 7, 325-330.
- 20) H. Okamoto, M. Hashida, H. Sezaki, Structure-activity relationship of 1-alkyl- or 1-alkenylazacycloalkane derivatives as percutaneous penetration enhancers, *J. Pharm. Sci.*, 77, 418-424 (1988).