

薬物のヒト爪甲透過機構および
透過促進に関する研究

甲第13号

小林洋一

薬物のヒト爪甲透過機構および透過促進に関する研究

小林 洋一

目 次

総論の部 1

緒言 1

第 1 編 薬物のヒト爪甲透過機構に関する検討

第 1 章 爪甲の三層構造と薬物の爪甲透過性との関係 3

第 1 節 爪甲の構造と爪白癬 3

第 2 節 爪甲の脂質含有量およびその分布 6

第 3 節 爪甲三層の薬物透過特性 8

第 4 節 爪甲三層中の薬物濃度予測 13

第 5 節 本章の考察 16

第 2 章 薬物の物性と爪甲透過性との関係 17

第 1 節 薬物の爪甲透過性に及ぼす親油性の影響 17

第 2 節 薬物の爪甲透過性に及ぼすイオン解離の影響 20

第 3 節 薬物の爪甲透過性に及ぼす分子量の影響 24

第 4 節 正常および疾病爪甲を介する薬物透過の比較 29

第 5 節 本章の考察 32

第 2 編 薬物のヒト爪甲透過促進に関する検討

第 1 章 爪甲透過促進剤の探索 33

第 1 節 爪甲物性に及ぼす種々基剤の効果 34

第2節	種々基剤からの薬物の爪甲透過促進効果	36
第3節	爪甲の物性および薬物の爪甲透過性に及ぼす促進剤濃度の影響	39
第4節	本章の考察	42
第2章	爪甲透過促進剤の最適な適用条件設定	43
第1節	薬物の爪甲透過性に及ぼす種々促進剤の効果	44
第2節	種々薬物の爪甲透過性に及ぼす促進剤の効果	47
第3節	薬物と促進剤の同時適用基剤による爪甲透過促進効果	51
第4節	本章の考察	55
結論		56
謝辞		60
実験の部		61
第1編		
第1章	実験の部	61
第2章	実験の部	65
第2編		
第1章	実験の部	68
第2章	実験の部	71
引用文献		72

総論の部

総論の部

緒言

「水虫」と呼ばれる白癬とは皮膚（角質層）、毛髪および爪などの皮膚表面ケラチン質に寄生する皮膚糸状菌に属する *Trichophyton* 属、*Microsporum* 属および *Epidermophyton* 属によって生じる表在性真菌症である。本疾患は、わが国のような高温多湿の夏期に特に多い皮膚病であり、性別を問わず見受けられる国民病として1000万人以上の人々に蔓延している。しかし、大きな苦痛を伴う疾患でなく、死に至る病でもないため、完全に治癒しないまま放置されることが非常に多い。

一方、「爪白癬」とは爪甲や爪床の表在性真菌症であり、一般的に治療困難な疾患として知られている。現在、この爪白癬の治療法として、グリセオフルビン、イトラコナゾールおよびテルビナフィン等の経口投与が主流であり、X線照射や爪抜去等も行われている。しかしながら、グリセオフルビンは白癬菌に対して静菌作用（殺菌的でない）のみを示すため長期間投与（6ヶ月以上）を強いられ、胃腸障害、肝障害、頭痛などの副作用もしばしば問題となっている¹⁻³⁾。また、イトラコナゾールの経口投与ではテルフェナジンやアステミゾールとの薬物相互作用等が問題となっている。さらに、X線照射は慢性炎症の消退に関し、多少の効果をもつが、白癬菌自体にはまったく効果がなく⁴⁾、抜爪する物理的手段による局所的な薬物療法でも、爪床、爪母、爪郭などに治療効果を発揮する十分な薬量を白癬菌感染部位へ長期間に渡って浸み込ませることができない⁵⁾。

これらの療法に比べ、副作用が少ないと考えられる従来の局所外用療法では、罹患爪甲の角質が有効成分（抗真菌剤）の吸収を妨げるため、最小発育阻止または最小殺菌濃度レベルの薬量を白癬菌感染部位に送達できないものと考えられてきた⁶⁾。そこで、爪白癬に対する有用性の高い局所製剤を開発するために、薬物（抗真菌剤）を白癬菌感染部位に効率よく送達できるシステム（ドラックデリバリーシステム；DDS）の考案を最終目的とし、研究を開始した。抗真菌剤のターゲット部位は爪甲下

層および爪床（爪甲下角質）であり、薬物の爪甲透過機構並びに爪甲透過促進に関する十分な検討が必要となる。近年、爪白癬に対する臨床的な全身薬物治療に関する多くの検討^{3,7-10)}に加えて、局所薬物治療に関する検討¹¹⁻¹⁶⁾もなされてきた。しかしながら、薬物の爪甲吸収および透過に関する薬剤学的な*in vitro*研究はほとんど報告されていない^{17,18)}。爪白癬治療に対して重要な薬物送達のバリアとなる爪甲は毛髪と同様に硬ケラチンで主に構成され、多くのジスルフィド結合を含有する強固なケラチン膜である¹⁹⁾。従って、有効な爪白癬治療を行うための局所製剤を開発するためには、爪甲の薬物透過特性を十分に理解した上で、吸収促進剤を探索し、最適な製剤処方を決定する必要がある。そこで、本研究では、薬物の爪甲吸収および透過に関する基礎的な知見を得るために、さらには薬物の爪甲透過機構を推定するために、研究に際して経皮吸収実験等で汎用されている横型（2-チャンパー）拡散セル²⁰⁾を改良し、健常人の爪甲切片（約1ヶ月ほど伸ばした爪甲先端部の遊離縁）を用いた*in vitro*透過実験を考案し、検討に用いた。ついで、爪白癬に対して有効性の高い局所製剤開発の可能性を追究するため、薬物の爪甲透過性を改善するための促進法についても検討を行った。

本研究では第1編-第1章において、三層構造で構成される爪甲の脂質分布や爪甲三層を介する親水性または親油性モデル薬物の透過性、分配性および爪甲三層中の薬物濃度について主に検討した。続いて第2章では、薬物の物性（親油性、解離度および分子量）とその爪甲透過性との関連性について検討し、透過を測定しがたい抗真菌剤の爪甲透過性の予測法を考案した。また、正常（健常）および疾病（真菌）爪甲の薬物透過性についても比較検討した。第2編-第1章では、第1編の爪甲透過機構の検討結果に基づき、爪甲透過促進剤を探索するために、角質溶解剤、経皮吸収促進剤およびジスルフィド結合還元剤等を用いて、爪甲の物性（硬度および重量）変化と種々薬物の透過促進効果についてスクリーニングした。また、その結果を基に第2章では、最適な促進剤の適用条件について検討を加え、臨床的に有用と考えられる爪白癬治療のための最適な局所製剤処方について最終的に考察を行った。

第1編 薬物のヒト爪甲透過機構に関する検討

第1章 爪甲の三層構造と薬物の爪甲透過性との関係²¹⁾

皮膚の付属器官の一つである爪甲は手足の指の背面の表皮から生じる角質の薄い板のことで、皮膚の角質層に相当する。皮膚角質層は脂質含量が高く、硫黄含量が低い軟ケラチンで主に構成されている。これに対して、爪甲は毛髪と類似しており、脂質含量が低く、3%以上の硫黄成分を含有した硬ケラチンで主に構成されている^{19, 22-24)}。この爪甲の主成分であるケラチンの化学構造は非常に複雑であり、その骨格をなすポリペプチド鎖はジスルフィド結合によって架橋され、極めて安定な不溶性タンパクとしての特色を保持している^{24, 25)}。

近年、経皮吸収に関する研究は盛んに行なわれており、大抵の場合、皮膚最外層の角質層が薬物透過の律速バリアとなることが知られている。しかしながら、皮膚の付属器官の一つである爪甲の薬物透過に関する研究報告はほとんどなく、薬物の透過機構もまったく明らかとされていない。上述したように、爪甲は皮膚角質層と異なった成分で主に構成されていることから、薬物透過の特性もまた皮膚（角質層）と異なるかもしれない。本章では、爪甲の性質および構造と爪甲の薬物透過特性との関連性を明らかにするために、爪甲中の三層構造に伴った脂質分布や親油性の異なるモデル薬物の透過性、分配性およびその三層中の濃度について検討し、考察を行った。

第1節 爪甲の構造と爪白癬

ヒト爪甲には一層構造説と三層構造説があり、三層構造説のほうが有力と言われている²⁶⁻²⁹⁾。三層構造説では、爪甲上層のdorsal nail plate (A)、中層のintermediate nail plate (B)、下層のventral nail plate (C)に分けられる (Fig. 1)。さら

に、爪床と呼ばれる爪甲下の組織は爪甲と密接する表皮から構成されており、爪甲が伸びるとともに平行して指先に向かって移動する。また、爪甲の成長に必要な爪甲の末端部分は爪母と呼ばれ、爪甲は爪母から一日に0.1~0.15 mmの割合で成長する³⁰⁾。

走差型電子顕微鏡により観察した爪甲断面の写真をFig. 2に示す。この顕微鏡観察

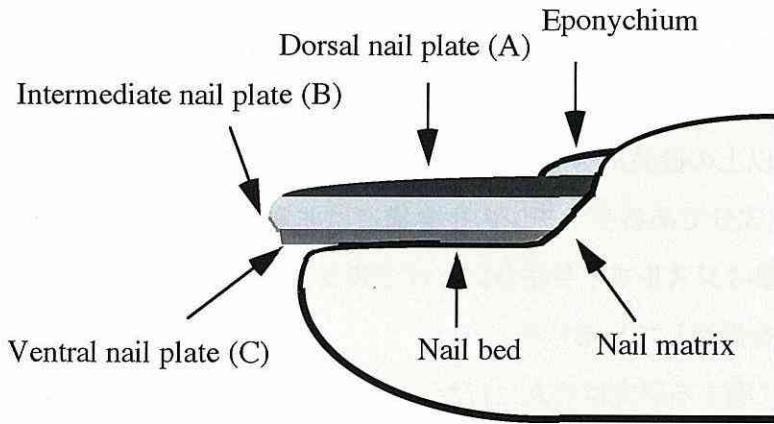


Fig. 1 Schematic diagram of the human nail plate

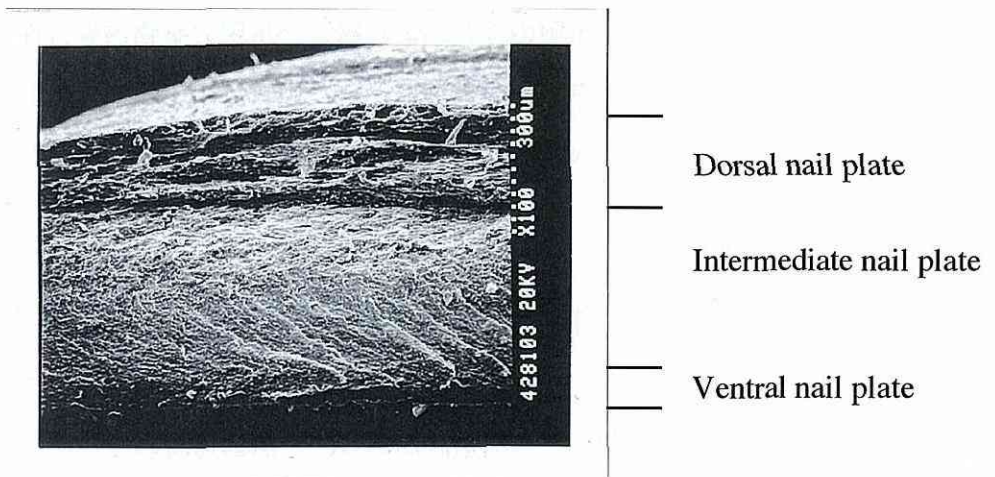


Fig. 2 Morphology of a cross section of the human nail plate

により、爪甲の上層と中層の構造が明確に分かれていることが確認できた。また、今回の走差型電子顕微鏡による観察では、爪甲下層がはっきりと区別はできなかったが、数多くの文献にてヒト爪甲の三層構造については報告されている^{28, 29)}。

Fig. 3に爪白癬患者の足の写真を示す。足白癬に爪白癬が合併する率は平均で10%、高齢者では50%以上ともいわれる。爪甲はたいていの場合、*Trichophyton rubrum* や*Trichophyton mentagrophytes*によって冒されることが報告されている³¹⁻³³⁾。また、爪白癬の症状の特徴としては溷濁、肥厚、変形の三つが挙げられる^{31, 33)}。

一方、爪甲中の白癬菌の分布は薬物治療を行うための必要不可欠な情報である。白癬菌が感染する爪の部位としては爪甲上層 (dorsal nail plate)、爪甲下層 (ventral nail plate)、爪甲下角質および爪上皮 (eponychium) が挙げられ、それらの中でも、爪甲下層と爪甲下角質は必ず感染されると言われている^{31, 34)}。しかし、ほとんどの場合、爪甲中層と爪母は感染しない。従って、抗真菌剤の爪甲透過を評価するうえで、白癬菌の分布や爪甲の性質を理解することは極めて重要である。

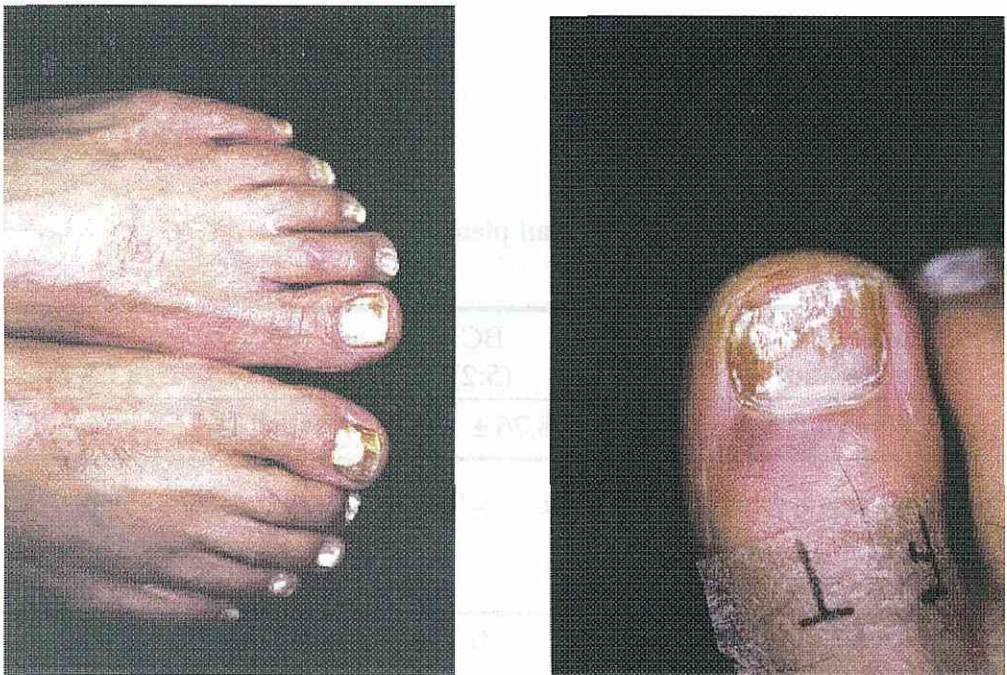


Fig. 3 Photograph of onychomycosis trichophytica

第2節 爪甲の脂質含有量およびその分布

爪甲中の脂質含量は角質層の脂質含量よりも非常に少ないことが知られている³⁵⁾。しかしながら、長鎖脂肪酸、遊離脂肪、コレステロール、スクアレン、リン脂質のような様々な脂質がヒト爪甲中に存在すると言われている^{28, 36)}。これらの爪甲中に分布する脂質は薬物の爪甲透過性、特に爪甲への薬物分配性に大きな影響を与えることが推測される。そこで本節では、爪甲三層中の総脂質濃度と脂質分布に関して検討を行った。なお、種々文献^{28, 37, 38)}から、研究に際して用いる爪甲三層それぞれの厚さ (h) または重量の比を爪甲上層 (A) : 爪甲中層 (B) : 爪甲下層 (C) = 3 : 5 : 2 と仮定し、計算に用いた。また、同健常人の同手指の未処理の爪甲をABC層 (爪甲全層)、A層を削ったBC層 (爪甲中層と下層の複合膜)、B層を削ったAB層 (爪甲上層と中層の複合膜)、A, C両層を削ったB層 (爪甲中層) をそれぞれ調製し、研究に用いた。

Table 1 (a) はAB, BC, B およびABC層それぞれから抽出した爪甲1 mg中の総脂質量 (総脂質濃度 : C_L $\mu\text{g mg}^{-1}$) を示す。AB層とBC層の総脂質濃度はB層の総脂質濃

Table 1 Lipid concentration in the nail plate

a)

Layer (thickness ratio)	AB (3:5)	BC (5:2)	B (5)	ABC _{exp} (3:5:2)
C_L ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	4.33 \pm 0.45	8.76 \pm 1.15	2.83 \pm 0.28	7.58 \pm 1.20

Each value represents the mean \pm S.E. (n=10).

b)

Layer (thickness ratio)	A (3)	B (5)	C (2)	ABC _{cal} (3:5:2)
C_L ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	6.82	2.83	23.6	8.50

度に比較してそれぞれ約1.5および3.0倍であった。

ここで、爪甲三層の重量の比が3 : 5 : 2と仮定できるならば、これらのAB, BC, B層の実験データから単層AおよびCの総脂質濃度が計算可能となる (Table 1 b) . この計算から求めたC層の総脂質濃度はヒト爪甲中で一番高い結果となった. 対照的に, B層の総脂質濃度は非常に低い結果であった. また, 各単層の総脂質濃度のランクオーダーは $C > A > B$ であり, この各単層 A, BおよびCの総脂質濃度と三層の重量比より求めた全層爪甲の総脂質濃度 (ABC_{cal}) は実験から得られた全層爪甲の総脂質濃度 (ABC_{exp}) とほぼ一致した (Table 1) .

Fig. 4は爪甲中の脂質をズダンブラックBによって染色したヒト爪甲薄片の断面の顕微鏡写真を示す. ズダンブラックBは, たいていの脂質 (中性脂肪や磷脂質) を青黒く染めることが知られている. 爪甲薄片の顕微鏡写真から, ヒト爪甲中の脂質はほとんど爪甲上層部と下層部に分布することが確認された. また, 爪甲下層側の凹凸の部分には多くの脂質が含有されていることがわかった. ところが, 爪甲のメイン部位である中層部分には脂質がほとんど観察されなかった. また, この結果は先の総脂質濃度による結果と一致した.

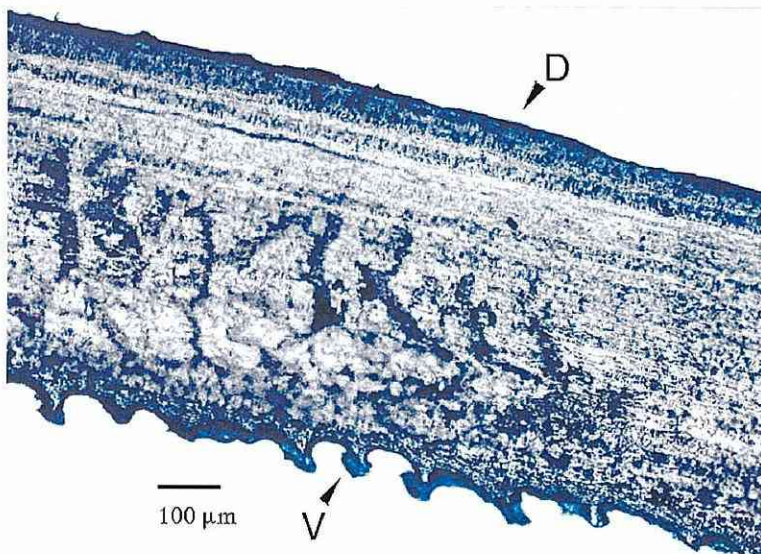


Fig. 4 Micrograph of human nail plate

D; dorsal nail plate side V; ventral nail plate side

This nail plate section was stained with Sudan Black B.

これらの結果から、爪甲の上層 (A) および下層 (C) はある程度の脂質成分を含有するが、爪甲中層 (B) は脂質成分をほとんど含有しないことが明らかとなった。従って、ヒト爪甲は油/水/油の三層膜で構成されていると解釈される。

第3節 爪甲三層の薬物透過特性

本節では、親水性モデル薬物 (5-フルオロウラシル ; 5-FU) および親油性モデル薬物 (フルルビプロフェン ; FP) の爪甲三層それぞれの透過特性を検討するため、前節と同様にAB層 (爪甲上層と中層の複合膜) , BC層 (爪甲中層と下層の複合膜) , B層 (爪甲中層のみ) およびABC層 (爪甲全層) の爪甲切片を調製し、*in vitro*爪甲透過および分配実験を行った。また、爪甲三層それぞれの厚さ (h) または重量比は前節と同様に爪甲上層 (A) : 爪甲中層 (B) : 爪甲下層 (C) = 3 : 5 : 2と仮定して、計算に用いた。

透過データの解析はFickの第一法則に基づき、行なった ((1)式)。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D_m \cdot \Delta C}{h} \quad \dots (1)$$

ここで、 dQ/dt は定常状態時の薬物透過速度、 D_m は膜中の薬物拡散係数、 ΔC は膜を介した濃度勾配、 h は膜厚である。レシーバ側がシンクコンデションの場合、(1)式の ΔC はドナー基剤の薬物濃度 (C_v) と膜/ドナー基剤の分配係数 (K_m) の積に置き換えることができる ((2)式)。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D_m \cdot K_m \cdot C_v}{h} \quad \dots (2)$$

また、薬物の透過係数 (P) は(3)式で表わせる。

$$P = \frac{D_m \cdot K_m}{h} \dots (3)$$

本節の透過実験において、ドナー基剤はすべて水懸濁液を使用したため、(2)式中の C_v は37°Cでの5-フルオロウラシル (17.1 mg/ml) およびフルルビプロフェン (27.7 $\mu\text{g/ml}$) の飽和濃度となる。

Fig. 5にAB, BC, BおよびABC層を介する5-フルオロウラシル (5-FU) およびフルルビプロフェン (FP) の爪甲透過プロファイルを示す。5-FUおよびFPの定常状態透過速度のランクオーダーはともに $B > BC > AB > ABC$ であった。また、全層爪甲 (ABC) を介する5-FUおよびFP透過のラグタイム (遅延時間) はそれぞれ、約2.5および11日と長期間であった。ヒト爪甲を介する薬物透過のラグタイムについて、Mertinらは水飽和溶液からのニコチン酸エステル透過で10~80時間のラグ

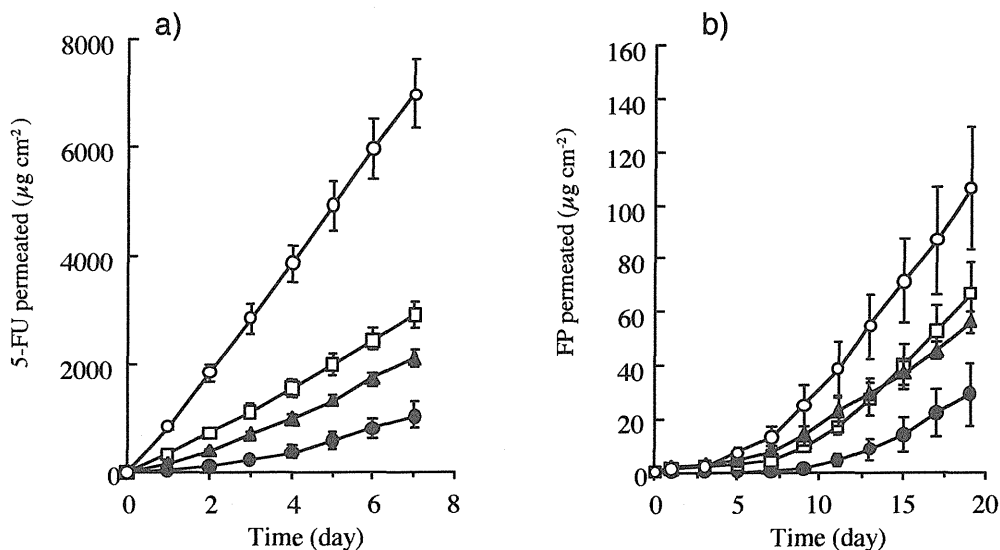


Fig. 5 Permeation profiles of 5-FU (a) and FP (b) through AB (\blacktriangle), BC (\square), B (\circ) and ABC (\bullet) layers. Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-5).

タイムが³⁹⁾、水飽和溶液およびネイルラッカーからのクロラムフェニコール透過でそれぞれ200時間および400時間もの長いラグタイム⁴⁰⁾が生じることを報告している。従って、彼らの研究報告や本節で得られた研究結果から、薬物の爪甲透過には非常に長いラグタイムが生じると示唆される。

Table 2にAB, BC, BおよびABC層の5-FUおよびFPの爪甲透過パラメータを示す。Table 2中の各薬物の爪甲透過係数(P)は(2)および(3)式を用いて計算した。その結果、AB層およびBC層を介する5-FUの透過係数はほぼ同様の値を示した。しかし、B層を介する5-FUの透過係数は他の層の透過係数に比較して高い値を示した。また、B層を介するFPの透過係数も他の層の透過係数に比較して高い値を示した。一方、各薬物の膜/基剤分配係数(K_m)はそれぞれ、37°CでのAB, BC, BまたはABC層/基剤(水)の濃度比として算出した。その5-FUおよびFPの膜/基剤分配係数はAB, BCおよびB層間で著しい差が認められなかった。さらに、Table 2中のAB, BC, BおよびABC層における各薬物の拡散係数(D_m)は(3)式を用いて算出した。そのAB層中の5-FUおよびFPの拡散係数はBCおよびB層中の拡散係数よ

Table 2 Permeation parameters of 5-FU and FP through the human nail plate

Drug	Parameter	Layer (thickness ratio)			
		AB (3:5)	BC (5:2)	B (5)	ABC _{exp} (3:5:2)
5-FU	h (μm)	396.0	346.5	247.5	495.0
	P ($\times 10^7 \text{ cm s}^{-1}$)	2.51 \pm 0.18	3.07 \pm 0.22	7.12 \pm 0.65	1.49 \pm 0.27
	K_m	0.53 \pm 0.04	0.49 \pm 0.01	0.56 \pm 0.02	0.54 \pm 0.06
	D_m ($\times 10^8 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	1.87	2.18	3.13	1.37
FP	h (μm)	347.2	303.8	217.0	434.0
	P ($\times 10^6 \text{ cm s}^{-1}$)	1.83 \pm 0.11	2.76 \pm 0.43	3.59 \pm 1.28	1.45 \pm 0.54
	K_m	1.07 \pm 0.15	1.13 \pm 0.24	0.98 \pm 0.22	1.47 \pm 0.32
	D_m ($\times 10^8 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	5.92	7.42	7.96	4.29

Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-5).

りも低かった。

Flynnら⁴¹⁾は*i*番目の層の拡散抵抗 (R_i) が (4) 式によって定義できることを提案している。

$$R_i = \frac{1}{P_i} = \frac{h_i}{D_i \cdot K_i} \quad \dots (4)$$

加えて、多層の場合、全拡散抵抗 (R_T) は (5) 式によって表わされる。

$$R_T = \frac{1}{P_T} = \frac{h_1}{D_1 \cdot K_1} + \frac{h_2}{D_2 \cdot K_2} + \dots + \frac{h_n}{D_n \cdot K_n} \quad \dots (5)$$

そこで、各単層AおよびCの透過パラメータをAB、BCおよびB層の透過パラメータを用いて、それぞれ算出した。Table 3に、計算から求めた各単層A、BおよびCに関する5-FUとFPの透過パラメータを示す。5-FUでは、B層の透過係数が他の単層の透過係数に比較して高かった。対照的にFPでは、C層の透過係数が他の単層の透過係数に比較して高かった。さらに、C層の5-FUの爪甲/基剤分配係数はAまたはB層の分配係数よりも低く、その分配係数のオーダーは $B > A > C$ となった。しかしながら、FPの分配係数のオーダーは5-FUの分配係数のオーダーの反対であった ($C > A > B$)。また、これらの結果は爪甲三層中の総脂質濃度の結果に依存していると推察された。一方、(3)式を用いて算出した各単層A、BおよびCに関する薬物拡散係数において、両薬物のA層中の拡散係数は他の単層の拡散係数に比較して一番低い値を示した。反対に、両薬物のB層中の拡散係数は一番高い値を示した。全層爪甲の透過パラメータ (ABC_{cal}) は (5)式に各単層A、BおよびCの透過パラメータを代入して算出した (Table 3)。その算出した両薬物の全層爪甲の透過パラメータ (ABC_{cal}) は Table 2に示した実験から得た実測の全層爪甲の透過パラメータ (ABC_{exp}) とほぼ一致する結果となった。

以上の結果から、薬物透過に関する爪甲三層それぞれの特性は、以下のように推論できる；爪甲上層（A；dorsal nail plate）は薬物拡散性が低く、若干、親油性の膜、爪甲中層（B；intermediate nail plate）は親水性の膜、爪甲下層（C；ventral nail plate）は親油性の膜とそれぞれ特徴づけられ、薬物透過に関する最大のバリア機能は爪甲上層中の低い薬物拡散性であると推定される。また、薬物の親油性が高い場合では爪甲中層への薬物分配性が、薬物の親油性が低い場合では爪甲下層への薬物分配性が若干の透過バリアになる傾向も観察された。しかしながら、5-FUとFP間の爪甲/基剤分配係数の差が爪甲の低い脂質含量のために著しく小さかったことから、ヒト爪甲全体としては皮膚角質層のような親油性分配膜というよりはむしろ親水性ゲル膜としてふるまうと示唆される。

Table 3 Calculated permeation parameters of 5-FU and FP through the human nail plate

Drug	Parameter	Layer (thickness ratio)			
		A (3)	B (5)	C (2)	ABC _{cal} (3:5:2)
5-FU	h (μm)	148.5	247.5	99.0	495.0
	P ($\times 10^7 \text{ cm s}^{-1}$)	3.87	7.12	5.39	1.71
	K _m	0.48	0.56	0.30	0.48
	D _m ($\times 10^8 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	1.21	3.13	1.80	1.75
FP	h (μm)	130.2	217.0	86.8	434.0
	P ($\times 10^6 \text{ cm s}^{-1}$)	3.71	3.59	11.9	1.58
	K _m	1.22	0.98	1.51	1.16
	D _m ($\times 10^8 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	2.63	7.96	3.42	5.91

第4節 爪甲三層中の薬物濃度予測

爪白癬の薬物治療に関して、爪甲中、特に爪甲下層中の抗真菌剤濃度は治療係数を評価するための非常に重要な因子である。しかしながら、その正確な爪甲中の薬物濃度を知ることは非常に困難であると思われる。従って、本節では、各単層中の薬物濃度を先の実験から得た透過パラメータを用いて推定することを試みた。また、爪白癬の薬物治療は現在のところ抗真菌剤の経口投与が主流であり、この場合、抗真菌剤は爪床および爪母下の真皮の血液から爪甲下層および爪甲下角質へ送達された後、爪甲全体に分配されると考えられる⁴²⁾。そこで、爪甲裏側 (ventral nail plate side) からの5-FUおよびFPの*in vitro*透過も合わせて検討し、この場合の各単層中の薬物濃度についても推定した。

Table 4に爪甲表側および裏側からの薬物透過における定常状態透過速度 (J) と爪甲中の薬物量 (Q) を示す。爪甲裏側から表側への5-FUの定常状態透過速度は爪甲表側から裏側へのそれぞれの定常状態透過速度とほぼ同様の値であった。また、爪甲裏側から表側への5-FU透過における全層爪甲中の薬物量も爪甲表側から裏側への5-FU透過における全層爪甲中の薬物量とほぼ同様の値であった。一方、爪甲表側および裏側からの薬物透過における全層爪甲中のFP量は非常に少なく、定量限界以下で測定できなかった。

一方、各層の薬物量は各薬物の透過パラメータから推測することができる。まず、各層を介する薬物の透過速度は以下の(6)式のように定義できる。

$$\frac{dQ}{dt} = D_A \frac{(C_A - C'_A)}{h_A} = D_B \frac{(C_B - C'_B)}{h_B} = D_C \frac{(C_C - C'_C)}{h_C} \quad \dots (6)$$

(6) 式中の $(C_A - C'_A)$ 、 $(C_B - C'_B)$ および $(C_C - C'_C)$ はそれぞれ各層を介する薬物の濃度勾配である。ここでレシーバー側がシンク状態であることより、 C'_c は

0 と定義できる。従って、全層爪甲中の薬物量 (Q_T) は以下の(7)式のように定義できる。

$$\frac{Q_A}{S} = \frac{(C_A - C'_A)}{2} \cdot h_A + \frac{(C_B - C'_B)}{2} \cdot h_B + \frac{C_C}{2} \cdot h_C \quad \dots (7)$$

ここで、Sは膜の表面積である。この(6)式と(7)式を用いて、各層ごとの平均薬物濃度を算出した。

Table 5は各薬物の透過パラメータから推定した各層中の薬物量 (Q_{cal}) と平均薬物濃度 (C_{cal}) を示す。爪甲表側および裏側からの薬物透過における推定した全層爪甲中の5-FU量は実験から得られた5-FU量 (Table4) と非常に近い値であった。また、爪甲裏側からの薬物透過における推定した爪甲下層中の5-FUおよびFPの濃度は爪甲表側からの薬物透過における推定した爪甲下層中の5-FUおよびFP濃度に比べてそれぞれ4.2倍および45倍高かった。さらに、推定した全層爪甲の5-FU濃度に比較して、全層爪甲の推定したFP濃度は約300倍低い値であった。おそらく、爪甲全体は親水性ゲル膜のようにふるまうため、FPのような水溶解度の低い薬物は5-FUのよう

Table 4 Drug amounts (Q) in the human nail plate and their respective fluxes (J)

	J ($\mu\text{g}^{-1}\text{cm}^2 \text{h}^{-1}$)	Q (μg)
Dorsal to ventral		
5-FU	9.19 ± 1.63	14.33 ± 0.69
FP	0.14 ± 0.05	N.D.*
Ventral to dorsal		
5-FU	9.54 ± 0.72	13.98 ± 1.25
FP	0.13 ± 0.03	N.D.*

* Not determined.

Each value represents the mean ± S.E.(n=3-5).

な水溶解度の高い薬物よりも爪甲中に分配されなかったと思われる。また、薬物の親油性に関与せず、爪甲裏側からの薬物透過は爪甲表側からの薬物透過よりも爪甲下層中に有効に薬物を送達するだろう。殆どの抗真菌剤はFPと同等またはそれ以上の親油性の高い薬物が多く、かつ分子量も大きいと考慮されるため、爪甲下層中の薬物濃度は推定したFP濃度よりも低くなることが予想され、その爪甲下層中の濃度もまた抗真菌剤の透過および水溶解度に依存するものと思われる。最近の抗真菌剤のMIC濃度は非常に低く、また、親水性の抗真菌剤も市販されてきていることより、爪白癬を治療可能な爪甲下層中の薬物濃度は達成できるかもしれない。

以上の結果から、親水性薬物は親油性薬物よりも高い爪甲中濃度を有することが明らかとなった。また、爪甲表側からの爪甲三層中の薬物濃度のオーダーが両薬物とも爪甲上層 > 爪甲中層 > 爪甲下層となり、通常認められる拡散過程であることも明らかとなった。

Table 5 Estimation of 5-FU and FP concentration in the human nail plate

		5-FU		FP	
		$Q_{cal} (\mu\text{g})^a$	$C_{cal} (\mu\text{g mL}^{-1})^b$	$Q_{cal} (\text{ng})$	$C_{cal} (\mu\text{g mL}^{-1})$
Dorsal to ventral					
	ABC	11.32	4657	22.60	10.61
	A	4.84	6642	15.45	24.17
	B	5.97	4911	6.80	6.38
	C	0.51	1045	0.35	0.83
Ventral to dorsal					
	ABC	10.68	4396	37.73	18.00
	A	1.49	2040	4.52	7.07
	B	7.05	5808	17.34	16.28
	C	2.14	4401	15.87	37.24

^a Amount of the drug in the nail plate. ^b The drug concentration in the nail plate.

第5節 本章の考察

本章では、薬物の透過部位であるヒト爪甲の三層構造に着目し、その脂質分布、薬物透過性、薬物分配性および薬物濃度について各層ごとに評価した。爪甲中の総脂質のオーダーは爪甲下層 (C) > 爪甲上層 (A) > 爪甲中層 (B) であり、この結果は爪甲の脂質をズダンブラックBで染色した爪甲薄片の顕微鏡による観察結果と一致した。また、爪甲三層を介する親水性モデル薬物の5-FUおよび親油性モデル薬物のFPの*in vitro*透過の解析結果から、5-FUにおいて爪甲上層が、FPにおいて爪甲上層と中層が透過バリアになっていることが明らかになった。一方、両薬物の爪甲三層への分配性は各層の総脂質濃度を反映する結果となったが、5-FUとFPの爪甲全体への分配性に著しい差は認められなかった。この結果は、爪甲全体が親油性分配膜というよりは、むしろ親水性ゲル膜としてふるまうことを示唆する。各薬物の透過係数および分配係数から算出した薬物拡散係数は両薬物とも爪甲上層が一番低く、これらの透過パラメータから算出した爪甲三層中の薬物濃度のオーダーは各層の脂質濃度に影響されず、両薬物とも拡散過程で通常認められる爪甲上層 > 爪甲中層 > 爪甲下層となり、さらに、推定した爪甲中の薬物濃度は両薬物の水溶解度に依存していた。以上の結果から、構造的に三層に分かれている爪甲は、薬物透過現象の解析においては、爪甲全体を一層膜と見なせることが明らかになった。

第2章 薬物の物性と爪甲透過性との関係⁴³⁾

我々は前章において、ヒト爪甲の薬物透過特性と薬物濃度について三層に分けて検討した。その結果、爪甲三層には、皮膚の角質層のような親油性の著しい律速バリアとしてふるまう層は存在しなく、爪甲全体としては親水性ゲル膜のような特性をもち、薬物透過において、爪甲全体を一層膜と見なして現象を解析可能なことが明らかとなった。

そこで本章からは、第1章の結果を踏まえて爪甲全層を1層膜として評価し、薬物の物性（親油性、解離度および分子量）と爪甲透過性との関連性について検討した。また、これらの結果を用いて、透過を測定しがたい、抗真菌薬物の爪甲透過性を予測することも試みた。さらに、正常（健常）爪甲と疾病（真菌）爪甲の薬物透過性についても比較検討した。

第1節 薬物の爪甲透過性に及ぼす親油性の影響

薬物の皮膚透過性を予測するために、PottsとGuyら⁴⁴⁾は透過物質のサイズ（分子容；MVまたは分子量；MW）とオクタノール／水分配係数（Kow）に基づいた数学的モデルにて皮膚透過性を解析した。このモデルにおいて、膜中の拡散係数（ D_m ）は薬物の分子量（MW）に対して指数関数的に依存する（(8)式）。

$$D_m = D^0 \cdot \exp(-\beta \cdot MW) \quad \dots (8)$$

ここで D^0 は0の分子量をもつ仮想の分子の拡散性であり、 β は定数である。膜／ドナー基剤の分配係数（ K_m ）とKowの関係は次式で表わされる（(9)式）。

$$K_m = [Kow]^f \quad \dots (9)$$

ここで係数 (f) はオクタノールと膜中の脂質によるドメイン間の違いを表わしている。従って、(3) 式、(8) 式および(9) 式を組み合わせることにより、以下の(10) 式が得られる。

$$\log P = \log\left(\frac{D^0}{h}\right) + f \cdot \log Kow - \beta' \cdot MW \quad \dots (10)$$

ここで $\beta' = \beta / 2.303$ である。そこで、種々薬物の爪甲透過性を解析し、最終的に抗真菌剤の爪甲透過性を予測するために、この重回帰式を用いて解析を行った。

本節において、薬物の爪甲透過性に対するオクタノール／水分配係数の影響を検討した。Table 6 に本研究で用いたモデル薬物である p-ヒドロキシ安息香酸エステル

Table 6 Physicochemical parameters and nail permeability coefficients (h=400 μ m) of p-hydroxybenzoic acid esters

Drug	MW ^{a)}	Log Kow ^{b)}	P ^{c)}
p-Hydroxybenzoic acid methyl ester (MP)	152.15	1.53	3.86 \pm 0.08
p-Hydroxybenzoic acid ethyl ester (EP)	166.18	2.23	2.43 \pm 0.48
p-Hydroxybenzoic acid propyl ester (PP)	180.20	2.75	2.01 \pm 0.35
p-Hydroxybenzoic acid butyl ester (BP)	194.23	3.13	2.38 \pm 0.32
p-Hydroxybenzoic acid amyl ester (AP)	208.25	3.65	2.24 \pm 0.39
p-Hydroxybenzoic acid hexyl ester (HP)	222.28	4.25	1.24 \pm 0.32

Each value represents the mean \pm S.E. (n=4). a) MW ; molecular weight

b) Kow ; octanol/water partition coefficient c) P ; permeability coefficient (x 10⁷ cm s⁻¹)

同族体の物性パラメータとその爪甲透過係数を示す。本節においては、薬物の爪甲透過性に及ぼすオクタノール/水分配係数 (K_{ow}) の影響を調査するため、*p*-ヒドロキシ安息香酸エステル同族体の分子量は一定と見なして考察を行なった。*p*-ヒドロキシ安息香酸エステル同族体のオクタノール/水分配係数の対数値は1.53 ~ 4.25であり、広範囲に推移した。Fig. 6 に*p*-ヒドロキシ安息香酸エステルのオクタノール/水分配係数 (K_{ow}) と爪甲透過係数 (P) との関係を示す。*p*-ヒドロキシ安息香酸エステルの爪甲透過性はその親油性 (K_{ow}) の増加に対して増加しなかった。また、*p*-ヒドロキシ安息香酸エステルのオクタノール/水分配係数と爪甲透過係数の対数間で直線関係が存在した ($r = -0.869$, $p < 0.05$)。もしも、爪甲が親油性の分配膜としてふるまうならば、その直線の傾き (f) は0よりも明らかに高い値をとることが予想される。しかしながら、その直線の傾きはほぼ0であった ($f = -0.160$)。

以上の結果から、爪甲透過性は透過物質の親油性に依存しなかった。ゆえに、前章でも考察したように爪甲は親油性分配膜というよりはむしろ親水性ゲル膜としてふるまうと示唆される。この考えはアルコール同族体の透過研究を行ったWaltersら⁴⁵⁾ やニコチン酸エステル同族体の透過研究を行ったMertinら³⁹⁾ の結果および前節による研究結果と一致する。しかしながら、Waltersら⁴⁵⁾ が示唆したヒト爪甲中の付加的な親油性ルートについては発見できなかった。前章では、爪甲上層 および爪甲下層には若干の脂質が存在するが、メイン爪甲の中層部には脂質をほとんど含有していないことを明らかにしている。また、ヒト爪甲中の脂質含量は皮膚角質層よりも非常に少ないことも報告されている。従って、本検討からは、Waltersらが推論した付加的な親油性ルートはほとんど影響しないものと考えられた。

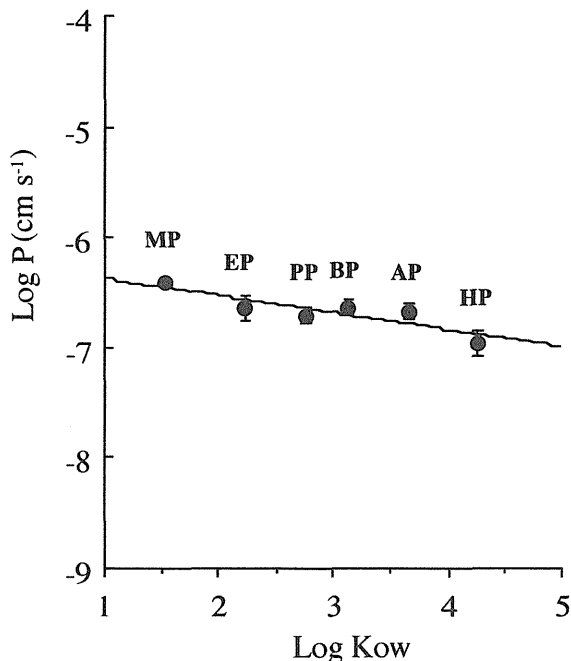


Fig. 6 Relationship between the permeability coefficient (P) and the octanol/water partition coefficient (Kow) of p-hydroxybenzoic acid esters
Each value represents the mean \pm S.E. (n=4).

第2節 薬物の爪甲透過性に及ぼすイオン解離の影響

薬物の爪甲透過性に及ぼす透過薬物のイオン解離の寄与を明らかにするため、モデル薬物として酸性薬物の安息香酸 (pKa 4.2) , 塩基性薬物のピリジン (pKa 5.2) および中性薬物のベンジルアルコールを、基剤として比較的高いイオン強度 (0.241 [pH 3.2] ~ 0.937 [pH 6.2]) をもつMcIlvaineの緩衝液 (1/10M クエン酸, 1/5M リン酸水素二ナトリウム) および低いイオン強度 (0.100 [pH 3.2] ~ 0.197 [pH 6.2]) をもつMichaelisの緩衝液 (1/10M 酢酸, 1/10M 酢酸ナトリウム) を用い、基剤のpH変化に伴う非解離型および解離型薬物の爪甲透過性について検討を行った。

Fig. 7に薬物の爪甲透過性に及ぼす基剤のpHと緩衝液の影響について示す。Fig. 7の左に示した安息香酸の爪甲透過性は、両緩衝液ともpHの上昇に伴い低下した。それとは反対に、Fig. 7の中央に示したピリジンの爪甲透過性は両緩衝液ともpHの上昇に伴い増加した。また、Fig. 7の右に示したベンジルアルコールの爪甲透過性は両緩衝液ともpHの変化に対してほとんど変化しなかった。さらに、Michaelisの緩衝液における安息香酸およびピリジンの爪甲透過性はMcIlvaineの緩衝液における安息香酸およびピリジンの爪甲透過性よりも基剤のpHの変化に対する著しい変動が認められた。

これらの結果を詳細に評価するため、分子型およびイオン型薬物の爪甲透過性をそれぞれ算出することにした。(3)式において膜厚(h)が一定であり、かつ、薬物の分子型濃度(C_{non})とイオン型濃度(C_{ion})を考慮すると、以下の(10)式で表わすことができる。

$$C_{tot} \cdot P_{tot} = C_{non} \cdot P_{non} + C_{ion} \cdot P_{ion} \quad \dots (10)$$

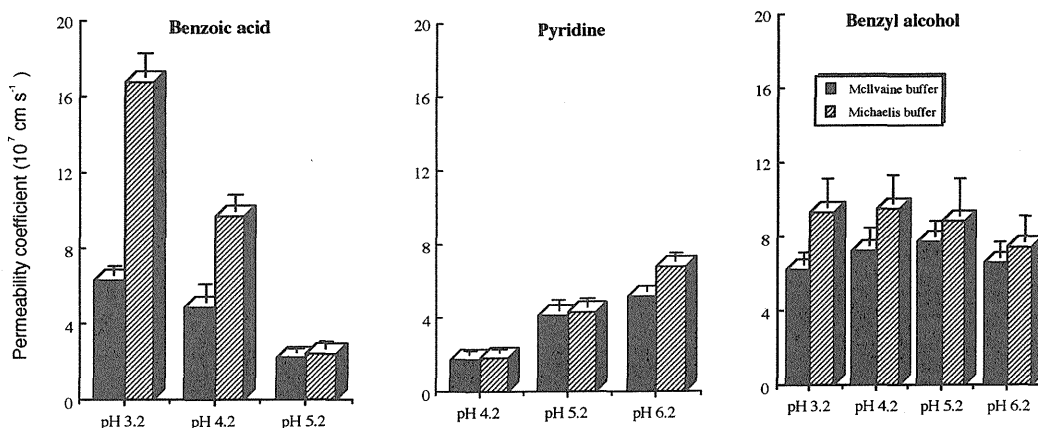


Fig. 7 Effect of the pH and the buffer on the permeability coefficient of benzoic acid, pyridine and benzyl alcohol through the human nail plate
Each value represents the mean \pm S.E. (n=3).

ここで、 C_{tot} は全体（分子型 + イオン型）の薬物濃度であり、また、 P_{non} と P_{ion} はそれぞれ分子型とイオン型薬物の爪甲透過係数、 P_{tot} は全体（分子型 + イオン型）の薬物の爪甲透過係数である。さらに、分子型濃度とイオン型濃度との関係は以下の (11) 式で表わされる。

$$\frac{C_{ion}}{C_{tot}} = 1 - \frac{C_{non}}{C_{tot}} \quad \dots (11)$$

また、これを (10) 式に代入し、整理すると以下の (12) 式が得られる。

$$P_{tot} = (P_{non} - P_{ion}) \frac{C_{non}}{C_{tot}} + P_{ion} \quad \dots (12)$$

この (12) 式に従って、安息香酸とピリジンの分子型分率 (C_{non}/C_{tot}) に対して各薬物の爪甲透過係数をプロットした (Fig. 8)。また、この得られた回帰直線から各薬物の分子型とイオン型の爪甲透過係数を算出した (Table 7)。全ての実験系において、分子型薬物の爪甲透過係数はイオン型薬物の爪甲透過係数に比べて高かった。また、分子型薬物とイオン型薬物の爪甲透過係数の比率は Michaelis 緩衝液の安息香酸で 21.25 倍と著しく高く、その他の実験系でも約 3~5 倍高かった。Walters らはミコナゾールのイオン解離がその爪甲透過性に対して影響しなかったことを論じている⁴⁶⁾。彼らは、pH の増加に伴いミコナゾールとエタノールの爪甲透過性が増加する傾向にあることから、分子型とイオン型の爪甲透過性の差は生じないと考察している。本実験に用いた McIlvaine の緩衝液は、Walters ら⁴⁶⁾ が用いた緩衝液と同様の組成であり、本研究の結果は彼らの結果と類似する傾向を示している。しかしながら、Mertin らは安息香酸およびピリジンのイオン解離がウシのヒズメ膜を介するそれらの透過速度を減少させると論じている³⁹⁾。Mertin ら³⁹⁾ が用いた緩衝液はイオン強度がすべて $\mu = 0.1$ と低く、本研究で得られた Michaelis 緩衝液を用いた安息香酸の

爪甲透過性の結果とほぼ同様であると考察される。彼らは、薬物のイオン解離によって生じた透過性の減少はドナンの膜平衡またはケラチン膜と拡散する分子との間の電氣的反発により生じると結論している。

以上より、分子型薬物の爪甲透過性はイオン型薬物の爪甲透過性よりも高く、さらに、薬物の爪甲透過性には適用溶液のイオン強度が影響する可能性が推定された。

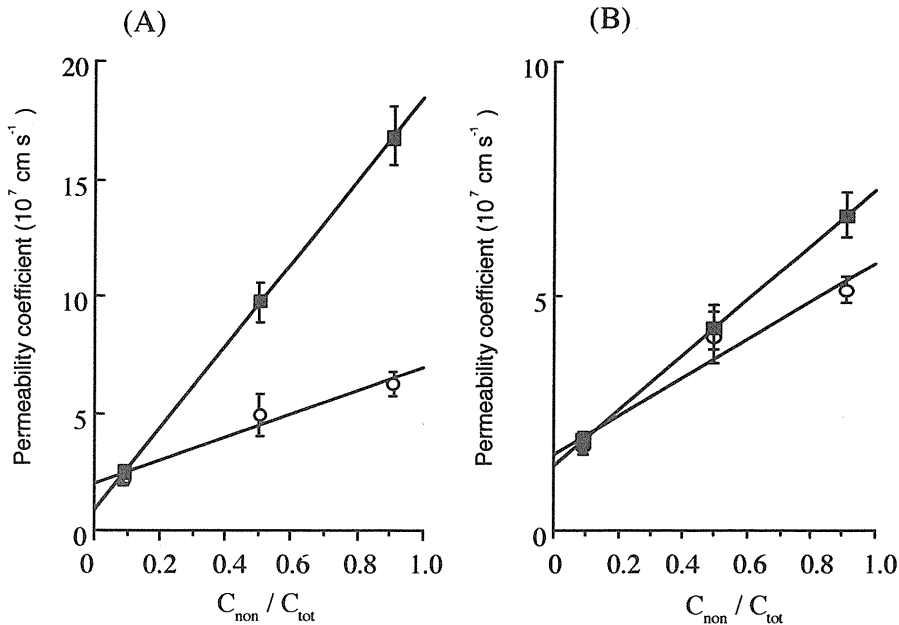


Fig. 8 Relationship between the ratio of non-ionic and total concentration (C_{non} / C_{tot}) and the permeability coefficient of benzoic acid (A) or pyridine (B) ■; Michaelis buffer, ○; McIlvaine buffer Each value represents the mean \pm S.E. (n=3).

Table 7 Permeability coefficients of ionic and non-ionic forms of benzoic acid and pyridine

Buffer	Benzoic acid		Pyridine	
	P_{non} ($\times 10^7 \text{ cm s}^{-1}$)	P_{ion} ($\times 10^7 \text{ cm s}^{-1}$)	P_{non} ($\times 10^7 \text{ cm s}^{-1}$)	P_{ion} ($\times 10^7 \text{ cm s}^{-1}$)
Michaelis buffer	18.462	0.869	7.261	1.343
McIlvaine buffer	6.912	1.995	5.718	1.627

第3節 薬物の爪甲透過性に及ぼす分子量の影響

本章の第1節にて、薬物の爪甲透過性は透過物質の親油性に依存しないことが明らかとなった。この研究結果から、(10)式中の係数(f)に0を代入することができる。(10)式の中へのf=0の代入は以下のようなシンプルな数式モデルを与える(13)式。

$$\log P = \log\left(\frac{D_0}{h}\right) - \beta' \cdot MW \quad \dots (13)$$

本節では、様々な薬物分子量をもつ数種のモデル薬物の爪甲透過性を検討した。一方、薬物の爪甲透過性に及ぼすイオン解離の影響が前節により明らかとなったことから、薬物の爪甲透過性に及ぼす分子量の影響を評価する際、分子型およびイオン型薬物を別々に評価することにした。

Table 8はこの研究に用いたモデル薬物のpKa, そのドナー溶液のpH, 薬物分子量およびその爪甲透過係数を示した。この透過実験において、ドナー溶液中のすべての薬物は分子型で存在している。また、これらのモデル薬物の分子量は20~236の範囲であり、240以上の分子量をもつ薬物の爪甲透過性はドナー溶液の低い薬物溶解度に伴った低い爪甲透過速度のため、測定できなかった。(13)式に従い、Fig. 9に種々分子型薬物の爪甲透過係数と分子量間の関係を示した。薬物の爪甲透過係数の対数値は透過物質の分子量の増加につれて減少した。モデル薬物の透過係数と分子量間に線形関係 ($r = -0.900, p < 0.01$) が存在し、その傾き (β') と切片 ($\log(D_0/h)$) はそれぞれ 0.00853 および -5.260であった。この知見から、薬物の爪甲透過性は透過物質の分子量, すなわち爪甲中の薬物拡散性に依存することが明らかになった。また、未知の分子型薬物の爪甲透過性はこの回帰直線 ($\log P_{\text{non}} = -0.00856 MW - 5.260$) と透過物質の分子量からおおよそ予測できるだろう。

Table 8 Physicochemical parameters and nail permeability coefficients ($h=400 \mu\text{m}$) of non-ionic model drugs

Drug	pKa	pH ^{a)}	MW	P _{non} ^{b)}
Deuterium oxide	-	7.81	20.0	45.52 ± 4.30
Ethanol	-	7.43	46.1	19.81 ± 2.21
Pyridine	5.19	7.35	79.1	6.36 ± 0.40
Benzoic acid	4.19	3.21	122.1	12.84 ± 0.05
5-Fluorouracil	8.0, 13.0	4.65	130.1	2.08 ± 0.13
Antipyrine	1.50	6.37	188.2	0.53 ± 0.07
Aminopyrine	5.00	8.44	232.3	0.09 ± 0.02
Lidocaine	7.92	10.21	234.3	0.39 ± 0.14
Isosorbide dinitrate	-	5.72	236.1	1.51 ± 0.29

Each value represents the mean ± S.E. (5-FU; n=30, other drugs n=3-4).

a) The pH in the donor solution. b) P_{non}; permeability coefficient ($\times 10^7 \text{ cm s}^{-1}$) of non-ionic drugs

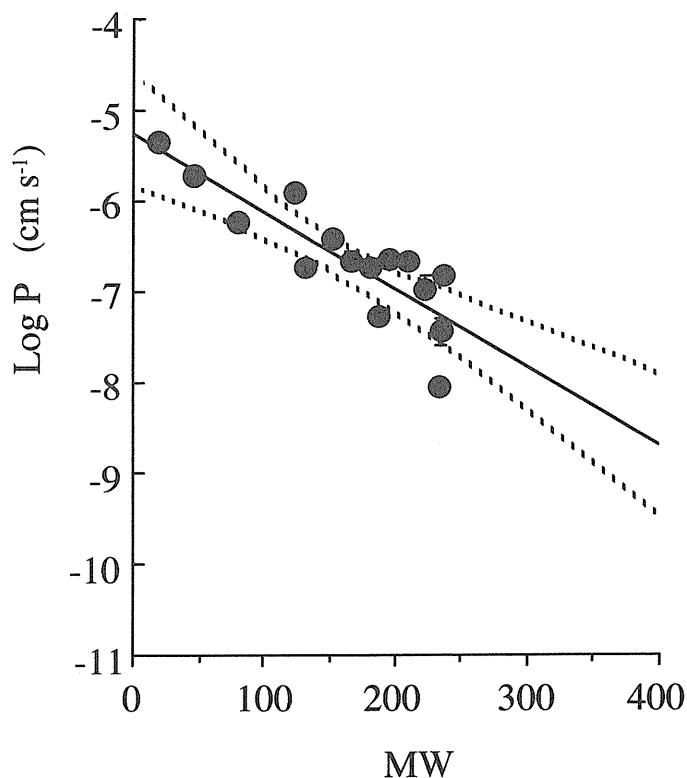


Fig. 9 Relationship between the permeability coefficient (P) and the molecular weight (MW) of non-ionic drugs

Each value represents the mean ± S.E. (5-FU; n=30, other drugs; n=3-4).

The dotted line shows 95% confidence interval of the regression line.

Table 9は他のモデル薬物のpKa, そのドナー溶液のpH, 分子量およびその爪甲透過係数を示した. そのモデル薬物群はドナー溶液中ではほぼイオン型で存在している. また, この透過実験で使用したそのイオン型の薬物分子量は120~312の範囲であった.

Fig. 10は適用基剤中でイオン型で存在する種々薬物の爪甲透過係数と分子量間の関係を示す. その爪甲透過係数の対数値は透過物質の分子量の増加に依存して, 減少した. また, このイオン型薬物群の透過係数と分子量間にも線形関係 ($r = -0.966$, $p < 0.01$) が存在し, その傾き (β') と切片 ($\log(D^0/h)$) はそれぞれ 0.01030 および -5.907 であった. 未知のイオン型薬物の爪甲透過性もまたこの回帰直線 ($\log P_{\text{ion}} = -0.01030MW - 5.907$) とイオン型の透過物質の分子量からおおよそ予測できるだろう.

酸性薬物である安息香酸の分子型の爪甲透過係数 (12.84×10^{-7} cm/s) はイオン型の爪甲透過係数 (0.91×10^{-7} cm/s) よりも約10倍以上高い結果となった. 一方, 塩基性薬物であるリドカインの分子型の爪甲透過係数 (39.31×10^{-9} cm/s) もまたそのイオン型の爪甲透過係数 (3.10×10^{-9} cm/s) よりも約10倍以上高い結果となった. 加えて, 分子型およびイオン型薬物の爪甲透過係数と分子量間の関係を示す回帰直線はFig. 10から明らかのように互いに平行であり, 分子型薬物の回帰直線はイオン型薬物の回帰直線と比較して約10倍高いポジションに位置した. これらの結果から, 薬物のイオン解離がその荷電 (酸/塩基) の違いによらず, 薬物の爪甲透過性の減少を導くことがわかった. これらの結果は薬物のイオンの水和による若干の見かけの分子量の増加 (約MW=100の増加) によって爪甲中の薬物拡散性が減少し, その透過性を低下に導くと推定された. 前節の知見から, 緩衝液は爪甲中の薬物拡散性に影響を与えると考えられるため⁴⁷⁾, 本検討には用いなかった. ω -dicarboxylic acidsの拡散性は完全なイオン化により約5%減少することが報告されている⁴⁸⁾. また, 同じ分子骨格をもつzwitterionic glycine や neutral glycolamideの拡散性の比較において, イオン化合物の拡散性は中性の化合物の拡散性よりも約10%小さいことも報告されている⁴⁹⁾. 薬物のイオン解離による爪甲透過性の減少はドナンの膜平衡または

Table 9 Physicochemical parameters and nail permeability coefficients (h=400 μm) of ionic model drugs

Drug	pKa	pH ^{a)}	MW ^{b)}	P _{ion} ^{c)}
Sodium benzoate	4.19	8.12	121.1	0.910 \pm 0.136
Sodium nicotinate	4.85	7.21	122.1	0.606 \pm 0.204
Barbital sodium	7.91	10.29	183.2	0.135 \pm 0.016
Mexiletin hydrochloride	9.0	4.87	179.3	0.202 \pm 0.057
Isoproterenol hydrochloride	8.57	4.06	211.2	0.084 \pm 0.013
Lidocaine hydrochloride	7.86	4.33	235.3	0.031 \pm 0.003
Procaine hydrochloride	8.8	5.27	237.3	0.110 \pm 0.016
Croconazole hydrochloride	6.0	1.96	311.8	0.017 \pm 0.009

Each value represents the mean \pm S.E. (n=4-6). a) The pH in the donor solution.

b) The molecular weight with an ionic form of the drug.

c) P_{ion}; permeability coefficient ($\times 10^7$ cm s⁻¹) of ionic drugs

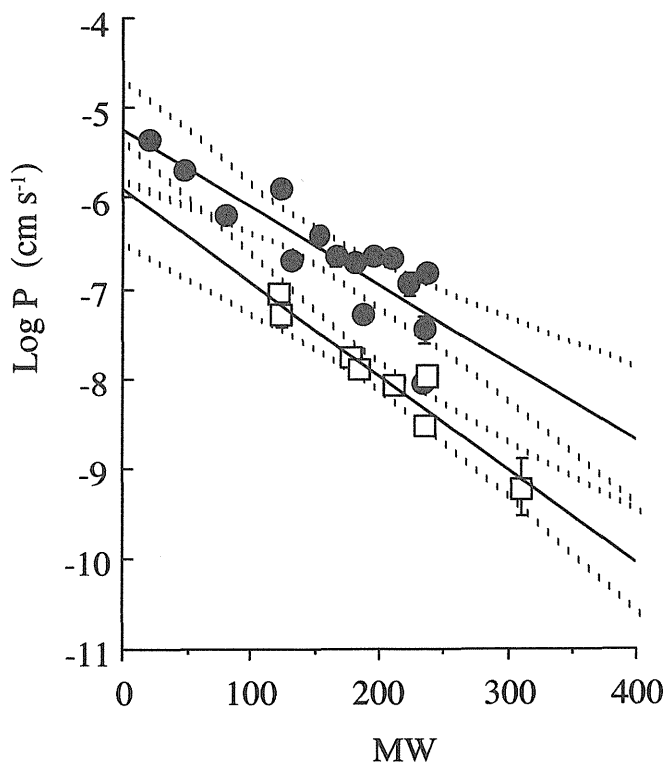


Fig. 10 Relationship between the permeability coefficient (P) and the molecular weight (MW) of ionic and non-ionic drugs

Each value represents the mean \pm S.E. (5-FU; n=30, other drugs; n=3-6).

The dotted line shows 95% confidence interval of the regression line.

(\square); ionic drugs, (\bullet); non-ionic drugs

爪甲ケラチンと透過物質との電気的反発が原因というよりはむしろ透過物質のイオンの水和による拡散性の減少によって生じると思われる。

ドナー溶液中で分子型薬物とイオン型薬物が共存するとき、その全体の爪甲透過性 (P_{tot}) は以下の (14) 式で計算できる。

$$P_{tot} = \frac{C_{non}}{C_{tot}} P_{non} + \frac{C_{ion}}{C_{tot}} P_{ion} \quad \dots (14)$$

したがって、(14) 式を用いることで薬物の解離度より全爪甲透過性を算出することができる。Table 10には本検討の結果から予測した数種の抗真菌剤の爪甲透過係数を示す。これらの抗真菌剤の分子型とイオン型の爪甲透過係数は抗真菌剤の分子量と本検討により得られた回帰直線 ($\log P_{non} = -0.00856 MW - 5.260$, $\log P_{ion} = -0.01030 MW - 5.907$) からそれぞれ計算した。さらに、pH 7.4の水溶液における抗真菌剤の爪甲透過係数もそのpKa値と(14)式を用いることで算出できた。従って、ドナー溶液中の濃度から未知の抗真菌剤の爪甲透過速度も計算できる⁵⁰⁾。また、その爪甲透過速度は薬物のイオン解離に伴う溶解度の増加によって促進させることも可能だろう。

Table 10 Prediction of nail permeability coefficient (h=400 μ m) of several antifungal drugs

Drug	MW	pKa	$P_{non}^{a)}$	$P_{ion}^{b)}$	$P_{T(7.4)}^{c)}$
Terbinafine	291.4	7.1	1.76×10^{-8}	1.23×10^{-9}	1.21×10^{-8}
Tolnaftate	307.4	-	1.28×10^{-8}	-	1.28×10^{-8}
Bifonazole	310.4	5.6	1.21×10^{-8}	7.87×10^{-10}	1.19×10^{-8}
Croconazole	310.7	6.0	1.20×10^{-8}	7.81×10^{-10}	1.16×10^{-8}
Butenafine	317.4	8.7	1.05×10^{-8}	6.66×10^{-10}	1.14×10^{-9}
Amorolfine	317.5	6.6	1.05×10^{-8}	6.65×10^{-10}	9.18×10^{-9}
Lanoconazole	319.8	4.6	1.01×10^{-8}	6.30×10^{-10}	1.00×10^{-8}
Griseofulvin	352.8	-	5.25×10^{-9}	-	5.25×10^{-9}
Sulconazole	397.7	5.8	2.17×10^{-9}	9.92×10^{-11}	2.12×10^{-9}
Itraconazole	705.6	3.7	5.01×10^{-12}	6.69×10^{-14}	5.01×10^{-12}

a) P_{non} ; permeability coefficient (cm s^{-1}) of a non-ionic form of antifungal drugs

b) P_{ion} ; permeability coefficient (cm s^{-1}) of an ionic form of antifungal drugs

c) $P_{T(7.4)}$; total permeability coefficient (cm s^{-1}) of antifungal drugs in pH 7.4 aqueous solution

第4節 正常および疾病爪甲を介する薬物透過の比較

ヒトは手指や足指に異なる厚さの爪甲をそれぞれ有している。健常人における爪甲の厚さとその爪甲を介する薬物の透過性との関係性を評価するため、水に比較的溶けやすく（水溶解度：17.1 mg/ml）、爪甲透過が容易に測定できる5-FUをモデル薬物として選択した。また、この透過実験においては、ドナー基剤中で5-FUを懸濁させた系ですべての検討を行った。

Fig. 11は正常（健常）爪甲の厚さ（h）とその5-FUの爪甲透過速度との関係を示す。250～1050 μm の厚さの爪甲を介する5-FUの透過速度は1～25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ の範囲であった。また、その5-FUの透過速度は爪甲厚の減少に伴って増加した。

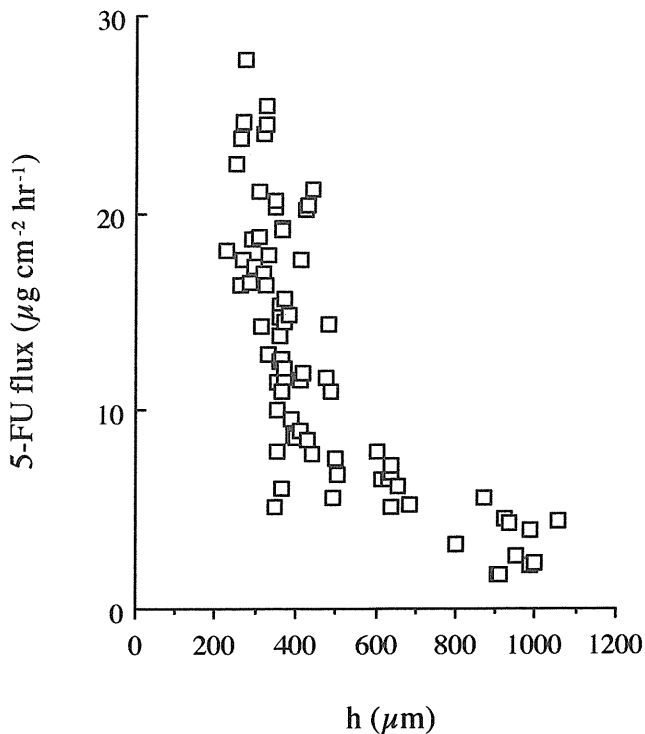


Fig. 11 Relationship between the 5-FU flux and the healthy nail plate thickness (h) (n=78)

8人の爪白癬患者の疾病（真菌）爪甲を介する5-FUの透過速度を測定した（Table 11）．さらに、その結果を健常人の正常爪甲を介する5-FUの透過速度と比較した（Fig.12）．疾病爪甲を介する5-FUの透過速度は $0.5\sim 15.5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であり、それらもまた正常爪甲と同様に爪甲厚の減少にて増加する傾向を示した．（2）式に従って、正常爪甲を介する5-FUの爪甲透過速度と爪甲厚の逆数間で線形関係（ $r = 0.796$, slope = $0.642\ \mu\text{g}/\text{cm}/\text{hr}$, intercept = $-3.38\ \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$, $p < 0.01$ ）が存在した． $800\sim 1200\ \mu\text{m}$ の厚い爪甲において、疾病爪甲を介する5-FUの透過速度は正常爪甲を介する5-FUの透過速度とほぼ同様であった．しかしながら、 $500\sim 700\ \mu\text{m}$ の薄い疾病爪甲を介する5-FUの透過速度は正常爪甲を介する5-FUの透過速度よりも若干高くなる傾向を示した．また、（3）式から算出できる正常および疾病爪甲の厚さと透過性との積（ $P \cdot h$ ）には有意な差が認められなかった．

さらに本検討において、重度な疾病爪甲は2つの理由により実験に使用できなかった．第一の理由は、爪甲表面の凸凹が激しく、その厚さを正確に測定できないことであり、第二の理由は、その表面の凸凹な爪甲は水中で崩れる恐れがあるからである．真菌による爪甲の構造破壊のために、重度な疾病爪甲における薬物の透過性は正常爪甲における薬物の透過性に比較して高い透過をもつ傾向を示すだろう．しかしながら、正常爪甲に比較して疾病爪甲、特にその最深の層(ventral nail plate)は肥厚することが一般的に知られている^{37, 51)}．従って、その相対的な疾病爪甲の透過速度は爪甲厚が若干増加することにより、その健常爪甲の透過速度に比較して低くなることも推測される．

前節において、正常爪甲を介する薬物の透過性は透過薬物の拡散性に依存することを明らかにした．本節において、爪甲厚の増加が正常爪甲の結果と同様に疾病爪甲の薬物透過速度の減少も導くことから、疾病爪甲を介する薬物透過も透過物質の拡散性に依存するだろう．本検討の結果として、正常爪甲または疾病爪甲を介する薬物透過性には有意な差が認められなかったことから、疾病爪甲を介する薬物透過性もまた正常爪甲透過性の結果から予測できることを示唆する．

Table 11 5-FU flux (J) through fungal nail plates from 8 patients

Patient number	Age/gender	h ^{a)}	J ^{b)}
1	—————	502	6.25
2	52/female	570	13.07
3	—————	626	15.41
4	38/male	665	9.67
5	42/female	820	5.93
6	—————	930	4.26
7	48/male	955	3.23
8	30/male	1158	0.51

a) h : nail thickness (μm)

b) J : flux ($\mu\text{g cm}^2 \text{hr}^{-1}$)

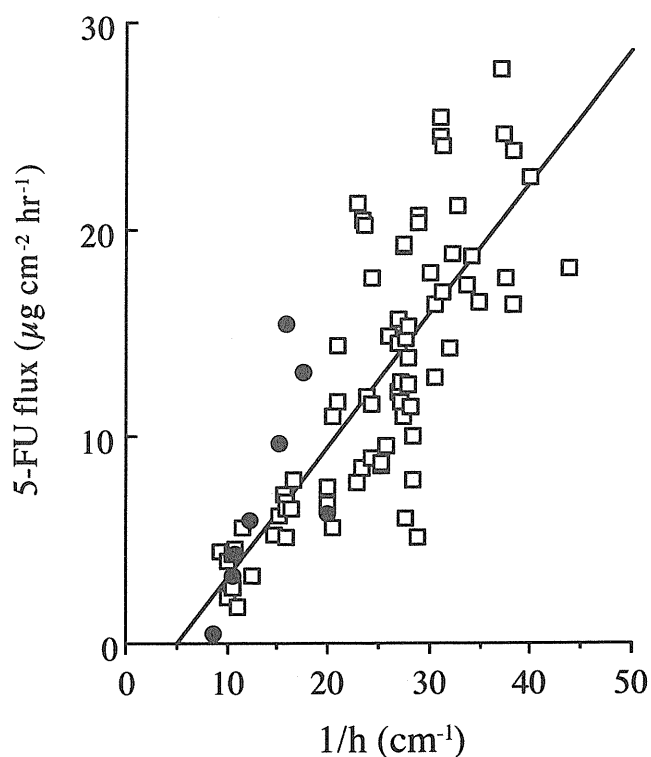


Fig. 12 Comparison between the healthy and the fungal plate fluxes of 5-FU (●); fungal nail plate (n=8), (□); healthy nail plate (n=78), h; nail plate thickness

第5節 本章の考察

本章において、薬物物性（親油性、解離度および分子量）と爪甲透過性との関連性を主に検討した。薬物のヒト爪甲透過性は透過物質の親油性（オクタノール／水分配係数）に対して依存しないが、透過物質の分子量の増加に対して著しく減少することが明らかとなった。また、透過物質のイオン解離は爪甲透過性の減少を導いた。この原因は透過物質のイオンの水和による見かけの薬物分子量の増加に伴った薬物拡散性の減少により生じると考えられた。また、そのイオン解離している薬物の爪甲透過性も透過物質の分子量の増加に対して減少する結果となった。これらの結果から、爪甲を介する薬物（抗真菌剤）の透過性および透過速度は透過物質の分子量、解離度、適用溶液の濃度、本検討から得られた分子型薬物とイオン型薬物の回帰直線（ $\log P_{\text{non}} = -0.00856 \text{ MW} - 5.260$, $\log P_{\text{ion}} = -0.01030 \text{ MW} - 5.907$ ）および(14)式を用いることで予測可能であることが明らかとなった。一方、正常および疾病爪甲を介する5-FUの透過の比較検討から、疾病爪甲を介する薬物透過性は正常爪甲と同様に透過薬物の拡散性に支配されており、正常爪甲を介する薬物透過性とほとんど変わらないことが明らかとなった。従って、種々抗真菌剤の適用濃度、基剤のpHおよびそのpKaがわかるならば、その疾病爪甲の透過速度は予測でき、その種々抗真菌剤の最小発育阻止濃度（MIC）等から爪白癬に対する各種抗真菌剤の治療係数も比較検討できると思われる。

第2編 薬物のヒト爪甲透過促進に関する検討

第1章 爪甲透過促進剤の探索⁵²⁾

有効な局所爪白癬治療を目的とする白癬菌感染部位への薬物（抗真菌剤）送達の改善は最大の課題であり，そのための爪甲透過促進剤の探索は非常に重要である．一般的に，透過促進剤は爪甲と相互作用するか，爪甲への薬物分配性を高めることにより薬物の透過促進作用を示すだろう．尿素⁵³⁾ やサリチル酸^{54, 55)} は爪甲や皮膚角質層のケラチンに作用し，角質を軟化させる働きがあり，爪白癬治療に対して尿素軟膏と抗真菌剤との併用が臨床的に有効であることも現在までに数多く報告されている⁵⁶⁻⁵⁸⁾．また，1-メントール・エタノール・水からなる多成分水性システム（MEW系）がヘアレスラットまたはヒト皮膚を介するモルヒネ⁵⁹⁾ や種々の心臓血管作用薬⁶⁰⁾ の透過を，乳酸，エタノール，ミリスチン酸イソプロピルからなる親油性多成分システム（LEI系）がヘアレスラット皮膚を介するケトチフェン^{61, 62)} および数種の薬物⁶³⁾ の透過を著しく促進することも報告されている．さらには，N-アセチル-L-システイン（AC）は爪甲中のオキシコナゾール濃度を上昇させることが臨床的な研究によって報告されている⁶⁴⁾．しかしながら，皮膚角質層の薬物拡散を促進するジメチルスルホキシドやイソプロピルアルコールが爪甲の薬物透過促進にほとんど寄与しなかったことも以前に研究されている⁶⁵⁾．

そこで本章では，爪甲の薬物透過を促進することが期待される数種の添加物または基剤のスクリーニングを行った．評価する添加剤として角質溶解剤（尿素とサリチル酸ナトリウム），新規経皮吸収促進剤（MEW系とLEI系），および硬ケラチンのジスルフィド結合に対する還元剤（ACおよび2-メルカプトエタノール；ME）を選択した．また，爪甲のバリア機能はその物性変化（膨潤や軟化）に関連すると思われるため，各適用基剤による爪甲の重量変化および硬度変化も合わせて検討した．なお，トルナフタート（TN）と5-フルオロウラシル（5-FU）はそれぞれ親油性と親水性のモデル薬物として用いた．

第1節 爪甲物性に及ぼす種々基剤の効果

種々基剤による爪甲の物性（膨潤と軟化）変化は爪甲を介する種々基剤からの薬物透過と比較するために検討した。Table 12はこの研究で使用した9種の基剤の構成を示す。実験開始時（0日目）に爪甲の重量および硬度のコントロール値を測定した後（Step 1），種々基剤中に爪甲切片を浸漬し，6日後の爪甲の重量および硬度を測定（Step 2）することで爪甲の重量変化率（ $W_{[\text{Step}2]}/W_{[\text{Step}1]}$ ）と硬度変化率（ $S_{[\text{Step}2]}/S_{[\text{Step}1]}$ ）を求めた。また，硬度の測定にはレオメータを用いて評価した⁶⁶⁾。

Fig. 13に種々基剤による6日後の爪甲重量および爪甲硬度の変化率を示す。コントロール基剤（水）による爪甲の物性変化は未処理の爪甲の重量および硬度の変化率に比較して，爪甲の重量変化率を約0.2ポイント増加し，その硬度変化率を約0.7ポイント減少した。また，水を含有するすべての基剤で，その爪甲の重量は増加し，その硬度は減少した。8M尿素（Urea）や40%サリチル酸ナトリウム（Na salicylate）水溶液はコントロール基剤（水）に比較して，爪甲重量の変化率を0.25～0.47ポイント増加させ，爪甲硬度の変化率を約0.06～0.10ポイント減少させた。対照的に，MEW系による爪甲の重量および硬度の変化はコントロール基剤による爪甲の重量および硬度の変化とほぼ同様であった。一方，爪甲のジスルフィド結合を還元する添加剤を含有した3%アセチルシステイン-40%エタノール-水システム（AEW系）および3%メルカプトエタノール-40%エタノール-水システム（MEEW系）は爪甲重量の変化率をそれぞれ約2.45および0.45ポイント増加させた。また，そのAEW系とMEEW系は爪甲硬度の変化率をそれぞれ約0.915および0.926ポイント減少させた。水を含有しないLEI系では未処理の爪甲切片と同様に，爪甲の重量および硬度をほとんど変化させなかった。また，ジスルフィド結合還元剤を含有する親油性基剤の0.5%アセチルシステイン-10%エタノール-ミリスチン酸イソプロピルシステム（AEI系）および3%メルカプトエタノール-10%エタノール-ミリスチン酸イソプロピルシステム（MEEI系）も爪甲の重量および硬度をほとんど変化させなかった。しかしながら，親水性基剤中の

Table 12 Solubilities of 5-FU and TN in each solvent system

Composition of solvent systems	5-FU(mg mL ⁻¹)	TN(μ g mL ⁻¹)
Water	17.1	0.391
MEW (3% l-menthol-40% ethanol-water)	19.6	373.8
AEW (3% acetylcysteine-40% ethanol-water)	20.2	118.1
MEEW (3% mercaptoethanol-40% ethanol-water)	24.6	107.1
LEI (1% lactic acid-10% ethanol-isopropyl myristate)	0.228	29610
AEI (0.5% acetylcysteine-10% ethanol-isopropyl myristate)	0.528	24681
MEEI (3% mercaptoethanol-10% ethanol-isopropyl myristate)	0.266	28009
Urea (8M urea)	5.11	0.853
Na salicylate (40% sodium salicylate)	38.4	39.82

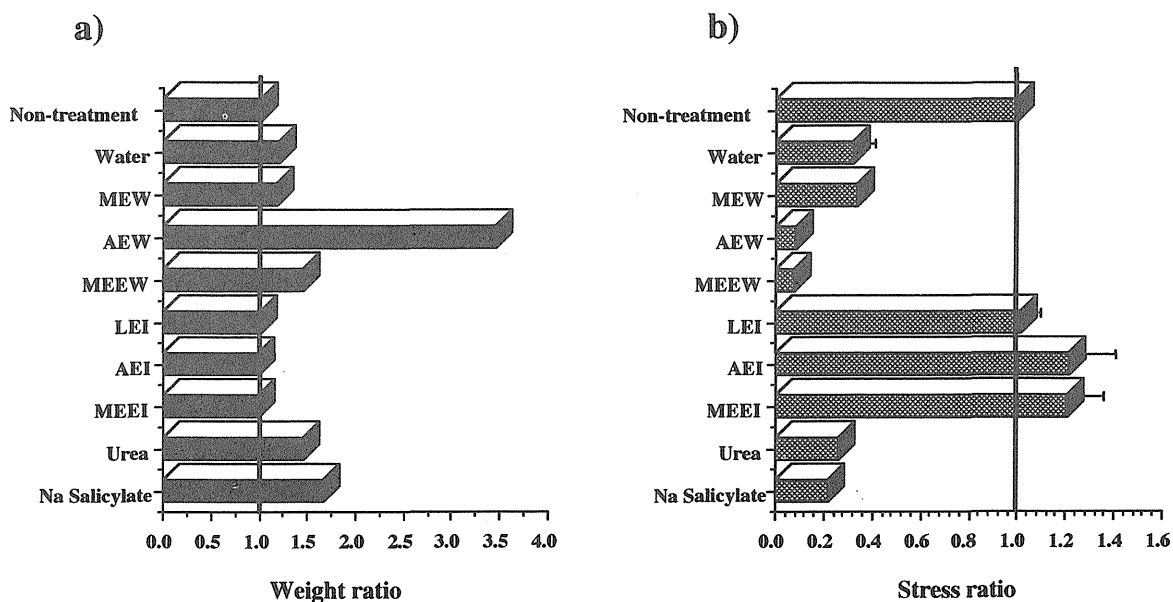


Fig. 13 Weight and stress ratios 6 days after treatment with several solvent systems
Each value represents the mean \pm S.E. (n=6).

ACとMEは爪甲物性に対して著しい影響を与えた。これらの結果から、水が爪甲物性を変化させるのに必要不可欠であると思われた。また、親水性基剤中の尿素、サリチル酸ナトリウム、ACおよびMEは爪甲ケラチンを変性させることにより、さらなる爪甲の物性変化をもたらすだろう。ところが、水を含有しない基剤（親油性基剤）では、爪甲ケラチンの変性は起こせないと考えられる。尿素とメルカプトエタノールは爪⁶⁷⁾ や羊毛⁶⁸⁾ からケラチンを抽出するのに利用できることが報告されている。ゆえに、これらの添加物はヒト爪甲を介する薬物透過を増加させる可能性があると考えられた。

第2節 種々基剤からの薬物の爪甲透過促進効果

本研究では、モデル薬物として親油性のトルナフタート (TN) と親水性の5-FUを用い、各基剤中にすべて懸濁状態で適用して透過実験を行った。従って、各ドナー基剤の熱力学的活量は最大であり、かつ等しい。拡散係数または活量係数の等しい場合、各基剤からの薬物透過速度はお互いに等しい。一方、透過係数はヒト爪甲の薬物の活量係数および基剤中の薬物溶解度の変化を反映する。したがって、膜中の薬物拡散性および膜への薬物分配性を評価することが可能である。

Table 12にこの研究で使用した9種の基剤構成とそれらの基剤における各薬物の溶解度を示す。本節の透過実験において、ドナー基剤はすべて懸濁液を使用した。Table 13に、ヒト爪甲を介する種々基剤からの5-FUおよびTNの定常状態の透過速度を示す。MEW系からの5-FUの爪甲透過速度はコントロール基剤（水）からの爪甲透過速度と比較してほとんど変わらなかった。また、角質溶解剤を含有した親水性基剤（Urea, Na salicylate）は爪甲物性を変化させたにもかかわらず、爪甲を介する5-FUの透過速度を反対に減少させた。一方、親油性基剤であるLEI系は爪甲を介する5-FUの透過を若干増加させる傾向を示した。本論文の第1編において、薬物のイオン解離が爪甲透過性を減少させる知見を得ている。酸性薬物の5-FU (pKa 8.0,

13.0) が角質溶解剤の水溶液中で懸濁するとき、爪甲中のpHはコントロール基剤 (pH 4.7) よりも、塩基性側 (Urea:pH 7.2, Na salicylate:pH 6.2) に傾くだろう。対照的に、LEI系による爪甲中のpHは、乳酸によってコントロール基剤よりも低くなることが予測される。ゆえに、爪甲中のpH変化がこれらの透過性の減少に対して説明可能であると思われる。尿素とピフォナゾールとの混合製剤が爪甲中へのピフォナゾールの浸透を有効に増加したことが報告されている⁶⁹⁾。もし、透過物質がピフォナゾールのような塩基性薬物であれば、尿素やサリチル酸ナトリウムの水溶液においてヒト爪甲を介する薬物透過を増加させるかもしれない。一方、ACまたはMEを含有した親水性基剤 (AEW系およびMEEW系) からの5-FUの爪甲透過速度はコントロール基剤からの5-FUの爪甲透過速度に比較して約13および16倍高かった。さらに、ACまたはMEを含有した親油性基剤 (AEEIおよびMEEI系) における5-FUの爪甲透過速度は、それぞれコントロール基剤における5-FUの爪甲透過速度よりも約6.7および8.4倍高かった。一方、AEW系、MEEW系、AEI系およびMEEI系からのTNの透過は測定できたが、他の基剤システムからのTNの爪甲透過は非常に低く測定できなかった。TNは5-FUに比較して高い薬物分子量と非常に低い水溶解度を有するため、低い爪甲透過性となることが推定される。ACまたはMEを含有した各種基剤からの爪甲を介するTNの透過速度は次のオーダーであった：AEI < MEEW < AEW < MEEI。従って、ACとMEは爪甲を介するTNの透過速度も増加することが示唆された。

Table 13 Effect of several solvent systems on the flux of 5-FU and TN through the human nail plate

Solvent system	5-FU($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	TN($\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)
Water	17.4 \pm 4.3	N.D. *
MEW	16.3 \pm 3.3	N.D.
AEW	228.8 \pm 52.3	0.137 \pm 0.080
MEEW	275.1 \pm 125.8	0.058 \pm 0.017
LEI	20.5 \pm 5.2	N.D.
AEI	116.4 \pm 6.8	0.053 \pm 0.009
MEEI	146.8 \pm 23	0.223 \pm 0.032
Urea	3.7 \pm 0.2	N.D.
Na salicylate	6.6 \pm 0.3	N.D.

* Not determined. Each value represents the mean \pm S.E. (n=3).

生体膜の薬物透過性を評価するにあたり、オクタノール/基剤分配係数 (K_{ov}) が膜/基剤分配係数の指標として広く用いられている。従って、TNと5-FUに関するオクタノール/基剤分配係数 (K_{ov}) の対数値と爪甲透過係数 (P) の対数値との関係を以下の図に表わした (Fig. 14)。TNは親水性基剤で高い爪甲透過係数を示したが、5-FUは、親油性基剤で高い爪甲透過係数を示した。ACまたはME含有の基剤はオクタノール/基剤分配係数に依存せず、5-FUおよびTNの爪甲透過性を増加させた。爪甲の脂質含量は皮膚角質層の脂質含量よりも非常に低いと言われている³⁵⁾。薬物の皮膚透過を増大させるトメントールやミリスチン酸イソプロピルのような親油性添加物は爪甲を介する薬物の透過性に対してほとんど影響しなかった。各基剤中のエタノールもまたWaltersらの研究結果と同様に爪甲を介する拡散を促進できなかった⁶⁵⁾。健常人の爪甲は常に水和し、水分の蒸散は $1.6\text{mg}/\text{cm}^2/\text{hr}$ と報告されている⁷⁰⁾。もし、爪甲が*in vitro*条件下のように随時膨潤しているならば、5-FUのような親水性薬物では高い熱力学的活量を保った親油性基剤を必要とするだろう。反対に、TNのような親油性薬物は親水性基剤が最良と考察される。

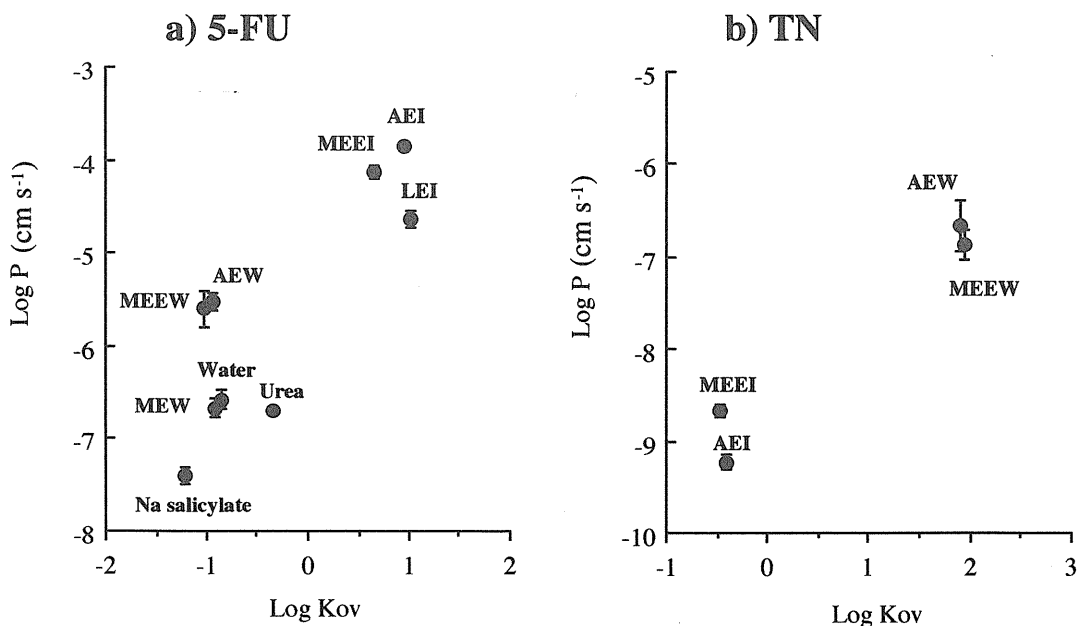


Fig. 14 Relationships between Log Kov and Log P of 5-FU and TN
Each value represents the mean \pm S.E. (n=3).

第3節 爪甲の物性および薬物の爪甲透過性に及ぼす促進剤濃度の影響

本節においては、異なったAC濃度による爪甲物性の変化と5-FUの爪甲透過速度との関係を調査した (Step2/Step1) . また、その爪甲の物性変化と薬物透過性の可逆性についても検討を行った. Fig. 15に示す透過実験スケジュール (i) に従って、Step2/Step1の爪甲透過速度の比は透過促進効果に関する指標として、Step3/Step1の爪甲透過速度の比は促進効果の消失に関する指標として用いた. また、Fig. 16は各AC濃度による6日目 (Step2/Step1) と12日目 (Step3/Step1) の爪甲重量の変化率と硬度の変化率を示す. 爪甲重量の変化率と硬度の変化率はAC濃度の増加に従って、それぞれ増加および減少した. 高濃度のAC (5%以上) において、爪甲重量の変化率はほとんど増加しなかった. また、爪甲硬度の変化率は低いAC濃度 (3%以下) によって著しい効果が観察された. Step2/Step1とStep3/Step1の比較から、若干の爪甲物性の可逆性は認められた. しかしながら、その爪甲重量の変化率および硬度の変化率はコントロール基剤 (水) による爪甲物性の変化率にもどらなかった. Fig. 17は異なったAC濃度による5-FUの爪甲透過速度の比を示す. Step2/Step1に関する5-FUの爪甲透過速度の比はAC濃度の上昇に伴って増加した. 特に、高濃度におけるStep3/Step1はStep2/Step1よりも若干低くなったことが観察されたが、そのStep3/Step1はStep2/Step1に類似した傾向を示した. この結果は、ACの促進効果の消失がほとんどなかったことを示唆するだろう. 還元されたジスル

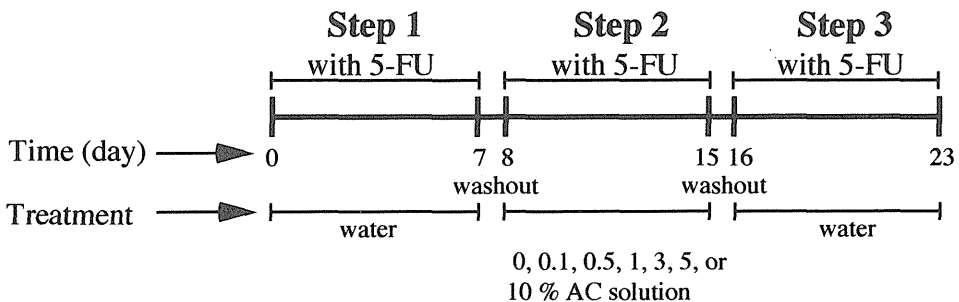


Fig. 15 Experimental schedule (i) for nail plate permeation study

フィド結合は空气中で再び酸化されることにより、物理化学的性質も元に復することが知られている。従って、爪甲のバリア機能が回復するまでには、多くの時間が必要なのかもしれない。3%ACの場合、水の透過速度はコントロールの透過速度よりも約3倍増加した (data not shown)。この結果もまた、爪甲中の薬物拡散をACによって増加できることを示唆している。

Fig. 18は爪甲重量の変化率または硬度の変化率と5-FUの透過速度の比との関係を示す。その爪甲透過速度は爪甲重量の増加と爪甲硬度の減少に伴って増加した。すなわち、ACによる5-FUの透過促進効果は爪甲切片の膨潤および軟化に密接に依存することが推定される。爪甲中のS-S結合の開裂により、おそらく爪甲の著しい膨潤と軟化は生じる。結果として、爪甲を介する薬物透過のバリア機能は低下するかもしれない。強固なジスルフィド結合をもつシスチンはヒトの角質化した爪甲に非常に多く含まれている。システインはヒト爪甲中のシスチンに対して還元作用をもっており、従って、ACはケラチンのS-S結合を開裂することができるだろう。その結合の開裂が爪甲重量の増加と爪甲硬度の減少に関連する。加えて、ヒト爪甲を介する薬物透過もまたジスルフィド結合が開裂した爪甲中の薬物拡散性の増加のために促進されることが明らかとなった。

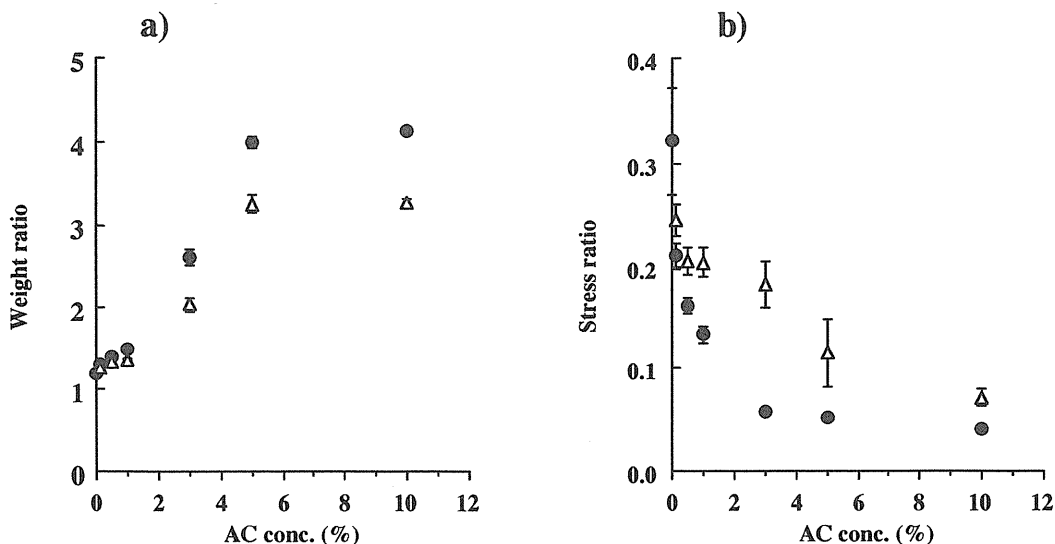


Fig. 16 Weight and stress ratios 6 days after treatment with a variety of AC concentrations
 ●; Step2/Step1, Δ; Step3/Step1
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3).

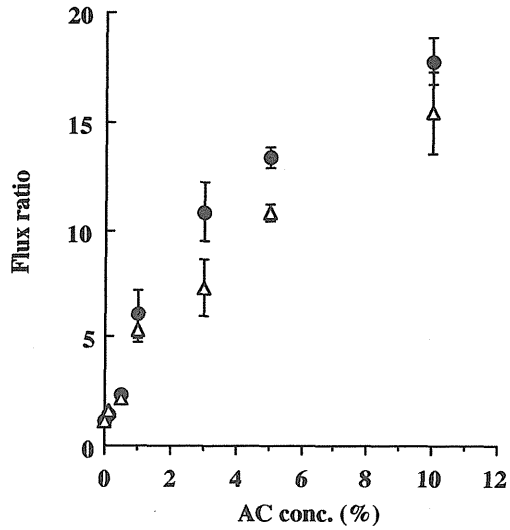


Fig. 17 Enhancing effect of various AC concentrations on the nail plate permeation of 5-FU
 ●; Step2/Step1, Δ; Step3/Step1
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3).

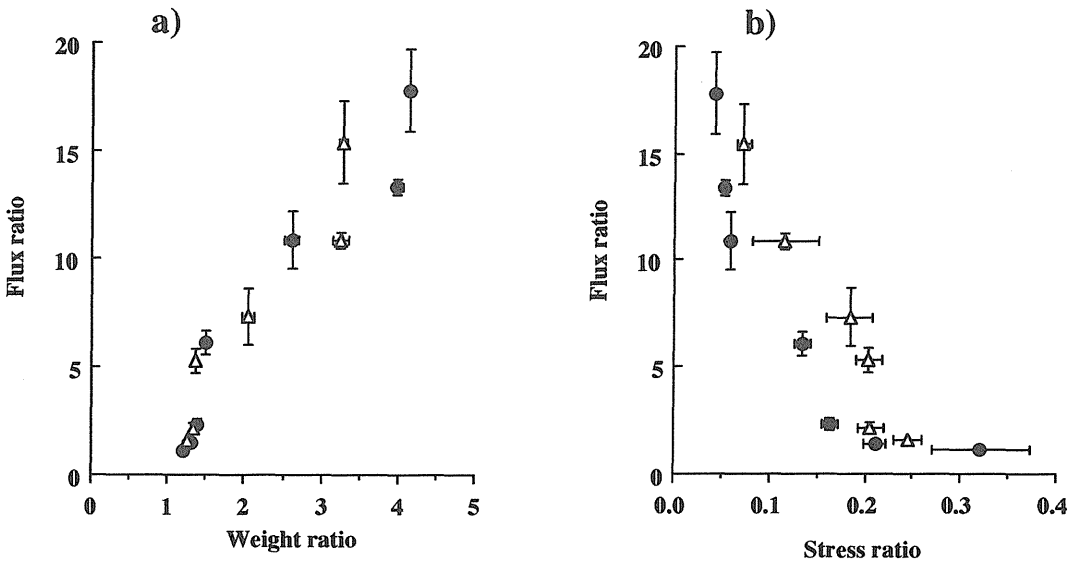


Fig. 18 Relationships between the weight ratio (a) or the stress ratio (b) and flux ratio of 5-FU
 ●; Step2/Step1, Δ; Step3/Step1
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-6).

第4節 本章の考察

本研究において、有効な局所爪白癬治療を目的とする白癬菌感染部位への薬物（抗真菌剤）送達の改善は最大の課題であり、そのための爪甲透過促進剤の探索は非常に重要である。そこで、本章では第1編の結果を基礎とし、爪甲の薬物透過を促進することが期待される数種の添加剤のスクリーニングを行った。また、爪甲の透過バリア機能はその物性変化（膨潤および軟化）に関連すると思われるため、各基剤による爪甲の重量および硬度変化もあわせて検討した。

すべての親水性基剤において、爪甲重量の増加と爪甲硬度の低下は観察された。特に、角質溶解剤およびジスルフィド結合還元剤を含有する親水性基剤においては、著しい爪甲の物性変化が認められた。しかしながら、親油性基剤において、爪甲の物性変化は認められなかった。一方、各基剤からの5-FUとTNの透過速度はACまたはMEを含有した基剤だけが著しい爪甲透過促進の効果を表わした。また、このAC濃度の増加につれて、5-FUの爪甲透過速度と爪甲の重量は増加し、爪甲の硬度は低下した。しかし、AC適用による爪甲の物性および透過の可逆性は認められなかった。

以上の結果から、薬物の爪甲透過促進作用を表わしたACとMEはおそらく爪甲中のジスルフィド結合を開裂させ、爪甲の膨潤および軟化を引き起こし、爪甲中の透過薬物の拡散性を増加させたものと考えられる。

第2章 爪甲透過促進剤の最適な適用条件設定

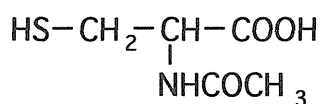
抗真菌剤による爪白癬の局所外用療法では、爪甲下層や爪甲下角質などの白癬菌の滞在している部位への薬物送達量が低いと考えられ、抗真菌剤の爪甲透過速度の向上が有効な爪白癬の局所療法には必要不可欠と思われる。すでに前章にて、爪甲透過促進剤に関するスクリーニングを行ない、*N*-アセチル-L-システイン (AC) と2-メルカプトエタノール (ME) が高い爪甲透過促進効果を表わすことを明らかにした。これらの添加物は、爪甲のジスルフィド結合を切断してケラチンを変性させ、薬物の爪甲透過促進作用を現したものであり、このジスルフィド結合の切断はACやMEのジスルフィドリル基による置換反応を利用したものである。従って、他にもジスルフィド結合を切断させる方法として、過ギ酸または過酢酸等の酸化剤の利用も考えられる⁶⁷⁾。これらの酸化剤を利用することで薬物の爪甲透過促進効果は期待できるが、製剤設計上の取り扱いおよび毒性等を考慮すれば、透過促進剤として適さないと思われる。従って、これらの点を考慮すると、医薬品添加物として認可されているジスルフィド結合の還元剤を中心に促進剤として選出することが最善の方法と思われる。

本章では、薬物の爪甲透過性に及ぼす種々促進剤の効果、種々薬物の爪甲透過性に及ぼす促進剤の効果、並びに薬物と促進剤の同時適用系による爪甲透過性への影響についてジスルフィド結合還元剤を促進剤として用いて検討し、有効な爪白癬の局所製剤設計を目的とした促進剤の最適な適用条件の設定に関して考察する。

第1節 薬物の爪甲透過性に及ぼす種々促進剤の効果

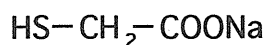
本節では、前章において薬物の爪甲透過促進効果を有する*N*-アセチル-L-システイン (AC) および2-メルカプトエタノール (ME) に加え、医薬品添加物として認可されているチオグリコール酸ナトリウム (TG) およびシステアミン (CA) に関する薬物の爪甲透過促進効果について検討した。Fig. 19 にこれら4種類のジスルフィド結合を還元すると考えられる添加物の構造式と分子量を示す。各添加物の分子量はCA (MW = 77.14) およびME (MW = 78.13) が非常に小さく、AC (MW = 163.19) が一番大きかった。本節の透過実験においてモデル薬物として5-FUを使用し、ドナー基剤中に懸濁状態で適用して評価した。また、各5%の添加物溶液を5日間前処理するFig. 20に示す実験スケジュール(ii)に従い、薬物の爪甲透過促進効果を評価した。

適用した添加物溶液の pH は AC で 1.5, TG で 5.7, CA で 10.4, MEで4.4であった。種々添加物溶液による5-FUの爪甲透過促進効果を Fig. 21 に示す。すべての添加物において、5-FUの爪甲透過促進効果が認められた。それらの中でも、CAに



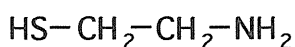
MW 163.19

N-Acetyl-L-cysteine (AC)



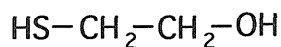
MW 114.11

Sodium thioglycolate (TG)



MW 77.14

Cysteamine (CA)



MW 78.13

2-Mercaptoethanol (ME)

Fig. 19 Structure and molecular weight of enhancer used in this experiment

よる5-FUの爪甲透過促進効果が一番高く、TGによる5-FUの爪甲透過促進効果は一番低かった。また、各添加物における5-FUの爪甲透過促進率のオーダーはCA>ME>AC>TGの順であった。

5%TG溶液の前処理系における5-FUの爪甲透過促進率が他の添加物による5-FUの爪甲透過促進率よりも低かった原因として、適用基剤中でのTGのカルボキシル基のイオン解離の影響が推測された。すなわち、第1編の結果からも明らかのように、添加物のイオン解離もその添加物自身の爪甲中への浸透（透過）を低下させ、爪甲中のジスルフィド結合との反応性も低下したと考えられた。一方、5%ACの前処理系による5-FUの爪甲透過促進率は、ACの分子量がCAおよびMEの分子量と比較して大きいいため、AC自身の爪甲中の拡散性が若干低下し、爪甲中のジスルフィド結合との反応性も低下したと考えられた。反対に、5%CAおよびMEの前処理系による5-FUの爪甲透過促進率が高かった理由の1つとして、これらの添加物の分子量が非常に小さかったことが挙げられる。また、5%MEの前処理系による5-FUの爪甲透過促進率に比べて、5%CAの前処理系が若干5-FUの爪甲透過促進率を増加させた原因として、CA基剤のpHがかなり塩基性側（pH=10.4）にシフトしていたことが挙げられる。すなわち、ジスルフィド結合と添加物のR-SH基との置換反応においてR-S⁻イオンが還元反応の活性種なので反応系のpHは7以上が最適であることがこのような現象を生じさせた理由と推察された。これらの四つの添加物の促進効果の違いは添加物自身の分子量、イオン解離状態および基剤のpHに伴った爪甲中のジスルフィド結合との還元反応活性に関連すると思われ、それらの条件を満たす添加物または基剤の選択が必要と思われる。

以上の結果から、CAはこれらの条件を他の添加物よりも多く満たし、そのために高い薬物の爪甲透過促進効果を示すことが明らかとなった。

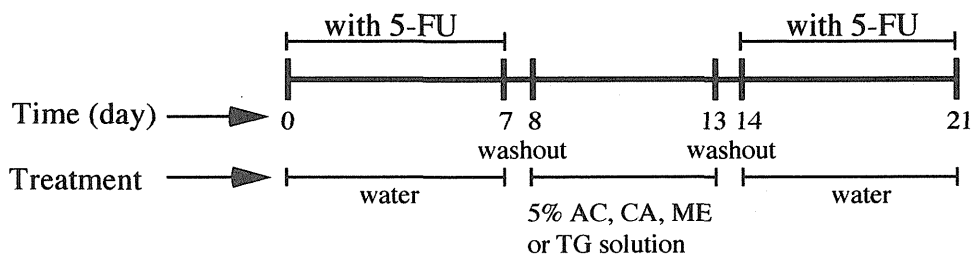


Fig. 20 Experimental schedule (ii) for nail plate permeation study

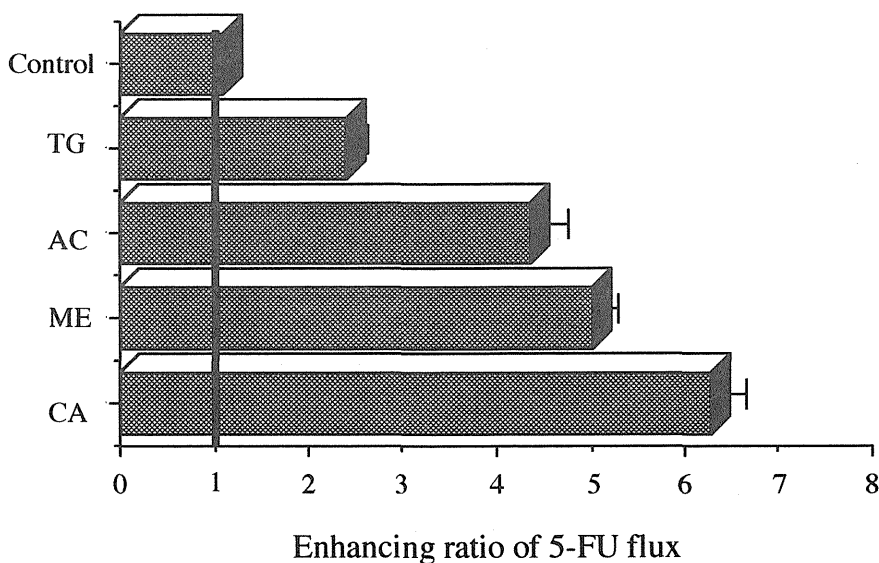


Fig. 21 Enhancing effect of 5% TG, AC, ME and CA on the flux of 5-FU through the human nail plate
Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-4).

第2節 種々薬物の爪甲透過性に及ぼす促進剤の効果

第1節において、CAが4種の促進剤の中で一番高い薬物の爪甲透過促進効果を示すことを明らかにした。この結果より、本節ではCAを用いて種々薬物の爪甲透過促進効果について検討し、その結果から数種の抗真菌剤の爪甲透過促進率について予測することも試みた。実験はFig. 22に示した実験スケジュール (iii) に従って、5% CAで5日間前処理した爪甲を介する種々薬物の透過性を測定し、第1編で得られたコントロール基剤（水）からの薬物透過性の結果（Table 8）と比較検討をした。なお、第1編では9種のモデル薬物の透過データに加え、p-ヒドロキシ安息香酸エステルの透過データを合わせて評価を行なったが、本節では、9種のモデル薬物のみで評価を行うことにした。

Table 14 にこの研究で用いた9種のモデル薬物の分子量、未処理の爪甲を介する薬物の透過係数 (P_{con})、5% CAで5日間前処理した爪甲を介する薬物の透過係数 (P_{CA}) および未処理の爪甲と5% CA前処理した爪甲を介する薬物の透過性の促進率 ($ER = P_{CA} / P_{con}$) を示した。5% CAで5日間前処理した爪甲を介する種々薬物の透過性は未処理の爪甲を介する種々薬物の透過性に比較して高く、その爪甲透過性の各促進率は約1.5~20倍であった。第1編の結果では、薬物の爪甲透過性が透過物質の分子量に依存することから、薬物の分子量と爪甲透過係数の対数値との関係について調査した (Fig. 23)。第1編でも考察したように、未処理の爪甲を介する9種の

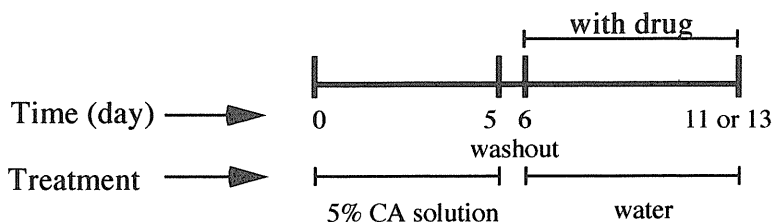


Fig. 22 Experimental schedule (iii) for nail plate permeation study

Table 14 Nail permeability coefficients (h=400 μm) of model drugs with 5% CA

Drug	MW	$P_{\text{con}}^{\text{a)}}$	$P_{\text{CA}}^{\text{b)}}$	ER ^{c)}
Deuterium oxide	20.0	45.52 \pm 4.30	73.91 \pm 5.16	1.62
Ethanol	46.1	19.81 \pm 2.21	47.00 \pm 1.14	2.37
Pyridine	79.1	6.36 \pm 0.40	18.70 \pm 3.27	2.94
Benzoic acid	122.1	12.84 \pm 0.05	28.58 \pm 4.01	2.22
5-Fluorouracil	130.1	2.08 \pm 0.13	14.46 \pm 2.26	6.93
Antipyrine	188.2	0.53 \pm 0.07	46.71 \pm 0.95	8.63
Aminopyrine	232.3	0.09 \pm 0.02	1.65 \pm 0.32	18.48
Lidocaine	234.3	0.39 \pm 0.14	5.33 \pm 1.33	13.57
Isosorbide dinitrate	236.1	1.51 \pm 0.29	12.30 \pm 1.32	8.16

^{a)} P_{con} ; permeability coefficient ($\times 10^7 \text{ cm s}^{-1}$) of drugs without 5% CA

^{b)} P_{CA} ; permeability coefficient ($\times 10^7 \text{ cm s}^{-1}$) of drugs with 5% CA

^{c)} ER ; enhancing ratio of permeability coefficient ($P_{\text{CA}}/P_{\text{con}}$)

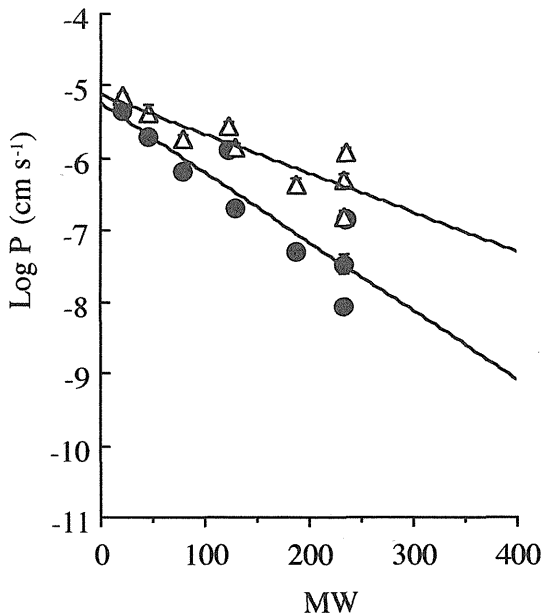


Fig. 23 Enhancing effect of 5% CA on the nail permeability of several drugs
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-6)
 (●); non-treatment, (Δ); pretreatment with 5% CA

モデル薬物の爪甲透過係数と分子量間で線形関係 ($r = -0.900, p < 0.01$) が存在し、その傾き (β') と切片 ($\log(D^0/h)$) はそれぞれ 0.00963 および -5.232 であった。また、5%CAで前処理した爪甲を介する薬物の透過係数と分子量間でも線形関係 ($r = -0.863, p < 0.01$) が存在し、その傾き (β') と切片 ($\log(D^0/h)$) はそれぞれ 0.00542 および -5.120 であった。この結果から、5%CAで前処理した爪甲を介する薬物の爪甲透過性もまた透過物質の分子量、すなわち、透過物質の拡散性に依存することが明らかとなった。また、5%CAで前処理した爪甲を介する未知薬物（抗真菌剤）の爪甲透過性はこの回帰直線 ($\log P_{CA} = 0.00542MW - 5.120$) と透過物質の分子量からおおよそ予測できると思われる。一方、Fig. 23 から2つの回帰直線の切片がほぼ同様の値を示すが、それらの回帰直線の包配は約1.8倍異なる。これは、CAで前処理した爪甲を介する薬物の透過係数が未処理の爪甲を介する薬物透過係数に比べて高い値を有し、なおかつ、透過物質の分子量の増加に伴い2つの実験系による薬物の爪甲透過性の差が増大することを示している。そこで、透過物質の分

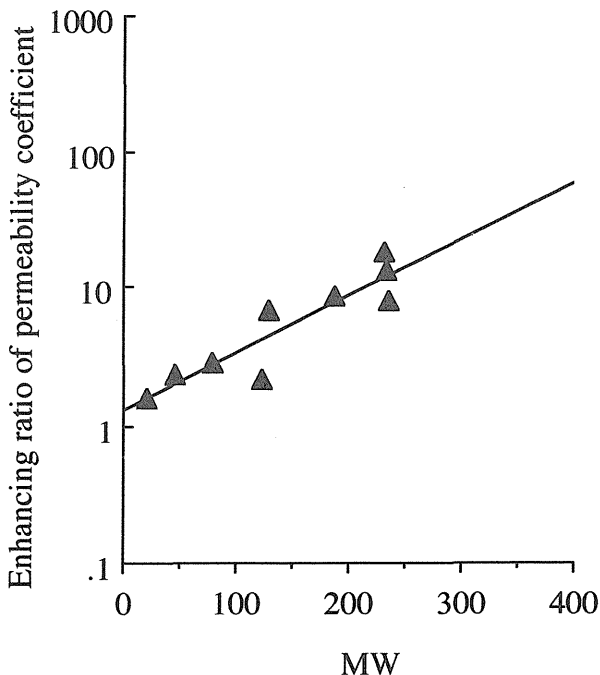


Fig. 24 Relationship between the enhancing ratio of permeability coefficient (P) and the molecular weight (MW) of the drug with 5% CA.

分子量と5%CAで前処理した爪甲を介する薬物の爪甲透過性の促進率との関係をFig. 24に示した。薬物の分子量と爪甲透過性の促進率の対数値との間にも線形関係 ($r = -0.915, p < 0.01$) が存在し、その回帰直線は $\log(P_{CA}/P_{con}) = 0.00413 MW + 0.1294$ であった。この結果より、5%CAで前処理した爪甲を介する未知薬物（抗真菌剤）の爪甲透過性の促進率（ER）もまたこの回帰直線からおおよそ予測できるだろう。Table 15に本検討から予測した数種の抗真菌剤の爪甲透過係数とその爪甲透過性の促進率を示す。未処理または5%CAで前処理した爪甲を介する種々抗真菌剤の透過係数とその透過性の促進率（ER）は抗真菌剤の分子量と本検討から得た回帰直線 ($\log P_{con} = -0.00963 MW - 5.232, \log P_{CA} = 0.00542 MW - 5.120, \log(P_{CA}/P_{con}) = 0.00413 MW + 0.1294$) をそれぞれ用いて算出した。これらの結果から、300～400の薬物分子量をもつ抗真菌剤では約20～60倍の爪甲透過性の促進率を有するものと予測できた。また、非常に高い薬物分子量をもつイトラコナゾールでは、1110倍もの著しい爪甲透過性の促進率が得られると予測された。

以上の結果より、5%CAで5日間前処理した爪甲を介する薬物の透過性もまた透過物質の分子量に対して依存し、その爪甲を介する未知薬物（抗真菌剤）の透過性およびその促進率もまたその透過物質の分子量と本検討の結果から得られた回帰直線を用いて予測可能であることが明らかとなった。

Table 15 Prediction of nail permeability coefficient ($h=400 \mu\text{m}$) of several antifungal drugs with 5% CA

Drug	MW	$P_{con}^a)$	$P_{CA}^b)$	ER ^{c)}
Terbinafine	291.4	9.17×10^{-9}	2.00×10^{-7}	21.56
Tolnaftate	307.4	6.43×10^{-9}	1.64×10^{-7}	25.10
Bifonazole	310.4	6.02×10^{-9}	1.58×10^{-7}	25.83
Croconazole	310.7	5.98×10^{-9}	1.58×10^{-7}	25.90
Butenafine	317.4	5.15×10^{-9}	1.45×10^{-7}	27.61
Amorolfine	317.5	5.14×10^{-9}	1.45×10^{-7}	27.63
Lanconazole	319.8	4.88×10^{-9}	1.41×10^{-7}	28.24
Griseofulvin	352.8	2.35×10^{-9}	9.32×10^{-8}	38.66
Sulconazole	397.7	8.69×10^{-10}	5.32×10^{-8}	59.27
Itraconazole	705.6	9.43×10^{-13}	1.14×10^{-9}	1109.66

^{a)} P_{con} ; permeability coefficient (cm s^{-1}) of antifungal drugs without 5% CA

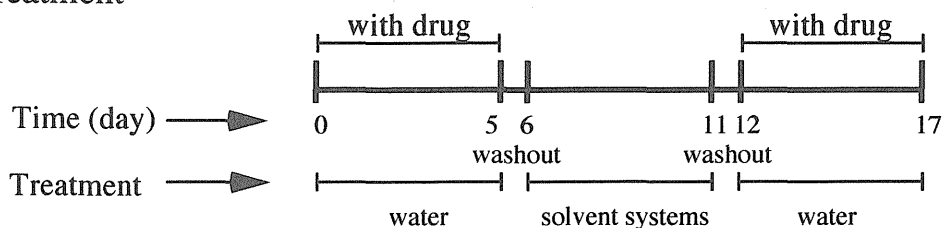
^{b)} P_{CA} ; permeability coefficient (cm s^{-1}) of antifungal drugs with 5% CA

^{c)} ER ; enhancing ratio of permeability coefficient (P_{CA}/P_{con})

第3節 薬物と促進剤の同時適用基剤による爪甲透過促進効果

爪甲透過促進剤を評価するにあたり、促進剤添加によって生じる基剤のpH変動が薬物の爪甲透過促進効果に影響を与える可能性が考えられる。そこで前節までは、各促進剤の前処理系により薬物の爪甲透過促進効果についてそれぞれ評価してきたが、本節では、促進剤と薬物を基剤中に同時適用した系による薬物の爪甲透過促進効果を検討した。また、抗真菌剤は塩基性薬物が非常に多いことから、本検討においてはピリジンをモデル薬物として用い、先に使用した酸性の促進剤のACと塩基性の促進剤のCAによる爪甲透過促進効果を中心に検討した。加えて、適用基剤のpHを変化させるための添加物として乳酸(LA)とエタノールアミン(EA)を用いた。なお、ドナー基剤中のピリジンは一定の濃度(1000 µg/ml)で適用した。透過実験はFig.25に示すスケジュールに従って前処理系と同時適用系の2つの実験系を用い、ピリジンの爪甲透過促進率について比較検討を行った。

Pretreatment



Simultaneous use

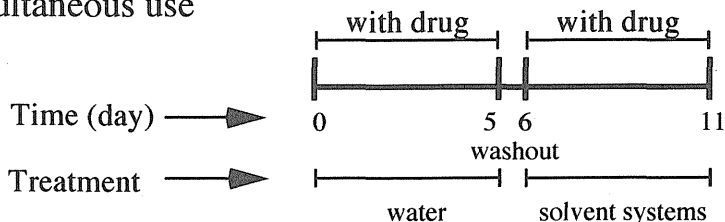


Fig. 25 Experimental schedule (iv) for nail plate permeation study

Fig. 26 に前処理系および同時適用系による種々基剤からのピリジンの爪甲透過促進率について示す。前処理系において、すべての基剤でピリジンの爪甲透過は促進された。また、高濃度（5%）のCAおよびACの前処理系で、高いピリジンの爪甲透過促進効果が認められた。さらに、CAの前処理系によるピリジンの爪甲透過促進率はACの前処理系によるピリジンの爪甲透過促進率に比べ高く、この結果は第1節で得られた結果とも一致した。また、1%CAと1%LAを併用した基剤による前処理系では1%CA単独系に比べてピリジンの透過促進率は減少した。この結果からも、第1節におけるCA前処理による5-FUの爪甲透過促進率がME前処理による5-FUの爪甲透過促進率よりも高かった原因に基剤pHが関与していることを証明している。一方、ピリジンとCAの同時適用系による爪甲透過促進率は前処理系による爪甲透過促進率とほぼ同様であった。しかし、ピリジンとACの同時適用系による爪甲透過促進率は前処理系による爪甲透過促進率と異なり、同時適用系によるピリジンの爪甲透過

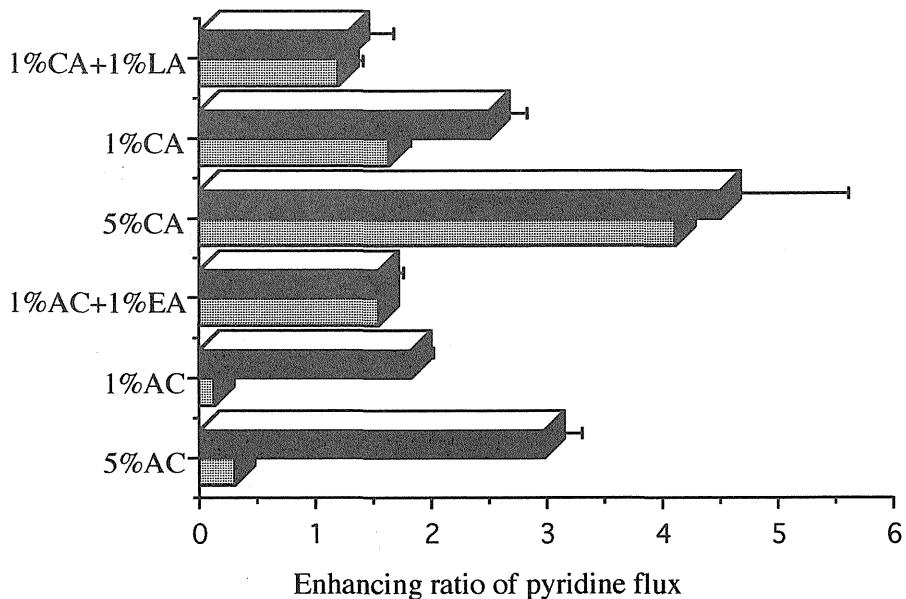


Fig.26 Enhancing effect of several additives on the flux of pyridine through the human nail plate

Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-4).

(■) ; pretreatment with additives, (▨) ; simultaneous use of pyridine and additives

促進率は前処理系による爪甲透過促進率よりも約10倍減少した。ピリジンとCAの同時適用系による適用基剤のpHは塩基性（約10.4）であるために、ピリジン（ $pK_a = 5.2$ ）は分子型で存在するのに対して、ACとの同時適用系による適用基剤のpHは酸性（約2.0）であるために、ピリジンはほとんどイオン型で存在する。その結果、ピリジンの爪甲透過が著しく減少したと考えられる。すなわち、ACと爪甲中のジスルフィド結合との還元作用による薬物の透過促進作用よりもAC添加による基剤のpH変動に伴ったピリジンのイオン解離による爪甲透過性の減少の寄与が大きかったと考察される。一方、ACとEAの同時適用系（ $pH=9.5$ ）ではEAの緩衝作用のためにピリジンの透過促進効果は得られ、それはACの前処理系によるピリジンの透過促進率とほぼ同じ促進率を示した。以上の結果より、薬物と促進剤を同時適用する通常系において、基剤のpHは薬物の爪甲透過性を左右する非常に重要な因子であり、高い爪甲透過性を得るためには基剤中で適用薬物を極力分子型で存在させ、促進剤と併用させる必要があることが明らかとなった。

さらに、親油性基剤による薬物と促進剤の同時適用基剤による爪甲透過促進効果についても若干の検討を加えた。本検討において、オクタノールを親油性基剤として用いた。CAとACの前処理系において、ピリジンの爪甲透過促進効果は認められ、親水性基剤の結果と同様にACに比べてCAの方が高いピリジンの透過促進率を認めた（Fig. 27）。一方、CAとピリジンの同時適用系による爪甲透過促進率はその前処理系とほぼ同程度の促進率を認めたが、ACとピリジンの同時適用系では爪甲透過促進効果は認められなかった。しかしながら、親水性基剤と比較して、顕著な爪甲透過速度の減少は生じなかった。結果として、親油性基剤からの薬物透過の評価においては、爪甲の水和や各添加物による適用基剤の親油性度の変化による種々要因が存在するため、さらなる多くの検討が必要と考えられた。

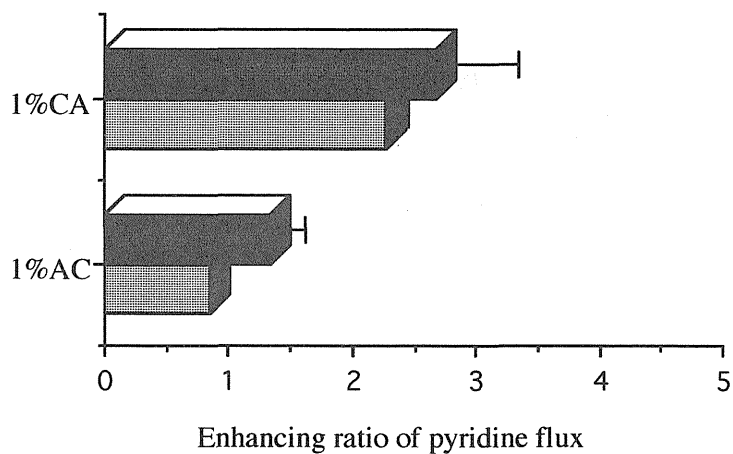


Fig.27 Enhancing effect of several additives on the flux of pyridine through the human nail plate
 Each value represents the mean \pm S.E. (n=3-4).
 (■) ; pretreatment with additives, (▨) ; simultaneous use of pyridine and additives

第4節 本章の考察

本章では前節で高い爪甲透過促進効果が認められたジスルフィド結合還元剤を用い、最適な爪甲透過促進剤の適用条件に関して検討した。

4種のジスルフィド結合還元剤（AC, ME, CA, TG）の5%水溶液による前処理系において、5-FUの爪甲透過はすべての基剤で促進された。特に低分子量であるMEやCAの促進効果は高く、水溶液中でイオン解離しているTGの促進効果は最も低い結果となった。また、4種の還元剤の中で一番5-FUの爪甲透過を促進した5%CAの前処理系による薬物の爪甲透過性の促進率は透過物質の分子量の増加に依存して増加する傾向を示し、300~400の薬物分子量をもつ抗真菌剤では約20~60倍の透過性の促進率を有するものと予測された。一方、薬物と促進剤の同時適用系による爪甲透過性の調査において、ピリジン（ $pK_a=5.2$ ）の爪甲透過性はACの前処理系により増加したが、ACとの同時適用系では、その爪甲透過性は増加せず、反対に減少した。この現象はAC適用により、基剤のpHが酸性側にシフトし、基剤中のほとんどのピリジンがイオン型に変化したことで説明可能であった。すなわち、ACの促進作用よりもピリジンのイオン解離による透過性の減少の寄与が大きかったとも考察される。従って、CAとの同時適用系（ $pH=10.4$ ）では、ピリジンのイオン解離は生じないために透過促進効果は顕著に現われ、ACとエタノールアミンを併用した基剤（ $pH=9.5$ ）では、エタノールアミンの緩衝作用のためにピリジンの透過促進効果は得られた。

結果として、高い薬物透過速度を得るためには、薬物と促進剤の水溶解度、解離定数、分子量および適用基剤のpH等を考慮する必要があることが明らかになった。

結論

以上、2編にわたり薬物のヒト爪甲透過機構および透過促進に関する検討を行った。その結果、以下の結論を得た。

1. 薬物のヒト爪甲透過機構の検討

(1) 薬物の透過部位である爪甲の三層構造に着目し、その脂質分布、薬物透過性、薬物分配性および薬物濃度について各層ごとに評価した。爪甲中の総脂質量の測定および脂質分布の観察により、爪甲は上層および下層に脂質成分を含有し、中層には脂質成分をほとんど含有しないことが明らかとなった。各単層における親水性モデル薬物の5-FUと親油性モデル薬物のFPの爪甲透過係数、膜/基剤分配係数および拡散係数を算出した結果、爪甲上層中の薬物拡散性が両薬物とも非常に低く、5-FUでは爪甲上層が、FPでは爪甲上層と中層が若干の透過バリアになっていることが明らかとなった。また、両薬物の爪甲三層への分配性は各層の総脂質濃度を反映したが、両薬物の爪甲全体への分配性に著しい差は認められず、これらの結果より、爪甲全体が親油性分配膜というよりはむしろ親水性ゲル膜としてふるまうことが考えられた。また、爪甲中の薬物濃度を推定した結果、各層の薬物濃度のオーダーは脂質濃度に影響されず、両薬物とも拡散過程で通常認められる爪甲上層 > 爪甲中層 > 爪甲下層となり、推定した全層爪甲中の薬物濃度は両薬物の水溶解度に依存した。

以上の結果から、爪甲は構造的に三層に分かれているが、薬物透過においては親水性ゲル膜様の一層膜とみなして現象を解析できることが明らかとなった。

(2) 薬物の物性（親油性，解離度および分子量）とその爪甲透過性との関連性について検討するにあたり，透過物質のサイズ（MW）とオクタノール／水分配係数（Kow）に基づいた重回帰式により解析を行った．薬物の爪甲透過性は透過物質の親油性に対して依存しないが，その分子量の増加に対して著しく減少することが明らかとなった．また，薬物のイオン解離はその爪甲透過性の減少を導き，解離した薬物の爪甲透過性もその分子量に依存した．これらの結果より，未知薬物（抗真菌剤）の爪甲透過性および透過速度は本検討から得られた回帰直線，透過物質の分子量，解離度および水溶解度からおおよそ予測可能であり，ヒト爪甲は親水性ゲル様の分子篩膜としてふるまうことが見いだされた．

一方，正常（健常）および疾病（真菌）爪甲を介する薬物の透過を比較検討した結果，疾病爪甲を介する薬物の透過性は正常爪甲を介する薬物の透過性と有意な差は認められず，また，その爪甲厚の変化にも依存することから，疾病爪甲を介する薬物透過性も透過薬物の拡散性に支配されることが明らかとなった．従って，正常爪甲を介する薬物の透過解析により疾病爪甲を介する薬物の透過性もおおよそ評価および予測できることが明らかとなった．

2. 薬物のヒト爪甲透過促進に関する検討

(1) 爪白癬の局所薬物治療効果を増強させるためには，白癬菌感染部位への薬物（抗真菌剤）送達を改善することが最大の課題であるため，薬物の爪甲透過を促進することが期待される数種の添加剤のスクリーニングを行った．適用基剤中の水は爪甲の物性を変化させるためには必要不可欠であり，角質溶解剤またはジスルフィド結合還元剤の添加はさらなる爪甲の物性変化（ケラチンの変性）を生じさせることが明らかとなった．また，薬物の爪甲透過速度はACまたはMEを含有する基剤により著しい

促進効果を表わした。さらに、適用基剤中のAC濃度の増加は5-FUの爪甲透過速度と爪甲重量を増加させ、爪甲硬度を低下させた。薬物の爪甲透過速度は爪甲重量の増加と爪甲硬度の減少に伴って増加した。しかし、AC適用後の爪甲物性および薬物透過バリアの回復は認められなかった。

以上の結果から、著しい薬物透過促進作用を表わしたACとMEはおそらく爪甲中のジスルフィド結合を開裂させ、爪甲の膨潤および軟化を引き起こし、透過物質の拡散性を増加させたものと考えられた。

(2) 薬物の爪甲透過促進効果を示すジスルフィド結合還元剤を用い、最適な促進剤の適用条件について検討した。4種の還元剤により、5-FUの爪甲透過速度は増加した。特に低分子量であり、水溶液のpHを塩基性にシフトさせるCAは他の促進剤に比べて高い薬物の爪甲透過促進効果を有した。また、このCAにより前処理した爪甲を介する薬物透過性 (P_{CA}) はその分子量、すなわち透過物質の拡散性に依存することが明らかとなり、その透過性の促進比は透過物質の分子量増加によって増大する傾向を示した。従って、未知の薬物(抗真菌剤)の爪甲透過性もまた、本検討から得られた回帰直線によりおおよそ予測できることが明らかとなった。ピリジンの爪甲透過性はACの前処理系で増加したが、ACとの同時適用系では、その爪甲透過性は増加せず、反対に減少した。この現象はAC適用により、適用基剤のpHが酸性側(pH=2.0)にシフトし、基剤中のほとんどのピリジンがイオン型に変化したためと考えられた。従って、CAとの同時適用系(pH=10.4)では、ピリジンのイオン解離がほとんど生じないために透過促進効果は顕著に現われ、ACとエタノールアミンを併用した基剤(pH=9.5)でも、エタノールアミンの緩衝作用のためにピリジンの透過促進効果は得られた。

以上の結果より、高い薬物透過速度を得るためには、薬物と促進剤の水溶解度、解

離定数，分子量および適用基剤のpH等を考慮する必要があることが明らかになった。

以上の2編により，薬物のヒト爪甲透過機構並びに爪甲透過促進について論じた。爪白癬の局所薬物治療において，最近は白癬菌に対する非常に低い最小阻止濃度を有する抗真菌剤が市販されてきているが，本論文にて紹介したように薬物の爪甲透過速度も治療効果を高める非常に重要な因子となる。ヒト爪甲は親水性のゲル膜様の薬物透過特性を示すため，十分な薬物の透過を得るためには，十分に爪甲を水和させておくことがポイントになるだろう。また，爪白癬の薬物治療効果を高めるためには，抗真菌剤および促進剤の選択において，その水溶解度，分子量，解離定数および製剤のpHに関して考慮する必要があるだろう。薬物のヒト爪甲透過現象とその促進法を明らかにした本研究は爪白癬の局所薬物治療を行なうための製剤設計に有用な情報を提供すると思われ，本研究によって爪白癬の治癒率が顕著に増加し，多くの爪白癬患者に朗報をもたらすことが期待される。

謝辞

本研究に際し、城西大学薬学部教授 森本雍憲先生には、たいへん素晴らしい研究テーマを与えていただくとともに終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り、深甚なる謝意を表します。

城西大学薬学部教授 杉林堅次先生には、実験の細部にわたる御指導並びに御助言を賜り、厚く感謝の意を表します。

また、本研究に際し終始有益な御指導と御助言を賜りました城西大学薬学部教授 従二和彦先生、城西大学薬学部講師 夏目秀視先生に感謝の意を表します。

さらに、実験に関するデータ解析等に御助言を頂きました城西大学薬学部講師 小林大介先生、城西大学薬学部助手 沼尻幸彦先生、並びに城西大学薬学部助手 関俊暢先生に感謝致します。

また、実験の一部を御協力して戴いた共同実験者である日産化学工業株式会社 宮本操氏並びに中外製薬株式会社 小松恒久氏に感謝致します。

さらに、貴重な実験材料である白癬爪甲を御提供して頂いた中山皮膚科クリニック 中山秀夫先生、東京都済生会中央病院皮膚科 笠原延子先生、埼玉医科大学総合医療センター皮膚科 飯泉陽子先生、並びに埼玉医科大学総合医療センター薬剤部長 木村昌行先生に感謝致します。

最後に、ボランティアとして長期間に渡り爪甲遊離縁を御提供し続けて戴いたとともに終始御協力して頂いた城西大学薬学部旧製剤学教室、病院薬剤学教室並びに臨床薬物動態学教室の諸氏に心より厚く御礼申し上げます。

実験の部

実験の部

第1編 実験の部

第1章

(1) 実験材料

5-フルオロウラシル (5-FU) は東京化成工業 (株) より購入した。また、フルルビプロフェン (FP) は科研製薬 (株) から供与された。総脂質の測定に用いたトリオレン、コレステロール、バニリン及び脂質の染色に用いたズダンブラックBは和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬は市販の特級品を購入して用いた。

(2) 摘出爪甲の調製法

同一の健常人 (1男性 ; 24歳) から爪切りを用いて切除した多数の爪甲切片 (爪甲遊離縁) は薬物の透過実験または脂質分布の観察用の試料として用いた。また、他の健常人 (10男性、平均24歳) から得た40個の爪甲切片は爪甲中の総脂質測定用の試料として用いた。実験に用いた爪甲切片は先端部のとがったメタルアタッチメントを装備したマイクロメーター (Mitutoyo, Corp.) を用い、厚さの測定を行った。ヒト爪甲三層の厚さおよび重量の比率 (上層 (A) : 中層 (B) : 下層 (C)) は種々の文献^{28, 37, 38)} を参考にし、3 : 5 : 2と仮定した。紙やすりを用いて既知の厚さの上層を削った爪甲 (BC), 下層を削った爪甲 (AB) および 上層および下層の両方を削った爪甲 (B) をそれぞれ調製した。爪甲切片はその重量、厚さ、幅、長さを測定した後、それぞれの実験に用いた。

(3) 爪甲/基剤分配係数の測定

5-FUおよびFPの水懸濁液を37℃でマグネットスターラによって攪拌し、24時間後にその懸濁液をろ過した (Ekicrodisk 3; German Sciences Japan) . そのろ液は直ちに水またはメタノールにて希釈し、分析のための試料とした。爪甲切片の重量を電子天秤 (JL-200 Chyo Balance Corp.)にて測定した後、48時間37℃で5-FUまたはFPの溶解度の半分の濃度の溶液 (1 ml) に浸漬した。各溶液から爪甲切片を除去した後、溶液の濃度を測定した。爪甲切片中の薬物を3回10mlのメタノールによって抽出した。その抽出溶媒を60℃窒素ガス下にて蒸発した。その後、1 mlの蒸留水またはメタノールを分析のための試料を調製するために加えた。薬物の爪甲/基剤分配係数は37℃での爪甲と基剤の濃度比として計算した。

(4) 透過実験法

個人差による爪甲透過バリアの変動に薬物透過性が左右されないようにするため、同じヒトの中指と小指の爪甲切片 (20-35 mg) をそれぞれ、5-FUとFPの透過研究に用いた。O-リングを装着したポリプロピレン性のアダプター (爪甲有効面積 0.049 cm²) に約1日間水中で湿潤させた全層爪甲 (ABC) , 上層を削った爪甲 (BC) , 下層を削った爪甲 (AB) または上層および下層を削った爪甲 (B) を装着し、37℃の水浴に接続したウオータジャケット付の横型拡散セル (2.5mlまたは1.5ml) にそれを挟んだ (Fig. 28) . 爪甲切片は拡散セル中でさらに一晩湿潤させ、生理食塩水下でのインピーダンス (DELICA, D-57, 三田無線研究所, 東京) を測定し、水和の程度を透過実験前に確認した。5-FUまたはFPの懸濁液は通常、横型拡散セルの爪甲上層側に適用し、爪甲下層側に蒸留水または40%ポリエチレングリコール400水溶液を入れた。また、爪甲下層側から薬物懸濁液を適用する場合には、爪甲上層側に蒸留水または40%ポリエチレングリコール400水溶液を入れた。保存剤はレシーバ溶液が実験終了時まで澄明であったため、加えなかった。その薬物透過は経時的にレ

シーバ側をサンプリングすることによって測定した。透過実験の期間は薬物の爪甲透過性が低いことから、5-FUで7日間、FPで19日間行った。

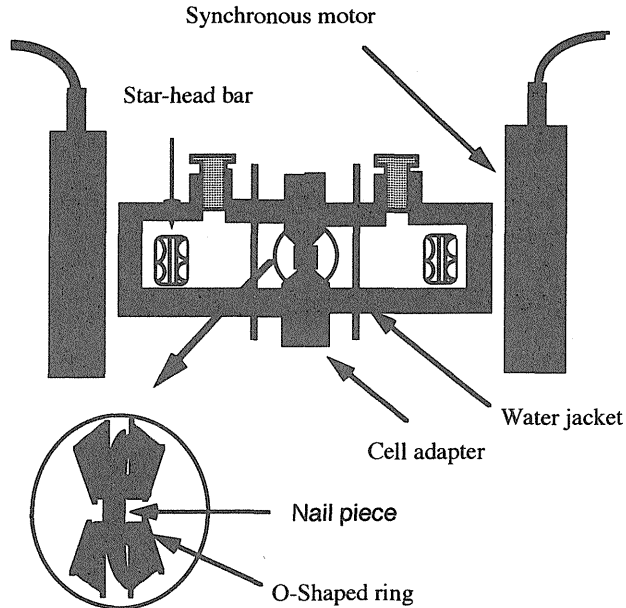


Fig. 28 Schematic diagram of the modified side-by-side diffusion cell

(5) 総脂質の測定

総脂質はKnightらの方法にしたがって測定した⁷¹⁾。全層爪甲 (ABC) , 上層を削った爪甲 (BC) , 下層を削った爪甲 (AB) または上層および下層を削った爪甲 (B) の脂質を抽出させるために、24時間クロロホルム-メタノール (3 : 1) 混合液へそれぞれ浸漬した。その抽出溶媒は50℃窒素ガス下にて蒸発させた。室温に冷却した後、2mlのphosphovanilline試液 (0.6%_{w/v} aqueous vanillin solution / phosphoric acid=1:4) を加え、37℃で15分間インキュベートした。その吸光度は分光光度計 (UV-160A, 島津製作所(株)) を用い、535 nmにて測定した。コレステロールとトリオレイン (3 : 1) の混合物は標準試料として使用した。

(6) 脂質分布の観察

健常人の親指から切除した爪甲切片は爪甲中の脂質分布を観察するための試料として用いた。その爪甲を包埋液 (Tissue-Tek, Sakura Finetechnical Co., Ltd.) を用いて凍らせた後, ミクロトーム (IEC MODEL MINOTOME MICROTOME CRYO-STAT, International Equipment Company) によって薄くスライスした。その爪甲の薄片を30分間イソプロピルアルコール中に溶かしたズダンブラックBによって染色した。染色した後, 50%メタノールにて爪甲薄片を洗浄し, 顕微鏡 (New VANOX, Olympus) によって観察した。

(7) 薬物の定量法

5-FUおよびFPの定量はHPLC法を用いて行った。以下に示すHPLC装置を用いた。

ポンプ	: LC-10A (島津製作所(株))
検出器	: SPD-10A (島津製作所(株)) RF-10A _{XL} (島津製作所(株))
データ処理	: C-R6A (島津製作所(株))
カラム	: Inertsil ODS (ジーエルサイエンス(株))

その他の測定条件は以下のTable 15に示した。

Table 15 HPLC condition for the analysis of drugs used in this experiment

Drug	Mobile phase	Detection	Internal standard
5-FU	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (2:98)	UV 270 nm	_____ ^{a)}
FP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (60:40)	EX 260 nm EM 313 nm	_____ ^{a)}

^{a)} absolute calibration method was used.

第2章

(1) 実験材料

アンチピリン (ANP) , 5-フルオロウラシル (5-FU) , p-ヒドロキシ安息香酸エステル (メチルエステル ; MP, エチルエステル ; EP, プロピルエステル ; PP, ブチルエステル ; BP, アミルエステル ; AP, ヘキシルエステル ; HP) およびニコチン酸ナトリウム (NA-Na) は東京化成工業 (株) から購入した. アミノピリン (AMP) , バルビタールナトリウム (BT-Na) , 安息香酸 (BA) , エタノール (EtOH) , 塩酸プロカイン (PC-HCl) , ピリジン (PD) および安息香酸ナトリウム (BA-Na) は和光純薬工業 (株) から購入した. 重水はMerck 社より購入した. 塩酸イソプロテレノール (IT-HCl) , リドカイン (LC) , 塩酸リドカイン (LC-HCl) および塩酸メキシレチン (MT-HCl) はSigma 社から購入した. 塩酸クロコナゾール (CCZ-HCl) は塩野義製薬 (株) から供与された. 硝酸イソソルビド (ISDN) は東光薬品工業 (株) から供与された. その他の試薬は市販の特級品を購入して用いた.

(2) 摘出爪甲の調製法

正常の爪甲切片 (爪甲遊離縁) は, 健常人 (男性15人と女性5人, 平均25歳, 年齢幅 20-45歳) の手足の指から爪切りを用いて得た. それらの爪甲は少なくとも一ヵ月以上伸ばしたものを使用した. 疾病爪甲は埼玉医療センター (埼玉医科大学) および東京都済生会中央病院より供与された. これらの両爪甲の厚さはとがったメタルアタッチメントを装備したマイクロメーター (Mitutoyo, corp.) を用い, 測定した. 約400 μm (350-450 μm) の厚さの正常爪甲は透過薬物のオクタノール/水分配係数, 分子量, イオン解離の影響を調査することに使用した. また, 様々な厚さの両爪甲は正常および疾病爪甲を介する薬物透過を比較するために使用した. 正常および疾病爪甲は一日間水和させた後, それらの薬物透過性の評価に用いた.

(3) オクタノール/水分配係数の測定

各薬物の懸濁液を37℃でマグネティックスターラによって攪拌し、24時間後にその懸濁液をろ過した (Ekicrodisk 3 or 3CR; German Sciences Japan) . そのろ液は分析のための試料とするために、メタノールまたはアセトニトリルで直ちに希釈した。薬物のオクタノール/水分配係数 (Kow) は37℃でのオクタノールと水の溶解度比として定義した。

(4) 透過実験法

第1章-第1節と同様の方法で実験を行なった。なお、その薬物の爪甲透過実験期間5-17日間で行なった。

(4) 薬物の定量法

重水 (D₂O) は赤外分光光度計 (260-30, (株) 日立製作所) にて2512 cm⁻¹ のO-D伸縮振動の吸収強度から定量した。エタノールはガスクロマトグラフ装置 (GC-14A, 島津製作所 (株)) で定量した。測定条件は以下の通りに行なった。

カラム	: Guskuropack 54, 60/80, 1.6 m, 3mm id.
検出器	: FID
カラム温度	: 150℃
インジェクション温度	: 190℃
検出器温度	: 190℃
キャリアガス	: N ₂

他の薬物は第1章で述べたHPLC装置によって測定した。各薬物の測定条件を以下の

Table 16 に示す。

Table 16 HPLC condition for the analysis of drugs used in this experiment

Drug	Mobile phase	Detection	Internal standard
MP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (30:70)	UV 256 nm	p-hydroxybenzoic acid propyl ester
EP	acetonitrile: 0.1% phosphoric acid (30:70)	UV 256 nm	p-hydroxybenzoic acid propyl ester
PP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (30:70)	UV 256 nm	p-hydroxybenzoic acid methyl ester
BP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (40:60)	UV 256 nm	p-hydroxybenzoic acid propyl ester
AP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (50:50)	UV 256 nm	p-hydroxybenzoic acid butyl ester
HP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (60:40)	UV 256 nm	p-hydroxybenzoic acid amyl ester
PD	acetonitrile : pH 7.0 phosphate buffer (30:70)	UV 254 nm	p-hydroxybenzoic acid ethyl ester
BA (BA-Na)	acetonitrile : pH 2.5 phosphate buffer (30:70)	UV 230 nm	p-ethyl benzoic acid
ANP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (35:65)	UV 245 nm	p-hydroxybenzoic acid ethyl ester
AMP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (45:55) +5mM sodium dodecylsulfonate	UV 254 nm	p-hydroxybenzoic acid hexyl ester
LC (LC-HCl)	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (35:65) +5mM sodium hexanesulfonate	UV 245 nm	p-hydroxybenzoic acid propyl ester
ISDN	acetonitrile : water (50:50)	UV 220 nm	p-hydroxybenzoic acid ethyl ester
NA-Na	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (30:70) +5mM sodium dodecylsulfonate	UV 260 nm	p-hydroxybenzoic acid propyl ester
BT-Na	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (20:80)	UV 220 nm	p-hydroxybenzoic acid ethyl ester
MX-HCl	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (40:60) +5mM sodium dodecylsulfonate	UV 220 nm	p-hydroxybenzoic acid isobutyl ester
IT-HCl	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (40:60) +5mM sodium dodecylsulfonate	UV 280 nm	p-hydroxybenzoic acid isobutyl ester
PC-HCl	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (35:65) +5mM sodium hexanesulfonate	UV 280 nm	p-hydroxybenzoic acid isobutyl ester
CCZ-HCl	methanol : pH 6.8 phosphate buffer (70:30)	UV 220 nm	p-hydroxybenzoic acid amyl ester

第2編 実験の部

第1章

(1) 実験材料

トルナフタート (TN) は日産化学工業 (株) から供与された。ミリスチン酸イソプロピル (IPM) は東京化成工業 (株) より購入した。尿素, サリチル酸ナトリウム, L-乳酸 (LA), N-アセチル-L-システイン (AC) および2-メルカプトエタノール (ME) は和光純薬工業 (株) より購入した。1-メントールは東光薬品工業 (株) より供与された。その他の試薬は市販の特級品を購入して用いた。

(2) 抽出爪甲の調製法

爪甲切片 (8-25mg) は健常人 (9男性; 平均24歳、21-32歳間) の手指から爪切りを用いて得た。少なくとも1ヶ月伸ばした爪甲切片をこの実験で使用した。健常人の小指の爪甲切片は一日間水和させた後、各基剤からの薬物透過を比較するための試料として用いた。人差し指、中指、薬指の爪甲切片は爪甲物性測定用の試料として用いた。

(3) 薬物の溶解度およびオクタノール/基剤分配係数の測定

5-FUまたはTNの懸濁液を37℃でマグネットスターラによって攪拌した。24時間後、各懸濁液をろ過 (Ekicrodisc 3 or 3CR; German Sciences Japan)した。そのろ液は分析のための試料とするため、直ちにメタノールまたはアセトニトリルで希釈した。薬物のオクタノール/基剤間の分配係数 (K_{ov}) は37℃でのオクタノールおよび基剤中の薬物溶解度の比として定義した。

(4) 爪甲切片の物性測定

健康人の手の指爪切片の重量および応力は各基剤に浸漬する前（0日目）に測定した（Step1）．爪甲切片を種々基剤10mlにそれぞれ37℃で浸漬し，6日後の重量および応力を測定した（Step2）．異なるAC濃度による爪甲物性への影響を調査した検討では，各爪甲切片の可逆性を評価するために，さらに6日間，水10mlに浸漬させた（Step3）．爪甲重量は爪甲切片に付着した基剤をキムワイプで拭った後，電子天秤（JL-200 Chyo Balance Corp.）で測定した．湾曲し発生する爪甲切片の応力はガイド（アタッチメント）を取り付けたレオメーター（NRM-2002J 不動工業K.K.）で測定した（Fig. 29）^{66）}．未処理の爪甲の応力（ $S_{[Step1]}$ ）および重量（ $W_{[Step1]}$ ）と得られる処理後の爪甲の応力および重量（ $S_{[Step2or3]}$ ， $W_{[Step2or3]}$ ）の率を爪甲軟化と膨潤の指標として使用した（ $S_{[Step2or3]}/S_{[Step1]}$ ， $W_{[Step2or3]}/W_{[Step1]}$ ）．

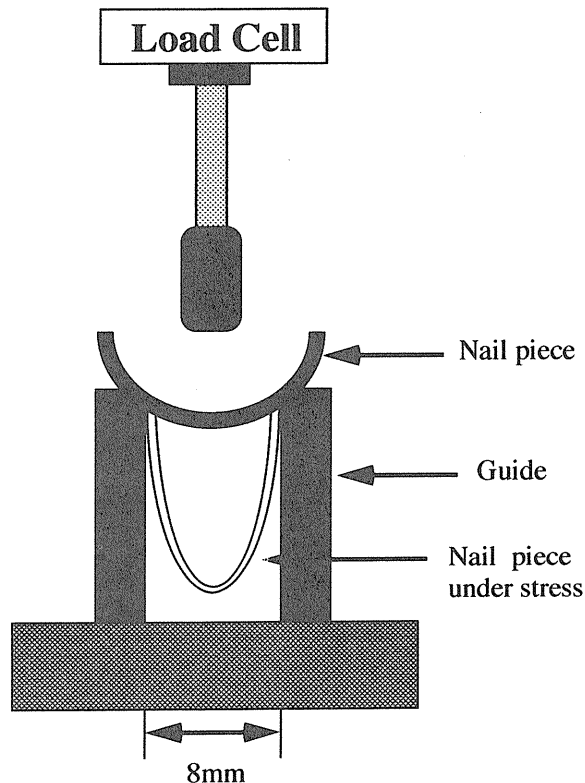


Fig. 29 Measurement of Stress on Nail Pieces

(5) 透過実験法

第1編-第1章と同様の方法で透過実験を行った。透過実験の期間は5-FUで7日間、TNで18日間行った。促進剤の効果を評価するにあたり、個体差による爪甲透過バリア特性の変動を小さくしなければならないことから、本節では以下の二つの実験計画を基にして実験を行なった。(i) 同じボランティアの同じ指の爪甲切片を使用する系 (ii) 同じ爪甲切片を連続的に使用する系。

(6) 薬物の定量法

5-FUは第1編-第1章と同様の方法で定量を行った。TNは第1編-第1章で述べたHPLC装置によって測定した。TNの測定条件を以下のTable 17に示す。

Table 17 HPLC condition for the analysis of drugs used in this experiment

Drug	Mobile phase	Detection	Internal standard
TN	methanol : water (70:30)	UV 260 nm	diphenyl phthalate

第2章

(1) 実験材料

システアミン (CA) , チオグリコール酸ナトリウム (TG) はSigma社から購入した。エタノールアミン (EA) は和光純薬工業 (株) から購入した。その他の試薬は市販の特級品を購入して用いた。

(2) 抽出爪甲の調製法

健康人の手指から爪切りにて切除した約400 μm (350-450 μm) の厚さの爪甲切片を実験に用いた。

(3) 透過実験法

第2編-第1章と同様の方法で透過実験を行った。

(6) 薬物定量法

第1編と同様の方法で各薬物を定量した。

引用文献

- 1) 高橋伸也, 総合臨床, **35**, 1735 (1986).
- 2) J. W. Wilson and O. A. Plunkett eds., "The fungus diseases of man", Univ. Calif. Press, Berkeley, 1962.
- 3) T. Piepponen, K. Blomqvist, H. Brandt, V. Havu, A. Hollmen, K. Kohtamäki, L. Lehtonen and K. Turjanmaa, *J. Antimicrobial Chemother.*, **29**, 195 (1992).
- 4) 島菌順雄, 林麟, 山田弘三, 山村雄一, 吉利和, "病気の生化学", **16** 189 (1973).
- 5) 庄司昭伸, 皮膚臨床, **33**, 1183 (1991).
- 6) P. D. Samman, "The Nails in Disease", William Heinemann Medical Books Ltd London, 1978, p. 40.
- 7) C. S. Munro, J. L. Rees and S. Shuster, *Acta. Derm. Venerol.*, **72**, 131 (1992).
- 8) M. Willemsen, P. de Doncker, J. Willems, R. Woestenborghs, V. van de Velde, J. Heykants, J. van Cutsem, G. Cauwenbergh and D. Roseeuw, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **26**, 731 (1992).
- 9) V. V. Villars and T. C. Jones, *Br. J. Dermatol.*, **126** (Suppl. 39), 61 (1992).
- 10) Itraconazole 皮膚科研究班, 基礎と臨床, **25**, 57 (1991).
- 11) 本間光一, 皮膚臨床, **33**, 1709 (1991).
- 12) 千代谷成史, 佐藤静生, 基礎と臨床, **21**, 431 (1987).
- 13) P. R. Mayer, R. C. Couch, M. K. Erickson, C. B. Wooldridge and R. K. Brazzell, *Skin Pharmacol.*, **5**, 154 (1992).
- 14) D. Reinel and C. Clarke, *Clin. Exp. Dermatol.*, **17** (Suppl 1), 44 (1992).
- 15) C. G. Ceschin-Roques, H. Hänel, S. M. Pruja-Bougaret, J. Luc, J. Vandermander and G. Michel, *Skin Pharmacol.*, **4**, 89 (1991).

- 16) E. J. van Hoogdalem, W. E. van den Hoven, I. J. Terpstra, J. van Zijtveld, J. S. C. Verschoor and J. N. Visser, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **5**, 119 (1997).
- 17) K. A. Walters, G. L. Flynn and J. R. Marvel, *J. Invest. Dermatol.*, **76**, 76 (1981).
- 18) F. Pittrof, J. Gerharads, W. Erni and G. Klecak, *Clin. Exp. Dermatol.*, **17** (Suppl 1), 26 (1992).
- 19) 光井武夫, "新化粧品学", 南山堂, 東京, 1993.
- 20) M. Okumura, Y. Nakamori, Y. Yoshida, H. Niwa, K. Sugibayashi and M. Morimoto, *Drug Design Deliv.*, **6**, 137 (1990).
- 21) Y. Kobayashi, M. Miyamoto, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 1 (1999).
- 22) 東禹彦, "爪", 日本書籍, 1980.
- 23) 北村包彦, "臨床皮膚科全書", 1, 金原出版, 東京, 1968.
- 24) 山崎一徳, 日本接着協会誌, **23**, 65 (1987).
- 25) 安藤鋭郎, 今堀和友, 鈴木友二, "タンパク質化学", 4, 共立出版, 東京, 1978.
- 26) B. Forslind, *Acta. Derm. Venererol.*, **50**, 161 (1970).
- 27) A. Jarrett and R. I. C. Spearman, *Arch. Derm.*, **94**, 652 (1966).
- 28) K. Jarret *ed.*, "The physiology and pathophysiology of the skin", Academic Press, London, 1978.
- 29) R. P. R. Dawber, *Arch. Dermatol. Res.*, **269**, 197 (1980).
- 30) 西山茂雄, *Fragrance J.*, **79**, 4 (1986).
- 31) 楠俊雄, 真菌誌, **16**, 165 (1975).
- 32) 富澤尊儀, 治療, **74**, 169 (1992).
- 33) 東禹彦, 皮膚科MOOK, **11**, 141 (1988).
- 34) 秋葉弘, 日本皮膚科学会雑誌, **81**, 1025 (1971).

- 35) K. A. Walters and G. L. Flynn, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **5**, 231 (1983).
- 36) T. Hirose, H. Momota, T. Kitajima, S. Okura, T. Matsuda and K. Motoyoshi, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **24**, 98 (1990).
- 37) O. F. Jillson and E. L. Piper *J. Invest. Dermatol.*, **28**, 137 (1957).
- 38) G. Stüttgen and E. Bauer, *Mykosen*, **25**, 74 (1982) .
- 39) D. Mertin and B. C. Lippold, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 30 (1997).
- 40) D. Mertin and B. C. Lippold, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 241 (1997).
- 41) G. L. Flynn, S. H. Yalkowsky and T. J. Roseman, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 479 (1974).
- 42) L. Matthieu, P. de Doncker, G. Gauwenbergh, R. Woestenborghs, V. van de Velde, P. A. J. Janssen, and P. Dockx, *Clin. Exp. Dermatol.*, **16**, 374 (1991).
- 43) Y. Kobayashi, T. Komatsu, M. Miyamoto, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, submitted.
- 44) R. O. Potts and R. H. Guy, *Pharm. Res.*, **9**, 663 (1992).
- 45) K. A. Walters, G. L. Flynn and J. R. Marvel, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 28 (1983).
- 46) K. A. Walters, G. L. Flynn and J. R. Marvel, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 498 (1985).
- 47) M. Z. Southard, L. J. Dias, K. J. Himmelstein and V. J. Stella, *Pharm. Res.*, **8**, 1489 (1991).
- 48) W. J. Albery, A. R. Greenwood and R. F. Kibble, *Trans. Faraday Soc.*, **63**, 360 (1967).
- 49) L. G. Longworth, "Amer. Inst. Phys. Handbook", 1936, p. 2.
- 50) D. Mertin and B. C. Lippold, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 866 (1997).
- 51) F. Sagher, *J. Invest. Dermatol.*, **11**, 337 (1948).
- 52) Y. Kobayashi, M. Miyamoto, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1787 (1998).
- 53) E. M. Farber and D. A. South, *Cutis*, **22**, 689 (1978).
- 54) 中島辰己, 佐藤宏, 飯島昌夫, 横山耕治, 加治晴夫, 吉田祚一, 西村和子, 宮治誠, *真菌誌*, **34**, 27 (1993).
- 55) 中島辰己, 中沢修一, 赤津栄, 米良幸典, 新井金保, 小林操, 中野美和, 佐藤

- 宏, 飯島昌夫, 加治晴夫, 横山耕治, 宮治誠, 薬剂学, **52**, 160 (1992).
- 56) 田沼弘之, 上村雅子, 上塚真理, 西山茂夫, 新薬と臨床, **36**, 184 (1987).
- 57) 石井正光, 濱田稔夫, 浅井芳江, 日皮会誌, **92**, 737 (1982).
- 58) 海野公成, 坪井良治, 小川秀興, 真菌誌, **35**, 281 (1994).
- 59) Y. Morimoto, K. Sugibayashi, D. Kobayashi, H. Shoji, J. Yamazaki and M. Kimura, *Int. J. Pharm.*, **91**, 9 (1993).
- 60) D. Kobayashi, T. Matsuzawa, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, M. Kobayashi and M. Kimura, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 254 (1993).
- 61) H. Nakamura, Y. Pongpaibul, T. Hayashi, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **141**, 71 (1996).
- 62) Y. Kobayashi, H. Nakamura, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **156**, 153 (1997).
- 63) H. Nakamura, Y. Kobayashi, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Drug Deliv. System*, **12**, 101 (1997).
- 64) E. J. Hoogdalem, W. E. Hoven, I. J. Terpstra, J. Zijtveld, J. S. C. Verschoor, J. N. Visser, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **5**, 119 (1997).
- 65) K. A. Walters, G. L. Flynn and J. R. Marvel, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 771 (1985).
- 66) 山崎一徳, 田中宗男, 粧技誌, **25**, 144 (1991).
- 67) 山内清, *Fragrance J.*, **5**, 62 (1993).
- 68) T. Kitahara and H. Ogawa, *J. Dermatological Sci.*, **2**, 402 (1991).
- 69) H. Fritsch, S. Stettendorf and L. Hegemann, *Dermatology*, **185**, 32 (1992).
- 70) D. Spruit, *Am. Perf. & Cosm.*, **87**, 57 (1972).
- 71) J. A. Knight, S. Anderson and J. M. Rawle, *Clin. Chem.*, **18**, 199 (1972).