

## 学位論文要旨

### 角層テープストリッピング法を用いた医薬品と化粧品の新しい適用法及び評価法に関する研究

菊池 啓介

粘着剤は、古くから世界各地で膏薬の材料として用いられており、近年では科学の進歩や製剤技術の発展によって様々な局所外用剤やTDDS製剤にも応用された。また、最近では感圧接着剤 (pressure sensitive adhesive: PSA) を用いた角層テープストリッピング法が局所外用剤の生物学的同等性の確認、経皮吸収促進剤の作用メカニズムの評価、また、角層形状や角層細胞の組織学的評価や角層バリア能の評価等に用いられている。しかし、工夫を凝らすことにより、テープストリッピング法は医薬品や化粧品のさらなる開発に貢献できる可能性があると考えられた。

そこで本研究では、角層テープストリッピング法を用いた医薬品と化粧品の新しい適用法及び評価技術について3章に分けて検討した。まず、第1章では、新規 PSAピール剤に関して検討した。すなわち、医療や臨床開発で繁用されている PSAの粘着性を修飾することにより角層剥離力の異なる新規 PSA (PSA-A, B) を作製し、その角層ピール効果とピール処理後の薬物透過性を調べ、新規 PSAのピール剤としての有用性について検討した。第2章では、角層テープストリッピング法を用いた「経皮投与製剤のマイクロドーズ (MD) 試験法」について検討した。すなわち、Fickの拡散則に従う解析法等を用いて、経皮投与製剤の MD試験法の確立、およびその有用性について検討した。また、第3章では、角層テープストリッピング法と毛嚢プラグギング法 (HF-P) を併用して皮膚適用した薬物の皮内動態評価法に関して検討を行った。

#### 1. 角層テープストリッピング法を用いた新規 PSAピール剤の開発に関する検討

第1章では、異なる粘着性を有する新規 PSA-A, Bを用いて、角層テープストリッピングによる角層ピール効果と角層ピールの薬物透過性、皮膚中薬物濃度および皮膚刺激性に及ぼす影響について評価した。まず、第1節では、剥離粘着力 (剥離力) や接着性 (タック) 試験により PSA-A, Bは市販 PSAと異なる粘着特性を有していることを明らかにした。さらに、ヘアレスラット背部皮膚バリア能変化に及ぼすテープストリッピング処理の影響は、PSA-A, Bのどちらを用いても市販 PSAと異なることを明らかにした。加えて、水溶液からの塩酸リドカイン (LID) の皮膚透過性に及ぼすテープストリッピング処理の影響を調べたところ、市販 PSAと比べて PSA-Aでは高い透過促進効果を、PSA-Bでは異なる挙動を示し、一定の透過促進効果が得られることを明らかにした。また、第2節では、市販製剤からの LIDの皮膚透過性、皮膚中濃度および皮膚刺激性に及ぼすテープストリッピング処理の影響を調べた。その結果、PSA-Aではわずかな処理数で透過性および皮膚中薬物濃度を劇的に改善する一方で刺激性も強いことを見出した。一方、PSA-Bでは、処理回数に関わらず一定の透過性改善効果を有し、刺激性も低いことを明らかにした。以上より、PSA-Aは安全使用の面でさらなる検討が必要であるものの、前処理用ピール剤として有用であることを見出した。また、PSA-Bは安全に使用できる前処理用ピール剤や美容用ピール剤として有用であることを見出した。異なる物性を有する化学物質を用いて更に検討をすることで、新規外用医薬品や美容分野において安全かつ効率的なピール剤の開発に繋がるものと思われた。

## 2. 角層テープstripping法を用いた経皮投与製剤におけるマイクロドーズ（MD）試験法の確立に関する検討

第2章では、ヒトを用いた *in vivo* 試験で化学物質の皮内動態解析を行うことができる「皮膚薬物動態学的 (dermatopharmacokinetics: DPK) 試験法」と早期医薬品開発時の探索的ヒト臨床試験を可能とする「マイクロドーズ (micro dose: MD) 試験法」に注目し、経皮投与製剤の MD 試験法の確立を試みた。

第1節ではモデル薬物として LID と <sup>14</sup>C-LID を選択し、Fick の拡散則に従う解析法を中心として、normal dose (ND) と MD 適用時 (共に水溶液を使用) のブタ耳介皮膚を用いた *in vitro* 透過実験から算出した皮膚 (角層) 中薬物濃度分布と DPK 試験より得られた角層中薬物濃度分布を比較評価した。*In vitro* 皮膚透過実験および DPK 試験の結果から ND および MD 間で適用濃度依存的な透過挙動 (線形性) がみられたこと、ND vs MD 間および MD vs MD 間での皮膚中濃度には高い相関性がみられたことから、MD 皮内動態解析法の妥当性が確認された。さらに MD 適用後の非定常状態皮膚透過時の角層中薬物濃度プロファイルから求めた角層透過パラメータを用いることで ND 適用時の実測値を予測することが可能であることも併せて明らかにした。第2節ではモデル薬物として酢酸トコフェノール (TA) と <sup>14</sup>C-TA を選択して複数の製剤を作製した。MD 適用後の非定常状態皮膚透過時の角層中薬物濃度プロファイルから求めた角層を介した透過パラメータを用いることで、ND 適用時の薬物濃度値も予測できること、また、皮膚透過性に及ぼす製剤 (基剤) の影響も評価可能であることを明らかにした。以上のことから、MD の DPK 試験は、特に新たな動物実験代替法としても利用できると期待された。また、短時間の MD 適用による皮内動態解析が可能なることから、被験者への負担も減少させることができ試験の効率化にも繋がる。特に外用医薬品や化粧品等の経皮投与製剤開発の効率化に有用であると考えられた。

## 3. 角層テープstripping法と毛嚢プラグging法を用いた薬物の皮内動態評価法の確立に関する検討

近年、毛嚢や汗腺・脂腺といった皮膚付属器官が重要な経皮吸収ルートとして再認識されつつあるが、皮膚付属器官を介した薬物透過に関する *in vivo* 評価法はほとんど報告されていない。そこで、第3章では HF-P 処理を施した皮膚を用いた DPK 試験と *in vitro* 皮膚透過試験を用いて、毛嚢を介して浸透する化学物質の皮内動態解析法の確立を試みた。その結果、極性が高い化学物質ほど毛嚢ルートの寄与が高くなることがわかった。また、HF-P 法を併用した DPK 試験より求めた AUC の変化率と HF-P 法を併用した *in vitro* 透過試験より求めた皮膚透過係数の変化率の間には良好な相関性が得られた。このことから、HF-P 処理に DPK 試験を併用することで、毛嚢を介して皮内に浸透する化学物質の皮内動態が解析できることが明らかとなった。本方法は、化学物質の皮膚透過ルートに対する毛嚢ルートの寄与を *in vivo* 試験にて明らかにする新規評価法として特に有用であると考えられるが、今後は、*in vivo* 実験系で、かつ実製剤を用いた検討が必要であると考えられた。

以上、本研究で開発した新規 PSA は前処理用ピール剤や美容用ピール剤として有用であることが明らかになった。また、皮膚適用製剤の MD 試験法や HF-P 法を併用した皮内動態評価法は新たな皮膚適用製剤開発にあたり大変有用であると考えられた。本研究が今後の医療分野や美容分野での製品開発を促進することを期待する。

**New application and evaluation methods of pharmaceuticals and cosmetics  
using stratum corneum-tape stripping method**

Keisuke Kikuchi

Adhesives have been used as a plaster in the world since thousands years ago. Various types of topical and transdermal drug delivery systems are now available using adhesives by scientific progress in the formulation techniques. Recently, a stratum corneum (SC)-tape stripping method with pressure sensitive adhesive (PSA) is utilized to evaluate bioequivalence of topically applied drugs, to elucidate mechanism of skin-penetration enhancers and to conduct histological investigation of the SC and corneocytes. Thus, an innovative proposal for SC-tape stripping method with PSA would contribute to the development of pharmaceutical and cosmetic products. In the present study, a novel approach to evaluate pharmaceutical and cosmeceutical products have been investigated by the SC-tape stripping method with PSA.

In the first chapter, two unique PSA tapes with different adhesive properties were prepared, and were evaluated for their usefulness as a skin-penetration enhancement method by peeling excess layers of SC. In the second chapter, microdosing (MD) study for topical formulations was tried with the SC-tape stripping method. Usefulness of the present MD study was evaluated by comparing dermatopharmacokinetic (DPK) parameters by Fick's 2nd law of diffusion. Finally, in the third chapter, changes in DPK parameters of topically applied drugs and cosmetic ingredients were investigated with SC-tape stripping method after plugging of hair follicles (HF) with an adhesive.

**1. Development of new pressure-sensitive adhesives as a peeling tape using stratum corneum-tape stripping method**

SC peeling effect of SC-tape stripping with different adhesive properties of PSAs (PSA-A and -B) was evaluated on the skin permeation, skin concentration and skin irritation. The adhesive properties of prepared PSAs and marketed PSAs were evaluated by a 180° peeling, a prove tack and a ball tack test. The effect of the number of times stripped with PSA-A and -B was investigated on the barrier function of hairless rat dorsal skin. In addition, the penetration-enhancement effects of SC-tape stripping with PSA-A and -B were evaluated with *in vitro* skin permeation experiment of lidocaine. The obtained results revealed that PSA-A and -B had higher stripping or peeling effects than those of the marketed PSAs. Marked changes were observed in the skin barrier function before and after stripping using PSAs. The penetration-enhancement effect of SC-tape stripping with PSA-A and -B was then evaluated on the skin permeation and concentration of lidocaine using *in vitro* skin permeation experiments after application of its tape formulation. PSA-A, in particular, markedly improved the skin permeation and skin concentration of topically applied chemical compounds, because the stripping removed many layers of SC only by a few times. When PSA-B was used to pretreat the skin surface, on the other hand, the extent of skin permeation and concentration of drugs was safely increased because only a few layers of the SC were removed, even with repeated stripping. Thus, stripping with PSA-A can be used as a penetration enhancement tool, whereas PSA-B can be used as a peeling material against excess layers of the SC.

## **2. Establish of microdosing (MD) study on skin permeability of topically applied drugs and cosmetic ingredients using stratum corneum-tape stripping method**

Then, the MD study was conducted in human *in vivo* to obtain DPK parameters. MD study is usually applied in the early phases of drug development (Phase 0 study) by identifying and quantifying drug metabolites in human. By definition, MD uses less than 1/100th of the proposed clinical dose of test substance (from 1 to 100 micrograms but not above). Development of an *in vivo* human MD method would be very important to accelerate development of pharmaceutical and cosmetic products for topical application. In the first part, lidocaine hydrochloride (LID) and <sup>14</sup>C labeled LID (<sup>14</sup>C-LID) were selected as model drugs. The skin concentration-distance profile of LID and <sup>14</sup>C-LID in the SC were evaluated by LC/MS/MS or Accelerated Mass Spectrometry (AMS). The obtained profiles were then analyzed by the Fick's 2nd law of diffusion to obtain DPK parameters. The calculated values were markedly similar to those obtained from skin permeation profiles. In addition, when MD and therapeutic dose of LID were topically applied on skin, dose dependent relationships were observed for the area under the skin concentration-depth curve (AUC) without changing DPK parameters. These results suggest that the present MD method would be a promising tool to obtain DPK parameters. In the second part, *DL*-( $\alpha$ )-tocopherol acetate (TA) and <sup>14</sup>C labeled TA (<sup>14</sup>C-TA) were selected and then different types of formulations were prepared. Skin concentration-distance profile after topical application of formulations with therapeutic dose could be estimated from DPK parameters in the MD study with a short application time. *In vivo* MD study with a short-time application of drugs would lead to less burden to subjects. Thus, this study would be useful for development of pharmaceutical and cosmetic products for topical use.

## **3. Evaluation of skin disposition of topically applied drugs and cosmetic ingredients using stratum corneum-tape stripping method and hair follicle-plugging.**

Recently, skin appendages such as HF and sweat ducts are beginning to be recognized as important permeation pathways for the skin permeation for hydrophilic drugs. However, only a few studies have reported on the HF contribution of topically applied drugs against the total amount of whole skin permeation. In the present chapter, DPK and *in vitro* skin permeation study were conducted to reveal the HF contribution of topically applied drugs against the total skin permeation using an HF plugged (HF-P) skin. The obtained results using hydrophilic compounds showed a higher contribution to the HF pathway than the SC pathway. In addition, a very good correlation was obtained between skin permeation decreasing and *AUC* decreasing ratios. These results suggest that the SC-tape stripping to HF-P treated skin is useful to understand the contribution of follicular pathway of topically applied drugs. Further studies have to be conducted to reveal the possibility of *in vivo* skin permeation study with this method after topical application of different types of formulations.

## **4. Summary**

The present results provide that PSA-A and -B can be utilized as a pretreatment- and safe peeling-material, respectively. In addition, the MD study for topically applied drugs could adequately provide DPK parameters and reveal the contribution of SC and follicular pathways against the total skin permeation using the HF-P method. I hope that this study will lead a new methodology for development of topically applied drugs and cosmetic products.

## 論文審査の結果の要旨

経皮吸収型製剤の研究・開発に伴い、皮膚局所での有効性及び安全性を評価するために、感圧接着剤 (PSA)を用いる角層テープストリッピング(TS)法が汎用されるようになった。すなわち、TS法は皮膚適用製剤の生物学的同等性の評価や経皮吸収促進剤の作用メカニズムの評価に利用されている。また、化粧品開発においても、角層形状や角層細胞の組織学的評価、および角層バリア能の評価等にTS法が用いられるようになった。

本研究は、TS法の角層剥離技術に着目し、TS法が新たな経皮吸収促進法として利用できるかどうかを検討し、さらに、極低用量の薬物や化粧品成分を適用するマイクロドーズ(MD)法や毛嚢を物理的に塞ぐ毛嚢プラグング(HF-P)法に、TS法を組合せてヒトにおける皮内動態解析の新たな評価法を確立できるかどうかを検討したものである。

第1章では、TS法を新たな経皮吸収促進法として利用するため、PSAの粘着性を修飾した2種類の新規PSAピール剤(AとB)を作製し、それらのTS用のテープ剤としての有用性に関して評価した。まず、第1節で、剥離粘着力など種々の粘着物性試験を行い、Aはセロテープなどの市販PSAと同等の、Bは市販PSAとは異なる粘着特性を示した。ヘアレスラット背部皮膚やブタ耳介皮膚を用いて、単回TS処理による角層剥離量から得られる角層剥離力はAとBのどちらも市販PSAよりも大きかったが、複数回TS処理による角層剥離力の値は、Aでは少ないTS回数で市販PSAと同等の値となり、BはTS回数に関係なく単回TS処理時の値に近かった。また、モデル薬物として、塩酸リドカイン(LID)を用い、*in vitro*皮膚透過性試験を行った結果、Aは少ないTS処理回数で高い透過促進効果を示した。一方、BはTS処理回数に関係なく、2~3倍の一定の透過促進効果が得られることを明らかにした。第2節では、適用剤形を水溶液系から製剤に替えてLIDの皮膚透過性、皮膚中濃度および皮膚刺激性に及ぼすTSの影響を調べ、Aは僅かな処理回数で透過性の促進および皮膚中薬物濃度を劇的に高めたが、刺激性も強いことが認められた。一方、Bは処理回数にかかわらず一定の透過促進効果を有し、刺激性も低いことを明らかにした。これらの結果から、Aは安全使用の面でさらなる検討が必要であるが前処理用ピール剤として有用である。Bは安全に使用できる前処理用ピール剤や美容ピール剤として有用であることを見出した。このように本章では、TS法が新たな経皮吸収促進手段として利用できることを明らかにした。

第2章では、経皮吸収性評価において、最も重要であるヒトでの試験法に、早期の医薬品開発時の探索的臨床試験に用いるMD試験を、ヒト*in vivo*での化学物質の皮内動態解析にTSを利用する皮内薬物動態学的(DPK)試験法と組合せた方法論について評価した。MD適用時の薬物分析には、高感度のLC/MS/MS法と加速器質量分析法を用いて行った。第1節では、皮膚透過性とPSAの角層剥離力がヒトに近いブタ耳介皮膚と、モデル薬物としてLIDと<sup>14</sup>C-LIDを選択し、Fickの拡散則に従う解析法により、normal doseとMDを溶液系で適用した時の*in vitro*皮膚透過実験から算出した皮膚(角層)中薬物濃度分布と、TSによるDPK試験の結果から得られた角層中薬物濃度分布を比較した。その結果、normal doseとMD間での皮膚中濃度には高い相関性がみられたことから、MD皮内動態解析法に適用できることを確認した。さらに、MD適用後、試験時間の短縮が可能となる非定常状態時のTS法によ

り得られた角層中薬物濃度プロファイルから求めた角層透過パラメータを用いることで、normal dose 適用時の実測値を高い精度で予測することが可能であることを明らかにした。第2節では、第1節の結果に基づいて、製剤に応用できるかをモデル薬物としてトコフェロール酢酸エステル(TA)と  $^{14}\text{C}$ -TA を選択し複数の製剤を調製して、ブタ耳介皮膚を用いた TS による DPK 試験から、製剤からの TA の皮内動態解析を行い、TA の皮膚(角層)透過性に及ぼす製剤化の影響をヒト試験で評価した。その結果、MD 適用後の非定常状態時の角層中薬物濃度プロファイルから求めた角層を介した透過パラメータを用いることで、normal dose 適用時の薬物濃度値も予測できること、また、ヒトでの皮膚透過性に及ぼす製剤(基剤)の影響も評価可能であることを明らかにした。このように本章では、MD 法に DPK 試験を組合せた方法は、新たな動物実験代替法として活用できることを示したものであり、短時間の MD 適用による皮内動態解析が可能になったことから、被験者への負担も軽減され、試験の効率化に繋がることが期待される。

第3章では、毛嚢などの皮膚付属器官を介した薬物透過に関する *in vivo* 評価法は報告されていないことから、ブタ耳介皮膚を用いた HF-P 法に TS による DPK 試験を組合せた方法により、毛嚢を介して浸透する化学物質の皮内動態解析法を確立できるか検討している。分子量や分配係数の異なる9種類の化学物質について評価した結果、皮膚透過に対する毛嚢寄与率の高い極性化学物質ほど、HF-P 法を併用した *in vitro* 透過試験より求めた皮膚透過係数の変化率と、HF-P 法に DPK 試験を組合せた方法から求めた角層中濃度の変化率との間に良好な相関性が得られた。このことから、HF-P 処理に TS 法を併用することで、毛嚢を介して皮内に浸透する化学物質の皮内動態が解析できることを明らかにした。このように本章では、*in vivo* 試験にも応用し、化学物質の皮膚透過ルートに対する毛嚢ルートの寄与率を評価することで、皮膚への浸透経路の評価が可能となることを見出した。

以上、本研究では薬物等の経皮吸収に対する新たな促進法として TS 法を利用するため、薬物の経皮吸収促進および美容領域に利用可能な TS 用 PSA の特性を明らかにした。また、TS により実施する DPK 試験に MD 試験を組合せることにより薬物の経皮吸収性を推定するための新たなヒト試験法を提案し、さらに HF-P 処理を併用することによる皮内動態評価法を確立した意義は大きい。本論文で示された知見は、医薬品の臨床適用、さらには医薬品・化粧品開発に必要な評価法として非常に意義深いものであり、今後幅広く利用されることが期待される。従って、本論文は、独創的な研究であるとともに、新規性と有用性の観点からも意義深く、本研究科課程による博士(薬科学)論文に十分値するものであると判断した。