

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

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

菊池 啓介

目次

略号および記号	8
緒言	9
第1章 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	14
第1節 種々PSA の粘着特性の評価および皮膚バリア能に及ぼす	
テープストリッピング処理の影響	14
第1項 実験方法	16
1.1. 試薬および実験材料	16
1.2. 実験動物	16
1.3. PSA の作製	17
1.4. 180°剥離試験	17
1.5. プローブタック試験	17
1.6. 傾斜式ボールタック試験	18
1.7. 単回角層剥離試験	18
1.8. 連続角層剥離試験	18
1.9. 経表皮水分蒸散量の測定	19
1.10. 皮膚電気抵抗の測定	19
1.11. <i>In vitro</i> 皮膚透過実験	19
1.12. LID の定量	20
1.13. 皮膚組織切片の作製および観察	20
1.14. 統計解析	21
第2項 結果および考察	22

2. 1.	種々PSA の物性評価	22
2. 2.	種々PSA の単回角層剥離力	23
2. 3.	累積角層剥離量、TEWL および skin impedance の測定	24
2. 4.	<i>In vitro</i> 皮膚透過実験	27
2. 5.	角層テープストリッピング処理後の皮膚組織切片像の観察	30
第 3 項	小括	32
第 2 節 薬物の皮膚透過性および皮膚中濃度に及ぼす		
	実使用に即したテープストリッピング処理の影響	33
第 1 項	実験方法	34
1. 1.	試薬および実験材料	34
1. 2.	実験動物	34
1. 3.	<i>In vitro</i> 皮膚透過実験	34
1. 4.	皮膚中濃度測定	35
1. 5.	LID の定量	35
1. 6.	<i>In vivo</i> 皮膚刺激性試験方法	35
1. 7.	統計解析	36
第 2 項	結果および考察	37
2. 1.	リドカインテープを適用した <i>in vitro</i> 皮膚透過実験	37
2. 2.	皮膚中薬物濃度測定	38
2. 3.	<i>In vivo</i> 皮膚刺激性試験	41
第 3 項	小括	43
第 2 章 角層テープストリッピング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	44

第1節 薬物の皮内動態評価における MD 適用の影響	44
第1項 理論	46
1.1. 皮膚透過挙動からの透過パラメータ算出方法.....	46
1.1.1. Fick の拡散則に従う 1 層膜モデル透過挙動の解析	46
1.1.2. Fick の拡散則に従う 2 層膜モデル透過挙動の解析	49
第2項 実験方法	52
2.1. 試薬および実験材料.....	52
2.2. 実験動物.....	52
2.3. <i>In vitro</i> 皮膚透過実験	52
2.4. 皮膚透過実験サンプル溶液の定量法.....	53
2.4.1. HPLC での定量法.....	53
2.4.2. LC/MS/MS での定量法	53
2.6. DPK 試験法.....	54
2.7. 角層厚の推定方法.....	55
2.8. 角層中薬物濃度の分析方法.....	57
2.8.1. HPLC および LC/MS/MS での LID 定量法	57
2.8.2. AMS での ¹⁴ C-LID 定量法	57
2.9. 角層中薬物プロファイルからの透過パラメータ算出方法.....	58
2.10. 統計解析.....	59
第3項 結果および考察	60
3.1. <i>In vitro</i> 皮膚透過実験での normal dose および MD 適用時の 透過挙動の評価.....	60
3.2. Normal dose および MD 適用時の DPK 試験結果.....	64
3.2.1. DPK 試験での normal dose および MD 適用時の	

皮内動態挙動の評価	64
3.2.2. Normal dose および MD 間での皮内動態挙動の線形性	67
3.2.3. Normal dose および MD 適用後の非定常状態皮膚透過時の 皮内動態挙動の評価	68
3.2.4. MD 適用後の非定常状態皮膚透過時の角層透過パラメータを 用いた normal dose 適用後の皮内動態挙動の予測.....	71
第4項 小括	74
第2節 実使用に即した MD 適用時の薬物の皮内動態に及ぼす 製剤化の影響	75
第1項 実験方法	76
1.1. 試薬および実験材料.....	76
1.2. 製剤の調製.....	76
1.3. 実験動物および被験者.....	77
1.4. DPK 試験法.....	77
1.4.1. ブタ耳介皮膚	77
1.4.2. ヒト試験	78
1.5. 角層中薬物濃度の分析方法.....	79
1.5.1. LC/MS/MS での TA 定量法	79
1.5.2. AMS での ¹⁴ C-TA 定量法.....	80
1.6. 角層中薬物プロファイルからの透過パラメータ算出方法.....	80
1.7. 統計解析.....	80
第2項 結果および考察	81
2.1. ブタ耳介皮膚を用いた DPK 試験.....	81
2.2. ヒト DPK 試験.....	83
2.2.1. MD 適用時のヒト DPK 試験.....	83

2.2.2.	MD 適用後の非定常状態皮膚透過時の角層透過パラメータを用いた normal dose 適用後の皮内動態挙動の予測	84
2.2.3.	Normal dose 適用時のヒト試験.....	85
2.2.4.	normal dose 適用後の皮内動態挙動の実測値と予測値の比較	88
第3項	小括	90
第3章 角層テープストリッピング法と毛嚢プラグギング法を用いた		
	薬物の皮内動態評価法の確立に関する検討.....	91
第1項	実験方法	93
1.1.	試薬および実験材料.....	93
1.2.	実験動物および皮膚摘出処理法.....	94
1.3.	毛嚢プラグギング (HF-P) 法	95
1.4.	<i>In vitro</i> 皮膚透過実験.....	95
1.5.	DPK 試験.....	96
1.6.	HPLC および蛍光分光光度計での定量法.....	96
1.7.	皮膚透過パラメータの算出.....	97
1.8.	角層中薬物プロファイルからの角層透過パラメータの算出.....	98
第2項	結果および考察	99
2.1.	化学物質の皮膚透過性に及ぼす HF-P 処理の影響	99
2.1.1.	<i>In vitro</i> 皮膚透過実験	99
2.1.2.	DPK 試験	100
2.2.	化学物質の皮膚透過パラメータへ及ぼす HF-P 処理の影響	102
2.2.1.	<i>In vitro</i> 皮膚透過実験	102
2.2.2.	DPK 試験	103
2.3.	AUC および皮膚透過パラメータの変化比に及ぼす HF-P 処理の影響	105

第3項 小括	107
総括	108
謝辞	112
参考文献	113

略号および記号

略号		記号	
PSA	Pressure Sensitive Adhesive	C ($\mu\text{g/mL}$)	濃度
EHA	2-ethylhexyl acrylate	C_v ($\mu\text{g/mL}$)	基剤中濃度
AA	Acrylic acid	C_{sc} ($\mu\text{g/mL}$)	角層中濃度
NVP	N-vinyl-2-pyrrolidone	C_{ved} ($\mu\text{g/mL}$)	生きた表皮・真皮 中濃度
EP	Ethyl paraben	K	膜/基剤間の分配 係数
BP	Butyl paraben	KL	分配パラメータ
ISMN	Isosorbide-5-nitrate	K_{sc}	角層/基剤間の分 配係数
FD-4	Fluorescein isothiocyanate-dextran ($M.W.: 4400$)	K_{ved}	生きた表皮・真皮/ 基剤間の分配係数
AMP	Aminopyrine	K_w	水の角層-表皮細 胞間分配係数
ISDN	Isosorbide dinitrate	D (cm^2/s)	膜中拡散係数
Ca-Na	Sodium calcein	D_{sc} (cm^2/s)	角層中拡散係数
LID	Lidocaine hydrochloride monohydrate	D_{ved} (cm^2/s)	生きた表皮・真皮/ 基剤間の拡散定数
MEP	Mepivacaine hydrochloride	D/L^2 (s^{-1})	拡散パラメータ
DFP	Diisopropyl fluorophosphate	D/L^2_{sc} (s^{-1})	角層中拡散パラメ ータ
PBS	Phosphate buffered saline	L, x (cm)	バリアの厚み
HPLC	High performance liquid chromatography	L_{sc} (cm)	角層の厚み
LC/MS/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry	L_{ved} (cm)	生きた表皮・真皮 の厚み
		t (h)	時間
AMS	Accelerator Mass Spectrometry	P (cm/s)	透過係数
		P_{sc} (cm/s)	角層透過係数
KA	Kojic acid	P_{ved} (cm/s)	生きた表皮・真皮 透過係数
BR	4-Butylresorcinol	Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	累積透過量
RD	Rhododol	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	膜透過速度
MP	Methyl paraben	$TEWL$	経表皮水分損失
MD	Microdose	$I.C.$	初期条件
DPK	Dermatopharmacokinetics	$B.C.$	境界条件

緒言

粘着剤は、紀元前の時代に中国やエジプトで使用されていた膏薬が起源といわれている¹⁾。本邦では江戸時代に富山の薬売りの商業的成功とともに「萬金膏」や「水森無二膏」などの膏薬の利用が盛んになった²⁾。さらに明治時代になると絆創膏が普及し、第二次世界大戦直後にはセロハンテープやビニールテープが開発された。その後、様々な粘着テープやラベル、包装、建材、電気・電子機器、医療など各種用途にあった産業用の粘着剤が開発され、今日では私たちの生活にとってなくてはならないものになっている。1980年頃に、スコポラミンやニトログリセリンのような皮膚局所に適用後、全身循環系に吸収された後に効果を発揮する薬物を粘着層に含有した経皮吸収治療システム（Transdermal Therapeutic System : TTS）や経皮薬物送達システム（Transdermal Drug Delivery System : TDDS）が開発されるようになると、粘着剤は今までも増して医療分野での存在感を示していった。また、インドメタシンやケトプロフェン等の非ステロイド性抗炎症薬（Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs : NSAIDs）を粘着層に含有した第2世代パップ剤の研究開発も進み、粘着剤を用いた局所外用剤（Topical Formulation）も広く使われるようになった。さらに現在では、これら外用医薬品だけではなく、美白効果や抗しわ・老化等の機能性を持たせた医薬部外品・化粧品開発にも粘着剤が利用されるようになった。

一方で、このような様々な外用製品の研究・開発に伴い、皮膚局所での有効性や安全性を評価するために、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汎用されるようになった。すなわち、テープストリッピング法は、すでに外用医薬品の生物学的同等性の評価³⁾や経皮吸収促進剤の作用メカニズムの評価⁴⁾に、また、化粧品開発では角層形状、角層細胞の組織学的評価や角層バリア能の評価等⁵⁻⁷⁾に用いられており、外用製品の欠点の一つである低い皮膚透過性を改善する皮膚透過促進法⁸⁾としても知られている。このような背景から、著者は現在の粘着剤やテープストリッピング法にさらに工夫を凝らすことによって外用医薬品や化粧品等の経皮投与製剤の新たな適用法や評価法を開発・提供できる可能性があると考えた。以下、考える

る問題点や活用法について論述する。

まず、現状での粘着剤の問題について以下に示す。

現在、臨床現場で繁用されている粘着剤利用製剤である **TDDS** や **Topical Formulation** では、含有薬物の皮膚透過性が十分でないものも多く存在している。例えば、穿刺時の痛みを抑える前処理剤として用いられているリドカインテープ剤（商品名ペンレス[®]）は、皮膚の最外層に位置する角層が高いバリア機能を有するため、短時間の貼付では十分な麻酔効果が得られないことが報告されている⁹⁾。角層は死んだ角質細胞と細胞間脂質からなる親油性の高い緻密な膜であり、外部からの異物の侵入や体内からの水分の蒸発を防ぐ役割を果たしているため、多くの薬物の皮膚透過性は十分ではなく、作用発現部位（全身または局所）での濃度が低くなる場合がある¹⁰⁻¹²⁾。薬物の効果や毒性の発現は **Hill** 式によって説明することができ、反応強度と作用発現部位中濃度の関係で表される^{13, 14)}。したがって、薬物の速やかな効果発現を期待するためには、この角層バリアを克服し、皮膚透過性や作用発現部位中濃度を増大することが重要である^{21, 22)}。そのため、**TDDS** や **Topical Formulation** の開発では、プロドラック化や化学的促進剤の利用が 1980 年代後半から研究されてきた。また近年では、この角層バリアによる低透過性を改善するために、物理的促進法であるエレクトロポレーション（**EP**）やマイクロニードル（**MN**）が注目されてきた。すでに、**EP** 処理や **MN** の経皮吸収促進効果について試験が行われ¹⁵⁻²⁰⁾、**MN** の吸収促進効果は、穿孔した角層の面積や **MN** の長さが角層バリア能の低下に密接に関係していることが明らかとされている¹⁵⁾。しかし、**MN** には適用面積が狭い、取り扱いが難しい、コストが高いという問題点もある。そのため、より簡便な方法による皮膚透過性改善方法が期待されている。

そこで著者は、取り扱いが容易でかつ安価である **PSA** を用いてリドカインパッチ等の経皮吸収製剤や貼付剤を適用する前に角層を **PSA** で数回テープストリッピング処理することで、皮膚透過性を改善できると考えた。なお、薬物の皮膚局所での速やかな効果発現には、皮膚透過性の改善だけではなく皮膚中薬物

濃度の増加が重要である^{21, 22)}。しかし、医療分野で用いられている角層剥離剤（ピール剤）では、十分な角層ピール効果が得られないことがあり、有効な前処理用ピール剤の開発が求められている。一方で、美容分野では、しみ・くすみおよびニキビ跡等の治療を目的としてサリチル酸マクロゴール²³⁾やグリコール酸²⁴⁾を用いたケミカルピーリングが施術され、表皮ターンオーバーの亢進や角層の平坦化、角栓・皮脂等の除去に伴う表皮の健常化が期待されている。また、美白成分の皮膚への吸収性の向上を目的とした角層のピーリング（施術の前処理）も行われている。しかしながら、これらの施術法に規制はなく、時に角層を取り過ぎてしまいヒリヒリ感や赤みの原因となっているケースも多い²⁵⁾。そのため、取り扱いが簡易であり誰でも安全に利用可能な美容ピール剤の開発も併せて求められている。

次に、テープストリッピング法の新たな活用例を以下に示す。著者はテープストリッピングによって剥離した角層中の薬物濃度から角層中薬物濃度プロファイルを見積もる方法である皮膚薬物動態学的（*dermatopharmacokinetics* : DPK）試験²⁶⁾に新たな概念を導入することで新たな活用法を見出せると考えた。すなわち、DPK試験はヒトを用いた *in vivo* 試験²⁷⁻³¹⁾が可能であり、すでに定常状態皮膚透過時の角層中薬物濃度から局所皮膚適用製剤の後発医薬品の生物学的同等性を評価する方法²⁶⁾として利用されている。

TDDS や外用剤に限らず、今日の医薬品開発には膨大な時間と莫大な費用が必要である。特に臨床試験にかかる費用は莫大であるため、開発費の削減と開発時間の短縮化を狙って、近年、薬効および毒性が全く現れない用量で試験をする MicroDose (MD) 試験法が考案された。すなわち、MD試験は Phase 1 試験開始前の前臨床試験として、ヒトに臨床投与量の 1/100 以下かつ 100 μg を超えない極微量の候補化合物を投与し、その体内動態を推定するものである³²⁻³⁴⁾。

現在の外用医薬品や機能性を期待する化粧品（機能性化粧品）の開発では、摘出動物皮膚や摘出ヒト皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過試験により候補化合物の有効性および安全性が推定されている^{35, 36)}。しかし一方で、外用医薬品や機能

性化粧品に含有させる候補化合物の選定は、生理学的または薬理学的特性を重視する傾向がある³⁷⁾。しかし、選定された候補化合物で *in vitro* 試験や *in vivo* 試験を行うと、期待した効果が得られない場合や刺激性など予期しない副作用が生じる場合は再び候補化合物を選びなおす必要がある。また、摘出ヒト皮膚は高価で希少であることから入手が困難であり、かつバリア能の不均一性や血流が欠損している等の実験上の問題も存在する^{38,39)}。さらに、欧州連合 (EU) 内では 2013 年から動物実験を行った化粧品の製造・輸入が禁止されており、これが世界的な潮流となってきている⁴⁰⁻⁴⁵⁾。現在、動物愛護法の改正施行により 3Rs (動物実験の代替 **Replacement**、実験動物数の制限 **Reduction** および動物実験内容の見直し **Refinement**) の徹底が推し進められており、動物実験代替法に関する研究も広く行われるようになってきた。しかし、特に有用とされている三次元培養ヒト皮膚モデルでも皮膚腐食性・刺激性試験のみに利用されているだけで⁴⁶⁻⁴⁹⁾、皮膚透過性や皮膚中濃度評価法への応用は未だ検討段階にあるのが現状である⁵⁰⁻⁵²⁾。また、実皮膚を忠実に模倣する三次元培養ヒト皮膚モデルの構築は難しいことから、新しい視点に立って動物実験代替法を確立することが必要であるとも考えられている。以上のことから、経皮投与製剤における MD 試験法の確立は外用医薬品のみならず化粧品の開発促進にも極めて有用であると考えられる。そこで著者は、MD 試験法の概念を導入することで新たな DPK 試験法の確立が可能であると考えた。

一方、前述したように、今日では外用医薬品をはじめ、医薬部外品や化粧品など様々な剤形の経皮投与製剤が開発され市場を賑わしている。しかし、2010 年の加水分解小麦を含有した「茶のしずく石鹸」によるアレルギー発生⁵³⁾や 2013 年の美白成分ロドデノールを配合した医薬部外品製剤の使用による白斑症状の発生^{54,55)}など、少なからぬ健康被害事象の報告・報道がなされ、大きな社会問題となった。経皮投与製剤の開発では有効成分の効果・効能ばかりでなく安全性の保証が非常に重要であると考えられる。これらの指標として全身作用薬では、血中薬物濃度測定による **bioavailability** の評価⁵⁶⁻⁵⁸⁾や **TDM** などの体内動態評価^{59,60)}が行われている。また、局所作用薬では、角層テープストリッ

ピング法を用いた DPK 試験によって皮内動態評価が行われている。しかしながら、DPK 試験は角層が主な皮膚透過ルートである化学物質に用いることができるが、水溶性化学物質や高分子化学物質等の経付属器官が主な透過ルートである化学物質の評価には向いていないという問題点がある。

Horita らの報告によると、毛嚢プラグギング処理 (hair follicle-plugging : HF-P) を施した皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過試験⁶¹⁻⁶³⁾によって、水溶性化学物質の皮膚透過性が毛嚢寄与率によって減少することを明らかにし、その減少率から種々化学物質の皮膚透過に対する経毛嚢ルートの寄与率を算出しており⁶¹⁾、化学物質の皮膚透過ルートを区別・評価できる。そこで著者は、HF-P 処理を施した皮膚を用いた DPK 試験により、HF-P 処理の有無によって生じる角層中濃度や皮膚透過パラメータの差を比較することで、毛嚢を介して皮内に浸透する化学物質の皮内動態解析が可能になるのではないかと考えた。

これらの多様な背景を勘案し、本研究では、粘着剤と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および評価法の開発について検討した。まず、第 1 章では、新規 PSA ピール剤を用いた新しい角層テープストリッピング法の開発に関する検討を行うこととした。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-A, B を作製し、その角層ピール効果とその効果の及ぼす薬物透過性への影響について評価することで新規に調製した PSA ピール剤の有用性について検討した。また第 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における MD 試験法を組み込んだ DPK 試験法の確立に関する検討を行った。Fick の拡散則に従う解析法を中心として、MD 適用時に考えうる問題点について吟味し、経皮投与製剤における MD 試験法の確立およびその有用性について検討した。さらに第 3 章では、角層テープストリッピング法と HF-P 法を用いた皮膚適用後の薬物の皮内動態評価法の確立に関する検討を行った。

以下、得られた結果について論述する。

第1章

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節

種々 PSA の粘着特性の評価および皮膚バリア能に及ぼす テープストリッピング処理の影響

本章では、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-A および B を作製し、その角層ピール効果と薬物透過性への影響について検討し、PSA-A および B の有用性について評価した。

まず、本章第1節では、市販 PSA (Cellotape[®]や Scotch tape[®]) の粘着性を調整することにより新規 PSA-A および B を作製した。一般に PSA の代表的な特性は、粘着力 (剥離力) や接着性 (タック) とされ、前者は恒久の接着性の指針として、後者は瞬間の接着性の指針として広く特性評価に用いられている⁶⁴⁾。そこで、作製した PSA-A および B と比較対照として市販 PSA (Cellotape[®]や Scotch tape[®]) を用いて 180°剥離試験、プローブタック試験、および傾斜式ボールタック試験の3種類の試験を行い、これら PSA の物性値⁶⁵⁾とした。180°剥離試験は PSA の粘着面と被着体との接触によって生じる力、言い換えれば、貼ったものを引き剥がすのに必要な力を評価する試験である。また、プローブタック試験や傾斜式ボールタック試験は共に粘着剤の主要性質のひとつで、軽い力で短時間に被着体に粘着する力 (ベタツキ) を評価する試験である。前者は古くから行われていた PSA の粘着面に親指を押しつけ、引き剥がす時の抵抗を官能的に評価する試験を発展させた試験であり、後者は瞬間的に被着体に粘着する力を評価する試験であり、傾斜台 (30°) に PSA の粘着面を上向きに貼り、上部から異なるサイズのベアリング球をころがし、粘着面で停止するボールナンバーを

数える試験である。その後、これらの PSA を用いて角層剥離量を測定して粘着剤特性を求めた。さらに、ヘアレスラット背部皮膚バリア能変化に及ぼす PSA-A および B と市販 PSA のテープストリッピング回数の影響⁶⁵⁾を、皮膚バリア能の指標である経表皮水分蒸散量 (transepidermal water loss, TEWL) や皮膚電気抵抗 (skin impedance)、また、角層剥離重量および皮膚組織切片画像観察により評価した。加えて、経皮局所麻酔薬であるリドカイン塩酸塩の皮膚透過性に及ぼす種々 PSA を用いたテープストリッピング処理による影響を調べた。

第1項 実験方法

1.1. 試薬および実験材料

PSA-A および B の比較対照として、市販 PSA である Cellotape[®] (セロテープ[®]、ニチバン株式会社、東京、日本) と Scotch tape[®] (Scotch[®]、住友スリーエム株式会社、東京、日本) を使用した。リドカイン塩酸塩 (Lidocaine hydrochloride monohydrate: LID) は、シグマアルドリッチジャパン株式会社 (東京、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は液体クロマトグラフ (HPLC) 用を使用した。試薬および溶媒は精製せずにそのまま用いた。Table 1 に PSA-A および B の構成材料を示す。

Table 1 Recipe of fabricate PSA-A and PSA-B

(1) PSA-A

Material	Conc. (%)	Composition ratio	Molar ratio	M _n * (kD.)
Polymer mixture a	35	100	2EHA ^α /AA ^β = 82/18	ca.1,000
Polymer mixture b	45	155	2EHA / NVP ^γ = 88 / 12	ca. 800
Oligomer mixture	85	123	2EHA / NVP = 80 / 20	ca. 6.0
Isothianate cross-linker	50	1		
Ethyl acetate	0	300		

(2) PSA-B

Material	Conc. (%)	Composition ratio	Molar ratio	M _n * (kD.)
Polymer mixture a	35	100	2EHA / AA = 80 / 20	ca. 650
Polymer mixture b	45	155	2EHA / NVP = 88 / 12	ca. 800
Oligomer mixture	90	115	2EHA / NVP = 88 / 12	ca. 6.0
Glycerin	100	70		
Isothianate cross-linker	50	1		
Ethyl acetate	0	200		

*: average number of the molecular weight.

α) 2-ethylhexyl acrylate. β) acrylic acid. γ) N-vinyl-2-pyrrolidone.

1.2. 実験動物

体重200-230 gの雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht系) は城西大学生命科学研究センター (坂戸、埼玉、日本) または石川実験動物研究所 (深谷、埼玉、日本) から購入した。ラットは、25 ± 2°Cに調節され12時間ごとに明暗サイクル (on、off 時間: 07:00-19:00 h) を繰り返す部屋で飼育した。また、餌はオリエンタル酵

母工業株式会社（東京、日本）から購入した。なお、水と餌は自由摂取とした。

ブタ耳介は株式会社埼玉実験動物供給所（杉戸、埼玉、日本）（注：現在は東京実験動物に業務移管）から購入した。搬入したブタ耳介は冷凍保存し、実験前に温水中に浸け、その都度解凍して使用した。なお、動物の飼育および実験は城西大学全学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験規定に従って行った。

1.3. PSA の作製

Table 1 に示した構成材料を混合し、得られた粘着剤組成物の酢酸エチル溶液を厚さ 50 μm のポリエチレンテレフタレートフィルム（東レ株式会社、東京、日本）上に、乾燥後の塗布量が 50 g/m^2 （厚さ 40 μm ）となるようにアプリケーションによって塗布した。その後、粘着剤に不必要な酢酸エチルを 100°C で 3 分間で蒸発させて粘着剤層を得た。これを PSA-A および B とした。

1.4. 180°剥離試験⁶⁴⁾

引張り試験機として Autograph (AG-IS、島津製作所、京都、日本) を用いた。SUS304 鋼板を試験板とし、試験板は使用前後にアセトンで洗浄した。PSA を幅 25 mm、長さ 70 mm に切断し、試験片を得た。試験片を試験板へ質量 2 kg 圧着ローラーを用いて、10 mm/s の速度で 2 往復して圧着し、30 分間置いたものを測定試験片とした。測定は、温度 23 \pm 2.0°C、湿度 50 \pm 5.0% の環境下で行い、試験機を 5.0 mm/s で運転し測定した。PSA が試験板から引きはがれるときの力 (N/cm) を剥離力とした。測定結果は、同一条件で 3 回測定した値の平均値とした。なお、本試験は JIS 法に従って行った。

1.5. プロブタック試験⁶⁴⁾

試験機として Probe Tack Tester (RPT100、株式会社レスカ、東京、日本) を用いた。直径 18 mm の表面を研磨したステンレス製のプローブを使用し、測定は、温度 23 \pm 2.0°C、湿度 50 \pm 5.0% の環境下で行い、粘着剤表面にプローブを一

定接触圧 100 g/cm²、一定接触時間 1 秒で圧着し、一定引きはがし速度で引きはがしたときの解結合に要する最大力 (g/cm²) を測定した。なお、測定結果は同一条件で 9 回測定した値の平均値とし、本試験は JIS 法に従って行った。

1. 6. 傾斜式ボールタック試験⁶⁴⁾

試験機として Ball Tack Tester (PI-1201、テスター産業、三芳、埼玉、日本) を用いた。SUJ2 を試験ボールとし、1/32 インチから 1 インチまでの 32 種を使用した。試験ボールは使用前後にトルエンとエタノールで洗浄した。PSA を幅 50 mm、長さ 250 mm に切断し、試験片を得た。傾斜板は、傾斜角を 30°に設定し、助走路を 100 mm とし、測定部は、助走路の下端から 100 mm を粘着面とした。測定は、温度 23 ± 2.0°C、湿度 50 ± 5.0%の環境下で行った。測定結果は粘着面上で 5 秒間以上停止した最大のボールナンバー (No.) をもって表し、同一条件で 3 回測定した値の平均値とした。なお、本試験は JIS 法に準拠した J. Dow 法に従って行った。

1. 7. 単回角層剥離試験

ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下、ヘアレスラット背部皮膚を剃毛処理した後、正中腺を挟んで左右の 2 カ所の皮膚を使用し、種々 PSA を定重量 (2 kg) で 1 往復圧着し、ヘアレスラット背部皮膚の角層を定速 (5.0 mm/s) で剥離した (剥離面積 4 cm²)。また、ブタ耳介皮膚もヘアレスラット背部皮膚と同様に剃毛処理した後に種々 PSA を用いて角層を剥離した。角層剥離処理前後の PSA 重量をマイクロ電子天秤 (MX5、メトラー・トレド株式会社、東京、日本) を用いて測定し、その差から角層剥離量を求め角層剥離力とした。

1. 8. 連続角層剥離試験

1. 7.と同様の方法で角層剥離量の測定を 1 から 20 回目まで連続して行い、累積剥離角層重量を測定した。なお、用いた PSA は角層剥離処理毎に新しいものに交換し、使用した。

1.9. 経表皮水分蒸散量の測定

ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下で、雄性ヘアレスラット背部皮膚を剃毛処理した後、正中線を挟んで左右の2カ所の皮膚を使用し、全層皮膚 (intact skin) とした。1. 8.と同様に種々PSA を用いてテープストリッピング処理を1から20回まで行った。Intact skin を含み、1回毎にTEWLをVapo Scan (AS-VT100RS、株式会社アサヒテクノラボ、横浜、日本) を用いて測定した。

1.10. 皮膚電気抵抗の測定

ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下で、剃毛処理した後の雄性ヘアレスラット背部皮膚を正中線を挟んで左右から2枚ずつ皮膚を摘出し、全層皮膚 (intact skin) とした。種々PSA を用いてテープストリッピング処理を最大20回まで規定処理回数行った後、摘出した。Cellotape®を用いて20回テープストリッピング処理を行い、角層を完全に除去した皮膚をstripped skin とした。摘出した皮膚の皮下脂肪と血液を丁寧に取り除き、side-by-side diffusion cell (有効透過面積0.95 cm²)⁶⁶⁾にセットし、両セル中をpH7.4等張リン酸緩衝液 (PBS) で満たした。測定には10 Hzの交流電流を供給するImpedance Meter (Advance、東京、日本) を用い、電極はAg-AgCl電極を使用した。測定中は電極の陽極を角層側、陰極を真皮側に適用した。2時間水和後、skin impedanceを測定した。

1.11. *In vitro* 皮膚透過実験⁶⁷⁻⁷⁰⁾

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下、除毛処理後のヘアレスラット背部皮膚を正中線を挟んで左右対称に2枚ずつ摘出した (intact skin)。種々PSA を用いてテープストリッピング処理を最大20回まで規定処理回数行った後、摘出した。stripped skin は1. 10.と同様とした。摘出皮膚は真皮側の皮下脂肪と血液を丁寧に取り除き、縦型拡散セル (セル容量: 6.0 mL、有効透過面積: 1.77 cm²)⁷¹⁾に装着した。PBS を角層側に1.0 mL、真皮側へ6.0 mL適用し、1時間水和した。水和後、角層側のPBSを取り除き、角層側へ10 mMのLID溶液を1.0 mL適用した。薬物溶液の作成には水性溶媒としてPBSを用いた。実験中

セルの温度は 32°C に保ち、レシーバーセル内はスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラーにより 500 rpm で回転させることで攪拌した。経時的に真皮側から 0.5 mL サンプリングし、その都度、同量の PBS を真皮側に補充した。サンプル溶液中の LID 濃度は HPLC を用いて定量した。

1. 12. LID の定量

内部標準物質としてエチルパラベン (EP) を用い、EP を含んだアセトニトリルとサンプル溶液を 1 : 1 で混和した。遠心分離 (15,000×g、5 min、4°C) によりタンパク除去を行った後、上清中 LID 濃度を HPLC にて測定した。HPLC のシステムは、system controller (SCL-6B; 島津製作所、京都、日本)、pump (LC-10AD; 島津製作所)、auto-injector (SIL-7A; 島津製作所)、column oven (CTO-6A; 島津製作所)、UV detector (SPD-6A; 島津製作所)、chromatopac (C-R6A; 島津製作所) を用いた。カラムには Inertsil® ODS-3 5 μm, 4.6×150 mm (GL Sciences Inc.、東京、日本) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相は acetonitrile : 0.1% phosphoric acid = 3 : 7 + 5 mM 1-heptanesulphonate を用い、流速 1.0 mL/min とした。また、injection volume は 20 μL とし、検出波長 UV 260 nm でピーク面積比を算出した。

1. 13. 皮膚組織切片の作製および観察

透過実験終了後のヘアレスラット背部皮膚を縦型拡散セルから摘出した後、フェザー剃刃 S 両刃 (フェザー安全剃刃、大阪、日本) を用いて約 2 mm の厚さに切り、川本法用凍結包埋剤 (SCEM、ライカマイクロシステムズ株式会社、東京、日本) に包埋し、ドライアイスを入れたイソペンタン中で速やかに凍結させた。その後、クライオスタット (CM3050S、ライカマイクロシステムズ株式会社、東京、日本) を用いて、垂直方向の皮膚凍結切片 (厚さ 10 μm) を作成した。作成した皮膚凍結切片にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色^{72, 73)}を行った後、位相差顕微鏡 (IX71、オリンパス、東京、日本) を用いて観察した。

1. 14. 統計解析

種々PSA を用いた角層テープストリッピング処理によって得られた角層剥離量の有意差検定には unpaired *t*-test を用い、 $p<0.05$ を有意と判断した。

第 2 項 結果および考察

2.1. 種々 PSA の物性評価

PSA の物性は、粘着力（剥離力）や接着性（タック）によって広く評価されており、その試験法は JIS 法によって規定されている。そこで、今回作製した新規 PSA-A および B の比較対照（コントロール）として市販 PSA（Scotch tape[®] と Cellotape[®]）を選択し、180°剥離試験、プローブタック試験、および傾斜式ボールタック試験を行い、これら PSA の物理特性を評価した。Table 2 に種々 PSA を用いた 180°剥離試験、プローブタック試験、および傾斜式ボールタック試験の結果を示す。180°剥離力は、Scotch tape[®]（11.6）が最も大きく、高い粘着力を有していた。次いで PSA-A（7.6）、Cellotape[®]（5.8）、PSA-B（2.5）の順となり、粘着面を引き剥がすのに必要な力である剥離力は全ての PSA で異なることが明らかとなった。また、PSA-A および B の平均剥離力の S.D.は市販 PSA の S.D.と同等であり、このことは、Table1 の組成で調製した PSA-A および B は、一定の規格特性で調製できることを示している。軽い力で短時間に被着体に粘着する力（ベタツキ）を評価する試験であるプローブタックやボールタックは、前者では PSA-B が 418 とその他の PSA と比較して約半分の値となり、PSA-A は市販の PSA の値に近かった。後者では、PSA-B が 27 と非常に高い接着性を有していることがわかった。次いで PSA-A（16）、Cellotape[®]（11）、Scotch tape[®]（5）の順であった。一般的にボールタック値が高いと、粘着力が低くなる傾向があり、特に PSA-B にはその傾向が強くみられた。さらに、剥離後に被着体への粘着剤の残留は認められず、PSA-A および B は十分な凝集力があるものと考えられる。

以上の結果より、PSA-A は総じて市販の PSA に近い粘着特性を、一方、PSA-B は市販の PSA とは異なる粘着特性を有していることが明らかとなった。

Table 2 Adhesive properties of various PSAs.

PSA	180° peel (N/25 mm)	Prove tack (g/1.8 cm ²)	Ball tack (No.)
PSA-A	7.6 ± 0.3	846 ± 36.1	16
PSA-B	2.5 ± 0.7	418 ± 22.6	27
Cellotape [®]	5.8 ± 0.3	958 ± 47.8	11
Scotch Tape [®]	11.6 ± 0.6	903 ± 106.0	5

Each value shows the mean ± S.D. (n=3-9).

2. 2. 種々PSA の単回角層剥離力

次に種々PSA の角層の剥離性を調べるために、PSA を用いてヘアレスラット背部皮膚およびブタ耳介皮膚の角層を単回テープストリッピングして（剥離面積 4 cm²）、角層剥離量を測定した。Fig. 1 に種々PSA を用いてヘアレスラット背部皮膚、ブタ耳介皮膚を単回テープストリッピング処理を行った際の角層剥離量を示す。角層剥離量は、どちらの皮膚を使用した場合でも PSA-A > PSA-B ≫ Cellotape[®] ≒ Scotch tape[®] の順となった。このとき Cellotape[®] をコントロールとして有意差検定した結果、有意水準 α (0.01) において PSA-A および B とともに剥離量が有意に高く ($p < 0.01$)、単回テープストリッピングでは PSA-A および B のどちらでも角層剥離力の高いテープであることがわかった。

また、ヘアレスラット背部皮膚からの単回角層剥離量はどの PSA を用いた場合でもブタ耳介皮膚からのそれと比べ約 2 倍の値であった。動物種差間での角層剥離量に違いはあったが、両者の単回角層剥離量間での相関をみると $r = 0.997$ であり (data not shown)、剥離量には良好な相関が認められた。動物種差間で角層剥離量に違いがみられたのは、ブタの角層は比較的人の角層に構造が近く、角層細胞間の接着力が強固なのに対し、ヘアレスラットの角層は角層細胞間の構造が未熟であり強度が弱いためと考えられる。

以上の結果から、以降の実験では *in vivo* 試験の可能なヘアレスラット背部皮膚のみを用いて評価することとした。

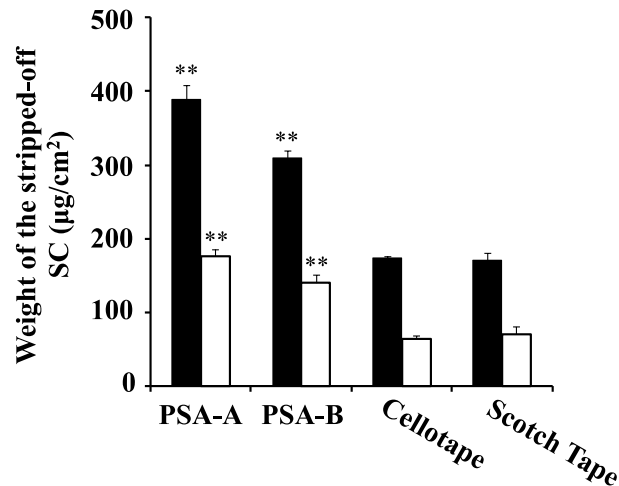


Fig. 1 Weight of removed SC from hairless rat skin by one time-stripping using different PSAs.

Symbols: Hairless rat dorsal skin (■), Pig ear skin (□).

Each value shows the mean \pm S.E. (n=3). ** p <0.01.

2.3. 累積角層剥離量、TEWL および skin impedance の測定

次にテープ剤の角層バリア能に及ぼすテープストリッピング処理回数の影響を調べるため、種々PSA を用いてヘアレスラット背部皮膚の角層を連続的にテープストリッピングしたときの、累積角層剥離量、TEWL および skin impedance を算出した。Fig. 2 にテープストリッピング処理回数に対する累積角層剥離量の結果を示す。Cellotape®と Scotch tape®はストリッピング約 10 回目まで 1 回の角層剥離がほぼ同量ずつ行われて累積角層剥離量が増大し、それ以降は角層剥離がみられなかった。PSA-A では、ストリッピング約 4 回目まで著しく累積角層剥離量が増加し、その回数以降は、ほぼプラトーに達し、Cellotape®と Scotch tape®の累積角層剥離量に近い値 (1.3-1.5 mg/cm²) となった。この結果は、PSA-A を用いると市販の 2 種類の PSA よりも少ない処理回数で角層を剥離できることを示している。一方、PSA-B は、Fig. 1 に示した単回テープストリッピング処理時と同様に、初回では著しい角層剥離がみられたが、2 回目以降はほとんど角層剥離がみられなくなった。また、PSA-A や市販の PSA とは異なり、累積角層剥離

量は非常に低値 (0.5 mg/cm²) で一定となった。このように PSA-B は、今回試験した他の3種の PSA とは大きく異なる角層剥離特性を有していることが明らかとなった。これは、PSA-B に含有される glycerin がストリッピング後に角層上層に残存したため、2回目以降に貼付した PSA-B が角層へ接着しづらくなると推察された。

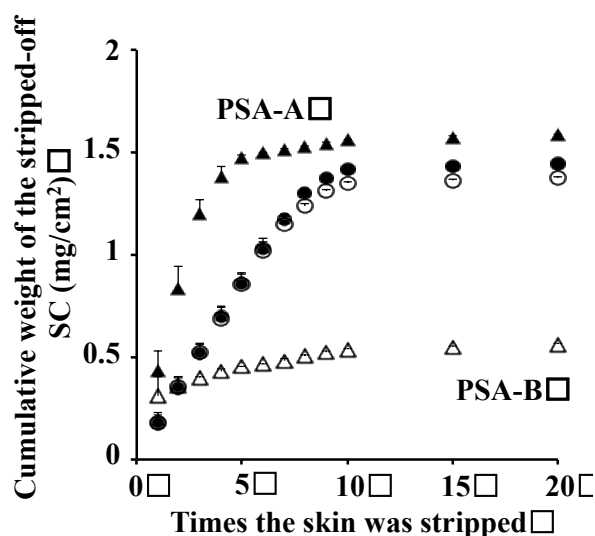


Fig. 2 Effect of tape-stripping times on the cumulative weight of removed SC from hairless rat skin.

Symbols: PSA-A (▲), PSA-B (△), Cellotape® (●), Scotch Tape® (○).

Each value shows the mean ± S.E. (n=3).

Fig. 3に TEWL および skin impedance の逆数値に及ぼす種々 PSA によるテープストリッピング処理回数の影響を示す。TEWL は体内水分の角層表面からの蒸発しやすさを表し、skin impedance は体内への電流の流れにくさを表しており、共に角層バリア能の評価に用いられている。しかし、skin impedance は性質上、TEWL とは挙動が逆になることから、その逆数値（コンダクタンス（電流の流れやすさ）としても捉えることできる）をプロットした。その結果、TEWL および skin impedance の逆数値は累積角層剥離量 (Fig. 2) と類似した挙動を示した。

TEWL および skin impedance の逆数値は、Cellotape[®]と Scotch tape[®]は共にストリッピング約 10 回時まで経時的に値が上昇し続け、TEWL では 80-90 g/h · m²、1/impedance では 8-9 kΩ/cm² となった以降は一定となった。PSA-A を用いた場合、ストリッピング約 5 回目まで急激に値が上昇し、その後、Cellotape[®]と Scotch tape[®]と同等の値 (TEWL: 80-90 g/h · m²、1/impedance: 8-9 kΩ/cm²) で一定となった。このことから PSA-A は市販 PSA と比べ、皮膚バリア能に及ぼすテープストリッピング処理の影響が大きいと考えられた。一方、PSA-B を用いた場合、ストリッピング初回は値が上昇したが、ストリッピング 2 回目以降では値の大きな変化がみられず TEWL では 20-30 g/h · m²、1/impedance では 0.5-1.0 kΩ/cm² と低い値で一定となった。このことから PSA-B は皮膚バリア能に及ぼすテープストリッピング処理回数の影響が小さいと考えられた。

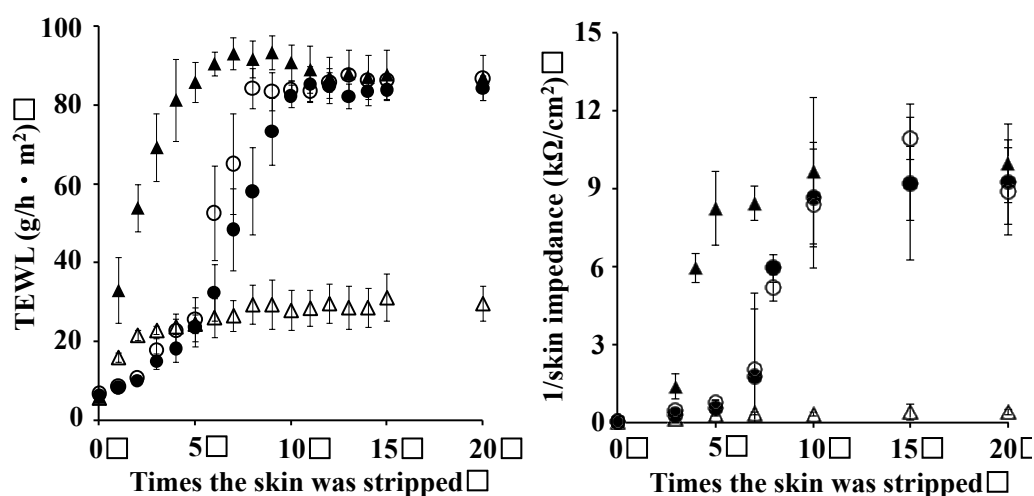


Fig. 3 Effect of tape-stripping times on TEWL and skin impedance values.

Symbols: PSA-A (▲), PSA-B (△), Cellotape[®] (●), Scotch Tape[®] (○).

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

以上のことから PSA-A および B は市販 PSA とは異なる角層剥離特性を有していることが確認された。PSA-A は強力な角層剥離力を有しており、少ない処理回数で皮膚バリア能に大きく影響を及ぼし、一方で、PSA-B は一定の角層剥離能を有しているが、皮膚バリア能に及ぼす角層テープストリッピング処理の影響

響は小さいことが示唆された。

2.4. *In vitro* 皮膚透過実験

LID 皮膚透過性に及ぼす角層テープストリッピング処理の影響について LID 皮膚透過実験を行い、調査した。種々 PSA を用いて角層テープストリッピング処理後のヘアレスラット背部皮膚に、LID 水溶液を適用して透過実験を行った。Fig. 4 に LID の皮膚透過プロファイルを示す。累積透過量を 6 時間目で比較すると、Cellotape[®]と Scotch tape[®]を用いた場合は、約 10 回ストリッピング時まで経時的な透過量の増加がみられ、その後は intact skin の透過量の 25 から 29 倍の値 (0.375-0.435 mg/cm²) の間で一定となった (Fig. 4c, d)。PSA-A を用いてテープストリッピングを行った場合、1 回ストリッピング後の累積透過量は intact skin の値 (0.015 mg/cm²) と比較し 5.2 倍 (0.078 mg/cm²) に増加し、2 回ストリッピング後では 9.2 倍 (0.138 mg/cm²)、3 回ストリッピング以降は 22 から 30 倍 (0.33-0.45 mg/cm²) の間で一定となり、高い皮膚透過促進効果が確認された (Fig. 4a)。一方、PSA-B の場合では、intact skin (0.015 mg/cm²) と比較し、1 から 20 回ストリッピングを行った場合でも 2 から 4 倍 (0.03-0.06 mg/cm²) の透過量の増加が認められた (Fig. 4b)。このことから PSA-B は処理回数に関わらず一定の透過促進効果が得られると考えられる。

以上より、PSA-A および B は市販 PSA とは異なる皮膚透過促進能があり、PSA-A は僅かな処理回数で高い透過促進効果が得られることから速やかな効果発現を期待できる有効な前処理用ピール剤として利用できる可能性が考えられた。また、PSA-B は処理回数に関わらず、一定の透過促進効果が得られることから安全に使用可能な前処理用ピール剤として利用できる可能性が考えられた。

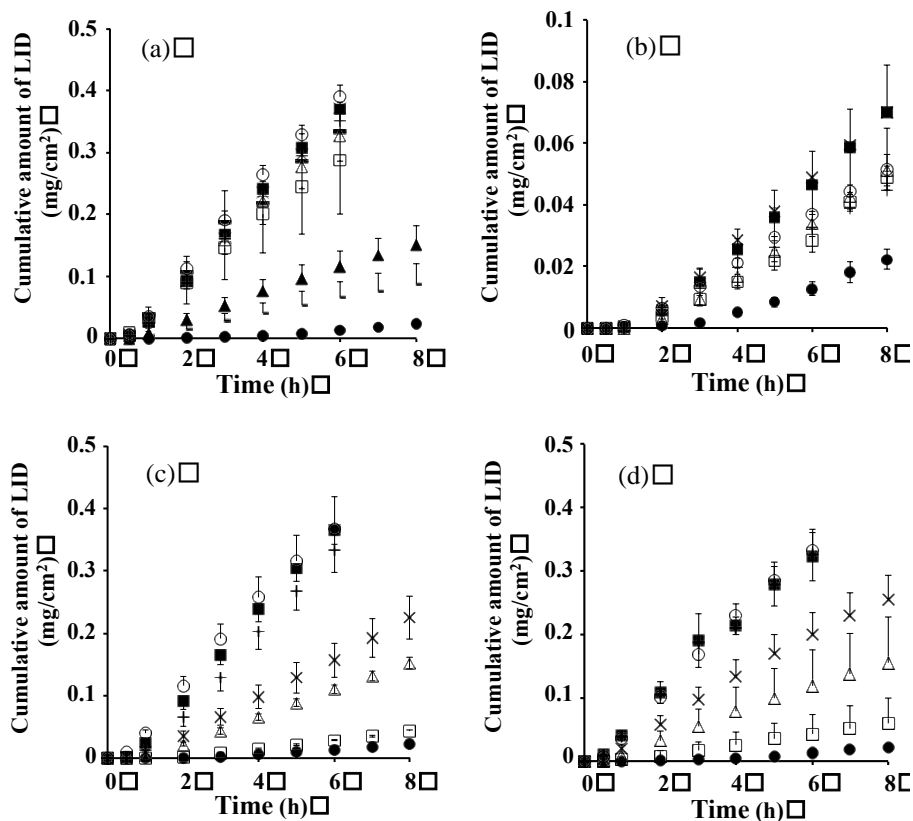


Fig. 4 Effect of tape-stripping times on the cumulative amount of LID that permeated through hairless rat skin.

PSA-A (a), PSA-B (b), Cellotape® (c) and Scotch Tape® (d).

Symbols: intact (●), 1 (-), 2 (▲), 3 (□), 4 (-), 5 (Δ), 7 (×), 10 (■), 15 (○), 20 (+).

Each value shows the mean ± S.E. (n=3-6).

皮膚を介した薬物の透過性は角層バリアによって制限されていることから、そのバリア能の指標である累積角層剥離量、TEWL および skin impedance の逆数と LID 皮膚透過性の関係をプロットし、角層テープstripping処理の及ぼす影響を確認した。その結果を Fig. 5 に示す。すべてのグラフで類似した直線関係がみられ、良好な相関 (Fig. 5a: $r=0.978$, b: $r=0.903$, c: $r=0.978$) を示したことから、種々PSA による角層テープstripping処理の効果は LID の皮膚透過性改善効果に大きく影響を与えていることが確認された。

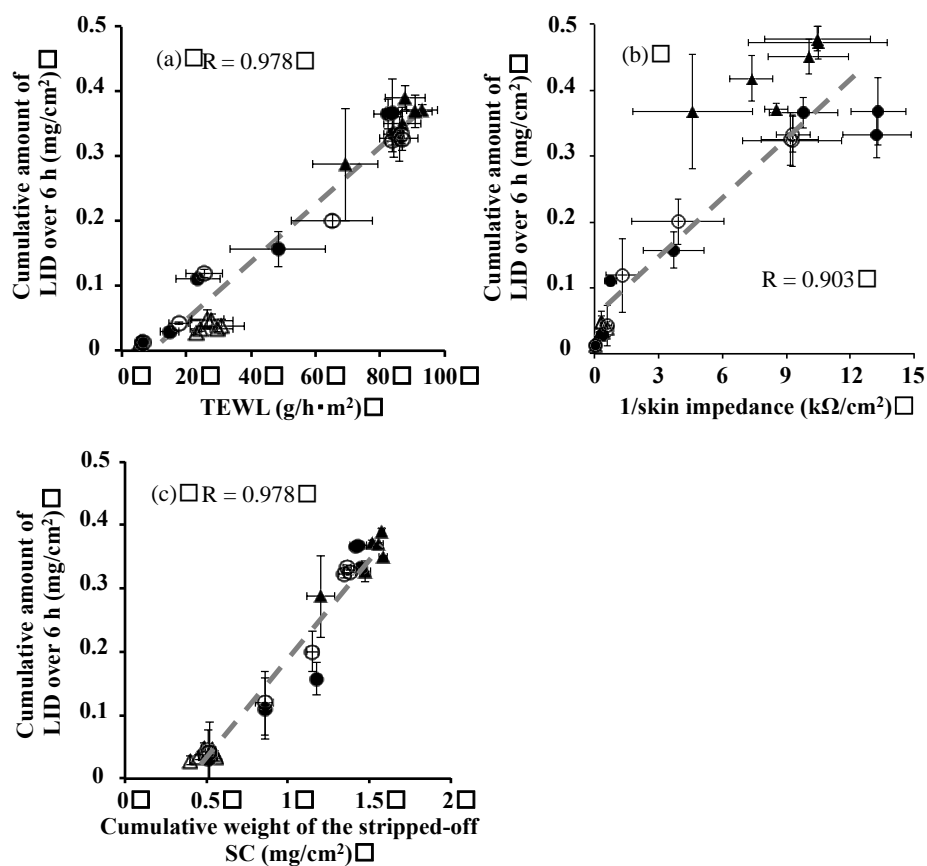


Fig. 5 Effect of skin barrier functions; TEWL (a), reverse of skin impedance (b) and cumulative weight of stripped SC (c) on the cumulative amount of LID that permeated through hairless rate skin over 6 h.

Symbols: PSA-A (\blacktriangle), PSA-B (\triangle), Cellotape[®] (\bullet), Scotch Tape[®] (\circ).

Each value shows the mean \pm S.E. (n=3-6).

2.5. 角層テープストリッピング処理後の皮膚組織切片像の観察

種々PSA を用いた角層テープストリッピング処理後の皮膚形態を観察した。透過実験終了後のヘアレスラット背部皮膚 intact skin、stripped skin (Cellotape[®] を用いて 20 回テープストリッピング処理を行った皮膚) および各 PSA で 5 および 10 回角層テープストリッピング処理した皮膚に HE 染色を施し、皮膚切片を顕微鏡にて観察した (Fig. 6)。Intact skin (Fig. 6a) は皮膚表面が完全に角層で覆われていること、stripped skin (Fig. 6b) はテープストリッピング処理によって皮膚表面を覆っていた角層が完全に除去されており、表皮・真皮が剥き出しの状態になっていることが確認された。

市販 PSA で処理した皮膚は、ストリッピング 5 回時 (Fig. 6e, i) では角層が残っているが、ストリッピング 10 回時 (Fig. 6f, j) では角層が完全に除去されていることが確認された。PSA-A で処理した皮膚は、ストリッピング 5 (Fig. 6c) および 10 回 (Fig. 6g) 時どちらの場合でも stripped skin と同様に角層が完全に除去されており、PSA-A が高い角層剥離力を有していることが確認された。一方、PSA-B で処理した皮膚は、ストリッピング 5 (Fig. 6d) および 10 回時 (Fig. 6h) のどちらの場合でも角層が残っており、処理回数を増やしても角層が完全に除去されないことが確認された。

以上より、市販 PSA と比較し、PSA-A は強力な角層剥離力を有していること、PSA-B は処理回数に関わらず角層を完全には除去しないことが明らかとなった。

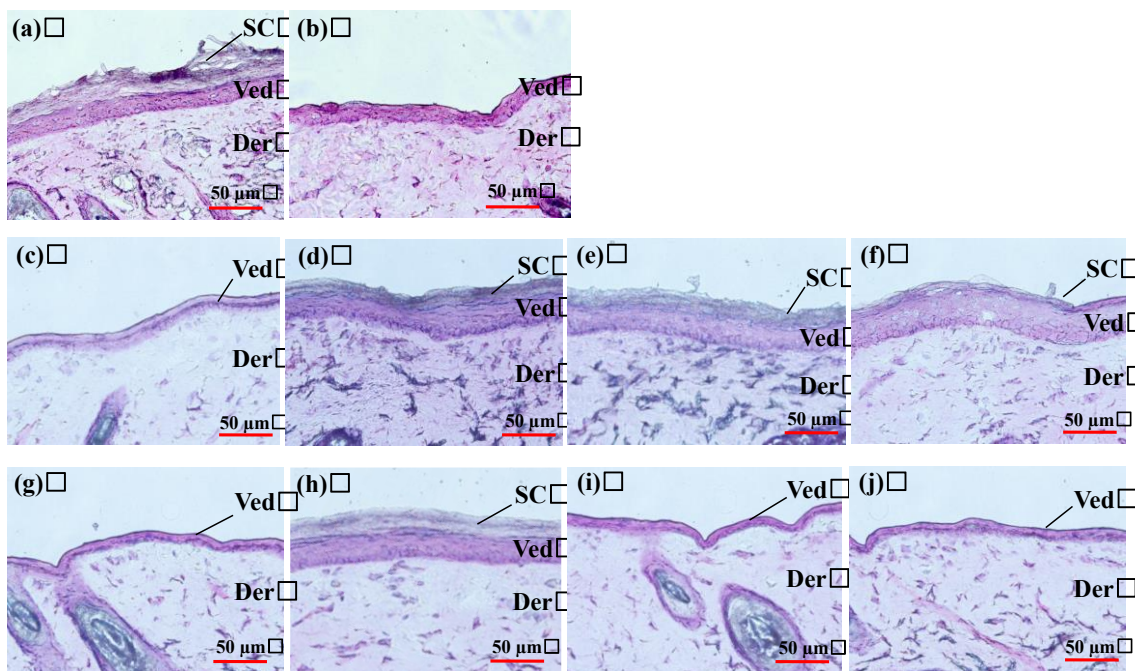


Fig. 6 H.E. stain images of hairless rat dorsal skin observed by microscope.

(a) intact skin, (b) stripped skin (20 times-stripped by Cellotape[®]), (c)-(f) 5 times-stripped by PSA-A, PSA-B, Cellotape[®] and Scotch Tape[®], respectively, and (g)-(j) 10 times-stripped by PSA-A, PSA-B, Cellotape[®] and Scotch Tape[®], respectively.

Stratum corneum (SC), viable epidermis (Ved), dermis (Der).

第3項 小括

本節の研究では、PSA-A および B を新規に調製し、それらの粘着特性および市販 PSA を対照として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を評価した。また、モデル化合物としてリドカイン塩酸塩 (LID) を用いて *in vitro* 皮膚透過実験を行い、皮膚透過性に与える種々 PSA によるテープストリッピング処理の影響を評価した。PSA-A は市販の PSA とほぼ同等の粘着特性を、一方、PSA-B は市販 PSA と異なる粘着特性を有していることが明らかとなった。しかし、PSA-A および B の角層剥離力は市販の PSA とは異なり、その特性は PSA-A と B との間で大きな違いが認められた。また、PSA-A は強力な角層剥離力の影響で、少ない処理回数で皮膚バリア能が大きく低下し、高い透過促進効果を示した。一方、PSA-B は一定の角層剥離能の影響で、皮膚バリア能に及ぼす角層テープストリッピング処理の影響は小さく、2-3 倍程度の透過促進効果を示した。以上のことから、PSA-A は市販 PSA と比べ少ないストリッピング処理回数で高い皮膚透過性促進効果を得ることのできる前処理用のピール剤としての利用価値は高く、結果的に皮膚適用製剤からの速やかで、かつ効率的な薬物送達を行うことが可能になると考えられた。また、PSA-B は単回ストリッピング処理では高い角層剥離力を有しているものの、複数回処理しても角層を一定量しか剥離せず、そのため、PSA-B は安全かつ一定の皮膚透過性促進効果を得ることが可能な前処理用のピール剤や美容用のピール剤として利用できると考えられた。

第2節

薬物の皮膚透過性および皮膚中濃度に及ぼす 実使用に即したテープストリッピング処理の影響

本章第1節より、種々PSAを用いた角層テープストリッピング処理の及ぼす皮膚バリア能への影響は、PSAの種類とその処理回数によって大きく異なることが明らかとなった。また、それに伴う皮膚透過性の変化から、PSA-AおよびBは異なる皮膚透過性促進能を有していることが明らかとなった。しかしながら、PSAによる前処理後に経皮吸収製剤や貼付剤を適用した際、薬物の皮膚局所で速やかな効果発現には、角層バリア能の改善に伴う皮膚透過性の改善だけではなく、皮膚中薬物濃度が増加することが重要であると考えられ^{21, 22)}、PSAによる前処理後の短時間での皮膚中薬物濃度を評価する必要があると考えられた。また、PSA-AおよびBを用いた前処理による安全性を担保するために、皮膚刺激性に及ぼす角層テープストリッピング処理の影響も併せて評価する必要があると考えられた。

そこで本節では、ヘアレスラット背部皮膚を種々PSAを用いてテープストリッピング処理後、臨床で用いられているリドカインテープを短時間適用して皮膚透過実験を行い、透過実験終了後にLIDの皮膚中濃度を評価した。また、*in vivo*皮膚刺激性試験法の一つであるMTTアッセイによりテープストリッピング処理後の皮膚刺激性についても評価し、PSA-AおよびBの有用性を検討した。

第1項 実験方法

1.1. 試薬および実験材料

本章第1節 1.1.と同様の試薬等を利用した。臨床で用いられているリドカインテープ（ペンレス®）はマルホ株式会社（大阪、日本）から購入した。その他の試薬および溶媒は液体クロマトグラフ（HPLC）用を使用した。なお、これらの試薬および溶媒は精製せずにそのまま用いた。

1.2. 実験動物

本章第1節 1.2.と同様の雄性ヘアレスラットを利用した。動物の飼育および実験は城西大学全学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学動物実験規定に従って行った。

1.3. *In vitro* 皮膚透過実験

ヘアレスラット背部皮膚（intact skin）の摘出方法、縦型拡散セルへの装着は本章第1節 1.10.と同様の方法で行った。また、本章第1節での検討から PSA-A および B 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は5回処理時で最大に達していたことから、本試験では5回処理を行った後にラット背部皮膚（intact skin）をそれぞれ摘出した。ただし、stripped skin の場合は Cellotape® を用いて20回テープストリッピングを行い、角層を完全に除去した後摘出した。縦型拡散セルに皮膚を瞬間接着剤（アロンアルファ®、ユニシ株式会社、大阪、日本）を用いてセットし、角層側へ1.82 mg/cm²のリドカインテープを適用した。実験中セルの温度は32°Cに保ち、レシーバーセル内はスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラーにより500 rpmで回転させることで攪拌した。経時的に真皮側から0.5 mL サンプルングし、その都度、同量のPBSを真皮側に補充した。サンプル溶液中の薬物濃度はHPLCを用いて定量した。

1.4. 皮膚中濃度測定

In vitro 皮膚透過実験終了後のヘアレスラット背部皮膚を拡散セルから外し、PBS で洗浄後、有効透過面積の大きさに切り取った皮膚重量を測定した。皮膚をハサミで細断し、エタノール溶媒 1 mL 中に入れ、LID の抽出を 24 時間行った。その後、エタノール溶媒中に抽出された LID 量を測定した。

一方、PBS に LID を溶解させた溶液 (1000 µg/mL (1 mL) : A) を作製し、A 中に皮膚を 12 時間浸漬後、皮膚を回収した。その後、皮膚をエタノール溶媒 1 mL 中に入れ、抽出されたリドカイン量を測定し、これを皮膚中 LID 量 (B) とした。また、皮膚回収後の溶液中に残っている LID 量を測定し、これを残存 LID 量 (C) とした。さらに B を (A-C) で除すことにより皮膚中からの LID 抽出率を算出した。

1.5. LID の定量

第 1 章 1.11.と同様の方法で行った。

1.6. *In vivo* 皮膚刺激性試験方法

ヘアレスラット皮膚処理：ウレタン麻酔下 (1.0 g/kg、*i. p.*)、ヘアレスラット背部皮膚 (intact skin (コントロール) および種々 PSA を用いて 5 または 10 回テープストリッピング処理を行った皮膚) 上にプラスチックチューブセル (セル容量：3.0 mL、有効透過面積：1.2 cm²) を接着した後、その中に PBS を 1.0 mL 適用した。8 時間後、適用面積下の皮膚を摘出し、生検パンチを用いて 0.28 cm² に打ち抜き、直ちに MTT アッセイを行った。

MTT アッセイ⁷⁴⁾：ヘアレスラット皮膚を MTT 溶液 (0.5 mg/mL) の入った 24 ウェルプレートに浸し、37°C、5%CO₂ 存在下で 16 時間インキュベートした。その後、皮膚を 1.5 mL マイクロチューブに移し細断し、ホルマザンを抽出した。抽出したホルマザンを 96 ウェルプレートに移し、マイクロプレートリーダー (Spectra Max[®] M2[°], Molecular Devices Llc., Sunnyvale, CA, U.S.A.) を用いて、波長 570 nm の吸光度を測定した。また、リファレンス波長として 650 nm でも吸

光度を測定し、波長 570 nm の吸光度から 650 nm の吸光度を差し引いた値を、各サンプル中ホルマザンの吸光度とした。

1.7. 統計解析

リドカインの皮膚中薬物濃度の有意差検定には unpaired *t*-test を用い、*in vivo* 皮膚刺激性試験より得られたデータの有意差検定には、Dunnett test を行い、 $p < 0.05$ を有意と判断した。

第 2 項 結果および考察

2.1. リドカインテープを適用した *in vitro* 皮膚透過実験

まず、皮膚透過実験では、第 1 節 2.4. (Fig. 4) の結果より PSA-A, B および市販 PSA を用いて 5 回テープストリッピング時において LID の皮膚透過性に最も大きな差がみられることがわかっていることから、*intact skin*、*stripped skin* (Cellotape®を用いて 20 回テープストリッピング処理を行った皮膚)、および PSA-A および B を用いてテープストリッピング処理を 5 回行ったヘアレスラット背部皮膚にリドカインテープを適用し、リドカインテープからの LID 皮膚透過性を調べた。Fig. 7 にリドカインテープからの LID の皮膚透過プロファイルを示す。PSA-A を用いた場合、試験を実施した 3 時間まで *stripped skin* と同等の透過挙動を示し、高い透過性を示した。これは水性溶液からの LID の透過試験結果 (第 1 節 2.4. (Fig. 4a)) と同様であり、僅かな処理回数で高い透過促進効果を得られることが確認された。また、PSA-B を用いた場合、8 時間目の累積透過量は *intact skin* の値 (0.8 mg/cm^2) と比較し約 3 倍の値 (2.4 mg/cm^2) となり、この結果も水性溶液を用いた結果 (第 1 節 2.4. (Fig. 4b)) と同様となったことから、処理回数非依存的に透過促進効果を得られることが確認された。以上より、PSA-A および B を用いた角層テープストリッピング処理は適用剤形を水性溶液系から製剤に変えても同様の透過促進効果を得ることが可能であると考えられた。

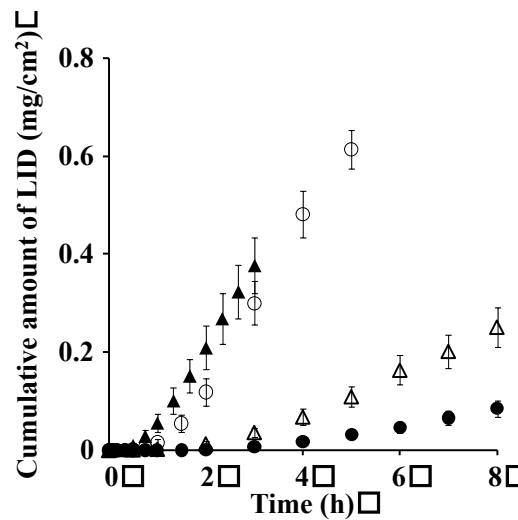


Fig. 7 Time course of the cumulative amount of LID permeated from marketed patch through hairless rat intact dorsal skin, 20 times-stripped skin by Cellotape® and 5 times-stripped skin by PSA-A and -B.

Symbols: 5 times-stripped by PSA-A (▲), 5 times-stripped by PSA-B (△), intact skin (●), 20 times-stripped by Cellotape® (○).

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

2. 2. 皮膚中薬物濃度測定

局所作用製剤の効果や毒性の発現にはその作用部位(皮膚中)での薬物濃度が大きく関わっており^{22, 23)}、皮膚中薬物濃度を評価することは非常に重要である。そのため、*in vitro* 皮膚透過実験終了後の intact skin、stripped skin (Cellotape®を用いて 20 回テープストリッピング処理を行った皮膚)、PSA-A および B を用いてテープストリッピング処理を 5 回行ったヘアレスラット背部皮膚にリドカインテープを貼付し、透過実験終了後の皮膚中薬物濃度を測定した (Fig. 8)。PSA-A を用いてストリッピング処理を行った皮膚では、stripped skin と同等に高値 (1,600 $\mu\text{g/g}$) を示した。これは intact skin (85 $\mu\text{g/g}$) と比較して約 19 倍であり、有意差も認められた ($p<0.01$)。一方、PSA-B を用いてストリッピング処理を行った皮膚では、intact skin と比べ約 3 倍高い値 (250 $\mu\text{g/g}$) を示した ($p<0.05$)。

また、臨床現場でのリドカインテープの推奨貼付時間は穿刺予定部位(皮膚)に対して穿刺前の 30 分間とされている。しかしながら、Ooi らによると短時間

(30 分間)の貼付では十分な麻酔効果が得られないことが報告されており^{9,75)}、長時間 (60 分間以上) の貼付を必要とすることがある。そのため、貼付後短時間で効果発現を可能にすることは QOL の向上に繋がると考えられる。そこで、実使用を考慮し、長時間 (3-8 時間) 貼付後の皮膚中薬物濃度だけではなく、推奨貼付時間 (30 分間) より短時間 (10 分間) 貼付時の皮膚中薬物濃度に及ぼす PSA-A および B を用いたテープstripping処理の影響について評価した。なお、比較対照として intact skin へ推奨貼付時間 (30 分間) および短時間 (10 分間) 貼付時の皮膚中薬物濃度も評価した。Fig. 9 に PSA-A および B を用いたテープstripping処理後の短時間 (10 分間) 貼付時の皮膚中薬物濃度を示す。Intact skin の場合、10 分間貼付時の皮膚中薬物濃度は 26.1 $\mu\text{g/g}$ (Fig. 9 dotted line) であり、リドカインテープの推奨貼付時間である 30 分間貼付後の皮膚中薬物濃度は 47.7 $\mu\text{g/g}$ (Fig. 9 dashed line) であった。このことから、リドカインの有効皮膚中濃度を 47.7 $\mu\text{g/g}$ と考えると、PSA-A を用いて前処理した皮膚では 1 回処理後では 62.2 $\mu\text{g/g}$ ($p<0.05$)、2 回処理後では 81.3 $\mu\text{g/g}$ ($p<0.05$) で有効皮膚中濃度を有意に上回る皮膚中薬物濃度を示した。3 回処理以降でも (3: 272.8 $\mu\text{g/g}$ 、4: 312.3 $\mu\text{g/g}$ 、5: 346.8 $\mu\text{g/g}$ ($p<0.01$)) すべてで有意に高い値を示したことから PSA-A を用いたテープstripping処理は短時間で効果発現を可能にする前処理用ピール剤として非常に有用であると考えられた。しかし、その使用にあたっては、その強力な透過促進効果だけではなく、角層バリア能の低下に伴う皮膚刺激性 (痛みやヒリヒリ感等) についても考慮しておく必要があると考えられた。

一方、PSA-B を用いて前処理した皮膚では 1 から 5 回処理後まで有意な差はないものの有効皮膚中濃度 (47.7 $\mu\text{g/g}$) に近い値 (1: 47.0 $\mu\text{g/g}$ 、2: 39.5 $\mu\text{g/g}$ 、3: 35.1 $\mu\text{g/g}$ 、4: 43.1 $\mu\text{g/g}$ 、5: 45.5 $\mu\text{g/g}$) を示し、一定の透過促進効果が得られた。以上より、PSA-B を用いた前処理は貼付時間の短縮に繋がると考えられた。また、PSA-B は処理回数に応じた透過促進効果を示さず、角層を取り除きすぎることが無いことから安全使用の面では PSA-A より優れているのではないかと考えられた。

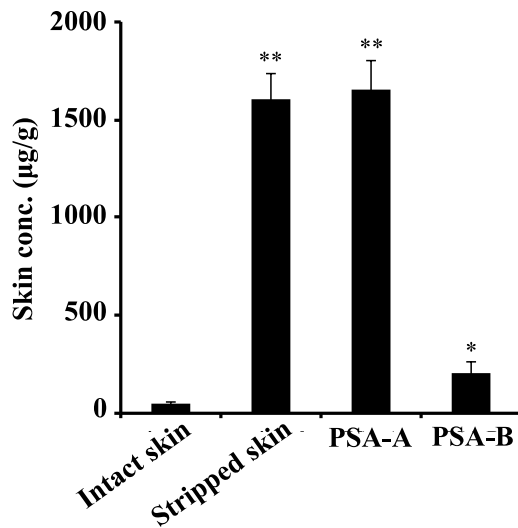


Fig. 8 Skin concentration of LID where 20 or 5 times-stripped was done by Cellotape® or PSA-A and PSA-B, respectively, after application of marketed LID patch.

Each column shows the mean \pm S.E. (n=3). * p <0.05, ** p <0.01.

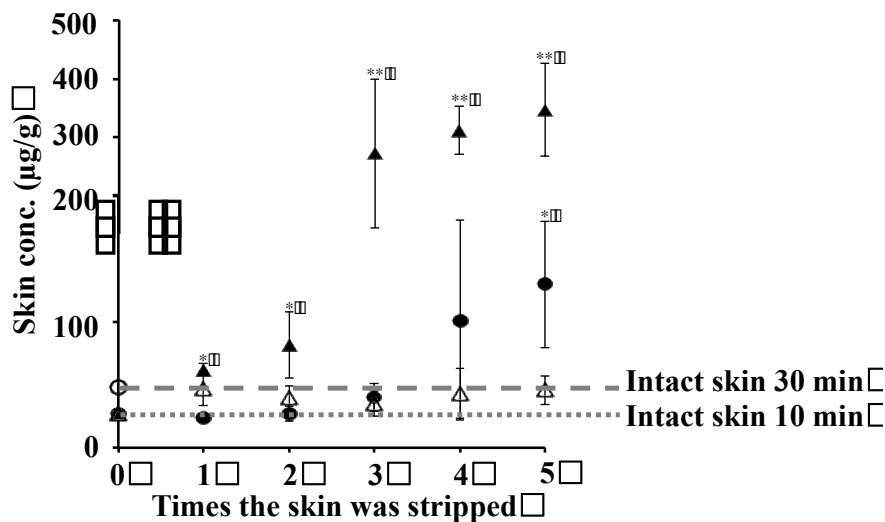


Fig. 9 Effect of tape-stripping times on the skin concentration of LID after 10 min application of marketed LID patch. Statistical analysis was performed by *t*-test vs. intact skin concentration (after 30 min application).

Symbols: PSA-A (▲), PSA-B (△), Cellotape® (●).

Each value shows the mean \pm S.E. (n=3). * p <0.05, ** p <0.01.

2.3. *In vivo* 皮膚刺激性試験

続いて、PSA-A および B の安全使用を考慮し、皮膚刺激性に及ぼすテープストリッピング処理の影響について調べた。Intact skin (コントロール) および種々 PSA を用いて 5 または 10 回テープストリッピング処理を行った皮膚に対して皮膚刺激性の指標として MTT アッセイを行い、cell viability を算出した。Fig. 10 に *in vivo* MTT アッセイの結果を示す。まず 5 回テープストリッピング処理を行った皮膚 (Fig. 10a) では intact skin (100%) と比較し PSA-A (66.4% ($p<0.05$)) のみ有意な cell viability の減少がみられた。また、PSA-B (104.2%) では cell viability の減少はみられず、Cellotape[®] (91.4%) と Scotch tape[®] (82.4%) では若干の cell viability の減少がみられたものの有意な差は認められなかった。次に 10 回テープストリッピング処理を行った皮膚 (Fig. 10b) では、PSA-B (103.1%) 以外のすべての PSA (PSA-A: 56.9% ($p<0.01$))、Cellotape[®]: 74.2% ($p<0.05$)、Scotch tape[®]: 53.2% ($p<0.01$)) で有意な cell viability の減少が認められた。これらのことから PSA-A は強力な角層剥離力を有しており、処理回数に応じて角層を取り除いてしまうため皮膚刺激性も高く、安全使用には処理回数等の注意が必要であると考えられた。一方、PSA-B は処理回数に応じた角層剥離能がないことから皮膚刺激性が表れなかった。そのため、安全使用の面では信頼性は高く一般的に利用しやすいのではないかと考えられた。

以上の結果から、今後さらに適正使用における処理回数の検討や化粧品有効成分、高分子化合物を用いた同様な検討を行うことにより、PSA-A および B のピール剤としての有用性がさらに明らかになると思われた。

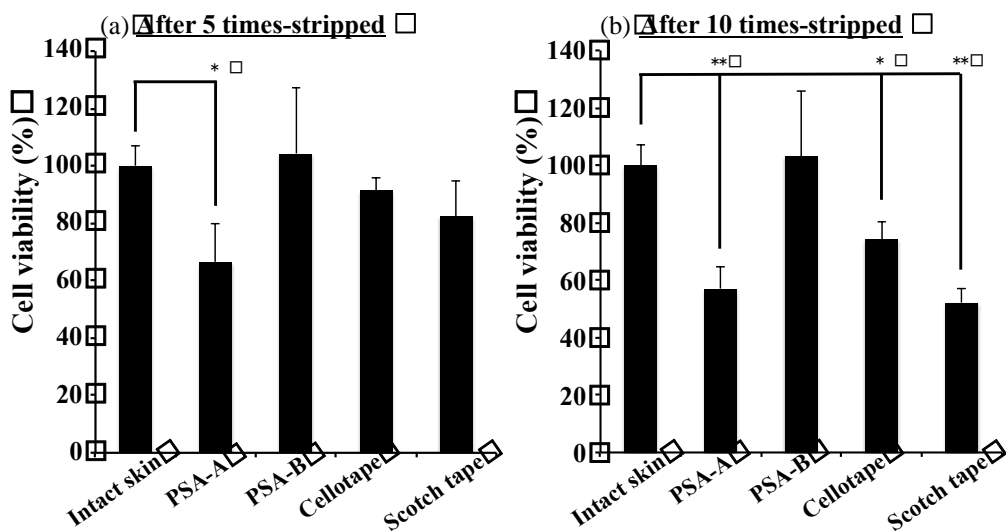


Fig. 10 Effect of tape-stripping times on the skin irritation caused.

(a): after 5 times-stripped, (b): after 10 times-stripped.

Statistical analysis was performed by Dunnett test vs. tape-stripping times.

Each column shows the mean \pm S.E. (n=3). * p <0.05, ** p <0.01.

第3項 小括

本節の研究により、新規 PSA-A および B のピール剤としての異なる特性が明らかとなった。PSA-A を用いた場合は、僅かな処理回数で薬物の皮膚透過性、皮膚中薬物濃度を大幅に改善したことから、前処理用ピール剤として有用であるが、安全使用の面でさらなる検討が必要であると考えられた。また、PSA-B は処理回数に関わらず薬物の皮膚透過性および皮膚中薬物濃度を一定量改善することや、皮膚刺激性が極めて低いことが明らかとなり、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と考えられた。しかしながら、今回は比較的親油性や皮膚透過性が高く、低分子量の LID をモデル化学物質として研究したため、今後は、異なる物性を有する化学物質について PSA-A および B を用いたテープストリッピング処理の有用性を検討することで、低い皮膚透過性がボトルネックとなっていた新規外用医薬品の開発を促進する前処理用ピール剤の提供や美容分野において安全かつ効率的なピール効果の提供に繋がる可能性が示唆された。

第2章

角層テープストリッピング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1節

薬物の皮内動態評価における MD 適用の影響

これまでの化粧品の経皮吸収評価は医薬品の試験法を参考に行われ、ヒトを試験材料として用いるには倫理的な問題等があることから、ラットやマウスといった小動物を用いた *in vivo* 試験や摘出皮膚を用いた *in vitro* 試験が広く使われてきた。しかし、欧州連合における動物実験の規制や動物愛護の思想の徹底が進み、現在および今後の化粧品開発には動物を用いた試験はできなくなった⁴⁰⁻⁴⁵⁾。そのため、シリコーン膜や三次元培養ヒト皮膚モデル等を用いて皮膚透過性や皮膚刺激性を推定するなど、*in vitro* 実験系での動物実験代替法に関する研究⁵⁰⁻⁵²⁾が広く行われるようになってきたが、これら代替法だけで有効性や安全性を担保することは困難であり、さらなる実験系の充実が望まれている。

そこで本章の研究では、今後の製品開発初期段階での経皮吸収性評価において非常に重要であると考えられるヒトを用いた試験を可能とする試験法の確立を目的として、角層テープストリッピングにより得られた角層中薬物量から皮膚適用医薬品の生物学的同等性を評価する方法に注目し、皮膚薬物動態学 (dermatopharmacokinetics: DPK) 試験および MD 試験へのテープストリッピング法の新たな適用について検討することとした。まず第1節では Fick の拡散則に従う解析法を中心として、化学物質の皮内動態解析法として幅広く用いられている *in vitro* 皮膚透過性の試験結果と比較して、normal dose と MD 適用間でのデータの整合性および適用濃度依存性 (線形性) を評価することにより、経皮投与製剤における MD 試験法の妥当性を評価し、その確立を目指した。なお、前章ではヘアレスラット皮膚を用いていたが、角層構造が脆く DPK 試験には不向きであることから、本章では角層構造がより強固でありヒトに近いといわれ

るブタ耳介皮膚を用いて検討を行った。また、MD 適用時の薬物分析法としては、高感度の LC/MS/MS 法⁷⁶⁻⁷⁹⁾、および¹⁴C により標識した候補化合物を加速器質量分析 (Accelerator Mass Spectrometry: AMS) 法⁸⁰⁻⁸²⁾を用い、両分析法の長所と短所についても検討した。

第 1 項 理論

1. 1. 皮膚透過挙動からの透過パラメータ算出方法⁸³⁻⁸⁶⁾

1. 1. 1. Fick の拡散則に従う 1 層膜モデル透過挙動の解析

皮膚適用後の LID の皮膚透過挙動は、Fick の拡散第 2 法則に従うと仮定し、差分法⁸³⁻⁸⁵⁾を用いて解析した。また、ここではブタ耳介 stripped skin (角層 (stratum corneum : sc) を粘着テープにより 20 回テープストリッピング処理を行った皮膚) を生きた表皮・真皮 (viable epidermis and dermis : ved) からなる 1 層膜モデルとして仮定し、ブタ耳介 full-thickness skin を sc と ved からなる 2 層膜モデルとして仮定した。さらに、本実験ではドナー側を有限用量系で行い、かつレシーバー側はシンク条件下で行った。

Fig. 11 に 1 層膜モデルの皮膚中薬物濃度プロファイルを示す。皮膚適用後の LID の皮膚中薬物濃度プロファイルは Fick の拡散第 2 法則に従い、時間経過に伴い非定常状態から定常状態へ移行する。この時の皮膚中の位置を表す x 、および時間 t での生きた表皮・真皮中薬物濃度 C_{ved} は、Fick の拡散第 2 法則から以下のように示される。

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 D_{ved} は生きた表皮・真皮中の薬物拡散係数を表す。

初期条件 (I.C.) よび境界条件 (B.C.) を以下のように設定した。

$$\begin{aligned} I.C. \quad t=0 \quad 0 < x < L_{ved} \quad C_{ved} &= 0 \\ B.C. \quad t > 0 \quad x=0 \quad C_{ved} &= K_{ved} \cdot C_v \\ x=L_{ved} \quad C_{ved} &= 0 \end{aligned}$$

ここで、 L_{ved} は生きた表皮・真皮の厚み、 K_{ved} は基剤 - 生きた表皮・真皮間薬物分配係数、そして C_v は基剤中薬物濃度である。 C_{ved} は初期条件と境界条件から Fick の拡散第 2 法則に従うため、差分法を用いて計算した。さらにレシーバー

側への薬物の stripped skin 透過速度 $Flux_{st}$ は (2) 式または (6) 式より表すことができる。また、単位面積当たりの stripped skin 累積透過量 Q_{st} は (3) 式または (7) 式で表すことができる。

$$Flux_{st} = -D_{ved} \left(\frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (2)$$

$$Q_{st} = -D_{ved} \int_0^t \left(\frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (3)$$

また、(1) 式は差分法を用いると、次式に変換することができる。

$$\frac{dC_{ved,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (4)$$

$$\frac{d^2 C_{ved,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (5)$$

ここで、 $C_{ved,i,j}$ は i 番目の位置の j 時間目の薬物濃度を表す。 Δx は $x_{i+1} - x_i$ を Δt は $t_{j+1} - t_j$ を表す。

(4) 式と (5) 式を (1) 式に代入すると次式が得られる。

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved} C_{ved,i-1,j} + (1 - 2rD_{ved}) C_{ved,i,j} + rD_{ved} C_{ved,i+1,j} \quad (6)$$

ここで、 r は $\Delta t / \Delta x^2$ を表す。差分式を使うと (2) 式と (3) 式はそれぞれ (7) 式と (8) 式になる。

$$Flux_{st,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,m+1,j} - C_{ved,m,j}}{\Delta x} \quad (7)$$

$$Q_{st,j} = Q_{st,j-1} + Flux_{st,j} \cdot \Delta t \quad (8)$$

m を皮膚（生きた表皮・真皮）の区分数とした。 $Flux_{st,j}$ を以上の方法に従っ

て Microsoft® Excel を用いて計算した。計算には $m=10$ を用いた。なお、この計算では、 Δt は $D_{ved} \Delta t / \Delta x^2$ に対して 0.5 未満になるように設定した (0.5 以上を設定すると解は発散する)。 $Q_{st, j}$ は (8) 式を使って $Flux_{st, j}$ から計算した。 D/L_{ved}^2 と K_{ved} は非線形最小二乗法を使って透過実験データにカーブフィッティングして得た。なお、最小二乗法は Microsoft® Excel Solver を使って行った。計算条件は制限時間 100 s、反復回数 100 回、精度 0.000001、基本公差 5%、収束 0.0001 とした。 Pseudo-Newtonian method をアルゴリズムとして用いた。

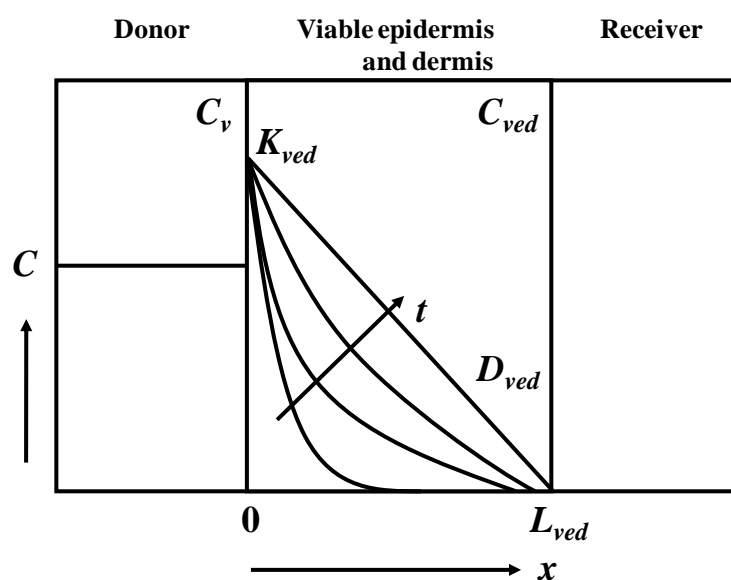


Fig. 11 Typical concentration-distance profiles in one-layered membrane diffusion models during membrane permeation of drug (finite dose system). Abbreviations C , C_v , C_{ved} : drug concentration, x : position of the membrane, t : time after starting the permeation experiment, L_{ved} : thickness, D_{ved} : diffusion coefficient, K_{ved} : partition coefficient.

1.1.2. Fick の拡散則に従う 2 層膜モデル透過挙動の解析

次に、ブタ耳介 full-thickness skin を Fick の拡散則に従う 2 層膜 (sc と ved) モデルとして仮定し、LID の皮膚透過挙動を解析した。Fig. 12 に 2 層膜モデルの皮膚中薬物濃度プロファイルを示す。角層中薬物濃度 C_{sc} と生きた表皮・真皮中薬物濃度 C_{ved} は式 (9) と (1) で表される。

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (9)$$

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 D_{sc} は角層中の薬物拡散係数を表す。初期条件 (I.C.) よび境界条件 (B.C.) は以下のように設定した。

$$I.C. \quad t = 0 \quad -L_{sc} < x < 0 \quad C_{sc} = 0$$

$$0 < x < L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

$$B.C. \quad t > 0 \quad x = -L_{sc} \quad C_{sc} = K_{sc} \cdot C_v$$

$$x = 0 \quad C_{ved} = K_{ved/sc} \cdot C_{sc} \quad \text{および} \quad D_{sc} \frac{dC_{sc}}{dx} = D_{ved} \frac{dC_{ved}}{dx}$$

$$x = L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

ここで、 L_{sc} は角層バリアの厚み、 K_{sc} は基剤 - 角層間薬物分配係数そして $K_{ved/sc}$ は角層 - 生きた表皮・真皮間薬物分配係数である。 C_{sc} と C_{ved} は初期条件と境界条件から Fick の拡散第 2 法則に従って変化すると考えて、差分法を用いて計算できる。レシーバー側への full-thickness skin 透過速度 $Flux_{full}$ は (10) 式より、単位面積当たりの full-thickness skin 累積透過量 Q_{full} は (11) 式で表すことができる。

$$Flux_{full} = -D_{ved} \left(\frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (10)$$

$$Q_{full} = -D_{ved} \int_0^t \left(\frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (11)$$

また、(9) 式は (12) と (13) 式に、(1) 式は (4) と (5) 式に変換することができる。

$$\frac{dC_{sc,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{sc,i,j+1} - C_{sc,i,j}) \quad (12)$$

$$\frac{d^2 C_{sc,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{sc,i-1,j} - 2C_{sc,i,j} + C_{sc,i+1,j}) \quad (13)$$

$$\frac{dC_{ved,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (4)$$

$$\frac{d^2 C_{ved,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (5)$$

(12) と (13) を (9) 式に、(4) 式と (5) 式を (1) 式に代入すると (14) 式と (6) 式が得られる。

$$C_{sc,i,j+1} = rD_{sc} C_{sc,i-1,j} + (1 - 2rD_{sc}) C_{sc,i,j} + rD_{sc} C_{sc,i+1,j} \quad (14)$$

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved} C_{ved,i-1,j} + (1 - 2rD_{ved}) C_{ved,i,j} + rD_{ved} C_{ved,i+1,j} \quad (6)$$

ここで、 r は $\Delta t / \Delta x^2$ を表す。差分式を使うと (10) そして (11) 式はそれぞれ (15) そして (16) 式になる。

$$Flux_{full,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,n+1,j} - C_{ved,n,j}}{\Delta x} \quad (15)$$

$$Q_{full,j} = Q_{full,j-1} + Flux_{full,j} \cdot \Delta t \quad (16)$$

n を角層の区分数とした。 $Flux_{full,j}$ は Microsoft® Excel を用いて計算した。計算に

は $n=10$ を用いた。 D/L_{sc}^2 と K_{sc} は非線形最小二乗法を用いて透過実験データにカーブフィッティングして算出した。また、 D/L_{ved}^2 と K_{ved} には、ブタ耳介 stripped skin の 1 層膜モデルの透過挙動解析から算出した値を用いた。なお、計算は 1 層膜モデルの透過挙動解析と同様に行った。

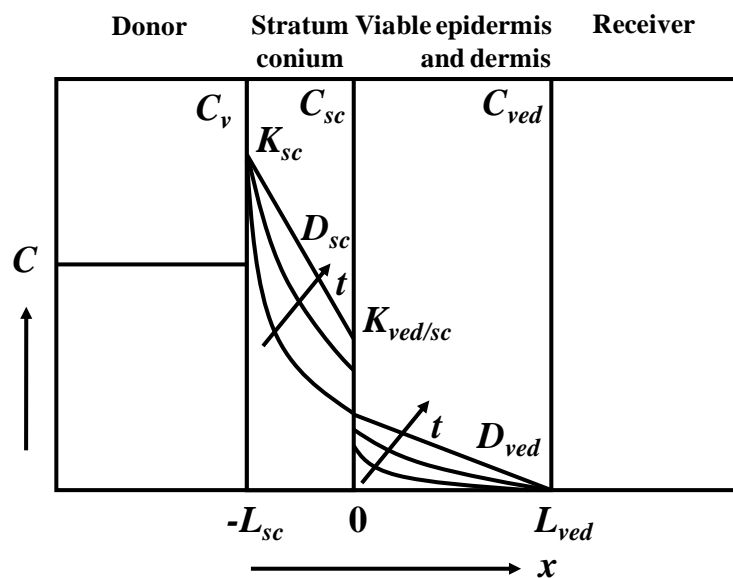


Fig. 12 Typical concentration-distance profiles in two-layered membrane diffusion models during membrane permeation of drug (finite dose system). Abbreviations C, C_v, C_{sc}, C_{ved} : drug concentration, x : position of the membrane, t : time after starting the permeation experiment, L_{ved}, L_{sc} : thickness, D_{ved}, D_{sc} : diffusion coefficient, $K_{ved}, K_{sc}, K_{ved/sc}$: partition coefficient.

第2項 実験方法

2.1. 試薬および実験材料

本試験のモデル化合物としてリドカイン塩酸塩 (Lidocaine hydrochloride monohydrate: LID) および ^{14}C 標識塩酸リドカイン (^{14}C -Lidocaine hydrochloride monohydrate: ^{14}C -LID、比放射能; 50-60 mCi/mmol) を選択した。LID およびメピバカイン塩酸塩 (MEP) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。 ^{14}C -LID は公益社団法人日本アイソトープ協会 (東京、日本) から購入した。4-ヒドロキシ安息香酸メチル (MP) および 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムは東京化成株式会社 (東京、日本) から購入した。また、酢酸アンモニウムは和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は、市販の HPLC 用または特級品を精製せずにそのまま用いた。さらに、粘着テープ (Scotch[®]) は住友スリーエム (東京、日本) から、ETFE テフロンメッシュは株式会社くればあ (豊橋、愛知、日本) から購入した。

2.2. 実験動物

第1章第1節 1.2.と同様のブタ耳介を用いた。

2.3. *In vitro* 皮膚透過実験

ブタ耳介 full-thickness skin は 32°C の温水中で解凍後、表皮側を PBS (pH7.4) で清拭してから摘出した。ただし、stripped skin は、清拭した耳介皮膚の角層を粘着テープ (Scotch[®]、住友スリーエム、東京、日本) により 20 回 tape-stripping 処理を行った後、摘出した。摘出した皮膚 (full-thickness skin または stripped skin) は真皮側の脂肪を取り除いた後、温水 (32°C) を循環させた縦型拡散セル (セルの拡散透過面積: 1.77 cm²、レシーバー容量: 6.0 mL) に表皮側をドナー側にして挟んだ。ドナー側に PBS を 1.0 mL、レシーバー側に PBS を 6.0 mL 適用し、1 時間水和させた。水和後、ドナー側から PBS を回収し、レシーバー側より 0 時間目のサンプリングを行い、同量の PBS を補充した。その後、PBS に溶解させた 4 種類の濃度の LID 水溶液 (1,000 (normal dose)、100 (MD)、10 (MD)、

1 (MD) $\mu\text{g/mL}$) をドナー側に 1.0 mL 適用し、透過実験を行った。実験中は、セル内の温度は 32°C に保ち、レシーバー側のシンク状態を保つために、レシーバー溶液をマグネットスターラーで攪拌した。経時的にレシーバー側から溶液を 0.5 mL サンプリングし、その都度、同量の PBS を補充した。なお、得られたサンプル中の LID 濃度は HPLC (normal dose : $1,000 \mu\text{g/mL}$) または LC/MS/MS (MD : 100、10、 $1 \mu\text{g/mL}$) を用いて測定した。

2.4. 皮膚透過実験サンプル溶液の定量法

2.4.1. HPLC での定量法

Normal dose適用時の透過実験により得られたサンプル溶液は内部標準物質として4-ヒドロキシ安息香酸メチル (MP) を定濃度溶解したアセトニトリルと1 : 1で混和した。その溶液を遠心分離 ($15,000\times g$ 、5 min、 4°C) し、上清20 μL 中のLID濃度をHPLCにて測定した。HPLCシステムはsystem controller (SCL-10A^{VP}; 島津製作所、京都、日本)、pump (LC-20AD; 島津製作所)、auto-sampler (SIL-20AC; 島津製作所)、column oven (CTO-20A; 島津製作所)、UV detector (SPD-M20A; 島津製作所)、analysis software (LC solution; 島津製作所) を用いた。カラムはInertsil[®] ODS-3 4.6 mm \times 150 mm (GL Sciences Inc.; 東京、日本) を、カラム温度は 40°C とした。移動相はacetonitrile : 0.1% phosphoric acid = 3 : 7 + 5 mM sodium 1-heptanesulfonateを用い、流速は1.0 mL/minとした。また、injection volumeは20 μL とし、検出波長UV 230 nmでピーク面積比を算出した。

2.4.2. LC/MS/MS での定量法⁷⁶⁻⁷⁹⁾

MD適用時の透過実験により得られたサンプルを、内部標準物質として塩酸メピバカイン (MEP) を定濃度溶解したアセトニトリルと1 : 1で混和し、遠心分離機 ($15,000\times g$ 、5 min、 4°C) によりタンパク除去後、上清をLC/MS/MSを用いて測定した。LC/MS/MSシステムはsystem controller (CBM-20A; 島津製作所)、pump (LC-20AD; 島津製作所)、auto-sampler (SIL-20AC_{HT}; 島津製作所)、column oven (CTO-20A; 島津製作所)、detector (4000QTRAP; AB Sciex、東京、日本)、

analysis software (Analyst[®] version 1.4.2; 島津製作所) からなる。カラムはShodex ODP2 HP-2B 2.0 mm × 50 mm (昭和電工、東京、日本)、ガードカラムはShodex ODP2 HPG-2A 2.0 mm × 10 mm (昭和電工) を用い、カラム温度は40°Cとした。移動相は、acetonitrile : 10 mM ammonium acetate = 3 : 7を用い、流速は0.2 mL/minとした。また、injection volumeは10 µLに設定した。LIDおよびMEPのイオン化には、electro spray ionization (ESI) 法を用い、イオンモードはポジティブ、測定分子量はLIDの場合、プリカーサーイオンをm/z 235.2、プロダクトイオンをm/z 86.1に設定した。MEPの場合、プリカーサーイオンをm/z 247.1、プロダクトイオンをm/z 98.0とした。また、イオンスプレイ電圧は5000 Vとし、ネブライザーガス圧力を40 psig、乾燥ガス流量を20 L/min、乾燥ガス温度を500°Cの条件下でピーク面積比を算出した。

2.6. DPK 試験法²⁶⁾

ブタ耳介皮膚は表面を丁寧に水洗いし、水分をよく拭き取りメスを用いて必要面積 (6×5 cm²) を摘出した。真皮側の脂肪をハサミで丁寧に取り除き、コルク台の上にPBSを浸したキムワイプをひき、皮膚を角層が上になるように水平に固定した。Fig. 13に薬物適用方法およびテープストリッピング方法を示す。表皮側にテンプレート-1 (透過面積: 4×3 cm²) を両面テープ (ナイスタック[®]、ニチバン、東京、日本) で強固に貼り付け、表皮側にPBSを適用し、室温 (24-25°C) で1時間水和した。水和後、表皮側からPBSを回収し、表皮側に種々ドナー水溶液 (LID: 1,000 (normal dose)、100 (MD)、10 (MD)、1 (MD) µg/mL, ¹⁴C-LID: 0.01 (MD) µg/mL) を10 mL適用し、室温にて5または15分間 (非定常状態) または1時間 (定常状態) 静置後、ドナー水溶液を回収した。経表皮水分蒸散量 (Transepidermal water loss: TEWL) 値を正常に戻すために室温にて5分間風乾した。風乾後、透過面積の内側に透過面積よりも小さい剥離面積 (3×2 cm²) をETFEテフロンメッシュ (株式会社くればあ) を用いたテンプレート-2 (角層テープストリッピング用) によって設定した。その後、剥離面積よりも大きいサイズ (3.5×2.5 cm²) の粘着テープ (Scotch[®]、住友スリーエム) を用いてHerkenne C.らが

行った方法と同様に角層テープストリッピングを行った⁸⁷⁾。角層剥離前後の粘着テープ重量をシムコ静電気除去装置 (SF-1000A、シムコジャパン株式会社、神戸、兵庫、日本) で静電気除去した後に、エクセレンスXPマイクロ天秤 (XP26、メトラー・トレド、東京、日本) を用いて測定し、剥離により得られた各角層重量を測定した。角層剥離後の粘着テープは2.5 mLガラスバイアルに入れ、1.0 mL のPBS (LID) またはメタノール (¹⁴C-LID) に浸し、1時間振とうすることで角層中LIDおよび¹⁴C-LIDを抽出した。ただし、¹⁴C-LID適用群に関しては、コンタミネーションの防止のためにすべての行程において金属製のピンセットを使い、その都度メタノールにて清拭した。抽出液中LIDおよび¹⁴C-LID濃度はHPLC、LC/MS/MSおよび加速器質量分析 (accelerator mass spectrometry: AMS) 法を用いて測定した。なお、角層中濃度の測定には抽出率を考慮した。

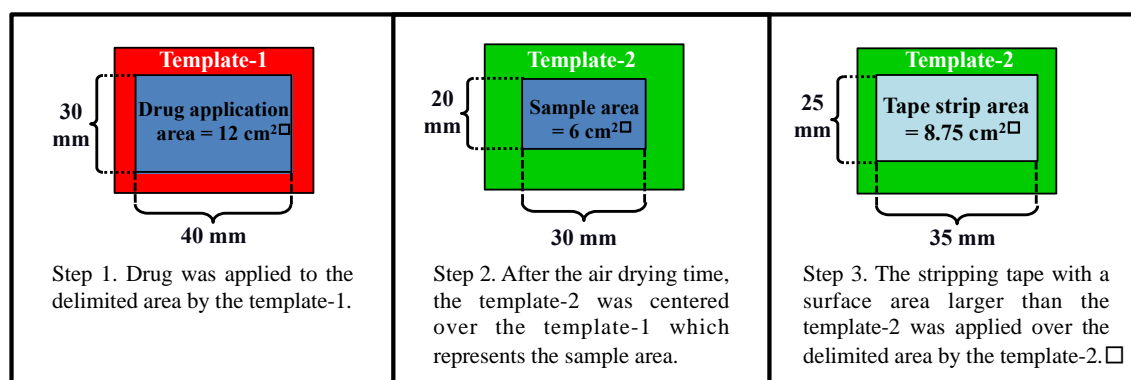


Fig. 13 Schematic diagram illustrating the drug application and tape-stripping protocols.

2.7. 角層厚の推定方法

粘着テープを用いた角層の剥離方法により、1回の操作で剥離される単位面積当たりの角層量 (角層数) は変動するため、1回の操作で剥離された角層厚は経表皮水分蒸散量 (Transepidermal water loss: TEWL) 計 (VAPOSCAN[®] AS-VT100RS、アサヒテクノラボ、横浜、日本) を用いて測定⁸⁸⁾した。以下に示す角層厚の推定方法にしたがって角層厚を推定した。体内の水分は生きた表皮・真皮側から角

層中をFickの拡散則に従い拡散し、角層表面から蒸発する。そのため、角層厚とTEWLの関係は以下の式およびFig. 14a, bで示される。

$$TEWL = \frac{K_w D_w \Delta C}{L_{sc}} \quad (17)$$

ここで、 K_w は水の角層-表皮細胞間分配係数、 D_w は水の角層内での拡散定数、 ΔC は角層の最深部と最表部の水の濃度差、 L_{sc} は角層厚である。厚さ x だけ角層を剥離した後の TEWL は次式で表される。

$$TEWL = \frac{K_w D_w \Delta C}{L_{sc} - x} \quad (18)$$

(18) 式の逆数値をとると

$$\frac{1}{TEWL} = \frac{L_{sc} - x}{K_w D_w \Delta C} = \frac{L_{sc}}{\gamma D_w} - \frac{x}{\gamma D_w} \quad (19)$$

ここで、 γ は $K_w \cdot \Delta C$ を表す。(19) 式に従い角層の密度を 1 g/cm^3 と仮定し、剥離面積を一定とすると、剥離された角層の累積質量を x に変換することができる。これを x 軸に、 y 軸に $1/TEWL_x$ をプロットすると x 軸の切片から L_{sc} を求めることができる^{89,90)}。

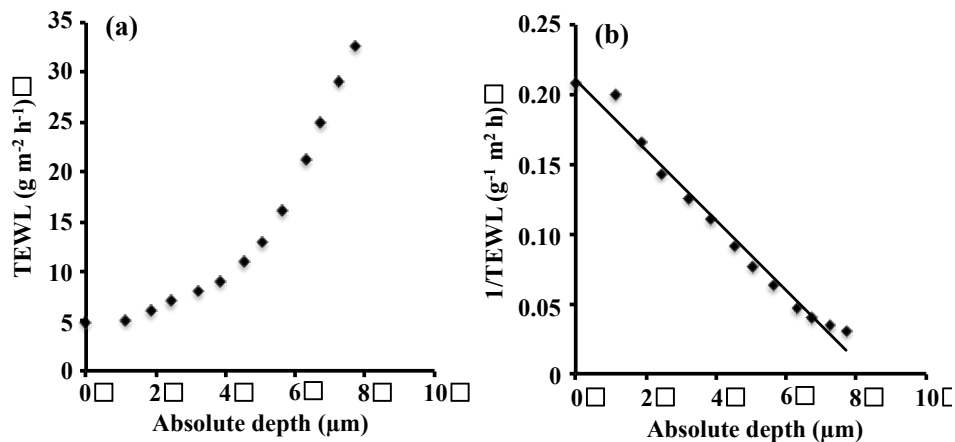


Fig. 14 a) Progressive increase of TEWL as a function of the absolute depth (μm) of SC removed. b) The data in a, replotted as a linear relationship between TEWL^{-1} and the depth of removed SC. The x-axis intercept equals the SC thickness.

2. 8. 角層中薬物濃度の分析方法

2. 8. 1. HPLC および LC/MS/MS での LID 定量法

角層から抽出したLID濃度は、内標準物質（HPLC: MP、LC/MS/MS: MEP）を溶解したアセトニトリルと1:1で混和し、遠心分離機（15,000×g、5 min、4°C）によりタンパク除去後、上清を2. 4. 1.および2. 4. 2.と同様の条件で測定した。

2. 8. 2. AMS での ¹⁴C-LID 定量法⁸⁰⁻⁸²⁾

角層から抽出した 1.0 mL のメタノール溶液は、石英管中にて室温で乾燥させた。その後、別の石英管中（850°C）で 1 g の酸化銅を加え酸化させた。次に酸化させたサンプルから真空条件下で CO₂ ガスを単離・精製した。650°C 条件下で H₂ ガスと鉄触媒により CO₂ ガスを還元し、得られた黒鉛およびグラファイト 1 mg をカソードに装填した。カソードの同位体比 (¹⁴C/¹²C) を AMS によって測定した。サンプル中 ¹⁴C 濃度は以下の式により計算した。

$$100 \text{ pMC (percent mod ern carbon)} = 13.56 \text{ dpm / gC} \quad (20)$$

$$\text{Graphite } ^{14}\text{C (dpm)} = A (\text{pMC}) \times 0.1356 (\text{dpm / gC / pMC}) \times C (\text{gC}) \quad (21)$$

$$\text{Sample } ^{14}\text{C (dpm/mL)} = (\text{Graphite } ^{14}\text{C (dpm)}) / \text{aliquot (mL)} \quad (22)$$

2.9. 角層中薬物プロファイルからの透過パラメータ算出方法²⁶⁾

種々濃度 LID 溶液から皮膚に移行した LID および ^{14}C -LID の角層中拡散は、Fick の拡散第 2 法則に従い、(23) 式によって表される。Fig 15 に薬物適用後の角層中薬物プロファイルを示す。本実験ではドナー側を有限用量系で行い、かつレシーバー側はシンク条件が成立していることとした。

$$C_x = KC_v \left\{ \left(1 - \frac{x}{L} \right) - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{10} \frac{1}{n} \sin \left(\frac{n\pi x}{L} \right) \exp \left(-\frac{Dn^2\pi^2}{L^2} t \right) \right\} \quad (23)$$

ここで、 C_x は各角層深度 x における薬物濃度を、 C_v は基剤中薬物濃度、 D は角層中拡散係数、 K は基剤-角層分配係数、 L は膜厚 (角層)、 t はドナー溶液の適用時間を表している。(23) 式に従って、粘着テープにより剥離された角層中薬物濃度 (薬物量/角層の質量) を x に対してプロットし、非線形最小二乗法によりカーブフィッティングし、 D/L^2_{sc} および K_{sc} を得た。なお、 n を角層の区分数とし、Microsoft[®] Excel を用いて計算した。最小二乗法は Microsoft[®] Excel Solver を使って行った。

上記により得られた D/L^2_{sc} 、 K_{sc} を以下の Fick の拡散第 2 法則の式を積分した (24) 式に代入し、角層全体の角層中濃度-位置曲線下面積 (AUC_{sc}) を計算した。

$$\bar{C} = \frac{KC_v}{2} \left\{ 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp \left(-\frac{D\pi^2}{L^2} t \right) + \frac{8}{9\pi^2} \left(-9\frac{D\pi^2}{L^2} t \right) - \frac{8}{25\pi^2} \exp \left(-25\frac{D\pi^2}{L^2} t \right) \dots \right\} \quad (24)$$

ドナー溶液の適用時間が十分に長く定常状態皮膚透過時では、 AUC_{sc} は K_{sc} に依存するため、(24) 式は (25) 式に略することができる。なお、計算は上記と同様に行った。

$$\bar{C} = \frac{KC_v}{2} \quad (25)$$

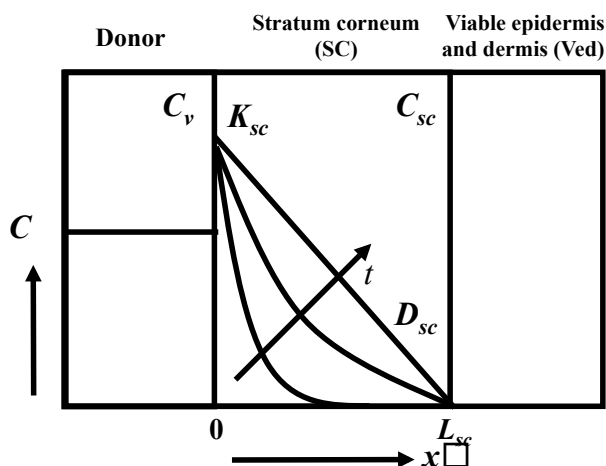


Fig. 15 Concentration-distance profiles of drug in SC after application of donor. Abbreviations C , C_v , C_{sc} : drug concentration, x : position of the SC, t : time after starting DPK experiment, L_{sc} : thickness, D_{sc} : diffusion coefficient, K_{sc} : partition coefficient.

2.10. 統計解析

皮膚透過挙動より算出した角層中濃度の計算値と角層中薬物プロファイルの実測値の相関性の検定には、Pearsonの相関係数を用い、 $p < 0.05$ を有意と判断した。

第3項 結果および考察

3.1. *In vitro* 皮膚透過実験での normal dose および MD 適用時の透過挙動評価

まず、本研究では *in vitro* 皮膚透過実験を行い、種々濃度の LID 水溶液 (1,000 (normal dose)、100 (MD)、10 (MD)、1 (MD) $\mu\text{g/mL}$) を適用し、基剤 (水溶液) から皮膚へ移行した LID の皮内動態を LID の皮膚透過プロファイルより得られた分配係数 (K) および拡散パラメータ (D/L^2) を用いて計算値 (理論値) を算出し、normal dose および MD 間での適用濃度依存的な透過挙動 (線形性) を評価できるか検討した。

ブタ耳介皮膚の LID 透過挙動の解析は、角層 (sc) と生きた表皮・真皮層 (ved) の2層膜として行った。Stripped skin の透過プロファイルを1層膜モデル (Fig. 11) として、基剤 - 生きた表皮・真皮間分配係数 (K_{ved}) および生きた表皮・真皮中拡散パラメータ (D/L^2_{ved}) を算出した。また、full-thickness skin の透過プロファイルを2層膜モデル (Fig. 12) として、基剤 - 角層間分配係数 (K_{sc}) および角層中拡散パラメータ (D/L^2_{sc}) を算出した。Fig. 16 に種々濃度 LID 溶液を用いた LID 累積皮膚透過挙動 (full-thickness skin と stripped skin) を、Table 3 に算出した透過パラメータをそれぞれ示す。典型的な薬物の累積皮膚透過プロファイルが得られ、さらに、適用濃度依存的な透過挙動を示した。4種類の濃度の LID 水溶液 (1,000、100、10、1 $\mu\text{g/mL}$) を適用した stripped skin の4時間累積透過量 (Q_{4st}) は、1,000 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 58.21 $\mu\text{g/cm}^2$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 5.92 $\mu\text{g/cm}^2$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 0.54 $\mu\text{g/cm}^2$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 0.045 $\mu\text{g/cm}^2$ であり、LID 濃度の減少に比例して低下した (Fig. 16 および Table 3)。同様に、各溶液の K_{ved} および D/L^2_{ved} は、薬物濃度が異なっても差はみられなかったが、1 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液に関しては定量限界 (S/N 比 3 未満) のサンプルが含まれていたため、透過パラメータを算出しなかった (Table 3)。

一方で、種々濃度の LID 水溶液を適用した full-thickness skin の8時間累積透過量 (Q_{8full}) は 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 12.14 $\mu\text{g/cm}^2$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 1.76 $\mu\text{g/cm}^2$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 0.11 $\mu\text{g/cm}^2$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 0.012 $\mu\text{g/cm}^2$ であり、適用濃度

に依存した値を示した (Fig. 16)。また、各溶液の K_{sc} および D/L_{sc}^2 は、stripped skin と同様に薬物濃度が異なっても差はみられず、1 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液に関しては定量限界 (S/N 比 3 未満) のサンプルが多く含まれており、その透過挙動からは透過パラメータを算出できなかつた (Table 3)。

Fig. 17 は、Fig. 16 の LID 透過プロファイルから得られた透過パラメータ (Table 3) を第 1 項に示した解析式に当てはめ、定常状態時 (60 min) および非定常状態時 (5, 15 min) の角層中 LID 濃度を算出して得た、concentration-distance profile を示している。定常状態時での角層中濃度 (solid line: applied after 60 min) は、角層上部 ($x = -L_{sc}$) から角層下部 ($x = 0$) へ角層深度が深くなるにつれて角層中濃度が直線的に減少することが確認された。また、非定常状態時での角層中濃度 (dotted line: applied after 5 min、dashed line: 15 min) は、角層上部から角層下部へ角層深度が深くなるに従って曲線を描くように角層中濃度が減少し、ドナー適用時間が長くなるに従い定常状態時に近づいていくことが確認された。

以上のことから、種々濃度の LID 水溶液を適用することで normal dose から MD へ適用濃度依存的な透過プロファイル (normal dose vs. MD 間での線形性) を得ることが可能であると考えられる。また、その透過プロファイルから得られた透過パラメータより算出した角層中 concentration-distance profile から、DPK 試験時の定常状態時および非定常状態時での LID の角層中動態を推定することで、透過実験結果と DPK 試験結果間の整合性を考慮し、DPK 試験を行うこととした。

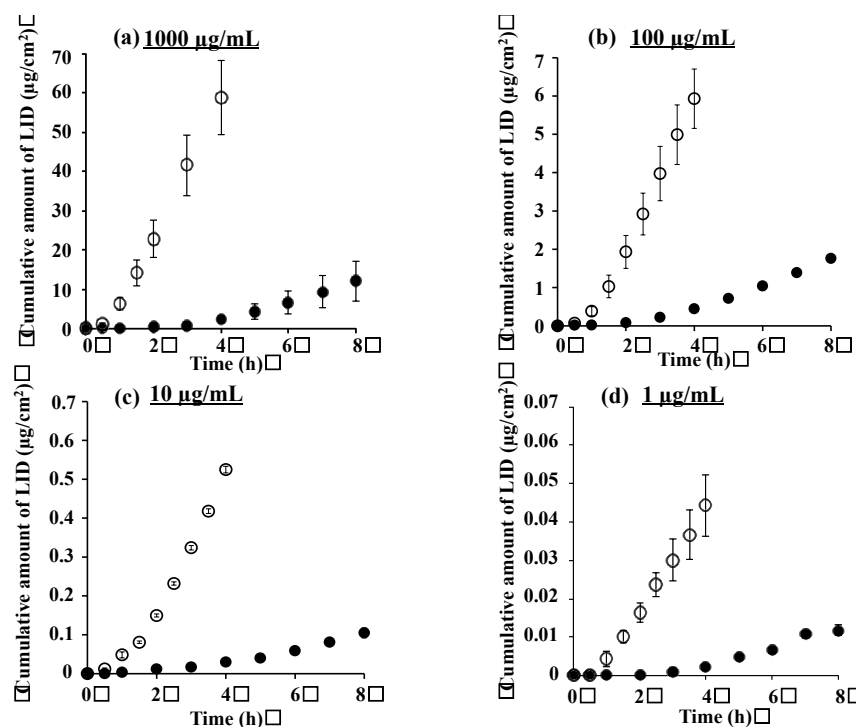


Fig. 16 Time courses of changes in the cumulative amounts of LID that permeated through the full-thickness skin and stripped skin. Symbols: full-thickness skin (●), stripped skin (○). Data are shown as the mean \pm S.D. (n=3).

Table 3 Calculated skin permeation parameters by LID permeation data through full-thickness and stripped skin. Each value shows the mean \pm S.D. (n=3).

Donor conc. ($\mu\text{g/mL}$)	1000	100	10	1
K_{sc}	8.80 ± 0.26	8.70 ± 2.08	8.50 ± 0.35	-
K_{ved}	1.05 ± 0.43	1.05 ± 0.43	1.02 ± 0.52	-
D/L^2_{sc} ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)	1.19 ± 0.62	0.93 ± 0.42	0.89 ± 0.73	-
D/L^2_{ved} ($\times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$)	4.49 ± 1.09	4.07 ± 0.36	3.95 ± 0.74	-
Q_{8full} ($\mu\text{g/cm}^2$)	12.14 ± 5.12	1.76 ± 0.18	0.11 ± 0.02	0.012 ± 0.001
Q_{4st} ($\mu\text{g/cm}^2$)	58.21 ± 18.40	5.92 ± 1.25	0.54 ± 0.03	0.045 ± 0.015

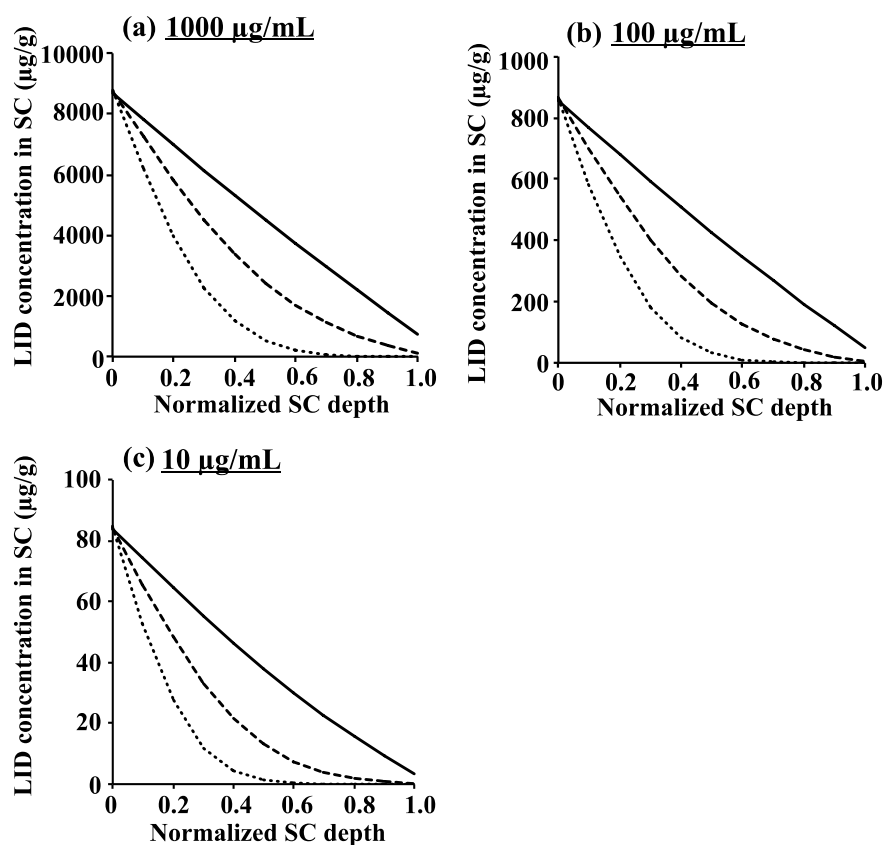


Fig. 17 Calculated average LID concentration-distance profile across the SC. Dotted line: applied after 5 min, Dashed line: 15 min and Solid line: 60 min, calculated value by the difference equation based on Fick's law of diffusion from the skin permeation profile (n=3).

3.2. Normal dose および MD 適用時の DPK 試験結果

3.2.1. DPK 試験での normal dose および MD 適用時の皮内動態挙動の評価

次に、角層中薬物量から皮膚適用医薬品（局所皮膚適用製剤）の生物学的同等性を評価する方法であり、ヒトを用いた *in vivo* で、かつ非侵襲的に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）試験法によって、*in vitro* 皮膚透過実験（3.1.）と同様に適用濃度依存的な皮内動態挙動（normal dose vs. MD 間での線形性）を評価できるか検討した。この試験は、薬物適用後、定常状態または非定常状態皮膚透過時において被験者の角層中に存在する薬物量をテープストリッピングによって剥離した角層中の薬物濃度から求め、角層中薬物濃度プロファイルを見積もる方法であり、生物学的同等性評価やその薬物の皮内動態解析を行うことが可能である。通常、皮膚に適用された薬物は Fick の拡散則に従って製剤中（水溶液）から適用部位の角層中へ分配・拡散し、角層を透過して生きた表皮・真皮層に達する。そのため、得られた角層中薬物濃度プロファイルを解析することで、角層中透過パラメータ（ D/L^2_{sc} 、 K_{sc} 、および AUC_{sc} ）を算出することが可能である。

Fig. 18 に種々濃度の LID（1,000（normal dose）、100（MD）、10（MD）、1（MD） $\mu\text{g/mL}$ ）および ^{14}C -LID（0.01（MD） $\mu\text{g/mL}$ ）水溶液を適用後、定常状態皮膚透過時（60 min）の角層各深度における LID および ^{14}C -LID 濃度の実測値（各シンボル）とそのフィッティングカーブ（実線）を示す。また、Table 4 には角層中薬物濃度プロファイルから式（23、24 および 25）を用いてカーブフィッティングによって算出した LID および ^{14}C -LID の角層透過パラメータを示す。定常状態皮膚透過時の角層中 LID および ^{14}C -LID 濃度は角層上部から角層下部へ角層深度が深くなるにつれて直線的に減少すること、適用濃度に依存した角層中薬物濃度プロファイルが得られることが確認された。この結果は Fig. 17 に示した角層中 concentration-distance profile の計算値と類似した挙動を示した（Fig. 18a-c gray dashed line）。このことから、Normal dose および MD 適用時の透過プロファイルから拡散モデルを用いて算出した結果と DPK 試験により得られた角層中 LID の concentration-distance profile 間では、そのデータ間で整合性が得られると

考えられた。また角層中 LID および ^{14}C -LID 濃度はその適用濃度によって HPLC (適用濃度: 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 18a))、LC/MS/MS (適用濃度: 100 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 18b, c)) および AMS (適用濃度: 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 18e)) で定量が可能であったが、LC/MS/MS (適用濃度: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 18d)) では皮膚透過実験の結果 (Fig. 16d) と同様に定量限界 (S/N 比 3 未満) であり、直線的な角層中薬物濃度プロファイルを得ることができなかった。定量可能であった 4 種類の濃度の LID (1,000、100、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および ^{14}C -LID (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 水溶液を適用した角層中薬物濃度プロファイルから算出した角層中濃度-位置曲線下面積 ($AUC_{sc60min}$) は、1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 4,210.26 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 464.36 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 45.18 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 0.054 $\mu\text{g}/\text{g}$ であり、LID 濃度の減少に比例して低下した (Fig. 18 および Table 4)。これは透過実験の結果 (Table 3) と同様の傾向がみられた。また、各水溶液の K_{ved} および D/L^2_{ved} は、薬物濃度が異なっても差はみられなかった。

以上のことから、種々濃度の LID 水溶液を適用することでテープストリッピング法 (DPK 試験) を用いた場合でも normal dose から MD 間で適用濃度依存的な皮内動態挙動 (線形性) を得ることが可能であり、AMS を用いることで極めて低濃度での評価も可能になると考えられた。

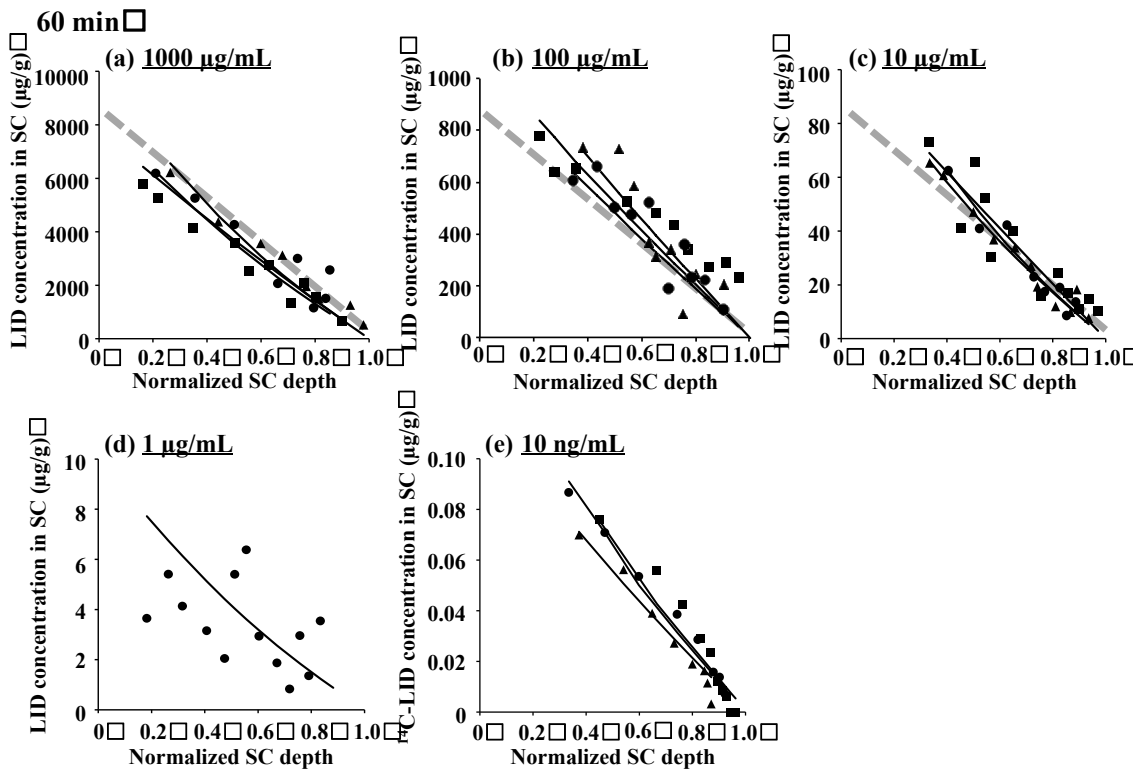


Fig. 18 *In vitro* pig ear SC concentration vs. normalized depth profiles for 60 min application of LID and ¹⁴C-LID in solutions. The best fits of Eq. (23) to the individual experimental data points (●, ■ and ▲) are shown (n=3). Gray dashed line: 60 min, calculated value by the difference equation based on Fick's law of diffusion from the skin permeation profile (Fig. 17). a) detected by HPLC. b), c) and d) detected by LC/MS/MS. e) detected by AMS.

Table 4 Diffusivity and partition parameters, and calculated AUCs (Eqs. (23) and (24)) describing LID and ¹⁴C-LID uptake into SC following 60 min application of various solutions. Each value shows the mean ± S.D. (n=3).

Donor conc.	$D/L^2_{sc60\ min} (\times 10^{-4}\ s^{-1})$	$K_{sc60min}$	$AUC_{sc60min}$ (μg/g)
1,000 μg/mL	1.01 ± 0.36	8.67 ± 1.02	4210.26 ± 228.46
100 μg/mL	0.97 ± 0.05	9.27 ± 0.38	464.36 ± 23.09
10 μg/mL	0.87 ± 0.12	9.33 ± 0.24	45.18 ± 1.02
1 μg/mL	—	—	—
0.01 μg/mL	1.03 ± 0.05	11.1 ± 0.85	0.054 ± 0.02

3. 2. 2. Normal dose および MD 間での皮内動態挙動の線形性

続いて、normal dose および MD 適用後の定常状態皮膚透過時の各角層深度の LID および ¹⁴C-LID 濃度の実測値の関係をプロットし、normal dose および MD 間または MD および MD 間での皮内動態挙動の線形性について調べた。

Fig. 19 に種々濃度の LID 水溶液を適用した定常状態皮膚透過時の各角層深度の LID および ¹⁴C-LID 濃度の実測値の関係を示す。Fig. 19a-c は 1,000 (normal dose) μg/mL 適用時の LID 濃度と 100 (MD)、10 (MD) μg/mL および 0.01 (MD) μg/mL 適用時の LID および ¹⁴C-LID 濃度の関係 (normal dose vs. MD) を、Fig. 19d, e は 100 (MD)、10 (MD) および 0.01 (MD) μg/mL 適用時の LID および ¹⁴C-LID 濃度の関係 (MD vs. MD) を示す。Normal dose 適用時の各角層深度での LID 濃度と MD 適用時の LID および ¹⁴C-LID 濃度間には 1:1 に近い高い相関 (Fig. 19a: r = 0.9973, b: r=0.9958, c: r=0.9988) がみられたことから、normal dose vs. MD 間での皮内動態挙動は同等であり、適用濃度に依存した角層中薬物濃度プロファイルが得られると考えられた。また、MD 適用時の LC/MS/MS にて測定した LID 濃度と MD 適用時の AMS にて測定した ¹⁴C-LID 濃度間でも 1:1 に近い高い相関 (Fig. 19d: r=0.9997, e: r=0.9952) がみられたことから、さらに低濃度であっても皮内動態挙動は同等であり、適用濃度に依存した角層中薬物濃度プロファイルが得られると考えられた。なお、各角層深度での薬物濃度間で完全に 1:1 の関係性が得

られないことに関しては、角層には毛嚢などの付属器官が存在し本質的に均一な膜ではないことや個体間での角層の成熟度に違いあること、角層の厚みのバラツキ等によって薬物の透過性にバラツキが生じたことが起因していると考えられた。以上の結果より、normal dose vs. MD 間および MD vs. MD 間での皮膚中濃度には高い相関性（線形性）がみられることが明らかとなり、テープストリッピング法（DPK 試験）を用いた皮内動態解析の妥当性が示唆された。

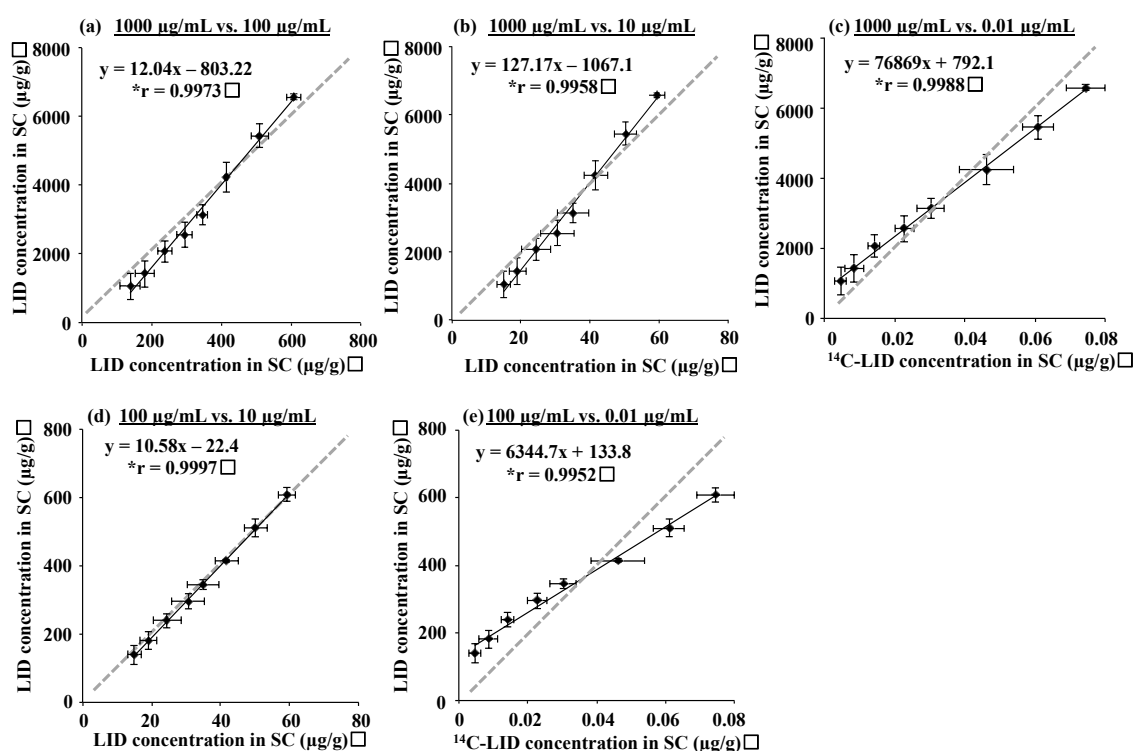


Fig. 19 Correlation of the steady-state SC concentration vs. normalized depth profiles between normal dose and MD (a, b and c), MD and MD (d, e). Each value shows the mean \pm S.D. (n=3). $*P < 0.05$

3. 2. 3. Normal dose および MD 適用後の非定常状態皮膚透過時の皮内動態挙動の評価

Herkenne らの報告⁹¹⁾によれば、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算出した角層透過パラメータ (K_{sc} および D/L^2_{sc}) を式 (24) に代入することで定常状態皮膚透過時の角層中濃度-位置曲線下面積 (AUC_{sc}) (Fig. 18)

を予測することが可能である。これが、MD 適用時でも可能であれば、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得られた角層透過パラメータから normal dose 適用時の AUC_{sc} を予測することが可能となる。現在、局所皮膚適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験に採用されている DPK 試験では、薬物適用時間を角層中の薬物濃度が定常状態にあるとみなされる一定時間またはそれより長い時間と規定している。そのため、この手法は試験時間の短縮によって被験者への負担を減らすことや試験の効率化に繋がると考えられる。そこで、種々濃度の LID (1,000 (normal dose)、100 (MD)、10 (MD) $\mu\text{g}/\text{mL}$) 水溶液適用後の非定常状態皮膚透過時 (5 または 15 min) の角層中薬物濃度プロファイルから角層透過パラメータを求め、得られた MD 適用時の角層透過パラメータから normal dose 適用後の定常状態皮膚透過時 (60 min) の皮内動態挙動を予測可能か検討した。Fig. 20 に種々濃度の LID (1,000 (normal dose)、100 (MD)、10 (MD) $\mu\text{g}/\text{mL}$) 水溶液を適用後、非定常状態皮膚透過時 (5 または 10 min) の角層各深度における LID 濃度の実測値 (各シンボル) とそのフィッティングカーブ (実線) の角層中薬物濃度プロファイルを示す。また、Table 5 には角層中薬物濃度プロファイルから式 (23 および 24) を用いてカーブフィッティングによって算出した LID の角層透過パラメータを示す。種々濃度の LID (1,000 (normal dose)、100 (MD)、10 (MD) $\mu\text{g}/\text{mL}$) 水溶液適用後の非定常状態皮膚透過時 (5 または 15 min) の角層中薬物濃度プロファイルはすべての結果において定常状態皮膚透過時 (60 min) の結果 (Fig. 18a-c) と同様に透過プロファイルから得られた透過パラメータを用いて算出した角層中 concentration-distance profile の計算値と類似した挙動を示し (Fig. 20 gray dashed line)、適用濃度に依存した角層中薬物濃度プロファイルが得られ、角層上部から角層下部へ角層深度が深くなるにつれて角層中 LID 濃度が曲線を描いて減少することが確認された。また、角層中薬物濃度プロファイルから算出した AUC_{sc} は、1,000 (normal dose) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 1,668.54 (5 min)、2547.48 (15 min) $\mu\text{g}/\text{g}$ 、100 (MD) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 192.27 (5 min)、251.63 (15 min) $\mu\text{g}/\text{g}$ 、10 (MD) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 17.01 (5 min)、24.96 (15 min) $\mu\text{g}/\text{g}$ であり、適用 LID 濃度の減少に比例して低下し、

適用時間の増加に比例して上昇した。 K_{sc} および D/L^2_{sc} は、適用 LID 濃度が異なっても値に差はみられなかったが、適用時間の増加に伴い、 K_{sc} の値が上昇し、 D/L^2_{sc} の値が低下する傾向がみられた。

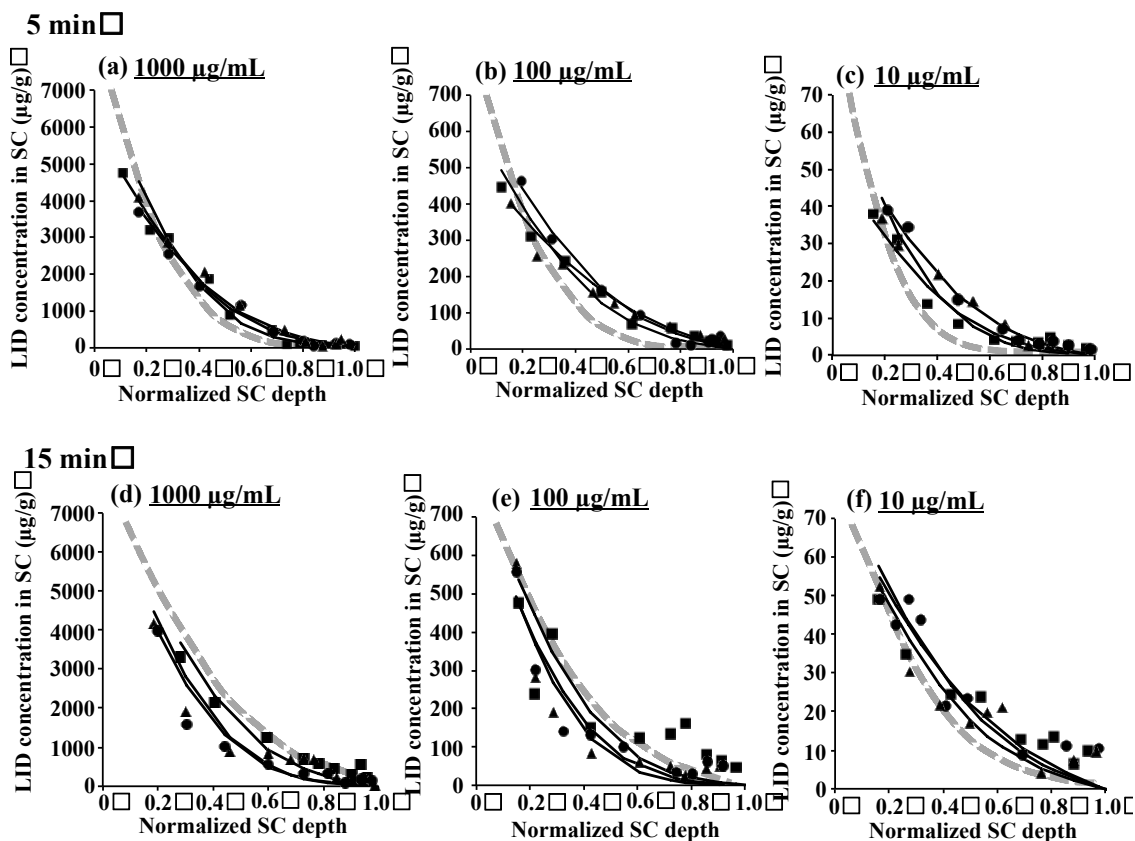


Fig. 20 *In vitro* pig ear SC concentration vs. normalized depth profiles for 5 and 15 min application of various LID concentration solutions. The best fits of Eq. (23) to the individual experimental data points (●, ■ and ▲) are shown (n=3). Gray dashed line: 5 and 15 min, calculated value by the difference equation based on Fick's law of diffusion from the skin permeation profile (Fig. 17). a-c): SC concentration vs. normalized depth profiles for 5 min application of various LID concentration solutions. d-f): SC concentration vs. normalized depth profiles for 15 min application of various LID concentration solutions.

Table 5 Diffusivity and partition parameters, and calculated AUCs (Eqs. (23) and (24)) describing LID uptake into SC following 5 and 15 min application of various concentration solutions. Each value shows the mean \pm S.D. (n=3).

Donor conc. ($\mu\text{g/mL}$)	1000	100	10
K_{sc5min}	7.56 \pm 0.35	7.49 \pm 0.64	7.66 \pm 0.31
$K_{sc15min}$	7.92 \pm 0.17	8.07 \pm 0.42	8.02 \pm 0.17
D/L^2_{sc5min} ($\times 10^{-4}$ s $^{-1}$)	1.13 \pm 0.14	1.30 \pm 0.35	1.21 \pm 0.26
$D/L^2_{sc15min}$ ($\times 10^{-4}$ s $^{-1}$)	0.97 \pm 0.11	0.88 \pm 0.05	0.87 \pm 0.05
AUC_{sc5min} ($\mu\text{g/g}$)	1668.54 \pm 153.94	192.27 \pm 21.95	17.01 \pm 1.63
$AUC_{sc15min}$ ($\mu\text{g/g}$)	2547.48 \pm 207.60	251.63 \pm 5.89	24.96 \pm 0.33

3. 2. 4. MD 適用後の非定常状態皮膚透過時の角層透過パラメータを用いた normal dose 適用後の皮内動態挙動の予測

続いて、MD 適用後の非定常状態皮膚透過時 (5 および 15 min) 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 K_{sc} および D/L^2_{sc} (mean \pm SD) (Table 5) を用いて normal dose 適用時の AUC_{sc} 予測値を算出し、normal dose 適用時の AUC_{sc} 実測値と比較した。Fig. 21 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て算出した normal dose 適用時の AUC_{sc} 予測値 (dashed lines) と normal dose 適用時の AUC_{sc} の実測値 (Symbols) の関係を示す。Fig. 21a, b, d そして d からの予測値の挙動はすべての結果において実測値に近似しており、短時間 (5-15 min) では急激な AUC_{sc} の増加がみられ、長時間 (60 min) ではプラトーに達することが明らかとなった。また、Herkenne らの報告⁹¹⁾に示された様に、今回の解析の結果から短時間の予測値では、式 (24) に代入する D/L^2_{sc} の値に大きく依存し、そのバラツキの影響が大きく反映して予測値のバラツキが大きくなる傾向がみられた。一

方、長時間の予測値では、時間経過と共に皮内動態挙動が定常状態時(式(25))へと近づくことから、式(24)に代入する D/L_{sc}^2 への依存度が減少するため、値のバラツキの影響が小さくなり、逆に K_{sc} の値への依存が高まることで予測値のバラツキが小さくなる傾向がみられた。さらにFig. 21c, fから予測に用いる角層透過パラメータの算出時間(5から15 min)が長くなるに従い、実験から得られる角層透過パラメータのバラツキが小さくなるため、式(24)に代入するに角層透過パラメータのバラツキが小さくなることから予測できる値の範囲に減少傾向がみられた。これは予測値の精度が上がる一方で予測値の許容範囲を狭めてしまう可能性もあると考えられた。

以上のことから、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normal dose適用時の皮内動態挙動を予測することが可能であることが示唆された。しかしながら、得られる予測値を過小または過大評価しないために、予測値の精度(範囲)を考慮し、予測に用いる角層透過パラメータの算出時間には注意が必要であると考えられる。

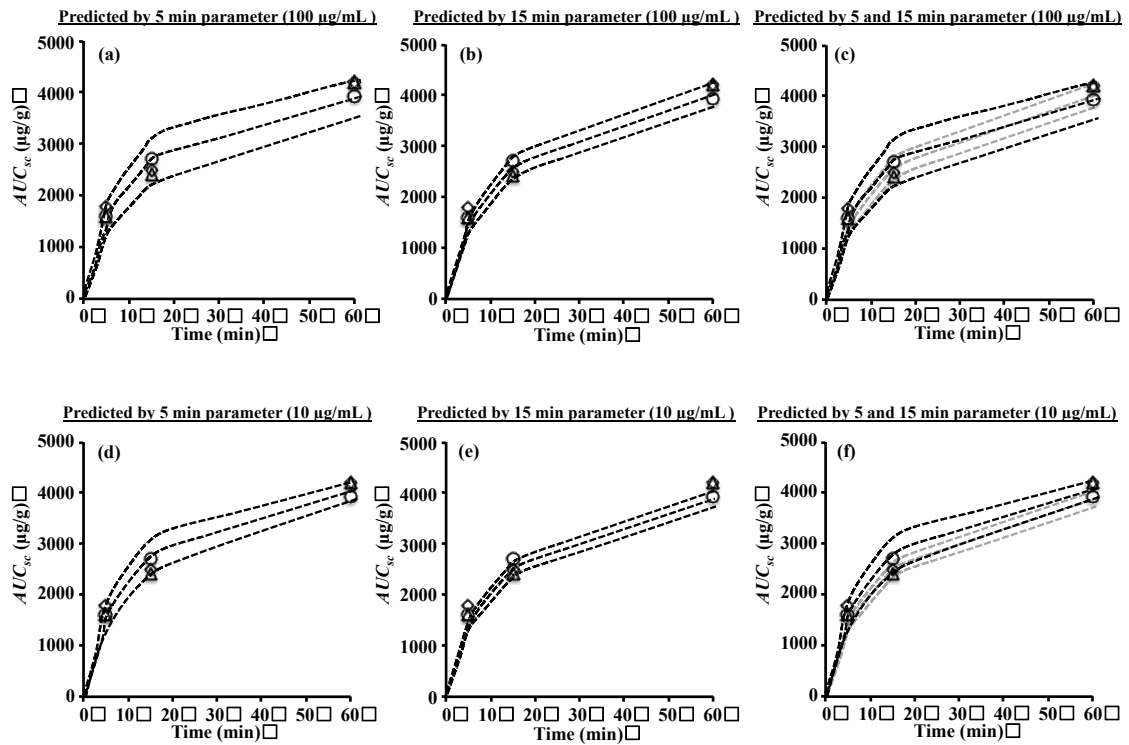


Fig. 21 Comparison of experimental and predicted AUC_{sc} values. The individual ($n=3$) experimentally determined AUC_{sc} (applied 1,000 µg/mL solution) as a function of time are plotted together with the mean prediction (dashed line) using the mean K_{sc} and the extreme values of D/L^2_{sc} (mean + SD, mean - SD), and the limits, of the predictions based on the 5 and 15 min K_{sc} and D/L^2_{sc} values from applied 100 or 10 µg/mL solution. a-c) The dashed lines are the predictions based on the 5 and 15 min K_{sc} and D/L^2_{sc} (mean + SD, mean - SD) values from applied 100 µg/mL solution. d-f) The dashed lines are the predictions based on the 5 and 15 min K_{sc} and D/L^2_{sc} (mean + SD, mean - SD) values from applied 10 µg/mL solution.

第4項 小括

本節の研究では、*in vitro* 皮膚透過実験および DPK 試験の結果から種々濃度の LID 水溶液を適用後、normal dose 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、normal dose vs. MD 間および MD vs. MD 間での皮内動態挙動には高い相関性がみられたことが明らかとなったことから、テープストリッピング法を用いた MD 適用後の皮内動態解析の妥当性が示唆された。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 normal dose 適用時の皮内動態挙動を予測することが可能であることも併せて明らかとなった。

これらのことから、本節で示した方法はテープストリッピング法を用いた新たな動物実験代替法としてだけではなく、短時間の MD 適用による皮内動態解析によって、試験時間の短縮による被験者への負担を減らすことや試験の効率化にも繋がり、外用医薬品や化粧品等の経皮投与製剤の開発を効率的に進める手段として利用可能であると考えられた。

しかしながら、今回モデル物質として選択した LID は、臨床にて局所麻酔薬として汎用されており、皮膚バリアである角層を透過しやすいこと、また、用いた実験系が単純な溶液系かつ *in vitro* での検討であったことを考慮する必要がある。皮膚表面では薬物や製剤中の基剤成分の吸着現象⁹²⁻⁹⁴⁾がみられることがあり、基剤と薬物間相互作用による非線形や毛嚢などの経付属器官の寄与⁹⁵⁾による非線形の可能性も考えられる。今後は皮内動態評価の難しいモデル物質の選択、製剤化の皮膚（角層）透過性に及ぼす影響の評価や *in vivo* での臨床試験の実施等、実使用に即した条件下でさらに本方法の有用性を評価していく必要がある。

第 2 節

実使用に即した MD 適用時の薬物の皮内動態に及ぼす 製剤化の影響

本章第 1 節では薬物の皮内動態評価における MD 適用の影響について述べた。単純な水溶系かつ *in vitro* 条件下の検討によって、normal dose および MD 間で適用濃度依存的な透過挙動（線形性）がみられることから MD 適用時の皮内動態解析の妥当性が示唆された。また、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透過パラメータを用いることで normal dose 適用時の皮内動態挙動を予測することが可能であることも併せて明らかとなり、本方法は局所皮膚適用製剤の開発を効率的に進める手段として有用であると考えられたが、実使用に即した複雑な条件下でさらに本方法の有用性を評価していく必要がある。

そこで本章第 2 節では、モデル物質として高脂溶性化合物であり、本邦でも医薬品や化粧品有効成分として用いられているトコフェロール酢酸エステルを選択し、2 種類の製剤（G および E）を作製した。薬物の皮膚（角層）透過性に及ぼす製剤化の影響をヒト試験にて検討し、本方法のさらなる有用性について評価した。まず、本研究ではヒト試験への概算を目的として第 1 節と同様にブタ耳介皮膚を用いて DPK 試験を行い、製剤からのトコフェロール酢酸エステルの皮内動態評価を行った後に、ヒト試験を行った。なお、本節の試験ではヒト試験を考慮し、被験者の負担軽減を目的として適用薬物量やテープストリッピング処理範囲等を縮小することで試験系のスケールダウンを行った。また、テープストリッピングを行う際に用いる粘着テープを Scotch®（第 1 節）からより取り扱いが簡易かつサイズの小さい D-SQUAME® D-100（プロモツール株式会社、東京、日本）へ変更した。

第1項 実験方法

1.1. 試薬および実験材料

本試験のモデル化合物としてトコフェロール酢酸エステル (DL- α -tocopherol acetate : TA、ClogP; 12.15 calculated by Chem Draw Ultra 12.2[®] (PerkinElmer Informatics, Cambridge, MA, USA)) および ¹⁴C 標識トコフェロール酢酸エステル (¹⁴C-DL- α -tocopherol acetate : ¹⁴C-TA、比放射能; 50-60 mCi/mmol) を選択した。TA およびビタミン K₁ (Phylloquinone : PQ) は東京化成 (東京、日本) から購入した。¹⁴C-TA は American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MI, USA) から購入した。Squalene は Kishimoto Special Liver Oil (東京、日本)、butylene glycol はダイセル化学 (大阪、日本)、glyceryl stearate は理研ビタミン (東京、日本)、polysorbate 80 は日本油脂 (東京、日本)、carbomer は Lubrizol Advanced Materials (Wickliffe, OH, USA)、polysorbate 85 は日本サーファクタント工業 (東京、日本)、sodium hydroxide は Eka chemicals (Amsterdam, Netherlands) から購入した。また、酢酸アンモニウムは和光純薬 (大阪、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は、市販の HPLC 用または特級品を精製せずにそのまま用いた。さらに、粘着テープ (D-SQUAME[®] D-100) はプロモツール株式会社 (東京、日本) から購入した。

1.2. 製剤の調製

Table 6 に調製した製剤の処方を示す。製剤中濃度が TA: 1,000 μ g/g (4.2 μ mol/g)、¹⁴C-TA: 0.2 μ g/g (2.1 nmol/g) となるように精製水に溶解し、TA または ¹⁴C-TA 水溶液を調製した。そこに table 6 に示した割合で基剤を添加し、超高速 乳化・分散試験装置: ラボ・リユーション (プライミクス株式会社、大阪、日本) を用いて混合 (20,000 rpm/min、5 min、70°C) することで乳化分散させ、squalane の配合の有無が異なる TA または ¹⁴C-TA 含有 Formulation G および E を調製した。

Table 6 Recipe of fabricate formulations.

Ingredients	Formulation G (% w/w)	Formulation E (% w/w)
Squalane	0	5
Butylene glycol	1	1
Polysorbate 80	1	1
Carbomer	0.1	0.1
Cetearyl alcohol	0.5	0.5
Palysorbate 85	0.5	0.5
Sodium hydroxide	0.02	0.02
Purified water	q. s.	q. s.

1.3. 実験動物および被験者

実験動物は第1章第1節 1.2.と同様のブタ耳介を用いた。

本試験は、城西大学 生命科学研究倫理審査委員会による承認（承認番号: H23-9）を受けた。被験者は本試験への参加を志願する文書同意能力のある者で同意取得時の年齢が25歳以上45歳未満、皮膚疾患歴のない健常な男性（4人）とした。すべての参加者に書面によるインフォームド・コンセントを行い、同意を得た。

1.4. DPK 試験法

1.4.1. ブタ耳介皮膚

試験方法は本章第1節 2.6.と同様であるが、本節の試験ではヒト試験を考慮し、被験者の負担軽減を目的として適用薬物量やテープstripping処理範囲等を縮小することで試験系のスケールダウンを行った。Fig. 22 に薬物適用方法およびテープstripping方法を示す。まず、ブタ耳介皮膚は表面を丁寧に水洗いし、水分をよく拭き取りメスを用いて必要面積(2×2 cm²)を摘出した。真皮側の脂肪をハサミで丁寧に取り除き、コルク台の上に精製水を浸したキムワイプをひき、皮膚を表皮側（角層）が上になるように固定した。表皮側にドナー塗布用のテンプレート-1（透過面積: 1.77 cm²）を両面テープ（ナイスタック[®]、ニチバン、東京、日本）で強固に貼り付けた後、表皮側に TA 1,000 μg/g（4.2

$\mu\text{mol/g}$ (normal dose)) 含有 Formulation G および E を適用 (10 mg/cm^2) し、室温にて 5 分間 (非定常状態) 静置後、透過面積の内側に透過面積より小さい範囲の剥離面積 (1.33 cm^2) を ETFE テフロンメッシュ (株式会社くればあ、豊橋、愛知、日本) を用いたテンプレート-2 (角層テープストリッピング用) によって設定した。その後、剥離面積より大きいサイズ (3.14 cm^2) の粘着テープ (D-SQUAME[®] D-100、プロモツール) を用いて角層テープストリッピングを行った。角層剥離前後の粘着テープ重量をシムコ静電気除去装置 (SF-1000A、シムコジャパン) で静電気除去した後に、エクセレンス XP ミクロ天秤 (XP26、メトラー・トレド) を用いて測定し、剥離により得られた各角層重量を測定した。その後の粘着テープは 2.5 mL ガラスバイアルに入れ、1.0 mL のメタノールに浸し、1 時間振とうすることで角層中 TA を抽出した。抽出液中 TA 濃度は LC/MS/MS を用いて測定した。なお、角層中濃度の測定には抽出率を考慮し、角層厚の推定方法も本章第 1 節 2.7.と同様である。

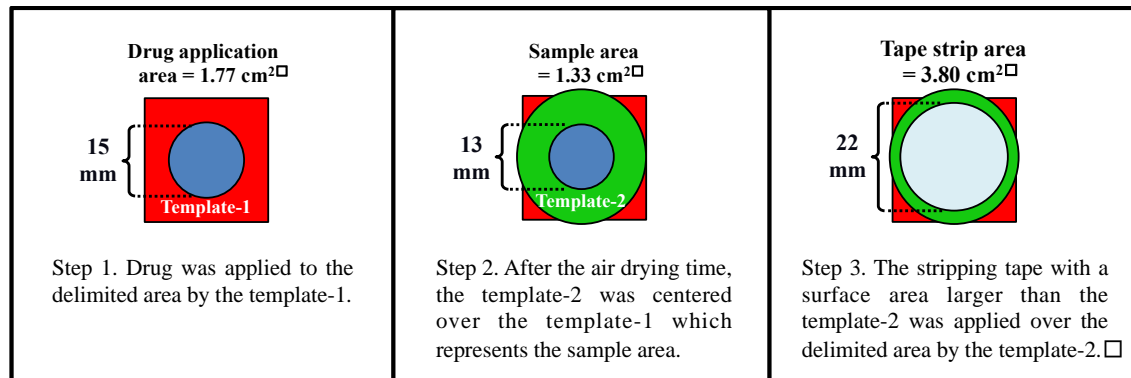


Fig. 22 Schematic diagram illustrating the drug application and tape-stripping protocols.

1.4.2. ヒト試験

まず、インフォームド・コンセントを行った被験者の被験部位である前腕内側部を石鹸で洗浄後、恒温恒湿環境下 (温度 $23 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5.0\%$) で 30 分間順化した。次に前腕内側部にドナー塗布用のテンプレート-1 (透過面積: 1.77 cm^2) を両面テープ (ナイスタック[®]、ニチバン) で強固に貼り付けた後、

TA 1,000 µg/g (4.2 µmol/g, normal dose) または ¹⁴C-TA: 0.2 µg/g (2.1 nmol/g, MD) 含有 Formulation G および E を適用 (10 mg/cm²) し、恒温恒湿環境下にて 5 分間 (非定常状態) または 30 分間 (定常状態) 静置後、透過面積の内側に透過面積より小さい範囲の剥離面積 (1.33 cm²) を ETFE テフロンメッシュ (株式会社くればあ) を用いた角層テープストリッピング用のテンプレート-2 によって設定した。その後、剥離面積より大きいサイズ (3.14 cm²) の粘着テープ (D-SQUAME[®] D-100、プロモツール) を用いて角層テープストリッピングを行った。角層剥離前後の粘着テープ重量をシムコ静電気除去装置 (SF-1000A、シムコジャパン) で静電気除去した後に、エクセレンス XP ミクロ天秤 (XP26、メトラー・トレド) を用いて測定し、テープストリッピングにより得られた各角層重量を測定した。その後の粘着テープを 2.5 mL ガラスバイアルに入れ、1.0 mL のメタノールに浸し、1 時間振とうすることで角層中 TA および ¹⁴C-TA を抽出した。ただし、¹⁴C-TA 適用群に関しては、コンタミネーションの防止のためにすべての行程において金属製のピンセットを使い、その都度メタノールにて清拭した。抽出液中の TA 濃度は LC/MS/MS にて、¹⁴C-TA 濃度は AMS を用いて測定した。また、角層中濃度の測定には抽出率を考慮し、角層厚の推定方法も本章第 1 節 2. 7. と同様であり、試験は OECD ガイドライン⁹⁶⁾に従い行った。

1. 5. 角層中薬物濃度の分析方法

1. 5. 1. LC/MS/MS での TA 定量法

角層から抽出した TA 濃度は、内標準物質 (PQ) を溶解したアセトニトリルと 1:1 で混和し、遠心分離機 (15,000×g, 5 min, 4°C) によりタンパク除去後、上清を LC/MS/MS を用いて測定した。LC/MS/MS システムは system controller (CBM-20A; 島津製作所)、pump (LC-20AD; 島津製作所)、auto-sampler (SIL-20AC_{HT}; 島津製作所)、column oven (CTO-20AC; 島津製作所)、detector (4000QTRAP; AB Sciex、東京、日本)、analysis software (Analyst[®] version 1.4.2; 島津製作所) からなる。カラムは Thermo Hypersil Gold 3 µm, 2.1 mm I. D., 50mm octadecylsilyl silica gel column (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を、カラム

温度は40°Cとした。移動相は、acetonitrile : 10 mM ammonium acetate = 96 : 4 (v/v) を用い、流速0.2 mL/minとした。また、injection volumeは10 µLに設定した。TA およびMCのイオン化には、electro spray ionization (ESI) 法を用い、イオンモードはポジティブ、測定分子量はTAの場合、プリカーサーイオンをm/z 473.47、プロダクトイオンをm/z 207.10に設定した。PQの場合、プリカーサーイオンをm/z 451.36、プロダクトイオンをm/z 187.10とした。また、イオンスプレイ電圧は5500 Vとし、ネブライザーガス圧力を70 psig、乾燥ガス流量を20 L/min、乾燥ガス温度を600°Cの条件下でピーク面積比を算出した。

1.5.2. AMS での ¹⁴C-TA 定量法

本章第1節 2.8.2.と同様の方法を用いた。

1.6. 角層中薬物プロファイルからの透過パラメータ算出方法

本章第1節 2.9.と同様の方法を用いた。

1.7. 統計解析

DPK 試験によって得られた角層中薬物プロファイルより算出した角層透過パラメータの有意差検定には unpaired *t*-test を用い、*p*<0.05 を有意と判断した。

第2項 結果および考察

2.1. ブタ耳介皮膚を用いた DPK 試験

第1節では、normal dose および MD 適用時の基剤（水溶液）から皮膚（角層）へ移行した LID の皮内動態を LID の角層中薬物濃度プロファイルより得られた角層透過パラメータ K_{sc} および D/L^2_{sc} から予測可能であること、また、normal dose および MD 間での適用濃度依存的な透過挙動（線形性）も評価可能であること、さらに、MD 適用時の角層中薬物濃度プロファイルより得られた角層透過パラメータから normal dose 適用時の皮内動態をも予測可能であることを明らかにした。

本節では、本法のさらなる有用性の検討を目的として、薬物の皮膚（角層）透過性に及ぼす製剤化の影響をヒト試験にて評価した。まず、ヒト試験への概算を目的として第1節と同様にブタ耳介皮膚を用いて DPK 試験を行い、製剤からのトコフェロール酢酸エステル（TA）の皮内動態評価を行った。

Fig. 23 に TA 1,000 $\mu\text{g/g}$ (4.2 $\mu\text{mol/g}$, normal dose) 含有製剤 G および E を適用後、非定常状態皮膚透過時（5 minutes）の角層各深度における TA 濃度の実測値（各シンボル）とそのフィッティングカーブ（実線）の角層中薬物濃度プロファイルを示す。また、Table 6 には角層中薬物濃度プロファイルから式（23 および 24）を用いてカーブフィッティングによって算出した TA の角層透過パラメータを示す。TA 1,000 $\mu\text{g/g}$ 含有製剤 G および E 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は角層上部から角層下部へ角層深度が深くなるにつれて角層中 TA 濃度が曲線的に減少することが確認された。また、製剤 G (Fig. 23a) および E (Fig. 23b) 適用群間で角層中 TA 濃度に差がみられ、その角層中薬物濃度プロファイルから算出した $AUC_{sc \text{ pig ear}}$ および $K_{sc \text{ pig ear}}$ は、製剤 G でそれぞれ 2.48 $\mu\text{mol/g}$ および 4.27、製剤 E でそれぞれ 1.89 $\mu\text{mol/g}$ および 3.20 であり、製剤 E 適用群と比較して製剤 G 適用群では有意に高かった ($p < 0.05$)。一方、 $D/L^2_{sc \text{ pig ear}}$ は、製剤間で値に差はみられなかった。これは製剤中の油性基剤である squalane の有無によって高脂溶性物質である TA の基剤中熱力学的活量が E よりも G で高いためと考えられ、それによって製剤からの TA の角層への分配性に差が生じ、それに伴い $AUC_{sc \text{ pig ear}}$ にも差が生じたと考えられた。

以上のことから、TA 1,000 $\mu\text{g/g}$ (normal dose) 含有製剤適用後の非定常状態皮膚透過時の角層中薬物プロファイルを評価することが可能であり、製剤間でのTA透過性に及ぼす基剤の影響を評価することが可能であることが明らかとなった。この結果を踏まえてヒト試験を行うこととした。

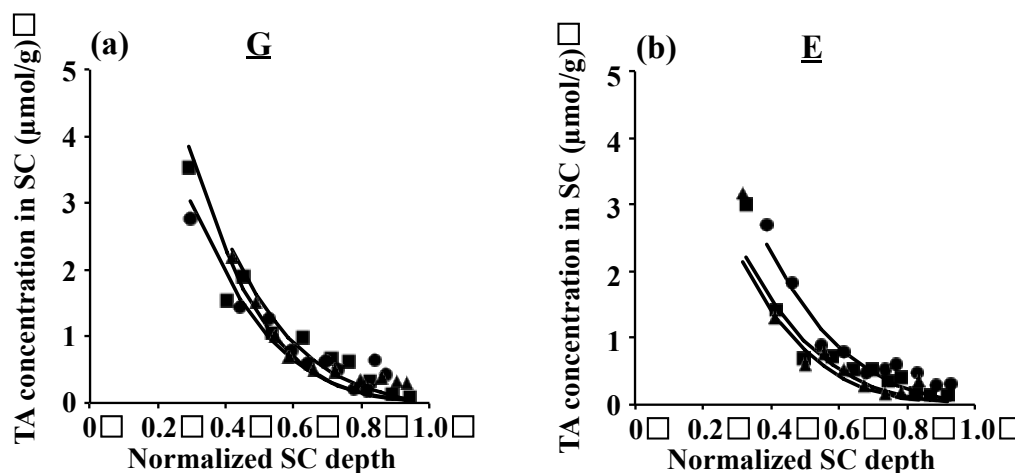


Fig. 23 *In vitro* pig ear SC concentration vs. normalized depth profiles of TA following 5 min treatment with formulation G (a: left panel) and E (b: right panel). The best fits of Eq. (23) to the individual experimental data points (\bullet , \blacksquare and \blacktriangle) are shown ($n=3$).

Table 6 Diffusivity and partition parameters, and calculated *AUCs* (Eqs. (23) and (24)) describing TA uptake into SC following 5 min application of various formulations. Each value shows the mean \pm S.D. ($n=3$). $*p<0.05$

Formulation	$D/L^2_{sc\ pig\ ear} (\times 10^{-4} s^{-1})$	$K_{sc\ pig\ ear}$	$AUC_{sc\ pig\ ear} (\mu\text{mol/g})$
G	2.06 ± 0.10	$4.27 \pm 0.50^*$	$2.48 \pm 0.27^*$
E	2.03 ± 0.21	3.20 ± 0.28	1.89 ± 0.26

2.2. ヒト DPK 試験

2.2.1. MD 適用時のヒト DPK 試験

本章第 1 節では 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 normal dose 適用時の実測値の予測が可能であることを明らかにした。本章ではヒトへ異なる 2 種類の製剤を MD 適用し、薬物の皮膚（角層）透過性に及ぼす製剤化の影響をヒト臨床試験にて評価した。さらに、得られた角層透過パラメータを用いて normal dose (1,000 $\mu\text{g/g}$ (4.2 $\mu\text{mol/g}$)) 適用時の予測値を算出した。

Fig. 24 に $^{14}\text{C-TA}$ 0.2 $\mu\text{g/g}$ (2.1 nmol/g , MD) 含有製剤 G および E を適用後、非定常状態皮膚透過時 (5 min) の角層各深度における $^{14}\text{C-TA}$ 濃度の実測値 (各シンボル) とそのフィッティングカーブ (実線) の角層中薬物プロファイルを示す。また、Table 7 には角層中薬物濃度プロファイルから式 (23 および 24) を用いてカーブフィッティングによって算出した $^{14}\text{C-TA}$ の角層透過パラメータを示す。 $^{14}\text{C-TA}$ 0.2 $\mu\text{g/g}$ (2.1 nmol/g , MD) 含有製剤 G および E 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、ブタ耳介皮膚 (Fig. 23) と同様に角層中 $^{14}\text{C-TA}$ 濃度は角層上部から下部へ角層深度が深くなるにつれて曲線的に減少することが確認された。また、こちらも同様に製剤 G (Fig. 24a) および E (Fig. 24b) 適用群間で角層中 $^{14}\text{C-TA}$ 濃度に差がみられた。また、得られた角層中薬物プロファイルから算出した AUC_{sc} および K_{sc} は、製剤 G でそれぞれ 1.38 nmol/g および 7.50、製剤 E でそれぞれ 0.86 nmol/g および 4.52 であり、製剤 E 適用群と比較して製剤 G 適用群では有意に高い値 ($p < 0.01$) が得られた。なお、 D/L^2_{sc} は製剤間での値に差はみられなかった (Table 7)。しかし、すべての角層中薬物濃度プロファイルおよび角層透過パラメータにおいてブタ耳介皮膚の結果 (Table 6) と比較してヒト皮膚では高い値を示した。なお、これらには動物種差間での皮膚（角層）構造が影響していると推定され、ブタ皮膚より脂溶性の高いヒト皮膚の方が高脂溶性物質である TA の分配性が高かったと思われる。また、製剤 G および E 適用後の TA の角層中薬物濃度プロファイルに及ぼす基剤の影響は、得られた挙動は同様であったが、ブタ耳介皮膚 ($p < 0.05$) と比較し

てヒト皮膚の方がより有意 ($p < 0.01$) な差がでることも確認された。

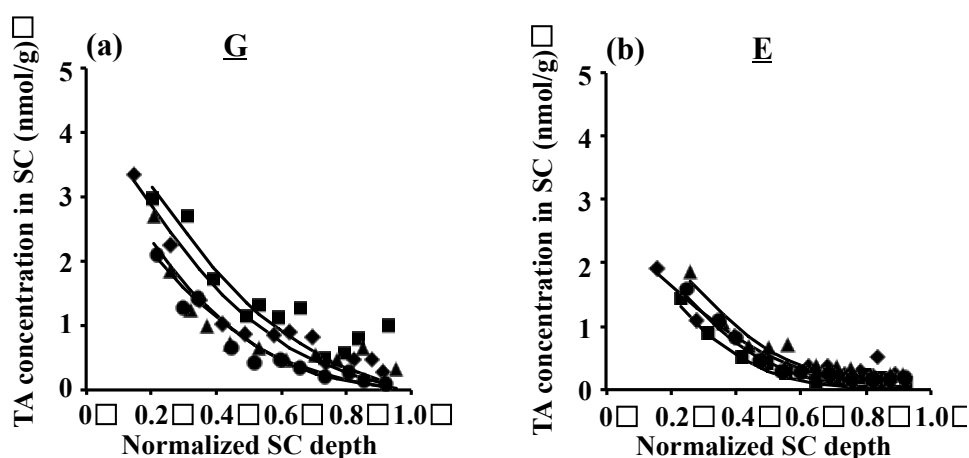


Fig. 24 *In vivo* human SC concentration vs. normalized depth profiles of ^{14}C -TA following 5 min treatment with formulation G (a: left panel) and E (b: right panel). The best fits of Eq. (23) to the individual experimental data points (\bullet , \blacksquare and \blacktriangle) are shown ($n=3$).

Table 7 Diffusivity and partition parameters, and calculated AUC s (Eqs. (23) and (24)) describing ^{14}C -TA uptake into SC following 5 min application of various formulations. Each value shows the mean \pm S.D. ($n=3$). $**p < 0.01$

Formulation	$D/L^2_{sc5min} (\times 10^{-4} \text{ s}^{-1})$	K_{sc5min}	$AUC_{sc5min} (\text{nmol/g})$
G	2.25 ± 0.56	$7.50 \pm 0.99^{**}$	$1.38 \pm 0.25^{**}$
E	2.10 ± 0.37	4.52 ± 0.32	0.86 ± 0.11

2.2.2. MD 適用後の非定常状態皮膚透過時の角層透過パラメータを用いた normal dose 適用後の皮内動態挙動の予測

続いて、第1節3.2.4.と同様にMD適用後の非定常状態皮膚透過時(5 min)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 K_{sc} および D/L^2_{sc} (mean + SD, mean - SD) (Table 7) を用いて normal dose 適用時の AUC_{sc} 予測値を算出した。Fig. 25 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て算出した normal dose 適用時

の AUC_{sc} 予測値 (dashed lines) を適用製剤 (a: G, b: E) ごとに示す。Fig. 24a, b から予測値の挙動は製剤 G および E のどちらの結果においても適用後 5-20 min では急激な AUC_{sc} の増加がみられ非定常状態であったのに対し、30 min 以降ではプラトーに達し定常状態に至ることが明らかとなった。また、解析の結果から第 1 節の結果 (Fig. 21) と同様に、適用後短時間 (非定常状態時) での予測値は D/L^2_{sc} への依存が高く、値にバラツキが大きくなる傾向がみられ、長時間 (定常状態時) の予測値は K_{sc} への依存が高まるため値のバラツキが小さくなる傾向がみられた。さらに経時的な AUC_{sc} の挙動から製剤 G および E の製剤間での TA の角層透過性には約 2 倍の差があることが予測された。

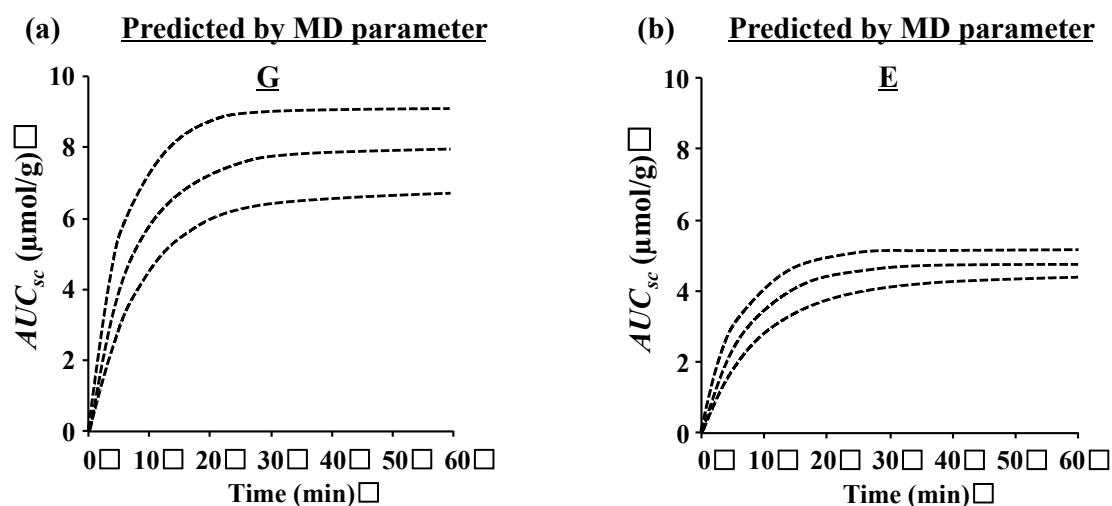


Fig. 25 Comparison of predicted AUC_{sc} values. The individual (n=3) experimentally predicted AUC_{sc} (dashed line) using the mean K_{sc} and the extreme values of D/L^2_{sc} (mean + SD, mean - SD), and the limits, of the predictions based on the 5 min K_{sc} and D/L^2_{sc} values from applied ^{14}C -TA including formulation G and E.

2. 2. 3. Normal dose 適用時のヒト試験

次に MD 適用後の非定常状態皮膚透過時 (5 min) の角層中薬物濃度プロファイルから得られた角層透過パラメータ K_{sc} および D/L^2_{sc} (Table 7) を用いて normal dose 適用時の AUC_{sc} 予測値 (Fig. 25) を得た。さらにこの値から非定常状態 (5 min)

および定常状態 (30 min) 皮膚透過時を推定し、TA 1,000 $\mu\text{g/g}$ (4.2 $\mu\text{mol/g}$, normal dose) 含有製剤 G および E 適用後の角層中薬物濃度プロファイルの実測値と比較した。加えて、その角層中薬物濃度プロファイルから角層透過パラメータを求め予測値と比較することで本方法の有用性を検討した。

Fig. 26 に、TA 1,000 $\mu\text{g/g}$ (4.2 $\mu\text{mol/g}$, normal dose) 含有製剤 G および E 適用後、非定常状態 (5 min) および定常状態 (30 min) 皮膚透過時の角層各深度における TA 濃度の実測値 (各シンボル) とそのフィッティングカーブ (実線) の角層中薬物濃度プロファイルを示す。また、Table 8 には角層中薬物濃度プロファイルから式 (23 および 24) を用いてカーブフィッティングによって算出した TA の角層透過パラメータを示す。TA 1,000 $\mu\text{g/g}$ (4.2 $\mu\text{mol/g}$, normal dose) 含有製剤 G および E 後の非定常状態 (5 min) および定常状態 (30 min) 皮膚透過時の角層中薬物濃度プロファイルは MD 適用時 (Fig. 24) と同様に非定常状態では角層上部から角層下部へ角層深度が深くなるにつれて角層中 TA 濃度が曲線的に減少すること、定常状態では直線的に減少することが確認され、経時的に角層中 TA 濃度が上昇することがわかった。また、製剤 G (Fig. 26a, c) および E (Fig. 26b, d) 適用群間でも角層中 TA 濃度に差がみられた。その角層中薬物濃度プロファイルから算出した AUC_{sc} は、製剤 G では 5 および 30 min に対してそれぞれ 4.44、7.07 $\mu\text{mol/g}$ 、製剤 E では 2.55、4.50 $\mu\text{mol/g}$ であり、経時的に値が上昇した。製剤 E 適用群と製剤 G 適用群の比較では、いずれの適用時間でも製剤 G の方が有意 ($p < 0.01$) に高かった (Table 8)。また、 K_{sc} は製剤 G では 5 および 30 min に対してそれぞれ 7.25、7.30 であり、製剤 E では 4.05、4.33 であり、経時的な値の変化はないが製剤 E 適用群と比較して製剤 G 適用群では有意 ($p < 0.01$) に高く、 D/L^2_{sc} は製剤間かつ適用時間での値に有意な差はみられなかった。これらの結果は MD 適用時の結果 (Table 7) と同様であった。

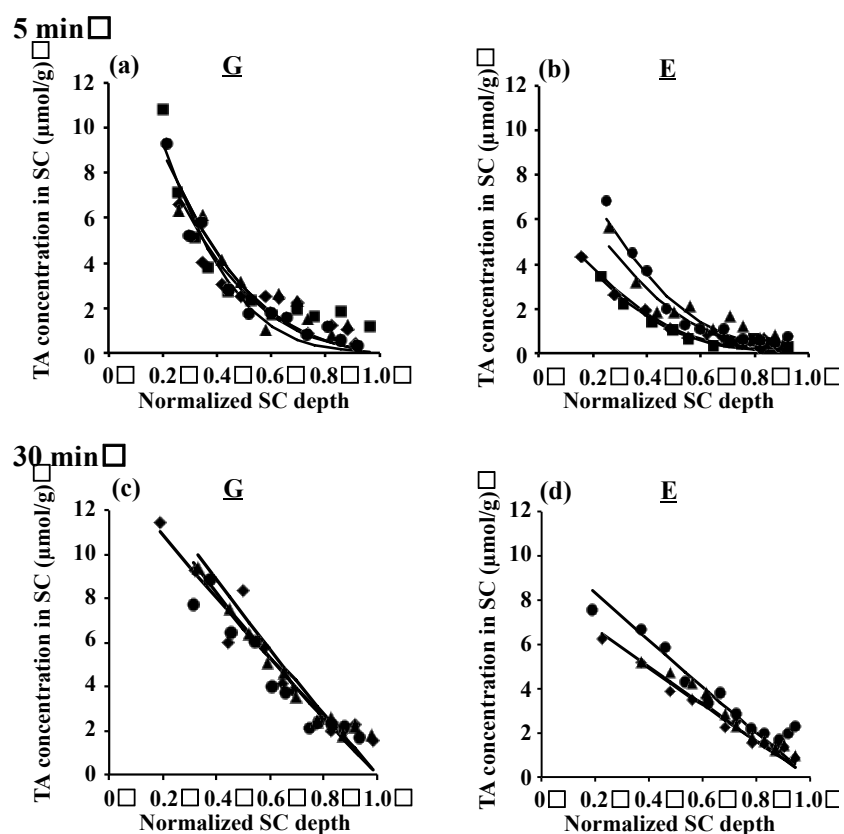


Fig. 26 *In vivo* human SC concentration vs. normalized depth profiles of TA following 5 and 30 min treatment with formulation G (a, c: left panels) and E (b, d: right panels). The best fits of Eq. (23) to the individual experimental data points (\bullet , \blacksquare and \blacktriangle) are shown ($n=3$). a) and b): SC concentration vs. normalized depth profiles for 5 min application of TA in formulations. c) and d): SC concentration vs. normalized depth profiles for 15 min application of TA in formulations.

Table 8 Diffusivity and partition parameters, and calculated AUCs (Eqs. (23), (24) and (25)) describing TA uptake into SC following 5 and 30 min application of various formulations. Each value shows the mean \pm S.D. (n=3). ** $p < 0.01$

Formulation	G	E
K_{sc5min}	7.25 \pm 0.75**	4.05 \pm 1.01
$K_{sc30min}$	7.30 \pm 0.37**	4.33 \pm 0.47
D/L^2_{sc5min} ($\times 10^{-4}$ s $^{-1}$)	2.23 \pm 0.30	2.30 \pm 0.31
$D/L^2_{sc30min}$ ($\times 10^{-4}$ s $^{-1}$)	1.80 \pm 0.26	2.06 \pm 0.14
AUC_{sc5min} (μ mol/g)	4.44 \pm 0.13**	2.55 \pm 0.74
$AUC_{sc30min}$ (μ mol/g)	7.07 \pm 0.32**	4.50 \pm 0.48

2. 2. 4. Normal dose 適用後の皮内動態挙動の実測値と予測値の比較

続いて、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て算出した normal dose 適用時の AUC_{sc} 予測値と normal dose 適用時の AUC_{sc} 実測値と比較した。Fig. 27 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て算出した normal dose 適用時の AUC_{sc} 予測値 (dashed lines) と normal dose 適用時の AUC_{sc} の実測値 (symbols) のプロットを示す。Fig. 27a, b から予測値の挙動はどちらの製剤において実測値に近似していたことから、MD から normal dose の挙動を予測すること可能であり、製剤化による皮膚透過性に及ぼす基剤の影響も併せて評価可能であることが明らかとなった。

以上より、テープストリッピング法を用いた本方法は新たな皮内動態評価法の動物実験代替法としてだけでなく、製剤からの化学物質の皮内動態解析を安全かつ短時間で行える新たな外用医薬品や化粧品等の皮膚局所適用製剤の開発を効率的に進める手段として有用であると考えられた。

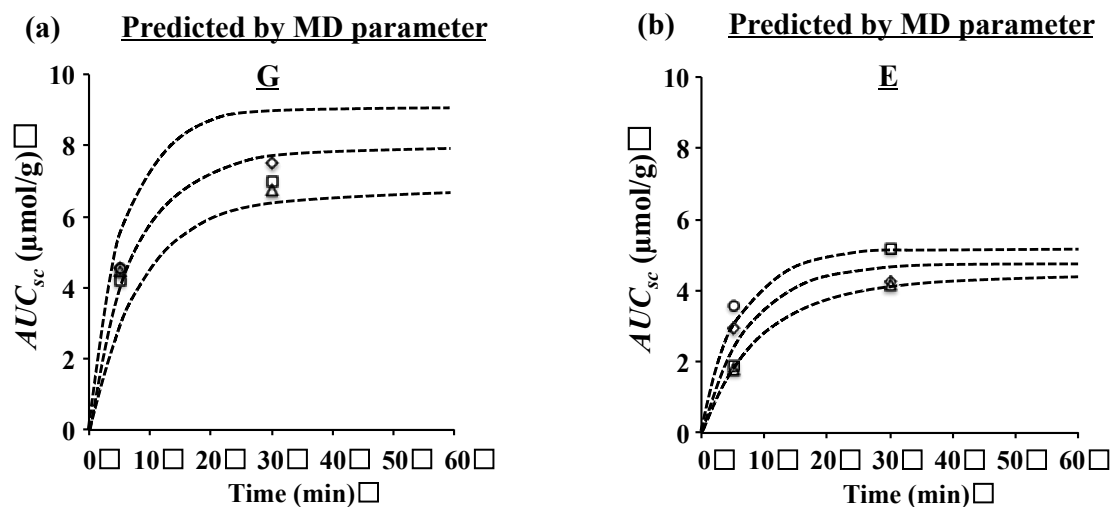


Fig. 27 Comparison of experimental and predicted AUC_{sc} values. The individual (n=3) experimentally determined AUC_{sc} (applied TA: 1,000 $\mu\text{g/g}$ (normal dose)) as a function of time are plotted together with the mean prediction (dashed line) using the mean K_{sc} and the extreme values of D/L^2_{sc} (mean + SD, mean - SD), and the limits, of the predictions based on the 5 min K_{sc} and D/L^2_{sc} values from applied ^{14}C -TA including formulation G and E. a): The dashed lines are the predictions based on the 5 min K_{sc} and D/L^2_{sc} (mean + SD, mean - SD) values from applied ^{14}C -TA including formulation G. b): The dashed lines are the predictions based on the 5 min K_{sc} and D/L^2_{sc} (mean + SD, mean - SD) values from applied ^{14}C -TA including formulation E.

第3項 小括

本節では、DPK 試験および MD 試験へのテープストリッピング法の新たな適用について、薬物の皮膚（角層）透過性に及ぼす製剤化の影響をヒト試験にて検討した。MD 適用後の非定常状態皮膚透過時の角層中薬物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 適用時の値を予測することが可能であること、また、皮膚透過性に及ぼす基剤の影響も評価可能であることが明らかとなった。DPK 試験と MD 試験を組み合わせた本方法は、特に新たな動物実験代替法として利用できると期待された。また、本方法は、後発医薬品の生物学的同等性評価法とは異なり、短時間の MD 適用による皮内動態解析によって有用なデータが得られたことから、試験時間の短縮によって被験者への負担を減らすことや試験の効率化が期待でき、特に外用医薬品や化粧品等の皮膚局所適用製剤の開発に有用であると考えられた。

しかし、皮膚局所での作用を目的とした外用医薬品や化粧品の皮内動態評価には、皮膚透過性だけではなく、生きた表皮・真皮層の皮膚中濃度評価も重要であると考えられる。例えば、ルシノールやコウジ酸等⁹⁷⁾の美白成分では、表皮中のメラノソームに送達されることで美白効果を発揮する。また、本研究で用いたビタミン E 誘導体であるトコフェロール酢酸エステルやビタミン A 誘導体の酢酸レチノール等⁹⁸⁾は真皮中で抗シワ効果を発揮する。したがって本研究で得られた角層透過パラメータから生きた表皮・真皮層中濃度が予測可能となれば、より正確な皮内動態評価が可能となると考えられた。

一方、本章で用いた DPK 試験は完全な非侵襲的方法ではないことから、角層深部までテープストリッピングを行うと痛みや色素沈着等、被験者に対する負担が大きくなる問題点がある。そのため、テープストリッピング回数の制限や被験者への負担が最小限になる回数等の調査も必要であろう。また、第 1 章にて開発した PSA-A, B を用いることで PSA-A では単回処理のみでの試験系、PSA-B では角層を取り過ぎない安全な試験デザインの検討が可能になるのではないかと考えられた。

第3章

角層テープストリッピング法と毛嚢プラグギング法を用いた 薬物の皮内動態評価法の確立に関する検討

毛嚢や汗腺・脂腺といった皮膚付属器官ルートが、近年、重要な経皮吸収ルートとして再認識されつつある⁹⁹⁾。角層は主な経皮吸収ルートであることが広く知られているが、逆に言えば経皮吸収の主な障壁でもある^{100,101)}。そこで、製剤技術の進歩もあって、育毛薬やニキビ治療薬といった外用医薬品をはじめ、リポソームやナノ・マイクロスフィアのようなナノパーティクルの製剤化によって毛嚢や脂腺等への移行・局在性を高めた医薬部外品や化粧品なども多く登場して注目を集めている。

一方、2010年には加水分解コムギを含有した「茶のしずく石鹸」によるアレルギー発生⁵³⁾が、また、2013年には美白成分ロドデノールを含有した医薬部外品製剤の使用による白斑症状の発生^{54,55)}など、皮膚に適用する化粧品や医薬部外品で健康被害事象の報告・報道があり、大きな社会問題となった。これら被害事象には顔周辺や髪の毛の生え際、手の甲など比較的皮膚の薄い部位や毛穴が多い部位に発生していることから、含有成分の皮膚透過性が大きく関係していると考えられ、安全性や有効性の評価には皮膚透過性だけではなく、その主な透過ルートやその寄与率を調査することも重要である。

皮膚に適用された化学物質の皮膚透過性には500 Daルール¹⁰²⁾といわれる基準がある。すなわち、分子量が500 Da以上になると急激に皮膚透過性が低下することが知られている。しかし、500 Da以上の分子であっても皮膚透過するものも報告^{103,104)}されており、これには毛嚢の寄与が大きいと考えられている。すなわち、高分子や親水性化合物の皮膚透過には毛嚢ルートの寄与を考慮する必要がある。最近、毛嚢プラグギング処理(HF-P)を施した皮膚を用いた*in vitro*透過試験⁶¹⁻⁶³⁾によって、化学物質の皮膚透過ルートを区別・評価できることが報告されたが、これらの手法は摘出皮膚を用いているため*in vivo*での評価は難しい。現在、*in vivo*での皮内動態解析にはDPK試験が用いられている。DPK

試験は角層が主な皮膚透過ルートである化学物質に用いることができるが、水溶性化学物質や高分子化学物質等の経付属器官が主な透過ルートである化学物質の評価には向いていない。しかし、HF-P 処理を施した皮膚を用いて DPK 試験を行うことにより、HF-P 処理の有無によって生じる角層中濃度や皮膚透過パラメータの差を比較することができ、主に毛嚢を介して皮内に浸透する化学物質の皮内動態を解析することも可能になると考えられる。

そこで本研究では、異なる物理化学的性質（分子量（*M.W.*）、油水分配係数（ $\log K_{ow}$ ））を有する種々化学物質を選択し、HF-P 処理を施した皮膚を用いて DPK 試験を行った。得られた角層中薬物濃度プロファイルより算出した角層透過パラメータと *in vitro* 皮膚透過挙動より算出した皮膚透過パラメータを比較することで、DPK 試験と *in vitro* 皮膚透過試験の同等性を評価し、毛嚢を介して皮内に浸透する化学物質の皮内動態を解析した。

第1項 実験方法

1.1. 試薬および実験材料

リドカイン塩酸塩 (LID) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。アミノピリン (AMP) およびフルオロリン酸ジイソプロピル (DFP) は和光純薬工業 (大阪、日本) から購入した。一硝酸イソソルビド (ISMN)、コウジ酸 (KA)、4-ブチルレゾルシノール (BR)、4-ヒドロキシ安息香酸メチル (MP)、4-ヒドロキシ安息香酸ブチル (BP)、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル (PP) および Calcein sodium salt (Ca-Na) は東京化成 (東京、日本) から購入した。また、二硝酸イソソルビド (ISDN) は東光薬品工業 (東京、日本) より、ロドデンドロール (RD) は株式会社カネボウ化粧品 (東京、日本) より供与された。Nile red は関東化学 (東京、日本) から購入した。その他の試薬および溶媒は、HPLC 用または特級品を精製せずにそのまま用いた。Table 9 に本研究で使用したモデル物質の $M.W.$ 、 $\log K_{ow}$ 、酸解離定数の対数值 (pK_a) および使用濃度を示す。

Table 9 Physicochemical properties of model compounds.

Model compounds	<i>M. W.</i>	$\log K_{o/w}$ (pH)	pK_a	Application conc. (mM)
Isosorbide-5-mononitrate (ISMN)	191.2	-0.20 (7.4) ^γ	-	500
Butyl paraben (BP)	194.2	3.50 (7.4) ^γ	8.3 ^{a)}	0.5
Aminopyrine (AMP)	231.3	-1.00 (3.0) ^{α)} 0.98 (7.4) ^γ	5.0 ^{b)}	10 100
Lidocaine hydrochloride monohydrate (LID)	234.3	-0.90 (5.0) ^{β)} 1.40 (10.0) ^{δ)}	7.9 ^{c)}	100 10
Isosorbide dinitrate (ISDN)	236.1	1.20 (7.4) ^γ	-	5
Sodium calcein (Ca-Na)	644.5	-3.50 (7.4) ^γ	5.5 ^{d)}	1
Kojic acid (KA)	142.1	-0.62 (7.4) ^γ	7.7 ^{e)}	100
4-Butylresorcinol (BR)	166.2	2.85 (7.4) ^γ	-	10
Rhododenol (RD)	166.2	1.42 (7.4) ^γ	-	20

a) pK_a at 25°C from Ref. 105.

b) pK_a at 25°C from Ref. 106.

c) pK_a at 25°C from Ref. 107.

d) pK_a at 25°C from Ref. 108.

e) pK_a at 25°C from Ref. 109.

α) *n*-octanol/pH 3.0 citrate buffer $\log K_{o/w}$ at 32°C.

β) *n*-octanol/pH 5.0 citrate buffer $\log K_{o/w}$ at 32°C.

γ) *n*-octanol/pH 7.4 phosphate buffer $\log K_{o/w}$ at 32°C.

δ) *n*-octanol/pH 10.0 carbonate buffer $\log K_{o/w}$ at 32°C.

1. 2. 実験動物および皮膚摘出処理法

実験動物は第1章第1節 1. 2.と同様のブタ耳介を用いた。ブタ耳介を丁寧に水洗いし、皮膚の水分をよく拭き取り、毛を短く刈りそろえた。その後、メスを用いて皮膚 (3×3 cm²) を摘出し、真皮側の脂肪をきれいにはさみで取り除いたものを non-HF-P skin とした。

1.3. 毛嚢プラグギング (HF-P) 法⁶¹⁾

HF-P 法は Horita ら⁶¹⁾と同様の手法を用いた。まず、Super Lube[®] silicone dielectric grease (Synco Chemical Co., Ltd., Long Island, NY, U.S.A.) と Nile red (0.1%) を混合したボンドアロンアルファ[®] ゼリー状 (コニシ株式会社、大阪、日本) を 1 : 1 の混合比で混和し、これを毛嚢プラグギング剤とした。なお、毛嚢プラグギング剤の処理面積を明らかにするためのマーカーとして Nile red を適量加えた。その後、キャピラリーピストン (CP10, Gilson, Inc., Middleton, WI, U.S.A.) からピストン部 (太さ: 0.5 mm、長さ: 4.0 cm) のみを取り出し、その先端に毛嚢プラグギング剤を少量とった。実体顕微鏡 (SZ61、オリンパス、東京、日本) 観察下にて、摘出皮膚の有効透過面積中の毛嚢開口部 1 つあたりのプラグギング処理面積が約 0.5 mm² になるようにプラグギング剤を塗布し、毛嚢プラグギング処理皮膚 (HF-P skin) とした。また、HF-P 処理を施した面積の算出は、実体顕微鏡に装着した顕微鏡デジタルカメラ (DP21、オリンパス、東京、日本) にて、HF-P 処理後の皮膚を撮影・保存 (カメラアタプタ倍率 0.48 倍、対物レンズ倍率 0.67 倍) し、顕微鏡デジタルカメラの付属する Standalone System[®] (多角形面積測定機能) (DP21、オリンパス、東京、日本) を用いて、毛嚢開口部に塗布した HF-P 剤の表面積を測定した。その後、有効透過面積から HF-P 処理部の総表面積を差し引き、HF-P skin の有効透過面積を算出した。なお、LID および fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4) の皮膚透過係数 (P) の減少率と HF-P 処理数 (0-40) の間には良好な直線性が報告されていることから、本研究での HF-P 処理数は、有効透過面積 (1.77 cm²) 中の総毛嚢数 (約 60) の半分である 30 とした。このときの HF-P 処理皮膚の有効透過面積は約 1.62 cm² である。

1.4. *In vitro* 皮膚透過実験

本章 1.3. または 1.4. にて処理したブタ耳介皮膚 (non-HF-P skin または HF-P skin) を温水 (32°C) を循環させた縦型拡散セル (セルの拡散透過面積: 1.77 cm²、レシーバー容量: 6.0 mL) に表皮側をドナー側にして挟んだ。ドナー側に種々緩衝液を 1.0 mL、レシーバー側に種々緩衝液を 6.0 mL 適用し、1 時間水和させた。

水和後、ドナー側から種々緩衝液を回収し、レシーバー側より 0 時間目のサンプリングを行い、同量の種々緩衝液を補充した。その後、1.2.にて調製した種々化学物質水溶液をドナー側に 1.0 mL 適用し、透過実験を行った。実験中は、セル内の温度は 32°C に保ち、レシーバー側のシンク状態を保つために、レシーバー溶液をマグネットスターラーで攪拌した。経時的にレシーバー側から溶液を 0.5 mL サンプルングし、その都度、同量の種々緩衝液を補充した。得られたサンプル中の化学物質濃度は HPLC または蛍光分光光度計を用いて測定した (1.7.)。なお、BP に関しては真皮側に DFP (2.7 $\mu\text{mol/mL}$) を溶解した PBS を 30 分適用し、その後に DFP を取り除き、真皮側に DFP (0.54 $\mu\text{mol/mL}$) を溶解した PBS を適用後、BP の皮膚透過実験を行った^{111, 112)}。

1.5. DPK 試験法

第 2 章第 2 節 1.4.1.と同様の方法で試験を行い、1.3. または 1.4.にて処理したブタ耳介皮膚を用いた。また、角層剥離後の粘着テープはガラスバイアルに入れ、適用ドナーごとに水溶性化学物質には種々緩衝液を、脂溶性化学物質にはメタノールを 0.5 mL 加え 1 時間振盪することで角層中の化学物質を抽出した。抽出溶液は HPLC または蛍光分光光度計を用いて測定した。なお、角層中濃度の測定には抽出率を考慮した。

1.6. HPLC および蛍光分光光度計での定量法

DPK 試験より得られた種々サンプル溶液は内部標準物質を含んだアセトニトリルまたはメタノールと 1:1 の比率で混合した。これらの混液を遠心分離 (CT15RE、日立工機、東京、日本) (15,000 \times g、5 min、4°C) 後、上清中の各化学物質濃度を HPLC にて測定した。HPLC システムは、第 2 編第 1 章 2.4.1.と同様のものを用いた。Table 10 に HPLC での定量条件を示す。また、蛍光サンプル溶液は、遠心分離 (15,000 \times g、5 min、4°C) 後、上清中の Ca-Na を蛍光分光光度計 (RF-5300PC、島津製作所) により、励起波長 488 nm、蛍光波長 515 nm で測定した。

Table 10 HPLC conditions for determination of model compounds.

Model compounds	Mobile phase	Wavelength (nm)	Internal standard
LID	Acetonitrile : 0.1% phosphoric acid = 20 : 80 + 5 mM sodium 1-heptanesulfonate	230	MP
AMP	Acetonitrile : 0.1% phosphoric acid = 50 : 50 + 5 mM sodium decyl sulfate	254	BP
ISDN	Acetonitrile : water = 40 : 60	210	BP
ISMN	Acetonitrile : water = 10 : 90	220	^{a)}
BP	Acetonitrile : 0.1% phosphoric acid = 45 : 55	254	PP
KA	Methanol : 0.1% phosphoric acid = 3 : 97	270	^{a)}
BR	Acetonitrile : water = 65 : 35	206	^{a)}
RD	Acetonitrile : water = 25 : 75	280	MP

a) Absolute calibration method was used.

1.7. 皮膚透過パラメータの算出

Non-HF-P skin もしくは HF-P skin を介した種々化学物質の透過プロファイルの定常状態時から種々化学物質の皮膚透過パラメータを算出した。

化学物質の皮膚透過性は Fick の拡散則に従い、このときの単位面積当たりの累積透過量 Q は以下の (26) 式で表すことができる。

$$Q = KLCv \left[\frac{D}{L^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{p^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{D}{L^2} n^2 p^2 t\right) \right] \quad (26)$$

ここで、 K は化学物質のドナー溶液から皮膚への分配係数、 D は物質の皮膚バリア中での拡散係数、 Cv は適用ドナー溶液濃度、 L は皮膚の厚みを示す。定常状態では (26) 式の右辺第 3 項がゼロとなり、(27) 式に簡略化できる。

$$Q = \frac{KDCv}{L} \left[t - \frac{L^2}{6D} \right] \quad (27)$$

(27) 式より定常状態時の lag time (T_{lag}) および透過速度 ($Flux$) は以下のように表される。

$$T_{lag} = \frac{L^2}{6D} \quad (28)$$

$$Flux = \frac{KDCv}{L} = PCv \quad (29)$$

(29) 式より flux を Cv で除することで透過係数 (P) を算出した。このとき、 T_{lag} は得られた透過プロファイルより定常状態時の傾きを求め、 x 切片から外挿して算出した。

1.8. 角層中薬物プロファイルからの角層透過パラメータの算出

第2章第1節 2.9.と同様の方法を用いた。

第 2 項 結果および考察

2.1. 化学物質の皮膚透過性に及ぼす HF-P 処理の影響

2.1.1. *In vitro* 皮膚透過実験

まず、化学物質の皮膚透過性に及ぼす HF-P 処理の影響を *in vitro* 皮膚透過実験にて評価した。Fig. 28 に *in vitro* 皮膚透過実験から得られた $\log K_{o/w}$ の大きく異なる水溶性化学物質の KA (a) および脂溶性化学物質の BR (b) の皮膚透過挙動に及ぼす HF-P 処理の影響について示す。縦軸は単位面積あたりの累積皮膚透過量 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)、横軸は経過時間 (h) を示す。non-HF-P skin を介した KA の 24 時間累積皮膚透過量 ($0.84 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) は、HF-P skin ($0.55 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) と比較して (HF-P 処理により) 約 35% 低下した。本実験では有効面積内 (1.77cm^2) の総毛嚢数 (約 60 本) の半数である 30 本に HF-P 処理を施したことから、仮に化学物質の透過ルートが 100% 毛嚢ルートであっても累積皮膚透過量の低下率は半数の 50% になると考えられる。ここで、KA の累積皮膚透過量は約 35% 低下したことから、皮膚透過ルートに及ぼす毛嚢ルートの寄与は極めて高いと考えられた。一方、BR の 8 時間目の累積皮膚透過量は HF-P 処理により non-HF-P skin ($0.155 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) から HF-P skin ($0.125 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$) へ約 20% 低下したことから、KA と比較して BR の毛嚢ルート寄与率は低いと考えられる。以上より、化学物質の皮膚透過性に及ぼす HF-P 処理による寄与は化学物質の $\log K_{o/w}$ と密接に関係していると考えられた。

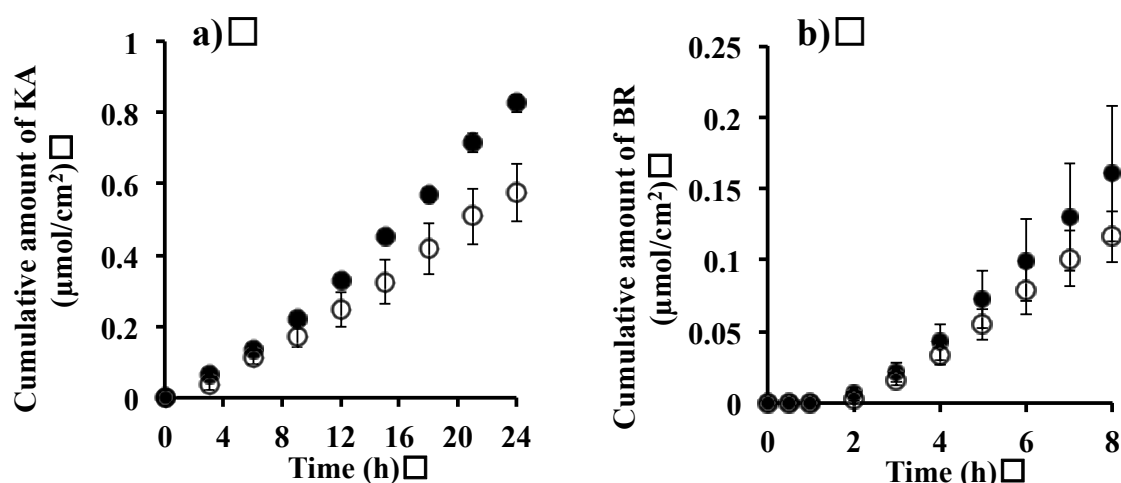


Fig. 28 Time course of the cumulative amount of KA (a) and BR (b) permeated through pig ear skin. Non-HF-P skin (●), HF-P skin (○). Each value shows the mean \pm S.D. (n=3).

2.1.2. DPK 試験

次に化学物質の皮膚透過性に及ぼす HF-P 処理の影響を DPK 試験にて評価した。Fig. 29 に DPK 試験から得られた化学物質の角層中 KA (a) および BR (b) 濃度プロファイルに及ぼす HF-P 処理の影響について示す。縦軸は角層中化学物質濃度 ($\mu\text{mol/g}$)、横軸は角層厚 (x/L) を示す。本試験でも *in vitro* 皮膚透過実験と同様に有効面積内の総毛嚢数の半数である 30 本に HF-P 処理を施した。30 min 適用後の KA の角層中濃度プロファイルは、深度が深くなるにつれて曲線的に減少することが確認された。HF-P skin では、non-HF-P skin と比較して低い角層中濃度で推移することが確認された。また、BR の 5 min 適用時の角層中濃度プロファイルからも角層の深部になるにつれて角層中 BR 濃度が曲線的に減少することが確認された。しかし、HF-P 処理による角層中 BR 濃度の変化は角層中 KA 濃度と比較して大きくなかった。このことから、毛嚢中の薬物濃度が角層中薬物濃度プロファイルに対して影響を及ぼすことが明らかとなり、その影響は化学物質の物理化学的性質に依存することが明らかとなった。また、このことは、HF-P 処理を施した皮膚を用いることで DPK 試験によって毛嚢を介して皮内に浸透する化学物質の皮内動態を解析することが可能であることを示している。しかし、Oshizaka らは、水溶性化学物質と脂溶性化学物質の皮膚透過に

は毛嚢ルートを含めた、経付属器官ルートへの寄与を考慮する必要性があり、特に水溶性物質では漏斗状の孔を形成している毛嚢開口部を介した y - z 軸方向での濃度分布評価が必要であると報告している¹¹⁰⁾。Fig. 30 に水溶性化学物質と脂溶性化学物質の角層透過のモデルを示す。水溶性化学物質は、親油性膜である角層実質部を介して透過する割合が低く、主に毛嚢部を介して透過すると考えられている (Fig. 30a)。一方、脂溶性化学物質では、水溶性化学物質に比べて角層実質部に対する透過寄与が大きく、かつ皮膚全体に占める毛嚢の面積が小さいことから、脂溶性化学物質の皮膚透過に対する毛嚢の寄与は小さいと考えられている (Fig. 30b)。そのため、HF-P 処理は毛嚢開口部を閉鎖することからその皮内動態の解析には x 軸方向への分配・拡散だけでなく、 y - z 軸方向での分配・拡散も考慮する必要があると考えられた。

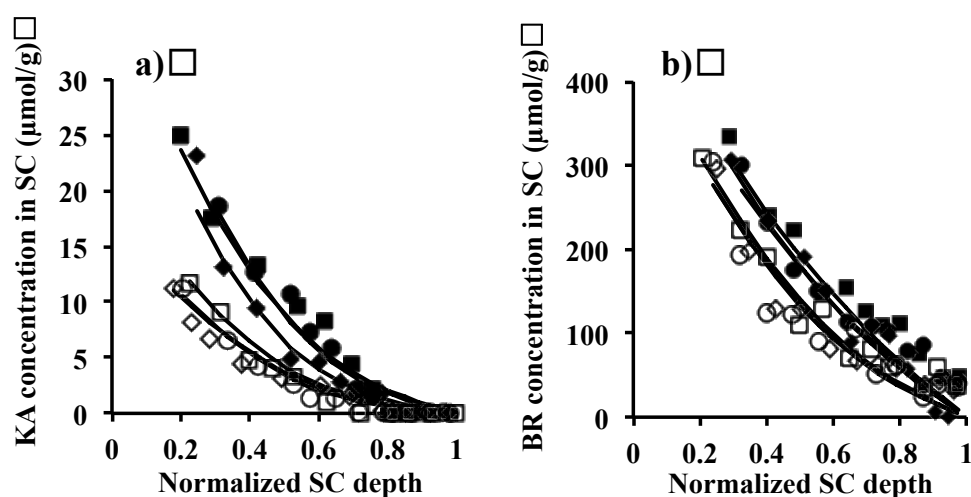


Fig. 29 SC concentration vs. normalized depth profiles of KA (a) and BR (b) following 30 and 5 min treatment with solution. The best fits of Eq. (23) to the individual experimental data points (Non-HF-P skin: ●, ■ and ◆, HF-P skin: ○, □ and ◇) are shown (n=3).

a) Permeation pathway model of hydrophilic compounds□ b) Permeation pathway model of lipophilic compounds□

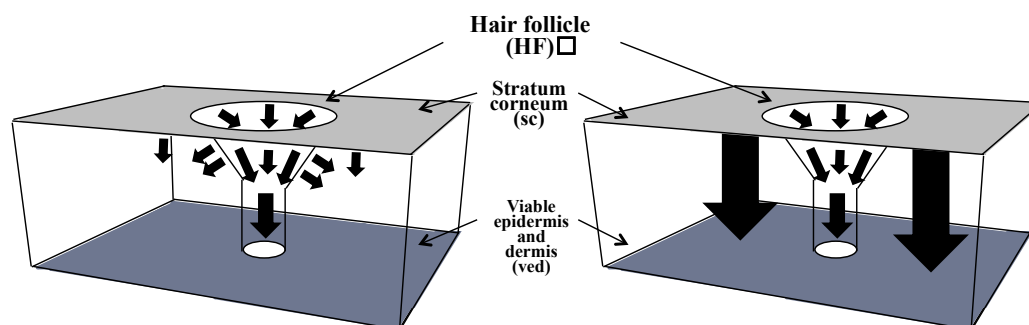


Fig. 30 Permeation pathway model of hydrophilic compounds (a) and lipophilic compounds (b) through skin.

2. 2. 化学物質の皮膚透過パラメータへ及ぼす HF-P 処理の影響

2. 2. 1. *In vitro* 皮膚透過実験

Table 11 に *in vitro* 皮膚透過実験から得られた種々化学物質の透過挙動より算出した皮膚透過係数および HF-P 処理による皮膚透過係数の変化比を示す。化学物質の $\log K_{o/w}$ の増加に伴い、皮膚透過係数も増加する傾向がみられた。既に化学物質の皮膚透過性には *M.W.* や $\log K_{o/w}$ などの物理化学的パラメータが影響することが知られている^{70, 102)}。本研究からも *M.W.* が 500 未満および $\log K_{o/w}$ が 0 以上の化学物質では皮膚透過係数が高く ($1 \times 10^{-7} \text{cm/s}$ 以上)、*M.W.* が 500 以上もしくは $\log K_{o/w}$ が 0 未満の化学物質では皮膚透過係数が低い ($1 \times 10^{-7} \text{cm/s}$ 未満) ことが示された。また、皮膚透過係数に及ぼす HF-P 処理の影響は $\log K_{o/w}$ が -4 から 0 の範囲 (水溶性物質) では、non-HF-P skin を 1 とした時の HF-P 処理による皮膚透過係数の変化比が約 0.5 と大きく減少し、 $\log K_{o/w}$ にかかわらず変化比が大きく減少する傾向を示した。一方、 $\log K_{o/w}$ が 0 から 4 の範囲 (油溶性物質) では $\log K_{o/w}$ の増加に伴い、HF-P 処理による皮膚透過係数の変化比が 1 に近づく傾向があった。しかし、RD ($\log K_{o/w}$: 1.42) のような脂溶性物質であっても変化比が 0.68 と大きく減少するものも存在したことから、この考え方はすべての化学物質に当てはまるわけではなかった。そのため、さらなる検討の必要性も考えられる。

Table 11 Change in permeability coefficient through the non-HF-P and HF-P skin. Each value shows the mean \pm S.D. (n=3).

Model compound	$\log K_{o/w}$	<i>P</i> values in non-HF-P skin ($\times 10^{-8}$ cm/s)	<i>P</i> values in HF-P skin ($\times 10^{-8}$ cm/s)	<i>P</i> values-change ratio [#]
BP	3.50	1324.0 \pm 501.0	1320.0 \pm 143.0	0.98
BR	2.85	424.0 \pm 71.2	372.0 \pm 34.7	0.88
RD	1.42	39.6 \pm 17.2	26.8 \pm 6.2	0.68
LID (pH 10.0)	1.40	255.3 \pm 109.1	210.0 \pm 49.1	0.83
ISDN	1.20	371.4 \pm 122.3	242.4 \pm 64.0	0.65
AMP (pH 7.0)	0.98	16.1 \pm 2.1	12.7 \pm 3.2	0.79
ISMN	-0.20	13.9 \pm 1.2	7.9 \pm 3.6	0.57
KA	-0.62	13.8 \pm 1.4	7.8 \pm 1.7	0.56
LID (pH 5.0)	-0.90	2.3 \pm 0.4	1.1 \pm 0.1	0.53
AMP (pH 3.0)	-1.00	0.9 \pm 0.5	0.5 \pm 0.4	0.52
Ca-Na	-3.50	1.4 \pm 0.9	0.6 \pm 0.1	0.43

[#] Change ratio = HF-P skin / non-HF-P skin. Values are the mean \pm S.D. (n=3).

2.2.2. DPK 試験

Table 12 に DPK 試験から得られた種々化学物質の種々角層透過パラメータおよび HF-P 処理による種々角層透過パラメータの変化比を示す。DPK 試験より得られた角層透過パラメータは、*in vitro* 皮膚透過実験の結果 (Table 11) と同様に化学物質の $\log K_{o/w}$ の低下に伴い低下する傾向がみられ、角層透過パラメータの変化比も同様であった。

Table 12 Dermatokinetics parameters of chemical compounds.

Model compound	$\log K_{ow}$	Non-HF-P skin			HF-P skin		
		AUC ($\mu\text{mol/g}$)	D/L^2 ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$)	K	AUC ($\times 10^4 \mu\text{mol/g}$)	D/L^2 ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$)	K
BP	3.50	66.0 \pm 8.4	52.0 \pm 2.0	50.0 \pm 2.9	62.0 \pm 1.0 #(0.94)	46.0 \pm 7.2 #(0.88)	49.4 \pm 0.8 #(0.99)
BR	2.85	207.4 \pm 4.8	54.3 \pm 3.3	49.6 \pm 1.1	168.1 \pm 3.5 #(0.81)	47.0 \pm 1.4 #(0.87)	45.0 \pm 0.8 #(0.91)
RD	1.42	128.0 \pm 13.4	41.3 \pm 8.1	16.0 \pm 1.4	83.6 \pm 3.3 #(0.65)	28.7 \pm 2.6 #(0.69)	12.8 \pm 0.6 #(0.80)
LID (pH 10.0)	1.40	11.3 \pm 0.2	62.5 \pm 3.2	2.6 \pm 0.1	9.5 \pm 1.3 #(0.84)	50.0 \pm 4.3 #(0.80)	2.4 \pm 0.4 #(0.92)
ISDN	1.20	415.2 \pm 46.3	20.0 \pm 2.9	303.4 \pm 12.5	249.1 \pm 14.5 #(0.60)	13.2 \pm 1.4 #(0.66)	228.7 \pm 2.5 #(0.75)
AMP (pH 7.4)	0.98	14.0 \pm 2.4	53.4 \pm 3.8	3.4 \pm 0.6	10.0 \pm 1.6 #(0.71)	48.2 \pm 5.4 #(0.90)	2.4 \pm 0.4 #(0.71)
ISMN	-0.20	1097.5 \pm 205.4	8.7 \pm 0.5	5.3 \pm 1.0	583.8 \pm 22.0 #(0.53)	5.6 \pm 0.5 #(0.64)	3.0 \pm 0.1 #(0.57)
KA	-0.62	12.0 \pm 1.1	4.5 \pm 0.4	0.4 \pm 0.1	5.8 \pm 0.5 #(0.48)	3.1 \pm 0.2 #(0.68)	0.2 \pm 0.02 #(0.50)
LID (pH 5.0)	-0.90	26.8 \pm 1.6	9.6 \pm 1.8	0.6 \pm 0.1	12.4 \pm 4.0 #(0.46)	6.9 \pm 0.9 #(0.72)	0.3 \pm 0.1 #(0.50)
AMP (pH 3.0)	-1.00	46.7 \pm 5.0	6.6 \pm 1.0	1.3 \pm 0.2	24.8 \pm 5.2 #(0.53)	4.7 \pm 1.1 #(0.71)	0.8 \pm 0.2 #(0.62)
Ca-Na	-3.50	0.6 \pm 0.1	7.5 \pm 1.3	1.5 \pm 0.3	0.2 \pm 0.01 #(0.33)	3.6 \pm 0.3 #(0.48)	0.7 \pm 0.1 #(0.47)

Change ratio = HF-P skin / non-HF-P skin. Each value shows the mean \pm S.D. (n=3).

2.3. AUC および皮膚透過パラメータの変化比に及ぼす HF-P 処理の影響

Fig. 31 に HF-P 処理による AUC および皮膚透過係数の変化比の関係を示す。それぞれの HF-P 処理による AUC および皮膚透過係数の変化比は $\log K_{ow}$ が低い化学物質ほど大きく減少する傾向を示した。これは、毛嚢などの経付属器官ルートを通る水溶性の高い化学物質ほど皮膚透過に及ぼす経毛嚢ルートへの寄与が高いことを示している。一方、 $\log K_{ow}$ が高い化学物質ほど HF-P 処理による変化がみられず、変化比は 1 に近づく傾向を示した。これは、脂溶性の化学物質では、皮膚透過に及ぼす経角層ルートへの寄与が高く、主に角層実質部を介して透過していることを示している。

Fig. 31 から AUC の変化比および皮膚透過係数の変化比間には、ほぼ 1:1 の関係性 ($r=0.9814$) がみられたことから、テープストリッピング法を用いた DPK 試験でも HF-P 処理を施すことによって、主に毛嚢を介して皮内に浸透する化学物質の皮内動態を解析することが可能になり、*in vitro* 皮膚透過試験と同等な評価が可能と考えられた。

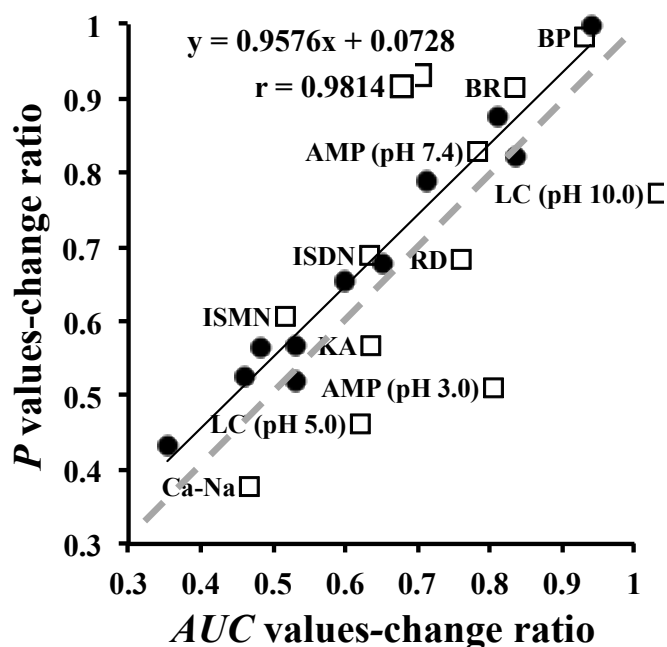


Fig. 31 Relationship between *P* values-change ratio from permeation experiment and AUC values-change ratio from DPK experiment.

続いて、HF-P 処理による種々化学物質の *AUC* の変化比に及ぼす分配・拡散性の寄与について調べた。Fig. 32 に HF-P 処理による *AUC* の変化比と分配係数 (a) および拡散パラメータ (b) の変化比の関係を示す。HF-P 処理による分配係数の変化比と *AUC* の変化比の間には、1:1 の関係に近い高い相関性 ($r=0.9602$) が得られたことから、分配係数の変化は *AUC* の変化に対して直接的に関係していること明らかとなった。このことから、HF-P 処理を施すことによりテープストリッピング法を用いた場合でも化学物質の皮膚 (角層) への分配性の評価が可能であると考えられた。一方、拡散パラメータと *AUC* の変化比の間にも高い相関性 ($r=0.8487$) がみられたものの、分配係数と比較すると 1:1 の関係は得られず、水溶性の化学物質になるほど 1:1 の関係性から外れる傾向がみられた。これには、角層を均一膜と仮定して式 (23) を用いて解析をしているため、HF-P 処理を施しもテープストリッピング法を用いた場合では、正確に水溶性化学物質の拡散性を評価することは難しいと考えられた。

以上のことから、HF-P 処理を施すことによりテープストリッピング法を用いた場合でも種々化学物質の *AUC* の変化比に及ぼす分配・拡散性の寄与を評価することは可能であるが、化学物質の有する物理化学的性質に注意する必要があると考えられた。

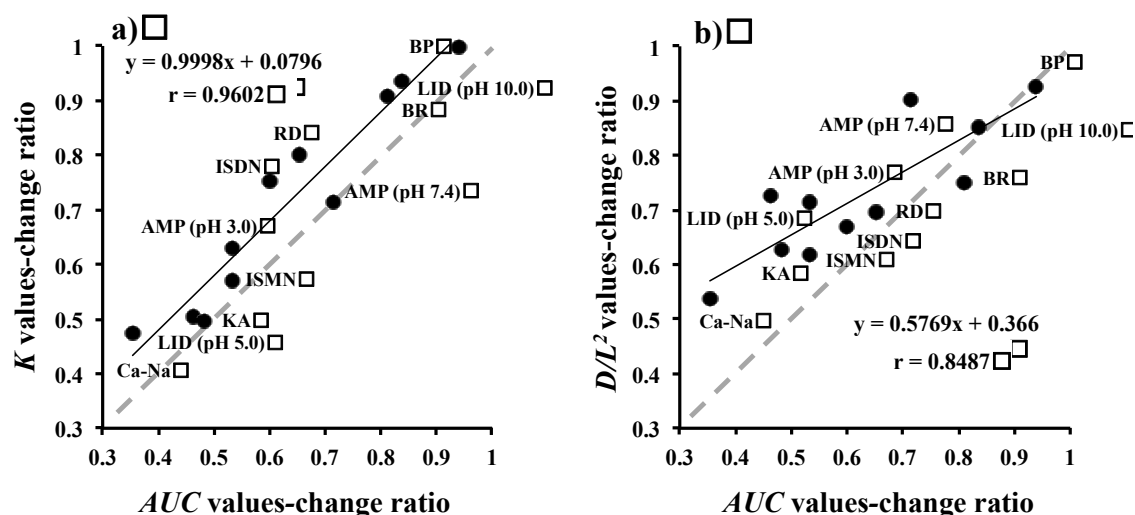


Fig. 32 Relationship between partition coefficient values-change ratio (a) or diffusion parameter (b) from DPK experiment and *AUC* values-change ratio from DPK experiment.

第3項 小括

本章の結果より、油水分配係数の違いによって HF-P 処理による化学物質の AUC の変化比と皮膚透過係数の変化比が異なること、すなわち、極性が高い化学物質ほど皮膚透過における毛嚢ルートへの寄与が高くなることがわかった。また、テープストリッピング法と HF-P 法を併用した DPK 試験より求めた AUC の変化比と 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比の間には良好な相関性が得られた。また、HF-P 処理による分配係数および拡散パラメータの変化比と AUC の変化比の間には高い相関性が得られたが、拡散パラメータでは、水溶性の化学物質になるほど 1:1 の関係性から外れる傾向がみられた。このことから、HF-P 処理を施すことによりテープストリッピング法を用いた場合でも種々化学物質の AUC の変化比に及ぼす分配・拡散性の寄与を評価することは可能であるが、化学物質の有する物理化学的性質に注意する必要があると考えられた。以上のことから、HF-P 処理を施すことによりテープストリッピング法を用いることで、毛嚢を介して皮内に浸透する化学物質の皮内動態を解析することが可能であると考えられ、本方法は、*in vivo* にて化学物質の皮膚透過ルートに対する毛嚢ルートへの寄与を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た。

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ろう。

総括

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 TDDS 製剤や局所外用剤等の皮膚適用製剤にも応用された。また、それら外用製品の研究・開発に伴って、皮膚局所での有効性や安全性を評価するために、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汎用されるようになった。テープストリッピング法は、すでに医薬品開発において生物学的同等性の確認や経皮吸収促進剤の作用メカニズムの評価に、また、化粧品開発においては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開発にさら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新評価技術について検討した。

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 の粘着性を調整することにより角層剥離力の異なる新規 PSA (PSA-A および 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、MD 試験法を組み合わせた新しい DPK 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を併用して皮膚に適用した薬物の皮内動態評価法に関して検討を行った。

以下、3 章に分けて総括する。

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 および 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薬物透過性、皮膚中薬物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について評価した。

まず、第1節では、新規 PSA-A および B の粘着特性および市販 PSA を対照として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を評価した。加えて、水溶液からのリドカイン塩酸塩 (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。その結果、粘着力 (剥離力) や接着性 (タック) 試験により PSA-A は市販 PSA と同等の粘着特性を、PSA-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とした。また、PSA-A および B の角層剥離力は市販の PSA とは異なり、その特性は PSA-A と B との間で大きな違いが認められた。さらに、PSA-A は強力な角層剥離力の影響で、市販 PSA と比べて少ないストリッピング処理回数で皮膚バリア能が大きく低下し、高い透過促進効果を示した。一方、PSA-B は一定の角層剥離能の影響で、PSA-A および市販 PSA と異なる挙動を示し、ストリッピング処理回数に関わらず、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 では僅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明らかとした。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 は処理回数など安全使用の面でさらなる検討が必要であるものの、皮膚適用製剤貼付前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。今後、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. 角層テープストリッピング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 ^{14}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 と MD 適用時(共に水溶液を使用)の pig ear skin *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 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 normal dose 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、normal dose 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 normal dose 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 ^{14}C -TA を選択し、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、normal dose 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. 角層テープストリッピング法と毛嚢プラグギング法を用いた薬物の

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章では毛嚢プラグギング (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 の変化比と 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比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った。また、経皮投与製剤の MD 試験法や HF-P 法を併用した皮内動態評価法は新たな経皮投与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。

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学・皮膚生理学講座教授 杉林 堅次 先生に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、御教示頂きました城西大学薬学部薬剤作用解析学講座教授 小林 大介 先生、城西大学薬学部臨床薬理学講座教授 荻原政彦 先生に深謝いたします。さらに、本論文作成にあたり、ご教示を頂きました城西大学薬学部生体分析化学講座教授 新津 勝 先生、城西大学薬学部製剤学講座教授 夏目 秀視 先生、城西大学薬学部病院薬剤学講座教授 上田 秀雄 先生に深謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり、終始有益な、御指導、御助言を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座准教授 藤堂 浩明 先生、城西大学招聘教授 Konstanty Wierzba 先生、東海大学医学部医学科客員准教授 畑中 朋美 先生、城西国際大学准教授 森 健二 先生に心から感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、有益なご意見ならびに実験のご協力をいただきました株式会社コーセイ 中出 正人 博士、中野 恵介氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに論文執筆にあたり、押坂 勇志 博士、喜島 小翔 博士の存在が大きな励みになったことをここに記するとともに深く感謝いたします。

最後に、本研究の実施に御協力いただきました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座助手 Wesam R. Kadhum 先生をはじめとする関係諸氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) 小堀 辰治, 膏薬療法発達史, *日本臨床社*, **10**, 42-47 (1952).
- 2) 鈴木 昶, 日本の伝承薬 : 江戸売薬から家庭薬まで, 薬事日報社, 198-318 (2005).
- 3) Pershing L. K., Corlett J. L., Nelson J. L., Comparison of Dermatopharmacokinetic vs. Clinical Efficacy Methods for Bioequivalence Assessment of Miconazole Nitrate Vaginal Cream, 2% in Humans, *Pharm. Res.*, **19**, 270-277 (2002).
- 4) Hoppel M., Baurecht D., Holper E., Mahrhauser D., Valenta C., Validation of the combined ATR-FTIR/tape stripping technique for monitoring the distribution of surfactants in the stratum corneum, *Int. J. Pharm.*, **472**, 88-93 (2014).
- 5) Wilhelm KP., Kaspar K., Schumann F., Articus K., Development and validation of a semiautomatic image analysis system for measuring skin desquamation with D-Squames, *Skin Res. Technol.*, **8**, 98-105 (2002).
- 6) Lu N., Chandar P., Tempesta D., Vincent C., Bajor J., McGuinness H., Characteristic differences in barrier and hygroscopic properties between normal and cosmetic dry skin. I. Enhanced barrier analysis with sequential tape-stripping, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **36**, 167-174 (2014).
- 7) Feng L., Chandar P., Lu N., Vincent C., Bajor J., McGuinness H., Characteristic differences in barrier and hygroscopic properties between normal and cosmetic dry skin. II. Depth profile of natural moisturizing factor and cohesivity, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **36**, 231-238 (2014).
- 8) Breternitz M., Flach M., Prässler J., Elsner P., Fluhr J. W., Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping. A randomized, controlled study, *Br. J. Dermatol.*, **156**, 231-240 (2007).
- 9) Ooi K., Sasaki H., Sugawa T., Kimura S., Ueda H., Numajiri S., Kojima S., Katayama T., Mizutani Y., Morimoto Y., Influence of skin hydration on anesthetic effect of lidocaine tape in hemodialysis patients, *J. Pharm. Health Care Sci.*, **34**, 1011-1016 (2008).
- 10) Barry B.W., Dermatological formulations, *Marcel Dekker*, New York, 1983.
- 11) Blank I.H., Cutaneous barriers, *J. Invest. Dermatol.*, **45**, 249-256 (1965).

- 12) Moser K., Hriwet T., Nail A., Guy R.H., Passive skin perteration enhancement and its quantification *in vitro.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **52**, 103-112 (2001).
- 13) Holford N.H., Sheiner L.B., Understanding the dose-effect relationship: clinical applications of pharmacokinetic-pharmacodynamic models, *Clin. Pharmacokinet.*, **6**, 429-453 (1981).
- 14) Kano S., Sugibayashi K., Kinetic analysis on the skin disposition of cytotoxicity as an index of skin irritation produced by cetylpyridinium chloride: comparison of *in vitro* data using a three-dimensional cultured human skin model with *in vivo* results in hairless mice, *Pharm. Res.*, **23**, 329-335 (2006).
- 15) Wu X.M., Todo H., Sugibayashi K., Effects of pretreatment of needle puncture and sandpaper abrasion on the *in vitro* skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran, *Int. J. Pharm.*, **316**, 102-108 (2006).
- 16) Yan k., Todo H., Sugibayashi K., Transdermal drug delivery by in-skin electroporation using a microneedle array, *Int. J. Pharm.*, **397**, 77-83 (2010).
- 17) Wu X.M., Todo H., Sugibayashi K., Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis, *J. Control. Release*, **118**, 189-195 (2007).
- 18) Tokudome Y., Sugibayashi K., The synergic effects of various electrolytes and electroporation on the *in vitro* skin permeation of calcein, *J. Control. Release*, **92**, 93-101 (2003).
- 19) Tokudome Y., Sugibayashi K., The mechanism of synergic effects of calcium chloride and electroporation on the *in vitro* enhanced skin permeation of drugs, *J. Control. Release*, **95**, 267-274 (2004).
- 20) Tokumoto S., Mori K., Higo N., Sugibayashi K., Effect of electroporation on the iontoporetic permselectivity of hairless mouse skin, *J. Control. Release*, **105**, 296-304 (2005).
- 21) Sugibayashi K., Oshizaka T., Todo H., Foresight into a new transdermal absorption study of cosmetics: how to evaluate transdermal absorption and skin concentration of cosmetics?, *Fragrance J.*, **38**, 53-60 (2010).
- 22) Sugibayashi K., For our continued youth and health: science and technology for enhanced skin penetration of cosmetic ingredients to obtain the high effects of cosmetics, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **41**, 241-245 (2007).

- 23) Hashimoto Y., Suga Y., Mizuno Y., Hasegawa T., Matsuba S., Ikeda S., Monma T., Ueda S., Salicylic acid peels in polyethylene glycol vehicle for the treatment of comedogenic acne in Japanese patients, *Dermatol. Surg.*, **34**, 276-279 (2008).
- 24) Yener G., Baitokova A., Development of a w/o/w emulsion for chemical peeling applications containing glycolic acid, *J. Cosmet. Sci.*, **57**, 487-494 (2006).
- 25) Yamamoto Y., Uede K., Yonei N., Kishioka A., Ohtani T., Furukawa F., Effects of alpha-hydroxy acids on the human skin of Japanese subjects: the rationale for chemical peeling, *J. Dermatol.*, **33**, 16-22 (2006).
- 26) 厚生労働省, 局所皮膚適用製剤の後発医薬品のための生物学的同等性試験ガイドライン, (2003). [www.nihs.go.jp/drug/be-guide/GL061124_hifu.pdf]
- 27) Wiedersberg S., Leopold C. S., Guy R. H., Dermatopharmacokinetics of betamethasone 17-valerate: influence of formulation viscosity and skin surface cleaning procedure, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **71**, 362-366 (2009).
- 28) Navidi W., Hutchinson A., N'Dri-Stempfer B., Bunge A., Determining bioequivalence of topical dermatological drug products by tape-stripping, *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.*, **35**, 337-348 (2008).
- 29) Pershing L. K., Nelson J. L., Corlett J. L., Shrivastava S. P., Hare D. B., Shah V. P., Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **48**, 740-751 (2003).
- 30) Ikeda Y., Hirata K., Kano S., Yanagihara H., Takahara J., Kondo K., Umemura K., *In vivo* assessment of the cutaneous bioavailability of topically applied maxacalcitol, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **27**, 305-310 (2005).
- 31) Herkenne C., Alberti I., Naik A., Kalia Y. N., Mathy F. X., Pr eat V., Guy R. H., *In vivo* methods for the assessment of topical drug bioavailability, *Pharm. Res.*, **25**, 87-103 (2008).
- 32) 厚生労働省, マイクロドーズ臨床試験の実施に関するガイダンス, (2008). [www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/chiken/dl/080705.pdf]
- 33) European agency for the evaluation of medicinal products. Evaluation of medicines for human use. Position paper on non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose, (2003).

- 34) U. S. Department of health and human services, Food and Drug Administration, Center for evaluation and research, Guidance for industry, Investigators and reviewers, Exploratory IND studies (2006).
- 35) Gabbanini S., Lucchi E., Carli M., Berlini E., Minghetti A., Valgimigli L., *In vitro* evaluation of the permeation through reconstructed human epidermis of essential oils from cosmetic formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **50**, 370-376 (2009).
- 36) Kano S., Sugibayashi K., Kinetic analysis on the skin disposition of cytotoxicity as an index of skin irritation produced by cetylpyridinium chloride: Comparison of in vitro data using a three-dimensional cultured human skin model with in vivo results in hairless mice, *Pharm. Res.*, **23**, 329-335 (2006).
- 37) Sato K., Aoki H., Analysis of dermatological features of solar lentigo and development of skin whitening ingredients, *Frag. J.*, **39**, 14-18 (2011).
- 38) Takeuchi H., Mano Y., Terasaka S., Sakurai T., Furuya A., Urano H., Sugibayashi K., Usefulness of rat skin as a substitute for human skin in the *in vitro* skin permeation study, *Exp. Anim.*, **60**, 373-384 (2011).
- 39) Sugibayashi K., Todo H., Oshizaka T., Owada Y., Mathematical model to predict skin concentration of drugs: toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, *Pharm. Res.*, **27**, 134-142 (2010).
- 40) Fentem J. H., Botham P. A., ECVAMs Activities in Validating Alternative Tests for Skin Corrosion and Irritation, *ATLA.*, **30**, 61-67 (2002).
- 41) Alépée N., Tornier C., Robert C., Amsellem C., Roux M.H., Doucet O., Pachot J., Méloni M., Anne de Brugerolle de Fraissinette, A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test, *Toxicol. In Vitro*, **24**, 257-266 (2010).
- 42) Toyoda H., Regulation of the animal experiments and testing in EU, *Envir. Mutagen. Res.*, **27**, 125-128 (2005).
- 43) Lodén M., Ungerth L., Serup J., Changes in European legislation make it timely to introduce a transparent market surveillance system for cosmetics, *Acta. Derm. Venereol.*, **87**, 485-492 (2007).
- 44) Kolar R., Animal experimentation, *Sci. Eng. Ethics.*, **12**, 111-122 (2006).
- 45) Spielmann H., Animal use in the safety evaluation of chemicals: Harmonization

- and emerging needs, *ILAR J.*, (Suppl.), S11-S17 (2002).
- 46) Faller C., Bracher M., Dami N., Roguet R., Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics, *Toxicol. In Vitro*, **16**, 557-572 (2002).
 - 47) Botham P.A., The validation of *in vitro* methods for skin irritation, *Toxicol. Lett.*, **149**, 387-390 (2004).
 - 48) Botham P.A., Earl L.K., Fentem J.H., Roguet R., Johannes J.M. van de Sandt, Alternative Methods for Skin Irritation Testing: the Current Status, *ATLA*, **26**, 195-211 (1998).
 - 49) Kidd D.A., Johnson M., Clements J., Development of an *in vitro* corrosion/irritation prediction assay using the EpiDerm™ skin model, *Toxicol. In Vitro*, **21**, 1292-1297 (2007).
 - 50) Watanabe T., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Sugibayashi K., Utility of MTT assay in three-dimensional cultured human skin model as an alternative for draize skin irritation test: approach using diffusion law of irritant in skin and toxicokinetics-toxicodynamics correlation, *Pharm. Res.*, **19**, 669-675 (2002).
 - 51) Kano S., Todo H., Sugie K., Fujimoto H., Nakada K., Tokudome Y., Hashimoto F., Utilization of reconstructed cultured human skin models as an alternative skin for permeation studies of chemical compounds, *AATEX*, **15**, 61-70 (2010).
 - 52) Borgia S.L., Schlupp P., Mehnert W., Schafer-Korting M., *In vitro* skin absorption and drug release-A comparison of six commercial prednicarbate preparations for topical use, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**, 380-389 (2008).
 - 53) 森田 栄伸, 石鹼中の加水分解コムギで感作されコムギ依存運動誘発アナフィラキシーを発症したと思われる3例, 日本皮膚科学会雑誌, **120**, 2421 (2010).
 - 54) 日本皮膚科学会 ロドデノール含有化粧品安全性に関する特別委員会, ロドデノール誘発性脱色素斑症例における一次全国疫学調査結果, 日本皮膚科学会雑誌, **124**, 2095-2109 (2010).
 - 55) Kasamatsu S., Hachiya A., Nakamura S., Yasuda Y., Fujimori T., Takano K., Moriwaki S., Hase T., Suzuki T., Matsunaga K., Depigmentation caused by application of the active brightening material, rhododendrol, is related to tyrosinase

- activity at a certain threshold, *J. Dermatol Sci.*, **76**, 16-24. (2014).
- 56) Park CG, Kim YK, Kim MJ, Park M, Kim MH, Lee SH, Choi SY, Lee WS, Chung YJ, Jung YE, Park KH, Choy YB. Mucoadhesive microparticles with a nanostructured surface for enhanced bioavailability of glaucoma drug, *J. Control. Release*, **220**, 180-188 (2015).
- 57) Tan A., Eskandar N. G., Rao S., Prestidge C. A., First in man bioavailability and tolerability studies of a silica-lipid hybrid (Lipoceramic) formulation: a Phase I study with ibuprofen, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **4**, 212-221 (2014).
- 58) Carlier M., Stove V., Wallis SC., De Waele J. J., Verstraete A. G., Lipman J., Roberts JA., Assays for therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics: A structured review, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **46**, 367-375 (2015).
- 59) Khire A., Vavia P., Bioavailability, bioequivalence, and *in vitro-in vivo* correlation of oxybutynin transdermal patch in rabbits, *Drug. Deliv. Transl. Res.*, **4**, 105-115 (2014).
- 60) Gotta V., Widmer N., Decosterd L. A., Chalandon Y., Heim D., Gregor M., Benz R., Leoncini-Francini L., Baerlocher G. M., Duchosal M. A., Csajka C., Buclin T., Clinical usefulness of therapeutic concentration monitoring for imatinib dosage individualization: results from a randomized controlled trial, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **74**, 1307-1319 (2014).
- 61) Horita D., Yoshimoto M., Todo H., Sugibayashi K., Analysis of hair follicle penetration of lidocaine and fluorescein isothiocyanate-dextran 4 kDa using hair follicle-plugging method, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **40**, 345-351 (2014).
- 62) Teichmann A., Otberg N., Jacobi U., Sterry W., Lademamm J., Follicular penetration: development of a method to block the follicles selectively against the penetration of topically applied substances, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **19**, 216-223 (2006).
- 63) Stahl J., Niedorf F., Wohlert M., Kietzmann M., The *in vitro* use of the hair follicle closure technique to study the follicular and percutaneous permeation of topically applied drugs, *Altern. Lab. Anim.*, **40**, 51-57 (2012).
- 64) Japanese Industrial Standards: Adhesive tape and sheet test, JIS Z0237 (2009).
- 65) Breternitz M., Flach M., Elsner P., Fluhr J.W., Acute barrier disruption by adhesive tapes is influenced by pressure, time and anatomical location: integrity

- and cohesion assessed by sequential tape stripping; a randomized, controlled study, *Br. J. Dermatology*, **156**, 231-240 (2007).
- 66) Okumura M., Sugibayashi K., Ogawa K., Morimoto Y., Skin permeability of water soluble drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1404-1406 (1989).
 - 67) Yamada K., Yamasita J., Todo H., Hashimoto S., Tokudome Y., Hashimoto F., Sugibayashi K., Preparation and evaluation of liquid-crystal formulations with skin-permeation-enhancing abilities for entrapped drugs, *J. Oleo. Sci.*, **60**, 31-40 (2011).
 - 68) Jaymin C.S., Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method., *Int. J. Pharm.*, **90**, 161-169 (1993).
 - 69) Scheuplein R.J., Mechanism of percutaneous absorption., *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79-88 (1967).
 - 70) Potts R. O., Guy R. H., Predicting skin permeability, *Pharm. Res.*, **9**, 663-669 (1992).
 - 71) Yukawa J., Sugibayashi K., Morimoto Y., Effect of various additives on the skin permeation of ketoprofen from the film forming transdermal formulation, *J. Pharm. Sci. Technol., Jap.*, **49**, 254-262 (1989).
 - 72) Rod D. B., Asad A., Orthotopic Human Choroidal Melanoma Xenografts in Nude Rats with Aggressive and Nonaggressive PAS Staining Patterns, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, 7-16 (2006).
 - 73) Desmond M. V., Ferrari B., Manfredini M., Giusti F., Pellacani G., Annually recurring erythema annulare centrifugum: a case report, *J. Med. Case. Rep.*, **9**, 236 (2015).
 - 74) Coquettea A., Bernab N., Vandenboscha A., Rosdyc M., De Weverc B., Poumay Y., Analysis of interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in *in vitro* reconstructed human epidermis for the prediction of *in vivo* skin irritation and or sensitization, *Toxicol. in vitro*, **17**, 311-321 (2003).
 - 75) Ooi K., Sasaki H., Yoshizawa N., Sugawa T., Kimura S., Ueda H., Numajiri S., Kojima S., Katayama T., Mizutani Y., Morimoto Y., Influence of Skin Hydration on Anesthetic Effect of Lidocaine Tape in Hemodialysis Patients, *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **34**, 1011-1016 (2008).
 - 76) Yamazaki A., Kumagai Y., Yamane N., Tozuka Z., Sugiyama Y., Fujita T.,

- Yokota S., Maeda M., Microdose study of a P-glycoprotein substrate, fexofenadine, using a non-radioisotope-labelled drug and LC/MS/MS, *J. Clin. Pharm. Ther.*, **35**, 169-175 (2010).
- 77) Churchwell M. I., Twaddle N.C., Meeker L. R., Doerge D. R., Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **25**, 134-143 (2005).
- 78) Lappin G., Kuhnz W., Jochemsen R., Kneer J., Chaudhary A., Oosterhuis B., Drijfhout W.J., Rowland M., Garner R.C., Use of microdosing to predict pharmacokinetics at the therapeutic dose: experience with 5 drugs, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **80**, 203-215 (2006).
- 79) Yamane N., Tozuka Z., Kusama M., Maeda K., Ikeda T., Sugiyama Y., Clinical relevance of liquid chromatography tandem mass spectrometry as an analytical method in microdose clinical studies, *Pharm. Res.*, **28**, 1963-1972 (2011).
- 80) Miyako T., Isono Y., Setani K., Masabuchi N., Yamada I., Sato Y., Gunji S., Matsui T., Application of AMS to bioanalysis-mass balance studies in human and mice, *Drug Metab. Rev.*, **37**, 368 (2005).
- 81) Tozuka Z., Kusuhara H., Nozawa K., Hamabe Y., Ikushima I., Ikeda T., Sugiyama Y., Microdose study of ¹⁴C-acetaminophen with accelerator mass spectrometry to examine pharmacokinetics of parent drug and metabolites in healthy subjects, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **88**, 824-830 (2010).
- 82) Miyaji Y., Ishizuka T., Kawai K., Hamabe Y., Miyaoka T., Oh-hara T., Ikeda T., Kurihara A., Use of an intravenous microdose of ¹⁴C-labeled drug and accelerator mass spectrometry to measure absolute oral bioavailability in dogs; cross-comparison of assay methods by accelerator mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 130-138 (2009).
- 83) Kijima S., Masaki R., Kadhum W. R., Todo H., Hatanaka T., Sugibayashi K., Potential of imaging analysis in establishing skin concentration- distance profiles for topically applied FITC-dextran 4 kDa, *ADMET & DMPK*, **2**, 221-234 (2014).
- 84) Hada N., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Sugibayashi K., Cultured skin loaded with tetracycline HCl and chloramphenicol as dermal delivery system:

- Mathematical evaluation of the cultured skin containing antibiotics, *J. Control. Release*, **108**, 341-350 (2005).
- 85) Sato K., Mitsui N., Hasegawa T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Potential usefulness of solubility index for prediction of the skin permeation rate of 5-ISMN from pressure-sensitive adhesive tape, *J. Control. Release*, **73**, 269-277 (2001).
- 86) Sugibayashi K., Hayashi T., Matsumoto K., Hasegawa T., Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**, 352-362 (2004).
- 87) Herkenne C., Naik A., Kalia Y.N., Hadgraft J., Guy R.H., Pig ear skin *ex vivo* as a model for *in vivo* dermatopharmacokinetic studies in man, *Pharm. Res.*, **23**, 1850-1856 (2006).
- 88) Herkenne C., Albeti I., Naik A., Kalia Y.N., Mathy F.X., Preat V., Guy R.H., *In vivo* methods for the assessment of topical drug bioavailability, *Pharm. Res.*, **25**, 87-103 (2007).
- 89) Albeti I., Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., Assessment and prediction of the cutaneous bioavailability of topical terbinafine, *in vitro*, in man, *Pharm. Res.*, **18**, 1472-1475 (2001).
- 90) Kalia Y.N., Pirot F., and Guy R.H.. Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum *in vivo*. *Biophys. J.*, **71**, 2692-2700 (1996).
- 91) Herkenne C., Naik A., Kalia Y.N., Hadgraft J., Guy R.H., Dermatopharmacokinetic prediction of topical drug bioavailability *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 887-894 (2007).
- 92) Ishii H., Todo H., Sugibayashi K., Effect of sebum and ointment rubbing on the skin permeation of triamcinolone acetonide from white petrolatum ointment, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 876-880 (2010).
- 93) Ishii H., Todo H., Terao A., Hasegawa T., Akimoto M., Oshima K., Sugibayashi K., Why does a hydrophilic drug permeate skin, although it is not soluble in white petrolatum?, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **35**, 1356-1363 (2009).

- 94) Ishii H., Todo H., Sugibayashi K., Effect of thermodynamic activity on skin permeation and skin concentration of triamcinolone acetonide, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 556-561 (2010).
- 95) Todo H., Kimura E., Yasuno H., Tokudome Y., Hashimoto F., Ikarashi Y., Sugibayashi K., Permeation pathway of macromolecules and nanospheres through skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1394-1399 (2010).
- 96) OECD: Test No. 427: Skin absorption: In Vivo Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Paris (2004).
- 97) Kolbe L., Mann T., Gerwat W., Batzer J., Ahlheit S., Scherner C., Wenck H., Stäb F., 4-n-butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **27**, 19-23 (2013).
- 98) Bonnekoh B., Daepler S., Krueger G. R., Mahrle G., Keratinocyte lipid fluidity under the influence of cholesterol, hydrocortisone, "active lipid", tocopherol and retinoic acid--a fluorescence polarization study with regard to physiological and pathophysiological epidermopoiesis and its therapeutic accessibility, *In Vivo.*, **5**, 227-232 (1991).
- 99) Lauer A. C., Lieb L. L., Ramachandran C., Flynn G. L., Weiner N. D., Transfollicular drug delivery, *Pharm. Res.*, **12**, 179-186 (1995).
- 100) Elias P. M., Epidermal lipids, barrier function and desquamation, *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 44-49 (1983).
- 101) Downing D. T., Lipid and protein structure in the permeability barrier of mammalian epidermis, *J. Lipid Res.*, **33**, 301-313 (1992).
- 102) Bos J. D., Meinardi M. M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000).
- 103) Wosicka H., Cal K., Targeting to the hair follicles: Current status and potential, *J. Dermatol. Sci.*, **57**, 83-89 (2010).
- 104) Ramachandran C., Fleisher D., Transdermal delivery of drug for the treatment of bone diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **42**, 197-223 (2000).
- 105) Błędzkaa D., Gryglikb D., Millera S. J., Photodegradation of butylparaben in aqueous solutions by 254 nm irradiation, *J. Photochem. Photobiol. A.*, **203**, 131-136 (2009).

- 106) Kolthoff I. M., Stenger V. A., *Volumetric Analysis*, **1**, New York, Interscience Publishers. (1942).
- 107) Cázares-Delgadillo J., Naik A., Kalia Y. N., Quintanar-Guerrero D., Ganem-Quintanar A., Skin permeation enhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon, *Int. J. Pharm.*, **297**, 204-212 (2005).
- 108) Heger M., Salles I. I., Van Vuure W., Deckmyn H., Beek J. F., Fluorescent labeling of platelets with polyanionic fluorescein derivatives, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, **31**, 227-232 (2009).
- 109) Serjeant, E.P., Dempsey B.; Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). IUPAC Chemical Data Series No. 23, New York. (1979).
- 110) Oshizaka T., Todo H., Sugibayashi K., Effect of direction (epidermis-to-dermis and dermis-to-epidermis) on the permeation of several chemical compounds through full-thickness skin and stripped skin, *Pharm. Res.*, **29**, 2477–2488 (2012).
- 111) Tamura M., Sueishi T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Juni K., Hasegawa T., Kawaguchi T., Metabolism of testosterone and its ester derivatives in organotypic coculture of human dermal fibroblasts with differentiated epidermis, *Int. J. Pharm.*, **131**, 263-271 (1996).
- 112) Ahmed S., Imai T., Otagiri M., Evaluation of stereoselective transdermal transport and concurrent cutaneous hydrolysis of several ester prodrugs of propranolol: mechanism of stereoselective permeation, *Pharm. Res.*, **13**, 1524-1529 (1996).