

【要旨】

化学物質の皮膚曝露後の皮膚透過性及び皮膚中分布の評価は、化学物質の安全性を評価する上で重要となる。また、標的部位で薬理作用を期待する医薬品を開発するためには、薬物の角層内及び毛嚢内薬物移行性の適切な評価が求められる。すでに、局所皮膚適用薬物の皮膚中濃度測定法として、テープストリッピング (tape stripping, TS) 法、suction blister 法、punch and shave biopsies 法、及び microdialysis 法などが知られている。しかし、これら皮膚中濃度測定法は主に経角層ルートを通じて皮膚に移行した薬物の評価方法であり、経毛嚢ルートを通じて皮膚に移行した薬物の評価方法についてはほとんど検討されていない。また、毛嚢に移行した薬物の評価方法として、シアノアクリレートバイオプシー (cyanoacrylate biopsies, CB) 法が報告されている。これは、適用したシアノアクリレートが硬化して得られる毛嚢レプリカ (hair follicle, HF レプリカ) を用いて、毛嚢中に移行した薬物を回収するという方法である。しかしながら、HF レプリカの高さ (毛嚢内領域の測定可能な深さ方向の薬物分布) と HF レプリカの回収率 (一定面積の皮膚に存在する毛嚢の数に対してレプリカとして回収された毛嚢の割合) との関係はわかっていない。

これらの現状を鑑み、本研究では、CB 法を用いた毛嚢中薬物濃度の評価法を確立するとともに、薬物の角層内及び毛嚢内への移行性に及ぼす薬物物性、製剤組成、さらには適用方法の影響を把握して、皮内・毛嚢内に作用部位を有する成分を配合した医薬品、医薬部外品、化粧品等の開発に活用すべく検討を行った。

まず、第 1 章では、CB 法に用いるシアノアクリレート接着剤の種類、滴下量、CB 操作に関して最適化を行い、角層を除去した皮膚の表面から深さ約 175 μm に相当する HF レプリカを得た。また、CB 法によって毛嚢漏斗部の浅い部分から皮脂腺近傍までの毛嚢領域の薬物分布を評価可能であることが明らかとなった。さらに、モデル薬物を用いた CB 法による評価を行ったところ、親水性薬物であるカフェイン (Caffeine, CAF) よりも脂溶性薬物である 4-ブチルレゾルシノール (4-butylresorcinol) の方がより短時間で多くの量が HF に送達されることが

明らかとなった。

第2章では、水溶性薬物であるCAF水溶液の皮膚適用後の角層内及び毛嚢内へのCAFの移行性に及ぼす塗擦方向の影響について、CB及びTS法を用いて評価した。毛の流れに逆らい塗擦適用することで、CAFの角層内及び毛嚢内移行量、さらに皮膚透過量はいずれもその他の塗擦方法と比較して著しく増加した。また、水溶性色素の水溶液や蛍光微粒子（Fluoresbrite®）を用いて毛嚢内薬物分布を観察することによって、毛の流れに逆らって塗擦すると薬物が角層、皮溝、毛嚢開口部、さらには毛嚢深部により多く集積し、角層内及び毛嚢内への薬物移行性と塗擦の方向性の関係が明らかとなった。

第3章では、モデル製剤を粘性のあるハイドロゲルに拡張し、各種ハイドロゲル製剤の塗擦適用によるCAFの角層内及び毛嚢内移行性への影響について検討した。ハイドロゲルの皮膚適用によるCAFの角層内及び毛嚢内移行量は、塗擦処理により、水溶液の場合と同様に向上することがわかった。また、皮膚透過速度は、中間的な粘度のハイドロゲル使用時に最大となった。製剤を塗擦処理することにより、皮溝や毛嚢に製剤が移行しやすくなるものの、製剤粘度の増大に伴い、製剤からの薬物放出性が低下するため、ハイドロゲルの塗擦処理による皮膚透過性に極大が認められたと推察された。

本研究では、毛嚢深部に移行した薬物の評価や毛嚢へ移行後の薬物の皮内動態については評価できておらず、これは今後の検討課題である。しかしながら、TS法、CB法及び皮膚透過性試験によって、各種薬物、製剤の角層及び毛嚢中濃度を評価することができ、さらには、塗擦処理の影響についても評価することができた。以上より、これらの実験結果を体系化し、角層及び毛嚢中薬物濃度を高めるための最適な製剤設計方法論を構築することで、皮内・毛嚢内に作用部位を有する成分を配合した医薬品、医薬部外品、化粧品等の開発につながるものと考えられた。

Effects of drug- and formulation-properties and application methods on the drug penetration into stratum corneum and hair follicles

Akinari Abe

[Abstract]

It is important to assess the safety of chemicals through skin permeation and skin distribution studies after skin exposure to chemicals. Furthermore, it is very important to evaluate distribution of drugs in the stratum corneum (SC) and hair follicles (HFs) in the development of pharmaceutical products which expects to have a pharmacologic effect at the target sites. Tape stripping (TS) method, suction blister method, punch and shave biopsies, and micro dialysis method are known methods in the evaluation of topical drugs. These methods are mainly suited in the evaluation of drugs through the SC pathway, but there are only limited studies about methods investigating drug permeation through the HF pathway. The cyanoacrylate biopsy (CB) method has been reported as an evaluation method for drugs distributed in the HF. In this method, it is possible to recover the drug that was deposited in the HF using its replica obtained by curing the cyanoacrylate applied in the HF. However, a relation has not been sufficiently assessed between the height of the recovered HF replica (measurable depth direction of the drug distribution of the HF region) and study on the recovery rate of HF replica. In this study, the CB method was established as a method for evaluating drug concentrations in the HF to understand the effects of drug and formulation properties, and application method on the distribution of the drug to the SC and HFs. This method of evaluation is useful in the development of pharmaceuticals, quasi-drugs and cosmetics with HF being the site of action in skin.

In the first chapter, the present CB method showed that HF replicas had an average height of approximately 175 μm from the surface of SC-stripped skin. The results obtained in this study indicated that this method can be used to evaluate drug disposition in the HF region from the shallow part of the infundibulum proximate to the opening of the sebaceous duct.

Furthermore, the CB method revealed that significantly higher amounts of lipophilic drug (4-butylresorcinol) could be delivered into HFs in a short period after application compared with hydrophilic ones (caffeine, CAF).

In the second chapter, the effect of the direction of rubbing on the disposition of the CAF into the SC and HF after application of the CAF solution was evaluated using the CB and TS methods. By rubbing against the hair flow, the amount of CAF in the SC and HF, and cumulative amount of CAF permeated were both significantly increased as compared with other rubbing methods. Furthermore, it was observed that a water-soluble dye or fluorescent fine particles (Fluoresbrite®), when they were rubbed against the hair flow, distributed mainly into the SC, furrows, and HF opening. Furthermore, they accumulated into the deeper parts of the HFs. From these findings, the relationship was clarified between the drug penetration into the SC and HF and the direction of rubbing.

In the third chapter, the investigation on model formulations was expanded to a viscous hydrogel, and the influence of rubbing application of various hydrogels on the SC and HF penetration of CAF was examined. It has been found that the amount of CAF in the SC and HF by skin application of hydrogel was increased by rubbing treatment as in the case of the aqueous solution. Also, the skin permeation rate was maximum for hydrogels of intermediate viscosity.

In this study, drugs penetration into the deeper part of the HF and intradermal dynamics of drugs after penetration to HFs were not evaluated, and thus remains a study subject in the future. However, TS method, CB method and the present skin permeation experiments sufficiently evaluated the concentrations in the SC and HFs of various drugs and formulations, as well as the effects of rubbing. It is considered that these results can be utilized for the development of pharmaceuticals, quasi-drugs, and cosmetics formulated with drugs intended to exhibit effects on the skin and HFs.

論文審査の結果の要旨

化学物質の皮膚暴露後の皮膚透過性や皮膚中分布の評価は、化学物質の安全性を評価する上で重要となる。また、標的部位で薬理作用を期待する医薬品を開発するためには、薬物の角層内および毛嚢内薬物移行性の適切な評価が求められている。局所皮膚適用薬物の皮膚中濃度（移行性）測定法として、テープストリッピング（tape stripping, TS）法、suction blister 法、punch and shave biopsies 法および microdialysis 法などが知られている。しかし、これら皮膚中濃度測定法は、主に経角層ルートを介して皮膚に移行した薬物の評価方法であり、経毛嚢ルートを介して皮膚に移行した薬物の評価方法については、ほとんど検討されていないのが現状である。また、毛嚢に移行した薬物の評価方法として、シアノアクリレートバイオプシー（cyanoacrylate biopsies, CB）法が報告されている。これは、適用したシアノアクリレートが硬化して得られた毛嚢（hair follicle, HF）レプリカを用いて、毛嚢に移行した薬物を回収することができるという方法である。しかしながら、回収された HF レプリカの高さ（毛嚢内領域の測定可能な深さ方向の薬物分布）および HF レプリカの回収率に関する検討は十分にされていない。阿部晃也氏は、現状の問題点を解決するため、CB 法を用いた毛嚢中薬物濃度の評価法を確立するとともに、薬物の角層内及び毛嚢内への移行性に及ぼす薬物物性、製剤組成及び適用方法の影響を把握し、皮内・毛嚢内に作用部位を有する成分を配合した医薬品、医薬部外品、化粧品等の開発に活用するべく検討を行った。

第 1 章では、CB 法に用いるシアノアクリレート接着剤の種類、滴下量、CB 操作の最適化を行い、角層を除去した皮膚の表面から深さ約 175 μm に相当する HF レプリカを得た。その結果、CB 法は毛嚢漏斗部の浅い部分から皮脂腺の近傍までの毛嚢領域の薬物分布が評価可能であることを明らかにした。さらに、モデル薬物を用いた CB 法による評価を行ったところ、親水性薬物であるカフェイン（caffeine, CAF）よりも脂溶性薬物の 4-ブチルレゾルシノール（4-butylresorcinol）の方がより短時間で多くの薬物を HF に送達できることを明らかにした。

第 2 章では、水溶性薬物である CAF 水溶液の皮膚適用後の角層内及び毛嚢内への CAF の移行性に及ぼす塗擦方向の影響について、CB 及び TS 法を用いて評価した。毛の流れに逆らい塗擦適用することで、CAF の角層内及び毛嚢内移行量、さらに皮膚透過量はいずれもその他の塗擦方法と比較して著しく増加した。さらに、水溶性色素の水溶液や蛍光微粒子（Fluoresbrite®）を用いて毛嚢内薬物分布を観察した結果、毛の流れに逆らって塗擦するとモデル薬物が角層、皮溝及び毛嚢開口部により多く集積し、さらに、毛嚢深部にまで送達された。これらの結果から、角層内及び毛嚢内への薬物移行

性と塗擦の方向性の関係を明らかとした。

第 3 章では、モデル製剤を粘性のあるハイドロゲルに拡張し、各種ハイドロゲルの塗擦適用による CAF の角層内及び毛嚢内移行性への影響について検討した。ハイドロゲルの皮膚適用による CAF の角層内及び毛嚢内移行量は、塗擦処理により、水溶液の場合と同様に向上することが分かった。また、塗擦による皮膚透過速度の増大は、中間的な粘度のハイドロゲルにおいて最大となった。

阿部氏は、再現性よく毛嚢開口部の薬物分布状態を評価できる方法を確立した。しかし、毛嚢のより深部に移行した薬物の評価や毛嚢へ移行後の薬物の皮内動態については評価できていないため、今後詳細な検討が必要であるが、TS 法、CB 法及び皮膚透過性試験によって、各種薬物、製剤の角層及び毛嚢開口部の濃度を測定し、さらには、塗擦方向が皮膚中または毛嚢中の薬物分布および皮膚透過性に影響することを明らかにした点は大いに評価できる。本論文で得られた結果は、角層及び毛嚢中薬物濃度を高めるための最適な製剤設計方法論を構築することで、皮内・毛嚢内に作用部位を有する成分を配合した医薬品、医薬部外品、化粧品等の開発に活用できるものと考えられる。

以上、本論文は、毛嚢のより深部に移行した薬物の評価や毛嚢へ移行後の薬物の皮内動態は不明であるものの、TS 法、CB 法及び皮膚透過性試験によって、各種薬物や製剤の角層及び毛嚢中濃度を評価し、さらには、塗擦処理の影響など、経皮適用製剤の角層や毛嚢内薬物移行性を評価する上で、極めて有益な情報を提供するものであると評価できる。新規性の高いことが認められる本論文は、その独創性および研究意義の観点から、本研究科において課程による博士（薬科学）の論文として十分に値するものであると判断した。