

薬物の角層及び毛嚢移行性に及ぼす薬物・製剤
物性及び適用方法の影響

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

阿部 晃也

目次

略語と記号.....	1
緒言.....	2
第 1 章 毛嚢中薬物濃度評価法の確立.....	7
第 1 節 実験方法.....	9
1. 1. 試薬及び実験材料.....	9
1. 2. 実験動物.....	9
1. 3. 種々ドナー溶液の調製	10
1. 4. <i>n</i> -オクタノール／水分配係数測定法.....	10
1. 5. <i>In vitro</i> 皮膚透過実験法	10
1. 6. テープストリッピング (TS) 法.....	11
1. 7. シアノアクリレートバイオペシー (CB) 法.....	12
1. 8. 毛嚢プラグギング法.....	13
1. 9. 薬物の定量方法.....	13
1. 10. 毛嚢レプリカの観察法.....	14
1. 11. 統計処理.....	15
第 2 節 結果.....	16
2. 1. 異なるシアノアクリレート接着剤で作製した毛嚢レプリカ.....	16
2. 2. シアノアクリレートの滴下量の検討.....	20
2. 3. CB 法にて得られた毛嚢レプリカの回収率.....	20
2. 4. HF レプリカの高さのバラツキ.....	23
2. 5. 角層及び毛嚢中薬物量の評価.....	25
第 3 節 考察.....	30
第 4 節 小括.....	35
第 2 章 角層及び毛嚢中薬物濃度に及ぼす塗擦の影響.....	36
第 1 節 実験方法.....	38
1. 1. 試薬及び実験材料.....	38
1. 2. 実験試料.....	38
1. 3. ドナー溶液の調製.....	38
1. 4. 塗擦方法.....	38
1. 5. <i>n</i> -オクタノール／水分配係数測定法.....	39
1. 6. 薬物の皮膚適用法.....	39
1. 7. TS 法.....	40
1. 8. CB 法.....	41

1.9. <i>In vitro</i> 摘出皮膚透過性試験法.....	41
1.10. 薬物の定量方法.....	42
1.11. 皮内（皮溝や毛嚢への色素の移行）と毛嚢内の薬物分布の観察..	43
1.12. 統計処理.....	44
第 2 節 結果.....	45
2.1. 塗擦処理による薬物の角層及び毛嚢内分布の影響.....	45
2.2. 塗擦処理による薬物の角層内深さ分布の影響.....	47
2.3. 塗擦処理による薬物の皮膚透過量の影響.....	48
2.4. 皮膚表面への薬物分布.....	50
2.5. 塗擦処理による皮膚適用した蛍光微粒子の皮内分布.....	51
第 3 節 考察.....	54
第 4 節 小括.....	58
第 3 章 角層及び毛嚢内分布に及ぼす製剤物性の影響.....	59
第 1 節 実験方法.....	60
1.1. 試薬及び実験材料.....	60
1.2. <i>n</i> -オクタノール／水分配係数測定	60
1.3. 製剤の調製.....	60
1.4. 製剤の粘度測定法.....	61
1.5. 薬物放出試験法.....	61
1.6. TS 法.....	62
1.7. CB 法.....	62
1.8. <i>In vitro</i> 摘出皮膚透過性試験法.....	62
第 2 節 結果.....	63
2.1. 各種ハイドロゲルの粘度.....	63
2.2. 各種ハイドロゲルからの CAF の放出性.....	63
2.3. 塗擦処理による薬物の角層及び毛嚢内濃度の影響.....	65
2.4. 塗擦処理による薬物の皮膚透過量の影響.....	66
第 3 節 考察.....	69
第 4 節 小括.....	71
結論.....	73
謝辞.....	75
引用文献.....	77

略語と記号

略号	
TS	tape stripping
CB	cyanoacrylate biopsy
CAF	caffeine
BR	4-butylresorcinol
TA	triamcinolone acetonid
SC	stratum corneum
HF	hair follicle
<i>IVIVC</i>	<i>in vitro-in vivo</i> 相関
EB	Evans blue
CLSM	共焦点レーザー走査型顕微鏡
HPC-M	ヒドロキシプロピルセルロース Mグレード
HPC-H	ヒドロキシプロピルセルロース Hグレード
RH	relative humidity
CV	coefficient of variation
記号	
$\log K_{o/w}$	<i>n</i> -オクタノール／水分配係数
flux	定常状態時の薬物皮膚透過速度

緒言

ヒトは日常生活の中で多くの化学物質に曝露されている。ヒトに曝露された化学物質の中には、経口、経肺、経皮、または他の粘膜を介して吸収されるものも多い。皮膚は全身を覆う最も外側の組織で表面積が大きいいため、これらの吸収経路の中で、経皮経路の寄与は無視できない¹⁾。そのため、皮膚曝露後の化学物質の皮膚透過性や皮膚中分布の評価は安全性を評価する上で極めて重要となる。また、皮膚は薬効を期待した薬物の投与部位としても注目されており、薬物の肝初回通過効果を回避できる、長時間にわたって薬物血中濃度を維持することができる、適用部位直下に高い皮膚中薬物濃度を得ることができる等の利点を有している。

皮膚は表皮・真皮・皮下組織の3層構造をとっており、表皮の最外層を構成する角層は経皮吸収の最大のバリアと考えられている。また、角層は角化細胞の角化により形成される。さらに、真皮には膠原線維（collagen：コラーゲン）や弾性線維、血管、細胞外マトリックス等の支持組織の他、汗腺、脂腺、毛包等の付属器官が存在する。

製剤中の薬物は製剤基剤から皮膚表面へ分配され、皮膚中での拡散を経て全身循環系や皮下に移行することから、全身作用及び局所作用を期待する薬物の

皮膚透過性を検討するには、前述した角層への薬物分配性と角層中の薬物拡散性に注目する必要がある。さらに、発育毛薬やにきび治療薬では、角層だけでなく毛嚢及び汗腺のような皮膚付属器官への薬物移行性の評価も重要となる。

男性型脱毛症または壮年性脱毛症等の毛髪疾患は、世界中に多くの患者を有する疾患であり、最も多く用いられている脱毛症治療薬としてミノキシジルが知られている。ミノキシジルは、毛乳頭付近の血管拡張の誘導による毛細血管組織血流の改善等、様々なメカニズムによって毛の成長を促進する²⁻⁴⁾。また、ミノキシジルは毛嚢中のカリウムチャネル受容体を介して直接効果を発揮し⁵⁾、毛周期の休止期から成長期への誘導及び成長期の延長を促す⁶⁾。一方、にきび治療で用いられるレチノールの誘導体であるアダパレンは、細胞分化に関与する核レチノイン酸受容体との選択的相互作用によって毛包上皮細胞の増殖及び分化を抑制することが報告されている。したがって、毛乳頭や毛包を標的として薬理作用を期待する医薬品を開発するためには、薬物の角層及び毛嚢への薬物移行性に関する適切な評価が非常に重要となる。

角層中の薬物動態学解析は、すでに局所皮膚適用製剤の後発医薬品の生物学的同等性評価に用いられており、テープストリッピング (TS) 法⁷⁾で製剤適用部位の角層を剥がし、角層に存在する薬物を定量することにより、薬物の皮膚へのバイオアベイラビリティを評価することができる。さらに、TS法以外にも局所

皮膚適用薬物の皮膚中濃度測定法として suction blister 法⁸⁾、punch and shave biopsies 法⁹⁾及び microdialysis 法¹⁰⁾、skin sandwich system 法¹¹⁻¹³⁾、毛嚢プラグギング法^{14,15)}、共焦点レーザー走査顕微鏡法¹⁶⁾等が知られており、拡散式を用いた数学的モデルによる皮膚中濃度予測法も報告されている¹⁷⁾。しかし、これら皮膚中濃度測定法は、主に経角層ルートにより皮膚に移行する薬物の評価方法であり、経毛嚢ルートを紹介して皮膚に移行した薬物の評価方法（毛嚢中の薬物濃度-時間プロファイルや薬物濃度-深さプロファイル等の評価）についてはほとんど検討されていない。Scheuplein は、半世紀も前に経毛嚢ルートは経角層ルートよりも薬物の適用初期の透過においてより重要であると報告¹⁸⁾しているものの、皮膚付属器官の毛嚢開口部面積が全皮膚表面積に対して0.1%程度しか占有していないことから¹⁹⁾、これまでは薬物の透過ルートとして皮膚付属器官として重要視されていなかった。

しかし、近年になって、測定機器や手法の発展に伴い、経毛嚢ルートを紹介した薬物の透過性評価が行われるようになり、ヒドロコルチゾン、カフェイン及び *p*-アミノ安息香酸の皮膚付属器官欠損皮膚を介した透過速度 (J) が正常皮膚と比較して1/2~1/4 であると報告^{20,21)}され、皮膚付属器官は水溶性薬物のみならず、脂溶性薬物の送達部位としても有用であるとの報告²²⁾も出てきた。さらに、局所適用されたカフェイン (CAF)¹⁵⁾及びミノキシジル²³⁾は、角層内拡散性が低い

ため血中に検出されるには時間を要すると考えられたが、適用後わずか 5 分で血中に検出されたとの報告等もあり、近年になって徐々に経毛嚢ルートの重要性が認識されつつある。

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 (CB) 法²⁴⁻²⁶⁾が報告されている。すなわち、シアノアクリレートが硬化して得られた毛嚢レプリカ (HF レプリカ) を用いて毛嚢中に移行した薬物を回収することができるようになった。Teichmann ら²⁶⁾は、ヒト背部皮膚を用いた *in vivo* 試験により CB 法を用いてフルオレセインナトリウムの毛嚢中濃度を測定している。しかしながら、毛嚢中濃度と 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) の関係が示されていない。したがって、現状では、薬物の毛嚢移行性を適切に、かつ精度高く評価する方法がないため、毛嚢をターゲットとする製剤の開発が十分に出来ていない。

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、薬物の毛嚢中薬物動態に及ぼす薬物物性、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したいと考えた。第 1 章では、CB 法に用いるシアノアクリレート系接着剤の選定、CB 法で回収されるレプリカの形状やサ

イズの評価、レプリカで回収可能な毛嚢の深さや評価の再現性の確認を行い、毛嚢中薬物濃度の評価法を確立することとした。さらに、モデル薬物として水溶性の CAF、脂溶性の 4-ブチルレゾルシノール (BR) を用いて、TS 法及び CB 法により、各薬物の角層及び毛嚢への移行性を評価した。また、第 2 章では、角層及び毛嚢中濃度に及ぼす適用方法の影響を検討した。当研究室では、トリアムシロンアセトニド (TA) を配合した軟膏剤を塗擦塗布することによって、薬物の皮膚透過性が向上した知見が得られていた⁴⁰⁾ため、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の強さ及び塗擦方向の影響について、CB 及び TS 法を用いて評価した。さらに、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。加えて、水溶性基剤であるハイドロゲルを用いて、製剤粘性や製剤からの薬物放出性を評価するとともに、製剤物性が角層及び毛嚢中薬物濃度、皮膚透過量に与える影響について調べた。以上、これらの実験結果を体系的にまとめ、薬物の角層及び毛嚢中濃度に及ぼす薬物物性、製剤組成及び適用方法の影響を把握し、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を目的とした。

第 1 章

毛嚢中薬物濃度評価法の確立

角層及び毛嚢内動態は、皮膚適用薬物の皮膚中濃度や血中濃度を予測する上で重要である。皮膚に適用した薬物の角層中薬物濃度評価法として TS 法が、毛嚢中薬物濃度測定法として CB 法が知られている。CB 法では HF レプリカを採取し、レプリカ剤中の薬物量を測定することで毛嚢中薬物移行量を評価できる。しかしながら、評価可能な毛嚢内領域や評価手法の再現性に関する十分な検討は行われていない。したがって、毛嚢をターゲットとする製剤開発を行うためには、薬物の毛嚢移行性を適切に、かつ、精度高く評価する方法が必要であると考えた。

そこで本章では、毛嚢中薬物濃度評価法としての CB 法の有用性を検討するためブタ耳介皮膚を用いて、CB 法によって回収された HF レプリカの高さ、HF レプリカの回収率及び同じ CB 処理部位からの HF レプリカの連続回収の影響を検討し、CB 法をバリデートされた評価法として確立することとした。さらに、2 種のモデル薬物として、親水性のモデル薬物として選択したカフェイン (CAF)、または、親油性のモデル薬物として選択した 4-ブチルレゾルシノール (BR) を用いて、CB 法のみならず TS 法も利用して、各薬物の水溶液適用後のこれら薬

物の角層及び毛嚢中移行量を経時的に評価した。これらによって、具体的な薬物について、経時的变化とバラツキ等の観点から、CB法が毛嚢中薬物濃度評価法として利用可能であるかを検証した。さらに、HFプラグギング皮膚を用いた試験によって、各薬物の透過ルートの解析が可能かも確認し、CB法の有用性を評価した。

第 1 節 実験方法

1.1. 試薬及び実験材料

CAF (M.W.: 194.2) と BR (M.W.: 166.2) は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (大阪) から入手した。アロンアルファ® (東亜合成株式会社、東京、シアノアクリレート含量: > 95 %、多目的型)、アロンアルファ® Tsurimeijin (同社、シアノアクリレート含量: > 95 %、低粘度タイプ)、アロンアルファ®色変化 (同社、シアノアクリレート含量: > 90 %、カラーチェンジタイプ)、アロンアルファ® Tsurimeijin (同社、シアノアクリレート含有: > 85 %、軟質粘着タイプ)、接着 (UHU GmbH & Co. KG、Bühl、ドイツ、シアノアクリレート含有量不明) を用いて CB 法を適用した。Nile red は関東化学株式会社 (東京) から購入し用いた。CuDerm 株式会社 (Dallas, TX、米国) からセロハンテープ (Standard D-Squame Discs) を購入し用いた。Teflon メッシュ (Teflon 40 メッシュ) は、株式会社くればあ (豊橋、愛知) から購入したものを用了。

1.2. 実験動物

冷凍食用豚耳皮膚は、全農飼料畜産中央研究所 (つくば、茨城) から購入し、搬入後は -30 °C で冷凍保存した。

1.3. 種々ドナー溶液の調製

CAF 及び BR ドナー溶液は、それぞれ、100 mM または 10 mM になるように精製水に溶解させ使用した。

1.4. *n*-オクタノール／水分配係数

CAF 及び BR の *n*-オクタノール／水分配係数は、flask 法を用いて求めた。すなわち、CAF と BR を予め *n*-オクタノールで飽和した水に溶解し、予め水で飽和した *n*-オクタノールの同体積と混合し、全サンプルを 37°C で 24 時間振とうし、水相中の薬剤濃度を HPLC を用いて分析した。なお、*n*-オクタノール相の薬物濃度は計算によって求め、最終的に CAF と BR の *n*-オクタノール／水分配係数 ($K_{o/w}$) を算出した。

1.5. *In vitro* 皮膚透過実験法

ブタの耳介皮膚はブタ耳組織から摘出することなく用いた。冷凍された皮膚は 32 °C の温水で解凍した。解凍後、皮膚を精製水で丁寧に洗浄した。その後、皮膚上の余分な水分を拭き取り、バリカンを使って長さ 約 1.5 mm に剃毛した。縦型フランツ型セル（有効透過面積: 1.77 cm²）のドナー側は、アロンアルファ®ゼリー状（コニシ株式会社、大阪）を用いて皮膚に接着した。表皮側に 1.0 mL

の精製水を適用し、1時間水和した。水和処理後、ドナーセルから精製水を取り除き、ドナー側に 1.0 mL の薬液を適用した。ドナーセルは、薬液の蒸発を防ぐためにパラフィルムで覆い、インキュベーター（18AIC、三洋電機株式会社、大阪）内で、32° C、80 % RH 下にて行った。

TS 及び CB 処理は、薬液適用後 5、30、120、480 分後に行った。各実験を 3 回繰り返して行った。全ての毛穴の開口面積を合わせた総開口面積をデジタルマイクロスコープ（VHX-5000 株式会社キーエンス、大阪）を用いて計算し、SC と HF の薬物量は、SC 面積（薬液塗布面積から HF 総開口部面積を減じた面積）及び全 HF の総開口部面積を用いて補正した。

1.6. TS 法

皮膚透過実験後、適用した薬液を SC 上のドナー部位から完全に除去し、皮膚を精製水 1.0 mL で 3 回洗浄した。その後、皮膚中心部に 1.33 cm² の孔を有するテフロンメッシュシートを重ね、薬液塗布面積の内部を露出させた。TS 処理は、セロハンテープ（標準 D-Squame ディスク、CuDerm 株式会社、Dallas、TX、米国）を用いて 20 回行い、露出した皮膚面積から SC 内の薬物を回収した。TS 処理前後の重量差から SC の重量を求めた。その後、各テープを 1.0 mL のメタノールを加えたガラスバイアルに入れ、1h ボルテックスミキサーを用い

て混合し、SC 層から薬物を抽出した。サンプル中の薬物濃度は、HPLC システムを用いて測定した。また、CB 法により得られた HF レプリカの回収率と高さを評価するために、薬液適用のない TS 法も実施した。

1.7. CB 法

TS 処理に引き続き、皮膚中心部に 1.13 cm^2 の孔を有するテフロンメッシュシートを置き、TS 処理領域を露出させた。次いで、露出した領域の上に所定の液滴のシアノアクリレート液を滴下し、その上にセロハンテープのシートを貼付した。滴下したシアノアクリレート液は、セロハンテープの上から指で皮膚の露出領域に広がるように優しく押した。シアノアクリレートが硬化した後、皮膚からセロハンテープを除去して硬化したシアノアクリレート (HF レプリカ) を採取した。デジタル顕微鏡を用いて、HF レプリカの回収率と高さを測定した。レプリカは、1.0 mL のメタノールを加えたガラスバイアルに入れ、ボルテックスミキサーを用いて 1 h 混合し、HF レプリカから薬物を抽出した。薬物濃度は HPLC システムを用いて測定した。

1.8. 毛嚢プラグギング法

毛嚢プラグギングは、以前に報告された方法²⁷⁾に従って行った。操作手順は、下記の通りである。指定された領域の HF（有効透過面積: 1.77 cm²）は、HF を介した薬物浸透を防ぐため、シリコングリースとシアノアクリレート接着剤の混合ペーストで埋めた。なお、混合ペーストは、シリコングリース（Super Lube® Silicone Dielectric Grease; Synco Chemical Corp、Bohemia、NY、米国）、 α -シアノアクリレート系接着剤（アロンアルファゼリー; コニシ株式会社、大阪）及び少量のナイルレッドを混合し調製した。混合比は、シリコングリース：シアノアクリレート系接着剤（ナイルレッド含む）=1：1 である。なお、ナイルレッドは、混合ペーストを適用した領域を視覚化するために使用した。

1.9. 薬物の定量方法

サンプル中の薬物濃度（CAF 及び BR）は、HPLC システム（Prominence; 島津製作所、京都）を用いて分離し、UV 検出器（SPD-M20A; 島津、京都）を用いて定量した。まずサンプル溶液とアセトニトリルを 1：1 の割合で混合した後、遠心分離機（Himac CT15RE、日立工機株式会社、東京）にて 21,500×g、4 °C で 5 分間遠心し、上澄みの 20 μ L を同体積のアセトニトリルに添加し、その混合溶液を HPLC システムに注入した。クロマトグラフィー分離は、Inertsil-

ODS-3 カラム（内径 5 μm 、 $150 \times 4.6 \text{ mm}^2$ ；GL サイエンス、京都）を用いて 40 $^{\circ}\text{C}$ にて行った。CAF 測定時の移動相は 0.1 %リン酸 aq/アセトニトリル（90/10、v/v）を、BR 測定時の移動相は水/アセトニトリル（35/65、v/v）を用いた。流速を 1.0 mL/min に調整し、CAF は 254 nm にて、BR は UV 280 nm にてそれぞれ検出した。

1.10. HF レプリカの観察法

皮膚表面及び得られた HF のレプリカはデジタルマイクロスコープ（VHX-5000）を使用して観察した。HF レプリカの高さは、三次元形状計測ソフトウェア（VHX-H4M、株式会社キーエンス、大阪）を用いて算出した。HF の高さは、異なる焦点面で迅速に画像を処理することによって得られる深さ画像を使用して計算した。また、毛嚢開口部の面積も VHX-5000 に組み込まれた測定システム（VH-M-100 XY、キーエンス株式会社、大阪）で測定した。Figure 1 は、CB 法にて得られた HF レプリカの皮膚及び断面図を示す。レプリカの高さと幅は、Figure 1b に示した位置から測定した。

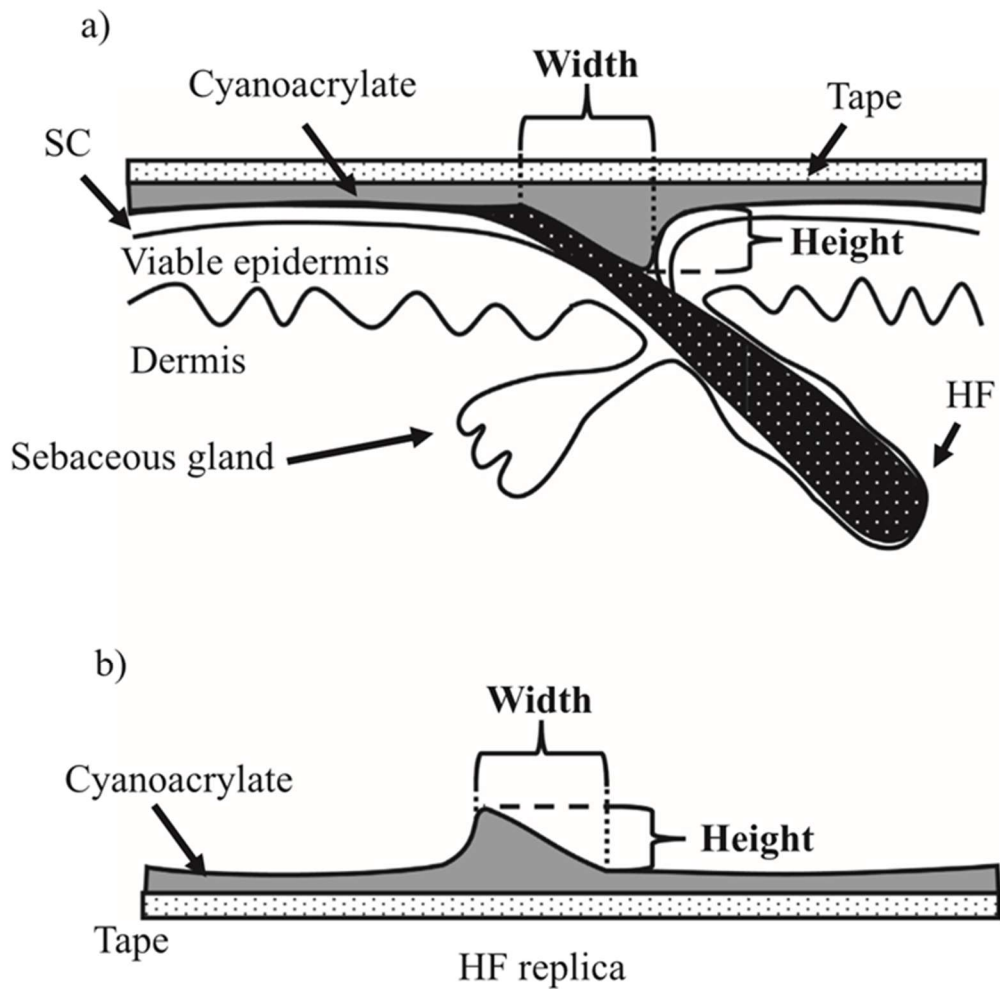


Fig. 1. Diagram of application of CB method on the skin (a) and the cross-section of obtained HF replica (b) .

1. 11. 統計解析

Student's-t 検定を用いて統計的解析を行った。p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

第 2 節 結果

2.1. 異なるシアノアクリレート接着剤で作製した HF レプリカ

はじめに、薬物の適用をせずに異なるシアノアクリレート接着剤にて調製された HF のレプリカについて調べた。Figure 2 に 5 種類の市販品を適用して得られた HF レプリカを示す。全ての製品について HF レプリカが得られた。また、一定面積内に目視確認できる毛嚢数に対して、HF レプリカとして回収できた割合は、カラーチェンジタイプの製品 (Aron Alpha® color change type) 以外は 85% 以上と高い回収率であった (Table 1)。

Table 1 Recovery rates of HF replicas

Cyanoacrylate products (Cyanoacrylate content)	Recovery rates (%)
Aron Alpha® multi-purpose type (95%)	88.1
Aron Alpha® Tsurimeijin low viscosity type (> 95%)	97.1
Aron Alpha® color change type (> 90%)	78.1
Aron Alpha® Tsurimeijin soft adhesive type (> 85%)	100
UHU super glue (unknown)	87.5

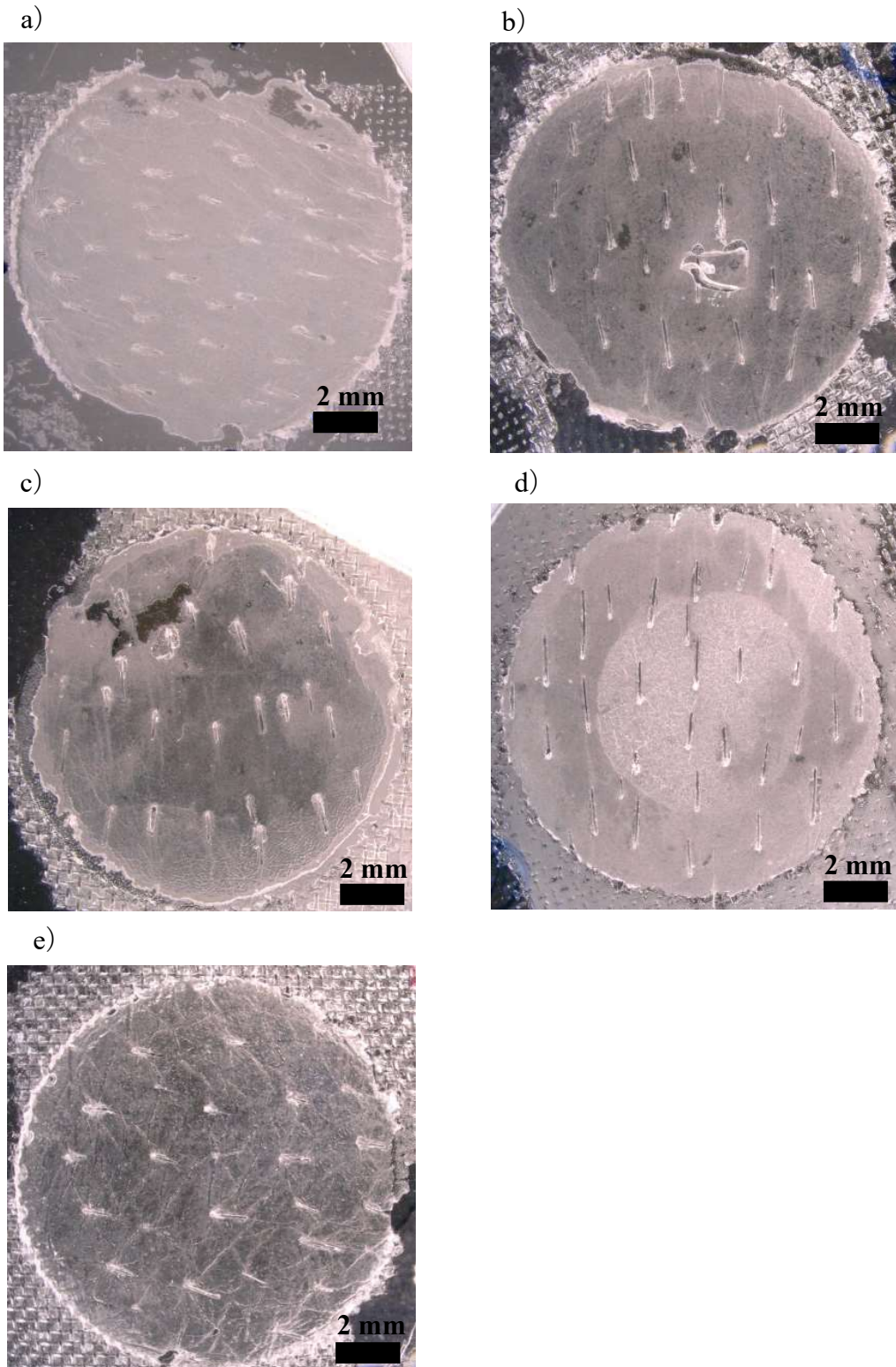


Fig. 2. Effect of different cyanoacrylates on the obtained HF replicas using five types of CB. multi-purpose cyanoacrylate (a) ; low viscosity cyanoacrylate (b) ; color change cyanoacrylate (c) ; soft adhesive cyanoacrylate (d) ; and UHU products (e) .

Figure 3a 及び b に得られた HF レプリカ及び HF レプリカから得られた 3 次元画像をそれぞれ示す。なお、Figure 3b の 3 次元画像は、Figure 3a に示した四角の範囲で示したものである。

HF のレプリカは正常に得られ、毛の流れに沿った形状であることが明らかとなった。Figure 3c は、得られた 3 次元画像の側面図（上図）とレプリカの最高点を記した断面を示す。Figure 3c に示した通り、縦軸と横軸は、それぞれ、高さ $158\ \mu\text{m}$ と幅 $768\ \mu\text{m}$ である。

この方法を用いて、5 種の市販シアノアクリレート製品にて得られた HF レプリカの高さを比較した。多目的タイプ、低粘度タイプ、カラーチェンジタイプ、ソフトタイプ及び UHU 製品のレプリカの高さは、それぞれ、 $175.3 \pm 38.7\ \mu\text{m}$ (mean \pm S.D.)、 $120.6 \pm 23.5\ \mu\text{m}$ 、 $122.2 \pm 24.7\ \mu\text{m}$ 、 $134.2 \pm 37.3\ \mu\text{m}$ 及び $130.4 \pm 30.2\ \mu\text{m}$ であった。多目的タイプは、その中でも高さが最も高く、すなわち最も深部まで到達すると考えられたため、以下の実験には多目的タイプのアロンアルファを用いた。

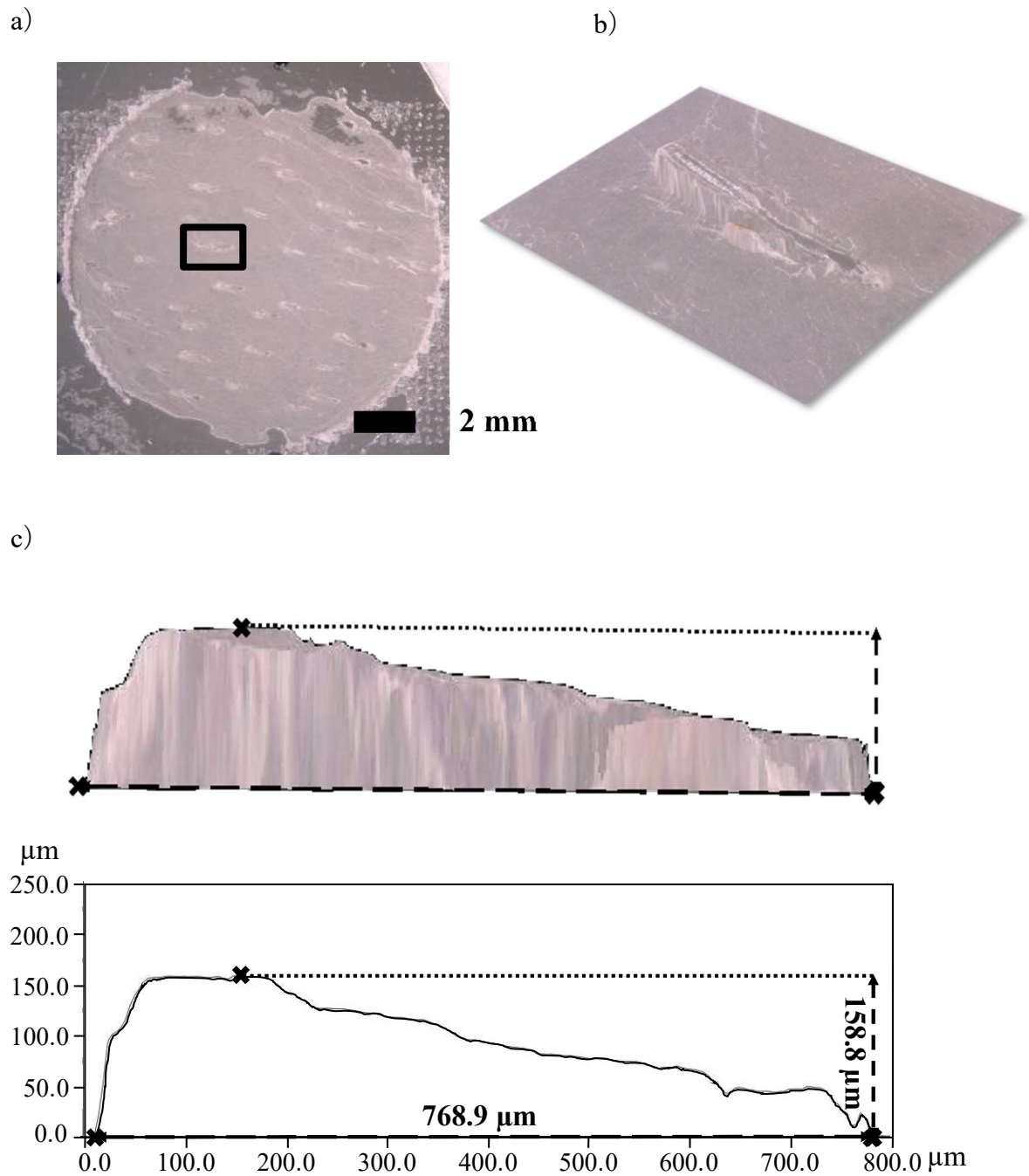


Fig. 3. Images of obtained HF replicas. Top view (a) ; composite three-dimensional image obtained from HF replicas in the area of the square shown in Figure. 2a (b) ; side view of the three-dimensional image (c) ; and the cross-section at its highest point of the replica.

2.2. シアノアクリレートの滴下量の検討

適用する皮膚面積に対するシアノアクリレートの被覆率と HF レプリカの高さに及ぼすシアノアクリレート液滴数の影響を調べた。マイクロ天秤（XP26、メトラー・トレド株式会社、東京）を用いて測定したシアノアクリレート接着剤（多目的型）の1滴の重量は、 17.77 ± 1.62 mg（平均 \pm S.D., n=10）であった。硬化したシアノアクリレートの被覆率は、 1.13 cm² に対して、それぞれ、205%、264%、317%であり、1 → 3 滴の液滴数の増加にともない増加した。また、2 滴及び 3 滴の滴下から得られる HF のレプリカの高さの平均値は、1 滴の滴下の際に得られるレプリカ高さに比べて、0.98 倍及び 0.95 倍であった。したがって、CB 法に用いる皮膚面積は、シアノアクリレート製品を 1 滴のみ滴下することで、十分にカバーできることが分かった。また、HF レプリカの高さは、シアノアクリレート接着剤の滴下数によってほとんど変わらなかった。したがって、以下の実験はシアノアクリレート接着剤を 1 滴滴下する条件で行うこととした。

2.3. CB 法にて得られた HF レプリカの回収率

1.13 cm² あたり 59 個の毛嚢を有するブタ耳の摘出皮膚を実験に使用した。Figure 4a 及び b-f は、それぞれ、同じ皮膚を用いて 5 回連続の CB 処理にて得られた HF の位置 (番号) と HF レプリカを示す。Figure 4b 中の円は 1 回目の CB

処理、Figure 4c 中の四角は 2 回目の CB 処理、Figure 4d 中の三角形は 3 回目の CB 処理でレプリカが得られた毛嚢番号をそれぞれ示す。さらに HF レプリカは、4 回目、5 回目の CB 処理によって、同じ HFs から複数回収されたが、いくつかの毛嚢（番号 24、40、47、48、49、及び 59）からはレプリカは 1 回しか回収されなかった。連続 3 回の CB 処理によって全ての毛嚢から HF レプリカが回収された。回収率は、各 CB 処理で HF レプリカが得られた毛嚢数を用いた皮膚の毛嚢数（59 個）で除した値として定義した。異なる 3 つの個体から摘出したブタ耳皮膚を用いて、1 回の CB 処理を行った後、全毛嚢数に対する HF レプリカの回収率を調べた。その結果、異なる 3 つの皮膚から回収された HF レプリカの回収率は、87.2%、93.5%及び 83.3%であった（HF レプリカの写真は非掲載）。

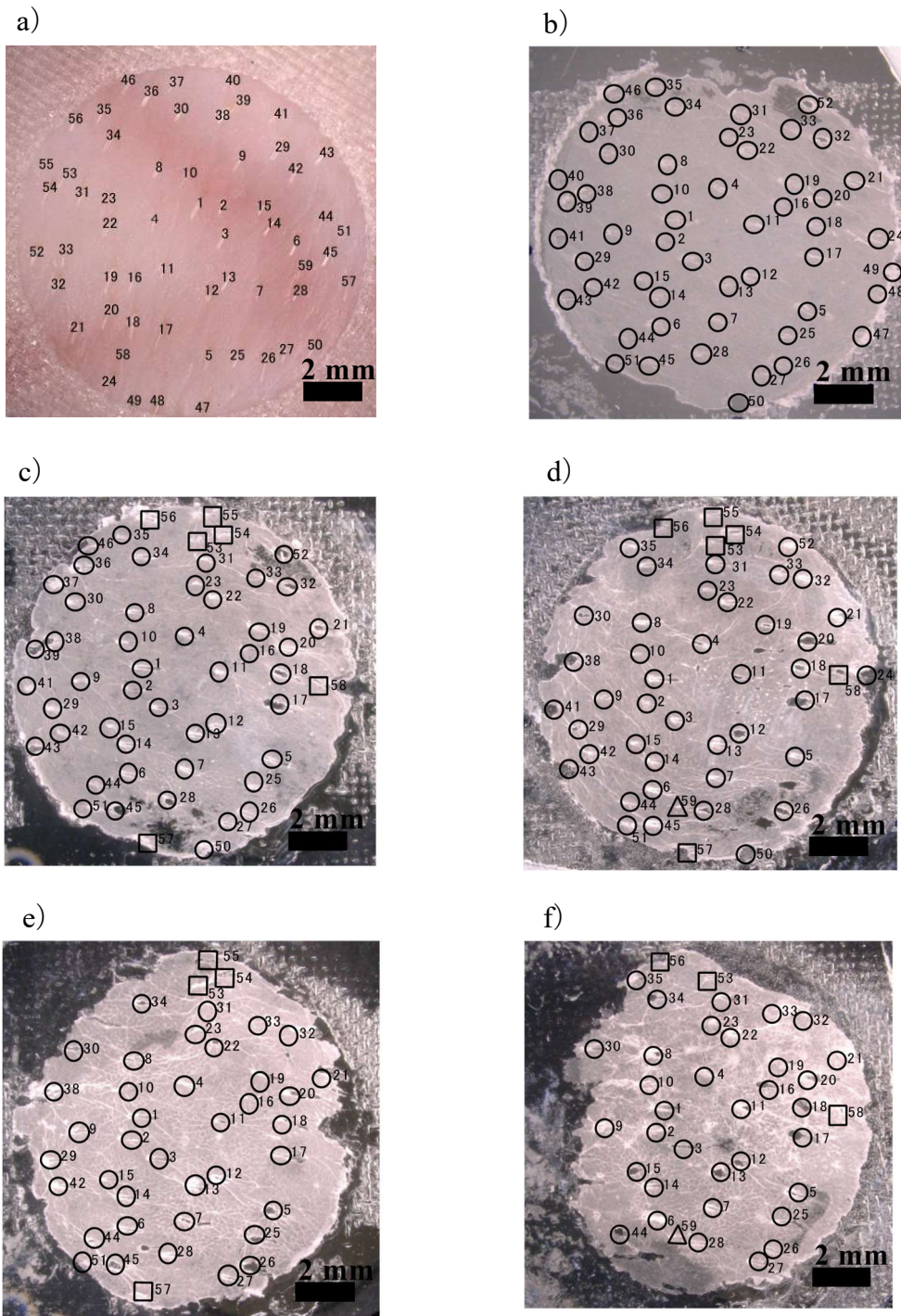


Fig. 4. Numbered HF positions (a) and images of recovered HF replicas obtained using five successive treatments from its corresponding position (b-f) . Replica images when the number of CB method applications was increased by one to five times (b-f) . Symbols: ○; HF replicas obtained from a single CB application. □ and △; HF replicas obtained for the first time from successive second and third applications, respectively.

2.4. HF レプリカの高さのバラツキ

Figure 5 は、対応する HF 位置から得られた HF レプリカの高さを示す。毛嚢位置の番号は、Figure 4a と同じである。5 回連続で行った CB 処理から得られた 5 つの HF レプリカを用いて高さを算出した。各 CB 処理によって得られた HF レプリカの高さの変化と CV 値を Table 2 に示す。表からわかるように、各 CB 処理に対する HF レプリカの高さの平均値は、CB 処理回数の増加に伴って減少した。注目すべきことに、第 1 回目の CB 処理によって得られた CV 値は、2 回目以降の操作で得られた CV 値よりも小さく、CB 処理数の増加に伴って CV 値が増加する傾向が見られた。そこで、毛嚢内の薬物量の評価は、1 回目の CB 処理により行うこととした。

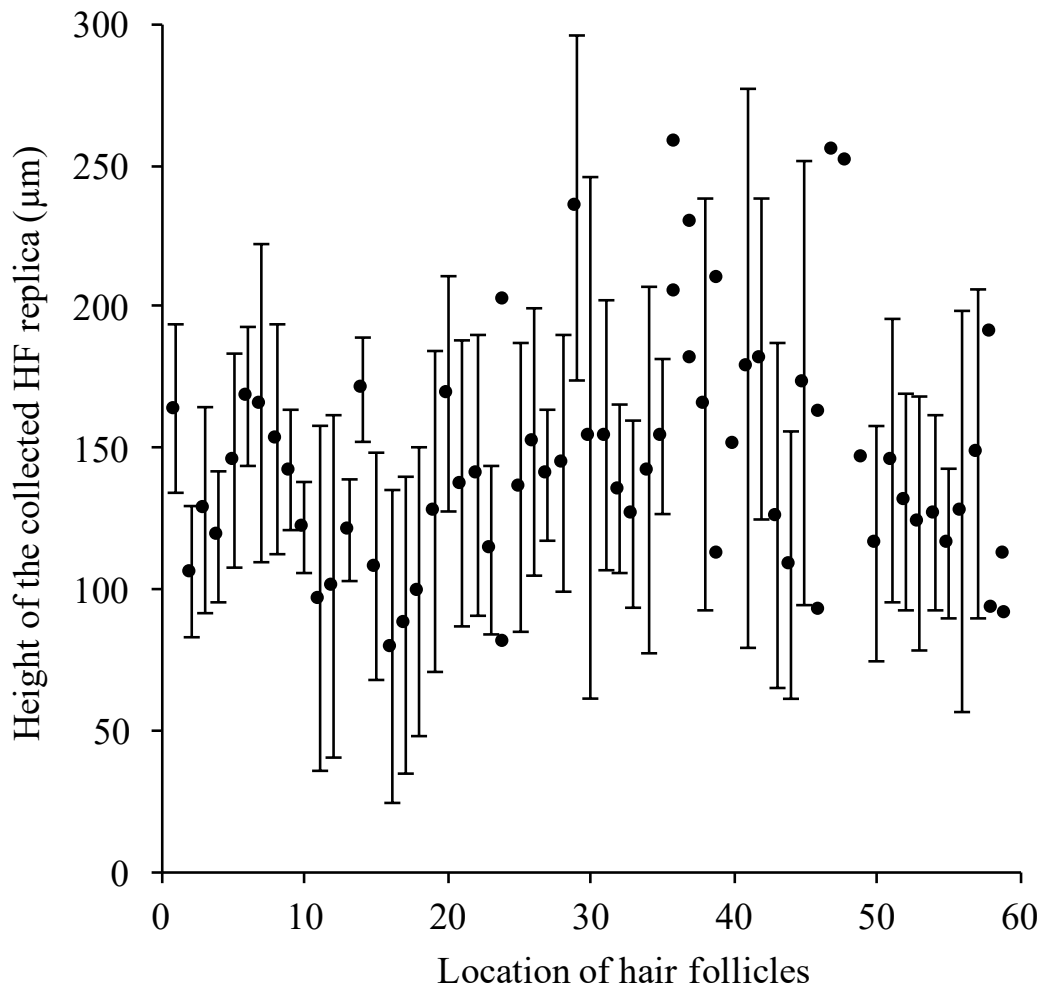


Fig. 5. Height of recovered HF replicas and their corresponding location. Each point represents the mean \pm S.D. ($n = 3-5$, raw data were plotted for the HF location number 24, 36-40, 46-50, 58, and 59, which could not be collectable for 3 points or more against the successive five CB applications) .

Table 2. Change in the height of reserved HF replicas and CV values

Number of applications of the CB method (times)	1	2	3	4	5
Average (μm)	175.3	144.6	117.9	133.0	118.3
S.D.	38.7	44.4	51.5	53.1	52.9
CV (%)	22.1	30.7	43.7	39.9	44.7
n	52	53	47	42	38
Collection ratios (%)	88.1	89.8	79.7	71.2	64.4
Maximum (μm)	268.0	258.1	248.4	293.3	236.1
Minimum (μm)	87.7	89.9	17.2	51.2	4.6

n: the number of HF replicas obtained in each CB application

2.5. 角層及び毛嚢中薬物量の評価

Figure 6 に CAF ($\log K_{o/w} : -0.12$) 及び BR ($\log K_{o/w} : 2.85$) を適用した後の SC 及び HF における薬物量の推移を示す。薬物の極性にかかわらず、SC 及び HF の両方で薬物が確認された。SC 内及び HF 内の薬物量は、いずれも薬物適用後経時的に増加し、適用後 2 時間でほぼ一定値に達した。さらに、SC 及び HF 中の BR 量は、いずれの評価時間においても CAF の薬物量よりも有意に高かった。特に、SC 及び HF 中の BR は、CAF と比較して適用後わずか 5 分で明確に検出され、BR は、CAF の SC 中薬物量及び HF 中薬物量と比較して、それぞれ、

100 倍及び 260 倍高い値を示した。ここで、SC 中に検出された薬物量を HF の薬物量で除した値として定義した。いずれの薬物についても薬物分布比は時間とともに減少した。BR については、30 分で 26.8 倍、1 時間で 16.3 倍、また 2 時間で 11.4 倍と減少した。同様に、CAF については、30 分で 35.1 倍、1 時間で 36.5 倍、また 2 時間で 15.0 倍と減少した。

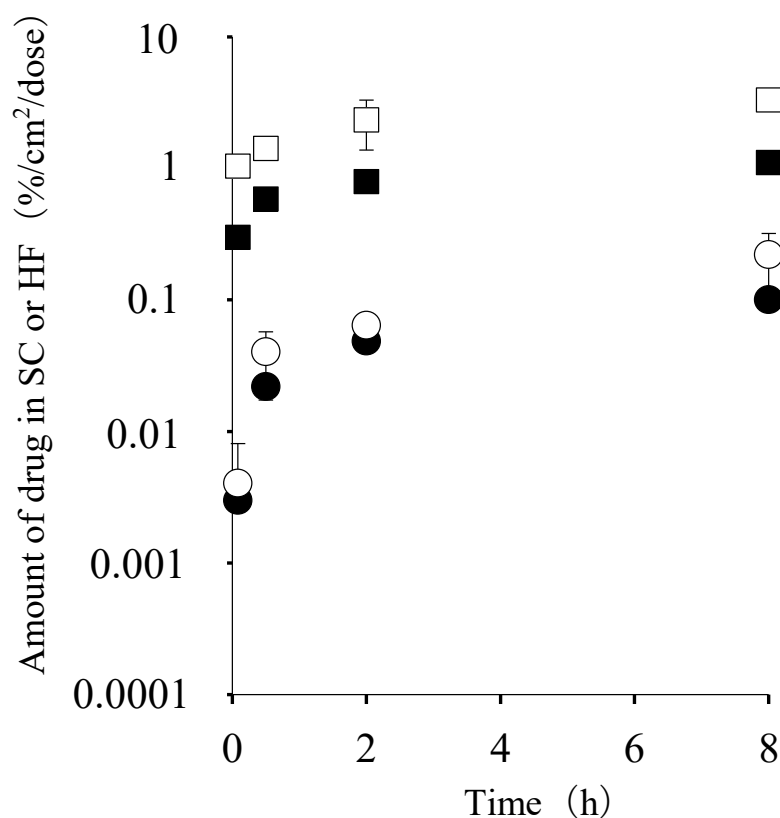


Fig. 6. Time course of the CAF and BR disposition in the HF and SC. Symbols: ● and ○; the amount of CAF in the SC and the HF, respectively, ■ and □; the amount of BR in the SC and the HF, respectively. Each point shows the mean \pm S. E.

適用した薬物の透過経路を調べるために、HF プラッキング皮膚を用いて検討した。Figure 7 は、HF プラッキングなし、及び HF プラッキングした皮膚に CAF

及び BR 水溶液を適用後の SC 及び HF における薬物分布を示す。HF プラッキングした皮膚における SC 中薬物量は、いずれの薬物についても、HF プラッキングをしていない皮膚よりわずかに低かった。一方、HF プラッキング皮膚に塗布した場合、いずれの薬物も HF 中には観察されなかったが、HF プラッキングをしていない皮膚ではいずれの薬物でも検出され、CAF が $3 \times 10^{-3} \text{ \%}/\text{cm}^2$ 、BR が $1.0 \text{ \%}/\text{cm}^2$ であった。

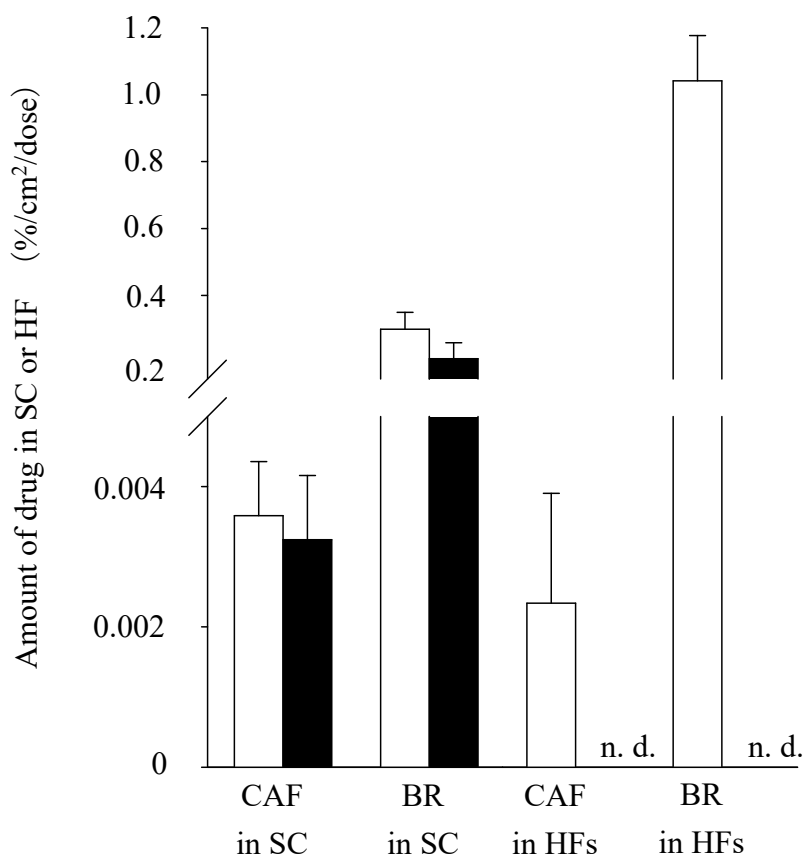


Fig. 7. Effect of HF plugging on the CAF and BR disposition in the SC and HF. Symbols: Open and filled column show non-HF-plugged skin and HF-plugged skin, respectively. No drug distribution was observed in the HF for HF-plugged skin. Each column shows the mean \pm S. D.

Figure 8 に、非 HF プラッキング及び HF プラッキング皮膚における薬物適用 5 分後の角層中薬物深度分布プロファイルを示す。薬物の分布は、薬物の極性にかかわらず、いずれの皮膚においても主に SC の浅い層で観察された。しかしながら、いずれの薬物についても、非 HF プラッキング皮膚において、TS 回数が 6 回目より多いより深い SC 層では、少量の薬物しか確認されなかった。

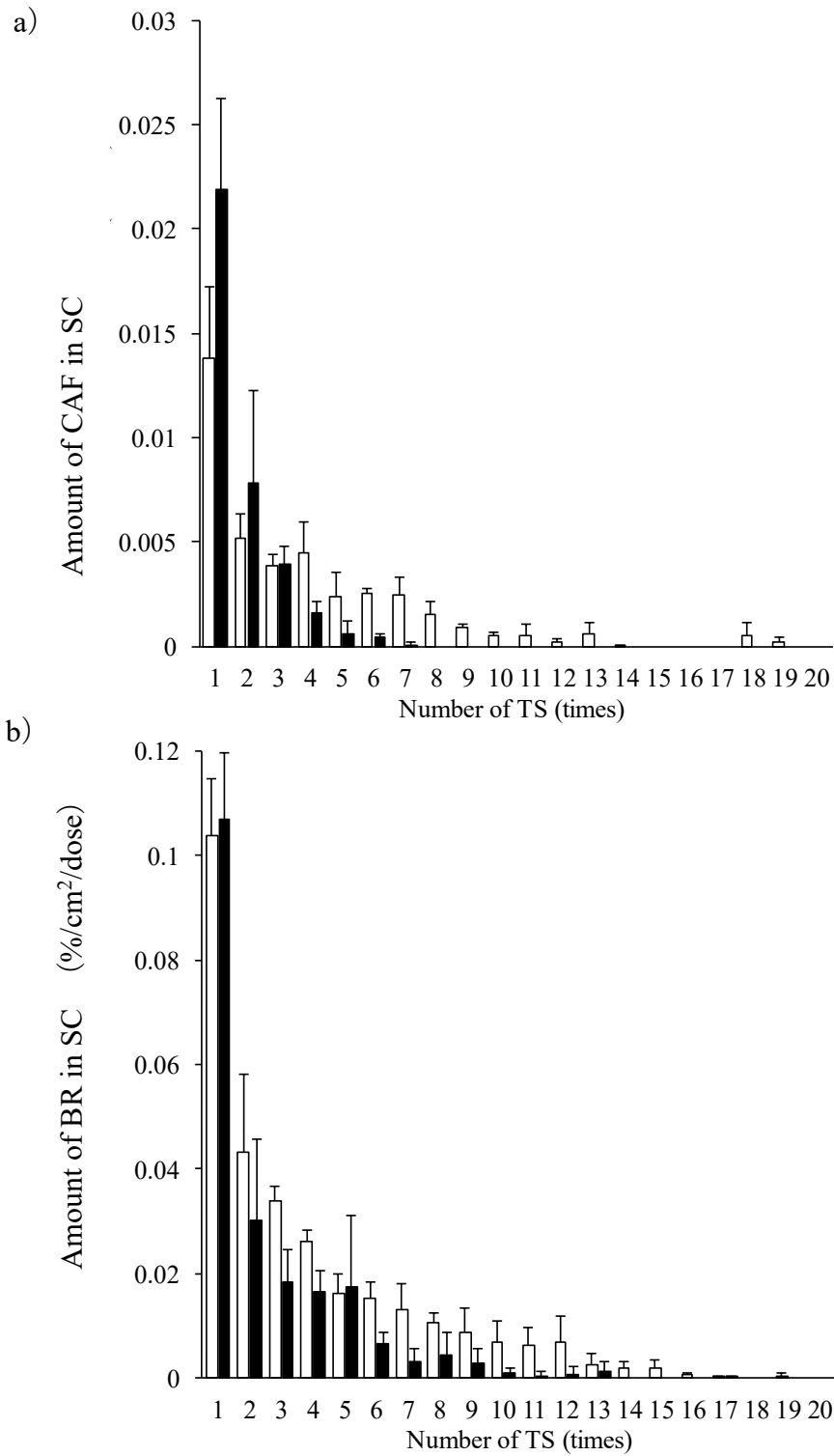


Fig. 8. Effect of HF-plugging on the CAF and BR distribution-depth profile in the SC. Open and filled columns show non-HF-plugged skin and HF-plugged skin, respectively. The X-axis shows the number of times tape stripping was applied. Each column shows the mean \pm S. D.

第4節 考察

薬物の経皮吸収または皮膚中分布に及ぼす HF ルートの寄与はいくつかの研究で試験されてきた^{27, 28)}。当研究室では、薬物の全皮膚透過量における HF ルートの寄与が、親油性薬物と比較して、CAF 等の親水性薬物の方が高いことを報告した²⁷⁾。Frum らは、*in vitro* サンドイッチ法を用いて、HF 透過における $\text{Log } K_{o/w}$ の影響を検討し、局所的に適用される薬物の親油性の増加に伴って全皮膚透過に対する HF ルートの寄与が減少したことを報告した。総透過速度 (flux) に対する HF の寄与は、親油性が高い 2 つの薬物については 4 % 及び 2 % と小さかったが、中程度及び低い $\text{Log } K_{o/w}$ 値の薬物については 34 から 60 % の間で変化した²⁹⁾。Liu らは、30 % エタノールと 70 % プロピレングリコールに溶解した CAF は、局所適用後 30 分以内に HFs を介して吸収されたことを報告し、SC または HF 単独でのルートを介した CAF の *in vivo* での吸収は、*in vitro* の透過に比べて、非常に速く、より大きかったことを報告した³⁰⁾。Otberg らは、CAF を用いて、HF の開放及び閉鎖された皮膚を用いて、*in vivo* 皮膚吸収実験を行った。HF 開放皮膚を用いた際に、CAF は局所適用後 5 分で血中に検出されたが、HF 閉鎖皮膚を用いた際には、CAF は適用 20 分後に検出された¹⁴⁾。

本研究では、最初に、HF 内において薬物が検出されうる深さを把握するため、HF レプリカの高さを測定した。HF レプリカは 1 回の CB 処理によって、高い回収率で回収され、レプリカの高さの平均値はおおよそ 175 μm であることがわか

った。ヒト頭皮の成長期毛嚢のバルジ領域は 500 から 800 μm の深さにあるが、皮脂腺は浅い部分、すなわち、おおよそ 100 から 500 μm の深さに位置することがわかっている。毛嚢の全長と漏斗部は、成長期と退行期の毛嚢によって大きく異なる¹⁶⁾。皮膚表面における成長期毛嚢の開口部の直系は、退行期毛嚢の 2 倍大きい³¹⁾。さらに、ヘアサイクル³²⁾、身体の部位の違い¹⁸⁾、性別、年齢も毛嚢の形態に影響を与える。ブタ皮膚における毛嚢漏斗部の開口部の直径及び漏斗部の深さは、それぞれ、173 から 229 μm 及び 493 から 665 μm と報告されている³³⁾。本実験で用いたブタ耳介皮膚の毛嚢漏斗部の開口部の直径は、 $216 \pm 21 \mu\text{m}$ (平均 \pm S.D.) であり、1 回の CB 処理によって得られた HF レプリカの高さの最大値及び最小値は、それぞれ、268.0 及び 87.7 μm であった。得られたレプリカの高さと対応する位置の毛周期、あるいは、毛嚢漏斗部の開口部の直径との関係はまだ調べられていないが、HF レプリカの高さの差異は、毛嚢の組織学的及び生理的要因に関連する可能性が考えられる。Grams らは、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて、新鮮なヒト頭皮の皮膚の異なる深さの毛嚢内における親油性モデル色素の拡散挙動を報告した³⁴⁾。なお、Grams らの論文中で蛍光強度の急速な増加が、皮膚の深さ 500 μm までで観察されている。また、分子量の小さな蛍光ラベルでは、2,000 μm よりも深い位置に達したが、4,000 μm の深さでは自発蛍光のみが観察されている。本報告から、CB 法を用いて得られた HF レ

プリカ法は、SC 除去皮膚表面から平均して約 175 μm の深さまでの HFs における薬物の分布を測定するのに有用であることと考えられた。

皮膚透過における *in vitro-in vivo* 相関 (IVIVC) は、医薬品製剤の開発期間の短縮や製剤の最適化、さらには皮膚に曝露される化学物質の安全性評価において非常に重要である。したがって、Trauer¹⁵⁾ら Blume-Peytavi²³⁾らによって報告されたように、HF ルートを介した薬物の速い吸収を推定するための実験法が必要であろう。著者らの予備実験では、*in vivo* 実験 (データは示していない) と比較して、モルモット摘出皮膚を用いた実験 (*in vitro* 実験) にて、毛嚢中薬物の劇的な減少が認められた。また、Patzelt らは、ヒト摘出皮膚を用いた *in vitro* 実験において、皮膚の摘出によって、毛嚢を取り巻く弾性繊維質の収縮が起こっている可能性を示唆した³⁵⁾。一方、彼らはまた、ブタ耳介皮膚の毛嚢内空間は、耳から皮膚を摘出した後も、毛嚢内空間は軟骨に固定されているため、変化せず一定のままであることを報告した³⁶⁾。

CAF 及び BR の毛嚢内への分布は、局所適用後 5 分以内に確認されたが、毛嚢プラグギング皮膚を用いた際には毛嚢分布が観察されなかった。さらに、薬物の極性に関わらず、適用後 5 分後には角層の浅い部分に分布が観察されており、毛嚢プラグギング皮膚を用いた実験と CB 法との組み合わせによって、毛嚢内への速い薬物の分布が確認されることがわかった。毛嚢から全身循環への薬物の

移行経路や吸収率はまだ明らかにされていないが、皮膚中濃度－時間プロファイルや皮膚中濃度－皮膚の深さプロファイルを取るように、薬物の適用時間における毛嚢中薬物濃度のプロファイルを取ることによって、良好な *IVIVC* モデルを構築できる可能性があることが明らかとなった。さらに、*in vitro* の実験は、薬物の局所適用による血中への速い移行を予測するために、毛嚢内薬物の速度論的モデルを得る目的で行われるべきであることも併せて明らかとなった。

本研究では、薬物の極性によらず HF 中の薬物分布が観察された。さらに、全適用薬物に対する HF 内の BR の分布比は、毛嚢内の CAF の分布比より高かった。特に、適用 5 分後の HF 内の BR 分布比は、CAF よりも約 260 倍高かった。皮脂腺から分泌される一次脂質成分は、トリグリセリド (~ 41%)、ワックスエステル (~ 26%)、スクワラン (~ 12%)、遊離脂肪酸 (~ 16%) であることがわかっている³⁷⁾。したがって、薬物と皮脂の相互作用は、薬物の毛嚢選択的なターゲティングの増加、あるいは、達成するための有望なツールとなる可能性がある。また、エマルションやリポソーム等の油性製剤は、薬物送達性を促進するのに使用されている³⁸⁾。さらに、スクロースやマンニトール等の親水性物質の経皮吸収速度は、HF 内の皮脂で覆われた皮膚では抑制されたとの報告がある³⁹⁾。これらの報告は、HF 内の BR と脂質の間の高い親和性が BR の HF へのより高い分配の理由と成り得ることを示唆している。

前述したように、総皮膚透過に対する HF ルートの寄与は、親水性薬物において高かった。SC 及び HF ルートを介した薬物拡散と SC への分配は、本実験では評価していない。しかし、毛嚢プラグギングしていない皮膚において、CAF は適用後 5 分以内で角層中に検出されたものの、毛嚢プラグギング皮膚を用いた際には、BR に比べてはるかに浅い SC 層で観察された。これらの結果は、全皮膚透過に対する HF ルートの寄与を推定するために適用することが出来るので、HF ルートの寄与を評価するための更なる実験を行うべきであると考ええる。

第5節 小括

本研究で実施した CB 法では、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 レプリカが得られた。本研究から、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を評価するために有用であることが明らかになった。さらに、CB 法を用いた実験結果から、親水性薬物よりも脂溶性薬物の方が、より短時間で HF に送達することが明らかとなった。薬物の HF ルートからの吸収における更なる研究は、毛嚢選択的な薬物送達の評価だけではなく、*IVIVC* のより良い理解や確立につながると考えられる。

第 2 章

角層及び毛嚢中薬物濃度に及ぼす塗擦の影響

局所皮膚適用製剤には効能・効果が同一である種々剤形がある。また、剤形ごとに塗布、塗擦、貼付と適用方法が異なり、これらの適用方法が薬物の皮膚透過性に影響を及ぼすことが知られている。たとえば、塗擦により薬物の皮膚透過性が増大することがすでにいくつかの研究グループより報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。したがって、塗擦による薬物の皮膚透過促進率の把握は、安全性や有効性に優れた皮膚適用製剤を開発する上でも重要となる。第 1 章より、CB 法は、毛嚢漏斗部の浅い部分から皮脂腺の近傍までの領域の薬物分布を評価する方法として有用であることが示唆された。また、CB 法により、皮膚適用薬物の皮膚移行性を角層経由と毛嚢内経由とに分けて評価することが可能となった⁴³⁾。

そこで本章では、薬物の毛嚢中薬物移行性に及ぼす塗擦方法の影響を把握し、毛嚢中薬物移行量を高めるための最適な塗擦方法を検討した。すなわち、モデル薬物として選択した CAF の水溶液皮膚適用後の皮膚透過性や皮内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。さらに、水溶性青色色素のエバンスブルー (EB) 水溶液または蛍光微粒子 (Fluoresbrite®) の塗擦時の皮内 (皮溝や毛嚢への移行) と毛嚢内薬物分布を光学顕微鏡及び共焦点レ

レーザー走査型顕微鏡（CLSM）を用いて観察した。以下、得られた結果を論述する。

第 1 節 実験方法

1.1. 試薬及び実験材料

Evans blue (EB) は東京化成工業（東京）、Fluoresbrite® Plain (YG) 0.05 Micron Microsphere (2.6 % Solid-Latex) は Polyscience, Inc. (Warrington, PA, 米国) から購入した。また、その他の試薬や材料は第 1 章に示したものと同一とした。

1.2. 実験試料

第 1 章と同様の入手先からブタ耳介試料を購入し、同一の処理を施した。

1.3. ドナー溶液の調製

CAF 100 mM になるように精製水に溶解させ、これをドナー溶液とした。

1.4. 塗擦方法

調製したドナー溶液を適用した後、ゴム手袋をした人差し指で約 30 秒間塗擦した（圧力：1.87-3.12 N/cm²）。塗擦の方向性は、円を描く塗擦、毛流れに沿う塗擦及び毛流れに逆らう塗擦を施した。なお、指（接触面積：約 0.79 cm²）で皮膚を擦るときの圧力は皮膚に加える重量（0.15-0.25 kg）から計算した⁴⁰⁾。

1.5. *n*-オクタノール／水分配係数測定法

第1章と同様の方法にて測定した。

1.6. 薬物の皮膚適用法

冷凍保存したブタ耳介は 32 °C の温水中にて解凍した。解凍後、ブタ耳介の皮膚表面を傷つけないよう丁寧に精製水で洗った。その後、水分をよく拭き取り、バリカンを用いて毛の長さが約 1.5 mm となるように剃毛した。なお、今回はブタ外耳部分の皮膚を用いた。表皮側に縦型拡散セルのドナーセル（有効透過面積：1.77 cm²）をアロンアルファ®ゼリー状（コニシ株式会社、大阪）を用いて貼り付けた。表皮側に 1.0 mL の精製水を適用し、1 時間水和した。水和後、精製水を回収し、ドナーセルを取り除き、表皮側にドナーセルと同じ面積にくり抜いたポリエチレンテレフタレートフィルムを貼り付け、本章 1.3. で調製した CAF 水溶液を 20 μL 適用し、適用開始直後に 1.4. の条件で、①円を描く塗擦処理を施したものを rubbing、②毛流れに沿う塗擦処理を施したものを toward hair flow、及び③毛流れに逆らう塗擦処理を施したものを against hair flow、塗擦処理を施していないものを control として実験を行った（なお

(Figure 9a-d) 。水和及び実験中、ブタ耳介皮膚は温度 32 °C、湿度 80 %に保ったインキュベーター（MCO-18AIC、三洋電機株式会社、大阪）内に 5 分間静置した。

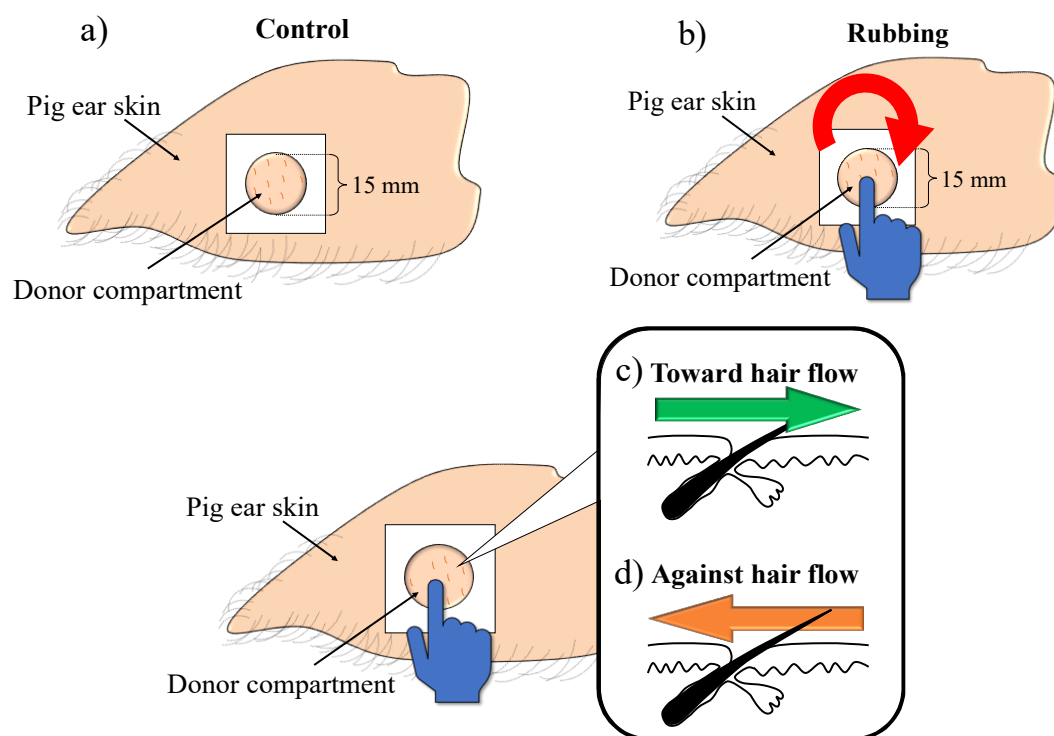


Fig. 9 Set-up for *in vitro* experiment control (a) , rubbing (b) , toward hair flow (c) and against hair flow (d) to evaluate drug disposition in skin.

1.7. TS 法

第 1 章 1.6.と同様の方法を用いた。

1.8. CB 法

第 1 章 1.7.と同様の方法を用いた。

1.9. *in vitro* 摘出皮膚透過性試験法

1.9.1. ブタ耳介皮膚の前処理方法

冷凍状態のブタ耳介皮膚を 32 °C の温水中にて解凍した。解凍後、ブタ耳介の皮膚表面を傷つけないよう丁寧に精製水で洗った。水分をよく拭き取り、バリカンとシェーバーを用いて剃毛した。その後、メスを用いてブタ耳介皮膚の外部皮膚を直径 2.8 cm の円形に切り取り、ハサミを用いて真皮側の脂肪を丁寧に取り除いたものを *in vitro* 皮膚透過実験に用いた。

1.9.2. ブタ耳介摘出皮膚を介した *in vitro* 皮膚透過実験

Figure 10 に本試験で用いた縦型拡散セルを示す。切り取ったブタ耳介摘出皮膚を 1 時間水和後、塗擦未処理は縦型拡散セル（有効透過面積：1.77 cm²）に装着し本章 1.3.で調製したドナー溶液 20 μL を適用した。また、各塗擦処理は本章 1.3.で調製した CAF 水溶液 20 μL を適用し、適用開始直後に本章 1.4.の条件で種々塗擦処理を施してから、縦型拡散セルに装着した。その後、真皮側に 6.0 mL の精製水を充填し、皮膚透過実験を 37 °C で 6 時間行った。実験中、真皮側のセ

ル内はマグネティックスターラーで常時攪拌した。経時的に真皮側から 0.5 mL 採取し、その都度同量の精製水を真皮側に補充した。なお、得られたサンプル溶液中の CAF 濃度は HPLC を用いて測定した。

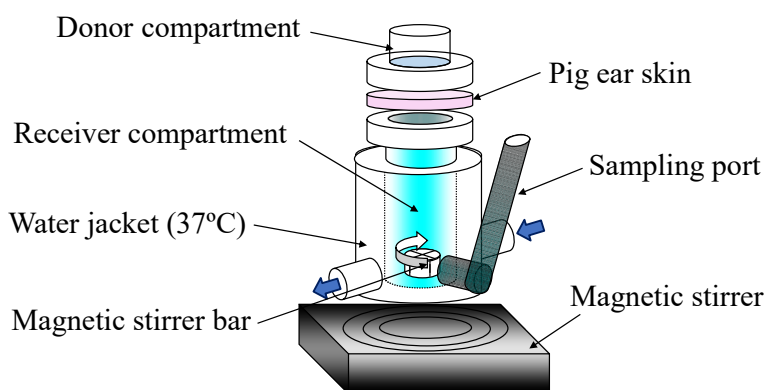


Fig. 10 Set-up of vertical type diffusion cell for *in vitro* skin permeation experiment.

1. 10. 薬物の定量方法

セロファンテープから抽出して得られたサンプル溶液またはブタ耳介摘出皮膚透過実験後に得られたサンプル溶液は、アセトニトリルと 1 : 1 の割合で混和した後、遠心分離器 (HimacCT15RE、日立工機株式会社、東京) で遠心分離 (21,500 × g、5 min、4 °C) し、サンプル中のタンパク及びテープ由来の夾雑物を沈殿させた。その上清を HPLC を用いて測定した。

1. 11. 皮内（皮溝や毛嚢への色素の移行）と毛嚢内の薬物分布の観察

1. 11. 1. ドナー調製方法

適量の EB を精製水に溶解させ、EB 水溶液を調製した。また、Fluoresbrite® Plain (YG) 0.05 Micron Microsphere (2.6 % Solid-Latex) はそのまま用いた。

1. 11. 2. 製剤適用方法

摘出皮膚の表皮側に縦型拡散セルのドナーセル（有効透過面積：1.77 cm²）をアロンアルファ®ゼリー状（コニシ株式会社、大阪）を用いて貼り付けた。表皮側に 1.0 mL の精製水を適用し、1 時間水和した。水和後、精製水を回収し、ドナーセルを取り除き、表皮側にドナーセルと同じ面積にくり抜いたポリエチレンテレフタレートフィルムを貼り付け、本章 1. 11. 1 で調製した EB 水溶液または Fluoresbrite®を 20 μL 適用し、適用開始直後に本章 1. 4. の条件で円を描く塗擦処理を施した（Rubbing）。水和及び実験中、ブタ耳介皮膚は温度 32 °C、湿度 80 %に保ったインキュベーター（MCO-18AIC、三洋電機株式会社、大阪）内に 5 分間静置した。

1.11.3. 光学顕微鏡による皮内（皮溝及び毛嚢）の色素分布

EB 適用群に関しては、ドナー溶液適用終了後の皮膚を 1.0 mL の精製水で表皮側を 3 回洗浄した。その後、第 1 章 1.6.と同様の方法を用いて TS 処理を 20 回施した。ドナー溶液適用前後、TS 処理 2 回後及び 20 回後の皮膚表面はデジタルマイクロスコープ（VHX-5000、株式会社 KEYENCE、大阪）を用いて観察した。

1.12. 統計処理

CAF の角層及び毛嚢への移行量の統計処理は、Tukey 検定にて行い危険率 5%未満を有意と判断した。

第 2 節 結果

2.1. 塗擦処理による薬物の角層及び毛嚢内分布の影響

Figure 11 に CAF 水溶液の角層内及び毛嚢内薬物移行量に及ぼす各塗擦処理の影響について示す。Figure 11a 及び 11b は CAF 水溶液適用 5 分後、Figure 11c 及び 11d は適用 120 分後の結果である。

角層内 CAF 移行量は、塗擦未処理と比較して、毛流れに逆らった塗擦及び毛流れに沿った塗擦処理を施すことで明らかに増大した。さらに、毛流れに逆らった塗擦処理を施した時の毛嚢内 CAF 移行量は、その他の塗擦方法と比較して有意に増大し、角層内よりも毛嚢内の方が塗擦処理の有無による薬物移行量の差が顕著に現れた。なお、塗擦処理による角層内及び毛嚢内への CAF 移行量の増大は、適用 5 分後の方が適用 120 分後よりもその傾向が顕著であった。

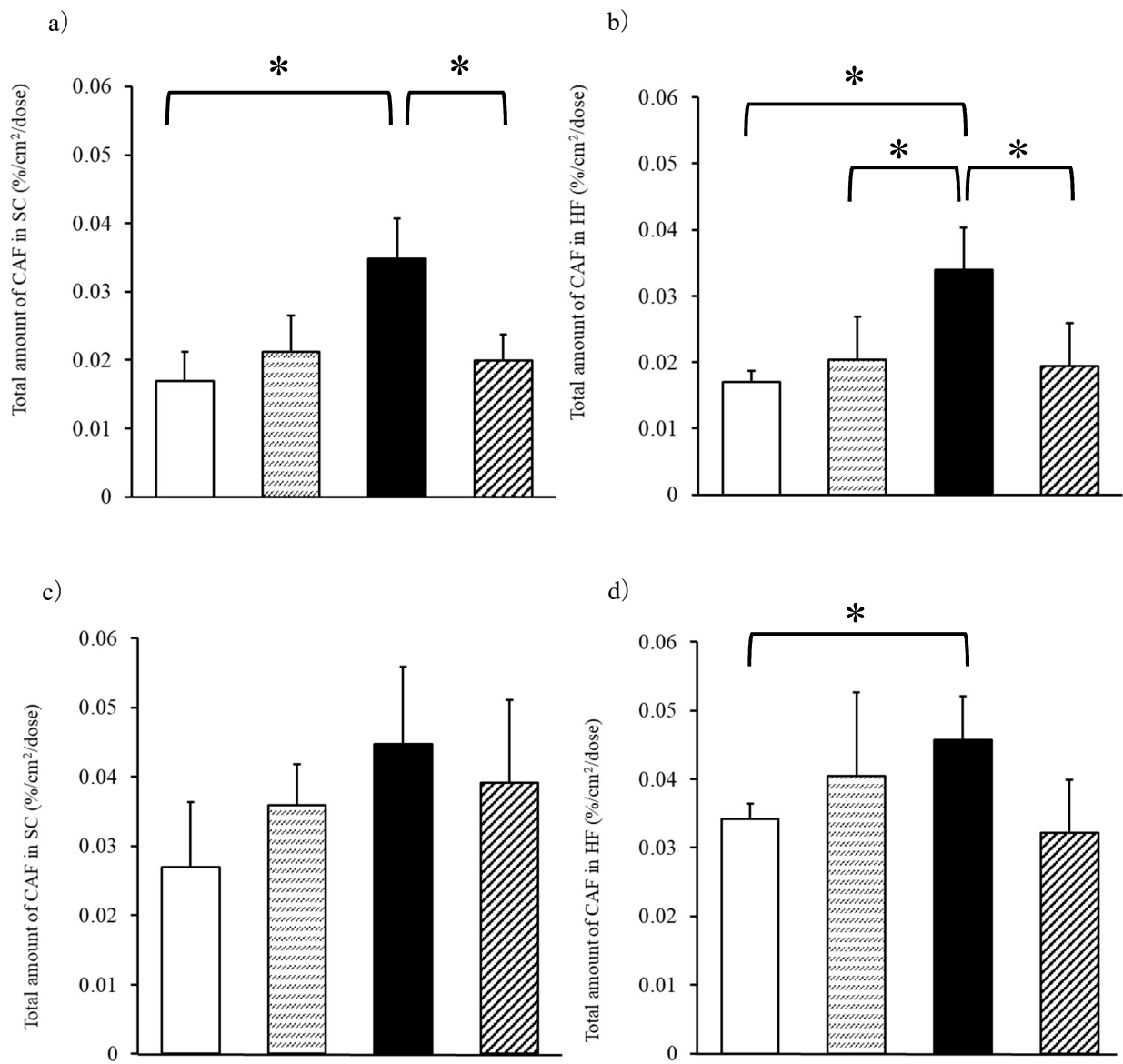


Fig. 11. Effect of rubbing on the CAF distribution in the SC (a, c) and HF (b, d) 5 and 120 min after application.

Control (□), Rubbing (▨), Against hair flow (■) and Toward hair flow (▩). Each value shows the mean ± S.D. (n=3) * represents statistical significance (p < 0.05).

2.2. 塗擦処理による薬物の角層内深さ分布の影響

Figure 12 に CAF の角層内の深さ方向への分布に及ぼす塗擦処理の影響を示す。毛流れに逆らった塗擦処理によって、テープストリッピング 10 枚未満の角層の比較的浅い層での CAF の分布が増大する傾向があることが明らかとなった。

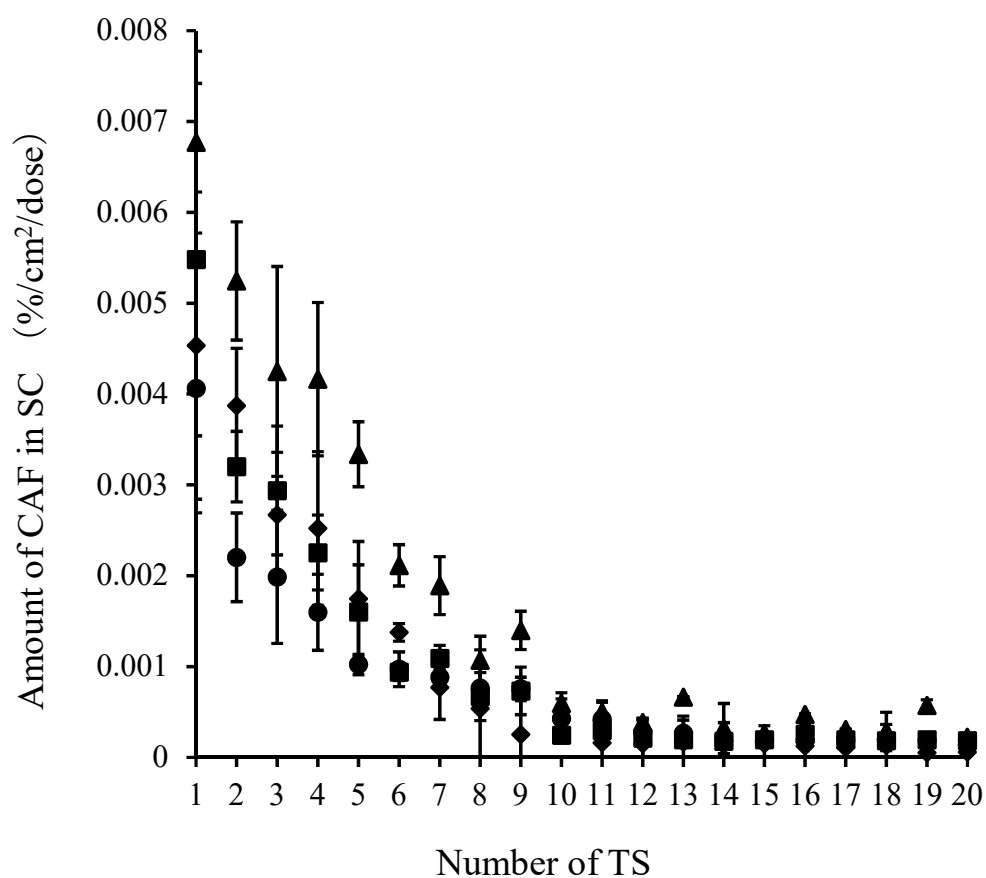


Fig. 12. CAF distribution-depth profile in the SC. The X-axis shows the number of times tape stripping was applied. Control (●), Rubbing (■), Against hair flow (▲) and Toward hair flow (◆). Each value shows the mean \pm S.D. (n=3).

2.3. 塗擦塗布による薬物の皮膚透過量の影響

Figure 13 に各塗擦処理による CAF 水溶液の *in vitro* 皮膚透過性に及ぼす各塗擦処理の影響について示す。毛流れに逆らい塗擦適用することで、CAF の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大した。塗擦未処理、毛流れに沿った塗擦、円を描く塗擦または毛流れに逆らった塗擦を施すことで、6 時間後の CAF 透過量は、それぞれ 2.4、4.0、4.6 及び 7.2 %/cm²/dose となった。

この結果と本章 2.1. の塗擦の方向性が及ぼす角層内及び毛嚢内移行性を評価した結果を比べると大小関係が一致した。また、6 時間後の CAF の透過量を比較すると、毛流れに逆らった塗擦処理皮膚では、塗擦未処理と比較しておよそ 3 倍高かった。注目すべきことに、毛流れに逆らった塗擦と塗擦未処理時の CAF 透過量を適用後 45 分、1 時間、1.5 時間、2 時間で比較すると、それぞれ 68 倍、30 倍、13 倍、7 倍となり、時間の経過とともに透過量の差が小さくなることが明らかとなった。

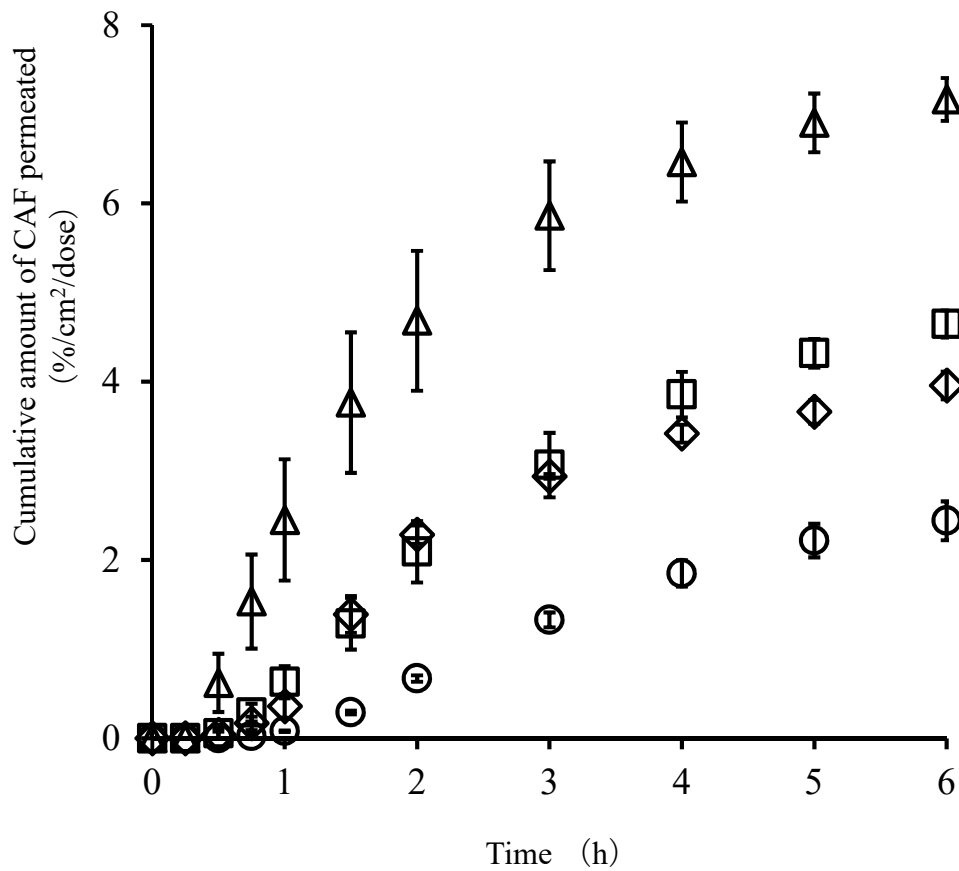


Fig. 13. Time course of cumulative amount of CAF with or without rubbing. Control (○), Rubbing (□), Against hair flow (△), and Toward hair flow (◇). Each value shows the mean \pm S.D. (n=3).

Figure 14 に透過試験終了後の皮膚表面の観察画像を示す。塗擦未処理 (Figure 14a) では、皮膚表面に析出した CAF の結晶が多く確認できた。一方で、塗擦処理した皮膚 (Figure 14b) では析出した結晶の量はわずかであった。

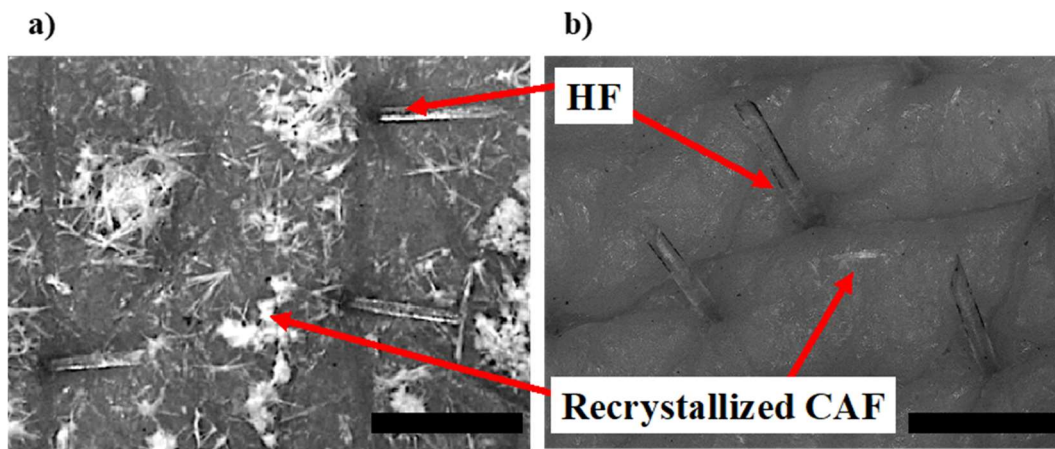


Fig. 14 Distribution of recrystallized CAF on porcine skin surface after permeation experiment. Without rubbing (a) and with rubbing (b) . White color means distribution of recrystallized CAF. HF: hair follicle. Bar: 1,000 μm .

2.4. 皮膚表面への薬物分布

皮膚表面への薬物の分布の様子を可視化するため、Figure 15 に皮膚適用した青色色素 (EB) の皮膚表面分布に及ぼす塗擦処理の影響について示す。EB 適用 5 分後の写真を比較すると、毛流れに沿った塗擦 (Figure 15b) よりも毛流れに逆らった塗擦 (Figure 15f) にて毛嚢開口部及び皮溝に EB が集積することが明らかとなった。さらに、毛流れに逆らって塗擦した場合は、2 回 (Figure 15c, g) 及び 20 回 (Figure 15d, h) の TS 処理後の皮膚表面画像から明らかなように、毛流れに沿った場合と比べて皮溝及び毛嚢開口部により多くの EB が残留している様子が観察された。ここで、CAF 水溶液を皮膚に適用後、毛流れに逆らう方向で塗擦した場合に、CAF の角層内及び毛嚢内移行性が向上した結果は、CAF が

皮溝及び毛嚢開口部に集積したためと推察される。また、このような分布が CAF の皮膚透過に関係している可能性も示唆されると考えられた。

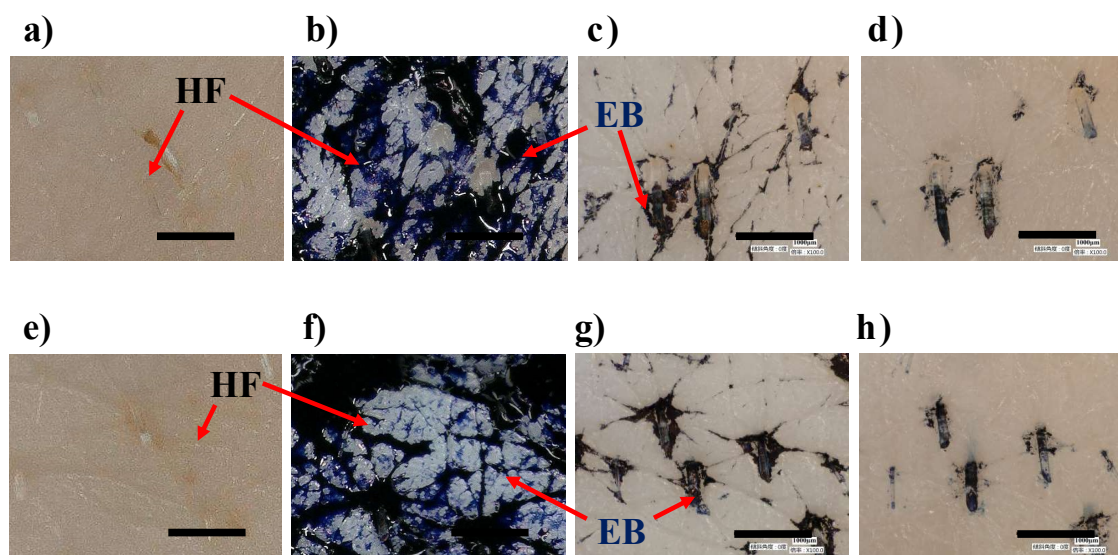


Fig. 15 Distribution of stained solution on porcine skin surface. Rubbing with toward hair flow (a-d) and rubbing with against hair flow (e-h) . Before application (a, e) and 5 min after application of dye (b, f) . Dye distribution on the skin surface after 2nd times tape-stripping (c, g) and 20th times tape-stripping (d, h) . HF: hair follicle, EB: Evans blue. Bar: 1,000 μm .

2. 5. 塗擦処理による皮膚適用した蛍光微粒子の皮内分布

皮膚表面及び毛嚢内への薬物の移行を視覚的に評価するため、蛍光微粒子 (Fluoresbrite®) を用いて、塗擦処理により皮膚適用した際の蛍光微粒子の皮内分布を観察した。Figure 16a に塗擦未処理、Figure 16b に毛流れに逆らった塗擦、Figure 16c に毛流れに沿った塗擦、Figure 16d に円を描く塗擦処理を施し Fluoresbrite®5 分間適用後の皮内 confocal laser scanning microscopy (CLSM) 観察

画像を示す。その結果、塗擦未処理では、角層及び毛嚢開口部付近に Fluoresbrite®由来の蛍光はほとんど確認できなかった (Figure 16a)。また、毛流れに沿った塗擦処理では、塗擦未処理と比較するとやや Fluoresbrite®由来の蛍光が確認できたものの蛍光強度は低かった (Figure 16c)。一方、毛流れ逆らった塗擦処理を施すことで、角層及び毛嚢開口部より深部に Fluoresbrite®由来の蛍光が強く確認できた (Figure 16b)。また、円を描く塗擦処理では角層及び毛嚢内に強い Fluoresbrite®由来の蛍光と弱い蛍光が混在して確認された。なお、円を描く塗擦は時計回りに塗擦したので、ある部分は毛流れに沿い、ある部分は毛流れに逆らった塗擦が施されているため、強弱が異なる Fluoresbrite®由来の蛍光が同一の皮膚サンプルで確認されたと考えられた (Figure 16d)。

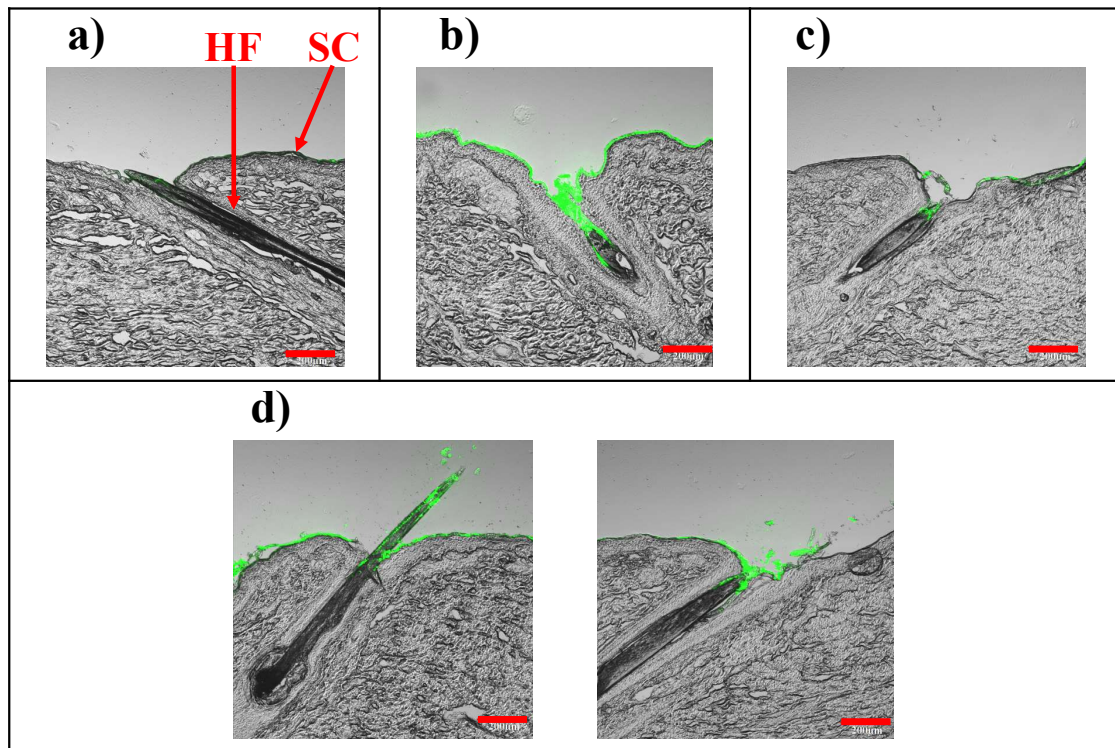


Fig. 16 CLSM images of porcine ear skin after application Fluoresbrite® without or with rubbing. Control (a) , against hair flow (b) , toward hair flow (c) , and rubbing (d) . Green color means distribution of fluorescent for Fluoresbrite®. HF: hair follicle, SC: stratum corneum. Bar: 200 μm.

第 3 節 考察

薬物の皮膚透過性に及ぼす塗擦の影響は、既にいくつかの研究成果が報告されている⁴⁰⁻⁴²⁾。当研究室では、トリアムシノロンアセトニド (TA) を含有する油性軟膏を皮膚に塗擦塗布することによって、TA の皮膚透過性が向上することを見出しており、その理由の一つとして、塗擦による皮膚の膜抵抗の減少が挙げられている⁴⁰⁾。また、塗擦の強さ、時間、適用する製剤の量によっても皮膚透過性が変化すると考えられる。Nguyen らは、2 %サリチル酸含有ゲルをブタ耳介皮膚に塗擦塗布する際に、ガラス棒、レオメーター、指にて塗布した際のサリチル酸の皮膚透過性を調べた。その結果、指にて塗擦塗布した際に他の塗布方法と比べて、サリチル酸の皮膚透過量が最も大きかった⁴¹⁾。また、Hasler-Nguyen と Fotopoulos は、ジクロフェナクジエチルアミンを 1.16 % 含むゲルを 45 秒間塗擦塗布することによって、適用 8 時間後までのジクロフェナクジエチルアミンの皮膚透過速度が 5 倍高くなったものの、24 時間後の累積皮膚透過量は塗擦をせず適用した場合と差がないことを報告した⁴²⁾。これらの結果は、塗擦の操作をすることによって、薬物の皮膚透過速度を高める効果あることを示している。しかしながら、塗擦による薬物の角層内、あるいは、毛嚢内への分布を確認した研究例はほとんどなく、さらには、毛流れに対

する塗擦の方向と薬物の皮膚組織内への分布や皮膚透過性に関して研究した例はない。

本論文第1章では、CB法の最適化を行い、ブタ耳介皮膚に水溶性薬物のCAF及び脂溶性薬物のBRを適用した際の各薬物の毛嚢内への分布を評価した。そして本章では、TS法及びCB法を用いて、薬物の角層内及び毛嚢内への移行に及ぼす塗擦塗布の影響、さらには、毛流れに対する塗擦の方向の影響を調べた。CAFの角層内移行量は、毛流れに逆らう方向で塗擦塗布することによって、他の塗擦条件と比較して明らかに増大した。さらに、毛嚢内移行量についても、毛流れに逆らう方向で塗擦塗布することによって、他の塗擦条件と比較して明らかに増大し、その傾向は角層内移行量よりも顕著であった。TS法によって、皮膚表面や毛嚢開口部の浅い部分に存在するCAFも回収されている可能性がある。一方、CB法では角層を除く皮膚表面からおよそ175 µmの深さの薬物を回収できることが分かっている⁴⁴⁾。したがって、毛流れに逆らう塗擦塗布によって、CAFがより毛嚢深部に移行したと推察される。さらに、毛流れに逆らう塗擦塗布によって、塗擦なしと比較して、適用6時間後までのCAFの累積皮膚透過量が3倍程度増大した (Figure 13)。Ishiiらは、TAを含有した軟膏剤の塗擦塗布により、TAの皮膚透過性が増大した理由として、塗擦による薬物あるいは製剤の角層への分布が増大したこと、また、皮膚の電気抵抗値が減少したことを報告し

ている⁴⁰⁾。また、Nguyenらは、他の塗擦方法と比較して、指による塗擦の際に薬物の皮膚透過性が増大した理由として、指で塗擦塗布することで、ガラス棒やレオメーターと比較して、ゲルが皮膚上で均一に広がり、皮膚とゲルとの親和性をもっとも高かったためと考察している⁴¹⁾。また、さらに強く塗擦することによって、皮膚の角層構造が破壊され、薬物の皮膚透過性が高まる可能性があるとも報告している⁴¹⁾。

本研究では、毛流れに逆らって塗擦塗布することによって、皮溝や毛嚢により多くの製剤が分布している様子が観察された。さらに、2回もしくは20回のテープストリッピング後の皮膚状態の観察においても、毛流れに逆らって塗擦塗布した場合には、毛嚢内にやや色濃くEBが分布していることが分かった (Figures 15, 16)。このことより、塗擦によるCAFの皮溝や毛嚢への分布が皮膚透過性の増大に寄与している可能性が示唆された。

CAFの皮膚透過性の増大は、CAFの適用5分後から120分後までの角層内及び毛嚢内への移行量が増大していることも要因として考えられる。一方で、塗擦処理を施すことで、CAFの角層内、毛嚢内移行量、皮膚透過量のいずれも増大したものの、塗擦による皮膚透過促進の効果に対し角層及び毛嚢内薬物移行促進の効果は小さい。特に、毛流れに逆らう塗擦を施した際にその傾向が顕著であった (Figure 17)。Figure 16より、毛流れに逆らう塗擦ではCB法で回収不

可能な深さまで CAF が送達されたため、皮膚透過促進効果に対し毛嚢内薬物移行促進の効果は小さいと推察される。

また、製剤粘度の増大は、塗擦による皮膚透過性の増大に寄与すると考えられる。Mathes らは、ナノパーティクルの局所適用の際の毛嚢への移行について、ナノパーティクルの分散液とゲルについて比較検討している⁴²⁾。さらに、Nathalie らは、ジクロフェナクジエチルアミンの 1.16%ゲルをヒト摘出皮膚に塗擦塗布することによって、適用 8 時間後までのジクロフェナクの皮膚透過速度が 5 倍向上すると報告している⁴³⁾。

以上のことを考えると、塗擦塗布による薬物の経皮吸収性の評価においては、薬物の物理化学的特性のみならず、製剤の極性、粘度、融点等の製剤物性の影響も検討する必要があると思われる。

第 4 節 小括

本章では、水溶性薬物の CAF 水溶液の皮膚適用後の皮膚透過性や皮内動態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や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、水溶性青色色素の EB 水溶液または蛍光微粒子 (Fluoresbrite®) を用いて光学顕微鏡及び CLSM にて皮内 (皮溝や毛嚢への移行) と毛嚢内薬物分布を観察した結果、毛流れに逆らって塗擦することによって薬物が角層、皮溝や毛嚢開口部により多く集積することがわかった。これらのことから、塗擦によって毛嚢内への薬物の移行が増大することが明らかとなった。

第 3 章

角層及び毛嚢内分布に及ぼす製剤物性の影響

前章では、CAF をモデル薬物として配合した水溶液にて、塗擦処理の角層及び毛嚢中薬物濃度への影響を評価し、毛流れに逆らう方向で塗擦することによって、適用後短時間の角層及び毛嚢中濃度だけでなく皮膚透過量も増大することを明らかにした。医薬品、医薬部外品、化粧品には、軟膏剤やクリーム剤があり、これらの実使用においては、皮膚表面で擦り込んで使用することもあり、擦り込み適用が薬物の皮膚透過性に影響を及ぼす可能性がある。

本章では、塗擦処理による薬物の皮内濃度や皮膚透過量への影響を前章の水溶液から粘性を有するハイドロゲルに拡張して検討することとした。すなわち、各種増粘剤を配合したハイドロゲルの粘度や薬物放出性を評価するとともに、塗擦処理した際の角層及び毛嚢中薬物濃度、皮膚透過量を評価することによって、ハイドロゲルの物性と塗擦処理の影響を明らかにすることとした。

第 1 節 実験方法

1.1. 試薬及び実験材料

ヒドロキシプロピルセルロース M グレード (HPC-M) 及び H グレード (HPC-H) は日本曹達株式会社 (東京) から購入した。透析膜は、富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。また、その他の試薬や材料は第 1 章及び第 2 章に示したものと同一とした。

1.2. *n*-オクタノール／水分配係数測定法

第 1 章と同様の方法にて測定した。

1.3. 製剤の調製

ビーカーに 32 °C の精製水を加え、さらに 2 % CAF 水溶液となるよう CAF を加え、攪拌し溶解した。CAF 水溶液を 70 °C に加温し、HPC-M を 3 %、5 %、HPC-H を 5 %、7 % 及び 10 % となるように加え、HPC が均一に膨潤するまで攪拌した。その後、常温で放置し、各種 CAF 含有ハイドロゲルを得た。

1.4. 製剤の粘度測定法

回転粘度計（R215、東機産業）を用いて各種ハイドロゲルの粘度を測定した。なお、回転数は 0.1 rpm にて測定した。

1.5. 薬物放出試験法

Figure 16 に本試験で用いた縦型拡散セルを示す。切り取った透析膜を 1 時間水和後、縦型拡散セル（有効透過面積：1.77 cm²）に装着し本章 1.3 で調製したドナー製剤（各種ハイドロゲル）1.0 mL を適用した。その後、レシーバーセルに 6.0 mL の pH7.4 リン酸緩衝液を充填し、薬物放出試験を 32 °C で 8 時間行った。実験中、レシーバー側のセル内はマグネティックスターラーで常時攪拌した。経時的にレシーバー側から 0.5 mL 採取し、その都度同量の精製水をレシーバー側に補充した。なお、得られたサンプル溶液中の CAF 濃度は HPLC を用いて測定した。

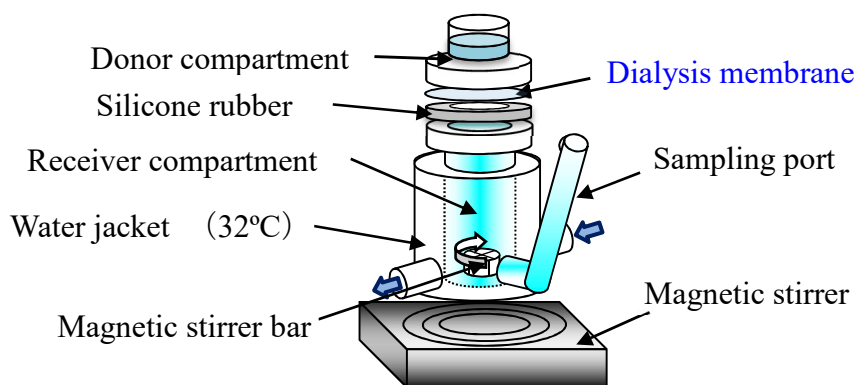


Fig. 16 Set-up of vertical type diffusion cell for *in vitro* drug release experiment.

1.6. TS 法

第1章 1.6.と同様の方法を用いた。

1.7. CB 法

第1章 1.7.と同様の方法を用いた。

1.8. *In vitro* 摘出皮膚透過性試験法

第2章 1.9 と同様の方法にて行った。

第 2 節 結果

2.1. 各種ハイドロゲルの粘度

Table 3 に各種ハイドロゲルの粘度測定結果（実測値及び対数值）を示す。

ハイドロゲルの粘度は、HPC-M 及び HPC-H とともに配合量の増加に伴い値が上昇した。なお、同濃度（5 %）添加して調製した HPC-H ハイドロゲルの粘度は、HPC-M ハイドロゲルより 18 倍高い値であった。

Table 3 Viscosity of HPC hydrogels

HPC 添加量	粘度 (mPa·s)	log 粘度
3 % HPC-M	150.07	2.18
5 % HPC-M	1,163.06	3.07
5 % HPC-H	21,110.20	4.32
7 % HPC-H	514,622.00	5.71
10 % HPC-H	3,926,884.00	6.59

2.2. 各種ハイドロゲルからの CAF の放出性

Figure 17 に各種ハイドロゲル（3 % HPC-M、5 % HPC-M、5 % HPC-H 及び 10 % HPC-H）からの CAF の放出性を示す。試験開始 8 時間後の 3% HPC-M、5% HPC-

M、5 % HPC-H 及び 10 %HPC-H からの CAF の累積放出量は、それぞれ、8,174 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、7,406 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、6,837 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 及び 5,629 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、添加した高分子の濃度及びハイドロゲルの粘度の増大に伴い、試験 8 時間後の CAF の累積放出量が低下することが明らかとなった。

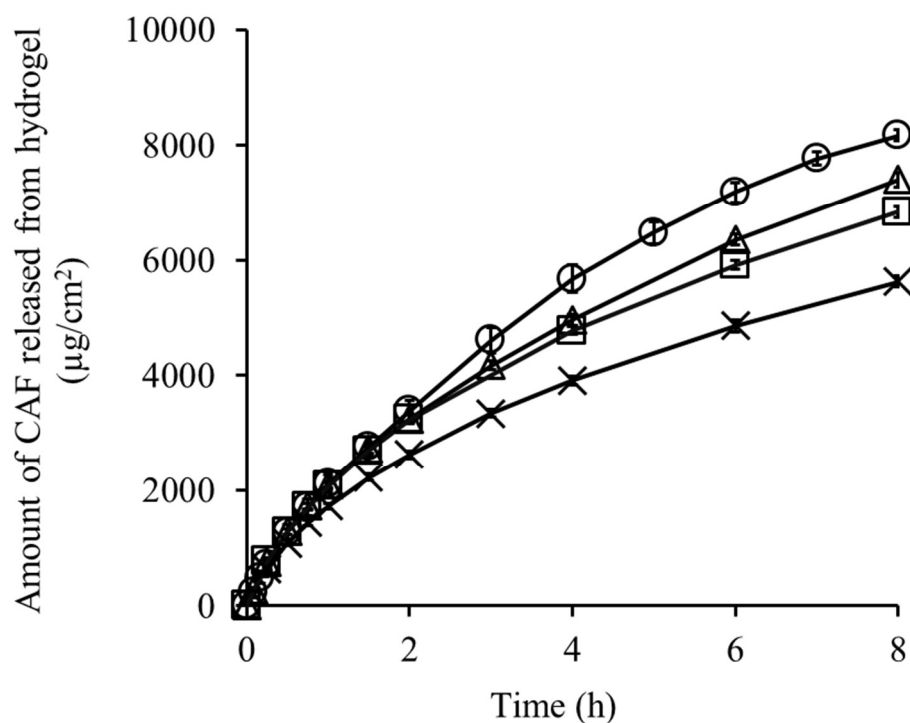


Fig. 17. Time course of cumulative amount of CAF. 3 % HPC-M (○) , 5 % HPC-M (△) , 5 % HPC-H (□) and 10 % HPC-H (×) . Each value shows the mean \pm S.D. (n=4) .

また、Figure 18 に各種ハイドロゲルの粘度（対数）と 8 時間目の CAF の累積放出量との関係を示す。粘度の対数と CAF の累積放出量との間に良好な負の相関が認められた。

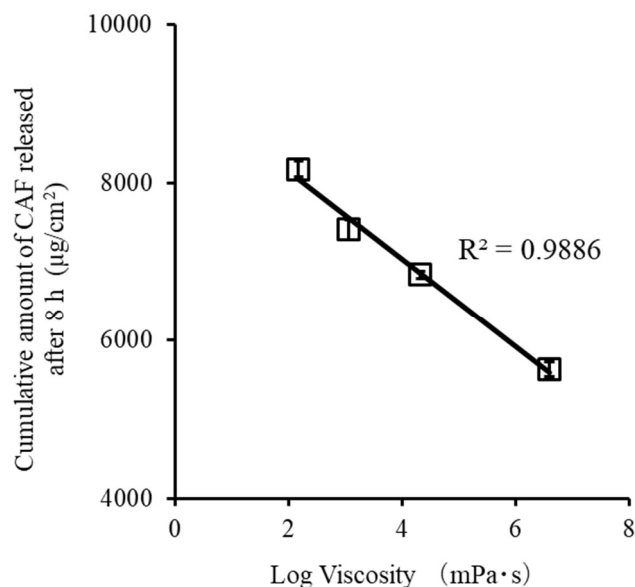


Fig. 18. Relations of viscosity and cumulative amount of CAF.

2.3. 塗擦処理による薬物の角層及び毛嚢内濃度の影響

次に、塗擦処理による薬物の角層及び毛嚢移行性の変化における製剤粘度の影響を調べるため、調製したハイドロゲルのうち、最も粘度が高い 10% HPC-H ゲルを用いて水溶液と比較した。なお、Figure 19 に CAF 水溶液及び CAF 配合 10% HPC-H ゲルの角層内及び毛嚢内薬物移行量に及ぼす塗擦処理の影響について示す。Figure 19a 及び 19b は CAF の角層及び毛嚢内量をそれぞれ示す。本研究での塗擦は円を描くように塗擦した。その結果、10% HPC-H ゲルの角層内 CAF 移行量は、水溶液と同様に塗擦未処理と比較して増大した。また、毛嚢内 CAF

移行量についても、水溶液と同様に増大した。なお、塗擦処理の有無に関わらず、角層及び毛嚢内 CAF 量はいずれも、10 % HPC-H ゲルの方が水溶液よりも高い値であった。

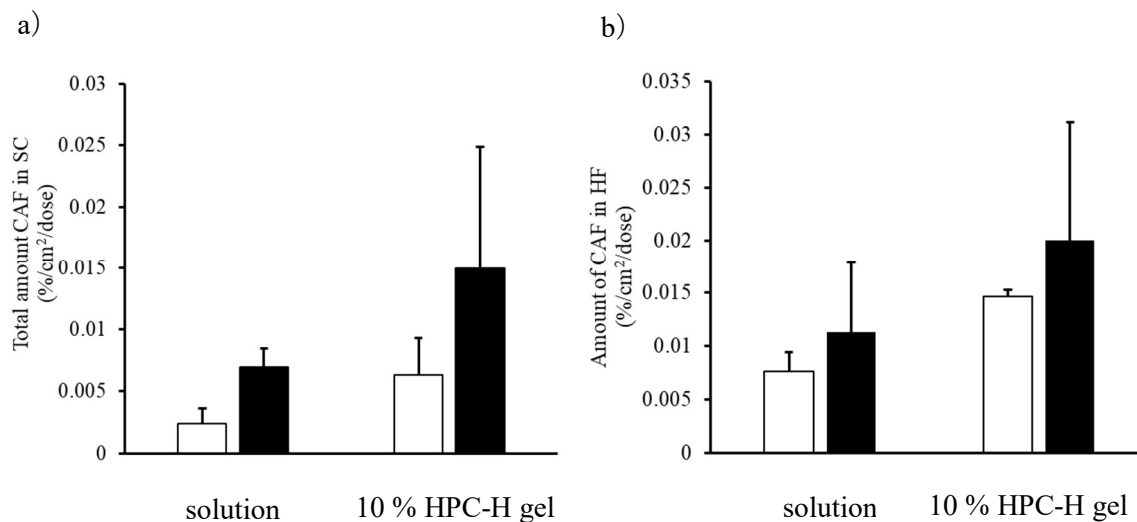


Fig. 19. Effect of rubbing on the CAF distribution in the SC (a) and HF (b) 5 min after application of solution or 10 % HPC-H gel. without rubbing (□) and with rubbing (■) . Each value shows the mean \pm S.D. (n=3) .

2. 4. 塗擦処理による薬物の皮膚透過量の影響

Figure 20 に CAF 水溶液及び各種 CAF 配合ハイドロゲルを用いた CAF の皮膚透過性に対する塗擦処理の影響を示す。3 % HPC-M、5 % HPC-M、5 % HPC-H 及び 10 % HPC-H のいずれのハイドロゲルについても、水溶液と同様に、塗擦処理によって CAF の皮膚透過性は向上した。

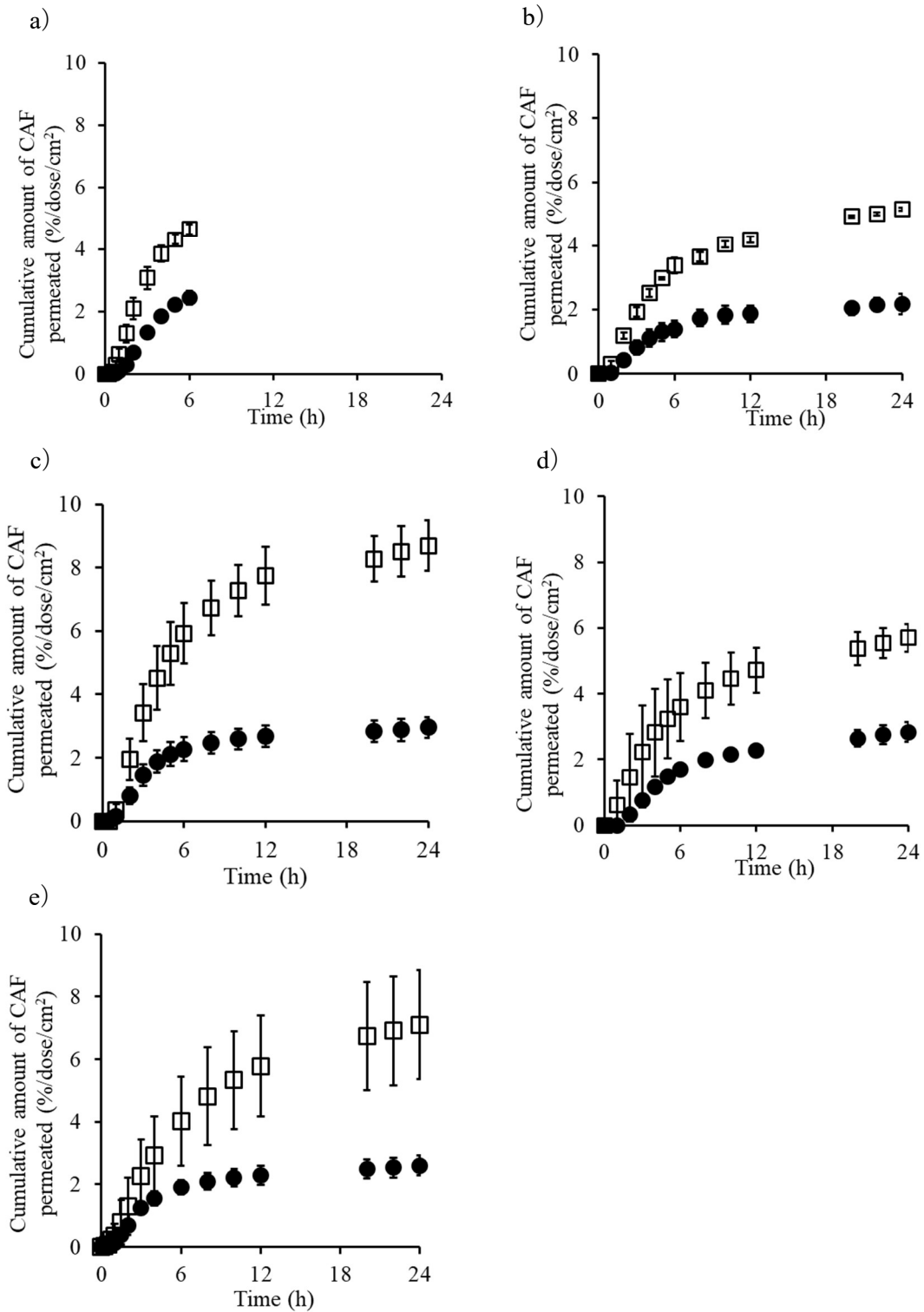


Fig. 20. Time course of cumulative amount of CAF permeated. with rubbing (□) and without rubbing (●). solution (a) , 3% HPC-M (b) , 5% HPC-M (c) , 5% HPC-H (d) and 10% HPC-H (e). Each value shows the mean \pm S.D. (n=4).

また、Figure 21 に各種ハイドロゲルの粘度の対数と CAF の累積透過量を示す。3 % HPC-M、5 % HPC-M、5 % HPC-H 及び 10 % HPC-H の 6 時間目の累積透過量は、それぞれ、 $11.13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $15.09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $18.69 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 及び $14.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、5 % HPC-H で最も高い値であった。さらに、塗擦処理なしに対する塗擦処理ありの累積透過量の比は、それぞれ、1.87 倍、1.93 倍、2.01 倍及び 1.70 倍であり、5 % HPC-H で最大であった。

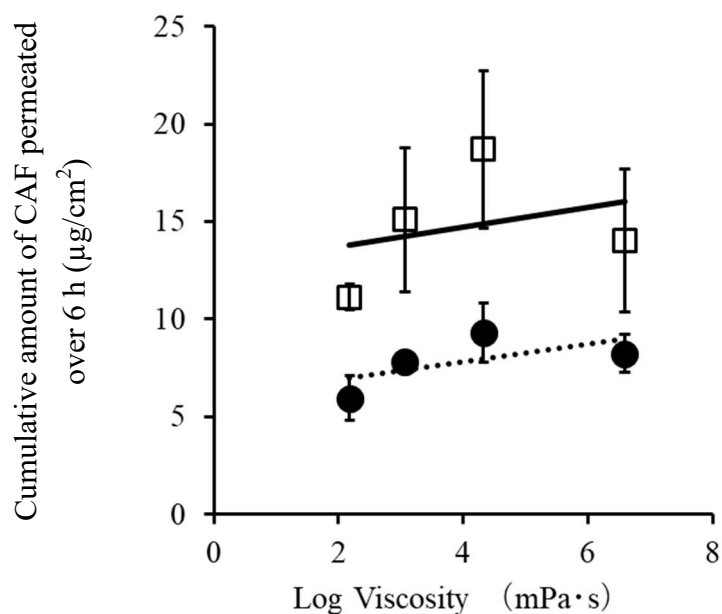


Fig. 21. Relations of viscosity and cumulative amount of CAF. With rubbing circular (□) Without rubbing (●) Each point shows the mean \pm S.D. (n=4) .

第 3 節 考察

第 3 章では、角質及び毛嚢中薬物濃度に及ぼす製剤物性の影響、さらには、塗擦処理による影響について検討した。モデル製剤としては、製剤物性として粘度の異なる製剤が調製しやすいこと、また、第 2 章までに評価してきた水溶液とも比較評価できるようハイドロゲルを選定した。Figure 17 及び Figure 18 より、ハイドロゲルの粘度の増大に伴い、ハイドロゲルからの CAF の累積放出量が低下したため、一般的に報告されている通り、製剤粘度の上昇により基剤からの薬物放出性が低下したものと考えられた。

塗擦処理による薬物の角層及び毛嚢移行性の増大に対する製剤粘度の影響を調べるため、調製したハイドロゲルのうち、最も粘度が高い 10 % HPC-H ゲルを用いて水溶液と比較した。その結果、10 % HPC-H ゲル適用時の角層内 CAF 移行量は、水溶液適用時と同様に塗擦未処理と比較して増大した (Figure 19a)。さらに、毛嚢内 CAF 移行量についても、水溶液と同様に増大した (Figure 19b)。なお、塗擦処理の有無に関わらず、角層及び毛嚢内 CAF 量はいずれも、10 % HPC-H ゲルの方が水溶液よりも高い値であった。本章では、ハイドロゲルについて薬物の皮膚上や毛嚢内への分布を視覚的に確認できていないが、水溶液での結果と同様に、塗擦処理によって薬物の皮溝や毛嚢への移行が促進されたと推察している。水溶液は粘度が低いため、皮膚適用時にはピペットで滴下するだ

けで皮膚上に広がったが、ハイドロゲル製剤は粘度が高いため、スパーテルで皮膚上に塗り広げる必要があった。このような操作によって、塗擦処理なしの場合でも角層及び毛嚢内 CAF 量が水溶液に比べて高い値を示したと推測された。

各種ハイドロゲル適用時における CAF の皮膚透過性は、Figure 20 及び Figure 21 に示す通り、塗擦処理をしない場合は、CAF の累積透過量は同程度であったが、塗擦処理を行った場合は、中間的な粘度のハイドロゲルを適用した際に最も高い皮膚透過性を示した。第 2 章において、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と述べたが、ハイドロゲルの粘度が増大するにつれて、塗擦により物理的に皮溝や毛嚢へハイドロゲル製剤をさらに移行させることができると予測された。一方で、製剤粘度の増大に伴い、製剤からの薬物放出性は低下する傾向が認められた。また、これらのことが、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原因と推察した。また、角層や毛嚢中においても累積透過量と同様に、CAF 濃度を最大化するハイドロゲルの至適粘度が存在する可能性が示唆された。

第 4 節 小括

本章では、皮膚への製剤適用時の塗擦処理による角層及び毛嚢内への薬物移行の影響を、第 2 章で用いた水溶液から粘性のあるハイドロゲルに拡張し、塗擦処理による製剤粘度の影響を調べた。

各種ハイドロゲルの製剤粘度と薬物放出性、皮膚透過性を評価するとともに、ハイドロゲル適用時の塗擦処理による角層及び毛嚢移行性及び皮膚透過性向上への影響について検討した。その結果、ハイドロゲルの粘度の増大に伴いハイドロゲルからの CAF の放出性は低下した。また、10 % HPC-H ゲルの角層及び毛嚢内 CAF 移行量は、いずれも水溶液と同様に、塗擦未処理と比較して増大した。さらに、CAF の皮膚透過性は、塗擦処理によりいずれのハイドロゲルについても向上したが、中間的な粘度のハイドロゲルにおいて累積透過量が最大となった。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は低下するため、ハイドロゲルの塗擦処理による皮膚透過性に対する粘度プロファイルに極大が認められたと推察された。ハイドロゲルからの CAF の放出速度、CAF の角層及び毛嚢内移行速度、さらには皮膚透過速度との大小関係から薬物移行の律速段階を特定するような速度論的解析を行ってハイドロゲル

からの薬物放出から皮膚透過までの過程について詳細な考察をする必要があ
ろう。

結論

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、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。また、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CAFよりも脂溶性薬物であるBRの方がより短時間で多くの量がHFに送達す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。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た。これらのことから、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、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は低下するため、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、毛嚢中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。これらの実験結果を体系的にまとめ、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する。

謝辞

本研究に際し、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬科学専攻薬粧品動態制御学講座教授 杉林 堅次 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり終始有益な御指導、御助言ならびに激励を賜りました城西大学薬粧品動態制御学講座准教授 藤堂 浩明 先生に深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり有益な御指導、御助言を賜りました城西大学薬学研究科薬品物理化学講座教授 関 俊暢 先生及び城西大学薬学研究科食品機能学講座教授 真野 博 先生に心から深謝致します。

本学位論文の審査を頂きました城西大学薬学研究科皮膚生理学講座教授 徳留 嘉寛 先生、城西大学薬学研究科製剤学講座教授 夏目 秀視 先生、城西大学薬学研究科病院薬剤学講座 上田 秀雄 先生に御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました大正製薬株式会社 上原 明 会長、上原 茂 社長、上原 健 副社長、同社セルフメディケーション研究開発本部 高橋 伊津美 取締役常務執行役員、高橋 健三 執行役員セルフメディケーション研究開発本部長に深甚なる感謝の意を表します。

最後に、本研究の実施にご協力頂きました、齋藤 美幸氏（現株式会社マンダム）、佐藤 千尋氏（現株式会社ダイゾー）、城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座 鈴木 宏宙氏をはじめとする関係諸氏に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Naik A., Kalia Y. N., Guy R. H., Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **3**, 318-326 (2000) .
- 2) Han J. H., Kwon O. S., Chung J. H., Cho K. H., Eun H. C., Kim K. H., Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle, *J. Dermatol. Sci.*, **34**, 91-98 (2004) .
- 3) Shapiro J., Safety of topical minoxidil solution: A One-Year, Prospective, Observational Study, *J. Cutan. Med. Surg.*, **7**, 322-329 (2003) .
- 4) Kurbel S., Kurbel B., Zani'c-Matani'c D., Minoxidil and male-pattern alopecia: A potential role for a local regulator of sebum secretion with vasoconstrictive effects?, *Med. Hypotheses*, **53**, 402-406 (1999) .
- 5) Shorter K., Farjo N. P., Picksley S. M., Randall V. A., Human hair follicles contain two forms of ATP-sensitive potassium channels, only one of which is sensitive to minoxidil, *FASEB J.*, **22**, 1725-1736 (2008) .
- 6) Buhl A., Waldon D. J., Baker C. A., Johnson G. A., Minoxidil sulfate is the active metabolite that stimulates hair follicles, *J. Invest. Dermatol.*, **95**, 553-557 (1990) .
- 7) 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, 厚労省 (2003) . [http://www.nihs.go.jp/drug/be-guide/GL061124_hifu.pdf.]

- 8) Kiistala U., Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis, *J. Invest. Dermatol.*, **50**, 129-137 (1968) .
- 9) Surber C., Wilhelm K. P., Bermann D., Maibach H. I., *In vivo* skin penetration of acitretin in volunteers using three sampling techniques, *Pharm. Res.*, **10**, 1291-1294 (1993) .
- 10) Seki T., Wang A., Yuan D., Saso Y., Hosoya O., Chono S., Morimoto K., Excised porcine skin experimental systems to validate quantitative microdialysis methods for determination of drugs in skin after topical application, *J. Control. Release*, **100**, 181-189 (2004) .
- 11) Essa E. A., Bonner M. C., Barry B. W., Human skin sandwich for assessing shunt route penetration during passive and iontophoretic drug and liposome delivery, *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 1481-1490 (2002) .
- 12) Frum Y., Eccleston G. M., Meidan V. M., Factors influencing hydrocortisone permeation into human hair follicles: Use of the skin sandwich system, *Int. J. Pharm.*, **358**, 144-150 (2008) .
- 13) Frum Y., Eccleston G. M., Meidan V. M., *In-vitro* permeation of drugs into porcine hair follicles: is it quantitatively equivalent to permeation into human hair follicles?, *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**, 145-151 (2008) .

- 14) Otberg N., Patzelt A., Rasulev U., Hagemeister T., Linscheid M., Sinkgraven R., Sterry W., Lademann J., The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **65**, 488-492 (2007) .
- 15) Trauer S., Patzelt A., Otberg N., Knorr F., Rozycki C., Balizs G., Büttemeyer R., Linscheid M., Liebsch M., Lademann J., Permeation of topically applied caffeine through human skin - A comparison of *in vivo* and *in vitro* data, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **68**, 181-186 (2009) .
- 16) Knorr F., Lademann J., Patzelt A., Sterry W., Blume-Peytavi U., Vogt A., Follicular transport route - Research progress and future perspectives, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **71**, 173-180 (2009) .
- 17) Barbero A. M., Frasc H. F., Effect of stratum corneum heterogeneity, anisotropy, asymmetry and follicular pathway on transdermal penetration, *J. Control. Release*, **260**, 234-246 (2017) .
- 18) Scheuplein R. J., Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration, *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79-88 (1967) .
- 19) Otberg N., Richter H., Schaefer H., Blume-Peytavi U., Sterry W., Lademann J., Variations of hair follicle size and distribution in different body sites, *J. Invest.*

- Dermatol.*, **122**, 14-19 (2004) .
- 20) Wepierre J., Doucet O., Marty J. P., Percutaneous absorption of drugs *in vitro*: Role of Transepidermal and Transfollicular route. In R.C. Scott, R.H. Guy and J. Hadgraft (eds.) , Prediction of Percutaneous Penetration, Methods, Measurements, Modelling, IBC Technical Services, London, 1990, pp. 129-139.
- 21) Illel B., Schaefer H., Wepierre J., Doucet O., Follicles play an important role in Percutaneous absorption, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 424-474 (1991) .
- 22) Allec J., Chatelus A., Wagner N., Skin distribution and pharmaceutical aspects of adapalene gel, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **36**, S119-125 (1997) .
- 23) Blume-Peytavi U., Massoudy L., Patzelt A., Lademann J., Dietz E., Rasulev U., Garcia-Bartels N., Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **76**, 450-453 (2010) .
- 24) Toll R., Jacobi U., Richter H., Lademann J., Schaefer H., Blume-Peytavi U., Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles, *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 168-176 (2004) .
- 25) Tampucci S., Burgalassi S., Chetoni P., Lenzi C., Pirone A., Mailland F., Caserini M., Monti D., Topical Formulations Containing Finasteride. Part2: Determination of finasteride penetration into hair follicles using the differential stripping technique, *J.*

- Pharm. Sci.*, **103**, 2323-2329 (2014) .
- 26) Teichmann A., Jacobi U., Ossadnik M., Richter H., Koch S., Sterry W., Lademann J., Differential stripping: Determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles, *J. Invest. Dermatol.*, **125**, 264-269 (2005) .
- 27) Mohd, F., Todo, H., Yoshimoto, M., Yusuf, E., Sugibayashi, K., Contribution of the hair follicular pathway to total skin permeation of topically applied and exposed chemicals, *Pharmaceutics* **8**, 32 (2016) .
- 28) Ogiso, T., Shiraki, T., Okajima, K., Tanino, T., Iwaki, M., Wada, T., Transfollicular drug delivery: Penetration of drugs through human scalp skin and comparison of penetration between scalp and abdominal skins *in vitro*, *J. Drug Target.* **10**, 369–378 (2002) .
- 29) Frum, Y., Bonner, M.C., Eccleston, G.M., Meidan, V.M., The influence of drug partition coefficient on follicular penetration: *In vitro* human skin studies, *Eur. J. Pharm. Sci.* **30**, 280–287 (2007) .
- 30) Liu, X., Grice, J.E., Lademann, J., Otberg, N., Trauer, S., Patzelt, A., Roberts, M.S., Hair follicles contribute significantly to penetration through human skin only at times soon after application as a solvent deposited solid in man, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **72**, 768–774 (2011) .

- 31) Vogt, A., Hadam, S., Heiderhoff, M., Audring, H., Lademann, J., Sterry, W., Blume-Peytavi, U., Morphometry of human terminal and vellus hair follicles, *Exp. Dermatol.* **16**, 946–950 (2007) .
- 32) Lauer, A.C., Lieb, L.M., Ramachandran, C., Flynn, G.L., Weiner, N.D., Transfollicular Drug Delivery, *Pharm. Res.* **12**, 179–186 (1995) .
- 33) Jacobi, U., Kaiser, M., Toll, R., Mangelsdorf, S., Audring, H., Otberg, N., Sterry, W., Lademann, J., Porcine ear skin: An *in vitro* model for human skin, *Skin. Res. Technol.* **13**, 19–24 (2007) .
- 34) Grams, Y.Y., Whitehead, L., Lamers, G., Sturmman, N., Bouwstra, J.A., On-line diffusion profile of a lipophilic model dye in different depths of a hair follicle in human scalp skin, *J. Invest. Dermatol.* **125**, 775–782 (2005) .
- 35) Patzelt, A., Richter, H., Buettemeyer, R., Huber, H.J.R., Blume-Peytavi, U., Sterry, W., Lademann, J., Differential stripping demonstrates a significant reduction of the hair follicle reservoir *in vitro* compared to *in vivo*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **70**, 234–238 (2008) .
- 36) Knorr, F., Patzelt, A., Richter, H., Schanzer, S., Sterry, W., Lademann, J., Approach towards developing a novel procedure to selectively quantify topically applied substances in the hair follicles of the model tissue porcine ear skin, *Exp. Dermatol.*

- 22, 417–418 (2013) .
- 37) Meidan, V.M., Methods for quantifying intrafollicular drug delivery: a critical appraisal, *Expert Opin. Drug Deliv.* **7**, 1095–1108 (2010) .
- 38) Grams, Y.Y., Alaruikka, S., Lashley, L., Caussin, J., Whitehead, L., Bouwstra, J.A., Permeant lipophilicity and vehicle composition influence accumulation of dyes in hair follicles of human skin, *Eur. J. Pharm. Sci.* **18**, 329–336 (2003) .
- 39) Verma, A., Jain, A., Hurkat, P., Jain, S.K., Transfollicular drug delivery : current perspectives. *Res. Reports Transdermal Drug Deliv.* **5**, 1–17 (2016) .
- 40) 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) .
- 41) X.Nguyen H., Puri A., K.Banga A., Methods to simulate rubbing of topical formulation for *in vitro* skin permeation studies, *Int. J. Pharm.*, **519**, 22–33 (2017) .
- 42) Mathes C., Melero A., Conrad P., Vogt T., Rigo L., Selzer D., A. Prado W., De Rossi C., Garrigues T. M., Hansen S., Guterres S. S., Pohlmann A. R., Beck R. C. R., Lehr C. M., Schaefer U. F., Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects, *Journal of Controlled Release*, **223**, 207–214 (2016) .

- 43) Hasler-Nguyen, N., and Fotopoulos, G., Effect of rubbing on the *in vitro* skin permeation of diclofenac-diethylamine 1.16% gel, *BMC Research Notes* **5**:321, 2-5 (2012)
- 44) Abe A., Saito M., Kadhun W. R., Todo H., Sugibayashi K., Establishment of an evaluation method to detect drug distribution in hair follicles, *Int. J. Pharm.*, **542**, 27–35 (2018)