

城西大学水田記念図書館

0089003772

城西大学大学院薬学研究科
博士学位論文

V

乙第2号

昭和63年度

城西大学水田記念図書館

昭和63年度城西大学大学院薬学研究科

博士課程論文発表会

日 時 昭和63年10月15日(土)

午後1時30分～

場 所 6-22教室

城西大学大学院薬学研究科

◎ プログラム

※ 午後1時30分～

開会挨拶

薬学研究科長

※ 午後1時35分～

司会：従 二 和 彦 助教授

発表者：佐藤 潔

論文題目：ヒトにおける薬物の経皮吸収性の予測に関する研究
—モデル動物とin vitro研究からのアプローチ—

※ 閉会挨拶

薬学研究科長

学位論文発表会講演要旨

ヒトにおける薬物の経皮吸収性の予測に関する研究
—モデル動物と *in vitro* 研究からのアプローチ—

佐藤 潔

はじめに

薬物を体内の必要とする部位に、必要な時間、必要な量だけ到達させることを目的とした薬物投与剤形を総称してドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; DDS) と呼び、主に徐放化 (Controlled release) と標的化 (Targetting) の2つの観点からの研究が盛んに行なわれている。なかでも、皮膚を全身作用を目的とした薬物の投与部位とする経皮治療システム (Transdermal Therapeutic System; TTS) は、薬物の長時間にわたる放出制御はもちろんのこと、肝臓での初回通過効果や消化管における副作用を避けることができたり、製剤を取り除くことによって投与の中断ができたりといった他の投与剤形にない多くの利点を有しており、現在まで、スコポラミン、ニトログリセリン、硝酸イソソルビド、クロニジン、エストラジオールなどの製剤が開発され、医療の場に供されてきた。

皮膚組織は体組織としては面積的 (体重70kg当り平均 1.8 m^2) にも重量的 (男性 4.8kg, 女性 3.2kg) にも最大の組織であり、しかも血流が体循環の3分の1を占めているため薬物の投与部位として大きな潜在能力を有している。しかし皮膚本来の機能は生体の保持ならびに外的因子 (熱, 放射線, 微生物, 化学物質等) に対するバリアー機能であるため、化学物質 (薬物) の吸収性は一般に乏しく適用できる薬物に限界がある。したがってTTSの開発に際しては、製剤設計や体内動態等の評価もさることながら、薬物の選択並びに選択した薬物の経皮吸収性の評価が重要なポイントであるといわれ、そのために簡便な実験系やより実用的な評価法に関する研究が多くの研究者によってなされている。

TTSの最終目的は言うまでもなくヒト（患者）にあるため、薬物の経皮吸収性並びに薬理効果の評価をヒトで行なうことができればそれに越したことはないが、ヒトでのin vivo 試験は薬物の毒性や副作用といった問題から開発の初期段階において安易に行うことはできない。ところが経皮吸収製剤の場合は経口剤や注射剤等と異なり摘出皮膚を用いたin vitroでの皮膚透過実験が可能であるため、実際、特に欧米ではヒトの摘出皮膚を用いたスクリーニングが評価法の一つとして確立されている。しかしながら本邦においてはヒトの摘出皮膚の入手が困難であるため、一般に動物の摘出皮膚を用いたin vitro透過実験が簡便なスクリーニング法として汎用されている。動物の摘出皮膚を用いた透過実験は、皮膚の入手が容易であるため様々な基剤の効果や吸収促進剤の検討には適しているが、in vitroとin vivo の相関¹⁾あるいは動物とヒトとの種差の問題²⁾等があるため得られたデータを直接ヒトのin vivo 挙動に当てはめることはできない。

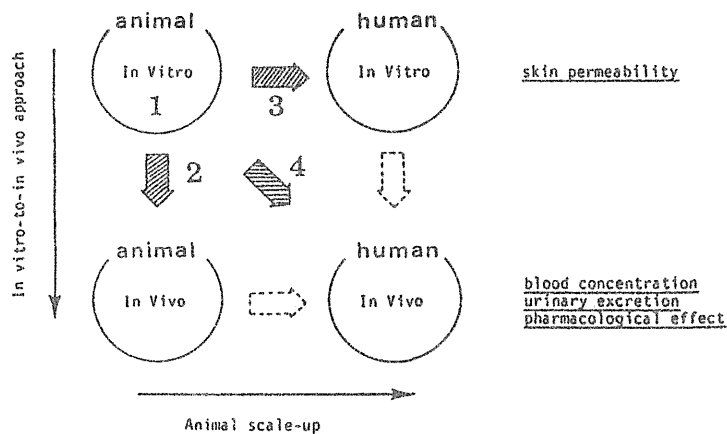


Fig. 1 Estimation method for skin permeability in human from the in vitro permeation data in animals

Each number(1-4) corresponds to volume number in the text.

そこで本研究において著者は、動物摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過実験の結果から最終的にヒトでの *in vivo* 経皮吸収性を予測することを目的として以下4編にわたって検討を試みた (Fig.1)。すなわち、モデル動物 (ヘアレスラット) 摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性の評価と吸収促進 (第1編)、ヘアレスラットにおける *in vitro* から *in vivo* の予測 (第2編)、*in vitro* 動物実験データからヒト *in vitro* の予測 (第3編)、動物での *in vitro* からヒト *in vivo* の予測 (第4編) である。

モデル薬物として、狭心症等の虚血性心疾患に広く用いられているニコランジルを用いた。またヒト *in vivo* の予測を目的とした第4編においては、ヒトでの血中濃度データが報告されているニトログリセリンを用いて検討を行った。

以下に第1～第4編までの検討により得られた結果を要約して示した。

1. ヘアレスラット摘出皮膚を用いたニコランジル皮膚透過性の評価

本研究の目的は動物の摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過データからヒトでの *in vivo* 挙動を予測することにある。したがって、*in vitro* での皮膚透過実験において選択した薬物に関するなるべく多くの情報を得ることが以後の研究 (第2編～第4編) を進める上で重要である。そこで本編においては、モデル薬物として選択したニコランジルの *in vitro* 皮膚透過性をヘアレスラットの腹部摘出皮膚を用いて評価した。皮膚透過性の評価は、2-チャンバー拡散セルに摘出した皮膚を挟み、角質層側 (Donor 側) に薬物溶液を入れて、真皮側 (Receiver側) に透過してくる薬物量を経時的に測定することにより行った。

Fig. 2から明らかなように、ミリスチン酸イソプロピル(IPM)とプロピレングリコール(PG)の混合溶媒を用いることによって、ニコランジルの高い皮膚透過性が得られることがわかった。また、IPMのかわりに他の脂肪酸エステル類を用いても同様の吸収促進作用が認められた。これらの脂肪酸エステル類の吸収促進機構に関する検討を加えたところ、皮膚角質層への直接作用(脂質区分への作用と思われる)により皮膚の抵抗性を下げ、その結果として薬物の透過を促進していることが示唆された。さらに脂肪酸エステル類は用いた基剤中の溶媒(PGあるいは水)の透過性を上げており、solvent dragが重要な透過機構の一つであることも併せて明らかとなった³⁾。

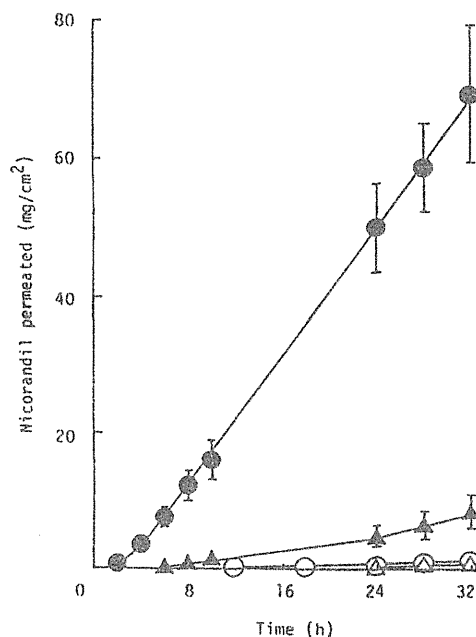


Fig. 2 Effect of IPM on the permeation of nicorandil across the full-thickness skin
 PG(O), PG with 10%IPM(●), water(Δ), water with 10%IPM(▲).
 Each point represents the mean \pm S.E. of 3-5 experiments.

第2編でのin vivo(ヘアレスラット)並びに第3編でのヒト(in vitro)においても10%IPH/PGによってニコランジルの顕著な吸収促進が確認されたことより、ヘアレスラット摘出皮膚でのin vitro試験の結果をin vivoあるいはヒト試験へ反映させることが可能であると推察された。以上のように、動物摘出皮膚を用いてのin vitro試験は、TTS開発の第一段階として有用であり、特に基剤のスクリーニングや薬物の透過機構の解明のためには不可欠な方法であると結論づけられる。

2. ヘアレスラットにおけるニコランジルのin vitroからin vivo 皮膚透過性の予測

TTSの最終目的はin vivoでの薬効発現にあるため、in vitroでの結果をいかにしてin vivoに反映させるかが重要な問題となってくる。そのため従来から拡散モデルやコンパートメントモデル等による解析が試みられてきたが、むしろin vitroの皮膚透過性の解析や予測を目的としたものが多く、in vivo(血中濃度)の予測を目的としたものは少なかった。そこで本研究においては、3種類の方法、すなわちコンボリューション法、shunt pathwayを有する拡散モデル、同じくshunt pathwayを有するコンパートメントモデルを用いて、ニコランジルのin vitro皮膚透過データの解析とin vivo(血中濃度)の予測性を比較検討した^{4,5)}。Table 1に各方法の特徴をまとめて示したが、それぞれが利点と欠点を有しており、しかもin vitro皮膚透過データから予測した血漿中濃度とin vivo実測値との一致性に関して三者の間に有意な差が認められなかった事から、一概にどの方法が優れているとは結論づけられなかった。一般

Table 1 Comparison of the characteristics of the diffusion model, compartment model and convolution method

Method (Model)	Diffusion	Compartment	Convolution
Model dependency	Dependent	Dependent	Independent ^a
Physicochemical meanings of the parameters in relation to skin permeability	Parameters(D,K,L) are meaningful	Parameters(k_1, k_2, k_d) are less meaningful	No parameters are used
Derivation and utilization of the equation	Most difficult	Difficult	Easier
Estimation of the blood concentration beyond the in vitro experimental period	Possible	Possible	Impossible
Slight change or modification of model	Possible ^b	Possible ^b	Impossible

a) Useful whatever drugs are metabolized and/or adsorbed in the skin.

b) For example, introduction of shunt transport.

的にモデルを複雑にすればするほど使用するパラメーターが多くなり、結果として予測値（計算値）と実測値のより良い一致が得られる。今回も拡散モデルとコンパートメントモデルに shunt という項を一つ加えることにより満足できる結果が得られた。しかし shunt pathway に関しては汗腺や毛嚢由来の透過ルートであるという説や、皮膚の水和 (hydration) によるものだという考え方もあり、全ての薬物においてその導入が妥当であるとは限らない。したがって実用的には、より簡便な方法で許容できる範囲内のバラツキに収まるものが望ましく、その点において演者らが経皮吸収の解析に始めて応用したコンボリューション法は、model independent でありしかも簡単な計算式で血漿中濃度の予測が可能であるという特徴を有しているため (Fig. 3), 広範な薬物において利用価値が高いものと考えられる。以上の理由から、ヒト in vivo の予測を目的とした第 4 編においてはコンボリューション法を用いることにした。

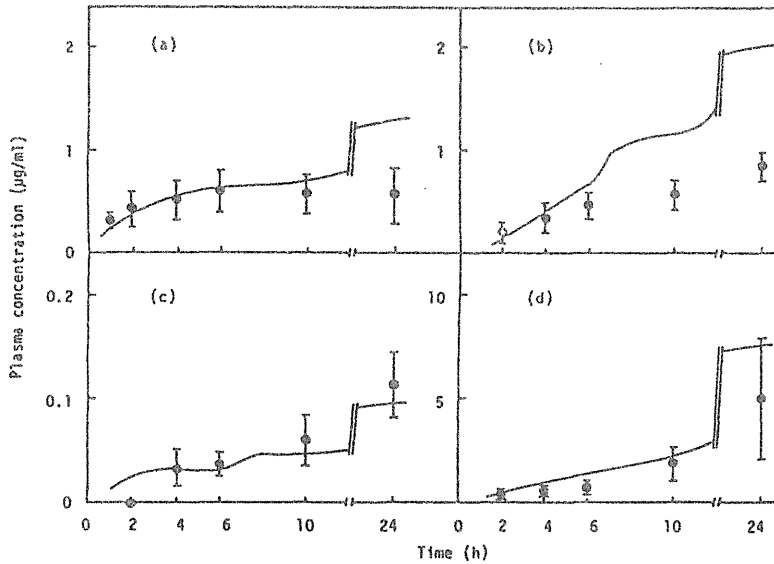


Fig. 3 Relationship between observed and calculated plasma concentrations of nicorandil after topical application of gel ointments in hairless rats
 (a) Aqueous gel; (b) PG gel; (c) PEG gel; (d) IPA gel.

3. ニコランジルの *in vitro* 皮膚透過性における種差とヒトへの予測

ニコランジル経皮吸収における種差とその原因について *in vitro* の系で検討し、同時にヒトへのスケールアップを試みた。その結果、以下の二つの知見が得られ、どちらかの方法を用いることによりヒト摘出皮膚を用いなくても動物実験データからヒトでの挙動を予測できることが示唆された⁶⁾。

1. 皮膚透過性の異なる数種の動物を用いて *in vitro* 透過実験を行い、拡散式によりそれぞれの動物における拡散係数、分配係数、バリアーの厚さを算出したところ、分配係数が透過性の種差に大きく影響していることが確認された。そこで角質層サンプルを用いて基剤（水）から皮膚への分配実験を行い、そのデータからヒトでの累積透過量を計算

して実際にヒト摘出皮膚で測定した実測値と比較したところ、両者は良く一致した (Fig. 4).

2. 実験に用いた動物及びヒト皮膚の組織切片像の観察と、皮表脂質量、水の透過係数、皮膚コンダクタンス等の皮膚の特性値とから、ニコランジル透過性の種差に影響している要因を決定した。また、得られた特性値を動物とヒトの間で比較したところ、あらゆる面においてブタ皮膚がヒト皮膚に近く、ブタがヒトでの経皮吸収挙動を予測するのに適した動物種であることが推察された。

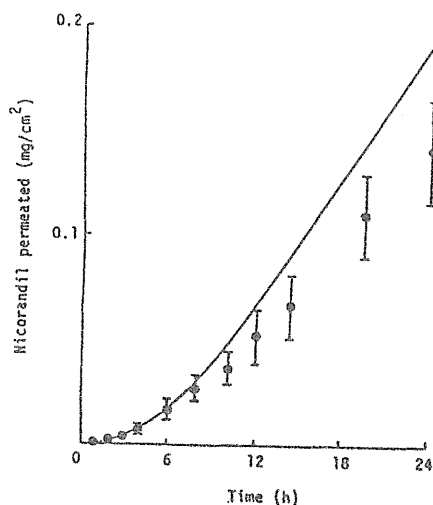


Fig. 4 Comparison between the observed (circles) and predicted (solid line) skin permeations of nicorandil in human.
Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

4. 市販ニトログリセリン製剤でのヒト *in vivo* 予測

第1～第3編の検討の結果、動物での *in vitro* 実験から動物での *in vivo* あるいはヒトでの *in vitro* の予測が可能であることが示されたので、最終目的であるヒト *in vivo* (血中濃度) の予測性について検討した。本来なら第3編ま

での検討に用いたニコランジルで評価するのが望ましいが、この段階においてはヒトでの *in vivo* 試験を行うことができなかったため、ヒトでの血漿中濃度の報告がある2%ニトログリセリン軟膏⁷⁾を用いて検討を行った。その結果、ニトログリセリンの場合でも *in vitro* から *in vivo* を予測する手段としてコンボリューション法が利用できること、並びにブタ摘出皮膚を用いた *in vitro* データから直接ヒト *in vivo* の予測が可能なが示唆され (Fig. 5)、経皮吸収実験におけるモデル動物からヒトへのスケールアップ法として本研究が有用であることが推察された。

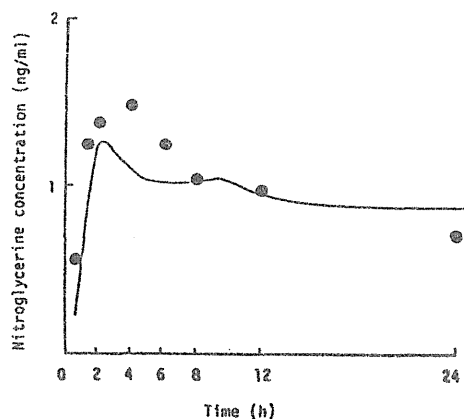


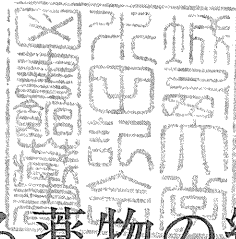
Fig. 5 Relationship between observed * and calculated plasma concentrations of nitroglycerine after topical application of ointment in human

* Data from Oka⁷⁾

以上演者は、ヒトにおける薬物の経皮吸収性の予測を目的にモデル動物並びに *in vitro* 実験からの検討を加え、ヒトの皮膚を用いることなくヒトでの経皮吸収挙動の予測ができることを明らかにした。以上の結果は、今後増々活発になると予想される経皮吸収の研究においていささかの知見を加えたものと考えられる。

参考文献

- (1) Ainsworth, M., *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 11, 69 (1960).
- (2) Wester, R. C. and Noonan, P. K., *Int. J. Pharmaceut.*, 7, 99 (1980).
- (3) Sato, K., Sugibayashi, K. and Morimoto, Y., *Int. J. Pharmaceut.*, 43, 31 (1988).
- (4) Sato, K., Oda, T., Sugibayashi, K. and Morimoto, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 2232 (1988).
- (5) Sato, K., Oda, T., Sugibayashi, K. and Morimoto, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 2624 (1988).
- (6) Sato, K., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Omiya, H. and Enomoto, N., *J. Pharm. Pharmacol.*, submitted.
- (7) 岡島智志, 菱田仁, 萩原和光, 中川立一, 坂部慶幸, 酒井泰彦, 水野康, *基礎と臨床*, 18, 2489 (1984).



ヒトにおける薬物の経皮吸収性
の予測に関する研究

— モデル動物と *in vitro* 研究
からのアプローチ —

佐 藤 潔

0089003772

目 次

総論の部	1
序論	1
第1編 ヘアレスラット摘出皮膚を用いたニコランジル皮膚透過性 の評価	4
第1章 In vitro実験条件の検討	4
第2章 脂肪酸エステル類による吸収促進	9
第3章 脂肪酸エステル類の吸収促進機構	13
第4章 考察	22
第2編 ヘアレスラットにおけるニコランジルのin vitroからin vivo 皮膚透過性の予測	24
第1章 静脈内投与後の体内動態	24
第2章 コンポリューション法による血中濃度の予測	27
第3章 拡散モデルによる解析	37
第4章 コンパートメントモデルによる解析	43
第5章 考察	47
第3編 ニコランジルのin vitro皮膚透過性における種差とヒトへの 予測	50

第1章	動物データからヒト皮膚透過性の予測	51
第2章	ヒトへの予測に適した動物種に関する検討	61
第3章	考察	70
第4編	市販ニトログリセリン製剤でのヒトin vivo 予測	72
第1章	ニトログリセリン経皮吸収性の種差	72
第2章	コンボリューション法を用いた血中濃度の予測	75
第3章	考察	78
結論		79
謝辞		83
実験の部		84
第1編	実験の部	84
第2編	実験の部	87
第3編	実験の部	89
第4編	実験の部	92
引用文献		94

総論の部

序論

薬物を体内の必要とする部位に、必要な時間、必要な量だけ到達させることを目的とした薬物投与剤形を総称してドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; DDS) と呼び、主に徐放化 (Controlled release) と標的化 (Targetting) の2つの観点からの研究が盛んに行なわれている¹⁻³⁾。中でも皮膚を全身作用を目的とした薬物の投与部位とする経皮治療システム (Transdermal Therapeutic System; TTS) は、薬物の長時間にわたる放出制御はもちろんのこと、肝臓での初回通過効果や消化管における副作用を避けることができたり、製剤を取り除くことによって投与の中断ができたりといった他の投与剤形にない多くの利点を有しており、現在まで、スコポラミン⁴⁾、ニトログリセリン^{5,6)}、硝酸イソソルビド、クロニジン⁶⁾、エストラジオールなどの製剤が開発され、医療の場に供されてきた。

皮膚組織は体組織としては面積的 (体重70kg当り平均 1.8 m^2) にも重量的 (男性 4.8kg, 女性 3.2kg) にも最大の組織であり、しかも血流が体循環の3分の1を占めているため薬物の投与部位として大きな潜在能力を有している。しかし皮膚本来の機能は生体の保持ならびに外的因子 (熱, 放射線, 微生物, 化学物質等) に対するバリアー機能であるため、化学物質 (薬物) の吸収性は一般に乏しく適用できる薬物に限界がある⁷⁾。したがってTTSの開発に際しては、製剤設計や体内動態等の評価もさることながら、薬物の選択並びに選択した薬物の経皮吸収性の評価が重要なポイントであるといわれ、そのために簡

便な実験系やより実用的な評価法に関する研究が盛んに行われている。

TTSの最終目的は言うまでもなくヒト（患者）にあるため、薬物の経皮吸収性並びに薬理効果の評価をヒトで行なうことができればそれに越したことはないが、ヒトでのin vivo 試験は薬物の毒性や副作用といった問題から開発の初期段階において安易に行うことはできない。ところが皮膚適用製剤の場合は経口剤や注射剤等と異なり摘出皮膚を用いたin vitroでの皮膚透過実験が可能であるため、実際、特に欧米ではヒトの摘出皮膚を用いたスクリーニングが評価法の一つとして確立されている^{8,9)}。しかしながら本邦においてはヒトの摘出皮膚の入手が困難であるため、一般に動物の摘出皮膚を用いたin vitro透過実験が簡便なスクリーニング法として汎用されている。動物の摘出皮膚を用いた透過実験は、皮膚の入手が容易であるため様々な基剤の効果や吸収促進剤の検討には適しているが¹⁰⁻¹²⁾、in vitroとin vivo の相関¹³⁾あるいは動物とヒトとの種差の問題^{14,15)}等があるため得られたデータを直接ヒトのin vivo 挙動に当てはめることはできない。

そこで本研究において著者は、動物摘出皮膚を用いたin vitro皮膚透過実験の結果から最終的にヒトでのin vivo 経皮吸収性を予測することを目的として以下4編にわたって検討を試みた(Fig.1)。すなわち、モデル動物（ヘアレスラット）摘出皮膚を用いたin vitro皮膚透過性の評価と吸収促進（第1編）、ヘアレスラットにおけるin vitroからin vivo の予測（第2編）、in vitro動物実験データからヒトin vitroの予測（第3編）、動物でのin vitroからヒトin vivo の予測（第4編）である。

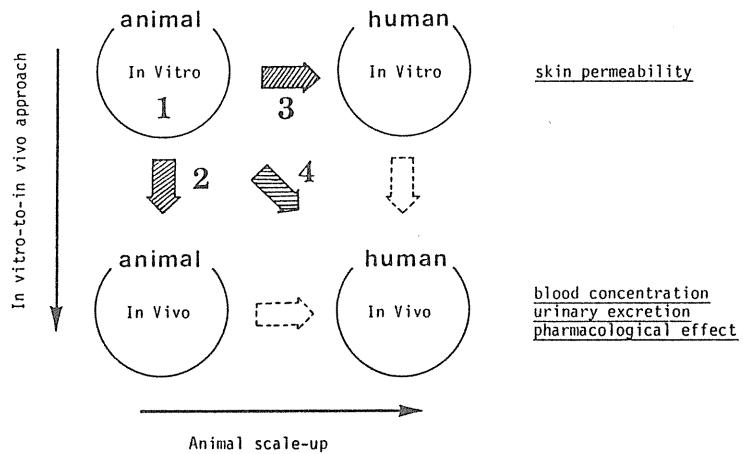


Fig. 1 Estimation method for skin permeability in human from the in vitro permeation data in animals

Each number(1-4) corresponds to volume number in the text.

モデル薬物として、狭心症等の虚血性心疾患に広く用いられているニコランジル (N-(2-hydroxyethyl) nicotinamide nitrate)(Fig.2) を用いた^{16,17)}。またヒト in vivo の予測を目的とした第4編においては、ヒトでの血中濃度データが報告されているニトログリセリンを用いて検討を行った。

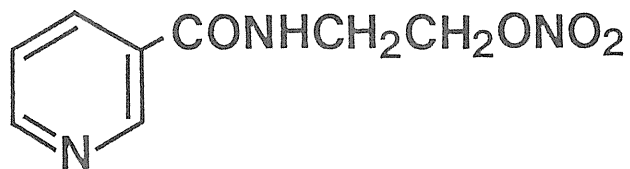


Fig. 2 Chemical structure of nicorandil

第1編 ヘアレスラット摘出皮膚を用いたニコランジル皮膚透過性の 評価¹⁸⁾

序論でも述べたように、本研究の目的は動物の摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過データからヒトでの *in vivo* 挙動を予測することにある。したがって、*in vitro*での皮膚透過実験において選択した薬物に関するなるべく多くの情報を得ることが以後の研究（第2～4編）を進める上で重要である。そこで本編においては、モデル薬物として選択したニコランジルの *in vitro* 皮膚透過性をヘアレスラットの腹部摘出皮膚を用いて評価した。

ニコランジルは、分子量が比較的小さく (MW 211) しかも $pK_a=3.18$ の弱塩基性薬物であるため、水及び有機溶媒両者に溶解易く、 pH 4～10.8までの油水分配率（クロロホルム/水）が約 2 とほぼ一定であることが知られている¹⁹⁾。したがって、経皮吸収性をよりシンプルな系で評価するには適当なモデル薬物であると考へて選択した。

第1章 *In vitro* 実験条件の検討

*In vitro*での皮膚透過実験を行うにあたって最も重要なことは皮膚の選択、すなわち動物種の選択である。過去においては、生物学的にヒトに近い動物種ということでブタ²⁰⁾の摘出皮膚が、また入手のしやすさといった点からラット²¹⁾、モルモット²²⁾、ウサギ²³⁾等の摘出皮膚が用いられてきたが、近年では、除毛の必要がなく入手も容易なヘアレスマウス²⁴⁻²⁶⁾やヘアレスラッ

ト^{27,28)}といったヘアレス動物での報告が増えている。本研究においても体重約150gの雄性のヘアスラット²⁹⁾を用いた。皮膚透過性の評価は2-チャンパー拡散セルに摘出した皮膚を挟み、角質層側 (Donor 側) に薬物溶液を入れて、真皮側 (Receiver側) に透過してくる薬物量を経時的に測定することにより行った。

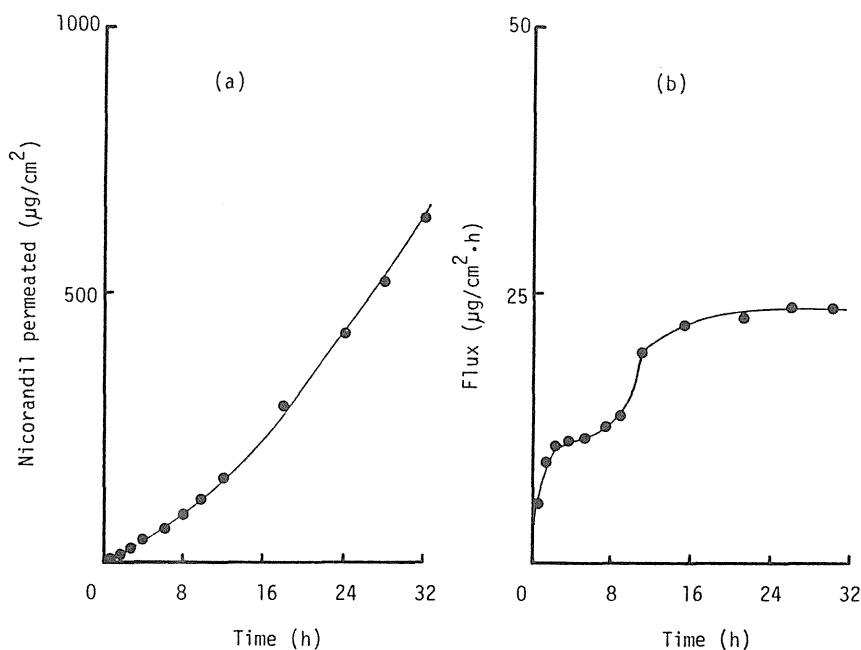


Fig. 3 In vitro skin permeation profile of nicorandil from aqueous suspension in hairless rat

Each point represents the mean of 3 experiments.

Fig. 3 にはニコランジルの水懸濁液を Donor 溶液として用いた時の累積透過量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) を時間に対してプロットした。12時間以後の透過量はほぼ直線的に増加し、32時間までの透過実験で定常状態が得られることが確認された。

薬物の単位面積当たりの定常状態透過速度 (Flux) は、Receiver側をシンク

状態と仮定すると以下の式で表されることが知られている³⁰⁾。

$$\text{Flux} = DKCv/L \quad (1)$$

ここで D は薬物の皮膚中拡散係数、 K は基剤と皮膚間での薬物分配係数、 Cv は基剤中に溶解している薬物濃度、 L は皮膚バリアーの厚さである。

L が常に一定の場合、薬物および基剤を固定すれば D 及び K は一定と考えられるので、 Flux は基剤 (Donor) 中薬物濃度に比例する。言いかえると、薬物がすべて溶解している時 Flux は基剤中濃度に比例し、薬物が溶解度以上で懸濁している時は Flux は一定となる。

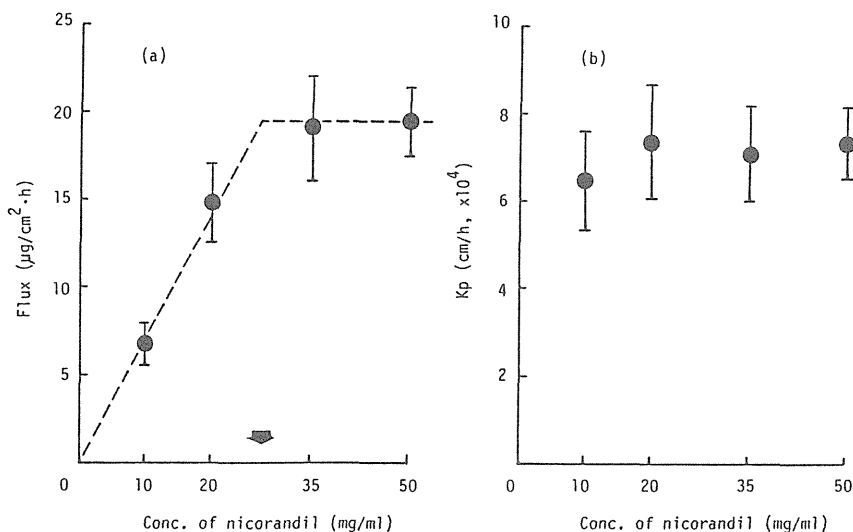


Fig. 4 Effect of initial concentration of nicorandil in donor compartment on the permeation of the drug from aqueous solution across hairless rat skin

Each point represents the mean \pm S.E. of 3-5 experiments. The arrow shows the saturated concentration of nicorandil at 37°C .

Fig. 4 にニコランジル濃度を10, 20, 35及び50mg/ml で実験した結果を示した。ニコランジルの37℃での水に対する溶解度は26.7mg/ml であるので、10及び20mg/ml は溶解型、35及び50mg/ml は懸濁型である。Fig. 4aより明らかなように、溶解型ではFluxはCvに比例し、懸濁型ではFluxは一定であった。(1) 式のFluxをCvで割った値を薬物の皮膚透過係数、Kpと称し薬物の経皮吸収性の示標に用いられている。理論的にはKpはCvにかかわらず一定であるが、ニコランジルにおいても実験したすべての濃度域でほぼ一定の値を示すことが確認された(Fig. 4b)。

T. Higuchi は(1) 式と共に(2) 式を提唱した³⁰⁾。

$$\text{Flux} = a v D / \gamma s L \quad (2)$$

ここで、 $a v$ は基剤中の薬物の活量であり、 γs は皮膚バリアー中での活量係数である。基剤中の活量は理想溶液においてはその薬物純結晶の活量と等しくなる。言いかえると、懸濁状態であれば(固体が存在すれば)溶媒を変えても薬物の $a v$ は等しく、 γs が不変である(皮膚バリアー能に変化がない)と仮定するとFluxも一定となるはずである。したがってDonor 中の基剤(溶媒)を変えて実験を行う際、薬物を懸濁状態に保つことが重要となる。Fig. 4 に示したようにニコランジルの経皮吸収挙動がHiguchi 理論に従うことが示唆されたので、以後の実験は懸濁状態で実施した。

次に摘出皮膚の保存時間によるバリアー能の変化について検討した。本編においてはヘアレスラットの摘出皮膚を直ちに実験に供したが、第3編以後においては大動物及びヒトの摘出皮膚を使用する必要が生じた。大動物あるいはヒ

トの皮膚では摘出後直ちに実験を開始することが困難であったため、 -20°C で凍結保存することにした。凍結保存によって皮膚のバリアー能が失われれば、薬物の透過性は有意に上昇し誤った解釈をもたらすことが予想されたので、ヘアレスラットの皮膚を摘出後凍結保存し、直ちに実験に供した結果と比較した。Fig. 5 に示したように、6週間保存においてもニコランジルのKpの有意な上昇は認められず、またヒトの摘出皮膚を凍結保存して用いた実験において466日まで透過性に変化がなかったとの報告もあるため³¹⁾、この程度の保存には耐えるものと判断した。

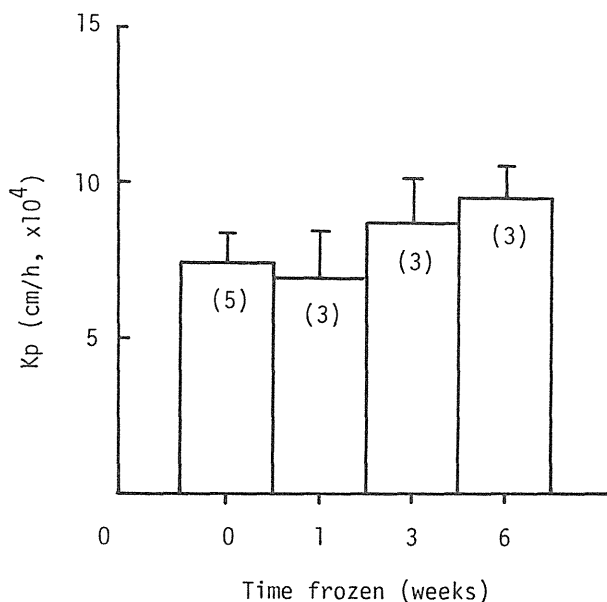


Fig. 5 Effect of freezing time on the hairless rat skin permeability for nicorandil

The values in parentheses are number of experiments.

第2章 脂肪酸エステル類による吸収促進

薬物の経皮吸収性は消化管等の吸収性に比べると低いため何らかの方法で吸収性を上げる必要がある³²⁾。経皮吸収促進の方法としてはProdrug化^{33,34)}、イオントフォーシス^{35,36)}等が試みられているが、本研究においては最も簡便な吸収促進剤を用いる方法を検討した。代表的な吸収促進剤としてはジメチルスルフォキシド³⁷⁾、ピロリドン類^{38,39)}、高級脂肪酸類⁴⁰⁾が知られており細部にわたる検討もなされている。また近年では、新規な合成化合物であるAzoneを用いた検討が盛んになされており、様々な薬物の経皮吸収性を改善することが報告されている^{41,42)}。ニコランジルにおいてもAzoneの添加効果は

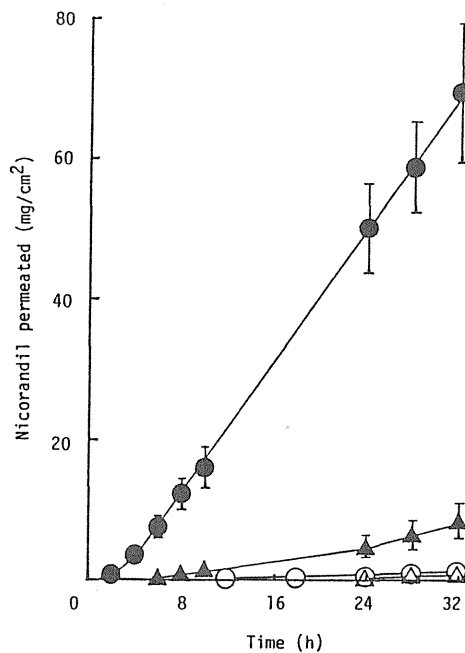


Fig. 6 Effect of IPM on the permeation of nicorandil across the full-thickness skin

PG(O), PG with 10%IPM(●), water(Δ), water with 10%IPM(▲).

Each point represents the mean \pm S.E. of 3-5 experiments.

著明であったが，種々スクリーニングを実施した結果，ミリスチン酸イソプロピル（IPM）が特にプロピレングリコール（PG）との組合せにおいてAzoneと同等かそれ以上の顕著な効果を示すことがわかったので，以後この系を中心に検討を加えた。

Fig. 6 には水あるいはPGにIPMを10%添加した時のニコランジルの累積皮膚透過量を示した．10% IPM/PGからのニコランジルのFluxは約 $1750 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ とPG単独に比べて約70倍増加した。

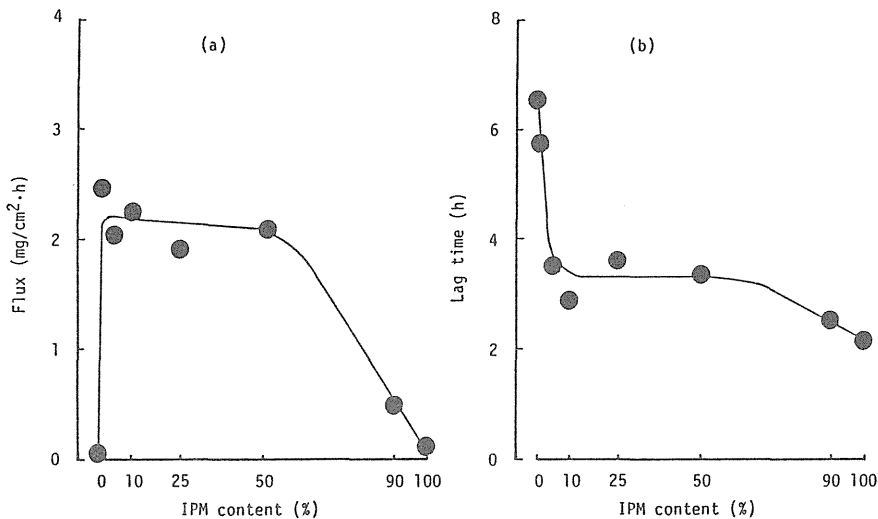


Fig. 7 Effect of IPM content on the skin permeation of nicorandil in PG

(a) Relationship between IPM content and flux.

(b) Relationship between IPM content and lag time.

Each point represents the mean of 2-4 experiments.

Fig. 7 に IPM の含量を 0 (PGのみ) から 100% (IPMのみ) に変化させた時の Flux(a) およびラグタイム(b) の結果を示す．ラグタイムは累積透過曲線の定常状態での直線部分を時間軸に外挿した値を用いた．図から明らかなように，Fluxは IPM 1%で有意に増加した後 50%まではほぼ一定であり，ラグタイムは IPM

5%以上で一定となった。したがって、IPM/PG系においてIPMが5~50%の範囲ではニコランジルの皮膚透過性を有意に上昇させ、しかも定常状態に達するまでのラグタイムを大幅に短縮することがわかった。

IPMは軟膏剤あるいは化粧品剤の基剤の一つとして用いられている。特に化粧品の分野では類似の脂肪酸エステル類がいくつか合成され使用されているので、Table 1に示した5種（IPMを入れると6種）の脂肪酸エステルを用いてニコランジルの経皮吸収促進効果について試験した。脂肪酸エステル類の脂溶性の指標としてLog P（n-ヘキサン/水 分配係数の対数値）を用いた。

Table 1 Chemical structures and lipophilic indexes, Log P, of aliphatic esters (R_1COOR_2)

Subject	MW ^a	R ₁	R ₂	Log P ^b
Isopropyl n-butyrate (IPB)	130	CH ₃ (CH ₂) ₂ -	-CH(CH ₃) ₂	1.12
Isopropyl n-hexanoate (IPH)	158	CH ₃ (CH ₂) ₄ -	-CH(CH ₃) ₂	1.38
Isopropyl n-decanoate (IPD)	214	CH ₃ (CH ₂) ₈ -	-CH(CH ₃) ₂	1.69
Isopropyl myristate (IPM)	270	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ -	-CH(CH ₃) ₂	1.96
Isopropyl palmitate (IPP)	298	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ -	-CH(CH ₃) ₂	2.09
Octyldodecyl myristate (ODM)	508	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ -	-CH ₂ CH(C ₁₀ H ₂₁) CH ₂ (C ₇ H ₁₅)	2.79

a) Molecular weight.

b) Logarithm of partition coefficient between n-hexane and water at 25°C.

Fig. 8 には脂肪酸エステル類のLog P 値に対するFluxとラグタイムの関係をプロットした。脂肪酸エステル類（10% 添加）の吸収促進効果はLog P 値の小さいエステル（IPB およびIPH）で最も顕著であり，Log P 値が上昇するにつれてその効果は減少した。したがって，本研究で用いた脂肪酸エステル類はニコランジルの経皮吸収促進に関してIPB からIPH 付近に至適な領域が存在するものと推察された。

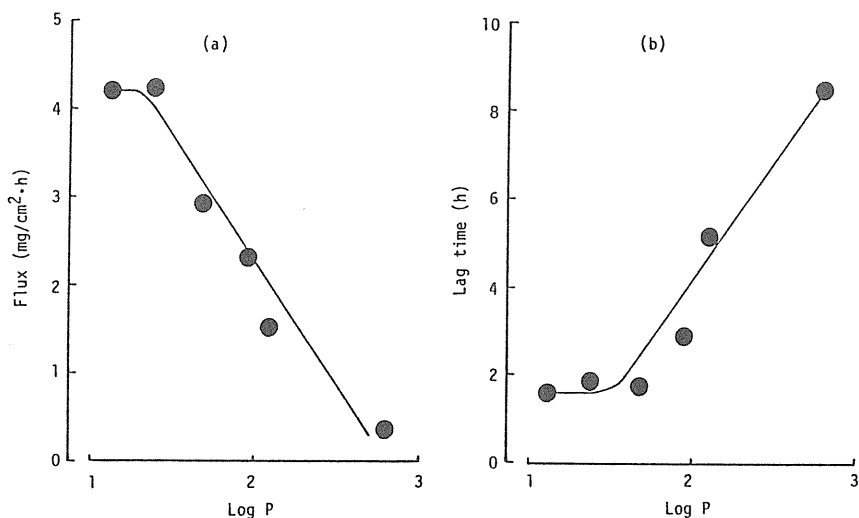


Fig. 8 Effect of lipophilicity of aliphatic esters on the skin permeation of nicorandil in PG

(a) Relationship between log P and flux.

(b) Relationship between log P and lag time.

Each point represents the mean of 2-3 experiments.

第3章 脂肪酸エステル類の吸収促進機構

第2章においてIPMを中心とした脂肪酸エステル類の吸収促進効果について明らかにしたので、本章においてはそれら脂肪酸エステル類の吸収促進機構について検討を加えた。

まず最初にIPM/PG混合基剤から水へのニコランジルの放出性について試験した。Fig.9から明らかなように、IPMの含量の増加に伴ってニコランジルの放出性は増し、IPM 100%で最大となることが明らかとなった。Fig.10にはFig.9で得られた4時間までの放出率と、その時の基剤中での薬物溶解度の関係を示した。ニコランジルのIPMへの溶解性は低く、しかもIPMはPGと混和しないためニコランジルの溶解度は基剤中のPGの量にほぼ比例した。すなわち、Fig.10においてニコランジルの溶解度はIPM含量の増加に伴って直線的に減少し、放出性とは逆の関係を示すことが確認された。

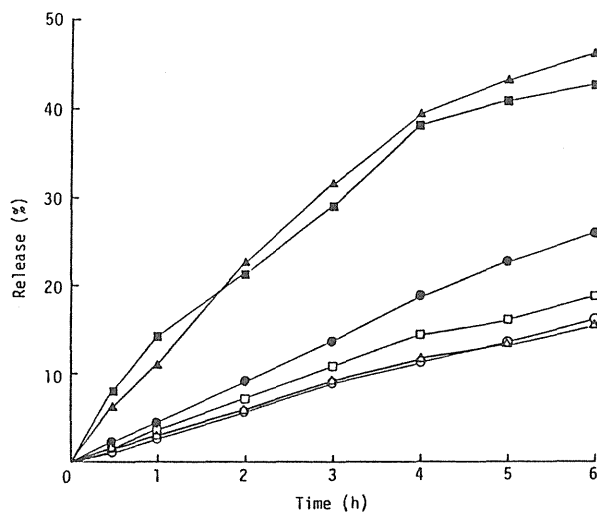


Fig. 9 Effect of IPM content on the release of nicorandil from IPM-PG mixed vehicles

IPM content in PG (%); 0%(○), 10%(△), 25%(□), 50%(●), 90%(▲), 100%(■).

Each point represents the mean of 2 experiments.

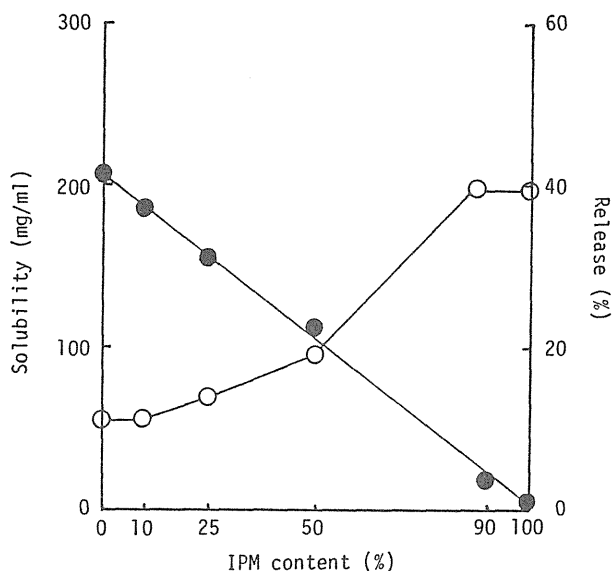


Fig. 10 Effect of IPM content on the solubility(●) of nicorandil and percent releasing of the drug over 4h(○)

Higuchi 式(1) は薬物の経皮Fluxが基剤中薬物溶解度と基剤／皮膚間の分配係数の積に比例することを示している。分配係数が基剤からの薬物の逃散傾向 (escaping tendency) を示していると考えると基剤からの放出性と等しいと仮定することも可能であり、この仮定のもとでは放出性と溶解度を掛けたものは Fluxと比例するはずである^{43, 44)}。Fig. 11に 2, 4, 6時間までの放出率 R(%) とその時の溶解度Cvの積をIPM濃度に対してプロットした。IPM含量10%以上においてはFig. 11はFig. 7aと同様な挙動を示し、特にIPM 50%以上では薬物溶解度の減少がそのままFluxの減少に反映しているものと予想される。しかしながら、IPM 0% (PGのみ)での挙動はFig. 11とFig. 7aではまったく異なり、IPMの吸収促進作用(特に低濃度における)は基剤中溶解度並びに基剤からの放出性だけでは説明がつかないことが明らかとなった。

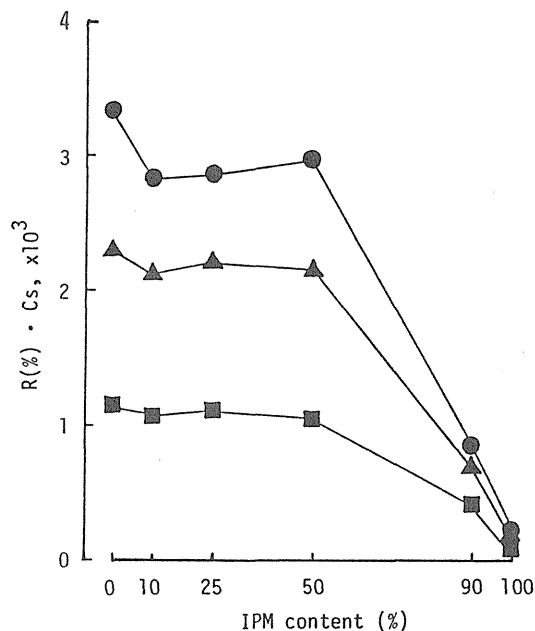


Fig. 11 Effect of IPM content on the $R(\%) \cdot Cs$
 $R(\%)$ over 6h(●), $R(\%)$ over 4h(▲), $R(\%)$ over 2h(■).

同様に他の脂肪酸エステル類をPG中に10%含有させた時のニコランジル溶解度 (Fig. 12) 及び基剤からの放出性 (Fig. 13) を測定した。脂溶性の低い (Log P 値が小さい) IPB とIPH はニコランジルに対する溶解能が高く、しかもIPB とIPH はPGと良く混和するため、10%IPB (またはIPH)/PG 系での溶解度はPGのみよりも高い値を示した。しかし、最も高い溶解度を示した10%IPB/PG においてさえもその値はPG単独に比べて30%程度増したに過ぎなかった。10%IPB, IPM, ODM からの薬物放出性においていずれもほぼ同様の挙動を示したFig. 13の結果と併せて考えると、IPM の含量を変えたときと同様にFig. 8aに示したFluxの大きな変化を溶解度と放出性のみから説明づけることはできなかった。そこで、他の観点から脂肪酸エステル類のニコランジル経皮吸収促進機構を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。

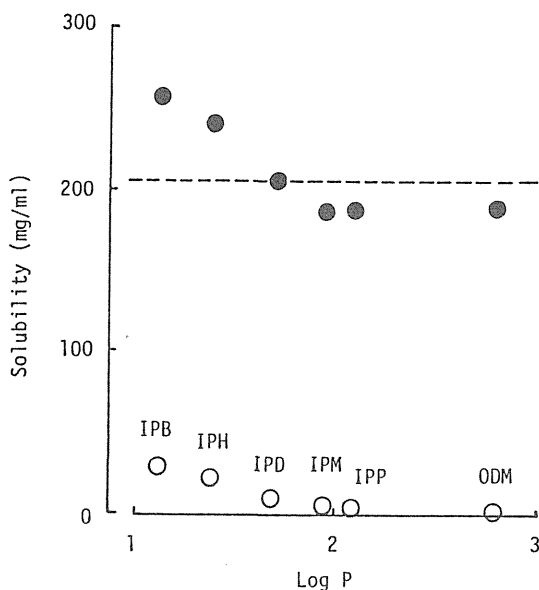


Fig. 12 Solubility of nicorandil in aliphatic esters(○) and in 10% aliphatic ester-PG mixtures(●)

The dotted line represents the solubility in PG.

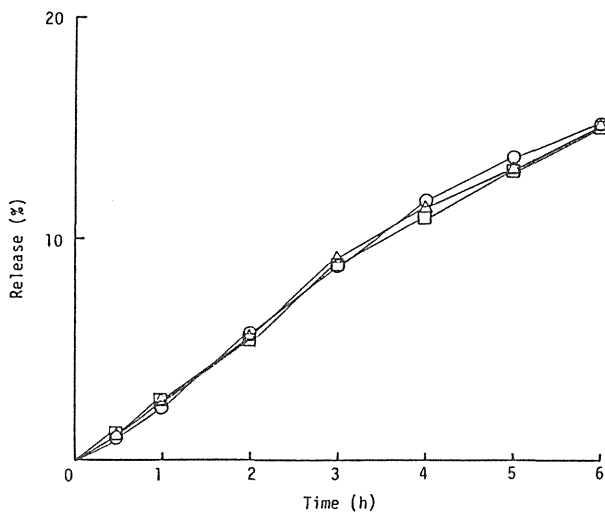


Fig. 13 Effect of aliphatic esters on the release of nicorandil from aliphatic ester-PG mixed vehicles

IPB(○), IPM(△), ODM(□) (10% each).

Each point represents the mean of 2 experiments.

薬物の消化管からの吸収はpH-分配仮説に従った受動拡散が一般的であるが、しかし何らかのcarrierによって輸送される能動輸送も知られている。また、水の移動によって運ばれる溶媒牽引(solvent drag)も重要な吸収メカニズムの一つとして知られている^{45,46)}。経皮吸収においても同様の現象が認められており、吸収促進剤を併用した時にその効果は顕著であるとの報告がある^{47,48)}。そこで次に溶媒として用いたPGの皮膚透過性について検討した。

Fig. 14及びFig. 15にPGの累積透過量を示したが、IPMをはじめとする脂肪酸エステル類の添加によってPGの吸収性が著しく増加し、その挙動は薬物であるニコランジルの吸収挙動とほぼ平行であることが確認された。この時、もう一つの基剤構成成分である脂肪酸エステル類の皮膚透過性について50%IPM/PG系からのIPMの吸収で確認したところ、32時間で $1\text{mg}/\text{cm}^2$ 以下と僅かであった。

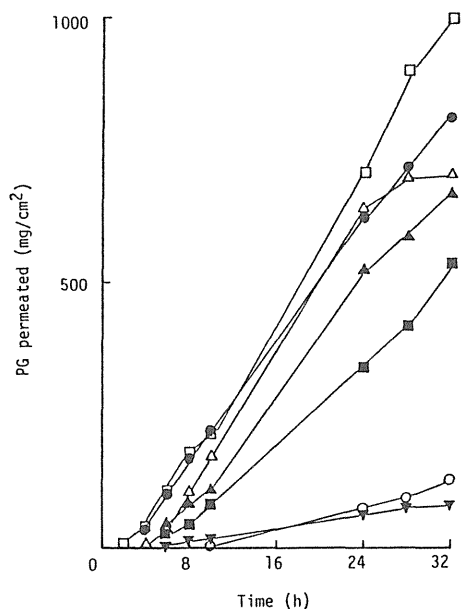


Fig. 14 Effect of IPM content on the permeation of PG across the full-thickness skin

IPM content in PG (%); 0%(○), 1%(△), 5%(□), 10%(●), 25%(▲), 50%(■), 90%(▼).

Each point represents the mean of 2 experiments.

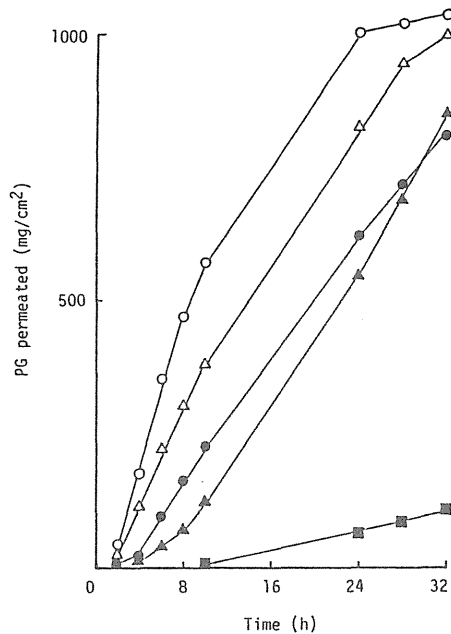


Fig. 15 Effect of aliphatic esters on the permeation of PG across the full-thickness skin

IPH(○), IPD(△), IPM(●), IPP(▲), ODM(■)
(10% each).

Each point represents the mean of 2 experiments.

ニコランジルの透過性とPGの透過性の関係をよりわかりやすく示すため、各測定時間におけるPGの透過量を横軸に、その時のニコランジルの透過量を縦軸にプロットした(Fig. 16a)。その結果、PGあるいは10%IPM/PG系においてニコランジルの透過量はPGの透過量に比例して増加することがわかった。Fig. 16bには実際のニコランジル透過量を Q_{obs} とし(3)式に従って計算した理論上の透過量(溶媒に溶解した薬物が溶媒の透過量に相当する量だけ透過すると仮定した)を Q_{cal} としてその両者の関係をプロットした。

$$Q_{cal} = Q_{slv} \cdot C_{sol} / \rho \quad (3)$$

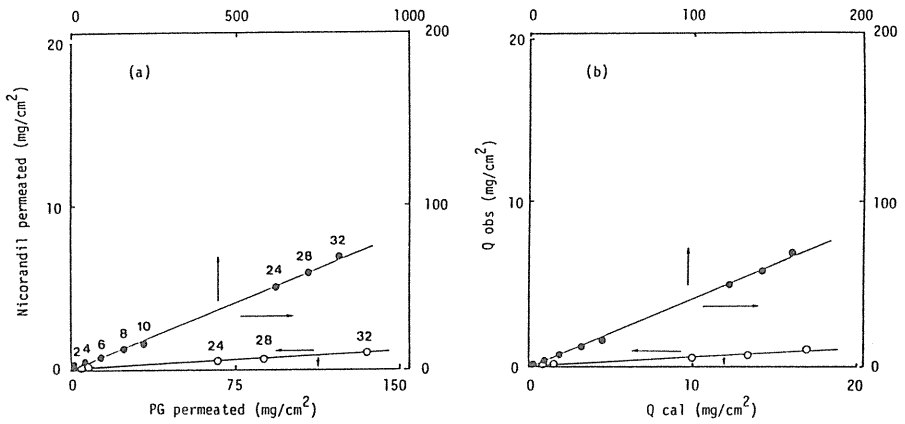


Fig. 16 Relationship between skin permeations of nicorandil and PG

(a) Nicorandil permeation vs. PG permeation.

(b) Observed (Q_{obs}) vs. calculated (Q_{cal}) amounts of nicorandil permeation.

PG (○), PG with 10%IPM (●).

The number on each symbol indicates the measuring time (h).

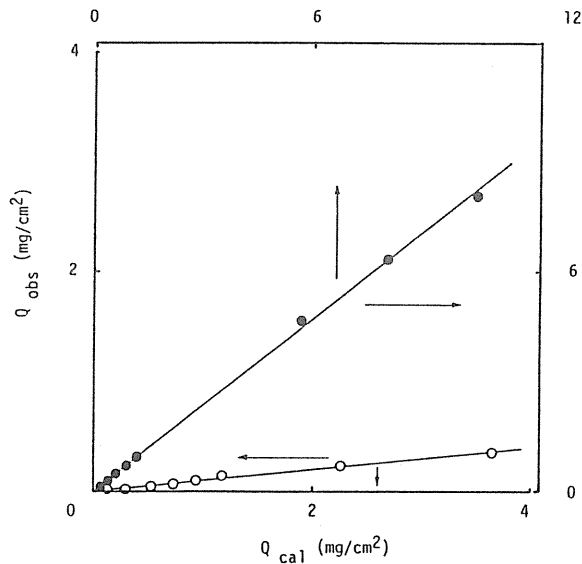


Fig. 17 Relationship between the calculated (Q_{cal}) and observed (Q_{obs}) amounts of the skin permeation of nicorandil in water

Water (○), water with 10%IPM (●).

Table 2 Relationship between the calculated and observed amounts of the permeation of nicorandil

Solvent	Additive (% w/w)	Slope ^a	r ^b
PG	None	0.057	0.998
	IPM (1)	0.240	0.996
	(5)	0.235	0.996
	(10)	0.421	0.999
	(25)	0.407	0.996
	(50)	0.610	0.998
	(90)	0.811	0.998
	IPH (10)	0.310	0.992
	IPD (10)	0.342	0.999
	IPP (10)	0.279	0.999
	ODM (10)	0.419	0.998
Water	None	0.103	0.999
	IPM (10)	0.789	0.997

a) Obtained from a plot of Q_{obs} vs. Q_{cal} .

b) Correlation coefficient.

ここで Q_{slv} は溶媒 PG あるいは水の透過量 (mg/cm^2), C_{sol} は $37^\circ C$ でのニコランジルの溶解度 (g/cm^3), ρ は溶媒の密度 (g/cm^3) である。

Fig. 16b から明らかなように IPM の添加の有無にかかわらず Q_{cal} と Q_{obs} は良好な直線関係を示した。Fig. 17 には PG の代わりに水溶媒を用いた時の値を同様にプロットしたが、PG の時と同様 Q_{obs} と Q_{cal} は比例関係を示すことが確認された。 Q_{cal} と Q_{obs} の関係をまとめて Table 2 に示した。ここで Q_{cal} を横軸に Q_{obs} を縦軸にプロットし最小二乗法により算出した傾きを slope と、またそのときの相関係数を r とした。すべての実験系において r は 0.99 以上を示し、solvent drag がニコランジル経皮吸収の重要なメカニズムの一つであることが裏づけられた。しかも脂肪酸エステル類を添加した時の slope の値が添加しない時に比べより 1 に近づく (Q_{cal} と Q_{obs} の値が近似する) ことから、これら吸収促進剤の添加により基剤として用いた PG あるいは水の solvent drag としての寄与が増しているものと予想される。

経皮吸収の主なバリアーは皮膚表面の死んだ細胞層である角質層である。したがって角質層を傷つけたりテープで剥離すると、薬物の透過性は顕著に上昇することが知られている⁴⁹⁾。一方、Azoneのような吸収促進剤は角質層中の脂質に作用し角質層のない状態(stripped skin)の透過性に近いレベルまで透過性を上げることが報告されている^{50,51)}。本研究においても、ヘアレスラットの皮膚をセロテープで20回剥離した皮膚を用いてニコランジルの皮膚透過性を試験した。その結果、基剤をPGのみ及び10%IPM/PGとした時の透過性はほぼ等しく、Fig.6で示したintactな皮膚での10%IPM/PGからの透過性とほとんど等しかった(Fig.18)。したがってIPMを始めとする脂肪酸エステル類は透過のバリアーである角質層に作用し、その結果として薬物の透過性はもちろん基剤中の溶媒(PGあるいは水)の透過性をも高めているものと推察された。

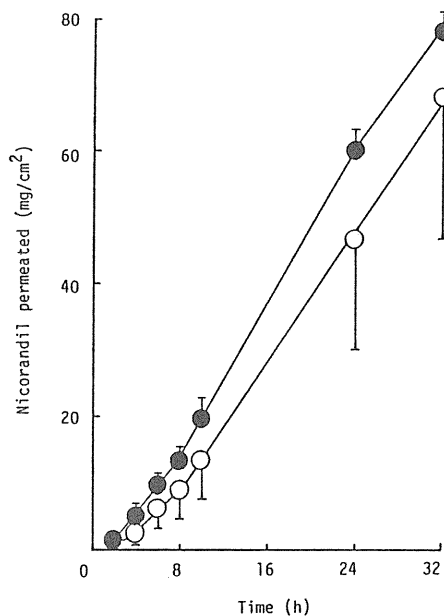


Fig. 18 Effect of IPM on the permeation of nicorandil across the stripped skin

PG(○), PG with 10%IPM(●).

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第4章 考察

序論でも述べたように皮膚適用製剤開発のための最初のポイントは選択した薬物の経皮吸収性の評価と、もう一つは吸収性の乏しい薬物の場合の吸収改善である。したがって本編においては、経皮吸収実験のモデル動物として近年汎用されるようになったヘアレスラットの摘出皮膚を用いて、ニコランジルの皮膚透過性の評価と吸収促進について *in vitro* で検討した。

本研究に先立ち、サンプリング時間、基剤中薬物濃度、皮膚サンプルの取扱い等について *in vitro* での皮膚透過性を正しく評価するための最低限の条件設定を行った。この条件を参考にニコランジルの皮膚透過性について試験したところ、水溶媒からの透過性に関してはさほど良好とは言えなかったが、脂肪酸エステル類とPGの混合基剤において薬効を現すのに十分と予想される皮膚透過性を得ることができた。またそれら脂肪酸エステル類の吸収促進機構に関する検討を加えたところ、皮膚角質層への直接作用（脂質区分への作用と思われる）により皮膚の抵抗性を下げ、その結果として薬物の透過を促進していることが示唆された。さらに脂肪酸エステル類は用いた基剤中の溶媒（PGあるいは水）の透過性も上げており、*solvent drag*が重要な透過機構の一つであることも併せて明らかとなった。

本編の結果だけでは *in vivo* あるいはヒトでの挙動を直接予測することはできないが、TTS開発の第一段階として今回のようなヘアレスラット摘出皮膚を用いた *in vitro* での薬物皮膚透過性の評価や基剤のスクリーニングは不可欠であり、この段階で以後の研究のための有用な知見が数多く得られるものと思われる。本研究により選択された脂肪酸エステル類(IPM)/PG系による皮膚刺

激性については未検討であるが、IPB、IPH、IPD を除いては製剤添加物として使用が認められている基剤であり、しかも臨床での治療効果が期待できるだけの薬物の皮膚透過量が得られたことから、ヒトへの展開が期待できる。すなわち以後の検討（in vivo あるいはヒトへのスケールアップ）に値するものと結論づけられる。

第2編 ヘアレスラットにおけるニコランジルのin vitroからin vivo 皮膚透過性の予測^{52,53)}

薬物を生体へ投与した際、薬物の体内への吸収量（あるいは吸収速度）と体内からの消失速度（クリアランス）がわかれば血中濃度や尿中排泄量の推測は可能である。経皮吸収においてもin vitroでの定常状態Fluxと総クリアランスとから定常状態での血中濃度を見積る方法が知られている⁵⁴⁾。この方法は、定常状態到達後の動態は予測できるもののそれ以前の吸収過程（ラグタイムを含む）の動態は予測できない。ところがTTSの中には定常状態に達するまでの時間が長かったり、また薬効から判断した場合適用後の初期吸収過程が重要である薬物も多いため、経皮適用後の体内動態（特に血中濃度）を解析するために様々なモデルを用いたアプローチが試みられている。本編において筆者は、in vitroからin vivo（血漿中濃度）の予測を目的に種々経皮吸収モデルを構築し、ニコランジルのin vitro 皮膚透過速度からin vivo 経皮適用後の血漿中濃度を予測して、実際にin vivo で測定した値との比較を試みた。

第1章 静脈内投与後の体内動態

ニコランジルの経口投与後あるいは静脈内投与後の体内動態に関してはSD系ラット⁵⁵⁾、ビーグル犬⁵⁶⁾あるいはヒト⁵⁷⁾で詳細に検討されており、経口投与後の消失半減期がラットで1.35時間、イヌで0.9時間、ヒトで0.8時間と比較的短い薬物であることが知られている。本研究ではモデル動物としてヘアレスラットを用いたため、まず最初にヘアレスラットにおけるニコランジル

の体内動態について検討した。

Fig. 19にニコランジルを 2.5, 5 及び10mg/kg 静脈内投与した時の血漿中の薬物濃度推移を示した。ニコランジルの血漿からの消失は 2相性を示したため 2-コンパートメントモデルを用いて消失パラメーターを算出した。

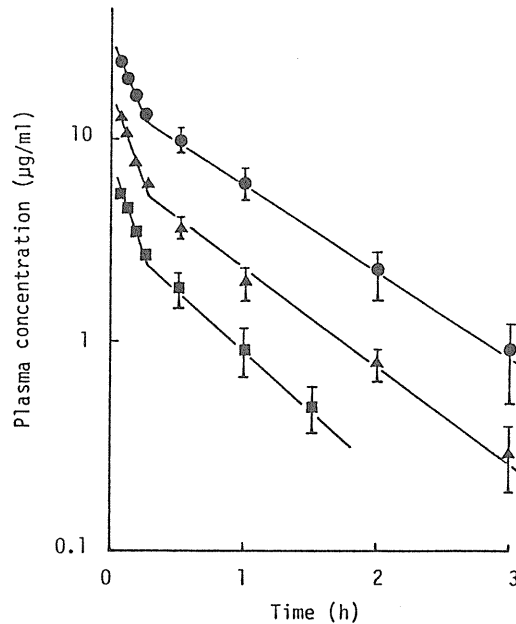


Fig. 19 Plasma concentrations of nicorandil after intravenous administration in hairless rat

2.5mg/kg(■), 5mg/kg(▲), 10mg/kg(●).

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 animals.

Table 3 に得られたパラメーターを示した。ニコランジルの血漿中濃度時間曲線下面積(AUC)は 2.5から10mg/kg まで投与量の増加に比例して増加し、しかも β 相の消失速度定数が 3投与量間でほぼ等しいため、ニコランジルの体内からの消失は線形モデルに従うことが明らかとなった。また得られた消失半減期の値も報告されている有毛ラットやヒトでの値に近い値のため、経時的な採血が

容易である点と併せてヘアレスラットは *in vivo* での経皮吸収実験にも適した動物種と考えられる。

Table 3 Pharmacokinetic parameters of nicorandil after intravenous administration

Parameter	Dose (mg/kg)		
	2.5	5	10
V_d (l/kg)	0.396 ± 0.035	0.326 ± 0.029	0.347 ± 0.058
α (h^{-1})	9.763 ± 2.547	8.554 ± 2.020	10.757 ± 0.698
β (h^{-1})	1.323 ± 0.228	0.934 ± 0.128	1.173 ± 0.027
k_{12} (h^{-1})	3.168 ± 1.017	3.533 ± 0.890	3.387 ± 0.124
k_{21} (h^{-1})	5.623 ± 1.503	3.556 ± 1.344	6.602 ± 1.013
k_{10} (h^{-1})	2.295 ± 0.337	2.399 ± 0.126	1.942 ± 0.218
CL (l/h/kg)	0.914 ± 0.173	0.788 ± 0.108	0.661 ± 0.037
AUC ($\mu g \cdot h/ml$)	2.926 ± 0.505	6.563 ± 0.796	15.179 ± 0.860

Each value represents the mean \pm S.E. of 3 animals.

Abbreviations : V_d , apparent volume of central compartment; α and β , disposition rate constant; CL, total body clearance; AUC, area under the plasma concentration-time curve.

第2章 コンピューレーション法による血中濃度の予測

薬物の *in vivo* での経皮吸収過程をモデル化し、Fig.20に示した。

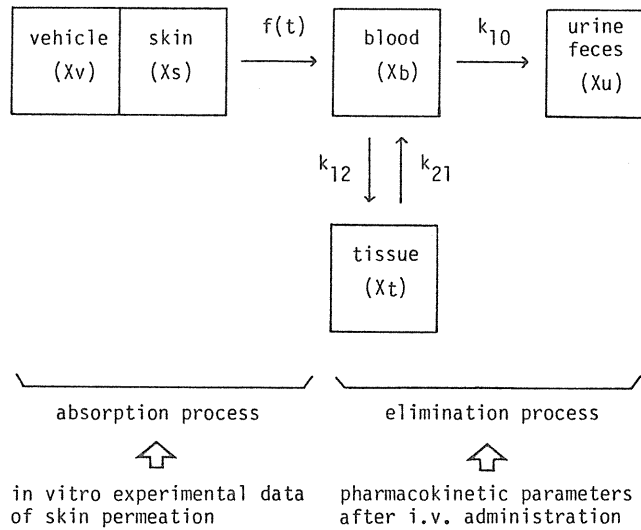


Fig. 20 Schematic model of percutaneous absorption and elimination of drugs

Fig.20において基剤，皮膚，血液，組織及び尿（糞）中の時間 t における薬物量をそれぞれ X_v, X_s, X_b, X_t, X_u とすると，その合計は適用薬物量 (X_0)となる。

$$X_v + X_s + X_b + X_t + X_u = X_0 \quad (4)$$

薬物の体内からの消失が 2-コンパートメントモデルで表される時，(4)式から(5)及び(6)式が得られる。

$$-\left(\frac{dX_v}{dt} + \frac{dX_s}{dt}\right) = \frac{dX_b}{dt} + \frac{dX_t}{dt} + k_{10} \cdot X_b \quad (5)$$

$$\frac{dX_t}{dt} = k_{12} \cdot X_b - k_{21} \cdot X_t \quad (6)$$

ここで k_{10} , k_{12} 及び k_{21} は静脈内投与時の血中濃度推移から得られた一次速度定数である。

In vivo での経皮吸収速度が in vitro での皮膚透過速度 $f(t)$ と等しいと仮定すると (7) 式が成立つ。

$$A \cdot f(t) = -\left(\frac{dX_v}{dt} + \frac{dX_s}{dt}\right) = \frac{dX_b}{dt} + \frac{dX_t}{dt} + k_{10} \cdot X_b \quad (7)$$

ここで A は薬物の適用面積である。

(6) 式と (7) 式を解くと、経皮適用後の血中濃度 $C_{ta}(t)$ はコンポリューションの式 (8) として表される⁵⁸⁾。

$$\begin{aligned} C_{ta}(t) &= \int_0^t A \cdot f(\theta) \left\{ \frac{C_{iv}(t-\theta)}{D_{iv}} \right\} \cdot d\theta \\ &= \int_0^t A \cdot f(\theta) \left[\frac{1}{V_d(\alpha-\beta)} \{ (\alpha - k_{21}) \cdot e^{-\alpha(t-\theta)} + (k_{21} - \beta) \cdot e^{-\beta(t-\theta)} \} \right] \cdot d\theta \quad (8) \end{aligned}$$

ここで $C_{iv}(t)$ 及び D_{iv} は静脈内投与後の時間 t における血漿中濃度及び投与量である。その他の記号に関しては Table 3 に示した通りである。

(8) 式は薬物の体内からの消失が 2-コンパートメントモデルに従う時、消失パラメーターと in vitro での皮膚透過速度データからコンポリューションを用いることによって経皮適用後の血中（血漿中あるいは血清中）濃度推移が計

算できることを示している。ニコランジルのヘアレスラットにおける消失パラメーターは第1章において算出済みであるので、本章では *in vitro* での透過速度 $f(t)$ を決定するために、各種基剤（溶媒）からのニコランジル *in vitro* 皮膚透過実験をヘアレスラット摘出皮膚を用いて実施した。基剤としては、外用剤あるいは化粧品等の皮膚適用製剤に汎用されている水、PG、ポリエチレングリコール-400 (PEG)、並びにイソプロピルアルコール (IPA) の4種の純溶媒を用いた。Donor 中の薬物は基剤中での活量を等しくするため全て懸濁とし、実験温度は 37°C とした。

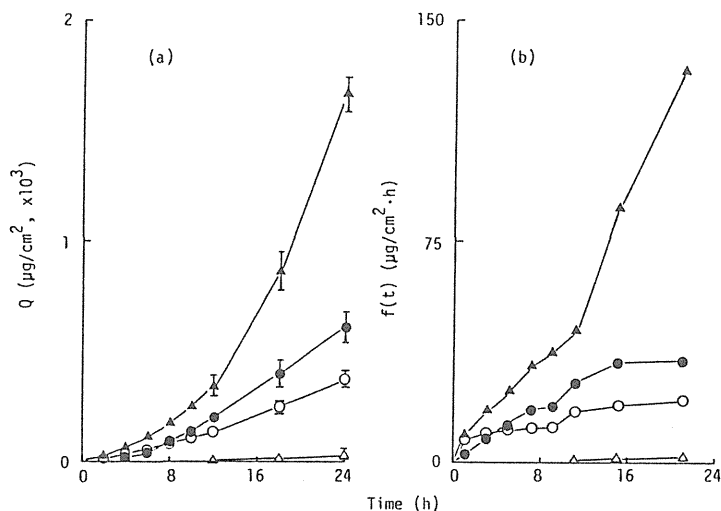


Fig. 21 Effect of solvents on the skin permeation of nicorandil across the hairless rat skin

(a) Cumulative amount of permeation, Q with water (O), PG (●), PEG (Δ) and IPA (▲).

(b) Permeation rate, $f(t)$, symbols as in (a).

Each point represents the mean of 3-6 experiments. Vertical bars indicate the standard error.

Fig. 21a には基剤として用いた 4種の溶媒からのニコランジル累積皮膚透過量を、またFig. 21b には各測定時間間隔における $f(t)$ 値をプロットした。図から明らかなように、定常状態での透過速度はIPA>PG> 水>PEGの順であった。水およびPG溶媒を用いた時10時間以後に $f(t)$ の上昇が見られたが、それ以後ほぼ一定の $f(t)$ を示した。これは皮膚の水和(hydration)の影響が10時間付近から大きく現れた結果と推察される^{59,60}。またIPA 溶媒においては、24時間まで $f(t)$ は経時的に上昇し定常状態には達しなかった。

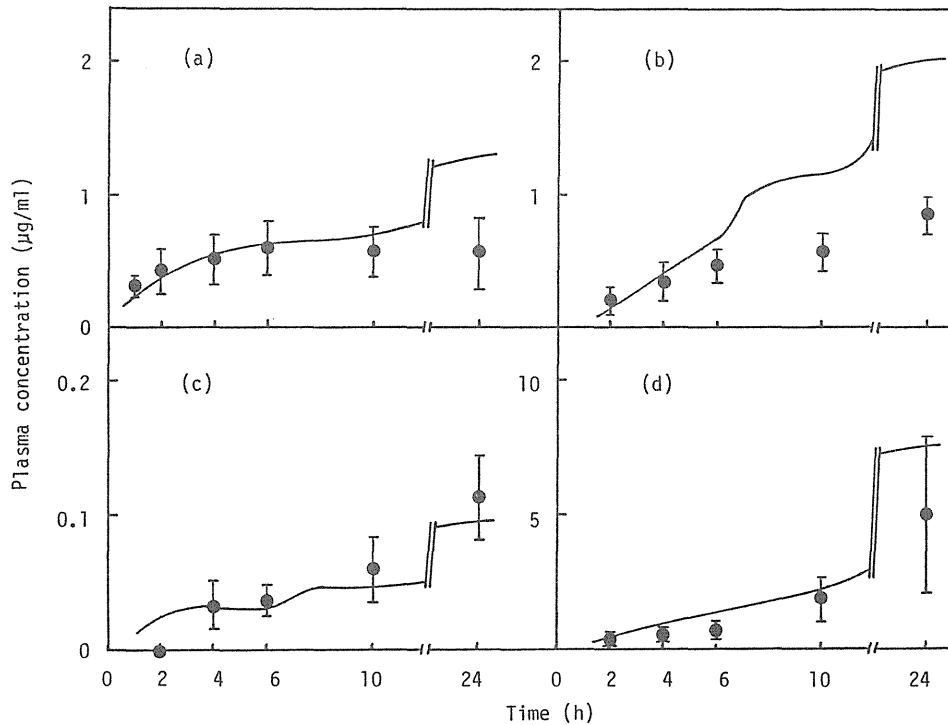


Fig. 22 Relationship between observed and calculated plasma concentrations of nicorandil after topical application of gel ointments in hairless rats
 (a) Aqueous gel; (b) PG gel; (c) PEG gel; (d) IPA gel.
 Each point, $C'_{ta}(t)$, represents the mean \pm S.D. of 3-6 animals.
 The solid line, $C_{ta}(t)$, was calculated by using Eq.8.

Fig. 21b から得られた $f(t)$ と静注後の消失パラメーター (Table 3) を用いて、式 (8) からニコランジル経皮適用後の血漿中濃度推移を予測した。この際、コンボリューション計算には矩形法を用いた⁵⁸⁾。また消失パラメーターとしては、2.5, 5, 10 mg/kg 投与時の消失半減期に有意な差が見られなかったことより 5mg/kg のデータを用いた。

Fig. 22 には計算した予測曲線を実際に測定した血漿中濃度と共にプロットした。血漿中ニコランジル濃度の測定は、少量の高分子 (0.8% ポリアクリル酸あるいは 3% ヒドロキシプロピルセルロース) により増粘したゲルを貼付することにより行った (第 2 編実験の部参照)。厳密には 2-チャンバー拡散セルを用いた *in vitro* 実験における溶液での適用と今回の *in vivo* のゲルでの適用状態は異なるが、薬物のゲルからの放出は極めて速くまた両者とも薬物を懸濁状態で含有していることから、ゲルにしたことによる実験値への影響はほとんどないものと予想した。図から明らかのように、実測値と予測値は良く一致し、PEG 及び IPA 溶媒では 24 時間後の予測値は実測値のバラツキの範囲内に収まった。一方、水溶媒では 10 時間まで PG 溶媒では 6 時間まで両者は良く一致し、それ以後予測値が実測値よりも高い値を示す傾向にあったが、24 時間後における両者の差は 2 倍程度であった。したがってコンボリューション法により経皮適用後の血漿中濃度推移の予測が可能であり、特に 10 時間程度の予測には充分実用的であることが示唆された。経皮吸収性の乏しい薬物の吸収を上げるために基剤中に吸収促進剤を添加する方法がよく用いられており^{32, 37)}、ニコランジルのヘアレスラット皮膚透過性も脂肪酸エステル類 (IPM)/PG を基剤として用いると顕著に促進されることを第 1 編において報告した。そこでそれら吸収促進剤を添加した時のコンボリューション法の有用性について以下に検討した。吸収促

進剤を含む基剤としては、第1編で用いた10%IPM/PG はもちろんのこと、それ以外で高い促進効果の得られたAzone(3%及び10%)水溶液並びに50% エタノール (EtOH)水溶液を用いた。

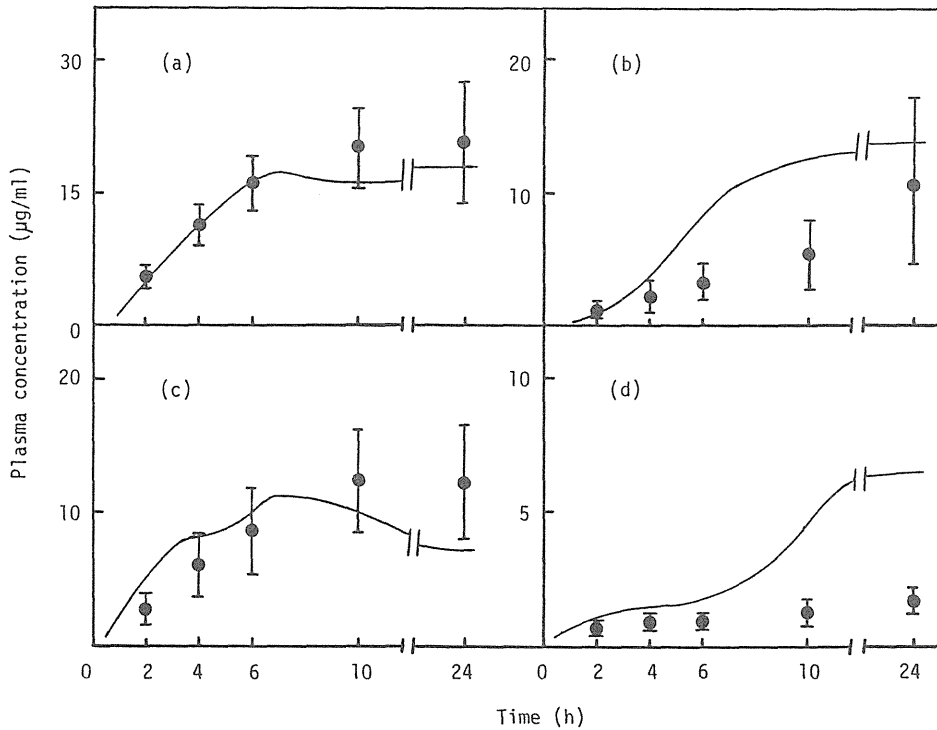


Fig. 23 Relationship between observed and calculated plasma concentrations of nicorandil after topical application of gel ointments in hairless rats

- (a) 10%IPM/PG gel; (b) 3%Azone/water gel;
- (c) 10%Azone/water gel; (d) 50%EtOH/water gel.

Each point, $C'_{ta}(t)$, represents the mean \pm S.D. of 4-5 animals.

The solid line, $C_{ta}(t)$, was calculated by using Eq.8.

Fig.23に2-チャンバ-拡散セル実験から得られた *in vitro*透過速度と消失パラメータ-(Table 3) とから算出したニコランジル血漿中濃度の予測曲線を血漿中濃度の実測値とともにプロットした。なお *in vivo* での適用面積を吸収促

進剤の含まない系(Fig.22)と同じ 4.91cm^2 としたところ、血漿中濃度が上昇しすぎ途中で死亡するラットが何匹か現れたので、本実験では適用面積を 0.636cm^2 とした。それにもかかわらず、いずれの基剤においてもin vivoでの吸収促進効果はin vitroと同様に顕著で、10%IPM/PG系での濃度は約 $15\mu\text{g/ml}$ と高いレベルに達した。予測値と実測値を比較すると、10%IPM/PG及び10%Azone水溶液では両者は良く一致し本法の有用性が示されたが、3%Azone並びに50%EtOH水溶液では予測値が実測値よりも高くなる傾向が認められた。この傾向はFig.22で示した吸収促進剤を含まない系でも認められており、その理由としては主に以下の3点が考えられた。

1. In vitroとin vivoでの皮膚hydrationの違い
2. 皮膚表面温度の違い
3. 適用剤形並びに適用方法の違い

1.に関して、in vivoでの角質層はin vitroに比べてhydrationの程度は低いという報告があるが⁶¹⁾、in vitroとin vivoでhydrationの影響がどの程度異なるのかは今のところ不明である。2.に関して、ヘアレスラットの腹部に適用したゲルの皮膚表面近くの温度を小型温度計を用いて測定したところ、解放状態で約 $33(30\text{分後})\sim 34^\circ\text{C}(6\text{時間後})$ 、パラフィルムで密封した時約 $35(30\text{分後})\sim 36^\circ\text{C}(1\text{時間後})$ であった。実際のin vivo実験は密封で行っているため、in vitroでの実験温度 37°C との差は $1\sim 2^\circ\text{C}$ 程度と小さいものの若干低く、in vivo実測値が予測値より低い理由の一つであると考えられる。3.の適用剤形の違いに関しては、実際の製剤として水溶液で適用することは非常にまれでもあるため、若干の検討を加えた。

Fig.24には、Fig.23であまり一致しなかった3%Azoneと50%EtOH水溶液のゲ

ルを *iv vivo* 測定時と同様に調製し、そのゲルを縦型の拡散セルに適用した時の *in vitro* 累積透過量を、Fig. 25にはその時の値を用いてコンボリューション法で算出した予測血漿中濃度を実測値 (Fig. 23 と同一) とともにプロットした。その結果、両製剤ともに予測値は実測値と良く一致し、3%Azone のように吸収促進剤の含量が少ない場合や基剤中に EtOH のような皮膚を比較的透過し易くそのため経時的に基剤組成が変化する (その変化が薬物の透過性を大きく変える) おそれがある場合には、2-チャンバー拡散セルを用いて溶液状態で評価するよりは、実際の製剤に近い形で評価する方が *in vivo* の予測のためにはより適切であることが示唆された。いずれにしても、吸収促進剤を添加した系においてもコンボリューション法により *in vivo* での血漿中濃度の予測は可能であり、本法は経皮吸収実験における *in vitro* から *in vivo* へのアプローチに有用であると結論づけられる。

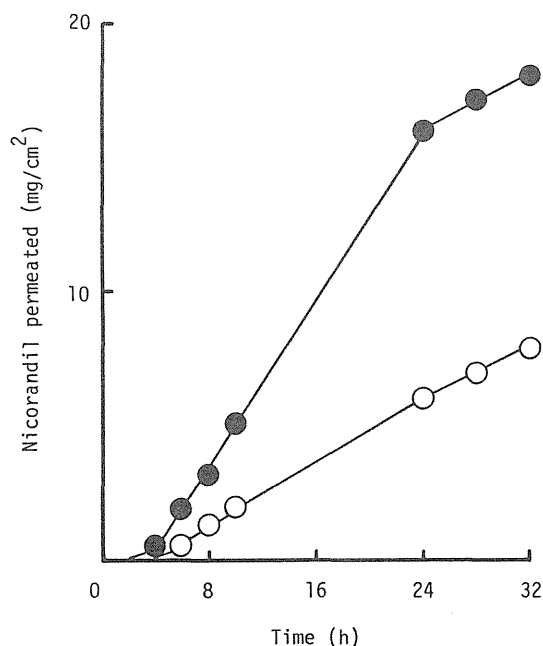


Fig. 24 In vitro skin permeation of nicorandil studied by the vertical type diffusion cells

3%Azone/water (●), 50%EtOH/water (○).

Each point represents the mean of 3 experiments.

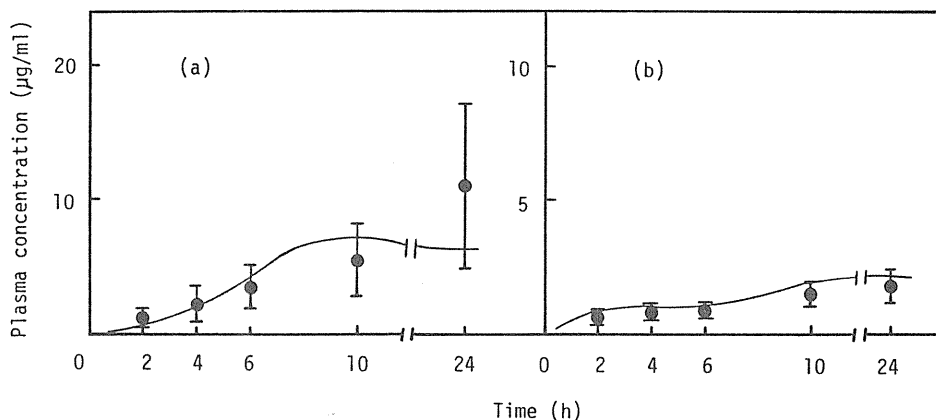


Fig. 25 Relationship between observed and calculated plasma concentrations of nicorandil after topical application of gel ointments in hairless rats
(a) 3%Azone/water gel; (b) 50%EtOH/water gel.

Each point, $C'_{ta}(t)$, represents the mean \pm S.D. of 3 animals.

The solid line, $C_{ta}(t)$, was calculated by using Eq.8.

薬動学(Pharmacokinetics)の分野では、薬物の体内への吸収速度を計算する目的でコンポリューションよりもむしろデコンポリューションが汎用されている⁶²⁻⁶⁴。今回のモデルにおいても(8)式が成り立つ場合、デコンポリューションを用いてin vivoでの経皮吸収速度 $f'(t)$ が(9)式から算出される。

$$C'_{ta}(t) = \int_0^t A \cdot f'(\theta) \left\{ \frac{C_{iv}(t-\theta)}{D_{iv}} \right\} \cdot d\theta \quad (9)$$

ここで $C'_{ta}(t)$ はin vivo 経皮吸収実験より得られた血中濃度を、 $C_{iv}(t)$ は(8)式と同様に静注時の血中濃度である。

Fig.26には4種の純溶媒を適用した時の血漿中濃度(Fig.22)からデコンポリューションを用いて計算したin vivoでの吸収速度の推移を、in vitroでの吸

取速度 (Fig. 21b) とともにプロットした。デコンボリューションの計算に際し、
 血漿中濃度の実測値のない時間に関してはスプライン関数を用いて補間した。
 Fig. 26はコンボリューション法で血漿中濃度を予測したFig. 22と同様に、PEG
 及びIPAでの良い一致と水及びPGでの実験の後半部におけるずれを示している。
 コンボリューションとデコンボリューションは逆の計算をしているだけであるの
 で当然の結果であるが、実用面においては経皮吸収機構やin vitro-in vivoの
 相関を議論する際にはデコンボリューション法を用いた吸収速度での比較がよ
 りわかり易く、血中濃度の予測に有用なコンボリューション法とあわせて優れ
 た方法であると考えられる。

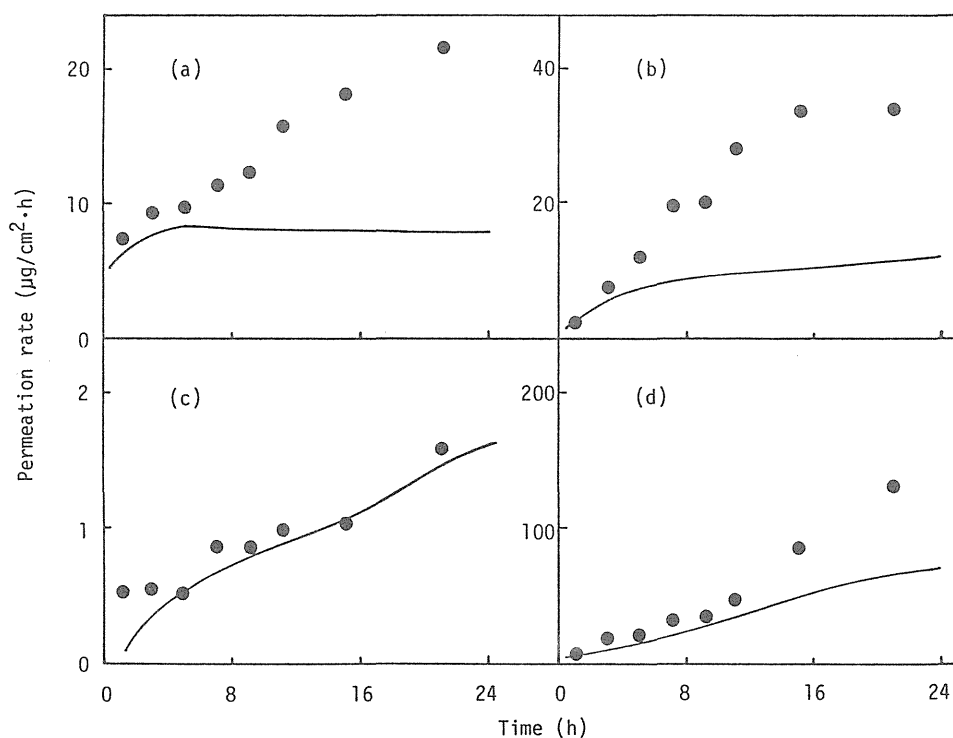


Fig. 26 Comparison between the in vitro skin permeation rate
 and calculated values for nicorandil
 (a) Water; (b) PG; (c) PEG; (d) IPA.

Each point, $f(t)$, represents the mean of 3-4 experiments.
 The solid line, $f'(t)$, was calculated by using Eq.9.

第3章 拡散モデルによる解析

薬物の皮膚透過はその薬物の濃度勾配を駆動力とする受動拡散に従う(1式). したがって経皮吸収速度論を取り扱う場合, 古くから拡散モデルで議論されてきた^{65,66)}. 拡散モデルは使用するパラメーターが物理化学的な意味を有しているためin vitroでの挙動を解析するには優れた方法であるが, 式の誘導が難しく, 特に薬物の消失が2-コンパートメントモデルに従う場合などはin vivoでの血中濃度予測にはあまり用いられていなかった. 第2章において著者は, 薬物のin vitroでの皮膚透過速度と体外への消失パラメーターとからin vivoにおける血中濃度を予測する方法としてコンボリューション法を確立した. コンボリューション法は複雑な計算式を必要としないのでin vitroからin vivoへの薬物の皮膚透過速度の予測には適しているが, 長時間にわたる血中濃度推移を予測するためにはin vivoで必要とするタイムスケジュールを考慮した長時間のin vitro試験が必須であるという欠点を有している. そこで本章においては, shunt pathwayを有した拡散モデルを新たに構築し, ニコランジルのin vitro透過データの解析とin vivo血中濃度の予測に用いた.

皮膚を単一な拡散膜(しかも拡散ルートとは独立したshunt pathway P_s を有している)と仮定すると, 経皮吸収拡散モデルはFig.27のように表される. 薬物の基剤中濃度が一定で(懸濁状態), しかもReceiver側はシンク状態を維持していると仮定すると, in vitro(Fig.27a)での薬物移動の微分式は以下のようになる. なお記号の詳細についてはFig.27に示した通りである.

$$dX_v/dt=0 \quad (10)$$

$$dX_s/dt = -DA_1(\partial C_s/\partial x)_{x=0} + DA_1(\partial C_s/\partial x)_{x=L} \quad (11)$$

$$dX_r/dt = -DA_1(\partial C_s/\partial x)_{x=L} \quad (0 \leq t < t_s) \quad (12)$$

$$= -DA_1(\partial C_s/\partial x)_{x=L} + P_s A_1 C_v \quad (t \geq t_s)$$

上記の微分方程式並びにFickの第2式 $\partial C_s/\partial t = D(\partial^2 C_s/\partial x^2)$ をそれぞれの境界条件 ($C_s = K C_v$ at $x=0$, $C_s=0$ at $x=L$) 及び初期条件 ($C_s=0$ at $t=0$) で解き、薬物の累積透過量 Q を求める一般式 (13) を得た。

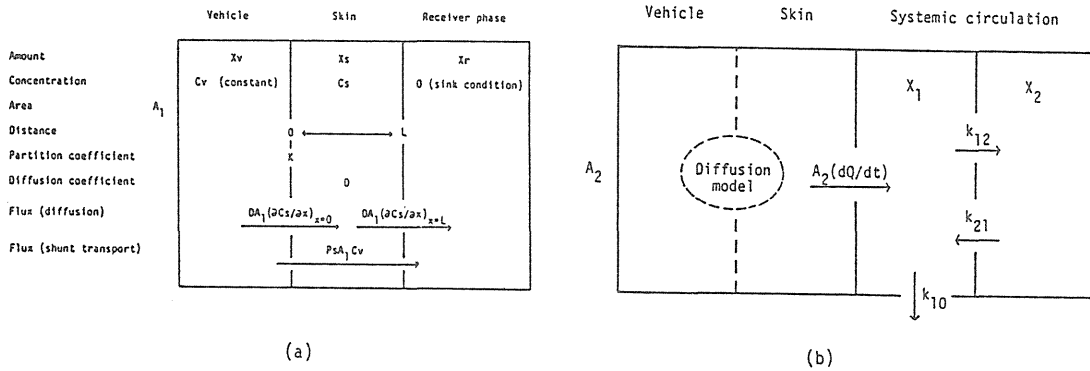


Fig. 27 Schematic diffusion model of in vitro (a) and in vivo (b) percutaneous drug absorption

The skin is postulated to be a diffusion membrane with thickness L , diffusion coefficient D and transport rate constant of shunt pathway P_s . The amounts of the drug dissolved in the vehicle, skin and receiver phase are designated as X_v, X_s and X_r , respectively. The concentration of the drug in the vehicle and effective diffusion area are designated as C_v and A_1 , respectively. At the vehicle-skin boundary, the drug is partitioned according to the partition coefficient K .

$$Q = DKC_v/L \cdot (t - L^2/6D) - 2KC_vL/\pi^2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n/n^2 \cdot \exp(-n^2\pi^2D/L^2 \cdot t) + P_s C_v(t - t_s) \quad (13)$$

ここで DKC_v/L , $6D/L^2$ 及び $P_s C_v$ をそれぞれ $P(1)$, $P(2)$, $P(3)$ とおき, *in vitro* 透過データを非線形最小二乗法 MULTI⁶⁷⁾ を用いた curve-fitting により解析した。

薬物の体内からの消失が2-コンパートメントモデルに従う時, *in vivo* での経皮吸収拡散モデルは Fig. 27b のように図示される。この場合の微分方程式は以下のように表わされる。

$$dX_1/dt = A_2(dQ/dt) - (k_{12} + k_{10})X_1 + k_{21}X_2 \quad (14)$$

$$dX_2/dt = k_{12}X_1 - k_{21}X_2 \quad (15)$$

ここで A_2 は適用面積を, k_{10} , k_{12} , k_{21} は一次速度定数を示している。

(14)式に *in vivo* 吸収速度, dQ/dt (式(13)を微分したもの) を代入して血中濃度 C_p を表す式(16)を得た。

$$C_p = \frac{P(1)MA_2}{D_o(iv)} \left[\frac{1 - e^{-\alpha t}}{\alpha} - \frac{e^{-\alpha t}}{P(2)} - \frac{12}{\pi^2 P(2)} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \left\{ \frac{\frac{n^2 \pi^2 P(2)}{6} e^{-n^2 \pi^2 P(2) \cdot t/6} - \alpha e^{-\alpha t}}{\frac{n^2 \pi^2 P(2)}{6} - \alpha} \right\} \right] + \frac{P(1)NA_2}{D_o(iv)} \left[\frac{1 - e^{-\beta t}}{\beta} - \frac{e^{-\beta t}}{P(2)} - \frac{12}{\pi^2 P(2)} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \left\{ \frac{\frac{n^2 \pi^2 P(2)}{6} e^{-n^2 \pi^2 P(2) \cdot t/6} - \beta e^{-\beta t}}{\frac{n^2 \pi^2 P(2)}{6} - \beta} \right\} \right] \quad (16)$$

ここで M , N , α , β は一般式(17)で表される投与量 $D_0(iv)$ の時の薬動学パラメーターである。なお *in vivo* においては *shunt pathway* の項をゼロとおいた。

$$C_p(iv) = M \cdot e^{-\alpha t} + N \cdot e^{-\beta t} \quad (17)$$

以上得られた式を用いて、*in vitro* (13式) 及び *in vivo* (16式) でのニコランジル皮膚透過性のデータを解析した。解析には第1章で得られた水並びにPG溶媒での透過速度 $f(t)$ と血漿中濃度 $C'_{ta}(t)$ の値を用いた (Fig.21及びFig.22参照)。

各々の図 (水溶媒の結果はFig.28に、PG溶媒の結果はFig.29に示した) においては、*in vitro* での計算された皮膚透過曲線を実測値と共に左側(a)に、*in vitro* データから計算された血漿中濃度曲線を実測値と共に右側(b)に示した。

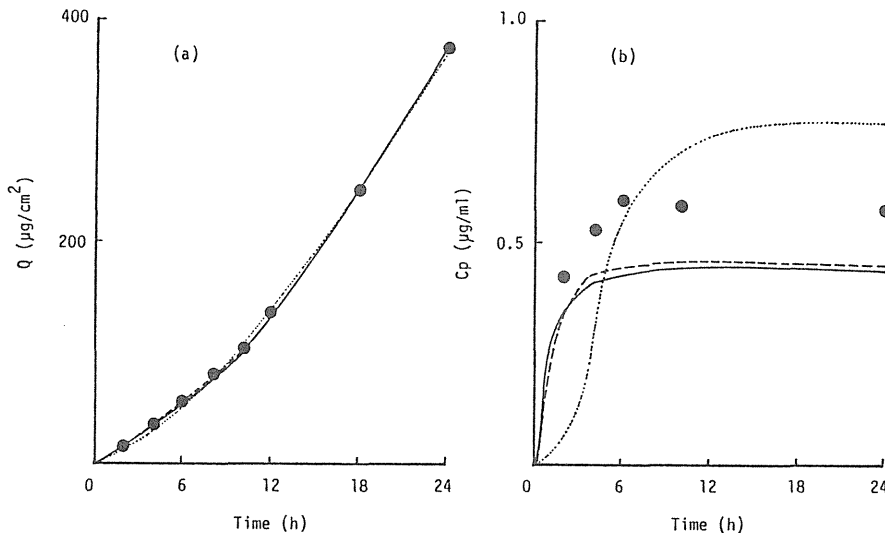


Fig. 28 Comparison between observed and calculated values of skin permeation of nicorandil in water treatment
 (a) Cumulative amount of permeation *in vitro*.
 (b) Time course of plasma concentration *in vivo*.

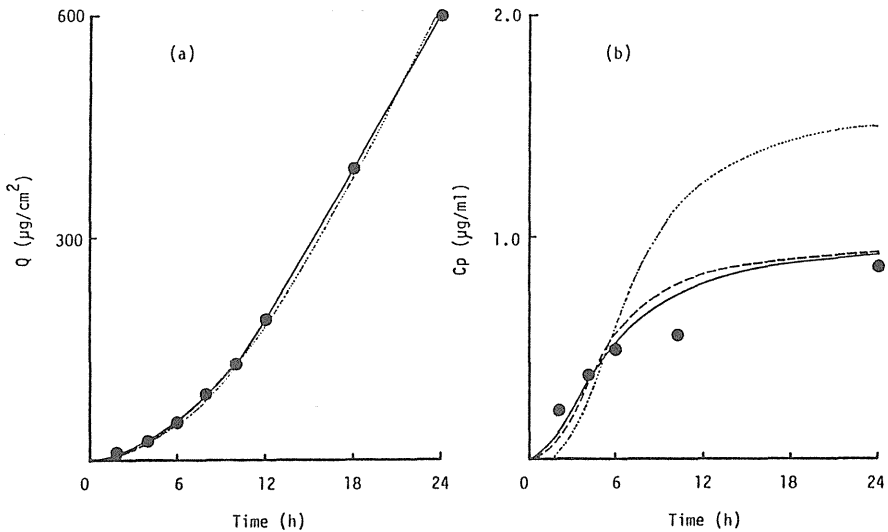


Fig. 29 Comparison between observed and calculated values of skin permeation of nicorandil in PG treatment
 (a) Cumulative amount of permeation in vitro.
 (b) Time course of plasma concentration in vivo.

まず最初に単純な拡散モデル (shunt pathway P_s をゼロとおいた) を用いて *in vitro* データを解析し、得られた値から *in vivo* の挙動を予測した (それぞれ図中 dotted line で示した)。図から明らかなように、水及びPG溶媒ともに *in vitro* でのシミュレーション曲線は実測値と良く一致していた。In vivo においてはPGでの前半部分を除いて計算された予測値と実測した血漿中濃度はあまり一致せず、特にPGでの後半部分 (6 時間以後) で顕著であった。この傾向は第1章のコンポリューション法での結果と同様であり、時間の経過とともに *in vitro* と *in vivo* における皮膚透過性にずれが生ずることを示唆している。この点を確認するために、次に *in vitro* のデータの前半部のみ (0 ~ 10時間) を用いて解析を行い、得られた値から *in vivo* の予測を行った (図中 dashed line)。その結果、血漿中濃度の計算値は水及びPG両者において実測値と良く

一致し、このことは水やPGといった親水性の基剤を用いた時 *in vitro* 透過実験の初期の状態、すなわち hydration の影響等を大きく受ける前の皮膚の状態が *in vivo* での状態に近いことを示唆している。この点について Behlら⁶⁰⁾ は、hydration による皮膚透過性の変化はその透過物質の特性による、すなわち水やメタノールといった極性物質は hydration によりその透過性に影響を受けないのに対して、ブタノールやヘキサノールのような比較的親油性の物質は hydration により10時間以後の透過係数がほぼ 2倍になったと報告している。今回の実験に使用したニコランジルに限らず、比較的親油性の薬物の場合には、*in vitro* 実験では皮膚の hydration に起因する透過係数の変化が予想されるため、*in vitro* から *in vivo* への予測にはその点に注意をはらう必要があり、解析に使用するモデルにも工夫が望まれる。

以上の結果から、*in vitro* と *in vivo* の皮膚を同一の拡散膜と考えるよりは *in vitro* において *in vivo* とは異なる透過ルートが存在を考えたほうがより実際的であると思われた。そこで *in vitro* での後半部（今回は10時間以後とした）に shunt を導入したモデル ($P_s \neq 0$) を用いて *in vitro* データの解析を行い、得られた値を用いて *in vivo* 挙動を予測した（図中 solid line）。その結果、前記の10時間までのデータを用いた場合と同様に血漿中濃度の予測値と実測値は良く一致し、ニコランジルの経皮吸収を拡散モデルで解析する際、受動拡散の項だけでなく shunt pathway も考慮したモデルが有用であることが示唆された。

第4章 コンパートメントモデルによる解析

薬動学分野においては、薬物を経口投与したり静脈内投与した際の体内動態の解析にコンパートメントモデルが汎用されている。経皮吸収の解析においても皮膚を独立したコンパートメントと見なしたモデルがいくつか報告されており⁶⁸⁻⁷¹⁾、コンパートメントモデルは拡散モデルと並んで最も一般的なモデルとなっている。本章においては、第2章と同様に shunt pathway を有するコンパートメントモデルを構築し、ニコランジルの皮膚透過データ (Fig.21 及び Fig.22) を解析した。

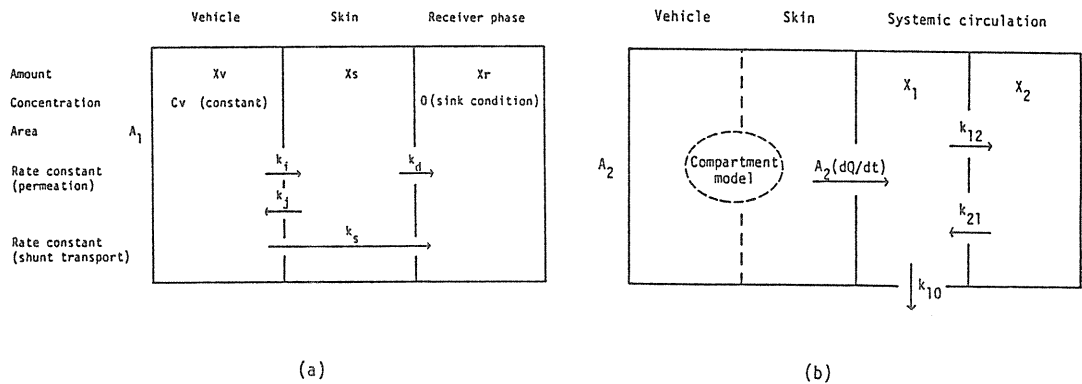


Fig. 30 Schematic compartment model of in vitro (a) and in vivo (b) percutaneous drug absorption

X_v , X_s , X_r , C_v and A_1 are the same in the legend to Fig.27. The first-order rate constants connecting each compartment are designated as k_i , k_j and k_d , and that of shunt transport is indicated as k_s .

基剤，皮膚，Receiver相をそれぞれ独立したコンパートメントと見なすと，
in vitro 経皮吸収モデルはFig. 30a で表される．薬物の基剤中濃度が一定でし
 かもReceiver側がシンク状態に保たれていると仮定すると，(18)～(20)式が成
 り立つ．なお記号の詳細についてはFig. 30に示した．

$$dX_v/dt = 0 \quad (18)$$

$$dX_s/dt = k_i X_v - k_e X_s \quad (\text{where } k_e = k_j + k_d) \quad (19)$$

$$dX_r/dt = k_d X_s \quad (0 \leq t < t_s) \\
 = k_d X_s + k_s X_v \quad (t \geq t_s) \quad (20)$$

この微分方程式を解いて単位面積当たりの累積透過量 Q を求める式(21)を得た．

$$Q = k_i k_d X_v / k_e A_1 \{ t + \exp(-k_e t) / k_e - 1 / k_e \} + k_s X_v / A_1 \cdot (t - t_s) \quad (21)$$

(21)式において $k_i k_d X_v / k_e A_1$ ， k_e 及び $k_s X_v / A_1$ をそれぞれ $P(1)$ ， $P(2)$ ， $P(3)$ とお
 き，*in vitro* 透過データをMULTIを用いたcurve-fittingにより解析した．

In vivo でのコンパートメントモデルはFig. 30bのように図示され，この場
 合の微分方程式は拡散モデルの時と同じになる(14及び15式)．(14)式に吸収
 速度 dQ/dt (式(21)を微分したもの) を代入して血中濃度 C_p を表す式(22)を
 得た．

$$C_p = \frac{A_2}{D_o(iv)} \left[\frac{MP(1)P(2)}{\alpha\{\alpha - P(2)\}} e^{-\alpha t} + \frac{NP(1)P(2)}{\beta\{\beta - P(2)\}} e^{-\beta t} + \frac{P(1)\{P(2)(M+N) - \alpha N - \beta M\}}{\{\alpha - P(2)\}\{\beta - P(2)\}} e^{-P(2)t} + \frac{P(1)(\alpha N + \beta M)}{\alpha\beta} \right] \quad (22)$$

以上得られた式を用いて、in vitro (21式) 及び in vivo (22式) でのニコランジル皮膚透過データ (水及びPG溶媒) を解析した。

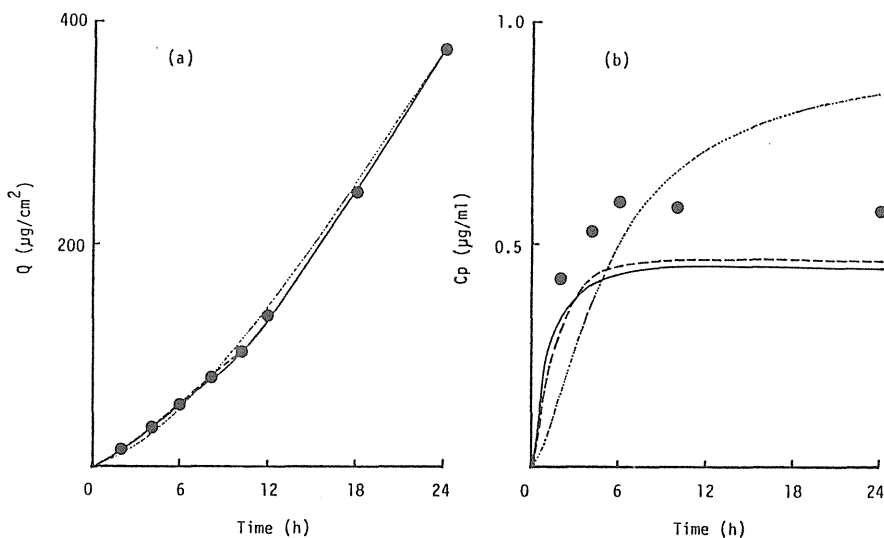


Fig. 31 Comparison between observed and calculated values of skin permeation of nicorandil in water treatment
 (a) Cumulative amount of permeation in vitro.
 (b) Time course of plasma concentration in vivo.

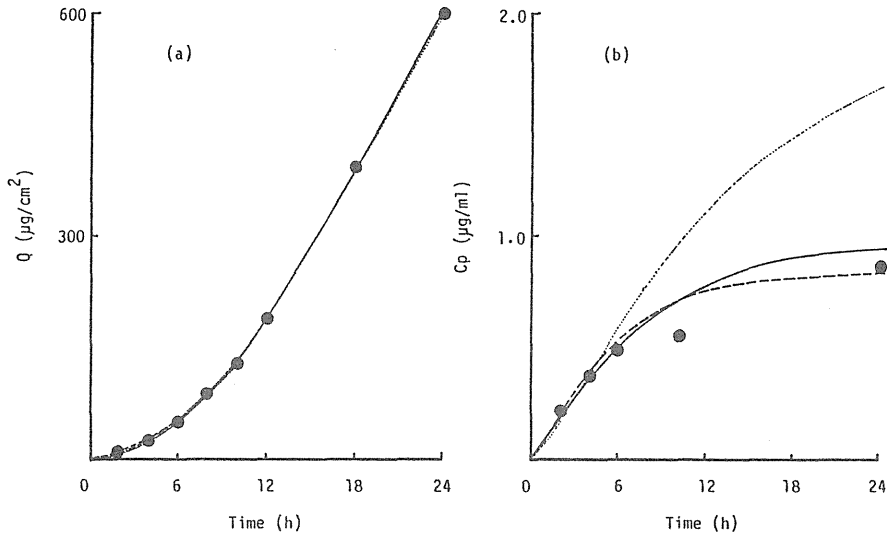


Fig. 32 Comparison between observed and calculated values of skin permeation of nicorandil in PG treatment
 (a) Cumulative amount of permeation in vitro.
 (b) Time course of plasma concentration in vivo.

Fig. 31及びFig. 32に得られた結果を示した。解析方法は第3章の拡散モデルの時と同一で、shunt pathway をゼロとおいた時(dotted line) , in vitroの前半部のみのデータを用いた時(dashed line) , 後半部にshunt pathway を導入した時(solid line)の3通りで行った。いずれの解析によっても得られた結果は拡散モデルの時と同様な傾向を示し、拡散モデルとコンパートメントモデルはin vitro皮膚透過データの解析並びにin vitroからin vivoの予測性という点ではほぼ同等であると考えられる。

第5章 考察

皮膚適用製剤は摘出皮膚を用いた *in vitro* での評価が可能な点で他の投与剤形と大きく異なっている。しかしながら最終目的はあくまでも *in vivo* にあるため、*in vitro* での結果をいかにして *in vivo* に反映させるかが重要な問題となってくる。そのため従来から拡散モデルやコンパートメントモデルによる解析が試みられてきたが、むしろ *in vitro* の皮膚透過性の解析や予測を目的としたものが多く、血中濃度の予測を目的としたものは少なかった。また当然のことながら、血中濃度の予測法に関して幾つかの方法を比較した例も見当たらない。そこで本研究においては 3 種類の方法、すなわちコンボリューション法、shunt pathway を有する拡散モデル、同じく shunt pathway を有するコンパートメントモデルを用いて、ニコランジルの *in vitro* 皮膚透過データの解析と *in vivo* の予測性を比較検討した。Table 4 に各方法の特徴をまとめて示したが、それぞれが利点と欠点を有しており一概にどの方法が優れているとは言えない。したがって、目的に応じて各方法を使い分けることが重要であると考えられる。

コンボリューション法は過去において経皮吸収の解析に応用した例がないため、純溶媒を基剤とした単純な系のみではなく吸収促進剤を含む基剤でもその有用性を検討した。その結果、コンボリューション法により *in vivo* での血漿中濃度の予測が許容できるバラツキの範囲内で可能なこと、また吸収促進剤を含む系でも実用的であり特に最終製剤に近い形態で評価した *in vitro* 透過実験の結果はその製剤を適用したときの *in vivo* の予測性に優れていることなどが明らかとなった。

拡散モデルは使用するパラメーター（拡散係数 D 、分配係数 K 、バリアーの厚さ L ）がそれぞれ物理化学的に意味のあるものであり、解析して得られた結果を経皮吸収のメカニズムや透過ルートの推測に用いることができる。本編では *in vivo* の予測という点に絞ってモデルを利用したが、むしろ *in vitro* 皮膚透過データの解析に適した方法であるといえる（第3編においては拡散式を利用して各動物における *in vitro* 皮膚透過性の解析を行い、種差の要因を明らかにした）。

Table 4 Comparison of the characteristics of the diffusion model, compartment model and convolution method

Method (Model)	Diffusion	Compartment	Convolution
Model dependency	Dependent	Dependent	Independent ^a
Physicochemical meanings of the parameters in relation to skin permeability	Parameters(D, K, L) are meaningful	Parameters(k_i, k_j, k_d) are less meaningful	No parameters are used
Derivation and utilization of the equation	Most difficult	Difficult	Easier
Estimation of the blood concentration beyond the <i>in vitro</i> experimental period	Possible	Possible	Impossible
Slight change or modification of model	Possible ^b	Possible ^b	Impossible

a) Useful whatever drugs are metabolized and/or adsorbed in the skin.

b) For example, introduction of shunt transport.

コンパートメントモデルはin vivoでの経皮吸収の解析に良く用いられている方法であり、この目的においては最も確立された方法であると考えられる。本研究においては、皮膚を一つのコンパートメントとして取り扱い解析に用いたが、拡散モデルと同様にshunt pathwayを導入することによりin vitroからの予測値とin vivo実測値を一致させることが可能となった。計算式の誘導も拡散モデルに比べると容易であるため、経皮適用後の薬物の体内動態の解析に用いるには有用な方法の一つであると考えられる。

一般的にモデルを複雑にすればするほど使用するパラメーターが多くなり、結果として計算値と実測値のより良一致が得られる。今回も拡散モデルとコンパートメントモデルにshuntという項を一つ加えることにより満足できる結果が得られた。しかしshunt pathwayに関しては汗腺や毛嚢由来の透過ルートであるという説や、今回のようなhydrationに因るものだという考え方もあり、全ての薬物においてその導入が妥当であるとは限らない。したがって実用的には、より簡便な方法で許容できる範囲内のバラツキに収まるものが望ましく、その点において第2章で確立したコンボリューション法はmodel independentでありしかも複雑な計算式を必要としないので、利用価値が高いものと考えられる。以上の理由から、ヒトin vivoを予測する第4編においてはコンボリューション法を用いることにした。

第3編 ニコランジルの *in vitro*皮膚透過性における種差とヒトへの 予測⁷²⁾

序論でも述べたように経皮吸収実験の最終目的はヒトにあるため、ヒトを用いた検討が自由にできればそれに越したことはないが、様々な制限から本研究で用いたようなヘアレスラットなどの動物での研究が大部分を占めているのが現実である。しかしながら動物とヒトの間の経皮吸収性には大きな種差が存在することが知られており^{14, 15, 73)}、動物でのデータをそのままヒトに当てはめることはできない。この問題を解決するために種々動物とヒトの皮膚を用いた比較実験が多数行なわれており、ヒトの経皮吸収性に近い動物種についての報告もいくつかある。例えば、Bartekらはミニブタが良いモデル動物であるとしているし⁷⁴⁾、Westerらはサルにおける幾つかの薬物の経皮吸収性がヒトに近かったと述べている⁷⁵⁾。しかしこれらの報告のほとんどは選択した薬物の動物とヒトでの一致性や相違について論じているだけであり、動物実験データからヒトへのアプローチを試みた例はほとんどない。

第1編並びに第2編において著者は、ヘアレスラットを用いて *in vitro*, *in vivo* 両面からニコランジルの経皮吸収性を評価してきた。特に第2編では、*in vitro* 摘出皮膚透過性から *in vivo* 血中濃度推移を簡便に予測する方法を確立できたので、本編においては *in vitro*皮膚透過性における種差の解析とヒトでの *in vitro*皮膚透過性の予測、すなわちアニマルスケールアップの検討を試みた。

第1章 動物データからヒト皮膚透過性の予測

本章では、種々動物の摘出皮膚を用いてニコランジルの透過実験を行い、得られた結果を拡散モデルで解析することにより種差の原因を考察した。また、拡散モデルによる解析データと角質層／基剤間の分配係数の値を用いてヒトにおけるニコランジルの *in vitro* 皮膚透過性を予測し実測値と比較した。

Table 5 Experimental species

Hairless rat	(WBN/kob)	130 - 170 g
Guinea-pig	(Hartley)	300 - 350 g
Dog	(beagle & mongrel)	10 - 15 kg
Pig	(LWD, 4-35 days old)	2 - 6 kg

Table 5 に本章で使用した動物の一覧を示した。ヘアレスラット、モルモット及びイヌは腹部の皮膚を摘出して用いたが、ブタは飼育中に腹部を傷つけ易いため背部の皮膚を使用した（実際に肉眼で観察される腹部角質層の傷が多かった）。またブタ以外の動物種は成獣を用いたが、ブタは幼児期あるいは離乳期前後の皮膚の透過性が比較的ヒトに近いという報告があるため^{20,76)}、生後1か月程度までの未成熟のものを使用した。ただし生後間もないブタ(2日令)の皮膚に関しては、角質層のバリアー機能が未発達と思われる結果が得られたので(Fig. 33)、本研究においては生後4~35日令のブタを用いた。

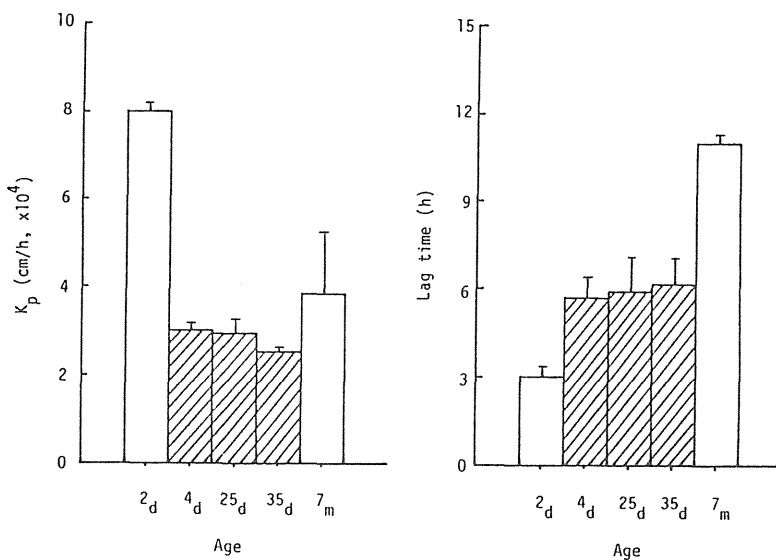


Fig. 33 Effect of age on the skin permeability of nicorandil in pig

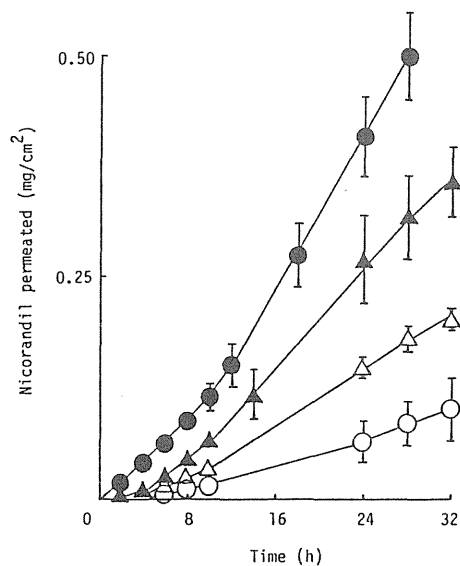


Fig. 34 Permeation of nicorandil across the excised animal skin from aqueous suspension

Hairless rat (●), Guinea-pig (▲), dog (○), pig (Δ).

Each point represents the mean \pm S.E. of 4-8 experiments.

Table 6 Comparison of the permeability, K_p and lag time for skin permeation of nicorandil from aqueous suspension in several species

Species	N	K_p (cm/h, $\times 10^4$)	Lag time (h)
Hairless rat	5	7.27 ± 0.77	3.51 ± 0.33
Guinea-pig	5	5.08 ± 1.23	5.27 ± 0.46
Dog	4	1.69 ± 0.30	6.53 ± 0.93
Pig	8	2.85 ± 0.15	5.91 ± 0.48

Fig. 34に各動物における水懸濁液からのニコランジル累積透過量をプロットした。図から明らかなように、ニコランジルのin vitro皮膚透過性における種差は顕著で、ヘアレスラットが最も高くイヌが最も低かった。この時の透過係数(K_p)とラグタイムを算出しTable 6 に示した。 K_p 並びにラグタイムの値より、4種の動物の間ではニコランジルの透過に対するバリアー能に約 4.5倍の差があることが示唆された。

第2編において、薬物の皮膚透過メカニズム等を論じるにはコンパートメントモデルよりも、得られたパラメーターが物理化学的な意味を有する拡散モデルを用いた解析の方が適していることを述べた。したがって本編においては、皮膚を均一な一層と見なした拡散式(13式のshunt pathwayを除いた部分)で上記の透過性のデータを解析した(23式)。用いた記号は前述の通りである。

$$Q = DKC_v/L \cdot (t - L^2/6D) - 2KC_vL/\pi^2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n/n^2 \cdot \exp(-n^2\pi^2D/L^2 \cdot t) \quad (23)$$

ニコランジル皮膚透過性における各動物種の拡散係数 D と分配係数 K を求めるために、(13)式の時と同様に(23)式の DKC_v/L と D/L^2 をそれぞれ $P(1)$ 、 $P(2)$ とおいて、MULTI を用いて Fig. 34 のデータの curve-fitting を行った。それぞれの動物種で得られた $P(1)$ 及び $P(2)$ の収束値を Table 7 に示した。

Table 7 Comparison of $P(1)$ and $P(2)$ values in several species

Species	$P(1)$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) ^a	$P(2)$ (h^{-1}) ^b
Hairless rat	19.407 ± 2.043	0.0491 ± 0.0045
Guinea-pig	13.553 ± 3.277	0.0329 ± 0.0036
Dog	4.523 ± 0.799	0.0276 ± 0.0049
Pig	7.504 ± 0.340	0.0296 ± 0.0024

a) DKC_v/L . b) D/L^2 .

Table 7 で得られた $P(1)$ 、 $P(2)$ の値から (24) 及び (25) 式を用いて D 並びに K 値を計算した。この際、 C_v には 37°C におけるニコランジルの基剤 (水) 中溶解度 ($26.7\text{mg}/\text{ml}$) を、 L には皮膚切片から顕微鏡を用いて測定した各動物における角質層の厚さを代入した。

$$D = P(2) \cdot L^2 \quad (24)$$

$$K = P(1) \cdot L / D \cdot C_v \quad (25)$$

Table 8 に計算された D 及び K の値を顕微鏡で測定したそれぞれの L の値とともに示した。4種の動物の中で比較した場合、最も顕著な差が見られたのは分配係数 K の値で、この値が一番大きいヘアレスラットと一番小さいイヌの間には 3倍もの差が見られた。それに対して D や L の値には有意な差は見られなかった。

Table 8 Comparison of diffusion coefficient, D, partition coefficient, K and barrier thickness, L in several species

Species	D ($\text{cm}^2/\text{h}, \times 10^7$)	K	L ($\text{cm}, \times 10^3$)
Hairless rat	1.164 ± 0.108	9.68 ± 0.67	1.54 ± 0.33
Guinea-pig	1.138 ± 0.125	8.61 ± 2.37	1.86 ± 0.12
Dog	1.093 ± 0.195	3.44 ± 0.94	1.99 ± 0.43
Pig	0.905 ± 0.074	5.68 ± 0.51	1.75 ± 0.24

Table 8 で示した 3種のパラメーターと皮膚透過性の関係をより明らかにするために、すなわちニコランジルの皮膚透過係数の種差に及ぼす D, K あるいは L の影響を調べるために、横軸にそれぞれの動物での D, K, L の値を、縦軸に対応する Kp の値をプロットした (Fig. 35)。その結果、D 及び K の値が大きいほど Kp は大きく、反対に L の値が小さいほど Kp は大きくなる傾向が認められた。しかし 4種の動物間での Kp 値の大きな差に比べて D あるいは L の差は小さく、ニコランジル皮膚透過性における種差への影響は少ないものと考えられた。それに対して K の動物間格差は大きく Kp 値との間に明らかな正の相関が認められ

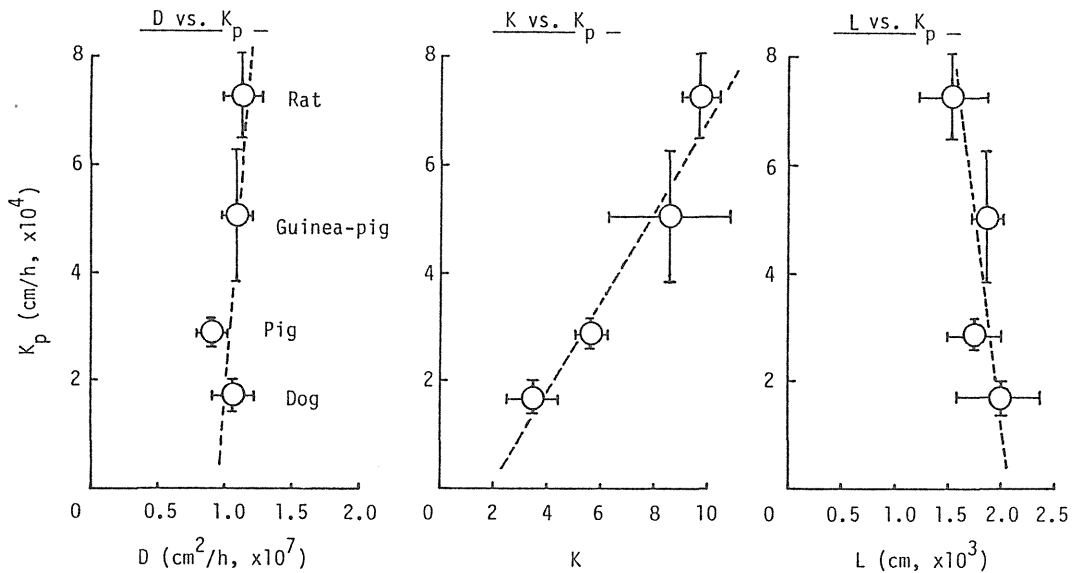


Fig. 35 Effect of diffusion coefficient, D , partition coefficient, K , and barrier thickness, L on the permeability, K_p of nicorandil

たことより ($r=0.970$) , 基剤から皮膚への薬物の分配に種差の大きな原因があることが示唆された。

薬物の皮膚透過性の変化を, その薬物の基剤と角質層の間の分配係数の違いとして捕えた報告は多い (77-79) . そこでその分配係数の違いについてさらに考察するために, ニコランジルの基剤 (水) と角質層間の分配係数を実験的に求めた. 各動物の角質層はそれぞれの full-thickness skin をトリプシン処理することにより得た. またヒトの角質層としては足裏の角化したカルスを削りとして用いた. Table 9 にはこのようにして得た角質層と水との間のニコランジルの分配係数を示した. この表から明らかなように, 分配係数の実験値にも種差が認められることがわかった. Fig.36にはTable 8 で示した分配係数の計

Table 9 Comparison of the partition coefficient of nicorandil between stratum corneum and water in several species

Species	N	Partition coefficient at 37°C (stratum corneum/water)
Hairless rat	4	10.38 ± 0.94
Guinea-pig	5	8.55 ± 0.99
Dog	3	4.48 ± 1.63
Pig	4	7.90 ± 0.69
Human	5	7.25 ± 1.25

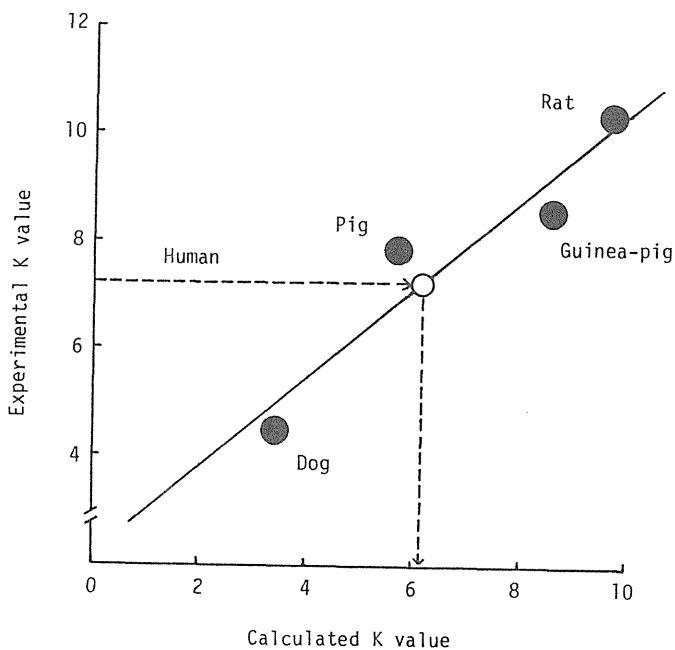


Fig. 36 Relationship between the calculated and experimental partition coefficients of nicorandil

算値とTable 9 で示した実験値との関係をプロットした。両者の間には明らかな正の相関が認められ ($r=0.945$)、この結果はニコランジルの皮膚透過性の種差の主な原因が薬物の基剤から角質層への分配の差にあることを示している。小松らもブチルパラベンの経皮吸収実験において、モルモットとヒトにおける分配係数の実測値が透過係数と高い相関を示したことを報告しており⁸⁰⁾、今回の結果を支持する一例であると考えられる。

式(23)は D 、 K 、 L 、 C_V といったパラメーターから、逆に薬物の累積透過量 Q の値を計算できることを示している。そこで以下の方法でヒトにおけるニコランジルのそれぞれのパラメーターを算出し、(23)式を用いてヒトでの累積透過量を見積った。分配係数 K は、Fig. 36 に示した動物でのデータの回帰直線にヒトでの分配係数の実験値 (Table 9) を内挿して求めた (Fig. 35 に点線で示した部分)。拡散係数 D は、Table 8 において 4種の動物間で D の値にほとんど差が見られなかったことより、動物での D の平均値をヒトにおける値とした。バリアーの厚さ L は、動物での場合と同様に皮膚切片の顕微鏡測定により求めた。以上をまとめて Table 10 に示した。

Table 10 Estimated diffusion coefficient, D , Partition coefficient, K and barrier thickness, L in human

Parameter	Estimated value
D (cm^2/h)	1.075×10^{-7}
K	6.15
L (cm) ^a	1.82×10^{-3}

a) Microscopically determined.

最後に、これらのパラメーターを式(23)に代入してヒトにおけるニコランジルの皮膚透過量を算出し、その予測曲線をFig. 37に示した。Fig. 37にはヒト摘出皮膚での実測値も併せてプロットした。その結果、予測曲線と実測値は良く一致し、特に8時間までは予測値は実測値のバラツキの範囲内にほぼ収まった。

8時間以後、実測値と予測値の間にはずれが生ずる傾向が見られたが、24時間後においてさえもその差は30%程度と少ないものであった。このことから、拡散式(23)と動物実験から得られた3つのパラメーター(D、K及びL)を用いて累積透過量を算出した本法が、ヒトにおける経皮吸収性の予測法として非常に有用であることが示唆された。ただし今回の見積りでは皮膚バリアーの厚みが顕微鏡測定した時のまま変化しないと仮定したが、透過実験においてはhydrationの影響等により角質層が膨潤してそれが実測値とのずれの要因になっているとも考えられるので注意を要する。また分配係数を求める時ヒトの角質層として入手が容易なカルスを用いたが、実際の透過実験は胸部の摘出皮膚で行っているとその部位差もずれの要因として考慮する必要がある。特に後者については、ヒドロコルチゾンの分配係数が胸部角質層よりも足裏のカルスの方が約1.6倍高かったとの報告もあり⁸¹⁾、本法を他の薬物に応用する際には適用部位による差をも考慮した解析が重要であると考えられる。

経皮吸収実験の最終目的はヒトにおける皮膚適用製剤を開発することにある。したがって薬物のヒトにおけるin vitro透過性のデータはその薬物の新しい有用な製剤開発のために非常に多くの知見を供給するに違いない。しかしヒト摘出皮膚を入手し透過実験に供することは本邦においては非常に難しく、一般的には動物を用いたin vitroあるいはin vivo実験から直接ヒトin vivo試験に移行せざるをえない。このような状況を考えると、たとえ多少の誤差を含んで

いても、ヒトの皮膚を用いることなしにヒトでの *in vitro* 皮膚透過性が予測できる本法の有用性は高いものと結論づけられる。

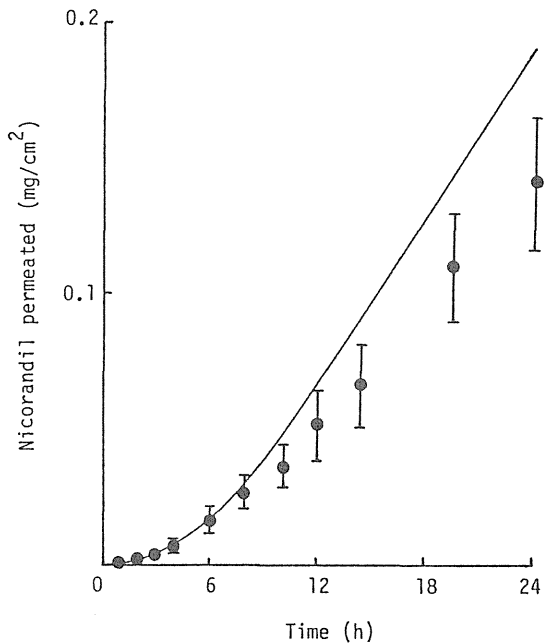


Fig. 37 Comparison between the observed (circles) and predicted (solid line) skin permeations of nicorandil in human.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

第2章 ヒトへの予測に適した動物種に関する検討

前章においてヒト抽出皮膚を用いずにニコランジルのヒトでの *in vitro* 皮膚透過性を予測した。しかしすべての場合にこの様な多種の動物を使用することは困難であるため、ある種のモデル動物の結果をそのままヒトに外挿できればそれに越したことはない。そこで本章においては、ヒトでの薬物透過性に近い動物種の検討と動物間で見られた種差の原因について、特に分配係数の差異を中心に様々な観点からの検討を加えた。

Table 11はTable 6で示した各種動物皮膚でのニコランジル透過係数にヒト及びヘアレスマウスでの結果を追加したものである。ニコランジルの皮膚透過性はヘアレスマウスで最も高く、またイヌで最も低くその差は約6倍であった。ところがブタとヒトの透過係数は良く一致しており、ヒトの予測のためのモデル動物としてはブタが有用であることが示唆された。ブタ皮膚の有用性については、Montagnaらが解剖学的、組織学的側面からヒトの皮膚に類似していることを⁸²⁾、またForbesがブタの血管系の分布や大きさがヒトに近いことを報告している⁸³⁾。もちろん薬物の皮膚透過性に関してもヒトとブタの間の一致性を指摘した文献は多く^{20, 76, 84)}、Meyerらはブタの皮膚が形態学的にも機能的にもヒトを近似できる唯一の動物であると結論づけている⁸⁵⁾。著者もまず最初に形態学的並びに組織学的な観点からの検討を試みた。

Table 11 Comparison of the skin permeabilities of nicorandil from aqueous suspension in several species

species	N	K_p (cm/h, $\times 10^4$)
Hairless mouse	4	10.08 \pm 3.48
Hairless rat	5	7.27 \pm 0.77
Guinea-pig	5	5.08 \pm 1.23
Dog	4	1.69 \pm 0.30
Pig	8	2.85 \pm 0.15
Human	3	2.66 \pm 0.75

Fig. 38には各動物及びヒト摘出皮膚の切片写真を示した。経皮吸収の主なバリエーションである角質層を比較すると、透過性の高かったヘアレスマウスやヘアレスラットの角質層はその一層一層が薄くしかも層数が少ないため全体的に非常に疎な構造になっている。それに対して透過性の低いイヌ、ブタ及びヒトの角質層は非常に密になっており、このような角質層の形態学的な差異が種差の一つの要因であることが示唆された。また角質層だけでなく表皮や真皮の厚さ、形状並びに付属器官（毛嚢、汗腺等）の分布といった皮膚の全体像から判断した場合、ブタがヒトに最も近似していることが明らかとなった。

上記の皮膚切片の顕微鏡観察により得られた角質層、表皮（角質層を除く）及び全皮膚の厚さをTable 12に示した。最も種差の大きいのは全皮膚の厚さで、角質層自身の厚さはヘアレスマウスを除いていずれも15~20 μ mの間であった。

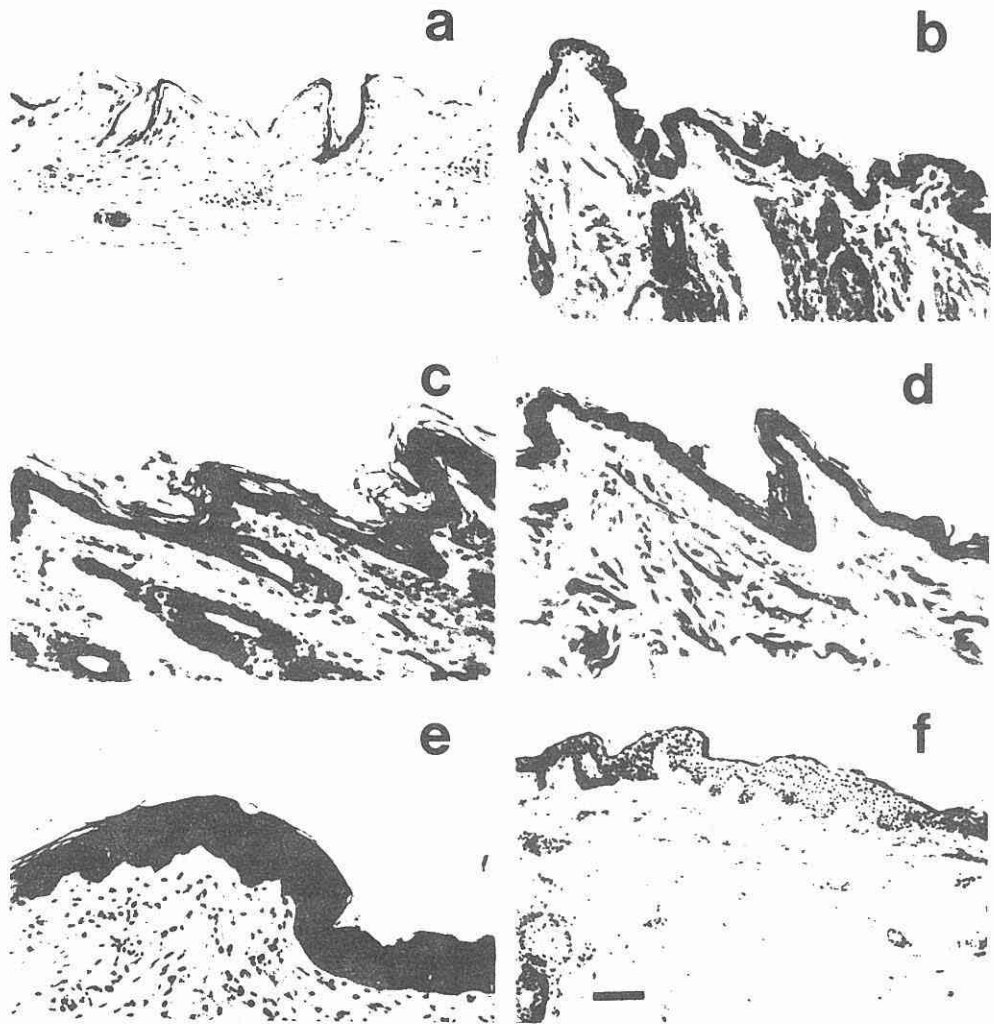


Fig. 38 Microtome section photograph of animal and human skin
(a) Hairless mouse; (b) hairless rat; (c) guinea-pig;
(d) dog; (e) pig; (f) human.

The scale bar indicates 50 μm .

Table 12 Comparison of the skin thickness in several species

Species	Stratum corneum (μm)	Epidermis (μm)	Whole skin (mm)
Hairless mouse	8.8 ± 1.0	18.0 ± 1.5	0.41 ± 0.02
Hairless rat	15.4 ± 3.3	23.8 ± 5.3	0.86 ± 0.06
Guinea-pig	18.6 ± 1.2	20.8 ± 1.4	1.15 ± 0.07
Dog	19.9 ± 4.3	28.3 ± 4.4	1.71 ± 0.16
Pig	17.5 ± 2.4	50.7 ± 11.4	1.74 ± 0.18
Human	18.2 ± 3.3	51.2 ± 12.2	2.58 ± 0.07

Table 13 Comparison of the skin conductance in several species

Species	N	Conductance (μs)
Hairless mouse	5	308.8 ± 42.3
Hairless rat	7	178.6 ± 21.7
Guinea-pig	6	211.8 ± 36.2
Dog	6	167.3 ± 21.4
Pig	9	224.4 ± 14.6
Human	8	327.6 ± 35.3

次に、皮膚の水分保持能を蒸留水滴下後の皮膚コンダクタンスを測定することにより比較した (Table 13)。ヒトの場合前腕部での測定値を採用したが、胸部における同一人での測定値は $334.9 \pm 42.6 \mu\text{mho}$ であり前腕部の値と大差なかった。Table 13の結果からヒト及びヘアレスマウスの皮膚の水分保持能が他の動物に比べて高い（正確には電気抵抗が低い）ことが示唆された。

角質層の主な構成成分はケラチンタンパクとそれらの細胞間を埋める脂質であると言われている⁸⁶⁾。細胞間脂質の大きな役割の一つは皮膚からの水分蒸発(Transepidermal Water Loss; TWL)を制御している点にあり^{87,88)}、TWLが皮膚のバリアー能を反映していることから考え併せると、角質層中の脂質量が皮膚バリアー能を左右するとも考えられる⁸⁹⁾。また、脂溶性薬物の主な透過ルートは細胞間脂質を通るいわゆるLipid domain routeであるとも言われており⁹⁰⁾。角質層中の脂質量を知ることは重要である。本研究においては、ヒト *in vivo* での脂質採取を考慮して比較的安全なアセトンカップ法を用いて実験を行い、単位面積当たりの脂質量で比較した。この際、ヘアレスマウスは皮膚面積が小さく *in vivo* でのアセトンカップ法が使用出来なかったため、麻酔下で素早く皮膚を摘出し縦型セルに平らに伸ばしたものについてアセトン抽出を

Table 14 Comparison of the skin surface lipids in several species

Species	Lipids ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
	Acetone ext.	Chloroform-Methanol ext.
Hairless mouse	212.4 \pm 32.0 (5) ^a	163.5 \pm 36.2 (4)
Hairless rat	273.3 \pm 36.2 (7)	269.3 \pm 47.8 (6)
Guinea-pig	224.7 \pm 24.0 (6)	179.7 \pm 52.4 (3)
Dog	ND ^b	ND
Pig	130.0 \pm 19.9 (3)	125.0 \pm 14.6 (4)
Human	60.5 \pm 6.9 (8)	ND

a) The values in parentheses are the number of determinations.

b) Not determined.

行った。Table 14に得られた結果を示したが、アセトンでの脂質の抽出が不十分であることが危惧されたので、動物の摘出皮膚からクロロホルム-メタノール混液を用いて抽出した結果も併記した。その結果、アセトンカップ法とクロロホルム-メタノール混液抽出の間に有意な差はなく、したがって皮表脂質量としてヒト *in vivo* での測定が可能なアセトンカップ法での値を採用した。

Table 15 Comparison of the water permeability in several species

Species	N	K_p (cm/h, $\times 10^3$)
Hairless mouse	3	3.38 ± 0.46
Hairless rat	3	2.96 ± 0.24
Guinea-pig	3	1.48 ± 0.27
Dog	3	1.30 ± 0.09
Pig	3	1.71 ± 0.40
Human	3	1.39 ± 0.28

第1編において、ニコランジル経皮吸収の主なメカニズムとして溶媒と共に皮膚を透過する solvent dragの可能性を示唆した。本編では基剤（溶媒）として水を用いているため、水の摘出皮膚透過性を知ることはニコランジル透過性の種差を考察する上で重要であると考えられる。そこで各動物並びにヒト摘出皮膚で水（重水）の透過実験を行い、結果をTable 15に示した。表から明らかのように、水の透過係数はヘアレスマウスで最も高く、以後ヘアレスラット、ブタ、モルモット、ヒト、イヌの順で減少した。

以上、Tables 12 ~15まで各抽出皮膚から得られた特性値を示した。これら特性値とニコランジル透過性の関係をより明らかにするために、横軸にそれら特性値を縦軸に対応するニコランジル透過係数をプロットした(Fig.39)。両者の相関性が良かったものは角質層の厚さ、皮表脂質量並びに水の透過係数であった。中でも各動物間の皮表脂質量の変化に伴いニコランジル透過係数が大きく変化することが明らかとなり、角質層が他の動物に比べると特別薄いために単位面積当たりの脂質量としては少なかったヘアレスマウスを除外すると、脂質量と透過係数は非常に良好な相関性を示した。そこで以下に皮表脂質量の種差に及ぼす影響について若干の検討を加えた。

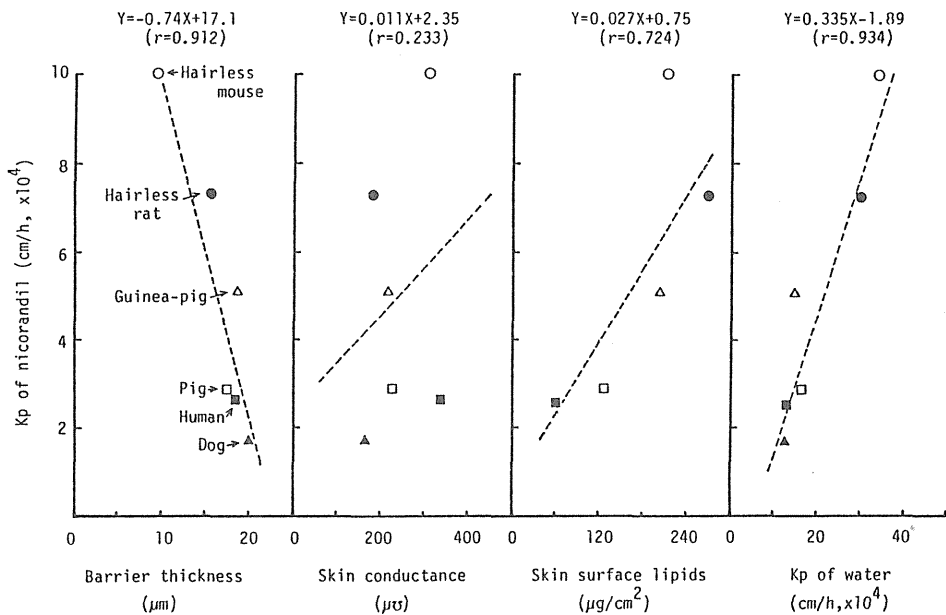


Fig. 39 Influence of barrier thickness, conductance, surface lipids and water permeability to the skin permeability of nicorandil

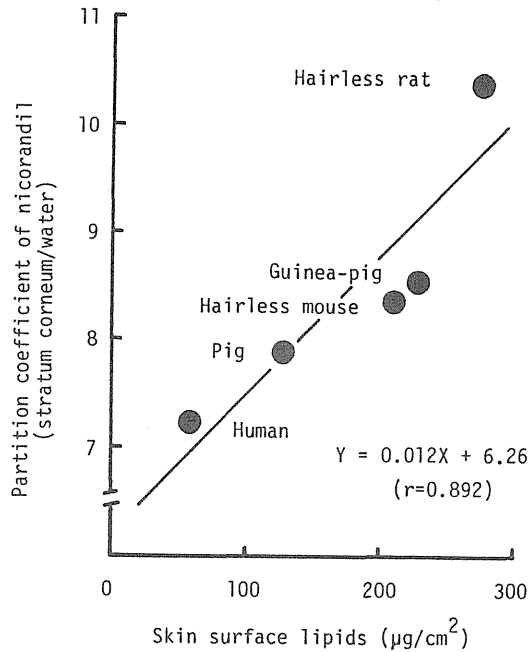


Fig. 40 Relationship between the partition coefficient of nicorandil (stratum corneum/water) and skin surface lipids

Fig. 40には第1章で得られた角質層／基剤（水）間のニコランジル分配係数 (Table 9) と今回得られた皮表脂質量の関係をプロットしたが、脂質量の増加に伴い分配係数が直線的に上昇することが明らかとなった。したがってニコランジルの抽出皮膚透過性における種差の最も大きな原因として上げられた皮膚から基剤への分配の差は、用いた動物種の皮表脂質量に基因しているものと考えられる。その点においてヒトでの脂質量に近い値を示し、しかも角質層の厚み (Table 12) や水の透過係数 (Table 15) においてもヒトの値に近かったブタの皮膚の利用は有用であると結論づけられる。

第1編及び第2編で述べたように、経皮吸収性の乏しい薬物の吸収改善のために吸収促進剤の利用が盛んになってきている。吸収促進剤の多くは角質層中の脂質に作用して薬物の吸収を上げることが報告されており⁵⁰⁾、前述のIPM

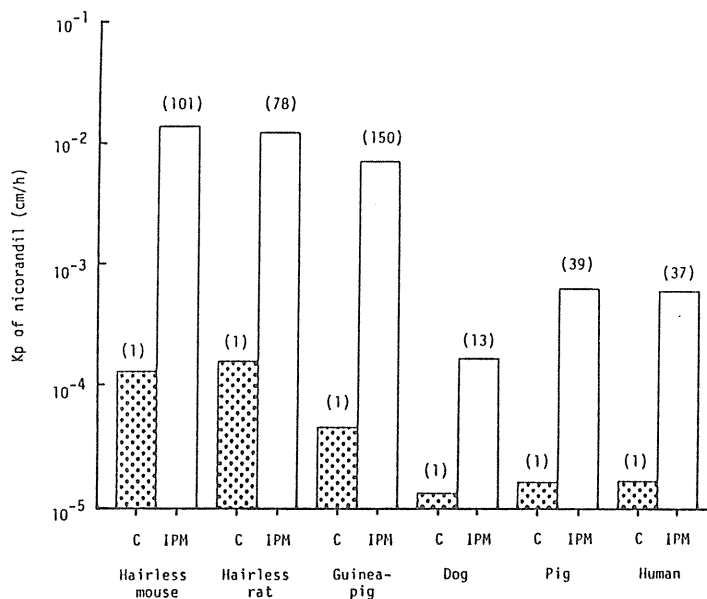


Fig. 41 Effect of IPM on the skin permeability of nicorandil from PG suspension in several species

C : Control (PG only); IPM : 10%IPM in PG.

The values in parentheses are the enhancing ratio against control.

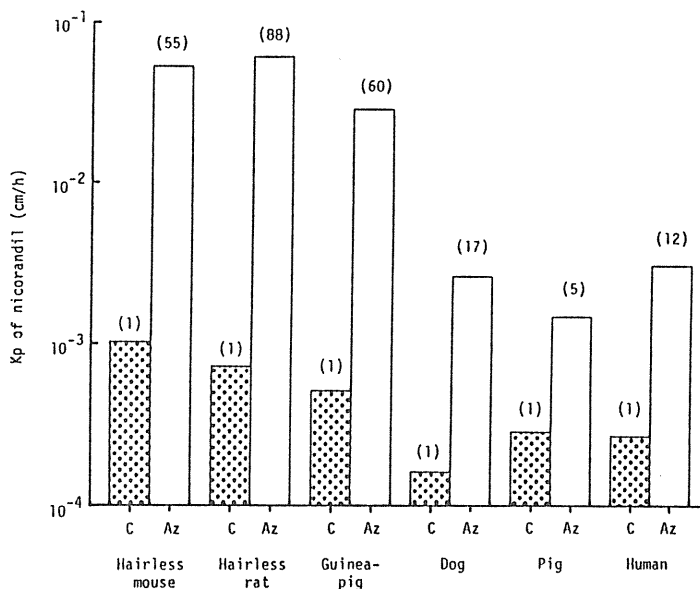


Fig. 42 Effect of Azone on the skin permeability of nicorandil from aqueous suspension in several species

C : Control (water only); Azone : 3%Azone in water.

The values in parentheses are the enhancing ratio against control.

やAzone もそうした促進剤の中の一つである。したがって、皮表脂質量と吸収促進剤の促進効果の関係を調べることによってヒト予測に適した動物種に関する考察が可能であると考えた。Fig. 41には10%IPM/PGからのニコランジル透過係数を、Fig. 42には3%Azone/水からの透過係数を、それぞれのコントロール（吸収促進剤を含まないPGあるいは水溶媒）と比較した。いずれの場合においても脂質量の多いヘアレスマウス、ヘアレスラット、モルモットでの促進効果は著しく、反対に脂質量の比較的少ないブタやヒトでの促進効果は小さかった。したがって脂質に作用点を持つと言われているIPMやAzoneを吸収促進剤として添加した時の薬物の皮膚透過性の種差は大きく、ヒトの予測に際してはより一層の注意を要することが示唆された。しかしブタでのニコランジル皮膚透過性はIPMやAzoneの添加の有無にかかわらずヒトでの値に近く、このような系でもブタ皮膚の有用性が明らかとなった。

第3章 考察

モデル薬物として選択したニコランジルの経皮吸収性における種差とその原因についてin vitroの系で検討し、ヒトへのスケールアップを試みた。

第1章においては、拡散モデルを用いて皮膚透過データを解析することにより薬物の皮膚中拡散係数 D と基剤から皮膚（角質層）への分配係数 K を求め、角質層（バリアー）の厚さ l とともに透過係数への影響を調べた。その結果、分配係数に最も大きな種差が認められ、しかもその分配係数（計算値）は実測した角質層／基剤間の分配係数（実験値）と良好な相関性を示すことが確認された。ニコランジルのヒト皮膚透過性が動物実験で得られた上記の結果を反映

していると仮定することによって、ヒトでの角質層／基剤間の分配係数値と拡散式とからヒトにおける *in vitro* 皮膚透過性の予測を可能にした。この方法を用いる場合の重要なポイントの一つとして分配係数の実測値の正確さが挙げられる。本研究ではヒトの角質層として実際の製剤適用部位とはかけ離れた足裏のカルスを用いたため、このことが実測値との誤差の原因となることが予想されたが、実測値とのずれは最大で30%程度であった。したがって、ヒトの抽出皮膚を用いることなしにヒトでの挙動を予測できる本方法は、経皮吸収における新しいアニマルスケールアップ法として位置づけられると考えられる。

第2章においては、種差の要因を様々な観点から検討した結果、第1章での分配係数の差異が皮表脂質量を反映したものであることが示唆され、その脂質量の大小によってニコランジルの透過係数や吸収促進剤を添加した時の促進効果における種差をある程度説明づけることができた。また皮膚組織切片像での高い類似性や、皮表脂質量、角質層の厚み、溶媒（水）の透過性等の近似性から判断すると、ブタがヒトでの経皮吸収挙動を予測するのに最も適した動物種であることが推察された。

したがって入手が困難なヒト抽出皮膚を用いなくても、数種の動物での実験結果を拡散モデルにより解析したデータと分配実験とからヒトでの挙動を予測したり（第1章）、場合によっては離乳期前後のブタを用いることによって直接ヒトの吸収性を予測することも可能で（第2章）、これらの方法は皮膚適用製剤の開発、特に動物実験からヒト（臨床）試験に移行する際の製剤設計（薬物含量や投与面積等の設定）に有用であると結論づけられる。

第4編 市販ニトログリセリン製剤でのヒト in vivo 予測

第1編においてはモデル薬物として選択したニコランジルの in vitro 皮膚透過性について、また第2編においては in vitro から in vivo (血中濃度) の予測法について、さらに第3編においては動物からヒトへの in vitro でのアニマルスケールアップについて述べてきた。その結果、in vitro 皮膚透過データからコンポリューション法等の計算式を用いることによって血中濃度の予測が、またブタを始めとする動物での摘出皮膚透過性からヒトでの in vitro 挙動が予測できることが確認された。そこで本編においては、本研究の最終目的である動物での in vitro データからヒトでの in vivo の予測を試みることにした。実験に用いる薬物としては、第3編までと同様にニコランジルを使用することが最良であると考えられたが、現段階においてニコランジルのヒト in vivo 試験を行なうことはできなかった。したがって、本編では TTS の中で最も研究がなされており、しかもヒトにおける in vivo データ (血中濃度) が公知であるニトログリセリンの市販製剤 (2%軟膏) を用いて実験を行った。

第1章 ニトログリセリン経皮吸収性の種差

ニトログリセリンはニコランジルに比べると非常に脂溶性が高いため⁹¹⁾、in vitro 実験においてブタやヒトのような真皮の厚い full-thickness skin を用いた場合、薬物の透過が真皮律速になってしまうおそれがある⁹²⁾。実際ニトログリセリン水溶液を用いた予試験において、ブタの full-thickness skin での透過性 ($K_p=0.13 \times 10^{-2} \text{ cm/h}$) が約 750 μm にカットした split-thickness

skinでの透過性 ($Kp=1.18 \times 10^{-2} \text{ cm/h}$) に比べて10分の1程度であったため、ブタ及びヒトの皮膚はsplit-thickness skinを用いて評価した。また、実験温度はラットにゲルを適用した時の皮膚表面温度(第2編参照)並びにヒトでの皮膚温⁹³⁾を参考に34℃とした。Fig. 43にヘアレスラット、ブタ及びヒト摘出皮膚にニトログリセリンとして 0.56 mg/cm^2 の軟膏を適用した時のニトログリセリン累積透過曲線を示した。その結果、ニトログリセリンの透過性はニコランジルと同様にヘアレスラットが最も高く、以下ヒト、ブタの順であった。ヒトの透過性はブタの2倍近く高い値を示しニコランジルの時よりは差が認められたが、ヘアレスラットと比べると近似していると考えられ、ニトログリセリンの経皮吸収実験においてもブタがヒトの良いモデルであることが示唆された。

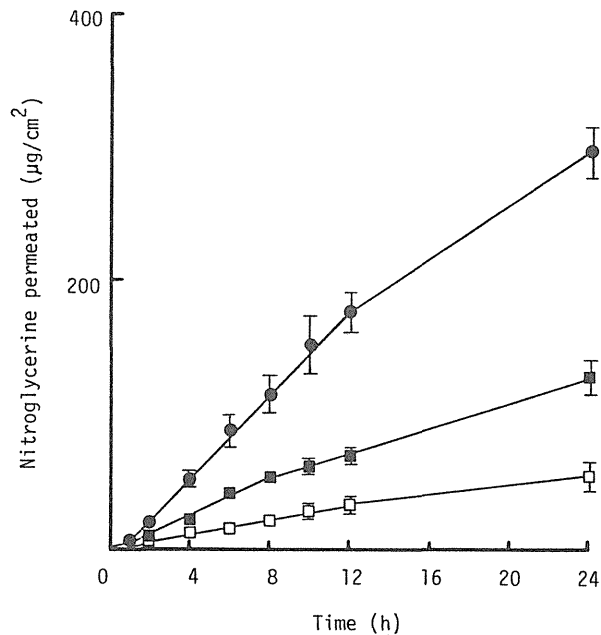


Fig. 43 In vitro skin permeation of nitroglycerine in hairless rat (●), pig (□) and human (■)

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

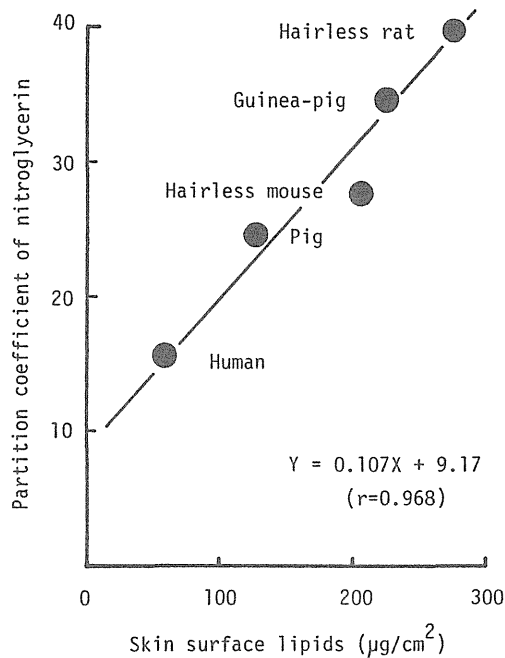


Fig. 44 Relationship between the partition coefficient of nitroglycerine (stratum corneum/water) and skin surface lipids

第3編において、経皮吸収における種差の大きな原因が各種動物の皮表脂質量にあり、その脂質量が薬物の角質層への分配を左右していることを考察した。そこで第3編で用いたニコランジルよりも脂溶性であるニトログリセリンの角質層／水間の分配係数を測定し、皮表脂質量に対してプロットした (Fig. 44)。その結果、ニトログリセリンの分配係数はニコランジル以上に皮表脂質量と良好な相関性を示し、この分配の差が種差に反映されていることが改めて確認された。脂質への分配に乏しい水溶性の薬物での種差の要因をこの様な脂質量と分配係数で説明づけることができるかどうかは断定できないが、一般にTTSに向いている薬物は比較的脂溶性の高い薬物であるとされており⁹⁴⁾、しかも

ヒトにおいて基剤から角質層への初期の薬物移行量（分配）と経皮吸収量とが良く一致したとの報告もある⁹⁵⁾。したがって分配係数を示標として種差を考察しても、そう大きな誤りではないと考えられる。この様な観点からFig. 44を見ると、ニトログリセリンの分配係数もニコランジルと同様にブタとヒトで近く、ブタでのin vitroからヒトin vitroの予測、さらにはヒトin vivo までの直接予測が可能であると示唆された。

第2章 コンポリューション法を用いた血中濃度の予測

ニトログリセリンを用いた経皮吸収実験の報告は多く、本研究で使用した2%軟膏適用時の血中濃度データに関してもラット⁹⁶⁾並びにヒト⁹⁷⁾で報告されている。そこで、Fig. 43で得られたin vitroでのニトログリセリン透過性からコンポリューション法を用いてin vivo 血漿中濃度を予測し、報告されているラット並びにヒトでの実測値と比較した。コンポリューション計算時の消失パラメーターとしては有毛ラット⁹⁸⁾並びにヒト⁹⁹⁾での文献値を用いた。その値をTable 16に示した。

Fig. 45にヘアレスラットのin vitro皮膚透過データ(Fig. 43)と有毛ラットでの消失パラメーターとから血漿中濃度を計算し、Horhotaらのラットにおける文献値⁹⁶⁾と比較した結果を示した。図から明らかなようにコンポリューション法による予測値は実測値と良く一致し、第2編での比較的単純な溶媒系のみならず、軟膏のような製剤においてもin vitroからin vivo へのアプローチが可能であることが示された。

Table 16 Pharmacokinetic parameters of nitroglycerine

Rat ^a	Human ^b
Dose : 0.7 mg/kg (214 µg/body)	Dose : 4 µg/kg (240 µg/body)
Co : 257 ng/ml	α : 1.86 m ⁻¹
k _e : 0.19 m ⁻¹	β : 0.14 m ⁻¹
t _{1/2} : 4.2 m	k ₁₀ : 1.54 m ⁻¹
Vd : 3.1 l/kg	k ₁₂ : 0.29 m ⁻¹
	k ₂₁ : 0.18 m ⁻¹
	CL : 4.41 l/m

a) Data from Yap et al. ⁹⁸⁾

b) Data from Idzu et al. ⁹⁹⁾

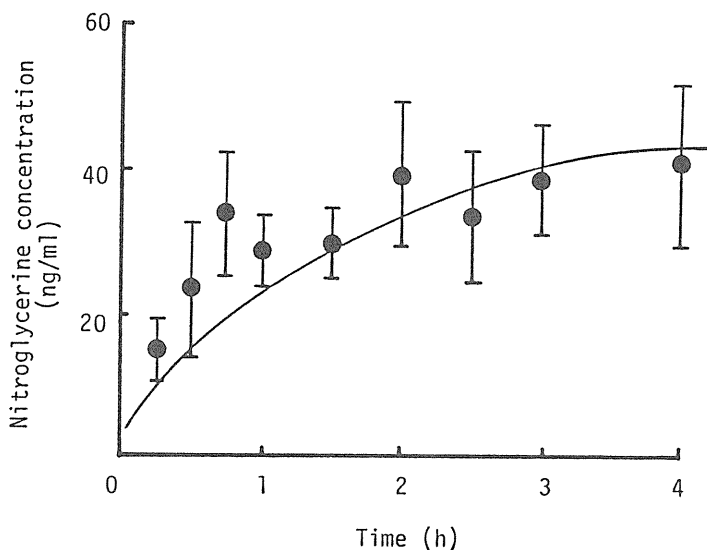


Fig. 45 Relationship between observed (circles)* and calculated (solid line) plasma concentrations of nitroglycerine after topical application of ointment in rat

* Data from Horhota et al. ⁹⁶⁾

最後に、ブタでの *in vitro* データ (Fig. 43) からヒト *in vivo* を直接予測し、岡島らのヒトでの血漿中濃度データ⁹⁷⁾と比較した。岡島らはその報告の中で、ニトログリセリン軟膏適用後のヒト血漿中濃度は適用面積にあまり影響されずむしろ適用量(薬物量)に関係することを述べている。したがって、本研究においては適用面積 4.15cm^2 で実施した縦型セルでの透過量(単位面積当たりの薬物量は文献と同一とした)から直接コンポリューション法で血漿中濃度を計算した (Fig. 46)。その結果、ブタ *in vitro* から予測したヒトでの血漿中濃度推移は、軟膏の適用面積が異なるにもかかわらず実測値の推移と似た挙動を示していた。適用面積に血中濃度が比例しない理由については今のところ定かではないが、*in vitro* での皮膚透過性におけるヒトとブタの差が小さかったことと併せて考えると、ブタ皮膚での *in vitro* データからヒトでの *in vivo* を直接予測することも可能であろうと考えられる。

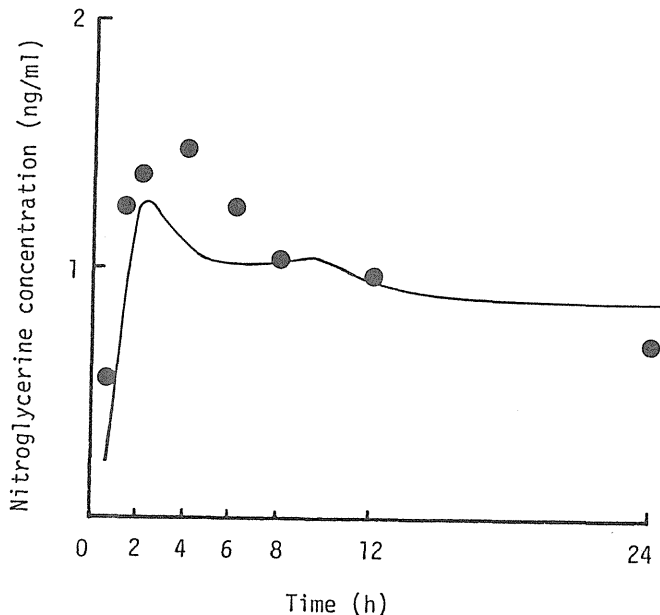


Fig. 46 Relationship between observed (circles)* and calculated (solid line) plasma concentrations of nitroglycerine after topical application of ointment in human

* Data from Okajima et al.⁹⁷⁾

第3章 考察

本編においては、ニコランジルをモデル薬物として用いて検討した結果得られた *in vitro* から *in vivo* の予測法（第2編）並びにアニマルスケールアップ（第3編）に関する知見の妥当性について、それらを市販の製剤（ニトログリセリン軟膏）に応用することで評価した。

ニトログリセリン軟膏の *in vitro* 皮膚透過性はヘアレスラットで最も高く、ブタ及びヒトでの結果はヘアレスラットの1/3～1/4と比較的近似した値であった。また、ニトログリセリンの *in vitro* での角質層/基剤（水）間分配係数と透過係数の間には良好な直線関係が認められ、この分配係数値においてもブタがヒトに最も近い値を示した。以上の結果、ブタはニトログリセリンの皮膚透過性においてヒトに近い動物種であると結論づけられ、第3編のニコランジルでの結果を支持していた。

次に *in vitro* から *in vivo* へのアプローチをコンボリューション法を用いた血漿中濃度の予測により実施した。本研究では血漿中濃度及び消失パラメータとして文献値を採用したため細部にわたる実験条件において異なる点が見られるが、それらを差引いても（特にラットでの予測値と実測値は良く一致しており）コンボリューション法でのアプローチの有用性が裏づけられた。

最後に、TTS開発の最終目的であるヒトでの *in vivo*（血中濃度）をブタ *in vitro* データからコンボリューション法により直接予測した。その結果、予測値と実測値（文献値）の挙動は良く類似しており、ブタのように形態学的にも機能的にもヒト皮膚に近い動物種での *in vitro* データからヒトでの *in vivo* の予測も可能であると推察された。

結 論

以上、著者は4編にわたり経皮吸収実験における動物 *in vitro* データからヒト *in vivo* を予測する方法について検討を加え、以下の結論を得た。

1. ヘアスラット摘出皮膚を用いたニコランジル皮膚透過性の評価

経皮吸収実験に汎用されている動物摘出皮膚を用いた *in vitro* での評価法の有用性について、モデル動物としてヘアスラットを用いて検討した。その結果、実験に使用した薬物ニコランジルの十分な皮膚透過性を得るためにはIPMを始めとする脂肪酸エステル類とPGの混合基剤が有効なことが明らかとなった。第2編での *in vivo* (ヘアスラット) 並びに第3編でのヒト (*in vitro*) においても10%IPM/PGによってニコランジルの顕著な吸収促進が確認されたことより、ヘアスラット摘出皮膚での *in vitro* 試験の結果を *in vivo* あるいはヒト試験へ反映させることが可能であると推察された。

また脂肪酸エステル類の吸収促進機構に関する若干の検討を加えたところ、それらエステル類のおもな作用点は角質層であり、しかもニコランジルの透過には基剤中の溶媒による *solvent drag* の寄与が大きいことが示唆された。

以上のように、動物摘出皮膚を用いた *in vitro* 試験法はTTS開発の第一段階として有用であり、特に基剤のスクリーニングや薬物の透過機構の解明のためには不可欠な方法であると結論づけられる。

2. ヘアレスラットにおけるニコランジルの *in vitro* から *in vivo* 皮膚透過性の予測

In vitro 皮膚透過実験の結果を *in vivo* (血中濃度) に反映させるために、3種の方法 (コンボリューション法, 拡散モデル, コンパートメントモデル) を構築し、ヘアレスラットにおける実測値と比較した。いずれの方法においても血中濃度の予測値と実測値の一致性に関しては遜色なく、特に実験前半部における両者は良く一致していた。実験後半には hydration 等の影響の差異と思われる *in vitro* と *in vivo* のずれが認められたが、拡散モデルとコンパートメントモデルにおいては shunt というパラメーターを加えることにより良く一致させることができた。Model independent なコンボリューション法は shunt の項を加えるといったモデルの修飾は通常できないが、複雑な計算式を必要としないので、*in vitro* 実験データから *in vivo* での血中濃度推移を予測する方法として利用価値が高いものと考えられた。

3. ニコランジルの *in vitro* 皮膚透過性における種差とヒトへの予測

ニコランジルの経皮吸収における種差とその原因について *in vitro* の系で検討し、同時にヒトへのスケールアップを試みた。その結果、以下の2つの知見が得られ、どちらかの方法を用いることによりヒト摘出皮膚を用いなくても動物実験データからヒトでの挙動を予測できることが示唆された。

1. 皮膚透過性の異なる数種の動物を用いて *in vitro* 透過実験を行い、拡散式によりそれぞれの動物における拡散係数, 分配係数, バリヤー

- の厚さを算出して、分配係数が透過係数に大きく影響していることを確認した。そこで角質層サンプルを用いて基剤（水）から皮膚への分配実験を行い、そのデータからヒトでの累積透過量を計算して実際にヒト摘出皮膚で測定した実測値と比較したところ両者はよく一致した。
2. 実験に用いた各動物皮膚の組織切片像の観察と、皮表脂質量、水の透過係数、皮膚コンダクタンス等の皮膚の特性値とから、ニコランジル透過性における種差に影響しているパラメーターを決定した。その結果、あらゆる面においてブタがヒトでの経皮吸収挙動を予測するのに適した動物種であると推察された。

4. 市販ニトログリセリン製剤でのヒト *in vivo* 予測

第1～3編の検討の結果、動物での *in vitro* 実験から動物での *in vivo* あるいはヒトでの *in vitro* の予測が可能であることが示されたので、最終目的であるヒト *in vivo*（血中濃度）の予測を市販の製剤（2%ニトログリセリン軟膏）を用いて行った。その結果、ニトログリセリンの場合でもニコランジルと同様に *in vitro* から *in vivo* を予測する方法としてコンボリューション法が利用できること並びにブタ摘出皮膚を用いた *in vitro* データから直接ヒト *in vivo* の予測が可能なが示唆され、経皮吸収実験におけるモデル動物からヒトへのスケールアップ法として本研究が有用であることが推察された。

以上著者は、ヒトにおける薬物の経皮吸収性の予測を目的にモデル動物並びに *in vitro* 実験からの検討を加え、ヒトの摘出皮膚を用いることなくヒトでの皮膚透過性の予測ができることを明らかにした。以上の結果は、今後増々活発になると予想される経皮吸収の研究においていささかの知見を加えたものと考ええる。

謝 辞

本研究課題を与えて下さり、終始御親切なる御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 森本雅憲教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究に際し、終始御指導並びに御激励を賜りました城西大学薬学部 杉林堅次講師に深謝致します。

さらに、本研究の機会を与えられ、終始御理解と御助言を賜りました日清製粉株式会社常務取締役 杉橋孝夫中央研究所長、常務取締役 府川秀明博士、小林昭男第三研究所長、上野雅男製剤研究室長に深謝の意を表します。

最後に、本研究の一部に有益な御助言と御協力を戴きました日産化学工業株式会社 織田寿久氏、並びに城西大学薬学部製剤学教室、日清製粉株式会社中央研究所の諸氏に感謝致します。

実験の部

第1編 実験の部

1. 実験材料

ニコランジルは日清製粉(株)中央研究所で合成し、Mass, NMR, IR スペクトル及び融点測定により同定した。滴定法を用いて算出した純度は 99.7%であった。IPM, IPB, IPH, IPD及び IPPは東京化成(株)より、PG及び重水は和光純薬(株)より購入した。ODM は花王(株)より提供を受けた。

2. 実験動物

雄性のヘアレスラット(WBN/kob)を埼玉実験動物(株)より購入して使用した。

3. In vitro皮膚透過実験

ヘアレスラット(体重 約150g)をペントバルビタール(ネンブタール注射液, 50mg/kg, ip)で麻酔したのち腹部を注意深く除毛し、左右から各1枚ずつの皮膚を摘出した。摘出皮膚を有効拡散面積 0.636cm^2 の2-チャンバー拡散セル(Fig. 47)に固定し37°Cの水浴に浸した。Stripped skin の場合は、摘出前の腹部皮膚角質層をセロテープ(ニチバン(株))で20回剥離したのち上記と同様に摘出して用いた。真皮側(Receiver側)に生理食塩液 2mlを、角質層あるいは表皮側(Donor側)に試料(薬物懸濁液) 2mlを入れ、テフロン製のスターラーを用いて 150rpm で攪拌した。溶媒の透過実験に際しては(水の透過性は重水を用いて評価した)、薬物フリーの溶媒のみ 2mlをDonor側セルに入れた。

各測定時間に 100 μ l をReceiver側からサンプリングし、生理食塩液 100 μ l を補充した。ニコランジルの定量の際は、サンプリングした試料に内部標準溶液（p-オキシ安息香酸エチル 1 μ g/mlメタノール溶液） 100 μ l 加え、攪拌後その一部をHPLCに注入した。

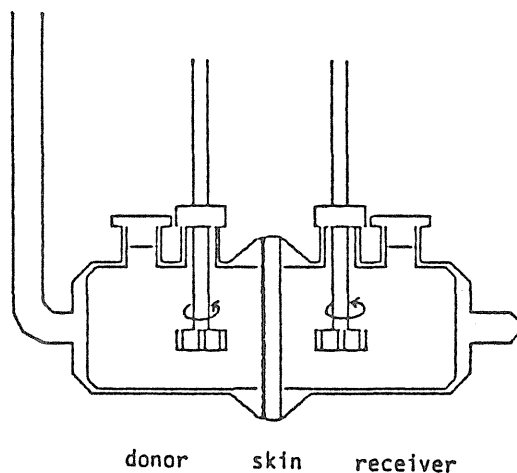


Fig. 47 2-Chamber diffusion cell

4. 溶解度実験

過剰のニコランジルを種々溶媒（水、PG、IPM、10%IPM/PG等）に加えて37 $^{\circ}$ Cの水浴中で攪拌した。2時間後にその一部を取りメンブランフィルター（Type RC、東洋科学産業^株）で素早く濾過したのち、メタノールあるいはイソプロパノールで希釈してHPLC法で定量した。実験に際しては、2時間で充分平衡に達していることをあらかじめ確認した。

5. 放出実験

透過実験で使用した拡散セルに透析膜 (Visking membrane, Union Carbide Co.) を挟み, Donor 側に 2ml の 0.5% (w/v) ニコランジル試料溶液を, Receiver 側に 2ml の精製水を入れて 37°C で攪拌した. Receiver 溶液を経時的にサンプリングし, HPLC法で定量した.

6. 定量法

ニコランジルの定量は HPLC で, PG の定量は GC-FID で行った. それぞれの測定条件は以下の通りである.

HPLC法

機種 : LC-6A, SPD-6A (島津製作所機)
カラム : Nucleosil 5C18, 4.6 mm X 250 mm
移動相 : 水 / アセトニトリル (6:4)
検出 : UV 254 nm

GC-FID法

機種 : GC-6A (島津製作所機)
カラム : Gaschrompak-54, 3 mm X 1 m (ガスクロ工業機)
カラム温度 : 200 °C
N₂ガス流速 : 40 ml/min

重水の定量は Thorntonらの方法¹⁰⁰⁾に従い, IR法で実施した. 測定条件は以下の通りである.

機種 : IR-450 (島津製作所機)
波長 : 2512 cm⁻¹

7. 脂肪酸エステル類の分配係数

50mlの遠沈管に 100mgの試料と精製水10ml及びn-ヘキサン10mlを加え、25℃で30分間激しく攪拌した。攪拌後、遠心分離して(2500 rpm, 5 min) n-ヘキサン層を取り、GC-FID法でn-ヘキサン中の脂肪酸エステル含量を測定した。カラムは 3% OV-17 on Gaschrom Q (3 mm X 1 m)を用い、カラム温度は80℃ (IPB), 120℃ (IPH), 150℃ (IPD), 200℃ (IPM), 220℃ (IPP), 280℃ (ODM) とした。分配係数 Pは以下の式に従って算出し、その対数値 Log Pを採用した。

$$P = C_{\text{hex}} / (C_{\text{tot}} - C_{\text{hex}})$$

ここで C_{tot} 、 C_{hex} は脂肪酸エステルの初濃度並びに平衡後のn-ヘキサン中濃度である。

第2編 実験の部

1. 実験材料

PEG、IPA及び EtOH は和光純薬(株)より、ポリアクリル酸 (Carbopol 934) は B. F. Goodrich Co. より、ヒドロキシプロピルセルロース (HPC-M) は日本曹達(株)より購入した。Azone は住商ネルソン(株)より提供を受けた。それ以外は第1編と同じものを用いた。

水性ゲル並びにPGゲルは、0.8%(w/w) のCarbopol 934を添加したのちNaOH溶

液で中和して調製し，PEG ゲル並びにIPA ゲルは，3%(w/w) のHPC-M を添加攪拌して調製した．薬物は全て懸濁となるように水性ゲルには3%(w/w)，IPA ゲルには15%(w/w)，PEG ゲルには20%(w/w)添加した．

2. 実験動物

第1編 2. と同じものを用いた．

3. 静脈内投与実験

ヘアレスラットを無麻酔下で背位固定し，尾静脈よりニコランジル 2.5, 5 及び10mg/kg (生理食塩溶液)を急速静注した．経時的に頸静脈より 0.3mlずつ採血し，血漿を得た．

4. In vitro皮膚透過実験

溶液からの皮膚透過実験は第1編 3. と同様に実施した．ゲル軟膏での透過実験は縦型の拡散セル (有効拡散面積 4.91 cm^2 , Receiver 容量 20ml)⁵⁴⁾ を用い，2g のゲルをDonor 側へ適用することにより行った．

5. In vivo 皮膚透過実験

無麻酔下で背位固定したヘアレスラットの腹部に縦型セル用のDonor 部ガラスセル (有効拡散面積 4.91 あるいは 0.636 cm^2) をシアノアクリレート接着剤 (アロンアルファ，東亜合成化学工業㈱) で固定し，その中へゲル 2g をなるべく均一になるように塗布した．塗布後ガラスセルをパラフィルムで密封し，経時的に頸静脈より 0.5mlずつ採血した．

6. 定量法

Receiver溶液あるいは血漿中のニコランジル濃度は第1編 6. と同様にHPLC法により定量した。血漿の前処理には神山らの方法⁵⁵⁾を用いた。

第3編 実験の部

1. 実験材料

トリプシン(Type II, from porcine pancreas)はSigma Chemical Co.より購入した。その他のものは第1編 1. 及び第2編 1. と同じものを用いた。

2. 摘出皮膚の調整

ヘアレスラット及びモルモット(Hartley, ♂, 300-350g)は埼玉実験動物(株)より。ヘアレスマウス(Hos :hr⁻¹, ♂, 20-30g)は星野実験動物(株)よりそれぞれ購入し、イヌ(beagle & mongrel, ♂♀, 10-15kg) 及びブタ(LWD, ♂♀, 2-6kg) は日清製粉(株)中央研究所で飼育あるいは繁殖したのちのものを用いた。各動物とも麻酔下で腹部(ブタのみ背部)を注意深く除毛したのち皮膚を摘出し、使用するまで-20℃で保存した。ヒト皮膚は、手術時に摘出した胸部皮膚(♀, 27-62才)を国立相模原病院より提供を受けて実験に供した。

3. 皮膚厚みの測定

摘出皮膚をホルマリン固定したのち常法に従って皮膚切片を作成し、ハマト

キシリン-エオジンで染色した。この標本の顕微鏡観察により角質層、表皮及び全皮膚の厚さを測定した。

4. In vitro皮膚透過実験

第1編 3. と同様に行った。

5. 角質層サンプルの調製

動物皮膚からの角質層サンプルの調製は Knutsonらの方法¹⁰¹⁾に準じて行った。即ち、1%トリプシン溶液(PBS, pH 7.4)に37℃で8時間浸し、角質層のみを剥離した。この角質層を精製水で洗ったのちデシケーター中で減圧乾燥した。ヒト角質層(ケラチンパウダー)は良く洗った足裏のカルスを削りとり、同様にデシケーター中で乾燥させて得た。

6. 角質層/水間分配係数の測定

共栓付き試験管に0.05%(w/v)のニコランジル水溶液1mlと10mgの角質層サンプルを入れ、37℃で攪拌した。24時間後、サンプルを遠心分離(11000 rpm, 5 min)し、水相中の薬物量をHPLCで定量した。分配係数は以下の式に従って算出した。

$$\text{Partition coefficient} = (C_{in} - C_{eq}) / C_{eq} \cdot 1000 / W_{sc}$$

ここで C_{in} 、 C_{eq} 及び W_{sc} はニコランジルの水相中の初濃度(mg/ml)、平衡後の濃度(mg/ml) 及び用いた角質層の重量(mg)である。

7. 皮膚コンダクタンスの測定

各動物の腹部あるいは背部（ブタのみ）皮膚に蒸留水を1滴たらし、10秒後に脱脂綿で拭きとった。直ちにSkin Surface Hygrometer (SKICON- 200, IBS Co.)を用いて皮膚コンダクタンスを測定した¹⁰²⁾。ヒトの場合は前腕部内側及び胸部で測定した。測定はいずれも空調の効いた部屋の中(23℃, RH50%以下)で行った。

8. 皮表脂質量の測定

In vivoでの皮表脂質量をアセトンカップ法¹⁰³⁾により測定した。即ち、ペントバルビタール麻酔下の動物皮膚に円筒ガラスセル（内径2.5cm）を固定し、アセトン5mlで3回（1回5分間）脂質を抽出した。抽出液をガラスフィルターで濾過したのち濾液を減圧下で溶媒留去し、残渣の重量を脂質量とした。ヒトは前腕部内側を用い、無麻酔下で行った。

また動物においては、摘出皮膚を直ちに縦型ガラスセルに固定し角質層側にクロロホルム-メタノール混液(1:1)5mlを入れ、同様に3回抽出して皮表脂質量を測定した(in vitro法)。

9. 定量法

ニコランジル及び重水の定量は第1編6.に従って行った。

第4編 実験の部

1. 実験材料

ニトログリセリン原末（乳糖吸着物）は日本化薬㈱より提供を受けた。またニトログリセリン軟膏は市販のバソレータ-2%軟膏（三和化学㈱）を用いた。

2. 摘出皮膚

ヘアレスラット、ブタ及びヒト摘出皮膚は第3編 2. と同じものを使用した。ただし、ブタ及びヒトの摘出皮膚はミクロトームの刃を用いて角質層側から約750 μm の厚みにカットした split-thickness skin を用いた。

3. In vitro皮膚透過実験

第2編 4. の縦型セルによる方法を用いた。この際、1.5g（ニトログリセリンとして30mg）の軟膏を54 cm^2 の製品添付の貼付紙に均一に延展し、その4.15 cm^2 （ニトログリセリンとして 0.56 mg/cm^2 ）を皮膚に適用した。Receiver溶液としては20%PEG/生理食塩液を用いた。

4. 角質層サンプルの調整

第3編 5. と同様に行った。

5. 角質層/水間分配係数の測定

第3編 6. と同様に行った。ニトログリセリン水溶液は、乳糖吸着物をニトログリセリンとして 0.05% (w/v) となるように溶解して調製した。

6. 定量法

ニトログリセリンの定量はHPLCで行った。測定条件は以下の通りである。

機種 : LC-6A, SPD-6A (島津製作所製)
カラム : Nucleosil 5C18 , 4.6 mm X 250 mm
移動相 : 水 / アセトニトリル (4:6)
検出 : UV 220 nm

引用文献

- 1) 中野真汎, 森本雍憲, 杉林堅次, "ドラッグデリバリーシステム", 南山堂, 東京, 1986.
- 2) Y.W.Chien, *Drugs of Today*, 23, 31 (1987).
- 3) 水島裕 (編), *Mebio*, 5(2), 38 (1988).
- 4) 小西良士, *月刊薬事*, 25, 247 (1983).
- 5) Y.C.Huang, P.R.Kesharey and Y.W.Chien, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 11, 1255 (1985).
- 6) J.R.Robinson and V.H.L.Lee, "Controlled Drug Delivery", Marcel Dekker, New York, 1987, pp.523-552.
- 7) 小西良士, "経皮・経粘膜吸収製剤の開発と新しい試験・実験・評価法の実際", テクノアイ, 東京, 1986, pp.9-13.
- 8) B.Milgaard and A.Hoelgaard, *Int.J.Pharmaceut.*, 15, 185 (1983).
- 9) E.R.Cooper, *J.Pharm.Sci.*, 73, 1153 (1984).
- 10) K.B.Sloan, K.G.Siver and A.M.Koch, *J.Pharm.Sci.*, 75, 744 (1986).
- 11) N.V.Sheth, D.J.Freeman, W.I.Higuchi and S.L.Spruance, *Int.J.Pharmaceut.*, 28, 201 (1986).
- 12) K.Sugibayashi, M.Nemoto and Y.Morimoto, *Chem.Pharm.Bull.*, 36, 1519 (1988).
- 13) M.Ainsworth, *J.Soc.Cosmet.Chem.*, 11, 69 (1960).
- 14) R.C.Wester and P.K.Noonan, *Int.J.Pharmaceut.*, 7, 99 (1980).

- 15) 松岡理, 小林定喜 (監訳), "動物種差と外挿", ソフトサイエンス社, 東京, 1984, pp. 44-55.
- 16) Y. Uchida, N. Yoshimoto and S. Murao, *Jpn. Heart J.*, 19, 112 (1978).
- 17) Y. Nakagawa, K. Takada, Y. Katano, T. Tsukada, T. Kitagawa, T. Otorii and S. Imai, *Jpn. Heart J.*, 20, 881 (1979).
- 18) K. Sato, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharmaceut.*, 43, 31 (1988).
- 19) 永井広史, 小泉郁恵, 羽田正利, 今井俊勝, 菊池峰生, 柴正晴, *医薬品研究*, 14, 968 (1983).
- 20) G. S. Hawkins and W. G. Reifenrath, *J. Pharm. Sci.*, 75, 378 (1978).
- 21) R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, E. R. Congdon and A. L. Giles Jr., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62, 474 (1982).
- 22) K. E. Anderson, H. I. Maibach and M. D. Anjo, *Br. J. Dermatol.*, 102, 447 (1980).
- 23) R. T. Tregear, *Nature*, 205, 600 (1965).
- 24) H. Durrheim, G. L. Flynn, W. I. Higuchi and C. R. Behl, *J. Pharm. Sci.*, 69, 781 (1980).
- 25) D. Mirejovsky and H. Takruri, *J. Pharm. Sci.*, 75, 1089 (1986).
- 26) R. L. Koch, P. Palicharla and M. J. Gloves, *J. Invest. Dermatol.*, 88, 582 (1987).
- 27) A. Hoelgaard and B. Møllgaard, *J. Pharm. Pharmacol.*, 34, 610 (1982).
- 28) A. Rougier, C. Lotte and H. I. Maibach, *J. Invest. Dermatol.*, 88, 577 (1987).

- 29) 杉林堅次, 森本雍憲, 製薬工場, 4, 543 (1984).
- 30) T.Higuchi, J.Soc.Cosmet.Chem., 11, 85 (1960).
- 31) S.M.Harrison, B.W.Barry and P.H.Dugard, J.Pharm.Pharmacol., 36, 261 (1983).
- 32) 杉林堅次, 奥村陸男, フレグランスジャーナル, 80, 40 (1987).
- 33) C.D.Yu, J.L.Fox, N.F.H.Ho and W.I.Higuchi, J.Pharm.Sci., 68, 1341 (1979).
- 34) B.Møllgaard, A.Hoelgaard and H.Bundgaard, Int.J.Pharmaceut., 12, 153 (1982).
- 35) K.Okabe, H.Yamaguchi and Y.Kawai, J.Controlled Release, 4, 79 (1985).
- 36) B.Kari, Diabetes, 35, 217 (1986).
- 37) B.W.Barry, "Dermatological Formulations", Marcel Dekker, New York, 1983, pp. 160-172.
- 38) D.Southwell, B.W.Barry, R.Evans and F.J.T.Fildes, J.Pharm.Pharmacol., 33, 3P (1981).
- 39) H.Sasaki, M.Kojima, Y.Mori, J.Nakamura and J.Shibasaki, Int.J.Pharmaceut., 44, 15 (1988).
- 40) M.Yamada and Y.Uda, Chem.Pharm.Bull., 35, 3390 (1987).
- 41) R.B.Stoughton and W.O.McClure, Drug Dev.Ind.Pharm., 9, 725 (1983).
- 42) K.Sugibayashi, K.Hosoya, Y.Morimoto and W.I.Higuchi, J.Pharm.Pharmacol., 37, 578 (1985).

- 43) J.Ostrenga, C.Steinmetz and B.Poulsen, *J.Pharm.Sci.*, 60, 1175 (1971).
- 44) J.Ostrenga, C.Steinmetz, B.Poulsen and S.Yett, *J.Pharm.Sci.*, 60, 1180 (1971).
- 45) A.Karino, M.Hayashi, T.Horie, S.Awazu, H.Minami and M.Hanano, *J.Pharmacobio-Dyn.*, 5, 410 (1982).
- 46) O.Kedem and A.Katchalsky, *Biochim.Biophys.Acta*, 27, 229 (1958).
- 47) P.K.Wotton, B.Møllgaard, J.Hadgraft and A.Hoelgaard, *Int.J.Pharmaceut.*, 24, 19 (1985).
- 48) M.Yamada, Y.Uda and Y.Tanigawara, *Chem.Pharm.Bull.*, 35, 3399 (1987).
- 49) M.Washitake, T.Yajima, T.Anmo, T.Arita and R.Hori, *Chem.Pharm.Bull.*, 21, 2444 (1973).
- 50) B.W.Barry, *J.Controlled Release*, 6, 85 (1987).
- 51) Y.Morimoto, K.Sugibayashi, K.Hosoya and W.I.Higuchi, *Int.J.Pharmaceut.*, 32, 31 (1986).
- 52) K.Sato, T.Oda, K.Sugibayashi and Y.Morimoto, *Chem.Pharm.Bull.*, 36, 2232 (1988).
- 53) K.Sato, T.Oda, K.Sugibayashi and Y.Morimoto, *Chem.Pharm.Bull.*, 36, 2624 (1988).
- 54) K.Hosoya, N.Shudo, K.Sugibayashi and Y.Morimoto, *Chem.Pharm.Bull.*, 35, 726 (1987).

- 55) 神山博, 日野原好和, 中野英樹, 東平靖雄, 沢田幹夫, 田村博志,
内山智晴, 大谷武彦, 石崎高志, 千葉寛, 応用薬理, 23, 261 (1982).
- 56) T. Ishizaki, K. Chiba, T. Suganuma, T. Sasaki, H. Kamiyama and
H. Nakano, J. Pharm. Sci., 73, 494 (1984).
- 57) 堀井大治郎, 石橋昭, 岩本淳, 臨床薬理, 15, 489 (1984).
- 58) 花野学, 薬局, 22, 67 (1971).
- 59) C. R. Behl and M. Barret, J. Pharm. Sci., 70, 1212 (1981).
- 60) C. R. Behl, G. L. Flynn, T. Kurihara, N. Harper, W. Smith, W. I. Higuchi,
N. F. H. Ho and C. L. Pierson, J. Invest. Dermatol., 75, 346 (1980).
- 61) R. J. Scheuplein and L. W. Loss, J. Invest. Dermatol., 62, 353 (1974).
- 62) J. G. Wagner and E. Nelson, J. Pharm. Sci., 53, 1392 (1964).
- 63) J. C. K. Loo and S. Riegelman, J. Pharm. Sci., 57, 918 (1968).
- 64) H. Nogami and M. Hanano, Chem. Pharm. Bull., 15, 1002 (1967).
- 65) R. J. Scheuplein, J. Invest. Dermatol., 48, 79 (1967).
- 66) K. Kakemi, H. Kameda, M. Kakemi, M. Uda and T. Koizumi, Chem. Pharm.
Bull., 23, 2109 (1975).
- 67) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa and T. Uno, J. Pharmacobio-Dyn.,
4, 879 (1981).
- 68) E. R. Cooper, J. Pharm. Sci., 65, 1396 (1976).
- 69) S. M. Wallece and G. Barnett, J. Pharmacokin. Biopharm., 6, 315 (1978).
- 70) R. H. Guy, J. Hadgraft and H. I. Maibach, Int. J. Pharmaceut., 11, 119
(1982).
- 71) R. H. Guy and J. Hadgraft, J. Pharm. Sci., 74, 1016 (1985).

- 72) K. Sato, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, H. Omiya and N. Enomoto, *J. Pharm. Pharmacol.*, in press (1989).
- 73) B. W. Barry, "Dermatological Formulations", Marcel Dekker, New York, 1983, pp. 138-145.
- 74) M. J. Bartek, J. A. Labudde and H. I. Maibach, *J. Invest. Dermatol.*, 58, 114 (1972).
- 75) R. C. Wester and H. I. Maibach, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 32, 394 (1975).
- 76) G. S. Hawkins Jr. and W. G. Reifenrath, *Fundament. Appl. Toxicol.*, 4, S133 (1984).
- 77) R. L. Bronaugh and E. R. Congdon, *J. Invest. Dermatol.*, 83, 124 (1984).
- 78) R. L. Bronaugh and T. J. Franz, *Br. J. Dermatol.*, 115, 1 (1986).
- 79) H. Okamoto, H. Komatsu, M. Hashida and H. Sezaki, *Int. J. Pharmaceut.*, 30, 35 (1986).
- 80) 小松秀雄。栗原敏夫。薬剂学, 45, 200 (1985)。
- 81) R. L. Bronaugh and H. I. Maibach, "Percutaneous Absorption", Marcel Dekker, New York, 1985, pp. 125-132.
- 82) W. Montagna and J. S. Yun, *J. Invest. Dermatol.*, 43, 11 (1961).
- 83) P. D. Forbes, *Adv. Biol. Skin*, 9, 419 (1969).
- 84) W. R. Garey, H. K. Lonsdale and S. Nacht, *J. Invest. Dermatol.*, 67, 713 (1976).
- 85) W. Meyer, R. Schwarz and K. Neurand, *Curr. Probl. Dermatol.*, 7, 39 (1978).

- 86) P.M.Elias, *Int.J.Dermatol.*, 20, 1 (1981).
- 87) P.M.Elias, E.R.Cooper, A.Korc and B.E.Brown, *J.Invest.Dermatol.*, 76, 297 (1981).
- 88) T.Abe, *Chem.Pharm.Bull.*, 26, 1659 (1978).
- 89) P.M.Elias, B.E.Brown, P.Fritsch, J.Goerke, G.M.Gray and R.J.White, *J.Invest.Dermatol.*, 73, 339 (1979).
- 90) P.V.Raykar, M.C.Fung and B.D.Anderson, *Pharmaceut.Res.*, 5, 140 (1988).
- 91) 井沼正美, 畑中朋美, 杉林堅次, 森本雍憲, 日本薬劑学会第4年会講演要旨集, 1988, pp. 181-182.
- 92) R.C.Scott, M.Walker and P.H.Dugard, *J.Soc.Cosmet.Chem.*, 37, 35 (1986).
- 93) L.F.Prescott and W.S.Nimmo, "Drug Absorption", ADIS Press, Sydney, 1981, pp. 186-193.
- 94) T.Arita, R.Hori, T.Anno, M.Washitake, M.Akatsu and T.Yajima, *Chem.Pharm.Bull.*, 18, 1045 (1970).
- 95) A.Rougier, C.Lotte and H.I.Maibach, *J.Pharm.Sci.*, 76, 451 (1987).
- 96) S.T.Horhota and H.L.Fung, *J.Pharm.Sci.*, 68, 608 (1979).
- 97) 岡島智志, 菱田仁, 萩原和光, 中川立一, 坂部慶幸, 酒井泰彦, 水野康, *基礎と臨床*, 18, 2489 (1984).
- 98) P.S.K.Yap and H.L.Fung, *J.Pharm.Sci.*, 67, 584 (1978).
- 99) G.Idzu, M.Ishibashi and H.Miyazaki, *J.Chromatogr.*, 229, 327 (1982).

- 100) V.Thornton and F.E.Condon, Anal.Chem., 22, 690 (1950).
- 101) K.Knutson, R.O.Potts, D.B.Guzek, G.M.Golden, J.E.Mckie,
W.J.Lambert and W.I.Higuchi, J.Controlled Release, 2, 67 (1985).
- 102) 田上八郎, 大井正俊, 山田瑞穂, 日皮会誌, 90, 445 (1980).
- 103) 花岡宏和, 大城戸宗男, 服部保次, 丸田忠雄, 新井敏夫, 日皮会誌 ,
81, 259 (1971).

