

ビタミン D₃ 誘導体の皮膚透過性解析
および定量的構造透過性相関に関する研究

2008

乙第51号

山口 幸治

ビタミン D₃ 誘導体の皮膚透過性解析
および定量的構造透過性相関に関する研究

2008

山口 幸治

目次

記号と略語	1
緒言	2
第1編 Maxacalcitol の <i>in vitro</i> ラット皮膚透過性評価	5
第1章 皮膚中で複雑に代謝される maxacalcitol の皮膚透過性解析手法の構築	5
第1節 理論	7
1. 皮膚中代謝を考慮した皮膚一層拡散モデル (one-layer skin model)	8
2. 皮膚中代謝を考慮した皮膚二層拡散モデル (two-layer skin model)	9
第2節 実験の部	12
1. 実験材料	12
2. 軟膏調製	12
3. ラット摘出皮膚の調製	12
4. Franz 型拡散セルを用いた <i>in vitro</i> ラット皮膚透過実験	14
5. [2 β - ³ H]OCT の代謝物プロフィール分析	14
6. 皮膚透過実験サンプル中 OCT の測定	15
7. データ解析	17
第3節 結果および考察	19
1. ラット皮膚中における[2 β - ³ H]OCT の代謝	19
2. OCT の <i>in vitro</i> ラット皮膚透過性	20
3. OCT 皮膚透過性の拡散モデル解析	22
4. 未変化体透過量および代謝物生成量におよぼす D'_{VED} 値の影響	25
第4節 小括	27
第2章 軟膏組成がおよぼす maxacalcitol の <i>in vitro</i> ラット皮膚透過性への影響	28
第1節 実験の部	30
1. OCT 軟膏の調製	30
2. Membraneless 法による OCT の軟膏中拡散実験	30
3. Netwell TM を用いた <i>in vitro</i> ラット皮膚透過実験	31
4. 実験サンプル中 OCT 濃度の測定	32
第2節 データ解析	33
1. 軟膏中拡散係数の算出方法	33
2. 軟膏中拡散を考慮した拡散モデルに基づいた OCT 皮膚透過性の解析	34
3. 軟膏中拡散係数が薬物皮膚透過におよぼす影響を評価するための数値計算実験	39
第3節 結果および考察	40

1. 軟膏中 OCT 拡散係数	40
2. <i>In vitro</i> ラット皮膚透過性	40
3. シミュレーション実験結果	43
第4節 小括	48
第2編 ビタミンD ₃ 新規誘導体SMD-429 の <i>in vitro</i> ラット皮膚代謝および透過性に関する検討	49
第1節 実験の部	50
1. 実験材料	50
2. 軟膏調製	50
3. <i>in vitro</i> ラット皮膚透過実験	51
4. LSE-high 透過実験	51
5. サンプル中薬物の測定	53
6. [³ H]SMD-429 透過実験で得たレセプター液サンプルの分析	53
7. 皮膚透過実験データの解析	53
第2節 結果および考察	55
1. ビタミン D ₃ 誘導体の <i>in vitro</i> 皮膚透過性	55
2. ビタミン D ₃ 誘導体の皮膚中代謝	58
3. 拡散モデルに基づいたビタミン D ₃ 誘導体の皮膚透過性解析	59
第3節 小括	64
第3編 物性の異なる化合物群を用いた定量的構造透過性相関解析	65
第1節 実験の部	67
1. 実験材料	67
2. <i>In vitro</i> ラット皮膚透過実験	67
3. サンプル測定	68
第2節 薬物皮膚透過プロフィールの分析	72
1. 理論	72
2. 皮膚透過パラメータの算出	72
3. 薬物の物理化学的パラメータの算出	73
第3節 結果	74
1. 薬物の物理化学的パラメータ	74
2. 薬物の <i>in vitro</i> ラット皮膚透過性	75
3. 薬物皮膚透過性の拡散モデルに基づいた解析	78
4. 化合物物性と皮膚透過パラメータとの相関解析	80
第4節 考察	84

第5節 小括.....	89
結論	91
謝辭	95
引用文献.....	96

記号と略語

	略語		
HBA	水素結合アクセプター数	P_{VED}	VED 透過係数
HBD	水素結合ドナー数	$P_{VED/SC}$	SC を介しての VED 透過係数
MCT	中鎖脂肪酸トリグリセリド	P_{full}	Full-thickness skin 透過係数
MW	分子量	Q_s	皮膚中薬物濃度
OCT	maxacalcitol	Q_v	基剤中薬物濃度
PG	プロピレングリコール	Q_R	累積薬物透過量
QSPR	quantitative structure-permeability relationship, 定量的構造透過性相関	V_v	基剤体積
SC	stratum corneum, 角層		
VED	viable epidermis and dermis		
	記号		
C_v	基剤中薬物濃度		
C_{SC}	SC 中薬物濃度		
C_{VED}	VED 中薬物濃度		
D_{full}	full-thickness skin 中拡散係数		
D_v	基剤中拡散係数		
D_{SC}	SC 中拡散係数		
D_{VED}	VED 中拡散係数		
k_{ms}	皮膚中代謝速度定数		
$K_{SC/v}$	SC/基剤間分配係数		
$K_{VED/SC}$	VED/SC 間分配係数		
$K_{VED/v}$	VED/基剤間分配係数		
L_{SC}	角層厚み		
L_v	基剤厚み		
L_{VED}	VED 厚み		
$\log K_{o/w}$	オクタノールー水分配係数		
$\log K_{o/w, pred}$	予測オクタノールー水分配係数		
P_{SC}	SC 透過係数		

緒言

尋常性乾癬は、鱗屑および紅斑等の皮膚所見を呈する難治性の慢性疾患である。その発症メカニズムが解明されていないため、治療としては対症療法が施される。尋常性乾癬の病態は、表皮細胞の増殖・分化異常および炎症細胞浸潤により特徴付けられる。薬物療法としては副腎皮質ステロイドの外用が広く用いられており、優れた効果を示している。その一方で、副作用が強く、強いリバウンドを引き起こすため慎重な使用が求められている。内服薬としてはレチノイド¹、メトトレキサート²およびシクロスポリン³が使用されており、これらは強い治療効果を示すことが知られている。その一方で、それぞれ催奇形性、重篤な肝障害、重篤な腎機能障害といった副作用を発現するため、重症度の高い場合にのみ処方され、その利用が制限されている。近年では、ビタミン D₃ 誘導体外用剤⁴⁻⁵が乾癬治療に用いられるようになり、その有効性とともに関与する既存の治療薬にみられるような重大な副作用が無いことが、治療上の利点としてあげられる。

活性型ビタミン D₃ は、カルシウム代謝調節作用⁶、分化誘導作用⁷、細胞増殖抑制作用⁸、副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌抑制作用⁹ といった多様な生理活性を有する。これら活性型ビタミン D₃ の持つ生理活性のうち、分化誘導作用および細胞増殖抑制作用が、表皮細胞の増殖・分化異常を正常化し、乾癬治療に有効性を示すと考えられている¹⁰。一方で、カルシウム代謝調節作用は、副作用である高カルシウム血症¹¹⁻¹²を引き起こす原因となる。

尋常性乾癬治療薬として国内で最初に承認されたビタミン D₃ 剤は tacalcitol¹³ である。その後、薬効の増強および副作用であるカルシウム作用の軽減を指向したビタミン D₃ 誘導体の開発が進められ、現在では、calcipotriol¹⁴ および maxacalcitol (OCT)¹⁵ が開発され外用剤として市販されている。これらビタミン D₃ 誘導体は乾癬治療に有効であるが、副作用である高カルシウム血症を回避するために使用量が制限されている。このため、さらに安全性が高く治療効果の優れたビタミン D₃ 誘導体の開発が望まれる。

しかしながら、ビタミン D₃ 誘導体の薬効と副作用はいずれもビタミン D レセプターを介した作用であることから、薬理活性の増強は、薬効のみならず副作用の増強を導くため、安全域を拡げることは容易ではない。

皮膚を標的臓器とする外用剤にとって、皮膚中で一定以上の薬物濃度を保つことが薬効を発現する上で重要である。一方で、経皮吸収されて循環血へと移行した薬物が副作用を引き起こすことになる。乾癬治療におけるビタミン D₃ 誘導体の薬効発現部位が局所であり、副作用発現が循環血移行後の全身性であることを考えると、皮膚透過性を制御することによって、薬効増強と副作用軽減とを同時に達成できる可能性がある。また、薬物の物理化学的性質から皮膚透過性を予測する試みが多数報告されていることを考えると^{16, 17, 18, 19, 20, 21}、分子設計による皮膚透過性の制御が可能と思われる。そこで、本研究では、乾癬治療に最適な皮膚透過プロフィールを有するビタミン D₃ 誘導体の設計を目指し、ビタミン D₃ 誘導体の皮膚透過性と物性との関係性を評価することにした。

本研究では、ビタミン D₃ 誘導体の皮膚中動態の特徴を明らかにするため、*in vitro* ラット皮膚透過実験を実施し、ビタミン D₃ 誘導体の皮膚中代謝を評価すると同時に、拡散モデルに基づいてその皮膚透過性を解析した。さらに、ドラッグデザインへの落としこみを目指し、皮膚透過性と化合物物性との関係を解析した。第 1 編では、摘出ラット皮膚を用いて OCT の皮膚中代謝および透過性を評価した。その結果、OCT の皮膚中代謝経路が複雑であることが明らかになった。複雑な代謝経路を有する薬物の皮膚透過性を解析すべく、代謝過程を含む拡散モデルに基づいた新規解析法を構築した。さらに、処方設計による皮膚透過性改良の可能性について、数値計算法を用いて考察した。第 2 編では、代謝的に不安定に設計されたビタミン D₃ 新規誘導体の皮膚透過性および代謝を評価し、既存薬との相違点を考察した。さらに、皮膚透過性と副作用との関係および物性と皮膚透過性との関係を考察した。第 3 編では、薬物の物性と皮膚透過性との関係を詳細に調べるため、脂溶性の異なる化合物群を用いて *in*

vitro ラット皮膚透過実験を実施した。得られた皮膚透過データを用い、定量的構造透過性相関解析を実施し、分子設計による皮膚中動態制御の可能性を考察した。

第1編 Maxacalcitol の *in vitro* ラット皮膚透過性評価

第1章 皮膚中で複雑に代謝される maxacalcitol の皮膚透過性解析手法の構築²²

皮膚は代謝活性を有する臓器であり、皮膚代謝は経皮投与された薬物のバイオアベイラビリティや血漿中濃度に影響を及ぼす重要な因子である。皮膚における薬物代謝速度は、皮膚ホモジネート^{23, 24, 25}や細胞画分^{26, 27}を用いた *in vitro* 実験により容易に求めることができる。しかしながら、3次元構造を無くしたホモジネート等が、実際の皮膚と同等の代謝活性を保持しているのかは定かではない。それに対し、皮膚透過実験系では、新鮮な摘出皮膚をそのまま使用でき、且つ、薬物の皮膚透過と代謝とを同時に評価できるという点で有用である。

皮膚中で代謝される薬物の皮膚透過上の特徴を明らかにするため、代謝過程を考慮した Fick の拡散法則に基づく理論モデルが開発されてきた。このようなモデルでは、皮膚代謝を1次速度^{28, 29, 30}あるいは Michaelis-Menten 式^{31, 32, 33, 34}で表現する。皮膚中で酵素は不均一に分布しており、生きた表皮が酵素活性の高い層であると考えられているが^{26, 27, 35}、均一な酵素分布を仮定したモデルの方が単純であり、利便性が高い。これまでに報告されてきた皮膚代謝を考慮した拡散モデル解析法では、通常、未変化体のみならず、その代謝物の観測データが必要とされている。しかしながら、代謝物の定量が困難な薬物、あるいは、代謝経路が不明な薬物に対して、この既存の解析法は適用できない。それ故、代謝物情報を必要としない解析方法を構築することができれば、このような薬物の皮膚透過過程を理解する上で役立つと思われる。

本研究では、乾癬外用治療に使用されるオキサロール軟膏中¹⁵の主成分であるビタミン D₃ 誘導体、maxacalcitol (慣用名：22-oxacalcitriol。以下、OCT)³⁶の *in vitro* ラット皮膚透過実験を実施した。その結果、OCT は皮膚中で未知代謝物を含む複数の

代謝物に変換されることが明らかになった。そこで、OCT の皮膚透過過程を解析するため、代謝物情報を必要とせず、未変化体の皮膚透過プロファイルのみによる新規解析法を構築した。この解析法を用いて、OCT の皮膚透過パラメータおよび代謝速度を算出し、皮膚透過上の特徴を考察した。

第1節 理論

OCT の皮膚透過性を解析するため、two-layer skin model^{30, 33, 35} を利用した。モデル模式図を Fig. 1 に示すが、本モデルは次の仮説から成り立つ: 1) 基剤中薬物の瞬時拡散および finite dose 条件、2) レセプター液における sink 条件、3) 皮膚は均質な 2 つの拡散層、すなわち、角層 (SC) および生きた表皮/真皮 (viable epidermis and dermis, VED) とで構成される、4) 薬物代謝は VED 中でのみ起こり、その速度は 1 次消失速度で表現される。上記仮説に基づいて、角層除去皮膚 (stripped skin) および正常皮膚 (full-thickness skin) における薬物透過性を、それぞれ one-layer skin model および two-layer skin model で表現した。以下、各モデルについて説明する。

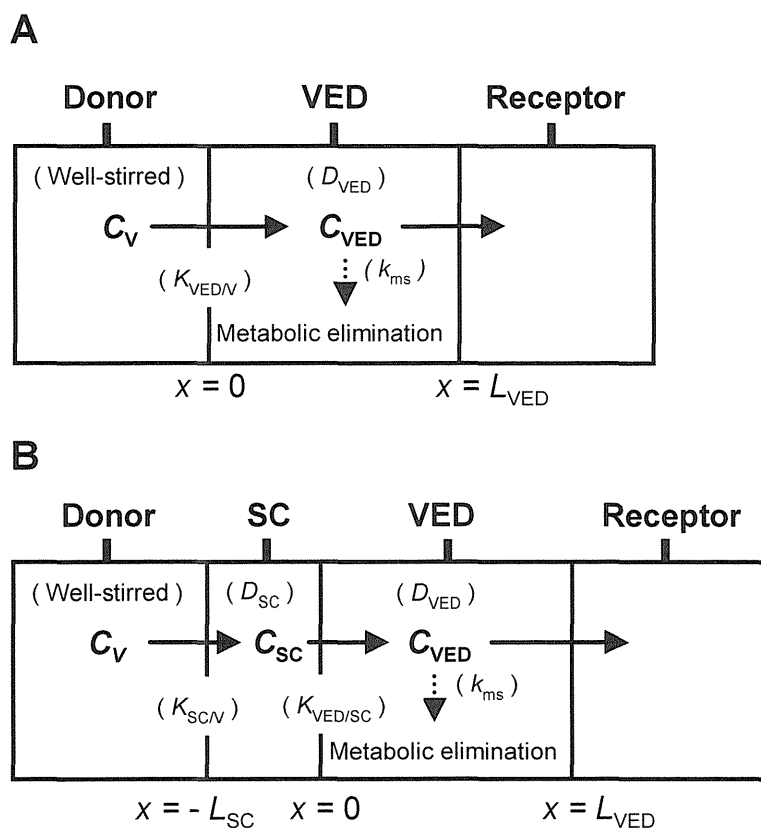


Fig. 1. Schematic representation of the diffusion model for skin permeation of a drug. (A) stripped skin, (B) full-thickness skin.

1. 皮膚中代謝を考慮した皮膚一層拡散モデル(one-layer skin model)

Stripped skin を用いた透過実験においては、皮膚中薬物濃度を以下の式で表現する。

$$\frac{\partial C_{VED}(x,t)}{\partial t} = D_{VED} \cdot \frac{\partial^2 C_{VED}(x,t)}{\partial x^2} - k_{ms} \cdot C_{VED}(x,t) \quad \text{Eq.1}$$

ここで、 C_{VED} は VED 中の位置 x 、時間 t における薬物濃度を表し、 D_{VED} は VED 中拡散係数、 k_{ms} は VED 中代謝速度定数を表す。初期条件は次式で表す。

$$C_V = \frac{Dose}{V_V}$$

$$C_{VED}(x,0) = 0 \quad (0 \leq x \leq L_{VED})$$

ここで、 C_V は基剤中薬物濃度を、 $Dose$ は基剤中薬物量を、 V_V は基剤体積を、 L_{VED} は VED の厚みを表す。位置 $x = 0$ および $x = L_{VED}$ は、それぞれ基剤/VED の境界および VED/レセプター液の境界を表す。境界条件は以下の式で表す。

$$C_{VED}(x,t) = K_{VED/V} \cdot C_V \quad (x = 0) \quad \text{Eq.2}$$

$$V_V \cdot \frac{\partial C_V}{\partial t} = D_{VED} \cdot Area \cdot \frac{\partial C_{VED}(x,t)}{\partial x} \quad (x = 0) \quad \text{Eq.3}$$

$$C_{VED}(x,t) = 0 \quad (x = L_{VED})$$

ここで、 $K_{VED/V}$ は VED/基剤間分配係数を $Area$ は実効拡散面積を表す。Eq.2 および Eq.3 とから次に示す境界条件式が得られる。

$$\frac{\partial C_{VED}(x,t)}{\partial t} = \frac{K_{VED/V} \cdot D_{VED} \cdot Area}{V_V} \cdot \frac{\partial C_{VED}(x,t)}{\partial x} \quad (x = 0) \quad \text{Eq.4}$$

厚み無次元の式を得るため $y = x/L_{VED}$ を仮定することで、Eq.4 および Eq.1 を次式に変換した。

$$\frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial t} = \frac{K'_{VED/V} \cdot D'_{VED} \cdot Area}{V_V} \cdot \frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial y} \quad (y=0)$$

$$\frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial t} = D'_{VED} \cdot \frac{\partial^2 C'_{VED}(y,t)}{\partial y^2} - k_{ms} \cdot C'_{VED}(y,t) \quad (0 < y < 1)$$

ここで、 C'_{VED} 、 $K'_{VED/V}$ および D'_{VED} は、それぞれ $C_{VED} \cdot L_{VED}$ 、 $K_{VED/V} \cdot L_{VED}$ および D_{VED}/L_{VED}^2 に等しい。これらの偏微分方程式を時間依存的な常微分方程式に変換し、陰的オイラー法で解いた。基剤中薬物濃度 ($Q_V(t)$) は次式により算出した。

$$Q_V(t) = \frac{V_V}{K'_{VED/V}} C'_{VED}(0,t) \quad \text{Eq.5}$$

皮膚中薬物濃度は次式により算出した。

$$Q_S(t) = Area \int_0^1 C'_{VED}(y,t) \cdot dy \quad \text{Eq.6}$$

累積透過量は次式で算出した。

$$Q_R(t) = -D'_{VED} \cdot Area \int_0^t \frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial y} dt \Big|_{y=1} \quad \text{Eq.7}$$

2. 皮膚中代謝を考慮した皮膚二層拡散モデル (two-layer skin model)

Full-thickness skin を用いた透過実験における SC および VED 中薬物濃度を次式により表す。

$$\frac{\partial C_{SC}(x,t)}{\partial t} = D_{SC} \cdot \frac{\partial^2 C_{SC}(x,t)}{\partial x^2} \quad \text{Eq.8}$$

$$\frac{\partial C_{VED}(x,t)}{\partial t} = D_{VED} \cdot \frac{\partial^2 C_{VED}(x,t)}{\partial x^2} - k_{ms} \cdot C_{VED}(x,t) \quad \text{Eq.9}$$

ここで、 C_{SC} は SC 中薬物濃度を、 D_{SC} は SC 中拡散係数を表す。初期条件は次式で

表す。

$$C_V = \frac{Dose}{V_V}$$

$$C_{SC}(x,0) = 0 \quad (-L_{SC} \leq x \leq 0)$$

$$C_{VED}(x,0) = 0 \quad (0 \leq x \leq L_{VED})$$

ここで、 L_{SC} および L_{VED} は、それぞれ SC および VED の厚みを表す。位置 $x = -L_{SC}$ 、 $x = 0$ および $x = L_{VED}$ は、それぞれ基剤/SC の境界、SC/VED の境界および VED/レセプター液の境界を表す。境界条件は次式で表す。

$$C_{SC}(x,t) = K_{SC/V} \cdot C_V \quad (x = -L_{SC}) \quad \text{Eq.10}$$

$$V_V \frac{\partial C_V}{\partial t} = D_{SC} \cdot Area \cdot \frac{\partial C_{SC}(x,t)}{\partial x} \quad (x = -L_{SC}) \quad \text{Eq.11}$$

$$D_{SC} \frac{\partial C_{SC}(x,t)}{\partial x} = D_{VED} \frac{\partial C_{VED}(x,t)}{\partial x} \quad (x = 0) \quad \text{Eq.12}$$

$$C_{VED}(x,t) = K_{VED/SC} \cdot C_{SC}(x,t) \quad (x = 0) \quad \text{Eq.13}$$

$$C_{VED}(x,t) = 0 \quad (x = L_{VED})$$

ここで、 $K_{SC/V}$ は SC/基剤間分配係数を表す。 $K_{VED/SC}$ は VED/SC 間分配係数を表し、 $K_{VED/V}/K_{SC/V}$ と等しい。Eq.10 および Eq.11 から次に示す境界条件が得られる。

$$\frac{\partial C_{SC}(x,t)}{\partial t} = \frac{K_{SC/V} \cdot D_{SC} \cdot Area}{V_V} \cdot \frac{\partial C_{SC}(x,t)}{\partial x} \quad (x = -L_{SC}) \quad \text{Eq.14}$$

厚み無次元の方程式を得るため、 $y = x/L_{VED}$ および $y = x/L_{SC}$ を仮定した。それにより、Eqs. 8, 9, 12, 13 および 14 をそれぞれ次式に変換した。

$$\frac{\partial C'_{SC}(y,t)}{\partial t} = \frac{K'_{SC/V} \cdot D'_{SC} \cdot Area}{V_V} \frac{\partial C'_{SC}(y,t)}{\partial x} \quad (y = -1)$$

$$\frac{\partial C'_{SC}(y,t)}{\partial t} = D'_{SC} \cdot \frac{\partial^2 C'_{SC}(y,t)}{\partial y^2} \quad (-1 < y < 0)$$

$$D'_{SC} \frac{\partial C'_{SC}(y,t)}{\partial y} = D'_{VED} \frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial y} \quad (y=0)$$

$$C'_{VED}(y,t) = K'_{VED/SC} \cdot C'_{SC}(y,t) \quad (y=0)$$

$$\frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial t} = D'_{VED} \cdot \frac{\partial^2 C'_{VED}(y,t)}{\partial y^2} - k_{ms} \cdot C'_{VED}(y,t) \quad (0 < y < 1)$$

ここで、 $K'_{SC/V}$ 、 $K'_{VED/SC}$ および D'_{SC} はそれぞれ $K_{SC/V} \cdot L_{SC}$ 、 $K_{VED/SC} \cdot L_{VED}/L_{SC}$ および D_{SC}/L_{SC}^2 と等しい。 C'_{SC} および C'_{VED} はそれぞれ $C_{SC} \cdot L_{SC}$ および $C_{VED} \cdot L_{VED}$ と等しい。これらの偏微分方程式を時間依存型の常微分方程式に変換し、陰的オイラー法により解いた。基剤中薬物量 ($Q_V(t)$) は次式により算出した。

$$Q_V(t) = \frac{V_V}{K'_{SC/V}} \cdot C'_{SC}(-1,t) \quad \text{Eq.15}$$

皮膚中薬物量 ($Q_S(t)$) は次式により算出した。

$$Q_S(t) = Area \int_{-1}^0 C'_{SC}(y,t) + Area \int_0^1 C'_{VED}(y,t) \quad \text{Eq.16}$$

累積透過量 ($Q_R(t)$) は次式で算出した。

$$Q_R(t) = -D'_{VED} \cdot Area \int_0^t \frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial y} \cdot dt \Big|_{y=1} \quad \text{Eq.17}$$

さらに、代謝物生成を次式で表現した。

$$\frac{\partial C'_M(y,t)}{\partial t} = k_{ms} \cdot C'_{VED}(y,t), \quad C'_M(y,0) = 0 \quad (0 < y < 1)$$

ここで、 $C'_M(y,t)$ は $C_M(x,t) \cdot L_{VED}$ と等しく、 $C_M(x,t)$ は VED 中の位置 x 、時間 t において新しく生成された薬物の濃度を表す。時間 t までに生成された総代謝物量 ($Q_M(t)$) は、次式で表される。

$$Q_M(t) = Area \cdot \int_0^t \int_0^1 k_{ms} \cdot C'_{VED}(y,t) \cdot dy \cdot dt$$

第2節 実験の部

1. 実験材料

OCT、20-*S*(OH)-hexanor-OCT、24-*R*(OH)OCT および 24-oxo-OCT は、中外製薬(株) (東京)にて合成された。 $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ は、Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA)にて合成された。これら化合物の構造式を Fig. 2 に示す。牛胎児血清は、MP Biomedicals (Irvine, CA, USA)から購入した。中鎖脂肪酸トリグリセリド(MCT)は、日清オイリオグループ(株)(東京)から購入した。白色ワセリンは、小堺製薬(株)(東京)から購入した。

2. 軟膏調製

OCT 軟膏 (500 $\mu\text{g/g}$ ointment, 3% (w/w) MCT)を以下の操作で調製した。まず、容器内の MCT 60 mg に対して、1 mg の OCT をエタノール溶液として添加した後、窒素気流下エタノールを留去した。次いで、OCT 含有 MCT 溶液に対して、白色ワセリン 1940 mg を加えた。容器を 60°C に温めてワセリンを融解し、MCT と混合して軟膏を調製した。得られた軟膏は、遮光下室温で保存した。 $[2\beta\text{-}^3\text{H}]\text{OCT}$ 軟膏 (10 μg OCT/13.9 MBq/g ointment, 3% (w/w) MCT)も同様の方法で調製した。

3. ラット摘出皮膚の調製

ラットの取扱いおよび実験プロトコールは、中外製薬(株)実験動物倫理規定に従った。雄性ラット(SD 系、7-8 週齢; 日本クレア(株)、東京)を実験に使用した。ラットをエーテル麻酔下、安楽死させた後、背部皮膚を毛刈りし、摘出、皮下組織をハサミで除去し、摘出皮膚(full-thickness skin)を調製した。角層除去皮膚(stripped skin)を調製するときは、10 回の tape-stripping を施して角層を除去した。

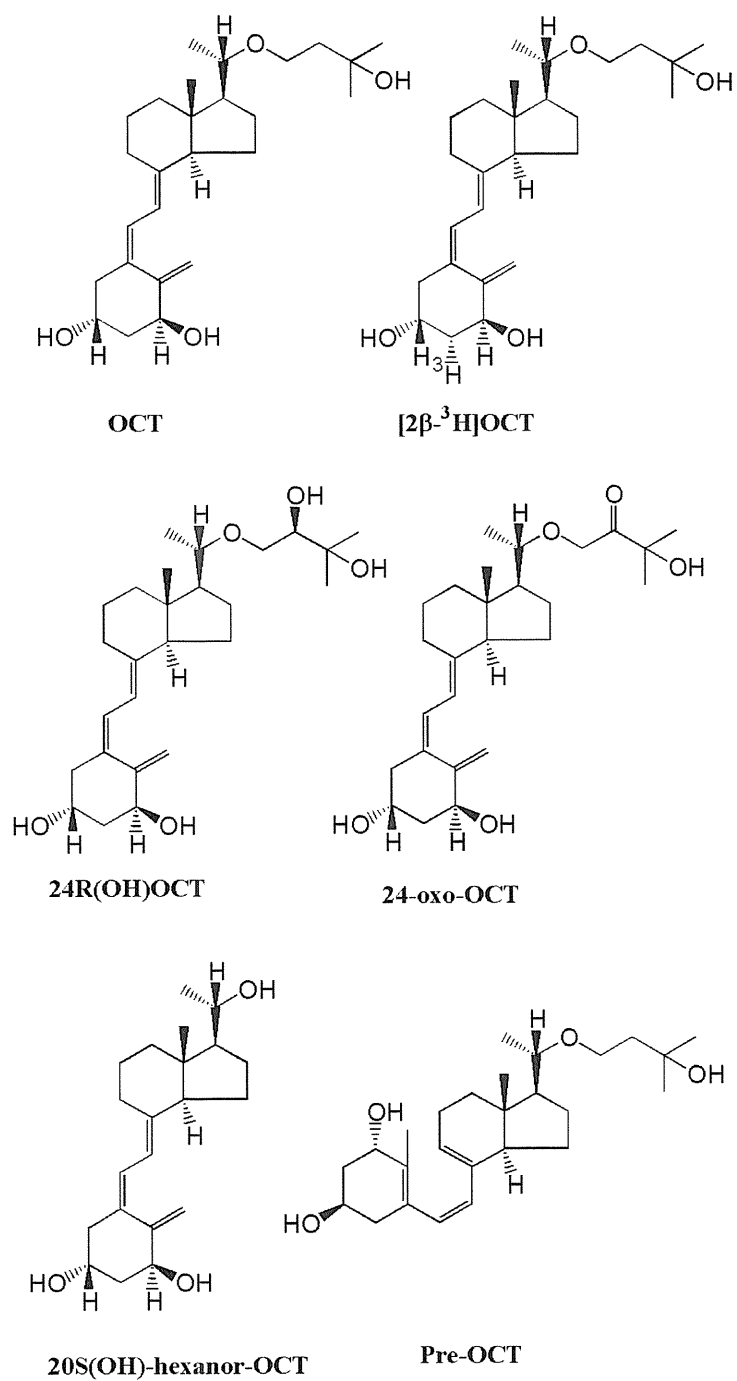


Fig. 2. Chemical structures of OCT, [2β-³H]OCT, and metabolites.

4. Franz 型拡散セルを用いた *in vitro* ラット皮膚透過実験

Franz 型拡散セル(有効拡散面積:4.9 cm²、レセプター容積:15 mL)を実験に使用した。真皮をレセプター側に向けた状態で、皮膚をセルに装着し、レセプター側に 20% (v/v) 牛胎児血清を含有するリン酸緩衝液(pH 7.4)を充填した。レセプター液を 37°Cに保温し、1 時間プレインキュベートした後、OCT 軟膏 24 mg(体積: 0.028 cm³)を皮膚表面に塗布した。軟膏塗布 1, 3, 8, 20 あるいは 24 時間後に、脱脂綿で軟膏を拭き取り、レセプター液および皮膚を回収した。回収した軟膏サンプルは 4°Cで、レセプター液および皮膚サンプルは-80°Cで保存した。

上記と同様の操作手順で、[2β-³H]OCT 軟膏を用いた透過実験を行い、軟膏塗布 24 時間後にレセプター液を回収した。

5. [2β-³H]OCT の代謝物プロフィール分析

レセプター液 2 あるいは 4 mL に対し、2 倍量のアセトニトリルを添加、混合した。混合液の遠心上清(3000 rpm, 10 min, 4°C)を回収し、窒素気流下溶媒を留去した。残渣を 300 μL の tetrahydrofuran/methanol/water (2:1:2, v/v/v)に再溶解し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)で分析した。HPLC システムは、ポンプ(LC-10AD; Shimadzu, Kyoto, Japan)、UV 検出器(SPD-10A; Shimadzu)、フロー型液体シンチレーションカウンター(FLO-ONE; Packard Instrument, Meriden, CT, USA)および分析カラム(YMC-Pack ODS-A A-313, 6.0×250 mm; YMC Co., Kyoto, Japan)で構成した。Table 1 に示したグラジエントプログラムに従い、1.0 mL/min の流速で HPLC 移動相を流した。HPLC へのサンプル注入量は 150 μL とした。OCT および代謝物の同定は、合成標品との溶出時間の比較により行った。

Table 1. Gradient program for Radio-HPLC analysis

Time (min – min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0 – 20	100 → 25	0 → 75
20 – 50	25	75
50 – 50.1	25 → 0	75 → 100
50.1 – 60	0	100

Solvent A: tetrahydrofuran/water = 10:90 (v/v), solvent B: tetrahydrofuran/methanol/water = 2:1:2 (v/v/v).

6. 皮膚透過実験サンプル中 OCT の測定

軟膏サンプルに 15 mL の *n*-hexane を加えて溶解した。得られた溶液にアセトニトリル 15mL を加えて 20 分間攪拌後、遠心(3000 rpm, 10 min, 4°C)し、アセトニトリル層を回収した。アセトニトリル画分を窒素気流下乾固し、残渣を 250 μ L の *n*-hexane/iso-propanol/methanol (135:8:2, v/v/v)に再溶解して HPLC サンプルを調製した。HPLC システムは、ポンプ (LC-10AD; Shimadzu)、UV 検出器 (SPD-10A; Shimadzu)、および分析カラム (YMC-Pack SIL A-004, 4.6×300 mm; YMC Co.)で構成した。移動相として *n*-hexane/iso-propanol/methanol (135:8:2, v/v/v)を用い、2.0 mL/min の流速で流した。UV 検出器の波長は 265 nm に設定した。HPLC へのサンプル注入量は 50 μ L とした。

皮膚サンプルに 70 mL の 70% (v/v) methanol を加えてホモジナイズし、ホモジネート遠心上清(3000 rpm, 10 min, 4°C)を回収した。ホモジネート残渣に対して同様の抽出操作を施した。得られた皮膚抽出液の総体積をメスシリンダーで測定した。皮膚抽出液の一部に対し、20 μ L の 500 ng/mL calcitriol を加えた後、窒素気流下溶媒を留去した。得られた残渣に対して、水 0.5 mL およびジエチルエーテル 2 mL を加えて 5 分間攪拌後、遠心(3000 rpm, 10 min, 4°C)した。有機層を回収し窒素気流下溶媒を

留去し、残渣を 50 μ L の methanol/10 mM ammonium acetate (85:15, v/v) に溶解して LC-MS/MS サンプルを調製した。検量線サンプルは以下の操作で調製した。まず、ブランク皮膚抽出液に対し、20 μ L の OCT 標準液 (エタノール溶液、濃度: 2, 6, 20, 60 および 200 ng/mL) および 20 μ L の 500 ng/mL calcitriol 溶液を内標準物質として加えた後、窒素気流下溶媒を留去した。得られた残渣に対して、水 0.5 mL およびジエチルエーテル 2 mL を加えて 5 分間攪拌後、遠心 (3000 rpm, 10 min, 4°C) した。有機層を回収し窒素気流下溶媒を留去し、残渣を 50 μ L の methanol/10 mM ammonium acetate (85:15, v/v) に溶解して検量線サンプルを調製した。LC-MS/MS システムは、液体クロマトグラフ (HP1090; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) を質量分析器 (API300; Applied Biosystems/MDS SCIEX, Concord, ON, Canada) に接続して構成した。分析カラムとして Capcell Pak C18 (UG120, 2.0 \times 150 mm, 5 μ m; Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。移動相として methanol/10 mM ammonium acetate (85:15, v/v) を用い、流速 0.2 mL/min で流した。TurboIonSpray® を介して HPLC 溶出液を質量分析器に導入し、陽イオンモードでイオンを検出した。OCT は m/z 297.3 (m/z 436.3 の daughter ion) のイオンとして検出し、calcitriol は m/z 363.3 (m/z 434.3 の daughter ion) のイオンとして検出した。

レセプター液に対して、3 あるいは 4 倍量のジエチルエーテルおよび 20 μ L の 500 ng/mL calcitriol 溶液を内標準物質として加え、5 分間攪拌した。次いで、遠心 (3000 rpm, 10 min, 4°C) し、有機層を回収、溶媒を窒素気流下留去した。残渣に 50 μ L の methanol/10 mM ammonium acetate (85:15, v/v) を加えて溶かし、LC-MS/MS サンプルを調製した。検量線サンプルは、以下の操作で調製した。まず、新鮮なレセプター液に対して、3 あるいは 4 倍量のジエチルエーテル、20 μ L の OCT 標準液 (エタノール溶液、濃度: 2, 6, 20, 60 および 200 ng/mL) および 20 μ L の 500 ng/mL calcitriol 溶液を内標準物質として加え、5 分間攪拌した。次いで、遠心 (3000 rpm, 10 min, 4°C) し、有機層を回収、溶媒を窒素気流下留去した。残渣に 50 μ L の methanol/10 mM

ammonium acetate (85:15, v/v)を加えて溶かし、検量線サンプルを調製した。レセプター液中 OCT の測定は、上述と同様の LC-MS/MS 分析条件で行った。

7. データ解析

軟膏中薬物量 (Q_V) は HPLC 分析で求めた。レセプター液まで透過した薬物量 (Q_R) は、次式で算出した。

$$Q_R = \text{レセプター液中薬物濃度} \times \text{レセプター液体積}$$

皮膚中薬物量 (Q_S) を算出する時、薬物の皮膚からの抽出率は 100%であると仮定した。このため、 Q_S は次式で算出した。

$$Q_S = \text{皮膚抽出液中薬物濃度} \times \text{皮膚抽出液体積}$$

例数3の皮膚透過実験で求めた Q_V 、 Q_R および Q_S の平均値を算出した。得られた値を用いて、Fig. 3 に示した手順で curve fitting を実行した。まず、Excel (Microsoft Co., Redmond, WA, USA) 上で動作する非線形最小二乗法プログラム MULTI³⁷ を用い、stripped skin における OCT の皮膚透過プロフィールを、Eqs. 5-7 に同時当てはめ計算することで、 $K'_{VED/V}$ 、 D'_{VED} および k_{ms} を求めた。次いで、full-thickness skin における OCT の皮膚透過プロフィールを Eqs. 15-17 に同時当てはめ計算することで、 $K'_{SC/V}$ 、 $K'_{VED/SC}$ ($= K'_{VED/V} / K'_{SC/V}$) および D'_{SC} を求めた。非線形最小二乗法の重み付けとして、 $1/y$ を採用した。

SC および VED 中透過係数は次式で表した。

$$P_{SC} = \frac{K'_{SC/V} \cdot D_{SC}}{L_{SC}}, \quad P_{VED} = \frac{K'_{VED/V} \cdot D_{VED}}{L_{VED}}$$

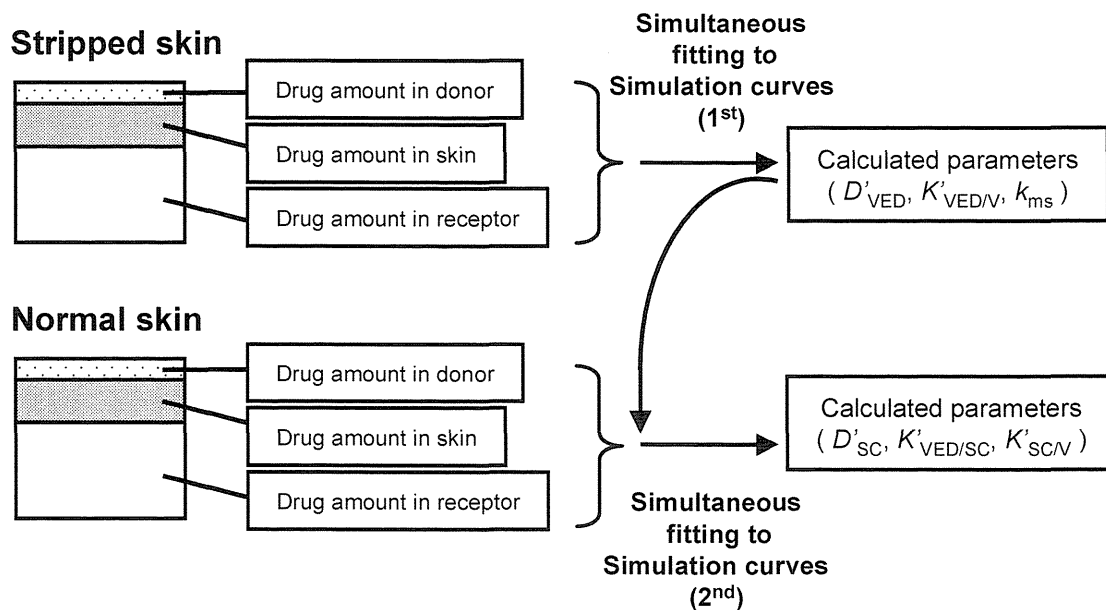


Fig. 3. Curve fitting procedure of skin permeation data. First, tape-stripped skin data (drug amount in donor, skin, and receptor) were simultaneously fitted to corresponding simulation curves. Next, full-thickness skin data were fitted.

第3節 結果および考察

1. ラット皮膚中における[2β-³H]OCT の代謝

[2β-³H]OCT の *in vitro* ラット皮膚透過実験で得られた典型的な Radio-HPLC クロマトグラムを Fig. 4 に示す。OCT、pre-OCT (OCT の熱平衡体)、20S(OH)-hexanor-OCT、24R(OH)OCT、24-oxo-OCT および複数の未知代謝物が、レセプター液中で検出された。20S(OH)-hexanor-OCT が OCT から直接生成したのか、あるいは、24R(OH)OCT のような代謝物を經由して生成したのかは不明である。軟膏塗布後 24 時間までにレセプター液中に透過した OCT および pre-OCT の合計は、レセプター液中総放射能の $25.2 \pm 11.5\%$ (mean \pm SD, n = 4) であった。代謝物としては 20S(OH)-hexanor-OCT が $16.5 \pm 8.9\%$ 、24R(OH)OCT が $3.4 \pm 2.0\%$ 、24-oxo-OCT が $2.7 \pm 1.1\%$ 、その他未知代謝物が $52.2 \pm 11.6\%$ であった。このことは、OCT が主として代謝物として皮膚を透過することを示している。

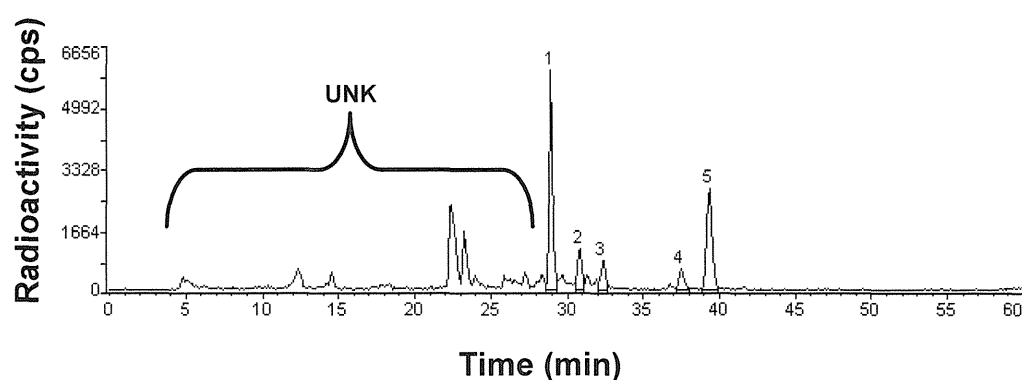


Fig. 4. Typical radio-HPLC chromatogram of receptor fluid at 24 h after application of [2β-³H]OCT to rat skin. Peak 1: 20S(OH)-hexanor-OCT, peak 2: 24R(OH)OCT, peak 3: 24-oxo-OCT, peak 4: pre-OCT, peak 5: OCT, UNK: unknown metabolites.

これまでに、OCT およびその代謝物の生物活性(HL-60 細胞増殖抑制、ビタミン D レセプターへの親和性)が調べられている³⁸。マイナーな代謝物である 24R(OH)OCT および 24-oxo-OCT の増殖抑制活性は、OCT よりも僅かに低く、主代謝物である 20S(OH)-hexanor-OCT の活性は顕著に低下していることが報告されている³⁸。未知代謝物(UNK)の化学構造および活性に関する情報は無い。しかしながら、逆相 HPLC 分析条件下における溶出時間からは、これら未知代謝物が、側鎖を有さない 20S(OH)-hexanor-OCT よりも極性が高いことが示唆される。OCT の乾癬外用治療を考えたとき、皮膚は薬効標的臓器であり、一方で、皮膚を透過し循環血へと移行した OCT は副作用を引き起こすと考えられる。20S(OH)-hexanor-OCT のような不活性代謝物に皮膚中で変換されることは、OCT の副作用軽減に寄与すると考えられた。

2. OCT の *in vitro* ラット皮膚透過性

Stripped skin および full-thickness skin 透過実験のいずれにおいても、軟膏および皮膚中 OCT 量は塗布 24 時間の間、減少していった(Fig. 5A および 5B)。Full-thickness skin に比べて stripped skin の方が、減少は速やかであった。塗布後 24 時間までに stripped skin を透過した累積 OCT 量は、full-thickness skin の 2.8 倍であった(Fig. 5C)。stripped skin および full-thickness skin 透過実験のいずれにおいても、実験系からの未変化 OCT の総回収量は経時的に減少した(Fig. 5D)。

[2β-³H]OCT を用いた *in vitro* ラット full-thickness skin 透過実験において、塗布 24 時間後に実験系(軟膏、皮膚抽出液およびレセプター液)から回収された放射能は、塗布した放射能の 92.5 ± 1.1% (mean ± SD, n = 3)であった。この結果は、実験系からの未変化 OCT の総回収量(Fig. 5D)が低下した原因が、主として代謝による消失であり、未変化 OCT の回収率が低いためではないことを示唆している。なお、レセプター液中安定性試験の結果、ガラス容器中 37°C で 24 時間インキュベートした後、OCT は 80%回収されることを確認している。また、[2β-³H]OCT を用いた透過実験の後、皮膚

中放射能の抽出率を評価したところ、ほとんどの放射能が皮膚抽出液へと抽出され (94%)、ペレットには僅かしか残存しなかった(6%)。これらの結果から、本実験方法が拡散モデル解析に耐えうるだけの正確性を有することが示された。

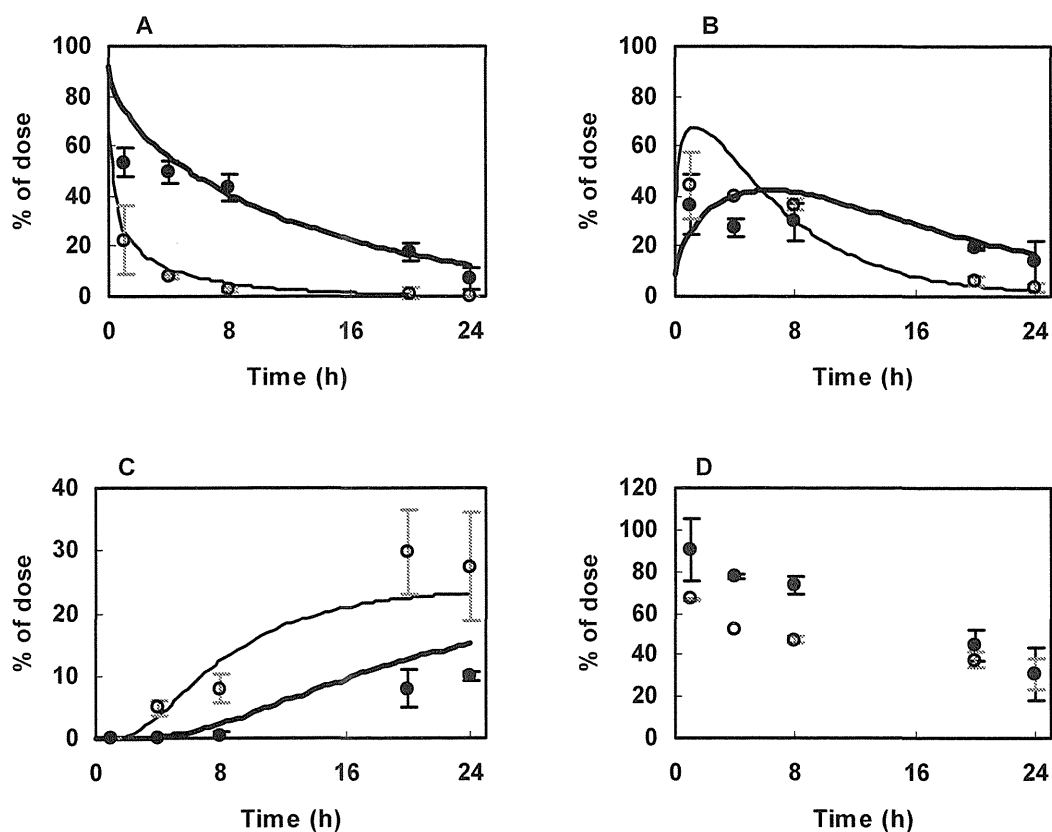


Fig. 5. Permeation profiles of OCT in stripped and full-thickness skin. (A) OCT amount in the ointment, (B) OCT amount in skin, (C) cumulative OCT permeated, and (D) total OCT amount in the experimental system. Open circles: stripped skin, closed circles: full-thickness skin, solid lines: simulation curves for stripped skin, bold lines: simulation curves for full-thickness skin. Error bars show SD.

3. OCT 皮膚透過性の拡散モデル解析

これまでに、代謝過程を考慮した拡散モデルに基づいて、薬物皮膚透過性が解析されてきた。これらの方法では、未変化体および代謝物の両方を測定し、かつ、それらの皮膚透過/代謝過程に関する方程式を記述している^{28, 29, 30, 31, 32, 33, 34}。しかしながら、本試験で用いた OCT は、皮膚中で未知代謝物を含む多くの代謝物へと変換されることから、全ての代謝物を定量し、さらに、それらの挙動を方程式として記述するのは困難である。そこで、我々は、代謝物を測定する代わりに、実験系内の全ての構成成分、すなわち、軟膏、皮膚およびレセプター液中の OCT 未変化体量を測定することで、OCT の皮膚透過性を解析することを試みた。皮膚透過パラメータを算出するために、curve fitting を実行したところ、軟膏、皮膚およびレセプター液中 OCT 未変化体量のシミュレーション値は、実測値と十分に近似した (Fig. 5A, B および C)。このことは、この理論モデルが OCT の皮膚透過性を表現するのに適していることを示唆する。厳密に言えば、stripped skin における実測値とシミュレーション値との相関性は若干悪い。この解析法では、皮膚透過過程の全体像、すなわち、軟膏および皮膚中薬物量、さらには累積透過量を同時当てはめする必要がある。このため、累積透過量のみを当てはめる既存の解析法に比べて、相関性の高い fitting curve を得るのは難しい。今回の解析法は、テストステロン^{39, 40}やプロプラノロール⁴¹のように皮膚中で複雑な代謝をうける薬物に対しても適応可能な、有用な方法と思われる。もっとも、活性代謝物の生成量が無視できないほど多い場合には、既存法のように代謝物自体の透過性も評価する必要がある。

Curve fitting により得られた OCT の皮膚透過パラメータを Table 2 に示す。 L_{SC} および L_{VED} をそれぞれ 0.001 および 0.1 cm としたとき、 D_{SC} は D_{VED} の約 1/2000 倍と算出される。このことは、OCT にとって SC は VED よりも透過し難い層であることを示唆している。一方で、 P_{VED} は P_{SC} の約 3 倍程度の大きさであり、VED はその長い拡散距離のために、SC と同様に OCT の透過障壁として機能することが考えられた。Pallas 2.0

software (CompuDrug, Sedona, AZ, USA) により算出した OCT の $\text{prolog } D_{7.4}$ は 4.57 であり、OCT が高脂溶性であることが、低い VED 透過性の1つの理由として考えられる^{42, 43}。Payan⁴⁴らは *in vitro* 実験で求めた flux は *in vivo* flux に比べて低く、*in vitro-in vivo* 間の違いは拡散距離に起因する可能性を報告している。OCT にとって VED は SC と同様に透過障壁となることを、本実験結果は示唆しているが、Payan らの報告を考慮すると、OCT 透過性に対する VED の影響は、*in vitro* 条件に比べて *in vivo* 条件下ではそれほど重大ではないかもしれない。

$K_{SC/V}$ は $K_{VED/V}$ の7倍であった。このことは、SC に対する OCT の親和性が、VED への親和性よりも高いことを示している。ラット皮膚中での OCT 代謝速度定数は、 0.137 h^{-1} と算出された。本研究では、皮膚中で複雑に代謝される薬物の新規皮膚透過性解析法の構築に焦点を当てたため、代謝の非線形を考慮しなかった。軟膏中薬物濃度が異なる複数条件下で皮膚透過実験を実施することで、代謝過程を Michaelis-Menten 式で表現したモデルによる解析が可能になり、より詳細に薬物皮膚透過性を説明できると思われる。

Table 2. *In vitro* rat skin permeation parameters of OCT

D'_{SC} ($\times 10^{-1}$ h^{-1})	D'_{VED} ($\times 10^{-2}$ h^{-1})	$K'_{VED/D}$ ($\times 10^{-2}$ cm)	$K'_{SC/V}$ ($\times 10^{-3}$ cm)	$K'_{VED/SC}$	k_{ms} ($\times 10^{-1} h^{-1}$)	D_{SC} ($\times 10^{-7}$ cm^2/h)	D_{VED} ($\times 10^{-4}$ cm^2/h)	$K_{VED/V}$	$K_{SC/V}$	$K_{VED/SC}$	P_{SC} ($\times 10^{-4}$ cm/h)	P_{VED} ($\times 10^{-4}$ cm/h)
1.50 (0.51)	2.96 (0.48)	6.33 (1.59)	4.31 (1.40)	14.7 (6.04)	1.37 (0.25)	1.50	2.96	0.633	4.31	0.147	6.48	18.7

Values in parenthesis are SD for estimated parameters. D_{SC} , D_{VED} , $K_{VED/V}$, $K_{SC/V}$, and $K_{VED/SC}$ were calculated assuming that $L_{SC} = 0.001$ cm and $L_{VED} = 0.1$ cm. P_{SC} and P_{VED} are equal to $D'_{SC} \cdot K'_{SC/V}$ and $D'_{VED} \cdot K'_{VED/V}$, respectively.

4. 未変化体透過量および代謝物生成量におよぼす D'_{VED} 値の影響

未変化体透過量および代謝物生成量におよぼす VED 中拡散係数 (D'_{VED}) の影響を評価するため、OCT の皮膚透過パラメータを用いて、数値計算を行った。OCT 軟膏塗布後 24 時間における full-thickness skin 透過プロフィールと D'_{VED} 値との関係を Fig. 6 に示す。 D'_{VED} 値が $0.01 - 0.2 \text{ h}^{-1}$ の範囲で、軟膏中未変化体量はほとんど変化しなかったが、未変化体透過量および代謝物生成量は変化した。 D'_{VED} 値の低下に伴い、未変化体透過量は減少し、代謝物生成量は増加した。このことは、 D'_{VED} 値の低下により、レセプター液中の代謝物／未変化体比が上昇することを示唆する。Hashida らは⁴⁵、拡散係数を含む方程式を用いて、皮膚中薬物の平均滞留時間 (MTT) を表現している。その数式からは、拡散係数の減少により MTT が増加することが導かれる。したがって、低い拡散係数のために MTT が増加し、皮膚中代謝をうける確率が上昇すると考えられる。今回のシミュレーション実験は、代謝速度定数のみならず皮膚中拡散係数も、薬物の皮膚中代謝の受けやすさに影響することを示している。Bando らは、acyclovir isovalerate の代謝速度定数が 0.156 h^{-1} であり、加水分解代謝物である acyclovir の透過量は acyclovir isovalerate よりも低く、主として未変化体として透過することを報告している³⁰。一方で、OCT の代謝速度定数は acyclovir isovalerate と同程度であるが、主として代謝物として透過した。Fig. 6 に示したように、 D'_{VED} 値は、皮膚中での代謝率に影響する因子であり、OCT と acyclovir isovalerate との間にみられるレセプター液中代謝物／未変化体比の違いは、 D'_{VED} 値で説明できる可能性がある。acyclovir isovalerate の D'_{VED} 値は 0.187 h^{-1} であり³⁰、OCT の 6 倍ある。acyclovir isovalerate は、その大きな VED 中拡散係数のために、皮膚中代謝をうける確率が OCT に比べて低下したものと考えられた。

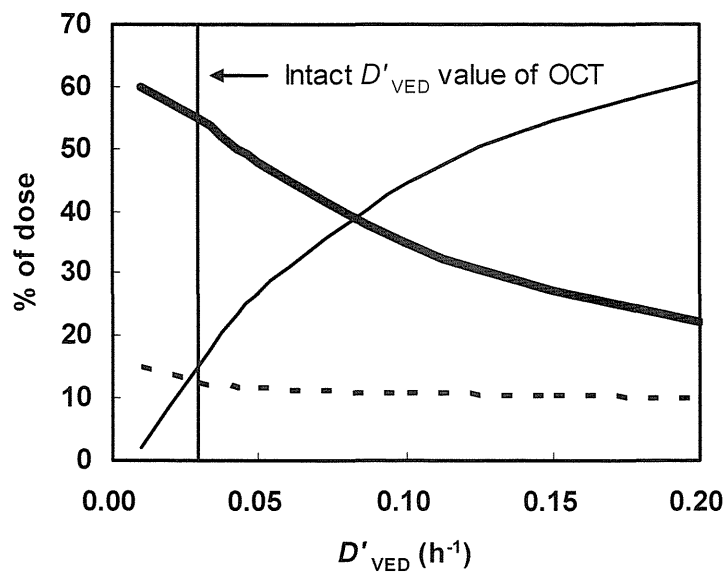


Fig. 6. Relationship between D'_{VED} value and permeation profiles. Permeated amount of the drug (solid line), metabolite formation (bold line), and the drug amount in donor (dotted line) at 24 h after application were simulated using OCT permeation parameters and the present experimental conditions.

第4節 小括

皮膚中で未知代謝物を含む複数の代謝物へと変換される OCT の *in vitro* 皮膚透過性を解析するために、通常は必須である代謝物測定をする代わりに、*in vitro* 透過実験系内の全ての構成成分(軟膏、皮膚、レセプター液)中の未変化体量を測定した。得られた OCT 皮膚透過プロフィールを、代謝過程を考慮した拡散モデルで解析したところ、実測値とシミュレーション値とは良く近似した。このことから、本研究で用いた理論モデルが、OCT の皮膚透過を表現するのに適していることが示唆された。今回の解析法は、代謝物の定量、代謝経路の同定といった代謝情報を用いずに、OCT の皮膚透過パラメータを算出することを可能にした。この解析法は、未変化体の測定および式のみから皮膚透過パラメータを算出するため、複雑な代謝経路を有する他の薬物に対しても広く適用できる有用な方法と思われる。

第2章 軟膏組成がおよぼす maxacalcitol の *in vitro* ラット皮膚透過性への影響⁴⁶

経皮剤の開発においては、良好な治療効果を得るために、慎重に剤形設計するべきである。このため、ゲル、クリーム、軟膏といった剤形と薬物皮膚透過性との関係が研究されている^{47, 48, 49}。*In vivo* skin stripping 法^{50, 51, 52}および *in vitro* 皮膚透過実験は、異なる剤形間で経皮吸収速度を比較する上で有用である。

基剤組成を変えることで、基剤中拡散係数や皮膚／基剤間の分配係数といったパラメータが容易に変化することが知られている⁵³。これらのパラメータは、薬物の経皮吸収速度に影響する重要な因子であり、様々な実験により個別に測定することができる。例えば、基剤から皮膚への分配係数は、薬物の組織分布を測定することで見積もることができ^{54, 55, 56}、基剤中拡散係数は *in vitro* 放出試験により求めることができる^{57, 58, 59, 60, 61}。しかしながら、薬物透過に対するこれらパラメータの混合効果は複雑である。剤形変更により生じるこれらパラメータの変化が薬物透過へ及ぼす影響を明らかにする上で、拡散モデル解析が役立つと思われる。

薬物の皮膚透過性を解析するために、数々の拡散モデルが開発されてきた^{22, 30, 34, 62, 63, 64}。これらのモデルでは、基剤中での“瞬時拡散および finite dose”あるいは“infinite dose”が仮定されているが、基剤中拡散は考慮されていない。Guy と Hadgraft は、基剤中拡散が薬物の皮膚透過に与える影響に関する理論研究を報告している⁶⁵。しかしながら、基剤中拡散と皮膚透過性との関係を考察する実用的な研究報告はほとんどないのが現状である。

本研究では、添加剤含量の異なる 2 つの軟膏を用いて、maxacalcitol (OCT) の *in vitro* ラット皮膚透過性を評価した。そして、軟膏間で認められた皮膚透過プロファイルの違いを、拡散モデルに基づいて考察した。本章では、第 1 章にて構築した拡散モデルを発展させ、基剤中拡散を考慮した two- および three-layer skin model を構築した。

得られたモデルを用いて、2 つの軟膏間で皮膚透過パラメータを比較した。さらに、基剤中拡散が OCT の皮膚透過性におよぼす影響を数値計算により評価した。

第1節 実験の部

1. OCT 軟膏の調製

第1章と同様の手順により、2種類のOCT軟膏を調製した。1つは3% (w/w) MCTを含有する軟膏(3MO)であり、もう一方は30% (w/w) MCTを含有する軟膏(30MO)である。いずれの軟膏においても、OCT含量は0.005% (w/w)に設定した。3MOは以下の手順で調製した。容器内のMCT 180 mg に対して、300 µg のOCTをエタノール溶液として添加し、エタノールを窒素気流下留去した。残渣に対し、白色ワセリンを5820 mg 加えて、60°Cに加熱した状態で混合し、軟膏を調製した。30MOの場合は、1800 mg のMCT および4200 mg の白色ワセリンを用いて同様の手順で調製した。OCTを含有しない以外は同様の組成からなるブランク軟膏も、同様の手順で調製した。調製した軟膏は、使用時まで遮光下室温で保存した。

2. Membraneless 法によるOCTの軟膏中拡散実験

OCTの軟膏中拡散係数は、シリンジを用いた修正 membraneless 法⁶¹により測定した。本方法の模式図をFig. 7A に示した。ブランク軟膏およびOCT軟膏を別々のシリンジ(内面積:0.18 cm²)に充填し、軟膏が接する状態で、両シリンジの末端を接着し、遮光下室温で放置した。5日後に2つのシリンジを分離し、シリンジ内の軟膏を押し出し、複数の軟膏ブロックに切り分けた。各軟膏ブロックは、重量測定後に3 mL の *n*-hexane に溶解した。得られた *n*-hexane 溶液に対し、3 mL のアセトニトリルおよび50 µL の40 µg/mL *p*-hydroxybenzoic acid 溶液を加えて混合した。その後、アセトニトリル層を回収し、窒素気流下溶媒を留去した。残渣を *n*-hexane/ethanol (85:15, v/v) 250 µL に再溶解し、HPLC サンプルを調製した。HPLC 分析システムは、ポンプ(LC-10AD_{VP}; Shimadzu Co.)、UV 検出器(SPD-10A_{VP}; Shimadzu Co.)および分析カラム(TSK gel OH-120, 4.6 mm × 250 mm; TOSOH Co., Tokyo, Japan)で構成した。移動相として *n*-hexane/ethanol (85:15, v/v)を用い、流速 1 mL/min で流した。UV 検出

器の波長は 265 nm に設定した。HPLC サンプル 50 μ L を注入し、HPLC 分析した。

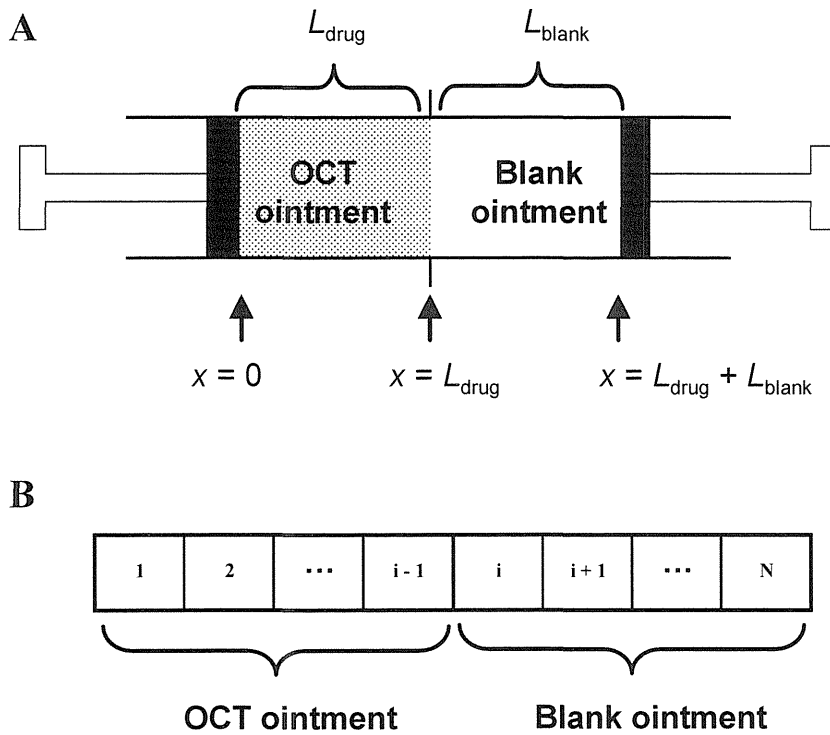


Fig. 7. Schematic representation of the modified membraneless method to determine diffusivity of a drug in ointment. Illustration of modified membraneless method (A). After incubation, the ointment from each syringe was ejected and cut into several blocks (B). The drug concentrations in the block were measured to obtain the concentration gradients.

3. NetwellTMを用いた *in vitro* ラット皮膚透過実験

SD 系雄性ラット(7–8 wks; Jaspan SLC Inc., Shizuoka, Japan)を実験に使用した。ラットをエーテル麻酔下安楽死させ、背部の毛を刈り取った。皮膚を摘出し、皮下組織を外科バサミで除去して full-thickness skin を調製した。Stripped skin を調製する場合は、皮膚摘出前に 10 回の tape stripping を施した。摘出皮膚の表皮側に、ポリプロピレ

ン製リング(内径:1.6 cm, 内面積:2.0 cm²)をアロンアルファで接着した。

6穴のNetwellTM プレート(直径: 24 mm, メッシュ径:500 μm; Corning, MA, USA)を皮膚透過実験に使用した⁴³。各ウェルに対し、20% (v/v) 牛胎児血清を含有するリン酸緩衝液(pH 7.4) 2 mLを、レセプター液として添加した。NetwellTM インサーター上に載せた摘出皮膚を、真皮側がレセプター液と接するようにプレートに載せ、CO₂ インキュベーター(37°C)に置いた。30分間プレインキュベートした後、OCT軟膏15 mg(体積:0.018 cm³)を皮膚表面(面積:2.0 cm²)に塗布した。軟膏塗布後1, 4, 7, あるいは24時間に、軟膏を綿棒で拭き取り回収し、レセプター液および皮膚を回収した。皮膚透過実験を24時間継続する場合、軟膏塗布後2, 4, 6, 8, 20, および24時間に、レセプター液1 mLを採取し、各サンプリングの後、新鮮なレセプター液1 mLを補充し、レセプター液量を一定に保った。

4. 実験サンプル中 OCT 濃度の測定

軟膏、皮膚およびレセプター液中の OCT 濃度は、第1章、第2節の実験の部に記載したものと同様の方法で定量した²²。

第2節 データ解析

1. 軟膏中拡散係数の算出方法

本研究ではシリンジを用いた membraneless 法により軟膏中拡散係数を求めた。軟膏中の薬物濃度は次式で表される。

$$\frac{\partial C'(y,t)}{\partial t} = D'_v \cdot \frac{\partial^2 C'(y,t)}{\partial y^2}$$

ここで、 y は x/L_{total} と等しく、 $C'(y, t)$ は $C(x, t) \cdot L_{\text{total}}$ と等しい。 $C(x, t)$ は、位置 x 、時間 t での薬物濃度を表し、 L_{total} は OCT 軟膏の長さ (L_{drug}) とブランク軟膏の長さ (L_{blank}) の合計を表す。OCT 軟膏とブランク軟膏中薬物濃度の初期条件は、それぞれ $C(x, 0) = C_0$ ($0 \leq x \leq L_{\text{drug}}$) および $C(x, 0) = 0$ ($L_{\text{drug}} \leq x \leq L_{\text{blank}}$) で表される。ここで、 C_0 は OCT 軟膏中薬物初濃度を表す。 D'_v は D_v/L_{total}^2 と等しく、 D_v は軟膏中拡散係数を表す。上記偏微分方程式を、線の方法により時間依存型の常微分方程式に変換し、陰的オイラー法により解いた。

Fig. 7B に示したように、OCT 軟膏およびブランク軟膏を、それぞれ左側および右側に置き、軟膏を幾つかのブロックに切り分けたとする。時間 t における左側から i 番目の軟膏ブロック中の OCT 量 ($Q_i(t)$) は、次式で表される。

$$Q_i(t) = \text{area} \cdot \int_a^b C'(y,t) \cdot dy, \quad a = \sum_{k=1}^{i-1} \left(\frac{L_k}{L_{\text{total}}} \right), \quad b = \sum_{k=1}^i \left(\frac{L_k}{L_{\text{total}}} \right) \quad (a = 0 \text{ when } i = 1)$$

ここで、 L_i は左側 (Fig. 7B) から i 番目の軟膏ブロックの長さを、 area はシリンジ断面積を表す。

非線形最小二乗法プログラム MULTI³⁷ を使い、各 $Q_i(t)$ とそれに対応する実測値との fitting を行い、 D'_v ($= D_v/L_{\text{total}}^2$) を算出、それを D_v へと変換した。

2. 軟膏中拡散を考慮した拡散モデルに基づいた OCT 皮膚透過性の解析

(1) Two-layer skin model に基づいた OCT の皮膚透過モデル

Fig. 8 に薬物皮膚透過性を表現する拡散モデルの模式図を示す。1) 基剤および VED 中での薬物の挙動は Fick の拡散法則に従う、2) 薬物は VED 中で 1 次消失速度で代謝される、3) レセプター液における sink 条件、を仮定することで、stripped skin 透過性を表現する次の偏微分方程式を得た。

$$\frac{\partial C'_V(y,t)}{\partial t} = D'_V \cdot \frac{\partial^2 C'_V(y,t)}{\partial y^2} \quad (0 < y < 1)$$

$$\frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial t} = D'_{VED} \cdot \frac{\partial^2 C'_{VED}(y,t)}{\partial y^2} - k_{ms} \cdot C'_{VED}(y,t) \quad (1 < y < 2)$$

初期値および境界値条件は、次の式で表される。

At $t = 0$

$$C'_V(y,t) = C_{V_0} \cdot L_V \quad (0 \leq y \leq 1)$$

$$C'_{VED}(y,t) = 0 \quad (1 < y \leq 2)$$

At $t > 0$

$$D'_V \cdot \frac{\partial C'_V(y,t)}{\partial y} = D'_{VED} \cdot \frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial y}, \quad K'_{VED/V} \cdot C'_V(y,t) = C'_{VED}(y,t) \quad (y = 1)$$

$$C'_{VED}(y,t) = 0 \quad (y = 2)$$

ここで、 y は x/L_V ($0 < x \leq L_V$) および x/L_{VED} ($L_V < x \leq L_V + L_{VED}$) と等しい。 $C'_V(y, t)$ および $C'_{VED}(y, t)$ は、それぞれ $C_V(x, t) \cdot L_V$ および $C_{VED}(x, t) \cdot L_{VED}$ と等しい。 $C_V(x, t)$ および $C_{VED}(x, t)$ は、それぞれ時間 t 、位置 x での基剤および VED 中薬物濃度を表す。 C_{V_0} は基剤中薬物初濃度を表す。 L_V および L_{VED} は、それぞれ基剤および VED の長さを表す。 D'_VED は D_{VED}/L_{VED}^2 と等しく、 D_{VED} は VED 中薬物拡散係数を表す。 $K'_{VED/V}$ は、 $K_{VED} \cdot L_{VED}/L_V$ と等しく、 $K_{VED/V}$ は VED/基剤間分配係数を表す。 k_{ms} は VED 中代

謝速度定数を表す。上記した偏微分方程式を時間依存的な常微分方程式に変換し、陰的オイラー法により解いた。

時間 t における軟膏 ($Q_V(t)$)、皮膚 ($Q_S(t)$) およびレセプター液中薬物量 ($Q_R(t)$) を次式で算出した。

$$Q_V(t) = area \cdot \int_0^1 C'_V(y, t) \cdot dy \quad \text{Eq. 1}$$

$$Q_S(t) = area \cdot \int_1^2 C'_{VED}(y, t) \cdot dy \quad \text{Eq. 2}$$

$$Q_R(t) = -D'_{VED} \cdot area \cdot \int_0^t \frac{\partial C'_{VED}(y, t)}{\partial y} \cdot dt \Big|_{y=2} \quad \text{Eq. 3}$$

ここで、 $area$ は有効拡散面積を表す。

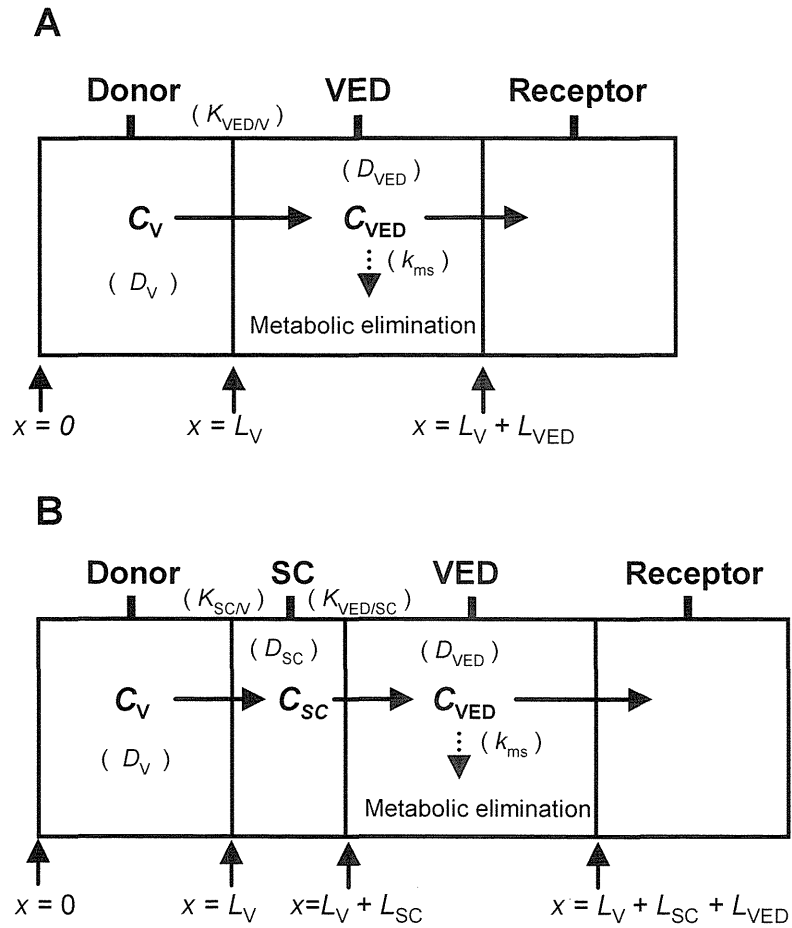


Fig. 8. Schematic representation of a diffusion model for skin permeation of a drug through stripped skin (two-layer diffusion model) (A) and full-thickness skin (three-layer diffusion model) (B).

(2) Three-layer skin model に基づいた OCT の皮膚透過モデル

Full-thickness skin モデルでは、代謝活性を有さない拡散層として SC を stripped skin モデルに追加した。このモデルは次の偏微分方程式で表現される。

$$\frac{\partial C'_{V'}(y,t)}{\partial t} = D'_{V'} \cdot \frac{\partial^2 C'_{V'}(y,t)}{\partial y^2} \quad (0 < y < 1)$$

$$\frac{\partial C'_{SC}(y,t)}{\partial t} = D'_{SC} \cdot \frac{\partial^2 C'_{SC}(y,t)}{\partial y^2} \quad (1 < y < 2)$$

$$\frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial t} = D'_{VED} \cdot \frac{\partial^2 C'_{VED}(y,t)}{\partial y^2} - k_{ms} \cdot C'_{VED}(y,t) \quad (2 < y < 3)$$

初期値および境界値条件は、次式で表される。

At $t = 0$

$$C'_{V'}(y,t) = C_{V_0} \cdot L_{V'} \quad (0 \leq y \leq 1)$$

$$C'_{SC}(y,t) = 0 \quad (1 < y \leq 2)$$

$$C'_{VED}(y,t) = 0 \quad (2 < y \leq 3)$$

At $t > 0$

$$D'_{V'} \cdot \frac{\partial C'_{V'}(y,t)}{\partial y} = D'_{SC} \cdot \frac{\partial C'_{SC}(y,t)}{\partial y}, \quad K'_{SC/V'} \cdot C'_{V'}(y,t) = C'_{SC}(y,t) \quad (y = 1)$$

$$D'_{SC} \cdot \frac{\partial C'_{SC}(y,t)}{\partial y} = D'_{VED} \cdot \frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial y}, \quad K'_{VED/SC} \cdot C'_{SC}(y,t) = C'_{VED}(y,t) \quad (y = 2)$$

$$C'_{VED}(y,t) = 0 \quad (y = 3)$$

ここで、 y は $x/L_{V'}$ ($0 < x \leq L_{V'}$)、 x/L_{SC} ($L_{V'} < x \leq L_{V'} + L_{SC}$) および x/L_{VED} ($L_{V'} + L_{SC} < x \leq L_{V'} + L_{SC} + L_{VED}$) と等しい。 $C'_{SC}(y,t)$ は、 $C_{SC}(x,t) \cdot L_{SC}$ と等しい。 $C_{SC}(x,t)$ は、時間 t 、位置 x での SC 中薬物濃度を表す。 L_{SC} は SC の長さを表す。 D'_{SC} は D_{SC}/L_{SC}^2 と等しく、 D_{SC} は SC 中薬物拡散係数を表す。 $K'_{SC/V'}$ および $K'_{VED/SC}$ は、そ

それぞれ $K_{SC/V} \cdot L_{SC}/L_V$ および $K_{VED/SC} \cdot L_{VED}/L_{SC}$ と等しい。 $K_{SC/V}$ および $K_{VED/SC}$ は、それぞれ SC/基剤間および VED/SC 間分配係数を表す。上記した偏微分方程を時間依存的な常微分方程式に変換し、陰的オイラー法により解いた。

時間 t における軟膏 ($Q_V(t)$)、皮膚 ($Q_S(t)$) およびレセプター液中薬物量 ($Q_R(t)$) を次式で算出した。

$$Q_V(t) = area \cdot \int_0^1 C'_{V'}(y,t) \cdot dy \quad \text{Eq. 4}$$

$$Q_S(t) = area \cdot \int_1^2 C'_{SC}(y,t) \cdot dy + area \cdot \int_2^3 C'_{VED}(y,t) \cdot dy \quad \text{Eq. 5}$$

$$Q_R(t) = -D'_{VED} \cdot area \cdot \int_0^1 \frac{\partial C'_{VED}(y,t)}{\partial y} \cdot dt \Big|_{y=3} \quad \text{Eq. 6}$$

(3) 皮膚透過データの解析

基剤中薬物量 (Q_V) は、HPLC 分析により求めた。皮膚中薬物量 (Q_S) は、次式で算出した。

$$Q_S = \text{皮膚抽出液中薬物量} \times \text{皮膚抽出液量}$$

レセプター液中累積透過量 (Q_R) は、次式で算出した。

$$Q_R = C_i \cdot V + \sum_{k=1}^{i-1} C_k \cdot v \quad (Q_R = C_i \cdot V \quad \text{when } i = 1)$$

ここで、 i はサンプリング回数を、 C_i は第 i 回目のサンプリング時におけるレセプター液中薬物濃度を表す。 v および V は、それぞれサンプリング体積および総レセプター液体積を表す。

各サンプリング時間における Q_V 、 Q_S および Q_R の平均値 ($n = 3$) を計算した。まず、stripped skin における OCT の皮膚透過プロフィールを、MULTI を用いて Eqs. 1 – 3 に

当てはめ、皮膚透過パラメータ($K'_{VED/V}$, D'_{VED} および k_{ms})を得た。次いで、先の解析で算出した D'_{VED} を用い、full-thickness skin における OCT の皮膚透過プロフィールを Eqs. 4 – 6 に当てはめて、パラメータ($K'_{SC/V}$, $K'_{VED/SC}$ ($= K'_{VED/V} / K'_{SC/V}$ および D'_{SC}) を求め、そして、 k_{ms} を再算出した。Stripped skin の表面は tape stripping により損傷し、代謝活性が低下している可能性があるため、再計算で求めた k_{ms} を実際の皮膚中代謝速度定数として採用した。30MO を塗布した後の full-thickness skin を解析する場合、3MO の透過実験を解析したときに得たパラメータ($K'_{VED/SC}$, D'_{VED} , および k_{ms})を用いて、 Q_V および Q_R を Eqs. 4 および 6 に当てはめた。その結果として、30MO に関連するパラメータ(D'_{SC} および $K'_{SC/V}$)を得た。

L_{SC} : 0.001 cm, L_{VED} : 0.1 cm および L_V (= 軟膏体積 / 塗布面積): 0.009 cm と仮定して、 D'_{SC} , D'_{VED} , $K'_{VED/V}$, $K'_{SC/V}$, および $K'_{VED/SC}$ を、それぞれ D_{SC} , D_{VED} , $K_{VED/V}$, $K_{SC/V}$, および $K_{VED/SC}$ に変換した。SC 透過係数(P_{SC})および VED 透過係数(P_{VED})は、次式で算出した。

$$P_{SC} = \frac{K_{SC/V} \cdot D_{SC}}{L_{SC}}, \quad P_{VED} = \frac{K_{VED/V} \cdot D_{VED}}{L_{VED}}$$

3. 軟膏中拡散係数が薬物皮膚透過におよぼす影響を評価するための数値計算実験

3MO を用いた皮膚透過実験で得た OCT の透過パラメータを用い、かつ、複数の軟膏中拡散係数を仮定して、OCT 皮膚透過性におよぼす軟膏中拡散の影響を評価した。 $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^5 \text{ cm}^2/\text{h}$ の範囲で軟膏中拡散係数を変化させ、累積透過量および軟膏中薬物残存量を算出した。全てのシミュレーションにおいて、*in vitro* 皮膚透過実験と同じ条件(塗布面積: 2 cm^2 , 軟膏体積: 0.018 cm^3)を仮定した。

第3節 結果および考察

1. 軟膏中 OCT 拡散係数

3MO および 30MO 中での OCT 拡散係数は、それぞれ $0.89 (\pm 0.07) \times 10^{-4}$ および $1.87 (\pm 0.11) \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{h}$ であった (Fig. 9)。軟膏中 MCT 含量の増加により OCT 拡散係数は約 2 倍大きくなり、その差は有意であった ($p < 0.01$, unpaired Student's *t*-test)。30MO 中での高い拡散係数は、軟膏の高い流動性に起因すると思われる。

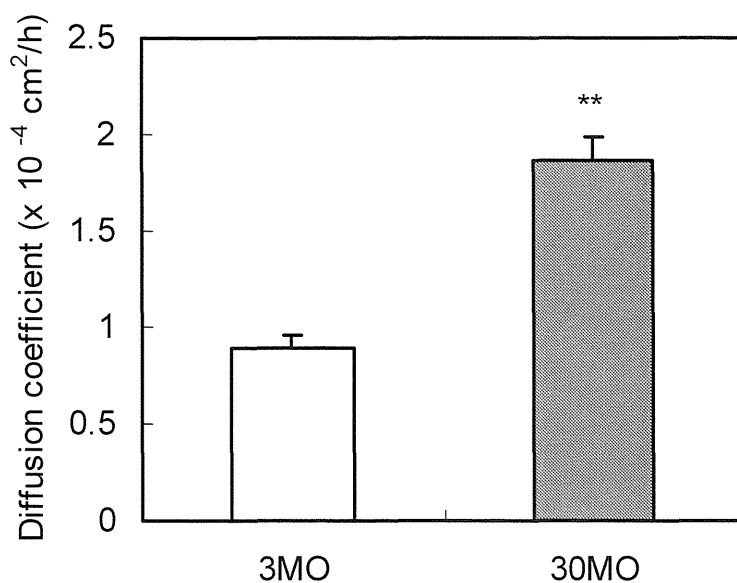


Fig. 9. Diffusion coefficients of OCT in two ointments. Diffusion coefficients were determined by a modified membraneless method under room temperature ($n = 3$). Error bars show SD. 3MO: OCT ointment containing 3% (w/w) MCT, 30MO: OCT ointment containing 30% (w/w) MCT. **: $p < 0.01$ (unpaired Student's *t*-test).

2. *In vitro* ラット皮膚透過性

OCT の *in vitro* ラット皮膚透過プロフィールを Fig. 10 に示す。3MO の場合、軟膏塗布 24 時間後までに 7% の未変化 OCT が皮膚を透過し、22% が軟膏中に残存した。Stripped skin を用いた場合は、より速やかな吸収が観測され、24 時間後までに 31% が

皮膚を透過し、7時間後の軟膏中残存量は僅か7%であった。30MOの場合、塗布24時間後までに2%が透過し、65%が軟膏中に残存した。軟膏中MCT含量が多い30MOの方が、OCTの吸収は低かった。軟膏中での高い拡散性により皮膚透過は上昇するものと思われたが、予想に反し、拡散係数が低い3MOを用いた方が30MOを用いた場合に比べて、高いOCT皮膚透過性を示した。

基剤あるいは皮膚中拡散係数、皮膚/基剤間分配係数といった皮膚透過パラメータにおよぼす基剤の影響を評価するため、基剤中拡散を考慮した拡散モデルを用いて、OCTの皮膚透過プロフィールを解析した。拡散モデルにより算出したシミュレーション値は、実測した皮膚透過データと良く相関した(Fig. 10)。このことは、このモデルがOCT皮膚透過性を表現するのに適していることを示唆する。30MOを用いたときの皮膚中OCT量は測定しなかったが、Fig. 10に示したシミュレーション値から予想されるように、3MOを用いた場合よりもその皮膚中量は低いと思われた。

解析で得られたOCTの皮膚透過パラメータをTable 3に示す。Stripped skin透過実験で求めたOCTの皮膚中代謝速度定数($k_{ms,st}$: $1.09 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$)は、full-thickness skinで求めた値(k_{ms} : $3.41 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$)の0.3倍であった。このことは、tape-strippingにより代謝活性が低下したことを示唆する。 D_{VED} は $4.04 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{h}$ であった。 D_{SC} は、3MOを用いた場合は $7.45 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{h}$ 、30MOを用いた場合は $6.92 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{h}$ であり、軟膏間で差はほとんど認められなかった。 $K_{VED/SC}$ は 5.23×10^{-2} であり、OCTにとってSCはVEDよりも親和性が高い層であることを示している。3MOを用いたときの $K_{SC/V}$ 値は11.6であり、30MOを用いた場合のそれよりも5倍大きかった。このことは、軟膏から角層への分配性の違いが、軟膏間に認められる皮膚透過速度の違いを引き起こしていることを示唆する。Ceshelらは、ketoprofenの皮膚分配係数が基剤中溶解度に反比例することを報告している⁶⁶。MCTはOCTの溶解剤であり、3MO中の低い溶解剤濃度によってOCTのSCへの分配係数が上昇したものと考えられた。

MCTがSC中におけるOCTの溶解度に影響したかは明らかではない。しかしなが

ら、軟膏中 MCT 含量の増加により SC への分配係数が低下したことを考慮すると、MCT が OCT の SC 中溶解度に与えた影響は小さいと考えられる。

本研究では、SC より下層における薬物挙動に関連する皮膚透過パラメータ(k_{ms} , $K_{VED/SC}$, および D_{VED})は、軟膏間で変化しないと仮定した。そして、2 つの軟膏間で、 $K_{SC/V}$ および D_{SC} を比較したところ、 $K_{SC/V}$ 値のみが変化することが明らかになった。すなわち、軟膏間で認められた OCT 皮膚透過性の違いは、SC 分配係数の違いのみで説明することができた。この事実は、上記仮定が正しいことを示しており、かつ、MCT が皮膚表面における相互作用($K_{SC/V}$)にのみ影響し、角層内(D_{SC})および下層(k_{ms} , D_{VED} , および $K_{VED/SC}$)には影響しないことを示している。

SC 透過係数(P_{SC})は、3MO で 8.62×10^{-4} cm/h、30MO で 1.77×10^{-4} cm/h であった。3MO で求めた VED 透過係数(P_{VED})は 2.44×10^{-3} cm/h であった。3MO を用いた場合、SC 透過抵抗($1/P_{SC}$)および VED 透過抵抗($1/P_{VED}$)は、それぞれ 1161 および 409 h/cm であり、 $1/P_{VED}$ は $1/P_{SC}$ の 0.35 倍であった。このことは、SC が OCT の主たる皮膚透過障壁であるが、VED もまた透過障壁として機能することを示している。本試験では、 0.018 cm^3 の軟膏を 2 cm^2 の面積に塗布している。皮膚表面に平行に塗布したとすると、軟膏厚み(L_V)は 0.009 cm になる。そして、3MO における軟膏中 OCT 透過係数(D_V/L_V)は、 9.89×10^{-3} cm/h と計算される。OCT の full-thickness skin 透過係数($1/P_{full}$)は次式⁶⁷で算出できる。

$$\frac{1}{P_{full}} = \frac{1}{P_{SC}} + \frac{1}{P_{VED}}$$

3MO では、 P_{VED} および P_{full} はそれぞれ 6.37×10^{-4} cm/h および 2.44×10^{-3} cm/h であった。 D_V/L_V は、 P_{full} の 16 倍、 P_{strip} の 4 倍あり、このことは OCT の軟膏中透過性が full-thickness skin および stripped skin 中よりも高いことを示している。

Table 3. *In vitro* rat skin permeation parameters of OCT estimated by a diffusion model considering diffusivity in a vehicle.

Ointment type	$K_{VED/V}$ ($\times 10^{-1}$)	$K_{SC/V}$	$K_{VED/SC}$ ($\times 10^{-2}$)	D_{SC} ($\times 10^{-8}$ cm ² /h)	D_{VED} ($\times 10^{-4}$ cm ² /h)	k_{ms} ($\times 10^{-1}$ /h)	$k_{ms,st}$ ($\times 10^{-1}$ /h)	P_{SC} ($\times 10^{-4}$ cm/h)	P_{VED} ($\times 10^{-3}$ cm/h)
<i>3MO</i>									
	6.04 (0.93)	11.6 (1.2)	5.23 (0.97)	7.45 (0.93)	4.04 (0.35)	3.41 (0.46)	1.09 (0.17)	8.62	2.44
<i>30MO</i>									
	–	2.37 (0.57)	5.23 (0.97)	6.92 (2.00)	4.04 (0.35)	3.41 (0.46)	–	1.77	–

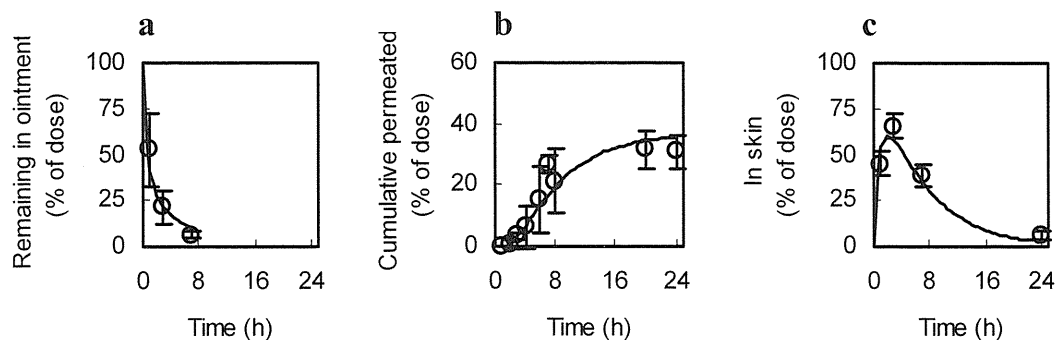
Values in parenthesis are SD for estimated parameters. –: not determined.

3. シミュレーション実験結果

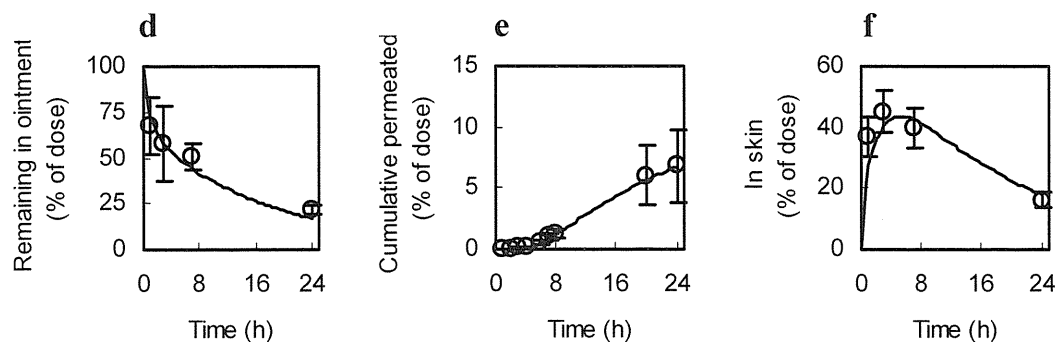
OCT の皮膚透過性におよぼす軟膏中拡散係数の影響を明らかにするため、シミュレーション実験を実施した。具体的には、3MO を用いた透過実験で得た OCT の皮膚透過パラメータを用い、かつ、幾つかの軟膏中拡散係数を仮定し、拡散モデルに基づいて軟膏中残存量および累積透過量をシミュレーションした (Fig. 11)。Full-thickness skin を仮定した場合、軟膏中拡散係数が 1×10^{-5} cm²/h 以上のとき、残存量および累積透過量が一定値に達した。Stripped skin を仮定した場合、軟膏中拡散係数が 1×10^{-5} cm²/h 以上のとき累積透過量が、軟膏中拡散係数が 0.89×10^{-4} cm²/h 以上のとき残存量が一定値に達した。シミュレーション実験によって、3MO 中の OCT 拡散係数 (0.89×10^{-4} cm²/h) は、累積透過量および残存量に影響しないだけ十分に大きいことが示された。30MO についてのシミュレーション実験は実施しなかったが、30MO 中の拡散係数が 3MO 中よりも大きいこと、および 30MO を用いたときの P_{SC} 値が 3MO の場合よりも小さいことを考慮すると、30MO 中拡散係数もまた、皮膚透過性に影響しないだけ十分に大きいことが示唆された。

処方設計による薬物皮膚透過性の制御を考えた場合、角層/基剤間分配係数 ($K_{SC/V}$)、角層中拡散係数 (D_{SC})、および基剤中拡散係数 (D_V) の 3 つのパラメータが重要な因子として挙げられる。皮膚を標的臓器とする外用剤にとって、皮膚中薬物濃度を高く保つことが薬効持続に必要な条件であるが、上記 3 つのパラメータのうち最も皮膚中薬物量に影響を与える因子を明らかにするために、OCT(3MO 軟膏)を例にしてシミュレーション実験を実施した。 $K_{SC/V}$ を実際の値の 5 倍まで変化させたところ、皮膚中薬物量は最大で約 2 倍高くなり、かつ、高濃度を持続することが示された (Fig. 12A)。 D_{SC} を実際の値の 5 倍まで変化させたところ、皮膚中薬物量は僅かに上昇する程度であったが、その一方で、皮膚中薬物濃度は速やかに低下する傾向が示された (Fig. 12B)。 D_V を実際の値の 5 倍まで変化させたが、皮膚中薬物量の経時推移はほとんど変化しなかった (Fig. 12C)。OCT の皮膚中濃度を上昇させる処方設計を考えた場合、 $K_{SC/V}$ が最も重要な因子であることが、本シミュレーション実験により明らかになった。

3MO to stripped skin



3MO to full-thickness skin



30MO to full-thickness skin

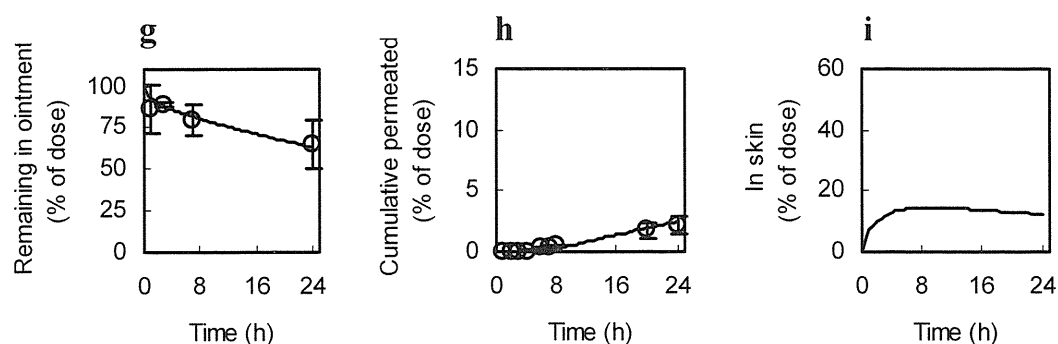


Fig. 10. *In vitro* rat skin permeation profiles of OCT after application of 3MO and 30MO. Application of 3MO to stripped skin: amount of OCT remaining in ointment (a), cumulative amount permeated (b), and amount in skin (c). Application of 3MO to full-thickness skin: amount of OCT remaining in ointment (d), cumulative amount permeated (e), and amount in skin (f). Application of 30MO to full-thickness skin: amount of OCT remaining in ointment (g), cumulative amount permeated (h), and amount in skin (i).

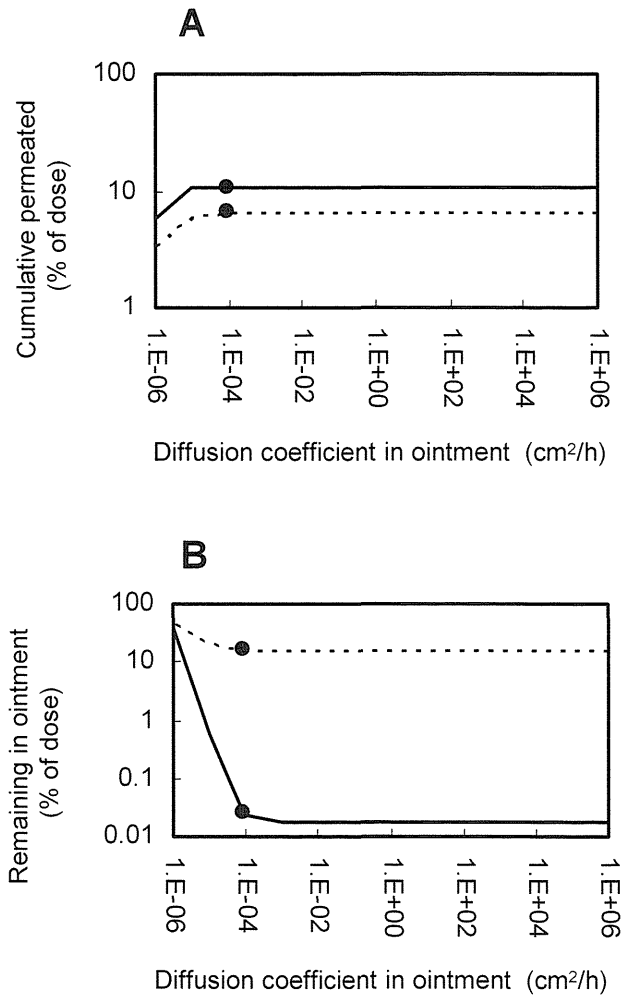


Fig. 11. Simulated permeation profiles of OCT at 24 h after application assuming various diffusion coefficients in ointment: simulation of cumulative amount permeated (A), simulation of amount remaining in ointment (B). Solid lines: stripped skin, dotted lines: full-thickness skin, closed circles: simulated value using intact diffusion coefficients of OCT in 3MO.

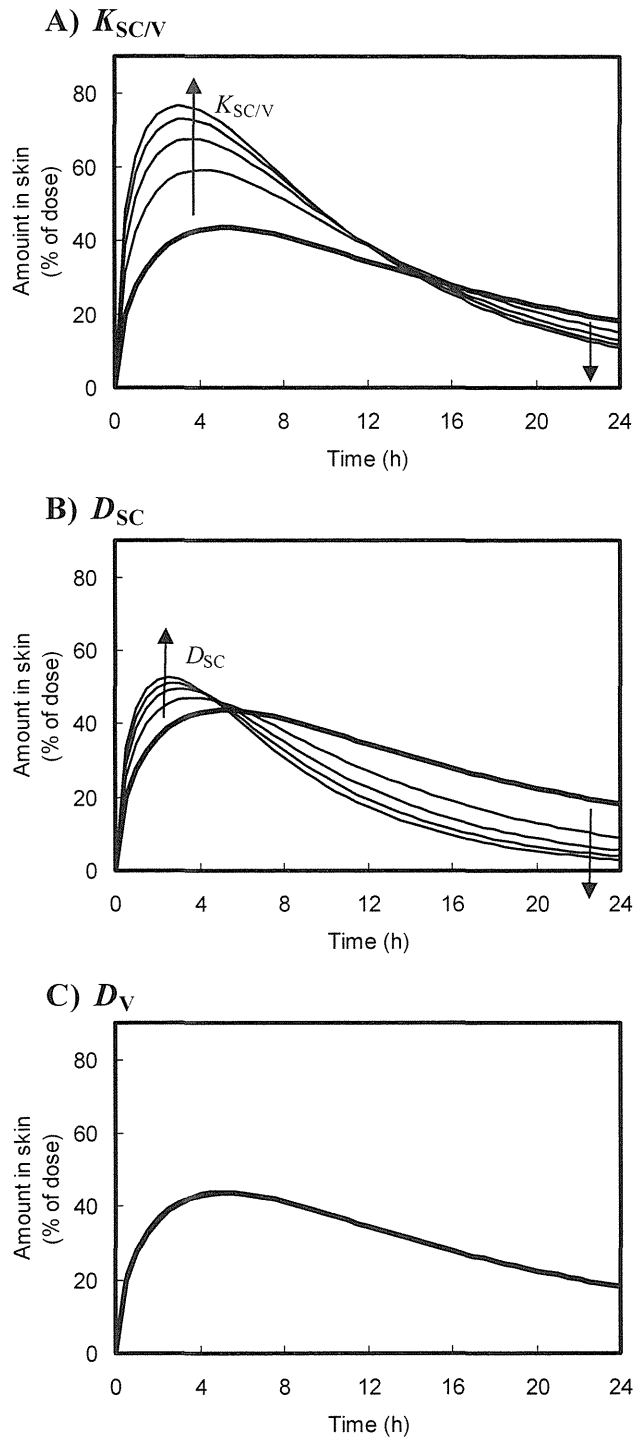


Fig. 12. Simulated OCT amount in skin assuming various $K_{SC/V}$ (A), D_{SC} (B), and D_V (C). Bold line: simulated value using intact parameter. Lines: simulated values using 2-, 3-, 4-, and 5-fold of intact parameter.

第4節 小括

本研究では、MCT 含量の異なる 2 つの軟膏を用いて OCT の *in vitro* ラット皮膚透過性を評価し、基剤中拡散を考慮した拡散モデルに基づいて皮膚透過プロフィールを解析することに成功した。処方設計により変化する可能性がある D_{sc} 、 D_v および $K_{sc/v}$ といったパラメータを算出し、軟膏間で比較した。その結果、次のことが明らかになった。1) 3MO および 30MO を用いたときの D_{sc} 値は同じであった、2) 3MO を用いたときの $K_{sc/v}$ 値は、30MO のそれよりも 5 倍大きかった、3) 軟膏間で D_v 値には 2 倍の差があったものの、皮膚透過性に影響しないほど十分に大きかった。これらの知見から、軟膏間に認められた皮膚透過プロフィールの違いは、主として分配係数の違いにより説明できることが示唆された。また、MCT 濃度 3–30% (w/w) の範囲内では、MCT 含量の低下に伴い、皮膚分配係数が高くなることが予想された。

本研究で構築した皮膚透過解析法およびシミュレーション法を利用することで、処方設計により生じる皮膚透過性の変化要因を、基剤中拡散係数、角層分配係数および角層中拡散係数といった因子に分離して評価することが可能になった。第 1 章で構築したモデルは基剤中での瞬時拡散を考慮しており²²、主として液体状の基剤を用いたときの皮膚透過解析に有用である。一方で、本章で構築したモデルは基剤中拡散および *finite dose* 条件を仮定しているため、実用的に利用される処方、特に放出持続型の剤形を用いたときの薬物皮膚透過解析に有効と思われる。本研究の試みは、放出制御を指向した経皮薬物送達システムの開発において、基剤中拡散係数の目標値を設定する際にも有用と思われる。

第2編 ビタミンD₃新規誘導体SMD-429 の *in vitro* ラット皮膚代謝および透過性に関する検討⁶⁸

Tacalcitol¹³、maxacalcitol (OCT)¹⁵および calcipotriol¹⁴といった活性型ビタミン D₃ 誘導体が乾癬外用治療薬として用いられている。これら誘導体の薬効は、分化誘導能およびケラチノサイト増殖抑制能に起因すると考えられている¹⁰。乾癬治療におけるビタミン D₃ 誘導体の標的臓器は皮膚であり、皮膚中薬物濃度を高く維持することが治療効果を発揮する上で重要である。一方で、皮膚を透過して循環血へと移行した薬物は、副作用である高カルシウム血症を引き起こす^{11,12}。

薬効と副作用との乖離を目指し、Shimizu らは 16-en-22-oxa-24-carboalkoxide 構造を有するビタミン D₃ 新規誘導体を設計し、OCT と比べて増殖抑制活性が高く、経皮投与後のカルシウム作用が弱い化合物群の創出に成功している⁶⁹。これら化合物群は、肝ミクロソームにおける代謝が速く、ラットでの *in vivo* クリアランスが高いことが明らかにされており、循環血移行後の速やかな消失が、副作用軽減に寄与していると考えられる。皮膚は経皮投与された薬物の循環血移行性を制御する臓器であり、皮膚もまた副作用を考える上で重要な因子であるが、これら化合物の皮膚透過性は明らかにされていない。

そこで本研究では、Shimizu らが設計したビタミン D₃ 新規誘導体の 1 つである SMD-429 の皮膚中代謝および皮膚透過性を評価し、OCT および calcipotriol といった既存薬と比較することにした。皮膚透過プロフィールを拡散モデルに基づいて解析し、皮膚透過上の特徴を明らかにすると同時に、SMD-429 の副作用軽減に対する皮膚の寄与について考察することにした。

第1節 実験の部

1. 実験材料

SMD-429 [(S)-1-{(S)-4-[2-[(3S,5R)-3,5-dihydroxy-2-methylene-cyclohex-(Z)-ylidene]-eth-(E)-ylidene]-7a-methyl-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3H-inden-1-yl}-ethoxy)-acetic acid 1-ethyl-1-methyl-propyl ester]、OCT、および calcipotriol は中外製薬㈱にて合成された。M1 [(S)-1-{(S)-4-[2-[(3S,5R)-3,5-dihydroxy-2-methylene-cyclohex-(Z)-ylidene]-eth-(E)-ylidene]-7a-methyl-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-3H-inden-1-yl}-ethoxy]-acetic acid] および M2 [1 α ,3 β -dihydroxy-20(S)-hydroxy-9,10-secopregna-5,7,10(19),16-tetraene] もまた、中外製薬㈱にて合成された。³H]SMD-429 (比放射能: 629 GBq/mmol)は、GE Healthcare Bio- Sciences Co. (NJ, USA)にて合成された。これら化合物の構造式を Fig. 13 に示した。ヒト皮膚 3 次元培養モデル (LSE-high) は、TOYOBO Co., Ltd. (Osaka, Japan)から購入した。

2. 軟膏調製

0.02 あるいは 0.05% (w/w)の薬物 (OCT、calcipotriol あるいは SMD-429) および 3% (w/w) MCT を含有する軟膏を次の手順で調製した。容器内の MCT 60 mg に対し、400 あるいは 1000 μ g の薬物をエタノール溶液として加え、混合した後、窒素気流下エタノールを留去した。得られた薬物含有 MCT 溶液に対し、1940 mg の白色ワセリンを加えた。容器を 60°C に温めでワセリンを溶解、混合し、軟膏を調製した。得られた軟膏は、使用時まで遮光下室温で保存した。0.02% (w/w) 薬物含有軟膏は LSE-high 透過実験に使用し、0.05% (w/w) 薬物含有軟膏は *in vitro* ラット皮膚透過実験に使用した。0.05% (w/w) SMD-429 および 3% (w/w) MCT を含有する³H]SMD-429 軟膏も同様の手順で調製した。

3. *in vitro* ラット皮膚透過実験

第 1 編に記載した方法と同様の手順でラット摘出皮膚 (full-thickness skin) を調製し、試験に用いた。フランツ型拡散セル (有効拡散面積: 4.9 cm²; レセプター容積: 15 mL) を試験に用いた。皮膚をセルに装着し、レセプター液として 20% (v/v) 牛胎児血清を含有するリン酸緩衝液 (pH 7.4) をセルに充填した。レセプター液を 37°C に温めて約 1 時間プレインキュベートした後、軟膏 24 mg (体積: 0.028 cm³) を皮膚表面に塗布した。軟膏塗布後 1, 4, 8, 20 あるいは 24 時間に、軟膏を綿棒で拭取り回収し、レセプター液および皮膚を回収した。回収した軟膏は 4°C で、レセプター液および皮膚は -80°C で保存した。実験は例数 3 で実施した。

4. LSE-high 透過実験

ヒト皮膚 3 次元培養モデル (living skin equivalent, LSE-high; TOYOBO Co.) は、ヒト由来包皮細胞を培養することで得た角層を含む表皮層および真皮層で構成されており、近年、ヒト皮膚代替品として利用されている。LSE-high を用いた透過実験は、以下の方法で実施した。Netwell™ 6 穴プレート (直径: 24 mm, メッシュ径: 500 μm; Corning, MS, USA) を使用した⁴³。各ウェルに 20% (v/v) 牛胎児血清含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1.5 mL をレセプター液として加えた。シリコンリングを接着した LSE-high を Netwell インサーター上に載せ、真皮側がレセプター液と接するようにセットした。次いで、Netwell プレートを CO₂ インキュベーター (37°C) に置いた。約 1 時間プレインキュベートした後、シリコンリング内の LSE-high 表面に軟膏 20 mg (体積: 0.024 cm³) を塗布した。軟膏塗布後 0.5, 1, 3, 5, 7, および 24 時間に、レセプター液 0.5 mL を採取した。レセプター液採取後に、新鮮なレセプター液 0.5 mL を補充し、レセプター液量を一定に保った。透過実験は例数 3 で実施した。サンプル処理時まで、レセプター液サンプルを -20°C で保存した。

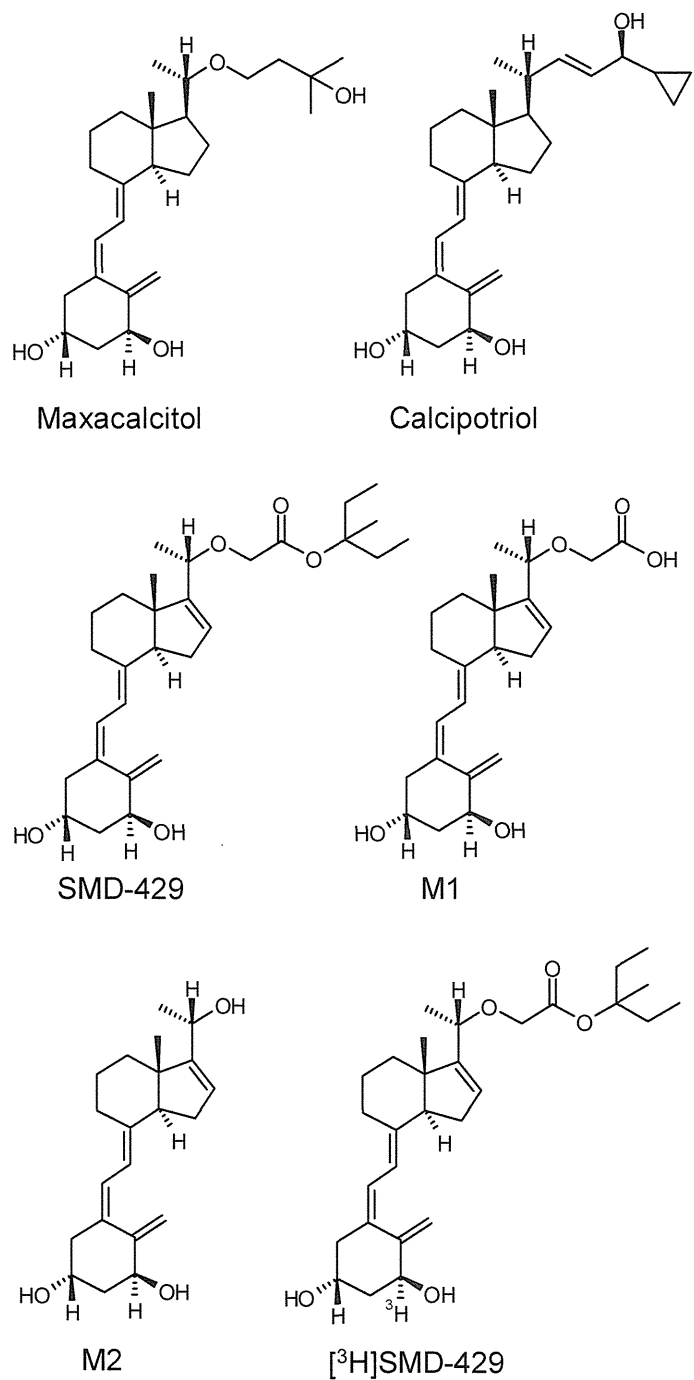


Fig. 13. Chemical structures of vitamin D₃ analogues. M1 and M2 are metabolites of SMD-429.

5. サンプル中薬物の測定

軟膏、皮膚およびレセプター液中の薬物量は、第1編に記載した方法²²と同様にして定量した。LC-MS/MS法で SMD-429 を測定する場合、m/z 313.3 (親イオン: m/z 490.3)のイオンを測定し、calcipotriol を測定する場合、m/z 377.3 (親イオン: m/z 430.3)のイオンを測定し、いずれも内標準物質として calcitriol を用いた。

6. [³H]SMD-429 透過実験で得たレセプター液サンプルの分析

[³H]SMD-429 透過実験で得たレセプター液サンプル 2 mL と acetonitrile 4 mL を混合した。得られた混合液を遠心 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を回収し、窒素気流下溶媒を留去した。残渣に acetonitrile/10 mM ammonium acetate (pH 3.5) (35:65, v/v) を加えて再溶解し、HPLC サンプルとした。HPLC 分析システムは、ポンプ (LC-10AD_{VP}; Shimadzu Co.)、UV 検出器 (SPD-10A_{VP}; Shimadzu Co.)、フロー型シンチレーションカウンター (FLO-ONE; Packard Instrument Co.) および分析カラム (CAPCELL PAK C18, UG120, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Shiseido Co., Ltd.) で構成した。2相グラジエント溶媒で分析し、移動相 A として acetonitrile/10 mM ammonium acetate (pH 3.5) (35:65, v/v) を、移動相 B として acetonitrile/10 mM ammonium acetate (pH 3.5) (80:20, v/v) を使用した。移動相を流速 1.0 mL/min で流し、以下のグラジエントプログラムを実行した。0 – 12 分: 移動相 A (100%), 12 – 25 分: 移動相 A (100% → 0%, linear gradient), 25 – 40 分: 移動相 B (100%)。SMD-429 および代謝物の同定は、合成標品との溶出時間の比較により行った。

7. 皮膚透過実験データの解析

基剤中薬物量 (Q_v) は、HPLC 分析により求めた。皮膚および LSE-high 膜中薬物量 (Q_s) は、次式で算出した。

$$Q_s = \text{皮膚あるいは LSE-high 膜抽出液中薬物量} \times \text{皮膚抽出液量}$$

レセプター液中累積透過量は、次式で算出した。

$$Q_R = C_i \cdot V + \sum_{k=1}^{i-1} C_k \cdot v \quad (Q_R = C_i \cdot V \quad \text{when } i = 1)$$

ここで、 i はサンプリング回数を、 C_i は第 i 回目のサンプリング時におけるレセプター液中薬物濃度を表す。 v および V は、それぞれサンプリング体積および総レセプター液体積を表す。

第 1 偏、第 1 章に示した one-layer skin model に基づいて、*in vitro* ラット full-thickness skin 透過実験で得たデータを解析し、皮膚透過パラメータとして皮膚/基剤間分配係数 (K'_s)、full-thickness skin 中拡散係数 (D'_{full}) および皮膚中代謝速度定数 (k_{ms}) を算出した。さらに、Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA) を用い、皮膚透過パラメータと薬物脂溶性との回帰分析を行った。

第2節 結果および考察

1. ビタミン D₃ 誘導体の *in vitro* 皮膚透過性

本研究では、摘出ラット皮膚およびヒト皮膚 3 次元培養モデル(LSE-high^{70, 71})を用いて、ビタミン D₃ 誘導体の *in vitro* 透過実験を実施した。ビタミン D₃ 誘導体の LSE-high 透過プロフィールを Fig. 14 に示す。軟膏塗布 24 時間後までの SMD-429 累積透過量は 7.5% であり、OCT および calcipotriol のそれよりも少なかった。本研究では、LSE-high をヒト皮膚代替品として使用したが、この結果は、ヒトにおいても SMD-429 の皮膚透過性が低いことを示唆する。

ビタミン D₃ 誘導体の *in vitro* ラット皮膚透過プロフィールを Fig. 15 に示す。軟膏塗布 24 時間後における軟膏中 SMD-429 残存量は 52.4% of dose であり、軟膏から皮膚への SMD-429 移行性は、OCT (7.1%) および calcipotriol (19.9%) よりも低かった。皮膚中 SMD-429 量は、塗布 1 時間後で 33.6% であったが、24 時間後には 16.1% に低下した。その量は、OCT および calcipotriol と同等あるいは 1/2 程度であった。塗布 24 時間後における SMD-429 の累積透過量は 0.0003% であり、OCT および calcipotriol よりも 4 桁低い値であった。

ラット皮膚および LSE-high のいずれにおいても、SMD-429 の累積透過量は既存のビタミン D₃ 誘導体よりも低かった。一方で、皮膚中 SMD-429 量は、他の誘導体と同程度であった。これら SMD-429 の特徴は、乾癬治療における優れた治療効果、および、副作用の軽減に適していると思われた。

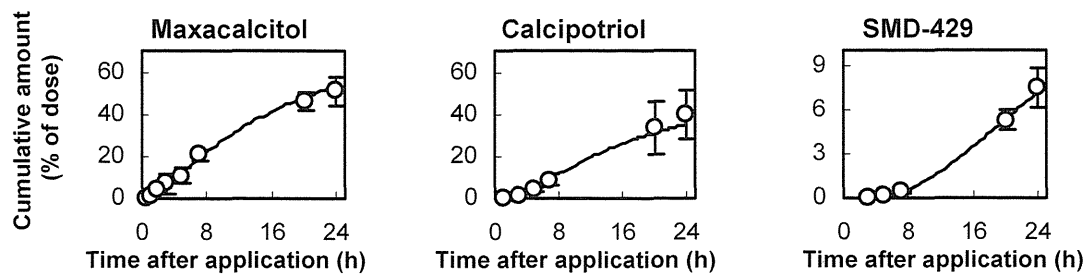


Fig. 14. Permeation profiles of vitamin D₃ analogues through LSE-high. After applications of maxacalcitol, calcipotriol, and SMD-429 ointment to LSE-high, the cumulative amount of drug permeated was determined. Open circles: Mean value of observed data from three experiments. Error bars: SD of corresponding observed data.

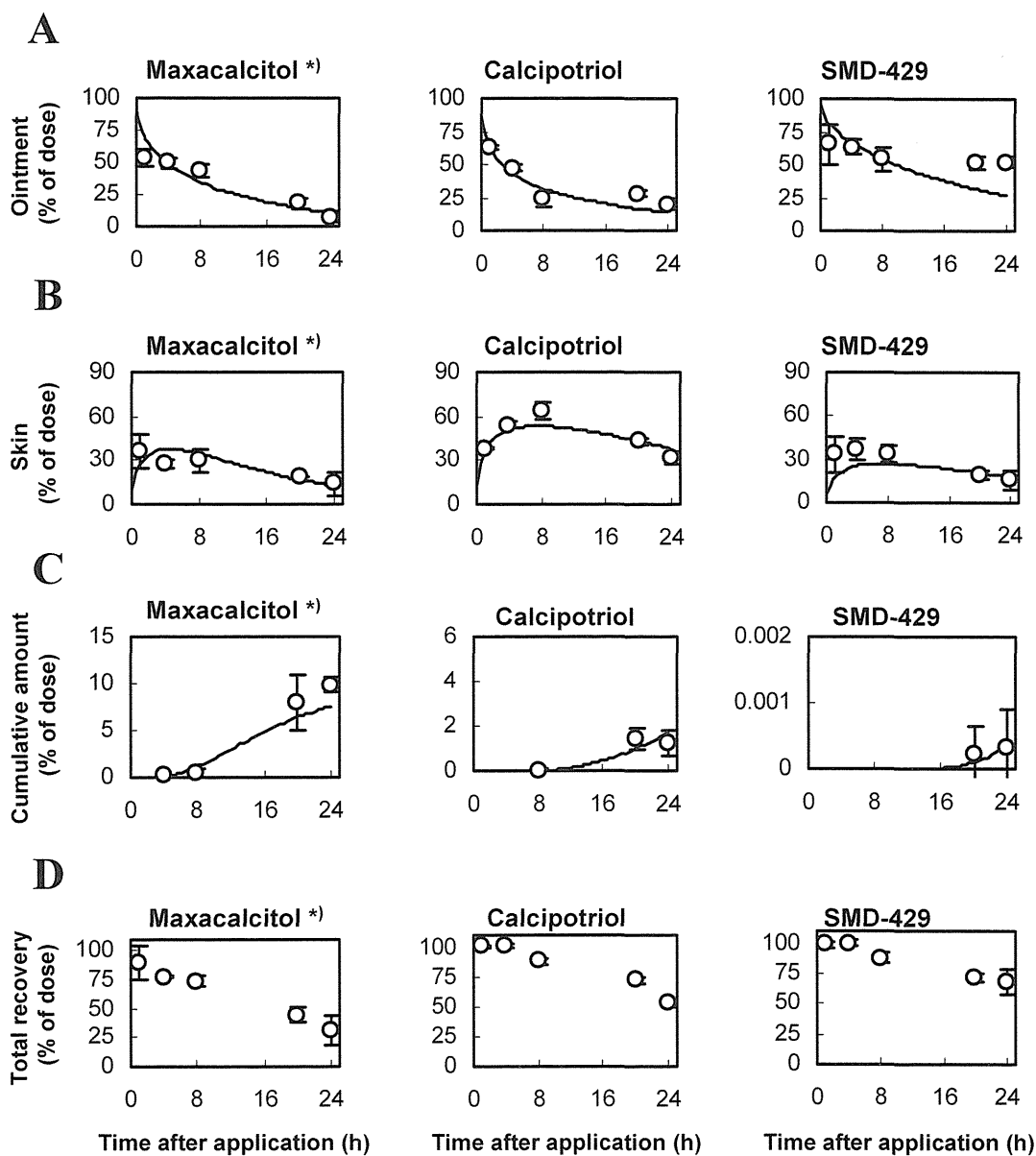


Fig. 15. Permeation profiles of vitamin D₃ analogues through rat skin. After applications of maxacalcitol, calcipotriol, and SMD-429 ointment to rat skin, drug amount remaining in ointment (A), drug amount in skin (B), and cumulative drug amount permeated (C), were determined. Total recovery (D) was the sum of unchanged drug in ointment, skin, and cumulative permeated. Open circles: Mean value of observed data from three experiments, Error bars: SD. *: Observed data of maxacalcitol was taken from a previous report.²²

2. ビタミン D₃ 誘導体の皮膚中代謝

実験系からの未変化体総回収率(軟膏、皮膚およびレセプター液中薬物量の合計)を Fig. 15D に示す。軟膏塗布後 1 時間における各化合物の回収率は 90%以上あったが、経時的に減少した。各化合物のレセプター液中安定性について予備検討した結果、ガラス容器内で 37°C、24 時間インキュベートした後の回収率は OCT で 80%、calcipotriol で 100%、SMD-429 で 73%であることが確認されており、レセプター液中で安定であることが明らかにされている。また、OCT および calcipotriol がラット皮膚^{22, 22} および培養ケラチノサイト^{38, 73}で代謝されることが知られている。本研究において、SMD-429 もまた皮膚中で代謝されることが示された (Fig. 16)。これらの知見は、実験系からの未変化体回収率の低下が、皮膚中代謝による消失に起因することを示唆している。

[³H]SMD-429 軟膏を用いた *in vitro* ラット皮膚透過実験で得たレセプター液の Radio-HPLC クロマトグラムを Fig. 16 に示す。軟膏塗布 24 時間後におけるレセプター液中放射能は、塗布量の 9.2% (例数 2 の実験の平均値) であった。未知代謝物 UNK (溶出時間: 3 分) および M1 (溶出時間: 11 分) がレセプター液中の主代謝物であり、SMD-429 (溶出時間: 32 分) は検出されなかった。M1 は SMD-429 の加水分解体であり、カルシウム作用を有さないことが知られている⁶⁹。SMD-429 がレセプター液および軟膏中で安定であることを確認しており、このことは、SMD-429 の加水分解が、レセプター液や軟膏中ではなく、主として皮膚中で起きていることを示唆する。未知代謝物 UNK の構造情報は得られていないが、逆相 HPLC 条件下の溶出時間からは、側鎖を持たずカルシウム作用が無い M2⁶⁹ よりも極性が高い化合物であることが推測された。このことから、経皮投与された SMD-429 のカルシウム作用軽減に対し、皮膚中代謝が寄与するものと考えられた。

Shimizu らは、SMD-429 が OCT に比べて、ラット肝ミクロソーム中で高い代謝クリアランスを示し、*in vivo* ラットで高いクリアランスを示すことを報告している⁶⁹。この知見

は、皮膚を透過した SMD-429 が代謝により速やかに生体内から消失することを示している。本研究により、SMD-429 の皮膚透過性が極めて低く、SMD-429 は主として代謝物として皮膚を透過することが明らかになった。循環血からの速やかな消失に加えて、低い皮膚透過性および皮膚中代謝が、SMD-429 の副作用軽減に寄与するものと思われる。Fig. 14 に示したように、SMD-429 はヒト皮膚再構築モデル透過性が低いことから、ヒトにおいて副作用の弱いことが予想される。

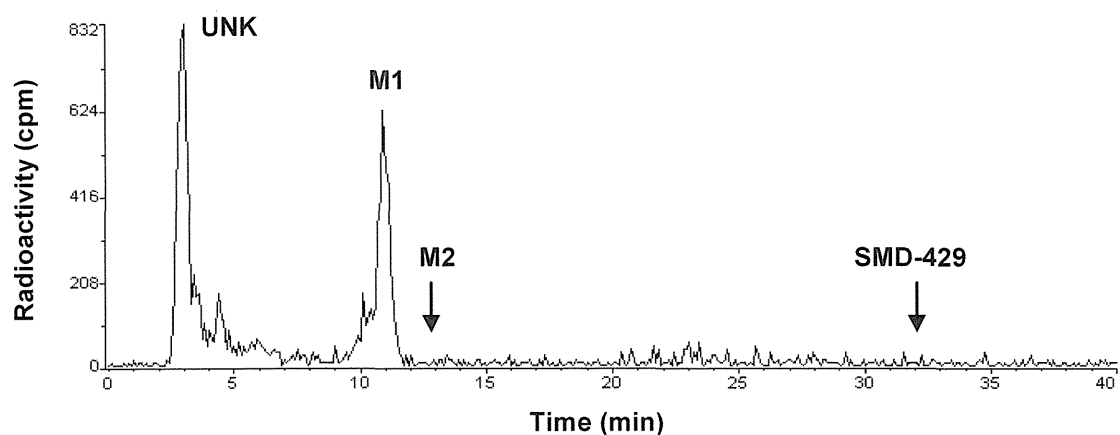


Fig. 16. Typical radio-HPLC chromatogram of a receptor fluid at 24 h after application of [³H]SMD-429 ointment to excised rat skin. UNK: Unknown metabolite, M1: Hydrolyzed SMD-429. M2, a predicted metabolite of SMD-429 (retention time: 13 min), and unchanged SMD-429 (retention time: 32 min) were not detected in the receptor fluid.

3. 拡散モデルに基づいたビタミン D₃ 誘導体の皮膚透過性解析

ビタミン D₃ 誘導体の *in vitro* ラット皮膚透過プロフィールを one-layer skin model に基づいて解析した。解析で得たシミュレーション曲線は、対応する実測値と良く一致し (Fig. 15)、解析に用いた拡散モデルがビタミン D₃ 誘導体の皮膚透過性を表現するのに適していることが示唆された。解析で得られた皮膚透過パラメータを Table 4 に示す。OCT、calcipotriol および SMD-429 の皮膚/基剤間分配係数 (K_S) は、それぞれ 1.68 ×

10^{-1} , 4.03×10^{-1} および 2.81×10^{-1} であった。OCT、calcipotriol および SMD-429 の full-thickness skin 中拡散係数 (D_{full}) は、それぞれ 1.34×10^{-4} , 4.41×10^{-5} および $1.30 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{h}$ であり、SMD-429 の拡散係数は OCT よりも 10 倍低かった。OCT、calcipotriol および SMD-429 の皮膚中代謝速度定数は、それぞれ 1.11×10^{-1} , 4.11×10^{-2} および $1.01 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ であり、SMD-429 の代謝速度定数は OCT と同程度であった。OCT、calcipotriol および SMD-429 の full-thickness skin 透過係数は、それぞれ 2.25×10^{-4} , 1.78×10^{-4} および $3.69 \times 10^{-5} \text{ cm/h}$ であり、SMD-429 の透過係数は他の化合物よりも低かった。SMD-429 の低い透過係数は、その低い拡散係数に起因すると考えられた。

本研究で用いたビタミン D₃ 誘導体の脂溶性は高く、Pallas 2.0 software (CompuDrug, Sedona, AZ, USA) で算出した prolog D_{7.4} 値は、Maxacalcitol: 4.57、Calcipotriol: 5.34、および SMD-429: 6.08 であった。化合物脂溶性と拡散係数との関係进行评估したところ、負の相関 ($r = -0.999$) が認められた (Fig. 17)。アルコール²⁴やステロイド系化合物²⁴において、化合物脂溶性と full-thickness skin 透過性および真皮透過性との間に負の相間があることが報告されている。これらの報告は本研究結果と類似している。このように興味深く、一般的とはいえない関係が生じる理由は定かではなく、これを明らかにするには本研究とは異なる手法からのアプローチが必要と思われる。表皮層は脂溶性薬物の透過障壁であることが知られており^{16, 75}、また、真皮は脂溶性薬物の貯留層のように働くと考えられている^{42, 43, 76}。真皮のバリアー機能についてはほとんど知られていないが、脂溶性の高い角層が水溶性薬物の透過障壁として働くのと対照的に、脂溶性が低い層である真皮が脂溶性薬物の透過障壁として働いているのかもしれない。本研究で用いたビタミン D₃ 誘導体は高脂溶性であり、これらの皮膚中動態は真皮により制御されている可能性がある。Fig. 17 に示したような脂溶性と拡散係数との負の相間関係は、ビタミン D₃ 誘導体の高脂溶性と真皮の高脂溶性薬物に対する透過障壁機能の 2 つの要因から生じた可能性がある。

本研究では、one-layer skin model を用いて正常皮膚透過性を評価した。One-layer model は単純ではあるが、有用な利点がある。すなわち、単純なモデルであるために少ないパラメータで皮膚透過性を表現することができるので、皮膚透過パラメータと薬物の物理化学的性質との間に関連性を見出すことができれば、その情報を、皮膚透過性制御を指向した新規薬物の分子設計に容易に適用できる可能性がある。

第1編、第1章に示したが、 $[^3\text{H}]\text{OCT}$ 軟膏塗布後 24 時間までにレセプター液に透過した放射能に占める未変化体の割合は、25.2%であった。 $[^3\text{H}]\text{SMD-429}$ 軟膏を用いたとき、塗布 24 時間後までの放射能透過量は 9.1% of dose であり、未変化体透過量は 0.0003%であった。これらの結果は、SMD-429 と OCT の皮膚中代謝速度定数が同じであるにもかかわらず、SMD-429 は OCT よりも皮膚中で代謝され易いことを示している。皮膚中拡散係数が低いことが、皮膚中滞留時間を長くし⁴⁵、皮膚中で代謝される確率を上昇させる²²。したがって、SMD-429 の皮膚中における低い拡散係数が、皮膚中代謝の受けやすさの 1 要因であると考えられる。皮膚中拡散係数が 10 倍低下することで、透過性が大きく変化する一方、皮膚中薬物濃度はほとんど変化しないことを、Boderkeらはシミュレーション実験で示している³⁴。彼らの報告は、低い拡散係数を有する SMD-429 が、既存のビタミン D₃ 誘導体 (OCT および calcipotriol) と比べて、低い皮膚透過性および同等の皮膚中濃度を示す事実を支持している。

Table 4. *In vitro* permeation parameters of vitamin D₃ analogues through rat skin.

Compound	K'_s ($\times 10^{-2}$ cm)	D'_{full} ($\times 10^{-2}$ h ⁻¹)	k_{ms} ($\times 10^{-1}$ h ⁻¹)	P_{full} ($\times 10^{-4}$ cm/h)	K_S ($\times 10^{-1}$)	D_{full} ($\times 10^{-4}$ cm ² /h)
<i>Maxacalcitol</i>	1.68 (0.27)	1.34 (0.23)	1.11 (0.18)	2.25	1.68	1.34
<i>Calcipotriol</i>	4.03 (0.63)	0.441 (0.091)	0.411 (0.076)	1.78	4.03	0.441
<i>SMD-429</i>	2.81 (0.82)	0.130 (0.009)	1.01 (0.29)	0.369	2.81	0.130

Permeation parameters were estimated by analyzing permeation profiles of maxacalcitol, calcipotriol, and SMD-429 based on a one-layer diffusion model. K'_s and D'_{full} are equal to $K_S \cdot L_{full}$ and D_{full}/L_{full}^2 , respectively. The partition coefficient, K_S , and the diffusion coefficient, D_{full} , were estimated using a skin thickness (L_{full}) of 1000 μm . The permeability coefficient, P_{full} , is equal to $K'_s \cdot D'_{full}$. k_{ms} is the metabolic rate constant. Values in parentheses are SD of estimated parameters.

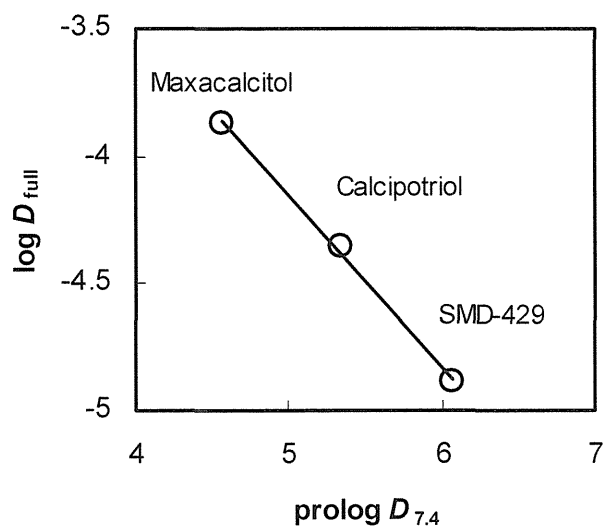


Fig. 17. Relationship between $\log D_{full}$ and $\text{prolog } D_{7.4}$ for vitamin D_3 analogues. The diffusion coefficients, D_{full} , were estimated by analyzing *in vitro* vitamin D_3 analogues permeation through rat skin based on a one-layer diffusion model.

第3節 小括

本研究では、副作用であるカルシウム作用が軽減されたビタミン D₃ 新規誘導体、SMD-429 の *in vitro* 皮膚透過性を評価し、既存のビタミン D₃ 誘導体と比較した。その結果、SMD-429 の皮膚中濃度は既存薬と同程度であるが、透過量は低いことが明らかになった。これらの特徴は、SMD-429 の治療効果を高め、副作用軽減につながるものと考えられた。循環血移行後の高いクリアランスに加えて、低い皮膚透過性および皮膚中代謝の受けやすさが、SMD-429 のラット経皮投与後の副作用(高カルシウム血症)の軽減に寄与すると考えられた。SMD-429 の皮膚中代謝の受けやすさは、その皮膚中拡散係数の低さに起因すると考えられた。

本研究で用いたビタミン D₃ 誘導体は高脂溶性(prolog D_{7,4}: 4.57 – 6.08)であったが、薬物脂溶性と皮膚中拡散係数との間には、負の相間関係が認められた。皮膚中拡散係数の低下は、皮膚透過性の低下および皮膚中代謝の受けやすさにつながることから、薬物脂溶性を高める分子設計をすることで、経皮投与後の循環血移行性が低下し、副作用が軽減された外用剤を開発できる可能性がある。

第3編 物性の異なる化合物群を用いた定量的構造透過性相関解析⁷⁷

第2編で脂溶性薬物であるビタミンD₃誘導体の *in vitro* 皮膚透過性を評価した結果、脂溶性と皮膚中拡散係数との間に負の相関関係が見出された⁶⁸。本編では、薬物の物理化学的性質と皮膚透過パラメータとの関係を詳細に考察すべく、物性の異なる化合物群を用いて *in vitro* 皮膚透過性を評価した。さらに、皮膚透過パラメータを求め、化合物物性との関連性を見出すことにした。

皮膚は不均一な臓器であり、相対的に脂溶性の高い角層、およびその下層に存在する親水性の高い viable epidermis and dermis (VED)により構成される。薬物の経皮吸収性を予測するために、定量的構造透過性相関解析 (Quantitative Structure-Permeability Relationship analysis, QSPR)に関する研究がされてきた^{16, 17, 18, 19, 20, 21}。これらのQSPR解析では、通常、皮膚透過係数を脂溶性、分子サイズ(分子量あるいは分子体積)および水素結合能等を用いて表現する。そして、脂溶性増加に伴い、皮膚透過係数が上昇するという結果が得られてきた。しかしながら、これまでのQSPR解析に用いられてきたデータセットの多くは、Flynn²⁸により収集されたものであり、その元になる透過データのほとんどが表皮膜を用いた実験から得られたものである。つまり、旧来のQSPRは角層透過性のみを反映したものであることができる。

皮膚の中でも角層は、重要な透過障壁であると考えられている。しかしながら、毛細血管が真皮上層を通ることを考慮すると、角層よりも下の生きた表皮および真皮 (viable epidermis and dermis, VED)もまた、循環血への薬物移行性を制御する重要な拡散層であるということが出来る。また、表皮膜を用いた *in vitro* 皮膚透過実験で脂溶性薬物の flux を観測した場合、*in vivo* flux を過大評価してしまうことが報告されている^{42, 43, 44, 76}。この知見は、VEDが角層と同様に重要な透過障壁として働くことを示唆している。

したがって、*in vivo* 条件を反映した QSPR を導出するには、角層および VED、それぞれの皮膚透過に対する寄与を考慮する必要があると考えられる。しかしながら、角層とは対照的に薬物の VED 透過性についてはほとんど研究されていない。薬物の皮膚透過過程をより良く理解するには、角層中のみならず VED 中での薬物の挙動を解析する必要がある。角層と VED は、相対的に脂溶性が異なる層であり、それ故、それぞれの層における薬物の挙動は異なることが予想される。

本研究の目的は、角層および VED における薬物の構造透過性相関を解析することにある。薬物の皮膚透過性は拡散モデルで表現できるが、two-layer skin model に基づいた解析を実行することで、角層および VED に関連した皮膚透過パラメータを算出することができる^{22, 33, 35, 39, 62}。本研究では、脂溶性および水溶性薬物を被験物質として用い、*in vitro* ラット皮膚透過試験を実施した。皮膚透過プロフィールを two-layer skin model に基づいて解析し、得られた皮膚透過パラメータと薬物の物理化学的パラメータとの間で相関解析を実施した。

第1節 実験の部

1. 実験材料

Ethyl nicotinate は Kanto Chemical Co. (Tokyo, Japan)より購入した。Ibuprofen は Sigma-Aldorich Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。Testosterone, *p*-hydroxybenzoic acid, salicylic acid, nicotinic acid, 5-fluorouracil, *dl*-propranolol hydrochloride, caffeine および propylene glycol (PG)は、Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan)から購入した。主成分として calcipotriol を含有する Dovonex®軟膏は、Astellas Pharma Inc. (Tokyo, Japan)より購入した。

2. *In vitro* ラット皮膚透過実験

Ethyl nicotinate, ibuprofen, *p*-hydroxybenzoic acid, nicotinic acid, 5-fluorouracil, *dl*-propranolol hydrochloride, caffeine, および calcipotriol を被験物質として使用した。Calcipotriol 以外の薬物は、PG/water (4:1, v/v) に溶解し、得られた溶液をろ過 (0.45 μm)した。各薬物濃度は、ethyl nicotinate, ibuprofen, *p*-hydroxybenzoic acid, salicylic acid および *dl*-propranolol については 5 mg/mL に設定し、nicotinic acid, 5-fluorouracil および caffeine については 2 mg/mL に設定した。0.05% (w/w) calcipotriol 含有軟膏を以下の操作で調製した。まず、2 g の Dovonex®軟膏 [calcipotriol content: 0.005% (w/w)] を入れた容器に 10 mg/mL calcipotriol をエタノール溶液として 90 μL 加えた。エタノールを窒素気流下留去した後、軟膏を 60°C に温めて、融解、混合した。得られた軟膏は、使用時まで室温下遮光保存した。

第1編、第2章に記載したものと同様の方法により *in vitro* ラット皮膚透過実験を実施した。雄性ラット (SD 系、7 – 8 週齢; Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) を試験に使用し、摘出皮膚 (full-thickness skin および stripped skin) を調製した。皮膚表面にはポリプロピレン製リング (内径: 1.6 cm, 内面積: 2.0 cm^2) をアロンアルファで接着した。透過実験には NetwellTM (6-well, 直径: 24 mm, メッシュ径: 500 μm ; Costar, MA, USA) を使用し⁴³、レセプター液として 20% (v/v) 牛胎児血清含有リン酸緩衝液 (pH 7.4) を

使用した。

インサーター上に皮膚を載せ、1.5 mL のレセプター液を充填した Netwell™ を CO₂ インキュベーター (37°C) に移した。約 30 分間プレインキュベートした後、薬物溶液 50 μL を皮膚に接着したリング内 (面積: 2.0 cm²) に添加した。薬物添加後 1, 5, および 24 時間に、皮膚表面の薬物溶液を綿棒でふき取り回収した。さらに、レセプター液および皮膚を回収した。透過実験を 24 時間続ける場合は、薬液添加後 3, 6, 8, 20 および 24 時間に、1.0 mL のレセプター液を採取し、採取後にレセプター液体積が一定となるように新鮮なレセプター液 1.0 mL を補充した。

Calcipotriol を用いた透過実験の場合、16 mg (体積: 0.018 cm³) の calcipotriol 軟膏を皮膚表面 (面積: 2.0 cm²) に塗布した。軟膏塗布 1, 4, 7, および 24 時間後に、綿棒で皮膚表面の軟膏をふき取り回収し、さらに、皮膚およびレセプター液を回収した。透過実験を 24 時間続ける場合は、薬液添加後 2, 4, 6, 8, 20 および 24 時間に、1.0 mL のレセプター液を採取し、採取後にレセプター液体積が一定となるように新鮮なレセプター液 1.0 mL を補充した。

i 回目のサンプリング時点までの累積薬物透過量 (Q_R) は、次式で算出した。

$$Q_R = C_i \cdot V + \sum_{k=1}^{i-1} C_k \cdot v \quad (Q_R = C_i \cdot V \quad \text{when } i = 1)$$

ここで、 C_i は i 回目のサンプリング時におけるレセプター液中薬物濃度を表す。 V および v は、それぞれレセプター液総体積 (1.5 mL) およびサンプリング体積 (1.0 mL) を表す。

3. サンプル測定

(1) 基剤中薬物量

基剤中薬物は、以下の操作で測定した。10 mL の methanol を綿棒に加えて振とうした。次いで、20 – 2000 μL の methanol 抽出液に対し、Table 5 に示した内標準物質 20 μL およびサンプル溶媒 125 μL を加えて HPLC サンプルとした。HPLC 分析システ

ムは、ポンプ(LC-10AD_{VP}; Shimadzu Co.)、UV 検出器(SPD-10A_{VP}; Shimadzu Co.)、蛍光検出器(L-7480; Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)および分析カラム(Table 5)で構成した。HPLC 分析条件を Table 5 に示す。Calcipotriol は、第 2 編に記載した方法でサンプル処理し、測定した。

(2) レセプター液中薬物濃度

レセプター液中薬物量は、以下の操作で測定した。Ibuprofen, caffeine, *p*-hydroxybenzoic acid, 5-fluorouracil および *dl*-propranolol の場合、内標準物質溶液 20 μ L および抽出溶媒を 20 – 500 μ L のレセプター液に加え、混合した後、混合液を遠心(3000 rpm, 10 min)した。遠心後、有機層を回収し、窒素気流下溶媒を留去した。残渣にサンプル溶媒 125 μ L を加えて、HPLC サンプルを得た。上述の抽出溶媒、サンプル溶媒等の抽出条件を Table 6 にまとめる。Nicotinic acid, ethyl nicotinate および salicylic acid の場合、レセプター液 100 μ L に対し、内標準物質溶液 20 μ L およびサンプル溶媒 125 μ L を加えて混合し、混合液を遠心(3000 rpm, 10 min)した。遠心上清を回収し、HPLC サンプルとした。得られた HPLC サンプルの分析は、先に示した基剤と同様の方法により行った。Calcipotriol は、第 2 編に記載した方法で、サンプル処理し、測定した。

Table 5. HPLC methods for determination of drug concentration

Compound	Mobile phase	Analytical column	Flow rate (mL/min)	Column oven (°C)	Detection (nm)	Sample solvent	Internal standard
Nicotinic acid	A/B = 1:9, v/v	Column A	1	40	UV: 260	Mobile phase	150 µg/mL CF
Caffeine (CF)	A/C = 9:91, v/v	Column B	1	40	UV: 260	Mobile phase	50 µg/mL p-HBA
Salicylic acid	A/C = 9:91, v/v	Column B	1	40	UV: 270	Mobile phase	150 µg/mL CF
p-Hydroxybenzoic acid (p-HBA)	A/C = 9:91, v/v	Column B	1	40	UV: 260	Mobile phase	150 µg/mL CF
5-Fluorouracil	Mobile phase a: A, mobile phase b: D, gradient: b% = 100 (0–6 min), b% = 85 (6–16 min), b% = 100 (16–25 min)	Column B	1	40	UV: 260	Mobile phase b	50 µg/mL p-HBA
<i>d</i> -Propranolol HCl	A/E = 1:3, v/v	Column B	1	40	Fluorescence: $\lambda_{ex} = 285, \lambda_{em} = 340$	Mobile phase	Not used
Ibuprofen, Ethyl nicotinate	Mobile phase a: A, mobile phase b: F, gradient: b% = 75→40 (0–10 min), b% = 40 (10–15 min), b% = 75 (15–25 min)	Column B	1	40	UV: 220 (IB), UV: 260 (EN)	A/F = 1:1, v/v	150 µg/mL testosterone
MC903	G/H/I = 135:8:2, v/v/v	Column C	2	Ambient	UV: 265	Mobile phase	Not used

A: acetonitrile, B: 10 mM NaHPO₄ (pH 7.0) containing 10 mM tetra-n-butylammonium phosphate, C: 10 mM ammonium acetate-acetic acid (pH 4.0), D: 10 mM NaHPO₄ (pH 3.0), E: 20 mM KHPO₄ (pH 4.6), F: 10 mM NaHPO₄ (pH 4.0), G: n-hexane, H: iso-propanol, I: methanol, Column A: CAPCELL PAK C18 (4.6 × 150 mm, Shiseido Co. Ltd., Tokyo, Japan), Column B: Develosil C30-UG-5 (4.6 × 150 mm, Nomura Chemical Co. Ltd., Aichi, Japan), Column C: YMC-Pack SIL A-004 (4.6 × 300 mm, YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan).

Table 6. Extraction methods for receptor fluid samples

Compound	Sample volume (mL)	Extraction solution or solvent	
		Aqueous	Organic
Ibuprofen	0.5	Not used	A
Caffeine, <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	0.5	B	A
5-Fluoruracil	0.5	B	C
<i>dl</i> -Propranolol HCl	0.02	D	A

A: 2 mL of diethyl ether, B: 20 μ L of 5% (v/v) phosphoric acid, C: 2 mL of 1-propanol/diethyl ether (16:84, v/v), D: 200 μ L of water and 200 μ L of 0.1 M KHPO_4 (pH 4.0) saturated with saline.

(3) 皮膚中薬物濃度

皮膚中薬物量を次の手順で測定した。まず、皮膚に 20 mL の 70% (v/v) methanol を加えてホモジナイズした。ホモジネート上清を回収した後、残渣に対して同様の操作を施し、上清を回収した。得られた皮膚抽出液量をメスシリンダーで計量した。その後、皮膚抽出液 50 – 1000 μ L をとり、窒素気流下溶媒を留去した。その後は、レセプター液と同様の操作で処理し、HPLC あるいは LC-MS/MS で分析した。Ethyl nicotinate の場合は、皮膚を 20 mL の 50% (v/v) acetonitrile 中でホモジナイズした。得られた皮膚抽出液から 400 μ L を採取し、内標準物質溶液 20 μ L を加えて HPLC 分析した。HPLC および LC-MS/MS 分析法は、レセプター液分析と同様の方法を用いた。

第2節 薬物皮膚透過プロフィールの分析

1. 理論

薬物皮膚透過プロフィールの解析は、第1編、第1章に記載した方法²²で実施した。すなわち、薬物の *in vitro* 皮膚透過性を表現するのに、皮膚中代謝を考慮した two-layer skin model を利用した。このモデルでは次のことを仮定した。1) 基剤中での薬物の瞬時拡散および finite dose 条件、2) 皮膚は性質の異なる2種類の均質な層、すなわち、角層(SC)および VED で構成される、3) 薬物は VED 中でのみ代謝され、その速度は1次速度定数で表現される、4) レセプター液における sink 条件。

薬物の皮膚透過を次のパラメータを用いて表現した：角層中拡散係数(D_{SC})、VED 中拡散係数(D_{VED})、VED/基剤間分配係数($K_{VED/V}$)、VED/SC 間分配係数($K_{VED/SC}$)、SC/基剤間分配係数($K_{SC/V}$)、および皮膚中代謝速度定数(k_{ms})。 $K_{VED/SC}$ は、 $K_{VED/V} / K_{SC/V}$ と等価であると定義した。SC 厚み(L_{SC})および VED 厚み(L_{VED})は、それぞれ 0.001 cm および 0.1 cm であると仮定した。

2. 皮膚透過パラメータの算出

例数3の実験で得た基剤中薬物量(Q_V)、皮膚中薬物量(Q_S)および累積透過薬物量(Q_R)の平均値を算出した。得られた値と、それに対応する拡散モデル式に基づいて算出したシミュレーション値との当てはめ計算を、Excel 上で動作する非線形最小二乗法プログラム MULTI³⁷を用いて実行した。まず、stripped skin 透過実験データを解析し、 $K_{VED/V}$ 、 D_{VED} 、および k_{ms} を算出した。次いで、full-thickness skin 透過実験データを解析したが、そのとき、先の解析で得たパラメータ($K_{VED/V}$ および D_{VED})を固定値として使用し、 $K_{SC/V}$ 、 $K_{VED/SC}$ ($= K_{VED/V} / K_{SC/V}$)を算出し、さらに、 k_{ms} を再算出した。VED は tape-stripping により損傷を受けていると考えられるため、stripped skin ではなく full-thickness skin の解析で再算出した代謝速度定数を正式な値として採用した。なお、*in vitro* 皮膚透過実験系からの未変化体総回収率(Q_V 、 Q_S 、および Q_R の合計)が

90%以上のときは、皮膚中代謝は起きていないとみなし、 $k_{ms} = 0$ とし、 Q_V および Q_R のみをデータ解析に使用した。

シミュレーション値と実測値との非線形最小二乗法解析では、重み付けを $1/y$ とした。SC を介しての VED 透過係数は次式で表した。

$$P_{VED/SC} = \frac{K_{VED/SC} \cdot D_{VED}}{L_{VED}}$$

3. 薬物の物理化学的パラメータの算出

オクタノール-水分配係数 ($\log K_{o/w}$) は、EPI SuiteTM Ver. 3.2. software (US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA) のデータベースから入手した。予測オクタノール-水分配係数 ($\log K_{o/w, \text{Pred}}$) は、Pallas 2.0 software (CompuDrug) で算出した。水素結合アクセプター数 (HBA) および水素結合ドナー数 (HBD) は QMPR plusTM Ver 4.0 software (Simulation Plus, Inc., Lancaster, CA, USA) で算出した。

第3節 結果

1. 薬物の物理化学的パラメータ

被験物質の物理化学的パラメータを Table 7 に示す。MW は 123.1 – 418.6 の範囲であり、 $\log K_{o/w}$ (あるいは $\log K_{o/w, Pred}$) は $-0.89 - 5.34$ の範囲であった。HBD および HBA は、それぞれ 0 – 3 および 2 – 4 の範囲であった。

Table 7. Physicochemical properties of test compounds

Compound	$\log K_{o/w}$	$\log K_{o/w, Pred}$	MW	HBD	HBA
Maxacalcitol (OCT)	–	4.57	418.61	3	4
Calcipotriol	–	5.34	412.60	3	3
Nicotinic acid	0.36	–	123.11	1	3
Salicylic acid	2.26	–	138.12	2	3
Ibuprofen	3.97	–	206.29	1	2
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	1.58	–	138.12	2	3
Ethyl nicotinate	1.32	–	151.17	0	3
5-Fluorouracil	-0.89	–	130.08	2	2
<i>dl</i> -Propranolol	3.48	–	259.35	2	3
Caffeine	-0.07	–	194.19	0	3

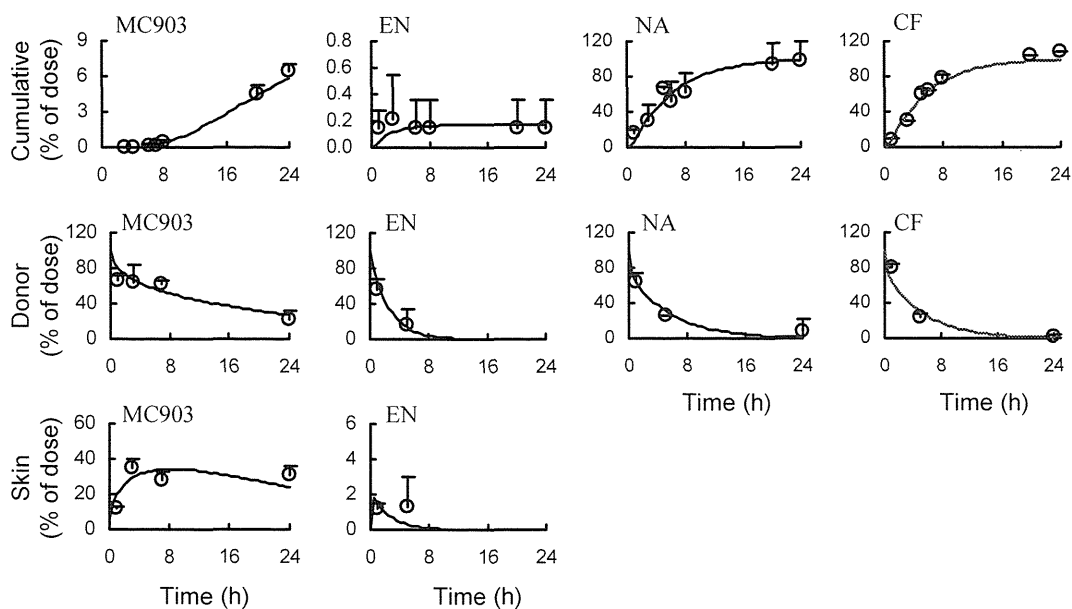
$\log K_{o/w}$: octanol-water partition coefficient obtained from the database in EPI SuiteTM Ver. 3.2 software, $\log K_{o/w, Pred}$: $\log K_{o/w}$ estimated using Pallas 2.0 software. MW: molecular weight, HBD: hydrogen bond donor number, HBA: hydrogen bond acceptor number, –: Not determined.

2. 薬物の *in vitro* ラット皮膚透過性

薬物の *in vitro* ラット皮膚透過プロフィールを Fig. 18 に示す。Full-thickness skin および stripped skin に薬物溶液あるいは軟膏を添加後 24 時間における、基剤中薬物量は次の通りであった：caffeine (92.8%, 2.8%)、nicotinic acid (80.6%, 8.0%)、*p*-hydroxybenzoic acid (78.8%, 0.2%)、salicylic acid (34.6%, 0.5%)、5-fluorouracil (89.1%, 18.5%)、ibuprofen (4.7%, 2.7%)、*dl*-propranolol (90.4%, 21.4%)、ethyl nicotinate (1.9%, 0.1%以下)、および calcipotriol (63.1%, 21.4%)。Full-thickness skin および stripped skin に薬物溶液あるいは軟膏を添加後 24 時間における、累積透過量は次の通りであった：caffeine (8.0%, 108.8%)、nicotinic acid (6.1%, 98.7%)、*p*-hydroxybenzoic acid (5.1%, 95.9%)、salicylic acid (37.9%, 91.5%)、5-fluorouracil (0.3%, 70.7%)、ibuprofen (84.9%, 99.7%)、*dl*-propranolol (1.0%, 62.2%)、ethyl nicotinate (0.1%, 0.1%)、および calcipotriol (0.5%, 6.5%)。Ethyl nicotinate を除けば、角層除去により、基剤中薬物残量は減少し、累積透過量は増加した。Ibuprofen と Calcipotriol の累積透過量は、角層除去により増加したが、その増加率は他の化合物と比べて僅かであった。

本試験により、角層除去により累積透過量が増加し、基剤中薬物残存量が減少するという結果が得られたが、このことは、角層がこれら化合物の透過障壁として働くことを示唆している。

A) Stripped skin



B) Full-thickness skin

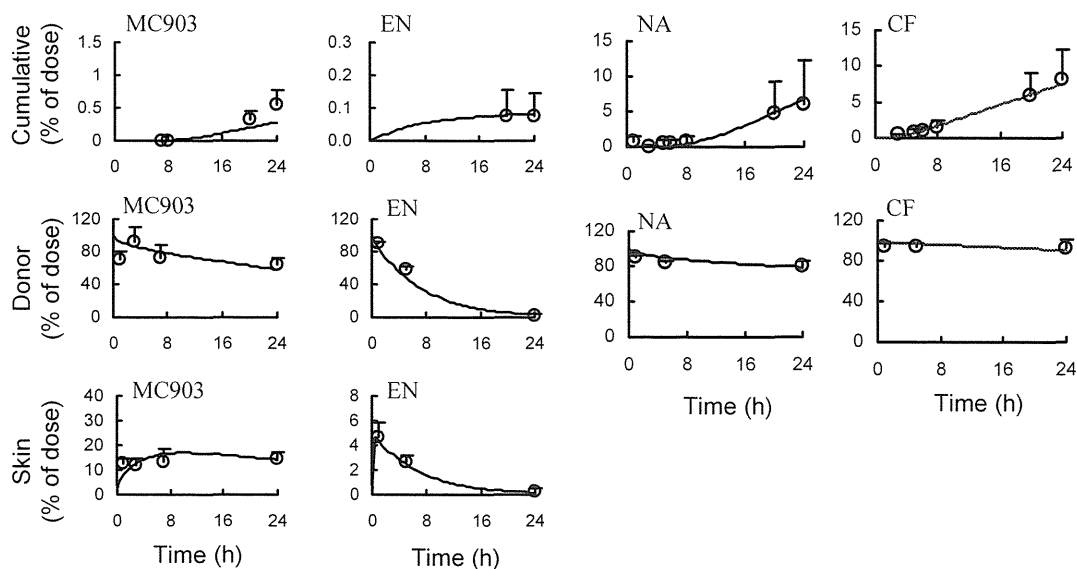
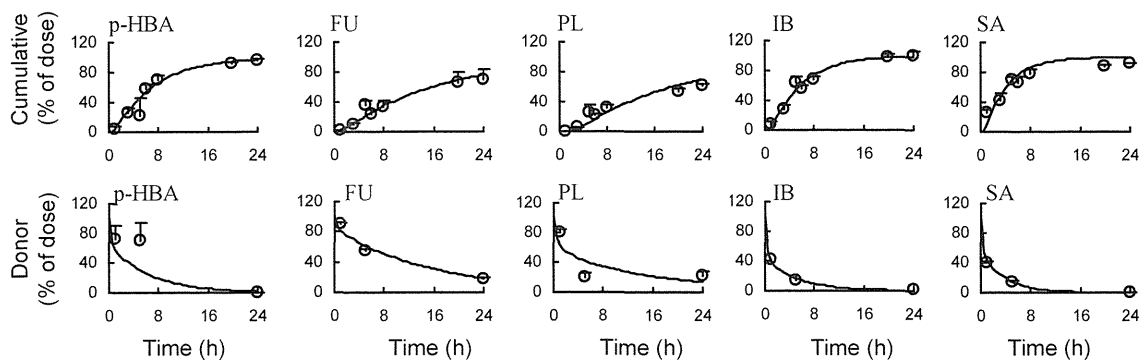


Fig. 18. *In vitro* rat skin permeation of the test compounds through stripped skin (A) and full-thickness skin (B). Open circles: observed data, lines: simulation data. Error bars show SD. MC903: calcipotriol, EN: ethyl nicotinate, NA: nicotinic acid, CF: caffeine.

A) Stripped skin



B) Full-thickness skin

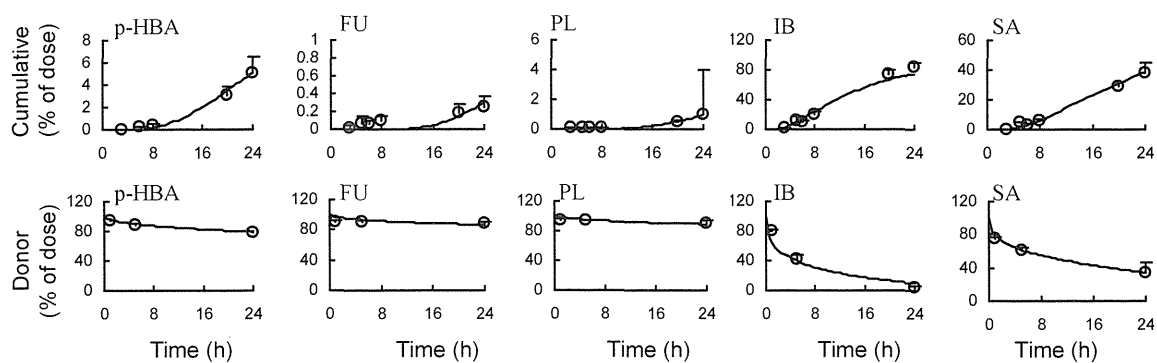


Fig. 18. (Continued).

p-HBA: *p*-hydroxybenzoic acid, FU: 5-fluorouracil, PL: *dl*-propranolol hydrochloride, IB: ibuprofen, SA: salicylic acid.

3. 薬物皮膚透過性の拡散モデルに基づいた解析

In vitro ラット皮膚透過実験系からの未変化体回収率(基剤、皮膚中薬物量および累積透過薬物量の合計)を Table 8 に示す。Stripped skin を用いた実験において、ethyl nicotinate および calcipotriol を添加後 24 時間の回収率は、それぞれ 0.1 および 47.4%であった。Ethyl nicotinate の皮膚透過実験では、代謝物である nicotinic acid も測定しており、ethyl nicotinate と nicotinic acid の stripped skin 透過実験系からの回収率の合計は、薬液添加後 24 時間において $96.5 \pm 3.2\%$ であった。Ethyl nicotinate は皮膚中で代謝されて nicotinic acid が生成することが報告されており³⁵、実験系からの ethyl nicotinate 回収率が低いのは、皮膚中代謝によるものと考えられた。Calcipotriol の実験系からの回収率もまた低かったが、次の事実は、低回収率が主として代謝によることを示唆する。1) calcipotriol はレセプター液中で安定である、2) [³H]calcipotriol を用いて calcipotriol の皮膚からの抽出実験をした結果、93%が皮膚抽出液中に回収された、3) calcipotriol は皮膚中で代謝されることが報告されている⁷²⁻⁷³。その他の化合物の回収率は全て 90%以上 (Table 8) であった。したがって、ethyl nicotinate および calcipotriol を除く化合物の皮膚透過パラメータを算出する場合は、皮膚中代謝速度定数 k_{ms} を 0 と定義した。

Two-layer skin model に基づいて、実測値とシミュレーション値との curve fitting を実行したところ、シミュレーション値とそれに対応する実測値とは良く一致した (Fig. 18)。このことは、本試験で用いた拡散モデルが、被験物質の皮膚透過性を表現するのに適していることを示唆し、また、皮膚状態が実験中に変化しなかったことを示唆する。解析により得られた皮膚透過パラメータを Table 9 に示す。第 2 章で求めた Maxacalcitol (OCT) の皮膚透過パラメータも、本研究で求めたパラメータのデータセットに加えた。

Table 8. Recovery of unchanged drug from the experimental system at 24 h after application

Compound	Recovery from	Recovery from
	stripped skin system (% of dose)	full-thickness skin system (% of dose)
Calcipotriol	58.6 ± 14.5	78.2 ± 10.5
Nicotinic acid (NA)	109.0 ± 13.5	98.4 ± 1.9
Salicylic acid	94.3 ± 0.3	93.6 ± 2.4
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	99.6 ± 1.7	96.9 ± 1.6
5-Fluorouracil	93.5 ± 3.4	92.5 ± 1.3
<i>dl</i> -Propranolol HCl	98.7 ± 3.8	97.2 ± 1.5
Ibuprofen	104.9 ± 7.8	98.1 ± 3.9
Ethyl nicotinate (EN)	0.1 ± 0.2	2.2 ± 1.7
EN (EN + NA)*	96.5 ± 3.2	84.9 ± 3.0
Caffeine	114.6 ± 0.6	106.9 ± 12.2

Data are expressed as mean ± SD of three experiments. *: The recovery of the sum of EN and regenerated NA after application of EN.

Table 9. *In vitro* rat skin permeation parameters based on a two-layer diffusion model

Compound	Vehicle type	$K_{VED/V}$ ($\times 10^{-1}$)	$K_{SC/V}$	$K_{VED/SC}$ ($\times 10^{-2}$)	D_{SC} ($\times 10^{-8}$ cm ² /h)	D_{VED} ($\times 10^{-4}$ cm ² /h)	k_{ms} (/h)
Maxacalcitol (OCT) *	Ointment	6.04	11.6	5.23	7.45	4.04	0.341
Calcipotriol	Ointment	1.96	2.22	8.85	10.0	0.971	0.232
Nicotinic acid	PG/water	2.34	8.30	2.82	1.85	24.8	–
Salicylic acid	PG/water	4.96	29.3	1.69	3.80	23.7	–
Ibuprofen	PG/water	7.62	31.2	2.44	14.2	13.6	–
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	PG/water	3.50	9.11	3.84	1.54	16.6	–
Ethyl nicotinate	PG/water	0.399	1.70	2.34	320	37.1	22.6
5-Fluorouracil	PG/water	1.32	9.81	1.34	0.501	14.2	–
<i>dl</i> -Propranolol HCl	PG/water	5.27	5.15	10.2	1.17	4.85	–
Caffeine	PG/water	2.11	0.971	21.7	10.0	28.7	–

–: Not calculated. *: Data from a previous study (ref. 46).

4. 化合物物性と皮膚透過パラメータとの相関解析

基剤は皮膚透過性に影響を与える因子であることが知られている。また、基剤組成によって、基剤から皮膚への薬物分配性が変化することが報告されている^{66, 79}。基剤の影響を受けない QSPR を構築する上で、基剤によって容易に変化しない皮膚透過パラメータを選択することが重要であり、本研究では、その要件を満たすパラメータである D_{SC} および D_{VED} について、化合物物性との関係を解析した。その結果、次の回帰式が得られた。

$$\log D_{SC} = 0.285 \times \log K_{o/w} - 0.674 \times \text{HBD} - 6.81 \quad (n = 10, r = 0.782, p < 0.05)$$

$$\log D_{VED} = -0.0715 \times (\log K_{o/w})^2 + 0.142 \times \log K_{o/w} - 2.63$$

$$(n = 10, r = 0.930, p < 0.01)$$

皮膚透過パラメータ (D_{SC} , D_{VED} , $P_{VED/SC}$) の対数値と薬物脂溶性 ($\log K_{o/w}$) との関係
を Fig. 19 に示す。 $\log D_{SC}$ 値と $\log K_{o/w}$ との間には相関性は認められなかった (Fig.
19A)。しかしながら、HBA を用いずに HBD と $\log K_{o/w}$ とを利用することで、 $\log D_{SC}$ 値
の良好な回帰式を得ることができた (Fig. 20)。 $\log D_{VED}$ 値は、 $\log K_{o/w} < 2$ のときは一定
値を示したが、 $\log K_{o/w} > 2$ のときは、脂溶性増加に伴い低下した (Fig. 19B)。

$P_{VED/SC} (= K_{VED/SC} \cdot D_{VED} / L_{VED})$ は SC を介した VED 透過係数であり、薬物の
full-thickness skin 透過性に対する VED の影響を予測するときに有用なパラメータで
ある。そこで、このパラメータと物性との相関を解析した。 $P_{VED/SC}$ と $\log K_{o/w}$ とは、 \log
 $K_{o/w} > 0$ のとき、2 次関数式で表現された。そして、 $\log K_{o/w} < 0$ の化合物である
5-fluorouracil および caffeine を除いた 8 化合物の値を用いることにより、次の回帰式を
得た。

$$\log P_{VED/SC} = -0.0486 \times (\log K_{o/w})^2 + 0.112 \times \log K_{o/w} - 3.21$$

$$(n = 8, r = 0.955, p < 0.01)$$

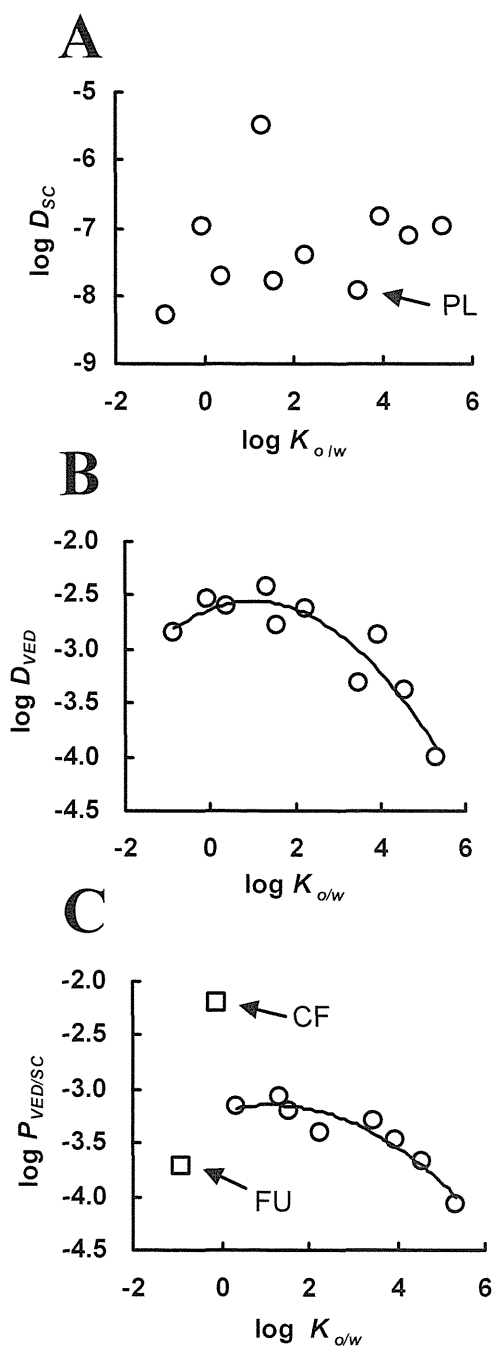


Fig. 19. Relationships between lipophilicity and permeation parameters, D_{sc} (A), D_{VED} (B), and $P_{VED/SC}$ (C). CF: caffeine, FU: 5-fluorouracil, PL: *dl*-propranolol.

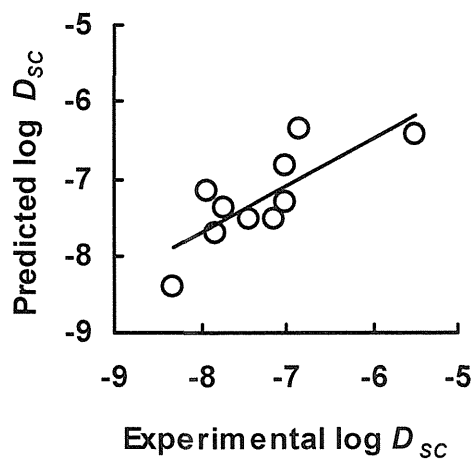


Fig. 20. Relationship between experimental and predicted values of D_{sc} .

第4節 考察

本実験では、基剤組成の1つとしてPGを使用しているが、PGは経皮吸収促進剤として知られており、被験物質の透過 flux を変化させた可能性がある。本研究で用いた拡散モデルに基づいて考えると、経皮吸収促進剤の効果は、みかけの角層中拡散係数(D_{SC})の変化あるいはみかけの角層/基剤間分配係数($K_{SC/V}$)の変化として現れると思われる。Díes らは、PG の吸収促進モードは拡散係数ではなく分配係数の変化として現れることを報告している⁵³。したがって、本研究において、PG の作用は D_{SC} ではなく $K_{SC/V}$ の変化として現れると思われる。 $K_{SC/V}$ 値が PG の影響を受けている可能性があること、また、本研究では2種類の基剤(PG/water および軟膏)を用いており、 $K_{SC/V}$ は基剤の影響を受けやすいことから、本研究では、 $K_{SC/V}$ と化合物物性との関係は考察しなかった。

$\log D_{SC}$ 値は、 $\log K_{o/w}$ と水素結合ドナー数との混合関数で表現された。*dl*-propranolol の D_{SC} 値は、その脂溶性からすると低い値であった。本研究では、*dl*-propranolol hydrochloride を使用したため、基剤中で *dl*-propranolol はイオン形で存在していた可能性がある。これが、full-thickness skin における低い透過性および低い D_{SC} 値の原因かもしれない。角層中での薬物の主たる移動経路は、おそらく細胞間隙だと思われる⁸⁰。角質細胞間隙の大部分は脂溶性であり、極性ルートは限られている。脂溶性と分子サイズが、角層中での拡散性を決める重要な因子である。脂溶性と分子サイズとを考慮して、Mitragotri は4つの拡散ルート(角質脂質二重層内の free-volume 拡散、脂質二重層に沿った側方拡散、脂質二重層内の極性 pore 中拡散、および毛穴等の shunt 内拡散)の寄与を提唱した⁸¹。本研究で用いた化合物群は、 $\log K_{o/w}$ が $-0.89 \sim 5.34$ の低分子(MW: 123.1 – 418.6)であり、Mitragotri の理論に従うと、被験物質の中でも高脂溶性の低分子薬物は、連続した脂質二重層中の free-volume (脂溶性ルート)を拡散し、親水性の低分子薬物は断続した pore (極性ルート)を拡散すると思われる。いずれのルートにおいても、分子サイズが大きくなると拡散係数は低

下するが、本研究で用いた化合物の角層中拡散係数は、分子サイズではなく、薬物脂溶性により決まる拡散ルートの利用率によって決定された可能性がある。HBD 数の増加により D_{SC} 値が低下する傾向が認められたが、これは角層脂質と薬物との水素結合に基づく相互作用の影響かもしれない。 D_{SC} 値に対する HBA の寄与についても評価したが、関連性は見出されなかった。

D_{VED} 値は $\log K_{o/w} < 2$ のとき一定であったが、 $\log K_{o/w} > 2$ のときは $\log K_{o/w}$ の増加により D_{VED} 値は低下した。Cross ら⁵⁴と Magnusson ら²⁴は、定常状態における *in vitro* 皮膚透過速度と皮膚中薬物量とを用いて、ヒト皮膚中での薬物の相対的拡散係数を算出している。彼らは、アルコール類 ($\log K_{o/w}$: -0.19–4.06) とステロイド類 ($\log K_{o/w}$: 1.43–4.04) とのいずれについても、脂溶性の上昇により、真皮中での相対的拡散係数が低下することを明らかにした。この知見は、本研究結果と類似する。仮に、薬物と皮膚構成成分との間に相互作用が無ければ、拡散係数は脂溶性よりは分子サイズの影響を受けるに違いない。しかしながら、彼らが用いたステロイド化合物では、分子量と拡散係数との間に相関は認められていない。このことから、脂溶性薬物が真皮構成成分と相互作用することが示唆される。Cross らはまた、ヒト表皮膜においても、脂溶性と拡散性との間に同様の関係を見出している⁵⁴。このことは、親水性の高い表皮下層 (viable epidermis) と薬物との間に相互作用が生じている可能性を示唆するものである。よって、本研究で観測された高脂溶性薬物の VED 中での低拡散性は、VED 構成成分(血管外アルブミン、皮膚タンパク、および皮膚脂質)に対する薬物の結合に起因する可能性がある。

分配係数 $K_{VED/SC}$ もまた、薬物の皮膚透過制御因子であり、基剤の影響を受けにくいパラメータである。本研究では、このパラメータと化合物物性との関係性を評価したが、いかなる物性パラメータとの間にも相関関係は認められなかった。前述したように薬物の VED 中拡散係数が VED 組織成分との結合の影響を受けるであろうことを考慮すると、 $K_{VED/SC}$ もまた組織結合の影響を受けることが予想され、そして、 $\log K_{o/w}$ の上昇に

より $K_{VED/SC}$ は上昇することが予想される。しかしながら、 $K_{VED/SC}$ と $\log K_{o/w}$ との間には関連性が見出されなかった。このことは、角層から VED への薬物分配が、VED との組織結合のみならず、親油性層(角層)から親水性層 (VED) への単純な分配によって決定されることを示唆する。

$\log K_{o/w} < 0$ の親水性化合物は例外であったものの、 $P_{VED/SC}$ と $\log K_{o/w}$ との間に 2 次関数式の関係が認められた (Fig. 19B)。 $\log K_{o/w} > 1$ のとき、 $\log K_{o/w}$ の上昇に伴い、

$P_{VED/SC}$ は低下した。 $P_{VED/SC}$ は数式 $\frac{K_{VED/SC} \cdot D_{VED}}{L_{VED}}$ と等価である。言い換えると、

$K_{VED/SC}$ は $P_{VED/SC}$ の構成成分である。 $K_{VED/SC}$ と $\log K_{o/w}$ との間に相関が認められなかったにもかかわらず、 $P_{VED/SC}$ は $\log K_{o/w}$ と良好に相関した。これは、 $P_{VED/SC}$ の構成成分である D_{VED} の影響によると考えられる。何故なら、 D_{VED} は $\log K_{o/w}$ と良好に相関する。 $\log K_{o/w} < 0$ のとき、 $P_{VED/SC}$ は $\log K_{o/w}$ との相関性が無くなったが、これは、そのような高極性域では、 D_{VED} 値はほぼ一定値であり、 $P_{VED/SC}$ 値は主として $K_{VED/SC}$ の違いによって変化するためと思われた。広範囲の $\log K_{o/w}$ で、VED 透過係数の QSPR を導出するには、 $K_{VED/SC}$ と化合物物性との関係についての研究が必要と思われる。

$\log K_{o/w}$ に対する full-thickness skin 透過性の関係が 2 次関数で表されることが報告されてきた^{82, 83, 84}。 $\log K_{o/w}$ に対する角層中拡散係数と VED 中拡散係数の対照的な関係により、そのような 2 次関数の関係が得られることが、本研究結果から推察される。そこで、皮膚透過性に対する角層と VED の影響を評価するため、 $P_{VED/SC}$ と D_{SC} の回帰式を用いて、シミュレーション実験を実施した。Full-thickness skin 透過係数 (P_{full}) は次式で算出した。

$$\frac{1}{P_{full}} = \frac{1}{P_{SC}} + \frac{1}{P_{VED}}$$

ここで、 P_{VED} は VED 透過係数を表し、 $\frac{K_{VED/V} \cdot D_{VED}}{L_{VED}}$ と等価である。 $K_{SC/V} = 1$ と仮定

すると、 $K_{VED/V}$ ($= K_{VED/SC} \cdot K_{SC/V}$) は $K_{VED/SC}$ と等しくなり、次式が得られる。

$$\frac{1}{P_{full}} = \frac{1}{P_{SC}} + \frac{1}{P_{VED/SC}}$$

$K_{SC/V} = 1$ および $HBD = 0$ を仮定し、さらに、幾つかの VED 厚み (100, 200, 300, 500, および 1000 μm) を仮定して、 $\log K_{o/w}$ が 0 から 5 の範囲で、 P_{SC} および P_{VED} を算出した。 P_{full} のシミュレーション値を Fig. 21 に示す。 $\log K_{o/w}$ と P_{full} との間に 2 次関数で示される関係が認められた。VED 厚みが 100, 200, 300, 500 および 1000 μm と仮定したときの P_{full} 値は、 $\log K_{o/w}$ 値がそれぞれ 4.2, 3.8, 3.5, 3.2 および 2.8 のときに最大となった。VED 中拡散距離が長くなるにつれて、最大 P_{full} 値を与える $\log K_{o/w}$ は低下していった。これまでに、*in vitro* 皮膚透過係数が最大値を示すときの $\log K_{o/w}$ について異なる値が報告されてきている。例えば、 $\log K_{o/w}$ が 3-4⁸⁴、-0.8⁸²、あるいは 3.4⁸³であったりする。今回のシミュレーション実験から、*in vitro* 透過実験に用いる皮膚の厚みにより皮膚透過速度が最大になる $\log K_{o/w}$ が変化することが示唆された。また、水溶性薬物は VED 中拡散係数が大きいいため、皮膚厚みが皮膚透過速度に影響しにくいことが示唆された (Fig. 21)。真皮に存在する毛細血管からの薬物クリアランスを考慮すると、*in vivo* 吸収を再現するのに適した皮膚厚みは 200 μm 程度⁸⁵ と考えられる。したがって、VED 厚みを 200 μm と仮定した P_{full} シミュレーション値が *in vivo* 皮膚透過係数を最も良く反映しているものと思われる。

ここで、full-thickness skin 中拡散係数 (D_{full}) について考えてみる。

$$P_{full} = \frac{K_{SC/D} \cdot D_{full}}{L_{full}}$$

であり、今回のシミュレーションでは $K_{SC/D} = 1$ および $L_{full} = 1000$

$\mu\text{m} = 0.1 \text{ cm}$ と仮定した。したがって、 $D_{full} = P_{full}/10$ と表すことができる。

このことは、今回のシミュレーション条件下では、full-thickness skin 中拡散係数は、 P_{full} の 1/10 倍の値を示すことを意味しており、 D_{full} 値もまた、ある脂溶性のときに極大値を示し、高脂溶性域では脂溶性増加とともに D_{full} は低下することを示している。この

事実は、第 2 編で高脂溶性薬物であるビタミン D₃ 誘導体の脂溶性と full-thickness skin 中拡散係数との間に負の相関が認められた結果⁶⁸を支持する。

脂溶性薬物の *in vitro* 皮膚透過速度は、表皮膜を用いた場合は *in vivo* よりも過大評価され、full-thickness skin を用いた場合は過小評価されることが報告されてきた^{42, 43, 44, 76}。この事実は、脂溶性薬物の *in vivo* 皮膚透過性を *in vitro* 実験から予測する場合、表皮層だけでなく真皮も考慮する必要があることを示唆しており、また、full-thickness skin の厚みは、*in vivo* 皮膚透過速度を予測するには厚すぎることを示唆している。本研究では、*in vitro-in vivo* 相関を評価しなかったが、本研究で展開したような VED 厚みを考慮したシミュレーション手法は、*in vitro-in vivo* 間の薬物透過速度の違いを補正するとき有用と思われる。

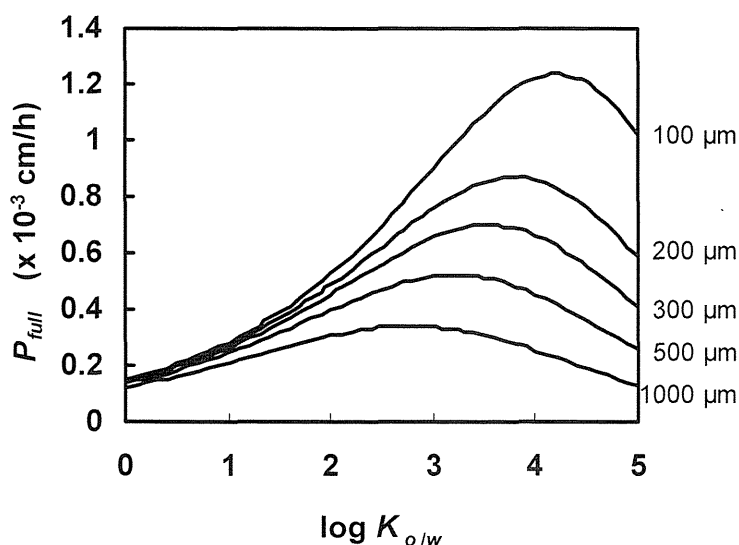


Fig. 21. Relationship between full-thickness skin permeability and lipophilicity, assuming several thickness of VED. P_{full} was calculated using the regression equations of $\log D_{SC}$ and $\log P_{VED/SC}$, assuming $HBD = 0$ and $K_{SC/V} = 1$. The intact length of full-thickness skin was 1000 μm .

第5節 小括

薬物の脂溶性増加に伴い、角層中拡散係数は上昇した。それとは対照的に、 $\log K_{o/w} > 2$ のとき、脂溶性増加に伴い、VED 中拡散係数は低下した。このことは、VED が脂溶性薬物にとって透過しにくい層であることを示唆する。薬物の脂溶性は、角層中拡散性と VED 中拡散性に対し、異なる様式で影響すると考えられた。言い換えると、薬物脂溶性は、角層中では拡散経路(連続した脂溶性ルートあるいは断続した極性ルート)の利用率を変化させ、VED 中では皮膚構成成分(血管外アルブミン、皮膚タンパク、および皮膚脂質)との相互作用を変化させる可能性がある。その結果として、薬物の角層および VED 中における見かけの拡散係数が変化すると考えられる。本研究では、分子サイズは皮膚中拡散性にとって重要ではないように見えたが、これは、試験に用いた薬物が低分子(MW: 123.1–418.6)であったことに起因すると思われる。

これまでの QSPR 解析では、主に薬物の角層透過性に関心が寄せられてきた。本研究で実施したような VED を考慮した QSPR 解析は、薬物の皮膚透過性の全体像を理解する上で重要である。今回の QSPR 手法をさらに発展させることで、物理化学的性質からの *in vivo* 皮膚透過予測が可能になるとと思われる。

本研究では、試料の入手しやすさを考慮して、ラット摘出皮膚を試験に用いた。相対的に脂溶性が高い角層と、極性が高い VED とから構成されるという点で、ラット皮膚はヒト皮膚と形態学的に類似している。したがって、本試験で得られた知見は、ラットのみならず、ヒトに対しても適用できると考えられる。

第2編において、副作用が軽減されたビタミン D₃ 新規誘導体、SMD-429 の *in vitro* 皮膚透過性を評価し、その皮膚透過性が低いことが、副作用軽減に寄与する可能性を示した。SMD-429 の皮膚透過性が低いのは、脂溶性の高さに起因することが示唆された。本稿では、脂溶性の異なる化合物群を用いて、その皮膚透過性の特徴を評価した。その結果、脂溶性が高くなることで、見かけの VED 中拡散係数が低下し、それにより皮膚透過性が低下することが示された。この皮膚の性質を利用することで、乾癬

外用治療を目的としたビタミンD₃誘導体を開発する場合、高脂溶性に分子設計することで、副作用が軽減できる可能性がある。この概念は、乾癬治療薬のみならず、皮膚を標的臓器とする外用治療薬を開発する際に、副作用軽減を図る上で留意すべき重要な知見である。

結論

皮膚を標的臓器とするビタミン D₃ 誘導体外用剤にとって、皮膚中濃度を高く維持することは薬効持続につながり、一方で、皮膚を透過し、循環血へ移行した薬物は副作用を引き起こす。このため、薬効に優れ、副作用が軽減された新規ビタミン D₃ 誘導体外用剤を開発する上で、皮膚透過を適切に制御することが重要である。皮膚透過性を制御する方法としては、製剤学的手法および経皮吸収最適化を指向した分子設計があげられる。いずれの方法を用いる場合でも、薬物経皮吸収性の制御因子を明確にすることが、効率的な開発への近道と思われる。経皮吸収の制御因子を明らかにするには、拡散モデルに基づいた解析が有効であるとの理念に基づいて、本研究を展開した。

1. 皮膚中で複雑に代謝される Maxacalcitol の皮膚透過性解析手法の構築

拡散モデルに基づいた解析法が数多く報告されてきたが、そのほとんどが infinite dose 条件を仮定している。また、皮膚中代謝を受ける薬物の解析をする場合、その代謝経路の全容が解明されている必要があり、かつ、未変化体のみならず代謝物をも測定する必要があった。しかしながら、実用面を考えると、外用剤は finite dose であり、かつ、多くの薬物にとって、その皮膚中代謝経路の全容を明らかにするのは困難である。このため、既存の解析法は必ずしも汎用性および実用性に優れているとは言えない。本研究では、皮膚中で未知代謝物を含む複数の代謝物へと変換される Maxacalcitol (OCT) の皮膚透過性を解析するため、新規の解析手法を構築した。この解析法では、実験系からの未変化体回収率の経時的減少が皮膚中代謝に起因すると仮定し、未変化体情報のみを利用するため、一切の代謝情報を必要としない。本解析手法は、代謝情報を必要としないことから、代謝経路が複雑なため既存法では解析できなかった薬物の皮膚透過性解析や、代謝研究が進んでいない創薬初期段階における薬物透過解析において有効と思われる。

2. 軟膏組成が及ぼす Maxacalcitol の *in vitro* ラット皮膚透過性への影響

MCT 含量の異なる 2 つの軟膏 (3MO および 30MO) を用いて OCT 皮膚透過性を評価したところ、軟膏間で皮膚透過性に違いが認められた。軟膏中拡散係数を評価したところ、MCT 含量が高い 30MO 軟膏の方が、拡散係数が 2 倍大きいことが明らかになった。軟膏中拡散係数が大きいことは、皮膚透過性の上昇につながるが、30MO 軟膏の皮膚透過性は 3MO 軟膏よりも低かった。そこで、軟膏間で皮膚透過性に違いが生じた原因を明らかにするため、基剤中拡散を考慮した拡散モデルに基づいた解析法を構築した。この解析法では、処方の違いにより基剤中拡散係数の他、角層中拡散係数および皮膚/基剤間分配係数が変化することを想定した。拡散モデル解析の結果、2 つの軟膏間で角層中拡散係数に差は生じなかったが、分配係数は 3MO 軟膏の方が 5 倍高いことが明らかになった。MCT は OCT の溶解剤であることから、MCT 含量の低下によって軟膏中での OCT 溶解度が低下し、その結果として、皮膚への分配が上昇したものと思われた。そして、軟膏間で生じた皮膚透過性の違いは主として、分配係数の変化で説明できることが示された。同じ拡散モデルを用いて、基剤中拡散係数が皮膚透過性に及ぼす影響を考察したところ、いずれの軟膏においても基剤中拡散は、OCT の皮膚透過性に影響しないほど十分に大きいことが示唆された。

処方設計の変更により、基剤中拡散性および皮膚/基剤間分配性が変化する可能性がある。さらには、吸収促進作用を有する物質が処方に含まれる場合には、角層中拡散性が変化する可能性もある。そして、これら因子の変化が複合した形で、薬物の経皮吸収性に変化が生じる。このように、処方変更により経皮吸収が変化する背景には、複数の要因が複雑に絡んでいる。個々の因子については、その評価に適した試験法により明らかにすることができ、例えば、基剤中拡散係数は放出試験により、薬物分配係数は組織分布試験により求めることができる。しかしながら、どの因子の変化がより強く経皮吸収性に影響するのか、あるいは、ある因子の変化が、経皮吸収性に影

響を与えるほど重大か否かを判断するのは難しい。本研究で構築した基剤中拡散を考慮した皮膚透過性解析法およびシミュレーション法は、処方変更により皮膚透過性が変化した場合の要因解明に有用である。また、皮膚透過パラメータの変化が薬物透過性に影響を及ぼすほど重大か否かを判別するのもも有効であり、基剤中拡散係数等の目標値を設定する際に有効利用できる。この解析法とシミュレーション法を利用することで、処方最適化検討の効率化、特に、徐放設計された基剤開発での応用が期待される。

3. 定量的構造透過性相関解析

乾癬治療を目的としたビタミン D₃ 新規誘導体、SMD-429 の *in vitro* ラット皮膚透過性を既存薬 (OCT および calcipotriol) と比較した。その結果、SMD-429 の皮膚透過性は既存薬よりも極めて低く、主として代謝物として透過することが明らかになった。SMD-429 は既存薬に比べて薬理活性が強いにもかかわらず、副作用が軽減された化合物であるが、副作用軽減の一因として、その低い皮膚透過性が考えられた。SMD-429 の皮膚透過上の特徴を明らかにするため、拡散モデル解析を実施したところ、その皮膚中拡散係数が既存薬よりも低いことが明らかになり、低拡散係数が低皮膚透過性の原因と考えられた。また、SMD-429 の脂溶性は既存薬よりも高く、薬物脂溶性と皮膚中拡散係数との間には負の相関が認められた。

化合物物性と皮膚透過性との関連性を見出すことができれば、その情報を分子設計に落とし込むことが可能になり、副作用が軽減された外用ビタミン D₃ 誘導体の効率的な開発が期待できる。先に示したように、ビタミン D₃ 誘導体の皮膚中拡散係数と脂溶性との間に負の相関が認められた。この知見を、より詳細かつ一般的なものとするため、脂溶性が異なる 10 化合物の皮膚透過性を評価し、two-layer skin model に基づいて皮膚透過パラメータを算出し、薬物の皮膚中での振舞いを角層と VED とに分けて考察した。その結果、角層中拡散係数は $\log K_{o/w}$ と水素結合ドナー数の複合関数と

して表現でき、脂溶性が高いほど拡散係数が大きくなることが明らかになった。一方で、VED 中拡散係数は、 $\log K_{o/w} < 2$ のときは一定値を示すが、 $\log K_{o/w} > 2$ のときは脂溶性増加に伴い拡散係数が低下することが示された。

角層は薬物の主たる透過障壁であることから、数多くの QSPR 解析が報告がされてきた。その一方で、角層の下に存在する VED における薬物透過性については、ほとんど研究されていない。本研究により、VED が角層とは異なる透過障壁機能を有することが示された。すなわち、角層が水溶性薬物の透過障壁として働くのに対し、VED は高脂溶性薬物の透過障壁として働くことが示された。ビタミン D₃ 誘導体は高脂溶性薬物であることから、VED の影響を受けやすいと思われる。その結果として、ビタミン D₃ 誘導体の脂溶性と皮膚中拡散係数との間に負の相関が生じたものと思われた。この脂溶性薬物に対する VED の透過障壁機能を利用することで、全身性副作用が軽減された外用剤の開発が可能になるであろう。

薬物の皮膚透過制御因子として、拡散係数のほかに、角層/基剤間分配係数および VED/角層分配係数が挙げられる。前者については本研究では評価対象外とし、後者については本研究の中で化合物物性との関連性を見出せなかった。いずれのパラメータも薬物皮膚透過性にとって重要な因子であることから、これらパラメータと物性との関連性が見出されることが期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 杉林堅次教授に感謝の意を表します。

さらに、論文校閲において適切なお助言を頂いた同大学薬学部 医薬品情報学講座 小林大介教授、ならびに同大学薬学部 毒性学教室 工藤なをみ准教授に御礼申し上げます。

最後に、本研究の実施にご協力戴いた中外製薬株式会社 前臨床研究部 満井哲也氏、森田圭一氏、麻生良典氏、臨床薬理部 大石哲久氏、塩川理絵氏、研究業務推進部 Ms. Frances Ford、旧薬物動態研究所 山本利憲氏、野見山有子氏をはじめとする関係諸氏に感謝申し上げます。

引用文献

- 1 深澤弘志, 影近弘之, 首藤紘一, 2006. レチノイドによる自己免疫疾患の治療. 日本臨床免疫学会会誌. 29(3): 114–126.
- 2 鈴木康夫, 2005. メトレキサート. 日本臨床. 63(5): 700–707.
- 3 田中良哉, 2005. 膠原病におけるシクロスポリン療法. 日本臨床. 63 (5): 240–246.
- 4 吉川邦彦, 1999. ビタミンと皮膚疾患. 日本臨床. 57 (10): 2385–2389.
- 5 Kubodera, N., 2006. Progress in research on vitamin D analogs. Clin. Calcium. 16: 1167–1172.
- 6 Lawson, D.E., Fraser, D.R., Kodicek, E., Morris, H.R., Williams, D.H., 1971. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism. Nature. 230: 228–230.
- 7 Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Kanno, K., Yamazaki, T., Yoshiki, S., Suda, T., 1981. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 4990–4994.
- 8 Miyaura, C., Abe, E., Kuribayashi, T., Tanaka, H., Kanno, K., Nishii Y., Suda, T., 1981. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ induces differentiation of human myeloid leukemia cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 937–943.
- 9 Cantley, L.K., Russell, J., Lettieri, D., Sherwood, L.M., 1985. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses parathyroid hormone secretion from bovine parathyroid cells in tissue culture. Endocrinology. 117: 2114–2119.
- 10 Takahashi, H., Ibe, M., Kinouchi, M., Ishida-Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Izuka, H., 2003. Similarly potent action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogues, tacalcitol, calcipotriol, and maxacalcitol on normal human keratinocyte proliferation and differentiation. J. Dermatol. Sci. 31, 21–28.
- 11 Brown, A.J., Ritter, C.R., Finch, J.L., Morrissey, J., Martin, K.J., Murayama, E., Nishii, Y., Slatopolsky, E., 1989. The noncalcemic analogue of vitamin D, 22-oxacalcitriol, suppresses parathyroid hormone synthesis and secretion. J. Clin. Invest. 84, 728–732.
- 12 Mortensen, J.T., Lichtenberg, J., Binderup, L., 1996. Toxicity of 1,25-dihydroxyvitamin D₃, tacalcitol, and calcipotriol after topical treatment. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 1, 60–63.
- 13 Kato, T., Rokugo, M., Terui, T., Tagami, H., 1986. Successful treatment of psoriasis with topical application of active vitamin D₃ analogue, 1 alpha,

- 24-dihydroxycholecalciferol. Br. J. Dermatol. 115, 431–433.
- 14 Kragballe, K., 1995. Calcipotriol: a new drug for topical psoriasis treatment. Pharmacol. Toxicol. 77, 241–246.
- 15 Barker, J.N.W.N., Ashton, R.E., Marks, R., 1999. Topical maxacalcitol for the treatment of psoriasis vulgaris: a placebo-controlled, double-blind, dose-finding study with active comparator. Br. J. Dermatol. 141, 274–278.
- 16 Potts, R.O., Guy, R.H., 1992. Predicting skin permeability. Pharm. Res. 9: 663–669.
- 17 Cronin, M.T.D., Dearden, J.C., Moss, G.P., Murray-Dickson, G., 1999. Investigation of the mechanism of flux across human skin *in vitro* by quantitative structure–permeability relationships. Eur. J. Pharm. Sci. 7: 325–330.
- 18 Pugh, W.J., Degim, I.T., Hadgraft, J., 2000. Epidermal permeability–penetrant structure relationships: 4, QSAR of permeant diffusion across human stratum corneum in terms of molecular weight, H-bonding and electronic charge. Int. J. Pharm. 197: 203–211.
- 19 Buchwald, P., Bodor, N., 2001. A simple, predictive structure-based skin permeability model. J. Pharm. Pharmacol. 53: 1087–1098.
- 20 Fujiwara, S., Yamashita, F., Hashida, M., 2003. QSAR analysis of interstudy variable skin permeability based on the “latent membrane permeability” concept. J. Pharm. Sci. 92: 1939–1946.
- 21 Geinoz, S., Guy, R.H., Testa, B., Carrupt, P-A., 2004. Quantitative structure–permeation relationships (QSPeRs) to predict skin permeation: A critical evaluation. Pharm. Res. 21: 83–92.
- 22 Yamaguchi, K., Mitsui, T., Yamamoto, T., Shiokawa, R., Nomiyama, Y., Ohishi, N., Aso, Y., Sugibayashi, K., 2006. Analysis of *in vitro* skin permeation of 22-oxacalcitriol having a complicated metabolic pathway. Pharm. Res. 23: 680–688.
- 23 Seki, T., Kawaguchi, T., Juni, K., 1990. Enhanced delivery of zidovudine through rat and human skin via ester prodrugs. Pharm. Res. 7: 948–952.
- 24 Ghosh, M.K., Mitra, A.K., 1990. Carboxylic ester hydrolase activity in hairless and athymic nude mouse skin. Pharm. Res. 7: 251–255.
- 25 Fort, J.J., Mitra, A.K., 1994. Effects of epidermal / dermal separation methods and ester chain configuration on the bioconversion of a homologous series of methotrexate dialkyl esters in dermal and epidermal homogenates of hairless mouse skin. Int. J. Pharm. 102: 241–247.

- 26 Mukhtar, H., Athar, M., Bickers, D.R., 1987. Cytochrome P-450 dependent metabolism of testosterone in rat skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 749–753.
- 27 Finnen, M.J., Herdman, M.L., Shuster, S., 1985. Distribution and sub-cellular localization of drug metabolizing enzymes in the skin. *Br. J. Dermatol.* 113: 713–721.
- 28 Yu, C.D., Fox, J.L., Ho, N.F.H., Higuchi, W.I., 1979. Physical model evaluation of topical prodrug delivery - simultaneous transport and bioconversion of vidarabine-5'-valerate I: physical model development. *J. Pharm. Sci.* 68: 1341–1346.
- 29 Liu, P., Higuchi, W.I., Ghanem, A-H., Kurihara-Bergstrom, T., Good, W.R., 1990. Quantitation of simultaneous diffusion and metabolism of β -estradiol in hairless mouse skin: Enzyme distribution and intrinsic diffusion / metabolism parameters. *Int. J. Pharm.* 64: 7–25.
- 30 Bando, H., Sahashi, M., Takagi, T., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M., 1996. Analysis of *in vitro* skin penetration of acyclovir prodrugs based on a diffusion model with a metabolic process. *Int. J. Pharm.* 135: 91–102.
- 31 Tojo, K., Yamada, K., Hikita, T., 1994. Diffusion and metabolism of prednisolone farnesylate in viable skin of the hairless mouse. *Pharm. Res.* 11: 393–397.
- 32 Steinsträsser, I., Sperb, R., Merkle, H.P., 1995. Physical model relating diffusional transport and concurrent metabolism of peptides in metabolically active cell sheet. *J. Pharm. Sci.* 84: 1332–1341.
- 33 Sato, K., Mine, T., 1996. Analysis of *in vitro* rat skin permeation and metabolism of SM-10902, prodrug of synthetic prostacyclin analogue. *Int. J. Pharm.* 135: 127–136.
- 34 Boderke, P., Schittkowski, K., Wolf, M., Merkle, H.P., 2000. Modeling of diffusion and concurrent metabolism in cutaneous tissue. *J. Theor. Biol.* 204: 393–407.
- 35 Sugibayashi, K., Hayashi, T., Morimoto, Y., 1999. Simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin after its topical application: the effect of enzyme distribution in skin. *J. Control. Rel.* 62: 201–208.
- 36 Abe, J., Morikawa, M., Miyamoto, K., Kaiho, S., Fukushima, M., Miyaura, C., Abe, E., Suda, T., Nishii, Y., 1987. Synthetic analogues of vitamin D₃ with an oxygen atom in the side chain skeleton. *FEBS letters.* 226: 58–62.

- 37 Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T., Uno, T., 1981. A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharmacobio-Dyn.* 4: 879–885.
- 38 Masuda, S., Byford, V., Kremer, R., Makin, H.L.J., Kubodera, N., Nishii, Y., Okazaki, A., Okano, T., Kobayashi, T., Jones, G., 1996. *In vitro* metabolism of the vitamin D analog, 22-oxacalcitriol, using cultured osteosarcoma, hepatoma, and keratinocyte cell lines. *J. Biol. Chem.* 271: 8700–8708.
- 39 Kao, J., Patterson, F.K., Hall, J., 1985. Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an *in vitro* study with benzo[*a*]pyrene and testosterone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 502–516.
- 40 Münster, U., Hammer, S., Blume-Peytavi, U., Schäfer-Korting, M., 2002. Testosterone metabolism in human skin cells *in vitro* and its interaction with estradiol and dutasteride. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16: 356–366.
- 41 Ademola, J.I., Chow, C.A., Wester, R.C., Maibach, H.I., 1993. Metabolism of propranolol during percutaneous absorption in human skin. *J. Pharm. Sci.* 82: 767–770.
- 42 Moody, R.P., Nadeau, B., 1993. An automated *in vitro* dermal absorption procedure: III. *In vivo* and *in vitro* comparison with the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide in mouse, rat, guinea pig, pig, human and tissue-cultured skin. *Toxicol. In Vitro.* 7: 167–176.
- 43 van de Sandt, J.J.M., Meuling, W.J.A., Elliott, G.R., Cnubben, N.H.P., Hakkert, B.C., 2000. Comparative *in vitro-in vivo* percutaneous absorption of the pesticide propoxur. *Toxicol. Sci.* 58: 15–22.
- 44 Payan, J.P., Boudry, I., Beydon, D., Fabry, J.P., Grandclaude, M.C., Ferrari, E., Andre, J.C., 2003. Toxicokinetics and metabolism of N-[¹⁴C]N-methyl-2-pyrrolidone in male Sprague-Dawley rats: *In vivo* and *in vitro* percutaneous absorption. *Drug Metab. Dispos.* 31: 659–669.
- 45 Hashida, M., Okano, H., Sezaki, H., 1988. Analysis of drug penetration through skin considering donor concentration decrease. *J. Pharmacobio-Dyn.* 11: 636–644.
- 46 Yamaguchi, K., Mitsui, T., Aso, Y., Sugibayashi, K., 2007. Analysis of *in vitro* skin permeation of 22-oxacalcitriol from ointments based on a two- or three-layer diffusion model considering diffusivity in a vehicle. *Int. J. Pharm.* 336: 310–318.
- 47 Hadgraft, J., Whitefield, M., Rosher, P.H., 2003. Skin penetration of topical formulations of ibuprofen 5%: An *in vitro* comparative study. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16: 137–142.
- 48 Özsoy, Y., Güngör, S., Cevher, E., 2004. Vehicle effects on *in vitro* release of

- tiaprofenic acid from different topical formulations. *IL Farmco*. 59: 563–566.
- 49 Wagner, H., Kostka, K-H., Adelhardt, W., Schaefer, U.F., 2004. Effects of various vehicles on the penetration of flufenamic acid into human skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 121–129.
- 50 Shah, V.P., Flynn, G.L., Yacobi, A., Maiback, H.I., Bon, C., Fleischer, N.M., Franz, T.J., Kaplan, S.A., Kawamoto, J., Lesko, L.J., Marty, J.-P., Pershing, L.K., Schaefer, H., Sequeira, J.A., Shrivastava, S.P., Wilkin, J., Williams, R.L., 1998. Bioequivalence of topical dermatological dosage forms – Methods of evaluation of bioequivalence. *Pharm. Res.* 15: 167–171.
- 51 Weigmann, H.-J., Lademann, J., Pelchrzim, R.V., Sterry, W., Hagemester, T., Molzahn, R., Schaefer, M., Lindscheib, M., Schaefer, H., Shah, V.P., 1999. Bioavailability of clobetasol propionate – Quantification of drug concentrations in the stratum corneum by dermatopharmacokinetics using tape stripping. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 12: 46–53.
- 52 Pershing, L.K., Bakhtian, S., Poncelet, C.E., Corlett, J.L., Shah, V.P., 2002. Comparison of skin stripping, in vitro release, and skin blanching response methods to measure dose response and similarity of triamcinolone acetonide cream strengths from two manufactured sources. *J. Pharm. Sci.* 91: 1312–1323.
- 53 Díez-Sales, O., Garrigues, T.M., Herráez, J.V., Belda, R., Martín-Villodre, A., Herráez, M., 2005. In vitro percutaneous penetration of acyclovir from solvent systems and carbopol 971-P hydrogels: Influence of propylene glycol. *J. Pharm. Sci.* 94: 1039–1047.
- 54 Cross, S.E., Magnusson, B.M., Winckle, G., Anissimov, Y., Roberts, M.S., 2003. Determination of the effect of lipophilicity on the in vitro permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers. *J. Invest. Dermatol.* 120: 759–764.
- 55 He, N., Li, S.K., Suhonen, T.M., Warner, K.S., Higuchi, W.I., 2003. Mechanistic study of alkyl azacycloheptanones as skin permeation enhancers by permeation and partition experiments with hairless mouse skin. *J. Pharm. Sci.* 92: 297–310.
- 56 Thomas, S., Narishetty, K., Panchagnula, R., 2004. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. *J. Control. Rel.* 95: 367–379.
- 57 Higuchi, T., 1961. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm. Sci.* 50: 874–874.
- 58 Higuchi, W.I., 1962. Analysis of data on the medicament release from ointments. *J. Pharm. Sci.* 51: 802–804.

- 59 Chen-Chow, P.-C., Frank, S.G., 1981. In vitro release of lidocaine from pluronic F-127 gels. *Int. J. Pharm.* 8: 89–99.
- 60 Upadrashta, S.M., Häglund, B.O., Sundelöf, L.-O., 1993. Diffusion and concentration profiles of drugs in gels. *J. Pharm. Sci.* 82: 1094–1098.
- 61 Lu, G., Jun, H.W., 1998. Diffusion studies of methotrexate in carbopol and poloxamer gels. *Int. J. Pharm.* 160: 1–9.
- 62 Okamoto, H., Yamashita, F., Saito, K., Hashida, M., 1989. Analysis of drug penetration through the skin by the two-layer skin model. *Pharm. Res.* 6: 931–937.
- 63 Sugibayashi, K., Hayashi, T., Hatanaka, T., Ogihara, M., Morimoto, Y., 1996. Analysis of simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin. *Pharm. Res.* 13: 855–860.
- 64 Kasting, G.B., 2001. Kinetics of finite dose absorption through skin 1. Vanilynonanamide. *J. Pharm. Sci.* 90: 202–212.
- 65 Guy, R.H., Hadgraft, J., 1980. A theoretical description relating skin penetration to the thickness of the applied medicament. *Int. J. Pharm.* 6: 321–332.
- 66 Ceschel, G.C., Maffei, P., Borgia, S.L., 2002. Correlation between the transdermal permeation of ketoprofen and its solubility in mixtures of a pH 6.5 phosphate buffer and various solvents. *Drug Delivery* 9: 39–45.
- 67 Ghanem, A-H., Mahmoud, H., Higuchi, W.I., Liu, P., Good, W.R., 1992. The effects of ethanol on the transport of lipophilic and polar permeants across hairless mouse skin: Methods / validation of a novel approach. *Int. J. Pharm.* 78: 137–156.
- 68 Yamaguchi, K., Morita, K., Mitsui, T., Aso, Y., Sugibayashi, K., 2008. Skin permeation and metabolism of a new vitamin D₃ analogue of structure 16-en-22-oxa-24-carboalkoxide with low calcemic effect. *Int. J. Pharm.* 353: 105–112.
- 69 Shimizu, K., Kawase, A., Haneishi, T., Kato, Y., Kinoshita, K., Ohmori, M., Furuta, Y., Emura, T., Kato, N., Mitsui, T., Yamaguchi, K., Morita, K., Sekiguchi, N., Sugita, A., Morikawa, K., 2006. Design and evaluation of new antipsoriatic antedrug candidates having 16-en-22-oxa-vitamin D₃ structures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 3323–3329.
- 70 Sugibayashi, K., Hayashi, T., Matsumoto, K., Hasegawa, T., 2004. Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin. *Drug Metab. Pharmacokin.* 19: 352–362.

- 71 Kano, S., Sugibayashi, K., 2006. Kinetic analysis on the skin disposition of cytotoxicity as an index of skin irritation produced by cetylpyridinium chloride: comparison of in vitro data using a three-dimensional cultured human skin model with in vivo results in hairless mice. *Pharm. Res.* 23: 329–335.
- 72 Tomida, M., Shirakawa, K., Masaki, K., Konishi, R., Esumi, Y., Ninomiya, S., Inaba, A., Mashiko, T., 1996. Metabolic fate of MC903 (2): Absorption, distribution, metabolism and excretion after single dermal application in rats. *Xenobio. Metabol. Dispos.* 11: 81–92.
- 73 Masuda, S., Strugnell, S., Calverley, M.J., Makin, H.L.J., Kremer, R., Jones, G., 1994. In vitro metabolism of the anti-psoriatic vitamin D analog, calcipotriol, in two cultured human keratinocyte models. *J. Biol. Chem.* 269: 4794–4803.
- 74 Magnusson, B.M., Cross, S.E., Winckle, G., Roberts, M.S., 2006. Percutaneous absorption of steroids: determination of in vitro permeability and tissue reservoir characteristics in human skin layers. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19: 336–342.
- 75 Roberts, M.S., Anderson, R.A., Swarbrick, J., 1977. Permeability of human epidermis to phenolic compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* 29: 677–683.
- 76 Cnubben, N.H.P., Elliott, G.R., Hakkert B.C., Meuling, W.J.A., van de Sandt, J.J.M., 2002. Comparative in vitro–in vivo percutaneous penetration of the fungicide ortho-phenylphenol. *Regul. Toxicol. Pharm.* 25: 198–208.
- 77 Yamaguchi, K., Mitsui, T., Aso, Y., Sugibayashi, K., 2008. Structure-permeability relationship analysis of the permeation barrier properties of the stratum corneum and viable epidermis/dermis of rat skin. *J. Pharm. Sci.* 97: 4391–4403.
- 78 Flynn, G.L., 1990. Physicochemical determinants of skin absorption. In: Gerrity, T.R., Henry, C.J. (Eds), *Principles of Route-to-Route Extrapolation for Risk Assessment*. Elsevier, New York, pp. 93–127.
- 79 Bonina, F.P., Carelli, V., Di Colo, G., Montenegro, L., Nannipieri, E., 1993. Vehicle effects on *in vitro* skin permeation of and stratum corneum for model drugs caffeine and testosterone. *Int. J. Pharm.* 100: 41–47.
- 80 Hadgraft, J., 2004. Skin deep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58: 291–299.
- 81 Mitragotri, S., 2003. Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J. Control. Rel.* 86: 69–92.
- 82 Lee, C.K., Uchida, T., Kitagawa, K., Yagi, A., Kim, N.S., Goto, S., 1994. Skin permeability of various drugs with different lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* 83: 562–565.

- 83 Kim, M.K., Lee, C.H., Kim, D.D., 2000. Skin permeation of testosterone and its derivatives in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 369–375.
- 84 Diez, I., Colom, H., Moreno, J., Obach, R., Peraire, C., Domenech, J., 1991. A comparative *in vitro* study of transdermal absorption of a series of calcium channel antagonists. *J. Pharm. Sci.* 80: 931–934.
- 85 Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., 1986. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VI: preparation of the barrier layer. *J. Pharm. Sci.* 75: 487–491.

