

皮膚外用剤からの薬物の皮膚透過性に影響を
及ぼす種々因子および適用方法に関する研究

石井 宏

目次

| | |
|--|----|
| 記号と略語 | 1 |
| 緒言 | 2 |
| 第1編 皮膚外用剤からのステロイドの皮膚透過性とその影響因子の関係 | 5 |
| 第1章 水溶液からのトリアムシノロンアセトニドの種々膜透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響 | 5 |
| 第1節 実験方法 | 6 |
| 1. 実験材料 | 6 |
| 2. 実験動物 | 7 |
| 3. トリアムシノロンアセトニド水溶液および懸濁液の調製 | 7 |
| 4. <i>In vitro</i> 種々膜透過実験法 | 8 |
| 5. トリアムシノロンアセトニドの測定法 | 9 |
| 6. ヘアレスラット皮膚表面の走査型電子顕微鏡観察 | 10 |
| 7. 統計解析 | 10 |
| 第2節 理論 | 11 |
| 1. 薬物の基剤中の熱力学的活量 | 11 |
| 2. Fickの拡散則に従う1層膜モデル透過挙動の解析 | 12 |
| 3. Fickの拡散則に従う2層膜モデル透過挙動の解析 | 14 |
| 第3節 結果 | 18 |
| 1. 水溶液からのトリアムシノロンアセトニドのシリコーン膜透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響 | 18 |
| 2. 水溶液からのトリアムシノロンアセトニドのヘアレスラット皮膚透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響 | 20 |
| 3. 水溶液からのトリアムシノロンアセトニドの三次元培養ヒト皮膚モデルLSE-high透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響 | 24 |
| 4. トリアムシノロンアセトニド懸濁液適用後のヘアレスラット皮膚表面の走査型電子顕微鏡観察 | 27 |
| 第4節 考察 | 28 |
| 第5節 小括 | 30 |

| | | |
|-----|---|----|
| 第2章 | 白色ワセリン軟膏からのトリアムシノロンアセトニドの皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みおよび皮脂成分の影響 | 31 |
| 第1節 | 実験方法 | 31 |
| 1. | 実験材料 | 31 |
| 2. | 実験動物 | 32 |
| 3. | トリアムシノロンアセトニド含有白色ワセリン軟膏の調製 | 32 |
| 4. | <i>In vitro</i> ヘアレスラット皮膚透過実験法 | 33 |
| 5. | 軟膏の皮膚擦り込み処理法 | 33 |
| 6. | トリアムシノロンアセトニドの測定法 | 34 |
| 7. | <i>In vitro</i> ヘアレスラット皮膚インピーダンスの測定法 | 34 |
| 8. | 皮脂成分の分離定性および半定量的測定法 | 35 |
| 9. | 白色ワセリン軟膏中のトリアムシノロンアセトニド溶解度の測定法 | 36 |
| 10. | 統計解析 | 36 |
| 第2節 | Fickの拡散則に従う1層膜および2層膜モデル透過挙動の解析 | 37 |
| 第3節 | 結果 | 37 |
| 1. | 白色ワセリン軟膏からのトリアムシノロンアセトニドの皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みの影響 | 37 |
| 2. | ヘアレスラット皮膚に適用した白色ワセリンに含まれる皮脂成分の分離定性と半定量的解析 | 40 |
| 3. | 白色ワセリン軟膏中のトリアムシノロンアセトニド溶解度に及ぼす皮脂成分の影響 | 41 |
| 4. | 白色ワセリン軟膏からのトリアムシノロンアセトニドの皮膚透過性に及ぼす皮脂成分の影響 | 43 |
| 第4節 | 考察 | 45 |
| 第5節 | 小括 | 48 |
| 第2編 | 白色ワセリン軟膏からの親水性薬物 FYK-1388b の放出性および皮膚透過性と皮脂成分の関係 | 49 |
| 第1節 | 実験方法 | 50 |
| 1. | 実験材料 | 50 |
| 2. | 実験動物 | 51 |
| 3. | FYK-1388b 含有水溶液および白色ワセリン軟膏の調製 | 51 |
| 4. | <i>In vitro</i> 薬物放出実験法 | 51 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5. | <i>In vitro</i> ヘアレスラット皮膚透過実験法 | 52 |
| 6. | FYK-1388b の測定法 | 53 |
| 7. | 統計解析 | 54 |
| 第2節 | 結果 | 54 |
| 1. | 水溶液からの FYK-1388b の皮膚透過性 | 54 |
| 2. | 白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性および皮膚透過性 | 56 |
| 3. | 白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性および皮膚透過性に及ぼす皮脂成分の影響 | 61 |
| 第3節 | 考察 | 63 |
| 第4節 | 小括 | 65 |
| 第3編 | イオントフォレシスを用いたステロイドの直接的経皮気管デリバリーの可能性 | 66 |
| 第1節 | 実験方法 | 68 |
| 1. | 実験材料 | 68 |
| 2. | 実験動物 | 68 |
| 3. | <i>In vivo</i> ヘアレスラット腹部及び頸部皮膚適用実験法 | 69 |
| 4. | <i>In vivo</i> ヘアレスラット頸部皮膚適用後の気管表面の蛍光顕微鏡観察 | 71 |
| 5. | <i>In vitro</i> ヘアレスラット腹部皮膚透過実験法 | 71 |
| 6. | コハク酸プレドニゾロンおよびプレドニゾロンの測定法 | 72 |
| 7. | 統計解析 | 73 |
| 第2節 | 結果 | 73 |
| 1. | イオントフォレシスを用いたフルオレセインの直接的経皮気管デリバリー | 73 |
| 2. | イオントフォレシスを用いたコハク酸プレドニゾロンおよびプレドニゾロンの皮膚透過性 | 76 |
| 3. | イオントフォレシスを用いたコハク酸プレドニゾロンおよびプレドニゾロンの直接的経皮気管デリバリー | 78 |
| 第3節 | 考察 | 80 |
| 第4節 | 小括 | 83 |
| | 結論 | 84 |
| | 謝辞 | 90 |

引用文献 91

略語と記号

| | | | |
|-----------|--|---------------|-----------------------------------|
| | 略語 | $Flux_{ss}$ | 定常状態時の薬物皮膚透過速度 |
| DSC | Differential Scanning Calorimetry | $Flux_{full}$ | 定常状態時の薬物 full-thickness skin 透過速度 |
| FL-Na | Sodium Fluorescein | | |
| FYK-1388b | N1-[2-(4-Guanidinophenyl)-1(S)-(N-methylcarbamoyl)ethyl]-N4-hydroxy-2(R)-iso-butyl-3(S)-(3-phenyl propyl)succinamide hydrochloride | $Flux_{sil}$ | 定常状態時の薬物シリコーン膜透過速度 |
| | | $Flux_{st}$ | 定常状態時の薬物 stripped skin 透過速度 |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography | $K_{o/w}$ | n -オクタノール／水分配係数 |
| | | K_s | 基剤 - 皮膚間分配係数 |
| $i.p.$ | Intraperitoneal administration | K_{sc} | 基剤 - 角層間分配係数 |
| IP | Iontophoresis | K_{sil} | 基剤 - シリコーン膜間分配係数 |
| LC/MS | Liquid Chromatography/Mass Spectrometry | K_{ved} | 基剤 - 生きた表皮・真皮間分配係数 |
| | | L_s | 皮膚バリアの厚み |
| LSE-high | Living Skin Equivalent-high | L_{sc} | 角層の厚み |
| NHFC | Non-hydroxy Fatty Acid Ceramide | L_{sil} | シリコーン膜の厚み |
| P | Prednisolone | L_{ved} | 生きた表皮・真皮の厚み |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | P_s | 皮膚透過係数 |
| PS-Na | Prednisolone Sodium Succinate | P_{sc} | 角層透過係数 |
| SEM | Scanning Electron Microscope | P_{sil} | シリコーン膜透過係数 |
| TA | Triamcinolone Acetonide | P_{ved} | 生きた表皮・真皮透過係数 |
| 記号 | | Q | 累積薬物透過量 |
| A_v | 熱力学的活量 | Q_v | 軟膏基剤からの薬物放出量 |
| A_v' | 熱力学的活量のモル分率比 | γ_v | 基剤中薬物活量係数 |
| C_0 | 基剤中薬物初濃度 | γ_s | 皮膚中薬物活量係数 |
| C_v | 基剤中薬物濃度 | SP | 溶解度パラメータ |
| C_{vss} | 基剤中薬物飽和溶解度 | | |
| C_{sc} | 角層中薬物濃度 | | |
| C_{sil} | シリコーン膜中薬物濃度 | | |
| C_{ved} | 生きた表皮・真皮中薬物濃度 | | |
| D_v | 基剤中薬物拡散係数 | | |
| D_s | 皮膚中薬物拡散係数 | | |
| D_{sc} | 角層中拡散係数 | | |
| D_{sil} | シリコーン膜中拡散係数 | | |
| D_{ved} | 生きた表皮・真皮中拡散係数 | | |

緒言

皮膚に適用する医薬品には、全身循環系に移行して作用を発揮する経皮吸収型製剤と皮膚局所に作用するいわゆる局所作用型外用剤があるが、これらは共に剤形的には、ローションなどの液剤、軟膏、クリーム、ゲルなどの半固形製剤、さらにはパップやテープなどの貼付型製剤が用いられる^{1,2)}。経皮吸収型製剤は例えば狭心症などの心疾患治療³⁾に、局所作用型外用剤は例えばアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患治療に繁用されている。これらの製剤を用いる利点には、投与の簡便さ、局所もしくは血中薬物濃度の維持、そして初回通過効果の回避などが挙げられる⁴⁾。しかし、ほとんどの薬物の皮膚透過性は皮膚最外層にある角層の高い透過バリア能に大きく依存することが知られている⁵⁾。そこで、吸収促進剤や薬物のプロドラック化などによる化学的促進法や電気のエネルギーを利用したイオントフォレシスやエレクトロポレーション、超音波を利用したソノフォレシス、そして微小針のマイクロニードルなどによる物理的促進法を使用して薬物の皮膚透過性もしくは局所部位および全身循環への薬物移行性を高めることが、薬理効果を得るために有効と考えられている^{4,6)}。

皮膚局所における薬理効果は対象薬物の皮膚透過性や皮膚中濃度と密接に関係している。そのため、皮膚透過パラメータである薬物の外用基剤から皮膚への分配性と皮膚中での拡散性の評価が重要となる⁷⁻⁹⁾。これら2つの透過パラメータに影響を及ぼす要因として、薬物の外用基剤中の熱力学的活量やその存在状態（溶解または懸濁状態）、外用剤適用部位の皮膚バリア状態などが考えられる。また、皮膚外用剤の適用方法も薬物の皮膚透過性に影響を及ぼす可能性がある。つまり、貼付型製剤であるパップ剤やテープ剤などは皮膚表面に貼付するが、半固形製剤である軟膏剤やクリーム剤などは皮膚表面に適用後、指で擦

り込む。したがって、軟膏剤などの適用時では皮膚擦り込みの有無によって薬物の皮膚透過性が変化する可能性が考えられる。また、Chengらは親油性薬物であるリドカインを含有した感圧粘着テープ製剤をヘアレスラット皮膚に適用すると、テープ表面に存在する薬物結晶が皮脂によって溶解することを報告している¹⁰⁾。すなわち、軟膏剤などを皮膚表面に適用することにより、軟膏剤中に皮膚表面に存在する皮脂成分が混ざり、軟膏基剤中の薬物の溶解性や皮膚透過性に影響を及ぼす可能性も考えられる。

皮膚疾患に用いる軟膏剤の基剤としては、皮膚刺激性の少ない白色ワセリン¹¹⁾が繁用されている。白色ワセリン(構成: C_nH_{2n+2} 、密度: 0.9 g/cm^3 、沸点: $302\text{ }^\circ\text{C}$ 、融点: $36 - 60\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $K_{o/w} : 1.0 \times 10^6$ (精製水に不溶))はその内部がほぼミセル様構造を保持する液体炭化水素から成る非直鎖固体炭化水素のコロイド系の非結晶鉱物性軟膏基剤であり、光や湿度に対して安定である¹²⁾。白色ワセリンは高い親油性を示すため、主薬にステロイドのような親油性薬物を含有することが多いが、親水性薬物を含有する場合もある。これまでに軟膏からの薬物の放出性や皮膚透過性などに関する数多くの研究¹³⁻¹⁵⁾があるにもかかわらず、これらに対する上述の皮膚表面への適用方法の影響など、白色ワセリン軟膏からのステロイドや親水性薬物の放出性や皮膚透過性に関する系統だった詳細な研究は少なく、また、未だ不明な点も多い。

さらに、ステロイドはアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患の治療薬としてだけでなく、呼吸器疾患の治療薬としても繁用されている。呼吸器疾患の一つである気管支喘息は気道の慢性炎症とその結果生じる気道収縮や気道過敏性亢進で引き起こされ、その持続により気道の平滑筋肥大、粘液腺過形成、血管増殖そして基底膜肥厚などのリモデリングが生じる^{16,17)}。現在、気管支喘息や咳喘息などの症状を長期的にかつ良好にコントロールして非可逆的なリモデリングを

予防する第一選択治療薬として吸入ステロイド剤が使用されている¹⁷⁻¹⁹⁾。しかしながら、吸入ステロイド剤の使用によって起こる局所副作用、すなわち嚔声、口内炎などにより、その使用が困難な場合もしばしば見られる²⁰⁾。また、気管支喘息や咳喘息に見られる気道炎症は気管支 (bronchial inflammation) のみに焦点が当てられてきたが、気管 (tracheal inflammation) にも炎症が及んでいることが報告されている^{21,22)}。したがって、吸入ステロイド剤を使用してもステロイドが気管に留まらず、十分な効果を得られない場合もある。そこで、咽喉から気管に至る比較的近い組織間距離から、血管系へのクリアランスを回避できれば、皮膚を介した直接的な気管へのステロイドの送達が可能であることが考えられた。

これらの多様な背景を勘案し、本研究では、外用基剤としては白色ワセリンを、薬物としてはステロイドを研究の中心として、皮膚外用剤からの薬物の皮膚透過性に影響を及ぼす種々因子や適用方法について検討することとした。すなわち、第 1 編では皮膚外用剤からのステロイドの皮膚透過性とその影響因子の関係について第 1 章と第 2 章に分けて検討した。まず、第 1 章では水溶液からのステロイドであるトリアムシノロンアセトニドの種々膜透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響について検討し、第 2 章では白色ワセリン軟膏からのトリアムシノロンアセトニドの皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みおよび皮脂成分の影響について検討した。第 2 編では白色ワセリン軟膏からの親水性薬物の放出性および皮膚透過性と皮脂成分の関係について検討した。第 3 編では気管の炎症部位をターゲットとした新たな薬物投与経路として、イオントフォレシスを用いたステロイドの直接的経皮気管デリバリーの可能性について検討した。以下、得られた結果について論述する。

第 1 編 皮膚外用剤からのステロイドの皮膚透過性とその影響因子の関係

第 1 章 水溶液からのトリアムシノロンアセトニドの種々膜透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響²³⁾

ステロイド外用剤の臨床研究は 1952 年に Goldman らによって酢酸コルチゾン
を皮膚疾患に使用したことから本格的に始まり、これまでに多くの薬理・治療
効果²⁴⁻³⁰⁾、さらに皮内動態に関する研究^{30,31)}が行われてきた。ステロイド外用
剤の局所薬理効果は皮膚適用部位中のステロイド濃度に関係しており、Dumas
と Scholtz は乾癬の治療効果はステロイドの皮膚局所濃度に依存することを報告
している³²⁾。また、ステロイドなどの薬物の皮膚中濃度は皮膚透過性と密接に
関係しており、透過パラメータから算出した皮膚中濃度（予測値）は実験的に
求めた皮膚中濃度（実測値）よりも役立つこともある³³⁾。したがって、薬物の
皮膚透過性に及ぼす種々因子の影響を明らかにすることは薬物治療の最適化に
あたり非常に重要となる。そこで第 1 章では、ステロイドの種々透過性に及ぼ
す基剤中の熱力学的活量や薬物存在状態（溶解もしくは懸濁状態）の影響につ
いて評価した。

薬物の基剤中熱力学的活量は薬物の基剤中濃度に比例して上昇し、飽和溶解
濃度以上で一定となる³⁴⁾。また、定常状態時の薬物皮膚透過速度 ($Flux_{ss}$) も薬
物の基剤中濃度に対して同様な挙動を示す¹³⁾。したがって、 $Flux_{ss}$ と基剤中熱力
学的活量は比例関係となる。ここで、熱力学的活量（熱力学的活動度）とは、
基剤からの薬物の逃散傾向や逸散能を表している^{13,34)}。薬物の皮膚透過はその

薬物の熱力学的活量が高い系から低い系に、活量の差によって生じる³⁵⁾。したがって、薬物の熱力学的活量を考慮して外用製剤³⁶⁻³⁸⁾および化粧品^{39,40)}を設計することは重要であると考えられる。これまで、基剤中に薬物が懸濁している場合、 $Flux_{ss}$ は熱力学的活量に比例して一定となり、その薬物存在状態はあまり影響しないと考えられてきた。しかし、これらのことについて検討した研究はあまり知られていない。

本研究では、モデル薬物としてステロイドランク⁴¹⁾ **medium** のトリアムシノロンアセトニド (TA) を選択し、シリコーン膜、ヘアレスラット皮膚そして3次元培養ヒト皮膚モデル LSE-high を介する TA の膜透過性を1層膜または2層膜モデルに近似して Fick の拡散第2法則に従う差分法を用いて評価した。なお、本章では、薬物の基剤中の熱力学的活量や存在状態の影響について考察しやすくするため、外用基剤として精製水を選択した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

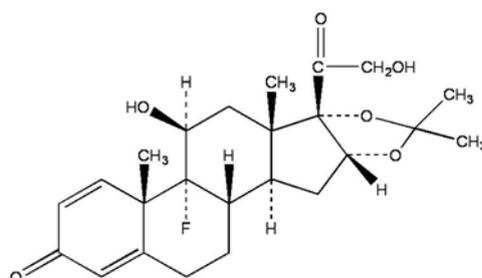
トリアムシノロンアセトニド (TA) は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した (Fig. 1)。その他の試薬および溶媒は市販の特級もしくは HPLC 用のものを精製せずそのまま使用した。シリコーン膜 (LTC-S1-75、厚さ ; 75 μm) はリンテック株式会社 (東京) から供与された。3次元培養ヒト皮膚モデル Living skin equivalent-high (LSE-high、TMLSE-003) は東洋紡績株式会社 (大阪) から購入した。

2. 実験動物

雄性ヘアレスラット (WBM/ILA-Ht、8-9 週齢、体重: 230-260 g) は城西大学生命科学研究センター (坂戸、埼玉) もしくは石川実験動物研究所 (深谷、埼玉) から購入した。すべての動物飼育および実験は城西大学動物実験規定に従って行った。

3. トリアムシノロンアセトニド水溶液および懸濁液の調製

TA 水溶液 (5 および 10 $\mu\text{g/mL}$, pH 6.3) そして TA 懸濁液 (30 および 1000 $\mu\text{g/mL}$, pH 6.5) は精製水にそれぞれの濃度になるように TA を加えて調製した。また、TA 飽和水溶液 (22.05 $\mu\text{g/mL}$ (22 $\mu\text{g/mL}$ と記載)、pH; 6.4) は、32 $^{\circ}\text{C}$ の恒温槽中で一晩攪拌した TA 懸濁液 (1000 $\mu\text{g/mL}$) をシリンジ用濾過フィルター (DISMIC[®]-13HP 0.20 μm 、東洋濾紙 (株)、東京) を用いて調製した。



| | |
|-------------------------------------|--|
| Molecular weight | 434.5 |
| Melting point | 290 $^{\circ}\text{C}$ |
| $\log K_{o/w}$ | 2.53 |
| Solubility (32 $^{\circ}\text{C}$) | water: 22.05 \pm 0.05 $\mu\text{g/mL}$ |
| Solubility parameter ⁴²⁾ | 19.3 (J/cm^3) ^{1/2} |
| Solid diameter | About 1-10 μm |

Fig. 1 Chemical structure and physicochemical properties of triamcinolone acetonide.

4. *In vitro* 種々膜透過実験法

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下の雄性ヘアレスラットを背位固定して、角層を傷つけないように腹部皮膚を剃毛した。その後、腹部皮膚を摘出し、余分な脂肪を取り除いた。摘出後処理したヘアレスラット腹部皮膚 (full-thickness skin または stripped skin)、3次元培養ヒト皮膚モデル LSE-high (LSE-high または stripped LSE-high) またはシリコーン膜を有効透過面積 0.95 cm² の横型拡散セルに装着した。ヘアレスラット stripped skin は角層をセロテープ[®] (ニチバン株式会社、東京) で 20 回除去した皮膚とした⁴³⁾。また、stripped LSE-high はピンセットを用いて LSE-high から角層を除去した⁴⁴⁾。ドナー側 (表皮側) に種々 TA 水溶液または懸濁液 3.0 mL を、レシーバー側 (真皮側) に pH 7.4 リン酸緩衝液 (PBS) 3.0 mL を適用した。横型拡散セル内は 32 °C に保ち、スターラーで攪拌した (Fig. 2)。経時的に真皮側セルから 600 µL をサンプリングした後、一定量を保つために新しい PBS を同量戻した。さらに、ヘアレスラット皮膚中濃度を測定するために、透過実験終了後の皮膚をセルから取り外し、皮膚表面の角層を剥がさないように注意しながら皮膚表面をエタノール (99.5%) で数回拭き取った後に直ちに PBS でよく洗い流して、-20 °C で冷凍保存した。なお、皮膚表面拭き取り方法は予備検討より皮膚中濃度に対して影響を及ぼさないことを確認している。冷凍保存した皮膚サンプルはハサミで細かく刻み、PBS 5.0 mL を加えて氷冷下ホモジナイズした。調製したホモジネート液中の TA 濃度を測定した。

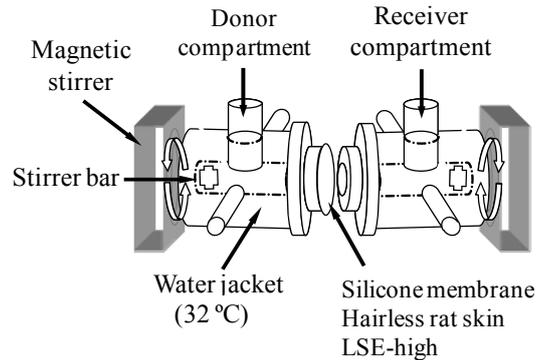


Fig. 2 Experimental set-up for *in vitro* skin permeation study using side-by-side (horizontal) diffusion cell.

5. トリアムシノロンアセトニドの測定法

種々膜透過実験のレシーバーサンプルまたは皮膚ホモジネート液それぞれ 600 μL に内部標準物質 (HPLC : 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4-ヒドロキシ安息香酸メチル/クロロホルム、LC/MS : 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ プレドニゾロン/クロロホルム) を同容量を加えて、攪拌・遠心分離 (18,000 $\times g$ 、5 min、4 $^{\circ}\text{C}$) した。得たクロロホルム相 500 μL を窒素乾固し、精製水 : アセトニトリル (65:35) 溶液 50 μL で再調製して HPLC もしくは LC/MS に 20 μL を注入した。HPLC システムはポンプ (LC-20AS ; 島津製作所株式会社、京都)、カラム (CAPCELL PAK C18 UG120 5 μm , 4.6 \times 250 mm ; 株式会社資生堂、東京)、オートインジェクター (SIL-20A ; 島津製作所)、UV 検出器 (SPD-20A ; 島津製作所)、そして解析システム (LC solution ; 島津製作所) から成り、移動相は精製水 : アセトニトリル (65 : 35)、流速は 1.0 mL/min、UV 波長は 240 nm とした。

一方、LC/MS システムは、イオントラップ型タンデム質量分析装置 (LCQ DECA XP plus ; サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社、神奈川)、ポンプ (Paradigm MS4 ; AMR、東京)、オートインジェクター (CTC HTS-PAL ; AMR)、カラム (Hypersil Gold 3 μm , 2.1 \times 50 mm ; サーマフィッシャーサイエン

ティフィック) から成り、移動相は A : B 溶液 (65 : 35) (A ; アセトニトリル : 精製水 : ギ酸 = 90 : 10 : 0.1、B ; アセトニトリル : 精製水 : ギ酸 = 2 : 98 : 0.1)、流速 0.2 mL/min とし、ポジティブイオンモードで検出した。

6. ヘアレスラット皮膚表面の走査型電子顕微鏡観察

摘出したヘアレスラット皮膚 (full-thickness skin) 表面に TA 懸濁液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を適用後、直ちにキムワイブ[®] (日本製紙クレシア株式会社、東京) で皮膚表面の水分を吸い取った。次に、皮膚を台座に固定した後に皮膚表面に金蒸着 (Ion sputter、E-1010 ; 株式会社日立製作所、東京) を行い、走査型電子顕微鏡 (SEM、S-3000N ; 日立製作所) で皮膚表面を観察した。

7. 統計解析

種々膜透過実験から得られたデータは、4 から 12 例数の平均 \pm 標準誤差 (S.E.) により表記した。

第2節 理論

1. 薬物の基剤中の熱力学的活量

定常状態時の薬物皮膚透過速度 ($Flux_{ss}$) は薬物の基剤中熱力学的活量 A_v を用いて次のように表すことができる³⁴⁾。

$$Flux_{ss} = \frac{K_s \cdot C_0 \cdot D_s}{L_s} = \frac{\gamma_v \cdot C_0 \cdot D_s}{\gamma_s \cdot L_s} = \frac{A_v \cdot D_s}{\gamma_s \cdot L_s} \quad (1)$$

ここで、 K_s は基剤 - 皮膚間薬物分配係数、 C_0 は基剤中薬物初濃度、 D_s は皮膚中薬物拡散係数、 L_s は皮膚バリアの厚み、 γ_v は基剤中の薬物活量係数、 γ_s は皮膚中の薬物活量係数を表す。(1) 式は Fick の拡散第 1 法則である。また、 $Flux_{ss}$ は化学ポテンシャル μ に比例するので、以下に示される Nernst-Planck 式で置き換えることができる。なお、化学ポテンシャルとは熱力学で用いられるエネルギー量であり、モル当たりのギブズエネルギーを意味している。

$$Flux_{ss} = C_0 u \frac{d\mu}{dx} \quad (2)$$

ここで x は膜の厚み、 u は薬物移動度 (drug mobility) で、皮膚透過係数 $P_s (= K_s \cdot D_s / L_s)$ と薬物を膜移動させるための駆動力 f を結ぶ比例定数である ($P_s = uf$)³⁶⁾。なお、Nernst-Planck 式は Fick の式と等価である。 μ は等温、等圧下で、かつ薬物が荷電していない場合、次式のようになる。

$$\mu = \mu^0 + RT \ln X \quad (3)$$

ここで、 μ^0 は標準化学ポテンシャル、 R は気体定数、 T は絶対温度、 X は基剤中薬物のモル分率を示す。薬物が固体 (たとえば粉末、結晶、厳密には過冷却液体) の状態で基剤や溶媒がまわりに存在しない場合、モル分率 X は 1.0 となる。したがって、この場合の化学ポテンシャル μ_{solid} は μ^0 に等しくなる。これに対して、基剤や溶媒中に薬物が存在する場合の化学ポテンシャル μ_{liquid} は、

$$\mu_{liquid} = \mu^0 + RT \ln A_v' \quad (4)$$

と表すことができる。 A_v' は A_v と同じく基剤中の活量であるが、 A_v をモル分率で示したものである。製剤として懸濁液を用いた場合、 $A_v' = 1.0$ とすると、 $\mu_{liquid} = \mu_{solid} = \mu^0$ となる。また、薬物が基剤中に溶解している場合は、 $A_v' < 1.0$ となり、基剤中に溶解状態にある薬物の化学ポテンシャル (μ_{liquid}) は懸濁液中の化学ポテンシャル (μ_{solid}) よりも小さくなる。一定温度下では、薬物が決まると μ^0 が決まるので、 $Flux_{ss}$ は A_v' のみの関数として扱うことができる。同一結晶を含む懸濁液を用いれば、 A_v' はすべての基剤で 1.0 であり、T. Higuchi が示したように、基剤をいくら変えても理論的には皮膚透過速度は変わらない¹³⁾。

2. Fick の拡散則に従う 1 層膜モデル透過挙動の解析

外用基剤からの TA 膜透過挙動を解析するために、Fick の拡散第 2 法則に従うと考え、差分法^{45,46)}を用いて解析を行った。シリコーン膜、生きた表皮・真皮からなるヘアレスラット *stripped skin* および *stripped LSE-high* を 1 層膜モデルとして仮定した。また、本実験ではドナー側を無限用量系で行い、かつレシーバー側はシンク条件が成立している。Fig. 3a に 1 層膜モデルの模式図を示す。皮膚中の位置を表す x そして時間 t での生きた表皮・真皮中薬物濃度 C_{ved} (シリコーン膜中薬物濃度は C_{sil} とする) は、Fick の拡散第 2 法則により以下のように示される。

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (5)$$

ここで、 D_{ved} は生きた表皮・真皮中の薬物拡散係数 (シリコーン膜の薬物拡散係数は D_{sil} とする) を表す。

初期条件および境界条件を以下のように仮定した。

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

$$t > 0 \quad x = 0 \quad C_{ved} = K_{ved} \cdot C_v$$

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

ここで、 L_{ved} は生きた表皮・真皮バリアの厚み（シリコーン膜の厚みは L_{sil} とする）、 K_{ved} は基剤 - 生きた表皮・真皮間薬物分配係数（基剤 - シリコーン膜間薬物分配係数は K_{sil} とする）、そして C_v は基剤中薬物濃度である。 C_{ved} は初期条件と境界条件から Fick の拡散第 2 法則に従うので、差分法を用いて計算できる。さらにレシーバー側への薬物の stripped skin 透過速度 $Flux_{st}$ （シリコーン膜透過速度は $Flux_{sil}$ とする）は (6) 式より表すことができる。また、単位面積当たりの stripped skin 累積透過量 Q_{st} （シリコーン膜累積透過量は Q_{sil} とする）は (7) 式で表すことができる。

$$Flux_{st} = -D_{ved} \left(\frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (6)$$

$$Q_{st} = -D_{ved} \int_0^t \left(\frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (7)$$

また、(5) 式は次式に変換することができる。

$$\frac{dC_{ved,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (8)$$

$$\frac{d^2 C_{ved,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (9)$$

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

(8) 式と (9) 式を (5) 式に代入すると次式が得られる。

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved} C_{ved,i-1,j} + (1 - 2rD_{ved}) C_{ved,i,j} + rD_{ved} C_{ved,i+1,j} \quad (10)$$

ここで、 r は $\Delta t / \Delta x^2$ を表す。差分式を使うと (6) 式と (7) 式はそれぞれ (11)

式と (12) 式になる。

$$Flux_{st,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,n+1,j} - C_{ved,n,j}}{\Delta x} \quad (11)$$

$$Q_{st,j} = Q_{st,j-1} + J_{st,j} \cdot \Delta t \quad (12)$$

n を皮膚 (膜) の区分数とした。そこで、 $Flux_{st,j}$ は $n=10$ にセットして Microsoft[®] Excel を用いて計算した。なお、この計算では、 Δt は $D_{ved} \Delta t / \Delta x^2$ に対して 0.5 未満になるようにセットした (0.5 以上を設定すると解は発散する)。 $Q_{st,j}$ は (12) 式を使って $Flux_{st,j}$ から計算した。 D_{ved} と K_{ved} は非線形最小二乗法を使って透過実験データにカーブフィッティングして得られた。なお、最小二乗法は Microsoft[®] Excel Solver を使って行った。計算条件は制限時間 100 s、反復回数 100 回、精度 0.000001、基本公差 5%、収束 0.0001 とした。Pseudo-Newtonian method をアルゴリズムとして用いた。

3. Fick の拡散則に従う 2 層膜モデル透過挙動の解析

次に、ヘアレスラット full-thickness skin もしくは LSE-high を角層と生きた表皮・真皮からなる 2 層膜モデルとして仮定した。Fig. 3b に 2 層膜モデルの模式図を示す。角層中薬物濃度 C_{sc} と生きた表皮・真皮中薬物濃度 C_{ved} は式 (13) と (5) で表される。

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (13)$$

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (5)$$

ここで、 D_{sc} は角層中の薬物拡散係数を表す。初期条件および境界条件は以下のように仮定した。

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

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

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

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

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

ここで、 L_{sc} は角層バリアの厚み、 K_{sc} は基剤 - 角層間薬物分配係数そして $K_{ved/sc}$ は角層 - 生きた表皮・真皮間薬物分配係数である。 C_{sc} と C_{ved} は初期条件と境界条件から Fick の拡散第 2 法則に従って変化すると考えて、差分法を用いて計算できる。レシーバー側への Full-thickness skin 透過速度 $Flux_{full}$ は (14) 式より、単位面積当たりの full-thickness skin 累積透過量 Q_{full} は (15) 式で表すことができる。

$$Flux_{full} = -D_{ved} \left(\frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (14)$$

$$Q_{full} = -D_{ved} \int_0^t \left(\frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (15)$$

また、(13) 式は (16) と (17) 式に、(5) 式は (8) と (9) 式に変換することができる。

$$\frac{dC_{sc,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{sc,i,j+1} - C_{sc,i,j}) \quad (16)$$

$$\frac{d^2 C_{sc,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{sc,i-1,j} - 2C_{sc,i,j} + C_{sc,i+1,j}) \quad (17)$$

$$\frac{dC_{ved,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (8)$$

$$\frac{d^2 C_{ved,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (9)$$

(16) と (17) を (13) 式に、(8) 式と (9) 式を (5) 式に代入すると (18) 式と (10) 式が得られる。

$$C_{sc,i,j+1} = rD_{sc}C_{sc,i-1,j} + (1-2rD_{sc})C_{sc,i,j} + rD_{sc}C_{sc,i+1,j} \quad (18)$$

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved}C_{ved,i-1,j} + (1-2rD_{ved})C_{ved,i,j} + rD_{ved}C_{ved,i+1,j} \quad (19)$$

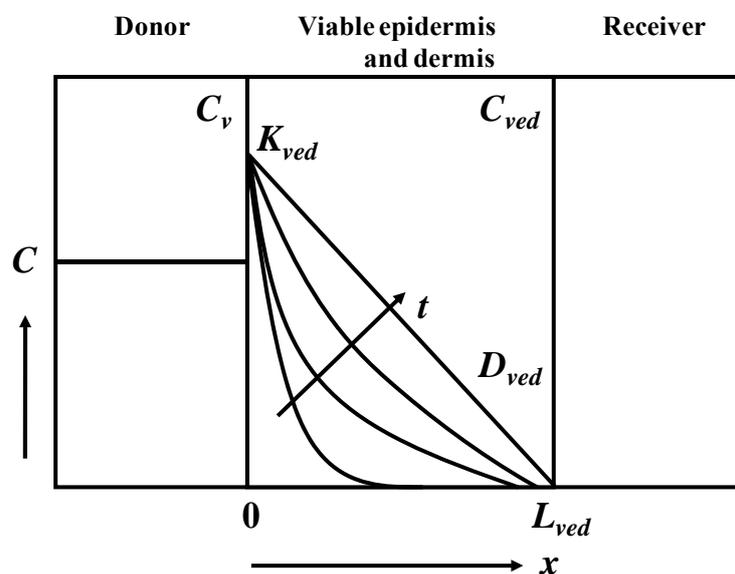
ここで、 r は $\Delta t/\Delta x^2$ を表す。差分式を使うと (14) そして (15) 式はそれぞれ (19) そして (20) 式になる。

$$Flux_{full,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,n+1,j} - C_{ved,n,j}}{\Delta x} \quad (19)$$

$$Q_{full,j} = Q_{full,j-1} + Flux_{full,j} \cdot \Delta t \quad (20)$$

n を角層および生きた表皮・真皮の区分数とした。 $Flux_{full,j}$ は $n=10$ にセットして Microsoft[®] Excel を用いて計算した。 D_{sc} と K_{sc} は非線形最小二乗法を用いて透過実験データにカーブフィッティングして算出した。また、 D_{ved} と K_{ved} には、stripped skin および stripped LSE-high の 1 層膜モデルの透過挙動解析から算出した値を用いた。なお、計算は 1 層膜モデルの透過挙動解析と同様に行った。

a) One-layered diffusion model for stripped skin



b) Two-layered diffusion model for full-thickness skin

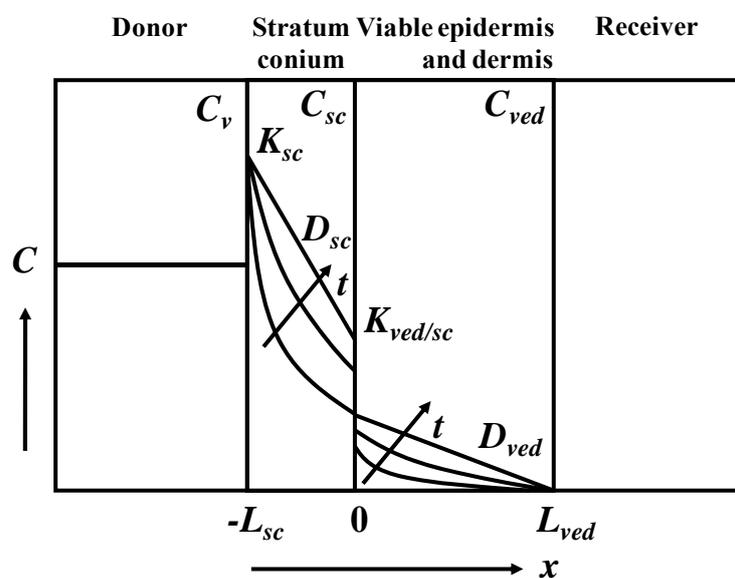


Fig. 3 Typical concentration-distance profiles in one-layered (a) and two-layered (b) membrane diffusion models during membrane permeation of drug (infinite dose system). Abbreviations C , C_v , C_{sc} , C_{ved} : drug concentration, x : position of the membrane, t : time after starting the permeation experiment, L_{ved} , L_{sc} : thickness, D_{ved} , D_{sc} : diffusion coefficient, K_{ved} , K_{sc} , $K_{ved/sc}$: partition coefficient.

第3節 結果

1. 水溶液からのトリアムシノロンアセトニドのシリコーン膜透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響

人工膜であるシリコーン膜を介する TA の透過性に及ぼす TA の基剤中熱力学的活量およびその存在状態の影響を評価した。3 種類の TA 水溶液 (TA ; 5、10 および 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および 2 種類の TA 懸濁液 (30 と 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いてシリコーン膜透過実験を行った。シリコーン膜 (L_{sil} : 75 μm) を介した TA 透過挙動を 1 層膜モデルの差分法を用いて解析し、基剤 - シリコーン膜間薬物分配係数 (K_{sil})、シリコーン膜中拡散係数 (D_{sil})、シリコーン膜透過係数 (P_{sil}) そして定常状態時のシリコーン膜透過速度 ($Flux_{sil}$) を算出した。各溶液からの TA 透過挙動を Fig. 4a に、算出した透過パラメータを Table 1 に示す。Fig. 4a に示すように、24 時間累積透過量は、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 0.11 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 0.17 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 0.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液で 0.31 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液で 0.35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。Fig. 4b に $Flux_{sil}$ と適用した基剤中 TA 濃度の相関関係を示す。なお、Fig. 4b の原点をとる回帰直線 (点線) は TA 水溶液 (5、10、22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) のデータから最小二乗法を用いて算出した。また、飽和溶解濃度以上 (22、30、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の一定直線 (点線) は算出した飽和溶解濃度 (22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の $Flux$ を定常状態 (一定) として示した。TA の $Flux_{sil}$ および 24 時間累積透過量はシリコーン膜に適用した TA 濃度に比例して上昇したが、TA 飽和溶解濃度 (22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 以上で一定となった。また、水溶液および懸濁液中の薬物濃度および存在状態が異なっても、算出した K_{sil} 、 D_{sil} および P_{sil} に差は見られなかった (Table 1)。

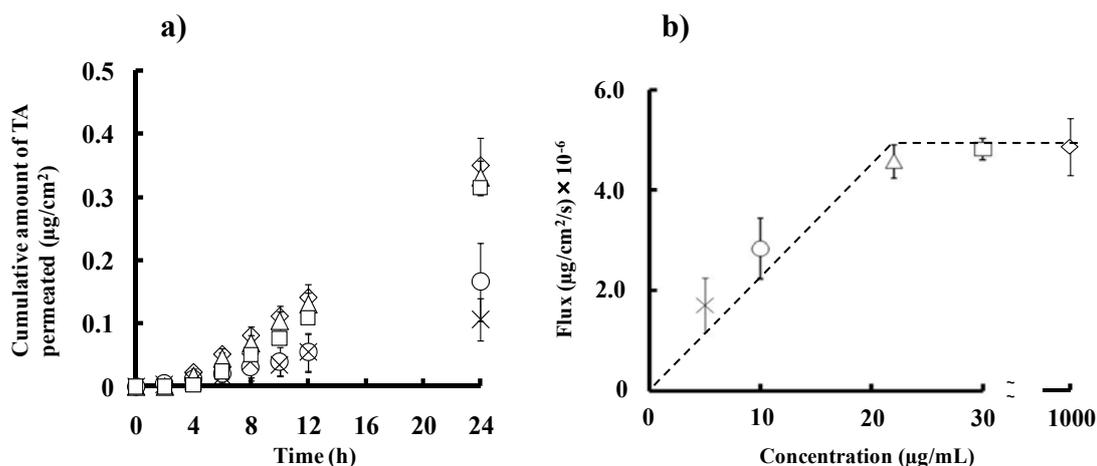


Fig. 4 Triamcinolone acetonide permeation through a silicone membrane. (a) Cumulative amount of triamcinolone acetonide permeated through the silicone membrane. (b) Correlation of applied concentration and flux of triamcinolone acetonide. Symbols: 5 (\times), 10 (\circ) and 22 (Δ) triamcinolone acetonide solutions and 30 (\square) and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\diamond) triamcinolone acetonide suspensions. Each value shows the mean \pm S.E. (n=4-8).

Table 1 Calculated parameters using permeation data through silicone membrane

| C_v ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 5 (solution) | 10 (solution) | 22 (saturation) | 30 (suspension) | 1000 (suspension) |
|---|-----------------|------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| A_v' | 0.23 | 0.45 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| K_{sil} | 4.96 ± 3.20 | 6.89 ± 1.09 | 2.55 ± 0.36 | 3.95 ± 0.20 | 2.47 ± 0.33 |
| D_{sil} (cm^2/s) $\times 10^{-10}$ | 10.8 ± 4.1 | 4.40 ± 1.99 | 6.44 ± 0.91 | 4.16 ± 0.04 | 7.62 ± 1.41 |
| P_{sil} (cm/s) $\times 10^{-7}$ | 3.39 ± 1.08 | 2.84 ± 0.61 | 2.08 ± 0.15 | 2.19 ± 0.10 | 2.19 ± 0.26 |
| $Flux_{sil}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$) $\times 10^{-6}$ | 1.69 ± 0.54 | 2.84 ± 0.61 | 4.58 ± 0.33 | 4.82 ± 0.26 | 4.82 ± 0.57 |

Each value shows the mean \pm S.E. (n=4-8).

2. 水溶液からのトリアムシノロンアセトニドのヘアレスラット皮膚透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響

次に、TA のヘアレスラット皮膚 (full-thickness skin と stripped skin) 透過性に及ぼす TA の基剤中の熱力学的活量およびその存在状態の影響について検討した。適用した TA 溶液はシリコーン膜の透過実験と同様である。ヘアレスラット皮膚は角層 (L_{sc} : 15 μm) と生きた表皮・真皮層 (L_{ved} : 585 μm) の 2 層膜として透過挙動の解析を行った。すなわち、stripped skin の透過データから、基剤 - 生きた表皮・真皮間分配係数 (K_{ved})、生きた表皮・真皮中拡散係数 (D_{ved})、生きた表皮・真皮透過係数 (P_{ved}) そして stripped skin 透過速度 ($Flux_{st}$) を算出した (Fig. 3a)。また、full-thickness skin の透過データから、基剤 - 角層間分配係数 (K_{sc})、角層中拡散係数 (D_{sc})、角層透過係数 (P_{sc}) そして full-thickness skin 透過速度 ($Flux_{full}$) を算出した (Fig. 3b)。Fig. 5a と 5b に各溶液を用いた TA 累積皮膚透過挙動 (full-thickness skin と stripped skin) を、Table 2 に算出した透過パラメータを、そして Fig. 5c と 5d に $Flux_{st}$ および $Flux_{full}$ と適用した基剤中 TA 濃度の相関関係をそれぞれ示す。なお、Fig. 5c と 5d の原点をとる回帰直線 (点線) は TA 水溶液 (5、10、22 $\mu\text{g/mL}$) のデータから最小二乗法を用いて算出した。また、飽和溶解濃度以上 (22、30、1000 $\mu\text{g/mL}$) の一定直線 (点線) は算出した飽和溶解濃度 (22 $\mu\text{g/mL}$) の $Flux$ を定常状態 (一定) として示した。3 種類の TA 水溶液 (TA ; 5、10 そして 22 $\mu\text{g/mL}$) および 2 種類の TA 懸濁液 (30 と 1000 $\mu\text{g/mL}$) を適用した stripped skin の 8 時間累積透過量は、5 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 1.04 $\mu\text{g/cm}^2$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 2.50 $\mu\text{g/cm}^2$ 、22 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で 4.74 $\mu\text{g/cm}^2$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 懸濁液で 4.68 $\mu\text{g/cm}^2$ そして 1000 $\mu\text{g/mL}$ 懸濁液で 5.61 $\mu\text{g/cm}^2$ であり、TA 濃度の増加に比例して上昇した (Fig. 5b)。同様に、3 種類の水溶液および 2 種類の懸濁液の $Flux_{st}$ も stripped skin に適用した TA 濃度に比例して上昇し、飽和

溶解濃度以上で一定となり (Fig. 5d)、各溶液の K_{ved} 、 D_{ved} そして P_{ved} は、シリコーン膜のパラメータと同様、薬物濃度およびその存在状態が異なっても差は見られなかった (Table 2)。

一方、各溶液を適用した full-thickness skin の 24 時間累積透過量は 5 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で $0.07 \mu\text{g/cm}^2$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で $0.09 \mu\text{g/cm}^2$ 、22 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液で $0.18 \mu\text{g/cm}^2$ そして 30 $\mu\text{g/mL}$ 懸濁液で $0.23 \mu\text{g/cm}^2$ であり、1000 $\mu\text{g/mL}$ 懸濁液を適用した 24 時間累積透過量は $0.44 \mu\text{g/cm}^2$ であり、TA 飽和溶解度である 22 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液に比べて約 2 倍高かった (Fig. 5a)。また、 $Flux_{full}$ は適用濃度に比例して上昇し、飽和溶解濃度以上で一定となったが、1000 $\mu\text{g/mL}$ 懸濁液の $Flux_{full}$ ($7.55 \times 10^{-6} \mu\text{g/cm}^2/\text{s}$) は 22 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液の $Flux_{full}$ ($3.86 \times 10^{-6} \mu\text{g/cm}^2/\text{s}$) に比べて約 2 倍高いことがわかった (Fig. 5c)。さらに算出した透過パラメータから、1000 $\mu\text{g/mL}$ 懸濁液の D_{sc} ($3.99 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$) と P_{sc} ($3.42 \times 10^{-7} \text{cm/s}$) は 22 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液の D_{sc} ($2.18 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$) と P_{sc} ($1.75 \times 10^{-7} \text{cm/s}$) に比べてそれぞれ約 2 倍高いことも明らかとなった (Table 2)。

Table 3 にヘアレスラット皮膚 (full-thickness skin と stripped skin) を介した 24 時間および 8 時間透過実験終了後の TA の皮膚中濃度を示す。適用した TA 水溶液が飽和濃度以下の場合、TA の full-thickness および stripped skin 中濃度は TA 溶解濃度の増加につれて上昇した。特に、1000 $\mu\text{g/mL}$ 懸濁液を適用した full-thickness skin 中の TA 濃度は 22 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液を適用したものに比べて約 15 倍高かった。これらの結果から、TA 固体の存在は皮膚透過性及び皮膚中濃度に対して影響を及ぼす可能性が示唆された。

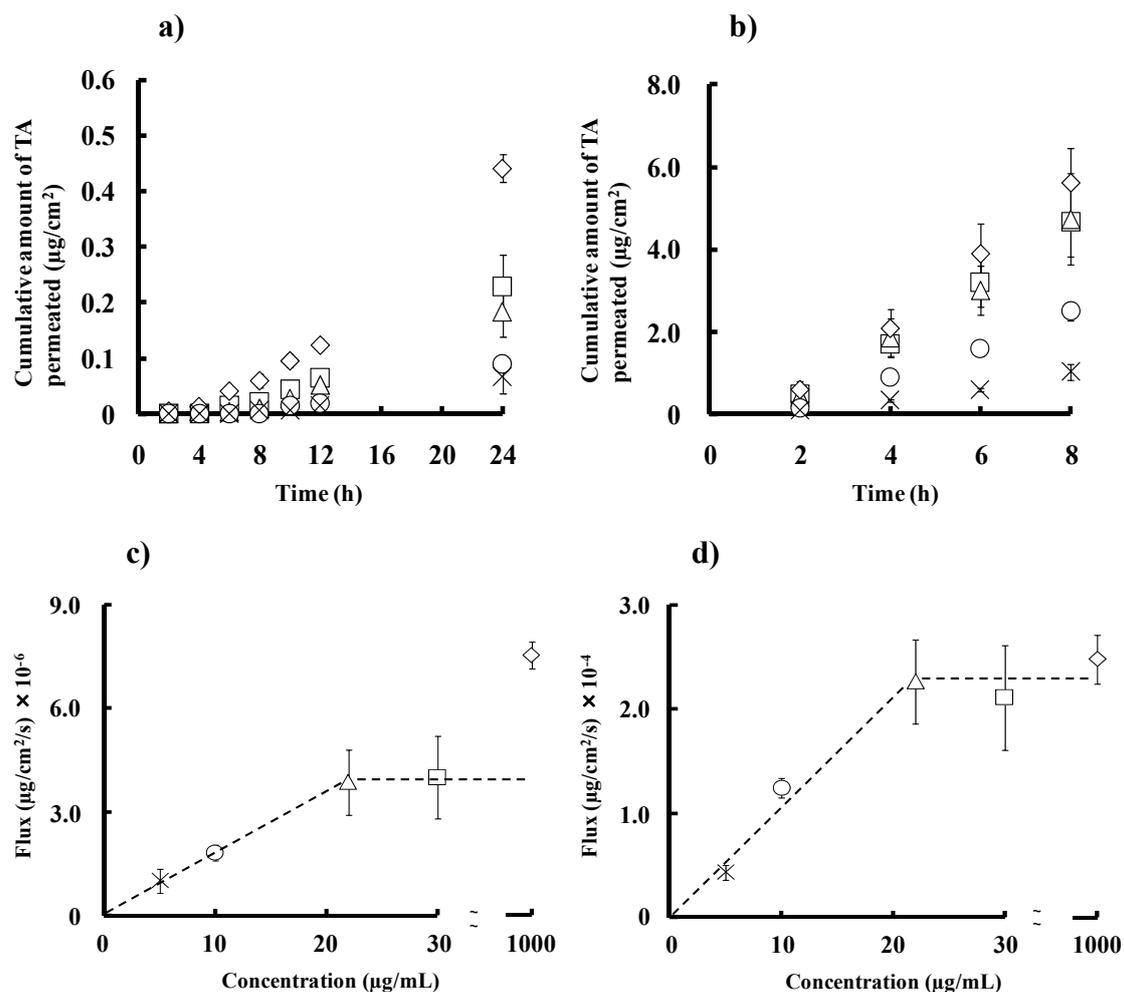


Fig. 5 Triamcinolone acetonide permeation through full-thickness (a, c) and stripped hairless rat skin (b, d). Cumulative amount of triamcinolone acetonide permeated through full-thickness (a) and stripped (b) hairless rat skin. Correlation of applied concentration and flux of triamcinolone acetonide after application on the full-thickness (c) and stripped hairless rat skin (d). Symbols: 5 (\times), 10 (\circ) and 22 (Δ) triamcinolone acetonide solutions and 30 (\square) and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\diamond) triamcinolone acetonide suspensions. Each value shows the mean \pm S.E. (n=4-12).

Table 2 Calculated parameters by permeation data through full-thickness or stripped hairless rat skin

| C_v ($\mu\text{g/mL}$) | 5 (solution) | 10 (solution) | 22 (saturation) | 30 (suspension) | 1000 (suspension) |
|--|-----------------|------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| A_v' | 0.23 | 0.45 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| K_{sc} | 10.7 ± 3.8 | 10.3 ± 1.3 | 13.3 ± 4.9 | 11.5 ± 6.0 | 15.1 ± 3.7 |
| K_{ved} | 5.82 ± 1.49 | 11.4 ± 1.7 | 9.11 ± 2.23 | 6.66 ± 2.71 | 8.00 ± 1.07 |
| D_{sc} (cm^2/s) $\times 10^{-11}$ | 2.85 ± 0.09 | 2.65 ± 0.07 | 2.18 ± 0.20 | 3.23 ± 0.62 | 3.99 ± 0.55 |
| D_{ved} (cm^2/s) $\times 10^{-8}$ | 9.44 ± 0.97 | 7.02 ± 0.75 | 8.94 ± 1.57 | 12.9 ± 0.4 | 10.1 ± 0.3 |
| P_{sc} (cm/s) $\times 10^{-7}$ | 2.02 ± 0.69 | 1.82 ± 0.29 | 1.75 ± 0.43 | 1.82 ± 0.54 | 3.42 ± 0.18 |
| P_{ved} (cm/s) $\times 10^{-6}$ | 8.65 ± 1.47 | 12.4 ± 0.9 | 10.3 ± 1.9 | 9.58 ± 2.28 | 11.2 ± 1.0 |
| $Flux_{full}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$) $\times 10^{-6}$ | 1.01 ± 0.35 | 1.82 ± 0.23 | 3.86 ± 0.94 | 4.00 ± 1.20 | 7.55 ± 0.39 |
| $Flux_{st}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$) $\times 10^{-4}$ | 0.43 ± 0.07 | 1.24 ± 0.09 | 2.26 ± 0.41 | 2.11 ± 0.50 | 2.47 ± 0.23 |

Each value shows the mean \pm S.E. (n=4-12).

Table 3 Skin concentration of triamcinolone acetonide 24 h after application on the hairless rat full-thickness skin and 8 h after application on the hairless rat stripped skin

| C_v ($\mu\text{g/mL}$) | A_v' | full-thickness skin ($\mu\text{g/g}$) | stripped skin ($\mu\text{g/g}$) |
|----------------------------|--------|--|--------------------------------------|
| 5 | 0.23 | 0.67 ± 0.11 | 5.63 ± 0.64 |
| 10 | 0.45 | 0.77 ± 0.05 | 12.4 ± 1.6 |
| 22 (saturation) | 1.00 | 1.54 ± 0.10 | 21.3 ± 1.2 |
| 30 | 1.00 | 3.56 ± 1.14 | 29.9 ± 7.2 |
| 1000 | 1.00 | 23.5 ± 4.6 | 36.5 ± 5.6 |

Each value shows the mean \pm S.E. (n=4-12).

3. 水溶液からのトリアムシノロンアセトニドの三次元培養ヒト皮膚モデル LSE-high 透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響

さらに、TA の皮膚透過性に対する TA 存在状態の影響を検討するため、毛嚢の無い 3 次元培養皮膚モデル LSE-high を用いて TA 水溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と TA 懸濁液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) からの TA の皮膚透過性に及ぼす TA の基剤中の熱力学的活量およびその存在状態の影響について調べた。Stripped LSE-high は生きた表皮・真皮層 (L_{ved} : 285 μm) の 1 層膜モデルに近似して解析を行い、LSE-high は角層 (L_{sc} : 15 μm) と生きた表皮・真皮層の 2 層膜モデルに近似して解析した (Fig. 3)^{40,42})。Fig. 6a と 6b に 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液と 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液を適用した時の LSE-high を介した TA 透過挙動を、Table 4 に算出した透過パラメータを、そして Fig. 6c と 6d に $Flux_{st}$ および $Flux_{full}$ と適用した基剤中 TA 濃度の相関関係をそれぞれ示す。なお、Fig. 6c と 6d の直線 (点線) は原点から 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を経て飽和溶解濃度 (22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) まで外挿し、飽和溶解濃度以上 (22、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の一定直線 (点線) は外挿した飽和溶解濃度 (22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の $Flux$ を定常状態 (一定) として示した。各溶液を適用した時の LSE-high を介する 24 時間累積透過量は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 1.80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ そして 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液で 4.07 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、また、stripped LSE-high を介する 8 時間累積透過量は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液で 1.01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ と 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液で 1.92 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった (Fig. 6a、b)。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液の $Flux_{st}$ と $Flux_{full}$ は適用した TA 濃度に比例して上昇し、その TA 存在状態に依存しないことが推測された (Fig. 6c、d)。さらに、LSE-high を介する透過パラメータ (K_{ved} 、 K_{sc} 、 D_{ved} 、 D_{sc} 、 P_{ved} 、 P_{sc}) は 2 つの適用濃度間で同程度であることも分かった (Table 4)。したがって、LSE-high を介する透過挙動はヘアレスラット皮膚 (full-thickness skin) ではなく、シリコーン膜透過挙動と類似することがわかった。

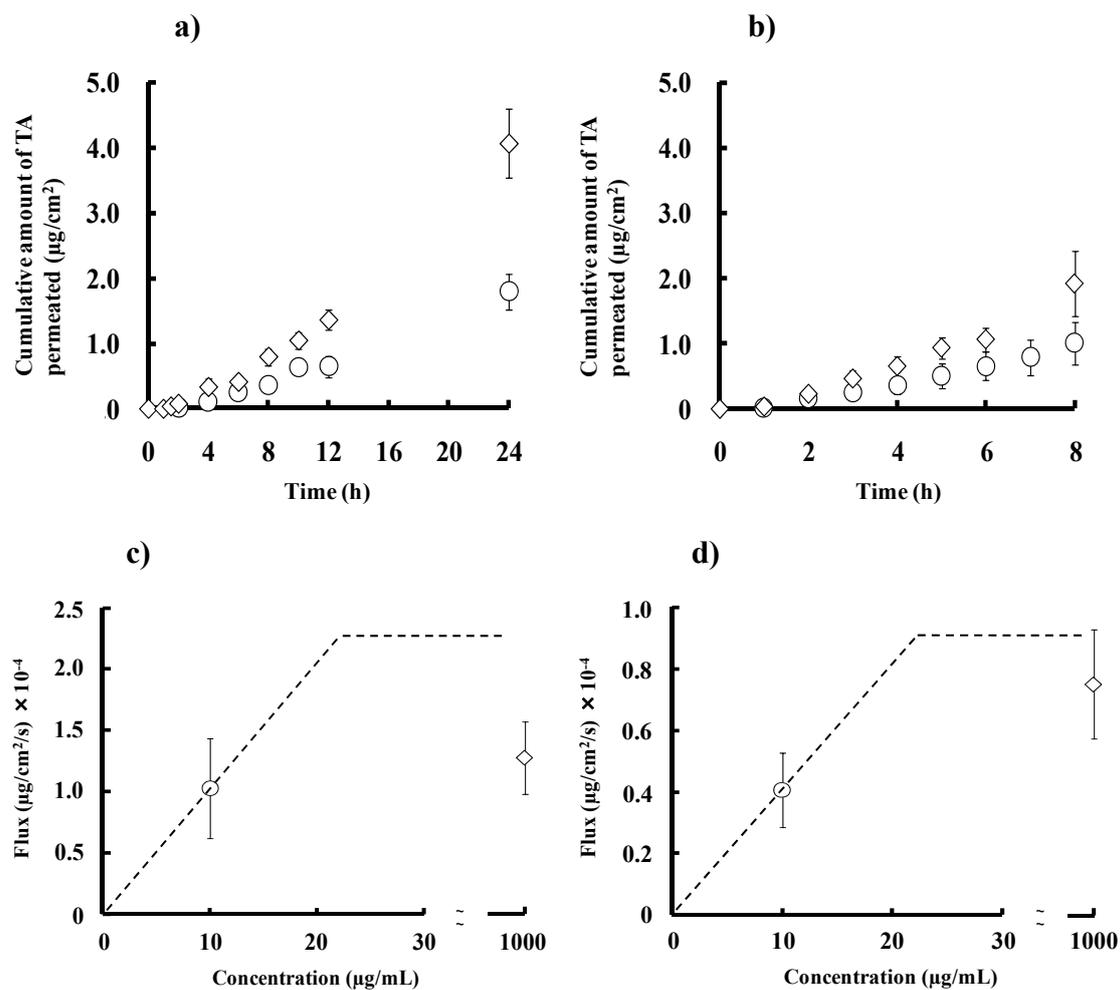


Fig. 6 Triamcinolone acetonide permeation through LSE-high (a, c) and stripped LSE-high (b, d). Cumulative amount of triamcinolone acetonide permeated through LSE-high (a) and stripped LSE-high (b). Correlation of applied concentration and flux of triamcinolone acetonide after application on the LSE-high (c) and stripped LSE-high (d). Symbols: 10 (\circ) triamcinolone acetonide solutions and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\diamond) triamcinolone acetonide suspensions. Each value shows the mean \pm S.E. (n=3-9).

Table 4 Calculated parameters by permeation data through full-thickness or stripped LSE-high

| C_v ($\mu\text{g/mL}$) | 10 (solution) | 1000 (suspension) |
|--|------------------|----------------------|
| A_v' | 0.45 | 1.00 |
| K_{sc} | 45.2 ± 10.0 | 53.7 ± 7.0 |
| K_{ved} | 4.57 ± 0.81 | 4.00 ± 1.34 |
| D_{sc} (cm^2/s) $\times 10^{-10}$ | 2.87 ± 0.66 | 1.59 ± 0.30 |
| D_{ved} (cm^2/s) $\times 10^{-8}$ | 2.26 ± 0.32 | 2.84 ± 0.46 |
| P_{sc} (cm/s) $\times 10^{-6}$ | 10.3 ± 4.1 | 5.77 ± 1.33 |
| P_{ved} (cm/s) $\times 10^{-6}$ | 4.07 ± 1.21 | 3.38 ± 0.80 |
| $Flux_{full}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$) $\times 10^{-4}$ | 1.03 ± 0.41 | 1.27 ± 0.29 |
| $Flux_{st}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}$) $\times 10^{-5}$ | 4.07 ± 1.21 | 7.46 ± 1.76 |

Each value shows the mean \pm S.E. (n=3-9).

4. トリアムシノロンアセトニド懸濁液適用後のヘアレスラット皮膚表面の走査型電子顕微鏡観察

TA のヘアレスラット皮膚透過挙動の解析によって示されたように、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液からの TA の $Flux_{full}$ および D_{sc} は飽和溶解濃度からのそれらの値以上に高かった。その理由として、毛嚢などへ TA 固体が直接侵入している可能性が考えられた。また、ステロイドの皮膚透過性に対する毛嚢経路の寄与が報告されている⁴⁷⁻⁴⁹。そこで、TA 懸濁液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を適用した直後のヘアレスラット皮膚 (full-thickness skin) 表面を SEM で観察した。Fig. 7 にその結果を示す。図中の 2 つの写真に示すように、多くの TA 粉末粒子が毛嚢周囲に集まっていた。Rolland らは 3 種類の Polymeric microspheres (直径 : 1、5、20 μm) を皮膚に適用した結果、直径 5 μm の microsphere が選択的に毛嚢へ行くことを報告した⁵⁰。この結果を考えても、TA 粉末 (約 1-10 μm) が毛嚢などへ侵入する可能性があると思われた。

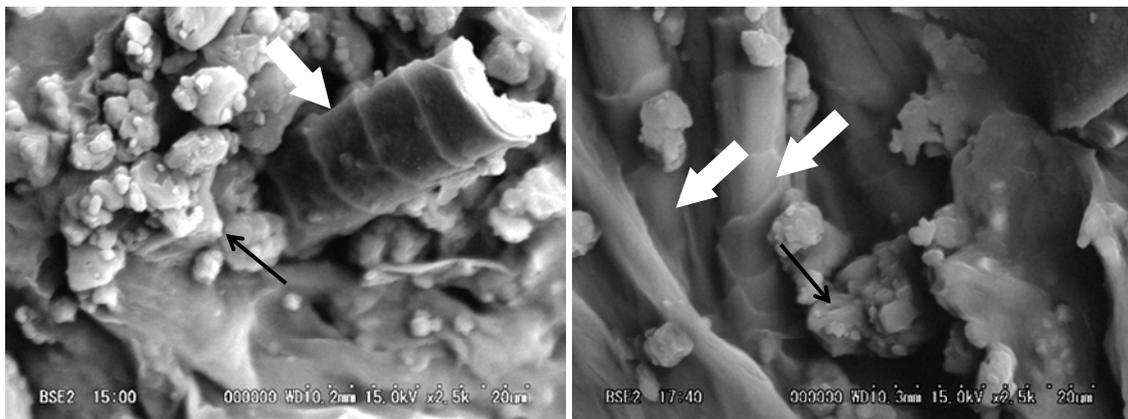


Fig. 7 Two typical images from SEM observation of full-thickness skin surface in hairless rats after application of triamcinolone acetate suspension. Large white arrows show hair shafts, and small black arrows show TA powders. TA powder was 1-10 μm in diameter, as shown in Fig. 7.

第4節 考察

TA のシリコーン膜透過速度は基剤中の TA 溶解濃度すなわち熱力学的活量に比例して上昇し、飽和溶解濃度以上で一定となった。また、各透過パラメータ (K_{sil} 、 D_{sil} 、 P_{sil}) は TA の存在状態にかかわらずほぼ一定の値を示した (Fig. 4、Table 1)。この理由は、基剤中で溶解している TA が溶解拡散膜であるシリコーン膜を透過したためであると考えられた。すなわち、TA のシリコーン膜透過性は TA 固体の存在に影響を受けないと考えられた。

TA のヘアレスラット *stripped skin* 透過速度も TA の基剤中熱力学的活量の増加に比例して上昇し、飽和溶解濃度以上で一定となった (Fig. 5d)。シリコーン膜透過パラメータと同様に、ヘアレスラット *stripped skin* 透過パラメータも TA 固体の存在に影響を受けなかった (Fig. 5b、Table 2)。

一方、TA のヘアレスラット *full-thickness skin* 透過速度は TA の基剤中熱力学的活量の増加に比例して上昇したものの、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液を適用した TA の皮膚透過速度および各透過パラメータ ($Flux_{full}$ 、 P_{sc} 、 D_{sc}) はこれと熱力学的活量の等しい 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液の値よりも高かった (Fig. 5a、c と Table 2)。一般に薬物の皮膚中拡散係数は薬物固有の値であり、薬物の溶解濃度や薬物固体の存在に影響を受けないと考えられる⁷⁾。しかし、計算の結果、 P_{sc} や $Flux_{full}$ の上昇は、みかけの角層中薬物拡散係数 D_{sc} に起因していることが示唆された。また、懸濁液中の TA 固体が角層に障害を与える可能性も考えられた。そこで、TA 適用部位の皮膚表面を SEM で観察したが、傷などは観察されなかった。 D_{sc} が上昇した理由として、溶液中に懸濁した薬物固体が経付属器官である毛嚢などへ侵入し (Fig. 7)、毛嚢中で皮脂などに溶解し、生きた表皮もしくは真皮へ浸透・拡散するためであると考えられる。単位面積当たりで比較すると、経付属器官

の毛嚢などのバリア機能は角層や生きた表皮・真皮のバリア機能よりも著しく低い。そのため、毛嚢などは full-thickness skin の透過性に高い寄与を有する可能性が示唆された。また、角層を除いた stripped skin の透過速度は full-thickness skin の透過速度に比べて約 100 倍速かったため、毛嚢などに対する TA 固体の寄与を確認できない可能性が考えられた。さらに、基剤中の TA 固体の存在はヘアレスラット皮膚中 TA 濃度 (full-thickness skin) に影響を及ぼすことも明らかとなった (Table 3)。ヘアレスラット皮膚透過性に及ぼす TA 固体の影響と同様に、懸濁した TA 固体が毛嚢などから侵入し、皮脂などに溶解して、皮膚中へ浸透したことで TA の皮膚中濃度が増加したと考えられた。

TA の LSE-high (または stripped LSE-high) の透過性速度はシリコーン膜と同様の膜透過挙動を示し、TA の LSE-high 透過性は TA 固体の存在に影響を受けなことが分かった (Fig. 6、Table 4)。LSE-high は毛嚢などの経付属器官を有さない溶解拡散膜であるため、水溶液中で溶解している TA が膜透過に起因したためであると考えられた。

第5節 小括

溶解拡散膜であるシリコーン膜や3次元培養ヒト皮膚モデル LSE-high を介した TA 透過速度は適用した水溶液中の TA の熱力学的活量に影響を受けたが、TA の存在状態（溶解および懸濁状態）とは関係しなかった。これらの膜透過現象は 40 年以上前に T. Higuchi によって論じられている¹³⁾。一方、ヘアレスラット皮膚（full-thickness skin もしくは stripped skin）を介した TA 透過速度は TA の基剤中の熱力学的活量に影響を受けたが、TA 懸濁液（1000 µg/mL）を適用後の full-thickness skin 透過速度は TA 飽和溶解濃度から予測される値よりも高くなった。皮膚透過挙動の解析の結果、みかけの角層中拡散係数 D_{sc} の上昇が示唆された。また、TA 懸濁液適用直後のヘアレスラット皮膚表面の SEM 観察から、毛囊周辺で多くの TA 固体が観察された。したがって、毛囊中へ TA 固体が侵入し、皮脂などに溶解し、皮膚内へ浸透する可能性が示唆された。以上のことより、外用剤からの薬物の皮膚透過性を考慮する際に、薬物の基剤中熱力学的活量に加えて、薬物の基剤中存在状態（溶解もしくは懸濁状態）にも注意する必要があることが明らかとなった。

第 2 章 白色ワセリン軟膏からのトリアムシノロンアセトニドの皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みおよび皮脂成分の影響⁵¹⁾

ステロイド外用剤から薬物の皮膚分配性や皮膚中拡散性を明らかにすることは、局所適用部位で効率的な薬理効果を得るために特に重要であることを前 1 章で述べた。また、TA のみかけの角層中拡散係数 (D_{sc}) は、水溶液中に TA 固体が存在する条件下で変化した²³⁾。この要因の一つとして、懸濁液中の TA 固体が毛嚢などへ侵入することが予想された。また、このような現象は、懸濁液剤だけでなく半固形製剤を使用した時にも起こり得ると考えられる。すなわち、軟膏剤やクリーム剤は皮膚表面で擦り込んで使用することが多く、軟膏の皮膚への擦り込みは薬物の皮膚透過性に影響を及ぼす可能性がある。さらに、軟膏を皮膚表面で擦り込む際に、軟膏中に皮膚表面に存在する皮脂成分（角質細胞間脂質なども含む）が混ざり、薬物の軟膏基剤中の溶解度や皮膚透過性に影響を及ぼす可能性もある。しかし、これまでに外用剤からのステロイドの皮膚透過性に対する軟膏の皮膚擦り込みや皮脂成分の影響について十分な検討は行われていない。

そこで第 2 章では、外用基剤として白色ワセリンを用いた軟膏からの TA の皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みの影響について、さらに、軟膏基剤中の TA の溶解度および TA の皮膚透過性に及ぼす皮脂成分の影響を評価した。

第 1 節 実験方法

1. 実験材料

トリアムシノロンアセトニド (TA)、トリオレイン、オレイン酸コレステリル

及びオレイン酸は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。白色ワセリンは小堺製薬株式会社（東京）から購入した。また、Non-hydroxy fatty acid ceramide (NHFC)⁵²⁾はシグマアルドリッチ株式会社 (ST. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級もしくは HPLC 用のものを精製せずそのまま使用した。

2. 実験動物

雄性ヘアレスラット (WBM/ILA-Ht、8-9 週齢、体重: 230-260 g) は城西大学生命科学研究センター (坂戸、埼玉) もしくは石川実験動物研究所 (深谷、埼玉) から購入した。すべての動物飼育および実験は城西大学動物実験規定に従って行った。

3. トリアムシノロンアセトニド含有白色ワセリン軟膏の調製

白色ワセリン 1.0 g 当たり 10 mg から 50 mg の TA (1.0-5.0%) をそれぞれ加えて陶製軟膏板と軟膏ペラを用いて全質均等になるまで混合調製した。以下、これを白色ワセリン軟膏 (original ointment) と呼ぶ。また、皮脂成分を含有する軟膏基剤モデルとして、白色ワセリンのみをヘアレスラット腹部皮膚 (full-thickness skin) に適用 (適用面積: 約 300 mg/0.95 cm²) して、これを 6 時間後に回収した⁵³⁾。以下、これを皮膚適用後ワセリン (pre-applied white petrolatum) と呼ぶ。皮膚適用後ワセリン 1.0 g 当たり 10 mg から 50 mg の TA (1.0-5.0%) をそれぞれ加えて混合調製した。以下、これを皮膚適用後ワセリン軟膏 (pre-applied ointment) と呼ぶ。なお、皮膚適用後ワセリンは前日に調製し、白色ワセリン軟膏と皮膚適用後ワセリン軟膏は実験直前に調製した。

4. *In vitro* ヘアレスラット皮膚透過実験法

雄性ヘアレスラットをペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下背位固定して、角層を傷つけないよう腹部皮膚を剃毛した。皮膚を摘出し、余分な脂肪を取り除いた。ヘアレスラットの *stripped skin* は角層をセロテープ® (ニチバン株式会社、東京) で 20 回除去して調製した⁴³⁾。1.0% TA 白色ワセリン軟膏もしくは皮膚適用後ワセリン軟膏 (約 300 mg) を充填した軟膏用セル (有効拡散直径 : 1.6 cm、深さ : 2.5 mm) を摘出した腹部皮膚 (*full-thickness skin* または *stripped skin*) の表皮側に適用し、横型拡散セル (有効透過面積 : 0.95 cm²) にセットした。真皮側に pH7.4 PBS を 3.0 mL 適用して透過実験を開始した (Fig. 8a)⁵³⁾。実験中はセル内を 32°C の一定温度に保ち、スターラーで攪拌した。経時的に真皮側セルから 600 µL をサンプリングして同量の PBS を戻した。透過実験終了後、皮膚をセルから取り外し、皮膚表面をエタノール (99.5%) で数回拭き取った後、直ちに PBS でよく洗い流して、-20 °C で冷凍保存した。冷凍保存した皮膚サンプルはハサミで細かく刻み、直ちにガラス製ホモジナイザー容器に移し、PBS 5.0 mL を加えて氷冷下ホモジナイズした。調製したホモジネート液中の TA 濃度を測定した。

5. 軟膏の皮膚擦り込み処理法

軟膏の皮膚擦り込み処理は摘出したヘアレスラット腹部皮膚表面 (*full-thickness skin*) に 1.0% TA 白色ワセリン軟膏または白色ワセリンのみ (約 100 mg/0.95 cm²) をゴム手袋をした人差し指で約 30 秒間擦り込んだ (圧力 : 1.87-3.12 N/cm²)。なお、指 (接触面積 : 約 0.79 cm²) で皮膚を擦るときの圧力は皮膚に加える重量 (0.15-0.25 kg) から計算した。その後、処理した皮膚の角層側に 1.0% TA 白色ワセリン軟膏または白色ワセリンのみを充填した軟膏用セ

ル（約 300 mg）を適用して同様に皮膚透過実験を行った。皮膚に擦り込む軟膏と皮膚擦り込み後に適用する軟膏の組み合わせを以下に記す。1.0% TA 白色ワセリン軟膏を皮膚に擦り込み、同軟膏を適用した組み合わせを II 群、1.0% TA 白色ワセリン軟膏を皮膚に擦り込み、白色ワセリンのみを適用した組み合わせを III 群、そして白色ワセリンのみを皮膚に擦り込み、1.0% TA 白色ワセリン軟膏を適用した組み合わせを IV 群とした。なお、比較対象として、擦り込み未処理皮膚に 1.0% TA 白色ワセリン軟膏を適用したものを I 群とした。

6. トリアムシノロンアセトニドの測定法

In vitro 皮膚透過実験のレシーバーサンプルまたは皮膚ホモジネート液 600 μL と同容量の内部標準物質（HPLC：1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4-ヒドロキシ安息香酸メチル/クロロホルム）を混合・攪拌・遠心分離（18,000 $\times g$ 、5 min、4 $^{\circ}\text{C}$ ）し、クロロホルム相 500 μL を窒素乾固した後に精製水：アセトニトリル（65：35）溶液 50 μL で再調製して、うち 20 μL を HPLC に注入した。HPLC システムはポンプ（LC-20AS；島津製作所株式会社、京都）、カラム（CAPCELL PAK C18 UG120, 5 μm , 4.6 \times 250 mm；株式会社資生堂、東京）、オートインジェクター（SIL-20A；島津製作所）、UV 検出器（SPD-20A；島津製作所）、そして解析システム（LC solution；島津製作所）で構成され、移動相は精製水：アセトニトリル（65：35）、流速 1.0 mL/min、カラム温度は室温、UV 波長は 240 nm とした。

7. *In vitro* ヘアレスラット皮膚インピーダンスの測定法

摘出したヘアレスラット腹部皮膚（full-thickness skin と stripped skin）もしくは摘出後に人差し指で 30 秒間擦った（圧力：1.87-3.12 N/cm^2 ）ヘアレスラット腹部皮膚（rubbed full-thickness skin）をそれぞれ横型拡散セル（有効透過面積：

0.95 cm²) に挟んで固定し、角層側と真皮側の両方に PBS をそれぞれ 3.0 mL 加えた。その後、表皮側および真皮側セルに Ag-AgCl 電極を挿入し、経時的に皮膚インピーダンス (インピーダンス測定装置 : 10 Hz 交流 ; ADVANCE R&D 株式会社、東京) を測定した (Fig. 8b) ⁵⁴)。

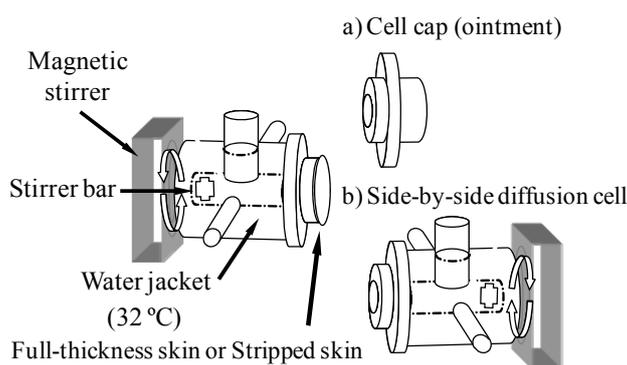


Fig. 8 Experimental set-up for *in vitro* skin permeation study (a) and skin impedance measurement (b).

8. 皮脂成分の分離定性および半定量的測定法

皮膚適用後ワセリン中に皮脂成分 (角質細胞間脂質なども含む) が抽出されたかどうか調べるため、以下の条件で薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて皮脂成分の分離定性および半定量的測定を行った。ヘアレスラット背部皮膚適用後 6 時間に回収した白色ワセリン (塗布面積 : 0.8 g/約 48 cm²) 約 0.5 g をヘキサン 10 mL に溶かした。まず、固相カラム (Inertsep[®] C18-C ; ジーエルサイエンス株式会社、東京) をヘキサン 5.0 mL で処理してから、サンプルを溶解したヘキサン溶液 10 mL を流した。さらに、クロロホルム : メタノール (2 : 1) 溶液 10 mL を流して皮脂成分を抽出した。抽出したクロロホルム : メタノール (2 : 1) 溶液を窒素乾固した後、クロロホルム : メタノール (2 : 1) 溶液 1.0 mL を加えて再調製したものを TLC 用試料とした。この試料を薄層板に 10 μL スポットし

て、展開溶媒にヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸 = 60 : 25 : 15 を用いて約 20 分間展開した⁵⁵⁾。その後、10% 硫酸銅 (エタノール : 8(w/v)%リン酸水溶液=23 : 77) 試薬に浸し、105 °C で 10 分間加熱してスポットを検出して同定した。さらに、デンストメーター (Scion Image, Frederick, MD, U.S.A.) を用いてスポット濃度から皮脂の半定量を行った。また、TLC 標品として、1.0% NHFC、1.0% コレステロールそして 1.0% 人工皮脂を含有したクロロホルム : メタノール (2 : 1) 溶液を用いた。なお、NHFC (溶解度 (クロロホルム) : 10 mg/mL、分子量 : 約 607) は主にステアリン酸とネルボン酸の N-アシル脂肪酸を持つスフィンゴシンである。人工皮脂 (ラット皮脂モデル) の組成は 50% トリオlein、30% オlein酸コレステリルと 20% オlein酸とした⁵⁶⁾。なお、既知の各脂質成分濃度とそれに対応するスポット密度 (density) をプロットすると良好な相関が得られることを確認している (コレステロール ; $R^2=0.992$ 、オlein酸コレステリル ; $R^2=0.893$ 、NHFC ; $R^2=0.971$)。

9. 白色ワセリン軟膏中のトリアムシノロンアセトニド溶解度の測定法

軟膏中の TA 溶解度は示差走査熱量計 (DSC8230 ; リガク株式会社、東京) を用いて軟膏中の TA 固体の吸熱ピークエリアから計算した^{45,57)}。0、1.0、2.0、3.0、4.0 そして 5.0%TA 濃度の白色ワセリン軟膏と皮膚適用後ワセリン軟膏 10 mg を各ステンレスパン (sus-sus ; リガク) に充填した。サンプル測定条件は大気中で 30-350 °C まで加熱し、昇温速度は 20°C/min、標準試料として Al₂O₃ を使用した。

10. 統計解析

実験から得られたデータは、3 から 7 例数の平均±標準誤差 (S.E.) により表記した。

第2節 Fickの拡散則に従う1層膜および2層膜モデル透過挙動の解析

白色ワセリン軟膏からのTAのヘアレスラット皮膚透過挙動はFickの拡散第2法則に従うと考え、差分法を用いて解析した^{45,46}。解析方法の詳細は第1章第2節理論2と3に記述した。stripped skinは生きた表皮・真皮層(K_{ved} 、 D_{ved} 、 P_{ved} 、 L_{ved})の1層膜モデル(Fig. 3a)に近似して、full-thickness skinは角層(K_{sc} 、 D_{sc} 、 C_{sc} 、 L_{sc})と生きた表皮・真皮層(K_{ved} 、 D_{ved} 、 P_{ved} 、 L_{ved})の2層膜モデルに近似して各透過パラメータを算出した(Fig. 3b)。

第3節 結果

1. 白色ワセリン軟膏からのトリアムシノロンアセトニドの皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みの影響

白色ワセリン軟膏からのTAの皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みの影響について検討した。Fig. 9に白色ワセリン軟膏および白色ワセリンを用いたTAの皮膚透過実験の結果を、Table 5に透過実験後の皮膚中TA濃度の結果を示す。1.0% TA 白色ワセリン軟膏擦り込み後の同軟膏適用群(II群)の24時間累積透過量及び皮膚中濃度($0.99 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と $31.17 \mu\text{g}/\text{mL}$)は、擦り込み未処理皮膚の1.0% TA 白色ワセリン軟膏適用群(I群)($0.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と $10.23 \mu\text{g}/\text{mL}$)に比べて約16.5倍と3倍高く、1.0% TA 白色ワセリン軟膏擦り込み後の白色ワセリン適用群(III群)($0.38 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と $20.75 \mu\text{g}/\text{mL}$)はI群に比べて約6.3倍と2.0倍高くなった。これらの結果から、軟膏を皮膚に擦り込むことでTAの皮膚透過量が増加することが分かった。また、白色ワセリンのみ擦り込み後の1.0% TA 白色ワセリン軟膏適用群(IV群)($0.11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ と $19.17 \mu\text{g}/\text{mL}$)はI群に比べて約1.8倍と1.9倍

高かった。この結果から、白色ワセリンで皮膚表面を擦るだけでも TA の皮膚透過を促進することが示唆された。この結果から、皮膚表面で軟膏を擦り込むと皮膚抵抗が変化する可能性も考えられたので、指で擦った皮膚のインピーダンス（皮膚電気抵抗）の変化について評価した。

Fig. 10 に経時的に測定した種々皮膚インピーダンスを示す。予備検討の結果から、白色ワセリン軟膏を皮膚に擦り込んだ後の皮膚インピーダンスは未処理の皮膚（full-thickness skin）に比べて著しく上昇することが分かった。この原因として、白色ワセリン自身は電気を通さないためであると考えられた。したがって、今回は白色ワセリン軟膏を使用せずに人差指で約 30 秒間擦った皮膚（rubbed full-thickness skin）のインピーダンスを測定した。皮膚インピーダンスは時間の経過につれて低下し、実験開始後約 2 時間でほぼ安定な値となった。この測定初期に見られる経時的な皮膚インピーダンスの低下は、角層の水和による皮膚インピーダンスの安定化であると思われた。実験開始後 8 時間の人差し指で約 30 秒間擦った皮膚（full-thickness skin）のインピーダンス値 ($1.29 \pm 0.34 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) は、未処理皮膚 ($3.91 \pm 0.83 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) に比べて約 1/3 となった。一方、角層を取り除いた皮膚（stripped skin）のインピーダンス値 ($0.08 \pm 0.02 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) は未処理の皮膚（full-thickness skin）に比べて約 1/50 倍であった。したがって、角層は皮膚電気抵抗の主要な部位であり、皮膚を擦るだけでも皮膚電気抵抗は低下することが分かった。

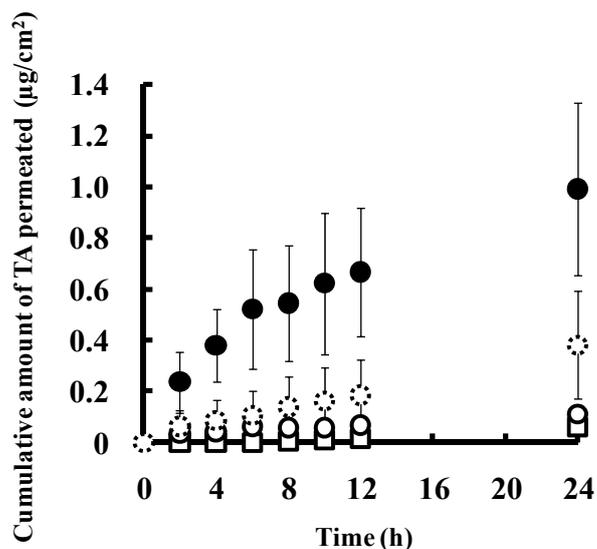


Fig. 9 Cumulative amount of triamcinolone acetonide that permeated through full-thickness skin. Each value shows the mean \pm S.E. (n=3 or 4). Symbols: \square : 1.0% triamcinolone acetonide original ointment, \bullet : 1.0% triamcinolone acetonide original ointment with rubbing 1.0% triamcinolone acetonide original ointment, \circ : 1.0% triamcinolone acetonide original ointment with rubbing white petrolatum, \ominus : white petrolatum with rubbing 1.0% triamcinolone acetonide original ointment

Table 5 Amount of triamcinolone actinide retained in full-thickness and stripped skin after application of 1.0% triamcinolone acetonide original ointment or pre-applied ointment with or without rubbing of white petrolatum or 1.0% triamcinolone acetonide original ointment on the full-thickness skin

| | Full-thickness skin ($\mu\text{g/g}$) | Stripped skin ($\mu\text{g/g}$) |
|--|--|--------------------------------------|
| 1.0% TA original ointment | 10.23 ± 3.11 | 26.14 ± 5.78 |
| 1.0% TA per-applied ointment | 13.92 ± 9.37 | 26.27 ± 5.70 |
| rubbing white petrolatum on the skin (applied: 1.0% TA original ointment) | 19.17 ± 7.97 | - |
| rubbing 1.0% TA original ointment on the skin (applied: white petrolatum) | 20.75 ± 5.88 | - |
| rubbed 1.0% TA original ointment on the skin (applied: 1.0% TA original ointment) | 31.17 ± 4.44 | - |

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

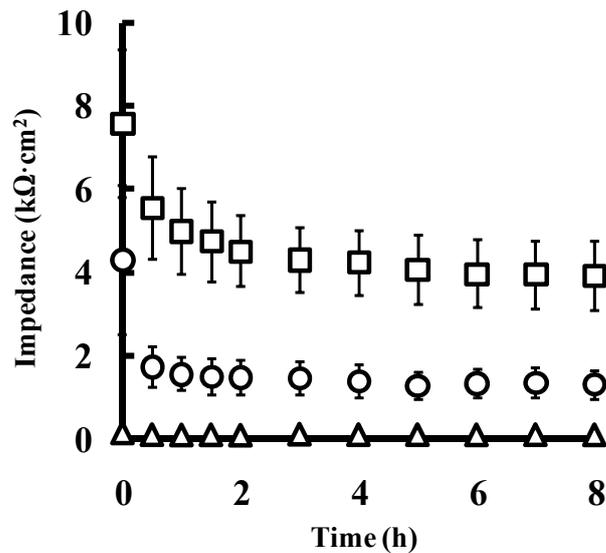


Fig. 10 Time course of skin impedance of full-thickness skin with (○) or without (□) rubbing on the full-thickness skin and stripped skin (Δ). Each value shows the mean \pm S.E. (n=3-5).

2. ヘアレスラット皮膚に適用した白色ワセリンに含まれる皮脂成分の分離定性と半定量的解析

ヘアレスラット皮膚 (full-thickness skin) に白色ワセリン軟膏を擦る際に、軟膏中へ皮脂成分が混ざり、白色ワセリン軟膏中の TA 溶解度や TA の皮膚透過性に何らかの影響を与える可能性も考えられる。また、皮膚表面に適用した白色ワセリンは角層中の脂質量に影響を及ぼすという報告もある⁵⁸⁾。そこでまず、皮脂成分を含む軟膏モデルとして使用した皮膚適用後ワセリン中の皮脂成分の有無を調べるために TLC を用いて分離定性および半定量的解析を行った。Fig. 11 に示されるように、オレイン酸コレステリル、コレステロールや NHFC と同じ極性を持つ脂質成分が白色ワセリン中へ含有されていることが明らかとなった。また、デンストメーターを用いてこれらの脂質成分のスポット密度から半定量解析を行った。その結果、皮膚適用後ワセリン 1.0 g 当たりオレイン酸コレステリル約 4.41 mg、コレステロール約 0.52 mg そして NHFC 約 0.22 mg に相

当する量を含んでいることがわかった。

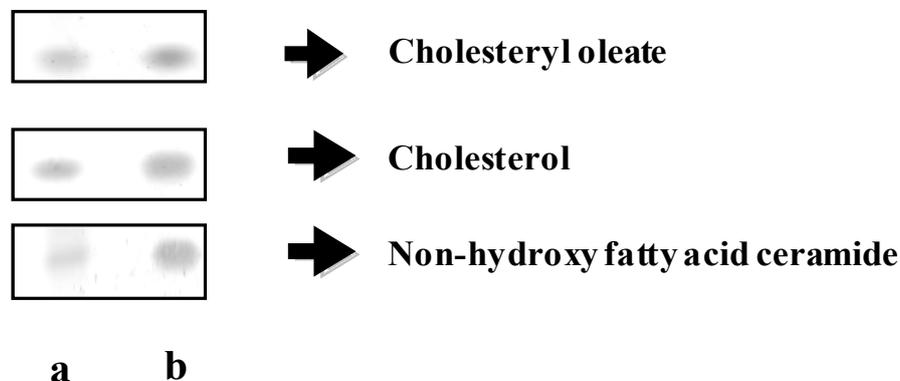


Fig. 11 Thin-layer chromatogram of endogenous lipids extracted from white petrolatum pre-applied to full-thickness skin (a) and mixed solution of 1.0% synthetic sebum, 1.0% cholesterol and 1.0% non-hydroxy fatty acid ceramide (b).

3. 白色ワセリン軟膏中のトリアムシノロンアセトニド溶解度に及ぼす皮脂成分の影響

次に、白色ワセリン軟膏中の TA 溶解度に及ぼす皮脂成分の影響を調べるため、各 TA 濃度 (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 そして 5.0% TA) の白色ワセリン軟膏および皮膚適用後ワセリン軟膏中に存在する TA 固体の吸熱ピーク面積を DSC を用いて測定した。Fig. 12a は白色ワセリン軟膏および皮膚適用後ワセリン軟膏中の TA 固体の吸熱ピークを示す。TA 固体単独の吸熱ピーク温度が 302.8 °C に確認できた。一方、白色ワセリン軟膏および皮膚適用後ワセリン軟膏中に存在する TA 固体の吸熱ピーク温度はそれぞれ 312.2 °C と 297.6 °C であった。また、軟膏基剤 (白色ワセリンおよび皮膚適用後ワセリン) 由来の吸熱ピークは TA 固体の吸熱ピークと同位置にないことが確認できた (Fig. 12a)。皮膚適用後ワセリン軟膏中の TA 固体の吸熱ピーク面積は同濃度の白色ワセリン軟膏中のそれより小さかった。また、各 TA 固体の吸熱ピーク面積を軟膏中の TA 濃度に対してプロットすると

直線性の良好な相関が得られた (Fig. 12b)。すなわち、皮膚適用後ワセリン軟膏で $y=0.6087x-0.3703$ ($R^2=0.976$) (solid allow)、白色ワセリン軟膏で $y=0.6682x-0.2179$ ($R^2=0.996$) (open allow) の直線が得られた。このときの各直線の X 軸 (軟膏中 TA 濃度) 切片から求めた値を各軟膏中の TA 飽和溶解濃度の指標として用いた。その結果、皮膚適用後ワセリン軟膏の TA 飽和溶解濃度 (インデックス) は 0.60%、一方、白色ワセリン軟膏の TA 飽和溶解濃度 (インデックス) は 0.33%であることが示された。

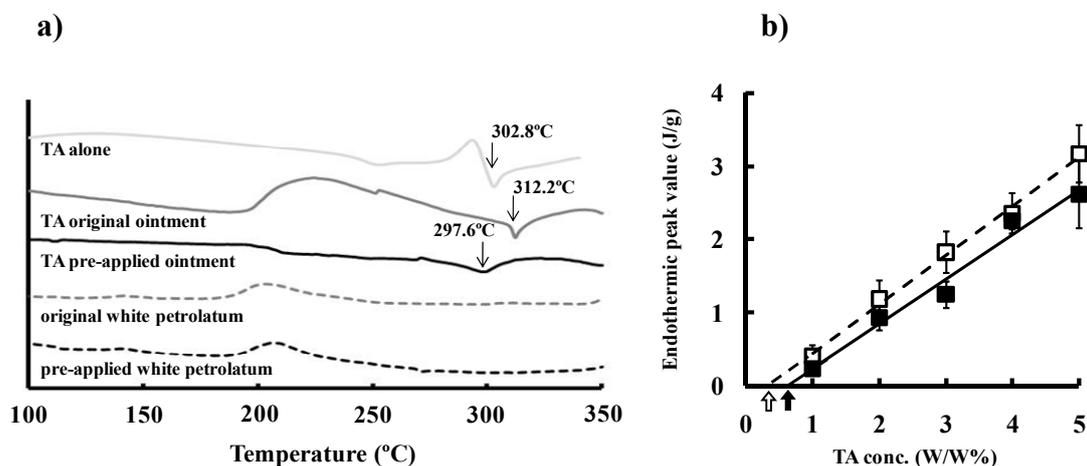


Fig. 12 DSC chart (a) and endothermic peak value-triamcinolone acetonide concentration (b) for TA original ointment (□) or TA pre-applied ointment (■). Each value shows the mean \pm S.E. (n=3). abbreviation in Fig. 12a: TA = triamcinolone acetonide, original ointment = white petrolatum ointment, pre-applied ointment = pre-applied white petrolatum ointment

4. 白色ワセリン軟膏からのトリアムシノロンアセトニドの皮膚透過性に及ぼす 皮脂成分の影響

次に、白色ワセリン軟膏からの TA のヘアレスラット腹部皮膚 (full-thickness skin と stripped skin) 透過性に及ぼす皮脂成分の影響について検討した。なお、この検討については軟膏の皮膚擦り込みは行わずに皮膚透過実験を行った。Fig. 13 に TA の皮膚透過挙動を、Table 6 に皮膚透過パラメータを示す。Stripped skin 透過実験の結果、1.0% TA 皮膚適用後ワセリン軟膏からの 6 時間累積透過量 ($1.71 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) は 1.0% TA 白色ワセリン軟膏 ($1.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) に比べて約 1.7 倍高かった (Fig. 13b)。また、皮膚適用後ワセリン軟膏の K_{ved} (0.86×10^{-2}) と P_{ved} ($1.73 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$) は 1.0% TA 白色ワセリン軟膏の K_{ved} (1.91×10^{-2}) と P_{ved} ($2.35 \times 10^{-10} \text{ cm/s}$) に比べてそれぞれ約 0.45 倍と 0.74 倍低下し、皮膚適用後ワセリン軟膏の D_{ved} ($1.17 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) は白色ワセリン軟膏 ($0.72 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) に比べて約 1.62 倍高かった (Table 6)。一方、Table 5 に示したように、1.0% TA 皮膚適用後ワセリン軟膏もしくは白色ワセリン軟膏を適用した透過実験後の stripped skin 中濃度は同程度 (それぞれ 26.27 と 26.14 $\mu\text{g}/\text{g}$) であった。

Full-thickness skin 透過実験の結果、1.0% TA 皮膚適用後ワセリン軟膏からの 24 時間累積透過量 ($0.14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) は 1.0% TA 白色ワセリン軟膏 ($0.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) に比べて約 2.3 倍高かった (Fig. 13a)。さらに、皮膚適用後ワセリン軟膏の K_{sc} (9.78×10^{-2})、 P_{sc} ($6.62 \times 10^{-10} \text{ cm/s}$) と皮膚中濃度 (13.92 $\mu\text{g}/\text{g}$) は白色ワセリン軟膏の K_{sc} (3.66×10^{-2})、 P_{sc} ($4.27 \times 10^{-10} \text{ cm/s}$) と皮膚中濃度 (10.22 $\mu\text{g}/\text{g}$) に比べてそれぞれ約 2.7 倍、約 1.6 倍そして約 1.4 倍高かった (Table 5 と 6)。

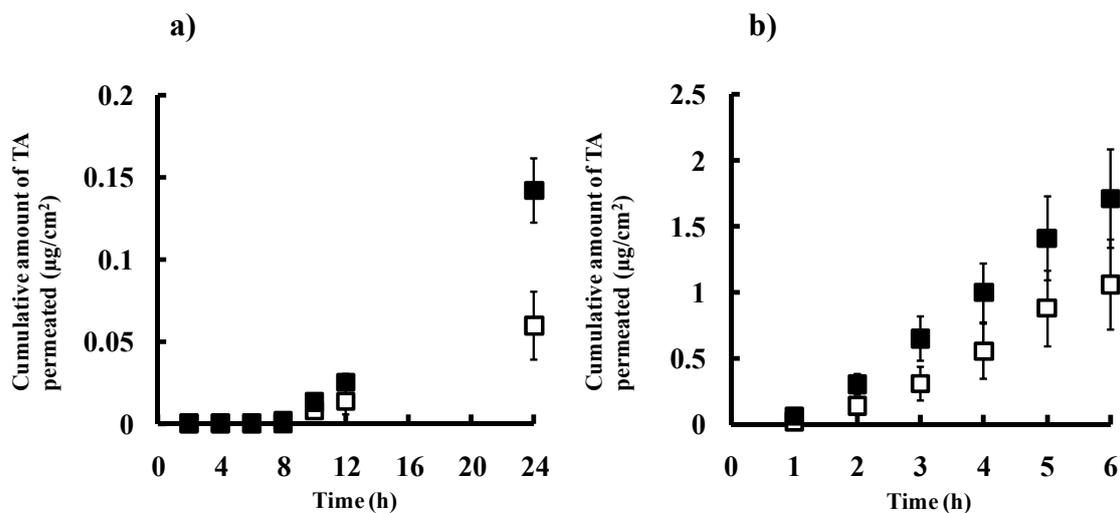


Fig. 13 Cumulative amount of triamcinolone acetone that permeated through full-thickness skin (a) and stripped skin (b) from 1.0% triamcinolone acetone ointment using original ointment base (□) or pre-applied ointment base (■). Each value shows the mean ± S.E. (n=4 or 6).

Table 6 Parameters calculated by permeation data through full-thickness or stripped hairless rat skin

| | 1.0% TA original ointment | 1.0% TA pre-applied ointment |
|---|---------------------------|------------------------------|
| C_v (mg/g) | 3.3 | 6.0 |
| $K_{sc} \times 10^{-2}$ | 3.66 ± 0.30 | 9.78 ± 2.15 |
| $K_{ved} \times 10^{-2}$ | 1.91 ± 0.17 | 0.86 ± 0.19 |
| $D_{sc} (\text{cm}^2/\text{s}) \times 10^{-11}$ | 1.78 ± 0.44 | 1.05 ± 0.09 |
| $D_{ved} (\text{cm}^2/\text{s}) \times 10^{-7}$ | 0.72 ± 0.13 | 1.17 ± 0.04 |
| $P_{sc} (\text{cm}/\text{s}) \times 10^{-10}$ | 4.27 ± 1.09 | 6.62 ± 1.02 |
| $P_{ved} (\text{cm}/\text{s}) \times 10^{-8}$ | 2.35 ± 0.51 | 1.73 ± 0.04 |
| $Flux_{full} (\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}) \times 10^{-6}$ | 1.41 ± 0.36 | 3.97 ± 0.61 |
| $Flux_{st} (\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{s}) \times 10^{-4}$ | 0.78 ± 0.17 | 1.04 ± 0.23 |

Each value shows the mean ± S.E. (n=4 or 6).

第4節 考察

各軟膏擦り込み後の皮膚透過実験結果から、TAの皮膚透過促進比は擦り込む軟膏もしくは擦り込み後に適用する軟膏で異なることが分かった。すなわち、1.0% TA 白色ワセリン軟膏の皮膚擦り込み後の1.0% TA 白色ワセリン軟膏および白色ワセリン適用群（II群およびIII群）は擦り込み未処理皮膚の1.0% TA 白色ワセリン軟膏適用群（I群）に比べて多くのTA固体を毛嚢などに侵入させ、TA固体が皮脂などに溶解そして表皮・真皮内へ浸透する可能性が考えられた（Fig. 9; ●, ○, □）。また、皮膚表面の白色ワセリン擦り込み後の1.0% TA 白色ワセリン軟膏適用群（IV群）のTA皮膚透過量がI群に比べて高かった理由として、皮膚表面（full-thickness skin）を指で擦った皮膚のインピーダンスが未処理皮膚よりも低下したことから、指で皮膚表面を擦ることで上部角層の剥離を引き起こすことが考えられた（Fig. 9; ○, □, Fig. 10）。よって、IV群のTA皮膚透過量がI群より高かったのは、軟膏を擦り込んで皮膚抵抗が低下した後に適用した白色ワセリン軟膏中のTAが毛嚢からではなく、角層実質細胞経路から透過促進したためであると考えられた。これらの結果から、I群に対するII群の軟膏の皮膚擦り込み効果比（約16.5倍）（Fig. 9; ●, □）は、主に毛嚢などからの軟膏の侵入と皮膚を擦ることによる皮膚抵抗の低下によって導かれることが分かった。さらに、III群とI群の皮膚透過量の比から予測できる毛嚢寄与率（約6.3倍）（Fig. 9; ○, □）は、I群とIV群の皮膚透過量の比から予測できる皮膚抵抗寄与率（約1.8倍）（Fig. 9; ●, ○）より高いことが予想された。したがって、TAの皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込み効果はこれらの相乗効果によって生じると考えられた。

次に、TLCを用いて皮膚適用後ワセリン中から分離定性された皮脂成分（角

質細胞間脂質なども含む) はオレイン酸コレステリル、コレステロールそして NHFC と同程度の極性を持つ脂質成分であり、少なくともこの 3 成分は皮膚表面から白色ワセリンに混合していることがわかった (Fig. 11)。分離された脂質成分を上記の皮脂成分と仮定して溶解度パラメータ値 (SP) を算出すると、コレステロール⁵⁹⁾ $19.5 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$ 、オレイン酸コレステリル⁵⁹⁾ $14.8 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$ 、NHFC⁴²⁾ $19.3 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$ (セラミド II⁴²⁾ $20.7 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$) であることから、白色ワセリン⁵⁹⁾ $15.0 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$ と値が類似している。したがって、白色ワセリンへこれらの皮脂成分が分配することは十分に起こり得る現象であると思われた。

また、白色ワセリン軟膏中の TA 固体の吸熱ピーク温度が TA 粉末単独に比べて高かったが、白色ワセリン中の熱伝導性が大気中に比べて遅いことがその原因と考えられた (Fig. 12a)。また、皮膚粘着剤に皮脂を添加することによって製剤のガラス転移温度が低下するという報告があり⁶⁰⁾、皮膚適用後ワセリン中の皮脂成分が白色ワセリン中の熱伝導性を変化させて、皮膚適用後ワセリン軟膏中の TA 固体の吸熱ピーク温度がさらに変化して TA 粉末単独と同程度になったことも考えられる。いずれにせよ、皮膚適用後ワセリン中の皮脂成分は、白色ワセリン軟膏中の TA 溶解性を約 1.8 倍上昇することが示された (Fig. 12b)。この結果は、皮膚適用後ワセリン中の皮脂成分は TA に対する可溶化作用を有することを示しており、大変重要な知見である。

さらに、各軟膏を用いた *stripped skin* および *full-thickness skin* 透過実験の結果から、1.0% TA 皮膚適用後ワセリン軟膏の K_{ved} は白色ワセリン軟膏に比べて低下したが、 K_{sc} は増加した (Table 6)。Rosado らは SP が $14\text{-}28 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$ 付近の数種の基剤を用いてジアゼパム ($\log K_{o/w}$; 2.96) の皮膚透過実験を行った結果、 SP が $20 \text{ (J/cm}^3\text{)}^{1/2}$ 付近の基剤を用いることでジアゼパムの皮膚への分配性が一番高くなることを報告している⁶¹⁾。したがって、白色ワセリン中に皮脂成分であるコ

レステロール ($19.5 \text{ (J/cm}^3)^{1/2}$) や NHFC ($19.3 \text{ (J/cm}^3)^{1/2}$) などを取り込むこと
よって白色ワセリンの SP ($15.0 \text{ (J/cm}^3)^{1/2}$) を上昇させた結果、角層の SP (20.0
 $\text{(J/cm}^3)^{1/2}$) に近似することで、皮膚適用後ワセリン軟膏から生きた表皮・真皮へ
の TA ($\log K_{o/w}; 2.53$) の分配性が低下し、角層への TA の分配性 (K_{sc}) が上昇し
たことが示唆された。しかし、 D_{ved} の上昇した理由については不明である。

第5節 小括

白色ワセリン軟膏からの TA の皮膚透過性と皮膚中濃度に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みおよび皮脂成分の影響について評価した。1.0% TA 白色ワセリン軟膏の皮膚擦り込みは擦り込み未処理に比べて TA の皮膚透過量および皮膚中濃度を共に増加させた。その理由として、指で皮膚表面を擦ることによる皮膚抵抗の低下と毛嚢への軟膏の侵入が示唆された。本章の結果から、軟膏の皮膚擦り込み適用法は病院や自宅でのシンプルな皮膚透過促進法として使用できることが明らかとなった。しかし、皮膚に対する擦り込み強度、処理時間そして軟膏適用濃度なども TA の皮膚透過性に影響を及ぼす可能性もあるため、さらに詳細な検討が必要である。また、ヘアレスラット皮膚に 6 時間適用した白色ワセリン中にコレステロールなどの皮脂成分（角質細胞間脂質なども含む）が抽出されることが明らかとなり、皮膚適用後ワセリン中の TA 飽和溶解度は白色ワセリンより約 1.8 倍高くなった。また、皮膚適用後ワセリン軟膏の TA の 24 時間累積 full-thickness skin 透過量と K_{sc} は白色ワセリン軟膏に比べて約 2.3 倍と約 2.7 倍高かった。白色ワセリン中に抽出された皮脂成分は TA に対して可溶化作用を示すことで軟膏中溶解度を上昇させ、さらに皮膚に対する白色ワセリンの親和性を変化させることで TA の皮膚透過性や皮膚中濃度に影響を及ぼしていることが考えられた。以上の結果は、局所ステロイド外用製剤の設計や軟膏の適正使用に対する有用な情報となるだろう。

第2編 白色ワセリン軟膏からの親水性薬物 FYK-1388b の放出性および皮膚透過性と皮脂成分の関係⁵³⁾

前編では、白色ワセリン軟膏からのステロイドの皮膚透過性に及ぼす種々要因について明らかにした^{23,51)}。本編では、白色ワセリン軟膏からの親水性薬物の放出性および皮膚透過性を評価し、さらに皮脂成分との関係について検討する。疎水性の高い白色ワセリンは主にステロイドのような親油性薬物に使用される。一方、医療現場では親水性薬物を含有する白色ワセリン軟膏が処方される場合もある。しかし、これまでに白色ワセリン軟膏からの水溶性薬物の放出性や皮膚透過性についてはあまり報告されていない。また、前編第2章より白色ワセリン中に皮脂成分（角質細胞間脂質も含む）が含有されると親油性薬物であるTAの皮膚透過は促進されることが明らかとなった。皮脂成分が白色ワセリンからの親水性薬物の放出性や皮膚透過性に影響を及ぼす可能性も十分考えられる。

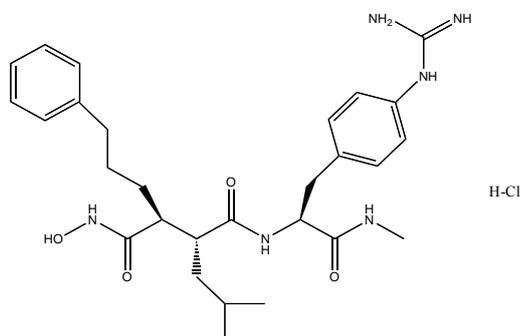
本編では、親水性薬物モデルとして新規アトピー性皮膚炎治療薬候補である N1-[2-(4-Guanidinophenyl)-1(S)-(N-methylcarbamoyl)ethyl]-N4-hydroxy-2(R)-isobutyl-3(S)-(3-phenylpropyl)succinamide hydrochloride (FYK-1388b) (Fig. 14) を選択した。なお、FYK-1388b (0.1%含有軟膏) は NC/Nga マウスの接触皮膚炎モデルに対してプレドニゾロン (0.5%含有軟膏) と同程度のアトピー性皮膚炎増悪抑制効果を有する。まず、FYK-1388b の皮膚透過性を明らかにするために、水溶液からの FYK-1388b の *in vitro* ヘアレスラット皮膚透過実験を行った。次に、白色ワセリンもしくは皮脂成分を含有する皮膚適用後ワセリンを用いた軟膏からの FYK-1388b の放出性や皮膚透過性について評価した。以上の検討より、白

色ワセリン軟膏からの親水性薬物の放出性および皮膚透過性について考察した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

FYK-1388b は第一ファインケミカル株式会社（高岡、富山）から提供された。白色ワセリンは小堺製薬株式会社（東京）、トリオレイン、オレイン酸コレステリル、オレイン酸は和光純薬工業株式会社（大阪）、Non-hydroxy fatty acid ceramide (NHFC)⁵²⁾はシグマアルドリッチ株式会社（ST. Louis, MO, U.S.A.）から購入した。その他の試薬および溶媒は市販特級もしくは HPLC 用を精製せずにそのまま用いた。



| | |
|-------------------------------------|--|
| Molecular weight | 561.13 |
| log $K_{o/w}$ | pH 2: -2.00 less or equal, pH 4: -1.52, pH 6: -0.89, pH 10: -1.00 |
| Solubility | water: ≥ 20 mg/mL, ethanol: ≥ 10 mg/mL |
| Solubility parameter ³⁸⁾ | 28.3 ((J/cm ³) ^{1/2}) |
| pKa | about 9 |

Fig. 14 Chemical structure and physicochemical properties of FYK-1388b.

2. 実験動物

雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht、7-8 週齢、体重 220-270 g) は城西大学生命科学研究センター (坂戸、埼玉) もしくは石川実験動物研究所 (深谷、埼玉) より購入した。すべての動物飼育および実験は城西大学動物実験規定に従って行った。

3. FYK-1388b 含有水溶液および白色ワセリン軟膏の調製

FYK-1388b 水溶液は精製水に 10 mg/mL (1.0%) の濃度になるように FYK-1388b を加えて調製した。また、白色ワセリン 1.0 g 当たり 10 mg および 30 mg の FYK-1388b (1.0 と 3.0%) を加えた FYK-1388b 含有白色ワセリン軟膏 (original ointment) は FYK-1388b と白色ワセリンを陶製軟膏板と軟膏ベラを用いて全質均等になるまで練合して調製した。この FYK-1388b 白色ワセリン軟膏を光学顕微鏡で観察した結果、かなりの薬物固体が確認された。したがって、白色ワセリン中に FYK-1388b はほとんど溶解していないと思われた (FYK-1388b は懸濁状態)。さらに、白色ワセリンからの薬物放出性や皮膚透過性に及ぼす皮脂成分の影響を調べるために、前編第 2 章で調製した皮膚適用後ワセリン (pre-applied white petrolatum) を用いた。皮膚適用後ワセリン 1.0 g 当たり 10 mg の FYK-1388b (1.0%) を加えて調製した。以下、これを皮膚適用後ワセリン軟膏 (pre-applied ointment) と呼ぶ。なお、皮膚適用後ワセリンは前日に調製し、白色ワセリン軟膏と皮膚適用後ワセリン軟膏は実験直前に調製した。

4. *In vitro* 薬物放出実験法

軟膏用セル (有効拡散直径 : 1.6 cm、深さ : 2.5 mm) に調製した軟膏 (約 100 mg または 300 mg) を充填した後、軟膏用セルと横型拡散セル (有効透過面積 :

0.95 cm²) の間に水漏れを防ぐためのシリコンゴムリングを装着して、レシーバー側に pH 7.4 PBS 3.0 mL を適用し、軟膏からの FYK-1388b の放出性を試験した (Fig. 15a₁)。なお、軟膏用セルに調製した軟膏を 100 mg 充填する場合、軟膏用セル底面に白色ワセリンのみ約 200 mg を充填して、その上に白色ワセリン軟膏約 100 mg を充填した。放出実験中はレシーバー側を 32°C に保ち攪拌した。レシーバー側から経時的に 500 μL ずつサンプリングし、同量の PBS をレシーバー側に戻した。サンプル中の FYK-1388b 量は HPLC を用いて測定した。

5. *In vitro* ヘアレスラット皮膚透過実験法

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下の雄性ヘアレスラットを背位固定して、角層を傷つけないよう剃毛した。水溶液からの FYK-1388b の皮膚透過性は、有効透過面積 3.14 cm² のフランツ型拡散セル (Fig. 15b) の上方に表皮が来るように摘出腹部皮膚 (full-thickness skin または stripped skin) を装着し、表皮側に調製した 1.0% FYK-1388b 水溶液 2.0 mL、真皮側に PBS 約 18 mL を適用して測定した。Stripped skin は角層をセロテープ[®] (ニチバン株式会社、東京) で 20 回剥離して調製した⁴³⁾。

一方、各軟膏からの FYK-1388b の皮膚透過性は、調製した軟膏を充填した軟膏用セルが表皮側に来るように摘出腹部皮膚 (full-thickness skin または stripped skin) を横型拡散セル (有効透過面積 0.95 cm²) に装着し、真皮側に PBS 3.0 mL を適用して試験した (Fig. 15a₂)。透過実験中は真皮側セル内を 32°C に保ち攪拌した。経時的に真皮側から 500 μL ずつサンプリングし、同量の PBS を戻した。サンプル中の FYK-1388b 量は HPLC を用いて測定した。

皮膚透過実験終了後、皮膚をセルから取り外し、皮膚表面から適用した軟膏をよく拭き取った後、サンプル調製まで -20°C で保存した。-20°C 保存した皮膚

はハサミで細かく刻み、PBS 2.5 mL と同容量の内部標準物質（10 $\mu\text{g/mL}$ 4-ヒドロキシ安息香酸メチル/アセトニトリル）を加え、氷冷下でホモジナイズした。ホモジネート液中の FYK-1388b 量は HPLC で測定した。

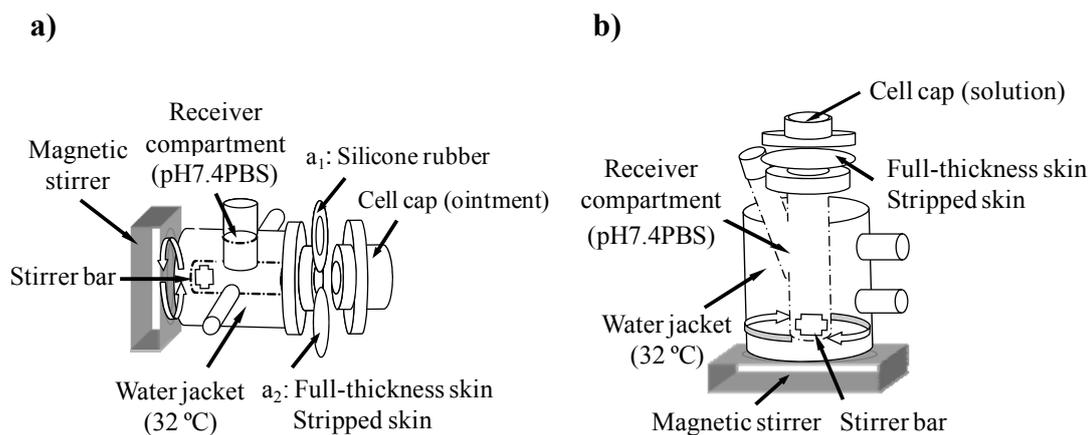


Fig. 15 Experimental set-up for *in vitro* release and skin permeation study using side-by-side (horizontal) diffusion cell (a) and Franz-type (vertical) diffusion cell (b). Silicone rubber was used for the release study (a₁), whereas full-thickness skin or stripped skin was applied for the *in vitro* skin permeation study (a₂).

6. FYK-1388b の測定法

In vitro 薬物放出実験または皮膚透過実験のレシーバーサンプルと内部標準物質（10 $\mu\text{g/mL}$ 4-ヒドロキシ安息香酸メチル/アセトニトリル）を 200 μL ずつ混合して、攪拌・遠心分離（18,000 \times g、5 min、4 $^{\circ}\text{C}$ ）を行った。このうち 20 μL を HPLC に注入した。なお、サンプル中の HPLC チャート上に FYK-1388b 代謝物は認められなかった。使用した HPLC システムはポンプ（LC-10AS；島津製作所株式会社、京都）、カラム（LiChrospher 100 RP-18 Endcapped, 4.0 \times 250 mm；Merck K GaA, Germany）、カラムオーブン（CTO-6A；島津製作所）、オートインジェクター（SIL-10A；島津製作所）、UV 検出器（SPD-10A；島津製作所）そしてレコーダー（C-R5A；島津製作所）から構成された。また、検出波長は UV 233 nm、

移動層はアセトニトリル：水：10%トリフルオロ酢酸=25：75：1、流速はそれぞれ 1.0 mL/min (*in vitro* 薬物放出実験と皮膚透過実験サンプル) と 0.8 mL/min (ホモジネートサンプル)、そしてカラム温度は 40°C とした。なお、この検出法は第一ファインケミカル（株）で確立された。

7. 統計解析

各実験から得られたデータは、3 から 7 例数の平均±標準誤差 (S.E.) により表記した。有意差検定は analysis of variance with non-repeated measures (ANOVA with non-repeated measures) と Dunnett's test を用いた。また、 $P<0.05$ を有意とした。

第 2 節 結果

1. 水溶液からの FYK-1388b の皮膚透過性

FYK-1388b の皮膚透過性を明らかにするため、1.0% FYK-1388b 水溶液を用いてヘアレスラット皮膚透過実験を行った。Fig. 16 に FYK-1388b の皮膚透過挙動を示す。Full-thickness skin を介する FYK-1388b の 24 時間累積透過量は $9.39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、stripped skin を介する 8 時間累積透過量は $1206 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。Table 7 に FYK-1388b の各皮膚中量を示す。24 時間 full-thickness skin 透過実験終了後の皮膚中量は $61.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、8 時間 stripped skin 透過実験終了後の皮膚中量は $652 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であることが分かった。

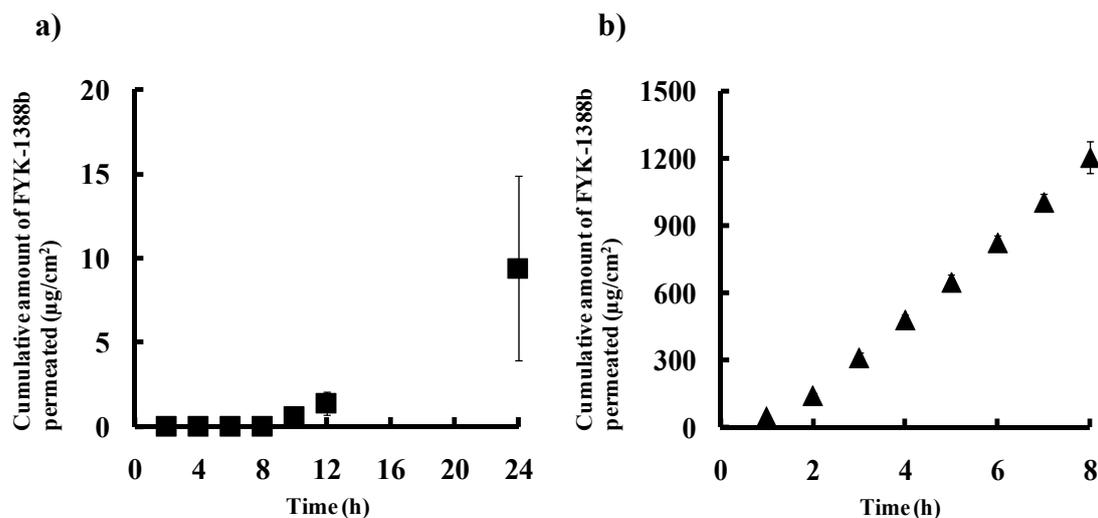


Fig. 16 Cumulative amount of FYK-1388b permeated full-thickness skin (■) (a) and stripped skin (▲) (b) from 1.0% FYK-1388b aqueous solution. Each value shows the mean \pm S.E. (n=3 or 4).

Table 7 Amount of FYK-1388b retained in stripped skin and full-thickness skin after application of a aqueous solution or white petrolatum ointment with or without pre-application to full-thickness skin or purified lanolin

| | Full-thickness skin (µg/cm ²) | Stripped skin (µg/cm ²) |
|--|--|--|
| Vehicle | | |
| Aqueous solution | 61.5 \pm 7.6 | 652 \pm 67 |
| White petrolatum (control) | 0.96 \pm 0.28 | 7.85 \pm 1.00 |
| White petrolatum with 10% purified lanolin | 3.30 \pm 0.96 | 7.04 \pm 0.56 |
| Pre-applied white petrolatum | 4.13 \pm 0.47 * | 9.56 \pm 0.76 |

* Significant at $p < 0.01$ when compared with control.

Each value shows the means \pm S.E. (n=3 or 4).

2. 白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性および皮膚透過性

Shah らは、皮膚局所製剤の *in vitro* 放出性は先発製剤に対する後発製剤の生物学的同等性の確認に使えることを指摘している^{62,63}。また、*in vitro* 放出実験は製剤からの薬物放出性の確認に有用であることから、1.0% FYK-1388b 白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性に及ぼす種々要因の影響を調べた。比較対象として1.0% FYK-1388b 親水軟膏(300 mg)と1.0% FYK-1388b 単軟膏(300 mg)からの FYK-1388b の放出実験も行った。T. Higuchi^{13,64}によれば、単位面積あたりの軟膏からの薬物放出量 Q_v は Fick の拡散法則⁶⁵に従い、以下のように時間 t の関数として表すことができる。

$$Q_r = \sqrt{(2C_0 - C_{vss})C_{vss}D_v t} = A\sqrt{t} \quad (21)$$

ここで、 C_0 と C_{vss} はそれぞれ軟膏基剤中の薬物初濃度と薬物飽和溶解度を表し、 D_v は軟膏基剤中の拡散係数を表す。また、 $A (\sqrt{(2C_0 - C_{vss})C_{vss}D_v})$ を薬物放出速度の指標として表す。Fig. 17 と 18 に各軟膏からの FYK-1388b の放出挙動を示す。単軟膏からの FYK-1388b の放出挙動は T. Higuchi 式に従ったが、白色ワセリン軟膏および親水軟膏からの FYK-1388b の放出挙動は T. Higuchi 式に従わなかった (Fig. 17b と 18)。そこで、1.0% FYK-1388b 白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性に及ぼす軟膏充填量や軟膏中濃度の影響、さらに、軟膏表面からの初期バーストを確認するために、一定時間薬物を放出した後に軟膏を再練合することによる放出性の変化について検討した。まず、軟膏中濃度(1.0%)を一定とし、軟膏充填量を 300 mg から 100 mg へ変更して、放出実験を行った。その結果、白色ワセリン軟膏 300 mg からの 4 時間累積放出量 ($13.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) は白色ワセリン軟膏 100 mg からの累積放出量 ($14.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) と同程度であり、薬物放出は軟膏表面近傍からのみ生じていると考えられた (Fig. 17; ○, ●)。次に、

軟膏充填量 (300 mg) を一定とし、軟膏中薬物濃度を 1.0% から 3.0% に変更して放出実験を行った。その結果、3.0% 白色ワセリン軟膏の 4 時間累積放出量 (44.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) は 1.0% 白色ワセリン軟膏に比べて約 3.5 倍高くなり、薬物固体量の増加が薬物放出量の増加に直接つながることが明らかとなった (Fig. 17; \blacklozenge)。また、放出実験開始後 60 分と 120 分に軟膏用セル内 (300 mg) の 1.0% 白色ワセリン軟膏を再練合して繰り返し放出実験を行った。その結果、再練合した 60 分と 120 分でそれぞれ初期バーストと同様のバースト挙動が観察され、軟膏を再び練合することにより FYK-1388b は直ちに軟膏表面から繰り返しレシーバー側へ放出されることがわかった (Fig. 17a; \diamond)。これらの結果から、白色ワセリン中の FYK-1388b の拡散性は極めて低く、白色ワセリン軟膏表面または放出表面に存在する薬物固体が、レシーバー側に溶解することによってバースト放出が起こることが明らかとなった。

初期のバースト放出とその後に続く放出をそれぞれ 1 次反応式と Fick の拡散式に従うと仮定すると、(21) 式は時間 t_0 を境界として以下のように示すことができる。

$$Q_r = B(1 - e^{-kt}) \quad \text{at} \quad 0 \leq t \leq t_0 \quad (22)$$

$$Q_r = A\sqrt{t} + C \quad \text{at} \quad t_0 \leq t < \infty \quad (23)$$

ここで、 C は薬物バースト放出量の指標を示す。また、 B と k は定数とする。 B と k そして A と C は最小二乗法を用いて放出実験データにカーブフィッティングして得た。 t_0 は (22) = (23) として計算ソフトウェア MapleTM ver. 11 (Maplesoft, Waterloo, Ontario, Canada) を用いて計算して求めた。Table 8 に白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出挙動から解析したパラメータ A 、 B 、 C 、 k 、そして t_0 を示す。算出した t_0 から放出実験開始後 50 分程度で 1.0% 白色ワセリン軟膏か

らの FYK-1388b 放出挙動は \sqrt{t} プロット上で直線になることがわかった (Fig. 17b)。また、3.0%白色ワセリン軟膏の C ($26.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) および A ($1.30 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}^{1/2}$) は 1.0%白色ワセリン軟膏に比べてそれぞれ約 3 倍および 4.8 倍高くなった (Fig. 17; ◆、Table 8)。1.0 および 3.0% FYK-1388b 白色ワセリン軟膏中の FYK-1388b の C_0 は C_{vss} よりも高く、薬物放出速度の指標である A は $\sqrt{2C_0C_{\text{vss}}D_v}$ でおおよそ表すことができる。したがって、 C_{vss} と D_v は 1.0%と 3.0% 白色ワセリン軟膏のどちらもほぼ同じであり、 A の比は約 $\sqrt{3}$ 倍、 C の比は約 3 倍であると考えられた。しかし、 A の実測値の比は理論値の比と異なったが、これはばらつきが大きく実験誤差範囲内であると思われた。したがって、(22) 式および (23) 式を用いることで白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出挙動は解析可能となった。

次に、白色ワセリンからの親水性薬物の皮膚移行性を明らかにするため、1.0% FYK-1388b 白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の *in vitro* 皮膚透過性を評価した。Fig. 19 に結果を示したように、FYK-1388b の full-thickness skin を介する透過は実験 24 時間後でも見られなかったが (Fig. 19a)、角層を除去した stripped skin を介する透過は実験開始後 1 時間で見られた (Fig. 19b; ○)。また、Table 7 は皮膚透過実験終了後の FYK-1388b の各皮膚中量を示す。1.0%白色ワセリン軟膏を full-thickness skin に適用しても透過しなかったにもかかわらず、皮膚中からは FYK-1388b ($0.96 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) が確認された。したがって、白色ワセリン中に溶解度の低い親水性薬物を含有しても、白色ワセリンから full-thickness skin へ親水性薬物が分配することが示唆された。

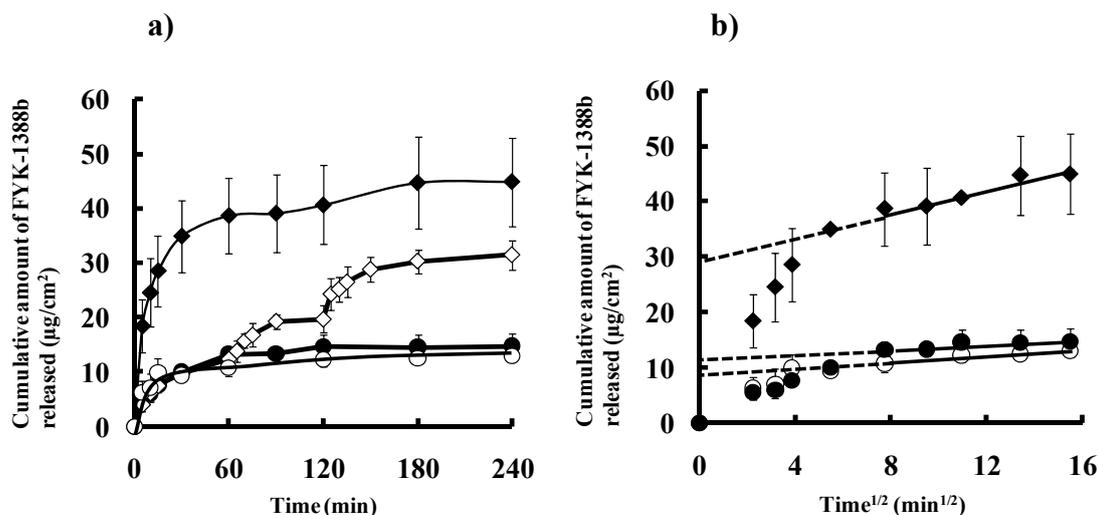


Fig. 17 a) Amount of FYK-1388b released from 100 mg of 1.0% FYK-1388b white petrolatum ointment (●), 300 mg of 1.0% FYK-1388b white petrolatum ointment (○) and with re-kneading the ointment at 60 and 120 minutes (◇) and 300mg of 3.0% FYK-1388b white petrolatum ointment (◆). b) Higuchi plot of FYK-1388b release from FYK-1388b white petrolatum ointment using the same data as shown in Fig. 17a. (The same symbols were used as in Fig. 17a.) Solid and dashed lines are calculated by the least squares method. Each value shows the mean ± S.E. (n=3-7).

Table 8 Release parameters of FYK-1388b from white petrolatum ointment

| | $A^a)$ (µg/cm ² /min ^{1/2}) | B (µg/cm ²) | C (µg/cm ²) | k (min ⁻¹) | t_0 (min) | r^2 |
|------------------------------|---|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------|-------|
| White petrolatum | | | | | | |
| 1.0% FYK-1338b 100 mg | 0.21 | 13.7 | 11.7 | 0.06 | 77.5 | 0.84 |
| 1.0% FYK-1338b 300 mg | 0.27 | 10.9 | 8.88 | 0.13 | 55.6 | 0.92 |
| 3.0% FYK-1338b 300 mg | 1.30 | 34.7 | 26.4 | 0.13 | 37.7 | 0.92 |
| Pre-applied white petrolatum | | | | | | |
| 1.0% FYK-1338b 300 mg | 0.55 | 19.6 | 16.0 | 0.17 | 41.0 | 0.85 |

a) $A = \sqrt{(2C_0 - C_{vss})C_{vss}D_v}$

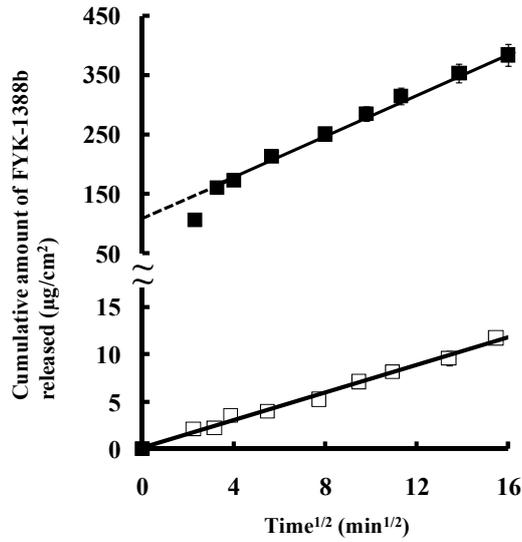


Fig. 18 Higuchi plot of FYK-1388b release from 300 mg of 1.0% FYK-1388b simple ointment (□) and hydrophilic ointment (■). Solid and dashed lines are calculated by the least squares method. Each value shows the mean \pm S.E. (n=4-8).

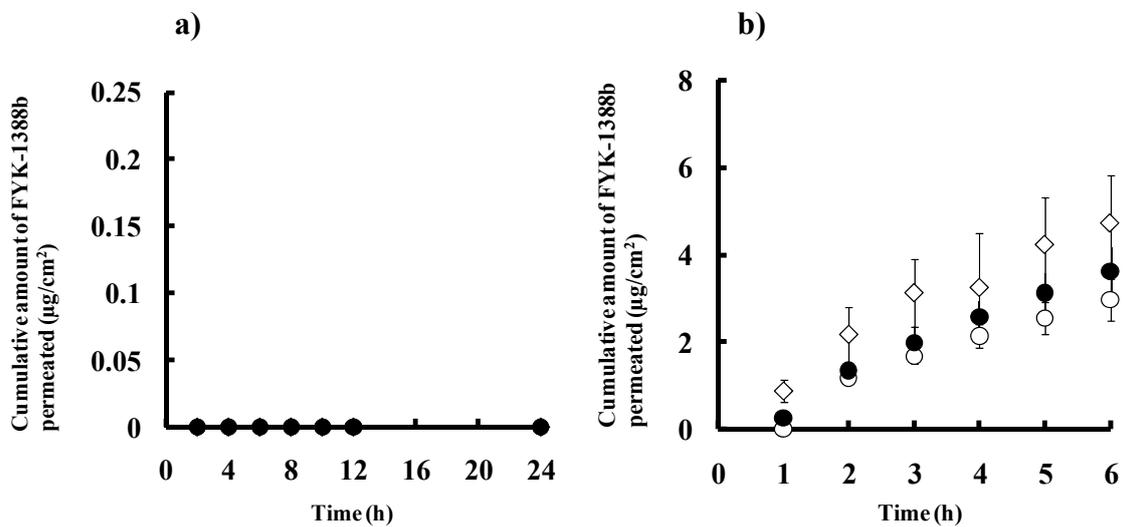


Fig. 19 Cumulative amount of FYK-1388b permeating full-thickness skin (a) or stripped skin (b) from white petrolatum ointment (○) with 10% purified lanolin (◇) and white petrolatum ointment pre-applied to skin (●) at a concentration of 1.0% FYK-1388b. Each value shows the mean \pm S.E. (n=3 or 4).

3. 白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性および皮膚透過性に及ぼす皮脂成分の影響

白色ワセリン軟膏から FYK-1388b は、full-thickness skin を介して透過しなかったが、皮膚中に浸透していた (Table 7)。すなわち、FYK-1388b が皮膚中へ分配移行していたことから、適用部位の皮膚表面に存在する皮脂成分が FYK-1388b の軟膏からの皮膚移行に関与していることが考えられる。前編第 2 章でも白色ワセリン軟膏からの TA の皮膚移行性が皮脂成分によって促進されることを明らかにした。また、ヒツジ (ovis aries) の皮脂分泌物を精製して得られる軟膏基剤である精製ラノリンが、親水軟膏からの親水性薬物の放出性や皮膚への親和性を増加することが知られている⁶⁾。

そこで、白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性および皮膚透過性に及ぼす皮脂成分の影響を評価するため、皮脂成分を含有する皮膚適用後ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性と皮膚透過性を評価した。比較対照として、精製ラノリンを 10%になるように添加した白色ワセリン軟膏を用いて同様に評価した。なお、各軟膏中の FYK-1388b 濃度は 1.0%とした。Fig. 19 に皮膚透過挙動を、Fig. 20 に薬物放出挙動をそれぞれ示す。Fig. 20 と Table 8 に示すように、皮膚適用後ワセリン軟膏からの FYK-1388b の 4 時間累積放出量 ($24.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)、および算出した A と B は白色ワセリン軟膏に比べてそれぞれ約 2 倍高かった。また、10%精製ラノリン含有軟膏からの FYK-1388b の 4 時間累積放出量 ($24.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) は白色ワセリン軟膏に比べて約 3 倍に増加したが、皮膚適用後ワセリン軟膏と同程度であった。

一方、1.0%皮膚適用後ワセリン軟膏および 10%精製ラノリン含有軟膏から full-thickness skin を介する FYK-1388b の透過は 1.0%白色ワセリン軟膏と同様に 24 時間では認められなかった。また、1.0%皮膚適用後ワセリン軟膏および 10%

精製ラノリン含有軟膏から stripped skin を介する 6 時間累積透過量 (3.61 および 4.72 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) は白色ワセリン軟膏 (2.97 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) に比べてそれぞれ約 1.2 倍と 1.6 倍で若干高い傾向を示した (Fig. 19)。さらに興味深いことに、1.0%皮膚適用後ワセリン軟膏および10%精製ラノリン含有軟膏を用いた stripped skin 透過実験終了後の FYK-1388b の皮膚中量 (9.56 および 7.04 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) は 1.0%白色ワセリン軟膏 (7.85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) と同程度であったが、full-thickness skin 透過実験終了後の皮膚中量 (4.13 および 3.30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) は 1.0%白色ワセリン軟膏 (0.96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) に比べて約 4.3 倍と 3.3 倍も高かった (Table 7)。

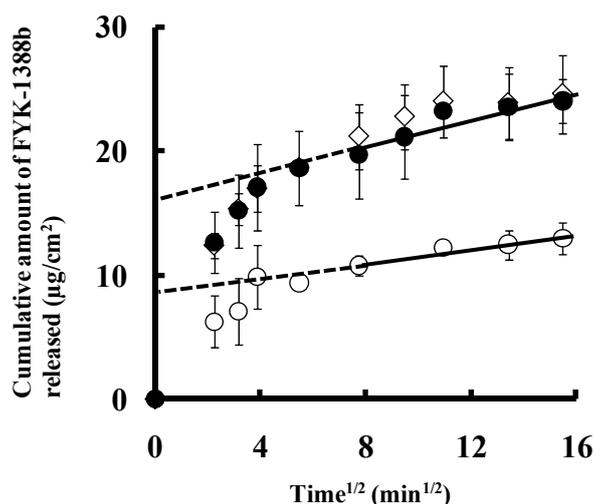


Fig. 20 Higuchi plot of FYK-1388b release from white petrolatum ointment (○) or with 10% purified lanolin (◇) and white petrolatum ointment pre-applied to full-thickness skin (●) at a concentration of 1.0% FYK-1388b. Solid and dashed lines are calculated by the least squares method. Each value shows the mean \pm S.E. (n=3 or 4).

第3節 考察

水溶液からの FYK-1388b の累積 stripped skin 透過量は累積 full-thickness skin 透過量に比べて 100 倍以上、皮膚中量も 10 倍以上の差があった (Fig. 16、Table 7)。このことから、親水性薬物である FYK-1388b の皮膚透過性に対して角層がバリアとして機能していることが明らかになった。

1.0%白色ワセリン軟膏および親水軟膏からの FYK-1388b の *in vitro* 放出実験から、実験初期に見られた白色ワセリンまたは親水軟膏からの FYK-1388b のバースト放出の理由は異なっていた可能性がある (Fig. 17b と 18; ■)。すなわち、放出実験終了後の親水軟膏の放出表面は凸状になっており、レーザー溶液によって軟膏基剤が膨潤している可能性が考えられた。一方、白色ワセリンからの放出試験では軟膏表面に存在する薬物固体の直接的な溶解に起因していると考えられた。また、1.0%FYK-1388b 白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出実験でも放出した軟膏を再練合して行った放出実験でも同様のバースト放出が見られたことから、軟膏の内側にある FYK-1388b 固体は放出界面へ移動せず、放出界面に存在する薬物固体のみによってバースト放出が生じたと考えられた (Fig. 17a)。また、白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出挙動は T. Higuchi 式に従わず、新たに示した軟膏放出解析法を用いることで解析可能となった。この解析法で算出した皮膚適用後ワセリン軟膏の軟膏放出速度の指標である A は白色ワセリン軟膏からの放出における A より約 2 倍高いことが分かった。さらに、皮膚適用後ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出量は羊の皮脂分泌物由来の精製ラノリンを含有する白色ワセリン軟膏と同程度であったことから、前編第 2 章で明らかにした皮膚適用後ワセリン中の皮脂成分(コレステロール、オレイン酸コレステリルおよび NHFC と同様の極性を持つ脂質)、特にコレステ

ロールは白色ワセリンより極性が高く乳化作用を有するため、親水性薬物の白色ワセリン軟膏中溶解度 (C_{vss}) や軟膏中拡散性 (D_v) を上昇させたことが考えられた。以上より、白色ワセリン軟膏中の FYK-1388b の拡散性は極めて低く、白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性は放出面積や放出界面付近の薬物量に依存しており、さらに、軟膏充填量にはほとんど関係しないことが明らかとなった (Fig. 17、Table 8)。また、親水性薬物 FYK-1388b に及ぼす皮膚適用後ワセリン中に含まれる皮脂成分の効果は、精製ラノリンと同様の可溶化作用によって説明できることが示唆された。

一方、白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の full-thickness skin 透過性は認められなかったが、皮膚中に FYK-1388b が浸透していることが示唆された (Fig. 19a、Table 7)。さらに、皮膚適用後ワセリン軟膏からの FYK-1388b の stripped skin 透過量は 10%精製ラノリン軟膏からの透過量と同程度であった。白色ワセリン軟膏中に親水性薬物 FYK-1388b があまり溶解しないにもかかわらず皮膚に浸透した理由として、白色ワセリン自身による密閉効果や白色ワセリン中に含まれる皮脂成分による白色ワセリンと皮膚表面 (角層) 間の親和性の改善によって、結果として FYK-1388b の透過が促進したと考えられた。したがって、白色ワセリン軟膏からの親水性薬物 FYK-1388b の皮膚への分配移行に皮脂成分が関与していることが示唆された。

第5節 小括

白色ワセリンおよび水溶液からの親水性薬物 FYK-1388b の放出性と皮膚移行性に関して検討した。水溶液からの FYK-1388b の皮膚透過実験から、FYK-1388b の皮膚透過の主なバリアは角層であることが明らかとなった。次に、白色ワセリンからの FYK-1388b の放出挙動は T. Higuchi 式に従わず、新たに示した軟膏放出挙動解析法を用いることで解析可能となった。また、皮膚適用後ワセリン軟膏からの FYK-1388b の放出性は 10%精製ラノリン含有軟膏と同程度であることから、皮膚適用後ワセリン中に含有される皮脂成分の可溶化作用によって白色ワセリン中の親水性薬物の溶解度や拡散性が上昇した可能性が示唆された。

一方、白色ワセリン軟膏からの FYK-1388b の full-thickness skin 透過性は見られなかったが、皮膚中で FYK-1388b は確認された。さらに、皮膚適用後ワセリン軟膏からの FYK-1388b の stripped skin 皮膚透過性は 10%精製ラノリン含有軟膏と同程度であった。したがって、白色ワセリン中に皮脂成分が含有されると、白色ワセリンと皮膚間の親和性が改善されることにより、FYK-1388b の皮膚透過性が促進された可能性が考えられた。以上のことから、白色ワセリン軟膏からの親水性薬物 FYK-1388b の放出性は主に白色ワセリンの放出界面に存在する薬物固体に依存すること、白色ワセリン中に分散している FYK-1388b の放出界面までの拡散性は非常に低いこと、さらには、放出性は皮脂成分に影響を受けることが明らかとなった。また、前編第 2 章および本編の結果から、皮膚表面に存在する皮脂成分が白色ワセリン軟膏からの親油性薬物および親水性薬物の皮膚への移行を促進することが明らかとなった。

第3編 イオントフォレシスを用いたステロイドの直接的 経皮気管デリバリーの可能性⁶⁷⁾

第1編および第2編ではアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患に用いられる外用剤の皮膚透過性に関して検討した。本編では、気管支喘息や咳喘息患者の気管炎症部位への新規ステロイド投与経路として、皮膚外用剤を用いた頸部皮膚を介するステロイドの直接的気管デリバリーの可能性について検討した。皮膚表面に適用した外用剤から薬物が直接的に皮下や筋肉に送達される可能性やその比率については多くの報告がなされている⁶⁸⁻⁷²⁾。たとえば、Singh と Roberts はステロイドの皮膚適用部位の皮下組織中濃度は血漿や対側組織中濃度より高いことを報告している⁷³⁾。さらに、皮膚深部へ薬物を到達させる手段として、血管作動性化学物質の利用や物理的皮膚透過促進法の一つであるイオントフォレシス (IP) などを使用する方法が知られている⁷⁴⁻⁷⁶⁾。電気的エネルギーを利用する IP は主にイオン性薬物の皮膚透過を促進する目的で使用されており、electrorepulsion と electroosmosis の2つのメカニズムが知られている^{77,78)}。Electrorepulsion はイオン性薬物の皮膚透過促進の主なメカニズムであり、electroosmosis はカチオン選択的皮膚透過性によっておこる solvent flow の一種で中性化合物の皮膚透過をも促進する⁷⁹⁾。IP を利用した局所製剤はすでに米国で認可されており、フェンタニル局所製剤である Ionsys[®] (Ortho-McNeil-Janssen Pharmaceuticals, Inc., Titusville, NJ, U.S.A.)⁸⁰⁾ やリドカイン局所製剤である Iontocaine[®] (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, U.S.A.)⁸¹⁾ などが知られている。また、Murray らは IP 処理することにより、局所適用した水溶性グルココルチコイドを皮下組織の病変部位へ直接的に送達できることを報告している⁸²⁾。

そこで本編では、ステロイドの直接的経皮気管デリバリーに対する IP 処理の有用性について検討した。なお、本研究では IP 処理を行うため、外用基剤として PBS を用いた。まず、気管への薬物送達の可能性について測定が簡易な水溶性蛍光物質であるフルオレセインナトリウム (FL-Na) を用いて *in vivo* ヘアレスラット頸部皮膚適用実験を行い、気管中 FL 濃度および気管表面の蛍光強度について評価した。また、皮膚を透過した FL は全身循環から間接的に気管へ再分布する可能性が考えられた。そこで、FL-Na を *in vivo* 下でヘアレスラット腹部皮膚に適用し、FL の直接的気管デリバリーに及ぼす IP 処理の影響について評価した。次に、気管支喘息治療薬である水溶性ステロイドのコハク酸プレドニゾロンナトリウム (PS-Na) を用いて頸部皮膚を介した気管デリバリーについて検討した。プロドラッグであるコハク酸プレドニゾロン (PS) は皮膚中エステラーゼ⁸³⁾により活性体であるプレドニゾロン (P) に代謝 (加水分解) されることが知られている⁸⁴⁾。そこで、PS と P の皮膚透過性に及ぼす IP の効果について明らかにするために、PS の *in vitro* ヘアレスラット皮膚透過実験を行った。さらに、PS の直接的経皮気管デリバリーに及ぼす IP の効果を調べるため、*in vivo* ヘアレスラット頸部皮膚適用実験を行った。

アトピー性皮膚炎患者の皮膚バリア機能は健常人よりも低いことが知られている⁸⁵⁾。喘息患者の中にはアトピー性皮膚炎を併発して角層バリア能が健常人の皮膚に比べて低下している可能性も考えられる。そこで、本研究では、皮膚バリア低下モデルとしてテープストリッピング法により角層を除去した皮膚を用いて PS の送達に及ぼす IP 処理の影響についても調査した。なお、IP を使用せずに同様に実験を行った群を IP 未処理群とした。得られた実験結果から、IP を使用したステロイドの直接的経皮気管デリバリーの可能性について考察した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

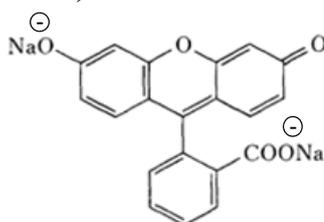
フルオレセインナトリウム (FL-Na)、コハク酸プレドニゾロンナトリウム (PS-Na) そしてプレドニゾロン (P) はシグマアルドリッチ株式会社 (ST. Louis, MO, U.S.A.) から購入した (Fig. 21)。その他の試薬や溶媒は特級もしくは HPLC 級のを精製せずにそのまま使用した。

Fluorescein sodium (FL-Na)

MW 376.30

$\log K_{o/w}$ -0.615

pKa 6.4

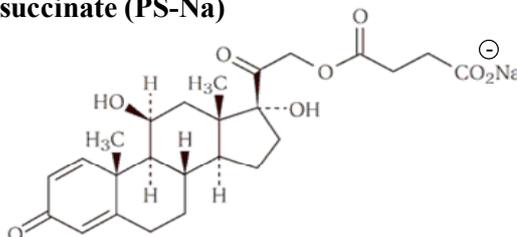


Prednisolone sodium succinate (PS-Na)

MW 482.5

$\text{Clog } K_{o/w}$ -1.01

pKa 0.3-0.95



Prednisolone (P)

MW 360.45

$\log K_{o/w}$ 1.62

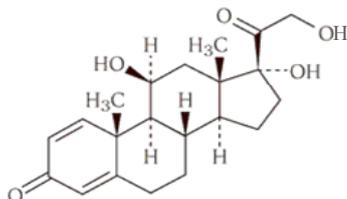


Fig. 21 Chemical structures and physicochemical properties of fluorescein sodium, prednisolone sodium succinate and prednisolone.

2. 実験動物

雄性ヘアレスラット (WBM/ILA-Ht、8-9 週齢、体重: 220-280 g) は城西大学

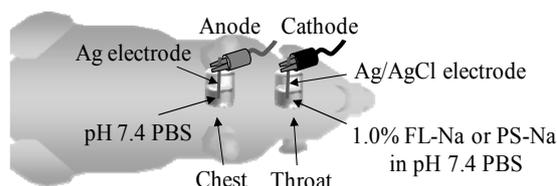
生命科学センター（坂戸、埼玉）もしくは石川実験動物研究所（深谷、埼玉）から購入した。すべての動物飼育および実験は城西大学動物実験規定に従って行った。

3. *In vivo* ヘアレスラット腹部および頸部皮膚適用実験法

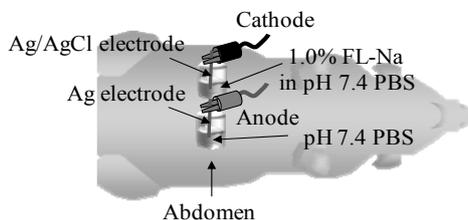
ウレタン（1.0 g/kg, *i.p.*）麻酔下、剃毛処理したヘアレスラット頸部および胸部皮膚表面に1ヶ所ずつ、下部を切除したポリプロピレンチューブ（旭硝子株式会社、東京）（高さ：2.0 cm、有効透過面積：0.64 cm²）を接着剤で固定した（Fig. 22a）。もしくは腹部皮膚表面の左右1ヶ所ずつに接着剤でチューブを固定した（Fig. 22b）。また、必要に応じて20回テープストリッピングを行い角層を除去した皮膚、stripped skin、も用いた⁴³⁾。頸部皮膚または一方の腹部皮膚に1.0% FL-Naもしくは1.0% PS-Na/PBS 700 μLを適用し、それぞれ胸部皮膚または他方の腹部皮膚にPBS 700 μLを8時間適用した。IPを使用する場合、Fig. 22aとbに示したように、薬物適用側にカソード電極（AgCl）を、またPBS適用側にアノード電極（Ag）をセットした。IPによる皮膚透過速度の促進効果は電流密度に比例し⁸⁶⁾、ヒトへの安全性を考慮して利用できるIPの最大電流値は0.5 mA/cm²であるという報告⁸⁷⁾がある。そこで、電流電源装置（ADIS-HP, ver.6；久光製薬株式会社、東京）を用いて直流定電流0.4 mA/cm²とし、8時間IPの連続処理を施した。適用8時間後に頸静脈から採血を行った後、組織中の血液を取り除くために腹部大静脈から脱血を行い、その後、頸部皮膚（throat skin）、胸骨舌骨筋（sternohyoid muscle）そして気管（trachea）の順に組織を摘出した。採取した血液を遠心分離（18800×g、5 min、4 °C）した後に血漿（plasma）を分取した。血漿または摘出した組織はサンプル調製まで-20°Cで冷凍保存した。冷凍保存した各組織はハサミで細かく切り刻み、超純水を適宜加えて氷冷下でホモ

ジナイズした。調製した 1.0%ホモジネート液 200 μ L に内部標準物質 (PS と P; 1.0 μ g/mL トリアムシノロンアセトニド/アセトニトリル、FL; アセトニトリル) を等量加えて攪拌して遠心分離した。その後、上清サンプル中の PS および P 濃度を LC/MS を用いて測定した。また、上清サンプル中の FL (E_x : 485 nm, E_m : 535 nm) 濃度は蛍光分光光度計 (RF5300PC、島津製作所株式会社、京都) を用いて測定した。

a) *In vivo* application on the throat skin in hairless rat



b) *In vivo* application on the abdominal skin in hairless rat



c) *In vitro* permeation through abdominal hairless rat skin

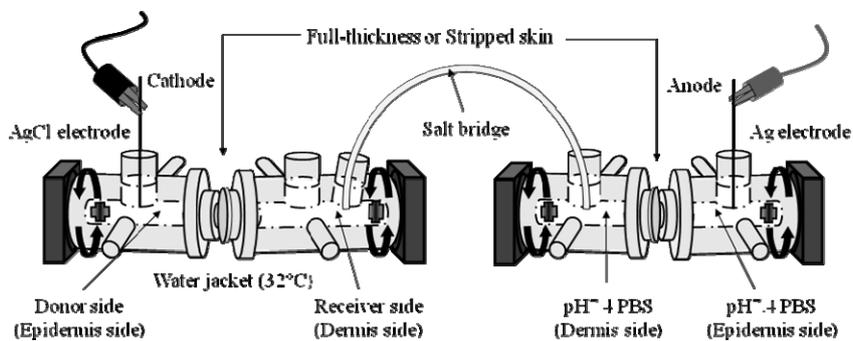


Fig. 22 Experimental setup for the *in vivo* hairless rat application study (a and b) and *in vitro* permeation study through hairless rat skin (c).

4. *In vivo* ヘアレスラット頸部皮膚適用実験後の気管表面の蛍光顕微鏡観察

前述したように FL-Na の頸部皮膚適用実験後に摘出した気管は、背部側をハサミで切断した後、気管の外側表面（腹部側）を上にして接着剤を用いてガラス板に固定して蛍光顕微鏡（IX71；オリンパス株式会社、東京）で観察した。また、気管表面の蛍光顕微鏡画像の蛍光強度は、画像処理ソフトウェア ImageJ（National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, U.S.A.）を用いて算出した。

5. *In vitro* ヘアレスラット腹部皮膚透過実験法

ペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, *i.p.*）麻酔下、剃毛処理したヘアレスラット腹部皮膚（full-thickness skin または stripped skin）を摘出した後、真皮側の脂肪をハサミで取り除いた。摘出した皮膚は PBS で 1 時間水和後、横型拡散セル（有効透過面積：0.95 cm²）に装着させた。表皮側に 1.0% PS-Na/PBS 3.0 mL そして真皮側に PBS 3.0 mL を適用して皮膚透過実験を行った。また、IP を使用する場合は、Fig. 22c に示したように、皮膚を装着させた横型拡散セルを 2 組用いて、カソード側（AgCl 電極）の表皮側に 1.0% PS-Na/ PBS 3.0 mL と真皮側に PBS 3.0 mL を適用し、アノード側（Ag 電極）の表皮および真皮側に PBS 3.0 mL を適用した後、各横型拡散セルの真皮側を塩橋（1.0% agar in 3.3N KCl 水溶液）でつなぎ、直流定電流 0.4 mA/cm² で full-thickness skin の場合は 10 時間、stripped skin の場合は 8 時間連続処理した。実験中はセル内を 32°C に保ち、濃度を均一にするために攪拌した。経時的に真皮側セル（IP 適用時はカソード側の真皮側セル）から 0.5 mL サンプリングし、同量の PBS を戻した。また、透過実験終了後の皮膚はサンプル調製まで -20°C で保存した。-20°C 保存した皮膚はハサミで細かく切り刻み、PBS を加えて氷冷下でホモジナイズした。皮膚透過実験のサンプルおよび皮膚ホモジネート液 200 μL に内部標準物質（10 μg/mL

4-ヒドロキシ安息香酸プロピル／アセトニトリル) 200 μ L を加えて攪拌して遠心分離 (18,000 \times g、5 min、4 $^{\circ}$ C) した。その上清サンプル中の PS および P 濃度を HPLC を用いて測定した。

6. コハク酸プレドニゾロンおよびプレドニゾロンの測定法

HPLC システムはポンプ (LC-20AS ; 島津製作所)、カラム (Capcell pak C18、UG120 5 μ m、4.6 \times 250 mm ; 株式会社資生堂、東京)、オートインジェクター (SIL-20A ; 島津製作所)、UV 検出器 (SPD-20A ; 島津製作所) そして解析システム (LC solution ; 島津製作所) で構成され、検出波長は UV 254 nm、移動相は 0.032%臭化テトラ n-ブチルアンモニウム、0.32%リン酸水素二ナトリウム十二水和物および 0.69%リン酸二水素カリウム含有水溶液 : メタノール (21 : 29) 混合液、流速は 1.0 mL/min とした。PS を測定した LC/MS システムはポンプ (LC-10AD ; 島津製作所)、カラム (Develosil ODS UG-3 ; 野村化学株式会社、愛知) そして四重極型質量分析装置 (API300 ; 宝酒造株式会社、京都) から構成され、移動相は 1 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリル (65 : 35)、流速は 1.0 mL/min とし、0.1 mL/min の割合で検出部へ行くようにスプリットした。一方、P を測定した LC/MS システムはイオントラップ型タンデム質量分析装置 (LCQ DECA XP plus ; サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社、神奈川)、ポンプ (paradigm MS4 ; AMR、東京)、オートインジェクター (CTC HTS-PAL ; AMR)、カラム (Hypersil GOLD, 3 μ m, 2.1 \times 50 mm ; サーマフィッシャーサイエンティフィック) から構成され、移動相は A:B 溶液 (65 : 35) (A ; アセトニトリル : 精製水 : ギ酸 = 90 : 10 : 0.1、B ; アセトニトリル : 精製水 : ギ酸 = 2 : 98 : 0.1)、流速は 0.2 mL/min とした。各 LC/MS 装置のカラム温度は室温とし、ポジティブイオンモードで検出した。

7. 統計解析

各実験から得られたデータは平均値±標準誤差で示した (n=3-8)。有意差検定は、多群間比較には Analysis of variance with non-repeated measures (ANOVA with non-repeated measures) と Bonferroni 補正を行った Mann-Whitney U-test を、また、2 群間比較には Mann-Whitney U-test を用いた。P<0.05 を有意であるとした。

第 2 節 結果

1. イオントフォレシスを用いたフルオレセインの直接的経皮気管デリバリー

ヘアレスラット頸部皮膚を介する FL の直接的気管デリバリーの可能性について評価した。1.0% FL-Na/PBS を *in vivo* でヘアレスラット頸部皮膚に適用して IP 処理を 8 時間連続で行った。Fig. 23 に結果を示す。IP 処理群の頸部皮膚、胸骨舌骨筋、気管そして血漿中の FL 濃度 (8366、36.4、136 nmol/g そして 24.5 nmol/mL) は IP 未処理群 (6164、23.5、51.5 nmol/g そして 0.38 nmol/mL) に比べてそれぞれ約 1.5 倍、1.5 倍、2.6 倍そして 65 倍高かった。Fig. 24 に IP 処理群および IP 未処理群の気管表面画像を示す。IP 処理群の気管表面 (intensity: 17.0 ± 2.7) は IP 未処理群 (intensity: 11.7 ± 1.9) より強い蛍光を発していることを視覚的に観察した (Table 9)。これらの結果から、IP 処理群の FL-Na の経皮気管デリバリーは IP 未処理群に比べて気管中 FL 濃度を増加させることが分かった。また、同時に血漿中 FL 濃度も著しく上昇させることが分かった。したがって、全身循環に吸収された FL は間接的に気管へ再分布する可能性も考えられた。そこで、1.0% FL-Na/PBS を *in vivo* でヘアレスラット腹部皮膚に適用して IP 処理を 8 時間連続で行った。Fig. 23 にその結果も併せて示す。腹部皮膚 IP 処理群の血漿中 FL 濃度 (30.0 nmol/mL) は頸部皮膚 IP 処理群と同程度であったが、頸部皮膚、胸

骨舌骨筋そして気管中の FL 濃度 (27.5、4.89 そして 11.2 nmol/g) は頸部皮膚 IP 処理群と比べてそれぞれ約 0.003 倍、0.14 倍そして 0.08 倍であることが分かった。したがって、全身循環から気管への再分布もわずかに寄与しているが、頸部皮膚への IP 処理が著しく高い効果を示すことが明らかとなった。

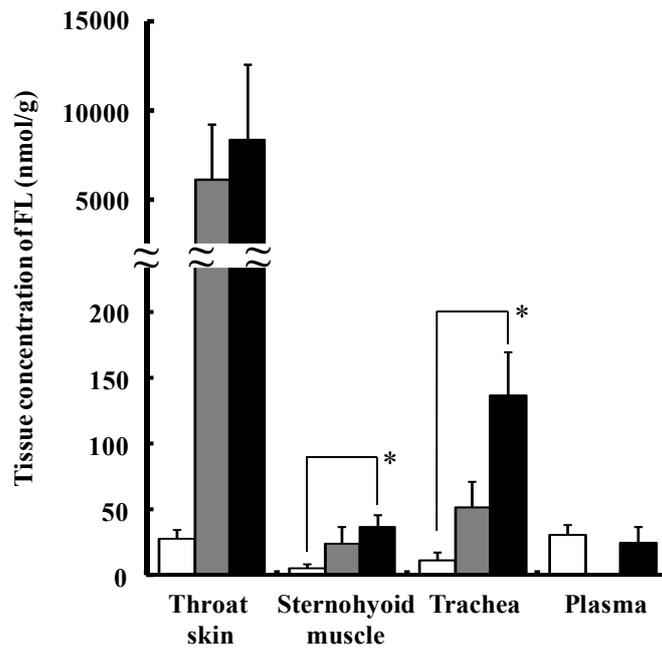


Fig. 23 Amount of fluorescein retained in each tissue sample excised from hairless rats 8 h after the application of 1.0% fluorescein sodium salt/pH 7.4 PBS to full-thickness throat or abdominal skin with or without cathodal iontophoresis. Each column shows the mean \pm S.E. (n=3-5). Statistical analysis was performed by ANOVA with non-repeated measures and Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction. * $P < 0.05$ was assumed to be significant. Symbols: □: abdominal skin for IP group, ■: throat skin for non-IP group, ■: throat skin for IP group.

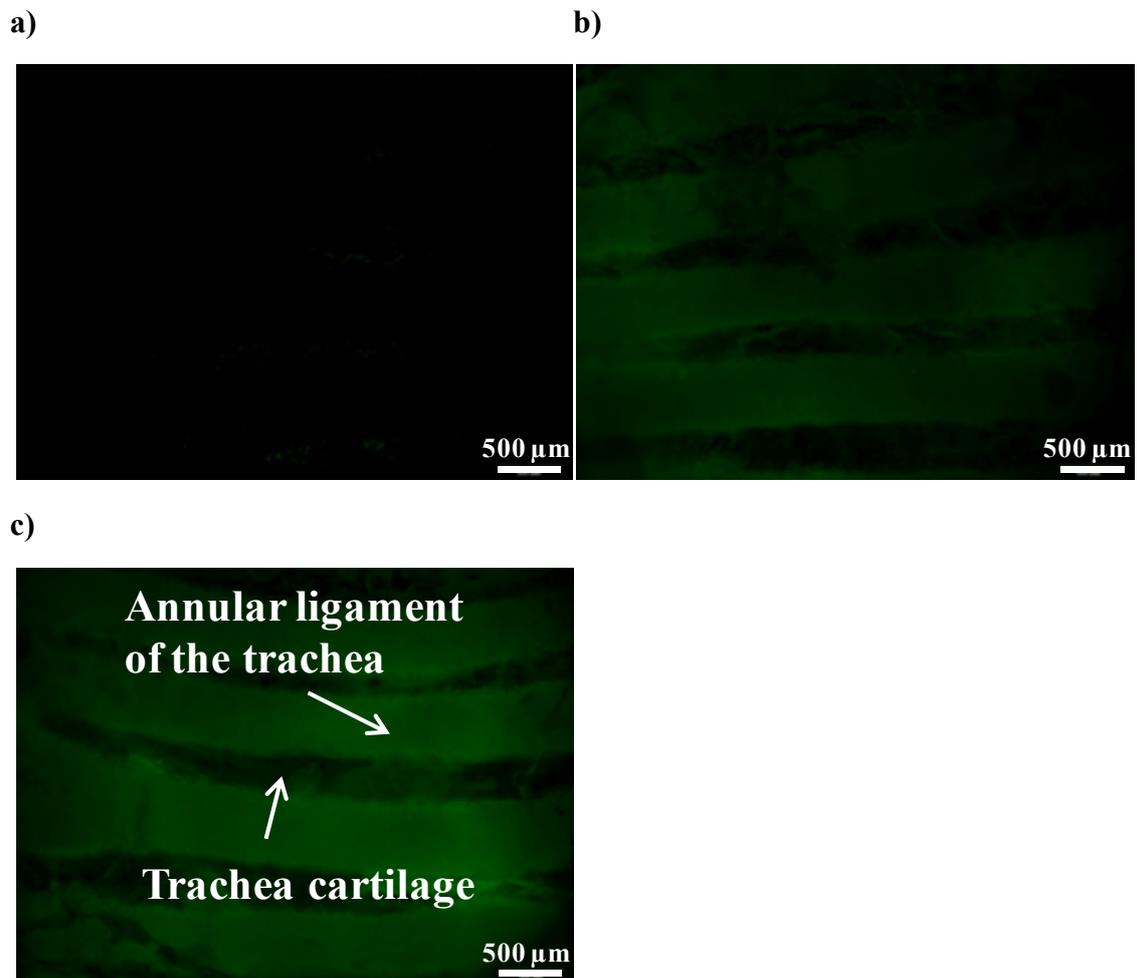


Fig. 24 Fluorescent observation of the outside surface of the trachea after the *in vivo* application of 1.0% sodium fluorescein/pH7.4 PBS to the throat skin of hairless rats. a) Non-application, b) non-IP group, and c) IP group.

Table 9 Fluorescent intensity calculated by fluorescent image of outside surface of trachea using image processing software (ImageJ)

| | Non-application | non-IP group | IP group |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|
| Intensity | 3.5 ± 0.6 | 11.7 ± 1.9 | 17.0 ± 2.7 |

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

2. イオントフォレシスを用いたコハク酸プレドニゾロンおよびプレドニゾロンの皮膚透過性

次に、PS の皮膚透過性に及ぼす IP 効果を調べるため、IP 処理した PS-Na の *in vitro* 腹部皮膚透過実験を行った。Full-thickness skin 透過実験より、IP 処理群の PS、P および total (PS+P) の 10 時間累積皮膚透過量 (131、117 そして 248 nmol/cm²) は IP 未処理群 (4.2、12.2 そして 16.4 nmol/cm²) に比べてそれぞれ約 30 倍、10 倍そして 15 倍高かった (Fig. 25a と Table 10)。また、IP 処理群の PS、P および total の皮膚中濃度 (245、501 そして 746 nmol/g) は、IP 未処理群 (62、59 そして 121 nmol/g) に比べてそれぞれ約 4 倍、9 倍そして 6 倍高かった (Table 11)。一方、stripped skin 透過実験より、IP 処理群の PS の 8 時間累積皮膚透過量 (1434 nmol/cm²) は IP 未処理群 (1281 nmol/cm²) と同程度であったが、P および total の皮膚透過量 (1183 および 2617 nmol/cm²) は IP 未処理群 (428 および 1709 nmol/cm²) に比べて約 2.8 倍そして 1.5 倍高かった (Fig. 25b と Table 10)。また、IP 処理群の皮膚中 PS、P および total 濃度 (7642、1548 および 9191 nmol/g) は IP 未処理群 (8010、1576 および 9586 nmol/g) と同程度であった (Table 11)。

Table 10 Cumulative amount of prednisolone succinate and prednisolone that permeated through skin 10 h or 8 h after their application to full-thickness or stripped abdominal skin

| | Full-thickness skin | | Stripped skin | |
|------------------------------|---------------------|------------|---------------|------------|
| | non-IP group | IP group | non-IP group | IP group |
| PS (nmol/cm ²) | 4.0 ± 3.2 | 125 ± 15 * | 1217 ± 347 | 1362 ± 189 |
| P (nmol/ cm ²) | 11.6 ± 3.5 | 112 ± 14 * | 407 ± 104 | 1124 ± 510 |
| PS+P (nmol/cm ²) | 15.6 ± 6.6 | 237 ± 22 * | 1624 ± 300 | 2486 ± 540 |

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

* Significant at $P < 0.05$ when compared with non-IP group. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test.

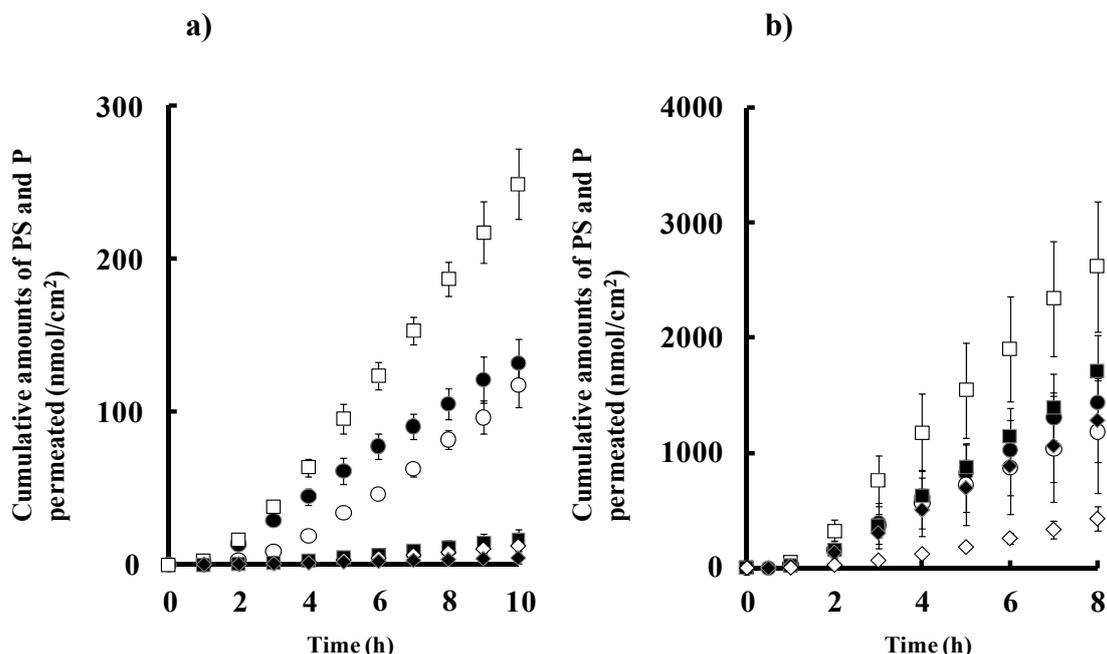


Fig. 25 Effects of cathodal iontophoresis on the time course of the cumulative amounts of prednisolone succinate and prednisolone that permeated through full-thickness skin (a) or stripped skin (b) from 1.0% prednisolone sodium succinate solution. Each value shows the mean \pm S.E. (n=3-6). Symbols: non-IP group; ■: PS+P, ◆: PS, ◇: P, IP group; □: PS+P, ●: PS, ○: P.

Table 11 Skin concentrations of prednisolone succinate and prednisolone 10 h or 8 h after their application to full-thickness or stripped abdominal skin

| | Full-thickness skin | | Stripped skin | |
|---------------|---------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | non-IP group | IP group | non-IP group | IP group |
| PS (nmol/g) | 62.4 \pm 8.4 | 245 \pm 40 * | 8010 \pm 1412 | 7642 \pm 586 |
| P (nmol/g) | 59.3 \pm 15.3 | 501 \pm 67 * | 1576 \pm 88 | 1548 \pm 124 |
| PS+P (nmol/g) | 121 \pm 22 | 747 \pm 48 * | 9587 \pm 1457 | 9191 \pm 567 |

Each value shows the mean \pm S.E. (n=3-8).

* Significant at $P < 0.05$ when compared with non-IP group. Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test.

3. イオントフォレシスを用いたコハク酸プレドニゾロンおよびプレドニゾロンの直接的経皮気管デリバリー

PS の皮膚透過性に及ぼす IP の効果は PS および P の皮膚透過を促進することが明らかとなった。次に、PS の経皮直接的気管デリバリーに対する IP の効果を評価するため、1.0% PS-Na/PBS を *in vivo* でヘアレスラット頸部皮膚に適用して IP 処理を行った。Full-thickness skin に適用した場合、IP 処理群の PS の胸骨舌骨筋と血漿中の濃度 (3.2 nmol/g と 0.19 nmol/mL) は IP 未処理群 (5.4 nmol/g と 0.21 nmol/mL) と同程度であったが、IP 処理群の PS の頸部皮膚と気管中の濃度 (228 と 6.7 nmol/g) は IP 未処理群 (119 と 4.1 nmol/g) に比べて約 2 倍そして 1.6 倍高かった (Fig. 26a)。また、IP 処理群の P の頸部皮膚、胸骨舌骨筋そして気管中の濃度 (401、6.9 そして 8.5 nmol/g) は、IP 未処理群 (31.4、0.3 そして 0.7 nmol/g) に比べてそれぞれ約 13 倍、23 倍そして 12 倍高かったが、IP 処理群の P の血漿中濃度 (0.03 nmol/mL) は IP 未処理群 (0.11 nmol/mL) に比べて約 0.3 倍に低下した (Fig. 26b)。一方、stripped skin に適用した場合、IP 処理群の PS の頸部皮膚、胸骨舌骨筋、気管そして血漿中の濃度 (1080、10.5、11.1 nmol/g そして 1.09 nmol/mL) は、IP 未処理群 (1674、10.4、8.7 nmol/g そして 0.55 nmol/mL) と比べて同程度であった (Fig. 27a)。また、IP 処理群の頸部皮膚、胸骨舌骨筋、気管そして血漿中の P 濃度 (372、5.0、0.9 nmol/g そして 0.54 nmol/mL) も IP 未処理群 (405、7.0、1.3 nmol/g そして 0.63 nmol/mL) と同程度であることがわかった (Fig. 27b)。

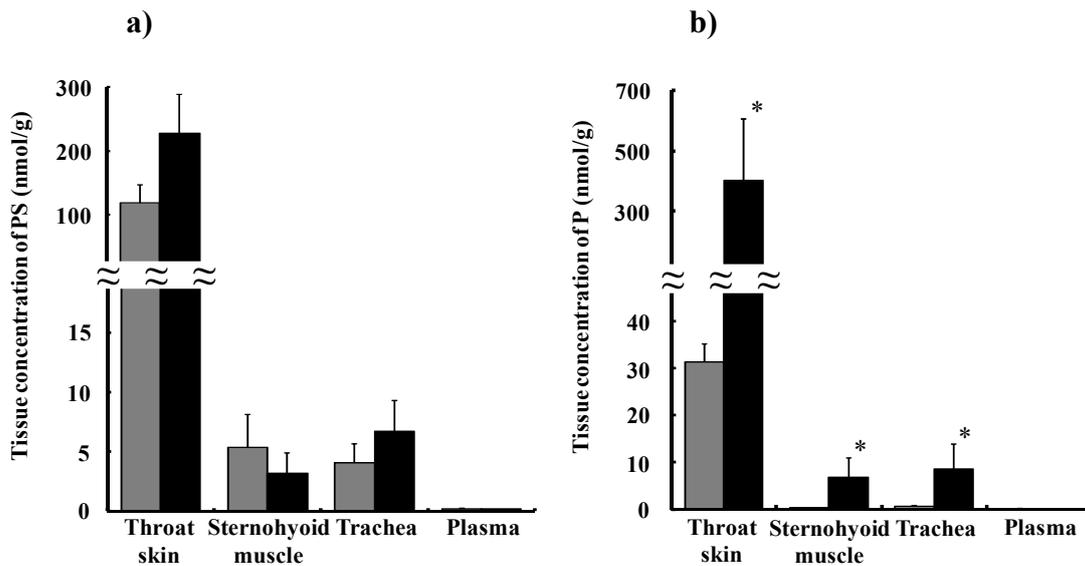


Fig. 26 Amounts of prednisolone succinate (a) and prednisolone (b) retained in the excised tissue of hairless rats 8 h after the application of 1.0% prednisolone sodium succinate solution to full-thickness throat skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n=3-6). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. *Significant at $P < 0.05$ when compared with non-IP group. Symbols: ■: non-IP group, ■: IP group.

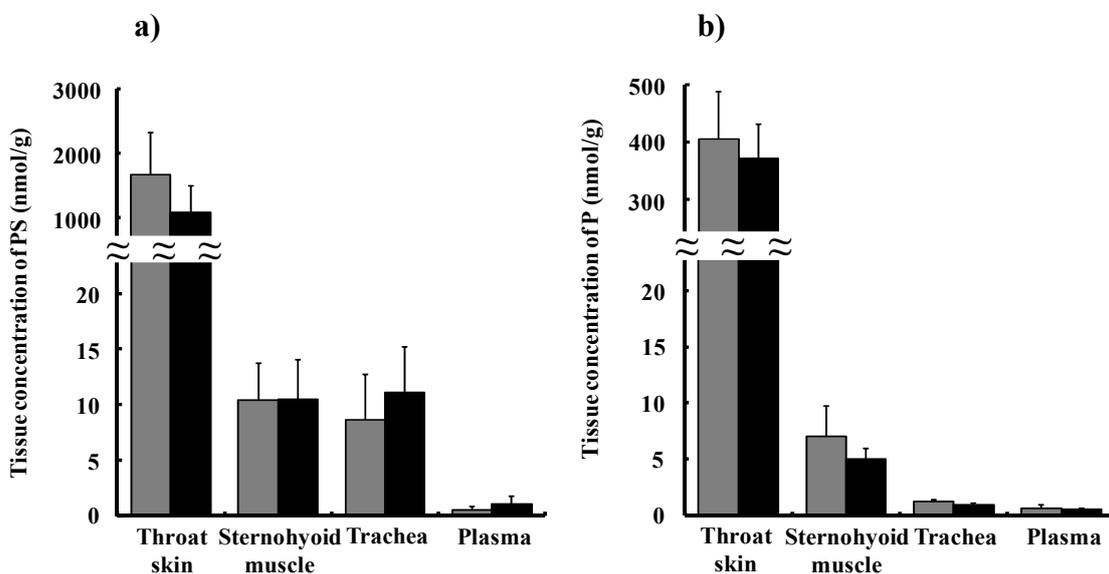


Fig. 27 Amounts of prednisolone succinate (a) and prednisolone (b) retained in the excised tissue of hairless rats 8 h after the application of 1.0% prednisolone sodium succinate solution to stripped throat skin. Each point represents the mean \pm S.E. (n=3-6). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney U-test. Symbols: ■: non-IP group, ■: IP group.

第3節 考察

Petelenz らは、アニオン性薬物であるリン酸デキサメタゾンナトリウムを陽極もしくは陰極に皮膚適用した場合、単位時間×単位電流当たりに経皮送達される薬物量は陽極からの *electroosmosis* による送達よりも陰極からの *electrorepulsion* による送達の方が効果的であることを報告している⁸⁸⁾。このことから、FL の皮膚表面を介した直接的な気管デリバリー促進効果はアニオン性薬物の FL を陰極に適用して生じた *electrorepulsion* 効果であることが考えられた (Fig. 23)。また、IP 処理群の胸骨舌骨筋／頸部皮膚の FL 濃度比 (0.004) は IP 未処理群 (0.004) と同じであったが、IP 処理群の気管／胸骨舌骨筋中濃度比 (3.74) は IP 未処理群 (2.19) に比べて約 1.7 倍高かった。カソードル IP の FL (アニオン性薬物) に対する *electrorepulsion* 効果は、胸骨舌骨筋から気管への透過性の促進、すなわち、皮下組織深部への移行に促進効果がある可能性が考えられた。また、FL の気管に対する親和性は胸骨舌骨筋に対する親和性よりも高いことも考えられた。したがって、気管中に見られる FL の特異的な高蓄積性は IP の皮下組織深部への直接的な促進効果によって生じることが示唆された (Fig. 23)。

カソードル IP を用いたプロドラッグである PS (アニオン性薬物) の full-thickness skin 透過促進効果 (Fig. 25) は多くの文献から *electrorepulsion* に起因していると考えられる⁸⁸⁻⁹⁰⁾。また、これらの結果は Laneri らが報告したアノードル IP を用いた dehydroepiandrosterone のプロドラッグ (水溶性ステロイド) の皮膚透過促進効果と類似する⁹¹⁾。すなわち、カソードル IP が PS の皮膚透過を促進した結果、皮内で代謝された P の透過量を増加させることが可能となった。さらに、P は皮膚に対する親和性が高く、特に表皮中に蓄積しやすいことが報告されている⁹²⁾。Table 11 に示したように、この結果は今回のデータと一致した。一方、P および PS の stripped skin 透過性に対する IP の促進効果はあまり見

られなかった (Fig. 26)。この原因として、水溶性ステロイドである PS の *stripped skin* 透過速度は *full-thickness skin* 透過速度に比べてかなり早いこと (約 100 倍) や角層除去による IP の電流経路変化による薬物輸送率の変化が考えられた。さらに、PS および P の皮膚中濃度はある一定濃度に達すると、皮膚中エステラーゼ活性は飽和する可能性が考えられた (Table 11 と Fig. 26)。また、IP 処理群の *full-thickness skin* を介した P の累積透過量は IP 未処理群より高いことから、IP 処理によって誘導された PS の透過促進は皮膚中の PS から P への代謝を増加させたことが示唆された。IP の使用は PS の代謝比 $P/(PS+P)$ を増加させ、PS の皮膚中濃度比 $PS/(PS+P)$ を減少させた。

次に、PS-Na を頸部 *full-thickness skin* に適用し IP 処理をした結果、IP 処理群の気管/胸骨舌骨筋中 PS 濃度比 (2.1) は IP 未処理群 (0.76) より約 2.8 倍高かった。FL と同様に、カソードル IP と PS の併用効果によって組織透過性は促進され、PS は特異的に気管中へ蓄積したと考えられた (Fig. 26a)。また、IP 処理群の P の胸骨舌骨筋や気管中濃度の顕著な上昇や P の血漿中濃度の減少は、PS の組織透過性促進によって増加した P の皮膚透過量の増加に起因していると考えられた (Fig. 26b)。一方、PS-Na を頸部 *stripped skin* に適用した後の PS および P の気管デリバリーは IP 使用の有無にかかわらず同程度であり、*in vitro* の腹部 *stripped skin* 透過実験と同様の結果が見られた (Fig. 27)。異常ケラチンは通常ケラチンと同程度のステロイド結合能はないと考えられるため、疾病皮膚のステロイド蓄積性は通常皮膚に比べて小さい可能性も指摘されている⁹³⁾。また、*stripped skin* で見られるように、アトピー性皮膚炎患者は一般的に低い皮膚バリア機能を示す。したがって、気管への PS と P の高レベルの直接的透過性はこのような皮膚バリア機能の低い患者で起こりやすいかもしれない。

IP は薬物の皮膚透過性を上昇させるために利用されるが、いくつかの薬物で

は皮膚透過性や皮膚中濃度を増加しないことも示唆されている。Fig. 28はFig. 26に示したカソードル IP の有無による PS もしくは P の組織中濃度と血中濃度の移行概略図を示す。Fig. 28 で示すように、PS のようなプロドラッグの皮膚透過性が高まれば P のような活性型薬物の高い皮膚中濃度を得ることができ、結果として気管などの深部組織へ活性薬物をデリバリーできると考えた。このように、IP はプロドラッグの適用後にプロドラッグ活性体の皮膚中（with or without IP: 401 と 31.4 nmol/g）や深部組織中（with or without IP: 8.5 と 0.7 nmol/g）の濃度を増加させることに使用可能であろう。

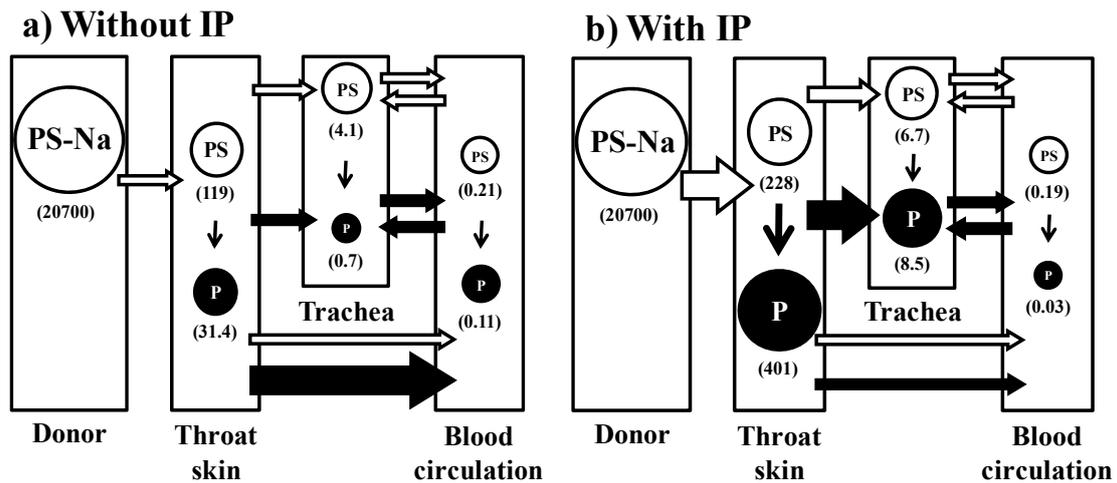


Fig. 28 Schematic illustration of prednisolone sodium succinate or prednisolone migration into the trachea through the throat skin with or without cathodal iontophoresis. The open big arrows show the permeation rate of PS, the closed big arrows show the permeation rate of P, and the small arrows indicate the rate of metabolism of PS to P. The open and closed circles represent the amounts of PS and P (nmol/g), respectively.

第4節 小括

頸部皮膚を介したステロイドの直接的気管デリバリーの可能性および IP 処理の有用性について *in vitro* および *in vivo* 皮膚透過実験を用いて検討した。まず、頸部皮膚を介した酸性蛍光物質である FL の直接的気管デリバリーの可能性及びカソードル IP 処理の有用性は気管中薬物濃度および気管表面画像から明らかにされた。しかし、IP はイオン性薬物の皮膚透過性を増加させるが、常に薬物の皮膚中濃度を増加させるとは限らなかった。次に、水溶性ステロイドのプロドラッグである PS とその代謝物である P の直接的経皮気管デリバリーに対する IP 処理の効果を評価した。その結果、カソードル IP は P の直接的気管デリバリーを増加させることが明らかとなった。P の顕著な気管中濃度の上昇は IP 処理による PS の皮膚透過促進によって増加した P の皮膚透過量の増加に起因していることが考えられた。したがって、カソードル IP 処理を用いたプロドラッグ PS-Na の頸部皮膚局所適用は気管へ活性体である P を直接的に送達するのに役立つ。

以上のことから、IP を用いたステロイド外用剤の頸部皮膚適用法は気管支喘息および咳喘息患者の気管炎症部位への新たなステロイド投与経路として有効な手段であると思われた。今回の研究は、頸部皮膚を介したステロイドの直接的気管デリバリーの可能性について評価するために数時間の連続的な IP 処理を行った。今後はさらに、直接的気管デリバリーに対する IP の電流密度や適用時間の影響⁸⁶⁾などについて評価する必要があるだろう。

結論

皮膚外用剤には多様な剤形があり、軟膏剤やクリーム剤は皮膚疾患を対象に繁用されている。皮膚外用剤を用いた局所効果は対照薬物の皮膚透過性に密接に関係し、薬物の外用基剤から皮膚への分配性や皮膚中での拡散性の評価が重要となる。これらの透過パラメータに影響及ぼす要因として、薬物の外用基剤中の熱力学的活量やその存在状態（溶解もしくは懸濁状態）、または外用剤適用部位の皮膚バリア状態や皮膚表面の皮脂成分、さらには外用剤の適用方法などが挙げられる。

皮膚疾患に用いる軟膏基剤として皮膚刺激性の少ない白色ワセリンが用いられている。白色ワセリンは高い親油性を示すため、主薬としてステロイドのような親油性薬物を含有するケースが多いが、親水性薬物を含有するケースもある。しかし、白色ワセリンを基剤とした軟膏からのステロイドや親水性薬物の放出性や皮膚透過性に関する系統だった詳細な研究は少なく、未だ不明な点も多い。

一方、ステロイドは皮膚疾患治療薬に加えて呼吸器疾患治療薬としても繁用され、気管支喘息や咳喘息などに対する第一選択治療薬として吸入ステロイド剤が使用される。しかしながら、吸入ステロイド剤の使用が困難な患者が多数みられ、さらに使用しても十分な効果を得られないこともある。そこで、物理的皮膚透過促進法の一つであるイオントフォレシス (IP) を用いて頸部皮膚を介したステロイドの直接的気管デリバリーを考案した。

本研究では、外用剤からの親油性薬物であるステロイドおよび親水性薬物の皮膚透過性に及ぼす種々因子の影響について明らかにし、さらに、新たな皮膚外用剤の適用方法として、IP を用いた皮膚外用剤からのステロイドの経皮直接的気管デリバリーの可能性について検討した。以下に得られた結果について要

約する。

第1編 外用剤からのステロイドの皮膚透過性とその影響因子の関係

第1章では、水溶液からのステロイドであるトリアムシノロンアセトニド(TA)の種々膜透過性に及ぼす熱力学的活量および薬物存在状態の影響について評価した。TA水溶液(5、10もしくは22 $\mu\text{g}/\text{mL}$)または懸濁液(30もしくは1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を用いてシリコーン膜、ヘアレスラット皮膚およびLSE-high透過実験を行った。その結果、定常状態時のTAのシリコーン膜、ヘアレスラット stripped skin、LSE-high および stripped LSE-high 透過速度は基剤中の薬物溶解濃度すなわち熱力学的活量に比例して上昇し、飽和溶解濃度(活量一定)以上で一定となった。このことから、TAの種々膜透過性は薬物の存在状態に影響を受けないことがわかった。しかし、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液を適用したTAのヘアレスラット full-thickness skin 透過速度、角層中拡散係数 D_{sc} および角層中透過係数 P_{sc} は、熱力学的活量が同一である飽和水溶液(22 $\mu\text{g}/\text{mL}$)に比べて約2倍高い値を示した。さらに、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 懸濁液適用直後のヘアレスラット皮膚表面を走査型電子顕微鏡で観察した結果、毛嚢周辺にTA粉末粒子が観察され、毛嚢へ侵入する可能性があると思われた。これらの結果から、懸濁液中のTA固体は皮膚毛嚢などから侵入し、皮脂などに溶解し、皮膚内へ浸透する可能性が示唆された。

第2章では、白色ワセリン軟膏からのTAの皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みおよび皮脂成分の影響について評価した。まず、白色ワセリン軟膏からのTAの皮膚透過性に及ぼす軟膏の皮膚擦り込みの影響について評価した。1.0% TA白色ワセリン軟膏を30秒間擦り込んだ後に同軟膏を皮膚適用した時のTAの24時間累積皮膚透過量は、擦り込み未処理皮膚に1.0% TA白色ワセリン軟膏を皮膚適用した時のTAの累積透過量よりも約16.5倍上昇した。また、指で擦っ

た皮膚のインピーダンスは、未処理皮膚に比べて約 1/3 であった。これらの結果から、軟膏の皮膚擦り込みによる透過促進効果は毛嚢などへの軟膏の侵入と皮膚抵抗の減少の相乗効果によって生じることが示唆された。さらに、皮脂成分を含む軟膏基剤モデルとしてヘアレスラット腹部皮膚に 6 時間適用した白色ワセリン（皮膚適用後ワセリン）を用いて TA の白色ワセリン軟膏中溶解度および TA の皮膚透過性に及ぼす皮脂成分の影響について評価した。まず、皮膚適用後ワセリン中の皮脂成分の有無を調べるため、TLC を用いて分離定性を行った。その結果、コレステロール、オレイン酸コレステリルそしてセラミド（NHFC）と同じ極性を持つ脂質が同定された。したがって、皮膚適用後ワセリン中に少なくともこれら 3 成分は含まれていると考えられた。また、皮膚適用後ワセリン軟膏中の TA 溶解度は白色ワセリン軟膏中のそれより約 2 倍高いことが示唆された。白色ワセリンに皮脂成分が含有されたことで、TA が皮脂成分によって可溶化されたと推定された。さらに、皮膚適用後ワセリン軟膏を用いた full-thickness skin を介する TA の 24 時間累積透過量および見かけの角層分配係数 K_{sc} は白色ワセリン軟膏適用時に比べてそれぞれ約 2.3 倍と 2.7 倍増加した。白色ワセリン中に皮脂成分が含有されると白色ワセリンと皮膚（角層）間の親和性が高まり、結果的に TA の皮膚透過が促進されたと考えられた。

以上、皮膚外用剤からのステロイドである TA の皮膚透過性に及ぼす基剤中の熱力学的活量や薬物存在状態および軟膏の皮膚擦り込みや皮脂成分の影響について明らかにした。これらの結果は、ステロイドの外用製剤設計や軟膏の適正使用について有用な情報となるだろう。

第2編 白色ワセリン軟膏からの親水性薬物 FYK-1388b の放出性および皮膚透過性と皮脂成分の関係

白色ワセリン軟膏にほとんど溶けない親水性薬物を含有したときの薬物放出性や皮膚透過性は未だ不明な点も多い。そこで前編の親油性薬物 (TA) と対比するため、モデル親水性薬物として新規アトピー性皮膚炎治療薬候補の FYK-1388b を選択して試験した。FYK-1388b の白色ワセリン軟膏からの放出挙動は T. Higuchi 式に従わなかったが、新たな軟膏放出挙動解析法を用いることでその放出挙動解析が可能となった。なお、放出された FYK-1388b は主に軟膏の放出界面に存在していたものであり、基剤中にほとんど溶解せず分散している FYK-1388b は放出界面までほとんど拡散・移行しないことが示唆された。また、白色ワセリン軟膏をヘアレスラット皮膚 (full-thickness skin) に適用すると FYK-1388b は皮膚透過しなかったが、皮膚移行 (皮膚分配) は確認できた。一方、FYK-1388b 皮膚適用後ワセリン軟膏を用いた FYK-1388b の放出量および皮膚透過量は、白色ワセリン軟膏からの放出量と皮膚透過量に比べて著しく増加し、羊の皮脂分泌物由来の精製ラノリンを加えた軟膏からの FYK-1388b の放出性および皮膚透過性と同程度となった。これらの結果から、白色ワセリン中に含有された皮脂成分は、白色ワセリン軟膏中の水溶性薬物 FYK-1388b の溶解度および拡散性を増加させ、さらに白色ワセリンと皮膚の親和性を改善する作用があると考えられた。

以上、白色ワセリン軟膏からの親水性薬物 FYK-1388b の放出性や皮膚透過性について明らかし、さらにそれらに対する皮脂成分の影響についても明らかにした。第1編第2章および第2編の結果は、親油性薬物や親水性薬物を含有する白色ワセリン軟膏に対する皮脂成分の役割について有用な情報となるだろう。

第3編 イオントフォレシスを用いたステロイドの直接的経皮気管デリバリーの可能性

吸入ステロイド剤を使用できない気管支喘息および咳喘息を伴う患者に対する新たな薬物投与経路として、皮膚外用剤を用いたステロイドの直接的経皮気管デリバリーの可能性とイオントフォレシス (IP) 処理の有用性について評価した。まず、蛍光物質であるフルオレセイン Na (FL-Na) を用いて、1.0% FL-Na/PBS をヘアレスラット頸部皮膚に適用して IP 処理を8時間連続で行った。その結果、IP 処理群の FL の気管中濃度や気管表面の蛍光強度は IP 未処理群に比べてそれぞれ約 2.6 倍と 1.5 倍高かった。また、頸部皮膚 IP 処理群の FL の血漿中濃度は、腹部皮膚 IP 処理群と同程度であったが、FL の気管中濃度は約 12 倍高かった。このことから、IP をどこに適用しても全身循環への薬物移行性は変わらないものの、気管への薬物移行は頸部皮膚からの直接的な影響が極めて強いことが示唆された。次に、プレドニゾロン (P) のプロドラッグであるコハク酸プレドニゾロン Na (PS-Na) を用いて PS と IP の併用効果を調べるため、1.0% PS-Na/PBS で *in vitro* ヘアレスラット full-thickness skin 透過実験を行った。その結果、IP 処理群の PS および活性体である P の 10 時間累積透過量は IP 未処理群に比べて約 30 倍と 10 倍高かった。また、*in vivo* でヘアレスラット頸部 full-thickness skin に適用した場合、IP 処理群の PS および P の気管中濃度は IP 未処理群に比べてそれぞれ約 1.6 倍と 12 倍高かった。P の気管中濃度の顕著な上昇はカソード電極とアニオン性薬物の PS 間に生じた *electrorepulsion* 効果による PS の皮膚透過促進によって増加した P の皮膚透過量の増加に起因していると考えられた。

以上、IP を用いたステロイドの直接的経皮気管デリバリーは皮膚や皮下組織を通過して直接的に気管へステロイドを送達可能であることが示唆された。特に、IP とプロドラッグを用いることで有効であることも示唆された。このこと

から、IP を用いた皮膚外用剤の頸部皮膚適用法は気管支喘息および咳喘息患者の気管炎症部位への新たなステロイド投与経路として有用であることが示唆された。

以上、本研究で見出した結果は皮膚外用剤（特にローション、軟膏やクリーム剤）の製剤設計や適正使用、さらに新規適用方法に向けて有用な情報となるであろう。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に際して終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次 先生に感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始有益なご指導、ご助言を賜りました城西国際大学薬学部准教授 長谷川哲也 先生ならびに城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座助教 藤堂浩明 先生に感謝の意を表します。

さらに、本論文作成にあたり、ご教示とご校閲をいただきました城西大学薬学研究科薬物療法学講座教授 津田 整 先生ならびに城西大学薬学研究科薬品物理化学講座教授 関 俊暢 先生に御礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行にあたり、有益なご意見ならびに実験のご協力をいただきました第一ファインケミカル株式会社 大島康一 氏ならびに独立行政法人国立病院機構災害医療センター 上村光弘 先生に御礼申し上げます。

最後に、本研究の実施にご協力いただきました城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座 鈴木恭沙 修士および藤野このみ 修士ならびに研究生 羽田乃武子 博士を始めとする関係諸氏に深く感謝いたします。

引用文献

1. Martin K., Ariëns E. J. (ed.): Drug Design IV, Academic Press, New York and London, 1973, 93-148.
2. Buhse L., Kolinski R., Westenberger B., Wokovich A., Spencer J., Chen C. W., Turujman S., Gautam-Basak M., Kang G. J., Kibbe A., Heintzelman B., Wolfgang E., Topical drug classification, *Int. J. Pharm.*, **295**, 101-112 (2005).
3. 奈良武志, 永井恒司 (監修) : DDS の基礎と開発, シーエムシー出版, 東京, 2000, 86-98.
4. 橋田充 著: ドラッグデリバリーシステム, 化学同人, 東京, 1995, 23-38.
5. 杉林堅次, 永井恒司 (監修) : DDS の基礎と開発, シーエムシー出版, 東京, 2000, 34-49.
6. 藤堂浩明, 杉林堅次, 薬物の皮膚表面および皮内からの吸収促進と制御, *Drug Delivery System*, **20**, 452-459 (2005).
7. Scheuplein R. J., Mechanism of percutaneous absorption I, *J. Invest. Dermatol.*, **45**, 334-346 (1965).
8. Scheuplein R. J., Mechanism of percutaneous absorption II, *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79-88 (1967).
9. Scheuplein R. J., Blank I. H., Brauner G. J., Macfarlane D. J., Percutaneous absorption of steroids, *J. Invest. Dermatol.*, **52**, 63-70 (1969).
10. Cheng Y. H., Hosoya O., Sugibayashi K, Morimoto Y., Effect of skin surface lipid on the skin permeation of lidocaine from pressure sensitive adhesives, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1640-1644 (1994).
11. Rantuccio F., Scardigno A., Conte A., Sinisi D., Coviello C., Histological changes in

- rabbits after application of medicaments and cosmetic bases, *Contact Dermatitis*, **5**, 392-397 (1979).
12. Shindler H., Petrolatum for drugs and cosmetics, *Drug Cosmet. Ind.*, **89**, 36-82 (1961).
 13. Higuchi T., Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments, *J. Soc. Cosmetic Chemists*, **11**, 85-97 (1960).
 14. Hatanaka T., Oguchi M., Sugibayashi K., Morimoto Y., Influence of isosorbide dinitrate concentration on its skin permeability from adhesive matrix devices, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1802-1805 (1991).
 15. Müller-Goymann C. C., Alberg U., Modified water containing hydrophilic ointment with suspended hydrocortisone-21-acetate -the influence of the microstructure of the cream on the *in vitro* drug release and *in vitro* percutaneous penetration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **47**, 139-143 (1999).
 16. Busse W., Elias J., Sheppard D., Banks-Schlegel S., Airway remodeling and repair, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **160**, 1035-1042 (1999).
 17. Niimi A., Matsumoto H., Minakuchi. M., Airway remodeling in cough-variant asthma, *Lancet*, **356**, 564-565 (2000).
 18. Cheriyan S., Greenberger P. A., Patterson R., Outcome of cough variant asthma treated with inhaled steroids, *Ann. Allergy*, **73**, 478-480 (1994).
 19. Bateman E. D., Hurd S. S., Barnes P. J., Bousquet J., Drazen J. M., FitzGerald M., Gibson P., Ohta K., O'Byrne P., Pedersen S. E., Pizzichini E., Sullivan S. D., Wenzel S. E., Zar H. J., Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary, *Eur. Respir. J.*, **31**, 143-178 (2008).
 20. Rachelefsky G. S., Liao Y., Faruqi R., Impact of inhaled corticosteroid-induced

- oropharyngeal adverse events: results from a meta-analysis, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **98**, 225-238 (2007).
21. Tanaka H., Yamada G., Saikai T., Hashimoto M., Tanaka S., Suzuki K., Fujii M., Takahashi H., Abe S., Increased airway vascularity in newly diagnosed asthma using a high-magnification bronchovideoscope., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **168**, 1495-1499 (2003).
22. Kamimura M., Mouri A., Takayama K., Mizutani T., Hamamoto Y., Iikura M., Furihata K., Cough challenge tests involving mechanical stimulation of the cervical trachea in patients with cough as a leading symptom, *Respirology*, **15**, 1244-1251 (2010).
23. Ishii H., Todo H., Sugibayashi K., Effect of thermodynamic activity on skin permeation and skin concentration of triamcinolone acetonide, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 556-561 (2010).
24. Goldman L., Thompson R. G., Trice E. R., Cortisone acetate in skin disease, *A.M.A. Arch. Derm. Syphilol.*, **65**, 177-186 (1952).
25. Sulzberger M. B., Witten V. H., The effect of topically applied compound F in selected dermatoses, *J. Invest. Dermat.*, **19**, 101-102 (1952).
26. Dempski R. E., Portnoff J. B., Wase A. W., *In vitro* release and *in vivo* penetration studies of a topical steroid from non aqueous vehicles, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 579-582 (1969).
27. Woodford R., Barry B. W., Bioavailability and activity of topical corticosteroids from a novel drug delivery system, the aerosol quick-break foam, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 99-103 (1977).
28. Wiedersberg S., Leopold C. S., Guy R. H., Bioavailability and bioequivalence of

- topical glucocorticoids, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**, 453-466 (2008).
29. Pershing L. K., Silver B. S., Krueger G. G., Shah V. P., Skelley J. P., Feasibility of measuring the bioavailability of topical betamethasone dipropionate in commercial formulations using drug content in skin and a skin blanching bioassay, *Pharm. Res.*, **9**, 45-51 (1992).
30. Hashiguchi T., Takada A., Ikesue A., Ohta J., Yamaguchi T., Yasutake T., Otagiri M., Evaluation of the topical delivery of a prednisolone derivative based upon percutaneous penetration kinetic analysis, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 882-885 (1998).
31. Knutson K., Harrison D. J., Pershing L. K., Goates C. Y., Transdermal absorption of steroids, *J. Control. Release*, **24**, 95-108 (1993).
32. Dumas K. J., Scholtz J. R., The psoriasis bio-assay for topical corticosteroid activity, *Acta Dermatovener (Stockholm)*, **52**, 43-48 (1972).
33. Sugibayashi K., Todo H., Oshizaka T., Owada Y., Mathematical model to predict skin concentration of drugs: Toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, *Pharm. Res.*, **27**, 134-142 (2010).
34. 杉林堅次, 薬物の経皮吸収性改善に関する理論的考察, *薬物動態*, **2**, 71-80 (1987).
35. Schultz S. G.: Basic principles of membrane transport, Cambridge University Press, Cambridge, 1980, 21-41.
36. Poulsen B. J., The use of models in estimating vehicle effects on the activity of topical corticosteroid formulations, *Br. J. Derm.*, **82**, 49-52 (1970).
37. Schwarb F. P., Imanidis G., Smith E. W., Haigh J. M., Surber C., Effect of concentration and degree of saturation of topical fluocinonide formulations on *in*

- vitro* membrane transport and *in vivo* availability on human skin, *Pharm. Res.*, **16**, 909-915 (1999).
38. Matsui R., Hasegawa M., Ishida M., Ebata T., Maniki N., Sugibayashi K., Skin permeation of lidocaine from crystal suspended oily formulations, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **31**, 729-738 (2005).
39. Uchida T., Saruwatari K., Nishioka K., Yamazaki K., Araki D., Hayashi T., Kawabata K., Ikeda N., Hikima T., Todo H., Sugibayashi K., Formulation on the basis of skin penetration of lipophilic ingredients, IFSCC, Barcelona, November 2008.
40. 杉林堅次, 有効性を発揮させるための剤形構築 - 皮膚浸透・経皮吸収に及ぼす剤形の影響 -, 日本化粧品学会誌, **30**, 261-265 (2006).
41. 武田克之, 各種ステロイド外用剤とその評価, 皮膚臨床, **26**, 631-647 (1984).
42. Fidors R. F., Method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids, *Polymer Engineer. Sci.*, **14**, 147-154 (1974).
43. Washitake M., Yajima T., Anmo T., Arita T., Hori R., Studies on percutaneous absorption of drugs. III. Percutaneous absorption of drugs through damaged skin, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 2444-2451 (1973).
44. Watanabe T., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Takayama K., Sugibayashi K., Utility of the three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs, *Altern. Animal Test. Experiment.*, **8**, 1-14 (2001).
45. Sato K., Mitsui N., Hasegawa T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Potential usefulness of solubility index for prediction of the skin permeation rate of 5-ISMN from pressure-sensitive adhesive tape, *J. Control. Release*, **73**, 269-277 (2001).
46. Hada N., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Sugibayashi K., Cultured skin

- loaded with tetracycline HCl and chloramphenicol as dermal delivery system: Mathematical evaluation of the cultured skin containing antibiotics, *J. Control. Release*, **108**, 341-350 (2005).
47. Illel B., Schaefer H., Wepierre J., Doucet O., Follicles play an important role in percutaneous absorption, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 424-427 (1991).
48. Hueber F., Wepierre J., Schaefer H., Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of hydrocortisone and testosterone: *In vivo* study in the hairless rat, *Skin Pharmacol.*, **5**, 99-107 (1992).
49. Hueber F., Schaefer H., Wepierre J., Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: *In vitro* studies on human skin, *Skin Pharmacol.*, **7**, 237-244 (1994).
50. Rolland A., Wagner N., Chatelus A., Shroot B., Schaefer H., Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres, *Pharm. Res.*, **10**, 1738-1744 (1993).
51. Ishii H., Todo H., Sugibayashi K., Effect of sebum and ointment rubbing on the skin permeation of triamcinolone acetonide from white petrolatum ointment, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 876-880 (2010).
52. Morrison W. R., Polar lipids in bovine milk I. Long-chain bases in sphingomyelin, *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 537-546 (1969).
53. Ishii H., Todo H., Terao A., Hasegawa T., Akimoto M., Oshima K., Sugibayashi K., Why does a hydrophilic drug permeate skin, although it is not soluble in white petrolatum?, *Drug Dev. Ind., Pharm.*, **35**, 1356-1363 (2009).
54. Okumura M., Sugibayashi K., Ogawa K., Morimoto Y., Skin permeability of water-soluble drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1404-1406 (1989).

55. Rousseau M., Bédouet L., Lati E., Gasser P., Ny K. L., Lopez E., Restoration of stratum corneum with nacre lipids, *Comp. Biochem. Physiol. B*, **145**, 1-9 (2006).
56. Lindholm J. S., McCormick J. M., Colton S. W. VI, Downing D. T., Variation of skin surface lipid composition among mammals, *Comp. Biochem. Physiol.*, **69**, 75-78 (1981).
57. Theeuwes F., Hussain A., Higuchi T., Quantitative analytical method for determination of drugs dispersed in polymers using differential scanning calorimetry, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 427-429 (1974).
58. Stamatias G. N., Sterke J., Hauser M., Stetten O., Pol A., Lipid uptake and skin occlusion following topical application of oils on adult and infant skin, *J. Dermatol. Sci.*, **50**, 135-142 (2008).
59. Vaughman C. D., Solubility effect in product, package, penetration and preservation, *Cosmet. Toilet.*, **103**, 47-69 (1988).
60. Andrews E. H., Khan T. A., Rieke J. K., Rudd J. F., Adhesion to skin III. Glass transition temperatures of surgical adhesives with added sebum, *Clinical Materials*, **1**, 205-213 (1986).
61. Rosado C., Cross S. E., Pugh W. J., Roberts M. S., Hadgraft J., Effect of vehicle pretreatment on the flux, retention, and diffusion of topically applied penetrants *in vitro*, *Pharm. Res.*, **20**, 1502-1507 (2003).
62. Shah V. P., Tymes N. W., Yamamoto L. A., Skelly J. P., *In vitro* dissolution profile of transdermal nitroglycerin patches using paddle method, *Int. J. Pharm.*, **32**, 243-250 (1986).
63. Shah V. P., Topical corticosteroids: quality control considerations, *Int. J. Dermatol.*, **31**, 34-37 (1992).

64. Higuchi T., Rate of release of medicaments from ointment bases containing drug in suspension, *J. Pharm. Sci.*, **50**, 874-875 (1961).
65. Peppas N. A., Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers, *Pharm. Acta. Helv.*, **60**, 110-111 (1985).
66. Shigeyama M., Ohgaya T., Kawashima Y., Takeuchi H., Hino T., Mixed base of hydrophilic ointment and purified lanolin to improve the drug release rate and absorption of water of minocycline hydrochloride ointment for treatment of bedsores, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 744-748 (1999).
67. Ishii H., Suzuki T., Todo H., Kamimura M., Sugibayashi K., Iontophoresis-facilitated delivery of prednisolone through throat skin to the trachea after topical application of its succinate salt, *Pharm. Res.*, in press.
68. Guy R. H., Maibach H. I., Drug delivery to local subcutaneous structures following topical administration, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1375-1380 (1983).
69. Singh P., Roberts M.S., Dermal and underlying tissue pharmacokinetics of salicylic acid after topical application, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **21**, 337-373 (1993).
70. Singh P., Roberts M. S., Dermal and underlying tissue pharmacokinetics of lidocaine after topical application, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 773-782 (1994).
71. Sugibayashi K., Yanagimoto G., Hayashi T., Seki T., Juni K., Morimoto Y., Analysis of skin disposition of flurbiprofen after topical application in hairless rats, *J. Control. Release*, **62**, 193-200 (1999).
72. Yanagimoto G., Hayashi T., Hasegawa T., Seki T., Juni K., Sugibayashi K., Morimoto Y., Skin disposition of drugs after topical application in hairless rats, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 749-754 (1999).
73. Singh P., Roberts M. S., Deep tissue penetration of bases and steroids after dermal

- application in rat, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 956-964 (1994).
74. Singh P., Roberts M. S., Effects of vasoconstriction on dermal pharmacokinetics and local tissue distribution of compounds, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 783-791 (1994).
75. Higaki K., Nakayama K., Suyama T., Amnuait C., Ogawara K., Kimura T., Enhancement of topical delivery of drugs via direct penetration by reducing blood flow rate in skin, *Int. J. Pharm.*, **288**, 227-233 (2005).
76. Glass J. M., Stephen R. L., Jacobson S. C., The quantity and distribution of radiolabeled dexamethasone delivered to tissue by iontophoresis, *Int. J. Dermatol.*, **19**, 519-525 (1980).
77. Guy R. H., Kalia Y. N., Delgado-Charro M. B., Merino V., López A., Marro D., Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis, *J. Control. Release*, **64**, 129-132 (2000).
78. Marro D., Kalia Y. N., Delgado-Charro M. B., Guy R. H., Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery, *Pharm. Res.*, **18**, 1701-1708 (2001).
79. Sims S. M., Higuchi W. I., Srinivasan V., Skin alteration and convective solvent flow effects during iontophoresis II. Monovalent anion and cation transport across human skin, *Pharm. Res.*, **9**, 1402-1409 (1992).
80. Pasero C., McCaffery M., Orthopaedic postoperative pain management, *J. Perianesth. Nurs.*, **22**, 160-174 (2007).
81. Galinkin J. L., Rose J. B., Harris K., Watcha M. F., Lidocaine iontophoresis versus eutectic mixture of local anesthetics (EMLA[®]) for IV placement in children, *Anesth. Analg.*, **94**, 484-488 (2002).
82. Murray W., Lavine L. S., Seifter E., The iontophoresis of C₂₁ esterified

- glucocorticosteroids: preliminary report, *J. Am. Phys. Ther. Assoc.*, **43**, 581-596 (1980).
83. Prusakiewicz J. J., Ackermann, Voorman R., Comparison of skin esterase activities from different species, *Pharm. Res.*, **23**, 1517-1524 (2006).
84. Boudinot F. D., Jusko W. J., Dose-dependent pharmacokinetics of prednisolone in normal and adrenalectomized rats, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **14**, 453-467 (1986).
85. Bos J. D., Meinardi M. M. H. M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000).
86. Singh P., Boniello S., Liu P., Dinh S., Transdermal iontophoretic delivery of methylphenidate HCl in vitro, *Int. J. Pharm.*, **178**, 121-128 (1999).
87. Abramson H. A., Preseasonal treatment of hay fever by electrophoresis of ragweed pollen extracts into the skin: preliminary report. *J. Allergy*, **12**, 169-175 (1941).
88. Petelenz T. J., Buttke J. A., Bonds C., Lloyd L. B., Beck J. E., Stephen R. L., Jacobsen S. C., Rodriguez P., Iontophoresis of dexamethasone: laboratory studies, *J. Control. Release*, **20**, 55-66 (1992).
89. Sylvestre J. P., Guy R. H., Delgado-Charro M. B., *In vitro* optimization of dexamethasone phosphate delivery by iontophoresis, *Phys. Ther.*, **88**, 1177-1185 (2008).
90. Cázares-Delgadillo J., Balaguer-Fernández C., Calatayud-Pascual A., Ganem-Rondero A., Quintanar-Guerrero D., López-Castellano A. C., Merino V., Kalia Y. N., Transdermal iontophoresis of dexamethasone sodium phosphate *in vitro* and *in vivo*: Effect of experimental parameters and skin type on drug stability and transport kinetics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **75**, 173-178 (2010).

91. Laneri S., Sacchi A., Abignente di Frassello E., Luraschi E., Colombo P., Santi P.,
Ionized prodrugs of dehydroepiandrosterone for transdermal iontophoretic delivery,
Pharm. Res., **16**, 1818-1824 (1999).
92. James M. P., Graham R. M., English J., Percutaneous iontophoresis of prednisolone-
a pharmacokinetics study, *Clin. Exp. Dermatol.*, **11**, 54-61 (1986).
93. Mauvais-Jarvis P., Vickers C. F. H., Wepierre J. (eds.): Percutaneous absorption of
steroids, Academic Press, London, 1980, 19-29.