

薬物のヒト経皮吸収性を予測するため
の動物皮膚の有用性に関する研究
— *in vitro* 皮膚透過性からのアプローチ —

武内 博幸

目次

| | |
|---|----|
| 略語と記号 | 1 |
| 緒言 | 2 |
| 第1編 薬物の <i>in vitro</i> Sprague-Dawley (SD) ラットまたは Yucatan micropig (YMP) 皮膚透過性における皮膚厚の影響 | 7 |
| 第1節 実験方法 | 10 |
| 1. 実験材料 | 10 |
| 2. SD ラット皮膚の調製 | 11 |
| 3. YMP 皮膚の調製 | 14 |
| 4. 縦型拡散セルを用いた <i>in vitro</i> 皮膚透過試験 | 16 |
| 5. NR および FP の濃度測定法 | 17 |
| 6. ISDN の濃度測定法 | 17 |
| 7. 皮膚切片の調製 | 18 |
| 8. データ解析 | 18 |
| 9. 統計解析 | 19 |
| 第2節 結果 | 20 |
| 1. Intact または split SD rat skin を介したモデル3 薬物の透過プロファイル | 20 |
| 2. Stripped または stripped/split SD rat skin を介したモデル3 薬物の透過プロファイル | 23 |
| 3. YMP 皮膚の特徴 | 24 |
| 4. Intact または split YMP skin を介したモデル3 薬物の透過プロファイル | 27 |
| 5. Stripped または stripped/split YMP skin を介したモデル3 薬物の透過プロファイル | 30 |
| 6. 抵抗と皮膚厚との関係 | 31 |
| 第3節 考察 | 34 |

| | | |
|-----|---|----|
| 第4節 | 小括 | 38 |
| 第2編 | <i>In vitro</i> 皮膚透過性研究におけるヒト皮膚に代わる動物皮膚の有用性 | 39 |
| 第1章 | 薬物の <i>in vitro</i> ヒト皮膚透過性における変動の評価 | 39 |
| 第1節 | 実験方法 | 40 |
| 1. | 実験材料 | 40 |
| 2. | ヒト皮膚の調製 | 40 |
| 3. | 縦型拡散セルを用いた <i>in vitro</i> 皮膚透過試験 | 40 |
| 4. | NR、ISDN および FP の濃度測定法 | 41 |
| 5. | 皮膚切片の調製 | 41 |
| 6. | データ解析 | 42 |
| 7. | 統計解析 | 42 |
| 第2節 | 結果 | 43 |
| 1. | ヒト皮膚透過性における個体内変動 | 43 |
| 2. | ヒト皮膚透過性における個体間変動 | 46 |
| 3. | ヒト皮膚の組織学的評価 | 48 |
| 第3節 | 考察 | 49 |
| 第4節 | 小括 | 51 |
| 第2章 | 薬物の <i>in vitro</i> SD ラット皮膚透過性における変動の評価およびヒト皮膚透過性の予測 | 52 |
| 第1節 | 実験方法 | 54 |
| 1. | 実験材料 | 54 |
| 2. | SD ラット皮膚の調製 | 54 |
| 3. | 横型拡散セルを用いた <i>in vitro</i> 皮膚透過試験 | 54 |
| 4. | 縦型拡散セルを用いた <i>in vitro</i> 皮膚透過試験 | 56 |
| 5. | NR、ISDN および FP の濃度測定法 | 56 |
| 6. | 皮膚切片の調製 | 56 |
| 7. | データ解析 | 57 |
| 8. | 統計解析 | 57 |
| 第2節 | 結果 | 58 |
| 1. | SD ラット皮膚における凍結の影響 | 58 |
| 2. | SD ラット皮膚の組織学的評価 | 60 |
| 3. | SD ラット皮膚透過性における個体間変動 | 61 |
| 第3節 | 考察 | 63 |
| 第4節 | 小括 | 67 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 第3章 | 薬物の <i>in vitro</i> YMP 皮膚透過性における変動の評価およびヒト皮膚透過性の予測 | 68 |
| 第1節 | 実験方法 | 70 |
| 1. | 実験材料 | 70 |
| 2. | YMP 皮膚の調製 | 70 |
| 3. | 縦型拡散セルを用いた <i>in vitro</i> 皮膚透過試験 | 70 |
| 4. | NR、ISDN および FP の濃度測定法 | 71 |
| 5. | 皮膚切片の調製 | 71 |
| 6. | データ解析 | 71 |
| 7. | 統計解析 | 72 |
| 第2節 | 結果 | 73 |
| 1. | YMP 皮膚透過性における個体内変動 | 73 |
| 2. | YMP 皮膚透過性における個体間変動 | 75 |
| 第3節 | 考察 | 77 |
| 第4節 | 小括 | 82 |
| 第3編 | YMP 皮膚を介した <i>in vitro</i> 透過性からニコチンテープまたはリドカインテープをヒトに適用した後の血中濃度の予測 | 83 |
| 第1節 | 理論 | 85 |
| 第2節 | 実験方法 | 87 |
| 1. | 実験材料 | 87 |
| 2. | YMP 皮膚の調製 | 87 |
| 3. | <i>In vitro</i> 皮膚透過試験 | 88 |
| 4. | ニコチンおよびリドカインの濃度測定法 | 88 |
| 5. | <i>In vitro</i> 皮膚透過パラメータの解析 | 89 |
| 6. | ヒト血中濃度の予測 (ニコチンテープ) | 90 |
| 7. | ヒト血中濃度の予測 (リドカインテープ) | 92 |
| 第3節 | 結果 | 94 |
| 1. | <i>In vitro</i> YMP 皮膚透過試験 (ニコチンテープ) | 94 |
| 2. | <i>In vitro</i> YMP 皮膚透過試験 (リドカインテープ) | 97 |
| 3. | ヒト血中濃度の予測 (ニコチンテープ) | 100 |
| 4. | ヒト血中濃度の予測 (リドカインテープ) | 103 |
| 第4節 | 考察 | 106 |
| 第5節 | 小括 | 110 |

| | |
|------|-----|
| 結論 | 111 |
| 謝辭 | 116 |
| 引用文献 | 117 |

略語と記号

| 略語 | | J | 定常状態時の単位面積当たりの透過速度 |
|---------------------|--|--------------|--------------------------|
| CV | Coefficient of variation | | |
| ESI | Electrospray ionization | K_{12} | コンパートメント間の移行速度定数 (中心→抹消) |
| FP | Flurbiprofen | | |
| H&E | Hematoxilin and Eosin | K_{21} | コンパートメント間の移行速度定数 (抹消→中心) |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography | K_{el} | 消失速度定数 |
| ISDN | Isosorbide dinitrate | $K_{o/w}$ | n -オクタノール/水分配係数 |
| LC-MS/MS | Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry | $K_{ved/sc}$ | 生きた表皮・真皮/角層の分配係数 |
| MRM | Multiple Reaction Monitoring | P | みかけの皮膚透過係数 |
| NR | Nicorandil | P_{sc} | 角層の透過係数 |
| OECD | Organization for Economic Co-operation and Development | P_{tot} | 皮膚全層の透過係数 |
| | | P_{ul} | 角層より下層の透過係数 |
| SC | Stratum corneum | R | 皮膚の抵抗 |
| SD | Sprague-Dawley | r | 相関係数 |
| S.D. | Standard deviation | R^2 | 決定係数 |
| Split skin | Dermis-split skin | R_{sc} | 角層の抵抗 |
| Stripped skin | Stratum corneum-stripped skin | R_{tot} | 皮膚全層の抵抗 |
| Stripped/split skin | Stratum corneum-stripped and dermis-split skin | R_{ul} | 角層より下層の抵抗 |
| | | V_1 | 中心コンパートメントの分布容積 |
| TTS | Transdermal Therapeutic System | | |
| UL | Underlying layer | V_2 | 末梢コンパートメントの分布容積 |
| VED | Viable epidermis and dermis | | |
| YMP | Yucatan micropig | V_d | 分布容積 |
| 記号 | | | |
| C_0 | 基剤中薬物初濃度 | | |
| C_s | 角層表面薬物濃度 | | |
| CV% | 変動係数×100 | | |
| D_{sc} | 角層の拡散係数 | | |
| D_{ved} | 生きた表皮・真皮中の拡散係数 | | |

緒言

医薬品として市販されている外用剤には、全身循環血流に移行して作用を発揮する経皮吸収型製剤 (TTS) と皮膚局所に作用する局所作用型製剤がある^{1,2)}。これらの外用剤を開発するためには、前臨床段階において十分な製剤設計が必要である。その製剤設計を行う上での一つの試験として摘出皮膚を用いた *in vitro* 透過試験が広く用いられている。薬物のヒト皮膚透過性を予測するためにはヒト皮膚を用いることが最良の方法であると考えられている。しかしながら、日本国内にけるヒト皮膚の入手は倫理的問題により難しく、入手できても量的な制限があることおよび品質が一定でないことから、ヒト皮膚透過性予測に関する十分な量とはならない。さらに、ヒト皮膚は人種、年齢、性および採取部位により皮膚バリア能に差があると報告されており³⁻¹⁶⁾、薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過性は個体間および個体内変動が大きいと報告されている^{3,12,13)}。現在、国内では外用剤の製剤設計に摘出ヒト皮膚の代替として摘出実験動物皮膚、3次元培養ヒト皮膚モデルおよび人工膜を用いた *in vitro* 透過試験が広く実施されている¹⁷⁻²¹⁾。

実験動物皮膚としては、マウス、ラット、モルモットおよびブタ等の皮膚が広く使用されている^{3,5,6,9,22-26)}。それらの実験動物皮膚の中で、ヘアレスマウスおよびヘアレスラット皮膚は、実験の操作性も良く、除毛が簡単であることから *in vitro* 透過試験に広く使用されている^{9,27-29)}。また、近年、ブタ皮膚はヘアレスマウスおよびヘアレスラット皮膚と比較してヒト皮膚透過性に近いことからヒト皮膚透過性の予測に有用であると報告され^{3,11,30-37)}、ブタ皮膚を用いた薬物の *in vitro* 透過試験が多く実施されている^{3,38-43)}。さらに大変興味深いことに、薬物の *in vitro* 実験動物皮膚透過性の個体間変動はヒト皮膚透過性の個体間変動

より小さく、実験動物皮膚を用いた *in vitro* 透過試験は薬物の皮膚透過性を精度良く評価できるとの報告がある^{3,14,15}。このように、多くの研究者がヒト皮膚の代替として実験動物皮膚を用いた薬物の *in vitro* 透過性を検討してきたが、残念なことに現在までにそれらのデータを用いた *in vivo* ヒト経皮吸収性の予測法は十分に確立していない。そのため、薬物の *in vitro* 皮膚透過試験に使用する皮膚の選定基準は不明瞭であり、*in vivo* ヒト経皮吸収性をより精度良く、より効率的に予測できる新たな *in vitro* 皮膚透過試験の方法論の確立が期待されている。

医薬品開発の前臨床段階において使用されている動物の中で Sprague-Dawley (SD) ラットは、*in vivo* 薬理、毒性および薬物動態研究に広く使用され、最も多くの情報が得られている動物である^{25,44-47}。ヘアレスラット皮膚が *in vitro* 皮膚透過試験に用いられるのと同様に、SD ラットは *in vivo* 経皮吸収試験に多く使用されている。しかし、SD ラットを *in vitro* 皮膚透過試験に使用する場合には、SD ラット皮膚に損傷を与えず除毛をする必要があるが、その操作は非常に難しい。そのため、SD ラット皮膚は *in vitro* 透過試験にはあまり使用されていない。SD ラット皮膚を用いた *in vitro* 透過試験から薬物のヒト皮膚透過性が予測可能となれば、*in vitro* ヘアレスラット皮膚透過試験を実施することなく、同一動物で外用剤の製剤設計における一連の試験が可能となり、製剤設計の効率化を計ることができると考えられる。また、ブタの中でも Yucatan micropig (YMP) の皮膚は、ヒト皮膚に似た皮溝を持ち、ヒトと同様に体毛が少なく、皮膚厚および角層厚もヒトに近いと報告されている^{22,37}。さらに、いくつかの薬物において YMP 皮膚がヒト皮膚透過性の予測に有用であると報告されている^{22,35,37}。この YMP 皮膚は、現在、国内において日本チャールス・リバー株式会社より安定供給されており、実験動物皮膚として使用が可能である。これらのことから、SD ラットおよび YMP 皮膚がヒト皮膚の代替皮膚として使用できると考えられ

たが、これら皮膚に関する薬物の *in vitro* 透過性の情報は十分ではない。そのため、これらの皮膚を用いた新たな *in vitro* 透過試験の方法論の確立が切望されている。

薬物の経皮吸収経路は、角層を経由する経表皮経路と毛孔や汗孔を経由する経付属器官経路の 2 つがある。さらに、経表皮経路は薬物の経皮吸収におけるバリア能を有する角層の細胞間隙を経由する細胞間経路と角層の細胞内を経由する細胞内経路の 2 つがある。経付属器官経路は、バリア能を有する角層を介さず直接真皮に移行できるため、経表皮経路と比較して一般的に薬物の特性（分子量や脂溶性など）による制限を受けにくいと考えられるが、毛孔や汗孔の面積は角質層の面積と比較して極めて小さいため、薬物の経皮吸収は、主に経表皮経路が寄与していると考えられている。皮膚に塗布された薬物は角層に分配した後、角層を含んだ表皮を通過して真皮以下にある毛細血管から吸収され全身循環血流に移行する。

薬物の *in vitro* 皮膚透過性から *in vivo* ヒト経皮吸収性を正確に予測するには、*in vitro* 皮膚透過試験に使用する皮膚厚が重要ポイントになる。現在、国内で実施されている *in vitro* 皮膚透過試験では主に intact skin (full-thickness skin) を使用している。しかしながら、2004 年の OECD ガイドライン⁴⁸⁾ では、化学物質の皮膚透過性を評価する目的として *in vitro* 皮膚透過試験を実施する際に使用する皮膚は、皮膚厚の影響を受けにくい厚さ約 1 mm 以下の皮膚が望ましいと述べられている。また、皮膚表面から毛細血管までの距離はラットでは約 0.05 mm、ヒトでは約 0.2 mm と報告されている⁴⁹⁻⁵¹⁾。さらに、ヒト皮膚を用いた *in vitro* 透過試験において真皮が薬物の皮膚透過性に影響しているとの報告もある⁵²⁻⁵⁷⁾。そのため、intact skin を用いた薬物の *in vitro* 透過試験は、*in vivo* 条件と異なっていると考えられる。したがって、薬物の *in vitro* 実験動物皮膚透過性から *in vivo*

ヒト経皮吸収性を予測するためには、厚さの異なる実験動物皮膚を介した薬物の *in vitro* 透過性を定量的に評価する必要がある。

TTS の製剤設計において、TTS をヒトに適用後の血中濃度を予測するには、*in vivo* ヒト試験を実施することが最も有効な手段と考えられるが、開発の初期段階では薬物の毒性や副作用の問題から *in vivo* ヒト試験は実施することは出来ない。また、ヒト皮膚を用いた *in vitro* 透過パラメータからのヒト血中濃度推移の予測は、前述したようにヒト皮膚の入手が困難であり、透過性の変動も問題となるため、ヒト皮膚の代替皮膚を用いた検討が必要となっている。TTS を摘出実験動物皮膚に適用して得た *in vitro* 透過パラメータから TTS をヒトに適用した後の血中濃度推移の予測が可能となれば、TTS の開発期間は飛躍的に短縮できると考えられ、その予測法の確立が期待される。

これらのことを背景として本研究では、薬物の *in vivo* ヒト経皮吸収性を予測するための動物皮膚の有用性について、SD ラットおよび YMP 皮膚を用いて検討した。さらに、*in vitro* YMP 皮膚透過パラメータからヒト血中濃度推移の予測性に関して研究を展開した。第 1 編では皮膚厚を調整した SD ラットまたは YMP 皮膚を介した 3 種のモデル薬物の透過性における皮膚厚の影響を検討した。第 2 編・第 1 章では第 1 編と同じモデル 3 薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過試験を実施し、ヒト皮膚の個体内および個体間変動を検証した。第 2 章ではモデル 3 薬物の *in vitro* SD ラット皮膚透過試験を実施し、第 1 章で検討したヒト皮膚と SD ラット皮膚との個体間変動を比較した。さらに、*in vitro* SD ラット皮膚透過性からヒト皮膚透過性の予測性について検討した。第 3 章ではモデル 3 薬物の *in vitro* YMP 皮膚透過試験を実施し、第 2 章と同様に第 1 章で検討したヒト皮膚と YMP 皮膚との個体内および個体間変動を比較した。さらに、*in vitro* YMP 皮膚透過性からヒト皮膚透過性の予測性について検討した。第 3 編では第 1 および 2 編の結果

より皮膚厚 0.4 mm に調整した split (0.4 mm) YMP skin を用いて市販 TTS の *in vitro* 透過試験を実施し、得られた薬物の *in vitro* YMP 皮膚透過パラメータから TTS をヒトに適用した後の血中濃度推移を予測した。

なお、第 1 および 2 編の検討で使用したモデル 3 薬物は、物理化学的性質 ($\log K_{o/w}$) が異なるニコランジル (NR)、硝酸イソソルビド (ISDN) およびフルルビプロフェン (FP) である (Table 1)。また、第 3 編では、既に Nicotinell[®] TTS[®] 20 (ニコチンテープ) または Penles[®] Tape 18 mg (リドカインテープ) をヒトに適用した後の血漿中ニコチン濃度または血清中リドカイン濃度の報告があることから、両テープ剤をモデル製剤として選定した。

以下に、得られた結果について論述する。

第1編 薬物の *in vitro* SD ラットまたは YMP 皮膚透過性における皮膚厚の影響⁵⁸⁾

国内では外用剤の製剤設計に摘出実験動物皮膚を用いた *in vitro* 透過試験が広く行われている¹⁷⁻²¹⁾。摘出実験動物皮膚としては、マウス、ラット、モルモットおよびブタ等の皮膚が使用されている^{3,5,6,9,22-26)}。多くの研究者がヒト皮膚の代替として実験動物皮膚を介した薬物の *in vitro* 透過性を検討してきたが、残念なことに現在までにそれらのデータを用いた *in vivo* ヒト経皮吸収性の予測法は十分に確立していない。そのため、薬物の *in vitro* 皮膚透過試験に使用する皮膚の選定基準は不明瞭であり、*in vivo* ヒト経皮吸収性をより精度良く、より効率的に予測できる新たな *in vitro* 皮膚透過試験の方法論の確立が期待されている。

2004年、OECD (Organization for Economic Co-operation and Development: ヨーロッパ、北米等の先進国によって、国際経済全般について協議することを目的とした経済協力開発機構) ガイドライン⁴⁸⁾では、化学物質の皮膚透過性を評価する目的として *in vitro* 透過試験を実施する際に使用することができる皮膚は、trypsin-isolated stratum corneum、heated-separated epidermis、dermis-split skin (split skin) および intact skin と述べられており、さらに、*in vitro* 皮膚透過試験に使用する皮膚厚は、1 mm以下であることが望ましいとも述べられている。Barberoら³⁾は、*in vitro* 皮膚透過試験は血流がないため、*in vivo* と異なり真皮が薬物の拡散のバリアとして作用し、皮膚厚が透過速度および Lag time に大きな影響を与える可能性があるとして報告している。

皮膚は不均一な臓器であり、相対的に脂溶性の高い角層と角層より下層 (underlying layer: UL) に存在する角層より親水性の高い viable epidermis, dermis

および hypodermis により構成されている。薬物の透過速度は、角層を剥離した stripped skin に対し intact skin を介した場合は非常に小さく、薬物の皮膚透過性において角層が主なバリア能として考えられている。しかし、最近、*in vitro* ヒト皮膚透過性研究において viable epidermis and dermis (VED) が透過バリア能として作用し、真皮厚が透過性に影響している薬物も存在すると報告されている^{56, 59)}。さらに数名の研究者は、脂溶性薬物の *in vitro* 皮膚透過速度と *in vivo* 経皮吸収性との比較において、epidermis を介した薬物の *in vitro* 透過速度では過大評価となり、intact skin を介した薬物の *in vitro* 透過速度では過小評価になると報告している^{52-55, 60-62)}。したがって、*in vivo* ヒト経皮吸収性を反映した試験を実施するためには皮膚厚の影響を明らかにする必要がある。

緒言で述べたように、著者は SD ラットおよび YMP 皮膚がヒト皮膚の代替皮膚として有用性が高い実験動物と考え、これら皮膚を用いた薬物の *in vitro* 皮膚透過試験法を確立したいと考えている。しかしながら、これら皮膚に関する薬物の *in vitro* 透過性の情報は十分ではなく、今までにこれら皮膚を介した *in vitro* 透過性における皮膚厚の影響を検討した報告はほとんどない。そのため、SD ラットおよび YMP 皮膚を用いた *in vitro* 透過試験法を確立する一環として、薬物の SD ラットおよび YMP 皮膚透過性における皮膚厚の影響を明らかにする必要がある。

本編では、薬物の脂溶性の違いにより、薬物の *in vitro* 皮膚透過性における皮膚厚の影響が異なると予想されたことから、モデル薬物として物理化学的性質 ($\log K_{o/w}$) が異なる NR (ニコランジル)、ISDN (硝酸イソソルビド) および FP (フルルビプロフェン) を選定した。*In vitro* 透過試験には縦型セルを用い、種々の厚さを持つ SD ラットまたは YMP 皮膚 [intact skin、dermis-split skin (split skin)、stratum corneum-stripped skin (stripped skin) または stratum corneum-stripped

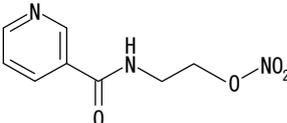
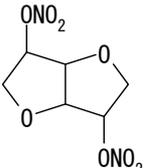
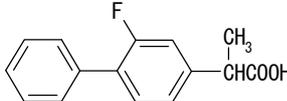
and dermis-split skin (stripped/split skin)]を介したモデル3 薬物の *in vitro* 透過性を評価した。これら薬物の *in vitro* SD ラットおよび YMP 皮膚透過性から薬物の *in vivo* ヒト経皮吸収性を予測するために用いるべき皮膚厚について考察した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

NR、ISDN および FP は Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada)、Alexis Corporation (San Diego, CA, U.S.A.) および Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した (Table 1)。その他の試薬類はすべて試薬特級品を購入して使用した。

Table 1 Chemical structures and physicochemical parameters of the model drugs^{a)}

| Drugs | Structure | Molecular weight | Solubility in water ^{b)} (mg/mL) | log K _{o/w} ^{c)} |
|-----------------------------|---|------------------|---|------------------------------------|
| Nicorandil (NR) |  | 211.17 | 39.6 | -1.02 |
| Isosorbide dinitrate (ISDN) |  | 236.14 | 1.34 | 1.34 |
| Flurbiprofen (FP) |  | 244.27 | 0.0277 | 3.86 |

a): Hatanaka *et al.* ²⁰⁾

b): Solubility in water at 37 °C

c): Logarithm of octanol/water partition coefficient at 37 °C

2. SD ラット皮膚の調製

すべての動物飼育および実験は大正製薬株式会社動物実験規定に従って行った。SD 系雄性ラット（8 週齢）は 日本チャールス・リバー株式会社（厚木市，神奈川県）より購入し、*in vitro* 皮膚透過試験に使用した。

SD ラットをジエチルエーテル麻酔下にて安楽死させ、皮膚に傷をつけないように注意深く背部の毛を剃った。皮膚の採取部位は、その中心を SD ラットの耳から尾方向に 7 ± 1 cm とし、1 匹の SD ラットから直径約 3 cm の円状皮膚または 4 cm \times 4 cm の四角形の皮膚 1 枚を摘出した。摘出したラット皮膚の皮下脂肪を手術用ハミで除去して調製した (intact SD rat skin)。Intact SD rat skin の皮膚厚をダイヤルシクネスゲージ (Model H; 株式会社尾崎製作所, 東京) により測定した (intact SD rat skin の皮膚厚: 1.18 ± 0.04 mm)。また、 4 cm \times 4 cm の四角形の intact SD rat skin を電動ダーマトーム (Model B; Padgett Instruments, Inc., Kansas, MO, U.S.A.) により、皮膚厚が約 0.4 または 0.9 mm になるように角層より下層をスプリットし (Fig. 1)、手術用ハサミにより直径約 3 cm の円状の split SD rat skin を調製した (split SD rat skin 0.4 および 0.9 mm の皮膚厚: 0.41 ± 0.02 および 0.85 ± 0.04 mm)。製後の intact および split SD rat skin はアルミ箔に包みビニール袋で密閉して使用するまで -80°C で保存した。また、冷凍保存していた intact および split SD rat skin を透過試験開始前に 32°C に設定した CO_2 インキュベータ (湿度: $80 \pm 10\%$) 内で解凍した (15 分間)。Stripped および stripped/split SD rat skin は、intact および split SD rat skin の角層をセロテープ (幅 30 mm, ニチバン株式会社, 東京) で 10 回 テープストリッピングにより剥離して作製した。これらの皮膚サンプルは直ちに *in vitro* 皮膚透過試験に使用した。

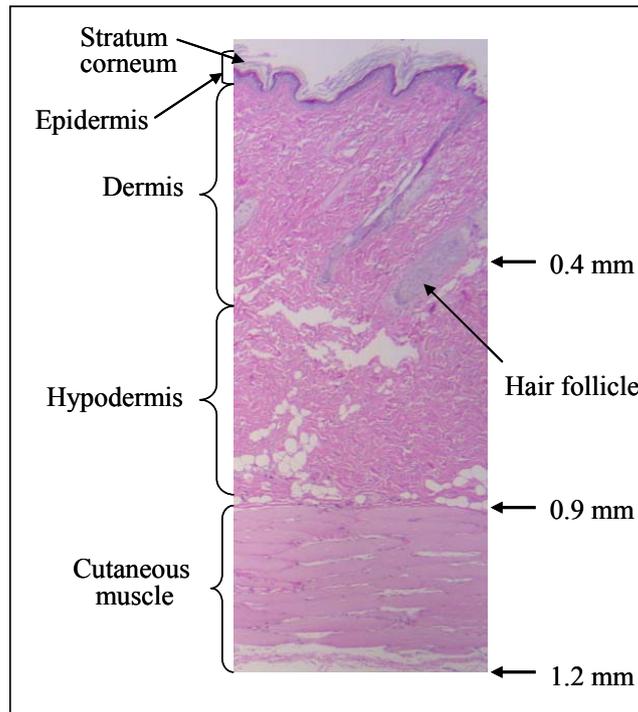


Fig. 1 H&E staining of intact SD rat skin sections.

3. YMP 皮膚の調製

凍結 YMP 皮膚セット（雌性，5 ヶ月）は日本チャールス・リバー株式会社より購入し、使用するまで -80°C で保存した。本編では、凍結 YMP 皮膚 2 セットの YMP 背部皮膚シート（L-1、L-5、R-1 および R-5）を *in vitro* 皮膚透過試験に使用した。また、3 セットの YMP 肩部、背部、腹部および腰部皮膚 16 シートを皮膚厚の測定に使用した（Fig. 2）。

冷凍保存していた YMP 皮膚シート（ $10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$ ）を 32°C に設定した CO_2 インキュベータ（湿度: $80 \pm 10\%$ ）内で解凍した（15 分間）。次いで皮下脂肪を除去して intact YMP skin を調製した。YMP 皮膚シートの中央部と 4 角の 5 カ所の皮膚厚をダイヤルシックネスゲージにより測定した。また、intact YMP skin を電動ダーマトームにより、皮膚厚が約 0.4、0.9、または 1.8 mm になるように角層より下層をスプリットし（Fig. 3）、split YMP skin を調製した。各 YMP 皮膚シート 1 枚から約 $2.5\text{ cm} \times 2.5\text{ cm}$ サイズの intact または split YMP skin サンプル 9 枚を調製した。Intact および split YMP skin の厚さは、ダイヤルシックネスゲージにより測定した。Intact YMP skin の厚さは $2.75 \pm 0.05\text{ mm}$ 、split YMP skin（0.4、0.9 および 1.8 mm）の厚さはそれぞれ 0.44 ± 0.03 、 0.89 ± 0.07 および $1.75 \pm 0.08\text{ mm}$ であった。Intact および split YMP skin は生理食塩液に湿らせたペーパータオル上に表皮側を上にして置き、気密容器に入れ 4°C で約 16 時間保存した。

また、intact および split YMP skin（0.4、0.9 または 1.8 mm）を透過試験の開始前に 32°C に設定した CO_2 インキュベータ（湿度: $80 \pm 10\%$ ）内で平衡化した（15 分間）。Stripped YMP skin と stripped/split YMP skin は、intact および split YMP skin の角層をセロハンテープで 30 回 テープストリッピングすることにより剥離して作製した。これらの皮膚サンプルは直ちに *in vitro* 透過試験に使用した。

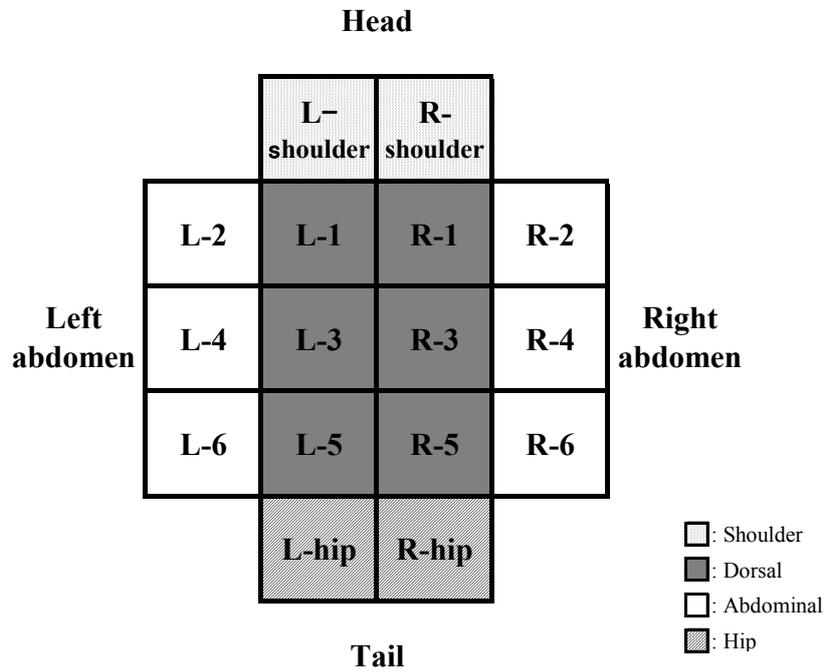


Fig. 2 Constituents of each YMP skin set.

Shoulder: L- and R-shoulder skin sheets.

Dorsal: L-1, L-3, L-5, R-1, R-3 and R-5 dorsal skin sheets.

Abdominal: L-2, L-4, L-6, R-2, R-4 and R-6 abdominal skin sheets.

Hip: L- and R-hip skin sheets.

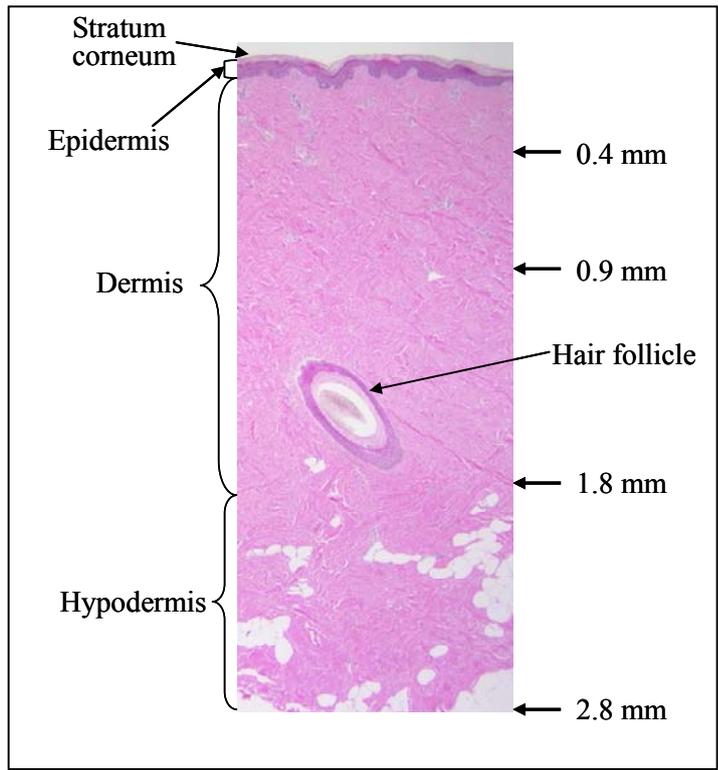


Fig. 3 H&E staining of intact YMP skin sections.

4. 縦型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過試験

縦型拡散セル（拡散面積: 0.95 cm^2 ，直径: 1.1 cm ）⁶³⁾ を *in vitro* 透過試験に使用した (Fig. 4)。NR、ISDN または FP 溶液 (30 mg/mL) は、水/エタノール混液 (3/1, v/v) にて溶解して調製した。

縦型拡散セルのレシーバーチャンバーに解凍した SD ラットまたは YMP 皮膚 (intact、split、stripped または stripped/split skin) の表皮側を上にして装着し、レシーバーチャンバー内に 32°C に加温した蒸留水または pH7.4、 0.1 M リン酸緩衝液 3.2 mL を添加した。皮膚の表皮側に薬物溶液 $5.0 \mu\text{L}$ 塗布した後、拡散セルは直ちに 32°C の CO_2 インキュベータ (湿度: $80 \pm 10\%$) に入れ、レシーバー相をマグネチックスターラーで攪拌した。SD ラットおよび YMP の intact および split skin に関しては塗布後 10 および 24 時間まで、stripped および stripped/ split skin に関しては 4 または 6 時間および 4 または 12 時間まで経時的に 1 または 2 mL のレシーバー溶液を採取し、同時に同容量の 32°C に保温した蒸留水または pH7.4、 0.1 M リン酸緩衝液を補充した。採取した試料は測定まで -80°C で保存した。

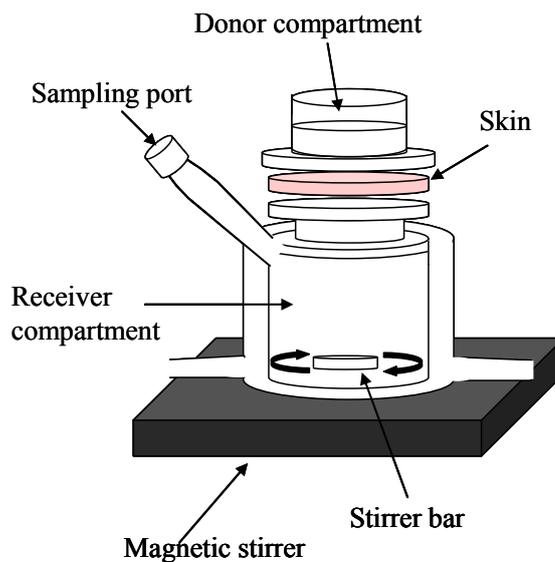


Fig. 4 Experimental set-up for *in vitro* skin permeation study using vertical diffusion cell.

5. NR および FP の濃度測定法

経時的に採取したレシーバー溶液 50 μL に内部標準物質[NR 分析用としてプロプラノロール (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、FP 分析用としてフロセミド (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)]を含んだアセトニトリル/メタノール混液 (9/1, v/v) 200 μL を加え、混合し、遠心分離 (4°C, 3,600 \times g, 10 分間) した。その上清 5.0 μL を液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) の測定試料とした。

LC-MS/MS は HP1100 binary pump (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, U.S.A.)、CTC-PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) と API3000 (AB Sciex, Foster City, CA, U.S.A.) を用いた。

NR および FP の分析条件は、分析カラムとして Shim-pack XR-ODS (2.2 μm , 3.0 \times 30 mm; 島津製作所, 京都) を用い、カラム温度は 50°C とした。移動相として 0.1%ギ酸水溶液 (A) とアセトニトリル (B) を使用し、以下のグラジエント条件で溶離した。0–1.00 分: 移動相 B (2% \rightarrow 98%, linear rgradient)、1.01–2.00 分: 移動相 B (98%)、2.01–2.50 分: 移動相 B (2%)、流速は 1.3 mL/min とした。イオン化法は Electrospray ionization (ESI) 法で行い、NR はポジティブイオンモード、FP はネガティブイオンモードで検出した。NR のモニタリングイオンは m/z 212 \rightarrow m/z 136、プロプラノロールのモニタリングイオンは m/z 260 \rightarrow m/z 116、FP のモニタリングイオンは m/z 243 \rightarrow m/z 192、フロセミドのモニタリングイオンは m/z 329 \rightarrow m/z 205 とした。NR および FP 濃度測定の検量線範囲は 0.003 \sim 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

6. ISDN の濃度測定法

経時的に採取したレシーバー溶液 250 μL にアセトニトリル/メタノール混液 (9/1, v/v) 100 μL を加え、混合し、遠心分離 (4°C, 3,600 \times g, 10 分間) した。そ

の上清 10 μL を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) の測定試料とした。

ポンプは LC-10ADvp (島津製作所, 京都)、オートインジェクターは SIL-10ADvp (同)、UV 検出器は SPD-10ADvp (同) を用いた。

ISDN の分析条件は分析カラムとして Capcell Pack C18 UG120 (5 μm , 4.6 \times 150 mm; 資生堂, 東京) を用い、UV 波長は 210 nm、カラム温度は 40°C とした。移動相として 0.1% リン酸水溶液/アセトニトリル (60/40, v/v) を使用し、流速は 1.0 mL/min とした。ISDN 濃度測定の量線範囲は 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ であった。

7. 皮膚切片の調製

各 YMP 皮膚シート (L-shoulder、L-1、L-2、L-3、L-5 および L-hip) から各 YMP 皮膚切片を準備し、直ちに 10%ホルマリン中性緩衝液で固定し、パラフィンで包埋した。次に、パラフィン標本 (5.0 μm) を作製し、H&E 染色を行った。染色した標本は光学顕微鏡 (Axioplan 2; Carl Zeiss, Jena, Germany) で皮膚の表皮および真皮を観察した^{4, 9, 64}。さらに各 YMP 皮膚切片の角層厚は電子顕微鏡下でマイクロメータを用いて測定した。

8. データ解析

NR、ISDN または FP の皮膚透過パラメータは各薬物の累積皮膚透過量 ($\mu\text{g/cm}^2$) を時間に対してプロットし、累積皮膚透過量-時間プロファイルを作成し、定常状態時の回帰直線の傾きから透過速度 (J , $\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$) を算出した。見かけの透過係数 (P) は次式 (1) から算出した。

$$P = J/C_0 \quad (1)$$

C_0 は皮膚に塗布した NR、ISDN または FP の初濃度である。

全皮膚、角層 (SC) および角層より下層 (UL) を介した薬物の透過係数は P_{tot} 、

P_{sc} および P_{ul} である。皮膚バリア能である抵抗 (R) は透過係数の逆数 ($1/P$) として算出され、全皮膚、角層および角層より下層の抵抗は R_{tot} 、 R_{sc} および R_{ul} となる。 R_{tot} は次式 (2) により表される。

$$R_{tot} = R_{sc} + R_{ul} = 1/P_{tot} = 1/P_{sc} + 1/P_{ul} \quad (2)$$

9. 統計解析

In vitro 皮膚透過試験から得られたすべてのデータは、3 例の平均 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) により表記した。

In vitro 皮膚透過試験で算出された透過速度および Lag time の統計解析は、パラメトリック Dunnett または Welch test (Bonferroni 法による多重比較) を行った。統計的な有意差は $p < 0.05$ とした (Bonferroni 法: SD ラット皮膚は $p < 0.025$ 、YMP 皮膚は $p < 0.017$)。また、皮膚厚と R_{ul} の相関関係は、直線回帰分析により評価した。統計解析は software program SAS (ver. 8.2; SAS Institute Japan Ltd., 東京) を用いた。

第2節 結果

1. Intact または split SD rat skin を介したモデル3薬物の透過プロファイル

Intact、split (0.4 mm) および split (0.9 mm) rat skin を用いてモデル3薬物の皮膚透過性における皮膚厚の影響を評価した。Intact または split SD rat skin を透過したモデル3薬物 (NR、ISDN または FP) の時間に対する累積皮膚透過量を Fig. 5 (A、B、C) に示す。さらに、intact または split SD rat skin を介したモデル3薬物の透過速度および Lag time を Table 2 に示す。

透過試験の開始後 10 時間までに split (0.4 mm) SD rat skin を介した NR、ISDN および FP の透過量は皮膚に塗布した初期量のそれぞれ約 23%、79% および 25% であった。ISDN の透過速度は NR および FP より大きかった。Split (0.4 mm) SD rat skin を介した NR、ISDN および FP の透過速度は intact rat skin を介した透過速度のそれぞれ約 1.20、1.19 および 1.29 倍であった。モデル3薬物の透過速度は皮膚厚の減少に伴って増加したが、統計的な有意差はなかった。

Split (0.4 mm) SD rat skin における NR、ISDN および FP の Lag time は intact SD rat skin における各薬物のそれぞれ約 0.12、0.23 および 0.01 倍であった。Lag time に関する統計的な有意差は intact SD rat skin と split (0.4 mm) SD rat skin 間 (NR: $p<0.05$ 、ISDN: $p<0.05$ 、FP: $p<0.025$) および intact SD rat skin と split (0.9 mm) SD rat skin 間 (ISDN: $p<0.05$ 、FP: $p<0.025$) に認められた。すなわち、モデル3薬物の Lag time は皮膚厚の減少に伴って短くなった。

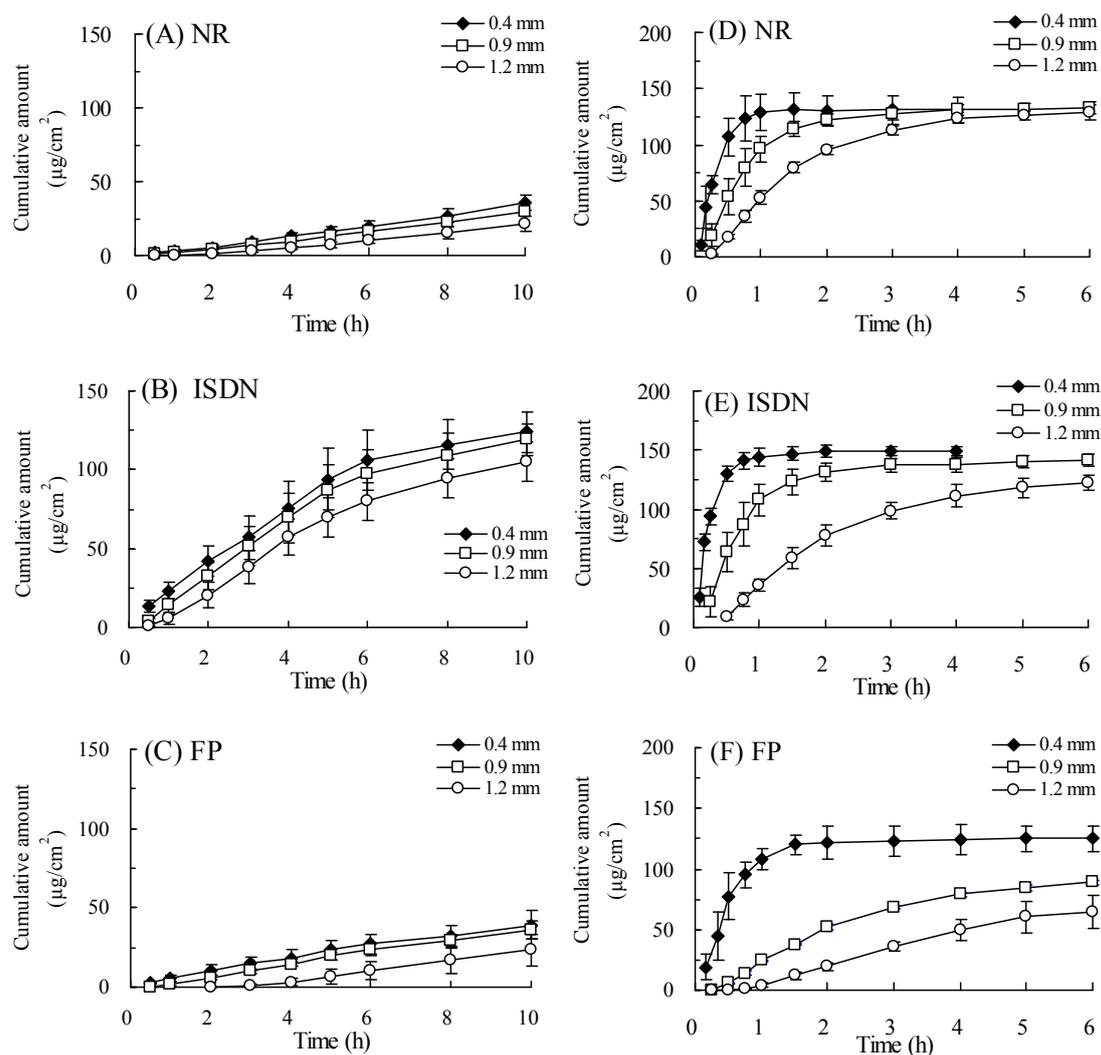


Fig. 5 Time course for the cumulative amounts of NR, ISDN and FP through intact, split, stripped or stripped/split SD rat skin (skin thickness: 0.4, 0.9 or 1.2 mm). Each value represents the mean \pm S.D. (n=3). Intact and split SD rat skin: (A), (B) and (C); stripped and stripped/split SD rat skin: (D), (E) and (F).

Table 2 Permeation rates and lag times of NR, ISDN and FP through intact, split, stripped or stripped/split SD rat skin (skin thickness: 0.4, 0.9 or 1.2 mm)

| Drug | Skin type | Skin thickness (mm) | Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | Lag time (h) |
|------|----------------|---------------------|--|------------------------------|
| NR | Intact | 1.2 | 2.95 \pm 0.66 | 2.68 \pm 1.31 |
| | Split | 0.9 | 3.32 \pm 0.55 | 1.14 \pm 0.80 |
| | Split | 0.4 | 3.53 \pm 0.64 | 0.32 \pm 0.33* |
| | Stripped | 1.2 | 70.0 \pm 7.7 | 0.24 \pm 0.01 |
| | Stripped/split | 0.9 | 120 \pm 14* | 0.08 \pm 0.08* |
| | Stripped/split | 0.4 | 327 \pm 22*** | 0.04 \pm 0.03** |
| ISDN | Intact | 1.2 | 15.6 \pm 1.6 | 0.71 \pm 0.18 |
| | Split | 0.9 | 18.4 \pm 3.7 | 0.23 \pm 0.11* |
| | Split | 0.4 | 18.5 \pm 3.1 | 0.16 \pm 0.28* |
| | Stripped | 1.2 | 52.4 \pm 5.5 | 0.32 \pm 0.06 |
| | Stripped/split | 0.9 | 130 \pm 12* | 0.07 \pm 0.06** |
| | Stripped/split | 0.4 | 413 \pm 42*** | 0.01 \pm 0.02*** |
| FP | Intact | 1.2 | 3.61 \pm 1.30 | 3.31 \pm 0.64 |
| | Split | 0.9 | 4.31 \pm 0.41 | 0.63 \pm 0.24 [#] |
| | Split | 0.4 | 4.66 \pm 1.11 | 0.03 \pm 0.03 [#] |
| | Stripped | 1.2 | 15.9 \pm 0.7 | 0.77 \pm 0.16 |
| | Stripped/split | 0.9 | 36.8 \pm 1.1 ^{###} | 0.35 \pm 0.04 |
| | Stripped/split | 0.4 | 175 \pm 27 [#] | 0.01 \pm 0.01 [#] |

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with intact or stripped SD rat skin for each drug using Dunnett tests.

[#] $p < 0.025$ and ^{###} $p < 0.0005$ compared with intact or stripped SD rat skin for FP using Welch tests (The Bonferroni method for multiple comparisons was applied).

2. Stripped または stripped/split SD rat skin を介したモデル 3 薬物の透過プロフィール

Stripped、stripped/split (0.4 mm) および stripped/split (0.9 mm) SD rat skin を用いてモデル 3 薬物の皮膚透過性における皮膚厚の影響を評価した。Stripped SD rat skin または stripped/split SD rat skin を介したモデル 3 薬物 (NR、ISDN または FP) の累積皮膚透過量を Fig. 5 (D、E、F) に示す。さらに、stripped SD rat skin または stripped/split SD rat skin を介したモデル 3 薬物の透過速度および Lag time を Table 2 に示す。

透過試験開始後 1 時間までに stripped/split (0.4 mm) SD rat skin を介した NR、ISDN および FP の透過量は、皮膚に塗布した初期量のそれぞれ約 80%、91% および 76%であった。ISDN の透過速度は、NR および FP より大きかった。Stripped/split (0.4 mm) SD rat skin を介した NR、ISDN および FP の透過速度は、stripped SD rat skin を介した透過速度のそれぞれ約 4.67、7.88 および 11.01 倍であった。透過速度に関する統計的な有意差が stripped SD rat skin と stripped/split (0.4 mm) SD rat skin 間 (NR: $p<0.001$ 、ISDN: $p<0.001$ 、FP: $p<0.025$) および stripped SD rat skin と stripped/split (0.9 mm) SD rat skin 間 (NR: $p<0.05$ 、ISDN: $p<0.05$ 、FP: $p<0.0025$) に認められた。すなわち、モデル 3 薬物の透過速度は皮膚厚の減少に伴って増加した。

Stripped/split (0.4 mm) SD rat skin における NR、ISDN および FP の Lag time は stripped SD rat skin における Lag time のそれぞれ約 0.17、0.03 および 0.01 倍であった。Lag time に関する統計的な有意差は stripped SD rat skin と stripped/split (0.4 mm) SD rat skin 間 (NR: $p<0.01$ 、ISDN: $p<0.001$ 、FP: $p<0.025$) および stripped SD rat skin と stripped/split (0.9mm) SD rat skin 間 (NR: $p<0.05$ 、ISDN: $p<0.01$) に認められた。すなわち、モデル 3 薬物の Lag time は皮膚厚の減少に伴って短くなっ

た。

3. YMP 皮膚の特徴

YMP 皮膚 3セットにおける各 YMP 皮膚シートの中央部の厚さ (full-thickness) を Table 3 に示す。YMP 背部皮膚 (L-1、L-3、L-5、R-1、R-3 および R-5; Fig. 2) の厚さは一定で約 3.0 mm であり、四隅の厚さも約 3.0 mm と中央部と同じであった。一方、YMP 肩部、腹部および腰部皮膚 (L-shoulder、L-2、L-4、L-6、L-hip、R-2、R-4 および R-hip; Fig. 2) の厚さは 1.9~2.5 mm であった。また、YMP 肩部、腹部および腰部皮膚の四隅の厚さは一定ではなく、これら四隅の皮膚厚の差 (最大皮膚厚-最小皮膚厚) は 0.6~1.3 mm であった。YMP 皮膚シートの厚さは部位 (背部、肩部、腹部および腰部皮膚) により異なっていた。このことから以後の透過試験においては、背部皮膚を用いた。

YMP 皮膚切片 (L-shoulder、L-1、L-2、L-3、L-5 および L-hip) の組織標本を Fig. 6 に示す。YMP 皮膚の凍結および解凍によるダメージは認められなかった。さらに、YMP 皮膚 1セットの各 YMP 皮膚シートの角層厚は約 20 μm で、部位による違いは認められなかった。

Table 3 The regional difference of full-thickness of each YMP skin

| Left - Region | Thickness (mm) | Right - Region | Thickness (mm) |
|---------------|-------------------|----------------|-------------------|
| L-shoulder | 2.77 ± 0.15 | R-shoulder | 2.38 ± 0.07 |
| L-1 | 3.33 ± 0.21 | R-1 | 3.29 ± 0.24 |
| L-2 | 2.50 ± 0.42 | R-2 | 2.09 ± 0.25 |
| L-3 | 3.17 ± 0.35 | R-3 | 3.15 ± 0.10 |
| L-4 | 1.92 ± 0.42 | R-4 | 1.87 ± 0.34 |
| L-5 | 3.01 ± 0.44 | R-5 | 3.40 ± 0.49 |
| L-6 | 1.98 ± 0.50 | R-6 | 2.08 ± 0.21 |
| L-hip | 1.89 ± 0.10 | R-hip | 2.05 ± 0.21 |

Each value represents the mean ± S.D. (n=3 for YMP skin).

Full-thickness of each YMP skin was measured in the center of each YMP skin sheet of three YMP skin sets.

Shoulder: L- and R-shoulder skin sheets.

Dorsal: L-1, L-3, L-5, R-1, R-3 and R-5 dorsal skin sheets.

Abdominal: L-2, L-4, L-6, R-2, R-4 and R-6 abdominal skin sheets.

Hip: L- and R-hip skin sheets. (see Fig. 2)

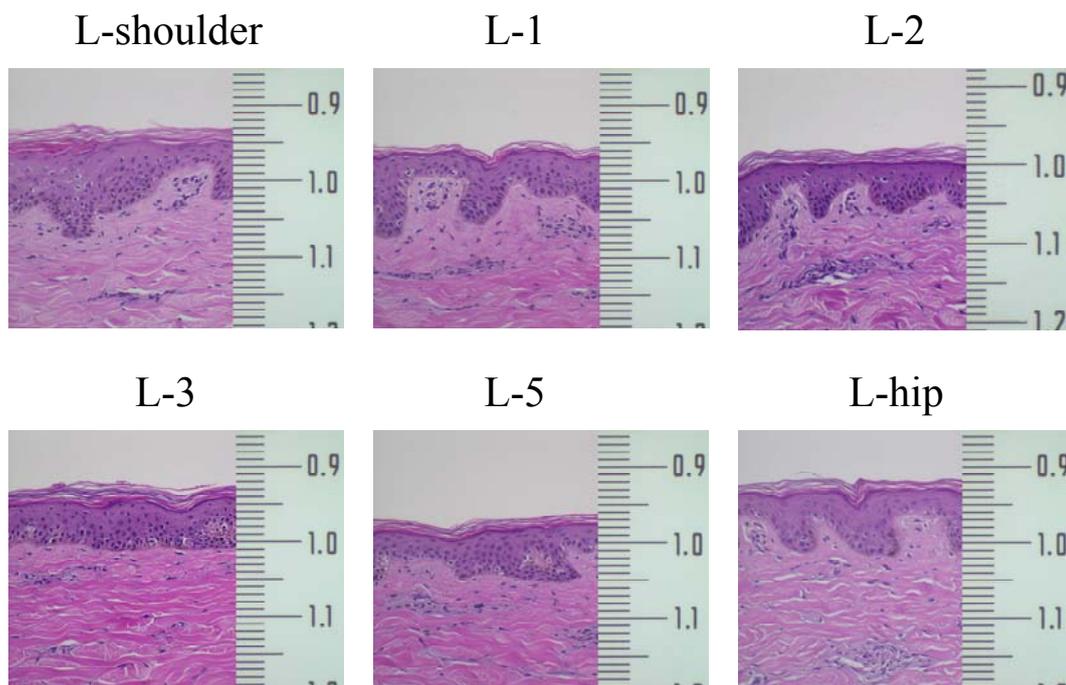


Fig. 6 H&E staining of YMP skin sections (L-shoulder, L-1, L-2, L-3, L-5 and L-hip; Fig. 2) immediately after thawing. The scale of rule indicates 10 μ m. Original magnification x 200.

4. Intact または split YMP skin を介したモデル 3 薬物の透過プロファイル

Intact、split (0.4 mm)、split (0.9 mm) および split (1.8 mm) YMP skin を用いてモデル 3 薬物の皮膚透過性における皮膚厚の影響を評価した。Intact または split YMP skin を介したモデル 3 薬物 (NR、ISDN または FP) の累積透過量を Fig. 7 (A、B、C) に示す。さらに、intact または split YMP skin を介したモデル 3 薬物の透過速度および Lag time を Table 4 に示す。

透過試験開始後 10 時間までに split (0.4 mm) YMP skin を介した NR、ISDN および FP の透過量は、皮膚に塗布した初期量のそれぞれ約 22%、74% および 21% であった。ISDN の透過速度は NR および FP より大きかった。Split (0.4 mm) YMP skin を介した NR、ISDN および FP の透過速度は intact YMP skin を介した各薬物のそれぞれ約 2.28、2.05 および 2.79 倍であった。透過速度に関する統計的な有意差は intact YMP skin と split (0.4 mm) YMP skin 間 (NR: $p < 0.05$ 、ISDN: $p < 0.01$ 、FP: $p < 0.05$)、intact YMP skin と split (0.9 mm) YMP skin 間 (NR: $p < 0.05$ 、ISDN: $p < 0.01$ 、FP: $p < 0.05$) に認められた。すなわち、モデル 3 薬物の透過速度は皮膚厚の減少に伴って増加した。

Split (0.4 mm) YMP skin における NR、ISDN および FP の Lag time は intact YMP skin における各薬物のそれぞれ約 0.28、0.10 および 0.23 倍であった。Lag time に関する統計的な有意差は intact YMP skin と split (0.4 mm) YMP skin 間 (NR: $p < 0.01$ 、ISDN: $p < 0.001$ 、FP: $p < 0.001$)、intact YMP skin と split (0.9 mm) YMP skin 間 (NR: $p < 0.01$ 、ISDN: $p < 0.001$ 、FP: $p < 0.001$) および intact YMP skin と split (1.8 mm) YMP skin 間 (ISDN: $p < 0.001$) に認められた。すなわち、モデル 3 薬物の Lag time は皮膚厚の減少に伴って短くなった。

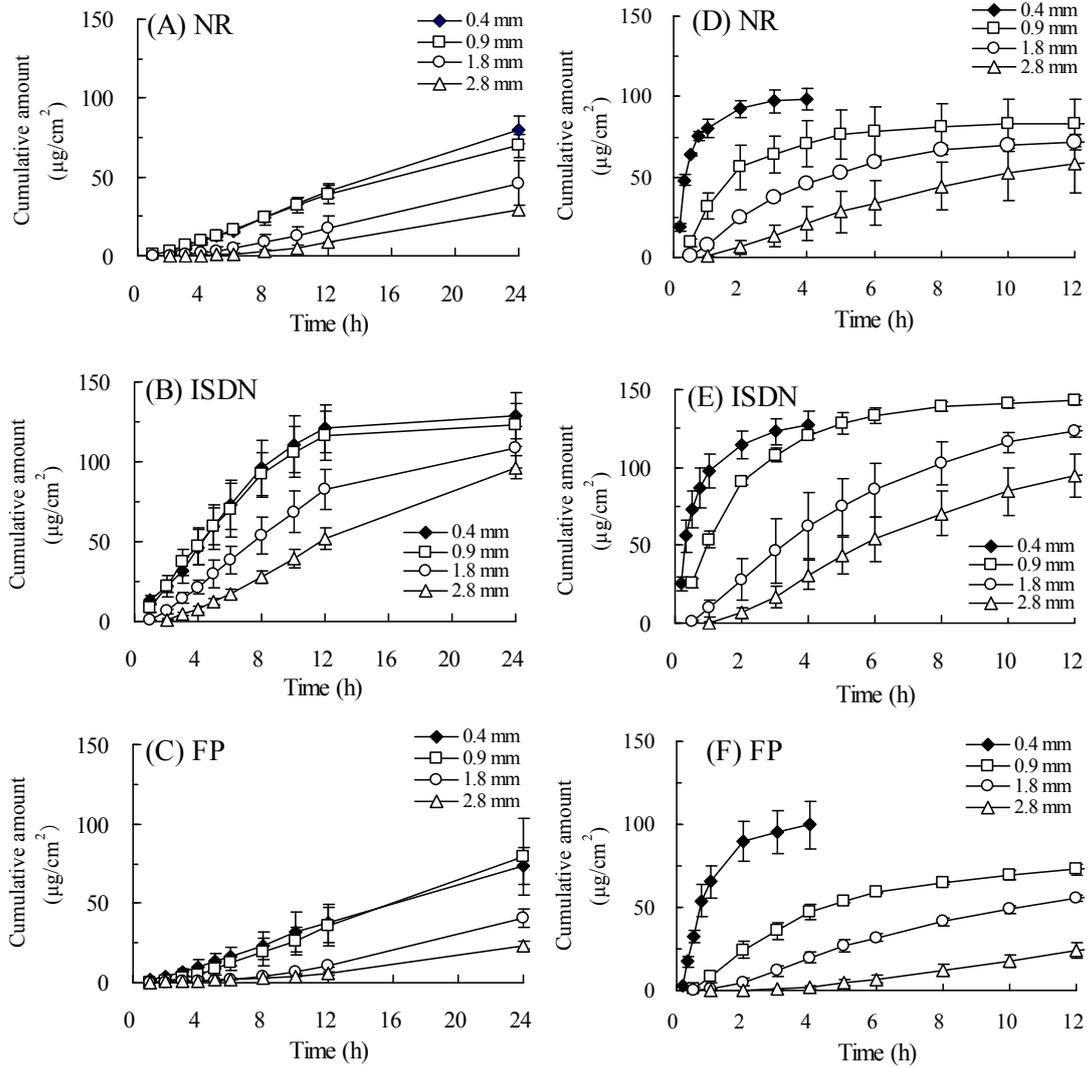


Fig. 7 Time course for the cumulative amounts of NR, ISDN and FP through split, intact, stripped/split or stripped YMP skin (skin thickness: 0.4, 0.9, 1.8 or 2.8 mm). Each value represents the mean \pm S.D. (n=3). Intact and split YMP skin: (A), (B) and (C); stripped and stripped/split YMP skin: (D), (E) and (F).

Table 4 Permeation rates and lag times of NR, ISDN and FP through intact, split, stripped or stripped/split YMP skin (Skin thickness: 0.4, 0.9, 1.8 or 2.8 mm)

| Drug | Skin type | Skin thickness (mm) | Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | Lag time (h) |
|------|----------------|---------------------|--|------------------------------|
| NR | Intact | 2.8 | 1.76 \pm 0.20 | 6.89 \pm 0.48 |
| | Split | 1.8 | 2.39 \pm 0.65 | 4.72 \pm 1.92 |
| | Split | 0.9 | 3.88 \pm 1.15* | 1.54 \pm 1.40** |
| | Split | 0.4 | 4.01 \pm 0.38* | 1.92 \pm 0.29** |
| | Stripped | 2.8 | 7.37 \pm 3.15 | 1.17 \pm 0.23 |
| | Stripped/split | 1.8 | 15.0 \pm 0.2 | 0.46 \pm 0.14*** |
| | Stripped/split | 0.9 | 45.4 \pm 14.0 | 0.24 \pm 0.09*** |
| | Stripped/split | 0.4 | 137 \pm 11 ^{##} | 0.02 \pm 0.02*** |
| ISDN | Intact | 2.8 | 6.04 \pm 0.75 | 3.45 \pm 0.23 |
| | Split | 1.8 | 8.05 \pm 1.63 | 1.19 \pm 0.47*** |
| | Split | 0.9 | 13.3 \pm 2.9** | 0.36 \pm 0.14*** |
| | Split | 0.4 | 12.4 \pm 1.6** | 0.34 \pm 0.44*** |
| | Stripped | 2.8 | 12.5 \pm 2.4 | 1.63 \pm 0.27 |
| | Stripped/split | 1.8 | 20.1 \pm 4.0 | 0.51 \pm 0.15 [#] |
| | Stripped/split | 0.9 | 56.2 \pm 6.3 [#] | 0.05 \pm 0.05 [#] |
| | Stripped/split | 0.4 | 147 \pm 25 [#] | 0.02 \pm 0.02 [#] |
| FP | Intact | 2.8 | 1.49 \pm 0.09 | 8.08 \pm 0.62 |
| | Split | 1.8 | 2.45 \pm 0.39 | 7.38 \pm 0.52 |
| | Split | 0.9 | 3.78 \pm 1.10* | 2.89 \pm 0.63*** |
| | Split | 0.4 | 4.16 \pm 1.27* | 1.86 \pm 0.42*** |
| | Stripped | 2.8 | 2.86 \pm 0.36 | 3.70 \pm 0.52 |
| | Stripped/split | 1.8 | 6.75 \pm 0.28 ^{##} | 1.14 \pm 0.58 [#] |
| | Stripped/split | 0.9 | 14.0 \pm 0.9 ^{##} | 0.38 \pm 0.22 [#] |
| | Stripped/split | 0.4 | 89.8 \pm 10.2 [#] | 0.14 \pm 0.01 [#] |

Each value represents the mean \pm S.D. (N=3).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with intact YMP skin for each drug using Dunnett tests.

[#] $p < 0.017$ and ^{##} $p < 0.003$ compared with stripped YMP skin for each drug using Welch tests (The Bonferroni method for multiple comparisons was applied).

5. Stripped または stripped/dermis-split YMP skin を介したモデル3薬物の透過プロファイル

Stripped、stripped/split (0.4 mm)、stripped/split (0.9 mm) および stripped/split (1.8 mm) YMP skin を用いてモデル3薬物の皮膚透過性における皮膚厚の影響を評価した。Stripped または stripped/split YMP skin を介したモデル3薬物 (NR、ISDN または FP) の累積皮膚透過量を Fig. 7 (D、E、F) に示す。また、Table 4 には stripped または stripped/split YMP skin を介したモデル3薬物の透過速度および Lag time を示す。

透過試験開始後1時間までに stripped (0.4 mm) YMP skin を介した NR、ISDN および FP の透過量は、皮膚に塗布した初期量のそれぞれ約 51%、62% および 44%であった。また、ISDN の透過速度は NR および FP より大きかった。Stripped/split (0.4 mm) YMP skin を介した NR、ISDN および FP の透過速度は、stripped YMP skin を介した透過速度のそれぞれ約 18.59、11.76 および 31.40 倍であった。透過速度に関する有意差は stripped YMP skin と stripped/split (0.4 mm) YMP skin 間 (NR: $p<0.003$ 、ISDN: $p<0.017$ 、FP: $p<0.017$)、stripped YMP skin と stripped/split (0.9 mm) YMP skin 間 (ISDN: $p<0.017$ 、FP: $p<0.003$) および stripped YMP skin と stripped/split (1.8 mm) YMP skin 間 (FP: $p<0.003$) に認められた。すなわち、モデル3薬物の透過速度は皮膚厚の減少に伴って増加した。

Stripped/split (0.4 mm) YMP skin における NR、ISDN および FP の Lag time は stripped YMP skin における Lag time のそれぞれ約 0.02、0.01 および 0.04 倍であった。Lag time に関する統計的な有意な差は stripped YMP skin と stripped/split (0.4 mm) YMP skin 間 (NR: $p<0.0003$ 、ISDN: $p<0.017$ 、FP: $p<0.017$)、stripped YMP skin と stripped/split (0.9 mm) YMP skin 間 (NR: $p<0.0003$ 、ISDN: $p<0.017$ 、FP: $p<0.017$) および stripped YMP skin と stripped/split (1.8 mm) YMP skin 間 (NR: $p<0.003$ 、ISDN:

$p < 0.017$ 、FP: $p < 0.017$) に認められた。すなわち、モデル 3 薬物の Lag time は皮膚厚の減少に伴って短くなった。

6. 抵抗と皮膚厚との関係

SD ラットまたは YMP 皮膚（全皮膚または角層より下層）を介したモデル 3 薬物の透過係数を Table 5 に示す。モデル 3 薬物の P_{tot} は皮膚厚の減少に伴って増加した。さらに、モデル 3 薬物の P_{ul} は皮膚厚の減少に伴って著しく増加した。

Stripped SD rat skin、stripped/split SD rat skin、stripped YMP skin または stripped/split YMP skin の平均皮膚厚とモデル 3 薬物の各 R_{ul} の相関関係を Fig. 8 に、SD ラットまたは YMP 皮膚の角層より下層を介したモデル 3 薬物の R_{ul} を Table 5 に示す。決定係数 (R^2) は SD ラット皮膚で 0.938~0.984、YMP 皮膚で 0.980~0.998 を示した。Stripped SD rat skin、stripped/split SD rat skin、stripped YMP skin または stripped/split YMP skin の平均皮膚厚とモデル 3 薬物の各 R_{ul} は良好な相関関係であった。また、SD ラット皮膚と YMP 皮膚共に、0.4 mm の皮膚厚において R_{ul} 値が十分に小さくなった。

Table 5 Resistances of NR, ISDN and FP in Each Skin Layer of SD Rat or YMP

| Species | Drug | Skin thickness (mm) | P_{tot} ($\times 10^{-4}$ cm/h) | P_{ul} ($\times 10^{-3}$ cm/h) | R_{tot} ($\times 10^3$ h/cm) | R_{ul} ($\times 10^3$ h/cm) | R_{ul}/R_{tot} (%) |
|---------|------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| SD rat | NR | 1.2 | 0.982 \pm 0.221 | 2.33 \pm 0.26 | 10.50 | 0.43 | 4.1 |
| | | 0.9 | 1.11 \pm 0.18 | 4.00 \pm 0.46 | 9.22 | 0.25 | 2.7 |
| | | 0.4 | 1.18 \pm 0.21 | 10.9 \pm 0.7 | 8.67 | 0.09 | 1.1 |
| | ISDN | 1.2 | 5.21 \pm 0.53 | 1.75 \pm 0.18 | 1.93 | 0.58 | 29.9 |
| | | 0.9 | 6.13 \pm 1.25 | 4.34 \pm 0.39 | 1.68 | 0.23 | 13.8 |
| | | 0.4 | 6.18 \pm 1.02 | 13.8 \pm 1.4 | 1.65 | 0.07 | 4.4 |
| | FP | 1.2 | 1.20 \pm 0.43 | 0.531 \pm 0.025 | 9.11 | 1.89 | 20.7 |
| | | 0.9 | 1.44 \pm 0.14 | 1.23 \pm 0.04 | 7.00 | 0.82 | 11.7 |
| | | 0.4 | 1.55 \pm 0.37 | 5.84 \pm 0.91 | 6.71 | 0.17 | 2.6 |
| YMP | NR | 2.8 | 0.587 \pm 0.066 | 0.246 \pm 0.105 | 17.20 | 4.65 | 27.0 |
| | | 1.8 | 0.796 \pm 0.216 | 0.500 \pm 0.007 | 13.30 | 2.00 | 15.0 |
| | | 0.9 | 1.29 \pm 0.38 | 1.51 \pm 0.47 | 8.33 | 0.70 | 8.4 |
| | | 0.4 | 1.34 \pm 0.13 | 4.56 \pm 0.37 | 7.53 | 0.22 | 2.9 |
| | ISDN | 2.8 | 2.01 \pm 0.25 | 0.418 \pm 0.081 | 5.02 | 2.45 | 48.8 |
| | | 1.8 | 2.68 \pm 0.54 | 0.671 \pm 0.134 | 3.84 | 1.54 | 40.1 |
| | | 0.9 | 4.44 \pm 0.97 | 1.87 \pm 0.21 | 2.33 | 0.54 | 23.1 |
| | | 0.4 | 4.13 \pm 0.52 | 4.90 \pm 0.84 | 2.44 | 0.21 | 8.5 |
| | FP | 2.8 | 0.497 \pm 0.029 | 0.0952 \pm 0.0121 | 20.20 | 10.60 | 52.5 |
| | | 1.8 | 0.818 \pm 0.129 | 0.225 \pm 0.009 | 12.40 | 4.45 | 35.9 |
| | | 0.9 | 1.26 \pm 0.37 | 0.466 \pm 0.031 | 8.50 | 2.15 | 25.3 |
| | | 0.4 | 1.39 \pm 0.42 | 2.99 \pm 0.34 | 7.77 | 0.34 | 4.3 |

R_{tot} and R_{ul} represent the mean (n=3).

R_{tot} : Resistances of intact or split skin (skin layers of stratum corneum, viable epidermis, dermis and hypodermis).

R_{ul} : Resistances of stripped or stripped/split skin (skin layers of viable epidermis, and hypodermis).

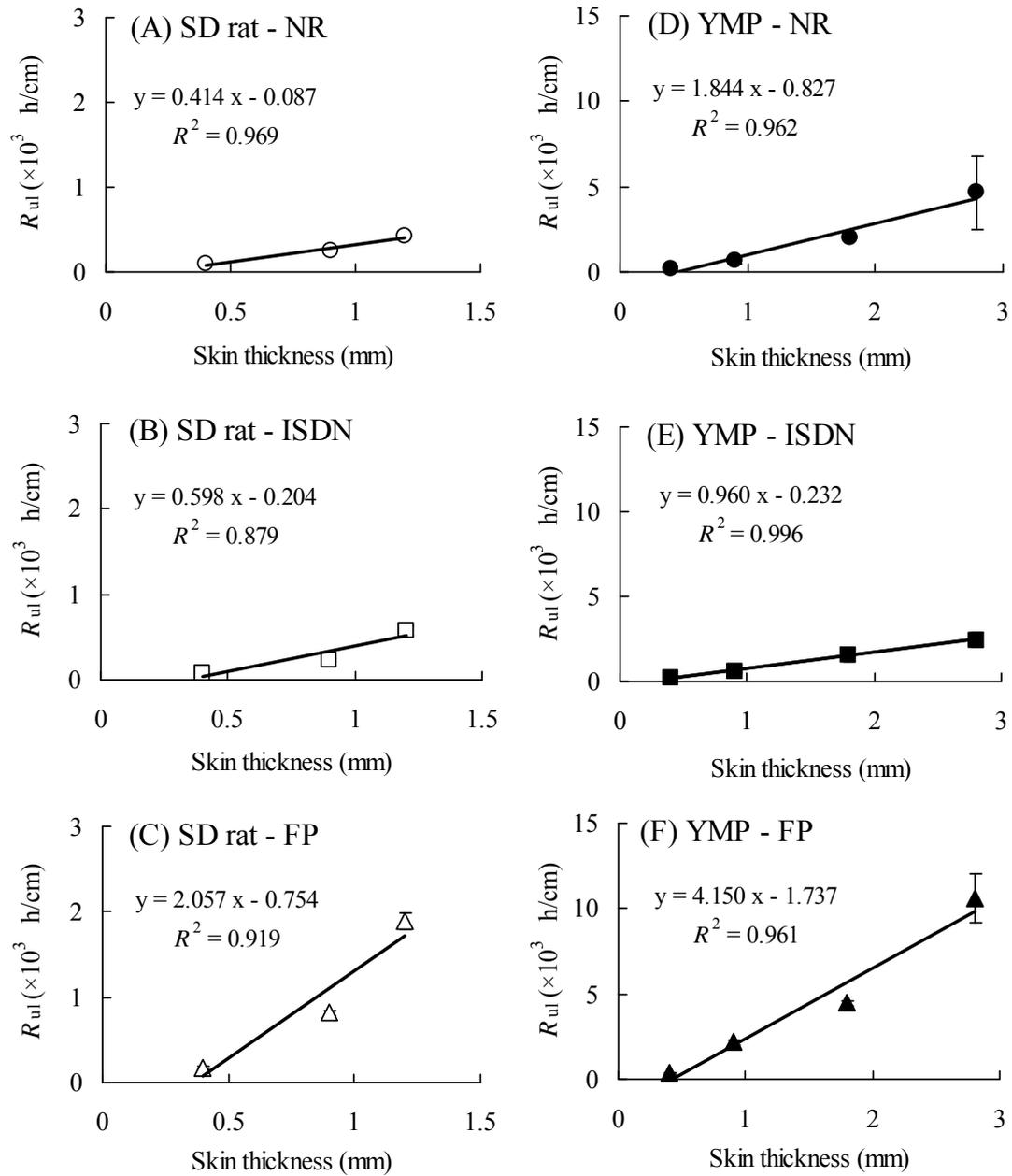


Fig. 8 Relationship between resistances of NR, ISDN and FP through stripped or stripped/split SD rat or YMP skin and skin thickness.

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

SD rat skin thickness: 0.4, 0.9 or 1.2 mm.

YMP skin thickness: 0.4, 0.9, 1.8 or 2.8 mm.

第3節 考察

In vitro 皮膚透過試験を実施するにあたり、YMP 皮膚の特徴を明らかにした。YMP 背部皮膚の皮膚厚はほぼ一定（約 3.0 mm）であったが、背部以外の部位では背部皮膚より薄く一定の厚さではなかった。角層厚は部位間で大きな違いはなく約 20 μm であった。この角層厚は Fujii ら²²⁾の報告と一致していた。また、YMP 肩部、腹部および腰部皮膚シートは YMP 背部皮膚シートより薄く、より柔らかかった。YMP 背部皮膚シートは他のシートより簡単にスプリットすることができ、一定の厚さを持つ YMP 背部皮膚を準備することができた。一方、YMP 肩部および腹部皮膚シートは弾性があるために簡単にスプリットすることができなかった。YMP 腰部皮膚シートはその皮膚表面に傷が多く認められたため本研究から除外した。これらのことから、本研究では YMP 背部皮膚が *in vitro* 透過試験に最も良いと考えられた。

Bronaugh ら⁵¹⁾は、ヒト皮膚表面に塗布した薬物は皮膚表面から約 0.2 mm の毛細血管から吸収されると報告している。また、数名の研究者が脂溶性薬物の *in vitro* 皮膚透過速度と *in vivo* 経皮吸収性との比較において、epidermis を介した薬物の *in vitro* 透過速度は過大評価となり、intact skin を介した薬物の *in vitro* 透過速度は過小評価になると報告している^{52, 53, 60, 61)}。また、Sato ら⁶⁵⁾および Kawamata ら⁴⁹⁾は、intact hairless rat skin を用いた *in vitro* 透過パラメータから Nicorandil (ゲル) または GTS-21 (TTS) を *in vivo* ヘアレスラットに適用した後の血漿中薬物濃度を予測しているが、予測値と実測値 (*in vivo*) に差異が認められ、予測性は十分ではなかった。両試験は intact skin を用いた *in vitro* 透過試験を実施しており、予測性が十分でなかった理由として、ラットの皮膚厚が *in vivo* 経皮吸収速度を予測するためには最適でなかったことが考えられる。本編での

検討では、intact skin より薄く、epidermis より厚い split skin を使用した。ラットまたはヒト皮膚の厚みの調整に際し、電動ダーマトームを用いて皮膚厚を 0.25 ~0.35 mm にすることを検討したが、皮膚に穴が開く場合があり使用できなかった。そのため、*in vitro* 透過試験には最も薄い皮膚として皮膚厚 0.4 mm の split skin を用いた。

Henning ら⁵⁶⁾は、*in vitro* 透過研究において intact human skin (皮膚厚: 2.02 mm) または split human skin (皮膚厚: 0.55 mm) を介した脂溶性薬物である fulfenamic acid ($\log K_{o/w}$: 3.9) の透過係数および Lag time の変動について報告している。Split human skin を介した fulfenamic acid の透過係数および Lag time は intact human skin に対してそれぞれ 5.2 および 0.1 倍であり、脂溶性薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過性における真皮厚の影響が認められている。

一方、Wilkinson ら⁵⁷⁾は、*in vitro* ヒト皮膚透過試験において、異なる物理化学特性を持つ 3 薬物 [caffeine: -0.01 ($\log K_{o/w}$)、propoxur: 1.52 ($\log K_{o/w}$)、testosterone: 3.32 ($\log K_{o/w}$)] の透過性と皮膚厚との関係を報告している。Split human skin (皮膚厚: 約 0.5 mm) を介したこれらの薬物の透過性は、皮膚が厚い intact human skin (皮膚厚: 約 1.0 mm) で低下している。さらに、Split human skin を介した caffeine (親水性薬物) の最大透過速度および Lag time は intact human skin に対してそれぞれ 2.4 および 0.8 倍となっている。すなわち彼らは、皮膚厚が親水性薬物の透過性にも影響することを示した。これらの結果^{56,57)} は本編の結果と一致しており、物理化学的性質の異なる薬物の *in vitro* 皮膚透過性における皮膚厚の影響は YMP skin でも同様であると考えられた^{56,57)}。

全皮膚、角層および角層より下層を介した薬物の透過係数は P_{tot} 、 P_{sc} および P_{ul} であり、透過係数の逆数 ($1/P$) として算出される^{66-68,70)}、全皮膚、角層および角層より下層の抵抗は R_{tot} 、 R_{sc} および R_{ul} である。 R_{ul} と皮膚厚との相関関係を

明らかにするために、SD ラットまたは YMP 皮膚を介したモデル 3 薬物の抵抗を皮膚厚に対してプロットした。その結果、モデル 3 薬物の皮膚厚と R_{ul} との間に良好な相関関係 ($R^2 \geq 0.879$) が認められた (Fig. 8)。さらに、YMP 皮膚における各薬物の傾きは SD ラット皮膚より大きく、YMP 皮膚において角層より下層の単位厚さ当たりの抵抗が大きいことが示された。また、FP の傾きが 3 薬物の中で一番大きく、角層より下層の抵抗が大きいことが示された。角層より下層の抵抗は角層より下層の厚みの減少に伴って上昇し、0.4 mm において無視できる程度であり、0.4 mm の split skin を用いることで *in vivo* ヒト経皮吸収性を反映した結果が得られると考えられた。

Behl ら⁶⁹⁾は、stripped hairless mouse skin を介した薬物の抵抗は viable epidermis でなく、dermis が主であると報告している。また、Ngawhirunpat ら¹⁴⁾は stripped human skin を介した薬物の透過性の変化が真皮厚の変化と一致していると報告している。本研究の結果は、これらに研究結果と一致している。

SD ラットにおいて、NR の R_{ul}/R_{tot} は 1.1%~4.1% と低く、皮膚 (角層より下層) 厚の減少に伴った変化は小さかった。一方、ISDN および FP の R_{ul}/R_{tot} は、ISDN では 4.4%~29.9%、FP では 2.6%~20.7% であった。ISDN および FP の R_{ul}/R_{tot} は皮膚 (角層より下層) 厚の減少に伴ってその値は大きく低下した。ISDN の R_{ul}/R_{tot} は FP の R_{ul}/R_{tot} と同程度であり、3 薬物における R_{ul}/R_{tot} は ISDN = FP > NR の順となった (Table 5)。YMP 皮膚において、NR、ISDN および FP の R_{ul}/R_{tot} は、NR では 2.9%~27.0%、ISDN では 8.5%~48.8%、FP では 4.3%~52.5% であり、皮膚 (角層より下層) 厚の減少に伴ってその値は低下した。3 薬物における R_{ul}/R_{tot} は FP > ISDN > NR の順となった (Table 5)。

これらの結果より、*in vitro* 皮膚透過試験において、SD ラットおよび YMP 皮膚を介したモデル 3 薬物の透過性は皮膚 (角層より下層) 厚の減少に伴い上昇

すること、また、0.4 mm の皮膚を用いることで R_{ul} が小さくなることが示された。したがって、*in vivo* ヒト経皮吸収速度の予測には、皮膚厚を 0.4 mm まで薄くした split (0.4 mm) skin を用いた *in vitro* 透過試験を実施することが、*in vivo* ヒト経皮吸収性を反映した結果を得られることから最良の方法であると考えられた。

第4節 小括

In vitro 皮膚透過試験に使用する YMP 皮膚の特徴を明らかにした。YMP 背部皮膚の皮膚厚は、ほぼ一定（約 3.0 mm）であったが、背部以外の部位では背部皮膚より薄く一定の厚さではなかった。また、角層厚は部位間で大きな違いはなく約 20 μm であった。YMP 皮膚を用いる場合、背部皮膚が *in vitro* 透過試験に最も良いと考えられた。

異なる物理化学的性質を持つモデル3薬物（NR、ISDN および FP）用い、薬物の皮膚透過性における皮膚厚の影響を *in vitro* SD ラットおよび YMP 皮膚透過試験により評価した。SD ラットまたは YMP 皮膚を介したモデル3薬物の *in vitro* 透過性は皮膚（角層より下層）厚の減少に伴って上昇し、その変化は SD ラット皮膚より YMP 皮膚が大きかった。

以上より、*in vivo* では比較的浅い毛細血管に薬物が取り込まれることを考えると *in vitro* YMP 皮膚透過性から *in vivo* ヒト経皮吸収性を予測するためには、皮膚（角層より下層）透過抵抗が無視可能な split (0.4 mm) YMP skin を使用することが *in vivo* ヒト経皮吸収性を反映した結果を得る目的において最良の方法であると考えられた。また、モデル3薬物の SD ラット皮膚透過性に及ぼす皮膚（角層より下層）厚の影響は YMP 皮膚より小さく、実験の操作性および皮膚厚調整時の皮膚損傷を防ぐためには、*in vitro* SD ラット皮膚透過試験においては intact skin を用いることが良いと判断した。

第2編 *In vitro* 皮膚透過性研究におけるヒト皮膚に代わる動物皮膚の有用性

第1章 薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過性における変動の評価⁷⁰⁾

緒言でも述べたように、薬物のヒト皮膚透過性を予測するためには、ヒト皮膚を用いることが最良の方法であると考えられている。しかしながら、日本国内においてヒト皮膚の入手は倫理的問題から難しく、入手できても量的な制限があり、*in vitro* ヒト皮膚透過性試験は十分に実施できない。さらに、ヒト皮膚には、人種、年齢および採取部位により皮膚バリア能に個体差があると報告されている³⁻¹⁶⁾。そのため、薬物の *in vitro* 皮膚透過性の変動が大きく、外用剤開発にヒト皮膚を使用することが問題となる場合が考えられる。薬物のヒト皮膚透過性の変動については、一般に個体間変動（異なる固体の皮膚）が個体内変動（同一個体の皮膚）より大きいとも報告されている^{3,12,13)}。しかしながら、ヒト皮膚または実験動物皮膚を介した薬物の *in vitro* 透過試験を同一の実験条件下にて実施し、薬物のヒトまたは実験動物皮膚透過性における個体内および個体間変動を比較した報告はほとんどない。

本章では第1編に使用した物理化学的性質の異なるモデル3薬物（NR、ISDN および FP）を用い^{14,17,20,24,27)}、皮膚厚 0.4 mm のヒト皮膚を介したモデル3薬物の *in vitro* 透過性の個体内および個体間変動を検証した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

NR、ISDN および FP は第1編と同じものを使用した (Table 1)。その他の試薬類はすべて試薬特級品を購入して使用した。

2. ヒト皮膚の調製

凍結ヒト腹部皮膚[白色人種 6 人: 男性 3 人 (46–52 歳) および女性 3 人 (38–53 歳) ; サイズ: 約 10 cm × 10 cm] は特定非営利活動法人エイチ・エー・ビー研究機構 (東京) より購入し、使用するまで -80°C で保存した。

実験の前日に冷凍保存していた凍結ヒト皮膚 (10 cm × 10 cm) を 32°C に設定した CO₂ インキュベータ (湿度: 80 ± 10%) 内で解凍した (15 分間)。皮下脂肪を除去し、電動ダーマトームにより皮膚厚が約 0.4 mm になるように角層より下層をスピリットした。ヒト腹部皮膚シート 1 枚から約 2.5 cm × 2.5 cm サイズのヒト皮膚サンプル 9 枚を調製し、皮膚厚をダイヤルシックスネスゲージにより測定した。また、ヒト皮膚は *in vitro* 皮膚透過試験を実施するまで生理食塩水に湿らせたペーパータオル上に表皮側を上にして置き、気密容器に入れ試験開始まで 4°C で 16 時間保存した。

3. 縦型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過試験

縦型拡散セル (拡散面積: 0.95 cm², 直径: 1.1 cm) ⁶³⁾ を *in vitro* 透過試験に使用した。NR、ISDN または FP 溶液 (30 mg/mL) は、水/エタノール混液 (3/1, v/v) にて溶解して調製した。*In vitro* 皮膚透過試験の開始 30 分前に、冷蔵保存していたヒト皮膚、冷凍保存していた SD ラット皮膚を 32°C に設定した CO₂ イ

ンキュベータ（湿度: $80 \pm 10\%$ ）内で平衡化または解凍した。縦型拡散セルのレシーバーチャンバーにヒト皮膚の表皮側を上にして装着し、レシーバーチャンバー内に 32°C に加温した蒸留水または $\text{pH}7.4$ 、 0.1 mol/L リン酸緩衝液 3.2 mL を添加した。皮膚の表皮側に薬物溶液 $5.0 \mu\text{L}$ を塗布した後、拡散セルは直ちに 32°C の CO_2 インキュベータ（湿度: $80 \pm 10\%$ ）に入れ、レシーバー相をマグネチックスターラーで攪拌した。塗布後 1、2、3、4、5、6、8、10 および 24 時間に 1 mL のレシーバー溶液を採取し、同時に同容量の 32°C に保温した蒸留水または $\text{pH}7.4$ 、 0.1 mol/L リン酸緩衝液を補充した。採取した試料は測定まで -80°C で保存した。

4. NR、ISDN および FP の濃度測定法

レシーバー溶液中 NR、ISDN および FP の濃度は第 1 編の実験の部に記載した方法で定量した。

5. 皮膚切片の調製

ヒト皮膚 (No.1) は解凍直後、直ちに 10%ホルマリン中性緩衝液で固定し、パラフィンで包埋した。また、縦型拡散セルを用いた透過試験開始後 10 および 24 時間の皮膚を採取した後、直ちに 10%ホルマリン中性緩衝液で固定し、パラフィンで包埋した。次に、各ホルマリン固定サンプルからパラフィン標本 ($5.0 \mu\text{m}$) を作製し、H&E 染色を行った。染色した標本は光学顕微鏡 (Axioplan 2; Carl Zeiss, Jena, Germany) で皮膚の表皮および真皮を観察した^{4,9,64}。さらに各ヒト皮膚切片の角層厚は電子顕微鏡下でマイクロメータを用いて測定した。

6. データ解析

NR、ISDN または FP の累積皮膚透過量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) を時間に対してプロットして累積皮膚透過量-時間プロファイルを作成し、定常状態時の回帰直線の傾きから透過速度 (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) を算出した。

モデル 3 薬物における *in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内および個体間変動は、6 人 (男性 3 人: No.1、No.2 および No.3、女性 3 人: No.4、No.5 および No.6) のヒト皮膚を用いて評価した。個体内変動は、各個体における同一部位のヒト皮膚サンプル 3 枚による平均透過速度を算出し、その CV%を用いて評価した。個体間変動は、各個体における同一部位のヒト皮膚サンプル 3 枚により算出した平均透過速度を個体の透過速度として、各個体間の平均透過速度を算出し、その CV%を用いて評価した。

7. 統計解析

In vitro 透過試験から得られたすべてのデータは、3 または 6 例の平均 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) により表記した。変動係数 (CV%) は次式 (3) を用いて算出した。

$$\text{CV}\% = \text{S.D.}/\text{Mean} \times 100 \quad (3)$$

男性皮膚と女性皮膚の透過速度 (J) の比較には Student's *t*-test を用いた。統計的な有意差は $p < 0.05$ とした。統計解析は software program SAS (SAS Institute Japan Ltd., 東京)を用いて行った。

第2節 結果

1. ヒト皮膚透過性における個体内変動

モデル3薬物における *in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内変動は、6人（男性3人: No.1、No.2 および No.3、女性3人: No.4、No.5 および No.6）のヒト皮膚を用いて評価した。*In vitro* 透過試験は縦型拡散セルを用いて実施した。ヒト皮膚を透過したモデル3薬物（NR、ISDN または FP）の累積皮膚透過量（同一皮膚シートからのヒト皮膚サンプル3枚の平均値）を Fig. 9 に示す。全てのヒト皮膚シートで ISDN の透過速度は NR および FP より大きかった。透過試験開始から10時間までに透過した ISDN 量は皮膚に塗布した初期量の約 51.0%~72.3%であった。

In vitro ヒト皮膚透過試験におけるモデル3薬物の透過速度およびその個体内変動（CV%）を Table 6 に示す。モデル3薬物の透過速度の CV%は、男性皮膚では最大 55.5%および女性皮膚では最大 40.4%であった。男性または女性皮膚の NR（No.3）、ISDN（No.5）および FP（No.6）の透過速度の CV%は 30%より大きかった。

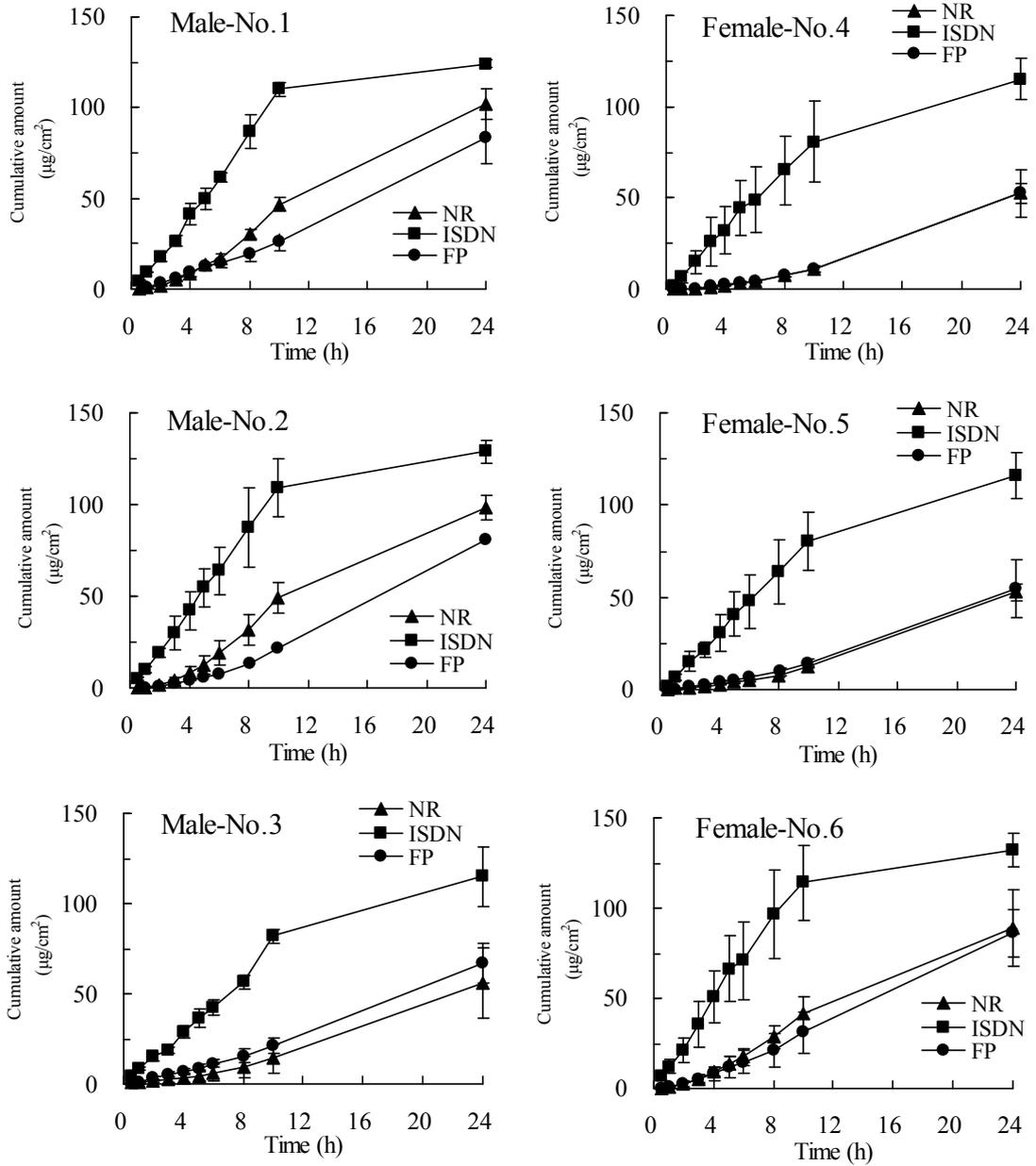


Fig. 9 Time course for the cumulative amounts of NR, ISDN and FP through human skin (three males and three females). Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

Table 6 CV% of the permeation rates for NR, ISDN and FP through human skin (Intra-individual variation for three males and three females)

| Sex | Drug | Permeation rate | CV% | Permeation rate | CV% | Permeation rate | CV% |
|--------|------|--|------|--|------|--|------|
| | | ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | | ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | | ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | |
| | | No.1 | | No.2 | | No.3 | |
| Male | NR | 5.45 \pm 0.29 | 5.3 | 5.89 \pm 1.26 | 21.4 | 1.54 \pm 0.85 | 55.5 |
| | ISDN | 11.6 \pm 0.85 | 7.4 | 11.3 \pm 3.22 | 28.5 | 6.84 \pm 0.78 | 11.4 |
| | FP | 2.38 \pm 0.40 | 16.8 | 2.35 \pm 0.40 | 16.8 | 2.20 \pm 0.44 | 19.8 |
| | | No.4 | | No.5 | | No.6 | |
| Female | NR | 1.35 \pm 0.13 | 9.7 | 1.34 \pm 0.27 | 20.1 | 4.84 \pm 1.07 | 22.1 |
| | ISDN | 7.89 \pm 1.48 | 18.8 | 8.09 \pm 2.17 | 26.8 | 11.0 \pm 2.56 | 23.3 |
| | FP | 1.28 \pm 0.24 | 18.9 | 1.47 \pm 0.57 | 38.6 | 3.27 \pm 1.32 | 40.4 |

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

Permeation rates of NR, ISDN and FP were calculated from 4 to 8 h.

2. ヒト皮膚透過性における個体間変動

男性（3人）、女性（3人）または男性+女性（6人：男性3人+女性3人）のヒト腹部皮膚を介したモデル3薬物のヒト皮膚透過性における個体間変動を評価した。*In vitro* ヒト皮膚透過試験におけるモデル3薬物の透過速度およびその個体間変動（CV%）をTable 7に示す。モデル3薬物において、男性皮膚を介した薬物の透過速度と女性皮膚を介した薬物の透過速度を比較したところ、値の変動が大きく男性と女性皮膚間で統計的な有意差は認められなかった。モデル3薬物における透過速度のCV%は、男性の皮膚では最大55.7%、女性の皮膚では最大80.5%、男性+女性の皮膚では最大65.0%であった。男性、女性または男性+女性の皮膚におけるNRの透過速度のCV%はISDNおよびFPの透過速度より大きかった。男性+女性の皮膚におけるモデル3薬物の透過速度のCV%はISDN < FP < NRの順であった。

モデル3薬物におけるヒト皮膚透過性の個体内変動と個体間変動を数値として比較した。モデル3薬物におけるヒト皮膚6人（男性3人+女性3人）の各個人の個体内変動（CV%）は最大55.5%、ヒト皮膚6人の個体間変動（CV%）は最大65.0%でNRに観察された。ISDNおよびFPの皮膚透過性の個体間変動は個体内変動と同程度であった。

Table 7 Permeation rates of NR, ISDN and FP through human or SD rat skin (Inter-individual variation)

| Species | Sex | N ^{a)} | Drug | Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | CV% |
|---------|---------------------|-----------------|------|---|------|
| Human | Male | 3 | NR | 4.29 \pm 2.39 | 55.7 |
| | | | ISDN | 9.91 \pm 2.67 | 26.9 |
| | | | FP | 2.20 \pm 0.01 | 4.2 |
| | Female | 3 | NR | 2.51 \pm 2.02 ^{b)} | 80.5 |
| | | | ISDN | 8.99 \pm 1.74 ^{b)} | 19.4 |
| | | | FP | 2.01 \pm 1.10 ^{b)} | 54.7 |
| | Male plus Female | 6 | NR | 3.40 \pm 2.21 | 65.0 |
| | | | ISDN | 9.45 \pm 2.08 | 22.0 |
| | | | FP | 2.16 \pm 0.72 | 33.2 |

Each value represents the mean \pm S.D. (n = 3 or 6).

^{a)}: Number.

^{b)}: No significant difference in the permeation rates of the three model drugs between male and female skin ($p < 0.05$, t-test) .

Permeation rates of NR, ISDN and FP were calculated from 4 to 8 h.

3. ヒト皮膚の組織学的評価

各ヒト皮膚について、組織切片を作成して角層の厚さを測定したところ、6人のヒト腹部の角層厚は $14.1 \pm 3.4 \mu\text{m}$ であった。縦型拡散セルを用いた *in vitro* 透過試験における組織切片のダメージを評価するため、男性皮膚 (No.1) の解凍直後、透過試験開始後 0、10 および 24 時間の組織標本を比較した (Fig. 10)。解凍直後、透過試験開始後 0、10 および 24 時間の角層に変化は観察されなかった。しかしながら、透過試験開始後 10 および 24 時間の真皮の結合組織に融解が観察された。

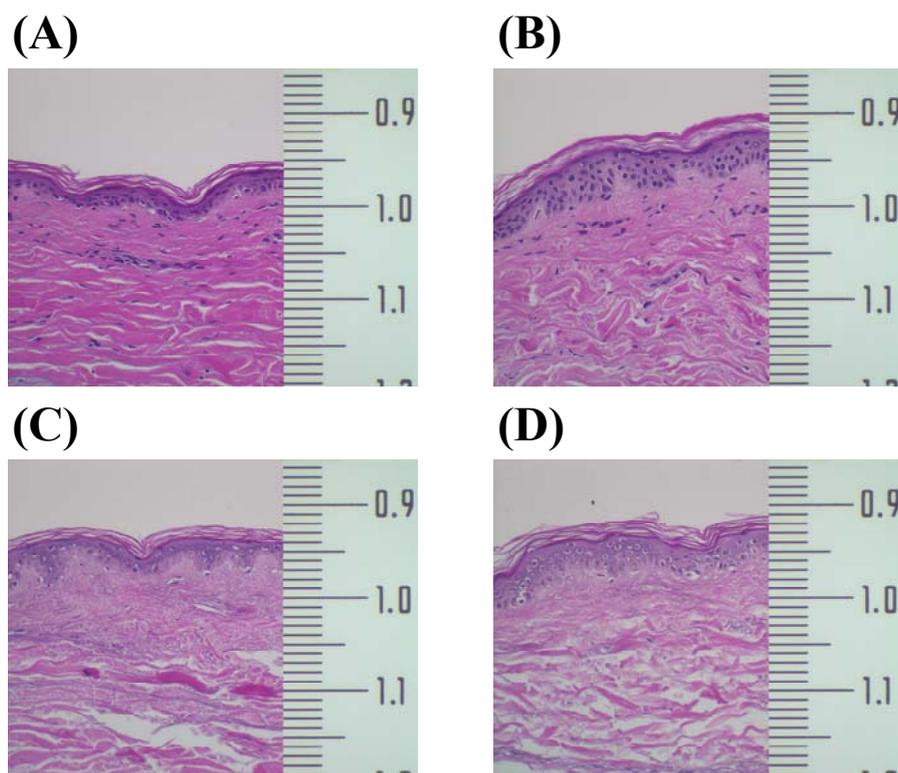


Fig. 10 H&E staining of human skin sections. Human skin sections (No.1) immediately after thawing (A) and at 0 h (B), 10 h (C) and 24 h (D) after the start of the permeation experiment. The scale indicates 10 μm . Original magnification, x 200.

第3節 考察

本章では、異なる物理化学的性質 ($\log K_{o/w}$) を持つモデル3薬物 (NR、ISDN および FP) を選定し^{14, 17, 20, 24-26)}、それら薬物のヒト皮膚透過性における個体内および個体間変動を評価した。NR、ISDN および FP の $\log K_{o/w}$ 値はそれぞれ -1.02 (low)、1.34 (intermediate) および 3.86 (high) であり、NR、ISDN および FP は親水性、脂溶性および高脂溶性薬物として使用した。角層は lipid pathway および pore pathway を持つ膜であり、それぞれは脂溶性および親水性薬物の主透過経路であると報告されていることから^{14, 27)}、各薬物の透過性から両経路の違いや変化を推定可能と考えられる。

薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過性における個体間変動を検証した結果、6人のヒト皮膚を介したモデル3薬物の透過速度の CV% は最大 65.0% であった。Southwell ら¹²⁾ は 8人の摘出ヒト皮膚を用いて 3化合物 (caffeine、methanol および octanol) の *in vitro* 透過性を評価し、透過速度の CV% は最大 71% であったと報告している。さらに、Schäfer-Koring ら¹⁵⁾ は 7~11人の human epidermis を用いて 7化合物 (caffeine、clotrimazole、digoxin、flufenamic acid、manitol、nicotine および testosterone) の *in vitro* 透過性を評価し、透過速度の CV% は最大 163% であったと報告している。これらの報告と本章の結果は同様であり、薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過性は、個体間変動が大きいことを確認した^{3, 13-16)}。NR の変動が特に大きく、pore pathway による変動が関係していると考えられた。

一方、Akomeah ら¹³⁾ は脂溶性薬物の皮膚透過速度は親水性薬物の皮膚透過速度に比べて変動が小さく、親水性薬物の *in vitro* 皮膚透過速度の変動は、皮膚中の脂質含量、皮膚のひびおよび穴による影響と報告されている。さらに、Morimoto ら⁷¹⁾ は -OH、-NH₂ および -COOH などの官能基が皮膚膜における薬

物の拡散に影響していると報告しており、その様な相互作用の違いも変動に関係していることも考えられる。

Qvist ら⁸⁾は薬物のヒト皮膚透過性の個体内および個体間変動は、選択した皮膚の部位、ドナーの年齢およびライフスタイル等の種々要素に依存していると報告している。したがって、薬物のヒト皮膚透過性における個体間および個体内変動はそれぞれの試験に同一部位を使用することでより明確にできる。しかしながら、同一のドナーから入手できる皮膚には倫理的な問題に加え現実的に制限がある。そのため、本研究におけるヒト皮膚での個体間変動の結果は、全て腹部の皮膚ではあるもののその内の特定部位ではなく、部位間変動を含むものである。また、年齢の影響や提供者の肥満などの影響なども個体間変動に含まれている。個体内変動と個体間変動が大きく変わらなかったことから、ヒト皮膚における個体内変動の大きさは、*in vitro* 透過試験を実施する上で大きな問題になると考える。

薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過試験は、個体内および個体間変動が大きいことから、外用剤の製剤設計において製剤間の僅かな皮膚透過性の差を評価することが難しく、ヒト皮膚は *in vitro* 透過試験において必ずしも第一選択とすべきではないと考えられた。

第4節 小括

本章では、薬物のヒト皮膚透過性の個体内および個体間変動を検証した。縦型拡散セルを用いてモデル3薬物（NR、ISDN およびFP）の *in vitro* ヒト皮膚透過試験を実施した。ヒト皮膚を介したモデル3薬物の透過速度を算出し、皮膚透過性の変動パラメータとしてそれらのCV%を評価した。モデル3薬物における *in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内変動は最大 55.5%、個体間変動は最大 65.0% と大きかった。外用剤の製剤設計において、薬物または製剤間の僅かな皮膚透過性の差を明らかにするためには、薬物の *in vitro* 皮膚透過性の変動がヒト皮膚より小さい実験動物の皮膚を用いた *in vitro* 透過試験法も積極的に利用していくことが必要と考えられた。

第2章 薬物の *in vitro* SD ラット皮膚透過性における変動の評価およびヒト皮膚透過性の予測⁷⁰⁾

マウス、ラット、モルモットおよびブタ皮膚はヒト皮膚の代替皮膚として外用剤の製剤設計に広く用いられている^{3, 5, 6, 9, 22-26)}。近交系動物の皮膚の個体間変動は近郊系以外の動物のそれらの変動より相対的に小さく、近交系動物皮膚を介した薬物の皮膚透過性の個体間変動は個体内変動と同程度に小さいと考えられている。そのため、外用剤の製剤設計において薬物の皮膚透過性における個体間変動が小さい実験動物皮膚は、ヒト皮膚より薬物または製剤間の僅かな皮膚透過性の差を評価できる *in vitro* 透過試験法と考えられる^{3,14,15)}。

実験動物の中で、ラットは動物サイズが小さく取り扱いが容易であり、ブタ皮膚より低コストであることから *in vitro* 皮膚透過試験および *in vivo* 経皮吸収試験に多く使用されている。また、医薬品開発の前臨床段階において SD ラットは *in vivo* 薬理、毒性および薬物動態研究に広く使用されている^{25, 44-47)}。そのことから、SD ラットを用いた *in vivo* 経皮吸収試験は、除毛の手間があるにもかかわらずヘアレスラット皮膚を用いた *in vitro* 透過試験と同様広く実施されている。SD ラット皮膚を用いた *in vitro* 透過試験から薬物のヒト皮膚透過性が予測可能となれば、*in vitro* ヘアレスラット皮膚透過試験を実施することなく、同一動物で薬物の *in vitro* 皮膚透過性と *in vivo* 経皮吸収性の相関関係と薬理作用や毒性との関係についての確認が可能となり、外用剤の製剤設計の効率化が計れる。さらに、SD ラットの新鮮皮膚は入手がしやすく、新鮮皮膚における薬物代謝を検討できることから、SD ラットは有用性の高い実験動物である。しかしながら、薬物の *in vitro* SD ラット皮膚透過性の変動および *in vitro* SD ラット皮膚透過性が

らのヒト皮膚透過性の予測性について明確に示した報告はほとんどない。

本章では、第1章と同様にモデル3薬物としてNR、ISDNおよびFPを選定した^{14, 17, 20, 24, 27)}。SDラット皮膚を用いた *in vitro* 透過試験を実施する際、主に、ヒト皮膚やYMP皮膚と同様凍結皮膚を使用した。それにより、動物の購入時期による個体差を小さくできると考えた。すなわち、必要数のSDラットを一度に購入し、皮膚を摘出した後に -80°Cで凍結保存した。新鮮皮膚と凍結皮膚の違いについては前もって確認した。すなわち、SDラット皮膚における凍結の影響を薬物の皮膚透過性および組織学的に比較した。

凍結SDラット皮膚を介したモデル3薬物の *in vitro* 透過試験を実施し、薬物の *in vitro* 凍結SDラット皮膚透過性における個体内変動を算出して、第1章で検討したモデル3薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過性における個体内および個体間変動と比較した。さらに、モデル3薬物における *in vitro* SDラット皮膚透過性からヒト皮膚透過性の予測性について考察した。

なお、凍結SDラットの皮膚厚の影響については、第1編の結果より脂溶性薬物であるISDNおよびFPの透過性において認められたが、皮膚厚調整時の皮膚損傷の回避および *in vitro* 皮膚透過試験の効率化のために *intact skin* を使用した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

NR、ISDN および FP は第1編と同じものを使用した (Table 1)。その他の試薬類はすべて試薬特級品を購入して使用した。

2. SD ラット皮膚の調製

SD 系雄性ラット (8 週齢) は日本チャールス・リバー株式会社 (厚木市, 神奈川) から購入した。すべての動物飼育および実験は大正製薬株式会社動物実験規定に従って行った。

SD ラットをジエチルエーテル麻酔下にて安楽死させ、皮膚に傷をつけないように注意深く背部の毛を剃った。皮膚の採取部位は、その中心を SD ラットの耳から尾方向へ 7 ± 1 cm とし、1匹の SD ラットから直径 2.5 cm の皮膚1枚を摘出した。摘出した SD ラット皮膚の皮下脂肪を手術用ハサミで除去して調製した。調製後の SD ラット皮膚はアルミ箔に包みビニール袋で密閉して使用するまで -80°C で保存した。この皮膚を凍結 SD ラット皮膚とした。また、比較のために、摘出後、すぐに調製した皮膚を新鮮 SD ラット皮膚として使用した。

3. 横型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過試験

横型拡散セル (拡散面積: 0.95 cm^2 , 直径: 1.1 cm) ^{14, 15)} は、新鮮 SD ラット皮膚または凍結 SD ラット皮膚を介した NR、ISDN または FP の透過係数 (P) の算出のために使用した (Fig. 11)。凍結 SD ラット皮膚は、*in vitro* 皮膚透過試験開始 30 分前に、 32°C に設定した CO_2 インキュベータ (湿度: $80 \pm 10\%$) 内で解凍し、横型拡散セルに装着した。また、新鮮 SD ラット皮膚は、摘出後直ちに横

型拡散セルに装着した。ドナー相（真皮側）に NR（蒸留水）、ISDN（蒸留水）または FP（pH7.4、0.1 mol/L リン酸緩衝液）の懸濁液 3.0 mL を添加し、レセプター相に蒸留水または pH7.4、0.1 mol/L リン酸緩衝液 3.0 mL を添加した。拡散セルは直ちに 32°C の CO₂ インキュベータ（湿度: 80 ± 10%）に入れ、ドナー相およびレシーバー相をマグネチックスターラーで攪拌した。試験開始後 1、2、3、4、5、6、8、10 および 24 時間に 1 mL のレシーバー溶液を採取し、同時に同用量の 32 °C に保温した蒸留水または pH7.4、0.1 mol/L リン酸緩衝液を補充した。採取した試料は測定まで -80°C で保存した。

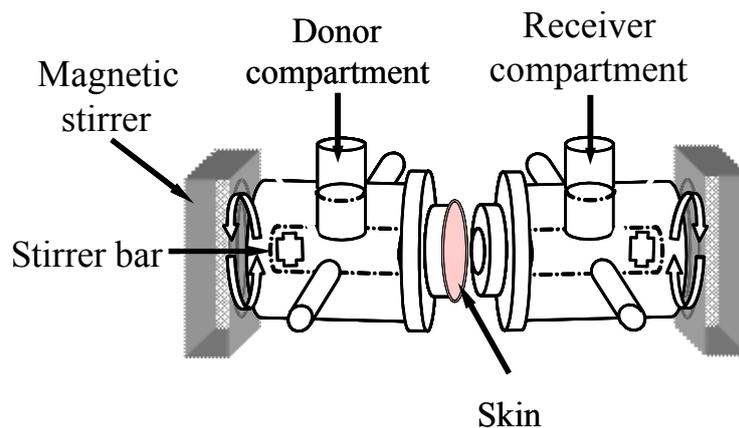


Fig. 11 Experimental set-up for *in vitro* skin permeation study using side-by-side diffusion cell.

4. 縦型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過試験

縦型拡散セル（拡散面積: 0.95 cm², 直径: 1.1 cm）⁶³⁾ を *in vitro* 透過試験に使用した。NR、ISDN または FP 溶液（30 mg/mL）は、水/エタノール混液（3/1, v/v）にて溶解して調製した。*In vitro* 皮膚透過試験の開始 30 分前に、冷凍保存していた SD ラット皮膚を 32°C に設定した CO₂ インキュベータ（湿度: 80 ± 10%）内で解凍した。縦型拡散セルのレシーバーチャンバーにヒトまたは SD ラット皮膚の表皮側を上にして装着し、レシーバーチャンバー内に 32°C に加温した蒸留水または pH7.4、0.1 mol/L リン酸緩衝液 3.2 mL を添加した。皮膚の表皮側に薬物溶液 5.0 μL を塗布した後、拡散セルは直ちに 32°C の CO₂ インキュベータ（湿度: 80 ± 10%）に入れ、レシーバー相をマグネチックスターラーで攪拌した。塗布後 1、2、3、4、5、6、8、10 および 24 時間に 1 mL のレシーバー溶液を採取し、同時に同容量の 32 °C に保温した蒸留水または pH7.4、0.1 mol/L リン酸緩衝液を補充した。採取した試料は測定まで -80°C で保存した。

5. NR、ISDN および FP の濃度測定法

レシーバー溶液中 NR、ISDN および FP の濃度は第 1 編の実験の部に記載した方法で定量した。

6. 皮膚切片の調製

新鮮 SD ラット皮膚および解凍直後の凍結 SD ラット皮膚の一部を直ちに 10% ホルマリン中性緩衝液で固定し、パラフィンで包埋した。また、横型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過試験では試験開始後 10 および 24 時間の新鮮および凍結 SD ラット皮膚を採取した後、直ちに 10%ホルマリン中性緩衝液で固定し、パラフィンで包埋した。

次に、各ホルマリン固定サンプルからパラフィン標本 (5.0 μm) を作製し、H&E 染色を行った。染色した標本は光学顕微鏡 (Axioplan 2; Carl Zeiss, Jena, Germany) により皮膚の表皮および真皮を観察した^{4,9,64)}。

7. データ解析

NR、ISDN または FP の累積皮膚透過量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) を時間に対してプロットして累積皮膚透過量-時間プロファイルを作成し、定常状態時の回帰直線の傾きから透過速度 ($J, \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) を算出した。見かけの透過係数 (P) は式 (1) から算出した。

モデル 3 薬物における *in vitro* SD ラット皮膚透過性の個体間変動は、6 匹の SD ラット皮膚サンプルによる平均透過速度を算出し、その CV%を用いて評価した。

8. 統計解析

In vitro 透過試験から得られたすべてのデータは、3 または 6 例の平均 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) により表記した。変動係数 (CV%) は式 (3) を用いて算出した。

新鮮 SD ラット皮膚と凍結 SD ラット皮膚の透過係数 (P) の比較には Student's *t*-test を用いた。統計的な有意差は $p < 0.05$ とした。また、新鮮 SD ラット皮膚の $\log P$ と Hatanaka ら²¹⁾が報告した新鮮ヘアレスラット皮膚の $\log P$ との相関関係、凍結 SD ラットの皮膚透過速度とヒト皮膚透過速度との相関関係は回帰分析により評価した。統計解析は software program SAS (SAS Institute Japan Ltd., 東京) を用いて行った。

第2節 結果

1. SD ラット皮膚における凍結の影響

薬物の *in vitro* SD ラット皮膚透過性における皮膚凍結の影響を明らかにするため、横型拡散セルを用いて新鮮 SD ラット皮膚と凍結 SD ラット皮膚を介したモデル3薬物の透過係数 (P) を算出し、新鮮 SD ラット皮膚透過性と凍結 SD ラット皮膚透過性を比較した。

新鮮 SD ラット皮膚または凍結 SD ラット皮膚を透過したモデル3薬物(NR、ISDN または FP) の累積皮膚透過量を Fig. 12 に示す。さらに、新鮮または凍結 SD ラット皮膚を介したモデル3薬物の透過係数 (P) を Table 8 に示す。

モデル3薬物の透過係数は Fig. 12 の直線の傾き (8-24 h) から算出した。モデル3薬物における新鮮 SD ラット皮膚の透過係数 (P) は $1.20 \times 10^{-7} \sim 342 \times 10^{-7}$ cm/s、凍結 SD ラット皮膚の透過係数は $1.51 \times 10^{-7} \sim 258 \times 10^{-7}$ cm/s であった。新鮮 SD ラット皮膚と凍結 SD ラット皮膚におけるモデル3薬物の透過係数 (P) は統計的な有意差は認められなかった。新鮮 SD ラット皮膚を介した NR、ISDN および FP の $\log P$ 値はそれぞれ -6.92、-5.27 および -4.47 (P の単位は cm/s)、一方、凍結 SD ラットを介した NR、ISDN および FP の $\log P$ 値はそれぞれ -6.82、-5.19 および -4.59 であった。

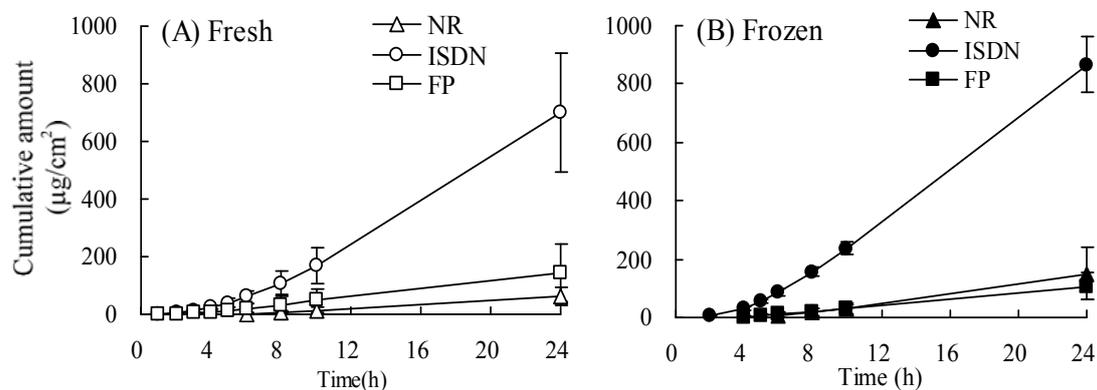


Fig. 12 Time course for the cumulative amounts of NR, ISDN and FP through fresh (A) and frozen (B) SD rat skin (skin permeation experiment using side-by-side diffusion cells). Each value represents the mean \pm SD (n=3).

Table 8 Comparison of the permeability coefficients of NR, ISDN and FP through fresh or frozen SD rat skin

| Drug | Fresh SD rat Skin | | Frozen SD rat Skin | | Fresh Hairless rat skin |
|------|--|----------------|--|----------------|-------------------------|
| | Permeability coefficient (cm/s) $\times 10^{-7}$ | log P (cm/s) | Permeability coefficient (cm/s) $\times 10^{-7}$ | log P (cm/s) | log P (cm/s) |
| NR | 1.20 \pm 0.89 | -6.92 | 1.51 \pm 0.80 ^{a)} | -6.82 | -7.01 ^{b)} |
| ISDN | 53.6 \pm 15.2 | -5.27 | 63.9 \pm 7.64 ^{a)} | -5.19 | -5.31 ^{b)} |
| FP | 342 \pm 148 | -4.47 | 258 \pm 104 ^{a)} | -4.59 | -3.99 ^{b)} |

The permeability coefficients are expressed as the mean \pm SD (n=3).

Log P represents the mean (n=3).

The permeability coefficients of the three model drugs are calculated from the slope of the linear portion of the graph corresponding to the time from 8 to 24 h.

^{a)}: No significant difference in the permeability coefficients of the three model drugs between fresh and frozen SD rat skin ($p < 0.05$, t-test).

^{b)}: The data for the fresh hairless rat was quoted from the results of Hatanaka *et al.* (1992).

2. SD ラット皮膚の組織学的評価

横型拡散セルを用いた *in vitro* 透過試験において、透過試験開始後 0（摘出直後または解凍直後）、10 および 24 時間の新鮮および凍結 SD ラット皮膚の組織標本を Fig. 13 に示す。透過試験開始後 0、10 および 24 時間の新鮮および凍結 SD ラット皮膚の角層に変化は観察されなかった。しかしながら、透過試験開始後 10 および 24 時間の新鮮および凍結 SD ラット皮膚の表皮には空胞化、真皮の結合組織には融解が観察された。透過試験開始後 0、10 および 24 時間の凍結 SD ラット皮膚の表皮および真皮の組織学的変化は、新鮮 SD ラット皮膚と同程度であった。

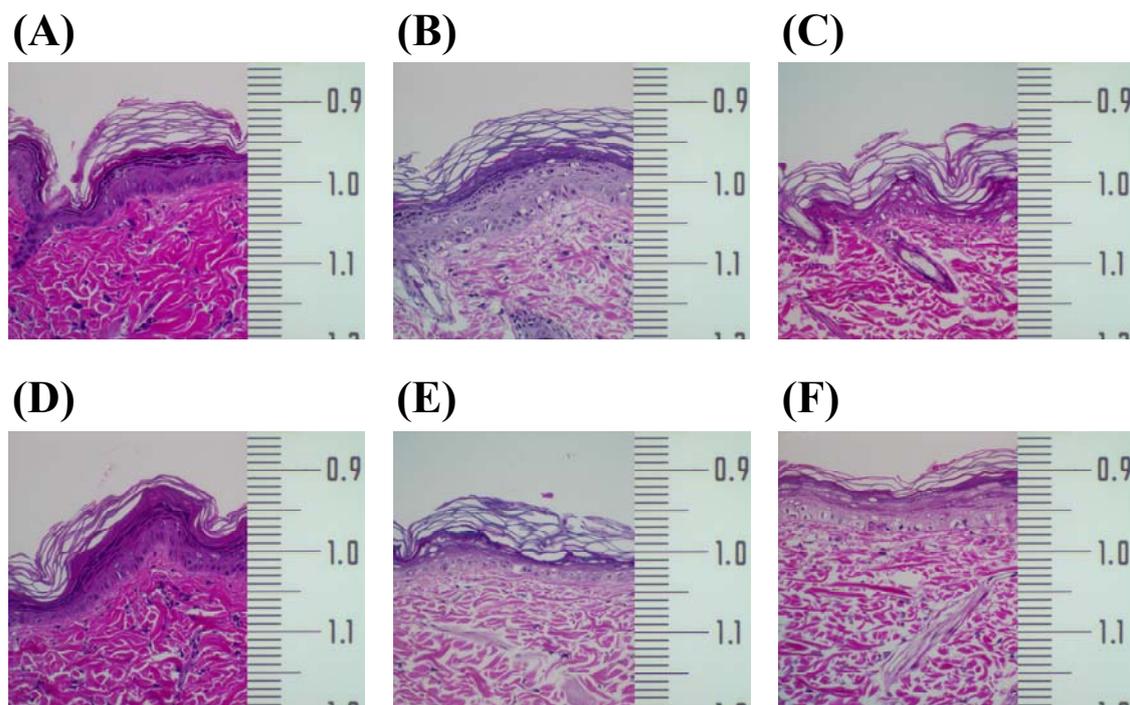


Fig. 13 H&E staining of fresh and frozen SD rat skin sections. Fresh SD rat skin sections at 0 h (A), 10 h (B) and 24 h (C) after the start of the permeation experiment. Frozen SD rat skin sections immediately after thawing (D) and at 10 h (E) and 24 h (F) after the start of the permeation experiment. The scale indicates 10 μ m. Original magnification, x 200.

3. SD ラット皮膚における個体間変動

モデル3薬物における *in vitro* 凍結 SD ラット皮膚透過性の個体間変動を評価した。*In vitro* 透過試験は縦型拡散セルを用いて実施した。凍結 SD ラット皮膚を透過したモデル3薬物 (NR、ISDN または FP) の累積透過量を Fig. 14 に示す。凍結 SD ラット皮膚を介したモデル3薬物の透過速度およびその CV% を Table 9 に示す。凍結 SD ラット皮膚透過試験において ISDN の透過速度は NR および FP より高かった。透過試験開始から 10 時間までに透過した ISDN 量は皮膚に塗布した初期量の約 60% であった。凍結 SD ラット皮膚を介したモデル3薬物の透過速度の CV% は、最大 25.9% となり、ヒト皮膚透過性の個体間変動 (最大 65%) に比べて非常に小さかった。モデル3薬物の透過速度の CV% は ISDN < FP < NR の順であった。

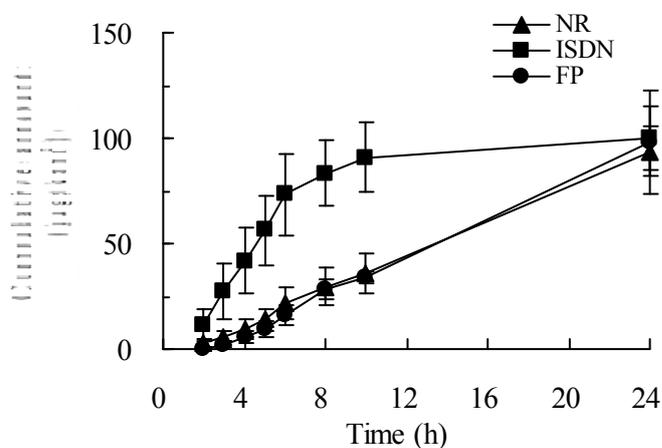


Fig. 14 Time course for the cumulative amounts of NR, ISDN and FP through SD rat skin.

Each value represents the mean \pm S.D. (n=6).

Table 9 Permeation rates of NR, ISDN and FP through human or SD rat skin (Inter-individual variation)

| Species | Sex | Drug | Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | CV% |
|---------|---------------------|------|---|------|
| Human | Male plus Female | NR | 3.40 \pm 2.21 | 65.0 |
| | | ISDN | 9.45 \pm 2.08 | 22.0 |
| | | FP | 2.16 \pm 0.72 | 33.2 |
| SD rat | Male | NR | 5.72 \pm 1.48 | 25.9 |
| | | ISDN | 14.7 \pm 1.91 | 13.0 |
| | | FP | 4.33 \pm 0.83 | 19.2 |

Each value represents the mean \pm S.D. (n = 6).

Permeation rates of NR, ISDN and FP were calculated from 4 to 8 h.

第3節 考察

著者は、実験の効率化および動物の個体差を小さくするために必要数の SD ラットを一度に購入し、SD ラット皮膚を摘出して凍結 SD ラット皮膚として -80°C に冷凍保存した。そのため、SD ラット皮膚を用いた *in vitro* 透過試験における凍結の影響を薬物の皮膚透過性および皮膚構造の変化から検証した。透過試験開始後 0、10 および 24 時間の凍結 SD ラット皮膚の組織学的な変化は新鮮 SD ラット皮膚のそれらと同程度であった。さらに、凍結 SD ラット皮膚を介した NR、ISDN および FP の透過係数 (P) を新鮮 SD ラット皮膚のそれらと比較した。その結果、凍結と新鮮 SD ラット皮膚を用いた NR、ISDN および FP の透過係数 (P) に統計的に有意差は認められなかった。

Bronaugh ら⁷²⁾および Harrison ら⁷³⁾は水の透過において凍結ヒト皮膚と新鮮ヒト皮膚に差が無いと報告している。一方、Babu ら⁷⁴⁾は凍結がラット皮膚を介した薬物の透過に僅かに影響していると報告している。Babu らの結果と本章における凍結の影響の結果が異なった理由は、皮膚凍結および解凍方法の違いによるものと考えられた⁷⁴⁾。我々は、本章の検討において皮膚凍結が透過試験開始後 24 時間までの皮膚透過性および皮膚形態に影響しないことを明らかにした。しかしながら、皮膚中には数多くの代謝酵素があり⁷⁵⁾、皮膚凍結によりその代謝酵素活性の低下が起こる可能性がある。凍結皮膚を用いた *in vitro* 透過試験を行う場合には、皮膚中酵素活性の減少の可能性を考慮すべきであり、その場合には新鮮皮膚を利用することも必要であると考えている。

また、横型拡散セルを用いて新鮮または凍結 SD ラット皮膚と新鮮ヘアレスラット皮膚における $\log P$ 値を比較した (Table 8)。比較に当たり、ヘアレスラット皮膚の $\log P$ 値は Hatanaka ら^{21, 22)}の結果を引用した。モデル 3 薬物に関して、

新鮮ヘアレスラット皮膚と新鮮 SD ラット皮膚との $\log P$ の関係は $r = 0.992$ (回帰直線: $y = 1.20x + 1.24$)、新鮮ヘアレスラット皮膚と凍結 SD ラット皮膚との $\log P$ の関係は、 $r = 0.983$ (回帰直線: $y = 1.23x + 1.69$) と良好な相関関係が認められた。*In vitro* 皮膚透過性研究において、凍結 SD ラット皮膚の結果を新鮮ヘアレスラット皮膚のデータと直接的に比較することも可能であると考えられた。

凍結 SD ラット皮膚を介したモデル 3 薬物の皮膚透過性およびその個体間変動を検討した。凍結 SD ラット皮膚を介した NR、ISDN および FP の透過速度はそれぞれ 5.72、14.7 および 4.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ となった。凍結 SD ラット皮膚を介した NR、ISDN および FP の透過速度の CV% はそれぞれ 25.9%、13.0% および 19.2% であった。モデル 3 薬物における *in vitro* SD ラット皮膚透過性の個体間変動は、*in vitro* ヒト皮膚透過性の個体間変動より著しく小さかった。ヒト皮膚を介したモデル 3 薬物の個体間変動が SD ラットより大きいのは、ヒト皮膚においては、第 1 章で述べた様に多くの変動要因を含んでいることによるものと考えている。

SD ラット皮膚を介したモデル 3 薬物の透過速度の CV% は ISDN < FP < NR の順であった。この結果は、第 1 章で報告したヒト皮膚の透過速度の CV% と同様であった。

6 人のヒト皮膚を介したモデル 3 薬物の透過速度に対して凍結 SD ラット皮膚を介したモデル 3 薬物の透過速度は、それぞれ 1.7、1.6 および 2.0 倍であった。モデル 3 薬物における凍結ヒト皮膚と凍結 SD ラット皮膚との透過速度の関係を Fig. 15 に示す。ヒト皮膚と凍結 SD ラット皮膚の間には良好な相関関係が認められた ($r = 0.999$)。これらの皮膚を介したモデル 3 薬物の透過速度の違いは、角層厚および皮膚バリア機能の種差により引き起こされていると考えられた^{6,9,27)}。

以上より、モデル3薬物における *in vitro* SDラット皮膚透過性の個体間変動(最大 25.9%) は、*in vitro* ヒト皮膚透過性の個体間 (最大 65.0%) および個体内変動 (最大 55.5%) より著しく小さいことが明らかとなった。また、SDラット皮膚を介したモデル3薬物の透過速度はヒト皮膚を介した各々の薬物の透過速度と良く相関していた。SDラット皮膚は、ヒト皮膚より2倍程度皮膚透過性が高いことを考慮すれば、ヒト皮膚透過性を予測できるヒト皮膚の代替として有用な実験動物皮膚であると考えられた。SDラット皮膚が外用剤の製剤設計に使用できることになれば、開発製剤の薬物動態、薬理効果および毒性についてのSDラットで得られた情報と総合的に解析することが可能となり、外用剤開発の効率化を推進できると考えられた。

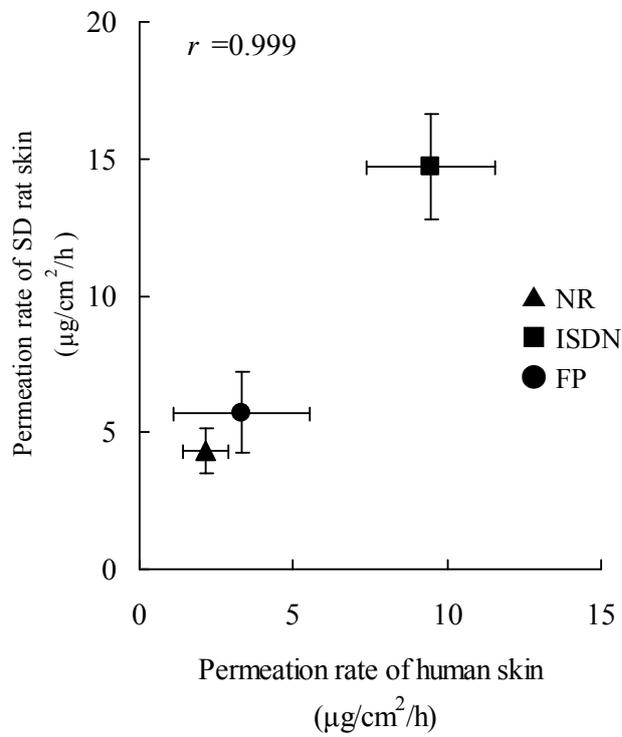


Fig. 15 Relationship between the permeation rates of NR, ISDN or FP through human skin and frozen SD rat skin.

Each point represents the mean \pm SD (n=6).

第4節 小括

本章では、凍結 SD ラット皮膚または新鮮 SD ラット皮膚を介したモデル3薬物（NR、ISDN および FP）の *in vitro* 透過試験を実施し、モデル3薬物の *in vitro* 皮膚透過性における皮膚凍結の影響を検討した。凍結 SD ラット皮膚と新鮮 SD ラット皮膚の *in vitro* 透過性に有意差は認められず、モデル3薬物の *in vitro* SD ラット皮膚透過性における皮膚凍結の影響はなかった。

また、第1章で検討したモデル3薬物における *in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内および個体間変動と *in vitro* 凍結 SD ラット皮膚透過性の個体間変動を比較した。さらに、モデル3薬物の *in vitro* SD ラット皮膚透過性からヒト皮膚透過性の予測性について検討した。モデル3薬物における *in vitro* SD ラット皮膚透過性の個体間変動（最大 25.9%）は、*in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内（最大 55.5%）および個体間変動（最大 65.0%）より著しく小さかった。さらに、凍結 SD ラット皮膚を介したモデル3薬物の透過速度はヒト皮膚に比べ約 2 倍となり、各薬物において良く相関していた。

以上より、SD ラット皮膚は、ヒト皮膚より薬物または製剤間の僅かな皮膚透過性の差を評価でき、TTS 製剤の開発において有用な実験動物皮膚であることが明らかとなった。

第3章 薬物の *in vitro* YMP 皮膚透過性における変動の評価および

ヒト皮膚透過性の予測⁷⁶⁾

本編・第2章において、SD ラット皮膚がヒト皮膚透過性を予測するための有用な実験動物皮膚であることを示唆した。しかし、経皮吸収に利用する面積と体重の比が、SD ラットではヒトの場合と大きく異なる。したがって、医薬品の開発研究における前臨床段階において、外用剤の製剤設計をより正確に実施するためには、この比がヒトに近く、比較的大型の実験動物の皮膚を用いた *in vitro* 透過試験も必要と考えられている。

近年、ブタ皮膚を用いた薬物の *in vitro* 透過試験が多く実施され^{3, 38-43)}、ブタ皮膚透過性はヘアレスマウスやヘアレスラット皮膚透過性と比較してヒト皮膚透過性に近く、ブタ皮膚がヒト皮膚透過性の予測に有用であることが報告されている^{3, 11, 30-37)}。また、YMP 皮膚はヒト皮膚に似た皮溝を持ち、ヒト皮膚と同様に体毛が少なく、皮膚厚および角層厚がヒト皮膚に近いと報告されている^{22, 35, 37)}。さらに、いくつかの薬物において YMP 皮膚がヒト皮膚透過性予測に有用であると報告されている^{22, 30)}。

現在、この YMP 皮膚は、国内において日本チャールス・リバー株式会社より安定供給されており、ヒト皮膚の代替皮膚として使用可能となれば、外用剤の開発速度は飛躍的に短縮できると考えられる。しかしながら、YMP 皮膚の透過性に関する情報は十分ではなく、YMP 皮膚を介した薬物の *in vitro* 透過性における個体内および個体間変動の報告例もない。さらに、薬物のヒト皮膚透過性の予測に関する情報もほとんどない。

本章では、第1および2章と同様にモデル薬物として物理化学的性質が異な

る NR、ISDN および FP を選定し、YMP 皮膚を介したモデル 3 薬物の *in vitro* 透過試験を実施した。また、モデル薬物の *in vitro* YMP 皮膚透過性における個体内および個体間変動を第 1 章で検討したモデル 3 薬物の *in vitro* ヒト皮膚透過性における個体内および個体間変動と比較した。さらに、モデル 3 薬物における *in vitro* YMP 皮膚透過性からヒト皮膚透過性の予測性について考察した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

NR、ISDN および FP は第1編と同じものを使用した (Table 1)。その他の試薬類はすべて試薬特級品を購入して使用した。

2. YMP 皮膚の調製

凍結 YMP 皮膚セット (雌性, 5ヶ月) は日本チャールス・リバー株式会社より購入し、使用するまで -80°C で保存した。本章では、凍結 YMP 皮膚3セットを使用し、YMP 背部皮膚 6シート (L-1、L-3、L-5、R-1、R-3 および R-5) を *in vitro* 透過試験に使用した。

冷凍保存していた YMP 皮膚シート ($10\text{ cm} \times 10\text{ cm}$) を 32°C に設定した CO_2 インキュベータ内 (湿度: $80 \pm 10\%$) で解凍し (15分間)、次いで皮下脂肪を除去した。さらに、各 YMP 皮膚シートは、電動ダーマトームを用いて皮膚厚が約 0.4 mm になるように角層より下層をスピリットした。YMP 皮膚シート1枚から約 $2.5\text{ cm} \times 2.5\text{ cm}$ サイズの YMP 皮膚サンプル9枚を調製した。YMP 皮膚の厚さは、ダイヤルシックネスゲージを用いて測定し、その皮膚厚は $0.41 \pm 0.04\text{ mm}$ であった。また、YMP 皮膚は生理食塩液に湿らせたペーパータオル上に表皮側を上にして置き、気密容器に入れ試験開始まで 4°C で16時間保存した。

3. 縦型拡散セルを用いた *in vitro* 皮膚透過試験

縦型拡散セル (拡散面積: 0.95 cm^2 , 直径: 1.1 cm) ⁶³⁾ を *in vitro* 透過試験に使用した。NR、ISDN または FP 溶液 (30 mg/mL) は、水/エタノール混液 (3/1, v/v) にて溶解して調製した。

In vitro 皮膚透過試験開始 30 分前に冷蔵保存していた YMP 皮膚を 32°C に設定した CO₂ インキュベータ (湿度: 80 ± 10%) 内で平衡化した。縦型拡散セルのレシーバーチャンバーに YMP 皮膚の表皮側を上にして装着し、レシーバーチャンバー内に 32°C に加温した蒸留水または pH7.4、0.1 mol/L リン酸緩衝液 3.2 mL を添加した。皮膚の表皮側に薬物溶液 5.0 μL 塗布した後、拡散セルは直ちに 32°C の CO₂ インキュベータ (湿度: 80 ± 10%) に入れ、レシーバー相をマグネチックスターラーで攪拌した。塗布後 1、2、3、4、5、6、8、10 および 24 時間に 1 mL のレシーバー溶液を採取し、同時に同容量の 32°C に保温した蒸留水または pH7.4、0.1 mol/L リン酸緩衝液を補充した。採取した試料は測定まで -80°C で保存した。

4. NR, ISDN および FP の濃度測定法

レシーバー溶液中 NR、ISDN および FP の濃度は第 1 編の実験の部に記載した方法で定量した。

5. 皮膚切片の調製

各 YMP 皮膚シート (L-1、L-3、L-5、R-1、R-3 および R-5) から各 YMP 皮膚切片を準備し、直ちに 10%ホルマリン中性緩衝液で固定し、パラフィンで包埋した。次に、パラフィン標本 (5.0 μm) を作製し、H&E 染色を行った。染色した標本は光学顕微鏡 (Axioplan 2; Carl Zeiss, Jena, Germany) で皮膚の表皮および真皮を観察した^{4, 9, 64}。さらに各 YMP 皮膚切片の角層厚は電子顕微鏡下でマイクロメータを用いて測定した。

6. データ解析

NR、ISDN または FP の透過パラメータは各薬物の累積皮膚透過量 (μg/cm²)

を時間に対してプロットし、累積皮膚透過量－時間プロファイルを作成し、定常状態時の回帰直線の傾きから透過速度 ($J, \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) を算出した。

モデル3薬物における *in vitro* YMP 皮膚透過性の個体内および個体間変動は、YMP3セット (No.1、No.2 および No.3) の YMP 背部皮膚シート (R-3) を用いて評価した。個体内変動は各個体の同一シートの YMP 皮膚サンプル3枚による平均透過速度を算出し、その CV%を用いて評価した。個体間変動は、各個体における同一シートの YMP 皮膚サンプル3枚により算出した平均透過速度を個体の透過速度として、各個体間の平均透過速度を算出し、その CV%を用いて評価した。

7. 統計解析

透過試験から得られたすべてのデータは、3 または 6 例の平均 \pm 標準偏差 (Mean \pm S.D.) により表記した。変動係数 (CV%) は式 (3) を用いて算出した。

第2節 結果

1. YMP 皮膚透過性における個体内変動

モデル3薬物における *in vitro* YMP 皮膚透過性の個体内変動は、各薬物の皮膚透過速度を算出し、その CV% で評価した。*In vitro* 透過試験は縦型拡散セルを用いて実施した。YMP 皮膚を透過したモデル3薬物 (NR、ISDN または FP) の累積皮膚透過量を個体毎に分け Fig. 16 に、透過速度およびその CV% を Table 10 に示す。YMP 皮膚透過試験において ISDN の透過速度は NR および FP より高かった。透過実験開始から 10 時間までに透過した ISDN 量は皮膚に塗布した初期量の 33.4%~43.1% であった。NR、ISDN および FP の皮膚透過速度の CV% はそれぞれ最大で 17.2%、20.8% および 13.5% であり、YMP 皮膚を介したモデル3薬物の皮膚透過速度の CV% は、ISDN で最大 20.8% であった。

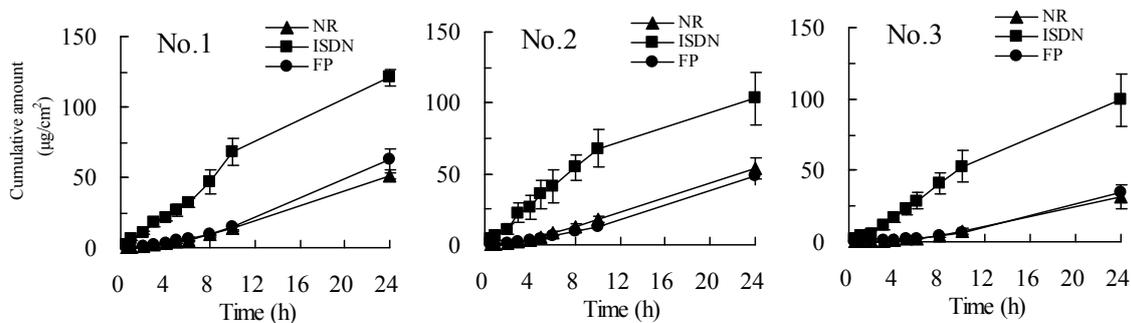


Fig. 16 Time course of the cumulative amount of NR, ISDN and FP through YMP skin (three YMP skin sets: No.1, No.2 and No.3).

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

Table 10 CV% of permeation rates for NR, ISDN and FP through YMP skin (Intra-individual variation)

| No. | Drug | Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | CV% |
|-----|------|---|------|
| 1 | NR | 1.69 \pm 0.25 | 14.5 |
| | ISDN | 6.44 \pm 1.34 | 20.8 |
| | FP | 1.42 \pm 0.11 | 7.9 |
| 2 | NR | 2.28 \pm 0.39 | 17.2 |
| | ISDN | 6.90 \pm 0.75 | 10.9 |
| | FP | 1.41 \pm 0.16 | 11.3 |
| 3 | NR | 0.86 \pm 0.14 | 16.4 |
| | ISDN | 6.03 \pm 1.08 | 17.9 |
| | FP | 0.71 \pm 0.10 | 13.5 |

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3 for YMP dorsal skin sample).

YMP skin sample: three skin samples of each R-3 dorsal skin sheet in three YMP skin sets. Permeation rates of NR, ISDN and FP were calculated from 4 to 8 h.

2. YMP 皮膚透過性における個体間変動

モデル3薬物における *in vitro* YMP 皮膚透過性の個体間変動は YMP 3 セットの各 YMP 背部皮膚シート (R-3) 間の皮膚透過速度の CV%により評価した。*In vitro* 透過試験は縦型拡散セルを用いて実施した。YMP 皮膚を介したモデル3薬物の透過速度およびその CV%を Table 11 に示す。YMP 皮膚透過試験において ISDN の透過速度は NR および FP より高かった。モデル3薬物の透過速度の CV% は、NR で最大 44.4%であり、ISDN の CV%は NR および FP の CV%より小さかった。

次に、モデル3薬物における YMP 皮膚透過性における個体内変動と個体間変動を比較した。モデル3薬物の個体内変動の CV%は最大 21.0%であったが、個体間変動の CV%は最大 44.4%であった。NR および FP における YMP 皮膚透過性における個体内変動は個体間変動より小さかったが、ISDN の個体内変動は個体間変動より大きかった。

**Table 11 Permeation rates of NR, ISDN and FP through YMP skin
(Inter-individual variation)**

| Drug | Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | CV% |
|------|---|------|
| NR | 1.61 \pm 0.72 | 44.4 |
| ISDN | 6.46 \pm 0.44 | 6.7 |
| FP | 1.18 \pm 0.41 | 34.7 |

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3 for YMP skin).

YMP skin: each R-3 dorsal skin sheet in three YMP skin sets.

Permeation rates of NR, ISDN and FP were calculated from 4 to 8 h.

第3節 考察

近年、外用剤の開発において、家畜ブタ、ゲッチンゲンミニブタおよび YMP 皮膚を用いた薬物の *in vitro* 透過試験が多く実施されている^{3, 11, 30-37})。著者は、これらのブタの中から入手が容易な YMP 皮膚を選択した。また、第1編の結果より透過試験に使用した YMP 皮膚の部位はダーマトーム処理が容易である YMP 背部皮膚を *in vitro* 透過試験に使用した。さらに、皮膚は角層より下層の影響が最も少ない 0.4 mm の厚さに調整した。

0.4 mm に皮膚厚を調整した YMP 背部皮膚を介したモデル3薬物の *in vitro* 透過試験を実施し、モデル3薬物における *in vitro* YMP 皮膚透過性の個体内変動と個体間変動を比較した。ISDN の皮膚透過性の個体内変動は最大 21.0%であったが、個体間変動は 6.7%であった。NR および FP の皮膚透過性の個体内変動は個体間変動より小さかったが、ISDN の皮膚透過性の個体内変動がその個体間変動より大きかった。第1および2章で報告したヒトまたは SD ラット皮膚を介した ISDN の皮膚透過性の個体間変動はそれぞれ 22.0%または 13.0%であった。我々は ISDN の YMP 皮膚透過性の個体間変動は 10%~20%と予測した。しかしながら、本章ではその CV%が 6.7%と小さかった。この ISDN の YMP 皮膚透過性における個体間変動が特に低かった理由は現時点で不明である。YMP 皮膚を介したモデル3薬物の個体間における透過速度の CV%は ISDN < FP < NR の順であった。この結果は、第1および2章で報告したヒトおよび SD ラット皮膚の個体間における透過速度の CV%と同様であった。

YMP またはヒト皮膚を介したモデル3薬物の皮膚透過速度の CV%を Table 15 にまとめて示す。モデル3薬物における *in vitro* YMP 皮膚透過性の個体内変動は最大 20.8%、ヒト皮膚の個体内変動は最大 55.5%となり、YMP 皮膚の個体内変

動はヒト皮膚透過性の個体内変動より小さかった。また、モデル3薬物における YMP 皮膚の個体間変動は最大 44.4%、ヒト皮膚の個体間変動は最大 65.0% であり、YMP 皮膚の個体間変動はヒト皮膚個体間変動より小さかった。

YMP 皮膚を介した NR、ISDN または FP の透過速度とヒト皮膚を介した NR、ISDN または FP の透過速度の相関を Fig. 17 に示す。YMP 皮膚を介した NR、ISDN および FP の透過速度はそれぞれ 1.61 ± 0.72 、 6.46 ± 0.44 および 1.18 ± 0.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ であり、ヒト皮膚を介した NR、ISDN および FP の透過速度はそれぞれ 3.40 ± 2.21 、 9.45 ± 2.08 および 2.16 ± 0.72 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ であった。すなわち、ヒト皮膚を介した NR、ISDN および FP の透過速度に対する YMP 皮膚を介した NR、ISDN および FP の透過速度は、それぞれ 0.47、0.68 および 0.55 倍であった。モデル3薬物における YMP 皮膚の透過速度とヒト皮膚の透過速度の絶対値は異なっていたが、それぞれの薬物において良く相関していた ($r=0.997$; Fig 17)。

各種動物の角層の性質に違いなどに関しては種々の研究が行われている。例えば、Netzlaff ら⁷⁷⁾は皮膚バリア能の種差の主要な要素は皮膚中遊離脂肪酸量およびトリグリセライド量ならびに毛包密度であると報告している。Sato ら⁹⁾は皮膚表面の脂質量が NR の皮膚透過性と良く相関していると報告している。また、Wertz ら⁷⁸⁾は種により角層の脂質の構成が異なっていると報告している。これらの違いは薬物の皮膚透過性における種差に関する重要なポイントであると考えられる。本研究では、YMP 皮膚を介したモデル3薬物の透過速度はヒト皮膚透過速度の約 0.5 倍であり、各薬物において良く相関していた。本章で用いた YMP 背部皮膚の角層厚は 20.3 ± 2.1 μm 、本編・第1章のヒト腹部皮膚の角層厚は 14.1 ± 3.4 μm であった。このことからモデル3薬物における YMP 背部皮膚とヒト腹部皮膚との透過速度の違いは、角層厚の差によってある程度説明可能と考えられた。

以上より、YMP 皮膚は、ヒト皮膚より薬物または製剤間の僅かな皮膚透過性の差を評価でき、薬物のヒト皮膚透過性を予測できる有用な実験動物皮膚であることが明らかとなった。

Table 12 CV% of Permeation Rates for NR, ISDN and FP through YMP and Human Skin (Inter- and intra-individual Variation)

| Species | Drug | CV% | |
|---------|------|----------------------------|----------------------------|
| | | Inter-individual variation | Intra-individual variation |
| YMP | NR | 44.4 | 14.5 - 17.2 |
| | ISDN | 6.7 | 10.9 - 20.8 |
| | FP | 34.7 | 7.9 - 13.5 |
| Human | NR | 65.0 | 5.3 - 55.5 |
| | ISDN | 22.0 | 7.4 - 28.5 |
| | FP | 33.2 | 16.8 - 40.4 |

The CV% of inter-individual variation represent the mean (n=3 for YMP skin, n=6 for three male skins plus three female skins). The CV% of intra-individual variation represent range of mean vale (n=3 for YMP skins, n=6 for three male skins plus three female skins).

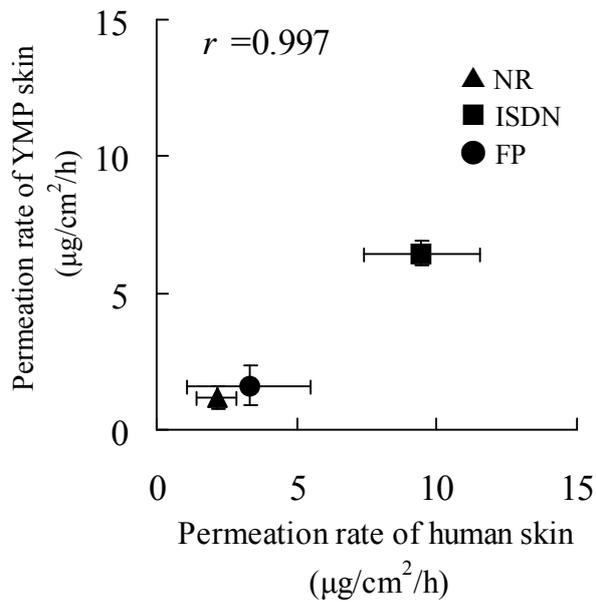


Fig. 17 Relationship between the permeation rates of NR, ISDN or FP through YMP and human skin.

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3 for YMP skin and n=6 for human skins).

第4節 小括

本章では、モデル3薬物における *in vitro* YMP 皮膚透過性の個体内および個体間変動と *in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内および個体間変動を比較した。さらに、*in vitro* YMP 皮膚透過性からヒト皮膚透過性の予測性について検討した。

モデル3薬物（NR、ISDN および FP）における *in vitro* YMP 皮膚透過性の個体内（最大 20.8%）および個体間変動（最大 44.4%）は、*in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内（最大 55.5%）および個体間変動（最大 65.0%）より小さかった。YMP 皮膚を介したモデル3薬物の透過速度は、ヒト皮膚の透過速度の約 0.5 倍であり、各薬物において良い相関が示された。モデル3薬物における YMP 皮膚とヒト皮膚との透過速度の絶対値の違いは、角層厚の差である程度説明可能と考えられた。

以上より、YMP 皮膚は、ヒト皮膚透過性を予測できるヒト皮膚の代替として有用な実験動物皮膚であることが明らかとなった。

第3編 YMP 皮膚を介した *in vitro* 透過性からニコチンテープまたはリドカインテープをヒトに適用した後の血中濃度の予測⁷⁹⁾

TTS は、薬物の肝臓での初回通過効果が回避できること⁸⁰⁾、内服困難な患者への投与（適用）が可能であること、投与が簡便であること、必要に応じ投与の中断が可能であること、消化器系の副作用発現が軽減されることなどの理由から、静脈内あるいは経口投与製剤に代わるものとして注目されている。1980年頃から現在までに、スコポラミン、ニトログリセリン、硝酸イソソルビト、クロニジン、ニコチン、エストラジオール、フェンタニル、テストステロン、ツロブテロール、オキシブチニンおよびリバスチグミンなどを含有した TTS が開発されている^{81, 82)}。

これら TTS の製剤設計では、*in vivo* ヒト経皮吸収試験に先立って *in vitro* 皮膚透過試験が実施されている。*In vivo* ヒト経皮吸収性の予測には *in vitro* ヒト皮膚透過試験が最良の方法であると考えられているが、日本国内におけるヒト皮膚の入手は倫理的問題から困難であり、入手できても十分な量とはならない。そのため、マウス、ラット、モルモットおよびブタ等の実験動物の皮膚がヒト皮膚の代替皮膚として使用されている^{3, 5, 6, 9, 22-25)}。もし、TTS をこれらの実験動物皮膚に適用した *in vitro* 皮膚透過パラメータから TTS をヒトに適用した後の血中（血漿または血清）濃度推移が予測できれば、TTS の開発効率は飛躍的に向上すると考えられる。しかしながら、動物皮膚を用いた *in vitro* 透過パラメータから TTS をヒトに適用した後の血中濃度推移を十分に予測できた報告はほとんどない。

著者は、第1編において *in vivo* 条件を反映した *in vitro* YMP 皮膚透過試験を

実施するためには、YMP 皮膚の角層より下層を出来るだけ薄くスプリットした皮膚厚約 0.4 mm の split YMP 皮膚を用いて *in vitro* 透過試験を実施することが良いことを明らかにした⁵⁸⁾。さらに、第 2 編・第 1 および 3 章において、YMP 背部皮膚とヒト腹部皮膚の透過性に関して NR、ISDN および FP を用いて *in vitro* 皮膚透過試験の検討を行い、モデル 3 薬物においてヒト皮膚の透過速度に対する YMP 皮膚の透過速度は約 0.5 倍となり、各薬物で良く相関することを明らかにした⁷⁶⁾。

そこで本編では、皮膚厚 0.4 mm の YMP 背部皮膚を用いた *in vitro* 透過パラメータから TTS をヒトに適用した後の血中濃度推移が良好に予測できるかを評価した。その際、YMP 皮膚の角層厚とヒト皮膚の角層厚の違いが TTS をヒトに適用した後の血中濃度の予測にどの程度影響するかを検討した。

なお、既に Nicotinell[®] TTS[®] 20 (ニコチンテープ) または Penles[®] Tape 18 mg (リドカインテープ) をヒトに適用した後の血漿中ニコチン濃度または血清中リドカイン濃度の報告があることから^{83,84)}、両テープ剤をモデル製剤として選定した。

第1節 理論

TTS 貼付後の薬物の血中濃度は、TTS 開発用体内動態シミュレーションソフト (SKIN-CAD[®]; 株式会社バイオコム・システムズ, 福岡)⁸⁵⁾を用い、薬物の皮膚中拡散モデルと体内動態モデルを組み合わせたモデルにより解析した。その原理と方法を Fig. 18 にまとめて示す。薬物の皮膚透過は、皮膚を角層 (SC) と生きた表皮および真皮層 (VED) からなるそれぞれ均一な 2 層膜と仮定し、Fick の拡散第 2 法則に基づく 2 層拡散/分配モデルにより解析した (Fig. 18a)。TTS を intact skin および stripped skin に適用後の薬物の累積皮膚透過量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) を時間に対してプロットして累積皮膚透過量-時間プロファイルを作成し、定常状態時の回帰直線の傾きから透過速度 (J)、また、その直線と x 軸の交点から Lag time を算出した。さらに、intact skin および stripped skin の透過速度および Lag time から角層中の拡散係数 (D_{sc})、生きた表皮および真皮層中拡散係数 (D_{ved})、角層/生きた表皮および真皮層分配係数 ($K_{sc/ved}$) および角層表面薬物濃度 (C_s) を算出した⁸⁵⁻⁸⁷⁾。

一方、薬物の体内からの消失は、ヒトに静脈内投与後の血中濃度プロファイルとその薬物の体内消失過程に合った 1-コンパートメントモデルまたは 2-コンパートメントモデルにより解析した速度定数 (k_{el} , k_{12} , k_{21}) および分布容積 (V_d , V_1 , V_2) を使用した (Fig. 18b)。Fig. 18a, b のパラメータを SKIN-CAD[®] に入力して TTS をヒトに適用した後の血中濃度を予測した (Fig. 18c)⁸⁵⁾。なお、*in vitro* 皮膚透過試験において透過速度の低下が認められた場合は、透過速度の低下を予測に反映させるために透過速度比 (低下が観察されたの任意の透過速度/定常状態時の透過速度) を使用して補正した。

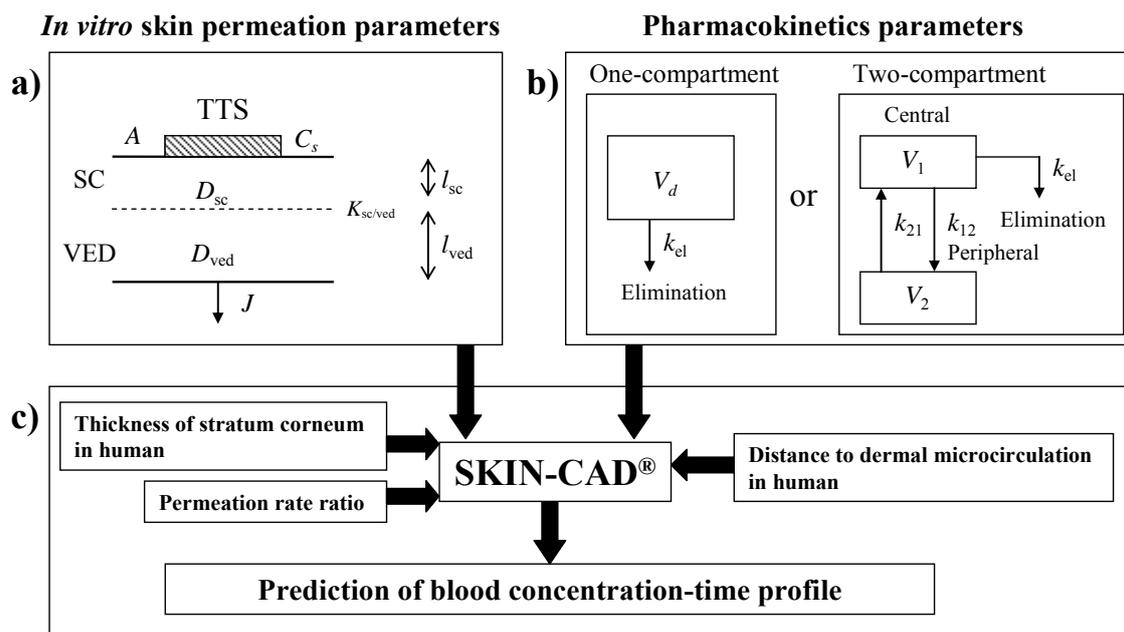


Fig. 18 Prediction of blood concentration after topical application of TTS using SKIN-CAD[®].

SC: stratum corneum.

VED: viable epidermis and dermis.

A: area of TTS.

C_s : skin surface concentration.

D_{sc} and D_{ved} : diffusion coefficient.

$K_{sc/ved}$: partition coefficient in stratum corneum/viable epidermis and dermis.

l_{sc} and l_{ved} : thickness of stratum corneum and viable epidermis and dermis.

J : skin permeation rate.

V_d : distribution volume.

V_1 and V_2 : distribution volumes in the compartments.

k_{el} : elimination rate constant.

k_{12} and k_{21} : transfer rate constants between the compartments.

Permeation rate ratio: ratio of arbitrary permeation rate/steady-state permeation rate.

第 2 節 実験方法

1. 実験材料

Nicotinell[®] TTS[®] 20 (ニコチン含量: 35 mg/20 cm²) および Penles[®] Tape 18mg (リドカイン含量: 18 mg/15.25 cm²) はノバルティスファーマ株式会社 (東京) およびマルホ株式会社 (大阪) より購入した。ニコチンおよびリドカインは Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, U.S.A) から購入した。その他の試薬類はすべて試薬特級品を購入して使用した。

2. YMP 皮膚の調製

凍結 YMP 皮膚セット (雌性, 5 ヶ月) は日本チャールス・リバー株式会社より購入し、使用するまで -80°C で保存した。透過実験に使用した YMP 皮膚の調製はすべて第 1 編の実験の部に準じて行い、YMP 背部皮膚シートを *in vitro* 透過試験に使用した。冷凍保存していた YMP 背部皮膚シート (10 cm × 10 cm) を 32°C に設定した CO₂ インキュベータ (湿度: 80 ± 10%) 内で解凍した (15 分間)。次いで皮下脂肪を除去し、電動ダーマトームにより皮膚厚が約 0.4 mm になるように角層より下層をスピリットした。その YMP 背部皮膚シート 1 枚から約 2.5 cm × 3.0 cm サイズの YMP 皮膚サンプル (split YMP skin) 6 枚を調製した。各 split YMP skin の厚さは、ダイヤルシクネスゲージにより測定した。Split YMP skin は生理食塩液に湿らせたペーパータオル上に表皮側を上にして置き、気密容器に入れて 4°C で約 16 時間保存した。また、透過試験開始前に split YMP skin の角層を 30 回のテープストリッピングにより剥離し、角質剥離 YMP 皮膚サンプル (stripped/split YMP skin) を作製した。

Split YMP skin の角層の厚さは、第 1 編の実験の部に準じてホルマリン固定後、

パラフィン包埋して作製した皮膚組織切片を H&E 染色して測定した。

3. *In vitro* 皮膚透過試験

縦型拡散セル（拡散面積: 1.77 cm²）^{58,63} のレシーバーチャンバーに split または stripped/split YMP skin の表皮側を上にして装着し、レシーバーチャンバー内に 32°C に加温した pH7.4、0.1 mol/L リン酸緩衝液 8.6 mL を添加した。次に、直径 1.4 cm（貼付面積: 1.54 cm²）に切り取ったニコチンテープまたはリドカインテープをそれぞれの YMP skin の表皮側に適用した。適用後、拡散セルは直ちに 32°C に設定した CO₂ インキュベータ（湿度: 80 ± 10%）に入れ、レシーバー相をマグネチックスターラーで攪拌した。Split YMP skin を用いた場合は適用後 1、2、3、4、6、8、10、12 および 24 時間、stripped/split YMP skin を用いた場合は適用後 0.17、0.33、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8 および 10 時間に 1 mL のレシーバー溶液を採取し、同時に同容量の 32 °C に保温した pH7.4、0.1 mol/L リン酸緩衝液を補充した。採取した試料は測定まで -80°C で保存した。

4. ニコチンおよびリドカインの濃度測定法

経時的に採取したレシーバー溶液 50 μL に内標準物質〔（ニコチン分析用としてアテノロール（0.25 μg/mL）、リドカイン分析用としてプロプラノール（0.25 μg/mL）〕を含んだアセトニトリル/メタノール混液（9/1, v/v）200 μL を加え、混合し、遠心分離（4°C, 3,600×g, 10 分間）した。その上清 0.5 μL を液体クロマトグラフータンデム型質量分析計（LC-MS/MS）の測定試料とした。

LC-MS/MS は LC-20AD HPLC システム（島津製作所, 京都）と API4000（AB Sciex, Foster City, CA, U.S.A.）を用いた。

ニコチンの分析条件は、分析カラムとして Atrantis T3（3 μm, 4.6 × 50 mm; 日

本ウォータズ株式会社，東京) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相として 0.1% ギ酸水溶液 (A) とアセトニトリル (B) を使用し、以下のグラジエント条件で溶離した。0–3.00 分: 移動相 B (2% → 98%, linear gradient)、3.01–3.50 分: 移動相 B (98%)、3.51–4.00 分: 移動相 B (2%)、流速は 1.0 mL/min とした。イオン化法は ESI 法で行い、ポジティブイオンモードで検出した。ニコチンのモニタリングイオンは m/z 163 → m/z 130、アテノロールのモニタリングイオンは m/z 267 → m/z 190 とした。ニコチン濃度測定の検量線範囲は 0.01~10 $\mu\text{g/mL}$ であった。

リドカインの分析条件は、分析カラムとして Shim-pack XR-ODS (2.2 μm , 3 × 30 mm; 島津製作所) を用い、カラム温度は 50°C とした。0.1% ギ酸水溶液 (A) とアセトニトリル (B) を使用し、以下のグラジエント条件で溶離した。0–1.00 分: 移動相 B (2% → 80%, linear gradient)、1.01–1.30 分: 移動相 B (98%)、1.31–1.70 分: 移動相 B (2%)、流速は 1.3 mL/min とした。イオン化法は ESI 法で行い、ポジティブイオンモードで検出した。リドカインのモニタリングイオンは m/z 235 → m/z 86、プロプラノロールのモニタリングイオンは m/z 260 → m/z 116 とした。リドカイン濃度測定の検量線範囲は 0.01~10 $\mu\text{g/mL}$ であった。

5. *In vitro* 皮膚透過パラメータの解析

ニコチンテープを split および stripped/split YMP skin に適用した際のニコチンの透過速度 ($\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$) は、累積皮膚透過量–時間プロファイルのそれぞれ 4~8 時間および 0.17~0.5 時間の傾きから算出し、その直線と x 軸の交点を Lag time (h) とした。

リドカインテープを split および stripped/split YMP skin に適用した際のリドカインの透過速度 ($\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$) は、累積皮膚透過量–時間プロファイルのそれぞれ

6~10 時間および 0.75~2 時間の傾きから算出し、その直線と x 軸の交点を Lag time (h) とした。

また、SKIN-CAD[®] (ver. 6)に *in vitro* split および stripped/split YMP skin 透過試験より得られたニコチンまたはリドカインの透過速度および Lag time を入力し、ニコチンおよびリドカインの D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s を算出した。その際、YMP の皮膚厚 (実測値) は 0.42 mm (ニコチンテープ) および 0.43 mm (リドカインテープ)、YMP の角層厚 (実測値) は 18.3 μm (ニコチンテープ) および 20.0 μm (リドカインテープ) を使用した。

6. ヒト血中濃度の予測 (ニコチンテープ)

理論で示した方法論により、Urae ら⁸³⁾ が報告したニコチンテープをヒトに 24 時間適用した後 36 時間までの血漿中ニコチン濃度推移を予測した。さらに、ニコチンの薬物動態パラメータ (C_{max} 、 t_{max} および AUC_{0-36h}) の予測値を算出し、Urae ら⁸³⁾ が報告したヒト薬物動態パラメータ (実測値) と比較した。

SKIN-CAD[®] に入力したパラメータは、本試験で得られた *in vitro* 皮膚透過パラメータ (D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s)、Benowitz ら⁸⁸⁾ が報告したニコチンをヒトに静脈内投与した後の薬物動態パラメータ (Table 13)、Schafer ら⁵⁰⁾ および Bronaugh ら⁵¹⁾ が報告したヒト皮膚表面から毛細血管までの距離 (0.20 mm)、ヒトに適用した TTS の面積 (20 cm^2) およびヒト角層厚に YMP の角層厚の実測値 18.3 μm を入力した。なお、Jane ら⁹⁰⁾ の報告より、Urae ら⁸³⁾ が実施したヒト薬物動態試験時のニコチンテープの貼付部位 (ヒト上腕部) の角層厚は、18.3 μm と推測しており、予測に使用した YMP 皮膚の角層厚 18.3 μm と同じであった。

Table 13 Pharmacokinetic parameters of nicotine after intravenous infusion in human ^{a)}

| Drugs | Parameters | |
|----------|-----------------------|------|
| Nicotine | V_1 (L) | 58.0 |
| | V_2 (L) | 138 |
| | k_{el} (h^{-1}) | 1.18 |
| | k_{12} (h^{-1}) | 2.96 |
| | k_{21} (h^{-1}) | 1.29 |

V_1 and V_2 : distribution volumes in the compartments.

k_{el} : elimination rate constant.

k_{12} and k_{21} : transfer rate constants between the compartments.

^{a)}: Data from Benowitz *et al.* ⁸⁸⁾

7. ヒト血中濃度の予測（リドカインテープ）

理論で示した方法論により、Yokota ら⁸⁴⁾が報告したヒトにリドカインテープを4時間適用した後24時間までの血清中リドカイン濃度推移を予測した。さらに、リドカインの薬物動態パラメータ (C_{\max} 、 t_{\max} および AUC_{0-24h}) の予測値を算出し、Yokota ら⁸⁴⁾が報告したヒト薬物動態パラメータ（実測値）と比較した。

SKIN-CAD[®] に入力した固定パラメータとして、本試験で得られた *in vitro* 皮膚透過パラメータ (D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s)、Olkola ら⁸⁹⁾が報告したリドカインの静脈内投与後の薬物動態パラメータ (Table 14)、Schafer ら⁵⁰⁾および Bronaugh ら⁵¹⁾ が報告したヒト皮膚表面から毛細血管までの距離 (0.20 mm) およびヒトに適用したテープ剤の面積 (30 cm²) を使用した。

また、ヒトの角層厚を変動パラメータとし、YMP の角層厚の実測値 20.0 μm (predict-1)、または Agache ら⁹¹⁾ の報告より Yokota ら⁸⁴⁾が実施したヒト薬物動態試験時にリドカインテープを適用した部位（ヒト上肢内側）の角層厚を 14.0 μm (predict-2) と推測し、入力した。

Table 14 Pharmacokinetic parameters of lidocaine after intravenous infusion in human ^{a)}

| Drugs | Parameters |
|-----------|-----------------------------|
| Lidocaine | V_d (L) 142 |
| | k_{el} (h^{-1}) 0.267 |

V_d : distribution volume.

k_{el} : elimination rate constant.

^{a)}: Data from Olkkol *et al.* ⁸⁹⁾

第3節 結果

1. *In vitro* YMP 皮膚透過試験 (ニコチンテープ)

Split または stripped/split YMP skin を介したニコチンの累積皮膚透過量-時間曲線を Fig. 19 に、透過速度および Lag time を Table 15 に示す。Split YMP skin を介したニコチンの透過率 (0-24 h) は $87.7 \pm 16.8 \%$ 、stripped/split YMP skin を介した透過率 (0-10 h) は $109.0 \pm 7.8 \%$ であった。Split YMP skin 透過試験から得られた透過速度 (4-8 h) および Lag time は、 $82.9 \pm 16.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ および $1.54 \pm 0.16 \text{ h}$ であった。Stripped/split YMP skin 透過試験から得られた透過速度 (0.17-0.5 h) および Lag time は $619 \pm 23.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ および $0.10 \pm 0.02 \text{ h}$ となり、split YMP skin の透過速度および Lag time に対する stripped/split YMP skin の透過速度および Lag time は 7.5 および 0.06 倍であった。

また、SKIN-CAD[®]により算出した D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s を Table 16 に示す。ニコチンの D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s は、 $1.55 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、 $7.47 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、 3.39×10 および $3.14 \times 10^5 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。なお、ニコチンテープを適用した後 8~24 時間の透過速度 (8-24 h) は $62.9 \pm 7.99 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ となり、透過速度 (4-8 h) より低下したことから、ニコチンテープをヒトに適用した後 8~24 時間の血中濃度予測には透過速度 (4-8 h) に対する透過速度 (8-24 h) の比 0.76 を使用した。

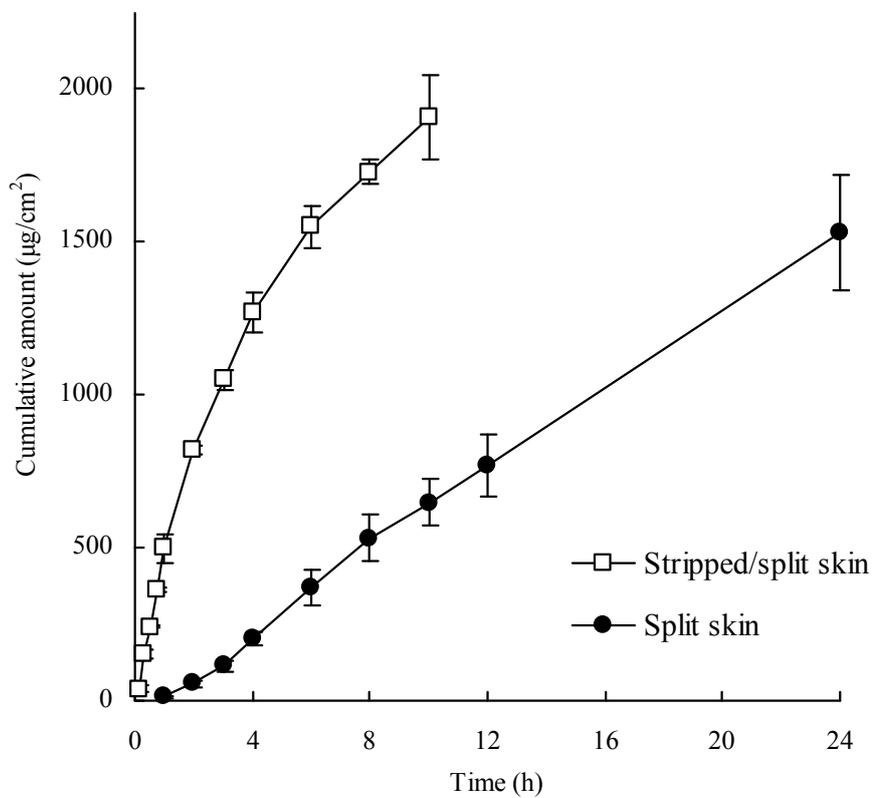


Fig. 19 Time course for cumulative amount of nicotine through split or stripped/split YMP skin after topical application of nicotine tape.

Table 15 Permeation rate and lag time of nicotine through split or stripped/split YMP skin after topical application of nicotine tape

| Drugs | Parameters | Split skin | Stripped/split skin |
|----------|--|-------------------------------|------------------------------|
| Nicotine | Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | 82.9 ± 16.8 ¹⁾ | 619 ± 23.6 ²⁾ |
| | Lag time (h) | 1.54 ± 0.16 | 0.10 ± 0.02 |

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

Permeation rate was calculated from time ranges as follows:

¹⁾: 4 to 8 h

²⁾: 0.17 to 0.5 h.

Table 16 Permeation parameters of nicotine through split YMP skin after topical application of nicotine tape

| Drugs | Parameters | | |
|----------|--------------|-----------------------------|------------------------|
| Nicotine | D_{sc} | (cm^2/s) | 1.55×10^{-10} |
| | D_{ved} | (cm^2/s) | 7.47×10^{-7} |
| | $K_{sc/ved}$ | (-) | 3.39×10 |
| | C_s | ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 3.14×10^5 |

Permeation parameters were calculated by SKIN-CAD[®].

D_{sc} : diffusion coefficient in stratum corneum.

D_{ved} : diffusion coefficient in viable epidermis and dermis.

$K_{sc/ved}$: partition coefficient in stratum corneum/viable epidermis and dermis.

C_s : skin surface concentration.

Thickness skin: 0.42 mm.

Thickness of stratum corneum: 18.3 μm .

2. *In vitro* YMP 皮膚透過試験 (リドカインテープ)

Split または stripped/split YMP skin を介したリドカインの累積皮膚透過量-時間曲線を Fig. 20 に、透過速度および Lag time を Table 17 に示す。Split YMP skin を介したリドカインの透過率 (0-24 h) は $26.9 \pm 3.9\%$ 、stripped/split YMP skin を介した透過率 (0-10 h) は $87.3 \pm 7.7\%$ であった。Split YMP 皮膚透過試験から得られた透過速度 (6-10 h) および Lag time は、 $12.8 \pm 2.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ および $2.92 \pm 1.51 \text{ h}$ であった。Stripped/split 皮膚透過試験から得られた透過速度 (0.75-2 h) および Lag time は $316 \pm 106 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ および $0.09 \pm 0.06 \text{ h}$ となり、stripped/split skin の透過速度および Lag time は split skin の 24.7 および 0.03 倍であった。

また、SKIN-CAD[®]により算出した D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s を Table 18 に示す。リドカインの D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s は、 $7.54 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、 $8.55 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、 2.34×10 および $9.83 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

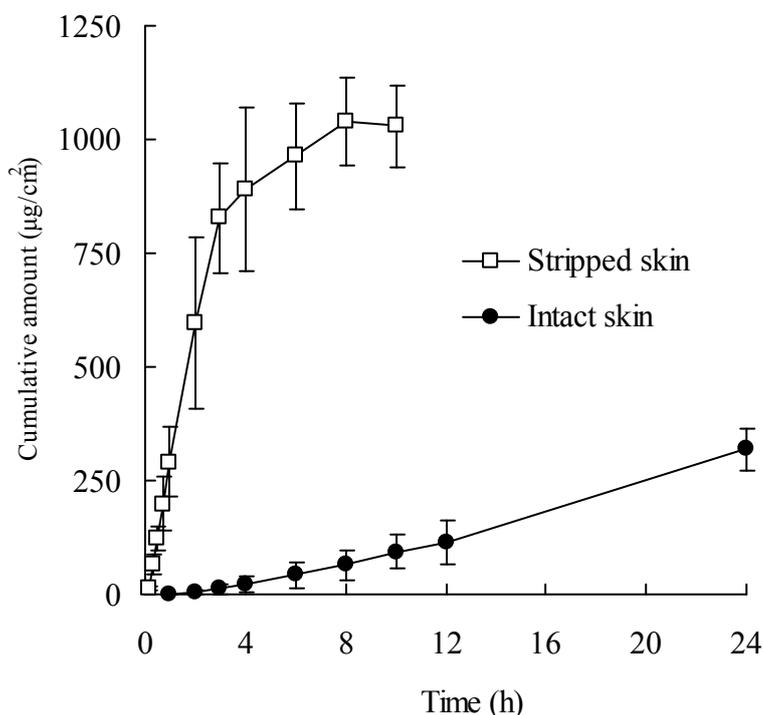


Fig. 20 Time course for cumulative amount of lidocaine through split or stripped/split YMP skin after topical application of lidocaine tape. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

Table 17 Permeation rate and lag time of lidocaine through split or stripped/split YMP skin after topical application of lidocaine tape

| Drugs | Parameters | Split skin | Stripped/split skin |
|-----------|--|-------------------------------|-----------------------------|
| Lidocaine | Permeation rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) | 12.8 ± 2.08 ¹⁾ | 316 ± 106 ²⁾ |
| | Lag time (h) | 2.92 ± 1.51 | 0.09 ± 0.06 |

Each value represents the mean \pm S.D. (n=3)

Permeation rate was calculated from time ranges as follows:

¹⁾: 6 to 10 h

²⁾: 0.75 to 2 h.

Table 18 Permeation parameters of lidocaine through split YMP skin after topical application of lidocaine tape

| Drugs | Parameters | | |
|-----------|--------------|----------------------|------------------------|
| Lidocaine | D_{sc} | (cm ² /s) | 7.54×10^{-11} |
| | D_{ved} | (cm ² /s) | 8.55×10^{-7} |
| | $K_{sc/ved}$ | (-) | 2.34×10 |
| | C_s | (µg/mL) | 9.83×10^4 |

Permeation parameters were calculated by SKIN-CAD[®].

D_{sc} : diffusion coefficient in stratum corneum.

D_{ved} : diffusion coefficient in viable epidermis and dermis.

$K_{sc/ved}$: partition coefficient in stratum corneum/viable epidermis and dermis.

C_s : skin surface concentration.

Thickness skin: 0.43 mm.

Thickness of stratum corneum: 20.0 µm.

3. ヒト血中濃度の予測 (ニコチンテープ)

SKIN-CAD[®]に入力したパラメータを Table 19 に、ニコチンテープ (35 mg、1 枚) をヒトに 24 時間適用した後の血漿中ニコチン濃度の予測値を Fig. 21 に示す。また、予測値から算出した薬物動態パラメータ (C_{\max} 、 t_{\max} および AUC_{0-36h}) を Table 20 に示す。

YMP の角層厚の実測値 18.3 μm をヒト角層厚として予測した血漿中ニコチン濃度は、実測値 (文献値)⁸³⁾ の血漿中ニコチン濃度と同様の推移を示し、予測された C_{\max} 、 t_{\max} および AUC_{0-36h} はそれぞれ 23.4 ng/mL、9.0 h および 561 ng \cdot h/mL となり、実測値の 0.9~1.2 倍であった。

Table 19 Input parameters for prediction of pharmacokinetic profiles of nicotine tape in human

| Drug | Input parameters | | Predict-1 |
|----------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| | | | |
| Nicotine | A | (cm ²) | 20 |
| | l_{sc} | (cm) | 1.83×10^{-3} |
| | l_w | (cm) | 2.00×10^{-2} |
| | D_{sc} | (cm ² /s) | 1.55×10^{-10} |
| | D_{ved} | (cm ² /s) | 7.47×10^{-7} |
| | $K_{sc/ved}$ | (-) | 3.39×10 |
| | C_s | (µg/mL) | 3.14×10^5 |
| | V_1 | (mL) | 5.80×10^4 |
| | V_2 | (mL) | 1.35×10^5 |
| | k_{el} | (s ⁻¹) | 3.28×10^{-4} |
| | k_{12} | (s ⁻¹) | 8.22×10^{-4} |
| | k_{21} | (s ⁻¹) | 3.58×10^{-4} |
| | Permeation rate ratio | 0.76 | |

A: area of TTS.

l_{sc} : thickness of stratum corneum.

l_w : distance to dermal microcirculation.

D_{sc} and D_{ved} : diffusion coefficient in stratum corneum and viable epidermis and dermis.

$K_{sc/ved}$: partition coefficient in stratum corneum/viable epidermis and dermis.

C_s : skin surface concentration.

V_1 and V_2 : distribution volumes in the compartments.

k_{el} : elimination rate constant.

k_{12} and k_{21} : transfer rate constants between the compartments.

Permeation rate ratio: permeation rate (8-24 h)/permeation rate (4-8 h).

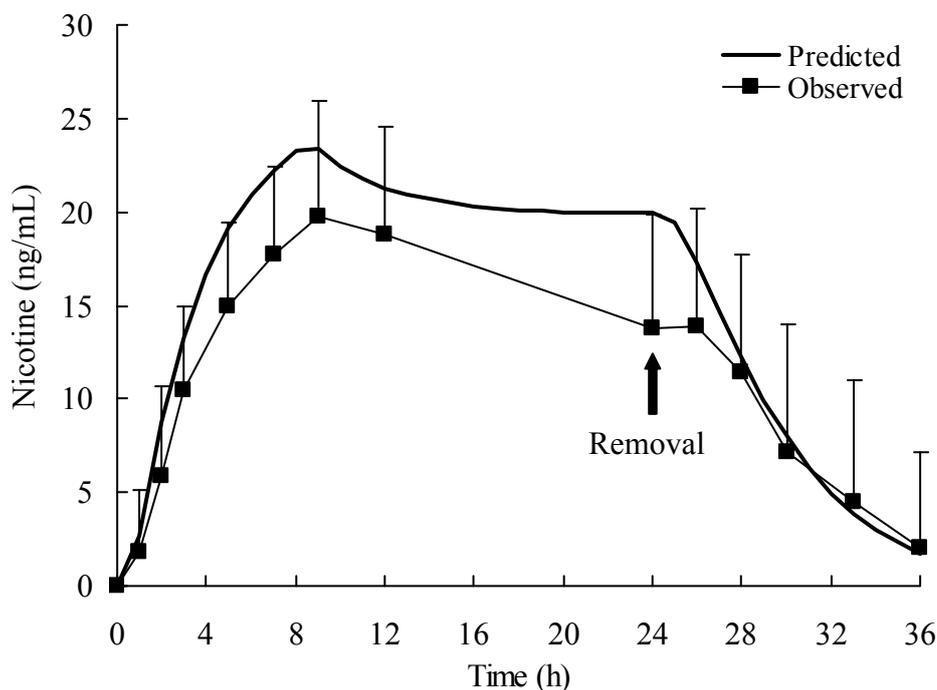


Fig. 21 Predicted and observed ^{a)} plasma concentrations of nicotine after topical application of nicotine tape.

Each observed value represents the mean + S.D. (n=12)

Stratum corneum thickness: 18.3 μ m (predict-1)

^{a)}: Data from Urae *et al.* ⁸³⁾

Table 20 Predicted pharmacokinetic parameters of nicotine after topical application of nicotine tape in human ^{a)}

| Drugs | Data | Stratum corneum thickness (μ m) | Pharmacokinetic parameters | | | | | |
|----------|-----------|--------------------------------------|----------------------------|---------|----------------|---------|-----------------------|---------|
| | | | C_{max} (ng/mL) | (ratio) | t_{max} (h) | (ratio) | AUC_{0-36h} (ng/mL) | (ratio) |
| Nicotine | Predicted | 18.3 | 23.4 | (1.1) | 9.0 | (0.9) | 561 | (1.2) |
| | Observed | | 20.7 \pm 16.0 | | 10.3 \pm 4.8 | | 460 \pm 171 | |

Ratio: predicted data/observed data

^{a)}: Data from Urae *et al.* ⁸³⁾ and each value represents the mean \pm S.D. (n=12).

4. ヒト血中濃度の予測（リドカインテープ）

SKIN-CAD[®]に入力したパラメータを Table 21 に、リドカインテープ（18 mg、2 枚）をヒトに 4 時間適用した後のヒト血清中リドカイン濃度の予測値を Fig. 22 に示す。また、予測値から算出した薬物動態パラメータ（ C_{\max} 、 t_{\max} および AUC_{0-24h} ）を Table 22 に示す。

YMP の角層厚の実測値 20.0 μm をヒト角層厚として予測した血清中リドカイン濃度（predict-1）は、実測値（文献値）⁸⁴⁾の血清中濃度と異なった推移を示した。また、ヒトの角層厚を 14.0 μm （ヒト上肢内側の角層厚の文献値）⁹¹⁾として予測したヒト血清中リドカイン濃度（predict-2）は、実測値（文献値）⁸⁴⁾の血清中濃度と同様の推移を示し、predict-2 の C_{\max} 、 t_{\max} および AUC_{0-24h} はそれぞれ 9.70 ng/mL、6.0 h および 90.1 ng·h/mL となり、実測値の 0.7~1.0 倍であった。

Table 21 Input parameters for prediction of pharmacokinetic profiles of lidocaine tape in human

| Drug | Input parameters | | | |
|-----------|------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| | | Predict-1 | Predict-2 | |
| Lidocaine | A | (cm^2) | 30 | → |
| | l_{sc} | (cm) | 2.00×10^{-3} | 1.40×10^{-3} |
| | l_w | (cm) | 2.00×10^{-2} | → |
| | D_{sc} | (cm^2/s) | 7.54×10^{-11} | → |
| | D_{ved} | (cm^2/s) | 8.55×10^{-7} | → |
| | $K_{sc/ved}$ | (-) | 2.34×10 | → |
| | C_s | ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 9.83×10^4 | → |
| | V_d | (mL) | 1.42×10^5 | → |
| | k_{el} | (s^{-1}) | 7.42×10^{-5} | → |

A : area of Tape.

l_{sc} : thickness of stratum corneum.

l_w : distance to dermal microcirculation.

D_{sc} and D_{ved} : diffusion coefficient in stratum corneum and viable epidermis and dermis.

$K_{sc/ved}$: partition coefficient in stratum corneum/viable epidermis and dermis.

C_s : skin surface concentration.

V_d : distribution volume.

k_{el} : elimination rate constant.

→: same value as the left column.

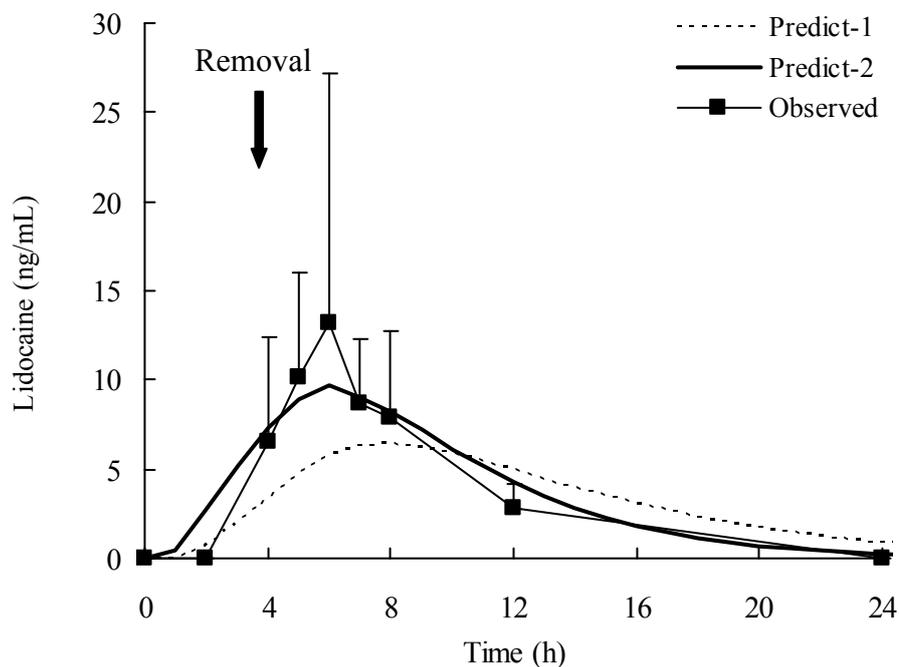


Fig. 22 Predicted and observed ^{a)} plasma concentrations of nicotine after topical application of lidocaine tape.

Each observed value ^{a)} represents the mean + S.D. (n=5).

Stratum corneum thickness: 20.0 μm (predict-1) or 14.0 μm (predict-2).

^{a)}: Data from Yokota *et al.* ⁸⁴⁾

Table 22 Predicted pharmacokinetic parameters of lidocaine after topical application of lidocaine tape in human ^{a)}

| Drugs | Data | Stratum corneum thickness (μm) | Pharmacokinetic parameters | | | | | |
|-----------|-----------|---|----------------------------|---------|----------------------|---------|------------------------------|---------|
| | | | C_{max} (ng/mL) | (ratio) | t_{max} (h) | (ratio) | $AUC_{0-24\text{h}}$ (ng/mL) | (ratio) |
| Lidocaine | Predict-1 | 18.3 | 7.1 | (0.5) | 7.0 | (1.1) | 82.6 | (0.9) |
| | Predict-2 | 14.0 | 9.7 | (0.7) | 6.0 | (1.0) | 90.1 | (1.0) |
| | Observed | | 14.9 \pm 14.9 | | 6.2 \pm 0.4 | | 90.5 \pm 53.8 | |

Ratio: predicted data/observed data.

^{a)}: Data from Yokota *et al.* ⁸⁴⁾ and each value represents the mean \pm S.D. (n=5).

第4節 考察

TTS をヒトに適用した後の血中濃度を予測するためには、ヒト皮膚を用いた *in vitro* 透過試験が最良の方法と考えられている。しかしながら、ヒト皮膚の入手は困難であり、使用量にも制限があることからヒト皮膚の代替皮膚として動物皮膚が広く使用されている。動物皮膚を用いた *in vitro* 透過パラメータから TTS をヒトに適用した後の血中濃度推移が予測できれば、TTS の開発期間は飛躍的に短縮されるが、現在までに *in vivo* ヒト経皮吸収性を予測した報告はほとんどなく、予測法の確立が期待されていた。

1988 年、Sato ら⁶⁵⁾ はニコランジルゲルを用いた *in vitro* ヘアレスラット皮膚透過パラメータからニコランジルゲルをヘアレスラットに適用した後の血漿中濃度推移の予測性について検討した。その結果、血漿中ニコランジル濃度の予測値と実測値 (*in vivo*) に差が認められ、十分な予測ではなかった。2001 年、Mori ら⁸⁵⁾ は薬物の皮膚透過モデルと体内動態モデルを組み合わせ、*in vitro* 皮膚透過パラメータから *in vivo* 血中濃度を予測する SKIN-CAD[®]を開発した。2002 年、Kawamata ら⁴⁹⁾はその SKIN-CAD[®]を用いて GTS-21 TTS の *in vitro* ヘアレスラット皮膚透過パラメータから GTS-21 TTS をヘアレスラットに適用した後の血漿中濃度予測性について検討し、血漿中 GTS-21 濃度の予測値は実測値 (*in vivo*) より低かったと報告している。著者は、Sato ら⁶⁵⁾および Kawamata ら⁴⁹⁾の予測性が十分でなかった理由は、*in vitro* 透過試験に用いたヘアレスラットの皮膚厚が *in vivo* 経皮吸収速度を予測するには最適でなかったためと考えている。2004 年の OECD ガイドライン⁴⁸⁾では、脂溶性薬物の皮膚透過性は皮膚厚の影響を受けるため、*in vitro* 透過試験に使用する皮膚厚は 1 mm 以下であることが望ましいと述べている。また、Bronaugh ら⁵¹⁾はヒト皮膚表面に適用した薬物は皮

膚表面から約 0.2 mm の毛細血管から吸収されると報告している。さらに数名の研究者は、脂溶性薬物の *in vitro* 皮膚透過速度と *in vivo* 経皮吸収性の比較において epidermis を介した薬物の *in vivo* 透過速度は過大評価、intact skin を介した薬物の *in vivo* 透過速度は過小評価になると報告している⁵²⁻⁵⁵)。本研究の第 1 編⁵⁸)において、薬物の *in vitro* 皮膚透過性における皮膚厚の影響を検討し、*in vivo* 条件を反映した *in vitro* 皮膚透過試験を実施するためには、角層より下層を可能な限り薄くスプリットした皮膚（皮膚厚：約 0.4 mm）を *in vitro* 透過試験に使用することが現時点において最良の方法であることを明らかにした。本編では *in vitro* split YMP 皮膚透過パラメータから *in vivo* ヒト血中濃度推移を予測することを試みた。

ニコチンテープにおいて、split YMP skin から算出した *in vitro* 透過パラメータ (D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{ved/sc}$ および C_s) とヒトの角層厚として YMP の角層厚 18.3 μm （実測値）を用いて予測したニコチンテープをヒトに適用した後の血漿中ニコチン濃度推移は、実測値（文献値）⁸³)とほぼ同様であった。このことから、YMP 皮膚を介した *in vitro* 透過パラメータ (D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s) は、ヒト皮膚を介した *in vitro* 透過パラメータとほぼ同じであると推測された。

一方、リドカインテープにおいて、split YMP skin から算出した *in vitro* 透過パラメータ (D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s) とヒトの角層として YMP の角層厚 20.0 μm （実測値）を用いて予測したリドカインテープをヒトに適用した後の血清中リドカイン濃度は、実測値（文献値）⁸⁴)の血清中リドカイン濃度と異なった（predict-1）。著者は、Yokota ら⁸⁴)が実施した臨床試験時の適用部位（ヒト上肢内側）のヒトの角層厚を 14.0 μm （文献値）⁹¹)と推測しており、本研究に使用した YMP の角層厚 20.0 μm と異なっていることから、角層厚 14.0 μm （文献値）⁹¹)を用いて血中濃度を予測した（predict-2）。予測した血清中リドカイン濃度推

移は実測値（文献値）⁸⁴⁾とほぼ同様であった。これらの結果より、リドカインテープにおいても、YMP 皮膚を介した *in vitro* 透過パラメータ (D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s) はヒト皮膚を介した *in vitro* 透過パラメータとほぼ同じであり、YMP 皮膚とヒト皮膚のバリア能の違いは、角層厚の差に起因し、角層厚の違いを考慮することで、YMP 皮膚での実験結果からヒト皮膚における血中濃度推移を正確に予測できる可能性が示唆された。

YMP 背部皮膚の角層厚は約 $20\ \mu\text{m}$ ^{22, 76)}と安定しているのに対して、ヒト皮膚の角層厚は $8\sim 20\ \mu\text{m}$ ^{90, 91)}と部位で異なることが報告されている。ニコチンテープを医薬品添付文書に記載されている使用部位以外の皮膚に貼付した場合および適用部位の角層が損傷により薄くなっていた場合を想定し、ヒトの角層厚が変動した場合の血漿中濃度推移の変化を検証した (Fig. 23)。角層厚が異なる場合、血漿中ニコチン濃度は、それぞれの実測血中濃度（文献値）⁸³⁾に対し大きく変動し (Fig. 23)、ニコチンテープをヒトに適用した後の血中濃度推移は、適用する皮膚の角層厚により大きな影響を受ける可能性が示唆された。

以上のことから、TTS を split (0.4 mm) YMP skin に適用して得た *in vitro* 透過パラメータ (D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s) と TTS を適用するヒト皮膚の角層厚を用いることで TTS をヒトに適用した後の血中濃度を予測できると考えられた。YMP 皮膚はヒト皮膚の代替皮膚として有用であることが示された。

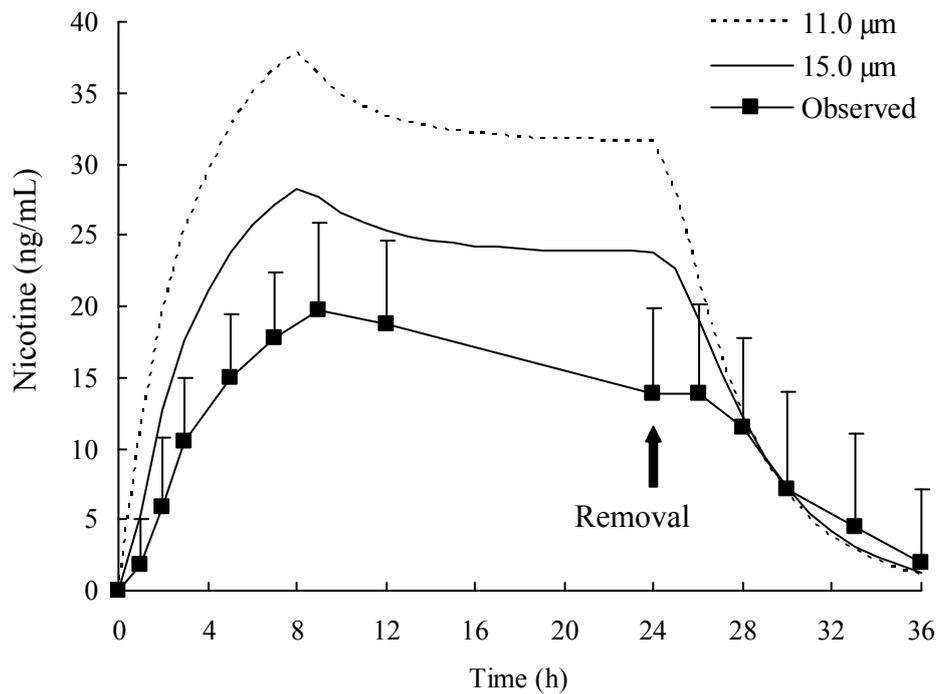


Fig. 23 Predicted and observed^{a)} plasma concentrations of nicotine after topical application of nicotine tape.

Each observed value represents the mean + S.D. (n=12).

Stratum corneum thickness: 15.0 μm and 11.0 μm.

^{a)}: Data from Urae *et al.*⁸³⁾

第5節 小括

ニコチンテープまたはリドカインテープについて、*in vitro* split (0.4 mm) YMP 皮膚透過試験を実施し、各テープ剤をヒト皮膚に適用した場合の血中濃度推移を予測して実測値と比較した。すなわち、SKIN-CAD[®]に本編で得られたニコチンおよびリドカインの YMP 皮膚透過パラメータ（実測値）、ヒトに静脈内投与後のニコチンおよびリドカインの薬物動態パラメータ（文献値）、ヒトの角層厚（文献値）、およびヒト皮膚表面から毛細血管までの距離（文献値）を入力し、ヒト血漿中ニコチン濃度または血清中リドカイン濃度を予測した。その結果、ヒト血漿中ニコチン濃度および血清中リドカイン濃度の予測値は文献値^{83, 84)}とほぼ同様な推移を示した。ニコチンテープまたはリドカインテープを YMP 皮膚に適用して得た *in vitro* 透過パラメータ (D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s) は、各テープ剤をヒト上腕または上肢内側に適用して得られる *in vitro* 透過パラメータとほぼ同じであると推測された。YMP 皮膚とヒト皮膚とのバリア能の違いは、角層厚の違いによって説明可能と考えられた。

以上、TTSの製剤設計において、YMP皮膚の厚みを調整した split (0.4 mm) YMP skin を用いた *in vitro* 透過試験は、TTS をヒトに貼付した後の血中濃度推移を予測するための有用な方法であり、実際にヒトに適用される部位の角層厚の情報が得られれば、正確に血中濃度推移を予測することは可能であることが示された。

結論

TTS および局所作用型製剤を開発するために、製剤設計の一環として *in vitro* 透過試験が実施されている。*In vivo* ヒト経皮吸収性を予測するための *in vitro* 皮膚透過試験には摘出ヒト皮膚を用いることが最良の方法と考えられている。しかしながら、国内では皮膚の入手量の制限、皮膚の個体間変動の問題があるため、ヒト皮膚の代替として動物皮膚を用いた *in vitro* 透過試験が広く実施されている。そのため、薬物の *in vitro* 皮膚透過試験に使用する皮膚の選定基準は不明瞭であり、*in vivo* ヒト経皮吸収性をより精度良く、より効率的に予測できる新たな *in vitro* 皮膚透過試験の方法論の確立が期待されている。

本研究では、薬物の *in vivo* ヒト経皮吸収性を予測するための動物皮膚の有用性について、SD ラットおよび YMP 皮膚を用いて検討した。はじめに、皮膚厚を調整した SD ラットまたは YMP 皮膚を介したモデル 3 薬物の透過性における皮膚厚の影響を定量的に評価し、*in vivo* 条件を反映した皮膚厚を検討した。次に、ヒト、SD ラットおよび YMP 皮膚を介したモデル 3 薬物の *in vitro* 透過試験を実施し、モデル 3 薬物における *in vitro* ヒト、SD ラットまたは YMP 皮膚透過性の個体内および個体間変動を評価した。また、薬物の *in vitro* SD ラットまたは YMP 皮膚透過性からヒト皮膚透過性の予測性について検討した。さらに、TTS を用いた *in vitro* YMP 皮膚透過パラメータから TTS をヒトに適用した後の血中濃度の予測性に関して検討した。

第 1 編 薬物の *in vitro* SD ラットまたは YMP 皮膚透過性における皮膚厚の影響

YMP 背部皮膚シートの皮膚厚は、ほぼ一定（約 3.0 mm）であったが、背部以

外の部位では背部皮膚より薄く一定の厚さではなかった。また、角層厚は部位間で大きな違いはなく約 20 μm であった。YMP 皮膚では背部皮膚が *in vitro* 透過試験に最も良いと考えられた。

異なる物理化学的性質を持つモデル 3 薬物 (NR、ISDN および FP) を用い、薬物の皮膚透過性における皮膚厚の影響を *in vitro* SD ラットおよび YMP 皮膚透過試験により評価した。モデル 3 薬物の *in vitro* SD ラットまたは YMP 皮膚透過性は、皮膚 (角層より下層) 厚の減少に伴って上昇し、その変化は SD ラット皮膚より YMP 皮膚で大きく、脂溶性薬物である ISDN および FP に著しい変化が認められた。

以上、モデル 3 薬物の SD ラット皮膚透過性に及ぼす皮膚 (角層より下層) 厚の影響は僅かであり、実験の操作性および皮膚厚調整時の皮膚損傷を防ぐために、*in vitro* SD ラット皮膚透過試験においては *intact skin* を用いることが良いと判断した。一方、*in vitro* YMP 皮膚透過性から *in vivo* ヒト経皮吸収性を予測するためには、皮膚 (角層より下層) 抵抗が *in vivo* 条件に見合った *split* (0.4 mm) YMP skin の使用が推奨された。

第 2 編 *In vitro* 皮膚透過性研究におけるヒト皮膚に代わる動物皮膚の有用性

第 1 章では薬物のヒト皮膚透過性の個体内および個体間変動を検証した。縦型拡散セルを用いてモデル 3 薬物 (NR、ISDN および FP) の *in vitro* ヒト皮膚透過試験を実施した。ヒト皮膚を介したモデル 3 薬物の透過速度を算出し、皮膚透過性の変動パラメータとしてそれらの CV% を評価した。モデル 3 薬物における *in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内変動は最大 55.5%、個体間変動は最大 65.0% と大きかった。外用剤の製剤設計において薬物または製剤間の僅かな皮膚透過性の差を明らかにするためには、薬物の *in vitro* 皮膚透過性の変動がヒト皮膚よ

り小さい実験動物の皮膚を用いた *in vitro* 透過試験法も積極的に利用していくことが必要と考えられた。

第 2 章では、凍結 SD ラット皮膚または新鮮 SD ラット皮膚を介したモデル 3 薬物 (NR、ISDN および FP) の *in vitro* 透過試験を実施し、モデル 3 薬物の *in vitro* 皮膚透過性における皮膚凍結の影響を検討した。凍結 SD ラット皮膚と新鮮 SD ラット皮膚の *in vitro* 透過性に有意差は認められず、モデル 3 薬物の *in vitro* SD ラット皮膚透過性における皮膚凍結の影響はなかった。

また、第 1 章で検討したモデル 3 薬物における *in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内および個体間変動と *in vitro* 凍結 SD ラット皮膚透過性の個体間変動を比較した。さらに、モデル 3 薬物の *in vitro* SD ラット皮膚透過性からヒト皮膚透過性の予測性について検討した。モデル 3 薬物における *in vitro* SD ラット皮膚透過性の個体間変動 (最大 25.9%) は、*in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内 (最大 55.5%) および個体間変動 (最大 65.0%) より著しく小さかった。さらに、凍結 SD ラット皮膚を介したモデル 3 薬物の透過速度はヒト皮膚に比べ約 2 倍となり、各薬物において良く相関していた。SD ラット皮膚は、ヒト皮膚より薬物または製剤間の僅かな皮膚透過性の差を評価でき、TTS 製剤の開発において有用な実験動物皮膚であることが明らかとなった。

第 3 章では、第 1 編および第 2 編 1 章のヒト皮膚と同様に、皮膚 (角層より下層) 厚の影響を出来る限り抑えた split (0.4 mm) YMP skin を用い、モデル 3 薬物における *in vitro* YMP 皮膚透過性の個体内および個体間変動と *in vitro* ヒト皮膚透過性の個体内および個体間変動を比較した。さらに、*in vitro* YMP 皮膚透過性からヒト皮膚透過性の予測性について検討した。

モデル 3 薬物 (NR、ISDN および FP) における *in vitro* YMP 皮膚透過性の個体内 (最大 20.8%) および個体間変動 (最大 44.4%) は、*in vitro* ヒト皮膚透過性

の個体内（最大 55.5%）および個体間変動（最大 65.0%）より小さかった。YMP 皮膚を介したモデル 3 薬物の透過速度は、ヒト皮膚の透過速度の約 0.5 倍であり、各薬物において良い相関が示された。モデル 3 薬物における YMP 皮膚とヒト皮膚との透過速度の絶対値の違いは、角層厚の差である程度説明可能と考えられた。YMP 皮膚は、ヒト皮膚透過性を予測できるヒト皮膚の代替として有用な実験動物皮膚であることが明らかとなった。

以上、モデル 3 薬物の *in vitro* ヒト、SD ラットまたは YMP 皮膚透過性における個体間変動は、SD ラット皮膚 < YMP 皮膚 < ヒト皮膚の順となった。SD ラットおよび YMP 皮膚はヒト皮膚より薬物の僅かな皮膚透過性の差を明らかにでき、かつヒト血中濃度推移を予測できる有用な実験動物皮膚であることが明らかとなった

第 3 編 YMP 皮膚を介した *in vitro* 透過性からニコチンテープまたはリドカインテープをヒトに適用した後の血中濃度の予測

これまでの本研究の結果より、皮膚（角層の下層）厚の影響を出来る限り抑えた split (0.4 mm) YMP skin を用い、*in vitro* split YMP 皮膚透過パラメータからヒト血中濃度の予測性について検討した。なお、血中濃度予測にはヒトと YMP の角層厚の違いを補正して血中濃度を予測できる SKIN-CAD[®] を使用した。

ニコチンテープまたはリドカインテープについて、*in vitro* split (0.4 mm) YMP 背部皮膚透過試験を実施し、ヒト皮膚に適用した場合の血中濃度推移を予測して実測値と比較した。SKIN-CAD[®] に本編で得られたニコチンおよびリドカインの YMP 皮膚透過パラメータ（実測値）、ヒトに静脈内投与後のニコチンおよびリドカインの薬物動態パラメータ（文献値）、ヒトの角層厚（文献値）、およびヒト皮膚表面から毛細血管までの距離（文献値）を入力し、ヒト血漿中ニコ

チン濃度または血清中リドカイン濃度を予測した。その結果、ヒト血漿中ニコチン濃度および血清中リドカイン濃度の予測値は文献値^{83,84)}とほぼ同様な推移を示した。ニコチンテープまたはリドカインテープを YMP 皮膚に適用して得た *in vitro* 透過パラメータ (D_{sc} 、 D_{ved} 、 $K_{sc/ved}$ および C_s) は各テープをヒト上腕または上肢内側に適用して得られる *in vitro* 透過パラメータとほぼ同じであると推測された。YMP 皮膚とヒト皮膚とのバリア能の違いは、角層厚の違いによって説明可能と考えられた。

以上、TTS の製剤設計において、YMP 皮膚の厚みを調整した split (0.4 mm) YMP skin を用いた *in vitro* 透過試験は、適用部位の角層厚の情報と組み合わせることで、TTS をヒトに適用した後の血中濃度推移を予測するための有用な方法であることが明らかとなった。

以上 3 編にわたる検討により、本研究で見出した結果は、TTS および局所型製剤の製剤設計において *in vitro* 透過試験の皮膚選定、条件設定および *in vivo* ヒト経皮吸収性の予測に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大学院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 先生ならびに城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座助手 石井宏 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品物理化学講座教授 関俊暢 先生ならびに城西大学薬学研究科分子免疫学講座教授 荒田洋一郎 先生に御礼申し上げます。

また、本研究の機会を与えてくださいました大正製薬株式会社医薬研究本部 本部長 奥山茂博士、安全性・動態研究所所長 浦野英俊氏、薬物動態研究室室長 中井康博博士、ご教示、ご助言を頂きました薬物動態研究室グループマネージャー 遠藤裕美博士、医薬開発部 古屋淳博士、安全性研究室 櫻井孝信博士に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究の実施にご協力いただきました薬物動態研究室 間野陽子氏、大道真理氏、石田真大氏を始めとする関係諸氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Martin K., Ariëns E. J. (ed.): Drug Design IV, Academic Press, New York and London, 1973, pp. 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. Barbero A. M., Frasch H. F., Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review, *Toxicol. in Vitro*, **23**, 1-13 (2009).
4. Bronaugh R. L., Stewart R. F., Congdon E. R., Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 481-488 (1982).
5. El Maghraby G. M., Barry B. W., Williams A.C., Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **34**, 203-222 (2008).
6. Godin B., Touitou E., Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 1152-1161 (2007).
7. Panchagnula R., Stemmer K., Ritschel W. A., Animal models for transdermal drug delivery, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **19**, 335-341 (1997).
8. Qvist M. H., Hoeck U., Kreilgaard B., Madsen F., Frokjaer S., Evaluation of Gottingen minipig skin for transdermal *in vitro* permeation studies, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 59-68 (2000).
9. Sato K., Sugibayashi K., Morimoto, Y., Species differences in percutaneous absorption of nicorandil, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 104-107 (1991).
10. Schmook F. P., Meingassner J. G., Billich A., Comparison of human skin

- or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption, *Int. J. Pharm.*, **215**, 51-56 (2001).
11. Singh S., Zhao K., Singh J., *In vitro* permeability and binding of hydrocarbons in pig ear and human abdominal skin, *Drug Chem. Toxicol.*, **25**, 83-92 (2002).
 12. Sowthwell D., Barry B. W., Woodford R., Variations in permeability of human skin within and between specimens, *Int. J. Pharm.*, **18**, 299-309 (1984).
 13. Akomeah F. K., Martin G. P., Brown M. B., Variability in human skin permeability *in vitro*: comparing penetrants with different physicochemical properties, *J. Pharm. Sci.*, **96**: 824-834 (2007).
 14. Ngawhirunpat T., Panomsuk, S., Opanasopit P., Rojanarata, T., Hatanaka T., Comparison of the percutaneous absorption of hydrophilic and lipophilic compounds in shed snake skin and human skin, *Pharmazie*, **61**, 331-335 (2006).
 15. Schäfer-Koring M., Bock U., Diembeck W., Weimer M., The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study, *Altern Lab Anim.*, **36**, 161-187 (2008).
 16. Zorin S., Kuylenstiern, F., Thulin H. *In vitro* test of nicotine's permeability through human skin: Risk evaluation and safety aspects, *Ann. Occup. Hyg.*, **43**, 405-413 (1999).
 17. Watanabe T., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Takayama K., Sugibayashi K., Utility of three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs, *Altern. Animal Test. Experiment*, **8**, 1-14 (2001).
 18. 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*, **28**, 341-350 (2005).
19. 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).
 20. Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y, Prediction of skin permeability of drugs. I. Comparison with artificial membrane, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3452-3459 (1990).
 21. Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y. Prediction of skin permeability of drugs. II. Development of composite membrane as a skin alternative, *Int. J. Pharm.*, **79**, 21-28 (1992).
 22. Fujii M., Yamanouchi S., Hori N., Iwanaga N., Kawaguchi N., Matsumoto M., Evaluation of Yucatán micropig skin for use as an *in vitro* model for skin permeation study, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**: 249-254 (1997).
 23. Přiborsk J., Mühlbachová E., Evaluation of *in-vitro* percutaneous absorption across human skin and in animal models, *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 468-472 (1990).
 24. Sato K., Sugibayashi K., Morimoto Y., Omiya H., Enomoto N., Prediction of the *in-vitro* human skin permeability of nicorandil from animal data, *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 379-383 (1989).
 25. Wang A., Seki T., Yuan D., Sas, Y., Hosoya O., Chono S., Morimoto K., Effect of camellia on the permeation of flurubiprofen and diclofenac sodium through rat and pig skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1476-1479 (2004).
 26. Yamaguchi K., Mitsui T., Aso Y., Sugibayashi K., Structure-permeability relationship analysis of the permeation barrier properties of the stratum corneum and viable epidermis/dermis of rat skin, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 4391-4403 (2008).

27. Morimoto Y., Hatanaka T., Sugibayashi K., Prediction of skin permeability of drugs: Comparison of human and hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol*, **44**, 634-639 (1992).
28. 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).
29. 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).
30. Lavker R. M., Dong G., Zheng P., Murphy G. F., Hairless micropig, anoble model for studies of cutaneous biology, *Am. J. Pathol.*, **138**, 687-697 (1991).
31. Dick I. P., Scott R. C., Pig ear skin as an *in-vitro* model for human skin permeability, *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 640-645 (1992).
32. 大谷道輝, 小瀧一, 内野克喜, 伊賀立二, 市販ステロイド軟膏剤の混合製剤からのステロイド皮膚投下実験におけるヘアレスマウスとミニブタ摘出皮膚の評価, *YAKUGAKU ZASSHI*, **122**, 589-594 (2002).
33. Hawkins G. S. J., Reifenrath W. G., Development of an *in vitro* model for determining the fate of chemicals applied to skin, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **4**, S133-S144 (1984).
34. Monterio-Riviere N. A., Inman A. O., Riviere J. E. , Mcneill S. C., Francoeur M. L., Topical penetration of piroxicam is dependent on the distribution of the local cutaneous vasculature, *Pharm. Res.*, **10**, 1326-1331 (1993).
35. Roberts M. E., Mueller K. R., Comparisons of *in vitro* nitroglycerin (TNG) flux across yucatan pig, hairless mouse, and human skins, *Pharm. Res.*, **7**, 673-676

- (1990).
36. Simon G. A., Maibach H. I., The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: Qualitative and quantitative observations-an overview, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **13**, 229-234 (2000).
 37. Kurihara B. T., Woodworth M., Feisullin S., Beall P., Characterization of the Yucatan miniature pig skin and small intestine for ical applications, *Lab. Animal Sci.*, **36**, 396-399 (1986).
 38. Fujiwara A., Hinokitani T., Goto K., Partial ablation of porcine stratum corneum by argon-fluoride excimer laser to enhance transdermal drug permeability, *Lasers in Medical Science*, **19**, 210-217 (2005).
 39. Koizumi A., Fujii M., Kondoh M., Watababe Y., Effect of N-methyl-2-pyrrolidone on skin permeation of estradiol, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 473-478 (2004).
 40. Sekkat N., Kalia Y. N., Guy R. H., Porcine ear skin as a model for the assessment of transdermal drug delivery to premature neonates, *Pharm. Res.*, **21**, 1390-1397 (2004).
 41. Simonsen L., Fullerton A., Development of an *in vitro* skin permeation model simulating atopic dermatitis skin for the evaluation of dermatological products, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **20**, 230-236 (2007).
 42. Vallet V., Cruz C., Josse D., Bazire A., Lallement G., Boudry I., *In vitro* percutaneous penetration of organophosphorus compounds using full-thickness and split-thickness pig and human skin, *Toxicol. In Vitro*, **21**, 1182-1190 (2007).
 43. Ackermann K., Borgia S. L., Korting H. C., Mewes K. R., Schafer-Korting M., The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **23**, 105-112 (2010).

44. Kim M. K., Lee C. H., Kim D. D., Skin permeation of testosterone and its esterderivatives in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 369-375 (2000).
45. Krishnaiah Y. S. R., Satyanarayana V., Karthikeyan R. S., Effect of the solvent system on the *in vitro* permeability of nicardipine hydrochloride through excised rat epidermis, *J. Pharm. Sci.*, **5**, 124-130 (2002).
46. Obata Y., Sato H., Li C. J., Takayama K., Higashiyama K., Nagai T., Isowa K., Effect of synthesized cyclohexanol derivatives using l-menthol as a lead compound on the precutaneous absorption of ketoprofen, *Int. J. Pharm.*, **198**, 191-200 (2000).
47. Yamashita N., Kawashima K., Nomura K., Nakazawa S., Watababe T., Takeuchi H., Naruke T., Inomata N., Oozi S., Metabolic fate of 4-biphenylacetic acid (Felbinac) in rats. Absorption, distribution and excretion in rats after topical application of felbinac patch (Seltouch[®]), *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **20**, 3957-3971 (1992).
48. OECD. Test Guideline 428. Skin absorption: *in vitro* method, OECD, Paris (2004).
49. Kawamata H., Tojo K., Prediction of plasma concentration of GTS-21 in hairless rats following monolithic transdermal delivery, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 342-345 (2002).
50. Schafer H., Zesch A., Penetration of vitamin a acid into human skin, *Acta Dermatovener (Stockholm) Suppl.*, **74**, 50-55 (1975).
51. Bronaugh R. L., Stewart R. F., Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies. VI: Permeation of the barrier layer, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 487-491 (1986).
52. Moody R. P., Nadeau B., An automated *in vitro* dermal absorption procedure: III. *In vivo* and *in vitro* comparison with the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide in mouse, rat, guinea pig, pig, human and tissue-cultured skin, *Toxicol. In Vitro*, **7**, 167-176 (1993).

53. van de Sandt J. J. M., Meuling W. J. A., Elliott G. R., Cnubben, N. H. P., Hakkert B. C., Comparative *in vitro-in vivo* percutaneous absorption of the pesticide Propoxur, *Toxicol. Sci.*, **58**, 15-22 (2000).
54. Cnubben N. H. P., Elliot G. R., Hakkert B. C., Meuling W. J. A, van de Sandt J. J. M., Comparative *in vitro-in vivo* percutaneous penetration of the fungicide ortho-phenylphenol, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **35**, 198-208 (2002).
55. Payan J. P., Boudry I., Beydon D., Fabry J. P., Grandlaude M. C., Ferrari E., Andre J. C., Toxicokinetics and metabolism of N-[¹⁴C]N-methyl-2-pyrrolidone in male Sprague-Dawley rats: *in vivo* and *in vitro* percutaneous absorption, *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 659-669 (2003).
56. Henning A., Neumann D., Kostka K. A., Lehr C. M., Schaefer U. F., Influence of human skin specimens consisting of different skin layers on the result of *in vitro* permeation experiments, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **21**, 81-88 (2008).
57. Wilkinson S. C., Maas W. J., Nielsen J. B., Greaves L. C., van de Sandt J. J., Williams F. M., Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **79**, 405-413 (2006).
58. Takeuchi H., Ishida M., Furuya A., Todo H., Urano H., Sugibayashi K., Influence of skin thickness on the *in vitro* permeability of drugs through SD rat or yucatan micropig skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1-11(2012).
59. Cross S. E., Magnusson B. M., Winckle G., Anissimov Y., Roberts M. S., Determination of the effect of lipophilicity on the *in vitro* permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 759-764 (2003).

60. Wilkinson S. C., Williams F. M., Effects of experimental conditions on absorption of glycol ethers through human skin *in vitro*, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **75**, 519-527 (2002).
61. Netzlaff F., Kaca M., Bock U., Haltner-Ukomadu E., Meiers P., Lehr C. M., Schaefer U. F., Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin® in comparison to various human skin permeations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **66**, 127-134 (2007).
62. van de Sandt J. J. M., van Burgsteden J. A., Cage S., Carmichael P. L., Dick I., Kenyon S., Kornith G., Larese F., Limasset J. C., Maas W. J. M., Montomoli L., Nielsen J. B., Payan J. P., Robinson E., Sartorelli P., Schaller K. H., Wilkinson S. C., Williams F. M., *In vitro* predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **39**, 271-281 (2004).
63. Franz T. J., Percutaneous absorption on the relevance of *in vitro* data, *J. Invest Dermatol.*, **64**, 190-195 (1975).
64. Hikima T., Yamada, K., Kimura T., Maibach H. I., Tojo K., Comparison of skin distribution of hydrolytic activity for bioconversion of β -estradiol 17-acetate between man and several animals *in vitro*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **54**, 155-160 (2002).
65. Sato K., Oda T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Estimation of blood concentration of drugs after topical application from *in vitro* skin permeation data. I. Prediction by convolution and confirmation by deconvolution, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2232-2238 (1988).
66. 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).
67. Martin A., Physical Pharmacy, 4th ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1993, pp. 324-361.
68. Scheuplein R. J., Blank I. H., Permeability of the skin, *J. Physiol. Rev.*, **51**, 702-747 (1971).
69. Behl C. R., Linn E. E., Flynn G. I., Pierson C. I., Higuchi W. I., Permeation of skin and eschar by antiseptics I: Baseline studies with phenol, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 391-397 (1983).
70. Takeuchi H., Terasaka S., Sakurai T., Furuya A., Urano H., Sugibayashi K., Usefulness of rat skin as a substitute for human skin in the *in vitro* skin permeation study, *Exp. Anim.*, **60**, 373-384 (2011).
71. Morimoto Y., Kokubo T., Sugibayashi K., Diffusion of drugs in acrylic-type pressure-sensitive adhesive matrix. II. Influence of interaction, *J. Control. Release*, **18**, 113-122 (1992).
72. Bronaugh R. L., Stewart R. F., Simon M., Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies VII: Use of excised human skin, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 1094-1097 (1986).
73. Harrison S. M., Barry B. W., Dugard P. H. Effects of freezing on human-skin Permeability, *J. Pharm. Pharmacol.*, **36**, 261-262 (1984).
74. Babu R. J., Kanikkannan N., Kikwai L., Ortega C., Andega S., Ball K., Yim S., The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide, *J. Control. Release*, **86**, 49-57 (2003).

75. Oesch F., Fabian E., Bartlomowicz B. O., Werner C., Landsiedel R., Drug metabolizing enzymes in the skin of man, rat, and pig, *Drug Metab. Rev.*, **39**, 659-698 (2007).
76. Takeuchi H., Terasaka S., Sakurai T., Furuya A., Urano H., Sugibayashi K., Variation assessment for *in vitro* permeabilities through yucatan micropig skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 555-561 (2011).
77. Netzlaff F., Schacfer U. F., Lehr C. M., Meiers P., Stahl, J., Kietzmann M., Niedorf F., Comparison of bovine udder skin with human and porcine skin in percutaneous permeation experiments, *Altern. Lab. Anim.*, **34**, 499-513 (2006).
78. Wertz P. W., Downing D. T., *Transdermal Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York, 1989, pp. 1-22.
79. 武内博幸, 石田真大, 浦野英俊, 杉林堅次, YMP 皮膚を介した *in vitro* 透過性からニコチンテープまたはリドカインテープをヒトに適用した後の血中濃度の予測, 薬剤学, submitted.
80. Cleary G. W., *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*, Shah V. P., Maibach H. I. (Eds), Plenum Press, New York, 1993, pp. 17-68.
81. 渡邊哲也, 皮膚適用製剤の現状と展望: Global な視点から, *Drug Delivery System*, **22**, 450-457 (2007).
82. Farahmand S., Maibach H. I., Transdermal drug pharmacokinetics in man Interindividual variability and partial prediction, *Int. J. Pharm.*, **367**, 1-15 (2009).
83. 浦江明憲, 入江伸, 天本利明, 吉家弘, Ba37142 (Nicotine TTS) Bioavailability 試験—Nicotine TTS の異なる貼付部位における生物学的利用能の比較—, *臨床医薬*, **10**, 53-62 (1994).
84. 横田秀雄, 北村正孝, 佐々木富男, L-740 の生態内動態および安全性に関する

- 検討, 基礎と臨床, **26**, 141-152 (1992).
85. 森大介, 東條角治, 経皮治療システム設計用体内動態シミュレーションソフトウェア : SKIN-CAD™, *Pharm Tech Japan*, **17**, 79-86 (2001).
86. Martin A., *Physical Pharmacy*, 4th ed, Lea and Febiger, Philadelphia, 1993, pp. 538-545.
87. Tojo K., *Mathematical models of transdermal and topical and topical drug delivery*, 2nd ed., Biocom Systems, Inc., Fukuoka, 2005.
88. Benowitz N. L., Jacob III P., Denaro C., Jenkins R., Stable isotope studies of nicotine kinetics and bioavailability, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **49**, 270-277 (1991).
89. Olkkola K. T., Isohanni M. H., Hamunen K., The effect of erythromycin and fluvoxamine on the pharmacokinetics of intravenous lidocaine, *Anesth. Analg.*, **100**, 1352-1356 (2005).
90. Jane S. M., Thomas P., Hans C. W., Epidermal thickness at different body sites: Relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skintype and smoking habits, *Acta Derm. Venereol.*, **83**, 410-413 (2003).
91. Agache P., Humbert P., *Measuring the Skin: Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*, Springer, New York, 2004.