

諸言

外皮用薬や医薬部外品、化粧品などの皮膚適用製剤の有効性や安全性を適切に評価するためには、含有成分の皮膚透過性を測定することが重要である。そのため、水溶液からの物質透過性に関する研究は数多く報告されており、成分の物性値を用いた *in silico* 透過性予測に関する研究も盛んに行われている。一方、皮膚適用製剤には水以外にも炭化水素類やエステル類といった油剤、低級アルコールや多価アルコールといった水性基剤、界面活性剤や高分子など様々な成分が配合されているが、油剤からの成分の透過とその物理化学的特性値との関係を検討した研究はこれまでほとんどなかった。さらに近年、動物実験に対する批判が強まってきており、*in vitro* 皮膚透過試験においても代替膜の検討が必要とされている。すでに、代替膜として三次元培養ヒト皮膚モデルが利用されており、その有用性は示されているものの、使用期限が限られていること、適用面積が小さく、適用が困難な場合があることなどの課題を有している。一方、シリコーン膜や合成人工膜などの人工膜モデルはロット差が少なく、多検体同時測定も可能などの利点を有しているが、ヒト皮膚代替膜として利用するためには、ヒト皮膚と人工膜との膜特性の相違点を明らかにする必要がある。そこで本研究では、皮膚透過代替膜であるシリコーン膜および Strat-M の膜特性を明らかにすること、および皮膚透過性に影響を与える油剤の物理化学的特性値を明らかにすることを目的とした。

第1編 皮膚透過代替膜としてのシリコーン膜の有用性評価

ヒト皮膚代替材料としてのシリコーン膜透過特性を明らかにすることを目的とし、各種透過パラメータを比較検討した。15種類のモデル化合物を用いて、シリコーン膜透過実験を行い、得られた透過プロファイルから透過係数 (P) と拡散パラメータ (DL^2)、分配パラメータ (KL) を算出した。

シリコーン膜の各種透過パラメータはヒト皮膚透過パラメータと良い相関がみられた。シリコーン膜の DL^2 はフルルビプロフェンを除いて、モデル化合物の極性によらず、ヒト皮膚のそれと比較し約 100 倍高い値を示した。また、親水性の高いアンチピリンやカフェインでは、シリコーン膜への KL はヒト皮膚のそれに比べて約 100 倍低い値となり、結果として DL^2 と KL の積として示される P は近い値を示した。一方、比較的親油性の高いブチルパラベンやフルルビプロフェンでは、シリコーン膜への KL はヒト皮膚の KL と約 1/10 または同等程度となり、 P は約 10 から 100 倍高い値を示した。さらに、 $\log K_{o/w}$ が 0.5 から 3.5 の化合物では、シリコーン膜の KL はヒト皮膚のそれよりも約 10 倍低く、透過係数はヒト皮膚よりも約 10 倍高かった。以上より、シリコーン膜は、化合物のヒト皮膚透過性を短時間で予測できるモデルとして有用であることがわかった。しかし評価するモデル化合物の極性によって、いくつかのパラメータは過大もしくは過小評価されることも明らかとなり、透過パラメータの特徴をよく理解してシリコーン膜を利用する必要がある。

第2編 皮膚透過代替膜としての Strat-M の有用性評価

ヒト皮膚代替膜としての人工膜 Strat-M の有用性を、モデル化合物の透過性を算出することで評価した。分子量は 152 から 289、 $\log K_{ow}$ は -0.9 から 3.5 までのモデル化合物 15 種類を選択し、これらの飽和溶液を Strat-M とヒト切除皮膚に適用して、膜透過量を測定した。そして得られた P 、 DL^2 、 KL を 2 つの膜間で比較した。

その結果、Strat-M の P は適用したモデル化合物の $\log K_{ow}$ が高くなるにつれて高くなり、同様の結果がヒト皮膚においても観察された。また、Strat-M とヒト皮膚間において $\log P$ の相関が得られた。さらに、Strat-M の DL^2 と KL はヒト皮膚のそれらと近似していた。これらの結果から、Strat-M を用いた透過試験はヒト皮膚透過試験の代替法に使用できることが明らかとなった。

第3編 ハイスループット拡散セル装置を用いた人工膜透過性に及ぼす油性基剤の影響

エステル油剤が透過物質の透過にどのような影響を与えるのか把握することを目的として、ハイスループット膜透過試験を行った。モデル化合物には極性の異なるカフェイン (CF)、アミノピリン (AMP)、安息香酸 (BA) およびフルルビプロフェン (FP) を、また油性基剤には化粧品に使用されるエステル油 25 種類を選択した。各モデル化合物のシリコーン膜および Strat-M 透過量を測定し、エステル油剤への溶解度や表面張力、濡れ性などの物性値との相関を検討した。

その結果、エステル油からの化合物のシリコーン膜透過と Strat-M 透過は相関し、化合物の親油性が高くなるにつれて相関係数が高くなった。また、親水性の高い CF を除く化合物のシリコーン膜透過量および Strat-M 透過量は、エステル油の表面張力、濡れ性や膜取込み量と相関することが分かった。また、油性基剤の取込み量は、シリコーン膜では濡れ性、Strat-M では粘度と高い相関がみられた。一方、CF のシリコーン膜透過量は膜取込み量に相関したのに対し、Strat-M 透過量は、油剤中の化合物の溶解度と膜取込み量に相関した。このことから、エステル油剤からの各種成分の膜透過性を制御するためには、エステル油の膜取り込み量を把握し、適切なエステル油を選択することが重要であると考えられた。また、膜構造が複雑な Strat-M における親水性化合物 (CF) の透過には油剤の取込み量以外にも油剤中溶解度を考慮することも重要である。

結論

シリコーン膜と Strat-M はヒト皮膚透過代替膜として有用であり、油性基剤からの透過については、膜への油性基剤の取込み量に強く依存し、親水性化合物の透過には溶解度も影響することが明らかとなった。シリコーン膜は、評価するモデル化合物の極性に応じて過大もしくは過小評価されることが明らかとなった。また、Strat-M はヒト皮膚透過係数と近似した値が得られた。さらに、シリコーン膜、Strat-M とともに膜に対する油性基剤の取込みが、油性基剤からのモデル化合物の透過に強く影響することが明らかとなった。また、油性基剤の取込み量は、シリコーン膜では濡れ性、Strat-M では粘度と高い相関がみられた。さらに、親水性モデル化合物の Strat-M 透過性には溶解度も影響していた。本研究の成果を用いることによって、油剤含有皮膚適用製剤に含まれる種々化合物の皮膚透過性の制御に繋がることが可能と考えられる。

Summary

Takashi Uchida

Introduction

Skin permeability coefficient of compounds is very important to evaluate safety and effectiveness of topically applied drugs, quasi-drugs and cosmetics. Therefore, skin permeability coefficient of compounds has been evaluated and *in silico* method to estimate the permeability coefficient from its aqueous solution has been developed with the physicochemical properties. On the other hand, an oil-based component such as hydrocarbons and esters, an aqueous-based component like alcohols and polyols, surfactants and macromolecules are blended in dermatological formulations besides water. Among these, oils are contained in many dermatological products. However, no reports have been published to estimate skin permeability coefficient of chemicals from oils with its physicochemical properties.

In addition the criticism to animal experiments had become strong in the worldwide and examinations with alternative membranes are being required also in the skin permeation studies in the cosmetic field. Three-dimensional cultured human skin model is examined as alternative membranes, and the usefulness has already been reported. However, the surface area is not enough size to be applied to compounds and final formulations and the expiration date for use is limited are problems for the cultured human skin models. On the other hand, artificial membranes such as silicone and synthetic artificial membranes have advantages for small lot differences and multi-sample measurement. In order to use them as a human skin substitute membrane, it is necessary to clarify the difference in permeation characteristics of chemicals through human skin and the artificial membrane. In this study, silicone membrane and Strat-M were selected as an artificial membrane, and usefulness of the artificial membranes as a human skin substitution for *in vitro* skin permeation experiment was evaluated. Furthermore, the effect of physicochemical parameters of the oils on the membrane permeation of chemicals was investigated.

Chapter 1. Usefulness of silicone membrane as an alternative human skin

The permeation parameters of chemical compounds through a silicone membrane were calculated from the obtained permeation profiles, in particular for chemical compounds with MWs between 151 and 288 and $\log K_{o/w}$ values from -1.5 to 3.9. For the hydrophilic compounds of antipyrine and caffeine, KL values for the silicone membrane were 100-fold lower than those in human skin, and P values for the silicone membrane were similar to those in human. On the other hand, in the hydrophobic model compounds of *n*-butyl paraben and flurbiprofen, KL values for the silicone membrane were similar to or 10-fold higher than those in human, and P values for the silicone membrane were 100-fold higher than those in human. From these results, it was found that the silicone membrane is useful as a model to predict the human skin permeability of a compound in a short time. However, depending on the lipophilicity of the model compounds, under- or overestimation of compounds permeability might occur in silicone membrane.

Chapter 2. Usefulness of Strat-M as an alternative human skin

The permeability coefficients of chemical compounds through Strat-M were evaluated with chemical compounds with molecular weights between 151 to 288 and $\log K_{o/w}$ from -0.90 to 3.53.

P of Strat-M increased as $\log K_{o/w}$ of the applied compound increased, and similar results were observed in human skin. In addition, a good correlation of $\log P$ was observed between Strat-M and human skin. Furthermore, DL^2 and KL of Strat-M were similar to those of human skin. From these results, Strat-M can be utilized in screening tests to estimate the permeability of chemicals through human skin.

Chapter 3. Effect of esters on the artificial membrane permeation using high-throughput diffusion cell array

A high-throughput diffusion cell array was used to evaluate the effect of ester oils on the compounds permeation through the artificial membrane. Four model compounds (CF, AMP, BA, and FP) having different lipophilicities were selected model compounds, and 25 kinds of esters that used in oil-base in cosmetic products were selected as vehicles. The permeated amount through the silicone or Strat-M was measured, and the correlation between the permeated amount and physical properties such as compound solubility in ester oils, surface tension and wettability of oils was examined. As a result, a good correlation was observed in compound permeations from the ester oils between silicone membrane and Strat-M. The correlation coefficient was increased as the lipophilicity of the compound increased. In addition, the compound permeations except for highly hydrophilic compound CF were significantly correlated with the wettability, surface tension, and uptake of esters into the membrane. On the other hand, the amount of CF permeated through silicone membrane correlated with the amount of ester uptake, whereas in Strat-M it correlated with the solubility of the compound and the membrane uptake. Interestingly, the uptake of oils was highly correlated with wettability in silicone membrane and viscosity in Strat-M, respectively. These findings suggested that the amount of ester oil uptake into the membrane is an important factor to affect membrane permeation of compounds from oil esters. In addition, compound solubility in oil ester, as well as the amount of ester uptake into the membrane, should be considered for a complicated membrane structure of Strat-M.

Conclusion

Silicone membrane and Strat-M were useful as an alternative membrane to human skin substitute. Especially, Strat-M showed close values of permeability coefficient to human skin.

Furthermore, the compound permeation from ester oils through these artificial membranes was strongly dependent on the solvent uptake into the membrane, and compound solubility in the oils also affected on the permeation of hydrophilic compounds. The effect of physicochemical properties of ester oils on the membrane permeation of compounds was revealed through our results. Thus, it is considered that silicone membrane and Strat-M could be utilized to develop pharmaceutical and cosmeceutical products.

論文審査の結果の要旨

外皮用薬や医薬部外品、化粧品などの皮膚適用製剤の有効性や安全性を適切に評価するためには、適用する化合物の皮膚透過量や皮膚中濃度といった皮膚透過性の把握が極めて重要となる。今まで皮膚透過性の評価を行う上では、*in vitro* 皮膚透過実験が行われてきた。しかし、動物実験に対する批判が強まってきていることや、近年、EU 諸国では化粧品開発において動物実験が禁止されたこと、ヒト摘出皮膚の使用には種々の問題が存在することなど、*in vitro* 皮膚透過実験においてもヒトや動物の皮膚に変わる代替膜が必要とされている。複数の研究者から、化合物の皮膚透過係数 (P) の予測が数多く報告されているが、これらのほとんどは透過物質の物理化学的特性値を用いた水溶液からの透過係数予測式であった。一方、医薬品や化粧品などをはじめとする皮膚適用製剤には水以外にも炭化水素類やエステル類といった油剤、低級アルコールや多価アルコールなどの水性基剤、界面活性剤や高分子など様々な成分が配合される。この中でも特に油剤は多くの製剤に配合され、油剤からの P は水溶液から予測した値と異なることが知られている。しかしながら、油剤からの化合物透過性とその物理化学的特性値との関係の網羅的な研究はほとんどされてこなかった。代替膜としては、三次元培養ヒト皮膚モデルが、ここ数年盛んに用いられており、その有用性も報告されているが、使用期限の問題や適用面積が小さいこと、ロット変動などの課題も多いことが知られている。一方、シリコーン膜や合成人工膜などの人工膜モデルはロット変動が少なく、多検体同時測定も可能などの利点を有しているが、分配パラメータ (KL) や拡散パラメータ (DL^2) などの膜透過パラメータを用いた代替膜としての有用性評価は実施されてこなかった。

このような背景のもと、内田崇志氏は、皮膚透過評価用代替膜としてシリコーン膜および Strat-M® といった人工膜モデルの有用性を評価すること、皮膚透過性に影響を与える油剤の物理化学的特性値を明らかにすることを目的として、以下の3章にわたり検討を行なった。以下に審査結果を示す。

第1編第1章では、ヒト皮膚代替材料としてのシリコーン膜透過特性を明らかにすることを目的とし、各種透過パラメータの比較、検討を行なった。15種類のモデル化合物を用いて、シリコーン膜透過実験を行い、得られた透過プロファイルから P 、 DL^2 、 KL の各種パラメータを算出した。その結果、シリコーン膜の各種透過パラメータはヒト皮膚透過パラメータと良い相関がみられた。シリコーン膜の DL^2 はフルルビプロフェン (FP) を除いて、モデル化合物の極性によらず、ヒト皮膚の DL^2 と比較し約 100 倍高い値を示した。また、親水性の高いアンチピリンやカフェイン (CF) では、シリコーン膜への KL はヒト皮膚の KL に比べて約 100 倍低い値となり、結果として DL^2 と KL の積として示される P は近い値を示した。一方、比較的親油性の高いブチルパラベンや FP では、シリコーン膜の KL はヒト皮膚の KL と約 1/10 または同等程度となり、 P は約 10 から 100 倍高い値を示した。さらに、 $\log K_{ow}$ が 0.5 から 3.5 である両親媒性化合物では、シリコーン膜の KL はヒト皮膚の KL よりも約 10 倍低く、 P はヒト皮膚よりも約 10 倍高かった。以上より、シリコーン膜は $\log K_{ow}$ が 0.5 から 3.5 である両親媒性化合物の透過試験のヒト皮膚代替膜として有効であることが明らかとなった。しかし、評価するモデル化合物の極性によって、いくつかのパラメータは過大もしくは過小評価されることも明らかとなった。

第2章では、ヒト皮膚代替膜としての人工膜 Strat-M®の有用性を、モデル化合物の膜透過性で評価した。分子量は152から289、 $\log K_{ow}$ は-0.9から3.5までのモデル化合物15種類を選択し、これらの飽和溶液をStrat-M®とヒト皮膚に適用して、膜透過量を測定した。そして得られた P 、 DL^2 、 KL を2つの膜間で比較した。その結果、Strat-M®の P は適用したモデル化合物の $\log K_{ow}$ が高くなるにつれて高くなった。同様の結果がヒト皮膚においても観察された。また、Strat-M®とヒト皮膚間において $\log P$ の相関が得られた。さらに、Strat-M®の DL^2 と KL はヒト皮膚のそれらと近似していた。これらの結果から、Strat-M®を用いた透過試験はヒト皮膚透過試験の代替法に使用できることが示唆された。

第2編では、透過性への影響因子がヒト皮膚と人工膜で同様であるとの仮定のもと、エステル油が透過物質の透過にどのような影響を与えるのか把握することを目的として、ハイスループット膜透過試験を行った。モデル化合物には極性の異なるCF、アミノピリン (AMP)、安息香酸 (BA)、FPを、また油性基剤には化粧品に汎用されているエステル油25種類を選択した。各モデル化合物のシリコーン膜およびStrat-M®透過量を測定し、エステル油への溶解度や表面張力、濡れ性などの物性値との相関を調べた。その結果、全ての化合物においてシリコーン膜透過量は溶解度と相関せず、エステル油の表面張力や濡れ性、膜取込み量と有意な相関が得られた。また、AMP、BA、FPのStrat-M®透過量はシリコーン膜と同様の相関がみられた。一方、親水性の高いCFのみStrat-M®透過量は溶解度と取込み量に相関した。さらに、エステル油からのモデル化合物のシリコーン膜透過とStrat-M®透過量は相関し、モデル化合物の親油性が高くなるにつれて相関係数は高くなった。これらのことから、エステル油からの各種成分の膜透過性を制御するためには、エステル油の膜取り込み量を把握し、適切なエステル油を選択することが重要であることが考えられた。また、膜構造が複雑なStrat-M®における親水性化合物の透過には油剤の取込み量以外にも油剤中溶解度を考慮することも重要であることが示唆された。

以上、本論文は、皮膚透過代替膜としてのシリコーン膜およびStrat-M®といった人工膜モデルの有用性と皮膚透過性に影響を与える油剤の物理化学的特性値との関係に対して、有益な情報を提供するものであり、新規経皮投与製剤の開発において、有用な情報をもたらす重要な研究であると評価できる。本論文は、その新規性および独創性、研究意義の観点から、本研究科において課程によらない博士(薬科学)の論文として十分に値するものであると判断した。