

種々物質の人工膜モデル透過性評価と
それに及ぼすエステル基剤の影響

内田 崇志

目次

略号	1
記号	3
諸言	5
第1編 皮膚透過代替膜としての人工膜の有用性	9
第1章 皮膚透過代替膜としてのシリコーン膜の有用性評価	9
第1節 実験方法	12
1. 実験材料	
2. 溶解度測定	
3. 膜透過試験	
4. UPLC 分析	
5. 統計解析	
第2節 理論	17
1. 膜透過パラメータの算出	
第3節 結果	18
1. 各モデル化合物のシリコーン膜およびヒト皮膚透過	
第4節 考察	26
第5節 小括	32
第2章 皮膚透過代替膜としての Strat-M [®] の有用性評価	33
第1節 実験方法	35
1. 実験材料	
2. 走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いた Strat-M [®] の観察	
3. 膜透過試験	

4.	各種化学物質の定量方法	
5.	統計解析	
第2節	結果	39
第3節	考察	46
第4節	小括	48
第3章	シリコーン膜と Strat-M [®] の比較	49
第1節	シリコーン膜と Strat-M [®] の予測性の比較	49
第2節	小括	51
第2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	52
第1節	実験方法	55
1.	実験材料	
2.	溶解度測定	
3.	ハイスループット膜透過試験	
4.	エステル油剤の物性値測定	
5.	シリコーン膜および Strat-M [®] に対する各エステル油剤の取込み試験	
6.	UPLC 分析	
7.	統計解析	
第2節	結果	63
1.	各モデル化合物のエステル油剤に対する溶解度	
2.	エステル油剤からの各モデル化合物のシリコーン膜透過	
3.	エステル油剤からの各モデル化合物の Strat-M [®] 透過	
4.	エステル油剤からの各モデル化合物のシリコーン膜と Strat-M [®]	

透過量の関係

第3節 考察	81
第4節 小括	85
結論	86
謝辞	90
引用文献	91

略号

AMP	Aminopyrine
ANP	Antipyrine
BA	Benzoic acid
BP	Butyl paraben
B-PABA	<i>n</i> -Butyl <i>p</i> -aminobenzoate
CEH	Cetyl 2-ethylhexanoate
CF	Caffein
DEHS	Di-2-ethylhexyl sebacate
DES	Diethyl sebacate
DFP	Diisopropyl fluorophosphate
DIBA	Diisobutyl adipate
DIPA	Diisopropyl adipate
DOC	Dioctyl carbonate
EHHS	2-Ethylhexyl hydroxystearate
EHIN	2-Ethylhexyl isononanoate
EHP	2-Ethylhexyl palmitate
EP	Ethyl paraben
E-PABA	Ethyl <i>p</i> -aminobenzoate
FP	Flurbiprofen
GTEH	Glyceryl tri-2-ethylhexanoate
GTIS	Glyceryl triisostearate
HPLC	High performance liquid chromatography
ININ	Isononyl isononanoate
IPIS	Isopropyl isostearate
IPL	Isopropyl linoleate
IPM	Isopropyl myristate
IPP	Isopropyl palmitate
ISDN	Isosorbide dinitrate
ISIS	Isostearyl isostearate
ISMN	Isosorbide 5-mononitrate
ITDIN	Isotridecyl isononanoate
LID	Lidocaine
MP	Methyl paraben
M-PABA	Methyl <i>p</i> -aminobenzoate

MW	Molecular weight
NPGDC	Neopentyl glycol dicaprato
NPGDEH	Neopentyl glycol diethylhexanoate
NSAIDs	Non-steroidal anti-Inflammatory drugs
ODM	2-Octyldodecyl myristate
ODR	2-Octyldodecyl ricinoleate
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay
PETIS	Pentaerythritol tetraisostearate
PGDC	Propyleneglycol dicaprylate
PGIS	Propyleneglycol isostearate
PP	Propyl paraben
P-PABA	<i>n</i> -Propyl <i>p</i> -aminobenzoate
PVPA	phospholipid vesicle-based permeation assay
SEM	Scanning electron microscope
TDDSs	Transdermal drug delivery systems
TEM	Transmission electron microscope
UPLC	Ultra performance liquid chromatography

記号

AUC	血中濃度－時間曲線下面積
C_{max}	最高血中薬物濃度
C_v	適用化合物の基剤中初期濃度
D	拡散係数
DL^{-2}	拡散パラメータ
$Flux$	定常状態時の単位面積あたりの薬物透過速度
HSP	ハンセンの溶解度パラメータ
K	分配係数
KL	分配パラメータ
$K_{o/w}$	n-オクタノール/水分配係数
L	膜の厚さ
MW	分子量
O/W	Oil in water
P	膜透過係数
π_2^H	Dipolarity/polarisability
R_2	Excess molar refraction
$\Sigma\alpha_2^H$	Hydrogen-bond acidity
$\Sigma\beta_2^H$	Hydrogen-bond basicity
SP	溶解度パラメータ
$SP\ Distance$	溶解度パラメータ距離
T_{lag}	ラグタイム
T_{max}	最高血中薬物濃度に到達するまでの時間
V_x	McGowan volume
W/O	Water in oil
δ_d	分散パラメータ
δ_h	水素結合パラメータ
δ_p	極性パラメータ

諸言

一般的に、医薬品の治療効果や化粧品の有効性は、薬物もしくは有効成分の薬効の強さと作用部位における曝露量により決定される。また、医薬品・化粧品における副作用発現などにつながるリスクも、ハザード物質の有害性の強さと曝露量により決定される。すなわち、医薬品や化粧品の有効性と安全性を適切に評価するためには、配合される薬物や有効成分、ハザード物質の曝露量を正確に把握することが重要となる。この曝露量を把握するためには、化学物質が適用されてから消失するまでの体内動態を知る必要があり、吸収 (absorption)、分布 (distribution)、代謝 (metabolism)、排泄 (excretion) の ADME 過程の評価が鍵となる。このうち吸収過程では、化学物質が体内に入る量と速度を評価しており、生物学的利用能を決める重要な過程である。例えば、経口薬においては、最高血中薬物濃度 C_{\max} やその濃度に到達するまでの時間 T_{\max} 、血中濃度-時間曲線下面積 AUC が評価され、外皮用薬や医薬部外品、化粧品などの皮膚適用製剤においては、皮膚透過量や皮膚中濃度といった皮膚透過性が評価される。

皮膚適用製剤は、経口投与製剤と比較して、肝臓または消化管での初回通過効果を回避できること、副作用発現時に迅速に投与が中止できること、穏やかに長時間に亘って吸収され、一定の血中濃度を維持できることなどの利点を有している^{1,2)}。一方で、皮膚は体と外界の境界に存在し、生体異物に対するバリアとして機能しているため、皮膚に適用された化学物質の皮膚透過性は必ずしも高くはない。このような背景のもと、皮膚適用製剤では皮膚透過性の把握が重要となり、皮膚を介する透過係数 (permeability coefficient、 P) の予測が数多く実施されている³⁻⁷⁾。例えば、Morimoto ら³⁾は K_{ow} を用いて式 (1)、Potts と Guy⁴⁾は $\log K_{ow}$ と MW を用いて式 (2)、Abraham ら⁵⁾は Excess molar refraction

(R_2)や Dipolarity/polarisability (π_2^H)、Hydrogen-bond acidity ($\Sigma\alpha_2^H$)、Hydrogen-bond basicity ($\Sigma\beta_2^H$)、McGowan volume (V_x) といった Abraham Solvation Parameter を用いて式 (3) として P が予測できることを報告している。

$$\log P \text{ (cm/s)} = 1.17 \times 10^{-7} K_{o/w}^{0.751} + 2.73 \times 10^{-8} \quad (1)$$

$$\log P \text{ (cm/s)} = -6.3 + 0.71 \times \log K_{o/w} - 0.0061 \times MW \quad (2)$$

$$\log P \text{ (cm/s)} = -5.1 + 0.44R_2 - 0.49\pi_2^H - 1.48\Sigma\alpha_2^H - 3.44 \Sigma\beta_2^H + 1.94V_x \quad (3)$$

但し、これら皮膚透過係数予測式の多くは、透過物質の物理化学的パラメータを用いた水基剤からの予測式であった。

一方、第十七改正日本薬局方では、皮膚適用製剤として外用固形剤、外用液剤、スプレー剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤などの剤形が挙げられている。さらに化粧品では、洗淨料、化粧水、乳液、クリーム、化粧用油、ファンデーション、口紅などの剤形がある。これらを調製するため、水以外にも様々な基剤成分が配合される。例えば、炭化水素類、ロウ類、エステル類、高級脂肪酸、高級アルコールなどの油性基剤、低級アルコール、多価アルコールなどの水性基剤、界面活性剤や高分子、防腐剤、酸化防止剤、金属イオン封鎖剤、pH 調整剤、香料などの添加剤がある。中でも、油性基剤は皮膚への伸ばしやすさなど使用感の向上や皮膚の閉塞によるエモリエント効果のため、多くの皮膚適用製剤に配合されている。また、油性基剤が配合されることによって、製剤中における薬物溶解度の変化や皮膚への作用が生じて、これら基剤からの皮膚透過係数は水基剤から予測したものとは異なることが知られている。しかしながら、油性基剤からの透過とその物理化学的特性値との関係を網羅的に検討した研究は、これまでほとんどなかった。

近年、動物実験に対する批判が強まってきている。1999年には、第三回生命科学における代替法と動物使用に関する世界会議において Reduction, Refinement, Replacement の 3R を適用するボロニア宣言が採択され、これに伴い、様々な動物実験代替法が検討されてきている。例えば、医薬品の毒性試験ガイドラインでは、*in vitro* 毒性試験として遺伝毒性試験における Ames 試験や染色体異常試験が記載されている。また、OECD ガイドライン TG439 として *in vitro* 皮膚刺激性試験および腐食性試験に三次元培養ヒト皮膚モデルである Episkin、EpiDerm、SkinEthic RHE、LabCyte EPI-Model が採用されている⁸⁾。さらに、*in vitro* 皮膚透過実験においても三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた検討が報告されている⁹⁻¹¹⁾。EpiDerm はヒト皮膚透過性に近いこと、TESTSKIN LSE-high はヒト皮膚と比較し、拡散パラメータが 10 倍高いことなどが報告されている¹⁰⁾。しかしながら、これら三次元培養ヒト皮膚モデルは培養細胞のため使用期限の問題や、適用面積が小さいため、一度に多数のサンプルを評価したい場合には適していない。これに対し、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ため、製剤評価などに適している。しかしながら、人工膜モデルの透過係数や分配パラメータ、拡散パラメータといった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いなかった。

2016年現在、医薬品の有効性や安全性評価に動物実験は欠かせないものとなっている。一方で、動物愛護の観点から動物実験を制限する動きが欧州を中心に高まっており、EU化粧品指令第7次改正の公布により2013年以降、動物実験を行った化粧品成分を含む製品の販売が欧州において禁止されている。イスラエルやインド、ニュージーランドにおいても同様の規制が成立し、動物実験の制限は世界に広がっている。このような流れのなか開発された動物に依存しない代替法は、動物福祉の向上のみならず、ヒトに対する有効性や安全性をよ

り適切かつ正確に評価することにも繋がる。また、医薬品や化粧品には数多くの油性基剤が配合されている。代替膜としての合成人工膜の有用性を見極め、モデル化合物の皮膚透過性に対する油性基剤の影響を明らかにすることによって、油性基剤を配合した医薬品や化粧品の化合物の皮膚透過性を予測・制御することができる。以上のように、本研究の目的を達成することにより、高い有効性と安全性を兼ね備えた油剤含有皮膚適用製剤を開発することが出来ると考えた。

そこで本研究では、皮膚代替膜として人工膜モデルの有用性について評価し、さらに、皮膚透過性に対する油剤の影響を明らかにするため、膜透過性に影響を与える油剤の物理化学的特性値を検討した。本論文第 1 編では、市販の人工膜モデルのヒト皮膚代替としての特性を水性基剤からの透過性について評価した。すなわち、種々モデル化合物のシリコーン膜とヒト皮膚透過試験を行って皮膚透過パラメータを算出し、シリコーン膜とヒト皮膚透過性の違いについて評価し（第 1 章）、さらに、市販品の合成皮膚代替人工膜である Strat-M[®]とヒト皮膚透過性の違いについて評価した（第 2 章）。第 2 編では、皮膚透過試験のハイスループットスクリーニングが可能である拡散セルアレイシステムを使用して、油性基剤からのモデル化合物の人工膜透過性を評価し、膜透過量と油性基剤の物理化学的特性値との関係性について調査した。このように本論文では、皮膚の代替膜としての人工膜の可能性を詳細に調べ、透過性に与える油性基剤の影響を網羅的に調査した。

なお、本論文について開示すべき利益相反はない。

第1編

皮膚透過代替膜としての人工膜の有用性

第1章

皮膚透過代替膜としてのシリコン膜の有用性評価¹²⁾

皮膚は体と外界の境界にあり、水分や物質などに対するバリアとして機能している。一方で、経口剤で観察される初回肝通過効果の回避や長時間に亘る放出制御などを目的として、Transdermal Drug Delivery Systems (TDDSs) の開発が盛んに行われている^{2, 13, 14)}。TDDSs の開発や評価を目的として、摘出されたヒト皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験が EU やアメリカ合衆国で実施されているが、日本ではヒト皮膚の入手が困難であることや論理的な観点から、ヒト皮膚を用いた透過試験は頻繁に実施できない。このため、動物、特にヘアレスラット、モルモット、ミニブタ等が経皮吸収評価用動物として使用されてきた。ところが近年、動物愛護の観点から EU において動物実験が実施された化粧品の販売が禁止されるなど¹⁵⁾、経皮吸収評価においても代替膜が必要とされていた。さらに、動物やヒト皮膚を使用した透過実験は、生体組織の複雑な性質や個体差、部位差のため、製剤成分の影響を評価する際にいくつかの難点や制限があった。

合成人工膜や培養ヒト皮膚モデルは、薬物透過の基本的な物理化学的メカニズムを研究するための単一で再生産性のある代替膜であり、動物やヒト皮膚のより複雑な皮膚透過を理解するための基本的な情報を提供する。経皮吸収試験において合成人工膜や培養ヒト皮膚モデルを用いた評価はすでに数多く実施されている。さまざまなモデル化合物を用いて3次元培養ヒト皮膚モデルや Parallel

artificial membrane permeability assay (PAMPA)などを介した透過性が試験されており¹⁶⁻¹⁸⁾、各々の膜においてその有用性が示されている。中でもシリコーン膜透過性は古くから検討され¹⁹⁾、膜透過性に与える基剤の影響²⁰⁾や皮膚中濃度の予測²¹⁾、皮膚透過ルートの解明²²⁾などに用いられてきた。一方、薬物のヒト皮膚透過係数とシリコーン膜透過係数の相関を検討し、代替膜としての有用性について報告されたのは最近である²³⁾。さらに、透過速度 (*Flux*) を指標にした相関性も検討されており^{24, 25)}、シリコーン膜の代替膜としての有効性も証明されてきている。ところが、シリコーン膜透過性はヒト皮膚透過性とは本質的に異なるとの報告^{26, 27)}もあり、シリコーン膜のヒト皮膚代替材料としての適用の可否、適用可能な範囲などについては不明であった。

一般的に、分子量や極性（例えば、ある pH における緩衝液とオクタノールの見かけの分配 $\log K_{o/w}$ ）のような化合物の物理化学的特性値が、皮膚透過性に大きく影響することが知られている^{4, 7, 28)}。経皮治療薬として有効なもの多くは分子量が 500 以下であり²⁹⁾、これまでに分子量 500 以上の化合物では皮膚透過係数 P は極端に減少することが報告されている。さらに薬物の $\log K_{o/w}$ の増加に伴って P が大きくなることも観察されている⁴⁾。このことから、代替膜検討に用いる化合物の分子量や $\log K_{o/w}$ によっては、シリコーン膜やヒト皮膚に対して異なる透過挙動を示すことが考えられる。実際に、Geinoz らがシリコーン膜の代替膜としての有用性について述べた論文では $\log K_{o/w}$ は 1.23 (ニコチン) から 2.59 (4-ブロモフェノール)、分子量は 94.11 (フェノール) から 234.40 (リドカイン) の 7 化合物が用いられたのに対し²³⁾、シリコーン膜透過性はヒト皮膚透過性と本質的に異なることを報告した Moss らの論文では、 $\log K_{o/w}$ は 0.84 (カプトプリル) から 5.36 (カプトプリルヘキシルエーテル)、分子量は 165.19 (ベンゾカイン) から 343.47 (ジブカイン) の 13 化合物を用いて検討されていた²⁷⁾。つま

り、検討した化合物の $\log K_{ow}$ や分子量の範囲が異なることで、ヒトまたは動物皮膚代替材料としてのシリコーン膜の有用性で相反する結論となった可能性が考えられた。

また、透過係数 P は拡散パラメータ (DL^{-2}) と分配パラメータ (KL) という2つのパラメータに分割することができる³⁰⁾。これらのパラメータは *in vitro* 皮膚透過実験から得られ、その値は化合物の透過特性と同様に膜の性質に依存する。それ故に、代替膜のこれらパラメータを検討することはヒト皮膚との類似性や膜の性質の理解に極めて有効である。3次元培養ヒト皮膚モデルである TESTSKIN LSE-high の場合、ヒト皮膚と比較し P が10倍高くなるが、その原因の解析により、 KL は近似しており DL^{-2} が10倍高いことが明らかとされている⁹⁾。ヒト皮膚や膜の透過性を判断する上では透過係数や $Flux$ は重要なパラメータであるが、ヒト皮膚中や膜中における化合物の動態を正確に把握するためには KL や DL^{-2} も合わせて知る必要がある²¹⁾。

そこで本章では、ヒト皮膚代替材料としてのシリコーン膜透過特性を検証することを目的とし、溶媒として水性基剤を用いて、 $\log K_{ow}$ が-1.50 (アンチピリン) から 3.86 (フルルビプロフェン)、分子量が 122.12 (安息香酸) から 270.80 (リドカイン塩酸塩) の 15 モデル化合物を用いて、 P と KL 、 DL^{-2} のシリコーン膜透過パラメータを算出し、ヒト皮膚のそれらと比較・評価した。

第1節 実験方法

1. 実験材料

アミノピリン (AMP) とアンチピリン (ANP)、安息香酸 (BA)、カフェイン (CF)、リドカイン塩酸塩 (LiD)、*p*-アミノ安息香酸メチル (M-PABA)、*p*-アミノ安息香酸エチル (E-PABA)、*p*-アミノ安息香酸プロピル (P-PABA)、*p*-アミノ安息香酸ブチル (B-PABA)、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル (MP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル (EP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸プロピル (PP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸ブチル (BP)、およびエステラーゼ阻害剤であるジイソプロピルフルオリン酸 (DFP) は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本)、またフルルビプロフェン (FP) は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。Table 1 に本実験で用いた各モデル化合物の分子量と $\log K_{ow}$ をまとめて示す。厚さ 545 μm のヒト腹部皮膚 (白人女性、60 歳) は株式会社ケー・エー・シー (京都、日本) を介して BIOPREDIC International (Rennes, France) から購入した。ヒト切除皮膚はヒト組織由来製品に対するケー・エー・シー倫理委員会の承諾を得たものを使用した。なお、シリコーン膜は厚さ 75 μm のものをリンテック株式会社 (埼玉、日本) から譲り受けた。その他の試薬は HPLC グレードのものをそれ以上精製することなく使用した。

2. 溶解度測定

過剰量の各モデル化合物 (ANP、AMP、CF、BA、LiD、M-PABA、E-PABA、P-PABA、B-PABA、MP、EP、PP、BP、FP) を精製水に加えた。得られた懸濁溶液を 32°C で 48 時間攪拌後、シリンジとフィルター (25 mm PVDF filter media device、0.45 μm pore size、Millipore) を用いてろ過を行った^{31,32)}。得られたろ液

を希釈し、UPLC を用いて定量を行い、溶解度とした。

Table 1 Physicochemical properties of the compounds used in the present study

No.	Compound	MW	$\log K_{o/w}$	Solubility mg/g
1	ANP	188.2	-1.51	746.1
2	LiD(pH5.0)	270.8	-0.90	22.37
3	CF	194.2	-0.12	28.87
4	AMP	231.3	1.10	53.83
5	M-PABA	151.6	1.38	1.980
6	LiD(pH10.0)	234.3	1.40	22.37
7	BA	122.1	1.41	3.779
8	E-PABA	165.1	1.89	1.164
9	MP	152.2	1.93	2.936
10	EP	166.2	2.27	0.9889
11	P-PABA	179.2	2.43	0.4997
12	B-PABA	193.2	2.70	0.1721
13	PP	180.2	2.81	0.3446
14	BP	194.2	3.53	0.2031
15	FP	244.3	3.86	0.04844

MW: molecular weight.

3. 膜透過試験

シリコーン膜

有効透過面積 0.636 cm^2 の 2 チャンバー横型拡散セルにシリコーン膜をセットし、各モデル化合物の懸濁溶液からの透過量を測定した。レシーバー溶液 (5.5 mL) には、LiD を除いて全て pH7.4 の PBS を使用した。LiD(pH5.0) では pH5.0 のクエン酸緩衝液、LiD(pH10.0) では pH10.0 の炭酸緩衝液を用いた。各溶液はスターラーを用いて攪拌し、 32°C に保って試験を実施した。1、2、3、4、5、10、20、30、40、60 分後にレシーバー側から 1.0 mL を取り、そして新鮮な緩衝液をレシーバーに同一量加えることで体積を一定に保った。レシーバー溶液中の各モデル化合物濃度は UPLC を用いて定量し、単位面積あたりのシリコーン膜累積透過量を計算した。

ヒト皮膚

凍結状態のヒト皮膚を室温に解凍し、有効透過面積 1.77 cm^2 のフランツ型拡散セルに装着した。エステル化合物の皮膚透過試験を実施する前には、皮膚を PBS で水和した後、代謝を妨げるためにレシーバー溶液に $2.7 \mu\text{mol/mL}$ の DFP リン酸緩衝液 (6 mL) を 11 時間適用した。パラベンやその他の皮膚透過に DFP の存在が影響を与えないことはすでに報告されている^{33, 34)}。他の化合物では、適切な緩衝液を用いて 32°C で 12 時間皮膚を水和させた後、透過実験を行った。 $0.54 \mu\text{mol/mL}$ の DFP リン酸緩衝液または緩衝液単独をレシーバー側へ、緩衝液中の透過物質溶液をドナー側に適用し、透過実験を開始した。レシーバー側から一定量 ($500 \mu\text{L}$) を取り出し、DFP 入りの緩衝液または緩衝液のみを同量、体積を一定に保つため補充した。その他の手順は、シリコーン膜で記載した方法に従って実施した。

4. UPLC 分析

各モデル薬物のレシーバー液中濃度は UPLC を用いて決定した。UPLC のシステムはポンプ (LC-30ADVP、Shimadzu、Kyoto、Japan) と UV-VIS 検出器 (SPD-20A、Shimadzu)、解析ソフトウェア (Labsolutions、Shimadzu)、システムコントローラー (CBM-20A、Shimadzu)、オートインジェクター (SIL-30AC、Shimadzu) 及びカラムオープン (CTO-20A、Shimadzu) からなる。LiD 用のカラムは Unison UK-C18 (Imtakt、Kyoto、Japan)、MP、EP、PP、BP、AMP、ANP、CF、BA、FP 用のカラムは Sunniest C18-HT (ChromaNik Technologies、Osaka、Japan)、M-PABA、E-PABA、P-PABA、B-PABA 用のカラムは CAPCELL CORE C18 (Shiseido、Tokyo、Japan) を使用し、カラム温度は 40°C に保った。各モデル化合物の移動相と流速、検出波長は Table 2 にまとめた。

5. 統計解析

値は平均値 ± 標準偏差で示す。ヒト皮膚とシリコーン膜透過パラメータはピアソンの積率相関を用いて評価した。全ての評価において、危険率 5%以下のものを有意とした。

Table 2 UPLC conditions for the analysis of model compounds

Compound	Mobile phase	Flow rate (mL/min)	Detection (nm)
LiD	0.1% phosphoric acid: acetonitrile (80:20)	0.45	225
MP	10 mM sodium acetate		
EP	(pH 4.8 by acetic acid):acetonitrile	0.20	230
PP	(80:20) →(20:80)		
BP			
CF			
BA	10 mM sodium acetate		
ANP	(pH 4.8 by acetic acid): acetonitrile	0.45	254
AMP	(80:20) →(20:80)		
FP			
M-PABA	20 mM sodium acetate		
E-PABA	(pH 4.6 by acetic acid):acetonitrile	0.50	290
P-PABA	(60:40)		
B-PABA			

第2節 理論

1. 膜透過パラメータの算出

各モデル化合物のシリコーン膜およびヒト皮膚の透過係数 (P) と拡散パラメータ (DL^{-2})、分配パラメータ (KL) などの透過パラメータは、時間に対するモデル化合物の累積膜透過量から次式を用いて算出した³⁵⁾。

$$Flux = \frac{C_v KD}{L} = PC_v$$

$$DL^{-2} = \frac{1}{6T_{lag}}$$

$$KL = 6T_{lag}P$$

ここで C_v は適用化合物の基剤中初期濃度である。ラグタイム (T_{lag}) は、化合物の膜透過プロファイルにおける定常状態時の傾きと時間軸 (x 軸) の交点から算出した。

第3節 結果

1. 各モデル化合物のシリコーン膜およびヒト皮膚透過性

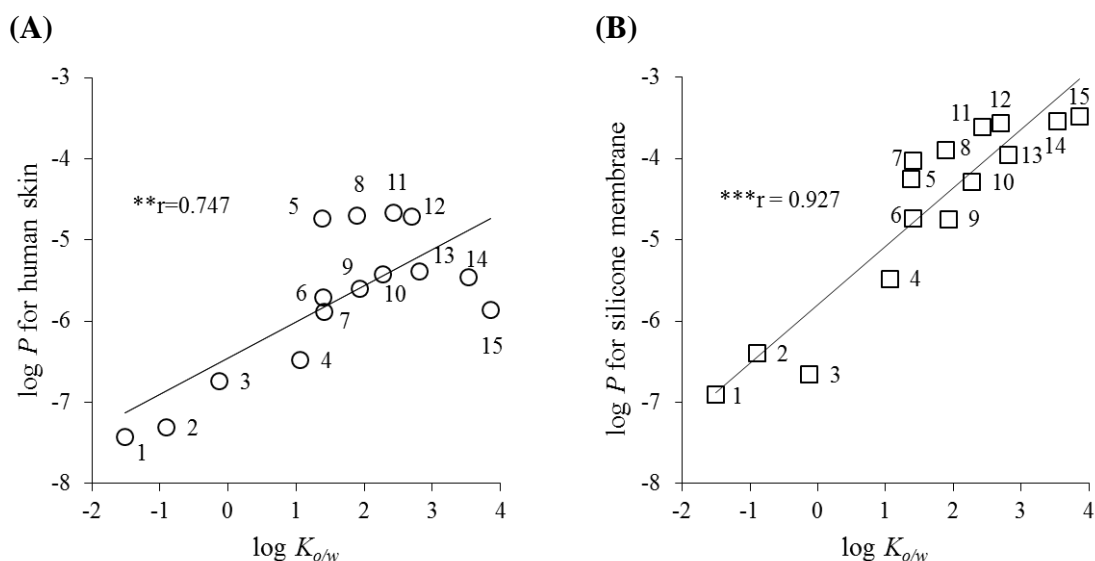


Fig. 1. Relationships between $\log K_{o/w}$ and $\log P$ of the applied chemical compounds for human skin (A) and silicone membrane (B).

Pearson's correlation coefficient showed significance. $**p < 0.01$. $***p < 0.001$. $K_{o/w}$, octanol-water coefficient; P , permeability coefficient.

Fig. 1A に、各モデル化合物の $\log K_{o/w}$ とヒト皮膚透過係数 $\log P_{human}$ の関係を示す。ヒト皮膚では、 $\log K_{o/w}$ が 1.0 (AMP) から 2.8 (PP) の範囲で親油性が高くなるにつれて $\log P_{human}$ が高くなる傾向が見られた。これらの関係は直線回帰よりもシグモイド様の曲線関係がみられた。これに対し、シリコーン膜透過係数 $\log P_{silicone}$ は $\log K_{o/w}$ に対して有意な線形相関関係 ($\log P_{silicone} = 0.721 \times \log K_{o/w} - 5.80$; $r = 0.927$) がみられた (Fig. 1B)。

各モデル化合物のシリコーン膜透過係数 $P_{silicone}$ とヒト皮膚透過係数 P_{human} の値を Table 3 に示す。試験したモデル化合物の中では、FP、BP のシリコーン膜透過係数が高い値を示した。これに対して、ヒト皮膚では B-PABA、P-PABA、E-PABA、M-PABA 等の PABA 類において高い透過係数が得られた。また、シリコーン膜において低い透過係数を示したのは、LiD(pH5.0)、ANP、CF であった。この結果は、ヒト皮膚においても同様であった。親水性の化合物である CF ではシリコーン膜とヒト皮膚において透過係数は類似していた。これに対して、両親媒性の化合物である AMP や P-PABA のシリコーン膜透過係数の値は、ヒト皮膚の値よりも約 10 倍高かった。さらに、親油性化合物である BP ではシリコーン膜透過係数の値は、ヒト皮膚の値よりも約 100 倍高かった。

Table 3 Permeability coefficients of model compounds through a silicone membrane and human skin

No.	Compounds	$P_{silicone} \text{ (cm/s)} \times 10^{-6}$	$P_{human} \text{ (cm/s)} \times 10^{-6}$
1	ANP	0.13 ± 0.02	0.04 ± 0.00^a
2	LiD(pH5.0)	0.40 ± 0.02	0.05 ± 0.02
3	CF	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.02
4	AMP	3.32 ± 0.17	0.33 ± 0.02
5	M-PABA	56.0 ± 8.20	18.4 ± 0.83
6	LID(pH10.0)	18.4 ± 3.28	1.97 ± 0.15
7	BA	95.8 ± 14.6	1.29 ± 0.10^a
8	E-PABA	128.0 ± 25.5	20.1 ± 2.24
9	MP	18.0 ± 1.64	2.49 ± 0.03
10	EP	51.4 ± 3.33	3.86 ± 0.49
11	P-PABA	252.0 ± 82.4	23.2 ± 3.03
12	B-PABA	274.0 ± 29.7	20.1 ± 3.02
13	PP	110.0 ± 7.41	4.10 ± 0.15
14	BP	289.0 ± 61.9	3.54 ± 0.18
15	FP	333.3 ± 43.2	1.39 ± 0.00^a

^aData from Watanabe *et al.* ⁹⁾

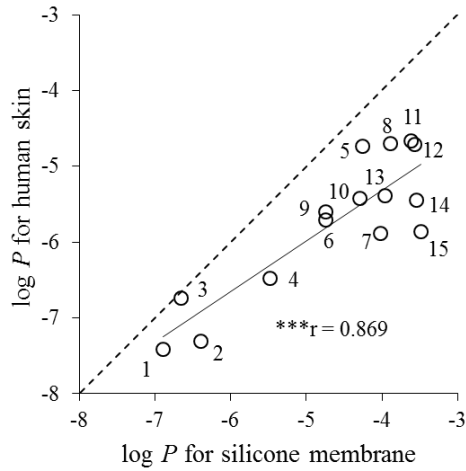


Fig. 2. Relationships between log P values in human skin and silicone membrane.

A dashed line shows a relationship with a 1:1 correlation. Pearson's correlation coefficient showed significance. *** $p < 0.001$. P , permeability coefficient

Fig. 2 に、各モデル化合物のシリコーン膜透過係数とヒト皮膚透過係数との関係を示す。シリコーン膜透過係数とヒト皮膚透過係数とは有意な線形相関がみられた ($r = 0.869$)。しかしながら、線形回帰式は 1:1 の関係からずれ、 $\log P_{human} = 0.670 \times \log P_{silicone} - 2.63$ となり、シリコーン膜 $\log P$ の方が、ヒト皮膚 $\log P$ よりも大きいことがわかった。また、親油性の高い薬物の $\log P$ は回帰式からのずれが大きかった。

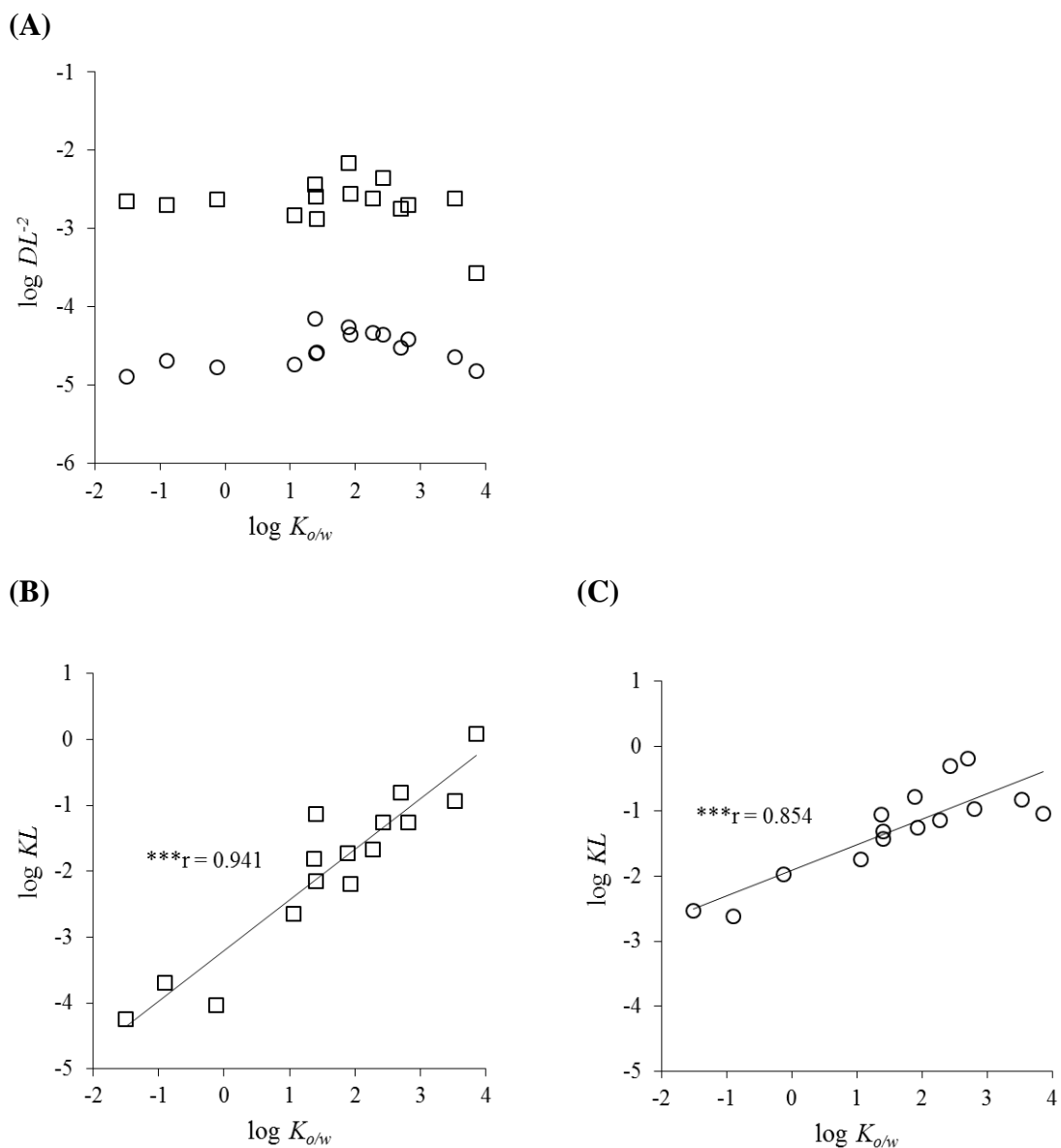


Fig. 3. Relationships between $\log K_{o/w}$ and $\log DL^{-2}$ (A) and those between $\log K_{o/w}$ and $\log KL$ for silicone membrane (B) and human skin (C) permeation of the model compounds.

Symbols: silicone membrane (\square) and excised human skin (\circ). DL^{-2} , diffusion parameter; KL , partition parameter; $K_{o/w}$, octanol-water coefficient

Fig. 3A にモデル化合物の $\log K_{o/w}$ とシリコーン膜およびヒト皮膚の拡散パラメータ (DL^{-2}) の関係を示す。ヒト皮膚 $\log DL^{-2}$ はモデル化合物の $\log K_{o/w}$ に依存せず、 -4.90 から -3.69 の一定値を示した。また、シリコーン膜の DL^{-2} もモデル化合物の $\log K_{o/w}$ に依存せず、 $\log DL^{-2}$ は -3.50 から -2.10 の一定値を示した。しかし、ヒト皮膚の DL^{-2} はシリコーン膜の DL^{-2} よりも $1/25 \sim 1/30$ 程度小さかった。

Fig. 3B と 3C にモデル化合物の $\log K_{o/w}$ とシリコーン膜およびヒト皮膚の分配パラメータ (KL) の関係を示す。シリコーン膜およびヒト皮膚の KL は透過係数と同様の傾向を示した。すなわち、シリコーン膜 $\log KL$ は $\log K_{o/w}$ に対して有意な線形相関 ($\log KL_{silicone} = 0.941 \times \log K_{o/w} - 3.21$; $r = 0.941$) がみられたが、ヒト皮膚では $\log K_{o/w}$ に対して $\log KL$ が高くなる傾向が見られたものの、 $\log K_{o/w}$ に対するヒト皮膚 $\log KL$ はシグモイド様の曲線がみられた。

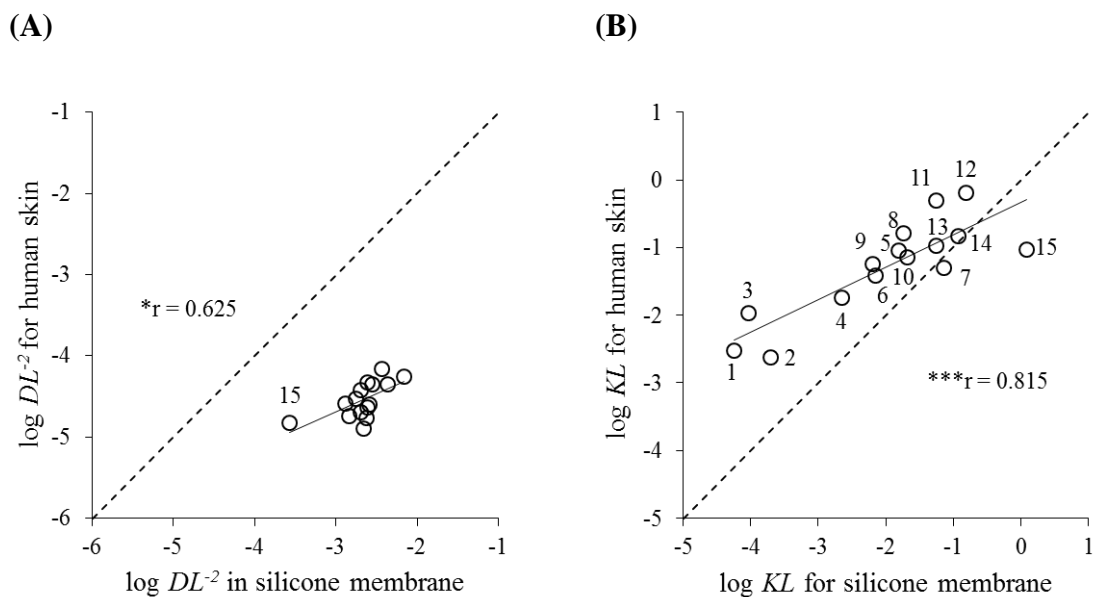


Fig. 4. Relationships between $\log DL^{-2}$ (A) and those between $\log KL$ (B) in human skin and the silicone membrane.

A dashed line shows a relationship with a 1:1 correlation. Pearson's correlation coefficient showed significance. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$. DL^{-2} , diffusion parameter; KL , partition parameter

Fig. 4A に各モデル化合物のシリコン膜拡散パラメータとヒト皮膚拡散パラメータとの関係を示す。シリコン膜 $\log DL^{-2}$ は、ヒト皮膚 $\log DL^{-2}$ と有意な線形相関 ($r = 0.625$) が得られたが、1 : 1 の関係からずれ、また親油性の高い FP を除き、モデル化合物のシリコン膜拡散パラメータはヒト皮膚と比較して、約 2 オーダー高い値を示した。

Fig. 4B に各モデル化合物のシリコン膜分配パラメータとヒト皮膚分配パラメータとの関係を示す。シリコン膜 $\log KL$ は、ヒト皮膚 $\log KL$ と有意な線形相関 ($r = 0.815$) がみられた。しかしながら、線形回帰式は $\log KL_{human} = 0.424 \times \log KL_{silicone} - 0.396$ となり、透過係数と同様に、ヒト皮膚 $\log KL$ に対するシリコー

ン膜 $\log KL$ の比率は、モデル化合物に応じて異なることが示された。すなわち、今回試験したモデル化合物の中でシリコーン膜分配パラメータが低かった化合物 ANP、CF では、ヒト皮膚と比較して、その値が約 100 倍低かった。また、シリコーン膜分配パラメータが高かった B-PABA ではシリコーン膜分配パラメータの値が約 10 倍低く、BP では同等、FP では約 10 倍高い値を示した。

第4節 考察

皮膚透過係数や *Flux* は皮膚局所に適用された薬物の血中濃度を見積もるパラメータとして有用である。一方、化粧品は主に皮膚への局所的な効果を期待しており、故に、*in vitro* 皮膚透過試験と同様、局所に適用された化合物の皮膚中濃度は、最適な製剤を開発するために有用である。Sugibayashi らや Hatanaka らは、皮膚透過プロファイルから得られた透過係数や分配係数を使用して、定常状態時における皮膚中濃度が計算できることを報告している^{21,36)}。したがって、シリコーン膜透過性から同様の情報が得られれば、シリコーン膜から各化合物の皮膚中濃度を予測できる。しかしながら、シリコーン膜透過性もヒト皮膚と同様に有用であるかはまだ明らかになっていない。このような背景から、本研究ではヒト皮膚とシリコーン膜透過性の DL^2 と KL の違いと相同性を比較・評価した。

これまで、3次元培養ヒト皮膚モデル⁹⁻¹¹⁾や PAMPA¹⁶⁻¹⁸⁾などを用いた化学物質の透過データとヒト皮膚等を介した透過データとの相関評価が行われてきた。一方、化学物質の透過試験の代替膜として最も古くから利用されているのはシリコーン膜である¹⁹⁾。 $\log K_{ow}$ が 1.23 (ニコチン) から 2.59 (4-ブロモフェノール)、分子量が 94.11 (フェノール) から 234.40 (リドカイン) の 7 種類のモデル化合物を用いて、ヒト皮膚透過係数とシリコーン膜透過係数の相関が初めて報告されたのは 2002 年になってからであった²³⁾。その際、シリコーン膜透過係数 $P_{silicone}$ (cm/h) はヒト皮膚透過係数 $P_{epidermis}$ を用いて次の式 $\log P_{silicone} = 1.15 (\pm 0.36) \times \log P_{epidermis} + 1.29 (\pm 0.58)$ で表された。

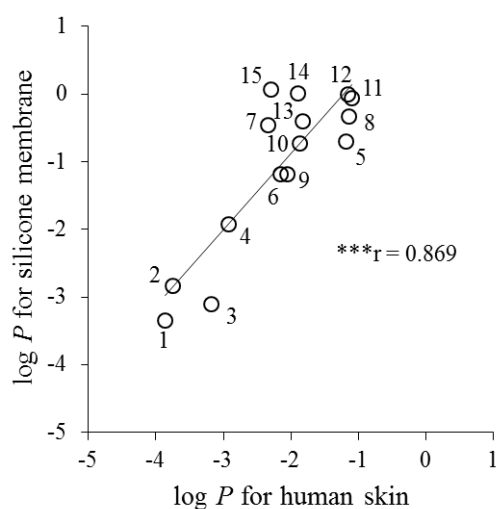


Fig. 5. Relationships between log P (cm/h) values for human skin and the silicone membrane.

Pearson's correlation coefficient showed significance. *** $p < 0.001$. P , permeability coefficient

Fig. 5 に Fig.2 の横軸と縦軸を入れ替えたシリコーン膜透過係数 $P_{silicone}$ (cm/h) とヒト皮膚透過係数 P_{human} (cm/h) の関係を示す。線形回帰式は、 $\log P_{silicone} = 1.13 \times \log P_{human} + 1.38$ であった。今回 $\log K_{o/w}$ が -1.51 (アンチピリン) から 3.86 (フルルビプロフェン)、分子量は 122.12 (安息香酸) から 270.8 (リドカイン塩酸塩) の 15 種類のモデル化合物を用いて試験を行ったが、以前の報告²³⁾と同様の線形相関式が得られた。一方で、親水性及び親油性の高い化合物は線形回帰式から外れていた。

ヒト皮膚や動物皮膚との相関性を検討するために、透過係数や拡散パラメータ、分配パラメータなどの透過パラメータを用いて評価された代替膜として 3 次元培養ヒト皮膚モデルである TESTSKIN LSE-high や Epiderm などがある^{9,10)}。TESTSKIN LSE-high の $\log P$ はヒトやヘアレスラット皮膚と比較して 1 オーダー高い値を示すと報告されている。また TESTSKIN とヒト皮膚、ヘアレスラット

皮膚の $\log KL$ はほとんど同じであり、 $\log DL^2$ では、TESTSKIN がヒトとヘアレスラット皮膚と比較し 1 オーダー高いことが明らかとなっている。すなわち、TESTSKIN はヒトおよびヘアレスラット皮膚と比較して、分配性は変化せず膜中の拡散性のみが高くなっており、その結果が皮膚透過性速度の指標である $\log P$ の増加に至ったと考えられている。また、TESTSKIN の $\log P$ と $\log K_{o/w}$ の関係はヒトおよびヘアレスラット皮膚と同様なパターンを示している⁹⁾。

これに対し、シリコーン膜の透過係数はヒト皮膚と相関はみられるものの、極性が異なる化合物間でシリコーン膜とヒト皮膚透過係数の関係は異なっていた (Fig. 2)。Flynn は分子量と $\log K_{o/w}$ を用いてヒト皮膚透過係数を予測するアルゴリズムを提案している³⁷⁾。例えば、分子量 150 以上の場合、 $\log K_{o/w}$ が 0.5 未満であれば $\log P$ (cm/h) は -5、3.5 を超えていれば $\log P$ は -1.5、0.5 以上 3.5 以下であれば $\log P = \log K_{o/w} - 5.5$ としている。このことはつまり、モデル化合物の分子量が 150 以上で $\log K_{o/w}$ が 0.5 以上 3.5 以下であれば、 $\log K_{o/w}$ の値が高くなるにつれて $\log P$ の値も高くなることを意味している。

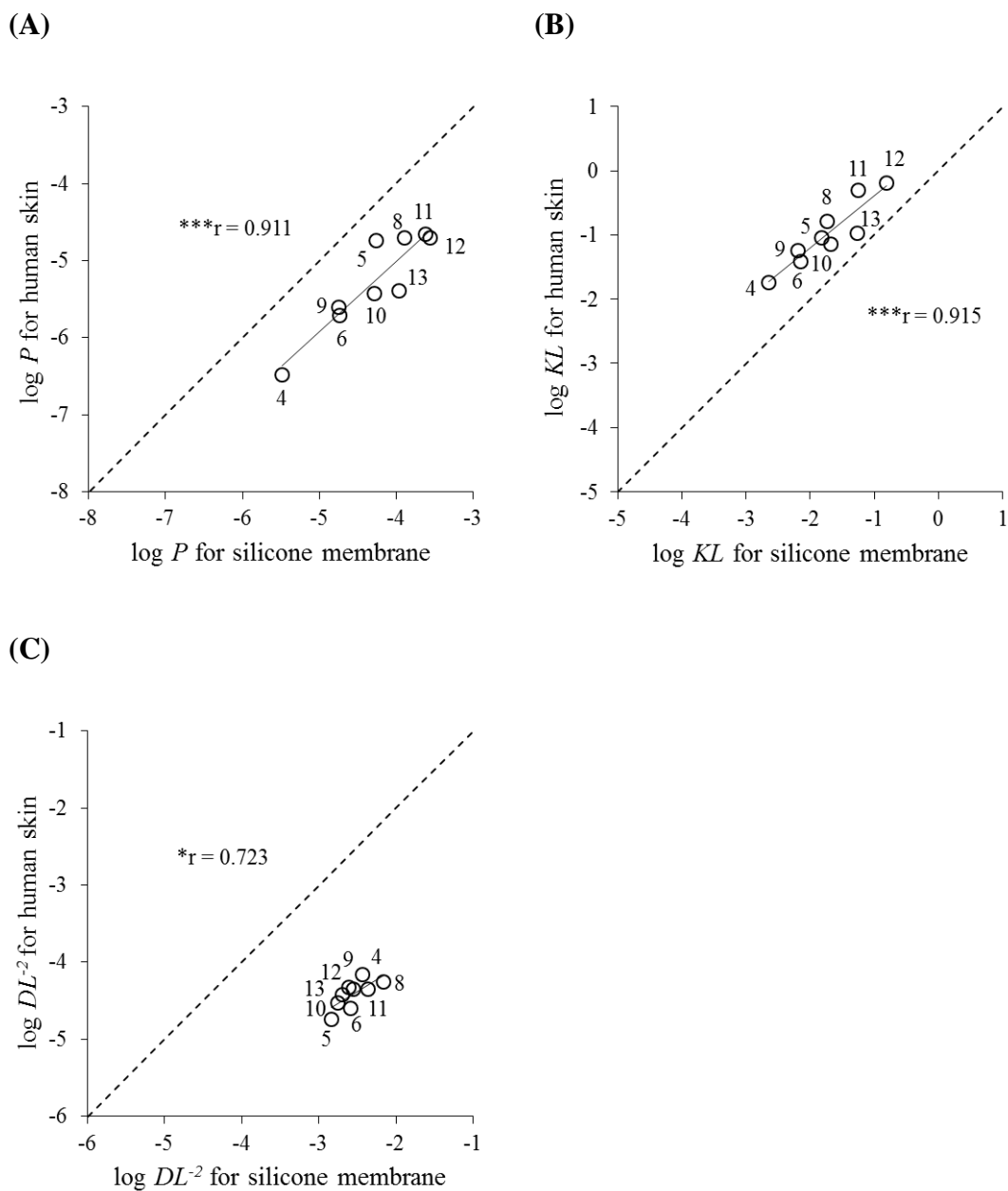


Fig. 6. Relationships between $\log P$ (A), $\log KL$ (B) and $\log DL^{-2}$ (C) in human skin and the silicone membrane.

Model compounds with MWs > 150 and $0.5 \leq \log K_{o/w} \leq 3.5$. A dashed line shows a relationship with a 1:1 correlation. Pearson's correlation coefficient showed significance. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$. DL^{-2} , diffusion parameter; KL , partition parameter; $K_{o/w}$, octanol-water coefficient; MW, molecular weight; P , permeability coefficient

そこで、今回使用したモデル化合物のうち、 $\log K_{o/w}$ が 0.5 以上 3.5 以下の範囲内にあるものだけを用いてシリコーン膜とヒト皮膚との透過係数、分配パラメータ、拡散パラメータの関係を評価した。その結果を Fig. 6 に示す。図から明らかのようにシリコーン膜とヒト皮膚の透過係数と分配パラメータ間には有意な線形相関 ($r = 0.911, 0.915$) がみられた。また、それぞれの線形回帰式は、 $\log P_{human} = 0.915 \cdot \log P_{silicone} - 1.35$ と $\log KL_{human} = 0.813 \cdot \log KL_{silicone} - 0.421$ であり、それぞれの回帰式の傾きは 1 に近づいた。このことから、分子量が 151.6 から 244.3 の範囲であり、また $\log K_{o/w}$ が 0.5 以上 3.5 以下の範囲であれば、ヒト皮膚と比較してシリコーン膜透過係数は約 10 倍、分配パラメータは約 1/10 倍としておおまかに予測できることがわかった。拡散パラメータも狭い範囲に収約されているものの、 $\log DL_{human}^{-2} = 0.619 \cdot \log DL_{silicone}^{-2} - 2.83$ ($r = 0.723$) となっており、ある程度は予測できると思われた。

一方、この範囲外であった親水性のモデル化合物であるアンチピリンやカフェインのシリコーン膜透過係数はヒト皮膚透過係数と類似し、それらのシリコーン膜分配パラメータはヒト皮膚の約 1/100 倍、拡散パラメータはヒト皮膚の約 100 倍であった。このことから、シリコーン膜はヒト皮膚のように毛穴や汗腺を有していないため、親水性のモデル化合物の分配性は低下したが、シリコーン膜中の化合物の拡散性は高いためにその積である透過係数は類似したと考えられる。

本章では、シリコーン膜透過係数と拡散パラメータ、分配パラメータを用いてシリコーン膜透過特性とヒト皮膚透過特性の関係を調べた。これまでの報告通り、シリコーン膜透過性とヒト皮膚透過性はある程度相関を示した。本検討から、用いたモデル化合物の極性により、ヒト皮膚透過性との関係が大きく変化する事が明らかとなった。Moss らは、シリコーン膜透過性がヒト皮膚透過

性とは本質的に異なると報告している^{26, 27)}。皮膚は親油性の性質を示す角層と親水性の性質を示す生きた表皮・真皮からなり、毛穴や汗腺などの付属器官も有した複雑な膜である。これに対してシリコーン膜はほぼ均一な一枚膜と仮定できるため、実験条件や適用する薬物の物性によっては、その透過性に違いが生じると考えられた。しかし、このような実験条件的な制約を十分考慮した上であれば、シリコーン膜はほぼ均一な一枚膜であるため、ヒトや動物皮膚と比較し、種差や個体差がなく、角層に作用する製剤の影響を正確に検討するのに有効であると考えられた。さらに、今回の検討からシリコーン膜の拡散パラメータはほとんどの化合物においてヒト皮膚より約 100 倍高い値であったことから、より短時間で透過性を評価できることも明らかとなった。このことから、厚さ 75 μm 程度のシリコーン膜は数多くの基剤の影響を評価するハイスループットスクリーニングに有用であると考えられた。しかし、上述のとおり前臨床の段階でヒト皮膚代替材料としてシリコーン膜を使用するときは、使用するモデル化合物の極性、すなわち $\log K_{ow}$ が 0.5 以上 3.5 以下であることを考慮する必要がある。

第5節 小括

分子量が 122 から 271、 $\log K_{ow}$ が -1.5 から 3.9 までの 15 種類のモデル化合物を用いて、ヒト皮膚と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各種皮膚透過パラメータを算出し、比較・評価した。その結果、分子量が 151.6 から 244.3 の範囲で、 $\log K_{ow}$ が 0.5 以上 3.5 以下の化合物では、シリコーン膜とヒト皮膚の透過パラメータ間に高い相関が示された。このことから、この範囲の薬物が対象であれば、前臨床段階で化粧品や皮膚適用製剤から薬物や化合物の透過性の予測にシリコーン膜を使用することは可能であると考えられた。しかし、この範囲外の薬物の場合、モデル化合物の極性によって、ヒト皮膚透過性が過大もしくは過小に予測される場合があることに注意する必要があることが併せて明らかとなった。

第 2 章

皮膚透過代替膜としての Strat-M[®] の有用性評価³⁸⁾

前章では、ヒト皮膚透過性を模倣する人工膜として、シリコーン膜の評価を行った。シリコーン膜はある範囲の薬物の透過性を予測する上では有用であったが、正確な予測ができない薬物もあることから、製品開発のために用いる材料としては理想的ではない。以下に改めて、製品開発という視点でヒト皮膚代替膜の必要性について論じる。

過去 20 年間で、35 種類以上の TDDSs 製剤が米国、欧州、日本で承認されている³⁹⁾。*In vitro* 皮膚透過試験は新しい TDDSs 製剤を開発するのに有用であると考えられているが、近年ヒト皮膚や動物皮膚を用いない評価法が必要とされてきている。すでに、Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) や Skin-phospholipid vesicle-based permeation assay (PVPA) で使用される人工膜が、経口投与に適した薬物のスクリーニングの試験期間短縮のために近年使用されている⁴⁰⁻⁴²⁾。皮膚透過性は他の粘膜透過性よりもかなり低いため、莫大な化合物ライブラリーからの候補化合物の選択は時間を費やす。それゆえに、人工膜や 3 次元培養ヒト皮膚モデルが TDDSs 製剤を開発するためのヒトや動物皮膚の代替膜として使用されてきた経緯がある^{10, 21, 22, 43)}。今までの皮膚や膜透過性の検討では、代替膜やヒト、動物皮膚に対する化合物の透過係数 P や $Flux$ を指標に試験されていた^{3, 10, 44)}。Sinko らは、角層に含まれる脂肪酸やセラミドを導入した PAMPA について報告している¹⁸⁾。この PAMPA はモデル化合物に対するヒト皮膚と合成膜の透過係数が 1 対 1 の相関ではなかったが、おおよそのヒト皮膚透過性を予測するのに用いることができた。

In silico アプローチは化合物の物理化学的特性値から、透過係数 P を予測する

ために用いられている^{4,7,45)}。予測された P 値は、皮膚に適用された化合物の安全性や有用性の評価や理解をより容易にする。したがって、代替膜とヒト・動物皮膚の溶解度パラメータや親水・親油特性間の近似性は、様々な製剤や適用条件（有限容量や無限容量）で良い予測を構築するのに必要となる。

Strat-M[®]は最近発売され、商業的に存在している、皮膚を模倣した多層人工膜である。この膜はスルホン酸のポリエーテルから出来ている。しかしながら、皮膚透過性を予測する代替膜としての可能性はまだ十分評価されていない。

そこで本研究では、Strat-M[®]を介する水溶液からの物性の異なる化合物の透過性を調べ、透過係数 P 、拡散パラメータ DL^2 、分配パラメータ KL をヒト皮膚のそれと比較・評価した。

第 1 節 実験方法

1. 実験材料

MP と EP、PP、BP、P-PABA、B-PABA、一硝酸イソソルビド (ISMN) は東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入した。LiD はシグマアルドリッチジャパン合同株式会社 (東京、日本) から、E-PABA は関東化学から購入した。AMP と ANP、M-PABA、DFP は第 1 編と同様のものを用いた。二硝酸イソソルビド (ISDN) は東光薬品工業株式会社 (東京、日本) より贈与された。これら化合物の分子量 (MW) とオクタノール/水分配係数 ($\log K_{ow}$) を Table 4 に示す。Strat-M[®] はメルクミリポア社 (Billerica, MA, USA) から購入した。その他の試薬は市販の特級品または HPLC 用を精製せずにそのまま用いた。

2. 走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いた Strat-M の観察

Strat-M[®] を細断後、観測部位に金蒸着を行い、高真空条件下で走査型電子顕微鏡 SEM (S-3000N、日本電子株式会社、東京、日本) を用いて観察した。また、得られた SEM 画像より画像解析ソフト DP2-BSW (オリンパス株式会社、東京、日本) を用いて Strat-M[®] の厚み (異なる 10 箇所 (箇所) の厚みの平均値) を求めた。さらに、Strat-M[®] を 2% 四酸化オスミウム溶液とエポキシ樹脂で固定し、超ミクロトームを用いて超薄切片を得た。これを 4% 酢酸ウラニルと鉛で二重染色し、透過型電子顕微鏡 TEM (JEM 1200-Ex、日本電子株式会社、東京、日本) で観察した。

Table 4 Physicochemical properties of the compounds used in the present study

No.	Compound	Abbreviation	MW	log $K_{o/w}$ *
a	Lidocaine(pH5.0)	LiD(pH5.0)	288.8	-0.90 (pH5.0)
b	Lidocaine(pH7.9)	LiD(pH7.9)		1.3 (pH7.9)
c	Lidocaine(pH10.0)	LiD(pH10.0)		1.4 (pH10)
d	Isosorbide 5-mononitrate	ISMN	191.1	-0.20
e	Caffeine	CF	194.2	-0.12
f	Aminopyrine	AMP	231.3	1.10
g	Isosorbide dinitrate	ISDN	236.1	1.20
h	Methyl paraben	MP	152.2	1.93
i	Ethyl paraben	EP	166.2	2.27
j	Propyl paraben	PP	180.2	2.81
k	Butyl paraben	BP	194.2	3.53
l	Methyl <i>p</i> -aminobenzoate	M-PABA	151.6	1.38
m	Ethyl <i>p</i> -aminobenzoate	E-PABA	165.1	1.89
n	n-Propyl <i>p</i> -aminobenzoate	P-PABA	179.2	2.43
o	n-Butyl <i>p</i> -aminobenzoate	B-PABA	193.2	2.70

pH was adjusted with pH 7.9 phosphate-buffered saline, pH 5.0 citrate-buffered saline, or pH 10.0 carbonate-buffered saline.

*Octanol/buffer partition coefficient of compounds at 32°C.

3. 膜透過試験

Strat-M[®]をフランツ拡散セル（有効透過面積、1.77 cm²）に装着し、レシーバー槽は32°Cに保った。pH 7.9 等張リン酸緩衝液（PBS）、pH 5.0 クエン酸緩衝液または pH 10.0 炭酸緩衝液に溶解させた各化合物の飽和溶液 1.0 mL をドナー側、それに対応する緩衝液 6.0 mL をレシーバー側に加えた。レシーバー溶液は実験中、スターラーを用いて攪拌した。経時的にレシーバーセルから 500 μL のレシーバー溶液をサンプリングした後、一定容量を保つために新しい緩衝液を同量戻した。レシーバー溶液の化合物濃度は HPLC を用いて定量した。ヒト皮膚の透過試験と膜透過パラメータの算出は第 1 編と同様の方法で行った。

4. 各種化学物質の定量方法

MP、EP、PP、BP、CF、AMP、ISMN、ISDN、LiD、M-PABA、E-PABA、P-PABA、B-PABA サンプルに同容量のパラベンを含むアセトニトリル溶液を加え、穏やかに攪拌した後、サンプルを 4°C、21,500 x g で 5 分間遠心分離し、上清液を HPLC に注入した。HPLC システムとして、ポンプは LC-AD10 (Shimadzu, Kyoto, Japan)、UV 検出器は SPD-6A (Shimadzu)、システムコントローラーは SCL-6B (Shimadzu)、オートインジェクターは SIL-7A (Shimadzu) を用いた。カラムは 40°C に保った LichroCART 250-4 (Merck, Darmstadt, Germany) を、移動相としては、CF の場合は 0.1% リン酸水溶液：アセトニトリル=90：10、MP、EP の場合は 0.1% リン酸水溶液：アセトニトリル=75：25、PP、BP の場合は 0.1% リン酸水溶液：アセトニトリル=55：45、AMP の場合は 5 mM 硫酸ドデシルナトリウムを含む 0.1% リン酸水溶液：アセトニトリル=50：50、ISDN の場合は水：アセトニトリル=55：45、LiD の場合は 5 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム：アセトニトリル=70：30、ISMN の場合は水：アセトニトリル=90：10 とした。流速は 1.0 mL/min に調

整した。注入量は 20 μ L とし、検出波長は、ISMN と ISDN で 220 nm、LID で 230 nm、AMP で 245 nm、CF で 254 nm、MP と EP、PP、BP で 260 nm とした。M-PABA と E-PABA、P-PABA、B-PABA の解析では勾配溶離法を用いた。まず 0.1%リン酸水溶液：アセトニトリル=70：30 を開始から 13 分まで 0.1%リン酸水溶液：アセトニトリル=50：50 となるよう直線的にアセトニトリル濃度を増やし、そこからさらに 10.5 分間維持した。流速は 1.0 mL/min とした。次のサンプルまでに直線的に初期の状態へ戻した。検出波長は 280 nm で行った。カラムは Inertsil ODS-3 (4.6 x 150 mm、5mm、GL Sciences inc.、Tokyo、Japan)を使用し、40°C に保った。

5. 統計解析

値は平均値 \pm 標準偏差で示す。ヒト皮膚と Strat-M[®]間の透過パラメータの関係性を明確にするためピアソンの相関係数を使用した。すべての評価において危険率 5%以下を有意と判定した。

第2節 結果

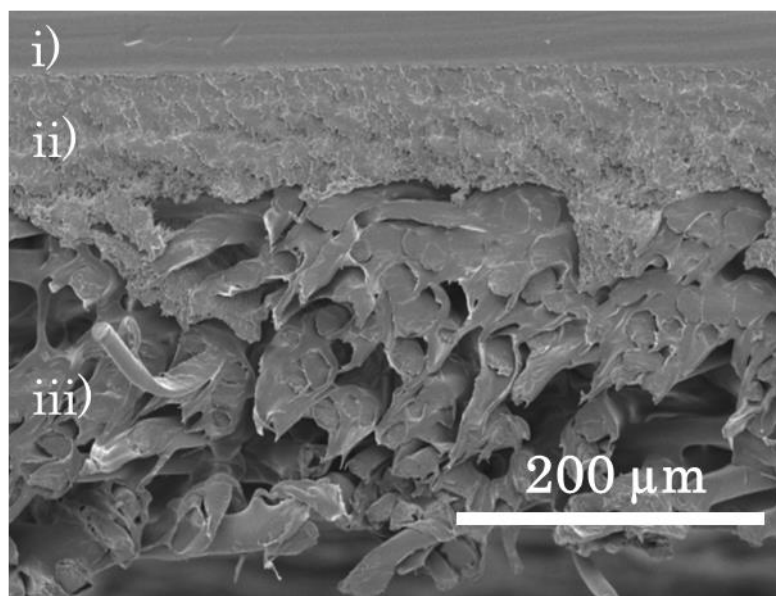


Fig. 7. Scanning electron microscopic image of a cross-section of Strat-M[®]. The image shows the first (i), second (ii), and third layer (iii) of Strat-M.

Fig. 7に Strat-M[®]の垂直断面の SEM 画像を示す。図の上側が薬物適用面であり、上から (i)、(ii)、(iii) の 3 つの層が確認された。各層の密度は異なっており、図から明らかなように膜の密度は (i) > (ii) > (iii) であった。これらの層の厚さは表面から、 $52.3 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 、 $76.7 \pm 5.07 \mu\text{m}$ 、 $196 \pm 7.37 \mu\text{m}$ であり、全層の厚みは $324.6 \pm 4.6 \mu\text{m}$ であった。

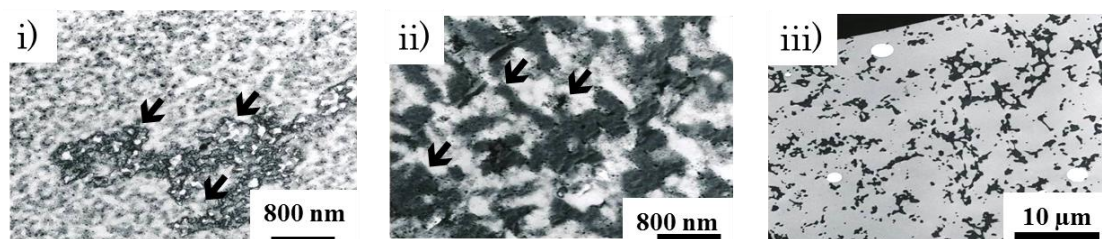


Fig. 8. Transmission scanning electron microscopic observation of a cross-section of Strat-M. The i, ii and iii mean first, second and third layer of Strat-M[®]. Lipids in the layer were stained with a black color. Arrows show the lipid region.

Fig. 8 に Strat-M[®]の (i)、(ii)、(iii) 層の TEM 画像を示す。(iii) 層には見られなかったが、(i)、(ii) 層には酢酸ウラニルと鉛による黒色染色像が観察でき、この両層には脂質の存在が示唆された。この (i)、(ii) 層目に見られた脂質は各層においてランダムに分布していた。

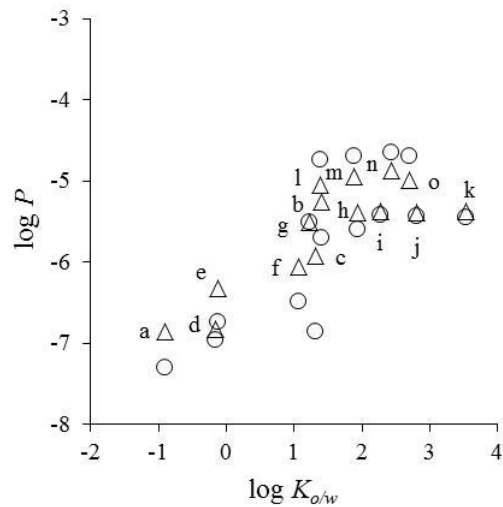


Fig. 9. Relationships between $\log K_{o/w}$ and $\log P$ of the applied chemical compounds. Symbols; Excised human skin (○) and Strat-M[®] (Δ). All results are expressed as the means (n=3).

Fig. 9 にヒト皮膚と Strat-M[®]を介した透過実験から得られた $\log P$ と $\log K_{o/w}$ の間の関係を示す。両方の膜において、適用した化合物の親油性が増加するに従って $\log P$ の増加が観察された。 $\log P$ と $\log K_{o/w}$ の間の関係は、いずれの膜もシグモイド様の曲線を示した。Table 5 に Strat-M[®]とヒト皮膚の P 値を示す。Lid (pH7.9) 以外の Strat-M[®]とヒト皮膚の P 値の違いは 3 倍以内であった。

Table 5 Permeability coefficients of model compounds through Strat-M[®] and human skin

No.	Compounds	$P_{Strat-M^{\circledR}}$ (cm/s) $\times 10^{-6}$	P_{human} (cm/s) $\times 10^{-6}$
h	MP	4.02 \pm 0.60	2.49 \pm 0.03
i	EP	4.21 \pm 0.20	3.86 \pm 0.49
j	PP	4.01 \pm 0.16	4.10 \pm 0.15
k	BP	4.24 \pm 0.34	3.54 \pm 0.18
d	ISMN	0.15 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01
f	AMP	0.87 \pm 0.25	0.33 \pm 0.02
g	ISDN	3.14 \pm 0.01	3.14 \pm 0.17
a	LiD (pH5.0)	0.14 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02
b	LiD (pH10)	5.55 \pm 0.53	1.97 \pm 0.15
c	LiD (pH7.9)	1.20 \pm 0.12	0.14 \pm 0.01
e	CF	0.47 \pm 0.07	0.18 \pm 0.02
l	M-PABA	8.95 \pm 0.26	18.4 \pm 0.83
m	E-PABA	11.25 \pm 0.41	20.1 \pm 2.24
n	P-PABA	13.55 \pm 0.58	22.3 \pm 3.03
o	B-PABA	10.14 \pm 0.53	20.1 \pm 3.02

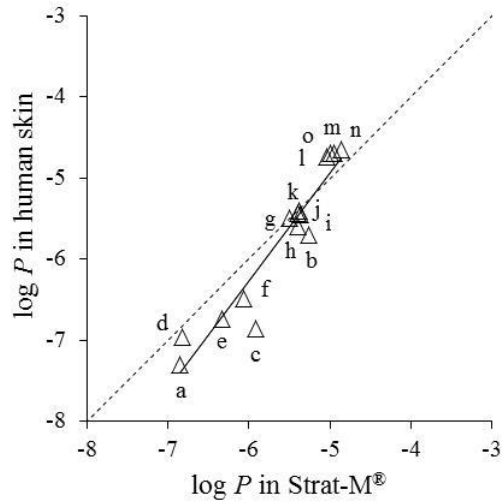


Fig. 10. Relationships between log P values of human skin and Strat-M[®]. All results are expressed as the means (n=3).

Fig. 10 にヒトと Strat-M[®]との log P 間の関係を示す。良好な相関関係 ($\log P_{human} = 1.13 \cdot \log P_{strat-M} + 0.69$, $r = 0.929$) が認められた。その関係はほぼ 1 : 1 の関係にあったが、勾配は 1.13 で 1 より大きく、より親水性で P 値が小さい薬物において $P_{human} < P_{strat-M}$ となった。

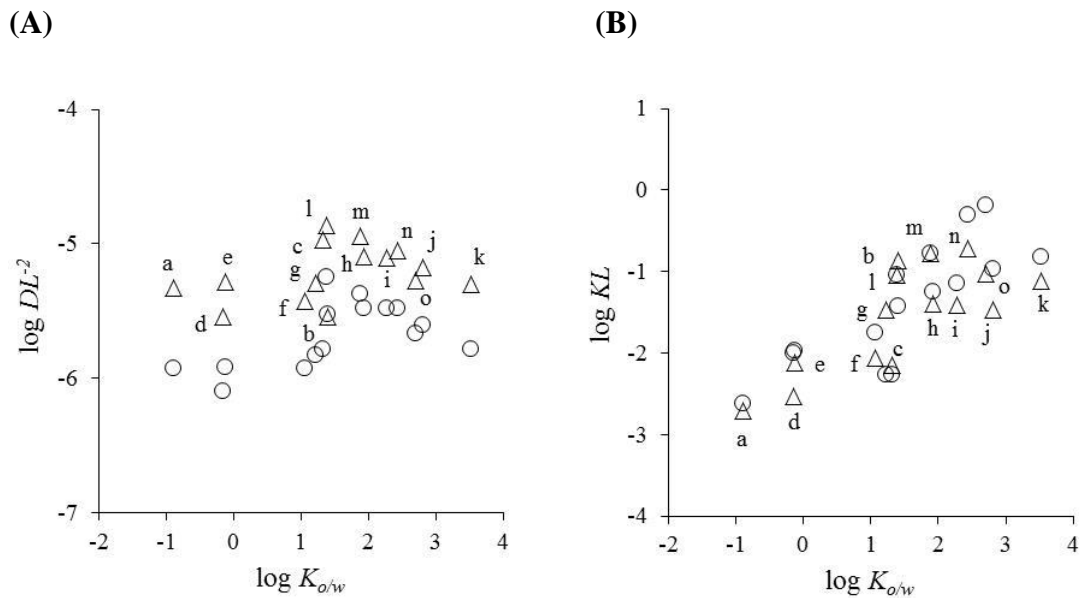


Fig. 11. Relationships between $\log K_{o/w}$ and $\log DL^{-2}$ (A), or $\log KL$ (B) of the applied chemical compounds through human skin and Strat-M[®]. Symbols; Excised human skin (\circ) and Strat-M[®] (Δ). All results are expressed as the means (n=3).

次に $\log KL$ や $\log DL^{-2}$ のような透過パラメータを用いて各膜の特性を評価した。Fig. 11A に Strat-M[®] とヒト皮膚の $\log K_{o/w}$ と $\log DL^{-2}$ との関係を示す。各膜の $\log DL^{-2}$ は化合物の $\log K_{o/w}$ に依らず、ほとんど一定の値を示したが、総じて Strat-M[®] の $\log DL^{-2}$ の方がヒト皮膚のそれよりも大きかった。Fig. 11B に Strat-M[®] とヒト皮膚の $\log K_{o/w}$ と $\log KL$ との関係を示す。Strat-M[®] とヒト皮膚の $\log KL$ のいずれも、 $\log K_{o/w}$ の増加に伴って増加し、Strat-M[®] とヒト皮膚の値は類似していた。

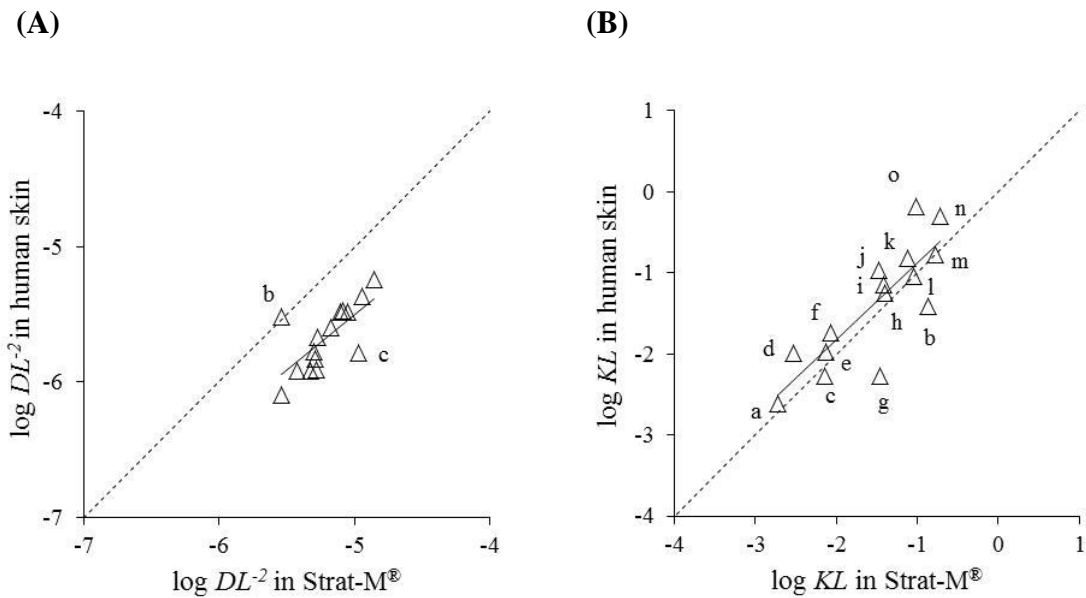


Fig. 12. Relationships in $\log DL^{-2}$ (A), or $\log KL$ (B) between Strat-M[®] and human skin. All results are expressed as the means (n=3).

Fig. 12 には Strat-M[®] とヒト皮膚の $\log KL$ または $\log DL^{-2}$ の関係を示す。いずれのパラメータも Strat-M[®] とヒト皮膚で類似していた。特に、 $\log KL$ の関係はほぼ一致した。一方、 $\log DL^{-2}$ は、LiD(pH7.9)を除き Strat-M[®] の方がわずかに大きかった。

第3節 考察

ヒトや動物切除皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過実験は局所適用された化合物の皮膚中濃度や皮膚透過プロファイルを理解するのにとても有効である。しかしながら、ヒト皮膚を使用した *in vitro* 試験は、高価、倫理的な問題、日本ではサンプルの入手が困難であることなどの制限がある。さらに、化粧品原料の有効性や安全性評価のための動物試験は欧州化粧品規制 (76/768/EEC) によって禁止されている。

Strat-M[®]はスルホン酸のポリエーテルからなり、3層構造を形成し、角層、表皮、真皮を模倣している。従って、物性の異なる化合物の透過性がヒト皮膚のそれと類似すれば前臨床での評価において、有用性は極めて高くなる。そこで本章では、Strat-M[®]を介する化合物の透過性や透過パラメータをヒト皮膚のそれと比較・評価した。

Strat-M[®]の電子顕微鏡観察の結果から、Strat-M[®]は3層構造を有しており、再表面と2層目には脂質が存在していることが明らかとなった (Fig. 7, 8)。このことから Strat-M[®]は角層と生きた表皮・真皮層の重なりを模した構造を有し、ヒト皮膚と類似した合成人工膜であると考えられた。また、化合物の $\log K_{ow}$ が増加するに従って、Strat-M[®]とヒト皮膚の $\log P$ は増加し (Fig. 9)、ヒト皮膚と Strat-M[®] の関係は 1:1 の相関関係がみられた (Fig. 10)。さらに $\log KL$ や $\log P$ は、同じ $\log K_{ow}$ の化合物において両膜間で近似しており、Strat-M[®]の性質はヒト皮膚に似ていることが示された。これらの結果から、化合物の皮膚透過性は Strat-M[®]の皮膚透過係数から予測できることが示唆された。

また、水溶性経路の存在とその透過への分子量の影響を確認するために、水溶性経路のマーカールとしてカルセイン Na (M.W.; 644.5, $\log K_{ow}$; -3.5 (at pH7.4)、

pKa; 5.5) を用いて、その透過試験を行った。ヒト皮膚では透過が見られたものの、Strat-M[®]を介した透過は8時間以上しても観察されなかった（データは示さず）。カルセイン Na の Strat-M[®]透過がみられなかった理由は大きな分子サイズに関連しているかもしれない。それゆえ、Strat-M[®]の使用に際して、適用する化合物が特に親水性であった場合、分子サイズなどの物理化学的特性を考慮すべきである。さらなる実験にて Strat-M[®]の水溶性経路の性質を明らかにしていくことが望まれる。

第4節 小括

Strat-M[®]を介した化合物の透過係数は、特に分子量：151～288、 $\log K_{o/w}$ ：-0.9～3.53の範囲でヒト皮膚とよく一致していた。したがって、Strat-M[®]はヒト皮膚を介した化合物の透過予測のためのスクリーニング試験に有用である。

第3章

シリコーン膜と Strat-M[®]の比較

本章では、第1章と第2章の結果から、両膜についてヒト皮膚透過予測に用いる部分の特性について比較した。

第1節 シリコーン膜と Strat-M[®]の予測性の比較

Fig. 13 に $\log K_{o/w}$ と $\log P_{silicone}/\log P_{human\ skin}$ または $\log P_{Strat-M}/\log P_{human\ skin}$ の関係を示す。シリコーン膜では $\log K_{o/w}$ が大きくなるにつれて $\log P_{silicone}/\log P_{human\ skin}$ は1よりも小さくなり、その平均値は0.802、変動係数は0.133であった (Fig. 13A)。また、分子量が151.6から244.3、 $\log K_{o/w}$ が0.5以上3.5以下の範囲であれば、 $\log P_{silicone}/\log P_{human\ skin}$ の平均値は0.812、変動係数は0.0634となり、予測精度の向上と値のバラつきの改善が示された (Fig. 13B)。一方、Strat-M[®]の場合、 $\log P_{Strat-M}/\log P_{human\ skin}$ の平均値は0.983、変動係数は0.0593となり、予測精度およびバラつきにおいて最も良好な結果が得られた (Fig. 13C)。しかし、 $\log K_{o/w}$ が1付近で予測精度が低いことが欠点として指摘できるかも知れない。

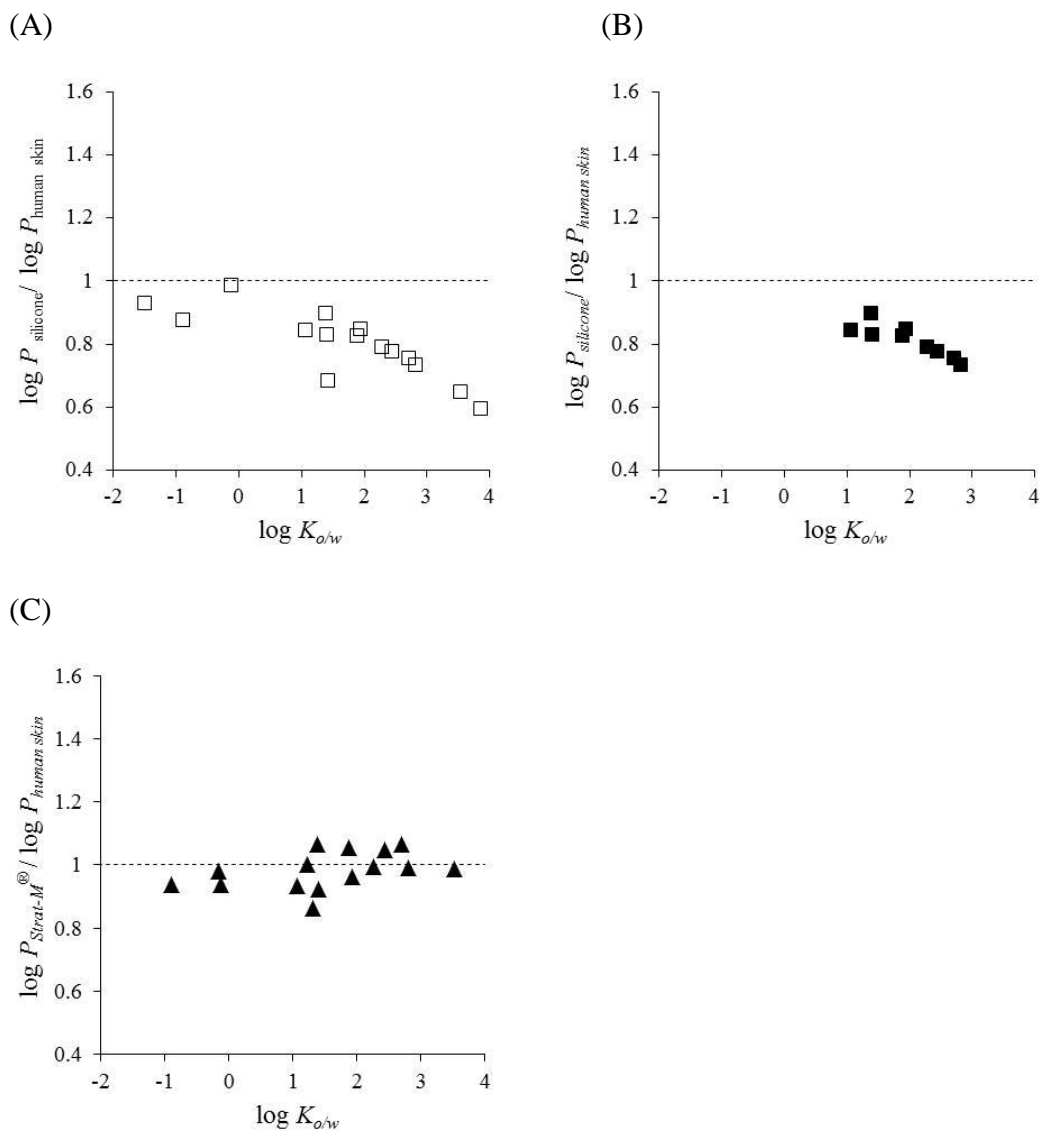


Fig. 13. (A) Relationships between $\log K_{o/w}$ and $\log P_{\text{silicone}} / \log P_{\text{human}}$ value of the applied chemical compounds, (B) Relationships between $\log K_{o/w}$ and $\log P_{\text{silicone}} / \log P_{\text{human}}$ value of the applied chemical compounds with $MW > 150$ and $0.5 \leq \log K_{o/w} \leq 3.5$, (C) Relationships between $\log K_{o/w}$ and $\log P_{\text{Strat-M}} / \log P_{\text{human}}$ value of the applied chemical compounds.

第2節 小括

第1章ではシリコーン膜、第2章では Strat-M[®]の透過特性をヒト皮膚と比較し評価した。それらの結果を踏まえ、*in vitro* 膜透過試験に使用される膜の特徴をまとめたものを Table 6 に示す。シリコーン膜は値段、安定供給、操作性に優れているが、ヒト皮膚との相関性に適用可能な薬物の物性の範囲に制限がある。一方、Strat-M[®]は値段面での課題や水溶性経路を透過する薬物への適用に関する問題があるものの、広い範囲の薬物においてヒト皮膚との相関性も良く、代替膜として有効である。

Table 6 *in vitro* 膜透過試験に使用される膜の特徴

	ヒト皮膚	ヘアレス ラット	3次元培養 皮膚モデル	シリコーン 膜	Strat-M [®]
化粧品原料 ・製品評価	◎	×	◎	◎	◎
値段	×	○	△	◎	○
安定供給	△	○	○	◎	◎
操作性	○	○	△	◎	◎
ヒト皮膚 との相関	—	◎	○	△	○
総合評価	○	△	○	○	◎

第2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⁴⁶⁾

皮膚を介したドラッグデリバリーシステムを開発するため、Fick の拡散則を用いて薬物の透過性が評価されている^{47, 48)}。Fick の第一法則に従う輸送では、膜中の物質透過速度は膜内の物質の濃度勾配と比例する。一般に皮膚透過試験用合成人工膜は、均一な拡散膜であり、ヒト皮膚角層を模して作成されている。これらはヒトや動物皮膚の代替膜として、ロット差が少なく、薬物透過メカニズムの理解を助ける重要な情報を提供する。なぜなら、理論的には、化学物質の皮膚透過性は分配と拡散という物理化学的現象によって表わすことができるからである。このため、これまでも様々な合成人工膜が皮膚透過性の評価に使用されている^{21, 22, 49)}。Maitani らはイオン性薬物の経皮吸収メカニズムを理解するために、シリコーン膜を介したジクロフェナクとその塩の透過性を比較・評価し、ジクロフェナクと同様にその塩も脂質経路を通ることを認めた⁵⁰⁾。Strat-M[®]は商業的に利用可能な、ポリエーテルスルホン酸からなる多層人工膜である⁵¹⁾。第1編の結果より、Strat-M[®]を介した透過係数や分配パラメータ、拡散パラメータはヒト皮膚を介したそれらと近似していること、一方、シリコーン膜の各パラメータは、一定の範囲の物性を有する化合物では、ヒト皮膚とよく相関することを示唆した^{12, 38)}。これまでいくつかの研究において、合成人工膜を用いた薬物の透過性に対する基剤の影響について評価されてきた^{20, 52-54)}。Twist らはメチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンに与えるアルコールの影響について評価している²⁰⁾。Dias らはモデル化合物としてカフェインと安息香酸、サリチル酸、基剤としてSP値の異なる油剤とポ

リオール類、水を用いてシリコーン膜透過試験を行い、モデル化合物の Flux や透過係数は基剤の SP 値の違いだけでは説明できないことを報告している⁵³⁾。さらに、Karadzovska らはジクロフェナクナトリウム、マンニトール、サリチル酸、テストステロンの種々基剤による Strat-M[®]を介する薬物の透過性は豚耳を介する透過性と同じであることを報告している⁴⁵⁾。

油剤は、望ましい使用感の付与（例えば皮膚へのなじみやすさ）のためや脂溶性薬物の製剤中溶解度改善のため、皮膚適用製剤成分に選択される傾向にある。すでに、インドメタシンやケトプロフェンの皮膚透過性に及ぼす脂肪酸エステル油剤の影響や非ステロイド性抗炎症薬 NSAIDS の皮膚透過性に及ぼす二塩基酸エステルの影響が報告されている⁵⁵⁻⁵⁷⁾。さらに、ハロペリドールの皮膚透過性は表面張力や濡れ性に影響を受けることや、有限用量系におけるグリチルリチン酸ステアリルのユカタンミニブタ透過量は基剤の分子量と表面張力に影響を受けること、モデル化合物の豚皮膚透過性に与える粘度の影響などの報告がある⁵⁸⁻⁶⁰⁾。これら基剤の物性値は化合物の皮膚透過性を促進する鍵となるパラメータである。一方、人工膜とヒト皮膚の透過に対する種々油性基剤の影響を網羅的に比較・評価した報告はほとんどない。また、化合物の皮膚透過性に与えるエステルの物性値の影響を明らかにするため、トリエステルやテトラエステルなど多くのエステル類を含んだ系統的な評価は実施されていない。

In silico 評価系は、局所適用された化合物の皮膚透過性を見積もるのに有用であり、すでに水溶液からの皮膚透過性を見積もりについては多くの論文で報告されている^{4, 6, 61)}。さらに、Gregoire らは水中油型エマルジョンからの皮膚透過性の *in silico* モデルの有用性について報告しているが、その研究において、化学物質の透過には製剤組成がほとんど影響を与えないこと、剤形が水中油型エマルジョンであること及び化合物は連続層（水層）から皮膚へ分配することなど、

いくつかの仮定がなされた⁶²⁾。したがって、実際の局所製剤の開発に適用する場合において、皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過実験は、現状で *in silico* 法より信頼性が高いと考えられる。

得られたデータを正しく解釈するために多数の透過実験を実施しなければいけないこと、多数の候補化合物から有望な化合物を効率的に見つける必要があること、という視点から、その解決策としてハイスループットスクリーニング法が提案されている。Karande らは約 1 cm 間隔に直径 3 mm の穴をあけ、合計 100 穴のプレートを作成し豚耳を挟むことで、一度に 100 検体の試験を実施できるハイスループットスクリーニング装置を考案している^{63,64)}。また、Karadzovska らは 96 穴フィルタープレートを改良したハイスループットスクリーニング装置について報告している⁴⁵⁾。これらの利用は、多くの異なった組成物からの特定の物質の皮膚透過性に対する各成分の影響を評価するための有効な方法である。

そこで、本研究ではモデル化合物として極性の異なる CF、AMP、BA、FP を、基剤として 25 種類のエステル油剤を使用し、有効透過径が 1 cm であり、一度に 48 サンプルの試験が可能な拡散セルアレイシステムを用いてシリコーン膜と Strat-M[®]を介するモデル化合物の透過性を評価した。そして、エステル油剤からのモデル化合物のシリコーン膜または Strat-M[®]透過量とエステル油剤の物性値との相関を評価することによって、膜透過性を高めるエステル油剤の主な特性値を調査した。

第 1 節 実験方法

1. 実験材料

AMP、BA、CF、FP は第 1 編と同様のものを使用した。基剤として使用した各種エステル油剤は化粧品グレードのものを使用した。Table 7 に本実験で用いた各モデル化合物、Table 8 に基剤として使用したエステル油剤の分子量とオクタノール/水分配係数 ($\log K_{ow}$)、ハンセンの 3 次元溶解度パラメータをまとめて示す。各モデル化合物と基剤の分子量は ChemBioDraw Ultra14.0 (PerkinElmer Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)、 $\log K_{ow}$ は EPI SuiteTM (US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA)、ハンセンの溶解度パラメータは HSPiP (version 4.0.05) の Y-MB メソッドを用いて算出した。また、溶質と溶媒との溶解度パラメータ距離 (SP Distance) は、

$$\text{SP Distance} = \sqrt{4(\delta_{d_{solvent}} - \delta_{d_{solute}})^2 + (\delta_{p_{solvent}} - \delta_{p_{solute}})^2 + (\delta_{h_{solvent}} - \delta_{h_{solute}})^2}$$

として算出した。ここで、 δ_d は分散パラメータ、 δ_p は極性パラメータ、 δ_h は水素結合パラメータである。

なお、シリコーン膜は第 1 編、Strat-M[®] は第 2 編と同様のものを使用した。その他の試薬は HPLC グレードのものをそれ以上精製することなく使用した。

Table 7 Physicochemical properties of model compounds used in the present study

	Abbreviation	M.W.	log $K_{o/w}$	HSP (MPa ^{1/2})		
				δ_d	δ_p	δ_h
Caffeine	CF	194.19	-0.12	20.0	12.7	8.3
Aminopyrine	AMP	231.30	1.10	18.5	3.8	6.9
Benzoic acid	BA	122.12	1.41	19.2	5.7	9.5
Flurbiprofen	FP	244.27	3.86	18.8	4.7	7.7

MW, molecular weight; log $K_{o/w}$, octanol/water coefficients; HSP, Hansen's 3D solubility parameter.

Table 8 Physicochemical properties of esters used in the present study

	Abbreviation	MW	log $K_{o/w}$	HSP (MPa ^{1/2})		
				δ_d	δ_p	δ_h
Diisopropyl adipate	DIPA	230.30	3.20	16.0	3.8	4.7
Diisobutyl adipate	DIBA	258.36	4.19	15.8	3.3	4.5
Diethyl sebacate	DES	258.36	4.33	16.2	4.1	5.0
Propyleneglycol dicaprylate	PGDC	328.49	6.72	16.2	3.3	4.1
2-Ethylhexyl isononanoate	EHIN	270.46	6.99	15.7	1.2	2.3
Dioctyl carbonate	DOC	286.46	7.11	15.8	3.5	3.0
Isopropyl myristate	IPM	270.46	7.17	16.0	2.1	2.7
Isononyl isononanoate	ININ	284.48	7.37	15.3	0.7	1.7
Neopentyl glycol diethylhexanoate	NPGDEH	356.55	7.51	16.1	2.0	2.8
Propyleneglycol isostearate	PGIS	342.56	7.60	16.2	3.3	4.9
Isopropyl palmitate	IPP	298.51	8.16	15.9	2.2	2.5
Isopropyl linoleate	IPL	322.53	8.71	16.4	1.9	2.9
Glyceryl tri-2-ethylhexanoate	GTEH	470.69	8.98	16.4	2.2	3.1
Isopropyl isostearate	IPIS	326.57	9.07	16.0	1.7	2.2
Isotridecyl isononanoate	ITDIN	340.59	9.52	15.6	1.0	1.8
Neopentyl glycol dicaprinate	NPGDC	412.66	9.62	17.7	2.2	3.0
Di-2-ethylhexyl sebacate	DEHS	426.68	10.08	16.2	2.1	2.8
Cetyl 2-ethylhexanoate	CEH	368.65	10.61	16.1	1.5	2.1
2-Ethylhexyl palmitate	EHP	368.65	10.61	16.0	1.7	2.2
2-Ethylhexyl Hydroxystearate	EHHS	412.70	12.01	16.0	2.8	4.2

2-Octyldodecyl myristate	ODM	508.92	15.52	16.1	1.1	1.9
2-Octyldodecyl ricinoleate	ODR	579.01	15.73	16.0	2.2	3.1
Isostearyl isostearate	ISIS	536.97	16.06	15.4	0.0	0.6
Glyceryl triisostearate	GTIS	891.50	23.72	16.5	1.5	1.7
Pentaerythritol tetraisostearate	PETIS	1202.0	31.98	17.4	1.3	0.9

MW, molecular weight; $\log K_{o/w}$, octanol/water coefficients; HSP, Hansen's 3D solubility parameter.

2. 溶解度測定

過剰量の 4 種類の各モデル化合物 (CF、AMP、BA、FP) を 25 種類の各エステル油剤に加え、80°C にて加温溶解させた。得られた懸濁溶液を 32°C で 48 時間攪拌後、シリンジとフィルター (25 mm PTFE filter media device, 0.45 μm pore size; Millipore) を用いてろ過を行い、ろ液を得た。得られたろ液を希釈し、UPLC を用いて定量し、溶解度とした。

3. ハイスループット膜透過試験

Fig.14 に示す拡散セルアレイシステム (池田理化、東京、日本) を用いて、ハイスループット膜透過試験を行った。

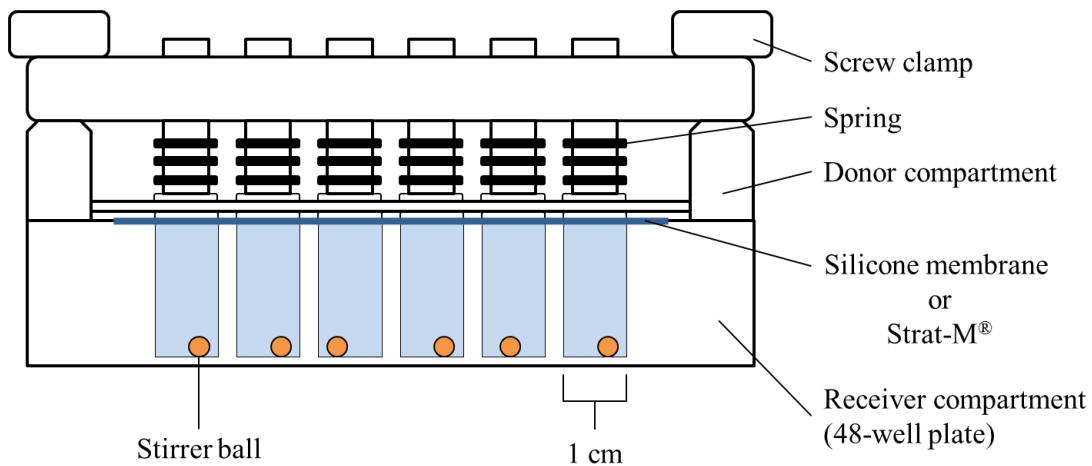


Fig. 14. Side view of the high-throughput diffusion cell array system

8.5 cm x 12.5 cm の大きさに切り取ったシリコーン膜または Strat-M[®]を拡散セルアレイシステムに装着し、直径 1 cm 有効透過面積 0.785 cm²にて、各エステル油剤からのモデル化合物の透過量を測定した。

レシーバー溶液 (1.4 mL) には、FP の場合は 40%PEG400 含有 PBS を、CF、AMP、BA の場合は pH7.4 の PBS を使用した。各溶液はスターラーボールを用いて攪拌し、32°C に保って試験を実施した。ドナー溶液は 10 mg/g となるよう測り取り 80°C にて加温溶解させ、32°C で 48 時間攪拌し、調製した。その際、全ての CF と一部の AMP についてはエステル油剤に対する飽和溶解度を超えていたため、懸濁状態で適用した。ドナー溶液を 0.2 mL 適用し、ハイスループット化の要求から、定常状態とシンク条件を仮定して、シリコーン膜では 1 時間後、Strat-M[®]では 3 時間後の 1 回のみレシーバー液を回収した。レシーバー溶液中の各モデル化合物濃度は UPLC を用いて定量し、単位面積あたりのシリコーン膜または Strat-M[®]透過量を計算した。

4. エステル油剤の物性値測定

各油剤の粘度は、振動式粘度計 (Viscometer VM-10A, SEKONIC, Tokyo) を用いて 32°C における粘度を 3 回測定し、その平均値として算出した。表面張力と濡れ性は自動接触角計 (Dropmaster DM-701, Kyowa Interface Science, Saitama, Japan) を用いて測定した。すなわち、エステル油剤の表面張力はペンダントドロップ法を用いて 25°C で 6 回測定し、その平均値とした。また、シリコーン膜と Strat-M[®]と標準測定用アクリル板に対する濡れ性は、液適法を用いて、標準測定用のアクリル板とシリコーン膜、Strat-M[®]に着滴し、30 秒後における接触角を 6 回測定し、その平均値とした。

5. シリコーン膜および Strat-M[®]に対する各エステル油剤の取込み試験

単層膜であるシリコーン膜への溶媒取込み量は、既報の重量法を使用して決定した^{65,66}。Strat-M[®]への取込み量は、上層2層に脂質がある多層膜であるため、方法を修正して実施した。

シリコーン膜: 厚さ約 75 μm のシリコーン膜表面のほこりを拭き取った。1.5 cm^2 に切り取ったシリコーン膜の重さを正確に測り、その後、バイアルにシリコーン膜と各種エステル油剤 (3 mL) を加え、32°C の恒温槽に静置した。3 時間後、各エステル油剤からシリコーン膜を取り出し、シリコーン膜表面の液滴を拭き、キムタオル[®] (日本製紙、東京、日本) に挟み 1 分間乾かした後、シリコーン膜の重量を測定した。膜に対する相対的な取込み量 (m_{upt}) は式 (1) を用いて、取込み前の重量 (m_b) と取込み後の重量 (m_a) の差から算出した。

$$m_{upt} = \frac{m_a - m_b}{m_b} \quad \dots (1)$$

Strat-M[®]: 厚さ約 320 μm の Strat-M[®]の重量を測定し、フランツ型拡散セル (有効透過面積 1.77 cm^2) に装着した。ドナー側に 1.0 mL の各種エステル油剤をレシーバー側に 6.0 mL の精製水を適用し、湿度 35 \pm 5% 環境下、レシーバー溶液を 32°C に維持した。15 分間静置した後、ドナー側からエステル油剤を取り除き、拡散セルから Strat-M[®]を取り外した。Strat-M[®]表面の液滴を拭き、キムタオル[®] に挟み乾かした後 Strat-M[®]の重量を測った。式 (1) を用いて Strat-M[®]への各種エステル油剤の取込み量を算出した。

6. UPLC 分析

各モデル薬物の濃度は UPLC を用いて決定した。UPLC のシステムはポンプ (LC-30ADVP、Shimadzu、Kyoto、Japan) と UV-VIS 検出器 (SPD-20A、Shimadzu)、解析ソフトウェア (Labsolutions、Shimadzu)、システムコントローラー (CBM-20A、Shimadzu)、オートインジェクター (SIL-30AC、Shimadzu) 及びカラムオーブン (CTO-20A、Shimadzu) からなる。カラムは Sunniest C18-HT (ChromaNik Technologies、Osaka、Japan) を使用した。カラム温度は 40°C に保ち、流速は 0.45 mL/min に調整した。移動相はグラジエント溶出系を用いた。溶媒プログラムは、まず酢酸を用いて pH4.8 に調整した 10 mM 酢酸ナトリウム : アセトニトリル (80:20) で 0.2 min まで保持し、10 mM 酢酸ナトリウム : アセトニトリル (20:80) になるように 2.4 min まで線形的に濃度変化させ、その後 3.5 min まで保持した。次のサンプルを開始する前に、元の溶媒比率に戻した。検出波長は 254 nm で行った。

7. データ解析

統計解析は SPSS Statistics (version 23; IBM、Chicago、IL、USA) を用いて行った。各化合物の膜透過量と溶解度、エステル油の物理化学的特性値間の関係はスピアマンの順位相関を用いて評価した。 p 値が 0.05 以下の場合に統計学的に有意とした。

第2節 結果

1. 各モデル化合物のエステル油剤に対する溶解度

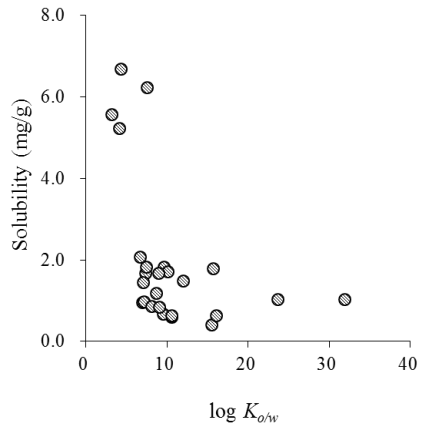
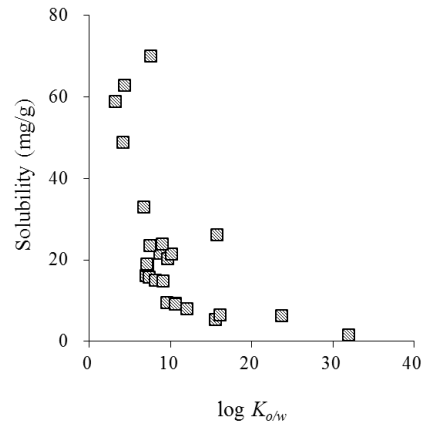
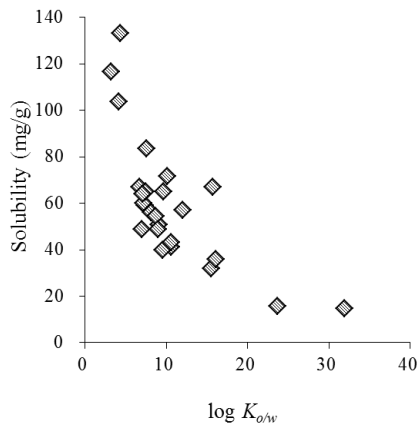
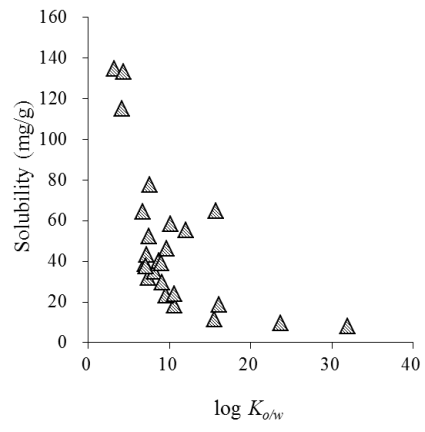
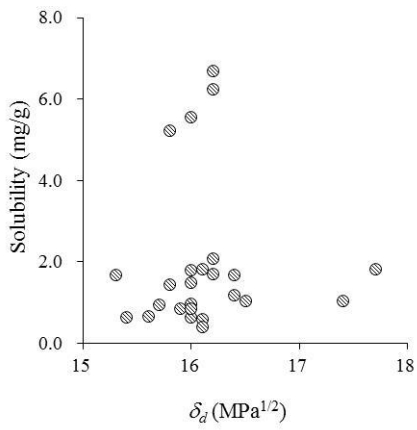
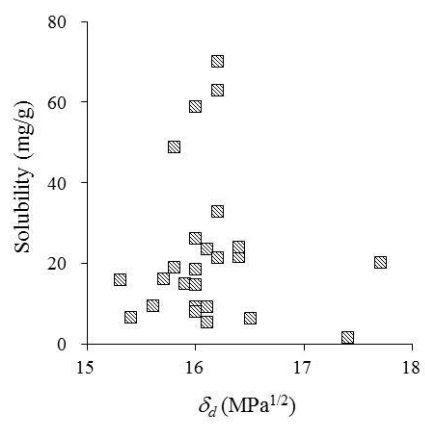
Table 9 にエステル油剤に対するモデル化合物の溶解度を示す。全てのモデル化合物の溶解度が高かったのは PGIS と DIPA や DIBA、DES のようなジエステルであり、 $\log K_{ow}$ が低いエステル油（それぞれ、7.60、3.20、4.19、4.33）であった。評価したエステル油剤の中で最も溶解能が高かったのは、CF と BA では DES、FP では DIPA、AMP では PGIS であった。一方、AMP、BA、FP の溶解度が低かったのは、ODM や ISIS、GTIS、PETIS のような長鎖脂肪酸と長鎖アルコールとのモノエステル、トリエステル、テトラエステルであり、 $\log K_{ow}$ が高いエステル油（それぞれ、15.52、16.06、23.72、31.98）であった。また、CF の溶解度が低かったのは、ODM や ISIS、CEH、EHP のような長鎖脂肪酸と長鎖アルコールのモノエステルであり、それぞれの $\log K_{ow}$ は 15.52、16.06、10.61、10.61 であった。

Fig. 15 にはエステル油剤の物理化学的パラメータとモデル化合物の溶解度との関係を示す。溶解度パラメータの分散項と各モデル化合物の溶解度には有意な相関は認められなかった (CF; $r = 0.285$, $p = 0.168$, AMP; $r = 0.132$, $p = 0.529$, BA; $r = -0.013$, $p = 0.952$, FP; $r = -0.068$, $p = 0.748$, Fig. 15B)。これに対して、溶解度と $\log K_{ow}$ (CF; $r = -0.546$, $p = 0.00473$, AMP; $r = -0.721$, $p = 4.86E-05$, BA; $r = -0.674$, $p = 2.23E-04$, FP; $r = -0.632$, $p = 7.01E-04$, Fig. 15A)、溶解度パラメータの極性項 (CF; $r = 0.745$, $p = 1.93E-05$, AMP; $r = 0.744$, $p = 2.02E-05$, BA; $r = 0.804$, $p = 1.30E-06$, FP; $r = 0.809$, $p = 9.72E-07$, Fig. 15C)、溶解度パラメータの水素結合項 (CF; $r = 0.795$, $p = 2.10E-06$, AMP; $r = 0.844$, $p = 1.13E-07$, BA; $r = 0.843$, $p = 1.22E-07$, FP; $r = 0.917$, $p = 1.11E-10$, Fig. 15D)、溶解度パラ

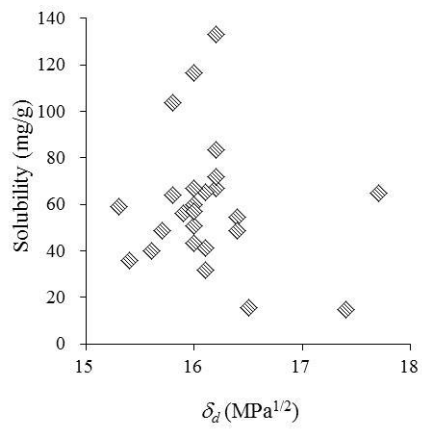
メータ距離 (CF; $r = -0.788$, $p = 2.86E-06$ 、AMP; $r = -0.819$, $p = 5.57E-07$ 、BA; $r = -0.832$, $p = 2.52E-07$ 、FP; $r = -0.881$, $p = 6.00E-09$ 、Fig. 15E) とは有意な相関がみられた。

Table 9 Solubility of model compounds in esters and their amount through silicone and Strat-M membranes

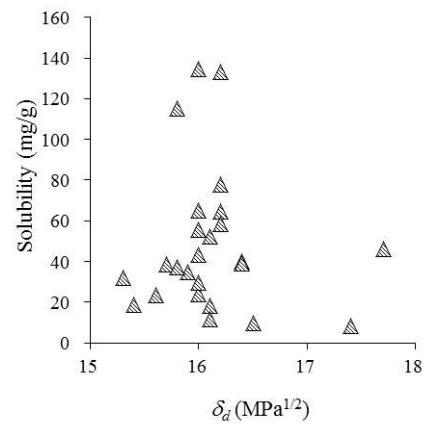
	Solubility (mg/g)				Amount of model compound permeated ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)							
					Silicone membrane				Strat-M [®]			
	CF	AMP	BA	FP	CF	AMP	BA	FP	CF	AMP	BA	FP
DIPA	5.56	58.9	117	135	218.5	523.6	390.3	77.12	571.2	684.2	554.4	155.4
DIBA	5.23	48.8	104	115	176.6	387.5	306.6	67.56	579.1	527.0	681.4	197.2
DES	6.68	62.9	133	133	94.07	262.3	148.7	32.52	424.0	629.5	405.5	80.34
PGDC	2.08	32.9	66.9	64.5	122.1	429.2	332.0	89.64	319.2	562.8	747.6	259.6
EHIN	0.946	16.2	48.8	38.6	240.2	1146	711.0	356.3	229.9	1011	1034	334.9
DOC	1.45	19.0	63.9	37.4	116.0	887.3	611.3	130.4	160.8	663.3	629.6	273.9
IPM	0.973	18.6	59.9	43.3	160.4	1118	867.9	308.9	242.2	953.5	913.9	382.0
ININ	1.67	15.9	59.0	31.9	201.9	1201	1075	359.6	187.7	996.6	960.7	367.0
NPGDEH	1.83	23.5	65.1	52.3	124.2	832.7	505.2	182.5	200.0	639.7	709.7	218.2
PGIS	6.24	70.0	83.5	77.7	32.53	62.07	50.03	6.493	306.0	197.9	248.2	44.67
IPP	0.860	15.0	56.0	34.9	144.7	529.9	494.8	203.7	218.9	912.4	833.4	345.4
IPL	1.19	21.7	54.5	40.2	136.0	720.3	552.2	168.0	255.2	881.4	837.7	285.0
GTEH	1.67	23.9	48.8	39.2	70.88	467.6	306.3	91.21	64.39	232.1	225.3	140.4
IPIS	0.848	14.8	50.7	29.8	97.07	945.5	592.5	238.3	149.3	776.9	792.2	361.4
ITDIN	0.663	9.57	39.9	23.3	105.0	710.9	598.6	226.5	86.44	632.0	629.6	309.8
NPGDC	1.82	20.2	64.9	46.3	65.59	463.8	234.6	59.67	91.50	321.6	377.0	149.4
DEHS	1.71	21.4	71.7	58.5	52.61	425.2	217.1	40.50	94.72	246.1	196.9	87.44
CEH	0.592	9.28	41.3	18.2	48.00	697.5	256.5	63.12	57.38	544.1	454.9	212.6
EHP	0.630	9.23	43.3	23.9	65.54	748.1	401.1	134.7	50.79	430.5	377.1	277.2
EHHS	1.49	7.97	57.1	55.4	22.31	159.4	55.25	7.184	19.17	97.56	44.91	34.46
ODM	0.408	5.40	31.8	11.5	28.12	559.6	309.5	74.24	11.74	248.7	171.4	135.0
ODR	1.79	26.1	67.0	65.0	21.91	166.7	58.64	6.579	22.69	56.47	31.96	34.97
ISIS	0.628	6.58	35.8	18.6	39.29	337.4	184.4	62.43	22.65	227.1	177.9	54.76
GTIS	1.04	6.38	15.7	10.8	22.05	264.6	195.5	35.67	8.420	90.90	76.31	46.08
PETIS	1.04	1.55	14.7	10.3	20.69	230.1	160.5	35.09	4.750	45.68	39.92	8.020

A**(1)****(2)****(3)****(4)****B****(1)****(2)**

(3)

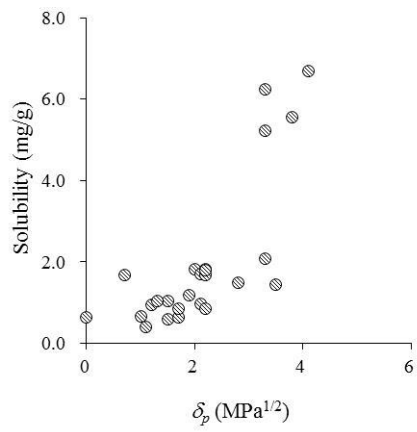


(4)

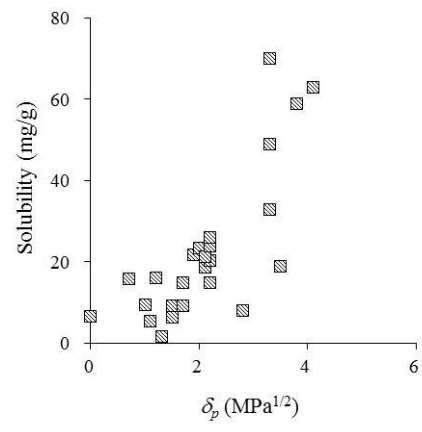


C

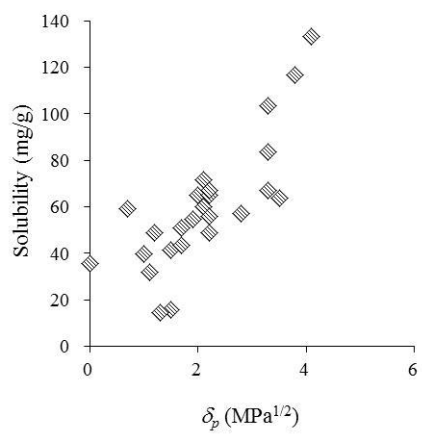
(1)



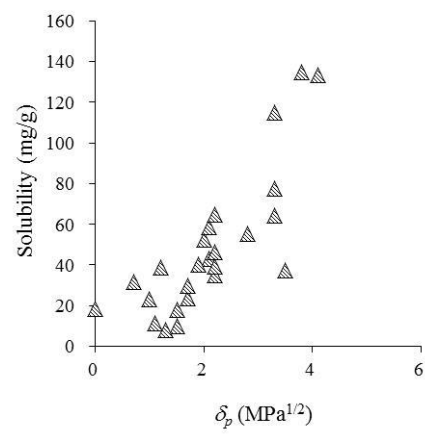
(2)

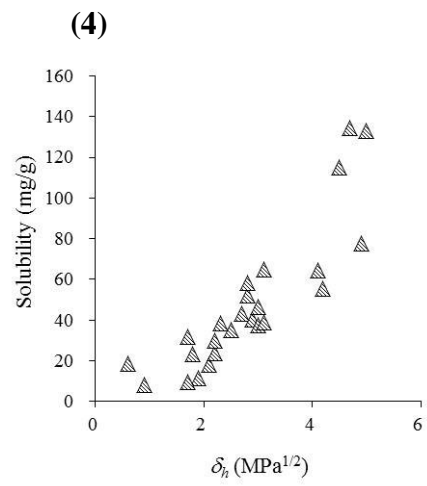
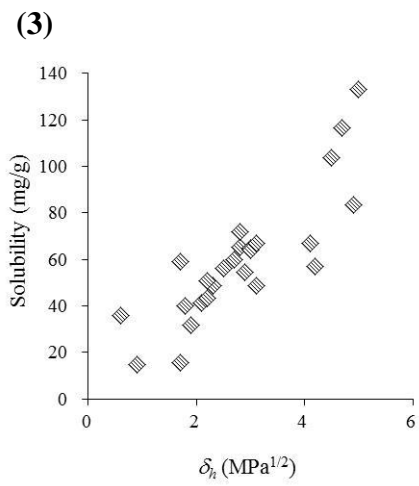
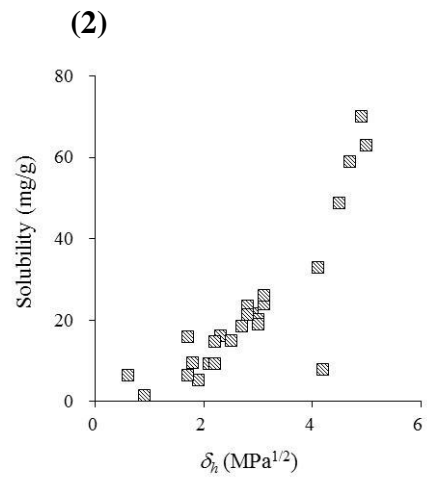
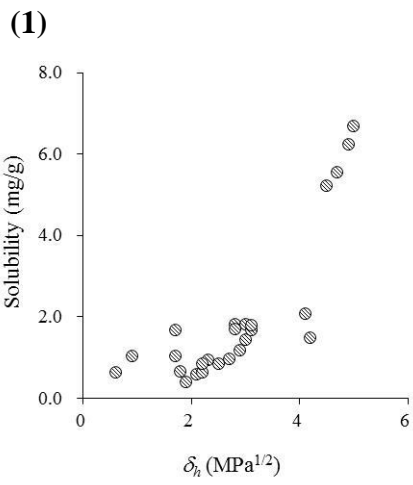
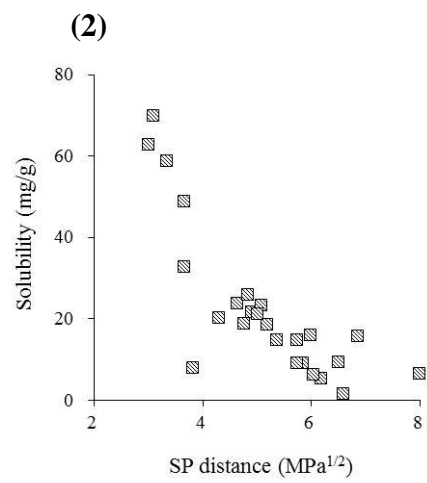
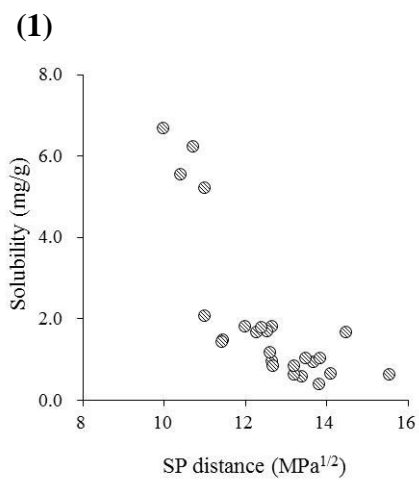


(3)



(4)



D**E**

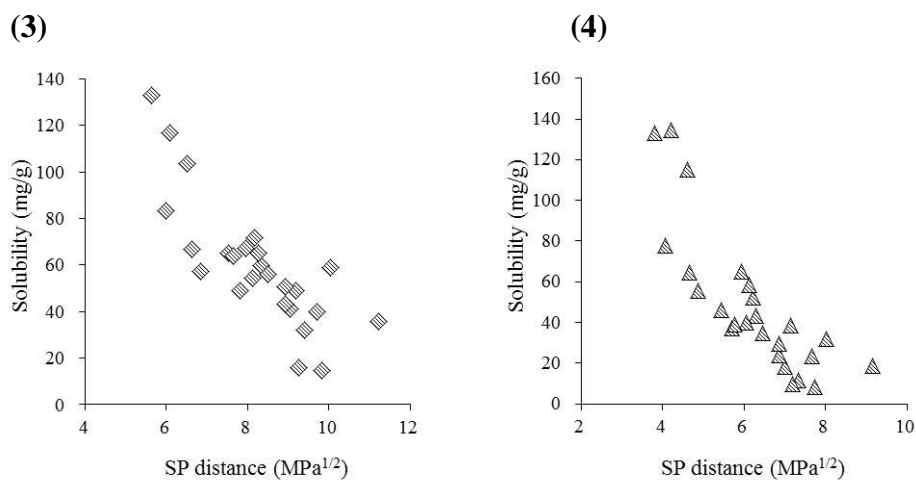
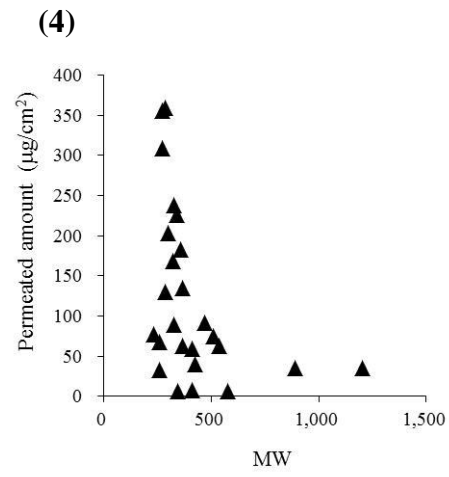
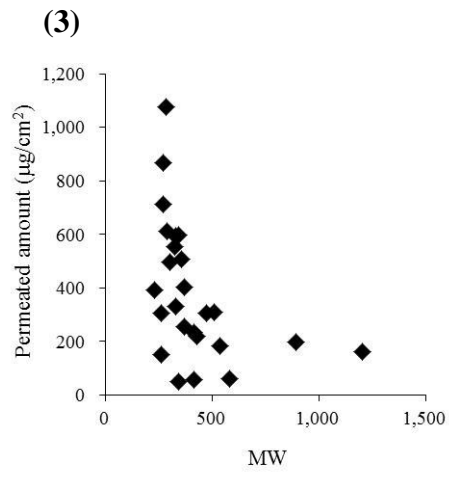
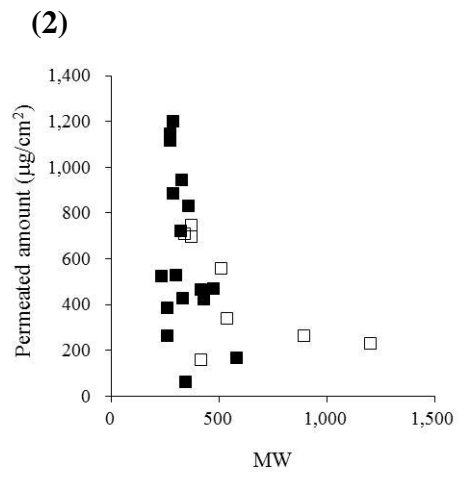
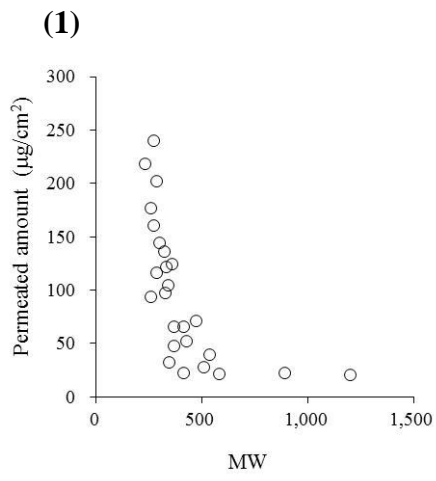
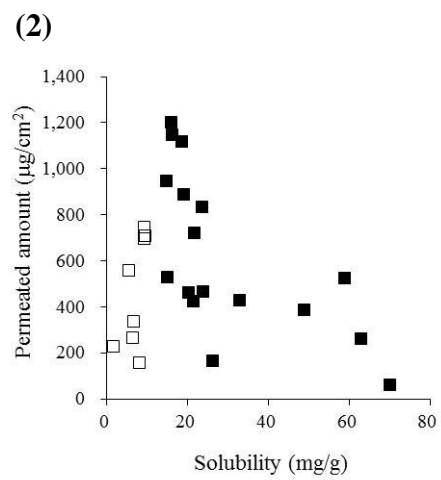
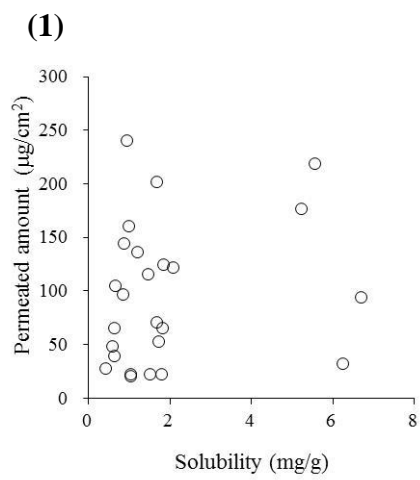
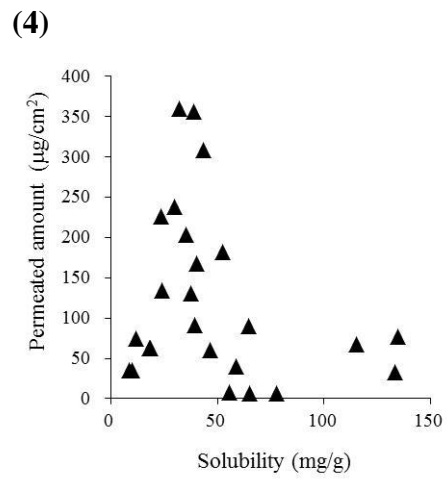
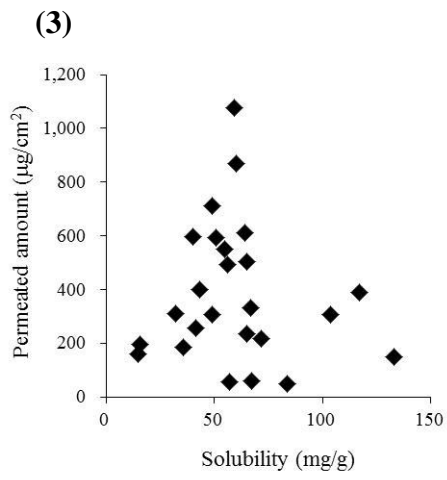


Fig. 15. Relationships between octanol/water coefficient ($\log K_{o/w}$) (A), dispersion solubility parameter (δ_d) (B), polar solubility parameter (δ_p) (C), hydrogen bond solubility parameter (δ_h) (D) or the solubility parameter SP distance (E) of the esters and the solubility of the model compounds. Compounds: (1) CF, (2) AMP, (3) BA, and (4) FP.

2. エステル油剤からの各モデル化合物のシリコーン膜透過

エステル油剤からの各モデル化合物のシリコーン膜透過量を Table 9 に示す。ININ や EHIN、IPM のような脂肪酸鎖の分子量が小さなエステル油からのシリコーン膜透過量は、すべての薬物で高かった。これに対して、PGIS や ODR、EHHS のような水酸基を有したエステル油剤からの AMP、BA、FP のシリコーン膜透過量は低く、ODR や GTIS、PETIS のような長鎖脂肪酸と長鎖アルコールからなる高い分子量のモノエステルやトリエステル、テトラエステルからの CF のシリコーン膜透過量は低かった。

A**B**



C

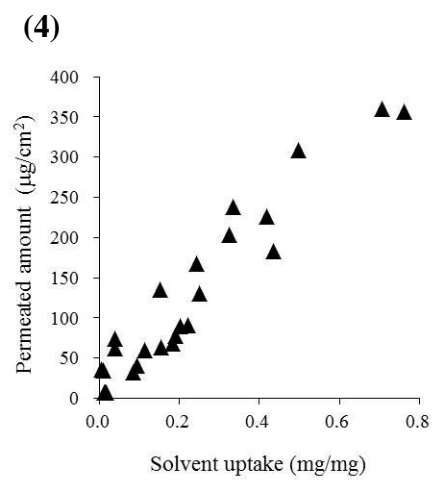
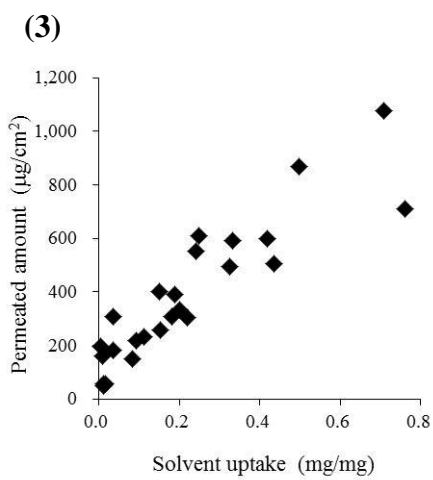
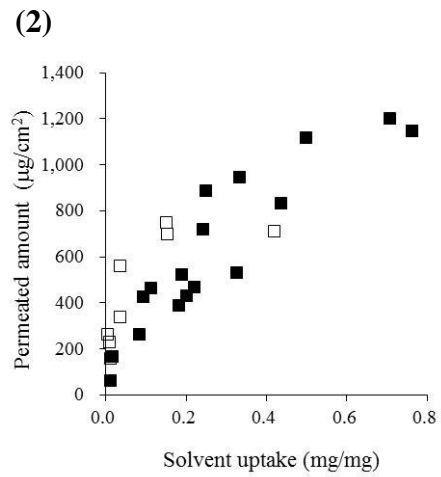
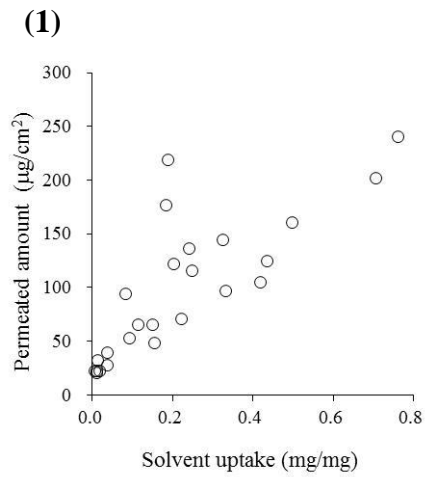


Fig. 16. Relationships between the molecular weights (MWs) of the esters (A), solubility of the model compounds in esters (B) or uptake of the esters (C) and the amount of the model compounds that permeated through the silicone membrane. Compounds: (1) CF, (2) AMP, (3) BA, and (4) FP. Donor concentration of the model compounds (Symbol): saturated (opened), 10 mg/g (closed).

Fig. 16 にエステル油剤の物理化学的特性値とエステル油剤からのモデル化合物のシリコーン膜透過量との関係を示す。各モデル化合物共に、エステル油剤に対する溶解度と透過量に相関は見られなかった (Fig. 16B)。一方、エステル油剤の分子量と各モデル化合物のシリコーン膜透過量に有意な相関がみられた (CF; $r = -0.876$, $p = 1.01E-08$, AMP; $r = -0.471$, $p = 0.0176$, BA; $r = -0.574$, $p = 0.00271$, FP; $r = -0.514$, $p = 0.00862$, Fig. 16A)。さらに、シリコーン膜へのエステル油剤の取込み量と各モデル化合物のシリコーン膜透過量に高い有意な相関がみられた (CF; $r = 0.859$, $p = 3.99E-08$, AMP; $r = 0.872$, $p = 1.40E-08$, BA; $r = 0.914$, $p = 1.65E-10$, FP; $r = 0.931$, $p = 1.62E-11$, Fig. 16C)。

エステル油剤の物性値を Table 10 に示す。粘度や濡れ性、表面張力のようなエステル油剤の物性値は、モデル化合物のシリコーン膜透過量と良い相関がみられた (Table 11)。注目すべき点として、エステル油剤の表面張力とシリコーン膜に対する濡れ性と高い負の相関がみられた。

Table 10 Physical properties of the esters used in this study

	Viscosity (mPa·s)	Surface tension (mN/m)	Wettability (Contact angle)		
			Acrylic plate	Silicone membrane	Strat-M [®]
DIPA	3.15	28.3	51.0	48.3	11.3
DIBA	4.38	28.0	51.1	47.4	11.5
DES	4.34	32.2	58.6	54.5	10.9
PGDC	6.11	30.0	51.4	47.7	12.7
EHIN	3.18	25.8	39.0	40.5	16.0
DOC	5.04	28.8	52.7	47.0	12.4
IPM	3.52	28.0	48.4	51.1	17.3
ININ	4.27	25.5	41.2	42.8	13.1
NPGDEH	8.74	28.0	48.6	46.1	13.8
PGIS	39.20	30.6	55.9	60.0	13.2
IPP	4.74	28.8	43.3	45.2	16.2
IPL	4.26	26.8	42.1	47.4	11.9
GTEH	23.20	28.9	52.7	50.3	14.3
IPIS	6.59	27.7	49.7	47.2	13.3
ITDIN	7.84	27.2	44.6	45.9	15.9
NPGDC	12.13	29.5	52.5	51.0	11.9
DEHS	13.43	30.6	57.4	53.9	12.6
CEH	8.75	29.8	45.7	49.4	15.1
EHP	8.19	29.3	52.4	49.0	15.0

EHHS	233.00	31.9	58.9	60.0	15.8
ODM	18.17	30.3	58.5	55.4	13.6
ODR	54.23	31.7	54.8	59.3	14.1
ISIS	31.03	30.5	53.8	58.6	13.0
GTIS	118.33	30.6	55.2	59.2	13.8
PETIS	213.67	30.5	56.4	60.1	17.7

Table 11 Correlation coefficients between physical properties of the esters and the amounts of the model compounds that permeated through a silicone membrane and solvent uptake of silicone membrane

		Viscosity	Surface tension	Wettability	
				Acrylic plate	Silicone
	CF	-0.927***	-0.806***	-0.766***	-0.835***
Permeated amount	AMP	-0.662***	-0.845***	-0.759***	-0.792***
	BA	-0.743***	-0.904***	-0.800***	-0.853***
	FP	-0.689***	-0.906***	-0.831***	-0.856***
Solvent uptake		-0.765***	-0.888***	-0.848***	-0.899***

CF, caffeine; AMP, aminopyrine; BA, benzoic acid; FP, flurbiprofen.

*** $p < 0.001$.

3. エステル油剤からの各モデル化合物の Strat-M[®]透過

エステル油剤からの各モデル化合物の Strat-M[®]透過量を Table 9 に示す。評価したエステル油剤の中で最も Strat-M[®]透過量が高かったのは、CF では DIBA、AMP、BA では EHIN、FP では IPM であった。また、最も Strat-M[®]透過量が低かったのは、CF、AMP、FP では PETIS、BA では ODR であった。

Fig. 16 と Table 12 に、エステル油剤からの各モデル化合物の Strat-M[®]透過量とエステル油剤の物性値および物理化学的特性値との関係を示す。CF において、エステル油剤に対する溶解度と Strat-M[®]透過量に有意な相関 ($r = 0.596$, $p = 0.00191$) がみられたが、その他のモデル化合物 AMP、BA、FP では相関は見られなかった (Fig. 17B)。シリコーン膜と同様に、エステル油剤の分子量と Strat-M[®]透過量に有意な相関がみられ (CF; $r = -0.876$, $p = 9.76E-09$, AMP; $r = -0.822$, $p = 4.56E-07$, BA; $r = -0.802$, $p = 1.40E-06$, FP; $r = -0.640$, $p = 5.65E-04$, Fig. 17A)、Strat-M 膜へのエステル油剤の取込み量とも有意な相関がみられた (CF; $r = 0.825$, $p = 3.99E-07$, AMP; $r = 0.830$, $p = 2.80E-07$, BA; $r = 0.818$, $p = 5.88E-07$, FP; $r = 0.656$, $p = 3.74E-04$, Fig. 17C)。さらに、Strat-M[®]透過量は、エステル油剤の粘度と高い有意な負の相関がみられ、また、AMP, BA, FP の Strat-M[®]透過量は、エステル油剤の表面張力、アクリル板への濡れ性と有意な負の相関がみられた (Table 12)。

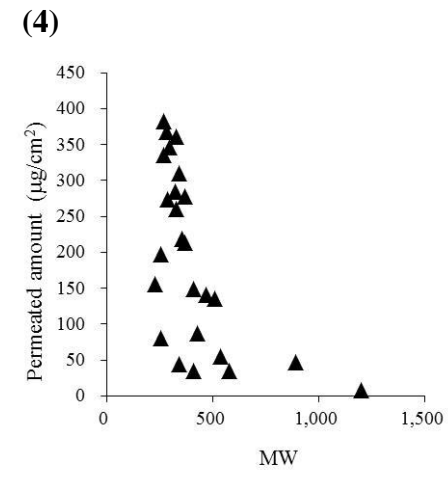
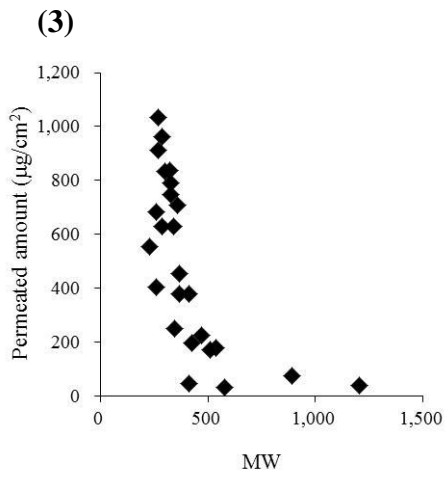
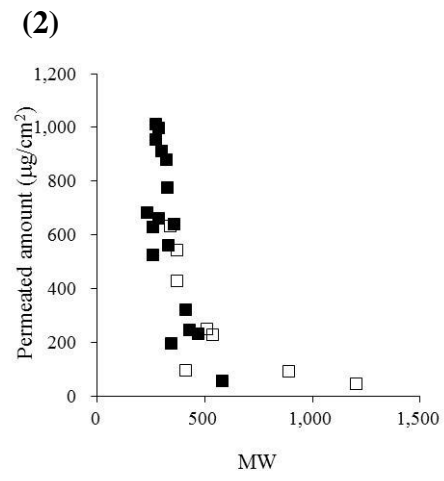
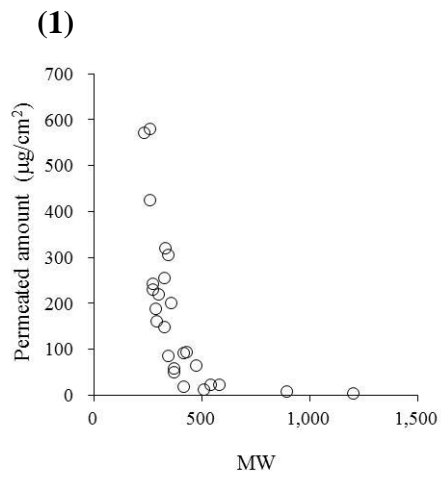
Table 12 Correlation coefficients between physical properties of the esters and the amount of the model compounds that permeated through a Strat-M[®] membrane and solvent uptake of a Strat-M[®]

		Viscosity	Surface tension	Wettability	
				Acrylic plate	Strat-M [®]
Permeated amount	CF	-0.778***	-0.398*	-0.412*	-0.484*
	AMP	-0.915***	-0.807***	-0.805***	-0.061
	BA	-0.870***	-0.836***	-0.857***	-0.042
	FP	-0.775***	-0.858***	-0.854***	0.114
Solvent uptake		-0.894***	-0.551**	-0.603**	-0.213

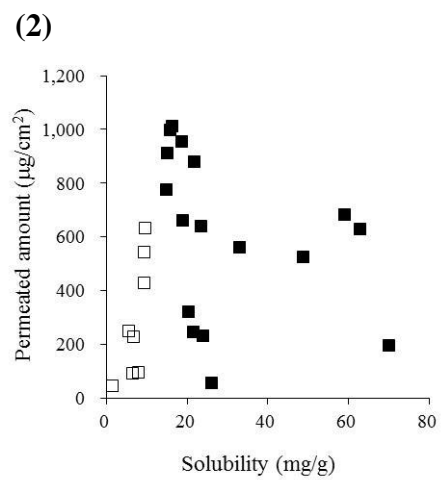
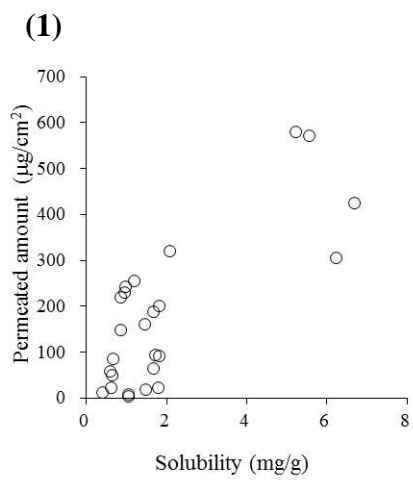
CF, caffeine; AMP, aminopyrine; BA, benzoic acid; FP, flurbiprofen.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$.

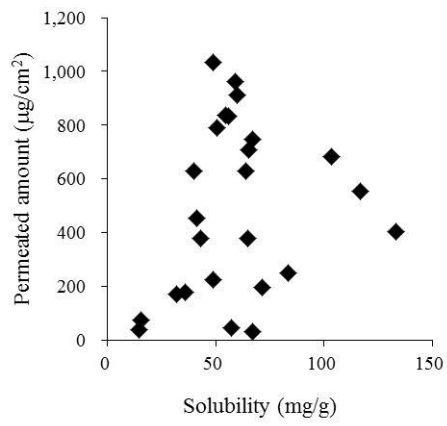
A



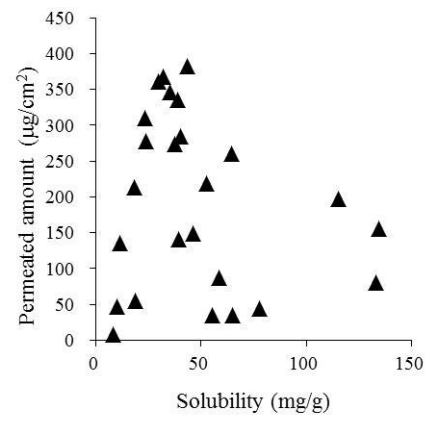
B



(3)

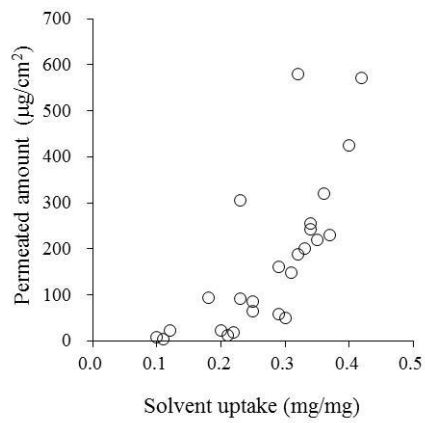


(4)

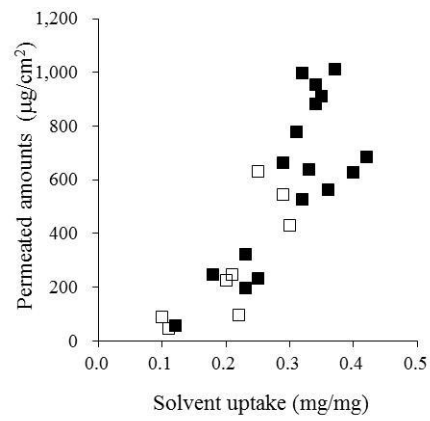


C

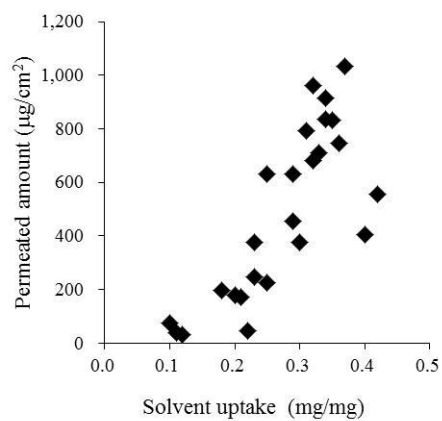
(1)



(2)



(3)



(4)

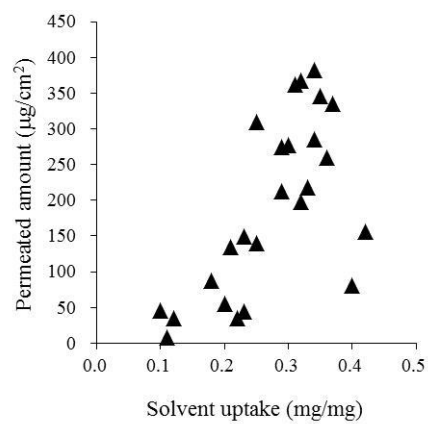


Fig. 17. Relationships between molecular weights (MWs) of esters (A), the solubility of the model compounds in the esters (B), or uptake of the esters (C) and the amount of the model compounds that permeated through the Strat-M[®] membrane. Compounds: (1) CF, (2) AMP, (3) BA, and (4) FP. Donor concentration of the model compounds (Symbol): saturated (opened), 10 mg/g (closed).

4. エステル油剤からの各モデル化合物のシリコーン膜と Strat-M[®]透過量の関係

Fig. 18 に、エステル油剤からの各モデル化合物のシリコーン膜と Strat-M[®]透過量の関係について示す。それぞれ有意な相関係数が確認された (CF; $r = 0.780$ 、 $p = 4.28E-06$ 、AMP; $r = 0.830$ 、 $p = 2.87E-07$ 、BA; $r = 0.840$ 、 $p = 1.51E-07$ 、FP; $r = 0.941$ 、 $p = 2.73E-12$)。親水性の CF の Strat-M[®]透過量はシリコーン膜透過量よりも高くなり、比較的親油性の BA と FP のシリコーン膜透過量は Strat-M[®]よりも高くなった。一方で、AMP においてだけ勾配 1 の関係が確認された。

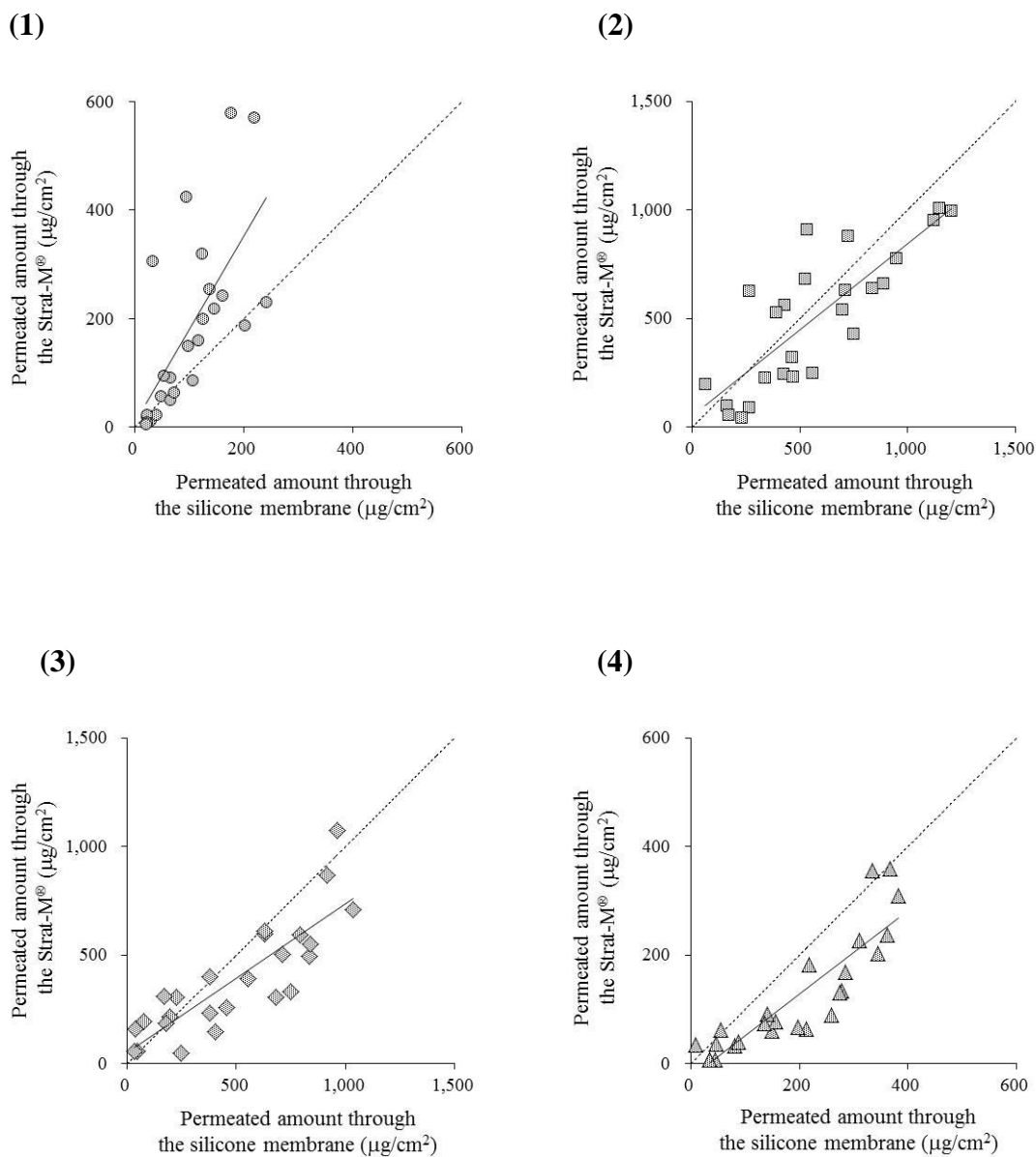


Fig. 18. Relationships between the amounts of model compounds in esters that permeated through the silicone and Strat-M[®] membranes. Dashed lines show the relationships with a 1:1 correlation. Compounds: (1) CF, (2) AMP, (3) BA, and (4) FP.

第3節 考察

製品開発の初期段階において、皮膚に適用される製剤の効果や安全性を正確に見積もるためには、皮膚適用製剤の透過性に対する基剤の影響を評価する必要がある。中でもエステル油剤は皮膚に適用される製剤に広く使用されているが、膜透過に与えるこれらの影響を報告した論文は少ない。本編では、薬物の透過における基剤の違いを明らかにするために、25種類の異なったエステル油剤を基剤として選択し、異なる極性を有する4種類のモデル化合物を用いて、2種類の人工膜を介した透過性を評価した。

化合物の膜透過性は基剤中の熱力学的活動度と関連すると考えられたため⁴⁷⁾、まず、エステル油剤に対する各モデル化合物の溶解度を測定した。溶媒と溶質のSP値距離は溶解度に関連することが良く知られており、本研究においてもSP値距離と溶解度の間には有意な負の相関が認められた。エステル油の物理化学的特性値と溶解度の関係において、溶解度はSP値の水素結合項と最も高い相関がみられた。以前の研究においても、脂肪酸エステルのケトプロフェンに対する溶解度とSP値の水素結合項とは有意な相関が認められたことが報告されている⁵⁶⁾。以上より、エステル油剤に対するモデル化合物の溶解度はエステル油剤の水素結合に強く影響することが示唆された。

エステル油剤に対するCFおよびAMPの溶解度が低いため、透過実験は飽和溶液で実施した。このため、エステル油剤からのCFと一部のAMPの人工膜透過実験は、熱力学的活量が同一条件下において実施し、それらの条件では人工膜透過量に変化はないと推定された。一方、残りのAMPとBA、FPの人工膜透過量は、基剤中への溶解度が増加するにつれて熱力学的活量は減少するため、溶解度と反比例すると考えられた。しかしながら、エステル油剤に対する溶解

度と膜透過量の間には相関関係は認められず、シリコーン膜への取込み量と透過量について有意な相関が認められた。透過と基剤のシリコーン膜取り量の関係については同様に、Twistらはパラベン類の分配係数が基剤として使用したアルコールのシリコーン膜に対する取込み量に依存することを報告している^{20, 65, 67)}。以上のことから、エステル油剤中のモデル化合物の熱力学的活量とシリコーン膜透過量には比例関係がなく、基剤の膜への取込みが主要な要因であることが示された。

また、エステル油剤からのシリコーン膜透過量は、粘度や濡れ性、表面張力と関連していた。例えば、ヒドロキシ基を有したPGIS ($\log K_{o/w}$; 7.60, MW; 342.6)の表面張力と濡れ性は、それぞれ 30.6 mN/m と 60.0°であり、これに対してヒドロキシ基を持たないNPGDEH ($\log K_{o/w}$; 7.51, MW; 356.6)の表面張力と濡れ性は、それぞれ 28.0 mN/m と 46.1°であった。NPGDEHに溶解させたAMPとBA、FPのシリコーン膜透過量(それぞれ、832.7、505.2、182.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)は、PGISに溶解させたAMPとBA、FPのシリコーン膜透過量(それぞれ、62.07、50.03、6.493 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)よりも高かった。さらに、エステル油剤の粘度や濡れ性、表面張力といった物性値は、エステル油剤のシリコーン膜への取込み量と高い相関が得られた。これらの結果は、今回評価した油剤の物性値が膜への取込み量と相関し、そしてその交絡関係から膜透過量とも相関するということを意味している。

エステル油剤からの各モデル化合物の膜透過量と最も高い相関係数を示したのは、エステル油剤の膜取込み量であった。一方で、膜への油剤の取込み量を把握するには、比較的長時間を要する実験を行って測定を実施しなければならない。これに対して、エステル油剤の粘度や表面張力などはすでに知られている文献値などを使用することが出来る。すなわち、スクリーニング段階におい

て、粘度や表面張力からエステル油剤を選択し、選択されたエステル油剤の膜取込み量を測定することにより、より効率的な製品開発に繋げることができると考えられた。

また、エステル油剤からのシリコーン膜と Strat-M[®]のモデル化合物透過量の間には有意な正の相関が認められ、モデル化合物の親油性が高くなるにつれて線形回帰式の勾配が小さくなった。シリコーン膜とは異なり、Strat-M[®]は3層構造を有しており、1番目と2番目の層には脂質成分があることが前編において明らかとなっている。このことから、親水性のモデル化合物であるCFでは、シリコーン膜と比較し、脂質層を有するStrat-M[®]に対する透過が小さくなることで勾配が大きくなったと考えられた (Fig. 17A)。一方で、親油性のモデル化合物であるFPでは、シリコーン膜と比較し、脂質層を有することでStrat-M[®]に対する透過が大きくなり、勾配が小さくなったと考えられた (Fig. 17D)。

また、ミリスチン酸イソプロピルは角層の細胞間脂質の流動性に影響を与えること⁶⁸⁾、セバシン酸ジエチルは脂質を抽出することなど⁵⁷⁾、エステル油剤は経皮吸収促進剤として知られている。また、ケトプロフェンは分子量の小さなエステル油剤に溶解させた時にヘアレスラット皮膚透過量が増加すること⁵⁶⁾、有限用量系におけるグリチルリチン酸ステアリルのユカタンミニ豚皮膚透過量は基剤の分子量と表面張力に影響すること⁵⁹⁾、が報告されている。したがって、これら透過促進剤である油剤の共通した特性は、分子量と表面張力が低いことである。本研究においても、基剤として表面張力と分子量が小さなエステル油剤を使用した時、モデル化合物の膜透過量が高くなることが示された。本研究での関係と油剤の皮膚透過促進作用の関係については、今後検討すべき課題であると考えられる。

前編において水性基剤からのヒト皮膚透過パラメータはシリコーン膜や

Strat-M[®]透過パラメータから予測できることを述べた^{12,38)}。本編では、人工膜透過性に与えるエステル油剤の影響を評価し、以前報告されたヒト皮膚⁵⁸⁾や豚耳^{59,60)}、ラット皮膚⁵⁵⁻⁵⁷⁾との結果と同様に、透過性と粘度や表面張力といった物性値の間に高い相関が得られた。したがって、将来、エステル油剤からのヒトまたは豚皮膚透過性と人工膜透過性の相関に関する研究が必要であるものの、シリコーン膜や Strat-M[®]は、新規医薬品または化粧品を開発するための初期段階において用いる材料として有用と考えられた。

第4節 小括

本研究では、ハイスループット拡散セルアレイシステムを用いて、基剤として 25 種類のエステル油剤を使用し、4 種類のモデル化合物（CF、AMP、BA、FP）のシリコーン膜および Strat-M[®]透過性を評価した。また、エステル油剤の物性値とエステル油剤からのモデル化合物透過量の関係について検討した。シリコーン膜透過量は各薬物のエステル油剤中溶解度とは相関せず、エステル油剤の濡れ性や粘度、表面張力、膜への取込み量と有意に相関した。また、AMP と BA、FP の Strat-M[®]透過量はシリコーン膜と同様、エステル油剤の濡れ性や粘度、表面張力、取込み量と相関したが、CF は溶解度とも相関した。また、シリコーン膜透過量と 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が高くなった。このことから、人工膜に適用されたエステル油剤からの化合物の透過量を把握するには、エステル油剤の膜取込み量を測定することが重要であり、また、粘度や表面張力などからもエステル油剤のスクリーニングが可能であることが示された。

結論

皮膚透過性の把握は、皮膚適用製剤の有効性および安全性を評価する上で極めて重要であり、これまでも透過物質の $\log K_{ow}$ や分子量などを用いた透過係数の予測論文が数多く報告されている。ところが、これらの多くは水性基剤からの透過予測であり、医薬品・化粧品には水以外にも油性基剤や水性基剤、界面活性剤や高分子など様々な成分が配合されるため、実際に皮膚に適用される医薬品や化粧品からの透過性は予測値とは異なることが考えられる。特に、油性基剤は多くの医薬品・化粧品に配合されているにも関わらず、化合物の透過性に与える油性基剤の影響を網羅的に解析した報告はほとんどなく、油性基剤からの化学物質の皮膚透過と油性基剤の物理化学的特性値との関係は明らかにされていない。一方で、動物愛護の観点から動物実験代替法の確立は大きな課題で、*in vitro* 皮膚透過実験においても、3次元培養ヒト皮膚モデルの代替膜としての有用性について詳細に調べられてきたが、合成人工膜モデルの利用については広汎な研究はほとんどないのが現状である。種々化合物の人工膜透過性とヒト皮膚透過性を比較することによって、動物福祉の向上も含めて、実使用される皮膚適用製剤の有効性と安全性を、より正確に評価する方法論の確立に繋がっていくと考えられた。そこで本研究では、まず、合成人工膜モデルの皮膚透過代替膜としての有用性を水性基剤の系で評価することで皮膚透過代替膜として信頼性が高いことを確認した後、皮膚透過性に影響を与える油剤の物理化学的特性値が、合成人工膜でも同様であるとの仮定のもと、それら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人工膜の有用性

第 1 章 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、水性基剤からの各種透過パラメータを比較検討した。すなわち 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有意な相関は得られたもののバラつきが大きかった。さらに、151.6 から 244.3 の範囲で、 $\log K_{ow}$ が 0.5 以上 3.5 以下の化合物では、シリコーン膜とヒト皮膚の透過パラメータ間に高い相関が得られた。以上より、化粧品や皮膚適用製剤から薬物や化合物の透過性の予測にシリコーン膜を使用することは可能であると考えられた。しかし、この範囲外の薬物の場合、モデル化合物の極性によって、ヒト皮膚透過性が過大もしくは過小に予測される場合があることに注意する必要があることが併せて明らかとなった。

第 2 章 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、モデル化合物の水性基剤からの透過性を比較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[®]とヒト摘出皮膚に適用して、得られた透過係数を 2 つの膜間で比較した。その結果、Strat-M[®]の透過係数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透過係数 ($\log P$) の高い相関が示された。さらに、Strat-M[®]の拡散と分配パラメータ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と考えら

れた。Strat-M[®]の電子顕微鏡観察の結果から、Strat-M[®]は3層構造となっており、1,2層目には脂質が存在していることが明らかとなった。このことから Strat-M[®]は角層の極性を模したシリコーン膜とは異なり、角層と生きた表皮・真皮層の重なりを模した構造を有し、脂質をバリア層に含むことから、ヒト皮膚と類似した合成人工膜であると考えられた。

第3章 シリコーン膜と Strat-M[®]との比較

シリコーン膜は値段、安定供給、操作性に優れているが、ヒト皮膚との相関性に適用可能な薬物の物性の範囲に制限があった。一方、Strat-M[®]は値段面での課題や水溶性経路を透過する薬物には不適があるものの、広い範囲の薬物においてヒト皮膚との相関性も良く、代替膜として有効であると考えられた。

第2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ヒト皮膚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、影響要因がヒト皮膚と人工膜で同様であるとの仮定のもと、ハイスループット拡散セル装置を用いた膜透過試験を行った。エステル油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、全ての薬物においてシリコーン膜透過量は各化合物の溶解度と相関せず、エステル油剤の表面張力や粘度、濡れ性、膜取込み量と有意な相関が得られた。このことから、人工膜に適用されたエステル油剤からの化合物の透過量を把握するには、エステル油

剤の膜取込み量を測定することが重要であり、また、粘度や表面張力などからもエステル油剤のスクリーニングが可能であることが示された。また将来、エステル油剤からのヒトまたはブタ皮膚透過性と人工膜透過性の相関に関する研究が必要であるものの、シリコーン膜や Strat-M[®]は、新規医薬品または化粧品を開発するための初期段階において用いる材料として有用と考えられた。

本研究の結果、合成人工膜、特に Strat-M[®]は *in vitro* 皮膚透過代替膜として有用であり、水性基剤からの化合物の皮膚透過予測に使用可能であることが明らかとなった。さらに、油性基剤からの各化合物の透過には、油性基剤の膜への取込み量が大きく影響し、表面張力や濡れ性、粘度が関連することを明らかとした。実際のヒト皮膚において、同様な影響がみられるのかは不明であるが、Strat-M[®]の構造上、性質上のヒト皮膚との類似性を考慮すると、本研究で得られた知見は、化合物の油剤からのヒト皮膚透過性を理解する上で有用な情報となると考えられる。今後、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と、それに基づく高い機能性を有する製品の開発に繋がることが期待される。

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次 先生に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始有益な御指導、御助言、ならびに激励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准教授 藤堂浩明 先生に心から深謝の意を表します。

また、本論文作成にあたりご教授とご校閲を頂きました城西大学薬学研究科製剤学講座教授 夏目秀視 先生および城西大学薬学研究科臨床薬理学講座教授 萩原政彦 先生に深く感謝いたします。

また、本論文校閲において適切なお助言をいただきました城西大学薬学研究科皮膚生理学講座教授 徳留嘉寛 先生および城西大学薬学研究科食毒性学講座教授 和田政裕 先生および城西大学薬学研究科薬品物理化学講座教授 関俊暢 先生に深く感謝いたします。

本研究の実施にご協力いただきました城西大学薬学研究科薬粧品動態制御学講座の学生をはじめとする関係諸氏に深く感謝いたします。特に、押坂勇志 博士、金井沙由美 修士、元木杏 修士、田村麻衣 学士の熱心な協力を得たことを記すとともに心より感謝申し上げます。

また、研究を進めるにあたり、ご支援、ご協力をいただきながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 中野真汎、森本雍憲、杉林堅次. ドラッグデリバリーシステム：現状と将来. 南山堂, 東京 (1986).
- 2) Knepp VM, Hadgraft J, Guy RH: Transdermal drug delivery: Problems and possibilities. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **4**, 13-37 (1987).
- 3) Morimoto Y, Hatanaka T, Sugibayashi K, Omiya H: Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 634-639 (1992).
- 4) Potts RO, Guy RH: Predicting skin permeability. *Pharm. Res.*, **9**, 663-669 (1992).
- 5) Abraham MH, Chadha HS, Martins F, Mitchell RC, Bradbury MW, Gratton JA: Hydrogen bonding part 46: a review of the correlation and prediction of transport properties by an lfer method: physicochemical properties, brain penetration and skin permeability. *Pestic. Sci.*, **55**, 78-88 (1999).
- 6) Mitragotri S: A theoretical analysis of permeation of small hydrophobic solutes across the stratum corneum based on Scaled Particle Theory. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 744-752 (2002).
- 7) Lian G, Chen L, Han L: An evaluation of mathematical models for predicting skin permeability. *J. Pharm. Sci.*, **97**, 584-598 (2008).
- 8) "OECD: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 439, Paris (2015)."
<<http://www.oecd.org/environment/>>.
- 9) Watanabe T, Hasegawa T, Takahashi H, Ishibashi T, Takayama K, Sugibayashi

- K: Utility of the three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs. *AATEX*, **8**, 1-14 (2001).
- 10) Kano S, Todo H, Sugie K, Fujimoto H, Nakada K, Tokudome Y, Hashimoto F, Sugibayashi K: Utilization of reconstructed cultured human skin models as an alternative skin for permeation studies of chemical compounds. *AATEX*, **15**, 61-70 (2010).
 - 11) Hikima T, Kaneda N, Matsuo K, Tojo K: Prediction of percutaneous absorption in human using three-dimensional human cultured epidermis LabCyte EPI-MODEL. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 362-368 (2012).
 - 12) Uchida T, Yakumaru M, Nishioka K, Higashi Y, Sano T, Todo H, Sugibayashi K: Evaluation of a silicone membrane as an alternative to human skin for determining skin permeation parameters of chemical compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 1338-1346 (2016).
 - 13) Kligman AM: Skin permeability: dermatologic aspects of transdermal drug delivery. *Am. Heart J.*, **108**, 200-206 (1984).
 - 14) Hadgraft J, Lane ME: Skin permeation: the years of enlightenment. *Int. J. Pharm.*, **305**, 2-12 (2005).
 - 15) Toyoda H: Regulation of the animal experiments and testing in EU. *Environ. Mutagen Res.*, **27**, 125-128 (2005).
 - 16) Ottaviani G, Martel S, Carrupt PA: Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *J. Med. Chem.*, **49**, 3948-3954 (2006).
 - 17) Miki R, Ichitsuka Y, Yamada T, Kimura S, Egawa Y, Seki T, Juni K, Ueda H, Morimoto Y: Development of a membrane impregnated with a

- poly(dimethylsiloxane)/poly(ethylene glycol) copolymer for a high-throughput screening of the permeability of drugs, cosmetics, and other chemicals across the human skin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **66**, 41-49 (2015).
- 18) Sinko B, Garrigues TM, Balogh GT, Nagy ZK, Tsinman O, Avdeef A, Takacs-Novak K: Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **45**, 698-707 (2012).
- 19) Garrett ER, Chemburkar PB: Evaluation, control, and prediction of drug diffusion through polymeric membranes. I. Methods and reproducibility of steady-state diffusion studies. *J. Pharm. Sci.*, **57**, 944-948 (1968).
- 20) Twist J, Zatz J: Influence of solvents on paraben permeation through idealized skin model membranes. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **37**, 429-444 (1986).
- 21) 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).
- 22) 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).
- 23) Geinoz S, Rey S, Boss G, Bunge AL, Guy RH, Carrupt PA, Reist M, Testa B: Quantitative structure-permeation relationships for solute transport across silicone membranes. *Pharm. Res.*, **19**, 1622-1629 (2002).
- 24) Wasdo SC, Juntunen J, Devarajan H, Sloan KB: A correlation of flux through a silicone membrane with flux through hairless mouse skin and human skin in *vitro*. *Int. J. Pharm.*, **373**, 62-67 (2009).

- 25) Sloan KB, Synovec J, Ketha H: A surrogate for topical delivery in human skin: silicone membranes. *Ther. Deliv.*, **4**, 203-224 (2013).
- 26) Cronin MT, Dearden JC, Gupta R, Moss GP: An investigation of the mechanism of flux across polydimethylsiloxane membranes by use of quantitative structure-permeability relationships. *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 143-152 (1998).
- 27) Moss GP, Sun Y, Wilkinson SC, Davey N, Adams R, Martin GP, Prapopopolou M, Brown MB: The application and limitations of mathematical modelling in the prediction of permeability across mammalian skin and polydimethylsiloxane membranes. *J. Pharm. Pharmacol.*, **63**, 1411-1427 (2011).
- 28) Riviere JE, Brooks JD: Predicting skin permeability from complex chemical mixtures: dependency of quantitative structure permeation relationships on biology of skin model used. *Toxicol. Sci.*, **119**, 224-232 (2011).
- 29) Bos JD, Meinardi MM: The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.*, **9**, 165-169 (2000).
- 30) Okamoto H, Hashida M, Sezaki H: Structure-activity relationship of 1-alkyl- or 1-alkenylazacycloalkanone derivatives as percutaneous penetration enhancers. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 418-424 (1988).
- 31) Matsui R, Hasegawa M, Ishida M, Ebata T, Namiki N, Sugibayashi K: Skin permeation of lidocaine from crystal suspended oily formulations. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **31**, 729-738 (2005).
- 32) Watkinson RM, Guy RH, Hadgraft J, Lane ME: Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery - II: influence of propylene glycol on

- ibuprofen permeation. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **22**, 225-230 (2009).
- 33) Sugibayashi K, Hayashi T, Matsumoto K, Hasegawa T: Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **19**, 352-362 (2004).
- 34) Ahmed S, Imai T, Otagiri M: Evaluation of stereoselective transdermal transport and concurrent cutaneous hydrolysis of several ester prodrugs of propranolol: mechanism of stereoselective permeation. *Pharm. Res.*, **13**, 1524-1529 (1996).
- 35) Flynn GL, Yalkowsky SH, Roseman TJ: Mass transport phenomena and models: theoretical concepts. *J. Pharm. Sci.*, **63**, 479-510 (1974).
- 36) Hatanaka T, Yoshida S, Kadhum WR, Todo H, Sugibayashi K: In silico estimation of skin concentration following the dermal exposure to chemicals. *Pharm. Res.*, **32**, 3965-3974 (2015).
- 37) Flynn GL. Principles of Route-to-Route Extrapolation for Risk Assessment. *Physicochemical determinants of skin absorption*. Elsevier, New York, 93-127 (1990).
- 38) Uchida T, Kadhum WR, Kanai S, Todo H, Oshizaka T, Sugibayashi K: Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **67**, 113-118 (2015).
- 39) Murthy S: Transdermal drug delivery: approaches and significance. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*, **1**, 1-2 (2012).
- 40) Avdeef A, Bendels S, Di L, Faller B, Kansy M, Sugano K, Yamauchi Y: PAMPA--critical factors for better predictions of absorption. *J. Pharm. Sci.*, **96**,

- 2893-2909 (2007).
- 41) Akamatsu M, Fujikawa M, Nakao K, Shimizu R: In silico prediction of human oral absorption based on QSAR analyses of PAMPA permeability. *Chem. Biodivers.*, **6**, 1845-1866 (2009).
 - 42) Palac Z, Engesland A, Flaten GE, Skalko-Basnet N, Filipovic-Grcic J, Vanic Z: Liposomes for (trans)dermal drug delivery: the skin-PVPA as a novel *in vitro* stratum corneum model in formulation development. *J. Liposome Res.*, **24**, 313-322 (2014).
 - 43) Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Herin M, Coquette A: A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in *in vitro* studies. *Arch. Dermatol. Res.*, **296**, 203-211 (2004).
 - 44) Scott RC, Walker M, Dugard PH: A comparison of the *in vitro* permeability properties of human and some laboratory animal skins. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **8**, 189-194 (1986).
 - 45) Karadzovska D, Riviere JE: Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **50**, 569-576 (2013).
 - 46) Uchida T, Nishioka K, Motoki A, Yakumaru M, Sano T, Todo H, Sugibayashi K: Effect of esters on the permeation of chemicals with different polarities through synthetic artificial membranes using a high-throughput diffusion cell array. *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 1597-1606 (2016).
 - 47) Higuchi T: Physical chemical analysis of percutaneous absorption oricess from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **11**, 85-97 (1960).
 - 48) Scheuplein RJ: Mechanism of percutaneous absorption. *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79-88 (1967).

- 49) 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).
- 50) Maitani Y, Kugo M, Nagai T: Permeation of Diclofenac Salts through Silicone Membrane : a Mechanistic Study of Percutaneous Absorption of Ionizable Drugs. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 1297-1301 (1994).
- 51) Joshi V, Brewster D, Colonero P: *In vitro* diffusion studies in transdermal research : a synthetic membrane model in place of human skin. *Drug Dev. Delivery*, **12**, 40-42 (2012).
- 52) Dias M, Hadgraft J, Raghavan SL, Tetteh J: The effect of solvent on permeant diffusion through membranes studied using ATR-FTIR and chemometric data analysis. *J. Pharm. Sci.*, **93**, 186-196 (2004).
- 53) Dias M, Hadgraft J, Lane ME: Influence of membrane-solvent-solute interactions on solute permeation in model membranes. *Int. J. Pharm.*, **336**, 108-114 (2007).
- 54) Watkinson RM, Guy RH, Oliveira G, Hadgraft J, Lane ME: Optimisation of cosolvent concentration for topical drug delivery III--influence of lipophilic vehicles on ibuprofen permeation. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **24**, 22-26 (2011).
- 55) Fujii M, Shiozawa K, Henmi T, Yamanouchi S, Suzuki H, Yamashita N, Matsumoto M: Skin permeation of indomethacin from gel formed by fatty-acid ester and phospholipid. *Int. J. Pharm.*, **137**, 117-124 (1996).
- 56) Fujii M, Hori N, Shiozawa K, Wakabayashi K, Kawahara E, Matsumoto M: Effect of fatty acid Esters on permeation of ketoprofen through hairless rat skin. *Int. J. Pharm.*, **205**, 117-125 (2000).

- 57) Takahashi K, Sakano H, Numata N, Kuroda S, Mizuno N: Effect of fatty acid diesters on permeation of anti-inflammatory drugs through rat skin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **28**, 1285-1294 (2002).
- 58) Azarbayjani AF, Lin H, Yap CW, Chan YW, Chan SY: Surface tension and wettability in transdermal delivery: a study on the *in-vitro* permeation of haloperidol with cyclodextrin across human epidermis. *J. Pharm. Pharmacol.*, **62**, 770-778 (2010).
- 59) Sakata O, Fujii M, Koizumi N, Nakade M, Kameyama K, Watanabe Y: Effects of the physicochemical properties of oil vehicles on the skin penetration of poor skin-penetrable materials under finite dose conditions *in vitro*. *J. Pharm. Sci. Technol. Jpn.*, **74**, 84-92 (2014).
- 60) Welin-Berger K, Neelissen JA, Bergenstahl B: The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 309-318 (2001).
- 61) Abraham MH, Martins F, Mitchell RC, Salter CJ: Hydrogen bonding. 47. Characterization of the ethylene glycol-heptane partition system: hydrogen bond acidity and basicity of peptides. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 241-247 (1999).
- 62) Gregoire S, Ribaud C, Benech F, Meunier JR, Garrigues-Mazert A, Guy RH: Prediction of chemical absorption into and through the skin from cosmetic and dermatological formulations. *Br. J. Dermatol.*, **160**, 80-91 (2009).
- 63) Karande P, Mitragotri S: High throughput screening of transdermal formulations. *Pharm. Res.*, **19**, 655-660 (2002).
- 64) Karande P, Jain A, Mitragotri S: Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 192-197 (2004).

- 65) Twist JN, Zatz JL: Membrane-solvent-solute interaction in a model permeation system. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 536-540 (1988).
- 66) Oliveira G, Beezer AE, Hadgraft J, Lane ME: Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part II. Thermodynamic analysis of membrane partitioning. *Int. J. Pharm.*, **420**, 216-222 (2011).
- 67) Twist JN, Zatz JL: A model for alcohol-enhanced permeation through polydimethylsiloxane membranes. *J. Pharm. Sci.*, **79**, 28-31 (1990).
- 68) Sato K, Sugibayashi K, Morimoto Y: Effect and mode of action of aliphatic esters on the in vitro skin permeation of nicorandil. *Int. J. Pharm.*, **43**, 31-40 (1988).