

エタノールのヘアレスラット皮膚透過と 皮膚毛細血管血色素漏出性および モルヒネ皮膚透過性の関係

関 俊暢^{*1,2)}, 和田好夫^{*2)}, 小林信子・従二和彦^{*1)}, 森本雍憲^{*1,2)}

Relationship among permeation of ethanol, leaching of hemoglobin from capillary blood, and permeation of morphine hydrochloride in hairless rat skin

Relationship between permeation of ethanol and leaching of hemoglobin from capillary blood, as a possible index of skin irritancy, was examined in hairless rats. Ethanol solutions were applied *in vivo* on the abdominal skin for 5h and then content of Fe, instead of hemoglobin, in the application site was measured. Permeation of ethanol through the skin was examined *in vitro* in the corresponding condition. The index, i.e. Fe content in the skin, shows correlation with cumulative amount of ethanol permeated or maximum flux of ethanol through the skin, while that wasn't correlated with concentration and content of ethanol in the applied solution. Since a slow and continuous permeation of ethanol for 8h didn't damage the skin, the maximum flux is more important parameter for the effect of ethanol on the skin irritation than the cumulative amount of ethanol permeated.

Relationship between permeation of ethanol and morphine hydrochloride (MPH) was also examined. The cumulative amount of MPH was correlated with the maximum flux of ethanol. A formulation containing ethanol should be designed carefully so as to attain effective skin permeation of drug while avoiding the occurrence of skin irritation.

*Toshinobu Seki^{*1,2)}, Yoshio Wada^{*2)}, Nobuko Kobayashi・Kazuhiko Juni^{*1)}, Yasunori Morimoto^{*1,2)}*

key words : ethanol, skin irritation, skin permeation, Fe content, morphine hydrochloride

全身作用性の薬物の適用部位として皮膚が有用であることはすでに十分知られているが、多くの薬物は皮膚透過性が低く、その経皮吸収型製剤の開発には吸収促進の技術が必要となる¹⁾。吸収促進剤の使用はその方法の一つであり、多くの新規化合物や既存添加剤についてその吸収促進効果の検証が行われている^{2,3)}。外用剤の添加剤としてエタノールは、古くから用いられており、その全身的な動態や毒性が明確であることから吸収促進剤としても有望である⁴⁻⁷⁾。すでにエタノールを含むエストラジオールの製剤が開発されており⁸⁾、その使用は今後広がって

いくものと考えられる。

しかし、エタノールには蛋白変性や脱脂による局所刺激性があり、その使用に際しては、その促進効果と局所毒性のバランスを取る必要がある。したがって、高い促進効果と低い刺激性を合わせもつ製剤を開発するためには、吸収促進作用に関してその様式やメカニズムを明らかにするだけでなく、皮膚刺激や組織の傷害に関しても同等な研究を行っていく必要がある⁹⁾。

筆者らは、すでに塩酸モルヒネ (MPH) の皮膚透過がエタノールと *l*-メントールの組合せによって効果的に増大することを示し、その作用様式やメカニズムを明らかにしてきた¹⁰⁻¹²⁾。また、これらの成分を含む MPH の皮膚適用製剤を患者に適用し、比較的低い皮膚刺激で疼痛のコントロールが可能であ

^{*1)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University 城西大学薬学部

^{*2)} Research Institute of TTS Technology 株式会社 TTS 技術研究所
Offprint requests to : Kazuhiko Juni, Ph. D., Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295

表 1 Composition and applied volume of test solutions

No.	composition(v/v%)			applied volume($\mu\text{l}/\text{cm}^2$)				
	ethanol	PEG400	l-menthol	50	100	200	300	500
1.	10	25	5			Δ		
2.	20	25	5	\square	\blacksquare	\blacksquare	\blacksquare	\blacksquare
3.	30	0	5	\diamond	\blacklozenge	\blacklozenge		
4.	30	50	5			∇		
5.	40	0	5		\circ			

ることを示した¹³⁾。しかし、エタノールや他の添加剤による皮膚刺激などの組織への影響の発現機構に関して十分な情報をすでに得ているわけではなく、より広範囲な臨床使用における安全性を確保するためには、それらの組織傷害における作用様式に関して基礎的研究を積み重ねていくことが必要である。

そこで本研究では、エタノールの作用のうち、血管などの組織の損傷とその後の痂皮形成を伴うような比較的強い作用に着目し、どのような適用条件においてその作用があらわれるかについて検討を行った。すなわち、実験動物としてヘアレスラットを用い、エタノールと *l*-メントールを含む種々組成の溶液を種々の容量で皮膚上に適用し、組織の傷害の程度を皮膚組織中の血色素の量として鉄(Fe)を測定することにより判定した。

方法

(1) ヘアレスラットへの各溶液の *in vivo* 適用

雄性ヘアレスラット(WBN-ILA-Ht, 200~250 g)をウレタン(1.0 g/kg)で麻酔して背位固定し、その腹部に有効面積 3.36 cm²のガラスセルをアロンアルファで接着した。表 1 に示すように、各溶液のそれぞれ適用量をセル中に加え、蒸発を防ぐように蓋をした。溶液の適用時間は、麻酔が維持される時間とエタノールの十分な透過が得られる時間の両方を考慮して、5 時間とした。

適用終了後、セルを取り外し、溶液を脱脂綿で拭き取ったあと、放血致死させ、有効面積部の皮膚を皮下組織とともに摘出した。摘出した組織は、重量と厚さを測定した後に -40°C で凍結保存した。

(2) 皮膚中の Fe の定量

皮膚をはさみで刻み、るつぼに入れ、ガスバーナー

で炭化後、電気炉(500°C, 3 時間)で灰化した。冷却後、塩酸 1 ml, フッ化水素酸 0.2 ml で一度溶解した後ホットプレート(120°C)上で蒸発乾固し、再度冷却後に塩酸 1 ml を加え溶解し、水で 25 ml に定容した。

各溶液中の Fe 濃度は、高周波プラズマ発光分析装置(ICPS-1000, 島津製作所)を用いて測定した¹⁴⁾。

(3) 摘出皮膚を用いた透過実験

ヘアレスラット腹部皮膚を摘出し、フランツ型セルに装着した。表 1 に示す各組成に 1% MPH を添加し、*in vivo* 実験と同様な条件でセル中に適用した。受容側は 37°C に保ち、1 時間毎に溶液を採取した。各試料中のエタノール濃度を測定し、各時間の皮膚透過速度と累積透過曲線を得た。

実験の間で最も高い透過速度の値を最大透過速度(F max)とした。エタノールの定量には内部標準物質をイソプロパノールとして、GC(GC-15A, 島津製作所)を、MPH の定量には内部標準物質をナロキソンとして、HPLC(LC-6A, 島津製作所)をそれぞれ用いた。

結果と考察

未処理の皮膚に関し同様な処置を行って測定した皮膚中 Fe 含有量は、 $0.57 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (\pm SD)であった。エタノール溶液で皮膚を 5 時間処理したあとでは、この皮膚中 Fe 含有量の値は、溶液の組成や適用条件によって大きく変化した。皮膚組織の傷害の原因となる基剤成分としては、エタノールと *l*-メントールが考えられたが、各適用条件で *l*-メントールの濃度が等しく、また予備検討において皮膚中 Fe 含有量と *l*-メントール皮膚透過量の間に関係がなかったことから、皮膚中 Fe 含有量の違いはエタ

表 2 Relationship between concentration in applied solution or applied volume of ethanol and Fe in skin after 5 h

No.	concentration of ethanol(v/v%)	applied volume of ethanol(μ l/cm ²)	Fe in skin (μ g/cm ²); (\pm SD)
1.	10	20	1.87 \pm 1.35
2.	20	10	0.14 \pm 0.13
	20	20	1.78 \pm 0.90
	20	40	3.53 \pm 0.91
	20	60	4.45 \pm 1.29
	20	100	4.26 \pm 0.90
3.	30	15	1.90 \pm 0.66
	30	30	2.87 \pm 0.33
	30	60	3.90 \pm 0.90
4.	30	60	0.14 \pm 0.24
5.	40	40	2.79 \pm 0.29

ノールの影響の違いによると考えた。皮膚中 Fe 含有量の値と適用条件である溶液中エタノール濃度およびエタノール適用量との関係を表 2 に示す。

溶液中エタノール濃度と皮膚中 Fe 含有量との間には明確な関係が認められず、皮膚の傷害の程度をエタノールの適用濃度の違いのみで説明することはできない(表 2)。皮膚へのエタノール適用量との関係でみると、エタノールの適用量の増加に対して皮膚中 Fe 含有量が増加する傾向が認められるが、処方 No. 4 : 200 μ l/cm²適用の場合には明らかにその関係が異なっている(表 2)。今回試験した処方のなかで、この処方においてのみ *l*-メントールが完全に溶解している。筆者らは以前の報告で *l*-メントールとエタノールを組み合わせた吸収促進系において、その促進作用が *l*-メントールの活量に依存することを示している¹¹⁾。そのことから、処方 No.4 : 200 μ l/cm²適用の場合、吸収促進効果が低く、皮膚組織の傷害も低かったものと考えられる。これらの結果から、溶液中エタノール濃度やエタノール適用量などの適用条件から得られるパラメータのみでは傷害性の違いを説明できないと思われる。

皮膚の傷害は、吸収促進作用により基剤成分が皮膚組織中に移行して生じるものと考えられる。適用する溶液中のエタノール濃度や適用したエタノール絶対量で皮膚傷害の強さが説明できない理由としては、実際に皮膚を透過するエタノールの量やその過程が各条件での促進効果の違いにより異なっている

ことが考えられる。そこで、各条件でのエタノールの透過を *in vitro* で測定し、皮膚組織の傷害との関係について検討を行った。そのパラメータとしては、5 時間までの累積エタノール透過量(Q_{5h})と F max を用い、皮膚中 Fe 含有量との関係を図 1 および図 2 にそれぞれ示す。どちらのパラメータを用いた場合でも、プロットは一つの曲線上に収束する傾向が認められ、その曲線はどちらの場合も、皮膚中 Fe 含有量に最大値がある飽和性を示す形状であった。

エタノールの皮膚透過に関係する Q_{5h} と F max のどちらが組織傷害において重要なパラメータかを知ることは、製剤設計を行ううえで有用な情報となる。そこで、表 1 に示した処方 No. 1 について皮膚適用量を 1 ml/cm²とし、8 時間まで適用を行って皮膚刺激の変化を評価した。そのエタノールの *in vitro* 皮膚透過プロファイルを図 3 A に示す。

図 3 A には、比較のため処方 No. 3 : 200 μ l/cm²適用と処方 No. 2 : 100 μ l/cm²適用についても併せて示す。処方 No. 1 : 1 ml/cm²適用では、F max の値は他の 2 条件と比較して最も低いが、適用時間がながくまた基剤中のエタノール濃度の減少が遅いため、エタノールの透過が持続的で、累積透過量の値では最も高い。この 3 条件での皮膚中 Fe 濃度の比較を図 3 B に示す。

処方 No. 1 : 1 ml/cm²適用がその値が最も低かった。3 時間の適用時間の延長により回復過程に移り傷害の程度が低下したとは考えられないので、組織傷害に関係するエタノールの透過パラメータとしては F max がより重要であると考えられる。この結果は、今回評価したような血管の傷害を伴うような強い作用がエタノールの皮膚中濃度と関係していることを示唆している。エタノールの皮膚中濃度は角質層を透過して皮膚に浸入する速度と血流によって皮膚から運び去られる速度のバランスにより決定し、角質層透過速度の増加は皮膚中エタノール濃度の増加を引き起こす。したがって、F max 値の違いは皮膚中エタノールの C max の違いと考えることができ、ある一定濃度以上のエタノール溶液において蛋白質が変性するという事実と考え合わせると、F max が重要なパラメータであるという結論は妥当であるように思われる。F max の値が大きくは違

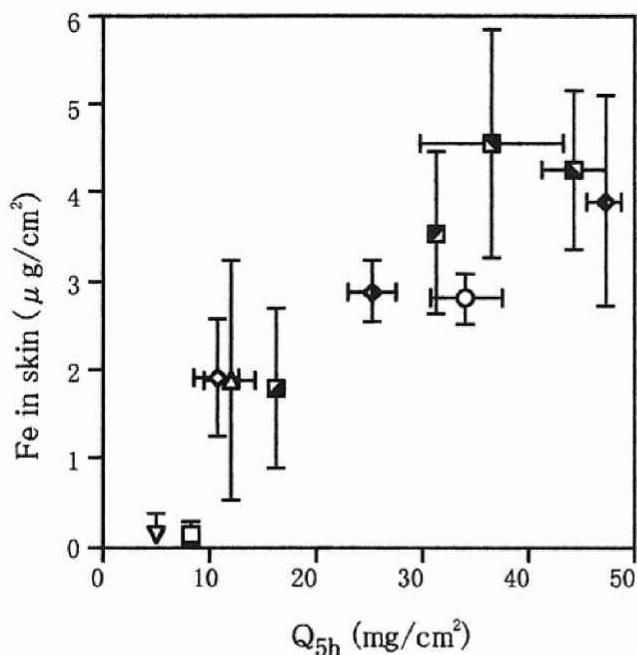


Fig 1 Relationship between cumulative amount of ethanol permeated through hairless rat skin in 5 h, Q_{5h} , and Fe in skin after 5 h

Symbols are shown in Table 1. Each plot represents the mean \pm SD (n=3-6).

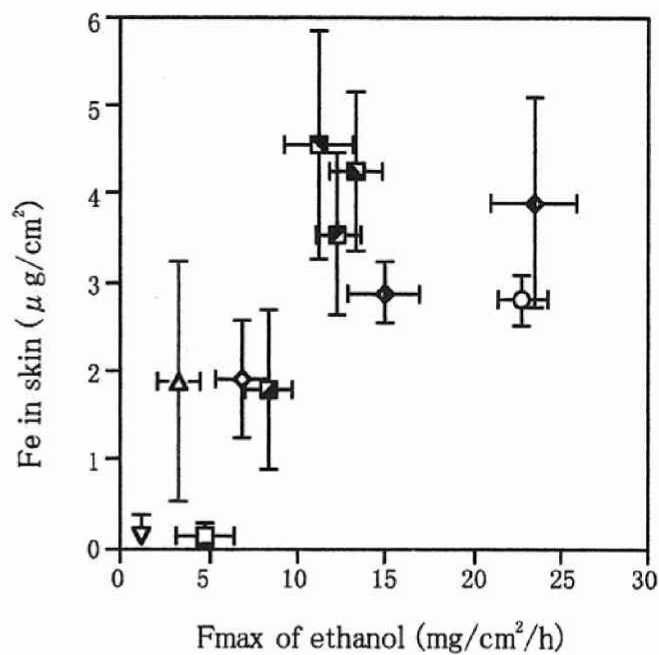


Fig 2 Relationship between maximum flux of ethanol through hairless rat skin, F_{max} , of ethanol and Fe in skin after 5 h

Symbols are shown in Table 1. Each plot represents the mean \pm SD (n=3-6).

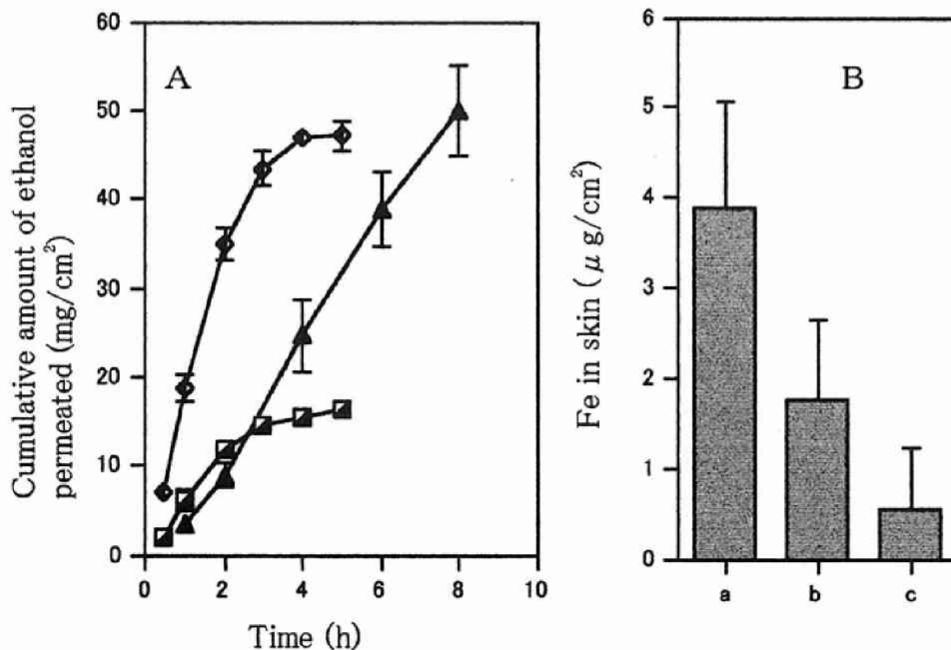


Fig 3 Permeation of ethanol through hairless rat skin (A) and Fe in skin (B) after application of ethanol solutions

- ethanol 30%, *l*-menthol 5%, applied $200 \mu\text{l}/\text{cm}^2$: No. 3 in Table 1 • (A) ◊, n=6 ; (B) a, n=3
- ethanol 20%, PEG400 25%, *l*-menthol 5%, applied $100 \mu\text{l}/\text{cm}^2$: No. 2 in Table 1 • (A) ◻, n=6 ; (B) b, n=3
- ethanol 10%, PEG400 25%, *l*-menthol 5%, applied $1 \text{ ml}/\text{cm}^2$: No. 1 in Table 1 • (A) ▲, n=3 ; (B) c, n=3

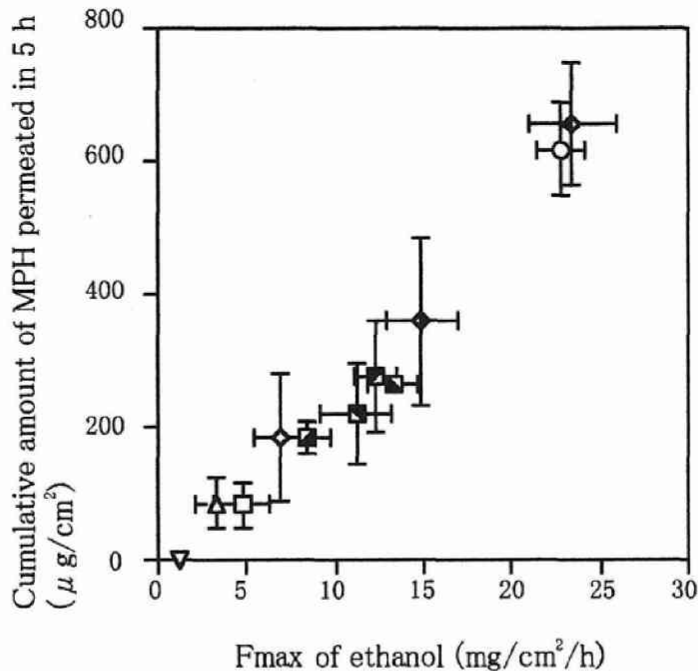


図 4 Relationship between cumulative amount of MPH permeated in 5 h and F max of ethanol through hairless rat skin
Symbols are shown in Table 1. Each plot represents the mean \pm SD (n=3-6).

わない処方 No.1: 1 ml/cm²適用と処方 No.2: 100 μ l/cm²適用で何故皮膚傷害が大きく異なるのかなど、不明な点もまだ多くあるが、これらの研究の更なる積み重ねにより、皮膚傷害の発現様式が明らかとなり、より安全な製剤が設計可能になると思われる。

皮膚組織の傷害において、F max が重要なパラメータであることが示されたが、このパラメータと薬物の皮膚透過の関係に興味をもたれる。そこで、各条件での 5 時間までの MPH の累積皮膚透過量の値を対応する F max 値に対してプロットした(図 4)。この両者の関係には明確な直線関係が認められる。エタノールの吸収促進機構の一つとして solvent drag 効果が指摘されている^{4-6,15)}。MPH の皮膚透過速度もエタノールの透過速度に依存していると考えられる。薬物吸収の促進と皮膚組織の傷害が同じ要因に依存しているというこの結果は、*in vitro* 実験で薬物透過性のみに着目して処方設計を行うことに警鐘を鳴らすものである。

実際に、ヒトに適用される製剤では、発赤や皮膚のあれなどより弱い皮膚刺激が問題の対象となる。

したがって、吸収促進の強度を許容可能なレベルに下げた時点で、薬物の吸収と皮膚刺激がそれぞれどんな要因に依存するかが重要となる。もし独立した要因に依存するように処方設計ができれば、その製剤は有効かつ安全となる。この目的を達成するためには、より弱い皮膚刺激や組織への影響を定量的に評価する方法を確立することに加え、動物種差の評価と予測理論の確立が必要であると思われる。

文 献

- 1) Hsieh DS(ed): Drug permeation enhancement. Marcel Dekker, New York, 1994.
- 2) Bando H, Takagi T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M: Theoretical design of prodrugs-enhancer combination based on a skin diffusion model: Prediction of permeation of acyclovir prodrugs treated with 1-geranylazacycloheptan-2-one. Pharm Res 13: 427-439, 1996.
- 3) Sugibayashi K, Nakayama S, Seki T, Hosoya K, Morimoto Y: Mechanism of skin penetration-enhancing effect by laurocapram. J Pharm Sci 81: 58-64, 1992.
- 4) Hori M, Maibach HI, Guy R: Enhancement of propranolol hydrochloride and diazepam skin absorption *in vitro*. II Drug, vehicle, and enhancer penetration kinetics. J Pharm Sci 81: 330-333, 1992.
- 5) Friend DR, Smedley SI: Solvent drag in ethanol/ethyl acetate enhanced skin permeation of *d*-norgestrel. Int J Pharmaceut 97: 39-46, 1993.

- 6) Tata S, Flynn GL, Weiner ND : Penetration of minoxidil from ethanol/propylene glycol solutions : Effect of application volume and occlusion. *J Pharm Sci* 84 : 688-691, 1995.
- 7) Kobayashi D, Matsuzawa T, Sugibayashi K, Morimoto Y, Kobayashi M et al. : Feasibility of use of several cardiovascular agents in transdermal therapeutic systems with *l*-menthol-ethanol system on hairless rat and human skin. *Biol Pharm Bull* 16 : 254-258, 1993.
- 8) Altenburger R, Rohr UD, Kissel T : Rate control in transdermal β -estradiol reservoir membrane systems : The role of membrane and adhesive layer. *Pharm Res* 15 : 1238-1243, 1998.
- 9) Nangia A, Camel E, Berner B, Maibach HI : Influence of skin irritants on percutaneous absorption. *Pharm Res* 10 : 1756-1759, 1993.
- 10) Sugibayashi K, Sakanoue C, Morimoto Y : Utility of topical formulations of morphine hydrochloride containing Azone and *N*-metyl-2 pyrrolidone. *Selective Cancer Ther* 5 : 119-128, 1989.
- 11) Wada Y, Nakajima K, Yamazaki J, Seki T, Sugibayashi K et al. : Influence of composition of *l*-menthol-ethanol-water ternary solvent system on the transdermal delivery of morphine hydrochloride. *Biol Pharm Bull* 16 : 600-603, 1993.
- 12) Matsuzawa T, Wada Y, Shimoyama M, Nakajima K, Seki T et al. : The effect of different routes of administration on the metabolism of morphine : The disposition of morphine and its metabolites after topical application. *Biopharm Drug Dispos* 15 : 665-678, 1994.
- 13) 塚越 茂, 堀越 昇, 高橋俊二, 加藤千明, 清水敬生・他 : 新モルヒネ経皮吸収型製剤とその臨床応用への可能性. *Drug Delivery System* 11 : 393-397, 1996.
- 14) 楳家 成, 野尻幸宏, 長谷川哲也, 原口紘元 : 誘導結合プラズマ発光分析による頭髪標準試料の多元素同時定量. *分析化学* 34 : 104-108, 1985.
- 15) Hatanaka T, Manabe E, Sugibayashi K, Morimoto Y : An application of the hydrodynamic pore theory to percutaneous absorption of drugs. *Pharm Res* 11 : 654-657, 1994.