

皮膚に浸透する物質の物理化学的パラメータを用いた有効性・安全性評価

押坂 勇志, 藤堂 浩明, 杉林 堅次*

Evaluation of Efficacy and Safety of Drugs Penetrated into Skin Using Their Physicochemical Parameters

Takeshi Oshizaka, Hiroaki Todo, and Kenji Sugibayashi*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University; 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

(Received July 30, 2012)

Skin has been paid attention as a site of application of prescription drugs, over-the-counter drugs (non-prescription drugs) and cosmetics. Skin permeation and skin concentration of the compounds should be considered after topical administration, as well as their blood concentration to evaluate efficacy and safety. Since the evaluation of the amount of drugs permeated through skin is important for topically applied drugs, studies on the skin permeation has been greatly advanced. In addition, many reports proved that skin permeabilities of drugs could be predicted from physicochemical parameters of drugs. On the other hand, few reports have been found on the prediction of skin concentration of drugs. Furthermore, many experimented problems are left to determine the skin concentration of drugs: severe consume of human or animal skins, difficult removal of applied drugs from the skin surface, low drug extraction ratio from skin and low sensitivity to determine skin concentration of drugs, and requirement of long time measurement. Thus, fast and accurate measurement of skin concentration of applied drugs are urgently required. This report describes the relationship between skin permeation and skin concentration, and the prediction of skin concentration of drugs using skin permeation parameters of drugs.

Key words——skin permeation; skin concentration; permeation coefficient; partition coefficient; concentration-distance profile

1. はじめに

近年、皮膚は医療用医薬品だけでなく一般用医薬品や化粧品の適用部位として注目されている。これらを開発する上で、研究者は皮膚に適用した製剤に含まれる成分の効果・効能だけでなく安全性を確認する必要がある。皮膚はまた、環境中から非意図的に種々化学物質の暴露を受けるため、それらの安全性についても確かめる必要がある。これまでに、全身循環系に移行して薬効を発現する薬物の有効性や安全性の評価のために、therapeutic drug monitoring (TDM) が行われてきた。¹⁻³⁾ TDM とは投与された薬物の血中濃度を測定し、薬物動態学的に解析し、そして、個々の患者に対して最も適切な薬物投与設計を行うことである。TDM を実施するには、

その対象となる薬物がいくつかの条件を満たさなければならない。すなわち、薬物の血中濃度に関する確実なデータを得るためには、信頼できる定量方法があり、血中濃度と効果の関係が明らかで、臨床的観点から治療濃度範囲と中毒発現濃度が既知である必要がある。このように薬物の血中濃度は有効性・安全性を評価するにあたって非常に重要な情報を提供する。濃度と有効性・安全性の関係は、血中濃度だけでなく、皮膚局所でも同様に考えることができる。すなわち、皮膚表層で作用する製剤（サンスクリーン剤、皮膚保護剤など）や皮膚局所で作用する製剤（抗菌剤、鎮痒剤、機能性化粧品など）の皮膚局所での有効性・安全性を評価するには、皮膚中濃度を評価する必要がある。皮膚中濃度は皮膚透過性同様に Fick の拡散式を用いて算出することができる。皮膚に適用する医薬品では、経皮吸収量の定量的評価が大切になるケースが多かったため、化学物質の経皮吸収研究は、今まで特に医薬品分野で進んだ。その中で、化学物質の皮膚透過性はその物理化

The authors declare no conflict of interest.

城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 (〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

*e-mail: sugib@josai.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 132 年会シンポジウム S01 で発表したものを中心に記述したものである。

学的パラメータ（オクタノール/水分配係数，分子量，溶解度，融点， pK_a など）から予測可能であることが数多く報告された。⁴⁻⁸⁾ 米国環境保護庁 (U.S. Environmental Protection Agency; EPA) のホームページから，化学物質の皮膚透過性予測ソフトをダウンロードして利用することも可能となっている。⁹⁾ 一方で，化学物質の皮膚中濃度に関しては，ほとんど研究報告がなく，皮膚中濃度の予測法はおろか，皮膚中濃度の実測値の決定方法についても様々な問題点が残っている。例えば，皮膚中濃度の決定には，ヒト又は動物皮膚サンプルが数多く必要なこと，製剤の皮膚からの除去方法が難しいこと，皮膚からの物質の抽出率が低いこと，皮膚中濃度が一定になるまでの時間が長く，測定時間がかかること等が挙げられる。したがって，迅速で正確な皮膚中濃度評価法が必要となる。

本稿では，化学物質の皮膚透過性と皮膚中濃度の関係を明らかにし，物質の皮膚透過試験から得られる透過パラメータを用いた皮膚中濃度予測法について述べる。

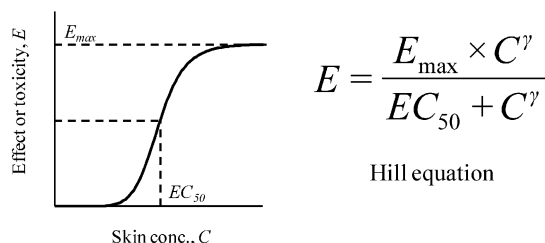
2. 有効性・安全性と皮膚中濃度の関係

化学物質の有効性や安全性と濃度の関係を Fig. 1 に示す。Figure 1 に示すように，化学物質の薬効発現反応や中毒反応には直接反応と間接反応がある。Figure 1 (a) に示した反応は，直接反応のモデルで，化学物質が作用部位レセプター等に結合して直接効果を発現する場合などで成り立つ。また，この場合，反応と濃度の関係は Fig. 1 (a) 中に示した Hill 式で表すことができる。¹⁰⁾ 一方，Fig. 1 (b) に示した反応は間接反応のモデルで，化学物質が酵素反応を促進するか又は阻害を行う場合等にみられる。この場合，反応と濃度の関係は Fig. 1 (b) 中に示した式で表すことができる。いずれにせよ，これらの式からも明らかなように，皮膚局所での化学物質の有効性や安全性は，反応部位での皮膚中濃度により決定される。したがって， EC_{50} や IC_{50} 等のパラメータを *in vitro* 試験で得ることができれば，皮膚中濃度を正しく評価することによって，化学物質の効能や皮膚刺激性を予測することが可能となる。

3. 化学物質と皮膚透過性

皮膚中濃度を評価するためには，まず皮膚透過性の理解が大変重要である。Figure 2 は化学物質を皮膚に適用した際の典型的な皮膚透過挙動を示す。皮

a) Direct reaction



b) Indirect reaction

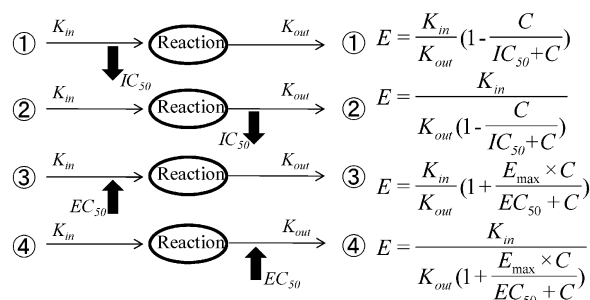


Fig. 1. Relationship between Skin Concentration and Effect or Toxicity of Compounds in Cases of Direct Reaction (a) and Indirect Reaction (b)

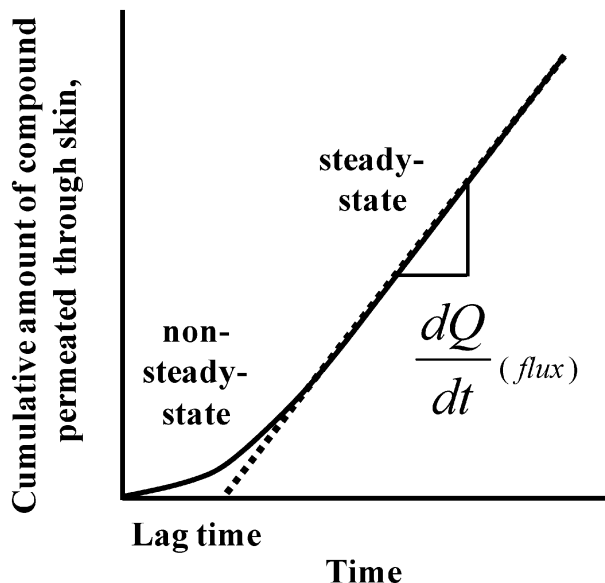


Fig. 2. Typical Skin Permeation Profile

膚に適用した化学物質は瞬時に皮膚最外部にある角層へ分配し，皮膚中を拡散する。一定時間が経過すると化学物質の透過速度は一定となり，Fig. 2 の直線性部になり，定常状態となる。定常状態時の透過挙動を，Fick の拡散則から導いた式 [Eqs. (1) and (2)] を用いて解析することで，以下の透過係数 (P)，分配係数 (K)，拡散係数 (D) を求めること

ができる。^{8,11,12)}

$$P = \frac{KD}{L} \quad (1)$$

$$T_{lag} = \frac{L^2}{6D} \quad (2)$$

また Fig. 2 中の皮膚透過速度が一定になるまでの時間 (lag time) T_{lag} は, Eq. (2) で示される. ここで, L は膜厚を表す.

次に, 化学物質の皮膚透過ルートについて考察する. 化学物質は角層実質又は毛嚢, 汗腺, 脂腺等の付属器官を通り, 皮膚透過すると考えることができる. この両者を角層実質ルートと付属器官ルートと呼ぶことにする. 両ルートを比べると, 付属器官は皮膚全体の面積の 0.1% 程度しか存在しないため, 全皮膚透過に対する角層実質ルートの寄与は付属器官ルートより著しく大きいと考えることができる.

皮膚はまた, 親油性である角層と親水性である角層以外の表皮 (生きた表皮)・真皮に分けて考えることができる. 角層は, 角質細胞の周りをセラミド等の細胞間脂質で覆われてできている層であり, 角質細胞層が 15-20 層積み重なってできている. 一般に, 化学物質の角層中の拡散は, 生きた表皮・真皮中の拡散より著しく遅いため, 角層が皮膚透過の最大のバリアである.

化学物質の皮膚透過性評価では, 皮膚の構造だけでなく化学物質の物理化学的パラメータをも考えなければならない. われわれは皮膚の構造を容易に変えることはできないが, 化学物質の物理化学的パラメータは化学的に容易に変えることができる. したがって, 化学物質の物理化学的パラメータと皮膚透過性の関係を理解しておけば, より短期間で有効な医薬品製剤や化粧品を作製することが可能であると考えられる. Figure 3 にヘアレスラット全層皮膚, ヘアレスラット角層除去皮膚及び LSE-high 全層皮膚を介した種々水溶性化学物質の透過係数と分子量の関係を示す. Figure 3 から明らかなように, ヘアレスラット皮膚及び LSE-high を介した化学物質の透過性は, 化学物質の分子量が 500 以上になると低くなる.¹³⁾ また, 前述したように, 化学物質の極性によっても皮膚透過性が異なることが知られている. Figure 4 は化学物質の極性を示すオクタノール/水分配係数の対数値 ($\log K_{o/w}$) と透過係数の対数値をプロットした結果である.⁵⁾ 皮膚表面には親油

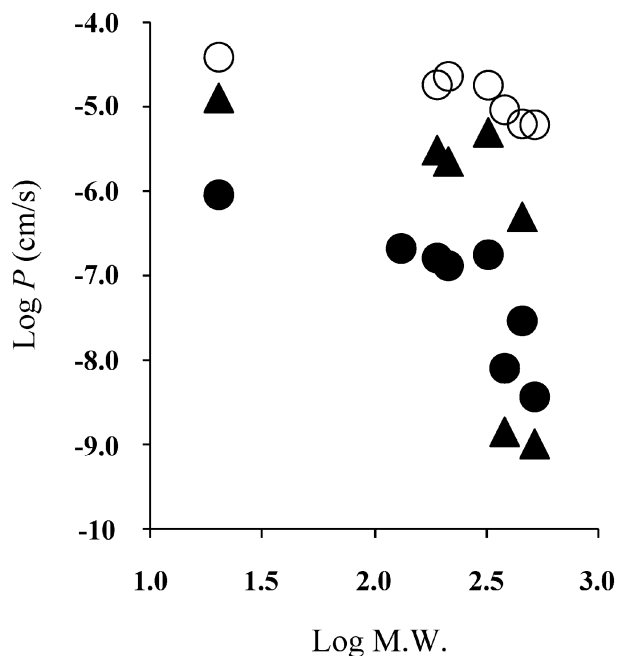


Fig. 3. Relationship between Molecular Weight and Skin Permeation Coefficients of Hydrophilic Compounds
●: Hairless rat full-thickness skin, ○: Hairless rat stripped skin, ▲: LSE-high.

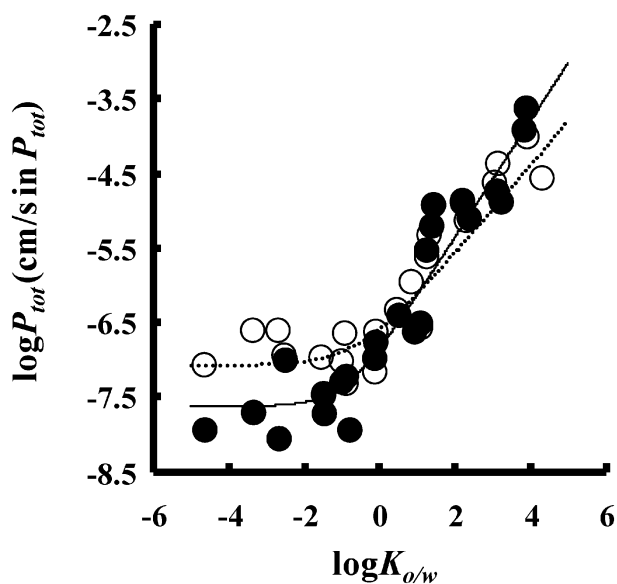


Fig. 4. Relationship between *n*-Octanol/Water Partition Coefficients and Skin Permeation Coefficients of Compounds
●: Hairless rat full-thickness skin, ○: Human full-thickness skin.

性である角層が存在するため, 親油性の化学物質ほど角層に分配し, 透過係数が高くなる.

4. 皮膚透過性と皮膚中濃度の関係¹⁴⁾

Figure 2 は典型的な皮膚透過挙動であるが, Fig. 5 は典型的な皮膚中濃度の経時的変化を示す. 化学

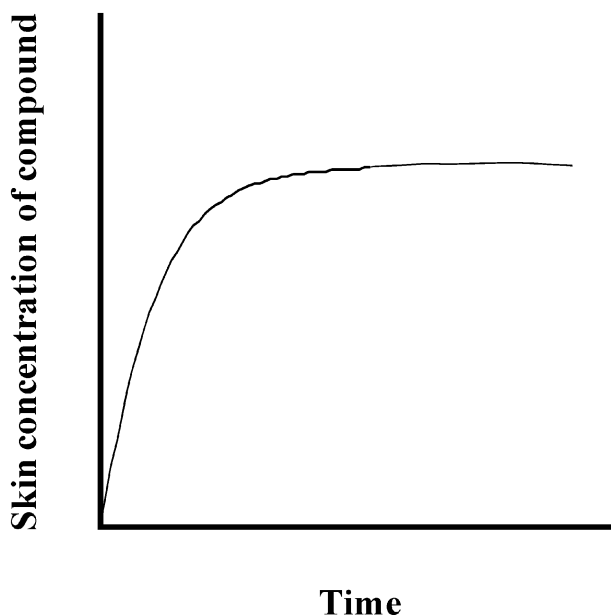


Fig. 5. Time Course of Skin Concentration of Topically Applied Compounds

物質を皮膚に適用すると、皮膚透過量及び皮膚中濃度は徐々に増えていくが、皮膚透過速度が一定となったときは皮膚中濃度も一定値をとる。すなわち、皮膚透過速度が一定で、適用した化学物質の濃度が変わらなければ、皮膚中濃度は一定の値を示す。

Figure 6 は膜を介した定常状態時の化学物質の concentration-distance profile を示す。

Figure 6 (a) は 1 層膜と仮定したときの concentration-distance profile で、物質の膜中濃度 C は、膜の位置 x 、時間 t の関数として次式に示す Fick の拡散第 2 法則で表すことができる。

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (3)$$

一般に、初期条件 (I.C.) と境界条件 (B.C.) は以下ようになる [Fig. 6(a) 参照].¹⁵⁾

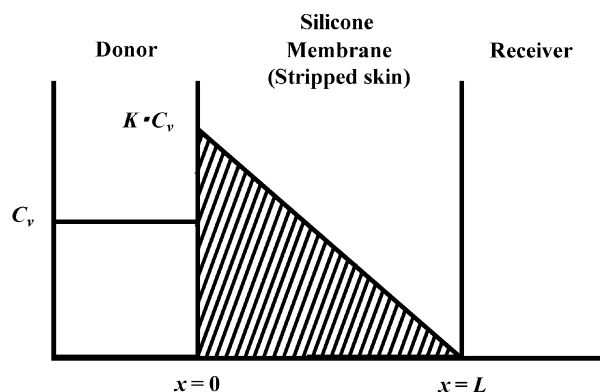
$$\begin{aligned} \text{I.C. } t=0 \quad 0 < x < L_s \quad C=0 \\ \text{B.C. } t>0 \quad x=0 \quad C=KC_v \\ x=L_s \quad C=0 \end{aligned} \quad (4)$$

Equation (4) を用いて Eq. (3) を計算すると C は次式となる。

$$\begin{aligned} C = KC_v \left[\left(1 - \frac{x}{L} \right) - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin \left(\frac{n\pi x}{L} \right) \right. \\ \left. \exp \left(-\frac{Dn^2\pi^2}{L^2} t \right) \right] \end{aligned} \quad (5)$$

ここで、 L_s は膜の厚さ、 K は膜/基剤間の分配係

(a) One-layered diffusion model



(b) Two-layered diffusion model

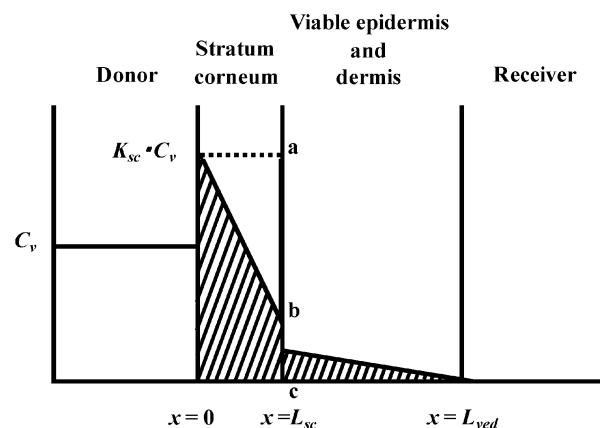


Fig. 6. Schematic Diagram of Concentration-Distance Profile of Compounds in One-layered Diffusion Model (a) and Two-layered Diffusion Model (b)

数、 C_v は基剤中物質濃度を示す。また、定常状態を迎えたあとの膜中濃度 C_{ss} は次式で表すことができる。

$$C_{ss} = KC_v \left(1 - \frac{x}{L} \right) \quad (6)$$

さらに、膜中平均濃度は Eq. (4) を x に関して膜の厚さ 0 から L まで積分して、次式で表すことができる。

$$\begin{aligned} \bar{C} = \frac{KC_v}{2} \left\{ 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{m=1}^{\infty} \frac{1}{(2m-1)^2} \right. \\ \left. \exp \left(-\frac{D(2m-1)^2\pi^2}{L^2} t \right) \right\} \end{aligned} \quad (7)$$

Equation (7) も同様に定常状態を迎えると、次式で表すことができる。

$$\bar{C}_{ss} = \frac{KC_v}{2} \quad (8)$$

Equation (8) から明らかなように、定常状態での膜中平均濃度は膜中拡散係数の D ではなく、適用濃度 C_v と基剤から膜への分配係数 K で決定される。ここで、 C_v は既知の値であるため、 K さえわかれば膜中濃度を予測することが可能である。このことは、非常に主要な意味を持っている。例えば、吸収促進剤を用いて膜透過性を増加させても、この吸収促進剤の寄与が膜中の拡散係数 D の上昇であったなら、皮膚中濃度は変わらないということである。すなわち、皮膚中濃度を上昇させるためには分配係数 K を上げなければならない。

1 層膜モデルは取り扱いが極めて簡単で、定常状態時の膜中平均濃度を簡潔な式 [Eq. (8)] で示すことができる。しかし、皮膚は複雑な拡散膜で、透過性はともかく皮膚中濃度評価では 1 層膜では不十分であることが多い。前述したように、ヒト皮膚や動物皮膚は、透過性（拡散性）の違いから死んだ角層バリアと生きた細胞からなる表皮・真皮バリアのそれぞれ均一な拡散抵抗を表す 2 層からなる拡散モデルとしてとらえられている。Figure 6(b) は 2 層膜時の concentration-distance profile を示す。Figure 6(b) の横軸は膜透過の方向を示す。一方、縦軸は物質の濃度を表す。また、Fig. 6 中の斜線部で示した面積は適用単位面積当たりの物質量（例えば $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で示される）に相当し、角層及び生きた表皮・真皮部位の物質濃度の傾き、すなわち濃度勾配と、その層中の拡散係数の積は、透過速度を示す。2 層膜モデルにおいては全体の透過係数 P_{tot} は角層の透過係数 P_{sc} と生きた表皮・真皮の透過係数 P_{ved} の逆数の和で表すことができる。^{16,17)}

$$\frac{1}{P_{tot}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{ved}} \quad (9)$$

さらに、これら透過係数の逆数 $1/P_{tot}$, $1/P_{sc}$, $1/P_{ved}$ は、透過抵抗 R_{tot} , R_{sc} , R_{ved} と表すこともできる [Eq. (10)].

$$R_{tot} = R_{sc} + R_{ved} \quad (10)$$

Figure 6 の sc と ved 界面での point a, b, c において、ab と bc の比は R_{sc} と R_{ved} の比で示されることになる。すなわち point b での薬物濃度は次式で表すことができる。

$$C_{point\ b} = K_{sc} \times C_v \times R_{ved} / R_{tot} \quad (11)$$

Equation (11) を用いることにより、単位面積あたりの角層中の薬物量 A_{sc} は次のように表すことができる。

$$A_{sc} = (K_{sc} \times C_v + K_{sc} \times C_v \times R_{ved} / R_{tot}) \times L_{sc} / 2 \quad (12)$$

角層から表皮・真皮への分配係数は、 K_{sc} と K_{ved} の定義から K_{ved} / K_{sc} と表すことができる。この比を使って単位面積当たりの ved 中の A_{ved} は Eq. (13) のように表すことができる。

$$A_{ved} = K_{ved} \times C_v \times L_{ved} \times R_{ved} / R_{tot} / 2 \quad (13)$$

さらに、Eq. (12) と Eq. (13) を足すと、単位面積あたりの皮膚中の薬物量 A_{tot} は次のようになる。

$$A_{tot} = \frac{C_v}{2} \{K_{sc} \times L_{sc} \times (1 + R_{ved} / R_{tot}) + K_{ved} \times L_{ved} \times R_{ved} / R_{tot}\} \quad (14)$$

Equation (14) を皮膚の厚さ (L_{tot}) で除すると、皮膚中の平均薬物濃度 C_{ss} が求められる。

$$C_{ss} = \frac{C_v}{2 \times L_{tot}} \{K_{sc} \times L_{sc} \times (1 + R_{ved} / R_{tot}) + K_{ved} \times L_{ved} \times R_{ved} / R_{tot}\} \quad (15)$$

さらに、Eq. (15) を透過係数 P で示すと次のように変形できる。

$$C_{ss} = \frac{C_v}{2 \times L_{tot}} \{K_{sc} \times L_{sc} \times (1 + P_{tot} / P_{ved}) + K_{ved} \times L_{ved} \times P_{tot} / P_{ved}\} \quad (16)$$

したがって、Eq. (16) を用いることで皮膚透過性から皮膚中濃度を計算して求めることができる。

本稿では、1 層膜であるシリコーン膜を用いて、Eq. (8) の妥当性を検討した。また、皮膚を用いて Eq. (16) の妥当性についても検討した。

ここで、実測値（膜中濃度）の決定方法について述べる。膜透過実験終了（物質の透過が定常状態時となった点）後、ドナー溶液を回収し、シリコーン膜又は摘出皮膚を取り出し、PBS 1 mL で 2 回洗浄した。次に、シリコーン膜の場合では、1 mL のクロロホルムに浸し、15 min 攪拌して化学物質（本研究ではパラベン類を用いた）を抽出した。クロロホルムを乾固して、アセトニトリルで再溶解させ、HPLC を用いてパラベン類を測定した。ヘアレスラット皮膚の場合は、ハサミを用いて皮膚をミンスし、1 mL のリン酸緩衝液（PBS）に浸し、電動ホモジナイザー（Polytron PT-MR 3000, Kinematica, Switzerland）で処理（12000 rpm, 5 min, 4°C）した。遠心分離（15000 rpm, 5 min, 4°C）後、上清を

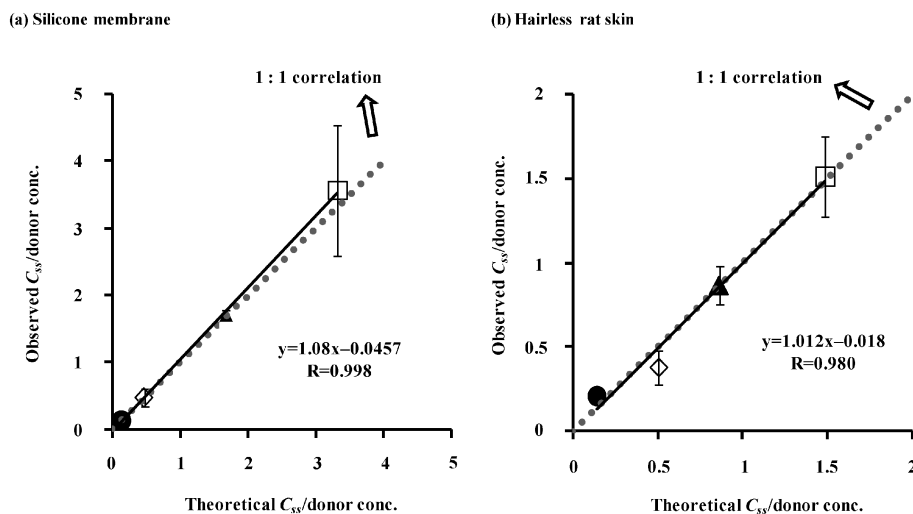


Fig. 7. Relationship between Theoretical and Observed Concentration of Compounds in Silicone Membrane (a) and Hairless Rat Skin (b) at Steady-state

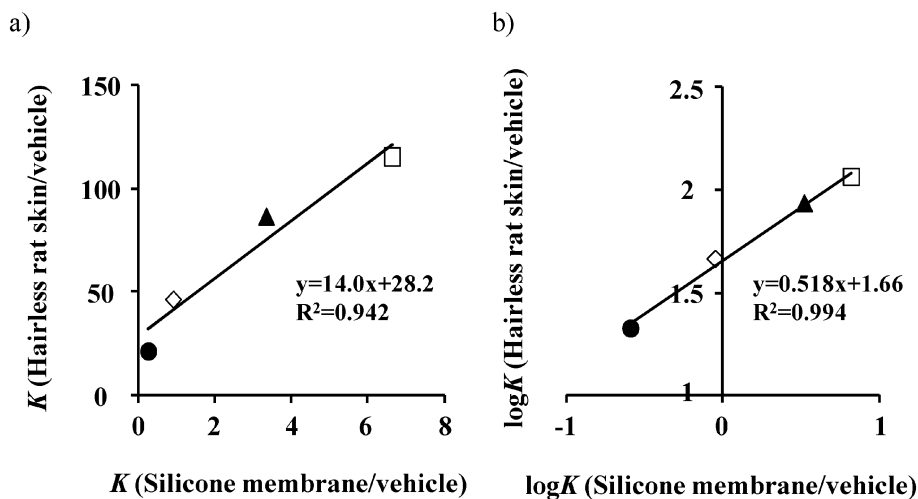


Fig. 8. Relationships in Partition Coefficients between Skin and Silicone Membrane (a) and between Their Logarithmic Values (b)

HPLC を用いて測定した。なお、化学物質の膜・皮膚抽出率については、あらかじめ求めておき、この値を用いて膜・皮膚中濃度を算出した。

Figure 7(a) にシリコン膜を用いたときのモデル化学物質（パラベン類）の膜中濃度実測値と Eq. (8) から求めた計算値を比較する。また、同様に Fig. 7(b) にヘアレスラットを用いたときのパラベン類の皮膚中濃度実測値と Eq. (16) から求めた計算値を比較して示す。これら Fig. 7 から明らかなように、シリコン膜・ヘアレスラット皮膚中濃度ともに、実測値と計算値はほぼ一致した（1 : 1 の相関を得られた）。したがって、concentration-distance profile から導き出した膜・皮膚中濃度予測式

[Eqs. (8) and (16)] は膜透過挙動から膜中濃度を予測するのに大変有用であると考えられた。

前述したように、全層皮膚透過係数（ P_{tot} ）は化学物質の $\log K_{o/w}$ から予測することが可能である。したがって、Eq. (16) に示した皮膚透過パラメータを化学物質の物理化学的パラメータを用いて予測することができれば、膜透過実験さえ行わずに皮膚中濃度を予測できるようになると考えられる。

Figure 8(a) は、パラベン類のシリコン膜に対する $K_{silicone/vehicle}$ とラット皮膚に対する $K_{skin/vehicle}$ の関係を示す。この 2 つの分配係数には、比較的良好な相関性（ $R^2=0.942$ ）があった。一般に同一物質の同一基剤から異なる 2 つの膜への分配率間には

以下の関係がある.

$$\log K_{\text{skin/vehicle}} = a \log K_{\text{silicone/vehicle}} + b \quad (17)$$

ここで、 a と b は係数である. Figure 8 (b) は $K_{\text{silicone/vehicle}}$ と $K_{\text{skin/vehicle}}$ の両対数プロットを示す. Figure 8 (b) から明らかなように、極めて良好な直線関係 ($R^2=0.994$) があった. 1 層膜モデルでは、皮膚中濃度を決定づける唯一のパラメータが K であるので、Eq. (17) 又はその関係図 [例えば Fig. 8 (b)] を用いて $K_{\text{silicone/vehicle}}$ から $K_{\text{skin/vehicle}}$ を予測し、皮膚中濃度を推定することも十分可能であろう.

5. おわりに

これら皮膚局所での有効性・安全性評価を行うためには、皮膚中濃度が大変重要であり、今回報告した式を用いて平均皮膚中濃度が予測可能であると考えられた. 有効成分だけでなく、製剤に含まれるすべての基剤成分も皮膚刺激性を示す. したがって、物質の物理化学的性質から皮膚透過パラメータの算出が可能となれば、皮膚に適用する医薬品製剤や化粧品を開発する上で、非常に有用であると考えられる. 近年は、動物福祉の観点から、動物実験の削減や代替評価法の導入が叫ばれていることから、本手法の発展は今後の医薬品や化粧品の開発に大きな影響を与えている.

REFERENCES

- Huffman D. H., Crow J. W., Pentikainen P., Azarnoff D. L., *Am. Heart J.*, **91**, 28–34 (1976).
- Sheiner L. B., Rosenberg B., Marathe W., *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **5**, 445–479 (1977).
- Vozeh S. R., Hillman R., Wandell M., Ludden T., Sheiner L., *Ther. Drug Monit.*, **7**, 66–75 (1985).
- Potts R. O., Guy R. H., *Pharm. Res.*, **9**, 663–669 (1992).
- Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3452–3459 (1990).
- Ottaviani G., Martel S., Carrupt P. A., *J. Med. Chem.*, **50**, 742–748 (2007).
- Naegel A., Hansen S., Neumann D., Lehr C. M., Schaefer U. F., Wittum G., Heisig M., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **68**, 368–379 (2008).
- Lian G., Chen L., Han L., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 584–598 (2008).
- U.S. Environmental Protection Agency: (<http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuite.htm>), cited 21 August, 2012.
- Kano S., Sugibayashi K., *Pharm. Res.*, **23**, 329–335 (2006).
- Scheuplein R. J., *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79–88 (1967).
- Yamada K., Yamashita J., Todo H., Miyamoto K., Hashimoto S., Tokudome Y., Hashimoto F., *J. Oleo Sci.*, **60**, 31–40 (2011).
- Bos J. D., Meinardi M. M., *Exp. Dermatol.*, **127**, 1701–1712 (2000).
- Sugibayashi K., Todo H., Oshizaka T., Owada Y., *Pharm. Res.*, **27**, 134–142 (2010).
- Kokubo T., Sugibayashi K., Morimoto Y., *J. Control. Release*, **20**, 3–12 (1992).
- Ghanem A. H., Mahmoud H., Higuchi W. I., Liu P., *Int. J. Pharm.*, **78**, 137–156 (1992).
- Oh S. Y., Fujii M., Takeda Y., Yoda K., Utoguchi N., Matsumoto M., Watanabe Y., *Int. J. Pharm.*, **236**, 35–42 (2002).