

皮膚拡散モデルに基づく吸収促進剤の機構解析  
と吸収動態予測に関する研究

山 下 富 義

皮膚拡散モデルに基づく吸収促進剤の機構解析  
と吸収動態予測に関する研究

山 下 富 義

# 目次

|  |    |
|--|----|
| 総論の部   | 1  |
| 緒言   | 1  |
| 第 I 章 皮膚拡散モデルの構築と経皮吸収動態解析への応用                      | 2  |
| I - 1 皮膚拡散モデルの構築                                   | 2  |
| 1 - a 極性および非極性経路を考慮した二枚膜皮膚モデルの構築                   | 3  |
| 1 - b 平均皮膚内通過時間 MTT の誘導                            | 9  |
| 1 - c in vitro における皮膚拡散モデルの構築                      | 10 |
| 1 - d 一枚膜および二枚膜拡散モデルとの対応                           | 13 |
| I - 2 二枚膜皮膚拡散モデルに基づく in vitro 皮膚透過挙動の解析            | 15 |
| 2 - a 正常および角質層除去皮膚における 6-mercaptopurine の透過        | 16 |
| 2 - b 二枚膜モデルに基づく皮膚透過パラメータの算出                       | 17 |
| 2 - c 平均皮膚内通過時間 MTT の算出                            | 19 |
| I - 3 薬物経皮投与時における皮膚中濃度の評価                          | 20 |
| 3 - a in vivo における皮膚中濃度の評価法                        | 21 |
| 3 - b acyclovir 軟膏投与後の in vivo 吸収パターンの評価           | 24 |
| 3 - c 二枚膜皮膚モデルに基づく皮膚透過パラメータの算出                     | 26 |
| 3 - d 皮膚中薬物濃度のシミュレーション                             | 27 |
| I - 4 考察   | 28 |
| 第 II 章 皮膚拡散モデルに基づく吸収促進剤の作用機構解析                     | 30 |
| II - 1 1-Geranylazacycloheptan-2-one(GACH) の促進機構解析 | 30 |
| 1 - a モデル薬物とその物理化学的性質                              | 31 |
| 1 - b 各種薬物の in vitro 皮膚透過に及ぼす GACH の影響             | 33 |
| 1 - c 薬物の親油性と吸収促進効果の関連                             | 36 |
| 1 - d 極性経路を考慮した二枚膜皮膚モデルに基づく吸収促進機構の解析               | 37 |
| 1 - e 線形自由エネルギー相関に基づく GACH 促進機構の考察                 | 40 |
| 1 - f 各種薬物に対する吸収促進効果のシミュレーション                      | 42 |
| II - 2 皮膚拡散モデルに基づく各種吸収促進剤の作用機構比較                   | 43 |
| 2 - a d-limonene、oleic acid、GACH の吸収促進効果の比較        | 44 |
| 2 - b 各種吸収促進剤の作用機構比較                               | 47 |
| II - 3 考察  | 49 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 第Ⅲ章  | 経皮吸収促進効果における動物種差および in vitro/in vivo 間の差の解析 | 53 |
| Ⅲ-1  | 経皮吸収および吸収促進効果における種差の解析                      | 53 |
| 1-a  | モルモットおよびラット皮膚における GACH の吸収促進効果              | 54 |
| 1-b  | モルモットおよびラット間での皮膚透過パラメータの比較                  | 56 |
| Ⅲ-2  | 経皮吸収および吸収促進効果における in vitro/in vivo 差の解析     | 58 |
| 2-a  | 静脈内投与後の薬物尿中排泄                               | 59 |
| 2-b  | GACH 適用時における in vitro および in vivo 皮膚透過      | 60 |
| 2-c  | in vitro/in vivo 間の皮膚透過パラメータの比較             | 63 |
| Ⅲ-3  | oleic acid による in vivo 経皮吸収促進の解析            | 64 |
| 3-a  | oleic acid による in vivo 経皮吸収促進効果             | 65 |
| 3-b  | in vivo における oleic acid の作用機構               | 66 |
| Ⅲ-4  | 考察  | 67 |
| 結論   |   | 70 |
| 謝辞   |   | 72 |
| 実験の部 |   | 73 |
| 第Ⅰ章  | 実験の部  | 73 |
| 第Ⅱ章  | 実験の部  | 75 |
| 第Ⅲ章  | 実験の部  | 77 |
| 引用文献 |   | 78 |

# 総論の部

## 緒言

近年高い薬理活性を有する薬物の開発が進むにつれて、薬物体内動態の精密制御による薬物療法の最適化が重要な課題となってきた。ドラッグデリバリーシステムはこうした概念に基づく薬物投与形態の総称であり、主として薬物放出制御と作用部位への標的化という観点から検討が進められている。皮膚への薬物投与に関しては、従来より局所薬物療法として用いられてきたが、最近では全身的な作用発現を期待した薬物投与経路としても注目を集めるようになり、scopolamine<sup>1)</sup>の放出制御システムをはじめとして、nitroglycerin<sup>2,3)</sup>、clonidine<sup>4)</sup>、estradiol<sup>5,6)</sup>、nicotine<sup>7)</sup>などの経皮治療システム Transdermal Therapeutic System(TTS)が上市されてきている。TTSは、長期間にわたる連続投与が可能であること、腸管や肝臓における初回通過効果が回避できること、副作用発現における投与中止が容易であることなど多くの利点を有している。しかしながら多くの薬物においては、皮膚本来のバリアー機能により皮膚透過性が著しく低く、単独では十分な治療効果が期待できないため、現在、プロドラッグ化<sup>8,9)</sup>、吸収促進剤の利用<sup>10,11)</sup>、イオントフォレシス<sup>12,13)</sup>などの吸収改善法を利用した製剤化検討が活発に試みられるようになってきた。このように経皮吸収製剤がますます複雑化する傾向にあるにもかかわらず、未だ製剤設計の基盤となる薬物吸収動態の予測手段が確立されておらず、現在のところ薬物投与の最適化は大部分試行錯誤的に行われているにすぎない。

著者は、こうした現状認識に基づき、薬物の皮膚透過挙動を精度よく予測できる方法論の開発を最終目的として、まず最初に新規経皮吸収モデルの構築および吸収動態解析法の確立を行った。さらに本解析法を吸収促進剤の作用機構解析に適用し、対象薬物の物性と吸収促進効果との関連性を整理することによって、吸収促進剤の作用機構と薬物の物性を基本として吸収促進剤適用時の *in vitro* 薬物吸収を予測する方法を開発した。また、実際の薬物投与のために考慮されるべき薬物吸収の動物種差や *in vitro/in vivo* 間の差に関して基本的な問題を明らかにするため、本モデル解析法を用いてこれらの差違を解析した。

以下、これらの結果について三章にわたり論述する。

# 第 I 章 皮膚拡散モデルの構築と経皮吸収動態解析への応用

経皮吸収剤の設計、開発において、薬物吸収を定量的に評価できる速度論的解析手法の開発が不可欠と考えられる。従来より経皮吸収動態解析法に関して数多くの検討がなされており、拡散モデル<sup>14-20)</sup>やコンパートメントモデル<sup>21-24)</sup>に代表されるモデル依存的解析法とデコンボリューション法<sup>25)</sup>やモーメント解析<sup>26,27)</sup>に代表されるモデル非依存的な解析法が考案されてきた。なかでも、薬物の経皮吸収機構が受動拡散と考えられるため、経皮吸収動態解析には拡散モデルに基づくアプローチが繁用されてきた。

しかしながら、薬物の経皮吸収に関して総合的な議論を行う上では皮膚の解剖学的特性を考慮した動態モデルの構築が必要とされるにも関わらず、Fick の拡散式を基本とした拡散モデルでは皮膚透過の理論式を解析的に解くのが困難であるため、従来より吸収動態解析には、皮膚を均一な一枚膜とみなすかあるいは定常状態のみを取り扱う単純なモデルしか用いることができなかった。コンピュータによる数値計算法の利用はこうした問題を打開するための手段と考えられるが、精度の高い数値計算には膨大な時間を要するために、これまでの研究では単にシミュレーションにしか応用されておらず、薬物吸収に関して概念的な理解を得ることを目的に利用されるにすぎなかった<sup>28-30)</sup>。

近年細野らによって高速ラプラス逆変換アルゴリズム Fast Inversion of Laplace Transform(FILT)が開発され<sup>31)</sup>、Fick の拡散式のような偏微分方程式に対しても高速でしかも精度の高い数値計算が可能となった。矢野、山岡らはこの FILT アルゴリズムを利用した非線形最小二乗法プログラム MULTI(FILT)を開発し<sup>32)</sup>、現在このプログラムは薬物体内動態の解析に幅広く応用されるようになっている<sup>33-37)</sup>。

本章では、皮膚の解剖学的構造を基盤として薬物の吸収過程を考慮した拡散モデルを構築し、ラプラス次元での皮膚透過に関する理論式を誘導することによって、FILT アルゴリズムによる数値計算と組み合わせた動態解析法の確立を行った<sup>38-41)</sup>。さらに、本解析アプローチの応用性を単純な系で検討する目的で、皮膚を角質層とそれ以下の層の二層からなると捉えた二枚膜皮膚拡散モデルに基づいて薬物皮膚透過挙動の解析を行った<sup>38,39)</sup>。

## I-1 皮膚拡散モデルの構築

皮膚は解剖学および物理化学的に性質の異なる幾つかの層からなり、薬物はそれ自身が有する物理化学的性質に応じて適した経路を介して皮膚透過するものと考えられる。したがって、薬物吸収動態を包括的に説明できる動態モデルを構築し吸収予測理論を確立するためには、皮膚の構造と薬物透過経路との関係を理解し、各経路における薬物の透過パラメー

タと薬物の物理化学的パラメータとを関連づけて整理することが必要である。

そこで本節では、これまでに得られている経皮吸収に関する基礎データを基に、薬物皮膚透過挙動を統一的に説明できるモデルを構築し、このモデルに基づいてラプラス次元での皮膚透過に関する式を誘導した。また、本モデルと従来より報告されているモデルとの対応関係を整理した。

### 1 - a 極性および非極性経路を考慮した二枚膜皮膚モデルの構築

皮膚は解剖学的に表皮、真皮、皮下組織からなる組織であるが、表皮層の最外層である角質層が薬物の皮膚透過に対して最も大きなバリアーとして機能している(Fig.1)。角質層はケラチンで満たされた角質細胞から構成されるが、細胞間隙には多重の脂質二分子膜が存在し、この脂質構造が角質層のバリアー機能に重要な役割を果たしていると考えられている。薬物の角質層透過経路には角質細胞の実質部分を透過する経路と細胞間隙を透過する経路の二つが考えられるが<sup>42,43</sup>、いずれが主たる経路であるかについては議論が分かれており<sup>44-48</sup>、現在のところ明確な結論は得られていない。また、皮膚には毛穴や汗腺といった付属器官が存在しており、これらもまた薬物の吸収経路となり得ることが知られている<sup>15</sup>。一般に付属器官からの吸収は速やかであるが有効表面積が小さいためにその経路の寄与は小さいと考えられてきたが<sup>15</sup>、毛穴を透過する寄与が予想されていた以上に大きいということも最近報告されている<sup>49</sup>。また、イオンや極性の高い薬物では、角質層実質での透過性が極めて低いため

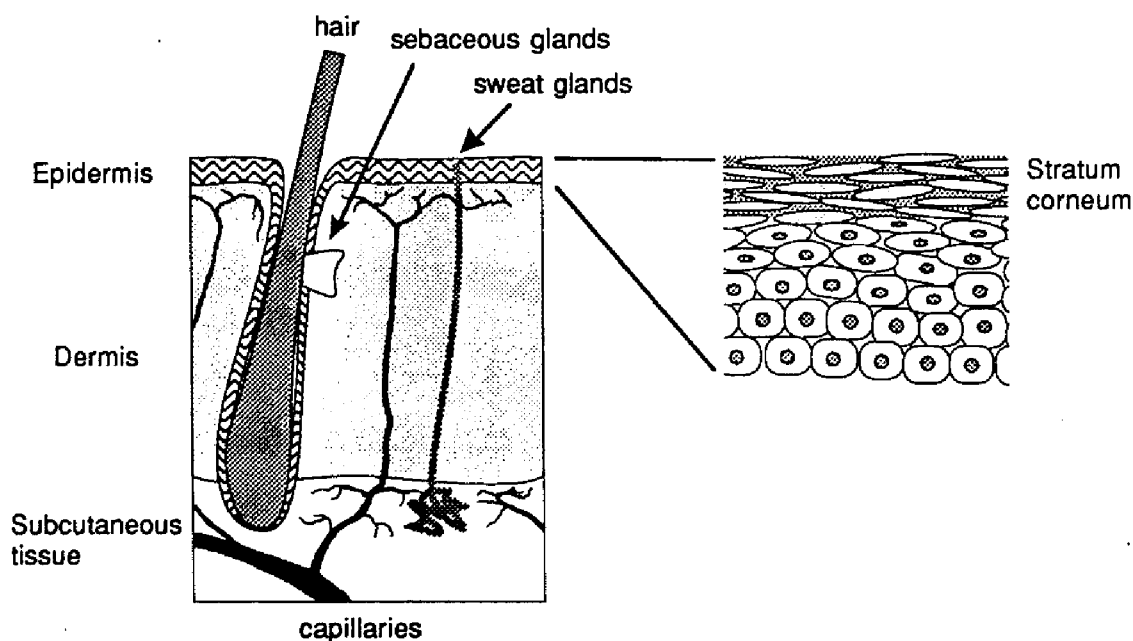
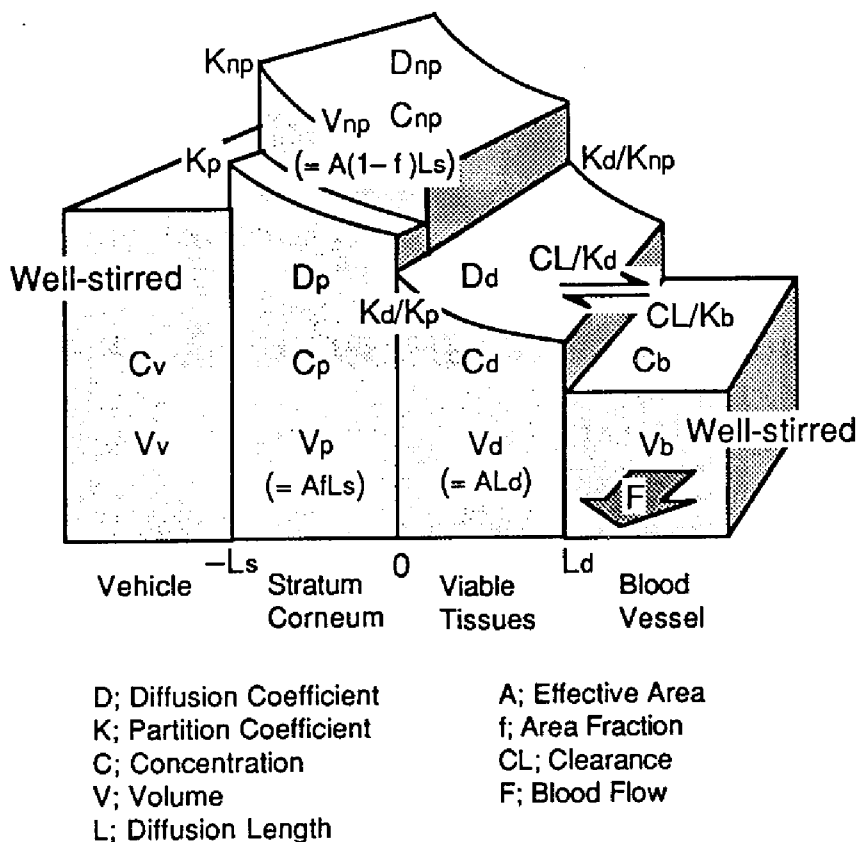


Fig. 1. The anatomical structure of skin.

経付属器官経路の寄与が相対的に大きいことが示されている<sup>21,50,51</sup>)。以上のような経路を介して角質層を透過した薬物は、さらに生きた表皮や真皮層を拡散し、真皮に発達した毛細血管から全身循環系へ移行すると考えられる。

従来より、定常状態における *in vitro* 皮膚透過性と薬物の物理化学的性質、特に薬物の親油性との関係について数多くの検討がなされてきた<sup>15,47,52-55</sup>)。これらの研究では、薬物の親油性が増大するにつれて基本的には水溶液からの皮膚透過性が増大するが、親水性が非常に高い薬物では親油性に依らず皮膚透過が一定であり、これらの薬物が角質層の極性の高い部分を透過すること、一方親油性が非常に高い薬物に対しても親油性に依らず皮膚透過が一定となるが、これらの薬物では角質層以下の水分含量の高い組織である生きた表皮および真皮層によって透過の制限を受けることが報告されている。これらの研究結果を総合すると、皮膚が角質層とそれ以下の生きた表皮及び真皮層の二層からなり、角質層には極性および非極性経路が並列に存在すると仮定したモデルを構築することによって、皮膚透過挙動の統一的な議論が可能となると思われる。これらの皮膚透過経路と実際の解剖学的構造とを対応づけて整理することは厳密には困難であるが、皮膚透過と薬物の物理化学的性質との関係を定量的に議論し、普遍性の高い吸収予測理論を構築する上では十分なモデルと考えられる。



**Fig. 2. A two-layer skin diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum combined with the blood compartment.**



以上の知見に基づき、in vitro から in vivo での薬物経皮吸収までを包括的に説明でき、かつ非定常状態での皮膚透過現象も含めた総合的な議論が可能となる皮膚拡散モデルを構築した(Fig.2)。ここでは、投与された薬物は、基剤から角質層中の極性および非極性経路に対して分配した後各経路を拡散し、さらに生きた表皮および真皮層中に対して分配・拡散をした上で、さらに引き続く過程として血管壁を透過後血流による運び去りを受けることを仮定した。基剤中および血管コンパートメント中では薬物は well-stirred の状態にあると仮定することによって、以下の物質収支式および境界・初期条件を得た。

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = D_p \frac{\partial^2 C_p}{\partial x^2} \quad (1)$$

$$\frac{\partial C_{np}}{\partial t} = D_{np} \frac{\partial^2 C_{np}}{\partial x^2} \quad (2)$$

$$\frac{\partial C_d}{\partial t} = D_d \frac{\partial^2 C_d}{\partial x^2} \quad (3)$$

$$V_v \frac{dC_v}{dt} = D_p A f \frac{\partial C_p}{\partial x} \Big|_{x=-L_s} + D_{np} A (1-f) \frac{\partial C_{np}}{\partial x} \Big|_{x=-L_s} \quad (4)$$

$$V_b \frac{dC_b}{dt} = \frac{CL}{K_d} C_{d,x=L_d} - \left( F + \frac{CL}{K_b} \right) C_b \quad (5)$$

境界条件:

$$C_p = K_p C_v \quad (x=-L_s) \quad (6)$$

$$C_{np} = K_{np} C_v \quad (x=-L_s) \quad (7)$$

$$C_d = \frac{K_d}{K_p} C_p \quad (x=0) \quad (8)$$

$$C_d = \frac{K_d}{K_{np}} C_{np} \quad (x=0) \quad (9)$$

$$D_d A \frac{\partial C_d}{\partial x} = D_p A f \frac{\partial C_p}{\partial x} + D_{np} A (1-f) \frac{\partial C_{np}}{\partial x} \quad (x=0) \quad (10)$$

$$-D_d A \frac{\partial C_d}{\partial x} = \frac{CL}{K_d} C_d - \frac{CL}{K_b} C_b \quad (x=L_d) \quad (11)$$

初期条件:

$$C_v = C_0 \quad \text{or} \quad C_v V_v = X_0 \quad (12)$$

$$C_p = C_{np} = C_d = C_b = 0 \quad (13)$$

ここで、 $K$ 、 $D$ 、 $V$ 、 $A$ 、 $f$ 、 $L$ 、 $C$ 、 $CL$ 、 $F$ はそれぞれ分配係数、拡散係数、体積、有効表面積、極性経路の面積分率、膜厚、濃度、血管壁透過クリアランス、血流を表す。下付き添字の  $v$ 、 $s$ 、 $p$ 、 $np$ 、 $d$ 、 $b$  はそれぞれ基剤、角質層、極性経路、非極性経路、生きた表皮および真皮層、血管コンパートメントを表す。また、 $C_0$ 、 $X_0$  はそれぞれ基剤中での薬物の初濃度、

投与量を表す。

(1)-(11) 式をラプラス変換することによって次式が得られる<sup>56)</sup>。

$$s\bar{C}_p = D_p \frac{\partial^2 \bar{C}_p}{\partial x^2} \quad (14)$$

$$s\bar{C}_{np} = D_{np} \frac{\partial^2 \bar{C}_{np}}{\partial x^2} \quad (15)$$

$$s\bar{C}_d = D_d \frac{\partial^2 \bar{C}_d}{\partial x^2} \quad (16)$$

$$V_v(s\bar{C}_v - C_0) = D_p A f \frac{\partial \bar{C}_p}{\partial x} \Big|_{x=-L_s} + D_{np} A (1-f) \frac{\partial \bar{C}_{np}}{\partial x} \Big|_{x=-L_s} \quad (17)$$

$$V_{bs}\bar{C}_b = \frac{CL}{K_d} \bar{C}_{d,x=L_d} - \left( F + \frac{CL}{K_b} \right) \bar{C}_b \quad (18)$$

$$\bar{C}_p = K_p \bar{C}_v \quad (x=-L_s) \quad (19)$$

$$\bar{C}_{np} = K_{np} \bar{C}_v \quad (x=-L_s) \quad (20)$$

$$\bar{C}_d = \frac{K_d}{K_p} \bar{C}_p \quad (x=0) \quad (21)$$

$$\bar{C}_d = \frac{K_d}{K_{np}} \bar{C}_{np} \quad (x=0) \quad (22)$$

$$D_d A \frac{\partial \bar{C}_d}{\partial x} = D_p A f \frac{\partial \bar{C}_p}{\partial x} + D_{np} A (1-f) \frac{\partial \bar{C}_{np}}{\partial x} \quad (x=0) \quad (23)$$

$$-D_d A \frac{\partial \bar{C}_d}{\partial x} = \frac{CL}{K_d} \bar{C}_d - \frac{CL}{K_b} \bar{C}_b \quad (x=L_d) \quad (24)$$

(14)-(18) 式を解くと次のようになる。

$$\bar{C}_p = \alpha \sinh \sqrt{s/D_p} x + \beta \cosh \sqrt{s/D_p} x \quad (25)$$

$$\bar{C}_{np} = \gamma \sinh \sqrt{s/D_{np}} x + \delta \cosh \sqrt{s/D_{np}} x \quad (26)$$

$$\bar{C}_d = \epsilon \sinh \sqrt{s/D_d} x + \xi \cosh \sqrt{s/D_d} x \quad (27)$$

$$\bar{C}_v = \frac{X_0 + D_p A f \sqrt{s/D_p} (\alpha \cosh \sqrt{s/D_p} L_s - \beta \sinh \sqrt{s/D_p} L_s) + D_{np} A (1-f) \sqrt{s/D_{np}} (\gamma \cosh \sqrt{s/D_{np}} L_s - \delta \sinh \sqrt{s/D_{np}} L_s)}{V_v s} \quad (28)$$

$$\bar{C}_b = \frac{K_b CL}{K_d (K_b V_{bs} + K_b F + CL)} \bar{C}_{d,x=L_d} \quad (29)$$

(19)-(24) 式を用いて (25)-(29) 式を解くと、

$$\alpha = -K_p X_0 \{ Z_{np} (\cosh d_{np} - \cosh d_p) (W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) + Z_d \sinh d_{np} (Z_d \sinh d_d + W \cosh d_d) \} / s / k(s) \quad (30)$$

$$\beta = K_p X_0 (Z_{np} \sinh d_p + Z_p \sinh d_{np}) (W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) / s / k(s) \quad (31)$$

$$\gamma = -K_{np}X_0\{Z_p(\cosh d_p - \cosh d_{np})(W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) + Z_d \sinh d_p(Z_d \sinh d_d + W \cosh d_d)\} / s / k(s) \quad (32)$$

$$\delta = K_{np}X_0(Z_{np} \sinh d_p + Z_p \sinh d_{np})(W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) / s / k(s) \quad (33)$$

$$\epsilon = -K_d X_0(Z_{np} \sinh d_p + Z_p \sinh d_{np})(Z_d \sinh d_d + W \cosh d_d) / s / k(s) \quad (34)$$

$$\xi = K_d X_0(Z_{np} \sinh d_p + Z_p \sinh d_{np})(W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) / s / k(s) \quad (35)$$

となる。ここで、

$$d_p = L_s \sqrt{s / D_p} \quad (36)$$

$$d_{np} = L_s \sqrt{s / D_{np}} \quad (37)$$

$$d_d = L_d \sqrt{s / D_d} \quad (38)$$

$$Z_p = K_p A f L_s / d_p \quad (\text{or } K_p V_p / d_p) \quad (39)$$

$$Z_{np} = K_{np} A (1 - f) L_s / d_{np} \quad (\text{or } K_{np} V_{np} / d_{np}) \quad (40)$$

$$Z_d = K_d A L_d / d_d \quad (\text{or } K_d V_d / d_d) \quad (41)$$

$$W = K_b C L (V_b s + F) / s / (K_b V_b s + K_b F + C L) \quad (42)$$

$$\begin{aligned} k(s) = & V_v \{ (Z_p \cosh d_p \sinh d_{np} + Z_{np} \sinh d_p \cosh d_{np})(W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) \\ & + Z_d \sinh d_p \sinh d_{np} (Z_d \sinh d_d + W \cosh d_d) \} \\ & + Z_p [ \{ Z_p \sinh d_p \sinh d_{np} + Z_{np} (\cosh d_p \cosh d_{np} - 1) \} (W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) \\ & + Z_d \cosh d_p \sinh d_{np} (Z_d \sinh d_d + W \cosh d_d) ] \\ & + Z_{np} [ \{ Z_{np} \sinh d_p \sinh d_{np} + Z_p (\cosh d_p \cosh d_{np} - 1) \} (W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) \\ & + Z_d \sinh d_p \cosh d_{np} (Z_d \sinh d_d + W \cosh d_d) ] \end{aligned} \quad (43)$$

と定義した。

累積透過量( $Q$ )、基剤中残存量( $X$ )、各経路における薬物量( $M_p$ 、 $M_{np}$ 、 $M_d$ 、 $M_b$ )は、

$$Q = F \int_0^t C_b dt \quad (44)$$

$$X = C_v V_v \quad (45)$$

$$M_p = A \int_{-L_s}^0 C_p dx \quad (46)$$

$$M_{np} = A \int_{-L_s}^0 C_{np} dx \quad (47)$$

$$M_d = A \int_0^{L_d} C_d dx \quad (48)$$

$$M_b = C_b V_b \quad (49)$$

であるから、ラプラス次元での累積透過量( $\bar{Q}$ )、基剤中残存量( $\bar{X}$ )、皮膚中薬物量( $\bar{M}_p$ )、

$\bar{M}_{np}$ 、 $\bar{M}_d$ 、 $\bar{M}_b$ ) は、

$$\begin{aligned}\bar{Q} &= FC_b / s \\ &= WZ_d F X_0 (Z_{np} \sinh d_p + Z_p \sinh d_{np}) / s / (V_b s + F) / k(s)\end{aligned}\quad (50)$$

$$\begin{aligned}\bar{X} &= \bar{C}_v V_v \\ &= V_v X_0 \{ (Z_p \cosh d_p \sinh d_{np} + Z_{np} \sinh d_p \cosh d_{np}) (W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) \\ &\quad + Z_d \sinh d_p \sinh d_{np} (Z_d \sinh d_d + W \cosh d_d) \} / s / k(s)\end{aligned}\quad (51)$$

$$\begin{aligned}\bar{M}_p &= Af \int_{-L_s}^0 \bar{C}_p dx \\ &= Z_p X_0 [ \{ Z_p \sinh d_p \sinh d_{np} + Z_{np} (\cosh d_p - 1) (\cosh d_{np} + 1) \} (W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) \\ &\quad + Z_d \sinh d_{np} (\cosh d_p - 1) (Z_d \sinh d_d + W \cosh d_d) ] / s / k(s)\end{aligned}\quad (52)$$

$$\begin{aligned}\bar{M}_{np} &= A(1-f) \int_{-L_s}^0 \bar{C}_{np} dx \\ &= Z_{np} X_0 [ \{ Z_{np} \sinh d_p \sinh d_{np} + Z_p (\cosh d_p + 1) (\cosh d_{np} - 1) \} (W \sinh d_d + Z_d \cosh d_d) \\ &\quad + Z_d \sinh d_p (\cosh d_{np} - 1) (Z_d \sinh d_d + W \cosh d_d) ] / s / k(s)\end{aligned}\quad (53)$$

$$\begin{aligned}\bar{M}_d &= A \int_0^{L_d} \bar{C}_d dx \\ &= Z_d X_0 (Z_{np} \sinh d_p + Z_p \sinh d_{np}) \{ Z_d \sinh d_d + W (\cosh d_d - 1) \} / s / k(s)\end{aligned}\quad (54)$$

$$\begin{aligned}\bar{M}_b &= \bar{C}_b V_b \\ &= WZ_d V_b s X_0 (Z_{np} \sinh d_p + Z_p \sinh d_{np}) / s / (V_b s + F) / k(s)\end{aligned}\quad (55)$$

と表される。ここで、拡散係数および分配係数は、

$$D_i' = D_i / L_i^2 \quad (56)$$

$$K_i' = K_i V_i \quad (i = p, np, d) \quad (57)$$

という複合パラメータの形で整理され、これらのパラメータを用いることによって実際の拡散距離あるいはその体積を評価することなしに薬物の拡散や分配に関する議論が可能となる。以下、これらを拡散パラメータ、分配パラメータと定義する。

以上のようなラプラス次元の式は FILT アルゴリズムの利用によって数値的に時間次元へ変換することが可能であり、矢野、山岡らによって開発された FILT アルゴリズムに基づくシミュレーションプログラム FILTS および非線形最小二乗法プログラム MULTI(FILT) を用いることによって薬物吸収動態解析への適用が可能となる。さらに、本モデル解析法では、皮膚透過のみならず皮膚内での薬物濃度あるいは薬物量に関する評価も可能であり、薬物経皮吸収に関する総合的な動態解析が実現できると考えられる。

## 1-b 平均皮膚内通過時間 MTT の誘導

統計学的モーメント解析は、モデル非依存的な動態解析法として山岡ら<sup>57)</sup>と Cutler<sup>58)</sup>により薬動学の分野に導入されて以来、全身系<sup>59-61)</sup>に限らず臓器レベル<sup>62-67)</sup>での薬物動態の解析を含めて広く応用されてきた。この解析法は、薬物の体内動態をマクロな観点で捉え、時間的広がりを持った確率過程として考えて記述しようとする方法であるが、本解析法では、薬物の動態特性を吸収率、吸収時間、滞留時間などの直感的に理解しやすいパラメータの形で表すことができると共に、薬物の体内動態を各素過程に分離して評価することも可能である<sup>61)</sup>。こうしたアプローチは既に経皮吸収動態の解析にも適用されてきており、簡単な皮膚拡散モデルに対しては既にモーメントパラメータとの対応関係が整理されている<sup>26,33)</sup>。ここでは、薬物の経皮吸収に関して各吸収素過程のレベルでの議論が可能となる方法論を確立することを目的として、前述の拡散モデルに対し一次モーメントである平均皮膚内通過時間 Mean Transit Time(MTT) の誘導を試みた。

モーメントパラメータは、上述のラプラス次元での透過量の式 ((50) 式) から以下のように算出される。

$$AUC = \lim_{s \rightarrow 0} s \bar{Q} = X_0 \quad (58)$$

$$\begin{aligned} MTT &= \lim_{s \rightarrow 0} \frac{d}{ds} \ln s \bar{Q} \\ &= V_v \left( \frac{L_s^2}{K_p D_p V_p + K_{np} D_{np} V_{np}} + \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} + \frac{1}{CL} + \frac{1}{K_b F} \right) \\ &\quad + \frac{K_p D_p V_p}{K_p D_p V_p + K_{np} D_{np} V_{np}} \times \frac{L_s^2}{2 D_p} + K_p V_p \left( \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} + \frac{1}{CL} + \frac{1}{K_b F} \right) \\ &\quad + \frac{K_{np} D_{np} V_{np}}{K_p D_p V_p + K_{np} D_{np} V_{np}} \times \frac{L_s^2}{2 D_{np}} + K_{np} V_{np} \left( \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} + \frac{1}{CL} + \frac{1}{K_b F} \right) \\ &\quad + \frac{L_d^2}{2 D_d} + K_d V_d \left( \frac{1}{CL} + \frac{1}{K_b F} \right) + \frac{V_b}{F} \end{aligned} \quad (59)$$

また、個々の吸収素過程における平均滞留時間 Mean Residence Time(MRT) は次の式を用いて計算でき、

$$MRT_i = \int_0^{\infty} X_i dt / X_0 = \lim_{s \rightarrow 0} \bar{X}_i / X_0 \quad (60)$$

(51)-(55) 式から各吸収過程における MRT は、

$$MRT_v = V_v \left( \frac{L_s^2}{K_p D_p V_p + K_{np} D_{np} V_{np}} + \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} + \frac{1}{CL} + \frac{1}{K_b F} \right) \quad (61)$$

$$MRT_p = \frac{K_p D_p V_p}{K_p D_p V_p + K_{np} D_{np} V_{np}} \times \frac{L_s^2}{2D_p} + K_p V_p \left( \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} + \frac{1}{CL} + \frac{1}{K_b F} \right) \quad (62)$$

$$MRT_{np} = \frac{K_{np} D_{np} V_{np}}{K_p D_p V_p + K_{np} D_{np} V_{np}} \times \frac{L_s^2}{2D_{np}} + K_{np} V_{np} \left( \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} + \frac{1}{CL} + \frac{1}{K_b F} \right) \quad (63)$$

$$MRT_d = \frac{L_d^2}{2D_d} + K_d V_d \left( \frac{1}{CL} + \frac{1}{K_b F} \right) \quad (64)$$

$$MRT_b = \frac{V_b}{F} \quad (65)$$

と表すことができ、MTT は各過程における MRT の総和とも考えられる。このように、MTT を算出することによって薬物皮膚透過における各過程の寄与を分離評価できるので、各種薬物における律速過程の違いなどの議論が可能となると思われる。

### 1 - c in vitro における皮膚拡散モデルの構築

in vitro 経皮吸収実験法は、薬物の皮膚透過過程のみを直接評価できる実験系であり、薬物の吸収性や吸収促進剤の効果に関して基礎的検討を行う上で適した系と考えられる。しかしながら、in vitro 実験の最終的な目的は in vivo における吸収予測にあるが、in vitro 実験法

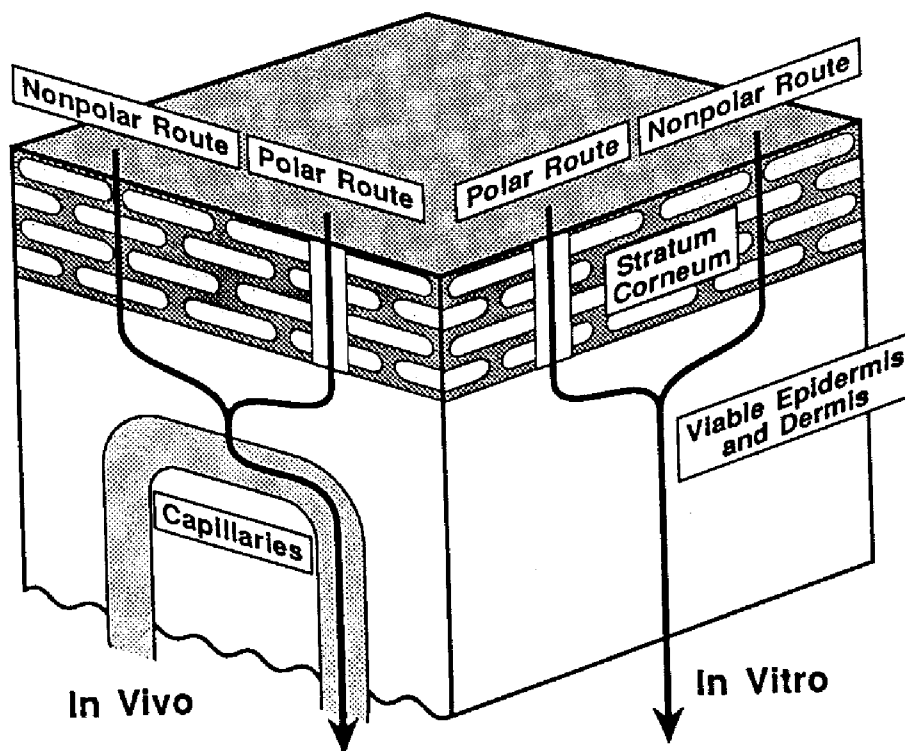


Fig. 3. In vitro and in vivo percutaneous drug absorption processes.

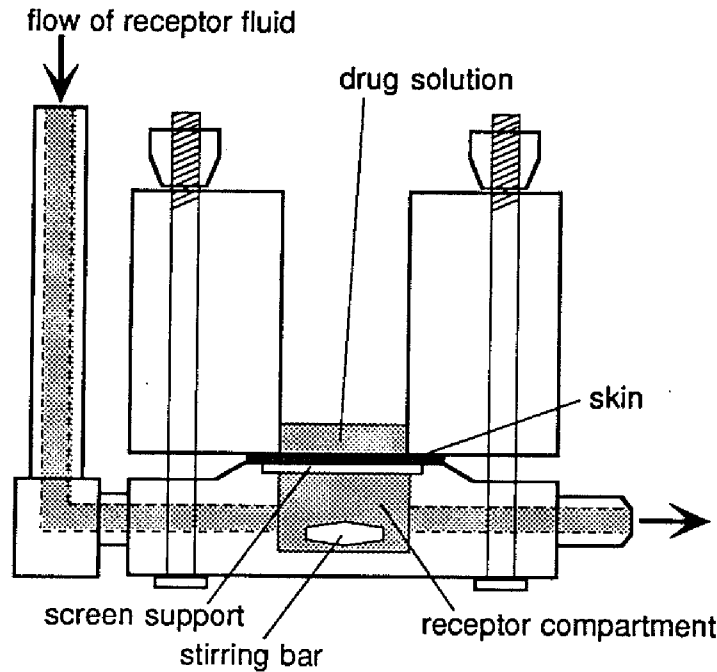


Fig. 4. A flow-through type diffusion cell used in the in vitro permeation study.

では摘出した皮膚が用いられるので、in vivo 条件と比べて皮膚の生理的および物理化学的性質が異なっていると考えられる。例えば、in vitro 実験では通常摘出皮膚をそのまま用いるために、薬物透過は皮膚全体に対して測定することになり、薬物が血流による運び去りを受ける in vivo 条件とは大きく異なることが考えられる (Fig.3)。したがって、薬物経皮吸収動態の解析、さらにはその予測においては、吸収評価に用いられる in vitro 実験系の特性を精度良く把握し、in vivo 実験系の違いを整理することが必要である。ここでは in vitro 実験系に対応する動態モデルを構築し、理論式の誘導を行った。

本研究では厳密な理論解析に耐えうる精度の高いデータが要求されるため、in vitro 実験には flow-through 型拡散セル (Fig.4) を使用し、薬物は水溶液で投与し、レセプター側では常にシンク条件が成り立つように実験条件を設定した。こうした条件に対応する物質収支式は、

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = D_p \frac{\partial^2 C_p}{\partial x^2} \quad (66)$$

$$\frac{\partial C_{np}}{\partial t} = D_{np} \frac{\partial^2 C_{np}}{\partial x^2} \quad (67)$$

$$\frac{\partial C_d}{\partial t} = D_d \frac{\partial^2 C_d}{\partial x^2} \quad (68)$$

$$V_v \frac{dC_v}{dt} = D_p A f \frac{\partial C_p}{\partial x} \Big|_{x=-L_s} + D_{np} A (1-f) \frac{\partial C_{np}}{\partial x} \Big|_{x=-L_s} \quad (69)$$

境界条件:

$$C_p = K_p C_v \quad (x=-L_s) \quad (70)$$

$$C_{np} = K_{np}C_v \quad (x=-L_s) \quad (71)$$

$$C_d = \frac{K_d}{K_p}C_p \quad (x=0) \quad (72)$$

$$C_d = \frac{K_d}{K_{np}}C_{np} \quad (x=0) \quad (73)$$

$$D_dA \frac{\partial C_d}{\partial x} = D_pAf \frac{\partial C_p}{\partial x} + D_{np}A(1-f) \frac{\partial C_{np}}{\partial x} \quad (x=0) \quad (74)$$

$$C_d = 0 \quad (x=L_d) \quad (75)$$

初期条件：

$$C_v = C_0 \quad \text{or} \quad C_v V_v = X_0 \quad (76)$$

$$C_p = C_{np} = C_d = 0 \quad (77)$$

となり、先に示したような手順に従ってラプラス次元の皮膚透過式を得ることができる。また、(50)-(54)式に対して、血管壁透過クリアランス  $CL$  および血流速度  $F$  が無限に大きいと仮定することによっても同じ理論式が誘導される。

$$\bar{Q} = Z_d X_0 (Z_{np} \sinh d_p + Z_p \sinh d_{np}) / s / g(s) \quad (78)$$

$$\begin{aligned} \bar{X} = V_v X_0 [ & Z_p \cosh d_p \sinh d_{np} \sinh d_d + Z_{np} \sinh d_p \cosh d_{np} \sinh d_d \\ & + Z_d \sinh d_p \sinh d_{np} \cosh d_d ] / s / g(s) \end{aligned} \quad (79)$$

$$\begin{aligned} \bar{M}_p = Z_p X_0 [ & \{ Z_p \sinh d_p \sinh d_{np} + Z_{np} (\cosh d_p - 1) (\cosh d_{np} + 1) \} \sinh d_d \\ & + Z_d (\cosh d_p - 1) \sinh d_{np} \cosh d_d ] / s / g(s) \end{aligned} \quad (80)$$

$$\begin{aligned} \bar{M}_{np} = Z_{np} X_0 [ & \{ Z_{np} \sinh d_p \sinh d_{np} + Z_p (\cosh d_p + 1) (\cosh d_{np} - 1) \} \sinh d_d \\ & + Z_d \sinh d_p (\cosh d_{np} - 1) \cosh d_d ] / s / g(s) \end{aligned} \quad (81)$$

$$\bar{M}_d = Z_d X_0 (Z_{np} \sinh d_p + Z_p \sinh d_{np}) (\cosh d_d - 1) / s / g(s) \quad (82)$$

ここで、

$$\begin{aligned} g(s) = V_v [ & Z_p \cosh d_p \sinh d_{np} \sinh d_d + Z_{np} \sinh d_p \cosh d_{np} \sinh d_d \\ & + Z_d \sinh d_p \sinh d_{np} \cosh d_d \\ & + Z_p \{ \{ Z_p \sinh d_p \sinh d_{np} + Z_{np} (\cosh d_p \cosh d_{np} - 1) \} \sinh d_d \\ & + Z_d \cosh d_p \sinh d_{np} \cosh d_d ] \\ & + Z_{np} \{ \{ Z_{np} \sinh d_p \sinh d_{np} + Z_p (\cosh d_p \cosh d_{np} - 1) \} \sinh d_d \\ & + Z_d \sinh d_p \cosh d_{np} \cosh d_d ] \end{aligned} \quad (83)$$



である。また、MTTは、

$$\begin{aligned}
 MTT = V_v & \left( \frac{L_s^2}{K_p D_p V_p + K_{np} D_{np} V_{np}} + \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} \right) \\
 & + \frac{K_p D_p V_p}{K_p D_p V_p + K_{np} D_{np} V_{np}} \times \frac{L_s^2}{2D_p} + K_p V_p \times \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} \\
 & + \frac{K_{np} D_{np} V_{np}}{K_p D_p V_p + K_{np} D_{np} V_{np}} \times \frac{L_s^2}{2D_{np}} + K_{np} V_{np} \times \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} \\
 & + \frac{L_d^2}{2D_d}
 \end{aligned} \tag{84}$$

と表される。

#### 1 - d 一枚膜および二枚膜拡散モデルとの対応

本研究で構築した極性および非極性経路を組み込んだ二枚膜皮膚拡散モデルは、吸収動態を総合的に議論し吸収予測理論を確立することを目的としたものであるが、モデルが複雑であるために、動態パラメータを得る上では系統的な薬物皮膚透過の評価が必要とされる。したがって、ある特定の薬物に対し、経皮吸収性を評価した上で製剤設計を行うには、皮膚を均一な一枚膜あるいは二枚膜と仮定したモデル等、より単純なモデルを基本として議論することも重要と思われる。ここでは、こうした単純なモデル解析によって得られる情報の意味を理解することを目的として、本研究で構築されたモデルと一枚膜および二枚膜モデルとの対応関係について整理を試みた。

二枚膜皮膚モデルは、皮膚を角質層とそれ以下の層の均一な二層からなると捉えたモデルである。本研究で構築した角質層に極性および非極性経路を考慮した拡散モデルにおいて、理論式中の  $Z_p$  あるいは  $Z_{np}$  が無視できるほど小さい場合には、二枚膜モデルへの近似が可能となる。このときのラプラス次元での皮膚透過式は以下のように表される。

$$\bar{Q} = Z_s Z_d X_0 / s / g(s) \tag{85}$$

$$\bar{X} = V_v X_0 (Z_s \cosh d_s \sinh d_d + Z_d \sinh d_s \cosh d_d) / s / g(s) \tag{86}$$

$$\bar{M}_s = Z_s X_0 \{ Z_s \sinh d_s \sinh d_d + Z_d (\cosh d_s - 1) \cosh d_d \} / s / g(s) \tag{87}$$

$$\bar{M}_d = Z_s Z_d X_0 (\cosh d_d - 1) / s / g(s) \tag{88}$$

$$d_s = L_s \sqrt{s / D_s} \tag{89}$$

$$d_d = L_d \sqrt{s / D_d} \tag{90}$$

$$Z_s = K_s V_s / d_s \quad (91)$$

$$Z_d = K_d V_d / d_d \quad (92)$$

$$g(s) = V_v (Z_s \cosh d_s \sinh d_d + Z_d \sinh d_s \cosh d_d) \\ + Z_s (Z_s \sinh d_s \sinh d_d + Z_d \cosh d_s \cosh d_d) \quad (93)$$

ここで、下付け添字の  $s$ 、 $d$  はそれぞれ角質層、それ以下の生きた表皮および真皮層を表す。また、MTT は以下のように表される。

$$MTT = V_v \left( \frac{L_s^2}{K_s D_s V_s} + \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} \right) + \left( \frac{L_s^2}{2D_s} + K_s V_s \times \frac{L_d^2}{K_d D_d V_d} \right) + \frac{L_d^2}{2D_d} \quad (94)$$

上記の仮定は、薬物が極性あるいは非極性経路のいずれかの経路を透過する場合を表している。エーテル/水間分配係数が  $10^{-2}$  以下の親水性の非常に高い薬物では極性経路を主に透過することが知られており<sup>68)</sup>、これらの薬物に対して二枚膜モデルに基づく解析を行った結果は、極性経路での透過パラメータが評価されると考えられる。一方、エーテル/水間分配係数が 0 より十分大きい薬物では非極性経路によって皮膚透過が支配されるため<sup>53)</sup>、これらの薬物に対しての解析結果は非極性経路の透過パラメータを意味すると考えられるが、中間的な親油性をもつ薬物における解析結果は極性および非極性経路の平均的なパラメータとして評価されると考えられる。Tojo は、clonidine の *in vitro* における二枚膜モデルに基づく皮膚透過パラメータから *in vivo* での血中濃度の予測が可能であることを報告しており<sup>69)</sup>、特定の薬物の吸収動態を議論する上では、こうした平均的なパラメータであっても十分なものと考えられる。

さらに、 $d_s$  あるいは  $d_d$  が無視できるほど小さい場合には、二枚膜モデルには一枚膜モデルに近似でき、ラプラス次元の式は、

$$\bar{Q} = ZX_0 / s / (V_v \sinh d + Z \cosh d) \quad (95)$$

$$\bar{X} = V_v X_0 \sinh d / s / (V \sinh d + Z \cosh d) \quad (96)$$

$$\bar{M}_s = ZX_0 (\cosh d - 1) / s / (V_v \sinh d + Z \cosh d) \quad (97)$$

$$d = L \sqrt{s / D} \quad (98)$$

$$Z = KV / d \quad (99)$$

となり、MTT は、

$$MTT = V_v \times \frac{L^2}{KDV} + \frac{L^2}{2D} \quad (100)$$

と表される。

これらの仮定は、角質層での拡散パラメータ  $D_s/L_s^2$  あるいは角質層以下の層での拡散パラメータ  $D_d/L_d^2$  が極めて大きいことに対応する。角質層中の薬物拡散が極めて遅いことは良く知られた事実であり、正常な皮膚に対して前者の仮定が適用できる場合はあり得ないと考えられる。一方後者に関しても、角質層以下の層の拡散係数 ( $\times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/sec) は角質層 ( $\times 10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/sec) に比べて十分大きい<sup>20)</sup>、一般に in vitro 実験に用いられる皮膚における角質層以下の層の厚さ ( $\approx 350$   $\mu$ m) は角質層の厚さ ( $\approx 15$   $\mu$ m) に比べて大きい<sup>70,71)</sup>、 $D_d/L_d^2$  は無視できるほど小さい値ではないと考えられる。多重膜モデルに基づく考察から、拡散抵抗が無視できる層であってもラグタイムを延長し得ることが知られており<sup>72)</sup>、また実験的にも真皮を含む皮膚と熱処理によって単離した表皮の場合では、betamethasone 17-valerate の透過係数がほぼ同じであるのに対し、ラグタイムは真皮を含む皮膚のほうが長いことが報告されている<sup>73)</sup>。したがって、角質層が律速過程となる場合においても、一枚膜モデルで得られる分配および拡散のパラメータは角質層自身のパラメータを反映するとは限らないと考えられる。しかしながら、定常状態では二枚膜モデルも一枚膜モデルとして扱うことができ、また製剤を取り除いた後の角質層およびそれ以下の層における薬物量の推移は同じ半減期を示し、あたかも皮膚が一枚膜として振る舞うことも知られている<sup>73)</sup>。これらのことから、皮膚を一枚膜とみなした解析も吸収動態解析に適用可能と考えられるが、得られるパラメータはあくまで皮膚全体の平均的なパラメータであることに注意が必要である。

## I-2 二枚膜皮膚拡散モデルに基づく in vitro 皮膚透過挙動の解析

拡散モデルに基づく解析では、皮膚透過における分配および拡散の各過程を分離評価することが可能であるが、一般的には皮膚透過実験で得られた透過パターンをモデル解析することによって両過程に対応するパラメータが算出される。パラメータの算出方法としては、皮膚透過曲線に対して、直線部分の x 切片 (ラグタイム) と傾き (透過速度) から各パラメータを評価する方法と、コンピュータによる理論式の当てはめ計算を行う方法が用いられている。一般的には前者の方法が簡便であるため多用されているが、定常状態における直線部分の判定を客観的に行う手段がないという解析上の問題点を抱えている。さらに、前者の解析では、基剤中薬物濃度を一定 (infinite 条件) に保つ必要があるが、基剤に対する薬物の溶解度が高い場合や、ドナー側の攪拌ができない垂直型拡散セルを使用する場合など infinite 条

件を保つことが困難な場合が多い。薬物を溶液 (finite 条件) として投与した場合には時間次元での理論式の誘導は困難であるが、京都大学薬学部薬剤学教室では既に finite 条件下で薬物投与した場合のラプラス次元の皮膚透過の式を一枚膜拡散モデルに基づいて誘導し、MULTI(FILT) を用いた透過パターンの解析法を確立している<sup>33)</sup>。

二枚膜拡散モデルに基づく解析は、薬物透過における最大のバリアーとなる角質層のバリアー特性を解明することを目的としたものであるが、本モデルでは infinite 条件下でさえ皮膚透過を表す理論式の誘導が困難であり、これまで解析は lag time 法でしか行われていなかった<sup>20)</sup>。本節では、先に誘導した二枚膜拡散モデルに基づく finite 条件下でのラプラス次元の皮膚透過の式 ((85)-(93)式) を用いて、MULTI(FILT) と組み合わせた in vitro 薬物皮膚透過挙動の解析を行い、多重膜モデルに基づく吸収動態解析への本数値計算アプローチの応用性について基礎的検討を行った<sup>38)</sup>。モデル薬物には [<sup>14</sup>C]6-mercaptopurine(6-MP) を用い、正常および角質層除去皮膚における透過パターンを解析することによって、6-MP の皮膚透過パラメータを算出すると共に、これらのパラメータを用いて平均皮膚内通過時間 MTT を算出し、薬物皮膚透過における各吸収過程の寄与を分離評価した<sup>38)</sup>。

## 2 - a 正常および角質層除去皮膚における 6-mercaptopurine の透過

in vitro 皮膚透過実験では、複雑な動態解析に耐えうる精度の高いデータが要求されるため、レセプター側で常にシンク条件が成り立つフロースルー型拡散セル(Fig.4)を用いた。角質層とそれ以下の層のバリアー特性を分離評価するため、正常皮膚とテープストリッピング法<sup>74)</sup>により角質層を除去した皮膚を用いて透過実験を行った。Fig.5 は、両皮膚における 6-MP の累積透過量-時間曲線を示している。正常皮膚における 6-MP の透過は極めて小さかったのに対し、角質層を除去することによって皮膚透過が顕著に増大しかつ lag time も減少した。本実験結果より、6-MP の皮膚透過において角質層が強力なバリアーとして機能していることが示唆された。

Table I は 24 hr の透過実験終了時におけるドナー中、皮膚中、および皮膚透過した薬物量をまとめたものである。いずれの薬物量においても、正常皮膚と角質層除去皮膚の間で有意な差が認められた。本実験では薬物を finite 条件で投与したため、皮膚透過に伴うドナー中薬物量の減少がみられたが、より大きな皮膚透過を示した角質層除去皮膚ではその程度が大きかった。また、皮膚中薬物量に関しては角質層除去皮膚のほうが大きかったが、これはより大きな透過を示す角質層除去皮膚では皮膚内に大きな薬物濃度勾配が皮膚内で形成されていることを示唆するものと考えられる。

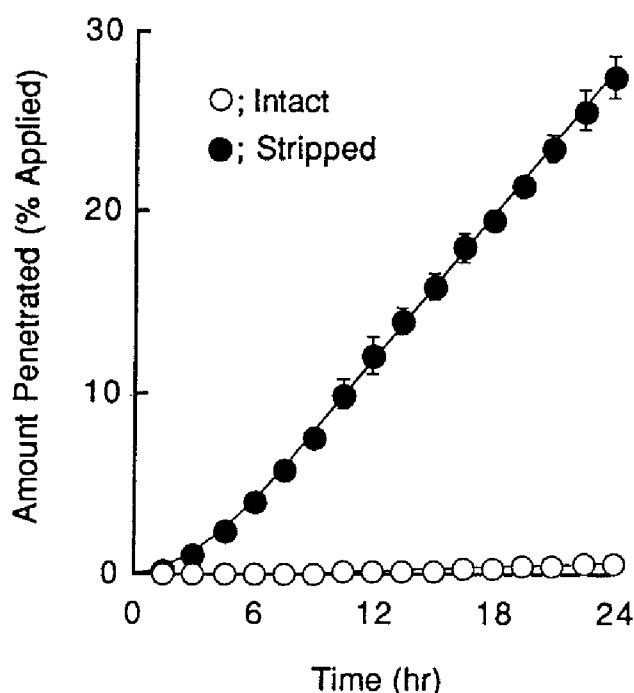


Fig. 5. In vitro penetration of 6-mercaptopurine through intact or stripped guinea pig skin. The drug was applied in the form of saline solution. Each point represents the mean value of at least three experiments. The curves were simulated using parameters listed in Table II.

Table I. Amounts of 6-mercaptopurine recovered at the end of 24-hr diffusion experiment in guinea pigs.

| Condition of skin | n | Recovery <sup>a,b</sup> (%) |                           |                           |                           |
|-------------------|---|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                   |   | Total                       | Donor                     | Skin                      | Receptor                  |
| Intact            | 4 | 94.66 ± 2.16<br>(94.66)     | 88.40 ± 2.84<br>(92.52)   | 5.60 ± 1.36<br>(1.09)     | 0.66 ± 0.15<br>(0.61)     |
| Stripped          | 3 | 94.10 ± 2.52<br>(94.10)     | 50.07 ± 3.80 *<br>(53.46) | 16.71 ± 2.60 *<br>(13.71) | 27.33 ± 1.20 *<br>(26.94) |

<sup>a</sup> Means ± S.D.

<sup>b</sup> Values in parentheses were estimated using penetration parameters obtained by the analyses of penetration profiles.

\* Significantly different ( $P < 0.001$ , Student's *t* test) from the values of intact skin.

## 2-b 二枚膜モデルに基づく皮膚透過パラメータの算出

本モデル解析では、以下のような手順で当てはめ計算を行い、各経路における皮膚透過パラメータを評価した。まず、角質層除去皮膚での透過曲線に対して一枚膜モデルに基づく皮

**Table II. Parameters for in vitro skin permeation of 6-mercaptopurine based on a two-layer diffusion model.**

|                 | Partition coefficient <sup>a</sup> | Diffusion constant <sup>b</sup><br>x10 <sup>6</sup> (cm <sup>2</sup> /hr) | Volume <sup>b</sup><br>x10 <sup>3</sup> (cm <sup>3</sup> ) | Distance <sup>b</sup><br>x10 <sup>3</sup> (cm) |
|-----------------|------------------------------------|---|--|--|
| Stratum corneum | 1.25 ± 0.10                        | 0.390   | 7.60   | 2.42   |
| Viable tissues  | 1.97 ± 0.29                        | 255   | 251  | 80.0   |

<sup>a</sup>Partition coefficient between stratum corneum or stripped skin and saline was experimentally determined and given as means ± S.D. (n=4).

<sup>b</sup>These values were obtained by curve-fitting to the penetration profiles.

膚透過式 (95式) を当てはめ、角質層以下の層における拡散および分配パラメータを算出した。次にこれらのパラメータを用いて、正常皮膚での透過曲線に対して二枚膜モデルに基づく皮膚透過式 (85式) を当てはめ、角質層における拡散および分配パラメータを算出した。さらに、解析法の妥当性を検証するために、角質層および角質層除去皮膚に対する分配係数を実測した上で、当てはめ計算によって得られたパラメータからバリアー膜の厚さおよび拡散係数を算出し、これまでに報告されている値<sup>20,75,76</sup>)を比較した。

Table II は分配実験および当てはめ計算によって評価された皮膚透過パラメータをまとめたものである。基剤として用いた生理食塩水溶液から角質層への分配係数は、角質層除去皮膚への分配係数とほぼ同じ値を示し、6-MP の角質層およびそれ以下の層への親和性はほぼ同程度であることが示された。角質層における拡散係数はそれ以下の層に比べて約 650 分の 1 であり、角質層中の拡散は極めて遅いことが明らかとなった。また、各層における 6-MP の拡散係数は、既にステロイド類で報告されている値<sup>20</sup>)と同じオーダーであり、MULTI(FILT) を利用した本解析法の妥当性が示された。また、角質層の厚さは、動物種<sup>75</sup>)あるいは部位<sup>76</sup>)によって異なるが約 15 μm と考えられており、水和した角質層ではさらに厚いことが報告されていることから<sup>77</sup>)、本解析結果で得られた 24 μm という値はほぼ妥当であると考えられる。また、角質層以下の層の厚さもノギスを用いて実測した値とよく一致した。

本アプローチでは、透過曲線の解析によって得られたパラメータを用いて、基剤中 ((86)式) および皮膚中 ((87), (88)式) の薬物量を計算することが可能である。皮膚透過パラメータより算出した基剤中および皮膚中薬物量は実測値ともほぼ対応し、本解析結果の妥当性が示された(Table I)。

以上のように二枚膜モデルに基づく解析法は、解剖学的にもよく対応したパラメータを与え、かつ基剤や皮膚中での薬物動態も精度よくシミュレーションできることから、薬物皮膚

透過を実体に即した形で議論する上で極めて有用なアプローチであることが示唆された。

## 2-c 平均皮膚内通過時間 MTT の算出

分配係数や拡散係数は皮膚透過を表す基本的なパラメータであるが、薬物の各層における皮膚透過性はこれらの組み合わせによって決定される。MTT の算出はこうした各層における薬物透過特性を理解する上で有用なアプローチであり、時間のパラメータを用いて直感的に理解しやすい形で表現することができる。

Fig.6 は、式(94)に基づき、Table II の皮膚透過パラメータから算出された正常および角質層除去皮膚における MTT を整理したものである。正常皮膚における MTT は角質層除去皮膚の 26 倍であり、基剤から角質層へ移行する過程に最も時間を要することが明らかとなった。6-MP の角質層に対する分配係数と角質層除去皮膚に対する分配係数がほぼ同程度であったことから、6-MP の正常皮膚における透過性が低い理由としては角質層での拡散係数

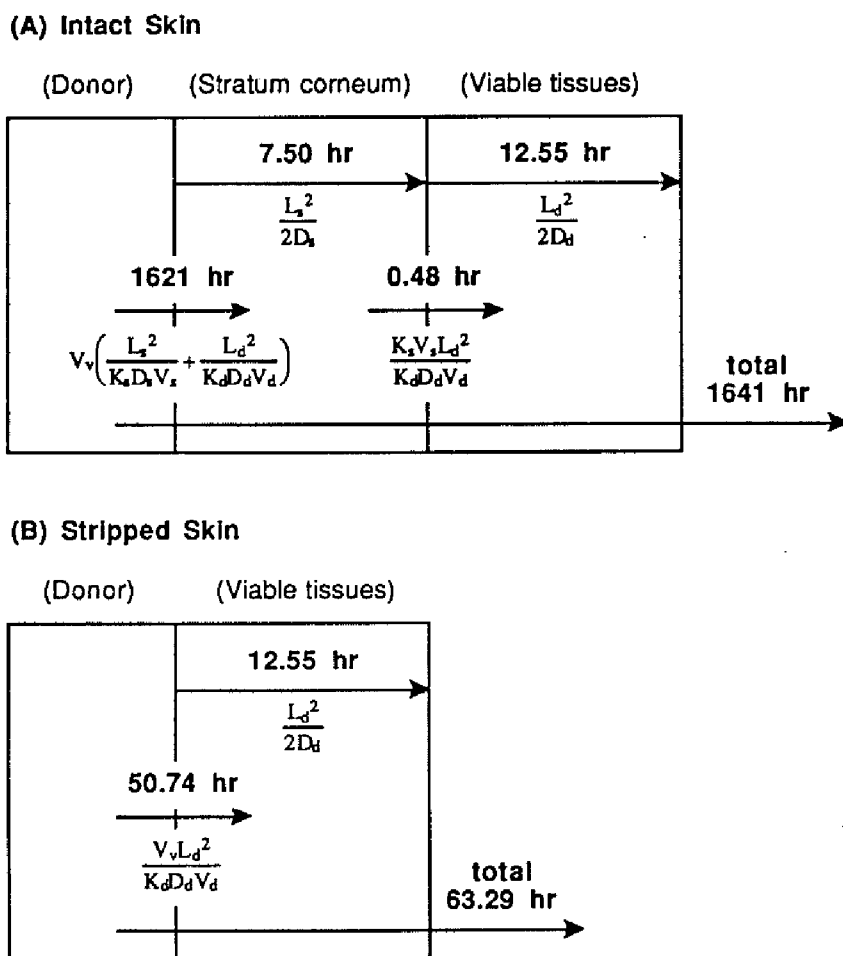


Fig. 6. Calculated mean transit time (MTT) for 6-mercaptopurine permeation through intact (A) or stripped (B) skin. These values were calculated using parameters listed in Table II. Theoretical equations for MTT and MRTs are also shown.

が極めて小さいことが考えられるが、これは、角質層中の拡散過程よりはむしろ、基剤から角質層へ移行する過程に反映することが示された。また、角質層とそれ以下の層を比較すると、角質層中拡散係数が極めて小さかったのに対し、拡散に要する平均時間はそれほど大きくは異ならなかった。これは、生きた表皮および真皮層での拡散距離が角質層に比べて長いためであり、皮膚透過において拡散距離は重要なパラメータの一つであることが示唆された。

MTT は基剤の体積を含んだパラメータであるので、投与液量によっても皮膚透過が異なり、基剤から角質層へ移行する過程に要する平均時間は投与液量が小さいほど短くなると考えられる。実際に投与液量が小さいほど salicylic acid の皮膚透過が増大することが報告されており<sup>78)</sup>、MTT から予想される結果ともよく対応している。理論的には 6-MP の MTT は投与液量が 0 の場合に最小となり、基剤から角質層への移行に要する時間を除いた合計の時間である 20.53 hr まで減少することになる。

以上のように MTT は、分配係数や拡散係数のような皮膚透過パラメータだけでは理解し難い各層の薬物透過特性に関する直感的な理解を助けることができ、薬物吸収を総合的に議論する上で有用なパラメータの一つと考えられる。

### 1-3 薬物経皮投与時における皮膚中濃度の評価

経皮吸収製剤の *in vivo* における評価は、一般に血中濃度や尿中排泄の測定により行われているが、投与された薬物の皮膚中濃度は局所における治療効果や副作用を決定する重要な因子であり、その評価法を確立することは重要な課題である。皮膚表面に投与された薬物は皮膚内を受動拡散し、血流によって全身系へと運ばれるが、これらの過程の中で薬物の濃度勾配が皮膚内に形成されると考えられる。東条らはこの皮膚内濃度勾配と皮膚透過との関係について着目し、角質層内の薬物濃度勾配から一枚膜拡散モデルに基づいて吸収速度を予測する方法を確立した<sup>79)</sup>。しかしながら、実際には薬物の標的部位となる生きた表皮層での濃度を評価することが重要であり、こうした目的を達成する上では皮膚構造を考慮したより詳細なモデルに基づく吸収動態の解析が必要と考えられる。

前節では、皮膚を角質層とそれ以下の層の二層からなると捉えた皮膚拡散モデルに基づく解析に MTT の概念を導入することによって、単に皮膚透過現象のみならず皮膚内挙動までを総合的に議論できることを示した。ここでは、さらに議論を *in vivo* 経皮吸収まで拡張し、薬物経皮投与後の尿中排泄パターンから皮膚中薬物濃度を評価する方法論の確立を行った。

ここでは、単純ヘルペスウイルス感染症に対する治療薬である acyclovir(AC)<sup>80)</sup> をモデル薬物として用いた。AC は従来より点滴静注剤や経口剤として広く用いられてきたが、単純ヘルペスウイルス感染症には再発型の性器ヘルペスや口唇ヘルペスなどの軽症例もあり、こう



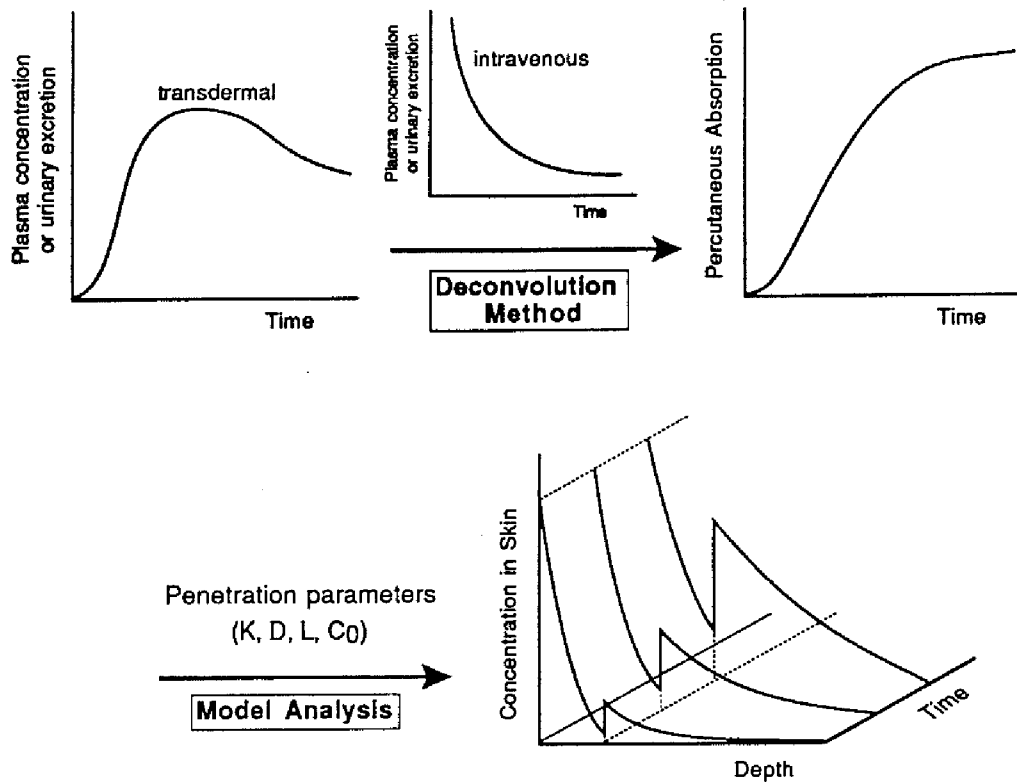


Fig. 7. Procedures for estimating drug concentration in the skin from plasma concentration or urinary excretion profile.

した場合には必ずしも全身投与は必要ではなく、安全性や使い易さの面からも外用剤が開発されている。これまでに AC 軟膏の臨床試験においてその有用性が報告されてきたが<sup>(81,82)</sup>、体内動態試験では経皮投与後の血漿中および尿中濃度は検出限界以下であることから吸収率が極めて低いと考えられ<sup>(83)</sup>、その作用については疑問点が残されている。そこで、<sup>[3H]</sup>AC を用いて軟膏の形で投与した場合の尿中排泄を測定し、モデル解析により作用部位と考えられる皮膚内での薬物濃度を評価した<sup>(39)</sup>。

### 3 - a in vivo における皮膚中濃度の評価法

in vivo において経皮投与された薬物の皮膚中濃度を評価する方法論について Fig.7 に整理した。経皮投与された薬物の血中濃度あるいは尿中排泄は、吸収動態に加え、分布・代謝・排泄といった全身動態に関する情報も含まれており、皮膚中薬物濃度のような局所動態を議論するためには、吸収過程を分離評価することが必要となる。デコンボリューション法は、古くから線形ファーマコキネティクス分野で利用されている方法であり、出力関数（製剤投与時の血中濃度あるいは尿中排泄）と入力関数（急速静注後の血中濃度あるいは尿中排泄）から重み関数（吸収速度）を計算する方法である<sup>(84-88)</sup>。デコンボリューション法を用い

て評価された吸収パターンをさらにモデル解析することによって、皮膚透過パラメータが算出でき、これらのパラメータを皮膚中濃度の理論式に代入することによって皮膚中濃度の経時変化をシミュレーションすることができる。

原理的には上述の手順に従って皮膚中濃度の評価が可能であるが、実際の計算においてはできるだけ数値計算による誤差を最小にすることが必要である。こうした観点から見た場合には、尿中排泄パターンに対して直接理論式を当てはめて皮膚透過パラメータの算出を行ったほうが、デコンボリューションによる数値計算の過程を省略でき、より信頼性の高い結果が得られると考えられる。経皮投与した薬物の尿中排泄の理論式は、吸収速度と静注後の尿中排泄の式をコンボリューションすることによって得られ、静注後の尿中排泄速度が bi-exponential の式 ( $dX_u/dt = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t)$ ) として近似されるならば、経皮投与後の累積尿中排泄量のラプラス次元の式は以下のように表される。

$$\bar{X}_u = \bar{Q} \times \{A/(s+\alpha) + B/(s+\beta)\} \quad (101)$$

ここで、 $\bar{X}_u$ 、 $\bar{Q}$  はそれぞれラプラス次元での尿中排泄量および吸収量を表す。

実験に用いた 5% AC 軟膏中では AC は懸濁状態であったので、この条件に対応する理論式の誘導を行った。二枚膜拡散モデルに基本とした場合、薬物の皮膚内における物質収支式は以下のように表される。

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2 C_s}{\partial x^2} \quad (102)$$

$$\frac{\partial C_d}{\partial t} = D_d \frac{\partial^2 C_d}{\partial x^2} \quad (103)$$

境界条件：

$$C_s = K_s C_0 \quad (x = L_s) \quad (104)$$

$$C_d = \frac{K_d}{K_s} C_s \quad (x = 0) \quad (105)$$

$$D_d A \frac{\partial C_d}{\partial x} = D_s A \frac{\partial C_s}{\partial x} \quad (x = 0) \quad (106)$$

$$C_d = 0 \quad (x = L_d) \quad (107)$$

初期条件：

$$C_s = C_d = 0 \quad (108)$$

これらの式をラプラス変換すると、

$$\bar{C}_s = K_s C_0 \{ Z_s \cosh d_s (x/L_s) \sinh d_d - Z_d \sinh d_s (x/L_s) \cosh d_d \} / s / h(s) \quad (109)$$

$$\bar{C}_d = K_d Z_s C_0 \sinh d_d (1 - x/L_d) / s / h(s) \quad (110)$$

$$\bar{Q}_{int} = Z_s Z_d C_0 / s / h(s) \quad (111)$$

$$d_s = L_s \sqrt{s/D_s} \quad (112)$$

$$d_d = L_d \sqrt{s/D_d} \quad (113)$$

$$Z_s = K_s V_s / d_s \quad (114)$$

$$Z_d = K_d V_d / d_d \quad (115)$$

$$h(s) = Z_d \sinh d_s \cosh d_d + Z_s \cosh d_s \sinh d_d \quad (116)$$

が得られる。

また、角質層除去皮膚における透過量は、(111)式に対して  $d_s = 0$  を置くことによって誘導できる。

$$\bar{Q}_{str} = Z_d C_0 / s / \sinh d_d \quad (117)$$

ここで、複合パラメータとして、

$$P1 = D_s / L_s^2 \quad (118)$$

$$P2 = D_d / L_d^2 \quad (119)$$

$$P3 = K_s D_s V_s C_0 / L_s^2 \text{ or } K_s D_s A C_0 / L_s \quad (120)$$

$$P4 = K_d D_d V_d C_0 / L_d^2 \text{ or } K_d D_d A C_0 / L_d \quad (121)$$

と定義することにより、軟膏に対する薬物の飽和濃度を実測することなしに皮膚中濃度のシミュレーションが可能となる。これらの複合パラメータを用いて、(109)–(111), (117)式は以下のように表される。

$$\bar{C}_s = \frac{P3}{V_s^* P1} \left\{ \frac{P3}{\sqrt{P1}} \cosh \left( \frac{x}{L_s} \sqrt{\frac{s}{P1}} \right) \sinh \sqrt{\frac{s}{P2}} - \frac{P4}{\sqrt{P2}} \sinh \left( \frac{x}{L_s} \sqrt{\frac{s}{P1}} \right) \cosh \sqrt{\frac{s}{P2}} \right\} / s / h'(s) \quad (122)$$

$$\bar{C}_d = \frac{P3^* P4}{V_d^* P2^* \sqrt{P1}} \sinh \left\{ \left( 1 - \frac{x}{L_d} \right) \sqrt{\frac{s}{P2}} \right\} / s / h'(s) \quad (123)$$

$$\bar{Q}_{int} = \frac{P3^* P4}{\sqrt{P1^* P2}} / s \sqrt{s} / h'(s) \quad (124)$$

$$\bar{Q}_{str} = \frac{P4}{\sqrt{P2}} / s\sqrt{s} / \sinh \sqrt{\frac{s}{P2}} \quad (125)$$

$$h'(s) = \frac{P4}{\sqrt{P2}} \sinh \sqrt{\frac{s}{P1}} \cosh \sqrt{\frac{s}{P2}} + \frac{P3}{\sqrt{P1}} \cosh \sqrt{\frac{s}{P1}} \sinh \sqrt{\frac{s}{P2}} \quad (126)$$

(101), (124), (125) 式を用いて尿中排泄パターンの解析を行い、得られたパラメータ P1-P4 を (122), (123) 式に代入することによって皮膚中濃度のシミュレーションが可能となる。

### 3 - b acyclovir 軟膏投与後の in vivo 吸収パターンの評価

まず最初に、 $[^3\text{H}]\text{AC}$  の全身動態を明らかにするために静脈内急速投与実験を行った。i.v. 投与後の尿中への放射活性の排泄は極めて速やかであり (Fig.8)、4 hr までに投与量の 88 % が回収された。得られた尿中排泄パターンに対して bi-exponential の式を当てはめたところ、

$$dX_u/dt \text{ (\% of Dose/hr)} = 166 * \exp(-2.61t) + 17.4 * \exp(-0.666t) \quad (127)$$

が得られた。

経皮吸収実験は、角質層とそれ以下の層のバリアー特性を分離評価するために、前節と同

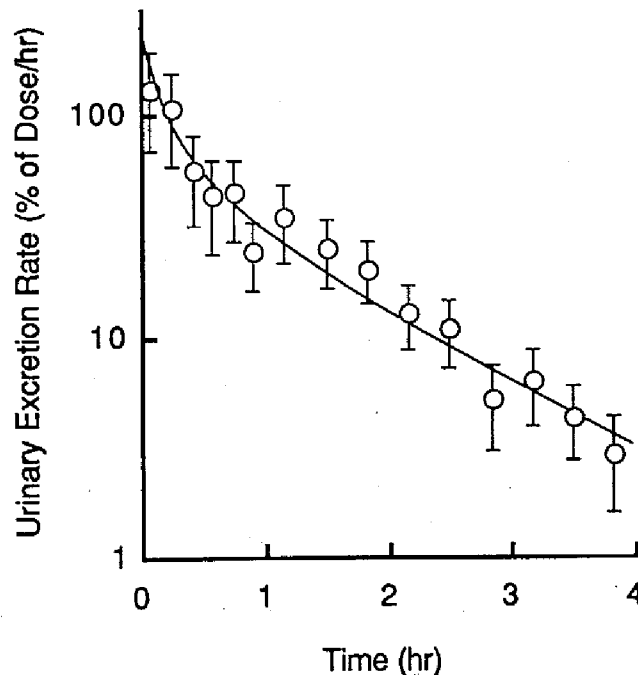


Fig. 8. Urinary excretion profile of acyclovir injected into femoral vein of rats. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. value of three experiment.

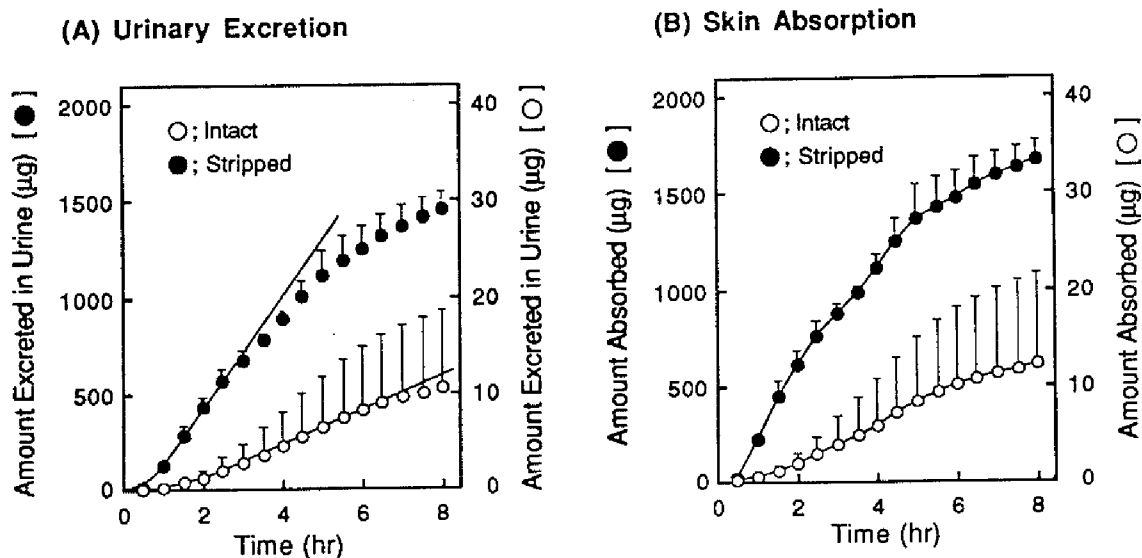


Fig. 9. The urinary excretion (A) and calculated absorption profile by deconvolution method (B) of acyclovir administered with polyethylene glycol ointment to intact or tape-stripped rat skin. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. value of three experiments.

様正常皮膚と角質層除去皮膚に対して行った。Fig.9には、これらの皮膚に対して放射標識体を含む5% AC軟膏を投与した際の尿中排泄パターンおよびデコンボリューション法<sup>87)</sup>によって計算された吸収パターンを示した。また、Table IIIは8 hrの吸収実験終了時における薬物の回収量をまとめたものである。実験終了時における放射活性の尿中排泄量は、正常皮膚では投与量の0.42%であったのに対し、角質層除去によって58%まで増大したことから、ACの皮膚透過において角質層が強力なバリアーとなっていることが明らかとなった。角質層除去皮膚では、投与後3 hr以降放射活性の排泄速度あるいは吸収速度の低下が認め

Table III. Amounts of acyclovir recovered at the end of 8-hr in vivo absorption experiment.

| Condition of skin | Recovery a,b (µg) |                          |                |
|-------------------|-------------------|--------------------------|----------------|
|                   | Ointment          | Skin                     | Urine          |
| Intact            | 2660 $\pm$ 750    | 35.1 $\pm$ 8.3<br>(1.96) | 10.5 $\pm$ 8.1 |
| Stripped          | 655 $\pm$ 91      | 88.8 $\pm$ 17.7<br>(341) | 1450 $\pm$ 90  |

<sup>a</sup> The experimental data are expressed as means  $\pm$  S.D.

<sup>b</sup> Values in parentheses were calculated using penetration parameters obtained by curve-fitting to urinary excretion profiles.

られたが、軟膏中薬物量の極度の低下により infinite 投与条件が成り立たなくなったためと推測される。一方正常皮膚においても、投与後 6 hr 以降排泄速度の低下が認められたが、このときの吸収率は極めて低かったことから、軟膏中 AC 濃度の低下によるものではないと考えられ、このような理由の一つに長時間麻酔下で実験を行ったために腎機能が低下したことが考えられる。以下の解析では、ラグタイム相を含め、排泄パターンの直線性が成り立つ領域までのデータに対して当てはめ計算を行った。

### 3-c 二枚膜モデルに基づく皮膚透過パラメータの算出

前節の吸収動態解析と同様に、角質層除去皮膚に対するモデル解析から角質層以下の生きた表皮および真皮層における皮膚透過パラメータを、正常皮膚での解析から角質層における皮膚透過パラメータを算出した。Table IV はモデル解析により得られたパラメータをまとめたものである。拡散パラメータ  $D/L^2$  は、生きた表皮および真皮層に比べ角質層のほうが大きくなったが、これは角質層の拡散係数は小さいにも関わらず角質層の厚さが非常に小さいためと考えられる。一方、後者のパラメータ  $KDVC_0/L^2$  は透過速度の次元をもち各層での AC の透過性を表す複合パラメータと考えられるが、角質層における値は生きた表皮および真皮層に比べて約 1/200 であり、AC の角質層透過性が極めて低いことが明らかとなった。

得られたパラメータを用いて実験終了時における皮膚中薬物量のシミュレーションを行った結果、正常皮膚に対しては実測値より小さく、逆に角質層除去皮膚に対しては実測値よりも大きくなった (Table III)。正常皮膚では、皮膚表面から軟膏を十分に除去することが困難であるため、測定された皮膚中薬物量は真の値に比べて過大評価されている可能性が考えられる。一方、角質層除去皮膚では、尿中排泄あるいは吸収パターンからも予想されたように、実験終了時には既に infinite 投与条件が成立していないために、実測の皮膚中薬物量が理論

**Table IV. Parameters for in vivo skin permeation of acyclovir based on a two-layer diffusion model.**

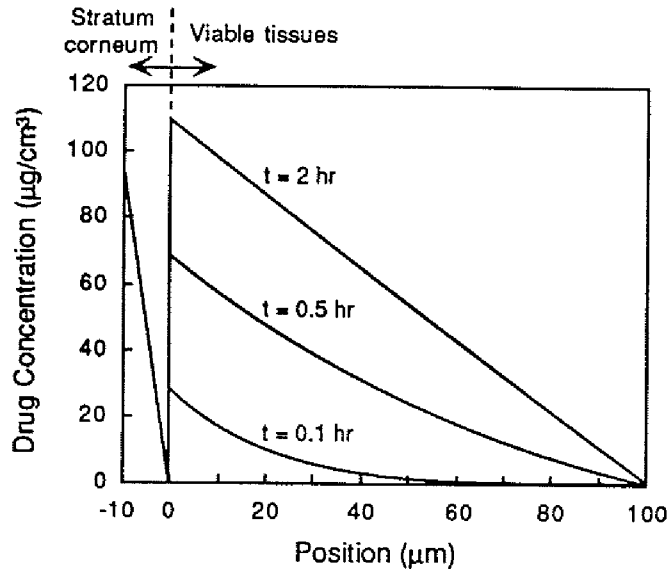
|                 | $D/L^2$<br>(hr <sup>-1</sup> ) | $KDVC_0/L^2$<br>(μg/hr) |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------|
| Stratum corneum | 6.97 ± 1.05                    | 2.08 ± 0.25             |
| Viable tissues  | 0.571 ± 0.102                  | 390 ± 12                |

Parameters are expressed as means ± computer calculated S.D.

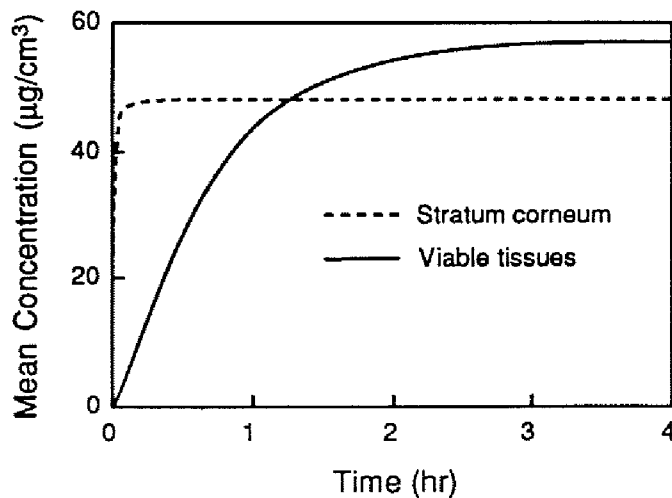
値よりも低くなったのではないかと推論される。

### 3-d 皮膚中薬物濃度のシミュレーション

Table IV に示されたパラメータを (122), (123) 式に代入し、皮膚中 AC 濃度のシミュレーションを行った。ここで、複合パラメータから実際の薬物濃度を計算するために、角質層と



**Fig. 10. Simulation of concentration gradient profiles of acyclovir in the skin at various time points.** Each curve was calculated using parameters listed in Table IV, assuming thickness of the stratum corneum and the lower viable layer to be 10 and 100  $\mu\text{m}$ , respectively.



**Fig. 11. Simulation of time courses of the mean concentration of acyclovir in the stratum corneum and the lower viable layer.** Each curve was calculated using parameters listed in Table IV, assuming thickness of the stratum corneum and the lower viable layer to be 10 and 100  $\mu\text{m}$ , respectively.

生きた表皮および真皮層の厚さは、それぞれ 10  $\mu\text{m}$ 、100  $\mu\text{m}$  と仮定した。ラット角質層の厚さは 13.8  $\mu\text{m}$  と報告されているが<sup>76)</sup>、測定の方法によっても値が違ふことも知られており<sup>75)</sup>、ここではその厚さを概数として 10  $\mu\text{m}$  と定義した。また、皮膚表面から毛細血管までの距離はヒトの場合で 150–200  $\mu\text{m}$  と報告されており<sup>89)</sup>、かつラットではヒトに比べて表皮の厚さが小さいので<sup>76)</sup>、生きた表皮および真皮層の厚さは 100  $\mu\text{m}$  と仮定した。

Fig.10 は、皮膚表面からの距離の関数として各時間における AC 濃度をシミュレーションしたものである。AC の角質層中での濃度勾配は、生きた表皮および真皮層に比べて極めて大きいことが示された。また投与後 2 hr で、皮膚中での濃度勾配はほぼ直線となり定常状態に到達することが明らかとなった。Fig.11 は、各層における AC 濃度の平均値を時間を変えてシミュレーションしたものであるが、角質層中では投与後速やかに平均濃度が一定に達したのに対し、生きた表皮および真皮層では定常状態に達するのにより長い時間を要することが示された。また、定常状態における平均濃度は生きた表皮および真皮層のほうが高かったことから、AC は親水的環境である生きた表皮および真皮層へ移行しやすいことが明らかとなった。生きた表皮および真皮層中での定常状態における平均濃度は、AC の HSV-I に対する  $\text{ID}_{50}$  値 (0.1  $\mu\text{M}$ )<sup>80)</sup> に比べ十分に高いことが示された。

以上の結果より、全身循環系への吸収が極めて小さい場合でも、投与部位の局所濃度は比較的高く維持されていることが明らかとなった。

#### 1-4 考察

薬物の皮膚透過は、受動拡散を基本とした物理化学的現象であり、薬物、基剤、皮膚の物性の組み合わせによって決定される。Fick の拡散式に基づく動態解析法は、これらの物理化学的特性を関連づけて議論する上で極めて有用なアプローチであるが、薬物経皮吸収を総合的に議論するためには、さらに皮膚の解剖学的特性を基本として薬物の皮膚透過経路を考慮した拡散モデルの構築が不可欠と考えられる。本研究では、極性および非極性経路が並列に存在する角質層とそれ以下の層からなる皮膚拡散モデルを基盤として、高速ラプラス逆変換アルゴリズムの利用と組み合わせた経皮吸収動態解析法を開発した。また、モーメント解析法との対応関係を整理することにより、薬物吸収に対する各吸収過程の寄与を直感的に理解しやすい形で評価する方法を確立した。

本解析法の特徴は、こうした複雑なモデルに対しても非定常状態も含めて皮膚透過挙動全体を解析できることにある。最近では吸収速度を一定に保つ TTS では薬剤耐性の問題が指摘され、TTS にも時間に依存した放出制御が要求されつつあり、こうした製剤設計を実現する上では、本解析法のように吸収現象を時間の関数として捉えることのできるアプローチが



不可欠である。さらに、本解析法では、皮膚透過のみならず皮膚内での薬物動態も含めて議論することができ、薬物の局所における治療効果や副作用の問題と密接に関連する局所薬物濃度の評価にも応用可能であるという利点を有している。

こうした薬物の皮膚透過過程を考慮したモデル解析では、薬物皮膚透過のみならず、吸収促進剤の効果も各吸収素過程に分離して評価することが可能である。したがって、吸収促進剤の作用点・作用様式を各吸収素過程のレベルで整理することによって、各種薬物に対する吸収促進効果に関して統一的な議論が可能になるものと思われる。さらに、本モデルは皮膚の解剖学および生理学的特性に基づいて構築されており、*in vitro* から *in vivo* までの吸収動態の系統的解析が可能となるため、実際の投与において問題となる *in vivo* における吸収動態を精度良く予測するための有力な手段となり得るものと思われる。

## 第II章 皮膚拡散モデルに基づく吸収促進剤の作用機構解析

多くの薬物においては、皮膚本来のバリアー機能によりその経皮吸収性は極めて低く、単独の経皮投与では十分な治療効果が期待できない場合が多い。こうした問題を解決するための手段として、これまでに幾つかの経皮吸収改善法が考案されており、中でも吸収促進剤の利用は有力な手段の一つである。吸収促進作用を有する化合物としては、古くから sulfoxides、pyrrolidones、fatty acids、alcohols などがよく知られているが、Azone<sup>®</sup> に代表される合成吸収促進剤もこれまでに数多く開発されている<sup>10,11)</sup>。京都大学薬学部薬剤学教室では、吸収促進剤として側鎖にテルペン構造を有する 1-alkyl- あるいは 1-alkenyl-azacycloalkanone 誘導体を開発し、各種薬物に対してその有効性を明らかにしている<sup>90-92)</sup>。

こうした吸収促進剤を用いて薬物吸収を最適化するためには、吸収促進機構に関する十分な理解が必要である。吸収促進機構の解析方法としては、既に幾つかの方法が確立されているが、大きくは機器分析法を利用した解析方法と吸収実験の結果をモデル解析する方法の二つに分類される。前者の方法は、示差熱分析(DSC)<sup>93,94)</sup>、フーリエ変換赤外吸収スペクトル法(FT-IR)<sup>95,96)</sup>などを利用して、皮膚構成成分に特有のシグナルの変化から吸収促進剤の作用部位や作用機構を同定する方法である。一方、後者の方法は、薬物皮膚透過パターンをモデル解析し、薬物の皮膚透過パラメータの変化により吸収促進機構を議論するアプローチであり、皮膚拡散モデルの場合では吸収促進剤の作用機構を薬物透過の分配および拡散の両過程に対する作用として捉えることができる<sup>33,92,97)</sup>。一般に吸収促進剤の効果は、皮膚に対する直接作用のみならず、基剤<sup>98,99)</sup>や薬物<sup>97,100-102)</sup>によっても大きく異なることがよく知られているが、後者の解析法はこうした点を含めて吸収促進現象を総合的に議論する上で極めて有用なアプローチと考えられる。

本章では、前章で確立した皮膚拡散モデルに基づいて、吸収促進剤適用時の皮膚透過パターンを解析し、各種吸収促進剤の作用部位および作用機構の解明を行った。吸収促進剤としては、京都大学薬学部薬剤学教室で開発された吸収促進剤の中で優れた促進効果を有しかつ皮膚に対する刺激性が低いことを明らかにしている 1-geranylazacycloheptan-2-one(GACH) を用いた<sup>40)</sup>。また、GACH とは異なった化学構造を有する代表的な吸収促進剤として、単環モノテルペンの *d*-limonene と不飽和脂肪酸の oleic acid を選び、これら吸収促進剤の作用機構比較を行った<sup>41)</sup>。

### II-1 1-Geranylazacycloheptan-2-one(GACH) の促進機構解析

GACH は、Azone<sup>®</sup> と同じ azacycloheptan-2-one 環を極性基として有し、側鎖にジテルペン

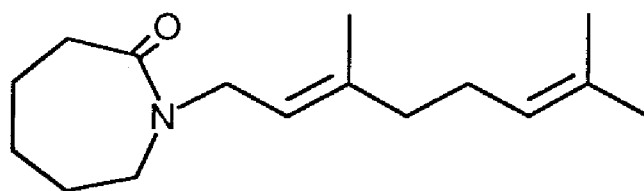


Fig. 12. Chemical structure of 1-geranylazacycloheptan-2-one (GACH).

の geranyl 基を有する吸収促進剤である (Fig.12)。Okamoto らは、この吸収促進剤が mitomycin C や 6-mercaptopurine に対して顕著な促進効果を示すとともに刺激性が極めて低いことから、吸収促進剤として有力な候補物質であることを報告している<sup>90,92</sup>。さらに、GACH は、octanol/水間分配係数( $PC_{oct/w}$ )の値が 0 付近の薬物に対して最も顕著な促進効果を示すことも報告している<sup>97</sup>。本研究では、薬物透過経路を考慮した皮膚拡散モデルに基づいて GACH の吸収促進機構の解析を行い、その解析結果に基づいて in vitro 系での種々の薬物に対する促進効果を予測する理論の確立を試みた。

### 1 - a モデル薬物とその物理化学的性質

薬物の皮膚透過経路が薬物の物性によって異なるのと同様に、吸収促進剤もまたその物性

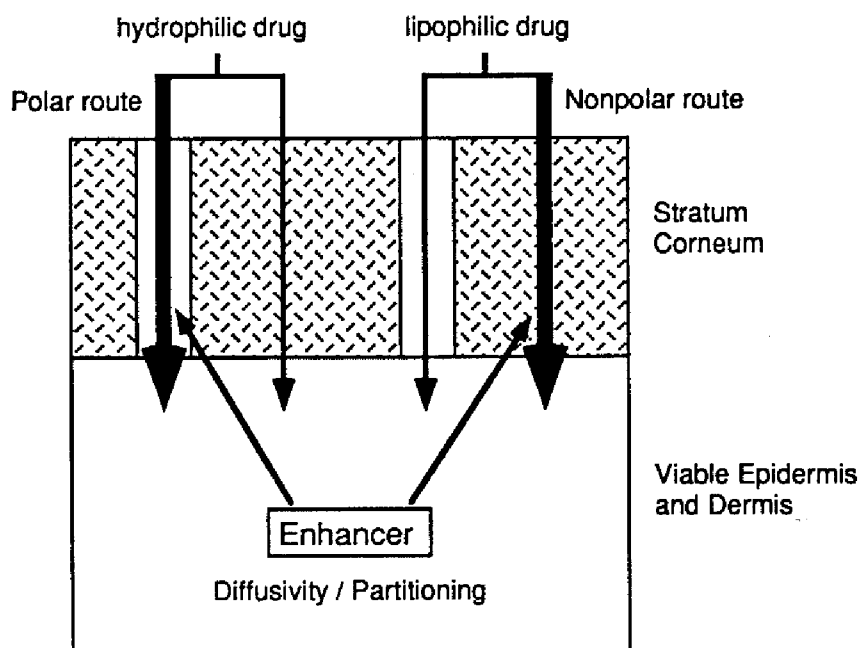


Fig. 13. Penetration pathways of drug and action mechanism of enhancer.

**Table V. Chemical structures and physicochemical properties of model drugs used in this study.**

| Drug                                      | Structure | Molecular Weight | Octanol-Water Partition Coefficient <sup>a</sup> |
|---|-----------|------------------|--|
| mannitol<br>(MT)                          |           | 182              | 0.00155  |
| cytosine β-arabino-<br>furanoside (ara-C) |           | 243              | 0.00939  |
| acyclovir<br>(AC)                         |           | 225              | 0.0304   |
| 5-fluorouracil<br>(5-FU)                  |           | 130              | 0.144  |
| 6-mercaptopurine<br>(6-MP)                |           | 152              | 0.654  |
| hydrocortisone<br>(HC)                    |           | 363              | 7.42   |
| butylparaben<br>(BP)                      |           | 194              | 371  |

<sup>a</sup> Octanol-water partition coefficients of drugs were determined at 37 °C.

に応じた経路に対して作用すると考えられ、結果として見かけの吸収促進効果は、薬物の透過経路と吸収促進剤の作用部位・作用機構のバランスによって決定されることが考えられる (Fig.13)。したがって、吸収促進剤の効果を総合的に議論する上では、透過経路の異なる薬物すなわち物性の異なる種々の薬物を対象に吸収実験を行い、吸収促進剤の各薬物透過経路に対する作用を分離評価することが重要である。そこで本研究では、Table V に示した [<sup>14</sup>C]mannitol (MT)、 [<sup>3</sup>H]cytosine β-arabinofuranoside(ara-C)、 [<sup>3</sup>H]acyclovir(AC)、 [<sup>14</sup>C]5-fluorouracil(5-FU)、 [<sup>14</sup>C]6-mercaptopurine(6-MP)、 [<sup>3</sup>H]hydrocortisone(HC)、 [<sup>14</sup>C]butylparaben (BP) の 7 種薬物をモデルとして in vitro 皮膚透過実験を行った。

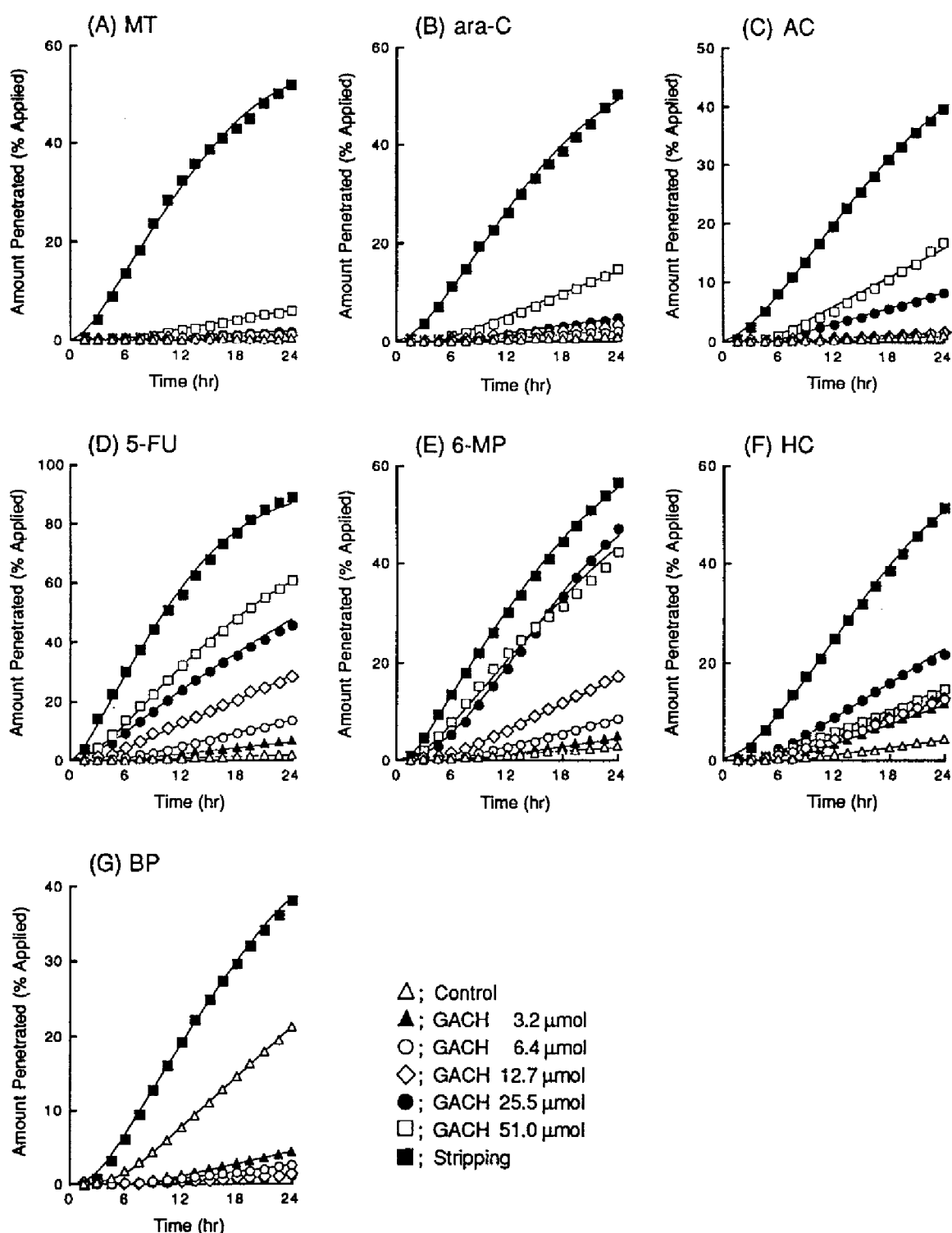
薬物の皮膚透過性を支配する薬物側の性質としては、主として分子のサイズおよび親油性の二つがあり、前者は薬物の皮膚中での拡散性を決定し、後者は皮膚に対する分配性を決定づけると考えられる。本研究では、比較的分子量範囲の狭い薬物を対象とすることによって、薬物間での拡散性の違いを無視できる条件下で実験を行った。また、 $PC_{oct/w}$  に示されるように、親油性が幅広く異なる薬物を用いることによって、皮膚透過経路の異なる薬物に対する吸収促進剤の促進効果の評価を行った。

#### 1 - b 各種薬物の in vitro 皮膚透過に及ぼす GACH の影響

本実験では、複雑なモデル解析に耐えうる精度の高いデータを得ることが必要とされるので、以下のように実験条件を設定した。まず、flow-through 型拡散セルを使用することにより、常にレセプター側でシンク条件が成立する条件下で実験を行った。また、ドナー中での吸収促進剤と薬物の相互作用をなくし皮膚に対する直接作用のみを評価することを目的として、吸収促進剤は前処理法によって投与した。さらに、極性経路への薬物の分配が薬物間で同じであることを仮定できるように水を基剤として用い、薬物の溶解速度が皮膚透過に影響しないように薬物は溶液の形で投与した。

Fig.14 は、モルモットの背部摘出皮膚に対して GACH を 24 hr 前処理した場合における各薬物の累積透過曲線を示したものである。促進剤無処理 (コントロール) 条件における皮膚透過は、薬物の親油性が高いほど大きく、皮膚が脂質バリアーであることが示された。また、角質層を除去することによって皮膚透過が顕著に増大し、特にその傾向は親水性薬物ほど大きかったことから、これらの薬物の皮膚透過において角質層が強力なバリアーとして機能していることが明らかとなった。

一方、GACH の促進効果は薬物間で大きく異なり、親水性の高い MT、ara-C、AC に対しては促進効果が小さく、中程度の親油性を有する 5-FU、6-MP では顕著な促進効果が認められた。一方、比較的親油性の高い HC では、GACH 適用量が 25.5 μmol の場合に皮膚透過が



**Fig. 14.** In vitro permeation of MT (A), ara-C (B), AC (C), 5-FU (D), 6-MP (E), HC (F), and BP (G) through intact guinea pig skin pretreated with an ethanolic solution of different doses of GACH or through tape-stripped skin. The drugs were applied in the form of aqueous solution. Each point represents the mean value of at least three experiments. The curves were simulated using parameters listed in Table VII.

**Table VI. Amounts of drugs recovered at the end of 24-hr diffusion experiment in guinea pigs.**

| Drug  | GACH dose (μmol) | Recovery <sup>a</sup> (%) |               |               |               |
|-------|------------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------|
|       |                  | Donor                     | Skin          | Receptor      | Total         |
| MT    | 0                | 95.72 ± 0.25              | 1.05 ± 0.16   | 0.53 ± 0.04   | 97.30 ± 0.13  |
|       | 3.2              | 93.30 ± 1.57              | 1.73 ± 0.11   | 0.60 ± 0.12   | 95.64 ± 1.54  |
|       | 6.4              | 93.14 ± 0.77              | 1.99 ± 0.64   | 1.44 ± 0.15   | 96.56 ± 0.52  |
|       | 12.7             | 93.24 ± 0.86              | 1.83 ± 0.37   | 0.98 ± 0.04   | 96.05 ± 0.93  |
|       | 25.5             | 92.78 ± 4.57              | 2.39 ± 0.16   | 1.86 ± 1.35   | 97.03 ± 3.39  |
|       | 51.0             | 71.06 ± 12.57             | 6.38 ± 1.91   | 6.16 ± 1.76   | 83.60 ± 13.10 |
|       | Stripping        | 27.62 ± 13.86             | 4.50 ± 2.46   | 52.35 ± 10.44 | 84.47 ± 8.70  |
| ara-C | 0                | 92.67 ± 0.69              | 2.69 ± 1.02   | 0.91 ± 0.13   | 96.37 ± 1.49  |
|       | 3.2              | 90.14 ± 3.44              | 2.81 ± 0.60   | 1.65 ± 0.80   | 94.60 ± 2.25  |
|       | 6.4              | 91.13 ± 2.77              | 3.81 ± 0.68   | 1.96 ± 0.65   | 96.91 ± 2.93  |
|       | 12.7             | 90.52 ± 2.22              | 5.47 ± 2.14   | 2.87 ± 0.74   | 98.86 ± 0.75  |
|       | 25.5             | 86.81 ± 3.07              | 4.93 ± 0.54   | 4.60 ± 0.56   | 96.34 ± 2.71  |
|       | 51.0             | 71.35 ± 1.44              | 10.50 ± 1.77  | 14.66 ± 1.98  | 96.51 ± 2.19  |
|       | Stripping        | 33.84 ± 10.38             | 7.35 ± 3.82   | 50.35 ± 14.25 | 91.55 ± 1.37  |
| AC    | 0                | 96.17 ± 0.83              | 3.27 ± 0.14   | 1.19 ± 0.31   | 100.62 ± 0.66 |
|       | 3.2              | 92.22 ± 0.73              | 4.34 ± 2.39   | 1.22 ± 0.31   | 97.79 ± 1.97  |
|       | 6.4              | 96.18 ± 4.62              | 5.01 ± 0.49   | 1.61 ± 0.40   | 102.79 ± 4.88 |
|       | 12.7             | 92.37 ± 5.14              | 6.28 ± 0.48   | 1.49 ± 0.36   | 100.13 ± 4.86 |
|       | 25.5             | 85.10 ± 1.79              | 8.17 ± 1.92   | 8.24 ± 2.75   | 101.50 ± 2.00 |
|       | 51.0             | 66.23 ± 10.64             | 15.88 ± 3.83  | 16.89 ± 5.15  | 99.01 ± 2.21  |
|       | Stripping        | 41.01 ± 12.17             | 10.91 ± 0.97  | 39.73 ± 13.74 | 91.66 ± 1.37  |
| 5-FU  | 0                | 97.66 ± 2.71              | 3.09 ± 1.01   | 2.09 ± 1.50   | 102.84 ± 1.68 |
|       | 3.2              | 77.95 ± 1.04              | 6.84 ± 3.72   | 6.99 ± 2.80   | 91.79 ± 0.97  |
|       | 6.4              | 74.86 ± 2.65              | 7.53 ± 0.52   | 13.65 ± 2.50  | 96.04 ± 1.35  |
|       | 12.7             | 57.31 ± 6.53              | 10.03 ± 1.81  | 28.07 ± 6.80  | 95.41 ± 0.85  |
|       | 25.5             | 45.72 ± 4.94              | 9.55 ± 1.86   | 44.98 ± 6.77  | 100.24 ± 1.24 |
|       | 51.0             | 24.98 ± 4.04              | 4.75 ± 0.78   | 60.90 ± 7.13  | 90.63 ± 4.41  |
|       | Stripping        | 4.77 ± 3.16               | 2.14 ± 0.79   | 89.38 ± 3.82  | 95.76 ± 0.54  |
| 6-MP  | 0                | 91.24 ± 3.86              | 6.69 ± 2.07   | 2.96 ± 1.63   | 100.88 ± 3.56 |
|       | 3.2              | 84.21 ± 3.99              | 11.43 ± 3.14  | 5.03 ± 1.27   | 100.65 ± 1.90 |
|       | 6.4              | 77.61 ± 5.72              | 15.35 ± 6.21  | 8.54 ± 2.35   | 101.49 ± 2.46 |
|       | 12.7             | 63.79 ± 5.08              | 17.32 ± 7.23  | 17.05 ± 3.45  | 98.15 ± 4.68  |
|       | 25.5             | 34.82 ± 3.92              | 23.67 ± 9.04  | 47.27 ± 5.31  | 105.75 ± 2.22 |
|       | 51.0             | 35.12 ± 4.45              | 15.49 ± 0.34  | 45.80 ± 4.63  | 96.41 ± 0.52  |
|       | Stripping        | 23.88 ± 8.38              | 8.27 ± 4.78   | 56.56 ± 11.73 | 88.71 ± 2.95  |
| HC    | 0                | 66.27 ± 7.44              | 24.25 ± 5.07  | 4.31 ± 2.85   | 94.83 ± 3.37  |
|       | 3.2              | 50.62 ± 4.38              | 30.46 ± 3.74  | 11.64 ± 1.03  | 92.72 ± 3.01  |
|       | 6.4              | 50.26 ± 8.19              | 30.72 ± 5.73  | 12.57 ± 2.58  | 93.54 ± 0.86  |
|       | 12.7             | 51.69 ± 3.98              | 29.31 ± 1.55  | 12.62 ± 0.95  | 93.62 ± 3.38  |
|       | 25.5             | 38.44 ± 5.17              | 42.42 ± 6.06  | 18.57 ± 8.02  | 99.43 ± 2.49  |
|       | 51.0             | 30.99 ± 4.69              | 53.96 ± 7.71  | 14.55 ± 5.08  | 99.50 ± 3.51  |
|       | Stripping        | 23.77 ± 3.80              | 13.55 ± 1.69  | 51.62 ± 4.21  | 88.94 ± 1.83  |
| BP    | 0                | 18.00 ± 4.94              | 49.06 ± 3.05  | 21.03 ± 3.26  | 88.09 ± 5.19  |
|       | 3.2              | 9.52 ± 1.02               | 55.84 ± 3.28  | 4.23 ± 1.64   | 69.59 ± 2.28  |
|       | 6.4              | 8.59 ± 0.84               | 65.29 ± 6.38  | 2.55 ± 0.79   | 76.43 ± 6.44  |
|       | 12.7             | 8.41 ± 0.53               | 68.48 ± 4.14  | 1.21 ± 0.52   | 78.09 ± 3.66  |
|       | 25.5             | 12.23 ± 1.72              | 75.39 ± 12.17 | 1.21 ± 0.06   | 88.83 ± 13.78 |
|       | 51.0             | 10.33 ± 2.33              | 79.66 ± 3.18  | 0             | 89.99 ± 0.78  |
|       | Stripping        | 9.19 ± 1.56               | 26.32 ± 6.05  | 38.04 ± 3.44  | 73.55 ± 2.65  |

<sup>a</sup> Amount recoveries at 24 hr are expressed as means ± S.D. of at least three experiments.

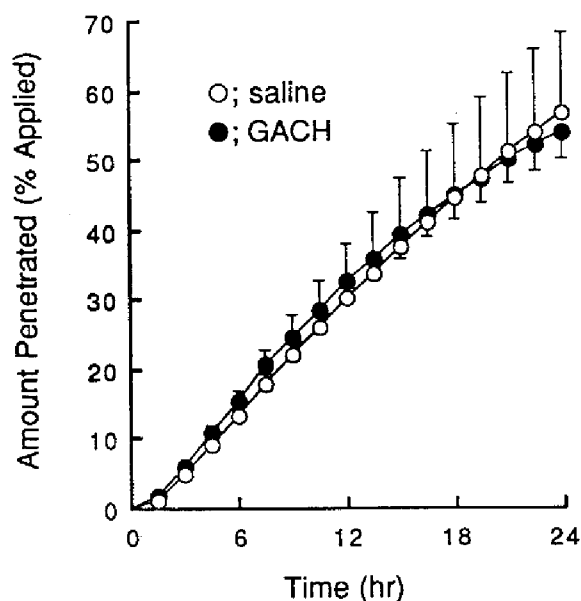


Fig. 15. In vitro permeation of 6-MP through tape-stripped skin pretreated with GACH or saline. Each point represents the mean value of three experiments.

最大となり、親油性の非常に高い BP の場合には GACH 適用量の増加に伴い皮膚透過が減少した。また、実験終了時における皮膚中薬物量に関しては、5-FU、6-MP を除くすべての薬物において GACH 適用量依存的に増加する傾向が認められた(Table VI)。ここで、5-FU や 6-MP に対して高投与量の GACH で前処理した場合には、皮膚透過が極めて大きかったために皮膚中薬物量が減少したものと考えられ、基本的に GACH は適用量依存的に皮膚中薬物量を増大させる作用を有することが示唆された。

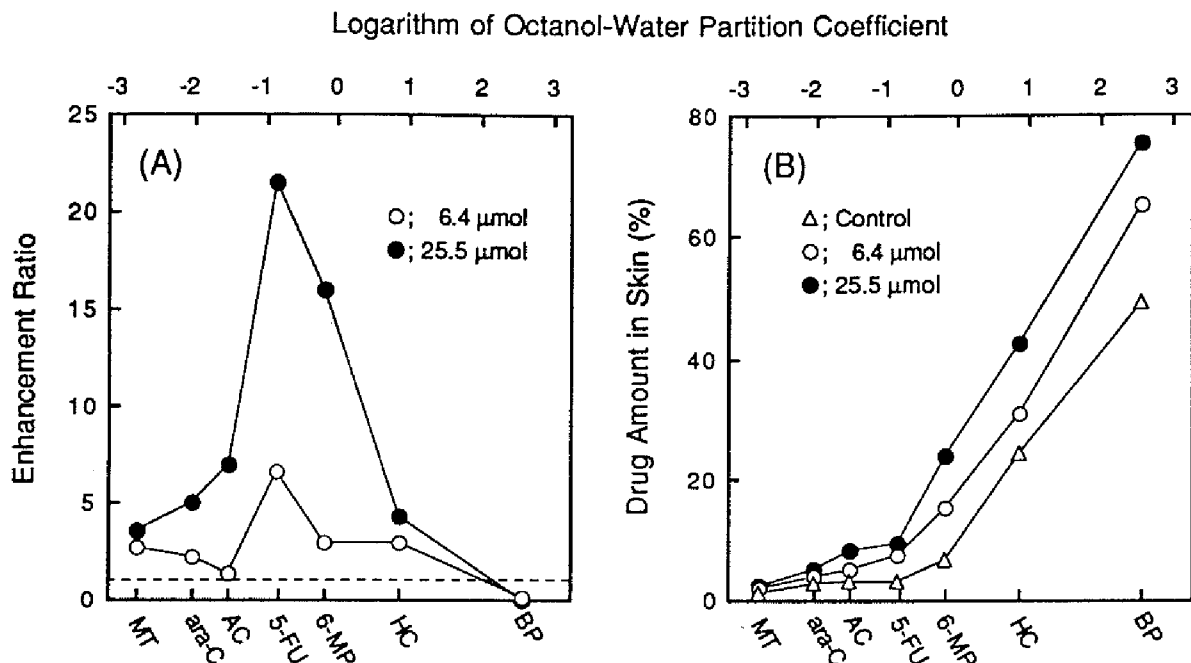
Fig.15 には、角質層除去皮膚を GACH で前処理した場合の 6-MP の皮膚透過を測定した結果であるが、促進剤無処理の場合と差の無い皮膚透過パターンを示し、GACH は角質層以下の層に対して作用を示さないことが明らかとなった。

### 1 - c 薬物の親油性と吸収促進効果

Fig.16 には、薬物の親油性と GACH の吸収促進効果、あるいは実験終了時の皮膚中薬物量の関係をプロットした。ここで、GACH の吸収促進効果は 24 時間後における透過量のコントロール値に対する比として定義した。Fig.16(A) に示されるように、薬物の  $\log PC_{oct/w}$  と促進効果との間にはベル型の関係が認められ、GACH は 5-FU( $PC_{oct/w} = 0.144$ ) に対して最大の促進効果を示した。一方皮膚中薬物量に関しては親油性の高い薬物ほど大きく、GACH 適用により皮膚中薬物量は各薬物とも顕著に増大することが明らかとなった(Fig.16(B))。

こうした吸収促進効果に関するベル型の関係は、角質層を均一と捉えた二枚膜皮膚モデルでは説明することができない。すなわち角質層を均一と仮定した場合には、親水性の高い薬





**Fig. 16. Relationship between logarithmic value of octanol/water partition coefficient and enhancement ratio (A) and drug amount in skin at 24 hr (B) under the pretreatment with different doses of GACH.** Each enhancement ratio was calculated by dividing the amount of drug penetrated through GACH-pretreated skin by that through ethanol-pretreated skin.

物の場合ほど角質層によって全体の透過が支配されるため、角質層に対して作用する吸収促進剤の効果は親水性の高い薬物ほど大きくなると考えられ、MT、ara-Cのような親水性の非常に高い薬物に対してGACHの促進効果が小さかったことに矛盾する。これに対し角質層極性経路を考慮した場合には、親水性が高い薬物は極性経路を透過し、一方親油性が高いGACHは非極性経路に対して作用すると考えることができるので、親水性薬物に対する吸収促進効果が小さかったことが合理的に説明される。本結果は、従来より薬物の透過性のみで議論されてきた極性経路の存在を、こうした吸収促進効果の立場から肯定するものである。

#### 1-d 極性経路を考慮した二枚膜皮膚モデルに基づく吸収促進機構の解析

薬物皮膚透過および吸収促進剤の効果を総合的に議論できるモデルとして、極性経路を考慮した二枚膜皮膚モデルが有用であることが示されたが、これを実際の吸収動態予測へ応用するためには、皮膚透過パラメータを算出することによって、薬物吸収機構や吸収促進剤の作用機構を定量的に議論することが必要である。そこで、先の実験で得られた透過パターン (Fig. 14) を本モデルに基づいて解析し、各吸収経路における薬物の分配および拡散パラメー

**Table VII. Parameters for in vivo skin permeation of drugs with GACH based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum.**

| Drug  | GACH dose<br>( $\mu\text{mol}$ ) | Polar route <sup>a</sup>            |  | Nonpolar route <sup>b</sup>            |  | Viable tissues <sup>c</sup>         |                                |
|-------|----------------------------------|-------------------------------------|--|--|--|-------------------------------------|--------------------------------|
|       |                                  | $D_p L_s^2$<br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_p V_p \times 10^5$<br>( $\text{cm}^3$ ) | $D_{np} L_s^2$<br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_{np} V_{np} \times 10^3$<br>( $\text{cm}^3$ ) | $D_d L_d^2$<br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_d V_d$<br>( $\text{cm}^3$ ) |
| MT    | 0                                | 38.1                                | 0.766                                      | —                                      | —  | 0.0812                              | 0.693                          |
|       | 3.2                              | 39.8                                | 0.872                                      | —                                      | —  | 0.0812                              | 0.693                          |
|       | 6.4                              | 40.8                                | 2.04                                       | —                                      | —  | 0.0812                              | 0.693                          |
|       | 12.7                             | 37.4                                | 1.43                                       | —                                      | —  | 0.0812                              | 0.693                          |
|       | 25.5                             | 38.6                                | 2.88                                       | —                                      | —  | 0.0812                              | 0.693                          |
|       | 51.0                             | 39.5                                | 11.2                                       | —                                      | —  | 0.0812                              | 0.693                          |
|       | Stripping                        | —                                   | —  | —                                      | —  | 0.0812                              | 0.693                          |
| ara-C | 0                                | 36.5                                | 0.766                                      | 1.64                                   | 0.233  | 0.0610                              | 0.745                          |
|       | 3.2                              | 38.2                                | 0.872                                      | 2.21                                   | 0.349  | 0.0610                              | 0.745                          |
|       | 6.4                              | 39.1                                | 2.04                                       | 1.95                                   | 0.286  | 0.0610                              | 0.745                          |
|       | 12.7                             | 35.9                                | 1.43                                       | 2.00                                   | 0.706  | 0.0610                              | 0.745                          |
|       | 25.5                             | 37.0                                | 2.88                                       | 1.62                                   | 1.35   | 0.0610                              | 0.745                          |
|       | 51.0                             | 37.9                                | 11.2                                       | 3.47                                   | 2.28   | 0.0610                              | 0.745                          |
|       | Stripping                        | —                                   | —  | —                                      | —  | 0.0610                              | 0.745                          |
| AC    | 0                                | 36.9                                | 0.766                                      | 1.39                                   | 0.354  | 0.0565                              | 0.566                          |
|       | 3.2                              | 38.6                                | 0.872                                      | 2.56                                   | 0.172  | 0.0565                              | 0.566                          |
|       | 6.4                              | 39.6                                | 2.04                                       | 1.52                                   | 0.0941   | 0.0565                              | 0.566                          |
|       | 12.7                             | 36.3                                | 1.43                                       | 1.01                                   | 0.421  | 0.0565                              | 0.566                          |
|       | 25.5                             | 37.4                                | 2.88                                       | 2.13                                   | 2.57   | 0.0565                              | 0.566                          |
|       | 51.0                             | 38.3                                | 11.2                                       | 2.91                                   | 3.92   | 0.0565                              | 0.566                          |
|       | Stripping                        | —                                   | —  | —                                      | —  | 0.0565                              | 0.566                          |
| 5-FU  | 0                                | 40.0                                | 0.766                                      | 2.04                                   | 0.381  | 0.0858                              | 1.84                           |
|       | 3.2                              | 41.8                                | 0.872                                      | 4.90                                   | 0.780  | 0.0858                              | 1.84                           |
|       | 6.4                              | 42.8                                | 2.04                                       | 3.98                                   | 1.90   | 0.0858                              | 1.84                           |
|       | 12.7                             | 39.3                                | 1.43                                       | 4.34                                   | 5.05   | 0.0858                              | 1.84                           |
|       | 25.5                             | 40.5                                | 2.88                                       | 4.71                                   | 9.56   | 0.0858                              | 1.84                           |
|       | 51.0                             | 41.5                                | 11.2                                       | 4.69                                   | 21.3   | 0.0858                              | 1.84                           |
|       | Stripping                        | —                                   | —  | —                                      | —  | 0.0858                              | 1.84                           |
| 6-MP  | 0                                | 39.1                                | 0.766                                      | 3.39                                   | 0.483  | 0.0595                              | 1.04                           |
|       | 3.2                              | 40.9                                | 0.872                                      | 3.01                                   | 0.954  | 0.0595                              | 1.04                           |
|       | 6.4                              | 41.9                                | 2.04                                       | 1.20                                   | 4.11   | 0.0595                              | 1.04                           |
|       | 12.7                             | 38.4                                | 1.43                                       | 2.98                                   | 4.65   | 0.0595                              | 1.04                           |
|       | 25.5                             | 39.6                                | 2.88                                       | 4.07                                   | 17.7   | 0.0595                              | 1.04                           |
|       | 51.0                             | 40.5                                | 11.2                                       | 2.95                                   | 28.7   | 0.0595                              | 1.04                           |
|       | Stripping                        | —                                   | —  | —                                      | —  | 0.0595                              | 1.04                           |
| HC    | 0                                | 34.5                                | 0.766                                      | 0.161                                  | 25.0   | 0.0390                              | 1.67                           |
|       | 3.2                              | 36.0                                | 0.872                                      | 0.691                                  | 18.1   | 0.0390                              | 1.67                           |
|       | 6.4                              | 36.9                                | 2.04                                       | 1.43                                   | 9.46   | 0.0390                              | 1.67                           |
|       | 12.7                             | 33.8                                | 1.43                                       | 1.39                                   | 9.77   | 0.0390                              | 1.67                           |
|       | 25.5                             | 34.9                                | 2.88                                       | 0.238                                  | 4140   | 0.0390                              | 1.67                           |
|       | 51.0                             | 35.7                                | 11.2                                       | 0.772                                  | 6710   | 0.0390                              | 1.67                           |
|       | Stripping                        | —                                   | —  | —                                      | —  | 0.0390                              | 1.67                           |
| BP    | 0                                | 37.7                                | 0.766                                      | 0.194                                  | 2020   | 0.0372                              | 1.52                           |
|       | 3.2                              | 39.4                                | 0.872                                      | 0.0682                                 | 13300  | 0.0372                              | 1.52                           |
|       | 6.4                              | 40.4                                | 2.04                                       | 0.0658                                 | 26700  | 0.0372                              | 1.52                           |
|       | 12.7                             | 37.1                                | 1.43                                       | 0.0335                                 | 50800  | 0.0372                              | 1.52                           |
|       | 25.5                             | 38.2                                | 2.88                                       | 0.0942                                 | 78500  | 0.0372                              | 1.52                           |
|       | 51.0                             | —                                   | —  | —                                      | —  | 0.0372                              | 1.52                           |
|       | Stripping                        | —                                   | —  | —                                      | —  | 0.0372                              | 1.52                           |

<sup>a</sup> Diffusion parameters for polar route ( $D_p L_s^2$ ) of each drug were calculated by correcting the corresponding values of mannitol based on molecular weight. Partition Parameters for polar route ( $K_p V_p$ ) of each drug were considered to be the same as the corresponding values of mannitol. These values were used for estimation of parameters for the nonpolar route.

<sup>b</sup> Diffusion and partition parameters for the nonpolar route ( $D_{np} L_s^2$ ,  $K_{np} V_{np}$ ).

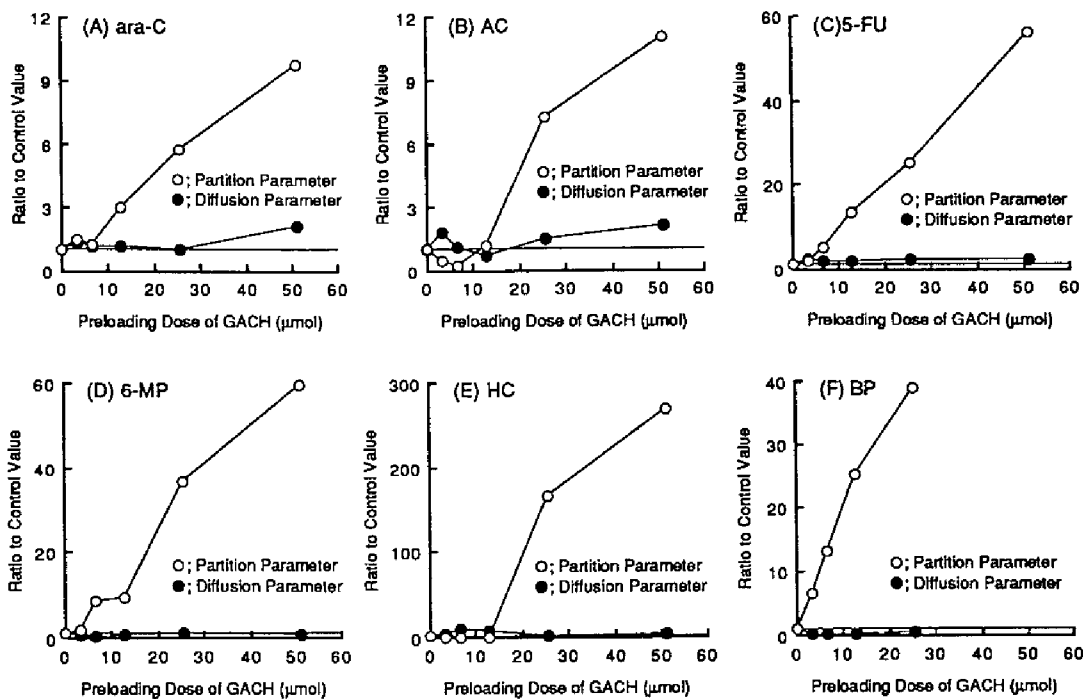
<sup>c</sup> Diffusion and partition parameters for viable tissues ( $D_d L_d^2$ ,  $K_d V_d$ ) were considered to be common to each drug with different GACH dose.

タを算出した。本モデルでは合計6つのパラメータを決定することが必要であるが、一本の透過曲線から得られる情報には限りがあるので、各層におけるパラメータの評価は以下に示した手順で行った。

- (1) 各薬物に対して、角質層除去皮膚における透過パターンを一枚膜モデルに基づいて解析し (Eq.(95))、角質層以下の層における拡散および分配パラメータ ( $D_d/L_d^2$ 、 $K_dV_d$ ) を算出した。GACHが角質層以下の層に対してほとんど作用しなかったことから、各薬物において角質層以下の層における透過パラメータは前処理条件によらず一定と仮定した。
- (2) 非常に親水性が高いため極性経路のみを透過すると考えられるMTの透過パターンを二枚膜モデルに基づいて解析し (Eq.(85))、角質層極性経路における拡散および分配パラメータ ( $D_p/L_s^2$ 、 $K_pV_p$ ) を算出した。各薬物の  $D_p/L_s^2$  は、分子量の立方根に反比例すると考え、MTのパラメータを用いて計算した。一方  $K_pV_p$  に関しては、極性経路が基剤の水と同じような性質をもつ経路であり、分配係数  $K_p$  が1と仮定できるので、薬物間で同じと仮定した。
- (3) 以上の4つのパラメータを用いて、各薬物の透過パターンを極性および非極性経路を考慮した二枚膜モデルに基づいて解析し (Eq.(78))、各薬物の非極性経路における拡散および分配パラメータ ( $D_{np}/L_s^2$ 、 $K_{np}V_{np}$ ) を算出した。

Table VII は、当てはめ計算によって得られた各層における透過パラメータをまとめたものである。極性経路での薬物拡散性に関しては、 $D_p/L_s^2$  が  $D_{np}/L_s^2$  に比べて非常に大きいことから、極性経路中の拡散は極めて速いことが示唆された。また  $K_pV_p$  に関しては、ara-C や AC のように非極性経路に対する分配が極めて低いと考えられる親水性薬物の場合でさえ  $K_{np}V_{np}$  よりも小さかった。分配パラメータは分配係数と有効拡散体積の積を表す複合パラメータであるが、極性経路に対する分配係数は基本的に1と考えられるため<sup>53,68)</sup>、この結果は角質層極性経路の有効表面積が極めて小さいことを示唆するものと考えられる。一方、GACHの極性経路に対する作用に関しては、 $D_p/L_s^2$  をほとんど変化させず  $K_pV_p$  を最大14.6倍増大させた。この結果から、GACHは角質層の水和を亢進させ、極性経路の有効表面積を増大させる作用を有することが示唆された。

非極性経路に対するGACHの作用に関しては、すべての薬物に対して  $D_{np}/L_s^2$  をほとんど変化させず、 $K_{np}V_{np}$  を適用量依存的に増大させることが明らかとなった (Fig.17)。この分配パラメータの変化は、極性経路に対するパラメータ変化に比べ非常に大きく、GACHの主たる作用部位は非極性経路であることが示唆された。また、分配パラメータは分配係数と拡散体積からなる複合パラメータであるが、拡散体積が100倍以上も変化するとは考え難いので、



**Fig. 17. Dose-dependent Effect of GACH on diffusion and partition parameters for the nonpolar route of MT (A), ara-C (B), AC (C), 5-FU (D), 6-MP (E), HC (F), and BP (G).**

この GACH の作用は主として分配係数の変化によるものと考えられる。

透過曲線の解析によって得られたパラメータを用いて、実験終了時における基剤中および皮膚中薬物量の理論値を計算し、実測値との相関を検討した結果、以下に示す式が得られた。

$$(\text{estimated amount in vehicle}) = 1.051 * (\text{observed one}) \quad (r^2 = 0.987, n = 48)$$

$$(\text{estimated amount in skin}) = 1.023 * (\text{observed one}) \quad (r^2 = 0.900, n = 48)$$

回帰直線の傾きがほぼ 1 を示すことから、本モデルに基づく解析法の妥当性が確認され、物性の異なる種々の薬物に対し、皮膚透過のみならず基剤中および皮膚中での薬物動態までを総合的に議論する上で、本モデルが非常に優れたモデルであることが示された。

### 1 - e 線形自由エネルギー相関に基づく GACH 促進機構の考察

以上のモデル解析の結果、GACH は薬物の非極性経路への分配を増大させることにより皮膚透過を促進することが明らかとなったが、こうした機構をより詳細に解明するために、線形自由エネルギー相関<sup>103,104</sup>に基づいた解析を行った。

Collander は、2 種類の異なった溶媒と水との間の分配係数( $k_1$ ,  $k_2$ )が以下のような関係式

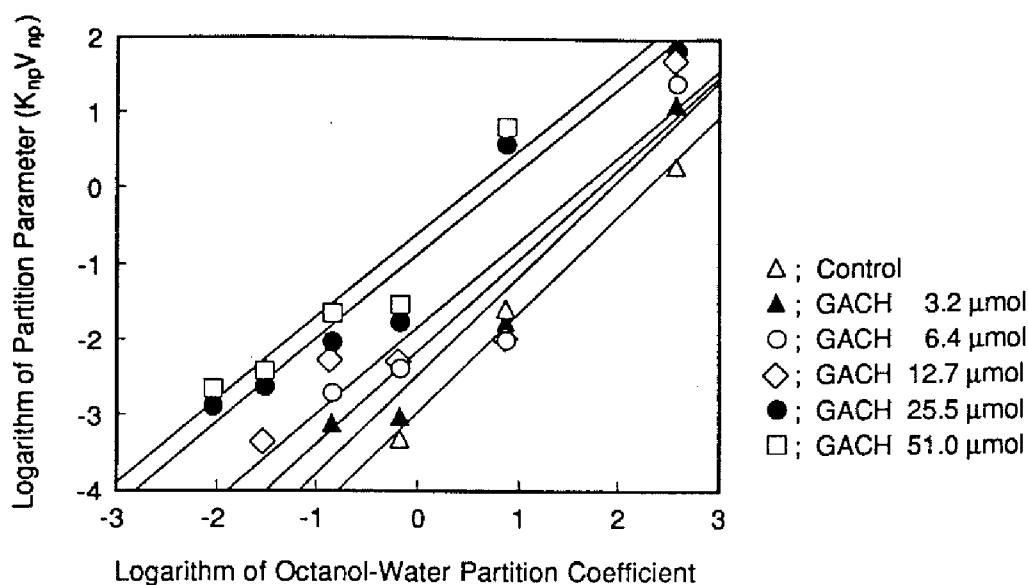


Fig. 18. Relationship between octanol/water partition coefficients of drugs and their partition parameters for the nonpolar route under the pretreatment with different doses of GACH. The regression lines are also shown in this figure.

で近似できることを報告している<sup>103)</sup>。

$$\log k_1 = \alpha * \log k_2 + \beta \quad (128)$$

この関係は経験的な式ではあるが、多くの溶媒において良好な相関関係が得られることが知られており<sup>104)</sup>、特に  $PC_{Oct/w}$  は薬物の親油性と生体膜への分配あるいは薬理活性との関係を議論する上でよく用いられてきた<sup>105)</sup>。こうしたアプローチを用いて、薬物の  $PC_{Oct/w}$  と各

Table VIII. Slopes and y-axis intercepts of correlations between octanol/water partition coefficient and partition parameter for the nonpolar route.

| GACH Dose ( $\mu\text{mol}$ ) | $\alpha$ | $\beta$ |
|-------------------------------|----------|---------|
| 0                             | 1.30     | -2.94   |
| 3.2                           | 1.30     | -2.47   |
| 6.4                           | 1.21     | -2.16   |
| 12.7                          | 1.13     | -1.87   |
| 25.5                          | 1.11     | -0.91   |
| 51.0                          | 1.14     | -0.64   |

<sup>a</sup>  $\alpha$  and  $\beta$  values mean slope and y-axis intercept of the following linear relationship:

$$\log K_p V_p = \alpha * \log PC_{Oct/w} + \beta$$

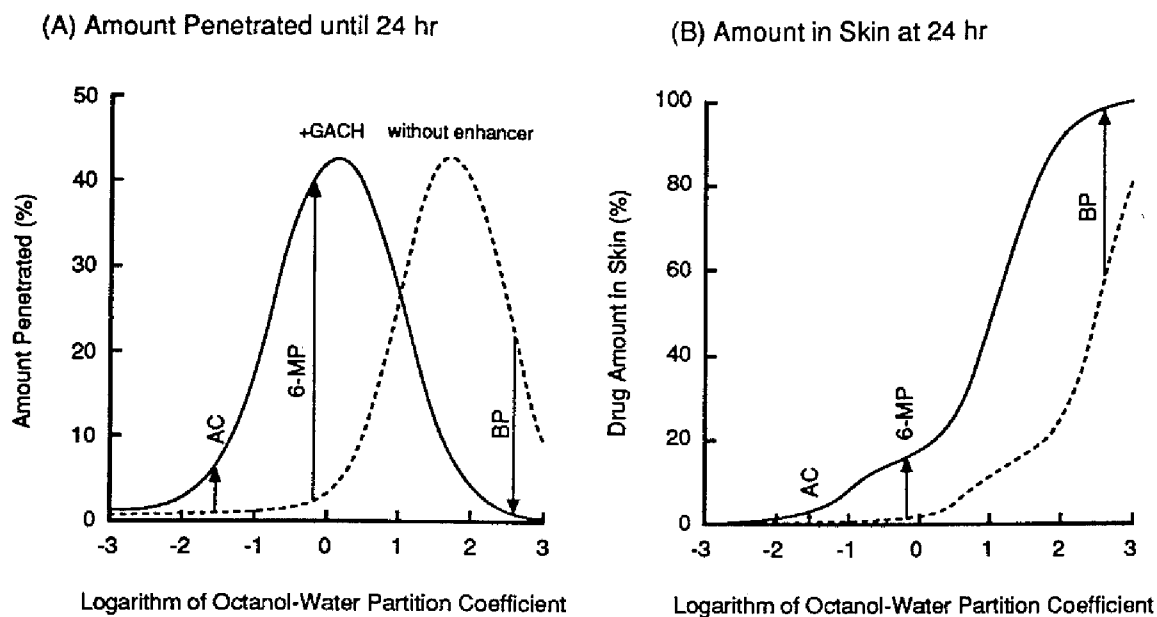
GACH 適用条件下における非極性経路への分配パラメータ  $K_{np}V_{np}$  との関連性について検討した。ただし、 $\log K_{np}V_{np}$  の値が非常に小さい場合 ( $< -3.5$ ) には、薬物透過における極性経路の寄与が非常に大きく、モデル解析で得られた非極性経路におけるパラメータの信頼性は低いと考えられることから、ここではこれらの値を除外して解析を行った。

各 GACH 前処理条件ごとに薬物の  $PC_{oct/w}$  と  $K_{np}V_{np}$  を直線回帰した結果、各直線は正の傾きを与え、親油性が高い薬物ほど非極性経路への分配が大きいことが示された (Fig.18)。Table VIII は各回帰直線の傾きおよび  $y$  切片の値をまとめたものであるが、GACH の適用量の増加に伴い直線の傾きが減少し、 $y$  切片は顕著に増大することが明らかとなった。直線の傾きに関しては、一般に傾きが小さいほど油層と水層の極性が近いと考えられており、一方  $y$  切片に関しては、油層の極性が高いほど大きく、油層に対する水の溶解度と良好な相関関係を示すことが知られている<sup>104)</sup>。これらの知見に基づいて、GACH 適用時の傾きおよび  $y$  切片の変化のパターンから、GACH が適用量依存的に非極性経路を親水的环境へ変化させることが明らかとなった。また、GACH と類似の構造を有する Azone<sup>®</sup> に関しては、脂質二重膜の水保持能を高める作用を有することも知られており<sup>106)</sup>、こうした脂質膜の環境変化により薬物の分配が増大するものと推測される。

#### 1-f 各種薬物に対する吸収促進効果のシミュレーション

薬物の物性を基本とした薬物皮膚透過および吸収促進効果の総合的な議論を目的として、先のモデル解析により得られた各パラメータを用いてシミュレーションを行った。Fig.19 は薬物の  $PC_{oct/w}$  に対して 24 hr 後の透過量および皮膚中薬物量をシミュレーションした結果であり、ここでは実験条件と対応した finite 系での皮膚透過を示している。促進剤無処理条件下では、薬物の親油性と透過との間にベル型の関係が成り立ち、 $\log PC_{oct/w}$  が 1.7 の薬物で最も透過しやすいことが示された。親油性が高い薬物に対しては、非極性経路への親和性が非常に高いために、finite 系では角質層以下の層への移行が制限され受動拡散の駆動力となる角質層以下の層での濃度勾配が小さくなるために、親油性の増大に伴う皮膚透過の減少がみられる。この皮膚透過の極大値は投与液量によって異なった値となるため、finite 系での薬物投与においてはこうした投与条件も含めた総合的な議論が必要である。

先のモデル解析では、GACH は主として非極性経路への薬物分配を増大させることが明らかとなったが、このタイプの促進剤は、基本的には薬物の親油性と皮膚透過の関係を左方向すなわち極性の高い方向へシフトさせることによって薬物の皮膚透過を促進する (Fig.19(A))。この場合、AC のような親水性の高い薬物では促進効果が小さく、6-MP のように中程度の親油性を有する薬物で最も大きな透過促進が認められるが、一方 BP のような親油性薬物で



**Fig. 19. Simulation of the amounts of drugs penetrated until 24 hr (A) and remaining in the skin at 24 hr (B) against their octanol/water partition coefficients.** The following constants were used in these simulations:  $D_p/L_s^2=40(\text{hr}^{-1})$ ,  $D_{np}/L_s^2=1.5(\text{hr}^{-1})$ ,  $D_d/L_d^2=0.06(\text{hr}^{-1})$ ,  $K_pV_p=1.5 \times 10^{-5}(\text{cm}^3)$ ,  $K_dV_d=0.7(\text{cm}^3)$ , and  $V_v=1(\text{ml})$ . The  $K_{np}V_{np}$  values were calculated from  $PC_{oct/w}$  values using the following equations:  
 $\log K_{np}V_{np}(\text{cm}^3) = 1.3 \times \log PC_{oct/w} - 3.0$  (for control)  
 $\log K_{np}V_{np}(\text{cm}^3) = 1.1 \times \log PC_{oct/w} - 0.9$  (for GACH treatment)

は薬物の非極性経路への分配が増大することにより皮膚透過が逆に減少することが示された。また、皮膚中薬物量に関しては、薬物の親油性が高いほど大きく、GACH適用により増大することが示され、Fig.16(B)とよく対応した結果が得られた。

以上、皮膚透過および皮膚中薬物量に関するシミュレーションは、実験結果ともよく一致し、本モデルに基づく解析が、薬物皮膚透過および吸収促進を統一的に議論し吸収動態を予測する上で、極めて有用なアプローチとなり得ることが明らかとなった。

## II-2 皮膚拡散モデルに基づく各種吸収促進剤の作用機構比較

吸収促進剤の作用がその化学構造あるいは物性によって大きく異なることはよく知られた事実であり、これまでに数多くの吸収促進剤に対して構造活性相関に関する研究が行われている<sup>92,95,107-111</sup>。また、幾つかの代表的な促進剤に対しては、FT-IR や DSC による解析を通じて角質層構成成分との相互作用が解明されている<sup>93,95</sup>。実際の製剤設計を行う上では、こうした吸収促進剤の作用の程度や機構に基づき、対象薬物に応じて適した促進剤を選択し処方することが必要と考えられる。本研究で構築した皮膚拡散モデルに基づく解析法は、各種

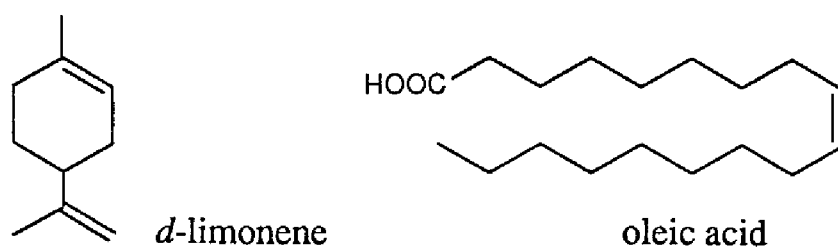


Fig. 20. Chemical structures of *d*-limonene and oleic acid

吸収促進剤の作用を定量的な観点から作用部位・作用様式の違いとして整理することができ、こうした合理的製剤設計を遂行する上で極めて有用なアプローチとなり得ると考えられる。

本節では、GACH と化学構造の異なる代表的な吸収促進剤として単環モノテルペンの *d*-limonene<sup>99,102,111-114</sup>) と不飽和脂肪酸の oleic acid<sup>96,115-118</sup>) を選び(Fig.20)、それらの作用機構をモデル解析することによって 1-alkenylazacycloalkanone 誘導体である GACH の作用機構と比較検討した<sup>41</sup>)。

## 2 - a *d*-limonene、oleic acid、GACH の吸収促進効果の比較

吸収促進剤の各薬物透過経路に対する作用を分離評価するためには、吸収動態の異なる薬物を選び、これらの皮膚透過を解析することが必要である。そこで、親油性の違いによって

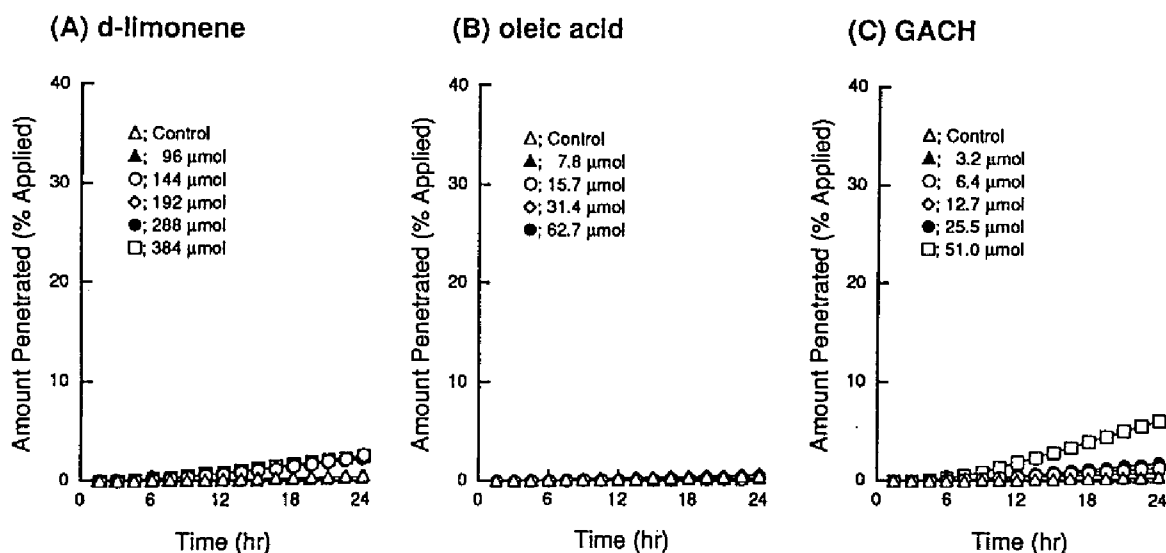


Fig. 21. In vitro permeation of MT through intact guinea pig skin pretreated with an ethanolic solution of different doses of *d*-limonene (A), oleic acid (B), or GACH (C). The drugs were applied in the form of aqueous solution. Each point represents the mean value of at least three experiments. The curves were simulated using parameters listed in Table X.



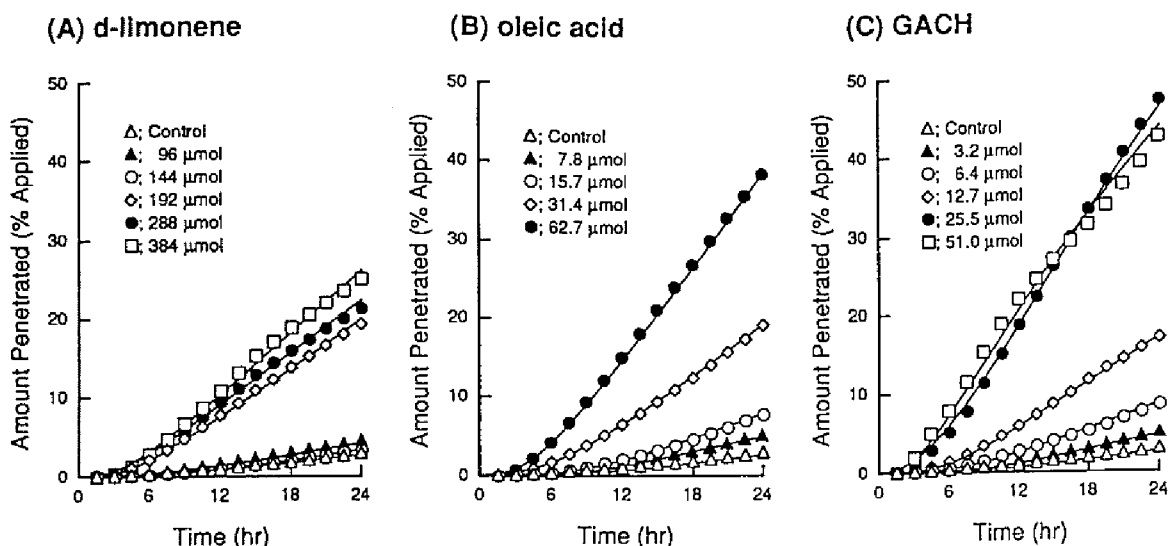


Fig. 22. In vitro permeation of 6-MP through intact guinea pig skin pretreated with an ethanolic solution of different doses of d-limonene (A), oleic acid (B), or GACH (C). The drugs were applied in the form of aqueous solution. Each point represents the mean value of at least three experiments. The curves were simulated using parameters listed in Table X.

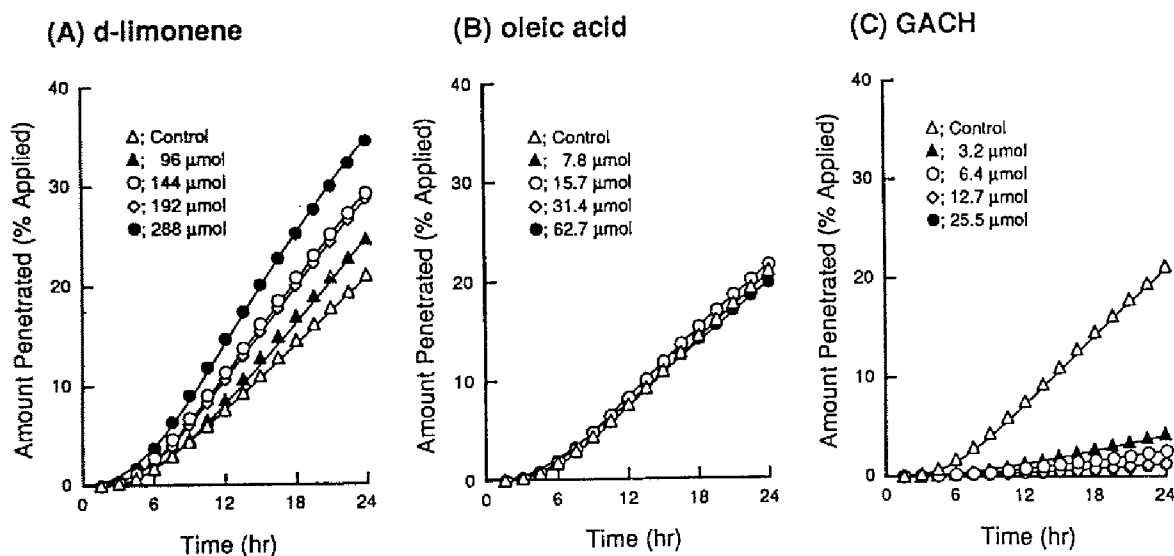


Fig. 23. In vitro permeation of BP through intact guinea pig skin pretreated with an ethanolic solution of different doses of d-limonene (A), oleic acid (B), or GACH (C). The drugs were applied in the form of aqueous solution. Each point represents the mean value of at least three experiments. The curves were simulated using parameters listed in Table X.

それぞれ吸収経路が異なる MT、6-MP、BP を用いて in vitro 皮膚透過実験を行った。Fig.21、22、23 は、各薬物に対して吸収促進剤 *d*-limonene、oleic acid、GACH で前処理した皮膚における in vitro 透過を測定した結果を示している。Table IX は、24 hr の透過実験終了時におけ

る回収量をまとめたものである。

親水性の非常に高い薬物である MT に対しては、各吸収促進剤ともそれほど大きな促進効果を示さなかった(Fig.21)。これに対し、中程度の親油性を有する 6-MP の場合には顕著な促進効果が認められたが、促進剤間で促進効果の程度および発現様式に差がみられた(Fig.22)。*d*-limonene では高投与量域でのみ 6-8 倍の促進効果を示し、効果発現には閾値が認められたのに対し、oleic acid および GACH の場合には適用量依存的な促進効果が認められ、それぞれ最大 13 倍、16 倍の透過促進効果を示した。一方、親油性の非常に高い BP の透過に対す

**Table IX. Amounts of drugs recovered at the end of 24-hr diffusion experiment in guinea pigs.**

| Drug | Enhancer<br>( $\mu\text{mol}$ ) | Recovery <sup>a</sup> (%) |                  |                   |                   |
|------|---------------------------------|---------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
|      |                                 | Donor                     | Skin             | Receptor          | Total             |
| MT   | None(control)                   | 95.72 $\pm$ 0.25          | 1.05 $\pm$ 0.16  | 0.53 $\pm$ 0.04   | 97.30 $\pm$ 0.13  |
|      | Stripping                       | 27.62 $\pm$ 13.86         | 4.50 $\pm$ 2.46  | 52.35 $\pm$ 10.44 | 84.47 $\pm$ 8.70  |
|      | <i>d</i> -limonene              |                           |                  |                   |                   |
|      | 96                              | 95.87 $\pm$ 0.78          | 2.23 $\pm$ 0.31  | 0.27 $\pm$ 0.14   | 98.37 $\pm$ 0.56  |
|      | 144                             | 87.10 $\pm$ 3.89          | 3.87 $\pm$ 1.26  | 2.56 $\pm$ 0.75   | 93.54 $\pm$ 3.9   |
|      | 192                             | 85.86 $\pm$ 4.56          | 3.15 $\pm$ 0.94  | 2.42 $\pm$ 1.41   | 91.43 $\pm$ 3.34  |
|      | 288                             | 86.22 $\pm$ 5.32          | 5.02 $\pm$ 0.44  | 2.24 $\pm$ 0.88   | 93.48 $\pm$ 4.32  |
|      | 384                             | 76.62 $\pm$ 7.95          | 3.65 $\pm$ 1.91  | 2.49 $\pm$ 0.26   | 82.77 $\pm$ 6.38  |
|      | oleic acid                      |                           |                  |                   |                   |
|      | 7.8                             | 92.00 $\pm$ 5.32          | 2.29 $\pm$ 0.63  | 0.25 $\pm$ 0.12   | 94.54 $\pm$ 5.95  |
|      | 15.7                            | 94.52 $\pm$ 2.44          | 2.84 $\pm$ 0.25  | 0.25 $\pm$ 0.04   | 97.60 $\pm$ 2.20  |
|      | 31.4                            | 93.50 $\pm$ 1.85          | 3.82 $\pm$ 1.08  | 0.68 $\pm$ 0.41   | 98.01 $\pm$ 2.60  |
|      | 62.7                            | 88.64 $\pm$ 7.39          | 3.12 $\pm$ 0.87  | 0.32 $\pm$ 0.15   | 92.08 $\pm$ 6.95  |
| 6-MP | None(control)                   | 91.24 $\pm$ 3.86          | 6.69 $\pm$ 2.07  | 2.96 $\pm$ 1.63   | 100.89 $\pm$ 3.56 |
|      | Stripping                       | 23.88 $\pm$ 6.25          | 8.27 $\pm$ 2.33  | 56.56 $\pm$ 7.95  | 88.71 $\pm$ 3.27  |
|      | <i>d</i> -limonene              |                           |                  |                   |                   |
|      | 48                              | 85.37 $\pm$ 2.69          | 5.34 $\pm$ 2.01  | 2.76 $\pm$ 0.33   | 93.47 $\pm$ 2.72  |
|      | 96                              | 83.62 $\pm$ 3.37          | 8.47 $\pm$ 1.50  | 4.50 $\pm$ 0.21   | 96.59 $\pm$ 4.04  |
|      | 144                             | 78.67 $\pm$ 8.79          | 6.58 $\pm$ 0.99  | 3.28 $\pm$ 0.84   | 88.53 $\pm$ 7.63  |
|      | 192                             | 64.49 $\pm$ 10.76         | 6.99 $\pm$ 1.95  | 19.26 $\pm$ 7.72  | 90.73 $\pm$ 5.43  |
|      | 288                             | 64.88 $\pm$ 4.61          | 7.01 $\pm$ 1.04  | 21.29 $\pm$ 1.90  | 93.18 $\pm$ 5.09  |
|      | 384                             | 58.10 $\pm$ 4.34          | 7.32 $\pm$ 1.15  | 25.00 $\pm$ 1.73  | 90.42 $\pm$ 6.60  |
|      | oleic acid                      |                           |                  |                   |                   |
|      | 7.8                             | 80.43 $\pm$ 2.22          | 6.31 $\pm$ 1.01  | 5.17 $\pm$ 1.91   | 91.91 $\pm$ 2.14  |
|      | 15.7                            | 75.63 $\pm$ 4.70          | 8.24 $\pm$ 1.49  | 7.80 $\pm$ 2.33   | 91.67 $\pm$ 3.62  |
|      | 31.4                            | 65.62 $\pm$ 5.27          | 6.72 $\pm$ 3.52  | 19.13 $\pm$ 4.74  | 91.46 $\pm$ 4.75  |
| 62.7 | 41.56 $\pm$ 7.98                | 7.06 $\pm$ 1.49           | 38.45 $\pm$ 4.94 | 87.06 $\pm$ 2.01  |                   |
| BP   | None(control)                   | 18.00 $\pm$ 4.94          | 49.06 $\pm$ 3.05 | 21.03 $\pm$ 3.26  | 88.09 $\pm$ 5.19  |
|      | Stripping                       | 9.18 $\pm$ 1.56           | 26.32 $\pm$ 6.05 | 38.04 $\pm$ 3.44  | 73.55 $\pm$ 2.65  |
|      | <i>d</i> -limonene              |                           |                  |                   |                   |
|      | 96                              | 12.26 $\pm$ 2.31          | 57.57 $\pm$ 4.73 | 24.70 $\pm$ 2.88  | 94.53 $\pm$ 3.31  |
|      | 144                             | 8.77 $\pm$ 0.73           | 52.91 $\pm$ 5.97 | 26.66 $\pm$ 5.87  | 88.34 $\pm$ 3.42  |
|      | 192                             | 10.09 $\pm$ 1.04          | 52.24 $\pm$ 4.25 | 28.72 $\pm$ 2.52  | 91.06 $\pm$ 5.33  |
|      | 288                             | 10.39 $\pm$ 3.87          | 45.51 $\pm$ 4.46 | 34.33 $\pm$ 3.41  | 90.23 $\pm$ 3.97  |
|      | oleic acid                      |                           |                  |                   |                   |
|      | 7.8                             | 13.68 $\pm$ 2.03          | 56.50 $\pm$ 6.90 | 20.93 $\pm$ 4.45  | 91.10 $\pm$ 7.76  |
|      | 15.7                            | 13.86 $\pm$ 1.76          | 58.20 $\pm$ 6.90 | 21.66 $\pm$ 1.44  | 93.73 $\pm$ 5.61  |
|      | 31.4                            | 13.62 $\pm$ 0.65          | 52.44 $\pm$ 3.53 | 21.70 $\pm$ 1.62  | 87.75 $\pm$ 4.34  |
|      | 62.7                            | 13.98 $\pm$ 1.69          | 51.68 $\pm$ 8.90 | 19.88 $\pm$ 4.24  | 85.54 $\pm$ 6.31  |

<sup>a</sup>The data represent means  $\pm$  S.D. of at least three experiments.

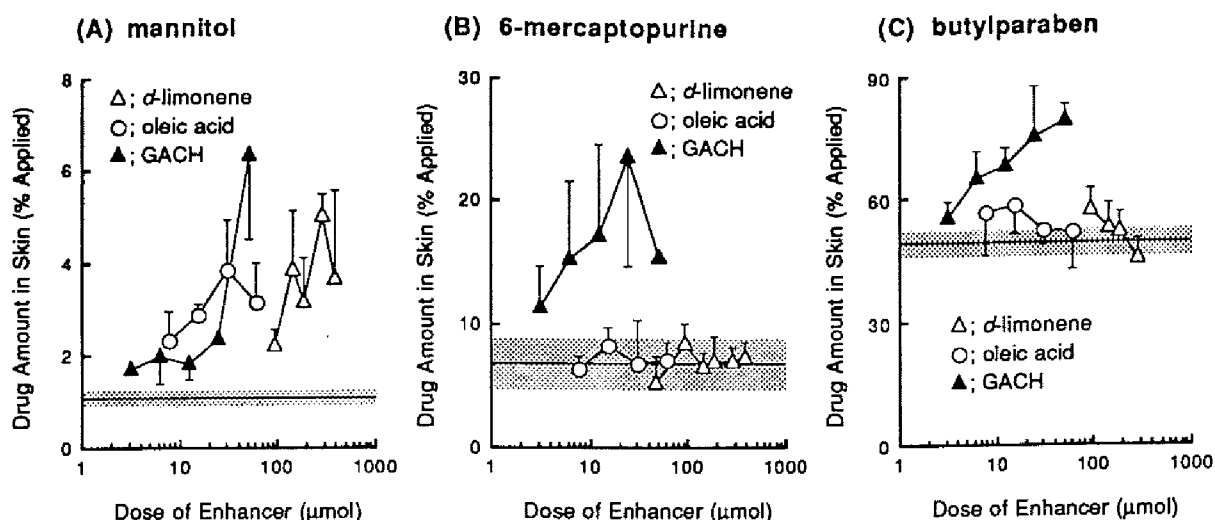


Fig. 24. Effect of preloading dose of enhancers on the amount of MT (A), 6-MP (B), and BP (C) in the skin at the end of 24-hr diffusion experiment. The horizontal line and shadow area in each figure represent the mean value and range of standard deviation of drug amount in the skin without enhancer, respectively.

る促進効果は促進剤間でそれぞれ特徴的な効果が認められ(Fig.23)、*d*-limonene は用量依存的な吸収促進効果を示し、最も高い投与量ではほぼ角質層除去皮膚における透過近くまで促進したのに対し、oleic acid ではほとんど効果がみられず、GACH の場合には逆に適用量依存的に透過が減少する傾向が認められた。

Fig.24 は、実験終了時における皮膚中薬物量を各吸収促進剤の適用量に対してプロットしたものである。MT に関しては吸収促進剤の適用量の増大に伴い皮膚中薬物量が増加する傾向がみられたが、その薬物量は絶対的に非常に小さいものであった(Fig.24(A))。6-MP および BP に関しては GACH では適用量の増大に伴い皮膚中薬物量の増加がみられたのに対し、*d*-limonene および oleic acid を適用した場合には、促進剤無添加の場合に比べ皮膚中薬物量の有意な変化は認められなかった(Fig.24(B),(C))。

## 2 - b 各種吸収促進剤の作用機構比較

以上透過実験のレベルから、本研究で用いた各吸収促進剤の間で、薬物の皮膚透過および皮膚中量に及ぼす影響が異なることが明らかとなったが、これら促進剤間の違いを作用機構の面から捉えるために皮膚拡散モデルに基づいた解析を行った。

Table X には、前節で示した手順に従い各経路における分配および拡散パラメータを算出した結果をまとめた。MT の皮膚透過から評価した角質層極性経路における各パラメータに関しては、各吸収促進剤とも拡散パラメータをほとんど変化させなかったが、分配パラメー

**Table X. Parameters for in vivo skin permeation of drugs with enhancers based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum.**

| Enhancer<br>( $\mu\text{mol}$ ) | MT <sup>a,b</sup>                   |  | 6-MP <sup>a,c</sup>                    |  | BP <sup>a,c</sup>                      |                                      |
|---------------------------------|-------------------------------------|--|--|--|--|--------------------------------------|
|                                 | $D_p/L_s^2$<br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_p V_p \times 10^6$<br>( $\text{cm}^3$ ) | $D_{np}/L_s^2$<br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_{np} V_{np} \times 10^4$<br>( $\text{cm}^3$ ) | $D_{np}/L_s^2$<br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_{np} V_{np}$<br>( $\text{cm}^3$ ) |
| None (control)                  | 39.9                                | 7.27                                       | 3.46                                   | 4.79   | 0.194                                  | 2.02                                 |
| <i>d</i> -limonene              |                                     |  |  |  |  |                                      |
| 96                              | 39.0                                | 3.65                                       | 6.41                                   | 4.79   | 0.169                                  | 1.44                                 |
| 144                             | 42.0                                | 33.3                                       | 3.59                                   | 2.76   | 0.256                                  | 1.09                                 |
| 192                             | 40.4                                | 25.0                                       | 41.0                                   | 4.46   | 0.257                                  | 0.859                                |
| 288                             | 41.7                                | 31.5                                       | 45.9                                   | 4.74   | 0.806                                  | 0.587                                |
| 384                             | 46.6                                | 37.6                                       | 53.6                                   | 5.45   | —                                      | —                                    |
| oleic acid                      |                                     |  |  |  |  |                                      |
| 7.8                             | 35.8                                | 3.86                                       | 3.50                                   | 9.99   | 0.179                                  | 2.17                                 |
| 15.7                            | 37.9                                | 3.50                                       | 4.13                                   | 13.2   | 0.243                                  | 2.25                                 |
| 31.4                            | 42.5                                | 8.41                                       | 10.9                                   | 15.9   | 0.245                                  | 1.96                                 |
| 62.7                            | 46.0                                | 3.78                                       | 25.1                                   | 27.2   | 1.47                                   | 2.29                                 |
| GACH                            |                                     |  |  |  |  |                                      |
| 3.2                             | 49.5                                | 6.99                                       | 3.46                                   | 7.59   | 0.0682                                 | 13.3                                 |
| 6.4                             | 42.1                                | 19.6                                       | 3.42                                   | 13.9   | 0.0658                                 | 26.7                                 |
| 12.7                            | 41.1                                | 13.0                                       | 2.85                                   | 42.0   | 0.0335                                 | 50.8                                 |
| 25.5                            | 49.6                                | 22.3                                       | 3.53                                   | 366  | 0.0942                                 | 78.5                                 |
| 51.0                            | 48.5                                | 90.4                                       | 4.19                                   | 431  | —                                      | —                                    |

<sup>a</sup> Parameters for penetration through viable tissues were  $D_d/L_d^2 = 0.0812$  ( $\text{hr}^{-1}$ ) and  $K_d V_d = 0.693$  ( $\text{cm}^3$ ) for MT, and  $D_d/L_d^2 = 0.0595$  ( $\text{hr}^{-1}$ ) and  $K_d V_d = 1.04$  ( $\text{cm}^3$ ) for 6-MP, and  $D_d/L_d^2 = 0.0372$  ( $\text{hr}^{-1}$ ) and  $K_d V_d = 0.693$  ( $\text{cm}^3$ ) for BP, respectively.

<sup>b</sup> The values are diffusion and partition parameters for the polar route of MT. For 6-MP and BP, diffusion parameters for the polar route were calculated by correcting the corresponding values of MT based on molecular weight, while partition parameters for the polar route were considered to be the same as the corresponding values. These parameters of 6-MP and BP are not shown in this table.

<sup>c</sup> The values are diffusion and partition parameters for the nonpolar route.

タでは、oleic acid を除く *d*-limonene、GACH の場合に適用量依存的な増大が認められ、それぞれ最大 5.2 倍、12.4 倍の増大がみられた。しかしながら、このパラメータの値は促進剤適用時においても依然として小さく、より高い親油性を有する多くの薬物の皮膚透過においては本効果はそれほど大きな影響を与えないことが示唆された。

一方、6-MP および BP の皮膚透過の解析によって得られた角質層非極性経路における各パラメータに関しては、吸収促進剤による適用量依存的な変化が認められた (Table X, Fig. 25)。*d*-limonene は高投与量域において主として薬物の拡散パラメータを増大させるのに対し、GACH は主として分配パラメータを増大させることが示された。また、oleic acid は他の吸収促進剤に比べ効果が小さいながらも拡散および分配の両パラメータを適用量依存的に増大させることが明らかとなった。

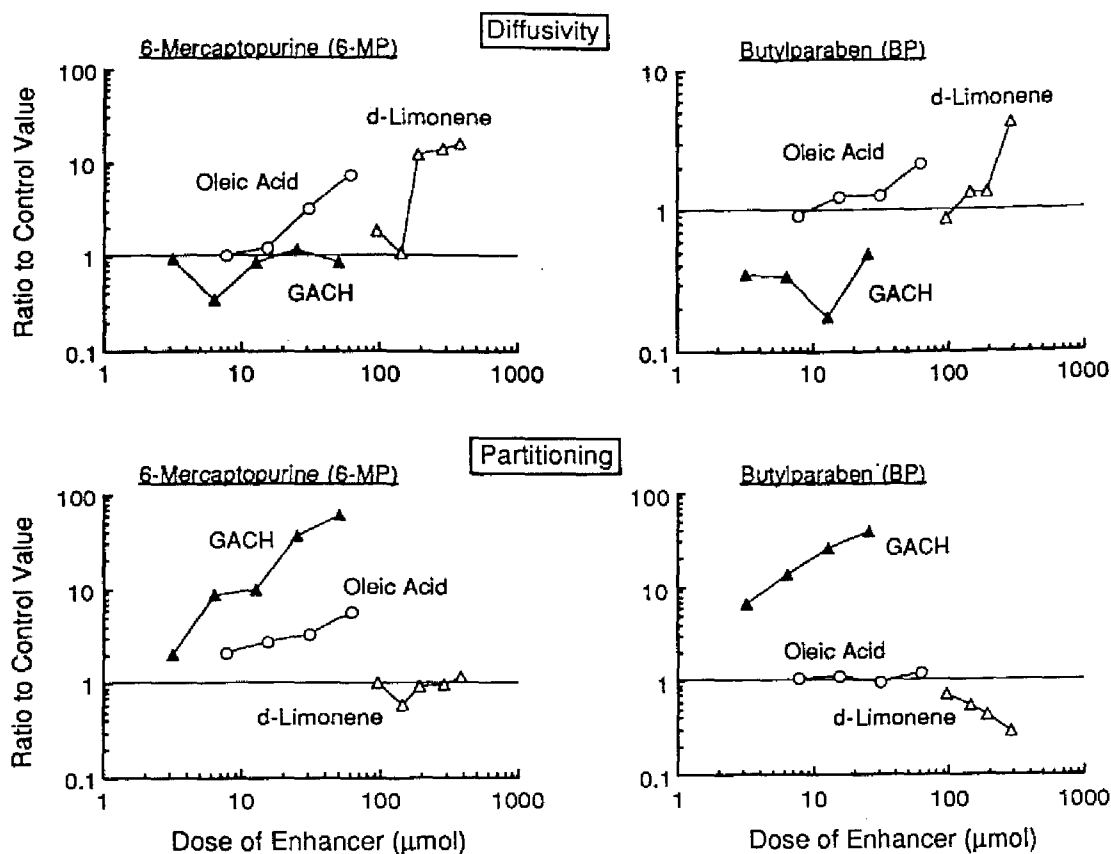


Fig. 25. Effect of preloading dose of enhancers on diffusion and partition parameters for the nonpolar route of 6-MP and BP.

GACHのように薬物の分配を増大させる吸収促進剤は、皮膚内の濃度勾配を増大させることにより皮膚透過を促進するため、皮膚中における薬物量の顕著な増大が認められるが、*d*-limoneneのように薬物拡散を主として増大させる促進剤は、薬物の拡散速度に大きく影響するため皮膚中薬物量に対してそれほど顕著な影響を示さないと考えられ、このことは実験結果ともよく対応している(Fig.24)。

以上のように、吸収促進剤の作用機構の違いによって、各種物性の異なる薬物に対する促進効果が大きく異なり、さらに同程度の皮膚透過を示す場合でも皮膚中での薬物濃度が異なる。したがって、単に薬物吸収改善のみならず局所での治療効果あるいは副作用の問題を含めた製剤処方最適化を図るためには、各種吸収促進剤の作用点および作用様式を整理することは重要な課題であり、本モデル解析法はこうした議論を行う上で極めて有用な知見を提供できるものと考えられる。

### II-3 考察

吸収促進剤は、皮膚に対して作用しその物理化学的性質を変化させることによって薬物透

過を促進するが、薬物が物性に依じて適した経路を透過するのと同様に、吸収促進剤もまたそれ自身が有する物性に依じて各薬物透過経路に対して移行すると考えられる。したがって、吸収促進剤の効果はみかけ上薬物の皮膚透過経路と吸収促進剤の作用部位および作用機作との関連によって決定される。本研究で構築した皮膚拡散モデルでは、こうした点を踏まえ、吸収促進剤の作用を薬物吸収の素過程のレベルで議論することが可能であり、吸収促進機構の解析において極めて有用なアプローチと考えられる。

前章で述べたように、本皮膚拡散モデルは皮膚の解剖学特性とこれまでの薬物経皮吸収に関する知見を基に構築したが、近年 Potts と Guy によって角質層極性経路の存在を否定する研究が報告され<sup>119)</sup>、現在、極性経路の存在の有無が経皮吸収の分野において議論の対象となっている。彼らの議論は、薬物の皮膚内拡散が自由容積理論に従うならば単純な一枚膜モデルでも数多くの薬物の皮膚透過が合理的に説明できるというものであるが、こうした理論が本研究で得られた吸収促進の結果に対しても適用できるかについて検討した。

自由容積理論を用いた場合には、薬物の皮膚内拡散係数  $D$  は、

$$D = D^{MV=0} \exp(-MV / V_f) \quad (129)$$

として定義され、ここで、 $MV$ 、 $V_f$ 、 $D^{MV=0}$  は、薬物のモル容積、膜中の平均自由容積、およびモル体積が 0 である場合の仮想的な拡散係数を表す<sup>120-122)</sup>。吸収促進剤が皮膚に対して作用し薬物の拡散係数を増大させると仮定すると、その場合の吸収促進効果  $E^D$  は、

$$E^D = \frac{D + \Delta D}{D} = 1 + \frac{MV}{V_f^2} \Delta V_f + \frac{1}{D^{MV=0}} \Delta D^{MV=0} \quad (130)$$

と表されるため、薬物間での吸収促進効果を比較した場合には、より大きな分子サイズを有する薬物のほうが少なくとも同等以上の促進効果を受けると考えられる。一方、吸収促進剤が皮膚の極性を増大させることによって薬物の分配係数を増大させる場合には、線形自由エネルギー相関の考えに基づき<sup>103,104)</sup>、吸収促進効果  $E^K$  は、

$$E^K = \frac{K + \Delta K}{K} = 1 + \ln PC_{oct/w} \times \Delta \alpha + 2.303 \times \Delta \beta \quad (131)$$

と表される。皮膚の極性が増大した場合には、 $\alpha$  が減少し  $\beta$  は増大するので、親水性薬物ほど皮膚への分配が増大すると考えられる。しかしながら、GACH の吸収促進効果は、MT、ara-C、AC に比べ、若干小さな分子量を有しかつ親油性の高い 5-FU や 6-MP に対して顕著

に大きかったことから、自由容積理論に基づく単純モデルでは本研究結果を説明できないことが明らかとなった。Fig.19 に示されるように、極性経路を考慮した本拡散モデルでは GACH の吸収促進効果に関する合理的な説明が可能となり、本研究結果は、これまでの議論とは異なった吸収促進効果の立場から、角質層極性経路の存在を示唆するものである。

本モデル解析法では吸収促進剤の作用機構を薬物の分配あるいは拡散の増大として捉えることができるが、こうした作用機構の違いは吸収促進剤と角質層構成成分との相互作用の違いによって生じると考えられる。一般的には DSC や FT-IR 法のような分子論的アプローチを用いて吸収促進剤と角質層の相互作用が評価されることが多く<sup>93-96</sup>、*d*-limonene、oleic acid、および GACH と類似の構造を有する Azone<sup>®</sup> に関しては、DSC により角質層脂質とのみ相互作用することが報告されている<sup>93,123,124</sup>。これは、これらの吸収促進剤の親油性が極めて高く、脂質層に対して高い親和性を有するためと考えられるが、主たる作用部位が非極性経路であるという本モデル解析結果ともよく対応している。さらに、これら促進剤の DSC の結果では、*d*-limonene および oleic acid が角質層脂質の相転移に関するピークを低温側にシフトさせるのに対し、Azone<sup>®</sup> はそのピークを消失させることが明らかにされており、促進剤間で角質層脂質に対する作用の仕方に違いがみられる点が指摘されている<sup>93,123,124</sup>。

これらの分子論的解析結果と吸収促進効果との関係についても数多くの検討がなされている<sup>95,96,123-125</sup>。これらの研究の多くでは、吸収促進剤添加による角質層脂質の相転移温度の減少と吸収促進効果との間に良好な相関関係がみられることが報告されており、吸収促進剤は脂質層の流動性を増大させることによって薬物の拡散を増大させると解釈されている。しかしながら、リポソーム膜を用いた研究では流動性の増大によって薬物の分配も増大することもまた知られている<sup>126</sup>。この現象は、脂質膜が液晶状態にある場合、薬物分配に必要な脂肪鎖間の疎水結合を切るためのエネルギーを必要としないためと考えられているが、脂質膜がこのような状態にある場合には、薬物分配によるエントロピーの増大が小さいため、薬物分配を低下させる方向へ作用する点も指摘されており、結果として流動性増大による分配係数の変化は両者の効果のバランスによると考えられている<sup>126</sup>。本研究で用いた 3 種の促進剤間ではそれぞれ異なった機構により吸収促進効果を示したが、これは各吸収促進剤の角質層脂質膜中での存在状態が異なるために生じたものと思われる。

また、最近の FT-IR による oleic acid の作用機構解析に関する研究では、oleic acid は通常の皮膚温度付近では角質層脂質全体の流動性増大を引き起こさないが、それ自身は流動性の高い状態で存在することが報告されており、角質層脂質中で oleic acid が相分離した状態で存在し、この界面に水が侵入することによって薬物の透過が促進されるという仮説が立てられている<sup>118</sup>。また、Azone<sup>®</sup> に関しても脂質膜の水保持能を増加させるという報告もあり<sup>106</sup>、こうした吸収促進剤の作用によって脂質膜内の疎水的環境が変化し、薬物の分配性が増大す

ることは十分に考えられる。

しかしながら、吸収促進剤によってはDSCを用いた解析結果と吸収促進効果との間に相関性がないという報告もあり<sup>124)</sup>、こうした分子論的解析の結果と吸収促進剤による薬物の分配や拡散過程の変化との関係については十分な理解が得られていないのが現状である。したがって、吸収促進剤の構造活性相関に関しても、現在のところ現象論的な理解の範囲に留まっており<sup>92,95,107-111)</sup>、両者の関係については今後整理されるべき問題点と考えられる。

本研究では、既に確立されている吸収促進剤に対してその作用機構を皮膚透過の物理化学的な側面から解析することによって、対象となる各種薬物の物性を基本とした吸収促進剤の効果の予測理論の確立を試み、その一端を明らかにした。本研究成果は、吸収促進法を合理的に設計し経皮吸収製剤の最適化を行う上で極めて有用な情報を提供するものであり、今後製剤設計の基本指針として応用されることによって、吸収促進剤を利用した経皮吸収製剤の開発に対し大きく貢献するものと思われる。



## 第Ⅲ章 薬物経皮吸収における動物種差および in vitro/in vivo 間の差の解析

医薬品の開発においては、実際の患者に対して医薬品の有効性および安全性を保証することが最も重要なポイントであるが、新規薬物の患者あるいは健常人への投与は常に危険を伴うため、前臨床段階すなわち動物実験のレベルにおいて薬理効果や体内動態を評価し、ヒトでの予測を行うことが必要となる。薬物の体内動態に関しては、生理学、生化学的パラメータを用いて実体に即した解析を試みる生理学的ファーマコキネティクスの考え方が導入されて以来<sup>127)</sup>、これまで困難にされていた in vitro から in vivo、動物からヒト、さらには正常時から病態時へのスケールアップに関する研究が活発に進められている<sup>128,129)</sup>。

薬物の経皮吸収に関する研究では、特に摘出皮膚を用いた in vitro 吸収実験法が薬物の吸収性評価や吸収促進剤のスクリーニングなど基礎研究に幅広く応用されている。in vitro 実験では、死体や手術後に得られるヒト皮膚が最も良いモデル皮膚であると考えられているが、その入手が困難であるため、こうした基礎実験の段階では基本的に動物実験に頼らざるを得ない。したがって、動物実験で得られた結果がヒトでの吸収に如何に反映するかを整理することは重要な課題であり、これまでに薬物経皮吸収に関する種差<sup>75,130-134)</sup>や in vitro/in vivo 差<sup>135-138)</sup>に関する研究が数多く行われてきた。しかしながら、薬物皮膚透過が幾つかの吸収素過程からなるにもかかわらず、これらの研究では皮膚全体としての透過性でしか両者の比較が行われていないために、これらの皮膚透過の違いが十分に整理されていないのが現状である。

基本的な皮膚の構造は動物間あるいは in vitro/in vivo 間で同じであるため、薬物の皮膚透過過程は基本的に同じであり、こうした薬物吸収における種差や in vitro/in vivo 差は、各吸収過程のバリアー能の違いによって生じると考えられる。本研究で提唱した、皮膚の解剖学的特性を考慮した拡散モデルに基づく解析法では、経皮吸収を吸収素過程に分離して議論できるので、薬物経皮吸収および吸収促進における種差や in vitro/in vivo 差の問題を解明する上でも極めて有用なアプローチと考えられる。そこで本章では、本モデル解析法を用いて各吸収過程における皮膚透過パラメータを抽出することによって、個々の吸収素過程のレベルで種差および in vitro/in vivo 差の問題を議論し、これらの違いが薬物吸収および吸収促進効果に対して及ぼす影響について整理を行った<sup>41,139)</sup>。

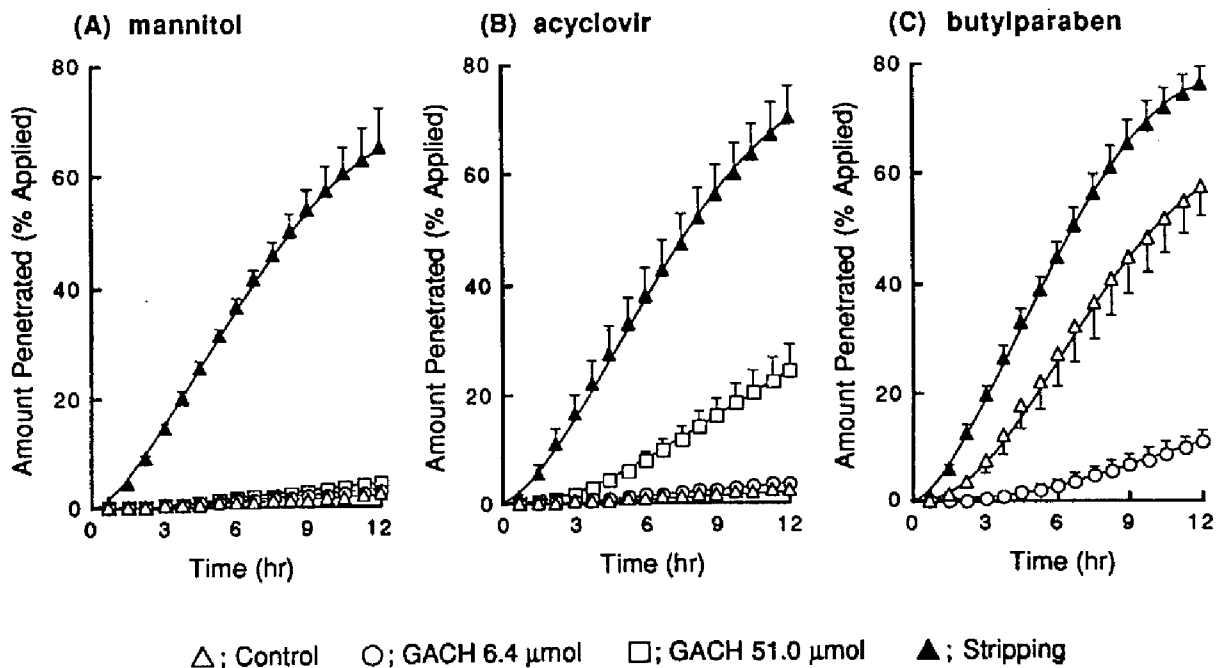
### Ⅲ-1 経皮吸収および吸収促進効果における種差の解析

これまで経皮吸収に関する種差の問題に関しては、ヒトに代わる動物モデルの開発という

観点から主として検討がなされてきた。ブタ皮膚が解剖学的な構造も含めてヒト皮膚に近いことが報告されているが<sup>75,140</sup>、実験動物としては、取り扱いの容易なゲッ歯類の小動物が注目され、ヘアレスマウスがヒトのモデルとして適当であるということが報告されている<sup>130,141</sup>。しかしながら、いずれの動物がヒトのモデルとして適当であるかは、対象とする薬物によっても異なる事実もまた指摘されている<sup>75,131</sup>。これらの種差は、各動物間での皮膚の形態学的な構造や皮膚構成成分の違いによって、各薬物吸収過程のバリアー能が異なるために生じると考えられる。したがって、こうした点を総合的に議論するためには、薬物吸収過程を素過程に分離した上で各種動物間での皮膚透過性の比較を行い、解剖学的あるいは生化学的な情報との対応関係を整理することが必要と考えられる。

そこで、薬物経皮吸収における種差解析への本モデル解析法の応用性について検討を行う目的で、ラット皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過実験を行った結果をモデル解析することによって、前章で得られたモルモット皮膚での結果と比較し、個々の吸収素過程のレベルでの違いが薬物吸収および吸収促進効果の種差に及ぼす影響を整理した。

### 1-a モルモットおよびラット皮膚における GACH の吸収促進効果



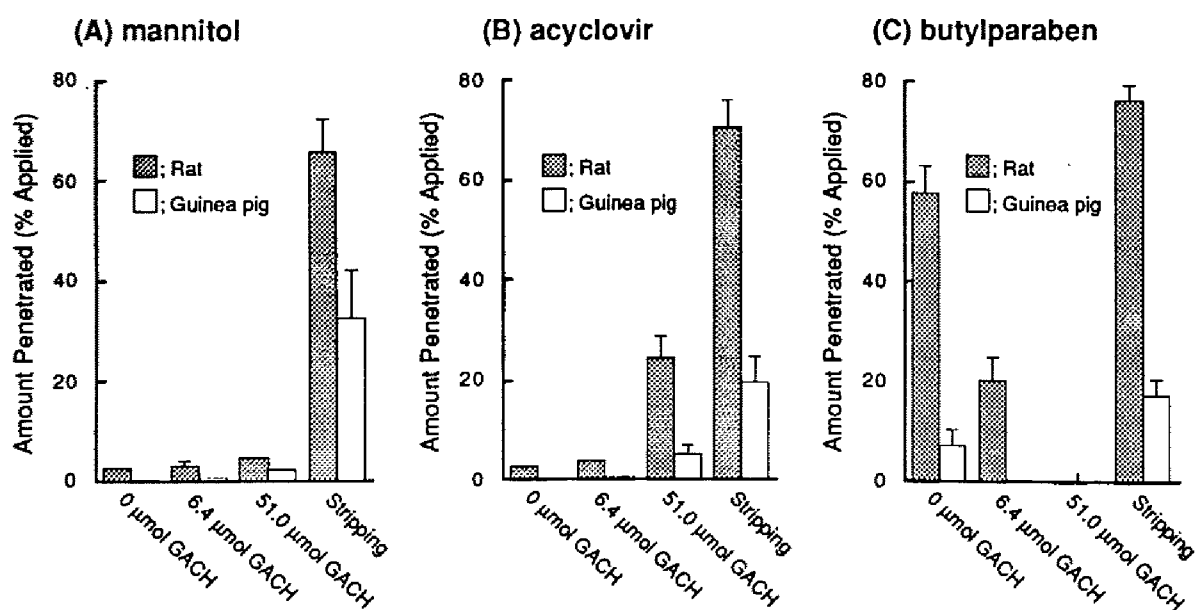
**Fig. 26.** *In vitro* permeation of MT (A), AC (B), and BP (C) through intact rat skin pretreated with an ethanolic solution of different doses of GACH or through tape-stripped skin. The drugs were applied in the form of aqueous solution. Each point represents the mean value of at least three experiments. The curves were simulated using parameters listed in Table XII.

**Table XI. Amounts of drugs recovered at the end of 12-hr diffusion experiment in rats.**

| Drug | GACH dose ( $\mu\text{mol}$ ) | Recovery <sup>a</sup> (%) |                   |                  |                   |
|------|-------------------------------|---------------------------|-------------------|------------------|-------------------|
|      |                               | Donor                     | Skin              | Receptor         | Total             |
| MT   | 0                             | 92.42 $\pm$ 1.35          | 0.46 $\pm$ 0.01   | 2.26 $\pm$ 1.12  | 95.13 $\pm$ 0.24  |
|      | 6.4                           | 92.33 $\pm$ 2.51          | 2.02 $\pm$ 0.97   | 2.60 $\pm$ 1.26  | 96.95 $\pm$ 2.63  |
|      | 51.0                          | 77.55 $\pm$ 4.28          | 10.67 $\pm$ 1.26  | 4.28 $\pm$ 0.33  | 92.50 $\pm$ 2.69  |
|      | Stripping                     | 21.50 $\pm$ 3.18          | 0.68 $\pm$ 0.35   | 65.25 $\pm$ 6.76 | 87.43 $\pm$ 9.59  |
| AC   | 0                             | 93.70 $\pm$ 2.89          | 0.95 $\pm$ 0.12   | 2.51 $\pm$ 0.79  | 97.15 $\pm$ 2.50  |
|      | 6.4                           | 92.71 $\pm$ 1.27          | 1.27 $\pm$ 0.43   | 3.63 $\pm$ 0.58  | 97.60 $\pm$ 2.45  |
|      | 51.0                          | 65.92 $\pm$ 6.60          | 3.87 $\pm$ 1.22   | 24.33 $\pm$ 4.65 | 94.12 $\pm$ 1.34  |
|      | Stripping                     | 22.29 $\pm$ 4.35          | 1.08 $\pm$ 0.52   | 70.30 $\pm$ 5.77 | 93.67 $\pm$ 1.10  |
| BP   | 0                             | 13.35 $\pm$ 2.79          | 14.36 $\pm$ 4.38  | 57.43 $\pm$ 5.55 | 85.14 $\pm$ 2.52  |
|      | 6.4                           | 20.15 $\pm$ 4.84          | 73.81 $\pm$ 11.05 | 20.15 $\pm$ 4.84 | 104.78 $\pm$ 7.44 |
|      | 51.0                          | 9.17 $\pm$ 0.72           | 71.13 $\pm$ 2.07  | 0.31 $\pm$ 0.02  | 80.61 $\pm$ 1.34  |
|      | Stripping                     | 10.84 $\pm$ 3.06          | 1.30 $\pm$ 0.12   | 76.04 $\pm$ 3.08 | 88.18 $\pm$ 0.74  |

<sup>a</sup> The data represent means  $\pm$  S.D. of at least three experiments.

親油性の異なる MT、AC、BP をモデル薬物として用い、ラット腹部摘出皮膚に対して、吸収促進剤である GACH 適用時の *in vitro* 皮膚透過実験を行った。Fig.26 は、12 hr の透過実験により得られた各薬物の皮膚透過曲線を示しており、Table XI は実験終了時におけるド



**Fig. 27. Comparison of amounts of MT (A), AC (B), and BP (C) penetrated until 12 hr between rats and guinea pigs.**

ナー、皮膚、およびレセプターで回収された薬物量をまとめたものである。親水性の高い MT、AC ではコントロールの皮膚では皮膚透過が極めて小さく、角質層除去することによって顕著に皮膚透過が増大したが、親油性の非常に高い BP では本来皮膚透過が大きいため角質層除去による皮膚透過の増大は小さかった。一方、GACH の作用に関しては、MT に対してはほとんど促進効果がみられず、AC では高投与量の GACH により顕著な促進効果が認められたのに対し、BP では GACH 適用量依存的に皮膚透過が減少した。また、実験終了時における皮膚中薬物量は、各薬物とも GACH の適用量依存的に増大する傾向が認められた (Table XI)。以上の薬物皮膚透過および GACH の吸収促進効果に関しては、前章でのモルモット皮膚での場合と良く相関した結果が得られた。両動物間で、各前処理条件毎に薬物投与後 12 hr における皮膚透過量を比較した結果、薬物の種類や適用条件に依らずラットのほうが皮膚透過が大きいことが明らかとなった (Fig.27)。

### 1-b モルモットとラット間での皮膚透過パラメータの比較

両動物種における皮膚透過の種差を明らかにするために、先の皮膚透過パターンを皮膚抜

**Table XII. Parameters for in vitro skin permeation of drugs with GACH based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum in guinea pigs and rats.**

| Drug | Animal     | GACH Dose<br>( $\mu\text{mol}$ ) | Polar route <sup>a</sup>            |  | Nonpolar route <sup>b</sup>            |                                      | Viable tissues <sup>c</sup>         |                                |
|------|------------|----------------------------------|-------------------------------------|--|--|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
|      |            |                                  | $D_p/L_s^2$<br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_p V_p \times 10^5$<br>( $\text{cm}^3$ ) | $D_{np}/L_s^2$<br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_{np} V_{np}$<br>( $\text{cm}^3$ ) | $D_d/L_d^2$<br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_d V_d$<br>( $\text{cm}^3$ ) |
| MT   | Guinea pig | 0                                | 39.9                                | 0.727                                      | —                                      | —                                    | 0.0812                              | 0.693                          |
|      |            | 6.4                              | 42.1                                | 1.96                                       | —                                      | —                                    | 0.0812                              | 0.693                          |
|      |            | 51.0                             | 48.5                                | 9.04                                       | —                                      | —                                    | 0.0812                              | 0.693                          |
|      | Rat        | 0                                | 61.6                                | 6.13                                       | —                                      | —                                    | 0.0818                              | 3.67                           |
|      |            | 6.4                              | 64.6                                | 7.38                                       | —                                      | —                                    | 0.0818                              | 3.67                           |
|      |            | 51.0                             | 64.8                                | 12.2                                       | —                                      | —                                    | 0.0818                              | 3.67                           |
| AC   | Guinea pig | 0                                | 37.2                                | 0.727                                      | 5.19                                   | 0.0000910                            | 0.0565                              | 0.565                          |
|      |            | 6.4                              | 39.2                                | 1.96                                       | 1.08                                   | 0.0000766                            | 0.0565                              | 0.565                          |
|      |            | 51.0                             | 45.2                                | 9.04                                       | 2.39                                   | 0.00450                              | 0.0565                              | 0.565                          |
|      | Rat        | 0                                | 57.4                                | 6.13                                       | 5.43                                   | 0.000109                             | 0.0804                              | 3.76                           |
|      |            | 6.4                              | 60.2                                | 7.38                                       | 4.99                                   | 0.000358                             | 0.0804                              | 3.76                           |
|      |            | 51.0                             | 60.4                                | 12.2                                       | 5.18                                   | 0.00935                              | 0.0804                              | 3.76                           |
| BP   | Guinea pig | 0                                | 38.9                                | 0.727                                      | 0.194                                  | 2.02                                 | 0.0371                              | 1.53                           |
|      |            | 6.4                              | 41.7                                | 1.96                                       | 0.0661                                 | 13.3                                 | 0.0371                              | 1.53                           |
|      | Rat        | 0                                | 61.0                                | 6.13                                       | 0.722                                  | 1.05                                 | 0.0845                              | 8.03                           |
|      |            | 6.4                              | 63.9                                | 7.38                                       | 0.0778                                 | 41.5                                 | 0.0845                              | 8.03                           |

<sup>a</sup> Diffusion parameters for polar route ( $D_p/L_s^2$ ) of each drug were calculated by correcting the corresponding values of mannitol based on molecular weight. Partition Parameters for polar route ( $K_p V_p$ ) of each drug were considered to be the same as the corresponding values of mannitol. These values were used for estimation of parameters for the nonpolar route.

<sup>b</sup> Diffusion and partition parameters for the nonpolar route ( $D_{np}/L_s^2, K_{np} V_{np}$ ).

<sup>c</sup> Diffusion and partition parameters for viable tissues ( $D_d/L_d^2, K_d V_d$ ) were considered to be common to each drug with different GACH dose.

散モデルに基づいて解析し、各経路における皮膚透過パラメータを比較した(Table XII)。

角質層以下の生きた表皮および真皮層における拡散パラメータ  $D_d/L_d^2$  には両動物間でそれほど大きな差が認められなかったのに対し、分配パラメータ  $K_dV_d$  に関してはラットのほうが5.3-6.7倍大きいことが明らかとなった。基本的に角質層以下の層は、コラーゲン様のマトリックス構造からなる水で満たされた親水的な環境であり、薬物はこうした組織の間隙を拡散すると考えられている<sup>43)</sup>。これは、モデル薬物の  $PC_{oct/w}$  が0.00155—371と大きく異なるにも関わらず、分配パラメータの値が薬物間でそれほど大きな差がみられないことから明らかである。したがって、水を基剤とした本研究では角質層以下の層への分配係数  $K_d$  はほぼ1とみなすことができ、本解析で明らかにされた両動物間での分配パラメータの差は組織間隙の容積の違いによると考えられる。

角質層極性経路に関しても、分配パラメータ  $K_pV_p$  にのみ種差がみられ、ラットのほうが大きな値を示したが、GACH適用量の増加に伴い差が小さくなる傾向が認められた。過去の報告に基づき<sup>53-55,68)</sup>、水基剤から極性経路への分配係数は1とみなすことができるので、ラットとモルモットの間では極性経路の体積が異なると考えられるが、さらには拡散距離の2乗に反比例する拡散パラメータ  $D_p/L_s^2$  に種差が認められなかったことから、両動物間で極性経路の有効表面積が異なっていると解釈できる。角質層極性経路の実体としては厳密には

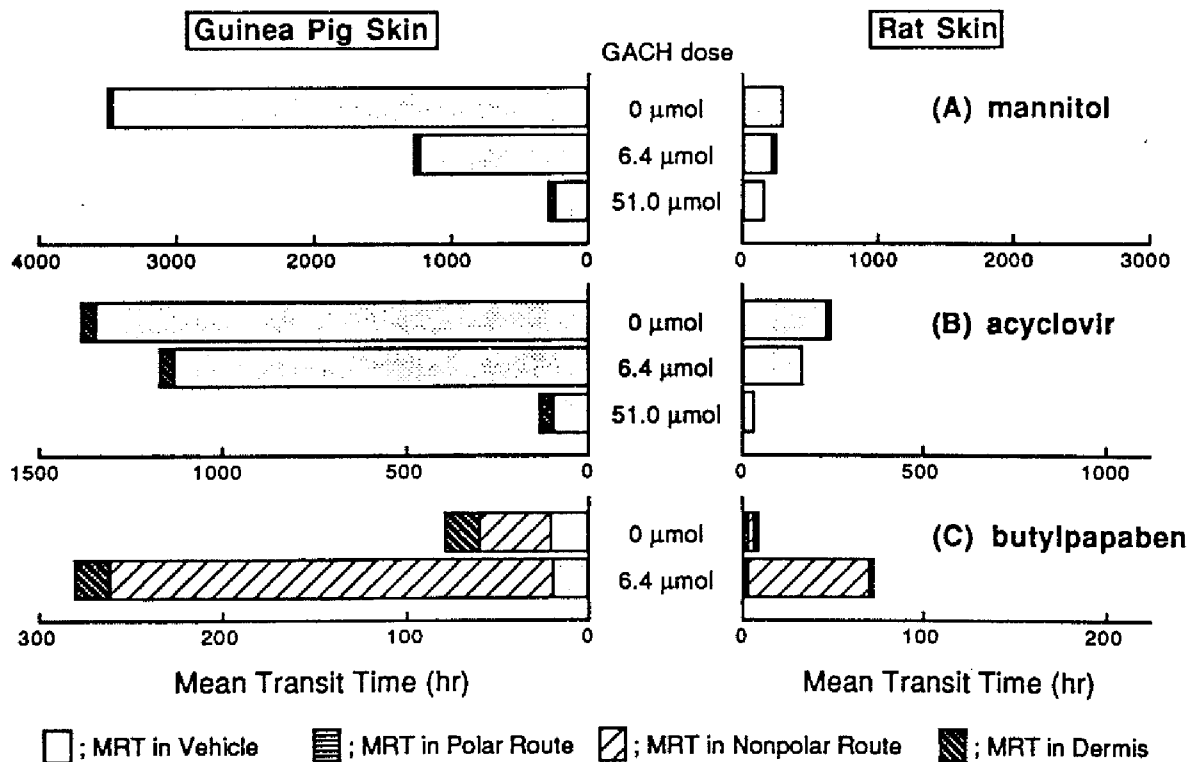


Fig. 28. Mean transit time for permeation of MT (A), AC (B), and BP (C) through guinea pig or rat skin pretreated with different doses of GACH.

明らかではないが、毛穴等の経付属器官経路や角質層の水和水によって形成される水孔経路が考えられており<sup>15,49,142)</sup>、両動物間での極性経路の表面積が異なるのは、こうした付属器官の密度や角質層水和の程度の差によるものと思われる。しかしながら、高濃度の吸収促進剤を十分に作用させた場合には、水の透過性が亢進し角質層の水和がほぼ限界の状態まで進行すると考えられ、このような条件下では両動物間で同様の分配パラメータを示したことから、両動物における経付属器官経路の寄与は同程度であり、促進剤無添加条件ではラットのほうが角質層の水和が亢進していることが推察される。

一方、角質層非極性経路のパラメータに関しては、両動物間で明確な違いはみられず、いずれの動物種においても GACH により分配パラメータが顕著に増大する傾向が認められた。この結果より、非極性経路のバリアー能に関しては、促進剤に対する感受性を含めて、両動物間で基本的には種差がみられないと考えられる。

以上のような両動物間でのパラメータの違いが、皮膚透過挙動に如何に反映するかについて直感的な理解を助けるために、皮膚透過に要する平均通過時間 MTT を算出した(Fig.28)。親水性の高い MT や AC の場合には、ラットのほうが基剤中での平均滞留時間 MRT が短いために、MTT が短く、高い皮膚透過性を示すことが明らかとなり、これは角質層極性経路での分配パラメータが大きいためであることが示された。一方、親油性の高い BP の場合には、ラットのほうが角質層非極性経路での MRT が短いために、高い皮膚透過を示すことが明らかとなり、親油性の高い薬物では角質層以下の層での分配パラメータの違いが反映することが示された。

### III-2 経皮吸収および吸収促進効果における in vitro/in vivo 差の解析

in vitro 皮膚透過実験は、薬物吸収過程のみを直接測定でき、かつ実験条件の設定が容易であるため、薬物経皮吸収の評価に繁用されるが、一般に実験動物皮膚を用いた in vitro 皮膚透過実験では真皮も含めた全皮膚を用いられることも多く、血流による薬物の除去を受け in vivo での皮膚透過とは生理学的に異なると考えられる。したがって、in vitro 実験の結果をもとに in vivo 吸収を予測するためには、両実験系の特性すなわち in vitro および in vivo における皮膚の生物学的および物理化学的性質を理解することが必要である。従来より薬物吸収における in vitro/in vivo 差における研究が数多く行われてきたが、両者の相関性は得られているものの定量的な一致がみられないことが報告されている<sup>135-138)</sup>。

そこで、薬物吸収および吸収促進効果における in vitro/in vivo 差に関して総合的な理解を得ることを目的として、本研究で構築した拡散モデルに基づいて in vitro および in vivo にお

ける両実験結果を解析し、各吸収過程におけるパラメータを比較することによって、両実験系での皮膚のバリアー特性の違いを皮膚の生理学および解剖学的特性と関連づけて整理した<sup>41,139</sup>。

## 2 - a 静脈内投与後の薬物尿中排泄

in vivo 吸収実験の結果より経皮吸収過程を分離評価するために、吸収実験のモデル薬物として用いた MT、AC、および BP を静脈内急速投与した後の尿中放射活性を測定した (Fig.29)。

各薬物の尿中排泄は二相性の消失を示し、以下の式によって表すことができる。

$$\text{MT: } dX_u/dt = 146 \cdot \exp(-2.24t) + 17.8 \cdot \exp(-0.689t) \quad (132)$$

$$\text{AC: } dX_u/dt = 166 \cdot \exp(-2.61t) + 17.4 \cdot \exp(-0.666t) \quad (133)$$

$$\text{BP: } dX_u/dt = 250 \cdot \exp(-6.75t) + 69.7 \cdot \exp(-1.05t) \quad (134)$$

ここで、 $dX_u/dt$  は尿中排泄速度(% of Dose/hr)を表す。これらの式に基づき、MT、AC、および BP の無限時間までの尿中排泄量はそれぞれ 91.0、89.7、103 % であった。いずれの薬物においても、そのほとんどが尿中に速やかに排泄されたが、特に MT と AC は非常に良く似た全身挙動を示すことが明らかとなった。

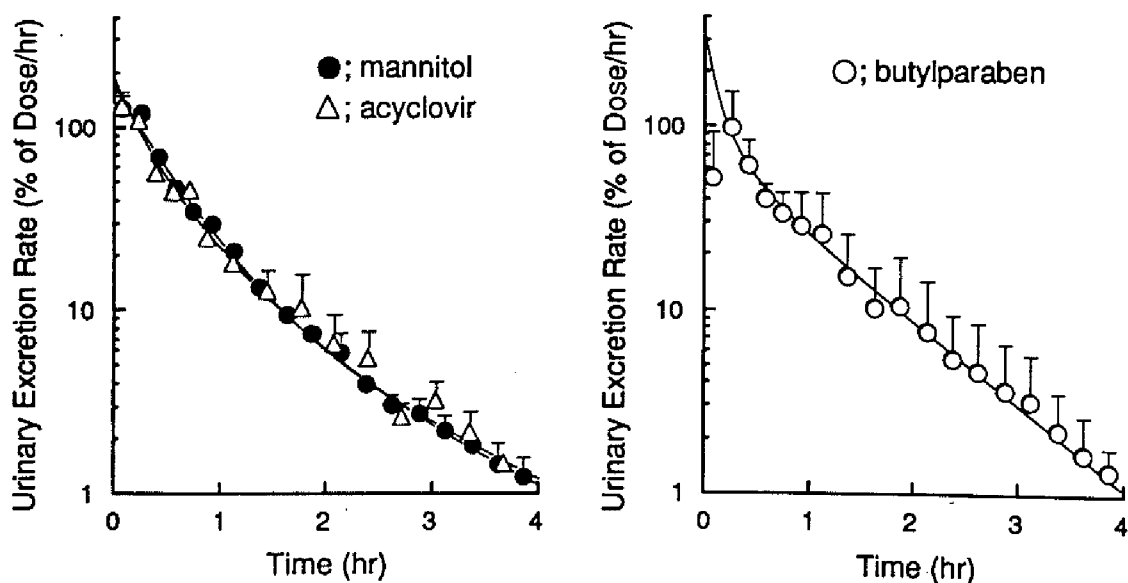


Fig. 29. Urinary excretion of MT, AC, and BP injected into femoral vein of rats. Each point represents the mean value of three experiment.

## 2-b GACH適用時における *in vitro* および *in vivo* 皮膚透過

モデル薬物として親油性の異なる MT、AC、BP を、吸収促進剤としては GACH を選び、薬物経皮吸収および吸収促進効果に関する *in vitro/in vivo* 差を解析した。*in vivo* における経皮吸収評価は、ラット腹部にガラスセルを接着し、吸収促進剤で 6 hr 前処理後薬物水溶液を投与した上で、尿中排泄を経時的に測定し、デコンボリューション法を用いて *in vitro* 実験系に対応する *in vivo* 経皮吸収パターンを得た(Fig.30)。

Fig.31 は、*in vitro* および *in vivo* 実験により得られた皮膚透過パターンを示したものである。角質層を除去した皮膚では、いずれの薬物においても *in vivo* での吸収が大きいことが明らかとなった。促進剤無添加（コントロール）条件での皮膚透過は、薬物によって両実験間での大小関係が異なり、親水性の非常に高い MT では *in vitro* のほうが大きかったのに対し、AC ではほぼ同程度であり、親油性の非常に高い BP の場合には *in vivo* のほうが大きくなった。また、皮膚透過の lag time に関しては、いずれの薬物の場合も *in vivo* のほうが短いことが明らかとなった。

Fig.32 は、GACH による吸収促進効果を表す指標として、吸収実験終了時の皮膚透過量の増加率を計算した結果を示したものである。*in vitro* および *in vivo* のいずれの実験系においても、AC に対して最も大きな吸収促進効果が認められたが、その程度は *in vivo* のほうが大きいこと、また *in vivo* 系では MT に対しても顕著な促進効果がみられることが明らかとなった。さらに、BP に対しては両実験とも GACH 適用により皮膚透過の減少がみられたが、その程度は *in vitro* のほうが顕著であった。

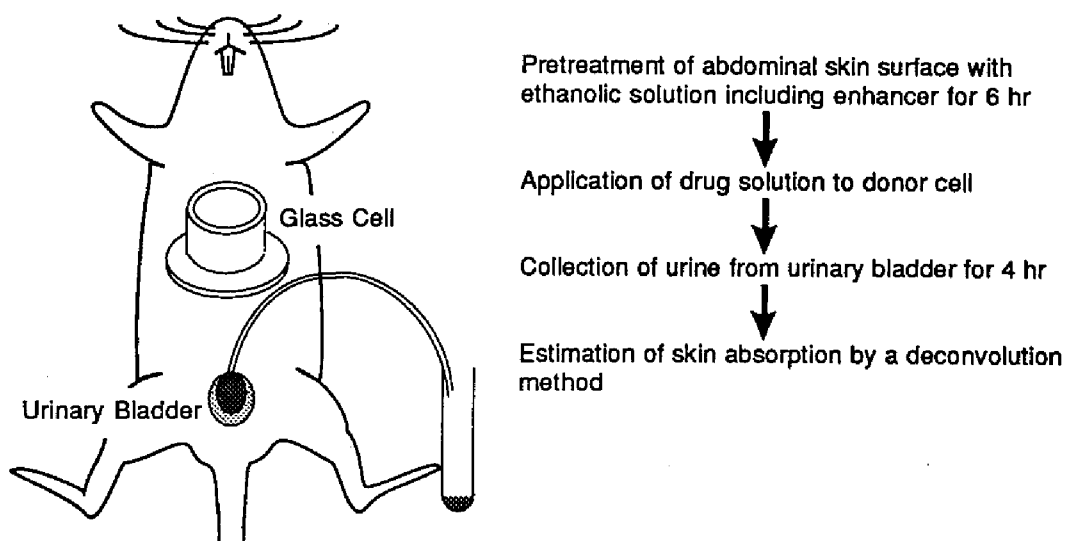
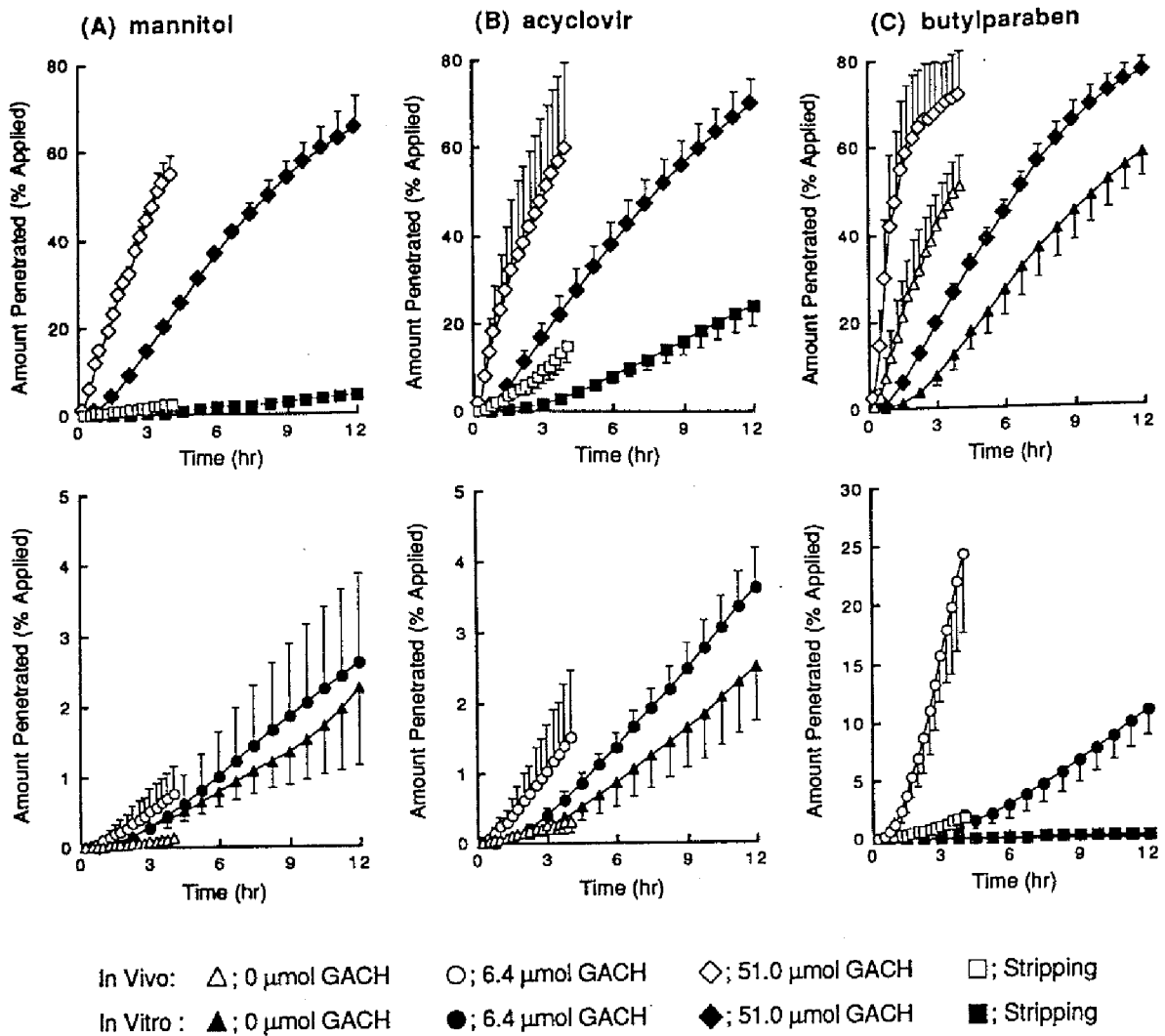


Fig. 30. Procedures for *in vivo* percutaneous absorption experiment.





**Fig. 31.** In vivo and in vitro absorption of MT (A), AC (B), and BP (C) through intact rat skin pretreated with an ethanolic solution of different doses of GACH or through tape-stripped skin. The drugs were applied in the form of aqueous solution. In vivo absorption profiles were obtained from urinary excretion data using a deconvolution method. Each point represents the mean value of at least three experiments.

Table XIII は、4 hr の in vivo 吸収実験終了後における回収率をまとめたものである。各薬物のコントロール条件の比較より、親油性の高い薬物ほど皮膚中薬物量が高いことが明らかとなった。また、GACH はいずれの薬物に対しても皮膚中薬物量を増大させることが示され、in vitro 実験の結果(Table XI)とも良く相関していた。

### 2 - c in vitro/in vivo 間の皮膚透過パラメータの比較

経皮吸収における in vitro/in vivo 差を各吸収過程のレベルで検討することを目的として、上述の実験結果を皮膚拡散モデルに基づいて解析した。in vivo での解析では、in vitro での解

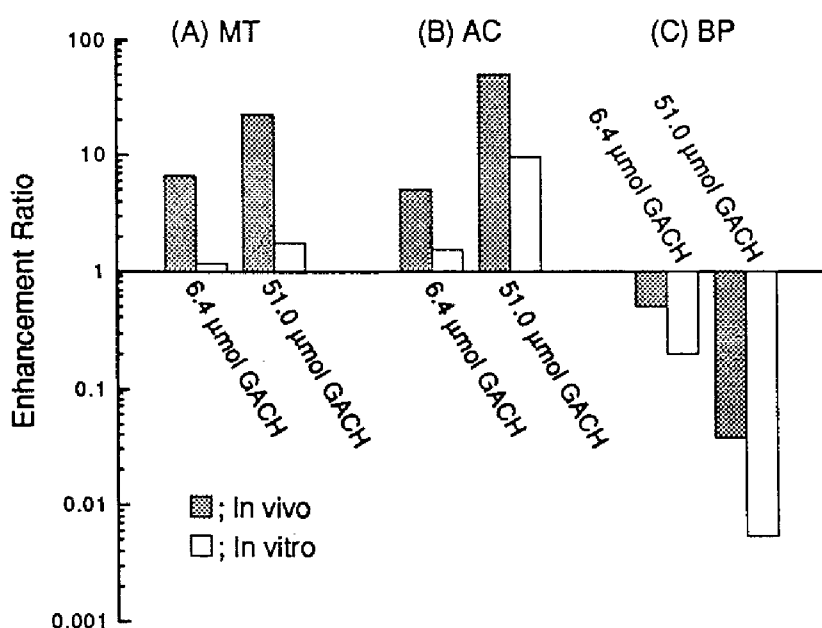


Fig. 32. Comparison of enhancement effect of GACH on skin permeation of MT (A), AC (B) and BP (B) between in vivo and in vitro. Each enhancement ratios was calculated by dividing the penetration amount at the end of experiment with enhancer by that without enhancer.

Table XIII. Amounts of drugs recovered at the end of 4-hr in vivo absorption experiment in rats.

| Drug | GACH dose (μmol) | Recovery <sup>a</sup> (%) |              |               |                       |                    |
|------|------------------|---------------------------|--------------|---------------|-----------------------|--------------------|
|      |                  | Donor                     | Skin         | Urine         | Absorbed <sup>b</sup> | Total <sup>c</sup> |
| MT   | 0                | 86.32 ± 8.79              | 0.35 ± 0.12  | 0.08 ± 0.02   | 0.11 ± 0.03           | 86.79 ± 8.72       |
|      | 6.4              | 101.34 ± 5.08             | 0.22 ± 0.07  | 0.55 ± 0.31   | 0.74 ± 0.41           | 102.30 ± 5.40      |
|      | 51.0             | 82.76 ± 15.05             | 0.52 ± 0.12  | 1.74 ± 0.45   | 2.48 ± 0.56           | 85.76 ± 15.55      |
|      | Stripping        | 39.29 ± 2.11              | 1.09 ± 0.60  | 42.06 ± 3.36  | 54.67 ± 4.18          | 95.05 ± 1.52       |
| AC   | 0                | 99.08 ± 1.14              | 0.32 ± 0.13  | 0.24 ± 0.13   | 0.30 ± 0.16           | 99.70 ± 1.27       |
|      | 6.4              | 97.46 ± 4.78              | 0.69 ± 0.33  | 1.13 ± 0.71   | 1.51 ± 0.96           | 101.72 ± 3.56      |
|      | 51.0             | 81.77 ± 6.89              | 1.61 ± 0.01  | 10.64 ± 3.04  | 14.81 ± 3.88          | 98.19 ± 3.02       |
|      | Stripping        | 39.73 ± 16.24             | 1.49 ± 0.48  | 47.13 ± 16.35 | 59.84 ± 19.29         | 101.06 ± 5.05      |
| BP   | 0                | 13.06 ± 0.70              | 9.84 ± 7.28  | 46.76 ± 7.26  | 50.87 ± 7.06          | 73.77 ± 7.74       |
|      | 6.4              | 25.47 ± 2.21              | 28.96 ± 7.62 | 20.37 ± 5.65  | 24.23 ± 6.65          | 78.67 ± 1.58       |
|      | 51.0             | 16.32 ± 3.99              | 51.84 ± 1.79 | 1.47 ± 0.43   | 1.78 ± 0.51           | 69.94 ± 5.25       |
|      | Stripping        | 6.30 ± 5.70               | 1.03 ± 0.89  | 70.71 ± 10.85 | 71.77 ± 9.96          | 79.11 ± 3.48       |

<sup>a</sup> The data are expressed as means ± S.D. of at least three experiments.

<sup>b</sup> Absorbed amounts were calculated using a deconvolution method.

<sup>c</sup> Total amount is the sum of the amounts in the donor, in the skin, and absorbed.

析結果と直接比較できるように、血液側でシンク条件を仮定した in vitro と同一のモデルを使用した。局所血流速度が過度に減少しない限り、薬物透過は血流律速にならないことが知られており<sup>143)</sup>、この仮定は基本的に成立すると考えられる。当てはめ計算では、皮膚透過

**Table XIV. Parameters for in vitro and in vivo skin permeation of drugs with GACH based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum in rats.**

| Drug | GACH dose<br>( $\mu\text{mol}$ ) | In vitro   |   |   |   | In vivo  |   |   |   |
|------|----------------------------------|--|---|---|---|--|---|---|---|
|      |                                  | $D_p/L_s^2$ <sup>a</sup><br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_p V_p \times 10^5$ <sup>b</sup><br>( $\text{cm}^3$ ) | $D_{np}/L_s^2$ <sup>c</sup><br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_{np} V_{np} \times 10^5$ <sup>c</sup><br>( $\text{cm}^3$ ) | $D_p/L_s^2$ <sup>a</sup><br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_p V_p \times 10^5$ <sup>b</sup><br>( $\text{cm}^3$ ) | $D_{np}/L_s^2$ <sup>c</sup><br>( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_{np} V_{np} \times 10^5$ <sup>c</sup><br>( $\text{cm}^3$ ) |
| MF   | 0                                | 61.6   | 6.13  | —   | —   | 58.7   | 0.612   | —   | —   |
|      | 6.4                              | 64.6   | 7.38  | —   | —   | 60.2   | 3.91  | —   | —   |
|      | 51.0                             | 64.8   | 12.2  | —   | —   | 60.2   | 14.5  | —   | —   |
|      | Stripping                        | $D_d/L_d^2 = 0.0818 \text{ hr}^{-1} \text{d}$    |   | $K_d V_d = 3.67 \text{ cm}^3 \text{d}$              |   | $D_d/L_d^2 = 0.677 \text{ hr}^{-1} \text{d}$     |   | $K_d V_d = 0.368 \text{ cm}^3 \text{d}$             |   |
| AC   | 0                                | 57.4   | 6.13  | 6.57  | 12.9  | 54.7   | 0.612   | 6.79  | 12.6  |
|      | 6.4                              | 60.2   | 7.38  | 4.71  | 45.8  | 56.1   | 3.91  | 5.03  | 64.9  |
|      | 51.0                             | 60.4   | 12.2  | 5.14  | 953   | 56.1   | 14.5  | 4.53  | 1320  |
|      | Stripping                        | $D_d/L_d^2 = 0.0804 \text{ hr}^{-1} \text{d}$    |   | $K_d V_d = 3.76 \text{ cm}^3 \text{d}$              |   | $D_d/L_d^2 = 2.84 \text{ hr}^{-1} \text{d}$      |   | $K_d V_d = 0.0838 \text{ cm}^3 \text{d}$            |   |

<sup>a</sup>Diffusion parameters for the polar route in the stratum corneum ( $D_p/L_s^2$ ). These values of each drug were calculated by correcting the corresponding ones of mannitol based on molecular weight and were also used for calculation of  $D_{np}/L_s^2$  and  $K_{np}V_{np}$  of drugs at each dose.

<sup>b</sup>Partition parameters for the polar route in the stratum corneum ( $K_p V_p$ ). These values of each drug were considered to be the same as the corresponding ones of mannitol and were also used for calculation of  $D_{np}/L_s^2$  and  $K_{np}V_{np}$  of drugs at each dose.

<sup>c</sup>Parameters for the nonpolar route in the stratum corneum ( $D_{np}/L_s^2$ ,  $K_{np}V_{np}$ ).

<sup>d</sup>Parameters for the viable tissues ( $D_d/L_d^2$ ,  $K_d V_d$ ). These values were considered to be common to each drug with different GACH dose.

の理論式に対して全身挙動を表す式をラプラス次元でコンボリューションした式(式(78), (101))を用いて、薬物経皮投与後の尿中排泄のデータに当てはめ、各皮膚透過パラメータを算出した。そのパラメータの評価の手順に関しては、前章で述べた方法に準じて行った。

Table XIV は、モデル解析により得られた皮膚透過パラメータをまとめたものである。ただし、BP に関しては in vivo 実験終了時の回収率が非常に低かったため(Table XIII)、本モデル解析は行わなかった。角質層以下の層に関しては、すべての薬物において拡散パラメータは in vivo のほうが大きく、分配パラメータは逆に in vitro のほうが大きかった。拡散パラメータは拡散距離の 2 乗に反比例するパラメータであるので、両実験間で薬物拡散係数が等しいと仮定すると、本解析結果から in vivo のほうが拡散距離が短いことが示唆された。また、分配パラメータは拡散距離に比例するパラメータであるので、このことは分配パラメータに関する解析結果ともよく対応している。この解析結果は、薬物は角質層透過後それ以下の層をさらに拡散するが、in vivo 条件では真皮上部で発達した血管系から血流による除去を受けるため、真皮を含めた全皮膚の透過を表す in vitro 実験の場合に比べて拡散距離が短くなることを示唆するものと思われる。

一方、角質層極性経路でのパラメータに関しては、拡散パラメータは両実験間でほぼ同じであったのに対し、コントロール条件における分配パラメータは in vitro のほうが 10 倍大きかった。この結果は、in vitro では in vivo に比べ極性経路の表面積が大きいことを示すものであり、角質層の水和が亢進していることが示唆された。一方、GACH の極性経路に対する作用は、in vitro ではほとんどみられなかったのに対し、in vivo では 24 倍まで分配パラメータ

タが増大した。GACHによる極性経路への分配パラメータの増大は、角質層水和の促進を示唆するものであるが、本来水和が亢進している *in vitro* 条件下では吸収促進剤による影響を受けにくいことを表すものと思われる。こうした吸収促進剤による水和の増大は、oleic acid や lauric acid でも確認されており、これらの吸収促進剤は角質層からの水分蒸発 Transepidermal Water Loss (TEWL) を増大させることが報告されている<sup>117)</sup>。これらの吸収促進剤による水和増大のメカニズムに関しては、これらが親油性の非常に高い化合物であるため、直接極性経路に対して作用するとは考え難いので、おそらく角質層の多重脂質膜の構造を乱すことによって新規の水孔経路を形成するかあるいは既に脂質膜に存在する水孔経路を拡大するものと思われる。また、角質層の水和には限界点が存在することが知られており<sup>142)</sup>、GACH適用時には *in vitro* と *in vivo* の分配パラメータがほぼ等しくなったことから、GACHにより角質層の水和状態が限界に近づいているものと思われる。

一方、角質層非極性経路に関しては、両パラメータとも *in vitro* と *in vivo* の間でほとんど同じ値を示した。さらに、GACHによる非極性経路でのパラメータの変化は、極性経路でのパラメータの変化に比べて大きく、GACHは顕著に非極性経路への薬物分配を増大させることが明らかとなり、GACHの吸収促進機構に関しても基本的に両実験間で同じであることが示唆された。以上のことから、薬物皮膚透過において最も重要な吸収過程と考えられる非極性経路に関しては、薬物透過性およびGACHに対する感受性に *in vitro/in vivo* 差がないことが明らかとなり、皮膚透過や吸収促進効果における *in vitro/in vivo* 差は、角質層の水和状態や真皮層の拡散距離の違いによって見掛け上生じることが明らかとなった。

### III-3 oleic acid による *in vivo* 経皮吸収促進の解析

以上の検討から、GACHによる吸収促進機構に関しては、基本的に種差および *in vitro/in vivo* 差がないことが示されたが、こうした議論が他の吸収促進剤に対しても同様に成り立つかを検討するために、吸収促進剤として oleic acid を選び、ラットを用いた *in vivo* 実験の結果を解析することによって、前章でのモルモットを用いた *in vitro* 実験での解析結果と比較した。

#### 3-a oleic acid による *in vivo* 経皮吸収促進効果

本章では、モルモットでの *in vitro* 検討と同じモデル薬物である MT、6-MP、BP の3種の薬物を用いて、前節と同様の *in vivo* 吸収実験を行った。

デコンボリューション法により吸収速度を計算するために、6-MPの静脈内急速投与実験

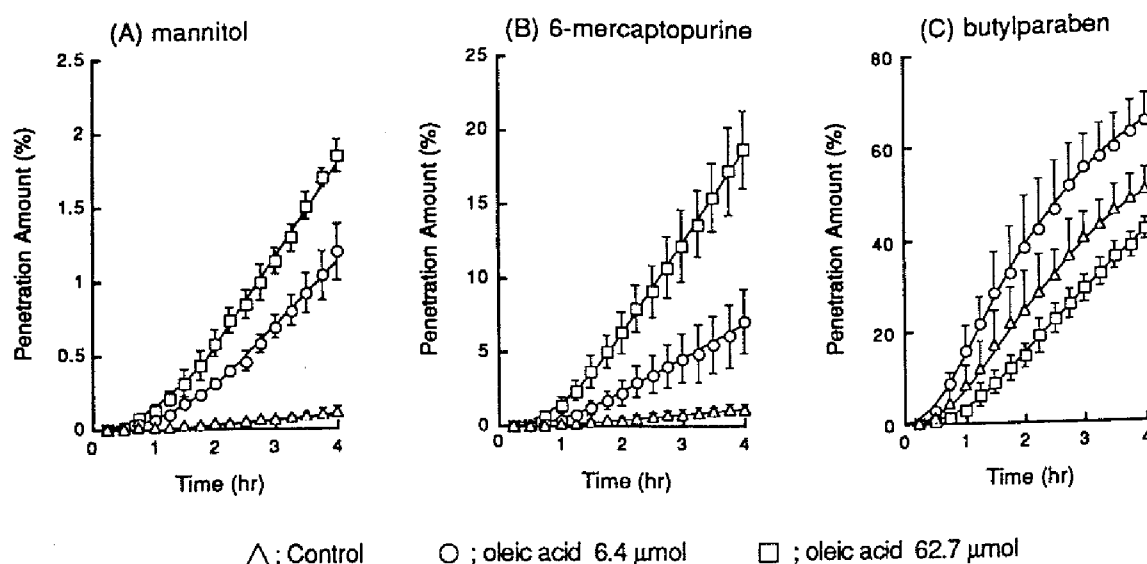


Fig. 33. In vivo absorption of MT (A), 6-MP (B), and BP (C) through intact rat skin pretreated with an ethanolic solution of different doses of oleic acid. The drugs were applied in the form of aqueous solution. In vivo absorption profiles were obtained from urinary excretion data using a deconvolution method. Each point represents the mean value of at least three experiments.

Table XV. Amounts of drugs recovered at the end of 4-hr in vivo absorption experiment in rats.

| Drug             | Amount of oleic acid (μmol) | Amount recovery (% Applied) <sup>a</sup> |              |              |                       |                    |
|------------------|-----------------------------|--|--------------|--------------|-----------------------|--------------------|
|                  |                             | donor                                    | skin         | urine        | absorbed <sup>b</sup> | total <sup>c</sup> |
| mannitol         | 0                           | 86.32 ± 8.79                             | 0.35 ± 0.12  | 0.08 ± 0.02  | 0.11 ± 0.03           | 86.79 ± 8.72       |
|                  | 15.7                        | 90.88 ± 5.39                             | 0.55 ± 0.12  | 1.04 ± 0.34  | 1.19 ± 0.19           | 92.62 ± 5.70       |
|                  | 62.7                        | 79.44 ± 0.03                             | 1.01 ± 0.02  | 1.34 ± 0.08  | 1.84 ± 0.11           | 82.29 ± 0.15       |
|                  | stripping                   | 39.29 ± 2.11                             | 1.09 ± 0.60  | 42.06 ± 3.36 | 54.67 ± 4.18          | 95.05 ± 1.52       |
| 6-mercaptopurine | 0                           | 98.06 ± 5.82                             | 2.17 ± 0.67  | 0.43 ± 0.14  | 1.12 ± 0.36           | 101.36 ± 5.84      |
|                  | 15.7                        | 86.65 ± 3.15                             | 3.57 ± 0.17  | 2.52 ± 0.86  | 7.02 ± 2.20           | 97.24 ± 4.51       |
|                  | 62.7                        | 63.65 ± 14.98                            | 4.55 ± 1.19  | 6.89 ± 1.11  | 18.76 ± 2.62          | 86.96 ± 12.12      |
|                  | stripping                   | 32.68 ± 4.48                             | 4.91 ± 0.19  | 32.62 ± 3.29 | 78.88 ± 7.01          | 116.47 ± 10.89     |
| butylparaben     | 0                           | 18.18 ± 5.88                             | 12.31 ± 7.47 | 45.17 ± 5.36 | 50.02 ± 4.66          | 80.50 ± 3.07       |
|                  | 15.7                        | 10.25 ± 5.74                             | 7.50 ± 3.43  | 59.78 ± 7.00 | 64.68 ± 6.11          | 82.43 ± 7.65       |
|                  | 62.7                        | 18.88 ± 2.99                             | 29.06 ± 8.16 | 35.63 ± 2.64 | 41.26 ± 2.37          | 89.20 ± 3.71       |
|                  | stripping                   | 2.01 ± 0.38                              | 0.34 ± 0.14  | 80.31 ± 3.29 | 80.37 ± 2.36          | 82.72 ± 1.93       |

<sup>a</sup>The data were expressed as mean ± S.D. at least three experiments.

<sup>b</sup>The values were calculated using a deconvolution method.

<sup>c</sup>The values were the sum of drug amounts in the donor, in the skin, and absorbed.

を行った結果、6-MP の尿中排泄速度(% of Dose/hr)は、

$$dX_w/dt = 108 \cdot \exp(-11.0t) + 30.4 \cdot \exp(-0.692t) \quad (135)$$

であることが示され、無限時間までの尿中回収率は 53.7 % であり、尿中排泄以外の消失経路が存在することが明らかとなった。MT および BP に関しては、(132) 式および (134) 式を用いた。

Fig.33 は、デコンボリューション法を用いて計算した、oleic acid の各種適用条件下における各薬物の in vivo 吸収パターンを示している。oleic acid は、MT および 6-MP の皮膚透過を顕著に促進したが、BP の場合には、低投与量では若干透過促進を示したのに対し、高投与量では皮膚透過を減少させた。モルモット皮膚を用いた in vitro 実験の結果では、oleic acid による吸収促進効果は 6-MP に対してのみ認められており (Fig.21、22、23)、本 in vivo 実験の結果とは MT に対する促進効果の有無に関して大きく異なることが示された。

Table XV は実験終了時における各薬物の回収量をまとめたものであるが、すべての薬物において oleic acid 適用により皮膚中薬物量が増大する傾向が認められた。

### 3 - b in vivo における oleic acid の作用機構

Table XVI は、尿中排泄パターンのモデル解析によって得られた皮膚透過パラメータをまとめたものである。角質層極性経路に関しては、oleic acid は拡散パラメータをほとんど変化させなかったのに対し、分配パラメータを適用量依存的に増大させたことから、oleic acid による角質層水和の亢進が示唆された。このような作用はモルモット皮膚を用いた in vitro 実験では認められなかったが (Table X)、他の吸収促進剤である GACH においても in vivo にお

**Table XVI. Parameters for in vivo skin permeation of drugs with oleic acid based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum in rats.**

| Drug | Amount of oleic acid ( $\mu\text{mol}$ ) | Polar route                       |   | Nonpolar route                      |                                   |
|------|--|-----------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|
|      |  | $D_p/L_s^2$ ( $\text{hr}^{-1}$ )  | $K_p V_p \times 10^5$ ( $\text{cm}^3$ ) | $D_{np}/L_s^2$ ( $\text{hr}^{-1}$ ) | $K_{np} V_{np}$ ( $\text{cm}^3$ ) |
| MT   | 0  | 60.9                              | 0.586                                   | —                                   | —                                 |
|      | 15.7                                     | 67.3                              | 6.67                                    | —                                   | —                                 |
|      | 62.7                                     | 65.4                              | 9.65                                    | —                                   | —                                 |
|      | stripping                                | $D_d/L_d^2=0.691(\text{hr}^{-1})$ |   | $K_d V_d=0.359(\text{cm}^3)$        |                                   |
| 6-MP | 0  | 64.7                              | 0.586                                   | 4.19                                | 0.00112                           |
|      | 15.7                                     | 71.5                              | 6.67                                    | 11.7                                | 0.00226                           |
|      | 62.7                                     | 69.5                              | 9.65                                    | 14.7                                | 0.00745                           |
|      | stripping                                | $D_d/L_d^2=0.352(\text{hr}^{-1})$ |   | $K_d V_d=1.37(\text{cm}^3)$         |                                   |
| BP   | 0  | 59.6                              | 0.586                                   | 0.544                               | 4.04                              |
|      | 15.7                                     | 65.9                              | 6.67                                    | 1.08                                | 2.27                              |
|      | 62.7                                     | 64.0                              | 9.65                                    | 0.243                               | 4.03                              |
|      | stripping                                | $D_d/L_d^2=1.13(\text{hr}^{-1})$  |   | $K_d V_d=2.04(\text{cm}^3)$         |                                   |

いてのみ薬物の極性経路への分配パラメータの顕著な増大が認められることを明らかにしている(Table XIV)。以上のことから、これらの親油性の高い吸収促進剤は、角質層の脂質多重膜の構造を乱すことにより角質層水和を促進する作用を有するが、本来水和の亢進した *in vitro* 状態ではこのような作用がみられないことが示唆された。

一方、oleic acid の角質層非極性経路に対する作用は、6-MP と BP を用いて評価したが、6-MP に対しては、oleic acid は拡散および分配の両パラメータを増大させ、モルモット皮膚を用いた *in vitro* 実験での解析結果と良く対応した。一方、BP の透過に対しては oleic acid による明確な作用は認められなかったが、これは BP の透過が極めて速いため真皮透過律速となり、角質層でのパラメータを精度良く評価することが困難であるためと考えられる。また、oleic acid による各パラメータの変化の程度は極性経路におけるパラメータの変化とほぼ同等であったが、oleic acid 適用時においても極性経路での分配パラメータは非常に小さく、多くの薬物においては皮膚透過過程全体に対する極性経路の寄与が小さいと考えられることから、oleic acid の主たる皮膚透過促進機構は非極性経路に対する両パラメータの増大とみなせるものと思われる。

以上の解析結果より、oleic acid による吸収促進機構に関しても種差および *in vitro/in vivo* 差は認められないことが明らかとなり、これらの間の薬物皮膚透過の差は、GACH の場合と同様、*in vitro/in vivo* 間での角質層の水和状態の違いや、角質層以下の層における拡散距離の違いあるいは動物種による組織間隙の大きさの違いによって説明されるものと思われる。

### III-4 考察

本章では、薬物皮膚透過および吸収促進効果における種差および *in vitro/in vivo* 差の問題を総合的に議論するために、皮膚構造を考慮した拡散モデルを基盤として各吸収素過程レベルでの両者の違いを比較検討した。

本解析では、角質層以下の層における透過パラメータに関して、種差および *in vitro/in vivo* 差が認められた。種差に関しては、ラットとモルモットでは分配パラメータのみ異なることから、真皮の組織間隙の大きさが両動物間で異なることが示唆された。一方、*in vitro/in vivo* 差に関しては、*in vivo* のほうが拡散パラメータは大きく、逆に分配パラメータは小さいことから、*in vivo* では真皮拡散距離が短いことが示唆された。

こうした角質層以下の層のバリアー能の違いは、親油性の高い薬物の場合や吸収促進剤を適用した場合のように角質層透過性が高い場合に、皮膚透過に影響すると考えられる。モルモットに比べラットの場合のほうが BP の皮膚透過が大きかったこと、あるいはほとんどの適用条件において *in vivo* のほうが *in vitro* に比べ皮膚透過が大きかったことは、こうした真

皮抵抗の違いによると考えられる。また、*in vitro* においても、真皮の一部を切り取った皮膚では皮膚全体を用いた場合よりも親油性薬物の皮膚透過性が高いことが知られている<sup>70)</sup>。親水性薬物では角質層の皮膚透過が律速過程であるため、皮膚透過性は基本的にこの真皮拡散距離が異なっても変化しないと考えられるが、皮膚透過のラグタイムはこのような場合でも影響されることが報告されている<sup>73)</sup>。本実験結果においても真皮拡散距離の短い *in vivo* のほうが顕著にラグタイムが短くなり、こうした結果とも良く対応した結果が得られた。

角質層極性経路に関しては、動物あるいは *in vitro/in vivo* 間で極性経路の表面積が異なり、これらの中で角質層水和の程度が異なることが示唆された。従来より、角質層の水和は薬物皮膚透過を支配する重要な因子として知られており<sup>144)</sup>、密封療法や軟膏基剤によって一時的に水分蒸発を抑えると皮膚が水和し、薬物透過性が増大することが報告されている<sup>145)</sup>。また、各部位からの benzoic acid の吸収と角質層からの水分蒸発速度 TEWL とは良好な相関関係を示し、吸収の部位差も角質層の水和の違いで説明できることも報告されている<sup>146)</sup>。

こうした角質層水和の効果に関しては、極性経路を透過しやすい親水性薬物ほど影響を受けやすいと考えられる。親油性の異なる薬物の皮膚透過性に対する長時間水和の影響を検討した研究では、親油性の最も高い butanol ではほとんど水和時間の影響を受けないことが知られている<sup>142)</sup>。本研究で行った種差に関する検討では、親水性薬物である MT や AC の透過は角質層水和の亢進したラットのほうが大きいことが示された。また、*in vitro/in vivo* 相関に関する検討では、ほとんどの適用条件において *in vivo* のほうが高かったのに対し、促進剤無添加時の MT の透過のみ *in vitro* での皮膚透過が大きかったが、これは *in vitro* のほうが角質層水和が亢進していることによるものと考えられる。

一方、薬物皮膚透過全体を支配する最も重要な吸収過程と考えられる非極性経路に関しては、動物間および *in vitro/in vivo* 間で透過パラメータに有意な差は認められなかったことから、吸収促進機構に関しては基本的に同じであり、角質層水和および真皮の拡散距離や組織構造の違いによって、吸収促進効果の見掛け上の差が生じることが明らかとなった。また、実験動物ではヒト皮膚に比べて水和による角質層のバリアー能の低下が著しく、実際のヒトでの吸収モデルとして適当ではないという報告もあるが<sup>147)</sup>、本結果では非極性経路の透過パラメータに種差が認められなかったことから、本モデル解析法のように薬物の角質層透過を極性経路と非極性経路に分離評価することによって、こうした動物間での水和の程度の違いを考慮した動態予測が可能となることが示唆された。

以上で明らかのように、種差あるいは *in vitro/in vivo* 差を引き起こす原因については個々の吸収素過程ごとに考えることが必要であり、薬物の物性によってもそれらの寄与が異なるため、薬物吸収におけるこれらの問題を議論する上では総合的な理解が必要とされる。本モデル解析法は、吸収過程を素過程に分離評価できるので、種差や *in vitro/in vivo* 差の問題を



解析する上でも極めて有用なアプローチと考えられる。さらに、こうした手法を用いて各種動物皮膚における薬物吸収を解析することによって、実験動物の結果からヒトでの動態予測いわゆるアニマルスケールアップも可能となるものと思われる。

## 結 論

以上、著者は三章にわたり、皮膚構造を考慮した皮膚拡散モデルを構築し、薬物経皮吸収および吸収促進効果の解析を行い、次の結論を得た。

### (I) 皮膚拡散モデルの構築と経皮吸収動態解析への応用

皮膚の生理学および解剖学的構造に基づいて、皮膚を角質層とそれ以下の層の二層からなると考えた皮膚拡散モデルおよびこれにさらに角質層に並列に存在する極性経路および非極性経路を仮定したモデルを構築し、薬物透過を表すラプラス次元の式を誘導して、高速ラプラス逆変換アルゴリズムによる数値計算を組み合わせた経皮吸収動態解析法を確立した。また、吸収挙動を総合的に評価する目的で、平均皮膚内通過時間 (MTT) などのモーメントパラメータの計算式を誘導した。本解析アプローチの応用性を単純な系で検討する目的で、直列二枚膜皮膚モデルに基づいて 6-mercaptopurine の *in vitro* 吸収動態の解析を行った結果、角質層中ではそれ以下の層に比べて非常に拡散が遅く、MTT の算出により各吸収過程の中で基剤から角質層への移行に最も時間を要することが明らかとなった。次に本モデル解析法を局所薬物濃度の評価に応用し、acyclovir を経皮および静脈内投与した後の尿中排泄パターンを解析することによって、皮膚中薬物濃度の時間推移を算出することに成功した。

### (II) 皮膚拡散モデルに基づく吸収促進剤の作用機構解析

本解析を吸収促進剤の作用機構解析に適用し、対象薬物の物性と吸収促進効果との関連性を整理した。親油性の異なる 7 種薬物の *in vitro* 皮膚透過に及ぼす吸収促進剤 1-geranylazacycloheptan-2-one (GACH) の影響を検討した結果、対象薬物の octanol/水間分配係数と促進効果との間にはベル型の関係が認められた。これは単純な二枚膜モデルでは説明できず、角質層の中に極性経路が存在することが示唆された。そこで、極性および非極性経路を組み込んだ二枚膜拡散モデルに基づく解析の結果、GACH は主として非極性経路に対する薬物分配を増大させることにより吸収を促進することが明らかとなった。さらに線形自由エネルギー相関の考えに基づいた解析により、GACH は非極性経路をより親水的な環境に変化させることが示唆され、こうした機構に基づいて各種薬物に対する吸収促進効果をシミュレートすることに成功した。次に、異なった化学構造を有する促進剤として、単環モノテルペンの *d*-limonene と不飽和脂肪酸の oleic acid の作用機構をモデル解析した結果、いずれの促進剤も主として非極性経路に作用するが、*d*-limonene は高投与量域で拡散パラメータを増

大きさを、一方 oleic acid は投与量依存的に拡散および分配の両パラメータを増加させることが示され、GACH とは異なった作用機構を有することが明らかとなった。以上本モデル解析法により、吸収促進剤の作用機構を各吸収素過程のレベルで解明することが可能となり、各種吸収促進剤の効果を作用点・作用様式の違いに基づき整理することが可能となった。

### (Ⅲ) 経皮吸収促進効果における動物種差および in vitro/in vivo 間の差の解析

薬物経皮吸収における種差および in vitro/in vivo 差を解析する目的で、ラットとモルモットを用いて吸収実験を行った結果をモデル解析した。両動物に対する in vitro 皮膚透過パラメータを比較した結果、ラットのほうが極性経路および角質層以下の層に対する分配パラメータが大きいことが明らかとなったが、非極性経路の薬物透過性および吸収促進剤に対する感受性には種差が認められなかった。また、ラットにおける in vivo 実験の結果をモデル解析し in vitro との違いを皮膚透過パラメータのレベルで比較検討した結果、in vitro 条件では角質層水和が亢進し極性経路が拡大していること、また in vivo 条件では角質層以下の層の拡散距離が短いことが明らかとなった。一方、GACH の作用機構は in vitro と in vivo の両実験系を通じて基本的に同じであるが、見かけ上の吸収促進効果は角質層水和の程度や真皮拡散距離の違いによって両実験間で異なることが明らかとなった。oleic acid を用いた検討においても、これらの種差および in vitro/in vivo 差に関して同様の結論が得られた。以上、吸収を構成する各素過程のレベルで動物間および in vitro/in vivo 間の違いを整理することによって、薬物吸収および経皮吸収促進に関する総合的な理解が得られた。

以上、皮膚拡散モデルに基づいて吸収促進剤の作用機構を解析し、作用機構を物理化学的視点より解明すると共に、吸収促進効果発現における種差および in vitro/in vivo 差に関して系統的な整理を行った。本研究で得られた知見は、薬物吸収動態に関する精度の高い予測を可能とし、吸収促進剤を利用した経皮吸収製剤の設計、開発に対して有益な指針を提供するものと思われる。

## 謝 辞

終わりに望み、本研究に際して、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました京都大学橋田充教授、並びに長らく御指導を賜りました京都大学瀬崎仁名誉教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、多くの有益な御助言と御指導を戴いた京都大学高倉喜信助教授、京都薬科大学山本昌助教授に心からの感謝の意を表します。さらに、種々の貴重な御助言を賜りました京都大学山岡清助教授、アップジョンファーマシューティカルズリミティッド岡本浩一博士、武田薬品工業奈良英治博士、並びに京都大学薬学部薬剤学教室員一同に深謝します。

さらに、実験の一部に御協力戴いた、斉藤恭子学士、越野（吉岡）環学士、小山靖夫修士、坂東博人修士、北野愛矩美学士、高木敏英学士に深く感謝します。

# 実験の部

## 第 I 章 実験の部

### 【1】モデル薬物

6-mercaptopurine(6-MP) はナカライテスク株式会社より購入した。acyclovir (AC) は日本ウェルカム株式会社より供与されたものを用いた。 $[^{14}\text{C}]6\text{-MP}$ 、 $[^3\text{H}]AC$  はそれぞれ Commissariat A L'Energie Atomique 社、第一化学薬品株式会社から購入したものを用いた。

### 【2】in vitro 経皮吸収実験

Hartley 系雄性モルモット (体重約 250 g) を pentobarbital (40mg/kg, i.p.) で麻酔下、その背部皮膚をバリカンで除毛した後、頸動脈切開により脱血し背部皮膚を摘出した。次に、真皮側に付着した皮下脂肪を注意深く取り除き、さらに角質層側の半分に対してはテープストリッピング処理を 15 回行うことによって角質層を除去した後、正常部位および角質層除去部位から直径 3 cm の切片を各 2 片ずつ打ち抜き、フロースルー型拡散セル (有効表面積: 3.14  $\text{cm}^2$ ) に装着した。レセプター側は、streptomycin sulfate (50 mg/l; Sigma 社) および penicillin G potassium salt (30 mg/l; ナカライテスク株式会社) を含む生理食塩水を用いて 6 ml/hr で灌流した。ドナー側は、皮膚の温度および水和状態を安定化させるために、37 °C で 6 hr 生理食塩水で前処理した。生理食塩水を取り除いた後、 $[^{14}\text{C}]6\text{-MP}$  (0.011 MBq) を含有する 1 mM 6-MP 生理食塩水溶液を 1 ml 投与し、レセプター流出液を 90 min 毎に 24 hr サンプルングした。24 hr 後には、ドナー溶液を約 8 ml の水で回収した後、皮膚を拡散セルから取り外した。さらに、皮膚から直径 1 cm の切片を打ち抜き、Soluene-350 (Packard 社) で溶解した。レセプター流出液、ドナー溶液、および皮膚溶解液中の薬物の定量は、液体シンチレーション法により行った。

### 【3】分配実験

角質層シートは Kligman と Christopher の方法に準じて剥離した<sup>148)</sup>。0.1 % trypsin (trypsin, 1:250; Difco Laboratories 社) を含有する pH 7.9 Tris/HCL Buffer を浸潤させた濾紙上にモルモット背部除毛皮膚を置き、密閉した状態で 16 hr 放置した。さらに、角質層をピンセットで剥離した後、水で洗浄し乾燥させた。

角質層除去皮膚 (約 67 mg) あるいは角質層 (約 4 mg) を  $[^{14}\text{C}]6\text{-MP}$  (0.0011 MBq) を含有する 1 mM 6-MP 生理食塩水溶液 1 ml 中で 37 °C、24 hr インキュベートした。インキュベート終了後、各サンプルを重量測定した後 Soluene-350 で溶解し、液体シンチレーション法によ

り薬物量を測定した。また、インキュベート後の生理食塩水溶液中の薬物量も併せて定量し、皮膚と生理食塩水間の薬物分配係数を計算した。

#### 【4】in vivo 経皮吸収実験

Wistar 系雄性ラット (体重約 200 g) を ether 麻酔下バリカンで除毛した。24 hr 後ラットを urethane (1g/kg, i.p.) で麻酔し、膀胱にビニールチューブ (i.d. 0.50 mm, o.d. 0.90 mm; Dural 社) を挿入した。皮膚表面をウェットペーパーで軽く拭いた後、 $^3\text{H}$ ]AC (18 MBq/g) を含有する 5 % (w/w) AC polyethylene glycol 軟膏 50 mg を、有効表面積 3.14 cm<sup>2</sup> の穴の空いた薄いアクリルプレートを用いて皮膚表面に塗布し、尿を経時的にサンプリングした。尿のサンプリングは、サンプリング時間の前に生理食塩水溶液 0.2 ml をカニューレを介して 2 回注入し膀胱内を洗浄することにより行った。8 hr の吸収実験終了時にラットを屠殺後、軟膏投与部位の皮膚を摘出し、水 30 ml 中で皮膚を洗浄することによって、皮膚表面の軟膏を洗い取った。尿および皮膚サンプルは Soluene-350 で溶解後、その中に含まれる薬物量を液体シンチレーション法により定量した。また、皮膚洗浄液中の放射活性も併せて測定し、軟膏中薬物残存量とした。

#### 【5】静脈内急速投与実験

Wistar 系雄性ラット (体重約 200 g) を urethane (1g/kg, i.p.) 麻酔下、in vivo 経皮吸収実験と同様膀胱カニューレを施し、0.018 MBq/ml  $^3\text{H}$ ]AC および 0.45 mg/ml AC を含有する生理食塩水溶液 0.2 ml を大腿静脈より急速投与した後経時的に尿を回収し、尿中放射活性を測定した。

#### 【6】データ解析

##### (1) 当てはめ計算

当てはめ計算は、京都大学大型計算機センターの富士通大型計算機 M-382 上で行い、高速ラプラス逆変換アルゴリズムを用いた非線形最小二乗法プログラム MULTI(FILT) を用いてパラメータを算出した。MULTI(FILT) は、京都大学薬学部山岡清助教授より供与されたものを使用した。

##### (2) シミュレーション

シミュレーションは、京都大学大型計算機センターの富士通大型計算機 M-382 上で、高速ラプラス逆変換アルゴリズムを用いたシミュレーションプログラム FILTS あるいはそれを一部変更したプログラムを用いて行った。FILTS は、京都大学薬学部山岡清助教授より供与されたものを使用した。

## 第Ⅱ章 実験の部

### 【1】モデル薬物および吸収促進剤

1-Geranylazacycloheptan-2-one(GACH)、oleic acid はそれぞれ株式会社クラレ、日本油脂株式会社より供与されたものを用いた。*d*-limonene は和光純薬工業株式会社より購入した。

Mannitol(MT) および 6-mercaptopurine(6-MP) はナカライテスク株式会社より、cytosine  $\beta$ -arabinofuranoside(ara-C) および hydrocortisone(HC) は Sigma 社より、butylparaben(BP) は東京化成工業株式会社より購入した。5-Fluorouracil(5-FU) および acyclovir(AC) は日本ウェルカム株式会社より供与されたものを用いた。 $[^{14}\text{C}]$ MT、 $[^3\text{H}]$ AC、 $[^3\text{H}]$ HC は第一化学薬品株式会社より、 $[^{14}\text{C}]$ 5-FU および  $[^{14}\text{C}]$ 6-MP は Commissariat A L'Energie Atomique 社より購入した。

$[^{14}\text{C}]$ BP は、第一化学薬品株式会社より購入した  $[^{14}\text{C}]$ *p*-hydroxybenzoic acid から以下の手順で合成した。 $[^{14}\text{C}]$ *p*-Hydroxybenzoic acid 1.8 MBq と非標識体 1.5 mg を butanol に溶解し、少量の濃硫酸存在下 3 hr 還流した。反応液を氷水中に加えた後 ether 抽出を行い、さらに  $\text{NaHCO}_3$  水を用いて ether 層を洗浄後減圧留去した。さらに、得られた粗結晶を  $\text{CHCl}_3$  に溶解した後、シリカゲルカラムを用いて精製した(移動相  $\text{CHCl}_3$ : ether = 4:1)。こうして得られた  $[^{14}\text{C}]$ BP (比活性 0.27 MBq/mg) を吸収実験に用いた。

### 【2】octanol/水間分配係数の測定

分配実験開始前に、MT、ara-C、AC、5-FU の場合は水飽和の octanol に、6-MP、HC、BP の場合は octanol 飽和の水に、標識体および非標識体の濃度がそれぞれ 1.8 kBq/ml、0.1 mM となるように溶解した。薬物溶液 2 ml と対溶媒 2 ml と混合し、37 °C で 48 hr インキュベートした。平衡後、octanol および水層からそれぞれ 1 ml を分取し、液体シンチレーション法により薬物量を定量した。

### 【3】in vitro 経皮吸収実験

第Ⅰ章の【2】と同様の手順で摘出したモルモット背部除毛皮膚をフロースルー型拡散セルに装着した後、ドナー側に吸収促進剤を含む ethanol 溶液 0.2 ml を投与した。24 hr の前処理終了後、ドライヤーを用いて皮膚表面に残存する ethanol を留去し、放射標識体 0.018 MBq を含む薬物水溶液 1 ml を投与した。ここで投与液には、1 mM (MT、ara-C、6-MP、HC、BP) あるいは 2 mM (AC、5-FU) の濃度となるように非標識体を加えたものを用いた。以下の手順に関しては、第Ⅰ章の【2】の方法に準じて行った。

また、角質層除去皮膚を用いた実験では、24 hr 生理食塩水 1 ml で前処理後薬液 1 ml を投与した。ここで、浸透圧差によるドナーからレセプターへの水の移動を防ぐために、基剤と

して水の代わりに生理食塩水を用いた。

#### 【4】データ解析

データ解析は、第 I 章の【6】と同様の方法で行った。



## 第Ⅲ章 実験の部

### 【1】モデル薬物および吸収促進剤

モデル薬物および吸収促進剤に関しては、第Ⅱ章と同じものを用いた。

### 【2】in vitro 経皮吸収実験

Wistar 系雄性ラット (体重約 200 g) を pentobarbital (40mg/kg, i.p.) で麻酔下、その腹部をバリカンで除毛し、さらに一群のラットに対しては、テープストリッピング処理を 15 回繰り返すことによって角質層を除去した。ラットを屠殺後除毛部位皮膚を摘出し、皮下脂肪を取り除いた後、フロースルー型拡散セルに装着した。吸収促進剤を含む ethanol 溶液 0.2 ml でドナー側を 6 hr 前処理後、残存する ethanol を留去し、0.018 MBq 放射標識体を含む 1 mM の薬物水溶液 1 ml を投与した。レセプター側は常に 12 ml/hr で生理食塩水を灌流し、レセプター流出液を 45 min 毎に 12 hr サンプリングした。その他の方法に関しては、第Ⅱ章の【3】に準じて行った。

### 【3】in vivo 経皮吸収実験

in vivo 経皮吸収実験は基本的に【2】の in vitro 吸収実験と対応した形で行った。Wistar 系雄性ラット (体重約 200 g) を urethane (1g/kg, i.p.) で麻酔下、その腹部をバリカンで除毛し、さらに一群のラットに対しては、テープストリッピング処理を 15 回繰り返すことによって角質層を除去した。皮膚表面をウェットペーパーで軽く拭いた後、円筒状のガラスセル (有効表面積 3.14 cm<sup>2</sup>) をアロンアルファ A (三共株式会社) を用いて除毛部位に固定し、吸収促進剤の前処理を行った。また、6 hr の前処理終了直前に第Ⅰ章の【4】と同様の方法で膀胱カニューレーションを施し、皮膚表面の ethanol を留去後、薬物水溶液 1 ml を投与し、尿中排泄を測定した。

### 【4】データ解析

データ解析は、第Ⅰ章の【6】と同様の方法で行った。

## 引用文献

- 1) J. E. Shaw and S. K. Chandrasekaran, *Drug Metab. Rev.* **8**: 223 (1978).
- 2) W. R. Good, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **9**: 647 (1983).
- 3) Y. W. Chien, P. R. Keshary, Y. C. Huang, and P. P. Sarpotdar, *J. Pharm. Sci.* **72**: 968 (1983).
- 4) D. Arndts and K. Arndts, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **26**: 79 (1984).
- 5) M. S. Powers, L. Schenkel, P. E. Darley, W. R. Good, J. C. Balestra, and V. A. Place, *Am. J. Obstet. Gynecol.* **152**: 1099 (1985).
- 6) R. J. Chetokowski, D. R. Meldrum, K. A. Steingold, D. Randle, J. K. Luk, P. Eggena, J. M. Hershman, N. K. Alkjaersig, A. P. Fletcher, and H. I. Judd, *N. Engl. J. Med.* **314**: 1615 (1986).
- 7) B. Berner, G. C. Mazzenga, P. M. Gargiulo and R. Steffens, *J. Controlled Release*, **20**, 13 (1992).
- 8) W. I. Higuchi, in *Transdermal Delivery of Drugs*. Vol. III (A. F. Kydonieus and B. Berner, eds.), CRC Press, Boca Raton, 1987, p. 43.
- 9) K. B. Sloan, in *Prodrugs: Topical and Ocular Drug Delivery* (K. B. Sloan, ed.), Marcel Dekker, New York, 1992, p. 17.
- 10) J. Hadgraft, *Pharm. Int.* **5**: 252 (1984).
- 11) A. C. Williams and B. W. Barry, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **9**: 305 (1992).
- 12) R. R. Burnette, in *Transdermal Drug Delivery: Development Issues and Research Initiatives* (J. Hadgraft and R. H. Guy, eds.), Marcel Dekker, New York, 1988, p. 247.
- 13) C. Cullander and R. H. Guy, *Adv. Drug Delivery Rev.* **8**: 291 (1992).
- 14) T. Higuchi, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **36**: 85 (1960).
- 15) R. J. Scheuplein and I. H. Blank, *Physiol. Rev.* **81**: 702 (1971).
- 16) A. S. Michaels, S. K. Chandrasekaran, and J. E. Shaw, *AIChE J.* **21**: 985 (1975).
- 17) C. D. Yu, J. L. Fox, N. F. H. Ho, and W. I. Higuchi, *J. Pharm. Sci.* **68**: 1341 (1979).
- 18) B. Berner and E. R. Cooper, in *Transdermal Delivery of Drugs* Vol. II (A. F. Kydonieus and B. Berner, eds.), CRC Press, Boca Raton, 1987, p. 41.
- 19) A.-H. Ghanem, H. Mahmoud, W. I. Higuchi, U. D. Rohr, S. Borsadia, P. Liu, J. L. Fox, and W. R. Good, *J. Controlled Release*, **6**: 75 (1987).
- 20) K. Tojo, C. C. Chiang, and Y. W. Chien, *J. Pharm. Sci.* **76**: 123 (1987).
- 21) S. M. Wallace and G. Barnett, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **6**: 315 (1978).
- 22) R. H. Guy, J. Hadgraft, and H. I. Maibach, *Int. J. Pharm.* **11**: 119 (1982).
- 23) R. H. Guy and J. Hadgraft, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **11**: 189 (1983).
- 24) K. Kubota, *J. Pharm. Sci.* **80**: 502 (1991).
- 25) K. Sato, T. Oda, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 2232 (1988).
- 26) K. Kubota and T. Ishizaki, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **13**: 55 (1985).
- 27) K. Kubota and T. Yamada, *J. Pharm. Sci.* **79**: 1015 (1990).
- 28) K. Kakemi, H. Kameda, M. Kakemi, M. Ueda, and T. Koizumi, *Chem. Pharm. Bull.* **23**: (1975).
- 29) B. Berner and E. R. Cooper, *J. Membr. Sci.* **14**: 139 (1983).

- 30) K. Tojo, *J. Chem. Eng. Japan* **20**: 300 (1987).
- 31) T. Hosono, *Radio Sci.* **16**: 1015 (1981).
- 32) Y. Yano, K. Yamaoka, and H. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1035 (1989).
- 33) M. Hashida, H. Okamoto, and H. Sezaki, *J. Pharmacobio-Dyn.* **11**: 636 (1988).
- 34) Y. Yano, K. Yamaoka, Y. Aoyama, H. Tanaka, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **17**: 179 (1989).
- 35) Y. Yano, K. Yamaoka, H. Yasui, and T. Nakagawa, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **19**: 71 (1990).
- 36) H. Yasui, K. Yamaoka, and T. Nakagawa, *J. Pharm. Sci.* **83**: 819 (1994).
- 37) E. Nara, M. Masegi, T. Hatono, M. Hashida, *Pharm. Res.* **9**: 161 (1992).
- 38) H. Okamoto, F. Yamashita, K. Saito, and M. Hashida, *Pharm. Res.* **6**: 931 (1989).
- 39) F. Yamashita, Y. Koyama, H. Sezaki, and M. Hashida, *Int. J. Pharm.* **89**: 199 (1993).
- 40) F. Yamashita, T. Yoshioka, Y. Koyama, H. Okamoto, H. Sezaki, and M. Hashida, *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 690 (1993).
- 41) F. Yamashita, H. Bando, Y. Koyama, S. Kitagawa, Y. Takakura, and M. Hashida, *Pharm. Res.* **11**: 185 (1994).
- 42) L. A. Goldsmith and H. P. Baden, *Nature (London)* **225**: 1052 (1970).
- 43) B. W. Barry, *Dermatological Formulation*, Marcel Dekker, New York, 1983.
- 44) M. K. Nemanic and P. M. Elias, *J. Histochem. Cytochem.* **28**: 573 (1980).
- 45) P. M. Elias, E. R. Cooper, A. Korc, and B. E. Brown, *J. Invest. Dermatol.* **76**: 297 (1981).
- 46) M. L. Williams and P. M. Elias, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **3**: 95 (1986).
- 47) A. S. Michaels, S. K. Chandrasekaran, J. E. Shaw, *AIChE J.* **21**: 985 (1975).
- 48) K. Tojo, *J. Pharm. Sci.* **76**: 889 (1987).
- 49) B. Illel, H. Schaefer, J. Wepierre, and O. Doucet, *J. Pharm. Sci.* **80**: 424 (1991).
- 50) R. T. Tregear, *J. Invest. Dermatol.* **46**: 16 (1966).
- 51) J. E. Wahlberg, *Acta Dermato-Venereol.* **48**: 549 (1968).
- 52) B. Idson and C. R. Behl, in *Transdermal Delivery of Drugs*. Vol. III (A. F. Kydonieus and B. Berner, eds.), CRC Press, Boca Raton, 1987, p. 85.
- 53) C. Ackerman, G. L. Flynn, and W. M. Smith, *Int. J. Pharm.* **36**: 67 (1987).
- 54) G. L. Flynn, in *Principles of Route-to-Route Extrapolation for Risk Assessment* (T. R. Gerrity and C. J. Henry, eds.), Elsevier, New York, 1990, p. 93.
- 55) T. Hatanaka, M. Inuma, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 3452 (1990).
- 56) スピーゲル著 (土井 誠訳)、ラプラス変換、マグロウヒル、1982.
- 57) K. Yamaoka, T. Nakagawa, and T. Uno, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **6**: 547 (1978).
- 58) D. J. Cutler, *J. Pharm. Pharmacol.* **30**: 476 (1978).
- 59) Y. Tanigawara, K. Yamaoka, T. Nakagawa, and T. Uno, *Chem. Pharm. Bull.* **30**: 2174 (1982).
- 60) K. Yamaoka, T. Nakagawa, and T. Uno, *J. Pharm. Pharmacol.* **35**: 19 (1982).
- 61) Y. Tanigawara, K. Yamaoka, T. Nakagawa, and T. Uno, *J. Pharm. Sci.* **71**: 1129 (1982).
- 62) T. Kakutani, K. Yamaoka, M. Hashida, and H. Sezaki, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **13**: 609 (1985).

- 63) K. Nishida, C. Tonegawa, T. Kakutani, M. Hashida, and H. Sezaki, *Pharm. Res.* **6**: 140 (1989).
- 64) R. Hori, Y. Tanigawara, Y. Saito, Y. Hayashi, T. Aiba, K. Okumura, and A. Kamiya, *J. Pharm. Sci.* **77**: 471 (1988).
- 65) K. Ohkouchi, H. Imoto, Y. Takakura, M. Hashida, and H. Sezaki, *Cancer Res.* **50**: 1640 (1990).
- 66) E. Nara, T. Hatono, M. Hashida, and H. Sezaki, *J. Pharm. Pharmacol.* **43**: 272 (1991).
- 67) K. Mihara, M. Mori, T. Hojo, Y. Takakura, H. Sezaki, and M. Hashida, *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 158 (1993).
- 68) C. Ackermann and G. L. Flynn, *Int. J. Pharm.* **36**: 61 (1987).
- 69) K. Tojo, *Int. J. Pharm.* **43**: 201 (1988).
- 70) R. L. Bronaugh and R. F. Stewart, *J. Pharm. Sci.* **73**: 1255 (1984).
- 71) R. L. Bronaugh, in *Percutaneous Absorption* 2nd Ed. (R. L. Bronaugh and H. I. Maibach, eds.), Marcel Dekker, New York, 1989, p.239.
- 72) R. A. Siegel, *J. Phys. Chem.* **93**: 2556 (1991).
- 73) K. Kubota, M. Sznitowska, and H. I. Maibach, *J. Pharm. Sci.* **82**: 450 (1993).
- 74) G. L. Flynn, H. Dürrhein, and W. I. Higuchi, *J. Pharm. Sci.* **70**: 52 (1981).
- 75) R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, and E. R. Congdon, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **62**: 481 (1982).
- 76) R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, and E. R. Congdon, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **34**: 127 (1983).
- 77) R. J. Sheuplain and L. J. Morgan, *Nature* **214**: 456 (1967).
- 78) M. Takehara, T. Nakagawa, Y. Ushio, K. Nakahara, and H. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.* **24**: 1779 (1976).
- 79) K. Tojo and A. C. Lee, *J. Invest. Dermatol.* **92**: 105 (1989).
- 80) H. J. Schaeffer, L. Beauchamp, P. De Miranda, G. B. Elion, D. J. Bauer, and P. Collins, *Nature* **272**: 583 (1978).
- 81) 新村真人、本田まりこ、西川武二、繁益弘志、肥田野 信、川島 真、西脇宗一、漆畑修、牧野寒河江、手塚 正、*臨床医薬* **8**: 281 (1992).
- 82) 新村真人、本田まりこ、西川武二、川島 真、安野洋一、石井 淳、*臨床医薬* **8**: 289 (1992).
- 83) 新村真人、横井 清、青木育子、山口万理子、安田耕太郎、大西明弘、*臨床医薬* **6**: 15 (1990).
- 84) A. Rescigno and G. Segre, *Drug and Tracer Kinetics*, Blaisdell Publishing, Waltham, 1966, p.102.
- 85) J. G. Wagner and E. Nelson, *J. Pharm. Sci.* **53**: 1392 (1964).
- 86) J. C. K. Loo and S. Riegelman, *J. Pharm. Sci.* **57**: 918 (1968).
- 87) H. Kiwada, K. Morita, M. Hayashi, S. Awazu, and M. Hanano, *Chem. Pharm. Bull.* **25**: 1312 (1977).
- 88) 山岡 清、谷川原祐介、マイコンによる薬物速度論入門、南江堂、1983、p. 91.
- 89) R. J. Scheuplein, *J. Invest. Dermatol.* **48**: 79 (1967).
- 90) H. Okamoto, M. Ohyabu, M. Hashida, and H. Sezaki, *J. Pharm. Pharmacol.* **39**: 531 (1987).
- 91) H. Okamoto, H. Tsukahara, M. Hashida, and H. Sezaki, *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 4605 (1987).

- 92) H. Okamoto, M. Hashida, and H. Sezaki, *J. Pharm. Sci.* **77**: 418 (1988).
- 93) B. W. Barry, *J. Controlled Release* **6**: 85 (1987).
- 94) J. A. Bouwstra, L. J. C. Peschier, J. Brussee, and H. E. Boddé, *Int. J. Pharm.* **52**: 47 (1989).
- 95) G. M. Golden, J. E. Mckie, R. O. Potts, *J. Pharm. Sci.* **76**: 25 (1986).
- 96) M. L. Francoeur, G. M. Golden, and R. O. Potts, *Pharm. Res.* **7**: 621 (1990).
- 97) H. Okamoto, M. Hashida, and H. Sezaki, *J. Pharm. Sci.* **80**: 39 (1991).
- 98) H. Okamoto, K. Muta, M. Hashida, and H. Sezaki, *Pharm. Res.* **7**: 64 (1990).
- 99) Y. Obata, K. Takayama, Y. Machida, and T. Nagai, *Drug Design Discovery* **8**: 137 (1991).
- 100) B. W. Barry and S. L. Bennett, *J. Pharm. Pharmacol.* **39**: 535-546 (1987).
- 101) R. H. Guy and J. Hadgraft, *J. Controlled Release* **5**: 43 (1987).
- 102) A. C. Williams and B. W. Barry, *Int. J. Pharm.* **74**: 157 (1991).
- 103) R. Collander, *Acta Chem. Scand.* **5**: 774 (1951).
- 104) A. Leo, C. Hansch, and D. Elkins, *Chem. Rev.* **71**: 525 (1971).
- 105) C. Hansch and W. J. Dunn, III, *J. Pharm. Sci.* **61**: 1 (1972).
- 106) A. J. I. Ward and R. Tallon, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **14**: 1155 (1987).
- 107) D. L. Sekura and J. Scala, *Adv. Biol. Skin* **12**: 257 (1972).
- 108) B. J. Aungst, N. R. Rogers, and E. Shefter, *Int. J. Pharm.* **33**: 225 (1986).
- 109) H. Sasaki, M. Kojima, Y. Mori, J. Nakamura, and J. Shibasaki, *Int. J. Pharm.* **44**: 15 (1988).
- 110) M. Hori, S. Satoh, H. I. Maibach, in *Percutaneous Absorption* 2nd Ed. (R. L. Bronaugh and H. I. Maibach, eds.), Marcel Dekker, New York, 1989, p.197.
- 111) A. C. Williams and B. W. Barry, *Pharm. Res.* **8**: 17 (1991).
- 112) H. Okabe, K. Takayama, A. Ogura, and T. Nagai, *Drug Design Delivery* **4**: 313 (1989).
- 113) Y. Obata, K. Takayama, H. Okabe, and T. Nagai, *Drug Design Delivery* **6**: 319 (1990).
- 114) M. Hori, S. Sato, H. I. Maibach, and R. H. Guy, *J. Pharm. Sci.* **80**: 32 (1991).
- 115) E. R. Cooper, *J. Pharm. Sci.* **73**: 1153 (1984).
- 116) M. Yamada and Y. Uda, *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 3390 (1987).
- 117) P. G. Green, R. H. Guy, and J. Hadgraft, *Int. J. Pharm.* **48**: 103 (1988).
- 118) B. Ongpipattantakul, R. R. Burnette, R. O. Potts, and M. L. Francoeur, *Pharm. Res.* **8**: 350 (1991).
- 119) R. O. Potts and R. H. Guy, *Pharm. Res.* **9**: 663 (1992).
- 120) M. H. Cohen and D. Turnbull, *J. Chem. Phys.* **31**: 1164 (1959).
- 121) W. R. Lieb and W. D. Stein, *Nature* **224**: 240 (1967).
- 122) W. R. Lieb and W. D. Stein, *J. Membr. Biol.* **92**: 111 (1986).
- 123) M. Goodman and B. W. Barry, *J. Pharm. Pharmacol.* **38**(Suppl.): 71P (1986).
- 124) A. C. Williams and B. W. Barry, *J. Pharm. Pharmacol.* **42**(Suppl.): 156P (1990).
- 125) W. J. Lambert, W. I. Higuchi, K. Knutson, and S. L. Krill, *Pharm. Res.* **6**: 798 (1989).
- 126) J. A. Dix, D. Kivelson, and J. M. Diamond, *J. Membr. Biol.* **40**: 315 (1978).
- 127) K. B. Bischoff and R. L. Dedrick, *J. Pharm. Sci.* **57**: 1346 (1968).

- 128) 杉山雄一、*薬学雑誌* 109: 231 (1989).
- 129) 杉山雄一編、*ファーマコキネティクス研究の方法と技術*、日本薬物動態学会、1993
- 130) R. B. Stoughton, in *Animal Models in Dermatology* (H. I. Maibach ed.), Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1975, p.121.
- 131) M. J. Bartek, J. A. LaBudde, and H. I. Maibach, *J. Invest. Dermatol.* **58**: 114 (1972).
- 132) M. Walker, P. H. Dugard, and R. C. Scott, *Hum. Toxicol.* **2**: 561 (1983).
- 133) R. C. Wester and H. I. Maibach, in *Percutaneous Absorption 2nd Ed.* (R. L. Bronaugh and H. I. Maibach, eds.), Marcel Dekker, New York, 1989, p.221.
- 134) K. Sato, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, H. Omiya, and N. Enomoto, *J. Pharm. Pharmacol.* **41**: 379 (1989).
- 135) T. J. Franz, *J. Invest. Dermatol.* **64**: 190 (1975).
- 136) R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, E. R. Congdon, and A. L. Giles, Jr., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **62**: 474 (1982).
- 137) R. L. Bronaugh and H. I. Maibach, *J. Invest. Dermatol.* **84**: 180 (1985).
- 138) R. L. Bronaugh and T. J. Franz, *Br. J. Dermatol.* **115**: 1 (1986).
- 139) F. Yamashita, Y. Koyama, M. Kitano, Y. Takakura, and M. Hashida, *Int. J. Pharm.*, in press.
- 140) W. Meyer, R. Schwarz, and K. Neurand, *Curr. Probl. Dermatol.* **7**: 39 (1978).
- 141) H. Durrheim, G. L. Flynn, W. I. Higuchi, and C. R. Behl, *J. Pharm. Sci.* **69**: 781 (1980).
- 142) W. J. Lambert, W. I. Higuchi, K. Knutson, and S. L. Krill, *J. Pharm. Sci.* **78**: 925 (1989).
- 143) R. T. Tregear, *Physical Functions of Skin*, Academic Press, New York, 1966, p.1.
- 144) B. Idson, *J. Pharm. Sci.* **64**: 901 (1975).
- 145) H. Oishi, Y. Ushio, K. Narahara, and M. Takehara, *Chem. Pharm. Bull.* **24**: 1765 (1976).
- 146) A. Rougier, C. Lotte, P. Corcuff, and H. I. Maibach, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **39**: 15 (1988).
- 147) J. R. Bond and B. W. Barry, *J. Invest. Dermatol.* **90**: 486 (1988).
- 148) A. L. Kligman and E. Christophers, *Arch. Dermatol.* **88**: 70 (1963).