皮膚拡散モデルに基づく皮膚中薬物濃度勾配の評価

瀬古則貴^{*1)}, 坂東博人・山下富義・高倉喜信・橋田 充^{*2)}*Estimation of drug concentration profiles in skin based on a skin diffusion model*

This study was carried out to determine the possibility of estimating drug concentration profiles in skin via a diffusion model. In an *in vitro* permeation study using butylparaben as model drug, percent of drug permeated amounted to approximately 57% and 76% for intact and stripped skin respectively, suggesting that the drug itself highly permeated through the stratum corneum. On the other hand, *in vivo* absorption study revealed that concentration of butylparaben decreased with skin depth where the maximum was achieved at approximately 30 min and thereafter decreased gradually with time. In order to analyze both *in vitro* and *in vivo* percutaneous drug absorptions, Laplace transformed equations were derived based on four different kinds of hypothetical diffusion models. Initially, diffusion and partition parameters for butylparaben was calculated by curve-fitting using nonlinear regression program combined with a fast Laplace transform algorithm (MULTI(FILT)). Using these parameters, further simulation studies of *in vivo* drug concentration profiles were carried out. When washout process due to blood flow was not taken into consideration, the decline of drug concentration profiles could hardly be stimulated. However, when model considering washout process to have occurred at the specific range in the dermis (50-200 μm from the stratum corneum/dermis boundary), this could fit the actual concentration profiles of butylparaben in skin well. Thus, this study demonstrated that the diffusion model enables us to evaluate the *in vivo* behavior of drug in skin.

Noritaka Seko^{*1)}, Hiroto Bando・
Fumiyoshi Yamashita・Yoshinobu Takakura・
Mitsuru Hashida^{*2)}**key words :** butylparaben, drug concentration in skin,
diffusion model, percutaneous absorption

近年、皮膚は局所治療のみならず全身治療を目的とした薬物投与経路の一つとして注目を集めており、経皮吸収製剤の開発が活発に進められている¹⁻³⁾。こうした経皮吸収製剤の有効性・安全性を議論するためには、全身への薬物吸収速度のみならず、局所における薬物動態を含めた総合的解析が必要と考えられるが、現在のところ皮膚内における薬物挙動を解析する方法論は確立されていない。

筆者らはこれまでに皮膚拡散モデルに基づく経皮吸収動態の解析法を開発し、薬物物性と皮膚透過の関係および経皮吸収促進法の作用機序について議論してきたが⁴⁻¹¹⁾、本解析法は Fick の拡散法則を基盤としたものであり、薬物の皮膚内挙動を評価するうえでも有用なアプローチとなりうると考えられる。そこで本研究では、皮膚を角質層とそれ以下の層の二層からなると捉えた二枚膜皮膚拡散モデルに基づいて *in vivo* における皮膚中薬物濃度の推定を試みた。また、実際に薬物を経皮投与したときの皮膚中薬物濃度を測定し、シミュレーションの結果と比較することによって理論検証するとともに、*in vivo* における薬物の皮膚内挙動に関する考察を行った。

方 法

(1) 動物およびモデル薬物

実験には Wistar 系雄性ラット(体重約 200 g)を用いた。またモデル薬物には ¹⁴C-butylparaben を用いた。¹⁴C-butylparaben は ¹⁴C-p-hydrox-

^{*1)} Kawanishi Pharmaceutical Research Institute, Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd. 日本ベーリンガーインゲルハイム(株)川西医薬研究所 製剤研究部

^{*2)} Department of Drug Delivery Research, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University 京都大学薬学部薬剤学教室

Offprint requests to : Noritaka Seko, Kawanishi Pharmaceutical Research Institute, Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd., 3-10-1, Yato, Kawanishi 666-01

表 1 Hypothetical expressing *in vivo* percutaneous drug absorption skin diffusion models

mass balance equations		boundary conditions	initial conditions
Model 1	SC: $\frac{\partial C_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2}$	$(x = -20\mu\text{m}) C_1 = K_1 C_d$	$C_1 = 0 \quad (-20\mu\text{m} \leq x \leq 0)$
		$V_d \frac{\partial C_d}{\partial t} = D_1 A \frac{\partial C_1}{\partial x}$	$C_2 = 0 \quad (0 \leq x \leq \infty)$
	VE & D: $\frac{\partial C_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 C_2}{\partial x^2}$	$(x = 0) \quad C_2 = \frac{K_2}{K_1} C_1$ $D_1 A \frac{\partial C_1}{\partial x} = D_2 A \frac{\partial C_2}{\partial x}$ $(x = \infty) \quad C_2 = 0$	
Model 2	SC: $\frac{\partial C_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2}$	$(x = -20\mu\text{m}) C_1 = K_1 C_d$	$C_1 = 0 \quad (-20\mu\text{m} \leq x \leq 0)$
		$V_d \frac{\partial C_d}{\partial t} = D_1 A \frac{\partial C_1}{\partial x}$	$C_2 = 0 \quad (0 \leq x \leq 200\mu\text{m})$
	VE & D: $\frac{\partial C_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 C_2}{\partial x^2}$	$(x = 0) \quad C_2 = \frac{K_2}{K_1} C_1$ $D_1 A \frac{\partial C_1}{\partial x} = D_2 A \frac{\partial C_2}{\partial x}$ $(x = 200\mu\text{m}) C_2 = 0$	
Model 3	SC: $\frac{\partial C_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2}$	$(x = -20\mu\text{m}) C_1 = K_1 C_d$	$C_1 = 0 \quad (-20\mu\text{m} \leq x \leq 0)$
		$V_d \frac{\partial C_d}{\partial t} = D_1 A \frac{\partial C_1}{\partial x}$	$C_2 = 0 \quad (0 \leq x \leq \infty)$
	VE & D: $\frac{\partial C_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 C_2}{\partial x^2} - kC_2$	$(x = 0) \quad C_2 = \frac{K_2}{K_1} C_1$ $D_1 A \frac{\partial C_1}{\partial x} = D_2 A \frac{\partial C_2}{\partial x}$ $(x = \infty) \quad C_2 = 0$	
Model 4	SC: $\frac{\partial C_1}{\partial t} = D_1 \frac{\partial^2 C_1}{\partial x^2}$	$(x = -20\mu\text{m}) C_1 = K_1 C_d$	$C_1 = 0 \quad (-20\mu\text{m} \leq x \leq 0)$
		$V_d \frac{\partial C_d}{\partial t} = D_1 A \frac{\partial C_1}{\partial x}$	$C_2 = 0 \quad (0 \leq x \leq 50\mu\text{m})$
	VE & D:		$C_3 = 0 \quad (50\mu\text{m} \leq x \leq 200\mu\text{m})$
	$(0 \leq x \leq 50\mu\text{m}) \quad \frac{\partial C_2}{\partial t} = D_2 \frac{\partial^2 C_2}{\partial x^2}$	$(x = 0) \quad C_2 = \frac{K_2}{K_1} C_1$ $D_1 A \frac{\partial C_1}{\partial x} = D_2 A \frac{\partial C_2}{\partial x}$	$C_4 = 0 \quad (200\mu\text{m} \leq x \leq \infty)$
	$(50\mu\text{m} \leq x \leq 200\mu\text{m}) \quad \frac{\partial C_3}{\partial t} = D_3 \frac{\partial^2 C_3}{\partial x^2} - kC_3$		
	$(200\mu\text{m} \leq x \leq \infty) \quad \frac{\partial C_4}{\partial t} = D_4 \frac{\partial^2 C_4}{\partial x^2}$	$(x = 50\mu\text{m}) \quad C_3 = C_2$ $D_2 A \frac{\partial C_2}{\partial x} = D_3 A \frac{\partial C_3}{\partial x}$ $(x = 200\mu\text{m}) \quad C_4 = C_3$ $D_3 A \frac{\partial C_3}{\partial x} = D_4 A \frac{\partial C_4}{\partial x}$ $(x = \infty) \quad C_4 = 0$	

S.C. : stratum corneum

C : concentration

D : diffusion coefficient

K : partition coefficient

VE&D : viable epidermis and dermis

V : volum

A : effective area

k : clearance

図1 *In vitro* penetration profiles of butylparaben through intact (●) and tape-stripped (△) rat skin

ybenzoic acid (Sigma) を用いて Fisher 法により合成した。その他、使用した試薬はすべて特級試薬を用いた。

(2) 皮膚中薬物濃度の測定

Wistar 系雄性ラット (体重約 200 g) にウレタン麻酔を行い、電気バリカンで腹部を除毛した後、ガラスセル (有効面積 3.14 cm^2) をアロンアルファ® (三共) で接着した。6 時間後、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の放射標識体を含む 1 mM に調製した ^{14}C -butylparaben 水溶液 1 ml を投与した。経時的に rat を屠殺した後ドナー溶液を回収し、投与部位直下の組織を切り取った。得られたサンプルは、その厚みを変化させないように注意しながらスライドガラスで挟み、表面を水平に保った状態で -85°C で急速冷凍させた。凍結した皮膚はクリオスタットを用いて^{12,13)}、皮膚表面から $100 \mu\text{m}$ の深さまでは $20 \mu\text{m}$ の厚みで、その後 $740 \mu\text{m}$ までは $80 \mu\text{m}$ の厚みでスライスした。皮膚薄片は重量測定後 Soluene-350 を加えて溶解し、溶体シンチレーションカウンターを用いてその放射活性を測定した。

(3) *in vivo* 皮膚透過実験

in vitro 皮膚透過実験は、すでに報告した方法に準じて行った。電気バリカンでラット腹部を除毛後、皮膚を摘出し、フローズルー型拡散セルに装着した。6 時間皮膚を水和させた後、 $0.5 \mu\text{Ci}$ の

表2 Skin penetration parameters of butylparaben based on a two-layer diffusion model

	Diffusion parameters (hr^{-1})	Partition parameters (cm^3)
Stratum corneum	9.62	0.0325
Viable epidermis and dermis	0.0937	5.11

Diffusion and partition parameters are D/L^2 and $K \cdot A \cdot L$, respectively.

D : diffusion coefficient. L : length. K : partition coefficient. A : effective area

放射標識体を含む 1 mM に調製した ^{14}C -butylparaben 水溶液 1 ml をドナー側に投与した。レセプター側はペニシリン G (30 mg/l , 和光純薬工業), およびストレプトマイシン (50 mg/l , Sigma) を含む生理食塩水を 12 ml/hr で灌流し、流出液を経時的にサンプリングした。また角質層を 15 回テープストリッピングした皮膚に対し、6 時間生食塩水で前処理した後、同様の透過実験を行った。薬物の定量は液体シンチレーション法により行った。

(4) モデル解析とシミュレーション

皮膚は角質層と生きた表皮および真皮層の二層で構成されと考え、さらに、① 薬物は無限に拡散するだけで皮膚からの消失は起こらない (model 1), ② 皮膚表面から $220 \mu\text{m}$ の位置で血流による除去を受ける (model 2), ③ 薬物は無限に拡散し、血流による除去は生きた表皮および真皮層内で均一に起こる (model 3), ④ 薬物は無限に拡散し、血流による除去は生きた表皮および真皮層のある限られた部分で起こる (model 4), という 4 種類の条件を仮定した皮膚拡散モデルをそれぞれ構築した。

表1には各モデルに対する物質収支式 (Fick の第2式)、境界条件および初期条件を示した。これらの式に基づいて、ラプラス次元での累積透過量および皮膚中薬物濃度の式を誘導した。これらの式に必要な各層における分配および拡散に関するパラメータは、高速ラプラス逆変換アルゴリズム (FILT) を利用した非線形最小二乗法プログラム MULTI (FILT)¹⁴⁾ を用いて、ラプラス次元での累積透過量の式を *in vitro* 透過曲線にあてはめるこ

図2 Time course of drug concentration profiles in skin after 30 min (□), 1 hr (◇), 2 hr (○) and 4 hr (△) percutaneous application of butylparaben under *in vivo* condition

図3 Simulation of concentration gradient profiles in rat skin at 30 min (—), 1 hr (·····), 2 hr (-----) and 4 hr (----) based on model 1
(A) : normal plot. (B) : semilogarithmic plot

とにより算出した。皮膚中薬物濃度勾配のシミュレーションは、FILTを利用したシミュレーションプログラム FILTS¹⁴⁾を用いて行った。ただし、角質層以下の層での拡散係数および分配係数は一様であると仮定した。

結果と考察

(1) *in vitro* 皮膚透過実験

Butylparabenの水溶液を投与した場合のレセプター側への累積透過曲線を図1に示した。テープストリッピングにより角質層を除去することによって、ラグタイムが若干減少する傾向が認めら

れたものの、12時間までの累積透過量は、intact skinでは約57%、stripped skinでは約76%であり、両者の間でそれほど顕著な差は認められなかった。この結果より、butylparabenは角質層透過性のきわめてすぐれた薬物であることが示唆された。またMULTI(FILT)を用いたあてはめ計算により、角質層と生きた表皮および真皮層の各層における分配パラメータと拡散パラメータが得られた(表2)。

(2) 皮膚中薬物濃度の測定

in vivo で butylparaben の水溶液を投与した場合の皮膚中薬物濃度の経時的变化を図2に示し

図 4 Simulation of concentration gradient profiles in rat skin at 30 min(—), 1 hr(·····), 2 hr(-----) and 4 hr(-·-·-) based on model 2
(A) : normal plot. (B) : semilogarithmic plot

図 5 Simulation of concentration gradient profiles in rat skin at 30 min(—), 1 hr(·····), 2 hr(-----) and 4 hr(-·-·-) based on model 3
(A) : normal plot. (B) : semilogarithmic plot

た。いずれの適用時間でも皮膚深部ほど薬物濃度は低くなったが、最深部でもその値は“0”にはならず、皮下組織や筋肉組織まで移行することが示唆された。適用後 15 min ですでに薬物の皮膚深部への拡散が認められ(図 2 には示していない)、皮膚中薬物濃度は適用後 30 min で最大に達した。その後ドナー溶液中の薬物濃度の減少にともない、皮膚中薬物濃度は徐々に減少し、適用後 4 hr ではほとんど認められなくなった。また図 2 B のように片対数プロットを行った場合には、皮膚中薬物濃度勾配に 2 相性が認められ、いずれの適用

時間でも皮膚表面から約 200 μm の距離までは皮膚中薬物濃度勾配が大きく、それ以下では小さくなる傾向が認められた。

(3) モデル解析とシミュレーション

モデル解析法より得られた分配パラメータおよび拡散パラメータ(表 2)を用いて、*in vivo* における皮膚中薬物濃度のシミュレーションを行った(図 3~図 6)。薬物は単に皮膚内を無限に拡散するだけで血流による除去を受けないと仮定した model 1 では、皮膚中薬物濃度は適用時間が長くなるほど、皮膚深部の薬物濃度が増加する傾向が

図6 Simulation of concentration gradient profiles in rat skin at 30 min(—), 1 hr(.....), 2 hr(-----) and 4 hr(- - - -) based on model 4
(A) : normal plot. (B) : semilogarithmic plot

示された(図3). このシミュレーション結果は、適用時間 30 min で皮膚深部の薬物濃度が最大となった実測値とは大きく異なり、皮膚中薬物濃度を予測するためには、皮膚内での血流による除去のプロセスをモデルの中に組み込む必要が示された。以下の検討では、皮膚内での薬物の血流による除去の過程に対し、いくつかの異なった条件を仮定しシミュレーションを行った。

まず薬物は表皮層を透過後、真皮上部に発達している皮膚の毛細血管で除去を受け、薬物濃度が“0”になると仮定したモデル(model 2)を用いてシミュレーションを行った(図4)。薬物消失を考慮することにより、皮膚中薬物濃度勾配は実測値とほぼ同様の傾向を示したが、皮膚中薬物濃度の実測からも明らかなように、薬物の皮膚深部への拡散が認められたことから、必ずしもシンク条件を仮定するのは適切ではないと考えられた。そこで、皮膚中での血流による薬物除去過程に対して、皮膚内での分布を考慮したモデルを構築した(model 3, 4)。

Model 3 では薬物は無限に拡散しながら生きた表皮、および真皮層に均一に分布した血流により一次消失($K_{el}=3\text{ hr}^{-1}$)することを仮定した。その結果、図5Aに示されるように皮膚中薬物濃度、およびその勾配の経時変化パターンは実測値と基本的によく似た傾向を示したが、図5Bで示さ

れるように、本モデルでは実測値で認められたような2相性の濃度勾配は説明できなかった。この結果より、実測値のような2相性の濃度勾配を得るためには、生きた表皮および真皮層で薬物が均一に消失するのではなく、生きた表皮および真皮層の一定の部分で消失することを考慮しなければならないことが示唆された。

Model 4 では、薬物は無限に拡散し、生きた表皮および真皮層のある一定の部分(皮膚表面から $70\text{ }\mu\text{m}$ ~ $220\text{ }\mu\text{m}$ の位置)で血流により一次消失($K_{el}=5\text{ hr}^{-1}$)すると仮定し、シミュレーションを行った(図6)。その結果、皮膚中薬物濃度およびその勾配の経時変化や2相性の濃度勾配は、実測値のパターンとほぼ同様の傾向を示した。

以上の結果から、*in vivo* における皮膚内の薬物挙動の推定においては、皮膚を角質層とそれ以下の層の二層からなるとみなしたうえで、投与された薬物は各層を受動拡散によって移行し、ある割合の薬物が生きた表皮、および真皮層の上部において血流により除去されることを考慮したモデルがもっとも適していると考えられる。本モデル解析では butylparaben の放射標識体を用いて検討を行ったが、筆者らはすでに butylparaben は皮膚中で酵素的に分解されることを報告しており¹⁵⁾、皮膚内での代謝過程を考慮した総合的なモデルを構築することで、より一層精度の高い局所

動態解析が可能になると思われる。

文 献

- 1) Short SM, Paasch BD, Turner JH, Weiner N, Daugherty AL, Mrsny RJ : Percutaneous absorption of biologically-active interferon-gamma in a human skin graft-nude mouse model. *Pharm. Res.* 13 : 1020, 1996.
- 2) Inoue N, Kobayashi D, Kimura M, Toyama M, Sugawara I, Itoyama S, Ogihara M, Sugibayashi K, Morimoto Y : Fundamental investigation of a novel drug delivery system, a transdermal delivery system with jet injection. *Int. J. Pharm.* 137 : 75, 1996.
- 3) Beall HD, Sloan KB : Transdermal delivery of 5-fluorouracil (5-FU) by 1-alkylcarbonyl-5-FU prodrugs. *Int. J. Pharm.* 129 : 203, 1996.
- 4) Yamashita F, Yoshioka T, Koyama Y, Okamoto H, Sezaki H, Hashida M : Analysis of skin penetration enhancement based on a two-layer skin diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum : dose-dependent effect of 1-geranylazacycloheptan-2-one on drugs with different lipophilicities. *Biol. Pharm. Bull.* 16 : 690, 1993.
- 5) Yamashita F, Koyama Y, Sezaki H, Hashida M : Estimation of a concentration profile of acyclovir in the skin after topical administration. *Int. J. Pharm.* 89 : 199, 1993.
- 6) Yamashita F, Koyama Y, Kitano M, Takakura Y, Hashida M : Analysis of *in vivo* skin penetration enhancement by oleic acid based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 117 : 173, 1995.
- 7) Bando H, Sahashi M, Takagi T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M : Analysis of *in vitro* skin penetration of acyclovir prodrugs based on a diffusion model with a metabolic process. *Int. J. Pharm.* 135 : 91, 1996.
- 8) Bando H, Yamashita F, Koyama Y, Kitagawa S, Takakura Y, Hashida M : *In vivo* and *in vitro* analysis of skin penetration enhancement based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. *Pharm. Res.* 11 : 185, 1994.
- 9) Koyama Y, Bando H, Yamashita F, Takakura Y, Sezaki H, Hashida M : Comparative analysis of percutaneous absorption enhancement by d-limonene and oleic acid based on a skin diffusion model. *Pharm. Res.* 11 : 377, 1994.
- 10) Yamashita F, Bando H, Takagi T, Takakura Y, Hashida M : Theoretical design of prodrug-enhancer combination based on a skin diffusion model : prediction of permeation of acyclovir prodrugs treated with 1-geranylazacycloheptan-2-one. *Pharm. Res.* 13 : 427, 1996.
- 11) Bando H, Sahashi M, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M : *In vivo* evaluation of acyclovir prodrug penetration and metabolism through rat skin using a diffusion/bioconversion model. *Pharm. Res.* 14 : 56, 1997.
- 12) Guzek DB, Kennedy AH, McNeill SC, Wakshull E, Potts RO : Transdermal drug transport and metabolism. I. Comparison of *in vitro* and *in vivo* result. *Pharm. Res.* 6 : 33, 1989.
- 13) Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Riviere JE, McNeill SC, Francoeur ML : Topical penetration of piroxicam is dependent on the distribution on the local cutaneous vasculature. *Pharm. Res.* 10 : 1326, 1993.
- 14) Yano Y, Yamaoka K, Tanaka H : A nonlinear least squares program, MULTI (FILT), based on fast inverse Laplace transform for microcomputers. *Chem. Pharm. Bull.* 37 : 1035, 1989.
- 15) Bando H, Mohri S, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M : Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs. *J. Pharm. Sci.* 1997 (in press).