薬物の皮膚透過および皮膚内代謝活性の ヘアレスマウス系統による差異

引間知広^{*1)}, 東條角治^{*2)}

Effect of hairless mouse strain on drug absorption and enzymatic activity in the skin

Hairless animals have been frequently used for *in vivo* and *in vitro* skin penetration experiments. The flux and enzymatic activity are obviously influenced by the species of animal used. In this paper, we have investigated the penetration and metabolism of prednisolone (PN) and prednisolone 21-acetate (PNA) in the skin using two different strains of hairless mouse. The abdominal skin of hairless mouse, inbred (HOS: HR-1 and Hr/Kud) and closed-colony (BALB/cA hr/hr) mice, was mounted between *in vitro* side-by-side penetration systems or homogenized by Polytrone[®] and Potter-Elvehjem type homogenizer. The thickness of whole skin (227 μ m) and stratum corneum (29 μ m) of HOS: HR-1 mouse was same as that of Hr/Kud mouse. The diffusion and partition coefficients in stratum corneum of PN for Hr/Kud mouse were 0.45 and 2.80 times as these for HOS: HR-1 mouse, respectively. The kinetic constants, V_{max} and K_m , for skin enzyme also differ between HOS: HR-1 and Hr/Kud mice.

Tomohiro Hikima^{*1)}, Kakuji Tojo^{*2)}

key words : hairless mouse, drug absorption,
skin metabolism, animal strain

経皮吸収実験の実験動物には、ヒト皮膚の代替としてマウス¹⁾、ヘアレスマウス²⁾、ラット³⁾、ヘアレスラット⁴⁾、モルモット⁵⁾などが用いられる。それぞれの動物皮膚の利点および欠点や、動物種の違いによる薬物の皮膚透過量および皮膚内代謝量の差異も多く報告されている^{6,7)}。

経皮治療システム研究においてヘアレスマウスは、体毛の処理をすることなく実験に使用でき、他の種よりも経済的であるなどの利点があり、多くの研究者により *in vitro* 実験に用いられている^{2,11~13)}。

そこで本研究では、ヘアレスマウスの系統による薬物皮膚透過速度の相違について検討を行った。また、皮膚の懸濁液を調整し、薬物の皮膚内代謝活性の差も比較した。モデル薬物には prednisolone およ

び prednisolone 21-acetate を用いた。

材料と方法

(1) 材料

Prednisolone 21-acetate (PNA) は、和光純薬工業より購入した。Prednisolone (PN) はナカライテスクより購入した。HPLC 用 methanol, PEG 400, およびその他の試薬は片山化学工業より購入した。ヘアレスマウス (8~10 週齢, メス) の系統は、クローズドコロニーおよび近交系を使用した。クローズドコロニーとして HOS: HR-1 および Hr/Kud を、星野試験実験飼育所、九動よりそれぞれ購入した。

また、近交系として、BALB/cA kud-hr/hr を九動より購入した。クローズドコロニーは長期間外部から動物の移入が行われず、その集団内でのみ繁殖が継続している系統で、近交系は兄妹交配を 20 世代以上継続している系統である。

(2) 皮膚透過実験

ヘアレスマウスの腹部皮膚を、intact skin およびセロテープ[®] により角質層を剥離した stripped

^{*1)} Department of Pharmacology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan 国立医薬品食品衛生研究所薬理部

^{*2)} Division of Therapeutic Systems Research, Department of Biochemical Science and Engineering, Kyushu Institute of Technology, 608-4 Kawazu, Iizuka-shi, Fukuoka 820-8502, Japan 九州工業大学情報工学部治療システム研究室

図 1 Relationship between the body weight of hairless mouse and the week age

skin の状態で切り取り、水平型拡散セル¹⁴⁾に取り付けた。皮膚厚みは皮膚を 2 枚のプラスチック板にはさみ、マイクロメーターで測定した。レセプター溶液として薬物を含まない 40% PEG 400 水溶液を用い、ドナー溶液には PN または PNA を分散した 40% PEG 400 水溶液を用いた。レセプターおよびドナー溶液は 37°C の一定温度で実験を行った。

経時時間ごとにレセプター溶液から 100 μ L ずつサンプリングし、サンプル液中の薬物濃度を HPLC により定量した。

(3) 系統差による皮膚内代謝活性変化

ヘアレスマウスの腹部皮膚 (0.5 mg) を、氷冷した 7.5 mL の緩衝液 (0.25 M Sucrose, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) に切り刻みながら入れた。氷で冷やしながらポリトロン® により懸濁し、さらにポッター型ホモジェナイザーで懸濁皮膚をすりつぶした。その後、懸濁皮膚を 4°C、10,000 g で 20 分間遠心し、上清 (酵素溶液) を 1 mL ずつサンプルチューブに分注した。

酵素溶液を 37°C で 30 分間保温したあと、基質として ethanol に溶解した PNA を 20 μ L 入れ、代謝反応を開始した。経時時間ごとにサンプルチューブから 200 μ L サンプリングし、蛋白質を除くために同量の ethanol を加えた。10,000 g で 10 分間遠心したあと、上清中の薬物濃度を HPLC で定量した。

表 1 The influences of strain on the thickness of hairless mouse abdominal skin

		Skin thickness[cm]
Intact skin	HOS: HR-1	0.0227 $\pm$ 0.0034
	Hr-/Kud	0.0225 $\pm$ 0.0027
	BALB/cA kud-hr/hr	0.0262 $\pm$ 0.0033
Stripped skin	HOS: HR-1	0.0198 $\pm$ 0.0033
	Hr-/Kud	0.0203 $\pm$ 0.0019
	BALB/cA kud-hr/hr	0.0252 $\pm$ 0.0006

結 果

(1) 体重および皮膚厚の系統差

それぞれのヘアレスマウスの体重変化を図 1 に示した。8 週齢において、クローズドコロニーである Hr-/Kud のほうが近交系である BALB/cA kud-hr/hr よりも約 8 g 重かった。また、クローズドコロニー同士であっても、Hr-/Kud のほうが HOS:HR-1 よりも約 4 g 重かった。表 1 にはそれぞれの皮膚厚みをまとめて示した。クローズドコロニーでは、皮膚厚みに差が見られなかった。

一方、近交系 (BALB/cA kud-hr/hr) の intact skin 厚みは、クローズドコロニー (Hr-/Kud) よりも 37 μ m 厚かった。そして薬物の拡散抵抗となる角質層の厚みは、クローズドコロニーで約 20 μ m であるが、近交系で約半分であった。

(2) 薬物皮膚透過の系統差

角質層厚みの等しかった HOS:HR-1 および Hr-/Kud を用いた PN の皮膚透過実験の結果を表 2 に示した。定常状態透過速度 (dQ/dt) は、intact

表 2 Steady-state penetration rate and lag-time of prednisolone across hairless mouse skin. Hairless mice are Hr⁻/Kud and HOS : HR-1 strains

	dQ/dt [μg/cm ² /hr]	td [hr]
Hr⁻/Kud		
Intact skin	0.055±0.015	9.306±1.176
Stripped skin	12.380±3.408	0.718±0.308
HOS : HR-1		
Intact skin	0.033±0.014	6.474±1.669
Stripped skin	13.244±6.404	0.297±0.260

表 4 The steady-state penetration rate of prednisolone 21-acetate(PNA) and its metabolite (PN) across hairless mouse skin

		dQ/dt [μg/cm ² /hr]
Intact skin		
PNA	HOS : HR-1	0.037±0.017
	Hr ⁻ /Kud	0.024±0.017
	BALB/cA kud-hr/hr	0.042±0.004
Metabolite (PN)	HOS : HR-1	0.011±0.005
	Hr ⁻ /Kud	0.008±0.004
	BALB/cA kud-hr/hr	0.021±0.003
Stripped skin		
PNA	HOS : HR-1	1.178±0.777
	Hr ⁻ /Kud	0.870±0.314
	BALB/cA kud-hr/hr	1.804±1.020
Metabolite (PN)	HOS : HR-1	0.395±0.092
	Hr ⁻ /Kud	0.395±0.109
	BALB/cA kud-hr/hr	0.456±0.029

skin および stripped skin とともにほぼ等しい値であるが、時間遅れは Hr⁻/Kud のほうが大きい傾向であった。さらに、皮膚を角質層と生きた皮膚からなる 2 層膜と仮定¹⁵⁾し、それぞれにおける PN の拡散係数および分配係数を計算した(表 3)。

角質層と生きた皮膚において、拡散係数は HOS : HR-1 に比較して Hr⁻/Kud のほうがそれぞれ 0.45 倍、0.42 倍と小さく、分配係数はそれぞれ 2.80 倍、2.20 倍と大きいことがわかった。

つぎに、皮膚内で代謝されることが知られている PNA を用いて透過実験を行った(表 4)。PNA およびその代謝物である PN の透過速度は、透過抵抗である角質層が一番薄い BALB/cA kud-hr/hr が一番大きかった。HOS : HR-1 および Hr⁻/Kud の角質層はほぼ等しい厚みであったが、PNA および代謝物の透過速度は、HOS : HR-1 のほうが大きい傾向であった。

表 3 Diffusion and partition coefficients of prednisolone in stratum corneum and viable skin of hairless mouse. Strains of hairless mouse are Hr⁻/Kud and HOS : HR-1

Stratum Corneum		Viable Skin	
D[μg/cm ²]	K[-]	D[μg/cm ²]	K[-]
Hr⁻/Kud			
3.158×10 ⁻¹¹	0.502	2.657×10 ⁻⁸	1.234
HOS : HR-1			
7.007×10 ⁻¹¹	0.179	6.111×10 ⁻⁸	0.560

表 5 Kinetic parameters of prednisolone 21-acetate metabolism in hairless mouse skin. K_m and V_{max} determined by Lineweaver-Burk plots

	K _m [μM]	V _{max} [nmol/min/mg-protein]
HOS : HR-1	5.15	0.25
Hr ⁻ /Kud	7.66	0.29
BALB/cA kud-hr/hr	9.46	0.43

図 2 Lineweaver-Burk plot for the hydrolysis of prednisolone 21-acetate in the skin homogenized suspension of HOS : HR-1(○), Hr⁻/Kud (□) and BALB/cA kud-hr/hr(△).

(3) 皮膚内代謝の系統差

ヘアレスマウスの皮膚懸濁液を用いた Lineweaver-Burk プロットを図 2 に示した。それぞれのプロットは Lineweaver-Burk プロットをよく満足することがわかった。この結果より、PNA から PN への代謝反応が Michaelis-Menten の式に従うと仮定し、プロットより PNA に対する代謝酵素の K_m および V_{max} を求めた(表 5)。

近交系(BALB/cA kud-hr/hr)の K_m および V_{max}

は、クローズドコロニー(Hr⁻/Kud)と比較してそれぞれ1.23倍、1.48倍となった。また、HOS:HR-1のK_mおよびV_{max}は、Hr⁻/Kudと比較してそれぞれ0.67倍、0.86倍となった。

考 察

近交系(BALB/cA kud-hr/hr)の体重がクローズドコロニー(Hr⁻/Kud)と比較して8週齢で8g軽かった(表1)。これは近交系の集団維持が兄妹交配であるために、遺伝子がホモとなり体質が弱くなっているためと思われる。また、同じクローズドコロニーであっても体重に差があるが、この理由はHr⁻/KudはICRマウス、HOS:HR-1はCBA/Nマウス、とそれぞれの起源が異なる点があげられる。Hr⁻/Kudの角質層厚みは、HOS:HR-1とほぼ等しいにも関わらず、PNの角質層における拡散係数および分配係数は、HOS:HR-1と比較してそれぞれ0.45倍、2.80倍であった。したがって、同じクローズドコロニーでもその起源が異なれば、皮膚(角質層)になんらかの組織学的な相違のあることが示唆された。

また、PNの透過速度(表2)とPNAの透過速度(表4)を比較すると、PNのintact skinにおける透過速度は、Hr⁻/Kud(0.055 μg/cm²/hr)のほうがHOS:HR-1(0.033 μg/cm²/hr)よりも大きい³、PNAの透過速度はHr⁻/Kud(0.015 μg/cm²/hr)よりもHOS:HR-1(0.037 μg/cm²/hr)のほうが大きくなっている。PNおよびPNAのK_{octanol/water}は、それぞれ31および560である¹⁶⁾ので、角質層の脂溶性はHOS:HR-1のほうが大きいことが予想できる。また、BALB/cA kud-hr/hrの角質層厚み(10 μm)は、Hr⁻/Kudの厚み(22 μm)の半分以下であるが³、生きた皮膚および真皮の厚みはBALB/cA kud-hr/hrのほうが49 μm厚い。

また、代謝酵素の基質への親和性および最大反応速度は、BALB/cA kud-hr/hr、Hr⁻/Kud、そしてHOS:HR-1の順に小さくなった(表5)。そのために、intact skinにおいて全透過薬物に占める代謝物の割合は、BALB/cA kud-hr/hrで35.83%、Hr⁻/Kudで30.87%、そしてHOS:HR-1で24.93%となった。肝臓⁸⁾、腎臓⁹⁾、そして血中¹⁰⁾における代謝

酵素活性は、系統により大きな差があることが報告されているが、皮膚内酵素活性にも系統差があることが明らかになった(表5)。

代謝酵素活性は、動物種により大きな相違が存在することが知られている。その理由として酵素蛋白質の構造が異なっていること¹⁷⁾、酵素発現量に差があること⁹⁾などがあげられる。動物種間だけでなく動物系統間にも代謝酵素の活性や基質に対する親和性に違いが生じるのは、系統間においても起源が異なるために遺伝子に相違があり、そのために酵素蛋白質の構造、酵素発現量が異なるためではないかと思われる。

結 論

本実験の結果から、実験動物の系統により薬物の皮膚透過性および皮膚内代謝性に相違のあることがわかった。そのため実験報告には、使用した実験動物種だけでなく、その系統も報告すべきであると思われる。特に皮膚代謝を伴う薬物の皮膚透過では、動物種だけでなく動物の系統も考慮すべきと考えられる。

文 献

- 1) Rahman MS, Hughes MF: In vitro percutaneous absorption of monosodium methanearsonate and disodium methanearsonate in female B6C3F1 mice. J Toxicol. Environ. Health 41: 421-433, 1994.
- 2) Padda M, Rallis M, Traber MG, Packer L, Maibach HI: Kinetic study of cutaneous and subcutaneous distribution following topical application of [7, 8-¹⁴C] rac-α-lipoic acid onto hairless mice. Biochem Pharmacol 52: 627-633, 1996.
- 3) Bando H, Takagi T, Yamashita F, 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: 427-432, 1996.
- 4) Ito Y, Ogiso T, Iwaki M: Thermodynamic study on enhancement of percutaneous penetration of drugs by Azone®. J Pharmacobio Dyn 11: 749-757, 1988.
- 5) Franz TJ, Lehman PA, Franz SF, Guin JD: Comparative percutaneous absorption of lindane and permethrin. Arch Dermatol 132: 901-905, 1996.
- 6) Panchagnula R, Stemmer K, Ritschel WA: Animal models for transdermal drug delivery. Methods Find Exp Clin Pharmacol 19: 335-341, 1997.
- 7) Bartek MJ, Labudde JA, Maibach HI: Skin permeability in vivo: Comparison in rat, rabbit, pig and man. J Invest Dermatol 58: 114-123, 1972.
- 8) Nakamura T, Satoh T, Horie T, Sagami F, Tagaya O: Strain differences of rat liver carboxylesterase activities related to the phenotype difference of esterase-3(egasyn).

- Res Commun Chem Pathol Pharmacol 66 : 451-459, 1989.
- 9) OH von Deimling : Genetic variation as a tool for histochemical localization of a nonspecific esterase. Histochemistry 88 : 641-643, 1988.
 - 10) Clement JG, Erhardt N : Serum carboxylesterase activity in various strains of rats : sensitivity to inhibition by CBDP(2-/o-cresyl/4 H : 1 : 3 : 2-benzodioxaphosphorin-2-oxide). Arch Toxicol 64 : 414-416, 1990.
 - 11) Liu P, Higuchi WI, Song WQ, Kurihara-Bergstrom T, Good WR : Quantitative evaluation of ethanol effects on diffusion and metabolism of β -estradiol in hairless mouse skin. Pharm Res 8 : 865-872, 1991.
 - 12) Ruland A, Kreuter J : Influence of various penetration enhancers on the *in vitro* permeation of amino acids across hairless mouse skin. Int J Pharm 85 : 7-17, 1992.
 - 13) Tojo K, Yamada K, Hikima T : Diffusion and metabolism of prednisolone farnesylate in viable skin of the hairless mouse. Pharm Res 11 : 393-397, 1994.
 - 14) Hikima T, Yamada K, Yamashita A, Tojo K : Drug permeation across the skin accompanied by enzymatic metabolism. Drug Deliv Syst 7 : 453-457, 1992.
 - 15) Tojo K, Valia KH, Chien YW : Skin permeation of drugs-diffusion and partitioning. J Chem Eng Jpn 18 : 174-178, 1985.
 - 16) Hikima T : Ph D thesis, Kyushu Institute of Technology, 1996.
 - 17) Satoh T, Hosokawa M : Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. Toxicol Lett 82/83 : 439-445, 1995.