薬物経皮吸収試験の素材としてのドジョウ摘出皮膚の基礎的検討¹⁾

渡辺善照,* 本郷秀二, 松本光雄

昭和薬科大学

Evaluation of Excised Loach Skin for Studies on Transdermal Permeation of Drugs *in Vitro*¹⁾

Yoshiteru WATANABE,* Shuji HONGO and Mitsuo MATSUMOTO

Department of Pharmaceutics, Showa College of Pharmaceutical Sciences,
1-8, Tsurumaki 5-chome, Setagaya-ku, Tokyo, 154, Japan

(Received April 25, 1989)

Transdermal permeation of drug across the excised skin of Asian pond loach (*Misgurnus anguillicaudatus* CANTOR) was studied *in vitro*.

Ten kinds of drugs, D-glucose, L-glucose, sucrose, salicylic acid, cefazolin, urea, antipyrine, naphazoline, propranolol and enniomycin were permeated through the excised loach skin, whereas dextran, a polysaccharide, could not be permeated through the skin. The observed transdermal flux (J), the slope of the line obtained from plots of the cumulative amount of drug permeated vs. time, increased as the drug concentration in the donor compartment solution (50→300 mM), as the temperature of the skin (test solution) increased (4→37°C), or as the molecular weight of compound decreased. These results suggested that the transport of drug across the loach skin was due to the passive diffusion mechanism. The effect of pH on the permeation of drug could not be elucidated since the loach skin was drastically impaired below pH 5.0.

The J values of antipyrine and naphazoline varied in proportion to the drug concentration in the donor compartment solution at time zero (C_0). The permeability constants (K_p , $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$) of antipyrine and naphazoline were 12.9×10^{-2} and 9.2×10^{-2} , respectively. However, the J values of salicylic acid and urea were not proportional to C_0 in high concentration (300 mM). Probably, these results were related to the irritative effect of salicylic acid or urea on the skin.

Keywords—*Misgurnus anguillicaudatus*; loach skin; skin permeation test; transdermal flux; drug permeability; drug concentration; skin temperature; molecular weight; pH effect

薬物の *in vitro* 皮膚透過試験には、ブタ、モルモット、ラット、マウス等の哺乳動物の摘出皮膚²⁾ やヘビの脱皮した外皮³⁾ を使用した報告がある。また、ヒト(死体)皮膚を用いた例もある。⁴⁾ しかし、近年、動物権(animal right)の擁護運動の高まりから動物実験の方法に関しても試験指針⁵⁾が採択されるなどの問題が提起され、皮膚に関する試験においても哺乳動物の種の選択や実験方法に制約が多い。また、ヒトの皮膚の使用は、患者(被験者)保護のための倫理的規約⁶⁾があり、通常はむずかしい。

これに対し、魚類は上記に比べて使いやすい実験生物と考えられる。本研究では、一般の魚に比べ鱗(scale)が退化的で⁷⁾体表が柔らかくまたその体形から皮膚の剥離、摘出が簡単なドジョウに着目した。ドジョウから剥離した皮膚(以下、摘出皮膚)における薬物の透過性を *in vitro* で比較し、薬物皮膚透過(経皮吸収)試験に用いる素材としての基礎的検討を行った。初期の実験において薬物の選択は重要であるが、分子量が相違する糖類としてD-グルコース、精製白糖(sucrose)及びデキストラン、酸性薬物としてサリチル酸及びセファゾリン、塩基性薬物として尿素、アンチピリン、ナファゾリン、プロプラノロール及びエンビオマイシンを選び試験に供した。

実 験 の 部

1. 薬物 糖類: D-グルコース, 精製白糖(和光純薬), L-グルコース (Sigma Chemical). 酸性薬物: サリチ

Fig. 1. Excision of Loach Skin

Number: 1, pectoral fin; 2, gill; 3, incision site; 4, pincette; 5, dorsal fin.

Body weight, 4–8 g (mean value, 5 g).

Body length, 10–12 cm (mean value, 11 cm).

After surgical incision of two sites (shown as 3_a and 3_b) on skin of loach, the skin was pinched and excised by pincette (4) from the site 3_a to the site 3_b. The ventral side of the reversed-cylindrical skin excised (shown as shaded part) was cut, finally, a sheet of skin (approximately 3 cm × 2 cm) was obtained. The excised skin was mounted on polypropylene tube using rubber band (see, Fig. 2).

ル酸 (Na 塩, 関東化学), セファゾリン (Na 塩, 藤沢薬品). 塩基性薬物: 尿素, アンチピリン (和光純薬), ナファゾリン, プロプラノロール (塩酸塩, Sigma Chemical), エンビオマイシン (硫酸塩, 東洋醸造). 高分子: デキストラン (平均分子量 60000–90000, Sigma Chemical). その他の試薬は, すべて市販の特級品を用いた.

2. 皮膚の摘出方法 ドジョウはいろいろな種属があり, 外部形態及び生態は多様である⁸⁾ が, 薬物透過試験に用いるためには種類や体長・体重を限定したものが望まれる. ドジョウは養殖が簡単で,⁸⁾ 年間を通じ同様な大きさのものを入手しやすい. 本研究には, 青森県産の養殖ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus* CANTOR) を使用した. 購入したドジョウから体長 10–12 cm (平均約 11 cm), 体重 4–8 g (平均約 5 g) のものを選び, これらを約 20°C の水槽で飼育したものを 1 日–1 週間以内に用いた. なお, この程度の飼育期間内では, 体長及び体重に大きな変化は見られなかった.

皮膚の摘出は以下のように行った. Fig. 1 に示すように, ドジョウの胸びれ直後及び背びれ直前の部位を切開し, 胸びれ直後の部位の皮膚をピンセットで挟み, 尾の方向に皮膚を剥離した. 背びれ直前の部位まで摘出し, 表裏が反転した状態の円筒状の皮膚を得た. この皮膚の腹部側を切断し, シート状 (約 3 cm × 2 cm) の摘出皮膚を得た. シート状とした皮膚は, 直ちに薬物透過試験に使用した. なお, ドジョウの入手時期 (春, 秋) の違いにより薬物の皮膚透過に大きな差は見られなかった.

3. In Vitro 皮膚透過試験 a) 方法—*In vitro* 皮膚透過試験には, これまで種々の拡散セル装置⁹⁾ が報告されているが, 上記で得られた摘出皮膚はこれらの装置を用いるには小さいため, Washitake らの方法¹⁰⁾ を参考にして試験した. 概要は Fig. 2 に示す. 断面積 1.45 cm² のポリプロピレン製チューブの一端に摘出皮膚をゴムバンドで固定し, これを一定の温度に保ったレセプター側の緩衝液 (50 ml) 内に装着した (水平膜型). 薬物を同じ緩衝液に溶かした試験液 4 ml をチューブ内 (ドナー側) に注入後, レセプター側 (100 rpm で攪はん) 溶液 2 ml を経時的に採取し, 透過した薬物量を測定した. なお, 採取後保温した緩衝液 2 ml をレセプター側へ加え, 溶液量を一定に保った.

b) 解析—時間 (*t*) に対して累積透過薬物量 (*Q*) をプロットすると, lag time の後に直線的な透過量の増加が認められ, (1) 式が適用される.¹¹⁾

$$J = \frac{K_m \cdot D \cdot C_0}{L} = K_p \cdot C_0 \quad (1)$$

J は流束であり, 単位面積 (cm²) 当たり単位時間 (h) に透過する薬物量 (μmol) を示す. *K_m* は皮膚と系との間

Fig. 2. Schematic Illustration of the Drug Permeation Test by Excised Loach Skin *In Vitro*

Number: 1, excised loach skin (cross section, 1.45 cm²); 2, rubber band; 3, glass beaker; 4, polypropylene tube; 5, donor compartment (4 ml); 6, receptor compartment (50 ml); 7, water bath (4, 25 or 37°C); 8, polytetrafluoroethylene-coated magnetic stirring bar; 9, magnetic stirrer (100 rpm).

The polypropylene tube with the excised loach skin was immersed in the receptor compartment solution (50 ml) at a constant temperature. Drug solution (4 ml) was placed in the donor compartment and the receptor compartment solution was stirred at 100 rpm with the magnetic stirring bar. An aliquot of 2 ml of the receptor compartment solution was taken and solution was replenished with same volume of buffer solution.

の薬物分配係数, D ($\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) は, 膜 (皮膚) L (cm) の長さを透過する際の薬物の拡散係数である. C_0 はドナー側とレセプター側との間の薬物濃度差 (時間ゼロにおけるドナー側の薬物濃度, mM), K_p ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$) は透過係数である.

c) 試験液の pH——デキストラン (5% (w/v) 溶液) を用い, 酸性 (pH 4.0—5.0, クエン酸緩衝液), 中性 (pH 6.4—7.4, リン酸塩緩衝液) 及びアルカリ性 (pH 9.3—11.6, ホウ酸緩衝液) における摘出皮膚での透過の有無を調べた.

中性及びアルカリ性ではデキストランは透過せず, 肉眼的観察により皮膚の外観変化を認めなかった. 酸性 (pH 5.0 以下) ではレセプター側に明らかにデキストランが認められ, 漏出が確認された. この場合, 試験開始 2 時間以後になると明確に皮膚の変質が目視された. したがって, 酸性条件での試験は不可能で, 以下の試験には pH 7.4 等張リン酸塩緩衝液を用いた.

4. 薬物定量法 レセプター側の薬物濃度は, 採取した液を緩衝液で適宜希釈後, 下記の方法で定量した.

紫外部吸光度法 (測定波長): セファゾリン (271 nm), アンチピリン (271 nm), ナファゾリン (280 nm), プロプラノロール (290 nm), エンビオマイシン (271 nm).

比色法 (方法, 測定波長): D-グルコース, L-グルコース, 精製白糖 (グルコーステストワコー®, 635 nm), サリチル酸 (Brodie 法,¹²⁾ 530 nm), 尿素 (Urea N B-Test Wako®, 570 nm). なお, デキストランは日局 11 の確認試験法 (アントロン法) に準じ, レセプター側での有無 (検出限界, 約 0.04 mg/ml) を定性的に調べた.

結 果

1. 薬物透過に及ぼす濃度の影響

試験液温を 37°C に設定し, 薬物濃度を 50, 100 又は 300 mM として試験した. D-グルコース, サリチル酸及びアンチピリンを例として, 平均累積透過薬物量と時間の関係を Fig. 3 に示す. 両者の関係はいずれの濃度においてもわずかな lag time の後に直線性を示し, 濃度が高いほど直線の傾き (J) は大であった. 他の薬物においても同様な結果が得られた.

得られた各薬物の J と C_0 の関係を Fig. 4 に示す. アンチピリン及びナファゾリンでは 0—300 mM で原点を通る直線関係が成立した (K_p ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$): アンチピリン, 12.9×10^{-2} ; ナファゾリン, 9.2×10^{-2}). プロプラノロールは溶解度の関係から 300 mM の試験が行えなかったため, Fig. 4 に示さなかった. サリチル酸と尿素では, 300 mM での J が高くずれた. セファゾリンでは, 300 mM での J が低くずれた. D-グルコースの J と C_0 の関係は, 50—300 mM で直線関係を示したが, 原点を通らなかった. 精製白糖ではセファゾリンと同様に高濃度 (300 mM) で J が低くずれた.

Fig. 3. Effect of Drug Concentration on Permeation of Drug through Excised Loach Skin at 37°C

Drug: (A), D-glucose; (B), salicylic acid; (C), antipyrine.

Drug concentration (mM): ----, 50; —, 100; ·····, 300.

Each point represents the mean $\pm$ S.D. (vertical bar) for three experiments at pH 7.4.

Fig. 4. Relationship between Transdermal Flux (J) at 37°C and Drug Concentration in Donor Compartment at Time Zero (C_0)

Key: ■, D-glucose; □, sucrose; ▲, salicylic acid; △, cefazolin; ●, antipyrine; ○, naphazoline; ◇, urea. Each point represents the mean $\pm$ S.D. (vertical bar) for three experiments at pH 7.4.

Fig. 5. Effect of Temperature on Permeation of Drug (100 mm) through Excised Loach Skin

Drug: (A), D-glucose; (B), salicylic acid; (C), antipyrine.

Temperature ($^{\circ}\text{C}$): -----, 5; , 25; ———, 37.

Each point represents the mean $\pm$ S.D. (vertical bar) for three experiments at pH 7.4.

2. 薬物透過に及ぼす温度の影響

薬物の皮膚透過に及ぼす温度の影響を調べる目的で、試験液温を 4, 25 又は 37°C に設定し、数種の薬物 (濃度 100 mm) の透過試験を行った。D-グルコース、サリチル酸及びアンチピリンを例として、平均累積透過薬物量と時間の関係を Fig. 5 に示す。D-グルコースとアンチピリンでは、いずれの温度においてもわずかな lag time の後に直線関係を示し、温度が低いほど直線の傾き (J) は小となった。サリチル酸を除く他の薬物では、D-グルコース又はアンチピリンと同様な関係が認められた。サリチル酸の場合は、25 及び 37°C での累積薬物透過量がほぼ等しく、薬物透過に及ぼす温度の影響が他の薬物と相違した。

3. 流束 (J) と薬物分子量との関係

各薬物 (100 mm) の J と分子量との関係を Fig. 6 に示す。薬物分子量と $\log J$ との間には負の相関 ($r = -0.931$, $p < 0.01$) が認められた。なお、薬物濃度が 50 mm の場合でも、負の相関 ($r = -0.862$, $p < 0.01$) が成立した。

考 察

ドジョウから剥離、摘出した皮膚を用いて、分子量が異なる数種の薬物の透過性を *in vitro* で比較した。摘出皮膚では、薬物透過性に対する剥離操作により生じる皮膚損傷の影響が危惧される。しかし、高分子のデキストランが中性—アルカリ性でこの摘出皮膚を透過（漏出）しないことから、操作時に注意すれば皮膚損傷の問題は回避できると思われる。

ドジョウの皮膚は、多くの脊椎動物の皮膚と同様に表皮 (epidermis) 及び真皮 (dermis) の 2 層からなっている。^{7,18)} 表皮層には糖たんぱくから成る粘液を分泌する粘液細胞 (mucous cell) と機能が明らかではない大形の棍棒状細胞 (club cell (clavated cell)) が認められる。¹⁸⁾ 水面に接する扁平上皮細胞層 (flat epithelial cell layer) の表面には小皮縁 (microvilli) と呼ばれる微小突起が多数あり指紋状構造を形成している。¹⁸⁾ この紋様構造が呼吸、水その他の物質の吸収や排出などの機能と関連すると見られる報告¹⁴⁾ もある。ドジョウ皮膚表面には hexose, hexosamine から成る多糖体¹⁵⁾ や sialic acid¹⁶⁾ などの粘性物質が付着している。粘液の機能的意義については、寄生虫、細菌などの魚体内への侵入を防ぐなどいくつかの説^{13a)} が考察されているが、粘性物質の存在は薬物透過性に影響することも考えられる。粘性物質の除去操作は皮膚に対して損傷をもたらす恐れがあるために、今回の試験では摘出後皮膚表面の粘性物質を除去しなかった。しかし、いずれの薬物においても観察された lag time は非常に短いことから、粘性物質による影響を無視してよいものと思われる。なお、lag time が短いことは、ドジョウ皮膚の水和状態が哺乳動物などの皮膚に比べて高いためと推定される。

薬物濃度 C_0 の増加に従い流速 J が大きくなり、ドジョウ皮膚での薬物透過は受動的拡散が示唆される。また、ドジョウ皮膚の温度 (液温) が高いほど J が大となった。温度が低い場合は、薬物の拡散や分配などに不利に働くためと見られる。なお、ドジョウが自然界で生息する水温はおよそ 10—25°C である⁸⁾ が、薬物皮膚透過試験を 37°C で行っても特に問題は見られなかった。薬物分子量が大きくなると J は小さくなった。したがって、ドジョウ皮膚での薬物透過性は分子量に依存するものと考えられる。皮膚表面の pH は、酸性又は塩基性薬物のイオン化の状態に影響し、薬物透過性に変動することが報告¹⁷⁾ されている。体表の粘性物質の性質も pH の違いにより変化し、薬物透過性に影響することも考えられる。しかし、ドジョウ皮膚は pH 5.0 以下の酸性で著しく変質し損傷するために、酸性からアルカリ性にわたる広い pH 領域での薬物透過の相違については試験できなかった。なお、天然に存在しない L-グルコースの J ($9.9 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, (100 mM, 37°C)) は D-グルコースの J ($9.7 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, (100 mM, 37°C)) と等しいことから、ドジョウ皮膚における能動的輸送の関与は少ないものと推測される。

$J = K_p \cdot C_0$ の関係において、高濃度 (300 mM) でサリチル酸及び尿素の J が高くずれ、セファゾリン及び精製白糖では J が低くずれた。これらの理由については本試験のみでは明確にすることはできなかった。サリチル酸は角質軟化剤 (keratolytics) としてしばしば用いられ、¹⁸⁾ 尿素 (2—20%) も皮膚角化症に適用されている。¹⁸⁾ 魚類の表皮は他の高等動物のものと異なり表層まですべて生きた細胞からなり、角質化した細胞がない。^{13b,19)} 一方、鱗 (scale) は真皮にある鱗嚢に生ずる硬組織で、カルシウム塩が沈着しており歯や骨と同系統である¹³⁾ が、ドジョウの鱗は極めて微小である。²⁰⁾ したがって、サリチル酸や尿素で J 値が高くずれた理由は、これらの薬物の角質

Fig. 6. Relationship between Drug Molecular Weight and log J at 37°C

Drug (100 mM): 1, urea; 2, salicylic acid; 3, D-glucose; 4, antipyrine; 5, naphazoline; 6, propranolol; 7, sucrose; 8, cefazolin; 9, enniomycin.

Each point represents the mean of three experiments at pH 7.4.

溶解作用によるものと推定することは難しいが、ドジョウ皮膚に対する何等かの作用が関与しているものと思われる。セファゾリン及び精製白糖では、濃度が高くなると溶液の粘性が増大することが影響するものと見られる。なお、薬物の種類により C_0 が大きい場合に、 $J=K_p \cdot C_0$ の直線関係からずれることが知られている。¹¹⁾

以上、本研究でドジョウ皮膚における薬物透過を *in vitro* で明らかにすることができた。ドジョウ皮膚は *in vitro* 皮膚透過試験に用いる素材の 1 つとして応用できるものと思われる。

引用文献及び注

- 1) 本報の要旨は、日本薬学会第 109 年年会にて発表した。名古屋、1989 年 4 月。
- 2) a) R. C. Wester, P. K. Noonan, *Int. J. Pharmaceut.*, **7**, 99 (1980); b) H. Durrheim, G. L. Flynn, W. I. Higuchi, C. R. Behl, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 781, (1980); c) R. L. Bronaugh, R. F. Stewart, E. R. Congdon, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 481 (1982).
- 3) T. Higuchi, 小西良士, *Pharm Tech Japan*, **2**, 1191 (1986).
- 4) P. Agrawala, W. A. Ritschel, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 776 (1988).
- 5) The NIH Guide, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW Publication No. (NIH) 80-23, Revised 1978, Reprinted 1980, Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD 20205, USA.
- 6) The Declaration of Helsinki, 1964, (1975 年東京にて改訂).
- 7) 松原喜代松, 落合 明, 岩井 保, “新版魚類学 (上),” 恒星社厚生閣, 東京, 1979, pp. 20—27.
- 8) 宮地傳三郎, 川那部浩哉, 水野信彦, “原色日本淡水魚類図鑑,” 保育社, 大阪, 1976, pp. 239—257.
- 9) a) I. H. Blank, *J. Invest. Dermatol.*, **43**, 415 (1964); b) T. J. Franz, *ibid.*, **64**, 190 (1975); c) C. L. Gummer, R. S. Hinz, H. I. Maibach, *Int. J. Pharmaceut.*, **40**, 101 (1987).
- 10) M. Washitake, Y. Takashima, S. Tanaka, T. Anmo, I. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2855 (1980).
- 11) R. J. Scheuplein, I. H. Blank, *Physiol. Rev.*, **51**, 702 (1971).
- 12) B. B. Brodie, S. Udenfriend, A. F. Coburn, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **80**, 114 (1944).
- 13) a) 日比谷 京編, “魚類組織図説—正常組織と病理組織,” 講談社サイエンティフィク, 東京, 1982, pp. 8—15; b) 落合 明, “水産養殖学講座第 1 巻, 魚類解剖学,” 落合 明編, 緑書房, 東京, 1987, pp. 9—21
- 14) 山田寿郎, 動物学雑誌, **75**, 140 (1966); J. Yamada, *Annot. Zool. Jpn.*, **41**, 1 (1968).
- 15) 榎本則行, 富安行雄, 日本水産学会誌, **26**, 739 (1960).
- 16) 榎本則行, 中川浩毅, 富安行雄, 日本水産学会誌, **30**, 495 (1964).
- 17) T. Arita, R. Hori, T. Anmo, M. Washitake, M. Akatsu, T. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1045 (1970).
- 18) E. A. Swinyard, M. A. Pathak, “Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th edition,” ed. by A. G. Gilman, L. S. Goodman, T. W. Rall, F. Murad, Macmillan Publishing Company, New York, 1985, pp. 946—958.
- 19) J. W. Hawkes, “Microscopic Anatomy of Salmonids: An Atlas,” ed. by W. T. Yasutake, J. H. Wales, United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, 1983, pp. 14—23.
- 20) 小林久雄, 植物及動物, **4**, 855 (1936).