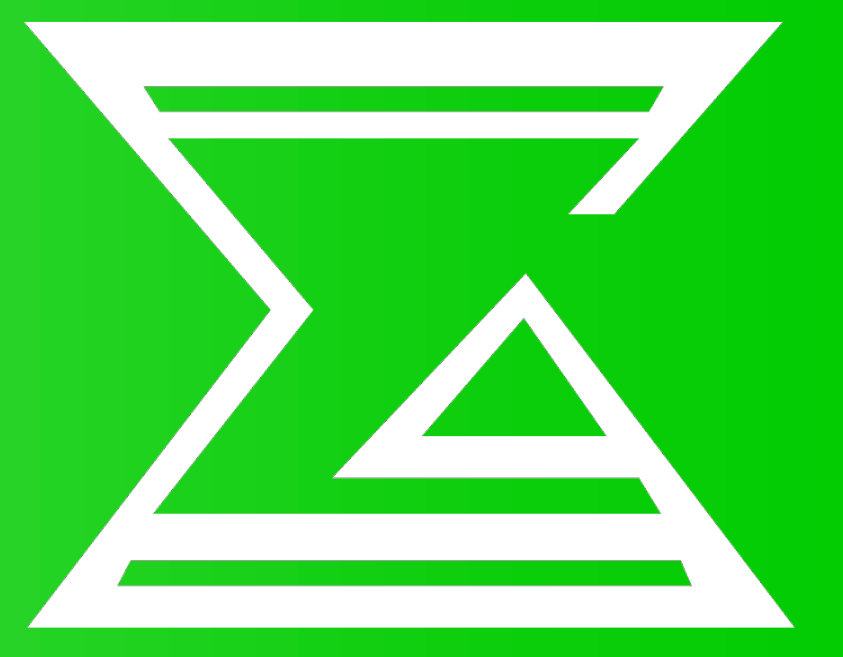


3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた 種々医薬部外品製剤からの有効成分の 皮膚透過性評価(2)

○関口 翔平¹・細田 晴夫¹・倉持 隆則¹・武内 博幸¹・平森 基起¹・渡辺 新²・
藤堂 浩明²・杉林 堅次²

(¹株式会社ローマン工業横浜研究所研究開発部・²城西大学薬学部)



Introduction

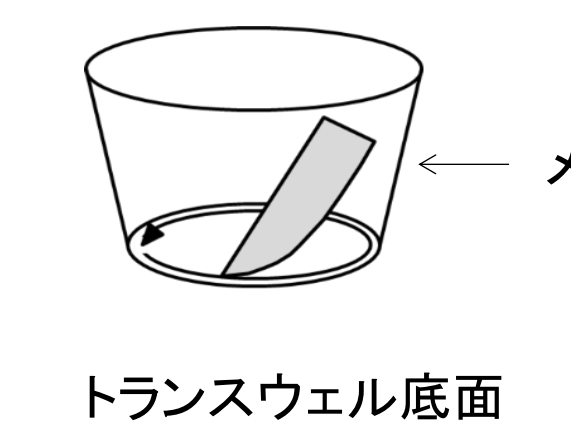
医薬部外品製剤において、有効成分の皮膚透過性や皮膚中濃度の測定は非常に重要であり、凍結摘出ヒト皮膚を用いた *in vitro* 透過試験が実施されている。しかしながら、凍結摘出ヒト皮膚は、部位差、性差、年齢差などの影響を受け、ばらつきが少ない安定なデータを取ることは非常に難しい。近年、3次元培養ヒト皮膚モデルが凍結摘出ヒト皮膚の代替膜として *in vitro* 透過試験に利用されているが、報告の多くは水性基剤からの有効成分の皮膚透過性評価であり、乳液やクリームなどの油性基剤からの皮膚透過性評価についての報告はほとんどない。また、3次元培養ヒト皮膚モデルは、角層バリア能が凍結摘出ヒト皮膚と比較して脆弱であることが知られており、長時間に渡る透過試験は、角層バリア能の変化に伴う有効成分の皮膚透過性を過大評価する可能性がある。そこで、本研究では、水溶性物質のカフェインを用い、3次元培養ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 透過試験における適切な試験時間の検討を行った。次に、アスコルビン酸-2-グルコシド(AA-2G)、インプロピルメチルフェノール(IPMP)、トラネキサム酸(TXA)、コウジ酸(KA)、ニコチン酸アミド(NA)、4-ブチルレゾルシノール(BR)の医薬部外品有効成分を塗布し、凍結摘出ヒト皮膚を介した有効成分の透過性と比較した(TXA, KA, NAおよびBRIに関しては昨年度報告済み)。また、AA-2G塗布後の皮膚中濃度および皮膚内分布についても調べた。

試験① 透過試験時間の検討

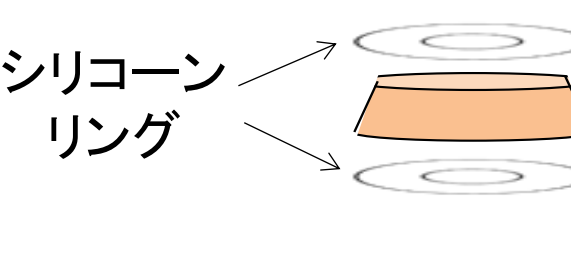
試験① Methods

- 水和なし(水和0時間)、水和12時間および24時間のLSE-highを用いて *in vitro* 透過試験を行った。
- 各水和時間終了後にカフェインを塗布し、Lag time、透過速度(Flux)および累積透過量(Q)を算出した。
- 得られた透過パラメータを比較した。

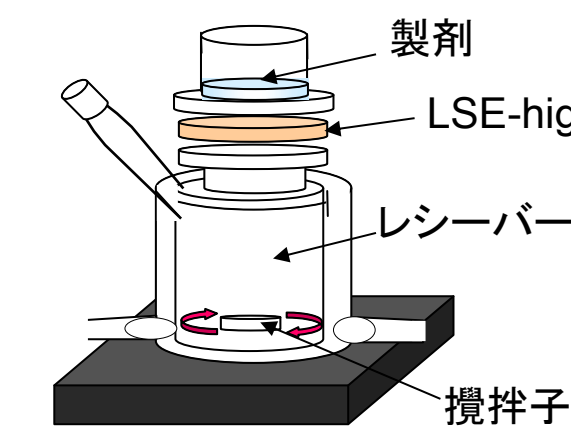
<LSE-highの拡散セルへのセット方法>



LSE-highをメスで
トランスウェル底面
から切り離す。



切り離したLSE-high
の表皮側と真皮側に、
シリコンリングを密着
させる。

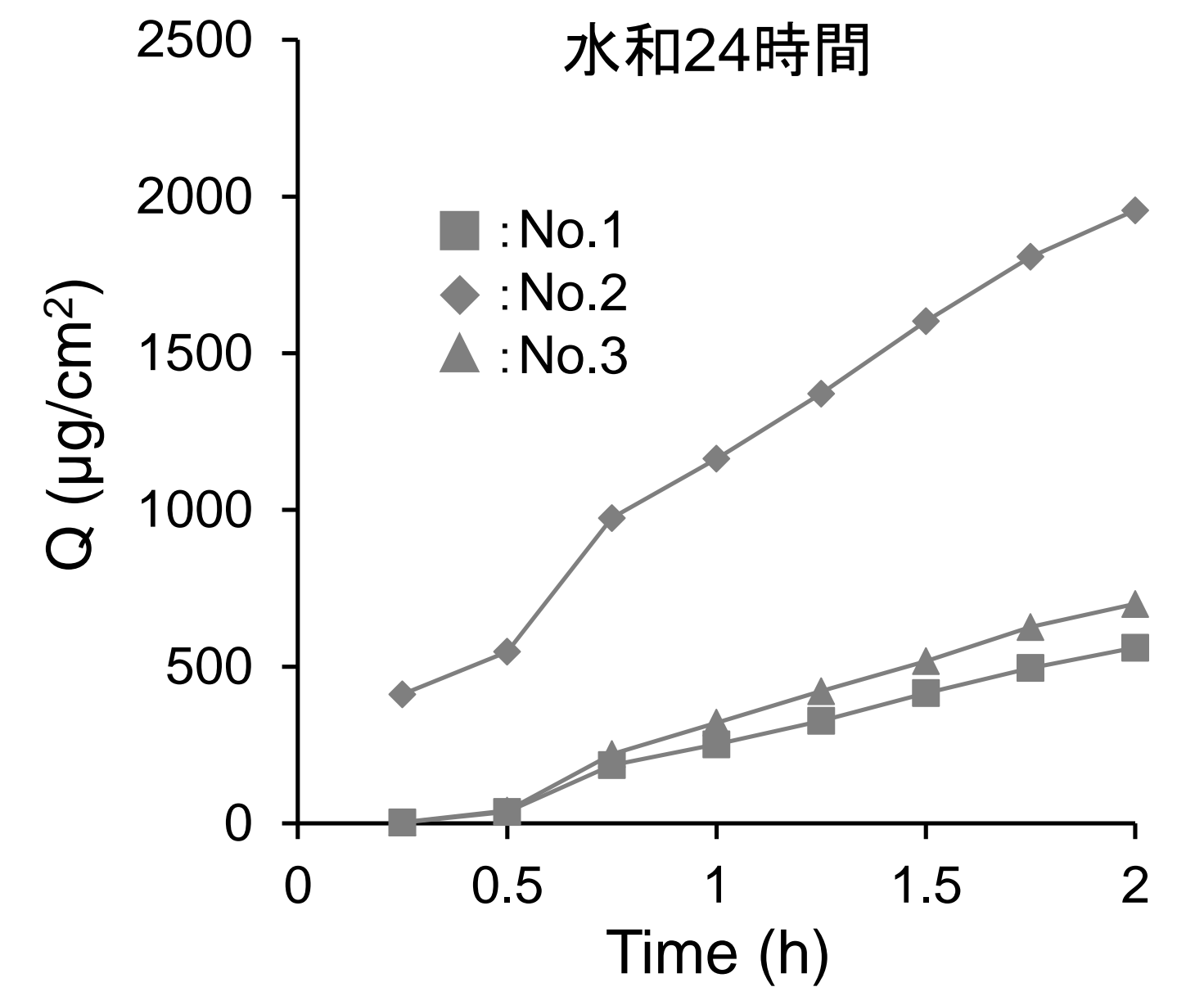
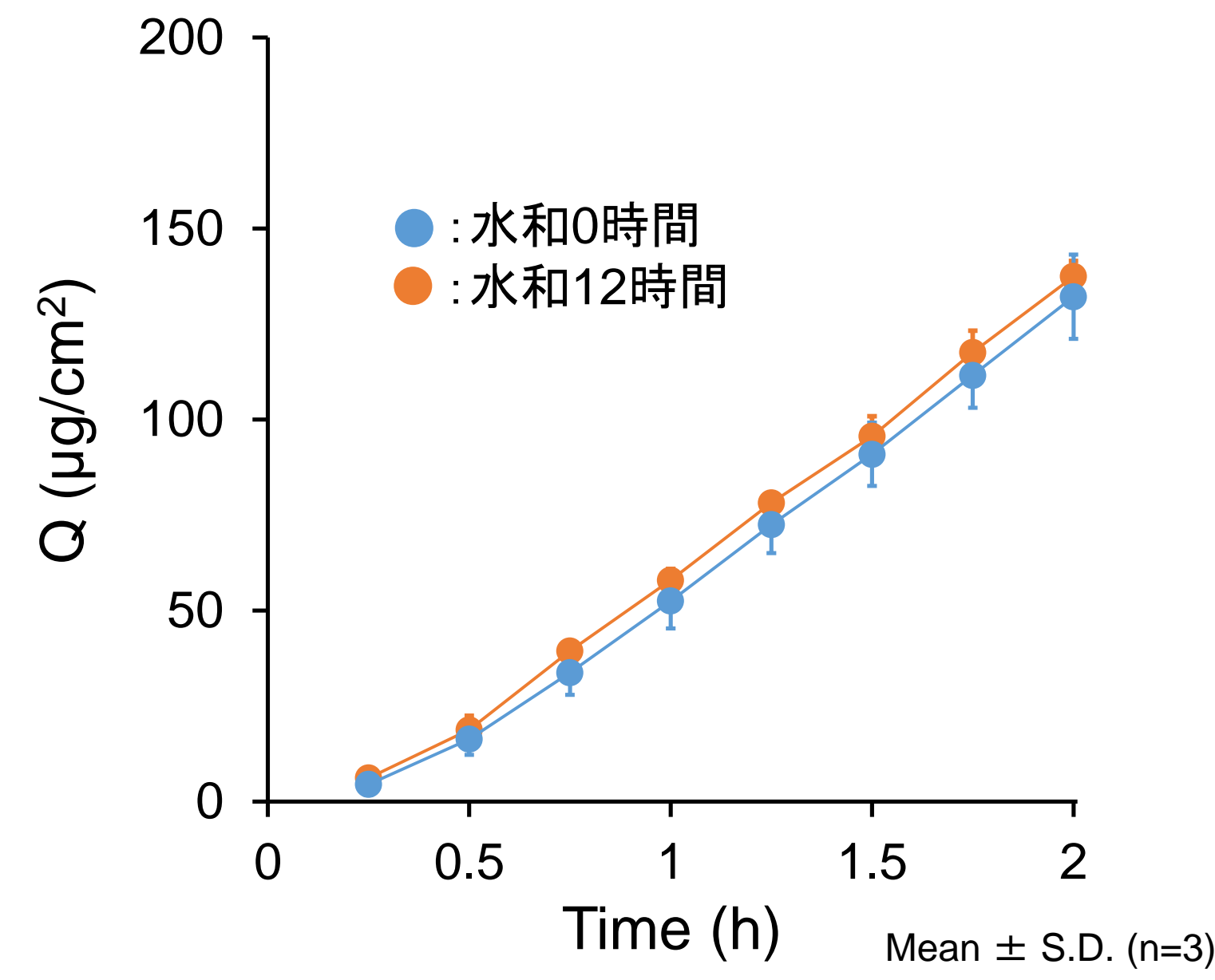


表皮側が上を向くよう
に、レーザーセルに
シリコンリングを密着
させたLSE-highおよび
ドナーセルを置く。罫口
クリップでドナーセルと
レーザーセルを固定
する。

<試験条件>

3次元培養ヒト皮膚モデル (LSE-high)	
由来	男性、新生児、包皮
皮膚表面温度	32°C
化合物	カフェイン(10 mg/mL水溶液)
塗布量	1000 μL
有効透過面積	0.79 cm ²
レーザー溶液	pH7.4 PBS
水和時間	0 h 12 h 24 h
透過試験時間	2 h
濃度測定	HPLC

試験① Results



	Lag time (h)	Flux (μg/cm ² /h)	Q (μg/cm ²)
水和0時間	0.40 ± 0.05	82.4 ± 6.37	132 ± 11.4
水和12時間	0.35 ± 0.14	83.6 ± 6.48	138 ± 4.00
水和24時間	0.04 ± 0.04	454 ± 223	1072 ± 768

- 水和12時間までは、カフェインの透過挙動に変化は認められなかった。
- 水和24時間では、水和0時間および12時間と比べてカフェインの透過量が増加しただけでなく、透過量のばらつきも確認できた。
- LSE-highを用いた透過試験では、試験時間を最大12時間までに設定する必要がある。

試験② 3次元培養ヒト皮膚モデルと凍結摘出ヒト皮膚の相関性の検討

試験② Methods

- AA-2G, TXA, KA, NA, BRおよびIPMPを含有する種々剤形(市販品の化粧水、乳液、クリーム)を用いて、LSE-highまたは凍結摘出ヒト皮膚を介した *in vitro* 透過試験を行った。

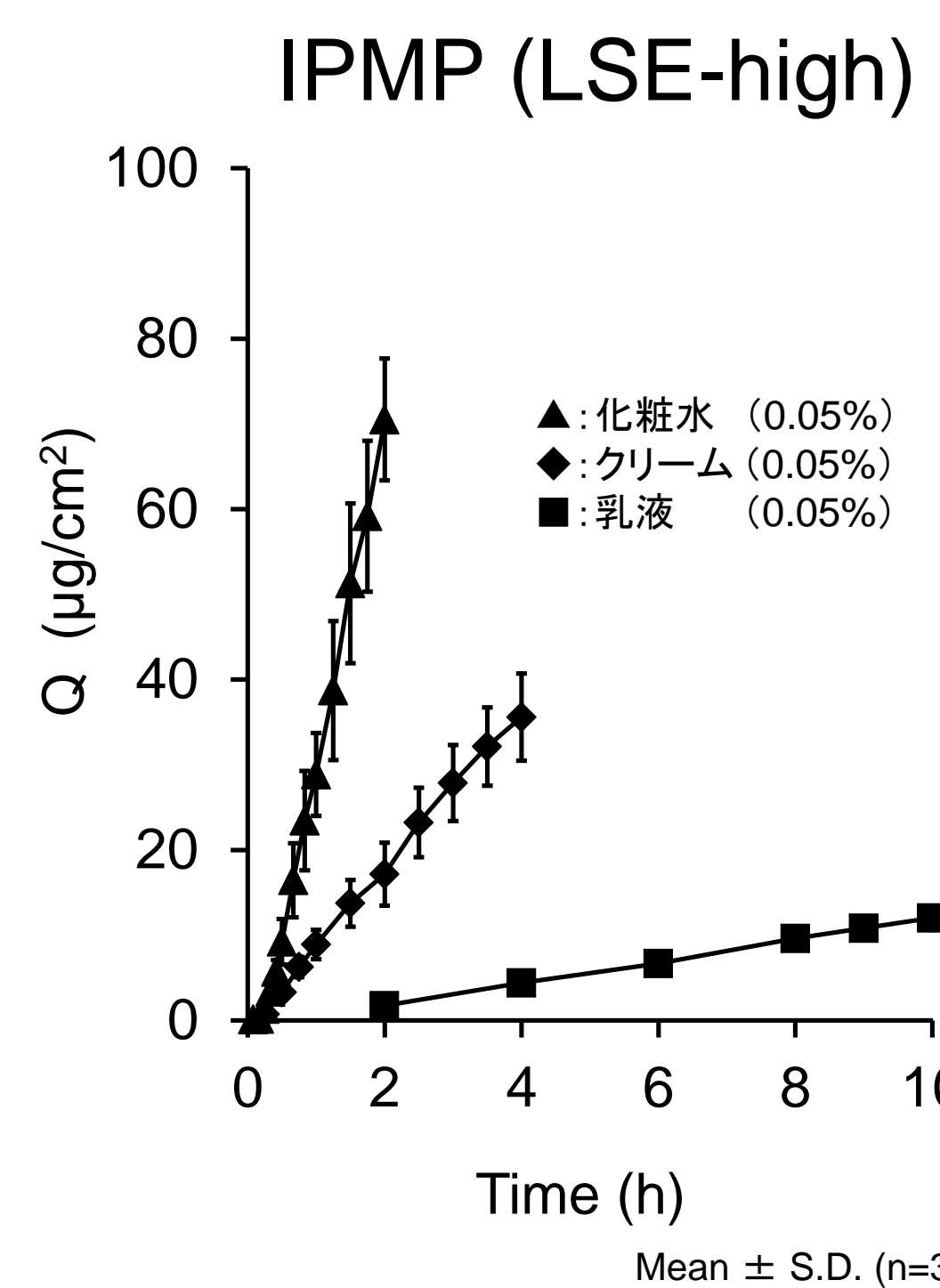
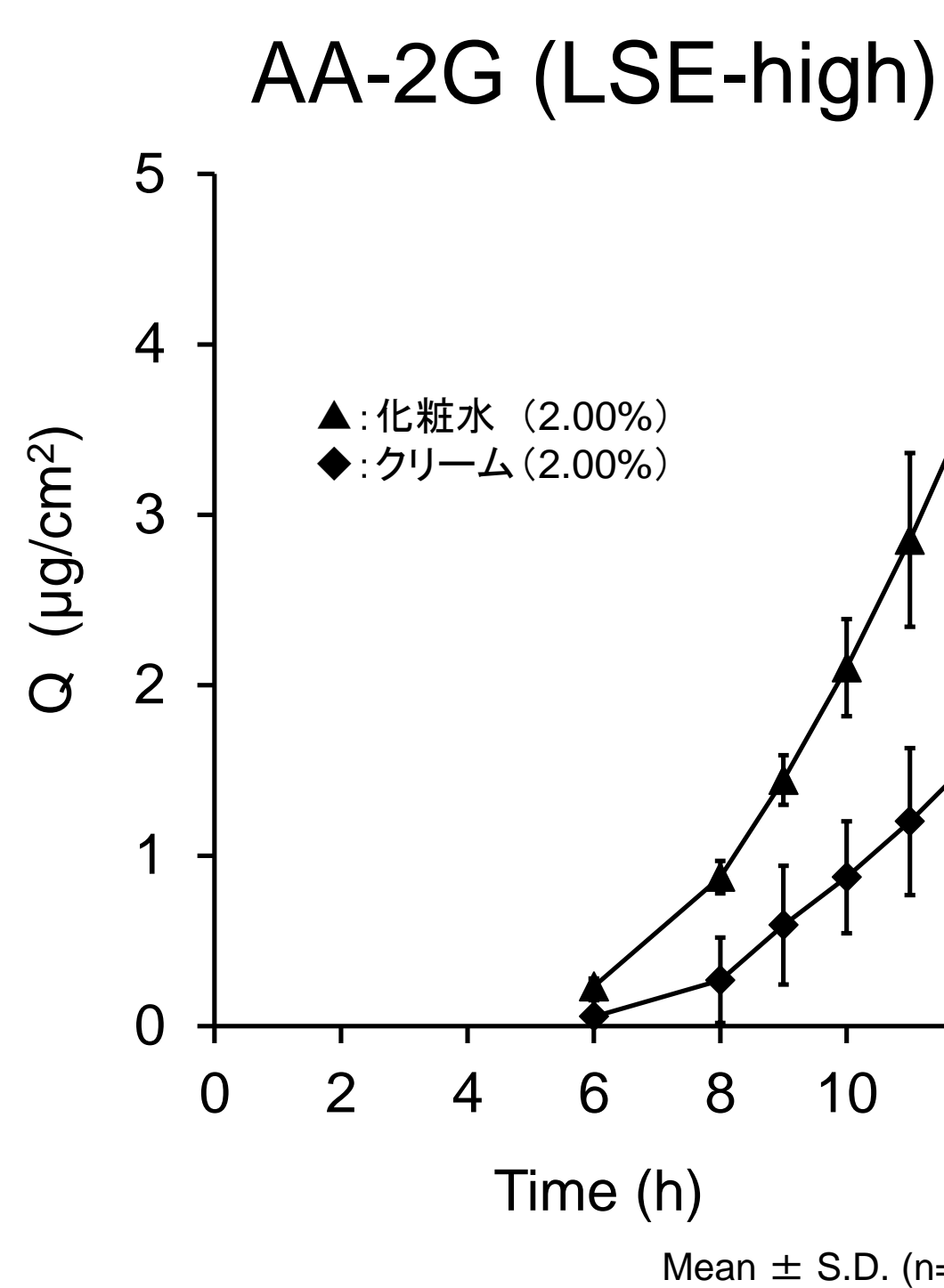
有効成分	構造式	分子量	CLogP*
AA-2G		338	-3.1
TXA		157	-2.0
KA		142	-0.9
NA		122	-0.4
BR		166	2.4
IPMP		150	3.0

*PubChemより参照。

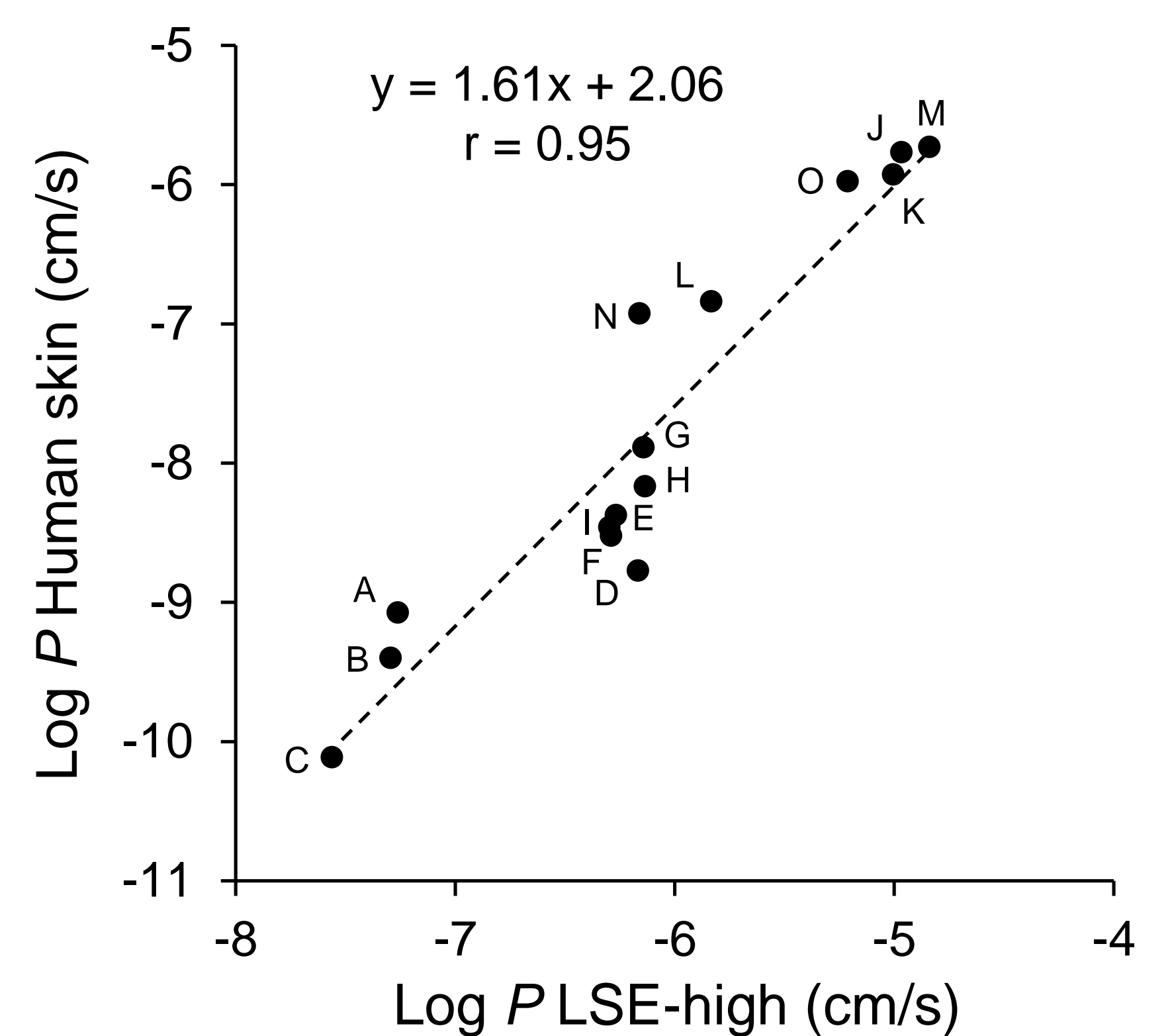
<試験条件>

	LSE-high	凍結摘出ヒト皮膚
由来	男性、新生児、包皮	白人女性、36歳~65歳、腹部
皮膚表面温度	32°C	
塗布量	100~500 μL	500 μL
剤形	化粧水、乳液、クリーム(市販品)	
有効透過面積	0.79 cm ²	1.77 cm ²
レーザー溶液	pH7.4 PBS or 40%PEG400	
透過試験時間	0~12 h	0~40 h
濃度測定	HPLC or LC/MS/MS	

試験② Results



LSE-high vs 凍結摘出ヒト皮膚透過係数相関図



剤形	Lag time (h)	Flux (μg/cm ² /h)	Q (μg/cm ²)	Q化粧水/Qクリーム
AA-2G 化粧水	7.39 ± 0.72	0.85 ± 0.32	3.76 ± 0.93 (24.6%)	2.33
AA-2G クリーム	7.73 ± 0.63	0.38 ± 0.06	1.61 ± 0.39 (24.3%)	1
IPMP 化粧水	0.20 ± 0.03	26.0 ± 4.05	70.6 ± 7.24 (10.3%)	1.45 × 10 ⁻⁵ ± 2.25 × 10 ⁻⁶
IPMP 乳液	0.56 ± 0.11	1.24 ± 0.16	14.7 ± 1.19 (8.09%)	6.88 × 10 ⁻⁷ ± 9.10 × 10 ⁻⁸
IPMP クリーム	0.19 ± 0.01	11.1 ± 1.92	35.6 ± 5.12 (14.4%)	6.13 × 10 ⁻⁶ ± 1.08 × 10 ⁻⁶

- AA-2Gを除く5つの有効成分におけるLSE-highと凍結摘出ヒト皮膚との透過係数の相関は、 $r = 0.95$ となり、高い相関が認められた。
- AA-2Gのクリームに対する化粧水のQ比は、LSE-highでは1:2.33、凍結摘出ヒト皮膚では1:2.89となった。

評価法

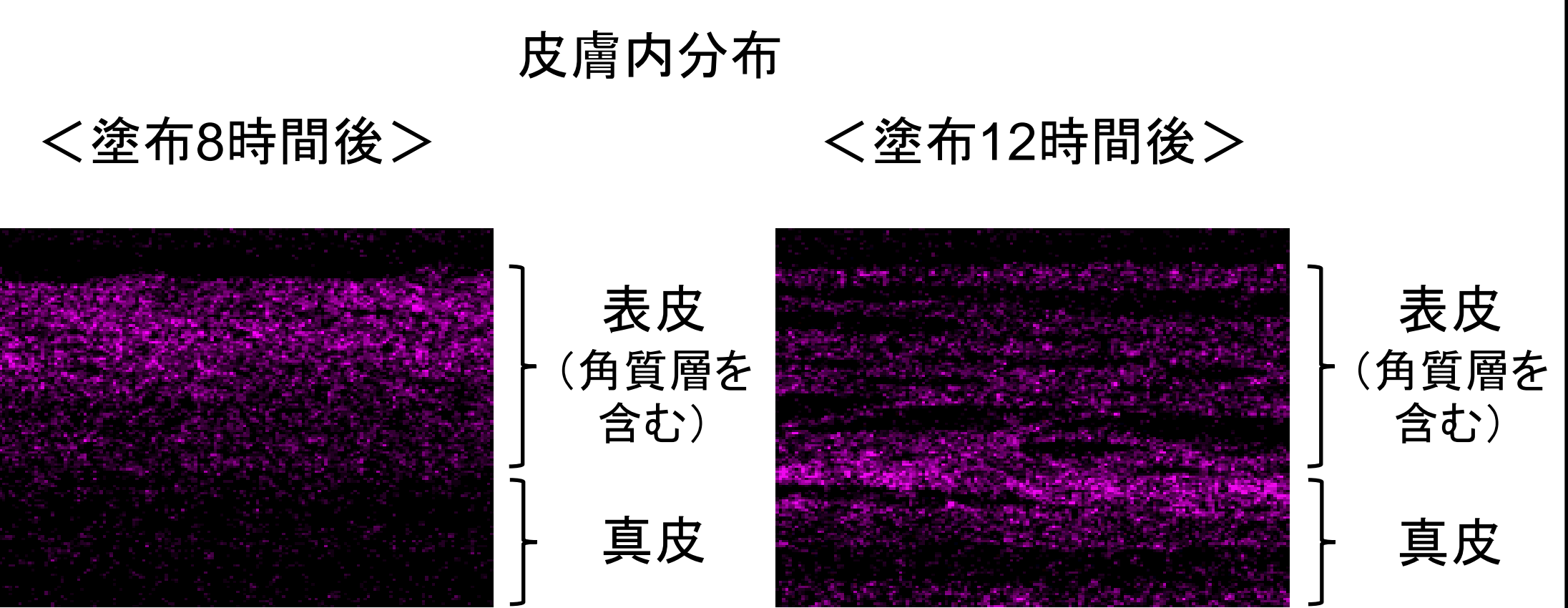
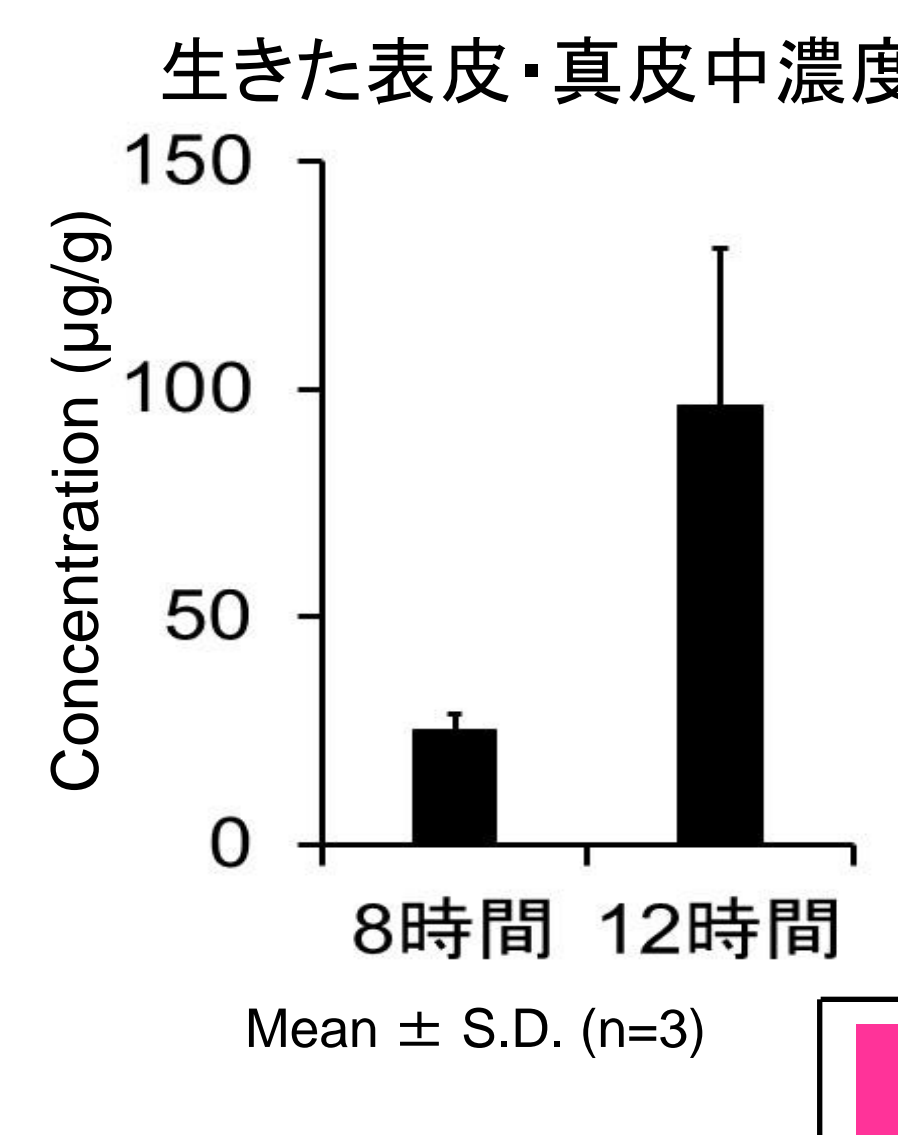
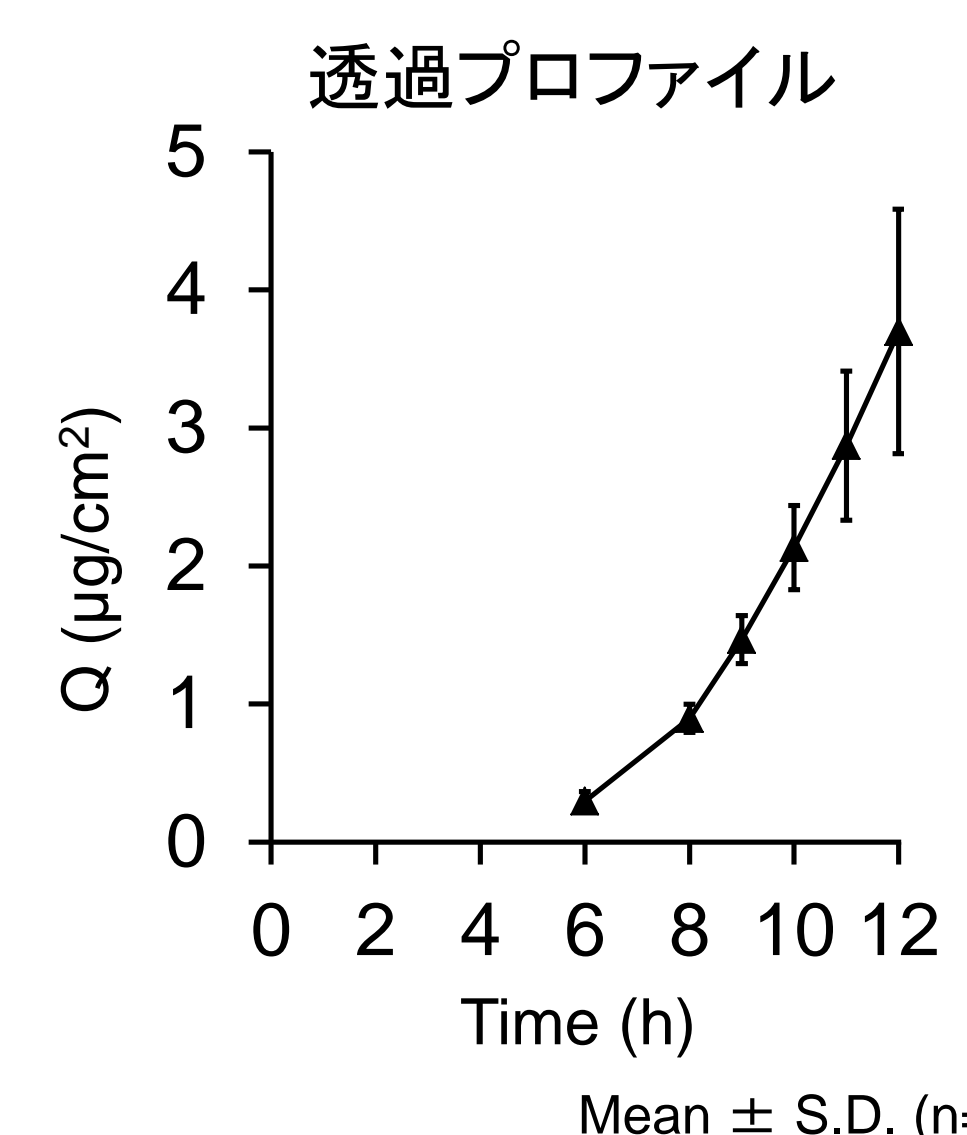
- 各有効成分のLag time、Flux、Qおよび透過係数(P)を算出した。
- LSE-highおよび凍結摘出ヒト皮膚から得られた有効成分のP値の相関性を確認した。なお、AA-2Gについては、クリームのQに対する化粧水のQ比を算出して比較した。
- LSE-highを用いた場合、各有効成分のFluxは、TXAは10~12時間、KA、NA、BRは0.5~2時間、IPMPは0.25~6時間の連続した3点のQ値を用いて算出した。
- 凍結摘出ヒト皮膚を用いた場合、各有効成分のFluxは、TXA、KAは24~26時間、NAは6~24時間、BR、IPMPは1~8時間の連続した3点のQ値を用いて算出した。
- Pは、Fluxを有効成分の塗布濃度で除して算出した。

試験③ AA-2Gの皮膚中濃度および皮膚内分布

試験③ Methods

- AA-2G含有化粧水を用いて、LSE-highを介した *in vitro* 透過試験を行った。また、同条件にて塗布8時間および12時間後の角質層を除去した生きた表皮・真皮中AA-2G濃度を測定した。さらに、皮膚切片(角質層を含む)を作成し、TOF-SIMS(ION-TOF社製)により、AA-2Gの皮膚内分布を確認した。

試験③ Results



- 生きた表皮・真皮中AA-2G濃度は、塗布12時間後のほうが8時間後よりも約3.7倍高かった。
- TOF-SIMSの結果より、AA-2Gの皮膚内分布は、塗布8時間と12時間後で違いを認めた。

Conclusion

- LSE-highを用いた透過試験は、12時間以上実施すると過大評価する可能性が示唆された。
- 種々基剤からの極性の異なる有効成分(ClogP: -3.1~3.0)のヒト皮膚透過性は、LSE-highを用いた試験結果から予測できることが示された。
- AA-2Gの皮膚中濃度および皮膚内分布は、塗布8時間と12時間後では異なった。