

日本動物実験代替法学会 第30回大会

平成 29 年 11 月 23 日～25 日
 大田区産業プラザ (Pio)

P-2

医薬部外品の *in vitro* 皮膚透過性研究における 3次元培養ヒト皮膚モデル (LSE-high) の有用性

○前旬貴志¹, 野地本和孝¹, 中山克大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
 (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)



Introduction

近年、化粧品、医薬部外品使用における安全性に対する関心が高まっていることから、特に医薬部外品の製品開発における有効成分の皮膚透過性が注目されている。

有効成分の皮膚透過性評価には、ヒト皮膚または動物皮膚を用いた *in vitro* 透過試験が有効である。しかし、ヒト皮膚は高価であり、動物皮膚は動物愛護の観点から入手するには制限があるため、ヒト皮膚および動物皮膚の代替皮膚モデルが求められている。

我々は、ヒト皮膚と同様に表皮層と真皮層を持つ 3次元培養ヒト皮膚モデル LSE-high を開発し、ヒト皮膚および動物皮膚の代替皮膚モデルとなり得るか検討した。

Purpose

本研究では剤形および有効成分の異なる種々医薬部外品を用い、LSE-high およびヘアレスラット皮膚を用いた *in vitro* 透過試験を実施し、有効成分の透過性を比較することで LSE-high のヒト皮膚代替モデルとしての有用性を検討した。

Methods

モデル有効成分 (医薬部外品主剤)

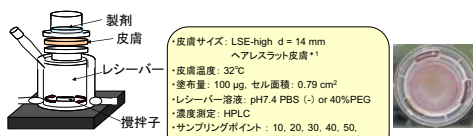
| 有効成分 | 構造式 | 分子量 | log _{K_{ow}} ² | 剤形 |
|-------------------|-----|-----|--|-------------------------------|
| コウジ酸 (KA) | | 142 | -0.16 | 化粧水 or 乳液 or クリーム |
| ニコチン酸アミド (NA) | | 122 | 0.88 | |
| 4-ブチルレゾルシノール (BR) | | 166 | 2.44 | |

²Logarithm of octanol/water partition coefficient at 37 °C

試験には下記の市販されている各種医薬部外品を用いた。

- コウジ酸: 市販製剤A(化粧水) 市販製剤B(乳液) 市販製剤C(クリーム)
- ニコチン酸アミド: 市販製剤D(化粧水) 市販製剤E(乳液) 市販製剤F(クリーム)
- 4-ブチルレゾルシノール: 市販製剤G(化粧水) 市販製剤H(乳液) 市販製剤I(クリーム)

In vitro 透過試験法および評価法



皮膚サイズ: LSE-high d = 14 mm
 ヘアレスラット皮膚¹
 皮膚温度: 32°C
 塗布量: 100 μg, セル面積: 0.79 cm²
 レシーバー溶液: pH7.4 PBS (-) or 40%PEG
 濃度測定: HPLC
 サンプリングポイント: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120 min

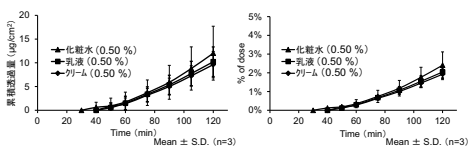
¹実験動物は城西大学倫理委員会の承認を得た後、城西大学全学実験動物規定に従って行った。

<評価法>

LSE-high またはヘアレスラット皮膚を介した各有効成分の、種々剤形からの lagtime, 透過速度, 累積透過量, 透過係数を算出した比較した。

Results - 1 (LSE-high)

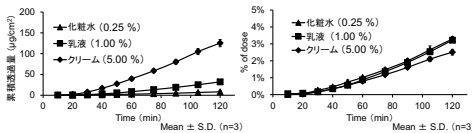
① コウジ酸 (KA)



| 市販製剤 | Lagtime (min) | 透過速度 (μg/cm ² /min) | 累積透過量 (μg/cm ²) (CV%) | 透過係数 (cm/s) |
|--------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|---|
| 市販製剤A (化粧水) | 62.1 ± 6.7 | 0.21 ± 0.07 | 12.03 ± 5.68 (47.2%) | 6.89 × 10 ⁻⁷ ± 2.34 × 10 ⁻⁷ |
| 市販製剤B (乳液) | 55.7 ± 5.8 | 0.15 ± 0.04 | 10.23 ± 3.12 (30.5%) | 5.00 × 10 ⁻⁷ ± 1.20 × 10 ⁻⁷ |
| 市販製剤C (クリーム) | 56.2 ± 4.9 | 0.15 ± 0.04 | 9.62 ± 2.78 (28.9%) | 5.00 × 10 ⁻⁷ ± 1.33 × 10 ⁻⁷ |

- ◆Lagtime は、3剤形の中で化粧水が一番長かった。
- ◆透過速度, 累積透過量および透過係数は、3剤形共にほぼ同じであった。
- ◆3 剤形の累積透過量の CV% は、28.9~47.2 であり、化粧水のバリエーションが一番大きかった。
- ◆KA の透過性は、剤形によらずほぼ同じであった。

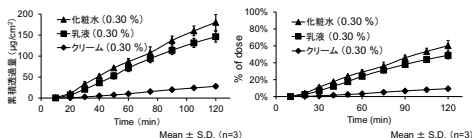
② ニコチン酸アミド (NA)



| 市販製剤 | Lagtime (min) | 透過速度 (μg/cm ² /min) | 累積透過量 (μg/cm ²) (CV%) | 透過係数 (cm/s) |
|--------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|---|
| 市販製剤D (化粧水) | 27.4 ± 1.9 | 0.08 ± 0.01 | 8.23 ± 0.38 (4.4%) | 5.33 × 10 ⁻⁷ ± 6.67 × 10 ⁻⁸ |
| 市販製剤E (乳液) | 40.0 ± 3.1 | 0.39 ± 0.03 | 32.18 ± 1.49 (4.6%) | 6.50 × 10 ⁻⁷ ± 5.00 × 10 ⁻⁸ |
| 市販製剤F (クリーム) | 33.6 ± 1.6 | 1.43 ± 0.08 | 125.41 ± 8.53 (6.8%) | 4.77 × 10 ⁻⁷ ± 2.67 × 10 ⁻⁸ |

- ◆Lagtime は、化粧水 < クリーム < 乳液の順であった。
- ◆透過速度, 累積透過量は、剤形による違いを認められたが、透過係数には違いが認められなかった。
- ◆3 剤形の累積透過量の CV% は、4.4 ~ 6.8 であった。
- ◆NA の透過速度および累積透過量は、剤形によらず製剤中 NA 含有量にほぼ比例していた。
- ◆NA の透過性は、剤形によらずほぼ同じであった。

③ 4-ブチルレゾルシノール (BR)



| 市販製剤 | Lagtime (min) | 透過速度 (μg/cm ² /min) | 累積透過量 (μg/cm ²) (CV%) | 透過係数 (cm/s) |
|--------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|---|
| 市販製剤G (化粧水) | 12.3 ± 5.5 | 1.93 ± 0.27 | 180.59 ± 18.82 (10.4%) | 1.07 × 10 ⁻⁵ ± 1.47 × 10 ⁻⁶ |
| 市販製剤H (乳液) | 17.6 ± 3.4 | 1.62 ± 0.12 | 146.14 ± 12.84 (8.8%) | 9.00 × 10 ⁻⁶ ± 6.63 × 10 ⁻⁷ |
| 市販製剤I (クリーム) | 23.7 ± 8.2 | 0.29 ± 0.01 | 27.97 ± 4.09 (14.6%) | 1.61 × 10 ⁻⁶ ± 3.21 × 10 ⁻⁷ |

- ◆Lagtime は、化粧水 < 乳液 < クリームの順であった。
- ◆透過速度, 累積透過量および透過係数は、クリーム < 乳液 < 化粧水の順であった。
- ◆3 剤形の累積透過量の CV% は、8.8 ~ 14.6 であった。
- ◆BR の透過性は、クリーム < 乳液 < 化粧水の順となり、剤形の差が認められた。

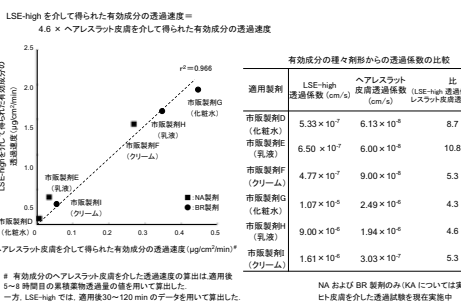
小括-1

- NA の結果より、LSE-high は、有効成分の含有量違いによる皮膚透過性を評価できる皮膚モデルであると考えられた。
- BR の結果より、LSE-high は、剤形の違いによる皮膚透過性を評価できる皮膚モデルであると考えられた。
- KA, NA および BR の結果より、LSE-high は、有効成分の物性の違いによる皮膚透過性を評価できる皮膚モデルであると考えられた。
- 累積透過量の CV% より、LSE-high の試験精度は、水溶性成分ではバラツキが大きく(28.9 ~ 47.2%)、両親媒性成分 ~ 脂溶性成分ではバラツキが小さく(4.4 ~ 14.6%)なり、ヒト皮膚および動物皮膚と同様であると考えられた。Appendix 1, 2)

- 以上より、LSE-high は、医薬部外品の剤形の違い、有効成分の物性の違いによる皮膚透過性を評価できる皮膚モデルであることが示唆された。

Results - 2

透過速度および透過係数比較 (LSE-high vs ヘアレスラット皮膚)



小括-2

- ヘアレスラット皮膚を介した有効成分の種々剤形からの透過性の順は、LSE-high を用いて評価した結果と一致した。
- ヘアレスラット皮膚と LSE-high を介した有効成分の透過速度の間には良好な関係が得られた。なお、human skin とSD rat skin, Yucatan micropig (YMP) skin やヘアレスラット皮膚とは良好な相関関係が得られることが報告されている。Appendix 2, 3)
- LSE-high を介した有効成分の透過性評価は、ヘアレスラット皮膚を用いた場合よりも短時間で可能であった。
- LSE-high を介した有効成分の透過係数は、剤形および有効成分の物理化学的性質によらず、ヘアレスラット皮膚の約 4~10 倍高値を示した。この結果より LSE-high を用いた場合には、有効成分の皮膚透過性を過大評価する可能性が考えられた。

Conclusion

LSE-high を用いた *in vitro* 透過試験は、ヘアレスラット皮膚を用いた *in vitro* 透過試験と類似した結果を与え、LSE-high の代替皮膚モデルとしての可能性が示された。

今後、さらに多くの有効成分についてヒト皮膚の *in vitro* 透過試験を実施し、代替皮膚モデルとしての有用性をより確固たるものとする必要がある。

Appendix

1) 各種皮膚における 3薬物の個体間変動

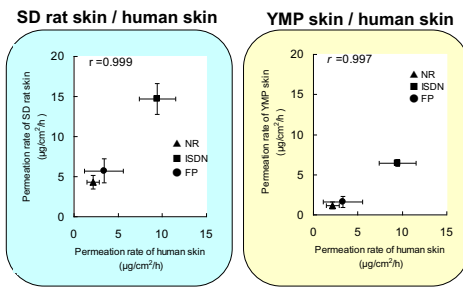
| Species | Drug | Permeation rate (μg/cm ² /h) | CV% |
|---------|------|---|------|
| Human | NR | 3.40 ± 2.21 | 65.0 |
| | ISDN | 9.45 ± 2.08 | 22.0 |
| | FP | 2.16 ± 0.72 | 33.2 |
| SD rat | NR | 5.72 ± 1.48 | 25.9 |
| | ISDN | 14.7 ± 1.91 | 13.0 |
| | FP | 4.33 ± 0.83 | 19.2 |
| YMP | NR | 1.61 ± 0.72 | 44.4 |
| | ISDN | 6.46 ± 0.44 | 6.7 |
| | FP | 1.18 ± 0.41 | 34.7 |

NR: Nicorandil, ISDN: Isosorbide dinitrate, FP: Flutibronfen. Each value represents the mean ± S.D. (n=3-6).

個体間変動 SD rat skin < YMP skin < Human skin

Takeuchi H, et al., *Biol Pharm Bull*, 34, 555-561 (2011).

2) 相関性 (透過速度)

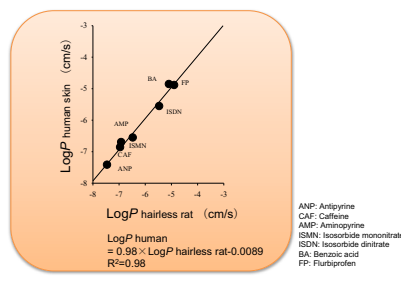


Mean ± S.D. (n=6) for SD rat skin comparison; Mean ± S.D. (n=3-6) for YMP skin comparison.

Takeuchi H, et al., *Exp Anim.*, 60, 373-384 (2011).

3) 相関性 (human skin vs hairless rat skin)

human skin / hairless rat skin



ANP: Antipyrene, CAF: Caffeine, AMP: Aminopyrine, ISDN: Isosorbide mononitrate, ISDN: Isosorbide dinitrate, BA: Benzoic acid, FP: Flutibronfen.

Watanabe T, Sugibayashi K, et al., *Altern. Animal Test. Experiment.*, 8, 1-14 (2001).