

市販ステロイド軟膏剤の混合製剤からのステロイド皮膚透過実験における
ヘアレスマウスとミニブタ摘出皮膚の評価

大谷道輝,^{*,a} 小瀧 一,^b 假家 悟,^a 内野克喜,^a 伊賀立二^c

**Evaluation of the Permeability of Corticosteroid in Hairless Mouse and
Hairless Micropig Skin from Admixture of Commercially
Available Corticosteroid Ointments and/or Creams**

Michiteru OHTANI,^{*,a} Hajime KOTAKI,^b Satoru KARIYA,^a
Katsuyoshi UCHINO,^a and Tatsuji IGA^c

Department of Hospital Pharmacy, Tokyo Postal Services Agency Hospital,^a 2-14-23, Fujimi, Chiyoda-ku,
Tokyo 102-8798, Japan, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo,^b 4-6-1,
Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108-8639, Japan, and Department of Pharmacy,
The University of Tokyo Hospital, Faculty of Medicine, The University
of Tokyo,^c 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan

(Received March 11, 2002; Accepted May 21, 2002)

Yucatan hairless micropig (YHMP) skin has been shown to have histologi and physiologic properties similar to human skin. To assess the relationship between the permeability of corticosteroid ointments and five types of commonly used admixtures of corticosteroid through hairless mice (HM) or YHMP skin and the clinical effects in humans, we conducte by *in vitro* experiments using HM and YHMP skin. The permeability of corticosteroid in admixtures with urea or heparinoid ointments across HM or YHMP skin was 1.5–4-fold greater than that of corticosteroid ointments alone. HM skin was found to have faster permeability than YHMP skin, but otherwise was similar to YHMP skin. These experiments demonstrated a close relationship between the permeability of HM or YHMP skin and vasoconstrictor activity in humans. These results suggest that the *in vitro* permeability of corticosteroid measurements across HM skin could be a useful, rapid, and easy method for assessing the vasoconstrictor activity of topical corticosteroids and the admixtures of commercially available ointments and/or creams in humans.

Key words—Yucatan hairless micropig; hairless mice; skin permeability; corticosteroids; vasoconstrictor activity; admixture

緒 言

皮膚科領域での薬物療法は、軟膏剤をはじめとした外用剤が中心となっている。これら外用剤は多剤処方されることが多く、軟膏剤等を時間をずらしてあるいは重ねて塗布する方法ではコンプライアンスが低下するために、併用される軟膏剤を混合・希釈する処方が増加している。¹⁾特に副腎皮質ホルモン(ステロイド)の軟膏剤と他剤との混合は、アンケート調査によると83%の皮膚科医が行っていることが報告されている。²⁾

我々はヘアレスマウス(HM)の皮膚を用いた拡散セルの実験によって、ステロイドの軟膏と保湿剤である尿素軟膏やヘパリノイド軟膏との混合は、ステロイドの濃度は希釈されるものの、皮膚透過性は増大することを明らかにした。³⁾

皮膚透過試験には、種々の動物の皮膚が使用される。HMを始めとした小動物は皮膚が薄く、角層の構造や機能も異なることから、一般に薬物の透過がヒトよりも速く、吸収促進剤の効果が大きく現れることが報告されている。^{4,5)}ブタの皮膚透過定数はHMやヘアレスラット及びヘアレスモルモットなどと比較して、ヒトにより近いことが知られており、多くの実験に使用されている。しかし毛穴の影響等の問題があり、ある種の薬物では透過性がヒト

^{a)}東京通信病院薬剤部, ^{b)}東京大学医科学研究所附属病院薬剤部, ^{c)}東京大学医学部附属病院薬剤部
e-mail: mootani@tpth.go.jp

と異なることからブタにおいても生後間もないものや耳が使用されている。⁶⁻⁸⁾ また最近では Yucatan hairless micropig (YHMP) が体毛が少なく、ヒトの皮膚に近く、いくつかの薬物でヒトの皮膚透過性の予測に有用であることが報告されている。⁹⁾

本研究では、ステロイド混合製剤のヒトにおける臨床効果を予測するために HM と YHMP の皮膚を用い、*in vitro* でのステロイド皮膚透過性を測定し、ヒトでの効果の指標である血管収縮反応との相関性について検討をした。

方 法

試料 使用した軟膏剤の商品名、成分及び基剤の種類及び乳化の型を Table 1 に示す。これらの軟膏及びクリームは、各製薬会社から購入して使用した。その他の試薬類はすべて試薬特級品を購入して用いた。

混合製剤の選択 混合に用いるステロイドの軟膏剤は当院において繁用されているアンテベート軟膏 (A)、ネリゾナユニバーサルクリーム (NC) 及びリドメックス軟膏 (L) を選択した。また、混合・希釈する軟膏あるいはクリームは、処方せん調査及び皮膚科学会総会のアンケート調査²⁾の結果において、混合される頻度の高かったヘパリノイド製剤のヒルドイドソフト (HS)、尿素軟膏のケラチナミン軟膏 (K) 及びパスタロンソフト (PS) を選択した。

混合製剤の調製 混合製剤は攪拌播潰機を用いて 1:1 で混合して調製した。¹⁰⁾ すなわち、混合する軟膏剤各 50 g を攪拌播潰機 (石川工場、東京) に同時に入れ、攪拌混合して全質均等として試験に供した。混合製剤の調製は皮膚透過実験の直前に行

った。

皮膚透過実験

1) 透過実験用皮膚——HM の皮膚は 10 週齢の雄性 Hr-1 系 (星野動物、東京) の背部を実験直前に摘出して用いた。YHMP の皮膚は雌の YHMP の凍結保存したスキンセット (日本チャールス・リバー、横浜) の背部皮膚を用いた。皮膚試料を使用する際は、あらかじめ室温で 1 時間程度放置して解凍した後、皮下の脂肪及び筋肉を切除して用いた。

2) 皮膚透過実験——皮膚透過実験は前報³⁾に従って行った。すなわち、縦型拡散セル (有効面積 π cm²) に HM あるいは YHMP の背部皮膚を装着し、温度 37°C で実験を行った。ドナー相には各混合製剤 400 mg を塗布し、レシーバー相には 40% ポリエチレングリコール (PEG) 400 を 15 ml 入れ、500 rpm で攪拌した。サンプリングは HM の場合、1 及び 2 日後にメンブランフィルター (0.45 μ m) を用いてレシーバー相から 200 μ l 採取後、新たな 40% PEG を 200 μ l 補充した。YHMP の場合は 12 時間、1, 2, 3, 4, 及び 7 日後に採取した。採取した試料は測定まで -80°C で保存した。試料中のステロイド濃度は、試料に 100 mM リン酸緩衝液 (pH 12.5) を 100 μ l 加え、40°C で 30 分間インキュベートして加水分解した後、高速液体クロマトグラフ法³⁾により測定して求めた。

3) ヒトでの血管収縮能との関係——L 単独と HS, K 及び PS との混合製剤について、HM あるいは YHMP の皮膚におけるステロイド透過性と前報で検討したステロイド軟膏剤の混合製剤によるヒトでの血管収縮による 2 時間後の皮膚蒼白化¹⁰⁾の total score とを比較した。

Table 1. Products Lists of Permeation Tests

Products	Ingredient	Base	Lot. No.	Manufactures
Corticosteroid preparations				
Antebate ointments	Betamethasone butyrate propionate	O ¹⁾	AY116N	Torii
Nerisona universal crames	Diflucortolone valerate	W/O ²⁾	12431	Nihon Schering
Lidomex ointment	Prednisolone valerate acetate	O	SK1W	Kowa
Moisuturized creams				
Keratinamin ointment	Urea	O/W ³⁾	D01A	Kowa
Pastaronsoft	Urea	W/O	BABN	Sato
Hirudoidosoft	Heparinoid	W/O	19406	Maruho

1) O: ointment, 2) W/O: water in oil, 3) O/W: oil in water

結 果

皮膚透過実験 A, NC あるいは L 単独とそれぞれの混合製剤から HM の皮膚を通しての 1 及び 2 日後におけるステロイド透過量の時間推移を Fig. 1 に示す. HM ではステロイド軟膏剤単独及び混合製剤いずれも 1 日目から検出された. 透過量は A, NC あるいは L の各市販ステロイド軟膏剤で異なり, 2 日後ではそれぞれ 2.06 ± 0.45 , 3.12 ± 0.25 及び $9.39 \pm 0.78 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$ であった. L は A や NC と比べてステロイドの皮膚透過性が高いことが認められた. A と HS 及び PS との混合製剤では A 単独と比べてほぼ同等の透過量を示し, 2 日後でそれぞれ 2.40 ± 0.41 及び $2.32 \pm 0.57 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$ であった. NC と PS との混合製剤では NC 単独と比べて約 2 倍高い透過量を示し, 2 日後で $6.74 \pm 0.27 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$ であった. L と HS, K 及び PS との混合製剤ではいずれも L 単独と比べて 3—4 倍高い透過量を示し, 2 日後でそれぞれ $26.81 \pm 1.80 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$, 32.45 ± 2.57 及び $37.19 \pm 2.62 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$ であった. ステロイド軟膏剤単独あるいは混合製剤からのステロイド皮膚透過速度はそれぞれ異なるものの, 塗布後 2 日間においていずれもほぼ一定であった.

A, NC あるいは L 単独とそれぞれの混合製剤からの YHMP の皮膚を通しての 1, 2, 4, 及び 7 日後におけるステロイド透過量の時間推移を Fig. 2

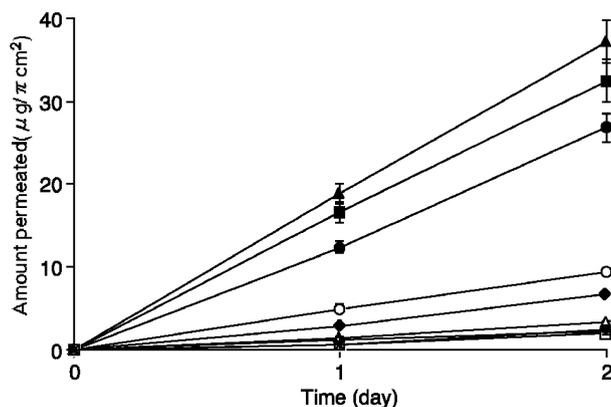


Fig. 1. Permeation Profiles of Corticosteroid Ointments, Creams, and Admixture with Moisturized Creams through Hairless Mouse Skin (n=3)

○=Lidmex ointment (L), □=Antebate ointment (A), △=Nerisona universal cream (NC), ●=L+Hirudoidosoft, ■=L+Keratinamin ointment, ▲=L+Pastaronsoft, ×=A+Hirudoidosoft, ◇=A+Pastaronsoft, ◆=NC+Pastaronsoft.

に示す. YHMP では HM と比べてステロイドの皮膚透過が遅く, NC 及び L では 2 日後から, A では 4 日後から検出され, 透過量も HM と比べて少なかった. YHMP においても L のステロイド透過性は A 及び NC と比べて高かった. 7 日後における透過量は A, NC あるいは L は, それぞれ $1.22 \pm 0.39 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$, 1.80 ± 0.09 及び $5.37 \pm 0.38 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$ であった. 一方, L との混合製剤では 2 日後, A 及び NC との混合製剤では 4 日後から検出された. 混合製剤からの透過量は A では単独と比べてほぼ同等であり, 7 日後では HS 及び PS との混合製剤はそれぞれ 1.42 ± 0.37 及び $1.37 \pm 0.28 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$ であった. NC では単独と比べて 2 倍高く, 7 日後では PS との混合製剤は $3.96 \pm 0.53 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$ であった. L では単独と比べて 2~3 倍高く, 7 日後では L と HS, K 及び PS との混合製剤はそれぞれ $11.70 \pm 1.19 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$, 14.22 ± 1.00 及び $15.47 \pm 1.91 \mu\text{g}/\pi \text{cm}^2$ であった. ステロイド軟膏剤単独あるいは混合製剤からのステロイド皮膚透過速度は塗布後 7 日間において, いずれもほぼ一定であった.

HM と YHMP との皮膚透過量の相関 HM と YHMP のステロイド皮膚透過速度の関係を比較した結果を Fig. 3 に示す. Fig. 3 に示すように, HM と YHMP のステロイド皮膚透過速度との間には良好な相関関係 ($r=0.995$) が認められた. また, HM のステロイド皮膚透過速度は YHMP の約 8 倍

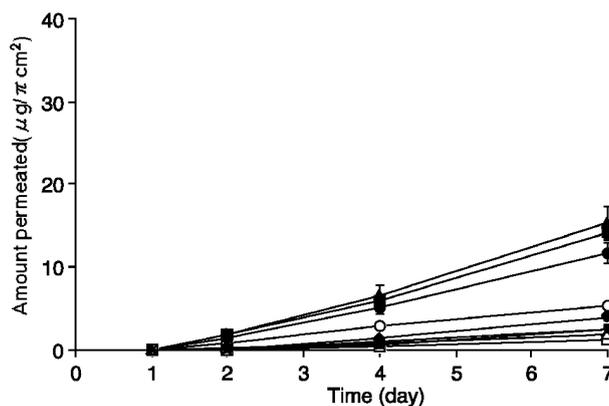


Fig. 2. Permeation Profiles of Corticosteroid Ointments, Creams, and Admixture with Moisturized Creams through Yucatan Hairless Micropig Skin (n=3)

○=Lidmex ointment (L), □=Antebate ointment (A), △=Nerisona universal cream (NC), ●=L+Hirudoidosoft, ■=L+Keratinamin ointment, ▲=L+Pastaronsoft, ×=A+Hirudoidosoft, ◇=A+Pastaronsoft, ◆=NC+Pastaronsoft.

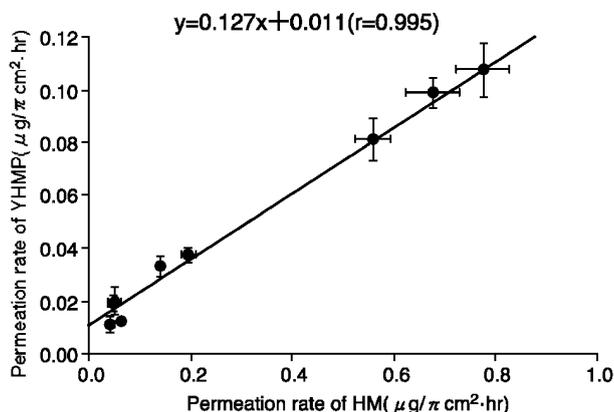


Fig. 3. Correlation of Permeation Rate of Corticosteroid Ointments, Creams, and Admixture with Moisturized Creams through Skin between Hairless Mice (HM) and Yucatan Hairless Micropig (YHMP)

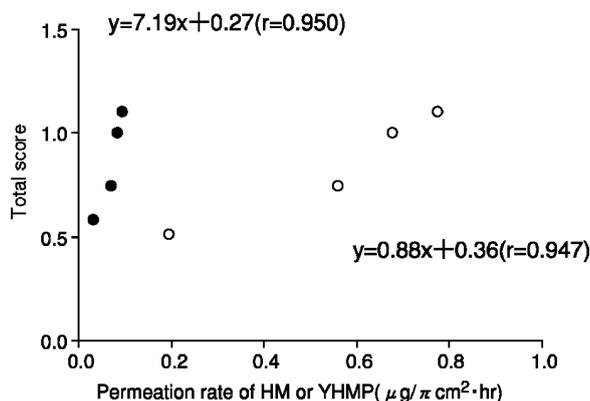


Fig. 4. Correlation between Total Score of Positive Blanching Phenomenon by Vasoconstrictor Activity¹¹⁾ and Permeability of Corticosteroid through Hairless Mice (HM) or Yucatan Hairless Micro Pig (YHMP) skin
○=HM, ●=YHMP.

であった。

HM と YHMP との皮膚透過量とヒトでの血管収縮反応の相関 ヒトにおける混合製剤 4 時間貼付し、除去後 2 時間の血管収縮反応による皮膚蒼白化現象の total score¹¹⁾ と HM と YHMP の *in vitro* のステロイド皮膚透過速度とを比較した。

Fig. 4 に示すように、ヒトにおける血管収縮による蒼白現象の total score と HM あるいは YHMP のステロイド皮膚透過速度との間にはそれぞれ良好な相関関係 (それぞれ $r=0.947$ 及び $r=0.950$) が認められた。

考 察

皮膚科領域においてコンプライアンスの向上、混合による効果の増強、及び副作用の軽減を目的として、軟膏剤などを混合する処方が増加している。²⁾ しかし、実際に混合により効果や副作用がどのように影響を受けるかはほとんど報告¹²⁾ がなく、検討されていない。ステロイドの軟膏剤では白色ワセリンで数倍に希釈しても、血管収縮反応の低下はあまりみられないことも報告¹³⁾ されている。この一因としてステロイドの作用がレセプターを介した作用であり、作用の発揮には高濃度のステロイドを必要としないこと¹⁴⁾ が指摘されているが、十分には明らかにされていない。これらの混合後の経皮吸収について検討するためには、ヒトの皮膚で評価することが望ましいが、倫理上問題があるばかりでなく、混合製剤のすべてについて評価するために必要なヒト皮膚を入手することも困難である。

HM を始めとした小動物は皮膚が薄く、角層の構造や機能も異なることから、一般に薬物の透過がヒトより速く、吸収促進剤の効果が大きく現れることが報告^{4,5)} されている。これに対し、YHMP はヒトの皮膚に似た網目状の皮溝が見られ、体毛はヒトの頭皮位とやや太いものの、体毛密度はヒトとほぼ同等であり、ステロイド外用剤による皮膚萎縮等の副作用もヒトと同様に認められることが報告^{15,16)} されている。今回の拡散セルを用いたステロイド軟膏剤及びそれとの混合製剤からのステロイド皮膚透過においても HM は透過が速く、YHMP と比較して透過速度が約 8 倍であり、藤井ら⁹⁾ の非ステロイド系消炎鎮痛薬の 3-7 倍と同様な結果となっている。しかし、Fig. 3 に示すように HM と YHMP の透過速度の間には良い相関関係 ($r=0.998$) が認められた。また、混合製剤による吸収促進効果も HM と YHMP いずれも認められたものの、HM が YHMP と比べてより大きく現れることはなかった。吸収促進効果の評価については、ニコランジルの皮膚透過においてブタ皮膚はヘアレスラットと比較して各種促進剤の効果が低くヒトに近いことが報告されている。¹⁷⁾ その原因として、真皮層が厚く、脂質量が影響していることが示唆されている。今回検討した 3 種類のステロイドと尿素軟膏あるいはヘパリノイド製剤では HM が YHMP と比べて促進効

果が過大に現れることがなく、その原因としてステロイドが脂溶性が高く、主に透過の機構が lipid pathway からであり、この透過は polar pathway と異なりラットにおいてもブタやヒトに近いことが考えられた。

ステロイド外用剤と尿素軟膏やヘパリノイド製剤との混合によりステロイド濃度は 1/2 に希釈されたものの、ステロイド透過量は HM と YHMP いずれも A との混合では単独と同等、NC 及び L ではそれぞれ 2 及び 2—4 倍となった。混合によるステロイドの透過が高まった原因として、尿素や乳化剤による吸収促進効果が報告されており、特に尿素では添加濃度に応じてステロイドの透過が高まることが示されている。¹⁸⁾ また混合後、遠心分離により乳化を破壊し、水が分離すると透過が著しく低下することから、乳化状態や水が透過の促進に影響していることも考えられる。³⁾ 乳化状態の影響については尿素を添加した場合は、皮膚透過性は w/o 型の方が o/w 型よりも優れていることも報告されている。¹⁹⁾

一方、吉草酸ベタメタゾン²⁰⁾やフルオシノロンアセトニド²¹⁾を含有するステロイド軟膏剤において、希釈しても血管収縮効果は低下せず、ステロイドの基剤からの放出が促進されることが報告されている。この原因として、希釈により種々の成分が加わることにより皮膚に直接影響することなく、基剤中の薬物の熱力学的活動度が増加すると考えられている。²¹⁾ 今回の HM と YHMP における研究でもステロイド透過速度は単独・混合製剤いずれも良く相関していたことから、皮膚への影響ではなく基剤中の薬物の熱力学的活動度が増加し、薬物の基剤からの escaping tendency (逃散傾向) や fugacity (逸散能) が高まったことが示唆された。

血管収縮によるヒトにおける蒼白化の total score¹¹⁾ と HM あるいは YHMP の皮膚透過速度の間には、いずれも良い相関関係が認められ、ヒトのステロイドによる血管収縮効果の予測に使用できることがわかった。また、HM はヒトと比べて透過性の低い YHMP よりステロイド透過速度が 8 倍程度大きく、飼育やコスト上の問題も少ないことから、迅速で簡便な皮膚モデルとして有用であることが示唆された。臨床においては多種の外用剤が異なった比率で処方されることから膨大な組み合わせが

化学的根拠なしに混合されており、早急な評価が必要である。そのため透過速度が速く、24 時間で透過実験が可能な HM は YHMP と比べて有用であると考えられた。

このことから、ステロイド軟膏剤やその混合製剤におけるヒトの臨床効果の評価は、HM 皮膚の拡散セルによるステロイド皮膚透過性により予測可能であることが示唆された。

REFERENCES

- 1) Tokyo Organization of Dermatology, *J. Jpn. Organi. Clin. Dermatol.*, **38**, 176–199 (1993).
- 2) Ethou T., *Clin. Dermatol.*, **55**, 96–101 (2001).
- 3) Ohtani M., Sakuma H., Tanayama K., Kotaki H., Sawada Y., Iga T., *Jpn. J. Hosp. Pharm.*, **23**, 11–18 (1997).
- 4) Bond J. R., Barry B. W., *J. Invest. Derm.*, **90**, 810–813 (1988).
- 5) Catz P., Friend D. R., *Int. J. Pharmaceut.*, **58**, 93–102 (1990).
- 6) Bhatti A. S., Scott R. C., Dyer A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **40** (Suppl.) (1988).
- 7) Dick I. P., R. Scott C., *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 640–645 (1992).
- 8) Dyer A., Aziza M. A. E., *Int. J. Cosmet. Sci.*, **11**, 175–183 (1989).
- 9) Fujii M., Yamanouchi S., Hori N., Iwanaga N., Kawaguchi N., Matsumoto M., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 249–254 (1997).
- 10) Ohtani M., Yokoyama M., Kotaki H., Sawada Y., Iga T., *Jpn. J. Hosp. Pharm.*, **19**, 493–502 (1993).
- 11) Ohtani M., Yamada N., Takayama K., Kotaki H., Ethou T., Kariya S., Uchino K., Iga T., *Yakugaku Zasshi*, **122**, 107–112 (2002).
- 12) Tajiri M., *Nishinohon Hifuka*, **58**, 271–277 (1996).
- 13) Gao H. Y., Wan Po A. L., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 71–75 (1994).
- 14) Asanuma H., *Nishinohon Hifuka*, **46**, 1361–1367 (1984).
- 15) Lavker R. M., Dong G., Zheng P., Murphy G. F., *American J. of Pathology*, **138**, 687–697 (1991).
- 16) Roberts M. E., Lavker R. M., *Pharm. Res.*, **7**, 673–676 (1990).
- 17) Sato K., Sugibayashi K., Morimoto Y., *J.*

-
- Pharm. Sci.*, **80**, 104–107 (1991).
- 18) Wohlrab W., *Acta Derm. Venereol (Stockh)*., **64**, 233–238 (1984).
- 19) Wohlrab W., *J. Apple Cosmetol.*, **9**, 1–7 (1991).
- 20) Woodford R., Barry B., *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 388–391 (1982).
- 21) Guin J., Wallis M. S., Walls R., Lehman P. A., Franz T. J., *J. Am. Acad. Dermatol.*, **29**, 197–202 (1993).