

## 被験物質の適用

- 開始時(時間 0)の値を測定後、速やかに眼球固定器を ICE 法検査装置から取り出し、角膜が上向きになるように眼球を水平に置き被験物質、陰性(溶媒)対照物質および陽性対照物質に曝露する。
- 液体の場合  
通常、原液のまま使用するが、希釈が必要な場合は生理食塩水を用いる。他の溶媒を用いることもできるが、その場合には溶媒として適切に用いることができるか十分に検討する必要がある。標準量として 0.03mL を用量として角膜を均一に覆うように曝露する。
- 固体の場合  
可能ならば乳鉢と乳棒、あるいは粉砕機で細かく粉砕して適用する。標準量として 0.03g を用量として角膜を均一に覆うように曝露する。
- 被験物質に 10 秒間曝露し、室温の生理食塩水約 20mL で眼球を洗浄した後、眼球固定器を ICE 法検査装置に設置する。被験物質が角膜に残っている場合には追加の洗浄を行うことができる。一般に洗浄に用いる生理食塩水の量は重要ではなく、被験物質が角膜に付着して残っているかを観察することが重要である。

## 対照物質

試験ごとに陰性対照物質または溶媒対照物質、および陽性対照物質を同時に試験する。

ICE 法では原液あるいは固体を被験物質として試験を行う場合、生理食塩水を陰性対照として用いる。

希釈した液体を被験物質として試験を行う場合、得られた結果が溶媒を用いることで生じる非特異的变化に起因するものではないことを確認するため、希釈に用いる溶媒を溶媒対照物質として用いる。

試験ごとに陽性対照物質も同時に試験して、適切な反応が誘導されることも確認する。

陽性対照物質の例としては液体の被験物質を試験する場合には10%酢酸あるいは5%塩化ベンザルコニウムがあり、固体の被験物質を試験する場合には水酸化ナトリウムあるいはイミダゾールがある。

ベンチマーク物質は、特定の化学物質または製品クラスに属する未知の化学物質の眼刺激性、または刺激反応が特定の範囲内にある眼刺激性物質の相対的刺激性を評価する上で有用である。

なお、被験物質との比較に用いられるベンチマーク物質は以下の要件を満たすものである。

(i)供給源に一貫性および信頼性があること、(ii)化学構造および機能が被験物質に類似していること、(iii)物理的／化学的特性が既知であること、(iv)既知の眼刺激作用に関するデータがあること、(v)眼刺激性が望ましい範囲内にあること(ヒトが安全に使用できること等)を示す既知のデータがあること、である。

## 測定評価項目

測定評価項目①角膜腫大および②角膜混濁については被験物質に曝露する前(時間 0)、曝露後の洗浄処置から 30、75、120、180、および 240 分後(±5 分)それぞれの時点で測定を行う。測定評価項目③フルオレセイン染色度については、曝露後の洗浄処置から 30 分後に測定を行う。以下に測定および評価方法を評価項目毎に示す。

### ① 角膜腫大(Corneal swelling)

光学的厚度計(Optical Pachymeter)を装着した細隙灯顕微鏡を用いて角膜の厚さを測定し(※1)、個々の眼球の角膜厚の変化率を以下の計算式により求める。被験物質、陰性(溶媒)対照物質および陽性対照物質の各試験群の値は各眼球(n≥3)から得られた値の平均値として表す。

$$\left( \frac{\text{時間}t\text{における角膜の厚さ} - \text{時間}0\text{における角膜の厚さ}}{\text{時間}0\text{における角膜の厚さ}} \right) \times 100$$

※1 角膜厚を Haag-Streit BP900 細隙灯顕微鏡に取り付けた深度測定装置 no. 1 を用いてスリット幅設定値 9½ (0.095 mm) で測定したときに限り角膜腫大スコアが適用できる。スリット幅の設定が異なれば細隙灯顕微鏡の角膜厚測定結果が異なることに注意する。

各時点で得られた値のうち最高値を最高平均角膜厚変化率(%)として採用し、表 1 に従って ICE クラス I ~IV に分類する。

表 1. 角膜厚に関する ICE クラス分類

最高平均角膜厚変化率(%)※2	ICEクラス
0-5	I
6-12	II
13-18(75分経過後)	II
13-18(75分以内)	III
19-26	III
27-32(75分経過後)	III
27-32(75分以内)	IV
32超	IV

※2 各時点で得られた平均角膜厚変化率の中で最高値

### ② 角膜混濁(Corneal opacity)

角膜の最も混濁した部分について細隙灯顕微鏡を用いて評価し、角膜混濁の程度を表 2-1 に従い 0~4 の評点(スコア)で採点する。被験物質、陰性(溶媒)対照物質および陽性対照物質の各試験群の値は各眼球(n≥3)から得られた値の平均値として表す。次に、平均角膜混濁

度の最高値(最高平均角膜混濁度)に基づき試験群毎の ICE クラスを表 2-2 に従い I ~IV に分類する。

表 2-1. 角膜混濁の観察所見とスコア

スコア	観察所見
0	混濁なし
0.5	ごくかすかな混濁
1	散在性またはびまん性の混濁領域があるが、虹彩は明視できる
2	半透明の領域を容易に識別できるが、虹彩の細部はわずかに不鮮明
3	かなり混濁して虹彩の細部を識別できないが、瞳孔の大きさはかろうじて判別できる
4	完全に混濁し、虹彩も透視できない

表 2-2. 角膜混濁度に関する ICE クラス分類

最高平均角膜混濁度※3	ICEクラス
0.0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-4.0	IV

※3 各時点で得られた平均角膜混濁度の中での最高値

### ③ フルオレセイン染色度 (Fluorescein retention)

細隙灯顕微鏡を用いてフルオレセイン染色度を評価し、表 3-1 に従い 0~3 の評点(スコア)で採点する。被験物質、陰性(溶媒)対照物質および陽性対照物質の各試験群の値は各眼球 (n ≥ 3) から得られた値の平均値として表す。次に、平均フルオレセイン染色度に基づき試験群毎の ICE クラスを表 3-2 に従い I ~IV に分類する。

表 3-1. フルオレセイン染色度

スコア	観察所見
0	フルオレセイン染色を認めない
0.5	ごく少数の点状染色が認められる
1	角膜の処理領域のいたるところに散在する点状染色が認められる
2	濃染された、巣状または斑状の点状染色が認められる
3	融合し、広がった染色領域が見られる

表 3-2. フルオレセイン染色度に関する ICE クラス分類

平均フルオレセイン染色度 ※4	ICEクラス
0-0.5	I
0.6-1.5	II
1.6-2.5	III
2.6-3.0	IV

※4 被験物質、陰性（溶媒）対照物質および陽性対照物質の曝露処理から 30 分後の平均フルオレセイン染色度

### 形態変化の観察

形態学的変化が観察された場合は、それを記録する。形態学的変化には角膜上皮細胞の「くぼみ」、上皮の「疎面化」、角膜表面の「粗化」、角膜に対する被験物質の「付着」等がある。

#### 1-2-2. 判定:

測定評価項目①角膜腫大、②角膜混濁、および③フルオレセイン染色度の結果から得られたそれぞれの ICE クラス分類の結果を総合して眼刺激性の判定を行う。以下の場合には『無刺激性』であると結論できる。

- ・ 3 種類の測定評価項目に関する ICE クラスがすべて I であった場合
- ・ 3 種類の測定評価項目に関する ICE クラスのうち、2 項目が I であり、1 項目が II であった場合

#### 1-3. 試験実施上の留意点

##### 1-3-1. 試験実施における各種条件および注意事項

試験施設については、新鮮なニワトリ眼球を入手できることが必要である。なお、新たに試験を実施する試験施設では、ICE 法の習熟度確認物質等を活用し精度の向上に努めること。

##### 1-3-2. 試験成立条件について

試験成立条件は、陰性（溶媒）対照物質が無刺激性、陽性対照物質が刺激性と判定される結果が得られた場合である。陽性対照物質における刺激性判定の基準は以下のとおりである。①3 種類の評価項目のうち少なくとも 2 項目の ICE クラスが IV、②30 分後の角膜混濁度が 2 眼球以上で 3 以上、③いずれの時点でも角膜混濁度が 2 眼球以上で 4、④1 眼球以上で上皮の重度の疎面化。

## 2. 本試験法の運用方法に関する留意点

- 1) 本試験法で原料を評価し、無刺激性と判定された場合は、原料は無刺激性であると結論できる<sup>11)</sup>。
- 2) 1)で原料を評価した結果、無刺激性と判定されなかった場合でも、以下の手順で原料または製剤の評価を行うことができる。
  - ① 原料を製剤配合濃度以上の濃度で調製した溶液で試験を行い、判定が無刺激性であった場合は、その濃度では無刺激性であると結論できる<sup>11)</sup>。
  - ② 原料の製剤配合濃度以上の濃度に調製した溶液で試験を行い、判定が無刺激性ではない場合は、最終製剤を用いて評価し、判定が無刺激性であった場合は、最終製剤は無刺激性であると結論してもよい。また、原料に関連したベンチマーク物質との相対評価を行うこともできる。
- 3) 本試験法の偽陽性率は約 33%と報告されている<sup>10)</sup>。そのため本試験法の結果から無刺激性であると判断できない場合に他の試験法による評価を実施し眼刺激性を検討することもできる。

## 3. 引用文献

- 1) Draize, J.H. (1959) Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics, Association of Food and Drug Officials of the United States
- 2) OECD (2012). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion.  
[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en\\_2649\\_34387\\_37051368\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34387_37051368_1_1_1_1,00.html)
- 3) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu\\_tmmer.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmmer.htm)
- 4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 5) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report – Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>

- 6) United Nations (UN) (2011). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fourth revised edition, UN New York and Geneva, 2011. Available at: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev04/04files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_e.html)
- 7) OECD (2009). Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants
- 8) OECD (2013). Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage
- 9) ニワトリ摘出眼球を用いた眼刺激性試験法 (ICE 法: Isolated Chicken Eye Test) の評価会議報告書、JaCVAM 評価会議、平成 21 年 (2009 年) 12 月 17 日、平成 23 年 (2011 年) 4 月 20 日改定
- 10) 眼刺激性代替法の評価会議報告書 2013 年改訂 OECD TG438 ニワトリ眼球を用いた眼刺激性試験 (ICE 法: Isolated Chicken Eye Test)、JaCVAM 評価会議、平成 26 年 (2014 年) 10 月 28 日
- 11) 眼刺激性分科会、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会最終報告書－眼刺激性分科会報告－、平成 21 年度厚生労働科学研究 動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究、平成 22 年 (2010 年) 4 月

その他関連情報

ICE法の習熟度確認物質

化学物質	CAS番号	分類 <sup>1</sup>	物理的状态	<i>In vivo</i> での区分 <sup>2</sup>	ICEでの区分 <sup>3</sup>
塩化ベンザルコニウム(5%) Benzalkonium chloride (5%)	8001-54-5	オニウム化合物類 Onium compound	液体 Liquid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
クロルヘキシジン Chlorhexidine	55-56-1	アミン類、アミジン類 Amine, Amidine	固体 Solid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
ジベンゾイル-L-酒石酸 Dibenzoyl-L- tartaric acid	2743-38-6	カルボン酸類、エステル類 Carboxylic acid, Ester	固体 Solid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
イミダゾール Imidazole	288-32-4	ヘテロサイクリック類 Heterocyclic	固体 Solid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
トリクロロ酢酸(30%) Trichloroacetic acid (30%)	76-03-9	カルボン酸類 Carboxylic acid	液体 Liquid	区分1 Category 1	区分1 Category 1
2,6-ジクロロベンゾイルクロリド Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	アシルハライド類 Acyl halide	液体 Liquid	区分2A <sup>5</sup> Category 2A	区分不可 <sup>4</sup>
硝酸アンモニウム Ammonium nitrate	6484-52-2	無機塩 Inorganic salt	固体 Solid	区分2B <sup>5</sup> Category 2B	区分不可 <sup>4</sup>
エチル-2-メチルアセト酢酸 Ethyl-2-methylacetoacetate	609-14-3	ケトン類、エステル類 Ketone, Ester	液体 Liquid	区分2B <sup>5</sup> Category 2B	区分不可 <sup>4</sup>
ジメチルスルホキシド(DMSO) Dimethyl sulfoxide	67-68-5	有機硫黄化合物 Organic sulphur compound	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified
グリセロール Glycerol	56-81-5	アルコール類 Alcohol	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified
メチルシクロペンタン Methylcyclopentane	96-37-7	炭化水素(環状) Hydrocarbon (cyclo)	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified
n-ヘキサン n-Hexane	110-54-3	炭化水素(鎖状) Hydrocarbon (acylic)	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified
トリアセチン Triacetin	102-76-1	脂質 Lipid	液体 Liquid	区分外 Not Classified	区分外 Not Classified

略号等： CAS 番号:Chemical Abstracts Service Registry Number (CASRN)

<sup>1</sup>National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH) 分類

(<http://www.nlm.nih.gov/mesh>)に基づき、標準的な分類スキームを用いてそれぞれの被験物質に化学的分類を割り当てた。

<sup>2</sup>*in vivo* rabbit eye test (OECD TG 405)の結果に基づき、UN GHSに従って表示。

<sup>3</sup>ICE法による判定の結果に基づき、UN GHSに従って表示。

<sup>4</sup>ICE法による評点の組み合わせでUN GHSによる区分で区分1や区分外に該当しない場合、区分不可とした。

<sup>5</sup>2A または 2B の区分については、GHS 基準の解釈による。*in vivo* 試験では 3 匹の動物を用いる。区分 2A の分類には 7 日目に 3 匹のうち 1 匹での反応となるか、または 3 匹のうち 2 匹での反応となるかによる。1 匹の動物において、結膜充血以外の項目で 7 日目より前にスコアが 0 となり回復を示す。7 日目に完全に回復しない 1 匹の動物に関しては、7 日目の結膜充血スコアが 1 であり、10 日目までに完全に回復する。

厚生労働科学研究費補助金  
(地球規模保健課題推進研究事業(地球規模保健課題解決推進のための研究事業))  
新規動物試験代替法の開発、国際標準化及び普及促進に関する研究

平成 26 年度分担研究報告書

## 動物実験代替法と皮膚透過性によるリスク評価手法の構築

研究分担者 杉林 堅次  
城西大学薬学部 薬粧品動態制御学講座 教授

### 研究要旨

皮膚に塗布した化学物質の安全性は、それらの皮膚中濃度により決定するため、化学物質の皮膚中濃度の予測は、皮膚暴露した化学物質のリスク評価の有効な手法となりうる。これまでに我々は、皮膚透過性試験から得られたパラメータを用いて、皮膚中濃度を算出できることを報告している。したがって、*in silico* や代替膜を用いて得られた皮膚透過性から、ヒト皮膚もしくは動物皮膚を介した化学物質の皮膚透過性の予測ができれば、代替法を用いたリスク評価を行うことが可能となる。そこで本年度は、化学物質の皮膚透過パラメータと皮膚中濃度の関係を明らかにし、次に、皮膚局所作用薬および全身性作用薬の皮膚透過係数を論文等にて調査し、皮膚透過係数と作用部位との関係を明らかにする。最後に、代替膜 (Strat-M™) を介した皮膚透過からヒト皮膚透過性が予測できるかを明らかにすることで、代替法を用いたリスク評価法の確立の可能性について報告する。

皮膚透過パラメータから算出した平均皮膚中濃度計算値と皮膚中濃度実測値との間にはほぼ 1 : 1 の良好な関係が得られたが、いくつかの水溶性物質は、信頼区間から外れる化学物質が見られた。この結果から、化学物質の物理化学的特性を考慮することで、ヒト摘出皮膚や動物摘出皮膚透過性に基づいた化学物質のリスク評価が可能であると考えた。さらに、人工膜である Strat-M™ を用いた検討から、水基剤からの化学物質のヒト皮膚透過性を予測できることが分かった。この結果より、本研究で用いた化学物質の物理化学的性質の範囲であれば (M.W. 300 Da 以下、 $1 \leq \log K_{ow} < 4$ )、代替膜を用いた透過性試験結果をリスク評価に用いることができると考えられた。

### 研究協力者

藤堂 浩明 城西大学薬学部  
薬粧品動態制御学講座  
准教授

### A. 研究目的

皮膚に適用された化学物質の安全性や有効性は、化学物質の皮膚中濃度により決まるため、皮膚中濃度が適用物質の皮膚透過性から



予測できれば、皮膚透過性の値を指標とした化学物質のリスク評価を行うことができる。また、*in silico* 手法や代替膜を用いた試験より、ヒト皮膚もしくは動物皮膚を介した化学物質の皮膚透過性が予測できれば、代替法を用いたリスク評価を行うことが可能となる。本年度はまず、化学物質の皮膚透過パラメータと皮膚中濃度の関係を明らかにする。次に、皮膚局所作用薬および全身性作用薬の皮膚透過係数を論文等にて調査し、皮膚透過係数と作用部位との関係を明らかにする。最後に、代替膜 (Strat-M™) を介した物質透過性からヒト皮膚透過性が予測できるかを明らかにする。これらを検討することで、皮膚透過性の値に、基づいた代替法を用いたリスク評価の可能性について述べる。

## B. 実験方法

### B-1. 理論

皮膚透過挙動からの透過パラメータ算出方法 1-4)

#### i. Fick の拡散則に従う 1 層膜モデル透過挙動の解析

角層を *tape-stripping* で取り除いた生きた表皮・真皮からなる *viable epidermis and dermis* を 1 層膜モデルと仮定し、各化学物質の *stripped skin* 透過性を解析した。また、本実験では有限用量系で行い、かつレシーバ側は *sink* 条件下で行った。Figure 1a に有限用量系における化学物質の 1 層膜透過の模式図 (*concentration-distance profile*) を示す。

*Viable epidermis and dermis* における位置  $x$ 、時間  $t$  の化学物質濃度  $C_{ved}$  は、Fick の第 2 拡散則から以下のように表すことができる。

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 $D_{ved}$  は生きた表皮・真皮中の化学物質拡散係数を表す。

初期条件および境界条件は以下のように仮定した。

$$t = 0 \\ 0 < x < L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

$$t > 0 \\ x = 0 \quad C_{ved} = K_{ved/v} \cdot C_v$$

$$\text{および} \quad \frac{dC_v}{dx} = D_{ved} \frac{dC_{ved}}{dx}$$

$$x = L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

ここで、 $L_{ved}$  は生きた表皮・真皮の厚み、 $K_{ved}$  は基剤-生きた表皮・真皮間化学物質分配係数、 $C_v$  は基剤中化学物質濃度である。位置  $x$ 、時間  $t$  における  $C_{ved}$  は、初期条件および境界条件によって算出される。また、レシーバ側への化学物質の *Viable epidermis and dermis* 透過度  $Flux_{ved}$  は Fick の第 1 法則 (式(2)) で表すことができる。さらに、 $Flux_{ved}$  を積分することにより化学物質の単位面積当たりの *viable epidermis and dermis* 累積透過量  $Q_{ved}$  が求められる (式(3))。

$$Flux_{ved} = -D_{ved} \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (2)$$

$$Q_{ved} = -D_{ved} \int_0^t \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (3)$$

また、Fick の拡散第 2 法則は差分法 (16, 18) により、式(4)および式(5) に変換することができる。

$$\frac{dC_{ved,i,j+1}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (4)$$

$$\frac{dC_{ved,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{ved,i-1,j} - 2C_{ved,i,j} + C_{ved,i+1,j}) \quad (5)$$

ここで、 $C_{ved,i,j}$  は皮膚における表面側から  $i$  番目の位置の  $j$  時間目の化学物質濃度を表す ( $i, j$  は自然数である)。 $\Delta x$  は  $x_{i+1} - x_i$  を、 $\Delta t$  は  $t_{j+1} - t_j$  を表す。式 (4)、式 (5) を式 (1) に代入すると次式が得られる。

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved}C_{ved,i-1,j} + (1-2rD_{ved})C_{ved,i,j} + rD_{ved}C_{ved,i+1,j} \quad (6)$$

ここで、 $r$ は  $\Delta t/\Delta x^2$  を表す。差分法を用いると式(2)と式(3)はそれぞれ式(7)と式(8)になる。

$$Flux_{st,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,m+1,j} - C_{ved,m,j}}{\Delta x} \quad (7)$$

$$Q_{st,j} = Q_{st,j-1} + J_{st,j} \cdot \Delta t \quad (8)$$

ここで、 $m$  は皮膚の区分数を表す。 $Flux_{st,j}$  は  $m = 10$  にセットして Microsoft® Excel を用いて計算した。なお、この計算では、 $\Delta t$  は  $D_{ved} \Delta t/\Delta x^2$  に対して 0.5 未満となるようにセットした。 $Q_{st,j}$  は式(8)を用いて計算した。 $D_{ved}$  と  $K_{ved}$  は  $Q_{st,j}$  の実測値を非線形最小二乗法を用いてカーブフィッティングすることにより算出した。なお、非線形最小二乗法は Microsoft® Excel Solver を使って行った。計算条件は制限時間 100 s、反復回数 100 回、精度 0.000001、基本公差 5%、収束 0.0001 とした。Pseudo-Newtonian method をアルゴリズムとして用いた。

## ii. Fick の拡散則に従う 2 層膜モデル透過挙動の解析

次に、全層皮膚(full-thickness skin)を角層と生きた表皮・真皮からなる 2 層膜モデルとして仮定した。Figure 1b に 2 層モデルの模式図を示す。Full-thickness skin における位置  $x$ 、時間  $t$  の化学物質濃度  $C_{sc}$  は、Fick の第 2 法則から以下のように表すことができる(式(9))。Viable epidermis and dermis における位置  $x$ 、時間  $t$  の化学物質濃度  $C_{ved}$  は、式(1)で表される。

$$\frac{\partial C_{sc}}{\partial t} = D_{sc} \frac{\partial^2 C_{sc}}{\partial x^2} \quad (9)$$

$$\frac{\partial C_{ved}}{\partial t} = D_{ved} \frac{\partial^2 C_{ved}}{\partial x^2} \quad (1)$$

ここで、 $D_{sc}$  は角層中の化学物質拡散係数を

表す。初期条件および境界条件は以下のように仮定した。

$$t = 0 \quad -L_{sc} < x < 0 \quad C_{sc} = 0$$

$$0 < x < L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

$$t > 0 \quad x = -L_{sc} \quad C_{sc} = K_{sc} \cdot C_v$$

$$x = 0 \quad C_{ved} = K_{ved/sc} \cdot C_{sc}$$

$$\text{および } D_{sc} \frac{dC_{sc}}{dx} = D_{ved} \frac{dC_{ved}}{dx}$$

$$x = L_{ved} \quad C_{ved} = 0$$

ここで、 $L_{sc}$  は角層の厚み、 $K_{sc}$  は基剤・角層間化学物質分配係数、 $K_{ved/sc}$  は角層・生きた表皮・真皮間化学物質分配係数を表す。 $C_{sc}$  と  $C_{ved}$  は初期条件および境界条件から Fick の第 2 則に従って変化すると考えて、差分法を用いて計算できる。レシーバ側への full-thickness skin 透過度  $Flux_{full}$  は式(10)より、単位面積当たりの full-thickness skin 累積透過量  $Q_{full}$  は式(11)で表すことができる。

$$Flux_{full} = -D_{ved} \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} \quad (10)$$

$$Q_{full} = -D_{ved} \int_0^t \left( \frac{dC_{ved}}{dx} \right)_{x=L_{ved}} dt \quad (11)$$

また、式(9)は式(12)と式(13)に、式(1)は式(4)と式(5)に変換することができる。

$$\frac{dC_{sc,i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{sc,i,j+1} - C_{sc,i,j}) \quad (12)$$

$$\frac{d^2 C_{sc,i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{sc,i-1,j} - 2C_{sc,i,j} + C_{sc,i+1,j}) \quad (13)$$

$$\frac{dC_{ved,i,j+1}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (4)$$

$$\frac{dC_{ved,i,j+1}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{ved,i,j+1} - C_{ved,i,j}) \quad (5)$$

式(12)と式(13)を式(9)に、式(4)と式(5)を式(1)

に代入すると式(14)と式(6)が得られる。

$$C_{sc,i,j+1} = rD_{sc}C_{sc,i-1,j} + (1-2rD_{sc})C_{sc,i,j} + rD_{sc}C_{sc,i+1,j} \quad (14)$$

$$C_{ved,i,j+1} = rD_{ved}C_{ved,i-1,j} + (1-2rD_{ved})C_{ved,i,j} + rD_{ved}C_{ved,i+1,j} \quad (6)$$

ここで、 $\mu$ は  $\Delta t/\Delta x^2$  を表す。差分法を用いると式(10)、式(11)はそれぞれ式(15)、式(16)になる。

$$Flux_{full,j} = -D_{ved} \frac{C_{ved,n+1,j} - C_{ved,n,j}}{\Delta x} \quad (15)$$

$$Q_{full,j} = Q_{full,j-1} + Flux_{full,j} \cdot \Delta t \quad (16)$$

ここで、 $n$  は角層および生きた表皮・真皮の区分数とした。 $Flux_{full,j}$  は  $n = 10$  にセットして Microsoft® Excel を用いて計算した。 $D_{sc}$  と  $K_{sc}$  は  $Q_{full,j}$  の実測値を非線形最小二乗法を用いてカーブフィッティングすることにより算出した。また、 $D_{ved}$  と  $K_{ved}$ には、viable epidermis and dermis の1層膜モデルの透過挙動解析から算出した値を用いた。なお、計算は1層膜モデルの透過挙動解析と同様の方法で行った。

### iii. 2 層膜モデル平均皮膚中濃度予測

2層膜モデルにおいては全体の透過係数  $P_{tot}$  は角層の透過係数  $P_{sc}$  と生きた表皮・真皮の透過係数  $P_{ved}$  を用いて以下のように示される<sup>3)</sup>。

$$\frac{1}{P_{tot}} = \frac{1}{P_{sc}} + \frac{1}{P_{ved}} \quad (29)$$

また、これら透過係数の逆数  $1/P_{tot}$ ,  $1/P_{sc}$ ,  $1/P_{ved}$  は透過抵抗  $R_{tot}$ ,  $R_{sc}$ ,  $R_{ved}$  となるので

$$R_{tot} = R_{sc} + R_{ved} \quad (30)$$

となる。化学物質の膜透過性は抵抗モデルで表すことができるため、Fig. 1b の  $L_{sc}$ ,  $L_{ved}$  を抵抗として考えた。

Figure 1b の角層と生きた表皮・真皮界面での point a, b, c において、ab と bc の比が  $R_{sc}$  と  $R_{ved}$  の比で示されることになる。すな

わち、point b での化学物質濃度は式(31)で表すことができる。

$$C_b = K_{sc} \times C_v \times R_{ved}/R_{tot} \quad (31)$$

式(31)を用いることにより、単位面積当たりの角層中化学物質質量  $M_{sc}$  は式(32)のように表すことができる。

$$M_{sc} = (K_{sc} \times C_v + K_{sc} \times C_v \times R_{ved}/R_{tot}) \times L_{sc} / 2 \quad (32)$$

次に、角層から生きた表皮・真皮への分配係数は  $K_{sc}$  と  $K_{ved}$  の定義から  $K_{ved}/K_{sc}$  と表すことができる。この比を使って単位面積当たりの生きた表皮・真皮中化学物質質量  $M_{ved}$  は式(33)のように表すことができる。

$$M_{ved} = K_{ved} \times C_v \times L_{ved} \times R_{ved} / R_{tot} / 2 \quad (33)$$

式(32)と式(33)を足すと単位面積当たりの皮膚中化学物質質量  $M_{tot}$  は次のように示すことができる。

$$M_{tot} = \frac{C_v}{2} \{ K_{sc} \times L_{sc} \times (1 + R_{ved}/R_{tot}) + K_{ved} \times L_{ved} \times R_{ved}/R_{tot} \} \quad (34)$$

式(34)を  $L_{tot}$  で割ると、化学物質の平均皮膚中濃度  $C_{ss}$  が求められる。

$$\bar{C}_{ss} = \frac{C_v}{2 \times L_{tot}} \{ K_{sc} \times L_{sc} \times (1 + R_{ved}/R_{tot}) + K_{ved} \times L_{ved} \times R_{ved}/R_{tot} \} \quad (35)$$

式(35)を透過係数  $P$  で示すと次のように変形できる。

$$\bar{C}_{ss} = \frac{C_v}{2 \times L_{tot}} \{ K_{sc} \times L_{sc} \times (1 + P_{tot}/P_{ved}) + K_{ved} \times L_{ved} \times P_{tot}/P_{ved} \} \quad (36)$$

### B-2. 実験材料

Table 1 には化学物質の  $M.W.$ , 酸解離定数(pKa)および  $\log K_{o/w}$  を示す。今後、 $\log K_{o/w} \geq 1$  の化学物質を脂溶性化学物質とし、 $\log K_{o/w} < 1$  の化学物質を水溶性化学物質と称する。アンチピリン(ANP)、カフェイン(CAF)、アミノピリン(AMP)、安息香酸(BA)、エピネ

フリン塩酸塩(Epi)および *p*-アミノ安息香酸メチル(M-PABA)は和光純薬工業株式会社(大阪, 日本)から、*p*-アミノ安息香酸エチル(E-PABA)、*p*-アミノ安息香酸プロピル(P-PABA)、*p*-アミノ安息香酸ブチル(B-PABA)より購入した。コチン酸メチル(MN)、ニコチン酸エチル(EN)、ニコチン酸ブチル(BN)、ニコチン酸(NA)、*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル(MP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル(EP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸プロピル(PP)、*p*-ヒドロキシ安息香酸ブチル(BP)および一硝酸イソソルビド(ISMN)は東京化成工業株式会社(東京, 日本)から、リドカイン塩酸塩(LC)およびドーパミン塩酸塩(Dopa)はシグマアルドリッチジャパン合同株式会社(東京, 日本)から購入した。また、二硝酸イソソルビド(ISDN)およびエステルゼ阻害剤であるフルオロリン酸ジイソプロピル(DFP)は東光薬品工業株式会社(東京, 日本)より贈与された。その他の試薬は市販の特級品または高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用を精製せずにそのまま用いた。

### B-3. 皮膚

雄性ヘアレスラット(WBM/ILA-Ht、体重200-250 g)は城西大学生命科学研究センター(埼玉, 日本)または東京実験動物研究所(埼玉, 日本)より購入した。なお、動物実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾を得た後、城西大学全学動物実験規定に従い行った。

ヒト皮膚(白人女性、43-55歳、厚み480-503 $\mu$ m)は、株式会社ケー・エー・シー(京都, 日本)より株式会社ケー・エー・シーのヒト組織由来製品の倫理・安全性委員会の許可を受けた皮膚を購入した。さらに、代替膜としてStrat-M™をMerck Millipore Co.(ビレリカ、マサチューセッツ州、U.S.A)から購入した。

### B-4. 皮膚前処理方法

ペントバルビタール麻酔下(50 mg/kg、

*i.p.*)、ヘアレスラット腹部皮膚(intact skinおよびstripped skin)を摘出し、真皮側の脂肪と血液を丁寧に取り除いた。なお、stripped skinは粘着テープ(セロテープ®、ニチバン株式会社、東京)を用いて20回tape-stripping処理<sup>4,7)</sup>を行った後、摘出した。ヒト皮膚は、凍結皮膚を32°Cの水浴で1時間解凍後用いた。Strat-M™はそのまま用いた。

### B-5. *in vitro* 皮膚透過実験

Intact skinまたはstripped skinを縦型拡散セル(有効透過面積1.77 cm<sup>2</sup>)にセットし、PBSを用いてヘアレスラット皮膚の場合は30分、ヒト皮膚の場合は12時間水和した。Strat-M™は水和せずに用いた。角層側(Strat-M™では上面側)に種々濃度に調製した薬物溶液を、真皮側にPBSを適用し、実験を行った。実験中、セル内の温度を32°Cに保ち、セル内をマグネットスターラーで攪拌した。経時的にレシーバ溶液をサンプリングし、その都度、同量のPBSを補充した。サンプル中のエステル化合物および代謝物濃度はHPLCを用いて測定した。また、エステルの皮膚透過パラメータ算出のため、intact skinおよびstripped skinのDFP処理を行った。ヘアレスラット皮膚摘出後、DFP(2.7  $\mu$ mol/mL)を角層側および真皮側に30分間適用した。その後、DFP溶液を取り除き、角層側に種々濃度に調製したエステル化合物を、真皮側にDFP(0.54  $\mu$ mol/mL)を溶解させたPBSを適用し、上記と同様の実験を行った<sup>1,7,8)</sup>。また、ヒト摘出皮膚を用いた場合は、32°Cで解凍後、11時間水和した後、ラット皮膚と同様にDFP処理を施した。

### B-6. 皮膚中濃度測定

*In vitro* 皮膚透過実験終了後、適用したドナー溶液を回収し、ヘアレスラット皮膚およびヒト皮膚の角層側および表皮側をPBSで洗浄した。その後、皮膚表面の余分な水分をキムワイプで拭きとった後、液体窒素を用い瞬

間冷却した。4°C 下で解凍および有効透過面積部分の切り取りを行い、皮膚重量を測定した。一方、エステラーゼにより代謝される可能性がある薬物の皮膚中濃度を測定する場合は、DFP (2.7  $\mu\text{mol/mL}$ ) を 30 分間皮膚に適用した後、皮膚重量を測定した。皮膚重量測定後、皮膚をハサミで細断し、電動ホモジナイザー (Polytron PT 1200 ; Kinematica AG, Littau-Lucerne, Switzerland) を用いてホモジネートを作製した (12,000 rpm、5 min、4°C)。その後、PBS に溶解させた 16% トリクロロ酢酸水溶液を加え 15 分攪拌し、遠心分離 (15,000 rpm、5 min、4°C) 後、上清中のエステルおよび代謝物の濃度を HPLC で測定した。

#### B-7. 抽出率測定

ヘアレスラット腹部皮膚およびヒト皮膚をハサミで細断し、既知濃度の薬物を加え、皮膚中濃度測定と同条件でホモジネートを作製した。上清中薬物濃度を測定し、得られた値から抽出率を算出した。

#### B-8. 定量方法

得られたサンプルにアセトニトリルを加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、遠心分離 (15,000 rpm、5 min、4°C) し、Table 2 に示した HPLC で測定した。また、HPLC のシステムは、システムコントローラー SCL-10A<sup>VP</sup> (島津製作所、京都、日本)、UV 検出器 SPD-10A (島津製作所、京都、日本)、オートインジェクター SIL-10AXL (島津製作所、京都、日本)、カラムオープン CTO-10A (島津製作所、京都、日本)、送液ユニット LC-10AD (島津製作所、京都、日本)、脱気装置 DGU-20A<sub>3</sub> (島津製作所、京都、日本)、カラム a; Inertsil® ODS-3、4.6 mm × 150 mm、(GL サイエンス株式会社、東京、日本)、もしくは、b; CAPCELL PAK C18、UG120 S5、4.6 × 250 mm (資生堂、東京、日本)、データ解析ソフト SmartChrom (株式会社ケーワ

イーテクノロジーズ、東京、日本) からなる。

#### B-9. 統計解析

皮膚透過パラメータから算出した皮膚中濃度の計算値と実測値の相関性の検定やヒト皮膚もしくはラット皮膚透過性と Strat-M<sup>TM</sup> を介した化学物質の透過性の相関性の検定には Pearson の相関係数を用い、いずれの場合も危険率 5%以下を有意と判断した。

### C. 結果

#### C-1. 全身作用型および局所作用型薬物の皮膚透過係数調査結果<sup>9)</sup>

Table 3 に市販されている全身作用型および局所作用型薬物の皮膚透過係数を示す。多くの全身作用型薬物の皮膚透過係数は、局所作用型薬物の皮膚透過係数よりも高く、一部の薬物を除いて、 $10^{-5} \text{ cm/s}$  から  $10^{-7} \text{ cm/s}$  の透過係数であった。一方、局所作用型薬物皮膚透過係数は多くの薬物が  $10^{-8} \text{ cm/s}$  から  $10^{-10} \text{ cm/s}$  の値を示した。

#### C-2. 皮膚透過性と皮膚中濃度評価

Figure 3 にヘアレスラット皮膚を用いて透過実験を行い、得られた皮膚透過パラメータより算出した種々化学物質の平均皮膚中濃度の計算値の対数値と皮膚中濃度実測値の対数値の関係を示す。ヘアレスラット皮膚の full-thickness skin および viable epidermis and dermis は共に、平均皮膚中濃度計算値と皮膚中濃度実測値との間にはほぼ 1:1 に近い良好な関係が得られたが、一部の化学物質で信頼区間から外れる化学物質が見られた。

#### C-3. Strat-M<sup>TM</sup> を介した皮膚透過性<sup>10)</sup>

Figure 3 に種々化学物質の  $\log K_{o/w}$  と Strat-M<sup>TM</sup>、ヒトおよびヘアレスラット皮膚を介した透過試験から得られた透過係数の対数値 ( $\log P$ ) の関係を示す。なお、親水性化学物質である FL-Na および Dopa は、ヒトや

ヘアレスラット皮膚では透過性が確認できたものの、Strat-M™を用いた場合にはその透過が認められなかった。

Strat-M™を介した化学物質の  $\log P$  は  $\log K_{ow}$  の上昇に伴い増加するシグモイド曲線を示し、これらの値はヒトおよびヘアレスラット皮膚の値と類似した。

#### D. 考察

全身作用型および局所作用型薬物の皮膚透過性を文献より調査した結果、局所作用を期待する薬物の場合には皮膚透過係数が  $10^{-10}\text{cm/s}$  よりも高い皮膚透過性を示す必要があることがわかった。よって化学物質の皮膚透過性が  $10^{-10}\text{cm/s}$  よりも高い場合には、皮膚刺激性について調べる必要があると考えられた。この調査結果から、皮膚透過係数に基づいた化学物質のリスク評価が可能であると考えられた。

さらに、皮膚透過性から化学物質の皮膚中濃度が予測できれば、より正確に化学物質のリスク評価を行うことができる。そこで、化学物質の皮膚透過性と皮膚中濃度の関係について調べた。ヘアレスラット皮膚を介した化学物質の皮膚透過性から算出した平均皮膚中濃度計算値は、皮膚中濃度実測値とほぼ 1 : 1 の良好な関係が得られた。一方、水溶性物質である Dopa および Epi の平均皮膚中濃度の計算値は信頼区間から外れることがわかった。この原因は化学物質の皮膚透過ルートの違いや化学物質の電荷状態が影響していると考えられた。本研究で用いた Fick の拡散則に基づく化学物質の皮膚透過理論では、角層を均一膜と仮定したモデルである。汗腺や毛嚢などの経付属器官ルートを介すと報告されている水溶性化学物質では平均皮膚中濃度の計算値と実測値は合わなかったと考えられた<sup>28-30)</sup>。そのため、本法を用いるには化学物質の物理化学的パラメータを十分に考慮することが望ましいと考えられた。

化学物質の  $\log K_{ow}$  の増加に伴い Strat-M™

とヒトおよびヘアレスラット皮膚を介した化学物質の  $\log P$  は上昇し、Strat-M™とヒトおよびヘアレスラット皮膚の  $\log P$  の間には 1:1 の良好な相関が得られた。

さらに Strat-M™ の特性を明らかとするため、ヒト皮膚を介したイオン型 LC の透過係数 ( $P_i$ ) と分子型 LC の透過係数 ( $P_u$ ) を比較した<sup>11, 12)</sup>。これらの値は pH5.0 と pH10.0 の異なるイオン型分子型分率を有する LC の透過係数から算出した。ヒト皮膚を介した LC の  $P_u$  と  $P_i$  はそれぞれ  $7.0 \times 10^{-6}\text{cm/s}$  と  $4.0 \times 10^{-8}\text{cm/s}$  であり、 $P_u$  は  $P_i$  と比べて約 177 倍高値を示した。一方、Strat-M™を介した LC の  $P_u$  と  $P_i$  はそれぞれ  $5.6 \times 10^{-6}\text{cm/s}$  と  $1.3 \times 10^{-7}\text{cm/s}$  であり、 $P_u$  は  $P_i$  よりも約 43 倍高値を示した。ヒト皮膚の  $P_u$  は Strat-M™の  $P_u$  よりも約 1.3 倍高値を示したのに対して、Strat-M™の  $P_i$  はヒト皮膚の  $P_i$  よりも約 3.2 倍高値を示した。これらの結果から、Strat-M™では水溶性化学物質の透過性が高くなる可能性が考えられた。そこで、更に水溶性化学物質である FL-Na および Dopa を用いた *in vitro* 膜透過試験を行った。これら化学物質のヒトおよびヘアレスラット皮膚透過は確認することができたが、一方、Strat-M™では、8 時間適用後後でもこれらの化学物質の透過は確認できなかった。その理由として、FL-Na および Dopa の  $M.W.$  と  $\log K_{ow}$  が関係していると考えられた。水溶性物質が Strat-M™を透過しなかった理由については更に詳細な検討が必要であるが、Strat-M™を用いた *in vitro* 透過試験を行う際には、適用する化学物質の物理化学的パラメータに注意する必要があると考えられた。今後は Strat-M™を介した水溶性化学物質の透過ルートを明らかとする必要があるものの、Strat-M™は化学物質の皮膚透過性を評価する代替膜として利用可能であり、リスク評価に用いることができると考えられた。

#### E. 参考文献

1) Sugibayashi K., *et. al.*, *Drug Metab.*

- Pharmacokinet.*, 19, 352-362 (2004).
- 2) Hada N., *et. al.*, *J. Control. Release*, 108, 341-350 (2005).
  - 3) Flynn G. L., *et. al.*, *J. Pharm. Sci.*, 63, 479-510 (1974).
  - 4) Higo N., *et. al.*, *Pharm. Res.*, 9, 303-306 (1992).
  - 5) Aspe E., *et. al.*, *J. Pharm. Sci.*, 84, 750-754 (1995).
  - 6) Shah H. S., *et. al.*, *Int. J. Pharm.*, 86, 167-173 (1992).
  - 7) Tamura M., *et. al.*, *Int. J. Pharm.*, 131, 263-271 (1996).
  - 8) Ahmed S., *et. al.*, *Pharm. Res.*, 13, 1524-1529 (1996).
  - 9) M. Sugino., *et. al.*, *J. Toxicol. Sci.*, 39(3), 474-485 (2014).
  - 10) T. Uchida *et. al.*, *Eur J Pharm Sci*, 67, 113-118 (2015).
  - 11) T. Kitamura *et. al.*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 35, 145-153 (2009).
  - 12) T. Hayashi, T., *et. al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 3090-3093 (1992).

## F. 研究発表

### F-1. 論文発表

- 1) M. Sugino., *et. al.*, Safety prediction of topically exposed biocides using permeability coefficients and the desquamation rate at the stratum corneum. *J. Toxicol. Sci.*, 39(3), 474-485 (2014).
- 2) T. Uchida *et. al.*, Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™, *Eur J Pharm Sci*, 67, 113-118 (2015).

### F-2. 学会発表

- 1) Sayumi Kanai<sup>1</sup>, Takashi Uchida<sup>2</sup>, Wesam R. Kadhum<sup>1</sup>, Hiroaki Todo<sup>1</sup>, Kenji

Sugibayashi<sup>1</sup>, Usefulness of Strat-M™ for prediction of human skin permeation of chemical compounds, <sup>1</sup>Faculty of Pharmaceutical Science, Josai University, <sup>2</sup>Kao Corporation, <sup>3</sup>rd International conference nutraceutical and cosmetic sciences, 2014年11月, Shinjuku.

- 2) 金井 沙由美、Wesam R. Kadhum、Konstanty Wierzba、藤堂 浩明、杉林 堅次、化学物質のヒト皮膚透過予測における Strat-M™ の有用性、城西大学 薬学部、日本薬学会 第135年会、2015年3月、神戸。

(発表紙名巻号・頁・発行年等も記入)

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

Table 1 Physicochemical properties of chemical compounds used in this experiment.

Chemical compound	Epi	Dopa	ISMN	CAF
<i>M.W.</i>	219.67	189.64	191.10	194.19
<i>pK<sub>a</sub></i>	8.55 <sup>a)</sup>	8.89 <sup>a)</sup>	—	14.0 <sup>b)</sup>
<i>logK<sub>o/w</sub></i>	-0.42 (pH5.0)	-1.10 (pH5.0)	-0.15 (pH7.4)	-0.12 (pH7.4)
Chemical compound	ANP	AMP	ISDN	M-PABA
<i>M.W.</i>	188.23	231.29	236.10	151.17
<i>pK<sub>a</sub></i>	2.20 <sup>b)</sup>	5.00 <sup>b)</sup>	—	2.47 <sup>c)</sup>
<i>logK<sub>o/w</sub></i>	-1.51 (pH7.4)	1.07 (pH7.4)	1.23 (pH7.4)	1.38 (pH7.4)
Chemical compound	MP	BA	E-PABA	LC
<i>M.W.</i>	152.15	122.12	165.19	234.36
<i>pK<sub>a</sub></i>	8.40 <sup>b)</sup>	4.20 <sup>a)</sup>	2.51 <sup>c)</sup>	7.86 <sup>b)</sup>
<i>logK<sub>o/w</sub></i>	1.93 (pH7.4)	1.88 <sup>#</sup> ( <i>ClogP<sup>d)</sup></i> )	1.89 (pH7.4)	1.32 (pH7.9)
Chemical compound	P-PABA	EP	B-PABA	PP
<i>M.W.</i>	179.22	166.18	193.24	180.20
<i>pK<sub>a</sub></i>	2.49 <sup>c)</sup>	8.40 <sup>b)</sup>	2.47 <sup>c)</sup>	8.40 <sup>b)</sup>
<i>logK<sub>o/w</sub></i>	2.43 (pH7.4)	2.27 (pH7.4)	2.43 (pH7.4)	2.81 (pH7.4)
Chemical compound	BP	MN	EN	BN
<i>M.W.</i>	194.23	137.14	151.17	179.22
<i>pK<sub>a</sub></i>	8.40 <sup>b)</sup>	—	—	—
<i>logK<sub>o/w</sub></i>	3.53 (pH7.4)	0.77 <sup>#</sup> ( <i>ClogP<sup>d)</sup></i> )	1.32 <sup>#</sup> ( <i>ClogP<sup>d)</sup></i> )	2.35 <sup>#</sup> ( <i>ClogP<sup>d)</sup></i> )
Chemical compound	NA	a) from Ref. 22. b) from Ref. 23. c) from Ref. 24.		
<i>M.W.</i>	123.11	d) Calculation by Chem Draw Ultra 12.2 <sup>®</sup> (PerkinElmer Informatics, Cambridge, MA, U.S.A.)		
<i>pK<sub>a</sub></i>				
<i>logK<sub>o/w</sub></i>	0.36 <sup>#</sup> ( <i>ClogP<sup>d)</sup></i> )			



Table 2. HPLC conditions for determination of chemical compounds used in this experiment.

Chemical compound	Mobile phase	Detection	Internal standard
ANP	Water : Acetonitrile (80 : 20)	UV254 nm	___ <sup>a)</sup>
ISMN	Water : Acetonitrile (90 : 10)	UV220 nm	___ <sup>a)</sup>
CAF	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (90 : 10)	UV254 nm	___ <sup>a)</sup>
AMP	0.1% Phosphoric acid + 5 mM Sodium dodecyl sulfate : Acetonitrile (50 : 50)	UV245 nm	BP
ISDN	Water : Acetonitrile (55 : 45)	UV220 nm	BP
LC	0.1% Phosphoric acid + 5mM Sodium 1-heptanesulfate : Acetonitrile (70 : 30)	UV230 nm	___ <sup>a)</sup>
BA	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (55 : 45)	UV254 nm	EP
Dopa	0.1% Phosphoric acid + 5 mM Sodium dodecyl sulfate : Acetonitrile (65 : 35)	UV280 nm	___ <sup>a)</sup>
Epi	0.1% Phosphoric acid + 5 mM Sodium dodecyl sulfate : Acetonitrile (65 : 35)	UV280 nm	___ <sup>a)</sup>
MP	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (70 : 30)	UV260 nm	EP
EP	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (70 : 30)	UV260 nm	MP
PP	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (55 : 45)	UV260 nm	BP
BP	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (55 : 45)	UV260 nm	PP
M-PABA	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (70 : 30)	UV280 nm	E-PABA
E-PABA	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (70 : 30)	UV280 nm	M-PABA
P-PABA	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (55 : 45)	UV280 nm	B-PABA
B-PABA	0.1% Phosphoric acid : Acetonitrile (55 : 45)	UV280 nm	P-PABA
MN, EN, BN and NA	0.1% Phosphoric acid + 5 mM Sodium dodecyl sulfate : Acetonitrile (50 : 50)	UV260 nm	___ <sup>a)</sup>

a) Absolute calibration method was used.

Table 3. Permeability coefficients of commonly used transdermal delivery routes

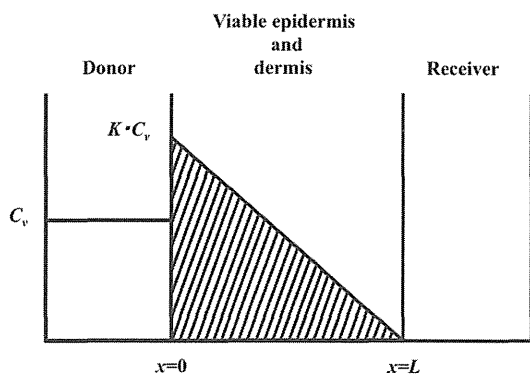
Expected site of effect	Compound name	Molecular weight	Permeability coefficient (cm/s)	References
Local	Acyclovir	225.2	$4.7 \times 10^{-7}$	Hasler-Nguyen <i>et al.</i> , 2009
	Clobetasol propionate	410.9	$2.2 \times 10^{-8}$	Fang <i>et al.</i> , 1999
	Clotrimazole	344.8	$1.4 \times 10^{-10}$	Schmook <i>et al.</i> , 2001
	Diclofenac	269.1	$1.8 \times 10^{-7}$	Ansari <i>et al.</i> , 2006
	Hydrocortisone	362.5	$8.3 \times 10^{-10}$	Johnson <i>et al.</i> , 1995
	Metronidazole	171.2	$7.5 \times 10^{-8}$	Ansari <i>et al.</i> , 2006
	Tacrolimus	804.0	$2.6 \times 10^{-9}$	Meingassner <i>et al.</i> , 2005
	Terbinafine	291.4	$2.8 \times 10^{-10}$	Schmook <i>et al.</i> , 2001
	Penciclovir	253.3	$2.8 \times 10^{-8}$	Hasler-Nguyen <i>et al.</i> , 2009
	Pimecrolimus	810.5	$4.2 \times 10^{-11}$	Meingassner <i>et al.</i> , 2005
Systemic	Caffeine	194.2	$2.9 \times 10^{-8}$	Mitragotri, 2005
	Estradiol	272.4	$8.3 \times 10^{-8}$	Schmook <i>et al.</i> , 2001
	Fentanyl	336.5	$9.7 \times 10^{-6}$	Roy and Flynn, 1990
	Isosorbidedinitrate	236.1	$1.3 \times 10^{-6}$	Singh <i>et al.</i> , 1999
	Methylphenidate	233.3	$7.1 \times 10^{-7}$	Farahmand and Maibach, 2009
		233.3	$1.8 \times 10^{-8}$	Singh <i>et al.</i> , 1999
	Nicotine	162.2	$7.5 \times 10^{-7}$	Zorin <i>et al.</i> , 1999
	Nitroglycerine	227.1	$9.9 \times 10^{-5}$	Minghetti <i>et al.</i> , 1999
	Norelgestromin	327.5	$4.1 \times 10^{-6}$	Farahmand and Maibach, 2009
	Oxybutynin	357.5	$2.8 \times 10^{-8}$	Farahmand and Maibach, 2009
	Rivastigmine	250.3	$1.5 \times 10^{-6}$	Farahmand and Maibach, 2009
	Rotigotine	315.5	$3.6 \times 10^{-8}$	Honey-Nguyen <i>et al.</i> , 2003
	Salicylic acid	138.1	$6.1 \times 10^{-7}$	Schmook <i>et al.</i> , 2001
		138.1	$4.1 \times 10^{-7}$	Farahmand and Maibach, 2009
	Scopolamine	303.4	$1.4 \times 10^{-8}$	Mitragotri, 2005
		303.4	$2.2 \times 10^{-7}$	Farahmand and Maibach, 2009
Sumatriptan	295.4	$6.9 \times 10^{-9}$	Femenía-Font <i>et al.</i> , 2006	
Testosterone	288.4	$1.1 \times 10^{-7}$	Schmook <i>et al.</i> , 2001	

Table 4. Permeability coefficients of chemical through Strat-M™, hairless rat skin and human skin

Compounds	$P$ (cm/s) $\times 10^{-6}$	$P$ (cm/s) $\times 10^{-6}$	$P$ (cm/s) $\times 10^{-6}$
	Strat-M™	Hairless rat skin	Human skin
MP	4.02 $\pm$ 0.60	2.39 $\pm$ 0.31	2.49 $\pm$ 0.03
EP	4.21 $\pm$ 0.20	2.96 $\pm$ 0.06	3.86 $\pm$ 0.49
PP	4.01 $\pm$ 0.16	3.63 $\pm$ 0.15	3.63 $\pm$ 0.15
BP	4.24 $\pm$ 0.34	2.31 $\pm$ 0.26	3.54 $\pm$ 0.18
ISMN	0.15 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01
AMP	0.87 $\pm$ 0.25	0.29 $\pm$ 0.11	0.33 $\pm$ 0.02
ISDN	3.14 $\pm$ 0.01	2.57 $\pm$ 0.15	3.14 $\pm$ 0.17
LCH (pH5.0)	0.14 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.02
LCH (pH10)	5.55 $\pm$ 0.53	9.21 $\pm$ 3.68	7.10 $\pm$ 0.15
LCH (pH7.9)	1.20 $\pm$ 0.12	1.30 $\pm$ 0.11	0.14 $\pm$ 0.01
CAF	0.47 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.02
M-PABA	8.95 $\pm$ 0.26	7.22 $\pm$ 0.17	18.4 $\pm$ 0.83
E-PABA	11.25 $\pm$ 0.41	10.6 $\pm$ 0.25	20.1 $\pm$ 2.24
P-PABA	13.55 $\pm$ 0.58	19.6 $\pm$ 1.61	22.3 $\pm$ 3.03
B-PABA	10.14 $\pm$ 0.53	9.49 $\pm$ 0.79	20.1 $\pm$ 3.02

Mean  $\pm$  S.E. (n=3)

**a) One-layered diffusion model**



**b) Two-layered diffusion model**

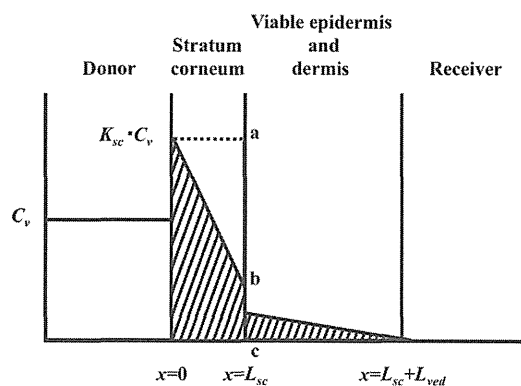


Fig. 1. Schematic diagram of concentration-distance profile in one- (a) and two-layered (b) diffusion membrane models in membrane permeation experiments.