

微小透析法を用いた皮膚内の化粧品素材動態および生体成分動態の系統的解析法の確立

長崎大学 医学部附属病院薬剤部

佐々木 均、中嶋 幹郎

Microdialysis is a relatively new technique for sampling tissue extracellular fluid that is gaining popularity in kinetic and dynamic studies of drugs in experimental animals. Intradermal microdialysis permits us to measure directly the concentration in dermis of test substances applied to the skin without loss of fluid volume. In this study, we have attempted to use this technique for characterizing the kinetic behavior in dermis of cosmetic compounds applied to living skin and evaluating the effect of cosmetic compounds permeated through the skin on biological elements in the surrounding dermal tissue of the rats. In general, several cosmetic compounds showing pharmacological activity were formulated in commercially provided cosmetics with various additives. It is important to evaluate the adequacy of intradermal microdialysis to quantify the interest cosmetic compound in cutaneous tissue following the topical application of its commercial product including various the other cosmetic compounds. Therefore, first we used Sandimmun that is 10% oily pharmaceutical preparation of cyclosporin (CYA), a low skin-permeable peptide, as the model product reflecting commercial cosmetics and measured the dermal concentration of CYA applied topically alone or with absorption enhancers. As the results, intradermal microdialysis enabled us to monitor cutaneous CYA quantitatively in proportion to its applied concentration to the skin. In addition, we found suitability of glycerin as an enhancer in the cutaneous penetration of CYA from its commercial product. Subsequently, the effect of barrier perturbation by delipidization on the cutaneous penetration of salicylic acid (SA) and the effect of SA permeated through the skin on the dermal endogenous homovanillic acid (HVA) were examined. SA was chosen as the model cosmetic compound because it is extensively used in the commercial cosmetics. As the results, enhanced cutaneous penetration of SA was correlated with the increase in barrier perturbation activity by delipidization. However, the dermal endogenous HVA levels were virtually unaffected by the increase in cutaneous penetration of SA in the various delipidized skins. A correlation between the dermal endogenous HVA levels and the cutaneous concentrations of SA was not found in the barrier-damaged skins.

This technique must become an available tool for kinetic analysis in dermis of cosmetic compounds and evaluation of their effects on biological elements in the surrounding dermal tissue.

1. 緒言

近年、美白剤など様々な新しい化粧品素材が開発されているが、市販の化粧品には、香料や色素のほか、薬理活性を示す化合物が保湿剤や血行促進剤として配合され、経皮的な適用が行われている。しかし、皮膚表面の最外層に位置する角質層が、外部から皮膚内への物質の透過に対するバリアー機能として働いているため、経皮適用された物質が皮膚内へ浸透するには、著しい制限が加えられている。この透過障壁においては、角質細胞間脂質が重要な因子であることが明らかとなってきた¹⁾。そこで、市販の化粧品に含有されている薬用成分の経皮吸収性を向上させる試みとして、角質層と親和性の高い油性基剤の利用²⁾や、従来、薬物の皮膚透過性改善の目的で利用されてきた経皮吸収促進剤の化粧品への応用³⁾等が報告されている。

しかし、吸収促進剤の応用には、それら自身が皮膚内に浸透し、刺激性や毒性を発現する可能性も懸念される。このように、市販の化粧品には様々な薬用成分や添加剤が配合されているにもかかわらず、皮膚内における化粧品成分の動態や相互作用、化粧品使用時における皮膚内生体成分の変動に関する情報は極めて少ない。従来、化粧品成分の皮膚内濃度や生体成分への影響などに関しては、動物レベルで放射性物質を用いた研究が行われてきた。それらは被験物質を経皮適用した後、動物を屠殺して皮膚組織を採取し、皮膚内濃度を測定する方法が主なもので、通常、1試料に1個体を必要とするため、実験には多くの動物が必要とされる。このことがこの分野の系統的な研究の妨げとなってきた。

微小透析法は、血管または任意の組織中に、先端に半透膜のついた小型の透析プローブを挿入することにより、非侵襲的に近い状態で、血液や組織の細胞外液中に存在する物質の濃度を連続測定できる独創的な *in vivo* サンプリング法である (Fig. 1)⁴⁾。

本法は、主として神経薬理学研究の領域で、脳内の薬物濃度や内因性神経伝達物質の検出に用いられてきた⁵⁾。しかし、実験動物を屠殺せずに1個体から多数の試料を採取することが可能で、被験物質の非結合型濃度を直接測定できるといった優れた利点を有しているため、近年では、様々



Application of Microdialysis to *In Vivo* Kinetic Analysis in Dermis of Cosmetic Compounds and Biological Elements

Hitoshi Sasaki, Mikiro Nakashima

*
Department of Hospital Pharmacy,
Nagasaki University School of Medicine

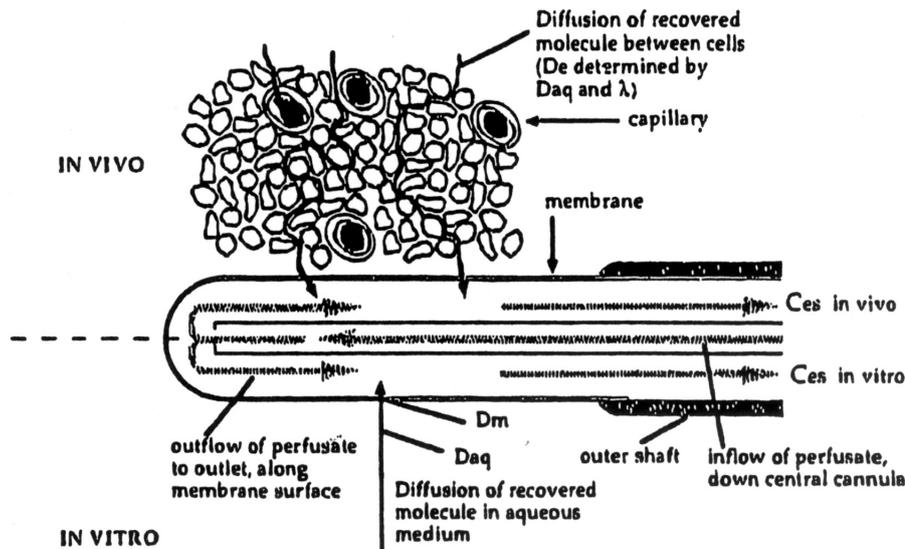


Fig.1 Schematic representation of solute recovery in vivo and in vitro during microdialysis. Cited from reference 4.

な組織中における薬物濃度の測定に用いられるようになってきた⁴⁾。著者らもこれまで微小透析法を用いて、各種薬物動態の詳細な解析に成功している^{6~11)}。経皮吸収動態の解析においては、皮膚内から抜去可能なガイドカニューレを利用した透析プローブのみの皮膚内挿入法を世界に先駆けて試み、ラットへ経皮適用した抗炎症薬の皮膚組織中濃度の連続測定に、本法が適用できることを明らかにした¹¹⁾。組織中物質濃度の in vivo 定量法として本法を適用する際には、被験物質の組織細胞外液中からプローブ灌流液中への回収率（透過率）を厳密に算出することが必要である。しかし、その回収率の正確な測定は難しく、本実験法は、組織における被験物質動態の相対的変化を検討する方法としては極めて高い有用性を示すが、絶対量を検討する方法としては限界があるとも考えられる。

今回著者らは、様々な薬用成分を含有する市販化粧品を皮膚表面へ適用した際の被験成分の皮膚内動態や他成分との相互作用、皮膚内生体成分への影響等を in vivo の状態で定量的に評価する簡便な実験系として、この微小透析法を応用することを考案した。本研究では、まず最初に、市販化粧品のモデルとして、被験化合物に加えて他の化合物が添加剤として配合されている医療用油性製剤を選び、ラット皮膚表面へ製剤適用後の被験化合物の経皮吸収動態を経皮微小透析法により種々検討し、市販化粧品を皮膚適用した際の皮膚内における特定成分濃度定量法としての本法の有用性について評価した。さらに、化粧品成分として繁用されているサリチル酸 (SA) をモデルに選び、ラット皮膚表面へ SA を適用した際の SA の経皮吸収速度に及ぼす角質層の脱脂方法の影響と、その時の内因性カテコールアミン濃度の変動を本法により検討し、物質浸透性が変化した皮膚における化粧品成分の吸収動態と皮膚内生体成分

動態との関連性の解析を試みた。

2. 実験

2.1 試料ならびに試薬

市販医療用製剤としては、主成分であるシクロスポリン (CYA) に種々の添加剤を加え、エタノールとオリーブ油に混合し 10% 油性溶液とした Sandoz Pharma 製のサンディミュン内用液を用い、オリーブ油で希釈することにより CYA の 0.5、2 および 8% 濃度油性溶液を調製した。化粧品に適用可能な吸収促進剤の候補として、広く化粧品に用いられているグリセリンと、経鼻吸収型カルシトニン製剤に吸収促進剤として添加されているピロチオデカン (久光製薬より供与)

^{12, 13)} を選び、それらを種々の濃度 (1、3、6、10 および 20%) で加えた 2% CYA 油性溶液を調製した。化粧品成分のモデルである SA はナカライテスクの特級試薬を用い、皮膚に適用する際にはエタノールに混合し 5% SA 溶液とした。角質細胞間脂質の除去溶媒として用いたアセトン、ジエチルエーテル、クロロホルムならびにメタノールは全てナカライテスクの特級試薬を用いた。CYA の蛍光偏光免疫測定用試薬キットはダイナボットから購入した。カテコールアミン類 (ドーパミン塩酸塩、ノルエピネフリン塩酸塩、DOPAC、ホモバニリン酸; HVA) は全て Sigma の特級試薬を用いた。オクタンスルホン酸ナトリウムは Aldrich の特級試薬を用いた。過塩素酸、塩酸、リン酸一カリウム、リン酸ならびにエチレンアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA・2Na) は全て和光純薬の特級試薬を用いた。その他の試薬についても全て特級品を使用した。

2.2 微小透析装置

Carnegie Medicin 製の CMA/100 微量注入ポンプに CMA/10 透析プローブ (透析膜の長さ 10mm) を接続し、リンゲル液を 2.5 μ L/min の微小速度で灌流した。

2.3 動物実験

Wistar 系雄性ラット (体重 250 ~ 270g) をウレタン 1.5g/kg の腹腔内投与による麻酔下、腹部皮毛を電気バリカン (動物用 900 型、大東電気工業) で除毛した。透析プローブを皮膚から抜去可能な自製の経皮用ガイドカニューレ (ポリエチレン製) を用いてラットの皮膚内へ挿入し、自製のガラスリザーバー (内径 20mm) をプローブ挿入部位の皮膚上にアロンアルファ A (三共) にて固定した¹¹⁾。

CYA 油性溶液を用いた実験では、ガラスリザーバー固

定1h後に種々のCYA油性溶液2mLをその中に充填し、適用6h後まで透析液を1h毎に皮膚内より回収し、全量をCYA濃度測定用に供した。

SAエタノール溶液を用いた実験では、ガラスリザーバーを固定した後、アセトン、ジエチルエーテルまたはクロロホルム/メタノール(2:1)混合液2mLをそれぞれリザーバー中に加え、1hにわたって角質層の脱脂を行った。コントロールについては生理食塩水を加えた。脱脂溶媒除去1h後に5%SAエタノール溶液2mLをリザーバー中に充填し、適用6h後まで透析液を1h毎に皮膚内より回収し、100 μ LをSA濃度測定用に、40 μ Lをカテコールアミン測定用に供した。なお、カテコールアミン測定用の試料には酸化を防ぐ目的で1M過塩素酸10 μ Lを加えた。

2.4 定量

透析液中のCYAは、TDX自動測定装置(Abbott Laboratories)を用いた蛍光偏光免疫測定法により定量した。

透析液中のSAは、先に報告した方法¹⁴⁾を参考にし、得られた試料にアセトニトリルを等容量加えた混合物を調製した後、高速液体クロマトグラフィー蛍光検出法により定量した。高速液体クロマトグラフはLC-6A型ポンプ(島津)を用い、RF-535型蛍光検出器(島津)を励起波長300nm、測定波長410nmにおいて用いた。カラムはCosmosil 5C18-MS(4.6 \times 150mm、ナカライテスク)を用いた。溶出は、水-メタノール-酢酸(58:38:4)の混合液を移動相とし、室温で、ポンプ流速を1.0mL/minに設定して行った。

透析液中のカテコールアミン類は、高速液体クロマトグラフィー電気化学検出法により定量した⁷⁾。高速液体クロマトグラフはLC-6A型ポンプを用い、L-ECD-6A型電気化学検出器(島津)を設定電位800mVにおいて用いた。カラムはTSK-GEL ODS-80TM(4.6 \times 150mm、東ソー)を用いた。溶出は、1.1mMオクタンスルホン酸ナトリウム、1mM EDTA \cdot 2Naおよび15%メタノールを含みリン酸

でpHを2.95に調整した0.05Mリン酸カリウム緩衝液を移動相とし、室温で、ポンプ流速を1.0mL/minに設定して行った。

2.5 速度論的解析

皮膚内から回収された透析液中におけるCYAおよびSAの累積回収量を時間に対してプロットし、各プロットの直線部分の傾きおよび時間軸に対する切片より、透析液中へのCYAおよびSAの回収速度およびラグタイムを算出した。なお、皮膚透析液中での物質の時間変化は皮膚内への物質の累積吸収量の時間変化と等しいと仮定できるため¹⁵⁾、上述の回収速度とラグタイムは、CYAおよびSAのみかけの経皮吸収速度と経皮吸収のラグタイムに相当する。

2.6 統計処理

得られた実験値の有意差の検定はStudentのt検定を使用した。

3. 結果と考察

種々の添加剤が配合されている市販品から調製したCYAの油性溶液を、ラット皮膚表面へ適用した後のCYAの経皮吸収動態を経皮微小透析法を用いて種々検討することにより、市販化粧品を皮膚適用した際に皮膚へ吸収された特定成分の定量法としての本法の有用性を評価した。CYA油性溶液を単独で皮膚適用した際に、経皮微小透析法により得られた皮膚内CYA濃度とその累積量の経時変化をFig. 2に示す。いずれも適用直後から皮膚内にCYAが検出され、その濃度は速やかにプラトーに達した。また、皮膚表面に適用した油性溶液中のCYA濃度を増加させると、皮膚内のCYA濃度も増大した。

そこで、皮膚内累積量の経時変化から、みかけの経皮吸収速度とラグタイムを算出した結果(Table 1)、皮膚表面に適用したCYA濃度の上昇とCYAのみかけの経皮吸

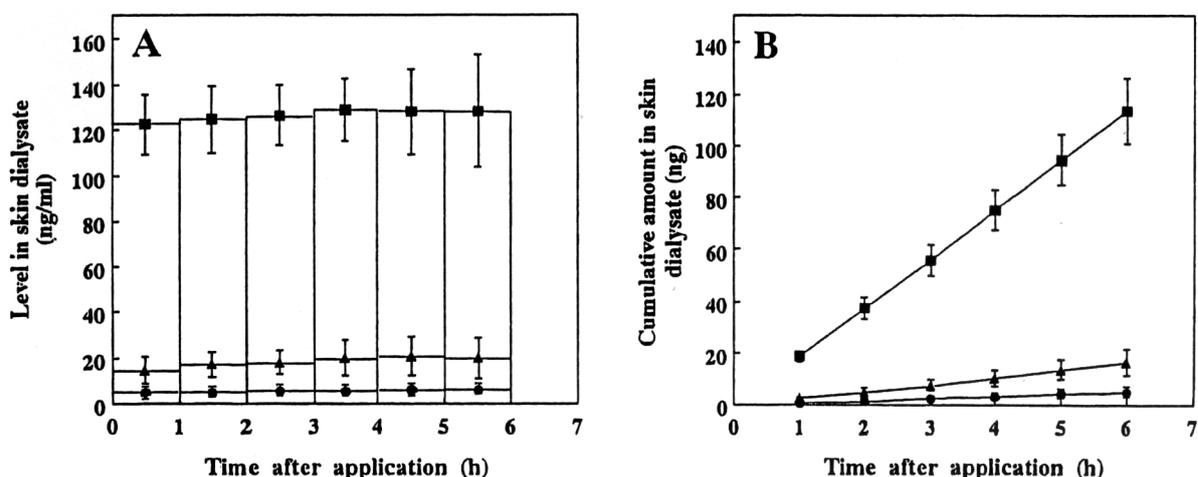


Fig.2 Level (A) and cumulative amount (B) profiles of CYA in the skin dialysate after topical application of 0.5% (●), 2% (▲) and 8% (■) CYA oily solutions in rats. Data represent the mean \pm SE of 5 rats.

収速度の増加には良好な正の相関が認められた (Fig. 3)。このことより、経皮微小透析法は、皮膚内へ浸透した被験物質の吸収量の変化を *in vivo* の状態で正確にモニターできる方法であることが立証された。

CYA は、11 個のアミノ酸からなる免疫抑制作用を有

Table 1 In vivo skin apparent absorption parameters for CYA after topical application of CYA oily solutions in rats.

CYA concentration (w/v%)	Apparent absorption rate in skin dialysate (ng/h)	Lag time (h)
0.5	0.85±0.39	0.21±0.14
2.0	2.78±0.89	0.18±0.22
8.0	19.02±2.08	0.06±0.05

Values represent the mean±SE of 5 rats.

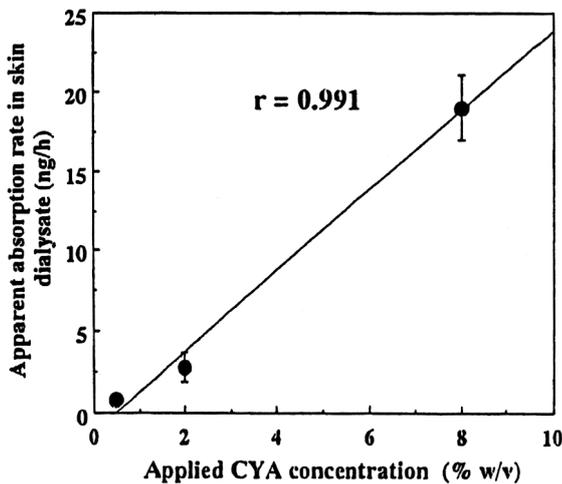


Fig.3. Correlation between topically applied CYA concentration and *in vivo* skin apparent absorption rate of CYA. Data represent the mean±SE of 5 rats.

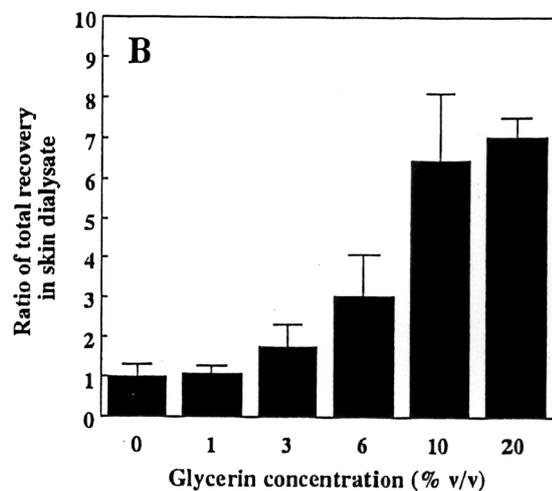
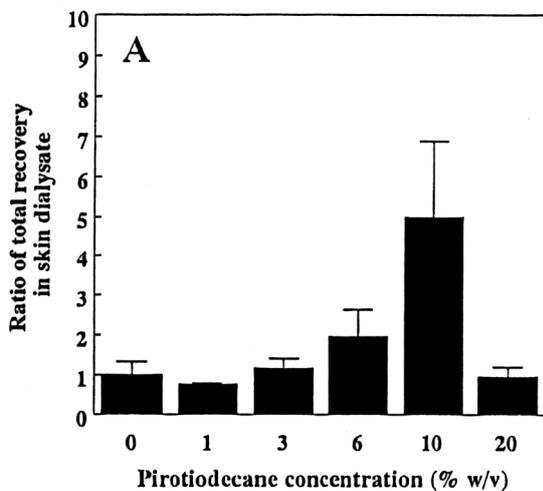


Fig.4. Ratio of total CYA recovery in the skin dialysate for 6 h after topical application of 2% CYA oily solutions with pirotiodecane (A) and glycerin (B) at various concentrations to that without them in rats. Control value was 16.5±5.1 ng. Data represent the mean±SE of 3-5 rats.

する分子量約 1200 の皮膚透過性の極めて低い環状ポリペプチドである。Hermannら¹⁶⁾は、ヒト摘出皮膚を拡散セル装置に装着し、*in vitro*で透過性を検討する実験を行い、CYA自身の皮膚透過性の低さは、アルコール類、非プロトン性極性溶媒、Azoneなど既存の経皮吸収促進剤を併用した場合においても改善されなかったと報告している。一方、Duncanら¹⁷⁾およびColeら¹⁸⁾は、本研究と同様、種々の添加剤が配合されているCYAの市販品から試験製剤を試作し、ヒト摘出皮膚を用いた種々の検討を行い、CYAが皮膚透過性を示すことを報告している。しかし、CYAの皮膚透過性に関して、Duncanら¹⁷⁾はアルコール類とAzoneの添加により改善されると報告しているが、Coleら¹⁸⁾は吸収促進剤としてアルコール類を添加しても改善されなかったと報告している。これらCYAの経皮吸収性における研究結果の相違は*in vitro*での実験条件の違いに起因するものと考えられる。従来、物質の経皮吸収性を評価する実験法としては、除毛した実験動物の摘出皮膚を拡散セル装置に装着し、*in vitro*でその透過性を検討する方法が繁用されてきた¹⁹⁾。しかし、同法は、非生理的条件下での実験法であるため、摘出皮膚間の含水量の違い²⁰⁾、や微生物の繁殖²¹⁾などの問題点があり、実際の生体での経皮吸収状態を反映することが難しい。経皮微小透析法による*in vivo*経皮吸収実験法においては、皮膚内で微小灌流を行うため水分含量も一定で、生理的条件下に近い状態で被験物質の経皮吸収性を検討できる利点がある。そこで次に、化粧品にも適用可能な吸収促進剤の候補として、実際に化粧品に広く用いられているグリセリンと医療用製剤の添加剤として実用化されているピロチオデカンを選び、CYAの経皮吸収性に及ぼす促進効果を経皮微小透析法により測定し、得られた結果を比較した。

2% CYA油性溶液の皮膚適用6h後までの皮膚内CYA蓄積量に対する種々の濃度でピロチオデカンまたはグリセ

リンを添加した2% CYA 油性溶液の適用6h後までの皮膚内CYA蓄積量の割合をFig. 4に示す。ピロチオデカンは、添加濃度が6%以下では経皮吸収性の改善を認めなかったものを、10%まで上げるとCYAの皮膚内への吸収量は著しく増大し、みかけの経皮吸収速度は4.9倍有意に増大した(Table 2)。しかし、添加濃度を20%まで上げるとその効果は消失した。これらの結果より、油性溶液中CYAの経皮吸収性改善の目的でピロチオデカンを用いる場合には、その効果発現に至適濃度が存在することが示唆された。一方、グリセリンの場合は、添加濃度が3~10%の範囲でその濃度上昇に比例した経皮吸収性の改善効果が認められ、10%を超えるとその効果が飽和するといった一般的な吸収促進剤の特性が認められた。油性溶液中CYAのみかけの経皮吸収速度は、6%のグリセリンの添加で3.0倍、10%以上の添加では6.4~6.9倍有意に増大した(Table 3)。今回の研究結果から、広く化粧品に用いられているグリセリンが、皮膚透過性の低い物質の経皮吸収性改善のためにも利用できることが示唆された。

次に、化粧品成分として繁用されているSAの5%エタノール溶液を用いて、皮膚内への化粧品成分の吸収速度と皮膚内生体成分動態に及ぼす角質層の脱脂方法の影響を経皮微小透析法により検討した。一般に物質の皮膚浸透性は、正常皮膚に比べて、角質層除去皮膚(stripped skin)および脱脂皮膚(delipidized skin)では上昇することが知られている。角質細胞間脂質を脱脂するには、種々の有機

溶媒を用いる方法が報告されているが、大きく分類すると、メタノール、エタノールおよびアセトン等の水と混和性の溶媒を使用する方法と、ヘキサン、ジエチルエーテルおよびクロロホルム等の非混和性の溶媒を使用する方法である²²⁾。その他、より脂質の脱脂効果の強い溶媒として、水と混和性、非混和性の溶媒の混合系についても、クロロホルム/メタノール(2:1)混合液が報告されている²³⁾。これら種々の溶媒の脱脂効果については、水の透過性の変化を指標とした報告があり、エタノール<アセトン<ジエチルエーテル<クロロホルム<クロロホルム/メタノール(2:1)混合液の順であることが確認されている²²⁾。一方、経皮微小透析法による皮膚内生体成分の検出は、一酸化窒素²⁴⁾、ヒスタミン²⁵⁾およびグリセロール²⁶⁾等が、ヒトまたはラットの正常皮膚を用いて報告されている。しかし、化粧品成分浸透の障壁となる角質細胞間脂質を脱脂した皮膚を用いて、皮膚内生体成分量の変化を測定した報告は見当たらない。著者らは、これまでラットの血液中、脳内および胎仔組織中等において内因性カテコールアミン量を測定し、その結果を報告してきた^{7, 27)}。そこで、本研究では、脱脂効果の異なるアセトン、ジエチルエーテル、クロロホルム/メタノール(2:1)混合液の3つの溶媒により脱脂したラット皮膚を用いて、5% SAエタノール溶液適用後に、物質浸透性が変化した状態の皮膚から吸収されたSA動態を求めると同時に、皮膚内の内因性カテコールアミン量を測定し、それらの関連性を解析した。

Table 2 In vivo skin apparent absorption parameters for CYA after topical application of 2% CYA oily solutions with various concentration of pirotiodecane in rats.

Parameter	Pirotiodecane concentration (w/v%)					
	0	1	3	6	10	20
Apparent absorption rate in skin dialysate (ng/h)	2.78±0.89	2.09±0.21	3.27±0.65	5.40±1.93	13.67±5.17*	2.64±0.71
Lag time (h)	0.18±0.22	0.10±0.10	0.18±0.16	0.15±0.04	0.14±0.19	0.18±0.13

Values represent the mean±SE of 3-5 rats. * $P<0.05$ compared with value obtained without pirotiodecane (Student's *t*-test).

Table 3 In vivo skin apparent absorption parameters for CYA after topical application of 2% CYA oily solutions with various concentration of glycerin in rats.

Parameter	Glycerin concentration (v/v%)					
	0	1	3	6	10	20
Apparent absorption rate in skin dialysate (ng/h)	2.78±0.89	2.93±0.50	4.78±1.67	8.39±2.78*	17.67±4.46*	19.21±1.37*
Lag time (h)	0.18±0.22	0.04±0.05	0.19±0.24	0.21±0.11	0.05±0.05	0.01±0.01

Values represent the mean±SE of 3-5 rats. * $P<0.05$ compared with value obtained without glycerin (Student's *t*-test).

5% SA エタノール溶液を正常皮膚または脱脂皮膚の表面に適用した際、いずれも適用直後から皮膚内に SA が検出され、その濃度は 2h 以降からプラトーに達した。そこで、SA の皮膚内累積量の経時変化から、みかけの経皮吸収速度とラグタイムを算出した結果 (Table 4)、脱脂皮膚では正常皮膚に比べて、みかけの経皮吸収速度が、アセトン<ジエチルエーテル<クロロホルム/メタノール(2:1) 混合液の順番で増大した。特に、クロロホルム/メタノール(2:1) 混合液による皮膚脱脂後には、SA のみかけの経皮吸収速度は正常皮膚に比べて 3.7 倍有意に増大した。この結果は、溶媒の脱脂効力の強さの順番²²⁾ と一致するもので、SA の皮膚吸収量は、角質細胞間脂質が脱脂される程度に依存し、増大することが示唆された。一方、SA の経皮吸収ラグタイムに関しては、有意差は認められなかったものの、溶媒の脱脂効力の強さの順番²²⁾ に符号し、減少する傾向が示された。これらの結果は、洗顔用化粧品等の使用により皮膚が脱脂された場合には、化粧品成分の皮膚浸透性が、容量的および時間的に変化することを示唆するものである。

微小透析法を用いた SA の経皮吸収性に関する検討は、Murakami ら²⁸⁾ および Benfeldt ら²⁹⁾ によっても報告されている。前者は、種々の基剤による SA の軟膏剤を試作し、除毛したラットの正常皮膚と角質層除去皮膚に塗布する実験を行い、除去皮膚での SA 吸収量の変化は、水溶性基剤を用いた軟膏剤の場合が最も大きかったと報告している。また後者は、本研究と同様、5% SA エタノール溶液を試作し、ヘアレスラットの正常皮膚、角質層除去皮膚な

らびに脱脂皮膚に表面適用する検討を行っているが、アセトンによる脱脂皮膚からの SA の経皮吸収量は、正常皮膚での結果と変化なかったと報告している。SA の経皮吸収性に関するアセトンの脱脂効果についての我々と Benfeldt ら²⁹⁾ の研究結果の相違は、使用した実験動物の違いに起因するものと考えられる。

内因性的のカテコールアミン類は、一般にストレスにより大きく濃度が変動することが知られているが、著者らは、ラットの脳内へ透析プローブ挿入後、1h 以上経過すると、ドーパミンをはじめ、ノルエピネフリン、DOPAC および HVA いずれも内因性物質量は安定することを報告している⁷⁾。また、ラットの血液中や胎仔組織中でも、透析プローブ挿入 1h 後には HVA の内因性物質量が安定することを報告している²⁷⁾。そこで、本研究では、ガラスリザーバー中から皮膚脱脂用の溶媒または生理食塩水を除去した直後から、皮膚透析液中のカテコールアミン量の測定を開始した。その結果、ドーパミン、ノルエピネフリンおよび DOPAC はいずれの透析液中でも検出されなかったが、HVA は検出された (Table 5)。しかし、正常皮膚へ SA エタノール溶液を適用する前のコントロールに比べて、皮膚透析液中の HVA 量が有意に変化したのは、クロロホルム/メタノール(2:1) 混合液による脱脂皮膚へ SA エタノール溶液を適用した後のみであった (1.7 倍有意な上昇)。このことより、表面を溶媒で脱脂するストレスを加えられ、物質の角質層浸透性が変化した皮膚では、SA の経皮吸収量は有意に変化するものの、皮膚内カテコールアミン量の変動は小さいことが示唆された。

Table 4 In vivo skin apparent absorption parameters for SA after topical application of 5% SA ethanol solution to normal skin and various delipidized skins in rats.

Parameter	Normal skin	Delipidized skin		
		Acetone	Diethyl ether	Chloroform/methanol (2:1)
Apparent absorption rate in skin dialysate ($\mu\text{g}/\text{h}$)	0.16 \pm 0.05	0.19 \pm 0.03	0.36 \pm 0.06*	0.59 \pm 0.21*
Lag time (h)	0.85 \pm 0.41	0.64 \pm 0.22	0.45 \pm 0.25	0.46 \pm 0.31

Values represent the mean \pm SE of 3 rats. * P <0.05 compared with value obtained normal skin (Student's t -test).

Table 5 Endogenous HVA levels obtained in skin dialysates after topical application of 5% SA ethanol solution to normal skin and various delipidized skins in rats.

Parameter	Normal skin	Delipidized skin		
		Acetone	Diethyl ether	Chloroform/methanol (2:1)
Level before application of SA (pmol/h)	0.46 \pm 0.18	0.54 \pm 0.16	0.58 \pm 0.25	0.68 \pm 0.13
Level after application of SA (pmol/h) ¹⁾	0.48 \pm 0.14	0.54 \pm 0.17	0.63 \pm 0.31	0.78 \pm 0.08*

Values represent the mean \pm SE of 3 rats. ¹⁾ average value for 6 h. * P <0.05 compared with value obtained level before application of SA in normal skin (Student's t -test).

4. 総括

以上、経皮微小透析法を用いることにより、皮膚内へ浸透した化粧品成分の吸収量の変化を *in vivo* の状態で正確にモニターできることが明らかとなった。さらに、本法を用いて、ラットの脱脂皮膚表面へ適用した化粧品成分の経皮吸収動態の定量を行うと同時に、皮膚内生体成分量の変動を測定することにより、角質層透過性が変化した皮膚での化粧品成分吸収性と生体成分動態との関連性を解析することができた。経皮微小透析法による *in vivo* 経皮吸収実験においては、皮膚内で微小灌流を行うため水分含量も一定で、生理的条件に近い状態で化粧品成分の経皮吸収性を検討できる利点がある。経皮微小透析法を用いた評価法では、化粧品成分の皮膚内動態を、皮膚内生体成分動態と関連づけながら解析できるため、安全性と障害性の検討が同時にできる利点がある。

(参考文献)

- 1) Proksch E, Holleran WM, Menon GK, et al. : Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis, *Br. J. Dermatol.*, **128**, 473-482, 1993.
- 2) 西坂崇宏、山崎誠司 : 経皮吸収油剤の探索、*DDS*, **13**, 347-351, 1998.
- 3) 季梅花、上田秀雄、杉林堅次、ほか1名 : 角質保湿剤ヒアルロン酸ナトリウムの皮膚浸透に及ぼす超音波照射の影響、*DDS*, **12**, 415-419, 1997.
- 4) Elmquist WF, Sawchuk RJ : Application of microdialysis in pharmacokinetic studies, *Pharm. Res.*, **14**, 267-288, 1997.
- 5) Stahle L, Segersvard S, Ungerstedt U : Theophyllin concentration in the extracellular space of the rat brain : measurement by microdialysis and relation to behaviour, *Eur. J. Pharmacol.*, **185**, 187-193, 1990.
- 6) Nakashima M, Takeuchi N, Hamada M, et al. : *In vivo* microdialysis for pharmacokinetic investigation : a plasma protein binding study of valproate in rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1630-1634, 1994.
- 7) Nakashima M, Zhao MF, Nakashima MN, et al. : *In vivo* microdialysis to determine the relative pharmacokinetics of drugs, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 988-994, 1996.
- 8) Nakashima M, Sasaki H, Ohira A, et al. : *In vivo* ocular microdialysis to monitor ocularly applied cyclosporin in the anterior chamber of rabbits, *Pharmaceutical Sciences*, **3**, 179-182, 1997.
- 9) Nakashima M, Shibata S, Tokunaga Y, et al. : *In vivo* microdialysis study of the distribution of cisplatin into brain tumour tissue after intracarotid infusion in rats with 9L malignant glioma, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 777-780, 1997.
- 10) Tokunaga Y, Nakashima M, Sasaki H, et al. : Local distribution into brain tumor and pharmacokinetics of 4-pyridoxate diammine hydroxy platinum, a novel cisplatin derivative, after intracarotid administration in rats with 9L malignant glioma : simultaneous brain microdialysis study, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1491-1496, 2000.
- 11) Matsuyama K, Nakashima M, Nakaboh Y, et al. : Application of *in vivo* microdialysis to transdermal absorption of methotrexate in rats, *Pharm. Res.*, **11**, 684-686, 1994.
- 12) Yano T, Higo N, Furukawa K, et al. : Evaluation of a new penetration enhancer 1-[2-(decylthio)ethyl]-azacyclopentan-2-one (HPE-101), *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**, 527-533, 1992.
- 13) 井戸田義弘、林正弘、大竹宏、ほか2名 : 吸収促進剤ピロチオデカンによるウサギ鼻粘膜吸収における作用機構の検討、薬物動態、**14**, S188, 1999.
- 14) Shibasaki J, Inoue Y, Kadosaki K, et al. : Hydrolysis of salicylic acid in rabbit intestinal microorganisms, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 989-995, 1985.
- 15) Hashimoto Y, Murakami T, Kumasa C, et al. : *In vivo* calibration of microdialysis probe by use of endogenous glucose as an internal recovery marker : measurement of skin distribution of tranilast in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 621-626, 1998.
- 16) Hermann RC, Taylor RS, Ellis CN, et al. : Topical cyclosporin for psoriasis : *in vitro* skin penetration and clinical study, *Skin Pharmacol.*, **1**, 246-249, 1988.
- 17) Duncan JJ, Payne SNL, Winfield AJ, et al. : Enhanced percutaneous absorption of a novel cyclosporin A formulation and assessment of its immunosuppressive activity, *Br. J. Dermatol.*, **123**, 631-640, 1990.
- 18) Cole GW, Shimomaye S, Goodman M : The effect of topical cyclosporin A on the elicitation phase of allergic contact, *Contact Dermatitis*, **19**, 129-132, 1988.
- 19) Sasaki H, Kojima M, Mori Y, et al. : Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal penetration of 5-fluorouracil, triamcinolone acetonide, indomethacin, and flurbiprofen, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 533-538, 1991.
- 20) Hinz RS, Hodson CD, Lorence CR, et al. : *In vitro* percutaneous penetration : evaluation of the utility of hairless mouse skin, *J. Invest. Dermatol.*, **93**, 87-91,

- 1989.
- 21) Sloan KB, Beall HD, Weimar WR, et al., : The effect of receptor phase composition on the permeability of hairless mouse skin in diffusion cell experiments, *Int. J. Pharm.*, **73**, 97-104, 1991.
- 22) Matoltsy AG, Downes AM, Sweeney TM : Studies of the epidermal water barrier. II. Investigation of the chemical nature of the water barrier, *J. Invest. Dermatol.*, **50**, 19-26, 1968.
- 23) Blank IH, Scheuplein RJ, MacFarlane DJ : Mechanism of percutaneous absorption. 3. The effect of temperature on the transport of non-electrolytes across the skin, *J. Invest. Dermatol.*, **49**, 582-589, 1967.
- 24) Clough GF, Bennett AR, Church MK : Measurement of nitric oxide concentration in human skin in vivo using dermal, *Exp. Physiol.*, **83**, 431-434, 1998.
- 25) Rizell M, Naredi P, Lindner P, et al., : Validation of the internal reference technique for microdialysis measurements of interstitial histamine in the rat, *Life Sci.*, **65**, 1765-1771, 1999.
- 26) Dodt C, Lonroth P, Fehm HL, et al., : Intraneural stimulation elicits an increase in subcutaneous interstitial glycerol levels in humans, *J. Physiol.*, **521**, 545-552, 1999.
- 27) 岩永宏、中嶋幹郎、佐々木均、ほか3名 : マイクロダイアリス法を用いたレボドパの胎盤移行性と胎児内動態の検討、*薬物動態*, **13**, S185, 1998.
- 28) Murakami T, Yoshioka M, Okamoto I, et al., : Effect of ointment bases on topical and transdermal delivery of salicylic acid in rats : evaluation by skin microdialysis, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 55-61, 1998.
- 29) Benfeldt E, Serup J : Effect of barrier perturbation on cutaneous penetration of salicylic acid in hairless rats : in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function, *Arch. Dermatol. Res.*, **291**, 517-526, 1999.