

〔技 術 報 告〕

水晶発振子を用いた薬物の *in vitro* 皮膚透過迅速測定法に関する検討

渡邊 哲也^a, 長谷川 哲也^a, 高橋 秀和^b, 石橋 卓也^b, 古澤 宏幸^c,
岡畑 恵雄^c, 杉林 堅次^{*a}

城西大学薬学部臨床薬物動態学教室^a, 東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所^b,
東京工業大学生体分子機能工学教室^c

Rapid Measurement of *In Vitro* Drug Skin Permeation Using a Quartz Crystal Microbalance

TETSUYA WATANABE^a, TETSUYA HASEGAWA^a, HIDEKAZU TAKAHASHI^b,
TAKUYA ISHIBASHI^b, HIROYUKI FURUSAWA^c, YOSHIO OKAHATA^c and KENJI SUGIBAYASHI^{*a}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University,^a 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama
350-0295, Japan, Tsuruga Institute of Biotechnology, Toyobo Co., Ltd.,^b 10-24 Toyochō,
Tsuruga, Fukui 914-0047, Japan, and Department of Biomolecular Engineering,
Tokyo Institute of Technology,^c 4259 Nagatsuda, Midori-ku,
Yokohama, Kanagawa 226-8501, Japan

(Received 5 December 2001; Accepted 5 February 2002)

Summary: A quartz crystal microbalance was tested and evaluated for a rapid measuring method of permeation of indomethacin as a model drug through a skin membrane. A cultured dermal membrane (Living Dermal Model, LDM) was set between two half-cells of a diffusion cell set. The chamber facing the upper surface of the model membrane contained indomethacin in ethanol (5 mg/mL) as a drug donor and the other 10% ethanol as a receiver. The quartz crystal adsorbed with dimethyl distearyl ammonium chloride was set into the receiver chamber to determine the time course of the LDM permeation of indomethacin by the decrease in vibration numbers of the quartz crystal. Separately, the skin permeation was determined by HPLC. Although the cumulative amount of indomethacin permeation determined by the quartz crystal microbalance method was slightly lower than that by HPLC, the steady state flux was almost the same. The difference in the initial permeation profiles was due to a short lag time before a constant vibration number of the quartz crystal was achieved. The time course of change in vibration numbers in a constant concentration of indomethacin solution was expressed by a simple equation. Deconvolution was used to correct the skin permeation profile. The corrected one was very close to that by HPLC, suggesting that this quartz crystal microbalance can be used to rapidly obtain the membrane permeation profiles of drugs.

Keywords: *in vitro* skin permeation; rapid measuring method; quartz crystal microbalance; deconvolution

現在, 医薬品の候補化合物の開発は Combinatorial Chemistry の手法と High Throughput Screening (HTS) の考え方によって, 従来より著しく高速化してきている¹⁾. しかし, 薬物の新規

合成速度や薬理活性評価速度に比して、薬物の消化管吸収や代謝の評価速度、さらにはそれに続く製剤化速度が遅く、これらが新薬開発の律速段階となっている。また、皮膚適用薬の開発に関しても経口薬と異なる HTS システムの確立が急がれ、特に、薬物の皮膚透過性を迅速に評価する方法を確立することが急務と思われる。薬物の皮膚透過性は消化管吸収性などに比較して著しく遅く、したがって、皮膚の透過性を今までより短時間で評価できれば、皮膚適用薬の全体の開発時間も著しく短縮できる可能性が増す。我々は、このような考え方にに基づき、すでに三次元培養ヒト皮膚モデル (Living Skin Equivalent: LSE) を用いて種々薬物の透過実験を行い、LSE 透過性がラットやヒト皮膚透過性より約 10 ~ 20 倍も速いため、LSE を用いることによって速くかつ高い相関性をもってヒト皮膚透過性を評価できることを報告した²⁾。しかし、薬物濃度の測定には従来と同様 HPLC を用いたため、透過実験時間を短縮することができても、薬物濃度測定時間は変わらず、この部分が全体の皮膚透過評価過程の律速段階になった。

そこで今回、薬物の皮膚透過性を評価するときの薬物濃度測定時間を短縮するため、エレクトロニクスの分野でマイクロバランスとして知られている水晶発振子に着目した³⁾。すなわち、水晶発振子の電極上を脂質膜で被覆し、これを薬物溶液中に浸せば、薬物分子が被覆した脂質に吸着し、吸着量に応じて水晶発振子の振動数が減少する。水晶発振子マイクロバランスは、この原理を利用して匂いや苦味分子の測定センサーとしてすでに実用化されている。今回は、薬物の皮膚透過に用いる拡散セルのレシーバ側に水晶発振子マイクロバランスをセットして、薬物の皮膚透過量を迅速に定量できるかを評価した。なお、本実験では、モデル皮膚膜として薬物透過性が良好で再現性にも優れた培養ヒト真皮モデル、Living Dermal Model (LDM)²⁾ を、モデル薬物としてインドメタシンを用いた。

実 験 の 部

1. 試 薬

インドメタシンは和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。水晶発振子の電極に貼りつける脂質には塩化ジメチルジステアリルアンモニウム (東京化成工業株式会社, 東京) を用いた。また、ポリスチレンスルホン酸はシグマ社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。その他の試薬と溶媒は HPLC 用もしくは特級品をそのまま精製せずに用いた。

2. 材 料

LDM²⁾ は東洋紡績株式会社 (大阪) から供与された。LDM はヒト由来の繊維芽細胞をコラーゲンゲルに包埋して作成された真皮膜で、血管系や汗腺は存在しない。

3. においセンサー

水晶発振子 (9 MHz) を有するにおいセンサー (SF-105W, 相互薬工, 東京) をインドメタシンの定量に用いた。まず、塩化ジメチルジステアリルアンモニウムとポリスチレンスルホン酸からなる 1 : 1 ポリイオンコンプレックスを Okahata の方法によって調製し⁴⁾、これをクロロホルムに溶かし (3.33 mg/mL)、その約 3 μ L をマイクロシリンジを用いて水晶発振子の電極上に被覆した。なお、正確な脂質被覆量は、被覆前後の水晶発振子の振動数差から計算して求めた。

4. インドメタシンの吸着実験

ビーカーに 10% エタノールを 30 mL を入れ、そこに水晶発振子をセットした。その模式図を Fig. 1 に示す。振動数変化が安定した後、100% エタノールに溶かしたインドメタシン (5 mg/mL) 25, 50, 100, 150 そして 200 μ L をそれぞれ滴下し (インドメタシン濃度に換算すると 4.17, 8.33, 16.67, 25.0, 33.3 μ g/mL となる)、経時的に振動数変化を記録した。なお、ビーカー内は 37°C に保ち、マグネティックスターラー (マルチスターラー MC-301, サイニクス, 東京) により攪拌子を

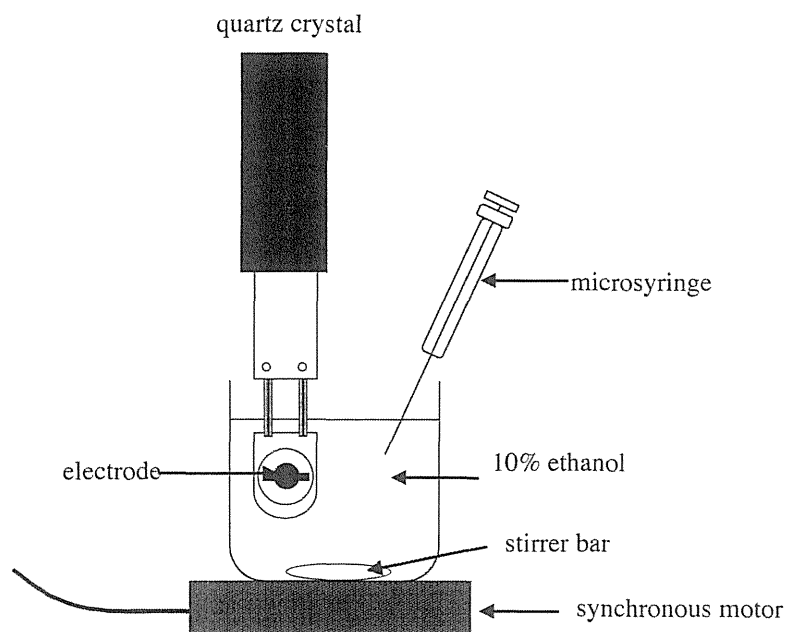


Fig. 1. Experimental Set-up for Indomethacin Adsorption by Quartz Crystal Microbalance.

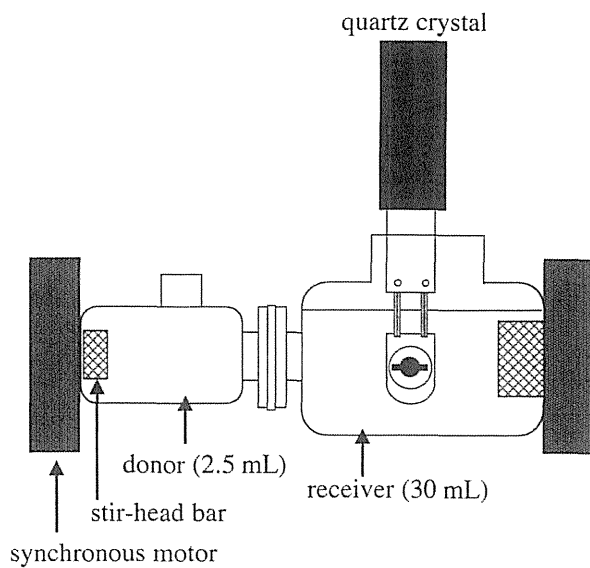


Fig. 2. Experimental Set-up for *In Vitro* Skin Permeation of Indomethacin with Quartz Crystal Microbalance

1,200 rpm で回転させることで攪拌した。

5. 皮膚透過実験

LDM を有効拡散面積 0.95 cm^2 の 2-チャンバー横型拡散セルに挟み、皮膚表面側にインドメタシンのエタノール溶液 (5 mg/mL) を 2.5 mL 適用し、裏側に 10% エタノールを 30 mL 適用した。ま

た、水晶発振子はレシーバ溶媒である 10% エタノール中にセットした。両セル内はスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラーにより 1,200 rpm で回転させることで攪拌した。その模式図を Fig. 2 に示す。インドメタシンの皮膚透過量は水晶発振子の振動数変化から算出した。また、水晶発振子をセットせずに同様な透過実験を行い、この場合は、経時的にレシーバ側から 0.5 mL サンプルングし、実験を継続するため 10% エタノールを戻した。採取したレシーバ溶液中のインドメタシン濃度は HPLC を用いて測定した。

6. HPLC によるインドメタシンの定量法

インドメタシンを含むレシーバ溶液に内部標準物質の *p*-ヒドロキシ安息香酸エチル/10% エタノール溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 1 : 1 で混和し、その 20 μL を HPLC システム (送液ユニット: LC-10ATvp (島津製作所, 京都), 検出器: SPD-10ATvp (島津製作所), レコーダー: CR-5A (島津製作所), カラムオープン: CTO-10ASvp (島津製作所), オートインジェクター: SIL-10ADvp (島津製作所), カラム: Inertsil ODS-2, 4.6 \times 250 mm (GL Sciences, 東京)) に注入した。なお、移動相はメタノール : 0.1% リン酸 = 8 : 2, 吸収波長は 262 nm, また流速は 1 mL/min とした。その他 HPLC 条件の詳細は既報によった⁵⁾。

結 果

1. インドメタシンの水晶発振子への吸着

種々濃度のインドメタシンを含む 10% エタノール中に水晶発振子を入れ、水晶発振子の振動数変

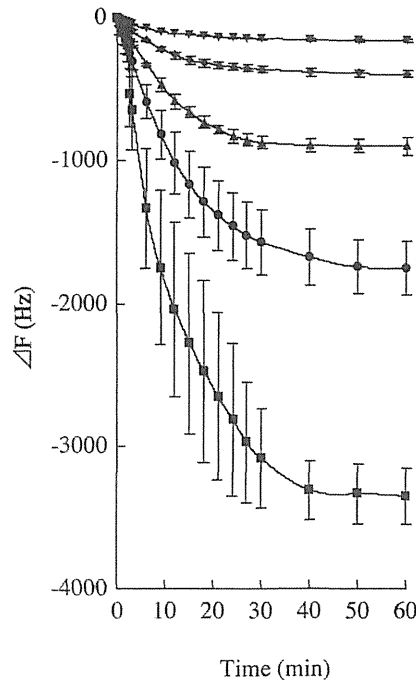


Fig. 3. Time Course of Frequency Changes in Indomethacin/10% Ethanol Measured by Quartz Crystal Microbalance

Symbol (concentration of indomethacin): ∇ , 4.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$; \blacklozenge , 8.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$; \blacktriangle , 16.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$; \bullet , 25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and \blacksquare , 33.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Each point represents the mean value \pm S.D. ($n = 3$).

化 (ΔF , Hz) を調べた. Fig. 3 にインドメタシンの吸着による水晶発振子の振動数の減少曲線を示す. 減少曲線は適用したインドメタシン濃度を増加するに従い大きく変動したが, すべての適用濃度において約 40 min で一定値となった. すなわち, バルク溶媒である 10% エタノールと水晶発振子に被覆した脂質 (塩化ジメチルジステアリルアンモニウム) 間でインドメタシンの分配が平衡になるのに約 40 min 要したと考えられた. そこで, 振動数変化 ΔF と時間 t との関係を調べたところ, 試験したすべての濃度においてほぼ次式の関係がみられた.

$$\Delta F = A(1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

ここで, A は定常状態時の振動数変化量, k は一次速度定数である. k はすべてのインドメタシン濃度においてほぼ等しく約 0.08 min^{-1} であった.

さらに, 60 min 後の ΔF を定常状態時の値, A とし, これと 10% エタノール中のインドメタシン濃度 (確認のため HPLC を用いて測定) との関係を調べた. その結果を Fig. 4a に示す. また, Fig. 4a に示した各点は水晶発振子に付着させた脂質 (塩化ジメチルジステアリルアンモニウム) 量がわずかに異なっていたので, 膜脂質量で補正をした振動数変化についても調べた. 結果を Fig. 4b に示す. インドメタシン濃度 ($4.2 \sim 33.3 \mu\text{g/mL}$) と振動数変化の関係の相関係数は Fig. 4a, b に示したデータでそれぞれ 0.959, 0.977 であった. また, インドメタシン濃度が高いとき相関性が悪くなる傾向にあったので, 4.2 から $25 \mu\text{g/mL}$ 間で相関係数を求めると, Fig. 4a, b でそれぞれ 0.982, 0.998 であった.

以上より, 膜脂質量で補正した振動数変化量とインドメタシン濃度 ($4.2 \sim 25.0 \mu\text{g/mL}$) が比例することがわかった. そこで, 以後は, この範囲内で検量線が成り立つものとしてインドメタシン濃度を求めることとした.

2. インドメタシンの皮膚透過性

次にインドメタシンの LDM 透過性を拡散セルを用いて調べた. なお, 実験を 2 種類行い, 一方は水晶発振子で, もう一方は HPLC でインドメタシンの膜透過量を測定した. Fig. 5 にインドメタシ

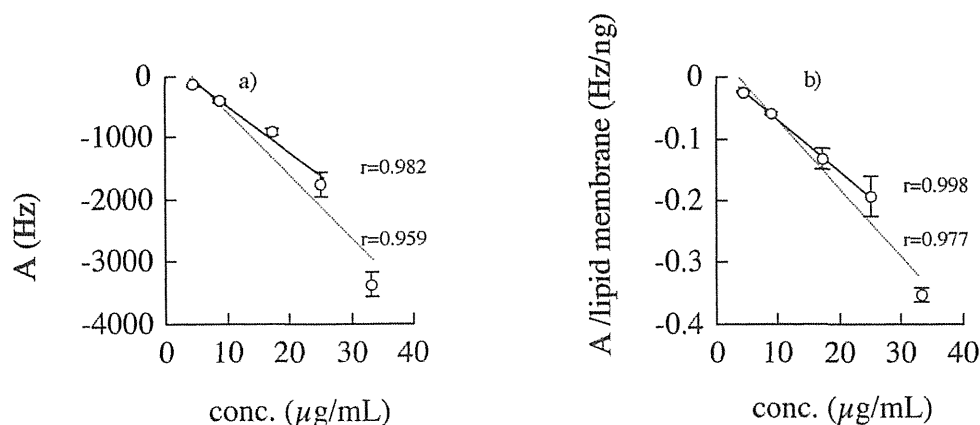


Fig. 4. Relation between Frequency Changes of Quartz Crystal Microbalance and Indomethacin Concentration in 10% Ethanol

a and b show the relation before and after correcting by lipid membrane mass, respectively.

————, from 4.2 to 25.0 $\mu\text{g/mL}$; ·····, from 4.2 to 33.3 $\mu\text{g/mL}$

Each point represents the mean value \pm S.D. ($n = 3$).

ンのLDM累積透過—時間曲線を示す。水晶発振子で評価した薬物の膜透過量(図△)をHPLCの値(○)と比較したところ、累積透過量は異なるものの定常状態透過速度はほぼ等しかった。なお、水晶発振子の60分以内のデータでは、検量線域より低いインドメタシン濃度であった。

水晶発振子で求めた累積透過量が低い原因について考察したところ、Fig. 3に示したように、水晶発振子の振動数減少量が一定になるのにlag timeが存在するためと思われた。そこで、水晶発振子で測定した累積皮膚透過量データ($Q'(t)$)と式1を用いて、デコンボリューション⁶⁾により真の累積皮膚透過量 $Q(t)$ を求めた。なお、 $Q'(t)$ と $Q(t)$ の関係は次式で示される。

$$Q'(t) = \int_0^t Q(\theta) (1 - e^{-k(t-\theta)}) d\theta \quad (2)$$

補正した結果 $Q(t)$ をFig. 5(▲)に示す。図から明らかなように、 $Q(t)$ はHPLCで測定した値とほぼ等しくなった。

考 察

水晶発振子マイクロバランスは空気中や溶液中の匂いや苦味物質の量を測定するのに使用されている。水晶発振子を用いる利点は測定時間が短く(数分)、前処理の必要がないことである。

我々は、まず、水晶発振子の電極上に吸着したインドメタシン量とその時のサンプル中インドメタシン濃度との関係を検討した。その結果、インドメタシン濃度に依存して振動数の減少度が大きくなった(Fig. 3)。特に、電極に付着させた脂質量あたりに換算すると、振動数減少度はインドメタシン濃度(4.2~25.0 µg/mL)に比例した(Fig. 4)。しかし、33.3 µg/mLでは直線性が得られなかった。この原因についてはまだはっきりしていない。

一方、Okahataは匂い物質の場合には水晶発振子に付着させた膜厚の増加と共に吸着量も増大したが、苦味物質は膜厚には依存しなかったと報告している³⁾。これは、匂い物質は膜の内部まで分配するが、苦味物質は表面のみに分配したためであるとしている。インドメタシンではその濃度と振動数の相関性が脂質量で補正することで良くなったことから、この薬物は脂質表面だけでなく深部にま

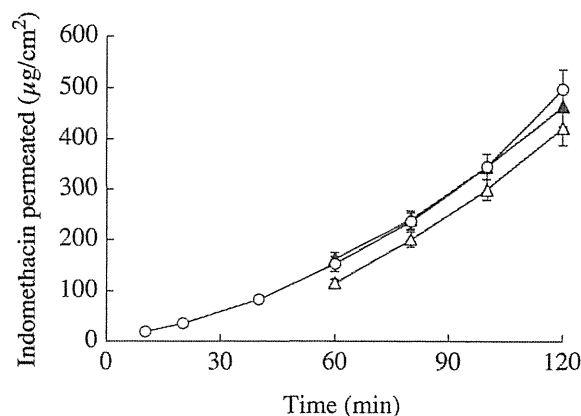


Fig. 5. Time Course of Cumulative Amount Changes of Indomethacin Permeated through Living Dermal Model
Symbol: ○, HPLC; △, quartz crystal; ▲, quartz crystal corrected by deconvolution.
Each point represents the mean value ± S.E. (n=3).

で分布することが示唆された。通常、皮膚適用する薬物は脂溶性物質が多く、水晶発振子マイクロバランスはこのような脂溶性薬物の定量に応用しやすいものと思われた。

Fig. 3 に示したように、インドメタシン溶液に水晶発振子を浸したとき、一定の振動数減少が得られるまで数十分必要とした。動物やヒト皮膚は薬物の拡散抵抗が高いため、一般に数時間から数十時間の透過実験時間を要す。このような場合では、一定の振動数減少が得られるまでの lag time はほぼ無視できる。しかし、迅速評価のために培養皮膚等を用いた場合では膜透過性が速いために、数十分の lag time でも問題になる。

今回、この欠点を解消するためデコンボリューションを用いた。また、デコンボリューションを行う際に用いる水晶発振子の振動数減少—時間曲線に関しては式 1 によって簡略に表現できた。なお、Fig. 3 のデータをていねいに観察すると、最初の 1 分以内は振動数減少がほとんど見られないことがわかる。しかし、この時間が膜透過時間に比べて極めて短いため、今回の計算式ではこの部分を無視した。

さらに、モデル薬物として脂溶性のインドメタシン以外にも、水溶性のアンチピリンや一硝酸イソソルビドを水晶発振子で定量したが、測定感度が悪かった（データは示していない）。水溶性薬物では水晶発振子に付着させる脂質の種類について今後検討する必要がある。

また、今回使用した水晶発振子では低濃度（約 4 $\mu\text{g/mL}$ 以下）のインドメタシンを検出することができなかったため、ドナー側にインドメタシンのエタノール溶液を用いて膜透過速度を促進させた（レシーバに 10% エタノールを用いたのはシンク条件を確保するためである）。しかし、測定値 $Q'(t)$ は HPLC の値より低くなった。この低感度に関する問題は、高品質の水晶発振子（27 MHz）を用いることで解決できると思われる⁷⁾。

以上、改善する余地は残されているものの、水晶発振子は、Caco-2⁸⁾、Calu-3⁹⁾、さらには LSE 等の培養組織膜の利用と並んで、生体膜透過性評価の有用な方法となることが期待できるものと推察された。

謝辞 本研究の一部は文部省科学研究費（09672286）の援助によるものである。また、研究を手伝って頂いた城西大学薬学部・北村敏彦氏に感謝します。

引 用 文 献

- 1) M. H. Tarbit, J. Berman, High-throughput approaches for evaluating absorption, distribution, metabolism and excretion properties of lead compounds, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 411–416 (1998).
- 2) T. Watanabe, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Takayama, K. Sugibayashi, Utility of the three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin permeation of drugs, *Altern. Animal Test. Exp.*, **7**, 1–14 (2001).
- 3) 岡畑恵雄, 二分子膜被覆水晶発振子を用いた匂い物質や苦味物質のセンシング, *生物物理*, **28**, 1–4 (1988).
- 4) Y. Okahata, Lipid bilayer-corked capsule membranes. Reversible, signal-receptive permeation control, *Acc. Chem. Res.*, **19**, 57–63 (1986).
- 5) Y. Morimoto, T. Hatanaka, K. Sugibayashi, H. Omiya, Prediction of skin permeability of drugs, comparison of human and hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 634–639 (1992).
- 6) J.G. Wagner, E. Nelson, Kinetic analysis of blood levels and urinary excretion in the absorptive phase after single doses of drug, *J. Pharm. Sci.*, **53**, 1392–1398 (1964).
- 7) Y. Okahata, K. Niikura, H. Furusawa, H. Matsuno, A highly sensitive 27 MHz quartz-crystal microbalance as a device for kinetic measurements of molecular recognition on DNA strands, *Anal. Sci.*, **16**, 1113–1119 (2000).
- 8) P. Vaishali, S. Salomon, Link between drug absorption solubility and permeability measurements in

- Caco-2 cells, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1604–1607 (1998).
- 9) K. A. Foster, M. L. Avery, M. Yazdanian, K. Audus, Characterization of Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery, *Int. J. Pharmaceut.*, **208**, 1–11 (2000).