

皮膚適用後の薬物の皮内動態および
皮下移行性に関する研究

甲第16号

柳 本 剛

皮膚適用後の薬物の皮内動態および
皮下移行性に関する研究

柳 本 剛

目次

| | |
|-------------------------------|----|
| 総論の部 | 1 |
| 緒言 | 1 |
| 第1章 薬物の皮内動態解析法の確立 | 5 |
| 第1節 皮内動態を評価するための寒天ゲル挿入ラットの作成 | 7 |
| 第2節 <i>In situ</i> 実験の消失動態の評価 | 8 |
| 第3節 全身循環系から皮下への移行性の評価 | 12 |
| 第4節 皮膚適用後の皮内動態および皮下移行性の評価 | 15 |
| 第5節 筋肉内移行性との比較 | 18 |
| 第6節 小括並びに考察 | 24 |
| 第2章 種々薬物の皮内動態の解析 | 26 |
| 第1節 ファルマコキネティックモデルによる解析 | 26 |
| 第2節 種々薬物の経皮吸収性と皮内動態の評価 | 33 |
| 第3節 薬物の物理化学的パラメータから見た皮内動態の解析 | 37 |
| 第4節 小括 | 41 |
| 第3章 薬物の皮内動態に及ぼす種々添加剤の影響 | 42 |
| 第1節 皮内動態に及ぼす血管作用薬の影響 | 43 |
| 第2節 皮内動態に及ぼす吸収促進剤の影響 | 47 |
| 第3節 小括並びに考察 | 52 |

| | |
|----------|----|
| 結論 | 53 |
| 謝辞 | 58 |
| 実験の部 | 59 |
| 第1章 実験の部 | 59 |
| 第2章 実験の部 | 64 |
| 第3章 実験の部 | 68 |
| 引用文献 | 71 |

総論の部

総論の部

緒言

近年の皮膚適用製剤の進歩はめざましく、多くの経皮吸収型製剤が開発された¹⁾。これらは、薬物が皮膚中血管に移行して薬効を発揮するいわゆる全身作用型製剤と表皮中に滞留または適用部位皮下の筋肉に移行して効果を発揮する局所作用型製剤に大別される²⁾。全身作用を目的とした皮膚適用製剤は注射剤や経口製剤と同様な全身レベルでの治療が可能で、その特徴としては、長時間にわたり薬物の有効血中濃度を維持できること、肝臓での初回通過効果を回避できること、副作用発現時に投与の中断ができること、投与回数を減らし患者のコンプライアンスの向上をはかることが可能など³⁾、多くの利点を有している。一方、局所作用を目的とする皮膚適用製剤の利点としては、病巣部へ効率的に薬物を送達し、全身的な副作用を低くすることが考えられている。また、最近ペプチドなどの薬物も皮膚に適用するという試みもなされ、適用部位としての皮膚の応用範囲が拡大している⁴⁾。

これらの製剤開発にはそれぞれ異なった点が要求されることに注意する必要がある。すなわち、この両製剤は、適用方法、形状において類似しており、薬効を得る上で皮膚最外層に位置する角質層での高い薬物透過性が必要である点で同じであるが、適用部位局所をターゲットとした製剤の場合、局所での一定以上の薬物濃度とその維持が重要であり^{5, 6)}、全身への薬物移行はむしろ副作用の可能性や局所適用の意義から考えると好ましくない。一方、全身をターゲットとした皮膚適用製剤では、薬物の角質層透過速度により血漿中濃度がほぼ決定されるので、適用部位局所での薬物の滞留は必要なく、むしろそれは

局所での刺激等との関連から好ましくない⁷⁾。したがって、角質層透過後の薬物動態を明らかにすることは、どちらの製剤を研究開発する場合でも意義深いと考えられる⁸⁾。

局所適用後の薬物吸収とターゲティングの効率は種々の実験法により評価されてきた⁹⁻¹¹⁾。*In vitro* 皮膚透過実験は角質層の透過律速を解明するのに広範に利用されている¹²⁾。しかし、摘出皮膚を用いた皮膚中濃度の測定は *in vivo* の結果とずれる傾向がある¹³⁾。一方、*in vivo* 実験は時間や労力がかかる割にはデータのばらつきが大きく、1 時点 1 殺の測定をしなければならないために効率がよくない¹⁴⁾。全身作用を目的とする製剤に限れば、*deconvolution* 法などを適用してすでに *in vitro* - *in vivo* 相関が検討され、十分ではないものの、ほぼ満足できる結果が得られている^{15, 16)}。これに対し、局所作用を目的としたものでは、*in vitro* 系で高い皮膚透過が見られたとしても *in vivo* 系において必ずしも高い適用部位下組織（例えば筋肉）移行が見られるとは限らない。このような状況から、角質層透過後の皮内及び皮下の組織内の薬物の移動、分布、代謝に関する詳細な検討は十分行われていない。

例えば非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）等では、皮膚に適用した製剤から皮下の炎症部位組織に直接的に送達されることが望ましいが、これらの製剤の有効性は主に薬理効果だけで評価されており¹⁷⁾、炎症部位局所の薬物が皮膚から直接移行したのか、もしくは全身循環血から移行したもののかの分離評価は十分でなく、その評価を可能にする理論もまだ確立されていない。

Riviere らは、局所適用したマラチオンが皮膚中の全身循環系へ完全に除去されることはなく、皮膚血管が完全シンクとして作用することはないということを報告している¹⁸⁾。また、Singh らもリドカインにおいて皮膚中の脈管系が完全シンクとならないと報告している¹⁹⁾。ま

た、瀬古らは 4 つのモデルを仮定し実測値とシミュレーションから血管系が完全なシンクとして作用しないことを証明している²⁰⁾。これらのことより、最大のバリアとなっている角質層を透過した後の薬物の移行過程は、真皮中の毛細血管を経て全身循環系へ移行するものと皮下の組織への拡散による直接移行に分けられる。したがって、皮膚に適用された薬物の局所作用は、全身循環系に一度移行してから皮下の組織（筋肉など）に血流を介して再分布したものと、皮膚中血流に移行せずに直接皮下の組織に拡散により移行したものの和になっていると推測される。しかし、これらの移行率や **Bioavailability** などは定量的に解明されておらず、学問的裏付けもなされていない。

すでに、これらの現象を定量的に評価する目的で、Singh らは局所適用後の深さ方向の薬物の組織中濃度分布と血漿中濃度を測定し、皮膚、皮下の組織及び全身循環系を 8 個のコンパートメントからなるファルマコキネティックモデルを構築し、皮下組織中の薬物の移行経路の分離評価を行っている^{19, 21-24)}。彼らのアプローチは画期的ではあるが、このモデルでは評価するためのパラメータの数が多く複雑であり、その解析は一般に困難である。また、他の研究者からも一部皮内薬物動態のモデルが提示されているが、それらもまた複雑なモデルを用いている²⁵⁻²⁸⁾。特に、皮内動態の薬物間の違い²⁹⁾や適用条件を変えたときの結果の変化を考察する際、パラメータの数が多いことは大きな欠点となる。

皮内動態を評価するための新しい実験方法としては、マイクロダイアリシスの利用^{30, 31)}や摘出皮膚灌流実験法³²⁻³⁶⁾の応用についていくつかの報告が見られる。しかし、これらの方法では薬物の皮内動態を定量的に収支計算するのが難しく、変動が大きいなどの問題がある。皮膚適用後の薬物の全身循環系及び皮下の組織への移行性についての薬

物間の差異や適用条件による変化をも包含した形で評価でき、かつ未知の結果を予測可能なモデルの確立が理想である。そのためには、移行の各過程が、薬物の違いや適用条件の違いによりどのように変化するかを十分理解する必要がある。そこで本研究において、薬物の皮内動態をより明確に見積もることが可能であるヘアレスラット *in situ* 実験法を確立し、種々薬物の皮内動態を解析し、さらに種々添加剤の併用効果について検討した。第1章では、本研究で用いた実験法の確立と生物薬剤学的側面からの評価、すなわち薬物の体内動態に及ぼす実験処理の影響とヘアレスラット腹部皮下に埋め込んだディスク状ゲルの薬物分布組織としての位置づけについて概説し、皮内および皮下への移行性を見積もった。第2章では、種々薬物の皮内および皮下への移行性を見積もり、各薬物の物理化学的パラメータとの関係について評価した。さらに、第3章では、内因性物質（血管作用薬）と吸収促進剤の併用による薬物の皮内動態に及ぼす影響について検討した。

第1章 薬物の皮内動態解析法の確立³⁷⁾

皮膚に適用された薬物は、最大のバリアとなっている角質層を透過した後、真皮中の毛細血管から全身循環系へ移行するものと皮下の組織に拡散していくものに分けられるが、その振り分けがどのような要因により決定するかを明らかにすることが皮内薬物動態の全体像を理解するために重要である³⁸⁾。したがって、各過程を分離評価できる実験法、すなわち皮膚内での薬物の移行過程を可能な限り単純なモデルで記述でき、各過程の変化を定量的に評価できる実験法の開発が必要である。そのための新しい実験法として、実験動物の皮下に寒天ゲルを挿入した Fig. 1 に示す方法が有望であると考えた。Fig. 1a は薬物の皮内および皮下動態を示したものである。この図のように皮内および皮下での薬物の出入りが複雑で物質収支を明らかにするためには評価するためのパラメータが非常に多くなり、解析するにあたり困難を伴う。そこで Fig. 1b に示す方法を用いることにより、簡便に皮内動態を評価することを目的とした。この方法により解析するためのパラメータの数が減り、皮内の各素過程が明確になると考えた。しかし、この実験方法を用いるためには、以下に示すような条件が満たされている必要がある。すなわち、ディスク状ゲルの動物への挿入により、動物の体力の極度な消耗や体内動態の大きな変化が生じないこと、また皮膚適用により全身循環や皮下ディスク状ゲルに定量可能な量が移行することが条件となる。さらに、得られた結果の評価にあたり、ディスク状ゲルが薬物分布部位としてどのような位置づけになるのかを理解していることが必要である。すなわち、ディスク状ゲルが分布平衡に達することがなく体外として振る舞うか、分布平衡に達する動物の臓器の一部のように振る舞うかが判明していなければ、ディスク状

ゲル中の薬物量の大小を議論することにまったく意味を持たせることができない。

そこで本章では、実験動物として経皮吸収性が多いの薬物で明らかになっているヘアレスラットを選び³⁹⁾、実験系を確立する目的で上述各項目を評価するために以下の検討を行った。

本章第 1 節は寒天ゲル挿入ラットの作成法について、第 2 節においては、この実験法を用いた時の急速静注による全身循環系からの消失動態について、第 3 節には、点滴静注時の全身循環系から皮下のディスク状ゲルへの薬物移行性について、また、第 4 節では、皮膚に薬物含有ゲルを適用した後の全身循環系への吸収と皮下のディスク状ゲルへの移行について、さらに、第 5 節には、筋肉と寒天ゲルへの移行性の違いを比較した。

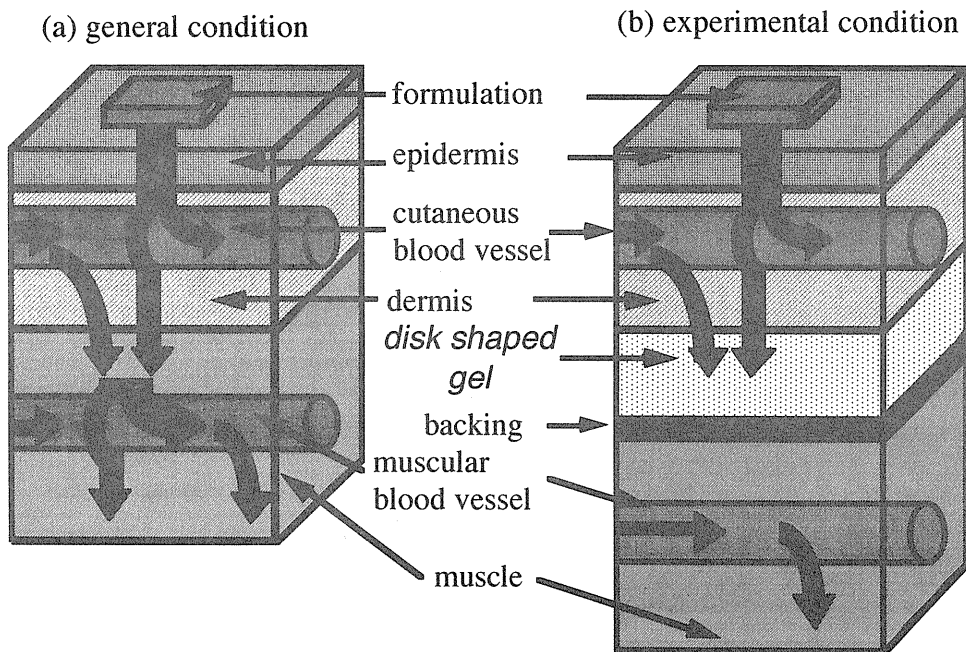


Fig. 1 Schematic representation for drug disposition in skin

第1節 皮内動態を評価するための寒天ゲル挿入ラットの作成

本節では、皮膚と皮下の筋肉の間に仮想の組織としてディスク状ゲルを挿入し、その中への薬物移行を定量するという方法を試みた。初めに、ディスク状ゲル挿入ラットの作成法について述べる。素材としては、生体に対し比較的 non-invasive かつ薬物が抽出できるものとして、寒天を選択した。まず、寒天粉末を pH7.4 等張リン酸緩衝液で 80℃ にて加温溶解して 2.5% 溶液を調製した。次に、その溶液をポリスチレン製組織培養用ディッシュに流し込み、片面をガーゼの付いたポリエチレンシートでシールして、室温で冷却後、冷蔵庫に保存した。調製した寒天ゲルは重さ約 6 g、厚さ 5 mm、直径 3.85 cm である。

通常の皮膚適用では、筋肉内の薬物濃度は皮膚から拡散により移行したものと筋肉内の全身循環系から移行したものの和になるが、薬物不透過性のシートでシールされているディスク状ゲルを挿入した場合は、ゲルへの薬物移行は製剤と皮膚からの拡散に限定される。したがって、評価が必要となるパラメータ数が少なくなり、解析が容易で薬物移動の各素過程がより明確になることが期待できる。

実験動物には体重 220~300 g の雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht) をウレタン水溶液により麻酔したものをを用いた。このラットの下腹部皮膚約 5 cm を正中線に垂直方向に切り、さらに皮膚-皮下組織間を切った。そこに、シールしていない寒天ゲル表面が皮膚裏側 (真皮)、ポリエチレンシート面が皮下の筋肉側に接するように挿入した。その際、挿入部位が傷つくことなく、皮下に持続的な出血がないことを確認した。また、ラットの挿入部位の角質層側表面に製剤適用用のガラスセル (有効拡散面積 : 3.14 cm²) を接着した (Fig. 2)。

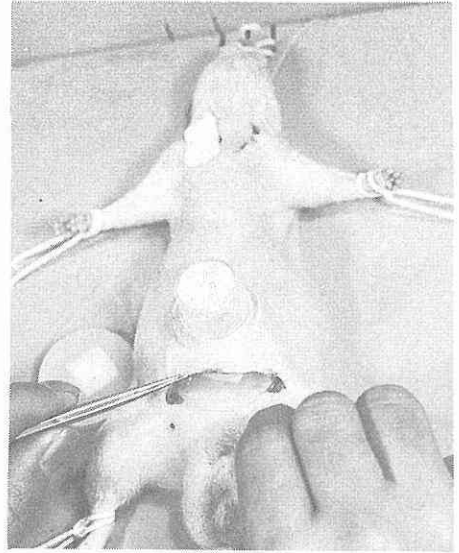
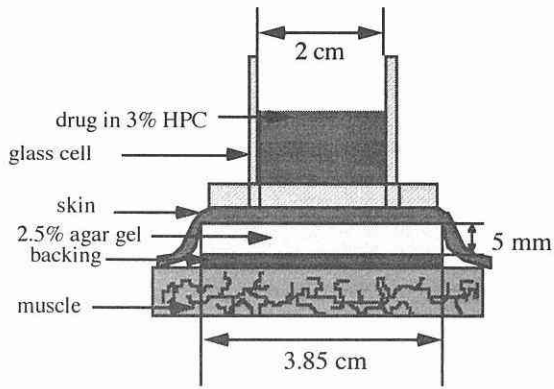


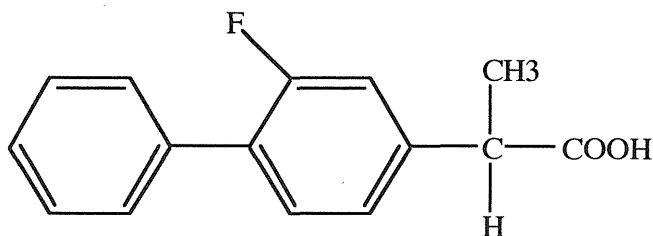
Fig. 2 Experimental set up

第 2 節 *In situ* 実験の消失動態の評価

モデル薬物として、オクタノール-水分配係数 (K_{ow}) が比較的高く、脂溶性である非ステロイド性抗炎症薬のフルルビプロフェン (FP, M.W. : 244.27) ^{40, 41)} を選択した (Fig. 3) .

前節で示した寒天ゲル皮下挿入ラットにこの薬物を静脈内投与して消失動態を調べ、未処理のラットと比較した。

寒天ゲルを挿入する手術でヘアレスラットの体力減弱等による全身クリアランスの低下が懸念される。そこで寒天ゲルを挿入したヘアレスラットと、挿入していないヘアレスラットに、pH7.4 等張リン酸緩衝液に溶解した FP を 2 mg/kg 静脈内単回投与し、血漿中濃度推移を比較した。



M.W. : 244.26
 m.p. : 113°C
 $\log K_{ow}$: 2.72
 pK_a : 3.73

Fig. 3 Chemical structure of flurbiprofen (FP)

Fig. 4 にはその時の血漿中濃度－時間曲線を示す．この結果から線形 2-コンパートメントモデルを仮定し，非線形最小二乗法 (algorithm : Damping Gauss Newton)^{42, 43)}を用いて解析した．得られた体内動態パラメータを Table 1 に示す．Fig. 4 及び Table 1 より，寒天ゲルを挿入したヘアレスラットでは挿入していないヘアレスラットと比較して全身クリアランス (CL_{tot}) が若干高いものの有意差はなく，手術によるラットの体力消耗や体内動態の変化は問題にならないものと考えた．

次に，寒天ゲルを挿入したヘアレスラットの定常状態時での FP の体内動態をさらに詳細に検討する目的で，種々速度で 6 時間もしくは 10 時間まで FP の点滴静注を行った．その際，FP の生物学的半減期が長いため，点滴実験初期より定常状態が得られるように急速静注による初期負荷を併用した⁴⁴⁾．Fig. 5 に，点滴静注後の血漿中濃度－時間曲線を示す．急速静注による初期負荷を与えることで，実験初期から一定の血漿中濃度が得られた．

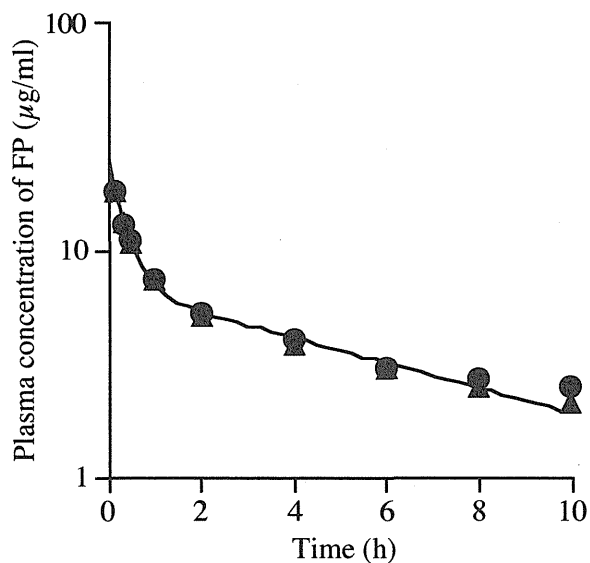


Fig. 4 Time course of plasma concentration of FP after *i. v.* injection in rats

●; intact rat, ▲; agar gel-inserted rat

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

Table 1 Pharmacokinetic parameters after *i. v.* injection of FP

| | intact rat | agar gel-inserted rat |
|------------------------------|------------------|-----------------------|
| Dose (mg/kg) | 2.0 | 2.0 |
| A ($\mu\text{g/ml}$) | 20.54 ± 0.95 | 18.34 ± 1.14 |
| α (h^{-1}) | 3.17 ± 0.15 | 2.85 ± 0.34 |
| B ($\mu\text{g/ml}$) | 6.94 ± 0.22 | 6.68 ± 0.07 |
| β (h^{-1}) | 0.12 ± 0.005 | 0.13 ± 0.012 |
| CL_{tot} (ml/h/kg) | 31.73 ± 2.05 | 33.47 ± 2.71 |

Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

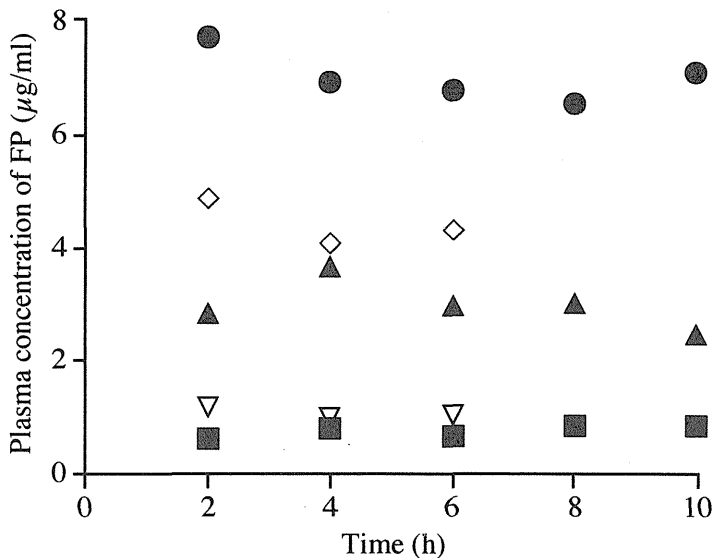


Fig. 5 Plasma concentration of FP during *i.v.* infusion with initial loading in agar gel-inserted rats
 Infusion rate ($\mu\text{g/h/kg}$): ●; 206.19, ▲; 98.04, ■; 46.51
 ◇; 136.36, ▽; 48.54

Fig. 6 には定常状態血漿中濃度と投与速度の関係を示す。この定常状態血漿中濃度は、実験最終時間の血漿中濃度を含め後ろから三点の平均値で示した。各点での投与速度を定常状態血漿中濃度で除した値は各ラットでの全身クリアランスとなる。Fig. 6 中の二本の直線は、静脈内単回投与実験の時に求めた全身クリアランス (Table 1) から予想される 95% 信頼限界を示したものである。ほとんどのプロットがこの 95% 信頼区間内に入っており、また各ラットでの全身クリアランスの値に投与速度依存性が認められないことから FP の体内動態は線形であると考えた。

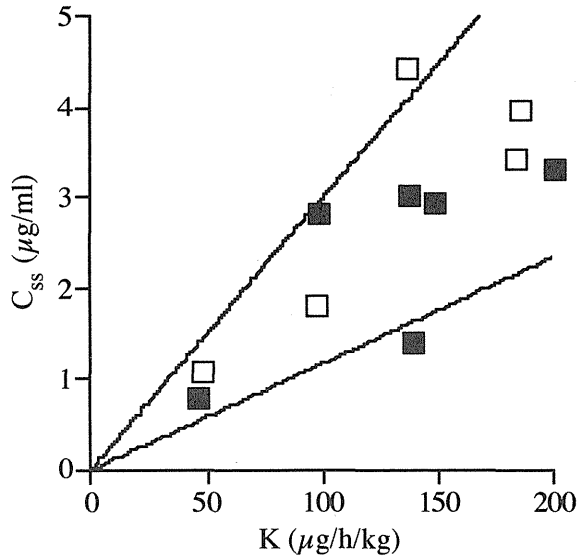


Fig. 6 Relationship between steady state plasma concentration of FP and infusion rate after *i.v.* infusion in agar gel-inserted rats
 ■; for 10h, □; for 6h

第3節 全身循環系から皮下への移行性の評価

全身循環系から皮下に挿入した寒天ゲル中への FP の移行分布特性を理解することは、本実験法で得られる結果を解釈する上で重要である。皮下寒天ゲルへの FP の移行特性は以下の 2 つの異なる状態が考えられる。1 つは寒天ゲルと血漿間での FP の移動が速く、FP の分配が平衡に達している状態 (Model I) , もう一つは寒天ゲルと血漿間での FP の分配が平衡に達せず、FP の寒天ゲルへの移行が主である状態 (Model II) である⁴⁵⁾。寒天ゲル中と血漿間での分配が平衡であると考える Model I の場合、寒天ゲル中濃度/血漿中濃度比が一定であり、寒天ゲルがほぼ一定の容積であるため、寒天ゲル中量/血漿

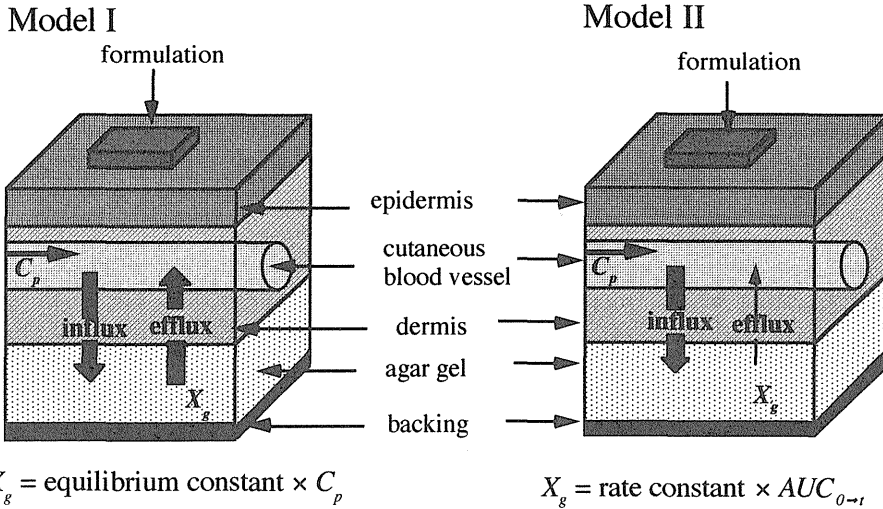


Fig. 7 Schematic representation for skin pharmacokinetics

中濃度の比も一定となる (Fig. 7, Model I) . 一方, 寒天ゲルへの薬物の移行過程が主である Model II の場合, 寒天ゲルが見かけ上ラットの体外またはシンクとして位置づけられ, ゲル中への薬物移行速度は血漿中薬物濃度に速度定数を掛けた値となり, 寒天ゲル中への薬物移行量 (X_g) は血漿中薬物濃度の AUC_{0-t} に速度定数を掛けたものになる (Fig. 7, Model II) . したがって, 寒天ゲル中薬物量 X_g は, Model I では血漿中濃度に, Model II では血漿中濃度の AUC_{0-t} に比例することになる.

Fig. 8a は, FP の点滴静注終了時, すなわち 6 時間または 10 時間目の血漿中濃度 (C_p) と皮下寒天ゲル中内の薬物量 (X_g) との関係を示す. 点滴静注終了時の血漿中濃度と寒天ゲル中薬物量は, 各点滴静注時間内では比例関係が認められたが, 点滴静注時間間では異なって二本の別な回帰直線で示された.

Fig. 8b は, 点滴静注終了までの血漿中 FP 濃度の AUC と皮下寒天ゲル中の薬物量との関係を示したものである. 回帰直線は, 6 時間と

10 時間のすべてのプロットを用いて計算した. 全てのデータは点滴静注時間に有意な差は認められず, ほぼ同一直線上にプロットされた. また, Table 2 に各時間での Fig. 8a, b それぞれの傾きである C_g/C_p (但し C_g はゲル中薬物濃度) および全身循環系から皮下寒天ゲルへの移行クリアランス (Dermal clearance) と注入速度の関係を示す. 注入速度によって C_g/C_p 比は変わらなかった. しかしながら, 10 h での比は 6 h の値より高かった. 一方, 移行クリアランスは 2 つの実験時間 (6 h, 10 h) でほぼ同様の値を示した. これらの結果から, 寒天ゲルと血漿間の FP の分配は平衡に達していないと考えられた. すなわち, 寒天ゲルから血液中への戻りは無視でき, 皮下寒天ゲルが見かけ上ラットの体外として位置づけられ, 寒天ゲルへの全身循環血からの薬物の移行は生物薬剤学的には寒天ゲルへの薬物の排泄という形で

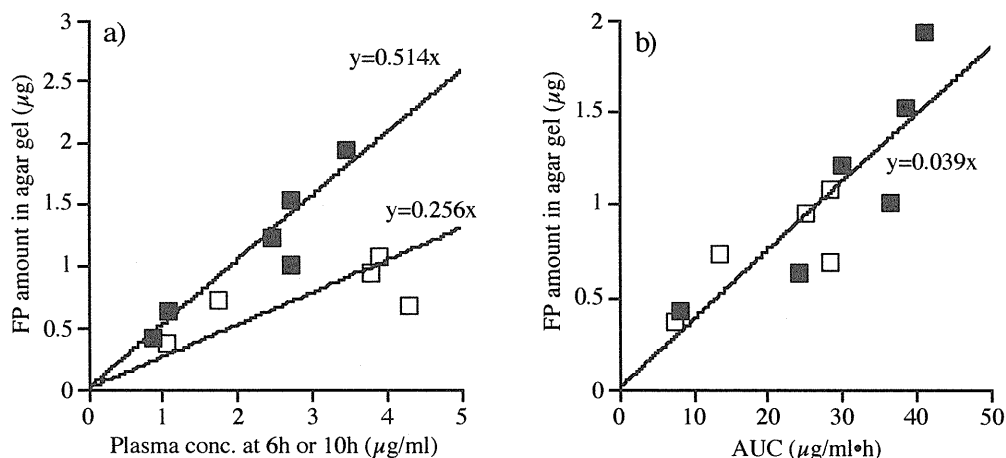


Fig. 8 Relationship between FP amount in agar gel and plasma concentration at 6h or 10h (a) and AUC (b) after *i. v.* infusion in agar gel-inserted rats
 ■; for 10h, □; for 6h

Table 2 C_g/C_p ratio and dermal clearance of FP at steady state

| Experimental period | 6 h | | 10 h | |
|---|-----------------------------------|---|-----------------------------------|---|
| | C_g/C_p ($\times 10^{-2}$) | Dermal clearance ($\mu\text{l/h}$) | C_g/C_p ($\times 10^{-2}$) | Dermal clearance ($\mu\text{l/h}$) |
| Infusion rate ($\mu\text{g/h/kg}$) | | | | |
| 50 | 5.15 \pm 1.30 | 42.0 \pm 9.31 | 8.33 \pm 0.531 | 43.3 \pm 3.69 |
| 100 | 4.74 \pm 1.24 | 38.2 \pm 8.69 | 8.63 \pm 0.771 | 42.0 \pm 2.44 |
| 150 | 5.41 \pm 0.749 | 42.9 \pm 5.41 | 8.77 \pm 0.652 | 37.3 \pm 6.13 |

Each value represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

捕らえることが可能であった。以上より、この実験時間と投与量の範囲ではクリアランスは一定であることが分かった。

さらに、この皮膚クリアランスは全身クリアランスのわずか 0.5% であり、寒天ゲル挿入によるラットへの体内動態への影響はほとんどないものと考えた。

第 4 節 皮膚適用後の皮内動態および皮下移行性の評価

前節の結果から、皮下の脈管系から寒天ゲルへの FP 移行量は、血漿中濃度の AUC から Fig. 8b 中の回帰式を用いて予測可能であることが明らかとなった。もし皮膚適用後の皮下寒天ゲル中への FP の移行に製剤からの直接移行が存在し、その量が本実験法によって検出可能であれば、寒天ゲル中量は Fig. 8b から予想される薬物量より高くなると考えられる。そこで FP 水性ゲルの皮膚適用実験を行った。

Fig. 9 は、Fig. 8b に示した AUC と皮下寒天ゲル中累積 FP 量の関係に皮膚適用実験のデータを加えたものである。皮膚適用群のプロットは点滴静注実験での直線から明らかにずれており、皮膚適用後の皮下寒天ゲル中への薬物移行には全身循環系からだけでなく直接移行する部分も存在することが示唆された。なお、Fig. 9 のデータを用

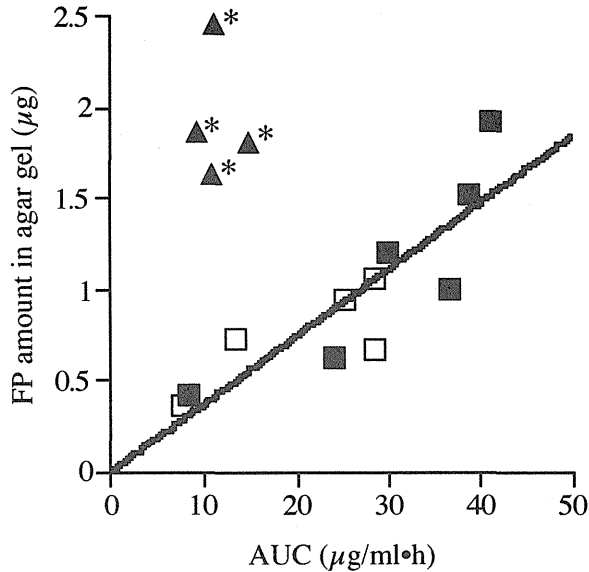


Fig. 9 Relationship between FP transport into agar gel and AUC in agar gel-inserted rats after *i.v.* infusion or topical application

i.v. infusion : ■; for 10h, □; for 6h

Topical application : ▲; for 10h

* $P < 0.05$ values are significantly different from the *i.v.* infusion group.

The line was calculated by 10h- and 6h-data for *i.v.* infusion ($y = 0.039x$).

いて皮下寒天ゲルに移行した総 FP 量から、回帰直線により計算される全身循環系を経て移行した FP 量を差し引くことにより、皮下へ直接移行した FP 量が求められる。

Fig. 10a には FP の皮膚適用後の血漿中濃度プロファイル、同 b にはその際の皮下寒天ゲル中への累積移行量を示す。皮膚適用により、FP の血液中への吸収と皮下への移行が認められた。また、血漿中濃度と寒天ゲル中の累積薬物量は時間とともに増加した。全身循環系から皮下寒天ゲルへ移行した FP 量は、点滴静注実験の結果から得られ

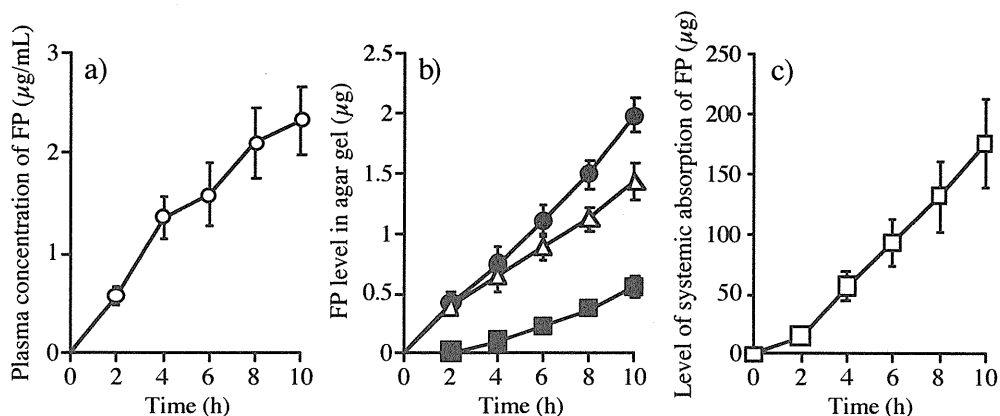


Fig. 10 Time course of FP after topical application (a) plasma concentration; (b) level in agar gel (●; observed value, ■; distribution from systemic circulation, △ direct penetration); (c) level of systemic absorption (deconvolution)
Each point represents the mean ± S.E. of 5 experiments.

た皮膚クリアランスの平均値を用い、皮膚適用後の各時間までの AUC から計算して求めた。

Fig. 10b には皮膚適用した製剤から直接寒天ゲルに移行した FP 量と全身循環系から寒天ゲルへの FP 移行量推移も合わせて示した。計算の結果、皮下寒天ゲル中に移行した薬物量のうち、全身循環系を経て移行したものは約 30% であり、残りが直接移行したものであると推定された。これらの結果より、本実験法を用いることで皮膚適用後の薬物の吸収過程での移行動態の定量的な評価が可能であることが示唆された。

Fig. 10c には、皮膚適用した時の血漿中濃度推移から deconvolution することにより計算した薬物の吸収量を示す。この吸収量と皮下の寒天ゲルに皮膚中の全身循環系を避けて直接移行した薬物量を加えたものが全吸収量となる。全吸収量に対し、皮下寒天ゲル中への直接移行

量は 10h で 0.8% ($1.43 \pm 0.158 \mu\text{g}$) であり、全身循環系への移行量は 99.2% ($175 \pm 36.4 \mu\text{g}$) であった。これらの結果より、皮膚中に浸透した FP の大部分が皮膚中血管系に吸収されるが、皮膚中血管系は完全なシンクではなく、皮膚中 FP の一部が皮下に拡散することが明白となった。

第 5 節 筋肉内移行性との比較

前節までに、ヘアレスラットの腹部皮下に寒天ゲル（面積、 11.6 cm^2 ）を挿入する *in situ* 実験法を用いて皮膚適用（適用面積、 3.14 cm^2 ）後の薬物の皮下移行動態を解明した。ここでラットに挿入した寒天ゲル中の薬物動態が実際の組織である筋肉や皮下中の動態とどの程度異なるかは極めて興味のある問題である。そこで、まず寒天ゲルを挿入していない *intact* なラット (*in vivo*) に FP を腹部皮膚適用（適用面積、 3.14 cm^2 ）し、FP の筋肉移行性を測定することとした。ここでは全身血中薬物レベルを等しくするため、単一ラットから FP 適用部位下の筋肉と非適用部位下の筋肉（それぞれ 0.75 g ）を摘出し FP 量を測定した。また、この *in vivo* 実験法と前節までに示した寒天ゲルを挿入した *in situ* 実験法を比較する前に、それらの中間モデルとして寒天ゲル（面積、 3.14 cm^2 ）を腹部両側の皮下に 2 つ挿入し、片側だけに FP を皮膚適用する *in situ* 実験方法を併用して各々の方法と比較することとした。

Fig. 11 に皮下挿入寒天ゲルが 1 つの場合と 2 つの場合の血漿中濃度推移と適用部位直下と非適用部位下の累積寒天ゲル中量推移を示す。挿入寒天ゲルが 1 つ場合の非適用部位下のゲル中量としては、前

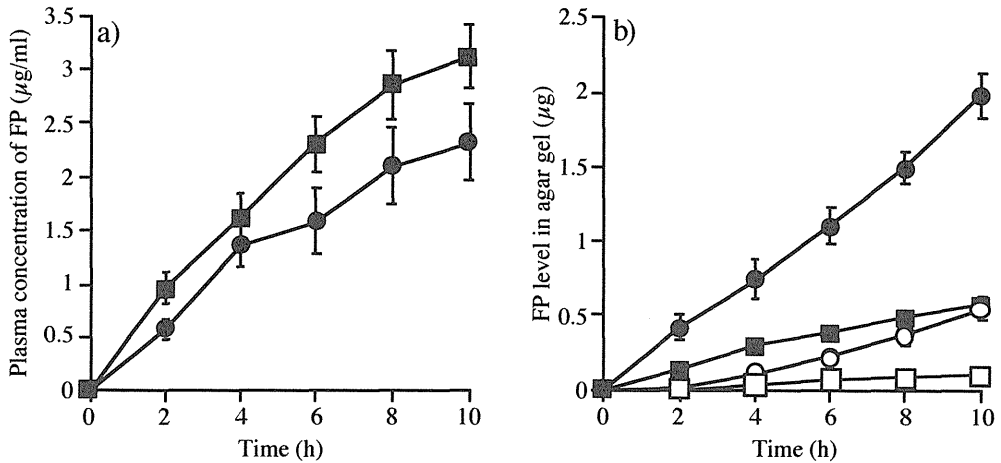


Fig. 11 Time courses of plasma concentration (a) and level in agar gel (b) of FP after topical application in single gel- and dual gel-inserted rats
 circle; single gel, square; dual gel, closed symbol; total amount in agar gel, open symbol; distribution from systemic circulation
 Each point represents the mean \pm S.E. of 5 experiments.

節に算出した全身循環系から分布した量(計算値)をプロットした(Fig. 11b, open circle) . 血漿中濃度推移は皮下に 2 個の寒天ゲルを挿入した群が 1 個のゲルを挿入した群より高い値を示し, 一方, 累積寒天ゲル中量推移は製剤適用部位, 非適用部位ともゲルが 1 つの場合の方が高い値を示した. これら 2 つの実験系における結果の違いは製剤を適用した部位の皮膚透過性の違いや挿入したゲル面積の違いなどに由来するものと思われる. また, ゲルが 1 つの場合は製剤を正中線上の皮膚に適用したのに対し 2 つの場合は腹部皮膚の左右の一方に適用しており, 両者では皮膚中の血管量もしくは血流量が異なっていることも違いの原因であると考えられた.

Fig. 12 はゲルを挿入しないラット (intact rat) を用いた *in vivo* 実

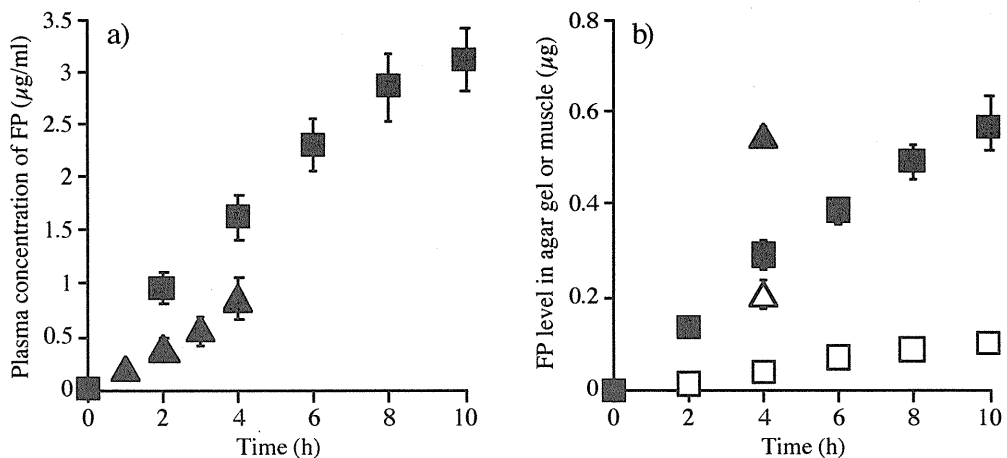


Fig. 12 Time courses of plasma concentration (a) and level in agar gel or muscle (b) of FP after topical application in dual gel-inserted rats and intact rats
square; dual gel-inserted rats, triangle; intact rats, closed symbol;
total amount in agar gel or muscle, open symbol; distribution from systemic circulation
Each point represents the mean \pm S.E. of 5 experiments.

験法により得た血漿中濃度推移と寒天ゲルもしくは筋肉中薬物量を示す。なお、比較のため皮下挿入寒天ゲルが 2 つの場合の結果 (Fig. 11) を併せて示した。血漿中濃度推移は皮下挿入寒天ゲルが 2 つの場合の方が高い値を示した。これは適用部位の皮膚バリアー能の微妙な差が原因しているかもしれない。また、4 時間目の筋肉中薬物量は累積寒天ゲル中量推移より高い値を示した。これらの違いを以後詳細に考察した。

Fig. 13 は製剤適用後 4 時間における三者 (intact rat, 1 つまたは 2 つのゲルを挿入したラット) の $X_g/AUC_{0\sim4}$ 比または $X_m/AUC_{0\sim4}$ 比 (皮下移行速度: K_p) を示す。皮下への FP 移行量は三者とも非適用部位下より製剤適用部位下の方が高く、製剤から皮下への FP の直接移行量が多いことが明らかとなった。

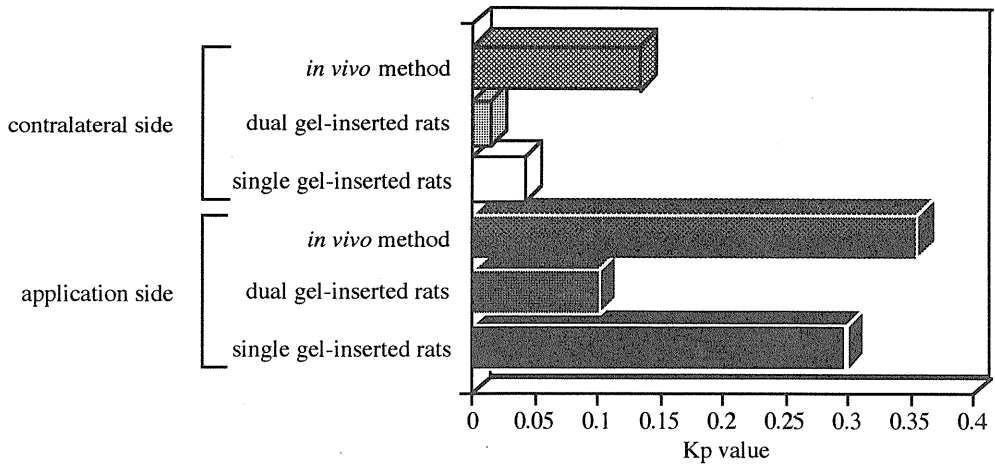


Fig. 13 Comparison of X_g or X_m/AUC_{0-4} ratio (Kp value) of FP among single gel-, dual gel-inserted rats and the intact rats

Fig. 14 に皮下寒天ゲルへの薬物移行過程と筋肉への薬物移行過程を模式的に示す。これらの薬物移行動態を生理学的薬動学の考え方をもとに考察した。寒天ゲルを 2 つ挿入したラットの適用部位直下ゲルへの薬物移行速度 $\frac{dX_{g,a}}{dt}$ は以下のように考えることができる。

$$\frac{dX_{g,a}}{dt} = fJ_{ss} + QC_{in} \quad (1)$$

ここで fJ_{ss} は製剤から皮下の寒天ゲル中に流入する薬物移行速度、 Q は薬物の血液から寒天ゲルへの移行クリアランス、 C_{in} は血管系から流入する薬物の血漿中濃度を示す。また、製剤非適用部位下寒天ゲルへの薬物移行速度 $\frac{dX_{g,c}}{dt}$ は以下のようになる。

a) dual agar gel-inserted rats

b) *in vivo* method

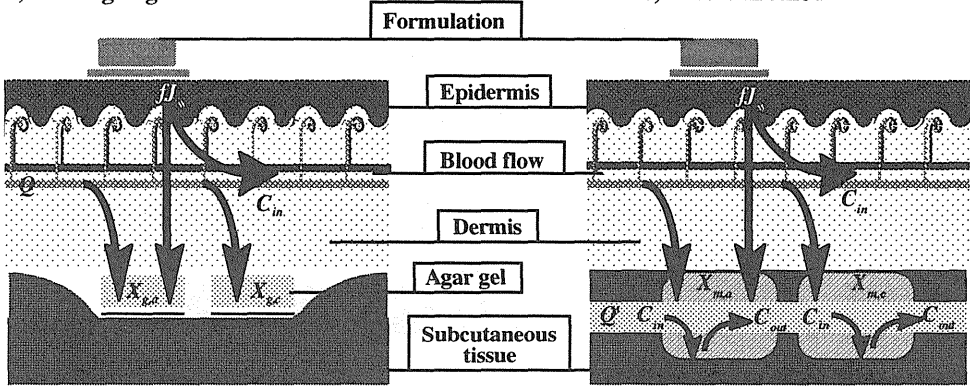


Fig. 14 Schematic representation for drug disposition in skin for each method

$$\frac{dX_{g,c}}{dt} = QC_{in} \quad (2)$$

すなわち、(薬物適用部位下ゲルへの移行量) / (非適用部位下ゲルへの移行量) の比、 Kp_g は、(1) 式を (2) 式で除して以下のように定義した。

$$Kp_g = \frac{fJ_{ss} + QC_{in}}{QC_{in}} \quad (3)$$

一方、寒天ゲル非挿入ラットにおける筋肉移行速度 $\frac{dX_{m,a}}{dt}$ は以下のようになる。

$$\frac{dX_{m,a}}{dt} = fJ_{ss} + Q'(C_{in} - C_{out}) \quad (4)$$

ここで Q' は筋肉中の血流速度（正確には皮膚中の血流との和）， C_{in} ， C_{out} は筋肉入口及び出口の血漿中薬物濃度を示す．また，非適用部位下筋肉への薬物移行速度 $\frac{dX_{m,c}}{dt}$ 式は以下のようなになる．

$$\frac{dX_{m,c}}{dt} = Q'(C_{in} - C_{out}) \quad (5)$$

同様に比， $Kp_{,m}$ ，を求めると，（4）式を（5）式で除して以下のようなになる．

$$Kp_{,m} = \frac{fJ_{ss} + Q'(C_{in} - C_{out})}{Q'(C_{in} - C_{out})} \quad (6)$$

Table 3 に薬物適用部位下の Kp 値 (Kp_{-appl}) と非適用部位下の Kp 値 (Kp_{-cont}) の比を示す．寒天ゲルを挿入したラットではこの比が $Kp_{,g}$ を，*in vivo* ラットでは $Kp_{,m}$ を意味している．皮下挿入ゲルが 1 つの時と 2 つの時ではほぼ同じ値を示したことより，両実験系での寒天ゲルへの FP 移行性に差が見られないことが明らかとなった．また，皮下挿入ゲルが 2 つの時の Kp 値の比 7.63 に比べて *in vivo* 実験では 2.66 と小さい値を示した．この違いは（3），（6）式で説明可能である．すなわち， $Kp_{,g}$ 値と $Kp_{,m}$ 値の違いは C_{out} の有無と Q と Q' の違いによって生じる． C_{out} が十分大きいと仮定した時は，筋肉中への移行速度比 $Kp_{,m}$ が Q' の増加に伴い小さくなるので，事実と反しこの仮定は捨てられる．したがって， C_{out} は小さく， Q' よりむしろ C_{out} が筋肉中への移行速度比に影響を与えていると考えられる．すなわち，筋肉中への移行速度比 $Kp_{,m}$ が寒天ゲル中への移行速度比 $Kp_{,g}$

Table 3 Kp-appl/Kp-cont value after topical application

| | Kp-appl/Kp-cont |
|--------------------------|-----------------|
| single gel-inserted rats | 7.2765 |
| dual gel-inserted rats | 7.6323 |
| <i>in vivo</i> methods | 2.6642 |

より十分小さいため、 C_{out} は移行速度比に対しほとんど影響を与えないこと、また Q' の関与が大きいことが明らかとなった。また、薬物適用部位と非適用部位の筋肉内濃度の差がゲル中濃度の差より小さいことより Q' の方が Q より高い値を示すことが示唆された。すなわち、皮下寒天ゲルへのクリアランスと筋肉中の血流は大きく異なっているものと考えられた。以上より、寒天ゲルに移行した薬物量がそのまま筋肉中に移行する薬物量とならないことが理論的にも明らかとなったが、本実験法は筋肉中の薬物量の予測や比較には十分使用できることも併せて明らかとなった。

第6節 小括並びに考察

本章では、皮下に寒天ゲルを挿入したラットにおける FP の体内動態と皮下寒天ゲル中への移行性について検討し、今回構築した *in situ* 実験系の評価を行った。その結果、FP の体内動態は線形であり、皮下に寒天ゲルを挿入したラットにおいて *intact* なラットと比べて、全身クリアランスの有意な違いは認められなかった。したがって、皮下に寒天ゲルを挿入してもラットの体力面での影響はないと考えられた。皮下に寒天ゲルを挿入したラットに点滴静注を行った場合、点滴静注終了時の FP の血漿中濃度と皮下寒天ゲル中量との関係には、点滴時

間間で有意な差があり，寒天ゲルと血液の間では FP の分配が平衡に達していないことが示唆された．FP の皮下寒天ゲル中量と血漿中濃度の AUC の関係には，点滴静注時間依存性が存在せず，比例関係が認められたことから，寒天ゲルから血液中への FP の戻りは無視でき，寒天ゲルは本実験の時間範囲ではラットにとって体外またはシンクとして位置づけられ，ゲルへの FP の移行は，生物薬剤学的には排泄として捕らえることが妥当であることが示された．

また，皮下寒天ゲル中への全身循環系からの薬物移行量は，AUC との関係式から予測が可能であった．さらに，FP を皮膚適用した後の寒天ゲルへの移行量は点滴静注時の AUC と皮下寒天ゲル中の薬物移行量との関係から予想される量より高く，皮膚適用後の皮下寒天ゲル中への移行には全身循環系からだけでなく皮下への直接移行も存在し，その量を本研究の実験方法で定量的に評価できた．

さらに実際の筋肉中薬物量を測定した結果，寒天ゲル中量より高い値を示した．しかし，累積寒天ゲル中量および筋肉中薬物量と AUC の間にはそれぞれ一定の関係が見られた．また，皮下寒天ゲルへのクリアランスと筋肉中の血流は大きく異なっているものと考えられ，適用部位下と非適用部位下の K_p 値の比で比較した結果より筋肉中の血流によって大きく影響していることが示唆された．

以上より，本研究での実験方法を用いることで，薬物皮膚適用後の皮下への薬物移行を全身循環系からの移行と皮膚からの直接の移行に分離評価できると思われた．さらに，寒天ゲルに移行した薬物量がそのまま筋肉中に移行する薬物量とならないものの，本実験法は筋肉中の薬物量の予測や比較には十分使用できることが明らかとなった．

第2章 種々薬物の皮内動態の解析⁴⁶⁾

前章の結果より、皮膚適用した FP の角質層を透過した後の移行過程は、真皮中の毛細血管から全身循環系への移行と皮下の組織への直接移行に分けられ、皮下組織（筋肉など）への移行は、全身循環系に一度移行してから血流を介して移行するものと、皮膚中血流に移行せずに直接移行したものの和によって決定されることが分かった。皮膚中から各々へ移行する薬物の割合は適用した薬物の物理化学的特性により大きく異なると思われる。したがって、本解析法を一般化して種々薬物に応用するには皮内での薬物の各移行過程が、薬物の違いによりどのように変化するかを十分理解する必要がある。そこで著者は皮内動態を簡便にかつ各過程の評価が定量的に可能になるような皮内および皮下への薬物移行動態を示すコンパートメントモデルを考えた。このモデルに基づき、各コンパートメントの物質収支式を誘導し、皮内動態パラメータである薬物の皮膚透過速度、全身循環系と皮下への移行率そして全身循環系から皮下への移行速度定数を算出した。また、各部位への薬物の移行量を推定した。さらに、これらの薬動学的パラメータと薬物の物理化学的パラメータとの関係について考察した。本章では、物理化学的性質の異なる薬物として新たにアンチピリン (ANP)、リドカイン (LC)、ピロキシカム (PXC) を追加して、皮内動態を調べ、FP の結果と比較した。

第1節 ファルマコキネティックモデルによる解析

各薬物の皮内動態を定量的に評価するために単純なコンパートメントモデルを構築した。そのモデルを Fig. 15 に示す。このファルマ

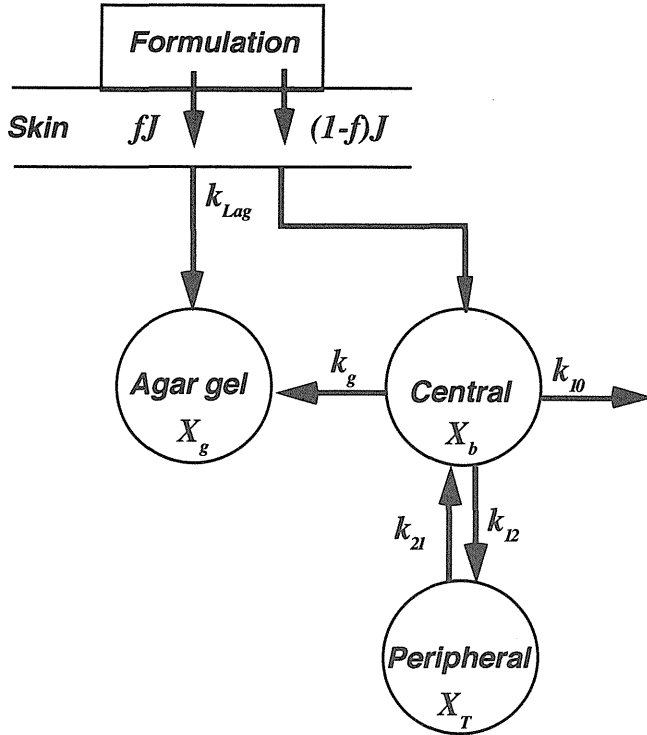


Fig. 15 Pharmacokinetic model for drugs after topical application

コキネティックモデルを用いて、寒天を腹部皮下に挿入したラットに各薬物を皮膚適用した後の皮内動態を解析した。なお、皮下の寒天ゲルコンパートメントはつねにシンクであり、寒天ゲルから体循環コンパートメントへの戻りはないものと仮定した。また、体内動態は、各薬物とも線形 2-コンパートメントモデルで表記した。

静注後の血中薬物量 Cb_{iv} 及び寒天ゲル中薬物量 Xg_{iv} は、常法により以下のように求められる。

$$Cb_{iv} = \frac{X_0(k_{21} - \alpha)}{Vd(\beta - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{X_0(k_{21} - \beta)}{Vd(\alpha - \beta)} e^{-\beta t} \quad (7)$$

$$X_{g_{iv}} = \frac{k_g X_0 k_{21}}{\alpha \beta} + \frac{k_g X_0 (k_{21} - \alpha)}{\alpha (\alpha - \beta)} e^{-\alpha t} + \frac{k_g X_0 (k_{21} - \beta)}{\beta (\beta - \alpha)} e^{-\beta t} \quad (8)$$

但し、 $\alpha + \beta = k_{10i} + k_{21}$ 、 $\alpha \beta = k_{10i} \cdot k_{21} - k_{12} k_{21}$ 、 $k_{10i} = k_{10} + k_g + k_{12}$ である。また、 X_0 は投与量を示し、 k_{12} 、 k_{21} は体循環および末梢コンパートメント間の薬物移行速度定数、 k_g は体循環から皮下寒天ゲルコンパートメントへの薬物移行速度定数、 k_{10} は体循環コンパートメントからの消失速度定数を示す。

一方、皮膚適用後の Cb_{id} 及び $X_{g_{id}}$ は以下のようにになる。

$$C_{b_{id}} = \frac{(1-f)Jk_{21}}{Vd \alpha \beta} + \frac{(1-f)J(k_{Lag} - k_{21})}{Vd(\alpha - k_{Lag})(\beta - k_{Lag})} e^{-k_{Lag}t} \\ + \frac{(1-f)Jk_{Lag}(\alpha - k_{21})}{Vd\alpha(k_{Lag} - \alpha)(\beta - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{(1-f)Jk_{Lag}(\beta - k_{21})}{Vd\beta(k_{Lag} - \beta)(\alpha - \beta)} e^{-\beta t} \quad (9)$$

$$X_{g_{id}} = \left(fJ + \frac{(1-f)Jk_g k_{21}}{\alpha \beta} \right) t \\ + \left[\frac{fJ}{k_{Lag}} + \frac{(1-f)Jk_g(k_{21} - k_{Lag})}{k_{Lag}(\alpha - k_{Lag})(\beta - k_{Lag})} \right] (e^{-k_{Lag}t} - 1) \\ + \frac{(1-f)Jk_g k_{Lag}(k_{21} - \alpha)}{\alpha^2(k_{Lag} - \alpha)(\beta - \alpha)} (e^{-\alpha t} - 1) + \frac{(1-f)Jk_g k_{Lag}(k_{21} - \beta)}{\beta^2(k_{Lag} - \beta)(\alpha - \beta)} (e^{-\beta t} - 1) \quad (10)$$

ここで、 J は基剤から皮膚までの薬物移行速度であり、 f および $1-f$ はそれぞれ寒天ゲル及び全身循環系へ移行した比率を意味する。また、 k_{Lag} は定常状態の J 、すなわち J_{ss} を示すまでのラグタイムを表現する一次速度定数であり、以下のようにになる。

$$J = J_{ss}(1 - e^{-k_{Lag}t}) \quad (11)$$

以上の式を血漿中濃度と皮下寒天ゲル中薬物量推移に非線形最小二乗法 (algorithm : Damping Gauss Newton 法) を用いてあてはめ各薬物の薬動学的パラメータを算出した。まず、静注後の血漿中濃度推移を (7) 式に当てはめ、各パラメータを算出した。次に、静注後の皮下寒天ゲル中薬物量推移と皮膚適用実験後の血漿中濃度と皮下寒天ゲル中薬物量推移の 3 者を、(7) 式より得られたパラメータを初期値として、それぞれ (8) , (9) 及び (10) 式に当てはめた。またその際、静脈内単回投与から得られたパラメータを用いて k_g , f , J , 及び k_{Lag} を算出した。

パラメータの決定に先立ち、(11) 式の妥当性の評価を試みた。皮膚を単一な拡散膜として仮定して *in vitro* での皮膚透過を評価するための式 (12) が Scheuplein らによってすでに構築されている⁴⁷⁾。

$$J = \frac{DKCv}{L} \left[1 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2}{L^2}t\right) \right] \quad (12)$$

In vitro 皮膚透過データを (12) 式を用いてカーブフィッティングすることにより、拡散係数である D と分配係数である K を予測することが可能となり、この 2 つのパラメータから J_{ss} と k_{Lag} を算出できる。一般に皮膚透過を評価する際は上式 ((12) 式) を使い、Shah らも評価を行っている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。しかし (9) , (10) 式中の J として (12) 式を用いると (9) , (10) 式が複雑となり、データをフィッティングする際発散しやすいことが明らかとなった。そこで今回は (12) 式の代わりにその近似式の 1 つである (11) 式を用いた。この式は製剤か

ら皮膚への流入速度を 0 次，流出速度は 1 次と仮定して求められたものである。

(11)，(12) 式を積分し，累積透過量推移を表す (13)，(14) 式を求めた。

$$Q = J_{ss}t - \frac{J_{ss}}{k_{Lag}}(1 - e^{-k_{Lag}t}) \quad (13)$$

$$Q = LKCv \left[\frac{D}{L^2}t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \left\{ \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2}{L^2}t\right) \right\} \right] \quad (14)$$

FP の *in vitro* 皮膚透過データを (13) 式でカーブフィッティングし，定常状態吸収速度である J_{ss} とラグタイムの逆数である k_{Lag} を算出し，(14) 式より求めたこれらの値と比較した。Fig. 16 は (13) 式より計算した累積透過曲線 (a) と比較のため (14) 式のシミュレーション結果 (b) を示す。また，今回の *in situ* 実験系は生きた血管系が存在するために，*in vitro* 透過実験の結果だけでなく，前章で示した FP の皮膚適用後の血漿中濃度挙動から **deconvolution** して求めた皮膚透過データも (13) 式でフィッティングした。その結果と算出した各パラメータを Fig. 17 および Table 4 に示す。

Fig. 16a および Fig. 17 より，(13) 式は実測値を極めて正確に表現することができることから，(12) 式のように複雑な式を (11) 式のように簡単な式で評価できると判断した。しかし，(11) 式は (12) 式に比べ皮膚透過のラグタイムの長いものには不適當であると考えられた。

次にモデルより得られた式を用いて，皮膚透過性（皮内動態）およ

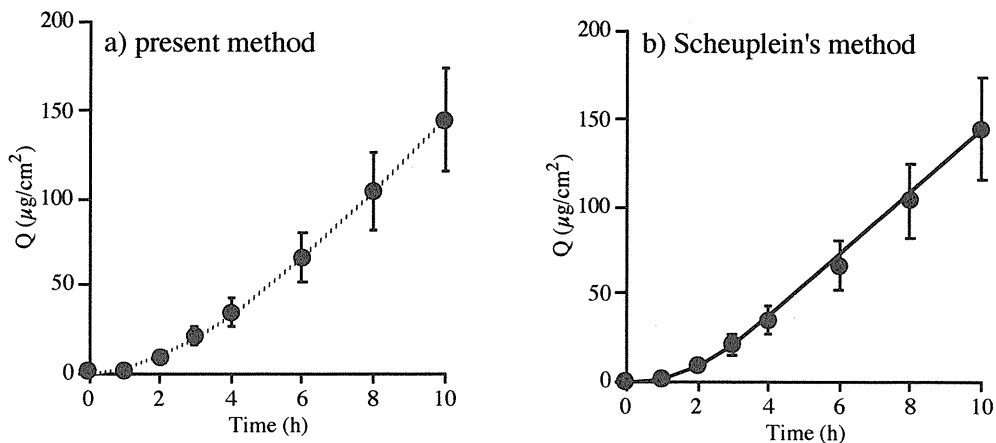


Fig. 16 Observed *in vitro* skin permeation profiles and their fitting curves for the present method (a) and the Scheuplein's method (b)
Each point represents the mean \pm S.E. of 9 experiments.

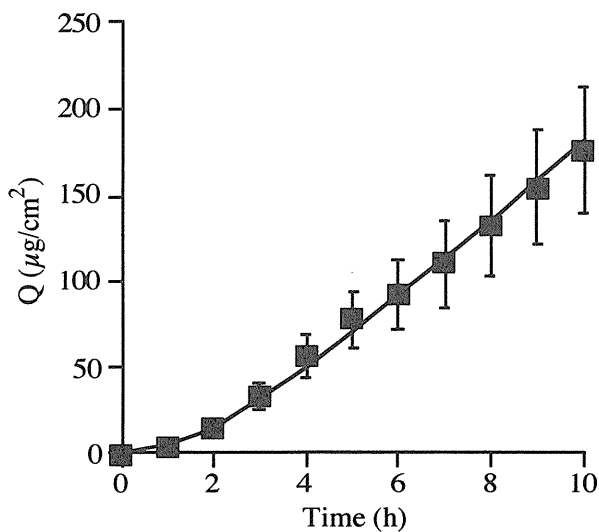


Fig. 17 Observed systemic absorption values (by deconvolution) and their fitting curve using the present method
Each point represents the mean \pm S.E. of 9 experiments.

び皮下移行性のデータを解析した。解析には第1章で得られたFP皮膚適用後の結果 (Fig. 10a, b) を用いてカーブフィッティングを行い、モデルの妥当性について検討した。Fig. 18a, b にはそれぞれFP皮膚適用後の血漿中濃度と累積寒天ゲル中量推移を示した。図中の実線は式 (9), (10) へのフィッティングカーブを示す。フィッティングカ

Table 4 Calculated flux and lag time for the each method

| | | flux ($\mu\text{g}/\text{h}$) | Lag time (h) |
|--|---------------------|---------------------------------|---------------------|
| <i>in vitro</i> skin permeation study | Scheuplein's method | $KDCv/L$ 26.81 | $L^2/6D$ 2.04 |
| | present method | J_{ss} 25.32 | $1/k_{Lag}$ 4.76 |
| systemic absorption (deconvolution) | | J_{ss} 23.12 | $1/k_{Lag}$ 2.15 |

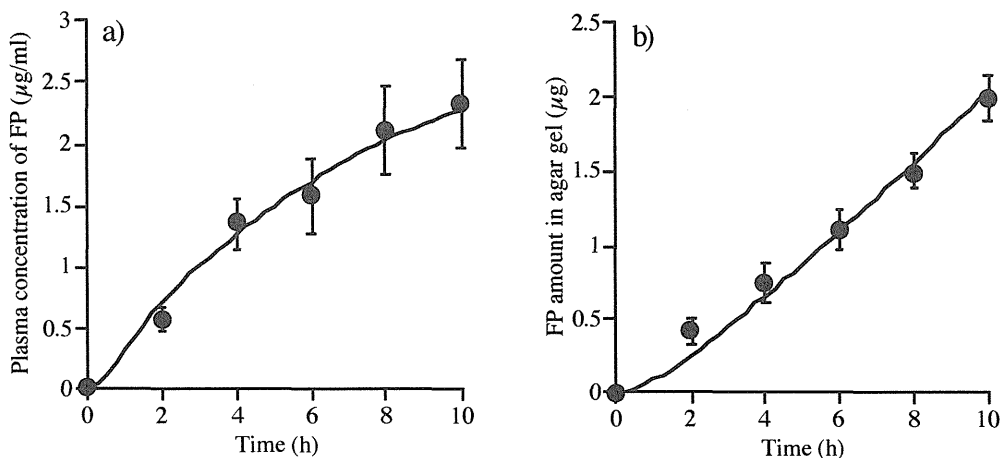
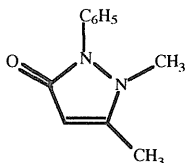


Fig. 18 Time course of plasma concentration (a) and amount in agar gel (b) of FP after topical application
Each point represents the mean \pm S.E. of 5 experiments.

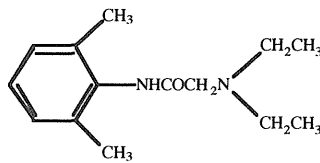
ープは得られた実測値と良く一致しており、その際得られた S.D. 値は皮膚中の皮内動態を解析するのに十分小さい値であった。これらの結果より、皮内および全身循環系の動態を表したコンパートメントモデルは妥当であることが示唆された。さらに、皮下の寒天ゲルから全身循環系への再吸収は無視することができ、寒天ゲルは完全にシンクとして考えることができた。

第 2 節 種々薬物の経皮吸収性と皮内動態の評価

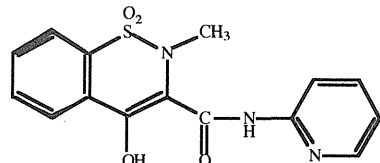
本節では、前節で確立した方法を用い、数種の薬物の皮膚適用製剤から全身循環系と皮下への移行性について検討した。モデル薬物は極性の異なる 4 種類, ANP, LC, PXC そして FP を選択した (Fig. 19) . Fig. 20a および b に各薬物を 4 mg/kg 単回静脈内投与後の血漿中濃度と累積寒天ゲル移行量の経時変化を示す。得られた血漿中濃度挙動を線形 2 -コンパートメントモデルに当てはめた。当てはめ曲線を Fig. 20a 中に、また、薬動学的パラメータを Table 5 に示す。実測値と図中のフィッティングラインは良く一致した。累積寒天ゲル移行量推移は高い方から ANP, PXC, FP, LC という順であった。また、いずれの薬物においても経時的な累積寒天ゲル移行量と血漿中濃度から



M.W. ; 188.23
Antipyrine (ANP)



M.W. ; 234.34
Lidocaine (LC)



M.W. ; 331.35
Piroxicam (PXC)

Fig. 19 Chemical structure and molecular weight of drugs used in the experiment

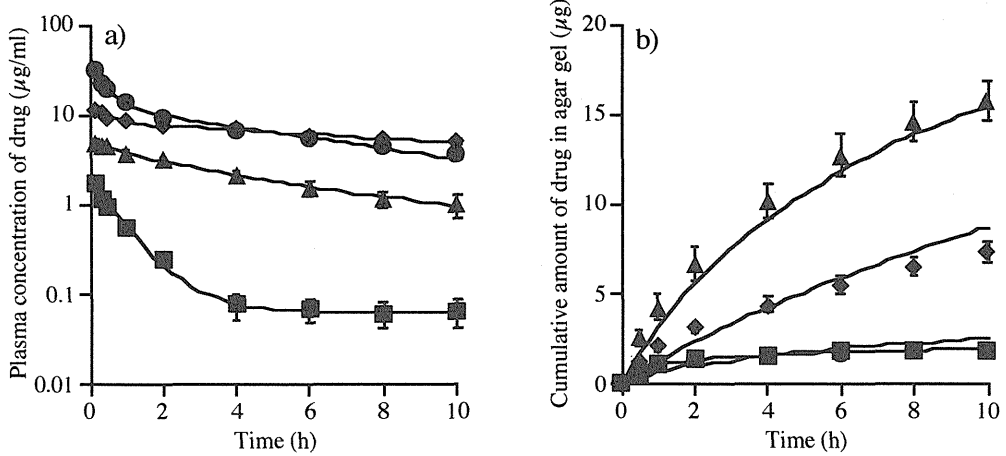


Fig. 20 Time courses of plasma concentration (a) and amount in agar gel (b) of each drug after *i. v.* injection
 ●; FP, ▲; ANP, ■; LC, ◆; PXC
 Each point represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments.

Table 5 Pharmacokinetic parameters for each drug after *i. v.* injection

| | ANP | | LC | PXC | FP | |
|-----------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| Dose (mg/kg) | 2.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 2.0 | 4.0 |
| k_{12} (h^{-1}) | 1.33 | 0.15 | 0.98 | 0.79 | 1.70 | 1.52 |
| k_{21} (h^{-1}) | 3.03 | 0.53 | 0.06 | 1.65 | 0.87 | 0.94 |
| $k_{10} + k_g$ (h^{-1}) | 0.23 | 0.17 | 0.19 | 0.088 | 0.42 | 0.40 |
| V_1 (l/kg) | 0.574 | 0.799 | 2.284 | 0.308 | 0.080 | 0.098 |
| V_2 (l/kg) | 0.250 | 0.226 | 40.144 | 0.148 | 0.157 | 0.159 |

算出した AUC は比例関係を示した。さらに、累積皮下寒天ゲル中移行量と AUC に比例関係が認められたことから、すべての薬物について寒天ゲルから血液中への薬物の戻りは無視でき、皮下寒天ゲルは本実験の交換間隔時間内ではシンクとして位置づけられた。また、今回得られた累積皮下寒天ゲル中移行量と AUC の間の比例関係は、投与量を変えて FP を点滴静注した時にも得られており、体内動態におい

て投与量および時間依存性が存在しないことが明らかとなった。

Fig. 21a および b は各薬物を含む水性ゲルを皮膚適用した際の血漿中濃度および累積寒天ゲル移行量プロファイルを示す。図中の実線は静注後の血漿中濃度推移から求めた消失パラメータを用い、静注後の寒天ゲル中量推移と皮膚適用後の血漿中濃度推移と寒天ゲル中量推移の 3 者を同時にカーブフィッティングして求めたものである。実測値と曲線は比較的よく一致しており、先に示したファルマコキネティックモデルの妥当性が示唆された。

Table 6 に静脈内投与実験と皮膚適用実験から得られた結果をもとに算出した、皮膚適用製剤から皮下寒天ゲルと全身循環系への薬物移行率を示す。まず、フィッティングにより得られたパラメータを用いて製剤から皮下の寒天ゲルへの直接移行量と全身循環系への移行率を

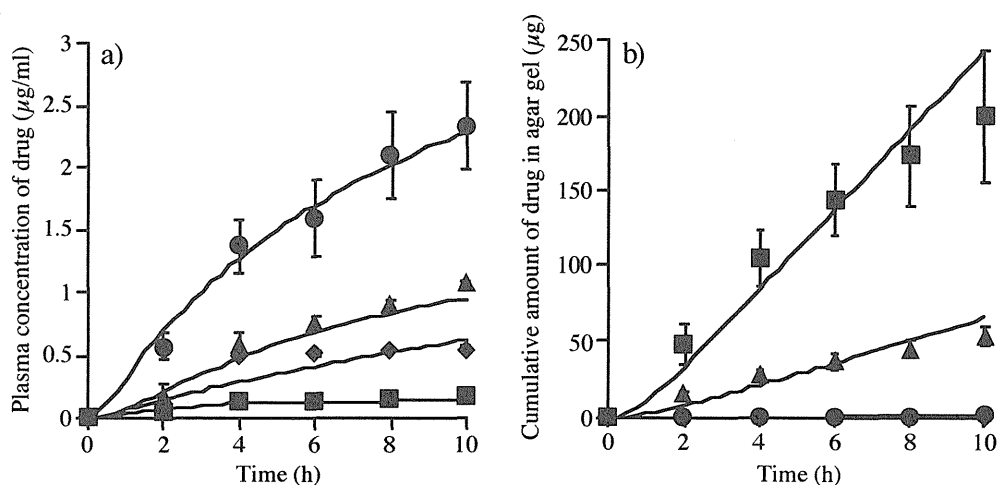


Fig. 21 Time courses of plasma concentration (a) and amount in agar gel (b) of each drug after topical application
 ●; FP, ▲; ANP, ■; LC, ◆; PXC
 Each point represents the mean \pm S.E. of 3-5 experiments.

Table 6a に示す。全ての薬物で、皮膚に適用した薬物のうち大部分 (75% 以上) が基剤から全身循環系に移行 (A) することが確かめられた。また、この移行率は PXC, FP, ANP, LC という順であった。さらに、製剤から皮下への移行率 (B) はこの逆であり、薬物間で比較すると、皮下への移行率は LC と ANP が高く、逆に FP と PXC が低い値となった。この結果は静注に比べて皮膚適用の方が皮下への直接移行がある分だけ、より皮下に薬物を送達出来ることを示している⁵¹⁾。また、皮膚適用後に検出されたゲル中の薬物は皮膚から直接移行したものと全身循環系から移行したものを含んでいる。そこで、これらの分離評価を試みた。この計算結果を Table 6b に示す。寒天ゲル中へ移行した FP, ANP, LC のうち全身循環系から移行 (C) したものは 20% 以下であった。これは主に k_g の変化に伴って変わるものと考えられた。また、製剤から直接移行 (D) したものは 80% 以上となった。したがって、皮下の寒天ゲルに分布した薬物量のほとんどは皮膚から直接移行したものであることが明らかになり、全身循環系由来の薬物の寄与は小さかった。しかし、PXC だけは血液からゲルへの移行率が特に高く、直接移行率は 39.1% に過ぎなかった。PXC の直接の移行率が低いのは他に比べてタンパク結合率が高いため真皮内

Table 6 Drug disposition in skin for each drug after topical application

(a) % fraction of distributed drug into skin from the formulation

| | ANP | LC | PXC | FP |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| to blood (A) | 86.0% | 76.6% | 99.8% | 99.3% |
| to agar gel (B) | 14.0% | 23.4% | 0.2% | 0.7% |

(b) % fraction of drug in agar gel

| | ANP | LC | PXC | FP |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| from blood (C) | 4.8% | 0.4% | 61.9% | 17.2% |
| from formulation (D) | 95.2% | 99.6% | 39.1% | 82.8% |

での拡散性が低下しているためと考えられた。さらに FP と比較して分子量が大きく複雑な構造をしていること、消失半減期が長いこと⁵²⁾が原因と思われた。

第3節 薬物の物理化学的パラメータから見た皮内動態の解析

Table 7 に各薬物の分子量 (M.W.) , 融点 (m.p.) , pKa, みかけのオクタノール/水分配係数 (K'_{ow}) , みかけのオクタノール/PBS 分配係数 (K'_{OPBS}) , 真のオクタノール/水分配係数 (=distribution coefficient of unionized drug) (K) , 水中溶解度 (S'_w) , PBS 中溶解度 (S'_{PBS}) 及び血漿中タンパク非結合率 (fu) を示す。生理条件下では ANP の大部分が分子型で存在しており, 逆に PXC と FP は大部分がイオン型で存在している。また, LC は約 20% が分子型で存在している。分子型薬物の脂溶性の指標である K は, FP, PXC, LC そして ANP の順に高かった。 fu のランクオーダーに関しては K と同様で, NSAID である FP と PXC のタンパク結合率が高く, LC, ANP は低かった。

Table 8 は皮膚適用実験データから求めた薬動学的パラメータ (J, f ,

Table 7 Physicochemical parameters and protein-unbound ratio in plasma for each drug

| drug | M.W. (g/mol) | m.p. (°C) | pKa | log K'_{ow} | log K'_{OPBS} | log K | S'_w ($\mu\text{g/mL}$) | S'_{PBS} ($\mu\text{g/mL}$) | fu |
|------|-----------------|--------------|----------|------------------------|------------------------|---------|--|--|------|
| ANP | 188.23 | 105 | 1.5 | 0.30 (± 0.02) | 0.37 (± 0.01) | 0.37 | 6.27×10^6 ($\pm 13.2 \times 10^3$) | 5.86×10^6 ($\pm 21.2 \times 10^3$) | 0.98 |
| LC | 234.34 | 65 | 8.0 | 2.38 (± 0.04) | 1.38 (± 0.05) | 2.08 | 3471 (± 45) | 4006 (± 63) | 0.30 |
| PXC | 331.35 | 201 | 1.8, 5.1 | 0.19 (± 0.02) | 1.14 (± 0.04) | 3.44 | 18.85 (± 0.16) | 738.8 (± 5.4) | 0.01 |
| FP | 244.26 | 113 | 3.7 | 2.72 (± 0.09) | 0.90 (± 0.02) | 4.57 | 8.59 (± 0.74) | 3810 (± 65) | 0.01 |

k_g, k_{Lag}) およびそのパラメータから求めたクリアランス値を示す. ANP の J の欄の括弧内は飽和溶液を適用したときの計算値を示す. 表中で, CL_{ab} は定常状態フラックス J_{ss} を適用薬物濃度もしくは飽和溶解度 S'_{PBS} で除して得た値である. 分子型薬物の吸収クリアランスである $CL_{ab,*}$ (= 分子型の permeability coefficient \times application area) は定常状態フラックス J_{ss} を分子型薬物適用濃度で除して得た値であり, これは FP, PXC, LC, ANP という順に小さくなった. 皮下寒天ゲルへの直接移行率 f は LC と ANP が高い値を示し, FP と PXC が低い値を示した. また, CL_g は k_g に central compartment の容積 V_1 を掛けた値である. CL_g^* と CL_g/fu はそれぞれ分子型と非タンパク結合型の全身循環系から皮下寒天ゲルへの移行クリアランスを意味する. 一方, CL_g^*/fu は分子型分率とタンパク結合率の両方を考慮した全身循環系から皮下の寒天ゲルへの薬物移行クリアランスである. CL_g^* と CL_g^*/fu は FP, PXC, LC, ANP という順に小さくなった.

次に, 皮膚適用実験から得られた結果と薬物の物理化学的特性を各薬物間で比較した. まず, 各薬物の経皮吸収過程について考察する. 一般に薬物の経皮吸収速度 J は皮膚バリアーである角質層中の濃度

Table 8 Pharmacokinetic parameters for each drug after topical application

| | ANP | LC | PXC | FP |
|---|---------------|--------|--------|---------|
| J ($\mu\text{g}/\text{h}$) | 49.66 (62.27) | 113.68 | 10.57 | 25.77 |
| $CL_{ab} \times 10^3$ (ml/h) | 0.1 | 28.4 | 14.31 | 6.76 |
| CL_{ab}^* (ml/h) | 0.0001 | 0.1413 | 2.8686 | 31.6388 |
| f (%) | 14 | 23 | 0.24 | 0.71 |
| $k_g \times 10^3$ (h^{-1}) | 3.9 | 1.5 | 1.4 | 1.3 |
| CL_g ($\text{ml}/\text{h}/\text{kg}$) | 2.23 | 3.48 | 0.43 | 0.1 |
| $CL_g^{\frac{1}{2}}$ ($\text{ml}/\text{h}/\text{kg}$) | 2.23 | 17.33 | 85.48 | 467.84 |
| CL_g/fu ($\text{ml}/\text{h}/\text{kg}$) | 2.28 | 11.60 | 42.63 | 10 |
| CL_g^*/fu ($\text{ml}/\text{h}/\text{kg}$) | 2.28 | 57.78 | 8548.4 | 46784 |
| k_{Lag} (h^{-1}) | 1.04 | 1.22 | 1.46 | 1.25 |

勾配と角質層中の拡散係数により左右される。その濃度勾配は適用薬物濃度によって変化する。今回は ANP を除いて基剤中に懸濁しているため、濃度勾配は基剤中の溶解度と皮膚／基剤分配係数の積によって決定される。溶解度は物質の融点 (m.p.) およびモル融解熱によって変化する。また、拡散係数は拡散物質の分子構造と拡散媒体の物性によって決まる。そこで m.p. と M.W. に着目したところ、低い m.p. と小さい M.W. を持つ薬物ほど高い吸収速度を示した (Fig. 22)。しかし、今回用いた薬物の M.W. の範囲は狭く (188.23-331.35)、このことを確認するためにはより広範な薬物で調べる必要があると思われた。Fig. 23a に分子型薬物の透過係数と有効透過面積の積である $CL_{ab,*}$ と真の分配係数である K との関係を示した。その結果、両者

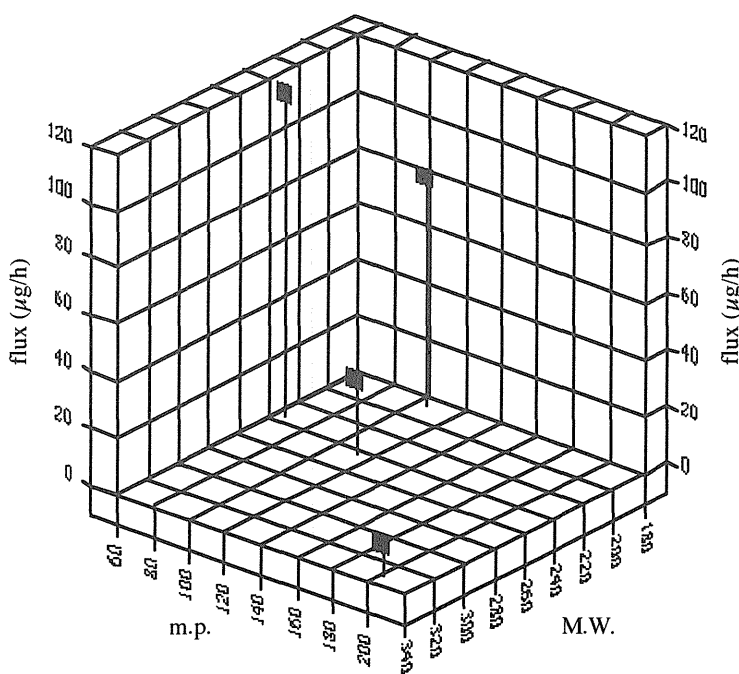


Fig. 22 Relationship between M.W., m.p. and flux of drugs

に一定の関係が認められたため、各薬物の皮膚中への吸収性は主に分配性により決定されることがわかった。同様な結果が、*in vitro* 透過実験を用いて多くの研究者より報告されていることとも一致する⁵³⁻⁵⁵。さらに種々薬物の皮膚透過性を分子量と分配性から予測している報告もある⁵⁶⁻⁵⁸。

次に、全身循環系から皮下への薬物移行性について考察する。各薬物の皮下への移行性は薬物の血液から皮下組織への分配性、皮膚組織中および血管内皮の拡散性、血液中および組織中のタンパク結合率、皮膚組織中の血流などによって変化するものと思われる。そこで各薬物の全身循環系から皮下への移行をクリアランスの概念を用いて評価した。その結果、 CL_g^* と CL_{int-g}^* は真の分配係数と一定の関係を示した (Fig. 23b)。このことより、全身循環系を介した皮下寒天ゲルへの分布は主に薬物の分配性に左右されることが示唆された。しかし、矢木らは、皮膚中のサイトゾルへの薬物の結合が影響するという報告をしている⁵⁹。今回の検討では血流や真皮内での拡散性など他の要因に

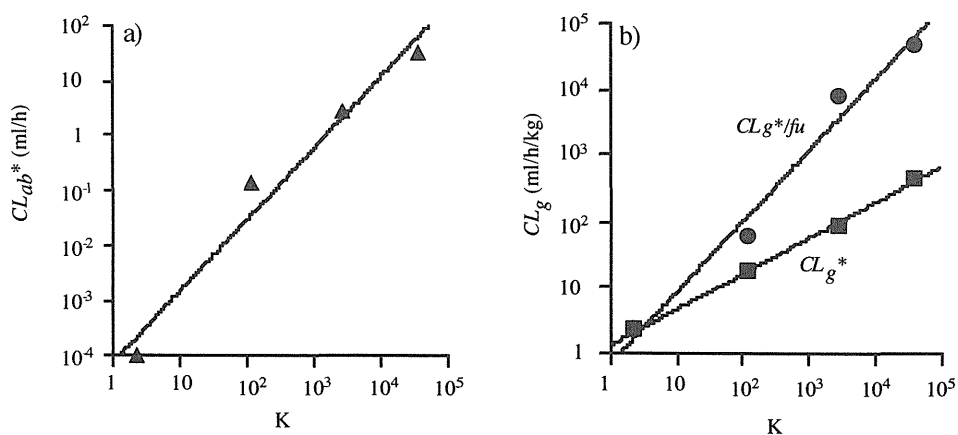


Fig. 23 Relationship between CL_{ab}^* (a) or CL_g (b) and K of each drug

ついて検討しなかったため、皮下への移行性を分配性だけに限定することはできない。

次に f と各薬物の物理化学的パラメータとの関係について考察した。残念ながら、今回は f とはっきり関連性が認められるパラメータは見つからなかった。しかし、薬物の血液中への溶解性、血管透過抵抗性、皮膚内での拡散性そして薬物の皮膚透過性が関係していると思われる。具体的な要因については更なる検討が必要であるが、分配性とタンパク結合率が高い薬物で f が低くなる傾向が見られた。

第4節 小括

本章ではファルマコキネティックモデルを用いて、種々薬物の皮内動態の解析について検討した。また、得られたパラメータを用いてシミュレーションすることにより全身循環系および皮下への薬物の移行率を推定することができた。さらに皮内での各移行過程と個々の薬物の物理化学的パラメータの比較を行うことにより、薬物の皮膚（角質層）透過性と分配性の関連性や全身循環系から皮下への移行性と分配性さらにはタンパク結合率や薬物イオン種との関連性について有用な知見を得ることができた。

以上より種々薬物の皮内動態および皮下移行性を予測することが可能になると思われた。

第3章 薬物の皮内動態に及ぼす種々添加剤の影響⁶⁰⁾

経皮吸収過程における皮膚内の薬物動態は、その後の全身や皮下への移行との関係から重要な意味をなしている。この薬物の皮内動態は特に血管作用薬によって影響を受けるものと思われる。すでに、Singhらは血管収縮薬を併用することにより、組織への薬物の分布が影響を受けることを報告している^{61, 62)}。エピネフリン (EP) はそのひとつの化合物であり、すでに局所適用したプロカインの効果を保ち、増加させるために利用されている⁶³⁾。また逆に、ブラジキニン (BK) のような血管拡張作用を持つようなものが炎症時には組織中に漏出することで皮内動態に変化を与えるものと思われる。加えて溶解補助剤や吸収促進剤を含む製剤は薬物の皮膚内および皮下移行動態に何らかの影響を与えるものと推察できる⁶⁴⁾。一般的な溶解補助剤そして吸収促進剤であるエタノールは低いレベルでも皮内の血流を増加することが良く知られている。しかしそれらの影響の定量的な評価は十分なされていない。

そこで本章では、血管作用薬や吸収促進剤を用い、各種適用条件の違いによる薬物の皮膚適用後の経皮吸収動態を比較することを目的にFPを用いて実験を行った。すなわち、第1節では皮下寒天ゲル中に血管作用薬であるEPもしくはBKを含有させて全身循環系や皮下寒天ゲルへの薬物移行に及ぼす影響を調べ、第2節では皮膚適用ゲル中に添加した吸収促進剤の薬物吸収動態に及ぼす影響について評価し、種々添加物併用時での本実験の有用性について検討した。

第1節 皮内動態に及ぼす血管作用薬の影響

本節では、寒天ゲル中に血管作用薬を添加したときの皮下寒天ゲルへの薬物の移行動態への影響を見るために実験を行った。すなわち、皮下に挿入する寒天ゲルに内因性物質であり血管収縮作用を持つ EP⁶²⁾ を 10 $\mu\text{g/g}$ agar gel 含有させたものと、毛細血管透過性亢進作用および血管拡張作用を持つ BK を 5 $\mu\text{g/g}$ agar gel 含有させたものを使用して検討を行った。

Fig. 24 a, b に EP または BK 含有ゲルを挿入したラットに FP を 4 mg/kg で静脈内投与後の FP の血漿中濃度推移と累積寒天ゲル中量推移を示す。EP および BK 群ともに FP の血漿中濃度推移は添加剤を含有しないものと比較しほとんど変わらなかったのに対し、寒天ゲル中量推移は EP 添加時で約 1/2 となり、BK 添加時では約 2 倍に

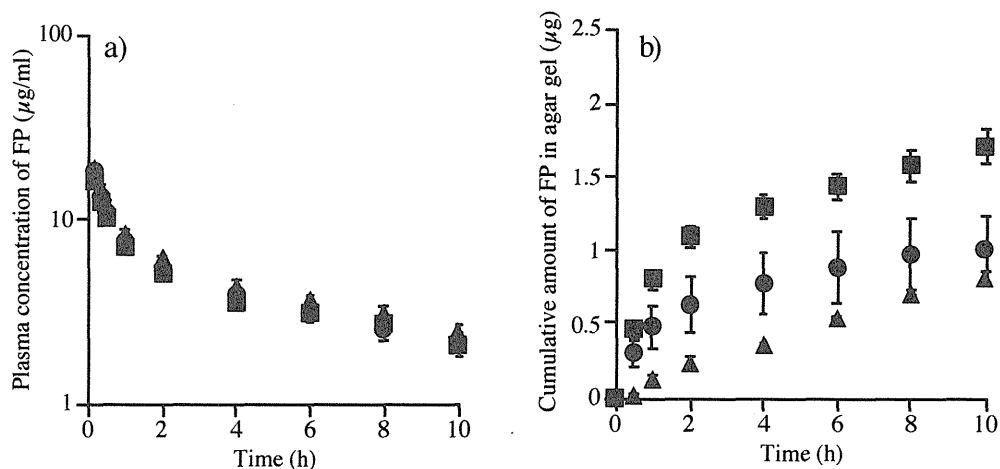


Fig. 24 Effect of vasoactive compounds on the plasma concentration (a) and amount in agar gel (b) of FP after *i. v.* injection

●; control, ▲; epinephrine, ■; bradykinin

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

増加した。

Fig. 25 a, b に EP, BK 含有ゲルを使用した際の FP 皮膚適用後の結果を示す。EP 添加時の FP の血漿中濃度推移は無添加時より低下し, BK 添加時では若干ではあるものの増加している傾向が見られた。また, 寒天ゲル中量は EP 添加時では増加し, BK 添加時では変化しなかった。

以上をまとめて, Fig. 26a, b に EP, BK 添加時と無添加時での皮膚適用後 6 時間の FP の血漿中濃度と寒天ゲル中量を示す。括弧中の値は無添加時での値に対する比を示している。EP 添加時は無添加時と比較して, 血漿中濃度は 0.70 倍, 寒天ゲル中量は 10.1 倍であり, BK 添加時はそれぞれ 1.56 倍と 1.07 倍であった。

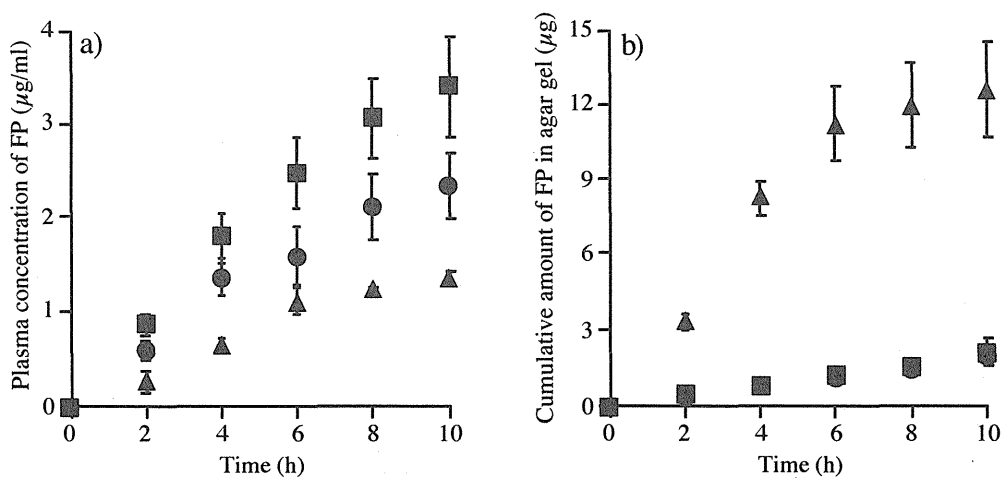


Fig. 25 Effect of vasoactive compounds on the plasma concentration (a) and amount in agar gel (b) of FP after topical application

●; control, ▲; epinephrine, ■; bradykinin

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

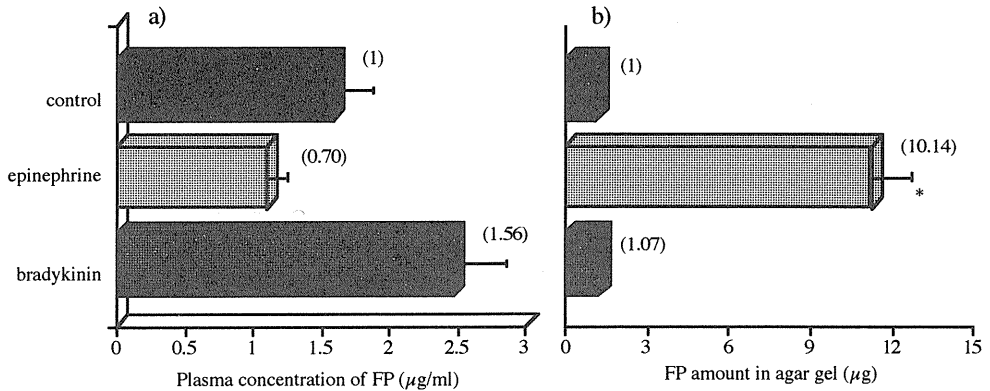


Fig. 26 Effect of vasoactive compounds on the plasma concentration (a) and amount in agar gel (b) of FP at 6h after topical application
 Values in parenthesis are ratios with respect to the corresponding control
 * $p < 0.05$

これらの結果を用いて、前章と同様にファルマコキネティックモデルよりカーブフィッティングを行い、各パラメータを算出した。Table 9a, b に静脈内投与後および皮膚適用後に得られたパラメータを示す。EP では f , J が無添加時より増加し、 k_g が減少した。一方、BK では f が減少し、 J , k_g が増加した。EP により皮膚中の血流量が変化し薬物の吸収動態が影響されるという報告がいくつか見られることを考え併せると、EP を併用したときは血流もしくは血管透過性が低下していると考えられる。また逆に、BK を併用したときは血流もしくは血管透過性が上昇したと思われるが、一部真皮内拡散性の上昇も寄与している可能性がある。

これらの結果より、EP は FP の全身循環系から皮下への移行を減少し、BK では逆に増加することが明らかとなった。全身循環系に吸収される FP の量は皮下寒天ゲルへの移行量に比べてはるかに大きいため、血漿中 FP 濃度に対しては EP の影響が認められなかったも

Table 9 Pharmacokinetic parameters after *i. v.* injection or topical application in agar gel-inserted rats including vasoactive compounds

(a) *i. v.* injection

| | control | | epinephrine | bradykinin |
|-----------------------------|---------|--------|-------------|------------|
| dose (mg/kg) | 2.0 | 4.0 | 2.0 | 2.0 |
| k_{12} (h ⁻¹) | 1.70 | 1.52 | 1.66 | 1.44 |
| k_{21} (h ⁻¹) | 0.87 | 0.94 | 1.06 | 0.93 |
| k_{10} (h ⁻¹) | 0.42 | 0.40 | 0.43 | 0.41 |
| V_1 (ml/kg) | 80.25 | 98.00 | 76.64 | 92.67 |
| V_2 (ml/kg) | 157.18 | 159.31 | 120.81 | 143.24 |

(b) topical application

| | control | epinephrine | bradykinin |
|---|---------|-------------|------------|
| J (μg/h) | 25.77 | 12.05 | 43.36 |
| f (%) | 0.71 | 14.00 | 0.42 |
| k_g (h ⁻¹)×10 ⁻³ | 1.3 | 0.55 | 2.1 |

のと思われた。また、逆に BK ではあまり差が見られなかったが、これは EP の逆の作用によることが示唆された。

さらに得られたパラメータを用いて全身循環系および皮下への移行率を計算した。その結果を Table 10 に示す。EP, BK と無添加時を比較すると、EP 併用時では血管を収縮するために、皮下への直接移行率 (B, D) を著しく増加させた。逆に、BK は全身循環系への移行 (A) と皮膚中血管から皮下への移行 (C) を増加させた。これらの増加は血管が拡張したことで、皮膚中の血管透過性が亢進したことによると思われた。これらの添加物を併用することで、皮膚適用により効率良く適用部位下の標的部位に薬物を送達させることができ、副作用の回避も可能になることが示唆された。

Table 10 Drug disposition in skin after topical application in agar gel-inserted rats including vasoactive compounds

(a) % fraction of drug distributed into skin from the formulation

| | control | epinephrine | bradykinin |
|-----------------|---------|-------------|------------|
| to blood (A) | 99.3% | 85.5% | 99.6% |
| to agar gel (B) | 0.7% | 14.5% | 0.4% |

(b) % fraction of drug in agar gel

| | control | epinephrine | bradykinin |
|----------------------|---------|-------------|------------|
| from blood (C) | 17.2% | 0.2% | 30.2% |
| from formulation (D) | 82.8% | 99.8% | 69.8% |

第 2 節 皮内動態に及ぼす吸収促進剤の影響

皮膚適用製剤中には吸収促進剤を含有するものが多くあり、これらが含有された製剤を適用すると、薬物の分配性や拡散性が変化する⁶⁵⁾。特に、エタノールなどを含有する製剤では皮膚中血管系にまで影響が及ぶ可能性がある。本節では、吸収促進剤を用いたときの薬物の皮内動態および経皮吸収動態を評価するために、吸収促進剤として 10% ミリスチン酸イソプロピル (IPM)^{66, 67)}を添加したゲル (IPMsys) もしくは 25% エタノール⁶⁸⁾, 3% *l*-メントール⁶⁹⁻⁷²⁾, 15% グリセリンを添加したゲル (MEGWsys) を用いて検討を行った。MEGWsys は MEW system と同様の効果を持ち、皮膚刺激性が低いことより選択した^{70, 73, 74)}。

Fig. 27a, b に FP の静脈内投与後 (促進剤のみを皮膚適用ゲルに

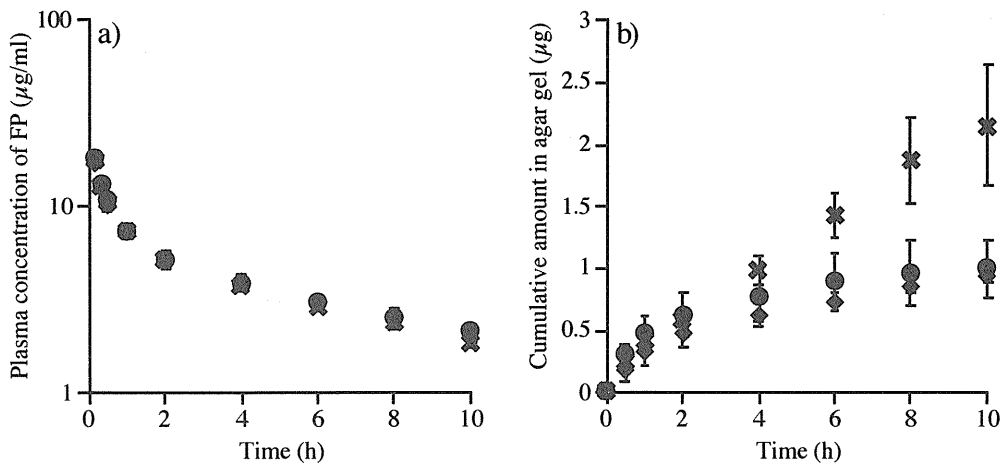


Fig. 27 Effect of enhancers on the plasma concentration (a) and amount in agar gel (b) of FP after *i.v.* injection
 ●; control, ◆; IPMsys, ✕; MEGWsys
 Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

添加) の FP の血漿中濃度とゲル中累積量を示す。IPMsys 及び MEGWsys 添加群の血漿中濃度推移は促進剤を含有しないものとほとんど変わらないのに対し、寒天ゲル中量推移は IPMsys 添加時で低下し、MEGWsys 添加時では増加した。

次に IPMsys, MEGWsys を併用した際の皮膚適用後の結果を Fig. 28a, b に示す。IPMsys, MEGWsys 併用時の血漿中濃度推移は無添加時と比較したところ両促進剤系ともに増加した。また、寒天ゲル中量は IPMsys ではほとんど変化しないのに対し、MEGWsys では有意に増加した。

以上をまとめて、Fig. 29a, b に IPMsys, MEGWsys 添加時と無添加時での皮膚適用後 6 時間の血漿中濃度と寒天ゲル中量を示す。括弧中の値は無添加時での値に対する比を示している。IPMsys, MEGWsys 群それぞれを無添加群と比較すると、血漿中濃度は 2.12 と 13.0 倍

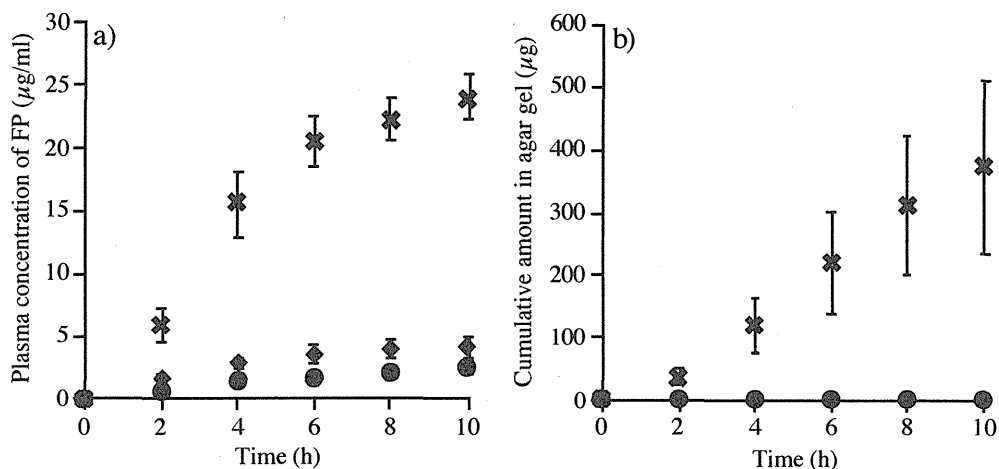


Fig. 28 Effect of enhancers on the plasma concentration (a) and amount in agar gel (b) of FP after topical application ●; control, ◆; IPMsyst, ✕; MEGWsys Each point represents the mean \pm S.E. of 5 experiments.

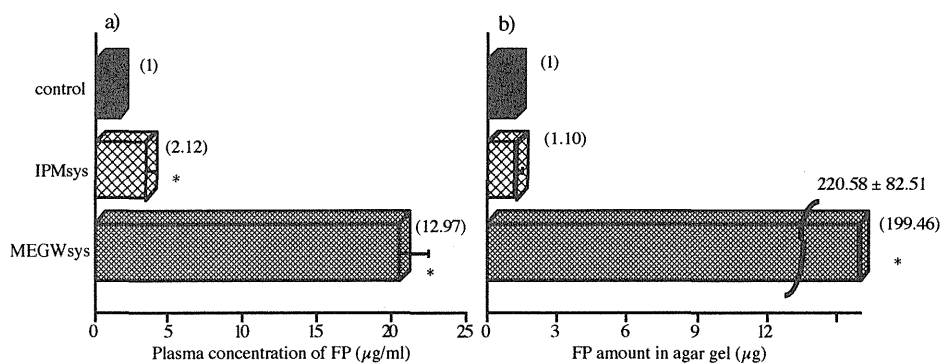


Fig. 29 Effect of enhancers on the plasma concentration (a) and amount in agar gel (b) of FP after topical application Values in parenthesis are ratios with respect to the corresponding control * $p < 0.05$

増加し、寒天ゲル中量は 1.10 と 199 倍増加した。これらの結果より、両方の系で吸収促進作用が示された。

これらの結果を用いて、前節と同様にファルマコキネティックモデルよりカーブフィッティングを行い、静脈内投与後と皮膚適用後の結果から各パラメータを算出し FP の皮膚中動態を評価した。得られたパラメータを Table 11 に示す。両促進剤ともに角質層の FP 透過性を上昇させた。また、IPMsys では J が増加したのに対し、 f を減少させたことから、真皮内の FP の拡散性を減少させたものもしくは血管系に作用したものと推測された。MEGWsys は J , f , k_g のすべてを上昇させたことにより、真皮内拡散性と血流もしくは血管透過性を増加していることが示唆された。IPMsys は皮膚中への FP の送達よりむ

Table 11 Pharmacokinetic parameters after *i.v.* injection or topical application in agar gel-inserted rats including penetration enhancers

(a) *i.v.* injection

| | control | | IPMsys | MEGWsys |
|-----------------------------|---------|--------|--------|---------|
| dose (mg/kg) | 2.0 | 4.0 | 2.0 | 2.0 |
| k_{12} (h ⁻¹) | 1.70 | 1.52 | 1.83 | 1.62 |
| k_{21} (h ⁻¹) | 0.87 | 0.94 | 0.99 | 0.88 |
| k_{10} (h ⁻¹) | 0.42 | 0.40 | 0.41 | 0.43 |
| V_1 (ml/kg) | 80.25 | 98.00 | 82.64 | 83.37 |
| V_2 (ml/kg) | 157.18 | 159.31 | 152.07 | 153.89 |

(b) topical application

| | control | IPMsys | MEGWsys |
|---|---------|--------|---------|
| J (μg/h) | 25.77 | 43.78 | 367.41 |
| f (%) | 0.71 | 0.34 | 11.99 |
| k_g (h ⁻¹)×10 ⁻³ | 1.3 | 1.2 | 2.0 |

しろ全身循環系への FP の送達を促進し、MEGWsys は IPMsys とは逆であった。さらに吸収促進剤を用いることによる薬物皮下移行性の変化について見てみると、IPMsys では全身循環系から皮下の寒天ゲルへの移行を増加し、また、MEGWsys では製剤から皮下の寒天ゲルへの直接の移行率を増加させることが確認できた。本実験法により吸収促進剤添加による皮下への薬物移行性の変化を検出できることが示唆された。

さらに得られたパラメータを用いて全身循環系および皮下への移行率を計算した。その結果を Table 12 に示す。IPMsys, MEGWsys 群と無添加群を比較すると、IPMsys 群では若干皮膚中血管から皮下への薬物移行 (C) が増加した。また、MEGWsys は皮下への直接移行率 (B, D) を著しく増加させた。

Table 12 Drug disposition in skin after topical application in agar gel-inserted rats including penetration enhancers

(a) % fraction of drug distributed into skin from the formulation

| | control | IPMsys | MEGWsys |
|-----------------|---------|--------|---------|
| to blood (A) | 99.3% | 99.7% | 88.0% |
| to agar gel (B) | 0.7% | 0.3% | 12.0% |

(b) % fraction of drug in agar gel

| | control | IPMsys | MEGWsys |
|----------------------|---------|--------|---------|
| from blood (C) | 17.2% | 23.6% | 1.2% |
| from formulation (D) | 82.8% | 76.4% | 98.8% |

第3節 小括並びに考察

本章では血管収縮薬の使用や吸収促進剤の適用等各種適用条件における FP の皮膚適用後の吸収動態への影響について検討を行った。血管収縮薬である EP を寒天ゲルに添加することで皮下寒天ゲルへの薬物移行がコントロールと比べて増加した。皮膚中の血流の変化が薬物の吸収動態に影響を及ぼすという報告はいくつか見られることから⁷⁵⁻⁸³⁾, EP の作用は皮膚中の血管を収縮させたことによると思われる。また吸収促進剤として IPM やエタノール等を含有する FP 適用ゲルを用いた場合、血漿中濃度がコントロールと比べて増加した。エタノール等を含む FP 適用ゲルでは、皮下寒天ゲル中薬物移行量も増加した。しかし IPM を含む FP 適用ゲルでは皮下移行量は逆に減少した。皮下寒天ゲル中への薬物移行量と全身循環系への薬物吸収量の比を薬物皮下移行性の指標として比較することで、それらの結果を定量的に評価することができた。また、EP と MEGWsys は全身循環系よりむしろ筋肉など標的部位により効率よく送達させることが可能になると考えられ、一方、BK と IPMsys は全身作用を期待するような製剤の添加物として有効と考えられた。また、カプサイシンにより血流が増加したという報告もある⁸⁴⁾。これら添加物を組み合わせることにより、副作用が少なく、目的とした標的部位に到達させることが可能なよりよい製剤の開発が可能となるであろう。

結論

皮膚適用製剤は非侵襲的に薬物を全身循環系または皮膚直下の病巣部へ送達することができるので、高齢者や服薬困難な患者に対する投与剤形としても極めて有用である。また、薬物の血中濃度を維持する必要のある病傷を有する患者に対しては投与の中断、継続が容易であるため特に利用価値が高い。しかしながら、全身もしくは局所作用を目的とする外用剤投与後の皮内、体内動態にはわからないところも多く、作用のみならず副作用のコントロールのためにも、種々薬物の皮内動態および皮下移行性を十分に理解し、コントロールすることが必要となる。

そこで、著者は皮内動態および皮下移行性の各素過程を評価し、またそれに及ぼす種々添加剤の影響を調べるために、寒天ゲルを皮下に埋め込んだ *in situ* 実験モデルを用いて検討した。以下にその要約を示す。

(1) まずはじめに、寒天ゲル挿入ヘアレスラットを作成した。このラットでの FP の体内動態と皮下寒天ゲル中への移行性について検討した結果、皮下に寒天ゲルを挿入したラットでは挿入していないラットと比較して FP の全身クリアランスに有意な差は無く、寒天ゲルの挿入による体内動態の変化は無視できることが明らかとなった。また、このラットに FP を点滴静注し、皮下の寒天ゲルと血液の間での FP の分配状態を評価したところ、実験時間内には平衡に達せず、寒天ゲルから血液中への戻りは無視できた。そこで、全身循環系から皮下寒天ゲル中への薬物の移行量を AUC から予測した。皮膚適用後の FP の皮下寒天ゲル中への移行量は点滴静注時の AUC と皮下寒

天ゲル中薬物量の関係から予想される値より高くなり、相当量の薬物が製剤から直接皮下に移行することが明らかとなった。また、これらの結果より、**deconvolution** 法を用いて各過程の移行率を計算したところ、皮膚に浸透した FP のうち大部分が全身循環系に移行していることが確認できた。また、皮下の寒天ゲルへ移行した FP のうち製剤から直接移行したものは約 70% であった。次に、**intact** なラットで皮膚適用後の筋肉中薬物量を測定した結果、寒天ゲル中量より高い値を示したが、累積寒天ゲル中量または筋肉中薬物量と AUC の間にはそれぞれ一定の関係が見られた。

以上の結果から、本研究で考案した *in situ* 実験法は皮膚適用後の薬物皮内動態の評価に関して有用なモデルであることが判明した。

(2) 次に種々薬物の皮内動態を解析した。はじめに各薬物の皮内動態を定量的に評価するために、皮内動態を示す単純なコンパートメントモデルを構築し、このモデルの妥当性について検討した。このモデルでは皮下の寒天ゲルコンパートメントは常にシンクであり、寒天ゲルから体循環コンパートメントへの戻りはないものと仮定できた。また、体内動態は線形 2-コンパートメントモデルで表記した。こうして構築したモデルから物質収支式を立て血漿中濃度推移と累積皮下寒天ゲル中量推移を非線形最小二乗法を用いてカーブフィッティングし、薬動学的パラメータを算出した。その結果、実測値とフィッティングラインは良く一致しており、その際、得られた S.D. 値は皮膚中の皮内動態を解析するのに十分小さい値であった。これらの結果より、皮内および全身循環系の薬物動態を表したコンパートメントモデルは妥当であることが示唆された。さらに、経皮吸収過程での製剤から皮膚までの薬物移行速度の式の妥当性も評価した。すでに一般的に解析

されている Scheuplein の式と皮膚への流入は 0 次, 流出は 1 次過程とした速度式を *in vitro* 皮膚透過実験の結果を用いて比較したところほとんど差が無く, 血漿中濃度推移を *deconvolution* して算出した全身への吸収量とも差は認められなかった. そこで, 取り扱いがより容易な後者の式を用い, 4 種類の薬物について皮膚適用製剤から全身循環系と皮下への移行性について検討した. 静脈内投与実験と皮膚適用実験から得られた結果からカーブフィッティングにより得られたパラメータを用いて, 皮膚適用製剤から皮下寒天ゲルまたは全身循環系への薬物移行率を算出した. 実験した全ての薬物で皮膚に適用した薬物のうち大部分 ($\geq 75\%$) が全身循環系に移行することが確かめられた. また, 皮膚適用後にゲル中に検出された薬物のうち皮膚から直接移行したものと全身循環系から移行したものを分離評価した. 寒天ゲル中へ移行した FP, ANP, LC のうち全身循環系から移行したものは 20% 以下であり, 全身循環系由来の薬物の寄与は小さかった. しかし, 他の薬物とは異なり PXC は血液からゲルへの移行率は特に高く, 直接移行率は 39.1% に過ぎなかった. これらの各薬物の移行率がどのような要因によって変化するのかを確かめ予測していくために, さらに各薬物の物理化学的パラメータとの関連性について検討した. 薬物の経皮吸収速度は低い融点と小さい分子量を持つ薬物ほど高かった. また, 分子型薬物の経皮吸収クリアランスは真の分配係数と一定の関係を示したことから, 各薬物の皮膚中への吸収性は主に分配性により決定されることが分かった. 次に, 全身循環系から皮下への移行をクリアランスの概念を用いて評価したところ, 分子型のみを考慮したクリアランスと分子型とタンパク結合率を考慮したクリアランスはともに真のオクタノール/水分配係数と一定の関係を示したことから, 全身循環系から皮下への分布も主に薬物の分配性に左右されることが示唆

された。全身循環系と皮下への移行率は分配性とタンパク結合率が低い薬物で皮下への移行率が高くなる傾向が見られた。

以上の結果から全身循環系および皮下への移行率を推定することが可能になった。さらに、皮内での薬物動態は各薬物の物理化学的パラメータから比較しうるということが明らかとなった。

(3) 薬物の皮内動態に及ぼす種々添加剤の影響について評価した。血管収縮薬である EP を寒天ゲル中に添加した場合、皮膚適用後の皮下寒天ゲル中への薬物移行は無添加時と比較して増加した。逆に血管拡張薬である BK を寒天ゲル中に添加した場合、血漿中濃度が若干増加した。これらの結果を用いて、モデルよりカーブフィッティングを行い各移行過程を評価した。その結果、EP を併用した時は血流もしくは血管透過性が低下したと考えられた。また、逆に BK を併用したときは血流もしくは血管透過性が上昇していると思われるが、一部真皮内拡散性の上昇も寄与している可能性があった。さらに得られたパラメータを用いて全身循環系および皮下への移行率を計算した。EP, BK 群と無添加群を比較すると、EP 併用群では血管が収縮するため、皮下への直接移行率が著しく増加した。逆に、BK 群は全身循環系への移行と皮膚中血管から皮下への移行が増した。また、吸収促進剤として IPMsys や MEGWsys を適用した場合、両者ともに吸収促進剤を含有しない場合と比べて血漿中濃度が増加した。また寒天ゲル中量は MEGWsys で有意に増加した。各パラメータを算出し各移行過程を評価した結果、IPMsys は真皮内の拡散性を減少させたものと推測された。また、MEGWsys は真皮内の拡散性と血流もしくは血管透過性を増加していることが示唆された。さらに得られたパラメータを用いて全身循環系および皮下への移行率を計算した。IPMsys,

MEGWsys 群と無添加群を比較すると、IPMsys 併用群では皮膚中血管から皮下への移行が増加した。また、MEGWsys は皮下への直接移行率が著しく増加した。

以上の結果から、EP と MEGWsys を組み合わせることで筋肉などの標的部位に効率よく送達させることが可能となり、一方、BK と IPMsys は全身循環系に選択的に送達させる製剤の添加物として有用と考えられる。これらの添加物を併用することで、皮膚適用により一層効率良く適用部位下の標的部位に薬物を送達させることができ、副作用の回避も可能になることが示唆された。

以上、本研究により確立した実験方法は皮膚適用後の全身循環系および皮下への薬物移行を定量的に評価でき、本方法を用いることにより薬物の経皮吸収の素過程がより明確になるものと考えられた。また、物理化学的性質の異なる種々薬物の皮内動態や添加剤の効果を検討することで、個々の患者に適した薬剤や製剤の選択が可能となり、医薬品製剤開発時の有用な情報を提供するものと考えられた。

謝辞

終わりに望み、本研究に際して、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西大学臨床薬物動態学教室杉林堅次教授、並びに長らく御指導を賜りました城西大学病院薬剤学教室森本雍憲教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行に当たり有益な御指導、御助言を賜りましたTTS 技術研究所林輝朗氏に心から感謝の意を表します。

さらに、多くの御助言並びに御激励を賜りました城西大学薬剤学教室従二和彦教授並びに関俊暢助手に厚くお礼申し上げます。

さらに、有益な御意見並びに実験に御協力頂いた城西大学臨床薬物動態学教室長谷川哲也助手、城西大学薬物治療学教室夏目秀視講師、城西大学臨床薬物動態学教室、病院薬剤学教室並びに薬剤学教室諸氏に深く感謝致します。

実験の部

実験の部

第1章 実験の部

1. 実験材料

フルルビプロフェン (FP) は科研製薬株式会社 (千葉), ヒドロキシプロピルセルロース (HPC-H) は日本曹達株式会社 (東京) より供与された。寒天はフナコシ株式会社 (東京) より購入した。その他の試薬及び溶媒は市販の特級品を用いた。また, これらの試薬は精製せずにそのまま用いた。

2. 皮膚適用製剤の調製

1% の FP 及び 3% の HPC-H を pH7.4 等張リン酸緩衝液中で攪拌しながら 80℃ にて加温溶解し, 均一な溶液にし, その後攪拌しながら室温にて冷却した。

3. 皮下挿入用ディスク状寒天ゲルの調製

2.5% の寒天を pH7.4 等張リン酸緩衝液で 80℃ にて加温溶解した。その溶液をポリスチレン製組織培養用ディッシュ (岩城硝子 (株), 東京) または, ガラス製シャーレに流し込み, 片面をガーゼのついたポリエチレンシート (厚さ, 0.1 mm) でバックングとしてシールし, 4℃ で保存した。調製したゲルは, 重さ約 6 もしくは 1.5 g, 厚さ 5 mm, 直径 3.85 もしくは 2 cm のディスク状ゲルである。実験を始める前に, 寒天ゲルを容器から取り外し, 薬物レセプターとして使用した。なお, ゲル素材の候補として, ポリビニルアルコール, ヒドロキシプロピルセルロース, カーボポールなども試験したが, 動物への侵襲性

とゲルからの薬物の抽出性において寒天が適当であったため、薬物レセプターとして選択した。

4. *In situ* 実験法 (寒天ゲルの挿入法)

城西大学生命科学センターから分与もしくは石川実験動物研究所 (深谷, 埼玉) から購入した体重 220~300 g の雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht) をウレタン (1.0 g/kg, *i.p.*) により麻酔し, 下腹部皮膚約 5 ~ 6 cm を正中線と垂直方向に切った。バッキングしていないゲル表面が皮膚の裏側, バッキング側が皮下の筋肉に接するように挿入した。また, 寒天ゲルをラットに 2 つ挿入する場合には正中線を軸とし, 左右対称となるように寒天ゲルを挿入した。次に, 寒天ゲルの挿入部位の角質層側表面にガラスセル (適用面積, 3.14 cm²) をアロンアルファにより接着した。なお, 皮下に持続的な出血が観察されないことを確認した。

5. 静脈内単回投与実験

寒天ゲルを挿入したラットのガラスセルに薬物を含まない水性ゲル (3% HPC-H, pH7.4) を適用したヘアレスラット, もしくは寒天ゲルの挿入処置をしていないヘアレスラットの頸静脈内より pH7.4 等張リン酸緩衝液に溶解した FP (0.8 mg/ml) を 2 mg/kg で急速単回投与し, 経時的に約 0.25 ml を反対側の頸静脈より採血し, 遠心分離 (4°C, 15000 × g, 5 min) して血漿を得た。その結果を非線形最小二乗法 (algorithm : Damping Gauss Newton 法) を用い, 2-コンパートメントモデルにあてはめ, 消失パラメータを得た。また, 寒天ゲルを 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 時間に交換し皮下への薬物移行量を測定した。

6. 点滴静注実験

寒天ゲルを挿入したヘアレスラットのガラスセルに薬物を含まない水性ゲル (3% HPC-H, pH7.4) を適用した. 実験初期から定常状態が得られるように, pH7.4 等張リン酸緩衝液に溶解した FP の急速静注を併用し, 点滴静注 (点滴流量, 2 ml/h/rat body) を行った. 6 時間もしくは 10 時間まで経時的に頸静脈から採血を行い, 実験終了時に皮下に挿入した寒天ゲルを摘出した. 血液はすぐに遠心分離し血漿を得た. 点滴速度と急速静注による初期負荷量は以下のように決定した.

点滴速度は, 目的とする C_{ss} 値を定め, 静脈内単回急速投与実験での消失パラメータを用いて (1) 式より決定した^{44, 85)}.

$$K = C_{ss} \times CL_{tot} \quad (1)$$

ここで, K は点滴速度, C_{ss} は定常状態時の血漿中濃度, CL_{tot} は全身クリアランスを示す. 急速静注による初期負荷量 X_0 は, 先に決定した点滴速度と (6) 式を用いて算出した. なお, (6) 式は, 以下の理論により誘導される.

急速静注と速度 K での点滴静注を併用する場合の 2-コンパートメントモデルでの血漿中濃度推移は, 急速静注による血漿中薬物濃度と点滴静注による血漿中薬物濃度の和として表すことができ, (2) 式のようになる.

$$C = \frac{K}{k_{10}V_1} + \left\{ \frac{(X_0\alpha - K)(\alpha - k_{21})}{V_1\alpha(\alpha - \beta)} \right\} e^{-\alpha t} + \left\{ \frac{(X_0\beta - K)(\beta - k_{21})}{V_1\beta(\beta - \alpha)} \right\} e^{-\beta t} \quad (2)$$

(2) 式より $t \rightarrow \infty$ とすることにより、定常状態における血漿中濃度 C_{ss} が以下のように求められた。

$$C_{ss} = K / (K_{10} \times V_1) \quad (3)$$

(2) 式を (3) 式で除し、 $\alpha\beta = K_{10}K_{21}$ 、 $\alpha + \beta = K_{12} + K_{21} + K_{10}$ という関係式を用いて整理すると

$$\frac{C}{C_{ss}} = 1 + \left\{ \frac{(X_0\alpha - K)(k_{10} - \beta)}{K(\alpha - \beta)} \right\} e^{-\alpha t} + \left\{ \frac{(X_0\beta - K)(k_{10} - \alpha)}{K(\beta - \alpha)} \right\} e^{-\beta t} \quad (4)$$

となる。血漿中濃度を目標値 C_{ss} にするには、(4) 式が常に $C/C_{ss} = 1$ となる条件を見いだせば良いが、それは不可能であるので、常に $C/C_{ss} \geq 1$ となる条件、すなわち第二の指数項がゼロになるような条件とすると、

$$(X_0\beta - K)(K_{10} - \alpha) / K(\beta - \alpha) = 0 \quad (5)$$

となり、整理すると

$$X_0 = K / \beta \quad (6)$$

となる。

7. 薬物皮膚適用実験

寒天ゲルを挿入したヘアレスラットのガラスセルに薬物含有水性

ゲル (3% HPC-H, pH7.4) を 1.0 g/3.14 cm² 適用した。また、寒天ゲルを 2 つ挿入するラットでは一方に薬物含有水性ゲルを、他方に薬物非含有水性ゲルを同量適用した。10 時間まで 2 時間ごとに採血と寒天ゲルの交換を行い、皮下への薬物の移行量を測定した。血液は速やかに遠心分離して血漿を得た。

8. *In vivo* 実験

第 1 章 実験の部 7. の薬物皮膚適用実験の項の寒天ゲル挿入時とほぼ同位置に角質層側表面にガラスセル (適用面積, 3.14 cm²) をアロンアルファにより接着し、一方に薬物含有水性ゲルを、他方に薬物非含有水性ゲルを同量適用した。4 時間まで 1 時間ごとに採血を行った。血液は速やかに遠心分離して血漿を得た。4 時間目の採血後、ただちに適用したゲルを拭き取り、断頭放血致死した。製剤適用部位と非適用部位直下の筋肉約 0.75 g を量り取った。

9. 薬物の定量法

採取した血漿 (100 μ l) に内部標準物質を含有させたアセトニトリル溶液 (200 μ l) を加え、ミキサーにより混合した。摘出したゲルは、内部標準物質を含有させたアセトニトリル溶液 (10 ml) を加え、ホモジナイザー (AceHOMOGENIZER, 日本精機製作所株式会社, 東京) を用いてホモジナイズ (13000 rpm, 3 min) した。また、必要に応じて上清を 3~4 ml を窒素乾固した。その後、移動相を 250 μ l を加え、ミキサーにより混合した。摘出した筋肉は内部標準物質を含有させたアセトニトリル溶液を加えホモジナイザー (POLYTRON PT3000, KINEMATICA AG, Switzerland) を用いてホモジナイズ (16000 rpm, 5 min) した。これを遠心分離 (4°C, 15000 \times g, 5 min) し、その上清 3

ml を窒素乾固した。その後、移動相を 250 μ l を加え、ミキサーにより混合した。そして、両サンプルとも遠心分離 (4°C, 15000 \times g, 5 min) し、その上清を液体クロマトグラフに注入した。使用したシステムを以下に示す。

| | |
|-------------|--|
| 送液ユニット | : LC-10AT (島津製作所 (株), 京都) |
| UV 検出器 | : SPD-10A (島津製作所 (株)) |
| レコーダー | : CR-6A (島津製作所 (株)) |
| カラムオーブン | : CTO-10A (島津製作所 (株)) |
| システムコントローラー | : SCL-10A (島津製作所 (株)) |
| オートインジェクター | : Sil-10AxL (島津製作所 (株)) |
| カラム | : Inertsil ODS (GL Sciences (株)), 4.6 \times 250 mm |

また、移動層は 0.1%リン酸：アセトニトリル=50：50、流速は 1.0 ml/min、検出波長は 245 nm、カラム温度は 40°Cであり、内部標準物質として p-ヒドロキシ安息香酸イソプロピルを用いた。

8. 統計処理

統計的有意差は両側 t 検定により評価した。

第2章 実験の部

1. 実験材料

アンチピリンは東京化成工業株式会社 (東京) より購入した。リドカインとピロキシカムは SIGMA CHEMICAL (St. Louis, MO, USA) より購入した。その他の試薬及び溶媒は第1章1. と同じものを用いた。

2. pH7.4 等張リン酸緩衝液および水中溶解度の測定

薬物の全溶解度を皮膚適用実験を行ったときの製剤と同じ状態下で測定した (pH7.4) . pH7.4 に保つために 1/30 M の等張リン酸緩衝液を用いた. 過剰量の各薬物をリン酸緩衝液に加え, 37°C で 24 時間混合し, フィルター (cellulose acetate, 0.45 μ m, DISMIC-25cs, ADVANTEC, 東京) を用いてろ過した. その際, 薬物がフィルターに吸着しないことを確認した. 溶液は適切に希釈し, 各薬物の濃度を HPLC にて測定した. また各薬物の水中での溶解度 (S_w) を同様の方法を用いて決定した. これらの結果と K_a 値をもとに分子型のみの真の溶解度を計算した.

3. オクタノール/pH7.4 等張リン酸緩衝液およびオクタノール/水分配係数の測定

オクタノールと pH7.4 リン酸緩衝液相を実験前少なくとも 24 時間混和し, 飽和させた. 各薬物溶液を飽和した溶液で調製した. この溶液と同量の飽和したもう一方の溶液を混合し, 24 時間攪拌した. 分離後 pH7.4 等張リン酸緩衝液中の各薬物の濃度を HPLC にて測定し, オクタノール中の薬物濃度は pH7.4 リン酸緩衝液中の初期と最後の濃度間の違いから計算した. また各薬物のオクタノール/水分配係数を同様の方法を用いて決定した. これらの結果と K_a 値から分子型のみの真の分配係数を計算した.

4. 皮下挿入用ディスク状寒天ゲルの調製

第 1 章 3. と同じ方法を用いた.

5. 製剤の調製

それぞれ 50% ANP, 3% LC そして 1% PXC を 3% の HPC-H と共に pH7.4 等張リン酸緩衝液中で攪拌しながら 80℃ にて加温溶解し, 均一な溶液にし, その後攪拌しながら室温にて冷却した. FP は第1章2. と同じものを用いた.

6. *In situ* 実験法 (寒天ゲルの挿入法)

第1章4. と同じ方法を用いた.

7. 静脈内単回投与実験

第1章5. と同じものを用いた. また, 各薬物の投与量を 4 mg/kg (1.5 mg/ml, pH7.4 等張リン酸緩衝液) に設定した急速単回投与も行った.

8. 薬物皮膚適用実験

第1章7. と同じものを用いた.

9. 摘出皮膚の調製

城西大学生命科学センターから分与もしくは石川実験動物研究所から購入した体重 220~300 g の雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht) をウレタン (1.0 g/kg, i.p.) により麻酔し, ヘアレスラットの腹部皮膚をそのまま摘出した. 真皮側の皮下脂肪組織を切除した後に透過実験に使用した.

10. *In vitro* 皮膚透過実験法

ヘアレスラット腹部摘出皮膚を縦型拡散セル (真皮側容積, 4.0 ml)

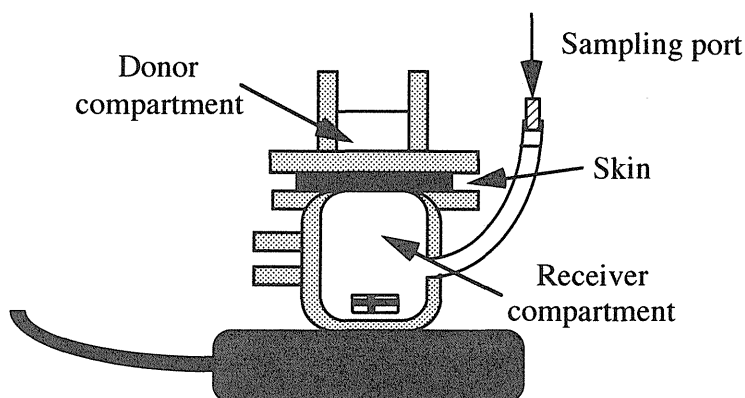


Fig. 26 Schematic diagram of experimental apparatus for *in vitro* skin permeation experiment

に装着した (Fig. 26) . 角質層側には皮膚適用実験で用いたものと同じ製剤を用いた (有効拡散面積, 0.95 cm^2) . 真皮側には pH7.4 等張リン酸緩衝液で満たし, スターヘッドスターラーを入れ, マグネティックスターラー (マルチスターラー® MC-301, サイニックス (株), 東京) を用いて攪拌した. 実験中の拡散セルの温度は循環水によって 37°C に保った. 経時的に真皮側の溶液を採取し, 同量の緩衝液を補充して用量を一定に保ち, 薬物移行量を測定した.

11. 薬物の定量法

血漿および寒天ゲルサンプルの処理方法および HPLC のシステムは第1章8. と同じものを用いた. Table 12 に各薬物の移動相と検出波長および内部標準物質を示した.

Table 12 HPLC conditions for analysis of drugs used in this experiment

| drug | mobile phase | wave length (nm) | internal standard |
|------|---|------------------|-------------------------------------|
| ANP | acetonitrile : water (15 : 85) | 242 | methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate |
| LC | acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (50 : 50) + 5 mM sodium dodecylsulfate | 210 | amyl <i>p</i> -hydroxybenzoate |
| PXC | acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (35 : 65) | 240 | isopropyl <i>p</i> -hydroxybenzoate |
| FP | acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (50 : 50) | 245 | isopropyl <i>p</i> -hydroxybenzoate |

1 2. 統計処理

第1章8. と同じ方法を用いた.

第3章 実験の部

1. 実験材料

エピネフリン注射液 (EP) は第一製薬株式会社 (東京) より購入した. ミリスチン酸イソプロピル (IPM) は東京化成工業株式会社 (東京) より購入した. *l*-メントールは保栄薬工株式会社 (大阪) より購入した. グリセリンおよびブラジキニン (BK) は和光純薬株式会社 (大阪) より購入した. 他の試薬は, 第1章1. および第2章1. と同じものを用いた.

2. 製剤の調製

第1章1. と同様に行った. ただし, 吸収促進剤として IPM を含む製剤は, 最終濃度 1% の FP 及び 3% の HPC-H を pH7.4 等張

リン酸緩衝液中で攪拌しながら 80℃ にて加温溶解し均一な溶液にした後、攪拌しながら室温にて冷却し、10% 相当量の IPM を最後に加え調製した。吸収促進剤として *l*-メントール、グリセリン、エタノールを含む製剤は、最終濃度 1% の FP 及び 3% の HPC-H を pH7.4 等張リン酸緩衝液中で攪拌しながら 80℃ にて加温溶解し、均一な溶液にした後、攪拌しながら室温にて冷却し、最後に 3% *l*-メントール、15% のグリセリン、25% エタノールになるように各成分を加えて調製した。

3. 皮下挿入用ディスク状寒天ゲルの調製

第1章3. と同様に行った。ただし、EP, BK を併用した場合は、室温にて放冷後、EP, BK を加えて均一に混和し、調製した。寒天ゲルが固まる前に片面をガーゼのついたポリエチレンシートでシールして、遮光するためにアルミホイルで覆い、冷蔵庫（約 4℃）で保存した。

4. *In situ* 実験法（寒天ゲルの挿入法）

第1章4. と同じ方法を用いた。ただし、吸収促進剤を用いるときはガラスセルはシリコン接着剤を使用して接着した。

5. 薬物皮膚適用実験

第1章7. と同じ方法を用いた。

6. 薬物の定量法

第1章8. と同じ方法を用いた。

7. 統計処理

第1章8. と同じ方法を用いた.

引用文献

- 1) 杉林堅次, 森本雍憲, 経皮治療システム (TTS) , 日本臨床, **56**, 619 (1998).
- 2) R.H. Guy and H.I. Maibach, Drug delivery to local subcutaneous structures following topical administration, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1375 (1983).
- 3) 中野眞汎, 森本雍憲, 杉林堅次, “ドラッグデリバリーシステム, 現状と将来” , 南山堂, 東京, 1986.
- 4) 粟津莊司, 小泉保, “最新生物薬剤学” , 南江堂, 東京, 1991.
- 5) P. Singh and M.S. Roberts, Iontophoretic transdermal delivery of salicylic acid and lidocaine to local subcutaneous structures, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 127 (1993).
- 6) S.C. McNeil, R.O. Potts and M.L. Francoeur, Local enhanced topical delivery (LETD) of drugs : Does it truly exist?, *Pharm. Res.*, **9**, 1422 (1992).
- 7) X. Gao, M.G. Wientjes and J.L.-S. Au, Use of drug kinetics in dermis to predict *in vivo* blood concentration after topical application, *Pharm. Res.*, **12**, 2012 (1995).
- 8) V.P. Shah, C.R. Behl, G.L. Flynn, W.I. Higuchi and H. Schaefer, Principles and criteria in the development and optimization of topical therapeutic products, *Pharm. Res.*, **9**, 1107 (1992).
- 9) M. Okumura, K. Sugibayashi, K. Ogawa and Y. Morimoto, Skin permeability of water-soluble drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1404 (1989).
- 10) G.G. Krueger, Z.J. Wojciechowski, S.A. Burton, A. Gilhar, S.E.

- Huether, L.G. Leonard, U.D. Rohr, T.J. Petelenz, W.I. Higuchi and L.K. Pershing, The development of a rat/human skin flap served by a defined and accessible vasculature on a congenitally athymic (nude) rat, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **5**, S112 (1985).
- 11) J.E. Riviere, K.F. Bowman, N.A. Monteiro-Riviere, L.P. Dix and M.P. Carver, The isolated perfused porcine skin flap (IPPSF) I. A novel *in vitro* model for percutaneous absorption and cutaneous toxicology, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **7**, 444 (1986).
- 12) J.P. Skelly, V.P. Shah, H.I. Maibach, R.H. Guy, R.C. Wester, G. Flynn and A. Yacobi, FDA and AAPS report of the workshop on principles and practices of *in vitro* percutaneous penetration studies: Relevance to bioavailability and bioequivalence, *Pharm. Res.*, **4**, 265 (1987).
- 13) D. Kobayashi, S. Kawabata, K. Sugibayashi, Y. Morimoto and M. Kimura, *In vitro/in vivo* difference in enhanced skin permeation of nifedipine hydrochloride by the *l*-menthol-ethanol system, *Skin Pharmacol.*, **9**, 130 (1996).
- 14) V.P. Shah, G. Flynn, R.H. Guy, H.I. Maibach, H. Schaefer, J.P. Skelly, R.C. Wester and A. Yacobi, *In vivo* percutaneous penetration/absorption, Washington, D. C., May 1989, *Pharm. Res.*, **8**, 1071 (1991).
- 15) K. Sato, T. Oda, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Estimation of blood concentration of drugs after topical application from *in vitro* skin permeation data. I. Prediction by convolution and confirmation by deconvolution, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2232 (1988).
- 16) K. Sato, T. Oda, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Estimation of blood

- concentration of drugs after topical application from *in vitro* skin permeation data. II. Approach by using diffusion model and compartment model, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2624 (1988).
- 17) 菅原幸子, 整形外科領域の薬物療法, *Ther. Res.*, **8**, 213 (1988).
 - 18) N.A.M. Riviere, A.O. Inman, J.E. Riviere, S.C. McNeill and M.L. Francoeur, Topical penetration of piroxicam is dependent on the distribution of the local cutaneous vasculature, *Pharm. Res.*, **10**, 1326 (1993).
 - 19) P. Singh and M.S. Roberts, Dermal and underlying tissue pharmacokinetics of lidocain after topical application, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 774 (1994).
 - 20) N. Seko, H. Bando, F. Yamashita, Y. Takakura and M. Hashida, Estimation of drug concentration profiles in skin based on a skin diffusion model, *Drug Delivery System*, **12**, 359 (1997).
 - 21) P. Singh and M.S. Roberts, Dermal and underlying tissue pharmacokinetics of salicylic acid after topical application, *J. Pharm. Sci.*, **21**, 337 (1993).
 - 22) P. Singh and M.S. Roberts, Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 144 (1993).
 - 23) P. Singh and M.S. Roberts, Blood flow measurements in skin and underlying tissues by microsphere method: Application to dermal pharmacokinetics of polar nonelectrolytes, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 873 (1993).
 - 24) P. Singh and M.S. Roberts, Deep tissue penetration of bases and steroids after dermal application in rat, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 956

- (1994).
- 25) P.L. Williams and J.E. Riviere, A biophysically based dermatopharmacokinetic compartment model for quantifying percutaneous penetration and absorption of topically applied agents. I. Theory, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 599 (1995).
 - 26) S.K. Chang, P.L. Williams, W.C. Dauterman and J.E. Riviere, Percutaneous absorption, dermatopharmacokinetics and related biotransformation studies of carbaryl, lindane, malathion, and parathion in isolated perfused porcine skin, *Toxicol.*, **91**, 269 (1994).
 - 27) E. Gupta, M.G. Wientjes and J.L.-S. Au, Penetration kinetics of 2', 3'-dideoxyinosine in dermis is described by the distributed model, *Pharm. Res.*, **12**, 108 (1995).
 - 28) O. Siddiqui, M.S. Roberts and A.E. Polack, Percutaneous absorption of steroids : Relative contributions of epidermal penetration and dermal clearance, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **17**, 405 (1989).
 - 29) R.H. Levy and M. Rowland, Absorption kinetics of a series of local anesthetics from rat subcutaneous tissue. I, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **2**, 313 (1974).
 - 30) J.M. Ault, C.M. Riley, N.M. Meltzer and C.E. Lunte, Dermal microdialysis sampling *in vivo*, *Pharm. Res.*, **11**, 1631 (1994).
 - 31) J.M. Ault, C.E. Lunte, N.M. Meltzer and C.M. Riley, Microdialysis sampling for the investigation of dermal drug transport, *Pharm. Res.*, **9**, 1256 (1992).
 - 32) L. Celesti, C. Murratzu, G. Sgaragli and P. Corti, The single-pass perfused rabbit ear as a model for studying percutaneous absorption of clonazepam. II. Influence of hydrogel-borne propylene glycol and skin

- pretreatment with lauryl alcohol, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **15**, 49 (1993).
- 33) L. Celesti, C. Murratzu, M. Valoti, G. Sgaragli and P. Corti, The single-pass perfused rabbit ear as a model for studying percutaneous absorption of clonazepam. I. General characteristics, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **14**, 701 (1992).
- 34) M. Kietzmann, B. Wenzel, W. Loscher, D. Lubach, B.W. Muller and H. Blume, Absorption of isosorbide dinitrate after administration as spray, ointment and microemulsion patch. An *in-vitro* study using the isolated perfused bovine udder, *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 22 (1995).
- 35) J. Lange, P. Eck, G.R. Elliott, W.L.A.M. Kort and O.L. Wolthuis, The isolated blood-perfused pig ear: An inexpensive and animal-saving model for skin penetration studies, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **27**, 71 (1992).
- 36) P.L. Williams, M.P. Carver and J.E. Riviere, A physiologically relevant pharmacokinetic model of xenobiotic percutaneous absorption utilizing the isolated perfused porcine skin flap, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 305 (1990).
- 37) G. Yanagimoto, T. Hayashi, T. Seki, K. Juni, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, A new *in situ* experimental method to evaluate the cutaneous disposition of flurbiprofen after topical application in hairless rats, *Pharm. Pharmacol. Commun.*, **4**, 261 (1998).
- 38) B. Hercelin, M. Delaunay-Vantrou, F. Alamichel, M. Mazza and J.-P. Marty, Pharmacokinetics of cutaneous sulconazole nitrate in the hairless rat: Absorption, excretion, tissue concentrations, *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokin.*, **18**, 149 (1993).

- 39) 杉林堅次, 佐藤潔, 森本雍憲, 経皮吸収実験におけるヘアレス動物の有用性, *ラボラトリーアニマル*, **4**, 25 (1987).
- 40) B.W. Berry and F. Jamali, Enantiomeric interaction of flurbiprofen in the rat, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 632 (1989).
- 41) F. Jamali, B.W. Berry, M.R. Tehrani and A.S. Russell, Stereoselective pharmacokinetics of flurbiprofen in humans and rats, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 666 (1988).
- 42) 山岡清, 谷川原祐介, “マイコンによる薬物速度論入門”, 南江堂, 東京, 1983, pp. 91-112.
- 43) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa and T. Uno, A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer, *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 879 (1981).
- 44) P.A. Mitenko and R.I. Ogilvie, Rapidly achieved plasma concentration plateaus, with observations on theophylline kinetics, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **13**, 329 (1971).
- 45) 花野学, 梅村甲子朗, 伊賀立二, “ファーマコキネティックス実験法”, ソフトサイエンス社, 東京, 1985.
- 46) G. Yanagimoto, T. Hayashi, T. Seki, K. Juni, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Skin disposition of drugs after topical application in hairless rats, *Chem. Pharm. Bull.*, submitted.
- 47) R.J. Scheuplein, Mechanism of percutaneous absorption II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration, *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79 (1967).
- 48) J.C. Shah, Analysis of permeation data: evaluation of the lag time method, *Int. J. Pharm.*, **90**, 161 (1993).
- 49) J.C. Shah, I. Kaka, S. Tenjarla, S.W.J. Lau and D. Chow, Analysis of

- percutaneous permeation data: II. Evaluation of the lag time method, *Int. J. Pharm.*, **109**, 283 (1994).
- 50) J.C. Shah, Application of kinetic model to *in vitro* percutaneous permeation of drugs, *Int. J. Pharm.*, **133**, 179 (1996).
- 51) J.L. Rabinowitz, E.S. Feldman, A. Weinberger and H.R. Schumacher, Comparative tissue absorption of oral ^{14}C -aspirin and topical triethanolamine ^{14}C -salicylate in human and canine knee joints, *J. Clin. Pharmacol.*, **22**, 42 (1982).
- 52) H. Suh, H.W. Jun, M.T. Dzimianski and G.W. Lu, Pharmacokinetic and local tissue disposition studies of naproxen following topical and systemic administration in dogs and rats, *Biopharm. Drug Dispo.*, **18**, 623 (1997).
- 53) R.O. Potts and R.H. Guy, Predicting skin permeability, *Pharm. Res.*, **9**, 663 (1992).
- 54) T. Hatanaka, M. Inuma, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Prediction of skin permeability of drugs. I. Comparison with artificial membrane, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3452 (1990).
- 55) P. Singh and M.S. Roberts, Local deep tissue penetration of compounds after dermal application: Structure-tissue penetration relationships, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 908 (1996).
- 56) W.J. Pugh, M.S. Roberts and J. Hadgraft, Epidermis permeability - penetrant structure relationships: 3. The effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum, *Int. J. Pharm.*, **138**, 149 (1996).
- 57) R-Y. Lin, C-W. Hsu and W-Y. Chen, A method to predict the transdermal permeability of amino acids and dipeptides through porcine

- skin, *J. Control. Rel.*, **38**, 229 (1996).
- 58) J.A.Cordero, L. Alarcon, E. Escribano, R. Obach and J. Domenech, A Comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs, *J. Pharm. Sci.*, **86**, 503 (1997).
- 59) S. Yagi, K. Nakayama, Y. Kurosaki, K. Higaki and T. Kimura, Factors determining drug residence in skin during transdermal absorption: studies on β -blocking agents, *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1195 (1998).
- 60) K. Sugibayashi, G. Yanagimoto, T. Hayashi, T. Seki, K. Juni and Y. Morimoto, Analysis of skin disposition of flurbiprofen after topical application in hairless rats, *J. Control. Rel.*, accepted
- 61) P. Singh and M.S. Roberts, Effect of vasoconstriction on dermal pharmacokinetics and local tissue distribution of compounds, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 783 (1994).
- 62) K. Kyyronen and A. Urtti, Effect of epinephrine pretreatment and solution pH on ocular and systemic absorption of ocularly applied timolol in rabbits, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 688 (1990).
- 63) A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W. Rall and F. Murad, (ed.), *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th ed, MackMillan, New York, (1985).
- 64) 関俊暢, 経皮吸収促進剤としてのエタノールに関する基礎的研究, *Pharm. tech. Japan*, **11**, 79 (1995).
- 65) Y. Jin, C. Toeda, T. Kawaguchi, T. Seki and K. Juni, Permeation of zidovudine and probenecid from oily bases containing alcohols through rat skin, *Develop. Ind. Pharm.*, **22**, 653 (1996).
- 66) K. Sato, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Effect and mode of action

- of aliphatic esters on the *in vitro* skin permeation of nicorandil, *Int. J. Pharmaceut.*, **43**, 31 (1988).
- 67) C.S. Leopold and B.C. Lippold, Enhancing effects of lipophilic vehicles on skin penetration of methyl nicotinate *in vivo*, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 195 (1995).
- 68) C.Y. Goates and K. Knutson, Enhanced permeation of polar compounds through human epidermis. I. Permeability and membrane structural changes in the presence of short chain alcohols, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1195**, 169 (1994).
- 69) Y. Wada, K. Nakajima, J. Yamazaki, T. Seki, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Influence of composition of *l*-menthol-ethanol-water ternary solvent system on the transdermal delivery of morphine hydrochloride, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 600 (1993).
- 70) Y. Morimoto, K. Sugibayashi, D. Kobayashi, H. Shoji, J. Yamazaki and M. Kimura, A new enhancer-coenhancer system to increase skin permeation of morphine hydrochloride *in vitro*, *Int. J. Pharm.*, **91**, 9 (1993).
- 71) D. Kobayashi, T. Matsuzawa, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, M. Kobayashi and M. Kimura, Feasibility of use of several cardiovascular agents in transdermal therapeutic systems with *l*-menthol-ethanol system on hairless rat and human skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 254 (1993).
- 72) D. Kobayashi, T. Matsuzawa, K. Sugibayashi, Y. Morimoto and M. Kimura, Analysis of the combined effect of *l*-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model, *Pharm. Res.*, **11**, 96 (1994).
- 73) K. Sugibayashi, D. Kobayashi, E. Nakajima, T. Hatanaka, N. Inoue, S.

- Kusumi, M. Kobayashi, M. Kimura and Y. Morimoto, Differences in enhancing effect of *l*-menthol, ethanol and their combination between hairless rat and human skin, *Int. J. Pharm.*, **113**, 189 (1995).
- 74) C.D. Ebert, Recent trends in transdermal technology in the USA, *Ther. Res.*, **13**, 29 (1992).
- 75) S.E. Cross, Z. Wu and M.S. Roberts, Effect of perfusion flow rate on the tissue uptake of solutes after dermal application using the rat isolated perfused hindlimb preparation, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 844 (1994).
- 76) F. Auclair, M. Besnard, C. Dupont and J. Wepierre, A new model: Bipediculated dorsal flap of hairless rat for cutaneous blood flow evaluation, *Skin Pharmacol.*, **2**, 198 (1989).
- 77) F. Auclair, M. Besnard, C. Dupont and J. Wepierre, Importance of blood flow to the local distribution of drugs after percutaneous absorption in the bipediculated dorsal flap of the hairless rat, *Skin Pharmacol.*, **4**, 1 (1991).
- 78) F. Hueber, M. Besnard, H. Schaefer and J. Wepierre, Percutaneous absorption of estradiol and progesterone in normal and appendage-free skin of the hairless rat: Lack of importance of nutritional blood flow, *Skin Pharmacol.*, **7**, 245 (1994).
- 79) N.L. Benowitz, P. Jacob III, P. Olsson and C.-J. Johansson, Intravenous nicotine retards transdermal absorption of nicotine: Evidence of blood flow-limited percutaneous absorption, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **52**, 223 (1992).
- 80) U. Vollmer, B.W. Muller, B. Wilffert and T. Peters, An improved model for studies on transdermal drug absorption *in-vitro* in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **45**, 242 (1993).

- 81) Z.Y. Wu, S.E. Cross and M.S. Roberts, Influence of physicochemical parameters and perfusate flow rate on the distribution of solutes in the isolated perfused rat hindlimb determined by the impules-response technique, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1020 (1995).
- 82) S.E. Cross and M.S. Roberts, Importance of dermal blood supply and epidermis on the transdermal iontophoretic delivery of monovalent cations, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 584 (1995).
- 83) J.E. Riviere and P.L. Williams, Pharmacokinetic implications of changing blood flow in skin, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 601 (1992).
- 84) B.M. Magnusson and L-O D. Koskinen, Effects of topical application of capsaicin to human skin: A comparison of effects evaluated by visual assessment, sensation registration, skin blood flow and cutaneous impedance measurements, *Acta. Derm. Venereol (Stockh)*, **76**, 129 (1996).
- 85) 高田寛治, “臨床薬物動態学”, 薬業時報社, 東京, 1982. pp79.