

薬物のヒト皮膚透過性評価に利用する
合成高分子膜に関する研究

三木 涼太郎

目次

総論の部

緒言

・・・1

第1章 MMA/GMA/PEG 6000 共重合体中の PEG 6000 ユニットの存在状態の評価

・・・4

第1節 MMA/GMA/PEG 6000 共重合体の化学的組成の評価

・・・4

第2節 MMA/GMA/PEG 6000 共重合体中の PEG 6000 ユニットの結晶性の評価

・・・7

第3節 MMA/GMA/PEG 6000 共重合体膜を介した薬物の透過性と PEG 6000 ユニット含量の関係

・・・10

第4節 小括

・・・11

第2章 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜の調製および薬物透過特性の評価

・・・13

第1節 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する高分子の合成と化学的組成の評価

・・・13

第2節 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜を介した薬物透過性に対する極性の影響

・・・16

第3節 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜を

介した薬物透過性に対する分子量の影響	・ ・ ・ 22
第4節 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜中の 水孔性透過経路の検証	・ ・ ・ 25
第5節 小括	・ ・ ・ 31
第3章 PDMS/PEG 6000 共重合体含浸膜のヒト皮膚代替物としての評価	・ ・ ・ 32
第1節 含浸膜 G とシリコーン膜を介した透過性の比較	・ ・ ・ 33
第2節 広範囲な物性を有する薬物の透過挙動についての含浸膜とヒト 皮膚の比較	・ ・ ・ 34
第3節 小括	・ ・ ・ 35
結論	・ ・ ・ 37
謝辞	・ ・ ・ 39
実験の部	
第1章 実験の部	・ ・ ・ 40
第2章 実験の部	

第3章 実験の部	・・・44
	・・・52
参考文献	・・・53

総論の部

緒言

皮膚は体表をなす生体最大の臓器であり、ヒトの身体において多くの外界の物質と接触する部位の一つである。皮膚の重要な役割にそれらの侵入に対するバリア機能が挙げられ、ヒトは化学物質、バクテリア、真菌、アレルゲンおよび放射線といった外界からの危険因子から身を守ることができ、またこのバリア機能は気温、湿度の変動や入浴などといった身体における環境の変化にも対応することができる¹⁾。日常生活において、皮膚には医薬品・化粧品が適用され、また化学物質の暴露を受けることから、皮膚を介する物質の透過性を評価することは、ヒトの健康に関わる幅広い分野に対して有益な情報を与える。

化学物質の経皮吸収性を評価する方法として *in vitro* 皮膚透過試験法が知られ、経済開発協力機構(Organisation for Economic Co-operation and Development ; OECD)によりそのガイドライン²⁾が制定されている。*In vitro* 皮膚透過試験では、ヒト皮膚や動物皮膚などの生体皮膚が利用されるが、皮膚を用いた実験法は膜調製の簡便さ、倫理面³⁾、供給およびコストなどの点で問題があることから、皮膚代替物の開発が望まれる。欧州においては、2009年より実験動物を用いて試験した化粧品および化粧品原料の販売に対する広域禁止令⁴⁾が施行され、今後世界的に医薬品など他の分野における試験についても規制が厳しくなると予想される。

ヒトや動物のケラチン細胞を分化・誘導した三次元培養皮膚⁵⁻⁷⁾や合成人工膜⁸⁻¹¹⁾などが皮膚透過性を評価するための代替物として利用できると期待されているが、データの再現性、使用の簡便さ、扱いやすさ、コストおよび安定供給といった点で、合成人工膜は有用性が高いと考えられる。特にヒト皮膚を使用する前段階において皮膚透過性を評価する場合には、人工膜によって皮膚を代替できることが望ましい。

皮膚は、最外層から角質層、生きた表皮および真皮からなり、さらに付属器官として毛嚢や汗腺が存在する複雑な構造をしている¹²⁾。皮膚に

おける最大のバリアである角質層は概して親油性のバリアとみなせるが、その角質層中にも角層間脂質の極性部分が配向した親水性の領域が存在すると考えられている¹³⁾。

物質透過性のみに着目した場合には、皮膚は溶解拡散理論で説明可能な大部分を占める親油性領域と細孔理論で説明可能なわずかな親水性領域からなる膜として単純化して捉えることができる¹⁴⁻¹⁵⁾。これまで皮膚代替物としては主に親油性薬物に対して、テトラデカン¹⁶⁾やミリスチン酸イソプロピル¹⁷⁾のような有機溶媒または脂質成分¹⁸⁻²⁰⁾を利用した含浸膜およびシリコン膜²¹⁻²⁵⁾などが検討されてきたが、親水性薬物に対する透過性を評価するための膜についてはほとんど検討されていない。幅広い分野へ応用していく皮膚代替物としては、親油性薬物のみでなく親水性薬物に対しても利用できることが望ましい。

先行研究において親油性のメチルメタクリレート(MMA)およびグリシジルメタクリレート(GMA)、および親水性であるポリエチレングリコール(PEG) 6000 ユニットを含有するアゾ系高分子重合開始剤であるポリ(ポリオキシエチレン-アゾビスシアノペンタノエイト) (VPE-0601)を用いた MMA/GMA/PEG 6000 共重合体を合成および製膜し、その膜を介した薬物透過性が、親水性薬物であるマンニトール(MT, オクタノール水分分配係数の対数値(log K_{ow}): -3.01)を含めてヒト皮膚と良好に相関することがわかっている。しかし、この共重合体における化学的組成と親水性領域の存在に関する十分な検討は、まだなされていない。高分子膜中の PEG 6000 ユニットが、親水性成分として親水性領域の形成に有効に機能しているかを明らかにすることは、膜の構造と組成を最適化するために必要であり、そのことを十分検証することにより、より良い高分子材料が得られると考えた。

その検討を踏まえ皮膚代替物のためのより良い高分子を模索する上で、MMA および GMA に代わる高分子の親油性の構成成分として、親油性のモデル膜の一つとして知られるシリコン膜²¹⁻²⁵⁾の構成成分であるポリジメチルシロキサン(PDMS)に注目し、PDMS および PEG 6000 ユニットを有する新規共重合体について検討することとした。

本研究ではヒト皮膚透過性評価に利用する合成高分子膜の調製に向けて、以下3章に亘る検討を行った。第1章では、MMA/GMA/PEG 6000共重合体中のPEG 6000ユニットの存在状態の評価を行った。また第2章では、PDMSおよびPEG 6000ユニットを有する新規共重合体含浸膜の調製および透過性の評価を行った。さらに第3章では、含浸膜とヒト皮膚を介した透過性の相関性を評価することで *in vitro* 皮膚透過試験における代替物としての有用性を検討した。以下、得られた知見について論述する。

第1章 MMA/GMA/PEG 6000 共重合体中の PEG 6000 ユニットの存在状態の評価²⁶⁾

親水性薬物を含めた広範な極性を有する薬物の合成高分子膜を介した透過特性をヒト皮膚のそれに類似させるためには、親油性高分子中に親水性のミクロドメイン構造を形成させることが必要と考えられる。MMA/GMA/PEG 6000 共重合体では、PEG 6000 ユニットが親水性のミクロドメイン構造を形成することが期待されているが、合成された高分子の化学的組成や製膜した膜サンプル中での PEG 6000 ユニットの存在状態は明らかにされていない。そこで本章では、MMA/GMA/PEG 6000 共重合体膜中で PEG 6000 ユニットが親水性領域を形成するために有効に機能しているかを検証し、高分子に組み込む親水性材料としての PEG 6000 ユニットの有用性を評価した。すなわち、MMA/GMA/PEG 6000 共重合体を合成し、その分子量分布、化学的組成および物理化学的性質をゲル濾過クロマトグラフィー(GPC)、¹H-NMR 測定、粉末 X 線回折(XRD)および示差走査熱量測定法(DSC)により評価した。

第1節 MMA/GMA/PEG 6000 共重合体の化学的組成の評価

MMA/GMA/PEG 6000 共重合体中の PEG 6000 ユニットの存在状態と化学的組成の関係を明確にするために、PEG 6000 ユニットを含有する VPE-0601 の使用量を広範囲に変化させた計 5 種の高分子を合成し、検討を行った。合成反応スキームを Fig. 1 および仕込み比、化学的組成、算出された高分子の数平均分子量(Mn)、質量平均分子量(Mw)および多分散度(Mw/Mn)を Table 1 に示す。高分子は、比較的簡単な構造単位であるモノマーあるいは残基が多数繰り返した大きな分子であり、その幾つかの性質は、分子量(MW)と分子量分布に大きく依存するため、MW と分子量分布は重要な分子パラメータである²⁷⁾。

Table 1 Feed ratio, composition and average molecular weight of synthetic polymers

Code	Feed ratio (wt%)			Product					
				Composition (wt%) ^a			Average molecular weight		
	MMA	GMA	VPE-0601	MMA	GMA	PEG 6000 ^b	Mn (kDa)	Mw (kDa)	Mw/Mn
A	45	5	50	35.1	6.6	58.3	39	67	1.72
B	55	5	40	40.8	6.6	52.6	37	74	2.01
C	65	5	30	47.7	6.8	45.5	45	83	1.92
D	75	5	20	63.9	8.1	28.0	79	123	1.56
E	85	5	10	85.4	3.1	11.5	111	171	1.56

a: Weight ratio in the polymers calculated from ¹H NMR data.

b: VPE-0601 was converted to PEG 6000 units.

合成した高分子の Mn および Mw は、それぞれ 37 kDa から 111 kDa および 67 kDa から 171 kDa の範囲であり、これらは VPE-0601 の仕込み比の増大に伴い減少した(Table 1)。一般的に高分子の Mw/Mn が 1.0 に近づくほど分子量分布のばらつきが小さくなり、2.0 以下を示すものが分布の狭い良好な高分子とされている²⁷⁾。得られた Mw/Mn は、高分子 A、C、D および E において 2.0 以下であったことから、これらの合成高分子は分子量分布が狭いものと考えられた(Table 1)。高分子 B の Mw/Mn は 2.01 であり、他の合成高分子よりは劣るものの、比較的良好な分子量分布であると考えられる。また ¹H-NMR 測定から算出した 5 種の合成高分子における各ユニットの質量比は、MMA ; 35.1 ~ 85.4wt%、GMA ; 3.1 ~ 8.1wt% および PEG 6000 ; 11.5 ~ 58.3wt% であり、仕込み比と近似した値を示した(Table 1)。このことから、仕込み比を変えることにより共重合体中に含まれる PEG 6000 ユニットの量を変化させることができると考えられた。

第2節 MMA/GMA/PEG 6000 共重合体中の PEG 6000 ユニットの結晶性の評価

高分子合成に用いたユニットのうち、PEG 6000 (平均分子量 6 kDa)は、結晶性であり²⁸⁾、Poly(MMA) (PMMA)は非晶性であることが知られている²⁹⁾。そこで、合成高分子サンプル中の PEG 6000 ユニットの集合した親水性領域の形成を検討するために、主に PEG 6000 ユニットの結晶性に焦点をあてて XRD および DSC を用いて評価した。また合成した高分子以外のサンプルとして PEG 6000 ユニットの含有する VPE-0601 および市販の PEG 6000、そして非晶性高分子のコントロールとして市販の PMMA を用い、測定サンプルには粉末および製膜したものを用いた。なお、以降の Fig. 中のサンプル A~E は Table 1 の code A~E に対応する。

XRD の回折プロファイルを図 2 に示す。PEG 6000 および VPE-0601 では粉末および膜サンプルにおいて、ともに $2\theta = 19^\circ$ および 23° に回折ピークが観察され、粉末サンプル A、B および C と膜サンプル A においても同様の回折ピークが観察された(図 2)。粉末サンプルでは、PEG 6000 ユニットの増大に伴って回折ピークは大きくなった。粉末サンプル D および E、および膜サンプル B、C、D および E においては、特徴的な回折ピークは観察されなかった(図 2)。XRD において、PEG 6000 構造の結晶性は、 $2\theta = 19^\circ$ および 23° の回折ピークとして観察されると報告されている²⁸⁾ため、粉末および膜サンプルの PEG 6000 の $2\theta = 19^\circ$ および 23° に観察された回折ピークは、PEG 6000 構造の結晶性に由来することが示唆された(図 2)。

DSC プロファイルを図 3 に示す。PEG 6000 および VPE-0601 の粉末および膜サンプルでは、それぞれ 61° および 56°C 付近に吸熱ピークが認められた(図 3)。粉末サンプル A、B および C と膜サンプル A で、 50° 、 49° 、 47° および 52°C 付近に吸熱ピークが観察され、粉末サンプルでは PEG 6000 ユニットの増大に伴って、吸熱ピークは大きくなった。粉末サンプル D および E、および膜サンプル B、C、D および E においては、特徴的な吸熱ピークは観察されなかった(図 3)。

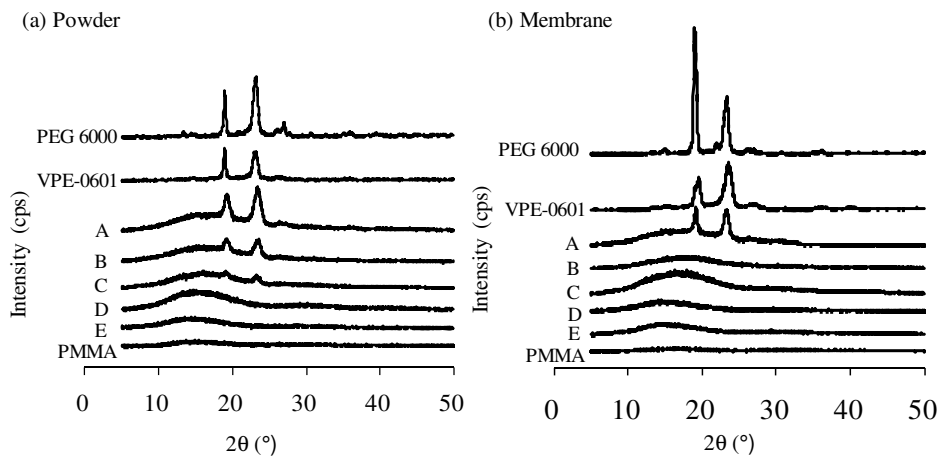


Fig. 2 X-ray diffractograms of the synthesized polymers and the prepared membranes

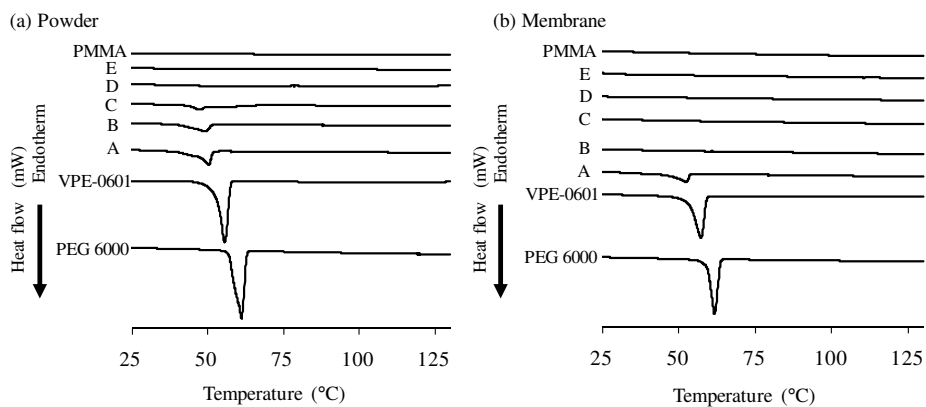


Fig. 3 DSC curves of the synthesized polymers and the prepared membranes

一般的に結晶性高分子では、非晶性高分子ではみられない融点が観察され³⁰⁾、DSC 測定においては、その構成ユニット特有の温度近傍で鋭い吸熱ピークが観察される³¹⁾。PEG 6000 の融点は、60～63°C 付近³²⁾または 66°C²⁸⁾であるとされており、DSC における粉末および膜サンプルの PEG 6000 の 61°C 付近に観察された吸熱ピークは、融解ピークであることが確認できた(Fig. 3)。一方、XRD および DSC において、非晶性である PMMA は特徴的なピークを示さなかった(Figs. 2 and 3)。すなわち本検討の実験条件で、結晶性の PEG 6000 では、回折ピークおよび吸熱ピークから結晶構造の存在を示すことが可能であった。また粉末サンプル A、B および C、および膜サンプル A において観察されたこれら回折ピークおよび吸熱ピークが VPE-0601 に含まれる PEG 6000 ユニットのそれらと対応していたことから、それらのピークは PEG 6000 ユニット由来であると考えられた。

以上より、上記のサンプルでは、PEG 6000 ユニットが集合した親水性領域が高分子中に形成されるものと推測された。一方、PEG 6000 ユニット含量が少ない粉末サンプル D および E、および膜サンプル B、C、D および E においては回折ピークおよび吸熱ピークが観察されなかったため、本検討においては、PEG 6000 ユニットによる親水性領域の存在を明らかにすることができなかった。

そこで、共重合体膜中の PEG 6000 ユニット含量と薬物透過性の関係から、回折ピークおよび吸熱ピークが観察されなかった膜サンプル C、D および E における PEG 6000 ユニットの部分的な局在化について考察することにした。

第3節 MMA/GMA/PEG 6000 共重合体膜を介した薬物の透過性と PEG 6000 ユニット含量の関係

高分子膜 C、D および E を介した親水性薬物である MT および親油性薬物であるブチルパラベン(BP)の透過係数(P)の対数值($\log P$)と高分子中の PEG 6000 ユニット含量の関係を Fig. 4 に示す。膜 C、D および E において PEG 6000 ユニット含量の増大に伴い、MT および BP の透過性はともに増大したが、MT に対してその影響は顕著であり、BP に対する影響はわずかであった。このことから膜サンプル C、D および E では、XRD および DSC において PEG 6000 ユニット由来のピークは観察されなかったが、合成高分子中の PEG 6000 ユニット含量の増大により、親水性薬物が透過できる親水性領域が増大しているものと考えられ、MMA/GMA の親油性環境中に PEG 6000 ユニットが集合した親水性領域が部分的に局在化しているものと推測された。

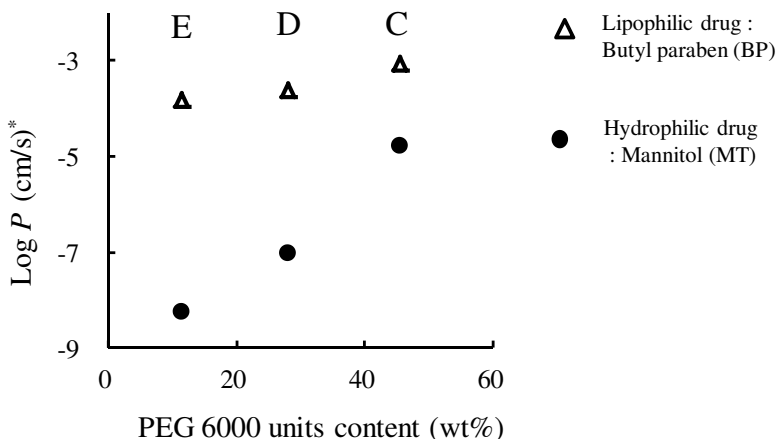


Fig. 4 Relationships between PEG 6000 units content in the synthesized polymers and $\log P$ through the polymer membranes

* $\log P$ values of BP through the membranes C, D and E were -3.08 , -3.61 and -3.82 cm/s, respectively. $\log P$ values of MT through the membranes C, D and E were -4.78 , -7.02 and -8.24 cm/s, respectively.

第4節 小括

本章では、仕込み比の異なる5種のMMA/GMA/PEG 6000共重合体を合成し、合成高分子の分子量分布および高分子の物性に大きく影響すると考えられる化学的組成を明らかにした。また合成高分子中のPEG 6000ユニットの存在状態を評価し、PEG 6000ユニット由来のピークが観察されたサンプルではPEG 6000ユニットが集合した親水性領域が形成されていることを明らかにした。

PEG 6000ユニット由来のピークが観察されなかったサンプル中の親水性領域の形成について検討するために、PEG 6000ユニット由来のピークが観察されなかった膜サンプルC、DおよびEにおいて、MTおよびBPの透過性データとPEG 6000ユニット含量の関係を評価し、MMA/GMAの親油性環境中にPEG 6000ユニットが集合した親水性領域が存在することを示した。

粉末サンプルCおよび膜サンプルAにおいてみられた回折ピークおよび吸熱ピークは、コントロールのPEG 6000のそれらと比較し、非常に小さく、一部の合成高分子サンプルにおいてはPEG 6000ユニット由来のピークが観察されなかった。このことから、粉末サンプルCおよび膜サンプルAよりもPEG 6000ユニット含量が少ないサンプルにおけるPEG 6000ユニットのピークは、本検討のXRDおよびDSCにおける検出限界以下であったと考えられた。このような占有率の非常に小さな領域の存在を明らかにするためには、より感度の高い分析法や種々の分析法を組み合わせることで多角的に捉えていくことが必要と思われる、その確証を高めるための検討が期待される。

先行研究においてMMA/GMA/PEG 6000共重合体膜を介したPは、ヒト皮膚と良好な相関性を示した。しかし、高分子膜のMMAおよびGMAの化学的組成が多い膜ほど、インドメタシンやケトプロフェンなど一部の薬物に対してラグタイムが著しく長くなる傾向にあり、そのような場合には薬物の分配係数から予想されるよりもPが低い傾向にあった(data not shown)。このような現象は今後、合成高分子膜を*in vitro*皮膚透過試

験における代替膜として他の様々な薬物に対して応用していくに当たり望ましくない。このような現象の原因は定かではないが、可能性として MMA および GMA が一部の薬物と相互作用していることが考えられる。

また MMA/GMA/PEG 6000 共重合体は、MMA および GMA が含まれるためにガラス状の高分子である。ガラス状の高分子は、熱力学的に非平衡の状態にあり時間とともにゆっくりと平衡状態へ移行し、このとき多くの物性が影響を受ける³³⁾。そのことにより、高分子膜を調製した後の期間によっては再現性および物理的安定性の面で影響が出るのが懸念される。一方、ゴム状の高分子は熱力学的に平衡の状態にあり³⁴⁾、ガラス状の高分子が受けるような影響を受けにくく、再現性や安定性の面で望ましい。

PDMS は親油性モデル膜であるシリコーン膜の構成成分として知られており、室温下でゴム状であり、不活性かつ化学的に安定である³⁵⁻³⁶⁾。したがって PDMS を人工膜の成分として用いた場合には、前述のような現象が生じる懸念が少なく、試験に用いる上での有用性も高くなるのが期待できる。そこで 2 章以降は、MMA および GMA の代わりに PDMS を親油性材料として選択し、VPE-0601 を利用して PDMS と PEG 6000 ユニットを共重合させて、目的に向けた検討を行った。

第2章 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜の調製 および薬物透過特性の評価

前章では、MMA と GMA を含む合成高分子中で PEG 6000 ユニットが親水性領域を形成することを示し、高分子中に親水性領域を形成させる上で VPE-0601 は有用な材料であることを明らかにした。本章では、MMA や GMA に代わる親油性成分として、親油性モデル膜であるシリコーン膜²¹⁻²⁵⁾の構成成分である PDMS に着目し、第1章で用いた VPE-0601 を用いて PDMS および PEG 6000 ユニットを有する新規高分子を合成した。次に、その高分子を用いて含浸膜を調製し、それを介した *in vitro* 透過試験を行い、薬物透過特性について評価した。

第1節 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する高分子の合成と化学的組成の評価

合成反応スキームおよび仕込み比を、それぞれ Fig. 5 および Table 2 に示す。親油性成分である PDMS ユニット(724 Da)を有するマクロマー FM-0711 および VPE-0601 を用いて、PDMS ユニットと PEG 6000 ユニットからなる PDMS/PEG 6000 共重合体(高分子 F, Fig. 5a)を合成し、また比較のために FM-0711 および PEG 6000 ユニットをもたない開始剤である 2, 2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル) (AMBN)を用いて PEG 6000 ユニットをもたない高分子 G (Fig. 5b)を合成した。合成した高分子の分子量分布および化学的組成の結果を Table 2 に示す。高分子 F および G の M_n は、それぞれ 157 kDa および 52 kDa、 M_w はそれぞれ 209 kDa および 106 kDa であった(Table 2)。高分子 F の M_w/M_n は、1.32 であり、2.0 以下であったことから、分子量分布の面で良好であった(Table 2)。高分子 G の M_w/M_n は 2.03 であり、高分子 F よりは劣るものの、比較的良好的な分子量分布であると考えられた(Table 2)。高分子 F における各ユニットの質量比は、PDMS ; 96.5wt% および PEG 6000 ; 3.5wt% であり、仕込み比を反映した高分子組成であった。

(a) Polymer F

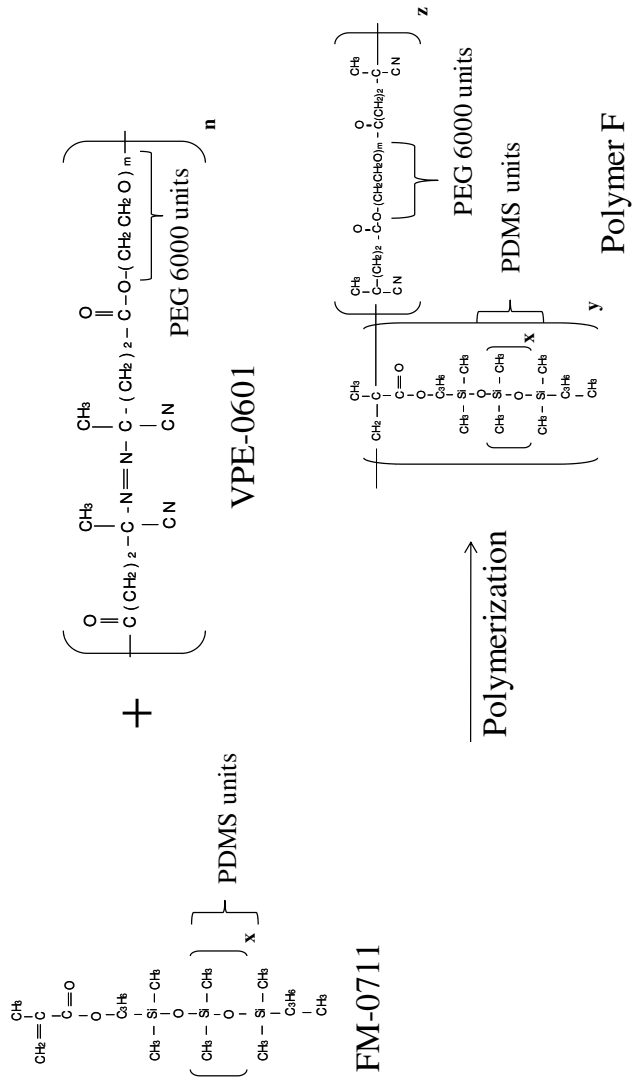


Fig. 5a Chemical structures of the macromer, the initiator and the prepared polymer

Assumed that molecular weight of PDMS units, PEG 6000 units and VPE-0601 were about 724 Da, 6 kDa and 50 kDa, respectively.

where $x = 8$, $m = 1.36$ and $n = 8$, respectively.

(b) Polymer G

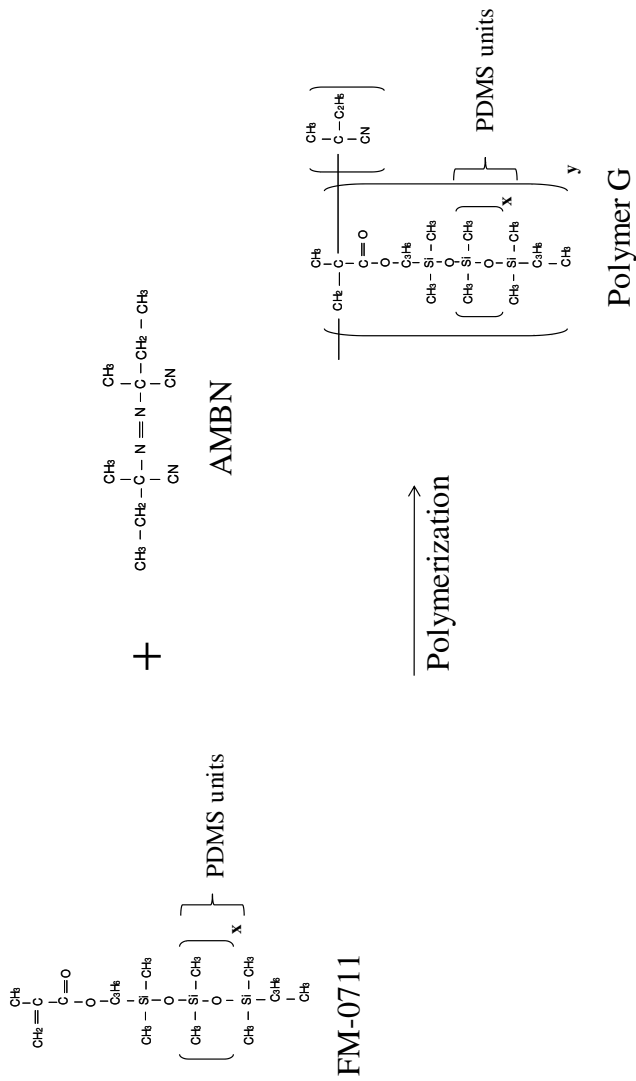


Fig. 5b Chemical structures of the macromer, the initiator and the prepared polymer

where $x = 8$.

Table 2 Feed ratio, composition and average molecular weight of polymers synthesized

Code	Feed ratio (wt%)			Product				
				Composition (wt%)		Average molecular weight		
	FM-0711	AMBN	VPE-0601	PDMS ^a	PEG 6000 ^b	Mn (kDa)	Mw (kDa)	Mw/Mn
F	97.00	0	3.00	96.5 ^c	3.5 ^c	157	209	1.32
G	99.69	0.31	0	100 ^d	0 ^d	52	106	2.03

a: FM-0711 was showed to convert PDMS units.

b: VPE-0601 was showed to convert PEG 6000 units.

c: Weight ratio in the polymer F was calculated from ¹H NMR.

d: Assumed that the synthesized polymer G was consisted of PDMS units only.

第2節 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜を介した薬物透過性に対する極性の影響

合成した2種の高分子FおよびGは粘稠性のある液体であり、キャストイングにより透過試験に用いる平膜として扱うことが難しかった。そこで、メンブランフィルターに含浸させることで平らな形状の含浸膜を調製した。高分子FおよびGを含浸させた膜をそれぞれ膜FおよびGとした(膜厚: 45 ~ 60 μm)。皮膚透過性予測に関するいくつかの報告があり、透過物質のMWおよび K_{OW} が重要な因子であることが知られている³⁷⁻⁴⁰⁾。Table 3に用いた薬物のMW、水に対する溶解度およびlog K_{OW} を示す。これら12種の薬物間におけるMWの最大の差は約1.7倍であり、分子サイズが類似している(MW: 188 ~ 318)が、 K_{OW} の最大の差は 10^8 倍であり、極性が大きく異なっている(log K_{OW} : -4.70 ~ 3.86)。

ドナー相中のイオン形薬物の存在量⁴¹⁾や水化学ポテンシャル⁴²⁾が皮膚

透過性に影響を与えることが報告されている。一方、シリコン膜ではこのような現象は観察されないことから、これらの透過性に関与する因子は皮膚に存在する親水性の領域を介して皮膚透過性に影響を与えていると考えられる。人工膜においてもこれらの影響を反映させるためには、皮膚代替物に生体皮膚に対応するような親水性領域が形成されていることが望ましい。

Hatanaka らが報告した parallel permeation pathway model¹⁴⁻¹⁵⁾を Fig. 6 に示す。

Table 3 Physicochemical properties of tested drugs

Drug	Abbreviation	MW	Solubility in water (mg/mL) ^a	Log K_{ow} ^b
Flurbiprofen	(FP)	244	0.0277	3.86
Ketoprofen	(KP)	254	0.185	3.11
Lidocaine	(LC)	234	3.03	2.34
Isosorbide dinitrate	(ISDN)	236	1.34	1.34
Cyclobarbitol	(CB)	236	3.07	0.873
Aminopyrine	(AMP)	231	55.9	0.497
Diclofenac sodium	(DC-Na)	318	32	-0.962
Nicorandil	(NR)	211	39.6	-1.02
Antipyrine	(ANP)	188	816	-1.55
Isoproterenol hydrochloride	(IPH)	248	345	-2.69
Dopamine hydrochloride	(DPH)	190	520	-3.40
Levodopa	(L-DP)	197	5.00	-4.70

a: Solubility in water at 37°C¹⁴⁻¹⁵⁾.

b: Logarithm of the octanol/water partition coefficient (log K_{ow}) at 37°C¹⁴⁻¹⁵⁾.

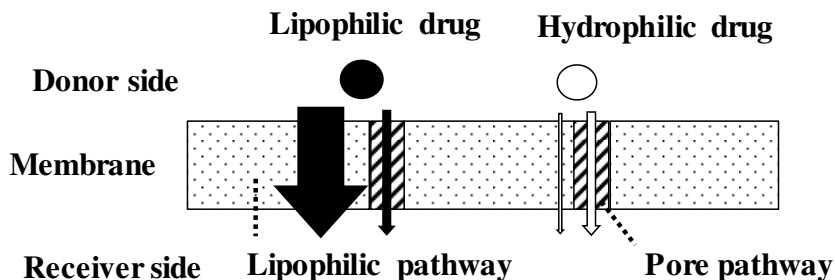


Fig. 6 Parallel permeation pathway model

この式は、皮膚を溶解拡散理論で説明可能な親油性領域と細孔理論で説明可能な親水性領域からなる膜として単純にモデル化したときの透過性を示すものであり、式(1)で表される。ここで、親油性薬物は膜へ高い分配性を示すため主に親油性領域を透過し、一方、分配係数が低い親水性薬物は主に親水性領域を透過する。

$$P_T = \frac{D_L(1-\varepsilon)K_{LV}}{\tau_L L} + \frac{D_V \varepsilon}{\tau_P L} \quad (1)$$

ここで P 、 D 、 ε 、 K_{LV} 、 τ および L は、透過係数、拡散係数、空隙率、親油性領域/基剤分配係数、曲路率および膜厚であり、添え字 T 、 L および P は、total, lipophilic pathway および pore pathway を意味している。この式における膜側の因子がほとんど変化しないと仮定した場合、膜 G および F に溶解拡散理論で説明されるような親油性領域が存在していれば、本検討では MW の類似した薬物群を用いているため、その領域を介する透過は、 D の違いの影響をあまり受けずに、 K_{LV} の違いに大きく依存することになる。また膜 F に細孔理論で説明されるような親水性領域が存在していると仮定すると、その領域を介する透過は、膜/基剤間分配係数の影響を受けず、また MW に依存した拡散係数の影響も受けにくいため、その透過性はほぼ一定になると予想される。Hatanaka らの報告では、通常、親水性薬物とみなされるような薬物(NR, DC-Na および ANP, MW ; 188 ~ 318, $\log K_{OW}$; -2.0 ~ 0)のシリコーン膜を介した透過性は、他の親油性薬物と同様に $\log K_{OW}$ の増大に伴い、増大した¹⁴⁾。このことから $\log K_{OW}$ が -2.0 ~ 0 の範囲にある薬物のシリコーン膜のような親油性領域を有する膜を介した透過性は、 D よりも K_{LV} に依存すると予想される。そこで第2節では、膜 G および F の親油性および親水性領域の形成を物理化学的アプローチによって検討しやすくするために、 $\log K_{OW} \geq -2.0$ の薬物を親油性薬物および $\log K_{OW} < -2.0$ の薬物を親水性薬物と定義した。膜 G および F を介した *in vitro* 透過試験の結果から薬物の極性と膜透過性の関係を検討することで、含浸膜中に親油性および親水性領域が形成されているかを考察した。

Table 2 の code で示される膜 F および G を介した典型的な透過プロファイルとして ISDN および NR の累積透過量を Fig. 7 に示す。ISDN および

NR どちらの場合も、その累積透過量は、短いラグタイムの後に、時間に比例して直線的に増大し、定常状態に達した(Fig. 7)。また、膜 F および G におけるその直線の傾き、すなわち定常状態透過速度(J)の差は、ISDN の場合よりも NR の場合の方が大きかった。この結果は、ISDN と NR の $\log K_{OW}$ の違い、つまり極性の違いに由来すると思われた。

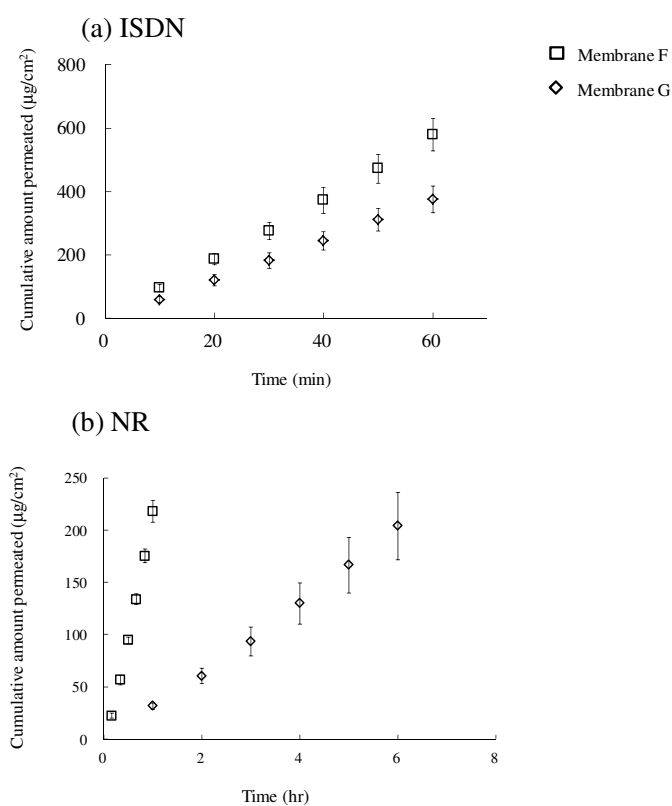


Fig. 7 Cumulative amount of ISDN and NR diffusing across impregnated membranes

Each symbol represents mean \pm S.D. (n=4).

Table 4 に、各含浸膜を介した薬物の J 、 P およびラグタイムを示す。膜 G および膜 F における $\log K_{OW}$ と $\log P$ の関係を Fig. 8 に示す。両膜ともに、親油性薬物に対して K_{OW} の増大に依存して P が増大し、親油性バリアとしての特徴を示した。Log K_{OW} と $\log P$ の関係に対する回帰直線の傾きおよび相関係数は、膜 G に対して 0.6984 および 0.9267、膜 F に対して 0.5196 および 0.9183 であった(Fig. 8)。このことから、親油性薬物に対して、膜 G および膜 F の間で透過特性の差は小さいと考えられ、膜 F および G には親油性の領域が存在し、その性質はほぼ等しいことが示唆された。つまり膜 F には、PEG 6000 ユニットがおよそ 3wt% 含有されているが、PDMS ユニットと PEG 6000 ユニットが均一に混ざり合った構造をしているのではなく、膜 G とほぼ同等の親油性領域が PEG 6000 ユニットとは独立して存在していると考えられた。膜 G を介した親水性薬物、L-ドーパ(L-DP, $\log K_{OW}$: -4.70)の透過量は定量限界以下であり、その透過性は著しく低いものと考えられた(Table 4)。一方、膜 F を介した親水性薬物の $\log P$ は、 K_{OW} に依存せず、ほぼ一定の範囲にあった($\log P$; -6.72 ~ -6.44 cm/s, Fig. 8b)。このような透過特性は、Hatanaka らが報告した同様の親水性薬物に対するヒト皮膚およびヘアレスラット皮膚を介した透過特性¹⁴⁻¹⁵⁾とよく一致しており、ヒト皮膚およびヘアレスラット皮膚などの生体皮膚に親水性とみなせる経路が存在すること¹⁴⁻¹⁵⁾に由来すると考えられる。このことおよび前述の考察から、膜 F では親油性領域の中に親水性領域が部分的に局在化していると考えられた。

Table 4 Permeation parameters of drugs through impregnated membranes

Membrane F								
Drug	J (mg/cm ² /hr)			P (cm/s)			Mean lag time (hr)	n
FP	46.4	± 5.6	CV (12.1%)	4.65×10^{-4}	± 5.64×10^{-5}	CV (12.1%)	0.02	4
KP	67.7	± 6.1	CV (9.0%)	1.02×10^{-3}	± 9.11×10^{-6}	CV (9.0%)	0.11	4
LC	3237.9	± 315.5	CV (9.7%)	2.97×10^{-4}	± 2.89×10^{-5}	CV (9.7%)	0.01	3
ISDN	606.3	± 62.1	CV (10.2%)	1.26×10^{-4}	± 1.29×10^{-5}	CV (10.2%)	0.05	4
CB	33.4	± 1.9	CV (5.7%)	3.02×10^{-6}	± 1.71×10^{-7}	CV (5.7%)	0.11	4
AMP	1410.8	± 380.0	CV (26.9%)	7.01×10^{-6}	± 1.89×10^{-6}	CV (26.9%)	0.09	4
DC-Na	113.4	± 30.7	CV (27.1%)	9.84×10^{-7}	± 2.67×10^{-7}	CV (27.1%)	0.45	4
NR	262.9	± 29.9	CV (11.4%)	1.84×10^{-6}	± 2.10×10^{-7}	CV (11.4%)	0.16	4
ANP	482.3	± 178.8	CV (37.1%)	1.34×10^{-6}	± 4.97×10^{-7}	CV (37.1%)	0.08	4
IPH	116.9	± 74.0	CV (63.3%)	3.25×10^{-7}	± 2.06×10^{-7}	CV (63.3%)	0.54	3
DPH	69.0	± 29.6	CV (42.9%)	1.92×10^{-7}	± 8.23×10^{-8}	CV (42.9%)	0.54	4
L-DP	6.56	± 3.24	CV (49.4%)	3.64×10^{-7}	± 1.80×10^{-7}	CV (49.4%)	0.79	3

Membrane G								
Drug	J (mg/cm ² /hr)			P (cm/s)			Mean lag time (hr)	n
FP	36.6	± 6.1	CV (16.7%)	3.67×10^{-4}	± 6.15×10^{-5}	CV (16.7%)	0.14	4
KP	42.4	± 9.2	CV (21.7%)	6.36×10^{-5}	± 1.38×10^{-5}	CV (21.7%)	0.21	4
LC	2250.9	± 139.7	CV (6.2%)	2.06×10^{-4}	± 1.28×10^{-5}	CV (6.2%)	0.02	3
ISDN	386.2	± 37.9	CV (9.8%)	8.01×10^{-5}	± 7.86×10^{-6}	CV (9.8%)	0.03	4
CB	9.4	± 1.7	CV (17.6%)	8.52×10^{-7}	± 1.50×10^{-7}	CV (17.6%)	0.19	4
AMP	319.4	± 45.3	CV (14.2%)	1.59×10^{-6}	± 2.25×10^{-7}	CV (14.2%)	0.01	4
DC-Na	8.96	± 0.87	CV (9.7%)	7.78×10^{-8}	± 7.57×10^{-9}	CV (9.7%)	1.00	3
NR	36.9	± 5.8	CV (15.7%)	2.59×10^{-7}	± 4.07×10^{-8}	CV (15.7%)	0.48	4
ANP	65.5	± 7.9	CV (12.1%)	1.82×10^{-7}	± 2.20×10^{-8}	CV (12.1%)	0.23	4
IPH	-	-	-	-	-	-	-	-
DPH	-	-	-	-	-	-	-	-
L-DP	- ^a	-	-	- ^a	-	-	-	3

a : No permeation of L-DP through membrane G was detected until 48 hr (detection limit 0.05 µg/mL), suggesting that the P of L-DP was below 1.58×10^{-10} cm/s.

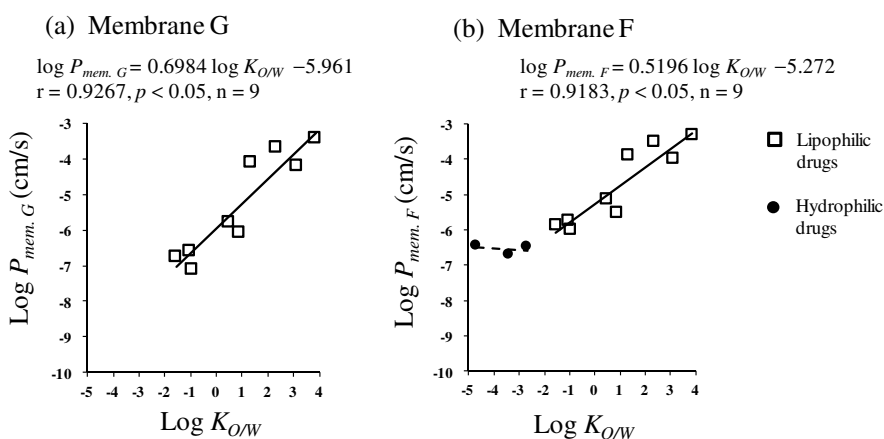


Fig. 8 Relationships between octanol/water partition coefficient ($\log K_{O/W}$) of drugs and permeability ($\log P_{mem.}$) through the impregnated membranes mem. G : membrane G, mem. F : Membrane F

第3節 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜を介した薬物透過性に対する分子量の影響

前節では、PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜を介する極性の異なる薬物の透過特性を評価し、膜 F には親油性環境の中に親水性領域が部分的に局在していると考えられた。第2節では、類似した MW の親水性薬物(MW : 190 ~ 248)を用いて評価したため、膜 F を介した親水性薬物の透過性に対する MW の影響は十分に評価できておらず、親水性領域の存在についても十分な検証がなされていなかった。そこで第3節では、膜 F の親水性領域の存在をさらに明らかにするために、異なる MW の親水性薬物の膜 F を介した透過性に対する MW の影響を評価した。

親水性領域を介した透過性は拡散性、すなわち分子サイズに依存するので、本検討では MW の異なる親水性薬物として、安息香酸ナトリウム (BA)、フルオレセインナトリウム(Flu)およびカルセインナトリウム(Cal) の 3 種を透過物質として選択し、透過試験を行った。また以前のヒト皮膚の透過性データを引用し、膜 F と比較した。ヒト皮膚の透過性データは、Mitragotri が編集した透過性データ⁴³⁾の中から、皮膚の親油性領域への分配の影響が十分に小さいと予想される $\log K_{O/W} < -2.0$ である親水性の高い薬物を選択した。Tables 5 および 6 に薬物の MW、膜 F を介した $P(P_{mem. F})$ およびヒト皮膚を介した $P(P_{hum.})$ をそれぞれ示す。

Table 5 MW and permeability of drugs used

Drug	MW	Log MW	$P_{mem. F}$ ($\times 10^{-8}$ cm/s)	Log $P_{mem. F}$ (cm/s)
BA	144.1	2.16	22.9 \pm 8.06	-6.64
Flu	376.3	2.58	7.17 \pm 2.67	-7.14
Cal	622.5	2.79	1.54 \pm 0.393	-7.81

$P_{mem. F}$ values represent the mean \pm S.D., n = 3-4.

Table 6 MW and permeability of drugs cited

Drug	MW	Log MW	$P_{hum.}$ ($\times 10^{-9}$ cm/s)*	Log $P_{hum.}$ (cm/s)*
Urea	60	1.78	41.7	-7.38
Mannitol	182	2.26	11.4	-7.94
Mannitol	182	2.26	13.9	-7.86
Atropine	289	2.46	2.39	-8.62
Sucrose	342	2.53	1.44	-8.84
Sucrose	342	2.53	5.83	-8.23
Raffinose	504	2.70	4.17	-8.38
Ouabain	584	2.77	0.217	-9.66

*Data of $P_{hum.}$ were obtained from reference 43).

薬物の MW の増大に伴い、 $P_{mem. F}$ は 22.9×10^{-8} から 1.54×10^{-8} cm/s まで減少し、また $P_{hum.}$ も 41.7×10^{-9} から 0.217×10^{-9} cm/s まで概して減少する傾向にあった (Tables 5 and 6)。Log $P_{mem. F}$ および log $P_{hum.}$ と log MW の関係を、Fig. 9 に示す。膜 F およびヒト皮膚における回帰直線の傾きは、それぞれ -1.761 および -1.862 であり、ほぼ等しかったが、その切片は、 -2.780 および -3.874 であり、およそ 1.1 の差があった。両対数グラフにおける 2 種の回帰直線の切片の差がおよそ 1.1 であったことから、回帰直線の傾きが等しいと仮定すると膜 F を介した同じ MW の親水性薬物の透過性は、ヒト皮膚よりも約 12.6 倍高いことになる。また 2 種の回帰直線の傾きがほぼ等しかったことは、膜 F を介した親水性薬物の透過性に対する MW の影響がヒト皮膚のそれと類似していることを示しており、異なる MW (144 ~ 623) の親水性薬物に対して膜 F はヒト皮膚の代替物として利用できると考えられた。本検討により膜 F の親水性領域の存在がさらに明らかとなった。

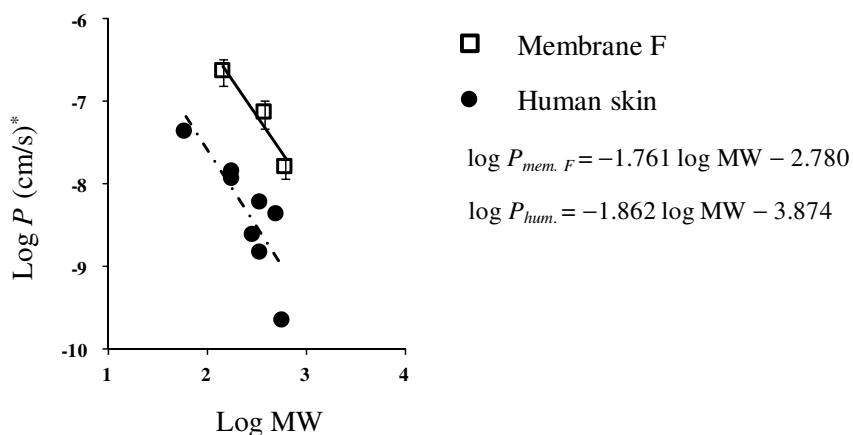


Fig. 9 Relationships between log MW of drugs and log P through membrane F and human skin

Each symbol represents the mean \pm S.D., $n = 3-4$ for $P_{mem. F}$.

*The data of human skin were obtained from reference 43).

第4節 PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜中の水孔性透過経路の検証

第3節では、異なる MW の親水性薬物の膜 F を介した透過性に対する MW の影響を評価し、膜 F の親水性領域の存在がさらに明らかになった。膜 F において親水性領域が部分的に局在していれば、その領域は水孔性透過経路として振る舞うと考えられる。そこで、膜 F 中の親水性領域が細孔理論に従う水孔性経路を形成しているとみなせるかを検討するために、第3節で評価された親水性薬物の膜 F を介した透過性に対して、様々な膜の水孔性透過経路の解析⁴⁴⁻⁴⁹⁾に用いられる Renkin 式⁵⁰⁾を適用し解析した。また第3節で引用したヒト皮膚の透過性データに対しても Renkin 式⁵⁰⁾を適用して親水性領域の特徴を検討し、膜 F と比較した。

Renkin 式⁵⁰⁾は、水で満たされた正円筒形の細孔を小さい非電解性の粒子が拡散で通るという非常に単純なケースでの透過性を表現することのできる式であり、この式では、粒子が細孔の入口に入る確率および細孔内を粒子が通るときに起こる粒子と壁との摩擦の二つの効果が考慮されている⁵¹⁾。式(2)に Renkin 式⁵⁰⁾を示す。

$$P_i = D_i \frac{A}{L} \left[1 - \left(\frac{r_i}{r_p} \right) \right]^2 \left[1 - 2.104 \left(\frac{r_i}{r_p} \right) + 2.09 \left(\frac{r_i}{r_p} \right)^3 - 0.95 \left(\frac{r_i}{r_p} \right)^5 \right] \quad (2)$$

ここで、 P_i 、 D_i 、 r_i 、 r_p および A/L は、それぞれ透過物質(i)の透過係数、拡散係数、分子半径、膜細孔半径および細孔占有率/長さ比である。Renkin 式を用いる上で D_i および r_i を求める必要があるため、Chromatographic Broadening Method (CBM)⁵²⁾により D_i を求め、その D_i を Stokes-Einstein の関係式に代入し r_i を算出した。

CBM において D_i は式(3)で表される。

$$D_i = \frac{0.231 \times (r_i)^2 \times t_R}{(W_{1/2})^2} \quad (3)$$

ここで、 r_i 、 t_R および $W_{1/2}$ は、それぞれキャピラリーチューブの半径、保持時間および半値幅である。

また Stokes-Einstein の関係式は式(4)で表される。

$$D_i = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_i} \quad (4)$$

ここで、 k 、 T および η は、それぞれボルツマン定数、絶対温度および媒体の粘性である。

薬物の MW と D_i の関係を、以前の他の薬物を用いて得られた回帰直線⁵²⁾と合わせて Fig. 10 に示した。本検討で得られた回帰直線(実線)は、以前の報告された式による回帰直線(点線)とよく一致したことから、本検討で得られた D_i は、MW に対して妥当な値であることが示唆された。

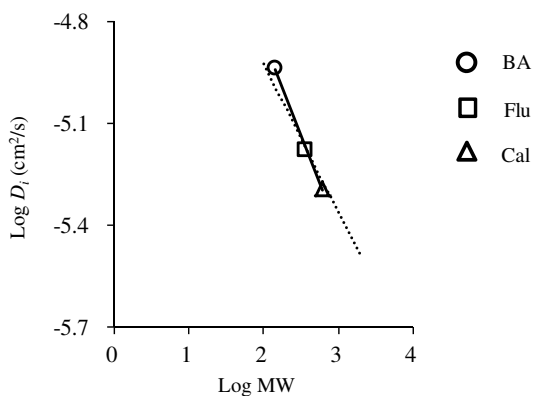


Fig. 10 Relationships between log MW and log D_i determined by the CBM of drugs

The solid line is from present study and shown ; $\log D_i = -0.557 \log MW - 3.740$

The dotted line is shown ; $\log D_i = -0.434 \log MW - 4.059$ ⁵²⁾

第3節で引用した親水性薬物におけるヒト皮膚の透過性データに対しても、Renkin 式を適用することで細孔パラメータが算出できるかを検討するため、薬物の D_i を Seki らが報告した MW と D_i の関係を表した式(5)⁵²⁾を用いて算出し、またその D_i から上記と同様に r_i を算出した。

$$\log D_i = -0.434 \log MW - 4.059 \quad (5)$$

Tables 7 および 8 に薬物の MW、 D_i 、 r_i 、 $P_{mem. F}$ および $P_{hum.}$ をそれぞれまとめた。

Table 7 Diffusion parameters of drugs used and permeability through membrane F

Drug	MW	$D_i (\times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s})$	r_i (nm)	$P_{mem. F} (\times 10^{-8} \text{cm/s})$
BA	144.1	11.47 ± 0.18	0.285	22.9 ± 8.06
Flu	376.3	6.58 ± 0.012	0.496	7.17 ± 2.67
Cal	622.5	5.10 ± 0.012	0.640	1.54 ± 0.393

The values of D_i and $P_{mem. F}$ represent the mean \pm S.D., $n = 11$ for D_i and $n = 3-4$ for $P_{mem. F}$.

Table 8 Diffusion parameters of drugs cited and permeability through human skin

Drug	MW	$D_i (\times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s})^a$	r_i (nm) ^b	$P_{hum.} (\times 10^{-9} \text{cm/s})^c$
Urea	60	14.8	0.221	41.7
Mannitol	182	9.12	0.358	11.4
Mannitol	182	9.12	0.358	13.9
Atropine	289	7.46	0.437	2.39
Sucrose	342	6.94	0.470	1.44
Sucrose	342	6.94	0.470	5.83
Raffinose	504	5.86	0.557	4.17
Ouabain	584	5.50	0.593	0.217

a : Calculated D_i in water using the equation ; $\log D_i = -0.434 \log MW - 4.059$ ⁵²⁾

b : The values of r_i were calculated by the Stokes-Einstein equation with the calculated D_i .

c : Data of $P_{hum.}$ were obtained from reference 43).

膜 F に対して用いた 3 種の透過物質のうち、BA と Cal における D_i 、 r_i および $P_{mem. F}$ から、膜 F の細孔パラメータ、 r_p および A/L を算出し、またヒト皮膚に対しては、尿素および MT の D_i 、 r_i および $P_{hum.}$ から、 r_p および A/L を算出した。Table 9 に、膜 F およびヒト皮膚において算出された各細孔パラメータをまとめて示す。

Table 9 Pore parameters of membrane F and human skin

Membrane	Combination	r_p (nm)	A/L ($\times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$)
Membrane F	BA/Cal	1.335	56.3
Human skin	Urea/Mannitol	1.060	7.77
Ratio (mem. F/hum.)		1.26	7.25

mem. F : membrane F, hum.: human skin

ヒト皮膚と膜 F の細孔パラメータの差異を考察するために、ヒト皮膚の r_p および A/L に対する膜 F のそれらの比を算出したところ、それぞれ 1.26 および 7.25 であった (Table 9)。これは、膜 F に存在する親水性経路の細孔半径とヒト皮膚に存在する親水性経路の細孔半径がおおよそ類似していることを示唆している。一方、膜 F の親水性経路の長さに対する細孔占有率は、ヒト皮膚のおよそ 7 倍であり、これが Fig. 9 で示された親水性薬物の透過性の差として反映されていると推測された。

これら算出された細孔パラメータの結果の妥当性を確認するために、膜 F およびヒト皮膚の r_p および A/L をもとに D_i と $P_{mem. F}$ および $P_{hum.}$ の関係をシミュレートした (Figs. 11 and 12)。膜 F を介した Flu の $P_{mem. F}$ は、BA/Cal から得た曲線近傍にプロットされた。Flu の $P_{mem. F}$ の計算値と実測値を比較したところ、それぞれ $4.89 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$ および $7.17 \times 10^{-8} \pm 2.67 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$ であり、有意な差はなかった ($p > 0.05$, 1 サンプル t 検定)。

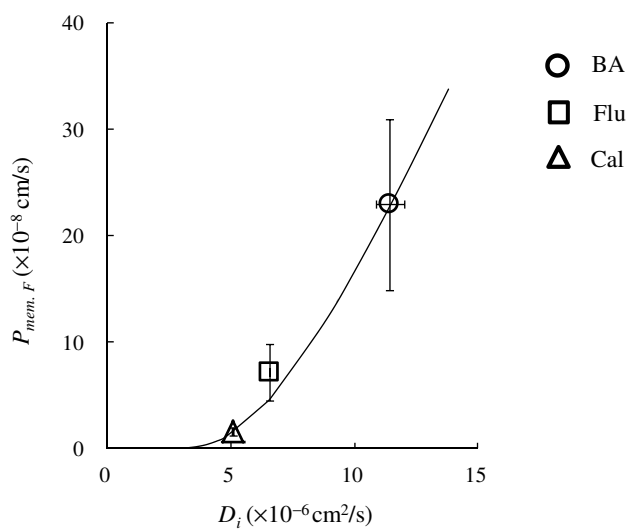


Fig. 11 The relationship between D_i and P through the membrane F
 Each symbol represents the mean \pm S.D., $n = 3-4$ for $P_{mem.F}$ and 11 for D_i .

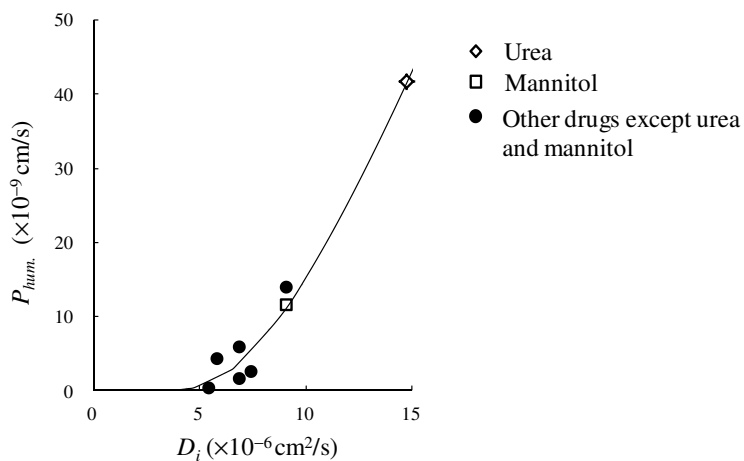


Fig. 12 The relationship between D_i and P through human skin
 The plotted data of $P_{hum.}$ were obtained from reference 43).

またヒト皮膚においても、当てはめに用いなかった他の薬物の実測値がシミュレーションカーブ付近にプロットされた(Fig. 12)。ヒト皮膚を介した $\log P$ の計算値と実測値における回帰直線は、 $r = 0.8628, p < 0.05$ となり、有意な相関性が示された(Fig. 13)。

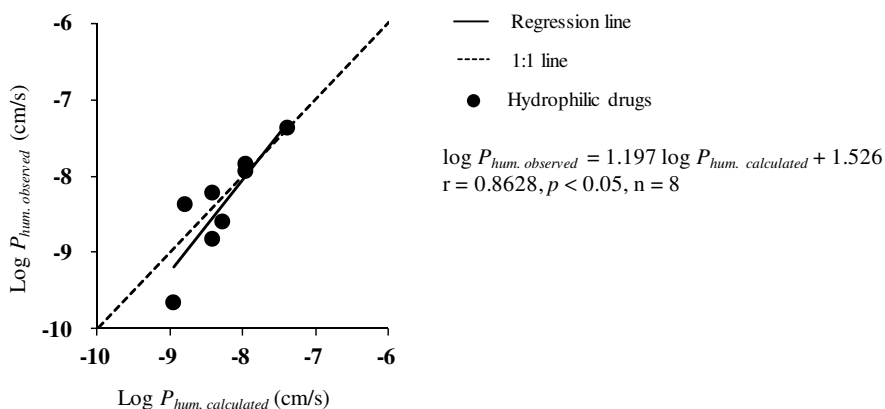


Fig. 13 The relationship between calculated $\log P_{hum.}$ and observed $\log P_{hum.}$.
 The plotted data of observed $P_{hum.}$ were obtained from reference 43).

生体皮膚の r_p に関して、Aguilella らはヒト皮膚の r_p を約 20 nm と見積もり⁵³⁾、Itoh らはブタ皮膚の r_p を 0.59 nm と算出した⁵⁴⁾。Ruddy および Hadzija は、ヘアレスラット皮膚の r_p を 1.8 nm と推測した⁵⁵⁾。本研究で算出したヒト皮膚の r_p は、これら報告された値の範囲内であった。これらのことから、本検討において Renkin 式を適用して算出された膜 F およびヒト皮膚の細孔パラメータは、ともに妥当な値であると推測された。

水孔性経路を特徴づけることのできる Renkin 式による透過性評価が妥当であったことから、膜 F およびヒト皮膚には Renkin 式で仮定されるような細孔理論に従う水孔性経路があると捉えることができる。すなわち、膜 F 中の親水性領域は水孔性経路として機能しており、その経路の大きさはヒト皮膚とほぼ等しく、その存在密度が約 7 倍であると考えられた。

第 5 節 小括

本章では、第 1 章で用いた親油性の高分子材料の MMA および GMA とは異なる親油性成分として PDMS ユニットを用いたが、大部分を占める PDMS 成分中におよそ 3wt% の PEG 6000 ユニットを導入した高分子 F を合成することができた。

極性の異なる親油性薬物の透過挙動から、膜 F には約 3wt% の PEG 6000 ユニットが含まれているにもかかわらず、膜 F および G には性質がほぼ同等とみなせる親油性領域が存在していることを示した。極性の異なる親水性薬物の透過挙動から、膜 F には存在比としてわずか 3wt% ほどの PEG 6000 ユニットが親水性領域を形成していることを示した。これらの考察から膜 F には親油性領域および親水性領域が独立して存在していると考えられた。

膜 F を介した親水性薬物の透過性に対する分子量の影響は、ヒト皮膚のそれと類似していたことから、膜 F は MW の異なる親水性薬物に対してもヒト皮膚の代替物として利用できると考えられた。

Renkin 式を用いた考察から、膜 F の親水性領域は細孔理論に従う水孔性経路とみなせることを示した。さらに膜 F およびヒト皮膚の細孔パラメータを特徴づけ、算出された細孔半径を比較したことで、膜 F の水孔性経路の細孔半径がヒト皮膚のそれと類似していることを明らかにした。膜 F を介した親水性薬物の透過性に対する分子量の影響が、ヒト皮膚のそれと類似していたことは、膜 F とヒト皮膚の細孔半径が類似しているためであると考えられた。

第3章 PDMS/PEG 6000 共重合体含浸膜のヒト皮膚代替物としての評価

前章では、PDMS および PEG 6000 ユニットを有する共重合体含浸膜 F を調製し、膜 F に親油性領域および親水性領域が独立して存在していることを示した。本章では、*in vitro* 透過試験におけるヒト皮膚代替物としての有用性を検討するために、前章で評価した含浸膜を介した透過性と以前に報告されたシリコーン膜およびヒト皮膚を介した透過性を比較した(Table 10)。

Table 10 Permeability through human skin, commercial silicone membrane and the impregnated membranes

Drug	Human skin	Silicone membrane	Membrane F	Membrane G
	Log P_{hum} (cm/s) ^a	Log P_{sil} (cm/s) ^b	Log $P_{mem.F}$ (cm/s)	Log $P_{mem.G}$ (cm/s)
FP	-3.928	-3.134	-3.333	-3.435
KP	-4.967	-4.542	-3.993	-4.196
LC	-5.154	-3.693	-3.527	-3.685
ISDN	-5.213	-4.322	-3.901	-4.097
CB	-6.355	-6.126	-5.520	-6.069
AMP	-6.510	-6.717	-5.154	-5.799
DC-Na	-7.127	-7.152	-6.007	-7.109
NR	-7.295	-6.623	-5.734	-6.587
ANP	-7.733	-7.417	-5.873	-6.740
IPH	-8.021	-	-6.488	-
DPH	-7.695	-11.26	-6.717	-
L-DP	-7.662	-	-6.438	- ^c

a : Data were obtained from reference 15).

b : Data were obtained from reference 14).

c : No permeation of L-DP through membrane G was detected until 48 hr (detection limit 0.05 µg/mL), suggesting that the log P of L-DP was below -9.80 cm/s.

第1節 含浸膜 G とシリコーン膜を介した透過性の比較

親油性薬物の評価を目的とした皮膚代替物としては、すでにシリコーン膜が有用であることが知られている²¹⁻²⁵⁾。そこで皮膚代替物としての有用性を評価する上で、まず前章で調製した高分子 G 中の PDMS ユニットが、すでに利用されている市販のシリコーン膜と同様に親油性バリアとして機能するかを検討した。

膜 G と市販のシリコーン膜²³⁾の透過性の関係を Fig. 14 に示す。膜 G と市販のシリコーン膜の透過性における回帰直線の相関性は、 $r = 0.9759$ と良好であり、その傾きも 1.090 と 1.0 に近い値であった。この結果より、膜 G を介する透過挙動は、一般的なシリコーン膜とほぼ同等なものとして扱うことができると考えられた。また膜 G が親油性薬物の皮膚透過性評価に利用する代替膜として有用であることが明らかとなった。さらに膜 G を介した薬物透過性に対して、メンブランフィルターの細孔などの影響は非常に小さく、含浸させた高分子 G の物性が主に反映されていることが確認できた。このことにより、膜 F を介した透過性に対しても高分子 F の物性が反映されるものと考えられた。

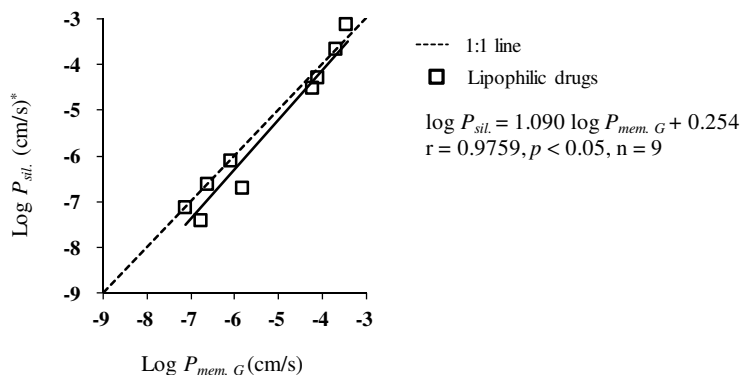


Fig. 14 The relationship between drug permeability through the membrane G and a commercial silicone membrane

* Data were obtained from reference 23).

$P_{sil.}$: $P_{silicone\ membrane}$

第2節 広範囲な物性を有する薬物の透過挙動についての含浸膜とヒト皮膚の比較

次に膜 F を介した透過挙動が、親油性から親水性の極性を有する広範囲な薬物に対してヒト皮膚と類似しているかを検討した。膜 G および F と以前に報告されたヒト皮膚¹⁵⁾を介した透過性の関係を Fig. 15 に示す。親油性薬物を対象とした膜 G とヒト皮膚の透過性に対する回帰直線は、 $r = 0.9554$ 、傾き 0.846 と良好であったが、膜 G を介した親水性薬物 L-DP の透過性が著しく低いと考えられたことから、膜 G は市販のシリコーン膜と同様に親水性薬物の透過性評価には利用できないと考えられた(Fig. 15a, Table 4)。一方、膜 F とヒト皮膚を介した透過性に対する回帰直線は、親油性から親水性薬物において $r = 0.9645$ と良好な相関性を示し、またその傾きは 1.067 であり、理想的な値である 1.0 に近かった(Fig. 15b)。

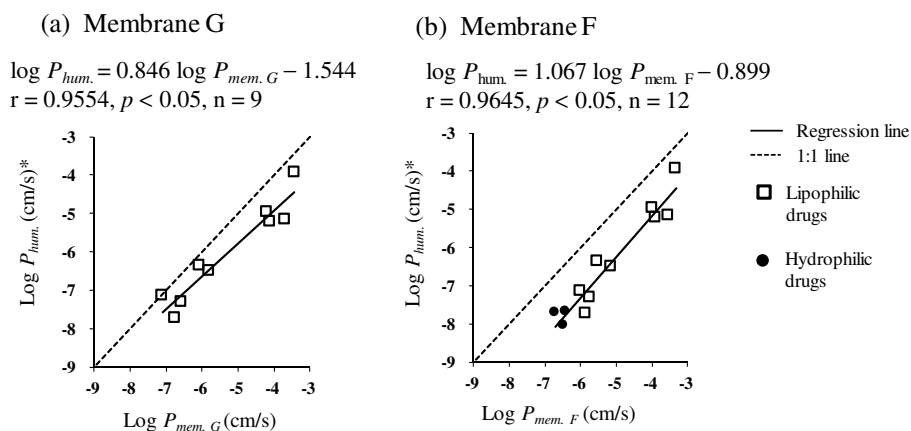


Fig. 15 Relationships between drug permeability through the impregnated membranes and human skin

*Data were obtained from reference 43).

このことは膜 F が、MW の類似した親油性から親水性の広範囲にわたる極性を有する薬物に対して、ヒト皮膚透過性の評価をする上で有用であることを示している。また膜 F とヒト皮膚における回帰直線の切片は -0.899 であり、回帰直線の傾きがほぼ 1.0 であると仮定すると、膜 F を介した透過性は、ヒト皮膚のおよそ 7.9 倍であることになる(Fig. 15b)。この結果は、第 2 章 第 3 節の膜 F を介した MW の異なる親水性薬物の透過性が、ヒト皮膚よりも約 12.6 倍高いという考察と類似しており、異なる薬物群を用いた解析においても膜 F の透過性は、ヒト皮膚よりも数倍高いことが確認された。

さらに親油性から親水性の極性を有する薬物に対する膜 F とヒト皮膚の回帰直線の傾きが 1.0 に近かったこと、および第 2 章 第 3 節の膜 F を介した親水性薬物の透過性に対する MW の影響が、ヒト皮膚と類似していたことから、膜 F は一定の MW の親油性から親水性の極性を有する薬物に対してヒト皮膚の代替物として利用でき、さらに MW の異なる(144 ~ 623) 親水性薬物に対しても利用できることが示された。

第 3 節 小括

本章では、膜 G と市販のシリコーン膜²³⁾の透過性を比較し、膜 G を介する透過挙動は、一般的なシリコーン膜とほぼ同等なものとして扱うことができることを明らかにし、また膜 G が親油性薬物の皮膚透過性評価に利用する代替膜として有用であることを示した。膜 G を介した薬物透過性に対して、含浸させた高分子 G の物性が主に反映されていることが確認でき、膜 F を介した透過性に対しても高分子 F の物性が反映されるものと考えられた。

親油性から親水性の極性を有する薬物に対する膜 F およびヒト皮膚を介した透過性を比較し、良好な相関性が得られた。この結果および第 2 章において示した膜 F とヒト皮膚を介した親水性薬物の透過性に対する MW の影響が類似していた結果から、膜 F は MW の異なる親水性薬物

および一定の MW の親油性薬物のように広範囲の薬物に対して、ヒト皮膚透過性の評価をする上で有用であることを示した。このことは、一定範囲の MW の親水性薬物に対して透過経路として機能する高分子 F 中の親水性領域が、ヒト皮膚の親水性領域とよく対応していることによると考えられる。

結論

In vitro 皮膚透過試験は、医薬品・化粧品および化学物質の皮膚透過性を評価する際に有用な試験法であり、信頼性の高い材料であるヒト皮膚を用いる前段階におけるヒト皮膚代替物としての合成人工膜が求められている。これまでヒト皮膚代替物に向けた研究が行われてきたが、それらは主に親油性薬物に対する透過性を評価するものであり、親油性のみでなく親水性薬物に対してもヒト皮膚透過性の予測できる膜に関しては、あまり研究されていない。そこで本研究では、幅広い極性を有する薬物に対して利用できる合成高分子膜の調製に向けた検討を行った。

第1章では、親油性材料である MMA や GMA と VPE-0601 を用いて合成された MMA/GMA/PEG 6000 共重合体に対して、XRD および DSC において PEG 6000 ユニット由来の回折ピークおよび吸熱ピークが観察されたこと、およびそれらのピークが観察されなかった膜 C、D および E においても親水性薬物である MT の膜を介した透過性が PEG 6000 ユニット含量に依存して増大したことから、親油性環境中に PEG 6000 ユニットが集合した親水性領域が形成されていることが示唆された。

第2章では、皮膚代替物のためのより良い高分子を模索する上で親油性材料を MMA/GMA から PDMS に変えたが、VPE-0601 を用いることで PEG 6000 ユニートを導入することが可能であった。また極性の異なる薬物の透過挙動から、PDMS/PEG 6000 共重合体含浸膜では、親油性領域の中に親水性領域が部分的に局在化していることを示した。Renkin 式を適用した解析により、膜 F 中で PEG 6000 ユニットにより形成される親水性領域が薬物透過に対して水孔性経路として機能しており、ヒト皮膚との比較からその膜 F の水孔性経路は、ヒト皮膚のそれと密度の面では異なっているものの、その大きさにおいて類似していることを示した。したがって、膜 F は、MW の異なる親水性薬物に対してヒト皮膚の代替物として利用できると考えられた。

第3章では、膜 G と市販のシリコーン膜の透過性を比較し、膜 G を

介する透過挙動が、一般的なシリコーン膜とほぼ同等なものとして扱うことができることを明らかにし、また膜 G が親油性薬物の皮膚透過性評価に利用する代替膜として有用であることを示した。さらに膜 F は、親油性から親水性の極性を有する広範囲の薬物に対しても利用可能であることを示した。

以上のことから、膜 F は医薬品、化粧品および化学物質などの性質が多岐にわたる化合物のヒト皮膚透過性を見積もる上で有用である。本研究で得られた知見は、今後の実用化に向けての重要な情報となる。

謝辞

本研究に際し、研究テーマの設定から結論に至るまで、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 病院薬剤学講座 教授 森本雍憲先生並びに同学部 薬剤学講座 教授 従二和彦先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始御指導並びに御激励を賜りました城西大学薬学部 薬品物理化学講座 教授 関俊暢先生、城西大学薬学部 病院薬剤学講座 准教授 上田秀雄先生、同講座 助手 木村聡一郎先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、有益な御意見並びに御指導を賜りました城西大学薬学部 基礎化学講座 助教 沼尻幸彦先生、株式会社アシスト 島村剛史先生に深謝の意を表します。

本研究の高分子合成に関して御協力頂きました富山大学大学院理工学研究部 教授 北野博巳先生に深謝の意を表します。

本研究の粉末 X 線回折測定に関して御指導を賜りました城西大学理学部 無機化学研究室 講師 日原五郎先生に深謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました城西大学薬学部 薬粧品動態制御学講座 教授 杉林堅次先生並びに同学部 製剤学講座 教授 夏目秀視先生に深く感謝致します。

本研究の遂行に当たりご支援、ご協力を頂きました城西大学薬学部 病院薬剤学講座 山田巧実氏並びに茅ヶ崎徳洲会総合病院 三沢宗生氏に感謝いたします。

最後に、本研究にご協力頂いた城西大学薬学部 病院薬剤学講座諸氏に厚く御礼申し上げます。

実験の部

第1章 実験の部

1. 実験材料

VPE-0601、メチルメタクリレート(MMA)およびグリシジルメタクリレート(GMA)は和光純薬工業(株)(大阪)より購入した。PEG 6000 および PMMA は、関東化学(株)(東京)から購入した。その他の溶媒および試薬は市販の特級品を用いた。MMA および GMA は、減圧蒸留し精製した。VPE-0601 は、クロロホルムを良溶媒およびヘキサンを貧溶媒として再結晶により精製した。

2. 高分子の合成法

あらかじめ精製しておいた VPE-0601 を量りとり、強化硬質全自動共栓試験管に入れ、それを攪拌子とマグネティックスターラーを用いてトルエン(30 mL)およびクロロホルム(3 ~ 11 mL)の混合溶液で溶かした。そこに MMA および GMA を加えて、さらに攪拌した。その後、酸素ラジカルの発生の原因となる酸素を除去するために①液体窒素に沈めて凍結、②試験管内の脱気、③窒素ガスの充填、④試験管内の脱気および融解の①~④の工程(凍結融解)を3回繰り返した。水浴を 80°C に設定し、攪拌しながら重合を開始した。24 時間後、反応液を高分子 D および E に対しては貧溶媒であるメタノールに、あるいは高分子 A、B および C に対してはヘキサンに投じ、結晶化させて沈殿物を吸引ろ過し採取した。一晩デシケーター内で減圧して乾燥させ、使用するまで常圧のデシケーター内で保管した。

3. 合成高分子の分子量測定

ゲル濾過クロマトグラフィー(GPC)により数平均分子量(M_n)および質量平均分子量(M_w)を測定し、得られた分子量から多分散度(M_w/M_n)を算出した。GPC には以下のシステム[クロマトグラムデータ処理装置 : Chromatocorder 21 (システム・インスツルメンツ(株), 東京), 検出器: RI-101

(昭和電工(株), 東京), カラム : K-804L (昭和電工(株)), ポンプ : LC-9A ((株)島津製作所, 京都), カラムオーブン : U-620 (スガイケミー(株), 和歌山, 日本), 脱気装置 : ERC-3115 α (昭和電工(株))]を用いた。カラム温度は 40°C、流速は 0.5 mL/min に設定し、移動相にはクロロホルムを用いた。MW のスタンダードとして分子量分布の狭いポリスチレン (昭和電工(株))を用いた。

4. 合成高分子膜の調製法

合成した高分子を 0.1 g/mL のクロロホルム溶液となるように調製し、室温、13400 rpm で 5 分間遠心分離した。ガラス板上にポリエチレンテレフタレート(PET)フィルム(NF SP-PET 751031, リンテック(株), 東京)を敷き、その上に上澄み液約 800 μ L を垂らして casting 法によって約 10 μ m の厚さに製膜した。室温で 1 時間乾燥した後、さらに 100°C で 1 時間乾燥した。乾燥した膜は、使用するまでデシケーター内で保存した。

5. $^1\text{H-NMR}$ 測定

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、合成高分子の組成を算出するために用いた。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、室温にて NMR spectrometer (JNM-ECA600, 日本電子(株), 東京)によって測定した。溶媒として CDCl_3 (ISOTEC, Inc., Miamis-burg, OH, USA; 99.96% D)を用い、サンプル濃度は 4.0 mg/mL とした。

6. 合成高分子の組成の計算

Table 11 は、MMA、GMA、VPE-0601 および合成高分子の帰属された主な官能基の化学シフト値および文献値を示している。Figure 16 は、合成反応スキームおよび Table 11 と対応する官能基のシンボルを示している。合成に用いたそれぞれの原料の化学シフト値は、文献値^{29, 56-61)}と類似しており、帰属された官能基に対する化学シフトは妥当であることを確認した。合成高分子を構成するユニットのモル比を各々の化学シフト値におけるシグナル強度比と帰属された官能基の ^1H の数により求めた。

ここで VPE-0601 は、平均分子量 6 kDa のエチレンオキサイド (-CH₂-CH₂-O-) の繰り返しユニットをいくつか含むため、PEG 6000 のユニットを含有しているとみなすことができ、PEG 6000 ユニットとして換算した。合成高分子の各ユニットのモル比の計算に対して以下の化学シフト値 [δ 0.8 ~ 1.4 (シンボル; j, k), δ 2.7, 2.9 (シンボル; d), δ 3.2 ~ 3.3 (シンボル; e) および δ 3.4 ~ 3.8 (シンボル; l, i)] (Table 11 and Fig. 16) を選択した。モル比として算出された値に MMA (100 Da)、GMA (142 Da) および PEG 6000 (6 kDa) の分子量を乗じ、高分子を構成するユニットの質量比とした (Table 1)。

Table 11 Assignment of resonance signals of ¹H NMR spectra recorded

	Chemical shift (δ), ppm	Symbol	Literature data	References
			Chemical shift (δ), ppm	
MMA	1.95	a	1.97	56)
	3.74	b	3.67	56)
	5.55, 6.10	c	5.45 ~ 5.72, 6.14 ~ 6.30	56-57)
GMA	1.97	a	1.9	56)
	2.66, 2.85	d	2.6 ~ 2.7, 2.8 ~ 2.9	29, 58)
	3.25	e	3.24	29, 58)
	4.0, 4.4 ~ 4.5	f	3.9, 4.3 ~ 4.5	29, 58)
VPE-0601	5.60, 6.16	c	5.45 ~ 5.72, 6.14 ~ 6.30	56-57)
	1.6 ~ 1.9	g	1.6, 1.62 ~ 1.67	59-60)
	2.2 ~ 2.7	h	2.45, 2.33 ~ 2.68	59-60)
PMMA	3.4 ~ 3.8	i	3.58, 3.6	56, 60)
	0.81 ~ 0.86, 1.00, 1.19 ~ 1.23, 1.54 ~ 1.59	j	0.91, 1.05, 1.22, 1.5	57, 61)
	1.79 ~ 1.93	k	1.5, 1.9	29, 57)
PEG 6000	3.58	l	3.6	29, 57)
	3.47 ~ 3.77	i	3.6	60)
Polymers synthesized	0.8, 1.0, 1.2, 1.4	j, k	-	-
	2.7, 2.9	d	-	-
	3.2 ~ 3.3	e	-	-
	3.4 ~ 3.8	l, i	-	-

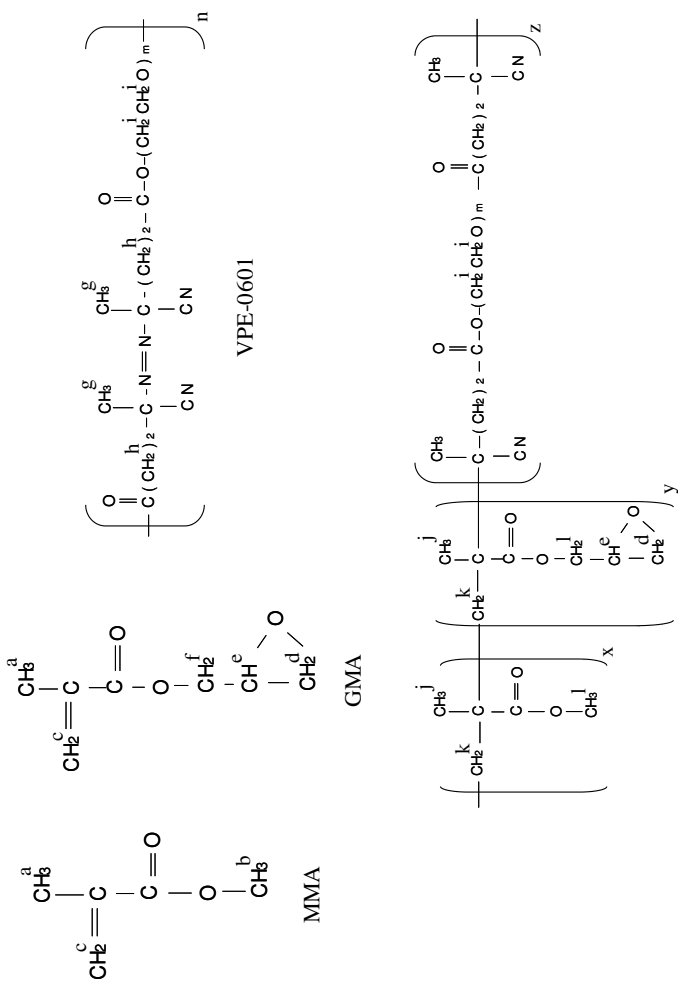


Fig. 16 Chemical structures of the monomers, the initiator and the prepared polymers

Superscript symbols represent functional group whose chemical shifts are shown in Table 11.

7. 粉末 X 線回折(XRD)

粉末および膜試料を試料板に置いて、試料板を室温にて回転させながら、反射法により X 線プロファイルを X 線回折装置(RINT2000 縦型ゴニオメータ, (株)リガク, 東京)を用いて以下の条件にて測定した(X 線源 : CuK α , 出力 : 40 kV, 20 mA, 検出器 : シンチレーションカウンタ, 走査範囲 : 5 ~ 50°, ステップ幅 : 0.02°)。

8. 示差走査熱量測定(DSC)

示差走査熱量計(DSC8230, (株)リガク)を用いて以下の条件で測定した(測定温度範囲 : 室温 ~ 130°C, 昇温速度 : 2°C/min、測定雰囲気 : 大気雰囲気, サンプル容器 : アルミニウムパン)。

第 2 章 実験の部

試薬

1. 実験材料

ポリ(ポリオキシエチレン-アゾビスシアノペンタノエイト) (VPE-0601)、2, 2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル) (AMBN)、アミノピリン(AMP)、アンチピリン(ANP)、ケトプロフェン(KP)および PEG 400 は、和光純薬工業(株)より購入した。シクロバルビタール(CB)、ジクロフェナクナトリウム(DC-Na)、塩酸イソプロテレノール(IPH)、リドカイン(LC)およびカルセインナトリウム(Cal)は、東京化成工業(株) (東京)から購入した。塩酸ドパミン(DPH)は、淀川製薬(株) (大阪)から調達した。二硝酸イソソルビド(ISDN)およびフルルビプロフェン(FP)は、東光薬品工業(株)から、ニコランジル(NR)は、日清製粉(株) (東京)から分与された。L-ドーパ(L-DP)、安息香酸ナトリウム(BA)およびフルオレセインナトリウム(Flu)は、シグマ アルドリッチ ジャパン(株) (東京)から購入した。マクロマーとして用いた α -ブチル- ω -(3-メタクリロキシプロピル)ポリジメチルシロキサン(SILAPLANE; FM-0711)は、チッソ(株) (東京)より供与された。その他の溶媒および試薬

は、市販の特級品を用いた。VPE-0601 は、第 1 章と同様に精製した。FM-0711 および AMBN は精製せずに用いた。

2. 高分子の合成法

VPE-0601 または AMBN を量りとり、強化硬質全自動共栓試験管に入れ、それを攪拌子とマグネティックスターラーを用いてクロロホルム(30 mL)で溶かした。さらに、FM-0711 を加え攪拌した。その後、酸素ラジカルの発生の原因となる酸素を除去するために①液体窒素に沈めて凍結、②試験管内の脱気、③窒素ガスの充填、④試験管内の脱気および融解の①～④の工程(凍結融解)を 3 回繰り返した。水浴を 65°C に設定し、攪拌しながら 24 時間重合反応を行った。強化硬質全自動共栓試験管から三方活栓を外した後、さらに 65°C、24 時間加熱することで溶媒を蒸発させて除去した。精製するために反応溶液と 20 mL の貧溶媒を混合させ、室温で 1 時間攪拌させた。高分子 F および G に対する貧溶媒として、それぞれメタノール/精製水の混合液(70:30)およびエタノールを用いた。攪拌後、室温で 1 時間静置し、2 層に分かれた溶液の上層を、パスツールピペットを用いて慎重に除去した。さらに高分子 G に対しては、未反応の FM-0711 を除去するため、2 番目の貧溶媒としてエタノール/クロロホルム(80:20)の混液(20 mL)を用いて、上記と同様の操作を行った。その後、上層が除去された反応溶液の下層を 100°C、48 時間乾燥させ残存する溶媒を除去した。

3. 合成高分子の分子量測定

第 1 章と同様に行った。

4. $^1\text{H-NMR}$ 測定

第 1 章と同様に行った。

5. 合成高分子の組成の計算

Table 12 は FM-0711、VPE-0601 および合成高分子の帰属された主な官

能基の化学シフト値および文献値を示している。Figure 17 は、合成反応スキームおよび Table 12 と対応する官能基のシンボルを示している。合成に用いたそれぞれの原料の化学シフト値は、文献値^{56-57, 59, 61-62)}と類似しており、帰属された官能基に対する化学シフトは妥当であることを確認した。合成高分子を構成するユニットのモル比を各々の化学シフト値におけるシグナル強度比と帰属された官能基の¹Hの数により求めた。合成高分子 F の各ユニットのモル比の計算に対して以下の化学シフト値 [δ -0.1 ~ 0.2 (シンボル; o), δ 3.60 ~ 3.65 (シンボル; t)] (Table 12 and Fig. 17) を選択した。VPE-0601 および FM-0711 は、それぞれ PEG 6000 ユニットおよび PDMS ユニットに換算した。モル比として算出された値に PDMS ユニット(724 Da)、および PEG 6000 (6 kDa)の分子量を乗じ、高分子を構成するユニットの質量比とした(Table 2)。また高分子 G は、用いた開始剤に PEG 6000 ユニットが含有されていないため、主に PDMS ユニットから構成されると仮定した。

Table 12 Assignment of resonance signals of ¹H NMR spectra recorded

	Chemical shifts (δ), ppm	Symbol	Literature data chemical shift (δ), ppm	References
FM-0711	-0.1 ~ 0.2	o	0.072, 0.0 ~ 0.5	61-62)
	1.90 ~ 1.95	p	1.97	57)
	5.5, 6.1	q	5.45 ~ 5.72, 6.14 ~ 6.30	56)
VPE-0601	1.6 ~ 1.7	r	1.6, 1.62 ~ 1.67	59, 61)
	2.3 ~ 2.7	s	2.45, 2.33 ~ 2.68	59, 61)
	3.2 ~ 4.0	t	3.58, 3.6	57)
AMBN	0.98 ~ 1.04	u	-	-
	1.66 ~ 1.68	v	-	-
	2.0 ~ 2.2	w	-	-
Polymer F	-0.1 ~ 0.2	o	-	-
	3.60 ~ 3.65	t	-	-
Polymer G	-0.1 ~ 0.2	o	-	-

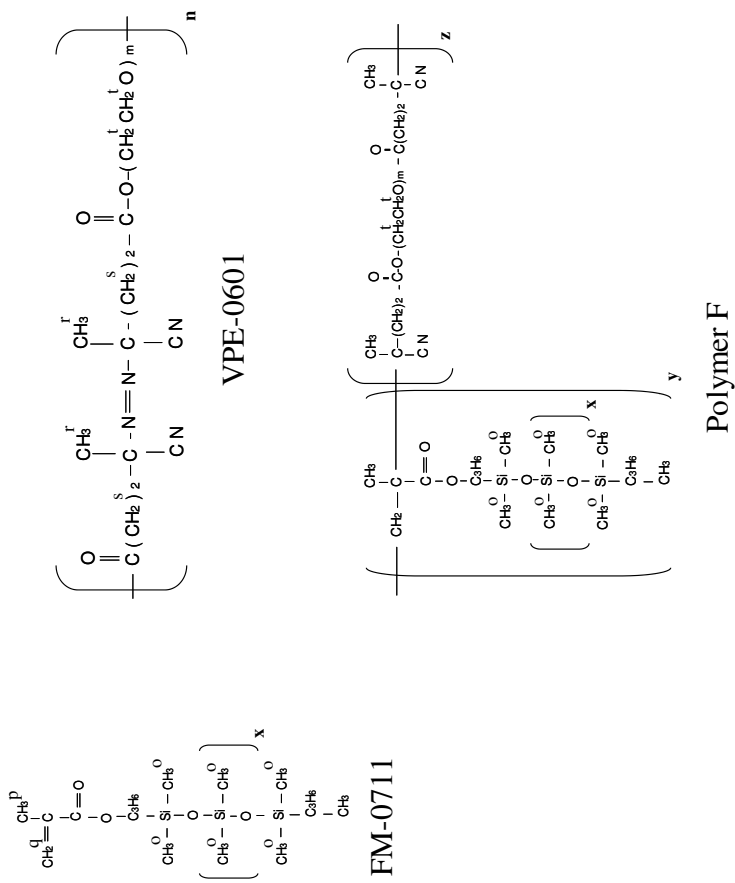
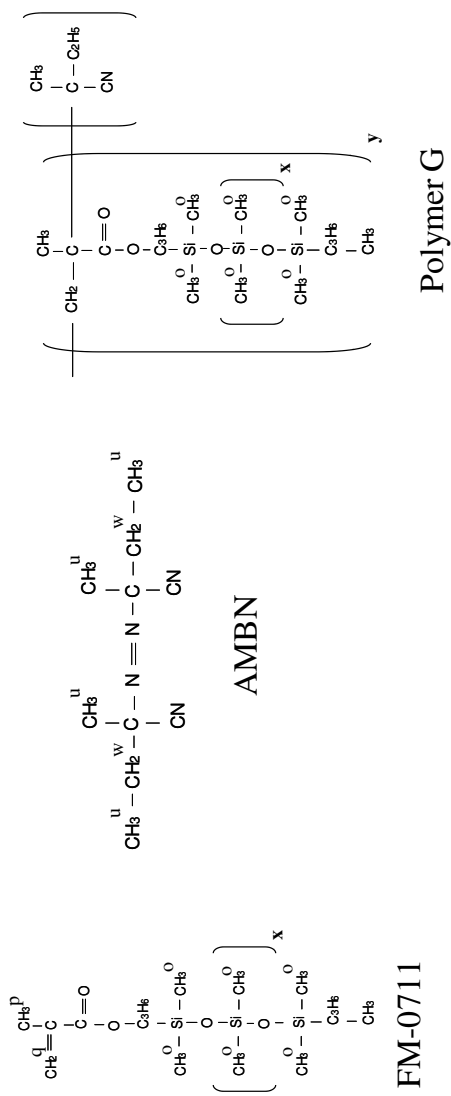


Fig. 17a Chemical structures of the macromer, the initiator and the prepared polymer
 Superscript symbols represent functional group whose chemical shifts are shown in Table 12.



Polymer G

Fig. 17b Chemical structures of the macromer, the initiator and the prepared polymer
Superscript symbols represent functional group whose chemical shifts are shown in Table 12.

6. 合成高分子含浸膜の調製法

合成した高分子を、クロロホルムを溶媒として 100 mg/mL の溶液となるように調製し、室温下でガラス板上の PET フィルムの上に合成高分子溶液 200 μ L を垂らして、その後すぐに、その合成高分子溶液の上から親水性テフロン製メンブランフィルター(Omnipore JH, 孔径; 0.45 μ m, 直径; 25 mm, 日本ミリポア(株), 東京)を被せて含浸させた。その後、室温で 1 時間乾燥させ、さらに 100°C で 24 時間乾燥させた。乾燥した膜は、使用するまで室温で保存した。

7. *In vitro* 透過試験

~極性の異なる 12 種の薬物を対象として行った透過試験~

調製された含浸膜を横型拡散セル(有効拡散面積 : 0.95 cm^2)⁶³⁾に挟み込んで、固定バネを用いてセルに固定した。ドナー側は、熱力学的活量を最大に保つために、精製水を溶媒として過剰な薬物を含有させた 2.6 mL の飽和水溶液で満たした。ただし、ANP、IPH および DPH に対しては、100 mg/mL の水溶液をドナー液として用いた。レシーバー側は、2.6 mL の精製水で満たした。ただし FP および KP の場合は、それらの水に対する溶解度が非常に低くシンク条件を保つことが難しかったため、それらの溶解度を高めてシンク条件を保ちやすくするために 40% PEG 400 水溶液をレシーバー液として用いた⁶⁴⁾。ドナーおよびレシーバー相をマグネティックスターラーで攪拌し、拡散セルのウォータージャケットを循環式の温浴によって 37°C に保った。経時的にレシーバー側から適切な量のレシーバー液をサンプリングし、レシーバー側の水溶液の体積を一定に保つために、直ちにサンプリングした分と同量の精製水または 40% PEG 400 水溶液をレシーバー側に加えた。レシーバー液中の薬物濃度を測定し、各サンプリングポイントにおける累積透過量を算出した。時間に対する累積透過量曲線の直線部分から、単位面積当たりの定常状態透過速度(J)を算出した。薬物懸濁液の飽和溶解度または規定した薬物濃度(100 mg/mL)で J を除すことにより、みかけの透過係数(P)を算出した。シンク条件は、レシーバー相の薬物濃度がドナー相の 10%以下であ

ることにより確認した。

8. *In vitro* 透過試験

~MW の異なる 3 種の親水性薬物を対象として行った透過試験~

含浸膜の扱いやサンプリング方法は前述と同様に行った。ドナー側は、Flu および Cal に対しては、1 mg/mL の Flu または Cal のリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4)溶液 2.6 mL で満たした。レシーバー側には、PBS を 2.6 mL 加えて満たした。BA の場合は水溶液中のイオン形分率をより高くするために、ドナー側を 100 mg/mL の BA のホウ砂リン酸緩衝液 (pH 8.5) 2.6 mL で満たし、レシーバー側をホウ砂リン酸緩衝液 2.6 mL で満たした。

9. *In vitro* 透過試験の定量

レシーバー側の薬物濃度は、紫外可視分光光度法または蛍光分光光度法によりマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2^e, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) または高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて測定した。マイクロプレートリーダーにおいて、精製水、40% PEG 400 水溶液、PBS またはホウ砂リン酸緩衝液を溶媒とする 200 μ L のサンプル溶液を、96 穴 UV 透過マイクロプレート(BD Falcon, NJ, USA)またはプラスチックマイクロプレート(AGCテクノグラス(株), 東京)に入れて、Table 13 に示す検出波長にて測定した。L-DP に対してのみ、より高い感度で検出するために、以下に示す HPLC システム[システムコントローラー : SCL-10A ((株)島津製作所), ポン

Table 13 Detection wavelengths for drugs

Drug	Wavelengths (nm)
FP	UV 245
KP	UV 254
LC	UV 245
ISDN	UV 220
CB	UV 205
AMP	UV 254
DC-Na	UV 286
NR	UV 254
ANP	UV 245
IPH	UV 280
DPH	UV 280
L-DP	UV 280
BA	UV 230
Flu	Em. 488 Ex. 515
Cal	Em. 488 Ex. 515

プ : LC-10AS ((株)島津製作所), UV 検出器 : SPD-10A ((株)島津製作所), カラムオープン : CTO-10A ((株)島津製作所), カラム : Inertsil C18 (4.6×250 mm, 5 μm, ジーエルサイエンス(株), 東京), オートインジェクター : SIL-10A_{XL} ((株)島津製作所), クロマトパック : C-R5A ((株)島津製作所)]を用いて絶対検量線法により測定した。UV 検出波長は 280 nm、カラム温度は 40°C および流速は 1.0 mL/min に設定し、移動相にはイオンペア試薬としてドデシル硫酸ナトリウムを含むアセトニトリル:0.1% リン酸=35:65 を用いた。

10. 拡散係数測定装置

拡散係数の測定には、HPLC 用の以下に示すシステム[システムコントローラー : SCL-10A, ポンプ : LC-10AS, 検出器 : SPD-10A_{VP} ((株)島津製作所), RF-10A_{XL} ((株)島津製作所), カラムオープン : CTO-10A, オートインジェクター : SIL-10A_{XL}, クロマトパック : C-R5A]を用いて測定した。カラムの代わりに長さ 10 m、内径 0.0375 cm (カタログデータ, PEEK 製, ジーエルサイエンス(株))のチューブを接続し、チューブはコイル状にして 37°C のカラムオープン中に設置した。移動相には、1/30 M リン酸緩衝液 (pH 7.4)を用い、試料溶液 10 μL を注入した。検出波長は、BA に対しては 230 nm、Flu および Cal に対しては励起波長 488 nm、蛍光波長 515 nm を用いた。カラム温度は 40°C、流速は 0.1 mL/min に設定した。

11. 拡散係数の計算方法

検出器からの電気信号をインテグレーターにより解析することによって保持時間(t_R)、ピーク面積($\mu V \cdot s$)、ピーク高さ(μV)の値を得た。ピーク面積をピーク高さで除した値を半値幅($W_{1/2}$)として、 t_R および $W_{1/2}$ の単位を秒になおし、以下の式(3)を用いて拡散係数(D_i)を求めた。

$$D_i = \frac{0.231 \times (r_i)^2 \times t_R}{(W_{1/2})^2} \quad (3)$$

12. 統計処理

本検討における相関性の検定には、ピアソンの相関係数の検定を用いて $p < 0.05$ のときを有意であると判定した。また、膜 F における細孔パラメータの妥当性の検証は、統計解析ソフト Excel 統計 2008 ((株) 社会情報サービス, 東京)を用いて 1 サンプル t 検定により $p < 0.05$ のときを有意であると判定した。

第 3 章 実験の部

1. 統計処理

第 2 章と同様に行った。

参考文献

- 1) Walters A. K., "Dermatological and Transdermal Formulations", Marcel Dekker, Inc., New York (2002).
- 2) OECD, "Test Guideline 428: Skin Absorption: In vitro Methods", OECD, Paris (2004).
- 3) Russell W. M. S., *Altern. Lab. Anim.*, **23**, 298-304 (1995).
- 4) European Commission, Directive 2003/15/EC of The European Parliament and of the Council of 27 February 2003, amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products. Official J. Eur. Union, L 66, 26 (2003).
- 5) Schäfer-Korting M., Bock U., Diembeck W., Düsing H. J., Gamer A., Haltner-Ukomadu E., Hoffmann C., Kaca M., Kamp H., Kersen S., Kietzmann M., Korting H. C., Krächter H. U., Lehr C. M., Liebsch M., Mehling A., Müller-Goymann C., Netzlaff F., Niedorf F., Rübhelke M. K., Schäfer U., Schmidt E., Schreiber S., Spielmann H., Vuia A., Weimer M., *Altern. Lab. Anim.*, **36**, 161-187 (2008).
- 6) Schäfer-Korting M., Bock U., Gamer A., Haberland A., Haltner-Ukomadu E., Kaca M., Kamp H., Kietzmann M., Korting H. C., Krächter H. U., Lehr C. M., Liebsch M., Mehling A., Netzlaff F., Niedorf F., Rübhelke M. K., Schäfer U., Schmidt E., Schreiber S., Schröder K. R., Spielmann H., Vuia A., *Altern. Lab. Anim.*, **34**, 283-294 (2006).
- 7) Watanabe T., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Sugibayashi K., *Altern. Animal Test. Experiment*, **8**, 1-14 (2001).
- 8) Garrett E. R., Chemburkar P. B., *J. Pharm. Sci.*, **57**, 944-948 (1968).
- 9) Barry B. W., Brace A. R., *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**, 397-400 (1977).
- 10) Barry B. W., El Eini D. I., *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**, 219-227 (1976).
- 11) Ottaviani G., Martel S., Carrupt P. A., *J. Med. Chem.*, **49**, 3948-3954 (2006).
- 12) 鈴木正, 皮膚科学, コーセー研究所, 東京 (1992).
- 13) Barry B.W., *J. Control. Rel.*, **15**, 237-248 (1991).

- 14) Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3452-3459 (1990).
- 15) Morimoto Y., Hatanaka T., Sugibayashi K., Omiya H., *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 634-639 (1992).
- 16) Hadgraft J., Ridout G., *Int. J. Pharm.*, **42**, 97-104 (1988).
- 17) Hadgraft J., Ridout G., *Int. J. Pharm.*, **39**, 149-156 (1987).
- 18) Matsuzaki K., Imaoka T., Asano M., Miyajima K., *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 575-579 (1993).
- 19) Miyajima K., Tanikawa S., Asano M., Matsuzaki K., *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 1345-1347 (1994).
- 20) de Jager M., Groenink W., Bielsa i Guivernau R., Andersson E., Angelova N., Ponc M., Bouwstra J., *Pharm Res.*, **23**, 951-960 (2006).
- 21) Geinoz S., Rey S., Boss G., Bunge A. L., Guy R. H., Carrupt P. A., Reist M., Testa B., *Pharm. Res.*, **19**, 1622-1629 (2002).
- 22) Dias M., Hadgraft J., Lane M. E., *Int. J. Pharm.*, **336**, 108-114 (2007).
- 23) Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Int. J. Pharm.*, **79**, 21-28 (1992).
- 24) Wasdo S. C., Juntunen J., Devarajan H., Sloan K. B., *Int. J. Pharm.*, **373**, 62-67 (2009).
- 25) Cronin M. T. D., Dearden J. C., Gupta R., Moss G. P., *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 143-152 (1998).
- 26) Miki R., Kimura S., Ueda H., Shimamura T., Numajiri S., Seki T., Juni K., Kitano H., Morimoto Y., *Altern. Animal Test. Experiment.*, **15**, 14-27 (2010).
- 27) 松下裕秀, 基礎化学コース高分子化学II, 丸善, 東京 (1996).
- 28) Zheng L., Wang Y. Z., Yang K. K., Wang X. L., Chen S. C., Li J., *Eur. Polym. J.*, **41**, 1243-1250 (2005).
- 29) Hussain R., Mohammad D., *Turk. J. Chem.*, **28**, 725-729 (2004).
- 30) 蒲池幹治, 改訂高分子化学入門, NTS, 東京 (2006).
- 31) 神戸博太郎, 熱分析, 講談社サイエンティフィク, 東京 (1984).
- 32) 三羽忠広, 基礎 合成樹脂の化学, 技報堂出版(株), 東京 (1975).

- 33) 高分子学会編, 高分子物性の基礎, 共立出版, 東京 (1993).
- 34) Greiner R., Schwarzl F. R., *Rheol. Acta*, **23**, 378-395 (1984).
- 35) De Coensel N., Desmet K., Górecki T., Sandra P., *J. Chromatogr. A.*, **1150**, 183-189 (2007).
- 36) Rutnakornpituk M., Ngamdee P., Phinyocheep P., *Polymer*, **46**, 9742-9752 (2005).
- 37) Potts R. O., Guy R. H., *Pharm. Res.*, **9**, 663-669 (1992).
- 38) Mitragotri S., *J. Pharm. Sci.*, **91**, 744-752 (2002).
- 39) Lian G., Chen L., Han L., *J. Pharm. Sci.*, **97**, 584-598 (2008).
- 40) Magnusson B. M., Anissimov Y. G., Cross S. E., Roberts M. S., *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 993-999 (2004).
- 41) Hayashi T., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3090-3093 (1992).
- 42) Björklund S., Engblom J., Thuresson K., Sparr E., *J. Control. Rel.*, **143**, 191-200 (2010).
- 43) Mitragotri S., *J. Control. Rel.*, **86**, 69-92 (2003).
- 44) Sugano K., Takata N., Machida M., Saitoh K., Terada K., *Int. J. Pharm.*, **241**, 241-251 (2002).
- 45) Sugano K., Nabuchi Y., Machida M., Aso Y., *Int. J. Pharm.*, **257**, 245-251 (2003).
- 46) Hosoya O., Chono S., Saso Y., Juni K., Morimoto K., Seki T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 1501-1507 (2004).
- 47) Seki T., Kiuchi T., Seto H., Kimura S., Egawa Y., Ueda H., Morimoto Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1915-1918 (2010).
- 48) Seki T., Harada S., Hosoya O., Morimoto K., Juni K., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 163-166 (2008).
- 49) Seki T., Kanbayashi H., Chono S., Tabata Y., Morimoto K., *Int. J. Pharm.*, **338**, 213-218 (2007).
- 50) Renkin E. M., *J. Gen. Physiol.*, **38**, 225-243 (1954).
- 51) Schultz S. G., "Basic principles of membrane transport", Cambridge

- University Press, Cambridge (1980). ; [鈴木泰三訳, 生体膜輸送の基礎, 東京化学同人, 東京 (1982).]
- 52) Seki T., Mochida J., Okamoto M., Hosoya O., Juni K., Morimoto K., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 734-736 (2003).
 - 53) Aguilera V., Kontturi K., Murtomaki L., Ramirez P., *J. Control. Rel.*, **32**, 249-257 (1994).
 - 54) Itoh Y., Shimazu A., Sadzuka Y., Sonobe T., Itai S., *Int. J. Pharm.*, **358**, 91-95 (2008).
 - 55) Ruddy S. B., Hadija B. W., *Drug Des. Discov.*, **8**, 207-224 (1992).
 - 56) 日本分析化学会編, 分析化学便覧, 丸善, 東京 (1991).
 - 57) Hesse M., Meier H., Zeeh B. 著, 馬場章夫, 三浦雅博 訳, 有機化学のためのスペクトル解析法 : UV, IR, NMR, MS の解説と演習, 化学同人, 京都 (2000).
 - 58) Brar A. S., Yadav A., *J. Mol. Struct.*, **602-603**, 29-39 (2002).
 - 59) Laverty J. J., Gardlund Z. G., *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **15**, 2001-2011 (1977).
 - 60) Brar A. S., Charan S., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **34**, 333-339 (1996).
 - 61) Hamurcu E. E., Baysal B. M., *J. Appl. Polym. Sci.*, **62**, 1415-1426 (1996).
 - 62) Mojsiewicz-Pieńkowska K., Jamrógiewicz Z., Łukasiak J., *Food Addit. Contam.*, **20**, 438-444 (2003).
 - 63) Okumura M., Sugibayashi K., Ogawa K., Morimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1404-1406 (1989).
 - 64) Yamaguchi Y., Usami T., Natsume H., Aoyagi T., Nagase Y., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 537-541 (1997).