

# 家兔摘出角膜および結膜を用いたイオン性および非イオン性薬物の 眼組織イオントフォレシス促進特性に関する研究

関島 秀久

## 緒論

イオントフォレシス(IP)は、電気を利用した物理的吸収促進法として知られており、皮膚および眼粘膜を含めた種々粘膜を介する薬物吸収を向上させることを目的に広く研究されている。これまでに、眼内への薬物送達を目的とした多くの眼組織 IP 研究は *in vivo* で行われており、特に角膜および結膜 IP はそれぞれ、前眼部(角膜や水晶体など)および後眼部(網膜や黄斑部など)の疾患に対する薬物吸収促進技術としての進展を期待されている。IP の利用は、ドライアイ患者を対象とした臨床研究により点眼薬に比べ薬理効果が高いことも明らかにされている。しかしながら、現在のところ、生きた角膜および結膜における IP の吸収促進特性について十分に特徴づけられていないことから、眼組織 IP は実用化に至っていない。眼内への薬物吸収促進法として眼組織 IP を実用化するためには、角膜および結膜における薬物の透過促進特性と生存性および integrity などの安全性を関連付けて眼組織 IP を特徴づける必要がある。そこで本研究の目的を、電流影響下の角膜と結膜の生存性および integrity を考慮した眼組織 IP の促進特性を *in vitro* 研究で特徴づけることとした。著者は、家兔摘出角膜および結膜を用いて眼組織 IP の薬物透過促進効果を研究し、透過促進機構を明らかにすることを試みた。

## 第一編 眼組織イオントフォレシスによる薬物透過促進効果の特徴づけ

本編では、家兔摘出角膜および結膜を介した薬物透過性に対する IP の適用電流値の影響を検討した。IP 薬物透過促進効果と角膜および結膜の状態を併行して評価するために、Ussing-type chamber を使用した。まず初めに、モデル透過物質としてイオン性薬物にリドカイン塩酸塩(LC, MW: 288.81, pKa 7.9)、および安息香酸ナトリウム塩(BA, MW: 144.11, pKa 4.21)を用いて、イオン性薬物の角膜および結膜透過に対する適用電流値の影響を評価した。膜電位差(PD)、短絡電流(Isc)および経上皮電気抵抗値(TEER)を組織生存性および integrity の指標として測定した。その結果、LC および BA の角膜および結膜透過は電流適用中に増大し、その増大は電流値に依存した。また、その透過促進効果は PD に依存しており、electrorepulsion 駆動によるものであると考えられた。角膜では  $2.0 \text{ mA/cm}^2$ 、結膜では 10 (上皮側を陽極) または  $5.0$  (上皮側を陰極)  $\text{mA/cm}^2$  までの電流値の範囲において、適用終了後に TEER は回復した。さらには PD や Isc もまた TEER の回復に従い概ね回復した。このことは、眼組織 IP が経皮 IP 薬物送達で許容される電流値( $\sim 0.5 \text{ mA/cm}^2$ )より高い電流値であっても安全に適用可能であることが明らかとなった。対して、非イオン性モデル高分子として fluorescein isothiocyanate-dextran (MW: 4400, FD-4)を用いた実験を、イオン性薬物の検討と同様の条件で行った。FD-4 flux は、上皮側を陽極とした IP 適用により、角膜では持続的に増大したが、結膜では一過的に増大した。非イオン性の FD-4 flux が電流値依存的に増大したことから、electroosmosis (EO)が FD-4 の IP 効果のメカニズムに関与していると考えられる。一般的に、上皮組織を介した親水性高分子化合物の透過は、細胞間隙バリアにより制限されている。TEER が電流適用により低下したため、細胞間隙の拡大が FD-4 flux の増大に関与していると推測される。角膜で

は持続的に flux が増大し、結膜では一過的に flux が増大するという促進特性の違いは、角膜および結膜内での FD-4 滞留の違いによるものであり、角膜および結膜の組織構造の違いが要因であると考えられる。

## 第二編 イオントフォレシスにより細胞間隙が受ける影響と促進機構との関連性

低い定電流適用により角膜および結膜 TEER の可逆的な低下が引き起こされたことから、IP 適用が細胞間隙の機能に影響を及ぼしていることが考えられた。その機能変化は、親水性高分子の透過促進を誘導する可能性がある。そこで本編では、非イオン性親水性高分子薬物に対する眼組織 IP の透過促進機構を明らかにするために、細胞間隙部位に存在するタイトジャンクション(TJ)機構に対する電流適用の影響について検討した。初めに、角膜および結膜上皮 TJ 関連タンパク質の局在性を免疫染色法により評価した。その結果、細胞辺縁の claudin-1、claudin-4、occludin および ZO-1 のような TJ 関連タンパク質の局在性は、上皮側に陽極または陰極を設置したいずれの条件においても、電流適用により細胞質側へ可逆的に変化した。それらタンパク質の分解が免疫染色の結果から考えられたことから、TJ バリア能の形成に重要な claudin-1 および occludin の量的変化を評価するために、ウェスタンブロット法による評価を行った。電流適用前と適用終了直後間で、角膜および結膜のいずれのタンパク質の存在量に有意な差は認められなかった。これらの結果は、電流適用は会合状態の TJ 関連タンパク質を解離させ、細胞辺縁から細胞質内への内在化を誘導し、その後細胞辺縁に再局在することを示唆する。加えて、IP は強制電位を生じさせるため、細胞内外のイオン環境を変化させることにより、細胞形態に影響を及ぼすことも考えられたが、細胞骨格系である actin filament の局在性に明らかな影響はなかった。これらのことから、角膜および結膜に対する IP 適用は角膜上皮および結膜上皮細胞の形態を維持したまま、細胞辺縁での TJ 関連タンパク質を細胞辺縁から細胞質内へ内在化させることにより細胞間隙透過経路の可逆的な開口を誘導すると考えられる。以上より、電流適用は細胞間隙を拡大することにより親水性高分子の透過を可能にし、この状況下で EO による透過促進を誘導すると考えられた。

## 結論

眼組織 IP は角膜および結膜の細胞間隙の拡大した状態で薬物透過を促進するものと考えられる。特に、FD-4 のような親水性高分子化合物の IP 効果は低分子イオン性化合物に比べて高い透過促進を示すことから、眼組織 IP は抗体や核酸医薬品のような高分子薬物に対する眼内薬物送達の有効な技術として期待できると考えられた。

# Study for characterization of ocular iontophoretic enhancement of ionic and non-ionic drugs across the isolated rabbit cornea and conjunctiva

Hidehisa Sekijima

## Introduction

Iontophoresis (IP) is known as a physical technique for drug absorption enhancement using electricity, which has been studied widely to enhance drug absorption through the skin and mucosa such as ocular surface tissues. A number of ocular IP studies for intraocular drug delivery have investigated in *in vivo*, especially, corneal and conjunctival IP are expected to be developed as an enhancing technique for drug absorption on the anterior (cornea and lens etc.) and posterior (retina and macular area etc.) eye diseases, respectively. IP application is known to demonstrate higher pharmacological effect compared with eye drop in clinical study conducted by dry eye patients. Currently, ocular IP has not been used practically, since iontophoretic enhancement properties of drug absorption in the viable cornea and conjunctiva have not been characterized well to date. In order to establish ocular IP as a practical technique for drug absorption enhancement into the eye, it is required to characterize the ocular IP with respect to enhancement properties for drug transport and potential safety including tissue viability and integrity in the cornea and conjunctiva. The purpose in the present study was to characterize enhancement properties of ocular IP, as well as tissue viability and integrity of the cornea and conjunctiva using *in vitro* technique under influence of an electric current. The author investigated enhancement effect of ocular IP on drug transport and tissue conditions, and tried to demonstrate potential mechanism of transport enhancement of ocular IP using the isolated rabbit cornea and conjunctiva.

## Part 1 Characterization of the enhancement effect of drug transport by ocular iontophoresis

In this part, the author investigated an effect of iontophoretic electric current on the drug transport across the isolated rabbit cornea and conjunctiva. The Ussing-type chamber was used to assess both iontophoretic enhancement effect of drug transport and state of cornea and conjunctiva concurrently. Firstly, effect of applied current on the ionic drug permeability across the cornea and conjunctiva was examined using lidocaine hydrochloride (LC, cation, MW: 288.81, pKa 7.9) and sodium benzoate (BA, anion, MW: 144.11, pKa 4.21). The potential difference (PD), short-circuit current (Isc) and transepithelial electrical resistance (TEER) were measured as the index of the tissue viability and integrity. Both LC and BA fluxes across the cornea and conjunctiva were increased during electric current application in a current-dependent manner. Furthermore such enhancement effect of drug permeation was dependent on PD, suggesting an involvement of electrorepulsion as the driving force for ionic drugs. Cornea and conjunctival TEER was recovered after cessation of IP application in the cornea up to 2.0 mA/cm<sup>2</sup> (both anodal and cathodal IP) and 10 (anodal IP) and 5.0 (cathodal IP) mA/cm<sup>2</sup> in the conjunctiva. PD and Isc were also recovered after the current application similar to the TEER recovery. Results showed that ocular IP is applicable safely even electric current is higher than that allowable for transdermal IP (~0.5 mA/cm<sup>2</sup>). On the other hand, experiments using fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4, non-ion, MW: 4400), as a non-ionic model macromolecule were conducted under same conditions as the experiments with ionic drugs. FD-4 flux across the cornea was sustainably increased by the anodal IP application, while transiently increased in the

conjunctiva. Since non-ionic FD-4 fluxes were increased by the anodal IP in a current-dependent manner, the electroosmosis (EO) can be involved in mechanistic aspect of the IP effect for FD-4. In general, transport of hydrophilic large compounds across the epithelial tissues is limited by paracellular barrier. As TEER was reduced by electric current application, it is speculated that enlargement of paracellular space related the observed increase in FD-4 fluxes. The difference in enhancing behavior of IP for FD-4 fluxes in cornea and conjunctiva, in other words sustainable increase in cornea and transient increase in conjunctiva is due to a difference in the FD-4 retention in the cornea and conjunctiva, attributed to structural configuration of the tissues.

## **Part 2 Influence of iontophoresis on paracellular functions and their relation to the iontophoretic permeation enhancement.**

Since reversible reduction of corneal and conjunctival TEER was triggered by low constant electric current application, it was supposed that IP application possibly influenced paracellular function. Such a functional change can induce permeation enhancement of hydrophilic macromolecules. In this part, the author investigated about effect of electric current application on the function of tight junction (TJ) existing at paracellular space in order to reveal the mechanism of permeation enhancement of ocular IP for non-ionic hydrophilic large drug. Firstly, localization of TJ-associated proteins in the corneal and conjunctival epithelia were examined by immunostaining technique. Localization of TJ-associated proteins such as claudin-1, -4, occludin and ZO-1 on the cellular margin was reversibly changed to the cytosolic compartment by electric current application at both anodal (anode in the epithelial side) and cathodal (cathode in the epithelial side) IP. Since degradation of those proteins may affect the results of immunostaining, western blot analysis was performed to examine the amount variability of claudin-1 and occludin, key proteins for constitution of TJ barrier. No significant difference in amount of the proteins between before and after electric current application in the cornea and conjunctiva, respectively. These results suggest that electric current application dissociates assembly of TJ-associated protein, then internalization from cellular margin to cellular cytoplasm is induced, followed by re-localizing at cellular margin. In addition, IP did not have obvious effect on localization of actin filament which is cytoskeletal system, indicating that IP influence cell shapes induced by changing ion environment of inside and outside the cell to generate a compulsory electric potential. Therefore, IP application on the cornea and conjunctiva induces the reversible opening of the paracellular transport pathway by changing the localization of TJ-associated proteins on the cellular margin without change in cell shape of corneal and conjunctival tissues. Thus, application of electric current enlarges the paracellular pathway to allow the penetration of macromolecules, and induces the transport enhancement attributed to EO under influence of electric current.

## **Conclusion**

Ocular IP has a potential to enhance drug transport with enlargement of paracellular pathway in the cornea and conjunctiva. Specially, since the effect of IP for hydrophilic large compounds such as FD-4 shows higher enhancement compared with low molecular ionic compounds, ocular IP may be expected to be useful technique for intraocular drug delivery of macromolecules such as antisense oligonucleotides and antibody fragments.

## 論文審査の結果の要旨

イオントフォoresis(IP)は、電気を利用した物理学的吸収促進法として知られ、経皮および眼粘膜を含めた経粘膜薬物吸収促進を目的に広く検討されている。薬物適用部位とその近傍に電極を設置して微弱な電流を適用することで、イオン性薬物では電気的な反発力(electrorepulsion, ER)、非イオン性薬物では電気的な界面導電現象に伴う電気浸透流(electroosmosis, EO)により組織中への薬物の移行が促進される。経皮吸収促進に関するIP研究が最も進んでいるが、その原理から、眼組織局所への効率的な薬物送達を可能にする方法としても期待されている。これまでに、眼組織IPに関する多くの*in vivo*研究が行われており、点眼薬に比べ高い薬理効果が得られることが明らかにされている。しかし、眼組織IPを実用化するためには、生きた角膜および結膜におけるIPの吸収促進特性について、組織変化とその回復性のような安全性に関わる基礎的情報の収集が必要である。

そこで本研究では、カチオン性もしくはアニオン性低分子薬物、および非イオン性高分子薬物を用いて、眼組織IPの透過促進効果および細胞間隙を介した透過促進機構について、IPによる膜の変化とIP終了後のその回復について特に着目して特徴づけを行っており、その知見は、2編にまとめられている。実験は、ウサギから摘出した角膜および結膜を用いたものであるが、動物実験として承認を受けた上で、適切に実施されている。

第1編として、まずモデル透過物質としてイオン性薬物であるリドカイン(カチオン, MW: 288.81, LC)および安息香酸(アニオン, MW: 144.11, BA)を用いて、角膜および結膜透過に対する定電流IPの適用電流値の影響と組織生存性が評価され、LCおよびBAの角膜および結膜透過速度が電流適用の期間に一過的に増大することを示している。適用電流値を変化させた場合に、透過速度の増大は電流値依存的であったが、薬物の輸率も電流値依存的であったことから、その透過促進効果は、適用電流値ではなく、膜間電位と比例関係になることも示している。さらに、角膜では2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では5.0 mA/cm<sup>2</sup>までの電流値の範囲において、IP適用により一時的に低下する経上皮電気抵抗(TEER)値が、適用終了後に回復することも示し、経皮IP薬物送達で一般に許容されると考えられている電流値(~0.5 mA/cm<sup>2</sup>)より高い電流値であっても、角膜および結膜IPでは十分に安全に適用できる可能性があると考えが述べられている。

非イオン性親水性高分子薬物のモデルとして fluorescein isothiocyanate-dextran (MW: 4400, FD-4)を用いても、イオン性低分子薬物の検討と同様の評価が行われ、FD-4の角膜および結膜を介した透過速度が電流適用により増大し、その透過促進効果が、同様に膜間電位と比例関係になることを示している。TEERの一時的な低下とIP終了後の回復も同様に確認し

ているが、角膜 IP の場合のみ、IP 終了後の透過速度の低下が認められず、高い吸収が持続することを明らかとしている。その理由を解明するため、組織中の薬物濃度とそこからの放出について検討がなされ、結膜では IP 適用により FD-4 が高濃度で組織に取り込まれるが、そこからの消失も速やかであるのに対し、角膜では組織中 FD-4 濃度が高く維持されることを確認している。親水性高分子非イオン性薬物の IP では、電流適用により TEER が低下することから、上皮組織の細胞間隙の拡大とそれに引き続く EO の増大が、その機構として考えられるが、IP 終了後の透過速度の低下については、組織中での薬物の拡散性も重要な要因であり、角膜では上皮細胞層と内皮細胞層に挟まれた領域に FD-4 が滞留したことが、角膜で持続的な透過の促進が観察された理由であると考察している。

第 2 編では、IP 適用による TEER の低下とその後の回復、またそれに関連すると考えられる非イオン性親水性高分子薬物に対する眼組織 IP の透過促進機構を明らかにするために、タイトジャンクション(TJ)関連タンパク質の存在状態に対する電流適用の影響について検討している。角膜および結膜上皮の claudin-1、claudin-4、occludin および zonula occludens-1 (ZO-1)などの TJ 関連タンパク質の局在性は、上皮側に陽極または陰極を設置したいずれの条件においても、電流適用により可逆的に変化し、IP 適用による細胞間隙からの一時的な消失とその後の再局在を観察している。角膜および結膜のいずれの TJ 関連タンパク質についても、ウェスタンブロット法による解析では電流適用前後での存在量、発現バンド位置に変化が認められず、IP 適用は会合状態の TJ 関連タンパク質を解離させ、細胞辺縁から細胞質内へ内在化を誘導し、その後細胞辺縁に再局在することにより、可逆的な変化が生じているものと考察している。さらに、IP 適用による細胞内外のイオン環境の変化が細胞形態に影響を及ぼすことも考えられたため、F-actin の局在性を評価しているが、IP 適用の影響は認められないことを確認している。これらのことから、角膜および結膜に対する IP 適用は、角膜上皮および結膜上皮細胞の生存性および機能を維持したまま、TJ 関連タンパク質の細胞辺縁での局在性を変化させることで可逆的に TJ を開口し、その後に生じる電流適用に伴う EO が親水性高分子の透過促進の主要な機構であると考察している。

以上のことから、眼組織 IP は角膜および結膜上皮 TJ の一過的な開口により薬物透過を促進するものと結論づけている。眼組織 IP は、抗体や核酸医薬品のような高分子薬物に対する眼内薬物送達システムとして期待できると考えられ、本論文は、そのために必要となる重要な情報を提供していることから、本研究科課程による博士（薬学）論文として十分な価値を有するものと判断する。