

家兎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

# 目次

## 総論の部

緒論	1
----	---

## 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

第一章 イオン性薬物の角膜および結膜透過に対する イオントフォレシスの影響	10
第一節 低分子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	10
第二節 低分子イオン性薬物を用いたイオントフォレシス 適用実験中の眼組織電気抵抗値の変化	14
第三節 低分子イオン性薬物の眼組織透過 flux と 膜電位の関係	19
第二章 非イオン性薬物の角膜および結膜透過に対する イオントフォレシスの影響	21
第一節 非イオン性親水性高分子薬物の角膜および結膜透過に対する 適用電流値の影響	21
第二節 非イオン性親水性高分子薬物を用いたイオントフォレシス 適用実験中の眼組織電気抵抗値の変化	24

第三節	非イオン性親水性高分子薬物の眼組織透過 flux と 膜電位の関係	27
第四節	角膜および結膜における親水性高分子のイオントフォレシス 促進効果に対する組織滞留性の影響	28
第三章	本編の考察および小括	33
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	39
第一章	角膜および結膜上皮タイトジャンクション関連タンパク質の 局在性に対する電流適用の影響	42
第二章	角膜および結膜タイトジャンクション関連タンパク質の 存在量に対する電流適用の影響	48
第三章	角膜および結膜上皮の細胞骨格に対する電流適用の影響	52
第四章	本編の考察および小括	55
結論		58
謝辞		61

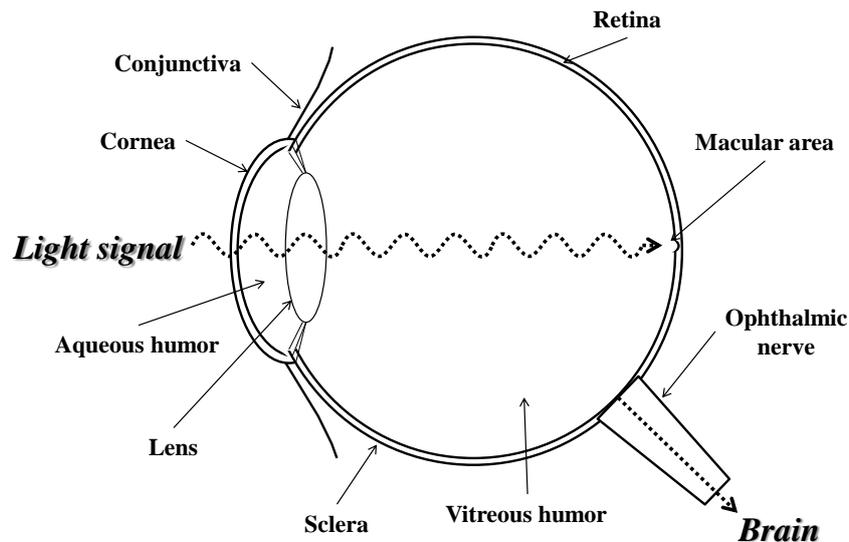
## 実験の部

第一編 実験方法	62
第二編 実験方法	68
引用文献	72

# 総論の部

## 緒論

動物は、目、鼻、舌、耳や皮膚などの感覚器から得られる情報に基づいて生命活動を営んでいる。一般的に、ヒトでは生命活動に必要な情報の約 8 割を目から得ていると言われ、目は **quality of life (QOL)** を維持するために重要な器官である。Fig. 1 に示すように、光は、眼表面に入射し、角膜および水晶体を通過して、黄斑部および網膜で強度や色彩情報に変換され、それら情報は視神経を介して脳内に伝達されて中枢神経系で視覚化される。この過程の中で、角膜—水晶体間および水晶体—網膜間に存在する房水および硝子体は入射した光の散乱を制限し、結膜、強膜および涙液は眼内環境を維持するために重要な役割を果たしている。すなわち、光情報の視覚化にはこれら眼組織や組織液の機能を保持することが必要である。



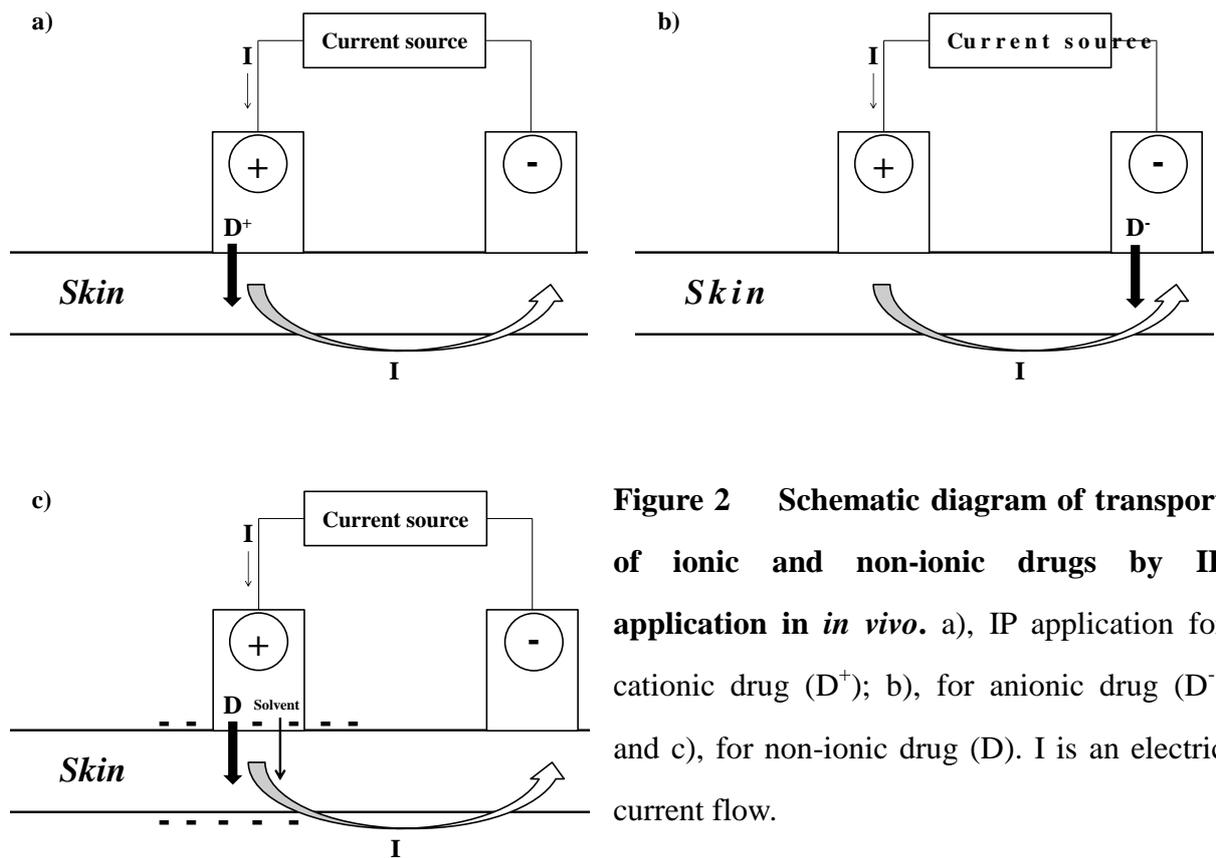
**Figure 1 Anatomical structure and receptiveness of light signal in the human eye.**

近年、科学技術の発展に伴うパーソナルコンピューターやスマートフォンの普及、さらには高齢化などの社会的背景から、視力低下や眼疾患を伴う生活者の割合が増加しており<sup>1,2)</sup>、これらを原因とする目の不具合は著しいQOLの低下につながる。眼疾患は、角膜、結膜や水晶体などの光路の前方の組織で不具合を生じる前眼部疾患、および網膜や黄斑部などの光路の後方の組織で不具合を生じる後眼部疾患に分類される。現在、先進国は高齢社会となっており、加齢や生活習慣病に起因する黄斑変性症や網膜症など後眼部に疾患をもつ患者数が増加している<sup>1,3)</sup>。一方、発展途上国では衛生管理が十分ではないことから、細菌やウイルス感染による角膜炎や結膜炎など前眼部の炎症性疾患の患者数が多いと報告されている<sup>4)</sup>。これら眼疾患は、視力障害を引き起こし、さらに失明のように重篤な不可逆的な症候をきたす場合もあるため、臨床では疾患の原因除去もしくは進行抑制を目的とした外科的処置や薬物治療が行われる。外科的処置は、薬物治療を行えない、もしくはそれによる改善を期待できない場合に実施される。一方、局所薬物治療では、点眼もしくは眼内注射により薬剤が投与され、治療目的別によってそれら投与方法は使い分けられている。眼内注射には、涙液または房水が接する眼表面組織内での薬物の滞留性の向上を目的とした結膜下注射や、抗体や核酸のような高分子医薬品による黄斑変性症や網膜症に対する薬物治療を目的とした硝子体内注射があり、薬剤を確実に投与できることから治療効果が高いとされている。しかしながら、外科的処置や眼内注射は侵襲的であるため、眼圧上昇や感染症などの有害事象も報告されており<sup>5,6)</sup>、患者の負担のみならず医療関係者の負担も大きいという欠点がある。一方、点眼薬は非侵襲的であり、主に緑内障、ドライアイ、角膜炎や結膜炎などの眼疾患に対する薬物治療の第一選択として用いられる。点眼された薬物は涙液層中に拡散し、角膜および結膜/強膜を介し、それぞれ房水中お

よび硝子体液中へ浸透するが<sup>7)</sup>、点眼された薬物量に対する眼内へ浸透する薬物量の割合は極めて少ない。その理由として、涙液による薬物の希釈・排泄や眼表面の上皮組織の高いバリア能などの複合的な要因が関係している<sup>8,9)</sup>。そのため、十分な効果を得るためには頻回投与や眼表面での滞留性の改善などの工夫が必要となる。

このような背景から、眼疾患に対する薬物療法を効率化するための研究が行われてきた。眼内への薬物送達の改善を目的とした Drug Delivery System 研究では、薬物のプロドラッグ化、リポソームへの内封、シクロデキストリンとの複合体形成、化学的および物理的吸収促進法の利用に関する知見が報告されている<sup>10-12)</sup>。吸収促進法は、眼内への吸収性の低い薬物の吸収改善を期待する方法であり、これまでに多くの研究グループにより、実際に吸収性の低い薬物の眼内吸収を改善できることが立証され<sup>10-13)</sup>、眼内注射に代わる薬物投与システムに応用することが検討されている。

イオントフォレシス(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。Fig. 2 は、最も研究が進んでいる経皮 IP の模式図を示している。皮膚表面に隣接するよう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氣的な反発力 (electrorepulsion, ER) (Fig. 2a および b)、非イオン性薬物では電氣的な界面導電現象に伴う電気浸透流 (electroosmosis, EO) (Fig. 2c) により皮内への移行が促進される<sup>14,15)</sup>。IP は、その電流を ON または OFF することにより促進効果を ON/OFF 制御できることに加え、電流値や適用時間などの適用条件を調節することによっても制御できる<sup>15,16)</sup>。生理学的 pH の下では、生体膜は負にチャージしており、電場の影響下では陽極から陰極方向へ EO が生じ、その効果により非イオン性薬物の体内への吸収が促進される (Fig. 2c)。このような原理により IP は様々な薬物の吸収を促進することから、



**Figure 2 Schematic diagram of transport of ionic and non-ionic drugs by IP application in *in vivo*.** a), IP application for cationic drug ( $D^+$ ); b), for anionic drug ( $D^-$ ) and c), for non-ionic drug ( $D$ ).  $I$  is an electric current flow.

その利用は眼組織局所へも効率的な薬物送達を可能にするものと期待されている。

眼組織 IP の研究は主に *in vivo* で行われており、そこでは薬物を含むリザーバー電極槽を眼表面組織に、対極を額などの目に近接する皮膚表面にそれぞれ設置して検討が行われている。ゲンタマイシン<sup>17-19)</sup>、バンコマイシン<sup>20)</sup>、トブラマイシン<sup>21, 22)</sup>、カルボプラチン<sup>23)</sup>、メチルプレドニゾロン<sup>24)</sup>およびデキサメタゾン<sup>25)</sup>に関するサルやウサギを用いた *in vivo* IP 研究では、点眼や結膜下注射に比べ房水中または硝子体中の薬物濃度が数倍から数十倍に増大し、角膜 IP では主に房水中、結膜 IP では主に硝子体中へ薬物の送達が特異的に増大することが明らかにされてきた。これらの報告に基づき、角膜 IP および結膜 IP は、それぞれ前眼部および後眼部疾患に対する薬物吸収促進技術として期待されている。また、陽極槽に添加した高分子化合物であるアンチセンスオリゴヌクレオチドが結膜 IP 適用後に網膜などの眼組織局所に送達され

ることも報告され<sup>26)</sup>、核酸や抗体のような高分子医薬品の眼内送達に対する IP の利用も期待されている。最近、角膜/結膜辺縁部からの薬物送達を目的とした眼組織 IP システムである EyeGate<sup>®</sup> II Delivery System (EyeGate pharma, Boston, USA)を用いて、ドライアイ患者を対象としたデキサメタゾン治療の臨床研究が実施され、IP 適用は症状の軽減や改善効果があることが立証されている<sup>27)</sup>。

IP の実用化には、薬物の吸収促進効果や臨床研究による治療効果に関する情報のみならず、電流適用条件を決定するための薬物の透過促進効果やその促進機構、また細胞・組織の生存性や細胞間隙に対する電流適用の影響のようなメカニズムに関わる臨床研究や *in vivo* 研究では情報収集が困難な基礎的情報も必要であると考えられる。

経皮 IP では薬物が透過促進される際、電流は抵抗の高い角層に比べて抵抗の低い毛嚢や汗腺などの付属器官を介して皮膚を流れるため、主な IP 透過促進経路は毛嚢や汗腺などの経路であることが報告されている<sup>28)</sup>。一方、毛嚢や汗腺が無い角膜および結膜では、電流は抵抗の低い上皮細胞間隙を流れることでその機能に影響を及ぼし、細胞間隙を介した薬物透過を促進すると考えられる。通常、上皮や内皮の細胞間隙にはタイトジャンクション(TJ)が存在し、細胞間隙を介した物質の自由な移動を制限していることから<sup>29)</sup>、IP による薬物の透過促進機構には TJ バリアの変化が関与していると考えられるが、IP 適用が薬物の細胞間隙透過性に対してどのような影響を及ぼすのかについてはまだ十分に明らかになっていない。眼組織 IP を眼内への薬物吸収促進法として実用化するためには、適用電流が角膜および結膜に与える影響を考慮した上で、薬物の透過促進特性を特徴づけることが必要であり、これら情報は眼組織 IP の効率的かつ安全な電流適用条件の決定に不可欠であると考えられる。

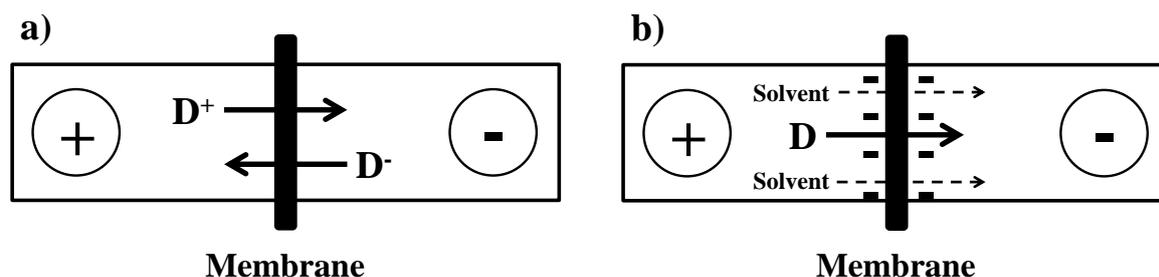
そこで本研究では、電流影響下の角膜および結膜に対する安全性を考慮した眼組織

IP の促進特性を特徴づけることを目的とし、家兎摘出角膜および結膜を用いて IP の薬物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検討した。すなわち、第一編では、摘出角膜および結膜を用いて、イオン性および非イオン性モデル透過物質の IP 透過促進効果と電気生理学的手法による膜の生存性および integrity の評価結果を特徴づけた。第二編では、細胞間隙バリアに重要な TJ 関連タンパク質の局在性と存在量、および細胞骨格系に対する電流適用の影響を評価し、IP によりこれらが受ける影響と透過促進機構との関連性を考察した。以下、得られた結果について論述する。

## 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

角膜および結膜生存性などの膜の状態と透過促進効果を併行して *in vitro* で評価するためには、*in vitro* 透過実験中に角膜および結膜の生存性を維持できる実験条件を確立するとともに、*in vivo* 実験でその効果が再現されることが必要である。IP の効果を *in vitro* で見積もる場合、Fig. 3 で示すようにセル間に膜を挟んだ 2-chamber を用いた *in vitro* 実験系が広く用いられている<sup>30)</sup>。



**Figure 3** Schematic diagram of IP transport system in *in vitro*. a), transport of cationic and anionic drug by electrorepulsion; b), transport of non-ionic drug by electroosmosis. The  $D^+$ ,  $D^-$  and  $D$  are cationic, anionic and non-ionic drug, respectively.

イオン性薬物の場合、カチオン性薬物は陽極槽から陰極槽、アニオン性薬物は陰極槽から陽極槽への透過が促進され(Fig. 3a)、非イオン性薬物では、陽極槽から陰極槽への透過が EO により促進されるなど(Fig. 3b)、2-chamber での実験系は、薬物の IP 透過挙動を明確かつ簡便に評価できる有用な実験系である。Ussing は、摘出カエル皮膚を用いた研究から、皮膚生存性を維持した状態でイオン輸送活性を電気生理学的に評価できる Ussing chamber を開発した<sup>31)</sup>。Ussing chamber を用いたシステムでは、基

本的に voltage/current clamp unit、リンゲル液、カロメル電極、Ag/AgCl 電極および塩橋を用いて、Fig. 4 で示すように生体膜を介した電気回路として連結することで、薬物透過の駆動力である電気化学ポテンシャル勾配に関する膜電位差(PD)、能動輸送の指標となる短絡電流(Isc)および膜バリアの指標となる経上皮電気抵抗(TEER)といった電気生理学的パラメーターを測定できる。PD、Isc および TEER は、上皮組織<sup>32-34)</sup>や細胞膜機能<sup>35)</sup>のモニタリングに利用され、摘出角膜および結膜における吸収促進剤による透過促進の実験において、組織生存性および integrity の指標として使用されている<sup>13,36)</sup>。さらに、このシステムでは voltage/current clamp unit を通じて一定の電流および電圧を印加することが可能であり、IP 適用実験にもそのまま利用することが可能である。そこで本研究では、Ussing chamber システムを用いて *in vitro* における IP 適用の効果を評価することにした。

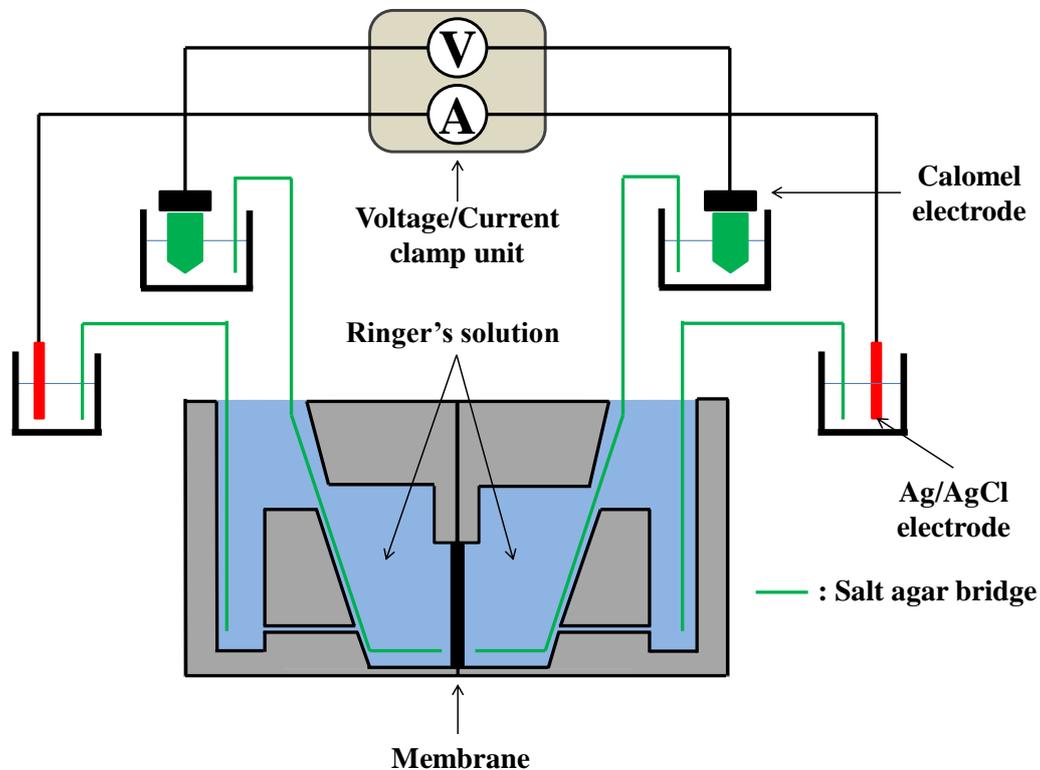


Figure 4 A Ussing-type chamber system.

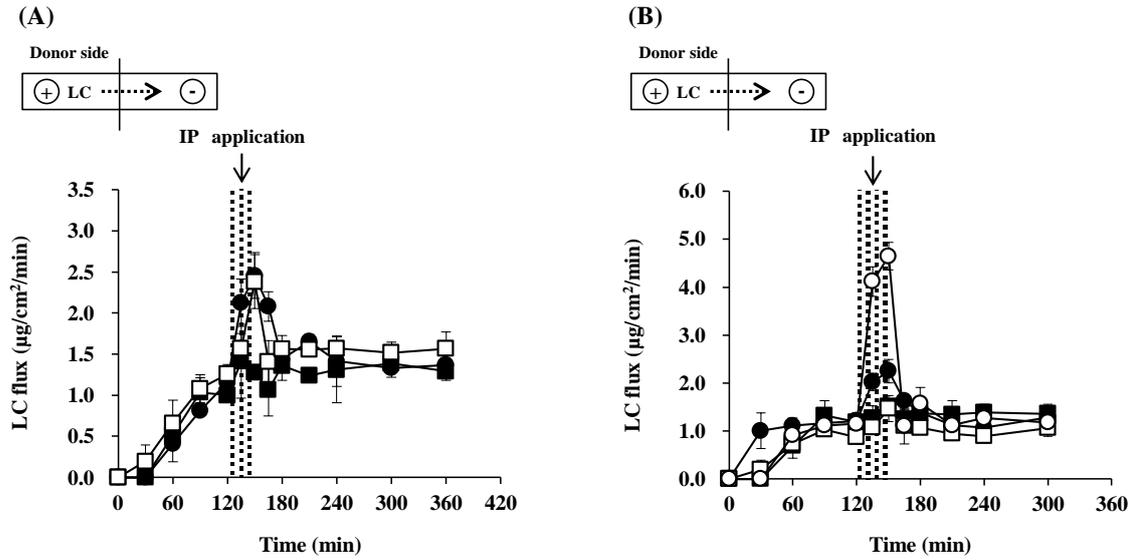
以前に行われた Ussing-type chamber を用いた結膜 IP 透過促進効果に関する検討において<sup>38)</sup>、0.85 mA/cm<sup>2</sup> までの定電流適用の範囲で、電流適用時のみイオン性薬物および非イオン性薬物の結膜透過性が一過的に増大し、その効果は電流値依存的であることが明らかとなっている。また、電流適用中に変動した PD、Isc および TEER が電流適用後に適用前のレベルと近い値まで回復したことは、薬物の透過促進効果と結膜感受性に対する電流適用の安全性を考慮すると実用化できる可能性の高い吸収促進技術になることを示すものと考えられた。しかしながら、眼組織 IP の *in vivo* 研究において吸収促進効果が得られている電流値は 0.8-28.2 mA/cm<sup>2</sup><sup>17-25)</sup>、ヒトでの臨床研究において安全性が高いとされる電流値は 3.65 mA/cm<sup>2</sup><sup>27)</sup>であることを考慮すると、*in vivo* 研究で用いられている電流値の範囲を網羅した IP 条件での促進効果を評価する必要がある。加えて、*in vitro* での角膜 IP に関する検討はこれまで行われておらず、摘出角膜を用いた特徴づけが有効な情報を提供するものと期待できる。

そこで本編では、Ussing-type chamber を用いて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について評価した。低分子モデルイオン性薬物のうち、カチオン性物質としてリドカイン塩酸塩(LC, MW: 288.81, pKa 7.9)、およびアニオン性物質として安息香酸ナトリウム塩(BA, MW: 144.11, pKa 4.21)を用いた。また、抗体医薬品のような親水性高分子薬物を想定したモデル高分子として、fluorescein isothiocyanate-dextran (MW: 4400, FD-4)を用いた。組織の生存性および integrity も同時に評価するため、透過実験中にわたる PD、Isc および TEER をモニタリングし、角膜および結膜の状態と薬物透過性との関係について考察した。

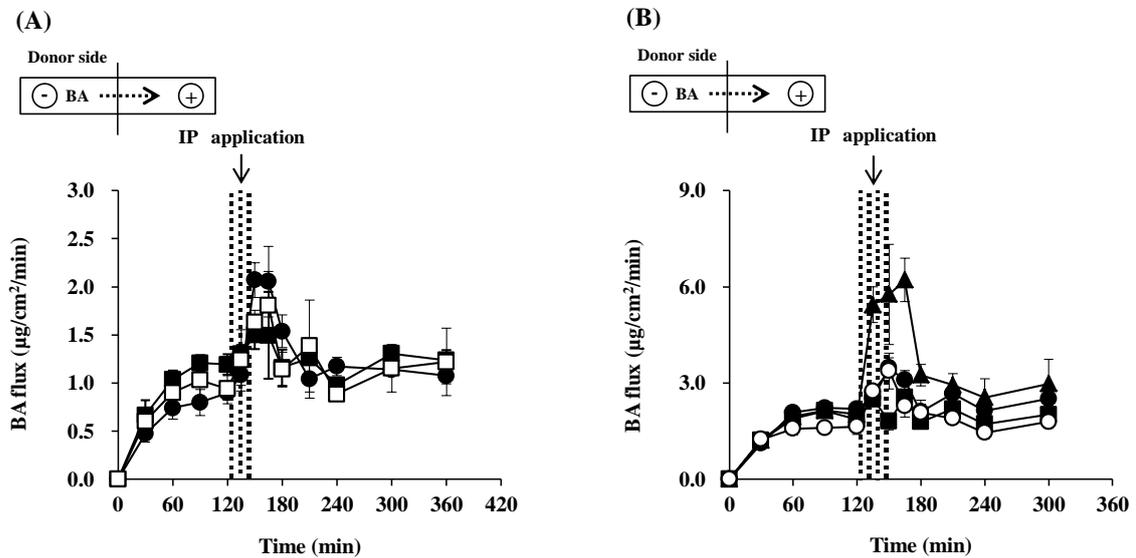
## 第一章 イオン性薬物の角膜および結膜透過に対する イオントフォレシスの影響

### 第一節 低分子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

まず、低分子イオン性薬物に対する IP の促進効果を評価した。種々電流値適用下の角膜および結膜を介した LC および BA 透過速度(flux)、電気生理学的パラメーターに対する IP 効果を測定した。透過実験開始から 120 分後に角膜では  $5.0 \text{ mA/cm}^2$  まで、結膜では  $10 \text{ mA/cm}^2$  までの電流値を 30 分間適用した。また、電流適用直前の flux を baseline とした。Fig. 5 はドナー側を陽極とした場合の角膜(A)および結膜(B)を介した LC flux、Fig. 6 はドナー側を陰極とした場合の BA flux の経時的変化を示している。角膜および結膜ともに、LC flux は IP 適用前に比べ、IP 適用中に増大し、IP 適用終了後には IP 適用前の baseline flux のレベルまで回復した(Fig. 5)。BA flux に対しても LC と同様の挙動が認められた(Fig. 6)。この結果から、適用した電流値では低分子イオン性薬物に対する IP の促進効果は可逆的であると考えられた。



**Figure 5** Time-courses of permeated flux of LC through the cornea (A) and conjunctiva (B) in the anodal IP experiments. ■, 0.5 mA/cm<sup>2</sup>; □, 2.0 mA/cm<sup>2</sup>; ●, 5.0 mA/cm<sup>2</sup>; ○, 10 mA/cm<sup>2</sup>. Data represent mean ± S. E. (n = 3-5).



**Figure 6** Time-courses of permeated flux of BA through the cornea (A) and conjunctiva (B) in the cathodal IP experiments. ■, 0.5 mA/cm<sup>2</sup>; □, 1.5 mA/cm<sup>2</sup>; ●, 2.0 mA/cm<sup>2</sup>; ○, 5.0 mA/cm<sup>2</sup>; ▲, 7.5 mA/cm<sup>2</sup>. Data represent mean ± S. E. (n = 3).

皮膚では、IP 適用中のイオン性薬物の透過速度は、膜厚、ポアサイズやポア数のような膜の状態が一定であると仮定した際、適用電流値と適用時間の積である総電流量に比例することが知られている<sup>39)</sup>。すなわち、適用時間一定の条件では、透過速度は適用電流値に依存することになる。そこで、低分子イオン性薬物の角膜 IP および結膜 IP が適用電流値に依存した透過促進効果であるかどうかを、LC および BA の IP 透過実験で得られた maximal flux を baseline flux で除した促進率(Eq. 1)に基づき評価した。Tables 1 および 2 はそのデータをまとめたものである。

$$\text{Enhancement ratio} = \frac{\text{Maximal flux}}{\text{Baseline flux}} \quad (\text{Eq. 1})$$

角膜および結膜ともに、適用したほとんどの電流値での LC および BA の maximal flux は、baseline flux に対して電流値依存的に有意に増大した(Tables 1 および 2)。また、角膜における LC および BA に対する促進率は、5.0 mA/cm<sup>2</sup> および 2.0 mA/cm<sup>2</sup> までの IP 適用により電流値依存的にそれぞれ 2.27 倍および 2.45 倍であり(Table 1)、結膜における LC および BA に対する促進率は、10 mA/cm<sup>2</sup> または 5.0 mA/cm<sup>2</sup> までの IP 適用により電流値依存的にそれぞれ 4.04 倍および 3.44 倍だった(Table 2)。これらのことから、低分子イオン性薬物に対する眼組織 IP の透過促進効果は電流値依存的であったが、LC および BA の促進率は電流値に対して比例関係ではなかった。

**Table 1 Enhancement ratio and flux values of LC and BA in the cornea as measured by IP experiments.**

<b>Compound</b>	<b>Current density (mA/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Baseline flux (µg/cm<sup>2</sup>/min)</b>	<b>Maximal flux (µg/cm<sup>2</sup>/min)</b>	<b>Enhancement ratio</b>
<b>LC</b>	0.5	1.00 ± 0.07	1.65 ± 0.32	1.65
	1.0	1.27 ± 0.20	1.96 ± 0.30**	1.54
	2.0	1.26 ± 0.12	2.41 ± 0.32*	1.92
	5.0	1.16 ± 0.19	2.62 ± 0.24*	2.27
<b>BA</b>	0.5	1.19 ± 0.11	1.81 ± 0.21*	1.52
	1.0	0.93 ± 0.07	1.73 ± 0.21*	1.85
	1.5	0.94 ± 0.16	1.95 ± 0.29*	2.08
	2.0	0.90 ± 0.07	2.20 ± 0.30*	2.45

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. significantly different from baseline flux ( $t$ -test).

Data represent mean ± S. E. (n = 3-5).

**Table 2** Enhancement ratio and flux values of LC and BA in the conjunctiva as measured by IP experiments.

Compound	Current density (mA/cm <sup>2</sup> )	Baseline flux (µg/cm <sup>2</sup> /min)	Maximal flux (µg/cm <sup>2</sup> /min)	Enhancement ratio
LC	0.5	1.18 ± 0.20	1.57 ± 0.17**	1.33
	1.0	0.95 ± 0.15	1.40 ± 0.22*	1.47
	2.0	0.87 ± 0.02	1.49 ± 0.25	1.71
	5.0	1.21 ± 0.04	2.41 ± 0.18**	1.99
	10	1.15 ± 0.07	4.65 ± 0.29**	4.04
BA	0.5	1.86 ± 0.10	2.59 ± 0.21	1.39
	1.0	1.65 ± 0.26	2.21 ± 0.31*	1.34
	2.0	2.19 ± 0.10	3.70 ± 0.19**	1.69
	5.0	1.64 ± 0.24	3.54 ± 0.42**	2.16
	7.5	2.01 ± 0.13	6.92 ± 0.89*	3.44

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. significantly different from baseline flux ( $t$ -test).

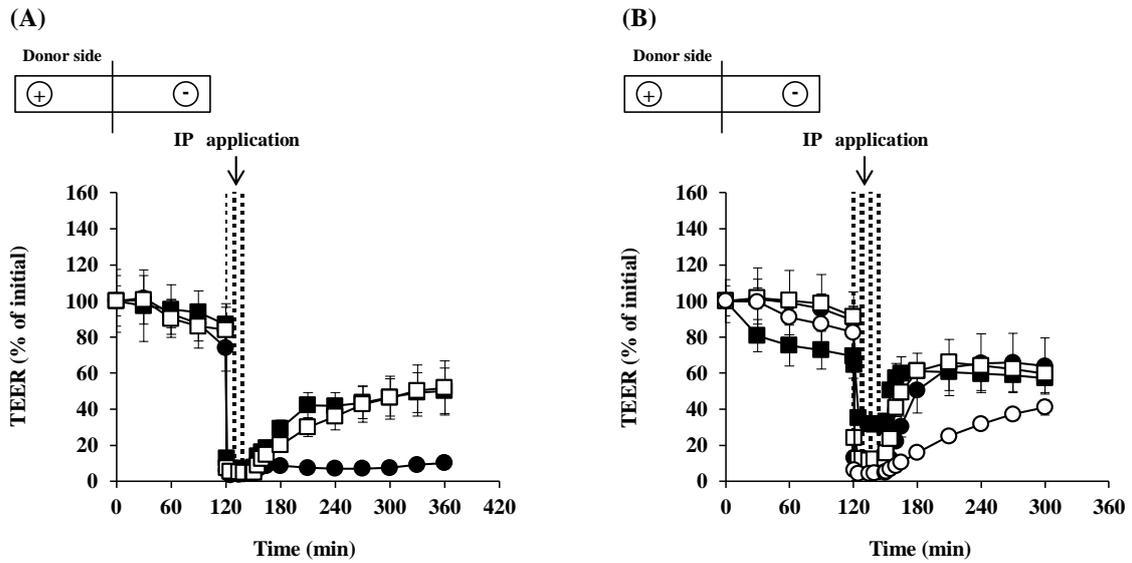
Data represent mean ± S. E. (n = 3).

## 第二節 低分子イオン性薬物を用いた IP 適用実験中の 眼組織電気抵抗値の変化

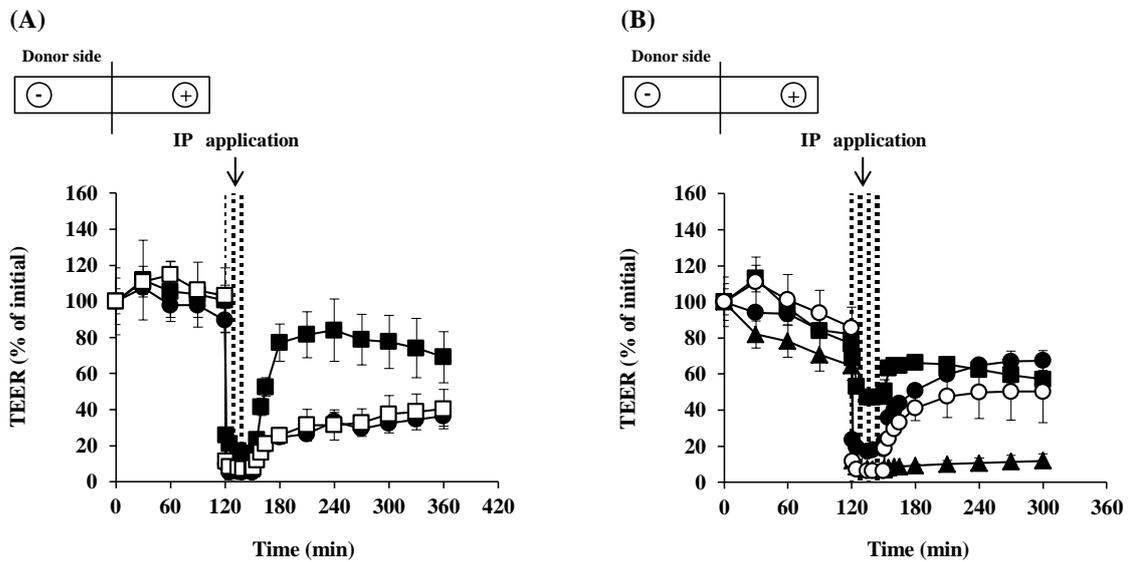
Fig. 7 はドナー側を陽極とした場合の LC 透過実験中の角膜(A)および結膜(B)の TEER の経時的変化、Fig. 8 はドナー側を陰極とした場合の BA 透過実験中の TEER の経時的変化をそれぞれ示している。ドナー側を陽極とした時の角膜および結膜 TEER は IP 適用前に比べ、IP 適用直後に急激に低下した(Fig. 7)。IP 適用終了後の TEER は、角膜では 2.0 mA/cm<sup>2</sup> までの IP 適用終了後に適用前の 62%まで回復し、5.0 mA/cm<sup>2</sup> の

電流適用終了後に回復は認められなかった(Fig. 7A)。結膜では、5.0 mA/cm<sup>2</sup>までの IP 適用終了後約 60 分で適用前の約 70%まで回復した(Fig. 7B)。また、10 mA/cm<sup>2</sup>適用後、低い電流値に比べて遅い回復速度で、150 分で 50%まで TEER が回復した。

ドナー側を陰極とした際の角膜および結膜 TEER は、ドナー側を陽極とした際の結果と同様、IP 適用直後に急激に低下した(Fig. 8)。角膜では電流値依存的な TEER の回復の程度の低下はあるが、2.0 mA/cm<sup>2</sup>までの IP 適用終了後 210 分で適用前の約 40%(Fig. 8A)、結膜では 5.0 mA/cm<sup>2</sup>の IP 適用終了後 150 分で適用前の約 60%まで回復した(Fig. 8B)。結膜における 7.5 mA/cm<sup>2</sup>では、適用後 150 分までの間で TEER の回復は認められなかった。また、Tables 3-6 で示すように電気生理学的パラメーターのサンプリング時点で得た PD は、IP 適用電流値と対応して大きな値を示し、適用終了後に TEER の回復に一致して回復する傾向にあった。Isc の値もまた、IP 適用終了後に同様に回復する傾向にあった。これらの結果から、適用電流値により TEER の回復の程度および速度の違いが認められたものの、上皮側を陽極とした場合、角膜では 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では上皮側を陽極として 10 mA/cm<sup>2</sup>まで、上皮側を陰極とした場合、角膜では 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 5.0 mA/cm<sup>2</sup>の電流値の値において、電気生理学的パラメーターが概ね回復し、角膜および結膜生存性に対して明らかな影響を及ぼさず、IP 処理終了後において integrity は保たれていると考えられた。



**Figure 7** Time-courses of the corneal (A) and conjunctival (B) TEER in the LC permeation experiments. ■, 0.5 mA/cm<sup>2</sup>; □, 2.0 mA/cm<sup>2</sup>; ●, 5.0 mA/cm<sup>2</sup>; ○, 10 mA/cm<sup>2</sup>. Data represent mean ± S. E. (n = 3-5).



**Figure 8** Time-courses of the corneal (A) and conjunctival (B) TEER in the BA permeation experiments. ■, 0.5 mA/cm<sup>2</sup>; □, 1.5 mA/cm<sup>2</sup>; ●, 2.0 mA/cm<sup>2</sup>; ○, 5.0 mA/cm<sup>2</sup>; ▲, 7.5 mA/cm<sup>2</sup>. Data represent mean ± S. E. (n = 3).

**Table 3 PD and Isc values in the cornea in the LC permeation experiments.**

	Current density (mA/cm <sup>2</sup> )	Before IP	During IP	After IP application	
				0 min	210 min
[PD] (mV)	0.5	12.6 ± 3.36	71.0 ± 3.28	0.60 ± 0.10	4.80 ± 2.16
	1.0	7.14 ± 1.40	99.5 ± 5.67	0.40 ± 0.08	2.56 ± 0.51
	2.0	7.42 ± 2.01	170 ± 11.8	0.74 ± 0.29	3.78 ± 1.46
	5.0	7.87 ± 2.84	356 ± 97.8	0.67 ± 0.09	0.77 ± 0.23
Isc (μA/cm <sup>2</sup> )	0.5	7.05 ± 1.44	-	5.15 ± 0.33	4.55 ± 0.82
	1.0	5.32 ± 0.81	-	5.91 ± 0.88	4.14 ± 0.64
	2.0	5.41 ± 0.85	-	6.55 ± 2.16	4.18 ± 0.69
	5.0	6.29 ± 1.00	-	8.79 ± 1.53	4.92 ± 0.87

Data represent mean ± S. E. (n = 3-5).

**Table 4 PD and Isc values in the conjunctiva in the LC permeation experiments.**

	Current density (mA/cm <sup>2</sup> )	Before IP	During IP	After IP application	
				0 min	150 min
[PD] (mV)	0.5	22.4 ± 1.77	86.1 ± 1.76	5.37 ± 0.90	16.3 ± 0.60
	1.0	23.6 ± 0.99	82.3 ± 4.01	2.53 ± 0.34	14.2 ± 0.68
	2.0	17.5 ± 1.23	101 ± 10.2	1.27 ± 0.03	9.93 ± 0.27
	5.0	19.0 ± 2.03	179 ± 13.0	0.50 ± 0.09	9.08 ± 0.93
	10	22.4 ± 2.33	270 ± 26.2	0.27 ± 0.09	6.57 ± 1.13
Isc (μA/cm <sup>2</sup> )	0.5	56.1 ± 6.76	-	36.2 ± 3.75	50.3 ± 5.99
	1.0	50.2 ± 3.93	-	31.0 ± 2.85	40.3 ± 3.20
	2.0	47.2 ± 1.33	-	28.3 ± 2.33	42.2 ± 3.34
	5.0	44.9 ± 3.96	-	16.0 ± 2.87	32.2 ± 3.88
	10	50.1 ± 9.93	-	12.1 ± 3.92	28.4 ± 3.03

Data represent mean ± S. E. (n = 3-4).

**Table 5 PD and Isc values in the cornea in the BA permeation experiments.**

	Current density (mA/cm <sup>2</sup> )	Before IP	During IP	After IP application	
				0 min	210 min
[PD] (mV)	0.5	10.7 ± 1.45	149 ± 22.1	9.57 ± 0.52	6.00 ± 1.32
	1.0	6.53 ± 1.29	207 ± 10.5	6.73 ± 0.47	2.46 ± 0.61
	1.5	10.8 ± 0.76	217 ± 29.1	5.23 ± 0.67	2.60 ± 0.61
	2.0	10.5 ± 2.72	229 ± 24.4	4.07 ± 0.19	3.00 ± 1.70
Isc (μA/cm <sup>2</sup> )	0.5	5.61 ± 0.97	-	33.0 ± 5.28	4.47 ± 1.18
	1.0	3.94 ± 0.20	-	28.3 ± 2.00	2.73 ± 0.23
	1.5	4.70 ± 0.08	-	33.0 ± 2.88	3.41 ± 0.13
	2.0	5.45 ± 1.51	-	30.2 ± 5.51	3.56 ± 1.54

Data represent mean ± S. E. (n = 3).

**Table 6 PD and Isc values in the conjunctiva in the BA permeation experiments.**

	Current density (mA/cm <sup>2</sup> )	Before IP	During IP	After IP application	
				0 min	150 min
[PD] (mV)	0.5	15.9 ± 1.65	118 ± 1.06	18.7 ± 0.98	12.2 ± 2.02
	1.0	12.9 ± 1.88	141 ± 5.25	15.6 ± 3.32	8.97 ± 0.64
	2.0	11.4 ± 1.46	157 ± 6.74	10.8 ± 0.46	9.00 ± 0.35
	5.0	15.0 ± 4.44	158 ± 11.8	9.10 ± 1.29	6.93 ± 3.58
	7.5	12.6 ± 1.07	249 ± 26.2	3.03 ± 0.32	0.90 ± 0.36
Isc (μA/cm <sup>2</sup> )	0.5	41.4 ± 4.19	-	81.7 ± 11.7	42.2 ± 3.13
	1.0	37.7 ± 5.31	-	99.4 ± 29.5	35.1 ± 2.75
	2.0	35.9 ± 1.85	-	109 ± 12.5	33.9 ± 2.80
	5.0	34.0 ± 6.17	-	90.5 ± 11.5	24.8 ± 4.90
	7.5	42.5 ± 4.21	-	89.2 ± 14.0	16.1 ± 2.71

Data represent mean ± S. E. (n = 3).

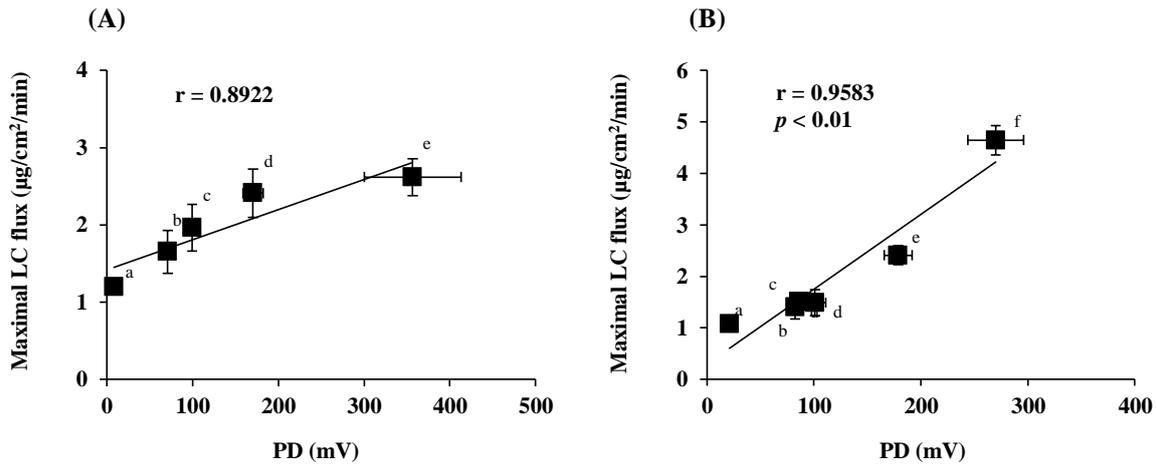
### 第三節 低分子イオン性薬物の眼組織透過 flux と膜電位の関係

薬物の生体膜透過は、Nernst-Planck 式に基づく、膜を介した電気化学ポテンシャルの差に依存する。IP 適用中のイオン性薬物の透過速度( $J$ )は、Nernst-Planck 式を変形した理論式(Eq. 2)と Pikal が誘導した理論式(Eq. 3)<sup>40)</sup>で表される。

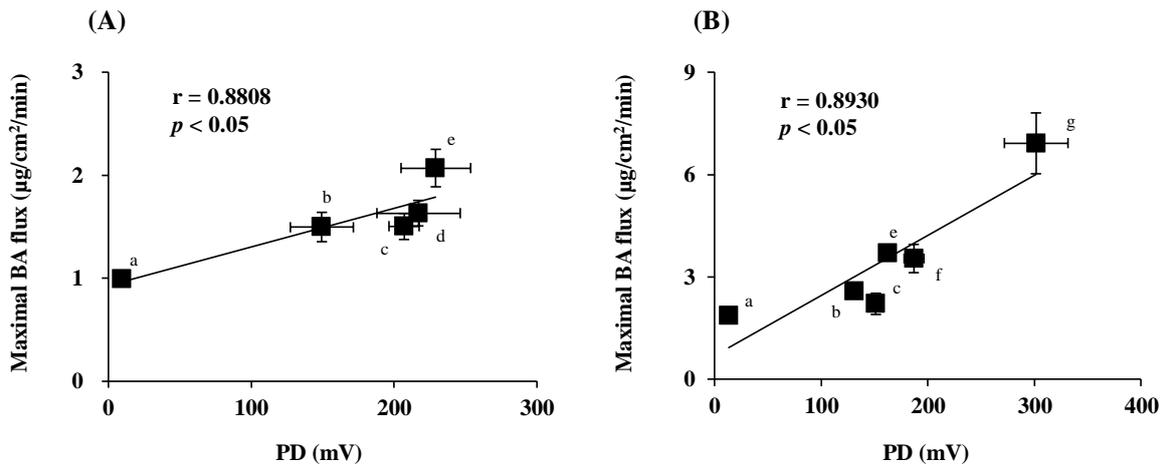
$$J = -D \left\{ \frac{dC}{dx} + \frac{Z \cdot F \cdot C}{RT} \left( \frac{dE}{dx} \right) \right\} \pm J_V \cdot C \quad (\text{Eq. 2})$$

$$J_V = P_{VE} \left( -\frac{d\Phi}{dx} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

ここで、 $D$  は膜中での薬物の拡散係数、 $C$  は薬物イオン濃度、 $Z$  は薬物のイオン価数、 $F$  はファラデー定数、 $J_V$  は electroosmotic volume flow、 $P_{VE}$  は electroosmotic flow 係数、 $dE$  および  $d\Phi$  は電位差である。 $R$  および  $T$  は、それぞれ気体定数および絶対温度である。 $\frac{dC}{dx}$  は濃度勾配による駆動力、 $\frac{Z \cdot F \cdot C}{RT} \left( \frac{dE}{dx} \right)$  は ER による駆動力、 $J_V \cdot C$  は EO による溶媒流である駆動力を示している。Eqs. 2 および 3 に基づくと、ER および EO のいずれの駆動力も電位勾配に比例することから、電流適用下でのイオン性薬物の透過速度( $J$ )は、 $D$  および  $P_{VE}$  一定の条件で PD の値に依存すると理解できる。そこで、IP 適用中の PD と IP 透過実験中に得られた maximal flux との関係をプロットした(Figs. 9 および 10)。ドナー側を陽極とした際の PD と maximal LC flux の関係は、角膜および結膜の両者で良好な相関関係が認められ、 $r$  は角膜および結膜において、それぞれ 0.8922 (Fig. 9A) および 0.9583 (Fig. 9B) だった。ドナー側を陰極とした場合にも、角膜および結膜の両者で良好な相関関係が認められ、 $r$  は角膜および結膜において、それぞれ 0.8808 (Fig. 10A) および 0.8930 (Fig. 10B) だった。



**Figure 9 Relationship between the corneal (A) and conjunctival (B) PD and maximal permeated flux of LC.** a, baseline; b, 0.5  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; c, 1.0  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; d, 2.0  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; e, 5.0  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; f, 10  $\text{mA}/\text{cm}^2$ . Data represent mean  $\pm$  S. E. ( $n = 3-5$ ).



**Figure 10 Relationship between the corneal (A) and conjunctival (B) PD and maximal permeated flux of BA.** a, baseline; b, 0.5  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; c, 1.0  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; d, 1.5  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; e, 2.0  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; f, 5.0  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ; g, 7.5  $\text{mA}/\text{cm}^2$ . Data represent mean  $\pm$  S. E. ( $n = 3$ ).

これらの結果から、イオン性薬物の IP 透過促進効果は電位差依存的な IP 駆動力の増大によるものと考えられた。Marro らは EO 流の指標となるマンニトールを用いた *in vitro* IP 研究で、電流適用下での皮膚を介した低分子カチオン性薬物の透過速度に対す

るマンニトールの透過速度の割合から、IP 透過に対する ER および EO の寄与率を算出した結果、低分子カチオン性薬物の IP 透過は、ER 駆動が 90%以上を担うことを報告した<sup>41)</sup>。したがって、本試験で得られた低分子イオン性薬物の IP 透過促進に対する駆動力も主に ER によるものと考えられるが、TEER が変化する条件では、D や P<sub>VE</sub> が一定とはならないことにも注意する必要があると考えられた。

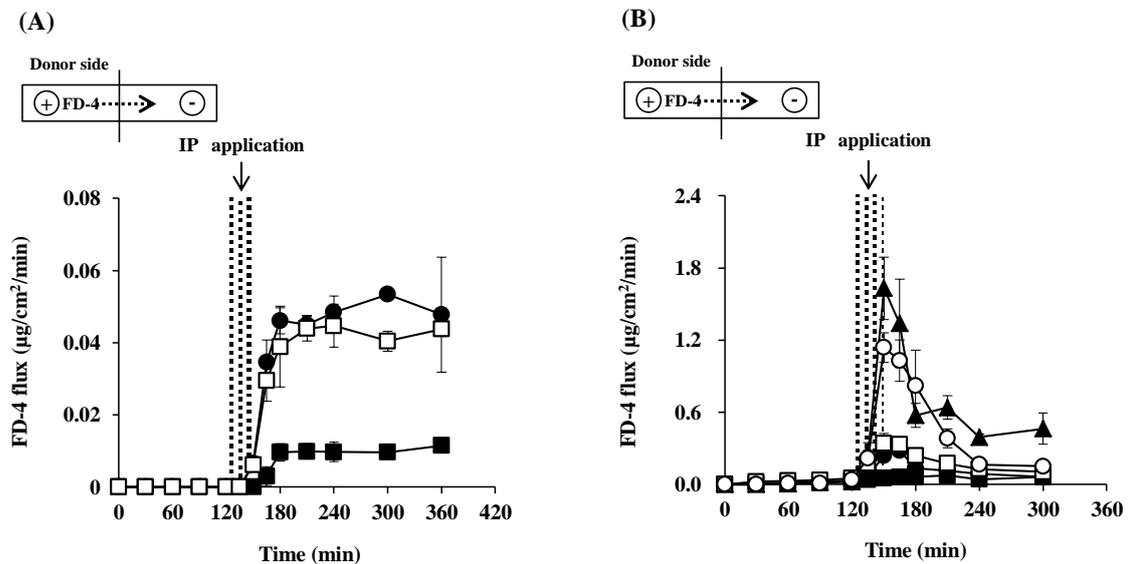
## 第二章 非イオン性薬物の角膜および結膜透過に対するイオントフォレシスの影響

### 第一節 親水性高分子非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

眼内注射で使用される抗体や核酸医薬品は親水性高分子イオン性薬物である。Guyらは、高分子イオン性薬物の IP 透過促進に対して ER よりも EO の寄与が大きく、その寄与率は分子量依存的であることを報告した<sup>14)</sup>。そこで、高分子薬物の IP 透過促進効果を見積もるために、親水性高分子非イオン性薬物である FD-4 をモデル透過物質として用い、前章と同様に角膜および結膜 IP に対する適用電流値の影響を検討した。透過実験開始から 120 分後に、角膜では 5.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 20 mA/cm<sup>2</sup>までの電流値を 30 分間適用した。

Figs. 11A および B は、ドナー側を陽極とした場合の角膜および結膜を介した FD-4 flux の経時的変化をそれぞれ示している。角膜では、120 分までの受動拡散による FD-4 透過量を検出できなかったが、IP 適用により明らかに透過が促進され、IP 適用終了後

から透過実験終了時まで FD-4 flux は高いレベルで持続した(Fig. 11A)。一方、結膜では IP 適用前の受動拡散による FD-4 透過が認められ、IP 適用による FD-4 flux の増大と電流適用終了後の回復が観察された。しかし、その回復は  $10 \text{ mA/cm}^2$  までの適用電流値においてであり、 $20 \text{ mA/cm}^2$  では、baseline まで回復しなかった(Fig. 11B)。



**Figure 11** Time-courses of permeated flux of FD-4 through the cornea (A) and conjunctiva (B) in the anodal IP experiments. ■,  $0.5 \text{ mA/cm}^2$ ; □,  $2.0 \text{ mA/cm}^2$ ; ●,  $5.0 \text{ mA/cm}^2$ ; ○,  $10 \text{ mA/cm}^2$ ; ▲,  $20 \text{ mA/cm}^2$ . Data represent mean  $\pm$  S. E. (n = 3-8).

**Table 7 Enhancement ratio and flux values of FD-4 in the cornea as measured by IP experiments.**

Compound	Current density (mA/cm <sup>2</sup> )	Baseline flux (µg/cm <sup>2</sup> /min)	Maximal flux (µg/cm <sup>2</sup> /min)	Enhancement ratio
FD-4	0.5	N. D.	0.01 ± 0	Acalculia
	1.0	N. D.	0.03 ± 0	Acalculia
	2.0	N. D.	0.05 ± 0.01	Acalculia
	5.0	N. D.	0.06 ± 0	Acalculia

N. D. not detected. Data represent mean ± S. E. (n = 3).

**Table 8 Enhancement ratio and flux values of FD-4 in the conjunctiva as measured by IP experiments.**

Compound	Current density (mA/cm <sup>2</sup> )	Baseline flux (µg/cm <sup>2</sup> /min)	Maximal flux (µg/cm <sup>2</sup> /min)	Enhancement ratio
FD-4	0.5	0.03 ± 0.01	0.10 ± 0.01***	3.42
	1.0	0.04 ± 0.01	0.16 ± 0.05	3.58
	2.0	0.05 ± 0.01	0.45 ± 0.04**	8.93
	5.0	0.03 ± 0.01	0.32 ± 0.03***	10.66
	10	0.04 ± 0.01	1.15 ± 0.13*	28.46
	20	0.02 ± 0	1.66 ± 0.28*	83.01

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. significantly different from baseline flux ( $t$ -test).

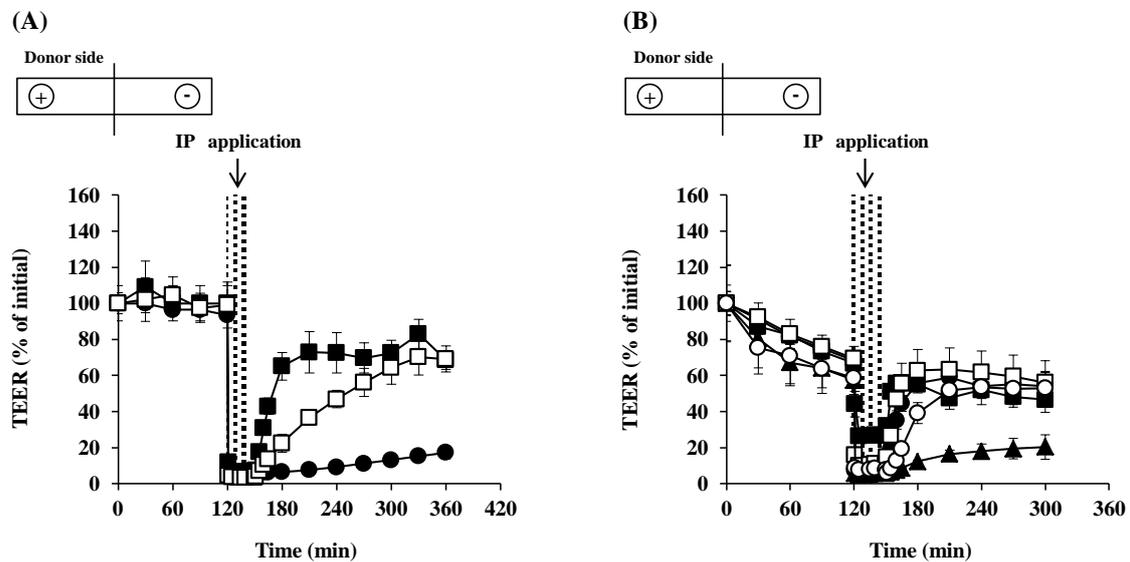
Data represent mean ± S. E. (n = 3-8).

角膜および結膜における FD-4 に対する IP 透過実験で得られた baseline flux、maximal flux および促進率を Tables 7 および 8 に示す。角膜では、baseline の FD-4 が定量限界以下であったため、促進率の算出は不可能であったが、電流値依存的な maximal flux の増大が認められた (Table 7)。結膜では、適用した電流値の範囲において FD-4 の maximal flux は baseline flux に比べ、電流値依存的に有意に増大し、促進率は  $20 \text{ mA/cm}^2$  の適用電流値で約 83 倍と、より強い電流依存性が示された (Table 8)。これらのことから、FD-4 の IP 効果は角膜 IP および結膜 IP とともに適用電流値に依存するが、角膜では増大した FD-4 flux が持続するのに対し、結膜では一過的であり、角膜と結膜で IP 促進特性が異なることが示された。

## 第二節 親水性高分子非イオン性薬物を用いた IP 適用実験中の 眼組織電気抵抗値の変化

Figs. 12A および B は、ドナー側を陽極とした場合の FD-4 透過実験中の角膜および結膜 TEER の経時的変化をそれぞれ示す。角膜および結膜 TEER は、低分子イオン性薬物に対して上皮側を陽極とした実験結果 (Fig. 7) と同様に、IP 適用直後に急激に低下した (Fig. 12)。IP 適用終了後の角膜の TEER は、 $2.0 \text{ mA/cm}^2$  までの条件では TEER に電流値依存的な回復時間の遅れはあるものの、IP 適用前の約 70% まで回復した (Fig. 12A)。 $5.0 \text{ mA/cm}^2$  の適用電流値では、IP 適用終了後に TEER は回復しなかった。結膜においても TEER の回復に電流値依存的な時間の遅れが認められたが、 $10 \text{ mA/cm}^2$  までの条件で IP 適用前の約 90% まで回復した (Fig. 12B)。Tables 9 および 10 に透過実験中にわたりモニターした電気生理学的パラメーターを示す。IP 適用中の PD は電流値

依存的に増大した。また、電流適用後の I<sub>sc</sub> および PD は TEER の回復に対応して、適用前のレベルまで回復する傾向が認められた。



**Figure 12** Time-courses of the corneal (A) and conjunctival (B) TEER in the FD-4 permeation experiments. ■, 0.5 mA/cm<sup>2</sup>; □, 2.0 mA/cm<sup>2</sup>; ●, 5.0 mA/cm<sup>2</sup>; ○, 10 mA/cm<sup>2</sup>; ▲, 20 mA/cm<sup>2</sup>. Data represent mean ± S. E. (n = 3-8).

**Table 9** PD and I<sub>sc</sub> values in the cornea in the FD-4 permeation experiments.

	Current density (mA/cm <sup>2</sup> )	Before IP	During IP	After IP application	
				0 min	210 min
[PD] (mV)	0.5	11.1 ± 1.01	72.1 ± 1.92	0.33 ± 0.09	8.50 ± 0.21
	1.0	16.8 ± 1.94	116 ± 8.26	0.27 ± 0.03	17.0 ± 2.49
	2.0	11.1 ± 2.31	157 ± 26.0	0.17 ± 0.03	6.97 ± 1.65
	5.0	9.83 ± 0.64	457 ± 18.7	0.83 ± 0.13	1.77 ± 0.43
I <sub>sc</sub> (μA/cm <sup>2</sup> )	0.5	5.30 ± 0.85	-	2.88 ± 0.66	5.61 ± 0.67
	1.0	8.64 ± 1.74	-	3.41 ± 0.13	10.9 ± 1.51
	2.0	5.30 ± 1.21	-	3.18 ± 0.47	4.70 ± 1.29
	5.0	5.00 ± 0.39	-	9.50 ± 1.99	4.70 ± 0.15

Data represent mean ± S. E. (n = 3).

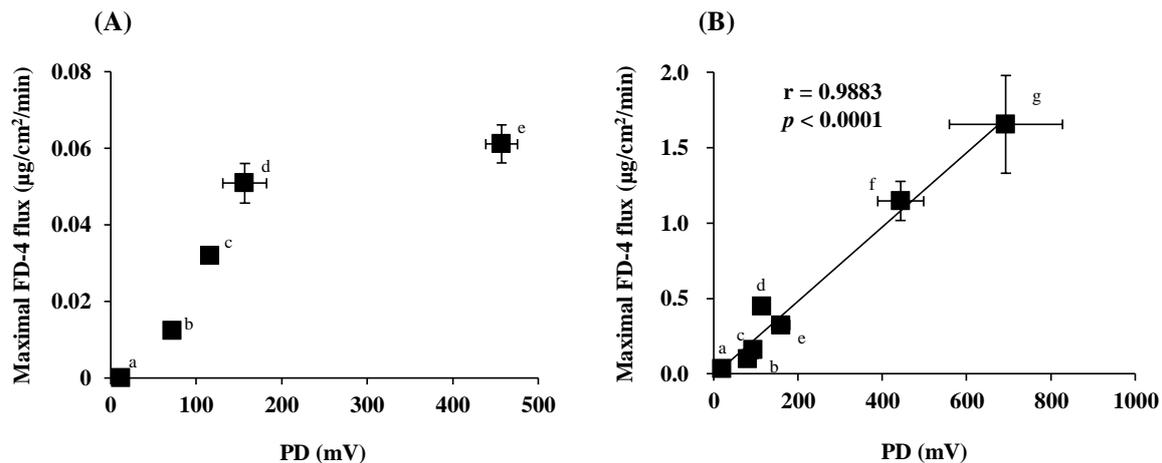
**Table 10 PD and Isc values in the conjunctiva in the FD-4 permeation experiments.**

	Current density (mA/cm <sup>2</sup> )	Before IP	During IP	After IP application	
				0 min	150 min
[PD] (mV)	0.5	20.6 ± 1.96	80.6 ± 2.67	6.36 ± 0.62	13.4 ± 2.88
	1.0	18.3 ± 2.26	94.2 ± 4.18	4.50 ± 1.53	14.4 ± 1.59
	2.0	23.1 ± 4.30	115 ± 17.1	2.18 ± 0.60	13.8 ± 3.35
	5.0	18.1 ± 2.20	160 ± 21.3	1.50 ± 0.28	11.1 ± 1.66
	10	22.6 ± 3.33	444 ± 54.5	0.60 ± 0.00	10.9 ± 1.61
	20	20.4 ± 3.07	664 ± 113	1.08 ± 0.54	4.9 ± 1.61
Isc (μA/cm <sup>2</sup> )	0.5	50.0 ± 4.25	-	39.6 ± 3.35	42.8 ± 6.25
	1.0	57.0 ± 14.7	-	43.9 ± 11.8	45.5 ± 11.1
	2.0	62.0 ± 11.2	-	36.5 ± 8.08	46.6 ± 8.89
	5.0	44.5 ± 6.04	-	26.2 ± 4.00	35.3 ± 5.06
	10	60.8 ± 6.49	-	23.2 ± 8.32	35.3 ± 4.81
	20	56.6 ± 5.48	-	36.0 ± 9.58	31.0 ± 1.81

Data represent mean ± S. E. (n = 3-8).

### 第三節 親水性高分子非イオン性薬物の眼組織透過 flux と 膜電位の関係

第一章第三節の Eq. 3 に示したように、EO の効果は電位勾配に依存し、これが非イオン性薬物である FD-4 に対する透過促進に対する駆動力となっていると考えられる。そこで、IP 適用中の PD と IP 透過実験中に得られた最大 flux との関係をプロットした(Fig. 13)。角膜を介した最大 FD-4 flux は、PD に依存して増大したが、高い PD 値(400 mV)で頭打ちになる傾向にあった(Fig. 13A)。一方、結膜では PD と最大 FD-4 flux の間に有意な相関関係( $r = 0.9883, p < 0.0001$ )が認められた(Fig. 13B)。結膜では IP 適用中にのみ FD-4 flux の増大が認められたことから(Fig. 11B)、IP の透過促進効果は電流値依存的な EO 駆動によるものと考えられた。一方、角膜においても PD に依存した flux の増大が認められたが、IP 適用終了後にも増大した flux が維持されたことから(Fig. 11A)、通常、角膜を拡散しない FD-4 が IP 適用中に電流値依存的な EO 効果により角膜へ移行し、その後角膜内に滞留していることが推測された。そこで、次節において、IP 適用後の薬物の組織滞留性を評価することにした。



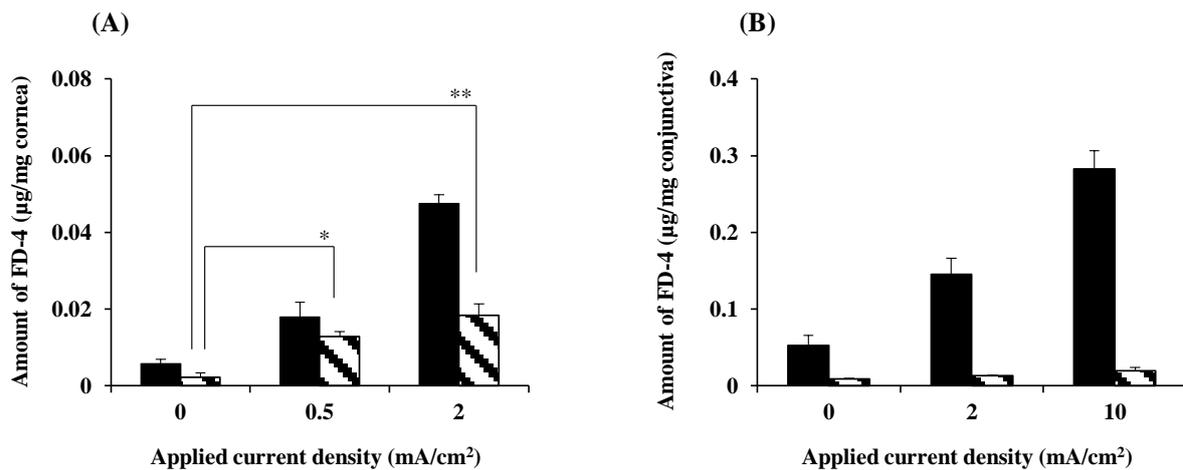
**Figure 13 Relationship between the corneal (A) and conjunctival (B) PD and maximal permeated flux of FD-4.** a, baseline; b, 0.5 mA/cm<sup>2</sup>; c, 1.0 mA/cm<sup>2</sup>; d, 2.0 mA/cm<sup>2</sup>; e, 5.0 mA/cm<sup>2</sup>; f, 10 mA/cm<sup>2</sup>; g, 20 mA/cm<sup>2</sup>. Data represent mean ± S. E. (n = 3-4).

#### 第四節 角膜および結膜における親水性高分子の

#### イオントフォレシス促進効果に対する組織滞留性の影響

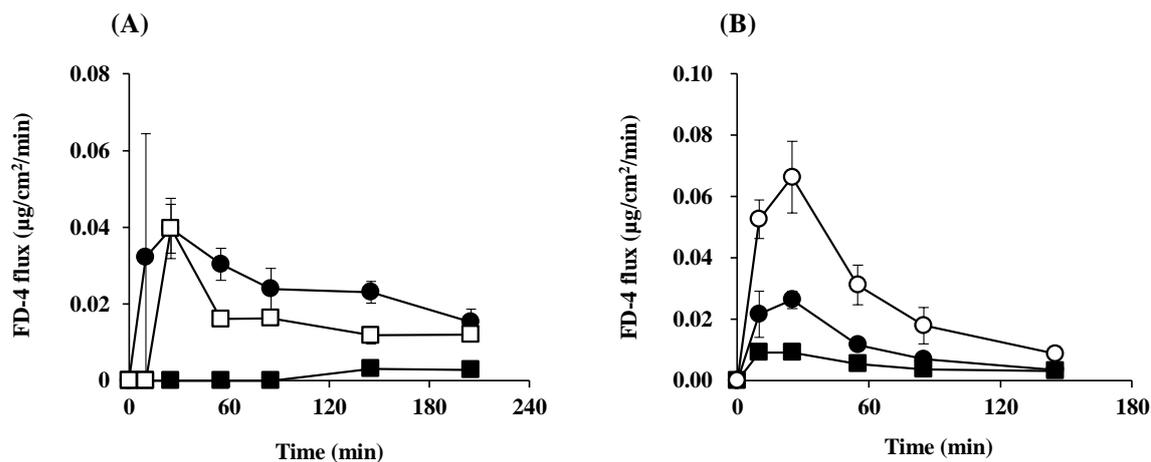
前節の検討から、角膜における FD-4 flux 増大の持続が、角膜中での FD-4 の滞留によるものと考えられた。そこで、本節では IP 適用終了後の角膜および結膜内 FD-4 の滞留性を評価し、比較した。適用電流値間での滞留性の違いも評価するため、前節の FD-4 透過促進に明らかな差が認められた電流値を選択した。ドナー側を陽極として、角膜では 0.5 および 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 2.0 および 10 mA/cm<sup>2</sup> の電流を 30 分間適用した。また、電流を適用していない条件(0 mA/cm<sup>2</sup>)を control とした。IP 適用終了直後にドナー側およびレシーバー側の chamber 内溶液を新鮮な重炭酸リンゲル液(BRS)で置換し、IP 適用終了直後および IP 適用終了から既定時間経過後(角膜: 210 分後、結膜: 150 分後)の組織内 FD-4 量を測定した。また、IP 適用終了後のレシーバー側への FD-4

放出性も評価した。Figs. 14A および B は、IP 適用終了直後および IP 適用終了後に得た角膜および結膜内 FD-4 量をそれぞれ示している。IP 適用終了直後の角膜および結膜内 FD-4 量は電流値依存的に有意に増大した。IP 適用終了 210 分後および 150 分後の角膜および結膜内それぞれの FD-4 量は適用終了直後に比べて低下したが、210 分後の角膜内 FD-4 量はいずれの適用電流値でも control に比べて有意に高く (Fig. 14A, hatched column) ( $0.5 \text{ mA/cm}^2$  で 5.74 倍、 $2.0 \text{ mA/cm}^2$  で 8.23 倍)、一方、結膜ではいずれの電流値でも IP 適用後 150 分で control と有意な差はなかった (Fig. 14B, hatched column)。



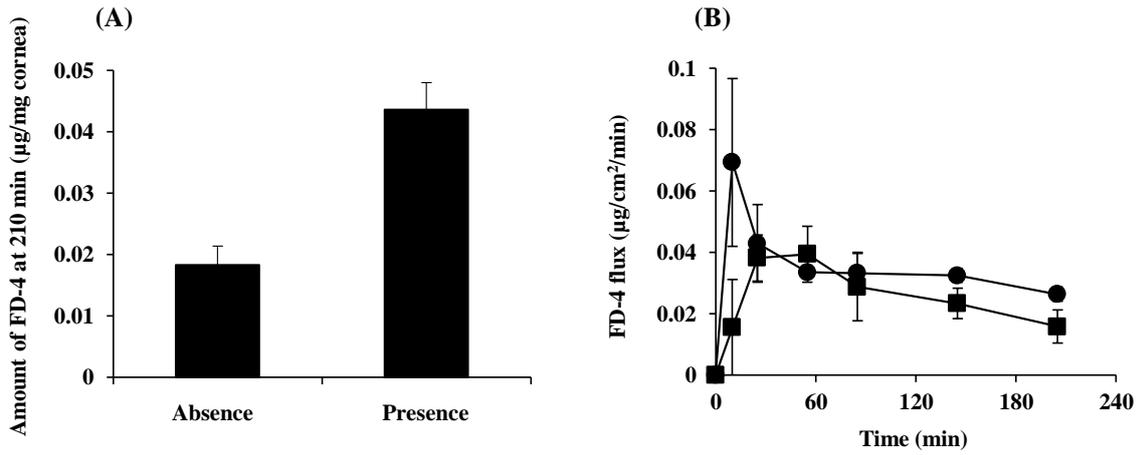
**Figure 14 Retained amount of FD-4 in the cornea (A) and conjunctiva (B) after anodal IP application.** Closed bars are the FD-4 concentration immediately after IP application. Hatched bars are the FD-4 concentration at 210 min for the cornea and 150 min for the conjunctiva after IP application. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. significantly different from  $0 \text{ mA/cm}^2$  (Tukey-Kramer test). Data represent mean  $\pm$  S. E. (n = 3-4).

Figs. 15A および B は、それぞれ IP 適用終了後の角膜および結膜からフレッシュなレシーバー液に入れ換えたレシーバー側への FD-4 放出 flux の経時的変化を示している。IP 適用により増大した FD-4 放出 flux は、結膜では時間依存的に徐々に低下し、IP 適用終了から 150 分後の放出 flux は control レベルまで低下した(Fig. 15B)。しかし、結膜における放出 flux の値は前章第一節の透過 flux の値に比べて低いものであった。このことは、放出実験開始時に両チャンバー溶液をフレッシュな BRS に置き換えたため、レシーバー側のみならずドナー側へも FD-4 が放出されることに起因していると考えられる。実際に、 $2.0 \text{ mA/cm}^2$  適用実験終了時までドナー側へ放出された FD-4 量は、結膜ではレシーバー側へのものと比べて 9 倍であった(data not shown)。この両側への放出性の高さが、IP 適用による FD-4 flux の上昇が一過性である要因として関与していると推測される。角膜からの放出 flux の場合、角膜での通常の IP 透過実験から得られた持続的な FD-4 flux (Fig. 11A)と比べて、時間依存的に低下する傾向が認められたが(Fig. 15A)、210 分後で control に比べて明らかに高かった。本実験系ではドナー側薬物溶液も薬物非含有の溶液に入れ換えた状態で放出挙動を見積もっているため、結膜の場合と同様に、ドナー側への薬物放出のため角膜中薬物量が低下している可能性がある。そこで、IP 適用終了後に角膜のドナー側溶液が存在する条件下でレシーバー側への放出挙動を評価し、非存在下での放出挙動と比較した。

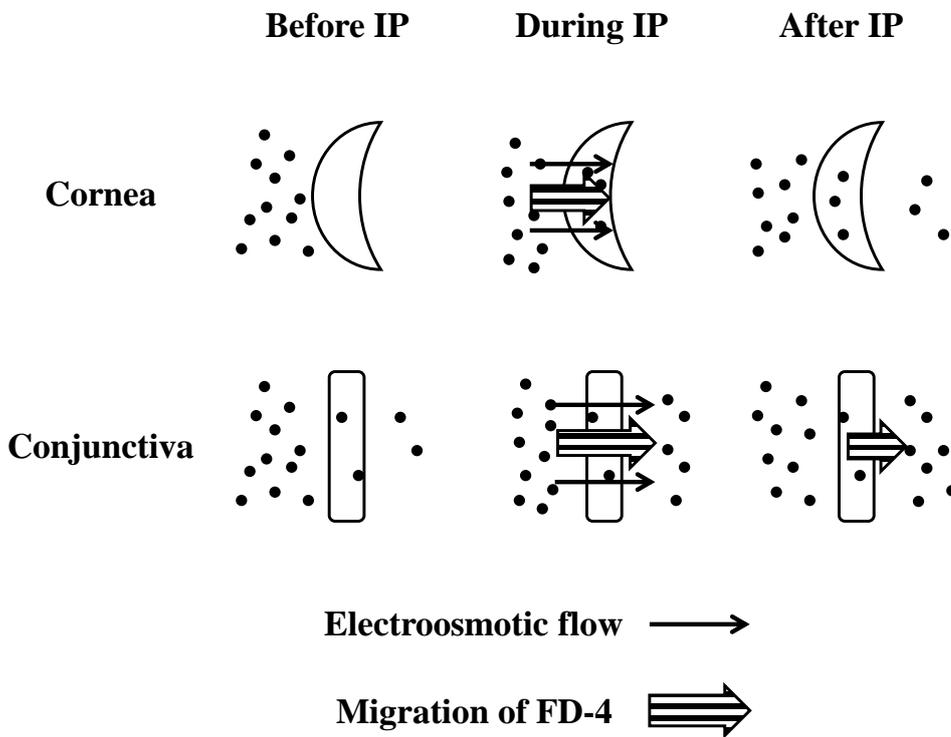


**Figure 15** Time-courses of released flux of FD-4 from the cornea (A) and conjunctiva (B) after anodal IP application. ■, 0 mA/cm<sup>2</sup>; □, 0.5 mA/cm<sup>2</sup>; ●, 2.0 mA/cm<sup>2</sup>; ○, 10 mA/cm<sup>2</sup>. Data represent mean ± S. E. (n = 3-4).

Figs. 16A および B は、ドナー側 FD-4 の存在下および非存在下での角膜中 FD-4 量およびレシーバー側への放出 flux の経時変化をそれぞれ示している。ドナー側 FD-4 存在下での 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、30 分間の電流適用終了 210 分後の角膜中 FD-4 量は、FD-4 非存在下に比べて約 3.5 倍高かった(Fig. 16A)。ドナー側 FD-4 存在下でのレシーバー側への FD-4 放出 flux は、FD-4 非存在下に比べ、30 分以降で高い値で推移した(Fig. 16B)。これらの結果から、眼組織を介した FD-4 透過に対する IP の促進効果の違いは Fig. 17 のようにまとめることができる。角膜では、通常、組織中へ移行しない FD-4 は IP 適用中の EO 効果により組織中に入り込み、IP 適用終了後に角膜内に FD-4 が滞留することで、FD-4 滞留量に依存した放出 flux の増大が IP 適用終了後 210 分まで維持される。一方、結膜では、IP 適用中の FD-4 透過は EO 効果により増大し、IP 適用終了後の組織内に存在する FD-4 が滞留しにくいため、放出 flux が IP 適用終了後 150 分で control レベルまで低下するものと推測される。以上、FD-4 の IP 促進特性の違いは、角膜および結膜における滞留性の違いが要因の一つであると考えられた。



**Figure 16** Retained amount of FD-4 (A) at 210 min and time-courses of released flux of FD-4 (B) in the cornea after anodal IP application at  $2.0 \text{ mA}/\text{cm}^2$  in the presence or absence of donor FD-4. ■; absence of FD-4 in the donor side, ●; presence of FD-4 in the donor side. Data represent mean  $\pm$  S. E. (n = 3-4).



**Figure 17** Schematic diagram of different permeation enhancement of FD-4 (●) in the cornea and conjunctiva.

### 第三章 本編の考察および小括

本編では、家兎角膜および結膜におけるイオン性および非イオン性薬物の透過性に対する電流値の影響、さらに電気生理学的パラメーターに基づいた組織生存性および integrity に対する影響を検討した。

眼組織 IP の *in vivo* 研究は、経皮 IP 薬物送達における電流値( $\sim 0.5 \text{ mA/cm}^2$ )<sup>14)</sup>と比較して高い電流値( $0.8\sim 28.2 \text{ mA/cm}^2$ )<sup>17-26)</sup>で評価されてきた。従って、生きた組織における IP の場合、生存性および integrity の観点からの組織機能に対する適用電流値の影響を知ることは重要である。本編の結果から、角膜および結膜の TEER 値は、上皮側を陽極または陰極を設置したいずれの条件でも IP 適用により急激に低下し、IP 適用終了後に回復することが明らかとなった(Figs. 7, 8 および 12)。組織 TEER の回復は、上皮側を陽極にした場合では(Figs. 7 および 12)、角膜で  $2.0 \text{ mA/cm}^2$ 、結膜で  $10 \text{ mA/cm}^2$ 、また上皮側を陰極にした場合では(Fig. 8)、角膜で  $2.0 \text{ mA/cm}^2$ 、結膜で  $5.0 \text{ mA/cm}^2$  の適用電流適用値で観察された。電流適用後の PD および  $I_{sc}$  の回復もまた TEER の挙動と一致したことから(Tables 3-6, 9 および 10)、これら適用電流値までは角膜および結膜の生存性および integrity を IP 適用後も維持していると考えられた。以上の結果から、眼組織 IP における組織生存性および integrity における適用電流に対する感受性は、組織により異なることが明らかとなり、さらに電極の設置方向、すなわち電流向きにも依存することが明らかとなった。

角膜および結膜を介した LC の baseline flux から算出した見かけの透過係数( $P_{app}$ )は、それぞれ  $3.98 \pm 0.25$  および  $3.58 \pm 0.19 (\times 10^{-5} \text{ cm/s})$  であり、BA の  $P_{app}$  は、それぞれ  $0.83 \pm 0.05$  および  $1.56 \pm 0.07 (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$  であった。加えて、結膜を介した FD-4 の  $P_{app}$  は  $1.14 \pm 0.13 (\times 10^{-7} \text{ cm/s})$  であったが、角膜を介した FD-4 の透過量は検出限界以下のた

め、 $P_{app}$  を算出できなかった。本研究において、モデル透過物質に使用した LC、BA および FD-4 の  $P_{app}$  は、これまでに角膜および結膜で報告された値<sup>42-45)</sup>と近いことから、本研究で得られた  $P_{app}$  は妥当な値であると考えられた。角膜および結膜において、LC では上皮側を陽極、BA では上皮側を陰極としたとき、IP 適用により flux が増大した(Figs. 5 および 6、Tables 1 および 2)。このことは、イオン性薬物の透過が電流の流れと一致することを示している。イオン性薬物の IP 駆動力は膜を介した電気化学ポテンシャル差であるため<sup>14, 16, 46)</sup>、LC および BA の透過は、抵抗が一定の条件では電流影響下の膜を介した PD に依存することが推測される。実際に、IP 適用により得られた最大 flux は、IP 適用中の角膜および結膜 PD に比例した(Figs. 9 および 10)。しかしながら、IP により得られた LC および BA の促進率(約 2-4 倍)は、経皮 IP で得られる典型的な促進効果<sup>47, 48)</sup>と比較して高いものではない。その原因として、角膜および結膜を介した IP flux において、LC および BA の輸率が低いことが考えられる。

電流適用下でのイオンの透過速度は膜を流れる総電流量(I)に依存し、Eq. 4 で表される。

$$I = F \left( \sum_C J_+ + \sum_A J_- \right) \cdot \text{Area} \quad (\text{Eq. 4})$$

ここで、F はファラデー定数(96485 C/mol)、Area は電流の有効面積である。Eq. 4 で示すように、I は膜を介したカチオンの透過速度とアニオンの透過速度の総和であることが理解できる。すなわち、電流適用時に移動する荷電には、薬物イオンだけでなく、共存する同符号や異符号のイオンも含まれ、イオン性薬物の透過速度は同槽に共存するイオン種易動度の影響を受ける。輸率を考慮した薬物イオンの透過速度( $J_D$ )および

薬物イオンの輸率( $t_D$ )は以下の式(Eqs. 5 および 6)で表される<sup>14)</sup>。

$$J_D = \frac{1}{Z_D \cdot \text{Area} \cdot F} \cdot t_D \cdot I \quad (\text{Eq. 5})$$

$$t_D = \frac{z_D \cdot u_D \cdot c_D}{\sum_{n=0}^i z_i \cdot u_i \cdot c_i} \quad (\text{Eq. 6})$$

ここで、 $z$  はイオン価数、 $u$  は易動度、および  $c$  はイオン濃度である。添え字の  $D$  および  $i$  は薬物およびその他のイオンを示す。Eq. 5 は電流適用下でのイオン性薬物の flux が薬物イオンの輸率に依存し、Eq. 6 は薬物イオンの輸率が、溶液中に含まれるイオン種の総量と易動度の積の比で決まることを意味している。本研究では、眼組織の生存性を維持するために必要なイオン種が BRS 中に多量に含まれているため、定電流影響下、LC や BA よりもイオン移動度の高いイオン種の  $I$  に対する寄与、すなわち輸率が高くなっているものと考えられる。実際に、Mudry らの理論式<sup>49)</sup>により算出した本検討における LC および BA イオンの輸率(Table 11)は、易動度の高い  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  および  $\text{HCO}_3^-$  のような共存イオンの輸率( $\text{Na}^+$ : 0.42,  $\text{K}^+$ : 0.02,  $\text{Cl}^-$ : 0.48,  $\text{HCO}_3^-$ : 0.07)に比べて極めて低く、その値は電流値依存的に低下した(Table 11)。このことから、適用した電流のほとんどは薬物イオンによるものではなく、共存イオンの移動によるものであると推測された。また、適用電流値に対して比例関係ではない LC および BA の IP 透過促進効果は、LC および BA の輸率が電流値依存的に低下していることに起因していると考えられた。加えて、IP 適用中に観察された TEER の低下から、細胞間隙の拡大による各種イオンの移動の増大が考えられ、このことも薬物イオンの輸率が低いことに起因していると考えられる。したがって、IP により低分子イオン性薬物に対

して高い透過促進効果を得るためには、薬物の妥当な輸率が得られるイオン組成を考慮する必要があると考えられる。事実、点眼薬や結膜下注射に比べて眼内局所で数十倍の薬物濃度が得られている眼組織 IP の *in vivo* 研究では、共存イオンの影響を受けない水を薬物リザーバー溶液に使用している<sup>18,22,24)</sup>。以上より、低分子イオン性薬物の眼組織 IP では、共存イオンの影響を考慮した条件設定が重要であることが示唆された。

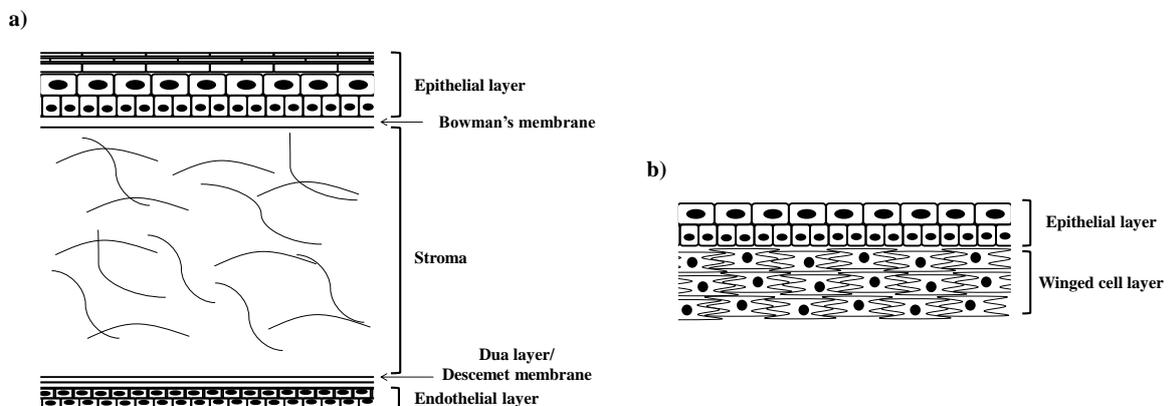
**Table 11 Transport number of LC and BA in the cornea and conjunctiva as measured by IP experiments.**

<b>Tissue</b>	<b>Ionic compound</b>	<b>Current density (mA/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Transport number</b>
<b>Cornea</b>	<b>LC</b>	0.5	0.0081 ± 0.0012
		1.0	0.0047 ± 0.0006
		2.0	0.0030 ± 0.0003
		5.0	0.0014 ± 0.0001
	<b>BA</b>	0.5	0.0164 ± 0.0008
		1.0	0.0077 ± 0.0003
		1.5	0.0056 ± 0.0006
		2.0	0.0046 ± 0.0002
<b>Conjunctiva</b>	<b>LC</b>	0.5	0.0085 ± 0.0012
		1.0	0.0038 ± 0.0005
		2.0	0.0020 ± 0.0002
		5.0	0.0013 ± 0.0000
		10	0.0026 ± 0.0002
	<b>BA</b>	0.5	0.0251 ± 0.0015
		1.0	0.0115 ± 0.0001
		2.0	0.0117 ± 0.0006
		5.0	0.0089 ± 0.0009
		7.5	0.0164 ± 0.0017

Data represent mean ± S. E. (n = 3-5).

非イオン性親水性高分子のモデルとして用いた FD-4 の角膜および結膜を介した透過に対して、種々電流値で IP 適用したとき、PD 依存的な flux の増大が観察された(Fig. 13)。Eq. 3(第一章第三節)で示されるように、EO の効果は膜を介した電位差に依存す

るので、FD-4 の flux の増大は、生理的 pH で負に荷電した生体膜において、陽極から陰極方向へ生じる EO 効果<sup>16,47)</sup>に起因すると思われた。実際に、結膜において FD-4 flux の増大は IP 適用中のみ観察されており、EO による溶媒流の一過的な誘導に起因していることを強く示唆している(Fig. 11B)。一方、角膜を介した FD-4 flux は、結膜での挙動とは異なり、IP 適用後にも持続した(Fig. 11A)。これは角膜中に FD-4 が滞留していることによると推測されたため、IP 適用から 210 分後の角膜内 FD-4 量および角膜からの放出 flux を測定したところ、IP 適用群の FD-4 量および放出 flux は、IP 非適用群と比較して明らかに高かった(Figs. 14A および 15A)。また、ドナー側 FD-4 存在下では、非存在下に比べて角膜中 FD-4 量は高く、角膜からの放出 flux も高い値で維持された(Fig. 16)。このことから、IP により角膜へ移行した FD-4 が組織内に滞留することによって、放出 flux が保たれているものと推察された。これは角膜と結膜の構造的な違い<sup>50,51)</sup>によるものかもしれない。すなわち、角膜は上皮細胞層、ボーマン膜、基質層、デュア層、デスメ膜および内皮細胞層から成り(Fig. 18a)、特に上皮細胞層と内皮細胞層に挟まれた領域に高分子薬物が滞留し、内皮細胞層もバリアとして機能して、flux が持続化した可能性が考えられる。一方、結膜は上皮細胞層および翼細胞(Fig. 18b)から成り、組織中で高分子薬物が滞留できる領域が少ないものと考えられる。

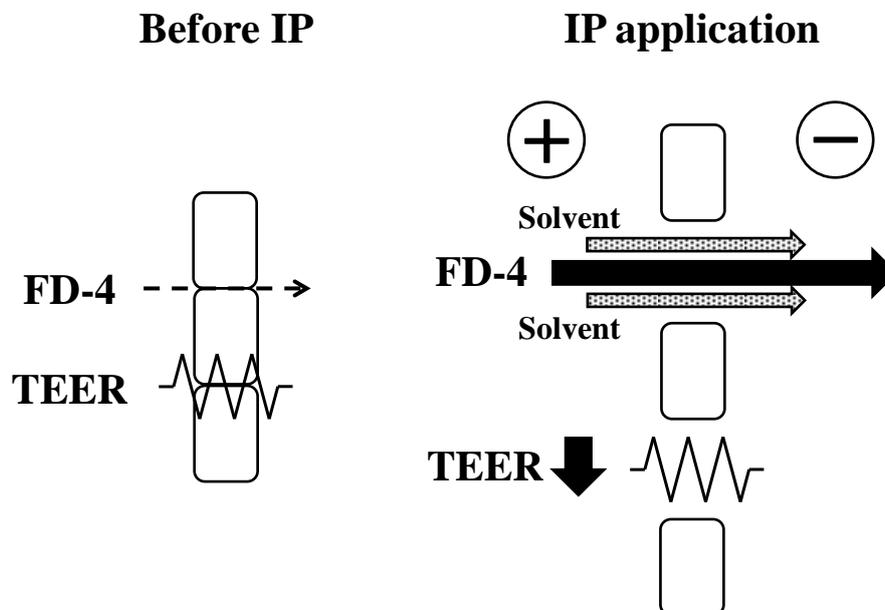


**Figure 18** Corneal (a) and conjunctival (b) structure of the human eye.

## 第二編

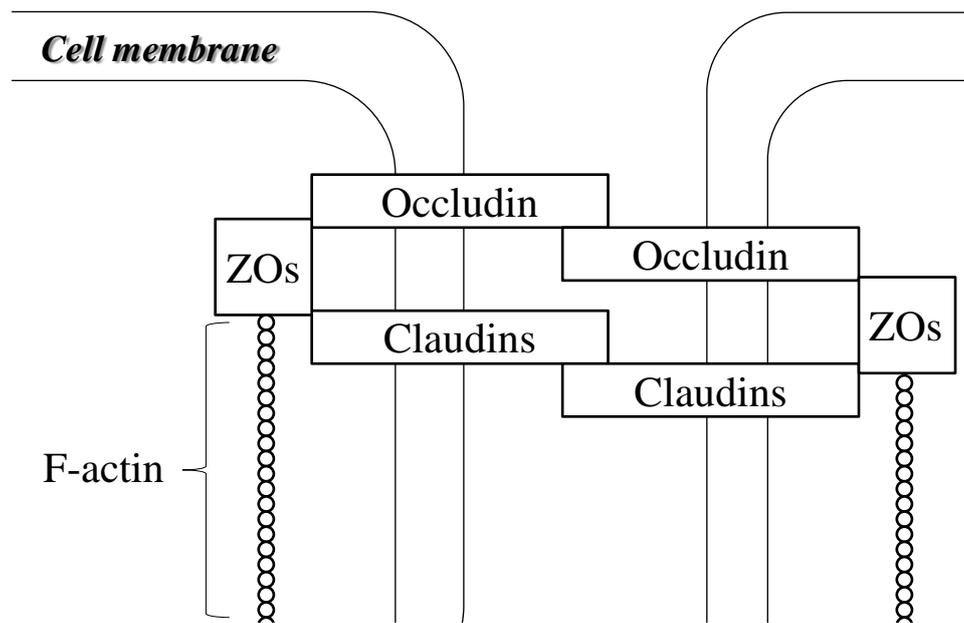
# イオントフォレシスにより細胞間隙が受ける影響と 促進機構との関連性

結膜では、FD-4 のような親水性高分子は、その見かけの透過係数( $P_{app}$ )は TEER の逆数に比例し、その透過経路は細胞間隙であることが知られている<sup>13)</sup>。また poly-L-arginine (PLA) のようなカチオン性透過促進剤の処理による、結膜 TEER の可逆的な低下、すなわち細胞間隙経路の可逆的な拡大により、FD-4 のような親水性高分子の透過が増大することが報告されている<sup>13)</sup>。前編で示したように、比較的低い定電流の 30 分間の適用により、角膜および結膜 TEER の可逆的な低下が生じたことから (Figs. 7, 8 および 12)、IP 適用が細胞間隙経路に影響し、親水性高分子の透過促進に関与している可能性がある (Fig. 19)。



**Figure 19** Schematic diagram of reduced barrier of paracellular pathway and permeation enhancement of FD-4 in the ocular epithelia by IP application.

上皮組織を介した薬物の細胞間隙透過は TJ により制限され、それは 4 回膜貫通タンパク質である claudins や occludin、膜裏打ちタンパク質である zonula occludens proteins (ZO)、さらには細胞骨格である actin filament (F-actin)などのタンパク質複合体で形成される(Fig. 20)<sup>52, 53)</sup>。



**Figure 20 Schematic diagram of tight junction complex in consist of claudins, occludin, ZOs and actin filament (F-actin) in epithelial and endothelial cell-cell junction.**

Leonaldらは、小腸結腸のモデルとして広く利用されている Caco-2 単層膜を用いた IP 研究を行い、TEER の低下に伴い親水性高分子化合物の透過が促進され、電子顕微鏡画像に基づき IP 適用が TJ 開口を導くことを報告した<sup>54)</sup>。すなわち生きた上皮組織では、IPはTJ関連タンパク質の会合状態を変化させることで細胞間隙経路を拡大し、通常は制限されている親水性高分子の膜透過促進に関与していることが考えられる。しかしながら、重層上皮細胞層から成る角膜や結膜における薬物の IP 透過促進機構に関する研究はほとんど行われておらず、細胞間隙透過性の制限に重要な TJ 機構に

対して IP がどのような影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。

そこで第二編では、細胞間隙部位に存在する TJ 機構に対する電流適用の影響を明らかにするため、家兔摘出角膜および結膜における上皮 TJ 関連タンパク質の局在性および存在量に対する電流適用の影響、さらには上皮 F-actin の局在性に対する影響を評価し、IP による薬物透過促進と TJ 開口との関係について考察した。

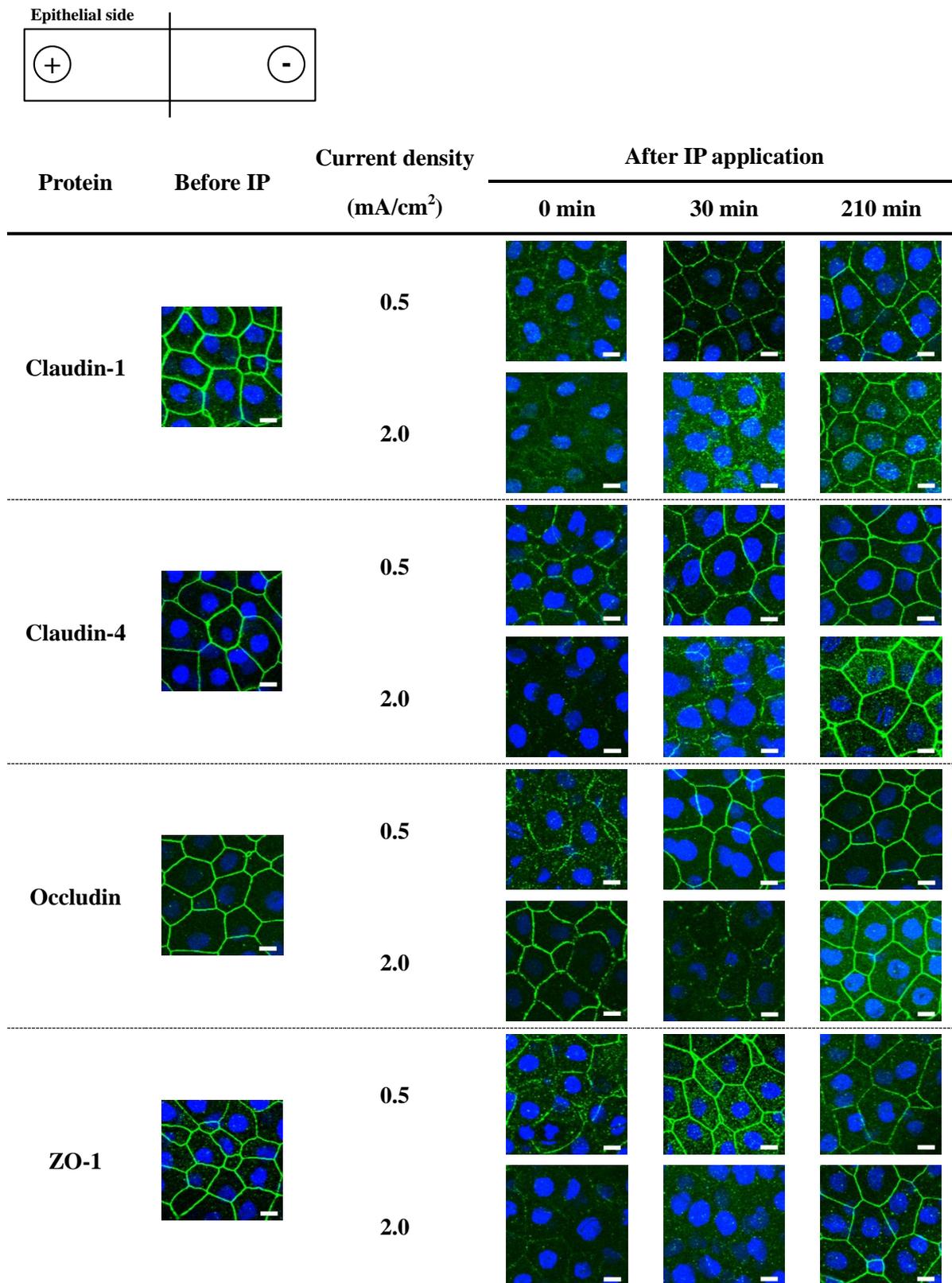
## 第一章 角膜および結膜上皮タイトジャンクション

### 関連タンパク質の局在性に対する電流適用の影響

まず、TJ 関連タンパク質の会合状態を定性的に評価するため、TJ 関連タンパク質のバイオイメージングに広く使用される免疫染色法により局在性を評価することとした。Huong らは、角膜および結膜を用いた薬物透過性に関する *in vitro* 研究を行い、親水性化合物の角膜および結膜透過が分子サイズ依存的であり、horse radish peroxidase の結膜透過が上皮細胞の TJ により制限されることを報告した<sup>55)</sup>。著者らの予備的検討では、重層細胞層を有する角膜および結膜上皮において、TJ 関連タンパク質である claudin-1、claudin-4、occludin および ZO-1 の局在が一致するのは第 1 層目のみであり、TJ は上皮層の最上皮のみで形成されることが示唆された(data not shown)。そこで本章では、角膜および結膜上皮細胞層の第 1 層目に着目し、TJ 関連タンパク質の局在性に対する電流適用の影響を試験した。

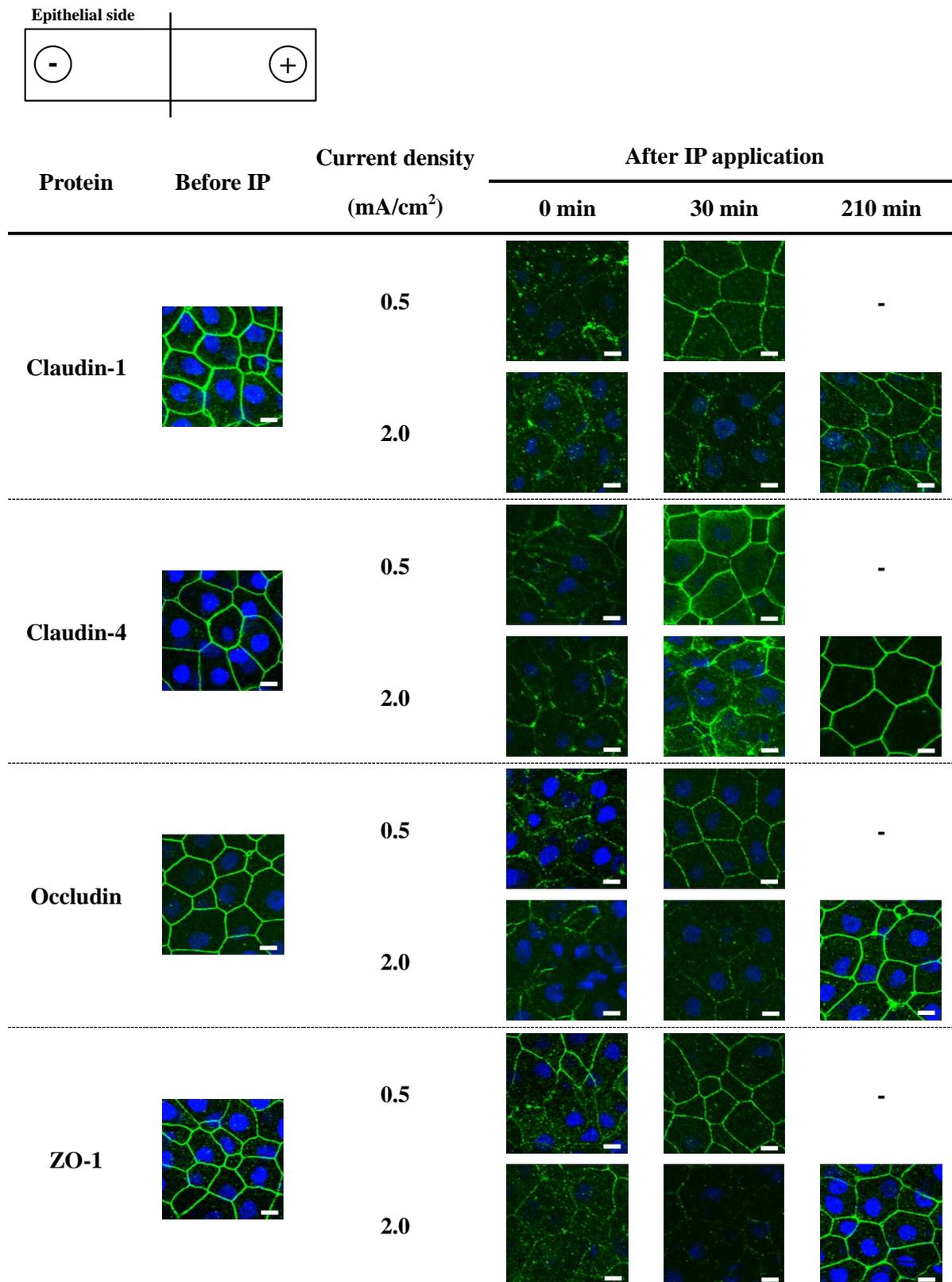
第一編において、IP 適用終了後の角膜および結膜 TEER の回復速度が電流値に依存し、電流値増大に伴い回復が遅れることが認められたため、適用電流値が TJ 関連タンパク質の会合状態の回復過程に影響していると考えられる。本章では、TEER の回復速度に明らかな違いが認められた電流値を用いることにした。すなわち、上皮側を陽極とした場合は、角膜では 0.5 および 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 0.5 および 10 mA/cm<sup>2</sup>、上皮側を陰極とした場合は、角膜では 0.5 および 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 0.5 および 5.0 mA/cm<sup>2</sup> を 30 分間適用する条件とした。Figs. 21 および 22 は、上皮側をそれぞれ陽極および陰極とした場合の角膜上皮 TJ 関連タンパク質の蛍光画像、Figs. 23 および 24 は、それぞれ上皮側を陽極および陰極とした場合の結膜上皮 TJ 関連タンパク質の蛍光画像を示している。角膜および結膜ともに、電流適用前に細胞辺縁部に局在してい

た claudin-1、claudin-4、occludin および ZO-1 の蛍光シグナルは(Figs. 21-24, Before IP)、適用終了直後に全てのタンパク質において低下した(Figs. 21-24, 0 min after IP application)。低下した TJ 関連タンパク質の蛍光シグナルは、本検討で適用した電流値に関係なく、角膜では適用終了から 210 分後(Figs. 21 および 22, 210 min after IP application)、結膜では適用終了から 90 分後に細胞辺縁部に再び確認された(Figs. 23 および 24, 90 min after IP application)。しかし、適用電流値が低い条件では、角膜では電流適用終了から 30 分後(Figs. 21 および 22, 30 min after IP application)、結膜では電流適用終了から 15 分後の蛍光画像から(Figs. 23 および 24, 15 min after IP application)、蛍光シグナルの細胞辺縁への再局在が確認できるが、高い条件ではそうではなく、適用電流値が高い場合、再局在に長い時間が必要と考えられた。これらの結果は、IP 適用時の TJ 関連タンパク質の局在性変化が Figs. 7, 8 および 12 に示した TEER の変化に一致する傾向であることを示し、IP 適用中に認められた角膜および結膜バリアの低下は TJ 関連タンパク質の会合状態の可逆的な変化によるものであると推察された。しかしながら、電流適用終了直後の TJ 関連タンパク質の蛍光シグナルの低下は、電流適用が抗原抗体反応に重要なタンパク質のエピトープ部位に影響を及ぼしていることや、TJ 関連タンパク質の分解を引き起こしていることによるとも考えられる。そこで、次章では、TJ 関連タンパク質の量的な変化を観点として着目して評価した。



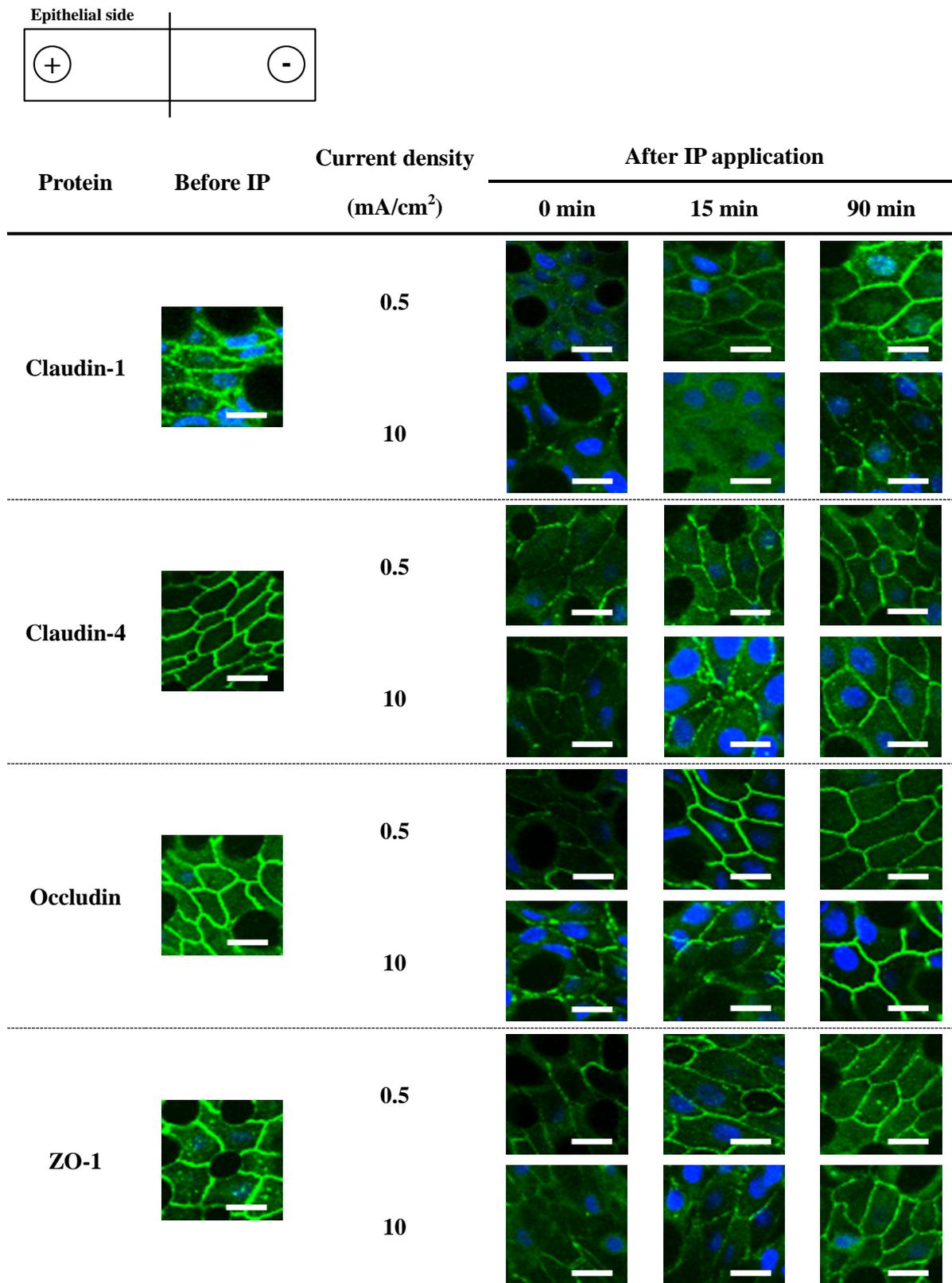
**Figure 21** Localization of tight junction (TJ) -associated proteins in the rabbit corneal epithelium before and after anodal IP application. Bar = 10  $\mu$ m.

Green signal is TJ-associated proteins. Blue signal is nucleus.



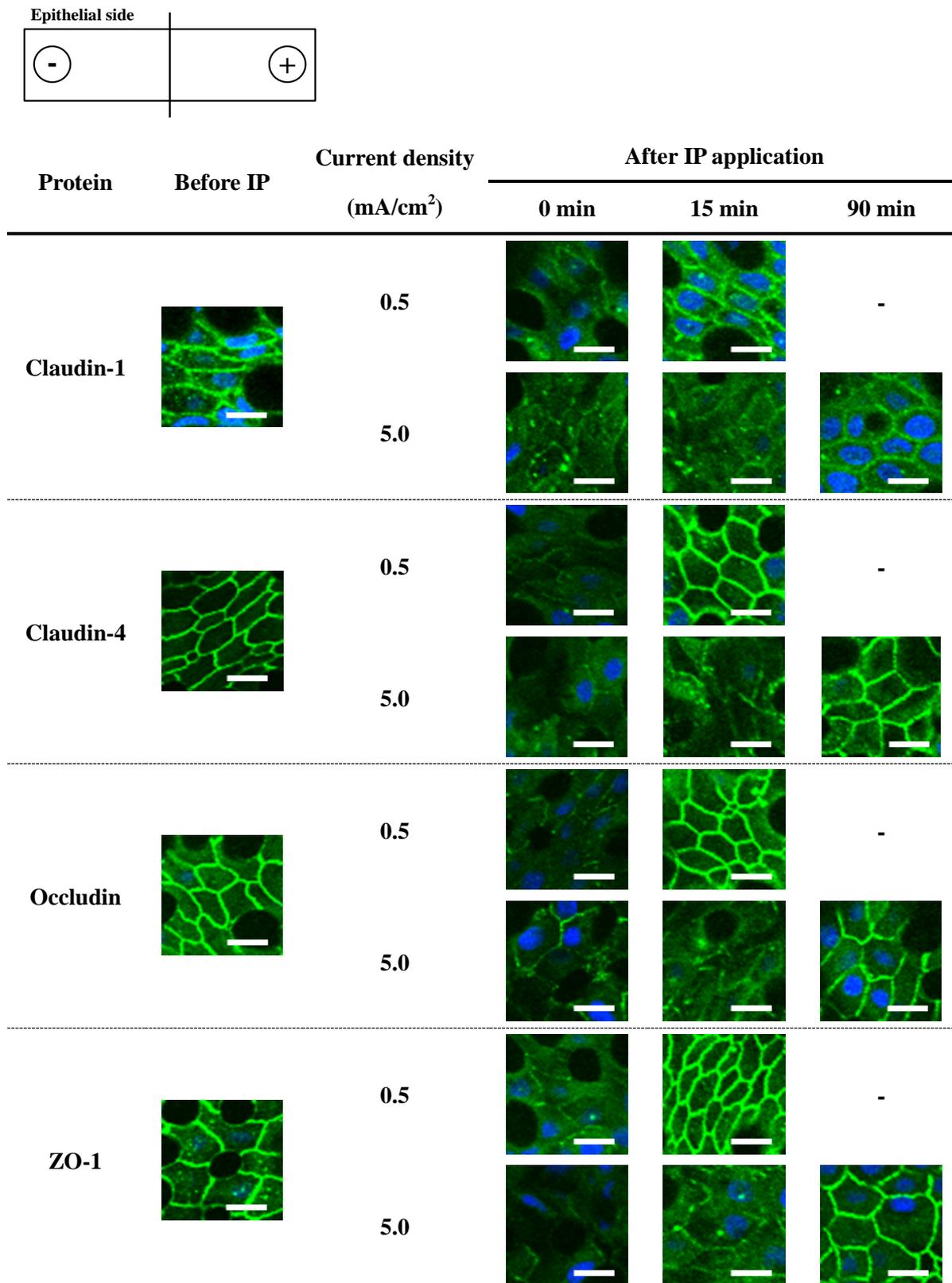
**Figure 22** Localization of tight junction (TJ)-associated proteins in the rabbit corneal epithelium before and after cathodal IP application. Bar = 10  $\mu$ m.

Green signal is TJ-associated proteins. Blue signal is nucleus.



**Figure 23** Localization of tight junction (TJ) -associated proteins in the rabbit conjunctival epithelium before and after anodal IP application. Bar = 10  $\mu$ m.

Green signal is TJ-associated proteins. Blue signal is nucleus.



**Figure 24** Localization of tight junction (TJ) -associated proteins in the rabbit conjunctival epithelium before and after cathodal IP application. Bar = 10  $\mu$ m.

Green signal is TJ-associated proteins. Blue signal is nucleus.

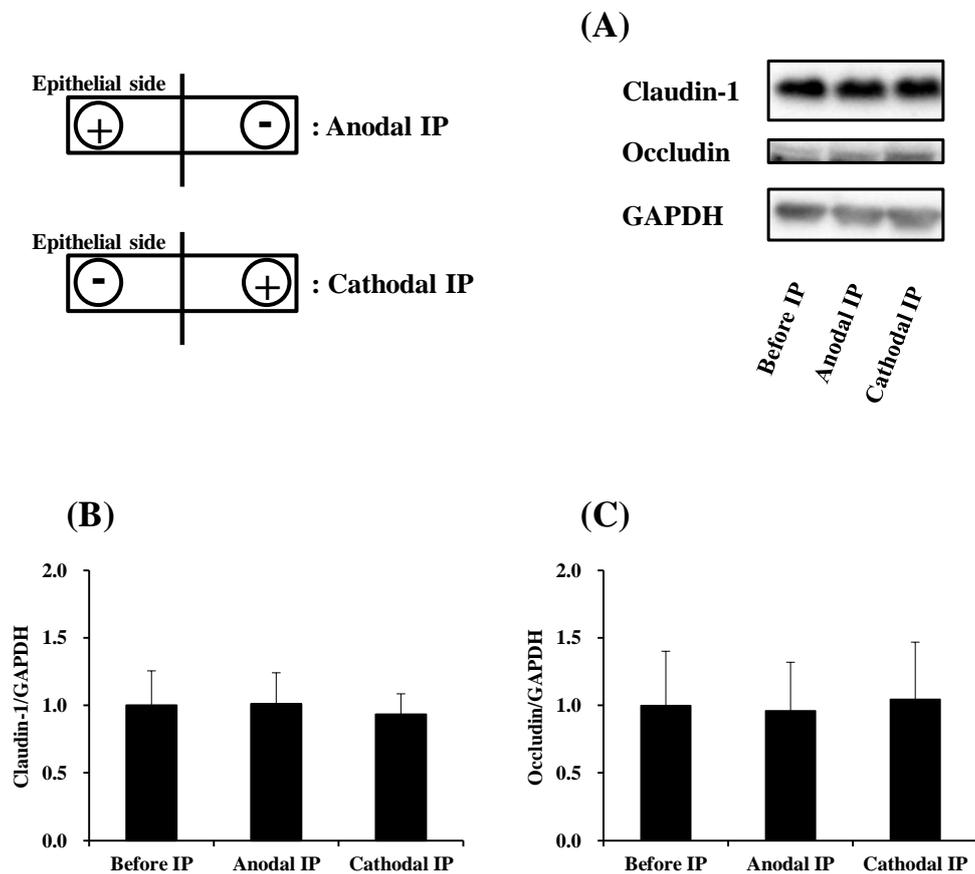
## 第二章 角膜および結膜タイトジャンクション

### 関連タンパク質の存在量に対する電流適用の影響

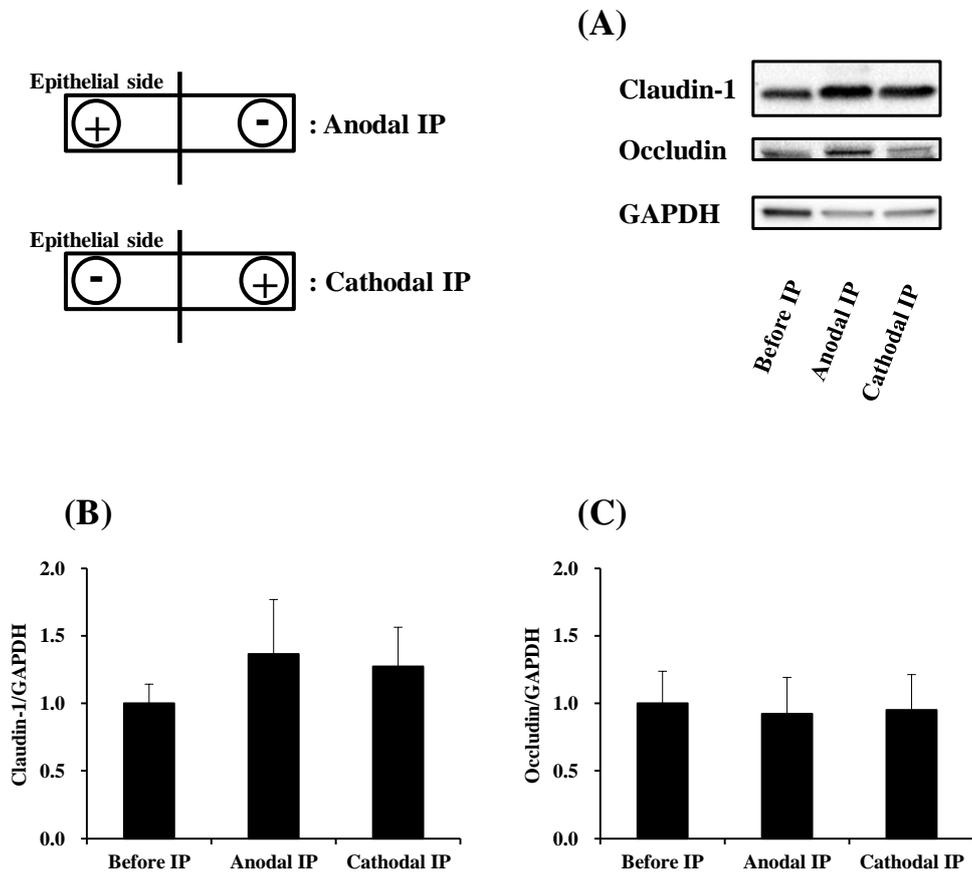
前章では、電流適用により角膜および結膜上皮細胞辺縁の TJ 関連タンパク質の蛍光シグナル強度の低下が観察され、TJ 関連タンパク質の局在性変化や分解もしくは消失が生じているものと示唆された。上皮 TJ バリアでは、claudin-1 や occludin の共発現部位が強いバリア機能を果たすことが明らかにされている<sup>56)</sup>。Claudin-1 は TJ の構築に重要な役割を果たし<sup>57)</sup>、occludin は高分子薬物の透過を制限<sup>58)</sup>していることから、親水性高分子の IP の透過促進効果には claudin-1 および occludin の局在性だけでなく、細胞内に含まれる量自体の変化が影響していることも考えられる。そこで、IP が角膜および結膜組織内における claudin-1 および occludin 存在量に影響するかどうかをウェスタンブロット法により評価し、IP によるバリア機能低下や高分子薬物の透過促進に関与しているかを考察した。上皮側を陽極とした場合、角膜では 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 10 mA/cm<sup>2</sup>、上皮側を陰極とした場合、角膜では 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 5.0 mA/cm<sup>2</sup> の電流を 30 分間適用し、適用終了直後の組織中 claudin-1 および occludin 量を測定した。なお、上皮細胞層のみの評価が困難であったため、試験サンプルは組織全層のホールライセートとした。Figs. 25 および 26 はそれぞれ、家兎摘出角膜および結膜における claudin-1 または occludin のウェスタンブロット解析結果を示している。角膜においては、上皮側を陽極および陰極とした場合の電流適用終了直後の claudin-1 および occludin の発現バンドは IP 適用前と比較して明らかな変化は認められなかった(Fig. 25A)。また、ハウスキーピングタンパク質である GAPDH 量で補正した claudin-1 量は、上皮側を陽極および陰極とした場合に対してそれぞれ IP 適用前の 1.01 倍および 0.93 倍であった(Fig. 25B)。同様に、occludin 量は、それぞれ IP 適用前の 0.95 倍および 1.04

倍であった(Fig. 25C)。一方、結膜においては、上皮側を陽極および陰極とした場合の電流適用終了直後の claudin-1 および occludin の発現バンドにおいても、角膜と同様に、IP 適用前と比較して明らかな変化は認められなかった(Fig. 26A)。また、GAPDH 量で補正した claudin-1 量は、上皮側を陽極および陰極とした場合に対してそれぞれ IP 適用前の 1.37 倍および 1.27 倍であり(Fig. 26B)、occludin 量は、それぞれ IP 適用前の 0.92 倍および 0.95 倍であった(Fig. 26C)。これらの結果から、角膜および結膜における TJ 関連タンパク質の存在量に対して電流適用が明らかな影響を及ぼさないことを意味している。したがって、IP による角膜および結膜バリアの低下と、それに伴う親水性高分子の透過促進は、TJ 関連タンパク質の量的変化を伴わない局在性変化によることが示唆された。加えて、claudin-1 および occludin の発現バンドは電流適用後も定位置で変化しなかった。このことから、電流適用がこれらタンパク質の構造自体には影響を及ぼさないものと考えられる。電流適用により細胞辺縁からの TJ 関連タンパク質の蛍光シグナルが消失し、適用終了後、短時間のうちに細胞辺縁で確認されたのは内在化した TJ 関連タンパク質が細胞辺縁に再局在したことによると考えられた。

一方、Ye らは TNF- $\alpha$  を Caco-2 細胞に適用した *in vitro* 研究において、TNF- $\alpha$  は TJ 関連タンパク質の合成に必要な mRNA 量の減少を引き起こし、TJ 関連タンパク質の合成を 24-48 時間かけて徐々に減少することで、TJ バリア能の低下を誘導することを報告している<sup>59)</sup>。本研究では、電流適用後短時間での影響のみ評価を行ったが、今後の研究では、電流適用後 24 時間以上にわたる経時的な mRNA 量やタンパク質量を評価することで、これらタンパク質の合成過程に IP 適用が影響するかどうかについても検討する必要があると考えられる。



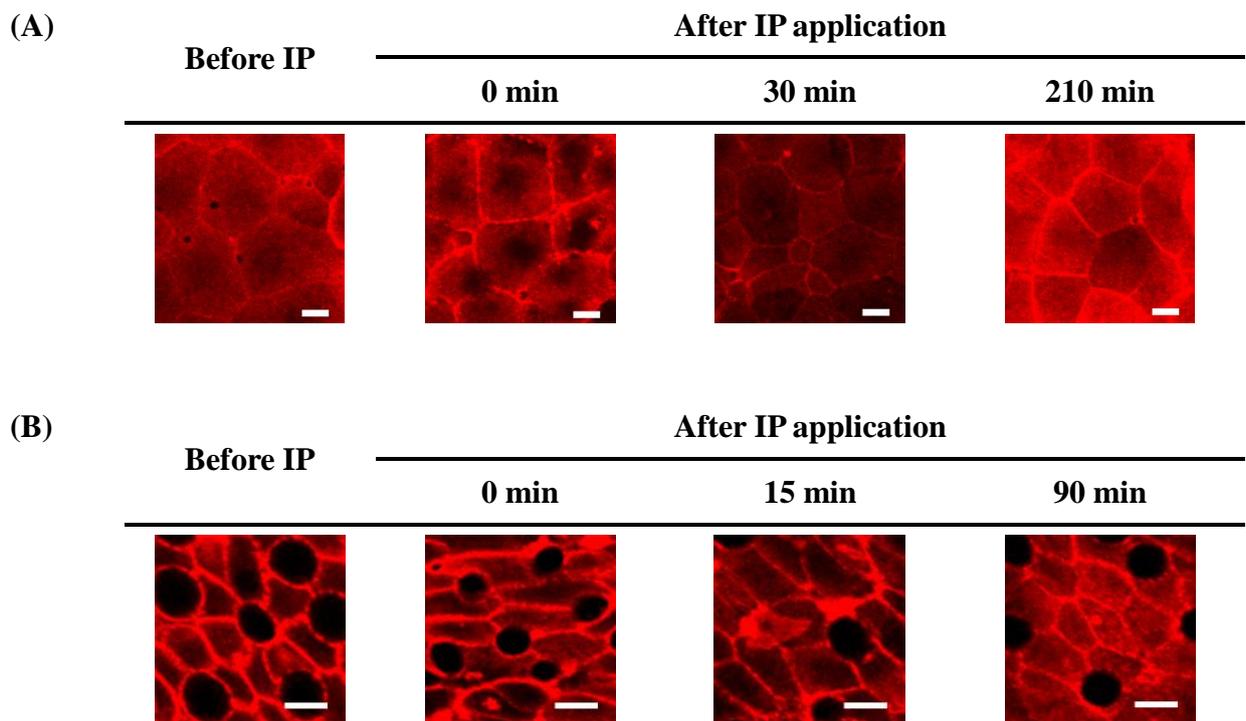
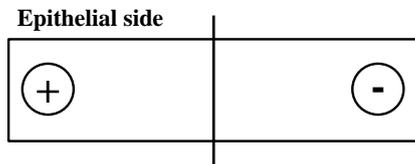
**Figure 25** Expression of tight junction-associated proteins in the cornea before and termination of application at anodal ( $2.0 \text{ mA/cm}^2$ ) and cathodal ( $2.0 \text{ mA/cm}^2$ ) IP. (A), Western blotting analysis in cornea; (B) and (C), the density of claudin-1 and occludin corrected GAPDH respectively. Mean  $\pm$  S. E. (n = 6).



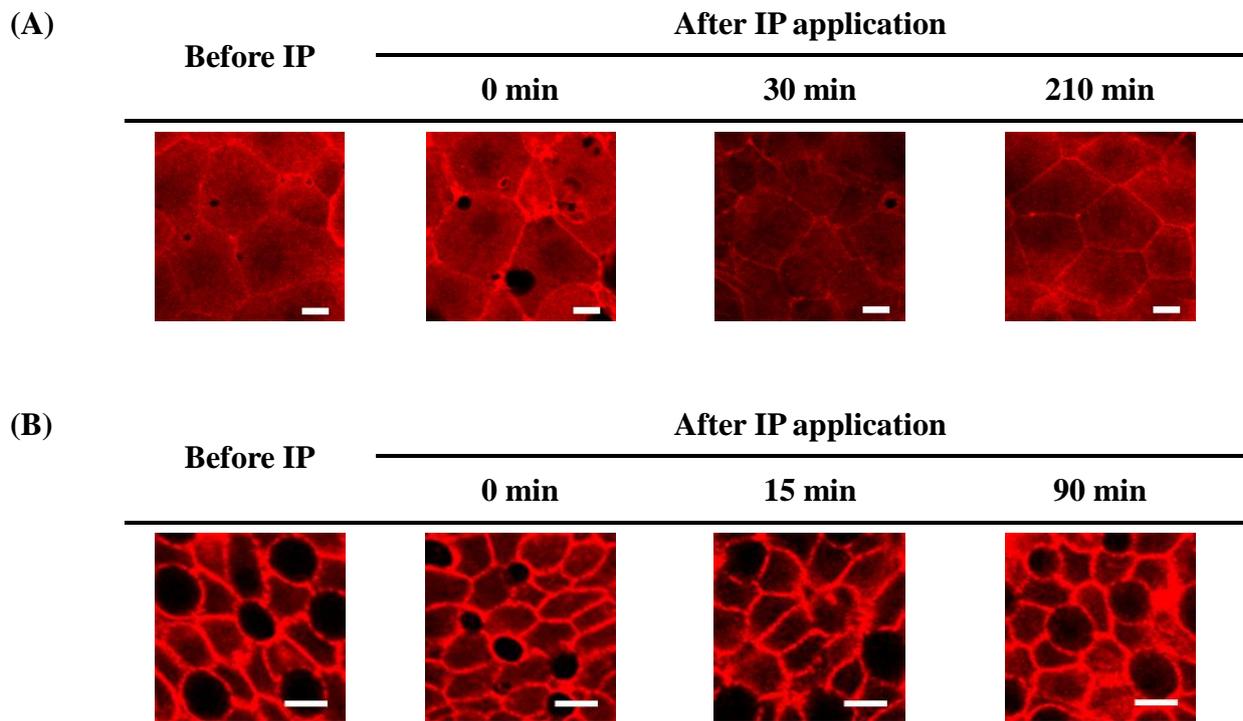
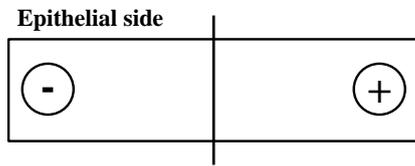
**Figure 26** Expression of tight junction-associated proteins in the conjunctiva before and termination of application at anodal ( $10 \text{ mA/cm}^2$ ) and cathodal ( $5.0 \text{ mA/cm}^2$ ) IP. (A), Western blotting analysis in conjunctiva; (B) and (C), the density of claudin-1 and occludin corrected GAPDH, respectively. Mean  $\pm$  S. E. (n = 4).

### 第三章 角膜および結膜上皮の細胞骨格に対する 電流適用の影響

F-actin は TJ 関連タンパク質の会合のみならず細胞の形態維持に重要な役割を果たす<sup>60)</sup>。近年、ヒト気管支上皮細胞株である Calu-3 を用いた研究で、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  が TJ 関連タンパク質と F-actin の会合維持に重要な役割を果たしていることが報告された<sup>61)</sup>。IP は強制的な電位勾配を生じさせることにより、細胞内外のイオン環境を変化させ、細胞形態に影響を及ぼすことが推測される。そこで、電流適用が細胞形態に対して影響を及ぼすのかを評価するため、細胞骨格である F-actin の局在性を評価した。電流適用は、上皮側が陽極の場合、角膜では  $2.0 \text{ mA/cm}^2$ 、結膜では  $10 \text{ mA/cm}^2$ 、上皮側が陰極の場合、角膜では  $2.0 \text{ mA/cm}^2$ 、結膜では  $5.0 \text{ mA/cm}^2$  とし、各条件で電流を 30 分間適用した。Figs. 27 および 28 はそれぞれ、上皮側を陽極および陰極とした場合の角膜または結膜上皮 F-actin の蛍光画像を示している。上皮側を陽極および陰極とした場合ともに、角膜および結膜において電流適用前に細胞辺縁部に局在していた F-actin の蛍光シグナルは、適用後も細胞辺縁に維持していた(Figs. 27 および 28)。これらのことから、電流適用は F-actin の局在性に対して明らかな影響を及ぼさないものと考えられ、細胞骨格に対する影響は考慮する必要がないものと考えられる。



**Figure 27** Localization of F-actin in the rabbit corneal (A) and conjunctival (B) epithelium observed by anodal IP experiments. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure 28** Localization of F-actin in the rabbit corneal (A) and conjunctival (B) epithelium observed by cathodal IP experiments. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

## 第四章 本編の考察および小括

前編第二章において、親水性高分子の IP 透過促進効果の特徴づけを行い、IP 適用は角膜および結膜 TEER の可逆的な低下を引き起こしたことから、IP 適用は上皮組織の TJ の状態変化を誘導し、細胞間隙を介した親水性高分子の薬物透過を促進したと考えられた。

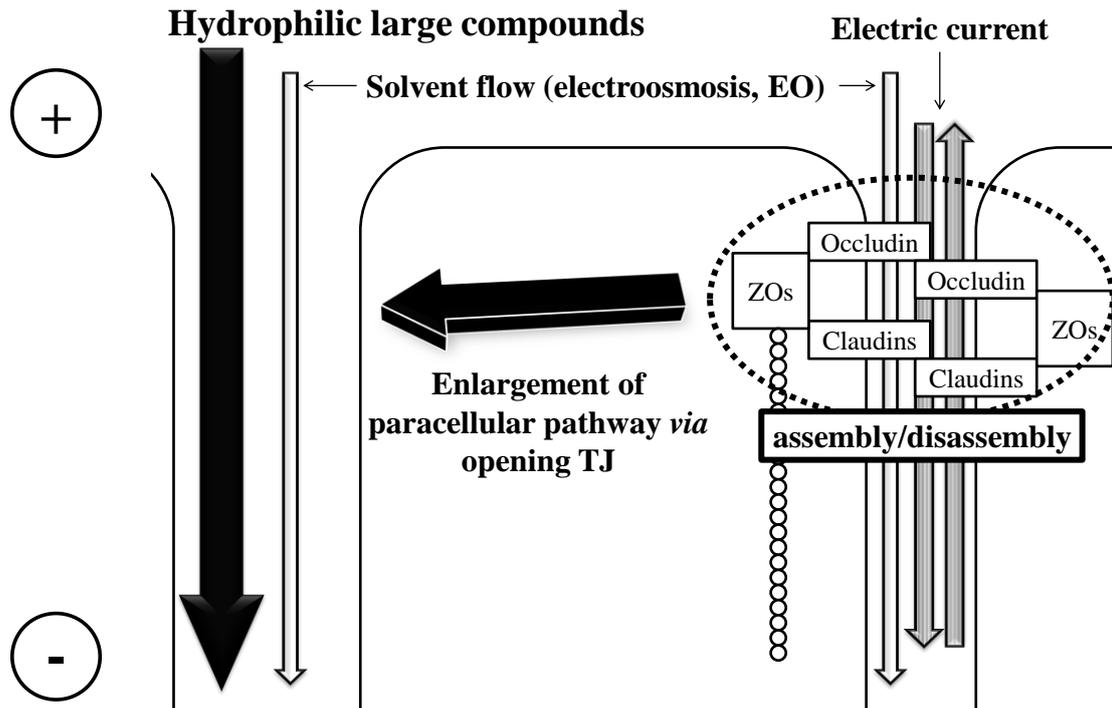
本編では、TJ 機構に対する電流適用の影響を明らかにするために、まず角膜および結膜上皮 TJ 関連タンパク質の局在性を評価した。角膜および結膜上皮の claudin-1、claudin-4、occludin および ZO-1 のような TJ 関連タンパク質の局在性は、上皮側を陽極または陰極とした両条件で電流適用により可逆的に変化し(Figs. 21-24)、前編で明らかとなった TEER の可逆的な変化(Fig. 7, 8 および 12)とよく対応することから、電流適用は TJ 関連タンパク質の会合と分布の状態に可逆的な影響を与えるものと推察された。また、電流適用終了直後の TJ 関連タンパク質の免疫染色画像において、いずれのタンパク質でも蛍光シグナルの低下が観察されたことから、細胞辺縁からの TJ 関連タンパク質の局在性変化だけでなく、タンパク質の分解も生じている可能性が考えられた。そこで、高い TJ バリア能の形成に重要な claudin-1 および occludin の量的変化をウェスタンブロット法で解析した。その結果(Figs. 25 および 26)、角膜および結膜のいずれのタンパク質において、電流適用前と適用終了直後の存在量に明らかな違いは認められず、発現バンドも定位置から変化しなかった。したがって、電流適用により細胞辺縁からの TJ 関連タンパク質の蛍光シグナルの消失は、細胞質内への内在化によるものと確認された。またさらに、IP は膜を介して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、細胞形態に影響を及ぼすことも考えられたが、F-actin の局在性は明らかな影響を与えないことも確認された(Figs. 27 および 28)。こ

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、TJ 関連タンパク質の局在性を変化させ、可逆的な TJ 開口を誘導すると考えられた。

電流適用終了後に TJ 関連タンパク質が再局在する時間が、電流値間で異なることが明らかとなった。したがって、TEER の回復に対する適用電流値依存性は、細胞辺縁から局在変化した TJ 関連タンパク質の再局在性の違いによるものと考えられた。最近、腎上皮 A6 細胞層において静水圧や浸透圧のような細胞に対する物理的な作用が、claudin-1 のような TJ 関連タンパク質の局在性に影響することが報告されている<sup>62,63</sup>)。したがって、IP 適用中に陽極から陰極方向に生じる溶媒流(EO)により生じる物理的な作用が TJ 関連タンパク質の会合に対して何かしらの影響を及ぼしている可能性もあり、さらなる検討が必要と思われる。

以上、眼組織を介した親水性高分子薬物透過に対する IP の促進効果は Fig. 29 のようにまとめることができる。通常、親水性薬物は細胞間隙を透過すると考えられ、特に親水性高分子の透過の場合には、上皮 TJ によるバリア機能によりそれが制限されている。上皮組織への電流適用は、細胞辺縁に局在している TJ タンパク質の会合と局在の状態を変化させることにより、高分子薬物の細胞間隙透過性を増大させる。電流適用下では、陽極から陰極方向に EO 効果による溶媒流を生じ、それが、これらの変化の引き金となって親水性高分子の膜透過が増大するものと推測される。

これまでに、TJ 関連タンパク質をターゲットとした眼内への吸収促進法として、PLA<sup>13)</sup>およびキトサン<sup>64)</sup>のようなポリカチオン性ポリマーを利用した研究が行われており、親水性化合物の吸収を促進することが示されている。Nemoto らは PLA を抽出



**Figure 29** Scheme of enlargement of paracellular pathway *via* opening TJ by IP application in the corneal and conjunctival epithelial cells.

結膜に適用した研究<sup>13)</sup>を行い、PLA適用は可逆的な結膜TEERの低下およびTJ開口を誘導することを明らかにした。加えて、角膜および結膜に対するPLA適用は*in vivo*試験およびMTT試験により、明らかな組織および細胞傷害を引き起こさないことも報告している。IP適用もまた、適用電流値に応じて可逆的な角膜および結膜TEERの低下およびTJの開口を誘導することから、適切な電流適用条件を用いることにより、明らかな細胞および組織傷害を引き起こさずに透過促進効果を期待することができ、安全性の高い眼内薬物送達法として利用できるものと思われる。

## 結論

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、特に角膜および結膜 IP の利用はそれぞれ、前眼部および後眼部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 の利用は効率的な眼内への薬物送達を可能にし、点眼薬に比べ薬理効果が高いことが明らかにされている。現在のところ、眼組織 IP は実用化に至っていないが、その理由の一つとして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な検討がなされていないことが挙げられる。角膜および結膜に対する安全性を考慮した眼組織 IP の実用化に向けて、IP の透過促進特性に関する基礎的情報を収集する必要があると考えられた。そこで著者は、低分子イオン性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特徴づけを行った結果、以下の知見が得られた。

(1) まず初めにモデル透過物質としてイオン性薬物に LC (cation, MW: 288.81) および BA (anion, MW: 144.11) を用いて角膜および結膜透過に対する適用電流値の影響、さらには組織生存性および integrity に対する影響を評価した。その結果、LC および BA の角膜および結膜透過は電流適用により一過的に増大し、その増大は電流値依存的であった。また、その透過促進効果は PD に依存しており、ER 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 (陽極) または  $5.0 \text{ (陰極) mA/cm}^2$  までの電流値の範囲において、角膜および結膜 TEER の低下が引き起こされるものの、適用後に回復することから、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十分に安全に適用可能であることが明らかとなった。次に、親水性高分子非イオン性薬物に FD-4 (MW: 4400) を用いて、イオン性薬物の検討と同様

の評価を行った。その結果、FD-4の角膜および結膜を介した透過 flux は、電流値依存的なEOにより増大すると考えられたが、結膜ではその増大が一過的であるのに対し、角膜では電流適用終了後にも持続した。親水性高分子の上皮組織を介した透過は細胞間隙により制限されており、電流適用によりTEERが低下することから、細胞間隙の拡大がEOを増大させて透過促進につながっていると推測される。角膜で持続的にfluxが増大し、結膜で一過的に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、構造的な要因によることが推測された。

(2) 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、TJ関連タンパク質の会合状態に対する電流適用の影響について検討した。初めに、TJ関連タンパク質の局在性を評価した。その結果、角膜および結膜上皮の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可逆的に変化し、角膜および結膜のいずれのタンパク質に対しても、ウェスタンブロット法による解析では電流適用前と適用終了直後の存在量に差が認められなかった。また、発現バンドも定位置以外には認められなかった。これらのことから、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を起こしているものと推測された。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、F-actin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、TJ関連タンパク質の細胞辺縁での局在性を

変化させ、可逆的に TJ を開口し、新水性高分子に対する透過バリアを低減しているものと考えられた。この状況下、電流適用に伴う EO の発生が親水性高分子の透過に対する主な駆動力となっていることが推測された。

以上のことから、眼組織 IP は角膜および結膜上皮 TJ の一過的な開口を伴う薬物透過を促進するものと考えられた。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システムとして期待できると考えられ、本研究の結果は今後の眼組織 IP のシステム開発や電流適用条件の決定に対して有益な情報となるものと考えられる。

## 謝辞

本研究に際し、研究テーマの決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 上田秀雄先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 製剤学講座教授 夏目秀視先生、城西大学薬学部 生化学講座教授 荒田洋一郎先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、研究遂行に対する御指導並びに御激励を賜りました城西大学 学長 森本雍憲先生、城西大学薬学部 病院薬剤学講座助教 木村聡一郎先生、城西大学薬学部 薬局管理学講座助教 武藤香絵先生に深謝の意を表します。

本論文作成に際し、御校閲並びに御教示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 薬剤学講座教授 従二和彦先生、城西大学薬学部 医薬品化学講座教授 坂本武史先生に深謝の意を表します。

学術論文作成に際し、御校閲並びに御教示を賜りました香港中文大学薬学部 教授 Vincent H.L. Lee 先生に深く感謝いたします。

本研究のタンパク質解析に際し、御助言を賜りました城西大学薬学部 製剤学講座助手 八巻努先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際し、御協力並びに御支援いただきました城西大学薬学部 病院薬剤学研究室関連諸氏に感謝いたします。

最後に、長い期間の学生生活を温かく支えていただいた両親、祖父母、妹、弟をはじめ、親族一同に心から感謝いたします。

# 実験の部

## 第一編 実験方法

### (1) 試薬

Lidocaine hydrochloride monohydrate (LC, MW: 288.81)、sodium benzoate (BA, MW: 144.11)および fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4, MW: 4400)は、Sigma-Aldrich Co., Lcc. (St. Louis, USA)から購入した。2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)から購入した。HPLC 分析用の methanol および acetonitrile は、Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan)から購入した。その他の試薬は、すべて特級品を使用した。

### (2) 実験動物

体重 2.5-3.5 kg の雄性日本白色種家兎は、Sankyo Labo Service Co., Inc. (Tokyo, Japan) から購入した。本実験における家兎を用いたすべての動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認(平成 24 年度: H24086, 平成 25 年度: H25020, 平成 26 年度: H26034, 平成 27 年度: H27033)を得て実施した。

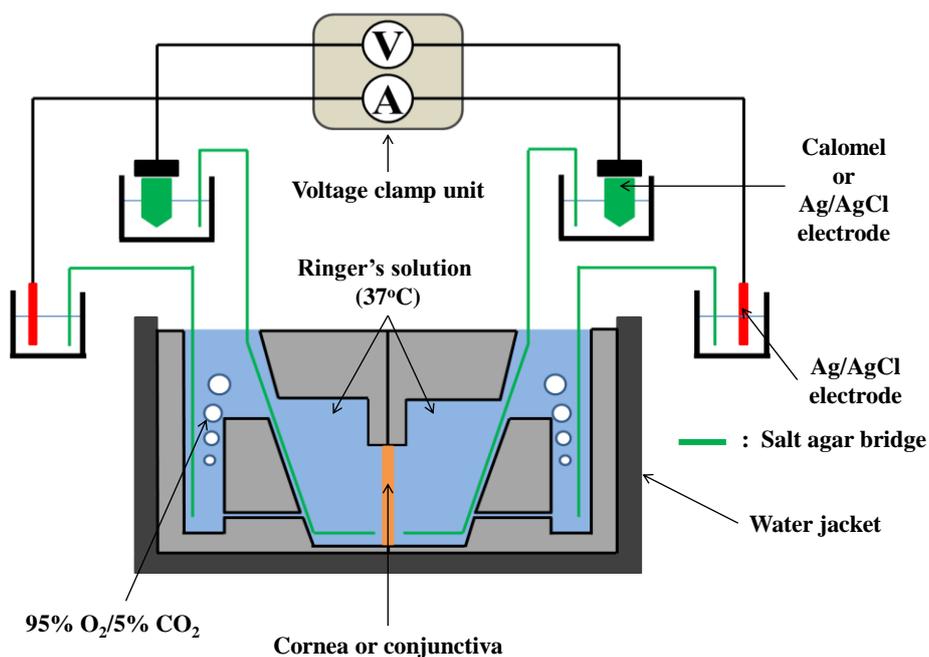
### (3) リンゲル液の調製

重炭酸リンゲル液(BRS)の組成は、111.5 mM NaCl、4.8 mM KCl、29.2 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.75 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1.04 mM CaCl<sub>2</sub>、0.74 mM MgCl<sub>2</sub> および 5 mM D-glucose (pH 7.4, 浸透圧: 約 280 mOsm/kg H<sub>2</sub>O)で調製した。15 mM MES in BRS (MES-BRS, pH 5.9, 浸透圧: 約 280 mOsm/kg H<sub>2</sub>O)は、LC のイオン形分率を高めるために LC 透過実験の緩衝

液として用いた。

#### (4) 角膜および結膜組織の調製

家兎の耳介静脈に sodium pentobarbital 溶液(20 mg/kg)を投与し、深麻酔後に KCl の静脈内投与により安楽死させ、直ちに眼球を眼窩から摘出し、角膜および結膜組織を採取した。採取した角膜および結膜組織にダメージを与えないように注意深くトリミングし、各組織を tissue adapter (有効面積 0.44 cm<sup>2</sup>)にマウント後、Fig. 30 に示す Ussing-type chamber にセットした。角膜では上皮側を 3 mL、内皮側を 7 mL、結膜では両チャンバーを 5 mL の BRS で満たし、37°C、95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> でバブリングし、pH を維持した。



**Figure 30** Ussing-type chamber system used in present study.

#### (5) 電気生理学的パラメーターの測定

電気生理学的パラメーターは短絡電流測定装置(CEZ-9100, Nihon kohden, Tokyo, Japan)により測定した。自発的膜電位(PD)および短絡電流(Isc)は、各 2 対の塩橋(3.3 M

KCl 中に 4% 寒天を含む)とそれぞれカロメル電極または Ag/AgCl 電極に連結した系において測定した(Fig. 30)。経上皮電気抵抗(TEER)は角膜および結膜に対し、それぞれ 5 mV および 3 mV を 3 秒間適用した時の Isc 変化量( $\Delta I_{sc}$ )をオームの法則に代入し算出した。角膜および結膜における TEER の計算式を以下に示す(Eqs. 7 and 8)。

$$\text{角膜: TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = \frac{5000 (\mu\text{V})}{\Delta I_{sc} (\mu\text{A})} \times \text{Area } (\text{cm}^2) \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\text{結膜: TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = \frac{3000 (\mu\text{V})}{\Delta I_{sc} (\mu\text{A})} \times \text{Area } (\text{cm}^2) \quad (\text{Eq. 8})$$

ここで、Area は有効面積( $0.44 \text{ cm}^2$ )である。

IP 適用中の TEER は定電流適用中の PD をオームの法則に代入し算出した(Eq. 9)。ただし、 $PD \geq 200 \text{ mV}$  の場合、デジタルマルチメーター(PC700, Sanwa Electric Instrument, Co., Ltd. Tokyo, Japan)を使用し、組織無しの blank PD (例: 組織有りて  $10 \text{ mA/cm}^2$  適用時に  $PD \geq 200 \text{ mV}$  の場合は組織無しで  $10 \text{ mA/cm}^2$  適用した際の PD)を差し引くことにより補正した組織 PD をオームの法則に代入し算出した(Eq. 10)。

- IP 適用中( $PD < 200 \text{ mV}$ )

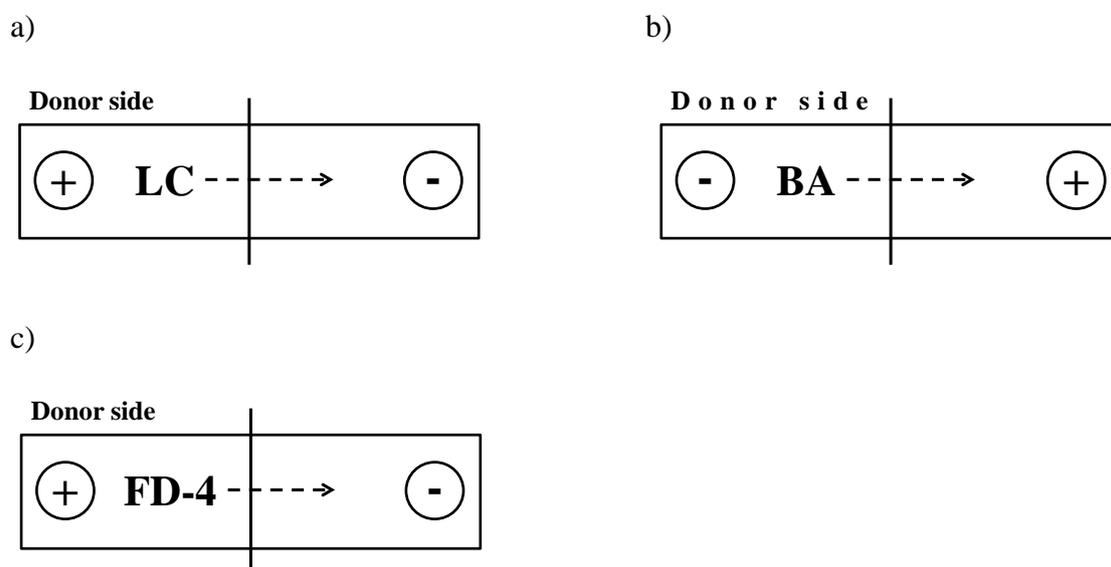
$$\text{角膜および結膜: TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = \frac{PD \times 1000 (\mu\text{V})}{\text{定電流 } I (\mu\text{A})} \times \text{Area } (\text{cm}^2) \quad (\text{Eq. 9})$$

- IP 適用中( $PD \geq 200 \text{ mV}$ )

$$\text{角膜および結膜: TEER } (\Omega \cdot \text{cm}^2) = \frac{(PD - \text{blank PD}) \times 1000 (\mu\text{V})}{\text{定電流 } I (\mu\text{A})} \times \text{Area } (\text{cm}^2) \quad (\text{Eq. 10})$$

## (6) 電流適用方法

IP適用装置はCEZ-9100またはアイソレーター(SS-104J, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)に連結した電気刺激装置(SEN-8203, Nihon Kohden, Tokyo, Japan)を用いた。CEZ-9100およびSS-104Jに連結したSEN-8203はそれぞれ、0.5-2.0および5.0-20 mA/cm<sup>2</sup>の定電流適用に使用した。Fig. 31で示すように、ドナー側の薬物がLCおよびFD-4の場合ではドナー側を陽極(Fig. 31a)とし、BAの場合では陰極(Fig. 31b)として電流を適用した。



**Figure 31** Method of IP application for LC (a), BA (b) and FD-4(c) permeation study.

## (7) イオントフォレシス透過実験

角膜を用いた透過実験は、角膜の形状を維持するために上皮側(donor side)に 3.0 mL、内皮側(receiver side)に 7.0 mL の BRS または MES-BRS で満たし、結膜を用いた透過実験は、粘膜側(donor side)および漿膜側(receiver side)ともに 5.0 mL の BRS または MES-BRS で満たした。電気生理学的パラメーター(PD、Isc および TEER)が安定した

後、ドナー側には最終濃度が LC では 0.50 mg/mL、BA では 2.0 mg/mL、FD-4 では 2.5 (角膜)および 5.0 (結膜) mg/mL となるように調製した溶液を添加し、透過実験を開始した。透過実験開始から経時的にレシーバー側溶液 0.20 mL をサンプリングし、直ちに同量のフレッシュな BRS もしくは MES-BRS をレシーバー側に添加した。また、透過実験開始から 120 分後、Fig. 31 で示すように電極を設置し、角膜では 0.50-5.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 0.50-20 mA/cm<sup>2</sup> の電流を 30 分間適用した。さらに、透過実験中も電気生理学的パラメーターをモニターした。

#### (8) 角膜および結膜内 FD-4 量および放出実験

実験条件はイオントフォレシス透過実験と同様に、FD-4 添加から 120 分後に、角膜では 0.50 もしくは 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 2.0 もしくは 10 mA/cm<sup>2</sup> の電流を 30 分間適用した。電流適用終了直後、両側チャンバー中の BRS をフレッシュな BRS 100 mL で wash out した。電流適用終了直後および wash out から角膜の場合は 210 分後、結膜の場合では 150 分後に組織を Ussing chamber から取り出し、フレッシュな BRS で表面に付着した薬物を洗い、有効面積 0.44 cm<sup>2</sup> の周辺部位を取り除いた。切り出したサンプル表面の水分をキムワイプ®で拭き取り、組織重量を測定した。重量測定後、眼科用剪定ハサミで組織を細かく切断し、4°C の BRS 中で 5 分間ホモジナイズした。得られた角膜または結膜ホモジネートを 4°C、10,000 × g で 5 分間遠心分離して上清を採取し、FD-4 量を測定した。なお、FD-4 量は組織重量で補正した。また、wash out 後から組織を取り出すまでの間、経時的にチャンバー中の溶液をサンプリングして膜からの FD-4 放出を同時に評価した。

### (9) 定量方法

LC および BA の定量は UV detector (SDP-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan)) に接続した HPLC system (system controller: SCL-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu), auto injector: SIL-10A<sub>XL</sub> (Shimadzu), pump: LC-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu), degasser: DGU-12A (Shimadzu), octadecyl reversed-phase column: Mightysil RP-18 GP (250 mm × 4.6 mm × 5 μm, Kanto Chemical Co., Inc.), column oven: CTO-10A (Shimadzu)) を用いて行った。LC および BA の定量条件を Table 12 に示す。

FD-4 の定量は multi-label reader (ARVO<sup>TM</sup> X 3 system, PerkinElmer Japan Co., Ltd.) を用いて行った。励起波長は 485 nm、蛍光波長は 535 nm として測定を行った。

**Table 12 HPLC conditions for analysis of LC and BA.**

Compound	Mobile phase (volume ratio)	Flow rate (mL/min)	Oven temp. (°C)	UV wavelength (nm)	Internal standard (concentration)	Injection volume (μL)
LC	CN <sub>3</sub> CN : CH <sub>3</sub> OH : 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> buffer (pH 2.0) = 1.5 : 1.5 : 7.0	1.0	40	262	p-hydroxybenzoic acid (1 μg/mL)	70
BA	CN <sub>3</sub> CN : 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> buffer (pH 2.2) = 1 : 1	1.0	40	230	_____ <sup>a)</sup>	20

a) Absolute calibration method was used.

### (10) データ解析

すべてのデータは、平均値 ± S. E. 値で示した。二群間の統計解析には *Student's t-test*、三群間の統計解析には *Turkey-Kramer test* を用いて評価した。PD と maximal flux 間の相関解析にはピアソンの積率相関分析を用いて評価した。危険率(*p*)が両側 0.05 未満の場合を有意な差とみなした。

## 第二編 実験方法

### (1) 試薬

Mouse anti-claudin-1、mouse anti-claudin-4、mouse anti-occludin、mouse anti-ZO-1、mouse anti-GAPDH、Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat anti-mouse IgG、horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG、rhodamine phalloidin、RNase A、propidium iodide、Pierce<sup>®</sup> BCA Protein assay kit および SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate は、Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA)から購入した。VECTASHIELD<sup>®</sup> は Vector Laboratories, Inc. (CA, USA)から購入した。その他の試薬は、すべて特級品を使用した。

### (2) 実験動物

第一章(2)と同様のものを用いた。

### (3) リンゲル液の調製

第一章(3)と同様の方法を用いた。ただし、薬物を適用しない評価であったため、MES-BRS は用いなかった。

### (4) 角膜および結膜組織の調製

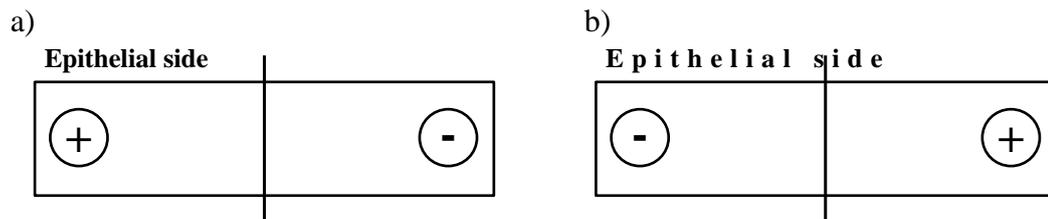
第一章(4)と同様の方法を用いた。

### (5) 電気生理学的パラメーターの測定

第一章(5)と同様の方法を用いた。

## (6) 電流適用方法

第一章(6)と同様の方法を用いた。なお、電流適用は上皮側を陽極として、角膜では0.50および2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では0.50および10 mA/cm<sup>2</sup>の電流を30分間適用した(Fig. 32a)。同様に、上皮側を陰極として、角膜では0.50および2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では0.50および5.0 mA/cm<sup>2</sup>の電流を30分間適用した(Fig. 32b)。



**Figure 32** Methods of IP application for analysis of TJ-associated protein in the cornea and conjunctiva. a), anode in epithelial side; b), cathode in epithelial side.

## (7) 免疫染色法

角膜および結膜の電気生理学的パラメーターが安定した後、薬物を添加せずに上皮側を陽極として、角膜では0.50および2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では0.50および10 mA/cm<sup>2</sup>、上皮側を陰極とした場合、角膜では0.50および2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では0.50および5.0 mA/cm<sup>2</sup>の電流を30分間適用した。電流適用前および電流適用終了後の角膜および結膜サンプルを、acetoneを用いて5分間、-20°Cで固定した後、0.1% Triton<sup>®</sup> X-100溶液で10分間、室温でインキュベートした。その後、ブロッキング溶液として5% skim milkおよび0.1% Tween-20を含むTris buffered saline (T-TBS)溶液(50 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris), 139 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4)で1時間、室温でインキュベートした。次に、T-TBS溶液で希釈した一次抗体(claudin-1, claudin-4, occludin および ZO-1 (1 : 40))で一晩、4°Cでインキュベートした。次に、T-TBSで希釈した二次抗体(Alexa fluor<sup>®</sup> 488 anti-mouse IgG (1 : 2000))で2時間、室温でインキュ

べートした。その後、核染色のために、T-TBS で希釈した RNase A (1 : 400) で 20 分間、室温でインキュベートしてから、T-TBS で希釈した propidium iodide (1 : 2000) を 10 分間、室温でインキュベートした。サンプルは VECTASHIELD<sup>®</sup> を 1-2 滴滴下し、カバーガラスを被せて標本とした。観察は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV-1000 (OLYMPUS<sup>®</sup>, Tokyo, Japan) で行った。全ての実験は 3 回以上行った。

#### (8) Western blot 法

角膜および結膜の電気生理学的パラメーターが安定した後、薬物を添加せずに上皮側を陽極として、角膜では 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 10 mA/cm<sup>2</sup>、上皮側を陰極とした場合、角膜では 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 5.0 mA/cm<sup>2</sup> の電流を 30 分間適用した。電流適用前および電流適用終了直後の角膜および結膜から有効面積 0.44 cm<sup>2</sup> 周辺を取り除いたサンプルを、乳棒を用いて液体窒素中でホモジナイズした。ホモジナイズした後、サンプルは NP-40 を Triton<sup>®</sup> X-100 に置き換えた RIPA buffer (0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% Triton<sup>®</sup> X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) に溶解した。角膜または結膜ホモジネート溶液を 10 分間、4°C、12,000 × g で遠心分離して上清を採取し、タンパク質サンプルとした。得られたタンパク質サンプルを Pierce<sup>®</sup> BCA protein assay kit を用いてタンパク質量を均一にした。サンプルを 2 × sample buffer と 1 : 1 の割合で混合し、100°C の水浴で 5 分間インキュベートし、SDS-PAGE サンプルとした。12% Mini-PROTEAN TGX<sup>™</sup> Gel にアプライし、SDS-PAGE (200 V, 35 分間) を行った。次にゲルから PVDF membrane に電氣的に転写 (70 V, 2 時間) した後、PVDF membrane を T-TBS で希釈した 5% skim milk で 1 時間、室温でブロッキングした。次に、1% skim milk T-TBS 溶液で希釈した一次抗体 (claudin-1 (1 : 400), occludin (1 : 300) および GAPDH (1 : 40000)) で一晩、4°C でインキュベートした。次に、

1% skim milk T-TBS 溶液で希釈した二次抗体(HRP-conjugated anti mouse IgG, claudin-1 (1 : 1000), occludin (1 : 1000)および GAPDH (1 : 80000))で 2 時間、室温でインキュベートした。目的のタンパク質を検出するために、SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate を用いて発光させ、ChemiDoc<sup>™</sup> XRS+ System (Bio-Rad laboratories, Inc. California, USA)により観察した。Claudin-1、occludin および GAPDH のバンド強度を Image J software program を用いて定量し、claudin-1 および occludin 強度を GAPDH 強度で補正した。

#### (9) F-actin 染色

角膜および結膜の電気生理学的パラメーターが安定した後、薬物を添加せずに上皮側を陽極として、角膜では 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 10 mA/cm<sup>2</sup>、上皮側を陰極とした場合、角膜では 2.0 mA/cm<sup>2</sup>、結膜では 5.0 mA/cm<sup>2</sup> の電流を 30 分間適用した。電流適用前および電流適用終了後の角膜および結膜サンプルを、4% paraformaldehyde を含む PBS を用いて 1 時間、室温で固定した。固定後、1% Triton<sup>®</sup> X-100 溶液を 30 分間、室温でインキュベートした。その後、T-TBS で希釈した rhodamine phalloidin (1 : 100)を 1 時間、室温でインキュベートした。サンプルは VECTASHIELD<sup>®</sup>を 1-2 滴滴下し、カバーガラスを被せて標本とした。観察は、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV-1000 (OLYMPUS<sup>®</sup>, Tokyo, Japan)で行った。全ての実験は 3 回以上行った。

#### (10) データ解析

Western blot の結果は、平均値 ± S. E. で示した。三群間の統計解析には *Turkey-Kramer test* を用いて評価した。危険率(*p*)が両側 0.05 未満の場合を有意な差とみなした。

## 引用文献

- 1) 笹田久美子著 (2005) 『よく分かる目の病気と目の異常』 久保田伸枝監修, 成美堂出版, 東京.
- 2) O. Chastnov, Universal eye health: a global action plan 2014-2019, *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, 2013.
- 3) R. Klein, T. Peto, A. Bird, M. R. Vannewkirk, The epidemiology of age-related macular degeneration, *Am. J. Ophthalmol.*, **137**, 486-495 (2004).
- 4) A. Pruss, S. P. Mariotti, Preventing trachoma through environmental sanitation: a review of the evidence base, *Bull. World Health Organ.*, **78**, 258-266 (2000).
- 5) F. K. P. Sutter, M. C. Gillies, Pseudo-endophthalmitis after intravitreal injection of triamcinolone, *Br. J. Ophthalmol.*, **87**, 972-974 (2003).
- 6) M. C. Gillies, J. M. Simpson, F. A. Billson, W. Luo, P. Penfold, W. Chua, P. Mitchell, M. Zhu, A. B. L. Hunyor, Safety of an intravitreal injection of triamcinolone results from a randomized clinical trial, *Arch. Ophthalmol.*, **122**, 336-340 (2004).
- 7) K. Hosoya, V. H. L. Lee, K. J. Kim, Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanism and their regulation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **60**, 227-240 (2005).
- 8) H. E. Edelbauser, C. L. Rowe-Rendleman, M. R. Robinson, D. G. Dawson, G. J. Cbader, H. E. Grossniklaus, K. D. Rittenbouse, C. G. Wilson, D. A. Weber, B. D. Kuppermann, K. G. Csaky, T. W. Olsen, U. B. Kompella, V. M. Holers, G. S. Hageman, B. C. Gilger, P. A. Campocbiaro, S. M. Whitcup, W. T. Wong, Ophthalmic drug delivery systems for the treatment of retinal diseases: Basic research to clinical applications, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**, 5403-5420 (2010).
- 9) A. Urtti, L. Salminen, Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs, *Surv. Ophthalmol.*, **37**, 435-457 (1993).
- 10) U. B. Kompella, R. S. Kadam, V. H. L. Lee, Recent advances in ophthalmic drug delivery, *Ther. Deliv.*, **1**, 435-456 (2010).

- 11) N. M Davies, Biopharmaceutical considerations in topical ocular drug delivery, *Clin. Exp. Pharmacol. Physio.*, **27**, 558-562 (2000).
- 12) J. G. Souza, K. Dias, T. A. Pereira, D. S. Bernardi, R. F. V. Lopez, Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods, *J. Pharm. Pharmacol.*, **66**, 507-530 (2013).
- 13) 根本英一, poly-L-arginine を用いた眼内薬物送達に関する研究, 博士学位論文, 城西大学 (2006).
- 14) R. H. Guy, Y. N. Kalia, M. B. Delgado-Charroa, V. Merino, A. López, D. Marro, Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis, *J. Control. Release*, **64**, 129-132 (2000).
- 15) Y. N. Kalia, A. Naik, J. Garrison, R.H. Guy, Iontophoretic drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 619-658 (2004).
- 16) E. E. Binstock, A. J. Domb, Iontophoresis: A non-invasive ocular drug delivery, *J. Control. Release*, **110**, 479-489 (2006).
- 17) M. Barza, C. Peckman, J. Baumf, Transscleral iontophoresis of gentamicin in monkeys, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **28**, 1033-1036 (1987).
- 18) R. E. Grossman, D. F. Chu, D. A. Lee, Regional ocular gentamicin levels after transcorneal and transscleral iontophoresis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **31**, 909-916 (1990).
- 19) J. F. Pery, H. Mechoulam, C. S. Siganos, P. E. Hadani, M. Shapiro, A. J. Domb, A Iontophoresis-gentamicin delivery into the rabbit cornea, using a hydrogel delivery probe, *Exp. Eye Res.*, **78**, 745-749 (2004).
- 20) T. B. Choi, D. A. Lee, Transscleral and transcorneal iontophoresis of vancomycin in rabbit eyes, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **4**, 153-164 (1988).
- 21) D. S. Rootman, J. A. Hobden, J. A. Jantzen, J. R. Gonzalez, R. J. O'callaghan, J. M. Hill, Iontophoresis of tobramycin for the treatment of experimental pseudomonas keratitis in the rabbit, *Arch. Ophthalmol.*, **106**, 262-265 (1988).

- 22) J. A. Hobden, D. S. Rootman, R. J. O'callaghan, J. M. Hill, Iontophoretic application of tobramycin to uninfected and *pseudomonas aeruginosa*-infected rabbit corneas, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **32**, 978-981 (1988).
- 23) B. C. Hayden, M. E. Jockovich, T. G. Murray, M. Voigt, P. Milne, M. Kralinger, W. J. Feuer, E. Hernandez, J. M. Parel, Pharmacokinetics of systemic versus forcal carboplatin chemotherapy in the rabbit eye: possible implication in the treatment of retinoblastoma, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**, 3644-3649 (2004).
- 24) F. F. B. Cohen, A. E. L. Aouni, S. Gautier, G. David, J. Davis, P. Chapon, J. M. Parel, Transscleral coulomb-controlled iontophoresis of methylprednisolone into the rabbit eye: Influence of duration of treatment, current intensity and drug concentration on ocular tissue and fluid levels, *Exp. Eye Res.*, **74**, 51-59 (2002).
- 25) E. E. Binstock, F. Raiskup, J. F. Pery, A. J. Domb, Transcorneal and transscleral iontophoresis of dexamethasone phosphate using drug loaded hydrogel, *J. Control. Release*, **106**, 386-390 (2005).
- 26) M. Voigt, Y. de Kozak, M Halhal, Y Courtois, F. Behar-Cohen, Down-regulation of NOSII gene expression by iontophoresis of anti-sense oligonucleotide in endotoxin-induced uveitis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**, 336-341 (2002).
- 27) M. A. Patane, A. Cohen, S. From, G. Torkildsen, D. Welch, G. W. Ousler, Ocular iontophoresis of EGP-437 (dexamethasone phosphate) in dry eye patients: results of a randomized clinical trial, *Clin. Ophthalmol.*, **5**, 633-643 (2011).
- 28) 藤堂浩明, 杉林堅次, Transdermal delivery of mal-absorbable drugs with chemical- and physical enhancement methods, *Drug delivery System*, **27**, 156-163 (2012).
- 29) M. A. Deli, Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 892-910 (2009).
- 30) Y. Morimoto, S. Numajiri, K. Sugibayashi, Effect of ion species and their concentration on the iontophoretic transport of benzoic acid through poly (vinyl acetate) membrane, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2412-2416 (1991).
- 31) H. H. Ussing, K. Zerahn, Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin, *Acta Physiol. Scand.*, **23**, 110-127 (1951).

- 32) W. S. Marshall, S. D. Klyce, Cellular and paracellular pathway resistances in the tight Cl<sup>-</sup> secreting epithelium of rabbit cornea, *J. Membrane Biol.*, **73**, 275-282 (1983).
- 33) U. B. Kompella, K. J. Kim, V. H. L. Lee, Active chloride transport in the pigmented rabbit conjunctiva, *Curr. Eye Res.*, **12**, 1041-1048 (1993).
- 34) M. A. Deli, Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 892-910 (2009).
- 35) T. Nakamura, M. Yamada, M. Teshima, M. Nakashima, H. To, N. Ichikawa, H. Sasaki, Electrophysiological characterization of tight junctional pathway of rabbit cornea treated with ophthalmic ingredients, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2360-2364 (2007).
- 36) J. E. C. Lin, K. J. Kim, V. H. L. Lee, Characterization of active ion transport across primary rabbit corneal epithelium cell layers (RCrECL) cultured at an air-interface, *Exp. Eye Res.*, **80**, 827-836 (2005).
- 37) T. Kikuchi, M. Suzuki, A. Kusai, K. Iseki, H. Sasaki, Synergistic effect of EDTA and boric acid on corneal penetration of CS-088, *Inter. J. Pharm.*, **290**, 83-89 (2005).
- 38) H. Ueda, V. H. L. Lee, Characterization of iontophoretic drug transport in the rabbit conjunctiva, *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, **28**, 754-755 (1998).
- 39) 杉林堅次, 新しい経皮投与方法 イオントフォレシス, *ファルマシア*, **37**, pp 385-387 (2001).
- 40) M. J. Pikal, Transport mechanisms in iontophoresis. I. A theoretical model for the effect of electroosmotic flow on flux enhancement in transdermal iontophoresis, *Pharm. Res.*, **7**, 118-126 (1990).
- 41) D. Marro, Y. N. Kalia, M. B. D. Charro, R. H. Guy, Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery, *Pharm. Res.*, **18**, 1701-1708 (2001).
- 42) C. Loch, S. Zakelj, S. Nagal, R. Guthoff, W. Weitschies, A. Seidlitz, Determination of permeability coefficients of ophthalmic drugs through different layers of porcine, rabbit and bovine eyes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **47**, 131-138 (2012).
- 43) K. S. Vellonena, M. Häkklia, N. Merezhinskayad, T. Tervoe, P. Honkakoskic, A. Urtti, Monocarboxylate transport in human corneal epithelium and cell lines, *Eur. J. Pharm. Sci.* **39**, 241-247 (2010).

- 44) H. Sasaki, K. Yamamura, C. Tei, K. Nishida, J. Nakamura, Ocular permeability of FITC-Dextran with absorption promoter for ocular delivery of peptide drug, *J. Drug Target.*, **3**, 129-135 (1995).
- 45) M. R. Prausnitz, J. S. Noonan, Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: A literature analysis for drug delivery to the eye. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1479-1488 (1998).
- 46) J. E. Riviere, M. C. Heit, Electrically-assisted transdermal drug delivery, *Pharm. Res.*, **14**, 687-697 (1997).
- 47) S. Nicoli, M. Cappellazzi, P. Colombo, P. Santi, Characterization of the permselective properties of rabbit skin during transdermal iontophoresis, *J. Pharm. Sci.*, **92**, 1482-1488 (2003).
- 48) S. Numajiri, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, Analysis of in vitro iontophoretic skin permeation of sodium benzoate by transport numbers of drug and additives, *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1351-1356 (1996).
- 49) B. Mudry, R. H. Guy, M. B. D. Charro, Transport numbers in transdermal iontophoresis, *Biophys. J.*, **90**, 2822-2830 (2006).
- 50) G. Sunkara and U. B. Kompella (2003) Membrane transport processes in the eye, In: A. K. Mitra (ed), *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp 13-58.
- 51) H. S. Dua, L. A. Faraj, D. G. Said, T. Gray, J. Lowe, Human corneal anatomy redefined: A novel pre-Descemet's layer (Dua's layer), *Ophthalmol.*, **120**, 1778-1785 (2013).
- 52) D. M. Denker, S. K. Nigam, Molecular structure and assembly of tight junction, *Am. J. Physiol.*, **274**, F1-F9 (1998).
- 53) L. Shen, C. R. Weber, D. R. Raleigh, D. Yu, J. R. Turner, Tight junction pore and leak pathway: A dynamic duo, *Annu. Rev. Physiol.*, **73**, 283-309 (2011).
- 54) M. Leonard, E. Creed, D. Brayden, A. Baird, Evaluation of the Caco-2 monolayer as a model epithelium for iontophoretic transport, *Pharm. Res.*, **12**, 1181-1188 (2000).
- 55) A. J. W. Huong, S. C. G Tseng, K. R. Kenyon, Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **30**, 684-689 (1989).

- 56) M. Furuse, H. Sasaki, K. Fujimoto, S. Tsukita, A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts, *J. Cell Biol.*, **143**, 391-401 (1998).
- 57) M. Furuse, M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, S. Tsukita, Claudin-1-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice, *J. Cell Biol.*, **156**, 1099-1111 (2002).
- 58) R. A. Sadi, K. Khatib, S. Guo, D. Ye, M. Youssef, T. Ma, Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelium tight junction barrier, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **300**, 1054-1064 (2011).
- 59) J. Miyoshi, Y. Takai, Structural and functional association of apical junctions with cytoskeleton, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 670-691 (2008).
- 60) D. Ye, S. Guo, R. A. Sadi, T. Y. Ma, MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability, *Gastroenterology*, **141**, 1323-1333 (2011).
- 61) 関口友太, Calu-3 細胞の物質透過バリア機能に対する細胞外環境の影響に関する研究, 修士論文 (未公刊), 城西大学 (2011).
- 62) S. Tokuda, H. Miyazaki, K. Nakajima, T. Yamada, Y. Marunaka, Hydrostatic pressure regulates tight junctions, actin cytoskeleton and transcellular ion transport, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 1315-1321 (2009).
- 63) S. Tokuda, H. Miyazaki, K. Nakajima, T. Yamada, Y. Marunaka, NaCl flux between apical and basolateral side recruits claudin-1 to tight junction strands and regulates paracellular transport, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **393**, 390-396 (2010).
- 64) A. M. Campos, Y. Diebold, E. L. S. Carvalho, A. Sánchez, M. J. Alonso, Chitosan nanoparticles as new ocular drug delivery systems: *in vitro* stability, *in vivo* fate, and cellular toxicity, *Pharm. Res.*, **21**, 803-810 (2004).