

5200320803

城西大学
水田記念図書館

エレクトロポレーションによる薬物の経皮
吸収促進に関する研究



博士学位論文
乙第40号

森 健 二

エレクトロポレーションによる薬物の経皮
吸収促進に関する研究

城西大学
水田記念図書館

5200320803

森 健二

目次

緒言	1
第1編 薬物の皮膚透過に対するエレクトロポレーションの有用性評価	5
第1章 非電解質の皮膚透過に及ぼすエレクトロポレーションの影響	6
第1節 実験方法	6
第2節 マニトールの皮膚透過に及ぼすエレクトロポレーションの影響	11
第3節 マニトールの皮膚透過に及ぼす電極位置の影響	13
第4節 マニトールの皮膚透過に及ぼす電極材料の影響	15
第5節 マニトールの皮膚透過に及ぼす電圧適用頻度の影響	17
第6節 エレクトロポレーションとイオントフォレーシスの併用効果	18
第7節 小括	21
第8節 考察	22
第2章 電解質の皮膚透過に及ぼすエレクトロポレーションの影響	23
第1節 実験方法	23
第2節 適用電圧の影響および電流の方向性の影響 1	24
第3節 適用電圧の影響および電流の方向性の影響 2	28
第4節 小括	29
第5節 考察	30
第2編 電場解析によるエレクトロポレーションの皮膚透過促進能の評価	31
第1章 3次元電場解析による評価	31
第1節 実験方法	32
第2節 薬物透過に及ぼすエレクトロポレーション適用条件の影響	36

第3節	エレクトロポレーション適用時に生じる角質層上電流密度と安息香酸皮膚透過量との相関.....	38
第4節	エレクトロポレーション適用時に生じる角質層上の電場強度と安息香酸の皮膚透過量との相関.....	45
第5節	小括.....	49
第6節	考察.....	50
第2章	2次元電場解析による電場分布と薬物皮膚取り込み分布の評価.....	52
第1節	実験方法.....	52
第2節	エレクトロポレーション適用時の皮膚内薬物量分布.....	54
第3節	エレクトロポレーション適用時の電場分布.....	54
第4節	小括.....	56
第5節	考察.....	56
第3章	2次元電場解析による電極の評価.....	58
第1節	実験方法.....	58
第2節	電場分布に及ぼす電極形状の影響.....	63
第3節	安息香酸の皮膚透過に及ぼす電極形状の影響.....	64
第4節	ジクロフェナックの皮膚透過に及ぼす電極形状の影響.....	68
第5節	ジクロフェナックの皮膚透過に及ぼす矩形波エレクトロポレーションパルスの影響.....	69
第6節	小括.....	71
第7節	考察.....	71
第3編	製剤化.....	73
第1章	リザーバー型製剤の開発.....	74
第1節	実験方法.....	75

第2節	ジクロフェナックナトリウム含有リザバー製剤の開発	76
第3節	小括.....	77
第4節	考察.....	77
第2章	マトリックス製剤の開発	78
第1節	実験方法	78
第2節	ジクロフェナックナトリウム含有マトリックス製剤の開発	80
第3節	小括.....	81
第4節	考察.....	81
結論	84
謝辞	89
引用文献	90

緒言

局所（皮膚及びその近傍）での薬効発現を期待した皮膚適用製剤は古くから利用されていたものの、全身作用を期待した皮膚適用製剤が上市されたのは 1974 年のスコポラミンの製剤が最初である¹⁾。この製剤の開発を契機に全身作用を有する薬物の投与部位として皮膚を用いるいわゆる経皮吸収型製剤（Transdermal Therapeutic System, TTS または Transdermal Delivery System, TDS）が注目されるようになった。経皮吸収型製剤の利点は投与の簡便さ、投与の中止中断の簡便さ、徐放化による血中濃度の維持、初回通過効果の回避等が挙げられ、非常に有用な投与剤形であると考えられる²⁾。しかし、皮膚の最外部を覆う角質層は物質透過バリアー能が高く、消化管粘膜などに比べ薬物の吸収性は悪い。また、皮膚が異物に対して防御膜³⁾として働くために、薬物の投与によって皮膚免疫系応答による皮膚感作⁴⁾や皮膚刺激⁵⁾が生じ、経皮吸収型製剤の開発研究を断念したケースも少なくない。現在まで開発に成功し、上市に至ったのはスコポラミンの他、ニトログリセリン⁶⁾、硝酸イソソルビド⁷⁾、エストラジオール⁸⁾、テストステロン⁹⁾、フェンタニル¹⁰⁾、ツロブテロール¹¹⁾等の極限られた薬物を含有した製剤に過ぎない。

経皮吸収型製剤に応用できる薬物種を増やすため、これまでに薬物の経皮吸収性を改善する試み（促進法）が数多くなされてきた。促進法は大きく、化学的促進法と物理的促進法に分類される。すなわち、エタノール¹²⁾、Azone¹³⁾さらには HPE-101¹⁴⁾に代表されるような吸収促進剤の利用、製剤中で高い薬物活量（thermodynamic activity）を維持する過飽和系の利用¹⁵⁾、高吸収性と高薬物溶解性の溶媒を利用した溶媒牽引（solvent drag）の利用¹⁶⁾などは化学的促進法に分類される。一方、電気エネルギーを用いたイオントフォーシス（iontophoresis）¹⁷⁾、超音波を利用したフォノフォーシス（phonophoresis）¹⁸⁾、高圧下で皮膚に小孔を生じさせる JET injection 法¹⁹⁾、極

小の針（microneedles）を用いて角質層に微小孔を空け吸収を高めるマイクロニードルの利用²⁰⁾などは物理的促進法と考えられる。この物理的促進方法の1つに、近年報告されたエレクトロポレーション（電気穿孔法）の利用がある²¹⁾。

エレクトロポレーションは、バクテリアや細胞への遺伝子導入方法として従来から用いられてきた技術^{22,23)}である。Fig. 0-1に示すような電極を有するキュベット中に細胞またはバクテリアとDNAなどを適用し、極短時間（数マイクロ秒から数ミリ秒）、数百ボルトを負荷することにより細胞膜に可逆的な小孔を生じさせ、そこから細胞内へ遺伝子（DNA）の導入を図るものであった。米国のPrausnitzらは1993年に本方法を最初に薬物の経皮吸収促進方法として応用した²¹⁾。Fig. 0-2に示すようにエレクトロポレーションは角質層を構成するコーニオサイト（corneocytes）間のセラミド脂質に作用し、皮膚に対してもバクテリアや細胞の生体膜と同様、脂質二重膜構造に孔を生じさせ、薬物の経皮吸収性を上げると言われており²¹⁾、同じ電気エネルギーを用いるイオントフォーシスとは大きくメカニズムが異なると思われる（Table 0-1）。Prausnitzらは単純な経皮吸収実験系においてパルス電圧を適用（エレクトロポレーションの処理）し、カルセインの経皮吸収に対する促進能について報告した。また、Bomannanらはその翌年（1994年）エレクトロポレーションとイオントフォーシスを併用することで、LH-RHに対して相乗的な促進能が得られることを報告した²⁴⁾。しかし、いずれも透過促進能についてのみの報告であり、促進メカニズムや促進能に寄与する因子等の報告はなされていない。

そこで本研究において、エレクトロポレーションによる薬物の経皮吸収促進能について詳細な検討を行い、そこから得られた知見よりエレクトロポレーションを利用した製剤化を目指した。

第1編では非電解質のマニトールの皮膚透過に対してエレクトロポレーションの効果を調べ、さらに電極の適用条件や材料の影響について調べた。また、エレクト

ロポレーションとイオントフォーシスの併用効果についても調べた。加えて、マンニトールのデータと比較するために、イオン性化合物の安息香酸ナトリウムについてもエレクトロポレーションによる促進効果及びその作用機構を調べた。第2編においては安息香酸ナトリウムやジクロフェナックナトリウムを用いてエレクトロポレーション適用時に生じる電場強度と促進能との関係を二次元または三次元の電場解析から評価し、エレクトロポレーションに最適な電極形状について考察した。さらに、第3編では第2編で見出された電極形状を組み込んだエレクトロポレーション製剤について検討した。すなわち本研究ではエレクトロポレーションの経皮吸収促進能におけるメカニズム解明から製剤化までの一連の研究を以下行った。

以下、得られた結果を論述する。

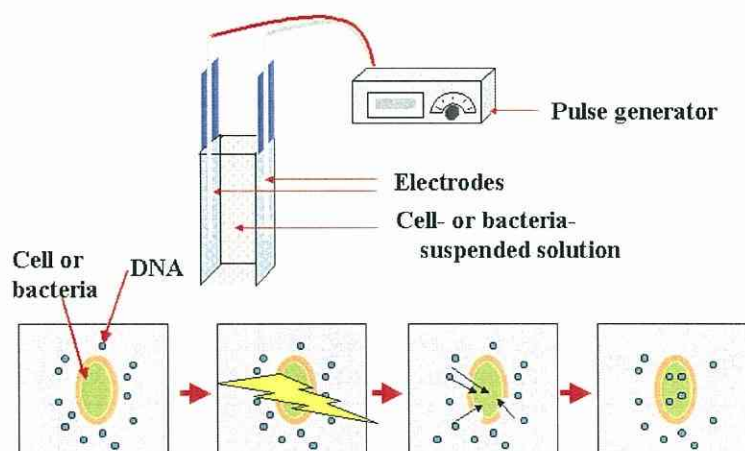


Fig. 0-1 Schematic Representation for the Treatment of Electroporation to Load DNA into Cells or Bacteria

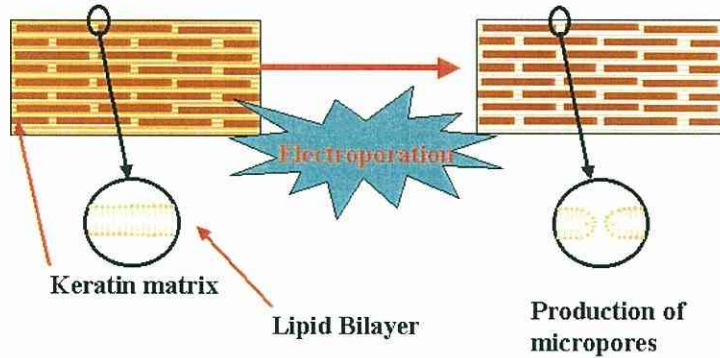


Fig. 0- 2 Supposed Mechanism of Electroporation on the Skin Barrier

Table 0- 1 Comparison of Application and Mechanism between Iontophoresis and Electroporation

	Iontophoresis	Electroporation
Application voltage	<10 V	>50 V
Application term	Minute ~ hour order	Microsecond ~ millisecond order
Enhancing mechanism	Increase in the electrochemical potential	Creation of the new permeation route
Application style		

第1編 薬物の皮膚透過に対するエレクトロポレーションの有用性評価

これまでに報告されているエレクトロポレーションの経皮吸収促進への応用研究において、電極の適用方法や材料等の検討は全くなされていない。例えば Prausntz²¹⁾らや Riviere ら²⁵⁾の *in vitro* 皮膚透過試験では、銀/塩化銀の陽陰電極をそれぞれ皮膚の角質層側と真皮側に配置している。また、Vanbever らは白金電極を用い、Prausntz らと類似した電極配置でメトプロロールの皮膚透過性を測定している²⁶⁾。さらに Hoffman らは、電極材料は明確に示していないものの、陽陰電極が互いに近隣し合うよう連続した皮膚同一表面に適用して、皮膚を介した微小薬物担体 (micro-carriers) の送達を報告している²⁷⁾。このように、ほとんどの研究論文では電極材料や配置の影響を直接的に比較検討していないため、最終的にヒトへ適用する場合の製剤形状が明確化できないのが現状である。また、エレクトロポレーション適用時にはイオンフォレーシス適用時に生じる electromigration²⁸⁾による促進効果はないと考えられている。しかし、前述した種々の報告ではエレクトロポレーションの促進効果は見られているものの、エレクトロポレーション適用回数も少ないために electromigration の効果が生じても皮膚に対する直接的な効果 (孔の形成による促進) の寄与が大きいため、認識されない可能性も考えられる。

そこで、第1章では electromigration 効果を受けない非イオン性物質のマニトールをモデル化合物として用いて、エレクトロポレーションの皮膚バリアーへの小孔形成による促進効果能を調べると共に、マニトールの皮膚透過に及ぼす電極の材料や位置の影響を調べた。

また、第2章では電解質の安息香酸ナトリウムをモデル化合物として用いて、電極形状が異なる電極を用いてエレクトロポレーションを適用し、適用する電流の方向を

入れ替えた場合や電極の適用状態を変えた場合に安息香酸の皮膚透過がどのように変化するかを調べることとした。

第1章 非電解質の皮膚透過に及ぼすエレクトロポレーションの影響²⁹⁾

本章ではマンニトールをモデル化合物として選択して、(1)エレクトロポレーションによるマンニトールの皮膚透過促進効果、及びマンニトールの皮膚透過に及ぼす、(2)陽陰電極の位置、(3)電極材料、(4)電圧の適用頻度、の影響等、基礎的知見について調べた。また、応用研究として、エレクトロポレーションと同様に電気エネルギーを用いた経皮吸収促進法であるイオントフォレーシス³⁰⁾との併用についても検討し、この併用系の有用性と実用性を検討した。

第1節 実験方法

1. 実験材料および試薬

¹⁴C-D-マンニトール (2.07 GBq/mmol, 放射性純度 96.6%以上) は Amersham Life Science (Buckinghamshire, England) より、非放射性 D-マンニトールはシグマ (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。注射用生理食塩液は大塚製薬 (株) (東京) より購入した。ペントバルビタールはネンブタール (大日本製薬 (株), 大阪) を用いた。さらに、シンチレーションカクテル (Hionicfluor) は Packard (Meriden, CT, U.S.A.) より購入した。

電極の材料として用いた板状の銀は村田洋白 (東京) より、白金やワイヤー状の銀はニラコ (東京) より購入した。ニードルタイプ (太さ 1.0 mm) またはリングタイプ (Fig. 1-1) の電極は実験室で作成した。なお、ニードルタイプ電極を皮膚に直接接する場合は、皮膚を傷つけないよう先端を折り曲げ曲線状に成型した。銀/塩化銀電極

は銀を生理食塩液中で電解して得た。

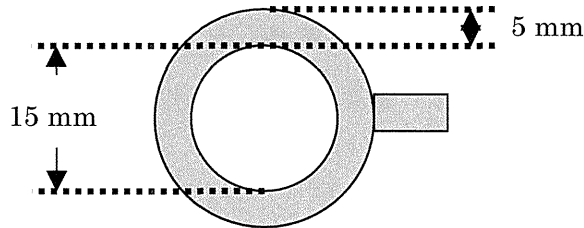


Fig. 1-1 Schematic Representation of a Ring Type of Electrode

2. 透過試験

WBMILA-Ht 系雄性ヘアレスラット³¹⁾150~180 g を埼玉実験動物 (杉戸、埼玉) より購入し、1 週間以上の予備飼育を経た。ネブタール麻酔下、腹部より皮膚を摘出し、摘出直後に実験に用いた。

¹⁴C-D-マンニトールを適宜非標識 D-マンニトールで希釈して得た 50mg/ml D-マンニトール生理食塩液溶液を調製し、これを試験溶液とした。

横型 2-チャンバー拡散セル (有効拡散面積 0.95cm^2)³²⁾ または Franz 型セル (有効拡散面積 3.14cm^2)³³⁾ を用いた。横型 2-チャンバー拡散セルを用いた時は、角質層側 (donor) セルに 2.7 ml の薬物溶液を、真皮側 (receiver) セルに同容量の生理食塩液を適用した。また、Franz 型セルを用いたときは角質層側 (donor) 側セルに 1.0 ml の薬物溶液を、真皮 (receiver) 側セルに約 17 mL の生理食塩水溶液を適用した (receiver セル容量はセル毎で多少異なったので、使用時にその容量を正確に測定した)。これらのセルは 37°C に保ったエアバス中に配置した。エレクトロポレーションパルス電圧はジーンパルサー (Gene pulser, Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) を用いて適用した。皮膚透過実験開始後、パルス負荷装置より電圧を負荷し、経時的に

真皮側 (receiver) 溶液を 0.1 mL 採取し、その都度同量の生理食塩液を receiver 側に戻した。採取した receiver サンプル 0.1 mL をシンチレーター 10.0 mL に加え、液体シンチレーションカウンター (TR-2200 CA, Packard, Meriden, CT, U.S.A.) で放射活性を測定し、マンニトール濃度に換算して皮膚透過量を求めた。

3. 実験条件

マンニトールの皮膚透過に及ぼすエレクトロポレーションの影響を調べるときは、横型 2-チャンバー拡散セル (Fig. 1-2) を用いて、実験開始直後から 1 分毎に 1 回の頻度で 500 V を負荷した。ただし、実験開始直後 4 時間まではパルス負荷装置のコンデンサー用量 (Capacitance) を 1.0 μF に、また、4 時間後から 6 時間目までは 25 μF とした。電極にはニードル電極を用い、陽極には銀電極、陰極には銀/塩化銀電極を適用した。Donor 側に適用した電極は皮膚角質層表面より約 1 cm の位置に、receiver 側に適用した電極は皮膚真皮より約 1 cm の位置にセットした。

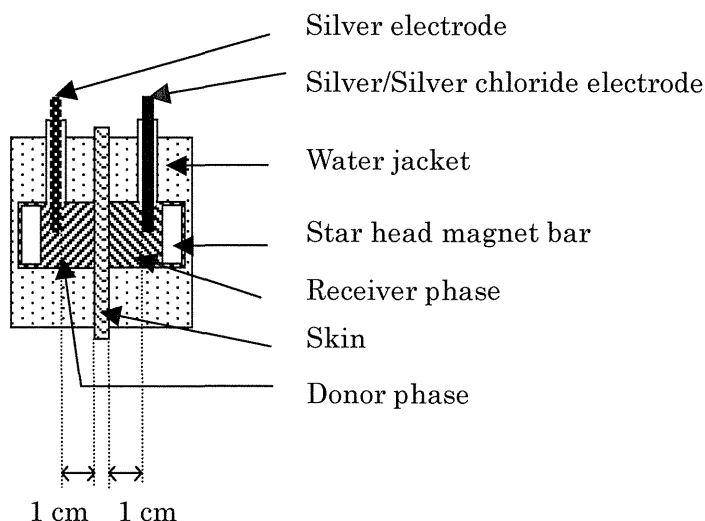


Fig. 1-2 Schematic Illustration of 2-Chamber Diffusion Cell

一方、マンニトールの皮膚透過に及ぼす電極位置の影響を調べる時は、Franz 型セルを用い、陽極側の電極をニードルタイプ、陰極側の電極をリングタイプとし、以下の(a), (b)の条件で実験を行った。(a)皮膚角質側に陽極（ニードル電極は角質層と接する）を、真皮側に陰極（リング電極は真皮層と接する）をセットした。(b)皮膚角質層側に陽極、陰極の両極をセットした。ただし、この時、両極は角質層に接するものの、互いに直接接しないようにした。また、パルス発生装置のコンデンサー容量は 25 μ FD で 1 分間に 1 回の頻度で 500 V を負荷した。

さらに、マンニトールの皮膚透過に及ぼす電極材料の影響を調べる時は、分極性の電極として白金を用い（陽極、陰極とも白金）、非分極性の電極として銀（陽極）、銀／塩化銀（陰極）を用いた。いずれの場合も陽極側電極はニードルタイプ、陰極側電極はリングタイプとし、陽陰両電極は共に皮膚角質層上にセットし、互いに直接接

しないように配置した。パルス発生装置のコンデンサー容量は 25 μ FD で 1 分間に 1 回の頻度で 500 V を負荷した。

また皮膚透過に及ぼす電圧の適用頻度の影響を調べるときは、陽極側に銀(ニードルタイプ)、陰極側に銀/塩化銀(リングタイプ)電極を用い、共に皮膚角質層側に配置した。パルス発生装置のコンデンサー容量は 25 μ FD として 60 分間に 1 回または 30 分間に 1 回の頻度で 500 V を負荷した。イオントフォレーシスを併用したときは、Fig. 1-3 に示したようにエレクトロポレーションとイオントフォレーシスの両方の電圧負荷に対して陰極となるリング電極(銀/塩化銀)を皮膚真皮側に、エレクトロポレーション用の陽極電極をニードル電極(銀)として皮膚角質層側に設置した。また、イオントフォレーシスの陽極となるリング電極(銀)を角質層側に設置した。なお、イオントフォレーシス陽極電極の角質層接触面はビニールテープで絶縁した。さらにイオントフォレーシス単独系ではニードル電極を適用しない他は同様に行った。イオントフォレーシス条件は、パルス脱分極イオントフォレーシス電流発生装置(AIDS-4030, 久光製薬)を用いて周波数 40 kHz、duty 比 30%で 3 mA の定電流を負荷した。エレクトロポレーションは実験開始直後に 1 回、500 V、もしくは実験開始直後、およびその後 1 時間毎に 50 V、200 V または 500 V を負荷した。

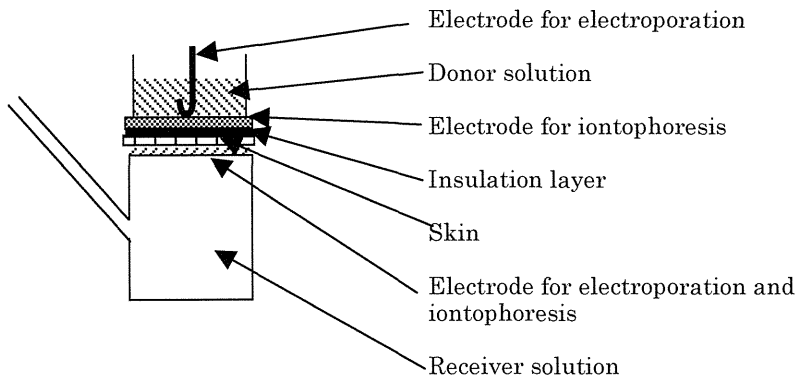


Fig. 1-3 Schematic Illustration of Diffusion Cell, Skin and Electrodes

第2節 マンニトールの皮膚透過に及ぼすエレクトロポレーションの影響

角質層側 (donor) を陽極、真皮側 (receiver) を陰極とした時と、逆に donor 側を陰極、receiver 側を陽極とした時のマンニトールの皮膚透過性を比較した。なお、コントロールとして、電圧を負荷しなかった時のマンニトールの皮膚透過性も測定した。Fig. 1-4 にマンニトールの累積皮膚透過量の経時変化を示す。エレクトロポレーション適用群では、donor 側を陽極 (Fig. 1-4, △) または陰極 (Fig. 1-4, ▲) とした場合のいずれも非通電群 (Fig. 1-4, ●) に比べてマンニトールの皮膚透過は著しく促進された。すなわち、非イオン性のマンニトールでもエレクトロポレーションによる皮膚透過促進効果が確認された。また、donor 側を陽極とした場合と陰極とした場合でマンニトールの透過に有意差は見られなかった。

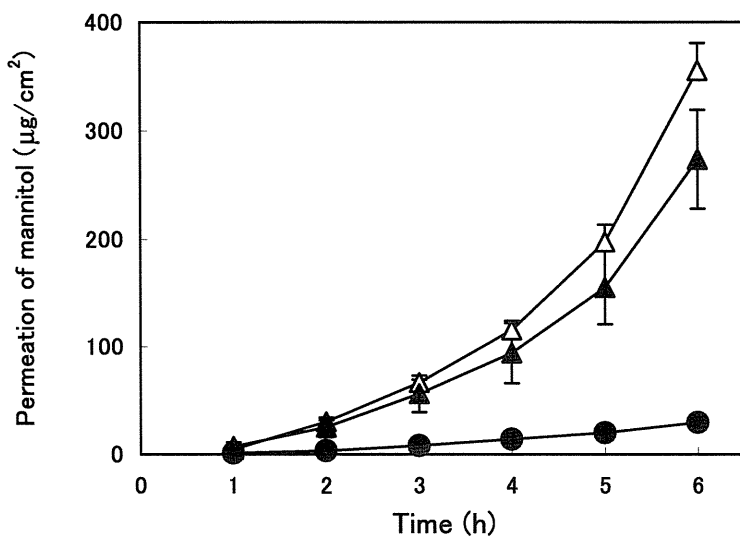


Fig. 1-4 Effect of Electroporation on the Permeation of Mannitol through the Excised Hairless Rat Skin

●: Control (non-pulse), △: Anode and Cathode were set in Donor and Receiver Compartment, respectively, ▲Anode and Cathode were set in Receiver and Donor Compartment, respectively

イオントフォーシスを用いた時では、マンニトールの皮膚透過性は convective flow の影響により、donor 側を陽極としたときの方が陰極とした場合に比べ高いことが報告されている³⁴⁾。しかし、今回のエレクトロポレーション処理でのマンニトールの皮膚透過性は電流の方向に依存しなかった。このことより、エレクトロポレーションのように電圧を負荷する時間が極めて短い場合では、イオントフォーシスで報告されているような convective flow による皮膚透過促進効果はほとんど生じないことが

示唆された。また、エレクトロポレーションの透過促進効果は、報告されているように³⁵⁾、皮膚に小孔が生じるため引き起こされたと考えられた。

Table 1-1 に今回行ったエレクトロポレーション処理時の平均 flux をまとめて示す。パルス発生装置のコンデンサー容量を 1 μF としたときは、非通電群に比べて donor 側を陽極とした時に約 6 倍の透過速度が、逆に donor 側を陰極とした場合に 4.8 倍の透過速度が得られた。また、コンデンサー容量を 25 μFD としたときは、非通電群に比べて donor 側を陽極とした時に約 25 倍の透過速度が、donor 側を陰極とした場合に約 18 倍の透過速度が得られた。

Table 1-1 Comparison of Mannitol Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)

Capacitance	Control	Donor (+) Receiver(-)	Donor (-) Receiver(+)
0~4 h (1 μFD)	—	29.3 \pm 1.9	23.4 \pm 6.9
4~6 h (25 μFD)	—	120.1 \pm 8.3	89.9 \pm 13.4
0~6h	4.9 \pm 1.8	—	—

本実験に用いたパルス発生装置のコンデンサー容量の違いはパルス電圧の通電時間に反映する。したがって、マンニトールの皮膚送達量が電流適用時間に依存したことが考えられた。

第3節 マンニトールの皮膚透過に及ぼす電極位置の影響

次にマンニトールの皮膚透過性に及ぼす電極位置の影響について試験した。なお、以後の皮膚透過実験には Franz 型拡散セルを用いた。本実験では、(a)皮膚角質側に陽極を、真皮側に陰極をセットした場合 (Fig. 1-5, ○) と、(b)陽極、陰極共皮膚角質層

側にセットした場合 (Fig. 1-5, ●) について試験した。パルス発生装置のコンデンサー容量は 25 μ FD で、1 pulse/分の頻度で 500 V を負荷した。得られたマンニトールの皮膚透過性を Fig. 1-5 に示す。両ケースでマンニトールの皮膚透過性はほぼ等しかった。すなわち、陽極と陰極を必ずしも皮膚を介してセットする必要はないことが明らかとなった。いずれの場合も 6 時間までに約 1500 μ g/cm² のマンニトールが皮膚を透過し、その透過速度はおおよそ 250 μ g/cm² · h であった。これは、皮膚透過試験に用いた拡散セルの違いはあるものの、前述した非通電時の約 50 倍の透過速度であった。また、本実験では電極を直接皮膚に接しているが、この場合、非接触群 (Table 1-1 に示した donor 側を陽極、25 μ FD の結果) に比べて約 2 倍の透過速度が得られた。なお、この差の原因は 3 次元電場解析を用いて評価した。このことは第 2 編で詳細に考察する。

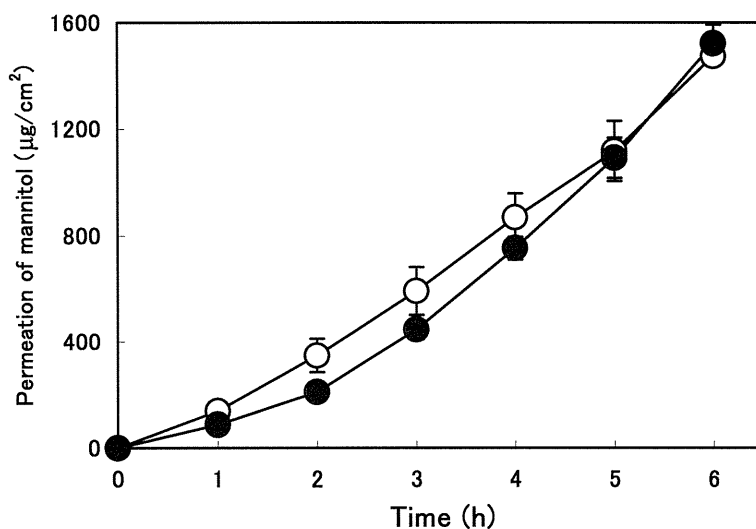


Fig. 1-5 Effect of Electrode Location on the Permeation of Mannitol through the Excised Hairless Rat Skin

○: Anode and cathode were set in donor and receiver compartment, respectively, ●: Both of anode and cathode were set in donor compartment.

第4節 マンニトールの皮膚透過に及ぼす電極材料の影響

マンニトールの皮膚透過に及ぼす分極性電極と非分極性電極の違いを調べるために電極材料に白金を用いた場合（陽極、陰極とも白金）と銀（陽極）、銀／塩化銀（陰極）を用いた場合を比較した。陽陰両電極は共に皮膚角質層上にセットした。得られた結果を Fig. 1-6 に示す。図から明らかな様に、分極性、非分極性電極いずれを用いた場合

もマンニトールの皮膚透過性はほぼ等しく、6時間までに約 1500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ が透過した。

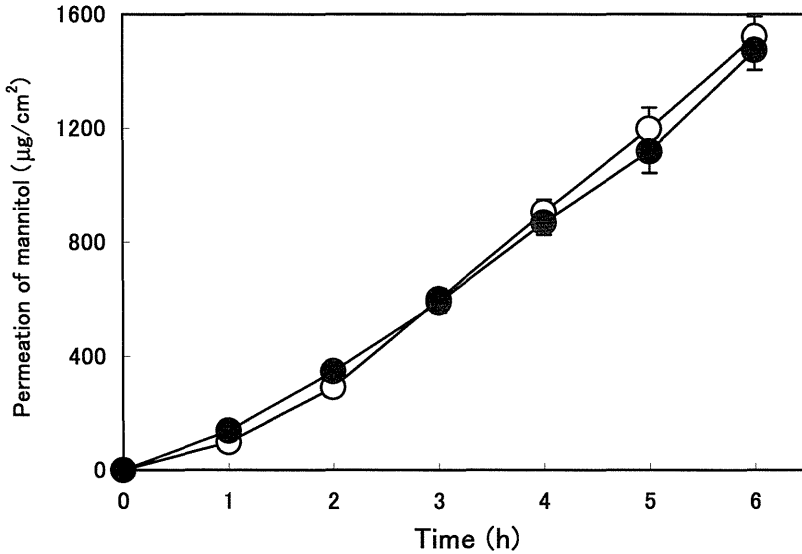


Fig. 1-6 Effect of Electrode Material on the Permeation of Mannitol through the Excised Hairless Rat Skin

○: Both Anode and cathode were Pt electrodes, ●: Anode and cathode were Ag and Ag/AgCl electrodes, respectively.

パルス脱分極型のイオントフォーシスにおいては、定電圧で負荷した場合、分極性電極を用いると電極-薬物溶液間の分極によって電圧が消費されるために、非分極性電極に比べて薬物の透過性が減少するという報告がある³⁶⁾。しかし、今回示したようにエレクトロポレーションでは分極性、非分極にかかわらず、同等にマンニトールの皮膚透過性を促進した。これは、エレクトロポレーションで負荷される電圧がイ

オントフォレーシスに比較して非常に高いことから（通常イオンフォレーシスでは 10 V 前後、今回のエレクトロポレーションでは 500 V）、電極で生じる分極電位の影響を受けにくいものと思われた。

第 5 節 マンニトールの皮膚透過に及ぼす電圧適用頻度の影響

上記第 2 節から 4 節に示したすべての実験結果は 500 V を 1 分間に 1 回の頻度で負荷した時のものである。そこで、次にパルスの適用頻度を減らしマンニトールの皮膚透過に及ぼす適用頻度の影響を調べた。電極には陽極側に銀電極、陰極側に銀／塩化銀電極を用い、皮膚角質層側に両方の電極を配置した。

Fig. 1-7 に得られたマンニトールの累積皮膚透過量を示す。1 分間に 1 回の適用では 6 時間目までに約 1500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のマンニトールが透過していたのに対し、1 時間に 2 回適用すると 86 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ に、さらに 1 時間に 1 回の適用では 52 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ に皮膚透過量が減少した。しかしながら、1 時間に 1 回でも非通電群 (Fig. 1-4 ●) に比べて 1.7 倍の透過量が見られた。

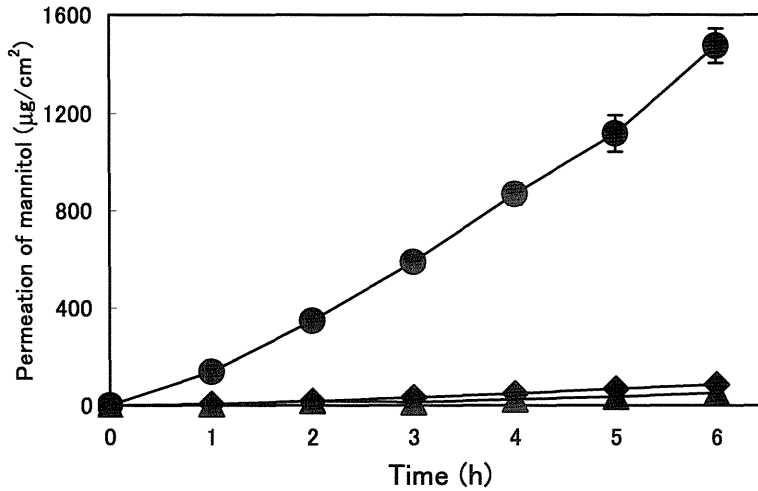


Fig. 1-7 Effect of Pulse Application Frequency on the Permeation of Mannitol through the Excised Hairless Rat Skin

▲: 1 pulse/h, ◆: 2 pulses/h, ●: 60 pulses/h

第6節 エレクトロポレーションとイオントフォーシスの併用効果

前節で示したように、エレクトロポレーションの適用回数を減らすとその促進効果は減少する。また、第1節～5節までに示したデータは全て500Vのパルスを負荷した時のものであるが、これは同じように電気的エネルギーを利用するイオントフォーシスで一般に用いられている電位と比較して50倍程度高い。電圧の適用時間、電極の形状等にもよるが、電圧負荷は皮膚刺激の原因にもなりかねない。そこで、エレクトロポレーションとイオントフォーシスとを併用することで、エレクトロポレーション適用回数を減らしたり、またエレクトロポレーション適用電圧を下げることも可能ではないかと考え、マンニトールの皮膚透過に及ぼすイオントフォーシスとエレ

クトロポレーションの併用効果を調べた。

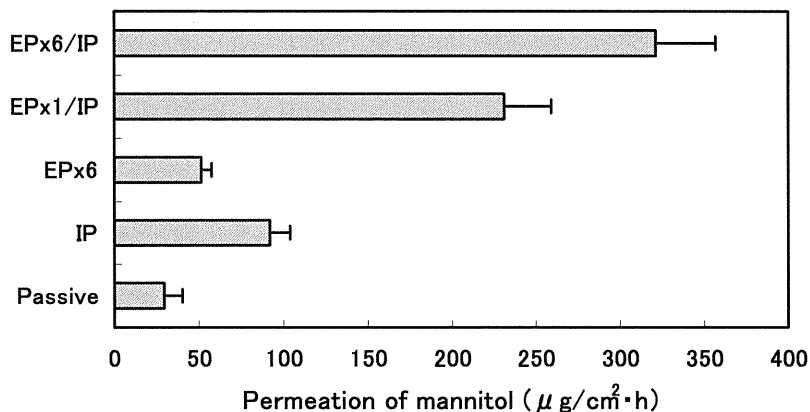


Fig. 1-8 Mannitol Flux through the Excised Hairless Rat Skin

IP: Iontophoresis 3mA, for 6 hours, EPx6: Electroporation (500 V) every an hour, EPx1/IP: One Electroporation (500 V) at 0 h and Iontophoresis (3.0 mA) for 6 hours, EPx6/IP: Electroporation (500 V) every an hour and Iontophoresis for 6 hours

Fig. 1-8 に非通電 (passive)、イオントフォレーシス単独適用 (パルス脱分極イオントフォレーシスにて 3 mA)、エレクトロポレーション単独適用 (500 V を 1 時間毎に負荷)、イオントフォレーシスとエレクトロポレーションを併用したとき (エレクトロポレーションを初期のみの 1 回または 1 時間毎に 500 V さらにパルス脱分極イオントフォレーシスにて 3mA) の 6 時間までのマンニトールの累積透過量を示す。非通電系では $29.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ しか皮膚透過しなかったのに対し、イオントフォレーシス単独適用では $92.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ が、エレクトロポレーション単独系では $51.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ が透過し、エレクトロポレーション、イオントフォレーシスそれぞれ単独の適用であってもマンニトー

ルの透過を促進することがわかった。さらに、エレクトロポレーションとイオントフォレーシスを併用することで、 $322 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のマンニトールが皮膚透過し、エレクトロポレーションとイオントフォレーシスで相乗的な効果が得られることがわかった。エレクトロポレーションのみ 500V を 1 分間に 1 回適用した時のマンニトールの透過量 (約 $1500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) には及ばないものの、エレクトロポレーションの適用回数を $1/60$ に減らしてもイオントフォレーシス併用することで透過量の減少は $1/5$ 程度であった。

さらにエレクトロポレーションの適用電圧を減らし、イオントフォレーシスとの併用効果を調べた。効果を調べた。その結果を Fig. 1-9 に示す。

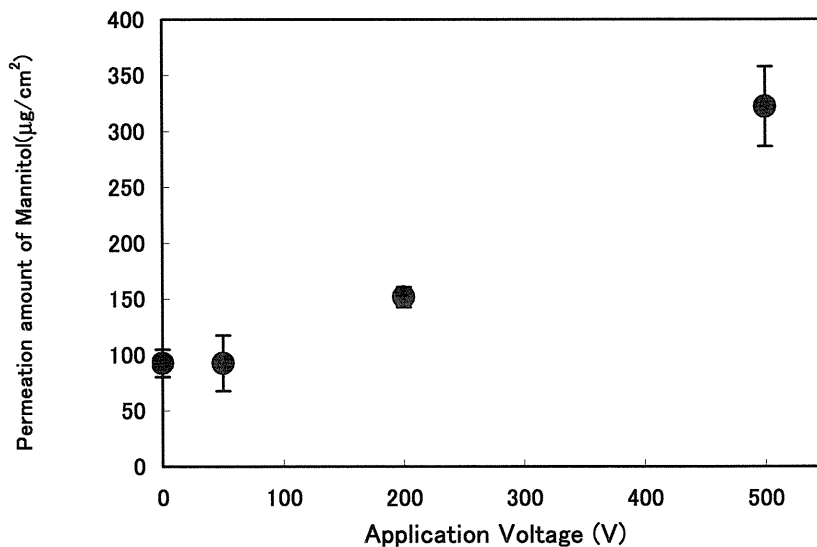


Fig. 1-9 Relationship between Pulse Application Voltage at Electroporation and Cumulative Amount of Mannitol that Permeated through the Excised Hairless Rat Skin

エレクトロポレーションを負荷しないイオントフォレーシス単独では、前述したように $92.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のマンニトールが6時間目までに皮膚透過した。エレクトロポレーションとの併用では、エレクトロポレーションを50 V負荷した時はその効果は見られず、イオントフォレーシス単独時と同等のマンニトール量しか透過しなかったが、200 Vや、500 Vを負荷したときではエレクトロポレーションとイオントフォレーシスの相乗効果が見られ、適用電圧に比例してマンニトールの皮膚透過量も増加した。すなわち、エレクトロポレーションの適用電圧を減少させても、イオントフォレーシスを負荷することで、相乗的な促進効果を示すことが明らかとなった。

第7節 小括

非電解質のマンニトールを用いてその皮膚透過性に及ぼすエレクトロポレーションの影響を調べた。その結果、エレクトロポレーションパルス発生装置の電気容量を増やすことで、すなわち、1パルスの電流適用時間を長くすることで、マンニトールの皮膚透過量は増加し、エレクトロポレーションのような極短時間の電圧適用であっても、促進効果は電圧適用時間に依存することがわかった。また同様に電気負荷パルスの頻度も促進効果に影響し、パルス適用回数が多いほど促進効果が増加した。一方、電極の材料は分極性のものであっても非分極性のものであっても促進効果はほぼ同じであった。また電極の位置についても非イオン性のマンニトールでは一対の電極を角質層上に配置しても、一方を角質層上にもう一方を真皮下に配置しても効果は変わらなかった。さらにイオントフォレーシスと併用することで、低いエレクトロポレーションの適用電圧であっても、イオントフォレーシスとの相乗効果によって高い促進効果を得ることができた。

第8節 考察

本章においては、分極性の電極材料として白金を非分極性の電極として銀と銀／塩化銀を用いたが、これらは高価な金属である。分極性電極でも、非分極性電極でもマンニトールの皮膚透過が変わらなかったことから、今後はカーボンのような安価な電極材料³⁷⁾を用いることで、実用的な製剤が開発できると考えられる。

両電極間の距離が近く、同一平面上に配置しても皮膚を介して電極を配置してもマンニトールの皮膚透過が変わらなかったことから、1つの製剤に一对の電極を有することができ、現在市販されている経皮吸収型製剤とほぼ同等の大きさの製剤を開発できる可能性がでてきた。

非イオン性のマンニトールの皮膚透過に及ぼしたイオントフォーシスの効果を考えた場合、イオントフォーシス適用時に生じる convective flow が主な促進メカニズムと考えられている²⁸⁾。今回得られたエレクトロポレーション／イオントフォーシスを併用時のマンニトールの高い皮膚透過促進効果と電圧値の上昇に伴う更なる効果の増大から、エレクトロポレーションによりイオントフォーシス時の convective flow が増大したと推測できる。さらには、超音波³⁸⁾やマイクロエマルション³⁹⁾などの促進方法との併用により高い吸収促進効果が得られとの報告もある。

これら本章の一連の検討によりエレクトロポレーションによる薬物の皮膚透過促進効果が確認され、エレクトロポレーションを利用した経皮吸収型製剤の開発が可能であることが確認された。

第2章 電解質の皮膚透過に及ぼすエレクトロポレーションの影響⁴⁰⁾

前章では非電解質のマニトールを用いて、エレクトロポレーションの促進効果を確認したが、本章では電解質の安息香酸ナトリウムを用いて、電極位置や適用電圧の影響を調べた。一般にエレクトロポレーションでは *electromigration*⁴¹⁾による促進効果はないと言われている。前章の結果においても、両電極で皮膚を挟み込むように設置しても、両電極共角質層側に設置してもマニトールの皮膚透過性は変わらなかった。しかし、これはエレクトロポレーションの皮膚に対して生じる小孔形成による促進効果が大きいために *electromigration* 効果があっても観察しえない可能性もあり、またマニトールが *electromigration* の影響を受けにくい非電解質であったことなども原因と考えられる。そこで電解質である安息香酸ナトリウムをモデル化合物として用い、形状の異なる電極を用い、陽陰極を入れ替えてエレクトロポレーションを負荷し、皮膚透過促進効果を調べた。

第1節 実験方法

1. 実験材料および試薬

安息香酸ナトリウムは和光純薬（大阪）より購入した。その他の試薬は分析グレードのものを精製せずにそのまま用いた。銀／塩化銀製のニードルタイプやリングタイプ電極（Fig. 1-1）は第1章と同様に調製した。

2. 透過試験

WBN/ILA-Ht系雄性ヘアレスラット 210～230g を城西大学生命科学センター（坂戸、埼玉）または石川実験動物（深谷、埼玉）より購入し、1週間以上の予備飼育を経た後、第1章と同様に皮膚を摘出、Franz型セルにセットした。角質層側には生理食塩液で

30 mg/mL に調整した安息香酸ナトリウム 3.0 mL を加え、真皮側には約 17 mL の生理食塩液を加えた。真皮側の溶液は 1200 rpm で良く攪拌された状態を保った。前章と同様に真皮 (receiver) 側より経時的にサンプリングした。サンプリングした溶液中の安息香酸を HPLC にて定量し、その皮膚透過量を求めた。

リングタイプの電極は皮膚角質層側または皮膚真皮側に設置し、ニードル電極は常に角質層側に設置した。ニードル電極を陽極、リング電極を陰極、またはニードル電極を陰極、リング電極を陽極として、第 1 章と同様の装置を用い、コンデンサー容量 1 μ F にセットして、透過試験開始後 4 時間目から 6 時間目の 2 時間、1 pulse/分の頻度で 120 回、エレクトロポレーションのパルス電圧を 150、300、450 または 600 V 負荷した。

3. 定量法

内部標準物質として 10 μ g/mL の *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルを含むアセトニトリルとサンプリング溶液を混和し、遠心分離による徐タンパク後、上澄み液を HPLC (ポンプ: LC-10AS、検出器: SPD10A、インテグレーター: CR-5A、コントローラー: SCL-10A、オートインジェクター: SIL-10AXL 全て島津製作所, 京都) に注入した。カラムには逆相カラム (Lichrospher 100 RP-18(e) 4 mm x 250 mm 関東化学, 東京) を用い、移動相 (アセトニトリル: 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 2.5)) は 1.0 mL/min で溶出させ、検出波長 230 nm で検出した。

第 2 節 適用電圧の影響および電流の方向性の影響 1

電極としてニードルとリング電極を角質層上に適用し、種々電圧のエレクトロポレーションを負荷し、安息香酸の皮膚透過に及ぼすエレクトロポレーション電圧の影響を調べた。その際、ニードル電極を陽極、リング電極を陰極にした場合とこれとは逆

にニードル電極を陰極、リング電極を陽極にした場合で安息香酸の透過性を比較した。実験は 10 時間の皮膚透過試験を行い、実験開始後 4 時から 6 時間までの 2 時間に亘ってエレクトロポレーションのパルスを 1 分間に 1 回の頻度で負荷した。

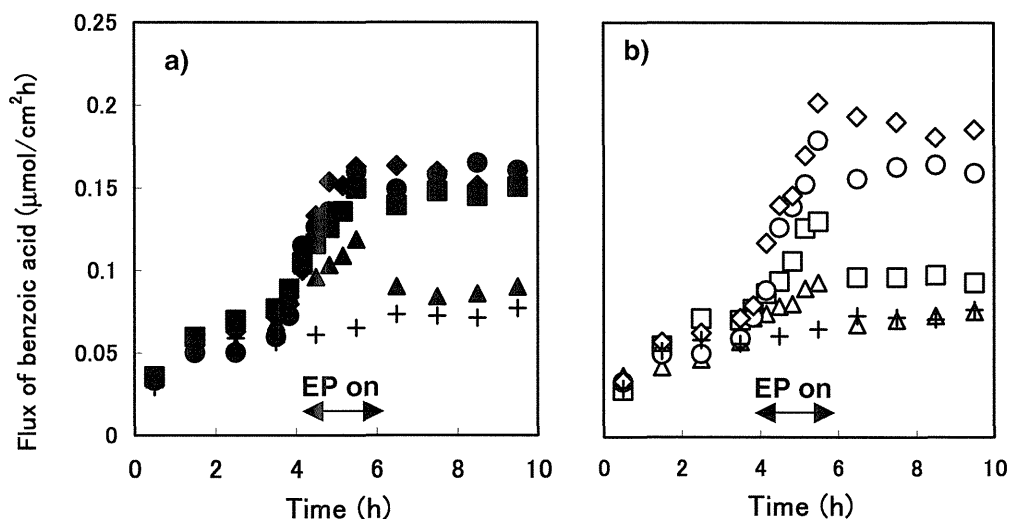


Fig. 1-10 Effect of Application Voltage on the Permeation of Benzoic acid with Both Electrodes on the Skin Surface

a) and b): Needle electrode was cathode and anode, respectively.

+: Control, ▲△: 150 V, ■□: 300 V, ●○: 450 V, ◆◇: 600 V

Fig. 1-10 a) にはニードル電極を陰極、リング電極を陽極にしたときの安息香酸の皮膚透過速度を、Fig. 1-10 b) にはニードル電極を陽極、リング電極を陰極にしたときの flux を示した。ニードル電極を陰極としたときは 150 V 以上の電圧を負荷したときに

促進効果が見られた。150 V の負荷ではエレクトロポレーションの負荷を止めると安息香酸の皮膚透過速度はエレクトロポレーション負荷前と同程度まで減少した。このことから、150 V 以下の負荷であれば皮膚バリアー能は一時的に低下するものの、負荷を停止することで速やかに回復したと予想される。すなわち、皮膚バリアーに引き起こされる変化は可逆的であると考えられる。一方、300 V 以上ではエレクトロポレーションの負荷を止めても透過速度は減少せず、皮膚の変化は不可逆的であった。また、ニードル電極を陽極にしてもほぼ同様な結果を示したが、450、600 V ではニードル電極を陰極にしたときに比べ、わずかに高い flux を示した。

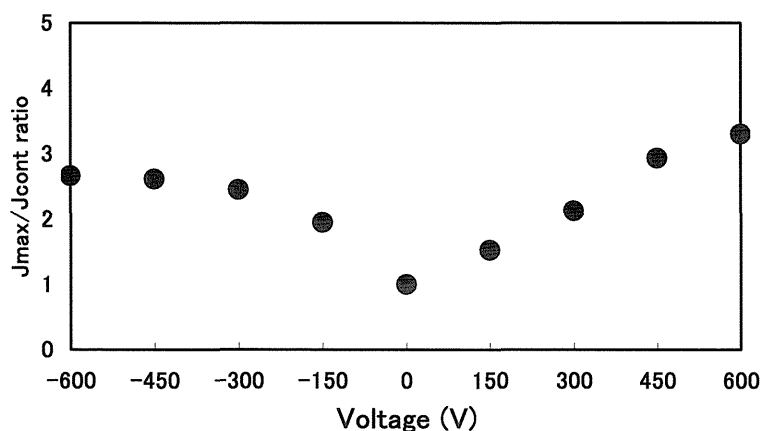


Fig. 1- 11 Relationship between Enhancement Ratio and Electroporation Application Voltage with Both Electrodes on the Skin Surface

さらにこれらの結果を Fig. 1- 11 にまとめる。すなわち、Fig. 1- 10 に示した安息香酸の最大皮膚透過速度をコントロール（エレクトロポレーション処理なし）の皮膚透過速度で除し、促進率（ J_{max}/J_{cont} ratio）として表した。またニードル電極を陰極と

して負荷した時の適用電圧値を便宜的に－値、陽極とした時の値を＋値として示した。ニードル電極を陽極とした場合と陰極とした場合を詳細に比較すると低電圧ではニードル電極を陰極としたときの方が、高電圧ではニードル電極を陽極を負荷したときの方が、わずかに高い促進率を示した。ニードル電極を陽極としたときは適用電圧に比例して直線的に促進率も増加し、ニードル電極を陰極として場合は高電圧側では緩やかな上に凸のカーブを描いた。2つの異なる形状の電極を用いた場合、電極の極性の違いにより弱電解質の安息香酸の皮膚透過速度（量）は異なったが、その差はわずかであった。

第3節 適用電圧の影響および電流の方向性の影響2

一方の電極を角質層側にもう一方の電極を皮膚真皮側に配置し、第2節と同様に極性の影響を調べた。その結果を Fig. 1-12 に示す。

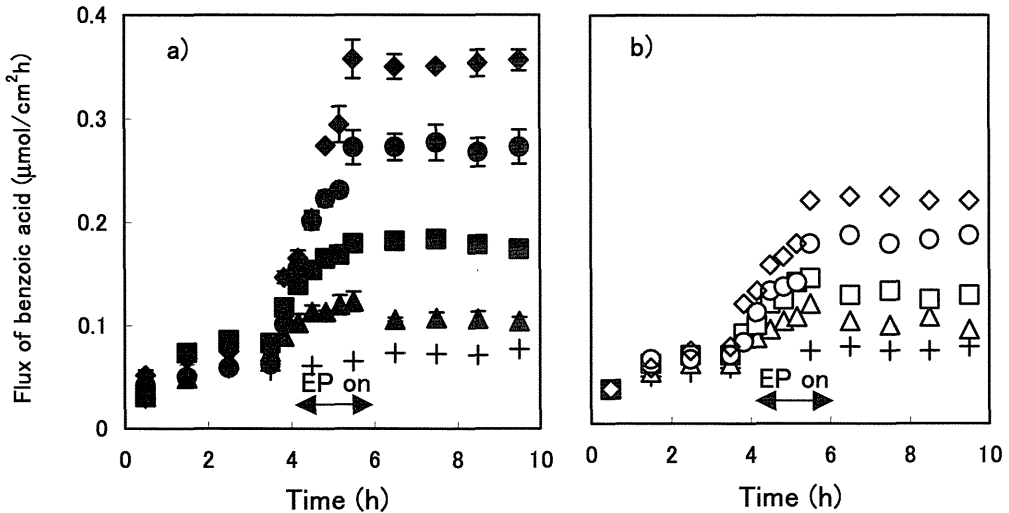


Fig. 1-12 Effect of Electroporation Application Voltage on the Skin Permeation of Benzoic Acid with the Two Electrodes Separated by Skin

+: Control, ▲△: 150 V, ■□: 300 V, ●○: 450 V, ◆◇: 600 V

a) and b): Needle electrode was cathode and anode, respectively.

安息香酸は 150 V 以下ではニードル電極の極性にかかわらずほぼ同等の皮膚透過性を示し、またエレクトロポレーション負荷を止めた後は負荷前と同等の透過性に戻り、皮膚バリアー能の回復が確認された。また、300 V 以上ではニードル電極を陰極とした場合の方が高い皮膚透過速度を示し、600 V の負荷ではニードル電極を陰極にした

場合は陽極にした場合に比べ約 1.5 倍高い透過性を示した。さらにこの結果を Fig. 1-11 と同様に Fig. 1-13 まとめた。

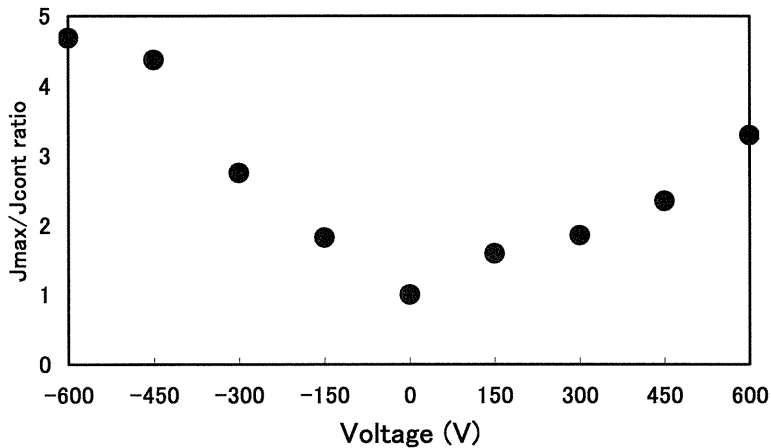


Fig. 1-13 Relationship between Enhancement Ratio and Electroporation Application Voltage with the Two Electrodes Separated by Skin

ニードル電極の極性に依らず、適用電圧を上昇させると安息香酸の皮膚透過促進率は直線的に増加した。しかし、ニードル電極を陰極としたときの方が、適用電圧に対する促進率の割合が大きかった。この原因として、陽極を皮膚真皮側に配置した時には、エレクトロポレーション処理でもイオントフォーシスで生じる electromigration によって安息香酸アニオンが皮膚透過する。

第4節 小括

ニードル電極とリング電極を皮膚角質層側に適用し、エレクトロポレーションのパ

ルスを負荷したときの安息香酸の皮膚透過促進効果は、適用電圧が同じであればニードル電極を陽極、リング電極を陰極とした場合とニードル電極を陰極、リング電極を陽極とした場合、ほぼ同等であった。一方、ニードル電極を真皮側、リング電極を角質層側に適用した場合の安息香酸の皮膚透過促進効果はニードル電極を陰極とした場合の方が高い透過速度を示した。

第5節 考察

4つの電極適用パターンを比較すると、ニードル電極を陰極として角質層側に、リング電極を陽極として真皮側に適用した場合のみが、他の3つの適用パターンに比べ高い促進効果を示した。この原因として、真皮側に陽極としてリング電極を配置すると、エレクトロポレーションのパルス負荷により皮膚を介してする電流が生じ、カチオンである安息香酸イオンが陽極電極へ向かうイオン流となって皮膚を透過することが考えられる。すなわち、エレクトロポレーションのように極短時間の電圧の適用であっても、頻回の負荷によりイオントフォーシスのような電流の流れに起因する促進効果 (electromigration) が生じていると考えられた。

第 2 編 電場解析によるエレクトロポレーションの皮膚透過促進能の評価

第 1 編ではエレクトロポレーションによる皮膚透過促進効果を電解質のマニトールや弱電解質の安息香酸で確認した。エレクトロポレーションの効果は、2つの電極間に負荷される電圧を電極間の距離で除した一次電場強度により決まると言われている⁴²⁾。しかしながら、著者が前編で用いた電極では皮膚全体に均一に電場が負荷されているとは考えにくい。そこで、本編では第 1 章で 3 次元電場解析により角質層に負荷される電場強度を解析した。さらに最適な電場強度を生じるための条件を求めするために、電解質濃度や電極の適用形態の影響を調べた。第 2 章では陽陰の電極を皮膚の同一平面上に設置し、そのとき皮膚に負荷される電場分布を 2 次元電場解析により求め、これと皮膚内への薬物の取り込み量との関係を調べた。さらに、第 3 章では形状の異なる 3 組の電極を適用した場合の電場分布の違いと薬物透過の違いを調べ、最適な電極を選択した。

第 1 章 3 次元電場解析による評価

本章ではエレクトロポレーションを負荷する際に使用する電極の最適な適用形態（電極位置、電極形状）と最適な薬物溶液の電解質濃度を 3 次元電場解析により調べた。電極としてはニードル電極とリング電極を用い、リング電極は常に皮膚に接するよう配置し、ニードル電極は皮膚に接する場合と皮膚から 5 mm 離して配置した。また、電圧負荷方法はニードル電極の全体表面積から電圧を負荷する場合と先端部分の底面から負荷する 2 種類を採用した。これらそれぞれの電極適用状態に対して、donor 溶液として 3%安息香酸ナトリウム水溶液、3%安息香酸ナトリウム 0.9%食塩水溶液、

3%安息香酸ナトリウム 9%食塩水溶液を用いた。これら合計 12 群のエレクトロポレーション負荷群の電場解析と皮膚透過試験の結果、さらにはエレクトロポレーション非適用時の透過試験(この場合 donor 溶液として先の 3 種類の 3%安息香酸ナトリウム溶液を用いた)により、最適な電極適用形態を明らかにし、また安息香酸の皮膚透過に及ぼす種々因子について調べた。

第 1 節 実験方法

1. 実験材料および試薬

WBN/ILA-Ht 雄性ヘアレスラット 180~230g は城西大学生命科学センター (坂戸, 埼玉) または石川実験動物 (深谷, 埼玉) より購入した。

試薬は全て第 1 編と同様に用いた。

電極材料は全て銀を用い、第 1 編と同様に作成した。なお、ニードル電極側面の絶縁にはセロハンテープ (ニチバン, 東京) を用いた。

パルス発生装置は第 1 編と同様に用いた。

2. 皮膚透過実験

第 1 編と同様に Franz 型セルを用いて行った。ただし、電極の設置形態は Fig. 2-1 に示したようにニードル電極 (絶縁せずに適用) またはポイント電極 (ニードル電極の側面を絶縁したもの) を皮膚上 (0 mm) または皮膚から 5 mm 離し保持した (それぞれニードル-0、ポイント-0 またはニードル-5、ポイント-5)。パルス発生装置のコンデンサー容量 1 μ F で、450 V を透過試験開始後 4~6 時間までの 2 時間、1 pulse/分の割合でエレクトロポレーションのパルスを負荷した。角質層側には NaCl 濃度の異なる 3 種類の安息香酸ナトリウム溶液 (3%安息香酸ナトリウムを水、0.9%食塩水、または 9%食塩水にて溶解) 3mL を適用した。

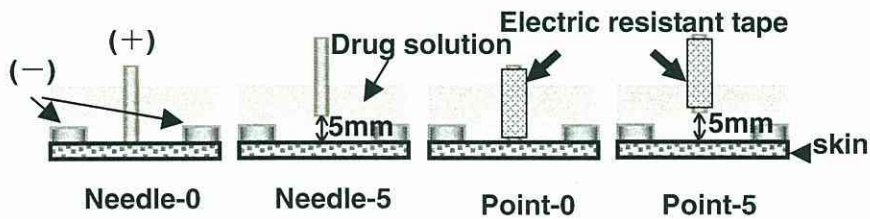


Fig. 2-1 Schematic Illustration of Electrode Types

Needle type; needle electrode in contact with drug solution. Point type; needle electrode covered with electrically resistant tape except at its tips. 0; needle electrode in contact with the skin surface. 5; needle electrode tip held 5 mm above the skin surface. To estimate the influence of drug formulation, the drug solution was prepared with 0, 0.9 or 9 % saline.

3. 定量

安息香酸ナトリウムの定量は第1編と同様に行った。

4. 電気伝導率の測定

皮膚透過試験で適用した NaCl 濃度の異なる3種類の安息香酸ナトリウム溶液の電気伝導度を、CONDUCTIVITY METER DS-15（堀場製作所，京都）を用いて測定した。

5. 皮膚インピーダンスの測定および角質層、真皮層の電気伝導度の算出

ヘアレスラット摘出皮膚を有効放電面積 2.5 cm^2 の銀電極で挟み、50 g を荷重し、インダクタンスーキャパシタンスーインピーダンスメーター（LCZ メーター2322, NF

回路設計ブロック，横浜，神奈川）により 100 kHz でインピーダンス（ Z ）および位相差（ θ ）を求めた。皮膚をコンデンサーと抵抗の並列回路(Fig. 2-2)⁴³⁾とし、抵抗（ R ）を eq. 2-1～eq. 2-5 により求めた。この R の値に加え、角質層の厚み（ L ）を 20 μm 、電極の有効放電面積（ S ）を 2.5 cm^2 とし、抵抗率（ ρ ）を eq. 2-6 から求め、さらに eq. 2-7 より電気伝導率（ κ ）を算出した。

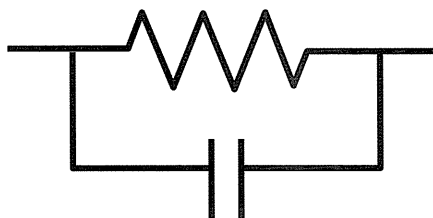


Fig. 2-2 Equivalent Electrical Circuit of the Skin

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{R} + j\omega C_p \quad \text{eq. 2-1}$$

但し、 Z はインピーダンス、 R は抵抗値、 j は虚数、 ω は測定時の周波数、 C_p はキャパシタンスを表す。

また、オイラー式⁴⁴⁾より

$$Z = |Z| \cdot (\cos \theta + j \sin \theta) \quad \text{eq. 2-2}$$

として表すことができる。

eq. 2-2 は

$$\frac{1}{Z} = \frac{1}{|Z| \cdot (\cos \theta + j \sin \theta)} = \frac{(\cos \theta - j \sin \theta)}{|Z| \cdot (\cos \theta + j \sin \theta) \cdot (\cos \theta - j \sin \theta)}$$

$$\frac{1}{Z} = \frac{(\cos \theta - j \sin \theta)}{|Z| \cdot (\cos^2 \theta + \sin^2 \theta)} \quad \text{eq. 2-3}$$

$(\cos^2 \theta + \sin^2 \theta) = 1$ なので、eq. 2-3 は

$$\frac{1}{Z} = \frac{\cos \theta}{|Z|} - \frac{j \sin \theta}{|Z|} \quad \text{eq. 2-4}$$

eq. 2-1 と eq. 2-4 の実数部分、虚数部分を比較して

$$R = \frac{|Z|}{\cos \theta} \quad \text{eq. 2-5}$$

$$\rho = \frac{R \cdot S}{L} \quad \text{eq. 2-6}$$

$$\kappa = \frac{1}{\rho} \quad \text{eq. 2-7}$$

6. 電流密度・電場解析

3次元電場解析は有限因子法ソフトウェア（PHOTO-VOLT ST, 株式会社フォトン, 奈良）⁴⁵⁾を用いて、「電流密度解析」により角質層平面における電場分布を求めた。

7. 電圧波形の測定

電圧波形はストレージオシロスコープ（デジタルオシロスコープ DL716, 横河電機, 東京）を用いて測定した。

第2節 薬物透過に及ぼすエレクトロポレーション適用条件の影響

Fig. 2-1 に示した4種類の電極を用い、安息香酸ナトリウム水溶液（安息香酸ナトリウム以外の電解質を含まない）を皮膚に適用し、安息香酸の皮膚透過性を経時的に調べた。得られた結果を Fig. 2-3 に示す。(a)は安息香酸の累積透過量を表し、(b)は透過速度を示す。エレクトロポレーションの負荷により促進効果が認められた。しかし、同じ電位を負荷しているにもかかわらず、適用する電極や適用状態によってエレクトロポレーションの皮膚透過促進効果は異なり、ニードル-0 とポイント-0 はほぼ同等の効果を示した。また、その効果は他の2つの電極（ニードル-5 とポイント-5）に比べ著しく高かった。皮膚に直接電極を設置させることで、高い促進効果が生じるのは第1編のマンニトールの結果と同様であった。

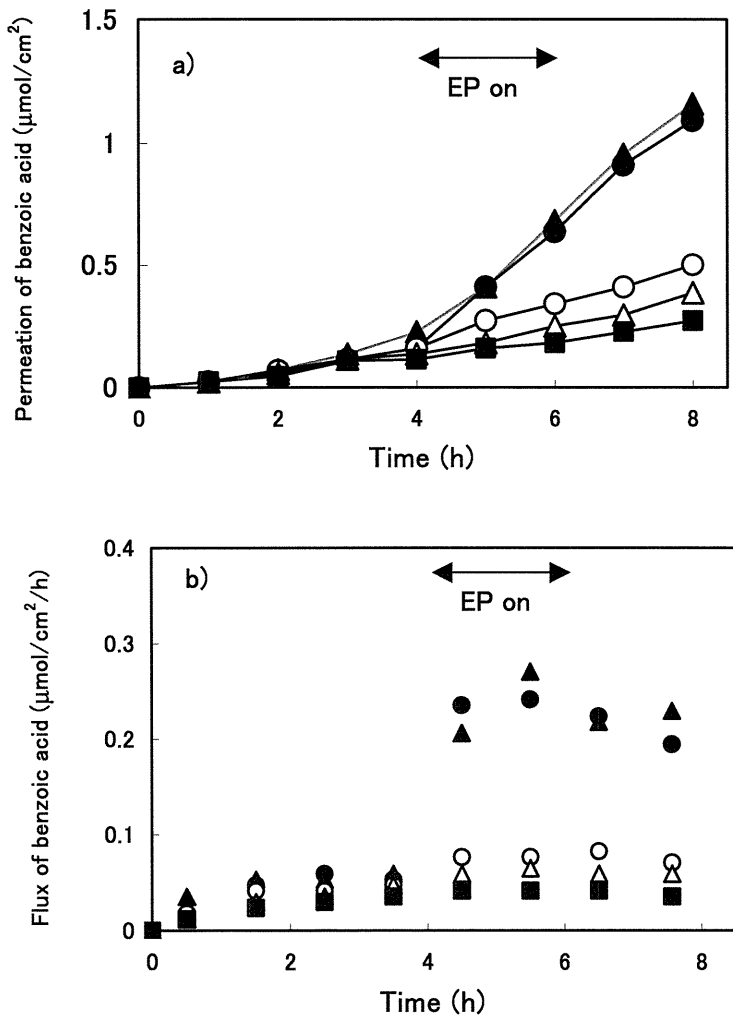


Fig. 2-3 Time Course of Changes in the Cumulative Amount of (a) and Flux (b) of Benzoic acid that Permeated through the Excised Hairless Rat Skin with and without Electroporation

■ : Control, ▲ : Needle-0, △ : Needle-5, ● : Point-0, ○ : Point-5

さらに donor 溶液中の電解質濃度を変えて同様の検討を行った。Donor 溶液は 0.9% 食塩水または 9%食塩水に 3%の安息香酸ナトリウムを溶解させた。このときの 8 時間目までの単位面積当たりの安息香酸の累積透過量を Fig. 2- 4 に示す。いずれの電解質濃度でも、水溶液と同様に皮膚に電極を直接的に設置したニードル-0 またはポイント-0 の透過が高かった。またポイント-0 を除いては 9.0%食塩水溶液を用いたときはコントロールと有意な差は認められずエレクトロポレーションによる促進効果は認められなかった。

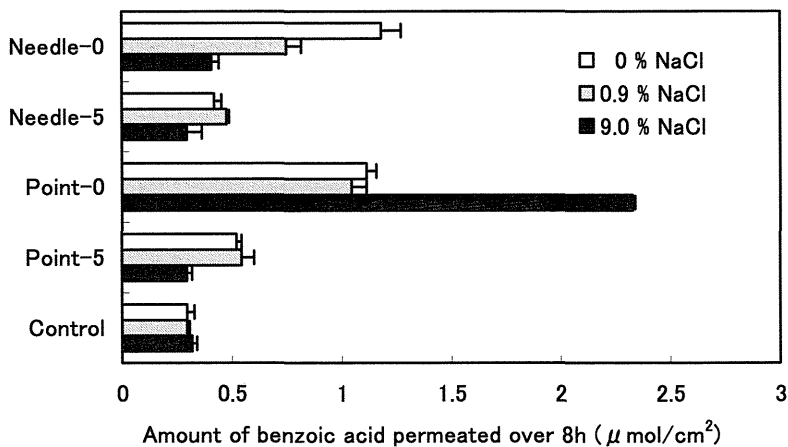


Fig. 2- 4 Effect of Electroporation on the Skin Permeation of Benzoic Acid

第3節 エレクトロポレーション適用時に生じる角質層上電流密度と安息香酸皮膚透過量との相関

第2節で得られた結果を評価するために、エレクトロポレーション適用時に生じる電流密度を3次元の有限要素法による電流密度解析によって行った。解析するにあたり電解質濃度の異なる各安息香酸ナトリウム溶液の電気伝導率を測定した。また角質層と真皮層の電気伝導率をLCZメーターにより測定したインピーダンスから算出し

た。その結果を Table 2- 1 示す。

Table 2- 1 Electric Conductivity

Conductor	Electric conductivity (S/m)
3% Sodium benzoate distilled water	1.25
3% Sodium benzoate in 0.9%NaCl aqueous solution	2.56
3% Sodium benzoate in 9.0%NaCl aqueous solution	11.39
Stratum corneum	1.45×10^{-6}
Dermis	4.57×10^{-2}

これらの電気伝導率を用いて3次元電流密度解析により電場強度および電流密度を求めた。3%安息香酸ナトリウム水溶液を適用したときの3次元の電流密度分布を Fig. 2- 5 に、角質層上の電流密度分布を Fig. 2-6 に示す。図から明らかなように、いずれの場合も角質層に分布する電流密度は均一ではなかった。

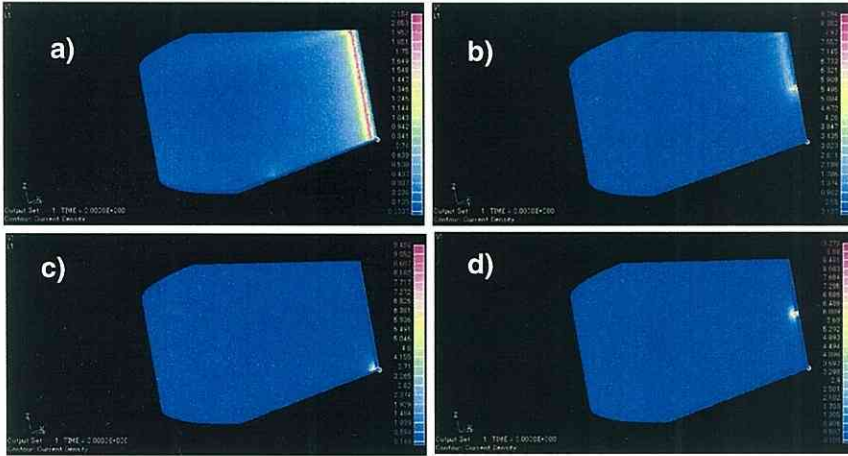


Fig. 2- 5 Analytical Profile of Three-Dimensional Current Density

a) Needle-0, b) Needle-5, c) Point-0, d) Point-5

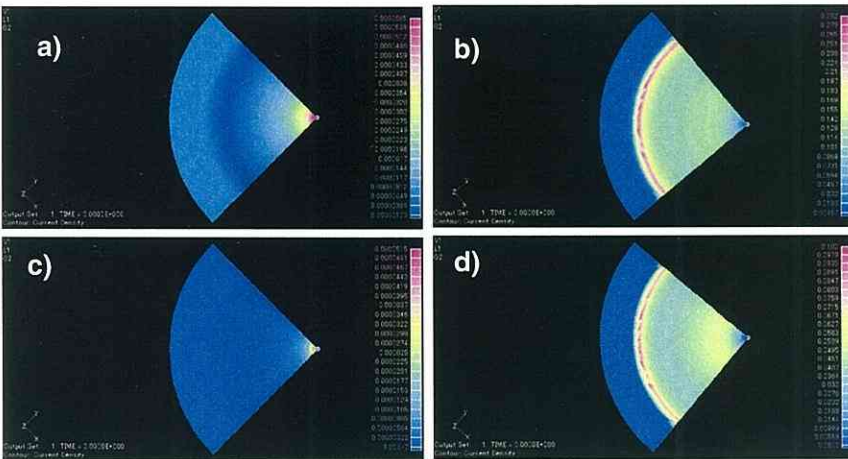


Fig. 2- 6 Analytical Profile of Two-Dimensional Current Density on the stratum

Corneum

a) Needle-0, b) Needle-5, c) Point-0, d) Point-5

イオントフォーシスでは皮膚を透過する電流と薬物の透過量は相関する⁴⁶⁾。そこで、透過と電流密度の関係を調べるために、Fig. 2-6の電流密度を平均化し平均電流密度 (*MCD*) を求めた。その値を Table 2-2 に示す。角質層に流れる電流密度は一方の電極を皮膚から離れたニードル-5 やポイント-5 で高く、これら電極では適用する電解質の濃度によりその値が異なった。一方、ニードル-0 やポイント-0 では角質層に流れる電流密度は低く、その値は電解質濃度によらず一定であった。さらに Fig. 2-4 に示した安息香酸の8時間目までの累積透過量と *MCD* の関係を Fig. 2-7 に示す。

Table 2-2 Mean Current Density on the Stratum Corneum (mA/cm²)

Solution	Needle -0	Needle -5	Point -0	Point -5
Sodium benzoate in distilled water	7.89×10^{-9}	6.42×10^{-3}	4.02×10^{-9}	2.21×10^{-3}
Sodium benzoate in 0.9%NaCl	7.89×10^{-9}	1.31×10^{-2}	4.02×10^{-9}	4.51×10^{-3}
Sodium benzoate in 9.0%NaCl	7.89×10^{-9}	5.83×10^{-2}	4.02×10^{-9}	2.01×10^{-2}

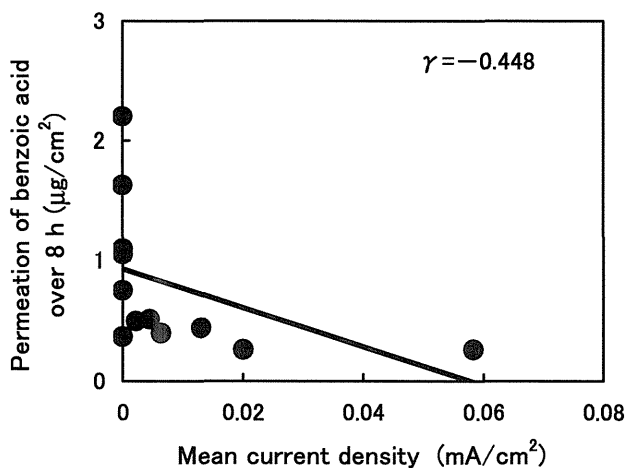


Fig. 2-7 Relationship between Mean Current Density and Skin Permeation of Benzoic Acid

MCD と安息香酸の皮膚透過には負の相関が見られ、相関関係も低かった ($\gamma = -0.448$)。ここで求めた *MCD* は 450 V を負荷したときに得られる電流値である。しかし、適用する電解質や電極形状が異なった場合、初期に 450 V が負荷されない可能性もある。また、今回用いたエレクトロポレーション装置から適用される電圧は経時的に指数減衰を示す。そのため、電解質や電極形状の違いにより時定数 (τ : 初期電圧の 36.8% にまで減衰する時間) に影響を及ぼす可能性がある。そこで、初期電圧 (V_0)、 τ 及び経時的な電圧変化をストレージタイプのオシロスコープにより測定した。その波形を Fig. 2-8 に、 V_0 および τ を Table 2-3 に示す。

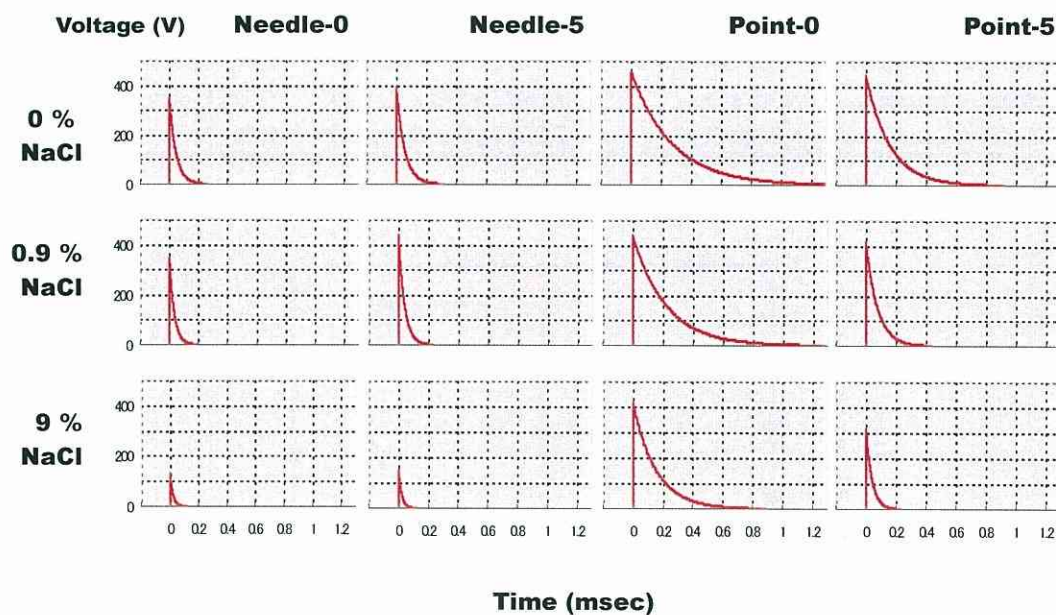


Fig. 2-8 Effect of Electrode Position, Shape and Solution on the Generated Pulse Wave

Table 2-3 Initial Voltage and Time Constant of the Pulse

		Needle-0	Needle-5	Point-0	Point-5
Vo (v)	0 % NaCl	345	393	457	445
	0.9%NaCl	345	360	436	416
	9 %NaCl	129	148	416	318
τ (msec)	0 % NaCl	0.0452	0.0544	0.2725	0.1592
	0.9%NaCl	0.0331	0.0393	0.2202	0.0765
	9 %NaCl	0.0203	0.0211	0.1533	0.0406

Fig. 2-8 より明らかなように、適用電圧を 450 V に設定（設定電圧: $V_s=450$ ）しているにもかかわらず、初期電圧 V_0 は必ずしも 450 V 得られていない。また電圧の負荷されている時間も同じではなかった。同じ電極内で比較すると、 V_0 も τ も電解質濃度が高くなるほど低くなる傾向が見られた。先に求めた MCD は 450 V を負荷したときのものであるので、これを V_0 で補正し、さらに電場負荷中の時間も考慮するために電圧-時間曲線化面積を求め、これと平均電流密度の積により電場負荷中の平均電流密度が求められると考えた。電圧-時間曲線化面積は以下のように算出した。

Fig. 2-8 に示した電圧波形から分かるように、一般に、指数型減衰波のパルスを適用したとき電圧の経時変化は次式で表される。

$$V=V_0 \cdot \exp (-1/\tau \cdot t) \quad \text{eq. 2- 8}$$

ただし、 V は時間 t における電圧である。

eq. 2- 8 を 0 時間から無限大に亘って積分すると次式が得られる。

$$V_{0 \rightarrow \infty}=V_0 \cdot \tau \quad \text{eq. 2- 9}$$

パルス適用中の皮膚の抵抗を一定と考えると、皮膚に負荷される電圧と電流は比

例関係にあり、電流密度も eq. 2-8 に従って減衰する。そこで、パルス適用中の電流密度の合計 (MCD_{tot}) を次式に示すように V_0 、 τ 、 MCD の積を設定電圧 V_s で除したものとした。

$$MCD_{tot} = V_0 \cdot \tau \cdot MCD / V_s \quad \text{eq. 2-10}$$

このように求めた MCD_{tot} と安息香酸の累積皮膚透過量の関係を Fig. 2-9 に示す。

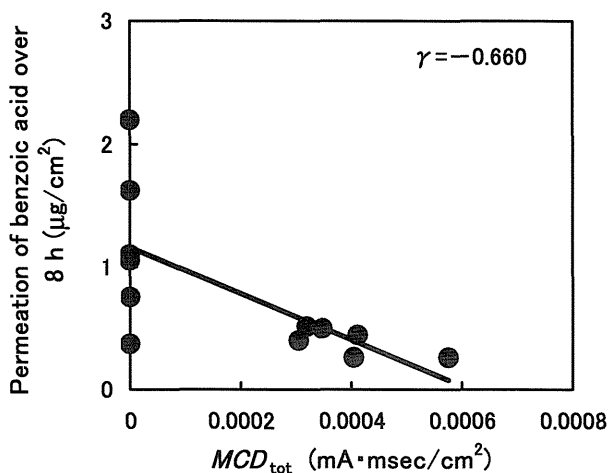


Fig. 2-9 Relationship between MCD_{tot} and Permeation of Benzoic acid

安息香酸の累積皮膚透過量と MCD_{tot} との相関は MCD との相関に比べ上がったものの ($\gamma = -0.660$)、負の相関関係となった。イオントフォーシスでは電流密度と物質皮膚透過に正の相関が見られ、電流密度の上昇と共に薬物透過量が上昇する⁴⁶⁾。しかしながら、エレクトロポレーションでは逆の傾向が見られた。以上より、エレクトロポレーションによる薬物の皮膚透過促進効果が電流に起因するものでないことが明らかとなった。

第4節 エレクトロポレーション適用時に生じる角質層上の電場強度と安息香酸の皮膚透過量との相関

安息香酸の皮膚透過が電流密度と関係しなかったことから、次に電場との関係を調べた。電場についても第3節と同様に有限要素法の電流密度解析によって評価した。このときの全体の電場強度分布を Fig. 2- 10 に、角質層のみの電場強度分布を Fig. 2- 11 に示す。全体の電場強度分布図 (Fig. 2- 10) から、いずれも場合も溶液部分の電場が低く電場分布が同じように見えるが、24 段階にレベル分けした数値および溶液内部および角質層の電場分布 (Fig. 2- 11) から明らかなように、電場分布および電場強度も電流密度と同様、適用する電極の形態により異なっており、また、角質層の電場強度は不均一であった。すなわち、今回のような電極の形状の場合、Zhang ら⁴²⁾のようにエレクトロポレーション負荷時の皮膚に負荷される電場を単に負荷電圧を電極間距離で割ったものとして表すことができないことが明らかとなった。

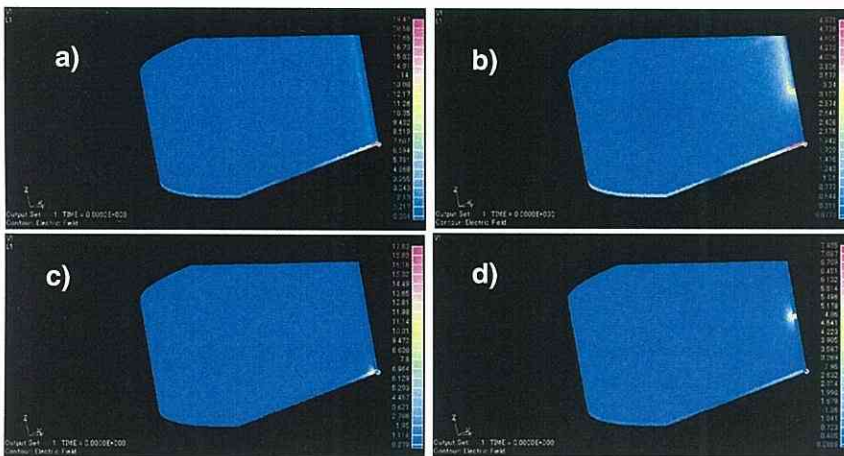


Fig. 2- 10 Analytical Profile of Three-Dimensional Electrical Field

a) Needle-0, b) Needle-5, c) Point-0, d) Point-5

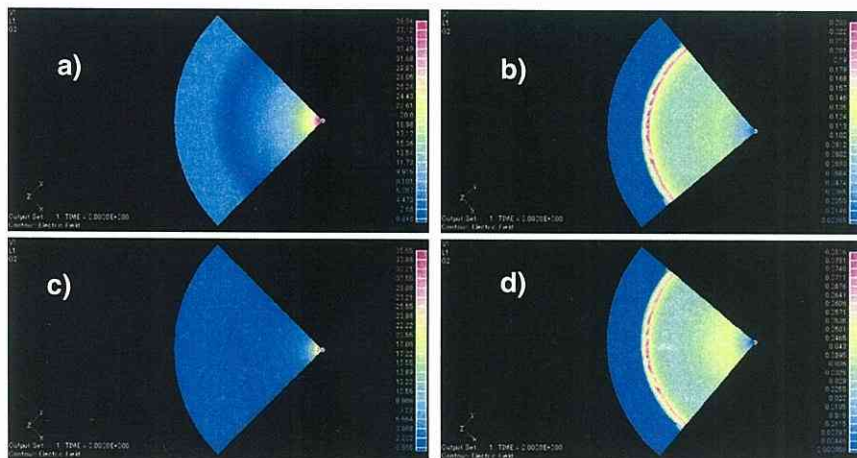


Fig. 2- 11 Analytical Profile of Two-Dimensional Electrical Field on the stratum Corneum

a) Needle-0, b) Needle-5, c) Point-0, d) Point-5

このようにエレクトロポレーションにより角質層に生じる電場は不均一であったことから、安息香酸の皮膚透過に最も影響を及ぼすと思われる角質層上の電場強度を平均化した。得られた値を平均電場強度 (*MEF*) として Table 2- 4 に示す。表から明らかのように、角質層に負荷される平均電場強度は電極の形状のみに依存し、電解質濃度には依存していない。これは角質層の電気伝導度が電解質溶液に比べ著しく高いことに起因していると思われる。

Table 2- 4 Mean Electrical Filed on Stratum Coneum (V/cm)

Solution	Needle	Needle	Point	Point
	-0	-5	-0	-5
3% Sodium benzoate in distilled water	108.80	101.91	55.40	35.24
3% Sodium benzoate in 0.9%NaCl	108.80	101.91	55.40	35.24
3% Sodium benzoate in 9.0%NaCl	108.80	101.91	55.40	35.24

次に、この平均電場と安息香酸の累積皮膚透過量の関係を評価した。その結果を Fig. 2- 12 に示す。図から明らかなように、平均電場強度と安息香酸の皮膚透過量に相関は見られなかった ($\gamma = -0.077$)。

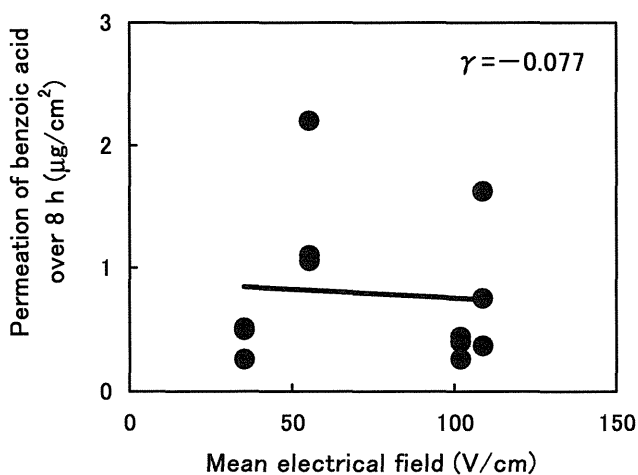


Fig. 2- 12 Relationship between Mean Electrical Field and and Skin Permeation of Benzoic acid

そこで、先の電流密度の時と同様に V_0 および τ の因子を導入した。すなわち、

電場強度の合計を MEF_{tot} として eq. 2-11 により求めた。結果を Table 2-5 に示す。

$$MEF_{tot} = V_0 \cdot \tau \cdot MEF / V_s \quad \text{eq. 2-11}$$

Table 2-5 MEF_{tot} on Stratum Corneum (V msec/cm)

Solution	Needle	Needle	Point	Point
	-0	-5	-0	-5
3% Sodium benzoate in distilled water	3.770	4.847	15.330	5.548
3% Sodium benzoate in 0.9%NaCl	2.761	3.204	11.819	2.492
3% Sodium benzoate in 9.0%NaCl	0.633	0.707	7.850	1.011

ここで求めた MEF_{tot} と安息香酸の皮膚透過との関係を Fig. 2-13 に示す。 MEF_{tot} の上昇と共に透過量も増加する傾向が見られ、相関係数も MCD_{tot} の場合と比べると著しく高い値を示した ($\gamma=0.509$)。すなわち、角質層に負荷される電場強度が透過促進の一因であることが示唆された。

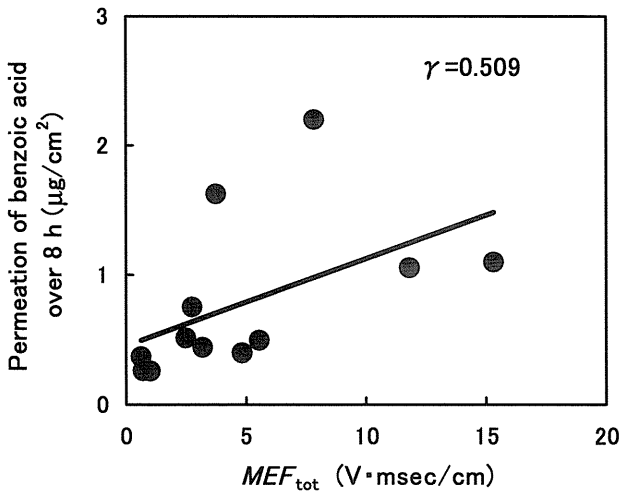


Fig. 2-13 Relationship between MEF_{tot} and Permeation of Benzoic Acid

第5節 小括

電解質濃度、電極の適用状態、さらには電極の形状の異なる条件で、安息香酸の皮膚透過に対するエレクトロポレーションの促進効果を調べた。電解質濃度は1条件（9%NaCl、ポイント-5）を除いて、NaCl濃度が高くなるほど安息香酸の皮膚透過量が減少する傾向が見られた（0%NaCl > 0.9%NaCl > 9% NaCl）。さらに電極の適用状態では、両方の電極が皮膚に接した方が高い透過が見られた（ニードル-0 > ニードル-5、ポイント-0 > ポイント-5）。また電極形態は電極を皮膚から離れた場合は、ニードル、ポイント電極ともほぼ同等の透過を示したものの、電極を皮膚に設置させた場合では、ポイント電極の方が高い透過を得ることができた。

これら安息香酸の皮膚透過量の違いを解析するために、角質層に流れる電流密度や電場強度、さらにはエレクトロポレーションのパルス波形を測定した。電流密度は、いずれの電解質溶液でもニードル-5が最も高く、次いでポイント-5、ニードル-0、ポイント-0の順であった。皮膚表面より電極を離すことで角質層の電流密度は増加した。またニードル-5やポイント-5では電解質（NaCl）濃度の増加に伴って電流密度も高くなっているが、ニードル-0、ポイント-0では電解質濃度によらず一定の値を示した。電場強度はニードル-0 > ニードル-5 > ポイント-0 > ポイント-5の順であった。しかし、電場強度はいずれの電極でも電解質濃度の影響は受けず、一定の値を示した。エレクトロポレーション適用時の初期電圧はパルス発生装置で450 Vにセットしても電極の形状や電解質濃度により異なり、129～457 Vの幅があった。また、時定数（ τ ）も適用する電極形状により異なり、ポイント-0が長く、次いでポイント-5、ニードル-5、ニードル-0の順であった。また、電解質濃度を上げることで τ は短くなった。

エレクトロポレーションのパルスを負荷することで生じる電気的な因子と安息香酸の皮膚透過の関係を調べたところ、イオンフォレーシスとは異なり、電流には依存せず、むしろ平均電流密度が高くなるほど透過が下がった。電場強度に対しては、平

均電場強度が高くなるほど透過が下がったが、初期電圧、 τ 値を考慮した総平均電場強度とは相関関係が見られ、角質上に負荷される総平均電場強度がエレクトロポレーションの透過促進の一因であることが示唆された。

第6節 考察

電場強度の決定することができる電気力線をもとに解析するため、各電極を用いてエレクトロポレーションのパルスを負荷したときの主な電気力線を Fig. 2-14 示す。電場強度の最も高かったニードル-0 では a、b、c のような3種類の電気力線が生じるが、同じニードル電極でもニードル-5 では a、b のみとなる。薬物透過においてバリアーとなる角質層に最も影響するのは電気力線 c であると考えられる。ニードル 0 における角質層上の平均電場 108.8 V/cm とニードル-5 の 101.9 V/cm との差はこの電気力線 c に起因したものと考えられる。同様にポイント電極においてもポイント-0 では電気力線 c のみの寄与で 55.4 V/cm の平均電場を得ていたのに対し、電気力線 b のみのポイント-5 では 35.2 V/cm と減少した。

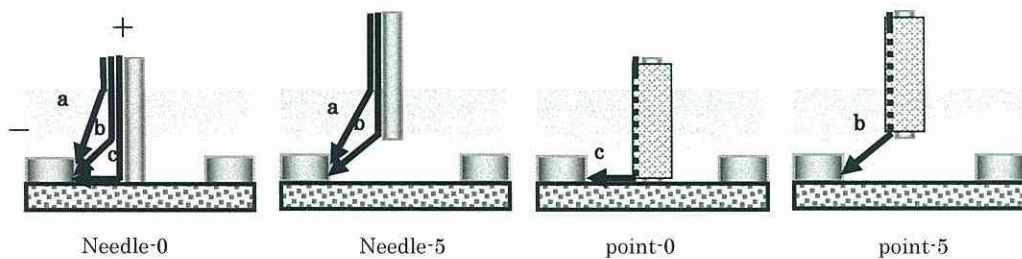


Fig. 2-14 Schematic Representation of Electric Force for Each Electrode Pattern

次に、エレクトロポレーションのパルス波形について考察する。ニードル電極は電解質と接する部分が多いために、電解質濃度を上げることで電気抵抗の低い溶液中を流れる電気力線 a の寄与が大きくなり、設定した V_0 が得られる。一方、ポイント電極では溶液と接する部分が少ないために、 V_0 の低下が少なくなるものと考えられる。また ϵ 値についても V_0 と同様な理由で、電解質の増加に伴い減少したと考えられる。

9%NaCl でポイント-0 を用いた時に最も高い透過が得られている。9%NaCl を用いた時に、他の電極では初期電圧 V_0 が低くなっており、これが促進効果が得られていない原因と考えられる。しかし、他の電解質濃度では初期電圧が十分に得られていても9%NaCl、ポイント-0 ほどの促進効果が得られていない。このことから、エレクトロポレーションの薬物透過促進効果に Na^+ もしくは Cl^- が何らかの影響（孔形成時間を延長する、孔の面積を増大する等）を及ぼし、十分な初期電圧の負荷と高濃度イオンの存在の組み合わせにより高い促進効果が得られたものと推察される。

高い電場強度を得るためには電極を皮膚に接する方がよく、特にニードル-0 電極では最も高い電場強度を得ることができた。さらに V_0 や ϵ の減少を少なくするためには電解質濃度は高くなりすぎない方がよいことも併せて明らかとなった。

第2章 2次元電場解析による電場分布と薬物皮膚取り込み分布の評価⁴⁷⁾

第1章の検討で皮膚全体に負荷される電場と安息香酸の皮膚透過性に相関関係があることがわかった。さらにこの関係を調べるために、皮膚表面上（2次元）の電場分布と皮膚に取り込まれる薬物量の関係について調べた。

第1節 実験方法

1. 実験材料および試薬

実験材料は全て、第1編および第2編第1章と同様に用いた。

2. *In vitro* 透過試験および皮膚中薬物の測定

ヘアレスラット腹部摘出皮膚を Franz 型拡散セル（有効透過面積 7.07 cm²）にセットし、角質層側に 0.5%安息香酸ナトリウム溶液を、真皮側に生理食塩液を適用した。摘出皮膚の透過面の中心付近に皮膚と垂直に接するように2本のニードル電極を電極間距離が 5 mm となるように設置した (Fig. 2-15)。実験開始後、4時間目に 300 V の指数減衰波を1分間に1回の頻度で10分間負荷し、その後20分間放置した後、その皮膚を縦横それぞれに 0.5 cm 毎に分割した。サンプルリング部位を Fig. 2-15 に示す。皮膚各部位 a~h それぞれに生理食塩液 2 mL を加え、皮膚ホモジネートを作成した。そのホモジネート中の安息香酸濃度を HPLC にて測定した。またエレクトロポレーション非適用時の皮膚内取り込み量も同様に測定した。

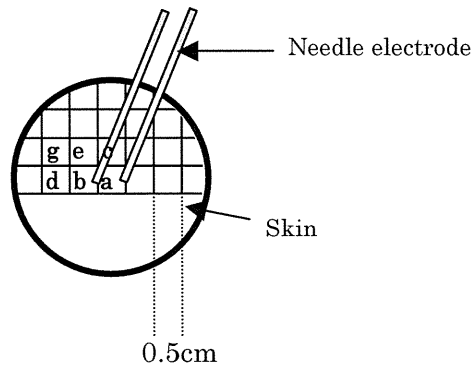


Fig. 2- 15 Schematic Illustration of the Sampling Position and Electrode on the Excised Hairless Rat Skin

3. 定量

第2編1章と同様に行った。

4. 電場解析

2次元電場解析は有限因子法ソフトウェア（PHOTO-VOLT ST，株式会社フォトン，奈良）を用いて、電場解析により電場分布を求めた。この際、電極の比誘電率を12.3、皮膚の比誘電率を243とした。

第2節 エレクトロポレーション適用時の皮膚内薬物量分布

Fig. 2- 16 にエレクトロポレーション非適用時（コントロール）およびエレクトロポレーション適用時の皮膚サンプリング部位と各部における安息香酸量を示す。コントロールに比べ、皮膚部位 a では約 3 倍、b では 2 倍、c では 1.6 倍の安息香酸量を示した。しかし、電極から遠い g や h ではコントロールと有意な差は見られなかった。以上の結果から、エレクトロポレーションによる薬物の皮膚移行促進効果は電極に近い部位では高く、離れるにしたがって低くなることが示唆された。

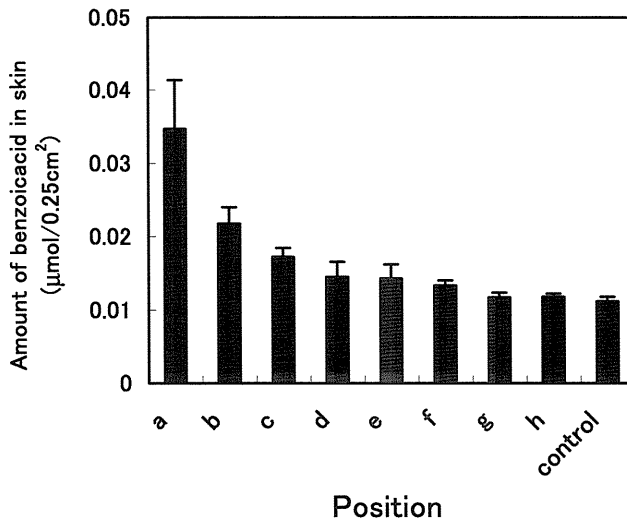


Fig. 2- 16 Benzoic acid Amount in Different Skin Site at Electroporation

第3節 エレクトロポレーション適用時の電場分布

皮膚各部位での安息香酸量に違いが見られたのは、エレクトロポレーション適用時の皮膚各部位の電場強度の違いによるものではないかと考え、皮膚に形成される電場

分布を調べた。その結果を Fig. 2- 17 に示す。図中の数値は電場強度を示す。部位 a が最も電場強度が高く分布し、次いで b、c の順であった。これは安息香酸の皮膚中量順位と一致した。

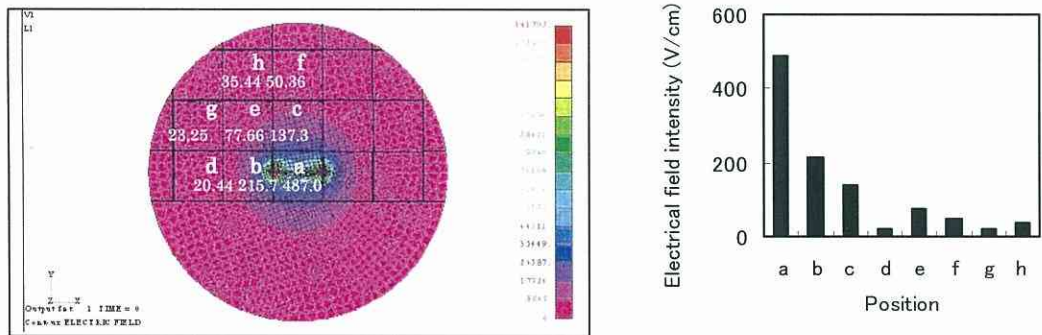


Fig. 2- 17 Analytical Profile of Electrical Field Intensity Generated by Electroporation

そこで、次に、電場強度と皮膚中安息香酸量との関係を調べた。その結果を Fig. 2- 18 に示す。図中の Y 切片はエレクトロポレーション非適用部位の皮膚中取り込み量に相当する。電場強度の増加に伴い皮膚中の安息香酸量も直線的に増加し、両者は非常によく相関した ($\gamma=0.991$)。

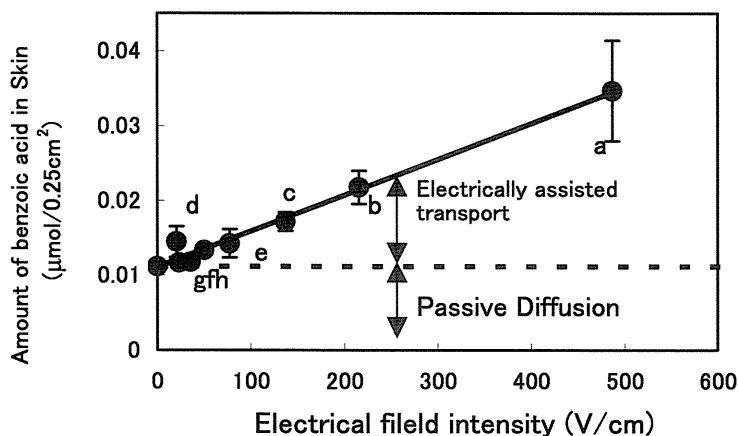


Fig. 2- 18 Effect of Electrical Field Intensity on the Benzoic Acid Amount in Skin at Electroporation

第4節 小括

エレクトロポレーション適用後の皮膚内への安息香酸量の分布を調べたところ部位によって差が見られた。また、エレクトロポレーション適用時の皮膚の電場分布を解析したところ、電極近傍の電場強度が高く電極から距離が遠ざかるに従って低くなる傾向が見られた。さらに電場強度の分布と皮膚内薬物の取り込みは非常によく相関した。

第5節 考察

前章では皮膚全体に負荷される電場を3次元で解析し透過性との比較を行い、電極を皮膚に直接的に接することがエレクトロポレーションの高い促進能を得るために有効であることを明らかにした。そこで、本章では電極を皮膚上に適用することで、皮膚のみに着目した2次元の電場解析により皮膚における電場分布を求めた。その結果、

エレクトロポレーション負荷時の皮膚に生じる電場強度に違いが見られ、これが薬物の皮膚取り込み量の違いに反映していることが明らかとなった。これよりエレクトロポレーションを用い効率よく薬物透過を促進するためには、今回用いたような皮膚適用面に電場の大きな違いを生じる電極より、電場の極端な分布を少なくし、均一な電場を負荷できる電極の方が皮膚全体から均一に薬物を透過させることができるので望ましいと思われた。さらに、均一な電場は皮膚に対する刺激など安全面においても優れているものと思われた。

第3章 2次元電場解析による電極の評価⁴⁸⁾

前章では、エレクトロポレーションを皮膚に適用したときの皮膚平面上の電場強度分布を求め、部位によって電場強度に違いがあり、電場強度の高い部位ほど皮膚内への薬物移行が高いことを明らかにした。このとき、ニードル-ニードル電極を用いたが、この電極を用いると皮膚に電場強度の違い（分布）が生じ、これが薬物透過に大きく影響していることがわかった。そこで、効率的にエレクトロポレーションを利用するためには、電場を均一に負荷できる電極の利用が望ましいと判断した。本章では電場が均一にかかる最適な電極を見いだすためにニードル-ニードル、ニードル-リング、プレート-プレートの3種類の電極を用いてエレクトロポレーション負荷時の電場強度と薬物透過を調べ、最適な電極の選択法を見出した。

本編第1章では、電解質濃度や電極の適用状態の違いが時定数 τ や初期電圧 V_0 に影響を与え、これが薬物の透過に影響することが明らかとなった。そこで、本章では2次元電場解析でも時定数 τ や初期電圧 V_0 の導入により薬物透過との相関を見いだすことが出来るかを調べ、さらにエレクトロポレーション装置として指数型減衰波を発生する電源装置だけでなく、時定数の影響を受けにくい矩形波を発生する電源装置を用いて薬物の透過促進能を比較した。なお、本章では安息香酸ナトリウムに加えジクロフェナックナトリウムを用いた。

第1節 実験方法

1. 実験材料および試薬

ジクロフェナックナトリウムはシグマ (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。その他の試薬はすべて前章と同様に用いた。

電極の材料として用いた板状の銀 (厚さ 40 μm) は村田洋白 (東京) より、ワイヤ

一状の銀（太さ 3.0 mm）はアルドリッチ（Milwaukee, WI, U.S.A.）より購入した。ニードル電極はワイヤー状の銀を用い、約 3 cm に切断し、切断面をヤスリを用いて平坦にした。なお、絶縁などは施さずそのまま用いた。また、リング電極（外形 25 mm、内径 15 mm）は板状の銀を用いて、実験室で作成した。板型電極は板状の電極を幅 5 mm、長さ 5 cm に切断し作成した。リング型電極と板型電極はいずれも片面（非皮膚適用面）に絶縁性の両面テープを貼り、donor セルと固定した。そのため、接続部以外で銀が露出している部分は皮膚に接している面のみである。

雄性ヘアレスラット（220～250g）を埼玉実験動物（杉戸，埼玉）またはチャールスリバー（Wilmington, MA, U.S.A.）より購入した。なお、埼玉実験動物より得たヘアレスラットは WBN/ILA-Ht、チャールスリバーより得たヘアレスラットは CD(SD)-hr BR と系統が異なるが、指数減衰のパルス発生装置を用いた一連の実験には WBN/ILA-Ht を、矩形波のパルス発生装置を用いた一連の実験には WBN/ILA-Ht を用い、同一実験系内でデータを解析した。それぞれのラットをペントバルビタール（ネンプタール，大日本製薬株式会社，大阪）麻酔下、腹部より皮膚を摘出し、摘出直後に実験に用いた。

2. 透過試験

前章と同様に Franz 型拡散セルを用いて行った。安息香酸の透過試験では角質層側（donor）には生理食塩液で 30 mg/mL に溶解させた安息香酸ナトリウム 1.0 mL を、真皮側（receiver）に生理食塩液約 18 mL を適用した。1 時間または 30 分に 1 回の頻度で電気量 25 μ FD、初期電圧 200 V の指数型減衰波のパルスをジーンパルサー（Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.）より適用し、経時的に receiver 側からサンプリングして安息香酸の透過を調べた。さらにコントロールとしてパルスを適用しない時の安息香酸の透過を調べた。全ての実験は 4 時間行い、実験中は receiver セルの外筒

部にウォータジャケットで温水を流し温度を 37°C に保った。

ジクロフェナックの透過試験では角質層側 (donor) には 20 mg/mL ジクロフェナックナトリウム水溶液 1.0 mL を、真皮側 (receiver) に生理食塩液約 18 mL を適用した。1 時間に 1 度の頻度で電気量 25 μ FD、初期電圧 200 V の指数型減衰波のパルスをジーンパルサー (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) より、またはパルス幅 50 msec、200 V の矩形波のパルスを BTX-T-820 (BTX, San Diego, CA, U.S.A.) より適用し、経時的に receiver 側からサンプリングを行いジクロフェナックナトリウムの透過を調べた。また、パルスを適用しない時のジクロフェナックナトリウムの透過を調べ、これをコントロールとした。実験は 7 時間にわたって行い、他は安息香酸ナトリウムとほぼ同条件で実験を行った。ただ、分子量の小さい安息香酸では浸透圧の影響が少なくなるように生理食塩水に溶解させたが、分子量の大きなジクロフェナックでは水に溶解させた。なお、指数型減衰波を適用したときにはパルス発生装置に表示される時定数 τ を記録した。

エレクトロポレーション適用時の 3 種類の電極配置を Fig. 2-19~Fig. 2-21 に示した。ニードルリング電極は Fig. 2-19 に示したように o-リング状の電極を皮膚に接するように適用し、その中心部にニードル電極を同様に皮膚に接するように設置した。このとき、リング電極を陽極、ニードル電極を陰極とした。ニードル-ニードル電極は Fig. 2-20 に示したように電極間距離を 6 mm とし、両電極を皮膚に接するように設置した。プレート-プレート電極は Fig. 2-21 に示したように電極間距離を 6 mm とし、平面的に皮膚と接するように設置した。

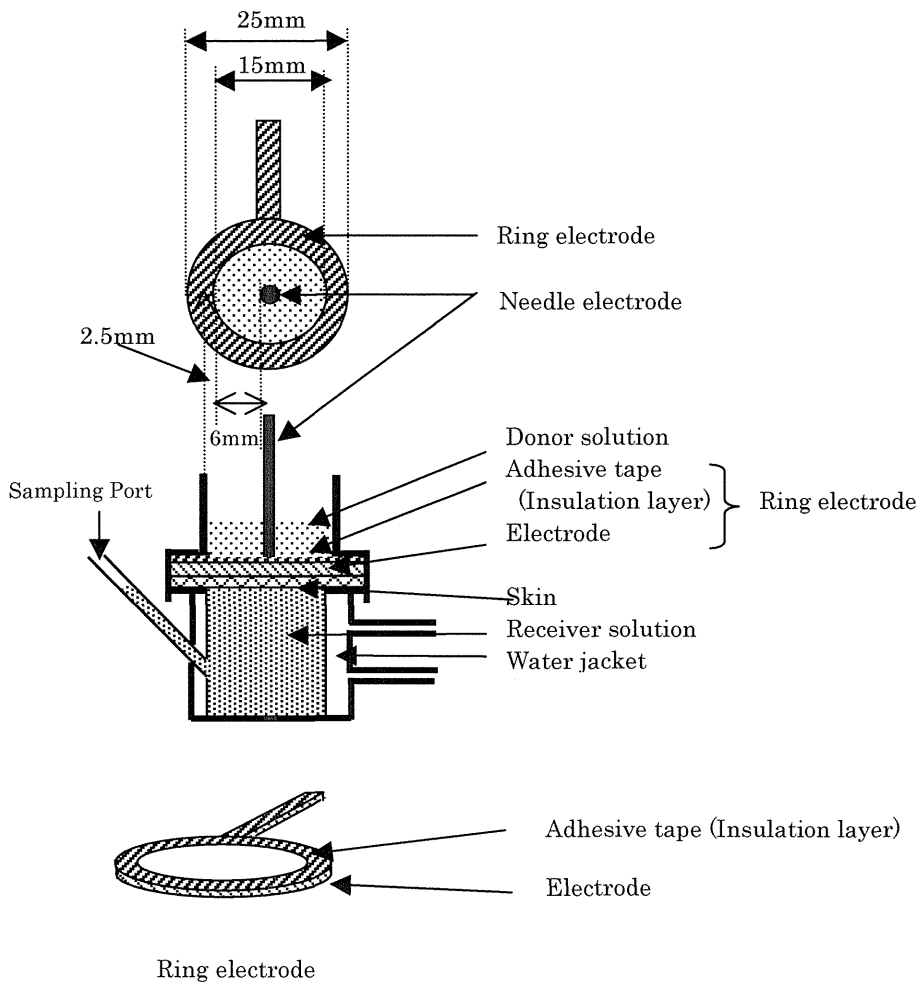


Fig. 2- 19 Schematic Representation of Diffusion Cell with Needle-Ring Type Electrode

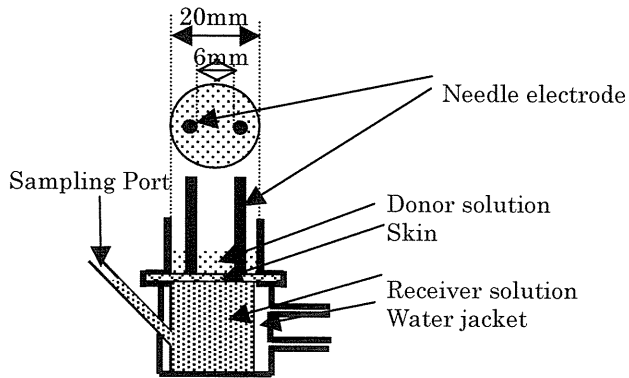


Fig. 2- 20 Schematic Representation of Diffusion Cell with Needle-Needle Type Electrode

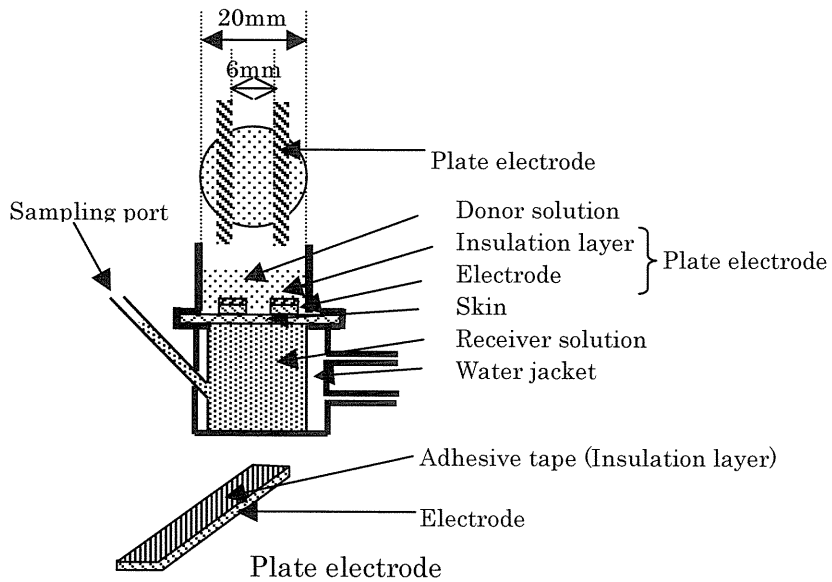


Fig. 2- 21 Schematic Representation of Diffusion Cell with Plate-Plate Type Electrode

3. 定量

安息香酸の定量は前章と同様に行った。

ジクロフェナックは C18 カラム（東ソーTSKgel ODS-80TS 4.6 mm i.d. x150 mm）を装着した HPLC（島津 LC-10Avp）を用い、流速 1.0 mL/min の移動相（メタノール/0.1%リン酸水溶液=75/25）で溶出させ、UV 検出器（SPD-10A）にて吸収波長 UV286 nm で定量し、皮膚透過量を求めた。

4. 電場解析

2次元電場解析は前章と同様に有限因子法ソフトウェア（PHOTO-VOLT ST, 株式会社フォトン, 奈良）を用いて、角質平面の電場分布を電場解析により調べ、切り抜き重量法⁴⁹⁾により分布比を求め透過面についてのみ平均化し平均電場値とした。

第2節 電場分布に及ぼす電極形状の影響

Fig. 2-22 は、3種類の電極を用いて 200 V のパルスを負荷したときに透過面である皮膚角質層にかかる電場値分布を示す。またこの電場分布から求めた平均電場値を Table 2-6 に示す。平均電場値は用いた電極により異なり、最も高い平均電場を負荷できたのはプレート-プレート電極であり、また Fig. 2-22 から明らかなように均一な電場を負荷できるのもプレート-プレート電極である。

Table 2-6 Mean Electrical Field on the Skin Surface

Electrode	Mean Electrical Field (V/cm)
Needle-Needle	161.2
Needle-Ring	242.4
Plate-Plate	324.9

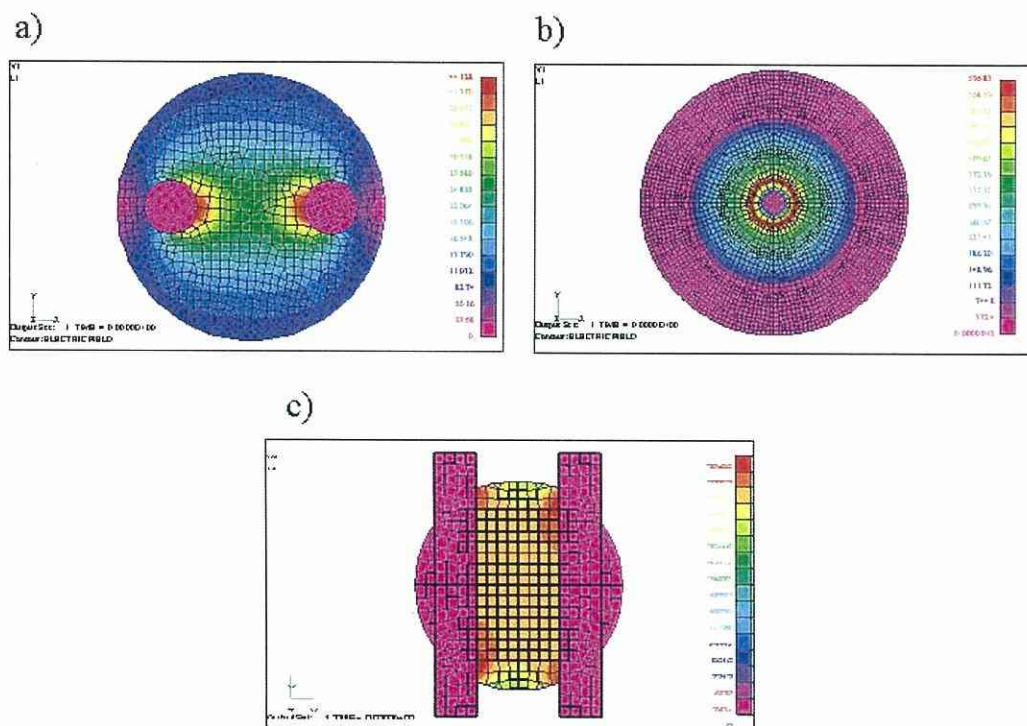


Fig. 2- 22 Two-dimensional Distribution of Electrical Field
a) Needle-Needle Electrode, b) Needle-Ring, c) Plate-Plate electrode

第3節 安息香酸の皮膚透過に及ぼす電極形状の影響

Fig. 2- 23a に3種類の電極から指数減衰波パルス（コンデンサー容量 $25 \mu\text{FD}$ 、初期電圧 200 V ）を1時間毎に適用したときの安息香酸の累積皮膚透過量の経時変化を示す。4時間目までの安息香酸の透過はパルスを適用しないときは $196.94 \pm 10.80 \text{ nmol/cm}^2$ であったのに対し、ニードルーニードル電極を用いてパルスを適用したときは $439.2 \pm 38.1 \text{ nmol/cm}^2$ 、ニードルーリング電極は $517.2 \pm 50.0 \text{ nmol/cm}^2$ 、プレートプレート電極は $1230.2 \pm 128.3 \text{ nmol/cm}^2$ の透過を示した。以上よりエレクトロポレ

ーションにより安息香酸の皮膚透過は促進され、その促進効果は同一の電極間距離、同じ電圧を適用しているにもかかわらず、電極形状により異なることが明らかとなった。

また、Fig. 2- 23b に 30 分毎に同条件でパルスを適用したときの安息香酸の累積皮膚透過量を示す。1 時間に 1 度のパルスを負荷したときと同様に安息香酸の透過量は電極形状により異なり、ニードル-ニードル電極を用いてパルスを適用したときは $428.7 \pm 99.8 \text{ nmol/cm}^2$ 、ニードル-リング電極では $586.0 \pm 210.9 \text{ nmol/cm}^2$ 、プレート-プレート電極で $1182.2 \pm 236.7 \text{ nmol/cm}^2$ であった。

以上より、1 時間毎にパルスを与えた時と 30 分ごとに与えた時とで、ほぼ同様な皮膚透過性を示すことが明らかとなった。すなわち、安息香酸の皮膚透過は電極形状が同じであれば、1 pulse/時間も 1 pulse/30 分でもほぼ同じで、これは第 1 編第 1 章のマニトールを用いた時の皮膚透過性の結果と類似した。このことから 1 回のパルスで形成する孔は一時間以上継続していることが示唆された。

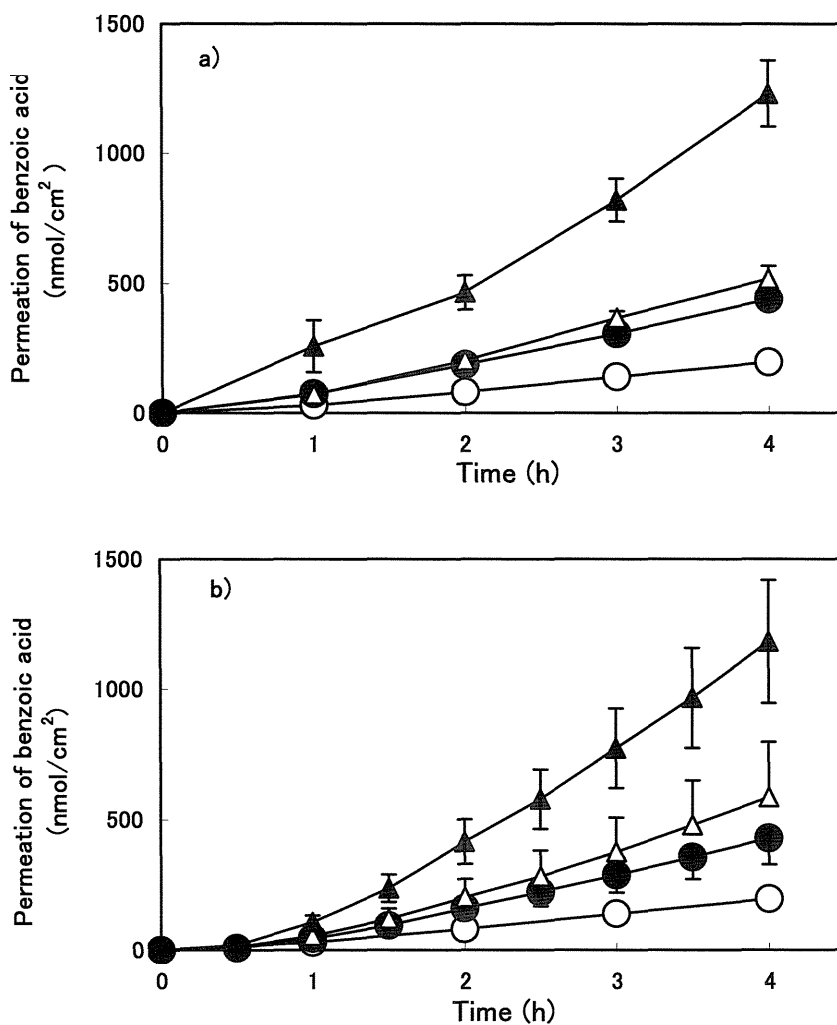


Fig. 2- 23 Effect of Type of Electrodes at Electroporation on the Time Course of the Cumulative Amount of Benzoic Acid that Permeated through Excised Hairless Rat Skin

a) 1 pulse every one hour, b) 1 pulse every 30 minutes

○: control (non-pulse), ●: needle-needle electrode, △: needle-ring electrode, ▲: plate-plate electrode

Fig. 2-24a に平均電場値と安息香酸ナトリウムの透過の関係を示す。なお、この時
用いたのは 1 pulse/時間のエレクトロポレーション処理時のデータである。ニードル
ニードル電極やニードルリング電極を用いた場合では透過量と平均電場値はほぼ比
例するものの、プレートプレート電極では皮膚透過量が高くなる傾向にあった。こ
の原因として、電極形状の違いは皮膚に負荷される電場に加え、指数型減衰波のバル
スを適用した場合は経時的な電圧の減衰にも影響を及ぼすと考えられた。そこで、電
場及び時定数 τ 、初期電圧 V_0 を考慮した本編第 1 章と同様の解析を 2 次元でも導入し
解析する。今回、実験的に測定した τ 値は、ニードルニードル電極で 1.3 ミリ秒、
ニードルリング電極では 0.8 ミリ秒、プレートプレート電極では 2.1 ミリ秒であっ
た。これと平均電場 (MEF) (Table 2-6) を eq. 2-11 に代入し、 MEF_{tot} として、こ
れと安息香酸の皮膚透過量の関係を Fig. 2-24b に示す。なお、このとき donor 溶液に
は全て同じものを用いており、電極は皮膚に接していることから、電圧の低下はない
と考え V_0 は V_s と同様 200 V とした。その結果、安息香酸の皮膚透過と MEF_{tot} は非
常によく相関した ($\gamma=0.995, P<0.01$)。また、この相関は Fig. 2-24a のデータ ($\gamma=0.876,$
 $P>0.05$) と比べても明らかに高かった。これらの結果から、3つの電極間ではプレ
ートプレート電極が一番有効であることが明らかとなった。また、同じ donor 溶液で
あれば、電場強度と時定数により薬物透過が予測でき、最適な電極の設計が可能とな
ることが示唆された。

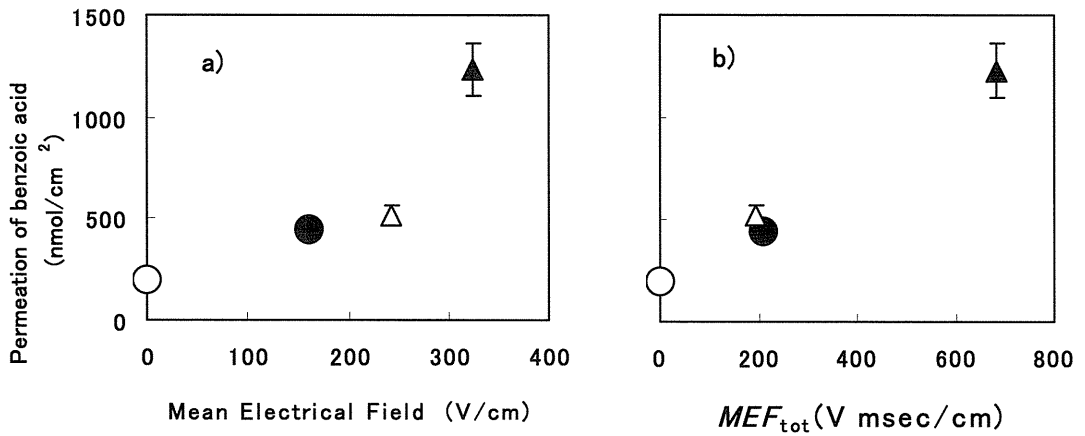


Fig. 2-24 Relationship between the Skin Permeation of Benzoic Acid and the Mean Electrical Field in the Stratum Corneum (a) or MEF_{tot} (b)

○ : control (non-pulse), ● : needle-needle electrode, △ : needle-ring electrode, ▲ : plate-plate electrode

Exponential decaying pulse wave was used for electroporation.

第4節 ジクロフェナックの皮膚透過に及ぼす電極形状の影響

前節の現象が安息香酸に特異的でないことを確かめるために、ジクロフェナックナトリウムをモデル化合物として、指数型減衰波パルスを用い同様の検討を行った。

指数型減衰波パルスを用いた時、ジクロフェナックの皮膚透過性は安息香酸と同様にニードル-ニードル電極、ニードル-リング電極、プレート-プレート電極の順であった。

さらにジクロフェナックでも皮膚透過性は平均電場値の上昇に伴い高くなったが、

安息香酸の皮膚透過性と同様、プレート-プレート電極（高電場）ではより高い透過量を示す傾向にあった(Fig. 2- 25a)。ここで、安息香酸の皮膚透過結果の処理と同様に、 MEF_{tot} とジクロフェナックの皮膚透過との関係を見たところよく相関した(Fig. 2- 25b、 $\gamma = 0.923$)。

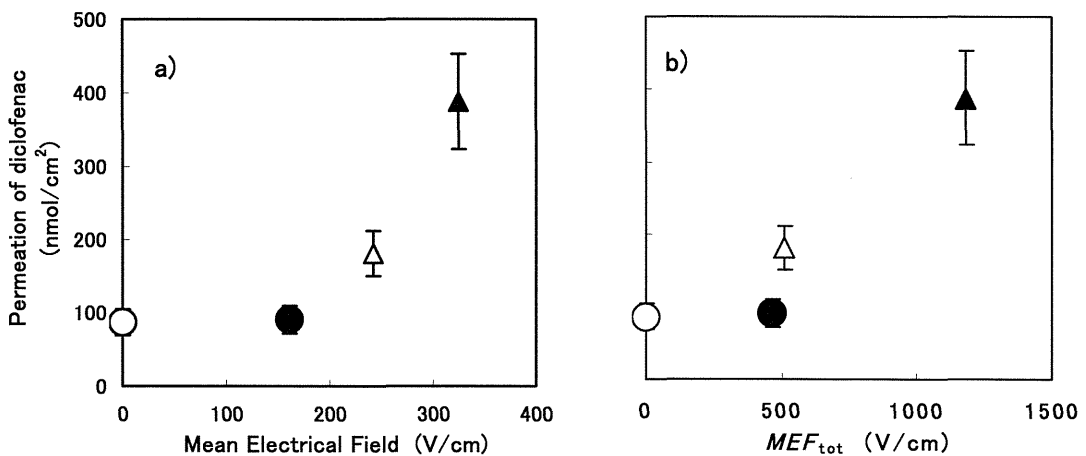


Fig. 2- 25 Relationship between the Skin Permeation of Diclofenac and the Mean Electrical Field in the Stratum Corneum (a) and MEF_{tot} (b)

○: control (non-pulse), ●: needle-needle electrode, △: needle-ring electrode, ▲: plate-plate electrode

Exponential decaying pulse wave was used for electroporation.

第5節 ジクロフェナックの皮膚透過に及ぼす矩形波エレクトロポレーションパルスの影響

エレクトロポレーション発生装置として、電極形状や溶液の抵抗に影響を受けず、

パルス適用時に時定数（パルス幅）が一定の矩形波を発生する装置を用いて、前節までの実験と同じ3種類の電極を用いジクロフェナックの皮膚透過性を調べた。

パルス幅はどの電極を用いても同じになるので、指数型減衰波を用いたときのように時定数を考慮した MEF_{tot} でなくとも平均電場値とで十分相関があるものと考えた。Fig. 2-26 に平均電場値と7時間のジクロフェナック累積透過量の関係を示す。図から明らかなように、矩形型のパルス波を適用した場合、ジクロフェナックの皮膚透過量と平均電場値は良く相関し、平均電場値から薬物透過量の予測が可能であった。また、 τ 値が一定であるので、 MEF_{tot} とも同様に相関した。

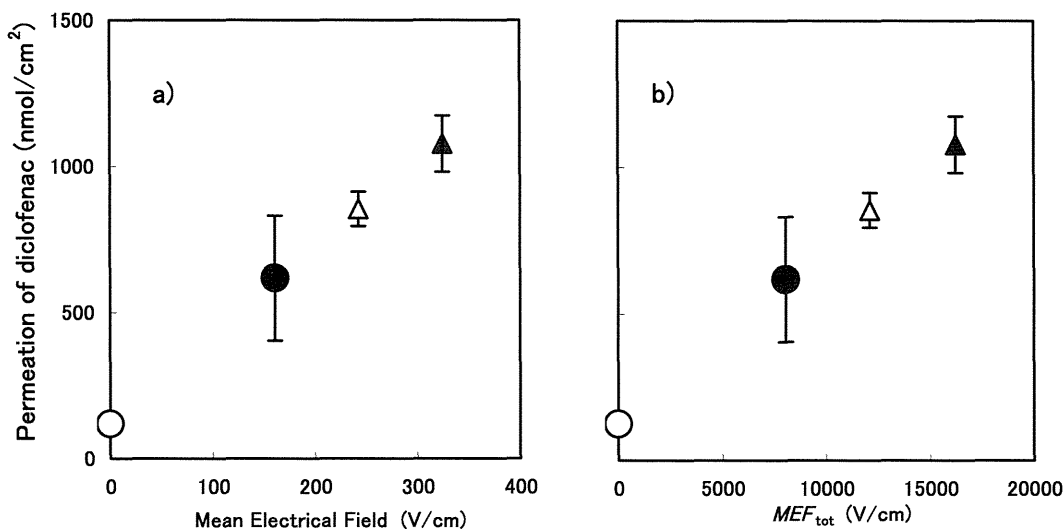


Fig. 2-26 Relationship between the Skin Permeation of Diclofenac and the Mean Electrical Field in the Stratum Corneum (a) and MEF_{tot} (b)

○: control (non-pulse), ●: needle-needle electrode, △: needle-ring electrode, ▲: Plate-plate electrode

Rectangle pulse wave was used for electroporation.

第6節 小括

3種類の形状の異なる電極を皮膚に適用して指数型減衰波発生装置よりエレクトロポレーション（電圧 200 V）を負荷し、モデル化合物である安息香酸の皮膚透過性を調べた。その結果、同じ電圧を負荷しているにもかかわらず、安息香酸の透過は電極形状により著しく異なり、プレートプレート電極が優れている電極であることが明らかとなった。これは電極形状が皮膚に負荷される2次元電場強度（2次元平均電場強度）やパルス波形（減衰時間）が異なるためであることが明らかになった。この現象は安息香酸に特異的ではなく、ジクロフェナックの透過性に関しても安息香酸と同様に2次元平均電場強度と減衰時間に影響されることが確認された。また両物質のエレクトロポレーションによって促進された皮膚透過性は時定数 τ と2次元平均電場強度の積によく相関することが明らかとなった。そこで電極形状にパルス波形が影響されない矩形波発生装置を用いてエレクトロポレーションを負荷し、ジクロフェナックの皮膚透過性を調べた。その結果、エレクトロポレーションの皮膚透過促進効果は電場強度のみに依存していた。

以上より、エレクトロポレーションによる物質の皮膚透過促進効果は適用する電圧の負荷時間（ τ 値またはパルス時間）および2次元平均電場強度に影響を受けることが明らかとなり、これらをコントロールすることで効率よく薬物の皮膚透過性をエレクトロポレーションにより促進できることがわかった。

第7節 考察

前章で報告したように、同じ皮膚上で電場強度の違いが生じる場合は2次元電場解析により求めた電場分布により、皮膚透過の高い部位と低い部位を予測することができた。Vanbeverらはエレクトロポレーションにより形成される小孔の数は適用する電圧に依存すると報告している⁵⁰⁾。しかしながら、今回のように同じ適用電圧であって

も、電極の形状が異なると薬物の皮膚透過量が異なることもある。このような異なる系どうしを比較する場合、矩形型のパルス波を用いる時は平均電場値で、また指数型パルス波を用いる時は平均電場値と時定数の積 (MEF_{tot}) により薬物透過量の予測が可能となることがわかった。エレクトロポレーションを利用した皮膚適用製剤の実用化を考えると、指数型減衰波の発生装置はコンデンサーを主回路とする比較的安価な装置となり、在宅治療へも応用できると考えられる。一方、矩形型は高価な機器になると予想されるものの、電極形状、溶液組成、さらには適用する皮膚によらず一定のパルス幅（時間）電圧を適用することができる。今後は、適用する薬物、適用方法により適宜パルス発生装置を選択する必要があるだろう。

第3編 製剤化⁵¹⁾

前編までにエレクトロポレーションにより薬物透過促進効果は角質層全体に負荷される電場強度もしくは MEF_{tot} によく相関することが明らかとなり、効率よく、かつ均一に高い電場強度を負荷することが出来るのは、プレート-プレート電極であることを見いだした。しかしこれらに用いた実験系は、電極と薬物溶液を適用したのみの簡単なものであった。またこれまで、エレクトロポレーションに関してメカニズムの解明⁵⁰⁾や種々薬物の促進効果が報告^{52,53)}があるものの、いずれも、簡便な *in vitro*, *in vivo* の実験系でエレクトロポレーションを用いたものであり、実用性を考慮したものではなかった。

一般に実験系を複雑にするほど、また実用的なものにするほど、皮膚透過は低くなる傾向があり、実用的な製剤化を企画する場合には細心の注意が必要である。特に、エレクトロポレーション処理では電極を皮膚に接触させる必要があり、また、電圧の適用により皮膚に形成された小孔は可逆的であると考えられるため²¹⁾、薬液はエレクトロポレーション処理と同時または処理後直ぐに適用することを考え製剤化することとした。

そこで、著者は薬物の適用と同時にエレクトロポレーション処理できる皮膚適用製剤を構築し、モデル薬物であるジクロフェナックナトリウムを用いて製剤を試作し、皮膚透過性からその有用性を評価した。

製剤を試作するにあたり、前章までに見いだした結果を基にプレート-プレート電極が直接皮膚に接触できる構造であること、製剤を貼付するときに薬液の漏れなどがなく簡単に皮膚に適用できる構造にすることを2点を考慮して製剤をデザインした。その結果、以下に示すリザーバー型製剤とマトリックス型製剤の2つの製剤を試作した。

第1章 リザーバー型製剤の開発

多孔質膜に電極を貼り合わせた電極膜を作成し、これと donor セルを貼り合わせて皮膚表面に適用し、ジクロフェナクナトリウム溶液を適用した (Fig. 3-1)。今回は donor セルを用いたが、これに代わり成型カップを用いることで完全なりザーバー型製剤とすることができる。

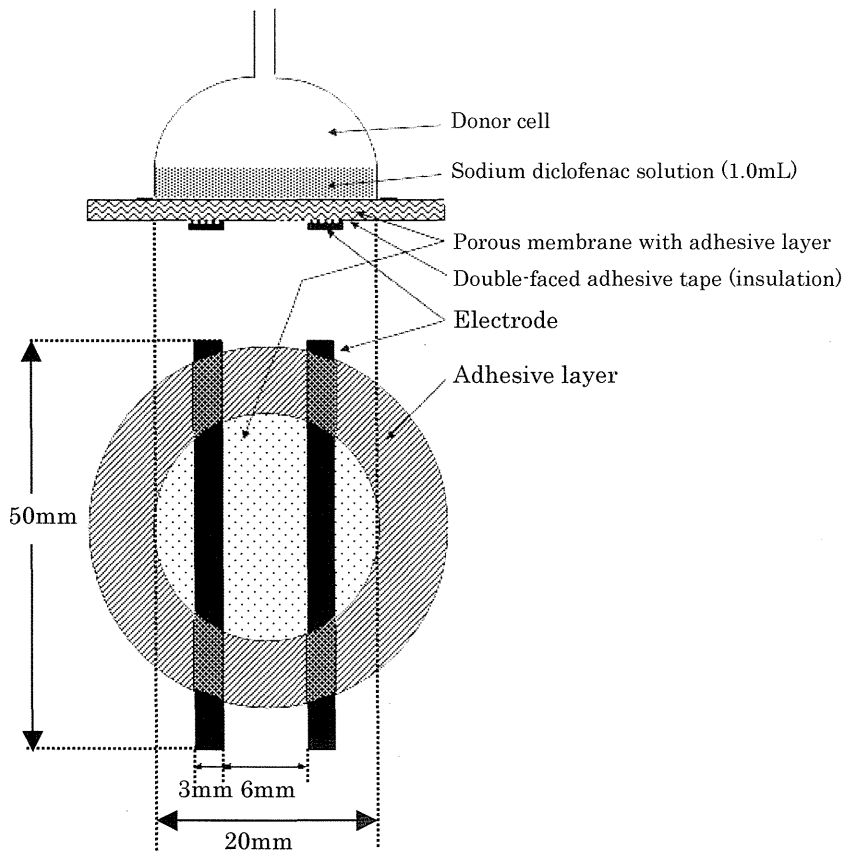


Fig. 3-1 Schematic Representation of Reservoir Type Device

第1節 実験方法

1. 試薬

ジクロフェナックナトリウムは前編第3章と同様に用いた。生理食塩液は塩化ナトリウム（和光純薬，大阪）を精製水に溶解させ調製した。麻酔に用いたウレタン溶液はカルバミン酸エチル（東京化成工業，東京）を生理食塩液に溶解させ 25%溶液とした。

2. 電極膜の調製

電極は銀箔（厚さ 40 μm ，村田洋白商店，東京）を幅 3 mm、長さ 50 mm に切り抜き、片面に両面テープ（ニチバン，東京）を貼付した。この電極 2 枚を孔径 5.0 μm のデュラポア SVLP 膜（Millipore, Bedford, MA, U.S.A.）上に貼付し（間隔 6 mm）、電極膜とした。

3. 透過試験

WBN/IIA-Ht 系雄性ヘアレスラット（体重 220~240g，埼玉実験動物，杉戸，埼玉）をウレタン麻酔下、腹部より摘出し、前編と同様 Franz 型拡散セル（有効透過面積 3.14 cm^2 ）を用いて試験を行った。角質層側には 20 mg/mL ジクロフェナックナトリウム水溶液を 1 mL またはリザバー型製剤を適用した。パルス適用系では必ず陽陰の両電極が皮膚角質層に接するように設置した。エレクトロポレーションは 200 V、50 msec のパルスで、実験開始直後から 1 時間毎に 6 時間目まで計 7 回適用した。なお、パルス発生装置は矩形波を出力するエレクトロポレーション装置 T-820 (BTX, San Diego, CA, U.S.A.) を用い、パルスモニター Enhance 4000 (BTX, San Diego, CA, U.S.A.) にて実際の出力波形を確認した。

4. ジクロフェナックの定量

ジクロフェナックの定量は第2編3章と同様に行った。

第2節 ジクロフェナックナトリウム含有リザーバー製剤の開発

リザーバー製剤を用いて *in vitro* 皮膚透過試験を行い、ジクロフェナックの皮膚透過性を調べた。このときの経時的な透過速度を Fig. 3-2 に示す。エレクトロポレーションを適用しないときの定常状態の透過速度は $9.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ 、ジクロフェナックナトリウム水溶液を投与し、エレクトロポレーションを適用したときの透過速度は $89.1 \pm 19.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ であった。これに対し、電極を多孔質膜で保持した電極膜を用いた製剤で $143.6 \pm 11.29 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ とエレクトロポレーション適用群の溶液と製剤からの皮膚透過に有意差はなかった (*t*-test) が、やや高いジクロフェナックの透過速度を得ることができた。

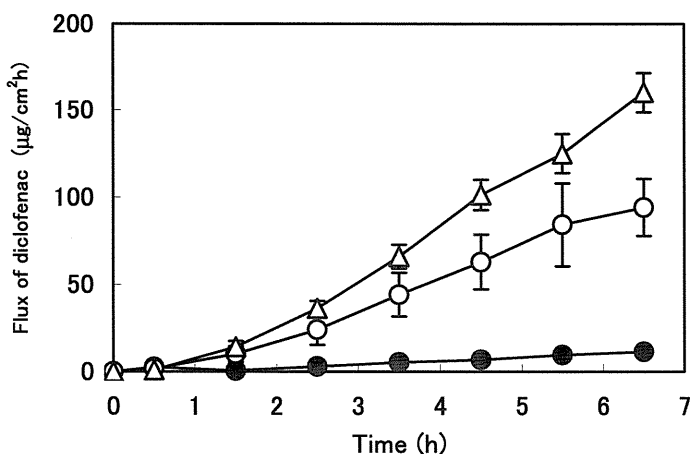


Fig. 3-2 Diclofenac Flux through the Excised Hairless Rat Skin

●: Control, ○: Solution, △: Reservoir

第3節 小括

エレクトロポレーションの電極を組み込んだリザーバー型製剤を試作することができ、これを用いて、ジクロフェナックの皮膚透過性を調べたところ、溶液で適用した場合とほぼ同等の透過を得ることができた。

第4節 考察

本章では比較的水溶性のジクロフェナックナトリウムをモデル化合物として、親水性高分子膜を用いて電極を組み込んだ電極膜を作成し、リザーバー型製剤を試作した。その結果、溶液を適用したとき時とほぼ変わらない（むしろわずかに高い）透過を得ることができた。一般に2枚の膜を重ねたときの皮膚透過性は以下の式で表すことができる (eq. 3-1)。データには示さなかったが、電極を装着していない多孔質膜のみを適用し、エレクトロポレーションを適用しない場合の透過は今回のコントロールとほぼ同等の皮膚透過速度を示しており、親水性の高分子多孔質膜を介するジクロフェナックの透過係数 (P_{memb}) が皮膚に比べ著しく大きく、皮膚に高分子膜を適用してもジクロフェナックの全体の透過係数 (P_{tot}) に影響しなかったため、溶液適用群とほぼ同等の透過を得ることができた。なお、これら3つの透過係数は以下の関係がある。

$$\frac{1}{P_{\text{tot}}} = \frac{1}{P_{\text{memb}}} + \frac{1}{P_{\text{skin}}} \quad \text{eq. 3-1}$$

今後、別の薬物を用いてエレクトロポレーション用リザーバー製剤を試作する場合には薬物の物性に応じ、 P_{memb} が高い高分子膜を選択する必要がある。また、本章では電極膜として銀箔を多孔質膜に貼り合わせるにより調製したが、より実用的な製剤では膜上に導電性ペーストインク³⁷⁾を印刷し作成することも可能である。

第2章 マトリックス製剤の開発

前章ではリザーバー型のエレクトロポレーション製剤を試作、溶液適用時と同等の透過を得ることができた。本章ではもう1つの経皮適用製剤であるマトリックス製剤を試作し、その効果を調べた。

第1節 実験方法

1. 試薬

ジクロフェナクナトリウムは前章と同様に用いた。寒天は日本薬局方品を用いた。他の試薬も前章と同様に用いた。

2. マトリックス製剤の調製

Table 3-1 に示した処方でジクロフェナクゲルを調製した。すなわち、沸騰した精製水に寒天を徐々に加えて完全に溶解させ、さらにジクロフェナクナトリウムを加え、よく混合した。この溶液 0.4 g を寒天水溶液が凝固する前に成型カップに充填し、室温で凝固させ、これにプレート・プレート電極を装着し、マトリックス型製剤とした (Fig. 3-3)。

Table 3-1 Composition of Diclofenac Matrix

Composition (%)	Matrix
Sodium dichlofenac	2.0
Agar	1.5
Distilled water	96.5

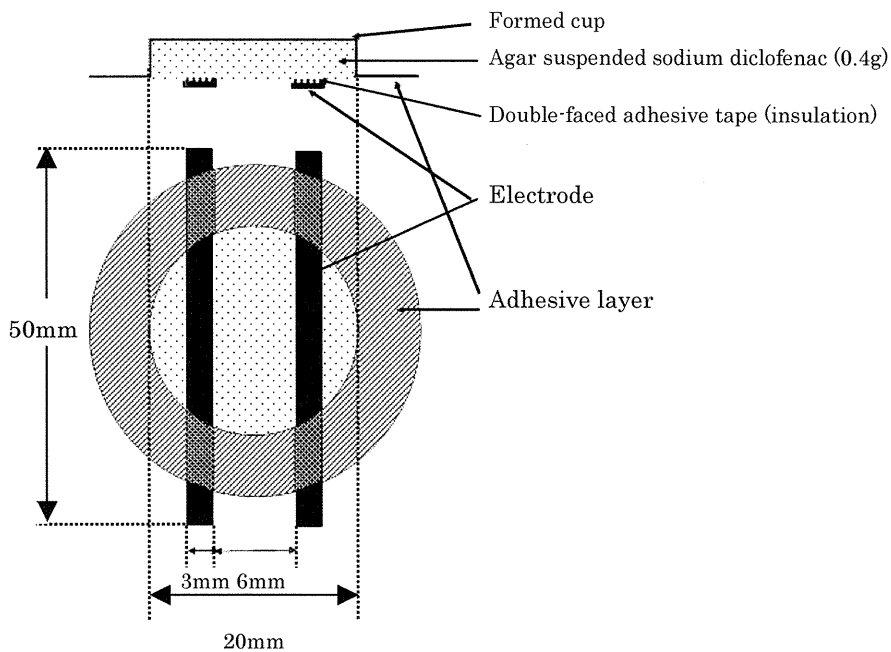


Fig. 3-3 Schematic Representation of Matrix Type Device

3. 透過試験

前章と同様にヘアレスラット摘出皮膚を Franz 型セルにセットし、マトリックス型製剤 (Fig. 3-3) を適用した。その他は全て前章と同様に行った。

4. 定量

ジクロフェナックの定量は前章と同様に行った。

第2節 ジクロフェナックナトリウム含有マトリックス製剤の開発

マトリックス製剤を用いて *in vitro* 皮膚透過試験を行い、ジクロフェナックの皮膚透過性を調べた。このときの経時的な透過速度を Fig. 3-4 に示す。

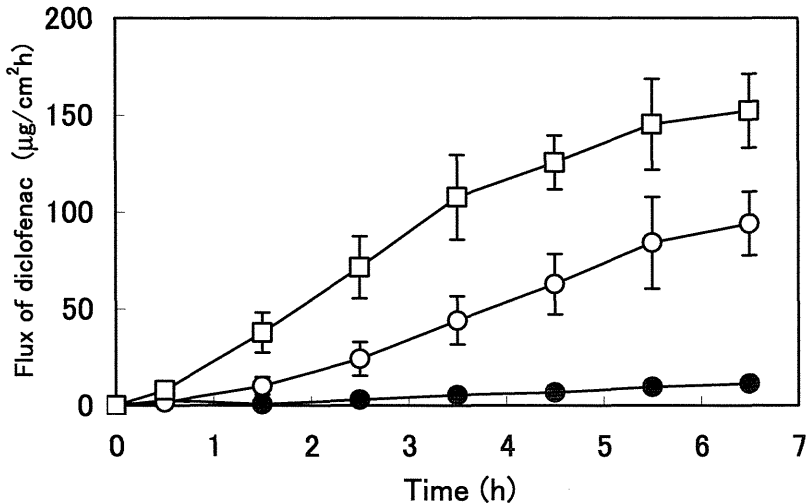


Fig. 3-4 Diclofenac Flux through the Excised Hairless Rat Skin

●: Control, ○: Solution, □: Matrix

エレクトロポレーションを適用しないときのジクロフェナック定常状態皮膚透過速度は $9.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ 、ジクロフェナックナトリウム水溶液を投与し、エレクトロポレーションを適用したときの透過性は $89.1 \pm 19.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ であった。これに対し、ジクロフェナックナトリウムを分散させた寒天ゲル製剤を適用した場合もジクロフェナックの皮膚透過速度は $148.7 \pm 21.19 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ と溶液を直接適用したときに比べ有意差はないものの (*t*-test)、若干高い透過を示した。

第3節 小括

ジクロフェナックナトリウムを含有するマトリックス製剤を試作し、製剤からの透過を調べたところ、十分なエレクトロポレーションの効果を得ることができ、溶液を適用し、エレクトロポレーションを負荷した場合と同等の透過を得ることができた。

第4節 考察

効率よく電場を適用できるプレート・プレート電極を維持したマトリックス型を試作し、ジクロフェナックをモデル化合物として皮膚透過実験を行ったところ、水溶液適用時比べ、有意差はないもののリザーバー型製剤と同様に透過性が若干高かった (Fig. 3-5)。この理由として、電極間に存在する電解質溶液 (ジクロフェナックナトリウム溶液) の電場への影響が考えられ、製剤化することにより偶発的に電極、電解質間にわずかな隙間が生じ、これにより皮膚に電場がより高く負荷できた可能性がある。すなわち、Fig. 3-6a に示したように溶液を適用した場合には A、B の電流の流れが生じると思われるが、前章のリザーバー型製剤 (Fig. 3-6b) や本章のマトリックス製剤 (Fig. 3-6c) では、わずかではあるが図中の A の流れが消失し、B の寄与が増えたと推測できる。より A の流れを消失させるためには電極の側面まで絶縁する構造の電極を用いることが望ましい。すなわち、今回調製したエレクトロポレーション用皮膚適用製剤はエレクトロポレーション吸収促進能を十分に保持することが確認された。

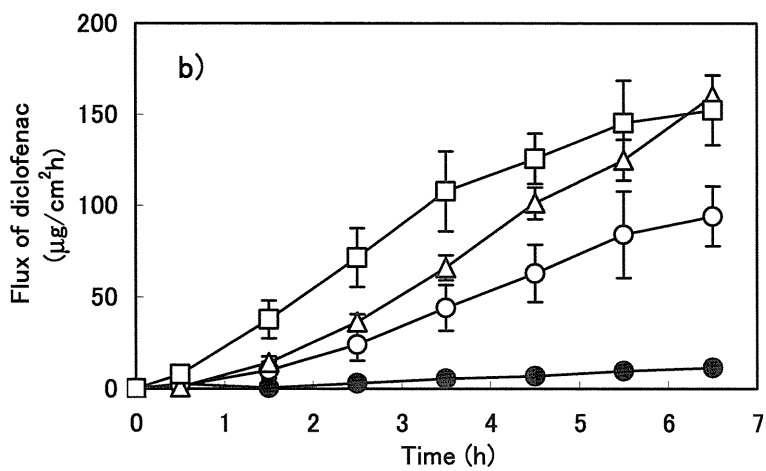
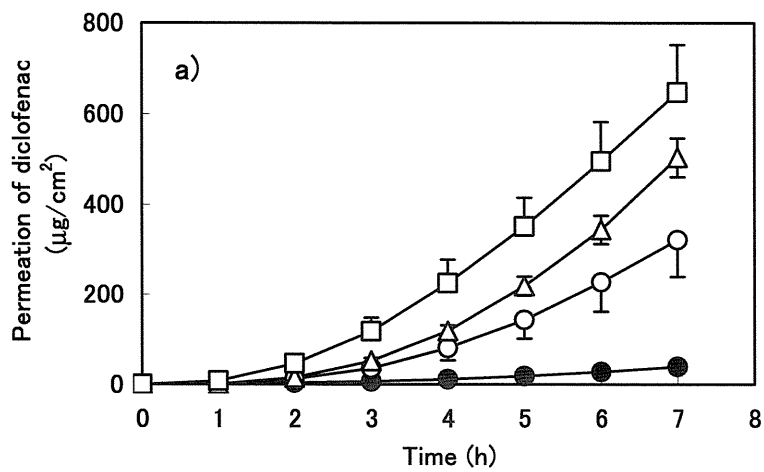


Fig. 3- 5 Permeation of Diclofenac through the Hairless Rat Skin

a) Cumulative amount, b) Flux

●: Control, ○: Solution, □: Reservoir, △: Matrix

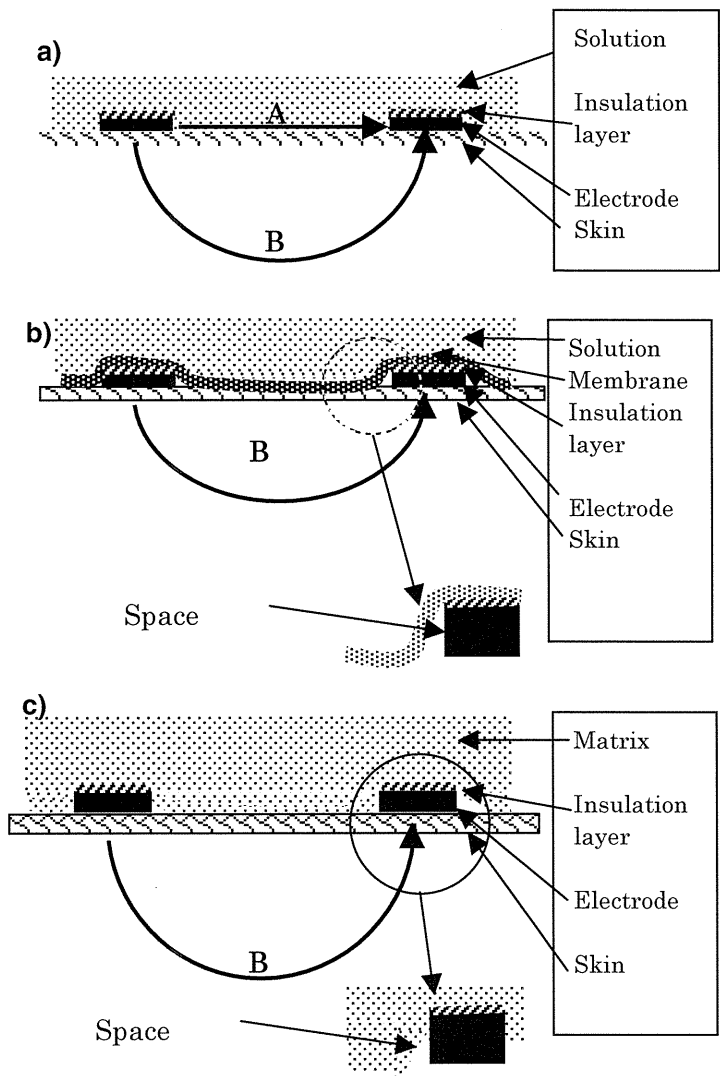


Fig. 3-6 Schematic Illustration of Line of Electric Force

a): Solution, b): Reservoir type device, c): Matrix type device

結論

経皮吸収型製剤の有用性が再認識され、種々の全身性薬物の TTS 製剤が開発されている。しかしながら併行して皮膚の物質透過性の低さから TTS 製剤化の開発を中止しなければならないケースも多数存在する。そのため、種々有用薬物の経皮吸収性（皮膚透過性）を促進するための試みが広範になされており、本研究で用いたエレクトロポレーションと同様に電氣的な力を利用したイオントフォーシスもその一例にあげられる。しかし、イオントフォーシスはイオン化した物質の皮膚透過性に対して効果が高いものの、非イオン性の薬物の皮膚透過性に対する効果はそれほど高くない。本研究において、エレクトロポレーションは非イオン性のマンニトールだけでなく、イオン性の安息香酸ナトリウムや水にやや溶けにくいジクロフェナックナトリウムの 3 化合物に対して皮膚透過促進効果を示すことが明らかとなった。さらに本研究では以下のことについて検討した。

- 1) 非イオン性のマンニトールの皮膚透過性に対する促進効果および電極材料、電極位置、エレクトロポレーション適用頻度の影響等
- 2) イオン性薬物の皮膚透過性に対する電流の影響（方向性）
- 3) 3次元電場解析によるエレクトロポレーション促進効果の解明および最適条件の検索
- 4) 2次元電場解析によるエレクトロポレーションの皮膚透過促進効果の解明および最適条件の検索
- 5) エレクトロポレーション適用製剤の開発

以下に得られた結果の要約を示す。

1) 非イオン性のマンニトールに対する促進効果および電極材料、電極位置、エレクトロポレーション適用頻度の影響等

皮膚の両側（角質層側、真皮側）に電極を適用しエレクトロポレーションを適用したとき、いずれの極を陽極もしくは陰極としてもマンニトールに対する皮膚透過促進効果に影響はなかった。また、エレクトロポレーションパルスを適用する電極の材料は分極性であっても、非分極であっても促進効果に違いは見られなかった。さらに、両電極を角質層上へ適用しても、一方の電極を角質層上、もう一方を真皮側に適用してもマンニトールに対する皮膚透過促進効果に相違は見られなかった。しかしながら、エレクトロポレーションの適用頻度を変えることで、マンニトールの皮膚透過量が変わり、1時間に1回と1分間に1回では30倍の皮膚透過量の違いが見られた。また、エレクトロポレーションの適用回数を減らすためにイオントフォレーシスと併用すると相乗的な皮膚透過促進効果が見られた。イオントフォレーシスの適用条件を一定としてエレクトロポレーションのパルス適用電圧を上げると、エレクトロポレーションの皮膚透過促進効果は適用電圧に依存して上昇した。本研究では詳細な検討は行わなかったものの、吸収促進剤との併用や他の物理的促進方法との併用も今後検討すべき課題であると考えられる。

2) イオン性薬物の皮膚透過性に対するエレクトロポレーション負荷時の電流の影響（方向性）

ニードル電極及びリング電極を共に角質層上に適用し、エレクトロポレーションのパルス電圧を1分間に1回の頻度で負荷したところ、150～300Vの負荷時では電極の極性によらず同等の安息香酸の皮膚透過促進効果を示した。さらに、電圧を450、600Vと増加すると、ニードル電極を陰極とした方が若干高い皮膚透過促進効果を示した。また、一方の電極を角質層側、もう一方を真皮側に適用してエレクトロポレーション

パルスを負荷したときは、150 V 以下では電極の極性によらず同等の促進効果を示した。しかし、300 V 以上ではニードル電極を陰極とした方が高い促進効果を示した。このように高い頻度でエレクトロポレーションを適用すると、イオントフォーシス時に生じるような *electromigration* による促進効果が生じることが示唆された。

3) 3次元電場解析によるエレクトロポレーションの皮膚透過促進様式の解明および適用最適条件の検索

エレクトロポレーションによる薬物の皮膚透過促進効果が確認されたことから、ニードルリング電極やこの一部を改良した電極を用いて電極の適用条件や電解質濃度の影響を調べ、さらには皮膚透過に影響する因子を電場、電流の両方から解析した。すなわち、安息香酸の皮膚透過を電極の形状（ニードル電極とニードル電極の先端のみを露出したポイント電極）、電極の位置（ニードル電極またはポイント電極を直接皮膚に接した場合と皮膚から 5 mm 離れた場合）、安息香酸ナトリウムを溶かす溶媒（安息香酸ナトリウムを水、0.9%食塩水及び 9%食塩水に溶解させて皮膚適用）を変えた計 12 群に加え、エレクトロポレーション非適用の 3 群（NaCl 濃度の違い）の計 15 群で比較し、安息香酸の皮膚透過に及ぼす因子について考察した。その結果、これら 3 因子により安息香酸の皮膚透過性は異なった。最も高い皮膚透過性を示したのはポイント電極を直接皮膚に接するように配置し、安息香酸ナトリウムを 9%食塩水に溶解させた群であった。

安息香酸の皮膚透過に影響を及ぼす因子として電流密度と電場の両面から考察した。第 1 編の 2 章では頻繁にエレクトロポレーションパルスを与えた時に *electromigration* の効果も示唆されたが、角質層に広がる電流密度と安息香酸の皮膚透過性に相関は見られなかった。電場解析では直接電場と皮膚透過性は相関しなかったものの、初期電圧の違いや電流適用時間を考慮した総電場は、最も透過の高いポイ

ント電極を皮膚に接しさせ 9%食塩水溶液を溶解液とした群を除いては、非常によく相関した。またいずれの群でもニードル電極を皮膚に接しさせた方が高い透過性を示した。

4) 2次元電場解析によるエレクトロポレーションの皮膚透過促進様式の解明および最適適用条件の検索

3次元解析で、角質層の電場が薬物の透過に影響することや陽陰両方の電極を皮膚に接した方が高い皮膚透過性を示したことから、より単純な2次元電場解析により電場と皮膚透過性の関係やエレクトロポレーションに最適な電極の形状を調べた。皮膚に広がる2次元電場分布を調べ、電場強度と皮膚内の安息香酸ナトリウム濃度の関係を調べた。その結果、電場の高い部位ほど安息香酸の皮膚中量が高かったことから、皮膚透過と電場がよく相関することが示された。さらに形状の異なる3組の電極を用いて、安息香酸やジクロフェナックの皮膚透過性を調べた。その結果、3組の電極の中で皮膚に均一に電場を負荷することができ、皮膚全体の平均電場が高いプレートプレート電極が最も高い薬物の透過を示した。2次元解析で、電極間の違いを比較しても薬物透過と総電場は相関した。以上、電極を皮膚に接しさせエレクトロポレーションパルスを適用した場合の同一皮膚中での薬物透過（取り込み）の違いは2次元解析による電場強度の違いとよく相関した。また、電極を皮膚に接しさせエレクトロポレーションパルスを適用した場合の薬物の皮膚透過に及ぼす電極の違いは、皮膚全体に広がる電場分布の平均値とよく相関した。この場合、電圧の適用時間や初期電圧に違いがある場合には、これらを考慮しなければならない。さらに適用する NaCl の濃度や電極を皮膚に直接接しさせない場合は3次元解析を行う必要があった。また、プレートプレート電極を皮膚に接しさせ、負荷装置として適用時間が変わらない矩形波を発生する装置の使用が最も好ましい適用条件であることが明らかとなった。

5) エレクトロポレーション用局所製剤の開発

電場解析から求めた最適条件を基に、エレクトロポレーションを適用できる実用化が可能な製剤を試作した。1つは電極と多孔質膜を貼り合わせた電極膜を有するリザーバー型製剤、もう1つは親水ゲルの寒天を基剤とするマトリックス製剤である。典型的な経皮吸収型製剤をベースにエレクトロポレーションを負荷できるように考慮し試作した2種類の製剤は溶液状態でエレクトロポレーションを適用した場合と同等または少し高い皮膚透過性を得ることができた。

以上のエレクトロポレーションに関する基礎から実用にかかる研究成果から、イオントフォーシスや促進剤の利用のみでは皮膚透過性が低い薬物であってもエレクトロポレーションを利用または併用することにより、有用な経皮吸収型製剤を開発できるものと思われた。

謝辞

本研究に際し、終始懇切なご指導を賜りました城西大学薬学部教授 杉林堅次先生には、深甚なる謝意を表します。

また、本研究テーマの発案やご助言をいただきました城西大学薬学部教授 森本雍憲先生には深謝の意を表します。

さらに、本研究に有益なご助言を賜りました城西大学薬学教授 従二和彦先生、同教授 白幡晶先生に厚く感謝を表します。

電極膜考案にご鞭撻いただきました株式会社ジェノファンクション社長 野沢巖氏、電場解析やインピーダンス測定にアドバイスをいただきました久光製薬 徳本誠治氏、同社、西芳弘氏、さらには実験の一部にご助力いただきました渡邊哲也氏、吉田牧氏に感謝いたします。

さらに城西大学薬学部臨床薬物動態学教室、旧製剤学教室、さらに久光製薬開発企画室、同 TTS 研究所、同カリフォルニア研究所の諸氏に感謝いたします。

引用文献

-
- 1 Zaffaroni A., U.S. Patent, 3,794,494 (Mar. 19, 1974).
 - 2 橋田 充, “ドラッグデリバリーシステム”, 化学同人, 京都, 1995.
 - 3 Barry, B.W. “Dermatological Formulations”, Marcel Dekker, New York, 1983.
 - 4 Murphy M., Carmichael A. J., Am. J. Clin. Dermatol., **1**, 361, 2000.
 - 5 Kobayashi I., Hosaka K., Ueno T., Maruo H., Kamiyama M., Konno C., Gemba M., Biol. Pharm. Bull., **20**, 421, 1997.
 - 6 Weber M. A., Drayer J. M., Brewer D. D., Lipson J. I., Lancet, Jan., **7**, 9, 1984.
 - 7 Parker J. O., VanKoughnett K.A., Fung H. L., Am. J. Cardiol., **54**, 8, 1984.
 - 8 Good W. R., Powers M. S., Campbell P., Schenkel L., J. Control. Rel., **2**, 89, 1985.
 - 9 An N. M., Kim D.D., Shin Y. H., Lee C.H., Drug Dev. Ind. Pharm., **29**, 99, 2003.
 - 10 Anderson D. T., Muto J. J., J. Anal. Toxicol., **24**, 627, 2000.
 - 11 Uematsu T., Nakano M., Kosuge K., Nakashima M., Eur. Clin. Pharmacol., **44**, 361, 1993.
 - 12 Comfort A.R., Dinh S.M., Otte J., Shevchuk I., Berner B., Biomaterials, **11**, 729, 1990.
 - 13 Sugibayashi K., Hosoya K., Morimoto Y., Higuchi W.I., J. Pharm. Pharmacol., **37**, 578, 1985.
 - 14 Yano T., Higo N., Furukawa K., Tsuji M., Noda K., Otagiri M., J. PharmacobioDyn., **15**, 527, 1992.
 - 15 Kemken J., Ziegler A., Muller B.W., Pharm. Res., **9**, 554, 1992.
 - 16 Wotton P.K., Mollgaard B., Hadgraft J., Hoelgaard A., Int. J. Pharm., **24**, 19, 1985.
 - 17 Siddiqui O., Sun T., Liu J.C., Chien Y. W., J. Pharm. Sci., **76**, 341, 1987.
 - 18 Ueda H., Sugibayashi K., Morimoto Y., J. Control. Rel., **37**, 291, 1995.
 - 19 Schramm J., Mitragotri S., Pharm. Res., **19**, 1673, 2002.

-
- 20 Henry S., McAllister D. V., Allen M. G., Prausnitz M. R., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 922, 1998.
 - 21 Prausnitz M. R., Bose V. G., Langer R., Weaver J. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10504, 1993.
 - 22 Neumann E., Rosenheck K., *J. Membr. Biol.*, **10**, 279, 1972.
 - 23 Zimmermann U., Schulz J., Pilwat G., *Biophys. J.*, **13**, 1005, 1973.
 - 24 Bommannan D.B., Tamada J., Leung L., Potts R.O., *Pharm. Res.*, **11**, 1809, 1994.
 - 25 Riviere J. E., Monteiro-Riviere N. A., Rogers R. A., Bommannan D. B., Tamada J. A., Potts R. O., *J. Control. Rel.*, **36**, 229, 1995.
 - 26 Vanbever R., Lecouturier N., Preat V., *Pharm Res.*, **11**, 1657, 1994.
 - 27 Hofmann G.A., Rustrum W.V., Suder K.S., *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, **38**, 209, 1995.
 - 28 Marro D., Kalia Y. N., Delgado-Charro M. B., Guy R.H., *Pharm. Res.*, **18**, 1701, 2001.
 - 29 Mori K., Watanabe T., Hasegawa T., Sato S., Sugibayasi K., Morimoto Y., *Drug Delivery System*, **14**, 485, 1999.
 - 30 Okabe K., Yamaguchi H., Kawai Y., *J. Control. Rel.*, **4**, 79, 1986.
 - 31 杉林堅次, 森本雍憲, 製薬工場, **4**, 543, 1984.
 - 32 Okumura M., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1375, 1989.
 - 33 Yukawa J., Sugibayashi K., Morimoto Y., *薬剤学*, **49**, 254, 1989.
 - 34 Delgado-Charro M. B., Guy R. H., *Pharm. Res.*, **11**, 929, 1994.
 - 35 Ilic L., Gowrishankar T.R., Vaughan E. V., Herndon T. O., Weaver J. C., *J. Control. Rel.*, **61**, 185, 1999.
 - 36 森健二, 平田隆洋, 片貝一哉, 特許公報, 登録第 3119488 号(Oct. 13 2000).
 - 37 日本アチソン社カタログ, アチソンのスクリーン印刷インク一覽表, 日本アチソン株式会社, 兵庫, 2002.

-
- 38 Prausnitz M, IBC's International conference on transdermal drug delivery, Dec., 16, 1997.
- 39 森健二, 安達博敏, 森本雍憲, 杉林堅次, 公開特許公報, 特開平 9-255561 (Sep. 30 1997).
- 40 Yoshida M., Mori K., Watanabe T., Hasegawa T., Sugibayashi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1807, 2000.
- 41 Lopez R. F., Bentley M. V., Delgado-Charro M. B., Salomon D., van den Bergh H., Lange N., Guy R. H., *Photochem. Photobiol.*, **77**, 304, 2003.
- 42 Zhang L., Li L., An Z., Hoffman R.M., Hofmann G.A., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **42**, 283-292, 1997.
- 43 Yamamoto T., Yamamoto Y., *J. Med. Biol. Eng.*, **14**, 151, 1976.
- 44 松元 崇, “改訂 電気回路論演習”, pp. 60-62, 学献社, 東京, 1985.
- 45 ユーザーズマニュアル, Photo-series-volt, 株式会社フォトン, 奈良, 1997.
- 46 Licht S.H. “Electrodiagnosis and Electromyography”, Waverly Press, Baltimore, MD and New Haven, CT, U.S.A., pp.1-23, 1971.
- 47 Sugibayashi K., Yoshida M., Mori K, Watanabe T., Hasegawa T., *Int. J. Pharm.*, **219**, 107, 2001.
- 48 Mori K., Hasegawa T., Sato S., Sugibayashi K., *J. Control. Rel.*, **90**, 171, 2003.
- 49 Johnson E. L., Stevenson R., “Basic Liquid Chromatography”, pp. 230-231, Varian Associates, Inc., Palo Alto, CA, U.S.A., 1978.
- 50 Vanberver R., Pliquett U. F., Preat V., Weaver J. C., *J. Control. Rel.*, **69**, 35, 1999.
- 51 Mori K., Tokumoto S., Kubo H., Higo N., Nozawa I., Sato S., Sugibayashi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 617, 2003.

-
- 52 Weaver J. C., Vanberver R., Vaughan T. E., Prausnitz M. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 637, 1997.
- 53 Vanberver R., Langers G., Montmayeur S., Preat V., *J. Control. Rel.*, **50**, 225, 1998.

