

薬物の拡散性に及ぼす要因の評価および  
体内挙動解析への応用に関する研究

乙第43号

細谷 治

# 目次

## 総論の部

緒言	1
第1章 薬物の拡散性に影響を及ぼす要因に関する基礎的検討	5
第1節 HPLC装置を用いた薬物拡散係数測定法の検討	5
1.1.1 パラベン類を用いた拡散係数の測定	6
1.1.2 パラベン類及びステロイド類を用いた拡散係数の分子量依存性の評価	11
第2節 薬物の拡散係数に影響する要因の検討	15
1.2.1 パラベン類及びステロイド類の水における拡散係数と脂溶性との関係	15
1.2.2 薬物の拡散係数に及ぼす解離状態の影響	19
1.2.3 オクタノール中におけるパラベン類及びステロイド類の拡散係数に影響する要因	21
1.2.4 水溶性高分子薬物の水における拡散係数の測定とそれに影響する要因	25
第3節 小括	29
第2章 相互作用による薬物の拡散性の変化とそれに起因する薬物体内動態への影響に関する検討	32
第1節 薬物の拡散係数に及ぼす高分子電解質の影響に関する検討	32

2.1.1	薬物の拡散係数に及ぼすコンドロイチン硫酸共存の影響	・・・32
第2節	フルルビプロフェンの皮膚内動態へのウシ血清アルブミン (BSA) との相互作用の影響に関する検討	・・・ 37
2.2.1	BSA との相互作用のフルルビプロフェンの拡散係数への影響	・・・ 37
2.2.2	ウサギ摘出耳介灌流実験系を用いたフルルビプロフェンの皮膚内動態に関する考察	・・・ 41
第3節	水溶性高分子薬物の吸収性に関する拡散性の評価に基づく考察	・・・ 46
2.3.1	水溶性高分子薬物の人工膜透過性の拡散係数を利用した予測	・・・ 46
2.3.2	ポリ-L-アルギニンの鼻粘膜吸収促進作用の拡散性の評価に基づく考察	・・・ 52
第4節	小括	・・・ 54
結 論		・・・ 56
謝 辞		・・・ 60
実験の部		・・・ 61
第1章	実験の部	・・・ 61
第2章	実験の部	・・・ 66

引用文献

• • • • • 73

## 総論の部

# 総論の部

## 緒言

医薬品を使用する臨床の場において、薬物動態に関する研究は数多く行われており、薬物治療の最適化を目標とする薬物治療モニタリング (Therapeutic Drug Monitoring, TDM) をはじめ、副作用あるいは薬物相互作用を解析する際のもっとも重要な手段のひとつとなっていることは周知の事実である。これらの検討は薬物の血中濃度推移を中心に議論をすることが多く、巨視的な観点で捕らえているといえる。しかしながら、薬物が生体内に投与され、製剤からの薬物の放出、生体膜の透過を経て分布により作用部位に至る一連の薬物移行過程において、薬物分子がどのような挙動をとるかを微視的な観点で検討することは投与後の薬物の体内挙動をより正確にモニターあるいは予測するために必要であると考えられる。これらの検討により、副作用の強い抗がん剤などをがん組織にのみ送達させたり、炎症部位での消炎鎮痛剤の滞留性を改善するといった臨床での薬物治療に重要な情報を提供できるかもしれない。一方、1980年代後半よりコンビナトリアルケミストリーやハイスループットスクリーニングが注目を集めるようになり、医薬品の探索研究は大きく変貌している<sup>1-3)</sup>。一連の医薬品開発の中で薬物動態は医薬品の有効性および安全性と密接に関係しており、ときに薬物動態特性の問題で開発を断念するケースも少なくない。また化合物合成の時間、コスト、労力等を考慮すれば、探索研究の早期に薬物動態特性を予測して化合物設計に反映させることが理想的であり、薬物動態予測に関する研究が盛んに行われている。*In silico* 消化管研究もそのひとつである<sup>4)</sup>。この場合も、薬物の体内挙動をより微視的な観

点で検討することが、より正確な薬物動態予測を行う上で重要であると考えられる。

薬物の拡散は、生体内での一連の移行過程において最も重要な機構のひとつである。たとえば固形製剤を生体に投与した場合、まず錠剤や粉体からの薬物の溶解過程において、固体表面と拡散層の界面は平衡状態にあり、一般的に飽和溶液層から内部溶液への拡散過程が薬物の溶解過程の律速段階となる。その際、その移行速度は Fick の拡散式より導かれた Nernst-Noyes-Whitney の式に従い、溶解速度は、拡散係数、有効表面積、拡散層の厚さ、薬物の溶解度などの関数として表される。また、粘膜からの薬物の受動的な吸収は、薬物が刷子縁膜脂質層に分配後細胞内を拡散して側底膜に達し、相分配の原理に従って溶出していく溶解拡散過程と、上皮細胞膜にある内在タンパク質の貫通による水分子で満たされた細孔、もしくは接合部から側細胞間隙にかけての細胞間隙路に相当する水性領域（水性細孔経路）を移動する制限拡散過程からなる<sup>5)</sup>。さらに投与部位から循環血液中に移行した薬物が、各組織で毛細血管から細胞間隙を経て組織細胞へ移行し薬効を発現する分布過程においては、薬物の分子量、脂溶性、立体構造等により決定される薬物自身の拡散性が重要となる。末梢では血管内皮の膜小孔には窓 (fenestra) があり、有窓性毛細血管を形成して分子量 5,000 以下の物質、水溶性薬物は簡単に組織間隙に移行し、肝臓や脾臓では細胞と毛細血管の間には類洞 (シヌソイド) と呼ばれる隙間にタンパク質などのかなり高分子なものまで自由に移動できるが、拡散性はその大きさに大きく依存するので、薬物がアルブミンなどの血漿タンパク質と結合した場合などでは、その移行特性が大きく変化することが予想される<sup>6)</sup>。

以上のことから、各過程における薬物の拡散性、すなわち拡散係数とそれに影響する種々要因を明らかにすることは薬物の溶出から作用発現までの一連の過程を理解する上で重要である<sup>7)</sup>。多くの研究は薬物の移動過程を記述するモデルへのあてはめ計算による方法で各過程における薬物の拡散係数を求めている。しかしながら、そのような方

法では得られた拡散係数がモデル依存的であり、薬物の拡散性に及ぼす要因を詳細に検討することは困難である。*In vitro* での方法で直接的に求めた拡散係数は、実際の生体内における拡散係数とは絶対値としては一致しないものの、それに影響を及ぼす要因を詳細に検討できることから、薬物の生体内挙動を理解するために重要な情報を与えるものと考えられる。*In vitro* で薬物の拡散係数を直接測定する方法として、Chromatographic broadening method (CBM)<sup>8-11)</sup>、Porous diaphragm method (PDM)<sup>12-14)</sup>、Capillary method<sup>15,16)</sup>、FT-IR technique<sup>17)</sup>、Conductometric technique<sup>18,19)</sup>、などがあり、それぞれ異なった特徴を有する。CBM は層流が生じた状態での薬物の移動から拡散係数を求める方法で、比較的低濃度で測定可能であり、使用する装置も比較的単純で安価なものが利用できる。また PDM は多孔膜を介した薬物の移動から拡散係数を求める方法であり、比較的高濃度の溶液が必要であるものの、やはり使用する装置および操作が簡単な方法である。

本研究では、薬物の拡散性に及ぼす要因の評価、および体内挙動解析へのその応用に関して、第1章～第2章に渡り検討を行った。第1章においては、薬物の拡散係数に及ぼす要因を明らかにするために種々検討を行った。先ず、第1節において、CBM のバリデーションを目的として、パラベン類の拡散係数の濃度および温度依存性を評価し、またパラベン類およびステロイド類を用いて拡散係数と分子量の関係について確認を行った。さらに、第2節において、薬物と溶媒の相互作用に関連するパラメータに着目し、水中およびオクタノール中で検討を行った。用いる薬物としては、パラベン類およびステロイド類に加え、水中に関しては pH により解離状態が異なる薬物や水溶性高分子薬物も選択し、評価を行った。

生体内における薬物の拡散性は、薬物が存在する周囲の環境やそこに共存する生体内構成物質との相互作用により影響を受けることが予想される。そこで、第2章では、薬物の体内局所における動態とその拡散性との関係について検討を行った。第1節において、生体内の結合組織に広く存在する酸性ムコ多糖のコンドロイチン硫酸が共存する



場合の拡散係数に及ぼす影響を検討した。また、第2節において、モデル薬物としてフルルビプロフェンを用い、血漿アルブミンとの相互作用が及ぼす局所における薬物動態への影響について *in vitro* ウサギ摘出耳介灌流実験系により検討を行った。さらに第3節では、水溶性高分子薬物の粘膜からの吸収が細胞間隙の水路における拡散により規定されるとの考えから、多孔膜に関するレンキン式を用いてその吸収過程の解析を試み、さらには、鼻粘膜吸収促進剤として検討されているポリ-L-アルギニンの作用機構の考察を行なった。

以下、得られた結果について論述する。

# 第 1 章 薬物拡散性に影響を及ぼす要因に関する基礎的検討

生体内で起こる薬物の溶出から作用発現に至る一連の過程を詳細に理解するためには、薬物の溶解、吸収、分布の各過程における薬物の拡散性さらには拡散係数を知ることが必要であると思われる。また、それら薬物移行過程において、その拡散性は、薬物自身および媒体の物理化学的性質、あるいは共存する物質に影響を受けることが予想されるので、それらの評価は大変重要である。そこで本章では、薬物の拡散係数に影響を及ぼす要因に関する情報を得る目的で、基礎的な検討を行った。すなわち、パラベン類およびステロイド類の拡散係数に影響を及ぼす要因として、薬物の脂溶性、解離状態、分子構造などの影響を検討した。拡散係数を測定する方法として、CBM および PDM を薬物の性質に応じて選択した。CBM は細管中に定速で溶媒を流し、層流が生じた状態での薬物の移動から拡散係数を求める方法である。本章では、先ずこの方法の妥当性を検証した。

## 第 1 節 HPLC 装置を用いた薬物拡散係数測定法の検討

CBM は細管中に一定の速度で溶媒を流し、層流が生じた状態での物質の移動から拡散係数を求める方法であり、Taylor、Aris らは水および有機溶媒中における物質の拡散係数を測定した<sup>20,21)</sup>。正確な拡散係数を測定するためには、安定した溶媒の流れが要求される。70 年代には窒素ガスを利用することにより溶媒の一定の流れを確保していた<sup>22,23)</sup>。近年、Mosher らは HPLC システムのポンプを用いることにより、緩衝液あるいはオクタノール中におけるアミノ酸および低分子有機化

合物の拡散係数を測定した<sup>24)</sup>。この方法は、特殊な装置を用いず、また薬物のラベル化の必要もなく、通常使用される HPLC 用のポンプまたは UV 検出器等を用いることにより測定が可能であることがその利点として指摘でき、より広範囲な薬物への適用とその測定値の妥当性の検証が期待されている。そこで著者は Mosher らと同様の装置を用いて、溶媒に水および 1-オクタノールを選択し薬物の拡散係数を測定し<sup>25)</sup>、その妥当性の検証をおこなった。

### 1.1.1 パラベン類を用いた拡散係数の測定

HPLC 装置を用いた CBM 法により、パラベン類の拡散係数の測定を行った。CBM 法では拡散係数の値は次式により求められる。

$$D = \frac{0.231 \cdot t_R \cdot r^2}{(W_{1/2})^2} \quad (1)$$

ここで  $t_R$  はリテンションタイム、 $r$  はチューブ半径、 $W_{1/2}$  は半値幅を示す。25°C における水中の拡散係数の値が  $8.43 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$  と既知の p-アミノ安息香酸を用い、0.7mM で 11 回拡散係数を測定し、計算により得られた  $r$  の値は  $0.426 \pm 0.003 \text{mm} (\pm \text{SD})$  であった。この値は実験に用いたステンレスチューブのカタログデータと近い値であり、以後の拡散係数の計算にはこの値を用いた。CBM 法は低濃度の薬物でも拡散係数の測定が可能である。Table 1 にパラベン類の拡散係数を示す。拡散係数の濃度依存性を確認するためにメチルパラベンを用いて  $100 \mu \text{g/mL} - 0.5 \mu \text{g/mL}$  の濃度範囲で水中における拡散係数を 25°C にて測定を行った。その結果、測定した濃度範囲における拡散係数の濃度依存性はないことが示された。

Table 1 Diffusion coefficient(*D*) of parabens in water

Parabens	Temp. (°C)	Conc. <sup>a)</sup> (µg/mL)	<i>D</i> (cm <sup>2</sup> /s)×10 <sup>6</sup>	SD×10 <sup>6</sup>	n <sup>b)</sup>
Methyl-	17	1.0	6.42	0.01	11
	25	0.5	8.44	0.14	11
	25	1.0	8.25	0.30	22
	25	3.0	8.14	0.38	11
	25	10	8.20	0.09	11
	25	100	8.16	0.07	11
	32	1.0	9.65	0.18	11
	37	1.0	10.88	0.14	11
	42	1.0	11.94	0.13	11
Ethyl-	25	1.0	7.48	0.18	11
n-Propyl-	25	1.0	6.81	0.19	16
	37	20	9.06	0.05	11
Isopropyl-	25	1.0	6.94	0.20	16
	37	20	9.09	0.04	11
n-Butyl-	25	1.0	6.31	0.02	11
	25	100	6.53	0.11	11
Isobutyl-	25	1.0	6.40	0.14	11
sec-Butyl-	25	1.0	6.42	0.13	11
n-Amyl-	17	1.0	4.93	0.20	11
	25	1.0	5.70	0.02	11
	32	1.0	7.42	0.37	22
	37	1.0	8.28	0.23	11
	42	1.0	9.24	0.30	11
Isoamyl-	25	2.0	5.74	0.04	11

a) Concentration of the injection solution, b) replicated.

温度の上昇により分子の運動は活発になり、その結果として拡散係数は上昇する。そこで、メチルパラベンと n-アミルパラベンの温度変化に対する拡散係数の変動に着目し、それぞれのアレニウスプロットを Fig. 1 に示した。測定した 17°C から 42°C の温度範囲において、温度の上昇に伴い拡散係数は増加した。

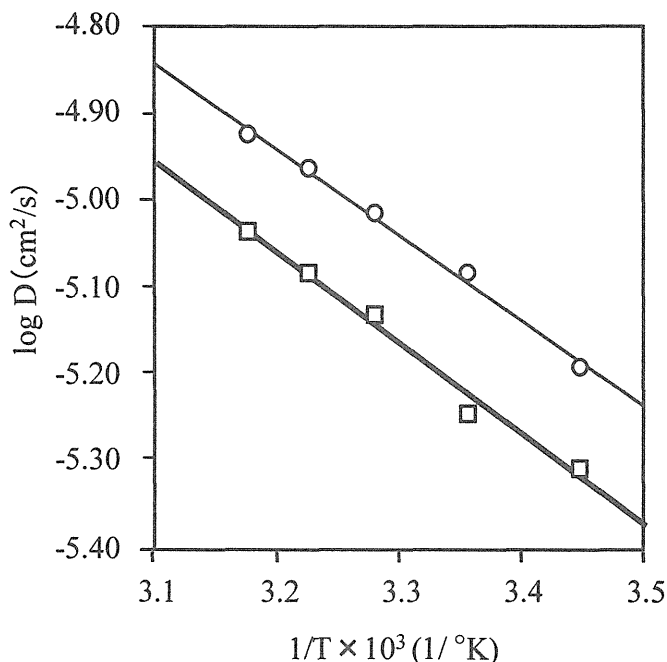


Fig. 1 Arrhenius plots for  $D$  of methylparaben and n-amyloparaben  
Methylparaben (○), n-Amyloparaben (□).

メチルパラベンおよび n-アミルパラベンの拡散における活性化エネルギーはそれぞれ 18.8 kJ/mol および 20.0 kJ/mol であった。このことから、分子が大きい方がより多くのエネルギーが必要であることが示された。

球形分子の拡散係数と溶媒の粘度および温度との関係は次式によって表される。

$$D = k \cdot T \cdot u = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_s} \quad (2)$$

ここで  $k$  は Boltzmann 定数、 $T$  は絶対温度、 $u$  は移動度、 $\eta$  は溶媒の粘度、 $r_s$  は分子の有効半径を示す。 $u$  の逆数は Stokes force、 $r_s$  は Stokes-Einstein 半径である<sup>26)</sup>。ここで溶媒の粘度、すなわち水のそれは既知の値 (Table 2) であり<sup>27)</sup>、温度により  $r_s$  の変化がなければ、 $u$  ( $= D/kT$ ) に対して  $1/6\pi\eta$  の逆数をプロットすると、傾き  $1/r_s$  の原点を通る直線になるはずである。 $1/6\pi\eta$  の値はそれぞれの温度における水の粘度の値を用いて計算し、それらの値に対してメチルパラベンおよび n-アミルパラベンの  $u$  の値をプロットした (Fig. 2)。その結果、いずれの薬物も原点を通る直線となり、 $r_s$  の温度依存性は無視することができ、さらに拡散係数の変動は主に水の粘度変化によるものと示唆された。メチルパラベンおよび n-アミルパラベン分子の有効半径、すなわち Stokes-Einstein 半径はこれらの直線の傾きから計算し、それぞれ  $3.01 \times 10^{-8}$  cm および  $3.99 \times 10^{-8}$  cm となった。また、これらの値は官能基寄与法<sup>7,28)</sup>により計算した分子の体積から、球形を仮定して求めた分子の有効半径 (Table 3) とかなり良く一致し、両薬物の拡散係数の温度依存性は、それぞれの分子の大きさと水の粘度の温度依存性により、説明できることが示された。

Table 2 Temperature dependency of viscosity of water<sup>27)</sup>

Temp. (°C)	Viscosity (mPa · s)
17	1.081
25	0.895
32	0.770
37	0.696
42	0.633

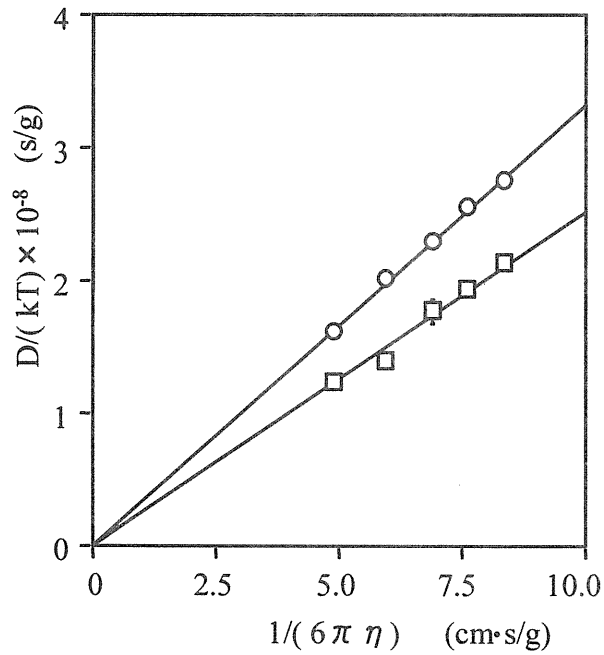


Fig. 2 Relationship between reciprocal of  $6\pi\eta$  and  $u$  ( $=D/kT$ )  
Methylparaben (○), n-Amylparaben (□).

Table 3 Radius of molecule

	Methylparaben	n-Amylparaben
Stokes-Einstein Radius ( $r_s$ )	$3.01 \times 10^{-8}$ cm	$3.99 \times 10^{-8}$ cm
Radius Calculated from Molecular Volume	$3.56 \times 10^{-8}$ cm	$4.14 \times 10^{-8}$ cm

### 1.1.2 パラベン類及びステロイド類を用いた拡散係数の分子量依存性の評価

薬物拡散係数に及ぼす分子量の影響を評価し、その関係から薬物の拡散係数の予測が可能であるかを検討した。数種のパラベン類およびステロイド類を用いて 37°C における拡散係数の測定を行った。実験に用いた薬物を Table 4 に示す。



Table 4 Drugs used for the determination of diffusion coefficient

Drug	Molecular Weight
Methylparaben	152.15
n-Propylparaben	180.20
n-Amylparaben	208.26
Isopropylparaben	180.20
Androsta-1,4-diene-3,17-dione	284.40
$\Delta^4$ -Androstene-3,17-dione	286.41
Testosterone	288.43
$\Delta^9(11)$ -Methyltestosterone	300.44
Methyltestosterone	302.46
11 $\alpha$ -Hydroxymethyltestosterone	318.46
16,17-Epoxyprogesterone	328.45
11 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	330.47
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	330.47
Prednisone	358.43
Prednisolone	360.54
Hydrocortisone	362.47
Deoxycorticosterone acetate	372.50
Digitoxigenin	374.52
Betamethasone	392.47
Prednisolone acetate	402.49
Beclomethasone	408.90
Spirolactone	416.58
Triamcinolone acetonide	434.50
Fluocinolone acetonide	452.50
Betamethasone valerate	476.59
Ecdysterone	480.64

分子量の対数値と拡散係数の対数値が直線関係にあることは、既に知られている<sup>29)</sup>。本測定においても、分子量が増加するにつれて拡散係数は減少した。測定結果に対して直線回帰分析を行った結果、 $\log D_w = -0.434 \cdot \log MW - 4.059$ （自由度調整決定係数、 $R^{2*}=0.693$ ）の有意な直線式が示された。（Fig. 3）

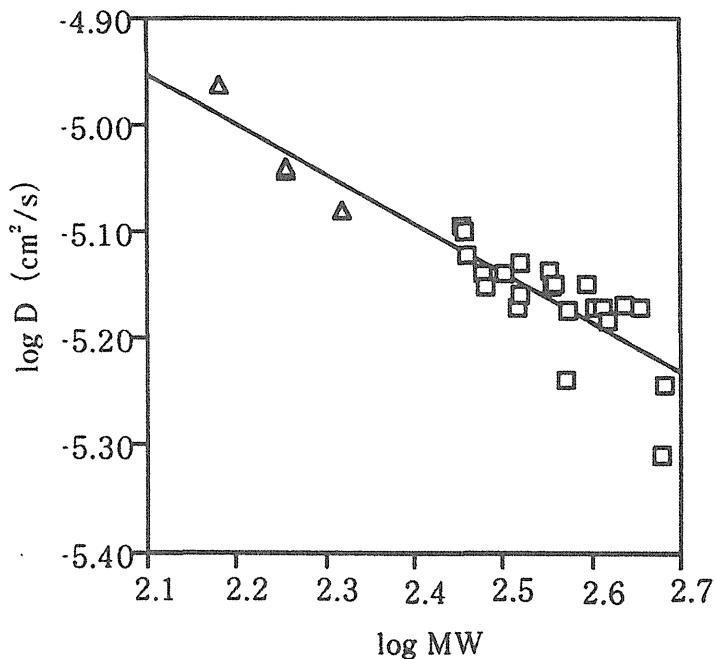


Fig. 3 Relationship between logMW and logD<sub>w</sub>  
△, Parabens; □, Steroids  
Line was obtained by linear regression analysis using all data.  
 $\log D_w = -0.434 \cdot \log MW - 4.059$  ( $R^{2*}=0.693$ )

分子構造上直鎖ものよりも側鎖が枝分かれしたものの拡散係数は大きくなることが報告されている<sup>23)</sup>。本測定結果においても n-プロピルパラベンよりイソプロピルパラベンの拡散係数のほうが大きい値を示した。すなわち分子が球形に近い方が拡散しやすくなると説明されるが、両者の値の違いはわずかであった。Fig. 4 にアルコール類およびアミド類の拡散係数の文献値<sup>16)</sup>と、今回測定したパラベン類およびステロイド類の拡散係数を併せてプロットした。ここでプロットしたアルコール類およびアミド類は、拡散係数の測定方法や測定した分子量の範囲も異なっているのにも関わらず、パラベン類およびステロイド類の測定結果の回帰分析から求めた直線上にプロットされた。

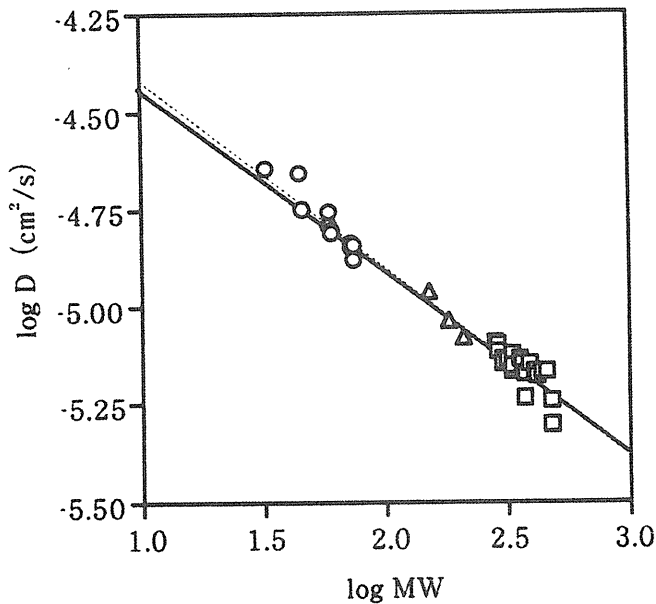


Fig. 4 Relationship between  $\log MW$  and  $\log D_w$   
 ○, Alcohols and Amides; △, Parabens; □, Steroides  
 .....; linear regression analysis for alcohols, amides, parabens, and steroides.  
 $\log D_w = -0.483 \cdot \log MW - 3.935$  ( $r = -0.986$ )  
 —; linear regression analysis for parabens, and steroides.  
 $\log D_w = -0.468 \cdot \log MW - 3.971$  ( $r = -0.897$ )

## 第2節 薬物の拡散係数に影響する要因の検討

薬物の拡散性は、その薬物自身および媒体の物理化学的性質、およびそれに関係する相互作用に影響を受けることが予想される。そこで、薬物の拡散係数に影響を及ぼす要因に関する情報を得る目的で、基礎的な検討を行った。すなわち、パラベン類およびステロイド類の拡散係数に影響を及ぼす要因として、薬物の脂溶性、解離状態、分子構造などの影響について検討を行った。

### 1.2.1 パラベン類及びステロイド類の水中における拡散係数と脂溶性との関係<sup>30)</sup>

Stokes-Einstein の式(式(2))で表されるように薬物は拡散する媒体の粘度の違いにより、その拡散係数の値は異なるが、薬物の拡散係数は媒体との相互作用によっても影響を受けることが予想される。そこで、薬物と溶媒の相互作用に影響するパラメータに着目して検討を行った。そのパラメータとしては、リポフィリックインデックス ( $LI$ )<sup>31)</sup>、分配係数および水との相互作用に関わる水素結合能 ( $HI$ )<sup>32)</sup>を測定した。そして、水中でのパラベン類およびステロイド類の拡散係数とこれらのパラメータとの関係を評価した。各パラメータの値を Table 5 に示す。

Table 5 Diffusion coefficients ( $D$ ) of parabens and steroids in water at 37°C

	$MW$	$LI^a$	$\log P_{octanal}$	$\log P_{cyclohexane}$	$HI^b$	$Dw^c \pm SD$ (cm/s) $\times 10^6$
Methyl paraben	152.14	1.61	0.914	-1.939	2.85	10.88±0.14
Ethyl paraben	166.17	2.08	1.590	-1.493	3.08	9.80±0.07
n-Propyl paraben	180.20	2.63	2.876	-0.478	3.35	9.06±0.05
n-Butyl paraben	194.23	3.11	3.428	0.301	3.13	7.04±0.03
Androsta-1,4-diene-3,17-dione	284.40	2.85	1.769	0.410	1.36	8.04±0.06
$\Delta^4$ -Androstene-3,17-dione	286.41	3.11	2.768	1.509	1.26	7.93±0.07
Testosterone	288.43	3.23	2.990	1.135	1.85	7.53±0.06
$\Delta^{9(11)}$ -Methyltestosterone	300.44	3.32	3.291	1.280	2.01	7.24±0.10
Methyltestosterone	302.46	3.46	3.303	1.523	1.78	7.02±0.04
11 $\alpha$ -Hydroxymethyltestosterone	318.46	2.86	1.611	-0.087	1.70	7.25±0.05
16,17-Epoxyprogesterone	328.45	3.57	3.034	1.933	1.10	6.70±0.06
11 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	330.47	3.12	2.459	1.125	1.33	7.40±0.04
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	330.47	3.43	2.929	1.548	1.38	6.88±0.08
Prednisone	358.43	2.50	1.058	-0.688	1.75	7.28±0.05
Hydrocortisone	362.47	2.63	2.333	-0.721	3.05	7.05±0.01
Deoxycorticosterone acetate	372.50	3.81	3.126	2.134	0.99	5.76±0.13
Prednisolone acetate	402.49	3.08	2.550	0.111	2.44	6.72±0.07
Beclomethasone	408.90	3.21	2.515	0.330	2.18	6.70±0.06
Spironolactone	416.58	3.40	2.619	1.638	0.98	6.53±0.06
Triamcinolone acetonide	434.50	3.14	2.477	-0.243	2.72	6.73±0.04
Fluocinolone acetonide	452.50	3.25	2.441	1.253	1.19	6.72±0.05
Betamethasone valerate	476.59	4.42	3.643	2.733	0.91	4.86±0.07

a, Lipophilic Index; b, Hydrogen bond Index =  $\log P_{octanal} - \log P_{cyclohexane}$  ; c, Diffusion coefficient in water (n=11).

薬物の拡散係数と分子量に関して、大きさに関する項  $\log MW$  のみを独

立変数として単回帰分析を行った場合、次式が得られている。

$$\log D_w = -0.434 \cdot \log MW - 4.059 \quad (3)$$

(自由度調整決定係数、 $R^{2*}=0.693$ )

そこで、各パラメータを組み込んで重回帰分析を行った結果、薬物の脂溶性に関する  $\log P_{octanol}$  と  $LI$  において有意な自由度調整決定係数 ( $R^{2*}$ ) の増大が確認された。 $LI$  の項を組み込んだ回帰式 (式 (4)) の  $R^{2*}$  は、 $\log P_{octanol}$  を組み込んだ場合 (式 (5)) の  $R^{2*}$  と比較してもより大きな値を示した。また、式 (4) により得られた予測値は実測値によく一致した (Fig. 5, Fig. 6)。

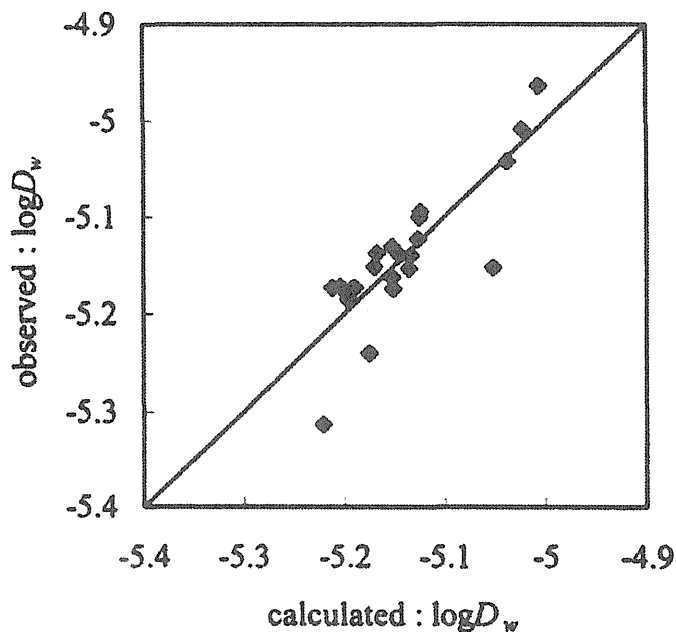


Fig. 5 Relationship between calculated values from equation (3) and observed values of  $\log D_w$

$$\log D_w = -0.215 \cdot \log MW - 0.077 \cdot LI - 4.367 \quad (4)$$

$$(R^{2*} = 0.899)$$

$$\log D_w = -0.374 \cdot \log MW - 0.040 \cdot \log P_{octanol} - 4.109 \quad (5)$$

$$(R^{2*} = 0.846)$$

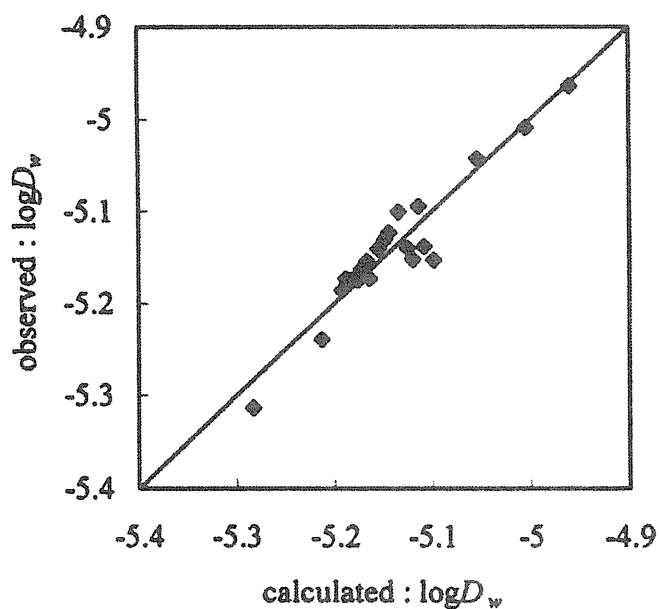


Fig. 6 Relationship between calculated values from equation (4) and observed values of  $\log D_w$

さらに  $LI$  と  $\log P_{octanol}$  の回帰係数は、それぞれ  $-0.077$  および  $-0.040$  であり、この負の値は水中において脂溶性薬物の拡散がわずかに抑制

されたことを示している。これは薬物分子の疎水性表面を氷様構造が取り囲む（疎水性水和）ことに関係すると思われた。

### 1.2.2 薬物の拡散係数に及ぼす解離状態の影響

一般に経口投与された薬物の多くは小腸上皮細胞膜を受動拡散により透過して吸収されるので、脂溶性の大きい薬物ほど吸収されやすい。また、弱電解質である薬物の吸収は pH 分配仮説に従う。すなわち分子形が吸収されやすくイオン形は吸収されにくい。しかしながら、小腸粘膜には水性細孔経路（aqueous pore pathway）である細胞間隙ルートが存在しイオン形および非イオン形薬物、さらに水溶性の薬物等がこのルートを透過すると考えられている。特に細胞間隙ルートにおける薬物の解離状態はその拡散性に影響を及ぼすと考えられる。また aqueous pore pathway を満たす媒体、すなわち溶媒としての水はその中に溶けている物質によって性質が変化し、イオンや中性の親水性物質、疎水性物質の存在によりその周りの水の状態は異なる。式 (4) および (5) に示すように薬物分子近傍の疎水性水和の影響もそのひとつである。したがって溶媒中のイオンの存在や薬物自身の解離の状態でも周りの水あるいは水和の状態が変わり<sup>33)</sup>拡散係数が変化すると予想される。生体には種々のイオンが存在し、そのイオン強度は血清で 0.153 と比較的高い。また pH が部位により広い範囲の値を示す。

そこで薬物の拡散係数に及ぼす解離状態の影響を評価するために、pH 5.0 において分子形、pH 12.0 においてイオン形で存在するメチルパラベン (pKa;8.3) と、pH 3.0 においてカチオンと両性イオン、pH 5.0 において両性イオン、pH 7.0 において両性イオンとアニオン、pH 9.0 においてアニオンで存在するセファレキシム (pKa;3.6, 7.1)<sup>34)</sup>を用いて濃度 20  $\mu$ g/mL、37°Cにて評価を行った。

その結果を Fig. 7 に示す。pH 5.0 で分子形、pH 11.7 でイオン形のメチルパラベンを比較したところ、解離により約 10%の拡散係数の有意な減少が観察された。一方、両性電解質であるセファレキシムの拡散係数は測定した pH により変化した。すなわち、両性イオンで存在す



る pH 5.0 において拡散係数は最も低くなり、アニオンで存在する pH 9.0 で最も高い値を示した。さらに両性イオンとアニオンが共存する pH 7.0 およびカチオンと両性イオンが共存する pH 3.0 における拡散係数は pH 5.0 および pH 9.0 のその中間の値であった。これらの結果から、拡散係数の値は分子全体として中性か否かより変化するのではなく、分子のもつ電荷の数に依存して減少しているものと思われる。薬物の解離もしくはイオン化による拡散係数の変化とそのメカニズムについては、これまで完全には明らかになっていない。ジカルボン酸の完全なイオン化により約 5% の有意な拡散係数の減少がみられるが、モノカルボン酸ではその減少は有意ではなく、その理由としてジカルボン酸のイオン化による分子のコンホメーション変化を指摘している報告<sup>7,35)</sup>がある。本測定法では再現性が良いため、一価のイオンでの拡散係数の減少が観察された。両性電解質であるセファレキシンでは、各 pH における拡散係数の変化が示され、両性イオンとして存在する pH 5.0 において拡散係数は最も小さな値を示した。したがって解離による拡散係数の減少は分子のコンホメーションの変化というよりはむしろ、水和により薬物イオンの周りの溶媒が固定されたことによるものと考えられる。

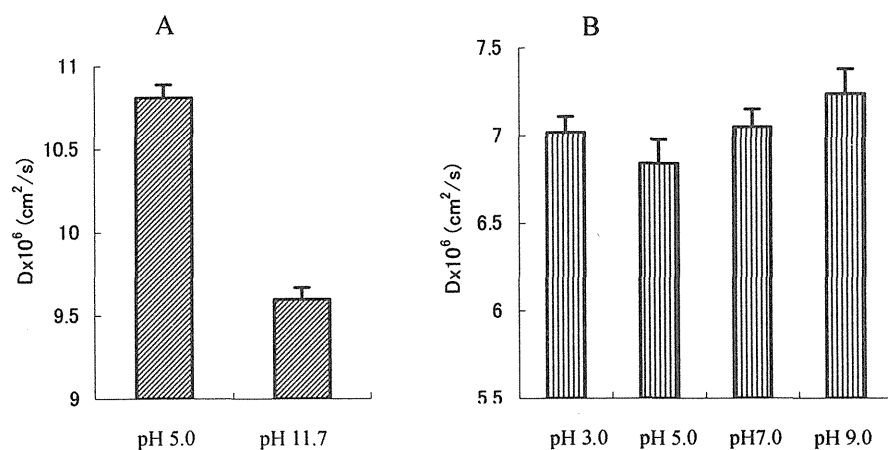


Fig. 7 Effects of pH on  $D$  of methylparaben (A) and cefalexin (B) in aqueous solutions at 37°C

Each determination of  $D$  was replicated 11 times and the mean values  $\pm$  SD are shown. Significant differences ( $p < 0.01$ ) were observed in each comparison except pH 3.0 vs pH 7.0 in (B).

### 1.2.3 オクタノール中におけるパラベン類及びステロイド類の拡散係数に影響する要因

水中における薬物の拡散係数の低下は疎水基周辺の氷様構造の増加によることが示唆された。そこで、次にモデル脂質として広く用いられている 1-オクタノール中においても同様の検討を行った。各パラメータの値を Table 6 に示す。

重回帰分析を行った結果、脂溶性に関係する  $LI$ 、 $\log P_{octanol}$  および水との相互作用に関わる  $HI$  の場合において回帰係数として有意であり、 $LI$  および  $\log P_{octanol}$  の回帰係数は正の値を示した。回帰係数はそれぞれ 0.072 および 0.027 であった。これは 1-オクタノール中において親水性薬物の拡散が抑制されたことを示している。しかしながら、 $R^{2*}$  の増加

は双方とも小さく、 $LI$ および $\log P_{octanol}$ は1-オクタノール中の薬物の拡散係数値を予測するためのパラメータとしては不十分であった。一方、 $HI$ の回帰係数は、 $-0.074$ と負の値を示し、これにより薬物分子と1-オクタノール間の水素結合<sup>36-38</sup>)によって1-オクタノール中の拡散が抑制されることが示唆された。疎水性環境において、薬物の極性基と溶媒の極性基との間の相互作用が増加すると考えられた。大きさに関係する項 $\log MW$ のみを独立変数として得られた回帰式(6)と比較して、水素結合能を表す $HI$ の項を組み込んだ回帰式(9)によって得られた予測値は実測値によく一致し(Fig. 8, 9)、 $R^{2*}$ の値は0.723となり他のパラメータを用いたもののなかで最大値を示した。

$$\log D_o = -0.435 \cdot \log MW - 4.861 \quad (6)$$

$$(R^{2*} = 0.442)$$

$$\log D_o = -0.640 \cdot \log MW + 0.072 \cdot LI - 4.573 \quad (7)$$

$$(R^{2*} = 0.541)$$

$$\log D_o = -0.476 \cdot \log MW + 0.027 \cdot \log P_{octanol} - 4.828 \quad (8)$$

$$(R^{2*} = 0.463)$$

$$\log D_o = -0.690 \cdot \log MW - 0.074 \cdot LI - 4.085 \quad (9)$$

$$(R^{2*} = 0.723)$$

Table 6 Diffusion coefficients (*D*) of parabens and steroids in 1-octanol at 37°C

	<i>MW</i>	<i>LI</i> <sup>a</sup>	$\log P_{\text{octanol}}$	$\log P_{\text{cyclohexane}}$	<i>HI</i> <sup>b</sup>	<i>D</i> <sup>c</sup> ± <i>SD</i> (cm/s) × 10 <sup>6</sup>
Methyl paraben	152.14	1.61	0.914	-1.939	2.85	1.46±0.01
Ethyl paraben	166.17	2.08	1.590	-1.493	3.08	1.41±0.01
n-Propyl paraben	180.20	2.63	2.876	-0.478	3.35	1.36±0.01
n-Butyl paraben	194.23	3.11	3.428	0.301	3.13	1.32±0.01
Androsta-1,4-diene-3,17-dione	284.40	2.85	1.769	0.410	1.36	1.45±0.01
Δ <sup>4</sup> -Androstene-3,17-dione	286.41	3.11	2.768	1.509	1.26	1.55±0.02
Testosterone	288.43	3.23	2.990	1.135	1.85	1.15±0.01
Δ <sup>9(11)</sup> -Methyltestosterone	300.44	3.32	3.291	1.280	2.01	1.15±0.02
Methyltestosterone	302.46	3.46	3.303	1.523	1.78	1.14±0.02
11α-Hydroxymethyltestosterone	318.46	2.86	1.611	-0.087	1.70	0.895±0.004
16,17-Epoxyprogesterone	328.45	3.57	3.034	1.933	1.10	1.53±0.01
11α-Hydroxyprogesterone	330.47	3.12	2.459	1.125	1.33	1.11±0.01
17α-Hydroxyprogesterone	330.47	3.43	2.929	1.548	1.38	1.12±0.01
Prednisone	358.43	2.50	1.058	-0.688	1.75	0.982±0.010
Hydrocortisone	362.47	2.63	2.333	-0.721	3.05	0.876±0.004
Deoxycorticosterone acetate	372.50	3.81	3.126	2.134	0.99	1.33±0.02
Prednisolone acetate	402.49	3.08	2.550	0.111	2.44	0.876±0.004
Beclomethasone	408.90	3.21	2.515	0.330	2.18	0.830±0.003
Spirolactone	416.58	3.40	2.619	1.638	0.98	1.13±0.02
Triamcinolone acetonide	434.50	3.14	2.477	-0.243	2.72	0.906±0.005
Fluocinolone acetonide	452.50	3.25	2.441	1.253	1.19	0.914±0.010
Betamethasone valerate	476.59	4.42	3.643	2.733	0.91	0.926±0.020

a, Lipophilic Index; b, Hydrogen bond Index =  $\log P_{\text{octanol}} - \log P_{\text{cyclohexane}}$ ; c, Diffusion coefficient in 1-octanol (n=11-16).

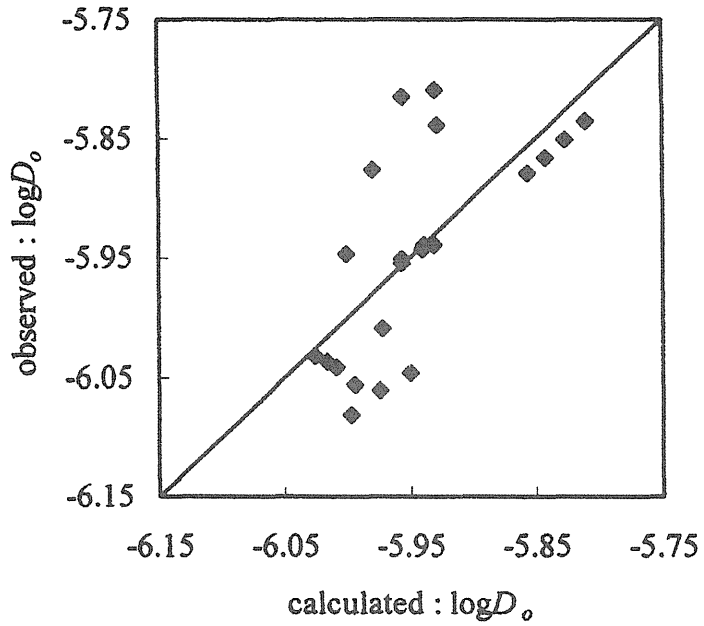


Fig. 8 Relationship between calculated values from equation (6) and observed values of  $\log D_o$

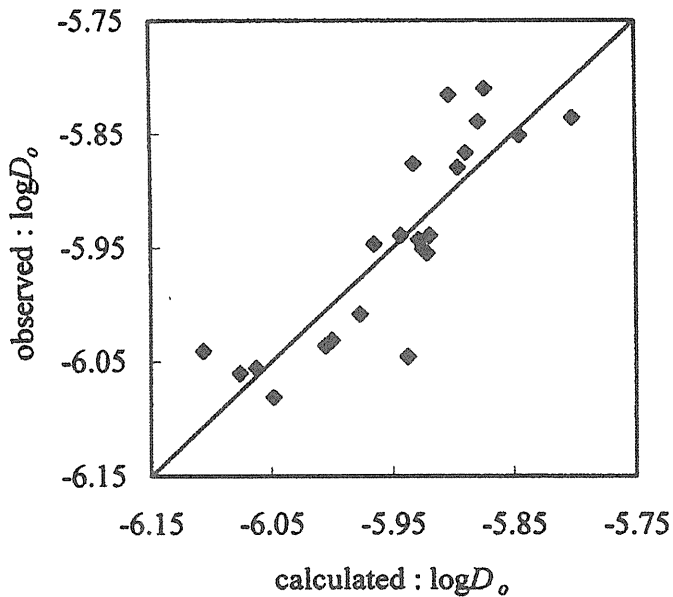


Fig. 9 Relationship between calculated values from equation (9) and observed values of  $\log D_0$ .

#### 1.2.4 水溶性高分子薬物の水中における拡散係数の測定とそれに影響する要因<sup>39)</sup>

分子量は薬物分子の拡散係数を決定する重要なパラメータであり、式 (3) によって分子量から拡散係数を計算することができる。しかしこの式 (3) の関係は、分子量の範囲が 152~477 であり、より高い分子量の薬物、例えばペプチド性薬物などの拡散係数の予測に適用できるかは不明である。そこで、水溶性高分子薬物の拡散係数を測定し、それに影響する要因について検討を加えた。

今回用いた FITC デキストラン (FD) および水溶性高分子薬物の分子量は 1000 以上であり、式 (3) の分子量範囲より大きいものであった。Table 7 にそれぞれの分子量、拡散係数の実測値および予測値を示す。また、インスリンを除く他の薬物の分子量と拡散係数の関係を式

(3) のプロットと共に Fig. 10 に示す。

Table 7 Calculated and observed  $D$  of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextrans (FDs), peptides and poly-lysine (Poly-Lys)

	S-S <sup>a</sup>	$MW$	$D_{cal}^b \times 10^6$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )	$D_{obs} \times 10^6$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )
FD4		4400	2.290	2.39 <sup>c</sup>
FD10		9500	1.639	1.61 <sup>c</sup>
FD40		38260	0.896	1.02 <sup>c</sup>
FD70		50700	0.793	0.891 <sup>c</sup>
<hr/>				
oxytocin	+	1007.2	4.34	4.30 <sup>c</sup>
angiotensin II	—	1046.2	4.27	4.20 <sup>d</sup>
[Lys <sup>8</sup> ]-vasopressin	+	1056.2	4.25	4.18 <sup>c</sup>
[Arg <sup>8</sup> ]-vasopressin	+	1084.2	4.20	4.27 <sup>c</sup>
$\alpha$ -conotoxin [m]	+	1351.6	3.82	4.22 <sup>d</sup>
somatostatin	+	1637.9	3.52	3.74 <sup>d</sup>
cortistatin (rat)	+	1721.0	3.44	3.70 <sup>d</sup>
gastrin I	—	2098.2	3.16	2.94 <sup>c</sup>
endothelin-3	+	2643.1	2.86	3.01 <sup>d</sup>
calcitonin	+	3417.8	2.55	2.76 <sup>d</sup>
$\beta$ -endorphin	—	3465.0	2.54	2.39 <sup>d</sup>
GIP	—	4983.6	2.17	2.22 <sup>d</sup>
Poly-Lys	—	16000	1.31	1.28 <sup>c</sup>
<hr/>				
insulin	+			1.14 <sup>c,e</sup>
nomomer		5807.6	2.03	
hexamer		34845.6	0.933	

<sup>a</sup>S-S bond in the molecule. <sup>b</sup>Calculated  $D$  in water using  $\log D_w = -0.434 \cdot \log MW - 4.059$ .

<sup>c</sup>Determined in buffer (pH 7.4) by CBM. <sup>d</sup>Determined at pH 2.2. <sup>e</sup>Determined by PDM.

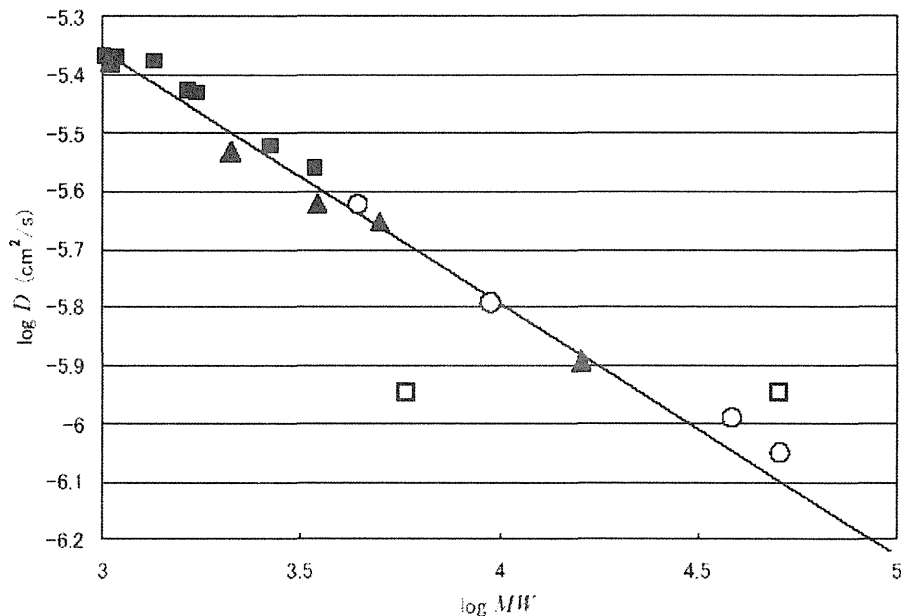


Fig. 10 Relationship between the  $MW$  and  $D$  determined by the CBM of FDs and peptides.

○, FDs; ▲, peptides without an S-S bond; ■, peptides with an S-S bond; □, insulin. Line,  $\log D_w = -0.434 \cdot \log MW - 4.059$  (式(3)). The line was obtained from the relationship between the  $MW$  and  $D$  of parabens and steroids ( $MW$  152-477).

測定の結果、インスリンを除くほとんどのペプチド性薬物における拡散係数の実測値は、分子量の範囲が完全に離れているにもかかわらず、式(3)により得られた予測値に近い値を示した。このことから、水溶性高分子薬物においても分子量は拡散係数を予測するのに有用なパラメータであり、さらにそれらの測定に用いたCBM法は高分子薬物の拡散係数の測定にも適切な方法であることが示唆された。また、



インスリンの場合、拡散係数の実測値はインスリンの単量体より計算された値に比べ低い値となった。インスリンは pH が中性の溶液中では二量体あるいは六量体で存在することが知られている<sup>40)</sup>。インスリンの拡散係数の実測値はその六量体から得られた予測値より大きい値を示したので、おそらくインスリンは単量体、二量体または六量体の平衡状態を保ちながら存在すると思われた。

本実験に用いたペプチド性薬物の内 5 つは直鎖上の構造を有し、その他は分子内にジスルフィド結合 (S-S 結合) を有している。このことはペプチド性薬物の水力学的な分子サイズおよび拡散性に影響を与えると考えられた。Fig. 11 にはインスリンを除くペプチド性薬物の拡散係数における実測値と予測値のずれを S-S 結合の有無により比較した。S-S 結合を有するペプチド性薬物の  $\Delta D$  値 (=calculated  $D$  - observed  $D$ ) は有意に ( $P < 0.05$ ) 直鎖上のそれに比べて低い値を示した。これは水力学的分子サイズが減少したことによるのかもしれない。

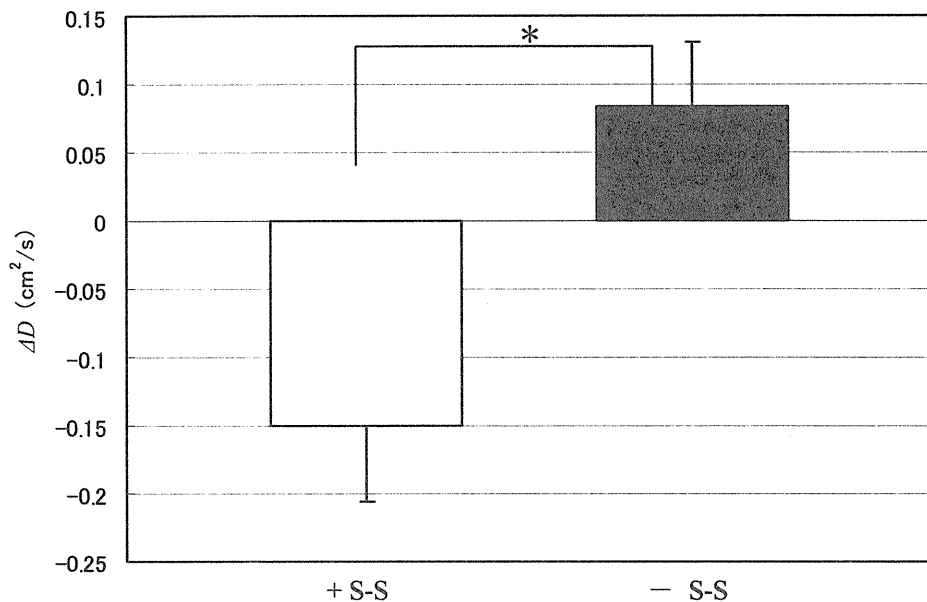


Fig. 11 Difference in  $D$  ( $\Delta D$ ) between the calculated and observed  $D$  values.  
 $\Delta D = \text{calculated } D - \text{observed } D$ .  
 + S-S, peptides with an S-S bond; - S-S, peptides without an S-S bond.  
 \*,  $P < 0.05$

### 第3節 小括

本章では薬物の拡散係数に及ぼす要因を明らかにするために種々検討を行った。多くの研究において、薬物の移行過程を拡散モデルとして表し、そのパラメータとして当てはめ計算により拡散係数を求める方法が行われている。しかし、この方法では、得られた拡散係数がモデル依存的であり、種々要因により拡散係数がどのように影響を受け

ているか詳細を検討するためには問題も多い。そこで本研究では、*in vitro* で拡散係数を直接測定し、薬物の拡散性に影響を及ぼす要因に関する基礎的検討を行った。拡散係数を求める方法としては、PDM が、理論的に、また実験手技的に簡単であり、その点で優れているが、高濃度の薬物溶液を比較的多量に用いることが必要な点で問題もある。そこで本研究では、HPLC装置を用いたCBMを主に用いることにした。そして、CBMを用いることができなかったインスリンに関してのみPDMを用いた。

まず、測定溶媒として水を選択し、パラベン類の拡散係数測定におけるCBM法の妥当性の検証を行った。その結果、測定した濃度範囲においてメチルパラベンの拡散係数には濃度依存性はないことが示された。17°Cから42°Cの温度範囲において、温度の上昇に伴いメチルパラベンおよびn-アミルパラベンの拡散係数は増加し、この両薬物の拡散係数の温度依存性は、それぞれの分子の大きさと水の粘度の温度依存性により説明できた。また、Stokes-Einsteinの式に基づき拡散係数から計算した分子容は他の方法で得られる値とよく一致した。

そこで、パラベン類にステロイド類を加え、薬物拡散係数と分子量の関係を評価した。分子量の対数値と拡散係数の対数値が直線関係にあることは、既に知られており、本測定においても有意な直線式が示された。しかしながら、この回帰式による分子量からの拡散係数の予測は必ずしも満足なものではなかった。これは、薬物の拡散係数が媒体との相互作用によっても影響を受けたことによると考えられた。そこでさらに、薬物と溶媒の相互作用に関連するパラメータに着目して検討を行った。そのパラメータとしてリポフィリックインデックス (*LI*)、オクタノール-水分配係数および水素結合能 (*HI*) を選択し、水中でのパラベン類およびステロイド類の拡散係数とこれらのパラメータとの関係を重回帰分析によって評価した。その結果、*LI* および分配係数を式に加えた場合において決定係数の有意な改善が認められた。*LI* の回帰係数は負の値を示し、このことから水中において脂溶性薬物の拡散がわずかに抑制されることが示された。これは薬物分子の疎水

性表面を氷様構造が取り囲む（疎水性水和）ことに関係すると思われる。さらに拡散係数に及ぼす解離状態の影響を評価した結果、その分子のもつ電荷の数に依存して拡散係数が減少することが示された。

パラベン類及びステロイド類の拡散係数について、1-オクタノール中においても検討した結果、分子量と水素結合能である *HI* をパラメータとする重回帰式が得られた。*HI* の回帰係数は負の値を示し、薬物分子と 1-オクタノール間の水素結合により拡散が抑制されることが示唆された。

さらに水溶性高分子薬物の水中における拡散係数についても測定を行った。先にパラベン類とステロイド類で求めた分子量と拡散係数の関係に結果をプロットしたところ、分子量 50000 の FD までその直線上にプロットされ、分子量の対数値と拡散係数の対数値の直線関係が広範囲に成立することが示された。各ペプチド性薬物のその直線からのずれとジスルフィド結合の有無とに関係が認められたが、用いた化合物でインスリンのみが分子量から予測されるより極度に低い拡散係数を示した。これは、インスリンが 6 量体などの会合体を生成することによると考えられる。

## 第 2 章 相互作用による薬物の拡散性の変化とそれ に起因する薬物体内動態への影響に関する 検討

生体内に投与された薬物の拡散性は、それが存在する部位の環境により様々な影響を受けることが予想される。すなわち、各部位の空間的構造、媒体の粘度、pH、極性などが、その影響要因として考えられ、また、血液中であればアルブミンに代表される血漿タンパク質との相互作用が、粘液中であればそこに多く存在する多糖類、電解質、酵素などとの相互作用が、多くの薬物のそこでの移動挙動に対して影響を与えると考えられる。そこで本章では、体内局所における薬物の動態と拡散性との関係について相互作用に着目し検討を行った。

### 第 1 節 薬物の拡散係数に及ぼす高分子電解質の影響に関する検討

酸性ムコ多糖は、結合組織に広く分布しており、その代表的なものであるコンドロイチン硫酸はじん帯のほか、腱、心臓弁、角膜、軟骨<sup>41)</sup>、骨、皮膚、軟骨肉腫、脊索腫などに含まれている<sup>42)</sup>。この他に、髄核<sup>43)</sup>、動脈管<sup>44)</sup>、鞏膜<sup>45)</sup> などからも見出されている。また、病的状態ではムコ多糖全量が著しく増加するという報告がある<sup>46)</sup>。したがって、コンドロイチン硫酸のような酸性ムコ多糖の存在が種々薬物の移動過程にどのような影響を及ぼすかについては大変興味を持たれる。そこで、薬物の拡散係数に及ぼすコンドロイチン硫酸共存の影響を *in vitro* で評価した。

#### 2.1.1 薬物の拡散係数に及ぼすコンドロイチン硫酸共存の影響<sup>47)</sup>

硫酸化ムコ多糖（グリコサミノグリカン）であるコンドロイチン硫

酸には硫酸エステル位置あるいは構成ウロン酸の異なる A、B、C の 3 種類がある。本研究では分子量 4 万～8 万のコンドロイチン硫酸-C のナトリウム塩を用いた。コンドロイチン硫酸-C は通常二糖単位当たり O-硫酸を 1mol 含み、硫酸基が N-アセチル-D-ガラクトサミンの 6 位に結合しているコンドロイチン-6-硫酸である (Fig. 12)。

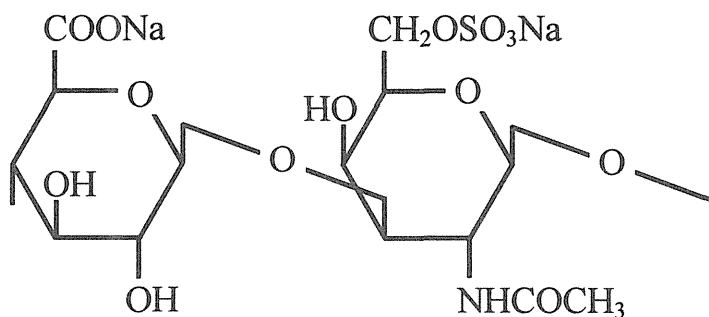


Fig. 12 Chemical structure of chondroitin 6-sulfate sodium salt

コンドロイチン硫酸-Cは他のムコ多糖と共に結合組織に広く分布している。結合組織全体に病変をもった膠原病の一種とも考えられる慢性関節リウマチや他の関節炎の治療に際して、長期連用の可能な非ステロイド性消炎剤および鎮痛剤がよく使用されているが、薬物の作用部位への移行過程についてはあまりよく分かっていない<sup>42)</sup>。コンドロイチン硫酸がポリアニオンという点から薬物の解離状態によりその過程への影響が異なることも予想できる。これらのことから薬物の拡散係数に及ぼすコンドロイチン硫酸の影響を評価することは意義深いと思われる。本検討に用いた薬物を Table 8 に示す。それぞれの薬物の拡散係数は CBM によって測定した。その結果を Table 9 に示す。

Table 8 Physicochemical properties of drugs used

	MW	pKa	Charge at pH5.0
Methylparaben (MP)	152.2	8.3	—
Cefalexin (CEX)	347.4	3.6, 7.1	Zwitterion
Morphine (MOR)	285.3	7.9, 9.9	Cation
Isoproterenol (IP)	211.3	8.6, 10.1, 12.0	Cation
Flurbiprofen (FP)	244.3	3.8	Anion
Salicylic acid (SA)	138.1	3.0	Anion

Table 9 Effects of Chondroitin Sulfate on *D* of Drugs at 37°C

		$D \text{ (cm}^2/\text{s)} \times 10^6$	$SD \times 10^6$	
MP	pH 5.0	10.81	0.08	
	with 1% ChS	10.14	0.22	
	with 1% ChS + 125mM NaCl	10.18	0.11	
CEX	pH 5.0	6.84	0.14	
	with 1% ChS	6.46	0.09	
	with 1% ChS + 125mM NaCl	6.42	0.07	
MOR	pH 5.0	7.98	0.15	
	with 1% ChS	5.96	0.34	
	with 1% ChS + 125mM NaCl	7.51	0.29	
IP	pH 5.0	7.49	0.08	
	with 1% ChS	5.91	0.17	
	with 1% ChS + 125mM NaCl	7.15	0.23	
	with 2% ChS	5.64	0.23	
	with 2% ChS + 125mM NaCl	6.72	0.19	
FP	pH 5.0	7.99	0.06	
	with 1% ChS	7.32	0.06	
	with 1% ChS + 125mM NaCl	7.57	0.12	
SA	pH 5.0	11.66	0.06	
	with 1% ChS	10.88	0.25	
	with 1% ChS + 125mM NaCl	11.15	0.14	

a) significant difference ( $p < 0.01$ ), b) significant difference between each group ( $p < 0.05$ ).



pH 5.0 において分子形で存在するメチルパラベンの場合、1%のコンドロイチン硫酸共存下で溶液の巨視的粘度は 83%増加したのにもかかわらず、拡散係数の値はわずか6%の減少にとどまった。これは薬物の拡散性はその近傍に存在する水の粘度、すなわち微視的粘度の影響を受けることによると思われる。また pH 5.0 においてカチオンで存在するモルヒネ (MOR) およびイソプロテレノール (IP) の場合、1%のコンドロイチン硫酸共存下における拡散係数は、それぞれ 25%および 21%減少した。MOR および IP の拡散係数の減少の程度は、両性イオンのセファレキシム (5%減少)、アニオンのフルルビプロフェン (FP) (8%減少) およびサリチル酸 (6%減少) のそれに比べて、明らかに大きかった。また IP の拡散係数の減少はコンドロイチン硫酸を 2%とすることで 25%となり、1%添加時に比べその影響がわずかではあるが高く観察された。コンドロイチン硫酸と薬物の相互作用を評価するために、塩化ナトリウム (125mM) 添加の影響を検討した。溶液中の塩濃度の増加により、溶媒のイオン強度が増加し、イオン間相互作用に影響すると考えられる。メチルパラベンの拡散係数は塩化ナトリウムの添加による影響をほとんど受けなかったが、MOR および IP の場合、塩化ナトリウムの添加によりコンドロイチン硫酸無添加時の拡散係数に近いレベルまで増加し、拡散係数に対するコンドロイチン硫酸の影響は塩化ナトリウムの添加により減弱した。これらの結果からコンドロイチン硫酸添加による MOR および IP の拡散係数の減少は、ポリアニオンであるコンドロイチン硫酸とカチオン性薬物とのイオン間相互作用によるものと思われる。また塩化ナトリウム添加によるコンドロイチン硫酸共存による効果の減弱は pH5.0 でアニオンの FP およびサリチル酸においても観察された。これは陰イオン同士の反発が、拡散係数に対するコンドロイチン硫酸添加の影響に寄与しており、それが塩の存在により変化したと考えることもできる。

## 第 2 節 フルルビプロフェンの皮膚内動態へのウシ血清アルブミン (BSA) との相互作用の影響に関する検討

多くの薬物は、血漿中や組織中においてタンパク質などの生体成分と結合した状態で存在している。この相互作用、いわゆるタンパク結合はその薬物の体内動態に大きな影響を与える。この薬物の体内動態に及ぼすタンパク結合の影響についてはこれまで多くの研究が成されている。しかし、そのほとんどはこの相互作用の平衡論的な影響について検討したものであり、動的現象に着目した研究は少ない。分子量数百程度の薬物分子が分子量数万のタンパク質分子に結合すれば、当然その運動性が変化し、移動課程にも影響を及ぼすと予想できる。

そこで本節では、薬物を皮膚に適用した後の皮膚内薬物動態へのタンパク結合の影響を、血清アルブミンと高い結合性を有することが知られている非ステロイド系抗炎症薬である FP をモデルとして用い検討を行った。また、実験系としてはウサギ摘出耳介灌流実験を用いた。皮膚組織の血管内の灌流実験は局所組織への薬物吸収の定量的な評価においても大変有用である。薬物の経皮吸収性の評価に、単離ブタ皮膚フラップ<sup>48-50)</sup>、摘出ブタ耳介<sup>51)</sup>、単離ウシ乳房<sup>52,53)</sup>、摘出ラット後肢<sup>54)</sup>あるいは摘出ウサギ耳介<sup>55,56)</sup>等を用いた灌流実験の例が既に報告されている。

### 2.2.1 BSA との相互作用のフルルビプロフェンの拡散係数への影響

血液中のタンパク質として重要な役割を果たしている血清アルブミンは、種々の生体成分や薬物と結合しやすく、薬物の体内動態に影響を及ぼす<sup>57)</sup>。そこでアルブミンとしてウシ血清アルブミン (BSA) を用い、FP の拡散係数の変化を 37°C において評価した。実験には限外ろ過法で求めた pH 7.4, 0.2%BSA 存在下、FP のタンパク結合率は 80%であった。比較を目的として、タンパク結合性が低い IP も検討に用いた。

FPの拡散係数は0.2%BSAの共存下で約1/8まで減少した(Fig. 13)。一方、IPの場合、0.2%BSAの添加による拡散係数の減少はわずかであった(Fig. 14)。そこで、pH 7.4, 0.2%BSA存在下でのFPの拡散係数の減少が、タンパク結合によるものなのかを明らかにする目的で、タンパク結合置換の効果を検討した。限外ろ過法で求めたpH 7.4, 0.2%BSA存在下のFPのタンパク結合率80%は、FPの10倍の濃度のケトプロフェンを共存させた場合、28%まで減少した。そこで、10倍の濃度のケトプロフェンを共存させた条件における拡散係数の測定を行った。その結果、200  $\mu$ g/mLのケトプロフェンを媒体中に添加することにより0.2%BSAのみの場合と比較して拡散係数は増加した。また、pH 7.4におけるBSA自身の拡散係数を別に測定したところ、pH 7.4, 0.2%BSA存在下のFPの拡散係数と同等の値を示した(Fig. 15)。以上のことから、pH 7.4, 0.2%BSA存在下におけるFPの拡散係数の減少はBSAとのタンパク結合によるものであるのは明らかである。

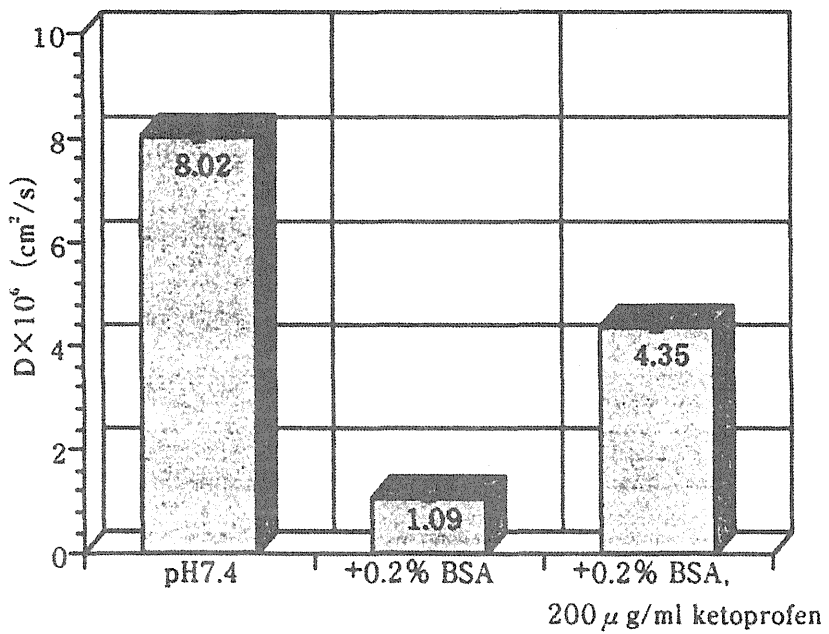


Fig. 13 Effect of BSA on diffusion coefficient of FP at pH 7.4  
Data represent the mean  $\pm$  SD (n=11)

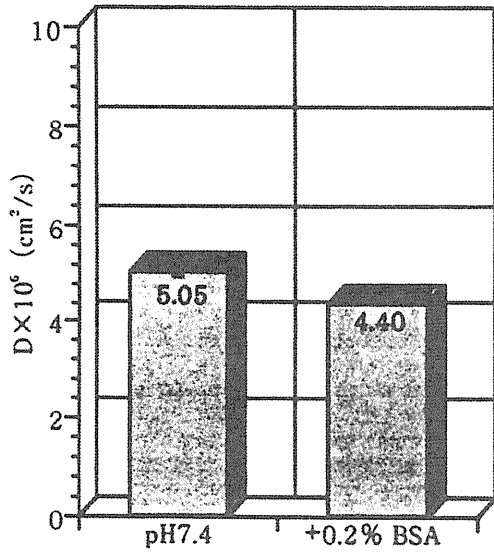


Fig. 14 Effect of BSA on diffusion coefficient of IP at pH 7.4  
Data represent the mean  $\pm$  SD (n=11)

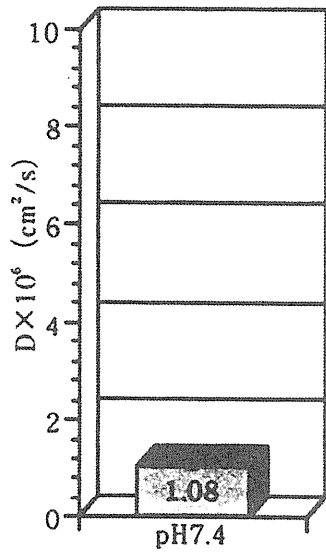


Fig. 15 Diffusion coefficient of BSA at pH 7.4  
Data represent the mean  $\pm$  SD (n=11)

### 2.2.2 ウサギ摘出耳介灌流実験系を用いたフルルビプロフェンの皮膚内動態に関する考察<sup>58)</sup>

FP は BSA 共存下でタンパク結合によりその拡散係数が減少することが明らかとなった。このことから、この薬物を投与した後の分布過程において、組織の状態の違いにより生じるアルブミンの挙動の変化に、その速度的過程が影響を受けると予想される。そこでウサギ摘出耳介を用いて FP を経皮的に投与したときの皮膚内挙動を灌流実験により評価した。Fig.16 にウサギ摘出耳介灌流実験の概略図を示す。

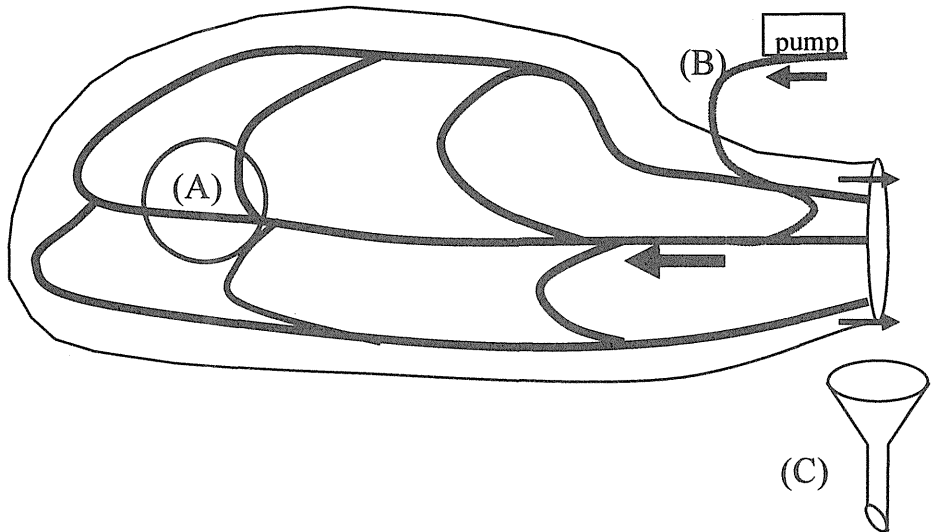


Fig. 16 Schematic diagram of rabbit ear flap for the experiments. (A) is the site for sampling in the perfusion experiments and for FP application in the skin absorption experiments. Tyrode solution was perfused at 1 mL/min via a polyethylene (B) cannula inserted into the central artery. All perfused solutions were collected using a funnel (C).

皮膚適用後の吸収過程における FP の分布状態を評価するために、

1%FP ゲル 1g を灌流開始 1 時間後に皮膚表面に適用した<sup>59)</sup>。灌流液は製剤適用後 15 分毎に 2 時間採取し、ゲル適用および非適用部位の FP 含有量を灌流終了後測定した。さらに、炎症のケミカルメディエーターであるブラジキニン(BK, Fig.17)を用いてその影響を検討した。BK は血漿キニンのひとつであり強力な血管作動性物質として生理的あるいは病的状態において生成遊離され、局所循環調節に重要な役割を果たしている<sup>60, 61)</sup>。その薬理作用は細動脈拡張による血流の増加、全身血圧降下、細動脈からの血漿タンパクの漏出等が挙げられる。この実験系では、灌流液から組織間液中への BSA の漏出が FP の挙動にどのような影響をもたらすかに興味を持たれる。BK の分布に対する影響を評価するために、灌流液に BK を  $0.1 \mu\text{M}$  含有する Tyrode 液を用いた<sup>62)</sup>。Fig.18 に経皮適用後の灌流液中に回収された FP の累積量を示す。



MW 1060.3

Fig. 17 Amino acid disposition of bradykinin (BK)

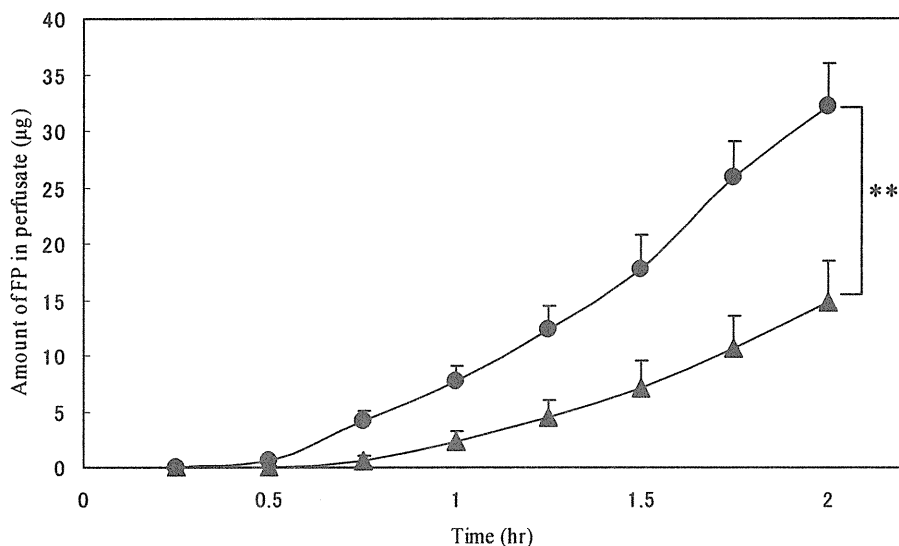


Fig. 18 Effect of BK on the cumulative amount of FP in the perfusate after application of FP gel (1 %) to the skin surface of the rabbit ear flap. Tyrode solution containing BSA (4.7 %), with or without BK (0.1  $\mu$ M), was perfused at 1 mL/min. Closed circles, without BK; closed triangles, with BK. Each data set is the mean  $\pm$  SE (n = 6). \*\*, p < 0.01 in Student's *t*-test.

灌流液に BK を含むとき、2 時間後の FP 累積回収量はコントロールに比べ有意に低い値を示した。また Fig. 19 に灌流液中の FP の分布状態を示す。Tyrode 液への BK の添加および非添加における、FP の総量には有意差は観察されなかった。しかしながら BK の添加により灌流液中の FP の回収量は減少したのに対し、適用部位におけるそれは増加した。BK は血管透過性を上昇させ、BSA の血管外スペースへの漏出を増加させており、適用部位において漏出したこの BSA に吸収過程において FP が結合したことが、適用部位において FP が増加し、FP の灌流液への移行が減少した原因と考えられた。この現象は、従来からの平衡論的な解釈で説明可能である。しかしながら、BK の添加による血



管透過性の増加は灌流耳介の全ての部位において生じているが、非適用部位でのFPの分布の増加は、平衡論から予測されるようには増加しなかった。

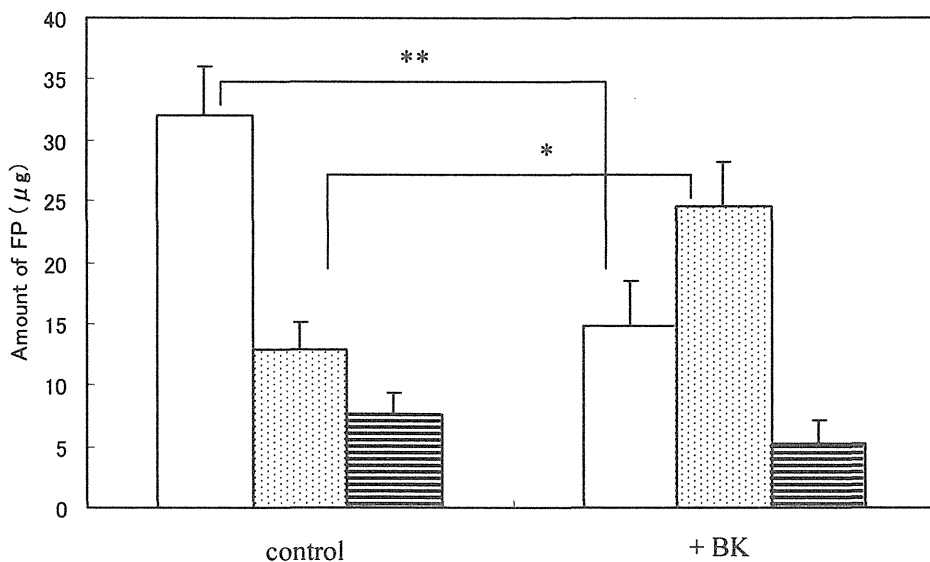


Fig. 19 Effect of BK on the distribution of FP 2 hr after application of FP gel (1 %) to the skin surface of rabbit ear flap. Open bars, in perfusate; dotted bars, in tissue under the application site; striped bars, in the rest of the ear flap tissue. Tyrode solution containing BSA (4.7 %), with or without BK (0.1  $\mu$ M), was perfused at 1 mL/min. Each data set is the mean  $\pm$  SE (n = 6). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01 in Student's *t*-test.

上述の現象をさらに詳細に検討するため、次式により再分布比 (redistribution ratio; *RR*) を算出し比較した。

$$RR = \frac{FP \text{ in rest of ear flap}}{FP \text{ in perfusate} + FP \text{ in rest of ear flap}} \quad (10)$$

$RR$  は適用部位から非適用部位へのダイレクトな拡散は無視できるものと仮定した場合、灌流液から血管外スペースへの薬物の漏出に関するパラメータである。Tyrode 液に BK を含む場合の  $RR$  の値はコントロールのそれより高い値を示したが、両者に有意差はなかった (Fig. 20)。

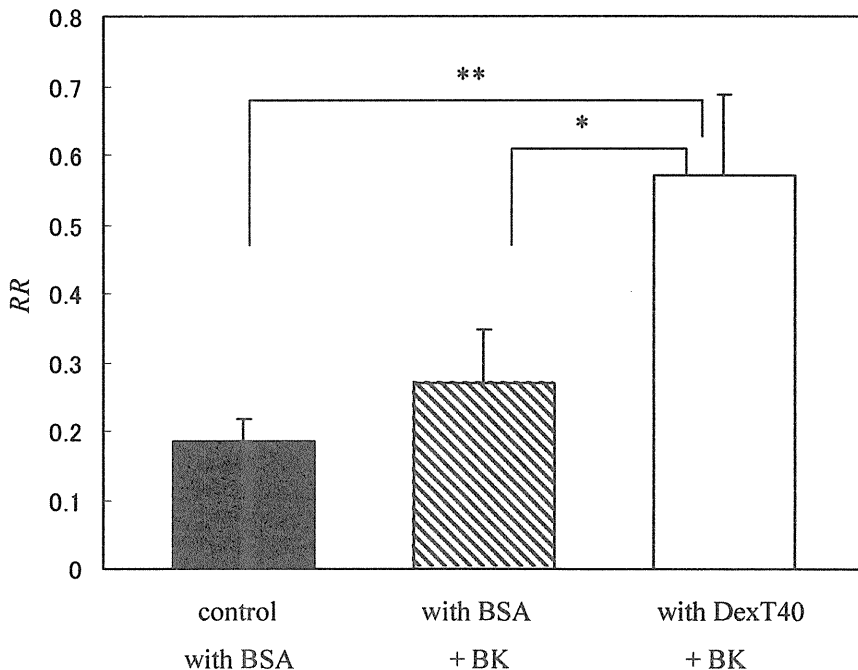


Fig. 20 Effect of BK on the redistribution of FP from perfusate to tissue 2 hr after application of FP gel (1 %) to the skin surface of rabbit ear flap. The ratio of redistribution ( $RR$ ) is defined in the text. Tyrode solution containing BSA (4.7 %), with or without BK (0.1  $\mu$ M) or DexT40 (3.95 %) with BK (0.1  $\mu$ M), was perfused at 1 mL/min. Each data set is the mean  $\pm$  SE ( $n = 4-6$ ). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  in Tukey-Kramer test.

再分布に及ぼすタンパク結合の影響を評価するために BSA と BK の代わりに Tyrode 液にコロイド浸透圧調節因子として薬物との結合を考慮する必要のないデキストラン T40 (DexT40) と BK を添加して検討した。DexT40 を添加した時の RR は BSA のみ、あるいは BSA と BK を含む場合に比べ高い値を示した (Fig. 20)。これは、BK により血管透過性が増加したことによると考えられる。BSA を添加した系では RR が増加しなかった理由は、BSA と結合している FP の拡散性が低く、血管透過性が十分でなかったことによると考えられ、BSA を含む灌流液中において FP は BSA と共に移動していることが示唆された。この結果は、薬物のタンパク結合が平衡論的な要因に関して影響するだけでなく、速度論的な要因に関して影響を及ぼすことを示すものである。

### 第 3 節 水溶性高分子薬物の吸収性に関する拡散性の評価に基づく考察

#### 2.3.1 水溶性高分子薬物の人工膜透過性の拡散係数を利用した予測<sup>63)</sup>

水溶性高分子薬物の生体膜透過は、チャネルや細胞間隙の水路を移動する拡散として捉えることができるので<sup>64-66)</sup>、そこでの拡散性を評価することができれば、膜透過性の予測も可能になると思われる。水が満たされた経路を通る透過に関しては、レンキン式 (式 11) が知られている<sup>67)</sup>。

$$P_i = D_i \cdot \frac{A}{L} \left[ 1 - \left( \frac{r_i}{r_p} \right) \right]^2 \left[ 1 - 2.109 \left( \frac{r_i}{r_p} \right) + 2.09 \left( \frac{r_i}{r_p} \right)^3 - 0.95 \left( \frac{r_i}{r_p} \right)^5 \right] \quad (11)$$

ここで、 $P_i$  は透過物質  $i$  の透過係数 (または吸収クリアランス;  $CL_{ai}$ )、 $D_i$  は透過物質  $i$  の拡散係数、 $r_p$  は透過ルートを円柱と仮定した場合の

ポア半径、また  $A/L$  は膜のポア占有率 (面積) とその長さの比を表す。異なるサイズの二つの透過物質をこの膜に適用した場合、仮に二つの透過物質よりもポアサイズが十分に大きければ、摩擦の影響は低くなり、透過物質の透過性の比は媒体における拡散係数に等しくなる。またもしポアサイズが小さければ、大きな透過物質はポアの壁面の摩擦により透過が制限される。

この式を水溶性高分子薬物の粘膜透過の評価に適用するのに先立ち、人工膜を用いた予備的な検討を行った。人工膜としては、多孔膜としての性質を有するセルロース透析膜 (MW cut off = 15,000) を用いた。膜の特徴づけには  $rp$  および  $A/L$  の二つのパラメータを用いた。

膜のパラメータを決めるために FD10 およびカルボキシフルオレセイン (CF) を両方含む溶液を片側に適用し、それぞれの透過係数の値を測定した。FD10 および CF の多孔膜の透過係数はそれぞれ  $P_{FD10} = 1.31 \times 10^{-6} \pm 0.15 \times 10^{-6}$  (cm/s  $\pm$  SE) および  $P_{CF} = 4.36 \times 10^{-5} \pm 0.14 \times 10^{-5}$  (cm/s  $\pm$  SE) であった。この値の比、すなわち  $P_{FD10}/P_{CF}$  は 0.030 となり、この比は拡散係数の比  $D_{FD10}/D_{CF}$  に (実測値, 0.27; 予測値, 0.25) 比べ低い値であった。FD10 および CF における  $P_i$  の実測値、式 (3) により計算された  $D_i$  の予測値 (FD10, 1.639 cm<sup>2</sup>/s; CF, 6.656 cm<sup>2</sup>/s) および Stokes-Einstein 半径  $r_i$  (Table 10) の値をレンキン式に代入し、膜の特徴づけを行った。 $rp$  および  $A/L$  はそれぞれ  $4.39 \pm 0.16$  (nm)、 $13.3 \pm 0.6$  (cm<sup>-1</sup>) となった。

Table 10 Stokes-Einstein radius ( $r_i$ ) of molecules.

		$r_i$ (nm)
FD10	observed	2.026
CF	observed	0.5558
insulin	observed	2.862
	calculated (monomer)	1.607
	calculated (hexamer)	3.498
poly-Lys	observed	2.549
	calculated	2.495

The values of  $r_i$  were calculated from the observed or calculated  $D$ .

水溶性高分子薬物のモデルとして、インスリンおよびポリリジン (poly-Lys) を用い、レンキン式に基づく透過係数の予測を試みた。水溶性高分子薬物の  $D$  の値は第 1 章に示したように分子量から予測できるので、薬物の多孔膜における透過係数  $P_i$  の値は、先に求めた 2 つのパラメータをレンキン式に代入し、式 (3) と組み合わせることで、分子量の値から予測計算することができる。Fig. 21 に多孔膜における  $P_i$  と分子量に関するシミュレーションカーブを示す。膜のパラメータ、 $rp$  および  $A/L$  はそれぞれ先に示した 4.39 (nm)、13.3 ( $\text{cm}^{-1}$ ) を用いた。実験により求めたインスリンの透過係数 ( $P_{Ins}$ ) および poly-Lys の透過係数 ( $P_{poly-Lys}$ ) の値はそれぞれ  $1.87 \times 10^{-7} \pm 0.26 \times 10^{-7}$  (cm/s) および  $2.24 \times 10^{-7} \pm 0.08 \times 10^{-7}$  (cm/s) であり、それらの値も Fig. 21 にプロットした。 $P_{poly-Lys}$  (MW=16,000) の実測値は、その分子量が FD10 と CF の分子量範囲 (376 から 9,500) から外れているのも関わらず、予測値に近い値を示した。このことから、より分子量の大きい薬物の  $P_i$  値もこのシミュレーションカーブを用いて求めることができることが示され

た。一方、インスリンにおける  $P_{Ins}$  の実測値は、インスリンが単量体として存在すると仮定した場合の予測値より低く、また、インスリンが六量体として存在すると仮定した場合の予測値よりも高かった。これはやはり、インスリンが単量体、二量体、六量体などが平衡状態で存在していることによると考えられた。

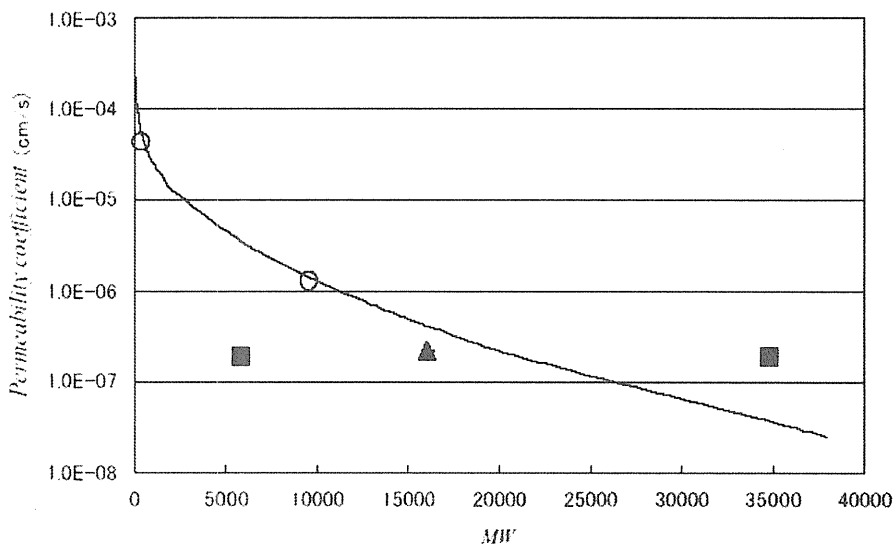


Fig. 21 Relationship between the MW and permeability coefficient through a porous membrane.

○, CF and FD10; ▲, poly-Lys; ■, insulin monomer and hexamer. The line is a simulation curve based on  $\log D = -0.434 \cdot \log MW - 4.059$  (式(3)) and Renkin equation. The  $P_i$  values of FD10 ( $P_{FD10}$ ) and CF ( $P_{CF}$ ) were used for the calculation of  $rp$  and  $A/L$  in the Renkin equation. The values of  $rp$  and  $A/L$  of the membrane are 4.39 nm and 13.3  $\text{cm}^{-1}$ , respectively.

Fig. 22 は、レンキン式に基づき作成した  $D_i$  に対する  $P_i$  の関係のシミュレーションカーブである。また Fig. 23 は、 $r_i$  と  $P_i$  の関係に関するシミュレーションカーブである。 $P_{Ins}$  の実測値は、インスリンの  $D$  の実測値に対して (Fig. 22)、および  $D$  の実測値から得られたインスリンの Stokes-Einstein 半径に対しても (Fig. 23)、それぞれプロットした。両方のグラフにおいて  $P_{Ins}$  の実測値は、曲線の近いところにプロットされた (Fig. 22, Fig. 23)。ペプチドおよびタンパク質は特殊なコンホメーションを生じたり、分子間相互作用をすることがあるので、そのような場合 *in vitro* における直接的な  $D$  の測定が多孔膜の透過性を予測するのに必要であると思われる。

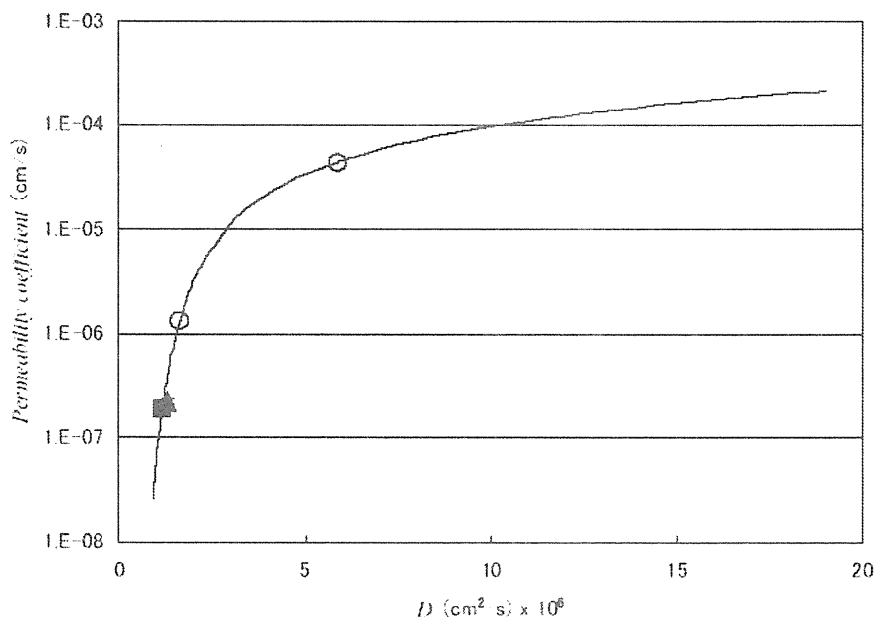


Fig. 22 Relationship between the observed  $D$  and the permeability coefficient through a porous membrane.

○, CF and FD10; ▲, poly-Lys; ■, insulin. The line is a simulation curve based on the Renkin equation. The  $P_i$  values of FD10 ( $P_{FD10}$ ) and CF ( $P_{CF}$ ) were used for the calculation of  $r_p$  and  $A/L$  in the Renkin equation. The values of  $r_p$  and  $A/L$  of the membrane are 4.39 nm and 13.3  $\text{cm}^{-1}$ , respectively.

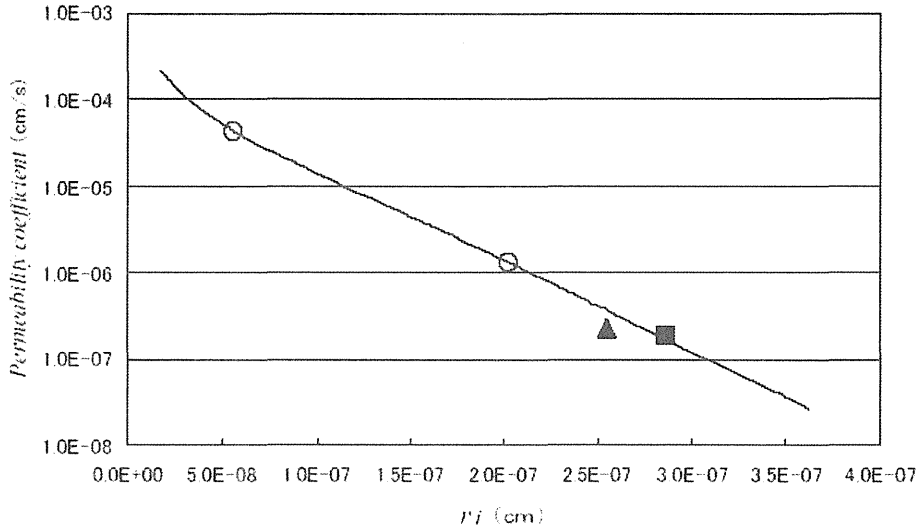


Fig. 23 Relationship between the Stokes-Einstein radius ( $r_i$ ) and the permeability coefficient through a porous membrane.

○, CF and FD10; ▲, poly-Lys; ■, insulin. The line is a simulation curve based on the Renkin equation. The  $P_i$  values of FD10( $P_{FD10}$ ) and CF( $P_{CF}$ ) were used for the calculation of  $r_p$  and  $A/L$  in the Renkin equation. The values of  $r_p$  and  $A/L$  of the membrane are 4.39 nm and 13.3  $\text{cm}^{-1}$ , respectively.

Chittchang らは poly-Lys の媒体中の  $D$  とその多孔性ポリエステル膜の透過性の関係、および透過性に及ぼすコンホメーション変化の影響を報告している<sup>68)</sup>。しかしながら、彼らが用いた膜のポアサイズは透過物質より大きく、したがって透過物質とポア壁面に生じる摩擦は、その結果に影響していない。今回、著者が用いた膜のポアサイズは小さく、ポアを通る透過物質の透過ルートの際壁との摩擦がその移動性に影響を与えた。粘膜炎には少なくとも二つのサイズの異なる



paracellular pathway が存在する<sup>69,70)</sup>。大きい方はペプチドあるいはタンパク性薬物のような水溶性高分子を対象にし、そのポアサイズは今回の検討に用いた膜に類似しているのかもしれない。その点から言うと、今回用いた透析膜は、粘膜における薬物透過に関するモデル膜として有用かもしれない。

ペプチドあるいはタンパク性薬物の粘膜における透過バリアーには、大きく分けて二つ存在する。そのひとつは高分子な水溶性化合物に対する本質的な透過バリアーである。そして重要なもう1つは、化合物を失活させてしまうタンパク分解酵素による代謝バリアーである。レンキン式を用いた膜透過性の予測の場合、透過バリアーのみが考慮される。しかし、通常、ペプチドおよびタンパク性薬物では酵素バリアーは無視できないので、ペプチドおよびタンパク性薬物の粘膜透過に関する予測値は、実測値より高くなると考えられる。この予測値と実測値の違いは、透過過程におけるタンパク分解酵素活性の程度を表すことになる。レンキン式を用いる方法での予測値は、タンパク分解酵素を完全に阻害した場合の期待値であるので、予測値と実測値のこの違いを調べることで、吸収促進剤としての酵素阻害剤の作用をより定量的に評価可能であると思われる。

### 2.3.2 ポリ-L-アルギニンの鼻粘膜吸収促進作用の拡散性の評価に基づく考察

カチオン性のポリ-L-アルギニン (Poly-L-Arg) は水溶性高分子化合物の粘膜吸収を安全にかつ効果的に増大することが報告されており<sup>71,72)</sup>、鼻粘膜吸収促進剤としてその有用性が期待される。またその吸収促進メカニズムについては、ポリカチオンである Poly-L-Arg が細胞表面の陰電荷と静電的に相互作用することを引き金として、細胞間隙の tight junction が開口することが、そのメカニズムとして考えられているが、詳細は明らかにはなっていない。そこでレンキン式を用いて細胞間隙の tight junction の状態の変化を評価した。

Fig. 24 に分子量の異なる FD4~FD70 をラット鼻粘膜に適用した場

合の吸収クリアランスと拡散係数の関係をレンキン式を用いて解析した結果を示す。

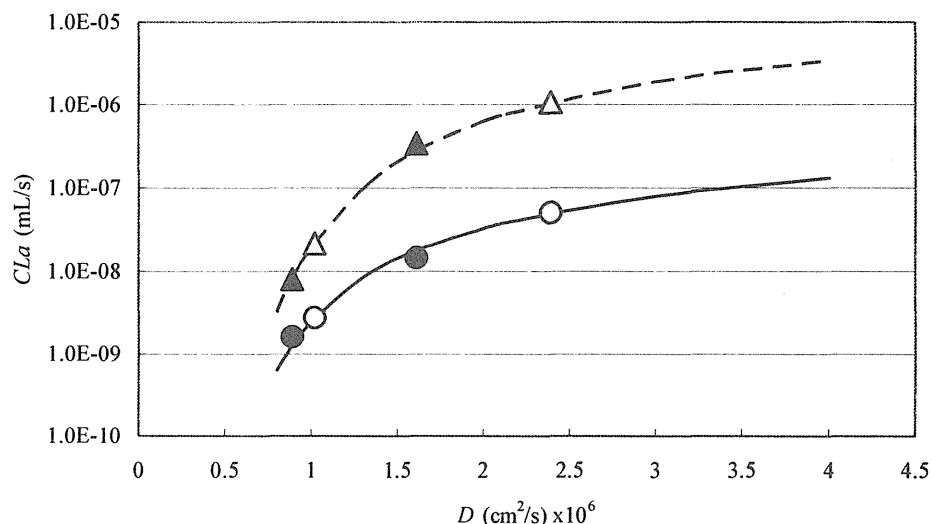


Fig. 24 Relationship between  $CLa$  and  $D$  after intranasal administration with Poly-L-Arg in rats.

○, FD4 and FD40; ●, FD10 and FD70; △, FD4 and FD40 with Poly-L-Arg; ▲, FD10 and FD70 with Poly-L-Arg.

—, simulation curve was based on Renkin equation using FD4 and FD40.

----, simulation curve was based on Renkin equation using FD4 and FD40 after intranasal administration with Poly-L-Arg.

FD4 と FD40 の結果を当てはめ計算し、得られた  $rp$  と  $A/L$  の値に基づいてシミュレーションカーブを作成した。FD10 と FD70 の吸収クリアランスの実測値は、このカーブによく一致した。また、Poly-L-Arg を

適用した場合も同様によい一致が示された。Poly-L-Arg を適用した場合の  $CLa$  の値は、コントロールの値に比べ上方へシフトしており、これは、Poly-L-Arg が吸収促進効果を有することによる。得られた  $rp$  および  $A/L$  の値を Table 11 に示す。Poly-L-Arg の添加により、 $rp$  はほとんど変化していないのに対して、 $A/L$  は著しく増加した。このことから、Poly-L-Arg は鼻粘膜の水溶性高分子薬物が透過可能な細胞間隙の数を増やす、すなわち Poly-L-Arg の吸収促進作用は透過経路の数が増やすことによると考えられた。

Table 11 Effect of Poly-L-Arg on the values of  $rp$  and  $A/L$

	Control	+ Poly-L-Arg
$rp$ (nm)	6.4574	4.941
$A/L$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	0.058743	1.846528

#### 第 4 節 小括

生体内における薬物の拡散性は、薬物が存在する周囲の環境やそこに共存する生体内構成物質との相互作用により影響を受けることが予想される。そこで、薬物の体内局所における動態とその拡散性との関係について検討を行った。

そこで先ず、結合組織に存在する酸性ムコ多糖であるコンドロイチン硫酸が共存する場合の拡散係数に対する影響を検討した。その結果、共存するコンドロイチン硫酸によりカチオン性薬物の MOR および IP の拡散係数は減少した。これは、ポリアニオンであるコンドロイチン硫酸とカチオン性薬物とのイオン間相互作用によるものと思われた。

多くの薬物は血漿アルブミンと結合することが知られている。そこで、この相互作用の薬物局所動態への影響をモデル薬物として FP を用

いてウサギ耳介灌流実験系で評価した。*In vitro* における実験で FP の拡散係数は 0.2% のアルブミンの存在下約 1/8 まで減少した。FP を皮膚表面に適用した時の直下組織の滞留性は、血管透過性を上昇させる炎症のケミカルメディエーターである BK の灌流液への添加で増加したが、血管から組織への移行は、BK による血管透過性亢進時でもほとんど増加しなかった。これは、FP がアルブミンと結合し、アルブミンと共に移動して拡散性が低下していることが原因であると考えられた。

水溶性高分子薬物の粘膜からの吸収は、細胞間隙の水路における拡散によると考えられるので、薬物の拡散性からその透過性を予測することが可能であると思われる。そこで、多孔膜に関するレンキン式を用いて、その吸収過程の解析を試みた。先ず予備検討として、セルローズ透析膜を用いて水溶性高分子薬物の透過係数の分子量から予測を行った。その結果、poly-Lys の透過係数の実測値は分子量からの予測値に近い値を示し、また、インスリンの場合でも、拡散係数の実測値を用いれば実測値と予測値はよく一致した。

そこで、この系を *in vivo* に適用し、鼻粘膜吸収促進剤として検討されている Poly-L-Arg 作用機構の検討に応用した。レンキン式を用いて解析したところ、Poly-L-Arg の適用により、ポア半径の変化は小さく、ポア占有面積は著しく増加した。このことから Poly-L-Arg は鼻粘膜における水溶性高分子が透過可能な細胞間隙の数を増やす作用を有すると考えられた。

## 結 論

臨床の現場では薬物治療の最適化を目標に TDM が多用されている。そこでは主に薬物の血中濃度の測定から体内動態の評価がなされており、それは薬物の挙動を巨視的な観点で捕らえているといえる。しかしながら、薬物投与後の一連の移行過程を薬物分子の局所的な動きに着目して微視的な視点から評価検討することも、投与後の薬物の体内挙動をより正確に理解するためには必要であると思われる。これらの検討を行うことで治療の効率化あるいは副作用の回避を実現するための手掛かりとなるかもしれない。そこで本研究では、薬物の拡散性に焦点を当て、その指標となる拡散係数に及ぼす種々要因の検討と薬物の拡散性と体内局所における移動過程との関連について考察を行った。以下に本研究により得られた知見について要約する。

(1) 薬物の拡散係数に及ぼす要因を明らかにするために種々検討を行った。まず、測定溶媒として水を選択し、パラベン類の拡散係数測定における CBM の妥当性の検証を行った。その結果、測定した温度範囲の 17°C から 42°C において、温度の上昇に伴いメチルパラベンおよび n-アミルパラベンの拡散係数は増加し、両薬物の拡散係数の温度依存性は、それぞれの分子の大きさと媒体である水の粘度の温度依存性により説明できた。また、Stokes-Einstein の式に基づき拡散係数から計算した分子容は他の方法で得られる値とよく一致した。

そこで、パラベン類およびステロイド類を用いて、薬物拡散係数と分子量の関係を評価した。分子量の対数値と拡散係数の対数値が直線関係にあることは、既に知られており、本測定においても有意な直線式が示された。しかしながら、この回帰式による分子量からの拡散係数の予測は十分なものではなかった。これは、薬物の拡散係数が媒体との相互作用によっても影響を受けたことによると考えられた。そこでさらに、薬物と溶媒の相互作用に関連するパラメータに着目し検討

を行った。パラメータとして  $LI$ 、オクタノール-水分配係数および  $HI$  を選択し、水中でのパラベン類およびステロイド類の拡散係数とこれらのパラメータとの関係を重回帰分析によって評価した。その結果、 $LI$  および分配係数を式に加えた場合において決定係数の有意な改善が認められた。 $LI$  の回帰係数が負の値を示したことから、水中において脂溶性薬物の拡散がわずかに抑制されることが示された。これは薬物分子の疎水性表面を氷様構造が取り囲む（疎水性水和）ことに関係すると思われる。さらに拡散係数に及ぼす解離状態の影響を評価した。その結果、薬物分子のもつ電荷の数に依存して拡散係数が減少することが示された。

パラベン類及びステロイド類の拡散係数について、媒体として 1-オクタノールを用いて検討した結果、分子量と水素結合能である  $HI$  をパラメータとする重回帰式が得られた。このとき  $HI$  の回帰係数は負の値を示し、薬物分子と 1-オクタノール間の水素結合により薬物の拡散が抑制されることが示唆された。

さらに水溶性高分子薬物の水中における拡散係数についても測定を行った。先にパラベン類とステロイド類で求めた分子量と拡散係数の関係に水溶性高分子薬物の結果をプロットしたところ、分子量 50000 の FD までその直線上にプロットされ、分子量の対数値と拡散係数の対数値の直線関係が広範囲に成立することが示された。また各ペプチド性薬物のその直線からのずれとペプチド性薬物が有するジスルフィド結合の有無とに関係が認められた。これはペプチド性薬物の水力学的分子サイズに起因するものかもしれない。また用いた化合物でインスリンのみが分子量から予測されるより極度に低い拡散係数を示した。これは、インスリンが 6 量体などの会合体を生成することによると考えられる。

(2) 生体内における薬物の拡散性は、薬物が存在する周囲の環境やそこに共存する生体内構成物質との相互作用により影響を受けることが予想される。そこで、薬物の体内局所における動態とその拡散性との関係について検討を行った。

結合組織に存在する酸性ムコ多糖であるコンドロイチン硫酸が共存する場合の拡散係数に及ぼす影響について検討した。その結果、共存するコンドロイチン硫酸によりカチオン性薬物の MOR および IP の拡散係数は減少した。これは、ポリアニオンであるコンドロイチン硫酸とカチオン性薬物とのイオン間相互作用によるものと思われた。

多くの薬物は血漿アルブミンと結合することが知られている。そこで、この相互作用の薬物局所動態への影響をモデル薬物として FP を用いてウサギ耳介灌流実験系で評価した。*In vitro* の実験で FP の拡散係数はアルブミンの存在下で約 1/8 まで減少した。FP を皮膚表面に適用した時の直下組織の滞留性は、血管透過性を上昇させる炎症のケミカルメディエーターである BK の灌流液への添加で増加したが、血管から組織への移行は、BK による血管透過性亢進時でもほとんど増加しなかった。これは、FP がアルブミンと結合し、アルブミンと共に移動し、拡散性が低下していることが原因であると考えられた。

水溶性高分子薬物の粘膜からの吸収は、細胞間隙の水路における拡散によると考えられるので、薬物の拡散性からその透過性を予測することが可能であると思われる。そこで、多孔膜に関するレンキン式を用いて、その吸収過程の解析を試みた。先ず予備検討として、セルロース透析膜を用いて水溶性高分子薬物の透過速度の分子量から予測を行った。その結果、poly-Lys の透過係数の実測値は分子量からの予測値に近い値を示した。また、インスリンの場合においても拡散係数の実測値を用いれば実測値と予測値はよく一致した。

そこで、この系を *in vivo* に適用し、鼻粘膜吸収促進剤として検討されている Poly-L-Arg 作用機構の検討に応用した。レンキン式を用いて解析したところ、Poly-L-Arg の適用により、ポア半径の変化は小さく、ポア占有面積は著しく増加した。このことから Poly-L-Arg は鼻粘膜における水溶性高分子が透過可能な細胞間隙の数を増やす作用を有すると考えられた。

以上、検討した内容は、生体内における多様な過程と比較すると、

わずかに一部分のみを見ているに過ぎない。しかしながら、このような研究の蓄積が、複雑な生体内での挙動を真に理解するためには必要であると考えます。そしてその情報が、臨床の最前線にいる薬剤師に伝わることで、薬物投与後の有効性あるいは副作用を体内挙動の面から正しく理解する一助となり、医薬品の適正使用に寄与するものと思われる。



## 謝 辞

本研究に際し、北海道薬科大学大学院製剤学特論研究室 関 俊暢 助教授には研究テーマの決定から結論に至るまで、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

また、城西大学薬学部薬剤学教室 従二和彦教授には終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに深甚なる謝意を表します。

さらに城西大学薬学部病院薬剤学教室 森本雍憲教授および北海道薬科大学大学院製剤学特論研究室 森本一洋教授には終始研究を見守っていただき、研究および実験の方向性につき、温かいご指導を賜りました。ここにあらためて感謝いたします。

さらに城西大学薬学部薬物治療学教室 夏目秀視助教授、薬物動態学教室 杉林堅次教授および日産化学工業株式会社新事業企画部長 宮本 操博士には有益なご助言およびご指導を賜りました。ここにあらためて感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださいました大森赤十字病院薬剤部 鈴木喜明部長に厚く御礼申し上げます。

また、共同研究者として本研究の遂行に多大なるご協力を頂きました、城西大学薬学部薬剤学教室 相場大樹助手 山崎 剛修士、山崎麻衣子修士、佐藤武志修士、持田純子修士、北海道薬科大学大学院製剤学特論研究室 丁野純男助手およびアベンティスファーマ株式会社 笹生優子氏に心より感謝いたします。

さらに有益なご意見並びに実験にご協力頂きました城西大学薬学部薬剤学教室および北海道薬科大学大学院製剤学特論研究室諸氏に深く感謝いたします。

## 実験の部

# 実験の部

## 第1章 実験の部

### 1. 実験材料

p-アミノ安息香酸、アンドロスタ-1,4-ジエン-3,17-ジオン、プレドニゾロン、ベタメタゾン、テストステロン、テストステロン、ヒドロコルチゾン、メチルテストステロン、スピロノラクトン、酢酸デオキシコルチコステロン、 $17\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン、トリアムシノロンアセトニド、プレドニゾン、酢酸プレドニゾロン、吉草酸ベタメタゾン、1-オクタノール、リン酸、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸三ナトリウム塩化ナトリウム、塩化テトラエチルアンモニウム、臭化テトラエチルアンモニウム、Ins (human recombinant)は和光純薬工業(株)から購入した。メチルパラベン、n-プロピルパラベン、イソプロピルパラベン、n-アミルパラベン、 $11\alpha$ -ヒドロキシメチルテストステロン、 $11\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン、ジギトキシゲニン、 $\Delta^{9(11)}$ -メチルテストステロン、 $16,17\alpha$ -エポキシプロゲステロン、 $\Delta^4$ -アンドロステン-3,17-ジオンは東京化成工業(株)から購入した。エクジステロン、ベクロメタゾン、フルオシノロンアセトニド、セファレキシシン (CEX)、FD4 ( $MW=4,400$ )、FD10 ( $MW=9,500$ )、FD40 ( $MW=38,260$ )、FD70 ( $MW=50,700$ )はSigma社から購入した。Oxytocin、angiotensin II、[Lys<sup>8</sup>]-vasopressin、[Arg<sup>8</sup>]-vasopressin、a-conotoxin ImI、somatostatin、cortistatin (rat)、gastrin I、endothelin-3、calcitonin、 $\beta$ -endorphinおよびgastric inhibitory polypeptide (GIP)はペプチド研究所(大阪)より購入した。5(6)-carboxyfluorescein (CF)はAcros Organics (NJ, USA)より購入した。Spectra/PorR Biotech Membranes ( $MW$  cut-off = 15,000)はSpectrum Laboratories, CA, USA)より購入した。その他の試薬は全て市販の特級品を用いた。また、これらの試薬は精製せずそのまま

用いた。水はピュアポート® (SHIBATA) で精製した後、使用前にメンブランフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) でろ過して用いた。

## 2. CBM 実験装置

拡散係数の測定には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用の装置 (LC-10A、島津製作所 (株)) を用いた (Fig. 25)。そのシステムを以下に示す。

脱気装置	GASTORR GT-102	(LABOC)
ポンプ	LC-10AD	(島津製作所 (株))
カラムオープン	CTO-10AC	(島津製作所 (株))
検出器	SPD-6A	(島津製作所 (株))
データ処理	C-R5A	(島津製作所 (株))
インジェクター	7125	(Rheodyne)

カラムの代わりに長さ 10m、内径 0.0420cm (PEEK 製; 水の場合) もしくは内径 0.0426cm (ステンレス製; 1-オクタノールの場合) のチューブを接続した。ポンプに負荷圧を得る目的でインジェクターの前に Nucleosil 100-5, 4.6 $\times$ 50mm を接続した。この接続により圧力は 20~30 $\times$ 10<sup>5</sup>Pa に保たれ、ガスの発生は抑えられた。チューブは直径約 23cm のコイル状にしてカラムオープン中に設置したが、その影響はチューブの直径の割合に対しコイルの直径の割合が大きい場合、無視できるところが Ouano により報告されている<sup>73)</sup>。流速は 0.1mL/min で、試料溶液 10 $\mu$ L を注入した。また、全てのサンプルで保持時間は約 48 分であり、この時間はチューブの長さから予測される時間と一致していた。したがって PEEK およびステンレスチューブの内壁と薬物の間には、相互作用はないと考えられる。

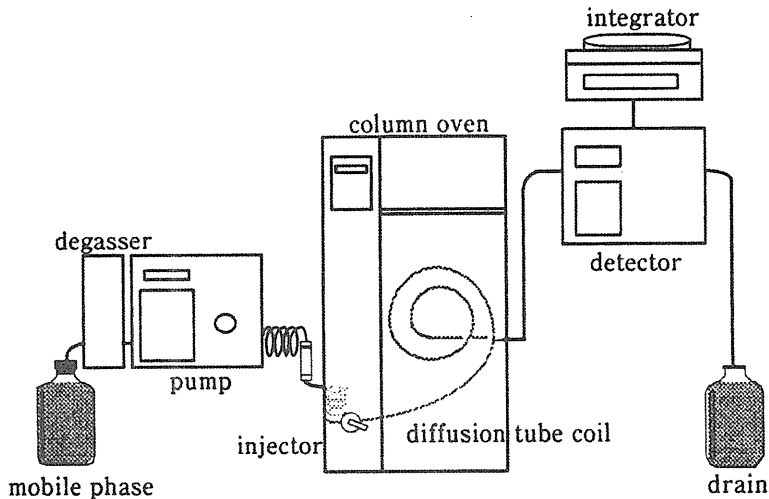


Fig. 25 Experimental system for determination of diffusion coefficients by CBM

### 3. 拡散係数の計算方法

検出器からの電気信号をインテグレーターにより解析することでリテンションタイム ( $t_R$ )、ピークエリア ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ )、ピーク高さ ( $\mu\text{V}$ ) の値を得た。ピークエリアをピーク高さで割った値を半値幅 ( $W_{12}$ ) として求め、 $t_R$  および  $W_{12}$  の単位を秒に直し、以下の式を用いて拡散係数を求めた。

$$D = \frac{0.231 \cdot t_R \cdot r^2}{(W_{12})^2}$$

### 4. 薬物溶液の調製

薬物を正確に量り、それをメンブランフィルターろ過後の精製水もしくは1-オクタノールに溶解した。水の場合は  $20\mu\text{g/mL}$ 、1-オクタノールの場合は  $100\mu\text{g/mL}$  の薬物溶液を調製した。セファレキシンはアルカリ条件での安定性に問題があるため、測定濃度の2倍の濃度になるようにメンブランフィルターろ過の精製水で溶解し、測定直前

に移動媒体として用いた液の 2 倍の濃度で全ての成分を含む液と等量混合した。

## 5. 粘度測定

粘度測定には回転粘度計 (HAAKE、Germany) を用いた。コントロールユニットには RV100、測定ヘッドには CV100、センサーシステムには ME30 を用いた。測定方法はリバーサル法で行い、測定温度は 37°C で行った。 $S_D$  (ずり速度) に対する  $S_\tau$  (応力) の値を示す直線から 3 点とり、以下の式を用いて得られた 3 つの粘度の平均値をその溶液の粘度とした。測定した全ての溶液でニュートン流動が観察され、3 つの値はほぼ一致した。Calculation factors として A を 0.27、M を 3 とした。

$$\tau = A \cdot \% \tau \cdot S_\tau [\text{Pa}]$$

$$D = M \cdot \% D \cdot S_D [\text{s}^{-1}]$$

$$\eta = \tau / D [\text{Pa} \cdot \text{S}]$$

## 6. リポフィリックインデックスの測定

移動相を各メタノール濃度で調製し、HPLC にメタノールで溶解した各薬物溶液を注入して溶媒の保持時間 ( $t_0$ ) および各薬物の保持時間 ( $t_R$ ) を求めた。HPLC 装置 (島津製作所) は、送液ユニット (LC-6A)、紫外可視分光光度計検出器 (SPD-6A) およびクロマトパック (C-R3A) からなる。以下の式から各メタノール濃度における  $\log k'$  を求め、0% に外挿した値をリポフィリックインデックスとした。HPLC の測定条件を Table 11 に示す。

$$\log k' = \log \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

Table 11 HPLC conditions for the analysis of LI

column	LiChrospher®100RP-18e
flow rate	1.0mL/min
detection	UV256nm
injection	20 $\mu$ L

## 7. 分配係数の測定および水素結合能の算出

分配係数は、水-1-オクタノール系 ( $P_{oct}$ ) および水-シクロヘキサン系 ( $P_{cyh}$ ) において測定した。室温で飽和の薬物水溶液と 1-オクタノールもしくはシクロヘキサンを混合して攪拌した。分配の前後における水層の一部を HPLC に注入して濃度を求め、それぞれの分配係数を計算した。HPLC 装置は Table 11 に示された条件と同様に行った。水素結合能は以下の式を用いて算出した。

$$HI = \log P_{oct} - \log P_{cyh} = \log (P_{oct} / P_{cyh})$$

## 8. PDM によるインスリンの拡散係数の測定

37°Cに保持した 2-チャンバー拡散セル (Fig. 26) に Anodisc™25 (孔径  $\sim 0.2 \mu$  m, Whatman, NJ) を挟み、ドナー側に FD10 (50  $\mu$  g/mL) あるいはインスリン (12.5IU/mL) を含む等張リン酸緩衝液 (PBS, 3.0mL)、レシーバー側に PBS (pH7.4, 3.0mL) を適用し、ドナー側から膜を介して透過してくる薬物をサンプリングした。サンプリングは予め決められた時間に 1.0mL レシーバー側より採取し、体積を一定にするために同量新しい PBS を戻した。採取したサンプル中の FD10 およびインスリンの定量は、それぞれ分光蛍光光度計 (EX.495nm, EM.515nm, F-2000;Hitachi, Tokyo) および Micro BCA protein assay kit (Pierce, IL) を用いて行った。インスリンの拡散係数以下の式により計算した。

$$D_{Ins} = D_{FD10} \times (P_{Ins,AD} / P_{FD10,AD})$$

ここで  $D_{FD10}$  は CBM により求めた FD10 の拡散係数、 $P_{Ins,AD}$  および  $P_{FD10,AD}$  はそれぞれ、インスリンおよび FD10 の膜の透過係数を示す。

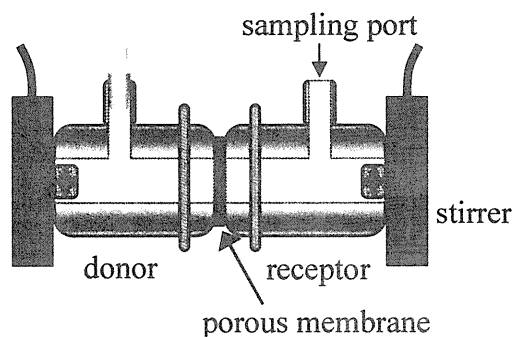


Fig. 26 Experimental system for determination of diffusion coefficients by PDM

## 9. 統計処理

メチルパラベン<sup>1)</sup>の拡散係数への pH の影響については、二元配置分散分析法により評価した。また、セファレキシンの pH の影響は、一元配置分散分析法により評価した。拡散係数への種々物理化学的因子の影響は、StatView<sup>®</sup> Ver.5.0 (SAS Institute Inc., NC, U.S.A) を用いた重回帰分析により評価した。

## 第2章 実験の部

### 1. 実験材料

フルルビプロフェン (FP) は科研製薬 (株) から贈与された。塩酸モルヒネ (MOR) は武田薬品工業 (株) から購入した。塩酸イソプロテレノール (IP) および Poly-Lys は Sigma 社から購入した。サリチル酸



ナトリウム、コンドロイチン硫酸 (ChS)、インスリン (human recombinant)、HPLC 用アセトニトリルは和光純薬工業から購入した。ウシ血清アルブミン(BSA, Fraction V)は Bayer 社から購入した。ULTRA FILTER UNIT (USY-1、文画分子量 ; 10,000) はアドバンテック東洋から購入した。ブラジキニン (BK) はペプチド研究所 (大阪) より購入した。その他の試薬は全て市販の特級品を用いた。

## 2. 実験装置

第1章 2. と同じものを用いた。

## 3. 薬物ピークの解析

第1章 3. と同様に行った。

## 4. 薬物溶液の調製

BSA の影響を評価する際、FP は測定濃度の 2 倍の濃度で pH7.4 の溶液に溶解し、測定直前に媒体中に溶解する濃度の 2 倍濃度の BSA を含有した pH7.4 溶液と同量混合し攪拌した。その他の薬物溶液は第1章 3. と同様に調製した。

## 5. ChS 含有各 pH 溶液の調製

ChS を 1%もしくは 2%含有した 10mM リン酸一ナトリウムとリン酸二ナトリウムを別々に調製し、それを適当な比率で混合して pH5.0 の溶液を得た。125mM NaCl 含有 pH5.0 ChS 溶液も、NaCl を前もってそれぞれに溶解して同様に調製した。

## 6. BSA 含有各 pH 溶液の調製

BSA を 0.2%含有した 10mM リン酸一ナトリウムとリン酸二ナトリウムを別々に調製し、それを適当な比率で混合して pH7.4 の溶液を得た。125mM NaCl 含有 pH7.4 BSA 溶液も同様に調製した。

## 7. タンパク結合率の測定

タンパク結合率の測定には ULTRA FILTER UNIT を使用した限外ろ過法を用い、遊離薬物を分離して定量を行った。pH7.4 リン酸緩衝液 (10mM) を用いて、BSA を 0.2%含む FP 溶液 (20  $\mu$ g/mL) と BSA を 0.2%含む IP 溶液 (20  $\mu$ g/mL) を調製した。各試薬を ULTRA FILTER UNIT の上部に 2mL 入れ、恒温層中 37°C で 30 分放置後 10mL の空気で加圧し、7,8 滴目の 2 滴を遊離薬物濃度測定のため採取した。また、上部の液をタンパク結合薬物濃度測定のため採取して 10 倍希釈した。各サンプル 1 容量に対して 2 容量のケトプロフェンのアセトニトリル溶液 (1  $\mu$ g/mL) を加え、攪拌、遠心後、HPLC に注入して薬物濃度を求めた。ケトプロフェンによる FP のタンパク結合置換実験では、ケトプロフェンをさらに 200  $\mu$ g/mL 添加した溶液について同様に操作した。FP の定量は絶対検量線法とした。HPLC の測定条件を Table 12 に示す。

Table 11 HPLC conditions for the analysis of protein binding

mobile phase	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid(1:1)
column	LiChrospher <sup>®</sup> 100RP-18e
flow rate	1.0mL/min
detection	UV256nm
injection	20 $\mu$ L

## 8. In vitro ウサギ摘出耳介灌流実験法

体重 2.0kg~2.5kg の日本白色種雄性家兎の耳介表面をバリカンで除毛した後、左耳の静脈より空気を 8mL 注入することによりすばやく屠殺した。直ちに耳介を摘出し、その耳介中央部の動脈へポリエチレンチューブ (PE50) を用いてカニューレションを施した。Tyrode 液を 5mL 流して耳介血管中に残存している血液などを洗い流した。耳介表の中央部に薬物を適用するため、ガラスセル (3.14cm<sup>2</sup>) をシリコン接着剤 (KE45W、信越化学) で固定した。また耳介への一連の処理は氷上で

行った。この耳介をコルク版に固定し、Fig. 27 のように全体を 37°C の恒温層に保持した。O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (95:5) 混合ガスをバブリングした Tyrode 液を 1.0mL/min の速度で灌流した。灌流圧は 47~61mmHg であった。

### 9. Tyrode 液の調製

Tyrode 液は各成分を精製水に溶解し、NE (50ng/mL) を添加して調製した。調製した (Table 12)。Tyrode 液はその日のうちに使用した。

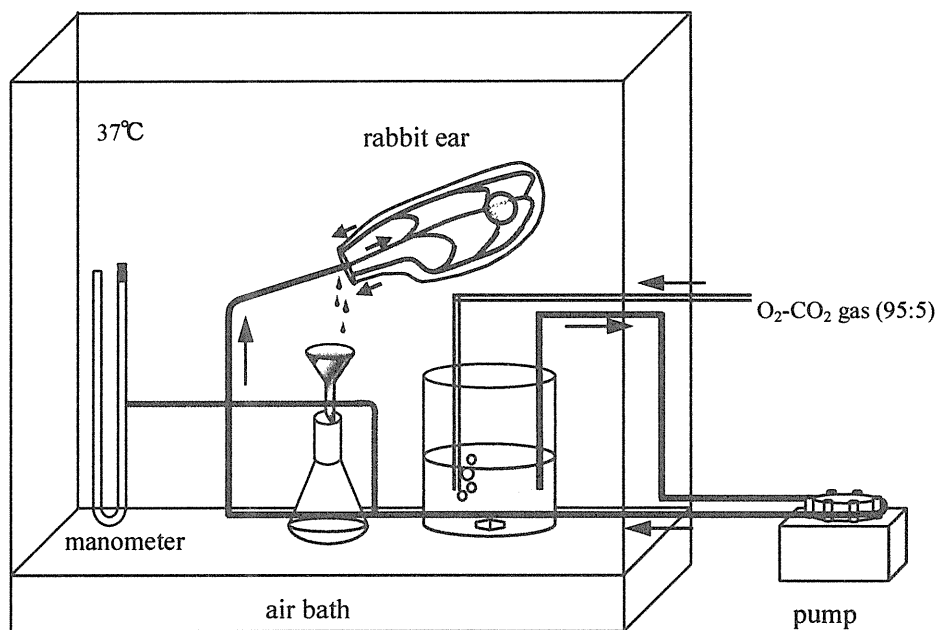


Fig. 27 Perfusion Apparatus

Table 12 Composition of Tyrode solution

NaCl	137 mM
KCl	1.5 mM
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.8 mM
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.0 mM
NaHCO <sub>3</sub>	12 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.4 mM
D-Glucose	5.0 mM
BSA	4.7 %
NE	50 ng/mL
Osmotic pressure	289 mOsm/kg
Viscosity	1.41 mPa · s
pH	7.4

#### 10. 耳介皮膚ホモジネート中の FP の定量

皮膚ホモジネートサンプルの残りに内部標準物質 (p-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル) 含有メタノール溶液 (50  $\mu$ g/mL) を 50  $\mu$ L 添加し、2mL のアセトニトリルを加えてミキサーにかけ、遠心分離 (4000 rpm, 15min, KUBOTA 5400, 久保田製作所) した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量を行った。

#### 11. FP の HPLC を用いた定量法<sup>73)</sup>

ホモジネート中の FP 量を測定するために 10. で得られた上清 20  $\mu$ L を HPLC に注入した。使用した HPLC システムを以下に示す。また、定量条件を Table 13 に示す。血漿中および灌流液中の FP 濃度の測定も同様のシステムを用い、同様の操作で行った。

ポンプ

LC-10AT

(島津製作所 (株))

検出器	SPD-10A	(島津製作所 (株))
データ処理	C-R4A, C-R6A,	(島津製作所 (株))

Table 13 HPLC conditions for the analysis of FP

mobile phase	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid(1:1)
column	LiChrospher®100RP-18e
flow rate	1.0mL/min
detection	UV245nm
column temp.	room temp.
internal standard	p-hydroxybenzoic acid isopropyl ester

## 12. 適用ゲル製剤の調製

FP および HPC-H の混合物をそれぞれ 1%および 3%となるように 80°Cにて pH7.4 等張リン酸塩緩衝液に加温溶解して均一な溶液とした。その後攪拌しながら室温にて放置冷却してゲル化させた。調製したゲルは冷蔵庫にて保存した。

## 13. 灌流液中 FP 濃度の測定法

サンプルを室温に戻した後、遠心分離 (0 °C, 13500rpm, 3min, model 1300) し、11.の HPLC 装置を用いて FP を定量した。但し、検出器は低濃度の測定のため蛍光検出器 (RF-10A, 島津製作所, EX. 262nm, EM. 313nm) を使用した。

## 14. 皮膚適用部位直下組織中の FP の定量

透過実験終了後に FP ゲルを水で洗い流した。脱脂綿に含ませたエタノールで拭き取り、乾拭きをするという操作を 3 回繰り返した後、薬物適用部位をセロハンテープにてストリッピングし、角質層を完全に除去した。そのセル適用部位 (3.14cm<sup>2</sup>) を切り取り、10.同様にホモジネートし、FP を定量した。また必要に応じ薬物適用部位以外について

も同様に操作し、組織中の FP 量を求めた。

#### 15. セルロース透析膜の透過実験

15.同様、37°Cに保持した 2-チャンバー拡散セルにセルロース透析膜を挟み、ドナー側に FD10 (200  $\mu$ g/mL) および CF (500ng/mL) を含む PBS、レシーバー側に PBS を適用し、ドナー側から膜を介して透過してくる薬物をサンプリングした。サンプリングは予め決められた時間に 1.0mL レシーバー側より採取し、体積を一定にするために同量新しい PBS を戻した。FD10 および CF の定量は HPLC を用いて行った。使用した HPLC システムを以下に示す。

ポンプ	LC-10AT	(島津製作所 (株))
検出器	RF-10A	(島津製作所 (株))
カラムオープン	CTO-6A	(島津製作所 (株))
データ処理	C-R5A	(島津製作所 (株))

Table 14 HPLC conditions for the analysis of FD10 and CF

mobile phase	gradient of 0.1M triethanolamine + 10% acetonitrile-0.1M triethanolamine + 10% acetonitrile + 60mM NaCl from 30:70 to 80:20 over 30 min.
column	Shodex Asahipak NH2P-50 4E
flow rate	1.0mL/min
detection	EX 495nm, EM515nm
column temp.	45°C

## 引用文献

- 1) N. Parrott, Lave T., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **17**, 51-61 (2002).
- 2) A. Boobis, U. Gundert-Remy, P. Kremers, P. Macheras and O. Pelkonen, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **17**, 183-193 (2002).
- 3) Matter H., Baringhaus K. H., Naumann T., Klabunde T., Pirard B., *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **4**, 453-475 (2001).
- 4) F. Yamashita, et al., *J Pharm Sci*, **91**: 2230-2239 (2002).
- 5) Y. Horibe, K. Hosoya, K. Kim, T. Ogiso, and V. H. L. Lee, *Pharm. Res.*, **14**, 1246-1251 (1997).
- 6) 花野 学ほか, 薬剤学, 南江堂, 東京, 203-204, 2002.
- 7) G. L. Flynn, S. H. Yalkowsky and T. J. Roseman, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 479-510 (1974).
- 8) S. G. Taylor, *Proc. R. Soc., London Ser. A*, **219**, 186-203 (1953).
- 9) R. Aris, *Proc. R. Soc., London Ser. A*, **235**, 67-77 (1956).
- 10) E. Grushka and E. J. Kikta Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 643-650 (1976).
- 11) G. L. Mosher, *Pharm. Res.*, **11**, 1325-1329 (1994).
- 12) R. H. Stokes, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 763-767 (1950).
- 13) A. H. Goldberg and W. I. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1583-1585 (1968).
- 14) R. G. Stehle and W. I. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 1931-1935 (1972).
- 15) P. A. Witherspoon and D. N. Saraf, *J. Phys. Chem.*, **69**, 3752-3755 (1965).
- 16) C. M. Gary-Bodo and H. W. Weber, *J. Phys. Chem.*, **73**, 1155-1156 (1969).
- 17) B. D. Hanh, R. H. Neubert, and S. Wartewig, *Int. J. Pharmacist.*, **204.**, 145-150 (2000).
- 18) D. G. Leaist, and P. A. Lynos, *J. Solution Chem.*, **13**, 77- 85 (1984).
- 19) R. A. Noulty, and D. G. Leaist., *J. Chem. Eng. Data*, **32**, 418-420 (1987).

- 20) S. G. Taylor, *Proc. R. Soc., London Ser. A*, **219**, 186-203 (1953).
- 21) R. Aris, *Proc. R. Soc., London Ser. A*, **235**, 67-77 (1956).
- 22) E. Grushka, E. J. Kikta, Jr. and H. T. Cullinan, Jr., *J. Phys. Chem.*, **80**, 757-761 (1976).
- 23) E. Grushka and E. J. Kikta, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 643-650 (1976).
- 24) G. L. Mosher, *Pharm. Res.*, **11**, 1325-1329 (1994).
- 25) T. Seki, M. Okamoto, O. Hosoya and K. Juni *J. Pharm. Sci. Technol. Jpn.*, **60**, 114-117 (2000).
- 26) G. L. Flynn, S. H. Yalkowsky and T. J. Roseman, Mass transport phenomena and models: Theoretical concepts, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 479-510 (1974).
- 27) 森野米三 (編), “化学便覧基礎編 改訂2版” 社団法人 日本化学会編, 丸善, 東京, 1975.
- 28) R. F. Fedors, *Polymer Eng. Sci.*, **14**, 147-154 (1974).
- 29) F. Grun, *Rubber Chem. Tech.*, **22**, 316-319 (1949).
- 30) T. Seki, J. Mochida, M. Okamoto, O. Hosoya, K. Juni and K. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 734-736 (2003).
- 31) T. Yamana, A. Tsuji, E. Miyamoto and O. Kubo, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 747-748 (1977).
- 32) N. E. Tayar, R.-S. Tsai, B. Testa, P.-A. Carrupt and A. Leo, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 590-598 (1991).
- 33) 上平 恒、逢坂 昭, “生体系の水”, 講談社, 東京, 1989.
- 34) K. Inui, T. Okano, M. Takano, S. Kitazawa and R. Hori, *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 621-626 (1983).
- 35) W. J. Albery, A. R. Greenwood and R. F. Kibble, *Trans. Faraday Soc.*, **63**, 360-368 (1967).
- 36) 関 集三, 松尾隆祐, 水の構造と物性, みすず書房, 東京, (1975).
- 37) 伊勢村壽三, 化学の話シリーズ6 水の話, 培風館, 東京, 1984.
- 38) 荒田洋治, 水の書, 共立出版, 東京, (1998).
- 39) O. Hosoya, S. Chono, Y. Saso, K. Juni, K. Morimoto and T. Seki, *J.*



- Pharm. Pharmacol.*, **56**, 1501-1507 (2004).
- 40) M. Dathe, K. Gast, D. Zirwer, H. Welfle and B. Mehlis, *Int. J. Peptide Protein Res Res.* **36** 344-349 (1990).
  - 41) 長谷川栄一, “ムコ多糖の構造と機能” 南江堂, 東京, p.156. (1968).
  - 42) K. Meyer, E. Davidson, A. Linker and P. Hoffman, *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 506-518 (1956).
  - 43) A. Hallen, *Acta Chem. Scand. Ser. A*, **14**, 1828-1832 (1960).
  - 44) D. Kaplan and K. Meyer, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **105**, 78-81 (1960).
  - 45) J. Polatnick, A. J. L. Tessa and H. M. Katzin, *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 365-369 (1957).
  - 46) 吉沢善作, 長谷川栄一 (編), “ムコ多糖実験法[Ⅱ]”, 南江堂, 東京, (1973).
  - 47) T. Seki, M. Okamoto, O. Hosoya, D. Aiba, K. Morimoto and K. Juni, *S.T.P. Pharma Sci.*, **13**, 215-218 (2003).
  - 48) S. K. Chang, P. L. Williams, W. C. Dauterman, and J. E. Riviere, *Toxicology* **91**, 269-280 (1994).
  - 49) J. E. Riviere, J. D. Brooks, P. L. Williams, E. McGown, and M. L. Francoeur, *Int. J. Pharm.* **127**, 213-217 (1996).
  - 50) P. L. Williams, M. P. Carver, and J. E. Riviere, *J. Pharm. Sci.* **79**, 305-311 (1990).
  - 51) J. Lange, P. Eck, G. R. Elliott, W. L. A. M. Lort, and O. L. Wolthuis, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **27**, 71-77 (1992).
  - 52) M. Kietzmann, B. Wenzel, W. Loscher, D. Lubach, B. W. Muller and H. Blume, *J. Pharm. Pharmacol.* **47**, 22-25 (1995).
  - 53) M. Kietzmann and H. Blume, *In Vitro Toxicol.* **10**, 11-15 (1997).
  - 54) M. S. Roberts and S. E. Cross, *Pharm. Res.* **16**, 1392-1398 (1999).
  - 55) G. E. Bast and H. G. Kampffmeyer, *Xenobiotica* **24**, 1029-1042 (1994).
  - 56) L. Celesti, C. Murratzu, M. Valoti, G. Sgaragli and P. Corti, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **14**, 701-709 (1992).
  - 57) 倉田宗司, 入江昌親 (編) “New生化学” 廣川書店, 東京, 1992.

- 58) T. Seki, O. Hosoya, T. Yamazaki, T. Sato, Y. Saso, K. Juni and K. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **276**, 29-40 (2004).
- 59) G. Yanagimoto, T. Hayashi, T. Hasegawa, T. Seki, K. Juni, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 749-754 (1999).
- 60) 入沢 宏, 山岸俊一, 松田幸次郎, ”生理学大系Ⅲ “医学書院, 東京, 1969.
- 61) 東田陽博, 木村康宏, “キニンとアンギオテンシン・生体調節の分子機構”, 松尾寿之, 鹿取 信 (監), 大石幸子, 加藤久雄, 三宅可浩 (編), 講談社, 東京, 1994.
- 62) V. Eisen, *Br. J. Exp. Pathol.* **51**, 322-327 (1970).
- 63) O. Hosoya, S. Chono, Y. Saso, K. Juni, K. Morimoto and T. Seki, *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 1501-1507 (2004).
- 63) V. Pade and S. Stavchansky, *Pharm. Res.* **14**, 1210-1215 (1997).
- 64) Pauletti, G. M., Okumu, F. W., Borchardt and R. T. *Pharm. Res.* **14**, 164-168 (1997).
- 65) F. A. Dorkoosh, C. A. N. Broekhuizen, G. Borchard, M. Rafiee-Tehrani, J. C. Verhoff and H. E. Junginger, *J. Pharm. Sci.* **93**, 743-752 (2004).
- 66) E. M. Renkin, *J. Gen. Physiol.* **20**, 225-243 (1954).
- 67) M. Chittchang, N. Salamat-Miller, H. H. Alur, D. G. Vander Velde, A. K. Mitra and T. P. Jonston, *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 1497-1505 (2002).
- 68) K.-J. Kim and E. D. Crandall, *J. Appl. Physiol.* **54**, 140-146 (1983).
- 69) M. Tomita, T. Sawada, T. Ogawa, H. Ouchi, M. Hayashi, and S. Awazu, *Pharm. Res.* **9**, 648-653 (1992).
- 70) K. Ohtake, T. Maeno, H. Ueda, H. Natsume and Y. Morimoto, *Pharm Res.* **20**, 153-160 (2003).
- 71) K. Ohtake, H. Natsume, H. Ueda and Y. Morimoto, *J. Control. Release*, **82**, 263-275 (2002).
- 72) A. C. Ouano, *Ind. Eng. Chem. Fund.*, **11**, 268-271 (1972).
- 73) B. W. Berry and F. Jamali, *Pharm. Res.*, **5**, 123-125 (1988).

