

皮内投与による局所および全身への  
薬物送達に関する研究

乙第52号

吉田 大介

皮内投与による局所および全身への  
薬物送達に関する研究

吉田 大介

# 目次

略語と記号	1
総論の部	2
緒言	3
序 章 皮内投与後の薬物動態の評価 ～皮下、筋肉内投与および皮膚適用の比較～	5
第 1 章 皮内投与後の薬物動態に及ぼす投与液の浸透圧 および投与容積の影響	15
第 1 節 解析法	17
第 2 節 体内動態パラメータの算出	20
第 3 節 投与液の浸透圧の影響	21
第 4 節 投与容積の影響	24
第 5 節 小括	26
第 2 章 皮内投与後の薬物動態に及ぼす薬物分子量の影響	27
第 1 節 解析法	28
1. 修飾 W.I. Higuchi 式	28
2. Convolution による皮内投与後の血中薬物濃度の予測	29
第 2 節 体内動態パラメータの算出	30
第 3 節 皮内投与後の薬物のみかけの皮膚中拡散係数の算出	31

第4節	薬物分子量の影響	35
1.	皮内投与後の血中薬物濃度	35
2.	皮内投与後の組織中薬物量	40
第5節	小括	42
第3章	皮内投与後の薬物動態に及ぼす血管作動薬併用の影響	43
第1節	解析法	44
第2節	血管作動薬による皮膚血流量の変化	45
第3節	体内動態パラメータの算出	48
第4節	血管作動薬併用の影響	49
1.	SA 皮内投与後の薬物動態	49
2.	FD-4 皮内投与後の薬物動態	53
第5節	小括	56
結論		57
謝辞		61
実験の部		62
引用文献		68



## 略語と記号

	略語		の一次速度定数
TTS	Transdermal Therapeutic System	$k_m$	薬物の筋肉からの一次消失速度定数
DDS	Drug Delivery System	$k_{sc}$	薬物の皮膚から全身循環系への一次速度定数
DNA	デオキシリボ核酸		
<i>i.c.</i>	Intracutaneous	$k_{cs}$	薬物の全身循環系から皮膚への一次速度定数
<i>s.c.</i>	Subcutaneous		
<i>i.m.</i>	Intramuscular	$k_{sm}$	薬物の皮膚から筋肉への一次速度定数
SA	Salicylate		
M.W.	Molecular weight	$k_{ms}$	薬物の筋肉から皮膚への一次速度定数
PK	Pharmacokinetics		
<i>i.v.</i>	Intravenous	$k_{mc}$	薬物の筋肉から全身循環系への一次速度定数
CAL	Calcein		
FD	Fluorescein isothiocyanate-labeled dextran	$k_{cm}$	薬物の全身循環系から筋肉への一次速度定数
AUC	血中濃度-時間曲線下面積	$k_{cp}$	薬物の全身循環系から末梢系への一次速度定数
PBS	Phosphate Buffered Saline	$k_{pc}$	薬物の末梢系から全身循環系への一次速度定数
	記号		
$k_{s-c}$	薬物の皮膚から全身循環系への一次速度定数	$k_{co}$	薬物の全身循環系からの一次消失速度定数
$k_{s-m}$	薬物の皮膚から筋肉への一次速度定数	$Q$	単位面積あたりの薬物放出量
$k_{m-c}$	薬物の筋肉から全身循環系への一次速度定数	$L$	基剤の厚さ
$k_s$	薬物の皮膚からの一次消失速度定数	$C_0$	基剤中の薬物初濃度
$k_{m1-c}$	薬物の投与部位筋肉から全身循環系への一次速度定数	$D$	基剤中の拡散係数
$k_{m2-c}$	薬物の投与部位周辺筋肉から全身循環系への一次速度定数	$Q_s$	皮膚からの薬物放出量
$k_{m1-m2}$	薬物の投与部位筋肉から周辺筋肉へ	$X_o$	皮膚から放出した全薬物量
		$L_s$	皮膚の厚さ
		$D_s$	皮膚中のみかけの拡散係数
		$T_{max}$	最高血中濃度の到達時間
		$C_{max}$	最高血中濃度

## 総論の部

## 緒言

皮膚に適用する薬物は、皮膚に貯留または筋肉へ移行して薬効を発揮する局所作用型<sup>1)</sup>と全身循環系に取り込まれて薬効を発揮する全身作用型に大別される。前者の代表例に、アトピー性皮膚炎に用いるタクロリムス<sup>2)</sup>や筋肉痛に用いる非ステロイド性抗炎症薬<sup>3)</sup>がある。これら薬物の皮膚適用では、注射剤や経口剤で投与されるよりも薬物の局所送達性が高いことが報告されており<sup>4)</sup>、軟膏、パップ剤およびテープ剤などが皮膚適用型製剤として汎用されている。後者は経皮治療システム (TTS) と呼ばれ、薬物の血漿中濃度の維持、肝臓での初回通過効果の回避、血漿中濃度上昇による副作用発現時の投与の簡便な中断、さらにコンプライアンスの向上などのメリットを持ち<sup>5)</sup>、スコポラミンやニトログリセリンから製剤開発が始まった<sup>6)</sup>。最近では製剤からの薬物放出制御により血漿中濃度を制御できるツロブテロールやフェンタニルのテープ剤が開発され、これらはドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術のめざましい発展にも多大な寄与をした。しかしながら、薬物の皮膚透過には皮膚の最外層にある角層が高いバリアーとして機能しているため、水溶性または高分子薬物の皮膚透過性が著しく低いことが TTS の欠点として挙げられる<sup>7, 8)</sup>。そのため、皮膚透過促進効果が高かつ皮膚障害性が少ない投与技術の発展が期待されているのが現状である。

一般に皮膚透過促進技術は、吸収促進剤<sup>9, 10)</sup>、プロドラッグ化<sup>11)</sup>および複合体形成を利用<sup>12)</sup>した化学的促進法と、超音波を利用したソノフォレシス<sup>13)</sup>、電気力を利用したエレクトロポレーション<sup>14, 15)</sup>およびイオントフォレシス<sup>16)</sup>などの物理的促進法に分けられる。特に近年、無針注射器<sup>17)</sup>やマイクロニードル<sup>18, 19)</sup>といった皮膚中に直接薬物を投与できる新規投与デバイスの開発が進み、“自己投与が可能”であることや“痛みを伴わない”というメリットから経口投与が難しくかつ経皮吸収性が低い薬物の投与方法としてこれらのデバイスが注目

されるようになった<sup>20)</sup>。

無針注射器は高圧で皮膚中に薬液を投与するもので、既にインスリン<sup>21)</sup>やヒト成長ホルモン<sup>22)</sup>で臨床化されている。一方、マイクロニードル製剤は長さ数百ミクロンの微細針を二次元に配置したアレイ状シート<sup>23,24)</sup>で、表面に薬液を塗りこれを皮膚に適用して薬液を表皮内に導入する他、皮膚適用後に針自身が溶解するものも開発されている。マイクロニードル素材は糖類<sup>25)</sup>や生分解性ポリマー<sup>26)</sup>が多く、微細針の作製には nano fabrication テクノロジーが応用されている。将来的には、これらは特殊なデバイスを用いたペプチドや DNA のような高分子化合物の経皮デリバリーにも利用されると考えられる<sup>27)</sup>。

従来の物理的経皮吸収促進法は、角層の透過バリアー抵抗を低下させることで薬物吸収を促進させている。また、無針注射器やマイクロニードルによる薬物投与も、同様に透過バリアー抵抗を低下させる。しかし、角層よりも深部の生きた皮膚中に直接薬物を投与することから、薬物を皮内に投与する皮内投与法に近いと考えられる。すなわち、この投与技術は注射剤に近い投与形態であるため、前述した皮膚適用後の薬物動態とは大きく異なることが予想される。そこで本研究では、直接皮内に薬物を投与できるデバイスを想定して、新規皮内薬物投与法の有用性について評価した。

本論文の序章では、薬物の皮内投与の有用性を評価するために、皮膚表面から異なる深度の組織に薬物を投与した後の皮内近傍の薬物の局所動態および全身吸収性を評価し、皮下、筋肉内投与および従来の皮膚適用後の薬物動態と比較した。第1章では、薬物を皮内投与する際の投与液あるいは投与条件の影響を調べるため、皮内投与後の薬物動態に及ぼす投与液の浸透圧および投与容積の影響について評価した。第2章では、皮内投与後の薬物動態に及ぼす薬物分子量の影響を評価した。また、第3章では、生体側の環境に関する因子として皮膚中血流量に注目し、皮内投与後の薬物動態に及ぼす血管作動薬併用の影響を評価した。以下、得られた結果を論述する。



## 序 章 皮内投与後の薬物動態の評価<sup>28)</sup>

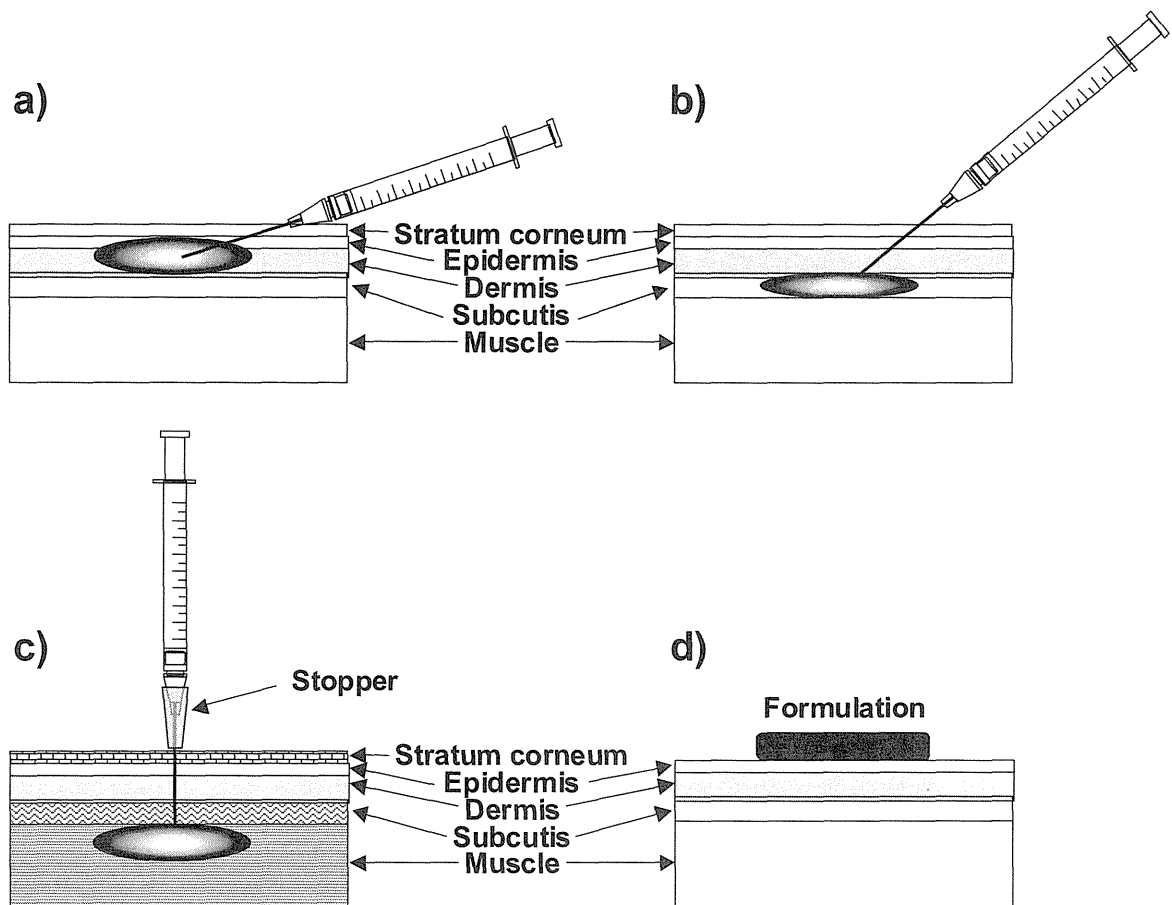
### ～皮下、筋肉内投与および皮膚適用の比較～

緒言でも述べたように、角層を回避できるデバイスを用いることにより、薬物を直接皮膚中に投与することが可能となった。しかし、皮膚表面からの深度が異なる投与部位の違いが、投与後の薬物の皮膚中貯留性や全身吸収性に大きな影響を及ぼすと考えられる。すでに様々なデバイスが開発されているものの、それらはヒトに適用することを目的として設計されているため、ラットのような小動物の皮膚中に精度よく薬液を投与することは難しい。そこで本研究では、この煩雑な投与形態を簡便にするため、デバイスの使用を想定した薬物の皮内投与を注射により行った。

皮内 (*i.c.*) 投与は、主にツベルクリン反応<sup>29)</sup>やアナフィラキシー反応<sup>30)</sup>の診断に長年用いられているが、薬物治療を目的とした投与方法としてはあまり一般的ではなく、投与した物質の皮内および全身動態に関する報告はほとんどない。そこでまず、薬物治療に用いる皮内投与方法の可能性を評価するために、皮内投与後の薬物の組織移行性および全身吸収性について、皮膚を介した類似投与方法である皮下 (*s.c.*) 投与、筋肉内 (*i.m.*) 投与および皮膚適用後の挙動と比較した。なお、皮下投与や筋肉内投与後の薬物体内動態については古くから研究されているものの<sup>31,32)</sup>、皮内投与後の体内動態と比較をするために、今回改めて評価することとした。

実験に用いた雄性ウイスターラット (300 ± 20 g) はウレタン麻酔下で腹部を剃毛し、体温を 36.5 ± 0.5°C に維持させて実験を行った。今回用いたそれぞれの投与方法を Fig. 1 に示す。すべての投与はラットの腹部正中線上に行った。皮内投与では皮膚に対しほぼ平行に注射針 (27 G) を刺した。皮下投与では皮膚をつまみ上げ、注射針を皮下組織まで刺した。また、筋肉内投与では注射針に、針先の 2 mm が突き出るストッパーを取り付け、皮膚に対し垂直に刺した。さ

らに皮膚適用では、テープストリッピングを 20 回した後に薬物を適用した。



**Fig. 1 Schematic representation for *i.c.* (a), *s.c.* (b) and *i.m.* (c) injection and topical application (d) in rats.**

モデル薬物にはサリチル酸ナトリウム (SA-Na) を選択し、薬物量 62.46  $\mu\text{mol}$ 、容積 20  $\mu\text{L}$  で投与した。なお、序章では、他の類似した投与方法との違いを明確にすることを目的としたために、高薬物量（高張液）を投与して評価した。

Fig. 2 にそれぞれの投与方法による薬物投与後の組織中量および全身吸収量の時間推移を示す。

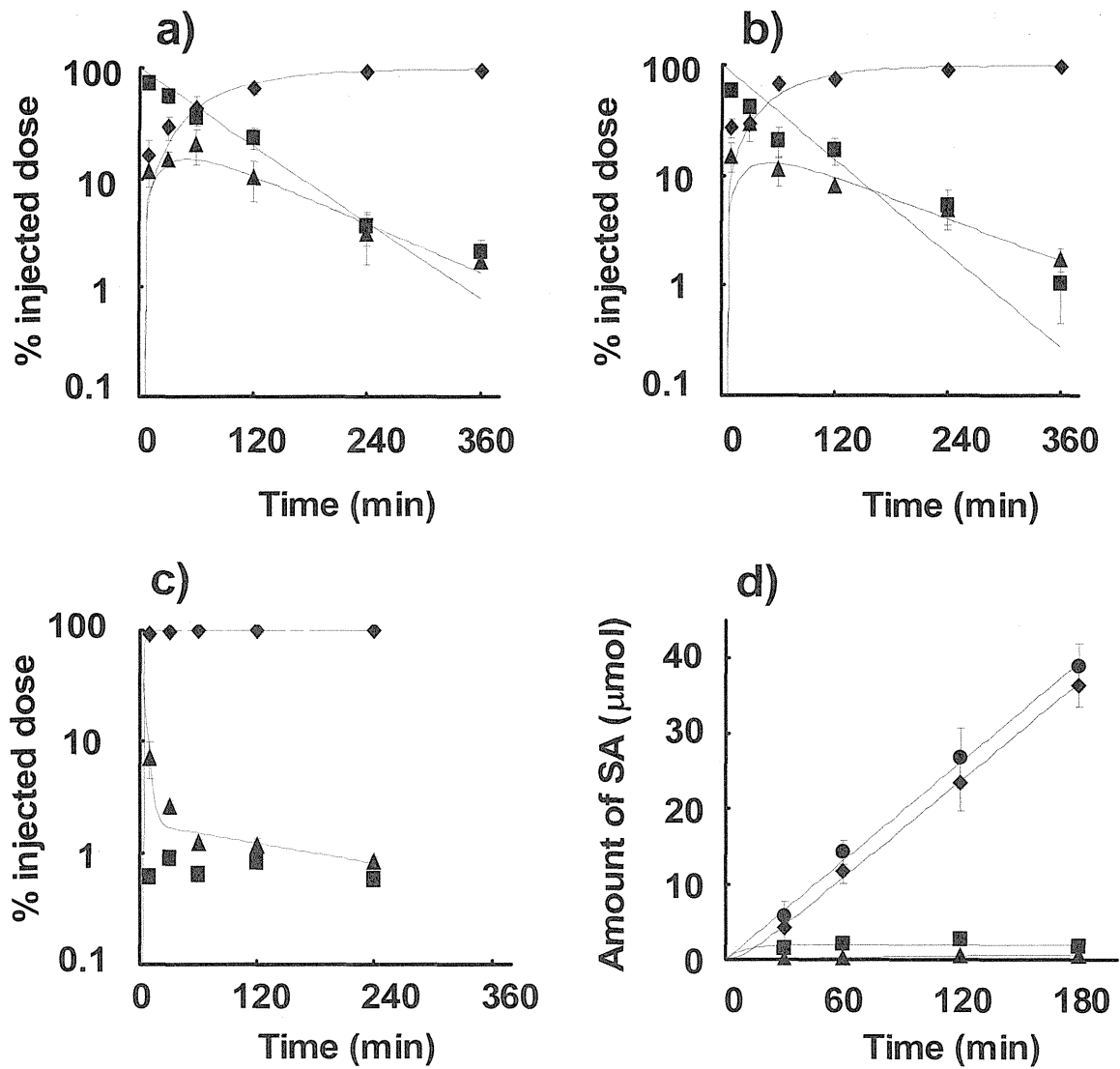


Fig. 2 Time courses of changes in % injected dose of SA following *i.c.* (a), *s.c.* (b) and *i.m.* (c) injections of SA-Na (62.46  $\mu\text{mol}$  / 20  $\mu\text{L}$ ), and topical application (d) of SA-Na (1% SA-Na) in rats. Symbols: ■ skin, ▲ muscle, ◆ absorption amount, ● total amount of skin permeation.

Each line was obtained by curve-fitting. Each data point represents the mean of 3-4 experiments.

皮内投与 (Fig. 2a) および皮下投与 (Fig. 2b) 後の薬物挙動は類似しており、皮膚中薬物量は投与後経時的に減少した。また、筋肉中量は投与初期に徐々に増加し、約 30~60 分をピークに減少した。一方、筋肉内投与 (Fig. 2c) 後の筋肉中薬物量は投与後急激に減少し、皮膚中への直接移行は認められなかった。これらに対し、皮膚適用 (Fig. 2d) 後は薬物が連続的に全身循環系に吸収され、皮膚中および筋肉中薬物量は一定時間経過後に定常状態となった。

角層通過後の薬物動態解析は、皮膚、筋肉および全身循環系などから構成したマルチコンパートメントモデル<sup>33,34)</sup>を用いる方法、皮下に挿入したマイクロダイアリシスを用いる方法<sup>35)</sup>、さらには寒天ゲルの皮下挿入法<sup>36)</sup>など、様々な解析法や理論により明らかにされつつある。本論文では、組織間の薬物の移行速度および移行経路を明確にするためにコンパートメントモデルによる解析を行った。

得られた局所投与後の薬物の組織量推移から解析に使用するコンパートメントモデルを構築した (Fig. 3)。皮内および皮下投与 (Fig. 3a) では皮膚、筋肉、全身 (全身循環系および末梢系) から構成された。筋肉内投与では (Fig. 3b) 投与部位筋肉 (muscle 1)、周辺筋肉 (muscle 2)、全身 (全身循環系および末梢系) から構成された。また、皮膚適用 (Fig. 3c) では製剤、皮膚、筋肉および全身 (全身循環系および末梢系) から構成された。

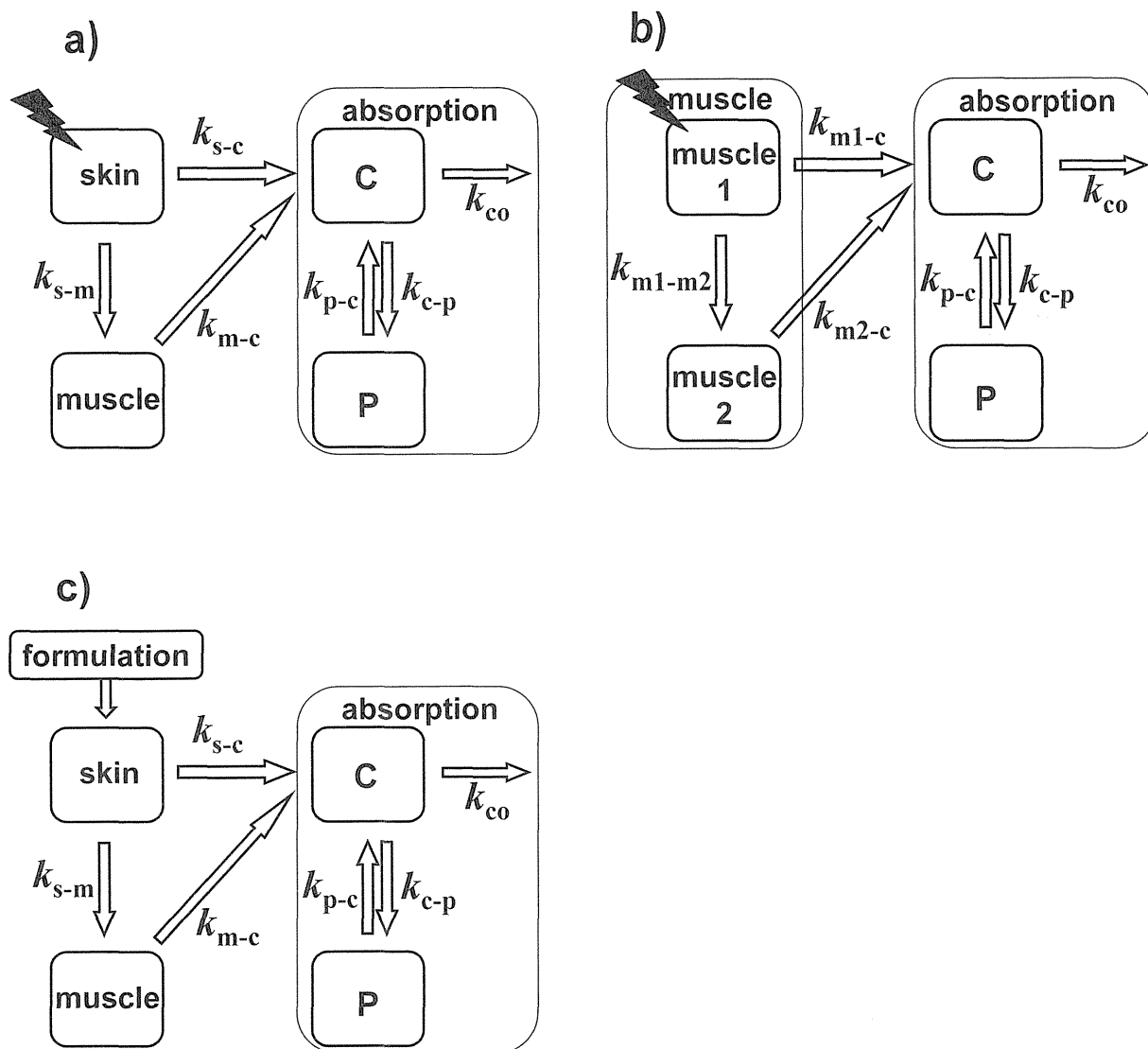


Fig. 3 Pharmacokinetic model for SA following *i.c* and *s.c.* injections (a), *i.m.* injection (b), and topical application (c).

Abbreviations: C, central compartment; P, peripheral compartment.

各組織間の速度定数は最小二乗法ソフトウェア MULTI<sup>37)</sup>を用いて非線形最小二乗法によりカーブフィッティング（アルゴリズム；Damping Gauss-Newton 法）して算出した。結果を Table 1 に示す。

**Table 1 Pharmacokinetic parameters of SA following *i.c.*, *s.c.* and *i.m.* injection and topical application in rats.**

administration route	$k_{s-c}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{s-m}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{m-c}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_s$ (min <sup>-1</sup> )
<i>i.c.</i> injection	$4.7 \times 10^{-3}$	$8.2 \times 10^{-3}$	$3.4 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-2}$
<i>s.c.</i> injection	$7.9 \times 10^{-3}$	$7.6 \times 10^{-3}$	$3.7 \times 10^{-2}$	$1.6 \times 10^{-2}$
topical application	$1.1 \times 10^{-1}$	$5.0 \times 10^{-3}$	$1.5 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-1}$
administration route	$k_{m1-c}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{m2-c}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{m1-m2}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_m$ (min <sup>-1</sup> )
<i>i.m.</i> injection	$2.5 \times 10^{-1}$	$1.9 \times 10^{-1}$	$2.9 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-1}$

$k_s$ , the first-order rate constant from skin, is the sum of  $k_{s-c}$  and  $k_{s-m}$ .

$k_m$ , the first-order rate constant from muscle 1, is the sum of  $k_{m1-c}$  and  $k_{m1-m2}$ .

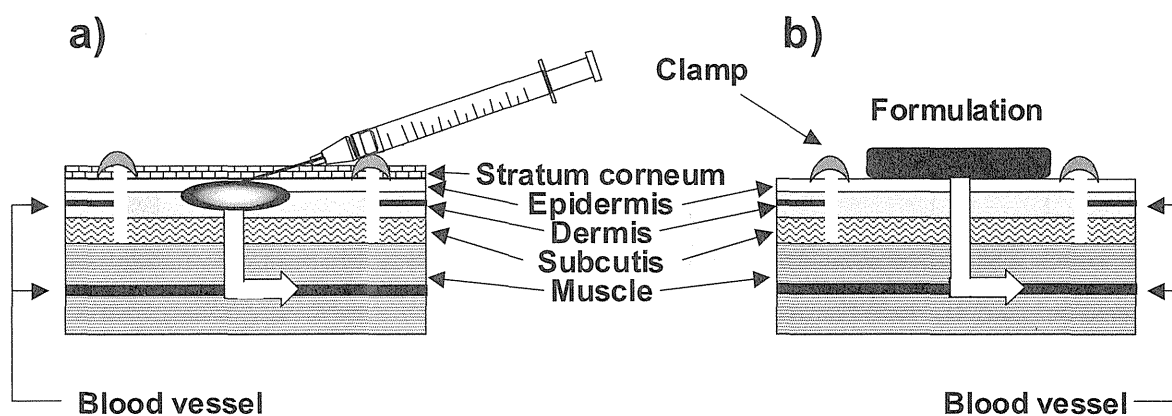
皮内投与後の皮膚から全身への SA の一次速度定数  $k_{s-c}$  は皮下投与のそれよりもわずかに小さく、筋肉内投与後の投与部位筋肉から全身への速度定数  $k_{m1-c}$  より極めて小さいことがわかった。また、 $k_s$  ( $k_{s-c}+k_{s-m}$ ) は皮膚からの消失速度定数を表しているが、それに対する  $k_{s-m}$  の割合、すなわち  $k_{s-m}/k_s$  について皮膚適用と比べると、皮内投与の方が極めて大きかった。これより皮内に投与された薬物は筋肉へも多く移行することが分かり、薬物の全身吸収は皮膚からだけでなく、筋肉を経由する寄与も大きいことが示唆された。

一般に血流が多い組織に直接投与した方が全身への薬物吸収は速い。今回の結果も血流量が多い筋肉組織（筋肉）に投与した方が SA の全身への吸収は速



く、比較的血流量が少ない皮膚組織（皮膚）に投与した場合、投与部位から徐々に SA が放出し、全身だけでなく近傍の組織（筋肉）にも移行することが示唆された。

次に、皮内投与後の薬物の吸収経路を確認するために、投与部位である腹部皮膚の血流を遮断させたラットを作製した。作製したラット皮膚の模式図を Fig. 4 に示す。図からもわかるように、皮膚中に投与または皮膚上に適用された薬物は、皮膚中血管から全身へ直接吸収されないため、血中で検出された薬物は皮膚から筋肉へ移行し、筋肉中血管から吸収したものと考えることができる。



**Fig. 4 Schematic representation of cutaneous blood flow-stopped rats for *i.c.* injection (a) and topical application (b).**

皮膚血流を遮断したラットにおける皮内投与および皮膚適用後の薬物の皮膚中量、筋肉中量および全身吸収量を未処理のラットのそれと比較した。結果を Fig. 5 に示す。

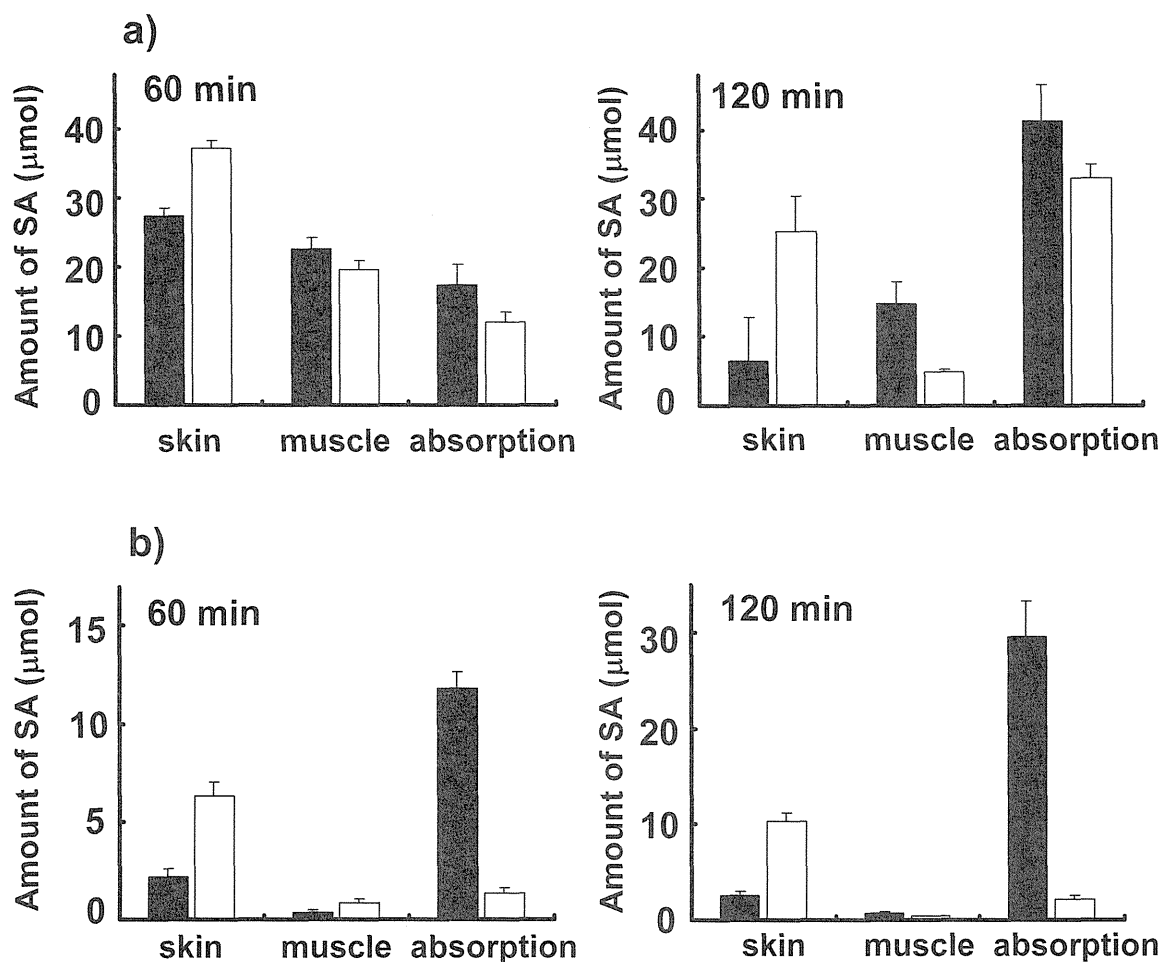


Fig. 5 SA amount in each compartment at 60 and 120 min following *i.c.* injection (a) of SA-Na (62.46 μmol / 20 μL) and topical application (b) of SA-Na (1% SA-Na, 2mL) in intact rats (closed columns) and cutaneous blood flow-stopped rats (open columns). Each column for skin and muscle represents the mean ± S.E. of 4-5 experiments.

皮膚中の血流を遮断したラットへの SA 皮内投与では、未処理のラットと比較して投与後 60 分、120 分とも SA が皮膚中に多く残存していたが、全身吸収量はほとんど変わらなかった。しかし、皮膚中の血流を遮断したラットへの皮膚適用では未処理ラットと比較して、皮内投与と同様に多くの SA が皮膚中に残存したものの、全身吸収量は大きく低下した。

これらの結果は、皮膚適用後では、薬物の大部分が皮膚中の血管から全身循環系に移行しているのに対し、皮内投与では、皮膚だけでなく皮膚から筋肉へ移行した薬物が、筋肉中血管から全身循環系に移行していることを示唆している。

序章では薬物を皮膚に直接投与できるデバイスを想定した投与形態としての皮内投与の有用性を評価するため、皮膚を介した類似投与方法である皮下投与、筋肉内投与および皮膚適用後の薬物動態を比較した。

皮内に薬物を投与した場合、皮膚中に薬液 depot ができ、そこから薬物が放出される。そして、皮膚中から全身循環系に移行するだけでなく、筋肉中に移行した薬物も全身循環系に移行していた。また、皮内投与後の全身循環系への移行速度は遅く、皮膚や筋肉に滞留することが示唆された。さらに皮膚適用とは、吸収（全身移行性）の経路や組織滞留性が大きく異なったことから、新規投与デバイスによる皮内投与は物理的経皮吸収促進法とは異なった新たな投与方法とみなした方がよいと考えられた。

このように薬物を直接皮膚中に投与した場合の薬物動態は、Fig. 6 に示した 4 要因のバランスで制御できると考えられた。ここで、薬物の性質とは分子量や油水分配係数、投与液（溶媒）特性とは薬液の浸透圧や投与容積、投与条件とは注射針のサイズや薬物注入速度、生体環境とは皮膚中の血流量（速度）を示し、それら要因のバランスにより皮内投与後の薬物動態が決定されるものと考えられた。以下に詳細な検討を行った。

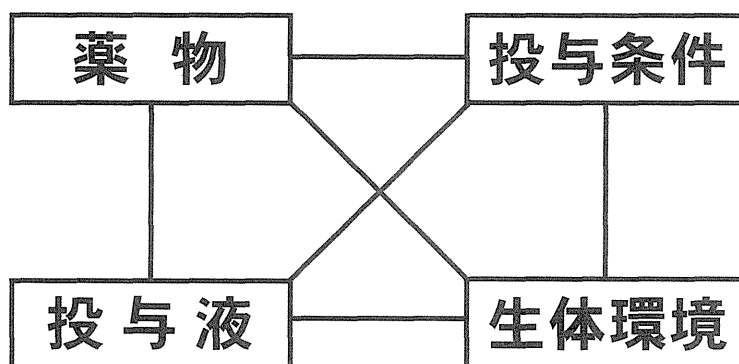


Fig. 6 Various factors for PK determination following *i.c.* injection of drugs.

## 第 1 章 皮内投与後の薬物動態に及ぼす種々投与液の影響<sup>38)</sup>

序章で説明したように、薬物を直接皮内に投与する方法は従来の皮膚適用とは異なり、角層を回避できる新たな皮内投与法として扱うべきと考えられた。この投与形態を注射剤として扱った場合、“浸透圧はなるべく血清と等張であること”、“水素イオン濃度はなるべく血清の pH に近いこと”、“組織障害性が認められないこと”などがあげられる。特に組織に直接薬液を投与する場合は、投与時の疼痛回避のため、薬液の浸透圧及び pH は体液に近いものほど望ましいと思われる。しかし、投与液の浸透圧や投与容積の変化は薬物投与後の皮内動態に大きく影響すると考えられるため、これら影響は十分に把握しておく必要がある。

そこで第 1 章では薬物の皮内動態に及ぼす投与液の浸透圧および投与容積の影響について評価した。Table 2 に浸透圧および投与容積の影響を調べるための SA 水溶液の処方 (No. 1~4) を示す。ここで、処方 No. 3 は序章の結果を再度評価するために用意した。皮内投与後の薬物動態に及ぼす浸透圧の影響については No. 1~3 間で比較した。No. 2 ではグルコースを添加することで高張液 (2983 mOsm) を調製し、No. 3 では薬物のみで高張液 (6246 mOsm) を調製した。さらに、投与容積の影響は処方 No. 2 と No. 4 間で比較した。低投与容積 (5  $\mu$ L) を等張にすると、薬物量が少量になり定量が困難になるため、高張液で比較を行った。

**Table 2 Several preparations of injectant**

Injectant No.	Dose ( $\mu\text{mol}$ )	Volume ( $\mu\text{L}$ )	D-glucose ( $\mu\text{mol}$ )	Osmotic pressure (mOsm)
1	3.08	20	-	308
2	3.08	20	51.7	2893
3	62.46	20		6246
4	3.08	5.0	8.31	2893



## 第1節 解析法

序章では、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与および皮膚適用後の薬物動態を比較するため、局所投与後の薬物量推移から簡便な薬物動態モデルを構築した。しかし、第1章では、皮内投与後の皮膚、筋肉または全身での物質移行をさらに詳細に評価するため、薬物動態モデルを再構築し、解析に用いた。

モデル解析の例として、皮膚適用後の薬物動態をマルチコンパートメントに当てはめ評価している報告が多数ある<sup>33,34)</sup>。これらの解析法では、組織から組織へのクリアランスが定量的に明らかになるため、局所薬物動態を把握するのに適している。しかし、モデル中のコンパートメント数を増やすとパラメータ数が増加するため、*in vitro* 実験や静脈内 (*i.v.*) 投与実験などから多くのデータを用意しなければ局所投与後のパラメータを同時に求めることが困難になるケースがよくある。今回、再構築したモデルも少し複雑で用いるパラメータ数が多いので、静脈内投与後の全身循環系濃度-時間挙動データから消失・分布パラメータを先にカーブフィッティングで求め、この値を用いて皮内動態を解析することとした。

Fig. 7 に構築した‘皮膚’、‘筋肉’、‘全身循環系’および‘末梢系’の4-コンパートメントからなる薬物動態モデルを示す。

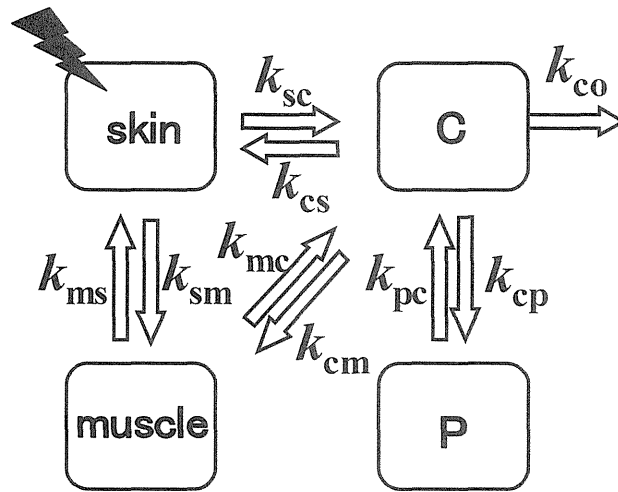


Fig. 7 Pharmacokinetic models for drugs following *i.c.* injection.  
 Abbreviations: C, central compartment; P, peripheral compartment.

予備的な解析で  $k_{ms}$  は極めて 0 に近い値で収束したので、本論文での解析では  $k_{ms}$  を 0 として解析を行った。

以下に各コンパートメントの物質の移行を表す微分方程式を示す。

$$dS/dt = -(k_{sm} + k_{sc})S + k_{ms}M + k_{cs}C \quad (1)$$

$$dM/dt = k_{sm}S - (k_{ms} + k_{mc})M + k_{cm}C \quad (2)$$

$$dC/dt = k_{sc}S + k_{mc}M - (k_{cs} + k_{cm} + k_{cp} + k_{co})C + k_{pc}P \quad (3)$$

$$dP/dt = k_{cp}C - k_{pc}P \quad (4)$$

ここで各速度定数については Fig. 7 を参照されたい。

上記に示した微分方程式 1)–4) は差分法により、それぞれ式 1')–4') に変換できる。

$$S_{i+1} = \{- (k_{sm} + k_{sc}) S_i + k_{ms} M_i + k_{cs} C_i\} \Delta t + S_i \quad (1')$$

$$M_{i+1} = \{k_{sm} S_i - (k_{ms} + k_{mc}) M_i + k_{cm} C_i\} \Delta t + M_i \quad (2')$$

$$C_{i+1} = \{k_{sc} S_i + k_{mc} M_i - (k_{cs} + k_{cm} + k_{cp} + k_{co}) C_i + k_{pc} P_i\} \Delta t + C_i \quad (3')$$

$$P_{i+1} = \{k_{cp} C_i - k_{pc} P_i\} \Delta t + P_i \quad (4')$$

ここで、 $S_i$ 、 $M_i$ 、 $C_i$  および  $P_i$  はそれぞれ  $i$  の時間の各組織中薬物量を表す。 $\Delta t$  は  $t_{i+1} - t_i$  を表す。初期条件 ( $t = 0$ ) は  $S_0 = \text{Dose}$ 、 $M_0 = C_0 = P_0 = 0$  とした。得られたデータは表計算ソフト Microsoft<sup>®</sup> Excel 中のソルバー機能を用いて非線形最小二乗法によりカーブフィッティング (アルゴリズム: 準ニュートン法) を行い、各パラメータを求めた。

## 第2節 体内動態パラメータの算出

皮膚および筋肉における局所薬物動態を評価する前に全身循環系からの薬物の消失挙動を調べた。静脈内投与後の SA の血中濃度推移を線形 2-コンパートメントモデルに当てはめ、MULTI を用いて非線形最小二乗法によるカーブフィッティング（アルゴリズム；Damping Gauss-Newton 法）をし、薬物動態パラメータを算出した。また、局所投与後の血中濃度の範囲では線型であることも確認した。Table 3 に得られた薬物動態パラメータを示す。静脈内投与後の  $\beta$  相において（投与後 60 分）、皮膚中および筋肉中薬物量/血中薬物量は 1 %以下を示した。

この得られた体内からの消失パラメータを用いて、皮内投与後の薬物動態を解析した。

**Table 3 Pharmacokinetic parameters of SA following *i.v.* injection.**

Drugs	$k_{cp}(\text{min}^{-1})$	$k_{pc}(\text{min}^{-1})$	$k_{co}(\text{min}^{-1})$	$V_1(\text{mL/kg})$	$V_2(\text{mL/kg})$
SA	$(6.3 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	$(9.3 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	$(2.2 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$124.3 \pm 7.1$	$73.3 \pm 6.2$
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ )	skin-plasma ratio <sup>a</sup>		muscle-plasma ratio <sup>b</sup>		
39.02	$(5.6 \pm 0.4) \times 10^{-3}$		$(8.2 \pm 0.6) \times 10^{-3}$		

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

<sup>a</sup> SA amount in skin / SA amount in plasma at 60 min following *i.v.* injection

<sup>b</sup> SA amount in muscle / SA amount in plasma at 60 min following *i.v.* injection

### 第3節 浸透圧の影響

浸透圧の影響を調べるため、SA-Na の等張液 (Table 2, No.1 ; 308 mOsm) および高張液 (Table 2, No.2; 2893 mOsm、No.3; 6246 mOsm) を調製し、皮内投与後の薬物動態パラメータを比較した。皮内投与後の皮膚、筋肉および血中薬物量の経時推移を Fig. 8、Fig. 9 および Fig. 10 に示す。

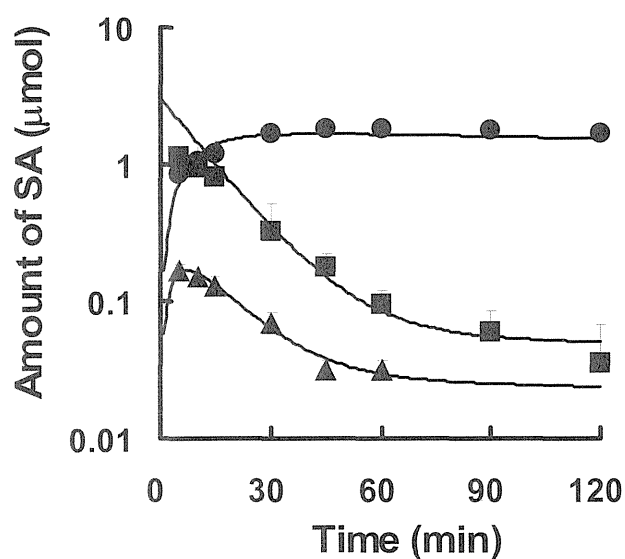


Fig. 8 Time courses of drug amount following *i.c.* injection of SA-Na (3.08  $\mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$ , Table 2, No. 1). Symbols: ■ skin; ▲ muscle; ● systemic circulation. Each line was obtained by curve fitting. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-6 experiments.

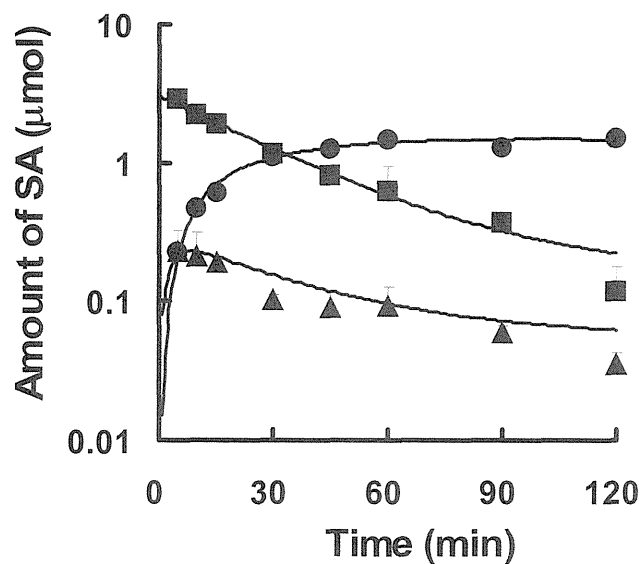


Fig. 9 Time courses of drug amount following *i.c.* injection of SA-Na (3.08  $\mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$ , Table 2, No. 2) in rats.

Symbols: the same as in Fig. 8. Each line was obtained by curve fitting. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-6 experiments.

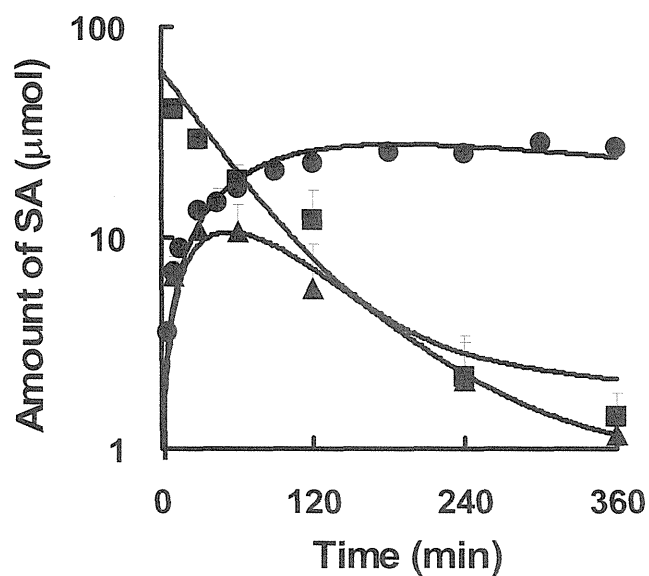


Fig. 10 Time courses of drug amount following *i.c.* injection of SA-Na (62.46  $\mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$ , Table 2, No. 3) in rats.

Symbols: the same as in Fig. 8. Each line was obtained by curve fitting. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-6 experiments.



皮内投与後の SA の皮膚中残存量は等張液 (308 mOsm; Fig. 8) より高張液 (2893 mOsm; Fig. 9, 6246 mOsm; Fig. 10) の方が多く、高張液の適用が組織における薬物滞留性に優れていることがわかった。同様に、血中薬物量推移から、全身への薬物吸収は等張液を投与した方が速やかであり、高張液は等張液よりも吸収が明らかに遅いことがわかった。

得られた各組織中薬物量推移を再構築したコンパートメントモデルに当てはめ、非線形最小二乗法によるカーブフィッティング (アルゴリズム: 準ニュートン法) を行った。本解析では筋肉から皮膚への SA の速度定数  $k_{ms}$  を 0 とすることで、実測値と理論値のよりよい一致が得られた。図中の曲線は各組織中薬物量の平均値を同時にカーブフィッティングしたものである。算出した皮内投与後の薬物動態パラメータを Table 4 に示す。その結果、 $k_{sm}$  は高張液の投与でも、その影響はほとんどなかったが  $k_{sc}$  は高張液の投与で小さくなっていた。このことから皮膚から筋肉への薬物移行は単純拡散であったが、皮膚から血中への移行は投与液や組織中の水の動きが関係していると考えられた。すなわち、薬物溶液を皮膚に投与すると、投与液による depot が形成される。また、薬物溶液が高張の場合、周囲との浸透圧差により、時間経過に伴って水が depot に集まり軽度の浮腫を起こす。この皮膚中の水の動きによって血管からの吸収が抑えられたと考えられる。しかし、表皮や真皮全体に広がる薬液は、ほぼ皮下組織や筋肉に接した状態なので筋肉移行にはあまり影響しなかったと考えられた。

**Table 4 Pharmacokinetic parameters of SA following *i.c.* injection.**

Osmotic pressure (mOsm)	$k_{sc}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{sm}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_s$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{mc}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cs}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cm}$ (min <sup>-1</sup> )
308	$5.4 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	$7.3 \times 10^{-2}$	$2.2 \times 10^{-1}$	$2.3 \times 10^{-3}$	$2.7 \times 10^{-3}$
2893	$5.0 \times 10^{-3}$	$2.6 \times 10^{-2}$	$3.1 \times 10^{-2}$	$2.8 \times 10^{-1}$	$3.3 \times 10^{-3}$	$7.9 \times 10^{-3}$
6248	$1.0 \times 10^{-2}$	$8.5 \times 10^{-3}$	$1.9 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^{-3}$	0

#### 第4節 投与容積の影響

投与容積の影響を調べるため、同投与量の SA-Na ( $3.08 \mu\text{mol}$ ) を高容積 (Table 2, No.2 ;  $20 \mu\text{L}$ ) と低容積 (Table2, No.4 ;  $5 \mu\text{L}$ ) で皮内に投与した。低容積で投与後の皮膚、筋肉および血中薬物量の経時推移を Fig. 11 に示す。

本来であれば、等張液で比較するべきである。しかし  $5 \mu\text{L}$  の投与容積は等張にすると投与量が少なくなり定量限界に近いところでの評価となるために、高張液を用いて比較を行った。

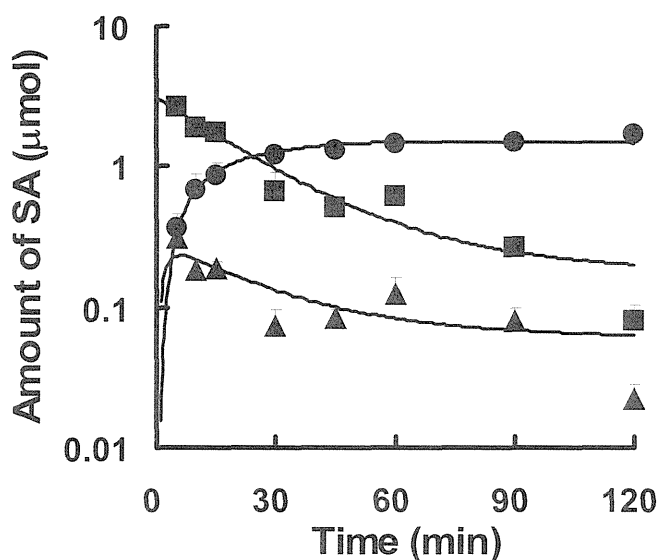


Fig. 11 Time courses of SA amount following *i.c.* injection of SA-Na ( $3.08 \mu\text{mol}/5 \mu\text{L}$ , Table 2, No. 4) in rats.

Symbols: ■ skin; ▲ muscle; ● systemic circulation. Each line was obtained by curve fitting. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-6 experiments.

皮膚滞留性は高容積 (20  $\mu\text{L}$ ; Fig. 9) の方が低容積 (5  $\mu\text{L}$ ; Fig. 11) よりもわずかに優れていたが、薬物挙動はほとんど変わらなかった。得られた各組織中薬物量推移を構築したコンパートメントモデルに当てはめ、非線形最小二乗法によりカーブフィッティング (アルゴリズム: 準ニュートン法) を行った。算出された皮内投与後の薬物動態パラメータを Table 5 に示す。その結果、モデル解析により得られたパラメータ  $k_s$  の値からも高容積の方が皮膚からの消失が遅いことがわかったが、 $k_{sc}$  値より全身への吸収はほとんど変わらないことが示唆された。しかし、高浸透圧の試験系では皮膚から血中への SA の移行が抑えられることが示された (第 3 節) ため、その効果に比べると投与容積の影響はそれほど大きくはないと考えられた。また、皮内に投与された薬液 depot からの薬物放出が吸収の律速過程ならば、投与液の容積が影響すると考えられたが、処方 No. 2 と No. 4 の皮膚からその直下筋肉への直接移行割合 ( $k_{sm}/k_s$ ) がそれぞれ約 83%、87%であったことから、(No. 1; 約 24%と比較して) 皮膚から筋肉への薬物移行には浸透圧の影響が大きいと考えられた。

**Table 5 Pharmacokinetic parameters of SA following *i.c.* injection.**

Volume ( $\mu\text{L}$ )	$k_{sc}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{sm}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_s$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{mc}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cs}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cm}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
20	$5.0 \times 10^{-3}$	$2.6 \times 10^{-2}$	$3.1 \times 10^{-2}$	$2.8 \times 10^{-1}$	$3.3 \times 10^{-3}$	$7.9 \times 10^{-3}$
5	$5.0 \times 10^{-3}$	$3.6 \times 10^{-2}$	$4.1 \times 10^{-2}$	$4.0 \times 10^{-3}$	$5.0 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-2}$

## 第5節 小括

第1章では、薬物を直接皮内に投与する際の投与液の特性について評価した。投与液の浸透圧について、高張液で投与した方が皮膚および筋肉での滞留性に優れ、全身への吸収が遅れることが明らかとなった。また、投与液の容積については、高容積で投与した方が皮膚での滞留性がわずかに高かったが、皮内投与後の薬物動態に及ぼす要因として、浸透圧の方が大きく影響することがわかった。

## 第2章 皮内投与後の薬物動態に及ぼす薬物分子量の影響<sup>39)</sup>

一般に薬物の皮膚透過性は薬物の皮膚への分配性と皮膚中拡散性により支配され、さらに拡散速度はモル体積に影響を受けることが報告されている<sup>40, 41)</sup>。しかし、角層バリアーを回避する皮内投与法では、薬物の皮膚への分配を考慮する必要がないため、皮膚中での薬物拡散性が極めて重要になり、そのため、薬物の分子量が皮内投与後の全身および近傍組織への移行性に大きな影響を与えると考えられる。

そこで、第2章では皮内投与後の薬物動態に及ぼす分子量の影響を評価するため、サリチル酸ナトリウム (SA-Na) に加えてカルセインナトリウム (CAL-Na)、FITC - デキストラン (FD-4, FD-10, FD-20 および FD-40) をモデル薬物として追加し、*in vitro* 皮内投与実験から薬物の皮膚中拡散性を、また、*in vitro* 皮内投与実験および *in vivo* 静脈内投与実験から convolution 法<sup>42)</sup>により *in vivo* 皮内投与後の血中薬物濃度を予測し、実測値と比較した。

## 第1節 解析法

### 1. 修飾 W.I. Higuchi 式

一般に、薬物溶解型経皮吸収製剤からの薬物放出量は、以下の W.I. Higuchi 式 (1) により解析される<sup>43)</sup>。

$$Q = LC_0 \left[ 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{D(2n+1)^2 \pi^2 t}{4L^2}\right) \right] \quad (1)$$

ここで、 $Q$  は単位面積あたりの薬物放出量 ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ )、 $L$  は基剤の厚さ (cm)、 $C_0$  は基剤中の薬物初濃度 ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ )、 $D$  は基剤中の薬物拡散係数 ( $\text{cm}^2/\text{min}$ )、 $t$  は時間 (min) である。

(1) 式は均一な matrix からの単位面積当たりの放出量を示している。一方、薬物を皮内投与した皮膚は薬物が均一に分布した matrix ではなく、薬液 depot が皮膚中の一部に分布したものと考えられる。しかし、広範囲の皮膚をサンプリングすれば、以下に示すような修飾 W.I. Higuchi 式 (2) を用いて、皮膚からの薬物放出性を解析できると判断した。

$$Q_s = X_\infty \left[ 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left(-\frac{D_s(2n+1)^2 \pi^2 t}{4L_s^2}\right) \right] \quad (2)$$

ここで、 $Q_s$  は時間  $t$  における皮膚からの薬物放出量 ( $\mu\text{mol}$ )、 $X_\infty$  は皮膚から放出した全薬物量 ( $\mu\text{mol}$ )、 $L_s$  は皮膚の厚さ (cm)、 $D_s$  は皮膚中のみかけの拡散係数 ( $\text{cm}^2/\text{min}$ ) である。

各種薬物の累積放出量－時間挙動データについて表計算ソフト Microsoft<sup>®</sup> Excel 中のソルバー機能を用いて、非線形最小二乗法により式 (2) にカーブフィッティング (アルゴリズム ; 準ニュートン法) し、薬物のみかけの皮膚中拡



散係数  $D_s$  を算出した。

## 2. Convolution による皮内投与後の血中薬物濃度の予測

Convolution は *in vitro* の皮膚透過-時間挙動データから *in vivo* で皮膚に薬物を適用した後の血中濃度-時間挙動を予測するのに有用な手段である<sup>42)</sup>。また、*in vitro* の皮膚透過データおよび体内での薬物消失挙動が線形であれば、予測された血中濃度も精度よく実測値に一致することが報告されている<sup>44)</sup>。そこで、*in vitro* 皮内投与後の皮膚からの薬物放出速度と静脈内投与後の血中薬物の消失挙動より convolution を利用して、*in vivo* 皮内投与後の血中濃度-時間挙動を予測した。Convolution 式を以下に示す。

$$B(t) = \int_0^t A(\theta) \cdot W(t - \theta) d\theta \quad (3)$$

ここで、 $B$  は時間  $t$  における *in vivo* 皮内投与後の血中濃度、 $A$  は静脈内投与後の血中濃度、 $W$  は *in vitro* 皮内投与後の薬物放出速度である。式 (3) を一定の時間間隔  $H$  で刻み、 $H$  ごとに積分することで近似計算を行った。

近似計算には以下に示す直線化法の式を用いた。

$$\frac{6B_n}{H} = W_0(A_{n-1} + 2A_n) + \sum_{l=1}^{n-1} (A_{l-1} + 4A_l + A_{l+1})W_{n-l} + W_n(A_1 + 2A_0) \quad (4)$$

## 第2節 体内動態パラメータの算出

第1節で述べたように、*in vitro* 皮内投与後の皮膚からの薬物放出速度と体内からの薬物消失挙動がわかれば、convolutionによって血中濃度-時間推移を予測することができる。そこで、静脈内投与後の血中薬物濃度を2-コンパートメントモデルに当てはめ、MULTIを用いて非線形最小二乗法によりカーブフィッティング（アルゴリズム；Damping Gauss-Newton法）した。各薬物の投与量および薬物動態パラメータをTable 6に示す。

**Table 6 Pharmacokinetic parameters for drugs following *i.v.* injection**

Drugs	Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ )	$A$ (nmol/mL)	$B$ (nmol/mL)	$\alpha$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{min}^{-1}$ )
SA	38.8	$103 \pm 13.6$	$170 \pm 13.0$	$(1.56 \pm 0.67) \times 10^{-1}$	$(1.38 \pm 0.20) \times 10^{-3}$
CAL	3.45	$6.38 \pm 1.21$	$3.53 \pm 0.79$	$(9.91 \pm 3.20) \times 10^{-2}$	$(1.07 \pm 0.21) \times 10^{-2}$
FD-4	1.31	$6.91 \pm 0.30$	$2.41 \pm 0.45$	$(7.87 \pm 1.81) \times 10^{-2}$	$(1.01 \pm 0.13) \times 10^{-2}$
FD-10	0.198	$8.53 \pm 3.60$	$0.78 \pm 0.09$	$(2.30 \pm 0.76) \times 10^{-1}$	$(1.18 \pm 0.14) \times 10^{-2}$
FD-20	0.101	$2.02 \pm 0.28$	$0.30 \pm 0.04$	$(9.50 \pm 0.18) \times 10^{-2}$	$(9.73 \pm 1.20) \times 10^{-3}$
FD-40	0.0510	$1.14 \pm 0.16$	$0.82 \pm 0.06$	$(1.05 \pm 0.25) \times 10^{-1}$	$(5.59 \pm 0.47) \times 10^{-3}$

### 第3節 皮内投与後の薬物のみかけの皮膚中拡散係数の算出

角層を除く生きた表皮中および真皮中での薬物の平均拡散性は、ストリッピングして角層を取り除いた皮膚での薬物透過データから求めることができる。一般に分子量の増加に伴い、生きた皮膚中での拡散性は低くなることがわかっている。しかし、皮内投与により薬液を皮膚中に直接投与すると、皮膚中に薬液が満たされ、その溶媒の移動（浸透）が薬物拡散性に影響する可能性がある<sup>38)</sup>ことから、皮膚中における薬物の存在環境が皮内投与後と通常の皮膚適用後では大きく異なると考えられる。そこでまず、投与量を SA-Na : 3.08  $\mu\text{mol}$ 、CAL-Na : 103.45 nmol、FD-4 : 78.53 nmol、FD-10 : 29.72 nmol、FD-20 : 15.15 nmol および FD-40 : 7.65 nmol、投与容積を 20  $\mu\text{L}$  としそれぞれ皮内投与を行い、真皮側からの経時的な薬物放出挙動から皮膚中のみかけの拡散係数を算出した。

Fig. 12 に *in vitro* 皮内投与後の皮膚からの6種モデル薬物の累積放出量（%）—時間曲線を示す。SA、CAL、FD-4、FD-10 および FD-20 は皮内投与後 2-3 時間以内に投与した薬物のほぼ全てが皮膚から放出した（Figs. 12a-e）。しかし FD-40 は 8 時間後も、投与量の約 8 割しか放出せず、残りの 2 割が皮膚中に残存していたと考えられた（Fig. 12f）。

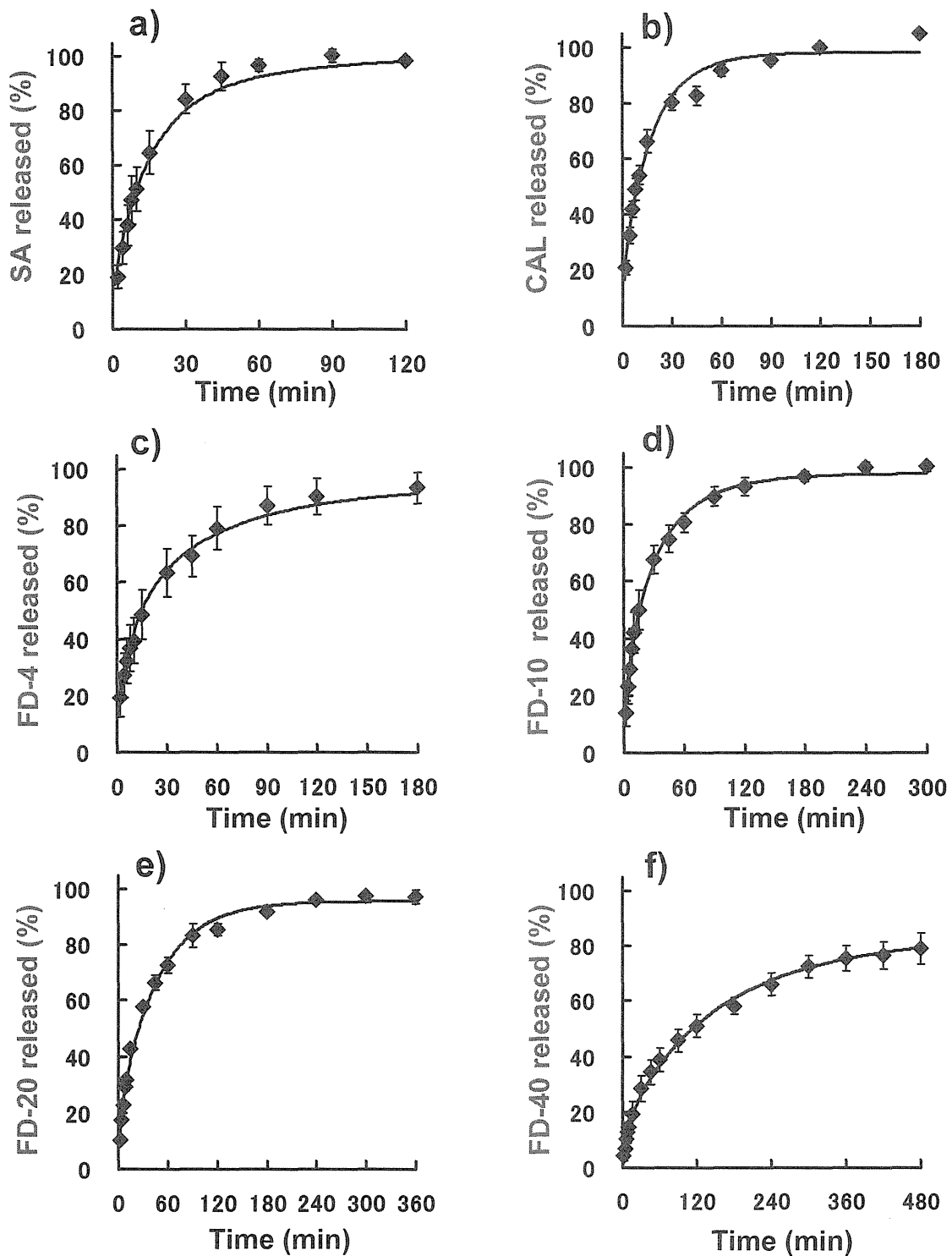
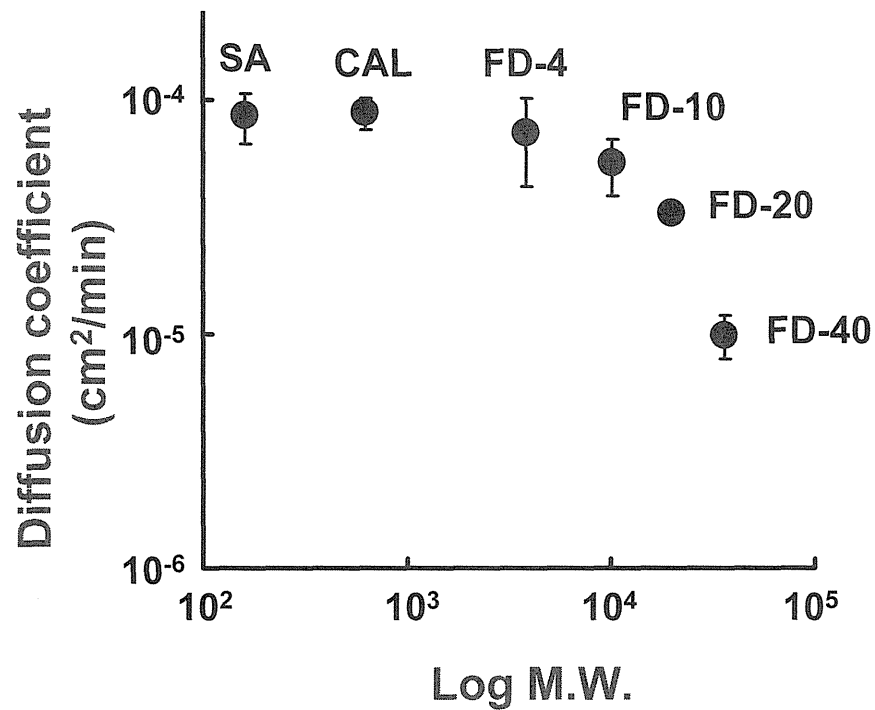


Fig. 12 Cumulative amount of drug released (%) *in vitro* following *i.c.* injection of SA (a), CAL (b), FD-4 (c), FD-10 (d), FD-10 (e) and FD-4 (f).

Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 4-6 experiments.

これら得られた各種薬物の累積放出量（%）一時間曲線をそれぞれ放出した絶対量を考慮した修飾 W.I. Higuchi 式に当てはめ、非線形最小二乗法によりカーブフィッティングし、みかけの皮膚中拡散係数を算出した。Fig. 13 にこうして求めた薬物のみかけの皮膚中拡散係数と分子量の関係を示す。SA、CAL および FD-4 のみかけの拡散係数  $D_s$  ( $\text{cm}^2/\text{min}$ )（平均  $\pm$  標準誤差）はそれぞれ  $(8.53 \pm 2.01) \times 10^{-5}$ 、 $(8.76 \pm 1.28) \times 10^{-5}$  および  $(7.20 \pm 2.91) \times 10^{-5}$  であり、ほぼ同じ値であった。一方、比較的分子量の大きい FD-10、FD-20 および FD-40 の  $D_s$  はそれぞれ  $(5.34 \pm 1.45) \times 10^{-5}$ 、 $(3.28 \pm 0.13) \times 10^{-5}$  および  $(9.96 \pm 2.05) \times 10^{-6}$  と FD-10 以上の分子量で急激に低下した。

通常 of 皮膚中拡散では、約 0.5 kDa 付近で物質の拡散性が著しく低下するのに対し、この投与条件（注射針；27 G, 投与容積；20  $\mu\text{L}$ ）では、10 kDa 付近に拡散性が低下する閾値があるかもしれない。これは、皮膚中に投与された溶媒（薬液）の影響が 10 kDa 付近までは大きく関与したが、それ以上では、分子量の大きさによる拡散性の低さが顕著に現れたと考えられた。この拡散係数が著しく減少し始める分子量の閾値は、投与容積、投与媒体浸透圧などの溶液の特性にも影響を受ける可能性が考えられることから、様々な投与条件においてこの閾値を推定することが必要であろう。



**Fig. 13** Relationship between molecular weight and apparent diffusion coefficient of drugs following *i.c.* injection (*in vitro*).

Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 4-6 experiments.

## 第4節 皮内投与後の薬物動態に及ぼす薬物分子量の影響

### 1. 皮内投与後の血中薬物濃度

皮内投与後の全身循環系への薬物吸収は、皮膚中の血管から吸収される経路と皮膚から筋肉へ移行した後に筋肉中の血管から吸収される場合の二通りあることはすでに序章で述べた。そこで、分子量が大きくなることで、どちらかの経路で遅延または組織中で滞留や吸着があるならば、計算式から予測される血中濃度と実測の血中濃度に乖離が生じるものと考え、その評価を行った。なお、予測値の算出には convolution を用いた。Fig. 14 に 6 種モデル薬物の *in vivo* 皮内投与後の血中薬物濃度 (実測値) と convolution により予測された血中濃度 (予測値) を示す。

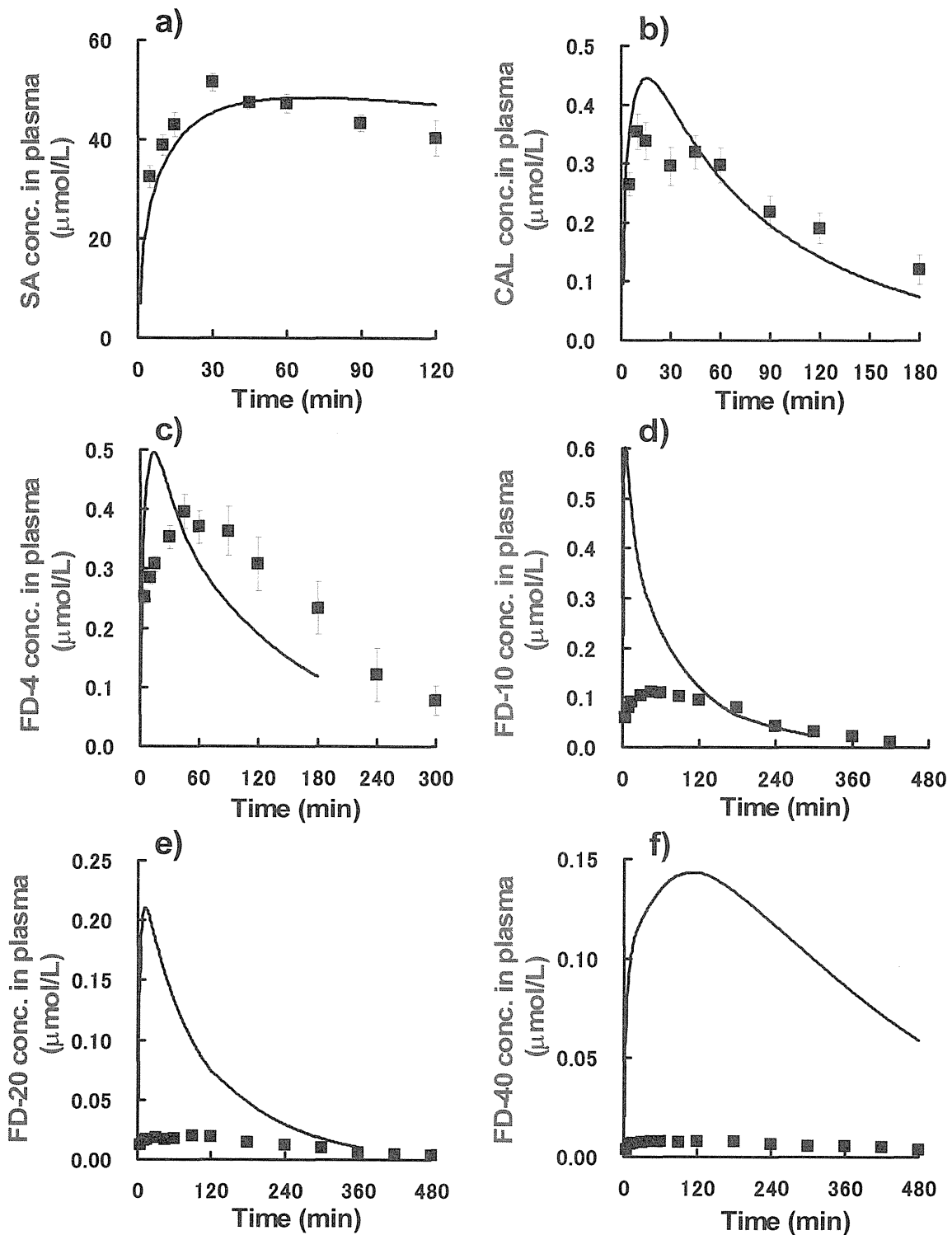


Fig. 14 Time courses of plasma concentration of drugs following *i.c.* injection of SA (a), CAL (b), FD-4 (c), FD-10 (d), FD-10 (e) and FD-4 (f).

Each observed data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-24 experiments.

Each line was predicted by the convolution.



SA と CAL の皮内投与後の血中濃度は実測値と予測値でほぼ一致した (Figs. 14a, b)。FD-4 では予測値に比べて、実測値の血中濃度推移の  $T_{\max}$  が遅く、 $C_{\max}$  が低くなっており、吸収に遅れが観察された (Fig. 14c)。FD-10、FD-20 および FD-40 では、予測値に比べ実測値が極めて低く、これら化合物は吸収速度だけでなく、吸収量も極めて低いことが示唆された (Figs. 14d, e, f)。

Table 7 に実測値と予測値の  $AUC_{0-t}$  を、Fig. 15 にそれぞれの AUC の実測値/予測値比と分子量の関係を示す。なお、 $AUC_{0-t}$  の算出は理論曲線の最終ポイントまで (0 から時間  $t$ ) を台形法により算出した。この理由は、最終ポイントから外挿した無限大までの  $AUC_{0-\infty}$  では最終ポイントに重みがかかりすぎ、得られる AUC の精度が低かったためである。なお、予測値の AUC の算出は convolution 計算の近似式で用いた刻み時間  $H$  ごとに計算した。

**Table 7 Molecular weight of drugs and pharmacokinetic parameters following *i.c.* injection**

Drugs	M.W.	0-time(min)	AUC (nmol/mL·min)	
			Observed value	Theoretical curve
SA	160	0-120	5232	5359
CAL	580	0-180	41.14	39.95
FD-4	3,820	0-180	57.14	47.45
FD-10	10,095	0-300	23.01	42.63
FD-20	19,800	0-360	5.12	24.40
FD-40	39,200	0-480	3.07	52.04

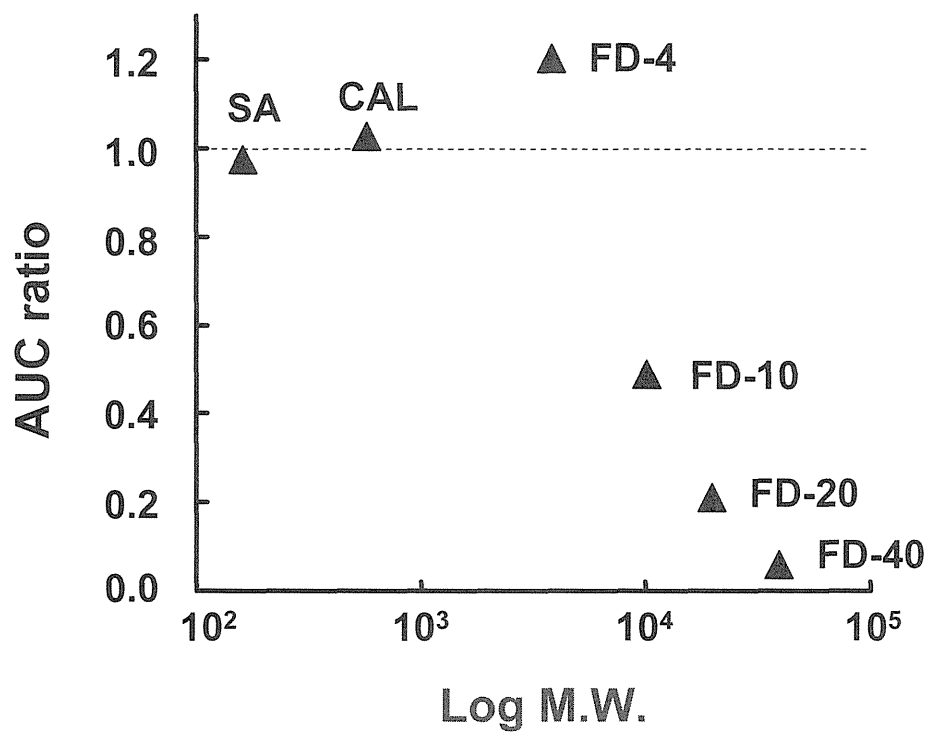


Fig. 15 Relationship between molecular weight and observed/predicted ratio of  $AUC_{0-t}$  of drugs following *i.c.* injection.

SA、CAL および FD-4 は AUC の実測値/予測値比がほぼ 1 を示し、吸収率は予測値と一致していた。しかし、FD-10 では約 0.5、FD-20 では約 0.2、FD-40 では約 0.05 と分子量が増加するに伴い、AUC 比は明らかに低下した。

本解析法では、皮膚から全身循環系への吸収経路に吸収を遅らせる障害がなければ、実測値と予測値と一致する。なお、一般に高分子薬物の局所投与ではリンパ管への薬物の直接移行が考えられるが<sup>45,46)</sup>、ここでは、血中への吸収性を評価しており、リンパ管への移行またはリンパ管を経由しての血中への移行は、全身循環系への吸収の遅れとして結果に反映されるので本解析法は理論的に問題ないと考えた。しかし、高分子薬物のリンパ管への移行性については経時的なデータがあれば得られる情報が多いことから、今後の検討が待たれるところである。

*In vivo* 皮内投与後の薬物の皮膚中からの消失速度は、*in vitro* 皮内投与後の薬物の放出速度よりも遅かったものの、分子量による皮膚中拡散性のランクオーダーは同じであった。*In vitro* と *in vivo* 挙動の違いは、*in vivo* 試験における薬物の皮膚中での低血管透過性による皮膚中での滞留、皮下脂肪の有無、さらに筋肉までの拡散距離などに影響すると予想され、さらに *in vivo* ではシンク条件が成立していない可能性も考えられた。

## 2. 皮内投与後の組織中薬物量

SA、CAL、FD-4、FD-10、FD-20 および FD-40 の皮内投与後のこれらの皮膚中量および筋肉中量の経時推移を Fig. 16 に示す。皮内投与後、全ての薬物の皮膚中量は経時的に低下した。分子量が小さい SA、CAL および FD-4 は皮膚からの消失が速かった。すなわち、SA、CAL は 60 分以内に、また、FD-4 は投与後 180 分で皮膚中量が 10%以下まで低下した。加えて、これらの薬物は筋肉からの消失も速かった。一方、分子量が大きい FD-10、FD-20 および FD-40 では、皮膚からの消失は遅く、FD-40 は 8 時間後でも皮膚中に約 8 割が残存していた。また、筋肉からの消失も遅く、筋肉中に滞留する傾向にあった。

第 3 節の *in vitro* 試験の結果より、薬物の皮膚中拡散性は分子量に関係して低下し、また、それに伴い *in vivo* 試験では筋肉移行性も低下すると考えられたが、分子量増大に起因する血管透過性の低下が薬物の筋肉組織中量増加に結びついたと考えられた。筋肉が薬物の標的部位であり、かつ滞留性を期待するならば、分子量がある程度大きい薬物を用いた方が有用となりやすいことは重要な知見であると思われる。

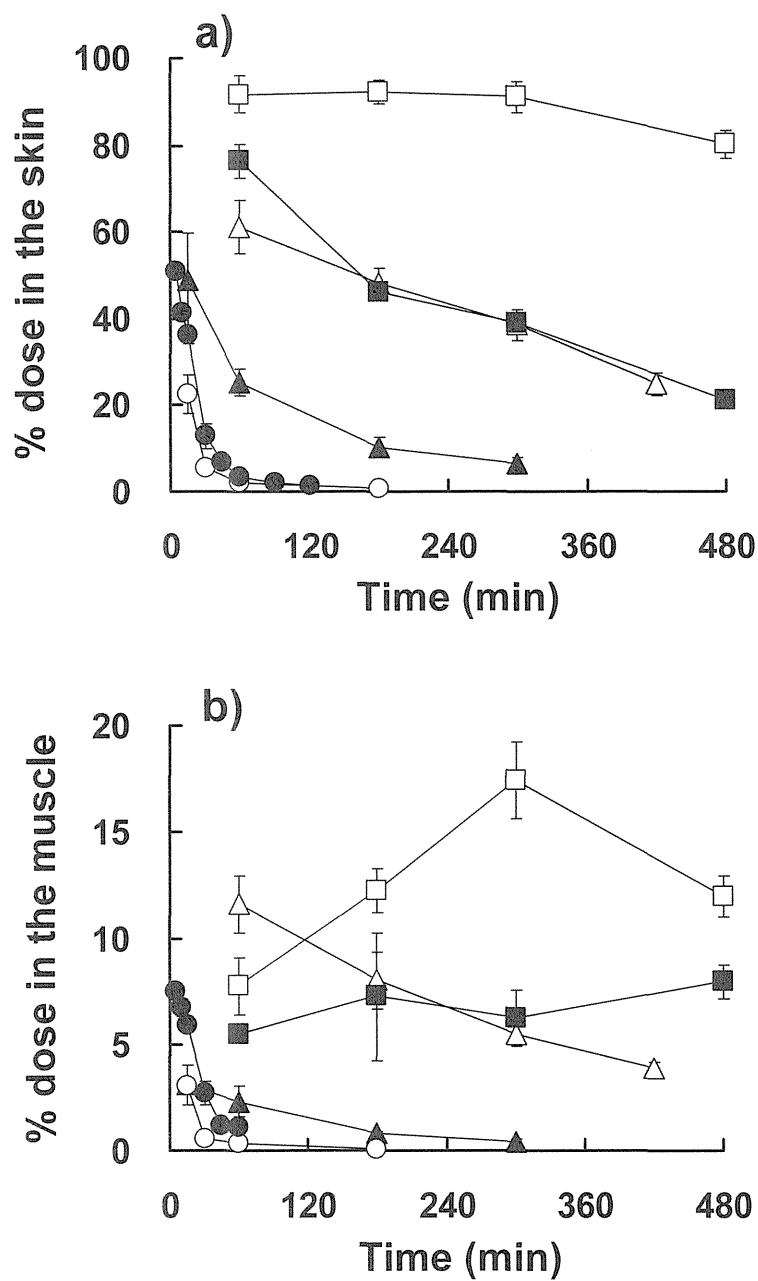


Fig. 16 Time courses of drug amount in skin (a) and muscle (b) following *i.c.* injection.

Symbols: ● SA; ○ CAL; ▲ FD-4; △ FD-10; ■ FD-20; □ FD-40. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-4 experiments.

## 第 5 節 小括

第 2 章では、直接皮内に投与した薬物の全身吸収性（皮膚中拡散性および血管透過性）に及ぼす薬物分子量の影響を評価した。本投与条件（27 G の注射針、投与容積 20  $\mu\text{L}$ ）の場合、皮膚中の薬物拡散性は約 10 kDa 以上の分子量で大きく低下し、*in vivo* 試験での吸収性は約 4 kDa 以上の分子量で低下し始めた。すなわち、皮内投与後の薬物吸収性の低下は、約 4 kDa 付近での薬物の血管壁透過性の低下もしくはリンパ管への取り込みに起因することが示唆された。

### 第3章 皮内投与後の薬物動態に及ぼす血管作動薬併用の影響<sup>47)</sup>

薬物の皮膚適用時に血管収縮薬であるフェニレフリンを併用することで、薬物の全身循環系への吸収は抑えられ、投与部位直下の筋肉への移行性が增大することが報告されている<sup>48)</sup>。また、局所麻酔薬として用いたリドカインの皮膚滞留性を改善するため、リドカインを含有した局所製剤中にエピネフリンやフェニレフリンを添加した例も報告されている<sup>49-51)</sup>。皮膚中に直接血管作動薬を含有した水溶液を投与すると直接血管作動薬が皮膚中の血管に曝されるため、皮膚中の血流量が変化することは十分予測されることである。角層バリアーを回避した皮内投与法における薬物の筋肉移行性または全身吸収性に対する血管作動薬の効果は角層バリアーを考慮する必要がないぶん皮膚適用時よりも顕著であると考えられる。すなわち、皮内投与では、血管作動薬の併用により、薬物の組織ターゲティングや全身循環系への吸収を制御できることが考えられる。

そこで第3章では、血管収縮薬として $\alpha_1$ 作動薬である塩酸フェニレフリン、血管拡張薬として $\alpha$ 遮断薬である塩酸トラゾリンをそれぞれ併用し、分子量の小さいSA-Na (M.W. 160) と比較的大きいFD-4 (M.W. 3,820) の皮内投与後の薬物動態を比較した。

## 第 1 節 解析法

薬物の体内動態の解析には第 1 章で用いた皮膚、筋肉、全身循環系および末梢系からなる 4-コンパートメントモデル (Fig. 7) を使用した。また、皮内投与後の薬物動態パラメータは第 1 章と同様な方法により算出した。



## 第2節 血管作動薬の皮内投与による皮膚中血流量の変化

薬物の皮内投与後の薬物動態に及ぼす血管作動薬併用の影響を評価する前に、血管作動薬のみを皮内投与し、皮膚中血流量の変化を確認した。なお、皮膚中血流量はレーザードップラー法にて測定した。この方法は、皮膚に照射したレーザー光が血球によって散乱し、そのドップラー効果によりシフトした周波数を検出することで皮膚中の血流量を測定する<sup>52)</sup>。本方法は非侵襲的計測法であり、また連続測定が可能であるため、本研究で選択した。

Fig. 17にラット腹部に各血管作動薬を含有したPBS溶液を皮内投与した後の局所皮膚血流量の経時変化を示す。また、確認のためPBSのみの皮内投与後の皮膚中血流量を測定したが、未処理の皮膚の血流量と変わらなかった。

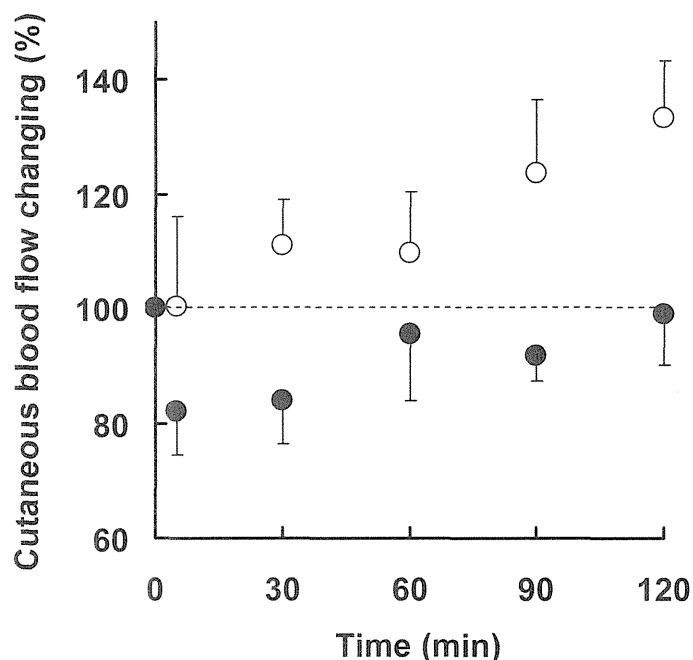


Fig. 17 Time courses of cutaneous blood flow following *i.c.* injection of vasoactive agents. Symbols: ● phenylephrine (2 nmol/20  $\mu$ L); ○ tolazoline (50 nmol/20  $\mu$ L). Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-4 experiments.

Fig. 17 の縦軸は投与前の皮膚血流量に対する割合を示す。図から明らかなように、フェニレフリンの皮内投与後 5 分で投与部位皮膚の血流量が減少し、2 時間後には投与前の血流量に戻った。それに対し、トラゾリンの皮内投与では徐々に投与部位皮膚の血流量が増加し、2 時間後も投与前の血流量には戻らなかった。このような血管作動薬を皮膚適用した時では、血管作動薬自体が血管系に浸透するまでのラグタイムが存在するために、その効果が現れるのに時間を要すると考えられるのに対し、今回試験した皮内投与では投与後すぐに血管収縮または拡張がみられた。

血管作動薬の併用量は、試験時間内に皮膚、筋肉及び血中にそれぞれの薬物 (SA および FD-4) が定量可能な量に存在するように設定した。すなわち、予備検討においてフェニレフリンの併用量を増やすと血管収縮効果は上がったが、皮内投与後に薬物 (SA および FD-4) は血中に検出されなかった。また、トラゾリンの併用量を増やすことで血管拡張効果は上がったが、投与部位から薬物 (SA および FD-4) の消失が速くなり、薬物の皮膚中滞留時間が短くなった。このどちらのケースも薬物 (SA および FD-4) の動態評価が困難であったため、血管作動薬の併用量をフェニレフリンでは 50 nmol、トラゾリンでは 2 nmol に設定した。なお、モデル薬物の選択についても、FD-4 より大きい分子量の薬物では、組織移行速度が極端に遅くなり、動態学的評価が困難であったので、SA と FD-4 のみとした。

レーザードップラー法によって求められる血流値は皮膚表面から真皮乳頭下血管までの脈管系の血流量を反映している (皮膚表面から約 500  $\mu\text{m}$  の深さ)<sup>53, 54)</sup>。そのため、血管作動薬皮内投与後の皮膚中血流量の変化を十分捉えることができ、フェニレフリンの血流量減少およびトラゾリンの血流量増大の現象を確認することができた。これら皮膚血流量の変化は、血管作動薬の作用機序、力価に関係すると思われるが、また、血管作動薬濃度や皮膚中拡散性にも影響を受けるかもしれない。しかし、本実験では血管作動薬の併用量がごく微量で

あるため、血管作動薬自体の動態を評価することはできなかった。

### 第3節 体内動態パラメータの算出

皮内投与後の薬物の皮膚および筋肉における局所薬物動態を評価する前に全身循環系からの薬物の消失挙動を調べた。静脈内投与後の SA の薬物動態パラメータは、第1章のデータ (Table 3) を用いた。また、静脈内投与後の FD-4 の血中濃度推移については、線形 2-コンパートメントモデルを仮定し MULTI を用いて非線形最小二乗法によるカーブフィッティング (アルゴリズム ; Damping Gauss-Newton 法) をして、薬物動態パラメータを算出した。また、局所投与後の血中濃度の範囲では消失挙動は線型であることも確認した。Table 8 に FD-4 の薬物動態パラメータを示す。皮膚中および筋肉中薬物量/血中薬物量比は、FD-4 では皮膚中および筋肉中量を検出できなかったため、算出しなかった。

このようにして得られた SA と FD-4 の体内からの消失パラメータを用いて、これら薬物の皮内投与後の薬物動態を解析した。

**Table 8 Pharmacokinetic parameters of FD-4 following *i.v.* injection.**

Drugs	$k_{cp}(\text{min}^{-1})$	$k_{pc}(\text{min}^{-1})$	$k_{co}(\text{min}^{-1})$	$V_1(\text{mL/kg})$	$V_2(\text{mL/kg})$
FD-4	$(4.5 \pm 0.9) \times 10^{-2}$	$(4.1 \pm 0.7) \times 10^{-2}$	$(3.1 \pm 0.4) \times 10^{-2}$	$134.2 \pm 7.7$	$145.3 \pm 7.8$
Dose ( $\mu\text{mol/kg}$ )		Skin-plasma ratio		Muscle-plasma ratio	
1.31		—		—	

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

## 第4節 血管作動薬併用の影響

### 1. SA 皮内投与後の薬物動態

Fig. 18 に SA-Na 単独 (Fig. 18a) および SA-Na にフェニレフリン (Fig. 18b) またはトラゾリン (Fig. 18c) を併用し皮内投与 ( $3.08 \mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$ ) した後の各組織中 SA 量の時間推移を示す。SA-Na 単独投与 (コントロール) は、90 分以降の筋肉中 SA 量が定量限界以下であった ( $<0.02 \mu\text{mol}$ )。また、トラゾリンを併用した SA-Na の皮内投与では、SA の 90 分以降の皮膚中量および 60 分以降の筋肉中量は定量限界以下であった。

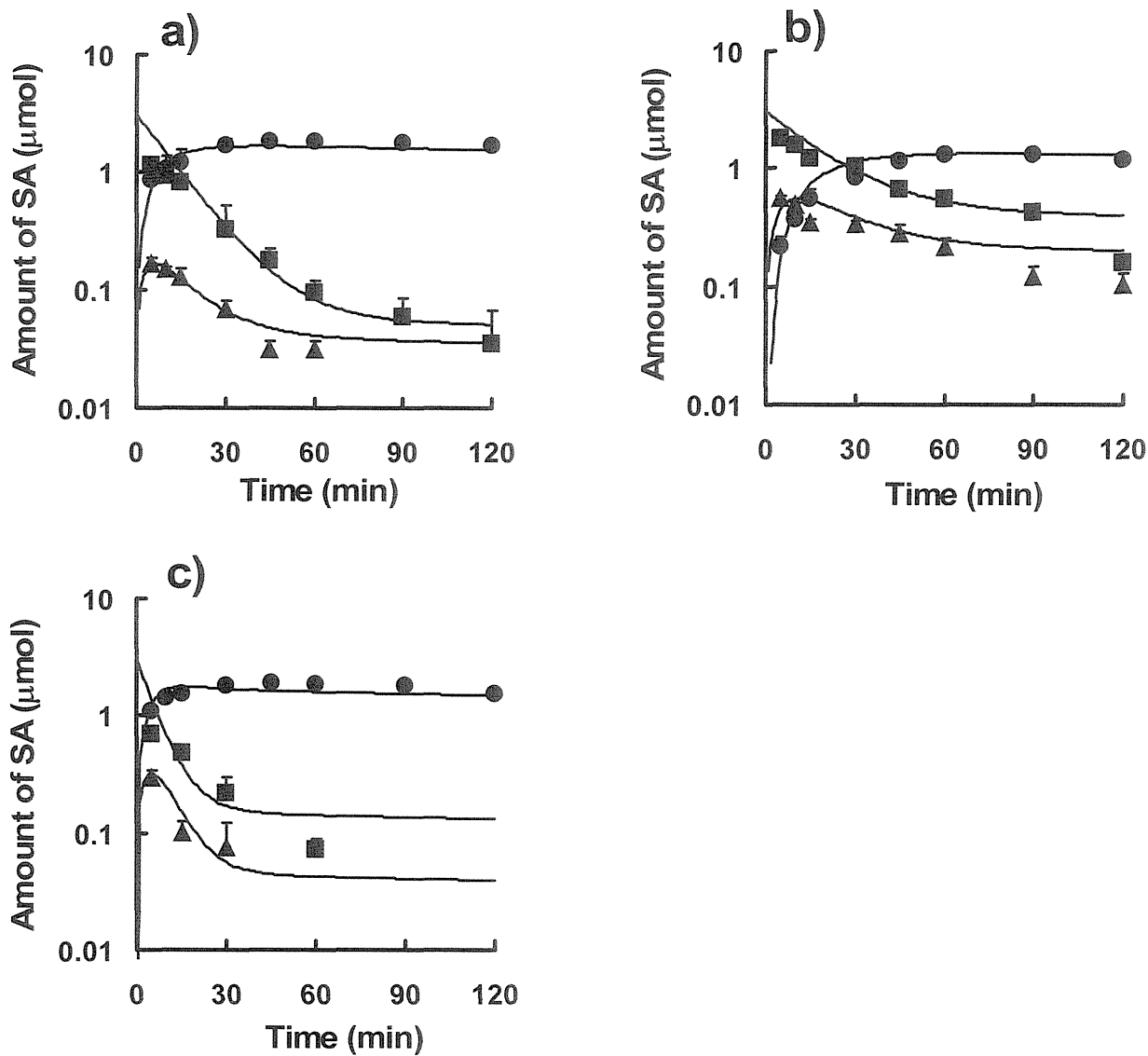


Fig. 18 Time courses of SA amount in each tissue following *i.c.* injection of SA-Na (3.08  $\mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$ ) (a) combined with phenylephrine (b) and tolazoline (c). Symbols: ■ skin; ▲ muscle; ● plasma. Each line was obtained by the curve-fitting technique. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-12 experiments.

得られた血中および皮膚、筋肉中 SA 量（平均値）を構築した薬物動態モデルに当てはめ、非線形最小二乗法によりカーブフィッティングを行った。本解析では筋肉から皮膚への速度定数  $k_{ms}$  を 0 とすることで、実測値と理論値のよりよい一致が得られた。図中の曲線は各組織中薬物量の平均値を同時にカーブフィッティングして得られたものである。Table 9 に得られた皮内投与後の薬物動態パラメータを示す。フェニレフリンの併用により、皮膚からの SA の消失 ( $k_s$ ) はコントロールの約 0.6 倍に低下した。また、SA の全身移行 ( $k_{sc}$ ) は 0 を示し、皮膚から筋肉への移行 ( $k_{sm}$ ) はコントロールの約 2.4 倍に上昇した。フェニレフリンの併用は、SA 単独で投与するよりも SA の血管移行性が低くなり、筋肉移行性が高くなった。フェニレフリンによる真皮中血管の収縮により薬物の血管移行が抑えられ、代替的に筋肉への移行が増加したと考えられる。一方、トラゾリンの併用により、皮膚から SA の消失 ( $k_s$ ) はコントロールの約 2.1 倍に上昇した。また、SA の皮膚から全身移行 ( $k_{sc}$ ) および筋肉移行 ( $k_{sm}$ ) は、それぞれコントロールの約 1.9 倍および約 2.5 倍に上昇した。すなわち、トラゾリンの併用では SA 単独で投与するより SA の血管移行性だけでなく筋肉移行性も高くなった。トラゾリンが皮内に存在することで真皮中血管が拡張し、薬物の血管移行が促進されるため筋肉移行 ( $k_{sm}$ ) が減少すると考えられたが、結果はそうならなかった。この原因については以下のように予測される。 $k_{sc}$  と  $k_{sm}$  の和である  $k_s$  を‘皮膚からの薬物放出パラメータ’とみなすと、その値はトラゾリンの併用により大きくなっていった。すなわち、血流量の増大により皮膚からの薬物クリアランスが大きくなっているために、結果的に  $k_{sm}$  が大きく見積もられたと考えられた。

**Table 9 Pharmacokinetic parameters of SA following *i.c.* injection**

	$k_{sc} (\text{min}^{-1})$	$k_{sm} (\text{min}^{-1})$	$k_s (\text{min}^{-1})$	$k_{mc} (\text{min}^{-1})$	$k_{cs} (\text{min}^{-1})$	$k_{cm} (\text{min}^{-1})$
Control	$5.4 \times 10^{-2}$	$1.9 \times 10^{-2}$	$7.3 \times 10^{-2}$	$2.2 \times 10^{-1}$	$2.3 \times 10^{-3}$	$2.7 \times 10^{-3}$
+phenylephrine	0	$4.5 \times 10^{-2}$	$4.5 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-1}$	$1.3 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-2}$
+tolazoline	$1.0 \times 10^{-1}$	$4.8 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^{-1}$	$2.3 \times 10^{-1}$	$1.3 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-3}$



## 2. FD-4 皮内投与後の薬物動態

Fig. 19 に FD-4 単独 (Fig. 19a) および FD-4 にフェニレフリン (Fig. 19b) またはトラゾリン (Fig. 19c) を併用し皮内投与 (78.53  $\mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$ ) した後の各組織中 FD-4 量の時間推移を示す。

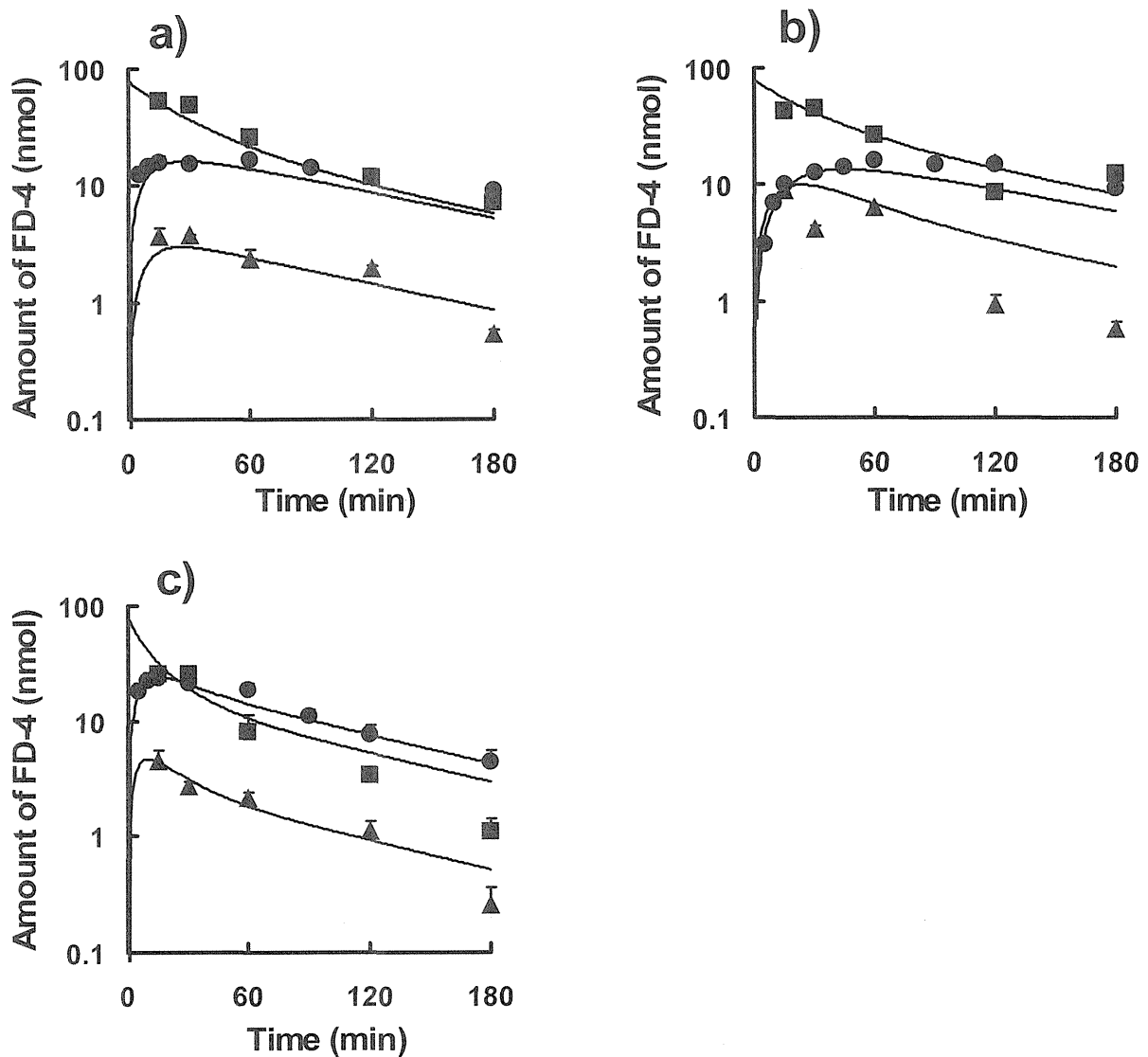


Fig. 19 Time courses of FD-4 amount in each tissue following *i.c.* injection of FD-4 (78.53  $\mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$ ) (a) combined with phenylephrine (b) and tolazoline (c). Symbols: ■ skin; ▲ muscle; ● plasma. Each line was obtained by the curve-fitting technique. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-12 experiments.

得られた血中および皮膚、筋肉中 FD-4 量（平均値）を構築した薬物動態モデルに、非線形最小二乗法により当てはめた。本解析でも SA と同様、筋肉から皮膚への速度定数  $k_{ms}$  を 0 とすることで、実測値と理論値のよい一致が得られた。なお、図中の曲線は各組織中薬物量の平均値を同時にカーブフィッティングしたものである。Table 10 に得られた皮内投与後の薬物動態パラメータを示す。フェニレフリンの併用により、皮膚からの FD-4 の消失 ( $k_s$ ) はコントロールの約 0.8 倍に低下した。FD-4 の皮膚からの全身移行 ( $k_{sc}$ ) はコントロールの約 0.3 倍に低下し、筋肉移行 ( $k_{sm}$ ) はコントロールの 4 倍に上昇した。SA と同様に、フェニレフリンの真皮中血管の収縮作用により、薬物の血管移行が抑えられ、代替的に筋肉への移行が増加したと考えられる。一方、トラゾリンの併用により、FD-4 の皮膚からの消失 ( $k_s$ ) はコントロールの約 2.5 倍に上昇した。また、FD-4 の全身移行 ( $k_{sc}$ ) および筋肉移行 ( $k_{sm}$ ) は、それぞれコントロールの約 2.2 倍および約 4.3 倍に上昇した。トラゾリンの併用は FD-4 単独で投与するより FD-4 の血管移行性だけでなく筋肉移行性も上昇させた。このトラゾリンの併用による FD-4 の筋肉移行性の増大は SA と同様、血流量の増大により皮膚からの薬物クリアランスが大きくなっているためと考えられた。

**Table 10 Pharmacokinetic parameters for FD-4 following *i.c.* injection**

	$k_{sc}(\text{min}^{-1})$	$k_{sm}(\text{min}^{-1})$	$k_s(\text{min}^{-1})$	$k_{mc}(\text{min}^{-1})$	$k_{cs}(\text{min}^{-1})$	$k_{cm}(\text{min}^{-1})$
Control	$2.7 \times 10^{-2}$	$4.0 \times 10^{-3}$	$3.1 \times 10^{-2}$	$2.0 \times 10^{-1}$	$2.4 \times 10^{-2}$	$2.8 \times 10^{-2}$
+phenylephrine	$9.1 \times 10^{-3}$	$1.6 \times 10^{-2}$	$2.5 \times 10^{-2}$	$7.3 \times 10^{-2}$	$2.4 \times 10^{-2}$	0
+tolazoline	$6.0 \times 10^{-2}$	$1.7 \times 10^{-2}$	$7.7 \times 10^{-2}$	$2.1 \times 10^{-1}$	$4.6 \times 10^{-2}$	$1.3 \times 10^{-2}$

SA、FD-4 両薬物の単独投与後の薬物動態を比較すると、FD-4 を投与した方が  $k_{sc}$  および  $k_{sm}$  が小さく、全身および筋肉に移行しにくいことが示唆された。これは分子量が大きくなることによる皮膚中拡散性および血管壁透過性の低下が起因していると考えられる。また、フェニレフリン併用では SA、FD-4 両薬物とも単独群より血管移行性が極めて低くなり、筋肉移行性が高くなった。一方、トラゾリン併用では両薬物で単独群より血管移行性が高くなった。また血管移行性は FD-4 (コントロールの 2.2 倍) の方が SA (コントロールの 1.9 倍) よりもわずかに大きかった。一般的には SA より分子量の大きい FD-4 の方が血管透過性は低いため、末梢血管へ吸収されにくい。そのため、血流量の増大による薬物吸収の改善度は高分子の方でより大きく影響したと考えられる。

## 第5節 小括

第3章では、SA および FD-4 皮内投与後の薬物動態に及ぼす血管作動薬（フェニレフリンとトラゾリン）併用の影響を評価した。血管収縮薬（フェニレフリン）を皮内投与すると皮膚中の血流量が低下し、SA および FD-4 の全身への吸収性が低下した。また、血管拡張薬（トラゾリン）を皮内投与すると皮膚中の血流量が増大し、SA および FD-4 の全身への吸収量が増大した。さらに血管収縮薬の併用だけでなく血管拡張薬の併用でも、両薬物の筋肉移行量を増大させた。なお、血管拡張薬併用の影響度は分子量の大きい FD-4 の方が大きかった。

## 結論

近年、角層を回避できる経皮投与型デバイスの開発が進み、薬物を直接皮膚中に投与することが可能となった。これらのデバイスは皮内を薬物貯留層とすることから、従来の皮膚適用とは薬物動態だけでなく得られる薬効も大きく異なると予想される。しかし、皮内投与は薬物治療を目的として利用されることがほとんどないため、皮内投与後の薬物動態は今まで報告されていない。そこで本研究では、経皮投与型デバイスを想定した皮内投与法の薬物動態的有用性の評価を行った。まず、サリチル酸ナトリウム (SA-Na) の皮内投与を行い、皮下投与、筋肉内投与後および皮膚適用後の薬物動態と比較した。その結果、皮内投与後の SA の全身吸収性は皮下投与や筋肉内投与後のそれより低く、SA は皮膚中に長く滞留した。また、皮内投与後の SA の筋肉移行性は皮膚適用に比べ極めて高いことが明らかとなった。そこで、次に投与部位皮膚中の血流を遮断したラットに SA-Na を皮内投与および皮膚適用した。その結果、皮膚適用後の薬物は、ほとんど皮膚中血管から吸収されたのに対し、皮内投与後の薬物は、皮膚からだけでなく筋肉中血管から吸収されることが明らかとなった。

以上、薬物は皮内投与後に皮膚中 depot から徐々に放出され、皮膚中血管だけではなく筋肉中血管を介して吸収され全身循環系に移行することがわかった。また、皮内投与は従来からある皮下投与、筋肉内投与および皮膚適用と異なる特徴を有していることが明らかとなった。そこで、著者は皮内投与後の薬物動態に及ぼす種々要因を挙げ、以下に示す項目について評価することとした。

- 1) 投与液の浸透圧および投与容積の影響
- 2) 薬物分子量の影響
- 3) 血管作動薬併用（皮膚中の血流量）の影響

以下、得られた結果の要約を示す。

## 1) 投与液の浸透圧および投与容積の影響

第1章では、皮内投与に用いた投与液の特性、すなわち浸透圧の影響を調べるために SA-Na の高張液と等張液を皮内投与した。また投与容積の影響を調べるために高容積 (20  $\mu\text{L}$ ) と低容積 (5  $\mu\text{L}$ ) を皮内投与した。得られた結果を皮膚、筋肉、全身循環系および末梢系から構成したコンパートメントモデルにて解析を行った。その結果、皮膚から筋肉への薬物の移行性には投与液の浸透圧の影響は見られなかったが、皮膚から全身循環系への移行性では高張液の投与で低くなった。また、薬物の皮膚滞留性は高容積の方がわずかに優れており、全身への吸収性は低容積の方が速やかであった。しかし、浸透圧の影響に比べると投与容積の影響はほとんどみられなかった。

以上より、投与液の浸透圧により局所および全身への薬物送達を制御できることが示唆された。しかし、投与液は等張に近い方が身体への負担も少ないことから、高張で薬物を皮内投与する場合、痛みを感じない皮膚表面側に投与することが望ましいと考えられた。

## 2) 薬物分子量の影響

第2章では SA-Na に加えて、カルセインナトリウム (CAL-Na) および FITC-デキストラン (FD-4, FD-10, FD-20, FD-40) の分子量の異なる6種モデル薬物の皮内投与後の薬物動態を評価した。まず、薬物の皮膚中拡散性を調べるため、摘出した皮膚に薬物を皮内投与した。得られた皮膚からの薬物放出量-時間挙動を修飾 W.I. Higuchi 式に当てはめ、みかけの皮膚中拡散係数を算出したところ、皮膚中の薬物拡散性は約 10 kDa 以上の分子量で大きく低下した。次に *in vitro* 皮内投与後の皮膚からの薬物放出速度と静脈内投与後の血中薬物の消失挙動から convolution 法により、*in vivo* 皮内投与後の血中濃度-時間挙動を予測し、実

測値と比較した。薬物の実測吸収性は約 4 kDa で予測吸収曲線に比べて遅延が生じ、10 kDa 以上では予測値から大きく乖離した。このことから、血管壁透過性の低下もしくはリンパ管への取り込みが約 4 kDa 付近で起こることが考えられた。なお、分子量が大きい方が、筋肉に蓄積する傾向にあった。

以上より、皮内投与後の高分子薬物の全身吸収に関して、皮膚中拡散性だけでなく血管透過性も重要であることが示唆された。そのため、薬物吸収性を制御するには、組織中の血流量を制御することが望ましいと考えられた。

### 3) 血管作動薬併用（皮膚中血流量）の影響

第 3 章では皮内投与時の薬物動態に及ぼす皮膚中血流量の影響を評価した。まず、血管収縮薬のフェニレフリン、血管拡張薬のトラゾリン水溶液を皮内投与した後の局所皮膚中血流量をレーザードップラー法により経時測定した。その結果、フェニレフリンの投与後の投与部位皮膚の血流量は減少し、約 2 時間後に投与前の血流量に戻った。それに対し、トラゾリンの皮内投与後では投与部位皮膚の血流量が徐々に増加し、2 時間後も投与前の血流量には戻らなかった。次に、各血管作動薬を併用し、SA-Na および FD-4 の皮内投与を行った。フェニレフリンの併用により、両薬物とも単独群に比べて血管移行性が低くなり、筋肉移行性が高くなった。一方、トラゾリンの併用により、両薬物とも単独群に比べて血管移行性だけでなく筋肉移行性も高くなった。また、トラゾリンを併用した両薬物の薬物動態を比較すると、血流量の増大による薬物吸収の改善度は高分子の方でより大きく影響した。

以上、各血管作動薬による血流量の変化は皮内投与後すぐに現れたため、血管作動薬併用により、薬物の局所および全身への薬物送達を制御できると考えられた。

これらの研究により、皮内投与後の薬物動態は、投与液の浸透圧および薬物

分子量に大きく影響することが明らかとなり、また、血管作動薬の併用により薬物吸収性を制御できることが示唆された。皮内に投与した薬物の体内動態に関する報告は今までにほとんどないことから、本論文は経皮投与型デバイスを用いた薬物の投与方法に関して、極めて重要な情報を与えるものと考えられる。



## 謝辞

終わりに望み、本研究に際して終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 杉林堅次 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり終始有益な御指導、御助言を賜りました城西国際大学薬学部 長谷川哲也 准教授ならびに城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 藤堂浩明 助手に心から感謝の意を表します。

さらに、有益なご意見ならびに実験にご協力いただいた城西大学薬学部薬粧品動態制御学講座 本田光一 氏・村山和宏 氏を始め関係諸氏に深く感謝いたします。

最後に、本論文のデータを取得する上で犠牲になりました動物に深く感謝し、お祈り致します。

## 実験の部

## 1. 材料

サリチル酸ナトリウム、塩酸トラゾリンおよびグルコースは和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。カルセインナトリウムは東京化成工業株式会社（東京）から購入した。Fluorescein Isothiocyanate-labeled Dextran（FD-4, FD-10, FD-20 および FD-40）と塩酸フェニレフリンは Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, U.S.A.) から購入した。その他の試薬および溶媒は特級品を用いた。これらの試薬は精製せずにそのまま用いた。

## 2. 動物

雄性ウイスターラット ( $300 \pm 20$  g) は城西大学生命科学研究センター（坂戸、埼玉）または石川実験動物研究所（深谷、埼玉）から購入した。*In vivo* 実験はウレタン ( $1.0$  g/kg, *i.p.*) 麻酔下でラットの腹部を剃毛し、体温は  $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に維持させて実験を開始した。また、*in vitro* 実験はペントバルビタール ( $50$  mg/kg, *i.p.*) 麻酔下で腹部を剃毛し、皮膚を摘出した。なお、動物実験は城西大学生命科学研究センターの倫理規定に従って行った。

## 3. 皮膚血流遮断ラットの作製

ウレタン ( $1.0$  g/kg, *i.p.*) 麻酔下の雄性ウイスターラットの腹部を剃毛し、直径  $3.0$  cm の円状に皮膚を摘出した。その皮膚を摘出部位に乗せて周囲を Michel's clamp で留めた。体温は  $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に維持させて実験を開始した。

## 4. 静脈内投与実験

各薬物を頸静脈より注入し、その後、経時的に反対側の頸静脈より採血した。血液サンプルは遠心分離 ( $15,000$  rpm,  $5$  min,  $4^\circ\text{C}$ ) し、血漿を得た。

## 5. 皮内投与実験

剃毛したウイスターラット腹部の正中線上に薬物水溶液を 27G の注射針を介して皮内へ投与した。皮内へは、ほぼ一定の深さの皮膚部位に投与できたのでストッパーなどで固定しなかった。薬物投与後、経時的に頸静脈より採血した。血液サンプルを遠心分離（15,000 rpm, 5 min, 4°C）し、血漿を得た。また、実験終了後（種々時間）に断頭脱血し、腹部正中線上に中心をおいた直径 3.0 cm の円状に皮膚および筋肉を摘出した。脂肪などの皮下組織は皮膚と共に摘出した。

## 6. 皮下投与実験

剃毛したウイスターラット腹部の正中線上に薬物水溶液を 27 G の注射針を介して皮下へ投与した。皮下へは、ほぼ一定の深さの皮膚部位に投与できたのでストッパーなどで固定しなかった。薬物投与後の操作は皮内投与実験と同様に行った。

## 7. 筋肉内投与実験

剃毛したウイスターラット腹部の正中線上に薬物水溶液を 27 G の注射針を介して筋肉内へ投与した。筋肉内へは筋肉中の部位（深さ）による吸収の差が懸念されたため、注射針の先端を皮膚表面から 2.0 mm の深さに固定して投与を行った。薬物投与後の操作は皮内投与実験と同様に行った。

## 8. 皮膚適用実験

剃毛したウイスターラット腹部を 20 回テープストリッピングした後、有効拡散面積  $3.14 \text{ cm}^2$  のガラスセルを装着し薬物水溶液を適用した。なお、水溶液は 1 時間おきに交換した。薬物投与後の操作は皮内投与実験と同様に行った。

## 9. *In vitro* 皮内投与実験

ペントバルビタール麻酔下、剃毛したウイスターラットの腹部皮膚を摘出して真皮側の脂肪を除去した。摘出皮膚に各種薬物水溶液で皮内投与した。投与後すぐに、皮膚を Franz 型拡散セルに挟んだ。レシーバー液として pH7.4 等張リン酸緩衝液 (PBS) を 16 mL を適用した。経時的にレシーバー液を 0.4 mL 採取し、同用量の pH7.4 PBS を補充した。実験中、温度は 37°C に保ち、レシーバー液はスターヘッド型攪拌子をマグネットスターラーにより攪拌した。

## 10. 皮膚血流量の測定

フェニレフリン (50 nmol/ 20  $\mu$ L PBS) およびトランゾリン (2 nmol/ 20  $\mu$ L PBS) の皮内投与後の皮膚中にできた薬液 depot の中心に、レーザードップラー血流画像化測定装置 Peri Scan PIM II (Perimed AB, Stockholm) を用いてレーザー光を照射し、直径 1.0 cm の円状の皮膚血流量を経時的に測定した。

## 11. 薬物の定量

### 11.1. SA の定量法

#### 11.1.1. *in vitro* 実験試料の前処理

採取した *in vitro* 皮内投与後のレシーバー液 200  $\mu$ L に内部標準物質 (パラヒドロキシ安息香酸プロピル) を含有したアセトニトリル 200  $\mu$ L を加え、攪拌後に遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) し、その上清を HPLC に注入した。

#### 11.1.2. *in vivo* 実験試料の前処理

得られた血漿 100  $\mu$ L に内部標準物質 (パラヒドロキシ安息香酸プロピル) を含んだアセトニトリル 200  $\mu$ L を加え、攪拌後、遠心分離しその上清を HPLC に注入した。また、細かく裁断した摘出皮膚および筋肉に、内部標準物質を含有させたアセトニトリル (4.0 mL) と生理食塩液 (4.0 mL) を加え、ホモジナイザー (POLYTORON PT3000, KINEMATICA AG, Switzerland) を用いて、氷冷下

でホモジナイズした。これを遠心分離し、その上清を HPLC に注入した。

### 11.1.3. 定量条件

使用したシステムを以下に示す。

送液ユニット (LC-10A, 島津製作所、京都)、

紫外分光光度計 (SPD-10A, 島津製作所)、

クロマトパック (C-R3A, 島津製作所)、

カラムオーブン (CTO-10A, 島津製作所)、

システムコントローラー (SCL-10A, 島津製作所)、および

カラム (LiChrospher 100, RP-18e (5  $\mu\text{m}$ ) 250-4, MERCK, Germany)。

また、移動相はメタノール:0.1%リン酸水溶液=55:45、流速は 0.8 mL/min、検出波長は 225 nm、カラム温度は 40°C である。

## 11.2. CAL の定量法

### 11.2.1. *In vitro* 実験試料の前処理

採取したレシーバー液は pH7.4 PBS で適宜希釈し、攪拌後、遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) した。

### 11.2.2. *In vivo* 実験試料の前処理

得られた血漿 100  $\mu\text{L}$  に pH7.4 PBS 400  $\mu\text{L}$  を加え、攪拌後、遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) した。また、細かく裁断した摘出皮膚および筋肉に、pH7.4 PBS 8.0 mL を加え、ホモジナイザーを用いて氷冷下でホモジナイズし、遠心分離した。

### 11.2.3. 定量条件

前処理した試料の蛍光強度 (Ex 490 nm, Em 515 nm) を蛍光分光光度計

RF-5300 PC（島津製作所，京都）にて測定した。

### 11.3. FDs の定量法

#### 11.3.1. *In vitro* 実験試料の前処理

採取したレシーバー液は pH7.4 PBS で適宜希釈し、攪拌後、遠心分離（15,000 rpm, 5 min, 4°C）した。

#### 11.3.2. *In vivo* 実験試料の前処理

得られた血漿 100  $\mu$ L に pH7.4 PBS 400  $\mu$ L を加え、攪拌後、遠心分離（15,000 rpm, 5 min, 4°C）した。また、細かく裁断した摘出皮膚および筋肉に、pH7.4 PBS 8.0 mL を加え、ホモジナイザーを用いて氷冷下でホモジナイズし、遠心分離した。

#### 11.3.3. 定量条件

前処理した試料の蛍光強度（Ex 495 nm, Em 515 nm）を蛍光分光光度計 RF-5300 PC（島津製作所，京都）にて測定した。

## 引用文献

- 1) R.H. Guy, H.I. Maibach, Drug delivery to local subcutaneous structures following topical administration, *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 1375-1380.
- 2) M. Furue, H. Uchi, Y. Moroi, S. Ogawa, T. Nakahara, K. Urabe, Topical tacrolimus in the management of atopic dermatitis in Japan, *Dermatol. Ther.* 19 (2006) 118-126.
- 3) N.A. Charoo, A. Anwer, K. Kohli, K.K. Pillai, Z. Rahman, Transdermal delivery of flurbiprofen: Permeation enhancement, design, pharmacokinetic, and pharmacodynamic studies in albino rats, *Pharm. Dev. Technol.* 10 (2005) 343-51.
- 4) G. Yanagimoto, T. Hayashi, T. Hasegawa, T. Seki, K. Juni, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, Skin disposition of drug after topical application in hairless rats, *Chem. Pharm. Bull.* 47 (1999) 749-754.
- 5) 中野眞汎, 森本雍憲, 杉林堅次, “ドラッグデリバリーシステム, 現状と将来”, 南江堂, 東京, 1986.
- 6) A. Zaffaroni, Microporous bandages., U.S. Patent 3, 797, 494 (March 19 1974).
- 7) A. Wilschut, W.F. ten Berge, P.J. Robinson, T.E. McKone, Estimating skin permeation. The validation of five mathematical skin permeation models, *Chemosphere* 30 (1995) 1275-1296.
- 8) Y. Morimoto, T. Hatanaka, K. Sugibayashi, H. Omiya, Prediction of skin permeability of drugs: Comparison of human and hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.* 44 (1992) 634-639.



- 9) T. Ogiso, M. Iwaki, T. Paku, Effect of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 482-488.
- 10) N. Ohara, K. Takayama, T. Nagai, Combined effect of d-limonene pretreatment and temperature on the rat skin permeation of lipophilic and hydrophilic drugs, *Chem. Pharm. Bull.* 18 (1995) 439-442.
- 11) K.B. Sloan, M. Hashida, J. Alexander, N. Bodor, T. Higuchi, Prodrugs of 6-thiopurines: Enhanced delivery through the skin, *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 372-378.
- 12) C. Valenta, U. Siman, M. Kratzel, J. Hadgraft, The dermal delivery of lignocaine: Influence of ion pairing, *Int. J. Pharm.* 197 (2000) 77-85.
- 13) S. Mitragotri, D. Blankschtein, R. Langer, Ultrasound-mediated transdermal protein delivery, *Science* 269 (1995) 850-853.
- 14) M.R. Prausnitz, V.G. Bose, R. Langer, J.C. Weaver, Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 10504-10508.
- 15) Y. Tokudome, K. Sugibayashi, The synergic effects of various electrolytes and electroporation on the in vitro skin permeation of calcein, *J. Control. Release* 92 (2003) 93-101.
- 16) P. Tyle, Iontophoretic device for drug delivery, *Pharm. Res.* 3 (1986) 318-326.
- 17) J. Baxter, S. Mitragotri, Jet-induced skin puncture and its impact on needle-free jet injections: experimental studies and a predictive model, *J. Control. Release* 106 (2005) 361-373.
- 18) M.R. Prausnitz, Microneedles for transdermal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 581-587.

- 19) X.M. Wu, H. Todo, K. Sugibayashi, Effects of pretreatment of needle puncture and sandpaper abrasion on the in vitro skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran, *Int. J. Pharm.* 316 (2006) 102-108.
- 20) 杉林堅次, 森本 雍憲, 経皮吸収型製剤から経皮注入システムへー現状と将来の展望ー, *Drug Delivery System* 14 (1999) 351-356.
- 21) D.L. Bremseth, F. Pass, Delivery of insulin by jet injection: recent observations, *Diabetes Technol. Ther.* 3 (2001) 225-232.
- 22) G.H. Verrips, R.A. Hirasing, M. Fekkers, T. Vogels, S.P. Verloove-Vanhorick, H.A. Delemarre-Van de Waal, Psychological responses to the needle-free Medi-Jector or the multidose Disetronic injection pen in human growth hormone therapy, *Acta Paediatr.* 87 (1998) 154-158.
- 23) M.A. Teo, C. Shearwood, K.C. Ng, J. Lu, S. Moochhala, In vitro and in vivo characterization of MEMS microneedles, *Biomed. Microdevices* 7 (2005) 47-52.
- 24) W. Martanto, S.P. Davis, N.R. Holiday, J. Wang, H.S. Gill, M.R. Prausnitz, Transdermal delivery of insulin using microneedles in vivo, *Pharm. Res.* 21 (2004) 947-952.
- 25) T. Miyano, Y. Tobinaga, T. Kanno, Y. Matsuzaki, H. Takada, M. Wakui, K. Hanada, Sugar micro needles as transdermic drug delivery system, *Biomed. Microdevices* 7 (2005) 185-188.
- 26) J.H. Park, M.G. Allen, M.R. Prausnitz, Polymer microneedles for controlled-release drug delivery, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1008-1019.
- 27) J. Birchall, S. Coulman, M. Pearton, C. Allender, K. Brain, A. Anstey, C. Gateley, N. Wilke, A. Morrissey, Cutaneous DNA delivery and gene expression in ex vivo human skin explants via wet-etch microfabricated microneedles. *J. Drug Target.* 13 (2005) 415-421.

- 28) D. Yoshida, T. Hasegawa, K. Sugibayashi, Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats, *Int. J. Pharm.* 231 (2002) 177-184.
- 29) J.B. Nissen, H. Egekvist, P. Bjerring, K. Kragballe, Effect of intradermal injection of methionine-enkephalin on human skin, *Acta Derm. Venereol.* 79 (1999) 23-26.
- 30) P.M. Mertes, D.A. Moneret-Vautrin, F. Leynadier, M.C. Laxenaire, Skin reactions to intradermal neuromuscular blocking agent injections: A randomized multicenter trial in healthy volunteers, *Anesthesiology* 107 (2007) 245-252.
- 31) K. Kakemi, H. Sezaki, K. Okumura, S. Ashida, Absorption and excretion of drugs. XXXIX, The absorption of isonicotinic acid derivatives from the skeletal muscle of the rats, *Chem. Pharm. Bull.* 17 (1969) 1332-1338.
- 32) K. Kakemi, H. Sezaki, K. Okumura, C. Takada, S. Furusawa, Absorption of drugs from the skeletal muscle of the rats, *Chem. Pharm. Bull.* 19 (1971) 2058-2064.
- 33) P. Singh, M.S. Roberts, Effects of vasoconstriction on dermal pharmacokinetics and local tissue distribution of compounds, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 783-791.
- 34) K. Nakayama, H. Matsuura, M. Asai, K. Ogawara, K. Higaki, T. Kimura, Estimation of intradermal disposition kinetics of drugs. I. Analysis by compartment model with contralateral tissues, *Pharm. Res.* 16 (1999) 302-308.
- 35) T. Seki, A. Wang, D. Yuan, Y. Saso, O. Hosoya, S. Chono, K. Morimoto, Excised porcine skin experimental systems to validate quantitative microdialysis methods for determination of drugs in skin after topical application, *J. Control. Release* 100 (2004) 181-189.

- 36) G. Yanagimoto, T. Hayashi, T. Hasegawa, T. Seki, K. Juni, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, Skin disposition of drug after topical application in hairless rats, *Chem. Pharm. Bull.* 47 (1999) 749-754.
- 37) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa, T. Uno, A pharmacokinetics analysis program (MULTI) for microcomputer. *J. Pharmaco-Dyn.* 4 (1981) 879-885.
- 38) D. Yoshida, H. Todo, T. Hasegawa, K. Sugibayashi, Dermatopharmacokinetics of salicylate following topical injection in rats: Effect of osmotic pressure and injection volume on salicylate disposition, *Int. J. Pharm.* 337 (2007) 142-147.
- 39) D. Yoshida, H. Todo, T. Hasegawa, K. Sugibayashi, Effect of molecular weight on the dermatopharmacokinetics and systemic disposition of drugs after intracutaneous injection, *Europ. J. Pharm. Sci.* 35 (2008) 5-11.
- 40) R.J. Scheuplein, Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration, *J. Invest. Dermatol.* 48 (1967) 79-88.
- 41) R.J. Scheuplein, I.H. Blank, Mechanism of percutaneous absorption IV. Penetration of nonelectrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids, *J. Invest. Dermatol.* 60 (1973) 286-296.
- 42) 長谷川哲也, 中川清世, 杉林堅次, In vitro 皮膚透過データから in vivo 経皮吸収性の簡便な予想のために (3), *ファームテックジャパン* 16 (2000) 23-28.
- 43) W.I. Higuchi, Analysis of data on the medicament release from ointments, *J. Pharm. Sci.* 51 (1962) 802-804.
- 44) K. Sato, T. Oda, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, Estimation of blood concentration of drugs after topical application from in vitro skin permeation data. I. Prediction by convolution and confirmation by deconvolution, *Chem.*

- Pharm. Bull. 36 (1988) 2232-2238.
- 45) M.J. King, I. Badea, J. Solomon, P. Kumar, K.J. Gaspar, M. Foldvari, Transdermal delivery of insulin from a novel biphasic lipid system in diabetic rats, *Diabetes Technol. Ther.* 4 (2002) 479-488.
  - 46) M.J. King, D. Michel, M. Foldvari, Evidence for lymphatic transport of insulin by topically applied biphasic vesicles, *J. Pharm. Pharmacol.* 55 (2003) 1339-1344.
  - 47) D. Yoshida, H. Todo, T. Hasegawa, K. Sugibayashi, Effect of vasoactive agents on the dermatopharmacokinetics and systemic disposition of model compounds, salicylate and FITC-dextran 4 kDa, following intracutaneous injection of the compounds, *Int. J. Pharm.* 356 (2008) 181-186.
  - 48) K. Higaki, K. Nakayama, T. Suyama, C. Amnuait, K. Ogawara, T. Kimura, Enhancement of topical delivery of drugs via direct penetration by reducing blood flow rate in skin, *Int. J. Pharm.* 288 (2005) 227-233.
  - 49) K. Sugibayashi, G. Yanagimoto, T. Hayashi, T. Seki, K. Juni, Y. Morimoto, Analysis of skin disposition of flurbiprofen after topical application in hairless rats, *J. Control. Release* 62 (1999) 193-200.
  - 50) P. Singh, S. Roberts, Effect of vasoconstriction on dermal pharmacokinetics and local tissue distribution of compounds, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 783-791.
  - 51) C.M. Bernards, D.J. Kopacz, Effect of epinephrine on lidocaine clearance in vivo, *Anesthesiology* 91 (1999) 962-968.
  - 52) M.S. Rendell, M.F. Finnegan, J.C. Healy, A. Lind, B.K. Milliken, D.E. Finney, R.F. Bonner, The relationship of laser-doppler skin blood flow measurements to the cutaneous microvascular anatomy, *Microvasc. Res.* 55 (1998) 3-13.
  - 53) R.H. Guy, E. Tur, L.M. Schall, S. Elamir, H.I. Maibach, Determination of vehicle effects on percutaneous absorption by laser doppler velocimetry. *Arch.*

Dermatol. Res. 278 (1986) 500-502.

- 54) H. Tanojo, E. Boelsma, H.E. Junginger, M. Ponec, H.E. Bodde, In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: a laser doppler velocimetry study, J. Control. Release 58 (1999) 97-104.



