

ケトチフェンの経皮吸収促進法と
処方設計に関する研究

井上 和博

目次：

略号一覧	1
緒言	3
1章 ケトチフェンの皮膚透過性と透過メカニズム	7
2章 各種吸収促進剤の効果と作用メカニズム	23
3章 過飽和状態を利用した経皮吸収促進法	37
結論	63
Appendix	64
謝辞	65
研究結果の掲載紙	66
引用文献	67

略号一覧

KT	: 分子型ケトチフェン
KHT+	: イオン型ケトチフェン
$C_{S_{total}}$: ケトチフェンの水溶液中溶解度
pKa	: ケトチフェンの酸解離定数
$C_{S_{KT}}$: 分子型ケトチフェンの水溶液中溶解度
$flux_{INT}$: インタクト皮膚におけるケトチフェンの皮膚透過速度
$flux_{VS}$: 角層除去皮膚におけるケトチフェンの皮膚透過速度
R_{INT}	: インタクト皮膚のケトチフェン透過に対する透過抵抗
R_{SC}	: 角層のケトチフェン透過に対する透過抵抗
R_{VS}	: 生きた上皮および真皮のケトチフェン透過に対する透過抵抗
$P_{(KT)intact}$: インタクト皮膚における KT の固有透過係数
$P_{(KTH+)intact}$: インタクト皮膚における KTH+ の固有透過係数
$P_{(KT)delip}$: 脱脂処理皮膚における KT の固有透過係数
$P_{(KTH+)delip}$: 脱脂処理皮膚における KTH+ の固有透過係数
$K_{(KT)intact}$: KT のインタクト角層／水相間固有分配係数
$K_{(KTH+)intact}$: KTH+ のインタクト角層／水相間固有分配係数
$K_{(KT)delip}$: KT の脱脂処理角層／水相間固有分配係数
$K_{(KTH+)delip}$: KTH+ の脱脂処理角層／水相間固有分配係数
Q_n	: <i>In vitro</i> 透過試験における n 番目のサンプリング時点 t_n における単位面積あたりの累積透過量
V	: <i>In vitro</i> 透過試験におけるレセプター体積、あるいは <i>in vitro</i> 溶出試験における溶出液体積
v	: <i>In vitro</i> 透過試験におけるサンプリング体積、あるいは <i>in vitro</i> 溶出試験におけるサンプリング体積
S	: <i>In vitro</i> 透過試験における透過面積、あるいは <i>in vitro</i> 溶出試験において製剤が溶出液と接触する部分の面積
結晶 KT	: 結晶型の KT
非晶 KT	: 非晶質型の KT
LS	: Lauroyl sarcosine
LDAO	: N,N-dimethyldodecylamine N-oxide
ER	: Enhancement ratio

PSA	: Pressure sensitive adhesive
結晶分散 PSA	: 結晶 KT を分散した PSA
非晶分散 PSA	: 非晶 KT を分散した PSA
PSA-Crystalline	: 結晶分散 PSA の英語表記
PSA-Amorphous	: 非晶分散 PSA の英語表記
R_n	: <i>In vitro</i> 溶出試験における n 番目のサンプリング時点 t_n における単位面積あたりの累積溶出量
Δ	: <i>In vitro</i> 溶出試験における、Higuchi モデルに基づく溶出速度定数
D	: KT の PSA マトリックス中拡散係数
A	: PSA 中 KT 含量
Q	: <i>In vitro</i> 溶出数学モデルにおける溶出量
t	: <i>In vitro</i> 溶出数学モデルにおける時間
x	: <i>In vitro</i> 溶出数学モデルにおける PSA 表面からの深さ
h	: PSA 層の厚さ
$c(x,t)$: PSA 中に溶解している KT の濃度
$M(x,t)$: PSA 中に分散している KT の濃度
a	: 拡散-溶解モデルにおける溶解速度定数
p	: 拡散-溶解モデルにおける形状パラメータ

緒言：

1979年、ALZA Corporation（現在、Johnson and Johnson Services, Inc.）が乗り物酔いを適応症とするスコポラミン経皮吸収型製剤を実用化して以来、全身循環血への送達を目的として薬物を皮膚に投与する Transdermal Therapeutic System (TTS) のコンセプトが広く認知されるようになった。TTS は薬物吸収を長時間維持しやすく、吸収速度の変動も少ないことから、利便性向上、副作用低減、および特殊な臨床効果を得る手段として様々な薬剤への適用が検討されてきた。しかし多くの例で有効性を発揮するために必要な経皮吸収性を確保できず、現時点で TTS 化された医薬化合物は、Table 1 に例示される化合物に限られている。

Table 1 Active pharmaceutical ingredients incorporated in Transdermal Therapeutic Systems launched in Japanese, U.S., and European markets

Active pharmaceutical ingredients	Molecular weight
Scopolamine	303.35
Nitroglycerin	227.09
Clonidine	23.09
Estradiol	272.39
Isosorbide dinitrate	236.14
Fentanyl	336.47
Nicotine	162.23
Testosterone	288.43
Estradiol	272.39
Norethindrone acetate	340.46
Turobuterol	227.73
Ethinyl estradiol	296.40
Norelgestromin	327.46
Oxybutynine	357.49
Selegiline	187.28
Methylphenidate	233.31
Rivastigmine	250.34
Rotigotine	315.48
Buprenorphine	467.64

こうした皮膚透過性が不十分な化合物にまでTTSの適用範囲を拡大すべく、コンセプト誕生直後からTable 2 に示す様々な経皮吸収促進法の研究がおこなわれてきた¹。主薬の性質を改変する吸収促進法には、過飽和状態を利用して皮膚中濃度勾配を高める方法 (supersaturation) や、薬物に逆の荷電を持つ脂溶性対イオンを結合させて皮膚との親和性を高める方法 (ion pair) がある。皮膚の性質を改変する吸収促進法には化学物質を皮膚に作用させる方法 (chemical enhancers ; 吸収促進剤)、外部エネルギーを利用する方法、および機械的に皮膚バリアを破壊する方法がある。水は皮膚のバリア能を変化させるもっとも単純な化合物であるが、より高い効果を目指して多彩な吸収促進剤が検討されている。外部エネルギーを利用する方法として

は、電場 (iontophoresis) や超音波 (sonophoresis) が研究されている。マイクロニードルは微小針を配列させたデバイスを皮膚に適用して機械的に透過障壁を破壊する方法である。このように、様々な吸収促進法が研究され、実験段階では多くの有効例が報告されている。今のところ、効果と安全性の両立や対費用効果など実用性に関する課題を克服して実用に供されたものはほとんどないが、吸収促進剤として検討された化合物の中には既存市販剤の添加物として安全性が確立されているものも多く、これらについては処方や適用条件などをもう一步最適化することで実用化可能なものも多数あると思われる。また過飽和状態を利用して吸収性を高める手法は経口剤では数多くの活用事例があり²、化合物の特性に応じた過飽和状態制御法を見出せば、TTSにおいても活用機会は充分あると考えられる。今後新しい医薬化合物に対して有効な吸収促進法を効率良く見出すには、過去の研究資源を有効に活用して成功確率の高い方法をあらかじめ予測し、無駄な検討を回避するアプローチが有効である。しかしこれまでの促進法研究は、ある特定の薬物に対する効果の検証にとどまり、メカニズム解析に基づいた普遍的な法則性の抽出が不十分であるために、研究資源として活用しにくいものが多いように思われる。このような活用に資するためには、促進法の効果を薬物固有の部分と汎用性のある部分に分けて理解する必要があり、それにはまず薬物の皮膚透過メカニズムをその物理化学的性質と関連付けて解明しておく必要がある。

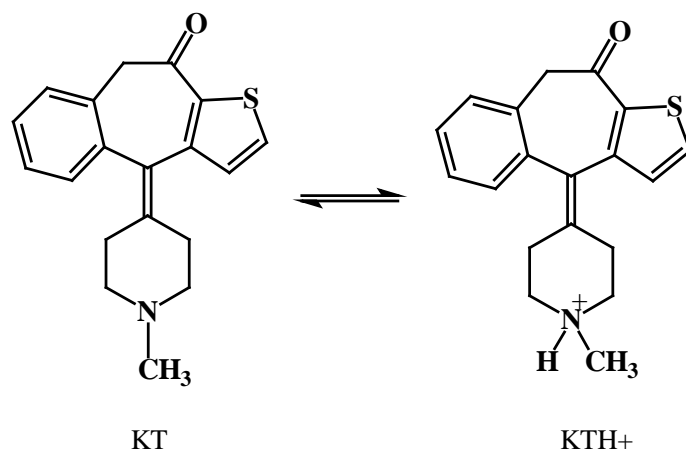


Fig.1 Chemical structure of free form of ketotifen (KT) and protonated form of ketotifen (KTH+), and their dissociation equilibrium

本研究は、他の医薬化合物の促進法探索指針として活用されることを期待し、塩基性低分子化合物であるケトチフェン (Fig. 1) に対する代表的な吸収促進法の効果を検討し、促進効果とケトチフェンの皮膚透過メカニズムの関係から一般則の抽出を試みた。ケトチフェンは第二世代H1抗ヒスタミン薬であり、錠剤、カプセル、シロップ、点鼻液剤および点眼剤として使われている³。一方ケトチフェンのTTSは、コンプライアンスや使用性の優れた剤形として医療ニーズがあり多くの研究報告があるものの、未だ実用化されていない。標準的な経口製剤はおおよそ1 mgを1日2回服用する用法用量であり、TTSとしての用量も1日あたり2 mg以上を確保する必要があると考えられる。一方、ケトチフェンの飽和水溶液からのヒト摘出角層を介した透過速度は0.4 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$ であることから (社外委託試験結果)、化合物本来の皮膚透過性のみでTTS化に必要な用量を確保するのは困難と思われる。このようにTTS化のニーズがあり、その実現に吸収促進法を必要とすることからケトチフェンは本研究の好適なモデル薬物と考えた。

第1章ではケトチフェンの皮膚透過性に対する分子型、イオン型各々の寄与を論じた。皮膚については透過障壁の大部分が角層に存在することを確認した上で、角層をランダムブリックモデル⁴に従い脂質相とタンパク相に分け、ケトチフェンの分子種毎に両相中の透過係数と水に対する各相への分配係数を解析した。吸収促進法としては吸収促進剤を用いる方法と過飽和状態を利用する方法を選択し、前者について第2章、後者については第3章で効果の程度と作用メカニズムを解析し、最後に、得られた結果から薬物の性質と促進剤の効果を関連付ける法則を抽出して結論とした。

Table 2 Techniques for transdermal absorption enhancement

Modification of physico-chemical properties of active substances		Super saturation	
		Ion pair	
Modification of the barrier properties of the skin	Chemical enhancers	hydration	
		Organic compounds	Alcohols Glycols Amines Amides Alkyl N, N-disubstituted-amino acetate Alkyl esters Phospholipids Terpens Surfactants N-alkyl Azacycloheptanones Decylmethylsulfoxide Dimethylsulfoxide Pyrrolidones Pirotiodecane Benzalkonium chloride polymer Fatty acids Urea and its derivatives Cyclodextrins
	Utilization of external energies	Iontophoresis	
		Sonophoresis	
	Mechanical destruction of the skin barrier	Microneedles	

第1章 ケトチフェンの皮膚透過性と透過メカニズム^{*1,*2}

本章では、まず溶解度の pH 依存性を解析することにより、ケトチフェンの解離定数と水溶液中における分子型（以下、KT と略す）の溶解度を決定した。なお、この検討の過程で KT には結晶型と非晶質型が存在することを見出したため、各々の生成条件と溶解度の相違について併せて検討した。本章と第2章では、専ら結晶型 KT を用いた検討結果について論じ、非晶質型 KT を用いる検討は第3章で論じる。

次に、ヘアレスマウス摘出皮膚を用いてインタクト皮膚と角層除去皮膚でのケトチフェン透過速度を比較することにより、皮膚全体の透過抵抗に占める角層抵抗の割合を確認した。また角層を構成する脂質相とタンパク相のケトチフェン透過に対する寄与を検討するため、角層から脂質を除去する処理を施した皮膚（脱脂処理皮膚）を調製し、インタクト皮膚と脱脂処理皮膚における KT およびイオン型ケトチフェン（以下、KTH+ と略す）の固有透過係数を求めた。また、ヘアレスマウス摘出皮膚から角層を単離し、水相とインタクト角層間、あるいは水相と脱脂処理角層間のケトチフェン分配係数を測定し、その pH 依存性から KT および KTH+ の固有分配係数を算出した。インタクト皮膚について求められた透過係数と分配係数は脂質相、タンパク相両方の寄与を含むが、脱脂処理皮膚について求められた透過係数は、インタクト皮膚の透過係数における脂質相の寄与が水相の寄与に置換されたものであり、この透過係数をインタクト皮膚の値と比較することにより、透過への両相の寄与を分離して評価できると考えた。同様に、インタクト角層と脱脂処理角層での分配係数比較から、ケトチフェンの分配に対する両相の寄与を評価した。

第1節 方法

1. 試薬、材料

フマル酸ケトチフェンは Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) より、シリコーンオイルは東レ・ダウコーニング株式会社（東京）より、ジクロロメタン、*n*-ヘキサン、クロロホルム、メタノール、トリエチルアミン、水酸化ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸は、和光純薬工業(株)（大阪）より、アジ化ナトリウムは関東化学(株)（東京）より、等張リン酸緩衝液（pH 7.4）はライフテクノロジーズ・ジャパン(株)（東京）より、ヘアレスマウス（Hos:HR-1）は(株)星野試験動物飼育所（坂東市、茨城）より入手した。

2. HPLC 条件

本章におけるケトチフェン濃度は以下に示す HPLC 法にて測定した。

- ・ 装置：LC-10（(株)島津製作所、京都）
- ・ カラム：YMC-Pack ODS-A-312（(株)ワイエムシィ、京都）
- ・ カラム温度：40°C

- ・ 移動相：アセトニトリル/水/トリエチルアミン/酢酸=500/500/2/1（体積比）
- ・ 流速：1.0 mL/min
- ・ 検出：UV 312 nm
- ・ 定量計算：外部標準法

3. KTの調製

KTを2通りの方法で調製した。

第一の方法（調製法-1）では、フマル酸ケトチフェン5 gを水200 mLに溶解し、5N水酸化ナトリウムを加えてpHを約11にした後、析出したKTをろ取し、純水で洗浄後、減圧乾燥して得た。

第二の方法（調製法-2）では、フマル酸ケトチフェン5 gを水200 mLに溶解し、5N水酸化ナトリウムを加えてpHを約11にした後、析出したKTを分液ロート中ジクロロメタン100 mL中に抽出し、得られたKTのジクロロメタン溶液を硫酸ナトリウムで脱水処理した後、ロータリーエバポレータで減圧下、液量が10 mL程度になるまで濃縮した。得られた濃縮液に、攪拌しながら*n*-ヘキサン500 mLを少量ずつ滴下し、析出物をろ取乾燥して得た。

調製法-1で得たKTと調製法-2で得たKTに対して、偏光顕微鏡観察（Optiphot-DPL、(株)ニコン、東京）（倍率3000倍）、粉末X線回折パターン測定（RINT-2000、(株)リガク、東京）（X-ray intensity of 40 kV/40 mA, emission and diffraction slit each of 18, exposure slit of 0.15 mm）、および示差走査熱分析（Thermal Analyst 2000、デュポン(株)、東京）

（un-hermetically sealed aluminum pan, heating rate of 10 °C/min from 15 to 200 °C）を行い、各々の結晶性を確認した。

4. ケトチフェンの水に対する溶解度および解離定数の評価

調製法-1で得たKTと調製法-2で得たKTの水溶液中溶解度を、各々の調製法に準じた2通りの方法で測定した。

第一の方法（溶解度測定法-1）では、0.4~7.05 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ の範囲内の種々濃度で調製したフマル酸ケトチフェン水溶液を37°Cで攪拌し、1 N NaOHを添加して生じた沈殿物を直ちにろ過して取り除き、ろ液のケトチフェン濃度（ $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ ）とpHを測定した。

第二の方法（溶解度測定法-2）では、pHを6~9の範囲内に調整した0.02Mリン酸ナトリウム塩緩衝液に3 mg/cm^3 の調製法-2で得たKTを投入し、37 °Cに保温しながら攪拌し、5日目および7日目に一部の液を採取してメンブレンフィルター（Micro-filter FR-40、富士フィルム(株)、東京）でろ過し、ろ液のpHとケトチフェン濃度（ $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ ）を測定した。5日目と7日目のケトチフェン濃度の差が5日目の値の1%以下であることを確認した上で、5日目の測定値を溶解度とした。以上の操作はpHの異なる12種の緩衝液について実施した。

以上の方法で求めたケトチフェン溶解度 $C_{S_{total}}$ ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) はKTの溶解度 $C_{S_{KT}}$ 、およびKTと平衡関係にある KTH^+ 濃度の和であり、解離定数 pKa および pH を含む式 (1) で表される。

$$C_{S_{total}} = C_{S_{KT}}(1 + 10^{\text{pKa} - \text{pH}}) \quad (1)$$

そこで、 $C_{S_{KT}}$ と pKa をフィッティングパラメータとする非線形最小二乗法により測定値に対して式 (1) をフィットさせることにより、 $C_{S_{KT}}$ ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) と pKa を算出した。なお、溶解度測定法-1 で得た結果に対するフィッティング式と溶解度測定法-2 で得た結果に対するフィッティング式では、 $C_{S_{KT}}$ は異なる値を設定したが pKa は同一の値とした。計算にはMicrosoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) のソルバーアドインにおける準ニュートン法 (精度 0.000001、公差 5%、収束 0.0001) を用いた。

5. ヘアレスマウス摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過試験

5-1. ヘアレスマウス摘出皮膚

エーテル麻酔下、頸動脈切断により安楽死させた 6 週例の雄性ヘアレスマウスから背部皮膚を摘出し、皮下脂肪を切除したのち等張リン酸緩衝液でリンスし、 -60°C にて使用まで保存した。皮膚は室温下で解凍後、直径 3.8 cm の円形にカットし、これをインタクト皮膚とし、必要に応じてさらに角層除去処理あるいは脱脂処理を施して実験に用いた。以上の操作は第一三共株式会社における実験動物倫理委員会規定に準じた。

5-2. 皮膚全体のバリア能に対する角層寄与の評価

インタクト皮膚、あるいは粘着テープ (セロテープ®、ニチバン(株)、東京) により 20 回テープストリッピング処理^{5,6,7}を行って角層を除去した皮膚を、縦型フランツセル (透過面積: 1.77 cm^2 、ドナー容積: 1 mL、レセプター容積: 10 mL、Crown Glass Co., Ltd., Somerville, NJ, USA) にセットした。レセプターチャンバーにはレセプター液 (0.1% NaN_3 in $\text{pH}7.4$ PBS) を満たし、保温のためセルジャケットに 37°C の恒温水を還流させた。ドナー液はシリコンオイルを分散媒とする 0.18 mol/L の調製法-2 で得たKT懸濁液 1 mLとした。ドナー液投入後、所定時刻に 1.8 mLのレセプター液を採取し、同時に同量の新鮮なレセプター液を補充した。採取したレセプター液中ケトチフェン濃度を測定し、「8. *In vitro*透過試験における累積透過量の算出」に示す方法で皮膚透過プロファイルを作成し、直線部分の傾きから皮膚透過速度 ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$) を算出した。実験はインタクト皮膚、角層除去皮膚各々について 3 回繰り返した。

インタクト皮膚における透過抵抗 R_{INT} は、角層の透過抵抗 R_{SC} と、生きた上皮および真皮の透過抵抗 R_{VS} の和で表される。皮膚透過速度は透過抵抗と逆比例するので、皮膚全体に対する角層の透過抵抗の比率は、インタクト皮膚における透過速度 $flux_{INT}$

と角層除去皮膚における透過速度 $flux_{VS}$ を用いて式(2)のように表される。この式を用いて皮膚全体のバリア能に対する角層の寄与を評価した。

$$\frac{R_{SC}}{R_{INT}} = \frac{R_{INT} - R_{VS}}{R_{INT}} = \frac{\frac{1}{R_{VS}} - \frac{1}{R_{INT}}}{\frac{1}{R_{VS}}} = \frac{flux_{VS} - flux_{INT}}{flux_{VS}} \quad (2)$$

5-3. KT、KTH+各々の固有透過係数の評価

インタクト皮膚を2チャンバー型拡散セル(透過面積: 3.14 cm²、ドナー容積: 50 mL、レセプター容積: 50 mL、柴田科学(株)、埼玉)にセットし、レセプターチャンバーにレセプター液(0.1% NaN₃ in pH7.4 PBS) 50 mLを満たした。脱脂処理皮膚群では、ドナーチャンバーに脱脂処理液(クロロホルム/メタノール=1/2(v/v)混液⁸) 50 mLを満たして3時間インキュベーション後、脱脂処理液とレセプター液の両方をセルから取り除き、角層側は窒素ガスを吹き付けて脱脂処理液を留去させた後、レセプターチャンバーに新鮮なレセプター液を満たし改めて37°Cに保温した。この脱脂処理による脂質除去率は80%–90%であり⁹、薬物の脂溶性が極端に高い場合(オクタノール/水分解係数が10⁵以上)を除き、残余脂質が薬物の分配係数測定値に与える影響は無視し得るとの報告がある¹⁰。また上記脱脂処理で角層中タンパク質は変性しないことが報告されている^{10, 11}。ドナー液のpHは6.0、9.0あるいは10.5に調整した。pH 6.0と9.0は20 mMのリン酸二水素ナトリウム水溶液と20 mMのリン酸水素二ナトリウム水溶液を混合して調整し、またpH 10.5は20 mMの炭酸水素ナトリウム水溶液と20 mMの炭酸ナトリウム水溶液を混合して調整した。pH 6.0のドナーには3.2 μmol/mLのフマル酸ケトチフェンを溶解させ、pH 9.0と10.5のドナーには1.3 μmol/mLの調製法-2で得たKTを懸濁させてドナー液とした。セル全体を恒温槽中で保温し、ドナーとレセプター両相をマグネティックスターラーで攪拌しながら、ドナー投入後の所定時刻に5 mLのレセプター液を採取し、同時に同量の新鮮なレセプター液を補充した。また最終サンプリング時点ではレセプター液と同時にドナー液を採取した。採取した液は皮膚由来の不溶物と未溶解のKTをろ過除去した後、pHとケトチフェン濃度を測定した。得られた測定値を用いて、「8. *In vitro*透過試験における累積透過量の算出」に示す方法により皮膚透過プロファイルを作成し、最終時点を含む直線部分の傾きから皮膚透過速度を算出した。また、得られた皮膚透過速度(μmol/h/cm²)を最終時点のドナー液中ケトチフェン濃度(μmol/cm³)で除し、皮膚透過係数(cm/h)を算出した。実験は各条件について3回繰り返した。

上述の方法により求めた透過係数を最終時点のドナーpHに対してプロットし、透過係数-pHプロファイルを作成した。また、各pHにおける透過係数は、KTの固有透過係数とKTH+の固有透過係数を各々の分子種の存在比率で加重加算したものと仮定し、実験で得られた透過係数-pHプロファイルに対して式(3)あるいは式(4)を

非線形最小二乗法によってフィットさせることにより、以下に示す4つの固有透過係数を算出した。計算にはMicrosoft Excel 2003のソルバーアドインにおける準ニュートン法（精度0.000001、公差5%、収束0.0001）を用いた。

$$P_{\text{intact}} = \frac{P_{(KT)\text{intact}} + 10^{pKa-pH} P_{(KTH+)\text{intact}}}{1 + 10^{pKa-pH}} \quad (3)$$

$$P_{\text{delip}} = \frac{P_{(KT)\text{delip}} + 10^{pKa-pH} P_{(KTH+)\text{delip}}}{1 + 10^{pKa-pH}} \quad (4)$$

- ・ $P_{(KT)\text{intact}}$: インタクト角層におけるKTの固有透過係数
- ・ $P_{(KTH+)\text{intact}}$: インタクト角層におけるKTH+の固有透過係数
- ・ $P_{(KT)\text{delip}}$: 脱脂処理角層におけるKTの固有透過係数
- ・ $P_{(KTH+)\text{delip}}$: 脱脂処理角層におけるKTH+の固有透過係数

6. ヘアレスマウス単離角層を用いた分配実験

6-1. ヘアレスマウス単離角層と脱脂処理

「5-1.ヘアレスマウス摘出皮膚」に示した方法で採取したインタクト皮膚を等張リン酸緩衝液（以下、PBSと略）中60°Cで1min加熱処理することにより角層を剥離し、得られた角層を0.5%トリプシンと0.74%NaN₃を含有するPBS中-4°Cで一夜インキュベーションすることにより付着組織を消化除去した後¹²、真空乾燥してインタクト角層を得た。脱脂処理角層はインタクト角層を脱脂処理液（クロロホルム/メタノール=1/2(v/v)混液）に室温下1夜浸したのち乾燥して得た。

6-2. 分配実験

20 mMのリン酸二水素ナトリウム水溶液と20 mMのリン酸水素二ナトリウム水溶液の混合、あるいは20 mMの炭酸水素ナトリウム水溶液と20 mMの炭酸ナトリウム水溶液の混合により種々のpHに調整した緩衝液に、pH 10未満の場合は0.04 μmol/cm³のフマル酸ケトチフェンを溶解し、pH 10以上の場合は1.3 μmol/cm³の調製法-2で得たKTを懸濁させて分配液とした。

これらに11.34 cm²のインタクト角層あるいは脱脂処理角層を投入し、攪拌下37°Cで一夜インキュベーションした。角層中に分配したケトチフェンは、インタクト角層あるいは脱脂処理角層を液から取り出し表面の液をふきとった後に5 mLの*n*-ヘキサン中に浸して溶出させ、3 mLの0.01 N塩酸を添加し攪拌遠心分離して塩酸水溶液側に抽出した。インキュベーション液と塩酸水溶液中のケトチフェン濃度(μmol/cm³)を定量し、後者は水相体積を乗じた後、角層の面積と厚さ(0.001 cmと仮定^{7, 13})で除すことにより角層中濃度(nmol/cm³)に換算し、インキュベーション液中濃度に対する角層中濃度の割合から分配係数を算出した。このようにして得られた分配係数は、KT

の固有分配係数とKTH+の固有分配係数を、各分子種の存在比率で加重加算した式(5)あるいは式(6)で表されると仮定し、非線形最小二乗法によるフィッティングを行って各固有分配係数を算出した。

$$K_{\text{intact}} = \frac{K_{(KT)\text{intact}} + 10^{pKa-pH} K_{(KTH+)\text{intact}}}{1 + 10^{pKa-pH}} \quad (5)$$

$$K_{\text{delip}} = \frac{K_{(KT)\text{delip}} + 10^{pKa-pH} K_{(KTH+)\text{delip}}}{1 + 10^{pKa-pH}} \quad (6)$$

- ・ $K_{(KT)\text{intact}}$: KTのインタクト角層/水相間固有分配係数
- ・ $K_{(KTH+)\text{intact}}$: KTH+のインタクト角層/水相間固有分配係数
- ・ $K_{(KT)\text{delip}}$: KTの脱脂処理角層/水相間固有分配係数
- ・ $K_{(KTH+)\text{delip}}$: KTH+の脱脂処理角層/水相間固有分配係数

7. ケトチフェンの水相中拡散係数の測定

角層におけるケトチフェンの透過係数 (cm/h) を、同じ厚さの水相における透過係数 (cm/h) と比較するため、ケトチフェンの水相中拡散係数 (cm²/h) を測定した。直径 2 cmの円筒形の孔を設けた厚さ 0.5 cmのステンレス板を2枚のセルロース製多孔膜 (孔径 0.4 μm、FR-40、富士フィルム株) で挟み、これをガラス製2チャンバー型拡散セル (チャンバー容量 50 mL、柴田科学株、埼玉) にセットした。多孔膜とステンレス板で囲まれた円筒形の空間とレセプターチャンバーをレセプター液で満たし、レセプターチャンバーを密封した後、ドナーチャンバーにドナー液を満たして密封し透過を開始した。レセプター液は 20 mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10)、ドナー液はレセプター液に 1.3 μmol/cm³の調製法-2 で得たKTを加えた懸濁液とした。セルは全体を恒温槽に浸漬させて 37°Cに保った。透過開始後、所定時間にレセプター液 5 mLを採取し、最終時点以外は同量のフレッシュなレセプター液を補充した。また最終サンプリング時点ではレセプター液と同時にドナー液を採取した。採取した液は未溶解のKTをろ過除去した後、ケトチフェン濃度 (μmol/cm³) を測定した。

得られた値を用いて、「8. *In vitro*透過試験における累積透過量の算出」に示す方法により透過プロファイルを作成し、最終時点を含む直線部分の傾きから透過速度 (μmol/h/cm²) を算出した。得られた透過速度を最終時点でのドナー液中薬物濃度 (μmol/cm³) で除すことにより透過係数 (cm/h) を算出した。実験は3回繰り返した。得られた透過係数は厚さ 0.5 cmの水相と、それを挟む2枚の多孔膜の透過係数であるが前者に対する後者の透過抵抗は無視し得ると仮定し、透過係数に厚さ 0.5 cmを乗じて水相中の拡散係数 (cm²/h) とした。

8. *In vitro* 透過試験における累積透過量の算出

本章の*in vitro*透過試験では、採取したレセプター液中薬物濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) を式(7)に代入してn番目のサンプリング時点 t_n における単位面積あたりの累積透過量 Q_n ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) を算出した。なお、 C_n はn番目に採取したレセプター液中薬物濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)、 V はレセプター体積 (mL)、 v はサンプリング体積 (mL)、 S は透過面積 (cm^2) を表す。

$$Q_n = \frac{C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i v)}{S} \quad (7)$$

Q_n を t_n に対してプロットすることにより透過プロファイルを作成した。

第2節 結果

1. KT のキャラクタリゼーション

調製法-1 あるいは調製法-2 で得た KT の偏光顕微鏡写真、粉末 X 線回折パターンおよび示差走査熱分析曲線を各々 Fig. 2、Fig. 3 および Fig. 4 に示す。調製法-2 で得た KT には明確な偏光性と X 線回折パターン上の明確なピークが認められ、融解点を示唆するシャープな吸熱ピークが認められたことから結晶型と判断した。一方、調製法-1 で得た KT は偏光性を示さず、X 線回折パターンに明確なピークが認められず、示差走査熱分析曲線において吸熱ピークの低温側に非晶から結晶への転移を示唆する発熱ピークが認められたことから非晶型と判断した。

以後本研究では、結晶型の KT を結晶 KT、非晶質型の KT を非晶 KT と称する。

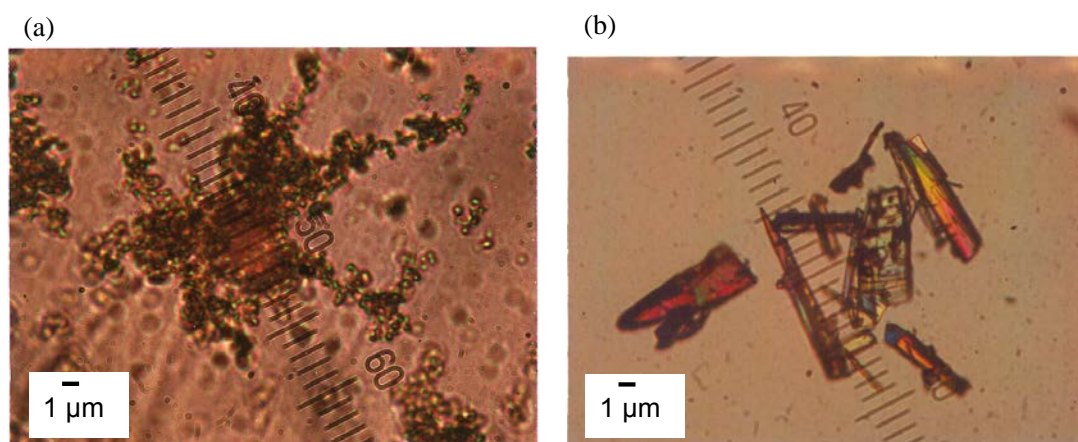


Fig. 2 Microscopic photographs of solid state ketotifen obtained by Method-1 (a) or Method-2 (b).

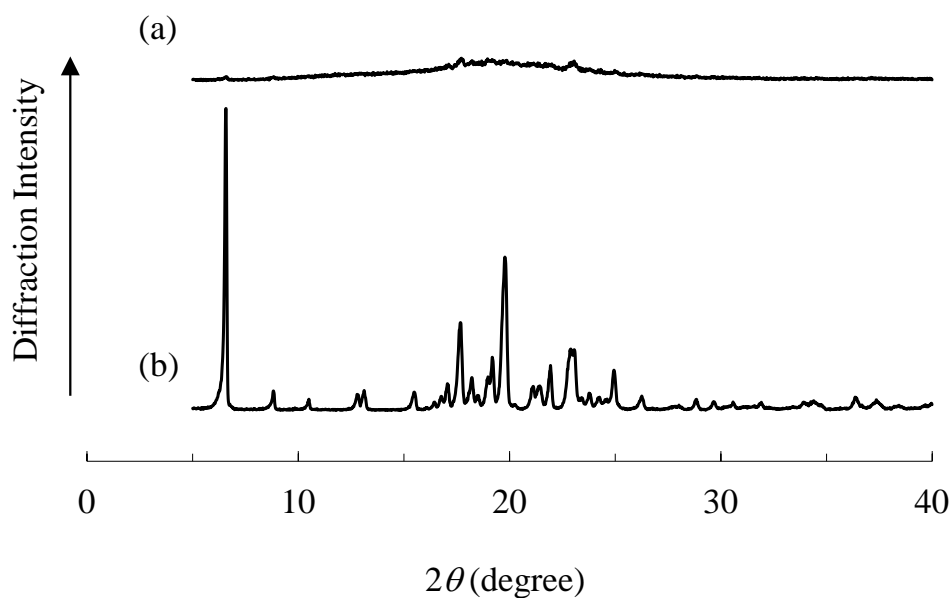


Fig. 3 Powder X-ray diffraction patterns of ketotifen obtained by Method-1 (a) or Method-2 (b).

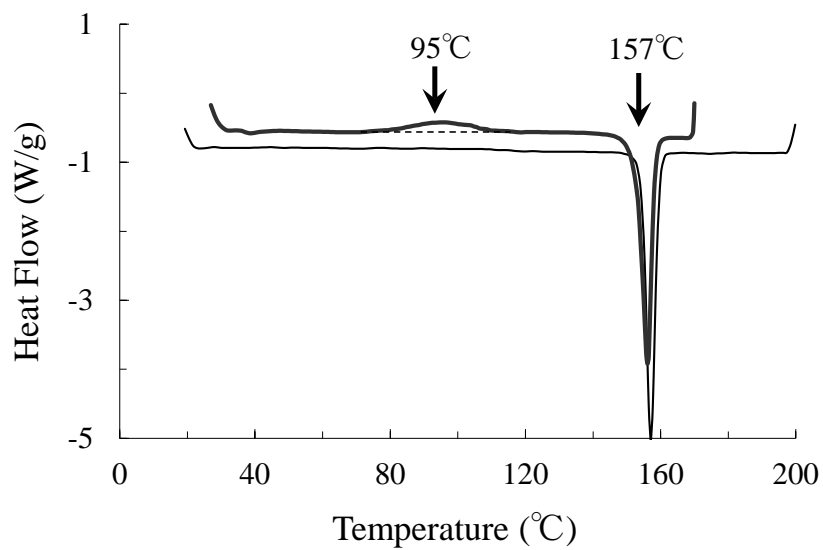


Fig. 4 Differential scanning calorimetry profiles of ketotifen obtained by Method-1 (bold line) or Method-2 (solid line).

2. ケトチフェンの水に対する溶解度と解離定数

溶解度測定法-1 あるいは溶解度測定法-2 で求めたケトチフェンの溶解度-pHプロファイルを図5に示す。pKaと $C_{s_{KT}}$ をフィッティングパラメータとして式(1)を測定値にフィットさせることにより求めたpKa、および結晶KTおよび非晶KTの溶解度をTable 3に示す。

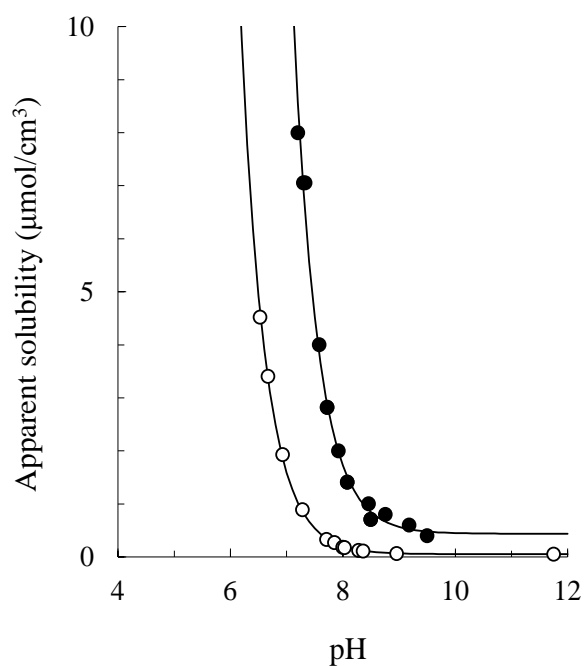


Fig. 5 Total solubility-pH profiles of crystalline (open circle) or amorphous (closed circle) ketotifen in aqueous solution at 37°C. Regression curves based on Eq. (1) are represented as solid lines.

Table 3 Solubility of unprotonated ketotifen ($C_{s_{KT}}$) and the dissociation constant of ketotifen in aqueous solution (pKa) at 37°C

$C_{s_{KT}}$ ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)	Crystalline	0.052
	Amorphous	0.438
pKa	8.5	

3. 皮膚全体のバリア能に対する角層の寄与

シリコンオイルに結晶KTを懸濁させたドナー液からのインタクト皮膚あるいは角層除去皮膚におけるケトチフェンの透過プロファイルを図. 6 に示す。良好な直線性が認められた 1.6~6 h の範囲の傾きから求めた各皮膚における皮膚透過速度 ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$) の平均値と標準偏差、および平均値を式 (2) に代入して求めた皮膚全体の透過抵抗に対する角層透過抵抗の比率を Table 4 に示す。

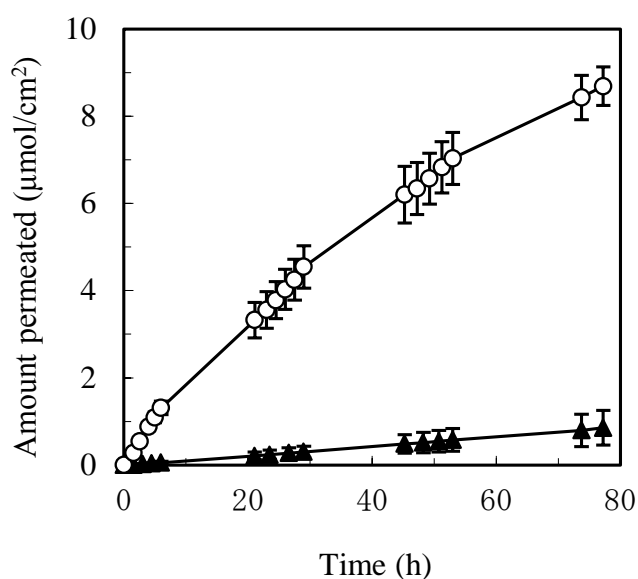


Fig. 6 Permeation profiles of ketotifen through intact (closed triangles) or tape-stripped (open circle) hairless mouse skin from suspension of unprotonated ketotifen in silicone oil.

Table 4 Permeation fluxes and the ratio of the permeation resistance between the stratum corneum and the intact skin.

$flux_{INT}$ ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$)	0.011 ± 0.006 ¹⁾
$flux_{VS}$ ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$)	0.232 ± 0.036 ¹⁾
$\frac{R_{SC}}{R_{INT}}$	0.95

1) Mean \pm standard deviation of triplicate data

4. インタクト皮膚および脱脂処理皮膚における KT および KTH+の固有透過係数

水溶液あるいは水性懸濁液からのインタクト皮膚あるいは脱脂処理皮膚におけるケトチフェンの皮膚透過プロファイルを図. 7 に示す。直線関係が認められた 5~40 h の範囲の傾きから求めた皮膚透過速度 ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$) を、最終時点におけるドナー中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) で除して皮膚透過係数とし、それを最終時点におけるドナー pH に対してプロットしたグラフを図. 8 に示す。またこれらの結果に対する式 (3) あるいは式 (4) に基づくフィッティングカーブを図. 8 に実線で示す。フィッティングにより求められた KT と KTH+ の固有透過係数を Table 5 に示す。

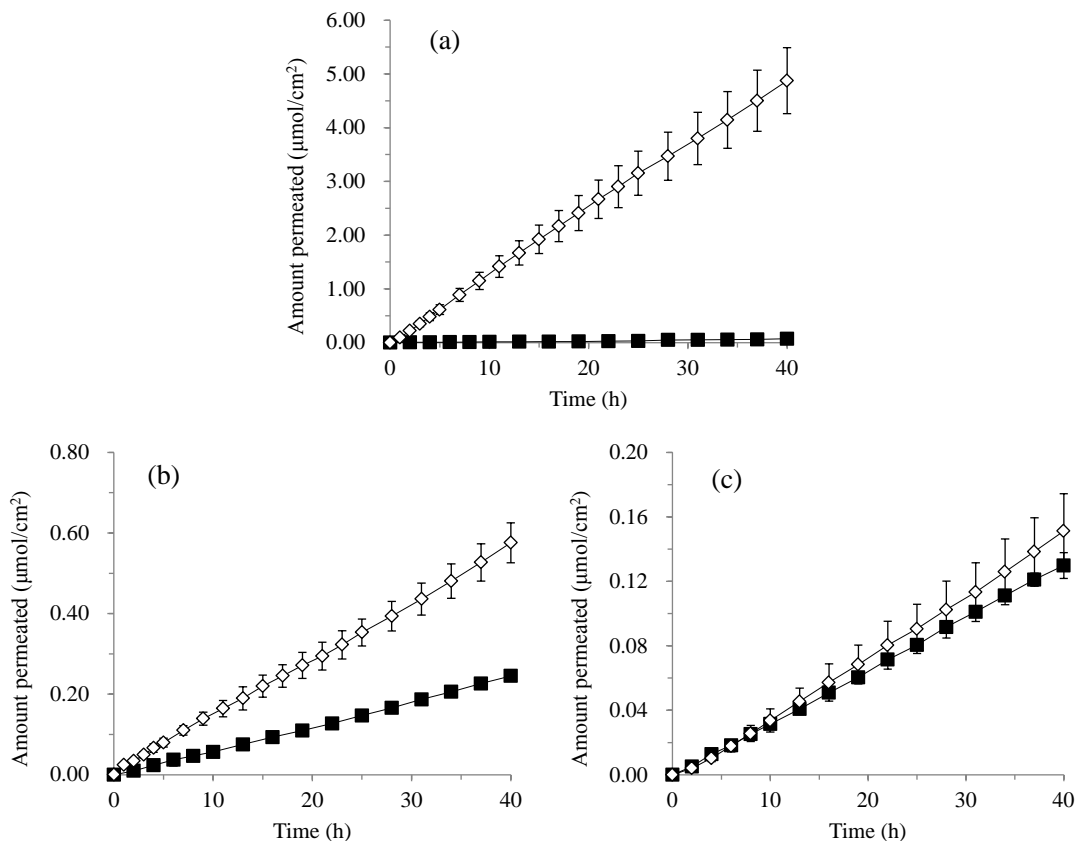


Fig. 7 Permeation profiles of ketotifen through intact (closed square) or delipidized (open diamond) hairless mouse skin from aqueous donor solution or aqueous donor suspension which pH was adjusted at 6.0 (a), 9.0 (b) or 10.5 (c).

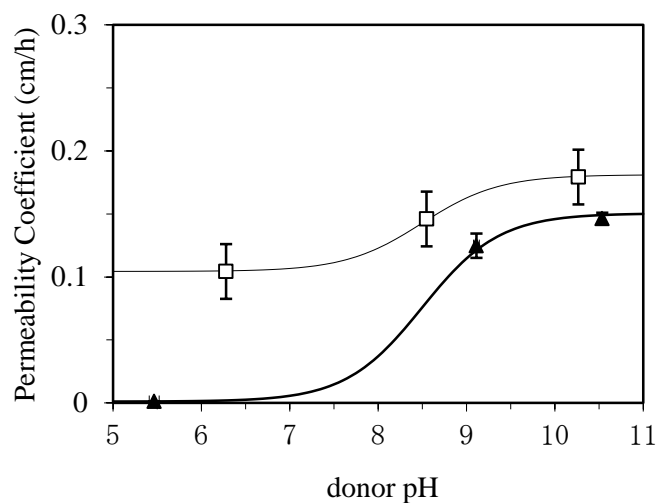


Fig. 8 Permeability coefficient of ketotifen through intact (closed triangle) or delipidized (open square) stratum corneum as a function of donor pH. Each plot represents the mean value, and the error bar represents the standard deviation of triplicate data. Solid curves represent the fitting curves based on Eq. (3) and (4).

Table 5 Intrinsic permeability coefficients of KT and KTH+ through intact or delipidized skin.

Intact stratum corneum		Delipidized stratum corneum	
$P_{(KT)intact}$ (cm/h)	$P_{(KTH+)intact}$ (cm/h)	$P_{(KT)delip}$ (cm/h)	$P_{(KTH+)delip}$ (cm/h)
1.5×10^{-1}	1.1×10^{-3}	1.8×10^{-1}	1.0×10^{-1}

5. KT および KTH+のインタクト角層／水相間および脱脂処理角層／水相間固有分配係数

ケトチフェンの角層／水相間分配係数、およびこれらの測定値に対する式 (5) あるいは式 (6) のフィッティングカーブを Fig. 9 に示す。またフィッティングにより得られた KT および KTH+の固有分配係数を Table 6 に示す。

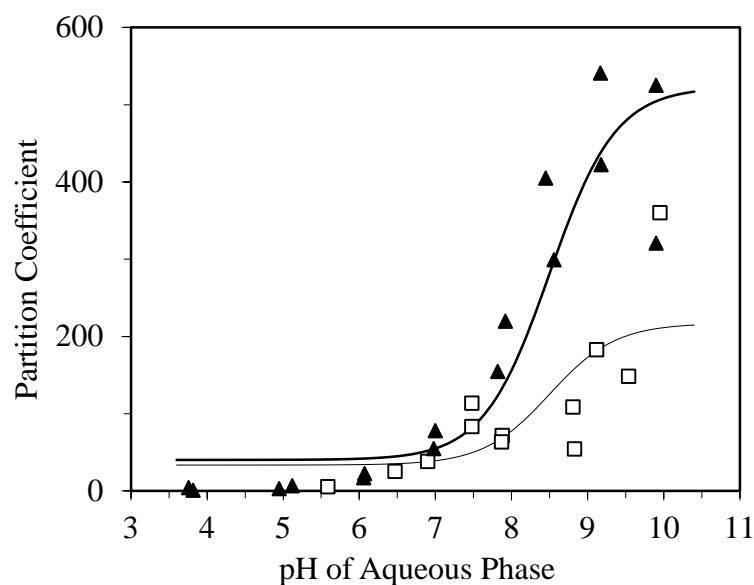


Fig. 9 Partition coefficient of ketotifen between intact stratum corneum and aqueous solution (closed triangle) or delipidized stratum corneum and aqueous solution (open square) as a function of pH. Solid curves represent the fitting curves based on Eq. (5) and (6).

Table 6 Intrinsic partition coefficients of KT and KTH+ between intact or delipidized stratum corneum and aqueous solution.

Intact stratum corneum		Delipidized stratum corneum	
$K_{(KT)intact}$	$K_{(KTH+)intact}$	$K_{(KT)delip}$	$K_{(KTH+)delip}$
523	40	217	34

6. ケトチフェンの水中における拡散係数

2枚の多孔膜で挟まれた水相におけるケトチフェンの透過プロファイルをFig. 10に示す。110 ~ 270 minの範囲を直線近似して得た透過速度は $0.55 \times 10^{-3} \mu\text{mol/h/cm}^2$ 、最終時点のドナー中ケトチフェン濃度は $4.2 \times 10^{-2} \mu\text{mol/cm}^3$ であった。以上の結果と水相厚さ 0.5 cmを用いて算出したケトチフェンの水中における拡散係数は $6.5 \times 10^{-2} \text{cm}^2/\text{h}$ であった。

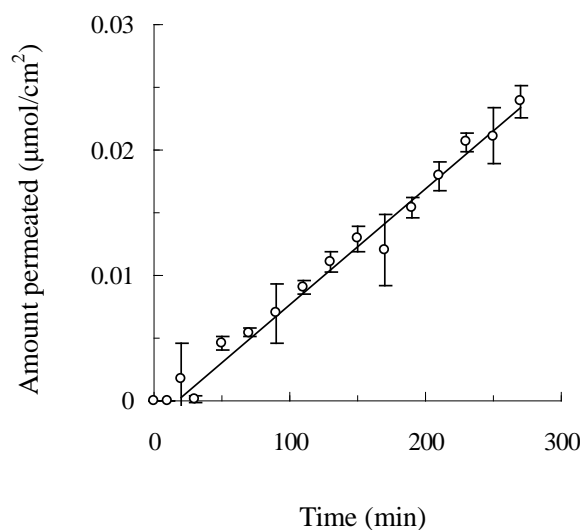


Fig. 10 Permeation profile of ketotifen through stationary aqueous layer (pH 10, 0.5-cm thick). Open circles and error bars represent mean values and standard deviations, respectively (n=3). The solid line represents a regression line calculated using the data from 110 to 270 min.

第3節 考察

皮膚全体の透過抵抗の95%が角層に由来するという Table 4 の結果から、皮膚において求められた透過係数は角層における透過係数と近似できることが示唆された。そこで Table 5 に示した KT および KTH+ の固有透過係数を角層における固有透過係数と見做して以下の考察を行った。

まず、ケトチフェンの角層透過性に対する脂質相の寄与を考察した。Table 5 に示すとおり $P_{(KTH+)_{\text{intact}}}$ に対して $P_{(KTH+)_{\text{delip}}}$ が 2 桁大きいことから、脂質相は KTH+ に対しては大きな透過障壁として機能するが、一方 $P_{(KT)_{\text{intact}}}$ と $P_{(KT)_{\text{delip}}}$ が同等の値であることから、KT に対して脂質相は水相と同様、透過性の良好な経路であることが示唆された。脂質相は緻密にパッキングした多重ラメラ構造からなり、ここでの物質の拡散速度は水相中に比べて低い¹⁴と考えられているが、Table 6 における $K_{(KT)_{\text{intact}}}$ と $K_{(KT)_{\text{delip}}}$ の結果から、KT の脂質相への溶解度は水相に比べて数百倍高いことが示唆されるので、脂質相での高い溶解性が低い拡散性を補う結果、KT が脂質相において水相と同等の透過性を示したと考えられる。

次に、ケトチフェンの角層透過性に対するタンパク相の寄与を考察した。脱脂角層はブリック状に積層されたタンパク相の間隙を水相が満たしたものであり、ここでのケ

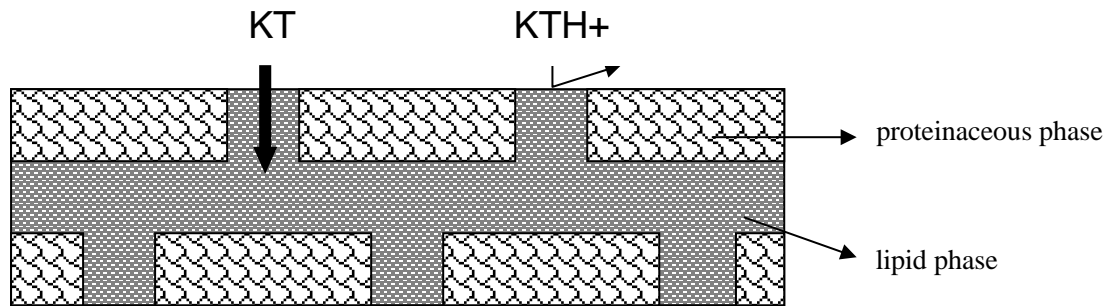
トチフェンの透過係数はTable 5 から $1.0\sim 1.8\times 10^{-1}$ cm/hであるが、同じ厚さ $10\ \mu\text{m}$ の水相透過係数を水相中の拡散係数 6.5×10^{-2} cm²/hから計算すると $64\ \text{cm/h}$ となり脱脂角層より300~600倍大きな値となる。この結果は、タンパク相がケトチフェンに対する大きな透過障壁であることを示唆する。そこで、タンパク相の分配性に対する寄与を見てみると、Table 6 からKTの角層に対する分配係数は脱脂処理を施した後も約4割残存することが判る。このようにKTが脱脂角層と高い親和性を示す理由としては、脱脂処理で除ききれなかった脂質による部分とタンパク相の寄与が考えられるが、脱脂処理の脂質除去率80%~90%から、脱脂角層へのKT分配性に対する残存脂質の寄与は高々半分程度と見積もられるため、KTはタンパク相にも高い分配性を示すと考えられる。

脂溶性の高い化合物がタンパク相あるいはその主成分であるケラチンに対して高い親和性を示すことは多くの研究で検証されている。例えばSeifらは¹⁵、ウシから単離したケラチンを用い、2種類の解離性医薬化合物flufenamic acid (pKa=3.67) とnortriptyline hydrochloride (pKa=10.00) について、タンパク相/水相間分配係数を異なるpHにおいて測定し、flufenamic acidの場合には671.30 (pH 5.5) および89.47 (pH 7.4)、nortriptyline hydrochlorideの場合には163.03 (pH 5.5) および770.56 (pH 8) という結果を報告している。いずれもイオン型に比べて分子型の分配係数が高いことを示唆する結果である。またHansenらは¹⁶、脂溶性の異なる多数の化合物についてヒト脱脂角層と水相間の分配係数を測定し、それらが化合物のオクタノール/水相間分配係数と良好な正の相関を示すことを報告している。KTのタンパク相への分配性がKTH+より高い結果は、これらの報告と矛盾しない。またSeifらは、ケラチンに分配した分子型のflufenamic acidやnortriptylineがケラチンから離脱する速度は、各々のイオン型に比べて約1/4遅いことを報告している。KTにおいても、タンパク相への分配性が高いにも関わらずここからの離脱速度が遅いため、タンパク相は透過障壁として働くと考えられる。すなわち、タンパク相へのKTの分配は結合であると推測される。

第4節 小括

前節で推定されたインタクト角層あるいは脱脂角層におけるケトチフェンの透過メカニズムを模式図にて Fig. 11 に示す。インタクト角層の場合、KTH+はタンパク相、脂質相両方への分配性が低いため透過性が低い。KTは脂質相に高い分配性を示すため、ここを水相と同程度の速度で透過する。またKTはタンパク相に対しても高い分配性を示すが、そこからの離脱が遅く結合状態にあるため、タンパク相を介した透過の寄与は小さい。脱脂角層の場合、KTH+とKTは主に脱脂によって生じた水相を介して透過する。KTH+の場合、脱脂による透過促進効果は大きい。KTの場合、脂質相を水相中と同程度の速度で透過し得るため、脱脂の効果は小さい。以上本章では、インタクト皮膚および脱脂処理皮膚のケトチフェン透過性のpH依存性から分子型KTとイオン型KTH+を分離して評価し、各々の透過性に対する脂質相とタンパク相の寄与を定量化した。

(a) Intact stratum corneum



(b) Delipidized stratum corneum

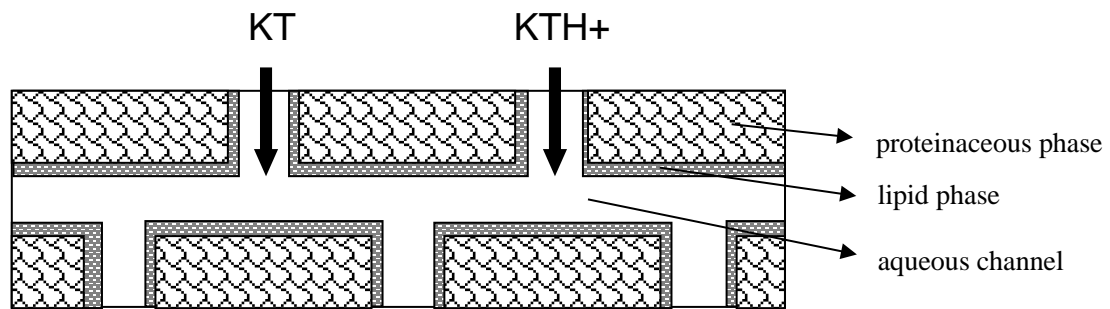
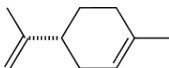
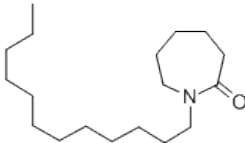
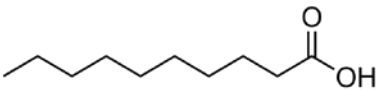
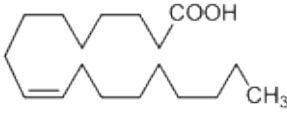
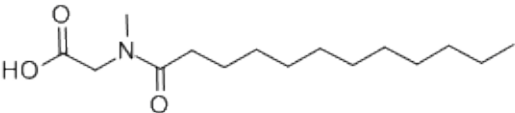
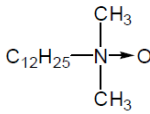


Fig. 11 Schematic diagram illustrating the permeation mechanism of ketotifen through intact (a) or delipidized (b) stratum corneum.

第2章 各種経皮吸収促進剤の効果と作用メカニズム^{*3}

吸収促進剤を用いる方法の最大の課題は有効性と安全性の両立であり、処方パラメータを最適化して吸収促進剤の添加量を減らすことが重要である。塩基性薬物において pH は分子型とイオン型の比率を決定する処方パラメータであり、両分子種に対する吸収促進剤の効果を個別に評価することで、促進剤の効果を最大化させる pH を見出すことが可能となる。本章では、吸収促進剤としての検討報告事例が豊富な 4 化合物群から比較的安全性が高いと考えられる 6 種類の吸収促進剤を選択し (Table 7)、KT と KTH+ に対する効果を個別に検討した。

Table 7 Chemical skin permeation enhancers

Category	Chemical enhancers	
	Name	Chemical structure
Terpenes	<i>d</i> -Limonene	
Synthetic enhancers	1-Dodecyl azacycloheptan-2-one (Azone)	
Fatty acids	Capric acid	
	Oleic acid	
Surfactants	Lauroyl sarcosine (LS)	
	N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide (LDAO)	

Terpenesはイソプレン骨格を有する天然物由来の化合物群の総称である。構造や官能基の種類と経皮吸収促進効果の相関について多くの研究報告があり¹⁷、炭化水素類の terpenesは脂溶性の薬物に対して、また官能基に酸素原子を含む terpenesは親水性の薬物に対して高い効果を示す傾向が認められている。*d*-Limoneneは炭化水素類に属する terpenesであり、矯味剤あるいは着香剤として経口投与や外用剤に使われるオレンジ油や

レモン油の主成分である。1-Dodecyl azacycloheptan-2-one（商品名：Azone[®]）は吸収促進剤としての使用を目的に開発された化合物であり¹⁸、未だ医薬品添加物としての使用前例は無いが、皮膚刺激性、皮膚感作性および光感作性の評価結果から臨床使用の可能性が示唆されている^{19, 20}。Fatty acidsも経皮吸収促進剤としての検討事例が豊富な化合物群であり^{21, 22}、アルキル鎖長や不飽和度と効果の関係から、炭素数が10から14で作用が極大となることや²³、同じ鎖長の場合、飽和脂肪酸より不飽和脂肪酸の方が高い効果を示す²⁴ことが報告されている。Capric acidは炭素数10、oleic acidは炭素数18であり、後者は一箇所にも不飽和結合を有する。両者は溶解補助剤や懸濁剤として外用剤を含む様々な医薬品に添加されている。Surfactantsは親水基の荷電状態やアルキル鎖長と促進効果の関係が系統的に研究されている²⁵。Lauroyl sarcosine（以下、LSと略す）はアニオン性、N,N-dimethyldodecylamine N-oxide（以下、LDAOと略す）は両イオン性であり、各々積水化学㈱、あるいは㈱資生堂において吸収促進剤としての有用性が検討されている^{26, 27}。

吸収促進剤の研究では通常、薬物と吸収促進剤を同時に皮膚に適用するため、得られる結果は薬物の性質に及ぼす影響と皮膚に及ぼす影響の両方を含み、考慮すべきメカニズムが複雑になる。本研究では、皮膚側の変化に起因する効果を抽出するため、吸収促進剤と薬物の相互作用を排除し得る前処理法を採用した。はじめに吸収促進剤のみを皮膚に作用させ、次に吸収促進剤を皮膚から取り除き、薬物のみを含む製剤を皮膚に適用して薬物の皮膚透過性を観測した。これにより吸収促進剤処理の違いによらず、同一の製剤処方での評価が可能となり、得られる結果は、皮膚に生じた変化のみを反映したものと見做した。

第1節 方法

1. 試薬、材料

フマル酸ケトチフェン、LDAOはSigma-Aldrich Co.（St. Louis, MO, USA）より、*d*-limonene、capric acid、oleic acid、LS、クロロホルム、メタノール、アセトニトリル、トリエチルアミン、1 N塩酸、ジクロロメタン、*n*-ヘキサン、水酸化ナトリウム、クエン酸は、和光純薬工業㈱（大阪）より、Azone[®]は共栄化学㈱（大阪）より、シリコーンオイルは東レ・ダウコーニング株式会社（東京）より、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムは岩井化学薬品㈱（東京）より、アジ化ナトリウムは関東化学㈱（東京）より、等張リン酸緩衝液（pH 7.4）はライフテクノロジーズ・ジャパン㈱（東京）より、ヘアレスマウス（Hos:HR-1）は㈱星野試験動物飼育所（坂東市、茨城）より入手した。

2. HPLC 条件

本章におけるケトチフェン濃度は第一章、第1節に示す方法と同一条件の HPLC 法にて測定した。

3. ヘアレスマウス摘出皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過試験

3-1. ドナー溶液

第1章、第1節、5-3項に示す方法に準じて調製した pH 5 のケトチフェン水溶液（以下、pH-5 ドナーと略す）、あるいは結晶型 KT を懸濁させた pH 10 の懸濁液（以下、pH-10 ドナーと略す）をドナー溶液とした。

第1章、第1節で求めたケトチフェンの 37°C における pKa (8.5) から、pH-5 ドナーあるいは pH-10 ドナーにおける溶解状態のケトチフェンのうち 95% 以上を各々 KTH+ あるいは KT が占めるので、これらを用いて測定される透過係数は KTH+ あるいは KT の固有透過係数と見做した。

3-2. レセプター溶液

0.1% の NaN_3 を添加した pH 7.4 の等張リン酸緩衝液をレセプター液とした。

3-3. 皮膚採取と透過セルのセットアップ

第1章、第1節、5-1項及び5-1項に示す方法でヘアレスマウス皮膚を縦型フランツセルにセットした。レセプターチャンバーにはレセプター液（0.1% NaN_3 in pH7.4 PBS）を満たし、マグネティックスターラーで攪拌しながら保温のためセルジャケットに 37°C の恒温水を還流させた。

3-4. 吸収促進剤による皮膚の前処理

吸収促進剤のうち 37°C で液体である *d*-limonene、Azone、capric acid および oleic acid は原液を前処理液とした。また、*d*-limonene と capric acid については併用効果を評価するため両者を体積比 1:1 で混合した液も前処理液として評価した。一方 37°C で固体である LS と LDOA は、等張リン酸緩衝液に各々 10% あるいは 2% を溶解した水溶液を前処理液とした。文献上で検討されている濃度の最大値は LS の場合 6%²⁸、LDAO の場合 0.9%²⁹ であり、本研究で設定された濃度は、これらの吸収促進剤の最大活性を評価するのに十分であると考えた。皮膚をセットしたフランツセルのドナーチャンバーに前処理液 1 mL を入れて 1 h インキュベーションした後、前処理液とレセプター液を取り除き、レセプターチャンバーに新しいレセプター液を満たして透過実験に供した。

3-5. 皮膚の脱脂処理

第一章で効果を検証した脱脂処理を本章の陽性対照群として改めて評価した。Chloroform と methanol を体積比 2:1 で混合した液を前処理液とし、3-4 に記載した吸収促進剤による前処理法と同一の条件で処理を行った。

3-6. ケトチフェンの皮膚透過実験

インタクト皮膚（吸収促進剤の前処理や脱脂処理を行わない皮膚）、脱脂処理皮膚、あるいは吸収促進剤前処理皮膚がセットされた透過セルのドナーチャンバーに 2 mL の pH-5 ドナーあるいは pH-10 ドナーを入れて透過実験を開始した。レセプター溶液は 1 h 毎に 8 h まで 1.8 mL を採取し、最終時点以外では同量のフレッシュなレセプター液をチャンバーに補充した。ドナー液は、ケトチフェン濃度および pH の変動を抑制するため 2 h 毎に全量を採取しフレッシュな液に置換した。採取したレセプター液はケトチフェン濃度、ドナー液はケトチフェン濃度と pH を測定した。得られたケトチフェン濃度を用い、第一章、第一節、8 項に示した方法で皮膚透過プロファイルを作成した。実験は各群 3 回繰り返した。

3-7. Enhancement ratio (ER) の計算

ドナーのケトチフェン濃度と pH が一定に保たれ、皮膚透過プロファイルが直線となる領域の傾きから定常皮膚透過速度 ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$) を求め、また定常皮膚透過速度を最終時点のドナー中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) で除して皮膚透過係数 (cm/h) を算出した。ER は、インタクト皮膚群の定常皮膚透過速度の平均値に対する各群の定常皮膚透過速度の平均値の比率から計算した。

4. *d*-Limonene 原液、Azone 原液中ケトチフェン透過パラメータの測定

皮膚に適用された *d*-limonene と Azone は角層の脂質相中で単独の相 (enhancer pooling) を形成することが知られている^{30,31}。Enhancer pooling 中のケトチフェン透過性と促進剤原液中透過性が同等であるとの仮定に基づいて enhancer pooling と促進効果の関係を検討するため、*d*-limonene 原液および Azone 原液中ケトチフェン透過パラメータ (cm/h) を測定し水相中の値と比較した。なお透過パラメータとは、拡散係数と吸収促進剤/水相間分配係数の積であり、本研究で独自に定義する値である。

吸収促進剤/水相間分配係数は、KTH+ と KT の両方について測定した。前者の場合 20 mM のリン酸ナトリウムで pH を 5 に調整した緩衝液、後者の場合 20 mM の炭酸ナトリウムで pH を 10 に調整した緩衝液を水相とした。1.3 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ の KT を溶解した *d*-limonene、あるいは 4.8 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ の KT を溶解した Azone を促進剤相とし、水相と促進剤相を 37°C で保温しながら 3 h 混合し遠心分離後 (3000 rpm、2 min)、両相中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) を測定した。なお水相中ケトチフェン濃度は直接 HPLC 分析に供し、促進剤相中ケトチフェン濃度は、含まれるケトチフェンを抽出液 (0.001

Mの塩酸水溶液)に抽出し、抽出液中のケトチフェン濃度に抽出液体積を乗じ、促進剤相体積で除して算出した。得られた促進剤相中ケトチフェン濃度を、それと共存させた水相中濃度で除し分配係数とした。実験は3回繰り返した。

吸収促進剤中のケトチフェンの拡散係数をDesaiらの方法に従い³²測定した。また対照として用いる水相中拡散係数については、第一章で別法により測定された値ではなく、吸収促進剤中の拡散係数を測定する方法と同じ方法で再測定した。レセプター液は、水相の場合20 mMの炭酸ナトリウム緩衝液(pH 10)、促進剤の場合は促進剤原液とし、ドナー液は水相の場合レセプター液に1.3 μmol/mLのKTを加えた懸濁液、促進剤の場合は1.3 μmol/mL (*d*-limonene)あるいは4.8 μmol/mL (Azone)のKTを溶解させた促進剤原液とした。チャンバー容量80 mLの2チャンバー型拡散セルに厚さ5 mmの焼結多孔性ガラス膜(柴田科学株、草加市、埼玉)をセットし、ドナーチャンバー、レセプターチャンバーおよび多孔性ガラス内をレセプター液で満たし、両チャンバー内の液をマグネティックスターラーで攪拌下、レセプターチャンバーを密封した状態でドナーチャンバーから液15 mLを取り除き、薬液15 mLを加えてドナーチャンバーも密閉し、透過を開始した。サンプリング時以外は両チャンバーとも密栓して多孔性ガラス膜内の液の動きを防ぎ、セル全体は恒温槽中で37°Cに保温した。透過開始後、所定時刻に1.8 mLのレセプター液を採取し、同時に同量の新鮮なレセプター液を補充した。また、最終サンプリング時点ではドナー液を採取し、未溶解の薬物をろ過除去した後、採取したサンプル中の薬物濃度を測定した。得られた値を用いて、第1章、第1節、「8. *In vitro*透過試験における累積透過量の算出」に示す方法により透過プロファイルを作成し、最終時点を含む直線部分の傾きから透過速度を算出した。得られた透過速度を最終時点でのドナー液中薬物濃度とセル係数で除すことにより拡散係数を算出した。実験は3回繰り返した。

セル係数は透過係数既知のクエン酸を標準物質とし、レセプター液は純水、ドナー液は19.2 mg/mLのクエン酸水溶液とし、上記手順で測定したクエン酸透過係数を拡散係数 $6.61 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$ で除して求めた。

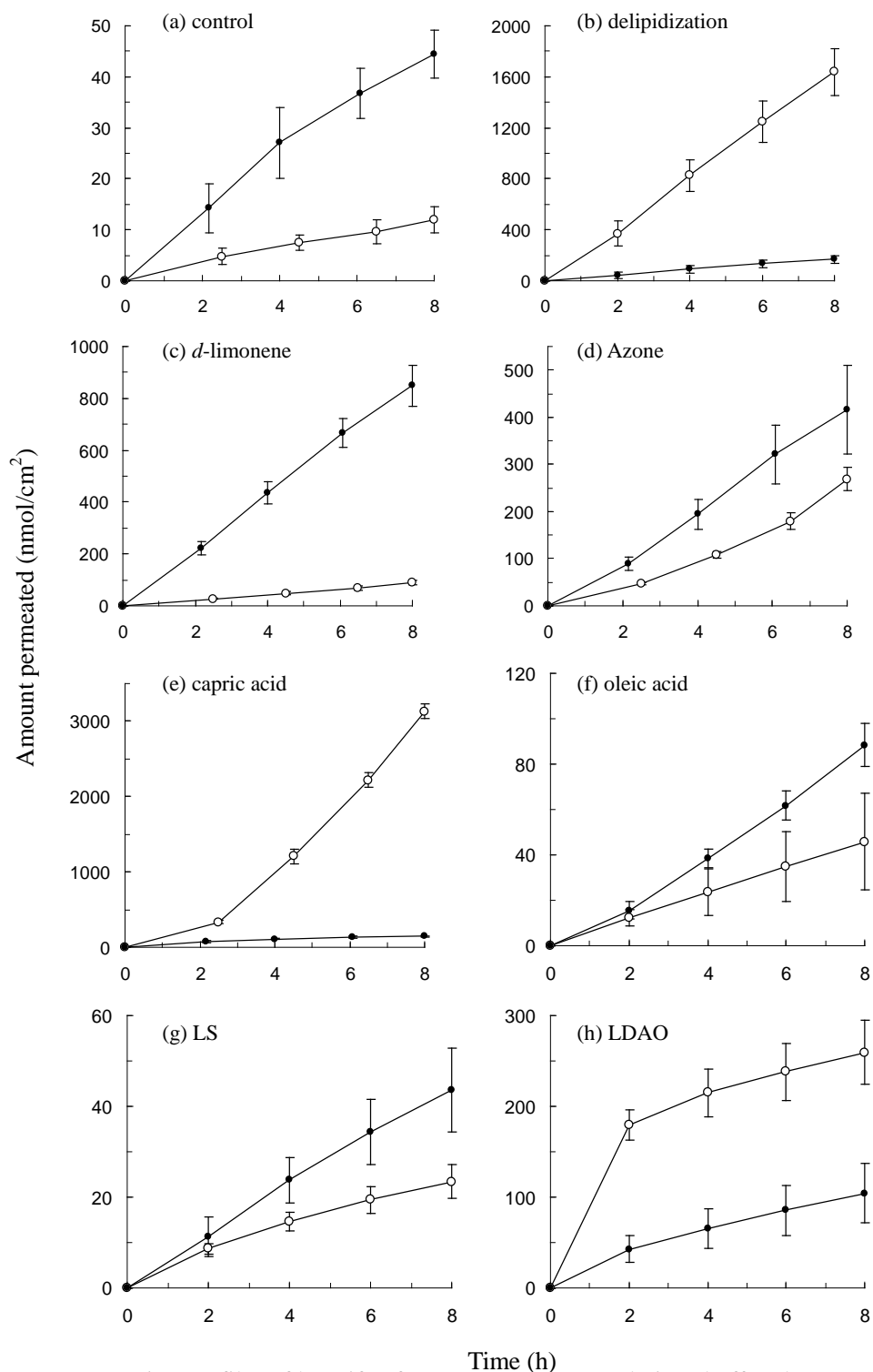


Fig. 12 Permeation profiles of ketotifen from aqueous donor solutions buffered at pH 5 (open circles) or pH 10 (closed circles) through intact (a), delipidized (b) hairless mouse skin, or skin pretreated with *d*-limonene (c), Azone (d), capric acid (e), oleic acid (f), LS (g), or LDAO (h). Each data point and error bar represents respectively the mean and the standard deviation of three replicates.

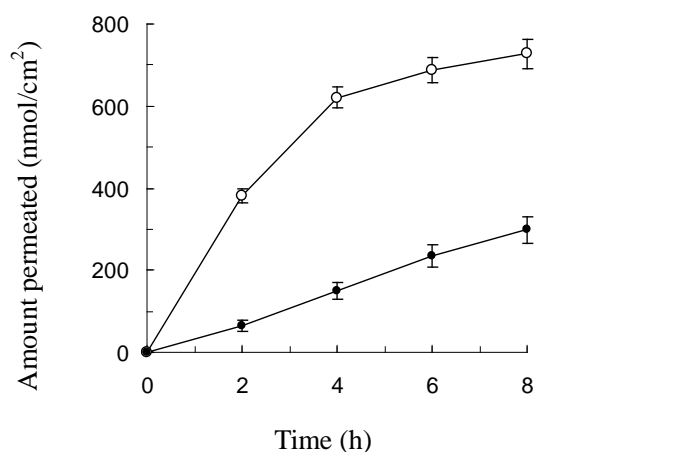


Fig. 13 Permeation profiles of ketotifen from aqueous donor solutions buffered at pH 5 (open circles) and pH 10 (closed circles) through hairless mouse skin pretreated with a 1:1 mixture of *d*-limonene and capric acid. Each data point represents the mean and the standard deviation of three replicates.

Table 8 Steady state permeation flux and permeability coefficient of ketotifen from pH 5 and pH 10 donor solutions through hairless mouse skin with and without pretreatment of various enhancers.

Pretreatment	Flux (nmol/h/cm ²)		Permeability coefficient* (cm/h)	
	pH 5	pH 10	pH 5	pH 10
None	1.3 ± 0.2	5.1 ± 0.2	0.0004 ± 0.0001	0.1748 ± 0.0119
Delipidization	210.9 ± 14.4	21.1 ± 1.3	0.0750 ± 0.0057	0.7446 ± 0.0538
<i>d</i> -Limonene	11.1 ± 1.0	107.6 ± 9.7	0.0036 ± 0.0006	3.9860 ± 0.2032
Azone	39.4 ± 4.4	56.5 ± 15.2	0.0131 ± 0.0016	2.1004 ± 0.5416
Capric acid	546.8 ± 22.0	8.3 ± 1.2	0.1868 ± 0.0111	0.3154 ± 0.0447
Oleic acid	5.6 ± 2.9	12.1 ± 1.5	0.0019 ± 0.0010	0.4202 ± 0.0410
LS	2.2 ± 0.4	5.4 ± 1.3	0.0007 ± 0.0001	0.1981 ± 0.0395
LDAO	11.2 ± 2.5	9.8 ± 2.8	0.0037 ± 0.0008	0.3743 ± 0.1299
<i>d</i> -Limonene + capric acid	26.7 ± 5.0	37.2 ± 12.1	0.0087 ± 0.0016	1.4884 ± 0.4720

* Each value represents the mean ± SD of three replicates.

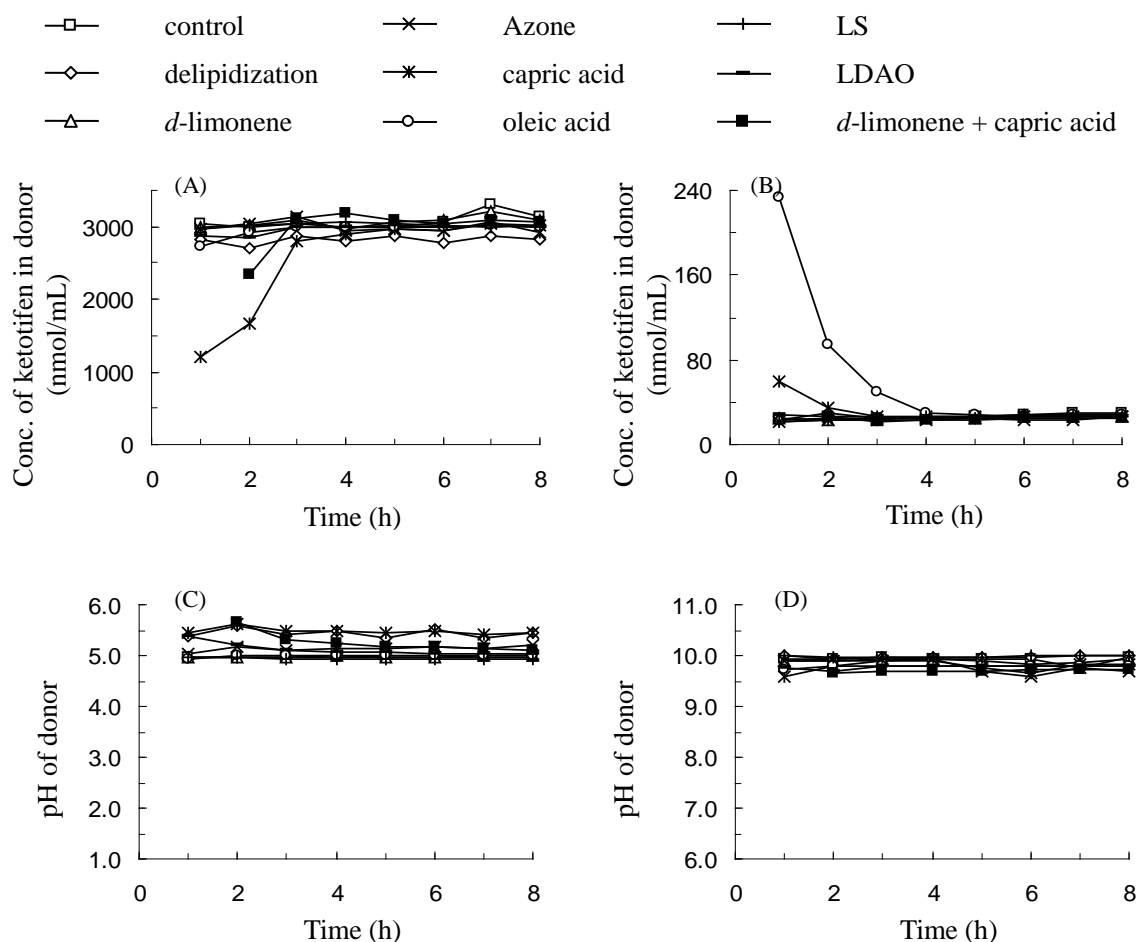


Fig. 14 Time courses of drug concentration (A, B) and pH (C, D) of donor solutions applied on intact (open squares) and delipidized (open diamonds) hairless mouse skin, and skin pretreated with *d*-limonene (open triangles), Azone (crosses), capric acid (stars), oleic acid (pluses), LS (bars), and LDAO (closed squares). Each data point represents the mean of three replicates.

第2節 結果

1. ヘアレスマウス皮膚における *in vitro* 透過プロファイルと ER

pH 5 あるいは 10 の水性ドナーからの、吸収促進剤前処理皮膚におけるケトチフェン透過プロファイルを、インタクト皮膚、あるいは脱脂処理皮膚におけるプロファイルと併せて Fig. 12 と Fig. 13 に示す。また、ドナーにおけるケトチフェン濃度と pH の推移を Fig. 14 に示す。pH 5 ドナーからの透過プロファイルのうち、Azone および capric acid で前処理した皮膚においてはラグタイムが、また LDAO および *d*-limonene/capric acid 混合液で前処理した皮膚においては初期バーストが認められたが、いずれの群においても 4 h~8 h の間で直線的なプロファイルが認められた。また、この区間のドナーにおけるケトチフェン濃度や pH の変動は認められなかったことから、この区間のプロファイルが定常状態を表すと判断し、傾きから定常皮膚透過速度を計算し、その値と最終時点ドナー中ケトチフェン濃度の比から皮膚透過係数を計算

した。結果を Table 8 に示す。また、インタクト皮膚群の定常皮膚透過速度に対する各群の値の割合から求めた ER を Fig. 15 に示す。

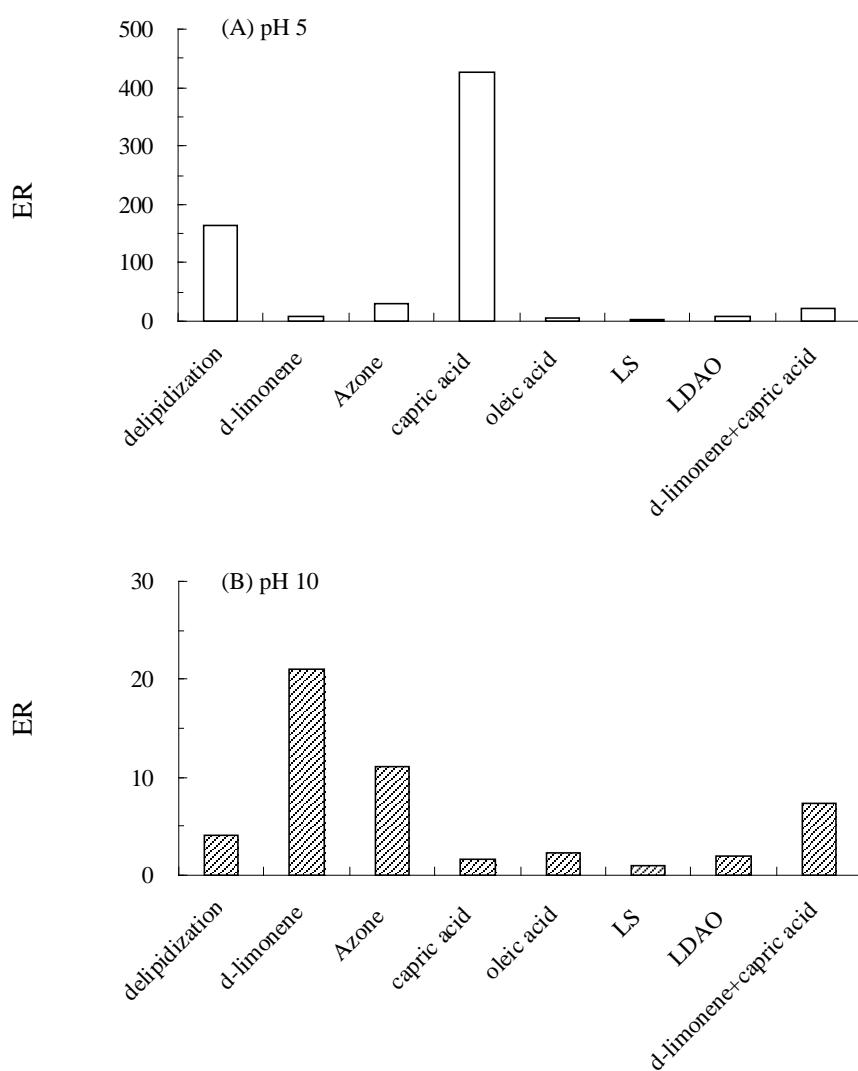


Fig. 15 ERs of delipidization and enhancer pretreatment in the steady state permeation flux of ketotifen through hairless mouse skin from aqueous donor solutions buffered at pH 5 (A) and pH 10 (B).

Table 9 Partition coefficients, diffusion coefficients and permeability parameters of protonated ketotifen (pH 5) and unprotonated ketotifen (pH 10).

pH	Medium	Partition coefficient	Diffusion coefficient (cm ² /s)	Permeability parameter (cm ² /s)
5	Water	1	-	-
	<i>d</i> -Limonene	0.03±0.002	-	-
	Azone	0.44±0.03	-	-
10	Water	1	1.01×10 ⁻⁶	1.0×10 ⁻⁶
	<i>d</i> -Limonene	1338±69	1.85×10 ⁻⁶	2.5×10 ⁻³
	Azone	1834±55	3.20×10 ⁻⁸	5.9×10 ⁻⁵

2. *d*-Limonene 原液、Azone 原液中ケトチフェン透過パラメータ

吸収促進剤/水相間分配係数、吸収促進剤原液中拡散係数 (cm^2/sec)、および両者の積として求められた透過パラメータ (cm^2/sec) をTable 9 に示す。

第3節 考察

1. インタクト皮膚あるいは脱脂皮膚におけるケトチフェン透過性

インタクト皮膚あるいは脱脂皮膚におけるケトチフェン透過性は第1章に示した結果を再現した。インタクト皮膚における pH 10 ドナーからのケトチフェン透過性は pH 5 ドナーに比べ定常皮膚透過速度で約 5 倍、透過係数に換算すると約 400 倍大きな値となった。KT は角層の脂質相を透過可能であるのに対し、KTH+ は角層にほとんど分配しないためと考えられる。脱脂処理の透過促進効果は、pH 5 では ER が約 200 と非常に顕著であるのに対し、pH 10 では ER は 5 以下であった。第一章に論述したとおり、脱脂によって KTH+ が透過可能な水性チャネルは拡大するが、脂質相を水性チャネル並みの速さで透過できる KT にとってはその効果は顕著ではないと解釈される。

2. *d*-Limonene と Azone の効果

d-Limonene と Azone の効果を脱脂処理と比較した場合、pH 5 ではほとんど無効であったのに対し pH 10 では脱脂処理の効果を大幅に上回った。この結果から、*d*-limonene と Azone には KTH+ が透過可能な水性チャネルを形成する効果はあまりないが、KT にとっては脂質相や水相よりもさらに透過性の高い経路を形成する効果があることが示唆される。Paul らは、X線回折像観察や示差走査熱分析結果から、*d*-limonene がヒト角層内に取り込まれるにもかかわらず脂質相のラメラ構造を破壊しないことを見出し、*d*-limonene は角層の脂質相に取り込まれた後 enhancer pooling を形成すると考察している。また Pilgram らは、脂質相を模倣した人工的な脂質マトリックスに対する Azone の効果を検討し、Azone 添加によりラメラ層膜面方向の脂質分子の充填性には変化がない一方、流動的な相の出現が認められることから、Azone は脂質相中で enhancer pooling を形成すると考察している。本研究における促進剤原液中透過パラメータ測定結果から (Table 9)、KT の *d*-limonene 原液や Azone 原液中における透過パラメータは水相中の値に比べて各々 2500 倍、あるいは 59 倍大きく、その原因は主として大きな分配係数によることが示唆される。KT の脂質相中の透過性は水相中と同程度であることから *d*-limonene 原液や Azone 原液中における透過パラメータは脂質相における値と比較しても有意に大きいと考えられる。したがって、もし *d*-limonene や Azone が脂質相中で enhancer pooling を形成するとすれば、そこでの KT の透過性は脂質相に比べて有意に高いと考えられる。Enhancer pooling が形成されるとき脂質相構造変化には 2 通りの様式が考えられる。ひとつは、enhancer pooling が元々の脂質相成分と置き換わり、

脂質相全体の厚さは変化しない様式 (Mode-1) であり、もうひとつは、enhancer poolingが脂質相を押しつけて新しい空間に形成され、脂質相全体の厚さが増加する様式 (Mode-2) である。前者の場合は、enhancer poolingの分だけ脂質相の厚さが減るので、両者が交互に積層された透過経路の透過性は脂質相のみからなる相に比べ大きくなり、角層全体の透過性は増加する。後者の場合は、enhancer poolingが角層を貫通するチャンネルを形成する場合に角層全体の透過性が増加する。*d*-LimoneneとAzoneはいずれかの様式でKTの透過性を促進すると考えられる。またAzoneと比較して*d*-limoneneの効果が大きいのは、*d*-limoneneの方が高い透過パラメータを有することから説明可能である。Enhancer poolingの形成により脂質相全域にわたる疎水性は維持されることから、この機構によるKTH+の透過促進効果は小さいと考えられる。Enhancer pooling形成に基づく促進機構をFig. 16 (A)に模式図として示す。

3. Capric acid と oleic acid の効果

Capric acidの効果におけるpH依存性は*d*-limoneneやAzoneとは逆であり、pH 5 では脱脂処理の2倍を上回る450のERを示したが、一方pH 10でのERは2であった。この結果からcapric acidはKTH+に対しては水性チャンネルを上回る透過性の高い経路をもたらす一方で、その作用はKTに対しては効果が無いことが示唆される。遊離脂肪酸の経皮吸収促進作用は角層脂質ラメラ構造の破壊と関連付けて報告される例が多いが³³、その機構で水性チャンネルを上回る透過性を説明するのは困難である。別のメカニズムとしては、capric acidが脱脂作用によって水性チャンネルを形成し、チャンネル内壁に吸着して負電荷を付与した結果、正荷電に対する透過の選択性が増大するという機構が考えられる。以上の機構をFig. 16 (B)に模式図として示した。

Oleic acidの経皮吸収促進効果を示唆する報告は多く、*d*-LimoneneやAzoneと同様oleic acidも脂質相中でenhancer poolingを形成することが報告されている³⁴。本研究では他の促進剤に比べてoleic acidの効果が低かったことから、oleic acidのenhancer poolingは*d*-LimoneneやAzoneほどKTの透過性が良好でなく、またcapric acidのような水性チャンネル形成作用もなかったと考えられる。

4. Lauroyl sarcosine (LS) と N,N-dimethyldodecylamine N-oxide (LDAO) の効果

本研究で検討した界面活性剤タイプの吸収促進剤LSとLDAOは、いずれのpHにおいても顕著な効果を示さなかった。一般に、界面活性剤タイプの促進剤は脱脂処理と同様、角層から脂質を引き抜く能力があると考えられている³⁵。LSのERはpH 5においては2、pH 10においては1、LDAOのERはpH 5においては9、pH 10においては2であり、ともに脱脂処理と類似のpH依存性を示したことから、pH 5での促進機構には水性チャンネルが寄与している可能性がある。積水化学㈱はアクリル粘着剤を基剤とするインドメタシン製剤のラットにおける経皮吸収実験において6%のLSを配合する

ことでインドメタシンの経皮吸収性が4倍増加することを報告している³⁶。またAioiらはラット経皮吸収実験において軟膏からの硝酸イソソルビドの経皮吸収性が6%のLS添加によって6倍増加すると報告している³⁷。さらに、(株)資生堂はLDAOが75%エタノールを含有する製剤において経皮吸収促進作用を発揮することを報告している³⁸。以上の報告はいずれも促進剤を薬物と共存させた製剤での評価であり、本研究における前処理法とは条件が異なるが、得られる効果がERとして高々10倍未満であるという本研究の結果は、他の報告と同程度である。

5. *d*-Limonene と capric acid の 1/1(v/v)混合物の効果

pH 5 で顕著な効果を示した capric acid と pH 10 で顕著な効果を示した *d*-limonene を体積比 1:1 で混合した場合、互いに効果を阻害し合う結果となった。pH 5 で認められた capric acid の顕著な効果はほぼ消失して ER は 21 となり、また pH 10 での *d*-limonene の効果は半減した。この結果は上述した capric acid の作用メカニズムと *d*-limonene の作用メカニズムを組み合わせて説明可能である。すなわち、capric acid は脂質引き抜き効果によって水性チャネルを形成するが、その大部分は *d*-limonene が形成する enhancer pooling によってふさがれてしまい、KTH+に対する促進効果は大部分消失してしまう。一方 capric acid の脂質引き抜き効果によって脂質相中で *d*-limonene が enhancer pooling を形成し得る領域が縮小し KT に対する効果が半減したと理解できる。以上の機構を Fig. 16 (C)に模式図として示した。

6. 透過プロファイルにおけるラグタイムあるいは初期バースト

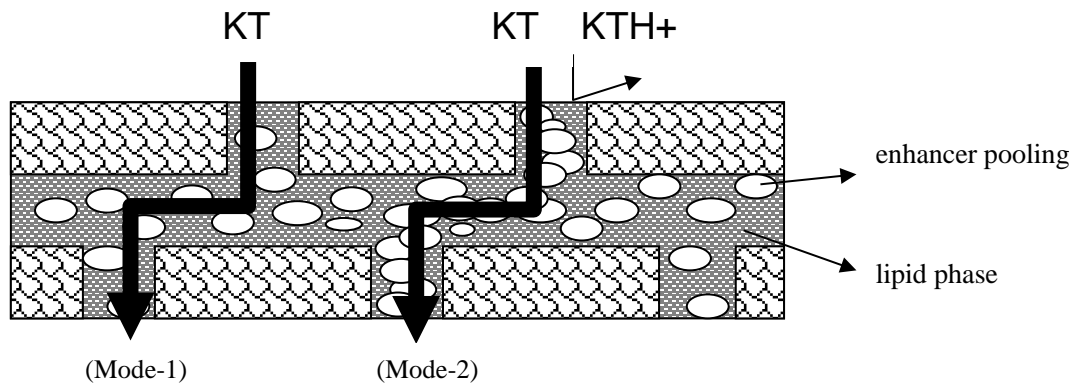
pH-5 ドナーからの透過プロファイルのうち、Azone および capric acid で前処理した皮膚におけるラグタイムは、皮膚中に残存した促進剤がドナー側へ溶出して水性チャネルが形成されるまでの時間と考えられる。また、LDAO および *d*-limonene/capric acid 混合液で前処理した皮膚における初期バーストは、ドナーに溶出した促進剤と KTH+との相互作用による、ミセル形成やイオンペア形成を介した一過性の透過促進と考えられる。しかしいずれの群においても、ドナー液の定期的な入れ替えによって 4 h 以降はこれら一過性の作用は消失し、促進剤の皮膚に対する作用のみを反映した透過プロファイルが得られたと考えられる。

第4節 小括

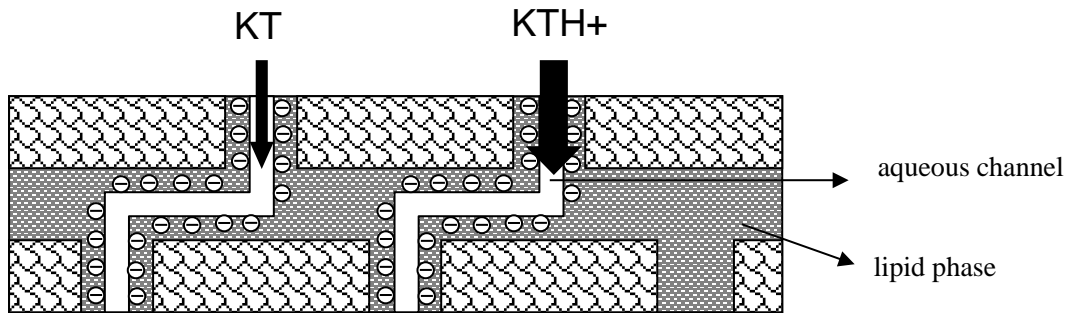
代表的な 6 種類の吸収促進剤についてケトチフェンの効果を pH 5 (大部分のケトチフェンが KTH+として存在) と pH 10 (大部分のケトチフェンが KT として存在) において評価した結果、pH 5 で顕著な効果を示した capric acid については負に帯電した水性チャネルを形成する機構、pH 10 で顕著な効果を示した *d*-limonene と Azone については enhancer pooling を形成する機構で、各々の pH 依存性や capric acid と *d*-limonene を併用

した場合の効果を説明することができた。以上の結果は、ケトチフェンと同じ低分子塩
基性化合物の TTS 処方を設計する際の指針になり得ると考えられる。特に、至適 pH が
異なる 2 種の促進剤を併用すると互いの効果が阻害されるという結果は、処方設計にお
ける重要な情報と考えられる。

(A) *d*-Limonene and Azone



(B) Capric acid



(C) 1/1(v/v) mixture of *d*-limonene and capric acid

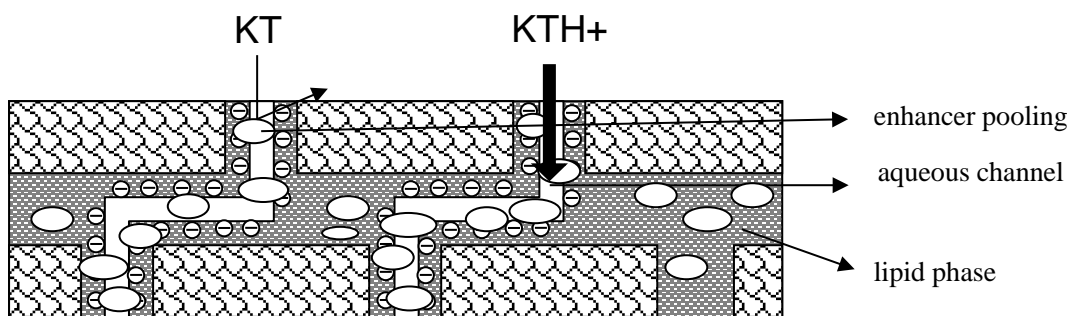


Fig. 16 Schematic diagram to illustrate the action mechanism of *d*-limonene and Azone (A), capric acid (B), or 1/1(v/v) mixture of *d*-limonene and capric acid (C) on the permeation of KT and KTH+ through hairless mouse skin pretreated with these enhancers. (Mode-1) in (A) represents the pathway consisting of the alternate stacking of the enhancer poolings and the lipid phases, and (Mode-2) represents the channel consisting of enhancer poolings connected each other.

第3章 過飽和状態を利用した経皮吸収促進法^{*4, *5}

過飽和状態を利用する経皮吸収促進法には2種類ある。ひとつは製剤を溶液として調製し、投与時に基剤の組成を変化させて薬物溶解度を低下させる方法であり、基剤成分を変化させる手段としては揮発性成分を蒸発させる方法^{39, 40, 41}、貧溶媒を添加する方法^{42, 43}、薬物含有非水性ポリマー層を水性ゲルと貼り合わせる方法（この場合、水が貧溶媒）⁴⁴などが報告されている。これらの方法では薬物は過飽和状態生成後も溶解状態にあり、皮膚に適用後の薬物枯渇に伴って過飽和度が経時的に減衰し、一定の吸収速度を持続しにくい。もう一つの方法は、非晶質の薬物を基剤中に分散させる方法であり、非晶質の溶解度が結晶より大きい場合、薬物が枯渇しない限り一定の過飽和度を維持することができる。この方法では、非晶質を均一に分散させる製造条件と非晶質から結晶への転移を抑制する処方設計が課題となる。

ケトチフェンが水溶液のアルカリ化により非晶質のKTとして析出し、その溶解度が結晶型に比べて約8倍大きいことを第1章で示した。非晶質KTを製剤中に均一に分散させ、投与期間中安定に維持できれば結晶KTを用いる製剤に対して8倍の経皮吸収促進効果が得られると期待される。本章では、このコンセプトに基づいた経皮吸収促進法の検討結果を2つのステップに分けて論じる。前半では非晶質KT分散製剤の設計、調製法スクリーニング、および非晶質状態を確認する手段としての*in vitro* 溶出性評価結果を論じ、後半では、得られた非晶質KT分散製剤からのケトチフェンの*in vitro* 皮膚透過性および*in vivo* 経皮吸収性を論じた。非晶質薬物を用いる経皮吸収促進法の場合、過飽和度は薬物が枯渇しない限り一定に保たれ、そのレベルは薬物含量に依存しないので、製剤中薬物含量は皮膚透過速度には影響を与えず、一方促進効果の持続時間には影響すると考えられる。この予想はヘアレスマウス皮膚を用いた*in vitro* 皮膚透過試験において検証した。また過飽和状態による促進効果の源は皮膚中薬物濃度勾配の増大にあるので、促進効果は皮膚中薬物量と相関すると考えられる。ただし*in vivo* における皮膚中薬物量は製剤側の要因だけでなく、皮膚から循環血への移行に関する様々な生体側の影響も受けると考えられるので、製剤を除去した後の皮膚中薬物量の変化についても併せて評価することが重要と考えられる。以上の検討は、ヘアレスラットを用いた*in vivo* の経皮吸収実験において実施した。

第1節 方法

1. 試薬、材料

フマル酸ケトチフェン、塩酸パパペリン、トリプシン（type I, isolated from bovine pancreas）はSigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) より、アセトニトリル、トリエチルアミン、ジクロロメタン、*n*-ヘキサン、クロロホルム、メタノール、水酸化ナトリウム、クエン酸、1N 塩酸は和光純薬工業(株)（大阪）より、シリコーン感圧性粘着剤（Q7-2920、50% in *n*-hexane）は東レ・ダウコーニング株式会社（東京）より、リ

ン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムは岩井化学薬品㈱（東京）より、アジ化ナトリウムは関東化学㈱（東京）より、アルミラミネートフィルムは三共製袋㈱（静岡）より、はく離フィルムはリンテック㈱（東京）より、等張リン酸緩衝液（pH 7.4）はライフテクノロジーズ・ジャパン㈱（東京）より、ヘアレスマウス（Hos:HR-1、雄、6週齢）は㈱星野試験動物飼育所（坂東氏、茨城）より、ヘアレスラット（雄、6週齢）は日本チャールス・リバー㈱（横浜、神奈川）より入手した。

2. 非晶質 KT を分散させた PSA の調製

テープ型経皮吸収製剤は、主に感圧性粘着剤（pressure sensitive adhesive、以下PSAと略す）を基剤とし⁴⁵、ホットメルト法⁴⁶あるいは溶媒キャスト法⁴⁷で製造される。前者は、あらかじめ単離した非晶薬物を加熱溶融したPSAと混合し、キャスト後冷却する方法である。ケトチフェンの場合、非晶KTは加熱により結晶への転移が認められたため本方法は不採用とし、溶媒キャスト法を選択した。溶媒キャスト法による非晶薬物分散製剤の調製は、公開特許に前例が見出される^{48, 49}。PSAポリマー溶液に薬物を添加し、これをフィルム上に塗布し溶媒を蒸発させて粘着層を形成させるが、このとき結晶の生成を抑制するための溶媒の選定が成否を左右する鍵となる。

PSAには主にアクリル製、ブチルゴム製、シリコーン製の3種がある。本研究ではケトチフェンとの予備的な配合性評価の結果に基づきシリコーンPSAを採用した。シリコーンPSAはヘキサソラン溶液として提供されており、KTにとってヘキサソランは貧溶媒である。そこでまず、あらかじめ単離した非晶KTを粉碎し、PSA溶液に添加する方法を試した。しかし、この方法ではPSA溶液中で結晶転移に起因すると思われる析出物の生成が認められた。そこで次に、PSA溶液に別の溶媒（希釈溶媒）を添加することにより、必要量のKTを一旦完全溶解させる方法を検討した。検討した希釈溶媒をTable 10に示す。KTが結晶か非晶かの判定は、Higuchiのモデル⁵⁰に基づく*in vitro*溶出性解析結果を指標とした。この解析では、溶出速度と薬物配合量の関係から分散薬物のPSA中溶解度を見積もることができるので、それを結晶あるいは非晶薬物の溶解度と比較することにより判定が可能となる。なおこの解析には薬物のPSA中拡散係数も必要である。結晶KTと非晶KTのPSA中溶解度は直接測定することが困難であったため、本研究では水相中溶解度とPSA/水相間分配係数を用いて間接的に求めた。PSA中拡散係数はPSAマトリックス膜を介した透過試験により求めた。

Table 10 Physicochemical properties of the dilution solvents used to prepare the casting solution

Diluting solvent	Boiling point ¹⁾ (°C)	Dipole moment ²⁾ (debyes)	Solubility parameter
<i>n</i> -Hexane	69	≤0.1 ³⁾	7.3 ⁴⁾
Dichloromethane	40	1.6	10.2 ⁵⁾
Tetrahydrofuran	67	1.63	9.0 ⁵⁾
Acetone	56	2.88	9.8 ⁴⁾
Ethylacetate	77	1.78	9.1 ⁵⁾
Toluene	111	0.36	8.9 ⁴⁾

1) R. C. Weast, Handbook of Chemistry and Physics, 68th edition 1987-1988, CRC press, Boca Raton, FL, 1987, C-42 ~ C-553.

2) R. C. Weast, Handbook of Chemistry and Physics, 68th edition 1987-1988, CRC press, Boca Raton, FL, 1987, E-58 ~ E-60.

3) Predicted by the dipole moment of other saturated hydrocarbons in ref. 2)

4) A. Martin, J. Swarblick and A. Cammarata, Physical Pharmacy –Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences, Lea & Febiger, PA, 1983, p 286.

5) R. C. Weast, Handbook of Chemistry and Physics, 68th edition 1987-1988, CRC press, Boca Raton, FL, 1987, C-676.

2-1. 溶媒キャスト法による PSA の調製

非晶 KT を分散させた PSA (以下、非晶分散 PSA と略) の調製は Table 10 に示すヘキサン以外の溶媒を希釈溶媒として使用した。PSA 溶液に KT と希釈溶媒を添加して KT を完全溶解させ、これをキャスト溶液としてリリースライナー上に 250 μm の厚さでキャストし (テストコーター CAD-150II、(株)康井精機、神奈川)、70°C の温風で約 3 min 乾燥させた。得られたバックフィルムと PSA からなる 2 層フィルムは所定の大きさにカット後、残留溶媒を除去するため一夜真空乾燥し、保護のため PSA 層にはく離フィルムを貼り合せた (乾燥後の PSA 層厚は約 60 μm)。また希釈溶媒毎に KT 添加量の異なる 3 種以上の製剤を調製した。なおジクロロメタンを用いた製剤については溶出メカニズムを検討するため別途 PSA 層厚の異なるものを数種類調製した。

対照となる結晶 KT を分散させた PSA (以下、結晶分散 PSA と略) は、非晶 KT がヘキサン中で速やかに微細結晶に転移する現象を利用して調製した。あらかじめ単離した非晶 KT を激しく攪拌下ヘキサンに投入して結晶 KT 懸濁液とし、これを PSA 溶液と混合したものをキャスト溶液として、上述の方法により調製した。またジクロロメタンを用いた製剤と同様、溶出メカニズム検討用として別途 PSA 層厚の異なるものを数種類調製した。

2-2. PSA 中 KT 含量の測定

所定の大きさにカットし、あらかじめ秤量した PSA を 5 mL のヘキサンに溶解し、0.01N 塩酸 3 mL を加えてケトチフェンを水相側に抽出し、遠心分離後 (3000 rpm、10 min)、水相中ケトチフェン濃度を HPLC で測定した。得られた値に水相体積を乗じて KT 含量とし、これを PSA の面積で除して単位面積当たりの KT 含量 (μmol/cm²)、

PSAの体積で除して単位体積当たりのKT含量 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) とした。PSAの体積 (cm^3) は、PSA重量をPSAの密度 ($1.103 \text{ g}/\text{cm}^3$) で除して求めた。なお、本研究で調製した製剤のKT含量は16.3%以下であり、KTを配合することによるPSA層密度への影響は無視し得ると仮定した。

2-3. PSA における KT 溶解度の測定

PSAにおけるKTの溶解度は、第1章、Table 3 に示した水相中溶解度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) とPSA/水相間分配係数から間接的に算出した。PSA溶液をはく離フィルム上に塗布して常圧乾燥 (1日) と減圧乾燥処理 (1日) により厚さ約1 mmの均質なPSA膜とし、95.6~481.2 mgの範囲内の種々重さにカットし秤量後、0.048 mMのケトチフェンを溶解した20 mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10) に浸漬し、37°Cで7日間インキュベーション後の水相中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) を定量した。PSA中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) は、インキュベーション前後の水相中ケトチフェン濃度差に水相体積 (cm^3) を乗じ、PSA体積 (PSA重量をPSA密度で除して計算) で除して算出した。分配係数は、PSA中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) を水相中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) で除して求めた。測定はPSA投入量を変えて4回実施し、それらの平均値に水相中KT溶解度を乗じて、37°CにおけるPSA中KT溶解度とした。

2-4. PSA における KT 拡散係数の測定

PSA溶液をはく離フィルム上に塗布して常圧乾燥 (1日) と減圧乾燥処理 (1日) を施して204~414 μm の厚さに調製した均質なPSA膜をガラス製2チャンバー型拡散セルにセットし、レセプターチャンバーとドナーチャンバーに液50 mLを投入して透過量を測定した。レセプター液はPBS、ドナー液は20 mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10) に1.0 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$ のKTを加えた懸濁液とした。セルは全体を恒温槽に浸漬させて37°Cに保った。透過開始後、所定時間にレセプター液5 mLを採取し、最終時点以外は同量のフレッシュなレセプター液を補充した。また最終サンプリング時点ではレセプター液と同時にドナー液を採取した。採取した液は未溶解のKTをろ過除去した後、ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) を測定した。

得られた値を用いて「6. *In vitro*透過試験における累積透過量の算出」に示す方法により透過プロファイルを作成し、最終時点を含む直線部分の傾きから透過速度 ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$) を算出した。得られた透過速度を最終時点でのドナー液中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) で除し、PSA膜厚 (cm) を乗じた後、PSA/水相間分配係数で除して拡散係数 (cm^2/h) とした。測定は膜圧の異なる7種のPSAについて実施し、得られた値の平均値を以降の解析に使用した。

2-5. *In vitro* における PSA からの KT 溶出プロファイルの測定

円形にカットしたPSAからはく離フィルムを取り除き、バックリングフィルム側を両面テープでビーカー内面に付着させて固定し、あらかじめ 37 °C に保温した溶出液 (PBS) 50 mL あるいは 100 mL をビーカーに注ぎ入れて溶出を開始した。実験中ビーカー全体は恒温槽中で 37 °C に保温し、溶出液はマグネティックスターラーで攪拌した。所定時間に溶出液 5 mL を採取しフレッシュなPBSを補充した。採取した溶出液中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) をHPLCで定量し、得られた値を式(8)に代入してn番目のサンプリング時点 t_n における単位面積あたりの累積溶出量 R_n ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) を算出した。なお、 C_n はn番目に採取した溶出液中ケトチフェン濃度 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)、 V は溶出液の体積 (mL)、 v はサンプリング体積 (mL)、 S はPSAの面積 (cm^2) を表す。

$$R_n = \frac{C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i v)}{S} \quad (8)$$

R_n を t_n に対してプロットすることにより溶出プロファイルを作成した。

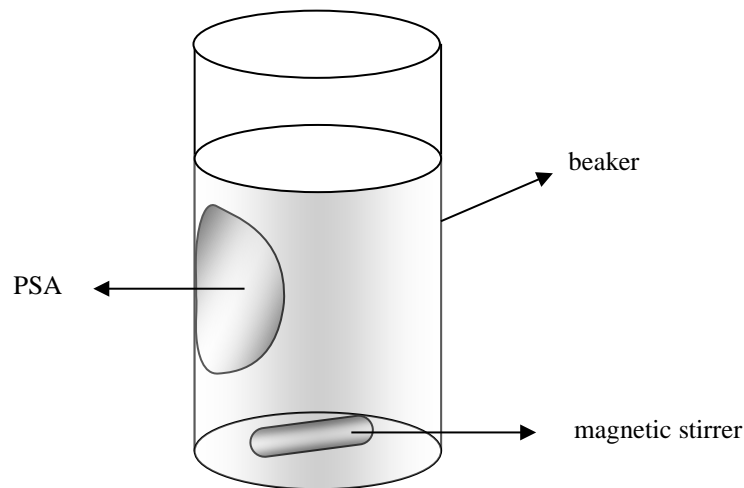


Fig. 17 Configuration of PSA, beaker and the magnetic stirrer for *in vitro* release tests. PSA was attached on the inner surface of the side wall of the beaker by double-sided adhesive tape while facing its adhesive surface inside.

2-6. *In vitro* 溶出性を指標とした非晶分散 PSA 調製法のスクリーニング

Higuchi のモデルでは、溶出量は時間の平方根に比例し、その比例定数 Δ は薬物のマトリックス中溶解度 C_s を含む式 (9) で表される。

$$\Delta^2 = DC_s(2A - C_s) \quad (9)$$

ここで、 D は薬物の PSA マトリックス中拡散係数、 A は薬物含量である。そこで 2-3. で求めた C_s ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) と 2-4. で求めた D (cm^2/h) の値を用いて結晶分散 PSA と非晶分散 PSA の各々に対して Higuchi のモデルに基づく Δ^2 と A の理論直線を描き、実際の溶出プロファイルから求めた Δ^2 と A の関係がどちらの理論直線に沿うかを検討することで、PSA 中の KT が結晶か非晶かを判定した。

3. 結晶分散 PSA と非晶分散 PSA からの *in vitro* における KT 溶出メカニズムの比較

非晶分散 PSA と結晶分散 PSA について、膜厚の異なる PSA からの溶出データを追加して溶出メカニズムを詳細に比較検討した。後述するように両製剤とも Δ^2 と A の関係は式 (9) に基づく理論式とよい一致を示したが、対照製剤である結晶分散 PSA の場合、個々の溶出プロファイルには Higuchi モデルで予測されないラグタイムが繰り返し認められた。Higuchi モデルでは分散薬物の溶解過程が律速に寄与しないことを仮定していることから、溶解過程の寄与がラグタイムの原因と予想し、拡散過程と溶解過程の両方を含むモデル (以後、拡散-溶解モデルと記す) を用いて溶出プロファイルを計算した。

各 PSA について、まず Higuchi モデルに基づく溶出プロファイルを式 (10) と式 (11) により作成した。

$$Q = \sqrt{DC_s(2A - C_s)}\sqrt{t} \quad \text{at} \quad 0 \leq t \leq h^2 \frac{A - C_s/2}{2DC_s} \quad (10)$$

$$Q = \frac{hC_s}{2} \left(1 - e^{-\frac{2D}{h^2}t + \left(\frac{A-C_s}{C_s}\right)\frac{t}{2}} \right) + Ah - \frac{hC_s}{2} \quad \text{at} \quad h^2 \frac{A - C_s/2}{2DC_s} \leq t \quad (11)$$

ここで、 Q ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) は溶出量、 t (h) は時間、 h (cm) は PSA の厚さを表す。一方、拡散-溶解モデルでは Q を直接 t の関数として表すことができない。そこで、PSA 中に溶解しているケトチフェンの濃度 $c(x,t)$ ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) と、分散しているケトチフェンの濃度 $M(x,t)$ ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) を式 (12) により数値計算し、得られた結果を式 (14) に代入して Q を算出した。ここで、 x は PSA 表面からの深さ (cm)、 a ($\text{cm}^3/\text{h}/\mu\text{mol}$) は溶解速度定数、 p は形状パラメータ、式 (13) は式 (12) を解くための境界条

件を表す。 a は分散薬物の比表面積に関係し、粒子径が小さいほど大きくなる。また p は分散薬物とPSAマトリックスの接触面積が溶出に伴ってどのように変化するかを表すパラメータであり、粒子が球形で、かつPSAとの間に隙間が無い理想的な条件では $2/3$ となるが、粒子の縮小に伴って薬物とPSAの間隙が広がる状況ではより大きな値となる。 a と p の値は未知であるため、モデルが実際の溶出プロファイルをもっともよく近似できるように非線形最小二乗法を用いて a と p の値を算出し、得られた値を用いて溶出プロファイルを作成した。非線形最小二乗法にはDownhill simplex algorithmを採用し⁵¹、式(12)の数値計算と非線形最小二乗法を同時に実行するルーチンプログラムをMathematica[®] (ver. 4.1.0.0, Wolfram Research, Inc., USA)上に作成して計算を行った。プログラムの主要コードをAppendixに掲載する。

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} c(x,t) = D \frac{\partial^2}{\partial x^2} c(x,t) + a(Cs - c(x,t))M(x,t) \left(\frac{M(x,t)}{A - Cs} \right)^{p-1} \\ \frac{\partial}{\partial t} M(x,t) = -a(Cs - c(x,t))M(x,t) \left(\frac{M(x,t)}{A - Cs} \right)^{p-1} \end{cases} \quad (12)$$

$$\begin{cases} c(0,t) = 0, M(0,t) = 0, \\ c(x,0) = Cs \text{ at } x \neq 0, \\ M(x,0) = A - Cs \text{ at } x \neq 0 \end{cases} \quad (13)$$

$$Q = \int_{\tau=0}^t D \left(\frac{\partial}{\partial x} c(x,\tau) \right)_{x=0} d\tau \quad (14)$$

4. 結晶分散 PSA と非晶分散 PSA の *in vitro* 皮膚透過プロファイルの比較

結晶分散 PSA に対する非晶分散 PSA の *in vitro* における皮膚透過促進効果、およびその効果に対する KT 含量の影響を Table 11 に示す 4 種の PSA にて評価した。

Table 11 PSA-Crystalline and PSA-Amorphous used for *in vitro* skin permeation experiments

	Type	Drug loading ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)
#1	PSA-Amorphous	94
#2		179
#3	PSA-Crystalline	90
#4		182

エーテル麻酔下、頸動脈切断により安楽死させた 6 週例の雄性ヘアレスマウスから背部皮膚を摘出し、皮下脂肪を切除したのち等張リン酸緩衝液でリンスし、 -60°C

にて使用まで保存した。使用時、皮膚は室温下で解凍後直径 3.8 cm の円形にカットして実験に用いた。以上の操作は第一三共株式会社における実験動物倫理委員会規定に準じて実施した。

皮膚を縦型フラントセル（透過面積：1.77 cm²、ドナー容積：1 mL、レセプター容積：10 mL）にセットし、レセプターチャンバーにはレセプター液（0.1% NaN₃ in pH7.4 PBS）を満たし、保温のためセルジャケットに 37°C の恒温水を還流させた。直径 1.5 cm の円形にカットした PSA から離フィルムを取り除き、皮膚の角層側に PSA の粘着面を貼付して透過を開始した。その後、適当な時間間隔で 1.8 mL のレセプター液採取と新鮮なレセプター液補充を繰り返しながら 30 h まで透過を観測した。採取したレセプター液中ケトチフェン濃度（μmol/mL）を HPLC で測定し、「6. *In vitro* 透過試験における累積透過量の算出」に示す方法で皮膚透過プロファイルを作成し、直線部分の傾きから皮膚透過速度（μmol/h/cm²）を算出した。実験は各 PSA について 3 回繰り返した。

5. 結晶分散 PSA と非晶分散 PSA の経皮吸収性および皮膚中ケトチフェン濃度の測定

結晶分散 PSA に対する非晶分散 PSA の *in vivo* における経皮吸収促進効果、およびその効果と皮膚中ケトチフェン濃度との関係を、ヘアレスラットを用い Table 12 に示す 2 種の PSA にて評価した。なお経皮吸収量は PSA からの溶出量と皮膚中貯留量の差から算出し、本方法の妥当性をマスバランスの観点から検証するため、別途ヘアレスラット腹部摘出皮膚を用いた *in vitro* の系で PSA からの溶出量と皮膚中貯留量の差を実際の皮膚透過量と比較した。

Table 12 PSA-Crystalline and PSA-Amorphous used for *in vivo* transdermal absorption experiments and *in vitro* permeation experiments with hairless rat skin

	PSA-Crystalline	PSA-Amorphous
Loading amount ^a	370.2 nmol/cm ²	1114.1 nmol/cm ²
Solubility of ketotifen ^b	51.3 nmol/cm ²	520.0 nmol/cm ²

^a Mean of ten measured values.

^b Calculated by multiplying the solubility per unit volume (crystalline: 8.06 μmol/cm³, amorphous: 67.89 μmol/cm³) and the thickness of the adhesive layer (PSA-Crystalline: 64 μm, PSA-Amorphous: 77 μm).

5-1. ヘアレスラット腹部摘出皮膚の調製

炭酸ガスで安楽死させたヘアレスマウスから腹部皮膚を摘出し、皮下脂肪を切除したのち等張リン酸緩衝液でリンスし、-60 °C にて使用まで保存した。使用時、

皮膚は室温下で解凍後直径 3.8 cm の円形にカットして実験に用いた。以上の操作は第一三共株式会社における実験動物倫理委員会規定に準じて実施した。

5-2. *In vitro* における皮膚透過量および皮膚中ケトチフェン濃度の測定

皮膚を縦型フランツセル（透過面積：1.77 cm²、ドナー容積：1 mL、レセプター容積：10 mL）にセットし、レセプターチャンバーにはレセプター液（0.1% NaN₃ in pH7.4 PBS）を満たし、保温のためセルジャケットに 37°C の恒温水を還流させた。直径 1.4 cm の円形にカットした PSA からはく離フィルムを取り除き、皮膚の角層側に PSA の粘着面を貼付して透過を開始した。所定時間後、PSA を皮膚から丁寧に剥し、レセプター液を採取した後、皮膚をセルから取り外し、貼付部位の角層を 20 回テープストリップ（Cellotape[®], Nichiban Co., Ltd., 東京）して採取し、残った生きた上皮および真皮と共に以後のケトチフェン濃度測定に供した。1 群あたり 12 組のセルを使用し、各サンプリング時点で 2 組のセルを割り当て、透過開始後 4, 8, 14, 17, 20, および 24 h の 6 時点でサンプリングを実施した。PSA 中のケトチフェン含量（μmol/mL）は「2-2.PSA 中 KT 含量の測定」に記載した方法、レセプター中ケトチフェン濃度（μmol/mL）は HPLC 法、角層中ケトチフェン濃度（μmol/cm²）と角層除去皮膚中ケトチフェン濃度（μmol/cm²）は各々「5-5.角層中ケトチフェン濃度の測定」と「5-6.生きた上皮および真皮中ケトチフェン濃度の測定」に記載した方法で測定した。

5-3. *In vivo* における経皮吸収量および皮膚中ケトチフェン濃度の測定

ヘアレスラットをエーテル麻酔し、腹部を PBS 含浸脱脂綿で洗浄後、はく離フィルムを除いた直径 2 cm の円形 PSA を、2 cm 離れた位置で同じ個体の腹部に 2 枚貼付した。投与後 PSA をサージカルテープ（Elatex[®], Alcare Co., Ltd., 東京）で保護し、1 匹ごとに個別のケージに移して、給水下サンプリング時間まで飼育した。所定時間後ラットを炭酸ガスで安楽死させ、PSA を皮膚から丁寧に剥し、貼付部位の角層を 20 回テープストリップして採取し、その下層の生きた上皮および真皮を採取した。結晶分散 PSA 投与群には 10 匹、非晶分散 PSA 投与群には 8 匹のラットを割り当て、前者は 2, 4, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 20, および 23 h、後者は 2, 4, 7, 10, 13, 16, 19, および 23 h に、各時点 1 匹から 2 組のサンプルを採取した。PSA 中のケトチフェン含量は「2-2.PSA 中 KT 含量の測定」に記載した方法、角層中ケトチフェン濃度と角層除去皮膚中ケトチフェン濃度は各々「5-5.角層中ケトチフェン濃度の測定」と「5-6.生きた上皮および真皮中ケトチフェン濃度の測定」に記載した方法で測定した。

5-4. *In vivo* における PSA 除去後の皮膚中ケトチフェン濃度の測定

6匹のヘアレスラットをエーテル麻酔し、腹部をPBS含浸脱脂綿で洗浄後、はく離フィルムを除いた直径2 cmの円形PSAを2 cm離れた位置で同じ個体の腹部に2枚貼付した。投与後PSAをサージカルテープ（Elatex[®], Alcare Co., Ltd.）で保護し、1匹ごとに個別のケージに移して、給水下飼育した。投与4時間後、すべての動物からPSAを回収し、1匹は直ちに、残りはさらに3, 6, 13, 18, あるいは23 hのいずれかの時間ケージで飼育した後、PSA貼付部位の角層とその下層の生きた上皮および真皮を前項と同じ方法で採取した。PSA中のケトチフェン含量は「2-2.PSA中KT含量の測定」に記載した方法、角層中ケトチフェン濃度と生きた上皮および真皮中ケトチフェン濃度は各々「5-5.角層中ケトチフェン濃度の測定」と「5-6. 生きた上皮および真皮中ケトチフェン濃度の測定」に記載した方法で測定した。

5-5. 角層中ケトチフェン濃度の測定

テープストリップで採取した角層はテープごと5 mLのヘキサンに浸漬してテープの粘着剤を完全に溶解させた後、0.01N塩酸を3 mL添加して混合遠心分離し、水相中のケトチフェン濃度をHPLCで定量した。単位貼付面積あたりの角層中ケトチフェン含量は、水相中ケトチフェン濃度に水相体積を乗じ、PSAの面積で除して求めた。本操作による回収率が95%以上であることを事前に確認済みである。

5-6. 生きた上皮および真皮中ケトチフェン濃度の測定

生きた上皮および真皮は小片に切り分けたあと50 µg/mLの塩酸パパベリン（内部標準物質）と0.2%（w/v）のトリプシンを溶解したPBS 2 mL中37°Cで一夜インキュベーションし、1N水酸化ナトリウム水溶液3 mLと5 mLのヘキサンを加えて激しく攪拌し、遠心分離（3000 rpm, 10 min）後、有機相を別の容器に移し、0.01N塩酸3 mLを加えて攪拌、遠心分離（3000 rpm, 10 min）し、水相中ケトチフェン濃度をHPLCで定量した。パパベリンのピーク面積に対するケトチフェンのピーク面積比を、ケトチフェン濃度既知試料で作成した検量線に当てはめてケトチフェン濃度を算出した。

6. *In vitro* 透過試験における累積透過量の算出

第一章、第1節、8項に記した方法で皮膚透過プロファイルを作成した。

7. HPLC 条件

本章におけるケトチフェン濃度は第一章、第1節、2項に記したHPLC法にて測定した。定量計算には、生きた上皮および真皮については塩酸パパベリンを内部標準物質とする内部標準法を、それ以外のサンプルについては外部標準法を採用した。

第2節 結果

1. 結晶型ケトチフェンの PSA 中溶解度と拡散係数

37°C における KT の PSA/水相間分配係数、PSA マトリックス中溶解度、および PSA マトリックス中拡散係数を Table 13 に示した。

Table 13 PSA/water partition coefficient, solubility and the diffusion coefficient of KT at 37°C.

PSA/water partition coefficient	155 ± 34 ¹⁾	
Solubility of KT in PSA matrix (μmol/cm ³)	Crystalline KT	8.06 ²⁾
	Amorphous KT	67.89 ²⁾
Diffusion coefficient of KT in PSA matrix (cm ² /h)	2.71 ± 0.24 × 10 ⁻⁵ ³⁾	

1) Mean ± standard deviation of four data

2) Calculated by multiplying the aqueous solubility shown in Table 3 by the mean PSA/water partition coefficient

3) Mean ± standard deviation of seven data

2. 非晶分散 PSA 調製法スクリーニング

希釈溶媒のスクリーニング検討用に調製したPSAのケトチフェン含量をTable 14に示した。また、これらのPSAからの*in vitro*溶出プロファイルを図. 18 に示した。いずれのPSAにおいても 0~0.5 h^{1/2}の範囲で溶出量は時間の平方根に概ね比例して増加したが、結晶分散PSA (control) では 0.3 h^{1/2}程度のラグタイムがいずれの薬物含量においても認められた。0.5 h^{1/2}以降では一部のPSA (たとえば(c)の 72.8 μmol/cm³, (d)の 69.8 μmol/cm³, (f)の 68.5 μmol/cm³) で溶出速度の低下傾向が認められた。各プロファイルの直線部分の傾きから求めた溶出速度Δの2乗をKT含量の関数としてFig.19に示した。また各グラフにはTable 13 に示した溶解度と拡散係数を用いて計算したHiguchiモデルに基づく結晶分散PSAあるいは非晶分散PSAの理論直線を、各々破線あるいは実線で示した。結晶分散PSAの場合、Δ²とKT含量の関係は結晶KTに対する理論式と一致した。種々希釈溶媒で調製したPSAのうちdichloromethaneで調製したPSAはKT含量に関らずΔ²とKT含量の関係が非晶KTに対する理論式に一致した。Acetone、ethyl acetate、およびtolueneで調製したPSAはKT含量が高い場合にΔ²とKT含量が非晶KTに対する理論式から逸脱し結晶KTの理論式に近づく傾向が認められた。Tetrahydrofuranの場合、Δ²とKT含量の関係が非晶KTに対する理論式より上方に逸脱する傾向が認められ、粘着剤マトリックスの変質が示唆された。以上より、非晶KTを安定的に調製するための希釈溶媒としてはdichloromethaneが適していることが示唆された。

Table 14 Drug content in PSA matrices

	Dilution solvent					
	<i>n</i> -hexane	dichloromethane	tetrahydrofuran	acetone	ethyl acetate	toluene
Drug content ¹⁾ ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$)	79.0 \pm 4.4	77.7 \pm 1.5	72.8 \pm 1.8	69.8 \pm 2.0	71.1 \pm 2.7	68.5 \pm 1.8
	79.7 \pm 3.7	218.9 \pm 3.6	144.3 \pm 9.5	119.1 \pm 3.7	104.1 \pm 5.7	133.3 \pm 4.3
	80.5 \pm 4.7	316.1 \pm 19.7	177.6 \pm 8.7	134.5 \pm 5.1	135.6 \pm 3.0	135.9 \pm 2.8
	91.1 \pm 13.1			197.7 \pm 6.3	183.5 \pm 5.2	234.0 \pm 12.5
	130.7 \pm 11.0			203.9 \pm 18.4	230.2 \pm 13.6	
	134.5 \pm 5.3					
	207.6 \pm 9.4					
	232.8 \pm 6.5					
	244.6 \pm 7.6					

1) Mean and the standard deviation of ten measurements.

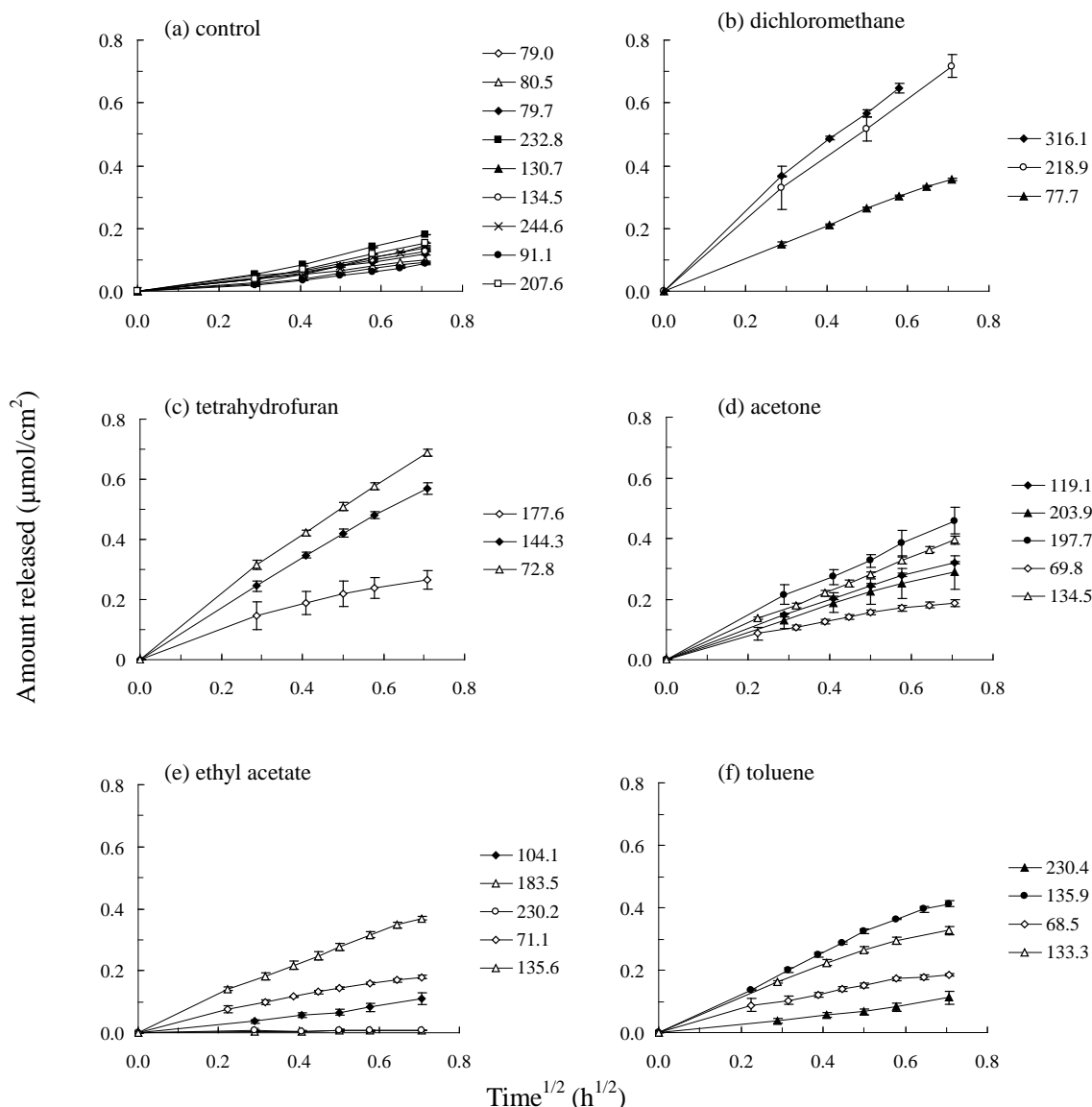


Fig. 18 *In vitro* release profiles of ketotifen from PSA containing crystalline KT (a) and those from PSAs prepared using dichloromethane (b), tetrahydrofuran (c), acetone (d), ethyl acetate (e), and toluene (f). The initial drug content in each PSA was shown as the legend symbols in $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$.

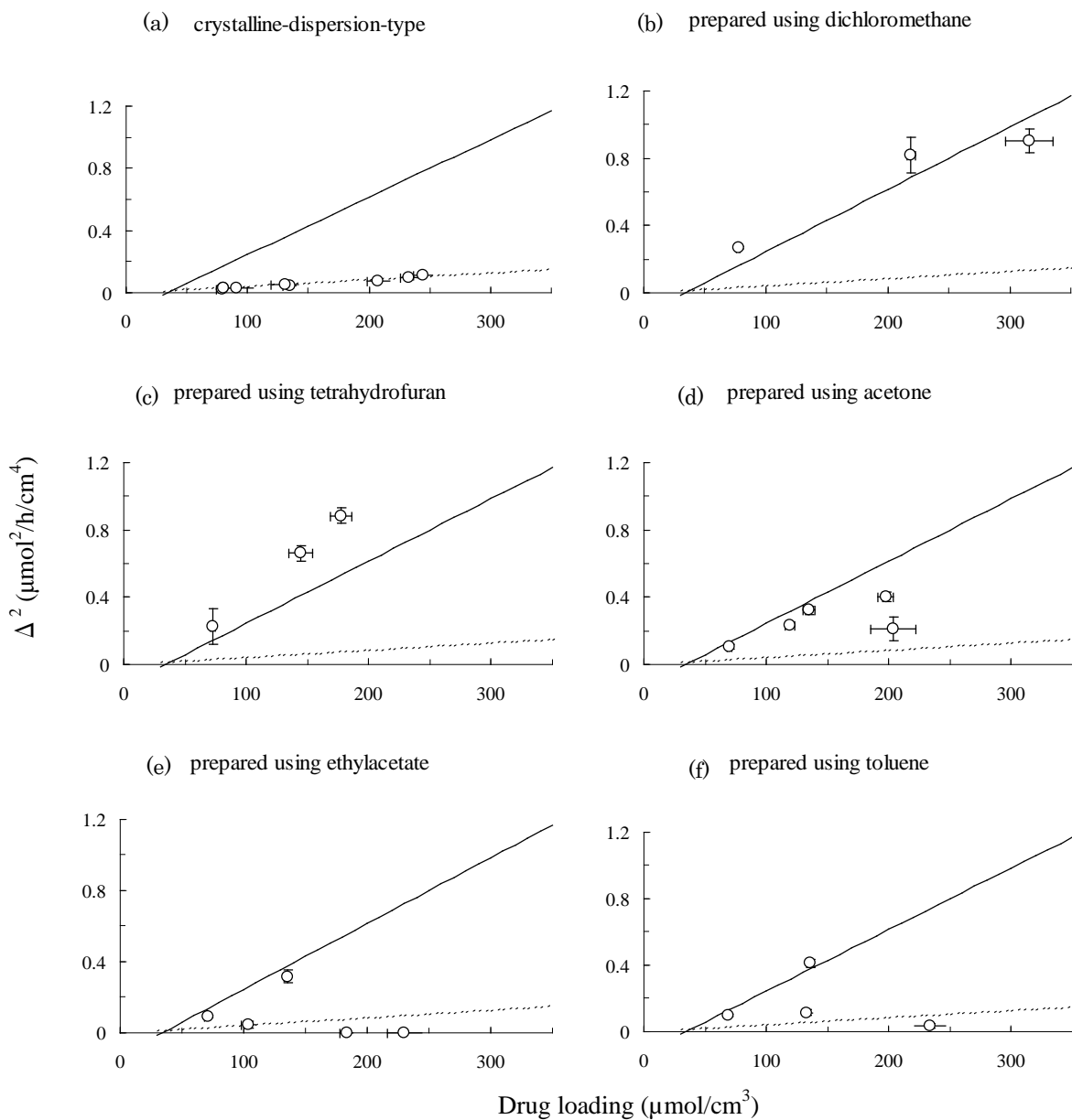


Fig. 19 Relationship between Δ^2 and ketotifen loading in PSA. Each point and error bar represents the mean and standard deviation of 3-9 data for Δ^2 and 10 for drug loading. Solid or broken line represents the theoretical line based on Higuchi's model corresponding to amorphous or crystalline PSA, respectively.

3. 数学モデルによる溶出プロファイルのシミュレーション

KT 含量と膜厚を変えて調製した 12 種の結晶分散 PSA (Table 15)、および dichloromethane を用いて調製した KT 含量、膜厚の異なる 8 種の PSA (Table 16) (以後、非晶分散 PSA と記す) について、個々の溶出プロファイル (白丸)、Higuchi モデルに基づく理論溶出プロファイル (灰色実線) を各々 Fig. 20 と Fig. 21 に示す。結

晶分散 PSA の場合、Fig. 18 で示唆された初期のラグタイムが再度認められ、特に層厚が薄いほどラグタイムが長くなる傾向が認められた。一方非晶分散 PSA の場合、いずれの PSA においてもラグタイムは認められなかった。

式 (1 2) ~ (1 4) で表される拡散-溶解モデルが実際の溶出プロファイルにもっともよくフィットするように溶解速度パラメータ a と形状パラメータ p を求めた結果、Table 17 に示す値が得られた。これらを用いて描かれる溶出プロファイルを Fig. 20 と Fig. 21 に実線で示した。パラメータのみを変えることで、結晶分散 PSA と非晶分散 PSA の両方の溶出プロファイルを同一の拡散-溶解モデルで表現できることから、KT の溶解過程が両 PSA 間で異なり、その相違は溶解速度パラメータ a と形状パラメータ p の違いで表現できることが示唆された。

Table 15 The drug loading, A , and the thickness, h , of PSA-Crystalline

Lot No.	A ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) ¹⁾	h (μm) ¹⁾
C-1	173.3 \pm 28.5	8.2 \pm 0.9
C-2	236.6 \pm 39.7	9.4 \pm 1.1
C-3	125.3 \pm 28.5	8.2 \pm 0.9
C-4	207.6 \pm 39.7	9.4 \pm 1.1
C-5	91.1 \pm 17.0	11.9 \pm 1.4
C-6	244.6 \pm 9.4	12.6 \pm 1.3
C-7	134.5 \pm 13.1	20.5 \pm 1.8
C-8	180.1 \pm 7.6	24.4 \pm 0.6
C-9	130.7 \pm 5.3	29.0 \pm 1.5
C-10	232.8 \pm 6.6	29.5 \pm 1.0
C-11	79.7 \pm 11.0	49.4 \pm 1.3
C-12	182.0 \pm 6.5	53.1 \pm 1.6

¹⁾ Mean \pm standard deviation of ten measurements

Table 16 The drug loading, A , and the thickness, h , of PSA-Amorphous

Lot No.	A ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3$) ¹⁾	h (μm) ¹⁾
A-1	82.9 \pm 15.0	30.6 \pm 6.1
A-2	157.2 \pm 6.1	31.1 \pm 1.8
A-3	314.9 \pm 8.1	31.8 \pm 2.3
A-4	354.5 \pm 11.2	33.5 \pm 1.8
A-5	77.7 \pm 5.9	57.1 \pm 4.3
A-6	218.9 \pm 7.0	49.8 \pm 1.3
A-7	416.1 \pm 24.1	55.9 \pm 3.6
A-8	582.4 \pm 33.2	66.9 \pm 5.0

¹⁾ Mean \pm standard deviation of ten measurements

Table 17 Dissolution parameter a and shape parameter p for Diffusion-Dissolution model

	PSA-Crystalline	PSA-Amorphous
a	0.587	2.744
p	1.945	0.597

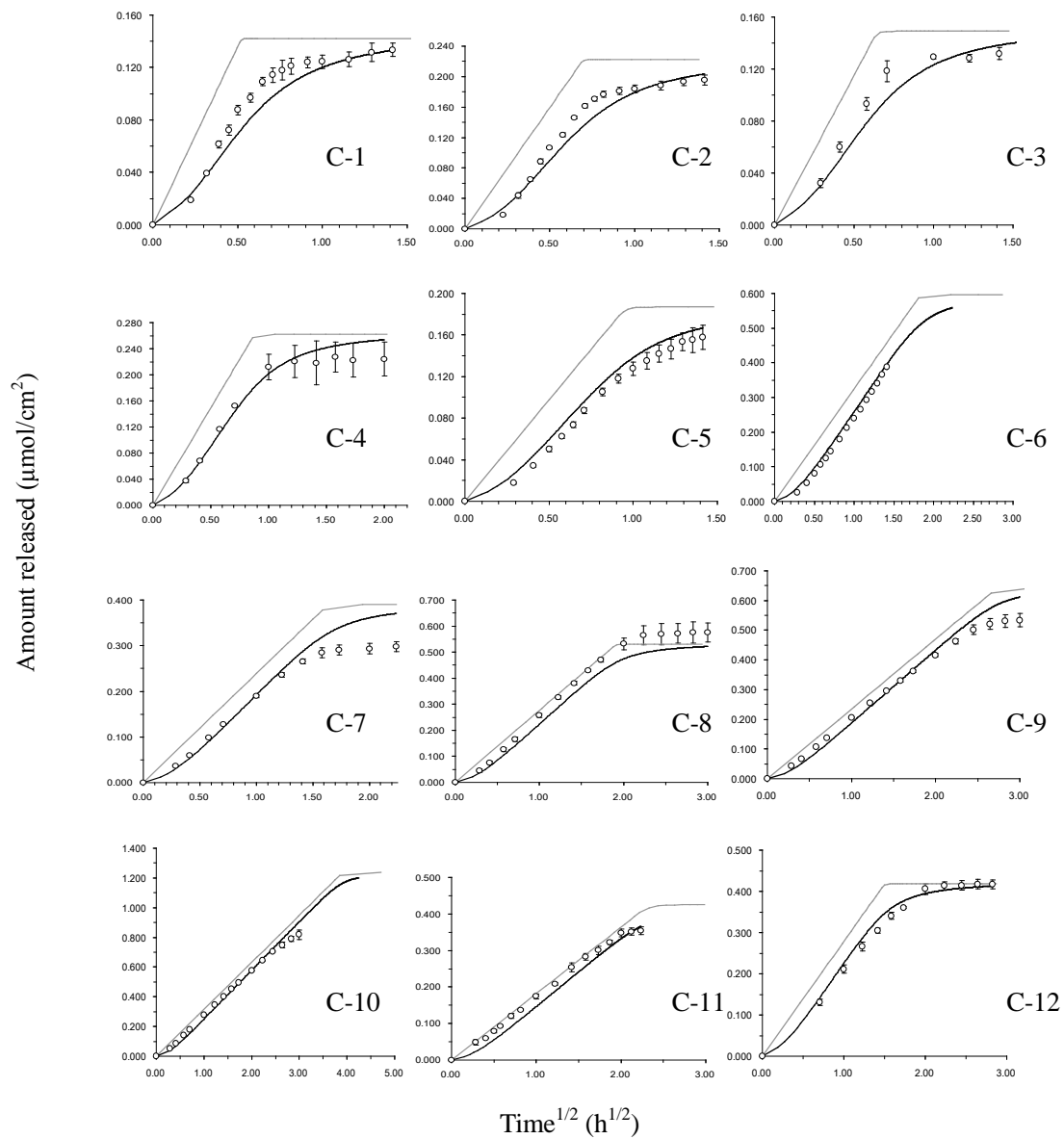


Fig. 20 Release profiles from PSA-Crystalline. Open circle and error bar represent respectively the mean and the standard deviation of the actual data. The gray line and solid line represents the simulation curves obtained respectively by Higuchi's model and by the Diffusion-Dissolution model.

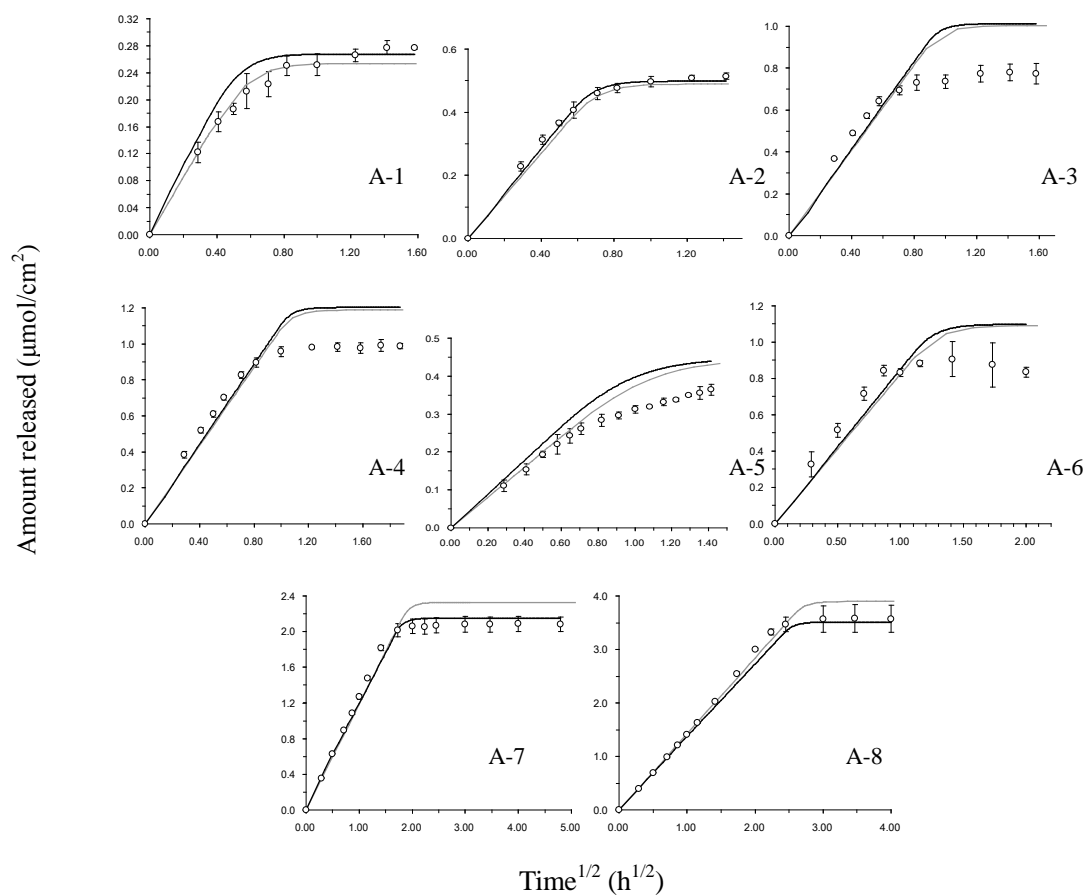


Fig. 21 Release profiles from PSA-Amorphous. Open circle and error bar represent respectively the mean and the standard deviation of the actual data. The gray line and solid line represents the simulation curves obtained respectively by Higuchi's model and by the Diffusion-Dissolution model.

4. 結晶分散 PSA と非晶分散 PSA の *in vitro* 皮膚透過プロファイルの比較

Fig. 22 に結晶分散 PSA (#3 および#4)、および非晶分散 PSA (#1 および#2) からのヘアレスマウス皮膚におけるケトチフェン皮膚透過プロファイルを示す。結晶分散 PSA の場合、4~30 h で一定の皮膚透過速度が認められ、KT 含量の違いによる皮膚透過速度の違いは認められなかった。一方非晶分散 PSA の場合、#1 では 4~8 h、#2 では 4~18 h が定常状態であり KT 含量によって定速領域の範囲に差異が認められた。定速領域の傾きから求められた皮膚透過速度を Table 18 に示す。同じ型の PSA 同士では、KT 含量に関らず定常皮膚透過速度は同一であること、非晶分散 PSA は結晶分散 PSA に対して約 5 倍大きな定常皮膚透過速度を示すことが示された。

Table 18 Steady-state permeation flux through hairless rat skin from PSA-Crystalline and PSA-Amorphous

	Type	Steady-state skin permeation flux ($\mu\text{mol}/\text{h}/\text{cm}^2$)
#1	PSA-Amorphous	0.033
#2		0.033
#3	PSA-Crystalline	0.007
#4		0.005

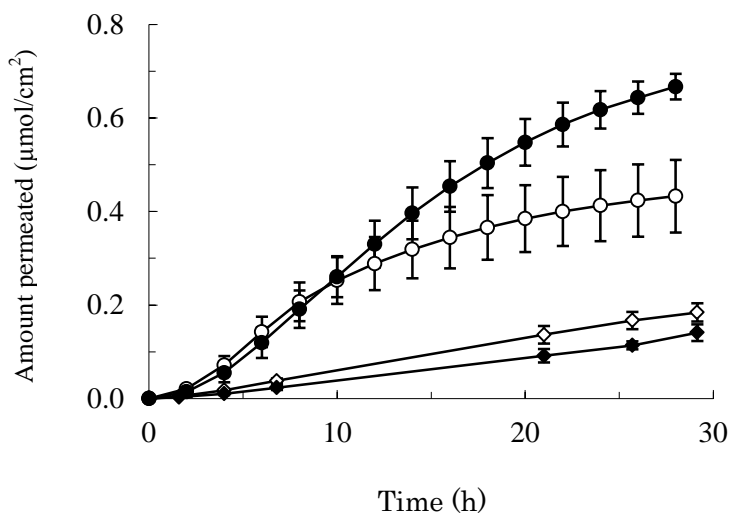


Fig. 22 Permeation profile of ketotifen through hairless mouse skin from PSA-Crystalline or PSA-Amorphous. Each point and error bar represents the mean and standard deviation of triplicate data, respectively. The type of PSA and initial drug content were as follows.

- Open circle: #1 (PSA-Amorphous, $94 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$)
- Closed circle: #2 (PSA-Amorphous, $179 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$)
- Open diamond: #3 (PSA-Crystalline, $90 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$)
- Closed diamond: #4 (PSA-Crystalline, $182 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$)

5. *In vitro* における皮膚透過量および皮膚中ケトチフェン濃度推移

In vitro ヘアレスラット腹部摘出皮膚透過実験において、PSA からの溶出量と皮膚中貯留量の差から算出した皮膚透過量（以下、計算皮膚透過量と記す）を、実際の皮膚透過量と比較して Fig. 23 に示す。両者は類似した推移を示し、皮膚透過量の差異は結晶分散 PSA の場合高々24%、非晶分散 PSA の場合高々15%であった。この結果から、*in vivo* における経皮吸収量を PSA からの溶出量と皮膚中貯留量の差から、誤差24%以下の真度で評価できることが示された（以下、計算経皮吸収量と記す）。計算皮膚透過量プロファイルおよび実際の皮膚透過プロファイルにおける、直線部分の傾きから求めた皮膚透過速度を Table 19 に示す。

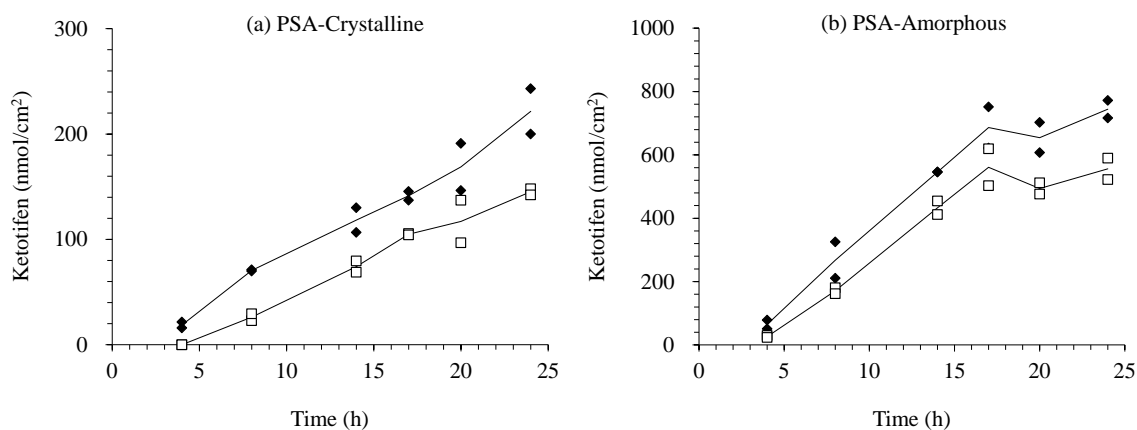


Fig. 23 Comparison of *in vitro* time course of Calculated Skin Permeation (closed diamond) and Actual Skin Permeation (open square) during the application of PSA-Crystalline (a) or PSA-Amorphous (b) on the excised hairless rat skin. Solid lines represent the time course of the mean value.

Table 19 The *in vivo* transdermal absorption rate or *in vitro* skin permeation rate of ketotifen from PSA-Crystalline or from PSA-Amorphous. (nmol/h/cm²)

		PSA-Crystalline	PSA-Amorphous
<i>In vivo</i>	Calculated	6.8 ^a	50.8 ^b
	Actual	9.2 ^c	41.5 ^d

^a Calculated from the slope of the time course between 10–23 h.

^b Calculated from the slope of the time course between 10–23 h.

^c Calculated from the slope of the time course between 8–24 h.

^d Calculated from the slope of the time course between 4–17 h.

6. *In vivo* における皮膚透過量および皮膚中ケトチフェン濃度推移

ヘアレスラット腹部に PSA を投与した *in vivo* 経皮吸収実験における投与開始から 23 h までの PSA 中、角層中および生きた上皮および真皮中ケトチフェン含量の推移を Fig. 24 に示す。PSA 中初期含量から投与後含量を差し引いて求めた PSA からのケトチフェン溶出プロファイルを図 25 (a) に示す。結晶分散 PSA の場合 23 h まで溶出速度はほぼ一定であったが、非晶分散 PSA の場合 7 h と 13 h で溶出速度の変化が認められた。Fig. 25 (b) には、計算経皮吸収量の推移を示す。どちらの PSA においても約 7 h のラグタイムの後、23 h まで経皮吸収速度はほぼ一定に保たれた。10 h 以降のプロファイルの傾きから求めた経皮吸収速度を Table 19 に示す。

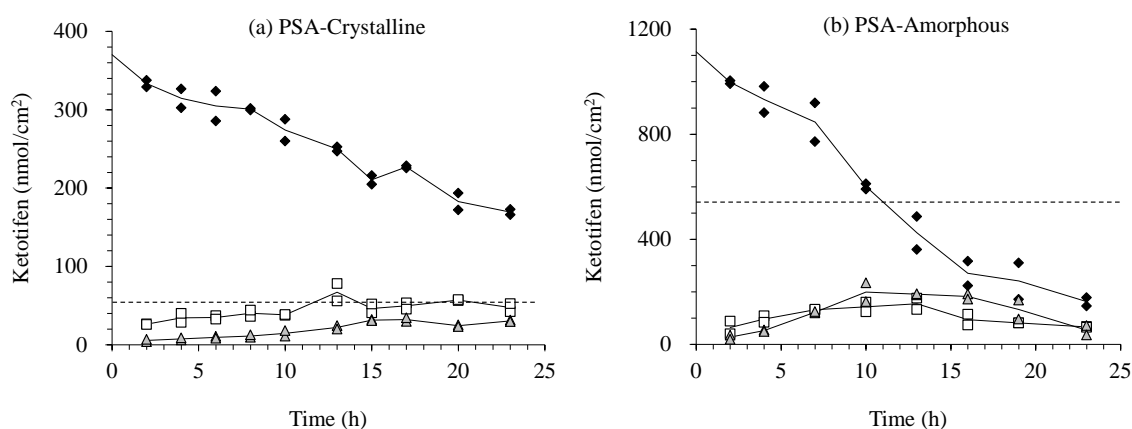


Fig. 24 *In vivo* time course of ketotifen amount in PSA (closed diamond), stratum corneum (open square), and viable epidermis and dermis (gray triangle) during the administration of PSA-Crystalline (a) or PSA-Amorphous (b) on the abdominal sites of hairless rats. Solid lines represent the time course of the mean value. Dashed line represents the solubility of crystalline or amorphous ketotifen per unit area of the corresponding PSA.

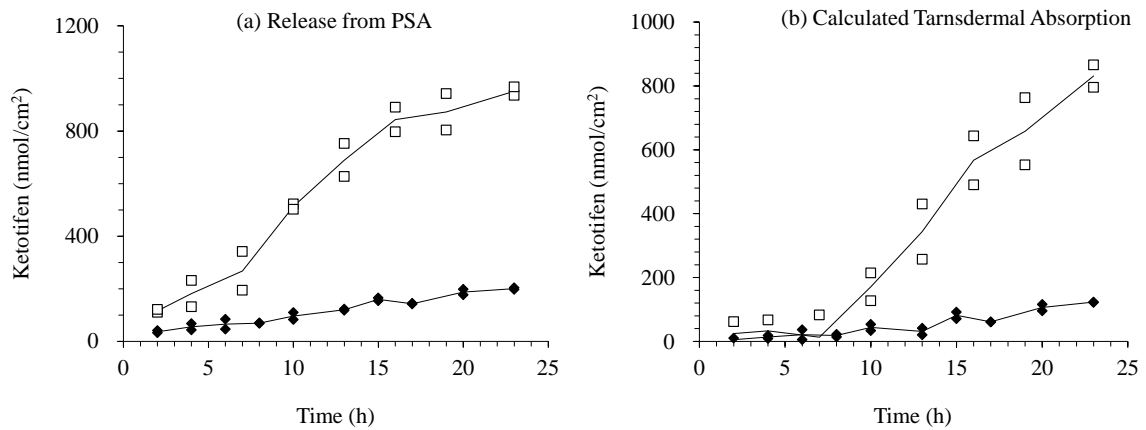


Fig. 25 *In vivo* time course of the release of ketotifen from PSAs (a) and Calculated Transdermal Absorption (b) during the administration of PSA-Crystalline (closed diamond) or PSA-Amorphous (open square) on the abdominal sites of hairless rats. Solid lines represent the time course of the mean value.

角層あるいは生きた上皮および真皮中ケトチフェン含量の推移を、縦軸を拡大して Fig. 26 に改めて示す。結晶分散 PSA の場合、角層中ケトチフェン含量は投与直後から 23 h まで一定レベルで推移し、生きた上皮および真皮中においても投与後 15 h までは緩やかな増加が見られたが、その後は一定であり全体として変動は少なかった。一方非晶分散 PSA の場合、投与後 13 h までの明確な増加傾向と、その後の明確な減少傾向が認められた。投与 13 h 時点の角層中、あるいは生きた上皮および真皮中ケトチフェン含量を両 PSA で比較すると、結晶分散 PSA に対する非晶分散 PSA の値は、角層の場合高々 2~3 倍であるのに対し、生きた上皮および真皮の場合は約 7 倍高値であった。

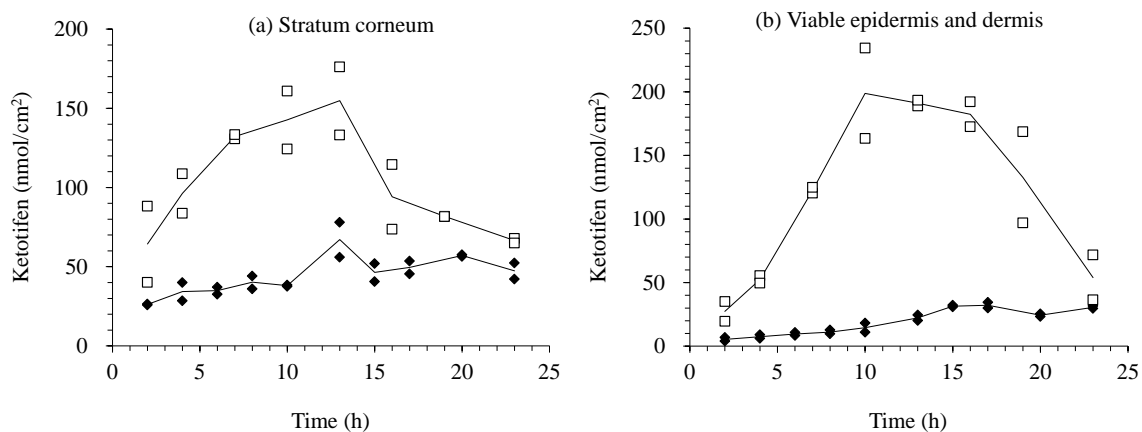


Fig. 26 Comparison of *in vivo* time course of ketotifen amount in the stratum corneum (a) or in viable epidermis and dermis (b) between PSA-Crystalline (closed diamond) and PSA-Amorphous (open square) during the application of PSAs on the abdominal sites of hairless rats. Solid lines represent the time course of the mean value.

7. *In vivo*における PSA 除去後の皮膚中ケトチフェン濃度推移

ヘアレスラット腹部に結晶分散 PSA を 4 h 投与し PSA を取り除いた後の、投与部位における角層および生きた上皮および真皮中ケトチフェン含量の推移を Fig. 27 に示す。ケトチフェンは角層および生きた上皮および真皮中に PSA 除去後 10 h まで残存しており、ケトチフェンが皮膚から体内に吸収される速度は比較的緩やかであることが示された。

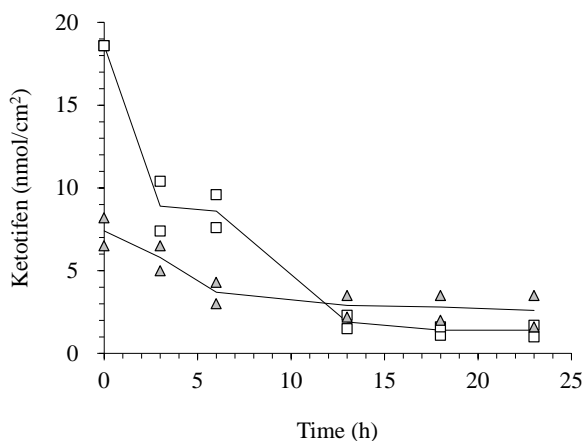


Fig. 27 Time course of ketotifen amount in the stratum corneum (open square) and in the viable epidermis and dermis (gray triangle) after the termination of 4-h transdermal administration of PSA-Crystalline on the abdominal site of hairless rats. Solid lines represent the time course of the mean value.

第3節 考察

1. 非晶分散 PSA の調製に適した溶媒の選定

Fig. 19 の結果から、溶媒キャスト法においてdichloromethaneを希釈溶媒とする場合にはKT含量 $300 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$ までの非晶分散PSAを調製できるが、acetone、ethylacetateおよびtolueneではKT含量が大きくなると、生成するKTが結晶型に変化することが示された。またtetrahydrofuranの場合は、Higuchiモデルによる予測値を上回る溶出速度の増加が認められ、残留溶媒による粘着剤の変質が疑われた。非晶型の生成に影響する希釈溶媒側の要因としては、揮発性、極性、溶解度パラメータが挙げられる。Table 10 に示した沸点、双極子モーメント、溶解度パラメータはこれらの要因に関する物性値であるが、いずれもdichloromethaneを他と差別化し得るものはない。一方、希釈溶媒とPSA溶液を重量比 1:2 で混合した液に対するケトチフェンの溶解度を目測で評価するとTable 20 に示すとおりdichloromethaneを用いた液で顕著に高い溶解度が得られることから、ケトチフェンを溶解しやすい性質が非晶質のKTを安定的に生成させるのに重要であると考えられる。

溶媒キャスト法の乾燥工程では、溶媒の蒸発に伴って薬物の濃縮と結晶核生成、PSAポリマーの濃縮による粘度上昇が並行して起こる。核生成速度は過飽和度の平方根と媒質中薬物拡散速度の積に比例するので⁵²、薬物溶解度が高いほど過飽和度は低く、核生成に必要な過飽和度に達する前に乾燥が完了して薬物の拡散が十分抑制された状態となり非晶質が安定に存在し得ると考えられる。

Table 20 Physicochemical properties of the dilution solvents used to prepare the casting solution

Diluting solvent	Solubility of ketotifen (mg/g)
Dichloromethane	103
Tetrahydrofuran	46
Acetone	44
Ethyl acetate	20
Toluene	19

2. 結晶分散 PSA と非晶分散 PSA の *in vitro* 溶出メカニズムの相違

両 PSA からの溶出プロファイルをシミュレーションした結果、結晶分散 PSA の初期溶出プロファイルに見られたラグタイムは薬物の溶解過程が律速に寄与していること、またラグタイムが見られなかった非晶分散 PSA では溶解過程が十分に早く律速に寄与しないことが示唆された。また、両者の相違は同一の拡散-溶解モデルにおけるパラメータの違いのみで再現できることが示唆された。溶解速度定数 a は分散薬物の比表面積に関係する。非晶分散 PSA の a が結晶分散 PSA に対して 5 倍高値であることは、Fig.28 に示す PSA 中 KT 粒子径の見かけの差異と整合する結果である。

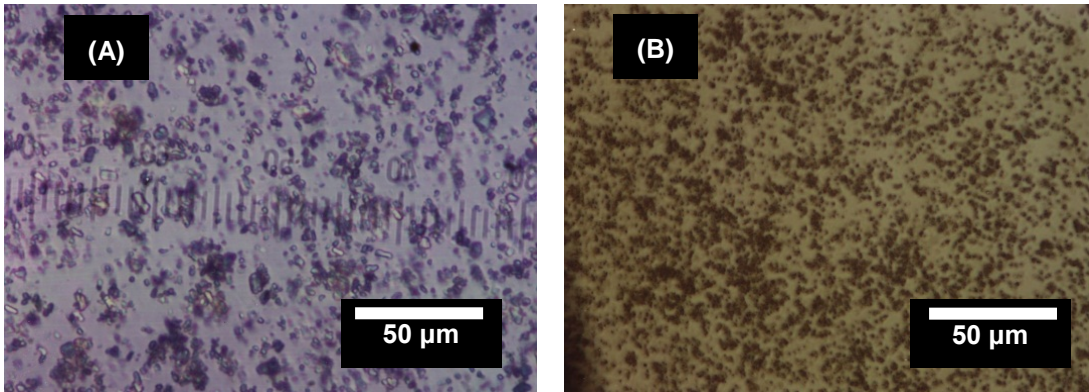


Fig. 28 Microscopic photographs of PSA-Crystalline (A) or PSA-Amorphous (B)

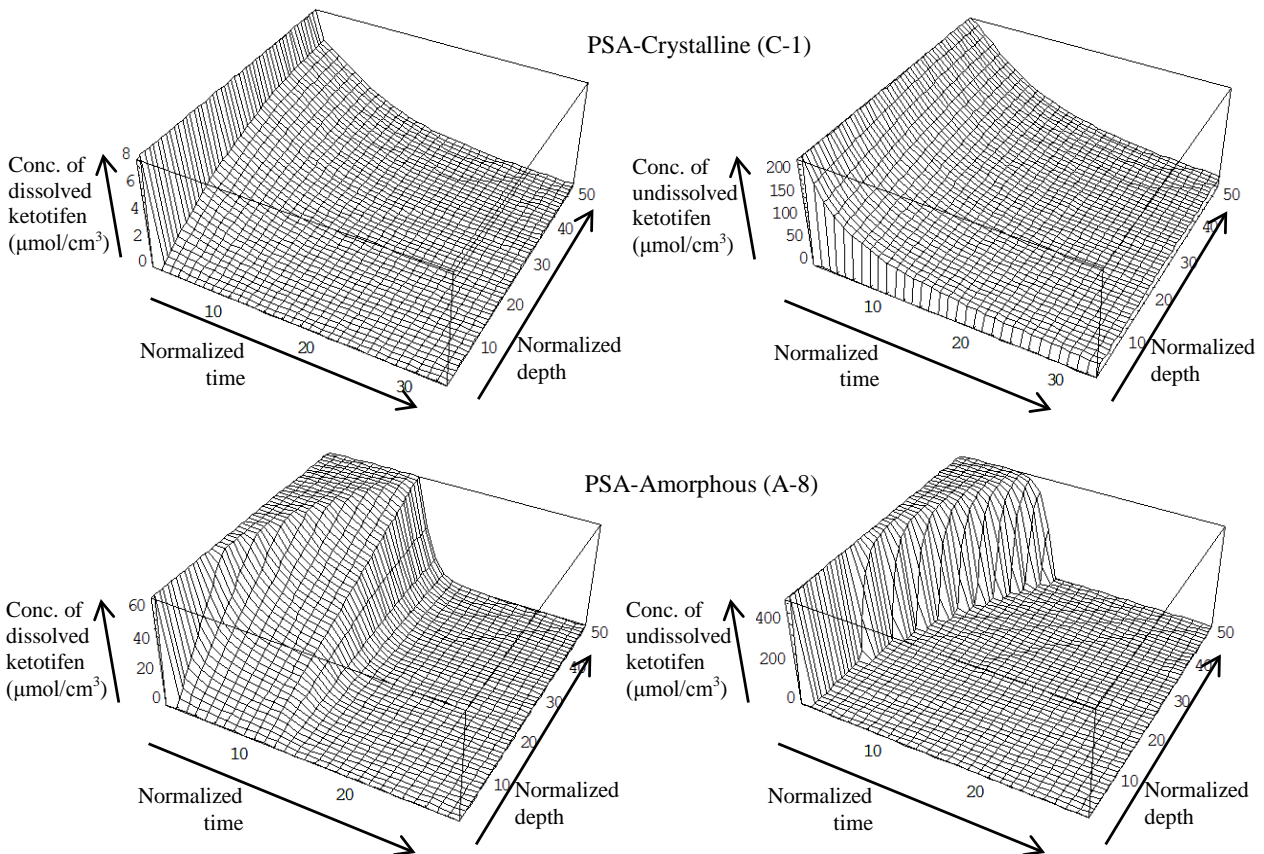


Fig. 29 Time course of the concentration profiles of dissolved (left) or undissolved (right) ketotifen in PSA-Crystalline C-1 (upper) or in PSA-Amorphous A-8 (lower) during the release study calculated based on the Diffusion-Dissolution model. Normalized time is the value calculated by normalizing total duration of the release study as 30, and Normalized depth is the value calculated by normalizing the thickness of PSA as 50.

Fig. 29 は、拡散-溶解モデルを用いて計算した溶解状態(左)あるいは固体状態(右)で存在する PSA 中 KT 濃度プロファイルの時間推移を示す。非晶分散 PSA (A-8) の場合、プロファイルの形と推移は Higuchi モデルに従い、固体薬物が存在する領域と存在しない領域の間に明確な境界があり、それが時間とともに PSA 表面から奥へ移動していく様子が再現されている。また溶解状態で存在する KT の濃度プロファイルは固体が存在しない領域では直線的であるが固体が存在する領域では飽和レベルが保たれることも Higuchi モデルと一致する。一方、結晶分散 PSA (C-1) では、溶解状態で存在する KT の濃度プロファイルはマトリックス全域にわたって飽和レベルを下回っており、溶出による濃度低下に対して固体からの補給が追いつかない様子が再現されている。

3. 非晶分散 PSA における経皮吸収促進効果

3-1. *In vitro* における皮膚透過促進効果と持続時間

Fig. 22 と Table 18 にて、非晶分散 PSA は結晶分散 PSA に対して約 5 倍高い皮膚透過速度を示し、その比率は非晶/結晶溶解度比に匹敵することが示された。また、同じ型同士を比較すると、定常皮膚透過速度は KT 含量によらず同等であるが、定常状態の持続時間は KT 含量に依存して変化した。#1 と #2 に含まれる固体の非晶 KT 含量を単位面積あたりに換算すると各々 $0.09 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ あるいは $0.39 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ であるが、Fig. 22 が示す定常領域は固体 KT に相当する量が透過し終えるまでの期間をカバーしており、皮膚に貼付中の非晶状態は安定に維持されていたと考えられる。

なお、前項で両 PSA の *in vitro* 溶出機構の違いを明らかにしたが、皮膚透過速度に比べて溶出速度は非常に速いため、前項で議論した溶出メカニズムの相違は *in vivo* 皮膚透過においては顕在化しないと考えられる。

3-2. *In vivo* における経皮吸収促進効果と皮膚中ケトチフェン濃度の関係

In vitro において観測された非晶分散 PSA による皮膚透過促進効果が、*in vivo* 経皮吸収性においても同様に認められた。Table 19 に示すとおり、非晶分散 PSA からの *in vivo* 経皮吸収速度は結晶分散 PSA に対して約 7 倍であり、これは *in vitro* 皮膚透過促進効果 (ヘアレスマウス皮膚の場合約 5 倍、ヘアレスラット皮膚の場合約 7 倍) と同等であった。また Fig. 26 が示すように、非晶分散 PSA 投与部位の皮膚中ケトチフェン含量が結晶分散 PSA より高値で推移したことから、非晶 KT による *in vivo* での促進作用は、皮膚中薬物濃度勾配を増大させる機構に基づくことが示唆された。ただし、2 つの点でこの考察には精査が必要である。第一点は、非晶分散 PSA 投与群において、*in vivo* 経皮吸収速度が 7~23 h の間ほぼ一定に保たれていたにもかかわらず (Fig. 25 (b))、皮膚中ケトチフェン含量には大きな変動

が認められたこと (Fig.26) である。第二点は、結晶分散 PSA に対する非晶分散 PSA の経皮吸収速度の比率が皮膚中ケトチフェン含量の比率とはほぼ一致していたのに対し、角層中ケトチフェン含量の比率はこれより低値 (高々2~3倍) であったことである。この二点について以下に考察する。

Fig.24に示された PSA 中溶解度と KT 含量を比較すると、結晶分散 PSA の場合、KT 含量は投与後 23 h まで溶解度より高値が維持されていたが、非晶分散 PSA の場合、投与後 10 h の時点で KT 含量が溶解度を下回っていた、すなわち 10 h 以降は PSA 中過飽和度が時間と共に低下していたことがわかる。したがって、非晶分散 PSA において認められた皮膚中ケトチフェン含量の変動は PSA からの薬物供給ドライビングフォースの低下が原因と考えられる。一方 Fig.27 から、PSA 除去後 10 h 以降もケトチフェンは皮膚に残存し、皮膚は容量の大きな貯蔵庫として機能し得ることが示唆される。したがって、皮膚からの薬物吸収が PSA 中のドライビングフォース低下を補う結果として 23 h までの定速吸収が得られたと考えられる。

角層中薬物濃度比と吸収促進効果の不一致は、透過性と分配性の間に何等かの非線形関係が存在することを示唆する。多くの薬物において角層を構成するタンパク相との結合現象が認められており⁵³、また本研究の第 1 章に示したとおり、ケトチフェンの角層への分配にはタンパク相への分配も寄与するが、この相に分配するケトチフェンは透過にあまり寄与しない。したがって、もしタンパク相に対するケトチフェンの分配に非線形性があれば、分配量の大きな非晶分散 PSA の場合、角層全体に対するタンパク相の寄与率が結晶分散 PSA に比べて小さくなり、上記不一致を説明することが可能である。

以上の精査を経た上で、非晶 KT による *in vivo* での促進作用が皮膚中薬物濃度勾配を増大させる機構に基づくとする解釈は妥当と判断される。

第4節 小括

分子型 KT に結晶型と非晶質型が存在し、後者が前者より高い溶解度を有するという特性を生かし、過飽和状態を利用した経皮吸収促進法を検討した。非晶 KT を均一に分散した PSA の調製法を検討した結果、dichloromethane を希釈溶媒とする溶媒キャスト法を見出した。この方法で調製した非晶分散 PSA は、内部に非晶 KT の溶解度に相当する KT を溶解し、非晶 KT が枯渇するまでの間、一定の過飽和状態が維持されることを *in vitro* 溶出プロファイルにおいて確認した。この製剤は結晶分散 PSA と比較して *in vitro* での高い皮膚透過性および *in vivo* での高い経皮吸収性を示し、その促進効果は非晶 KT によって生じる過飽和度に一致した。また、効果の程度は KT 含量によらないが効果の持続時間は KT 含量に依存し、効果発現に伴って皮膚中ケトチフェン含量の増加が観測されたことから、過飽和状態によ

って形成される高い皮膚中濃度勾配が促進効果のメカニズムであることが示された。

結論

①と②の性質を有するケトチフェンをモデル薬物として、吸収促進剤および過飽和状態を用いる経皮吸収促進法のメカニズムを研究した。

①塩基性薬物であり、分子型とプロトネートしたイオン型がある。

②分子型には結晶型と非晶質型があり、後者は前者に比べて溶解度が高い。

まず、分子型とイオン型各々について皮膚透過過程を制御する透過バリアの局在部位、あるいは主な透過経路を検討し、以下を明らかにした。

③皮膚の透過抵抗の大部分は角層に局在する。

④角層中の脂質相は、分子型の主な透過経路であり、その透過性は水相に匹敵する。

⑤角層中の脂質相は、イオン型に対しては透過障壁である。

⑥角層中のタンパク相は、分子型、イオン型双方にとって透過障壁である。

次に、①の特性に基づき、脂質相中に **enhancer pooling** を形成するタイプの吸収促進剤と、角層から脂質を引き抜くタイプの吸収促進剤の効果を検討し、以下を明らかにした。

⑦脂質相中に **enhancer pooling** を形成するタイプの吸収促進剤は、分子型をよく溶かすものであれば分子型の透過性を促進する。一方、イオン型に対しては効果がない。

⑧角層から脂質を引き抜くタイプの吸収促進剤は、脱脂処理と同様イオン型には著効を示すが分子型にはあまり効果がない。

⑨脂質相中に **enhancer pooling** を形成するタイプの吸収促進剤と角層から脂質を引き抜くタイプの吸収促進剤を併用すると、互いの効果が阻害される。

また②の特性に基づいて以下を明らかにした。

⑩非晶質の分子型薬物を安定に含有する処方製法を見出せば、その製剤では薬物が枯渇するまで一定の過飽和度が維持され、過飽和度に応じた経皮吸収促進効果を任意の時間持続させる有用な手段となる。

多くの薬物がケトチフェンと類似した①～⑥の性質を有すると思われる。それらの薬物に対する促進法の適性は⑦～⑩に記した法則に従う可能性が高く、処方選定の指針として活用可能と考える。

Appendix

The program on Mathematica[®] to calculate $c(x,t)$, $M(x,t)$, Q , and to perform the regression analysis simultaneously. Before executing this routine, actual release data and the corresponding sampling time were substituted in data release [id, j] and data time [id, j] in advance. 'id' and 'j' are respectively the serial number of PSAs and the number of the sampling time. The initial drug content and the thickness of PSA were also substituted in advance in content [id] and thickness [id].

```

Do[{
  Do[{nχ = 50, nr = 2160 × 3}],
  Do[{Array[u, {nχ + 1, nr + 1}, 0], Array[m, {nχ + 1, nr + 1}, 0],
    Array[y, nχ, 1], Array[z, nχ, 1], Array[simQ, nr + 1, 0]}],
  Do[{u[i, 0] = 1, m[i, 0] = 1}, {i, 1, nχ, 1}],
  Do[{u[0, j] = 0, m[0, j] = 0}, {j, 0, nr, 1}],

  Do[{d = 0.000271, cs = 8.06}],

  ssf[a_, p_] :=
  (
    Do[{
      Print["enter loop"];
      ss = 0,
      For[id = 1, id ≤ dataid, id ++, {
        Print["id=", id],
        Do[{h = thickness[id] / 10000, A = content[id],
          T = datatime[id, ntimepoints[id]] / 60}],
        Do[{k1 =  $\frac{h^2}{d} (A - cs) a$ , k2 =  $\frac{h^2}{d} a cs$ }],
        Do[{
          y[nχ] =  $- \left( 1 + \frac{\left(\frac{1}{n\chi}\right)^2}{\frac{d}{h^2} \frac{T}{nr}} \right)$ ,
          z[nχ] =  $- \left( \frac{1}{n\chi} \right)^2 k1 (1 - u[n\chi, j - 1]) m[n\chi, j - 1]^p -$ 
 $\frac{\left(\frac{1}{n\chi}\right)^2}{\frac{d}{h^2} \frac{T}{nr}} u[n\chi - 1, j - 1]$ ,
          For[i = nχ - 1, i ≥ 1, i --, {
            y[i] =  $- \left( 2 + \frac{\left(\frac{1}{n\chi}\right)^2}{\frac{d}{h^2} \frac{T}{nr}} \right) - \frac{1}{y[i + 1]}$ ,
            z[i] =  $- \left( \frac{1}{n\chi} \right)^2 k1 (1 - u[i, j - 1]) m[i, j - 1]^p -$ 
 $\frac{\left(\frac{1}{n\chi}\right)^2}{\frac{d}{h^2} \frac{T}{nr}} u[i, j - 1] - \frac{z[i + 1]}{y[i + 1]}$ ,
          }],
          u[nχ, j] = z[nχ],
          Do[{
            u[i, j] = Min[Max[z[i] - u[i - 1, j]] / y[i], 0], 1],
            }, {i, 1, nχ}],
          Do[{
            m[i, j] = Min[Max[m[i, j - 1] -
               $\left( \frac{d}{h^2} \frac{T}{nr} \right) k2 (1 - u[i, j - 1]) m[i, j - 1]^p$ , 0],
              m[i, j - 1]],
            }, {i, 1, nχ}],
          }, {j, 1, nr, 1}],
      simQ[0] = 0,
      Do[simQ[j] = simQ[j - 1] +  $\frac{d cs u[1, j - 1]}{n\chi} \frac{T}{nr}$ , {j, 1, nr}],
      simrelease[id, 1] = 0,
      Do[simrelease[id, j] = simQ[ $\frac{nr \text{ datatime[id, j]}}{\text{datatime[id, ntimepoints[id]]}$ ],
        {j, 2, ntimepoints[id]}],
      Do[simtime2[id, j] =  $\frac{60 T}{nr} 30 j$ , {j, 0, 216}],
    }],
    Do[
      ss =
      ss + ((datarelease[id, j] - simrelease[id, j]) / datarelease[id, j])2,
      {j, 2, ntimepoints[id]}
    ]
  ]];
Print["a=", a, ", p=", p, ", ss=", ss];
For[id = 1, id ≤ dataid, id ++, {
  MultipleListPlot[Table[{datatime[id, j]1/2, datarelease[id, j]},
    {j, 1, ntimepoints[id]}],
  Table[{datatime[id, j]1/2, simrelease[id, j]}, {j, 1, ntimepoints[id]}],
  PlotRange → {{0, datatime[id, ntimepoints[id]]1/2,
    {0, 1.1 Max[datarelease[id, ntimepoints[id]],
      simrelease[id, ntimepoints[id]]}},
  PlotJoined → {False, True}
}];
Return[ss]
},
ref = 1, ex = 2, con = 0.5,
a1 = 1, p1 = 0.6,
a2 = 1.5, p2 = 2,
a3 = 0.5, p3 = 1,
ss1 = ssf[a1, p1], ss2 = ssf[a2, p2], ss3 = ssf[a3, p3],
While[(ss1 - ss3)2 + (ss2 - ss3)2 + (ss1 - ss2)2 ≥ 0.000001, Do[{
  vectorss = {{ss1, a1, p1}, {ss2, a2, p2}, {ss3, a3, p3}},
  vectorsort = Ordering[ss1, ss2, ss3],
  {ssl, al, pl} = vectorsss[[vectorsort[[1]]]],
  {ssm, am, pm} = vectorsss[[vectorsort[[2]]]],
  {ssh, ah, ph} = vectorsss[[vectorsort[[3]]]],
  ag =  $\frac{am + al}{2}$ , pg =  $\frac{pm + pl}{2}$ ,
  ar = (1 + ref) ag - ref ah, pr = (1 + ref) pg - ref ph,
  ssr = ssf[ar, pr],
  If[ssr < ssl, {ae = ex ar + (1 - ex) ag, pe = ex pr + (1 - ex) pg,
    sse = ssf[ae, pe],
    If[sse < ssr, {an = ae, pn = pe, ssn = sse},
      {an = ar, pn = pr, ssn = ssr}]}],
  If[ssr ≥ ssh, {ac = con ah + (1 - con) ag, pc = con ph + (1 - con) pg,
    ssc = ssf[ac, pc],
    If[ssc < ssh, {an = ac, pn = pc, ssn = ssc},
      {an =  $\frac{ah + al}{2}$ , pn =  $\frac{ph + pl}{2}$ , am =  $\frac{am + al}{2}$ , pm =  $\frac{pm + pl}{2}$ }}],
  If[(ssr < ssh) && (ssr ≥ ssm),
    {ac = con ar + (1 - con) ag, pc = con pr + (1 - con) pg,
    ssc = ssf[ac, pc],
    If[ssc < ssh, {an = ac, pn = pc, ssn = ssc},
      {an =  $\frac{ah + al}{2}$ , pn =  $\frac{ph + pl}{2}$ , am =  $\frac{am + al}{2}$ , pm =  $\frac{pm + pl}{2}$ }}],
  If[(ssr < ssm) && (ssr ≥ ssl), {an = ar, pn = pr, ssn = ssr}],
  ss1 = ssf[a1, p1], ss2 = ssf[a2, p2], ss3 = ssf[a3, p3],
  Print["a=", a, ", p=", p, ", ss=", ss]
}];
Print["Loop End, a=", a, ", p=", p, ", ss=", ss]
}];

```

謝辞

本研究は、城西大学薬学部 薬粧品動態制御学研究室 杉林 堅次 教授の長年にわたる丁寧なご指導により、本稿の形に纏め上げることができました。この場を借りて深謝致します。

また、第一三共株式会社 ランバクシー・ラボラトリーズ LTD. 岡田 純一 博士による、研究立案から結果の解釈に到る様々な場面でのご指導、ご助言は本研究を推進する大きな原動力でありました。この場を借りて御礼申し上げます。

さらに本研究の結果の多くは、第一三共株式会社 製剤技術研究所 治験薬製造管理グループ 小川 賢剛 研究員、ならびに第一三共株式会社 DDS 研究グループ 鈴木 由喜江 研究員の忍耐強い実験により取得されました。この場を借りて御礼申し上げます。

研究成果の掲載紙

- *1. Kazuhiro Inoue, Kengo Ogawa, Yukie Suzuki, Jun'ichi Okada, Akira Kusai, Masaru Ikeda, and Kenji Nishimura, The Skin Permeation Mechanism of Ketotifen: Evaluation of Permeation Pathways and Barrier Components in the Stratum Corneum, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(1), 45–53 (2000).
- *2. Kazuhiro Inoue, Kengo Ogawa, Jun'ichi Okada, Kenji Sugibayashi, Enhancement of skin permeation of ketotifen by supersaturation generated by amorphous form of the drug, *Journal of Controlled Release*, 108, 306– 318 (2005).
- *3. Kazuhiro Inoue, Jun'ichi Okada, Kenji Sugibayashi, Enhancing effects of six chemical enhancers on the permeation of ketotifen through excised hairless mouse skin from aqueous donor solutions buffered at pH 5 and 10, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 18(5), 335-341 (2008).
- *4. Kazuhiro Inoue and Kenji Sugibayashi, *In vivo* enhancement of transdermal absorption of ketotifen by supersaturation generated by amorphous form of the drug, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47, 228-234 (2012).
- *5. Kazuhiro Inoue and Kenji Sugibayashi, Mathematical analysis of drug release from silicone pressure sensitive adhesive matrices containing crystalline or amorphous ketotifen, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, doi: 10.1252/jcej.12we140; published online on June 15 (2012).

引用文献

- ¹ Chattaraj S.C., Walker R.B., - Penetration Enhancer Classification: The Fundamentals. - In: Percutaneous Penetration Enhancers, E.W. Smith and H.I. Maibach Eds., CRC Press, Inc., North West, 1995, pp. 5-20.
- ² Joachim B., Marcus B.E, Augustijns P., Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability?, *J. Pharm. Sci.*, 98 (8), 2549-2572 (2009)
- ³ Craps L.P., Ney U.M. - Ketotifen: current views on its mechanism of action and their therapeutic implications. - *Respiration*, 45 (4), 411-421 (1984)
- ⁴ Tojo K., Random brick model for drug transport across stratum corneum, *J. Pharm. Sci.*, 76(12), 889-891 (1987).
- ⁵ Aspe E., Guy R.H., Lee W.A., Kennedy J.A., Visor G.C., Ennis R.D., Optimization of in vitro flux through hairless mouse skin of cidofovir, a potent nucleotide analog, *J. Pharm. Sci.*, 84(6), 750-754 (1995).
- ⁶ Higo N., Hinz R.S., Lau D.T.W., Benet L.Z., and Guy R.H., Cutaneous metabolism of nitroglycerin in vitro. II. Effects of skin condition and penetration enhancement, *Pharm. Res.*, 9(3), 303-306 (1992).
- ⁷ Shah H.S., Tojo K., Chien Y.W., Transdermal controlled delivery of verapamil: characterization of in vitro skin permeation, *Int. J. Pharm.*, 86, 167-173 (1992).
- ⁸ Kuo P.C., Liu J.C., Chang S.F., Chien Y.W., In vitro transdermal permeation of oxycodone: (I) effect of pH, delipidization and skin stripping, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 15(8), 1199-1215 (1989).
- ⁹ Werts P.W., Downing D., Covalent attachment of w-hydroxyacid derivatives to epidermal macromolecules: a preliminary characterization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137(3), 992-997 (1986).
- ¹⁰ Raykar P.V., Fung M.C., Anderson B.D., The role of protein and lipid domains in the uptake of solubility by human stratum corneum, *Pharm. Res.*, 5(3), 140-150 (1988).
- ¹¹ Knutson K., Krill S.L., Lambert W.J., Higuchi W.I., in *Controlled Release Technology: Pharmaceutical Applications* (P. I. Lee and W. R. Good, Eds.). ACS Symposium Series 348, Washington, D.C., 1987, pp. 241-266.
- ¹² Lampe M.A., Williams M.L., Elias P.M., Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation, *J. Lipid Res.*, 24, 131-140 (1983).
- ¹³ Tsai J.C., Weiner N., Flynn G.L., Ferry J.J., Drug and vehicle deposition from topical applications of minoxidil with skin strata of the hairless mouse, *Skin Pharmacol.*, 7(5), 262-269 (1994).
- ¹⁴ Cooper E.R., Increased skin permeability for lipophilic molecules, *J. Pharm. Sci.*, 73(8), 1153-1156 (1984).
- ¹⁵ Seif S., Hansen S., Measuring the Stratum Corneum Reservoir: Desorption Kinetics from Keratin. *J. Pharm. Sci.*, 2012 Jun 25. doi: 10.1002/jps.23245. [Epub ahead of print]
- ¹⁶ Hansen S., Selzer D., Schaefer U., Kasting G.B., An Extended Database of Keratin Binding, *J. Pharm. Sci.*, 100(5), 1712-1726 (2011).

-
- ¹⁷ Hashida M., Yamashita F. - Terpenes as penetration enhancers. - In: Percutaneous Penetration Enhancers, E.W. Smith and H.I. Maibach Eds., CRC Press, Inc., North West, 1995, pp. 309-321.
- ¹⁸ Azone Allan G. - Azone. - In: Percutaneous Penetration Enhancers, E.W. Smith and H.I. Maibach Eds., CRC Press, Inc., North West, 1995, pp. 129-181.
- ¹⁹ Wiechers J.W., Drenth B.F., Jonkman J.H., de Zeeuw R.A. -Percutaneous absorption and elimination of the penetration enhancer azone in humans, *Pharm. Res.*, 4 (6), 519-523 (1987).
- ²⁰ Wester R.C., Melendres J., Sedik L., Maibach H. I. – Percutaneous absorption of Azone following single and multiple doses to human volunteers, *J. Pharm. Sci.*, 83, 124-125 (1994).
- ²¹ Aungst B.J. - Fatty Acid as skin permeation enhancers. - In: Percutaneous Penetration Enhancers, E.W. Smith and H.I. Maibach Eds., CRC Press, Inc., North West, 1995, pp. 277-287.
- ²² Chiang C.H., Chen J.L., Liu Y.T., Wang D.P. - Therapeutic effect and pharmacokinetics of ketotifen transdermal delivery system, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24 (3), 213-217 (1998).
- ²³ Morimoto K., Haruta T., Tojima H., Takeuchi Y. – Enhancing mechanisms of saturated fatty acids on the permeations of indomethacin and 6-carboxyfluorescein through rat skins, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 21 (17), 1999-2012 (1995).
- ²⁴ Aungst B.J. - Structure/effect studies of fatty acid isomers as skin permeation enhancers and skin irritants, *Pharm. Res.*, 6, 244-247 (1989).
- ²⁵ Ruddy S.B. - Surfactants. - In: Percutaneous Penetration Enhancers, E.W. Smith and H.I. Maibach Eds., CRC Press, Inc., North West, 1995, pp. 245-257.
- ²⁶ Azuma M., Inoue T., Kawano Y. - Pharmaceutical preparation for administration by percutaneous absorption and a method for their manufacture. - US Patent 5211943, (1993).
- ²⁷ Shiseido Co., Ltd. - Skin permeation enhancer and dermatological formulation. - Japan Patent H6-177666, (1994).
- ²⁸ Azuma M., Inoue T., Kawano Y. - Pharmaceutical preparation for administration by percutaneous absorption and a method for their manufacture. - US Patent 5211943, (1993).
- ²⁹ Shiseido Co., Ltd. - Skin permeation enhancer and dermatological formulation. - Japan Patent H6-177666, (1994).
- ³⁰ Cornwell P.A., Barr B.W., Bouwstra J.A., Gooris G.S. – Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; differential scanning calorimetry, small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies, *Int. J. Pharm.*, 127, 9-26 (1996).
- ³¹ Pilgram G.S.K., van der Meulen J., Gooris G.S., Koerten H.K., Bouwstra J.A. - The influence of two Azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, 1511, 244-254 (2001).
- ³² Singh P., Simonelli A.P., Higuchi W.I., Desai S.J. – Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in inert matrix II, *J. Pharm. Sci.*, 55 (11), 1224-1229 (1966).
- ³³ Aungst B.J. - Structure/effect studies of fatty acids isomers as skin permeation enhancers and skin irritants, *Pharm. Res.*, 6, 244-247 (1989).
- ³⁴ Ongpipattanakul B., Burnette R.R., Potts R.O., Francocur M.L. - Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids, *Pharm. Res.*, 8 (3), 350-354 (1991).
- ³⁵ Ridout G., Hinz R.S., Hostynek J.J., Reddy A.K., Wiersema R.J., Hodson C.D., Lorence C.R.,

-
- Guy R.H. - The effects of zwitterionic surfactants on skin barrier function, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 16 (1), 41-50 (1991).
- ³⁶ Azuma M., Inoue T., Kawano Y. - Pharmaceutical preparation for administration by percutaneous absorption and a method for their manufacture. - US Patent 5211943, (1993).
- ³⁷ Aioi A., Kuriyama K., Shimizu T., Yoshioka M., Uenoyama S. – Effects of vitamin E and squalene on skin irritation of a transdermal absorption enhancer, lauroylsarcosine, *Int. J. Pharm.*, 93, 1-6 (1993).
- ³⁸ Shiseido Co., Ltd. - Skin permeation enhancer and dermatological formulation. - Japan Patent H6-177666, (1994).
- ³⁹ Tanaka S., Takashima Y., Murayama H., Tsuchiya S., Studies on drug release from ointments: V. Release of hydrocortisone butyrate propionate from topical dosage forms to silicone rubber, *Int. J. Pharm.*, 27, 29– 38 (1985).
- ⁴⁰ Chiang C.M., Flynn G.L., Weiner N.D., Szpunar G.J., Bioavailability assessment of topical delivery systems: effect of vehicle evaporation upon in-vitro delivery of minoxidil from solution formulations, *Int. J. Pharm.*, 55, 229– 232 (1989).
- ⁴¹ Kenken J., Zeigler A., Mullar B.W., Investigation into the pharmacodynamic effects of dermally administered microemulsion containing h-blockers, *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 679– 684, (1991).
- ⁴² Davis A.F., Hadgraft J., Effect of supersaturation on membrane transport: 1. Hydrocortisone acetate, *Int. J. Pharm.*, 76, 1–8 (1991) .
- ⁴³ Hadgraft J., Hadgraft J.W., Sarkany I., The effect of thermodynamic activity on the percutaneous absorption of methyl nicotinate from water glycerol mixtures, *J. Pharm. Pharmacol.*, 25, 122– 123 (1973).
- ⁴⁴ Nitto Electric Industry KK. Composite plaster sheet — comprising water-impermeable sheet layer containing water-soluble pharmaceutical active ingredient and aqueous gel layer of e.g., polyacrylic acid, Japan Patent J6 3297-320-A.
- ⁴⁵ Chien W.E., - Development Concepts and Practice in Transdermal Therapeutic Systems.- In: *Transdermal Controlled Systemic Medications*, Chien W.E. Eds., Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, pp. 25-83.
- ⁴⁶ Kinloch A.J., *Adhesion and Adhesives: Science and Technology*, Chapman and Hall Ltd., London, 1987, pp. 175– 176.
- ⁴⁷ Merkle H.P., Transdermal delivery systems, *Methods Find, Exp. Clin. Pharmacol.*, 11(3), 135– 153 (1989).
- ⁴⁸ Dittgen M., Bombor R., Process for the production of a pharmaceutical preparation. German patent DD 217989 A1.
- ⁴⁹ Sekisui Chemical Industries KK. Dermal absorption plaster— comprising adhesive layer containing solid medicine on substrate surface which is impervious to the medicine, Japan Patent J6 3093-715-A.
- ⁵⁰ Higuchi, T.; Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension, *J. Pharm. Sci.*, 50, 874-875 (1961).
- ⁵¹ Nelder J.A., Mead R., A simplex method for function minimization, *Comput. J.*, 7, 308–313 (1965).

-
- ⁵² Nakagaki M., Hyomen Jotai to Koroido Jotai, Tokyo-Kagaku- Dojin K.K, Tokyo, 1968, p. 248.
- ⁵³ Hansen S., Selzer D., Schaefer U.F., Kasting G.B., An extended database of keratin binding, *J. Pharm. Sci.*, 100 (5), 1712-1726 (2011).