

人工膜積層皮膚モデルの薬物皮内動態解析への  
応用性に関する基礎的研究

大島 新司

## 目次

### 総論の部

緒言	・ ・ ・ ・ 1
第 1 章 急性炎症皮膚モデルラットにおける薬物経皮吸収動態に 及ぼす浮腫の影響に関する検討	・ ・ ・ ・ 4
第 1 節 皮膚組織中への血漿タンパク質滲出と浮腫の評価	・ ・ ・ ・ 5
第 2 節 フルルビプロフェンの経皮吸収動態に及ぼす血漿タンパク 質滲出の影響	・ ・ ・ ・ 8
第 3 節 小括	・ ・ ・ ・ 10
第 2 章 人工膜積層皮膚モデルの構築と定量性に関する検討	・ ・ ・ ・ 11
第 1 節 フルルビプロフェンの透析膜から成る単一積層膜透過性に 及ぼす膜積層の影響	・ ・ ・ ・ 12
第 2 節 フルルビプロフェンのシリコーン膜と透析膜から成る複合 積層膜透過性に及ぼす膜積層の影響	・ ・ ・ ・ 17
第 3 節 マイクロダイアリシスプローブのフルルビプロフェン回収 特性の評価	・ ・ ・ ・ 19
第 1 項 プローブへのフルルビプロフェン移行に及ぼす灌流液の 速度および組成の影響	・ ・ ・ ・ 20
第 2 項 プローブのフルルビプロフェン回収クリアランスの評価	・ ・ ・ ・ 23
第 4 節 人工膜積層皮膚モデルの定量性の評価	・ ・ ・ ・ 26
第 1 項 薬物濃度測定プローブから得られる情報の定量的評価	・ ・ ・ ・ 28
第 2 項 人工膜積層皮膚モデル実験系の定量性の評価	・ ・ ・ ・ 31
第 5 節 小括	・ ・ ・ ・ 35
第 3 章 炎症病変を模倣した人工膜積層皮膚モデルによるフルルビ プロフェン皮内動態の検討	・ ・ ・ ・ 36
第 1 節 皮膚浮腫におけるフルルビプロフェン皮内動態の評価	・ ・ ・ ・ 37

第1項 皮内動態に及ぼす血管外滲出した血漿タンパク質の影響	・ ・ ・ ・ 38
第2項 皮内動態に及ぼす血管透過性亢進の影響	・ ・ ・ ・ 41
第3項 皮内動態に及ぼす血流速度変化の影響	・ ・ ・ ・ 43
第4項 皮内動態に及ぼす血漿タンパク質の滲出の影響	・ ・ ・ ・ 45
第2節 フルルビプロフェンの皮内動態に及ぼすタンパク結合阻害 の影響	・ ・ ・ ・ 48
第1項 ケトプロフェンの透析膜透過性評価	・ ・ ・ ・ 49
第2項 フルルビプロフェンの膜透過性に及ぼすケトプロフェン のタンパク結合阻害の影響	・ ・ ・ ・ 51
第3節 小括	・ ・ ・ ・ 53
結論	・ ・ ・ ・ 54
謝辞	・ ・ ・ ・ 59
実験の部	・ ・ ・ ・ 60
第1章 実験の部	・ ・ ・ ・ 60
第2章 実験の部	・ ・ ・ ・ 61
第3章 実験の部	・ ・ ・ ・ 66
引用文献	・ ・ ・ ・ 70

## 総論の部

### 緒言

皮膚適用製剤は、全身性の作用を期待する製剤（全身作用型製剤）と、皮膚局所に作用する製剤（局所作用製剤）に大別される。全身作用型製剤は、表皮透過後に真皮中の毛細血管から全身循環へ移行することで期待された薬効が発現する。また局所作用製剤は、皮膚局所もしくは皮下組織で薬効を発現する<sup>1)</sup>。どちらの製剤においても重要なのは、薬物およびその活性代謝物の濃度が標的部位で副作用を発現することなく適切に維持されることである<sup>2,3)</sup>。タクロリムス水和物軟膏は、表皮から真皮上層の病変部位を標的部位とする局所作用製剤であり、過度な皮膚透過性の亢進による薬物の全身循環への移行増加は、副作用発現の観点から望ましくない<sup>4)</sup>。一方で、全身を標的とした経皮吸収型製剤では、局所での薬物滞留は局所刺激等との関連から望ましくないと考えられる<sup>5)</sup>。それゆえ、どちらの製剤も薬物の皮内動態は重要であり、薬物皮内動態の評価は有効かつ安全な皮膚適用製剤の有用な手助けと成りうる<sup>6)</sup>。

ヒトや哺乳動物の皮膚は表皮と真皮から構成され、このうち表皮の皮膚表面に位置する最外層が角質層である。角質層は死んだ角化細胞（角質細胞）の層から成り、外界からの刺激や異物の侵入に対する保護膜として作用している<sup>7,8)</sup>。そのため、多くの薬物または化学物質の透過において、この角質層の透過が律速過程となる。角質細胞は細胞間脂質に囲まれているため、角質層は疎水性膜と考えられている<sup>9)</sup>。定常状態時のヒト皮膚の薬物透過速度を予測するために種々の疎水性人工膜が角質層モデルとして使用されている一方で、水性ゲルのように含水率の高い生きた表皮や真皮も、脂溶性化学物質の経皮吸収において、バリア機能として作用することが知られている<sup>10-14)</sup>。さらに、皮膚における生理学的な反応は、血流や水分を欠く角質層よりも、血流があり、生きた細胞が存在する表皮および真皮において重要であると考えられる。全身作用型製剤において、薬物の表皮から全身循環系への移行遅延は、全身性の治療効果を低下させてしまうことが考えられ、さらに適用部位である局所組織での副作用を誘発すると考えられる。例えば、炎症皮膚において血管から滲出した血漿タンパク質は、薬物

結合能を有することから、それが局所の皮膚内もしくは皮下組織中での薬物動態に影響を与えると考えられる。多くの皮膚適用製剤は、炎症や損傷のない皮膚へ適用される。しかしながら全身作用型製剤や局所作用製剤の同一部位への繰り返し適用や長期間の適用は、皮膚炎症もしくは損傷を誘発することが知られている<sup>15-18)</sup>。また、落屑などの皮膚所見が認められない軽症のアトピー性皮膚炎患者の無疹部皮膚の皮膚バリア機能は、健常者に比べて著しく低下していることが知られている<sup>19)</sup>。小児医療の現場において、アトピー性皮膚炎と気管支喘息を併発している患児が見受けられ<sup>20)</sup>、これらの患児に気管支拡張作用を有するツロブテロールテープ剤を貼付した際に、動悸や振戦といった全身性の副作用が報告されている<sup>21,22)</sup>。よって、皮膚生理状態変化を考慮した薬物皮内動態評価は、全身作用型製剤のみならず局所作用製剤のより効果的かつ安全な使用にむけて重要であると考えられる。

現在、経皮吸収性に関する動物実験代替法として、経済開発協力機構 (OECD) がガイドラインを公表している<sup>23)</sup>。本ガイドラインにおいて、経皮吸収性に関する動物実験代替法として、ヒトあるいは動物の皮膚を用いると記載されているが、日本において、ヒト皮膚は安定した入手が難しく、ほとんど使用できない現状にある。代わりに動物皮膚を使用する場合には、動物愛護の問題を回避できず<sup>14)</sup>、EU においては化粧品生産や輸入のための動物実験は禁止された<sup>24-27)</sup>。一方、シリコーン膜のような人工膜を用いた *in vitro* 実験系は、再現性の高いデータが得られ、実験動物を使用しない利点を持つが、従来のこの実験系では、薬物の皮内動態研究に用いる場合、皮内の薬物濃度に影響を及ぼしうる皮膚局所の血流や炎症のような組織反応性を欠くため<sup>28,29)</sup>、薬物皮内動態を評価する上では適さない側面がある<sup>30)</sup>。しかしながら、この問題は血管モデルを組み込むことにより改善可能であると考えられる。

生理状態が変化した皮膚における薬物皮内動態について、その要因を詳細に検討した報告は、これまでほとんど見当たらない。そこで、本研究では、皮膚の生理状態変化を反映し得る *in vitro* 人工膜透過実験系の構築を目的とした。まず、著者は角質層モデルに皮膚の代替物としてヒト皮膚や動物皮膚と薬物の透過性について比較されてきたシリコーン膜を<sup>10-13)</sup>、また角質層下の親水性である生きた表皮-真皮層モデルに透析膜を選択し、さらに血管モデルである細管を人工膜間に留置するために透析膜を積層させ、細管には経時的な薬物回収が行えるマイクロダイアリシスプローブ (プローブ) を選択した。皮膚生理状

態変化の 1 つとして炎症を選択し、以下の 1) - 3) の炎症病変を人工膜積層皮膚モデルの構成要素条件設定を変更して模倣し薬物移行動態への影響を検討した。すなわち、1) 血管透過性の変化をプローブの変更、2) 血流速度の変化を灌流液の流速調整、3) 血管からの血漿の組織細胞間質への滲出をプローブからの灌流液の漏出によって模倣し、それに伴う薬物移行動態への影響を第 1 章から第 3 章に渡り検討を行った。第 1 章においては、炎症皮膚のような病変部位における *in vivo* 薬物経皮吸収実験の報告が少ないため、炎症皮膚の 1 つとして皮膚浮腫モデルラットを作製した。まず、起炎混合溶液 (0.5%  $\lambda$ -カラゲニン、1.0% ザイモサン、1.0% カゼイン含有のカルボキシメチルセルロース溶液) をヘアレスラット背部皮内へ投与し、炎症病変の初期に起こる血管透過性亢進に伴う皮膚組織細胞間質への血漿タンパク質の滲出について評価した。さらに、モデル薬物としてフルルビプロフェン (FP) を選択し、それを主成分とする FP パップ剤を適用し血漿タンパク質血管外滲出による FP 経皮吸収動態への影響を評価した。第 2 章では、人工膜積層皮膚モデルの構築を目的として、生きた表皮-真皮層のモデルとして選択した透析膜の積層および角質層のモデルとして選択したシリコーン膜と透析膜の異種膜の積層が FP 膜透過性に及ぼす影響について評価した。また、薬物の全身への移行を仮定した血管モデルであるプローブ微小透析膜部の FP の回収性について評価した。さらに、構築した人工膜積層皮膚モデルの妥当性の確認を目的として、FP の透析膜の透過クリアランスとプローブ微小透析膜の回収クリアランスから求められる皮下組織もしくは全身循環予測移行率を、それらの実測値と比較検討した。第 3 章では、皮膚局所の炎症病変で発現し得る条件を模倣するため、透析膜間にウシ血清アルブミン溶液の留置、プローブ灌流液の流速の変化もしくはプローブ透析膜の分画分子量の変更により反映し、FP の膜内移行動態に及ぼすこれらの影響を評価した。さらに、ケトプロフェンのタンパク結合置換による FP の膜透過性への影響を評価した。

## 第1章 急性炎症皮膚モデルラットにおける薬物経皮吸収動態に及ぼす浮腫の影響に関する検討

薬物の角質層の透過過程は経皮吸収の律速段階であるが、生きた表皮と真皮の皮内環境の変化は、皮膚適用製剤の薬理作用に影響を与える可能性がある。表皮中に薬物が長期保持されることによる治療効果の発現遅延や局所組織での副作用を誘発する可能性がある。特に炎症皮膚における血管外滲出した血漿タンパク質は薬物結合能を有することから、その薬物の皮内動態へ影響を及ぼすことが予想される<sup>28)</sup>。血漿タンパク結合性の低い薬物では、経皮吸収動態への影響は小さいと考えられる一方で、結合性の高い薬物においては、経皮吸収動態への影響を大きく受けることが考えられる。また、ほとんどの皮膚適用製剤は損傷や炎症のない正常な皮膚への適用を想定している。しかしながら、同一部位へ長期間もしくは繰り返し適用されることにより、皮膚に炎症をもたらすことが知られている<sup>15-18)</sup>。また、局所作用製剤に分類される薬物の中には、炎症皮膚を治療するために適用されるものもある。そこで、本章では、薬物の経皮吸収動態に及ぼす炎症初期に起こる血管透過性の亢進および皮膚組織細胞間質への血漿タンパク質滲出の影響を検討した。

## 第 1 節 皮膚組織中への血漿タンパク質滲出と浮腫の評価

ウレタン麻酔下のヘアレスラットにエバンスブルーを静注後、背部へ  $\lambda$ -カラゲニン、ザイモサン、カゼインからなる起炎物質混合溶液 (prophlogistic material mixed solution: 起炎溶液) 50  $\mu$ L を皮内投与して炎症を惹起させ皮膚を摘出した。皮膚摘出までのタイムスケジュールおよび皮膚組織中への血管からのエバンスブルー (EB) 漏出量を Fig. 1 および 2 に示す。EB は血漿タンパク質とほとんど結合することが知られており、血漿タンパク質の血管外滲出を定量化するマーカーとして多くの研究で用いられている<sup>31)</sup>。よって EB の摘出皮膚への滲出量を血漿タンパク質滲出量として評価した。

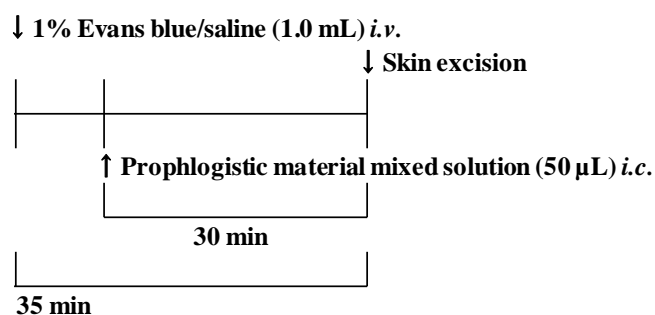
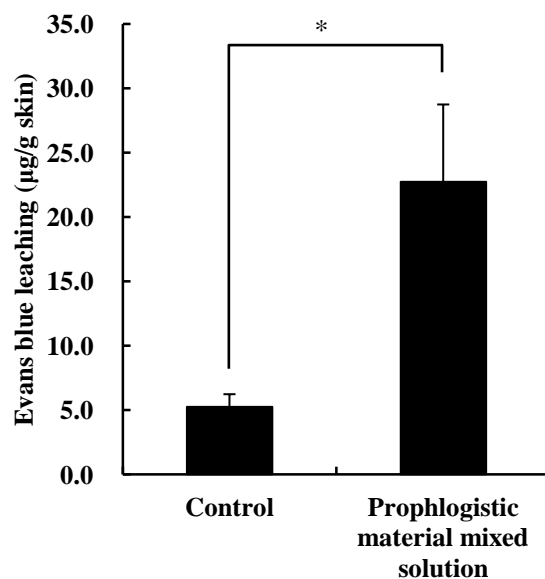


Fig. 1 Time schedule for the experiments of plasma protein leaching





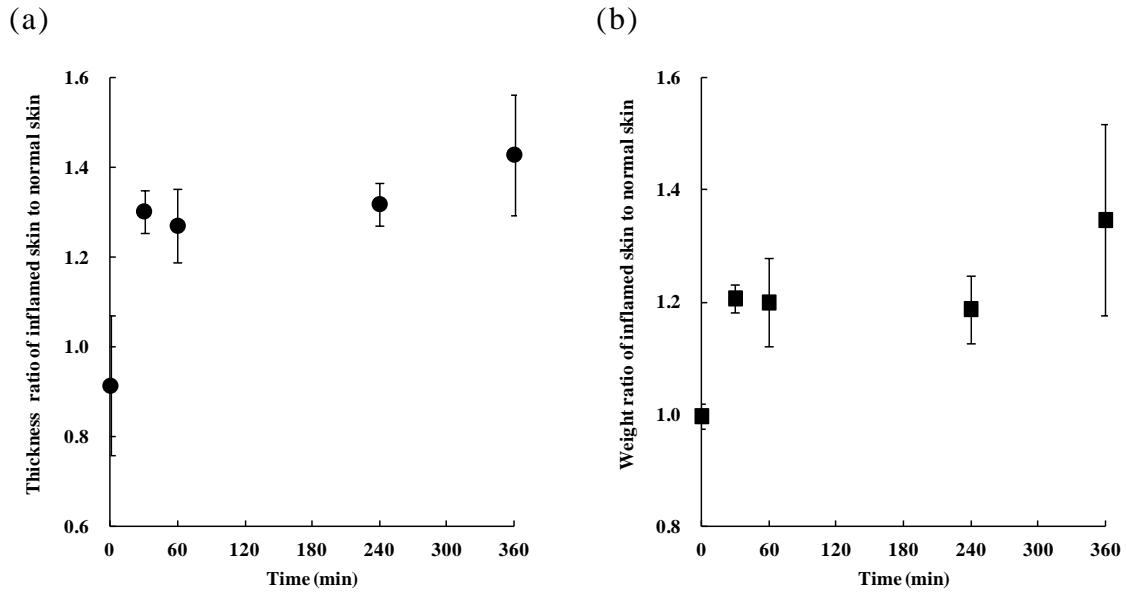
**Fig. 2 Induction of skin inflammation in Hairless rats**

An EB saline solution (1.0%) was first injected (1.0 mL) intravenously, and a prophlogistic material mixed solution of  $\lambda$ -carrageenan (0.5%), zymosan (1.0%), and casein (1.0%) was intracutaneously injected 5 min after the EB administration. The treated skin was excised 30 min after the induction. Data represent mean $\pm$ S.D. (n = 3-6). \* $p$ <0.05 was assumed to be significant.

Fig. 2 より、起炎溶液の皮内投与によって投与部位の血管透過性が亢進し、アルブミンなどの血漿タンパク質の組織細胞間質への滲出が確認された。このことから、起炎溶液注入局所の組織において、血管からの滲出液によって炎症性浮腫を呈することが考えられた。滲出液は、時間経過とともに脈管系より回収されるため皮膚局所の浮腫状態を下記の (1)、(2) 式を用いて経時的に評価した (Fig. 3)。個体による皮膚の厚みおよび重量を補正するため、起炎溶液皮内投与部位の対側皮膚に対する皮膚厚ならびに重量比で浮腫状態を評価した。Fig. 3 より本炎症皮膚モデルにおける浮腫は 30 分までに発現し、その状態は 360 分まで継続することが示された。

$$\text{Thickness ratio of inflamed skin to normal skin} = \frac{\text{Thickeess of skin}_{\text{inflamed}}}{\text{Thickeess of skin}_{\text{normal}}} \dots (1)$$

$$\text{Weight ratio of inflamed skin to normal skin} = \frac{\text{Weight of skin}_{\text{inflamed}}}{\text{Weight of skin}_{\text{normal}}} \quad \dots (2)$$



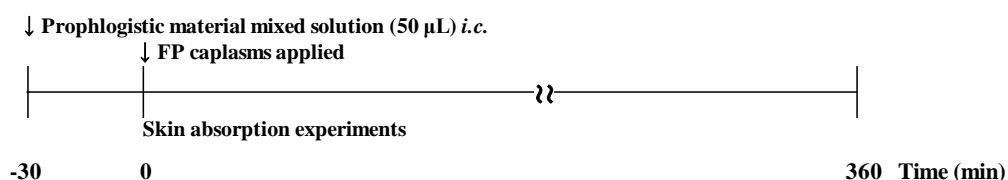
**Fig. 3 The time dependent change in edema in hairless rat inflamed skin**

(a), Skin thickness ratio of inflamed to normal; (b), Skin weight ratio of inflamed to normal. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

## 第2節 フルルビプロフェンの経皮吸収動態に及ぼす血漿タンパク質滲出の影響

第1節において起炎溶液の皮内投与によって投与部位局所の血管から組織細胞間質へ血漿タンパク質滲出が観察された。吸収とは、薬物が投与部位から脈管系へと移行する過程を定義する言葉であるため<sup>32)</sup>、本節では、経皮吸収動態への影響を血漿中薬物濃度の変化で評価した。本研究で選択したモデル薬物のフルルビプロフェン (FP) は、経皮吸収鎮痛・消炎剤として用いられ、アルブミンと高い結合性を示し<sup>33)</sup>、HPLCによる定量感度が良いことから選択された。経皮吸収実験には、FPを主成分とする薬価収載品目のZEPOLAS<sup>®</sup> パップ (FP パップ) を用いた。ウレタン麻酔下のヘアレスラット背部4箇所直径10 mmの円形に打ち抜いたFPパップ剤を背部に貼付しFP経皮吸収動態を評価した (FP適用量として0.92 mg/匹)。FPパップ貼付30分前もしくは30分後に起炎溶液を貼付部位の皮内へ投与し、それぞれ pre、post 投与群とした。タイムスケジュールを Fig. 4 に、6時間までの血漿中 FP 濃度推移を Fig. 5 に示した。

### PM sol. injected before 30 min of FP cataplasms application (Pre)



### PM sol. Injected after 30 min of FP cataplasms application (Post)

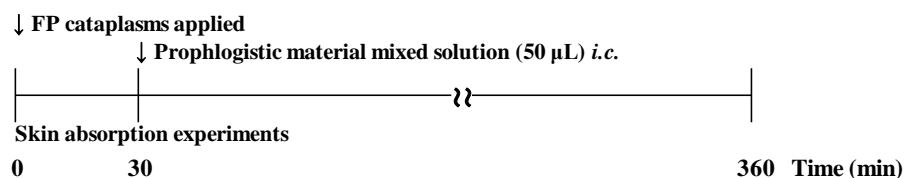
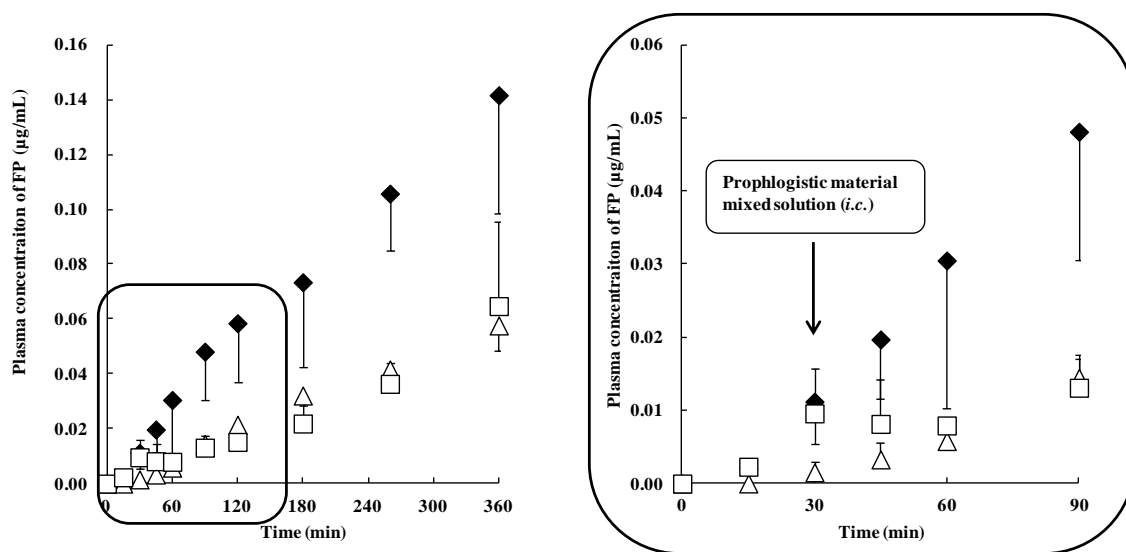


Fig. 4 Time schedule for the skin absorption experiments

いずれの起炎溶液投与群においても血漿中 FP 濃度は、未投与群のそれに比べ明らかな低下を示した。また、pre 投与群において、貼付後 15 分まで血漿中 FP を検出することができなかった。さらに、post 投与群において血漿中 FP 濃度は、起炎溶液注入前 (30 分) までは、control 群のそれに近似したが、注入後に一時的な吸収速度の低下が観察された後に、緩やかな上昇を認めた。



**Fig. 5 Plasma concentration of FP after application of the FP cataplasms to hairless rat with or without skin inflammation**

◆, Control (normal skin); △, Pre (inflamed skin); □, Post (inflamed skin). Data represent the mean±S.D. (n = 3).

ここで炎症に伴う局所の血流速度増加、血管透過性亢進や皮膚バリア能の低下は、血漿中 FP 濃度を増加させる因子である。しかしながら、起炎溶液投与群での血漿中 FP 濃度が低下したことから、他の因子が考えられ、それは血管から組織細胞間質中へ滲出した血漿タンパク質と FP の結合によるものと考えられた。

### 第 3 節 小括

本章では、皮膚浮腫により FP の経皮吸収動態が大きく影響を受けることを明らかにした。また、炎症性浮腫に伴う血漿タンパク質の血管外滲出によって FP 経皮吸収動態が大きく影響を受けることを明らかにした。さらに起炎溶液の投与タイミングによって経皮吸収プロファイルが変化することを明らかにした。炎症時に FP 経皮吸収動態を変化させる皮膚生理状態の因子として血漿タンパク質の滲出に伴う浮腫、血管透過性亢進および血流速度増加などが考えられる。これらの皮膚生理状態の変化を反映でき、薬物経皮吸収動態への影響をより詳細に検討できる実験系構築の必要性が強く示された。

## 第 2 章 人工膜積層皮膚モデルの構築と定量性に関する検討

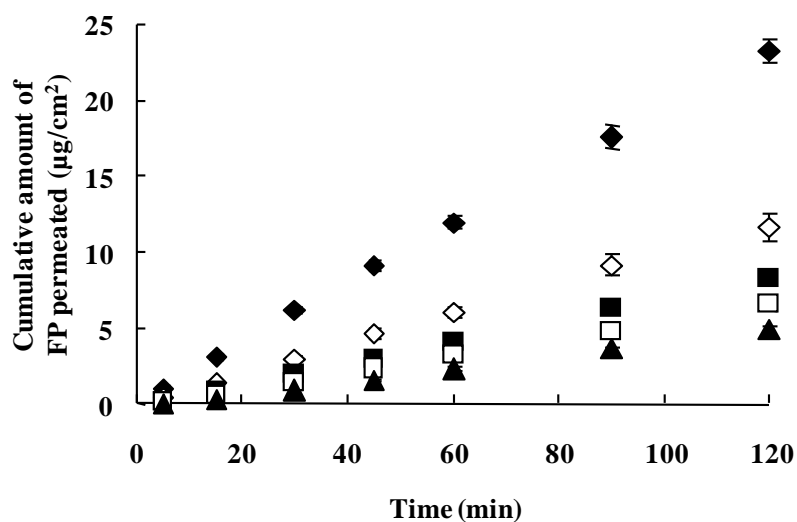
薬物や化学物質の皮膚透過において、多くの場合は角質層の透過が律速過程である。そのため、皮膚代替人工膜を用いた薬物の皮膚透過性評価は、多くの場合に角質層を想定した均質な疎水性の膜を用いており<sup>11,12,34,35</sup>、親水性の膜としての特徴を有する生きた表皮や真皮を想定した人工膜を用いた薬物の透過性評価は、ほとんど見受けられない<sup>10</sup>。しかしながら、皮膚における生理学的な反応は、血流や水分を欠く角質層よりも、生きた細胞や血流が存在する表皮—真皮等において重要と考える。したがって、血流や生理学的な変化を反映した *in vitro* 人工膜透過実験系の構築には、角質層を想定した膜に加えて、表皮—真皮を想定した膜および血管を想定した細管を構成要素とすることが必要であると考えられる。人工膜を積層し膜間へ血管モデルである細管を挿入することで血流が存在する真皮モデルを構築した。

本章では、人工膜積層皮膚モデルの構築を目的とし、第 1 節では、角質層下の生きた表皮—真皮層モデルとして選択した透析膜 (Molecular weight cut off (MWCO) 1 kDa) の積層による、FP 膜透過性への影響を評価した。第 2 節では、角質層モデルとして選択したシリコーン膜と透析膜を積層した複合積層膜の FP 膜透過性に及ぼす影響について評価した。第 3 節では、人工膜積層皮膚モデルの血管モデルおよび膜間の薬物濃度の測定のために選択したマイクロダイアリシスプローブ (プローブ) の FP 回収特性について評価した。第 4 節では、構築した人工膜積層皮膚モデルの定量性についてプローブ (血管モデル) およびレシーバーセル (皮下組織モデル) の各経路への FP の移行性について予測値および実測値の関係から評価した。

## 第 1 節 フルルビプロフェンの透析膜から成る単一積層膜透過性に及ぼす膜積層の影響

薬物の生体膜透過機構は、膜両側における薬物の濃度勾配を駆動力とする受動拡散と、輸送担体など膜の特殊な機構を利用する特殊輸送の 2 つに大別される。輸送担体を有さない人工膜を介した薬物の透過は、濃度勾配を駆動力とした受動拡散であり、定常状態に達した時の薬物の膜透過速度は Fick の第 1 法則に従う<sup>36)</sup>。そこで、まず人工膜積層皮膚モデルの積層透析膜における FP 膜透過性について評価した。まず、FP を等張リン酸塩緩衝液 (PBS、pH7.4) に溶解し 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製した溶液をドナーセルに適用し、1-5 枚の透析膜を積層した単一積層膜を横型拡散セル (拡散セル) に装着した。その累積透過量の経時的な変化を Fig. 6 に示す。Table 1 に単一積層膜における FP の実測透過係数ならびに (12) 式から求めた予測値を示す。透析膜の積層枚数に応じて透過係数に変化が生じた。(3) 式は、Fick の第 1 法則を膜透過速度  $F$  と透過係数  $P$  で表した式である。また、 $C_D$  は高濃度側の溶質濃度、 $C_R$  は低濃度側の溶質濃度、 $A$  は透過有効面積を表す。

$$F = P \times A \times (C_D - C_R) \dots (3)$$



**Fig. 6 Cumulative permeation profiles of FP through laminated dialysis membranes**

◆, Single dialysis membrane; ◇, Two dialysis membranes; ■, Three dialysis membranes; □, Four dialysis membranes; ▲, Five dialysis membranes. Data represent the mean±S.D. (n = 3).

**Table 1 Observed and predicted permeability coefficients of FP through single or laminated dialysis membranes**

Piled-membrane	Observed permeability coefficient (cm/min)	Predicted permeability coefficient (cm/min)
Single dialysis membrane	$3.76 \times 10^{-3} \pm 0.11 \times 10^{-3}$	-
Two dialysis membranes	$1.90 \times 10^{-3} \pm 0.17 \times 10^{-3}$	$1.88 \times 10^{-3} \text{ a}$
Three dialysis membranes	$1.39 \times 10^{-3} \pm 0.03 \times 10^{-3}$	$1.25 \times 10^{-3} \text{ a}$
Four dialysis membrane	$1.14 \times 10^{-3} \pm 0.10 \times 10^{-3}$	$0.94 \times 10^{-3} \text{ a}$
Five dialysis membranes	$0.87 \times 10^{-3} \pm 0.05 \times 10^{-3}$	$0.75 \times 10^{-3} \text{ a}$

a: Calculated using the observed value of the single dialysis membrane. Data represent the mean±S.D. (n=3).

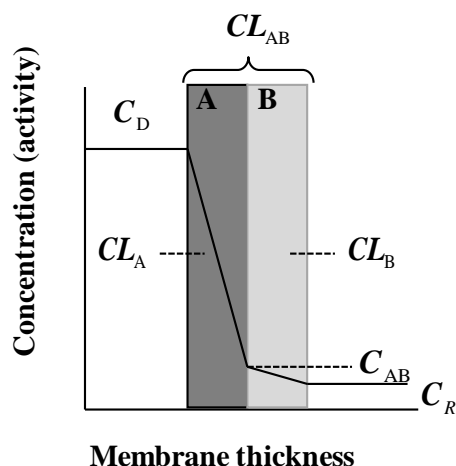


輸送担体を有さない人工膜を介した本実験における FP の膜透過は、受動拡散である。拡散とは無作為な分子の運動の結果としてある物質がある系のある部分から他の部分へ輸送される過程である<sup>33)</sup>。薬物膜透過クリアランスは、膜を介して輸送される薬物の透過速度をその濃度差、すなわち濃度勾配 ( $\Delta C$ ) で除したものであり、透過係数に膜透過に関わる透過有効面積を掛けたものと一致し (4) 式で表すことができる。

$$CL = \frac{F}{\Delta C}$$

$$= P \times A \dots (4)$$

Fig. 7 に、膜 A と膜 B を積層して作製された膜 AB によって、高濃度溶液と低濃度溶液が遮られ、溶質が膜 AB 内を受動拡散によって透過する場合の定常状態時の濃度 (活量) 勾配を表した模式図を示す。(5) 式のパラメータは、膜 A の膜透過クリアランスを  $CL_A$ 、膜 B の膜透過クリアランスを  $CL_B$ 、膜 A と膜 B をそれぞれ一枚ずつ積層した積層膜 AB の透過クリアランスを  $CL_{AB}$ 、高濃度溶液の濃度を  $C_D$ 、低濃度溶液の濃度を  $C_R$ 、膜 A と膜 B の界面における溶質濃度を  $C_{AB}$  とした。



**Fig. 7 Schematic diagram of concentration-distance profile for a laminated membrane**

定常状態時における膜間の薬物濃度  $C_{AB}$  と膜透過クリアランス  $CL$  の関係について考えた時、膜間における薬物の流入速度は、その流出速度と等しいことから (5) 式が成り立つ。

$$CL_A \times (C_D - C_{AB}) = CL_B \times (C_{AB} - C_R) \dots (5)$$

ここで、(5) 式についてシンク条件を仮定すると、 $C_R = 0$  が代入され、さらに、積層膜 AB に濃度  $C_D$  の溶液を適用した時の膜 A 中の透過速度は、膜 A に濃度  $C_D$  の溶液を適用した時のそれと等しく、さらに膜 B 中の透過速度は、膜 B に濃度  $C_{AB}$  の溶液を適用した時のそれと等しいため、式 (6)、(7) が成り立ち、これを  $CL_{AB}$  で表すと、(5) 式は以下の過程で(8) 式に整理される。

$$CL_{AB} \times C_D = CL_A \times (C_D - C_{AB}) \dots (6)$$

$$CL_{AB} \times C_D = CL_B \times C_{AB} \dots (7)$$

(6)、(7) 式より

$$\begin{aligned} CL_{AB} &= CL_A - CL_A \times \frac{C_{AB}}{C_D} \\ &= CL_A - CL_{AB} \times \frac{CL_A}{CL_B} \end{aligned}$$

よって

$$CL_{AB} = \frac{CL_A \times CL_B}{CL_A + CL_B} \dots (8)$$

ここで、(8) 式の逆数をとると(9) 式が得られる。

$$\frac{1}{CL_{AB}} = \frac{1}{CL_A} + \frac{1}{CL_B} \dots (9)$$

また、膜 AB に膜 C を積層した膜 ABC についても同様の手順により、(10) 式が得られる。

$$\frac{1}{CL_{ABC}} = \frac{1}{CL_A} + \frac{1}{CL_B} + \frac{1}{CL_C} \dots (10)$$

以下、同様の手順を繰り返すことにより、一般式として(11) 式が成り立つ<sup>37)</sup>。

$$\frac{1}{CL_{tot}} = \sum \frac{1}{CL_i} \dots (11)$$

さらに (4) 式より

$$\frac{1}{P_{\text{tot}}} = \sum \frac{1}{P_i} \quad \dots (12)$$

ここで式 (11) および (12) における、 $CL_{\text{tot}}$  および  $P_{\text{tot}}$  は積層膜の  $CL$ 、 $P$  であり、 $CL_i$  および  $P_i$  は積層膜を構成する各膜の  $CL$ 、 $P$  である。 $CL_{\text{tot}}$ 、 $P_{\text{tot}}$  がその構成要素である膜の積層順には依らないことを示すものでもある。また、本節において積層膜を構成する膜は、同一のものを使用したため各膜の  $CL$ 、 $P$  は同一であり、(11) 式は膜の積層枚数に応じた(13) 式で示される。

$$CL_{\text{tot}} = \frac{CL}{n} \quad \dots (13)$$

さらに、(4) 式より  $P$  で表すと

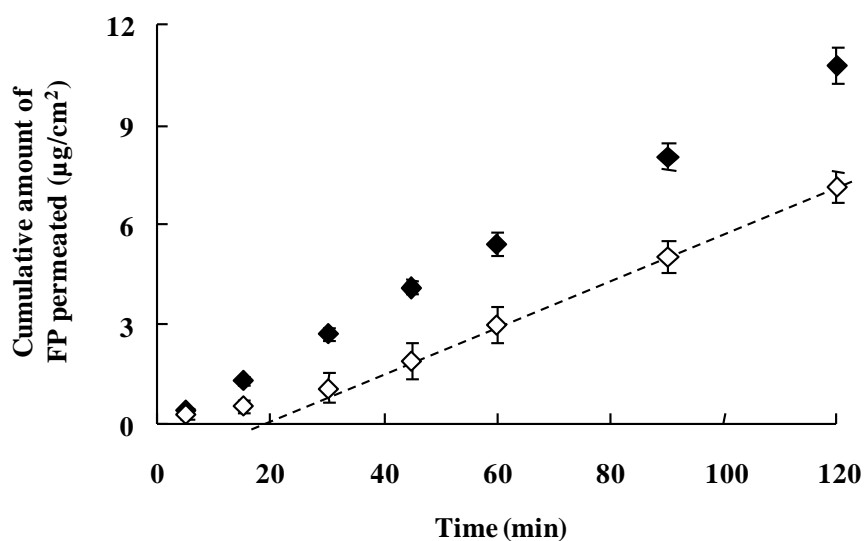
$$P_{\text{tot}} = \frac{P}{n} \quad \dots (14)$$

同一膜を積層した時の薬物膜透過係数は、積層した膜の枚数に反比例すると考えられ、Table 1 の実測値は、(14) 式から求められる値に近似した。このことから、単一積層膜を用いた薬物の膜透過では、透析膜の界面同士が近接している、もしくは膜間に存在する非攪拌水層の抵抗が透析膜を介した物質透過に対して無視しうる程度に小さいと考えられ、単一積層膜における薬物透過性は、(14) 式で表されるような基本的な拡散理論に従うことが示された。

## 第 2 節 フルルビプロフェンのシリコーン膜と透析膜から成る 複合積層膜透過性に及ぼす膜積層の影響

第 1 節にて皮膚角質層下に存在する生きた表皮—真皮を想定した親水性多孔膜、すなわち透析膜を介した薬物透過に対して透析膜のみから成る単一積層膜の薬物膜透過挙動は、基本的な拡散理論に従い膜間抵抗は無視できることが示された。しかしながら、疎水性と親水性を有する皮膚層構造を想定した積層膜の構築にあたり、薬物皮膚透過に重要な役割を担う角質層モデル、すなわち疎水性膜の存在は不可欠である。よって本節では、従来、ヒト皮膚や動物皮膚と薬物透過性の関係について評価されてきたシリコーン膜 (厚さ 50  $\mu\text{m}$ )、さらにはドナー側からシリコーン膜 1 枚および透析膜 4 枚からなる複合積層膜を拡散セルに設置し、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液をドナー溶液として適用し、FP 膜透過性について調べることで、FP 複合積層膜透過性に及ぼす異種膜の積層による影響を評価した。

Fig. 8 に複合積層膜における FP の累積透過量を、Table 2 にシリコーン膜および複合積層膜の FP 膜透過係数を示した。透過実験の定常状態時における回帰直線の x 軸切片から 20 分程度のラグタイムが、複合積層膜の透過に発生した。また、膜透過速度は、透過実験開始 1 時間後にほぼ一定となった。しかしながら、その値は、シリコーン膜 1 枚の透過速度に比べると若干の低下が確認され、さらに定常状態時の FP 膜透過係数は、(12) 式から得られる値に近似した。したがってシリコーン膜と透析膜の複合積層膜においても、薬物透過性が基本的な拡散理論に従うことが示された。



**Fig. 8 Cumulative permeation profiles of FP through the silicone membrane or with four dialysis laminated membranes**

◆, Single silicone membrane; ◇, Silicone membrane with four dialysis membranes. Data represent the mean±S.D. (n = 3).

**Table 2 Observed and predicted permeability coefficients of FP through single or with four dialysis laminated membranes**

Piled-membrane	Observed permeability coefficient (cm/min)	Predicted permeability coefficient (cm/min)
Single dialysis membrane	$3.76 \times 10^{-3} \pm 0.11 \times 10^{-3}$	-
Four dialysis membrane	$1.14 \times 10^{-3} \pm 0.10 \times 10^{-3}$	$0.94 \times 10^{-3}$ <sup>a</sup>
Single silicone membrane	$1.78 \times 10^{-4} \pm 0.08 \times 10^{-4}$	-
Silicone membrane with four dialysis membranes	$1.45 \times 10^{-4} \pm 0.16 \times 10^{-4}$	$1.54 \times 10^{-4}$ <sup>b</sup>

a: Calculated using the observed value of the single dialysis membrane.

b: Calculated using the observed value of the single silicone membrane and four dialysis membranes. Data represent the mean±S.D. (n=3).

### 第3節 マイクロダイアリシスプローブのフルルビプロフェン回収特性の評価

近年、皮膚適用製剤の薬物透過性評価にマイクロダイアリシス(MD)法が応用されている<sup>38)</sup>。このMD法は中枢神経系に関する研究を中心に発展してきた。そして、この中枢における技術が基となり、多くの臓器や組織に対して技術応用され、経皮吸収製剤の経時的な薬物皮膚移行性評価に用いられている。MD法とは、微細なチューブの一部に微小透析膜を備えたMDプローブ(プローブ)を生体組織や血管内などの目的部位に留置し、内部を透析液で低速灌流することにより、標的部位の外液中に存在する物質を経時的に回収する方法である。本節では、人工膜積層皮膚モデルの血管モデルであるプローブの薬物回収特性について評価した。第1項では灌流液中のウシ血清アルブミン(BSA)またはデキストラン(MW ~40000、Dex)が、プローブへのFP回収性に及ぼす影響、第2項では、積層透析膜間に設置したプローブのFP透過クリアランスについて評価した。

## 第 1 項 プローブへのフルルブプロフェン移行に及ぼす灌流液の速度および組成の影響

50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を満たした拡散セル間にプローブ (MWCO 50kDa) を挿入し、セル内をスターラーで十分に攪拌しながら、1、2、5、10、20 および 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  の範囲の灌流速度で PBS (pH 7.4)、5% BSA/PBS 溶液または 2% Dex/PBS 溶液を灌流した。Fig. 9 に実験系を示す。

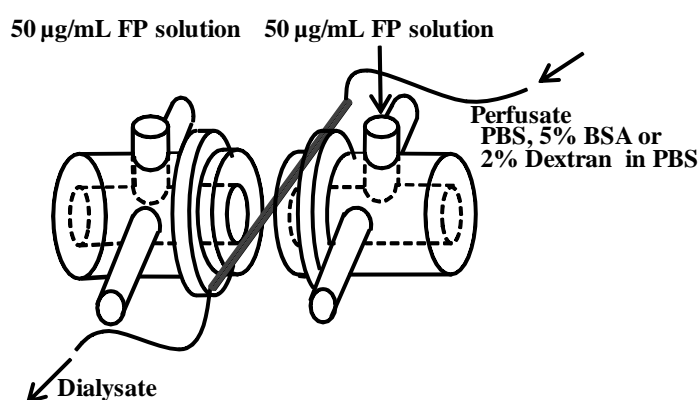
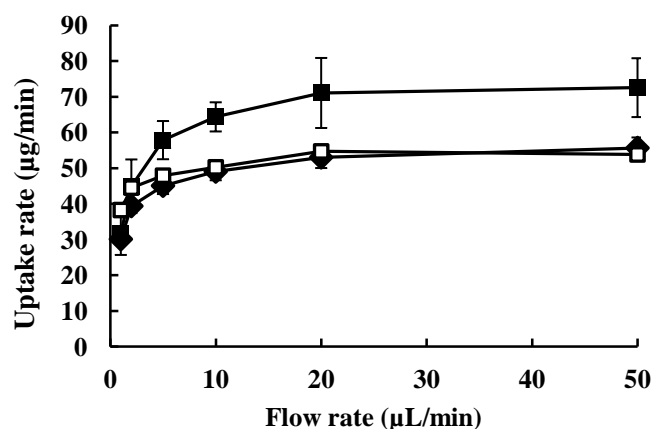


Fig. 9 Setup of the experimental system

Fig. 10 には各灌流速度におけるプローブへの FP 回収速度 (uptake rate : UR) を示す。UR は、プローブ末端からの流出液 (透析液) の FP 濃度  $C_o$  と灌流速度  $Q$  を用いた式 (15) より求めた。

$$UR = C_o \times Q \quad \dots (15)$$



**Fig. 10 Relationship between FP uptake rate and flow rate**

■, PBS; □, BSA (5%); ◆, Dextran (2%). Data represent the mean±S.D. (n = 3).

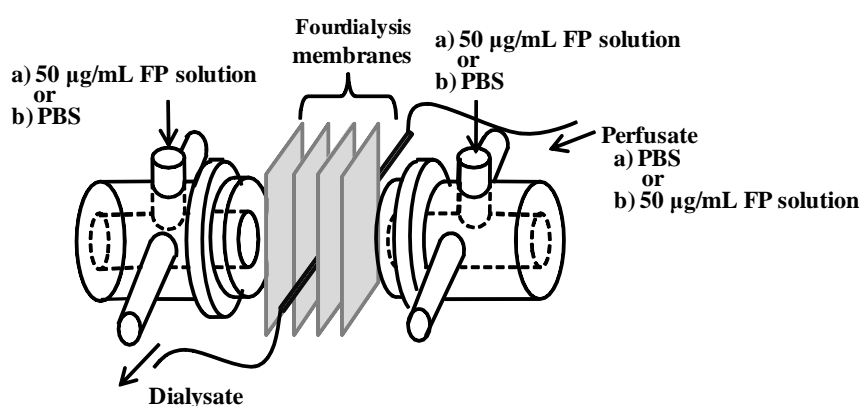
プローブへのFP回収速度は、灌流速度1 - 10 µL/minにおいて速度上昇に伴って増加した一方で、灌流速度10 - 50 µL/minにおいて速度上昇に伴う回収速度変化は、確認されなかった。その一定となった回収速度は、PBSを灌流した系に対して5% BSA/PBS溶液および2% Dex/PBS溶液を灌流した系で低下した。また、5% BSA/PBS溶液と2% Dex/PBS溶液を比較した際に一定となった回収速度は、組成による顕著な差を認められなかった。ここで、BSAやDexの添加による膠質浸透圧が、プローブへのFP移行に影響を及ぼすのであれば、その回収速度は、FP溶液のプローブ内への移動のために上昇すると考えられる。また、BSAとFPのタンパク結合が回収速度へ影響を及ぼすと仮定した場合、灌流液中の非結合型FP濃度は、BSA-FP結合によって低下し、回収速度の上昇が生じると考えられる。しかしながら、回収速度はPBSの灌流に比べて5% BSA/PBS溶液や2% Dex/PBS溶液の灌流によって同程度の低下を示した。このことから、PBS灌流液へのBSAやDex添加は、プローブへのFP回収速度に影響を及ぼさないことが考えられる。そして、BSAやDexの添加による灌流液の粘度の増加が、回収速度の低下という影響を及ぼしたと考えられる(5% BSA/PBS溶液; 1.41 mPa·s、2% Dex/PBS溶液; 1.39 mPa·s)。また、灌流速度の変化に対する応答から、流速が10 µL/min未満においてセル内とプローブ内のFPがシンク状態ではないことが考えられる一方で、一定の回収速度が



観察された流速  $10 \mu\text{L}/\text{min}$  以上においてセル内とプローブ内の FP がシンク状態に保たれていることが考えられた。

## 第 2 項 プローブのフルルビプロフェン回収クリアランスの検討

血管モデルが存在する人工膜積層皮膚モデル構築において、薬物回収部分にあたるプローブ微小透析膜に対する FP の透過性について評価した。積層した 4 枚の透析膜の 2 - 3 枚間にプローブを挿入し、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を両セルに適用し、プローブに PBS を灌流する系 (FP の移行方向: プローブ外 $\rightarrow$ 内) と PBS を両セルに適用し、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を灌流する系 (FP の移行方向: プローブ内 $\rightarrow$ 外) の両方向の FP プローブ膜透過クリアランス、すなわち FP 移行クリアランスを求めた。Fig. 11 に実験系を示す。



**Fig. 11 Setup of the experimental system**

The direction of the FP migration was from the outside to inside of the MD probe (a) or from inside to outside (b).

灌流速度 1、2、5、10、20 および 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  におけるプローブ透析膜の FP 移行クリアランスを検討した。FP の移動がプローブ外 $\rightarrow$ 内の系において、プローブ内の灌流速度  $Q$ 、両セルの FP 濃度を  $C_c$ 、プローブ末端からの透析液の FP 濃度を  $C_o$  とすると、透析膜間に設置したプローブの FP 回収クリアランス ( $CL_{\text{probe}}$ ) の関係は、(16) 式のように表される<sup>39)</sup>。

Direction = outside to inside;

$$\ln \left[ 1 - \frac{C_o}{C_c} \right] = -CL_{\text{probe}} \times \frac{1}{Q} \quad \dots (16)$$

一方、プローブ内→外の系では、回収方向と逆方向で評価することになるが、流入する灌流液の FP 濃度を  $C_i$  とすると、プローブの FP 回収クリアランスの関係が (17) 式で示すように表される<sup>39-41)</sup>。

Direction = inside to outside;

$$\ln \left[ \frac{C_o}{C_i} \right] = -CL_{\text{probe}} \times \frac{1}{Q} \quad \dots (17)$$

ここで、(16)、(17) 式を  $CL_{\text{probe}}$  で表すと (18)、(19) 式となる。

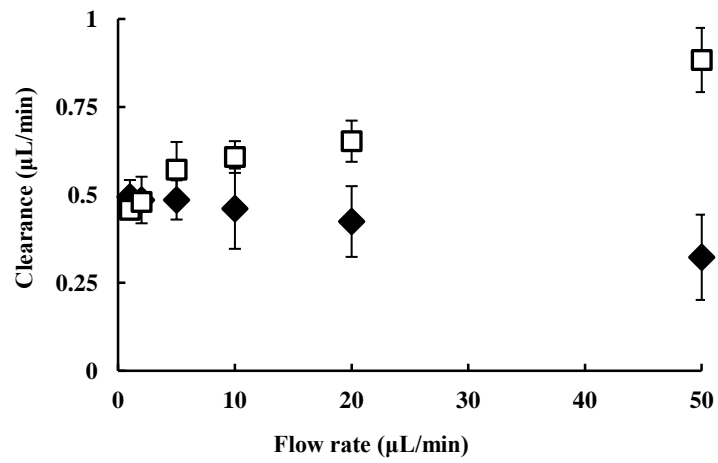
Direction = outside to inside;

$$CL_{\text{probe}} = \ln \left[ 1 - \frac{C_o}{C_c} \right] \times (-Q) \quad \dots (18)$$

Direction = inside to outside;

$$CL_{\text{probe}} = \ln \left[ \frac{C_o}{C_i} \right] \times (-Q) \quad \dots (19)$$

Fig. 12 に、灌流速度と (18)、(19) 式から得られるプローブの FP 回収クリアランスの関係を示した。プローブ外→内の FP 回収クリアランスは、灌流速度 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  以上で減少し、プローブ内→外の FP 回収クリアランスは増加した。これは、プローブ内の圧力がプローブ灌流速度の上昇に伴って上昇することにより灌流液が速度 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  以上でプローブ内から透析膜間へ漏出することが考えられる。そのため、プローブ外→内の回収クリアランスは、灌流速度の上昇に伴って漏出する溶液の流体抵抗が FP の透析膜間への移動を妨害し、減少したと考えられる。一方、プローブ内→外の回収クリアランスは、灌流液の透析膜間への漏出に伴って FP もプローブ内から透析膜間へより多く移動、すなわち溶媒牽引による移動のために上昇したと考えられる。



**Fig. 12 Effect of perfusion rate in microdialysis probe on the permeation clearance of FP**

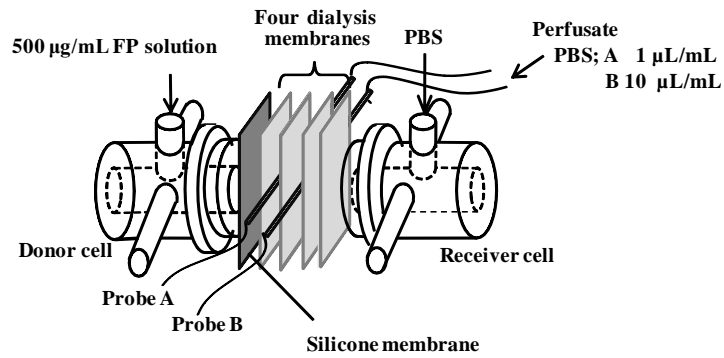
◆, values calculated using Eq. 18, outside to inside; □, values calculated using Eq. 19, inside to outside. Data represent the mean±S.D. (n = 3).

## 第 4 節 人工膜積層皮膚モデルの定量性の評価

本章第 1 節から第 3 節にかけて人工膜積層皮膚モデルの構成要素における FP 移行特性について検討した。本章第 1 節および第 2 節において、定常状態時の FP の複合積層膜の透過性が、Fick の第 1 法則に従うことを示した。また、第 3 節において血管モデルとしたプローブへの FP 移行性は、プローブ灌流速度による影響を受けることを示した。そこで、FP の膜透過クリアランス値およびプローブ微小透析膜部の FP 回収クリアランス値を用いて、人工膜積層皮膚モデルの FP の定量性を評価した。

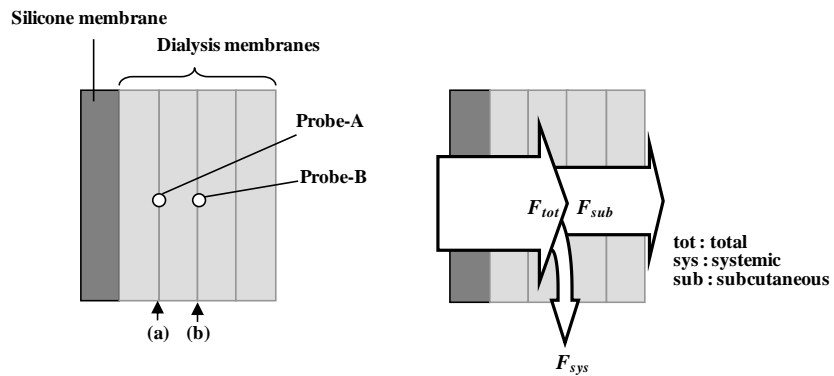
人工膜積層皮膚モデルは、角質層モデルとしてシリコーン膜、角質層下の生きた表皮-真皮層モデルとして透析膜、局所薬物濃度測定にプローブ（プローブ A：MWCO 50kDa、灌流速度 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ ）、血管モデルにプローブ（プローブ B：MWCO 50kDa、灌流速度 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ）を積層することで構築した。前節よりプローブ B の灌流速度は、プローブ内をシンク状態に保ち、FP の回収クリアランスに影響を及ぼさない 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  とした。500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液をドナーセルへ適用後、レシーバーセルおよびプローブ B への FP 移行動態を評価した。Fig. 13、14 に実験系を示す。本節第 1 項では、膜間濃度測定機能を担うプローブ A から得られる情報の定量的評価について、本節第 2 項では、人工膜積層皮膚モデル全体の定量性の評価について検討を行った。

本研究では、FP のレシーバーセルへの透過を皮下組織への薬物透過、プローブ B への回収を全身循環への薬物移行とみなした。また、定常状態時の膜間 (b) への FP の流入速度 ( $F_{\text{tot}}$ ) と流出速度は等しいことから (20) 式が成り立つ。



**Fig. 13 Setup of the laminated model skin system**

The laminated system was mounted in the diffusion cell, and the probes were perfused using a syringe pump.



**Fig. 14 Schematic diagram of the laminated model skin system**

A silicone membrane (the model stratum corneum) and four dialysis membranes (the model of the viable skin layer) were laminated, and microdialysis probes were placed in (a) and (b).

$$F_{\text{tot}} = F_{\text{sys}} + F_{\text{sub}} \quad \dots (20)$$

## 第 1 項 薬物濃度測定プローブから得られる情報の定量的評価

人工膜積層皮膚モデルにおける定量性の評価として、プローブ A 末端からの透析液の FP 濃度から、膜間 (a) の FP 濃度を zero net flux (ZNF) 法を用いて測定した。ZNF 法は、MD 法の定量的評価法の 1 つで、目的とする溶質を種々の濃度で灌流液に添加し灌流し、初期の添加濃度が変化しない濃度を標的部位の溶質濃度とする方法である<sup>40,42-44</sup>)。Table 3 にプローブ A の灌流タイムスケジュールと測定された濃度の実測値を示す。

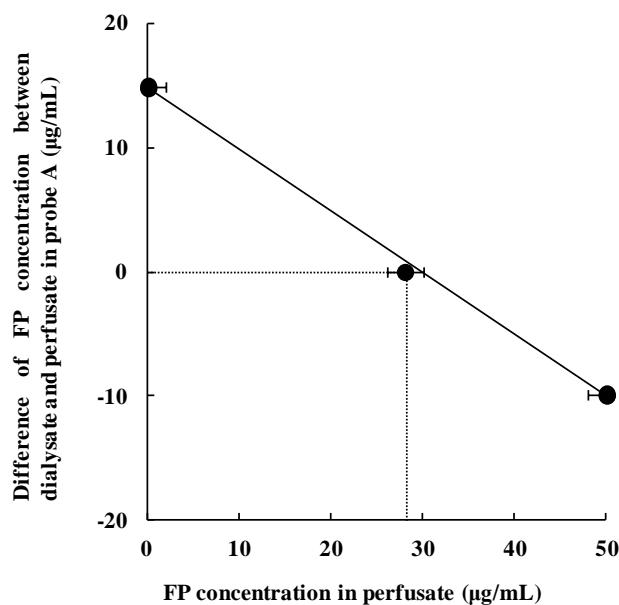
**Table 3 Procedure for determination of FP concentration between the membrane inserted with probe A and the results in the ZNF method**

	Time (min)	Flow rate ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Inflow ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Outflow ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\Delta$ Inflow ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Step 1	0-30	-	-	-	-
Step 2	30-60	1	0	-	-
Step 3	60-90	1	0	14.8 $\pm$ 0.8	14.8 $\pm$ 0.8
Step 4	90-120	-	-	-	-
Step 5	120-150	1	50	-	-
Step 6	150-180	1	50	40.1 $\pm$ 1.4	-9.9 $\pm$ 0.6
Step 7	180-210	-	-	-	-
Step 8	210-240	1	28 $\pm$ 2	-	-
Step 9	240-270	1	28 $\pm$ 2	28.1 $\pm$ 0.4	0.1 $\pm$ 0.4

Data represent the mean $\pm$ S.D. (n = 3).

Table 3 の step 2、3 において FP 濃度 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の PBS を、step 5、6 において膜間 (a) の予測濃度よりも高い 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液をプローブ A に灌流した。Fig. 15 に ZNF 法における灌流液の濃度および透析液と灌流液の濃度差の関係を示す。膜間 (a) の FP 予測濃度は、透析液 FP 濃度と灌流液 FP 濃度の差から 27.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と予測された。そこで、step 8、9 において 28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を灌流した。その結果、プローブ A 末端からの透析液中の FP 実測濃度は、28.1 $\pm$ 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で

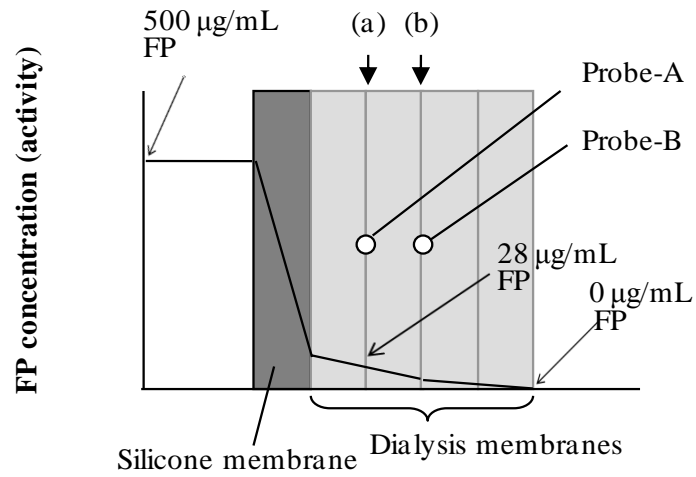
あり、灌流液の初期 FP 濃度と等しい値を示した。以上より、膜間 (a) における FP 予測濃度と実測濃度の近似性から ZNF 法から得られる膜間 FP 濃度の妥当性が示された。すなわち、人工膜積層皮膚モデルにおいて、プローブ A を用いた膜間の薬物濃度の定量性が示された。Fig. 16 には予測された膜間 (a) の FP 濃度を模式的に示す。



**Fig. 15 Relationship between FP concentration in inflow and concentration difference of FP (dialysis-perfusate) in the ZNF method**

Data represent the mean $\pm$ S.D. (n = 3).





**Fig. 16 Schematic diagram for predicted FP concentration-distance profile in the laminated model skin system**

## 第 2 項 人工膜積層皮膚モデル実験系の定量性の評価

人工膜積層皮膚モデルの定量性の評価の 1 つとして、ドナーセルへ適用された FP のレーザーセルとプローブ B への移行率の予測値と実測値を比較した。

まず、FP の予測移行率を求めた。血管を介した全身循環への FP 移行とみなしたプローブ B への予測移行率 ( $R_{\text{sys-pre}}$ ) および皮下組織への透過とみなしたレーザーセルへの予測移行率 ( $R_{\text{sub-pre}}$ ) を、プローブ B への FP 回収クリアランスおよび透析膜の FP 透過クリアランスから算出した。プローブ B への回収クリアランスを全身循環への移行クリアランス ( $CL_{\text{sys}}$ ) として、また、透析膜透過クリアランスを皮下組織への移行クリアランス ( $CL_{\text{sub}}$ ) として、(21) および (22) 式より求めた。

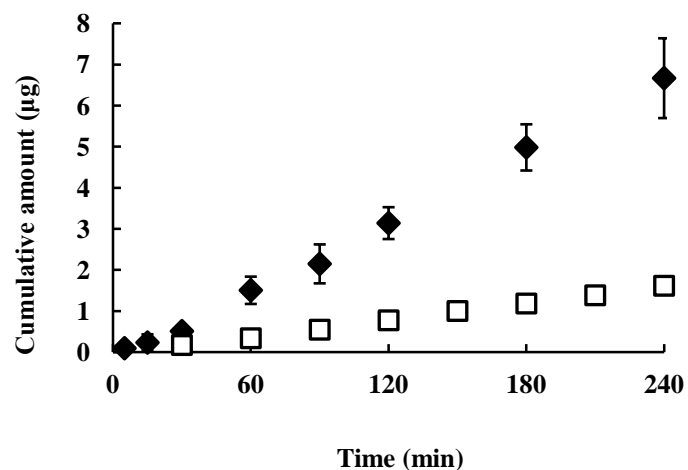
$$R_{\text{sys-pre}} = \frac{CL_{\text{sys}}}{CL_{\text{sys}} + CL_{\text{sub}}} \times 100 \quad \dots (21)$$

$$R_{\text{sub-pre}} = \frac{CL_{\text{sub}}}{CL_{\text{sys}} + CL_{\text{sub}}} \times 100 \quad \dots (22)$$

定常状態時のプローブ B への FP 回収クリアランス、すなわち全身循環への移行クリアランス ( $CL_{\text{sys}}$ ) は、本章第 3 節からプローブ外→内の FP 回収クリアランスの灌流速度 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  における値 (0.49 $\pm$ 0.04  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) を用いた。Fig. 14 の膜間 (b) とレーザーセル間の 2 枚の積層透析膜透過クリアランス ( $CL_{2\text{DM}}$ )、すなわち皮下組織への FP 移行クリアランス ( $CL_{\text{sub}}$ ) は、透析膜 1 枚のクリアランス ( $CL_{1\text{DM}}=3.49$   $\mu\text{L}/\text{min}$ ) および式 (13) より求めた。その結果、 $CL_{\text{sub}}$  は 1.75 $\pm$ 0.13  $\mu\text{L}/\text{min}$  であった。(21) および (22) 式より求められた全身循環ならびに皮下組織への予測移行率は、 $R_{\text{sys-pre}} = 21.9\%$ 、 $R_{\text{sub-pre}} = 78.1\%$  であった。

続いて実測移行率の測定を行った。Fig. 17 に人工膜積層皮膚モデルにおけるレーザーセルとプローブ B への FP 累積移行量を示す。プローブ B への FP の実測移行率 ( $R_{\text{sys-obs}}$ ) およびレーザーセルへの実測移行率 ( $R_{\text{sub-obs}}$ ) は、透過実験の 120 - 240 分値の FP の実測移行速度 ( $F_{\text{sys-obs}} = 7.0\pm 0.7$   $\text{ng}/\text{min}$ 、 $F_{\text{sub-obs}} = 29.4\pm 8.4$   $\text{ng}/\text{min}$ ) を用いて (23) お

よび (24) 式より求めた。その結果、全身循環ならびに皮下組織への実測移行率は、 $R_{\text{sys-obs}} = 80.5 \pm 3.2\%$ 、 $R_{\text{sub-obs}} = 19.2 \pm 3.2\%$ であった。



**Fig. 17. FP transport in the laminated model skin system**

◆, transport to the receiver cell (hypothetical subcutaneous transport); □, transport via probe B (hypothetical systemic absorption). Data represent the mean±S.D. (n = 3).

$$R_{\text{sys-obs}} = \frac{F_{\text{sys}}}{F_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{F_{\text{sys}}}{F_{\text{sys}} + F_{\text{sub}}} \times 100 \quad \dots (23)$$

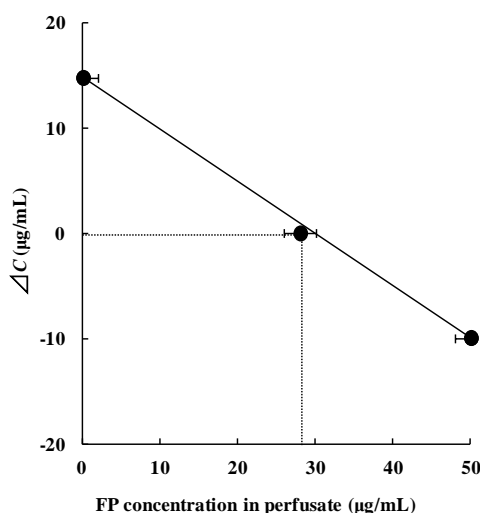
$$R_{\text{sub-obs}} = \frac{F_{\text{sub}}}{F_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{F_{\text{sub}}}{F_{\text{sys}} + F_{\text{sub}}} \times 100 \quad \dots (24)$$

**Table 4 Evaluation of systemic and subcutaneous uptake in the lamindeted model skin system**

	$R_{\text{sys}}$ (%)	$R_{\text{sub}}$ (%)
Predicted value	21.9	78.1
Observed value	$19.2 \pm 3.2$	$80.5 \pm 3.2$

Table 4 に各経路への移行率の予測値および実測値を示す。膜透過およびプローブクリアランスから算出した予測移行率と透過実験の透過速度から算出した実測移行率は、よく一致した。

本実験モデルの妥当性をさらに検証するため、 $F_{\text{tot-cal}}$ 、 $F_{\text{sys-cal}}$  を ZNF 法から推定される膜間濃度  $C$  (a) と、FP の透析膜透過速度および透析膜透過クリアランスから推定される膜間濃度  $C$  (b) から算出し移行率を計算した。透過実験の間、プローブ A に灌流液を Table 2 のタイムスケジュールで灌流し、灌流液初期濃度と透析液濃度が等しくなる値を求めた。Fig. 18 に ZNF 法における灌流液の濃度および透析液と灌流液の濃度差の関係を示す。



**Fig. 18 Relationship between FP concentration in inflow and concentration difference of FP ( $\Delta C$ ) in the ZNF method**

この実験結果から  $C$  (a) = 28  $\mu\text{g/mL}$  が得られた。本章第 1 節および第 2 節より、定常状態時の FP の積層膜の透過性は、Fick の第 1 法則に従うこと示した<sup>37)</sup>。このことから膜間濃度  $C$  (b) は  $F_{\text{sub-obs}}$  と  $CL_{2\text{DM}}$  の間に (25) 式の関係が成り立ち、 $C$  (b) = 16.8  $\mu\text{g/mL}$  であった<sup>45)</sup>。

$$C_{(b)} = \frac{F_{\text{sub-obs}}}{CL_{2\text{DM}}} \quad \dots (25)$$

また、膜間 (b) への FP の予測流入速度 ( $F_{\text{tot-pre}}$ ) は、 $CL_{1\text{DM}}$  と膜間濃度  $C$  (a) と  $C$  (b) の間に (26) 式の関係が成立する。さらに、 $F_{\text{sys}}$  の

予測値 ( $F_{\text{sys-pre}}$ ) は、FP のプローブへの薬物回収クリアランスと膜間濃度  $C$  (b)を用いた (27) 式から算出した。これらの値を用いて求められる検証移行率  $R_{\text{sys}}$  ( $R'_{\text{sys-cal}}$ ) は (28) 式から算出した。

$$F_{\text{tot-pre}} = CL_{1\text{DM}}(C_{(a)} - C_{(b)}) \quad \dots (26)$$

$$F_{\text{sys-pre}} = CL_{\text{probe}} \times C_{(b)} \quad \dots (27)$$

$$R'_{\text{sys-pre}} = \frac{F_{\text{sys-pre}}}{F_{\text{tot-pre}}} \times 100 \quad \dots (28)$$

Table 5 に FP の各移行速度および予測移行率を示す。(28) 式より得られた全身循環への移行とみなしたプローブ B への FP 検証移行率は、その実測値 (Table 3) とよく一致した。以上より、人工膜積層皮膚モデルにおける薬物膜透過挙動が、基本的な拡散理論に従い、本モデルが薬物の各経路への移行を定量的に評価可能なモデルであることを示した。

**Table 5 Prediction of systemic uptake ( $R'_{\text{sys}}$ ) in the laminated model skin system**

$F_{\text{tot-pre}}$ (ng/min)	$F_{\text{sys-pre}}$ (ng/min)	$R'_{\text{sys-pre}}$ (%)
39.6	8.3	20.9

## 第 5 節 小括

本章ではまず、1 節、2 節にて透析膜を積層することで FP の膜透過挙動に及ぼす影響を評価した。その結果、膜の積層枚数に応じた膜透過クリアランスの変化が観察された。第 3 節では、プローブ透析膜の FP 透過挙動を、灌流速度の変化および灌流液への BSA もしくは Dex の添加による影響について評価した。その結果、灌流速度 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  以上の条件下でシンク状態であること、また、プローブ透析膜の FP 回収クリアランスは、灌流液の膠質浸透圧やタンパク結合の影響を受けないことが示された。さらに、灌流速度 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  を超えるとプローブ内圧も上昇し、灌流液の透析膜間中への漏出によりプローブ透析膜の FP 回収クリアランスが影響を受けることが示された。第 4 節では積層透析膜およびプローブ微小透析膜のクリアランスの値を用いて、血管モデルが存在する人工膜積層皮膚モデルの定量性を評価した。その結果、薬物膜透過挙動は基本的な拡散理論に従い、人工膜積層皮膚モデルは FP の模擬全身循環および模擬皮下組織への移行動態を定量的に評価できることを示した。

### 第 3 章 炎症病変を模倣した人工膜積層皮膚モデルによるフルルビ プロフェンの皮内動態の検討

第 2 章において人工膜積層皮膚モデルにおける FP 膜透過性が、基本的な拡散理論に従うこと、さらには人工膜積層皮膚モデルが各経路への FP 移行性を定量的に評価し得るモデルであることを示した。炎症時の皮膚では、毛細血管の血流速度変化や、血管透過性亢進による血漿や血漿タンパク質等の血管外滲出が生じることが報告されている<sup>42)</sup>。本人工膜積層皮膚モデルにおいて皮膚局所の血流変化や炎症等を模倣することにより、炎症の種々因子による薬物皮内動態に与える影響を再現し得るか検討した。第 1 節において、人工膜積層皮膚モデルを用いて皮膚の炎症に伴う種々因子が FP の皮内動態に及ぼす影響について検討した。さらに、第 2 節では、タンパク結合の阻害時と非阻害時の皮下組織への FP 移行性について検討した。

## 第 1 節 皮膚浮腫におけるフルルビプロフェン皮内動態の評価

第 1 項では、皮膚浮腫の形成による FP 皮内動態への影響を、第 2 項では、毛細血管の血流変化による FP 皮内動態への影響を、第 3 項では毛細血管の血管透過性変化による FP 皮内動態への影響を、さらに第 4 項では血漿もしくは血漿タンパク質滲出による FP 皮内動態への影響を、それぞれの病変条件を人工膜積層皮膚モデルに反映し検討した。



## 第 1 項 皮内動態に及ぼす血管外滲出した血漿タンパク質の影響

炎症皮膚において血管透過性の亢進や血流速度の上昇により、血漿タンパク質が組織細胞間質中へ滲出し、浮腫が形成されることを第 1 章で明らかにした<sup>46,47)</sup>。そこで、組織に滲出した血漿タンパク質の存在を模倣するため、人工膜積層皮膚モデルの積層透析膜間に FP と結合性の高い 5% BSA/PBS 溶液を注入し、それに伴う FP 移行動態の変化を評価した<sup>31)</sup>。Fig. 19 および 20 に実験系を示す。5% BSA/PBS 溶液を、プローブ B が存在する膜間 (b) にあらかじめ 20  $\mu$ L 注入した。

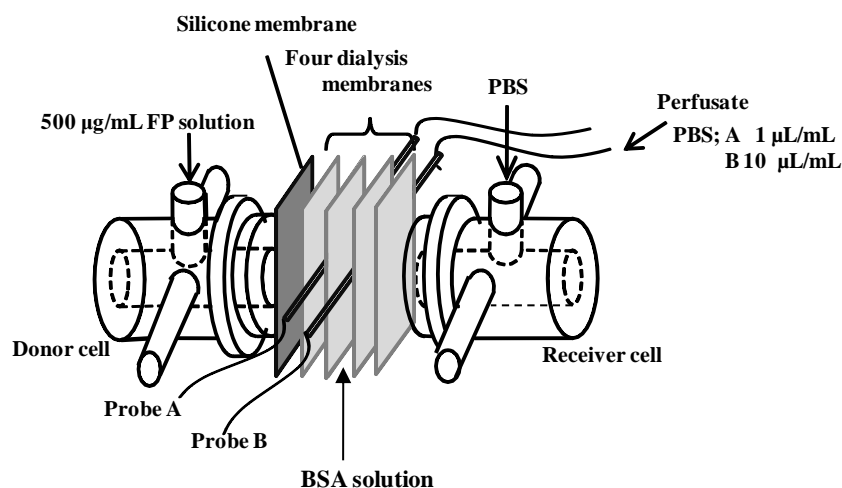
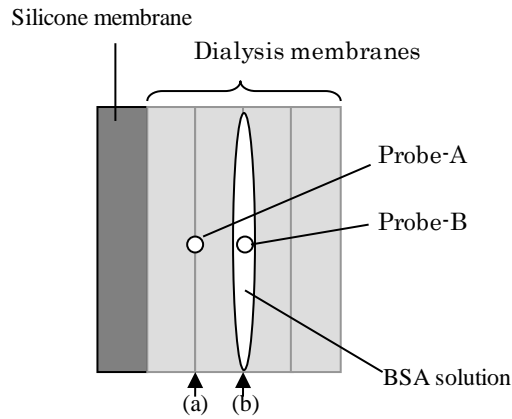
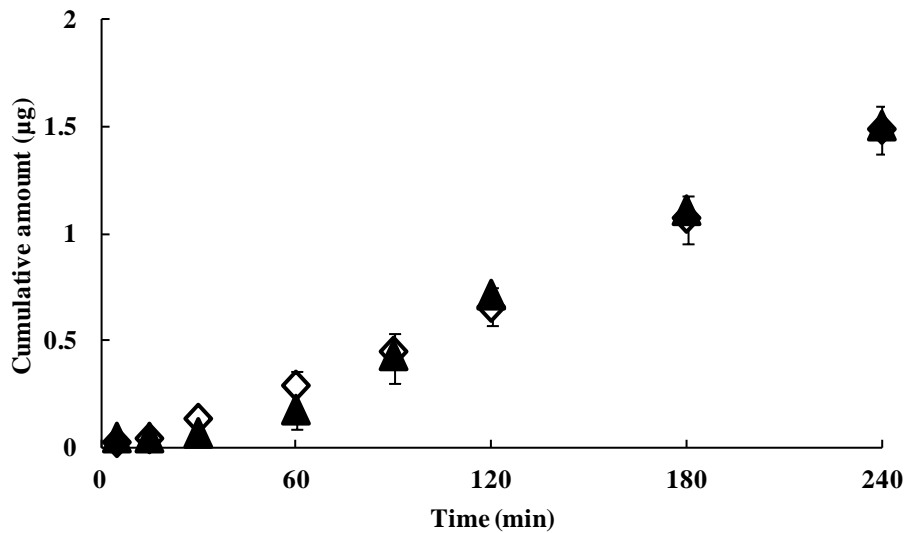


Fig. 19 Setup of the laminated model skin system



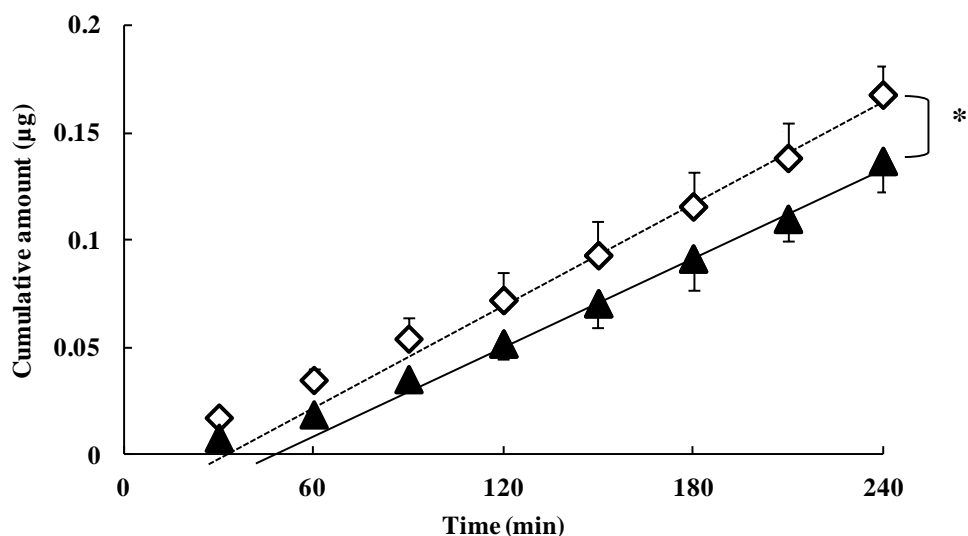
**Fig. 20 Schematic diagram of the laminated model skin system**

積層膜間に 5% BSA/PBS 溶液挿入時のレシーバーセルへの FP 累積透過量を Fig. 21 に示し、プローブ B への FP 累積移行量を Fig. 22 に示す。定常状態の回帰直線の傾きから回収速度、また、その直線と x 軸の交点からラグタイムを算出した。



**Fig. 21 Effect of BSA solution placed in the laminated model skin system on the FP permeation to the receiver cell**

◇, PBS; ▲, 5% BSA solution. Data represent the mean±S.D. (n = 3).



**Fig. 22 Effect of BSA solution placed in the laminated model skin system on the FP uptake into probe B**

◇, PBS; ▲, 5% BSA solution. Data represent the mean±S.D. (n = 3).  
\* $p < 0.05$

FPのプロープ B およびレシーバーセルへの回収速度ならびに各経路への移行率を Table 6 に示す。レシーバーセルへの移行は 5% BSA/PBS 溶液の注入により若干の遅延が生じたが、その膜透過速度や累積透過量に顕著な変化を認めなかった。一方、血管モデルプロープ B への FP 移行性は、5% BSA/PBS 溶液の注入により、ラグタイムがおおよそ 31 分から 48 分と延長し、さらに累積回収量が顕著に低下した。これは、透過実験初期において、膜間へ透過した FP が透析膜間の BSA に結合し非結合型 FP が減少したためと考えられる。このような全身循環への FP の吸収低下は、第 1 章での浮腫を呈した皮膚における経皮吸収動態 (Fig. 5-pre) においても認められた。

**Table 6 Effect of BSA solution placed in the laminated model skin system on the systemic uptake of FP**

	$F_{\text{sys}}$ (ng/min)	$F_{\text{sub}}$ (ng/min)	$R_{\text{sys-obs}}$ (%)
PBS	0.8±0.2	6.1±0.8	12.1±1.5
5% BSA/PBS	0.7±0.1	6.3±0.2	9.9±1.4*

\* $p < 0.05$  vs PBS

## 第 2 項 皮内動態に及ぼす血管透過性亢進の影響

炎症時、皮膚中の血管透過性は亢進し血管内を流れる血液成分が組織に滲出する<sup>31,46)</sup>。そこで、血管透過性の変化を人工膜積層皮膚モデルで模倣するため、微小透析膜の MWCO が異なるプローブを透析膜間へ挿入し FP 移行動態への影響を評価した。MD 法に用いる一般的なプローブは遊離の薬物を回収するため MWCO は 20 - 50 kDa 程度である。また、ペプチドやタンパク質を回収可能な 200 kDa 以上のものもある<sup>48)</sup>。しかし、血漿や血漿タンパク質の血管から組織への移行を模倣する場合、より大きい MWCO を有するプローブが求められる。さらに孔径を広げたプローブを利用すると、その背圧により灌流液が膜間へ漏出してしまふ。この灌流液の漏出による FP のプローブへの移行低下を排除するため、通常の push 式ポンプに加えて、低パルス型の pull 式ローラーポンプを併用した<sup>49)</sup>。膜間濃度測定用として第 1 項で挿入した再生セルロース製の MWCO 50 kDa のプローブを、透過性亢進血管モデルとしてポリエチレン製の MWCO 1000 kDa のプローブを膜間へ挿入した<sup>50)</sup>。本項以降、血管モデルとして MWCO 1000 kDa のプローブを用いた。プローブ B の灌流速度は 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  とし PBS を灌流した。各経路への移行率は、予め求めた MWCO 1000 kDa プローブの微小透析膜透過クリアランス ( $0.59 \pm 0.04 \mu\text{L}/\text{min}$ ) を用いて、人工膜積層皮膚モデルのドナーセルへ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を適用した定常状態時のプローブ B への回収速度およびレシーバーセルへの透過速度から算出した。Table 7 に灌流速度ごとの FP の各経路への実測移行速度およびプローブ B への実測移行率と (28) 式から求められた予測移行率を示す。プローブ B への FP 移行率は、MWCO 1000 kDa のプローブの方が 50 kDa に比べ高く、その値は予測値とよく一致した。このことから、生体での皮膚中の血管透過性亢進による全身循環への FP 移行上昇を、人工膜積層皮膚モデルにおいて再現できたと考えられる。

**Table 7 Effect of the MWCO of MD probe B on the systemic absorption and migration to subcutaneous tissues in the laminated model skin system**

MWCO (kDa)	$F_{sys}$ (ng/min)	$F_{sub}$ (ng/min)	$R_{sys-obs}$ (%)	$R'_{sys-pre}$ (%)
50	$7.0 \pm 0.7$	$29.4 \pm 8.4$	$19.2 \pm 3.2$	20.9
1000	$11.0 \pm 1.1$	$31.1 \pm 3.1$	$26.3 \pm 3.4^*$	25.1

\* $p < 0.05$  vs MWCO 50 kDa

### 第 3 項 皮内動態に及ぼす血流速度変化の影響

炎症部位へ供給される血流量は、皮膚で炎症が起こるとブラジキニンやプロスタグランジンなどのケミカルメディエーターの作用による細動脈の拡張のため増加し、その結果、血流速度が上昇する<sup>51)</sup>。そこで、血流速度の変化を模倣するため灌流液の灌流速度の変化によって人工膜積層皮膚モデルにおいて再現を試みた。すなわち、血管モデルプローブ B の灌流液を 2、5 もしくは 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  の速度で灌流させ、それに伴う FP の各経路への移行動態を評価した。各経路への移行率は、人工膜積層皮膚モデルのドナーセルへ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を適用し定常状態時のプローブ B への回収速度およびレシーバーセルへの透過速度から算出した。Table 8 に (18) 式より求めた移行率の予測に必要とする、MWCO 1000 kDa プローブの微小透析膜透過クリアランスを示し、Table 9 に灌流速度ごとの FP の各経路への実測移行速度およびプローブ B への実測移行率と (28) 式から求められた予測移行率を示す。

**Table 8 Relationship between flow rate and clearance using MWCO 1000 kDa MD probe**

Flow rate ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Clearance ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )
2	$0.53 \pm 0.04$
5	$0.56 \pm 0.05$
10	$0.59 \pm 0.04$

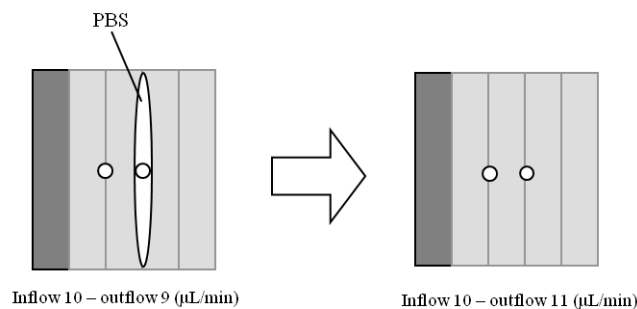
灌流速度が 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  と低速の場合では、血管モデルへの FP 移行率が 5、10  $\mu\text{L}/\text{min}$  と比較して若干低い値を示した。しかしながら血管モデルへの FP 実測移行率は、灌流速度間で明らかな差を認められず、さらにクリアランスから算出した予測移行率と高い一致性を示した。以上の結果から、人工膜積層皮膚モデルは、灌流速度 2 - 10 $\mu\text{L}/\text{min}$  の間では、灌流速度の変化に対する FP の移行動態に関する検出力は小さいと考えられる。

**Table 9 Effect of flow rate on the systemic absorption and migration to subcutaneous tissues in the laminated model skin system**

Flowrate ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	$F_{\text{sys}}$ (ng/min)	$F_{\text{sub}}$ (ng/min)	$R_{\text{sys-obs}}$ (%)	$R'_{\text{sys-pre}}$ (%)
2	$9.9 \pm 2.7$	$34.4 \pm 5.0$	$22.2 \pm 3.4$	23.1
5	$10.9 \pm 1.7$	$32.4 \pm 3.5$	$25.2 \pm 4.1$	24.2
10	$11.0 \pm 1.1$	$31.1 \pm 3.1$	$26.3 \pm 3.4$	25.1

#### 第 4 項 皮内動態に及ぼす血漿タンパク質の滲出の影響

炎症時、皮膚中の血管は血管透過性が亢進し、血管内を流れる血漿が組織に漏出するため、浮腫が生じる<sup>46)</sup>。そこで、炎症時に起こる血管から組織への血漿の漏出を模倣するため、人工膜積層皮膚モデルの血管モデルから灌流液を漏出させることで再現し、それに伴う FP 移行動態を評価した。実験は、血管モデルプローブ B と接続する push 式および pull 式ポンプの速度を制御し、一時的にプローブ B から灌流液である PBS が透析膜間へ流出し、それに続く漏出液の回収という 2 つの流れを作製し、灌流液の移動による FP 移行動態への影響を評価した。Fig. 23 に灌流液のプローブ B からの流出および回収の過程を示し、Table 10 に各ポンプの設定速度のタイムスケジュールを示す。



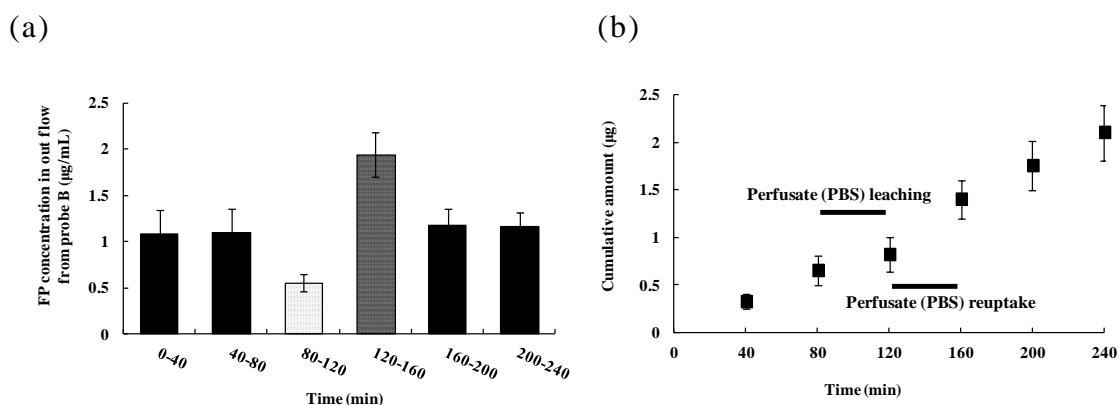
**Fig. 23 Schematic diagram of the experimental system**

**Table 10 Time schedule of flow rate of the push pump and pull pump**

Steps	Conditions	Time (min)	Push pump flow rate	Pull pump flow rate
			( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	( $\mu\text{L}/\text{min}$ )
1	Normal	0-80	10	10
2	Leaching	80-120	10	9
3	Reuptake	120-160	10	11
4	Normal	160-240	10	10



Fig. 24 に、各時間にプローブ B 末端から流出した透析液中 FP 濃度および累積回収量を示す。灌流液を膜間に漏出させた step 2 ではプローブ B へ回収された FP 濃度が他の時間と比較して低い、すなわちプローブ B への移行率が低く、漏出液を再回収した step 3 では FP 濃度が高い、すなわち FP のプローブ B への移行率が上昇した。これらのことから、血管からの血漿の漏出により、血管を介した FP の全身循環への移行が減少し、逆に漏出した血漿が回収されると FP の全身への移行も上昇することが予測される (Fig. 24(b))。したがって、炎症性浮腫形成過程では、炎症部位の血管透過性が亢進していても薬物の全身循環への移行増加は生じにくいと予測される。

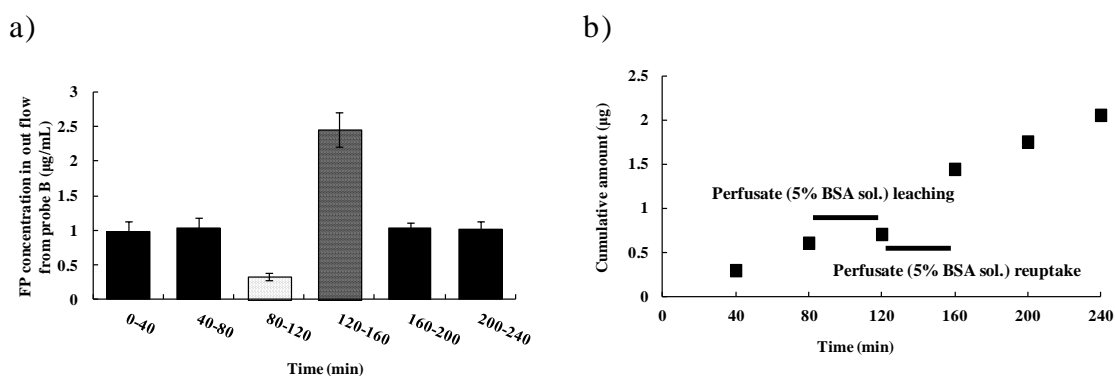


**Fig. 24 Concentration (a) and cumulative amount (b) of FP in outflow through MD probe B**

Data represent the mean±S.D. (n = 3).

さらに、血漿の漏出に加えて、炎症時に生じる血管からの血漿タンパク質の滲出も FP 移行動態へ影響を及ぼす可能性があることを考慮する必要がある。そこで、血漿タンパク質含有の灌流液をプローブ B から膜間へ流出させることで、この病変を模倣した。すなわち、人工膜積層皮膚モデルの血管モデルプローブ B から 5% BSA/PBS 溶液を流出させ、それに伴う FP 移行動態を評価した。各ポンプの設定速度は、Table 10 のタイムスケジュールに従った。Fig. 25 に、時間ごとにプローブ B から流出してきた透析液中 FP 濃度を示す。5% BSA/PBS 溶液をプローブ B から膜間に流出させた step 2 では、PBS の流出時と同様なプローブ B への FP 移行低下を示した。漏出液を再回収した step 3 で

はプローブ B への FP 移行増加を示した。また、灌流液に BSA を添加した時のプローブ B への FP 移行変化量を比較すると BSA/PBS 溶液の変化の方が、PBS のそれよりも大きくなった。このことは、血漿タンパク結合性が高い薬物でより顕著になると予測される。前述の結果は、第 1 章の Fig. 5 の post 投与群における、FP パップ貼付後の経皮吸収動態でも認められた。さらに、PBS の漏出で予想された局所浮腫形成過程での全身への薬物移行遅延、すなわち吸収遅延は、血漿の漏出のみでも起こることが予想される。



**Fig. 25 Concentration (a) and cumulative amount (b) of FP in outflow through MD probe B**

Data represent the mean±S.D. (n = 3).

## 第 2 節 フルルビプロフェンの皮内動態に及ぼすタンパク結合阻害の影響

前節で、炎症皮膚における初期の血管透過性亢進と、それに伴う血管からの血漿タンパク質の滲出によって、FP 経皮吸収度動態が変化を受けることを明らかにした。このような炎症皮膚病変では、血漿タンパク質の組織細胞間質への滲出のみならず、血漿中薬物も組織中へ漏出することが考えられる。薬物は、血管内で血漿タンパク質と結合型もしくは非結合型として存在している。いずれにおいても血管から漏出し組織細胞間質へ滞留した場合、皮膚表面から透過した薬物と漏出薬物間で競合的タンパク結合が生じ、全身および組織移行率に変化が生じることが考えられる。そこで本節では、プローブから透析膜間に任意の濃度でケトプロフェン (KP) を滞留させ、FP の積層膜透過に及ぼすタンパク結合阻害の影響を評価した。第 1 項では KP 透析膜透過性を評価し、第 2 項にてタンパク結合の阻害時と非阻害時の FP の積層膜透過性の比較を行った。

## 第 1 項 ケトプロフェンの透析膜透過性評価

KP は FP と同様に、経皮吸収性鎮痛消炎薬として用いられる NSAIDs であり、FP 同様にアルブミンの site II への結合性が高いことが知られている<sup>52-54</sup>)。これに従い、KP を FP と BSA の結合阻害剤として選択した。まず、本項では KP を膜間に任意の濃度で滞留させるために、KP 膜透過性を評価した。Fig. 26 に実験系を示す。ドナーセルに 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  KP/PBS 溶液適用時の透析膜 2 枚の KP 透過性を Fig. 27(a) に、プローブ (MWCO 50 kDa) に 2.4  $\text{mg}/\text{mL}$  KP/PBS 溶液灌流時のレシーバーセルへの KP 透過性を Fig. 27(b) に示した。透析膜 1 枚の KP 透過クリアランス ( $CL_{1\text{DM-KP}}$ ) を、定常状態時 (45 から 120 分) の KP 透過速度 (Fig. 27 (a) の直線の傾き =  $0.073 \pm 0.0041 \mu\text{g}/\text{min}$ ) とドナーセル適用濃度を用いて、(4) および (13) 式より求めた ( $CL_{1\text{DM-KP}} = 2.91 \pm 0.16 \mu\text{L}/\text{min}$ )。

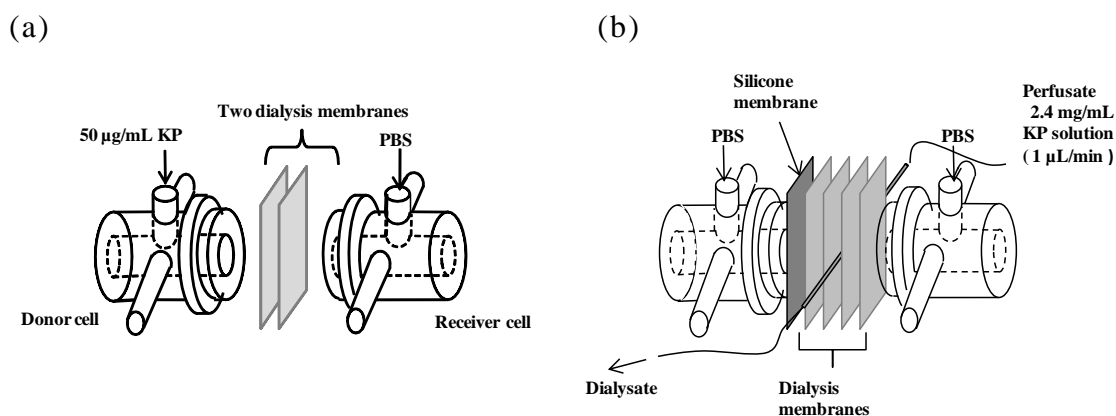
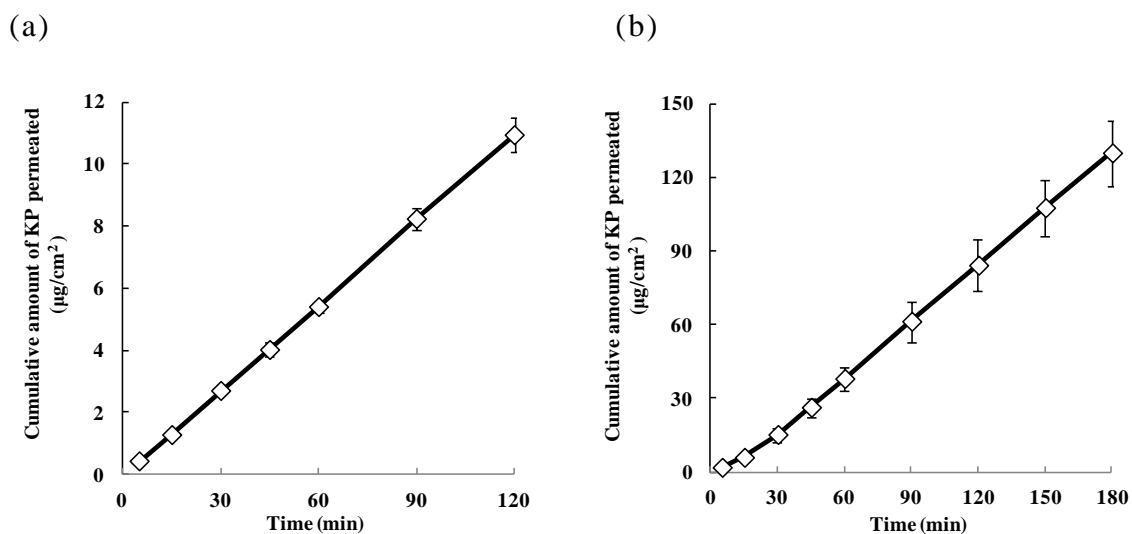


Fig. 26 Setup of the laminated model skin system



**Fig. 27 Permeation profiles of KP**

(a) Permeation of KP from 50 µg/mL PBS solution through two dialysis membranes.  $CL_{1DM-KP}$  value was calculated from the slope as 2.91 µL/min.  $CL_{1DM-KP}$  is the clearance value of KP through the single dialysis membrane. (b) Transfer of KP from probe (2.4 mg/mL) to receiver cell through the laminated dialysis membranes. Data represent the mean±S.D. (n = 3).

## 第 2 項 フルルビプロフェンの膜透過性に及ぼすケトプロフェンのタンパク結合の阻害の影響

Fig. 28 に本実験系を示す。まず、膜間部位 (d) の KP 濃度 ( $C_{d-KP}$ ) を、2.4 mg/mL KP/PBS 溶液をプローブに灌流し定常状態時 (60 から 180 分) のレシーバーセルへの KP の透過速度 (Fig. 27 (b) の直線の傾き =  $0.74 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{min}$ ) と  $CL_{1DM-KP}$  値を用いて (4) 式より求めた ( $264 \pm 25 \mu\text{g}/\text{mL}$ )。  $C_{d-KP}$  は、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP 溶液をドナー溶液として適用し膜間 (d) へ透過した FP 予測濃度 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) より明らかに高値であり、これは FP とタンパクの結合に充分影響を与える値であると考えられた。そこで 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液をドナーセルへ適用し、膜間 (d) に 5% BSA/PBS 溶液を 20  $\mu\text{L}$  留置し、2.4 mg/mL KP/PBS 溶液をプローブへ灌流させた際のレシーバーセルへの FP の透過量ならびに膜間 (d) の非結合型 FP 濃度を Fig. 29 に示した。KP/PBS 溶液を灌流させることにより、レシーバーセルへの FP の累積透過量は増加し、さらにラグタイムの短縮も認められた。また、膜間 (d) のタンパク非結合型 FP 濃度の増加が認められた。これらは、KP によって FP のタンパクへの結合が阻害されたためと考えられる。このことから、人工膜積層皮膚モデルは、皮膚代替人工膜のみを用いた既存の *in vitro* 実験系や *in vivo* 実験系で再現することが難しいと予想される皮膚透過薬物と血管漏出薬物間のタンパク結合相互作用を評価し得る実験系であると考えられる (55,56)。

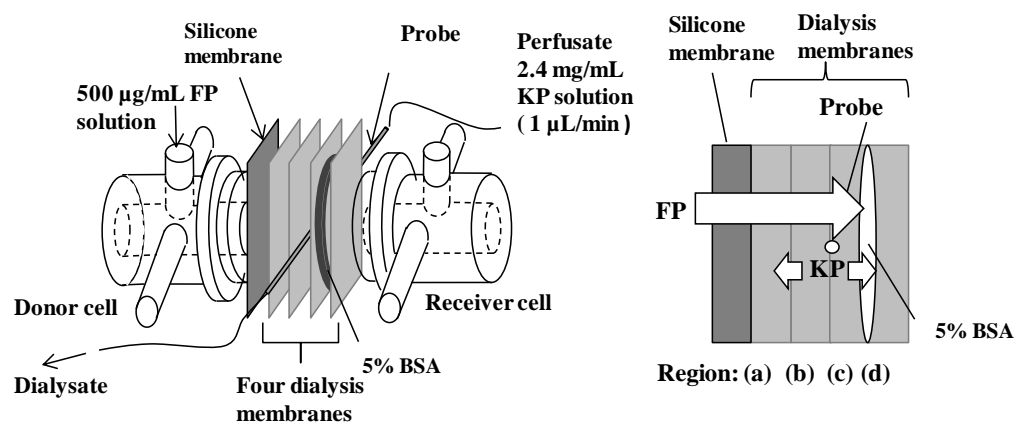
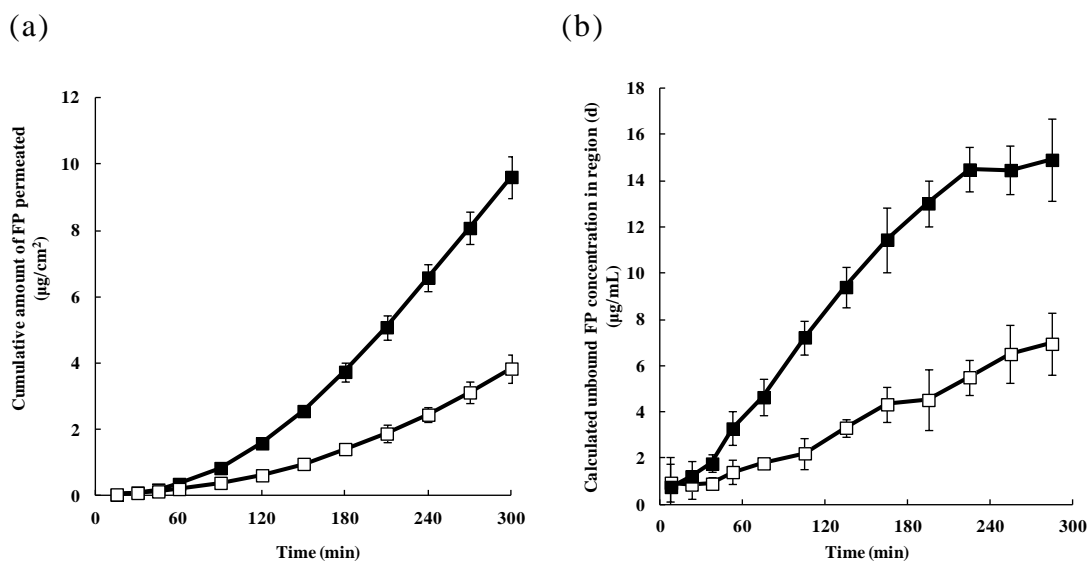


Fig. 28 Setup of the laminated model skin system



**Fig. 29 Effect of KP contained in the perfusate on FP permeation through the laminated model skin system** (a) Permeation profiles of FP. (b) FP concentration in region (d) calculated using Eq. (4).  $CL_{1DM}$  value  $2.72 \mu\text{L}/\text{min}$  was used to calculate.  $CL_{1DM}$  is the clearance value of FP through the single dialysis membrane.  $\square$ , PBS perfused;  $\blacksquare$ , 2.4 mg/mL KP/PBS perfused. Data represent the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ).

### 第 3 節 小括

第 1 節において皮膚炎症の基本病変を人工膜積層皮膚モデルで再現し、予測される薬物の皮内動態への影響を評価した。その結果から、人工膜積層皮膚モデルは、血管透過性の変化および血管からの血漿の漏出や血漿タンパク質の滲出による FP 経皮吸収動態への影響を再現できる有用な実験系であることを示した。さらに、第 2 節において透析膜間における KP の FP に対する競合的タンパク結合皮膚適用後の薬物皮膚透過過程における薬物 - タンパク結合阻害の影響を評価し得ることを示した。



## 結論

薬物や化粧品成分の経皮吸収型製剤の開発には、高い再現性のデータが得られること、そして動物愛護の観点から実験動物使用数の抑制のために、人工膜を皮膚代替膜として用いた研究が多くなされている。それは、皮膚の生理化学的な反応に大きな影響を与え得る表皮および真皮に存在する血流や生きた細胞を欠いた代替膜であるが、正常な皮膚組織での薬物皮膚透過挙動を評価するのに用いられてきた。近年、多くの皮膚適用製剤が上市され、同一部位への繰り返し適用やその適用方法に準じた長時間の貼付によって発現する皮膚の炎症もしくは損傷が、しばしば問題となっている。そして、皮膚炎症部位に製剤を適用し全身性の副作用が発現し、効果的な薬物治療を継続して行うことが困難となることが報告されている。しかしながら、このように生理状態が変化した皮膚における薬物皮内動態について、その要因を詳細に検討した報告は、これまでほとんど見当たらない。そこで、本研究では、皮膚の生理状態変化を反映し得る *in vitro* 人工膜透過実験系の構築を目的とした。

以下に本研究により得られた知見について要約する。

第1章では、血漿タンパク質の滲出によるフルルビプロフェン (FP) 経皮吸収動態への影響を明らかにするために、皮膚浮腫モデルラットを作製し種々検討を行った。

まず、血漿タンパク質と結合性が高いエバンスブルー (EB) を血漿タンパク質血管外滲出の指標として選択し、皮膚浮腫モデルラットにおける血管透過性亢進に伴う浮腫病変の妥当性について評価した。その結果、起炎物質混合溶液 (起炎溶液：ザイモサン 1.0%、カゼイン 1.0%、 $\lambda$ -カラゲニン 0.5%を含む 0.2% カルボキシメチルセルロース溶液) の背部皮内投与により、投与 30 分後に血管からの血漿タンパク質の局所組織細胞間質への滲出が顕著に増大した。また、その滲出に起因する皮膚浮腫は、起炎混合物質投与後、30 分までに形成され 360 分まで持続し、浮腫の影響を安定して評価可能であることが示された。そこで、モデル薬物として薬価収載されている FP パップ剤を選択し、FP 経皮吸収動態に及ぼす血漿タンパク質滲出の影響を評価した。起炎溶液の背部皮内投与 30 分後、皮内投与部位を完全に覆うように FP パップ剤を貼付した。血漿中 FP 濃度は、起炎溶液未投与群に比べて明らかに低下した。さらに、起炎溶液皮内投与よりも先行して FP パップ剤

を貼付し、30分後に起炎溶液をFPパップ剤貼付部位の皮内へ注入することにより、薬物の経皮吸収速度が一時的に低下した。炎症に伴う血管からの血漿タンパク質の滲出によってFPの経皮吸収動態が大きく影響を受けることが示された。FPがアルブミンのsite IIと高い結合性を有することは既に知られている。このことから、血漿中FP濃度の低下は、血管から滲出した血漿タンパク質とFPの結合により生じたと考えられた。この低下は、タンパク結合率の低い薬物よりも高い薬物において、顕著に認められると考えられる。さらに起炎溶液の投与タイミングによって経皮吸収プロファイルが影響を受けることを明らかにした。炎症時にFP経皮吸収動態を変化させる皮膚生理状態の因子として血漿タンパク質の滲出に伴う浮腫、血管透過性亢進および血流速度増加などが考えられる。これらの皮膚生理状態の変化を反映でき、薬物経皮吸収動態への影響をより詳細に検討できる実験系構築の必要性が強く示された。

第2章では、人工膜の積層により発生する膜-膜界面や膜厚の増加によるFP膜透過性に及ぼす影響、さらに膜間に挿入する血管モデルとしてマイクロダイアリシスプローブ(プローブ)を選択し、そのFP回収特性について検討した。人工膜積層皮膚モデルにおける薬物透過の定量性を明らかにするため、皮膚性状の特徴である疎水性と親水性の層構造を組み込むことを目的に2種類の人工膜(シリコーン膜1枚、透析膜1-4枚)を積層し、さらに膜間へプローブを挿入し透過実験を行った。まず、親水性を有する生きた表皮、真皮のモデルとして透析膜を積層(1-5枚)しFP積層膜透過に及ぼす影響について評価した。その結果、FPの膜透過係数は積層した膜の枚数に反比例することが確認され、このことから積層により発生した膜-膜界面が近接している、もしくは膜の間に存在する非攪拌水層の抵抗が透析膜を介したFP透過に対して無視しうる程度に小さいと考えられた。すなわち、定常状態時のFP積層膜透過は、Fickの第1法則に基づく拡散理論に従うことが明らかとなった。次に、疎水性を有する角質層モデルとしてシリコーン膜と透析膜を積層した複合膜(シリコーン膜1枚および透析膜4枚)におけるFP複合膜透過性を評価した。その結果、FP複合膜実測透過係数の逆数が、構成膜の透過係数の逆数の和に近似した。すなわち、透析膜のみから構成される積層膜と同様に、基本的な拡散理論に基づくことを明らかにした。さらに、人工膜積層皮膚モデル(ドナーセル-シリコーン膜-透析膜-局所薬物濃度測定用プローブ(プローブ

プローブ A ; MWCO 50 kDa、灌流速度 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) - 透析膜 - 血管モデル用プローブ (プローブ B ; MWCO 50 kDa、灌流速度 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) - 透析膜 2 枚 - レシーバーセル (皮下組織モデル) を積層) においてプローブ B の FP 移行 (回収) 性に及ぼす灌流速度の影響を評価した。まず、透析膜 2 枚 - プローブ B - 透析膜 2 枚を積層し横型拡散セルに設置し両セルへ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液もしくは PBS を、プローブ B への灌流液として PBS もしくは 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液の組み合わせで、灌流速度の変化によるプローブ B への FP 移行クリアランス (FP の移動: プローブ B の外 $\rightarrow$ 内もしくは内 $\rightarrow$ 外) を測定した。その結果として、10  $\mu\text{L}/\text{min}$  よりも速い灌流速度で、外 $\rightarrow$ 内の系では灌流速度の上昇に伴い FP のプローブ B への回収クリアランスの減少が、内 $\rightarrow$ 外の系ではプローブからセルへの FP の移行クリアランスの増加が観察された。このことから、10  $\mu\text{L}/\text{min}$  より速い灌流速度でプローブ内圧が上昇し、透析膜間へ灌流液が漏出することが考えられた。そのため、外 $\rightarrow$ 内の系では、灌流速度の上昇に伴って漏出する溶液により、FP の透析膜間への移動が妨害されて FP のプローブ膜の薬物回収クリアランスが減少したと考えられた。一方、内 $\rightarrow$ 外の系では、灌流液の透析膜間への漏出に伴って FP もプローブ内から透析膜間へより多く移動したと考えられた。また、10  $\mu\text{L}/\text{min}$  未満の灌流速度では、速度依存的にプローブ B 末端から回収される透析液中 FP 濃度の上昇を確認した。このことから、血管モデルプローブへの FP 回収特性が灌流速度に依存することを明らかにした。最後に、人工膜積層皮膚モデルの定量性について評価を行った。まず、プローブ A を用いて zero net flux (ZNF) 法から予測された膜間薬物濃度は、拡散理論に基づく予測値に近い濃度であることを明らかにした。すなわち人工膜積層皮膚モデル中に組み込まれたプローブが、膜間部の局所 FP 濃度をモニターし得ることを明らかにした。さらに、人工膜積層皮膚モデルにおける FP 移行挙動を明らかにするため、横型拡散セルのドナーセルへ 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を適用し、レシーバーセルおよびプローブ B への Fp 移行動態を透過速度から算出した実測値 ( $F_{\text{sub-obs}}$ 、 $F_{\text{sys-obs}}$ ) および膜間濃度とクリアランスから予測される予測値 ( $F_{\text{sub-pre}}$ 、 $F_{\text{sys-pre}}$ ) とを比較することにより定量的な妥当性を検討した。その結果、予測値 ( $F_{\text{sys-pre}} = 20.9\%$ ) と実測値 ( $F_{\text{sys-obs}} = 19.2 \pm 3.2\%$ ) がよく一致した。すなわち、定常状態時の FP 透過挙動が基本的な拡散の理論に従い、人工膜積層皮膚モデルが、薬物の移行を定量的に評価可能なモデルであることを明らかにした。また、プロー

ブの膜間への挿入による FP 膜透過挙動に及ぼす影響は、無視できる程度に少ないものであることも明らかにした。

第 3 章では、この人工膜積層皮膚モデルを用いて炎症の基本病変、特に薬物の経皮吸収に影響を与えると考えられる血流速度の変化、血管透過性の亢進、それに伴う血漿や血漿タンパク質の血管外滲出を模倣し、*in vivo* 実験系におけるレーザーセル（模擬皮下組織）およびプローブ B（模擬全身循環）への FP 移行挙動に及ぼす影響について検討した。①積層膜間に血漿タンパク質存在時の FP 移行動態への影響を検討するため、人工膜積層皮膚モデルの構築時、透析膜間に 5% BSA/PBS 溶液を注入した。その結果、レーザーセルへの FP 膜透過に遅延がみられ、プローブ B への移行率が低下した。この低下は FP と BSA のタンパク結合によるものだと考えられた。第 1 章での *in vivo* 経皮吸収実験においても浮腫による血漿中 FP 濃度の低下およびラグタイムの延長を認めた。②血管透過性の変化を模倣するため、孔径の違いにより膜透過性を変化させた 2 種類のプローブ（MWCO : 50 kDa、1000 kDa）を用いて FP の移行挙動を評価した。その結果、皮膚中の血管透過性亢進による血管を介した全身循環への移行の上昇を再現できた。③血流速度の変化を模倣するため、プローブ B（MWCO : 1000 kDa）の灌流液の速度を変化させ、それに伴う FP の移行挙動を評価した。その結果、本実験モデルは血流速度変化に対する検出力が小さいことが示された。④血管からの血漿や血漿タンパク質の滲出を模倣するため、一時的にプローブ B（MWCO : 1000 kDa）から積層膜間へ灌流液が漏出する期間と、またそれを回収する期間を設定し、FP の移行挙動を評価した。その結果、血管モデルからの PBS 漏出や BSA 溶液の滲出により模擬全身循環への移行率が低下した。第 1 章での *in vivo* 経皮吸収実験においても血漿および血漿タンパク質の滲出による一時的な血漿中 FP 濃度の増加抑制を認めたことから、人工膜積層皮膚モデルにおいて経皮吸収動態に及ぼす血漿タンパク質の滲出の影響を再現できた。さらに、FP とタンパク質との結合を置換するケトプロフェン（KP）を、プローブを介して BSA を設置した膜間へ送り込んだ結果、BSA により生じた FP の膜透過の遅延が消失した。これは、KP が BSA と結合することで FP の結合が阻害されたことによると考えられた。このことから、生体でも起こり得る薬物皮膚透過過程における複雑な薬物相互作用を評価し得ることを示した。

本人工膜積層皮膚モデルは、薬物膜透過性、模擬全身循環ならびに模擬皮下組織への移行性を定量的に評価できるモデルであった。また、構成要素条件設定の変更によって、薬物皮内動態へ影響を与える皮膚生理状態の変化要因を再現できるモデルであった。このモデルを用いることで、実験動物を使用する前段階における皮膚生理状態変化の及ぼす薬物皮内動態への影響やそれに関係する薬物相互作用について、予備的に検討することが可能となり、実験動物使用匹数を削減できると考える。

以上より、本人工膜積層皮膚モデルは、皮膚生理状態の複雑な変化によって影響を受ける *in vivo* 経皮吸収動態について、それを理解するために必要な情報を提供する有用なモデルであると考えられる。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に際して終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬剤学講座教授 従二和彦 先生に深甚なる謝意を表します。

また、城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座教授 関 俊暢 先生には本研究の遂行にあたり終始研究を見守っていただき、行き詰まった時など、有益なご助言ならびに力強いご激励を賜わり、研究の進展をみることができました。ここにあらためて深謝の意を表します。

さらに、本研究に際して終始ご指導ならびにご助言をいただきました、城西大学大学院薬学研究科薬剤学講座准教授 細谷 治 先生、城西大学薬学部薬剤学教室助手 杉野雅浩 先生に感謝の意を表します。

本論文作成にあたり、ご教示とご校閲をいただきました城西大学大学院薬学研究科薬剤作用解析学講座教授 小林大介 先生ならびに城西大学大学院薬学研究科分子免疫学講座教授 荒田 洋一郎 先生に深謝の意を表します。

また、共同研究者として本研究の遂行に多大なるご協力をいただきました、城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座 鈴木千尋 修士および城西大学大学院薬学研究科薬剤学講座 指田達也 修士を始めとする関係諸氏に心から感謝いたします。

## 実験の部

### 第 1 章

#### 1. 実験材料

ZEPOLAS<sup>®</sup> pap 40 mg は三笠製薬（東京）から、4-ヒドロキシ安息香酸イソプロピルは東京化成工業株式会社（東京）から購入した。HPLC 用アセトニトリル、エバンスブルー（EB）、zymosan、casein および  $\lambda$ -carrageenan は和光純薬工業株式会社（大阪）から購入した。カルボキシメチルセルロース（CMC、500–800 mPa·s）は株式会社ダイセル（大阪）から購入した。その他の試薬は、全て市販の特級品を用い精製せずにそのまま用いた。

#### 2. 皮膚浮腫モデルラットの作製

雄性ヘアレスラット（WBN/ILA-Ht、9–10 週齢、体重 230–260 g）は、城西大学生命科学センター（埼玉）から購入した。ウレタン（1.5 g/kg、*i.p.*）麻酔下の雄性ヘアレスラットの角層を傷つけないように背部皮膚を剃毛した。1% EB/生理食塩溶液 1.0 mL を尾静脈より投与した。その 5 分後、炎症を惹起させるために起炎物質混合溶液（ザイモサン 1.0%、カゼイン 1.0%、 $\lambda$ -カラゲニン 0.5%を含む 0.2% カルボキシメチルセルロース溶液）50  $\mu$ L を剃毛部位の皮内へ投与した。起炎物質混合溶液投与 30 分後に皮膚を摘出し、ポンチで直径 15 mm に打ち抜き余分な脂肪を取り除いた。処置した摘出皮膚は、EB 含有量の測定まで -20°C で保存した。すべての動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認を得て実施した。

#### 3. 摘出皮膚組織中 EB 量の測定

冷凍保存した皮膚サンプルから EB を抽出するために、0.5 M KOH 水溶液 7.0 mL を加えて定温振盪した（37°C、24 h、200 rpm）。その懸濁液に 2.0 M リン酸水溶液：アセトン=3.5：32.5 の溶液 18 mL を加えて定温振盪（25°C、10 min、200 rpm）後に、遠心分離（25°C、3000 rpm、15 min）した。得られた上清を紫外可視分光光度計（U-3000、株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京）を用いて波長 620 nm の吸光度を測定した。

#### 4. フルルビプロフェン (FP) 経皮吸収実験

2. と同様の方法を用いて、雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht、9—10 週齢、体重 230—260 g) 背部皮膚に炎症を惹起させた。すなわち、角層を傷つけないように背部皮膚を剃毛し、直径 1.0 cm の円形に製剤 (ZEPOLAS<sup>®</sup> pap 40 mg、三笠製薬、東京) 適用部位を定めた。起炎物質混合溶液 各 50  $\mu$ L を 4 か所の適用部位へ製剤適用範囲外から、適用部位皮内へ投与した。製剤がずれた場合の予想外の吸収を避けるため、刺針痕はアロンアルファ A<sup>®</sup> (第一三共、東京) で塞いだ。ラットの体温を 37°C に保った状態で、起炎物質混合溶液投与 30 分後、製剤を適用して、8 時間まで経時的に頸静脈から採血 (0.2 mL) を行った。その後、遠心分離 (15000 rpm、4°C、5 min) し血漿を得た。得られた血漿は、測定まで -20°C で保管した。

#### 5. HPLC による血漿中 FP 濃度の測定

HPLC システムはポンプ (LC-10AD<sub>VP</sub>、島津製作所、京都)、カラム (Mightysil C18 5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm、関東化学株式会社、大阪)、ガードカラム (Mightysil C18 5  $\mu$ m, 4.6 mm、関東化学株式会社)、オートインジェクター (SIL-10A、島津製作所)、システムコントローラー (SCL-10A、島津製作所)、脱気装置 (DGU-12A、島津製作所)、カラムオーブン (CTO-10A、島津製作所)、蛍光検出器 (RF-10A<sub>XL</sub>、島津製作所) から成り、移動相はアセトニトリル : 0.1% リン酸溶液 = 3 : 2、流速は 1.0 mL/min、カラムオーブン温度は 35°C とした。血漿サンプル (50  $\mu$ L) は、内部標準物質である 4-ヒドロキシ安息香酸イソプロピルを含有したアセトニトリル (150  $\mu$ L) と混合した後、遠心分離 (11000 rpm、10 min) し上清 50  $\mu$ L を装置に注入し励起波長は 250 nm、蛍光波長は 310 nm を用いて血漿中 FP を測定した。

## 第 2 章

### 1. 試薬

フルルビプロフェン (FP)、デキストラン (MW ~40000) は SIGMA ALDRICH (MO、U.S.A)、4-ヒドロキシ安息香酸イソプロピルは東京化成工業株式会社 (東京)、ウシ血清アルブミン (BSA、試薬特級)、アセトニトリル (HPLC 用) は和光純薬工業株式会社 (大阪) からそれぞれ



れ購入した。その他の試薬及び溶媒は市販の特級品を購入し、さらなる精製を行わずにそのまま使用した。

## 2. 等張リン酸塩緩衝液 (PBS) pH7.4 の調製

下記の組成の水溶液 A, B の 2 : 3 の混合液を調製し、超音波洗浄機 (ASU-3D、アズワン株式会社、大阪) で超音波処理して脱気した。

Table e1.

Solution A	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.03 M
	NaCl	0.11 M
Solution B	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.03 M
	NaCl	0.1 M

また、FP の溶解により pH に変化が起こる時は必要に応じて 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を適量加えた上で FP/PBS 溶液を調製した。pH の測定には pH メーター (F-52、堀場製作所、京都) を用いた。

## 3. HPLC によるサンプル溶液中の FP 濃度の測定

サンプル溶液と内標準物質 (4-ヒドロキシ安息香酸イソプロピル、2.5 µg/mL) 含有メタノールを等容量加えて十分に攪拌したものを、HPLC システムにマイクロシリンジ (Hamilton Co. Ltd., U.S.A.) で 20 µL 注入して FP 濃度を測定した。HPLC システムは、HPLC システム (LC-Net II /ADC、日本分光株式会社、東京)、紫外可視検出器 (UV-1570、日本分光株式会社)、送液ポンプ (PU-1580、日本分光株式会社)、分離カラム (CAPCELL PAK C18 MG、150 mm×4.6 mm、資生堂、東京) からなる。移動相は 0.1% リン酸水溶液 : アセトニトリル = 2 : 3 を 10 分間超音波で脱気処理し、流速は 1.0 mL/min、測定波長 245 nm とした。

## 4. FP の膜透過性評価

透析膜 (SpectraPor 7、Molecular Weight Cut Off (MWCO) 1000、フナコシ、東京) を予め 1.5 cm 四方に切り出し、蒸留水に浸漬した。横型拡散セルに装着する前の 1 時間は PBS に浸漬した。FP 透過実験中は拡散セル内を 37°C に保った。セル間の液漏れを防ぐために、ドナーセルとレシーバーセルにはそれぞれ、直径 1 cm の孔 (有効透過面積 0.79 cm<sup>2</sup>) をあけた厚さ 0.5 mm のシリコーンリングを装着した上で、各枚数の透析膜を装着した。膜の積層にはピンセットを用いて、孔をあけ

たシリコーンリング上にドナー側の膜から静置し、クリップを用いてセル同士を固定した。透析膜のみから成る積層膜を設置する場合には、ドナーセルに 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を、ドナーセル側にシリコーン膜 (膜厚 50  $\mu\text{m}$ 、アズワン株式会社) を含む積層膜を設置する場合には 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を 2.8 mL 適用し、レシーバーセルには 2.8 mL の PBS を適用した。拡散セル内はスターラーを用いて十分な攪拌条件を保った。ドナーセルに FP/PBS 溶液を適用した 5、15、30、45、60、90 および 120 分後に、レシーバーセルからシンク条件を保つため 2.0 mL の溶液をサンプリングし、直ちに 37°C の等容量の PBS をレシーバーセルに適用した。サンプル溶液は等容量の内標準物質含有メタノール溶液を加えてよく攪拌し、20  $\mu\text{L}$  を HPLC へ注入し FP を測定した。

#### 5. 灌流液に加えた BSA/PBS 溶液とデキストラン/PBS 溶液の粘度の測定

粘度は、回転粘度計 (RE 215L、東機産業株式会社、東京) により 37°C 条件下で測定した。

#### 6. マイクロダイアリシスプローブ (プローブ) の薬物回収特性の評価

横型拡散セルのドナーセルとレシーバーセルの両側に、直径 1 cm の孔をあけた厚さ 0.5 mm のシリコーンリングを 2 枚ずつ、計 4 枚のシリコーンリングを装着して、両セルの間に MWCO 50 kDa のプローブ (OP-100-10、エイコム、京都) を挟みこんだ。PBS を充填したシリンジ (Hamilton Co. Ltd.、U.S.A.) とプローブをテフロンチューブ (JT-10、エイコム) で接続し、push 式インフュージョンポンプ (ESP-32、エイコム) に設置した。両セル内に 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を 2.8 mL 適用し、1、2、5、10、20 および 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  の流速でプローブに PBS を灌流し透析液をプローブ末端より回収した。プローブ末端に 1.5 mL マイクロチューブを設置後、パラフィルムで覆い灌流速度ごとに 20 分間×3 回透析液を回収した。透析液は、流速 1、2 および 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  では PBS を添加し 10 倍希釈後に充分攪拌した。流速 10 および 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  では透析液を希釈せずにそのまま用いた。この透析液 20  $\mu\text{L}$  を HPLC へ注入し FP を測定した。

#### 8. 灌流液への BSA もしくはデキストランの添加によるプローブの薬物回収性に及ぼす影響

プローブと接続するシリンジを 5% BSA/PBS 溶液または 2% デキストラン/PBS 溶液で満たし、他の条件は 7. と同様の手順で測定を行った。回収した透析液は、等容量のアセトニトリルを添加し充分攪拌後、遠心分離機 (MRX-150、株式会社トミー精工、東京) により遠心分離 (15000 rpm、10 min、室温) した。上清の 20  $\mu$ L を用いて HPLC で FP を定量した。

#### 9. 透析膜間に設置したマイクロダイアリシスプローブの薬物回収クリアランスの測定

拡散セルの両側に厚さ 0.5 mm のシリコーンリングをはさみ、膜を積層する時と同様に透析膜 2 枚の上にプローブを静置し、さらにその上に 2 枚の透析膜を静置した。透析膜間に挿入したプローブを push 式インフュージョンポンプに設置したシリンジと接続した。両セルを 50  $\mu$ g/mL FP/PBS 溶液 2.8 mL で満たした場合にはシリンジに PBS を、両セルを PBS で満たした場合にはシリンジに 50  $\mu$ g/mL FP/PBS 溶液を充填した。両セル内はスターラーにより充分に攪拌し、37°C に保ち、1、2、5、10、20 および 50  $\mu$ L/min の流速で各溶液を灌流した。プローブ末端に 1.5 mL マイクロチューブを設置後、パラフィルムで覆い灌流速度ごとに 20 分間 $\times$ 3 回透析液を回収した。透析液は、流速 1、2 および 5  $\mu$ L/min では PBS を添加し 10 倍希釈した。流速 10、20 および 50  $\mu$ L/min では透析液を希釈せずにそのまま用いた。この透析液 20  $\mu$ L を HPLC へ注入し FP を測定した。

#### 10. 人工膜積層皮膚モデルの作製

横型拡散セルに、ドナーセル側からシリコーン膜－透析膜－膜間薬物濃度測定プローブ (MWCO 50 kDa)－透析膜－血管モデルプローブ (MWCO 50 kDa)－透析膜 2 枚の順に積層し、両セルの両側に厚さ 1 mm のシリコーンリングを設置し人工膜積層皮膚モデルを作製した。膜間に設置した 2 本のプローブは、push 式インフュージョンポンプに装備された PBS 充填済のシリンジと接続した。ドナーセルに 500  $\mu$ g/mL FP/PBS 溶液を適用 5、15、30、60、90、120、180 および 240 分後にレシーバーセルからシンク条件を保つため 2.0 mL の溶液をサンプリングし、直ちに 37°C の等容量の PBS をレシーバーセルに適用した。これと並行してドナーセルへ FP/PBS 溶液適用後、血管モデルプローブ末端に 1.5 mL マイクロチューブを設置後、パラフィルムで覆い灌流速度 10  $\mu$ L/min、30 分間隔で 240 分まで透析液を回収した。レシーバーセルお

よび血管モデルプローブ末端から得られた各サンプル溶液は、HPLCを用いてFP濃度を測定した。同時に行った膜間薬物濃度測定プローブによるFP濃度の測定については11.に示す。

#### 11. 人工膜積層皮膚モデルの膜間FP濃度の測定

10.の実験中に膜間薬物濃度測定プローブ(MWCO 50 kDa)末端から透析液を回収した。この透析液から得られるFP濃度をZero net flux (ZNF)法にあてはめ膜間FP濃度を求めた。すなわち、ドナーセルへ500 µg/mL FP/PBS溶液を適用し30分後、PBSを充填したシリンジから流速1 µL/minでプローブへの灌流を開始した。ドナー溶液適用60分から90分後までの30分間、膜間薬物濃度測定プローブ末端から流出する透析液を1.5 mLマイクロチューブに回収し、HPLCを用いてFP濃度を測定した。ドナー溶液適用90分から120分後までの30分間は、膜間薬物濃度測定プローブへのPBSの灌流は行わず、続いて、120分から150分後までの30分間、50 µg/mL FP/PBS溶液を充填したシリンジとプローブを接続し充填溶液を再灌流した。そして150分から180分後の30分間、先程と同様に透析液を回収し、HPLCを用いてFP濃度を測定した。ここで、前述の灌流液のFP濃度をX軸に、透析液と灌流液のFP濃度値の2数の差をY軸にとった平面上に、この2点をプロットし得られる直線のX軸切片の値を膜間FP予測濃度とした。このFP/PBS溶液をドナー溶液適用210から240分後の30分間、灌流した。最後に240から270分後の30分間、先程と同様に透析液を回収し、HPLCを用いてFP濃度を測定した。そして、透析液と灌流液の濃度が等しくなる時の透析液濃度を膜間のFP濃度としたなお、灌流タイムスケジュールをTable e2に示す。

Table e2.

	Time (min)	Flow rate (µL/min)	Inflow (µg/mL)
Step 1	0-30	-	-
Step 2	30-60	1	0
Step 3	60-90	1	0
Step 4	90-120	-	-
Step 5	120-150	1	50
Step 6	150-180	1	50
Step 7	180-210	-	-
Step 8	210-240	1	Predicted value
Step 9	240-270	1	Predicted value

## 第 3 章

### 1. 試薬

ケトプロフェン (KP)は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。その他の試薬および溶媒は、第 2 章 1. と同様のものを使用した。

### 2. 等張リン酸塩緩衝液 (PBS) pH7.4 の調製

第 2 章 2. と同様の方法で調製した。

### 3. HPLC によるサンプル溶液中の FP 濃度の測定

第 2 章 3. と同様の方法でサンプル溶液中の FP 濃度を HPLC で測定した。

### 4. 積層膜間の血漿タンパク質の存在による薬物膜内動態への影響

第 2 章 10. と同様にシリコーン膜-透析膜-膜間薬物濃度測定プローブ-透析膜-血管モデルプローブ-透析膜 2 枚を積層するが、血管モデルプローブを静置する際に、5% BSA/PBS 溶液 20  $\mu$ L を充填したシリンジの針先も設置した。これら全ての材料を積層し、シリンジに充填した 5% BSA/PBS 溶液を注入し、セルの留め器具で直ちにセルを固定することにより BSA/PBS 溶液を透析膜で挟み込んだ。ドナーセルに 500  $\mu$ g/mL FP/PBS 溶液適用し 5、15、30、60、90、120、180 および 240 分後にレシーバーセルからシンク条件を保つため 2.0 mL の溶液をサンプリングし、直ちに 37°C の等容量の PBS をレシーバーセルに適用した。これと並行してドナーセルへ FP/PBS 溶液適用後、血管モデルプローブ末端に 1.5 mL マイクロチューブを設置しパラフィルムで覆い、PBS を流速 10  $\mu$ L/min で灌流、30 分間隔で 240 分まで透析液を回収した。同時に膜間薬物濃度測定プローブに Table e3. に従って PBS を灌流し、透析液を回収した。レシーバーセルおよびプローブ末端から得られた各サンプル溶液は、HPLC を用いて FP 濃度を測定した。

Table e3.

	Time (min)	Flow rate ( $\mu$ L/min)	Inflow ( $\mu$ g/mL)
Step 1	0-30	1	0
Step 2	30-60	1	0
Step 3	60-90	-	-
Step 4	90-120	1	50
Step 5	120-150	1	50
Step 6	150-180	-	-
Step 7	180-210	1	Predicted value
Step 8	210-240	1	Predicted value

## 5. プローブ微小透析膜透過性の変化による薬物皮内動態への影響の評価

血管モデルは再生セルロース膜、MWCO 50 kDa と、ポリエチレン膜、MWCO 1000 kDa(特注品、エイコム)の2種類のプローブを用いた。人工膜積層皮膚モデルは第2章10.と同様の手順で組み立てた。血管モデルプローブの灌流速度を10  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、膜間薬物濃度測定プローブは1  $\mu\text{L}/\text{min}$  に設定し、透過実験およびFP濃度の測定は、4.と同様に行った。

## 6. 灌流速度の変化による薬物皮内動態への影響の評価

第2章10.の手順で人工膜積層皮膚モデルを組み立てた。Push式インフュージョンポンプおよびpull式ポンプ(ERP-10、エイコム)の設定速度を血管モデルプローブの灌流速度の実測値が2、5、および10  $\mu\text{L}/\text{min}$  で灌流されるように調節した(Table e4.)。膜間の2本のプローブは、push式ポンプに装備されたPBSを充填したシリンジと接続した。ドナーセルに500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS溶液適用し5、15、30、60、90、120、180 および 240 分後にレシーバーセルからシンク条件を保つため2.0 mLの溶液をサンプリングし、直ちに37°Cの等容量のPBSをレシーバーセルに適用した。これと並行してドナーセルへFP/PBS溶液適用後、血管モデルプローブ末端に1.5 mLマイクロチューブを設置しパラフィルムで覆い、PBSを流速10  $\mu\text{L}/\text{min}$  で灌流、30分間隔で240分まで透析液を回収した。同時に膜間薬物濃度測定プローブにTable e3.に従ってPBSを灌流し、透析液を回収した。レシーバーセルおよびプローブ末端から得られた各サンプル溶液は、HPLCを用いてFP濃度を測定した。

Table e4.

Push 式ポンプ 設定速度 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Pull 式ポンプ 設定速度 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	流出速度実測 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )
2	3.4	2
5	8.5	5
10	17.5	10

## 7. プローブ微小透析膜からの灌流液漏出による薬物皮内動態への影響の評価

人工膜積層皮膚モデルは第2章10.と同様の手順で組み立てた。ドナーセルに500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS溶液適用後、レシーバーセルからのサンプリングを4.と同様に行った。ドナーセルに500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS溶液適用し、血管モデルプローブへ灌流するPBSの流速は、Table e5.に従って設定した。Step 2で血管モデルプローブ設置膜間にPBSを40  $\mu\text{L}$

漏出させた。さらに step 3 において膜間に漏出した PBS 40  $\mu\text{L}$  を血管モデルプローブへ回収した。同時に膜間薬物濃度測定プローブに Table e3. に従って PBS を灌流し、透析液を回収した。レシーバーセルおよびプローブ末端から得られた各サンプル溶液は、HPLC を用いて FP 濃度を測定した。膜間の FP 濃度は、ZNF 法にて求めた。血漿タンパク質の漏出を想定した実験系では、血管モデルプローブの灌流液に 5% BSA/PBS 溶液を用いて、Table e5. と同様のスケジュールで実験を行った。回収した各サンプル溶液は、等容量のアセトニトリルを添加し、充分攪拌し遠心分離 (15000 rpm、室温、10 min) し、その上清 20  $\mu\text{L}$  を HPLC で FP 濃度を測定した。

Table e5.

	Time (min)	Push 式ポンプ設定速度 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Pull 式ポンプ設定速度 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	流出速度実測 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )
Step 1	0-80	10	17.5	10
Step 2	80-120	10	15.9	9
Step 3	120-160	10	19.3	11
Step 4	160-240	10	17.5	10

## 8. HPLC によるサンプル溶液中の KP 濃度の測定

KP のサンプルに内標準物質 (FP、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 含有メタノールをサンプルと等容量加えて FP の測定と同条件の HPLC システムで測定した。

## 9. KP の膜透過性実験

2 章 4. と同様の手順で透析膜 2 枚を横型拡散セルへ組み込んだ。ドナーセルへ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  KP/PBS 溶液を適用し、5、15、30、45、60、90 および 120 分後にレシーバーセルから、シンク条件を保つため 200  $\mu\text{L}$  の溶液をサンプリングし、直ちに 37 $^{\circ}\text{C}$  の等容量の PBS をレシーバーセルに適用した。得られたサンプル溶液は、HPLC を用いて KP 濃度を測定した。

## 10. KP による FP と BSA の結合阻害実験

ドナーセル側からシリコーン膜-透析膜 2 枚-プローブ-透析膜 2 枚を積層するが、ドナーセル側から 3 枚目の透析膜に、5% BSA/PBS 溶液 20  $\mu\text{L}$  を充填したシリンジの針先も設置した。これら全ての材料を積層し、シリンジに充填した 5% BSA/PBS 溶液を注入しセルの留め器具で直ちにセルを固定することにより BSA/PBS 溶液を透析膜で挟み込んだ。膜間に設置したプローブは、push 式ポンプに装備された 2.4 mg/mL KP/PBS 溶液を充填したシリンジと接続した。ドナーセルに 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FP/PBS 溶液を適用すると同時に灌流液の送液を開始した。ドナ

一溶液を適用し、15、30、45、60、90、120、150、180、210、240、270 および 300 分後にレシーバーセルから、シンク条件を保つため 200  $\mu$ L の溶液をサンプリングし、直ちに 37°C の等容量の PBS をレシーバーセルに適用した。FP の測定は絶対検量線法により行った。



## 引用文献

- 1) Russel L. M., Guy R. H., Measurement and prediction of the rate and extent of drug delivery into and through the skin, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **6**, 355–369 (2009).
- 2) Singh P., Roberts M. S., Iontophoretic transdermal delivery of salicylic acid and lidocaine to local subcutaneous structures, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 127–131 (1993).
- 3) McNeill S. C., Potts R. O., Francoeur M. L., Local enhanced topical delivery (LETD) of drugs: Does it truly exist?, *Pharm. Res.*, **9**, 1422–1427 (1992).
- 4) 西岡清, アトピー性皮膚炎—病態と治療—改訂版, 医薬ジャーナル社, 東京 (1997).
- 5) Gao X., Wientjes M. G., Au J. L.-S., Use of drug kinetics in dermis to predict in vivo blood concentration after topical application, *Pharm. Res.*, **12**, 2012–2017 (1995).
- 6) Touitou E., Meidan V. M., Horwitz E., Methods for quantitative determination of drug localized in the skin, *J. Control. Release*, **56**, 7–21 (1998).
- 7) Eriko K., Todo H., Sugibayashi K., Skin penetration and safety of nanoparticles, *YAKUGAKU ZASSHI*, **132**, 319–324 (2012).
- 8) 渡邊哲也, 皮膚適用製剤の現状と展望, *Drug Delivery System*, **22**, 450–457 (2007).
- 9) 杉林堅次, 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた薬物の皮膚透過性および皮膚刺激性評価—動物実験代替法確立に向けて—, *薬剤学*, **67**, 89–95 (2007).
- 10) Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y., Prediction of skin permeability of drugs. I. Comparison with artificial membrane, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3452–3459 (1990).
- 11) Leveque N., Raghavan S. L., Lane M. E., Hadgraft J., Use of a molecular from technique for the penetration of supersaturated solutions of salicylic acid across silicone membranes and human skin in vitro, *Int. J. Pharm.*, **318**, 49–54 (2006).
- 12) Ottaviani G., Martel S., Carrupt P., Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction on passive human skin permeability, *J. Med. Chem.*, **49**,

- 3948–3954 (2006).
- 13) Geinoz S., Rey S., Boss G., Bunge A. L., Guy R. H., Carrupt P. A., Quantitative structure-permeation relationships for solute transport across silicone membranes, *Pharm. Res.*, **19**, 1622–1629 (2002).
  - 14) 上月裕一, 板垣宏, 化粧品動物実験代替法の動向 日本における経皮吸収性試験代替法の動向, *Fragr. J.*, **33**, 60–66 (2005).
  - 15) Iizuka T., Minegishi S., Hiramoto K., Samizo K., Ishizuka H., Ishikura C., Relationship between skin irritation and the amount of stripped stratum corneum following the use of adhesive tape for the treatment of ischemic heart disease, *Jpn. J. Hosp. Pharm.*, **24**, 526–532 (1998).
  - 16) Sasamoto A., Tsubaki T., Kabayama H., Clinical efficacy of tulobuterol tape in pediatrics, *Therapeutic Research*, **30**, 1659–1668 (2009).
  - 17) 新開規弘, 奥村豊, 斉藤英男, 楠彰彦, 山内仁史, 鎮痛・消炎貼付剤の薬剤特性と皮膚刺激性, *Pharm. Med.*, **25**, 113–117 (2007).
  - 18) Saita A., Inoue A., Ishibashi H., Tominaga K., Hori A., Miki A., Ohtani H., Ono N., Sawada Y., A questionnaire survey of patients comparing the usability of brand-name and generic ketoprofen tapes, *YAKUGAKU ZASSHI*, **128**, 795–803 (2008).
  - 19) Matsuki H., Kiyokane K., Matsuki T., Sato S., Imokawa G., Recharacterization of the nonlesional dry skin in atopic dermatitis through disrupted barrier function, *Exog. Dermatol.*, **3**, 282–292 (2004).
  - 20) Yoshihara S., Fukuda H., Abe T., Arisaka O., Comparative study of skin permeation profiles between brand and generic tulobuterol patches, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1763–1765, (2010).
  - 21) Uematsu T., Nakano M., Kosuge K., Kanamaru M., Nakashima M., The pharmacokinetics of the beta 2-adrenoceptor agonist, tulobuterol, given transdermally and by inhalation, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **44**, 361–364 (1993).
  - 22) Iikura Y., Uchiyama H., Akimoto K., Ebisawa M., Sakaguchi N., Tsubaki T., Ishizu H., Kabayama H., Yagi K., Miura K., Onda T., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tulobuterol patch, HN-078, in childhood asthma, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **74**, 147–151 (1995).
  - 23) OECD Guideline for the testing of chemicals, 428 Skin absorption : In vitro method (2004).
  - 24) Lodén M., Ungerth L., Serup J., Changes in European legislation make

- it timely to introduce a transparent market surveillance system for cosmetics, *Acta Derm. Venereol.*, **87**, 485–492 (2007).
- 25) Toyoda H., Regulation of the animal experiments and testing in EU, *Environ. Mutagen. Res.*, **27**, 125–128 (2005).
  - 26) Kolar R., Animal experimentation, *Sci. Eng. Ethics*, **12**, 111–22 (2006).
  - 27) Spielmann H., Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs, *ILAR. J.*, **43**, 11–17 (2002).
  - 28) Ortiz P. G., Hansen S. H., Shah V. P., Menne T., Benfeldt E., The effect of irritant dermatitis on cutaneous bioavailability of a metronidazole formulation, investigated by microdialysis and dermatopharmacokinetic method, *Contact Dermatitis*, **59**, 23–30 (2008).
  - 29) Clough G. F., Boutsouki P., Church M. K., Michel C. C., Effects of blood flow on the in vivo recovery of a small diffusible molecule by microdialysis in human skin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **302**, 681–686 (2002).
  - 30) Proksch E., Brandner J. M., Jensen J. M., The skin: an indispensable barrier, *Exp. Dermatol.*, **17**, 1063–1072 (2008).
  - 31) Harada S., Dannenberg A. M. Jr., Kajiki A., Higuchi K., Tanaka F., Pula P. J., *Am. J. Pathol.*, **121**, 28–38 (1985).
  - 32) 森本 雍憲, 從二和彦, 小林大介, 竹内由和, 福島昭二, 宮崎正三, 関川彬, 山下伸二, 夏目秀視, 西田孝洋, 杉林堅次, 長谷川高明, 灘井雅行, *新しい図解薬剤学 改訂 3 版*, 南山堂, 東京, pp. 273 (2003).
  - 33) Sudlow G., Birkett D. J., Wade D. N., Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin, *Mol. Pharmacol.*, **12**, 1052–1061 (1976).
  - 34) Dureja H., Tiwary A. K., Gupta S., Simulation of skin permeability in chitosan membranes, *Int. J. Pharm.*, **213**, 193–198 (2001).
  - 35) Scott C. W., Juntunen J., Devarajan H., Sloan K. B., A correlation of flux through a silicone membrane with flux through hairless mouse skin and human skin in vitro, *Int. J. Pharm.*, **373**, 62–67 (2009).
  - 36) Crank J., Diffusion in a plane sheet, *The Mathematics of Diffusion second edition*, Oxford University Press, Oxford, pp. 44–47 (1975).
  - 37) Seki T., Sashida T., Oshima S., Egawa Y., Nakagawa H., Hosoya O., Juni K., Novel experimental system as an alternative to animal experiments to study skin permeation of drugs, *AATEX*, **14**, 887–897 (2009).

- 38) Kreilgaard M., Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 99–121 (2002).
- 39) Seki T., Wang A., Yuan D., Saso Y., Hosoya O., Chono S., Morimoto K., Excised porcine skin experimental systems to validate quantitative microdialysis methods for determination of drugs in skin after topical application, *J. Control. Release*, **100**, 181–189 (2004).
- 40) Kehr J., A survey on quantitative microdialysis: theoretical models and practical implications, *J. Neurosci. Methods*, **48**, 251–261 (1993).
- 41) Jacobson I., Sandberg M., Hamberger A., Mass transfer in brain dialysis devices—a new method for the estimation of extracellular amino acids concentration, *J. Neurosci. Methods*, **15**, 263–268 (1985).
- 42) Lonroth P., Minisymposium, Microdialysis – new and promising method in clinical medicine, *J. Intern. Med.*, **230**, 363–386 (1991).
- 43) Wang Y., Wong S. L., Sawchuk R. J., Microdialysis calibration using retrodialysis and zero-net flux: application to a study of the distribution of zidovudine to rabbit cerebrospinal fluid and thalamus, *Pharm. Res.*, **10**, 1411–1419 (1993).
- 44) Whitehead K. J., Manning J. P., Smith C. G. S., Bowery N. G., Determination of the extracellular concentration of glycine in the rat spinal cord dorsal horn by quantitative microdialysis, *Brain Res.*, **910**, 192–194 (2001).
- 45) Oshima S., Sashida T., Egawa Y., Hosoya O., Juni K., Seki T., Study of a drug interaction involving the permeation process using an artificial skin model as an alternative to animal skin, *AATEX*, **15**, 97–105 (2010).
- 46) Huggenberger R., Siddiqui S.S., Brander D., Ullmann S., Zimmermann K., Antsiferova M., Werner S., Alitalo K., Detmar M., An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation, *Blood*, **117**, 4667–4678 (2011).
- 47) Mahmoodi M., Hadad M.K., Shamsizadeh A., Azarang A., Rayeni R.A., Effect of trifluoperazine on carrageenan-induced acute inflammation in intact and adrenalectomized rats, *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, **15**, 150–153 (2009).
- 48) 倉田知光, 末梢組織での無麻酔・無拘束マイクロダイアリシス法, *日本薬理学雑誌*, **116**, 181–187 (2000).
- 49) Rosenbloom A. J., Ferris R.L., Sipe D.M., Riddler S.A., Connolly N.C., Abe K., Whiteside T.L., In vitro and in vivo protein sampling by com-

- bined microdialysis and ultrafiltration, *J. Immunol. Methods*, **309**, 55–68 (2006).
- 50) Hotta H., Uchida S., Kagitani F., Stimulation of the nucleus basalis of Meynert produces an increase in the extracellular release of nerve growth factor in the rat cerebral cortex, *J. Physiol. Sci.*, **57**, 383–387 (2007).
- 51) Nose T., Tsurumi K., Pharmacological studies on cutaneous inflammation induced by ultraviolet irradiation (1): Quantification of erythema by reflectance colorimetry and correlation with cutaneous blood flow, *Jpn. J. Pharmacol.*, **62**, 245–256 (1993).
- 52) Sjöholm I., Ekman B., Kober A., Pahlman I., Seiving B., Sjödin T., The specificity of three binding site as studied with albumin immobilized in microparticles, *Mol. Pharmacol.*, **16**, 767–777 (1976).
- 53) Borga O., Borga B., Serum protein binding of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a comparative study, *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **25**, 63–77 (1997).
- 54) Zhang Q., Huang Y., Zhao R., Liu G., Chen Y., Determining binding sites of drugs on human serum albumin using FIA-QCM, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 48–54 (2008).
- 55) Seki T., Hosoya O., Yamazaki T., Sato T., Saso Y., Juni K., Morimoto K., A rabbit ear flap perfusion experiment to evaluate the percutaneous absorption of drugs, *Int. J. Pharm.*, **276**, 29–40 (2004).
- 56) Morimoto Y., Hayashi T., Kawabata S., Seki T., Sugibayashi K., Effect of 1-menthol-ethanol-water system on the systemic absorption of flurbiprofen after repeated topical applications in rabbits, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1254–1257 (2000).