

イオントフォレシスの薬物の皮膚透過促進能に及ぼすエレクトロポレーション  
またはソノフォレシス併用効果に関する研究

【緒言】 皮膚を薬物の投与部位とする経皮吸収型製剤（TDDS: Transdermal Drug Delivery System）や局所皮膚適用製剤は、DDS の一つとして注目されており、すでに医療現場で広範に使用されている。しかし一方で、皮膚はその高いバリアー能から薬物の透過性が低いため、TDDS 等に応用できる薬物は限られる。したがって、より多くの薬物を TDDS 等にするためには薬物の経皮吸収性を高める工夫が必要であり、そのため化学的および物理的吸収促進技術が長年に亘り研究されてきた。特に、物理吸収促進技術はペプチドやタンパク等の高分子薬物の経皮吸収性を向上させるため、注射剤の代替となる TDDS の可能性も期待される。物理吸収促進技術は、皮膚表面に物理的に小孔を形成させたり、電気などの外部エネルギーを利用することにより能動的に薬物を投与または診断することを特徴とする。最近では物理学的経皮促進技術の多様化にともない実用化に向けた様々な検討が試みられており、すでに複数の薬物において臨床試験が進行している。

代表的な物理的吸収促進法としては、電気エネルギーを利用したイオントフォレシス（IP）や高電圧パルスを皮膚に適用するエレクトロポレーション（EP）、超音波を利用したソノフォレシス（SP）、微細な針を利用したマイクロニードル（MN）等がある。IP は低電流（ $0.05\sim0.4\text{ mA/cm}^2$ ）を皮膚に比較的長時間適用する方法で、電荷を有する薬物の電氣的な反発力（electrorepulsion）や電場によって生成される電気浸透流（electroosmotic flow）を駆動力として薬物の経皮吸収を促進させる技術である。一方、EP は細胞膜上に可逆的な小孔を形成させる技術であり、動物やヒト細胞への遺伝子導入法として用いられている。皮膚に対して比較的高電圧（ $>50\text{ V}$ ）パルスを超短時間（数ミリ秒）適用した場合は、高分子薬物の皮膚透過性が促進される。また、SP は低周波数の超音波を皮膚に適用して皮膚透過性を促進させる技術であり、主なメカニズムはキャビテーション、マイクロストリーミング、可熱である。最近では、EP または SP と IP を併用する研究も行われているが、薬物の皮膚透過性が著しく促進されるケースとはほとんど併用効果がないケースがある。これは、これら物理的吸収促進法の効果が薬物の分子量や電荷によって大きく異なることが原因であると考えられる。

そこで本研究では、経口投与が困難な高分子医薬品（タンパク質や遺伝子、抗体等）の TDDS 開発を目指し、IP 技術をベースに EP、SP の併用促進効果とそのメカニズムに関する研究を行った。また、全ての併用実験は、EP または SP を皮膚に前処理適用した後に数時間適用可能な IP を併用した。なお、高分子モデル薬物はインスリンとデキストランローダミン B を用い EP、IP 単独、EP/IP 併用による促進効果を比較した。さらに、高分子薬物の併用促進効果を高める因子として electroosmosis にも着目して electroosmosis に及ぼす EP または SP 前処理の影響についても評価した。

【第1章 インスリンのイオントフォレシスデリバリーに及ぼすエレクトロポレーションの効果】

イオン性高分子モデル薬物であるヒトインスリンの経皮吸収に及ぼす EP、カソードル IP、EP/カソードル IP 併用の効果を評価するために、各電氣的パラメータおよび薬物を含む溶液 pH を変動させて *in vivo* ラット経皮吸収実験を実施した。pH7 の溶液中での EP 単独（ $300\text{ V}$ ）やカソードル IP 単独（ $0.4\text{ mA/cm}^2$ ）適用によりインスリンの吸収はほとんど認められなかったが、pH10 溶液中での EP 単独（ $300\text{ V}$ ）適用により明らかな血中濃度の上昇が確認された。また、EP/カソードル IP 併用群は EP 単独群よりも更に血中濃度の上昇が見られた。さらに、インスリンの血糖値推移においても血中濃度を反映した血糖値の低下が確認され、EP/カソードル IP 併用により著しい血糖値の低下が観察された。また興味深いことに、適用する溶液の pH を 7 から 10 に傾けることにより、インスリンの血中濃度は明らかに上昇する傾向を示した。この原因の一つとしては pH の違いによるインスリンの会合状態の違いが考えられた。すなわち、pH7 溶液中ではほとんどのインスリンが 6 量体を形成するが、pH10 溶液中では、数パーセントながらモノマーもしくはダイマーの形成が観察された。そこで、インスリンの経皮吸収性に及ぼすインスリンの会合状態の影響を確かめるために、ヒトインスリンアナログであるインスリンリスプロを用いて評価を行った。その結果、インスリンリスプロは pH を上げることなく、従来のインスリンに比べて明らかに高い経皮吸収性を示した。したがって、EP/カソードル IP 併用によりインスリンの経皮吸収性を相乗的に高めるためには、pH をアルカリ側に

傾けるだけでなく、インスリンの会合状態を変化させることが有効であることが示された。本実験から、インスリンの経皮吸収は、EP/カソーダル IP 併用により相乗的に促進されることが明らかとなり、インスリンの会合状態を変えることが、カソーダル IP または EP/カソーダル IP 併用によるインスリンの吸収促進に重要であることが示唆された。

### 【第2章 イオントフォレシスにより生じる electroosmosis に及ぼすエレクトロポレーションの影響】

IP 適用時に生じる electroosmosis に及ぼす EP の影響について評価するために、非電解質であるマンニトールを用いて *in vitro* ヘアレスマウス皮膚透過実験を実施した。マンニトールは電荷を持たない低分子化合物であるため、electroosmotic flow のマーカーとして用いた。なお、本実験では、EP 前処理後直ちに  $0.4 \text{ mA/cm}^2$  のアノードル IP を4時間適用した。EP/アノードル IP 併用群のマンニトールの透過性は、アノードル IP 単独群よりも高い透過性を示した。しかし、EP 併用によって促進された透過性の上昇は、EP 前処理にともなう受動拡散の増大に起因するものであり、アノードル IP によって生じる electroosmosis の寄与は EP 前処理により低下していた。加えて、electroosmotic flow は適用する EP 電圧の上昇にともない低下した。一方で、EP 前処理後にカソーダル IP ( $0.4 \text{ mA/cm}^2$ ) を適用した場合のマンニトールフラックスは、IP 単独群 (アノードル、カソーダル-IP) よりも高かったが、EP 単独群よりも低い値を示した。次に、別のモデル化合物として中性高分子化合物であるローダミンBを用いたところ、アノードル IP、EP 単独では透過性の上昇は見られなかったが、EP/アノードル IP 併用により透過性が上昇し、その効果は electroosmosis によって誘導されたものであった。これらの結果は、EP 前処理により新たな透過ルートが形成されてマンニトールやデキストラン等の中性分子の透過性を向上させるが、アノードル IP 併用によって生じる electroosmosis に関しては低下することが示唆された。したがって、EP はアノードル IP 適用時のプラス極からマイナス極に向かって生じる electroosmotic flow を減弱させる方向に影響することが明らかとなった。すなわち、EP/アノードル IP 併用により高い吸収促進効果を得るためには、IP 適用によって生じる electroosmosis の変化にも留意して製剤を設計する必要があることが明らかとなった。

### 【第3章 Electroosmosis に及ぼす低周波数ソノフォレシスまたはエレクトロポレーションとイオントフォレシスの併用効果】

IP の実験と同様に、EP または SP とアノードル IP の併用効果とその吸収促進メカニズムを解析するために、マンニトールのヘアレスマウス皮膚透過実験を実施した。SP/アノードル IP 併用により、マンニトールのフラックスは (効果がない場合もあるが) 明らかに上昇したが、EP/アノードル IP 併用は相乗的な促進効果は示さなかった。次に、このメカニズムを解析するために tape stripping (TS) 法とアノードル IP の併用 (TS/アノードル IP) 効果を同様に評価した。3回までの TS 回数の増加にともない electroosmotic flow によるマンニトールフラックスは相乗的に増加した。しかし、3回以上の TS 回数では増加は得られず、5回の TS 処理によりむしろ低下する傾向を示した。そこで、SP または TS 処理した皮膚を用いて皮膚表面のゼータ電荷を測定したところ、SP 処理した皮膚表面の表面電荷は大きくマイナスに傾く傾向が確認された。これらの結果から、IP 適用時に生じる electroosmotic flow の増加は、EP や TS 前処理よりも SP 前処理により期待できることが明らかとなった。したがって、SP/アノードル IP の併用は薬物の経皮吸収促進に最も有望な組み合わせと考えられた。

【結論】 SP は electroosmosis に対して明らかに EP とは異なる効果を有することが明らかとなり、この結果は、イオン性薬物のみならず非イオン性薬物を含む様々な薬物の経皮吸収性を相乗的に促進させる可能性を示す有用な情報であると考えられた。EP や低周波 SP は皮膚に新規透過ルートを形成させる点では一致しているが、IP を併用する際には electroosmosis に及ぼす効果が大きく異なることを明らかにした。特に、SP の前処理は electroosmosis の増大が期待できるため、アノードル IP との組み合わせが最適であることが見出された。この組み合わせは、これまでに経皮吸収が困難とされていたペプチドやたんぱく質、遺伝子を含む高分子薬物の効率的な経皮送達手法として非常に有用であると考えられた。

## Summary of Academic Dissertation

Seiji Tokumoto

### Studies on the synergistic effect of electroporation or sonophoresis on the enhancement ability of iontophoretic delivery across the skin

**Introduction:** Transdermal drug delivery systems (TDDS) have made an important contribution to medical practice. However, because of the poor permeability of the skin, due to its high barrier properties, the number of drugs that can be delivered via the transdermal route is limited. Over the years, various chemical and physical enhancement techniques have been developed to enlarge the selection of candidate drugs for TDDS. In particular, physical enhancement techniques can be used to deliver macromolecules, such as proteins and peptides, which have been expected as an alternative to injection devices. The characteristic features of these techniques are that they are able to deliver drugs actively by creating new aqueous pathways and/or by utilizing external energy across the skin. Recently, various research designs and commercial development efforts have led to the testing of some products in clinical trials. Some of the physical enhancement techniques that are under investigation include iontophoresis (applying an electric current), electroporation (disrupting the lipid-bilayer through short, high-voltage pulses), sonophoresis (using low-frequency ultrasound), and microneedles (perforating the stratum corneum with very short needles). Iontophoresis (IP) is a technique for enhancing the transport of water-soluble drugs into the body through the application of a low level electric current for a period of several hours. IP enhances the transport of charged and neutral compounds through electrorepulsion and electroosmosis. Electroporation (EP) is used to transfer genes into bacterial, animal and human cells, because it produces reversible tiny pores on the cell membrane. When a high voltage pulse ( $>50$  V) to skin is applied, this property also allows it to enhance the transdermal delivery of macromolecular drugs. Sonophoresis (SP) is a promising technique that uses low frequency ultrasound to deliver water-soluble drugs. The main mechanisms of SP are related to the cavitation of bubbles, thermal effects and microstreaming. Recent studies have demonstrated that markedly high skin permeability can be achieved by the combined use of EP or SP/IP, but some other studies have shown almost no synergistic effect. It has been suggested that the efficacy would vary widely, depending on the molecular weight and electrical charge of the drugs.

In this study, in order to provide important data for promoting the development of TDDS for macromolecules that cannot be taken orally, we investigated the synergistic effect of EP and SP pretreatment on the IP application using some model drugs and analyzed its mechanisms. In all of the experiments, skin pretreatment with EP or SP was applied prior to constant DC-IP for a period of several hours. Insulin and dextran-rhodamine B were used as macromolecular model drugs, and the enhancement of skin permeation when the pretreatment was applied alone or in combination with IP was compared. Furthermore, we paid attention to electroosmosis, which has an important role in the enhancement of the delivery of macromolecules into the skin, and evaluated the effects of EP or SP pretreatment on the electroosmosis during IP.

**Effect of electroporation on the iontophoretic transdermal delivery of human insulin:** In the present study, the effects of EP or cathodal IP alone and their combination on the percutaneous absorption of human insulin were evaluated in solutions with different pHs using various electric parameters in rats. EP alone (300 V) and cathodal IP alone (0.4 mA/cm<sup>2</sup>) resulted in almost no skin permeation of insulin at pH 7, whereas EP treatment (300 V) at pH 10 resulted in a high plasma level of insulin. The combined use of EP and cathodal IP led to a further increase in the plasma level of insulin in comparison to that measured after EP alone. Marked decreases in blood glucose levels, reflecting the increases in the plasma concentration of insulin, were also observed after EP/cathodal IP treatment. Interestingly, a much higher plasma level was observed when the pH of the insulin solution was increased from 7 to 10. One of the reasons was the different self-association properties of insulin at these pH levels. At pH 10, insulin monomers and dimers were observed in addition to the normal hexamer form of insulin, in spite of low percentages. In contrast, at pH 7, most of the insulin was in the hexamer form. To confirm the influence of the self-association properties of insulin, a commercially available human

insulin analogue (Insulin lispro) was then used and evaluated in the same manner. Its skin absorption was found to be extremely high in comparison to that of conventional human insulin without increasing the pH of the solution. The present study therefore suggests that the percutaneous absorption of insulin is synergistically enhanced by the combined use of EP and cathodal IP and that altering the self-association properties of insulin is important for enhancing the percutaneous absorption of insulin by cathodal IP and/or EP.

***The effects of electroporation on the electroosmosis caused by anodal IP:*** The effects of EP on the IP-produced electroosmosis were evaluated in an *in vitro* permeation study of mannitol, a non-electrolyte, through excised hairless mouse skin. Mannitol flux was utilized as an index for the electroosmotic flow due to its low molecular weight and no electrorepulsion effect. Immediately after the EP pretreatment, the anodal iontophoretic permeations were determined at 0.4 mA/cm<sup>2</sup> for 4 h. The mannitol flux observed with the combined application of EP/anodal IP was higher than that without pretreatment. However, with EP pretreatment, a large percentage of the enhancement of mannitol flux occurred due to increased passive diffusion. The contribution of electroosmotic flow caused by anodal IP on the skin permeation of mannitol was decreased by EP pretreatment. In addition, electroosmotic flow was decreased when the voltage applied for EP was increased. In contrast, mannitol flux during cathodal IP at 0.4 mA/cm<sup>2</sup> after EP pretreatment at 150 or 200 V was higher than both that without EP and anodal IP, while the cathodal IP flux after EP was lower than without IP. Next, the neutral high-molecular compound dextran rhodamine B was used as a second model. Anodal IP and EP alone did not increase the skin permeability of this model drug. However, EP pretreatment prior to anodal IP enhanced the skin permeation of dextran rhodamine B. Electroosmotic flow accounted for a large portion of the increased flux of the model drug. These results suggest that the combined effect of EP/anodal IP on the skin permeability to small non-ionic drugs cannot be achieved by electroosmotic flow alone. A synergistic effect of combined EP/anodal IP can be expected for non-ionic high molecular drugs. It therefore became clear that EP affects reduction of electroosmotic flow from the anode to the cathode during anodal IP, and that it will be necessary to take into the change in electroosmotic flow and the size of the penetrants into consideration in order to obtain a synergistic effect from EP/IP.

***The effect of the combination of low-frequency sonophoresis or EP with IP on electroosmosis:*** As with EP/IP, the *in vitro* permeation studies of mannitol were conducted across excised hairless mouse skin to determine and compare the enhancing effect of EP or SP combined with anodal IP on the electroosmotic flow, and to analyze the enhancement mechanism of these combined methods. The combination of SP and anodal IP (SP/IP) resulted in an apparent increase of electroosmotic flow (in some cases no effect was observed with SP/IP), while that of EP and anodal IP (EP/IP) had no synergistic enhancing effect on the electroosmosis. Next, the combined effect of tape-stripping (TS) and anodal IP (TS/IP) was examined in a similar manner to clarify the difference between the SP/IP and EP/IP on the electroosmosis. When the TS number was increased from 0 to 3, a synergistic increase was observed in the electroosmotic flow. However, no further increase was observed with TS numbers of more than 3, and the flow started to decrease when the TS number became 5. Next, the electric charge of the skin surface was measured after application of SP or TS. When SP was applied, the skin surface became much more negative and the electroosmotic flow was markedly increased by SP/IP. Thus, the increase in the electroosmotic flow across the skin during IP application can be obtained not by EP and TS, but by SP. The combined use of SP and IP is a promising means for enhancing the skin delivery of non-electrolyte drugs.

***Conclusion:*** An apparent additional increase in electroosmotic flow during anodal IP was induced by SP pretreatment in comparison to EP; these results suggest that a synergistic promoting effect can be expected for a wide variety of ionic and non-ionic drugs. Although EP and low-frequency SP have similar mechanisms by which to create new pathways for drug transport, electroosmotic flow was dramatically changed by its combination with anodal IP. In conclusion, it became clear that SP and anodal IP was the optimum combination, since it was found that SP pretreatment can be expected to increase the electroosmotic flow. This combination will be useful for delivering peptide and protein drugs for which transdermal delivery has not previously been possible.

## 論文審査の結果の要旨

経皮薬物送達システム (TDDS) は、ドラッグデリバリーシステム技術の一つとして注目されており、局所性、全身性を含む多くの TDDS 製剤が開発され、医療の場で用いられている。最近では、物理的経皮吸収促進技術の開発および実用化が進んでいる。代表的な技術として、電気エネルギーを利用するイオントフォレシス (IP) やエレクトロポレーション (EP)、超音波を利用するソノフォレシス (SP) があり、これら吸収促進法の原理や吸収促進メカニズムも解析されている。近年では、これら技術を併用した研究も行われており、より効果の高い物理的吸収促進法の開発が期待されている。一方で、これら技術の併用により高い経皮吸収促進効果を得るためには、各技術の吸収促進因子に及ぼす影響を評価する必要があるが、併用時の吸収促進メカニズムと効果について論述した報告はない。

本研究は、すでに米国で実用化されている IP 技術と新規物理的吸収促進技術である EP や SP の併用による吸収促進効果とその促進メカニズムについて、薬物の経皮吸収性に及ぼす各技術の適用条件や適用する薬物の分子量、電荷の影響を *in vitro* 皮膚透過試験および *in vivo* 吸収試験によって評価し、その結果を 3 章構成で論じている。本論文では、IP の駆動力である電氣的な反発 (electrorepulsion) と電気浸透 (electroosmosis) の寄与を考慮し、EP や SP の併用効果について詳細な検討を行っている。

第 1 章では、IP の電氣的な反発の駆動力に着目し、溶液中において負に帯電した高分子薬物であるインスリンをモデル薬物としてプレート型電極を用いた EP (150 および 300 V、10 回、パルス間隔 1 秒) またはカソードル IP (0.4 mA/cm<sup>2</sup>、60 分間適用) 単独での効果と EP/IP 併用時の吸収促進効果およびインスリンの経皮吸収に及ぼす EP 電圧強度やインスリンの存在形態 (分子量) の影響について、ラットを用いた *in vivo* 吸収試験による検討を行った。その結果、EP と IP の併用により、インスリンの経皮吸収性は相乗的に促進されることを見出した。インスリンの経皮吸収は、IP 単独もしくは EP 単独適用の場合、インスリンを含むドナー溶液の pH に大きく影響され、アルカリ性側 (pH 10) でインスリンの吸収性が増大することを示した。また、各種 pH のドナー溶液を用いて EP/IP の併用効果を検証した結果、EP および IP 単独に比べて著しく吸収が促進されることを明らかとした。その効果は、ドナー溶液の pH のアルカリ性側へのシフト、300 V までの EP 適用電圧強度に依存して増大することを示した。さらに、この併用効果は溶液中のインスリンの会合状態によって大きく影響され、pH をアルカリ性側に傾けて単量体や二量体の形成率を高めることにより、併用効果も増大することを見出し、負電荷を有する高分子薬物であっても、EP と IP を併用することにより、相乗効果が期待できることを示した。

第 2 章では、IP の電気浸透流 (electroosmotic flow) に着目し、電荷を持たない低分子化合物であるマンニトールと高分子化合物であるデキストランローダミン B をモデル薬物として、皮膚の透過性に及ぼす EP の影響を調べるために、剣山型電極を用いた EP

(150 および 300 V、10 回、パルス間隔 1 秒) またはアノードル IP ( $0.4 \text{ mA/cm}^2$ 、4 時間適用) 単独および EP / IP 併用時の *in vitro* 皮膚透過試験による検討を行った。その結果、300 V までの電圧を用いた EP 前処理によりアノードル IP 適用時のマンニトールの皮膚透過性は促進されるが、その効果は EP 前処理による受動拡散の増加によるものであり、電気浸透に依存した透過性はむしろ低下することを明らかにした。一方で、デキストランローダミン B の場合は、 $0.4 \text{ mA/cm}^2$ 、4 時間のアノードル IP 単独ではほとんど透過しないが、EP / IP 併用により皮膚透過性の上昇が確認された。これらの結果より、EP の適用は電気浸透流を減弱させるが、EP 適用によって新たに形成された透過ルートによってのみ透過するような高分子薬物の場合には、EP / IP 併用により透過促進効果が期待できることを明らかにした。

以上、1 章および 2 章の結果より、高分子薬物を用いた場合には、電荷の有無にかかわらず EP / IP 併用により、相乗的な吸収促進効果が期待できることを明らかにした。

第 3 章では、電場を利用した EP に加えて超音波を利用した SP に着目し、マンニトールをモデル薬物として電気浸透流に及ぼす EP または SP の影響を評価するために IP 単独時、EP / IP および SP / IP 併用時の *in vitro* 皮膚透過試験による比較検討を行った。EP の適用条件は、剣山型電極による 150 V、10 回、パルス間隔 1 秒、SP の適用条件は、20 kHz、 $1.1 \text{ W/cm}^2$ 、5 秒 ON/OFF パルス、1 分間照射とし、IP は  $0.4 \text{ mA/cm}^2$ 、4 時間のアノードル IP とした。その結果、SP とアノードル IP の併用により、マンニトールの透過性は相乗的に促進され、その効果は SP 前処理による促進効果が高い程、電気浸透流も増大する傾向があることを示した。また、皮膚表面のゼータ電位の測定結果から、SP の適用により皮膚表面のマイナス電位が増大されていることが示唆され、これらの結果から、SP による皮膚表面電位変化や皮膚表面の構造変化が電気浸透流の増大を引き起こす可能性を示した。

以上、本論文では、物理的経皮吸収促進技術である EP や SP と IP を併用することによる相乗的皮膚透過促進効果について、適用条件、モデル薬物の電荷・分子量および IP の駆動力に着目して検討し、EP および SP は、皮膚に新規透過ルートを形成させる点では一致しているが、IP を併用する際には、これらの因子によってその効果が大きく影響されることを明らかとした。本研究で用いた条件での SP 前処理は電気浸透流の増大が期待できるため、SP と IP の併用は新規な物理的経皮吸収促進技術としての実用化も期待できる。

本論文はこれまでに明確になっていない物理的経皮吸収促進技術を組み合わせた外用剤の設計および開発手法を新たに提供するものであり、本論文の内容は、研究の意義に加えて有用性に富むものであることから、本研究科課程によらない博士（薬科学）の論文に十分値するものと判断した。