

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

徳本 誠治

目次

緒言	1
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	9
第1節 実験の部.....	11
1. 実験材料	11
2. 実験動物	11
3. 血漿中のインスリンおよびグルコース濃度の測定方法	11
4. ラット <i>in vivo</i> 吸収実験	12
5. インスリンの分子量分布解析	14
6. データ解析	15
第2節 結果	16
1. ヒトインスリンの経皮吸収に及ぼすイオントフォレシスまたは エレクトロポレーションの効果	16
2. インスリンの経皮吸収に及ぼすエレクトロポレーションおよび イオントフォレシスの併用効果	18
3. インスリンの会合に及ぼす pH の影響	23
4. インスリンリスプロの経皮吸収に及ぼすイオントフォレシスと エレクトロポレーションの影響	24
第3節 考察	26
第4節 小括	31
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	32
第1節 実験の部.....	33
1. 実験材料	33
2. 実験動物	33
3. <i>In vitro</i> 皮膚透過試験	33
4. エレクトロポレーション または イオントフォレシス適用	33
5. デキストランローダミンBの皮膚透過	36
6. 皮膚電気抵抗の測定法（直流通電時）	36
7. データ解析	36
第2節 結果	37
1. ヘアレスマウスの皮膚電気抵抗値変化	37
2. マンニトールの皮膚透過	38
3. デキストランローダミンBの皮膚透過	43

第3節 考察	45
第4節 小括	49
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	50
第1節 実験の部	51
1. 実験材料	51
2. 実験動物	51
3. <i>In vitro</i> ヘアレスマウス皮膚透過試験法	51
4. 物理的吸収促進法による前処理法と IP 適用法	51
5. ヘアレスマウス皮膚表面電荷の測定法	52
6. データ解析	52
第2節 結果	53
1. マンニトールの皮膚透過	53
2. ソノフォレシスとイオントフォレシス併用効果とソノフォレシス 前処理後の passive flux の関係	55
3. テープストリッピング回数とマンニトールフラックスの関係	56
4. Electroosmosis に及ぼす各種物理的吸収促進技術の影響	58
5. ヘアレスマウス皮膚の表面電位	61
第3節 考察	62
第4節 小括	65
総括	66
謝辞	71
引用文献	72

略号

TDDS	:	Transdermal Drug Delivery System
EP	:	Electroporation
IP	:	Iontophoresis
SP	:	Sonophoresis
LHRH	:	Luteinizing hormone-releasing hormone
PTH	:	Parathyroid hormone
pI	:	Isoelectric point
AUC	:	Area under the curve
HEPES	:	4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
DC	:	Direct current
DEX	:	Dextran rhodamine B
EF	:	Enhancement factor
ER	:	Enhancement ratio

緒言

皮膚から薬物を吸収させる技術や外用剤に関する研究の歴史は古く、20世紀前半には本邦においてはパップ剤が日本薬局方に収載されるなど、局所適用製剤を中心に研究が進められてきた。20世紀後半からは、経皮薬物送達システム（TDDS: Transdermal Drug Delivery System）として鋭意研究され、現在では適用した局所での効果発現を期待する局所性製剤のみならず、薬物が皮膚の血管から吸収され全身循環系を経て効果を発現する全身性製剤が医療現場で用いられている¹⁾。TDDSの特長は、血中濃度の持続化や肝臓による初回通過効果の回避、投与の簡便化や投与回数を減らすことによるアドヒアランス向上などが挙げられる²⁾。最近では、アルツハイマー型認知症治療薬やパーキンソン病治療薬のTDDSも上市され、製品数、領域も多岐に亘っている³⁾。

一方で、皮膚は高いバリア機能を有しており、薬物の透過性も低いため、TDDS開発意義の高い薬物であっても製剤化可能な薬物は制限されている。そのバリア機能の主体は皮膚の最外層に存在する角層であり、薬物の透過性に対して最も大きな障壁となる。したがって、より多くの薬物のTDDS開発を加速させ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、化学的吸収促進法や物理的吸収促進法が長年に亘り研究されてきた。最近では物理的吸収促進法による経皮吸収促進技術の開発および実用化が進み、技術の種類も多岐に亘っている。これらの技術は、角層に対して物理的に新規透過ルートを形成させたり、外部エネルギーを利用することにより薬物を能動的に投与することを特徴とする。したがって、従来の濃度勾配のみを駆動力とした受動拡散による経皮吸収に比べ、経皮吸収させることが困難であったペプチドやタンパク質等の高分子薬物の投与も可能となるため、今やTDDSは注射剤の代替としても期待されるようになった。代表的な物理的な吸収促進技術としては、電気エネルギーを利用するイオントフォレシス（IP）⁴⁾ やエレクトロポレーション（EP）⁵⁾、超音波エネルギーを利用するソノフ

オレシス (SP) ^{6,7)} がある。これらの技術については、既に様々な薬物を用いた検討が行われており、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。また近年では、これらの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方法の開発が期待されている。しかし、これら技術の併用により高い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、そのため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まだない。

IP は、皮膚に低い電流 ($0.05\sim 0.5\text{ mA/cm}^2$) を比較的長時間適用することにより主にイオン性薬物の経皮吸収を促進させる方法で、電場によって発生する電気的な反発 (electrorepulsion) と電気浸透 (electroosmosis) が主な駆動力となる ⁸⁾。米国では既に実用化された製剤も存在し、IP ではリドカイン/エピネフリン ⁹⁾、フェンタニル ¹⁰⁾、スマトリプタン ¹¹⁾ を含有した製剤が承認されており、LHRH (Luteinizing hormone-releasing hormone) ¹²⁾ やカルシトニン ¹³⁾ などのペプチドや、アンチセンスオリゴヌクレオチド ¹⁴⁾ への応用が報告されている。典型的な IP システムを Fig. 1 に示す。IP の通電方式は、電流を一定に制御する定電流通電と電圧を一定に制御する定電圧通電がある。IP による薬物の透過性は電圧よりも電流密度 (mA/cm^2) の影響を大きく受けるため、定電流通電は薬物の送達量をある程度制御することが可能である。一方、定電圧通電は電流制御が不要なためコスト低減が見込めるが、皮膚の電気抵抗には個体差があるため薬物の送達量の制御が難しい側面がある。IP システムは基本的に、電流をコントロールする電源部、陽極電極、陰極電極を備えた2つのリザーバー部から成る。薬物の電気的特性に応じてカチオン性の場合は陽極槽に、アニオン性の場合は陰極槽に薬物を含有させる。両極の電極槽を皮膚に密着させ、定電流通電の場合は低電流 ($0.05\sim 0.5\text{ mA/cm}^2$) を数分から数時間適用する。その結果、薬物が能動的に皮膚へ移行し、同時に薬物と対をなす内因性イオンが皮膚からリザーバー中に抽出される。この時、電流 (イオン) は皮膚の中でも電気抵抗の小さい汗腺や毛嚢などの付属器官を流

れるため、薬物の透過ルートは主にこれらの経路に限られる¹⁵⁾。実際に、IP 単独適用によってデリバリー可能な薬物の分子量による限界は、約 20,000 Da 程度であることが報告されている¹⁶⁾。

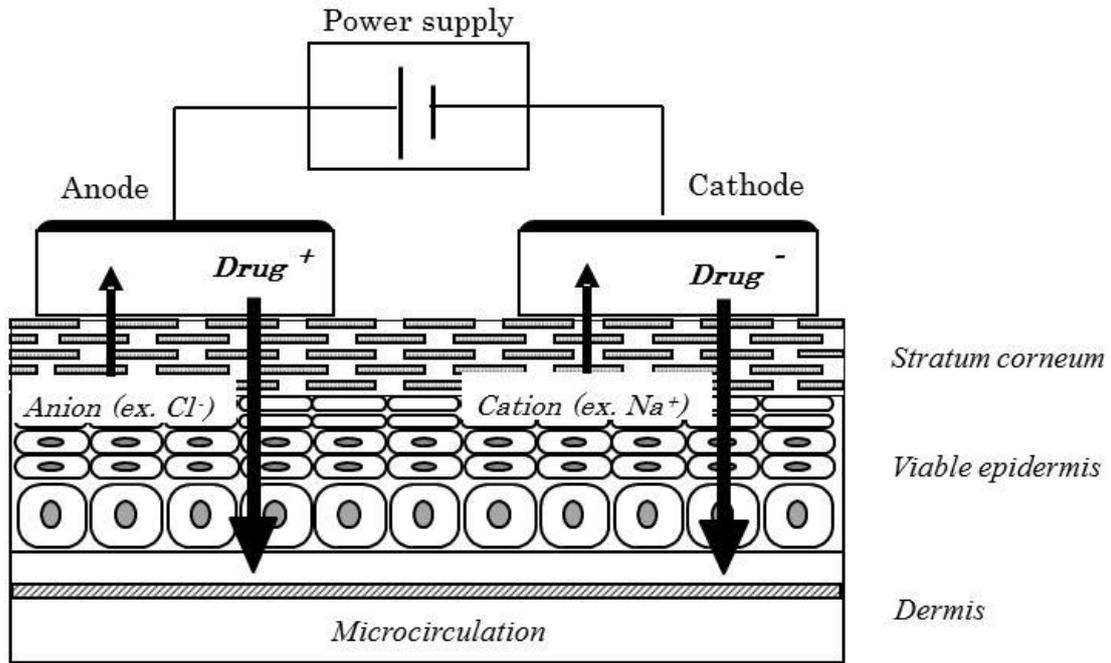


Fig. 1 Schematic representation of transdermal iontophoresis system. Drug⁺ and Drug⁻ are positive and negative drug ions. Anion (ex. Cl⁻) and cation (ex. Na⁺) are counter ions transferred from the skin.

IP による薬物イオンの移動量は、適用する電流量（電流と時間の積）に比例する。

また、総電流量は以下の式で表される。

$$I_t = F \left(\sum_d J_{d+} + \sum_k J_{k-} \right) \quad (1)$$

ここで、電流量 I_t はこの式から、電流は陽イオンと陰イオンの透過の総和となることが理解できる。但し、通電時に移動するイオンは薬物だけではなく、リザーバー内に共存する同種のイオンや、皮膚側に存在する反対符号のイオンも含まれる。よって、製剤中の薬物 (d 成分) の透過速度 J_d と I_t の関係には、電流で移動する薬物イオンの割合

として輸率を考慮しなければならない。

すなわち、薬物の透過速度 J_d は以下の式 (2) で示される。

$$J_d = t_d I_t (MW) / z_d F \quad (2)$$

ここで、 MW は d の分子量、 Z_d は薬物のイオン価、 F はファラデー定数である。さらに輸率 t_d は以下の式 (3) のように示すことができる。

$$t_d = Z_d u_d C_d / \sum_{i=1}^n Z_i u_i C_i \quad (3)$$

ここで、 u_d は薬物イオンの移動度、 C_d は薬物のモル濃度、 Z_d は薬物の価数、添え字 i はイオンの種類、 n はその数を示す。

また、electrorepulsion による皮膚透過に加え、electroosmosis により生じる電気浸透流 (electroosmotic flow) も皮膚からの透過に大きな役割を果たす (Fig. 2)。

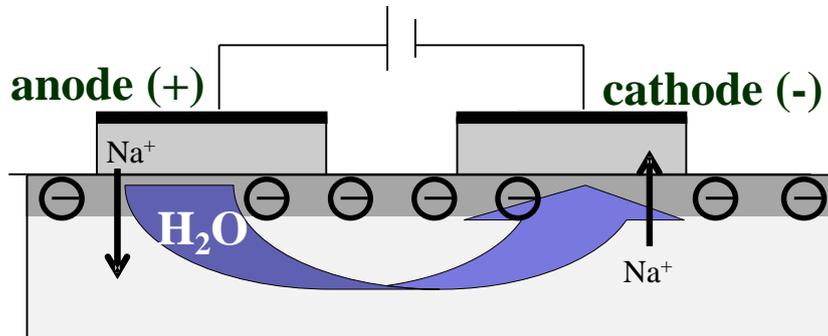


Fig. 2 Schematic representation of iontophoresis system and electroosmotic flow.

一般に、角層は生理的 pH 下では負にチャージしており、陽イオンを選択的に透過させる性質を持っている¹⁷⁾。この選択性により、水和したイオンの移動によって電気浸透流を引き起こし、陽極側から陰極側へ溶媒 (水) の流れが発生する。したがって、陽イオン性薬物は electrorepulsion だけでなく、electroosmosis による電気浸透流によって促進されるため、陰イオン性薬物よりも高い皮膚透過性が期待できる。また、電気

浸透流は、薬物のイオン化/非イオン化に関わらず水に溶解した薬物の透過を促進させるため、IP は荷電した物質だけでなく、水溶性薬物の透過促進に有効な促進技術と言える。ただし、皮膚の表面電荷（負電荷）を中和するような化学的吸収促進剤やペプチドの前処理^{18,19)}、また、角層を完全にストリッピングした場合には電気浸透流が減少することが報告されている²⁰⁾。したがって、陽イオン性薬物の皮膚透過性は、electrorepulsion に加え、electroosmosis も大きく影響するため、皮膚透過 flux (J_{total}) は以下の式 (4) のようになる²¹⁾。なお、 $J_{passive}$ は受動拡散による薬物の皮膚透過を示しており、 $J_{electrorepulsion}$ と $J_{electroosmosis}$ は IP 適用によって透過促進される因子を示す。

$$J_{total} = J_{electrorepulsion} + J_{electroosmosis} + J_{passive} \quad (4)$$

($J_{passive}$ は $J_{electrorepulsion}$, $J_{electroosmosis}$ に比べて寄与率が著しく低いため、省略される場合もある)

一方、陰イオン性薬物については、electroosmosis を除いた以下の式によって表される。

$$J_{total} = J_{electrorepulsion} + J_{passive} \quad (5)$$

Guy らはカチオン性薬物の皮膚透過性に対する electrorepulsion, electroosmosis および受動拡散の寄与について報告している。彼らは透過物（一価のカチオン）の分子量と Flux（透過速度）の関係を理論的に解析し、Fig. 3 のような結果を得ている²¹⁾。ここで、縦軸、横軸はそれぞれ相対的な透過速度とカチオン性薬物の分子量を表しており、透過に寄与する各因子（passive diffusion, electrorepulsion, electroosmosis）と薬物分子量の関係が示されている。Fig. 3 から明らかなように、electrorepulsion は分子量の増大にともない直線的に低下するが、electroosmosis は分子量の大きさによらず一定の値を示している。すなわち、Na⁺などの低分子で移動度の大きい荷電分子の皮膚透過速度は electrorepulsion が大きく寄与することを示しており、分子量が 1,000 Da 程度の比較的大きいペプチド化合物等の皮膚透過速度は、electrorepulsion よりも

electroosmosis が大きく寄与することを示している。加えて、 J_{total} に対する $J_{passive}$ の割合は、ほとんど無視できる程度と考えると良いことが分かる。したがって、IP 製剤の最適化に関しては、electrorepulsion と electroosmosis の寄与を考慮した上で設計することが重要であり、特に高分子薬物の経皮送達を考えた場合、electroosmosis の変化が皮膚透過性に大きく影響することは明らかである。一方、EP は、高電場を印加することにより細胞膜に可逆的に小孔を形成させるため、遺伝子などを細胞に導入する方法として従来から用いられた技術である⁵⁾。このメカニズムを経皮吸収に応用した例としては、1993 年の Prausnitz らの報告²²⁾ を皮切りに、モデル薬物として比較的分子量の安息香酸²³⁾ や、カルセイン (MW: 684)²⁴⁾、高分子にあたるオリゴヌクレオチド (MW ~ 5,000 Da)²⁵⁾、4.4~38 kDa の分子量を持つ FITC (フルオレセインイソチオシアネート標識) デキストラン²⁶⁾ など多くの薬物について報告された。これらの報告から EP は、少なくとも分子量 4 万程度の高分子に対しても皮膚透過促進効果を有することが示されている。EP による薬物の吸収促進メカニズムとしては、皮膚に 50 V 以上の高電圧を非常に短い時間 (数マイクロ~ミリ秒)、複数回適用することにより、皮膚に新たな透過ルートを形成させることが報告されている²²⁾。

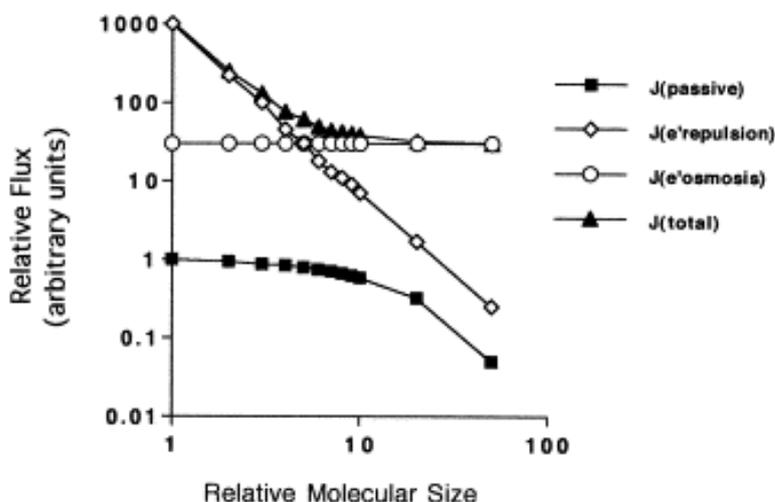


Fig. 3 The contributions of passive [J (passive)], electrorepulsive [J

(e⁻repulsion)], and electroosmosis [J (e⁻osmotic)] fluxes to the total iontophoretic transport [J (total)] of cationic drugs as a function of relative molecular size. (RH. Guy らの論文²¹⁾ から引用)

また、SP は超音波エネルギーによって薬物の皮膚透過性を促進させる技術であり、1954 年に Fellingner らが初めて報告して以来、インスリンを含む多くの高分子薬物の経皮吸収について研究報告がなされている²⁷⁻³⁰⁾。SP のメカニズムとしては、熱効果、超音波による対流効果、さらにキャビテーション効果が報告されている²⁷⁾。Mitragotri らは、周波数の比較検討を行い、20 kHz の周波数が従来の 1 MHz よりも約 1,000 倍の効果があることを報告しており、周波数に反比例すると言われているキャビテーション効果が主要メカニズムであることを示唆している²⁸⁾。キャビテーションは真空に近い空洞が形成される現象であり、溶液中に超音波が照射されると負圧により液体分子が引き裂かれ、溶液中に存在する小さな気泡を核として真空状態に近い空洞が形成される³⁴⁾。真空状態に近い空洞（気泡）は、超音波の振動により押しつぶされて、活性酸素、衝撃波、高熱等の非常に大きなエネルギーを発生させる。これらのエネルギーが角層に作用することによって薬物の新規透過ルートを形成させると考えられる。したがって、新規透過ルートを皮膚に形成させる EP や SP と長時間適用可能な IP を組み合わせることは、生理活性ペプチド、タンパク質、遺伝子、さらには抗体のような高分子医薬品の持続的な経皮送達も実現する可能性が期待される。

以上のような背景のもと、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）の経皮デリバリーの実現を目指し、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。併用実験は、EP または SP を前処理適用した後に長時間適用可能な IP を併用する方法に統一して実験を開始した。まず第 1 章では、electrorepulsion に着目し、EP または IP 単独での効果と EP / カソード IP 併用時の吸収促進効果について、インスリン（負電荷）を用いた *in vivo* 吸収

実験から検討した。また、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）の影響についても検討を行った。第 2 章では、第 1 章で EP / カソードル IP 併用により促進効果が確認されたため、高分子薬物の送達に大きく影響するもう一つの因子である electroosmosis に着目し、その影響について ¹⁴C-マンニトールを用いた皮膚透過試験により考察した。また、第 3 章では、SP が electroosmosis に及ぼす影響に着目し、EP / IP 併用試験との比較検討を行った。また、SP / IP 併用により、電気浸透流の増大が確認されたため、そのメカニズムについてもテープストリッピング法や皮膚ゼータ電位測定により考察することを試みた。

以下に本研究で得られた結果について詳述する。

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

インスリンは、消化管で分解されるため、非経口的に投与されている。最も一般的な投与方法は、患者の自己注射による皮下投与方法であり、針注による痛みや、注射部位における感染の危険性は免れず、より簡便で非侵襲的な投与方法が望まれている。インスリンの経皮投与は、消化管における薬物の分解や初回通過効果を避けることができるため、最適な投与ルートとしての一つである。インスリン分子は 21 個の直鎖ペプチド (A 鎖) と 30 個の直鎖ペプチド (B 鎖) を 2 個の S-S 結合で連結し、他にもう 1 個の S-S 結合を A 鎖内に有して立体構造を保持し、体内では 6 量体として存在している。速効型ヒトインスリン注射液中のインスリンも製剤中では 6 量体を形成しているが、皮下注射後に 6 量体から 2 量体、単量体になって血中に吸収され体内の血流に到達する³¹⁾。したがって 6 量体を形成したインスリン (MW: 36 kDa) の皮膚透過に関しては角層がメインバリアとなり、IP 単独適用による吸収促進効果は得られていない³²⁾。インスリンの IP に関する報告としては、遺伝子組み換え技術により合成されたモノマーインスリンを用いた例³²⁾ や、角質剥離³³⁾、脱毛クリーム³⁴⁾、ケミカルエンハンサー³⁵⁾などと IP を組み合わせた投与により血糖値の減少が認められた報告があるが、EP との併用による効果を *in vivo* で調査した報告はまだ無い。また、これまで EP と IP を併用した *in vitro* の例としては、LHRH (MW: 1.2 kDa)³⁶⁾、サーモンカルシトニン (MW: 3.6 kDa)³⁷⁾、PTH (Parathyroid hormone) (MW: 4.1 kDa)³⁷⁾、ブプレノルフィン³⁸⁾、sodium nonivamide acetate³⁹⁾、チモロール、アテノロール⁴⁰⁾が挙げられるが、IP と EP の併用により著しく皮膚透過性が促進されたケース³⁶⁻³⁸⁾ や、ほとんど併用効果が確認されなかったケース^{39,40)} が混在し、薬物の分子量や電荷によって効果が大きく異なることが報告されている。加えて、これまでに併用促進効果が得られたケースとして、LHRH³⁶⁾、サーモンカルシトニン、PTH³⁷⁾等の薬物

が挙げられることから、EP と IP の併用は比較的高分子の薬物において有用であると
考えられる。

そこで、本研究では、ヒトインスリンを *in vivo* で吸収させるために、ラットを用い
て EP または IP をそれぞれ単独もしくは併用することによる経皮吸収促進効果につい
て、各電気的パラメータおよび薬液の pH を変動（インスリンの電荷状態変化、会合状
態変化）させて評価した。また、十分な薬理効果が期待できるヒトインスリンの血中
濃度が得られる条件であることを確認するために、得られたラット血漿中インスリン
濃度プロファイルから吸収速度を算出し、ヒトに投与した場合に予想される血中濃度
をシミュレーションによって求めた。

第1節 実験の部

1. 実験材料

ヒトインスリン (Humulin R U-100) および インスリンリスプロ (Humalog) はイーライリリー (神戸) より購入した。血中グルコース濃度の測定は、和光純薬工業株式会社 (大阪) のグルコース CII-テストワコーを使用した。その他のすべての溶媒、試薬類は、市販の特級グレード品を精製せずにそのまま使用した。また、EP に用いたプレートタイプの電極 (厚さ, 0.04 mm) は銀箔 (村田余箔, 東京) と試験管を用いて加工した (Fig. 1-1)。

2. 実験動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (250~300 g) は株式会社 埼玉実験動物供給所 (杉戸, 埼玉) (現在は廃業) より購入し、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ にコントロールされ、12 時間ごとに明暗サイクルを設定した部屋で飼育した。水と餌 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) は自由に摂取可能とした。また、動物入荷後一週間は馴化期間を設けた。なお、動物実験は城西大学生命研究センターの倫理規定にしたがって行った。

3. 血漿中のインスリンおよびグルコース濃度の測定方法

ラットの血液は、尾静脈より 0, 0.5, 1, 2, 4 時間のタイミングで経時的に採取した。血中のグルコース濃度はグルコーステストワコー II で測定し、対コントロール% で表示した。なお、インスリン適用前 (0 時間) の血糖値をコントロールとして、各採血ポイントでの変化率の平均値を % Average、最も変化が大きい採血ポイントの変化率を % Change として算出した (Table 1-1)。採取した血液は、遠心分離操作 (12,000 rpm, 5 分) を行い血漿を得た。この血漿サンプル中のインスリン濃度は、エンザイムイムノアッセイキット (ダイナボット株式会社, 東京) を用いて測定し、 $\mu\text{U}/\text{mL}$ で表示した。

4. ラット *in vivo* 吸収実験

ウレタン麻酔下 (50 mg/kg, *i.p.*) のラットを 37°C 程度に暖めた温熱パッドの上に載せて実験を行った。上腹部付近の毛を電気シェーバーで注意深く剃毛した後、エタノールを含浸させた脱脂綿で皮膚表面を拭き取った。これらの処理を施した腹部 2ヶ所に、有効面積 2.5 cm² のアクリルセルを接着し、一方のセルには 0.2% BSA 溶液を含むインスリン溶液 2 mL を、もう一方のセルには生理食塩液を注入した。なお、インスリン溶液の pH は 0.2 N の NaOH を用いて pH7~10 に調節した (pH7~10 の範囲では大部分のインスリンはマイナスに荷電している)。

EP の適用は、150 または 300 V (10 ms) ×10 回 (パルス間隔 1 秒) を矩形波発生装置 (Electro Square Porator T820, BTX, San Diego, CA, U.S.A.) を用いて行った。EP 電極には、プレートタイプの電極を用い、電極が皮膚に触れるようにセルの中に配置して適用した。EP 適用後、Ag/AgCl 電極を皮膚表面から 5 mm の距離に配置し、カソードル IP を 60 分間適用した。なお、カソードル IP は ADIS-HP (久光製薬株式会社, 鳥栖, 佐賀) を用いて 0.4 mA/cm² の直流電流を 60 分間適用した。本実験に使用した EP 電極、IP 電極の適用方法を Fig. 1-1 に示す。

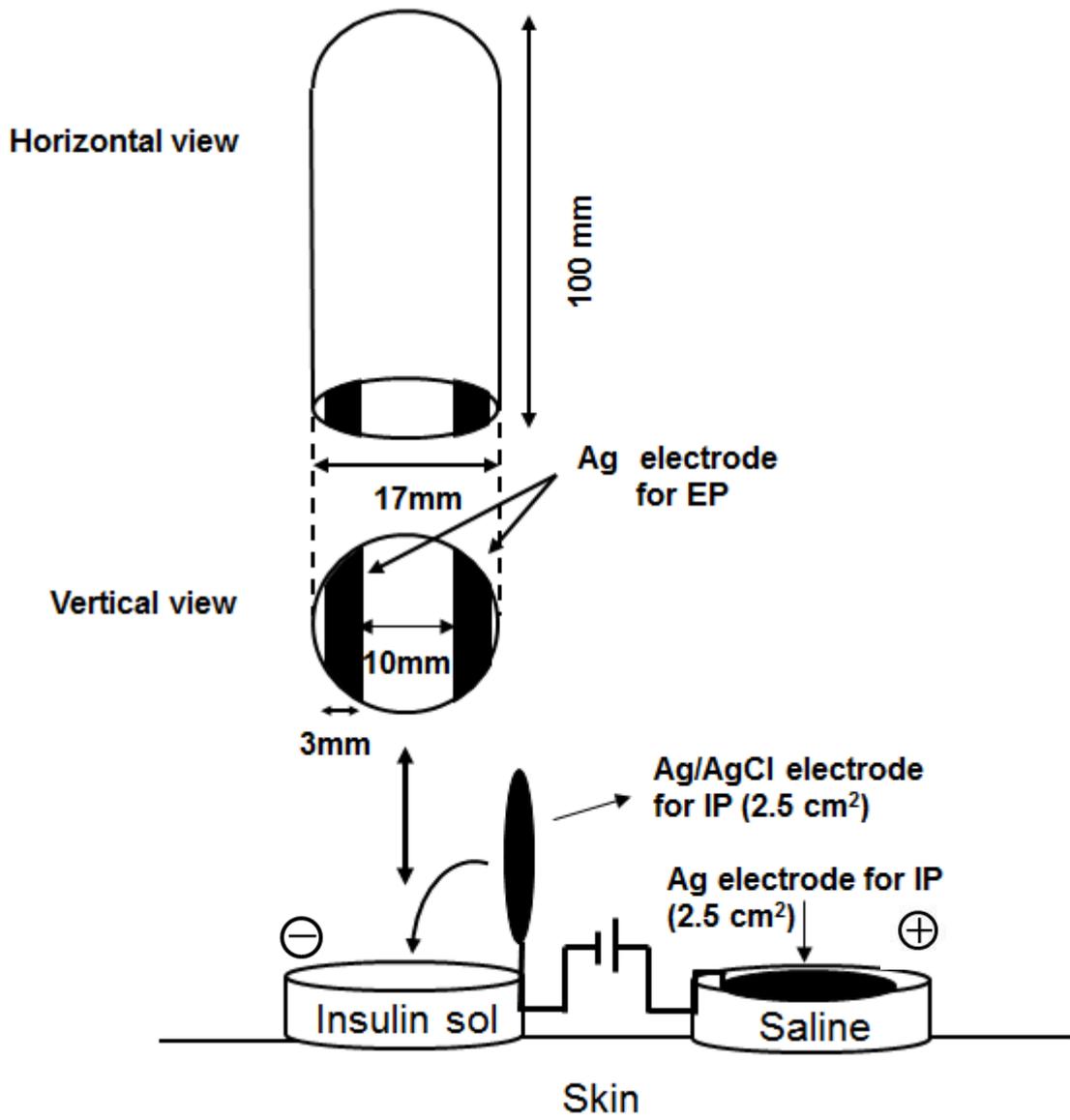


Fig. 1-1 Schematic representation of electrodes for EP and IP

5. インスリンの分子量分布解析

インスリンの自己会合状態に及ぼす EP の影響や溶液 pH の影響を評価するために、遠心式フィルターユニット (Microcon® Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) を用いて分画操作を行い、会合状態の解析を行った。EP は、pH7 または pH10 に調整したヒトインスリン溶液を 2 mL 注入した 2.5 cm² のアクリルセル内で適用した。EP 適用条件は *in vivo* 吸収実験と同様で、プレートタイプ電極を用いて 150 V または 300 V (10 ms) × 10 回 (パルス間隔 1 秒) を適用した。インスリン溶液はフィルターユニットの上部に適用し、遠心分離 (14,000×g, 30 分) 後、ろ液中のインスリンを HPLC (LC-10AS, 株式会社島津製作所, 京都) にて測定した。なお、インスリンの回収率 % は、下記式 (1-1) により算出した。

$$\% \text{ filtrate} = 100 \times \frac{W_f \times C_f}{W_0 \times C_0} \quad (1-1)$$

ここで、 W_f および W_0 はろ過液および注入液の質量、 C_f と C_0 はろ過液および注入液中のインスリン濃度を表す。ろ過液および注入液は希薄溶液のため比重を 1 とすると、この計算式からろ過されたインスリンの回収率を算出できる。

また、HPLC 測定条件を以下に示す。

送液ユニット	: LC-10AS (株式会社島津製作所)
レコーダー	: C-R5A (株式会社島津製作所)
システムコントローラー	: SCL-10A (株式会社島津製作所)
カラムオープン	: CTO-6A (株式会社島津製作所)
UV 検出器	: SPD-10A (株式会社島津製作所)
カラム	: Inertsil® ODS-3, 4.6×150 mm (GL サイエンス, 東京)
流速	: 1.0 mL/分
移動相	: アセトニトリル: 0.015 M リン酸緩衝液 (pH6.8) (1:1)
検出波長	: 205 nm

6. データ解析

データ数は $n = 3-5$ とし、図および表には平均値 \pm S.D. で示した。必要に応じて一元配置分散分析 (One-factor ANOVA) および Tukey's test によって統計解析を行った。 $P < 0.05$ または $P < 0.01$ を有意とした。

第2節 結果

1. ヒトインスリンの経皮吸収に及ぼすイオントフォレシスまたはエレクトロポレーションの効果

インスリンの *in vivo* 経皮吸収に及ぼすIPもしくはEP単独の効果を調べるために、pH7 と pH10 に調整したインスリン溶液 (50 U/mL) を用いてラットに適用した。IP ではインスリンの等電点 ($pI=5.3$) を考慮して cathode をドナー溶液とし、1 時間、定電流通電 (0.4 mA/cm^2) を行った。EP は 300 V, 10 ms の矩形波パルスを用いて適用前に前処理使用 (10 pulse/10 s) した。Fig. 1-2 にインスリンの血漿中薬物濃度推移を、Table 1-1 には血糖値の変化率を示す。pH7 のインスリン溶液を用いた場合、カソードル IP 単独群、EP (300 V) 単独群の両群ともにインスリンの経皮吸収は認められず、血糖値にも大きな変動は認められなかった。

一方、pH10 のインスリン溶液を用いた場合、カソードル IP 単独群において $107 \mu\text{U/mL}$ の血漿中濃度上昇が確認され、IP 適用後は速やかに減少した。また、EP 単独群においても時間依存的なインスリン血中濃度の増加が確認され、4 時間後には約 $50 \mu\text{U/mL}$ を示した。しかし、血糖値レベルに関しては、ほとんど影響は見られなかった。

なお、インスリン適用前 (0 時間) の血糖値は、 $150 \text{ mg/dL} \sim 250 \text{ mg/dL}$ の範囲であった。

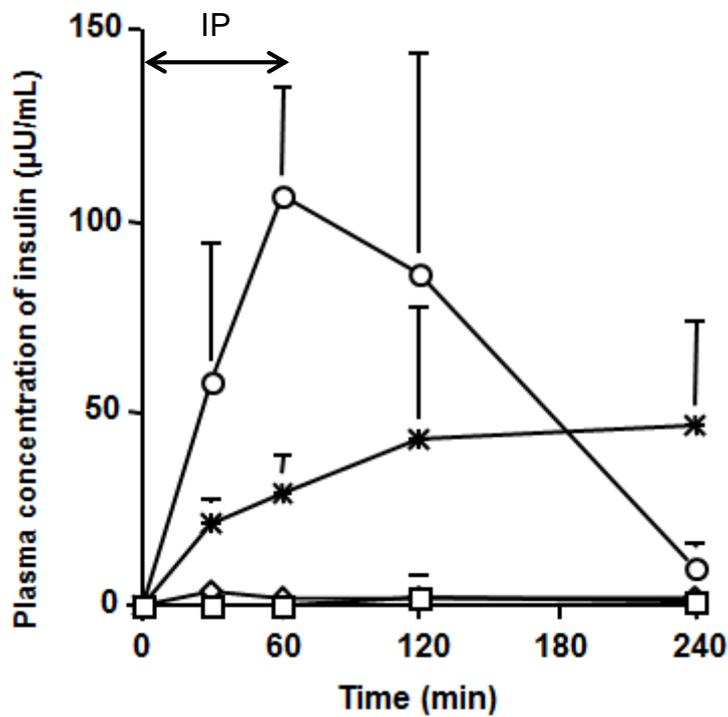


Fig. 1-2 Effect of cathodal iontophoresis or electroporation on the time course of plasma level of human insulin (pH7 or pH10) in rats. Symbols: □, iontophoresis (pH7) ; ◇, electroporation (pH7) ; ○, iontophoresis (pH10) ; x, electroporation (pH10) . Each point represents the mean \pm S.D. of 3 to 5 experiments. (EP condition: 10 pulse of 300 V-10 ms, IP condition: 0.4 mA/cm² for 1 hr) .

2. インスリンの経皮吸収に及ぼすエレクトロポレーションおよびイオントフォレシスの併用効果

EP とカソード IP 併用による吸収促進効果を評価するために、pH7 のインスリン溶液を用いて EP (150 V-, 300 V-10 ms) を 10 pulse 適用し、直ちにカソード IP (0.4 mA/cm²) を 1 時間適用した (Fig. 1-3)。EP 前処理により、IP によるインスリンの吸収は顕著に増加し、適用電圧 (150 V or 300 V) に依存した吸収性の増加が認められた。また、血糖値においてもインスリンの血漿中濃度の上昇を反映した低下が確認され、投与 2 時間後には 150 V 適用群で約 75%、300 V 適用群で約 50%まで低下することが確認された (Table 1-1)。

更に、EP / カソード IP 併用によるインスリンの経皮吸収に及ぼす溶液 pH の影響を検討するために、インスリン溶液の pH を 7 から 10 に変更して同様の吸収実験を行った (Fig. 1-4)。先の試験結果と同様に EP 電圧 (150 V, 300 V) に依存した血漿中インスリン濃度の上昇が認められ、その程度は pH7 の場合よりも高い値を示した。EP-300 V / カソード IP 適用 2 時間後の血糖値は、初期値の約 30%まで減少した (Table 1-1)。なお、低血糖によると思われる死亡ラット (3 例 / 4 例) が多く認められたため、血漿中薬物濃度の表示は 120 分までの値とした。更に、カソード IP 吸収に及ぼす、EP のパルス回数 (10 pulse, 5 pulse) 及びパルス幅 (10 ms, 5 ms, 1 ms) の影響を調べた結果、各パラメータ強度に依存した吸収性を示した (data not shown)。

また、各 pH におけるインスリンの経皮吸収性と適用電圧との関係を求めるために、種々条件におけるインスリンの AUC を算出しプロットした (Fig. 1-5)。各 pH においても電圧と AUC の関係にはよい直線性が見られた。また、pH10 の溶液を用いることでより高い吸収性が得られることが明らかとなった。

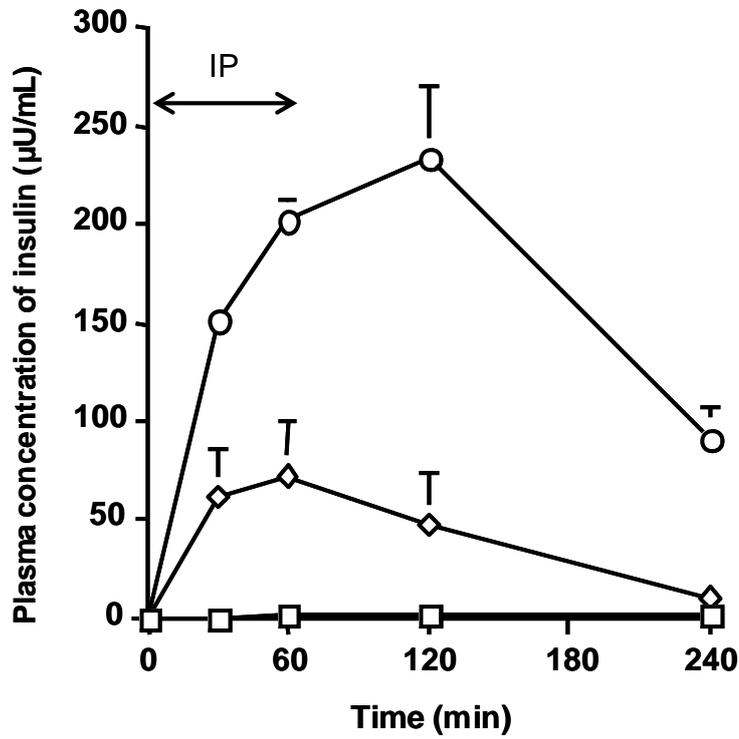


Fig.1-3 Effect of electroporation voltage on the time course of plasma insulin level under iontophoretic delivery in rats. The pH of the insulin solution was adjusted to 7. Symbols: \square , iontophoresis without electroporation; \diamond , electroporation at 150 V with iontophoresis; \circ , electroporation at 300 V with iontophoresis. Each point represents the mean \pm S.D. of 3 to 5 experiments (IP condition : 0.4 mA/cm² for 1h) .

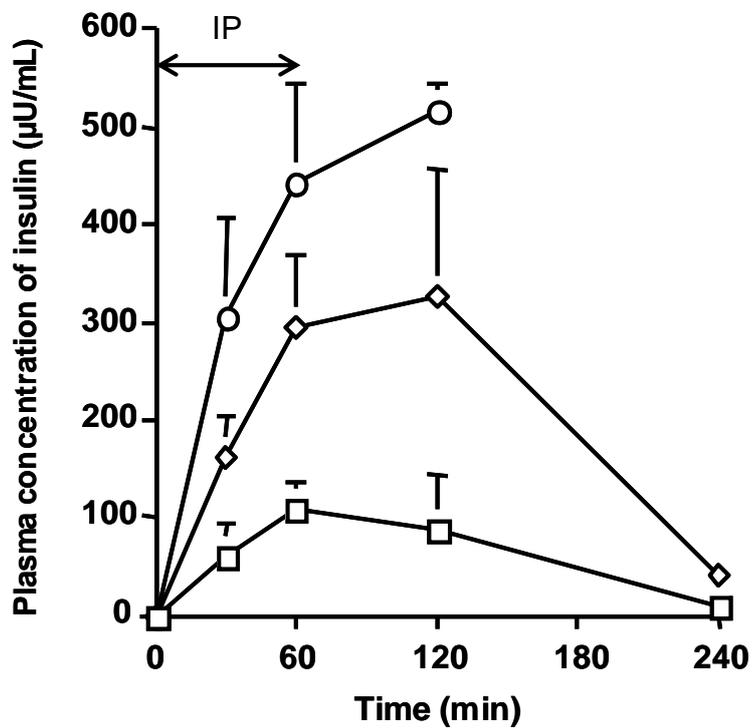


Fig. 1-4 Effect of electroporation voltage on the time course of plasma levels of insulin under iontophoretic delivery in rats. The pH of the insulin solution was adjusted to 10. Symbols: □, iontophoresis without electroporation; ◇, electroporation at 150 V with iontophoresis; ○, electroporation at 300 V with iontophoresis. Each point represents the mean \pm S.D. of 3 to 5 experiments (IP condition : 0.4 mA/cm² for 1 h) .

Table 1-1 Blood glucose levels and their %change in rats after EP alone, IP alone, and EP / IP (n = 3-5, mean \pm S.D.) .

n=3-9	Electrical condition	% Average	% Change
Passive	-	105 \pm 2.0	5.0 \pm 4.9
IP (pH7)	0.4 mA/cm ²	98.6 \pm 1.8	12.2 \pm 1.3
IP (pH10)		90.6 \pm 3.2	17.4 \pm 9.4
EP (pH7)	300 V	102 \pm 2.9	3.0 \pm 2.8
EP (pH10)		99.6 \pm 3.0	0.0 \pm 8.1
EP/IP (pH7)	150 V / 0.4 mA/cm ²	80.7 \pm 2.6	22.7 \pm 6.3
EP/IP (pH10)		73.7 \pm 6.3	39.7 \pm 9.5
EP/IP (pH7)	300 V / 0.4 mA/cm ²	69.7 \pm 3.1	52.5 \pm 7.9
EP/IP (pH10)		69.3 \pm 1.4	61.7 \pm 0.3

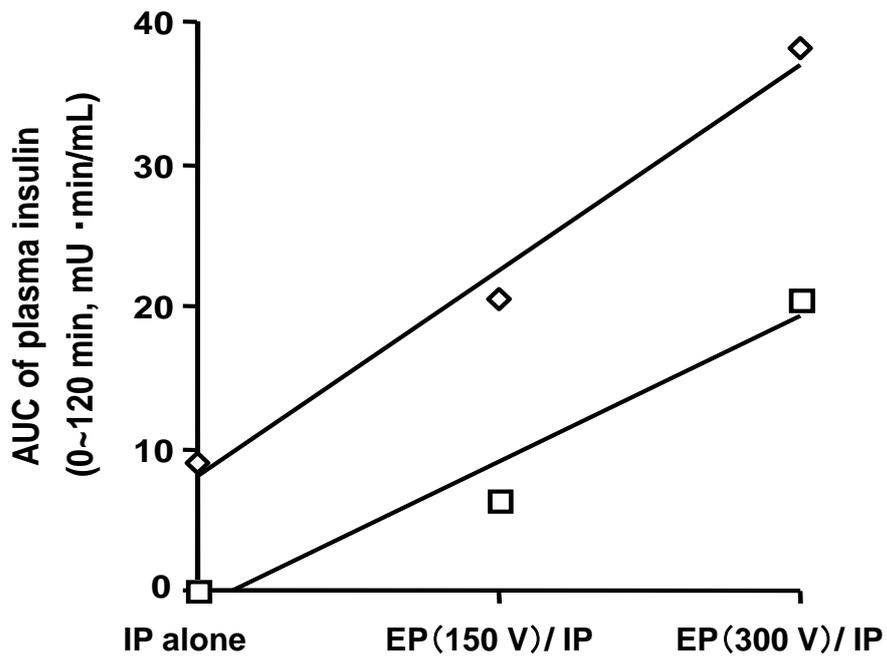


Fig. 1-5 Relationship between electroporation voltage and AUC of plasma concentration of insulin from 0-120 min. Symbols: □, iontophoresis with/without electroporation at pH7; ◇, iontophoresis with/without electroporation at pH10 (IP condition: 0.4 mA/cm² for 1 h) .

3. インスリンの会合に及ぼす pH の影響

インスリンの自己会合に及ぼすアルカリ性の pH、高電場（150 V, 300 V）の影響を調べるために、EP 負荷後及び非負荷時における各 pH 溶液中の存在形態を遠心式ろ過ユニットを用いて HPLC 法にて解析した（Table 1-2）。pH7 のインスリン溶液を分画分子量 30,000 Da のろ過膜を用いて遠心ろ過し、抽出液を HPLC で分析したところ、インスリンのピークは全く検出されなかった。一方、pH10 のインスリン溶液について、分画分子量 10,000、30,000 Da のろ過膜を使って同様に分析した結果、両方の抽出液中にインスリンのシングルピークが検出された。よって、アルカリ性側への pH シフトにより会合したインスリンが解離する傾向が認められ、わずかな単量体と 10 パーセント以下の 2 量体もしくは 4 量体が存在することが明らかになった。また、高電場負荷後のインスリン溶液においても非負荷時と比較して抽出率に有意な違いは認められず、凝集物や単量体よりも低分子化された分解物のピークも確認されなかったことから、インスリンは高電場下においても分解されず、安定に存在することが示唆された。

Table 1-2 Dependence of insulin aggregation on the pH with and without electroporation (n = 3-5, mean ± S.D.) .

% of total insulin	Without EP		EP-150 V		EP-300 V	
	pH10	pH7	pH10	pH7	pH10	pH7
Association						
Monomer	0.83	N.D.	0.68	N.D.	0.36	N.D.
Dimer, Tetramer	7.78	N.D.	7.3	N.D.	9.14	N.D.
Hexamer	91.4	≐100	92	≐100	90.7	≐100
Total insulin	100	100	100	100	100	100

4. インスリンリスプロの経皮吸収に及ぼすイオントフォレシスとエレクトロポレーションの影響

インスリンリスプロはアミノ酸を置換して作られたヒトインスリンアナログであり、インスリンの2量体形成に関わるB鎖の28番目のプロリンと29番目のリジンを入れ替えている。インスリン分子の会合が阻害されるような分子設計となっているため、製剤中では6量体として存在するが、皮下注射後速やかに単量体へと解離されることで血中に速やかに吸収される。Fig. 1-6にインスリンリスプロ溶液を用いた血漿中インスリン濃度に及ぼすEP、カソードルIPの単独及び併用効果を示す。IP単独群においては、ヒトインスリンと同様、ほとんど経皮吸収性は確認されなかった。一方、EP / カソードルIP併用により、経皮吸収性は著しく上昇する傾向を示し、ヒトインスリンと比較すると約2倍の血中濃度を示した。また、血中濃度プロファイルは通電開始後速やかに上昇し、通電終了後直ちに下降する傾向を示した。データは示していないが投与前値に対する血糖値の変化率においてもインスリンリスプロ投与群ではEP / カソードルIP併用によりヒトインスリンの同条件（150 V EP / IP）と比べて著しく低値を示した。

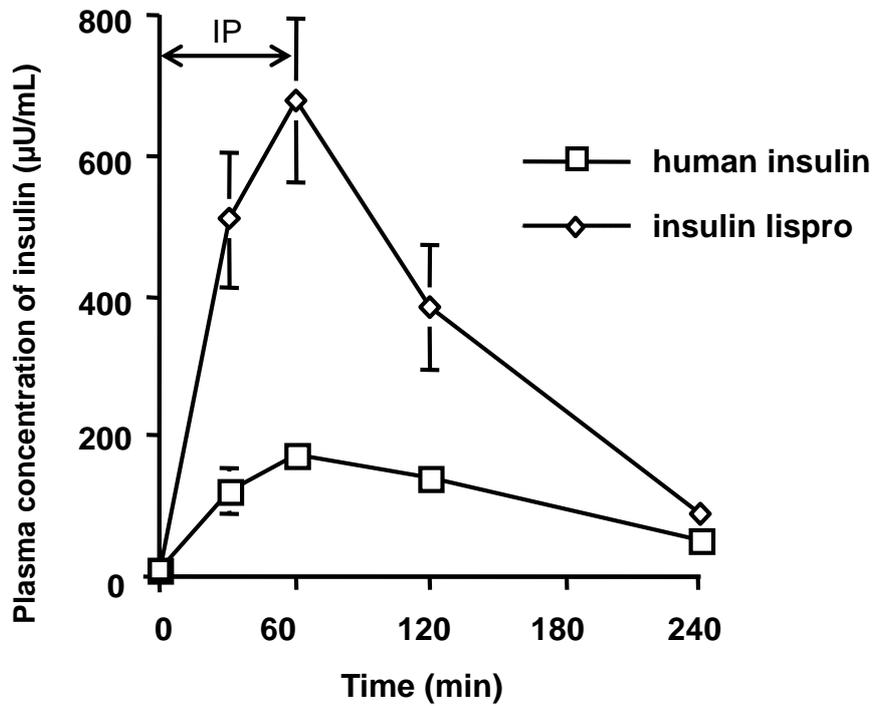


Fig. 1-6 Effect of combined electroporation and iontophoresis on the time course of plasma concentration of insulin after application of human insulin and insulin lispro at pH7 (EP condition: 10 pulses of 150 V–10 ms and IP condition: 0.4 mA/cm²). Each point represents the mean ± S.D. of 3 to 5 experiments.

第3節 考察

これまで、Sugibayashiらは *in vivo* で EP を適用することを想定して、陽電極・陰電極の両方を角層上に設置するタイプの電極を設計してきた⁴⁾。その例として、ニードル・ニードル電極、ニードル・リング電極、プレート・プレート電極（プレートタイプ電極）が挙げられる。彼らは電極の形や位置によって皮膚に形成される電場、及び電流密度分が異なり、結果として薬物の皮膚透過性にも影響することを明らかにした⁴⁾。本実験で用いたプレートタイプ電極は、その中でも皮膚表面上に最も均一な電場、電流密度分布を形成することがコンピューターシミュレーションにより解析されており、EP に対して最適な電極であることが考えられた。そこで著者は、IP に対する EP の前処理効果について、プレートタイプ電極を用いて検討を行った。IP を用いた高分子化合物の経皮デリバリーについてはすでにいくつか報告されており、分子量 4,000 程度の hPTH (1-34) の皮膚透過性は、実験動物の毛穴密度に大きく依存することが示されている¹⁵⁾。一方、分子量が 20 kDa を超えるような高分子である poly-L-lysine や 6 量体インスリンについては IP 単独では intact skin をほとんど透過しないことが報告されている¹⁶⁾。そこで、著者はインスリンの経皮吸収に及ぼす EP とカソード IP の併用効果について有毛ラットである SD ラットを用いて評価を行った。インスリンの pI は 5.3 であり、皮膚内の生理的 pH 下では負に帯電するため、インスリン溶液を cathode 側に適用し、pH7、pH10 の二種類の薬物溶液を調製して実験に用いた。その結果、インスリンの IP、EP 単独適用時の経皮吸収能は薬液の pH に依存して変化し、PH10 のインスリン溶液を適用したケースのみ IP、EP 適用共にインスリンの吸収が認められた (Fig. 1-2)。一方、インスリン溶液の pH を酸性側 (pH 2~3) に傾けて同様の実験を実施したが、インスリンの吸収は認められなかった (data not shown)。IP によって薬物の皮膚透過が促進される主要因子としては、すでに述べてきたように、electrorepulsion と electroosmosis が挙げられ、これらの寄与の違いによって薬物の経皮吸収は大きく影響

される。pH2 の溶液中ではインスリン自体はプラス電荷を有するが、electroosmosis による物質移動の向きはマイナス側からプラス側となり逆向きとなることが報告されている²¹⁾。さらに、皮膚中に移行したインスリンの電荷はプラスからマイナスに変化するため透過が阻害される可能性がある。したがって、吸収の増加が観察されなかった原因として、pH2 条件下では electroosmosis と electrorepulsion が皮膚を介する物質移動が逆向きに作用した可能性が考えられる。一般的に、EP により形成される pore は可逆的であり、数百ミリ秒以内に消失し、EP 適用後の flux は完全に適用前の値にまで戻ることが報告されている⁴²⁾。ただし、EP の適用条件によっては pore の持続時間が延長し、EP の作用が長時間持続することが報告されており、サーモンカルシトニン (3.6 kDa)、PTH (4.1 kDa)¹⁷⁾ 等は、前処理で EP を適用した EP / IP 併用法により相乗的な効果を得ている³⁷⁾。著者らのケースにおいても、EP を前処理として適用することにより、EP 単独および IP 併用により吸収促進効果が確認された。これらの結果は、EP 適用により、インスリンが透過できるほどの不可逆的な透過ルートが角質層中に形成されたことに起因しており、IP が有する駆動力を効率的に利用することにより併用促進効果が期待できると考えられた。一般的に IP における薬物輸送は、electrorepulsion と electroosmosis のバランスによって以下の式で表される²¹⁾。

$$J_{total} = J_{electrorepulsion} + J_{electroosmosis} + J_{passive} \quad (1-2)$$

なお、 $J_{passive}$ は、 $J_{electrorepulsion}$ や $J_{electroosmosis}$ と比較して寄与率が著しく低い場合が多い。しかし、本実験においては、インスリンの等電点を考慮してカソードル IP を用いているために、 $J_{electroosmosis}$ は透過に寄与しない。したがって J_{total} は以下の式で表される。

$$J_{electrorepulsion} = J_{total} = \frac{z_{ins} u_{ins} c_{ins}}{F \cdot \sum z_i u_i c_i} \cdot I \quad (1-3)$$

ここで、 z_{ins} 、 u_{ins} 、 c_{ins} はそれぞれインスリンの荷電数、移動度、濃度を示し、 I は電流密度、 F はファラデー定数を示す。これらの式から、本実験において定電流 IP

を使用したにも関わらず、EP との併用によりインスリンの吸収性がより亢進された要因として輸率の変化が挙げられる。IP 単独では、インスリンは角層を透過できないため、移動度としては非常に小さい値を示すと思われるが、EP により新規水溶性ルートが形成され、角層中のインスリンの移動度が変化し、結果として輸率の上昇がもたらされたと推察できる。もちろん、アルカリ性 pH により皮膚が障害を受けていること、インスリンの電荷状態がより負に傾いていること、また、インスリンの自己会合状態が変化していることも考えられる。そこで、まず、インスリンの透過に及ぼすアルカリによる皮膚障害性の影響を調べるために、予め pH10 に調整した溶液を 2 時間皮膚に適用した後に pH7 の溶液を用いて IP 単独投与を行ったがインスリンの吸収性に有意な違いは認められなかった (data not shown)。この結果から角層の損傷レベルは低いと予想される。加えて、本溶液を 3 次元培養皮膚に適用し、MTT 試験を行った時でも、pH の影響で細胞が死滅する傾向は認められなかった。一般にインスリンはある程度高濃度溶液下では 6 量体を形成するが、その会合状態は濃度、pH、金属イオン、添加剤などに影響され、pH2 以下、もしくは pH9 以上の溶液中においては単量体のインスリンを形成することが報告されている⁴³⁾。我々の結果もこの報告と一致したので、溶液 pH をアルカリ側にシフトすることにより単量体のインスリンが生成することが示唆された (Table 2)。よって、pH7 溶液における EP / IP の併用効果は、6 量体のインスリン (MW: 36,000 Da) に対しても促進効果を示すことが明らかとなり、pH10 溶液における併用効果の増大は、荷電状態の変化だけでなく、インスリン 6 量体構造破壊による低分子化が大きく寄与していることが示唆された。

さらに、インスリンリスプロを用いることにより pH7 条件下におけるインスリンの吸収性はヒトインスリンに比べて顕著に増大し、 T_{max} 値も短縮される傾向を示した。この原因には、インスリンリスプロのアミノ酸置換による構造修飾が影響したと考えられる。しかし、溶液中のインスリンリスプロは通常のヒトインスリンと同様に亜鉛を中心

に持つ6量体として存在していると考えられるため、顕著に認められた吸収促進効果に対する直接的なメカニズムについては明らかにすることはできなかった。インスリンリスポロは、皮内において6量体から2量体への形成が阻害されて直ちに単量体を形成する特徴を有するが、本実験結果との直接的な影響については正確に考察することはできなかった。

次にこれらの経皮吸収データを用い、デコンボリューション法により吸収速度を算出して利用率を求め、さらに健常人のヒトインスリンの単回静注後の血漿中薬物濃度データから、2-コンパートメントモデル（血中濃度 $C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ ）に基づく各定数（ α : 14.6 h^{-1} 、 β : 0.653 h^{-1} 、 A : $293 \mu \text{ U/mL}$ 、 B : $16.3 \mu \text{ U/mL}$ ）を算出して 10 cm^2 の製剤を想定した場合の血中濃度をシミュレートした（Fig. 1-7）。その結果、最も高い吸収性を示したインスリンリスポロ投与群では約 0.4% の生物学的利用率を示し、血中濃度シミュレーションの結果、 C_{\max} は約 $5 \mu \text{ U/mL}$ の値を示した。この値は、毎食後に分泌されるインスリンを補う追加インスリン療法（Bolus 療法）には不十分であるが、基礎インスリンの補充療法（ $2.5 \sim 10 \mu \text{ U/mL}$ ）を想定した場合においては有効となる可能性が示唆された。ただし、本シミュレーションの結果は、SD ラットでのインスリンの吸収速度とヒトでの吸収速度が同等であると仮定した場合の予測値であり、ヒト血中濃度を高く見積もっている可能性が考えられる。しかし、本研究で得られた結果は、インスリンの経皮投与技術が注目される中で、EP / IP 併用技術による経皮インスリン投与の実用性と可能性を見極める上では大変重要な意味を持つと考えられた。今後は、生物学的利用率を高め、より安全に投与するために、製剤形状の最適化や電気刺激感の低い電極形状の設計が必要である。

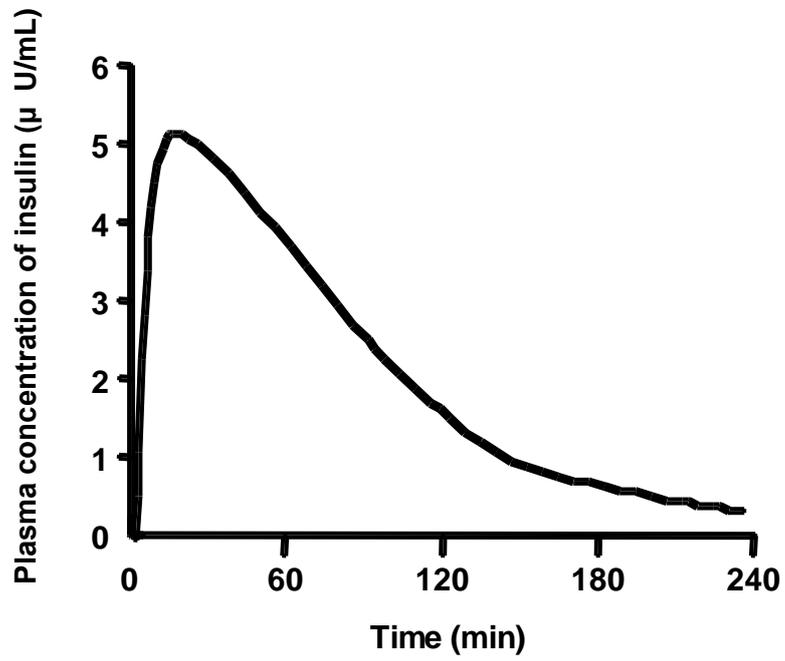


Fig. 1-7 Simulated plasma concentration of insulin based on the elimination parameters in healthy subjects.

第4節 小括

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の経皮吸収は、EP/IP 併用により EP および IP の単独使用時よりも高い経皮吸収性を示すことが明らかとなり、その効果は相乗的であった。加えて、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 2 量体の形成率を高めることにより、併用効果も増大した。類似の実験として、ヒトインスリンのアナログである超速効型のインスリンリスプロを用いることにより、pH をアルカリ性側に傾けることなく、高い吸収を実現できることが示された。インスリンの EP / カソードル IP の併用促進効果は *electrorepulsion* の効果によるものであり、EP の前処理適用によって形成された新規透過ルートの拡大によるインスリン分子の輸率が増大したことが原因と考えられた。したがって、EP によって形成された新規透過ルートを効率的に利用するためには、薬物の存在形態、電荷、分子サイズを考慮する必要があると考えられ、新たな透過ルート形成によってのみ透過する高分子薬物は、EP / IP 併用により相乗効果を示す可能性がある。さらに、正に帯電した高分子薬物を想定した場合には、*electroosmosis* の寄与も加わるため、負に荷電した薬物の経皮吸収を上回る相乗効果が期待されると考えられた。

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

前章では、**electrorepulsion** に着目して負電荷を有するインスリンを用いた EP / IP 併用による吸収促進効果について検討を行い、相乗的に吸収が促進されることを示した。本章では、この EP / IP の併用効果をさらに高めるために IP のもう一つの駆動力である **electroosmosis** に着目し、電気浸透流に及ぼす EP 適用の影響について検討を行った。これまでに、Guy らは IP による薬物の分子量と皮膚透過に関与する **electrorepulsion** / **electroosmosis** の寄与について評価しており、薬物の分子量増加にともない **electroosmosis** による寄与が増大することを報告している²¹⁾。したがって、高分子薬物の経皮送達を考えた場合、電気浸透流の大きさを維持または高めることが有効である。しかし、EP が **electroosmosis** に及ぼす影響については未だ明らかとなっておらず、EP / IP 併用による促進効果の効率を理解するためには、皮膚の選択透過性に及ぼす EP の影響を調べることは非常に重要である。そこで、本実験は皮膚の選択透過性に及ぼす EP の影響を調べるために、電荷を有さない低分子化合物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試験を実施した。EP / IP 併用、EP 単独、IP 単独時のマンニトールの皮膚透過性試験を行い、得られた透過速度から透過に寄与する因子と大きさを予測して **electroosmosis** の影響を考察した。さらに、分子量の影響を調べるために、非荷電性高分子のモデル薬物であるデキストランローダミン B (MW: 10,000 Da) を用い同様に実験を行い、比較検討した。

第1節 実験の部

1. 実験材料

N-2-Hydroxyethylpiperazine-*N*'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) および D-マンニトールはシグマアルドリッチ株式会社 (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。デキストランローダミン B は、モレキュラープローブ社 (Waltham, MA, U.S.A.) から購入した。D- [1-¹⁴C] マンニトール (56.0 mCi/mmol) は、アマシャムファルマシアバイオテック (Buckinghamshire, U.K.) から購入した。その他のすべての溶媒、試薬類は、市販の特級グレード品を精製せずにそのまま使用した。銀箔 (厚さ 0.04 mm) は村田余箔 (東京) から購入した。

2. 実験動物

7~8 週齢の雌性ヘアレスマウス (HR-1) を日本 SLC (浜松、静岡) より購入した。動物の取り扱いは、第1章第1節の2.実験方法に準じて行った。

3. *In vitro* 皮膚透過試験

摘出したヘアレスマウス皮膚を角層が上にくるようにフランツセル (有効面積 1.77 cm², レシーバー容量 16 mL) 上に載せ、改良したアクリルセルで挟んだ。Fig. 2-1 に試験のセットアップ図を示す。ドナーおよびレシーバー溶液には、133 mM の NaCl を含む 25 mM の HEPES 溶液 (pH7.4) を用いた。なお pH は 1 N NaOH を用いて 7.4 に調整した。拡散セル内は、マグネチックススターラー (マルチススターラー MC-301, サイニクス株式会社, 東京) を用いて攪拌し、レシーバー溶液の温度は、37°C に維持した。

4. エレクトロポレーション または イオントフォレシス適用

EP 前処理は、150 または 300 V (10 ms) ×10 回 (パルス間隔 1 秒) を矩形波発生

装置 (Electro Square Porator T820, BTX, San Diego, CA, U.S.A.) を用いて行った。EP 電極は剣山タイプを用い、25 mM の HEPES 緩衝液中で電極の先端が皮膚に触れるようにセルの中に配置させて適用した (Fig. 2-2)。剣山型の電極は、電極間距離がプレートタイプ電極よりも短いため、電位勾配の形成と電流による電気刺激感の低減効果が期待できる。EP 適用後は、直ちにドナー溶液を 1 mM マンニトールと ^{14}C -マンニトール (1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) を含む HEPES 緩衝液に置換した。続いて、IP を併用する場合は、ADIS-HP (久光製薬株式会社、鳥栖、佐賀) を用いて 0.4 mA/cm² の直流通電を 4 時間行った。銀電極は陽極に用い、銀/塩化銀電極は陰極に用いた。アノードル IP を適用する際には、銀電極をマンニトールを含むドナー溶液中に配置させ、レシーバー溶液側には、銀/塩化銀電極を配置させた。一方、カソードル IP を適用する際には、銀/塩化銀電極をドナー側、銀電極をレシーバー側に配置させた。これらの電極は皮膚へ直接接触れるのを避けるため、皮膚上 5 mm の位置に配置させて通電を行った。ダメージ皮膚モデルの作製は、ヘアレスマウス皮膚に粘着テープ (Cellophan TapeTM, ニチバン, 東京) を用いて 20 回テープストリッピング操作を行った。皮膚透過試験中は、経時的にレシーバー溶液 200 μL をサンプリングし、その都度同量の緩衝液を補充した。サンプルは、液体シンチレーションカウンターにて ^{14}C -マンニトールを検出し、総マンニトールの値に補正して皮膚透過量を算出した。

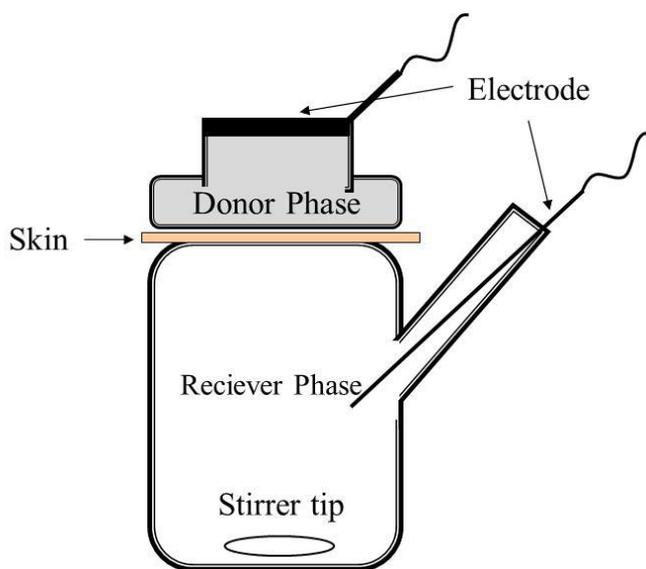


Fig. 2-1 *In vitro* experimental set-up

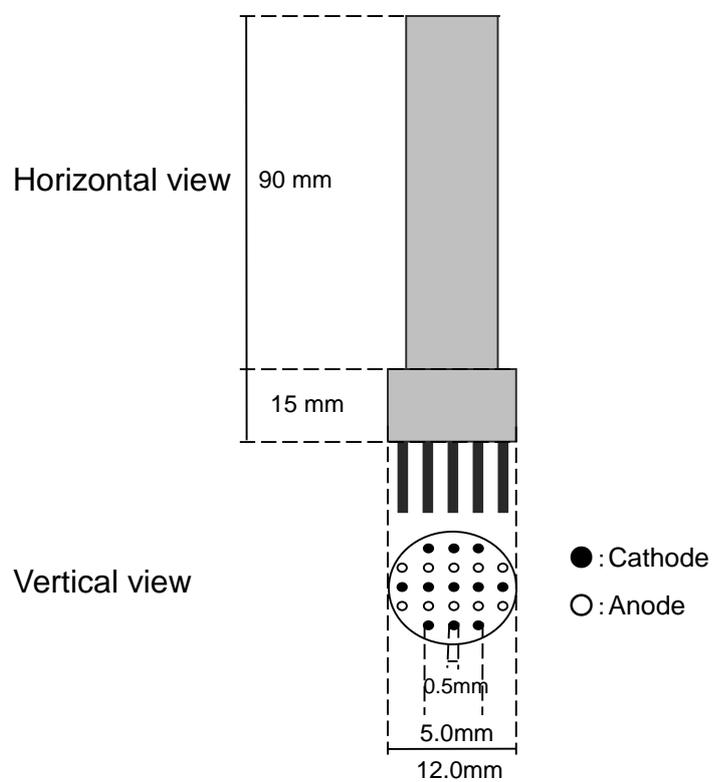


Fig. 2-2 Schematic representation of a frog-type electrode for electropermeabilization.

5. デキストランローダミン B の皮膚透過

デキストランローダミン B を用いた皮膚透過試験は、マンニトールの皮膚透過試験と同様の方法で行った。ドナー溶液は、50 μM の デキストランローダミン B を含む HEPES 緩衝液 (pH7.4) とした。EP は IP 適用前に前処理適用 (10 パルス) し、アノダル IP (0.4 mA/cm^2) を 4 時間適用した。ローダミン B の定量は、蛍光光度計 (RF 5300 PC, 株式会社島津製作所, 京都) によって測定 (励起波長 : 570 nm, 蛍光波長 : 590 nm) した。

6. 皮膚電気抵抗の測定法 (直流通電時)

皮膚の電気的性質を調べるために、IP 適用時に流れる電流と電圧の値から皮膚の電気抵抗値を算出した。無処置の皮膚をコントロールとして、IP 単独適用後、EP (100-200 V) 単独適用後または EP (100-200 V) / IP 併用後の皮膚を用いて 0.4 mA/cm^2 の直流通電中の電圧の値から電気抵抗を算出した。また、得られた抵抗値から皮膚を取り外した場合の電気抵抗値 ($1.4 \text{ k}\Omega$) を差し引いて皮膚の電気抵抗値と定義した。

7. データ解析

データ数は $n = 3-5$ とし、図および表には平均値 \pm S.D. で示した。

第2節 結果

1. ヘアレスマウスの皮膚電気抵抗値変化

皮膚電気抵抗値に及ぼす EP 及び IP の効果を評価するために、直流の定電流通電を 3 分間適用して皮膚電気抵抗値 (DC-resistance) を測定した。IP (0.4 mA/cm^2 , 60 分) もしくは EP (100-200 V) 適用直後と EP/IP 併用後の抵抗値を Fig. 2-3 に示す。初期の皮膚電気抵抗値は約 $6 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$ を示し、IP 60 分適用後は 75% ($1.5 \text{ k}\Omega\text{cm}^2$) 低下した。また、EP 単独適用 (100 -200 V) によっても電気抵抗値は明らかに低下したが、EP 電圧の違いにより差は認められなかった。加えて、EP 適用後 IP を併用することにより、電気抵抗値はわずかに低下する傾向が認められた。

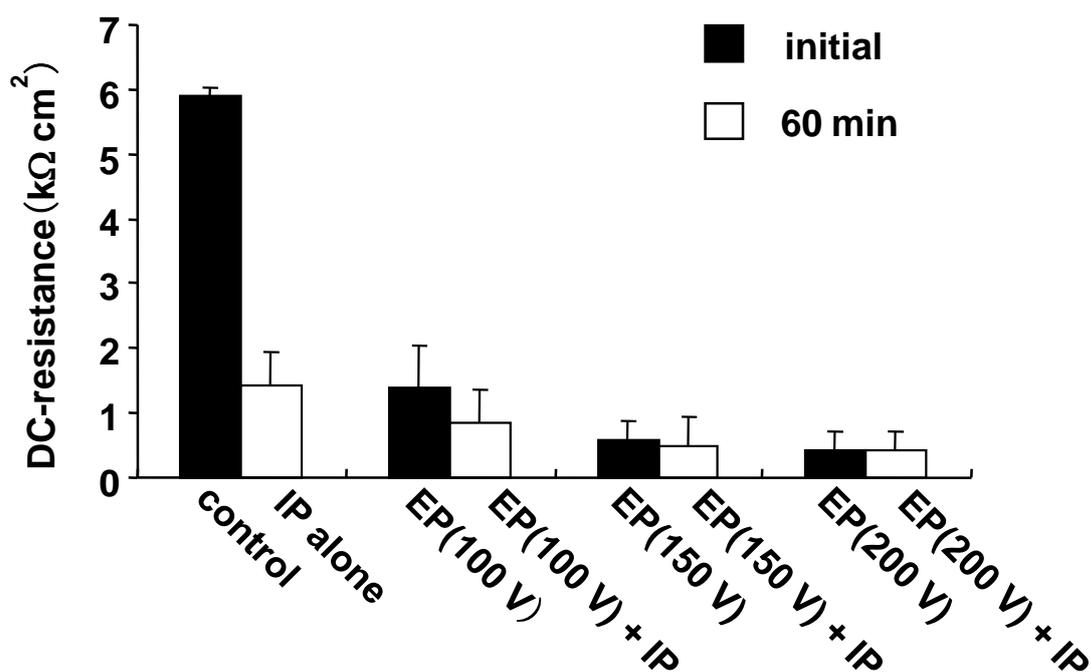


Fig. 2-3 The effect of 0 – 200 V electroporation on the DC-resistance during iontophoretic transport of mannitol (0.4 mA/cm^2) through excised hairless mouse skin. Solid and open columns show value of DC-resistance immediately measured after electroporation and after 60-min iontophoresis, respectively. Each value represents the mean \pm SD of 3 to 5 experiments.

2. マニトールの皮膚透過

Fig. 2-4a はアノード IP 単独もしくは EP / アノード IP 併用時のマニトールの皮膚透過速度 (flux) の時間変化を示し、また、Fig. 2-4b はカソード IP もしくは EP / カソード IP 併用時の同様の結果を示す。Table 2-1 には、IP 適用時 (1-4 h) の flux の平均値を示す。アノード IP 単独時の平均 flux は、 $266 \pm 44 \text{ ng/cm}^2/\text{h}$ を示し、受動拡散による flux ($17 \pm 3 \text{ ng/cm}^2/\text{h}$) の 16 倍であった。この flux の上昇はアノード IP 適用後に著しく低下したため、アノード IP 適用により陽極側から陰極側の方向に電気浸透流が発生していることが示唆された。一方、EP 単独適用群では、EP 電圧の上昇にともない flux も増大する傾向が見られ、アノード IP 併用によりさらに増大した。EP / IP 併用時の IP 単独時に対する促進比は、EP-100 V で 1.4 倍、150 V で 2 倍、また、200 V で 2.9 倍であった。加えて、いずれの群も IP によって増大された flux は IP 適用後には低下する傾向を示した (Fig. 2-4a)。また、Fig. 2-4b と Table 2-1 にはカソード IP 単独および EP 併用時の flux を示しており、アノード IP の場合と同様に EP 電圧の増加にともない flux は上昇する傾向を示した。しかし、EP / カソード IP 併用時の flux は、EP 単独時よりも低い値を示した。また、カソード IP 適用後に flux が上昇する傾向を示した。したがって、EP 単独適用時に上昇した flux が、カソード IP 併用により抑制されていることが明らかとなった。また、最後のサンプリング時 (6-7 h) の flux は、アノード / カソード IP いずれの場合も同程度の値を示した。

これらの IP ON / OFF によって変動する flux の値から電気浸透流の大きさを評価するために、IP 適用 2-4 時間の flux (J_{2-4}) の値を IP 適用 6-7 時間の flux (J_{6-7}) の値で除した値を enhancement ratio (ER) として算出した。 J_{2-4} の flux には電気浸透流だけでなく受動拡散も含まれるが、 J_{6-7} の flux は受動拡散のみが寄与するため、ER 値は IP 適用による透過促進率を示す。すなわち、マニトール flux から算出した ER は

電気浸透流の大きさの指標として捉えることができる。Fig. 2-5 に各実験条件と ER の関係を示す。アノードル IP 併用時の ER は、EP 電圧の増加に依存して低下する傾向を示した。一方、カソードル IP 併用時は、EP 電圧に依存せず一定値を示すことが明らかとなった。

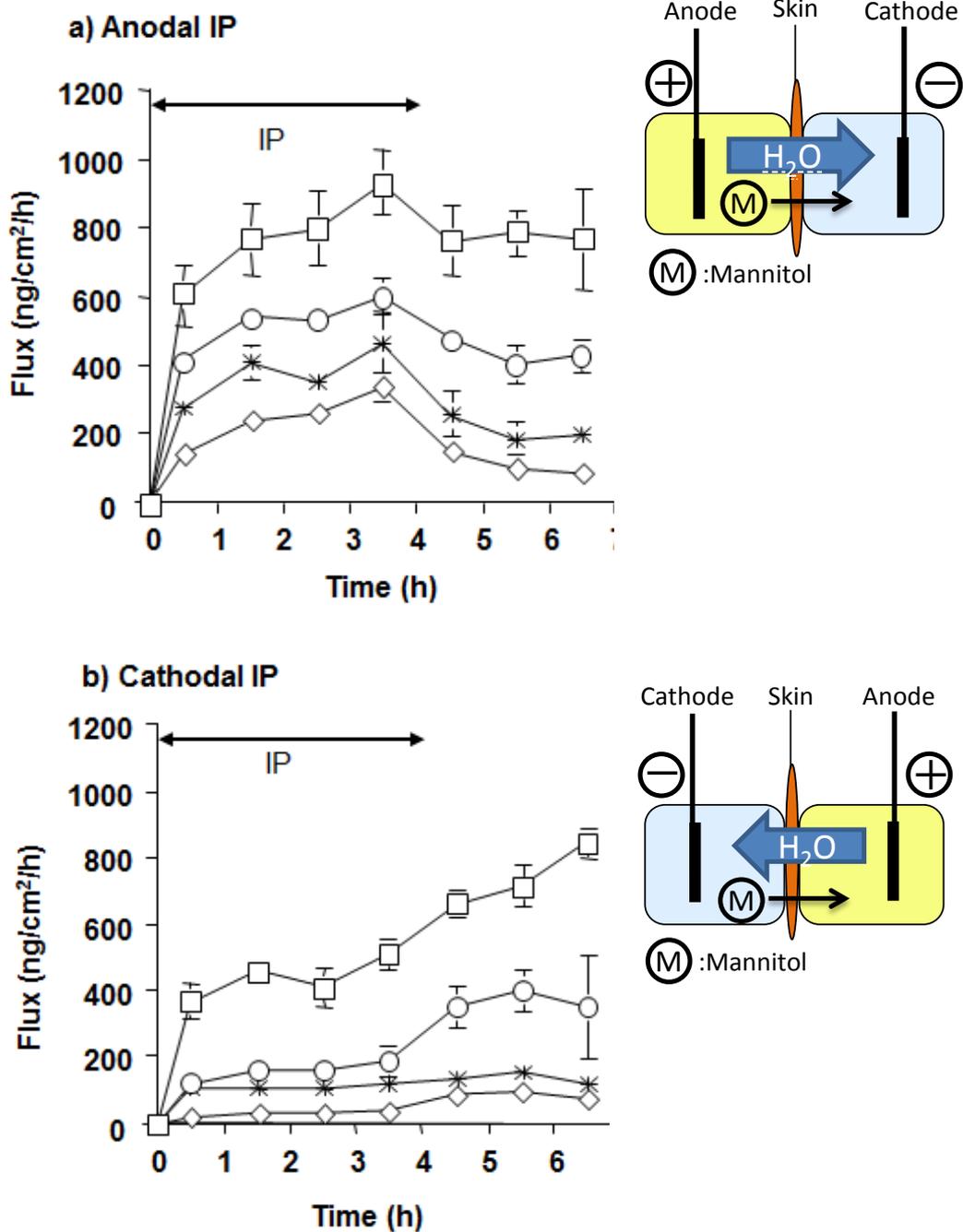


Fig. 2-4 The effect of 0 – 200 V electroperoration on the electroosmotic flux of mannitol during and after 4 h-anodal (a) and cathodal (b) iontophoresis at 0.4 mA/cm². Electroperoration (10 pulses of 100-200 V, 1 ms) was applied prior to iontophoresis. Symbols: \diamond , iontophoresis without electroperoration; \times , electroperoration at 100 V with iontophoresis; \circ , electroperoration at 150 V with iontophoresis; and \square , electroperoration at 200 V with iontophoresis. Each data point represents the mean \pm SD of 3 to 5 experiments.

Table 2-1 Enhancement of *in vitro* passive and iontophoretic mannitol flux through hairless mouse skin.

Treatment	Mannitol flux (mean \pm S.D.) (ng/cm ² /h)		Abbreviation for J
Passive permeation			
Control (without pretreatment)	16.9 \pm 2.9		$J_{passive}$
Stripped skin	6100 \pm 391		
Electroporation			
EP (100 V)	59.5 \pm 3.10		J_{ep}
EP (150 V)	301 \pm 46.8		J_{ep}
EP (200 V)	669 \pm 103		J_{ep}
Iontophoresis			
	Anodal	Cathodal	
Control (without treatment)	266 \pm 44	30.5 \pm 3.5	J_{ip}
Stripped skin	5950 \pm 487	5994 \pm 610	
Electroporation			
	Anodal	Cathodal	
EP (100 V) + IP	373 \pm 41	88.9 \pm 3.1	J_{ep+ip}
EP (150 V) + IP	518 \pm 35	156 \pm 14	J_{ep+ip}
EP (200 V) + IP	774 \pm 68	437 \pm 32	J_{ep+ip}

EP: electroporation; IP: iontophoresis Each data value shows average mannitol flux after pretreatment (EP or tape-stripping: 0-8 h) or during IP application (0-4 h) .

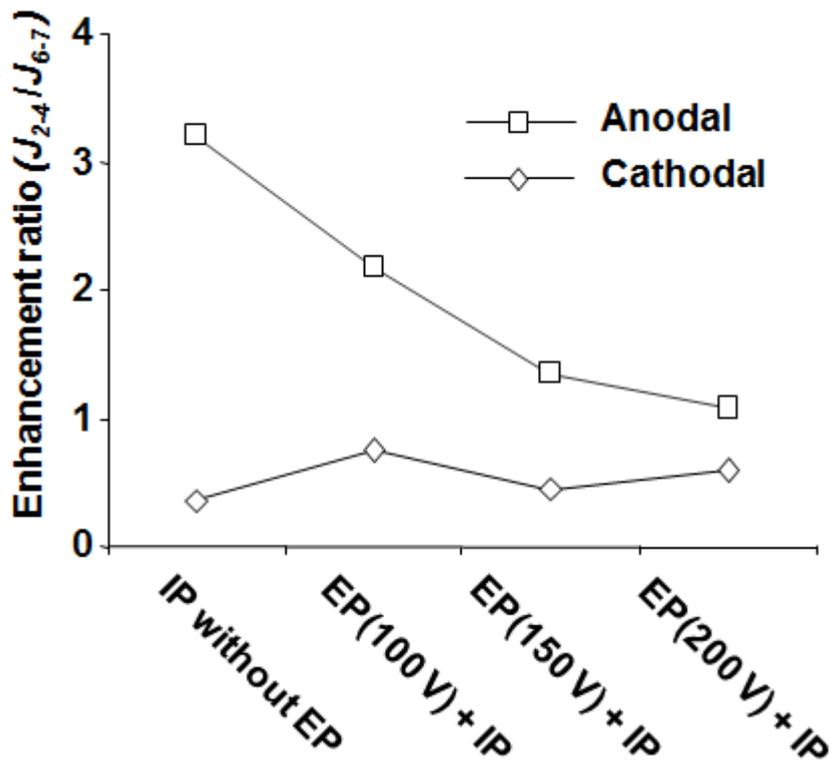


Fig. 2-5 The effect of 0 – 200 V electropermeabilization on the enhancement ratio (ER) of mannitol flux during anodal (\square) and cathodal (\diamond) iontophoresis at 0.4 mA/cm². ER was calculated by dividing the iontophoretic mannitol flux (J_{2-4}) by the passive flux (J_{6-7}) after iontophoresis.

3. デキストランローダミン B の皮膚透過

非荷電性中性の高分子モデル薬物として、デキストランローダミン B (MW: 10,000 Da) を選択し、マンニトールと同様に皮膚透過試験を実施した (Fig. 2-6 および Table 2-2)。150 V、200 V の EP を適用した後、4 時間に亘ってアノードル IP (0.4 mA/cm²) を適用した。EP-150 V 適用時においては、EP 単独、EP / IP 併用時においても Passive、IP に比べて促進効果は認められなかった。一方、EP-200 V 適用時においては EP 単独により促進効果が認められ、EP / IP 適用時においては明らかな併用促進効果が認められた。したがって、この EP / IP 併用による相乗効果を enhancement factor (EF) を用いて表した (Table 2-2)。なお、EF 値は $(J_{ep+ip} - J_{ep}) / (J_{ip} - J_{passive})$ として表した。EF 値は、electroosmosis によって促進される flux の大きさを示す値であり、IP 単独適用時の透過性に対する EP 前処理の IP による透過性が高い場合には 1 よりも大きい値を示す。EP-150 V / IP 併用群の EF 値は低値 (0.6) を示したが、EP-200 V / IP 併用群は、高値 (2.2) を示し IP 単独群を上回る結果であった。

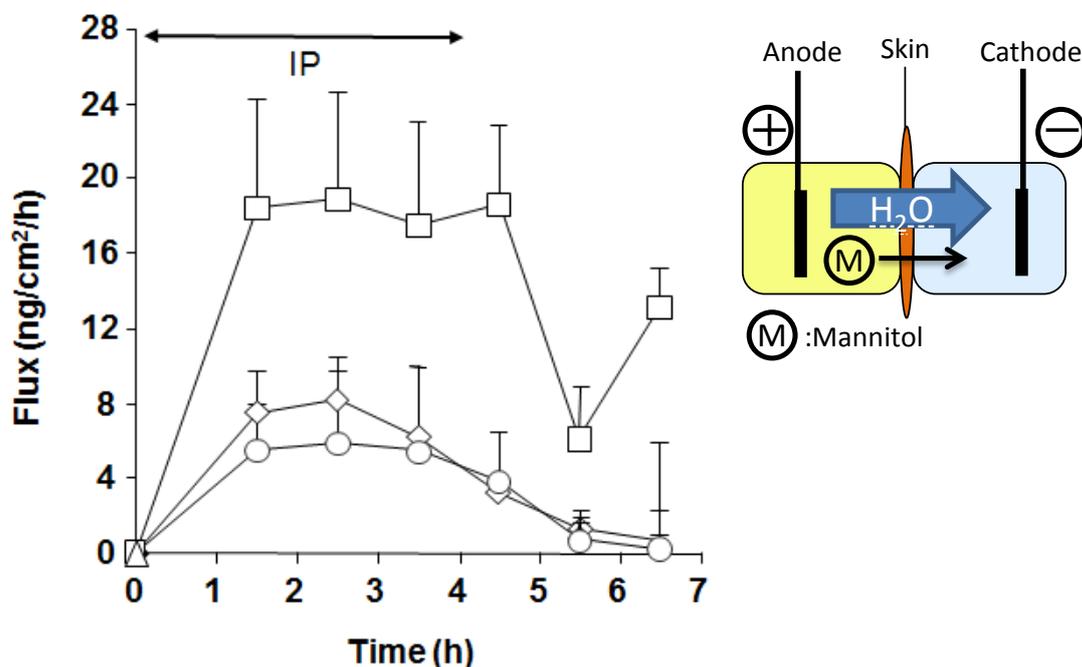


Fig. 2-6 Anodal iontophoretic flux of dextran rhodamine B induced by *in vitro* electroporation pretreatment at 0 -200 V.

Electroporation (10 pulses of 100-200 V, 1 ms) was applied prior to iontophoresis. Symbols: ◇, iontophoresis without electroporation; ○, electroporation at 150 V with iontophoresis; and □, electroporation at 200 V with iontophoresis. Each data point represents the mean ± SD of 3 to 5 experiments.

Table 2-2 Enhancement of *in vitro* passive and electrophoretic dextran rhodamine B flux through hairless mouse skin.

Test	Flux (ng/cm ² /h) (mean ± S.D.)	EF ^a
Passive permeation	1.1 ± 0.2	-
IP only (anodal)	7.3 ± 2.9	1.0
EP (150 V) only	1.9 ± 0.7	-
EP (150 V) + IP	5.6 ± 3.3	0.6
EP (200 V) only	4.9 ± 0.7	-
EP (200 V) + IP	18.3 ± 5.3	2.2

^aThe enhancement factor, EF, was calculated as follows: $(J_{ep+ip} - J_{ep}) / (J_{ip} - J_{passive})$ (see Table 2-1 for the abbreviation of J).

第3節 考察

EPは皮膚バリアである角層に小孔を形成させるため、皮膚電気抵抗を低下させることが報告されている⁴⁴⁾。Fig. 2-3に示したように、皮膚の電気抵抗値(DC-resistance)はEP適用により低下し、その程度はEP電圧強度とある程度相関する傾向を示した。一方、EP単独適用後のfluxはEP電圧強度に依存して明らかに増大したが、皮膚電気抵抗値との相関性は低く、150 Vまたは200 V-EP適用時の電気抵抗値はほぼ同じ値を示した。この原因としては、皮膚電気抵抗の測定方法が影響していると考えられた。データには示していないが、20回テープストリッピングを行い角層を除去した皮膚においても200 V-EPを適用した場合とほぼ同じ値を示したため、この皮膚電気抵抗値は、皮膚というよりは電極間の抵抗値(1.4 k Ω)が大部分を占めていると考えられた。また、高電圧EP適用により、マンニトールの皮膚透過性が著しく増大したため、皮膚電気抵抗値はEPによって形成された新規透過ルートの数やサイズを必ずしも反映していないと考えられた。

次に、EP適用が薬物の透過性や皮膚に及ぼす影響を調べるために、IP適用時に生じるelectroosmosisに着目し、マンニトールの皮膚透過性試験を行った。マンニトールは非荷電性の低分子化合物であり、IPの駆動力の一つであるelectroosmosisによって発生する電気浸透流に依存して移動するため、electroosmosisの指標として汎用されている^{21,45)}。EP/IP併用後のfluxは、EP電圧に依存して増大したが、EPによって増大された受動拡散が主要因子であった。GuyらはIP適用時に生じる電気浸透流の生成またはトリガーに対して2つの仮説を提唱している⁴⁶⁾。一つは、マイナスに電荷した皮膚上に形成された電場によって電気浸透流が生じるというもので、もう一つは、水の移動がNaやClイオンの移動にともなって発生するという考え方である。本実験は、EP前処理がelectroosmosisに及ぼす影響を評価するために、定電流通電(0.4 mA/cm²)を適用している。Pikalらは、電気浸透流(J_v)は、電位勾配($-d\Phi/dx$)に依存する

ため次式で表している⁴⁷⁾。

$$J_v = P_{VE} \left(-\frac{d\Phi}{dx} \right) \quad (2-1)$$

ここで、 P_{VE} は電気浸透流係数を表す。また、 Li らは電気浸透流（ペクレ数: Pe ）とアノードル IP の適用電圧とは直線関係を示すことを報告している⁴⁸⁾。ペクレ数は、対流・拡散の比率を表す無次元数であり、以下の次式によって表される。

$$Pe = \frac{Wv\Delta x}{HD} \quad (2-2)$$

H 、 W はそれぞれ受動拡散と electroosmosis の制御因子を表し、 v は電気浸透流の平均速度、 Δx は皮膚の膜厚、 D は薬物の拡散係数を示す。物質の拡散、対流においてペクレ数が1よりも大きいと対流が支配的であり、1よりも小さいと拡散の方が支配的となる。本実験結果を用いてペクレ数を算出すると、2.5 (0 V)、2.5 (100 V)、1.2 (150 V)、0.4 (200 V) の値を示し、EP 電圧の増加にともないペクレ数は低下した。この結果から、100 Vを除いて EP 適用により、電気浸透流は減少している可能性が示された。この原因は、EP 適用によって皮膚の電気抵抗値が低下したために、IP 適用時に皮膚にかかる電位勾配が低下したことが一因であると考えられる。したがって、高電圧 EP 適用によってマンニトールの透過性は上昇するが、electroosmosis による寄与は低下していることが示された。但し、100 V-EP 適用群は、非適用群と同程度のペクレ数を示しているため、適用電圧間で皮膚の構造や特性変化が生じ、皮膚のイオン選択性変化も影響している可能性が考えられる。次にカソードル IP についても同様に検討を行った。EP / カソードル IP 併用は、Fig. 2-4b と Table 2-1 から明らかなように、IP 適用中は透過が抑制され、適用後に上昇する傾向が見られた。Fig. 2-5 はアノードル IP とカソードル IP 適用では明らか傾向が異なることを示している。また、データは示していないが、ER は角層のテープストリッピング前処理した皮膚の場合には溶媒流は発生しないので、EP 適用後も角層が選択透過性膜として機能していることは明らかである。こ

これらの結果から、アノード IP 適用時のみ EP 適用により陽極側から陰極側への電気浸透流が影響（減少）することが明らかとなった。Riviere らは、正に荷電したリドカインのアノード IP による皮膚透過性が、角層のテープストリッピングによって明らかに低下してすることを報告している⁴⁹⁾。EP による前処理は、角層のバリア能は低下させるが、角層は剥がさないので electroosmosis に及ぼす影響もテープストリッピングとは異なると考えられる。

いずれにせよ、EP / アノード IP の併用によりマンニトールの相乗的な透過性の促進は認められなかったため、薬物分子量の影響を評価すべく非荷電性高分子を用いて同様の試験を行った。非荷電性高分子であるデキストランローダミン B は 200 V-EP 前処理により促進効果が認められ、IP 併用によりさらに相乗的な透過性の促進が確認された (Fig. 2-6)。マンニトールの結果から、この条件下では電気浸透流 は大きく減少していると考えられるが、デキストランローダミン B においては併用促進効果が認められている。この現象を著者は次のように考えた (Fig. 2-7)。すなわち、150 V の EP 適用では溶媒流は維持されているが、デキストランローダミン B が透過できる程の pore は形成されないためほとんど透過しない。一方、200 V の EP 適用により溶媒流は減少するが、デキストランローダミン B が透過できる程の pore が形成され溶媒流に乗ることが可能になり、見かけ上、併用促進効果が認められると考えられた。したがって、未処理皮膚でもある程度自由に透過する非荷電性薬物については EP 併用促進効果をあまり望めないが、通常ほとんど透過しない非荷電性薬物（特に高分子）に関してはルート拡大により電気浸透流 を利用して透過を著しく促進させることが可能と考えられた。

以上は、全て非荷電性の薬物を想定した場合の皮膚透過性を考察したものであり、チャージを有する多くの薬物の場合は、electrorepulsion についても同様に EP の影響について解析する必要があると思われる。

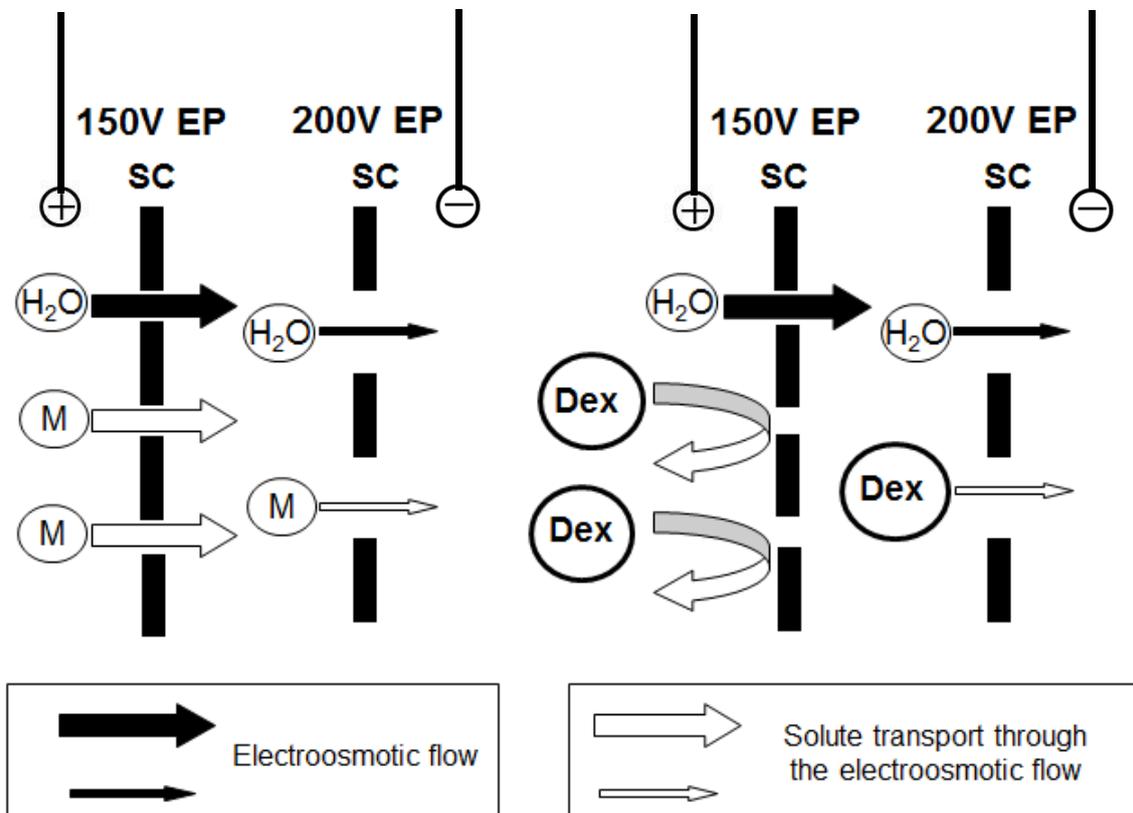


Fig. 2-7 A hypothetical illustration of selective permeability of different sized neutral solutes through the skin before and after electroporation. Neutral solutes are represented by mannitol (M) and dextran rhodamine B (Dex) .

第4節 小括

分子量の異なる 2 種類の非荷電性のモデル化合物を用いることにより、IP 適用中に陽極側から陰極側方向に生じる電気浸透流に及ぼす EP の影響が明らかとなり、EP 電圧に依存して電気浸透流は減弱することが明らかとなった。また、この原因としては、EP 適用による皮膚抵抗値の低下により皮膚に印加される電位勾配が低下することが一因として考えられた。また、デキストランローダミン B を用いた実験により、非荷電性の薬物であっても高分子薬物の場合には EP / アノードル IP 併用により促進効果が得られた。これらの結果は、選択する薬物の分子量と皮膚上に形成された新規透過ルート サイズや、電気浸透流の大きさが透過性に大きく影響することを示唆しており、電荷を有する高分子薬物の併用効果を考える場合においても重要となることが明らかとなった。また、少なくとも正の電荷を有する高分子化合物を想定した場合、EP によって形成された新規透過ルートの数やサイズにもよるが、electrorepulsion と electroosmosis の両方の因子の利用が可能になるため、非荷電性の薬物よりも高い併用促進効果を示す可能性があると考えられた。

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

第1章および第2章では、経皮吸収には及ばず EP と IP の併用効果とそのメカニズムに着目し、高分子薬物であるインスリンやデキストランローダミン B の場合は電荷の有無に関わらず相乗効果を示したが、電荷を持たない低分子化合物であるマンニトールの場合は、相乗効果は期待できないことを示した。これらの結果より、electroosmosis によって生じる陽極側から陰極側に生じる電気浸透流は、EP 前処理によって減弱される可能性があることを示した。

そこで、本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、同様に検討を行った。ソノフォレシス (SP) と IP の併用促進効果に関する経皮吸収研究については、ヘパリン⁵⁰⁾ が報告されているが、その吸収促進メカニズムについては未だ明らかになっていない。また、EP または SP と IP の併用効果とメカニズムを理解するためには、electroosmosis に及ぼす EP または SP の影響を同じ評価系で比較検討することが非常に有用である。そこで、electroosmosis に及ぼす EP または SP の影響を評価するために、ヘアレスマウス皮膚を用いてアノーダル IP 単独時、EP / アノーダル IP、SP / アノーダル IP 併用時のマンニトールの皮膚透過性を比較検討した。また、SP 適用した皮膚やテープストリッピング処理した皮膚表面のゼータ電位を測定し、electroosmosis と皮膚表面電荷の関係についても考察した。

第1節 実験の部

1. 実験材料

D-マンニトールおよび HEPES buffer は Sigm-Aldrich 社 (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。D-[1-¹⁴C] マンニトール (specific activity 56.0 mCi/mmol) は Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, U.K.) から購入した。IP に使用した Ag および Ag/AgCl 電極 (0.04 mm thick) は、銀のワイヤー (村田余箔、東京) を用いて作製した。EP は、剣山型電極を用いて適用した。テープストリッピングには、ニチバン社製のセロファンテープ (Cellophan Tape™、ニチバン、東京) を用いた。

2. 実験動物

7~8 週齢の雌性ヘアレスマウス (HR-1) を日本 SLC (浜松) より購入した。動物の取り扱いは、第1章第1節の2.実験方法に準じて行った。

3. *In vitro* ヘアレスマウス皮膚透過試験法

摘出したヘアレスマウス皮膚を角層が上にくるようにフランツセル (有効面積 1.77 cm²、レシーバー容量 16 mL) 上に載せ、改良したアクリルセルで挟んだ。ドナーおよびレシーバー溶液には、133 mM の NaCl を含む 25 mM の HEPES 溶液 (pH7.4) を用いた (pH は 1 N NaOH を用いて 7.4 に調整した)。拡散セル内は、マグネチック スターラー (マルチスターラー MC-301、サイニクス株式会社、東京) を用いて攪拌し、レシーバー溶液の温度は、37°C に維持した。

4. 物理的吸収促進法による前処理法と IP 適用法

EP は、150 V (10 ms) ×10 回 (パルス間隔 1 秒) を矩形波発生装置 (Electro Square Porator T820, BTX, San Diego, CA, U.S.A.) を用いて EP の前処理適用を行った。EP

適用には剣山型の電極を用い、25 mM の HEPES 緩衝液中で電極の先端が皮膚に触れるようにセルの中に配置させて適用した (Fig. 2-2)。

SP 適用は、周波数 20 kHz のソニケーター (VCX400, Horn area of 1.33 cm², Sonics & Materials, Newtown, CT, U.S.A.) を用いた。ソニケーターホーンは皮膚から約 5 mm 上のドナー溶液中に設置して 1 分間適用した (Ultrasound condition : 5 s ON/OFF, 1.1 W/cm²)。EP または SP 適用後は、直ちにドナー溶液を 1 mM マンニトールを含む溶液 (1 μ Ci/mL of ¹⁴C-マンニトール-HEPES pH7.4) に置換して 4 時間間隔で Passive とアノードル IP (0.4 mA/cm²) を繰り返した (Fig. 2-1)。

皮膚のテープストリッピングは、摘出したヘアレスマウス皮膚にテープ (Cellophan Tape™、ニチバン、東京) を貼り付けてから数秒後に剥がす作業を最大で 5 回繰り返して処理した皮膚を用いた。

IP では全てアノードル IP を適用し、適用条件および装置は第 2 章第 1 節の 2. 実験方法に準じて行い、皮膚透過試験中は、経時的にレシーバー溶液を 200 μ L サンプルングし、その都度、同量の緩衝液を補充した。サンプルは、液体シンチレーションカウンターにて ¹⁴C-マンニトールを検出し、総マンニトールの値に補正して皮膚透過量、flux を算出した。

5. ヘアレスマウス皮膚表面電荷の測定法

皮膚表面電荷の測定は、大塚電子株式会社 (枚方、大阪) のゼータ電位測定装置 (電気泳動光散乱光度計 : ELS-800) を用いて測定した。ゼータ電位の測定は、専用の平板試料用セルユニットに 1 cm \times 2.5 cm に切断した皮膚をセットして、モニター粒子としてポリスチレンラテックス粒子を用いて 0.01 M KCl 溶液に懸濁させ測定した。結果は自動的に複数回測定したデータの平均値として表した。

6. データ解析

データ数は $n = 2-16$ とし、図および表には平均値 \pm S.D. で示した。

第2節 結果

1. マニトールの皮膚透過

IP 単独群および EP または SP 併用群の皮膚を介するマニトールの flux を Fig. 3-1 に示す。ここでは、EP または SP 前処理してから 4 時間後にアノードル IP を 4 時間適用した。また、IP 適用後も 4 時間サンプリングを行い計 12 時間の実験を実施した。EP は剣山型電極を用い、150 V, 1 ms, 10 pulses の条件で前処理適用した。SP は 1.1 W/cm² の超音波を 1 分間前処理適用した。EP または SP を前処理適用してから IP を適用するまでの 4 時間の flux (J_{ep}) は、150V-EP 適用により約 123 倍 (2.3 ng/cm²/h → 366 ng/cm²/h)、IP 併用により約 196 倍 (582 ng/cm²/h) 程度上昇した。一方、SP 適用群では、同一条件 (1.1 W/cm²) であるにも関わらず最初の 4 時間の flux (J_{sp}) のデータには大きなばらつきが見られた。このばらつきの範囲は、コントロール群 (EP, SP 非適用群) の約 2 倍から 269 倍 (5.6 ng/cm²/h ~ 800 ng/cm²/h) を示し、IP 併用により Flux は約 96 倍~689 倍 (284 ng/cm²/h ~ 2046 ng/cm²/h) と著しく上昇する傾向を示し、ばらつきの範囲も増大した。特徴的な傾向として、SP 適用後の passive flux が高い場合に、IP 併用時の flux が著しく高くなる傾向が見られた。加えて、IP 適用後の flux は、IP 適用前の flux と同程度の値まで戻った。

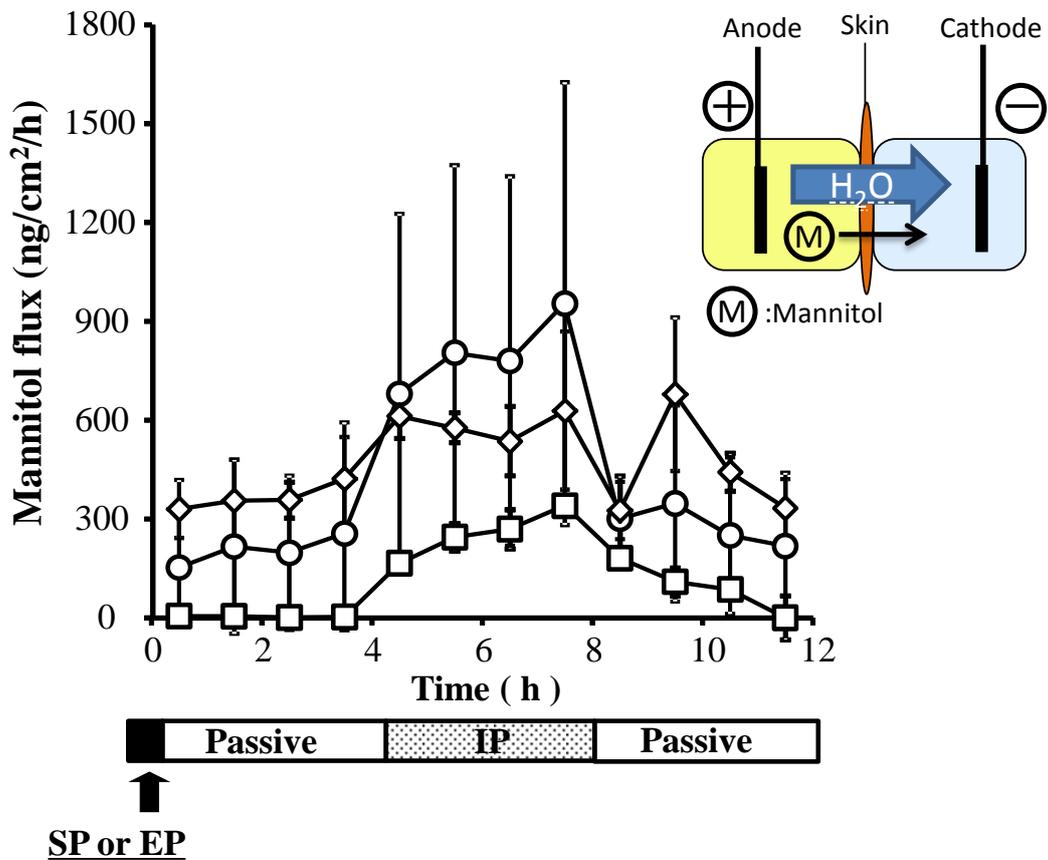


Fig.3-1 The effect of sonophoresis or electroporation on the electroosmotic flux of mannitol during and around 4 h of anodal iontophoresis at 0.4 mA/cm².

Electroporation (10 pulses of 150 V, 1 ms) and sonophoresis (5 s ON/OFF for 60 s) were applied at the beginning of each study. Symbols: □, iontophoresis; ◇, electroporation at 150 V with iontophoresis; ○, sonophoresis with iontophoresis. Each data point represents the mean ± SD of 3 to 16 experiments.

2. ソノフォレシスとイオントフォレシス併用効果とソノフォレシス前処理後の passive flux の関係

SP / IP 併用時のマンニトールの flux が SP 前処理後の passive flux の増大にともなうて大きく増大する傾向が示されたため、SP / IP 併用群の実験を繰り返し行い、n 数を 16 とした。得られた個々のデータを用いて SP 前処理後の passive flux (J_{sp}) と SP / IP 併用時に IP により促進された flux ($J_{sp+ip} - J_{sp}$) の関係についてまとめた。その結果を Fig. 3-2 に示す。図の縦軸の ($J_{sp+ip} - J_{sp}$) は SP / IP 併用時の flux から SP 単独時の flux を差し引いた値であるため、electroosmosis によって透過した flux とみなすことができる。この $J_{sp+ip} - J_{sp}$ の値は SP 前処理により促進される passive flux (J_{sp}) の増大にともなうて著しく増大する傾向を示した。

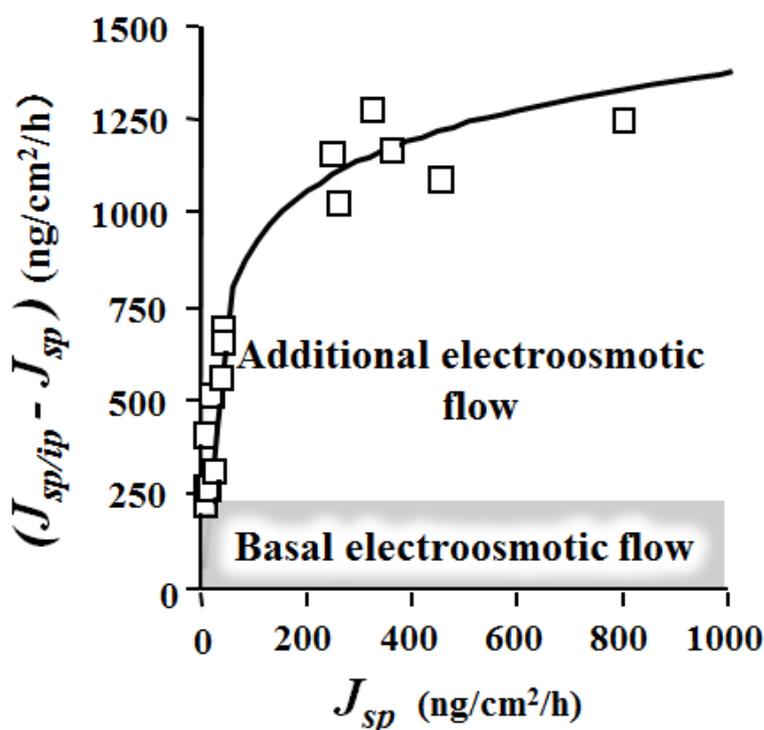


Fig. 3-2 Relationship between passive flux by sonophoresis alone ($J_{passive}$) and additional electroosmotic flow by combining with IP ($J_{sp/ip} - J_{sp}$).

3. テープストリッピング回数とマンニトールフラックスの関係

次に、物理的な皮膚前処理法の一つであるテープストリッピング法を用いて、マンニトールのヘアレスマウス皮膚透過試験を実施した。実験条件はテープストリッピングの条件を1回、3回、5回の3条件とした以外はこれまでと同様とした。Passive flux と IP 適用時の flux を Table 3-1 に示す。テープストリッピング処理により、passive flux および IP 適用時の flux は増大し、その値はテープストリッピング回数に応じて増大する傾向を示した。皮膚表面の余分な異物による影響を取り除くために、70%エタノールを滲み込ませた脱脂綿で皮膚表面を数回拭き取り、同様に皮膚透過試験を行ったが、flux は無処理皮膚の値と同程度であった (data not shown)。そこで、SP 併用時と同様にテープストリッピング処理後の passive flux (J_{ts}) と電気浸透流の関係を評価するために、これらの実験データを用いてテープストリッピング時の $J_{ip} - J_{ts}$ と J_{ts} の関係を求めた。その結果を Fig. 3-3 に示す。テープストリッピングによる passive flux の増大にともなって $J_{ip} - J_{ts}$ は増大する傾向を示したが、 J_{ts} が 700 ng/cm²/h を超えるあたりで急に低下する傾向を示した。本結果は、第2章第2節の Table 2-1 で示した結果と一致しており、角層を完全に除去すると IP による電気浸透流は消失することが明らかにされた。

Table 3-1 The effect of tape-stripping frequency on the passive and electroosmotic flux of mannitol.

	Passive flux (ng/cm ² /h)	$J_{ip+passive}$
Control	2.97 ±1.0	255 ±11
Stripping-1	19.3 ±5.7	285 ±22
Stripping-2	67.9 ±9.8	548 ±16
Stripping-3	718 ±47	1524 ±55
Stripping-5	1486 ±121	1947 ±162

Each data point represents the mean ± SD of 2 to 3 experiments.

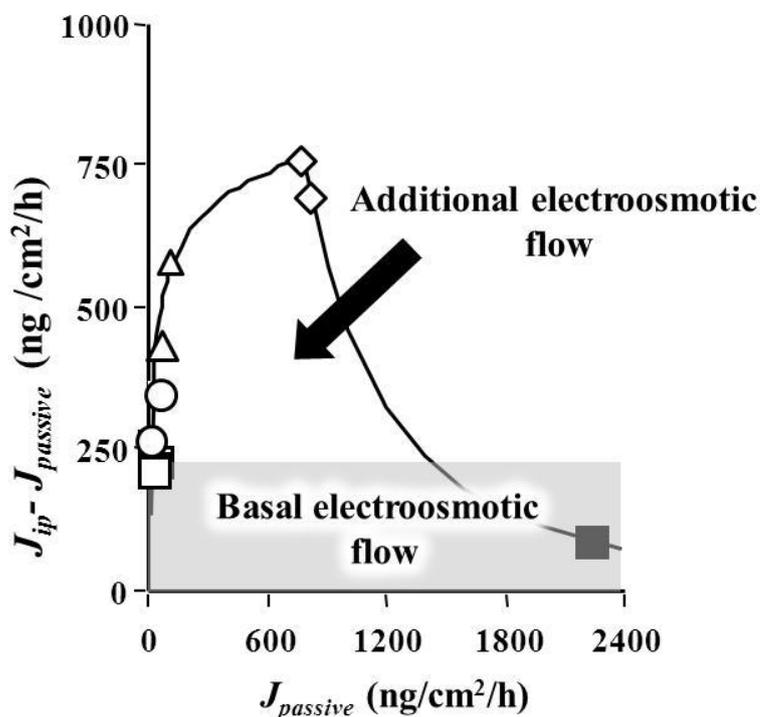


Fig. 3-3 Relationship between passive flux by tape-stripping alone ($J_{passive}$) and additional electroosmotic flow by combining with IP ($J_{ts/ip} - J_{ts}$).

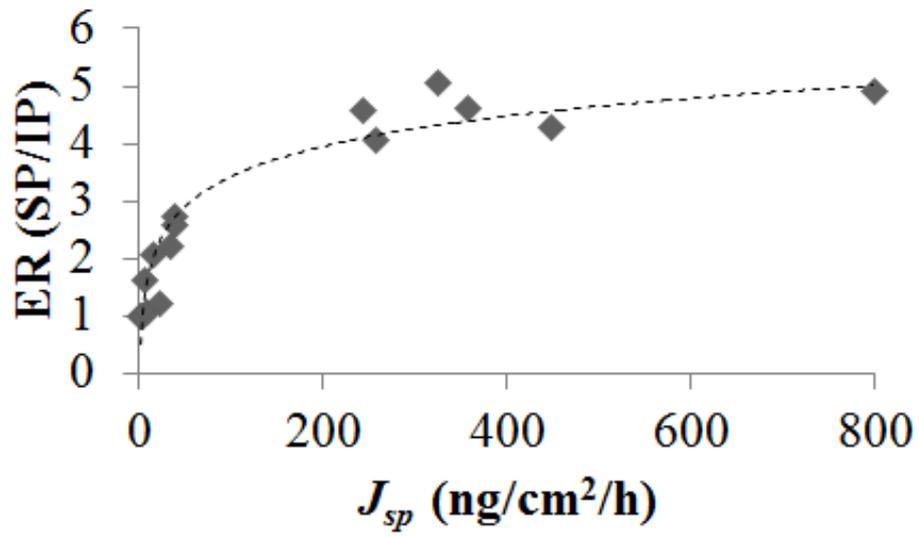
Symbols: □, TS-0; ○, TS-1; ◇, TS-2; △, TS-3; ■, TS-5.

4. Electrosmosis に及ぼす各種物理的吸収促進技術の影響

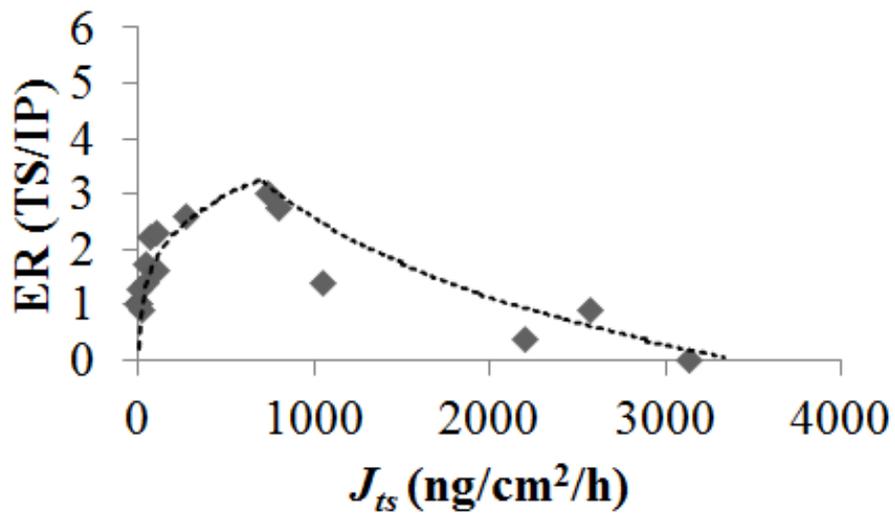
これらの結果を総合的に考察するために、IP 単独群の IP 適用時に促進される flux ($J_{ip} - J_{passive}$) を基準として、SP、EP またはテープストリッピングと IP 併用時に付加される flux の比を ER として算出した。例えば、SP/IP 併用時の ER は、次式 ($J_{sp+ip} - J_{sp}$) / ($J_{ip} - J_{passive}$) によって表し、EP、テープストリッピング処理においても同様の方法で ER を算出した。結果を Fig. 3-4 に示す。SP やテープストリッピング併用群の ER は passive flux (J_{sp} または J_{ts}) の増大にともない上昇するが、EP 併用群は J_{ep} の増大にともない低下する傾向を示した。また、ER の大きさは SP/IP 併用群が最も大きく、最大で約 5 倍促進されることが明らかになった。

また、ER の値を個別に解析するために横軸は SP、TS、EP 単独適用時の passive flux とし、各種促進技術と ER の関係を整理した。

a) SP/IP



b) TS/IP



c) EP/IP

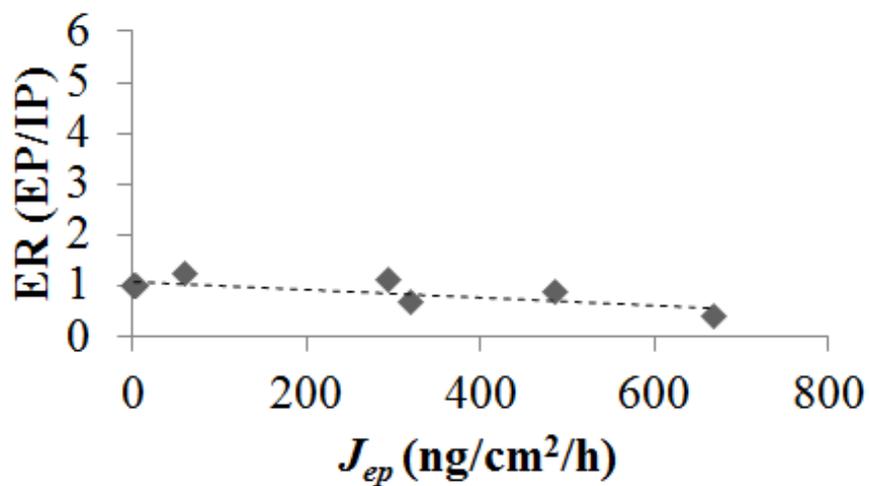


Fig. 3-4 The effect of various physical enhancement methods on the enhancement ratio (ER) of mannitol flux. In the case of SP, ER was calculated as follows:

$$(J_{sp+ip} - J_{sp}) / (J_{ip} - J_{passive}) .$$

5. ヘアレスマウス皮膚の表面電位

皮膚表面電位を測定するために、電気泳動光散乱光度計を用いて皮膚表面のゼータ電位測定を行った結果を Table 3-2 に示す。テープストリッピング処理皮膚および SP 処理を行った皮膚表面のゼータ電位は、コントロール皮膚のゼータ電位がマイナス 4 程度であったのに対し、テープストリッピング皮膚は、マイナス 1.5 ～マイナス 4 程度でコントロールと同等かむしろゼロに近づく傾向を示した。一方、SP 適用群については、マイナス 8 程度と明らかに皮膚表面電位がマイナス側に傾く傾向を示した。

Table 3-2 The change of zeta potential values of the skin surface after tape-stripping and sonophoresis treatment.

	ζ potential	Average
Control	-4.37	-4.58
	-4.79	
Stripping-1	-1.63	-1.53
	-1.43	
Stripping-3	-1.47	-2.69
	-3.9	
ultrasound	-7.06	-8.63
	-7.52	
	-11.32	

第3節 考察

EP や SP は、皮膚に対して物理的な構造変化を引き起すため、薬物分子を透過させる新たな投与ルートを形成させる点で、IP とは大きく異なっている^{22,27)}。本研究では、SP または EP を前処理適用しており、マンニトールを含むドナー溶液に置換してから IP を適用しているため、SP/IP の併用により相乗的に促進された flux は、アノードル IP 適用時に生じる electroosmosis によって生成された電気浸透流の増大によって促進された結果であると考察できる。一方で、EP 前処理においては、第2章の結果と同様に EP 電圧に依存して電気浸透流は減弱する傾向を示した。electroosmosis は、皮膚の電位勾配や皮膚表面の電荷と密接に関係すると考えられており、電位勾配の低下や皮膚表面電荷の中和によって電気浸透流は低下することが報告されている^{18-20,47)}。本実験で行った EP または SP 前処理は、皮膚電気抵抗の低下を引き起こすため、電位勾配の低下にともない電気浸透流は減弱する可能性が考えられる。したがって、EP 前処理によって確認された電気浸透流の低下は電位勾配の低下によって説明可能である。しかし、SP 前処理による電気浸透流の増大は電位勾配では説明が困難である。SP の経皮吸収促進メカニズムは、キャビテーションバブルの振動と崩壊によって引き起される角層の構造破壊や acoustic streaming⁵¹⁾ が考えられており、皮膚表面の性状や物理化学的性質も大きく変化している可能性が考えられる。本研究では、SP を前処理適用しているため jet stream による吸収促進効果は期待できない。また SP は、表面の洗浄にも優れた効果を示すため、レンガ状に積み重なった角層細胞表面の洗浄や剥離効果も高いことも予想される。実際に、本研究において複数回のテープストリッピング処理した皮膚を用いた評価では、付加された電気浸透流が増大する傾向を示している。その増大の程度は SP 併用時程ではないものの、SP による併用効果の一因である可能性が考えられる。一方、SP と皮膚表面電位の関係を考察するために直接的な皮膚表面電位測定を行い、electroosmosis との関係を考察した報告はないが、本実験結果を考察する上で重要な因

子と考えられる。本実験では、皮膚表面のゼータ電位を測定するために専用のセルユニットを用いて表面電位を測定し、皮膚前処理が及ぼす影響を評価した。その結果、皮膚表面は明らかにマイナスに荷電していることが確認され、SP 処理した皮膚はマイナス電位の増大が確認されたため、電気浸透流の増大の一因である可能性が示唆された。一方、テープストリッピング皮膚においても、同様の傾向を示すことが予想されたが、予想に反してむしろ中和される傾向が見られており、皮膚表面電位のみで *electroosmosis* との関係性を説明することはできなかった。SP により皮膚表面のマイナス電荷がさらにマイナス側に傾くことは、皮膚のイオン交換膜としての選択透過性は増強されることを意味しており、水和水を含む Na^+ や K^+ などの陽イオンの透過性が増加する可能性がある⁵²⁾。また、SP によって新たに形成された透過ルートが負に帯電されることで、水の移動が促進される可能性も考えられる。様々なメカニズムが考えられるため、今回の結果のみで SP / IP の相乗効果のメカニズムを完全に証明するには不十分であるが、SP 前処理により電気浸透流の著しい上昇が引き起されることは明らかである。加えてこの上昇は、SP 前処理による吸収促進効果が高いほど電気浸透流の上昇が期待できるため、SP の適用エネルギーを最適化することで、さらに高い効果が期待できる可能性がある。

また、*electroosmosis* による吸収促進効果は送達させる分子の電荷や分子量の影響を受け難いため、皮膚透過性が低い高分子薬物には特に有用な組み合わせと考えられる。以上の結果から、IP との併用により相乗効果を期待する場合には、SP とアノードル IP の組み合わせが最も効果的であり、幅広い薬剤に応用できる可能性があることが明らかとなった。今後の課題としては、SP 適用時の *flux* にはばらつきが見られており、IP 適用時においても相乗効果はみられる一方でばらつきが見られることが挙げられる。SP の効果発現には、何らかの閾値パラメータが存在するため、今後は照射条件（強度、時間、溶液組成）と閾値の関係について更なる検討が必要である。

また、安定した効果を得るためには、定電圧 IP に変更する方法や皮膚の電気抵抗値

を指標にする方法、界面活性剤を併用する方法等が考えられるため、今後はこのような手法を組み合わせることにより、より定量的な効果が期待できると考えられる。

第4節 小括

本章では、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、IP 適用時に発生する電気浸透流に及ぼす影響について同様に検討を行った。SP と IP の併用により、マンニトールの皮膚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認められた。また、皮膚のテープストリッピング処理によっても回数に依存するが電気浸透流の増大が確認された。これは SP による皮膚表面洗浄効果や剥離効果も影響している可能性が示唆された。さらに、皮膚表面のゼータ電位測定結果から、SP 適用により皮膚表面のマイナス電位が増大されている可能性が示唆された。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が示唆された。一方で、SP と IP の併用効果には大きなばらつきが認められており、照射条件と閾値の関係を最適化する必要があることも明らかとなった。

総括

本研究では、物理的経皮吸収促進技術である IP、EP、SP に着目し、これらの技術を組み合わせることにより高分子薬物の経皮吸収を相乗的に促進させるために検討を開始した。中でも IP は最も代表的な物理的経皮吸収促進法であり、皮膚を介して低い電流を比較的長時間適用することによりイオン性だけでなく非イオン性薬物の経皮吸収性を高めることができる技術である。一方で、皮膚に対して新たな透過ルートを形成させる技術ではないため、送達される分子の量、サイズには限界があることが分かっている。したがって、本論文では、高分子薬物の経皮吸収促進を念頭におき、IP が有する駆動力である *electrorepulsion*、*electroosmosis* を最大限に活用すべく、EP、SP の併用効果について詳細な検討を行った。

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

第1章では、インスリンをモデル薬物としてカソードル IP によるインスリンのラット経皮吸収に及ぼす EP の効果について検討した。ラット *in vivo* 吸収実験の結果、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。IP 単独 (0.4 mA/cm^2) もしくは、EP 単独適用の場合、インスリンの経皮吸収は、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 (pH10) でインスリンの吸収性の増大が認められた。また、各種 pH ドナー溶液 を用いて EP、IP の併用効果を検証した結果、EP 単独及び IP 単独に比べて著しく促進されることが明らかとなり、その効果は、ドナー溶液 pH のアルカリ側へのシフト、EP の適用電圧強度に依存して増大した。血糖値推移においてもインスリン血中濃度を反映した血糖値の低下が確認され、EP と IP 併用により著しい血糖値の低下が確認された。加えて、アルカリ溶液中 (pH10) におけるインスリンの会合状態を調べたところ、pH7 溶液中に比べて非会

合状態の比率が高く、数パーセントながら単量体もしくは 2 量体の形成が確認された。これらの結果から、EP と IP の併用促進効果には、インスリンの電荷だけでなく、分子量も影響することが示唆されたため、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同様の検証を行ったところ、pH を上げることなくインスリンの吸収性を増大させる結果が得られた。以上の結果より、インスリンのような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が明らかとなった。この効果メカニズムについては、以下のように考察される。

1. EP 適用により、インスリンが透過可能な新規透過ルートが角層上に形成された。
2. インスリン透過の主な駆動力は electrorepulsion であり、新規透過ルートが形成された結果、負に荷電したインスリンの輸率が增大することによって吸収が促進された。
3. IP のもう一つの駆動力である electroosmosis はカソードル IP の場合は利用できず逆向きの効果となるが、新規透過ルート形成によって増大した輸率の影響を大きく受けた。これらの考察からすると、正電荷の高分子薬物の場合は、electroosmosis を利用可能なためさらに高い併用効果を示すことが推察される。

したがって、第 2 章では、electroosmosis に着目して EP が electroosmosis に及ぼす影響について検討を開始した。

第 2 章 Electroosmosis に及ぼすエレクトロポレーションの効果

Electroosmosis に及ぼす EP の影響をマンニトールのヘアレスマウス皮膚透過性を通じて評価した。皮膚は EP で前処理を行った後、直ちにアノードル IP を適用し、electroosmosis の指標であるマンニトールの透過性を評価した。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、electroosmosis に依存した透過性はむしろ低下することが明らかとなった。これらの結果より、EP の適用により薬物の透過性は適用す

る電圧に依存して促進されるが、アノードル IP 併用によって生じる電気浸透流自体は減弱される傾向があることが明らかとなった。しかし、電荷を有さない高分子モデル薬物であるデキストランローダミン B を用いた場合には、アノードル IP 単独ではほとんど透過しないが、EP とアノードル IP を併用すること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、アノードル IP 併用により併用促進効果が期待できる可能性が示された。したがって、EP/IP 併用時による相乗的効果を得るためには、電気浸透流の変化や投与したい薬物の分子量についても考慮した上で設計することが重要であることが示唆された。一方、EP 前処理後、カソードル IP を適用した場合は、マンニトールの透過性は増加したが、EP 単独群よりも明らかに低値を示した。すなわち、EP とカソードル IP の併用は、電気浸透流の観点からは逆効果であり、薬物の分子量や電荷によっては併用によりむしろ効果が減弱される可能性が考えられた。第 1 章では、EP とカソードル IP の併用によりインスリンの吸収は相乗的に促進されているが、これはインスリンが高分子薬物であり完全にマイナスに荷電していることと、インスリンが透過し得るルートが皮膚に形成されたことが影響していると考えられた。

以上の結果より、EP の前処理は皮膚のイオン選択透過性の変化を引き起こし、アノードル IP 適用時の電気浸透流を減弱させる方向に影響すると考えられた。次に、EP とは異なるメカニズムで新規透過ルートを形成させる SP に着目し、マンニトールを用いて同様の解析を行った。

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の併用効果

第 2 章に続き、ヘアレスマウス皮膚を用いて electroosmosis に及ぼす EP または低周

波数 SP の影響をマンニトールの皮膚透過性を通じて評価した。興味深いことに、SP とアノード IP 併用により、EP とアノード IP 併用時よりも明らかに高い併用促進効果と電気浸透流の増大が確認された。このメカニズムを考察するためにテープストリッピング処理の影響を同様に検証したところ、SP 適用に類似した傾向を示し、テープストリッピング回数の増加（3 回まで）にともないマンニトールの flux は増加し、electroosmosis に依存した透過性も増大する傾向を示した。次に、electroosmosis に影響する因子として皮膚の表面電位が考えられたため、SP 処理またはテープストリッピング処理した皮膚表面のゼータ電位を調べたところ、SP 処理した皮膚表面の電位のみではあるが、大きくマイナスに傾く傾向が確認された。以上の結果より、低周波数 SP とアノード IP の併用は、電気浸透流を大きく促進させることが示され、その機序の一つとして SP の適用により皮膚表面の電位がマイナス側にシフトすることが関与していることが想定された。しかし、テープストリッピング処理の結果と皮膚ゼータ電位の結果のみでは、SP によって促進される電気浸透流の増大を説明するには不十分であり、メカニズムの解析には更なる実験が必要と考えられた。

いずれにせよ、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、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結果と考えられた。本実験の条件下では、SP 前処理の効果が高ければ高い程電気浸透流も増大する傾向が見られること、第 1 章で負電荷を有するインスリンでも相乗効果が示されたことを考慮すると、特に正電荷を有する高分子薬物に対しては相乗効果が発揮される可能性は高いことが推察できる。一方で、本実験における SP の課題としては、併用促進効果にばらつきが見られることがあげられた。このばらつきを低減する方法としては、定電圧 IP を適用することにより電気浸透流を一定に収束する方法や、皮膚電気抵抗値を指標に照射強度を調整する方法等が考えられるため、更なる検討が必要と考えられた。

本研究では物理的経皮吸収促進技術である EP や低周波数 SP と IP を併用することにより相乗的皮膚透過促進効果を得ることを目的として、適用条件、薬物の電荷、分子量、electroosmosis に着目して検討・論述した。EP や低周波数 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にした。特に、SP の前処理は電気浸透流の増大が期待できるため、アノード側 IP との組み合わせが最適であることが明らかとなった。この組み合わせは、電荷の有無に関わらず有用なため、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経皮送達手法として将来有用になると考えられる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に際して終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次 先生に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始有益な御指導、ご助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科薬粧品動態制御学講座准教授 藤堂浩明 先生に心から感謝の意を表します。

さらに、本論文作成にあたり、御指導と御校閲をいただきました城西大学大学院薬学研究科病院薬剤学講座教授 上田秀雄 先生ならびに有機薬化学研究室教授 山ノ井孝 先生に厚く御礼申し上げます。

また、本論文作成にあたり、有益な御助言と御校閲をいただきました城西大学大学院薬学研究科 生物有機化学講座教授 杉田義昭 先生ならびに臨床薬理学講座教授 荻原政彦 先生、薬品作用学講座教授 岡崎真理 先生に感謝の意を表します。

さらに、本研究を終始御助言、御指導をいただきました久光製薬株式会社 常務取締役執行役員 研究開発本部長 肥後成人博士に感謝の意を表します。

城西大学での研究生活において、多大なるご協力をいただきました城西大学薬粧品動態制御学講座の皆様へ感謝致します。

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

引用文献

1. 高橋俊雄, 橋田充, 杉林堅次, 森本雍憲, 今日の DDS 薬物送達システム, **80**, (1999) .
2. Prausnitz M., Mitragotri S., Langer R., Current status and future potential of transdermal drug delivery, *Nature Rev. Drug Discovery*, **3**, 115-120 (2004) .
3. 池村舞, 橋田亨, ロチゴチン, 薬局, **64**, 66-71 (2013) .
4. Siddiqui O., Roberts M. S., Polack A. E., The effect of iontophoresis and vehicle pH on the *in-vitro* permeation of lignocaine through human stratum corneum, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 732-735 (1985).
5. Zimmermann U., Schulz J., Pilwat G., Transcellular ion flow in *Escherichia coli* B and electrical sizing of bacterias, *Biophys. J.*, **13**, 1005-1013 (1973).
6. Fellingner K., Schmidt J., Klinik and therapies des chronischen gelenkreumatismus, *Maudrich Vienna, Austria*, 549-552 (1954).
7. Ogura M., Paliwal S., Mitragotri S., Low-frequency sonophoresis: current status and future prospects, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1218-23 (2008).
8. Kim A., Green P. G., Rao G., Guy R. H., Convective solvent flow across the skin during iontophoresis, *Pharm. Res.*, **10**, 1315-1320 (1993).
9. Dixit N., Bali V., Baboota S., Ahuja A., Ali J., Iontophoresis - an approach for controlled drug delivery: a review, *Curr. Drug Deliv.*, **4**, 1-10 (2007).
10. Power I, McCormack J. G., Advances in patient-controlled analgesia: the role of fentanyl ITS, *Med. Devices*, **1**, 49-57 (2008).
11. Vikelis M., Mitsikostas D. D., Rapoport A. M., Sumatriptan iontophoretic transdermal system for the acute treatment of migraine, *Pain. Manag.*, **4**,

- 123-128 (2014).
12. Nair V. B., Panchagnula R., Effect of iontophoresis and fatty acids on permeation of arginine vasopressin through rat skin, *Pharmacol. Res.*, **47**, 563-569 (2003).
 13. Chang S. L., Hofmann G. A., Zhang L., Deftos L., Banga, A.K., Transdermal iontophoretic delivery of salmon calcitonin, *Int. J. Pharm.*, **200**, 107-113 (2000).
 14. Aramaki Y., Arima H., Takahashi M., Miyazaki E., Sakamoto T., Tsuchiya S., Intradermal delivery of antisense oligonucleotides by the pulse depolarization iontophoretic system, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1461-1466 (2003).
 15. Suzuki Y., Iga K., Yanai S., Matsumoto Y., Kawase M., Fukuda T., Adachi H., Higo N., Ogawa Y., Iontophoretic pulsatile transdermal delivery of human parathyroid hormone(1-34), *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 1227-1234 (2001).
 16. Turner N. G., Ferry L., Price M., Cullander C., Guy R. H., Iontophoresis of poly-L-lysines: the role of molecular weight? *Pharm. Res.*, **14**, 1322-1331 (1997).
 17. Marro D., Guy R. H., Delgado-Charro M. B., Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin, *J. Control. Release*, **70**, 213-217 (2001).
 18. Kirjavainen M., Urtti A., Monkkonen J., Hirvonen J., Influence of lipids on the mannitol flux during transdermal iontophoresis *in vitro*, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **10**, 97-102 (2000).
 19. Hirvonen J., Guy R. H., Transdermal iontophoresis: modulation of electroosmosis by polypeptide, *J. Control. Release*, **50**, 283-289 (1998).

20. Riviere J. E., Bowman K. F., Monteiro-Riviere N. A., Dix L. P., Carver M. P., The isolated perfused porcine skin flap (IPPSF). I. A novel *in vitro* model for percutaneous absorption and cutaneous toxicology studies, *Fund. Appl. Toxicol.*, 7444-7453 (1986).
21. Guy R. H., Kalia Y. N., Delgado-Charro M. B., Merino V., Lopez A., Marro D., Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis, *J. Control. Release*, **64**, 129-132 (2000).
22. Prausnitz M. R., Bose V. G., Langer R., Weaver J. C., Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 10504-10508 (1993).
23. Sugibayashi K., Yoshida M., Mori K., Watanabe T., Hasegawa T., Electric field analysis on the improved skin concentration of benzoate by electroporation, *Int. J. Pharm.*, **219**, 107-112 (2001).
24. Tokudome Y., Sugibayashi K., The synergic effects of various electrolytes and electroporation on the *in vitro* skin permeation of calcein, *J. Control. Release*, **92**, 93-101 (2003).
25. Regnier V., Tahiri A., Andre N., Lemaitre M., Le Doan T., Preat V., Electroporation-mediated delivery of 3'-protected phosphodiester oligodeoxynucleotides to the skin, *J. Control. Release*, **67**, 337-346 (2000).
26. Tokudome Y., Sugibayashi K., The effects of calcium chloride and sodium chloride on the electroporation-mediated skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextrans *in vitro*, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1508-1510 (2003).
27. Mitragotri S., Blankschtein D., Langer R., Ultrasound-mediated transdermal

- protein delivery, *Science*, **269**, 850-853 (1995).
28. Mitragotri S., Blankschtein D., Langer R., Sonophoresis: Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis, *Pharm. Res.*, **13**, 411-420 (1996).
 29. Bommannan D., Okuyama H., Stauffer P., Guy R. H., Sonophoresis.1, The use of high-frequency ultrasound to enhance transdermal drug delivery. *Pharm. Res.*, **9**, 559-564 (1992).
 30. Tachibana K., Transdermal delivery of insulin to alloxan-diabetic rabbits by ultrasound exposure, *Pharm. Res.*, **9**, 952-954 (1992).
 31. 廣峰義久, 池上博司, 超速効型インスリン製剤の薬理学的特徴と臨床的有用性, 月刊糖尿病, **6**, 34-35 (2010) .
 32. Kanikkannan N., Singh J., Ramarao P., Transdermal iontophoretic delivery of bovine insulin and monomeric human insulin analogue, *J. Control. Release*, **59**, 99-105 (1999).
 33. Kari B., Control of blood glucose levels in alloxan-diabetic rabbits by iontophoresis of insulin, *Diabetes*, **35**, 217-221 (1986).
 34. Siddiqui O., Sun Y., Liu J. C., Chein Y. W., Facilitated transdermal transport of insulin, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 341-345 (1987).
 35. Choi E. H., Lee S. H., Ahn S. K., Hwang S. M., The pretreatment effect of chemical skin penetration enhancers in transdermal drug delivery using iontophoresis, *Skin. Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **12**, 326-335 (1999).
 36. Bommannan D. B., Tamada J., Leung L., Potts R. O., Effect of electroporation on transdermal iontophoretic delivery of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) *in vitro*, *Pharm. Res.*, **11**, 1809-1814 (1994).
 37. Chang S. L., Hofmann G. A., Zhang L., Deftos L. J., Banga A. K., The effect of

- electroporation on iontophoretic transdermal delivery of calcium regulating hormones, *J. Control. Release*, **66**, 127-133 (2000).
38. Fang J. Y., Sung K. C., Wang J. J., Chu C. C., Chen K. T., The effects of iontophoresis and electroporation on transdermal delivery of buprenorphine from solutions and hydrogels, *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 1329-1337 (2002).
39. Fang J. Y., Hwang T.L., Huang Y. B., Tsai Y. H., Transdermal iontophoresis of sodium nonivamide acetate. V. Combined effect of physical enhancement methods, *Int. J. Pharm.*, **20**, 95-105 (2002).
40. Denet A. R., Ucakar B., Preat V., Transdermal delivery of timolol and atenolol using electroporation and iontophoresis in combination: a mechanistic approach, *Pharm. Res.*, **20**, 1946-1951 (2003).
41. Yoshida M., Mori K., Watanabe T., Hasegawa T., Sugibayashi K., Effects of application voltage and cathode and anode positions at electroporation on the *in vitro* permeation of benzoic acid through hairless rat skin, *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1807-1809 (2000).
42. Pliquett U., Prausnitz M. R., Chizmadzhev Y. A., Weaver J. C., Measurement of rapid release kinetics for drug delivery, *Pharm. Res.*, **12**, 594-555 (1995).
43. Darrington R., Anderson B. D., The role of intramolecular nucleophilic catalysis and the effects of self-association on the deamidation of human insulin at Low pH, *Pharm. Res.*, **11**, 784-793 (1994).
44. Vanbever R., Prausnitz M. R., Preat V., Macromolecules as novel transdermal transport enhancers for skin electroporation, *Pharm. Res.*, **14**, 638-644 (1997).
45. Marro D., Kalia Y. N., Delgado-Charro M. B., Guy R. H., Contributions of electromigration and electroosmosis to iontophoretic drug delivery, *Pharm. Res.*,

- 18, 1701-1708 (2001).
46. Delgado-Charro M. B., Guy R. H., Transdermal iontophoresis for controlled drug delivery and non-invasive monitoring, *S.T.P Pharma. Sci.*, **11**, 403-414 (2001).
 47. Pikal M. J., Transport mechanisms in iontophoresis. I. A theoretical model for the effect of electroosmotic flow on flux enhancement in transdermal iontophoresis, *Pharm. Res.*, **7**, 118-126 (1990).
 48. Li S. K., Ghanem A. H., Higuchi W. I., Pore charge distribution considerations in human epidermal membrane electroosmosis, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1044-1049 (1999).
 49. Riviere J. E., The isolated perfused porcine skin flap (IPPSF). I. A novel *in vitro* model for percutaneous absorption and cutaneous toxicology studies, *Fund. Appl. Toxicol.*, **7**, 444-453 (1986).
 50. Lanke S. S., Strom J. G., Banga A. K., Enhancement of transdermal delivery of heparin by various physical and chemical enhancement techniques, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier*, **26**, 581-606 (2009).
 51. Mutoh M., Ueda H., Nakamura Y., Hirayama K., Atobe M., Kobayashi D., Morimoto Y., Characterization of transdermal solute transport induced by low-frequency ultrasound in the hairless rat skin, *J. Control. Release*, **92**, 137-146 (2003).
 52. Abla N., Naik A., Guy R. H., Kalia Y. N., Contributions of electromigration and electroosmosis to peptide iontophoresis across intact and impaired skin, *J. Control. Release*, **108**, 319-330 (2005).