

無針注射器とイオントフォーシスの併用による

ペプチドホルモンの経皮投与

(研究課題番号 07457532)

平成7～9年度科学研究費補助金

基盤研究 (B)(2)

研究成果報告書

平成10年3月

森 本 雍 憲

0098030718

城西大学
水田記念図書館

無針注射器とイオントフォーシスの併用による
ペプチドホルモンの経皮投与

(07457532)

0098030718

城西大学
水田記念図書館

平成7年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究（B）（2））研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 森本 雍 憲
（城西大学薬学部教授）

研究組織

研究代表者：森本雍憲（城西大学薬学部教授）

研究分担者：杉林堅次（城西大学薬学部助教授）

研究分担者：木村昌行（埼玉医科大学総合医療センター講師）

研究分担者：沼尻幸彦（城西大学薬学部助手）

研究経費

平成7年度 4,900千円

平成8年度 400千円

平成9年度 600千円

計 5,900千円

研究発表

（1）学会誌

Naoko Inoue, Daisuke Kobayashi, Masayuki Kimura, Machuji Toyama, Isamu Sugawara, Shinji Itoyama, Masahiko Ogihara, Kenji Sugibayashi, Yasunori Morimoto, Fundamental investigation of a novel drug delivery system, a transdermal delivery system with jet injection, International Journal of Pharmaceutics, **137**, 75-84 (1996).

岩崎栄一, 沼尻幸彦, 杉林堅次, 森本雍憲, ジェットインジェクターと定電圧イオントフォレーシスの併用による *in vitro* 薬物皮膚透過性の促進, Therapeutic Research, **17**, 69 (1996).

鍵野みどり, 沼尻幸彦, 杉林堅次, 森本雍憲, ジクロフェナクの皮膚透過に及ぼすジェットインジェクターとイオントフォレーシスの併用効果とその解析, 薬物動態, **12**, S285 (1997).

第3章	アンジオテンシンⅡを用いたジェットインジェクターとイオン フォレーシスの併用効果	・・・17
第1節	ジェットインジェクター適用によるアンジオテンシンⅡの透過 性に関する検討	・・・17
第2節	定電圧イオンフォレーシスとジェットインジェクターの併用 効果	・・・18
第3節	定電流イオンフォレーシスとジェットインジェクターの併用 効果	・・・20
結論		・・・22
参考文献		・・・24

緒言

現在使用されている医薬品の多くは経口剤及び注射剤として投与されている。経口剤は、患者自身によって服用でき、安全性に優れているという利点があるが、初回通過効果を受け薬効の発現にばらつきが生じるなどの欠点を有している。一方、注射剤は、薬効の発現が極めて速いという利点を有しているものの、投与時に痛みを伴い、一部の製剤を除き患者自ら投与ができない欠点がある。また、頻回投与が必要な場合、患者は入院を余儀なくされ、精神的にも肉体的にも負担が大きくなる。

近年、このような問題を克服するための新たな投与方法として、薬物を皮膚から投与する経皮治療システム (TTS) が開発された。このシステムは経口剤や注射剤に比べ、a) 投与が確実である、b) 肝臓での初回通過効果の回避ができる、などの利点を有しており¹⁾、患者の Quality of Life の向上に大きく貢献できることが期待されている。しかし、皮膚は本来生体を保護するためのバリアーとして機能しており²⁾、薬効を発揮するのに十分な吸収速度を得ることは非常に困難であった。特に、皮膚の最表面に位置する角質層は非常に大きな透過バリアーを形成しており³⁾ 消化管などに比べると薬物の吸収性は低く、中でも水溶性薬物や高分子量薬物などの吸収性は極めて低い。皮膚透過性の低い薬物を皮膚適用し薬効を十分に発揮させるために、吸収促進剤を用いたり⁴⁻⁶⁾、あるいはプロドラック化¹⁾ など多くの試みがなされている。しかし、特に近年開発が目覚ましいペプチドやオリゴヌクレオチドを経皮吸収させるにはこれらの方法はあまり十分とはいえない⁷⁾。そこで、十分な治療効果が期待でき、かつ効率良く薬物を皮膚から吸収させることのできる方法として、物理的透過促進法が試みられている^{8, 9)}。

Iontophoresis (IP) はこの物理的透過促進法のひとつであり、電気の流れを駆動力として皮膚を介して薬物を吸収させる方法である¹⁰⁻¹³⁾。これは、一般的に経皮吸収性が低いとされている水溶性のイオン型薬物の皮膚透過の促進に有効である^{14, 15)}だけでなく、経口投与では吸収性が低いとされているたん白質、ペプチド¹⁶⁾などの高分子量の薬物の皮膚透過を促進できることがわかっている。また、電流を適用することで生じる水の流れ (電気浸透流) により荷電をもたない非電解質薬物の皮膚透過を促進することも報告されている¹⁷⁾。さらに IP は適用電流によって薬物の投与速度を制御でき^{18, 19)}、使用が簡便であるため在宅療法への応用が期待できる。また、これまでの経皮吸収型製剤と比較して bioavailability が改善され、半減期の短い薬物を連続的に投与することが可能となる、などの利点も有している。しかしながら、皮膚透過性が極めて低い薬物では、一般に高い適用電流を必要とし、皮膚に負荷される電位勾配が大きくなり、皮膚構造の変化や発赤、紅斑といった皮膚刺激が問題となっている²⁰⁻²¹⁾。

一方、Jet injector (JI) は (Fig. 1) 、インスリンの自己注射を余儀なくされているインスリン依存型の糖尿病患者の注射時の疼痛や心理的嫌悪感、頻回投与による生活の不便さ、注射部位の硬結などを解決するために開発された無針圧力注射器である²²⁾。この注射器は薬物溶液を高速高圧で射出するもので、薬液は皮膚角質層を貫通し血管付近に到達する。しかも通常の注射器による疼痛がほとんどないという利点も有している。

しかしながら，無針圧力注射器の使用により，一時的な比較的速やかに修復される角質層の破壊が生じる．ほとんどの薬物の皮膚透過の律速段階は角質層であるため，このような方法により角質層を経ずに薬物を皮内毛細血管近傍へ直接投与できることは，経皮吸収性を著しく高めることに繋がり，非常に多くの薬物を経皮的に投与することが可能であることを意味する．しかしながら，単に薬液を投与するのでは持続的な血中濃度のコントロールは難しく，また分子量の大きな薬物では投与部位から毛細血管への移行性が律速となる可能性もある．

そこでまず，JIで直接薬物を投与するのではなく，皮膚に細孔を形成させた後，様々な薬液を皮膚上に適用し，形成された細孔から薬物が持続的に血中に移行するかどうかを調べた．次に薬物透過実験用セルとして，IP用横型拡散セル（Fig. 2）を用い，イオン性の低分子モデル薬物としてジクロフェナクナトリウムを用い，JIにIPを併用したときに電氣的に皮膚透過の制御が可能かどうかを調べ，最後にモデルペプチド性医薬品としてアンジオテンシン II を用いて，IP-JIの併用効果について検討を加え，このようなシステムが分子量の大きな薬物の投与方法として有用であるかを考察した．

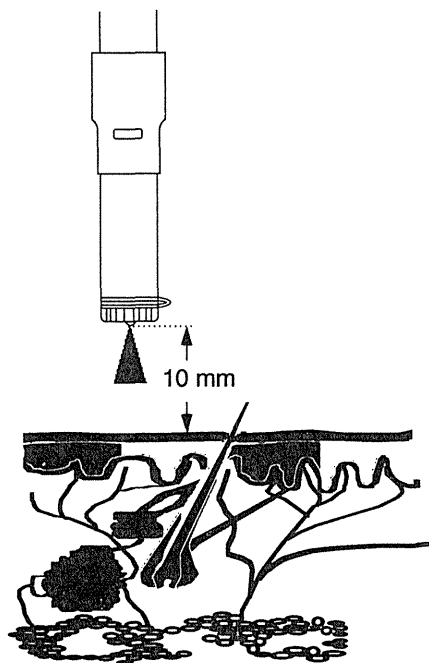


Fig. 1 Schematic diagram of skin at JI treatment

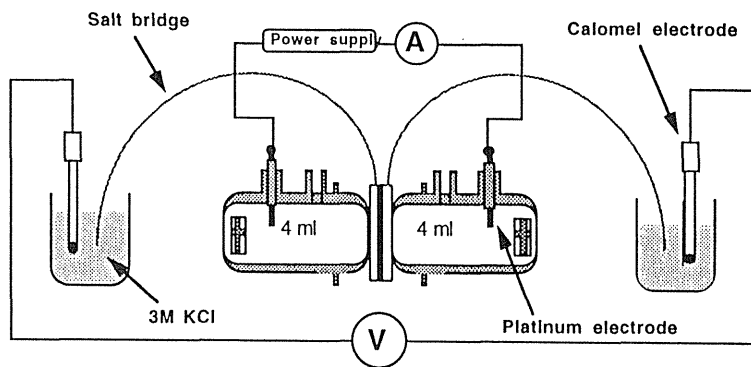


Fig. 2 Schematic diagram of iontophoretic permeation apparatus

第1章 ジェットインジェクターによる種々薬物の皮膚透過性

ジェットインジェクター (JI) は、もともと薬液を皮下に直接投与する方法で、皮下への送達量はほぼ100%とあってよい。しかし、JIにより細孔を形成させた後、その細孔ルートから薬物溶液を適切な速度で浸透させるためには、(1)果たして0次速度で薬物の透過(吸収)が得られるのか、(2)細孔の大きさが透過速度の決定因子となるのか、(3)溶媒流の影響はあるのか、を明らかにする必要がある。そこでまず、JIと皮膚との射出距離を変えたときの射出距離と溶媒流との関係及び細孔の大きさととの関係を調べた。次にモデル薬物としてゲンタマイシン、テオフィリン、塩酸ニカルジピンを選び、それらの吸収性及び透過速度を評価した。

第1節 JI射出距離、細孔の大きさ及び溶媒流の関係

Fig. 3に様々な距離からJIを用いてヘアレスラット皮膚に細孔を形成させた後の、射出距離と溶媒流、射出距離と細孔面積及び細孔面積と溶媒流との関係を示す。JIと皮膚との距離が離れると溶媒流は増加した (Fig. 3a)。また、距離が離れるとそれに比例して細孔の面積が増加し (Fig. 3b)、結果的に、形成された細孔の大きさが溶媒流を決定することがわかった (Fig. 3c)。これらの結果より、JIにより形成された細孔が薬物の透過性(吸収性)を決定する場合は、射出距離に依存した透過速度が得られる可能性が示唆された。また、Fig. 3cの傾きから計算される透過係数は角質層を取り除いた皮膚 (stripped skin) の透過係数に等しかった²³⁻²⁵⁾。

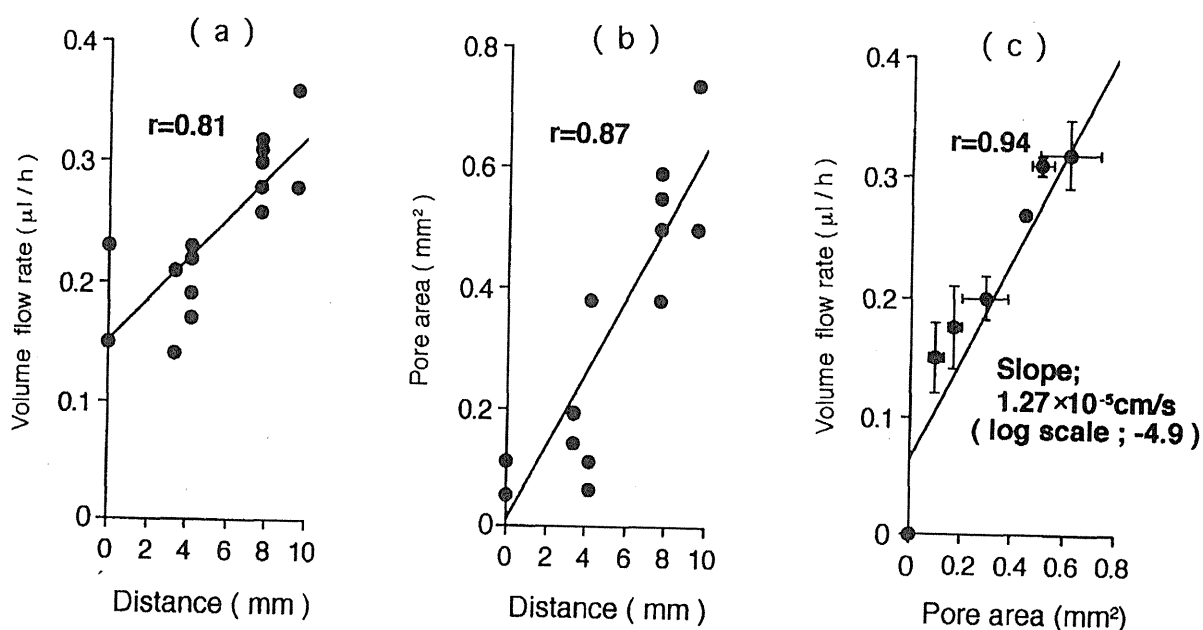


Fig. 3 Correlation between volume flow rate and skin-Jet injection distance (a), pore area and the distance (b) and the flow rate and pore area (c)

第2節 JI適用後の種々薬物の透過性

先の結果を元に難吸収性の薬物であるゲンタマイシンを用いて、細孔の形成性が薬物透過の律速過程となるかを調べた。Fig. 4にJIを皮膚から0 mm及び5 mmの距離で細孔を形成させた後のゲンタマイシンの*in vitro*ヘアレスラット皮膚を介する透過性を示す。JI処理をしなかった場合、サンプリング側に出現したと思われるゲンタマイシンは定量限界以下であり、ほとんど透過しなかったと考えられた。一方、JI処理で細孔を形成すると、射出距離に依存したゲンタマイシンの透過が観察された (Fig. 4)。また、角質層を取り除いた皮膚では、射出距離の違いで透過は変わらなかった。これらの結果より、正常な皮膚に細孔を形成させた場合、薬物の透過は細孔の形成性に依存することがわかった。

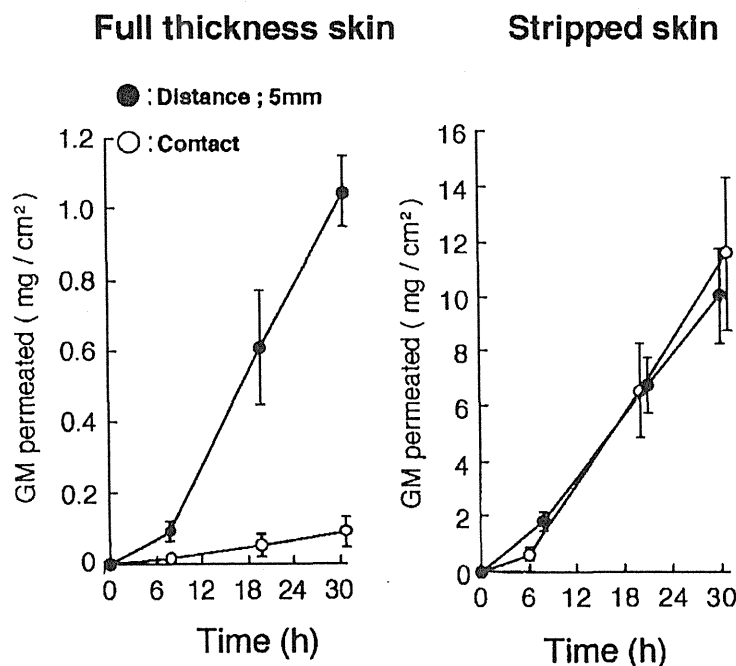


Fig. 4 *In vitro* permeation of gentamicin through full thickness or stripped skin pretreated with Jet injector

次に、射出距離を10 mmに固定し、ゲンタマイシン、テオフィリン、塩酸ニカルジピンを投与したときの*in vivo*ヘアレスラットにおける血中濃度を評価した。Fig. 5に24時間までの各薬物の血中濃度の時間推移並びに各薬物の薬動的パラメータを用いてデコンポリューション法により求めた吸収プロファイルを示す^{2,6)}。各薬物の血中濃度の推移は、各薬物の消失パラメータに依存して比較的速やかに定常状態に達した。デコンポリューション法により得られた吸収プロファイルは、どの場合も直線的であり、しかもラグタイムもほとんど観察されなかった。各薬物の吸収速度(透過速度, J)から算出された溶媒流(J_v , 透過係数に等しい)はどの場合もほぼ等しく約0.4 l/hであった。これらの結果より、細孔の形成性に依存した薬物吸収が得られることが明らかとなった。

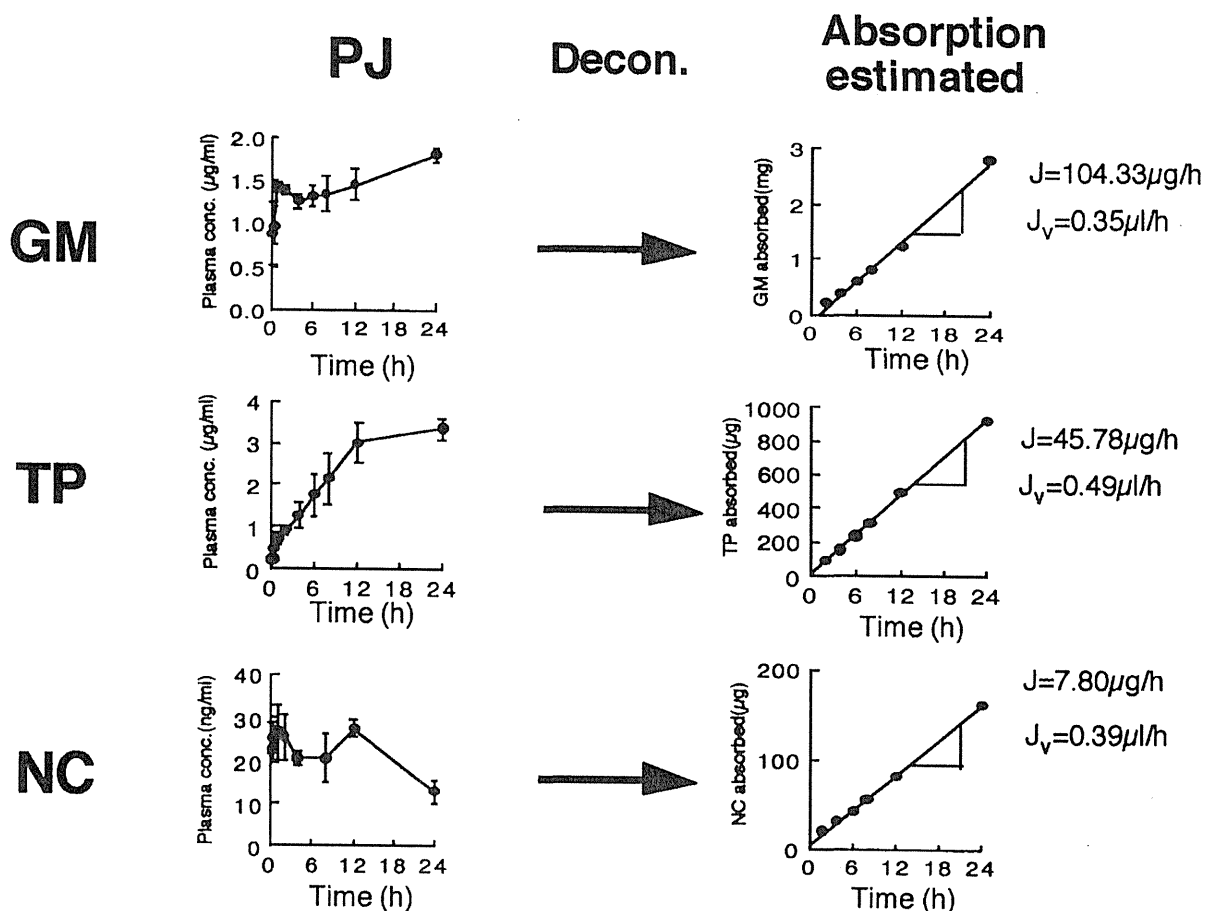


Fig. 5 Time course of plasma concentration of moderl drugs after topical application with Jet injector treatment (left) and cumulative amount of skin permeation of moderl drugs calculated by deconvolution method (right) after application with Jet injector treatment.

GM: gentamicin, TP: theophylline, NC: nicardipine hydrochloride

第2章 ジクロフェナクナトリウムの皮膚透過に及ぼすジェットインジェクターとイオントフォーシスの併用効果

本章では、皮膚透過性が低いとみなされるジクロフェナクナトリウム (DC-Na) (Fig. 6) をモデル薬物とし、IP の2つの適用様式、すなわち定電圧 IP、または定電流 IP と JI を併用し、ヘアレスラット腹部摘出皮膚を用いた *in vitro* 透過実験により、DC-Na の透過性の違いについて詳細な検討を行い、促進効果を明らかにすることを目的とした。なお、JI適用距離は前章の結果から、10 mmとした。また、DC-Na の pKa は 4.00、オクタノール/水分配係数は -0.962 である。

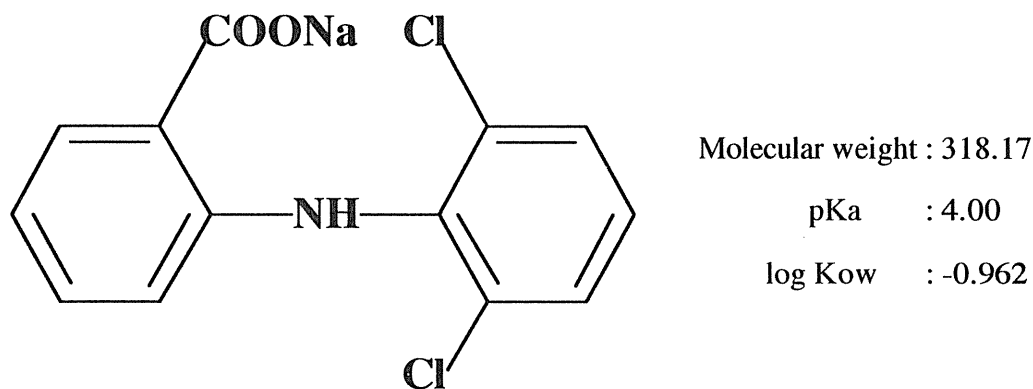


Fig. 6 Chemical structure of diclofenac sodium

第1節 定電圧イオントフォーシスとジェットインジェクター併用時におけるジクロフェナクナトリウムの透過性に関する検討

第1項 定電圧イオントフォーシスとジェットインジェクターの併用効果

Fig. 7 a に定電圧 0.5V IP 単独系と定電圧 0.5V IP-JI 併用系での DC 累積皮膚透過量を示す。定電圧 IP 単独系に対する定電圧 IP-JI 併用系の 4 時間後の DC の累積透過量は約 3 倍高かった。また両方の透過 profile において共に定常状態が得られなかったのは、時間と共に皮膚抵抗が低下して皮膚を介した電流が時間の経過と共に増大するためと思われた。そこで、3～4 時間目の透過速度 (flux) を用いて、定電圧 IP 系と定電圧 IP-JI 併用系の比較を行った。Fig. 7 b にその結果を示す。3～4 時間での flux はそれぞれの実験で皮膚を介する電流密度が同じでないために多少のばらつきがあるものの、JI 併用時が IP 単独系より数倍高かった。以上より IP と JI を組み合わせることにより、DC の皮膚透過性はそれぞれの単独より高くなること、すなわち併用効果があらわれることが明らかとなった。

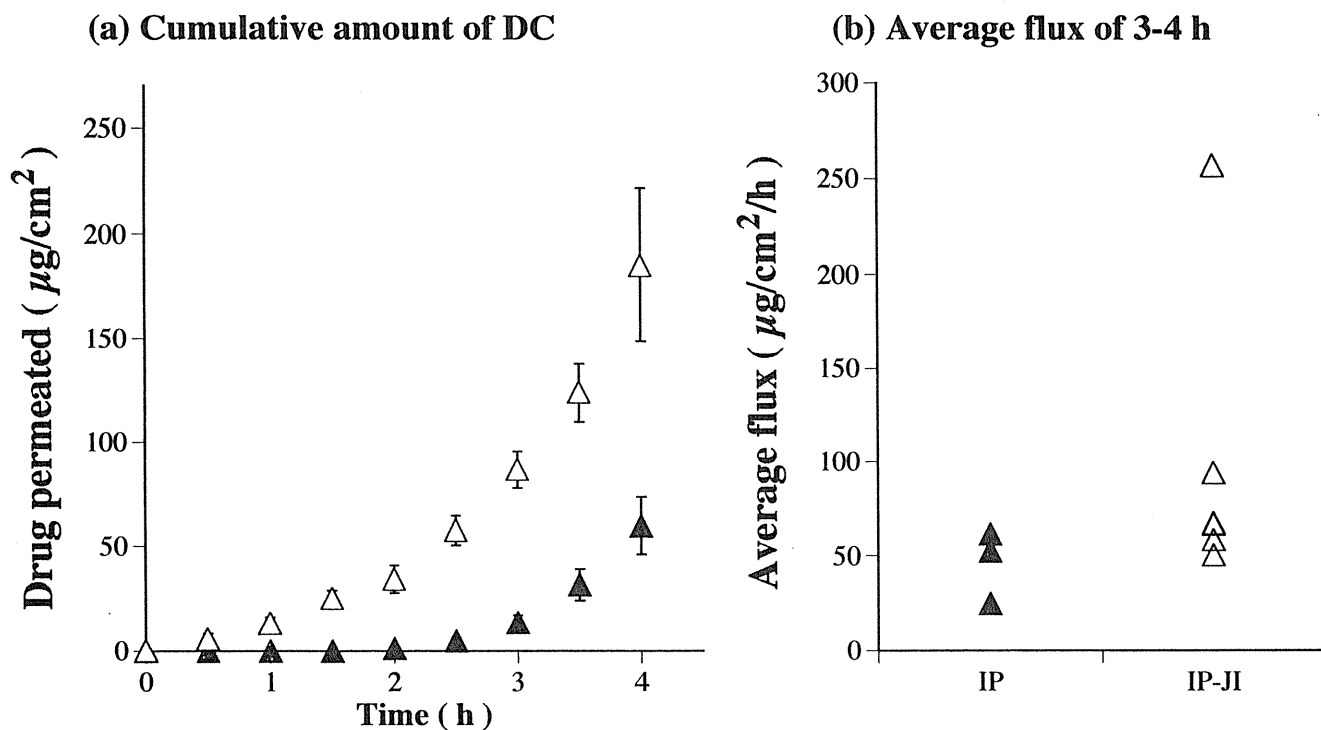


Fig. 7 Skin permeation profiles of DC at constant voltage (0.5 V) IP with and without JI

0.5 V IP (▲); 0.5 V IP-JI (△)

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3-6 experiments

次に、定電圧 IP 適用時及び定電圧 IP-JI 併用系の DC の皮膚透過の挙動を、その時の皮膚を流れる電流を測定し皮膚透過速度と電流という観点から検討した。Fig. 8 にそれぞれの実験条件において皮膚を介して流れた電流密度と DC の flux の関係について示す。図に示したように、ばらつきは観察されるものの、JI 処理を施した場

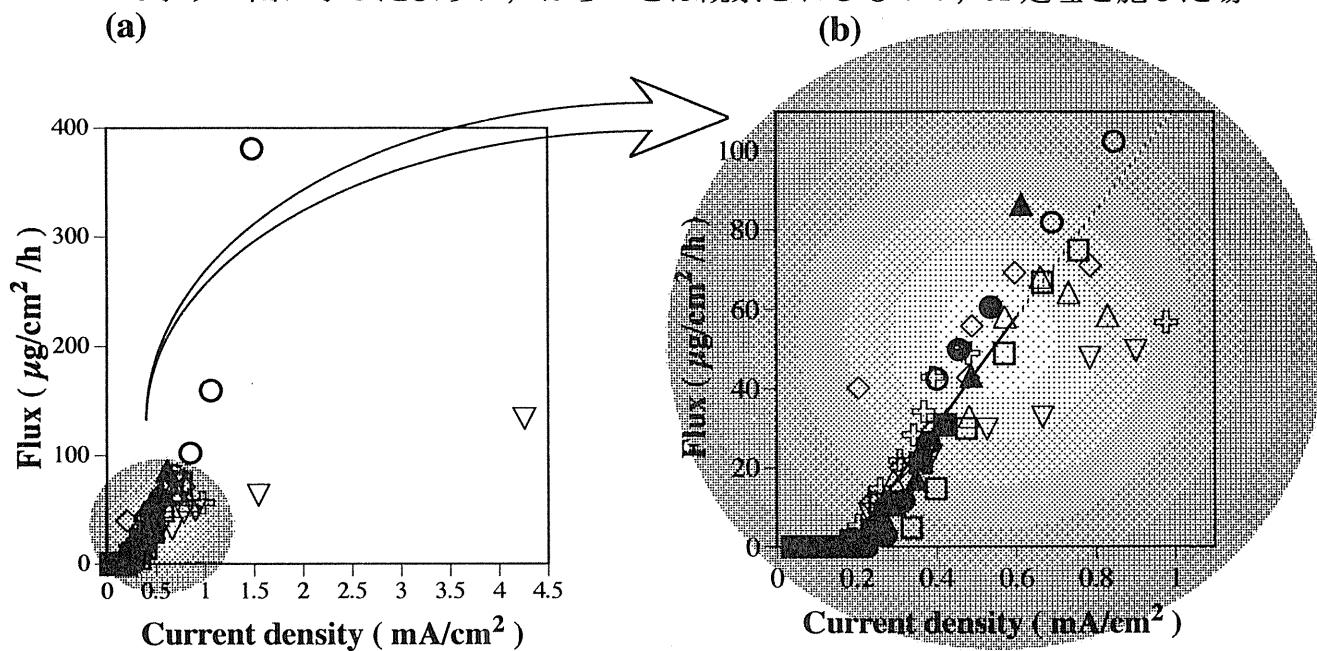


Fig. 8 Relationship between current density and DC flux at constant voltage IP with (open symbol) and without JI (closed symbol)

合も JI 処理を施していない場合も、共に電流密度が 0.6 mA/cm^2 位までは皮膚を介して流れる電流密度と DC の flux との間に比較的良好な相関性が観察された (Fig. 8b) .

JI 処理を施すことで皮膚透過抵抗が減少した場合でも、皮膚を介して流れる電流と DC の flux は相関しており、電流によって DC の皮膚透過が制御されていることが示唆された。しかしながら高い電流値の場合、電流密度と flux との相関性が下がった (Fig. 8a) . IP 適用時においては一般に 0.5 mA/cm^2 以上の電流値を適用すると皮膚の正常な状態が保たれなくなることが報告されているので²⁷⁾、この現象は高い電流値にさらされたことによって皮膚の integrity が保たれなくなり、DC の透過性に何らかの影響を与えたため生じたと推察される。なお、 0.2 mA までの電流値では DC の flux はほとんど観察されなかった。これには皮膚中の電解質や対極側の Na^+ などが関与していると思われるが、この現象で正確に把握するためにはさらなる検討が必要である。

第 2 項 定電圧 イオンフォレーシスとジェットインジェクター併用時における現象の解析

定電圧 IP と JI の併用効果が得られた理由は以下のように考えることができる。すなわち、皮膚に JI 処理を施すことにより生じた細孔は、角質層において新たな水溶性ルートを形成することになるため皮膚の電気抵抗が減少し、JI 処理を施す前と比較すると電流値が増加したことにより、この電流値にほぼ比例して DC の累積透過量及び flux が増加したものと考えられる。

オームの法則 (式 1) を用いてこの現象をさらに考えてみる。

$$V = IR \quad (1)$$

ここで、 V は電圧、 I は電流、 R は抵抗である。今回の検討においては、水溶性ルートすなわち水中を移動するイオン flux が電流値 (I) と相関すると考えられる。

定電圧 IP では V は一定である。また、DC の皮膚中での拡散抵抗は電気抵抗と置き換えて考えることができる。すなわち、JI を適用し皮膚角質層に細孔が形成されれば抵抗 (R) が減少し、電流値 (I) すなわち、DC の透過量が増大したと解釈できる。

IP 単独適用時の研究においても、駆動力となる電圧 (V) を増大させることで薬物の皮膚透過性が上昇する^{28, 29)}。皮膚を介して流れる電流は Fig. 9 に示したようにドナー→レシーバーとレシーバー→ドナーのイオンの流れの総和と考えられ、総電流 (I_t) は以下の式で表わされる³⁰⁾。

$$I_t = (Z_d F J_d + Z_s F J_s + Z_p F J_p) S \quad (2)$$

ここで Z はイオンの荷電, F はファラデー定数, J はイオンの flux, S はイオンの透過面積である. また添字の d , s と p はそれぞれ DC-Na と ナトリウムイオン (Na^+) とカリウムイオン (K^+) を意味する (Fig. 9 参照).

(2) 式を書き換えると

$$I_t / S = Z_d F J_d + Z_s F J_s + Z_p F J_p \quad (3)$$

となる. この式は薬物の輸率に変化しないとすれば, 薬物の flux に関する右辺の第 1 項の寄与も変化しないとみなせるため, 皮膚を流れる電流密度すなわち I/S と薬物の flux は相関することを示している. しかしながら, 前述したように, DC の皮膚透過に関係している皮膚の電気抵抗には個体差があり, 極端に皮膚の電気抵抗が低かった場合には高い電流にさらされることで皮膚の integrity が保たれなくなってしまう. またこの時電流値が一定とならず, 薬物の投与量や速度をコントロールすることは困難になると思われる. さらに, 電流値が著しく高くなる場合も考えられ, 電流による皮膚障害の危険性も懸念される. また, 皮膚の異なった部位に JI を複数回適用することで, 単回適用よりも皮膚の親水性ドメインが増大し DC の皮膚透過促進効果を増大させることができる可能性があり, JI の適用回数を変化させた場合の定電流 IP-JI 併用効果についても検討することとした.

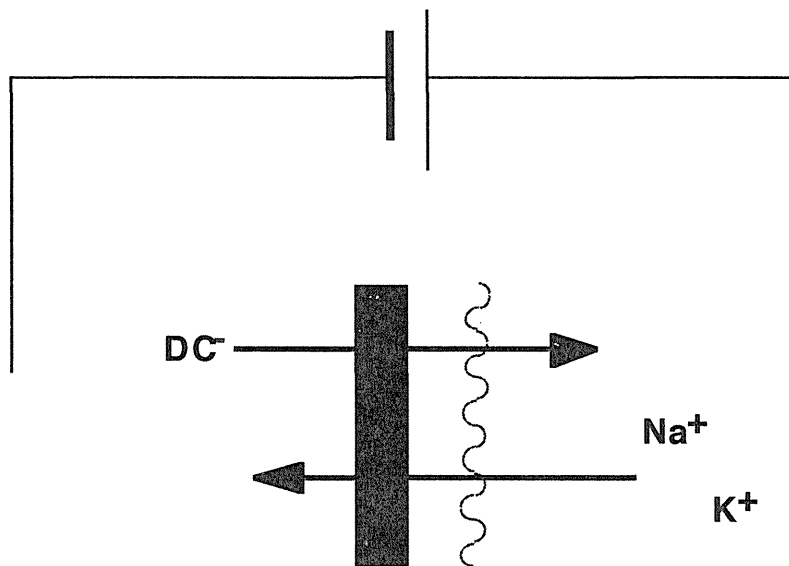


Fig. 9 Schematic diagram of oppositely directed DC⁻ current and Na⁺ and K⁺ currents

第3節 ジェットインジェクター適用回数の違いによるジクロフェナクナトリウムの透過性の検討

まず、JI 単独適用時における DC 皮膚透過に及ぼす JI 適用回数の影響について検討した。Fig. 10 に JI を 1 回及び 3 回適用した時の DC 累積透過量を示す。JI 適用回数が増加すると lag time は短くなり、JI を 3 回適用したものにおいては lag time はほとんど観察されなかった。また、薬物の透過 profile は時間の経過と共にほぼ直線的に増加した。それぞれの 8 時間目の累積透過量をコントロールと比較すると 1 回適用及び 3 回適用でそれぞれ約 14.5 倍、約 41.2 倍高かった。

Fig. 11 に JI 適用回数と DC の定常状態時の flux との関係を示す。薬物の透過速度は JI の処理回数を 1 回から 3 回にしても、DC の定常状態 flux は 3 倍よりも若干低い値となった。皮膚表面と JI 先端部に距離をおいた場合、薬物の主な透過ルートになると考えられる角質層の破壊部分が生じ、さらに射出した生理食塩液の放射状の滞留部ができる。透過の増大は、角質層の破壊増大によるドナーとレシーバー間の皮膚を介した拡散抵抗の減少が大きく寄与しているものと考えられるが、JI によって生じた生理食塩液の滞留部も薬物の透過に寄与していると考えられる。しかし、JI を 3 回適用した場合、この 2 種類の部位が重複する可能性があり、これが透過面積が正確に 3 倍とならなかったことの 1 つの原因と考えられた。

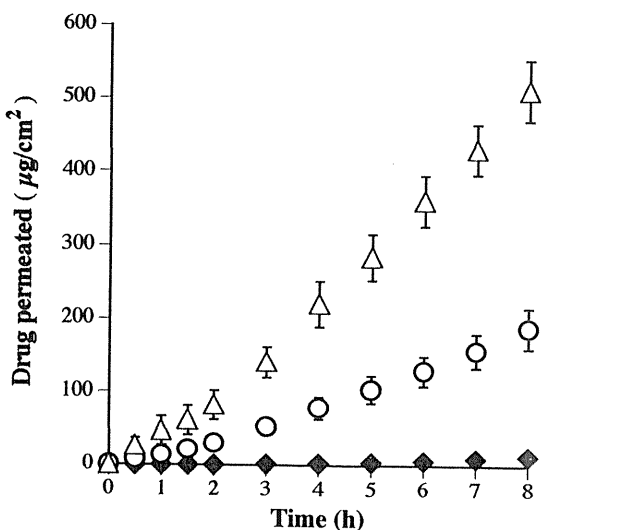


Fig. 10 Effect of application times of JI on the skin permeation of DC
control (◆); 1 time JI (○); 3 times JI (△)
Each data point represents the mean ± S.E. of 3-6 experiments

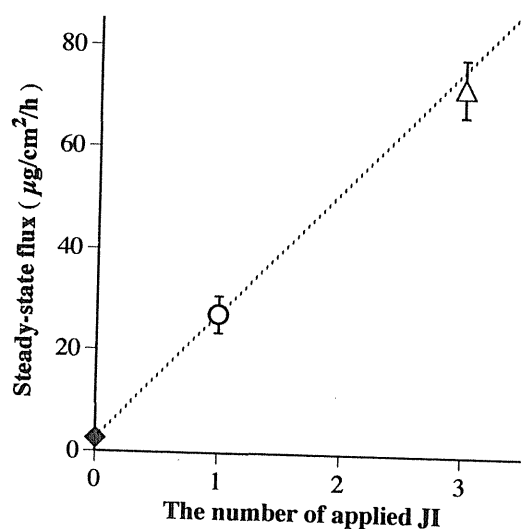


Fig. 11 Relationship between application times of JI and steady-state flux of DC
control (◆); 1 time JI (○); 3 times JI (△)
Each data point represents the mean ± S.E. of 3-6 experiments

第4節 定電流イオントフォーシスの適用条件の違いによる検討

定電流 IP 単独適用時の DC 皮膚透過に及ぼす適用電流の影響について検討した。Fig. 1 2 に 0.1 mA IP と 0.3 mA IP における DC の累積透過量を示す。薬物の透過 profile は 2 時間目から 6 時間目まで時間の経過と共にほぼ直線的に増加したが、IP の適用時間が長くなると透過 profile は頭打ちの傾向を示した。これは、長い時間 IP を適用したことによる皮膚の構造の変化が原因であるのかもしれない。8 時間後の累積透過量はコントロールと比較すると 0.1 mA IP で約 7.7 倍、0.3 mA IP で約 28.4 倍であった。

Fig. 1 3 にこの時の DC の定常状態時の flux と電流密度との関係を示す。電流密度が増大するにつれて DC の flux も増大しており、比較的高い相関性 ($r = 0.943$) が観察された。なお、0.3 mA 適用時の flux が回帰直線より高くなったのは、高電流による皮膚のダメージによるものと推察された。

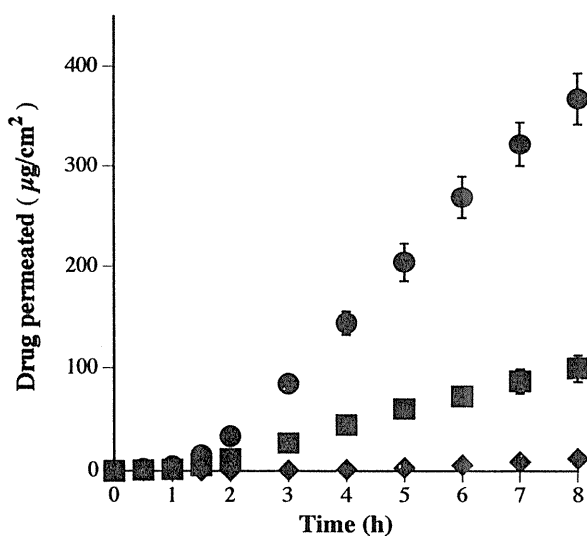


Fig. 12 Skin permeation profiles of DC at constant current IP
control (◆); 0.1 mA IP (■); 0.3 mA (●)
Each data point represents the mean \pm S. E. of 3-8 experiments

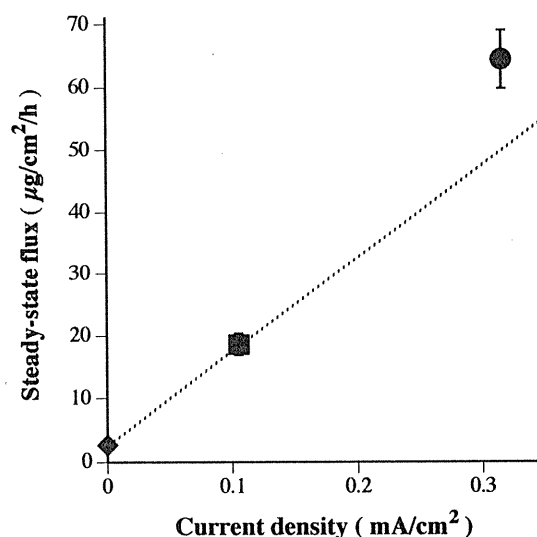


Fig. 13 Relationship between current density and steady-state flux of DC
control (◆); 0.1 mA IP (■); 0.3 mA (●)
Each data point represents the mean \pm S. E. of 3-8 experiments

先の現象は次式に示した DC の輸率 (t_d) を用いて説明できる. t_d は次式で示される.

$$t_d = \frac{Z_d F J_d}{Z_d F J_d + Z_s F J_s + Z_p F J_p} = \frac{Z_d J_d}{I_t} \quad (4)$$

ここで, t_d が変化しないとすれば, すなわち総電流に占める DC の flux 比が一定であれば, (3) 式に示したように電流密度 (I_t/S) と DC の flux (J_d) は比例するので, 電流密度の増大に伴って DC の flux が増大することが説明できる. また, 0.3 mA 適用時の DC の flux が予想値よりも高かったのは, 高い電流を適用したことで皮膚に何らかの変化が生じてしまい, DC の輸率が変化したものと予想される. したがって, 前節でも述べたように, ある電流値までならば IP の電流値を制御することで薬物の透過速度をコントロールできることが示唆された.

第5節 定電流イオンフォレーシスとジェットインジェクター併用時におけるジクロフェナクナトリウムの透過性に関する検討

第1項 定電流イオンフォレーシスとジェットインジェクターの併用効果

今までの結果をふまえて, 定電流 IP と JI を併用し薬物の透過性を改善することを試みた. Fig. 1 4a 及び b は定電流 IP (適用電流は 0.1 mA または 0.3 mA) と JI (適用回数を変化させた) の併用時の DC の累積透過量を示す. 両図とも薬物の透過 profile は時間の経過と共にほぼ直線的に増加した. Fig. 1 4a において定電流 IP

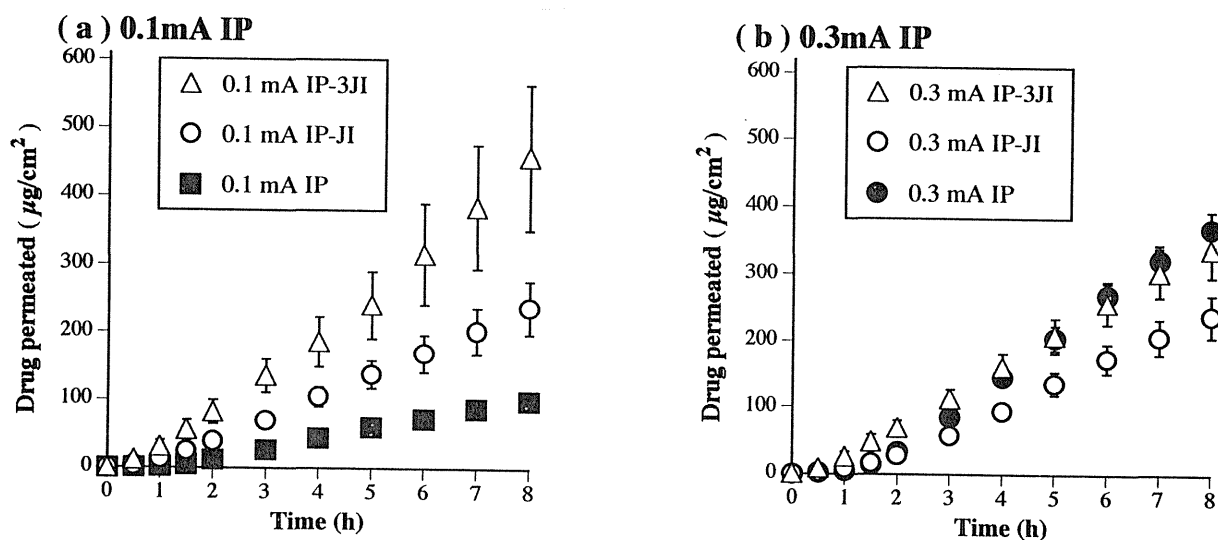


Fig. 14 Skin permeation profiles of DC at applied constant current IP with JI Each data point represents the mean \pm S.E. of 4-10 experiments

単独系とJI併用を比較すると、lag timeはJIの適用回数の増大に伴い短くなり、JI 1回適用を併用した系(0.1 mA IP-JI)やJI 3回適用した系では(0.1 mA IP-3JI)では8時間目の累積透過量はJIの処理回数の増加に伴って高くなった。一方0.3 mAを適用した系(Fig. 1 4b)では、JIの適用回数の増加に伴いlag timeは短くなり、透過profileも時間の経過と共にほぼ直線的に増加する傾向を示したものの、それぞれの8時間目の累積透過量には差がみられなかった。

このように定電流IPにJIを併用しても薬物の透過促進に対してさらなる併用効果は得られなかった。しかし、本実験下における皮膚の電位勾配の時間推移(Fig. 1 5)から、IP-JI併用系の方がIP単独系よりIP適用直後に印加される電圧は低いこと、またJIの適用回数を増加させるとさらに低下することが明らかとなった。JI 1回適用とIP単独系とでは、定常状態時における皮膚の電位勾配はほとんど変化がないものの、JI 3回適用とIP単独系とでは、定常状態における皮膚の電位勾配はIP-3 times JI系の方が低くなった。このため、JI処理を施すことでIP適用による電気エネルギーの皮膚に対する負荷を軽減できると思われる。低電圧適用時と比べ皮膚に高電圧を適用すると、IP off後の皮膚抵抗の回復性が低下するという報告がある²⁸⁾。本実験において明らかのように、IP適用直後の皮膚間電圧は高いので、これが皮膚に対して大きな負荷となり、IP適用直後に痛み(刺激)が発生すると考えられる。したがって、定電流IPにJIを併用すれば、痛みの問題を解決できる可能性が高い。また本実験では、JIの皮膚からの適用距離を10 mmとして比較的大きく孔をあけ検討したが、孔の大きさを小さくした方が炎症反応が出にくいという報告もある²⁹⁾。したがって、適用距離を近づけてより小さい小孔を形成させてIPを併用すれば、皮膚にかかる印加電圧を低下させ、結果として皮膚の刺激性の軽減や炎症反応の抑制につながると思われる。

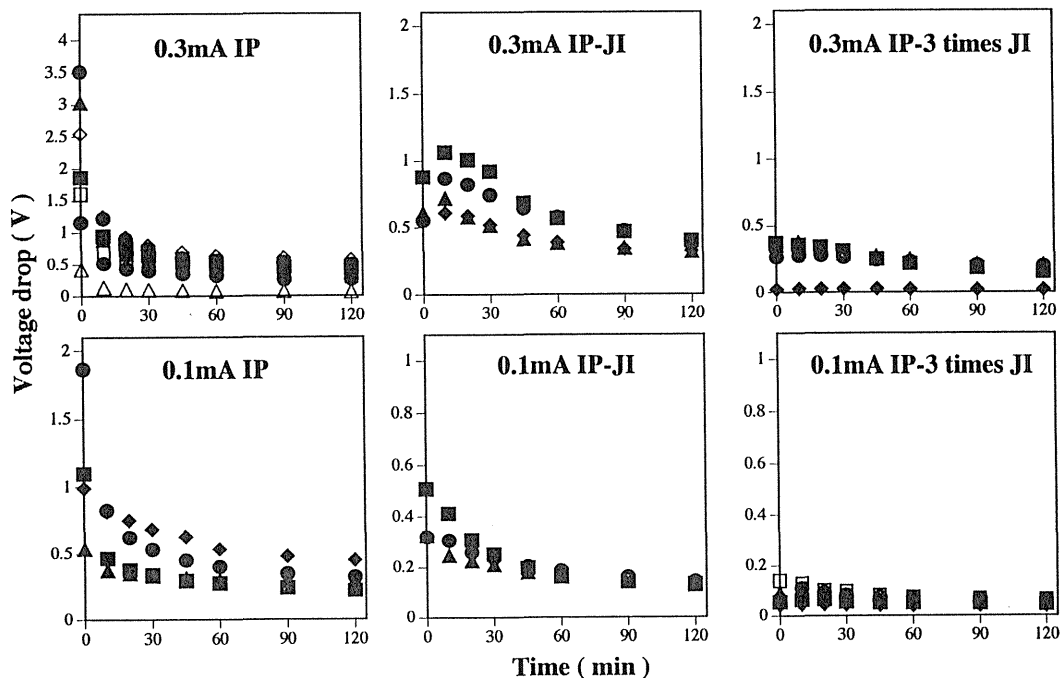


Fig. 15 Time course of voltage drop at constant current IP

さらに、定電流 IP 適用時の電流と皮膚間電圧から、定電流 IP-JI 併用時の消費電力量を算出した。結果を Fig. 15 に示す。定電流 IP 単独系に比べ JI を適用した方が消費電力量が少なくなり、この値は、JI の適用回数を増加させることでさらに小さくなった。これらの結果は、定電流 IP 単独系よりも JI を併用したものの方が電力の節約も期待できることを示すものであり、装置の小型化、さらには長時間使用装置の開発に有益な情報を提供することになるものと思われる。

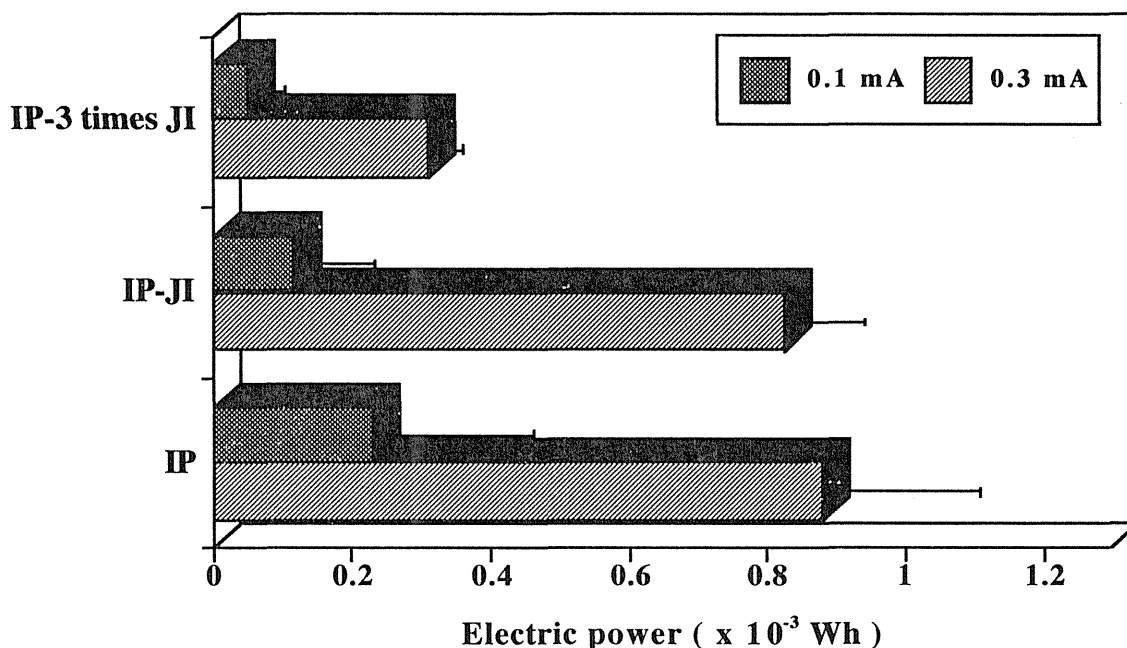


Fig. 16 Comparison of electric power of constant current IP among several treatments

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3-10 experiments

第2項 定電流イオンフォレーシスとジェットインジェクター併用時における現象の解析

前項で示したように定電流 IP に JI を併用しても薬物透過性を有意に増加させることはできなかった。この原因として考えられるものを以下に示す。

今回の検討では、ドナー側に DC-Na 水溶液を、レシーバー側に pH 7.4 リン酸緩衝液を適用して cathodal IP すなわち、ドナー側を陰極として IP を行っているため皮膚を介して移動するイオンは先に示した Fig. 9 のように示すことができる。したがって、総電流 (I_t) は先に示した (4) 式のように表わすことができる。定電流 IP 適用では総電流値 (I_t) は一定であるので、前節でも説明したように Na^+ , K^+ の flux すなわち各イオンの輸率に変化しないとすれば、DC の flux は総電流に相関す

と考えることができる。また、各イオンの flux は

$$J_d = \beta_d U_d C_d E \quad (4)$$

$$J_s = \beta_s U_s C_s E \quad (5)$$

$$J_p = \beta_p U_p C_p E \quad (6)$$

となる³⁹⁾。ここで、 β は皮膚/溶液の分配係数、 U は水中のイオン移動度、 C はイオンの濃度、 E は皮膚を介した電位勾配である。(4)、(5)、(6)式を(2)式に代入すると

$$I_t = (Z_d F \beta_d U_d C_d E + Z_d F \beta_d U_d C_d E + Z_p F \beta_p U_p C_p E) S \quad (7)$$

となる。定電流 IP 適用下では I_t が一定であり、これに JI 処理を施すことで新たな水溶性ルートが形成され β が増大すると考えられる。しかしながら、 β が増大して皮膚抵抗が減少しても、前節でも説明したように同時に E も減少する (Fig. 15) ので、(4) 式に示したように J_d は一定となり DC の flux は変化しないものと考えられる。また、0.3 mA 定電流 IP 単独系に比較して、JI 3 回適用を併用した系 (0.3 mA IP-JI) で DC の定常状態 flux が減少傾向を示したのは、JI 適用によって水溶性ルートが増大する際に皮膚に内在していたイオンが漏出し、結果として DC の輸率が減少する可能性もある。

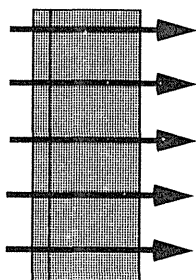
加えて、皮膚は pH 4 以上の溶液にさらされると角質層の構成成分である脂肪酸のカルボキシル基が解離し負に帯電することが知られている³⁰⁾。本実験では pH 7.4 の溶液を用いたことから皮膚は負に荷電する、陽イオン選択透過性膜としての性質をもつようになる^{31, 32)}。またこの場合、正に荷電したイオンが皮膚を透過し易いため、陽極側から陰極側への溶媒流が生じる^{33, 34)}。DC の透過はドナー側からレシーバー側に、逆に溶媒流はレシーバー側からドナー側に生じるため、DC の透過が抑制されると考えられる。仮に、陽イオン選択透過性が角質層特有の性質でなく真皮にも存在していると考えれば、JI を施すことにより小孔の表面積が大きくなり皮膚の負の帯電の割合が変化し溶媒流の量に変化を及ぼす恐れがあると考えられる。このような、溶媒流の影響は electrorepulsion に比較するとそれほど大きくはないものの³⁵⁾、荷電をもたない薬物が IP によって吸収されることを考えると、無視できないように思われる。

さらに、電流は抵抗の低下している JI 適用により形成された小孔に集中してしまい、そのことが原因となって IP 単独系に比べ IP-JI 併用系の方が透過量及び透過速度が若干低くなってしまった可能性も考えられる (Fig. 17)。

以上、定電流 IP と JI 併用時の促進効果がそれぞれの単独適用より著しく高くない

理由として考えられるものを4つ示した。この原因を明らかにするためには今後の検討が必要であろう。

intact skin



one or three pores skin

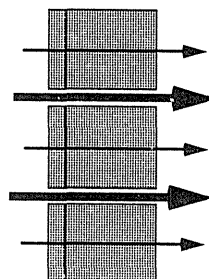


Fig. 17 Schematic diagrams of intact and pieced skin

第3章 アンジオテンシン II を用いたジェットインジェクターとイオントフォーシスの併用効果

前章では DC-Na を用いて検討を行った。定電圧 IP では、JI を併用することにより DC の透過は増加したものの、定電流 IP では、JI を併用しても DC の透過の促進率に有意な差はみられなかった。これは、DC-Na が比較的高い皮膚透過性を示し、透過抵抗の小さな薬物であることから、皮膚バリアーに新たに透過ルートを形成させても DC-Na の皮膚透過抵抗がほとんどかわらないためであると推察した。そこで、DC-Na より分子量も大きく、より水溶性で皮膚への透過抵抗が高いペプチド性薬物であり、かつ電気エネルギーに対しても比較的安定であるアンジオテンシン II (ANG II) を用い、IP-JI の併用効果について検討を行った。

一般に経皮吸収では適用薬物の酵素的分解を回避できるといわれているが、ペプチド性医薬品では皮膚中酵素により代謝される可能性もある³⁶⁾。酵素は表皮部分や IP の透過経路でもある毛穴の毛嚢部分に多く存在するといわれているので³⁷⁾、JI 処理を施し小孔を形成することで皮膚中酵素を回避できる可能性がある。また、IP によって薬物の皮膚透過抵抗を下げることににより薬物透過ルートを拡大することができるので、JI に IP を併用することでペプチド性医薬品の皮膚透過を増大でき、さらに透過をコントロールできると考えた。そこで、本章では定電圧・定電流 IP と JI 併用時における ANG II の透過性について検討した (Fig. 18)。

		pK _R
Asp - Arg - Val - Tyr - Ile - His - Pro - Phe		Asp 3.90
		Arg 12.48
M.W.	1046	Tyr 10.13
pI	7.7	His 6.04

Fig. 18 Sequence and physicochemical parameters of ANG II

第1節 ジェットインジェクター適用によるアンジオテンシン II の透過性に関する検討

まず、ANG II の皮膚透過性に対する JI の効果について検討を行った。Fig. 19 にコントロール、JI における ANG II の累積透過量を示す。コントロールでは ANG II の透過はほとんどみられなかったものの、JI を処理した皮膚では約 1 時間の lag time の後、ほぼ直線的な累積皮膚透過曲線を示した。また、JI での ANG II の 8 時間目の累積透過量はコントロールと比較すると約 12 倍高くなった。Table 1 にこの透過実験から得られた透過係数を示す。コントロールの透過係数は 3.37×10^{-8} cm/s

と非常に低く、これは、ANG II の水溶性がかなり高いことを示している。しかしながら、JI を用い皮膚に小孔を形成することで ANG II の透過係数は 7.56×10^{-7} cm/s となり、透過性がかなり改善された。これは、水溶性薬物の透過ルートが拡大され ANG II の皮膚透過抵抗が減少したためと考えられ、JI 処理による経皮吸収促進法が、高分子量のイオン性薬物にも有用であることが明らかとなった。

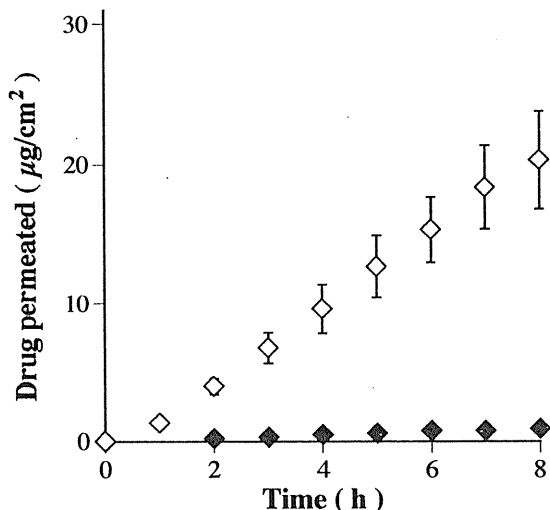


Fig. 19 Effect of JI treatment on the skin permeation of ANG II

control (◆); JI treatment (◇)

Each data point represents the mean ± S.E. of 3-4 experiments

Table 1 Effect of JI on the permeation coefficients of ANG II

	Permeation coefficient (cm/s)
intact skin	$(3.37 \pm 0.67) \times 10^{-8}$
1 time JI	$(7.56 \pm 1.34) \times 10^{-7}$

第2節 定電圧イオントフォーシスとジェットインジェクターの併用効果

次に、定電圧 IP と JI 併用系について検討した。Fig. 20 に 0.2 V IP, 0.2 V IP-JI における ANG II の累積透過量を示す。定電圧 IP は約 2 時間の lag time の後ほぼ直線の累積透過曲線を示した。また定電圧 IP-JI も IP 適用と同様にほぼ直線の透過曲線を示した。DC-Na では、皮膚の透過抵抗が時間の経過に伴って減少傾向を示したために、皮膚を介して流れる電流密度が増大し、透過抵抗の減少に伴い薬物の透過性は増大するという傾向を示した。しかし ANG II では、時間が経過しても皮膚透過抵抗の減少が観察されず、皮膚を介して流れる電流密度が変化しなかったために透過曲線はほぼ直線を示したと考えられた。なお、定電圧 IP-JI と定電圧 IP の ANG II

の 8 時間目の累積透過量を比較すると、定電圧 IP-JI の方が約 4.6 倍高くなった。

Fig. 21 に実験中の電流値と定電圧 IP, 定電圧 IP-JI の flux との関係を示す。DC-Na の時と同様に電流値と flux の間で比較的良好な相関性がみられた。

本実験では 0.9% NaCl 溶液を用いており、この溶液中で ANG II はプラスに荷電している。また、ANG II 以外にもドナー側、レシーバー側共に Na^+ や Cl^- が含まれており、これらのイオンは ANG II イオンと比べ非常に小さく移動度は大きい。前章のときとは異なり溶媒流の流れと薬物の流れとは同じ方向であるので、溶媒流で薬物の透過が抑制されることはないが、輸率の小さいイオン (ANG II) の透過が抑制される可能性が考えられた。しかしながら、溶液中の ANG II の量 (0.1%) に比べ他のイオン (0.9%) の方が多く、輸率も大きいにもかかわらず電流値と ANG II flux との間に相関性がみられたので ANG II の透過は電流値で制御できる可能性があるとして示唆された。この結果より、JI 処理により ANG II の透過性が改善され、かつ電流を流すことにより分子量の大きな薬物でも透過をある程度制御できることが示唆された。

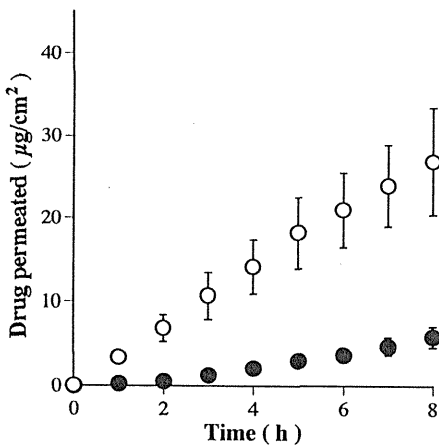


Fig. 20 Permeation profiles of AT II at constant voltage IP
2 V IP (●); 0.2 V IP-JI (○)
Each data point represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments

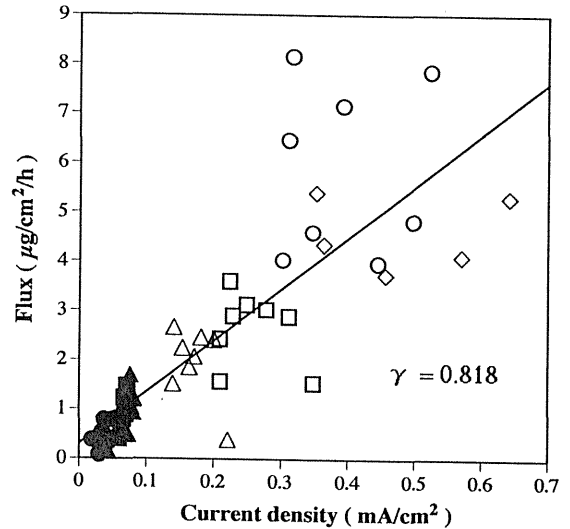


Fig. 21 Relationship between current density and ANG II flux at constant voltage (0.2 V) IP with (open symbol) and without JI (closed symbol)

第3節 定電流イオントフォーシスとジェットインジェクターの併用効果

次に、定電流 IP と JI 併用系について検討した。Fig. 22 にコントロール, JI, 定電流 0.3 mA IP, 定電流 0.3 mA IP-JI 時の ANG II の累積皮膚透過量を示す。定電流 IP 単独系は、電流適用後約 1 時間の lag time の後ほぼ直線的な透過曲線を描き、定電流 IP-JI 併用系は電流適用直後からほぼ直線的な透過を示した。8 時間目の ANG II の累積透過量は、定電流 IP-JI が JI 単独処理より約 2 倍、定電流 IP-JI でも定電流 IP より約 2 倍の値を示した。しかしながら、定常状態 flux を比較してみると、定電流 IP と定電流 IP-JI に有意な差はみられなかった。これは、第 1 章でも述べたように、薬物の透過は主に電流により制御されるため、この場合の JI 処理は薬物の透過抵抗を下げる効果はあるものの薬物の透過性の増加にはあまり寄与していないように思われた。

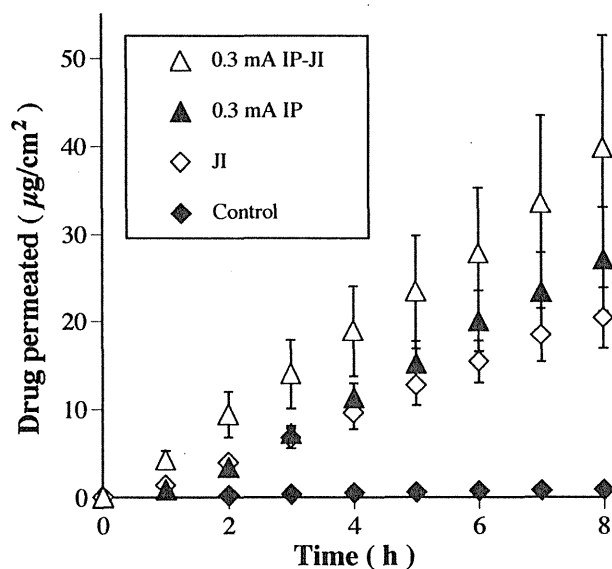


Fig. 22 Permeation profiles of ANG II at several treatments
Each data point represents the mean \pm S.E. of 3-4 experiments

この時の膜電圧の時間推移をみると (Fig. 23), DC-Na のときと同様, JI 処理を行ったものの方が IP 適用直後にかかる初期電圧が低いことがわかる。さらに, DC-Na では定常状態になったときの膜電圧の値は IP と IP-JI でほとんど変わらなかったが, ANG II での膜電圧は IP 適用直後の初期電圧のみならず定常状態時における膜電圧も IP 単独系と比較すると IP-JI 併用系の方が低いことが観察された。このことから, 水溶性高分子のような皮膚透過抵抗の高い薬物を IP 送達させる場合, 皮膚に高い電圧が長期にわたり印加されることが明らかとなった。IP 適用初期の印加電圧により膜の形態的構造変化が起こり, 皮膚の pore route が増大すると考えると, そこに JI 処理を施しても低分子である DC の透過抵抗はほとんど変化しないものと考えられる。しかし, ANG II は DC-Na と比較すると水溶性で高分子量であるため, JI で皮膚の透過抵抗を低下させ皮膚に対する負担を軽減することの効果は DC-Na の時より顕著に現われたものと推察される。高電圧が皮膚に適用されると皮膚に与え

るダメージは大きくなるが、低電圧が長い時間皮膚に適用されると皮膚に与えるダメージはさらに大きくなる²⁸⁾という報告がある。効率良くペプチド性医薬品の様な高分子量の薬物を皮膚から吸収させる場合、定電流 IP 単独系でも未処理皮膚と比較すると透過は促進され、かつ薬物注入速度のコントロールもできると考えられるが、皮膚透過抵抗が高い薬物の場合 IP 適用により皮膚の炎症を引き起こす可能性が考えられる。したがって、皮膚の炎症を最小限におさえる小さな孔を JI で形成させて、IP を適用すれば皮膚に与えるダメージを最小限に抑え効率良く薬物を送達できる可能性が示唆された。

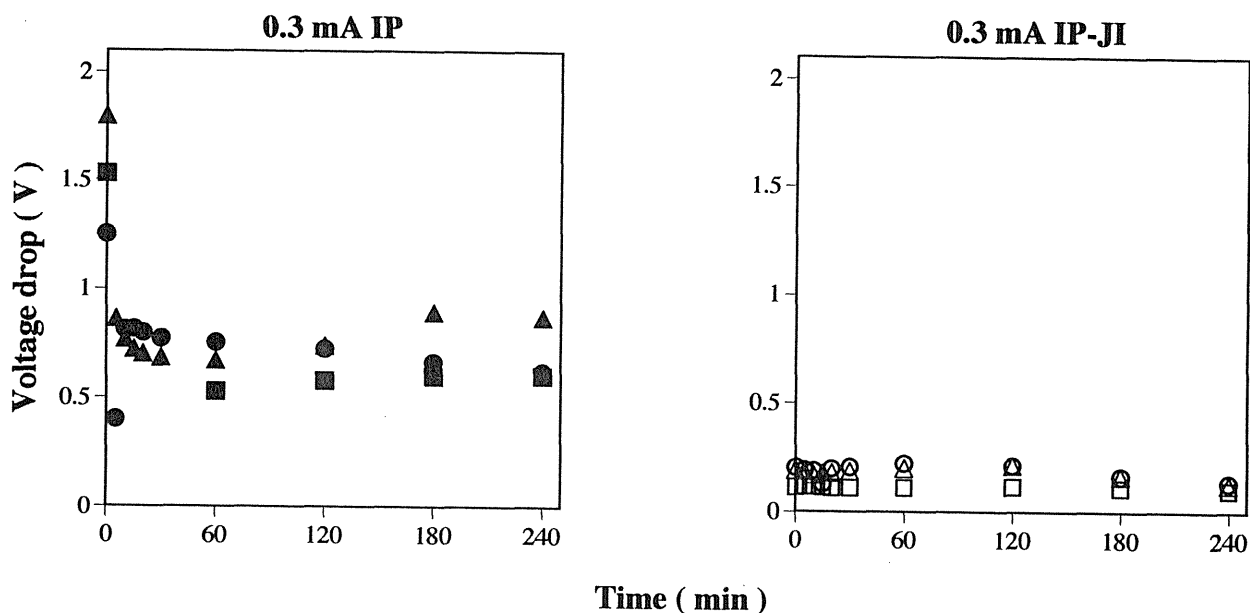


Fig. 23 Time course of voltage drop at constant current IP with and without JI

結論

第1章ではモデル薬物として硫酸ゲンタマイシン、テオフィリン及び塩酸ニカルジピンを用いて、JIの効果を検討した。JI処理した皮膚においては、吸収クリアランス（容積流，volume flow rate）が、 $0.4 \mu\text{l/h}$ の値を示し、この値に準拠した上記薬物の経皮的吸収の生じることが血中濃度の測定から明らかとなった。これら水溶性薬物の経皮吸収が生じたのは、JI処理によって角質層の一部が一時的に破壊されて親水性の吸収経路が形成されたものと考えられる。それゆえ、この経路は以下で検討されるiontophoresis (IP)において、用いられる薬物の吸収経路とほぼ同様であると想定されるので、IPとJIの併用効果が大きいと期待される。

第2章ではDC-Naを用いて定電圧IPにJIを併用した時と定電流IPにJIを併用した時の薬物の皮膚透過性について検討した。

定電圧IPにJIを併用すると未処理及びそれらの単独適用に比べ薬物の透過を促進することができた。高い効果が得られた原因は、JIにより皮膚の透過抵抗が減少し、皮膚を介する電流値が増大したためであると考えられた。また、この時の電流値と薬物透過速度（flux）とは良く相関しており、IPによる薬物送達では主に皮膚を介して流れる電流が関与しているのではないかと推察された。しかしながら、定電圧IPでは皮膚の透過抵抗の低下に伴い皮膚を介する電流値が時間と共に変化していくために、IPの利点ともされている薬物投与速度の制御は難しいと思われた。

定電流IPにJIを併用した系の透過量と透過速度は定電流IP単独処理時と変わらなかった。これは、IP適用時にはイオン（薬物）の透過を制御しているのは電流値であるためであると推察された。しかし、定電流IPにJIを併用した時、薬物の透過は促進されなかったものの、JIによって皮膚の抵抗を低下させることができ、IP適用初期の皮膚の大きな構造変化はほとんど生じないと推察された。

第3章では水溶性高分子であるペプチドのANG IIを用い定電流または定電圧IPにJIを併用した時の薬物の皮膚透過性について検討した。定電圧IP-JI併用系ではANG IIの透過が単独系より高かった。また、この時の皮膚を介する電流と薬物のfluxは良く相関した。一方、定電流IP-JI併用系ではANG IIの透過をより高めることはできなかった。しかしDC-Naと同様、JIを施すことにより皮膚抵抗が低下し、薬物の透過抵抗を下げる効果は低分子の薬物の時よりも顕著に現われた。その結果、電流による皮膚の構造変化を軽減することができ、皮膚のintegrityを保ちながら薬物を皮膚から吸収させることができる可能性があるのではないかと考えられた。

近年、ペプチド性医薬品の開発は目覚ましく、今後多くの薬物が臨床的に応用されていくと考えられる。患者のQOLを考えこれらの薬物を投与する場合、経皮吸収型製剤が今よりも増して注目をされるであろう。水溶性高分子薬物は皮膚からの吸収性が低いと考えられていたが、IP及びJIを用いることにより十分経皮吸収できることが本実験より明らかとなった。また、両者の併用は薬物投与量をコントロールでき、かつ皮膚のintegrityを保つことができると考えられる。本実験において検討を

行った定電圧 IP-JI 併用系では、薬物の透過性は増大させることができたものの、電流値の増大により薬物の投与量をコントロールすることが困難であり、電流値の増大により皮膚の integrity が保たれなくなる恐れがあることが懸念された。一方、定電流 IP-JI 併用系では皮膚の透過抵抗を低下させることにより皮膚の integrity を保ち投与できるという可能性はあるものの、定電流 IP 単独と比べ透過性は増大させることができなかった。この結果をふまえると、より効率良く水溶性高分子薬物を投与するためには、皮膚に炎症をきたさない小さな孔を JI のような装置で形成し、適用開始後数分～数時間は定電圧 IP で適用しある電流値になった時定電流 IP になるように調整したデバイスを用いることが望ましいと考えられた。

参考文献

- 1) 橋田充, ドラックデリバリーシステム, 化学同人, 京都, (1995).
- 2) 杉林堅次, 薬物の経皮吸収性改善に関する理論的考察, *薬物動態*, **2**, 71-80, (1987).
- 3) C.Ribaud, J.C.Garson, J.Doucet and J.L.Lveque, Organization of stratum corneum lipids in relation to permeability : influence of sodium lauryl sulfate and preheating, *Pharm. Res.*, **11**, 1414-1418 (1994).
- 4) K.Sugibayashi, K.Hosoya, Y.Morimoto and W.I.Higuchi, Effect of the absorption enhancer, Azone, on the transport of 5-fluorouracil across hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 578-580 (1985).
- 5) B.W.Barry, Mode of action of penetration enhancer in human skin, *J. Controlled Rel.*, **6**, 85-97 (1987).
- 6) P.Liu, W.I.Higuchi, W.Q.Song, T.Kurihara-Bergstrom and W.R.Good, Quantitative evaluation of ethanol effects on diffusion and metabolism of β -estradiol in hairless mouse skin, *Pharm. Res.*, **8**, 865-580 (1991).
- 7) R.H.Guy, Current status and future prospects of transdermal drug delivery, *Pharm. Res.*, **13**, 1765-1769 (1996).
- 8) H.Ueda, K.Sugibayashi and Y.Morimoto, Skin penetration-enhancing effect of drugs by phonophoresis, *J. Controlled Rel.*, **37**, 291-297 (1995).
- 9) J.Kost, U.Pliquet, S.Mitragotri, A.Yamamoto, R.Langer and J.Weaver, Synergistic effect of electric field and ultrasound on transdermal transport, *Pharm. Res.*, **13**, 633-638 (1996).
- 10) P.Tyle, Iontophoretic device for drug delivery, *Pharm. Res.*, **3**, 318-326 (1986).
- 11) A.K.Banga and Y.W.Chien, Iontophoretic delivery of drug: Fundamentals, developments and biochemical application, *J. Controlled Rel.*, **7**, 1-24 (1988).
- 12) N.H.Bellantone, S.Rim, M.L.Francoeur and B.Rasadi, Enhanced percutaneous absorption via iontophoresis I. Evaluation of an in vitro system and transport of model compounds, *Int. J. Pharm.*, **30**, 63-72 (1986).
- 13) L.H.Chen and Y.W.Chien, Development of a skin permeation cell to simulate clinical study of iontophoretic transdermal delivery, *Drug Develop. Ind. Pharm.*, **20**, 935-945 (1994).

- 14) P.G.Green, R.S.Hinz, C.Cullander, G.Yamane and R.H.Guy, Iontophoretic delivery of amino acids and amino acid derivatives across the skin *in vitro*, *Pharm. Res.*, **8**, 1113-1120 (1991).
- 15) J.E.Sanderson, R.W.Caldweel, J.Hsiao, R.Dixon and R.R.Tuttle, Noninvasive delivery of a novel inotropic catecholamine: Iontophoretic versus intravenous infusion in dogs, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 215-218 (1987).
- 16) P.G.Green., Iontophoretic delivery of peptide drugs, *J. Controlled Rel.*, **41**, 33-48 (1996).
- 17) P.Singh, M.Anliker, G.A.Smith, D.Zavortink and H.I.Maibach, Transdermal iontophoresis and solute penetration across excised human skin, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 11, 1342-1346 (1995).
- 18) B.H.Sage, Technological and developmental issues of iontophoretic transport of peptide and protein drugs, in *Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery*, V.H.L.Lee, M.Hashida, Y.Mizushima Eds., Harwood Academic Publishers, Switzerland, 1995, pp.111-134
- 19) Theme Issue: Iontophoresis. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **9**, 119-307 (1992).
- 20) R.van der Geest, D.A.R.Elshove, M. Danhof, A.P.M.Lavrijsen and H.E.Boddé, Non-invasive assessment of skin barrier integrity and skin irritation following iontophoretic current application in humans, *J. Controlled Rel.*, **41**, 205-213 (1996).
- 21) R.M.Brand, P.Singh, E.Aspe-Carranza, H.I.Maibach and R.H.Guy, Acute effects of iontophoresis on human skin in vivo: cutaneous blood flow and transepidermal water loss measurements, *Eur. J. Pharmaceut Biopharmaceut*, **43**, 133-138 (1997).
- 22) 武越裕, 渥美義仁, 鈴木吉彦, 加藤清江, 久保明, 松岡健平, インスリン専用針無圧力注射器 (Preci-Jet[®] 20) の臨床評価, *医学と薬学*, 東京, **24**, 801-807 (1990).
- 23) T. Hatanaka, E. Manabe, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, An application of the hydrodynamic theory to percutaneous absorption of drugs, *Pharm. Res.*, **11**, 654-658 (1994).
- 24) D. Kobayashi, T. Matsuzawa, K. Sugibayashi, Y. Morimoto and M. Kimura, Analysis of the combined effect of l-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model, *Pharm. Res.*, **11**, 96-103 (1994).

- 25) Y. Morimoto, K. Sugibayashi, K. Hosoya and W. I. Higuchi, Penetration enhancing effect of Azone on the transport of 5-fluorouracil across the hairless rat skin, *Int. J. Pharm.*, **32**, 31-38 (1986).
- 26) K. Sato, T. Oda, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Estimation of blood concentration of drugs after topical application from in vitro skin permeation data. I. Prediction by convolution and confirmation by deconvolution, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2232-2238 (1988).
- 27) P.W.Ledger, Skin biological issues in electrically enhanced transdermal delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **9**, 289-307 (1992).
- 28) H.Inada, A.H.Ghanem and W.I.Higuchi, Studies on the effect of applied voltage and duration on human epidermal membrane alteration/recovery and the resultant effects upon iontophoresis, *Pharm. Res.*, **11**, 687-697 (1994).
- 29) M.H.Su, V.Srinivasan and A.H.Ghanem, W.I.Higuchi, Quantitative in vivo iontophoretic studies, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 1, 12-17 (1994).
- 30) S.Numajiri, H.Inada, K.Sugibayashi and Y.Morimoto, Iontophoretic transport of morphine across hairless rat skin: Is a further increase obtained with chemical enhancer ?, *YAKUZAIGAKU*, **58**, 1, 29-36 (1998).
- 31) L.Wearley and Y.W.Chien, Enhancement of the *in vitro* skin permeability of azidothymidine (AZT) via iontophoresis and chemical enhancer, *Pharm. Res.*, **7**, 34-40, (1990).
- 32) O.Siddiqui, M.S.Roberts and A.E.Polack, 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).
- 33) R.R.Burnette and B.Ongpipattanakul, Characterization of the permselective properties of excised human skin during iontophoresis, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 10, 765-773 (1978).
- 34) S.G.Schulthz., 生体膜輸送の基礎, 東京化学同人, 東京, P.71-102 (1982)
- 35) P.Santi and R.H.Guy, Reverse iontophoresis - Parameters determining electro-osmotic flow. II. Electrode chamber formulation, *J. Controlled Rel.*, **42**, 29-36 (1996).
- 36) T.Hayashi, Y.Iida, T.Hatanaka, T.Kawaguchi, K.Sugibayashi and Y.Morimoto, The effects of several penetration-enhancers on the simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin, *Int. J. Pharm.*, **154**, 141-148 (1997).

37) 飯田裕美子, ニコチン酸エチルの皮膚中代謝に関する研究, 城西大学 修士論文 (1997).

