

点滴注射剤に代わる製剤に関する研究

研究課題番号 09672286

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究C-1）研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 杉林 堅次
(城西大学薬学部教授)

点滴注射剤に代わる製剤に関する研究

研究課題番号 09672286

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究C-1）研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 杉林 堅次
（城西大学薬学部教授）

はしがき

点滴注射剤に代わる製剤として皮膚適用製剤が考えられる。チューブがない点滴注射剤としての皮膚適用製剤は患者にとって極めて使いやすく、将来は在宅への応用も期待される。しかし、薬物の皮膚透過性は現在投与部位として用いられている上皮細胞膜の中でも最も遅く、皮膚適用製剤からの薬物の吸収性の改善が点滴注射剤に代わる製剤とするために必須となる。現在までに、薬物の皮膚透過性の改善のために、薬物をプロドラッグ化したり製剤中に種々吸収促進剤を併用することが試みられている。しかしながら、これらの方法は新しい薬物群として最近注目を集めているペプチド類やオリゴヌクレオチド薬物の皮膚透過の改善にはあまり寄与しないと考えられている。すなわち、これら水溶性で比較的分子量も大きい薬物の皮膚透過性の改善に関しては、ホノホレシス phonophoresis やエレクトロポレーション electroporation を用いて皮膚透過ルートを拡大したり新規作成するなどの工夫が必要と考えられている。我々は、これらの方法に薬物の化学ポテンシャルを増大させる方法を併用すれば更なる皮膚透過性の改善が期待できると考えた。透過ルートの拡大手段に併用でき化学ポテンシャルの増大に寄与して皮膚透過性改善に最も期待されているものの1つにイオントフォレシス iontophoresis がある。この方法は特にプロテインやペプチド、さらにはオリゴヌクレオチドのような分子量の大きい、電解質の皮膚透過にも用いることができる。また、イオントフォレシスは電圧や電流を調節することにより薬物投与の簡便化をはかれるので、在宅での薬物治療にも応用が期待される。

本報告書ではまず、皮膚透過ルートを拡大したり新規作成する2つの方法論についての研究成果について示す。また、これらとイオントフォレシスの併用効果について報告し、点滴注射剤に代わる製剤としての皮膚適用製剤の可能性について考察する。

研 究 組 織

- 研究代表者 : 杉林堅次 (城西大学薬学部教授)
研究分担者 : 木村昌行 (埼玉医科大学総合医療センター
薬剤部長・講師)
研究分担者 : 夏目秀視 (城西大学薬学部講師)

研 究 経 費

平成 9年度	1, 6 0 0 千円
平成10年度	5 0 0 千円
平成11年度	6 0 0 千円
計	2,700 千円

研 究 発 表

(1) 学会誌等

鍵野みどりら, ジクロフェナクの皮膚透過性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とその解析, 薬物動態, 12, S285, (1997).

渡辺哲也ら, 薬物の経皮吸収促進効果に対する Electroporation の適用電圧と電極の位置の影響, *Drug Delivery System*, 13, 300, (1998).

渡辺哲也ら, 薬物の経皮吸収促進効果に対する Electroporation の電極間距離の影響, 薬物動態, 13, S264, (1998)

吉田牧ら, Electroporation による薬物の皮膚透過促進効果～電気力線を用いた解析～, 薬物動態, 14, S190, (1999).

目 次

第1章 ジェットインジェクターとイオントフォレシスの併用に関する検討

第1節 ジェットインジェクター単独処理の効果

- (1) In vitro 皮膚透過試験法
- (2) ジクロフェナックの皮膚透過に及ぼすジェットインジェクター処理の効果
- (3) アンジオテンシン II の皮膚透過に及ぼすジェットインジェクター処理の効果

第2節 ジェットインジェクターとイオントフォレシスの併用

- (1) 皮膚透過試験法
- (2) ジクロフェナックの皮膚透過におけるジェットインジェクターと定電圧イオントフォレシスの併用効果
- (3) ジクロフェナックの皮膚透過におけるジェットインジェクターと定電流イオントフォレシスの併用効果
- (4) アンジオテンシン II の皮膚透過におけるジェットインジェクターとイオントフォレシスの併用効果

第3節 まとめ

第2章 エレクトロポレーションとイオントフォレシスの併用に関する検討

第1節 エレクトロポレーション単独処理の効果

- (1) 安息香酸の皮膚透過性に及ぼすエレクトロポレーション時の適用電圧の影響
- (2) エレクトロポレーションの角質層への影響
- (3) エレクトロポレーションのより実用的な系に関する検討
- (4) エレクトロポレーションによる電極間距離の影響
- (5) エレクトロポレーション負荷時における安息香酸の皮膚内濃度の測定
- (6) エレクトロポレーションによる電極の適用部位の影響

第2節 エレクトロポレーションとイオントフォレシスの併用に関する検討

- (1) エレクトロポレーションとイオントフォレシスの併用に関する検討
- (2) 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に対するエレクトロポレーションの適用電圧の影響

第3節 まとめ

おわりに

文献

第1章 ジェットインジェクターとイオントフォレシスの併用に関

する検討

第1節 ジェットインジェクター単独処理の効果

ジェットインジェクター (JI) は針のないシリンジで、すでにインスリンや成長ホルモンの自己投与に使用されている。¹⁾ 薬液は高圧下で皮膚のバリアである角質を通り、生きている皮膚組織内に噴射され、急速に皮膚血管中に吸収される。我々は以前に難吸収性の低分子薬物 (ゲンタマイシン、ニカルジピン、塩酸ニカルジピン) の皮膚送達にジェットインジェクターを使用した。²⁾ すなわち、まず生理食塩液をジェットインジェクターにより投与し皮膚角質層に小孔を作成後、薬物溶液を前処理した皮膚上に適用した。結果として、これら薬物の皮膚透過は上昇した。また、この吸収速度は薬液が皮膚上にある限りほぼ0次速度となり、さらにこのときの流束 (flux) はどの薬物でも同様であることから、あらかじめ計算された速度の薬物送達が可能であることも明らかになった。このように、ジェットインジェクターの前処理は点滴注射剤に代わる製剤を考えると、きわめて有用性が高いと思われる。

本章では、低分子薬物であるジクロフェナック (DC) と分子量約 1000 のペプチドであるアンジオテンシン II (AT)³⁾ を用いて主に 2-チャンバー拡散セルとヘアレスラット皮膚を用いた *in vitro* 実験から皮膚透過性の改善度を評価した結果を説明する。

(1) *In vitro* 皮膚透過試験法

雄性ヘアレスラット (7~8 週令、城西大学生命科学研究センターまたは石川実験動物より購入) の腹部摘出皮膚をイオントフォレシス用 2-チャンバー拡散セル (ドナー、レシーバ容積はそれぞれ 4.0mL、有効拡散面積は 0.95cm²)⁴⁾ にはさみ、1/30M リン酸緩衝液に溶かした DC、AT (濃度はそれぞれ 0.5%と 0.1%、AT では適宜 ³H-labeled AT を添加) 4.0mL をセルの角質側に、同量の緩衝液のみを真皮側に加えた。これらドナーおよびレシーバ側はスターヘッド型攪拌子により約 1200 rpm で攪拌し、37 度に保った。経時的にレシーバ溶液 (0.1mL) を皮膚透過性の測定のためにサンプリングした。DC の定量は HPLC により、³H を含む AT はシンチレーションカクテル 10mL 合わせ液体シンチレーションカウンターで測定した。

(2) ジクロフェナックの皮膚透過に及ぼすジェットインジェクター処理の効果

Fig. 1 に DC の累積皮膚透過量を示す。◇は皮膚表面に直接ジェットインジェクターをセットして処理したもの、○は皮膚から 10mm 離してジェットインジェクターで処理したものである。図から明らかなように、ジェットインジェクターの使用によりコントロール（未処理）に比べ定常状態 flux が高くなり、また lag time が短くなった。すなわち、コントロールと比較して定常状態 flux は、皮膚に接してジェットインジェクター処理を施すと 4 倍になり、皮膚から 10 mm 離してジェットインジェクター処理を施すと 13 倍となった。以上より、ジェットインジェクターのチップを皮膚表面に接して注入するよりも皮膚から 10 mm 離して注入した方が有効であることがわかった。この結果を Table 1 にまとめる。

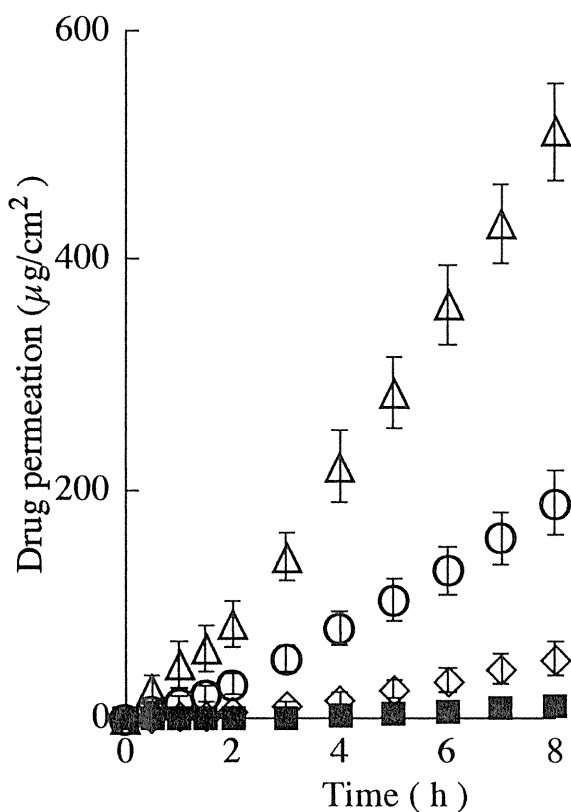


Fig. 1 Effects of different jet injector pretreatment schedules onto the skin permeation of diclofenac through hairless rat skin

Symbols: control (■), single jet injection directly onto the skin surface (◇), single jet injection 10 mm above the skin surface (○), triplicate jet injection 10 mm above the skin surface (△).

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

Table 1 Effects of different types of jet injector and iontophoresis treatment on the permeation parameters of diclofenac [steady-state flux (Jss) and lag time] and electrical parameters [potential difference (Vss), electric current (Iss) and membrane resistance (Rss)] at steady-state

	Jss ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Lag time (h)	Vss (V)	Iss (mA)	Rss ($\text{k}\Omega$) ref.
Control	1.96 ± 0.23	2.66 ± 0.32			Fig.1
1xJI (0 mm)	7.81 ± 0.84	1.55 ± 0.18			
1xJI (10 mm)	26.30 ± 3.65	0.98 ± 0.18			
3xJI (10 mm)	71.83 ± 5.35	0.96 ± 0.17			
0.5 V IP	$46.22 \pm 10.04^*$	$2.74 \pm 0.47^*$	0.5	$0.433 \pm 0.038^*$	1.15 Fig. 3
0.5 V IP + 1xJI (10 mm)	$98.76 \pm 16.93^*$	$2.16 \pm 0.41^*$	0.5	$0.688 \pm 0.087^*$	0.72
0.1 mA IP	14.76 ± 5.43	1.08 ± 0.07	0.092 ± 0.084	0.1	0.92 Fig. 4
0.1 mA IP + 1xJI (10 mm)	33.03 ± 4.61	0.84 ± 0.08	0.051 ± 0.031	0.1	0.51
0.3 mA IP	57.26 ± 4.40	1.24 ± 0.17	0.360 ± 0.088	0.3	1.20
0.3 mA IP + 1xJI (10 mm)	45.96 ± 5.36	0.50 ± 0.05	0.246 ± 0.042	0.3	0.82

Each value represents the mean or the mean \pm S.E. of 3-6 replicates.

nxJI (a mm): n times jet injection a mm over the skin surface, IP: iontophoresis.

Rss was calculated according to Ohm's law.

* average value calculated from the last three sampling points (see Fig. 3).

我々は以前、ジェットインジェクターのチップと皮膚の距離が角質に作られる小孔のサイズに影響を及ぼすと報告した。²⁾ 両者の距離を 10mm とすると皮膚表面にチップをセットした時と比べて噴射される食塩液が広い面積に浅く拡散し、結果として角質に大きな小孔が生じた (0 と 10mm 処理で皮膚表面の小孔の面積は約 0.1 と 0.3 mm^2 であった)。これが Fig. 1 の 2 つのグループの皮膚透過性が違う理由と考えられる。そこで、次に皮膚上 10 mm から 3 回処理し 3 つの孔をあけて試験した。この結果も Fig. 1 と Table 1 に併記する。3 回処理後の flux は 1 回処理に比べて 3 倍高く、コントロールに比べて 37 倍高かった。以上より、ジェットインジェクター処理皮膚を通る DC の主な透過ルートはジェットインジェクターによって作られる小孔であることが明らかとなった。

(3) アンジオテンシン II の皮膚透過に及ぼすジェットインジェクター処理の効果

AT は DC より分子量で 3 倍大きく、水溶性でそれゆえに皮膚を透過しにくい。なお、実験に先立ち AT の化学的、放射化学的安定性を確認した。³⁾

Fig. 2 は未処理とジェットインジェクター(皮膚表面とチップの間隔を 10mm

とした)を用いた場合のATの累積皮膚透過量を示す。全ての群で、短い lag time とその後の定常状態 flux が得られた。Table 2 にこの flux と lag time を示す。ジェットインジェクター群の flux はコントロールと比べ約 22 倍高かった。ジェットインジェクターは水溶性薬物の透過孔を大きくさせ、皮膚透過の改善に有効であった。この検討より、AT のような分子量の大きい薬物の皮膚透過の改善にもジェットインジェクターを使用できることが判明した。'

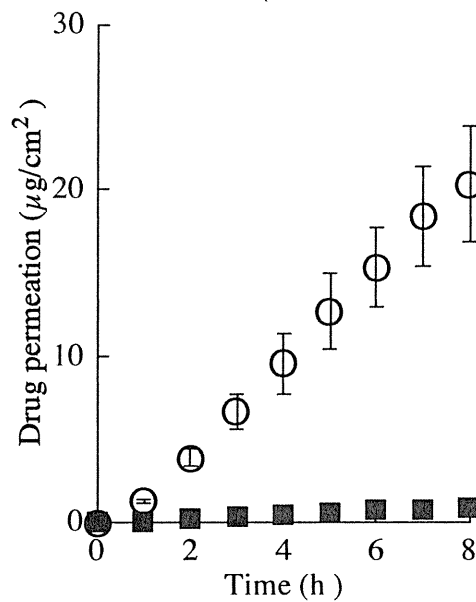


Fig. 2 Effects of jet injector pretreatment on the skin permeation of angiotensin II through hairless rat skin

Symbols: control (■), single jet injection 10 mm above the skin surface (○).

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

Table 2 Effects of different types of jet injector and iontophoresis treatment on the permeation parameters of angiotensin II [steady-state flux (Jss) and lag time] and electrical parameters [potential difference (Vss), electric current (Iss) and membrane resistance (Rss)] at steady-state

	Jss ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Lag time (h)	Vss (V)	Iss (mA)	Rss (k Ω) ref.
Control	0.177 ± 0.013	0.37 ± 0.20			Fig.2
1xJI (10 mm)	2.628 ± 0.445	0.23 ± 0.21			
0.2 V IP	0.878 ± 0.093	1.52 ± 0.15	0.2	0.068 ± 0.028	2.94
0.2 V IP + 1xJI (10 mm)	4.868 ± 1.178	-0.09 ± 0.34	0.2	0.428 ± 0.103	0.47
0.3 mA IP	4.007 ± 0.751	1.16 ± 0.14	0.647 ± 0.028	0.3	2.16
0.3 mA IP + 1xJI (10 mm)	4.979 ± 1.503	0.22 ± 0.17	0.185 ± 0.041	0.3	0.62

Each value represents the mean or the mean \pm S.E. of 3-6 replicates.

nxJI (a mm): n times jet injection a mm over the skin surface, IP: iontophoresis.

Rss was calculated according to Ohm's law.

第 2 節 ジェットインジェクターとイオントフォレシスの併用

イオントフォレシスに関する研究は多いが、皮膚透過ルートをあらかじめ拡大させて使用した報告は少ない。そこで、ジェットインジェクターで前処理を行って DC と AT の皮膚透過改善効果を検討した。

(1) 皮膚透過試験法

定電圧イオントフォレシスと定電流イオントフォレシスを行った。ドナー側とレシーバ側セルに白金電極をセットし、薬物の皮膚透過性のみならず電圧と電流を測定した。DC、AT の皮膚透過実験に適用した電圧値はそれぞれ 0.5V、0.2V、電流値は 0.1、0.3mA (DC) と 0.3mA (AT) とした。他の方法は前節と同様である。

(2) DC の皮膚透過におけるジェットインジェクターと定電圧イオントフォレシスの併用効果

まず、ジェットインジェクターと定電圧イオントフォレシスの併用効果を評価した。予備実験より 0.2V イオントフォレシスはジェットインジェクターのみと比較して低い透過性を示したので 0.5V の適用とした。Fig. 3 に 0.5V イオントフォレシスにおける DC の累積透過量を示す。ジェットインジェクターと定電圧イオントフォレシスを併用した時の 4 時間までの累積量はイオントフォレシスのみより 3 倍高かった。なお、どちらも定常状態 flux が見られな

った。これは皮膚抵抗の漸次的な減少が原因と思われる。Table 1 に平均 flux と lag time を示す。これらは Fig. 2 の最後の 3 点から計算して求めた。この検討より、両者の併用は DC の皮膚透過の改善に有効であることが明らかになった。

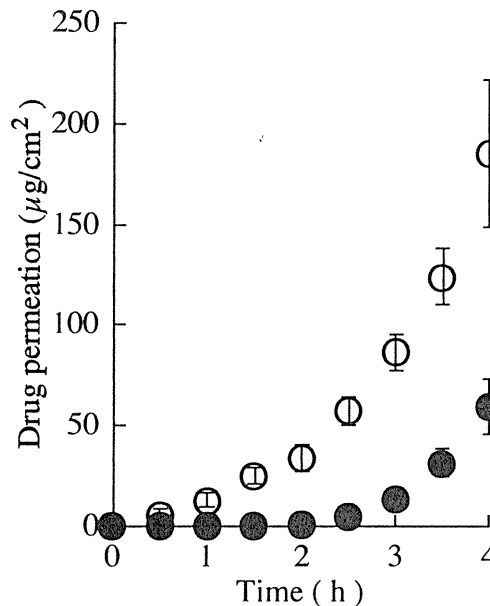


Fig. 3 Combined effects of jet injector pretreatment and constant voltage iontophoresis on the skin permeation of diclofenac through hairless rat skin

Symbols: constant voltage (0.5 V) iontophoresis alone (●), single jet injection 10 mm above the skin surface with constant voltage (0.5 V) iontophoresis (○).

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

ここで得られた併用効果は、ジェットインジェクターによって作られた小孔が DC の新しい皮膚透過ルートとなり、角質バリアーの電気抵抗を減少させたためによると考えられた。なお、ジェットインジェクターで前処理した皮膚の定電圧イオントフォレシス時の皮膚を通る平均電流 ($0.69\text{mA}/\text{cm}^2$) はジェットインジェクター未処理時の値 ($0.43\text{mA}/\text{cm}^2$) よりも高かった。電流値は皮膚を通る DC イオンの含むいろいろなイオンの原子価 \times 透過速度の合計に比例している。しかし、透過実験中の電流密度が $0.5\text{mA}/\text{cm}^2$ 以下では、電流と DC flux の関係はほぼオームの法則に従ったが、それ以上では、両者の相関性は低下した。この結果より、高い電流値になると皮膚ダメージが生じる可能性があったので、ここに示した定電圧イオントフォレシス透過実験は 4 時間とした。

(3) DC の皮膚透過におけるジェットインジェクターと定電流イオントフォレシスの併用効果

薬物 flux の漸次的な増加は定電圧イオントフォレシス中による電流の増加のためであり、この方法では経皮吸収速度が調節しにくい。そこで、次に定電圧から定電流イオントフォレシスに代えてジェットインジェクターとイオントフォレシスの併用効果を評価した。

Fig. 4a と 4b にそれぞれ 0.1mA、0.3mA の電流適用時のジェットインジェクター 1 回処理の DC の累積皮膚透過量を示す。Table 1 の下の部分はその時のデータである。定電圧イオントフォレシスとは異なり定電流イオントフォレシス時の透過プロファイルでは、短い lag time の後に定常状態の flux が得られた。ジェットインジェクター処理の flux はジェットインジェクター処理なし時よりも大きかった。しかしこの値はジェットインジェクターのみ処理時の flux とほとんど等しく、DC 透過に及ぼす両者の併用効果は見られなかった。

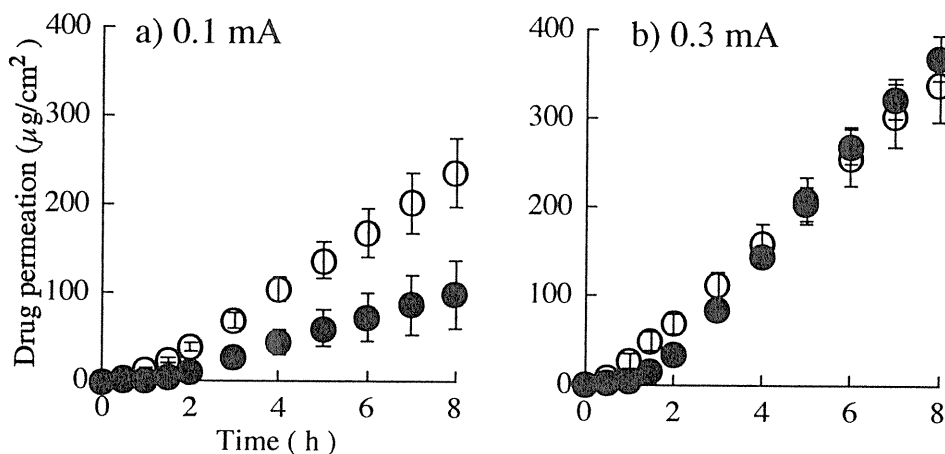


Fig. 4 Combined effects of jet injector pretreatment and constant current iontophoresis on the skin permeation of diclofenac through hairless rat skin

Symbols: constant current (0.1 and 0.3 mA) iontophoresis alone (●), single jet injection 10 mm above the skin surface with constant current (0.1 and 0.3 mA) iontophoresis (○).

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

0.3 mA のイオントフォレシスの場合、定常状態 flux はジェットインジェクター処理群よりも未処理群の方が低かった。また、ジェットインジェクターと定電流イオントフォレシス (0.1mA, 0.3mA) の併用はイオントフォレシスのみよりも皮膚を介する電気的なエネルギーにあまり差はなかった。しかし、ジェットインジェクターの併用は化学的促進剤とイオントフォレシスの併用時と

同様に⁵⁾、必要とする電気力を減らすことができた。定電流イオントフォレシスによる皮膚への傷害の可能性は定電圧イオントフォレシスより低く、特に長時間でのイオントフォレシス処理では定電流イオントフォレシスが有用であろうと思われた。

(4) アンジオテンシンⅡの皮膚透過におけるジェットインジェクターとイオントフォレシスの併用効果

Fig. 5a は 0.2 V イオントフォレシスのみとジェットインジェクター併用時の AT の累積透過量を示す。併用群ではイオントフォレシスのみより 5 倍 flux が高く、ジェットインジェクターのみの 2 倍であった。このように AT でも併用による効果が得られた。興味深いことに、DC と異なり、両方のケースで定常状態 flux が得られた。DC の定電圧イオントフォレシス群とは異なり AT のイオントフォレシスでは、皮膚抵抗の経時変化は見られなかった。これは定電圧イオントフォレシス中の電流増加は DC などの分子量が小さな薬物や内因性イオンの経時的な増加に関係しているのが原因と思われた。

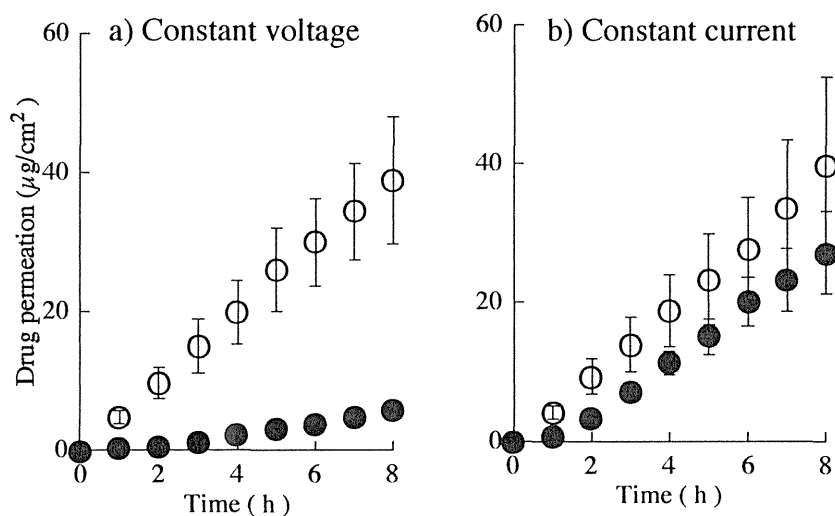


Fig. 5 Combined effects of jet injector pretreatment and constant voltage and constant current iontophoresis on the skin permeation of angiotensin II through hairless rat skin

Symbols: constant voltage (0.2 V)- or constant current (0.3 mA) iontophoresis alone (●), single jet injection 10 mm above the skin surface with constant voltage (0.2 V) or constant current (0.3 mA) iontophoresis (○).

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

次にジェットインジェクターと定電流イオントフォレシスの併用を検討した。Fig. 5b は 0.3 mA イオントフォレシスでジェットインジェクターの処理をした場合としない場合の累積皮膚透過量を示す。図から明らかなように、ジェットインジェクターの併用の有無による定電流イオントフォレシス中の定常状態 flux に有意な差はなかった。

第3節 まとめ

ジェットインジェクターと定電圧イオントフォレシスはコントロールに比べ DC や AT の皮膚送達速度を上昇させた。また、これらの併用ではジェットインジェクター、定電圧イオントフォレシスのみよりも高い flux となった。この併用効果はジェットインジェクターによって皮膚抵抗が低くなったためである。しかしながら、定電圧イオントフォレシスでは皮膚透過の薬物送達制御が難しく、皮膚に傷害を与えるかもしれない。ジェットインジェクター処理に加えて短時間の定電圧イオントフォレシスの後の定電流イオントフォレシス処理が、皮膚の傷害を抑えて薬物の皮膚透過を改善する最も適切な方法であると考えられた。

第2章 エレクトロポレーションとイオントフォレシスの併用に

関する検討

第1節 エレクトロポレーション単独処理の効果

物理的皮膚透過促進方法の一つである エレクトロポレーション electroporation⁶⁻⁸⁾ はもともと生体内や細胞内への遺伝子導入法の一つとして開発されたものである。本方法では、瞬間的に高電圧パルスを負荷することで生体膜や細胞膜に小孔を形成させ物質を導入することができる⁹⁻¹¹⁾。すなわち、パルス状の電場を負荷することによって、生体膜中の脂質二重層はラメラ層から非ラメラ層へ変化して pore を形成する。一般に、この pore 形成は可逆的であり^{12,13)}、適用電圧の高いほうが透過性も高いとされている¹⁴⁾。

しかし、エレクトロポレーションの効果を十分に引き出しかつ副作用を抑える最適化の検討はほとんどない。そこで、エレクトロポレーションの効果に関連すると思われる基礎的なパラメーターである適用電圧、電極の位置、電極間距離等の影響について検討した。なお、本章ではモデル薬物として安息香酸ナトリウム (BA Na) (分子量 144、pKa 4.19) を選び、エレクトロポレーション適用時の安息香酸 (BA) の皮膚透過性をヘアレスラット腹部摘出皮膚を用いた in vitro 透過実験から検討した。

(1) 薬物の皮膚透過性に及ぼすエレクトロポレーション時の適用電圧の影響

皮膚を介して電極を設置し（角質層側を needle 電極、真皮側を ring 電極）、BA 皮膚透過に対するエレクトロポレーションの効果を実験電圧を変えて検討した。Figs. 6a, 6b にそれぞれ角質層側を陰極または陽極としたときの種々適用電圧における *in vitro* BA 透過の経時 flux を示す。EP 処理を施さないとき（コントロール）、約 2 時間の lag time の後ほぼ一定の flux ($0.07 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$) が得られた。一方、4 から 6 時間目までの 2 時間に亘り 1 pulse/min で断続的にエレクトロポレーション処理を行うと両者とも BA flux は経時的に増加した。また、この皮膚透過促進効果は適用電圧を上げるにつれて増強した。興味深いことに、flux は角質層側を陽極とするより陰極としたときの方が大きかった。すなわち、エレクトロポレーションの透過促進メカニズムには前述した皮膚バリアー中の pore 形成だけでなく、いわゆるイオントフォoresis でみられるような電気駆動力の効果も関与していることが示唆された。また、両ケースとも比較的低電圧の負荷では電圧 off 後に BA flux の低下がみられた (Fig. 6a ●, 6b ○)。すなわち、エレクトロポレーションではある程度の電圧までなら一旦形成された pore が比較的早く消失する、いわゆる可逆的效果が得られることが示唆された。

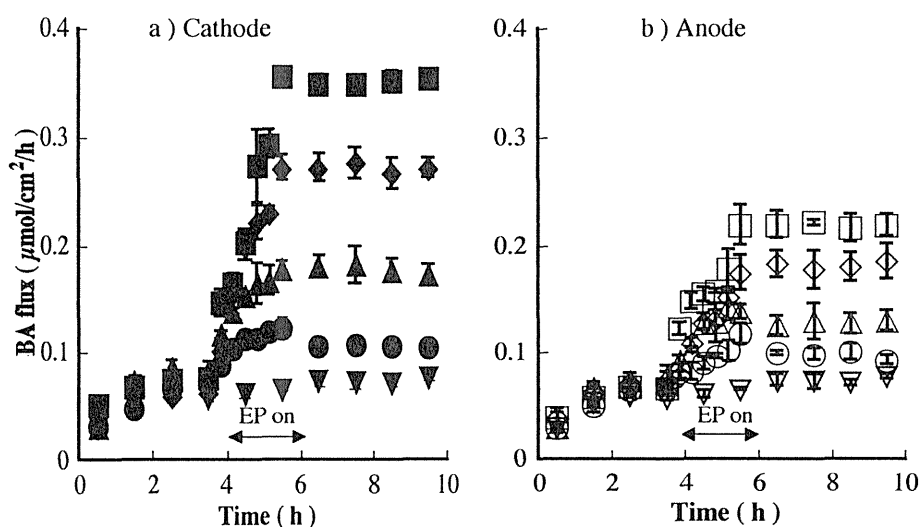


Fig. 6 Effects of electroperoration on the time course of BA flux through hairless rat skin.

Symbols: control (∇, ∇), 150V (\bullet, \circ), 300V ($\blacktriangle, \triangle$), 450V (\blacklozenge, \lozenge), 600V (\blacksquare, \square).
 Closed symbols : Needle electrode was set as a cathode. Open symbols : Needle electrode was set as an anode.

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates.

次に、陽極、陰極の設置位置とエレクトロポレーションの皮膚へのダメージ (pore 形成の可逆性) の関係を検討するために、角質層側の溶液を電圧負荷するときは生理食塩液、off のときは BA Na 溶液として皮膚透過実験を行った。なお、電圧は 1 時間毎に最初の 10 分間のみ 1 pulse/min で負荷した。この実験により、エレクトロポレーションの電気駆動力による透過促進能が無視でき pore 形成能のみを分離評価できると思われた。結果を Fig. 7 に示す。電極の設置位置にかかわらず、8 時間に亘る BA 累積透過量はコントロール (エレクトロポレーション処理なし) 時の値より約 2.1 倍高かった。しかし、電極の位置を変えても促進比には有意な差はなかった。このことから、陽極、陰極の設置位置を変えても皮膚への pore 形成能に差がないものと考えられた。

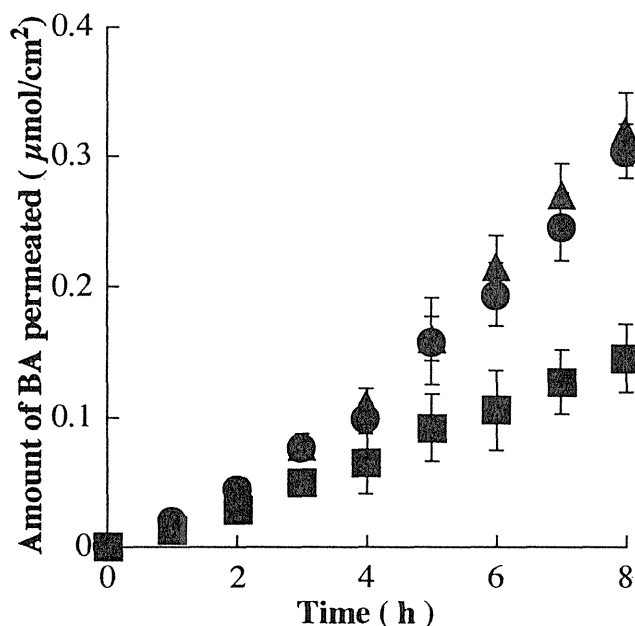


Fig. 7 Effects of anode and cathode positions at electroploration on the BA permeation across hairless rat skin

Symbols: control (■), anode (●), cathode (▲)

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates.

Figs. 6a, 6b) に示したエレクトロポレーション on 直前の定常状態 flux を J_{cont} 、off 直後の flux を J_{max} として、各適用電圧における最大促進比 ($J_{\text{max}}/J_{\text{cont}}$) を計算した。その結果を Fig. 8 に示す。同じ適用電圧で比較す

ると、角質層側の needle 電極を陰極にした方が陽極とするより高い促進比が得られた。また、適用電圧を上げていくと最大促進比も直線的に増大した。以上の結果から、エレクトロポレーションには 2 つの異なった促進メカニズム、すなわち、電圧を適用している間に pore が皮膚バリアー中に形成され、そこを BA が拡散するという機構と、イオンフォレスिसにみられるように電気エネルギーによる駆動力の増加による促進機構が関与していると考えられた。また、エレクトロポレーションでは off した後もバリアー中に残存している pore を通って BA が輸送されるものと考えられた。

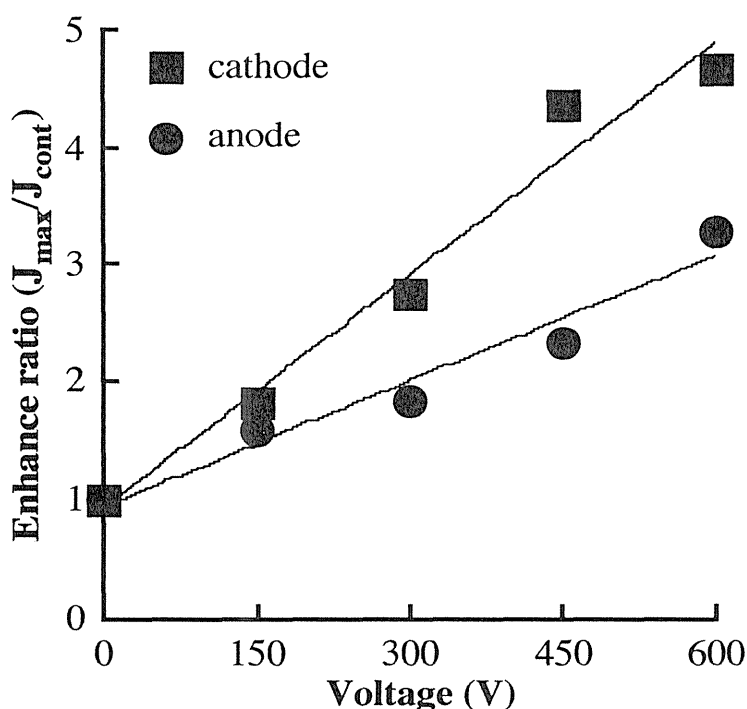


Fig. 8 Effects of electrode position on J_{max}/J_{cont} through hairless rat skin

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates.

今回の *in vitro* 皮膚透過実験では角質層側、真皮側ともに生理食塩液を使用したため、Fig. 9a に示すように角質層側を陰極としてエレクトロポレーションの処理を行うと、まず最初に角質層に水溶性経路である pore が形成され、その pore を通り瞬間的にイオンも流れる。その後断続的に適用電圧を負荷することによりイオンが pore を流れ、また、pore 自身も拡大して pore の存

続時間が延長すると考えられる。そのため Na^+ などの陽イオンが形成された pore を通り真皮側から角質層側へ、逆に BA^- や Cl^- などの陰イオンが角質層側から真皮側に電気駆動力によって移動する。また、角質層側を陽極にすると Cl^- が真皮側から角質層側へ、 Na^+ が角質層側から真皮側に電気駆動力によって移動すると考えることができる (Fig. 9b)。

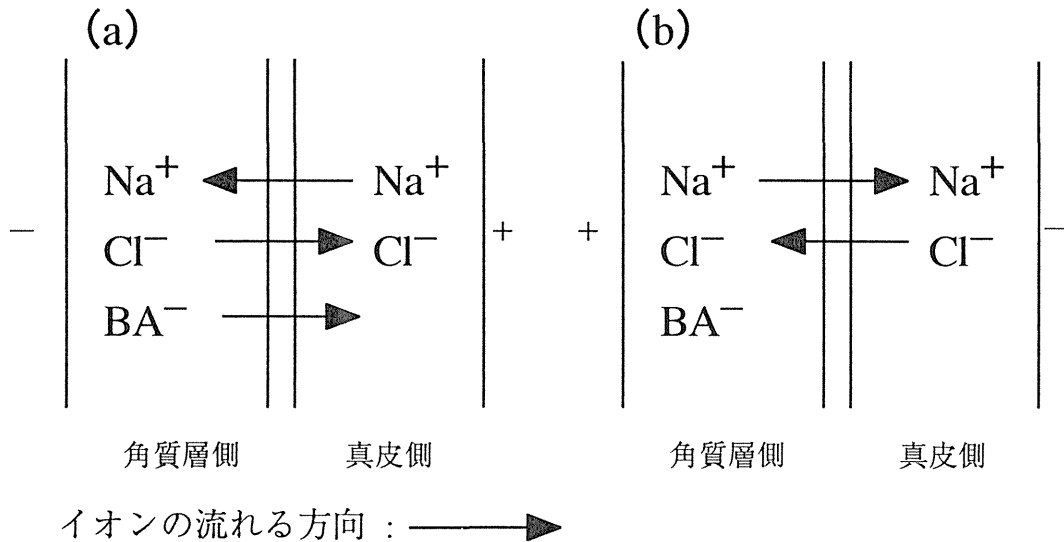


Fig.9 Schematic diagram of ion transport at electrophoresis

以上のことからエレクトロポレーションには本来の pore を形成して薬物の皮膚透過を促進しているのではなく、イオントフォレシス様の電気駆動力も関与していることが示唆された。

(2) エレクトロポレーションの角質層への影響

次に、角質層のない stripped skin ではエレクトロポレーションの作用がどのように表れるか評価した。Fig. 10 に stripped skin を介した BA の経時 flux を示す。エレクトロポレーション処理と未処理ともにほぼ同様の挙動が得られ、3 時間の lag time の後ほぼ一定の flux (約 $15 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$) となった。このことより stripped skin 透過性に対しては、エレクトロポレーションの効果はみられないことがわかった。

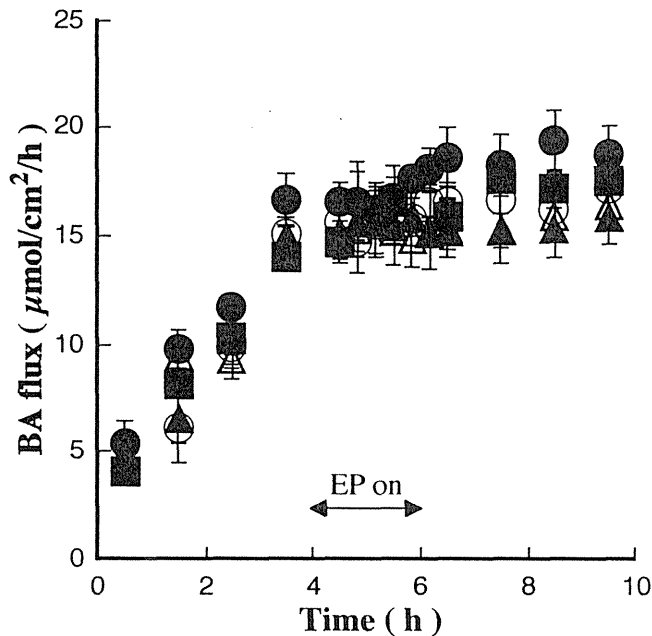


Fig. 10 Effects of electroporation on the time course of BA flux through stripped hairless rat skin.

Symbols: control (■), 150V (○), 150V (●), 300V (△), 300V (▲)

Closed symbols : Needle electrode was set as an cathode. Open symbols : Needle electrode was set as an anode.

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates.

(3) エレクトロポレーションのより実用的な系に関する検討

次に エレクトロポレーションの実用性を考慮に入れて、ring 電極と needle 電極をともに角質層側に適用し皮膚透過実験を行った。Fig. 11 にその時の各適用電圧での BA の経時 flux を示す。なお、図中の脚注に示した N(-) または N(+) は needle 電極をそれぞれ陰極、陽極としたことを示す。コントロール時の BA の皮膚透過は 2 時間の lag time 後一定の flux ($0.07 \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$) を示した。一方 エレクトロポレーションで処理すると flux は経時的に増加した。また、この作用は適用電圧が高い方がより大きく、さらに ring 電極を陽極とした時の方が大きかった。ring 電極を陽極とするとエレクトロポレーション on のときに皮膚表面に BA を引きつけることによって薬物透過が上がったと推察された。

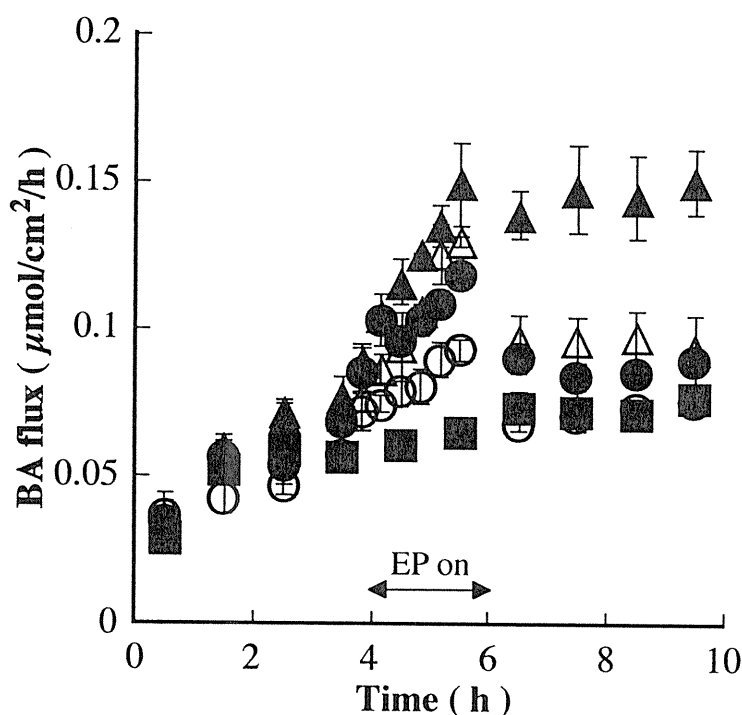


Fig. 11 Effects of electroporation on the time course of BA flux through hairless rat skin.

Symbols: control (■), 150V-N-(+) (○), 150V-N-(-) (●), 300V-N-(+) (△), 300V-N-(-) (▲)

N-(+): Needle electrode was set as an cathode. N-(-): Needle electrode was set as an anode.

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates.

また、この電極の位置（陽、陰極ともに角質層側に設置）が（1）で行った実験系、つまり皮膚を介して電極を設置したとき（Figs. 6、7）とどのように異なるかについて検討した。これら各実験から、エレクトロポレーション on 直前の定常状態 flux を J_{cont} 、エレクトロポレーション off 後の flux を J_{max} として、各適用電圧でのエレクトロポレーションの最大促進比 ($J_{\text{max}}/J_{\text{cont}}$) を計算した。結果を Fig. 12 に示す。電極の皮膚を介した設置と皮膚を介さない設置で BA の最大促進比には有意差はみられなかった。このことからエレクトロポレーションでは皮膚を介して電極を置く必要がないことが明らかとなった。

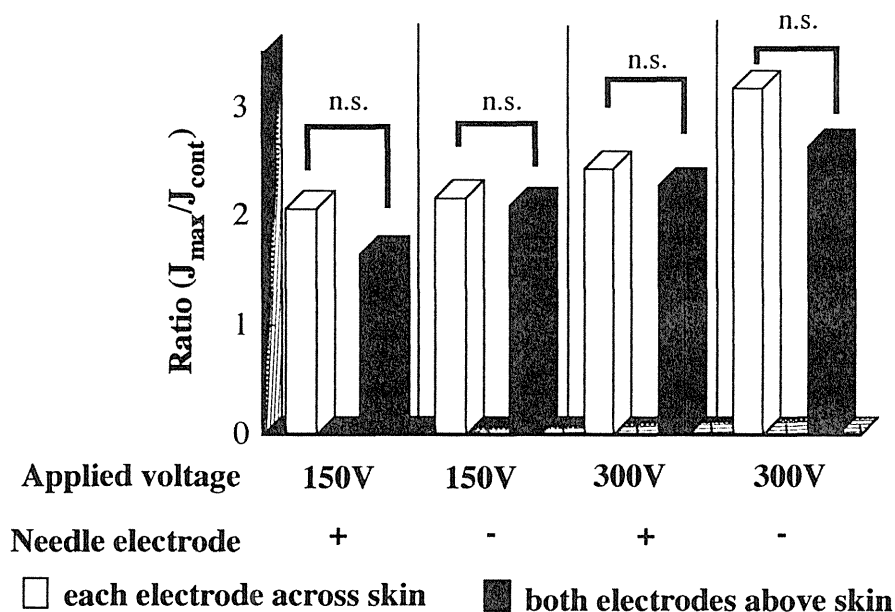


Fig. 12 Effects of electrode position and voltage on J_{max}/J_{cont}

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates

ここで、エレクトロポレーションの経皮吸収促進効果に関する適用電圧とそのときの電極の置き方の影響について小括する。角質層側に陽極または陰極の電極のどちらを設置しても、適用電圧を上げていくと BA の皮膚透過性は増加した。しかし、その促進作用は角質層側を陰極としたときの方が陽極とするより大きかった。さらに、エレクトロポレーション負荷時に角質層側を生理食塩液とし off 後に BA 溶液として行った透過実験から BA の皮膚透過性に有意な差が得られなかったことから、陽極、陰極の選択による pore の形成能に違いがないことが示唆された。これらの結果から、角質層側を陽極としたときは皮膚中に形成された pore 中を BA が拡散・透過したと考えられた。また、角質層側に陰極電極を設置したときは角質層バリアー中の pore が形成に加え、電気エネルギーによる駆動力が加わり BA の皮膚透過がさらに促進されたものと考えられた。また、適用電圧が低い時の pore 形成は可逆的であることが示唆された。また、電極を皮膚を介して設置した場合と両電極ともに角質層側に置いたときの皮膚透過性には有意な差が見られなかったことから、電極は皮膚を介して置く必要がないことが明らかとなった。

(4) エレクトロポレーションによる電極間距離の影響

次に、電極間距離を変えてエレクトロポレーションの皮膚透過促進効果について検討した。また、エレクトロポレーションの作用部位をより詳細に検討するために BA の皮膚内濃度を測定した。

Fig. 13 は電極間距離に対する BA の最大 flux を示す。コントロール (エレクトロポレーション処理なし) に比べ、15 mm の間隔で電極を設置すると、で約 1.45 倍の最大 flux の違いが得られた。また、電極間隔を近づけていくと皮膚透過促進効果がさらに増大した。しかし、5 mm 以下とすると逆に促進効果が小さくなる傾向を示した。これは、おそらく電極間の放電現象によるものと考えられた。

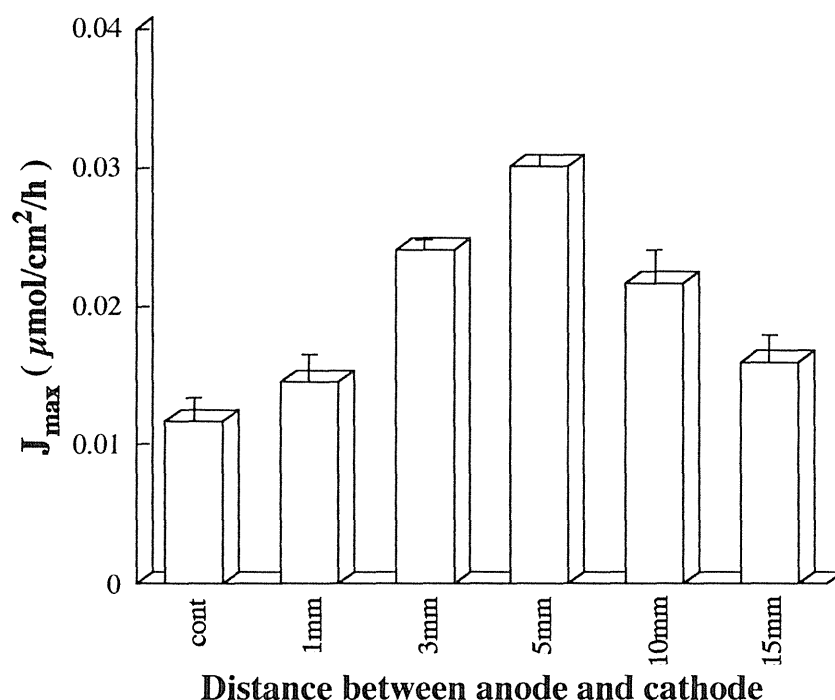


Fig. 13 Effects of anode-cathode distance and voltage on J_{\max}/J_{cont}

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates.

(5) エレクトロポレーション負荷時における BA の皮膚内濃度の測定

薬物の皮膚透過性は皮膚透過量からだけでなく皮膚中量を測定することによっても評価できる。そこで、エレクトロポレーション on 時の BA の皮膚内濃度を測定して皮膚透過促進部位を検討した。Fig. 14 に電極 (needle 電極) 設置部位と皮膚サンプリング部位を、Fig. 15 に各皮膚部位での BA 濃度を示す (ただし、a のみにエレクトロポレーション処理)。コントロール時の皮膚

内濃度に比べ、a、b、c はそれぞれ約 3 倍、2 倍、1.6 倍であった。すなわち、電極に極めて近い a では電場強度が大きく、pore 形成能が高く、結果として BA の皮膚内濃度が高くなったと考えられた。一方、g、h のように電極から離れると電場強度が低下し、BA の皮膚中量はコントロール部位と有意な差が得られなかった。以上より、エレクトロポレーションは電場強度の高いところ、すなわち電極の真下と電極間の角質層に作用して pore を形成し薬物皮膚透過性を向上させているものと考えられた。

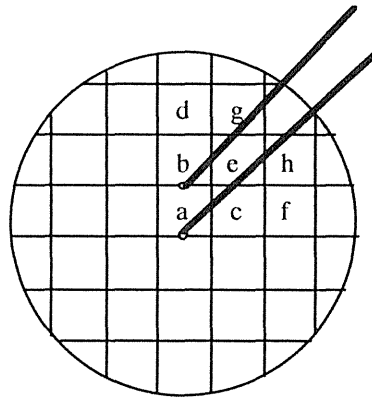


Fig. 14 Position of electrodes and skin samples to measure BA amount

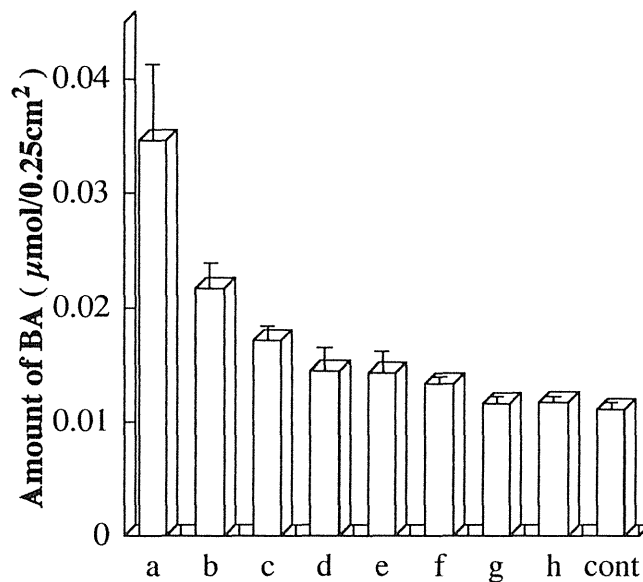


Fig. 15 Effects of electroporation on the BA amount in several skin sites

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3-5 replicates.

(6) エレクトロポレーションによる電極の適用部位の影響

Fig. 3、4 の結果から、電極を一ヶ所に設置し エレクトロポレーション処理

(300 V) しても flux は 2~3 倍の促進効果しか示さなかったが、電極付近の皮膚内 BA 濃度は高いことがわかった。したがって、エレクトロポレーション適用部位数を増せば BA の皮膚透過がさらに促進することが予想された。そこで、電極の適用部位数をローテーションしてエレクトロポレーション処理した。Fig. 16 にローテーション方法を、Fig. 17 に各実験における BA の経時 flux を示す。1 のみに電圧を負荷したものを集中型 (localized) とし、1 時間目に 1、2 時間目に 2 の部位のようにエレクトロポレーションを処理したものを分散型 (rotated) とした。集中型、分散型はともにコントロールに比べ BA の皮膚透過を促進したが、分散型は集中型より 5~6 時間目の flux で約 1.5 倍高かった。以上、集中型では促進効果の飽和が見られたが、分散型では各部位で飽和のない促進効果が得られた。

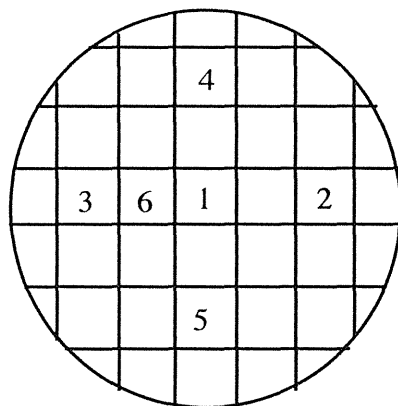


Fig. 16 Electroporation position on the excised skin

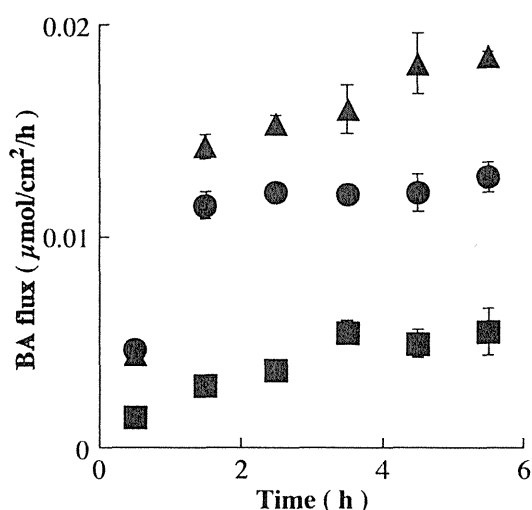


Fig. 17 Effects of rotated or localized electrode position on the electroperated skin permeation of BA

Symbols: control (■), rotated(▲), localized (●)

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates.

ここで、エレクトロポレーションの効率化を目指し、電極間距離、電場強度、および電極の位置についての検討結果を小括する。エレクトロポレーション適用時の電極間距離が 5 mm のとき BA 皮膚透過性が最大であったことから、電極間距離には至適距離が存在することが明らかとなった。また、BA の皮膚内濃度は電極近傍で高く、電極から離れていくにしたがい皮膚濃度が低くなった。さらに、電極の適用部位数を増すことにより皮膚透過性が増加した。以上の結果から、エレクトロポレーションの皮膚透過促進効果は電場強度に密接に関係していることが示唆された。また、エレクトロポレーションの負荷部位を増すことは、薬物の皮膚移行部位を増すことになり、皮膚透過性を向上させる方法として有用であることが明らかとなった。

第2節 エレクトロポレーションとイオントフォレシスの併用に関する検討

エレクトロポレーションに作用メカニズムの異なるイオントフォレシスを併用して、さらなる促進効果を得ることを目的に以下の実験を行った。

(1) エレクトロポレーションとイオントフォレシスの併用に関する検討

Fig. 18 にエレクトロポレーション単独系 (450 V) と、エレクトロポレー

ションとイオントフォレシス (450 V、3 V) 併用系の BA 累積皮膚透過量-時間曲線を示す。各処理群の 8 時間に亘る累積透過量をコントロールと比較すると、イオントフォレシス単独系は 3.67 倍、エレクトロポレーション単独系は 1.67 倍、またこれらの併用系は 7.08 倍になった。この結果から、エレクトロポレーションにイオントフォレシスを併用することで BA の皮膚透過性が相乗的に促進されることが明らかになった。この促進メカニズムとしては、エレクトロポレーションによって pore が形成され、そこにイオントフォレシスによって生じた電気駆動力が作用して BA の透過性をさらに増加させたことであると考えられた。

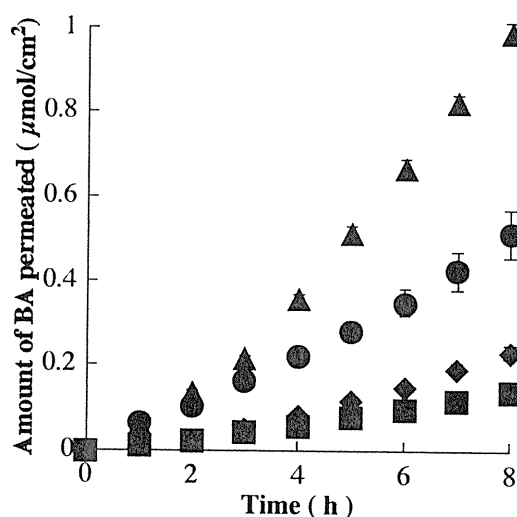


Fig. 18 Effects of electroporation and/or iontophoresis on the amount of BA permeated through hairless rat skin.

Symbols: control (■), iontophoresis (●), electroporation 450V (◆),
iontophoresis + electroporation 450V (▲)

Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates.

(2) 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に対するエレクトロポレーションの適用電圧の影響

Fig. 19 にエレクトロポレーションとイオントフォレシスとの併用系とエレクトロポレーション単独系における各適用電圧での定常状態 flux を示す。エレクトロポレーション単独系 (150、300 V) の BA flux はコントロール時の値とほぼ変わらなかった。BA 自身の固有の皮膚透過性は高く、150、300 V ではエレクトロポレーションの促進効果がほとんど現れなかったと考えられた。しかし、この程度の適用電圧でも イオントフォレシスを併用することによ

て高い促進効果がみられた。また、より高い電圧（450、600 V）でエレクトロポレーション処理をしイオントフォレシスを併用すると、相乗的な皮膚透過促進効果がみられた。また、その効果はエレクトロポレーション時の適用電圧の高いほうが大きくなった。

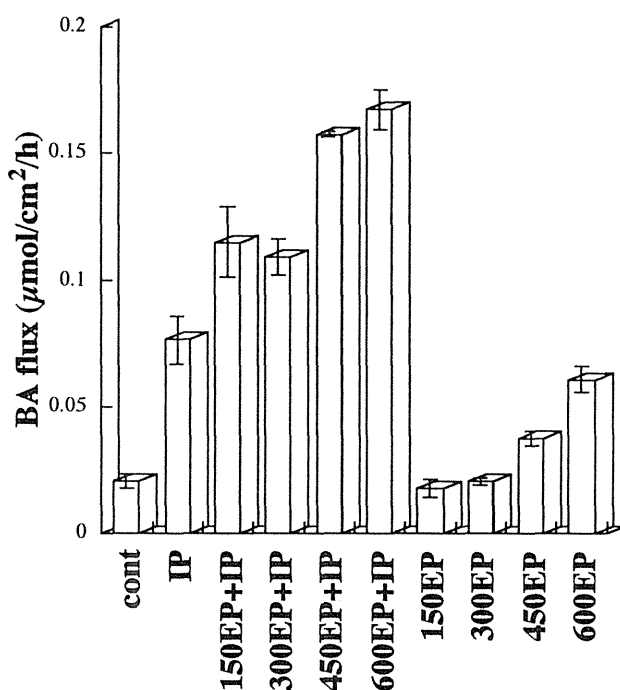


Fig. 19 Effects of electroporation and/or iontophoresis on the BA flux
Each data point represents the mean \pm S.E. of 3 replicates.

第3節 まとめ

150、300 V のエレクトロポレーション単独系ではほとんど促進効果がみられなかったが、この適用電圧でもイオントフォレシスを併用することで高い促進効果が得られた。この時に皮膚バリアー中に形成された pore は、BA 自身の皮膚透過性が高いため、ほとんど単独系での促進効果に寄与しなかったものと考えられた。しかしエレクトロポレーションの適用電圧を 450、600 V まで上げてイオントフォレシスを併用すると、相乗的な透過促進効果が得られた。以上より、エレクトロポレーションに作用メカニズムの異なるイオントフォレシスを併用すると皮膚透過性をさらに増加できると思われた。

おわりに

本研究より、ジェットインジェクターやエレクトロポレーションで前処理を行い、角質層バリアーに小孔を形成させ、これとは全く促進メカニズムの異なるイオントフォレシスを併用することで、薬物の経皮吸収のさらなる改善が可能であることが明らかになった。

今回得られた結果は、現在点滴治療に用いられている薬物のみならず皮膚からの吸収がほとんど期待できずヒトへの適用方法がないペプチドや DNA 薬の皮膚適用製剤化のための一歩になるものと思われる。また、今回の研究を継続することによって、これらの製剤が点滴注射に代わるものとして広く受け入れられると考えている。

文献

- 1) Lindmayer, I., Menassa, K., Lambert, J., Moghrabi, A., Legendre, L., Legault, C., Letendre, M., Halle, J.P., Development of new jet injector for insulin therapy, *Diabetes Care*, **9**, 294-297 (1986).
- 2) Inoue, N., Kobayashi, D., Kimura, M., Toyama, M., Sugawara, I., Itoyama, S., Ogihara, M., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Fundamental investigation of a novel drug delivery system, a transdermal delivery system with jet injection, *Int. J. Pharm.*, **137**, 75-84 (1996).
- 3) Clemessy, M., Couarraze, G., Bevan, B., Puisieux, F., Mechanisms involved in iontophoretic transport of angiotensin, *Pharm. Res.*, **12**, 998-1002 (1995).
- 4) Morimoto, Y., Numajiri, S., Sugibayashi, K., Effect of ion species and their concentration on the iontophoretic transport of benzoic acid through poly (vinyl acetate) membrane, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2412-2416 (1991).
- 5) Numajiri, S., Inada, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Iontophoretic transport of morphine across hairless rat skin: Is a further increase obtained with chemical enhancer ?, *Yakuzaigaku*, **58**, 29-36 (1998).
- 6) Tsong, T. Y., Electroporation of cell membranes, *Biophys. J.*, **60**, 297-306 (1991).
- 7) Ho S. Y., Mittal G. S., Electroporation of cell membrane: A review, *Critical Reviews in Biotechnology*, **16**, 349-362 (1996).
- 8) Weaver J. C., Chizmadzhev Y. A., Theory of electroporation: A review, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **41**, 135-160 (1996).
- 9) Spiller D. G., Giles R. V., Grzybowski J., Tidd D. M., Clark R. E., Improving the intracellular delivery and molecular efficacy of antisense oligonucleotides in chronic myeloid leukemia cells; A comparison of streptolysin-O permeabilization, electroporation, and lipophilic conjugation, *Blood*, **91**, 4738-4746 (1995).

10) Nishi T., Yoshizato K., Yamashiri S., Takeshima H., Sato K., Hamada K., Kitamura I., Yoshimura T., Saya H., Kuratsu J., Ushio Y., High-efficiency *in vivo* gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following *in vivo* electroporation, *Cancer Res.*, **56**, 1050-1055 (1996).

11) 葛西道生, 稲葉浩子, 高電圧パルスによる細胞穿孔のメカニズム, 蛋白質, 核酸, 酵素, **31**, 1591-1603 (1986).

12) Pliquett U., Langer R., Weaver J. C., Change in passive electrical properties of human stratum corneum due to electroporation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1239**, 111-121 (1995).

13) Pliquett U., Weaver J. C., Transport of charged molecule across the human epidermis due to electroporation, *J. Controlled Rel.*, **38**, 1-10 (1996).

14) Prausnitz M. R., Pliquett U., Langer R., Weaver J. C., Rapid temporal control of transdermal drug delivery by electroporation, *Pharm. Res.*, **11**, 1834-1846 (1994).

