

氏名(本籍)	大原長夫喜 (滋賀県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	甲第61号
学位授与年月日	平成8年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者
学位論文の題名	薬物の皮膚透過に及ぼす吸収促進剤と温度の影響
論文審査員	主査 教授 永井恒司 副査 教授 高橋浩 副査 教授 高橋朋子

## 論文内容の要旨

経皮治療システムは、皮膚を経由して直接体循環系に薬物を送達することを目的とした薬物投与方法であり、経口や注射などの他の投与方法に比較して多くの利点が認められている。しかし、皮膚は本来、外界からの異物の侵入や、体内からの水分の蒸発を防ぐバリアーとしての機能を有し、生体粘膜に比べると物質の透過性が低い。そのため、必要かつ十分な治療を行なうためには透過性の改善が必要となる。経皮吸収において、一般的に律速となるのは角質層であり、この障壁能を一時的に低下させ、薬物の透過を促進する方法は種々考えられているが、そのひとつとして吸収促進剤を用いる方法がある。これは皮膚に直接的に作用させることにより、その障壁能を低下させるもので、化学的手段としては簡便かつ容易で応用性にも優れている。

近年、単環モノテルペン類の経皮吸収促進作用について多くの研究が行なわれ、*d*-リモネンを始めとする炭化水素系モノテルペンが薬物の経皮吸収に対して、強い促進活性を示すことが見いだされている。しかしながら、一種類の吸収促進剤で事実上十分な活性を得ることは難しい。そこで著者は吸収促進剤を併用のもと、外部から温熱を適用することによる経皮吸収の改善を試みた。また、経皮吸収促進剤と温熱の適用における併用効果の機構について検討し、皮膚刺激性や製剤化する上での最適条件の探索も行ない、以下に示す所見を得た。

*in vivo* 吸収実験において、*d*-リモネンと温熱を併用した時のケトプロフェンの透

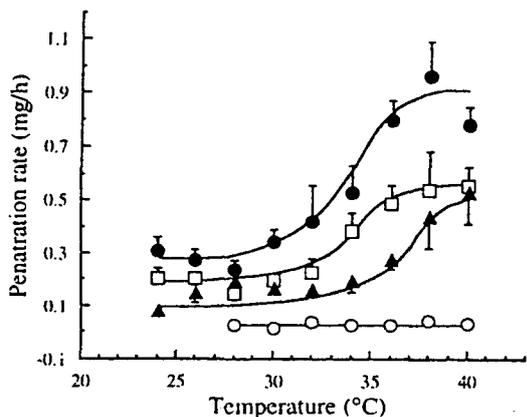


Fig. 1 Relationship between rate of penetration and temperature on the percutaneous absorption in rat. (○) control, (▲) 0.5% *d*-limonene, (□) 1.0% *d*-limonene, (●) 1.5% *d*-limonene.

過速度 ( $R_p$ ) は、ある温度に変曲点を持つシグモイド型の関係が認められた (Fig. 1)。透過速度が上昇し始める温度は、各処方 (*d*-リモネンを 0.5%、1.0% および 1.5% 含有するゲル軟膏) において血中薬物濃度が急激に上昇し始める温度とほぼ一致した。したがって、*d*-リモネンの経皮吸収促進作用は、外部から温熱を適用

することによって飛躍的に増大し、両者間に相乗作用のあることが確認された。

*in vitro* 透過実験においても、温度の上昇に伴いケトプロフェンの透過量が顕著に増大した。定常状態より求めた透過係数 ( $P$ ) 値も温度の上昇とともに増大し、*d*-リモネンと温熱の併用による皮膚透過の促進が確認された。*d*-リモネンを含まない系においては、 $P$  値のアレニウスプロットは良好な直線性を示し、透過の活性化エネルギーは 113.7 kJ/mol であった (Fig. 2)。これに対し、*d*-リモネン 1.5% を含む系では、 $P$  値のアレニウスプロットが上に凸の曲線となり、高温側での傾きが低下する結果となった。これは *d*-リモネンで前処理した皮膚では、薬物の透過ルートが温度の上昇とともに何らかの構造変化を起こしているためと推測され

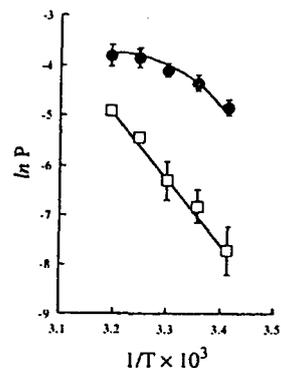


Fig. 2 Arrhenius plots of the steady state permeability coefficient of ketoprofen. Each point is the mean  $\pm$  S.D. of 3 determinations. (□) Without *d*-limonene, (●) 1.5% *d*-limonene.

た。また、これに対応した皮膚表面の形態学的な変化も確認された。さらに前処理に伴うドナー側への脂質の遊離を測定した結果、セラミド、コレステロール、およびリン脂質等の遊離が認められたが、遊離量はごくわずかであり、皮膚の構造を著しく破壊することはないと考えられた。

透過機構の解明を目的とした *in vitro* 透過実験では、皮膚透過経路を疎水性物質が透過する non-polar pathway と親水性物質が透過する polar pathway に大別することにより、透過挙動を比較検討した。その結果、疎水性物質 (プレドニゾンおよ

びケトプロフェン) の P 値のアレニウスプロットは、*d*-リモネンを含まない系では直線となった (Fig. 3)。これに対し、*d*-リモネンを分散させた系では、いずれの薬

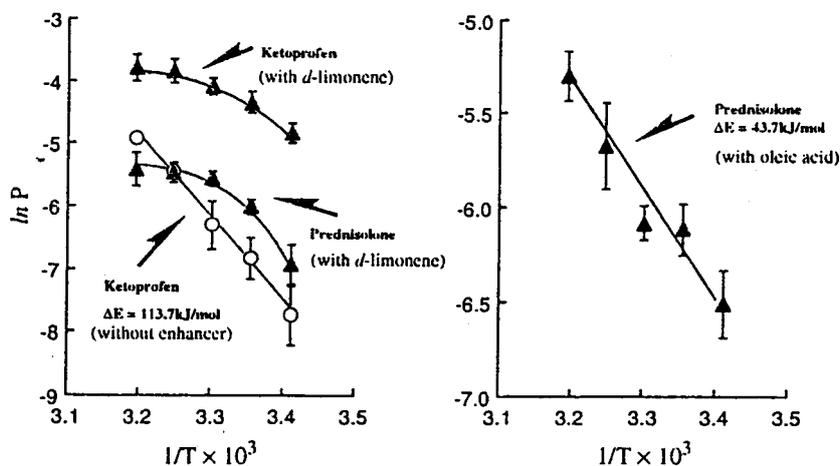


Fig. 3 Arrhenius plots of steady state permeability coefficients (P) of lipophilic penetrant

物においてもアレニウスプロットは上に凸となり、*d*-リモネンにより non-polar pathway の構造変化が惹起されたことが確認された。また適用温度が高くなるほどこの変化も大きくなり、より抵抗性が減少する方向へと角質層の形態が変化し、拡散性が增大していることが示唆された。また、オレイン酸を吸収促進剤として用いた場合は、P 値のアレニウスプロットは直線となり、オレイン酸による non-polar pathway の構造変化は起こらないと考えられた。一方、親水性物質 (D-グルコースおよびイソニアジド) の P 値のアレニウスプロットは、*d*-リモネンもしくはオレイン酸に限らず、いずれにおいても良好な直線性を示したことから、これら促進剤における polar pathway の構造変化は惹起されないものと考察された。以上の結果より、促進剤として *d*-リモネンを用い温熱を併用した場合、疎水性薬物の皮膚透過において特に相乗効果が認められ、その有用性が認められたが、オレイン酸においては温熱併用時でもさほど透過の改善は期待できないことが示唆された。

ゲル軟膏を用いた皮膚刺激性は、皮膚切片を組織学的に分類することにより評価した。その結果、*d*-リモネンが低濃度の場合、ほとんど刺激はないが、濃度の増大および適用温度の上昇により刺激性が増大した (Fig. 4a)。一方、オレイン酸においても同様の傾向が認められたが、*d*-リモネンと比べて比較的 low 濃度でも刺激が現れ、全体的にオレイン酸のほうが皮膚刺激が強かった (Fig. 4b)。また二元配置の

分散分析を行なった結果、*d*-リモネンと温度もしくはオレイン酸と温度の交互作用は、刺激の増大に対して、いずれも危険率1%以下で高度に有意な値を示した。さらに、*d*-リモネンでは観察されなかった皮膚付属器官の変性がオレイン酸にのみ観察されたことから、オレイン酸は皮膚付属器官に強く作用することにより、親水性薬物の透過を促進する可能性が示唆された。

最後に最適化法を利用することにより、吸収促進作用と皮膚への安全性をともに満足する両システム(*d*-リモネンを含む系

とオレイン酸を含む系)の至適条件を推定し、相互に比較した。得られた同時最適解(Table 1)より、*d*-リモネン、エタノールおよび温度の併用系はケトプロフェンの経皮吸収に対し、優れた促進作用を示すが、比較的刺激性の強い条件であることがわかった。一方オレイン酸の系では、皮膚刺激性はさほど強くないものの、吸収促進作用はかなり弱いことが確認された。

またどちらの促進剤においても、特性値の予測値と実測値は高精度に一致した。さらに、各特性値の同時最適解を制約条件として設定し、各促進剤における特性値の最適化を再度実施した。その結果、オレイン酸で*d*-リモネンと同等の促進活性を得よう

とすると、皮膚刺激は著しく増大することが予測された。また*d*-リモネンでオレイン酸と同等の刺激性に抑えると、強力な促進作用はほとんど得られなくなるものと考察された。

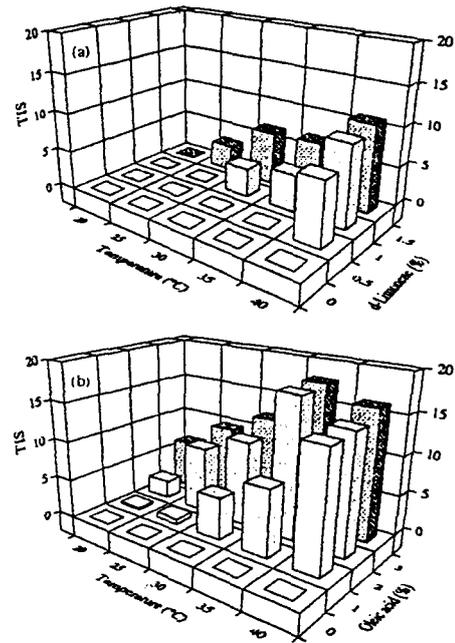


Fig. 4 Total irritation score (TIS) of rat skin at 6 h after application as a function of penetration enhancer concentration and temperature. Each column represents the mean of 3 animals. (a) *d*-Limonene, (b) oleic acid.

Table 1  
Response variables of the optimal condition

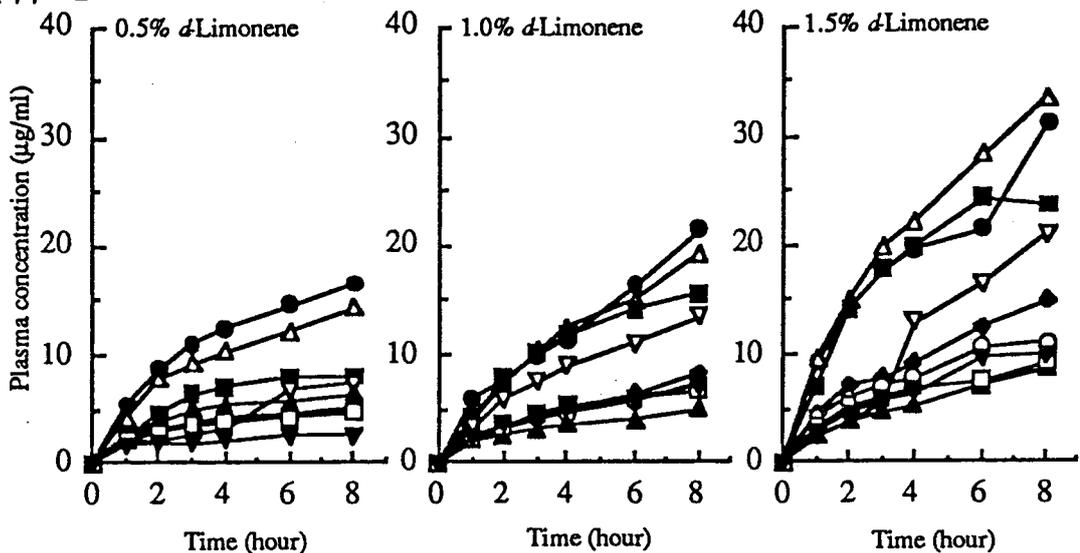
Response		Predicted	Experimental <sup>21)</sup>
<i>d</i> -Limonene	Rp	0.954	0.999 ± 0.16
	TIS	10.4	16.8 ± 0.80
Oleic acid	Rp	0.620	0.623 ± 0.17
	TIS	6.83	7.20 ± 1.30

<sup>21)</sup>Represented as the mean ± S.D. for five determinations.

# 参考資料

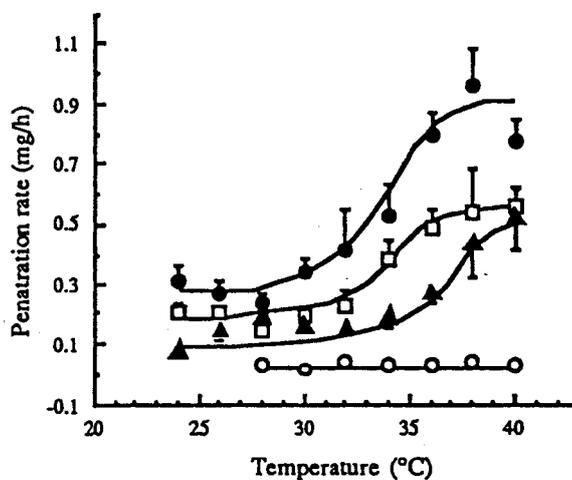
## D - 107 大原長夫喜

### 参考資料 1



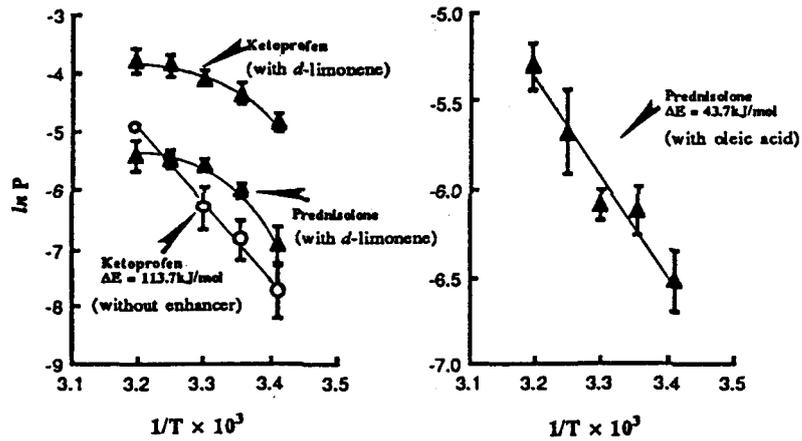
Combined effect of *d*-limonene and temperature on the percutaneous absorption of ketoprofen in rats (▼) 24°C, (□) 26°C, (▲) 28°C, (○) 30°C, (◆) 32°C, (▽) 34°C, (■) 36°C, (△) 38°C, (●) 40°C.

### 参考資料 2



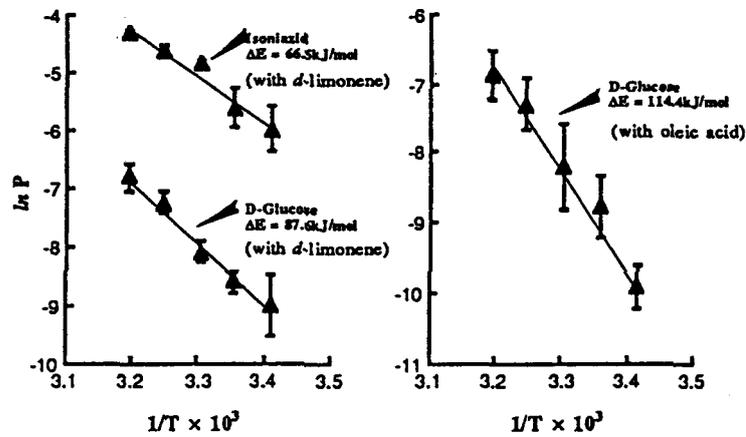
Relationship between penetration rate and temperature on the percutaneous absorption in rats (○) Control, (▲) 0.5% *d*-limonene, (□) 1.0% *d*-limonene, (●) 1.5% *d*-limonene.

参考資料 3



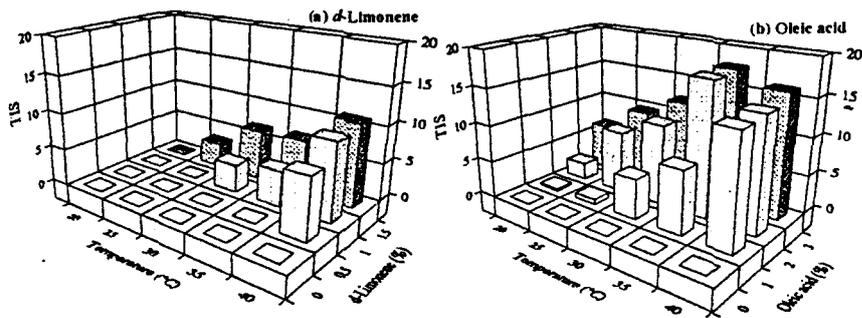
Arrhenius plots of steady state permeability coefficients (P) of lipophilic penetrants

参考資料 4



Arrhenius plots of steady state permeability coefficients (P) of hydrophilic penetrants

参考資料 5



Total Irritation scores (TIS) of rat skin at 6 hour after application as a function of penetration enhancer concentration and temperature

参考資料 6

Optimal condition of *d*-limonene and oleic acid systems for three factors

	<i>d</i> -Limonene	Oleic acid
X <sub>1</sub> (Ethanol)	40.9%	23.0%
X <sub>2</sub> (Enhancer)	2.86%	2.19%
X <sub>3</sub> (Temperature)	37.8°C	39.7°C

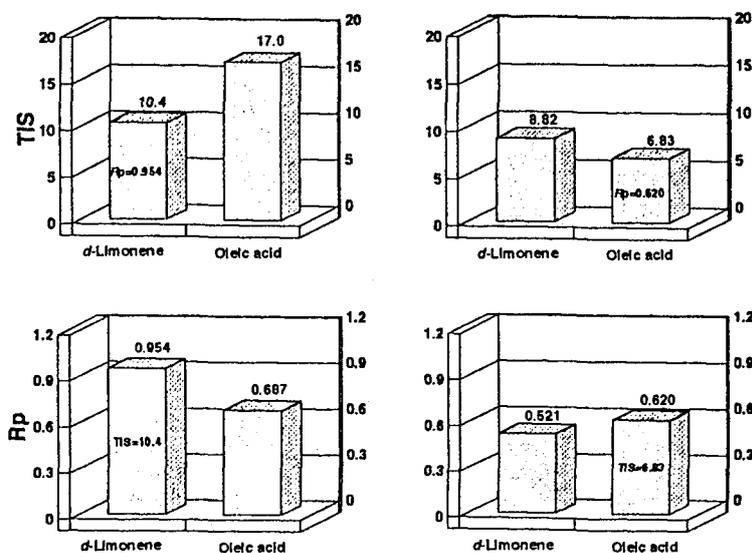
参考資料 7

Response variables of the optimal condition

Response		Predicted	Experimental <sup>a)</sup>
<i>d</i> -Limonene	<i>R<sub>p</sub></i>	0.954	0.999 ± 0.164
	TIS	10.4	16.8 ± 0.80
Oleic acid	<i>R<sub>p</sub></i>	0.620	0.623 ± 0.168
	TIS	6.83	7.20 ± 1.30

<sup>a)</sup>Represented as the mean ± S.D. for five determinations.

参考資料 8



Trade-off analysis of *R<sub>p</sub>* and TIS in *d*-limonene and oleic acid systems

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、薬物の皮膚透過に及ぼす吸収促進剤と温度の影響について検討を行なったものであり、以下の内容からなる。d-リモネンを促進剤として用いた場合、疎水性薬物が透過するnon-polar pathway では、角質層の脂質遊離等による構造的な変化に起こし、また適用温度を変えると異なった変化を起こすことが考えられた。このことは SEMによる皮膚表面構造の変化からも確認された。すなわち、温度上昇により、抵抗性が減少する方向へと角質層が変化を起こしていると考えられる。しかし、このような変化は薬物の皮膚透過速度に対して必ずしも有効ではなく、特に高温においては皮膚の構造変化が律速となり、温度の影響が小さくなるものと推測される。したがって疎水性薬物の皮膚透過の機構は、角質層の構造変化および温度上昇に伴う皮膚内拡散の増大が主な透過促進の機構であると考察された。一方、親水性薬物が透過するpolar pathway では、d-リモネンと温熱の併用による異なる温度間での構造変化の相違はなく、温度上昇に起因する拡散性の改善が重要な透過促進の機構であると考えられた。これに対し、オレイン酸を促進剤として用いた場合、non-polar もしくは polar pathway を問わず、温度に対して比例的に透過が増加する結果となり、構造の変化は認められなかった。したがって、オレイン酸による皮膚透過は、透過ルートに関わらず、温度上昇による拡散性の増大のみが透過促進の機構であると考察された。

d-リモネンおよびオレイン酸の皮膚刺激性は、温度の上昇もしくは促進剤濃度の増加とともに増悪した。またオレイン酸適用では、皮膚付属器官に変性をきたすことが確認された。両促進剤により惹起される刺激性と促進活性を考慮した場合、温熱とd-リモネンの併用は刺激が少なくかつ十分な活性を得ることができると考察された。

さらにヒドロゲルの処方最適化を試みたところ、エタノール、d-リモネンおよび温熱適用の組み合わせは高い吸収性があり、かつ皮膚刺激性もある程度回避できると考えられた。また温熱併用に適した促進剤が存在することが示されたことから、異なる吸収促進剤に対して同様の実験を行なうことにより、対象となる薬物に最も適した促進技術の開発が可能であると考えられる。

以上の内容は新規性が高く、正確に記述され、表現上問題もない。よって博士（薬学）の学位論文として合格と判定した。