

ジクロフェナクの皮膚透過に及ぼす
単環モノテルペン類とエタノールの
併用効果

星薬科大学
図書館



0000061051

小 幡 誉 子

ジクロフェナクの皮膚透過に及ぼす
単環モノテルペン類とエタノールの
併用効果

目次

緒言	1
----	---

第1章 ジクロフェナクナトリウムの経皮吸収に及ぼす単環モノ

テルペン類の促進効果	4
------------	---

第1節 序論	4
第2節 実験の部	4
第3節 単環モノテルペン類の促進効果	9
第4節 <i>l</i> -メントールとAzoneの比較	12
第5節 ジクロフェナクの血中濃度の予測	16
第6節 本章のまとめ	19

第2章 ジクロフェナクナトリウムの経皮吸収に及ぼす単環モノ

テルペン類とエタノールの協同効果	20
------------------	----

第1節 序論	20
第2節 実験の部	20
第3節 エタノール濃度の影響	21
第4節 テルペンとエタノールの協同効果	23
第5節 ジクロフェナクの経皮吸収	26
第6節 ジクロフェナクの経皮吸収に対するpHの影響	26
第7節 本章のまとめ	30

第3章 分子形及びイオン形ジクロフェナクの皮膚透過に対する

エタノールの影響	31
----------	----

第1節	序論	3 1
第2節	実験の部	3 2
第3節	ジクロフェナクの皮膚透過に対する pH の影響	3 3
第4節	ジクロフェナクの溶解度に対するエタノールの影響	3 3
第5節	ジクロフェナクのフラックスと透過係数に対する エタノールの効果	4 1
第6節	透過係数の理論値と実験値の比較	4 4
第7節	本章のまとめ	4 8

第4章 分子形及びイオン形ジクロフェナクの皮膚透過に及ぼす

単環モノテルペン類の前処理の効果	4 9
------------------	-----

第1節	序論	4 9
第2節	実験の部	4 9
第3節	ジクロフェナクの皮膚透過係数に対するテルペン類の 促進効果	5 0
第4節	本章のまとめ	5 3

総括	5 6
----	-----

謝辞	5 8
----	-----

参考文献	5 9
------	-----

緒言

薬物の投与方法には、内服をはじめ、注射、坐剤、外用など従来から多くの形態が存在し、医療の現場では種々の剤形が、患者の症状に応じて適宜選択されている。錠剤やカプセル剤の内服は、一般的に最も身近な薬物投与方法であるが、薬物の化学的特性により消化管内での酵素分解や肝での初回通過による代謝を受けやすく、薬効の減弱を余儀なくされる場合もある。これを回避する手段のひとつとして、注射による投与があるが、患者の苦痛を伴うため、必ずしも望ましい方法とはいえない。このように、薬物の投与形態は、多くの問題点を抱えている現状であり、優れた薬効を有する薬物が、投与経路の制約により、その効果を充分発揮できない例も知られている。また、血中半減期の短い薬物では、薬効を持続させるために、頻回投与を行う必要があり、このことから派生する患者のノンコンプライアンスの問題も無視できない。このようなことから、近年、必要量の薬物を必要とする部位に送り込むことを目的とした薬物送達システム（Drug Delivery System, DDS）の研究開発が活発に行われるようになってきた。具体的には、保持体からの薬物の放出性の制御、剤形の改善、吸収部位での薬物の吸収量の調節、あるいは標的臓器への選択性向上を目的とするターゲティング療法などがDDSの研究分野を構成している。

近年、皮膚を薬物投与部位として積極的に活用しようという試みは、多くの研究論文を生みだし、そのいくつかは経皮吸収型製剤という形で結実した¹⁻⁴⁾。Transderm-Nitro（ニトログリセリン）、フランドルテープ S（硝酸イソソルビド）をはじめとするこれらの製剤の有用性は、薬物投与部位としての皮膚をますます重要なものとして認識させるに至っている。従来、外用剤は体表面そのものが患部であり、その部位に局所適用することが目的であったが、経皮治療システムは、これとは異なり、皮膚を投与ルートとして、薬物の全身作用を期待するものであり、DDSにおける重要な研究領域の一つを形成している。

薬物の経皮吸収の利点は、薬物が速やかに体循環系へと移行して肝での初回通過効果を回避できること、患者間、患者内での変動が少ないこと、薬物が皮膚から連続的に体内に入ること、薬物の血中濃度を長時間にわたり維持できること、これに付随して、薬物の一日投与量を少

なくすることが可能で、投与回数を減らし、患者のコンプライアンスの向上を図ることができることなどが挙げられる。また、副作用がみられた場合、皮膚からシステムを除去することにより薬物治療を容易に中断することも可能である⁵⁾。

しかしながら、皮膚は元来、外因性物質の体内侵入に対する防御壁としての機能を持っている。皮膚最外層の角質層脂質中のセラミドのアシル部分に起因するといわれるこの障壁能により、生体は外界から保護されている⁶⁾。従って、通常の状態では、治療上十分な量の薬物を皮膚から体内へ送達することは困難である。そこで、この障壁能に積極的に働きかけ一時的に薬物の透過を促進する方法が、いくつか考案されている。電氣的駆動力を利用するイオントフォレシスは、主として、イオン化しやすく皮膚透過性の低いペプチド系薬物を体内に送達する研究である⁷⁻⁹⁾。超音波を利用して薬物の皮膚透過を改善しようとするフォノフォレシス（ソノフォレシス）は研究例は少ないものの今後の発展に期待が寄せられている¹⁰⁻¹²⁾。また、疎水性の強い皮膚角質層の性質を考慮して、皮膚への分配性に優れるプロドラッグ化の試みも行われている¹³⁾。

薬物の皮膚透過性を改善する目的で、現在最も活発な研究が行われているのは、吸収促進剤の利用に関するものである。これは、皮膚に直接作用して、一時的にその障壁能を低下させ、薬物の皮膚透過を促進する物質を併用するものであり、簡便であることから、製剤化への応用性に優れている。これまでに見いだされた経皮吸収促進剤で最もよく研究されたものは、おそらくAzoneであろう¹⁴⁾。ネルソンリサーチ社により発表されたAzoneは、無色澄明無臭の液体で、経皮吸収促進剤としての使用を目的としてデザイン、合成された化合物である。Azoneは、広範な薬物に対して優れた吸収促進効果を示すことが知られているが、皮膚の細胞や粘膜に対する毒性についての報告例もある^{15, 16)}。近年、Azoneの促進作用機序について、詳細な検討が行われ、その主要な作用機序は、角質細胞間隙を構成する脂質二重層の流動化作用であると考えられている¹⁷⁻¹⁹⁾。薬物とAzoneをエステル結合させた二段階方式の経皮送達システムも登場した²⁰⁾。さらに、処方中の重要構成成分が一度放出された後、再びこのシステムへと逆流するのを避けるために考案された合成膜の使用や^{21, 22)}、システム内を高圧にすることによって逆流を防止する方法も研究されている²³⁾。

Okabe^{24, 25)}らは、モデル薬物として非ステロイド系抗炎症薬を用いて、テルペン系化合物の吸収促進活性をスクリーニングした。その結果、*d*-リモネンに代表される炭化水素系テルペンに極めて高い活性を見いだした。著者は、薬物にイオン性薬物であるジクロフェナクナトリウムを選択し、その経皮吸収に対するテルペン系化合物の促進活性の評価と、促進機構の解明を目的として詳細な研究を展開した。

ジクロフェナクナトリウムは優れた解熱消炎鎮痛作用を有し、慢性関節リウマチ、変形性関節症をはじめ、かぜ症候群、咽喉頭炎の際の鎮痛、消炎の治療薬として広く臨床に用いられている。フェニル酢酸誘導体に分類されるジクロフェナクナトリウムは、アラキドン酸カスケード中のシクロオキシゲナーゼの活性阻害によるプロスタグランジン合成阻害を作用機序とするため、胃障害を惹起する危険性がある。そのうえ体内における半減期が1.2から1.5時間と短く、経口投与では肝での初回通過効果による代謝を受けやすい。このようなことからジクロフェナクナトリウムの経皮送達システムを開発することは、薬効の持続化や副作用を回避する上で極めて重要であると判断される。

本研究は、ジクロフェナクナトリウムの経皮吸収型製剤を開発する上で重要と思われる基礎的データの収集とその解析を中心に行ったものである。

第1章 ジクロフェナクナトリウムの経皮吸収に及ぼす単環モノテルペン類の促進効果

第1節 序論

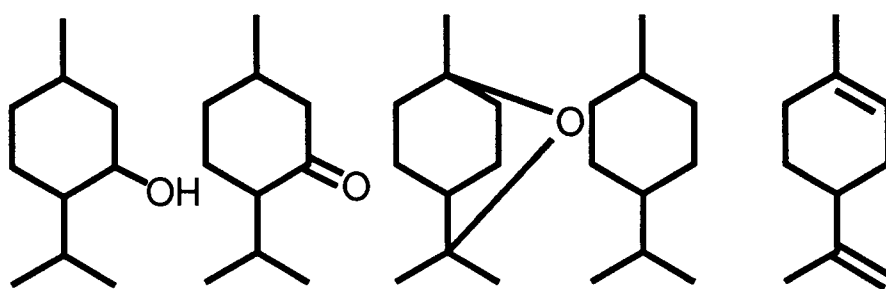
透過促進剤の開発は、薬物の皮膚透過性向上のひとつの手段として重要であることは、緒言でも述べてきたが、吸収促進剤としては、刺激性や薬理活性がなく、また、安定で効果が可逆的であることが望ましい。さらに、製剤化を考える上では他の処方因子との混合性に優れ、入手及び取扱いが容易であることも重要である。すでに、Azoneとその誘導体^{26, 27)}、ピロリドン誘導体²⁸⁾、高級不飽和脂肪酸²⁹⁾、シクロヘキサノン誘導体³⁰⁾などが有効な促進剤として報告されているが、実際製剤への応用を考える時、さらに安全で有効な促進剤の開発が必要であると考えられる。

これまでに、インドメタシンやケトプロフェンのような脂溶性薬物のゲル軟膏からの経皮吸収に対して d -リモネンをはじめとする単環モノテルペン類に著明な効果が見いだされている^{24, 25)}。また、テルペンの皮膚刺激性は通常の使用量では充分低いものであることも確認されている。本章では、5種類の代表的なテルペンを選択してラットにおけるジクロフェナクナトリウムのin vivo経皮吸収に及ぼす促進効果を検討した³¹⁾。

第2節 実験の部

2-1 試薬

実験に用いた単環モノテルペン類は、東京化成工業株式会社製の試薬特級品を購入して使用した。各テルペンの構造式をFig.1-1に示す。ジクロフェナクナトリウムはシグマ社製の特級品を購入して使用した。カルボキシビニルポリマー、"HIVISWAKO 105"は和光純薬株式会社より、Azoneは住商ネルソン社より提供されたものを用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。



l-Menthol *dl*-Menthone 1,8-Cineole *p*-Menthane *d*-Limonene

Fig.1-1 Chemical structures of cyclic monoterpenes used in this study

2-2 ゲル軟膏の調製

ジクロフェナクナトリウムゲル軟膏の処方をTable 1-Iに示した。ゲル軟膏は以下の手順で調製した。まず、ジクロフェナクナトリウム、カルボキシビニルポリマー、トリエタノールアミンを精製水に溶解した。これとは別に、単環モノテルペンをエタノールに溶解した。これらの溶液を徐々に合わせ均一なゲルが形成されるまで攪拌した。調製したゲル軟膏は密封容器に入れて、室温で24時間以上静置したのち実験に供した。

2-3 in vivo経皮吸収実験

実験には、体重160-180 gのウイスター系雄性ラット（埼玉実験動物供給所、埼玉）を用いた。ラットをウレタン生理食塩水溶液（25%；3 ml/kg, i.p.）で麻酔後、背位固定し、腹部を電気バリカンを用いて除毛した。除毛皮膚にガラスセル（内径16 mm、高さ10 mm）を接着剤で固定し、その内部にゲル軟膏1.5gを適用した。セル上部をパラフィルムで覆うことにより、実験を通じて密封状態を維持した。適用後、0.5、1、2、4、6、8時間後に頸静脈より血液0.5 mlを採取した。これを遠心分離して、血漿0.2 mlを量り、内部標準物質として、*p*-ヒドロキシ安息香酸-*n*-ヘキシルエステルを含有するメタノール0.5 mlと混合した。これを再度遠心分離したのち、上清をメンブランフィルター（0.45 μ m）でろ過して、HPLCによる定量用試料とした。HPLCによるジクロフェナクの定量条件は以下の通りである。

測定装置：日立655形高速液体クロマトグラフ(Hitachi, Ltd. Tokyo Japan)

カラム：YMC PACKED COLUMN A-302 S-5
120A ODS

カラム温度：室温

移動相：メタノール：水（0.1%リン酸添加）= 73：27

流速：1.0 ml/min

測定波長：283 nm

検出感度：0.02 a. u. f. s.

試料注入量：30 μ l

Table 1-I
Formulae of diclofenac sodium
gel ointments containing
cyclic monoterpenes

Diclofenac sodium	2.0g
Carboxyvinyl polymer	2.0g
Triethanolamine	2.5g
Ethanol	30.0g
Cyclic monoterpene	1.0-5.0g
Water	ad 100.0g

2-4 血流速度の測定

ゲル軟膏適用部位における血流速度を、レーザー流速計 (Model ALF 2100, アドバンス社製) を用いて測定した。1-メントール含有ジクロフェナクナトリウムゲル軟膏を経皮吸収実験と同様に適用した。適用1時間後に、軟膏を除去し、直ちに測定を行った。

2-5 in vitro皮膚透過実験

フランツ型セルにラットの摘出腹部除毛皮膚を装着して、ドナーセルに種々のゲル軟膏を、レシーバーセルに pH 7.2 リン酸緩衝液を適用した³²⁾。実験は 37℃で行った。一定時間毎に、レシーバー溶液の一部を採取し、レシーバー側に透過したジクロフェナクナトリウム量を HPLC で定量した。

2-6 ラットにおけるジクロフェナクナトリウムの薬動学的パラメータの算出

ジクロフェナクナトリウムの生理食塩水溶液をウイスター系雄性ラットの頸静脈より静脈内投与した。一定時間毎に投与部位と反対側の頸静脈から採血して血中ジクロフェナク濃度を HPLC で定量した。この方法で得られた血中濃度を 1-コンパートメントモデルにあてはめ、ジクロフェナクの薬動学的パラメータを算出した。

2-7 単環モノテルペン類の物理化学的特性の測定

2-7-1 ジクロフェナクナトリウムの溶解度の測定

1%テルペン含有エタノール/水混合液 (体積比 3:7) 中のジクロフェナクナトリウムの溶解度を調べた。これらの溶液に過剰量のジクロフェナクナトリウムを加え、攪拌しながら 24 時間、37℃に保った。上清中のジクロフェナクナトリウム濃度を HPLC で定量して、溶解度を求めた。

2-7-2 ジクロフェナクナトリウムの分配係数の測定

pH 7.2 リン酸緩衝液/*n*-オクタノール間のジクロフェナクナトリウムの分配係数に対する、テルペン類の影響を調べた。1%テルペン含有の *n*-オクタノールと、ジクロフェナクナトリウムを溶解した、pH 7.2 リン酸緩衝液を混合して 24 時間、37℃に保った。遠心分離し

て、それぞれの層中のジクロフェナクナトリウムの濃度をHPLCで定量した。

第3節 単環モノテルペン類の促進効果

Figure 1-2に示すように、ジクロフェナクナトリウムの吸収は、*l*-メントールまたは*dl*-メントンの共存により、テルペンを含まないコントロールに比較して著明に促進された。すでに報告されているように、インドメタシンやケトプロフェンのような脂溶性薬物の経皮吸収において効果の大きかった*d*-リモネンの効果は比較的弱かった^{24, 25)}。BarryとWilliams^{33, 34)}は、1,8-シネオールが*in vitro*ヒト死体皮膚において5-フルオロウラシルの透過に対して、極めて有効であるが、炭化水素系テルペンの効果は小さいことを報告している。一方、ユーカリ油とカンフルは、摘出ヘアレスマウスの皮膚におけるニコチンのフラックスを増加させることが報告されている³⁵⁾。また、テルピネオールとアセチルテルピネオールは、ヘアレスマウスの皮膚におけるプレドニゾロンの拡散性を促進する³⁶⁾。このように、テルペンの経皮吸収促進効果は薬物や適用条件によって異なっており、薬物や基剤成分の物理化学的性質に密接に関連していることが示唆された。

そこで、これらのテルペン類の吸収促進機構を知る目的で、まず初めにゲル軟膏中のジクロフェナクナトリウムの熱力学的性質に及ぼすテルペンの影響を検討した³⁷⁾。すなわち、それぞれのテルペン1%を含有する30%エタノール/水混合液中でのジクロフェナクナトリウムの溶解度及びこれらのテルペンを含有する*n*-オクタノール/pH7.2リン酸緩衝液間のジクロフェナクナトリウムの分配係数を測定した。その結果、Table 1-IIに示すように、ジクロフェナクナトリウムの溶解度及び分配係数は、テルペンの添加による影響をほとんど受けなかった。従って、*l*-メントールと*dl*-メントンに認められた促進活性は、これらのテルペンが皮膚に対して直接作用し、その障壁能を低下させたことによると考えられる。

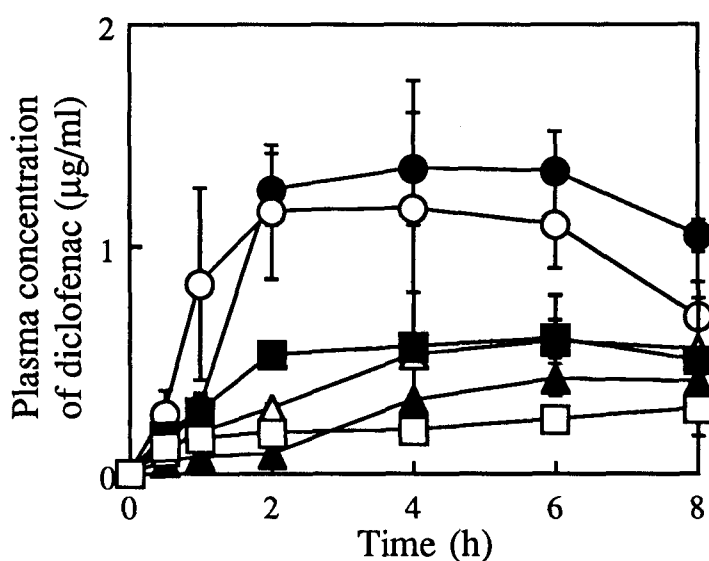


Fig.1-2 Effect of cyclic monoterpenes on the percutaneous absorption of diclofenac from gel ointments containing 1 % terpenes in rats.

●, *l*-menthol; ○, *dl*-menthone; ▲, 1,8-cineole; △, *p*-menthane; ■, *d*-limonene; □, control.

Each point represents the mean \pm S.D. for three determinations.

Table 1-II

Solubility of diclofenac in 30 % ethanol - water containing 1 % cyclic monoterpenes at 37°C, and the partition coefficients (K) of diclofenac sodium between *n*-octanol containing 1 % cyclic monoterpenes and buffer solution (pH7.2) at 37°C.

Cyclic monoterpene	Solubility of diclofenac sodium (g/l)	log K
<i>l</i> -Menthol	179.3	1.27
<i>dl</i> -Menthone	176.4	1.29
1,8-Cineole	180.9	1.23
<i>p</i> -Menthane	178.8	1.23
<i>d</i> -Limonene	182.6	1.23
Control	161.3	1.28

第4節 I-メントールとAzoneの比較

次に、I-メントールの吸収促進活性を、既存の促進剤であるAzoneと比較した。Figure 1-3に、ジクロフェナクの C_{max} と AUC_{0-8h} に対する、I-メントールとAzoneの影響を示す。 C_{max} および AUC_{0-8h} は、ゲル軟膏中のI-メントールの濃度上昇に伴って直線的に増大したが、それとは対照的に、Azoneの場合には両パラメータは2%までは増加し、それ以上の濃度では逆に減少する傾向を示した。結果として、3-5%までの濃度ではI-メントールの促進活性が有意に大きかった。さらに、I-メントール含有ゲル軟膏の適用では、ジクロフェナクナトリウムの血中濃度は速やかに定常状態に到達し、その濃度が長時間にわたって維持された。一方、Azone含有ゲル軟膏の適用では、ジクロフェナクナトリウムの吸収は比較的遅く、血漿中濃度は徐々に増大した。

Figure 1-4は、in vitro透過実験より得られた、ジクロフェナクナトリウムの定常状態のフラックスと透過のラグタイムを示したものである。in vivo実験で得られた結果と同様に、ゲル軟膏中のI-メントール濃度の増加に伴ってフラックスは増加し、またラグタイムは2.8時間（I-メントール無しの場合）から1.0時間（3%I-メントール添加の場合）へと減少し定常状態のフラックスはin vivo実験の C_{max} および AUC_{0-8h} によく対応した。

次に、I-メントールを配合したゲル軟膏適用部位の血流速度をレーザー血流計を用いて測定した。その結果、Fig.1-5に示すように、ゲル軟膏の適用による血流の変化はほとんど認められず、むしろ、I-メントール濃度の増大とともに血流速度が僅かに低下する傾向がみられた。従って、適用部位の血流改善による吸収性の増大は考えられず、またジクロフェナクナトリウムの物理化学的性質に対してテルペン類はほとんど影響を与えないことから、これらの化合物の作用部位は皮膚であり、角質層に直接作用することによって、その障壁能を変化させることが示唆された。

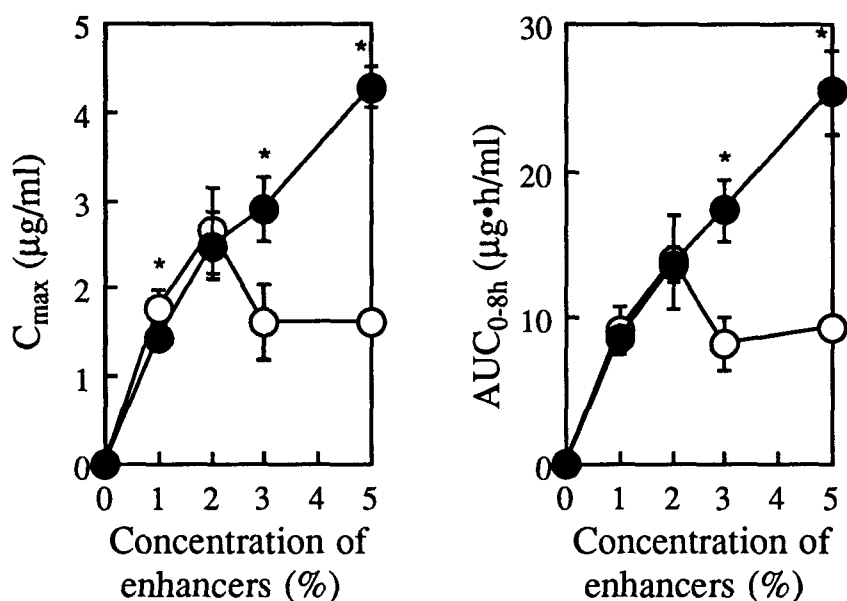


Fig.1-3 Effect of *l*-menthol and Azone on the percutaneous absorption of diclofenac in rats *in vivo*.

●, *l*-menthol; ○, Azone.

Each point represents the mean \pm S.D. for three determinations. Significant differences ($p < 0.01$) are denoted by asterisks.

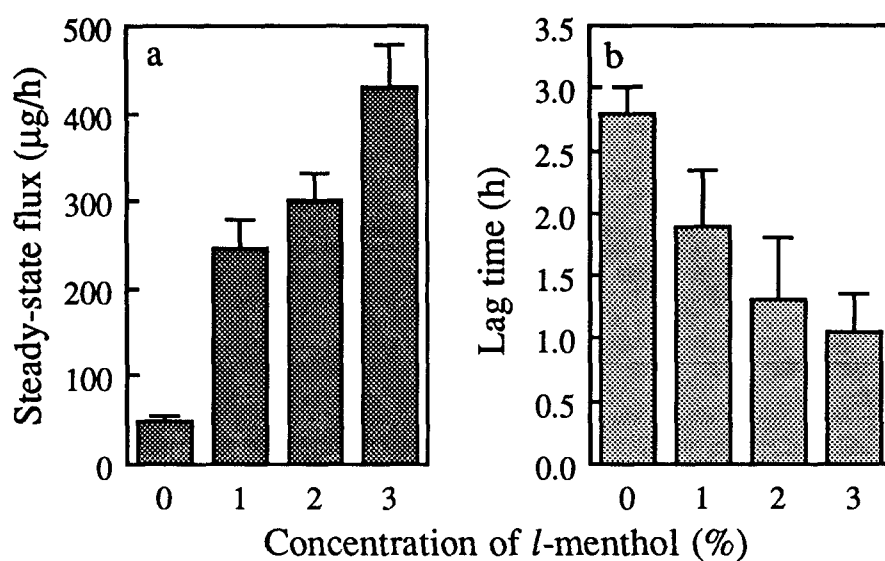


Fig.1-4 Effect of *l*-menthol concentration on the steady-state flux (a) and lag time (b) of diclofenac from excised rat skin *in vitro*. Each column represents the mean \pm S.D. for three determinations.

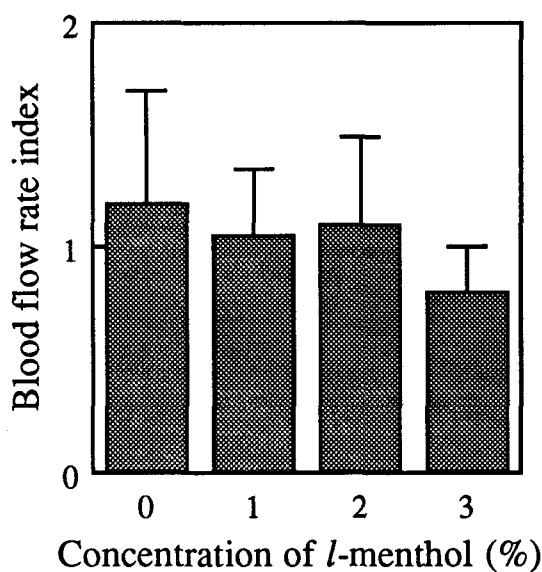


Fig.1-5 Effect of *l*-menthol concentration on blood flow rate in the application site of diclofenac sodium gel ointments in rats. Each column represents the mean \pm S.D. for three determinations. The blood flow rate index represents the blood flow rate 1 h after treatment with the gel ointment divided by the control value (no treatment with the gel ointment).

第5節 ジクロフェナクの血中濃度の予測

経皮吸収されたジクロフェナクは速やかに定常状態に到達する。そこで、*l*-メントール含有ゲル軟膏適用時のフラックスと薬動学的パラメータから薬物の定速注入の式(1-1)を用いて、ジクロフェナクの血中濃度の予測を試みた^{3,8)}。

$$C=FA/(K_{e1} \times V_d) \quad (1-1)$$

ここでCは、定常状態のジクロフェナクの血中濃度、Fは*in vitro*透過実験で得られた定常状態のフラックス、Aは透過面積、 V_d は分布容積、 K_{e1} は一次消失速度定数である。静脈内投与実験から得られたジクロフェナクの薬動学的パラメータをTable1-Ⅲに示す。ジクロフェナクナトリウムの投与量を変化させても、 V_d と K_{e1} の変動はほとんど認められない。従って、ラットでのジクロフェナクの薬物体内動態は用量に依存しないものと考えられる。Figure 1-6に示すように、実験で得られた血中濃度は式(1-1)による予測値と一致し、*in vitro*で得られた定常状態のフラックスは、*in vivo*での経皮吸収をよく反映することがわかった。従って、ジクロフェナクナトリウムの経皮吸収における律速段階は、主に、皮膚角質層の透過過程であり、毛細血管の血流等生理的因子の影響は無視し得ると考えられる。また、*l*-メントールの作用部位は皮膚角質層であり角質層の透過抵抗を低下させることによってジクロフェナクの経皮吸収を促進するものと推測される。

Table 1-III
**First order elimination rate constant (k_{el}) and
distribution volume (V_d) of diclofenac sodium
in rats**

Parameter	Dose (mg)	
	0.2	0.5
$k_{el} (h^{-1})$	5.96±1.35	6.19±0.85
$V_d (ml)$	35.0±7.1	40.9±4.8

Each value represents the mean \pm S.D. for three determinations.

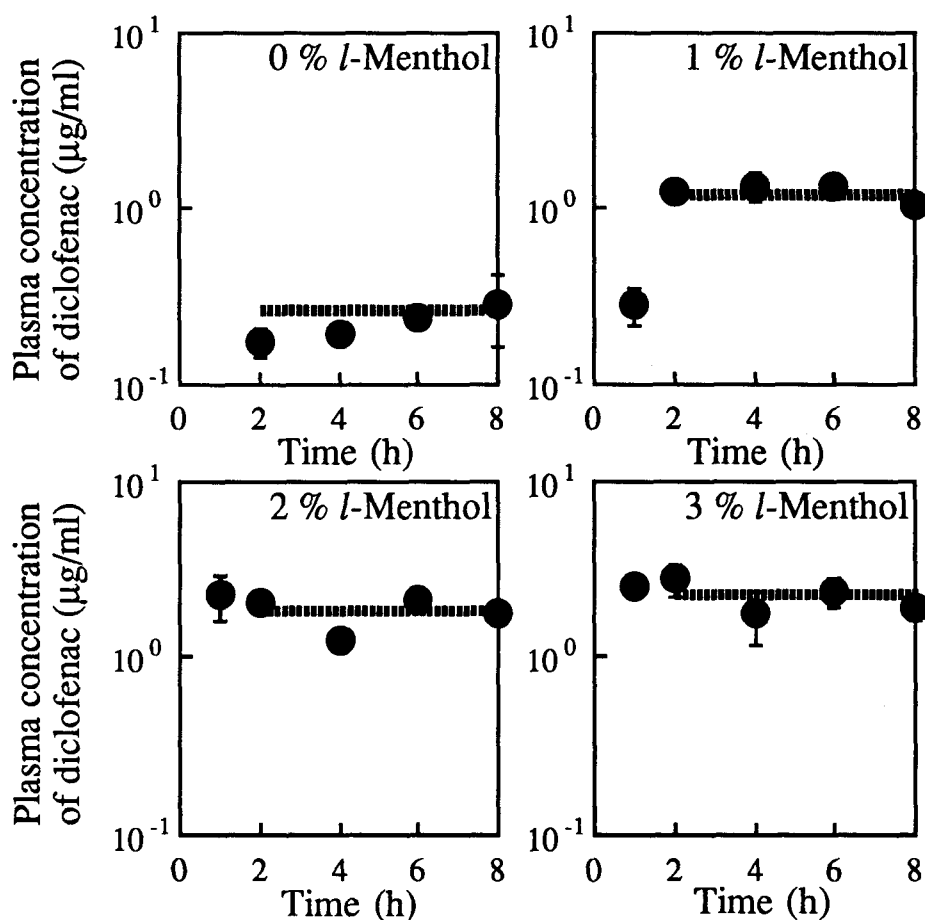


Fig.1-6 Prediction of plasma concentration of diclofenac following application of gel ointments containing varying amounts of *l*-menthol. Shaded areas are the predicted range of plasma concentrations of diclofenac, calculated from the mean values of *in vitro* steady-state flux (Fig.1-4) and pharmacokinetic parameters (Table 1- III). Each point represents the mean \pm S.D. for three determinations.

第6節 本章のまとめ

テルペン1%、エタノール30%を含有するゲル軟膏からのジクロフェナクナトリウムの経皮吸収は、*l*-メントールを配合することによって著明に増大した。また、既存の吸収促進剤であるAzoneには至適濃度が存在したのに対して、*l*-メントールの効果は濃度依存的であった。さらに、*in vitro*皮膚透過実験から得られたジクロフェナクナトリウムの透過フラックスを用いることにより、*in vivo*における血中濃度を精度よく予測でき、これより経皮吸収の律速は皮膚角質層の透過過程であると推測された。

第2章 ジクロフェナクナトリウムの経皮吸収に及ぼす単環モノテルペン類とエタノールの協同効果

第1節 序論

前章における検討から、ジクロフェナクナトリウムの経皮吸収に対しては1-メントールが有効な促進剤であることが明かとなったが³¹⁾、これはゲル軟膏中のエタノール添加量が30%に固定された条件下で得られたものである。インドメタシンやケトプロフェン等の薬物を用いた実験は軟膏中エタノール添加量がより多い条件下で行われていることを考慮すると、テルペン類の活性とエタノール添加量の関連性を明確にする必要があると思われる。

本章では、第1章と同様にラットを用いたin vivo実験により、ジクロフェナクナトリウムの経皮吸収に対するテルペン類とエタノール添加量の関連性を統計的手法を用いて評価することを試みた。すなわち、テルペン添加量とエタノール添加量を要因とする二元配置の実験計画を導入し、8時間までのみかけのAUC (AUC_{0-8h})を促進活性の指標として分散分析を行い、各要因の寄与を検討した³⁹⁾。

第2節 実験の部

2-1 試薬

第1章 2-1と同様の試薬を用いた。

2-2 ゲル軟膏の調製

二元配置の実験計画に基づいて、テルペン及びエタノールの添加量を割り付け、ジクロフェナクナトリウムおよびジクロフェナクのゲル軟膏の処方を調製した。ここで、テルペンの添加量は1、2、3%及びエタノールの添加量は、20、30、40%の3水準とした。

2-3 in vivo経皮吸収実験

第1章 2-3と同様に操作して経皮吸収実験を実施した。

2-4 統計的解析

実験結果の解析には、二元配置分散分析を用いた。計算は、デスクトップデジタルコンピュータ（PC-9801RX, NEC Corp.）により行った。

第3節 エタノール濃度の影響

まず最初にテルペン添加量を1%に固定し、エタノール添加量の影響を検討した。種々の濃度のエタノールを添加したゲル軟膏を用いて行ったin vivo実験の結果を、Fig.2-1に示す。8時間までの見かけのAUC (AUC_{0-8h})を台形則を用いて計算し、それぞれのテルペンの促進効果を比較するための指標とした。

ゲル軟膏中のエタノール濃度が20%のとき、1,8-シネオールが最も効果的だったが、それぞれのテルペンの促進活性はコントロールに比較してそれほど小さくなく、促進効果の差異も小さかった(Fig.2-1A)。このような結果が得られた理由として考えられるのは、ゲル軟膏中のエタノール添加量が少ないために促進活性を発揮するのに十分なテルペン量が溶解できなかったことが考えられる。

これに比べて、30%エタノールでは、*l*-メントールや*dl*-メントンの効果が大きかった(Fig.2-1B)。

さらに、エタノール添加量を増やした40%エタノールの場合には、*d*-リモネンが最も効果的であり、また、各テルペンの促進効果の差が明確にあらわれた(Fig.2-1C)。全体として、エタノール濃度が小さいと、1,8-シネオールや*l*-メントールのような相対的に親水性のテルペンの方が効果が高かった。一方、*d*-リモネンや*p*-メンタンのような疎水性テルペンは、エタノール濃度が大きくなると強い促進活性を示した。

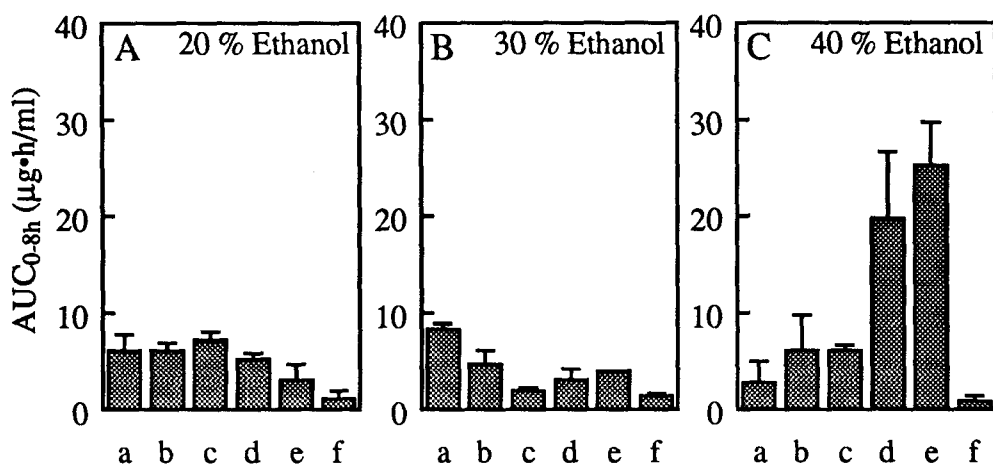


Fig.2-1 Effect of concentration of ethanol on the percutaneous absorption of diclofenac sodium under the existence of various terpenes (1 %).

Each column represents the mean \pm S.D. for three determinations.
a; *l*-Menthol, b; *dl*-Menthone, c; 1,8-Cineole, d; *p*-Menthane,
e; *d*-Limonene, f; Control.

第4節 テルペンとエタノールの協同効果

次に、各エタノール添加量毎に最も促進効果の大きかった3種類のテルペン類（1,8-シネオール、*l*-メントール、*d*-リモネン）を用いて、ジクロフェナクナトリウムの経皮吸収に対するこれらのテルペン添加量とエタノール添加量の関連性を評価するために、二元配置の実験計画を導入した。これに基づいてゲル軟膏を調製して、*in vivo*実験を行い、ジクロフェナクの血中濃度から促進活性の指標として AUC_{0-8h} を算出した。これにより得られた結果をFig.2-2に示す。また、分散分析の結果をTable 2-Iに示す。

まず、20%エタノールで最も促進効果の大きかった1,8-シネオールの場合には、3%のシネオールと、30%エタノールが処方された時、 AUC_{0-8h} が特徴的に増大した(Fig.2-2a)。分散分析の結果、1,8-シネオールとエタノールの交互作用は、 AUC_{0-8h} の増加に対して高度に有意であった。

また、30%エタノールで効果のあった*l*-メントールの場合には、2%または3%の添加量と40%エタノールとの組み合わせで促進効果が高く、*l*-メントールもエタノールも相対的に高濃度に処方された場合に促進活性がより強くなることが示唆された(Fig.2-2b)。上述の1,8-シネオールの場合と同様に、*l*-メントールとエタノールの交互作用は AUC_{0-8h} の増加に対して高度に有意であった。一方、*d*-リモネンにおいては、*d*-リモネン濃度とエタノール濃度の増大に伴って、 AUC_{0-8h} の上昇が認められ(Fig.2-2c)、1,8-シネオールや*l*-メントールの場合と異なる挙動を示した。また、今回の実験範囲では、*d*-リモネンとエタノールの交互作用項の AUC_{0-8h} に対する寄与は認められなかった (Table 2-I)。以上のように、テルペンの吸収促進活性発現にとってエタノールの存在は重要であるが、両者の協同効果はテルペンの種類によって大きく異なることが観察された。

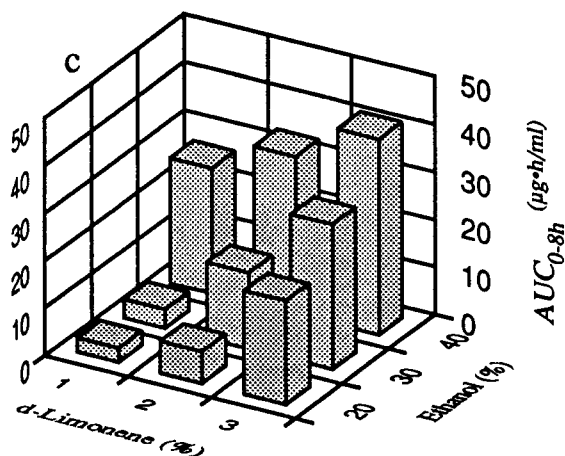
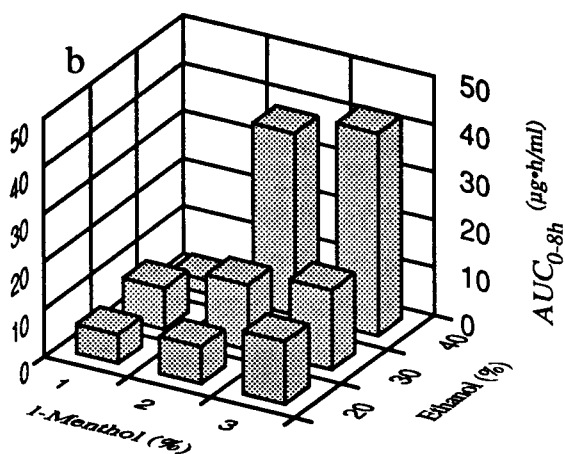
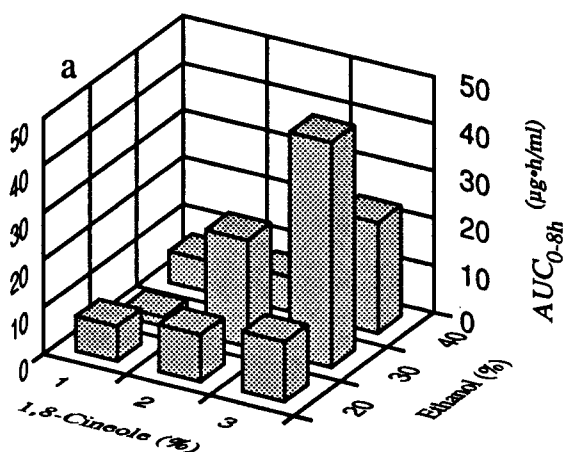


Fig.2-2 Effect of differing concentration of terpenes and ethanol on AUC_{0-8h} determined in diclofenac sodium gel ointments. Each column represents the mean of three determinations.

Table 2-I
ANOVA table for AUC_{0-8h} calculated with
diclofenac sodium gel ointment

Factor	DF ^a	MS ^b	F _o ^c
1,8-Cineole	2	1184.7	142.5 ^d
Ethanol	2	512.3	61.6 ^d
Interaction	4	338.0	40.6 ^d
Error	18	8.3	—
<i>l</i> -Menthol	2	827.7	85.1 ^d
Ethanol	2	872.6	89.1 ^d
Interaction	4	343.8	35.3 ^d
Error	18	9.7	—
<i>d</i> -Limonene	2	918.9	73.0 ^d
Ethanol	2	1288.7	102.3 ^d
Interaction	4	35.1	2.7
Error	18	12.5	—

^aDegree of freedom.

^bMean square.

^cObserved *F* value.

^d*p*<0.01.

第5節 ジクロフェナクの経皮吸収

ここまではジクロフェナクのナトリウム塩を用いて実験を行ってきたが、次に、ナトリウムを除いた酸型のジクロフェナクを用いて同様に *in vivo* 実験を行い、ナトリウム塩の場合と比較した。

その結果、Fig.2-3に示すように、 AUC_{0-8h} の変化に対するテルペンとエタノール添加量の寄与はジクロフェナクナトリウムの場合とほとんど同様であったが (Table 2-II)、 AUC_{0-8h} の著明な減少が認められた。ゲル軟膏の pH は、ジクロフェナクを処方することによりジクロフェナクナトリウムに比較して約 0.3 の低下を示した。このようなゲル軟膏の pH 変化はジクロフェナクの分子形、イオン形の割合に直接影響するため、その吸収性は pH により大きく影響されることが示唆される。

第6節 ジクロフェナクの経皮吸収に対する pH の影響

ゲル軟膏の pH がジクロフェナクナトリウムの吸収にどのように影響するかについてさらに詳細に検討した。実験には、2% *l*-メントール / 40% エタノール処方のゲル軟膏を選択し、ゲル軟膏の pH は、トリエタノールアミン添加量で調整した。その結果、Fig.2-4に示すように、 AUC_{0-8h} は pH の上昇とともに増大し pH 6.5 で最大になった。それ以上 pH が上昇すると、 AUC_{0-8h} は若干低下した。pH の上昇に伴って、ジクロフェナクの溶解度は急激に増大するが、ゲル軟膏中のジクロフェナクは2%に固定されている。そのため高い pH 領域では、ジクロフェナクの熱力学的活動度が低下して AUC_{0-8h} の減少が生じたものと推測される。

一方、pH 6.5 以下では、ゲル軟膏中のイオン形ジクロフェナクの割合は pH の上昇に伴って増加することを考慮すると、経皮吸収における支配的な透過経路といわれる脂質経路とともに、イオン形ジクロフェナクの通過経路の存在も示唆された。

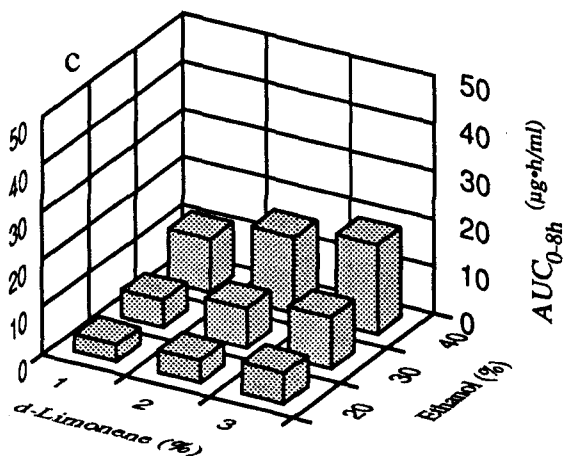
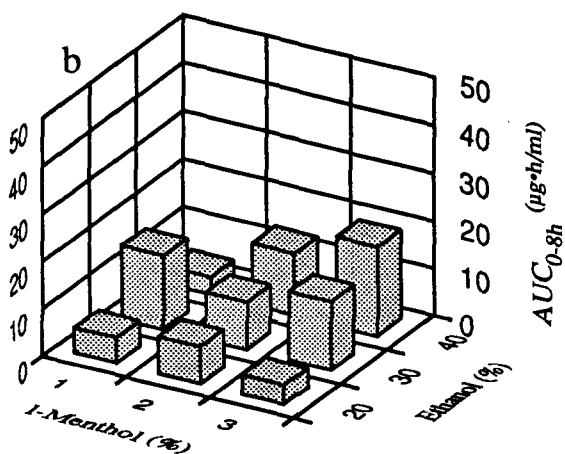
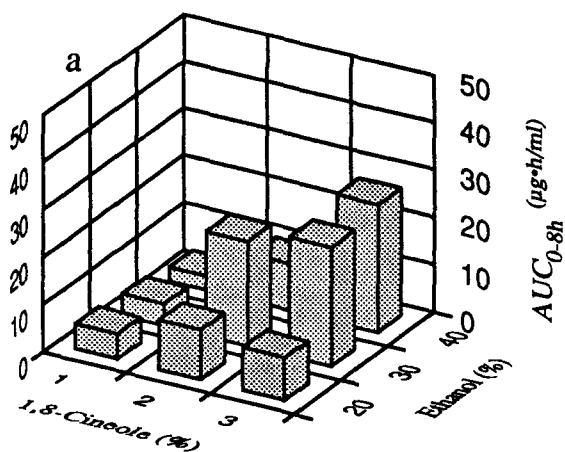


Fig.2-3 Effect of differing concentration of terpenes and ethanol on AUC_{0-8h} determined in diclofenac gel ointments. Each column represents the mean of three determinations.

Table 2-II
ANOVA table for AUC_{0-8h} calculated with
diclofenac gel ointment

Factor	DF ^a	MS ^b	F _o ^c
1,8-Cineole	2	595.5	92.5 ^d
Ethanol	2	180.1	28.0 ^d
Interaction	4	127.2	19.7 ^d
Error	18	6.4	—
<i>l</i> -Menthol	2	40.9	5.5 ^e
Ethanol	2	143.1	19.8 ^d
Interaction	4	85.9	11.7 ^d
Error	18	7.3	—
<i>d</i> -Limonene	2	59.1	19.4 ^d
Ethanol	2	264.9	86.9 ^d
Interaction	4	4.8	1.5
Error	18	3.0	—

^aDegree of freedom.

^bMean square.

^cObserved *F* value.

^d*p*<0.01.

^e*p*<0.05.

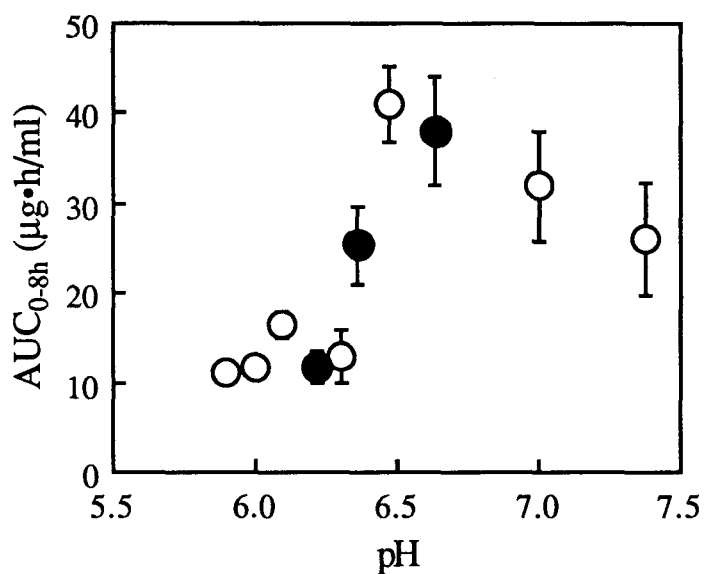


Fig.2-4 Effect of gel ointment pH containing 2 % *l*-menthol and 40 % ethanol on AUC_{0-8h}.
 ●, diclofenac sodium; ○, diclofenac.
 Each point represents the mean \pm S.D. for three determinations.

第7節 本章のまとめ

in vivo実験におけるジクロフェナクナトリウムの経皮吸収に対して、処方中のエタノールとテルペンの促進活性における交互作用を検討したところ、テルペンの活性発現にはエタノールの共存が必須であることがわかった。最大の活性を得る上で必要な両者の添加量はテルペンの種類によって大きく異なることが観察された。さらに、ジクロフェナクの経皮吸収にはゲル軟膏のpHの影響が大きく脂質経路とともにイオン形の透過経路の存在も示唆された。

第3章 分子形及びイオン形ジクロフェナクの皮膚透過に対するエタノールの影響

第1節 序論

前章までの実験により、ジクロフェナクの経皮吸収はテルペンの種類や添加量、また、エタノールの添加量やゲル軟膏のpHによって大きく影響を受けることが明らかとなった^{31, 39)}。しかしながら、*in vivo*実験を通して得られる結果は、生体側の因子を含めて非常に多くの要因を包含しているために透過促進の機構を明らかにするうえで、有用な情報を得ることは困難である。従って、ジクロフェナクの皮膚透過性に及ぼす要因の解析を行うためには、摘出皮膚を用いた*in vitro*透過実験を行うことが望ましい。透過実験を行うにあたっては、ヒト皮膚の利用が理想的ではあるが、我が国においては、入手がきわめて困難であるため、通常、動物の皮膚を使用することになる。ヘアレスマウスやヘアレスラットの皮膚をはじめとして、表面が角化していることからハムスター頬袋などが用いられている^{40, 41)}。近年では、ヘビの抜け殻を利用する試みも進められている^{42, 43)}。また、動物の皮膚の代替としてその透過性を再現し得る合成膜の利用も検討されている⁴⁴⁾。

透過実験に用いるセルにも数種類の形が知られている。実際製剤の評価にはフランチ型セル（垂直型セル）が使いやすいが、薬物の透過速度や透過係数を求めるためには、2-チャンバー拡散セル（水平型セル）の利用が望ましい⁴⁵⁾。本章では、ジクロフェナクの皮膚透過性に及ぼす要因を明らかにするために、まず、エタノールの促進作用に着目した。エタノールは、よく知られた促進剤であり、しばしば、市販の軟膏の主要な処方成分になっている。Nishihata⁴⁶⁾らは、ジクロフェナクの経皮吸収に対するエタノールの促進効果を報告している。著者は、単環モノテルペン類の促進作用の発現にはエタノールの共存が必須条件であることを明らかにした。さらに、ジクロフェナクの吸収量全体に対するイオン形の寄与が無視できないことを示唆した³⁹⁾。

そこで、本章では、ヘアレスラットの腹部皮膚を装着した2-チャンバー拡散セルを利用することにより、ジクロフェナクの皮膚透過現象を、分子形とイオン形のそれぞれに分けて検討し、両分子種の透過に対する

エタノールの効果を定量的に解析した。

薬物の皮膚透過経路については、Higuchiら⁴⁷⁾のグループが提唱する、皮膚は脂質と細孔部分から成る角質層とその下のヒドロゲル様の真皮から構成されると考えるモデルを用いた考察が一般的であるが、これに対して、PottsとGuy⁴⁸⁾は、薬物の透過性を考察するには分子量や分子容積を考えるべきでそのような方法においては細孔を仮定する必要がないと述べている。本章では、ジクロフェナクの皮膚透過の機構に対する若干の考察も加えた⁴⁹⁾。

第2節 実験の部

2-1 試薬

ジクロフェナクナトリウムはエスエス製薬株式会社より提供されたものを用いた。ジクロフェナクナトリウムを、酸性条件下（0.1N HCl）で、再結晶することによりジクロフェナクを得た。得られたジクロフェナクの純度は元素分析の結果からはほぼ100%であった。

2-2 皮膚透過実験

ウォータージャケット型2-チャンバー拡散セル（37℃、有効拡散面積：0.785 cm²、セル容積3.0 ml）に、ヘアレスラット（WBN、埼玉実験動物供給所、埼玉）の摘出腹部皮膚を装着した⁵⁰⁾。ドナーセルにジクロフェナク懸濁液（pHはMcIlvaine緩衝液で調整）を適用した。レシーバーセルには、pH 7.2リン酸緩衝液を適用した。一定時間毎に、レシーバー溶液の一部を採取して、透過したジクロフェナク量を、HPLCで定量した。透過実験は8時間まで行い、得られた累積透過量は、時間に対して十分な直線性を示した。

2-3 ドナー液の調製

過剰量のジクロフェナク（溶解度の約10倍）をMcIlvaine緩衝液または種々の混合比から成るMcIlvaine緩衝液とエタノールとの混合液に加え、KClでイオン強度を一定とした（0.5 M）⁵¹⁾。

2-4 薬物溶解度の測定

ジクロフェナク懸濁液を、37℃で24時間攪拌し、メンブランフィルター（0.45 μm ）を用いてろ過したのち、ろ液中のジクロフェナク濃度を紫外部分光光度法により求めた。なお、測定は283 nm付近の λ_{max} により行った。

第3節 ジクロフェナクの皮膚透過に対するpHの影響

Figure 3-1aに緩衝液系におけるジクロフェナクの定常状態のフラックスに対するドナー液のpHの影響を示した。ジクロフェナクの定常状態のフラックスはジクロフェナク懸濁ドナー液のpHの増加に伴って増大した。この現象は前章におけるin vivo実験の結果とよく一致している³¹⁾。ジクロフェナクの溶解度は、ドナー液のpHの上昇に伴ってイオン形ジクロフェナクの量が増加することにより増大した。従って、pHの高い領域でのフラックスの増大は、主に、ドナー液中のイオン形ジクロフェナクの溶解度の増大により惹起され则认为られる。また、この結果は皮膚を經由するジクロフェナクの透過に対して、イオン形ジクロフェナクの寄与が無視できないことを示唆している。緩衝液系のジクロフェナクの定常状態の透過係数をFig.3-1bに示した。pH 3-4で透過係数が最大になったがこれは皮膚表面の電荷が中和され皮膚の疎水性が最大になったことによると考えられる⁵²⁾。ドナー液中のpHがさらに上昇するとジクロフェナクの透過係数は有意に減少した。例えば、pH 3での透過係数はpH 7での透過係数よりおよそ100倍大きかった。ジクロフェナクの pK_a は、水溶液中25℃の条件下で4.7と報告されていることから⁵³⁾、ジクロフェナクはpH 3ではほぼ分子形、pH 7ではほぼイオン形として存在すると考えられる。このことはジクロフェナクの皮膚透過がpH分配説によって概ね説明されるものの、イオン形ジクロフェナクの寄与も無視できないことを示唆している。

第4節 ジクロフェナクの溶解度に対するエタノールの影響

エタノールの共存下、すなわちコソルベント中のジクロフェナクの pK_a は以下の式により算出できる。

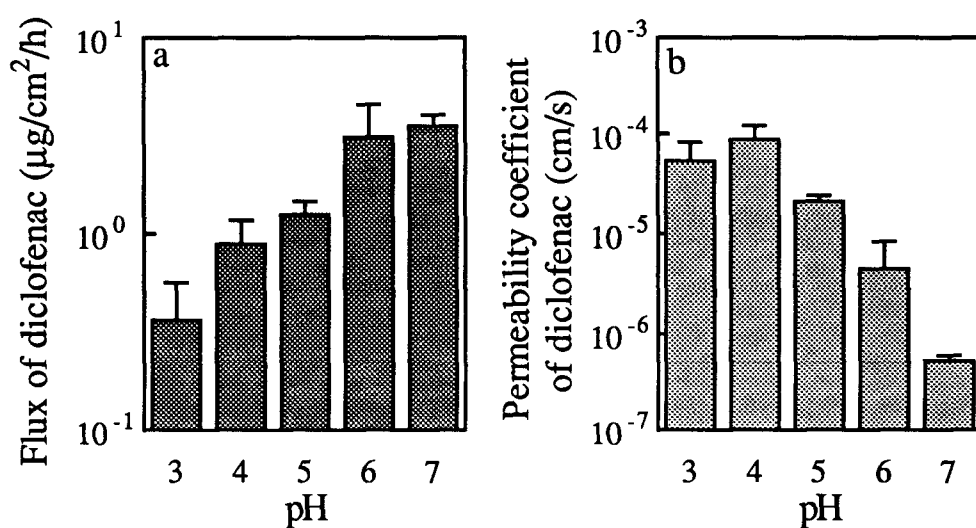


Fig.3-1 Effect of pH on flux and permeability coefficient of diclofenac in buffer system.

Each column represents the mean \pm S.D. for three determinations.

$$pK_a = pH - \log\{(S - S_0)/S_0\} \quad (3-1)$$

ここで、Sは各pHでのジクロフェナクの溶解度、 S_0 は分子形ジクロフェナクの溶解度である（pH2で測定）。エタノールを含有する種々のpHの溶媒中でのジクロフェナクの溶解度を、Table 3- I にまとめた。 pK_a は溶解度データを用いて式(3-1)より計算し、Table 3- I に載せた。Figure 3-2に示すようにジクロフェナクの pK_a はエタノール濃度の増大に伴って上昇し、エタノールの重量分率fに対して式(3-2)に示す関係が得られた。このことは分子形、イオン形の割合は同じpHであってもエタノール濃度の影響を受けることを示唆している。

$$pK_a = 2.49f + 4.05 \quad (3-2)$$

Figure 3-2に示すように、ドナー液中の分子形ジクロフェナクの割合はエタノール濃度の増大に伴って増加する。一般的に、コソルベントは溶液中の薬物の溶解度を上昇させることが知られており、薬物分子がコソルベント中で分子形として存在する場合には、その溶解度 S_c は以下のように表される⁵⁴⁾。

$$\log S_c = \log S_w + \sigma f \quad (3-3)$$

ここで σ はコソルベントの溶解力を意味するパラメータ、 S_w は水溶液中での薬物の溶解度である。Table 3- I に示した pK_a と溶解度を用いることにより、種々の割合でエタノールを含有するコソルベント中での分子形及びイオン形ジクロフェナクの溶解度（ S^n, S^i ）を求めることができる。Figure 3-3に示すように、分子形もイオン形もその溶解度はエタノール濃度の上昇とともに増加し、式(3-3)が分子形ジクロフェナクだけでなくイオン形ジクロフェナクにも適用できることを示唆している。これらの直線の傾きから分子形の σ 値として7.19、イオン形の σ 値として3.28が得られた。従ってコソルベント中の分子形及びイオン形ジクロフェナクの溶解度は、以下の式によって推定し得る。

$$S_c^n = S_w^n \times 10^{7.19f} \quad (3-4)$$

Table 3-I
Solubility of diclofenac (M)^{a)} in the media containing ethanol
at various pH and pK_a values estimated using the solubility data.

Ethanol (w/w%)	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pK _a ^{b)}
0	5.30x10 ⁻⁶	5.89x10 ⁻⁶	8.34x10 ⁻⁶	5.11x10 ⁻⁵	4.84x10 ⁻⁴	5.90x10 ⁻³	4.07
20	9.14x10 ⁻⁵	9.14x10 ⁻⁵	1.18x10 ⁻⁴	4.62x10 ⁻⁴	2.46x10 ⁻³	3.46x10 ⁻²	4.49
30	7.26x10 ⁻⁴	7.32x10 ⁻⁴	8.90x10 ⁻⁴	1.79x10 ⁻³	8.63x10 ⁻³	9.44x10 ⁻²	4.83
40	3.79x10 ⁻³	4.77x10 ⁻³	5.23x10 ⁻³	8.92x10 ⁻³	2.22x10 ⁻²	9.98x10 ⁻²	5.05

^{a)} Data were shown as average of three determinations.

^{b)} pK_a values were calculated from Eqn 3-1 by using the solubility data at pH 2 as S₀

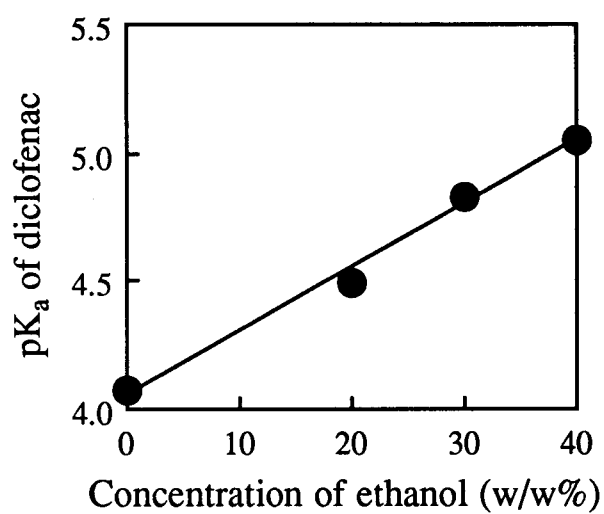


Fig.3-2 pK_a Values of diclofenac determined at various concentrations of ethanol.

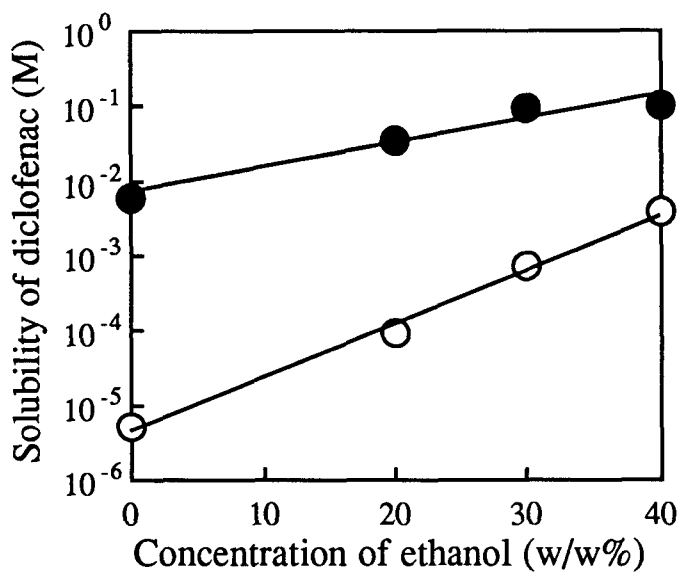


Fig.3-3 Effect of ethanol on solubility of the nonionized (S^n) and ionized (S^i) forms of diclofenac.

○, S^n ; ●, S^i .

Slopes of solid line (σ value) are of 7.19, S^n ; 3.28, S^i .

Each point represents the mean of three determinations.

$$S_c^i = S_w^i \times 10^{3.28f} \quad (3-5)$$

ここで、 S_w^n は緩衝液中の分子形ジクロフェナクの溶解度を意味し、実験的にはpH 2での溶解度 S_0 にほぼ等しい値であると考えられる。

一方、 S_w^i は緩衝液中のイオン形ジクロフェナクの溶解度である。式(3-1)より緩衝液中におけるジクロフェナクの各pHにおけるジクロフェナクの溶解度 S_w は次の式で与えられる。

$$S_w = S_w^n (1 + 10^{pH - pK_a}) \quad (3-6)$$

ここで、 S_w^n は式(3-1)の S_0 で置き換えることができるから、式(3-6)をコソルベントに適用した場合、コソルベント中のジクロフェナクの溶解度 S_c は以下のようになる。

$$S_w = S_c^n (1 + 10^{pH - pK_a}) \quad (3-7)$$

式(3-7)における S_c^n と pK_a は式(3-2)および式(3-4)を代入することにより次のように表される。

$$\begin{aligned} S_c &= S_w^n \times 10^{7.19f} (1 + 10^{pH - 4.05 - 2.49f}) \\ &= S_0 \times 10^{7.19f} (1 + 10^{pH - 4.05 - 2.49f}) \end{aligned} \quad (3-8)$$

コソルベント中の各pHにおけるジクロフェナクの溶解度を式(3-8)を用いて計算した結果、Fig.3-4に示すように実験値とよく一致した。このことは式(3-7)がエタノールを含有するコソルベント中の分子形及びイオン形ジクロフェナクの割合を見積もるために適用し得ることを示唆している。

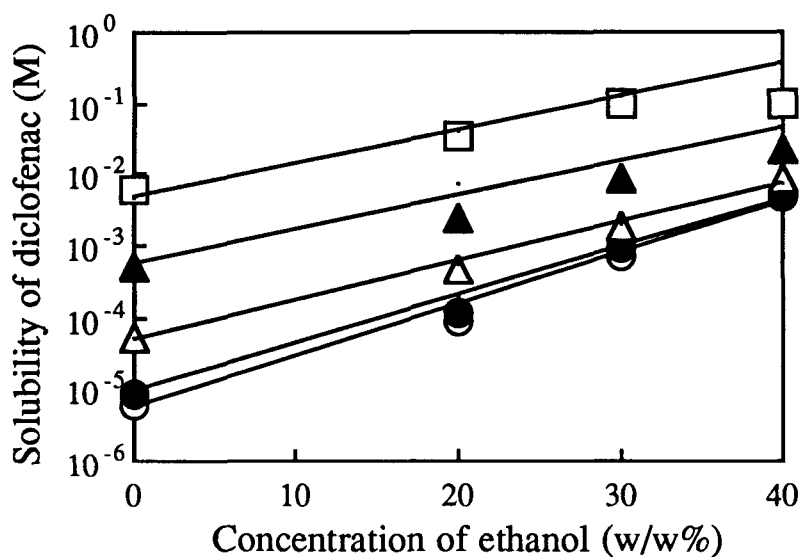


Fig.3-4 Solubilities of diclofenac in the cosolvent at various pH values.

○, pH 3; ●, pH 4; △, pH 5; ▲, pH 6; □, pH 7.

Each point represents the mean of three determinations.

Each line was obtained by using Eqn (3-8).

第5節 ジクロフェナクフラックスと透過係数に対するエタノールの効果

ジクロフェナクの定常状態のフラックスに対するドナー液中のエタノールの効果を広範なpHにわたって検討した。その結果をFig.3-5に示す。いずれの条件下でも緩衝液系に比べてフラックスは約10倍の増大を示した。Figure 3-6に種々のエタノール濃度におけるジクロフェナクの透過係数を示す。20%エタノールでは、緩衝液系に比べて透過係数は約1/10だった。このことはドナー液へのエタノールの添加は透過係数の減少を導くことを示唆している。この減少はドナー液へのエタノールの添加による溶解度の上昇とほぼ反比例の関係にあった。従って、エタノールの添加によるジクロフェナクのフラックスの増大はエタノールの皮膚への直接作用よりも、むしろドナー液中ジクロフェナクの溶解度の増大によって引き起こされたと考えられる。30%、40%エタノールでも同様の傾向が認められたがpHの変化による効果は20%エタノールの場合より小さくなった。次に、分子形及びイオン形ジクロフェナクの透過係数に対するエタノールの効果について検討した。全体の透過フラックスは、分子形のフラックスとイオン形のフラックスの和であると仮定すると、以下に示す式(3-9)が誘導される⁵⁵⁾。

$$J^t = P^n C^n + P^i C^i \quad (3-9)$$

ここで P^n と P^i はそれぞれ分子形、イオン形ジクロフェナクの透過係数である。 C^n と C^i は、同様にドナー液中の濃度を表している。これらの値は、以下に示すHenderson-Hasselbalchの式から得られる。

$$C^n = C^t - C^i \quad (3-10)$$

$$C^i = C^t / \{1 + 10^{(pH - pK_a)}\} \quad (3-11)$$

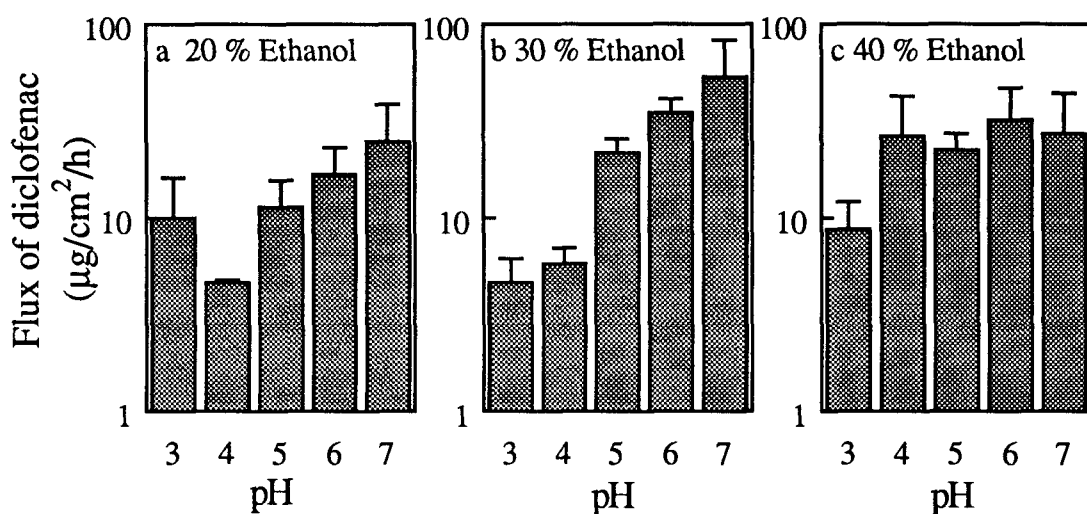


Fig.3-5 Effect of pH on flux of diclofenac in hairless rat skin at various concentrations of ethanol.
Each column represents the mean \pm S.D. for three determinations.

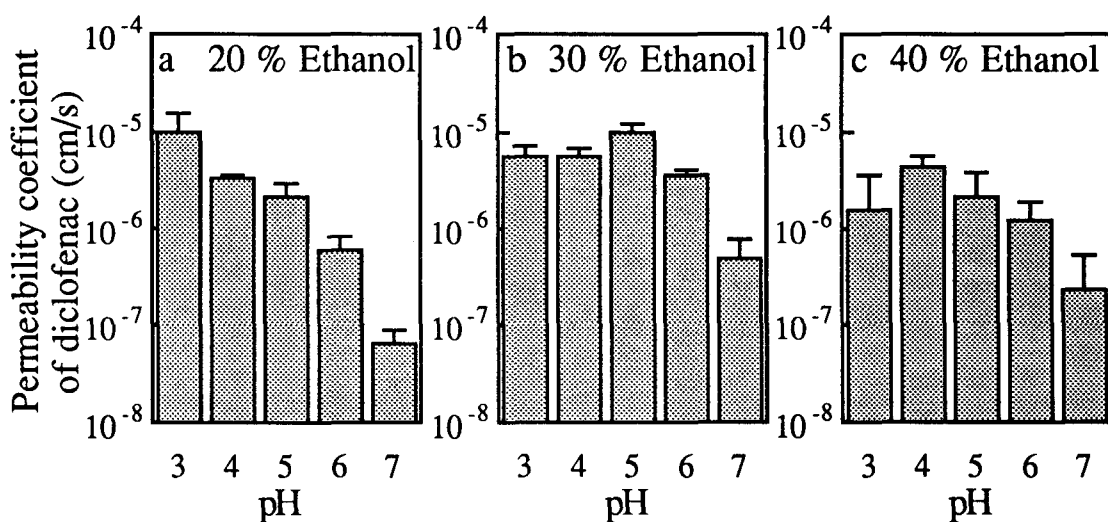


Fig.3-6 Effect of pH on permeability coefficient of diclofenac in hairless rat skin at various concentrations of ethanol. Each column represents the mean \pm S.D. for three determinations.

ここで C^t はドナー液中のジクロフェナクの総濃度である。ドナー液中のジクロフェナクは懸濁状態であるので、ここではジクロフェナクの溶解度を、 C^n と C^i を予測するための C^t として用いた。分子形、イオン形ジクロフェナクの透過係数はpH 4とpH 6の実験値を用いて式(3-9)より算出した。得られた結果は、Fig.3-7に溶解度測定の結果とともに示した。分子形の透過係数は、ドナー液中のエタノール濃度の増大に伴って有意に減少した。これは、ドナー液中の分子形の溶解度が上昇したことにより、ドナー液と皮膚表面間の分配係数が低下し、その結果、分子形の透過係数が減少したものと考えられる。一方、イオン形の透過係数はエタノールの添加によってさほど大きな影響を受けなかったが、ドナー液中のエタノール濃度が低いとき（20%）には分子形と同様に減少する傾向を示した。イオン形の透過機構として皮膚の細孔を経由する経路を仮定すると、透過係数の減少を説明できない。従って、イオン形も分子形と同様に、例えばイオンペアのような形で脂質経路を通過している可能性が示唆される。

第6節 透過係数の理論値と実験値の比較

第5節に示したエタノールの影響をより明確にするために、実験を通じて皮膚の構造変化が無いことを仮定して、分子形及びイオン形ジクロフェナクの透過係数に対するエタノールの影響を定量的に解析することを試みた。

薬物の分配係数 K_w は、皮膚中の薬物溶解度 S_m と緩衝液中の薬物溶解度 S_w の比で表される。

$$K_w = S_m / S_w \quad (3-12)$$

分子形ジクロフェナクの場合、皮膚とコソルベント間の分配係数 K_f は、式(3-4)と式(3-12)を用いて、次のように表される。

$$K_f = S_m / S_c = (S_m / S_w^n) \times 10^{-7.19f} \quad (3-13)$$

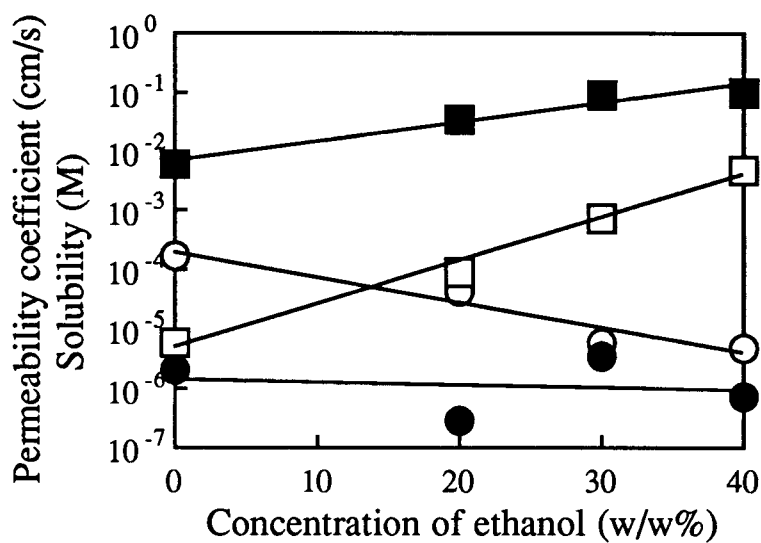


Fig.3-7 Permeability coefficient (P) and solubility (S) of diclofenac as a function of ethanol.

○, P^n ; ●, P^i ; □, S^n ; ■, S^i .

Each point represents the mean of three determinations.

もし、コンソルベントが皮膚中の薬物溶解度に影響を与えないなら、分子形ジクロフェナクの透過係数 P^n は次のように表される。

$$P^n = (K_f \times D) / h = \{(D/h) \times (S_m / S_w^n)\} \times 10^{-7.19f} \quad (3-14)$$

ここで、 D は皮膚中のジクロフェナクの拡散係数、 h は有効拡散距離を表している。 $\{(D/h) \times (S_m / S_w^n)\}$ は、緩衝液中の分子形ジクロフェナクの透過係数の実験値に等しいとおくことができる。従って、コンソルベント中の P^n の値は、式(3-14)により予測し得ると考えられる。もし、イオン形ジクロフェナクも皮膚中の脂質経路を、例えばイオンペアのような形で通過すると仮定すれば、イオン形ジクロフェナクの透過係数 P^i は、式(3-14)と同様に、以下のように誘導される。

$$P^i = \{(D/h) \times (S_m / S_w^i)\} \times 10^{-3.28f} \quad (3-15)$$

ここで、 $\{(D/h) \times (S_m / S_w^i)\}$ は、緩衝液中のイオン形ジクロフェナクの透過係数の実験値に等しい。式(3-14)及び(3-15)により予測された値と、実験により得られた値をFig.3-8に併せて示した。分子形もイオン形も、エタノール濃度が低い時は(20%)、予測値は実験値と良く一致した。エタノール濃度がさらに増大すると(30-40%)、実験値は上方へのずれを生じた。式(3-14)及び(3-15)は、ドナー液中のエタノールによって、透過経路の構造変化が起こらないという仮定に基づき誘導されているので、予測値の上方へのずれは、30-40%の比較的高濃度のエタノールによって皮膚の障壁能が低下したことによると推測される。

Ghanemら⁵⁶⁾は β -エストラジオール、ヒドロコルチゾン、マンニトール、臭化テトラエチルアンモニウムの透過に対するエタノールの効果を検討した。その結果、 β -エストラジオールのような脂溶性薬物の透過係数は、エタノールの添加によって低下することを示した。この現象は、Fig.3-8に示した、分子形ジクロフェナクの結果と一致している。しかしながら、マンニトールや臭化テトラエチルアンモニウムのような水溶性薬物の透過係数は、エタノール濃度の増加に伴って促進されると報告している。

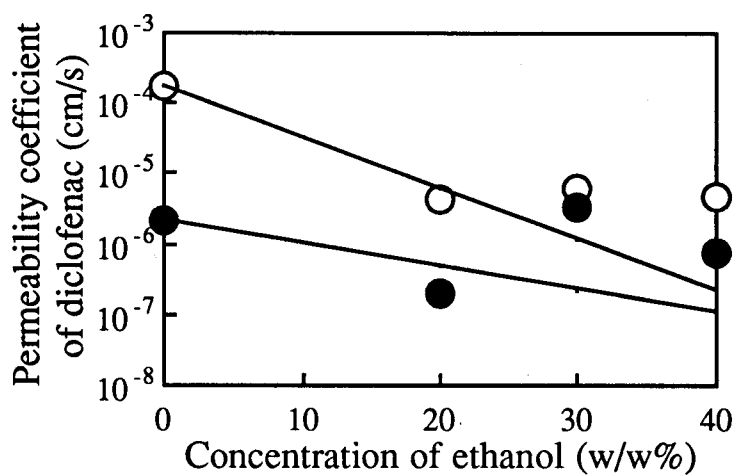


Fig.3-8 Effect of ethanol on permeability coefficient of diclofenac.

○, P^n ; ●, P^i .

Each point represents the mean \pm S.D. for three determinations.

Kurihara-Bergstromら⁵⁷⁾は、サリチル酸イオンの透過係数が、ドナー液中のエタノール濃度の増大に伴って徐々に上昇し、エタノール濃度63%において最大の透過係数が得られることを報告している。もし、イオン形ジクロフェナクが、主に、皮膚中の細孔経路を通り、コンソルベントが皮膚構造を変化させないと仮定すると、 P^i は、皮膚/コンソルベント間の分配係数の影響を受けないことになり、 P^i の減少を説明できない(Fig.3-8)。さらに、ドナー液中に20%のエタノールを含む場合には、 P^i の実験値は、イオン形が脂質経路を通ると仮定して導かれた式(3-15)の予測値と近かった。従って、イオン形ジクロフェナクが、例えばイオンペアの形で脂質経路を通ることも十分に考慮に入れるべきである。人工膜の透過においてはジクロフェナクのイオンペアの形成が報告されており、また、イオンペアによって皮膚透過が促進された研究例も認められている⁵⁸⁻⁶¹⁾。

以上より、大量のエタノールは、皮膚の障壁能に直接的な影響を与えることによって、脂質経路を通る薬物の透過速度を増大させる可能性が示された。また、イオン形ジクロフェナクのフラックスは、分子形のフラックスに比較すると、分配係数の影響を強く受けていないために、エタノールを含まない系に比べて著明に促進されたものと考えられる。

第7節 本章のまとめ

in vitro皮膚透過実験においては、ドナー液へのエタノールの添加により、ジクロフェナクの透過係数が減少した。しかしながら、ドナー液中のジクロフェナクの溶解度上昇による皮膚への分配係数の減少を考慮すると、そこから求められる透過係数の計算値より、実験値の方が大きく、エタノールが皮膚に直接作用してジクロフェナクの透過を促進していることが示唆された。イオン形ジクロフェナクの皮膚透過は細孔経路では説明することが困難であり、例えば、イオンペアのような形で、分子形と同様脂質経路を通る可能性が示唆された。

第4章 分子形及びイオン形ジクロフェナクの皮膚透過に及ぼす単環モノテルペン類の前処理の効果

第1節 序論

前章では、ジクロフェナクの皮膚透過に対するエタノールの効果を詳細に検討した。本章では、同様の解析方法を用いて、テルペン類の効果を評価した。すなわち、皮膚の障壁能に対するテルペン類の影響を明確に把握するために、ここでは、テルペン類の40%エタノール溶液を用いて皮膚を前処理する方法を採用した。分子形及びイオン形ジクロフェナクの皮膚透過係数に対する前処理時間の影響を詳細に調べ、これよりテルペンの種類によって促進活性が異なる理由について考察した。テルペンとしては、*d*-リモネンと*l*-メントールを選択した^{6,2)}。

第2節 実験の部

2-1 試薬

ジクロフェナクについては、第3章 2-1と同様にエスエス製薬株式会社より提供されたものを用いた。*d*-リモネン並びに*l*-メントールは東京化成工業株式会社より購入した特級試薬を用いた。他の試薬はいずれも特級試薬を用いた。

2-2 透過実験用ドナー液及び前処理溶液の調製

テルペン（1または2%）、エタノール（40%）及びMcIlvaine緩衝液（pH4とpH6）を混合して前処理溶液とした。透過実験にはMcIlvaine緩衝液にジクロフェナクを懸濁したpH4およびpH6の溶液を用いた。

2-3 テルペンによる皮膚の前処理

透過実験の前に予め調製した前処理溶液で37℃、一定時間（1～5時間）皮膚の前処理を行った。その後、皮膚の表皮側を緩衝液で十分に洗浄し、直ちに第3章2-2と同様に操作して透過実験を行った。

2-4 テルペンの溶解度測定

過剰量のテルペンを種々の濃度のエタノール溶液に加え、37℃で24時間激しく攪拌した。これを遠心分離して、下層をろ過し、ろ液中のテルペン濃度をガスクロマトグラフィーで定量した。ガスクロマトグラフィーにおけるテルペン類の定量条件は以下の通りである。

測定装置：GC-7A (Shimadzu Corp.)

カラム：Chromosorb WHP

カラム温度：150℃ (*d*-リモネン)、180℃ (*l*-メントール)

キャリアーガス：N₂

流量：40 ml/min

検出器：水素炎イオン化検出器

試料注入部温度：250℃

第3節 ジクロフェナクの皮膚透過に対するテルペン類の促進効果

1% *d*-リモネンを含有する40%エタノール溶液により皮膚を前処理したときの、分子形及びイオン形ジクロフェナクの透過係数を、Fig.4-1に示す。分子形、イオン形いずれにおいても、1時間の前処理でその透過が著しく促進され、未処理の場合に比べると分子形で約10倍、イオン形で約100倍の透過係数が得られた。前処理時間を延長しても分子形、イオン形ともにそれ以上の透過係数の増大は起こらず、最大促進効果を得るためには1時間の前処理で充分であることがわかった。またこのことは、*d*-リモネンは皮膚に速やかに移行して、ジクロフェナクの皮膚透過に対する障壁能を低下させることを示唆している。

次に同様の実験を*l*-メントールを用いて行った。Fig.4-2に*l*-メントールで前処理した時の結果を示す。分子形もイオン形もその透過係数は、前処理時間の延長により徐々に増大し1% *l*-メントールによって充分な促進活性を得るためには比較的長時間の前処理が必要であり、*d*-リモネンの場合と明らかに異なる結果を示した。

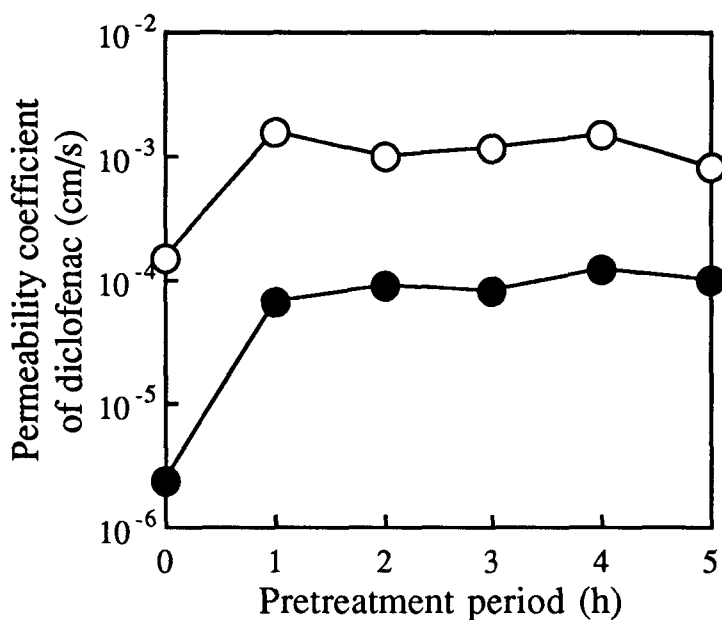


Fig.4-1 Effect of pretreatment with 1 w/w % *d*-limonene suspended in 40 % ethanol - buffer solution on permeability coefficient of nonionized and ionized diclofenac in buffer system.

○, P^n ; ●, P^i .

Each point represents calculated value using average of three determinations.

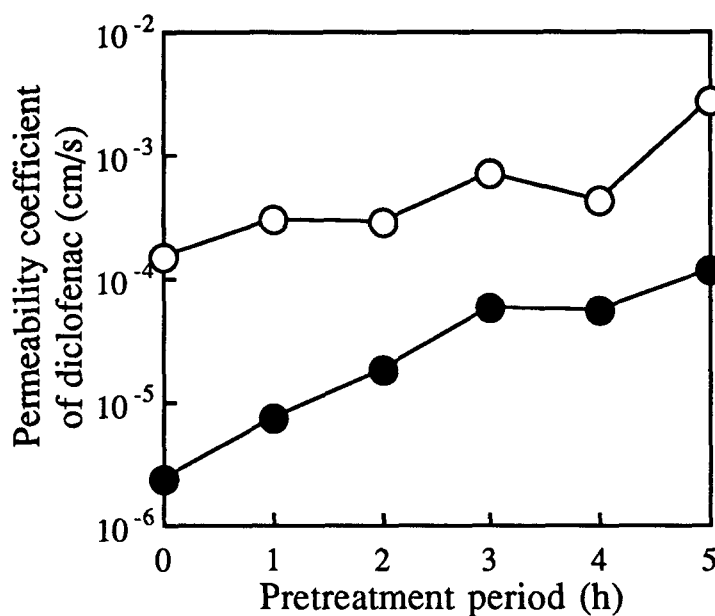


Fig.4-2 Effect of pretreatment with 1 w/w % *l*-menthol suspended 40 % ethanol - buffer solution on permeability coefficient of nonionized and ionized diclofenac in buffer system.

○, P^n ; ●, P^i .

Each point represents the calculated value using average of three determinations.

Figure 4-3に種々の濃度のエタノールに対するテルペン類の溶解度を示す。*d*-リモネンの溶解度は、*l*-メントールに比較して小さく、1%の*d*-リモネンは40%エタノールに対して完全には溶解せず、一部分が分散した状態であった。これに対して、1%*l*-メントールは40%エタノールに完全に溶解した。このことは前処理溶液における*d*-リモネンの熱力学的活動度は最大に設定されているのに対して、*l*-メントールの場合には最大の活動度になっていないことを意味している。そこで、*d*-リモネン及び*l*-メントールをそれぞれ2%として前処理を行い、同様の透過実験を行った。その結果、2%*d*-リモネンでは1%の場合とほぼ同一の結果が得られた。一方、2%*l*-メントールで前処理した場合にはFig.4-4に示すように活性が速やかに発現し、分子形、イオン形いずれの透過係数に対しても、1時間以内に最大効果に到達していることが認められた。2%の*l*-メントールは40%エタノール中でその溶解度を越えており、熱力学的活動度は最大になっていると考えられる。非常に興味深いことに、2%*l*-メントールで得られた促進効果は1%*d*-リモネンとほぼ同等だった。

第4節 本章のまとめ

in vitro皮膚透過実験において、テルペン類（*d*-リモネン、*l*-メントール）を添加にした40%エタノール溶液で皮膚を前処理することにより、ジクロフェナクの透過係数の増大が観察された。テルペン添加量が1%のときには、*d*-リモネンと*l*-メントールで、促進効果に明らかな差が認められたが、溶解度以上の量を添加することによって、両テルペンともに短時間の前処理で最大効果が得られた。従って、テルペン類の吸収促進活性には、熱力学的活動度が重要な役割を演じており、優れた促進効果を期待するためにはテルペン類の活動度を最大に維持し得る条件の設定が望ましいと思われる。

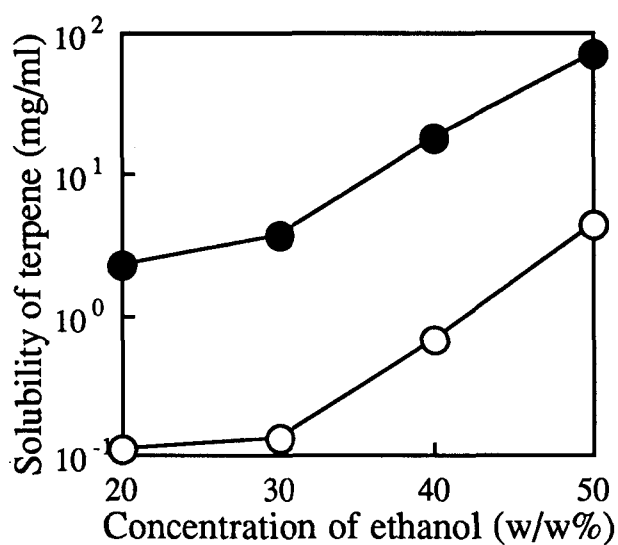


Fig.4-3 Solubility of terpenes in ethanol - water solution.
○, *d*-limonene; ●, *l*-menthol.
Each point represents the average of three determinations.

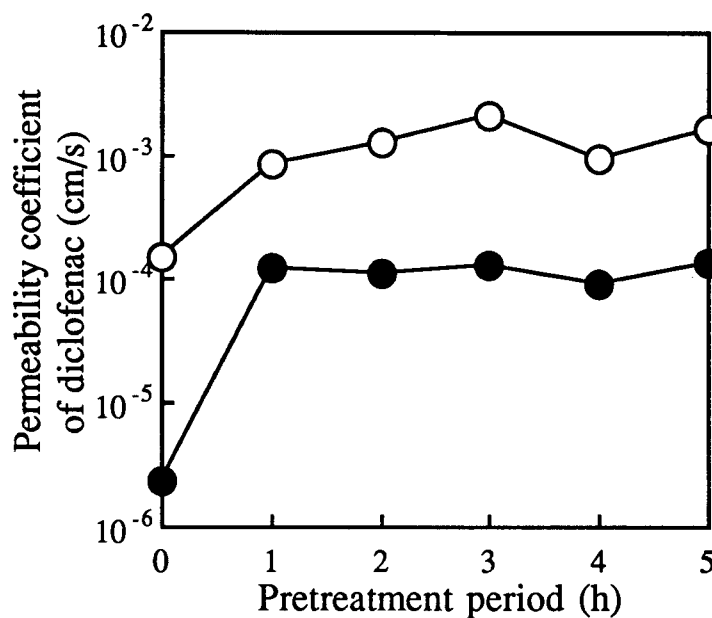


Fig.4-4 Effect of pretreatment with 2 w/w % *l*-menthol suspended in 40 % ethanol - buffer solution on permeability coefficient of nonionized and ionized diclofenac in buffer system. \bigcirc , P^n ; \bullet , P^i .

Each point represents the calculated value using average of three determinations.

総括

ジクロフェナクの皮膚透過に及ぼす単環モノテルペン類とエタノールの併用効果についてin vivo、in vitro実験を通じて検討し、以下に示す知見を得た。

まず、テルペン1%、エタノール30%を含有するゲル軟膏からのジクロフェナクナトリウムの経皮吸収は、*l*-メントールを配合することによって著明に増大した。また、既存の吸収促進剤であるAzoneには至適濃度が存在したのに対して、*l*-メントールの効果は濃度依存的であった。さらに、in vitro皮膚透過実験から得られたジクロフェナクナトリウムの透過フラックスを用いることにより、in vivoにおける血中濃度を精度よく予測でき、これより経皮吸収の律速は皮膚角質層の透過過程であると推測された。

さらに、in vivo実験におけるジクロフェナクナトリウムの経皮吸収に対して、処方中のエタノールとテルペンの促進活性における交互作用を検討したところ、テルペンの活性発現にはエタノールの共存が重要であることがわかった。また、最大の活性を得る上で必要な両者の添加量はテルペンの種類によって大きく異なることが観察された。さらに、ジクロフェナクの経皮吸収にはゲル軟膏のpHの影響が大きく、分子形ジクロフェナクの皮膚透過とともにイオン形の透過も示唆された。

in vitro皮膚透過実験においては、ドナー液へのエタノールの添加により、ジクロフェナクの透過係数が減少した。しかしながら、ドナー液中のジクロフェナクの溶解度上昇による皮膚への分配係数の減少を考慮すると、とくにエタノールの添加量が多い場合には、透過係数の計算値より実験値の方が大きくなり、エタノールが皮膚に直接作用してジクロフェナクの透過を促進していることが示唆された。イオン形ジクロフェナクの皮膚透過は細孔経路では説明することが困難であり、例えば、イオンペアのような形で、分子形と同様脂質経路を通る可能性が示唆された。

in vitro皮膚透過実験において、テルペン類(*d*-リモネン、*l*-メントール)の40%エタノール溶液で皮膚を前処理することにより、前処理後のジクロフェナクの透過係数は増大し、テルペンの溶解度以上の添加で最大効果が得られた。一方、テルペンが溶解度以下の系では、前処理時の延長に伴って、ジクロフェナクの透過係数は徐々に増加した。従って、

テルペン類の促進活性の発現には熱力学的活動度が重要な役割を演じていることが示唆された。

謝 辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました星薬科大学永井恒司教授、町田良治助教授、高山幸三講師並びに米谷芳枝博士に深く感謝いたします。

また、ジクロフェナクナトリウムを御提供頂きましたエスエス製薬株式会社並びにAzoneを御提供頂きました住商ネルソン社に深く感謝いたします。

さらに、本研究の遂行にあたり、絶えざる御助言、御協力を頂きましたリンテック株式会社研究所岡部秀晃氏及び星薬科大学薬剤学教室の諸氏に感謝いたします。

参考文献

- 1) B.W.Barry, *J.Contr.Rel.*, **6**, 85 (1987).
- 2) B.W.Barry, *J.Contr.Rel.*, **15**, 237 (1991).
- 3) R.O.Potts, G.M.Golden, M.L.Francoeur, V.H.W.Mak and R.H.Guy, *J.Contr.Rel.*, **15**, 249 (1991).
- 4) Y.Morimoto, *Pharm Tech Japan*, **7**, 71 (1991).
- 5) R.H.Guy, *Ther.Res.*, **6**, 1031 (1985).
- 6) J.L.Melton, P.W.Wertz, D.C.Swartzendruber and D.T.Downing, *Biochem Biophys.Acta*, **921**, 191 (1987).
- 7) Y.W.Chien, P.Lelawongs, O.Siddiqui, Y.Sun and W.M.Shi, *J.Contr.Rel.*, **13**, 263 (1990).
- 8) S.M.Sim, W.I.Higuchi and V.Srinivasan, *Int.J.Pharmaceut.*, **69**, 109 (1991).
- 9) M.J.Pikal and S.Shah, *Pharm.Res.*, **8**, 365 (1991).
- 10) D.Bommannan, H.Okuyama, P.Stauffer and R.H.Guy, *Pharm.Res.*, **9**, 559 (1992).
- 11) D.Bommannan, G.K.Menon, H.Okuyama, P.M.Elias and R.H.Guy, *Pharm.Res.*, **9**, 1043 (1992).
- 12) H.A.E.Benson, J.C.McElnay, R.Harland and J.Hadgraft, *Pharm.Res.*, **8**, 204 (1991).
- 13) M.Hashida, E.Mukai, T.Kimura and H.Sezaki, *J.Pharm.Pharmacol.*, **37**, 542 (1985).
- 14) J.W.Wiechers and R.A.DeZeeuw, *Drug Design Delivery*, **6**, 87 (1991).
- 15) M.Ponc, M.Haverkort, Y.L.Soei, J.Kempenaar, J.Brusse and H.Bodde, *J.Pharm.Sci.*, **78**, 738 (1989).
- 16) I.M.Ismail, C.C.Chen, J.B.Richman, J.S.Anderson and D.D.S.T.Liu, *Pharm.Res.*, **9**, 817 (1992).
- 17) K.Sugibayashi, S.Nakayama, T.Seki, K.Hosoya and Y.Morimoto, *J.Pharm.Sci.*, **81**, 58 (1992).
- 18) T.Ogiso, M.Iwaki, K.Bechako and Y.Tsutsumi, *J.Pharm.Sci.*, **81**, 762 (1992).
- 19) J.A.Bouwstra, G.S.Gooris, J.Brussee, M.A.Salomons-de Vries and

- W.Bras, *Int.J.Pharmaceut.* , **79**, 141 (1992).
- 20)F.P.Bonina, L.Montenegro, P.D.Capraris, E.Bousquet and S.Tirendi, *Int.J.Pharmaceut.* , **77**, 21 (1991).
- 21)S.H.Yuk, S.J.Lee, T.Okano, B.Berner and S.W.Kim, *Int.J.Pharmaceut.* , **77**, 221 (1991).
- 22)S.H.Yuk, S.J.Lee, T.Okano, B.Berner and S.W.Kim,*Int.J.Pharmaceut.* , **77**, 231 (1991).
- 23)K.Sugibayashi, K.Mori amd Y.Morimoto, *J.Contr.Rel.*, **20**, 99 (1992).
- 24)H.Okabe, K.Takayama, A.Ogura and T.Nagai, *Drug Design Delivery*, **4**, 313 (1989).
- 25)H.Okabe, Y.Obata, K.Takayama and T.Nagai, *Drug Design Delivery*, **6**, 239 (1990).
- 26)H.Okamoto, M.Hashida, H.Sezaki, *J.Pharm.Sci.*, **77**, 418 (1988).
- 27)H.Okamoto, K.Muta, M.Hashida, H.Sezaki, *Pharm.Res.*, **7**, 64 (1990).
- 28)R.Woodford and B.W.Barry, *J.Toxicol-Cut.Ocular Toxicol.*, **5**, 167 (1986).
- 29)E.R.Cooper, *J.Pharm.Sci.*, **73**, 1153 (1984).
- 30)Y.Akitoshi, K.Takayama, Y.Machida and T.Nagai, *Drug Design Delivery*, **2**, 239 (1989).
- 31)Y.Obata, K.Takayama, H.Okabe and T.Nagai, *Drug Design Delivery*, **6**, 319 (1990).
- 32)E.W.Merrit and E.R.Cooper, *J.Contr.Rel.*, **1**, 161 (1984).
- 33)B.W.Barry and A.C.Williams, *Proc.Intern.Symp.Control.Rel.Bioact. Mater.* , **16**, 33 (1989).
- 34)A.C.Williams and B.W.Barry, *Int.J.Pharmaceut.*, **57**, R7 (1989).
- 35)E.S.Nuwayser, M.H.Gay, D.J.DeRoo and P.D.Blaskovich, *Proc.Intern. Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.* , **15**, 213 (1988).
- 36)J.Yamahara, H.Kashiwa, K.Kishi and H.Fujimura, *Chem.Pharm.Bull.*, **37**,855 (1989).
- 37)T.Higuchi, *J.Soc.Cosmetic Chemists*, **11**, 85 (1960).
- 38)T.Okano, M.Miyajima, F.Komada, G.Imanidis, S.Nishiyama, S.W.Kim and W.I.Higuchi, *J.Contr.Rel.* , **6**, 99 (1987).
- 39)Y.Obata, K.Takayama, Y.Machida and T.Nagai, *Drug Design Discovery*,

- 8, 137 (1992).
- 40) T.Kai, T.Isami, K.Kobata, T.Nakamura and T.Kimura, *Chem.Pharm.Bull.*, **40**, 2498 (1992).
- 41) Y.Morimoto, T.Hatanaka, K.Sugibayashi and H.Omiya, *J.Pharm.Pharmacol.*, **44**, 634 (1992).
- 42) T.Itoh, L.Washington, T.M.Turunen and J.H.Rytting, *Pharm.Res.*, **9**, 1168 (1992).
- 43) O.Wong, N.Tsuzuki, B.Nghiem, J.Kuenhoff, T.Itoh, K.Masaki, J.Huntington, R.Konishi, J.H.Rytting and T.Higuchi, *Int.J.Pharmaceut.*, **52**, 191 (1989).
- 44) T.Hatanaka, M.Inuma, K.Sugibayashi and Y.Morimoto, *Int.J.Pharmaceut.*, **79**, 21 (1992).
- 45) D.R.Friend, *J.Contr.Rel.*, **18**, 235 (1992)
- 46) T.Nishihata, A.Kamada, K.Sasaki, K.Takahashi, K.Matsumoto, K.Shinozaki, Y.Tabata, M.Keigami T.Miyagi and N.Tsutsumi, *Int.J.Pharmaceut.*, **46**, 1 (1988).
- 47) Y.H.Kim, A.H.Ghanem, H.Mahmoud and W.I.Higuchi, *Int.J.Pharmaceut.*, **80**, 17 (1992).
- 48) R.O.Potts and R.H.Guy, *Pharm.Res.*, **9**, 663 (1992).
- 49) Y.Obata, K.Takayama, Y.Maitani, Y.Machida and T.Nagai, *Int.J.Pharmaceut.*, in press.
- 50) K.Tojo, C.C.Chiang and Y.W.Chien, *J.Pharm.Sci.*, **76**, 123 (1987).
- 51) P.J.Elving, J.M.Markowitz and I.Rosenthal, *Anal.Chem.*, **28**, 1179 (1956).
- 52) M.Katz and B.J.Poulsen, (Eds) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol.28, Springer-Verlag, Berlin (1971).
- 53) Y.Maitani, M.Nakagaki and T.Nagai, *Int.J.Pharmaceut.*, **74**, 105 (1991).
- 54) S.H.Yalkowsky and T.J.Roseman, (Eds) *Techniques of solubilization of drugs*, Marcel Dekker, New York and Basel, pp.91 (1981)
- 55) J.Swarbrick, G.Lee, J.Brom and N.P.Gensmantel, *J.Pharm.Sci.*, **73**, 1352 (1984).
- 56) A.H.Ghanem, H.Mahmoud, W.I.Higuchi, U.D.Rohr, S.Borsadia, P.Liu, J.L.Fox and W.R.Good, *J.Contr.Rel.*, **6**, 75 (1987).

- 57) T. Kurihara-Bergstrom, K. Knutson, L.J. DeNoble and C.Y. Goates,
Pharm.Res., **7**, 762 (1990).
- 58) S.J. Lee, T. Kurihara-Bergstrom and S.W. Kim, *Int.J.Pharmaceut.*, **47**, 59
(1987).
- 59) P. Liu, T. Kurihara-Bergstrom, F.H. Clarke, N. Gonnella and W.R. Good,
Pharm.Res., **9**, 1035 (1992).
- 60) G.C. Mazzenga, B. Berner and F. Jordan, *J.Contr.Rel.*, **20**, 163 (1992).
- 61) A. Pardo, Y. Shiri and S. Cohen, *J.Pharm.Sci.*, **81**, 990 (1992).
- 62) Y. Obata, K. Takayama, Y. Maitani, Y. Machida and T. Nagai,
Biol.Pharm.Bull., **16**, 312 (1993).