

薬物の皮膚透過に及ぼす
吸収促進剤と温度の影響

星薬科大学
図書館



0000061061

大原 長夫喜

薬物の皮膚透過に及ぼす
吸収促進剤と温度の影響

目 次

緒言	1
第1章 ケトプロフェンの皮膚透過における <i>d</i> -リモネンと 温熱の併用効果	4
第1節 序論	4
第2節 実験の部	4
第3節 <i>in vivo</i> における <i>d</i> -リモネンと温熱の 併用効果	12
第4節 <i>in vitro</i> における <i>d</i> -リモネンと温熱の 併用効果	18
第5節 皮膚表面の構造変化	22
第6節 角質層からの脂質遊離	22
第7節 本章のまとめ	25
第2章 薬物の皮膚透過経路に及ぼす <i>d</i> -リモネンと 温熱の併用効果	26
第1節 序論	26
第2節 実験の部	26

第3節 *d*-リモネンと温熱の併用効果 29

第4節 本章のまとめ 39

第3章 薬物の皮膚透過経路に及ぼすオレイン酸と
温熱の併用効果 40

第1節 序論 40

第2節 実験の部 40

第3節 オレイン酸と温熱の併用効果 41

第4節 本章のまとめ 47

第4章 吸収促進剤の皮膚刺激性に及ぼす温度の影響 . . 48

第1節 序論 48

第2節 実験の部 49

第3節 皮膚刺激性に及ぼす吸収促進剤と
温度の影響 49

第4節 吸収促進剤の活性と刺激性との相関 59

第5節 本章のまとめ 61

第5章 ケトプロフェンの経皮吸収における温熱と 吸収促進剤の適用条件の最適化	62
第1節 序論	62
第2節 実験の部	63
第3節 特性値に影響する要因	65
第4節 重回帰分析による予測式の推定	67
第5節 適用条件の最適化	71
第6節 本章のまとめ	76
総括	77
謝辞	79
参考文献	80

緒 言

薬物送達システム（DDS）は、既知の薬物に対して物理的あるいは化学的な修飾を加えることにより、その生体内動態を積極的に変化させ、治療上の有用性（効果の持続や副作用の軽減）を向上させようとするもので、薬学研究者のみならず、医学や高分子化学などの多くの研究者の関心を集めている¹⁾。DDSに関する従来の研究開発では、実用化されているDDS製剤も含めて、放出制御型製剤、すなわちシステムからの薬物の放出速度を一定に保つことによって、一定の血中濃度を維持しようとする試みが多く行なわれてきた。しかし、最近の研究では、ターゲティング療法や外部刺激に応答して薬物を放出するシステムなど、次世代のDDSを指向したものが報告されるようになってきた^{2,3)}。また、その投与部位も多様化し、特に皮膚を介して薬物を全身的に送達させるDDSは、経皮吸収治療システム（Transdermal therapeutic system）と呼ばれ、経口や注射など他の投与方法と比較して多くの利点が認められている。経皮吸収治療システムの特徴を要約すると、①経口投与の困難な患者にも適用し得る、②注射などに比べ患者の苦痛、負担が少ない、③経口投与に比べ吸収に影響する因子が少なく、血中薬物濃度を制御し易い、④肝臓での初回通過効果を回避し得る、⑤長時間連続投与が可能である、⑥吸収速度を製剤側で調節し易い、⑦血中薬物濃度を長時間必要レベルに維持し易い、⑧必要に応じて薬物治療を中断し得る、などが挙げられる⁴⁾。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⁵⁾、生体粘膜に比べると物質の透過性が低いため、経皮吸収性の低い薬物の製剤化には、その皮膚透過性の改善が重要となる⁶⁻¹²⁾。

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われ、*d*-リモネンをはじめとする炭化水素系テルペ

ンがケトプロフェンなどの脂溶性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出されている¹³⁻¹⁸⁾。また *d*-リモネンなどのテルペン類は、エタノールの共存により皮膚角質層の細胞間脂質の構造を流動化させ、薬物透過速度を促進すると考えられ、実際にジパルミトイルホスファチジルコリンを膜成分とするリポソームのゲル-液晶転移温度を有意に低下させる作用を持つことが確認されている^{19,20)}。この脂質二重層（リン脂質）は、温度の上昇とともに“固い”ゲル相から“柔らかい”液晶相へと相転移することが知られており、テルペン類による脂質膜の流動化作用が、薬物の皮膚透過に対して有効に作用していると推測される²⁰⁻²⁴⁾。しかしながら、薬物の経皮吸収において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と外部からの温熱の併用による吸収促進作用の改善を試みた。一般に皮膚透過において強力な活性を得ようとする、吸収促進剤を高濃度に配合しなければならず、皮膚への刺激性が心配される。温熱適用等の物理的手段との併用は、促進剤の濃度を制限することにより副作用を最小限に抑えることができるという点からも望ましいと考えられる。

経皮吸収における温度の影響を詳細に調べた報告は少ない。Fritsch^{25,26)} および有田等²⁷⁾は、温度や湿度の増大により、薬物の経皮吸収が促進されることを報告している。また、Blank等²⁸⁾は直鎖状アルコールの皮膚透過係数を5~50℃の温度範囲で測定し、そのアレニウスプロットから皮膚透過に対する温度の寄与を考察している。佐々木等^{29,30)}は、サリチル酸メチルおよびフルルビプロフェン含有パップ剤について、薬理試験、血中濃度、尿中排泄量、皮膚貯留量および抗炎症効果を測定し、皮膚表面温度との関係について検討している。温度の上昇により薬物の皮膚透過性が増大することは良く知られており、これは皮膚内への薬物の分配および皮膚中拡散速度が温度とともに

に上昇することに起因している。また *in vivo* においては温度の上昇に伴って表皮層中の毛細血管への薬物の移行性が增大することも考えられる⁹⁾。人における皮膚温度は、通常 32℃ 付近であるが、外部から温熱を適用することによって、皮膚表面の温度は容易に制御することができる³¹⁾。

本研究では、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するとともに、製剤化を指向した皮膚刺激性および促進剤と温熱の最適条件の探索を行なった。

第 1 章 ケトプロフェンの皮膚透過における *d*-リモネンと温熱の併用効果

第 1 節 序論

薬物の皮膚透過性を向上させる手段として、吸収促進剤の開発、イオントフォレシスやソノフォレシスの利用、さらに最近ではプロドラッグの研究も試みられている。この中で、最も簡便かつ容易に皮膚障壁能を低下させ、製剤への応用が期待できるものは吸収促進剤を利用する方法である。これまでに Azone およびその誘導體³²⁻³⁵⁾、高級不飽和脂肪酸³⁶⁻⁴⁰⁾などが吸収促進剤として報告されている。しかし、全身作用を目的とした薬物送達の場合、いずれも促進作用は不十分であり、また安全性の面でも多くの問題が残されているのが現状である。

近年、インドメタシン、ケトプロフェンおよびジクロフェナクなどの抗炎症作用を有する薬物の皮膚透過性が、炭化水素系モノテルペン類を用いることにより著しく改善されることが見い出されている^{13, 15-18)}。これらテルペン類の中で、比較的強い促進活性を示すのは *d*-リモネンであり、これはオレンジやレモン等柑橘類の果皮に多量に含まれる精油の主成分で、生体に対する安全性の高いことが予想される。本章では、この *d*-リモネンを吸収促進剤として用い、適用時の温度を変化させることによる促進効果の検討を行なった⁴¹⁾。

第 2 節 実験の部

2-1 試薬

実験に用いた *d*-リモネンは、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。ケトプロフェンはシグマ社製の特

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”[®]、コレステロール CII-テストワコー[®]、およびリン脂質 B-テストワコー[®]は和光純薬株式会社より購入して用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

2-2 *in vivo* 吸収実験

in vivo 吸収実験に用いたケトプロフェンゲル軟膏の処方を Table 1 に示した。ゲル軟膏は以下の手順で調製した。まず、カルボキシビニルポリマーと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、*d*-リモネンとケトプロフェ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、室温で 24 時間以上静置したのち実験に供した。

Fig. 1a に *in vivo* 吸収実験に供したガラス製経皮吸収セルの概略を示した。ガラスセルは、内径 16 mm、高さ 30 mm、(有効面積；2.0 cm²) のものを用いた。一定温度の水をガラスセルに循環させることにより、吸収実験を通じて皮膚表面温度を一定に維持できるようにした。*in vivo* 実験法は、体重 180~200 g の wistar 系雄性ラット (埼玉実験動物供給所) を 25% ウレタン生理食塩液で麻酔し (4 ml/kg i.p.)、Fig. 1b に示すように背位固定した。腹部を電気バリカンで丁寧に除毛した後、その部分にシアノアクリル酸系接着剤 (外科用接着剤アロンアルファ A [三共][®]) でガラスセルを固定し、ゲル軟膏 1.5 g を適用した。軟膏中成分の揮発を防ぐため、ガラスセルをパラフィルムで覆った。ゲル軟膏投与後、血液凝固阻止剤 (日本薬局方、ヘパリンナトリウム注射液) で処理した注射筒を用い、1、2、3、4、6 および 8 時間後に頸部静脈より、血液サンプル (400 μl) を採取した。4 種類のゲル軟膏について、24~40℃まで 2℃ 間隔で実験を行なった。ラットより採取した血液 400 μl を遠心分離後 (アボットラボラトリー社製 遠心分離機 LN-9527

Table 1
Formulae of ketoprofen gel ointments
containing *d*-limonene

Ketoprofen		2.0g
Carboxyvinyl polymer		2.0g
Triethanolamine		2.5g
Ethanol		30.0g
<i>d</i> -Limonene		0.5–1.5g
Water	ad	100.0g

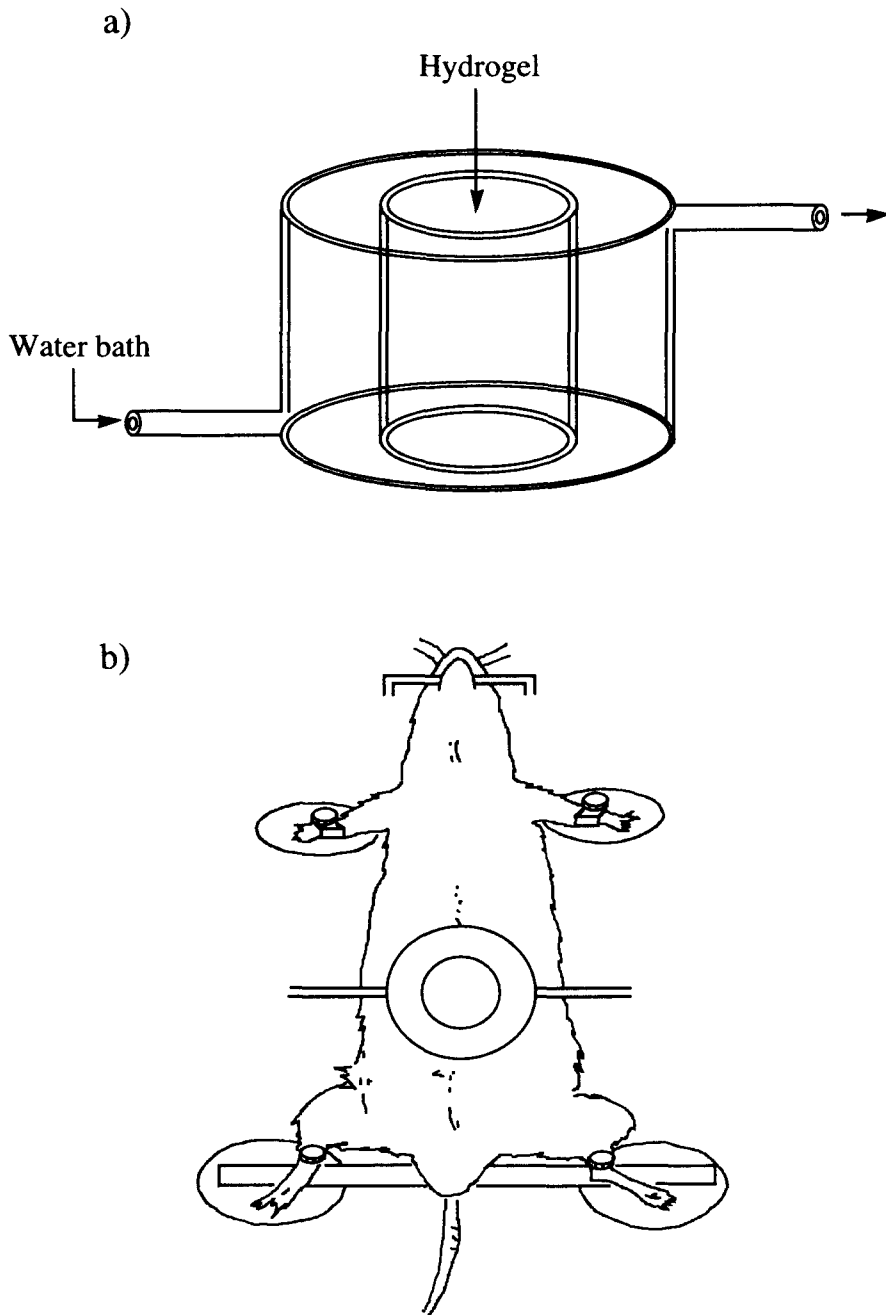


Fig. 1 Schematic diagrams of *in vivo* absorption cell. a) *in vivo* absorption cell, and b) absorption cell attached on the abdominal skin of rat.

型)、血漿 200 μ l を採取した。これに内部標準物質として n-butyl-parabene (p-hydroxybenzoic acid n-butyl ester) のメタノール溶液 (3 μ g/ml) 500 μ l を加えて十分に攪拌後、再び遠心分離した。上澄み液を非水系液体クロマトグラフィー用フィルターユニット(ゲルマンサイエンス ジャパン株式会社製エキクロディスク 3CR[®]) でろ過し、ろ液中のケトプロフェン濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した。HPLC によるケトプロフェンの定量条件は以下の通りである。

液体クロマトグラフィー	: LC-3A (島津製作所)
検出器	: SPD-6A (島津製作所)
クロマトパック	: C-R1B (島津製作所)
カラム	: YMC PACKED COLUMN A-302 S-5 120A ODS
カラム温度	: 室温
移動相	: 0.057%リン酸水溶液 : メタノール (35 : 65)
流速	: 1.0 ml/min
測定波長	: 254 nm
検出感度	: 0.02~0.08 A.U.F.S.
試料注入量	: 20 μ l

2-3 *in vitro* 透過実験

wistar系雄性ラット(体重 180~200 g)の腹部を丁寧に除毛した後、皮膚を摘出し、Fig. 2に示すウォータージャケット型2-チャンバー拡散セル(有効拡散面積; 0.785 cm²)に装着した。前処理として、ドナー側に *d*-リモネンを含む 30%エタノール水溶液を、またレシーバー側には pH7.0のリン酸緩衝液をそれぞれ 3 ml ずつ入れ、2時間攪拌を行なった。その後、セル内をリン酸緩衝液で数回洗浄し、ドナーセルに 30%エタノー

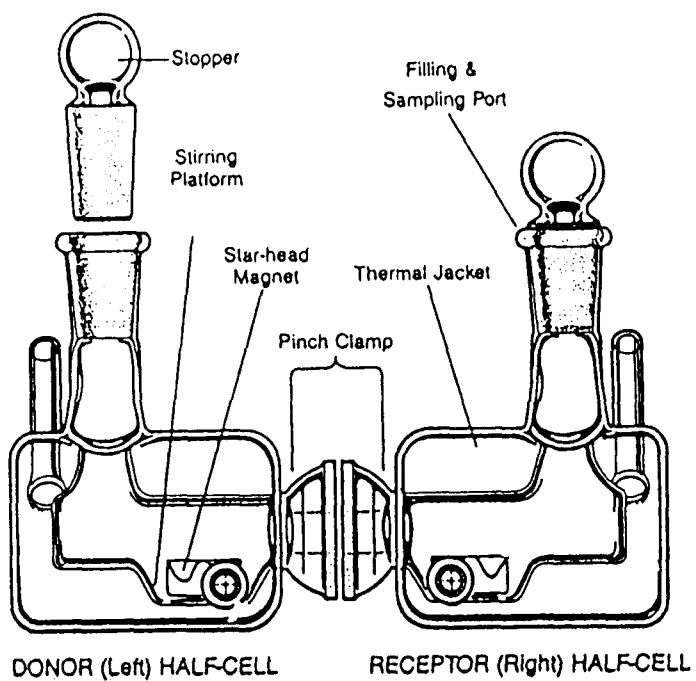


Fig. 2 Schematic diagram of *in vitro* diffusion cell

ル水溶液で調製したケトプロフェン懸濁液を、レシーバーセルにリン酸緩衝液をそれぞれ 3 ml ずつ入れ、透過実験を行なった。両セルをマグネチックスターラーで攪拌し、シンク条件を保ちながら、1 時間毎にレシーバー側から 20 μ l を採取し、直ちに同量のリン酸緩衝液を補充した。透過実験は 8 時間まで行ない、*d*-リモネンを 0%、もしくは 1.5% 含有するエタノール水溶液につき、それぞれ 20~40 $^{\circ}$ C まで 5 $^{\circ}$ C 間隔で実験を行なった。レシーバーセルより採取した溶液 20 μ l に、内標準物質として *n*-butyl-parabene のメタノール溶液 (5 μ g/ml) 200 μ l を加えて十分に攪拌後、上澄み液を非水系液体クロマトグラフィー用フィルターユニットでろ過し、ろ液中のケトプロフェン濃度を HPLC により定量した。定量条件は *in vivo* 吸収実験と同条件で行なった。

2-4 溶解度測定法

in vitro 透過実験に用いたドナー液と同条件に調製したケトプロフェン懸濁液を、恒温槽中で 24 時間マグネチックスターラーで攪拌した後、静置し、上澄みをろ過した。ろ液を希釈したのちその吸光度 (波長 254 nm 吸光度計; 日本分光工業株式会社 Ubest-30) を測定し、*in vitro* 透過実験におけるドナー液中のケトプロフェンの溶解度を求めた。10 $^{\circ}$ C 間隔で 20~50 $^{\circ}$ C までの溶解度を求めた。

2-5 透過実験における皮膚表面の変化

透過実験に伴う皮膚表面の変化を構造観察するために、*in vitro* 透過実験の前処理後の皮膚を、走査電子顕微鏡 (SEM; 日本電子 JSM-T200 型走査電子顕微鏡) を用いて観察した。なおコントロールとして、ヘアレスラットの未処理皮膚を用いた。前処理した皮膚を 30% エタノール水溶液で洗浄し、2% グルタルアルデヒド溶液に 2 時間浸してタンパク組織を固定した。次

に 7.5% ショ糖溶液に 2 時間浸した後、1% オスミウム酸溶液に 2 時間浸し、脂肪組織の固定を行なった。その後、60~90% アセトンにそれぞれ 5 分ずつ浸し、最後に 100% アセトンに一晩浸し、脱水した。次に臨界点乾燥（日立製作所 HPC-2）を行ない、乾燥後、金蒸着（日本電子 FINE COAT ; IONSPUTTER JFC-1100）し、SEM で観察した。

2-6 透過実験に伴う皮膚内脂質成分の遊離

in vitro 皮膚透過実験の前処理と同様に操作を行なった後、ドナー側より 20 μ l 採取し、遊離したコレステロール、セラミドおよびリン脂質の濃度を求めた。コレステロールの定量には、コレステロール CII-テストワコー[®]を用いた。試料に発色試薬を作用させると、試料中のコレステロールエステル類は、コレステロールエステラーゼの作用により遊離のコレステロールと脂肪酸に分解される。生成したコレステロールは、既存の遊離型コレステロールと共にコレステロールオキシダーゼの作用を受けて酸化され、同時に過酸化水素を生じる。生成した過酸化水素は、ペルオキシダーゼ（POD）の作用により、p-クロロフェノールと 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ赤色の色素を生成させる。この赤色の吸光度を測定することにより試料中の総コレステロール濃度を求めた。セラミドの定量には、Lauter および Trams の方法⁴²⁾を用いた。リン脂質の定量には、リン脂質 B-テストワコー[®]を用いた。試料中のリン脂質は、ホスホリパーゼ D の作用により加水分解されコリンを遊離する。生成したコリンは、コリンオキシダーゼの作用を受けてベタインに酸化され、同時に過酸化水素を生じる。生成した過酸化水素は、POD の作用によりフェノールと 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、赤色の色素を生成させる。この赤色の吸光度を測定することにより試料中のリン脂質濃度を求めた。

第 3 節 *in vivo*における *d*-リモネンと温熱の併用効果

d-リモネンを含まないゲル軟膏適用時は、血中薬物濃度が HPLC での検出限界に近く、28℃から 40℃においてほとんど差が認められなかった（8 時間値で約 0.8 μg/ml）。したがって、*d*-リモネン無添加におけるケトプロフェンの経皮吸収に対する温度の影響を明確にすることはできなかった。Fig. 3 に *d*-リモネンを種々の濃度に含有するゲル軟膏をラットに適用した時の、血中ケトプロフェン濃度と温度との関係を示した。*d*-リモネン濃度の増加、もしくは温度の上昇に伴い血中薬物濃度は上昇したが、その挙動は比例的ではなく、ある温度を境界として急激に増大することがわかった。すなわち、*d*-リモネン 0.5% 適用時には 36~38℃に、*d*-リモネン 1.0~1.5% 適用時には 32~36℃に境界が認められ、血中薬物量の上昇し始める温度は、*d*-リモネンの濃度増加により低下する傾向を示した。*d*-リモネンと温熱の併用効果を定量的に調べるために、ケトプロフェンの経皮吸収動態を薬動学的モデルに基づいて解析した。経皮吸収の薬動学的検討は多く行なわれているが^{43,44)}、ここではケトプロフェンの静注後の体内動態が 2-コンパートメントモデルによって解析できること、ならびに皮膚の薬物透過速度が一定のラグタイムののちに定常状態になると仮定して誘導されるコンパートメントモデルを用いて、経皮吸収動態の解析を行なった⁴⁵⁾。Fig. 4 にそのモデルを模式的に示した。ここで、V は基剤、S は皮膚、B は血液、T は組織、また k は各コンパートメントモデル間の薬物移動速度定数を表す。コンパートメント S から B への移行過程は 0 次速度式、また他のコンパートメント間の移行過程は 1 次速度式により記述できると仮定して連立微分方程式を解き、さらにラグタイムを考慮すると、このモデルに従って経皮吸収される薬物の血中濃度は以下の式により表される。

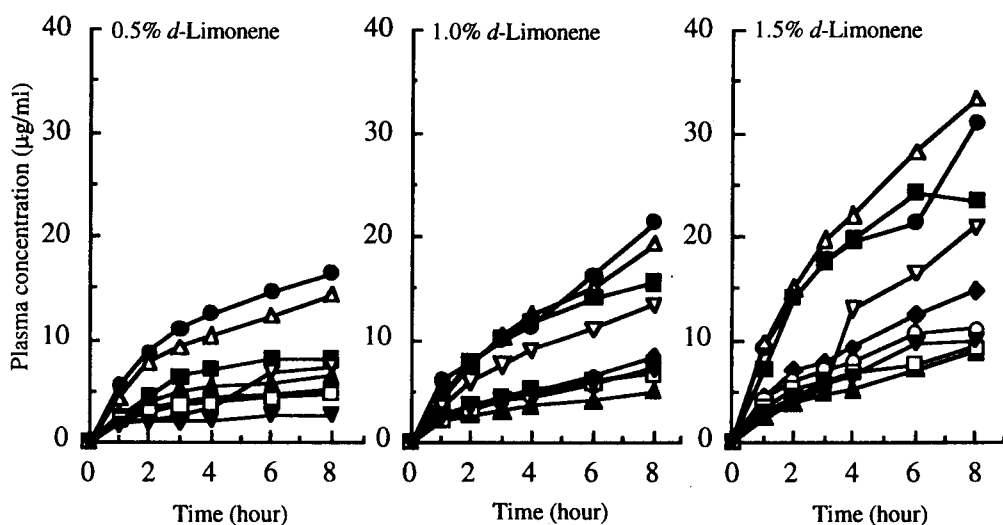


Fig. 3 Combined effect of *d*-limonene and temperature on the percutaneous absorption of ketoprofen in rats. Each point is the mean of 4-6 determinations. (▼) 24°C, (□) 26°C, (▲) 28°C, (○) 30°C, (◆) 32°C, (▽) 34°C, (■) 36°C, (△) 38°C, (●) 40°C.

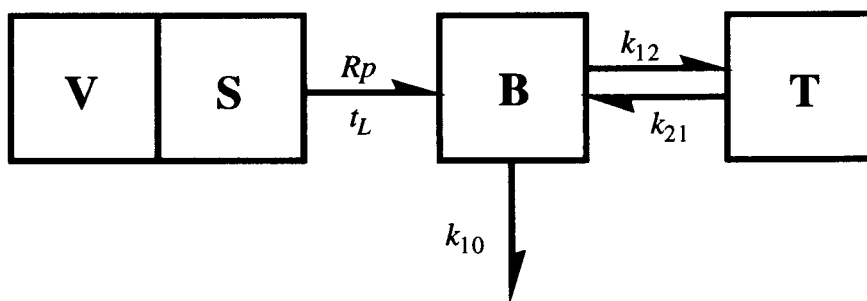


Fig. 4 Schematic representation of percutaneous absorption

$$C = \frac{R_p}{V_1 k_{10}} \left\{ 1 + \frac{\beta - k_{10}}{\alpha - \beta} e^{-\alpha(t-t_L)} + \frac{k_{10} - \alpha}{\alpha - \beta} e^{-\beta(t-t_L)} \right\} \text{-----(1)}$$

ここで、 C は薬物の血中濃度、 R_p は透過速度、 V_1 は血液コンパートメントの分布容積、 k_{10} は血液コンパートメントからの消失速度定数、 α および β はハイブリッド形パラメータ、 t は時間、また t_L はラグタイムをそれぞれ意味する。(1)式に基づいて曲線あてはめ法により透過速度 (R_p) を算出し、*in vivo* での吸収性の指標とした。 R_p の推定には山岡等のプログラム MULTI⁴⁶⁾を用い、静注から得られるパラメータには文献値⁴⁵⁾を用いた。Fig. 5に *d*-リモネン濃度 0.5%、36℃における血中薬物量を先のコンパートメントモデルに当てはめた時の結果を示した。実測値と理論曲線はよく一致し、このモデルに従って得られる透過速度を経皮吸収の指標として用いることは、有効であると考えられる。

Fig. 6に透過速度に対する温度の影響を示した。*d*-リモネン濃度 0.5%では 34℃、1.0%では 32℃、1.5%では 30℃付近から透過速度が急激に上昇し始め、ある温度で上昇は緩やかとなるシグモイド型の関係が認められた。透過速度が上昇し始める温度は、各処方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。

以上より、*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。相乗効果の機構を明らかにするために、次節ではラット摘出皮膚を透過膜とする *in vitro* 拡散セルによる実験を行なった。

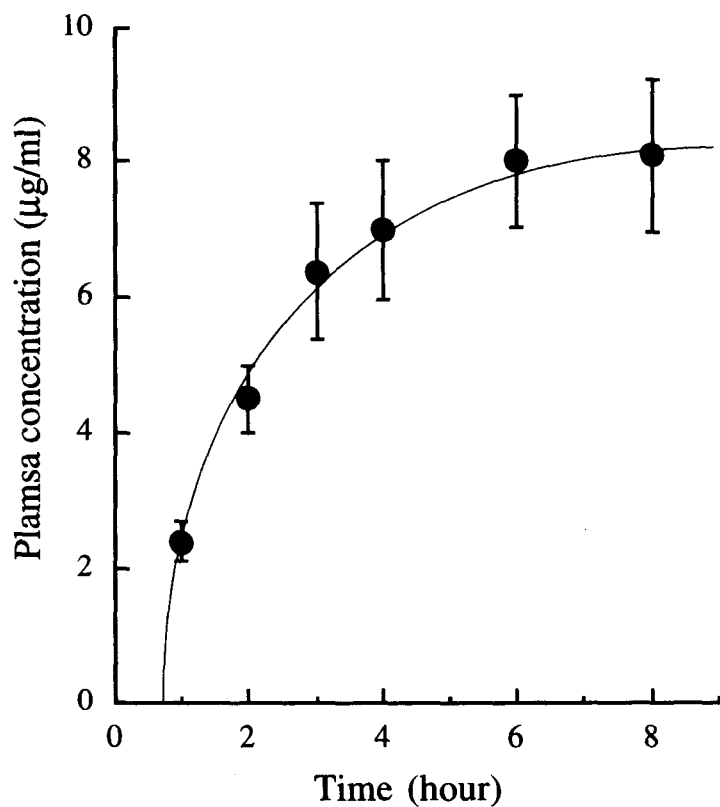


Fig. 5 Percutaneous absorption of ketoprofen after application of hydrogel ointment containing 0.5% *d*-limonene at 36°C in rats

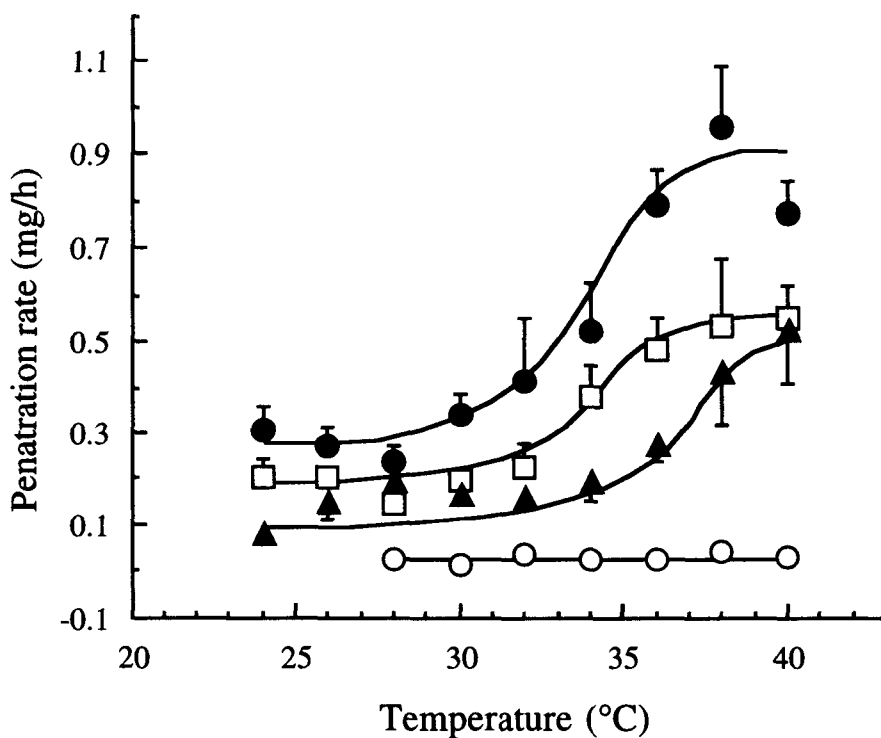


Fig. 6 Relationship between penetration rate and temperature on the percutaneous absorption in rats. Each point is the mean \pm S.D. of 4-6 determinations. (O) Control, (▲) 0.5% *d*-limonene, (□) 1.0% *d*-limonene, (●) 1.5% *d*-limonene.

第 4 節 *in vitro* における *d*-リモネンと温熱の併用効果

in vitro 透過実験の評価には、通常、定常状態における透過のフラックス (J) や透過係数 (P) が用いられる。J は累積透過量-時間曲線における定常状態の傾きより求められるが、温度の上昇によってドナー側での薬物溶解度 (C_s) が増大するため、異なる温度での透過性を比較するための指標とはならない。P は J を C_s で除した値であり、溶解度の差が基準化された透過性の指標である。したがって本研究では、異なる温度間で吸収促進活性を評価するための指標として P を用いた。Fig. 7 に *in vitro* 皮膚透過実験での、*d*-リモネン濃度 0% および 1.5% の処方における種々の温度条件で測定された累積透過量を示した。*d*-リモネンを含まない系においては、温度上昇により透過量が増加する傾向は見られたが、*in vivo* 吸収実験と同様に 20~35℃ の範囲ではあまり差がなく、40℃ で初めて透過量の増大が確認された。これに対し、*d*-リモネン 1.5% の添加では、同一温度において 2~30 倍の累積透過量が得られ、また温度の上昇とともに透過量が顕著に増大し、ラグタイムの減少も認められた。さらに、30~35℃ において透過量の著しい増大が観察され、*in vivo* 吸収実験と同様に透過性の増大が温度の上昇に対して比例的ではないことが確認された。定常状態より求めた P 値も温度の上昇とともに増大しており、*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。

Fig. 8 は、P 値のアレニウスプロットを示したものである。図の傾きより透過の活性化エネルギーは次式に従って算出することができる。

$$\ln P = \ln A - \frac{E}{RT} \text{-----}(2)$$

ここで A は頻度因子、E は活性化エネルギー、R は気体定数、

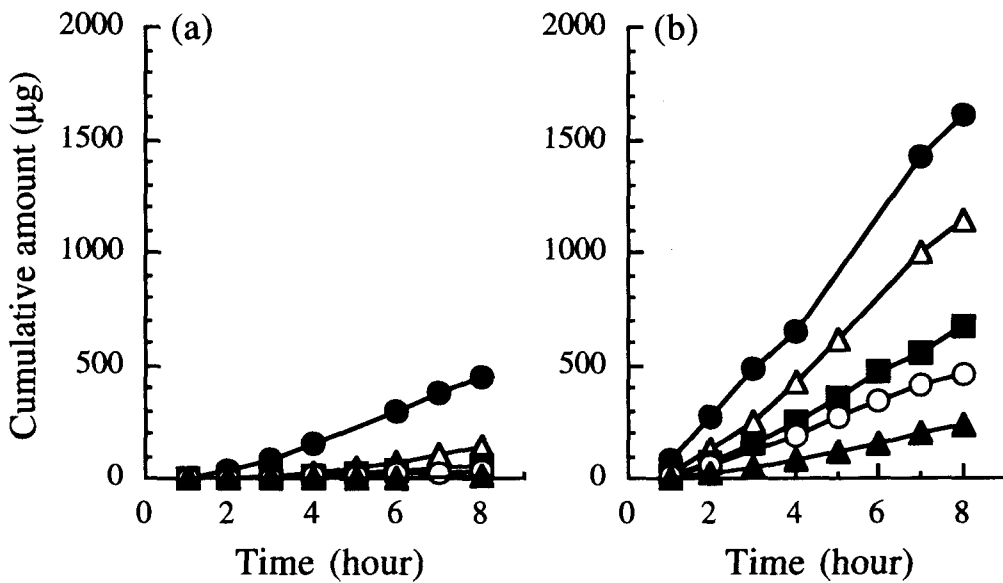


Fig. 7 Combined effect of *d*-limonene and temperature on the percutaneous absorption of ketoprofen through rat skin. Each point is the mean of 3 determinations. (a) Without *d*-limonene, (b) 1.5% *d*-limonene. (▲) 20°C, (○) 25°C, (■) 30°C, (△) 35°C, (●) 40°C.

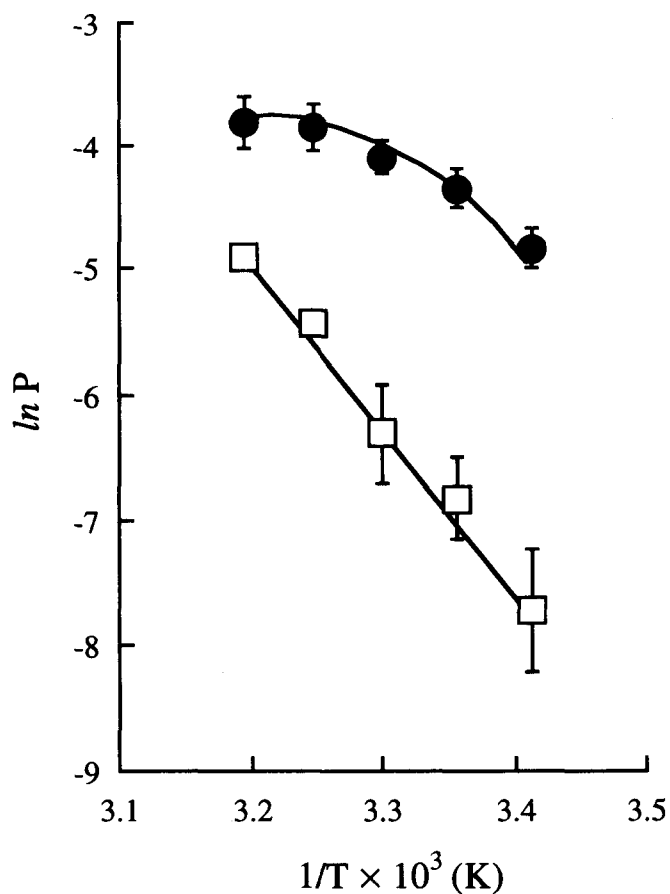


Fig. 8 Arrhenius plots of steady state permeability coefficients (P) of ketoprofen. Each point is the mean \pm S.D. of 3 determinations. (\square) Without *d*-limonene, (\bullet) 1.5% *d*-limonene.

また T は絶対温度をそれぞれ表す。d-リモネン濃度 0% の処方においては、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 113.7kJ/mol であった。この値は皮膚透過に必要とされるエネルギーとして妥当であると考えられ、Golden²³⁾ および Fritsch 等²⁶⁾ の報告ともほぼ一致した。これに対し、d-リモネン濃度 1.5% においては、P 値のアレニウスプロットが上に凸の曲線となり、活性化エネルギーを算出することができなかった。これは、d-リモネンで前処理した皮膚では、薬物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たことを意味している。Fick の拡散理論より透過係数 (P) は、ドナー側と皮膚表面の薬物の分配係数 (K)、皮膚内拡散係数 (D) および有効拡散距離 (h) により以下のように定義される。

$$P = \frac{K \times D}{h} \text{-----}(3)$$

ここで h は不変であると考えられるので、皮膚透過の活性化エネルギーは、薬物の分配のエンタルピー変化と皮膚内拡散の活性化エネルギーの和として与えられる。ケトプロフェンの油水分配係数に対して、d-リモネンはほとんど影響しないことがすでに報告されていることを考慮すると¹³⁾、d-リモネンの活性は主に皮膚内拡散係数の増大に起因すると推察される。このことは、d-リモネンの前処理でアレニウスプロットが上に凸の曲線となり、特に高温側での傾きが低下していることから明らかである。

以上の考察に基づいて、次節では皮膚表面の微小構造の変化を形態学的に追跡した。

第 5 節 皮膚表面の構造変化

in vitro 透過実験に伴う *d*-リモネンで前処理後の皮膚表面の走査電子顕微鏡 (SEM) 像を Fig. 9 に示した。なお、倍率はすべて 500 倍で観察した。コントロールでは角質細胞が密に詰まった状態で、温度上昇による皮膚表面の変化はほとんど認められなかった。しかし、*d*-リモネンで前処理した場合、温度の上昇とともに表面状態が徐々に変化し、細胞間隙の緩みが観察された。また、この傾向は特に 40℃ 以上で大きくなり、*d*-リモネンと温熱の併用によって経皮吸収が著しく促進されることに関連しているものと推測される。

第 6 節 角質層からの脂質遊離

皮膚表面の構造の変化が観察されたことから、*d*-リモネンと温熱の適用によって皮膚成分のドナー側への遊離が予想される。そこで、角質細胞間隙の脂質成分として、コレステロールとセラミドを、また角質層下の生きた表皮細胞の膜成分としてリン脂質を選択し、ドナー側に遊離するこれらの脂質の測定を行なった。Fig. 10 に結果を示す。コレステロールについては、温度上昇により遊離量は徐々に増大しているが、*d*-リモネンの有無による有意差は認められなかった。またセラミドについてはこの温度範囲ではほぼ一定の遊離量を示し、コレステロールと同様に *d*-リモネン添加による違いはなかった。これに対し、リン脂質の遊離においては、*d*-リモネン無添加の系では遊離量が一定であるにもかかわらず、*d*-リモネン添加系では温度の上昇に伴い遊離量が増大しており、特に 40℃ 以上での遊離が大きく認められた。この現象は SEM による皮膚表面構造の変化によく対応しており、*d*-リモネンと温熱の併用は皮膚の構造変化を促して、薬物透過に対する皮膚の障壁能を低下させるものと

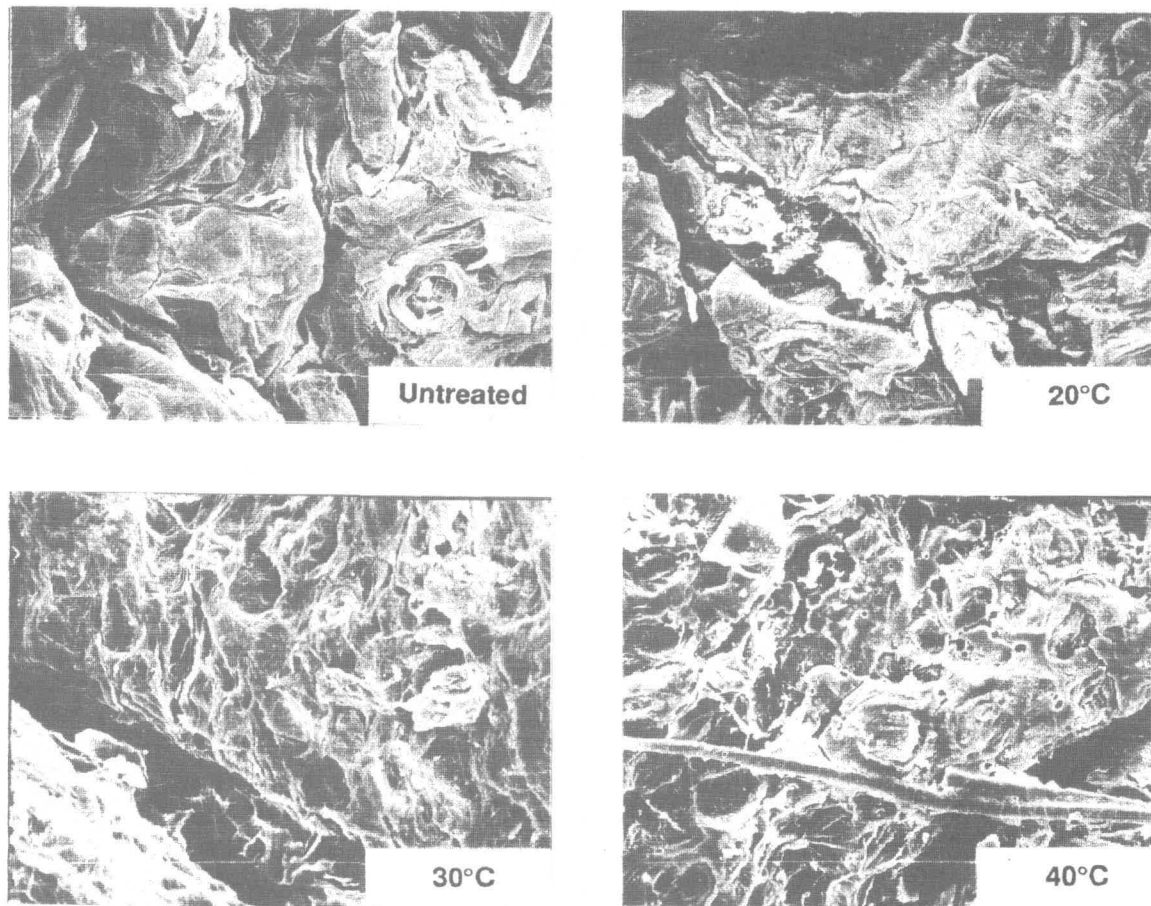


Fig. 9 Scanning electron micrographs of hairless rat skin treated with 1.5% *d*-limonene in 30% ethanol for 2 h at various temperature. Magnification, $\times 500$.

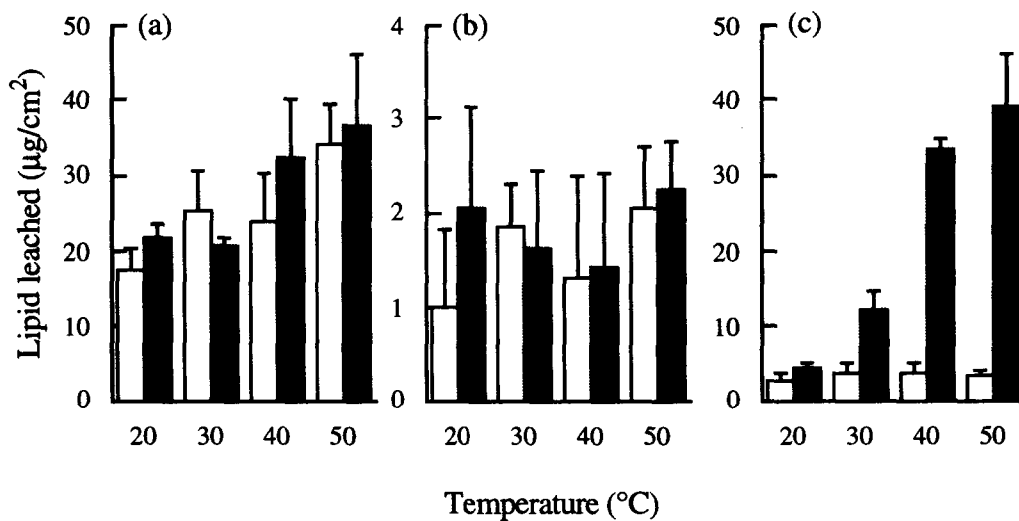


Fig. 10 Amount of (a) cholesterol, (b) ceramides and (c) phospholipids leached after pretreatment for 2 hour at various temperatures. Each point is the mean \pm S.D. of 3 determinations. (□) Without *d*-limonene, (■) 1.5% *d*-limonene.

考えられる。しかしながら、適用部位の全脂質量に対する遊離脂質の割合は、いずれも 10% 以下であり、皮膚の構造を著しく破壊して刺激や炎症を惹起するほどではない。*in vivo* 透過実験後の皮膚表面状態の観察においても、35℃ 以下では紅斑や浮腫などの刺激反応はほとんど認められなかった。

第 7 節 本章のまとめ

d-リモネンの経皮吸収促進活性は、34~40℃の温熱を併用することにより、増強させることができると推測された。また、透過係数のアレニウスプロットや走査電顕像から、*d*-リモネンと温熱の併用は皮膚の構造変化を惹起し、これに伴い角質層下のリン脂質の遊離が観察された。しかし、脂質の遊離量はごくわずかであり、*d*-リモネンと温熱の併用による皮膚への刺激作用はほとんど認められなかった。以上の結果より、薬物の経皮吸収における *d*-リモネンと温熱の併用は、優れた経皮吸収促進作用を実現する上で、極めて有用であることが示唆された。

第 2 章 薬物の皮膚透過経路に及ぼす *d*-リモネンと温熱の併用効果

第 1 節 序論

前章では、ケトプロフェンの経皮吸収における現象を中心に観察を行ってきた⁴¹⁾。*d*-リモネンの活性はエタノール共存下で顕著に現れ、その促進効果は熱力学的活動度に依存していると言われている^{18,47)}。したがって基剤中で *d*-リモネンが飽和溶解度以上であれば、その活性は一定であると考えられるが、実際には基剤中の溶解度が極端に低い時や、逆に高い時は透過が抑制される可能性がある。また、*in vivo* と *in vitro* 間ではその作用に若干の相違があり、この相違に対する説明も研究段階にある。さらに *d*-リモネンは一般的に疎水性薬物の透過促進に用いられるが、水溶性薬物に対する研究はほとんど行なわれていない。そこで本章では、前章で確認された *d*-リモネンと温熱の併用効果を踏まえ、この組み合わせが皮膚透過経路に及ぼす影響を詳細に調べた。一般に経皮吸収における透過経路は親水性物質が透過する polar pathway と疎水性物質が透過する non-polar pathway の二つに大別される^{5,11,12,48)}。本実験には polar pathway を透過する薬物としてグルコースおよびイソニアジドを、また non-polar pathway を透過する薬物としてプレドニゾロンを選択し、*in vitro* 透過実験を行ない、その透過挙動を比較検討した⁴⁹⁾。

第 2 節 実験の部

2-1 試薬

プレドニゾロンおよびイソニアジドはシグマ社から、グルコ

ースは第一化学薬品株式会社からそれぞれ特級品を購入して使用した。グルコース B-テストワコー[®]は和光純薬株式会社より購入して用いた。その他の試薬は第1章 2-1と同様の試薬を用いた。

2-2 *in vitro* 透過実験

第1章 2-3と同様に操作して透過実験を実施した。

2-3 透過した薬物量の測定

2-3-1 プレドニゾロンの定量

レシーバーセルより採取した溶液 20 μ l に、内標準物質として oxyben M (methyl p-hydroxybenzoate) のメタノール溶液 (1 μ g/ml) 200 μ l を加えて十分に攪拌した。その後、上澄み液を非水系液体クロマトグラフィー用フィルターユニット(ゲルマンサイエンス ジャパン株式会社製 エキクロディスク 3CR[®]) でろ過し、ろ液中のプレドニゾロン濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した。定量条件は以下の通りである。

液体クロマトグラフィー	: LC-3A (島津製作所)
検出器	: SPD-6A (島津製作所)
クロマトパック	: C-R3A (島津製作所)
カラム	: YMC PACKED COLUMN A-302 S-5 120A ODS
カラム温度	: 室温
移動相	: 水 : メタノール (56 : 44)
流速	: 1.0 ml/min
測定波長	: 254 nm
検出感度	: 0.02~0.08 A.U.F.S.
試料注入量	: 20 μ l

2-3-2 グルコースの定量

レシーバーセルより採取した溶液 20 μ l 中のグルコースは、グルコース B-テストワコー[®]を用いて定量を行なった。試料に発色試薬を作用させると、試料中のグルコースは発色試薬中に含まれるグルコースオキシダーゼ (GOD) の作用を受けて酸化され、同時に過酸化水素を生じる。生成した過酸化水素は、共存するペルオキシダーゼ (POD) の作用により発色試薬中のフェノールと 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、赤色の色素を生成させる。この赤色の吸光度を測定することにより試料中のグルコース濃度を求めた。

2-3-3 イソニアジドの定量

レシーバーセルより採取した溶液 20 μ l に、内標準物質として phthalic acid di-n-butyl ester のメタノール溶液 (0.5 μ l/ml) 200 μ l を加えて十分に攪拌した。その後、上澄み液を非水系液体クロマトグラフィー用フィルターユニット (ゲルマンサイエンスジャパン株式会社製 エキクロディスク 3CR[®]) でろ過し、ろ液中のイソニアジド濃度を HPLC により定量した。定量条件は以下の通りである。

液体クロマトグラフィー	: LC-3A (島津製作所)
検出器	: SPD-6A (島津製作所)
クロマトパック	: C-R3A (島津製作所)
カラム	: YMC PACKED COLUMN A-301 S-5 120A ODS
カラム温度	: 60°C 付近の一定温度
移動相	: メタノール 600 ml に docusate sodium (dioctyl sulfosuccinate, sodium salt) 4.4 g を溶かし、水 400 ml を加えた後、2 N 硫酸で pH 2.5 に調整

流速	: 2.0 ml/min
測定波長	: 254 nm
検出感度	: 0.02~0.08 A.U.F.S.
試料注入量	: 20 μ l

2-4 薬物溶解度の測定

in vitro 透過実験に用いたドナー液と同条件に調製したプレドニゾロン、グルコースおよびイソニアジド懸濁液を、恒温槽中で24時間マグネチックスターラーで攪拌後、静置し、上澄みをろ過した。ろ液を希釈した後、プレドニゾロンおよびイソニアジドはHPLCで、グルコースは吸光度測定法でそれぞれ測定した。*in vitro* 透過実験におけるドナー液中の溶解度は20、30および40℃で測定した溶解度と温度の検量線から推定した。

2-5 分配係数の測定

d-リモネンを無添加もしくは分散（1.5%）させた30%エタノールーリン酸緩衝液にプレドニゾロンを100 μ g/mlの濃度で溶解させた。同容量のミリスチン酸イソプロピル（IPM）を加えた後、恒温槽中で24時間攪拌しながら放置し、IPM中のプレドニゾロンの移行量を*in vitro* 透過実験と同温度で測定し、HPLCで定量した。

第3節 *d*-リモネンと温熱の併用効果

プレドニゾロン、グルコース、およびイソニアジドの皮膚透過において、*d*-リモネン無添加の前処理溶液では、いずれもHPLCの検出限界以下であり、ほとんど透過は認められなかった。したがって*d*-リモネン無添加における各薬物の皮膚透過に対する温度の影響を明確にすることはできなかった。Fig.11に*d*-リモネンを分散（1.5%）させた前処理溶液でのプレドニゾ

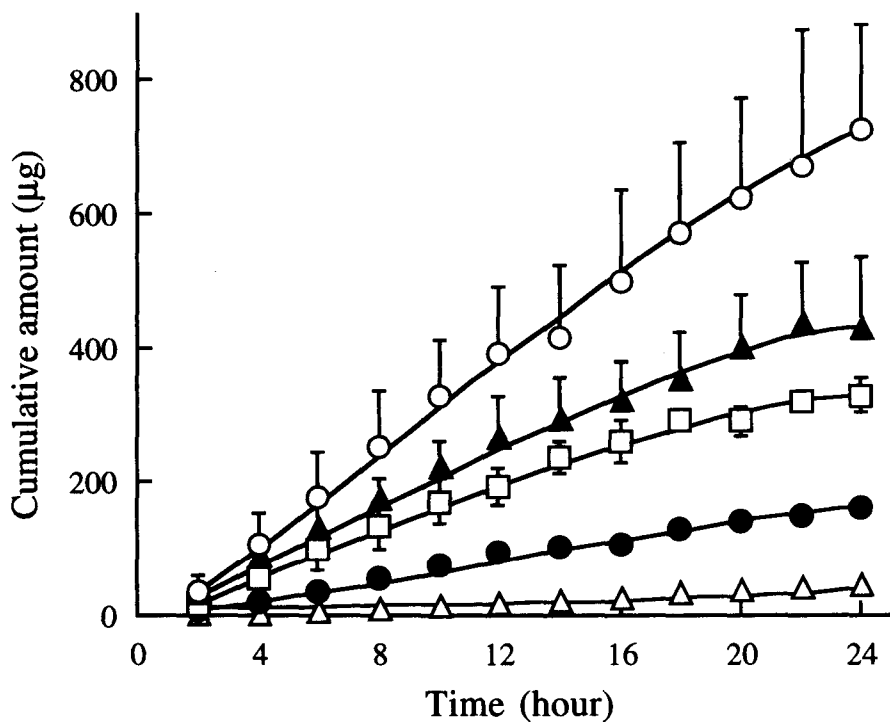


Fig. 11 Combined effect of *d*-limonene and temperature on the flux of prednisolone through rat skin. Each point is the mean \pm S.D. of 3 determinations. (O) 40°C, (▲) 35°C, (□) 30°C, (●) 25°C, (Δ) 20°C.

ロンの累積透過量と温度の関係を示した。温度の上昇とともに透過量が著しく増大し、ラグタイムの減少も認められた。Fig. 12a および 12b に *d*-リモネン分散の前処理溶液におけるグルコースおよびイソニアジドの温度に対する累積透過量を示した。プレドニゾロンと同様に温度の上昇により透過量は顕著に増大しており、ラグタイムの減少も認められた。これら累積透過量より求めた定常状態の透過のフラックス (J)、および薬物溶解度と J より算出される透過係数 (P) の値を Table 2 にまとめた。また比較の目的で、前章で得られたケトプロフェンの結果も併せて示した⁴¹⁾。いずれの薬物における J および P 値も、温度の上昇により増大しており、累積透過量のグラフとよく一致した。各薬物の J 値はイソニアジドが最も高く、これはドナー側での溶解度が高いこと、および分子量が一番小さいことに依存すると考えられた。しかし、溶解度の温度変化を基準化した P 値では、ケトプロフェンが一番大きく、皮膚透過性に優れていることが確認された。また疎水性薬物（プレドニゾロンとケトプロフェン）では、高温側（30～40℃）で P 値の増加傾向が減弱するのに対し、親水性薬物（グルコースとイソニアジド）では温度の上昇とともに P 値が大きく増加する傾向が認められた。これは皮膚透過において、疎水性薬物と親水性薬物に及ぼす *d*-リモネンと温熱の作用が異なることによると考察される。Fig. 13 にプレドニゾロンの P 値のアレニウスプロットを示した。 P 値のアレニウスプロットは前章に示したケトプロフェンと同様に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。このような傾きの低下は、高温側での活性化エネルギーの減少を意味し、プレドニゾロンやケトプロフェンのような疎水性薬物の透過する non-polar pathway では、温度の上昇

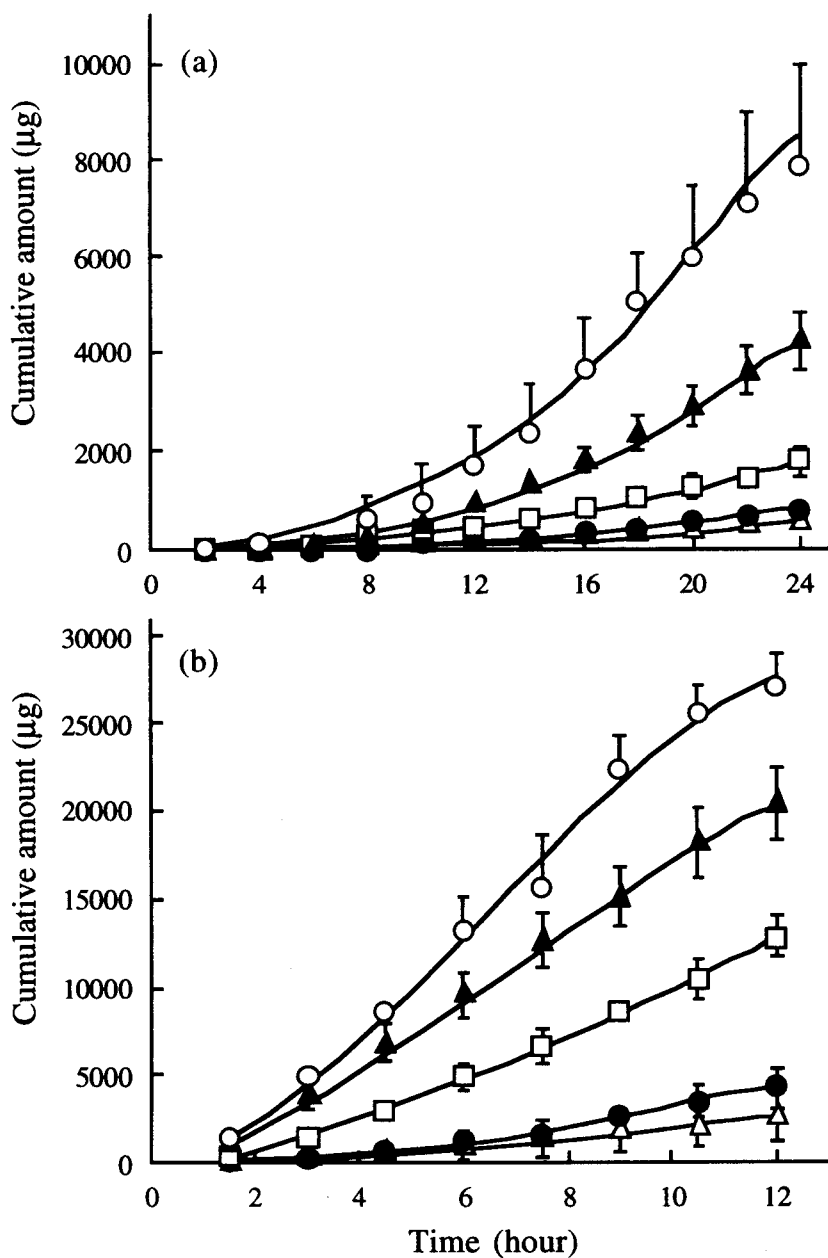


Fig. 12 Combined effect of *d*-limonene and temperature on the flux of (a) D-glucose and (b) isoniazid through rat skin. Each point is the mean \pm S.D. of 3 determinations. (O) 40°C, (\blacktriangle) 35°C, (\square) 30°C, (\bullet) 25°C, (\triangle) 20°C.

Table 2
Steady state flux (J) and permeability coefficient (P) of prednisolone, ketoprofen, D-glucose and isoniazid

Drugs	Temperature(°C)	J ($\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$)	P ($\text{cm}/\text{h}\times 10^3$)
Prednisolone	20	3.05 \pm 0.97	1.00 \pm 0.32
	25	10.42 \pm 1.28	2.48 \pm 0.31
	30	21.72 \pm 2.66	3.88 \pm 0.47
	35	30.39 \pm 4.79	4.25 \pm 0.67
	40	40.83 \pm 10.77	4.54 \pm 1.20
Ketoprofen ^a	20	49.70 \pm 7.38	8.02 \pm 1.19
	25	93.53 \pm 15.44	13.08 \pm 2.16
	30	142.24 \pm 19.69	16.83 \pm 2.33
	35	227.20 \pm 41.47	21.64 \pm 3.95
	40	297.81 \pm 61.46	22.65 \pm 4.67
D-Glucose	20	44.59 \pm 25.23	0.13 \pm 0.08
	25	74.49 \pm 13.43	0.19 \pm 0.03
	30	144.33 \pm 27.34	0.31 \pm 0.06
	35	388.32 \pm 65.66	0.71 \pm 0.01
	40	712.08 \pm 160.43	1.13 \pm 0.25
Isoniazid	20	366.91 \pm 149.57	2.66 \pm 1.08
	25	637.31 \pm 201.42	3.79 \pm 1.20
	30	1636.21 \pm 84.20	8.14 \pm 0.42
	35	2364.26 \pm 210.21	10.06 \pm 0.90
	40	3619.13 \pm 286.90	13.36 \pm 1.06

^a Cited from chapter 1.

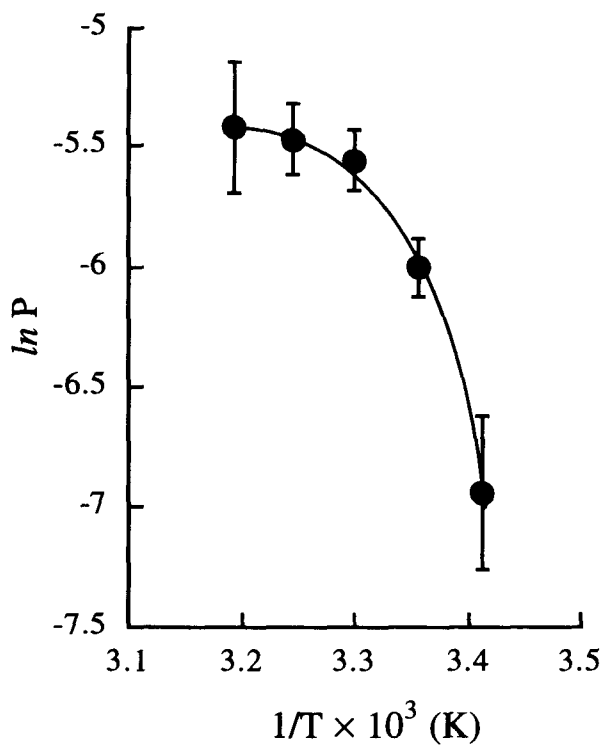


Fig. 13 Arrhenius plot of steady state permeability coefficients (P) of prednisolone

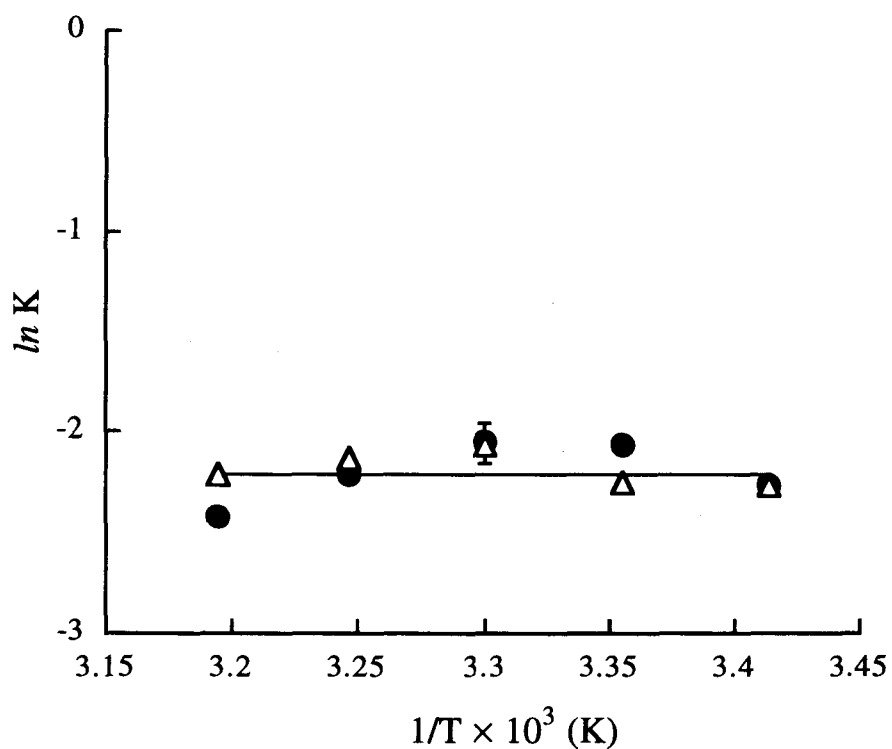


Fig. 14 Van't Hoff plots of partition coefficients (K) of prednisolone between isopropyl myristate and 30% ethanol-buffer solution (pH 7.0). (●) Without *d*-limonene, (Δ) 1.5% *d*-limonene.

に伴って構造変化を起こしている可能性が示唆された。Fig. 14に、プレドニゾロンのミリスチン酸イソプロピル (IPM) への分配係数における温度の影響をファントホッフプロットとして示した。なお、IPMは皮膚角質層のモデルとして用いた。*d*-リモネンの有無、もしくは温度の上昇による分配係数の変化はほとんど認められず、この温度範囲においてはプレドニゾロンの分配係数に及ぼす温度および *d*-リモネンの影響は無視できるものと考えられる。このことはプレドニゾロンの P 値の上昇が、拡散係数の増大に依存していることを意味しており、温度の上昇に伴う角質層の non-polar pathway の構造変化が推察された。

Fig. 15a および 15b に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を示した。いずれの薬物も皮膚透過におけるアレニウスプロットは良好な直線となることが確認された。透過の活性化エネルギーはグルコースが 87.6 kJ/mol、イソニアジドが 66.5 kJ/mol と皮膚透過において妥当な値であり、文献値と相違ない値が得られた^{23,26)}。ここでグルコースおよびイソニアジドはいずれも親水性薬物であることから、皮膚の polar pathway を透過するため、分配係数の寄与を考慮する必要はない。したがって親水性薬物に対する *d*-リモネンの吸収促進活性は主に皮膚内拡散係数の増大によると考えられる。また、アレニウスプロットが直線性を示したことから、*d*-リモネンおよび温熱の併用において、適用温度の相違による polar pathway の構造変化はないと考察される。

以上の結果より、Fig. 16 に角質層内で起こっていると考えられる構造変化を模式的に示した。前処理溶液に *d*-リモネンを含む場合、polar および non-polar pathway は、温度上昇による構造変化を受けないと考えられる。したがって、プレドニゾロン、グルコースおよびイソニアジドの皮膚透過がほとんど起こらなかったと考察できる。これに対し、前処理溶液に *d*-

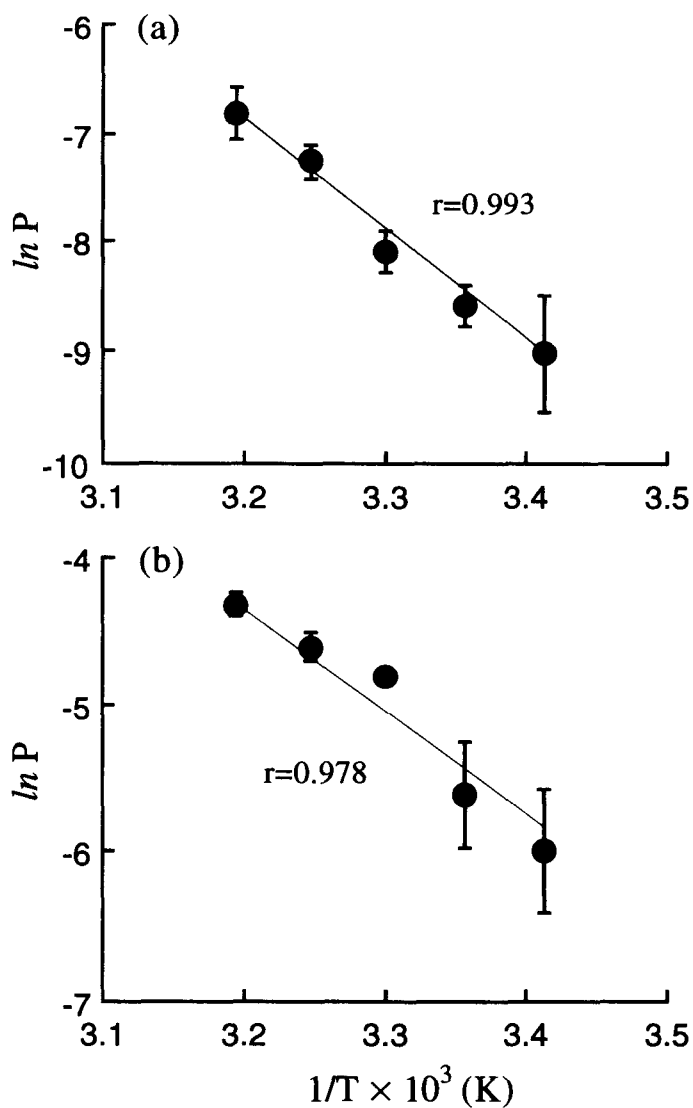


Fig. 15 Arrhenius plots of steady state permeability coefficients (P) of (a) D-glucose and (b) isoniazid. Each point is the mean \pm S.D. of 3 determinations.

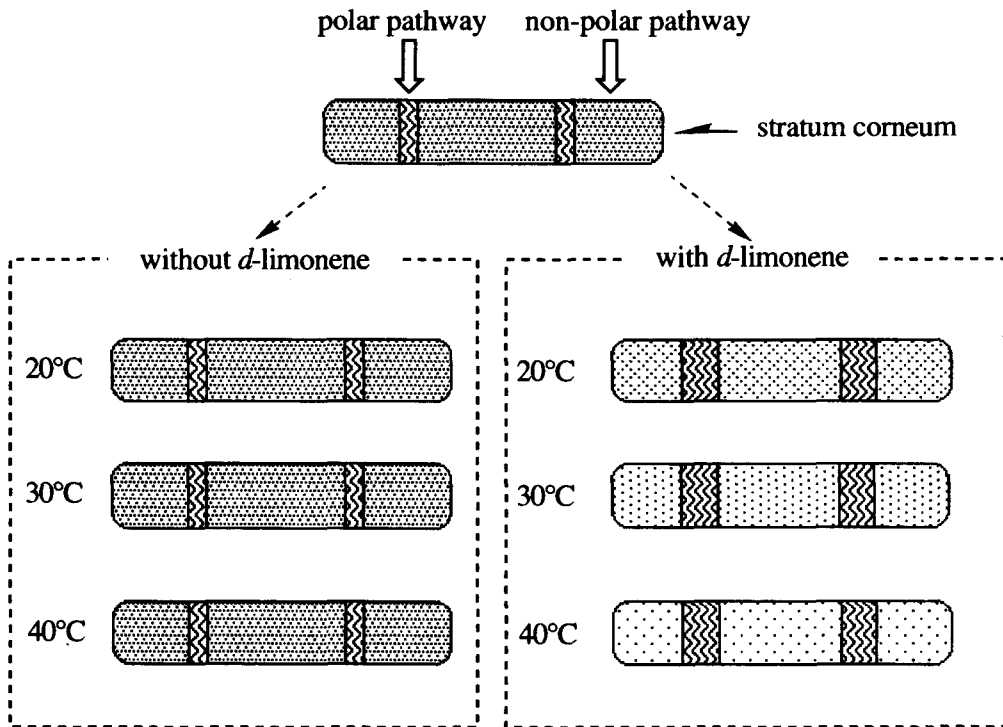


Fig. 16 Proposed mechanism of combined effect of *d*-limonene and temperature on polar and non-polar pathways in the skin. The structure of polar pathway could be changed with a pretreatment with *d*-limonene independently on applied heat, however, the non-polar pathway could be synergistically affected by the combination of *d*-limonene pretreatment with applied heat.

リモネンを分散させた場合、polar pathway では透過に寄与する有効面積の増大や拡散距離の減少といった変化が惹起されるが、この現象が温度の上昇とともに増強されるようなことはない。一方 non-polar pathway では、*d*-リモネンの前処理により構造変化が起こり、また温度の上昇とともにこの変化が増幅されるものと考えられる。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考えられる。

第 4 節 本章のまとめ

本章の結果より、polar pathway の構造変化に対する *d*-リモネンの作用は適用温度に依存しないのに対し、non-polar pathway の構造変化に対しては温度依存的に作用することが認められた。また、non-polar pathway に対する *d*-リモネンと温熱の併用は、薬物の皮膚への分配には影響せず、構造変化を惹起することによって薬物の透過に対する皮膚への抵抗を減少させ、皮膚内拡散性を増大させるものと推測された。

第3章 薬物の皮膚透過経路に及ぼすオレイン酸と温熱の併用効果

第1節 序論

経皮吸収における促進剤の研究には関心が高く、特にオレイン酸は角質層脂質と類似の性質を有することから、その促進作用について数多くの研究が行なわれている³⁶⁻⁴⁰⁾。角質層の示差熱分析の結果、オレイン酸処理により脂質の相転移温度が変化することから、オレイン酸が角質層内で脂質と何らかの相互作用を引き起こすことが示唆されている³⁶⁾。またオレイン酸による皮膚への分配性の改善も報告されている²²⁾。しかしながら、これらはいずれもオレイン酸を高濃度（基剤中に10%以上）に適用した場合の結果であり、低濃度を適用した時の吸収促進作用や、温熱の併用によって促進作用が増強される機能については、全く研究が行なわれていない。

そこで本章では、吸収促進剤としてオレイン酸を用い、前章と同様の皮膚透過実験を行なうことにより、*d*-リモネンの結果と比較した。なお、疎水性薬物にはプレドニゾロン、親水性薬物にはグルコースを用いた⁵⁰⁾。

第2節 実験の部

2-1 試薬

オレイン酸はシグマ社製の特級品を購入して用いた。その他の試薬はすべて第2章 2-1と同様の試薬を用いた。

2-2 *in vitro* 透過実験

第1章 2-3と同様に操作して透過実験を実施した。ただ

し、オレイン酸の前処理溶液の濃度は3%とした。

2-3 透過した薬物量の測定

第2章 2-3と同様に操作して定量を行なった。

2-4 前処理後の皮膚表面の観察

第1章 2-5と同様に操作して、皮膚表面の観察を行なった。

第3節 オレイン酸と温熱の併用効果

オレイン酸無添加の前処理溶液におけるプレドニゾロンおよびグルコースの透過はHPLCの検出限界以下であり、ほとんど透過が起こらなかった。したがって、オレイン酸無添加においては両薬物の皮膚透過に対する温度の影響を明確にすることはできなかつた。Fig. 17にオレイン酸を分散(3%)させた溶液で前処理した皮膚での、プレドニゾロンおよびグルコースの累積透過量を示した。両薬物とも温度の上昇とともに透過量が顕著に増大し、ラグタイムの減少も認められた。特にグルコースの場合は、25℃から30℃付近を境に、急激な透過の増大が観察され、これに伴うフラックスの増大も認められた。次に定常状態のフラックスおよび薬物溶解度を求め、透過係数(P)値を算出した(Fig. 18)。オレイン酸添加に伴う薬物溶解度の減少もしくは増加は認められなかつたため、溶解度は前節で求めた値を用いた。両薬物のP値は、温度の上昇とともに増加しており、オレイン酸と温熱の併用により、疎水性薬物だけでなく、親水性薬物の皮膚透過も促進されることが確認された。Fig. 19に、プレドニゾロンおよびグルコースのP値のアレニウスプロットを示す。オレイン酸前処理では、どちらの薬物においても良好な直線性が認められた。透過の活性化エネルギーはプ

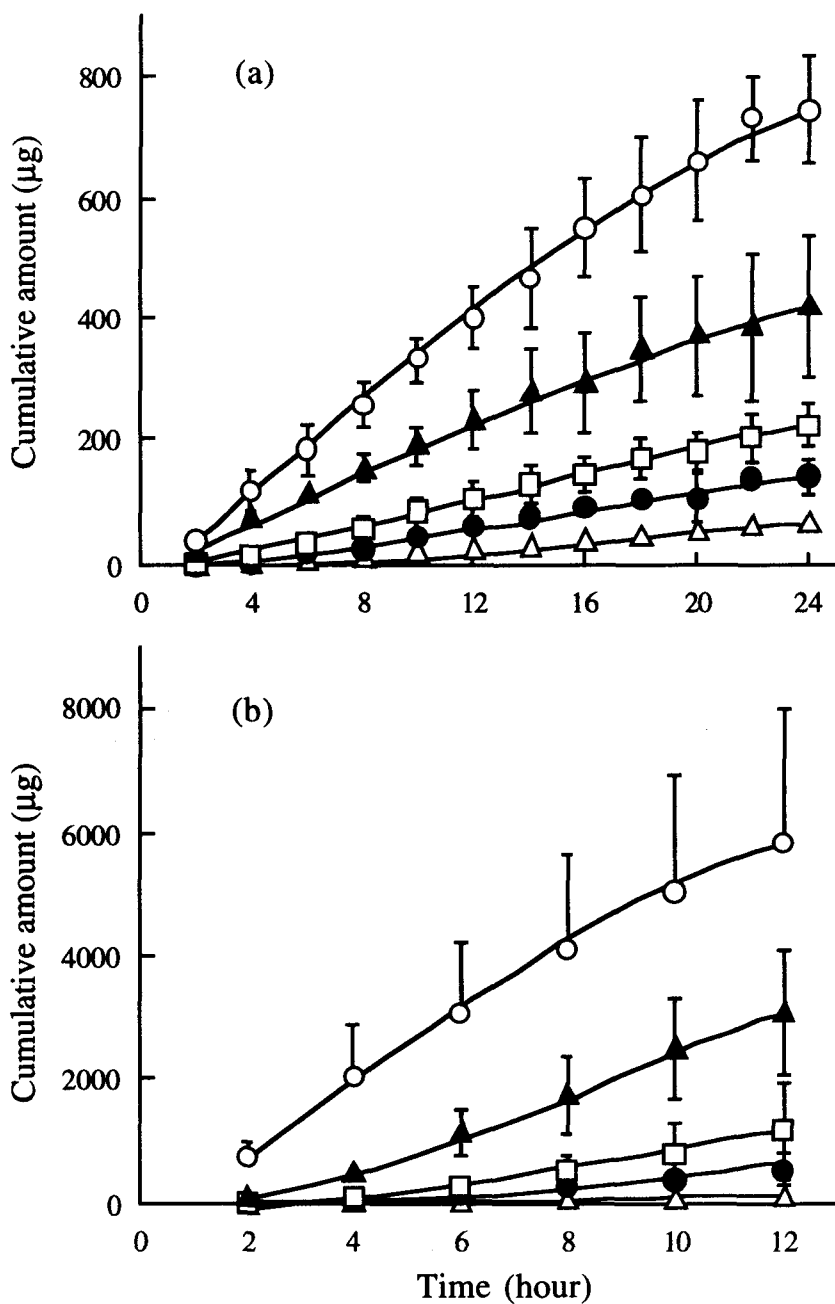


Fig. 17 Combined effect of oleic acid and temperature on the flux of (a) prednisolone and (b) D-glucose through rat skin. Each point is the mean \pm S.D. of 3 determinations. (O) 40°C, (▲) 35°C, (□) 30°C, (●) 25°C, (△) 20°C.

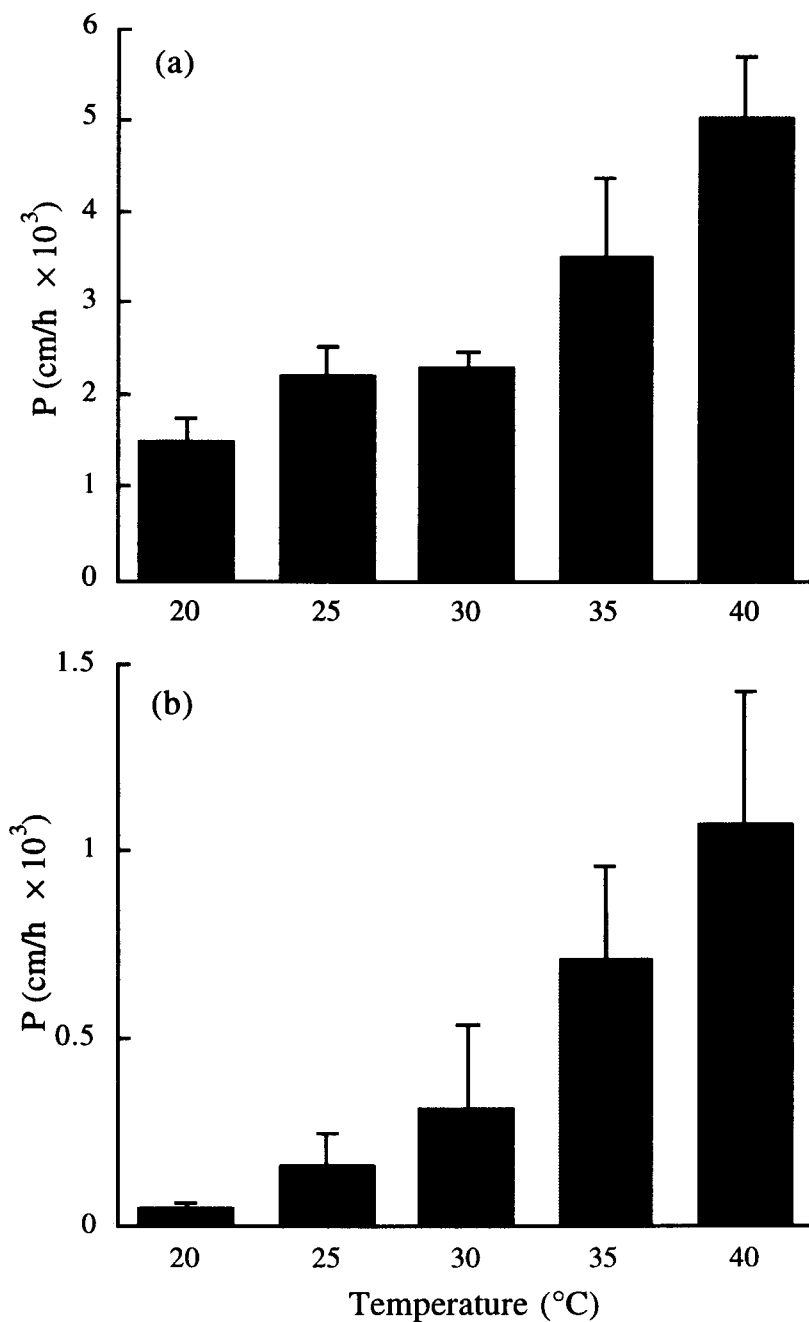


Fig. 18 Steady state permeability coefficients (P) of penetrants. Each point is the mean \pm S.D. of 3 determinations. (a) Prednisolone, (b) D-glucose.

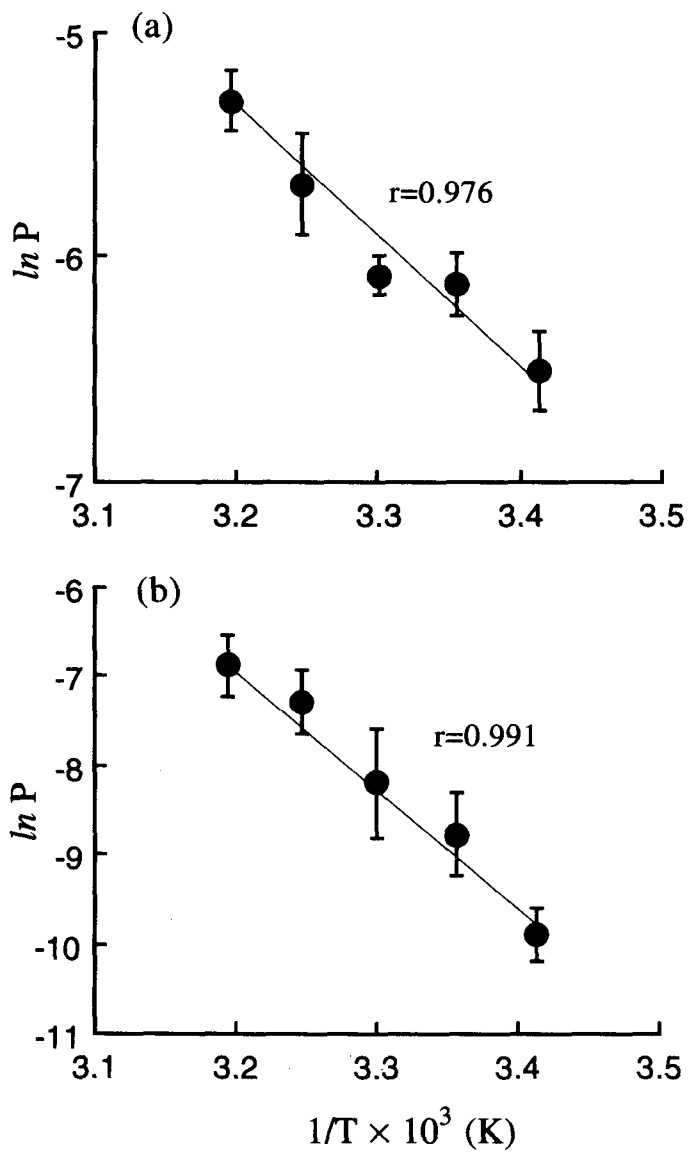


Fig. 19 Arrhenius plots of steady state permeability coefficients (P) of penetrants. (a) Prednisolone, (b) D-glucose.

レドニゾロンが 43.7 kJ/mol、グルコースが 114.4 kJ/mol であり、他の文献と相違ない値が得られた^{23,26)}。これは前節までの *d*-リモネンの結果とは明らかに異なっており^{41,49)}、プレドニゾロンのような疎水性薬物においてもアレニウスプロットは良好な直線性を示した。したがって、オレイン酸と温熱の併用は non-polar pathway に対し、*d*-リモネンで認められたような特異な作用は示さないものと考えられる。一方、グルコースのような親水性薬物に対するオレイン酸の作用は、有効面積の増大や拡散距離の減少が考えられ、*d*-リモネンと同様に温度上昇による拡散性の増大が透過性改善の主な機構であると考察された。次に、オレイン酸処理による皮膚表面の微小構造の変化を形態学的に追跡した。Fig. 20 にオレイン酸で前処理した後の皮膚表面の SEM 像を示す。未処理皮膚とは著しく異なる表面状態が認められた。表面に見られる微細な顆粒状の物質が、皮膚表面に残存するオレイン酸そのものか、あるいはオレイン酸が皮膚の成分に影響して形成されたものであるかは明らかでないが、未処理皮膚とは明らかに異なる傾向を示した。しかし、この形態は温度上昇により変化することはなく、この温度範囲では同様の形態を維持し、透過係数のアレニウスプロットが示す結果と一致した。以上より、non-polar pathway に対するオレイン酸の影響は、*d*-リモネンとは大きく異なることが確認された。

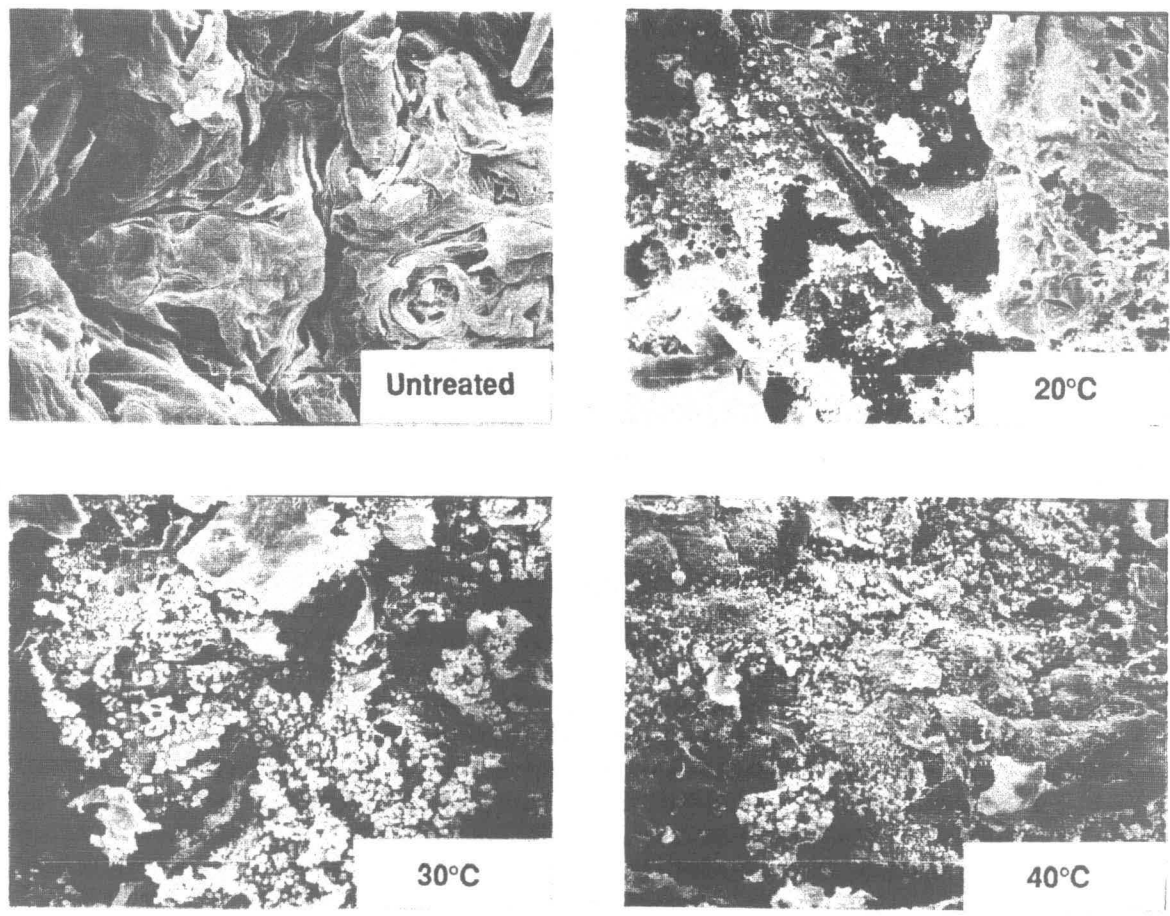


Fig. 20 Scanning electron micrographs of hairless rat skin treated with 3.0% oleic acid in 30% ethanol for 2 h at various temperature. Magnification, $\times 500$.

第 5 節 本章のまとめ

オレイン酸と温熱の併用による薬物の経皮吸収促進作用では、疎水性薬物もしくは親水性薬物のいずれにおいても、透過係数のアレニウスプロットが良好な直線性を示す結果となった。これは前章までの *d*-リモネンの結果とは大きく異なっており^{41,49)}、オレイン酸処理による皮膚の構造変化は、適用温度に依存せず、いずれの温度条件でオレイン酸を作用させても、同程度の構造変化が惹起されるものと推測された。

第4章 吸収促進剤の皮膚刺激性に及ぼす温度の影響

第1節 序論

前章までの実験では、*d*-リモネンもしくはオレイン酸と温熱の併用による吸収促進効果を詳細に検討してきた^{41,49,50}。その結果、疎水性薬物に対する*d*-リモネンの適用は、高温になるほど感受性は低下するものの、著しい皮膚バリアー機能の低下作用が認められた。一方、疎水性薬物に対するオレイン酸の促進作用は、*d*-リモネンとは明らかに異なっていた。水溶性薬物の皮膚透過に対しては、*d*-リモネンおよびオレイン酸のいずれにおいても、同様の促進作用を示した。

吸収促進剤の活性の評価とともに、その皮膚刺激性についても検討を行なうことが大切である。すなわち、臨床応用可能な製剤の開発を考える場合、皮膚刺激を最小限に抑えることが重要な課題となってくる。皮膚刺激性の判定には、発赤、浮腫、水和などを肉眼で検査するドレイズ法が繁用されている⁵¹⁻⁵³。しかし、実際の製剤を考慮した場合ドレイズ法では不十分であり、皮膚を組織病理学的に検査することが、より望ましいと考えられる^{54,55}。

本章では、温熱併用時の促進剤（*d*-リモネンおよびオレイン酸）の皮膚刺激性を、組織学的に分類することにより評価した。また同時に促進剤の活性とその刺激性の相関についても考察した⁵⁶。

第 2 節 実験の部

2-1 試薬

前章までと同様の試薬を用いた。

2-2 ゲル軟膏の作製

第 1 章 2-2 に記載した方法を用いてゲル軟膏を作製した。ゲル軟膏中の促進剤濃度は吸収促進活性を同程度にするため、*d*-リモネン濃度を 0.5~1.5%、オレイン酸濃度を 1.0~3.0% とした。なお、すべての軟膏にエタノール 30% を含有させた。

2-3 皮膚刺激性の評価

第 1 章 2-2 に記載した *in vivo* 吸収実験の方法に基づき、ゲル軟膏をラット腹部に適用した。適用 6 時間後の皮膚を摘出し、10%ホルマリン溶液で 24 時間以上保存した後、濃度の異なるエタノール溶液で逐次脱水した。次にパラフィンに包埋した後、ミクロトームを用いて厚さ 3 μm の組織切片を作成した。ヘマトキシリンおよびエオジンで染色を行なった後、光学顕微鏡下で観察し、皮膚への刺激性を評価した。実験は 5°C 間隔で 20~40°C まで行なった。

第 3 節 皮膚刺激性に及ぼす吸収促進剤と温度の影響

皮膚は組織学的に表皮、真皮および皮下組織の 3 層に分けることができ、その最外層部は角質層で覆われている。加えて表皮、真皮は立毛筋、エクリン腺、汗腺、毛穴などの付属器官を形成しており、複雑な構造をしている⁵⁷⁻⁵⁹⁾。本研究では、これら皮膚構造を組織学的に観察することにより、吸収促進剤と温熱の併用による皮膚刺激性を検査した。

Fig. 21 は、促進剤を含まないゲル軟膏を 20°C と 40°C でラットの腹部除毛皮膚に適用し、6 時間経過後の顕微鏡像を示した

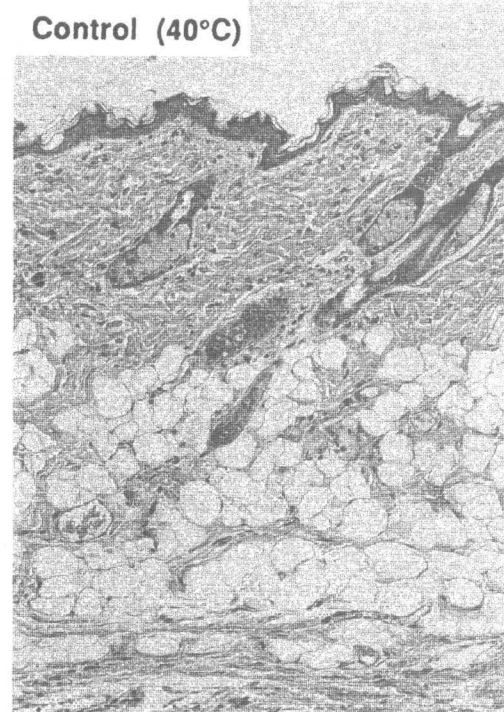
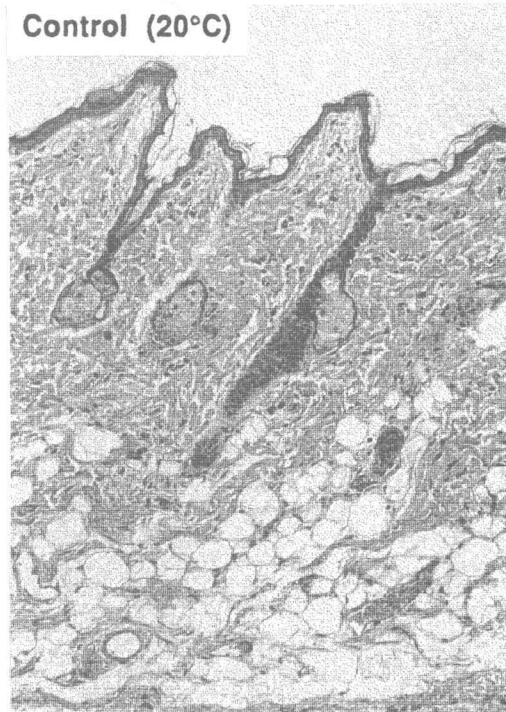


Fig. 21 Microphotographs of rat skin at 6 h after application of hydrogels alone at 40°C. H & E \times 100.

ものである。促進剤を含まない場合、高温の適用においても表皮、真皮および皮下組織のいずれにも刺激は認められず、未処理の皮膚組織と全く変わらなかった。これに対し、*d*-リモネンを0.5%ゲル軟膏に含有させた場合、35℃までは全く刺激が認められなかったが、40℃でわずかに表皮が液化し、真皮下で浮腫が起こった (Fig. 22)。*d*-リモネン1.0%の場合は、30℃まではほとんど刺激性が認められていないが、35℃になると、表皮の液化、真皮下の浮腫、また40℃になると、真皮および皮下組織でのコラーゲン繊維の膨潤が観察された。さらに*d*-リモネン1.5%の場合、25℃まではほとんど刺激がないのに対し、30℃になるとわずかに表皮の液化、真皮下の浮腫、真皮のコラーゲン繊維の膨潤が認められ、35℃、40℃と温度の上昇とともに顕著に刺激が増大した。また40℃では、わずかに皮下組織の炎症性細胞の浸潤が認められた。

オレイン酸を用いたゲル軟膏適用後の顕微鏡像を Fig. 23 に示す。オレイン酸1.0%の場合は30℃から、また2.0%の場合は25℃から、さらに3.0%の場合は20℃から表皮の液化、真皮下の浮腫、真皮および皮下組織でのコラーゲン繊維の膨潤などの刺激が観察された。この刺激の程度は、温度上昇もしくはオレイン酸濃度の増加に伴い増悪する傾向が認められた。また特にオレイン酸3.0%においては、高温域で、*d*-リモネンでは全く観察されなかった皮膚付属器官の変性が観察された。

これら刺激の程度を定量的に見積るため、スコア付けを行なった。皮膚を組織学的に (A) 表皮の液化、(B) 表皮下の浮腫、(C) 真皮のコラーゲン繊維の膨潤、(D) 皮下織コラーゲン繊維の膨潤、(E) 皮下織炎症細胞の膨潤および (F) 皮膚付属器官の変性について観察した。これらの刺激について5段階 (0~4) にスコア付けを行ない、これらを加え合わせることでより総合刺激指数 (TIS) を算出した。Table 3 に *d*-リモネンを用いたゲル軟膏における皮膚刺激スコアを示す。*d*-リモネン

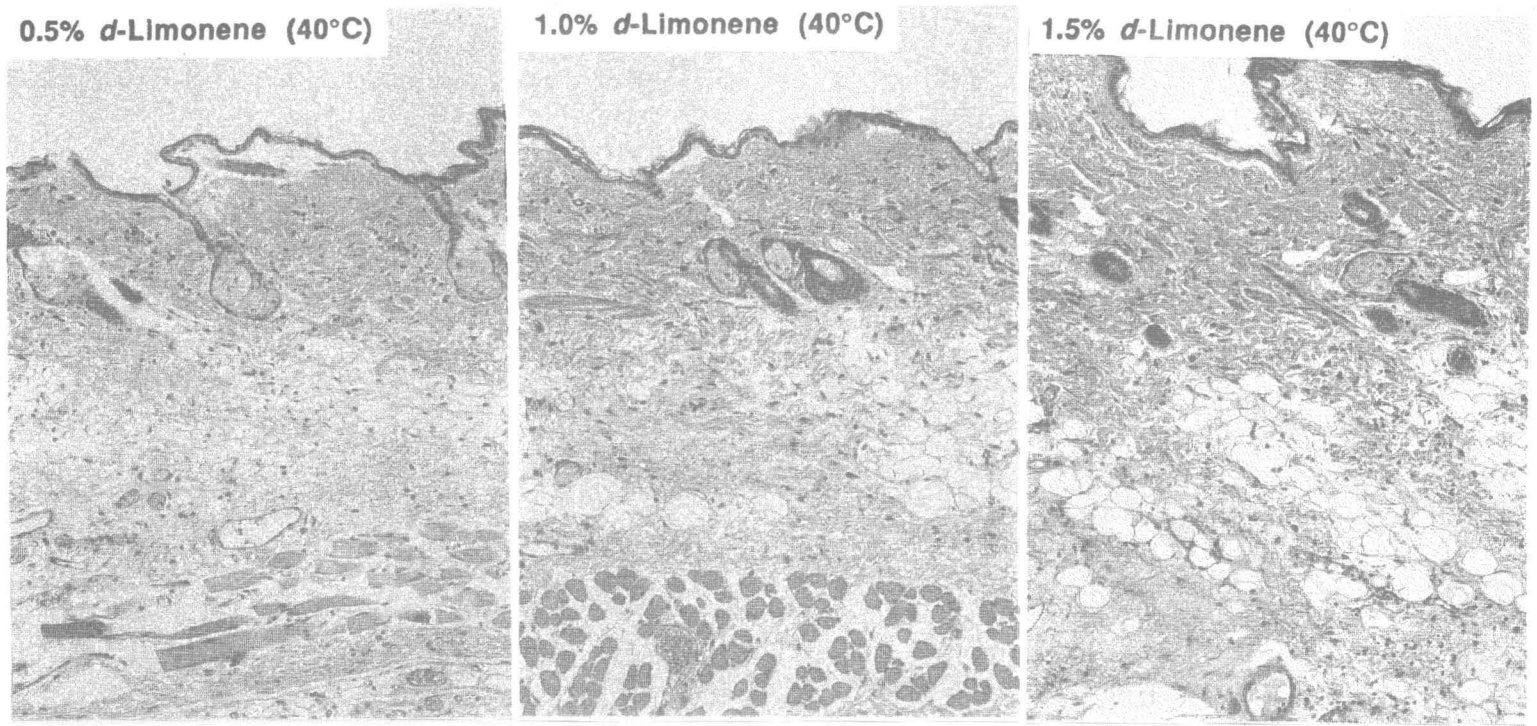


Fig. 22 Microphotographs of rat skin at 6 h after application of hydrogels containing *d*-limonene at 40°C. H & E \times 100.

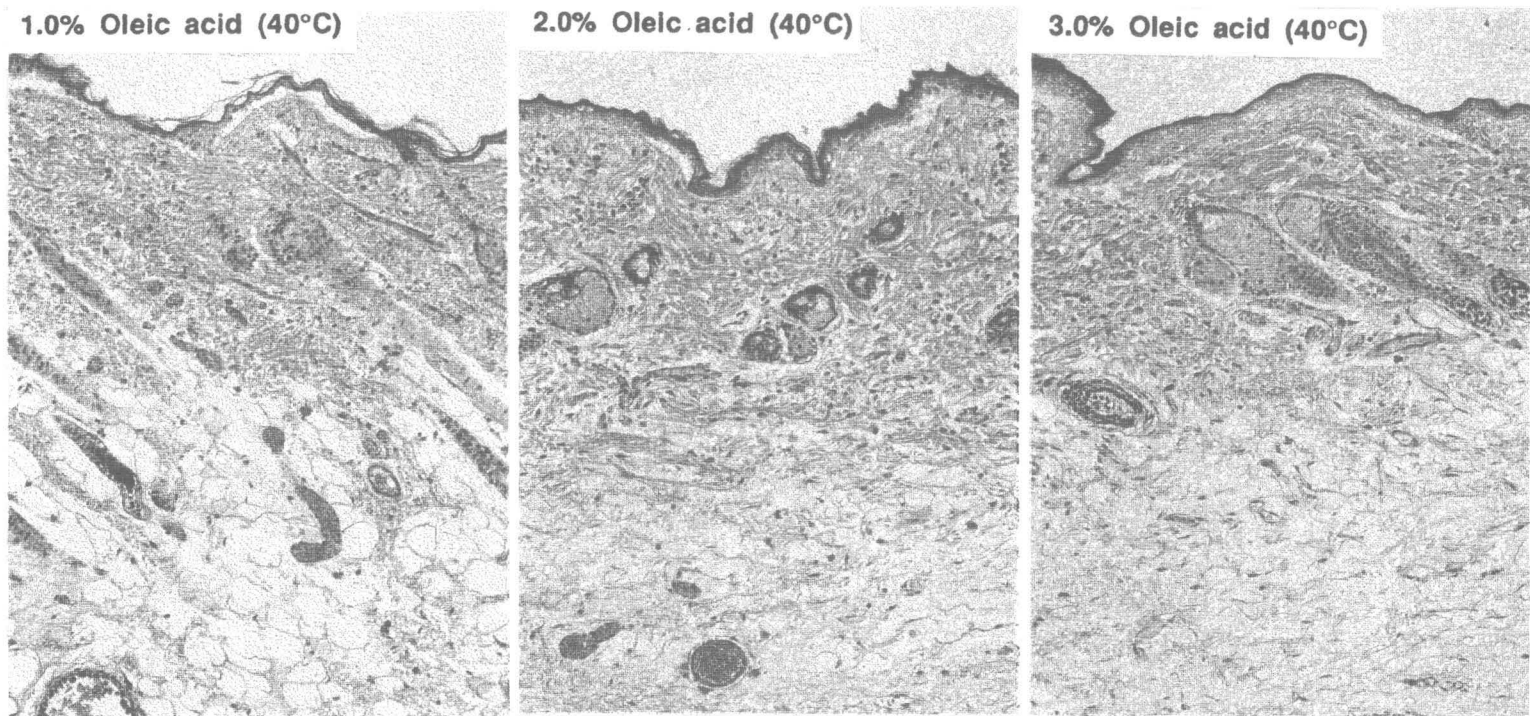


Fig. 23 Microphotographs of rat skin at 6 h after application of hydrogels containing oleic acid at 40°C. H & E \times 100.

Table 3
Histopathological findings of rat skin 6 h after application of hydrogels containing *d*-limonene

Enhancer (<i>d</i> -Limonene)	Temperature (°C)	Histopathological findings ¹						Total irritation score		
		A	B	C	D	E	F			
0.5%	20	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	0	0
	25	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	0	0
	30	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	0	0
	35	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	0	0
	40	2 2 3	2 2 3	2 2 2	2 0 2	0 0 0	0 0 0	8	6	10
1.0%	20	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	0	0
	25	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	0	0
	30	1 1 2	1 1 2	1 1 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	3	3	5
	35	2 2 1	2 2 1	2 1 0	0 1 0	0 0 0	0 0 0	6	6	2
	40	3 3 3	2 3 3	3 3 2	2 2 2	0 0 0	0 0 0	10	11	10
1.5%	20	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0	0	0
	25	1 1 2	1 0 2	1 0 2	0 0 0	0 0 0	0 0 0	3	1	6
	30	2 3 1	2 3 1	2 2 2	0 2 0	0 0 0	0 0 0	6	10	4
	35	3 1 3	3 0 2	3 1 2	2 0 1	0 0 0	0 0 0	11	2	8
	40	2 3 4	2 2 3	2 3 3	2 2 3	0 1 1	0 0 0	8	11	14

¹ A, Epidermal liquefaction; B, Subepidermal edema; C, Dermal collagen fiber swelling; D, Hypodermal collagen fiber swelling; E, Hypodermal inflammatory cell infiltration; F, Skin appendages degeneration. (0) No change; (1) very slight; (2) slight; (3) moderate; (4) marked.

が低濃度の場合ほとんど刺激はないが、*d*-リモネンの濃度増加および適用温度の上昇により刺激性が増大している。オレイン酸においても同様の傾向が認められるが (Table 4)、*d*-リモネンと比べて比較的低濃度から刺激が見られ、全体的にオレイン酸の方が強い刺激性を現わした。また *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、オレイン酸では 2.0% の 35℃ 付近から観察された。Fig. 24 に TIS に及ぼす促進剤と温度の影響を示す。コントロールでは全く刺激が無いのに対し、いずれの促進剤においても濃度増加および温度上昇により刺激性が増大しており、また特にオレイン酸において強い刺激性が確認された。次に、TIS に対する促進剤と温度の関連性を統計的に評価する目的で、二元配置の分散分析を行なった。結果を Table 5 および 6 に示す。*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項は、刺激の発現に対して高度に有意であり、吸収促進作用と同様に、刺激に対しても相乗的に働くものと考えられた。

Table 4
Histopathological findings of rat skin 6 h after application of hydrogels containing oleic acid

Enhancer (Oleic acid)	Temperature (°C)	Histopathological findings ¹						Total irritation score		
		A	B	C	D	E	F			
1.0%	20	0 0 0	0 0 0	0 0 1	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 1	
	25	0 0 0	0 0 0	0 0 2	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 2		
	30	2 0 3	2 0 2	2 0 2	1 0 2	0 0 0	0 0 0	7 0 9		
	35	3 1 2	3 1 2	2 2 2	3 2 2	0 0 0	0 0 0	11 6 8		
	40	3 3 3	3 3 3	3 3 3	3 3 3	0 0 0	2 3 3	14 15 15		
2.0%	20	0 1 1	0 1 0	0 2 1	0 1 0	0 0 0	0 0 0	0 5 2		
	25	3 2 1	3 2 0	2 3 2	2 3 2	0 0 0	0 0 0	10 10 5		
	30	3 3 3	3 2 3	3 2 3	2 0 2	0 0 0	0 0 3	11 7 14		
	35	3 4 4	3 4 4	3 3 3	3 3 3	1 1 3	2 3 3	15 18 20		
	40	3 3 3	3 3 3	3 3 3	2 3 3	0 1 0	3 3 3	14 16 15		
3.0%	20	1 1 1	1 1 1	2 2 2	3 2 2	0 0 0	0 0 0	7 6 6		
	25	2 2 3	2 3 3	2 2 2	2 2 2	0 0 0	0 0 2	8 9 12		
	30	3 3 3	3 3 3	3 2 3	3 3 2	0 0 0	3 0 0	15 11 11		
	35	3 4 4	3 3 4	3 4 4	3 4 4	0 0 0	3 4 4	15 19 20		
	40	4 4 4	0 0 2	4 4 4	4 4 3	0 0 0	4 4 4	16 16 17		

¹ A, Epidermal liquefaction; B, Subepidermal edema; C, Dermal collagen fiber swelling; D, Hypodermal collagen fiber swelling; E, Hypodermal inflammatory cell infiltration; F, Skin appendages degeneration. (0) No change; (1) very slight; (2) slight; (3) moderate; (4) marked.

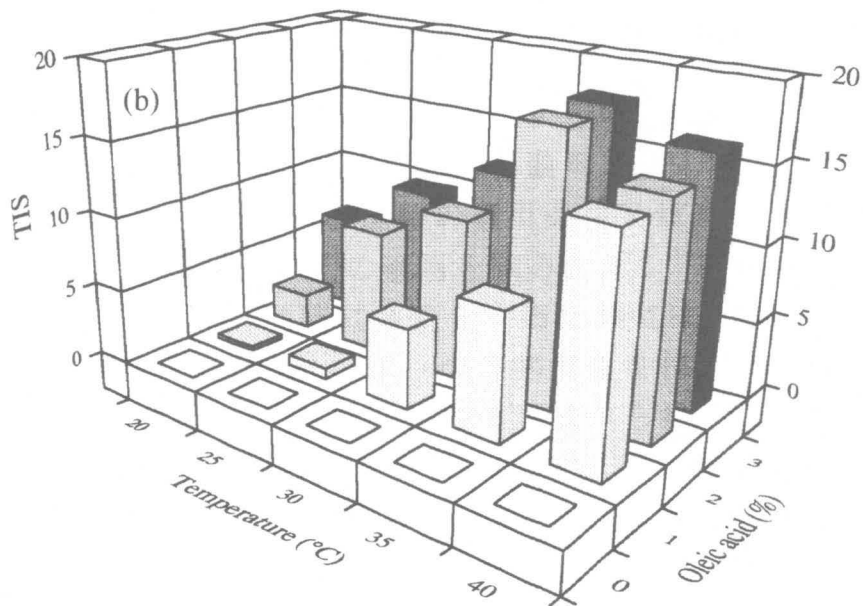
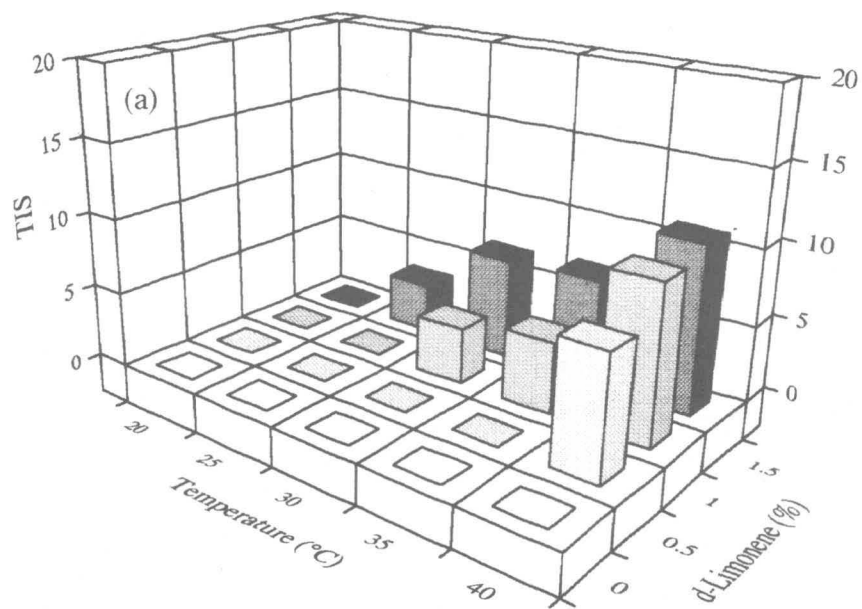


Fig. 24 Total irritation score (TIS) of rat skin at 6 h after application as a function of penetration enhancer concentration and temperature. Each column represents the mean of 3 animals. (a) *d*-Limonene, (b) oleic acid.

Table 5
ANOVA for skin irritation calculated with hydrogel containing *d*-limonene

Factor	Df ^a	MS ^b	F ₀ ^c
<i>d</i> -Limonene	3	89.9	31.7**
Temperature	4	96.9	34.2**
Interaction	12	15.8	5.6**
Error	40	2.8	—

^a Degrees of freedom.

^b Mean square.

^c Observed *F* value (MS of each factor/MS of error).

** $p < 0.01$

Table 6
ANOVA for skin irritation calculated with hydrogel containing oleic acid

Factor	Df ^a	MS ^b	F ₀ ^c
Oleic acid	3	474.9	115.4**
Temperature	4	191.4	46.5**
Interaction	12	30.0	7.3**
Error	40	4.1	—

^a Degrees of freedom.

^b Mean square.

^c Observed *F* value (MS of each factor/MS of error).

** $p < 0.01$

第 4 節 吸収促進剤の活性と刺激性との相関

d-リモネンとオレイン酸とでは適用濃度が異なるため、温熱の併用により惹起される刺激性と吸収促進活性の関係について考察した。前述した Fig. 11、12 および 17 の *d*-リモネン 1.5% とオレイン酸 3.0% における疎水性薬物のプレドニゾロンと親水性薬物のグルコースの *in vitro* 透過実験の結果を比較するため、スケールを同様にとり、Fig. 25 にまとめた。いずれのグラフにおいても、温度上昇により透過量は顕著に増大しており、その刺激性と非常によく相関している。またプレドニゾロンの場合、*d*-リモネン 1.5% とオレイン酸 3.0% では各温度間でほとんど透過量に差がないことがわかる。一方グルコースの場合、*d*-リモネン 1.5% では 40℃ で透過量が約 2000 μg (12 時間値) であるのに対し、オレイン酸 3.0% では約 6000 μg (12 時間値) と 3 倍の透過量が得られている。先の刺激性の評価より、皮膚付属器官の変性がオレイン酸にのみ観察され、*d*-リモネンには認められなかったことから、ひとつの可能性として、オレイン酸は皮膚付属器官に対して強く作用することにより、親水性薬物の透過を促進することが考えられる。

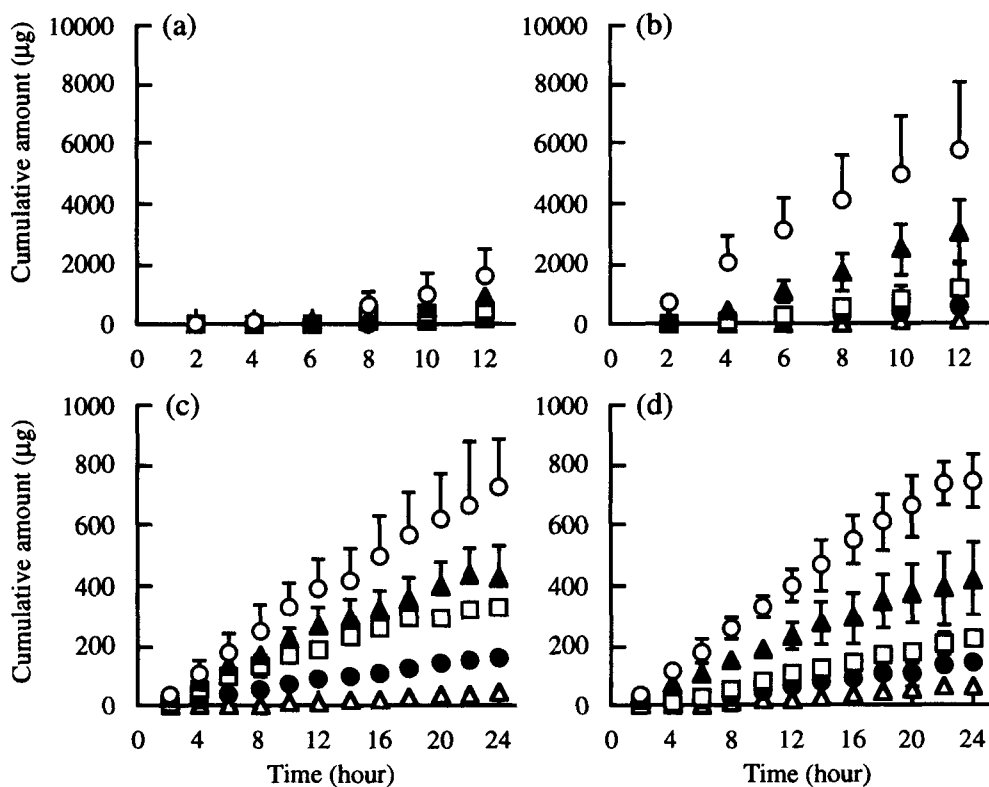


Fig. 25 Combined effect of enhancer and temperature on the flux of lipophilic and hydrophilic penetrants through rat skin. (a) Skin permeation of D-glucose after pretreated with *d*-limonene, (b) skin permeation of D-glucose after pretreated with oleic acid, (c) skin permeation of prednisolone after pretreated with *d*-limonene, (d) skin permeation of prednisolone after pretreated with oleic acid.

第 4 節 本章のまとめ

温度上昇もしくは促進剤濃度増加に伴い、皮膚刺激性は顕著に増大した。オレイン酸は *d*-リモネンより刺激が強く、また皮膚付属器官の変性はオレイン酸の適用によってのみ観察された。さらに、皮膚の組織学的な刺激と薬物透過は密接に関連していた。しなしながら、*d*-リモネンとオレイン酸により惹起される刺激性とそれら促進剤の活性を比較した場合、皮膚に及ぼす刺激が少なく、かつ十分な活性が得られることから、*d*-リモネンはオレイン酸よりも優れた促進剤であると考察された。

第5章 ケトプロフェンの経皮吸収における温熱と吸収促進剤の適用条件の最適化

第1節 序論

前章までに、吸収促進剤 (*d*-リモネンおよびオレイン酸) と温熱の併用による促進効果^{41,49,50)}、皮膚への刺激性⁵⁶⁾について検討を行ってきた。エタノールの共存下で温熱の併用によって惹起される *d*-リモネンとオレイン酸の吸収促進剤としての機能を総合的に比較するためには、それぞれのシステムについて吸収促進作用と皮膚への刺激性を同時に考慮した最適な適用条件を推定する必要がある、このためには従来の実験手法とは異なる方法論を適用することが望ましい。本研究ではケトプロフェンの経皮吸収における吸収促進剤 (*d*-リモネン、オレイン酸)、エタノールおよび温熱の適用条件を最適化する目的で、多目的同時最適化法^{60,61)}の適用を試みた⁶²⁾。

複数の製剤特性を同時に最適化するためには、特性値ごとに得られる予測式を統合し、単一の目的関数を作成する必要がある。Khuri と Conlon⁶³⁾は特性値の予測式から得られる個々の理想値と予測値の重み付きユークリッド距離を用いる方法として、次式を提出した。

$$S(\mathbf{X}) = \left[\sum_{i=1}^n \{W_i (FD_i(\mathbf{X}) - FO_i(\mathbf{X}))\}^2 \right]^{1/2} \text{-----}(4)$$

ここで \mathbf{X} は要因を、 $S(\mathbf{X})$ は重み係数 W_i により基準化された汎距離関数を意味する。 $FD_i(\mathbf{X})$ は特性値の個々の予測式 $F_i(\mathbf{X})$ の実験領域内での最適値、 $FO_i(\mathbf{X})$ は同時最適値である。製剤特

性に対して多くの要因が同時に関与する場合、両者の真の関数関係は通常未知であるため、各特性値の予測式は実験結果から近似的に求めざるを得ない。しかし、限られた実験範囲内であれば、全要因の組み合わせからなる2次多項式を基本式とする重回帰分析を適用することによって、精度の高い予測式が得られることが多い。(4)式における W_i の設定は種々考えることができるが、著者は以下の式にしたがって W_i を求めた^{45,64)}。

$$W_i = RA_i^2 / SD_i \text{ -----(5)}$$

ここで RA_i^2 は重回帰分析における自由度2重調整寄与率であり、 SD_i は各特性値の実測値の標準偏差である。 RA_i^2 値は予測式 $F_i(X)$ の信頼性を表し、 SD_i は各特性値の広がりを表している。

以上に概要を示した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。

第2節 実験の部

2-1 試薬

前章までと同様の試薬を用いた。

2-2 ゲル軟膏の調製および経皮吸収実験

エタノール濃度、吸収促進剤および適用温度をそれぞれ要因 X_1 、 X_2 および X_3 として選択した。これら3要因を球形複合実験計画(Table 7)にしたがって割り付けることにより、18種類の適用条件を選択した。各要因のレベルの実験の実験に供した単位をTable 8に示す。実験に用いたゲル軟膏は、第1章 2

Table 7
Experimental design for three factors

Formulation	Factor level in coded form		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	$-\sqrt{3}$	0	0
10	$\sqrt{3}$	0	0
11	0	$-\sqrt{3}$	0
12	0	$\sqrt{3}$	0
13	0	0	$-\sqrt{3}$
14	0	0	$\sqrt{3}$
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

Table 8
Levels of factors in ketoprofen hydrogels

Factor	Factor level coded form				
	$-\sqrt{3}$	-1	0	1	$\sqrt{3}$
X ₁ Ethanol (%)	20.0	26.3	35.0	43.7	50.0
X ₂ <i>d</i> -Limonene (%)	0	0.63	1.50	2.37	3.00
Oleic acid (%)	0	1.27	3.00	4.73	6.00
X ₃ Temperature (°C)	32.0	34.1	37.0	39.9	42.0

－ 2 と同様の手技に基づき調製した。

2－3 血液中のケトプロフェン濃度の測定

第 1 章 2－2 と同様の定量法を用いた。

2－4 皮膚刺激性の評価

第 4 章 2－4 と同様の方法で評価を行なった。

第 3 節 特性値に影響する要因

第 1 章 第 3 節で用いたコンパートメントモデルによって、経皮吸収動態の解析を行ない、透過速度 (R_p) およびラグタイム (t_L) を算出し、特性値とした。次に、8 時間後のゲル適用部位の皮膚を摘出し、第 4 章 2－3 と同様に皮膚切片を作成し、刺激性の評価を行なった。これらの刺激について 5 段階 (0~4) にスコア付けを行い、合計スコアを総合刺激指数 (TIS) とした。 R_p 、 t_L および TIS の実測値を Table 9 に示す。 R_p 値は幅広く変動し、エタノール、吸収促進剤および温度のいずれの要因も R_p 値に大きく影響することが示された。特に条件 11 の吸収促進剤を含まないゲルの適用では、 R_p が 0.0350 mg/h と最も低い値を示したことから 3 要因中、吸収促進剤の影響が最も大きいことが予測された。また d -リモネンにおいて R_p が最大となるのは、条件 12 ($R_p=1.20$) の促進剤濃度最大の条件であるのに対し、オレイン酸においては温度が最大となる条件 14 ($R_p=1.12$) であり、2 つの吸収促進剤が最適な作用を現わす条件は明らかに異なっていた。一方、 t_L においては、 d -リモネンおよびオレイン酸のいずれの適用条件においてもほとんど差が見られず、0.8~0.9 時間であった。TIS は R_p と同様に幅広い数値の変動が認められた。とくに条件 11 においては全く刺激が認められなかった (TIS=0) のに対し、 R_p の増大に伴い

Table 9
Experimental values of response variables

	Condition	R_p (mg/h)	t_L (h)	TIS
<i>d</i> -Limonene	1	0.112	0.943	2
	2	0.594	0.981	20
	3	0.732	0.866	17
	4	0.659	0.983	17
	5	0.164	0.901	6
	6	1.14	0.933	15
	7	0.904	0.523	16
	8	0.965	0.942	14
	9	0.205	0.253	8
	10	0.555	0.950	13
	11	0.0350	1.97	0
	12	1.20	0.864	12
	13	0.556	0.906	16
	14	0.760	0.880	19
	15	0.770	0.961	21
	16	0.554	0.768	16
	17	0.449	0.789	19
	18	0.795	0.814	21
Oleic acid	1	0.176	1.00	2
	2	0.284	1.05	20
	3	0.899	0.778	19
	4	0.795	0.897	21
	5	0.487	0.821	9
	6	0.635	0.916	19
	7	0.654	0.796	20
	8	0.791	0.784	19
	9	0.475	0.933	3
	10	0.827	0.954	19
	11	0.0350	1.97	0
	12	1.08	0.885	19
	13	0.527	1.00	21
	14	1.12	0.904	19
	15	0.686	0.431	20
	16	0.496	0.928	19
	17	0.805	0.938	22
	18	0.779	0.798	20

刺激性も大きくなることが確認された。

第 4 節 重回帰分析による予測式の推定

Table 9 に示した特性値の実測値に対し、次に示す 2 次多項式を基本式として、全要因の組み合わせから最適な組み合わせを選択する方式の重回帰分析を適用し、予測式を推定した。なお、要因選択の指標として自由度二重調節寄与率を用いた⁶⁵⁾。

$$F(\mathbf{X}) = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij} X_i X_j \text{ -----(6)}$$

ここで $F(\mathbf{X})$ は特性値、 b_0 は定数項、 b_i および b_{ij} は回帰係数であり、 X_i はコード化された要因のレベル (Table 8) である。(6) 式より得られた回帰式を Table 10 に示す。 d -リモネン、オレイン酸いずれの系においても、 R_p および TIS の予測における相関係数 (r) は十分に高く、これらの特性値の予測式は信頼性に優れるものと考えられた。しかしながら、 t_L はどちらの吸収促進剤においても相関係数が低く、 t_L を同時最適化の特性値として選択するには問題があると考察された。したがって、以後の検討には最適化の指標として R_p と TIS を用い、 t_L を除外した。Fig. 26 および Fig. 27 に、 d -リモネンおよびオレイン酸の系において、温度 (X_3) を逐次変化させたときの特性値 R_p および TIS の等高線相図を、エタノール (X_1) および促進剤 (X_2) の関数として示した。 d -リモネンにおける R_p は低温側ではエタノール濃度 (X_1) よりも促進剤濃度 (X_2) に大きく影響を受けているが、高温になるとエタノール濃度 (X_1) の影響を強く受けることが認められた。これに対しオレイン酸では、いずれの温度においてもほぼ同様の相図となり、エタノール (X_1) よりも促進剤 (X_2) の影響が強いことがわかった。TIS の相図に

Table 10

Optimal regression equation for each response variable determined by multiple regression analysis

		R_p	t_L	TIS
<i>d</i> -Limonene	b_0 (constant)	0.677	0.856	19.0
	b_1 (X_1)	0.146	0.129	2.40
	b_2 (X_2)	0.233	-0.168	2.86
	b_3 (X_3)	0.102	<i>a</i>	<i>a</i>
	b_{11} (X_1X_1)	-0.0741	-0.102	-2.51
	b_{12} (X_1X_2)	-0.183	<i>a</i>	-3.63
	b_{13} (X_1X_3)	0.0781	<i>a</i>	-1.38
	b_{22} (X_2X_2)	<i>a</i>	0.169	-3.84
	b_{23} (X_2X_3)	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
	b_{33} (X_3X_3)	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
	r^b	0.918	0.863	0.955
	s^c	0.166	0.186	2.24
F_0^d	9.76 ^e	9.53 ^e	19.2 ^e	
Oleic acid	b_0 (constant)	0.689	0.802	20.7
	b_1 (X_1)	0.0641	<i>a</i>	4.05
	b_2 (X_2)	0.241	0.114	4.42
	b_3 (X_3)	0.103	<i>a</i>	<i>a</i>
	b_{11} (X_1X_1)	<i>a</i>	<i>a</i>	-2.68
	b_{12} (X_1X_2)	<i>a</i>	<i>a</i>	-3.38
	b_{13} (X_1X_3)	<i>a</i>	<i>a</i>	-1.38
	b_{22} (X_2X_2)	-0.0601	0.168	-3.18
	b_{23} (X_2X_3)	-0.114	<i>a</i>	<i>a</i>
	b_{33} (X_3X_3)	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
	r^b	0.911	0.763	0.965
	s^c	0.141	0.200	2.34
F_0^d	11.7 ^e	10.5 ^e	25.0 ^e	

^aNot included in the optimum regression equation. ^bMultiple correlation coefficient. ^cStandard deviation of residual. ^dObserved *F* value (mean square regression/mean square residual). ^e $p < 0.01$.

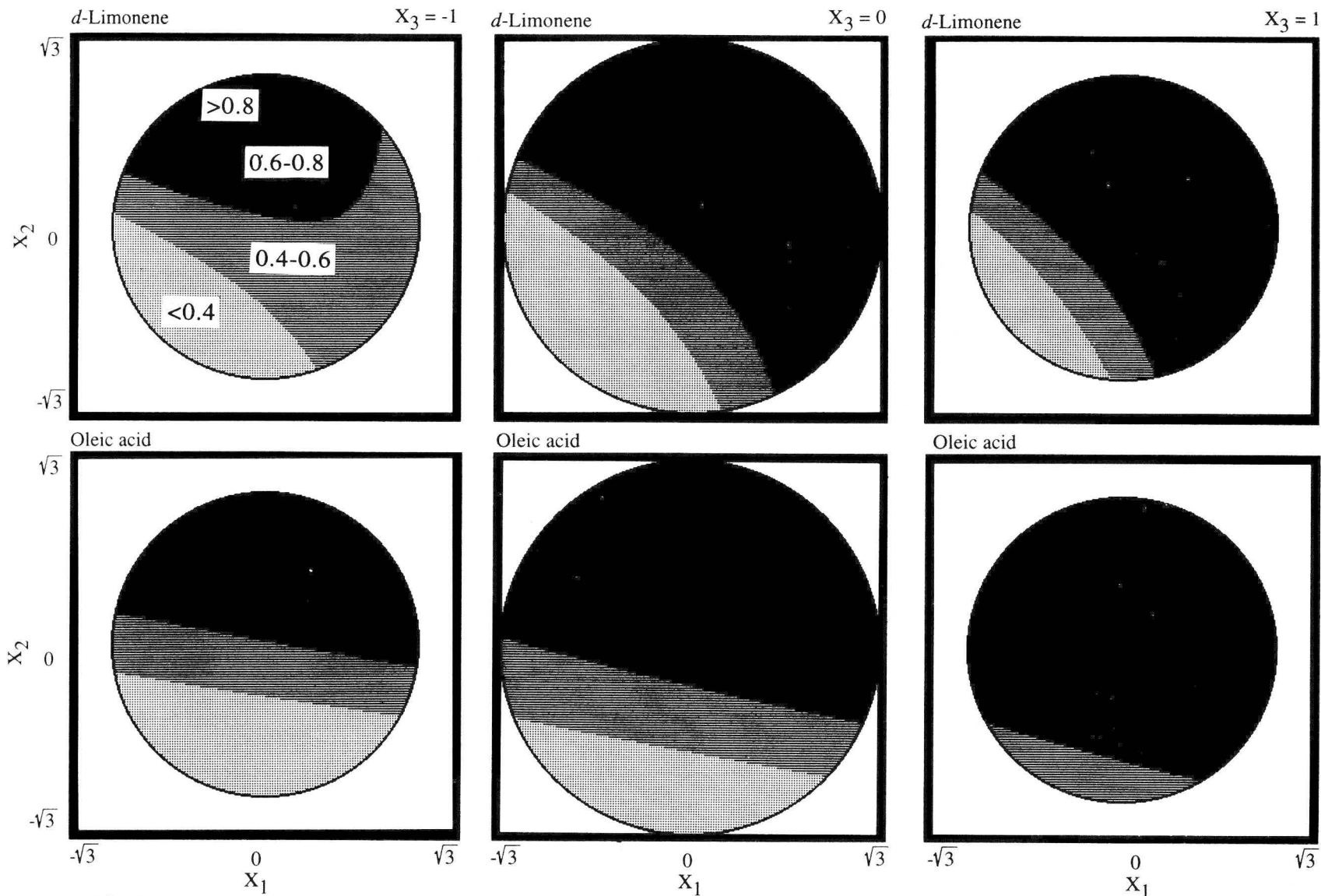


Fig. 26 Contour diagrams of R_p as a function of ethanol (X_1), penetration enhancer (X_2) and temperature (X_3)

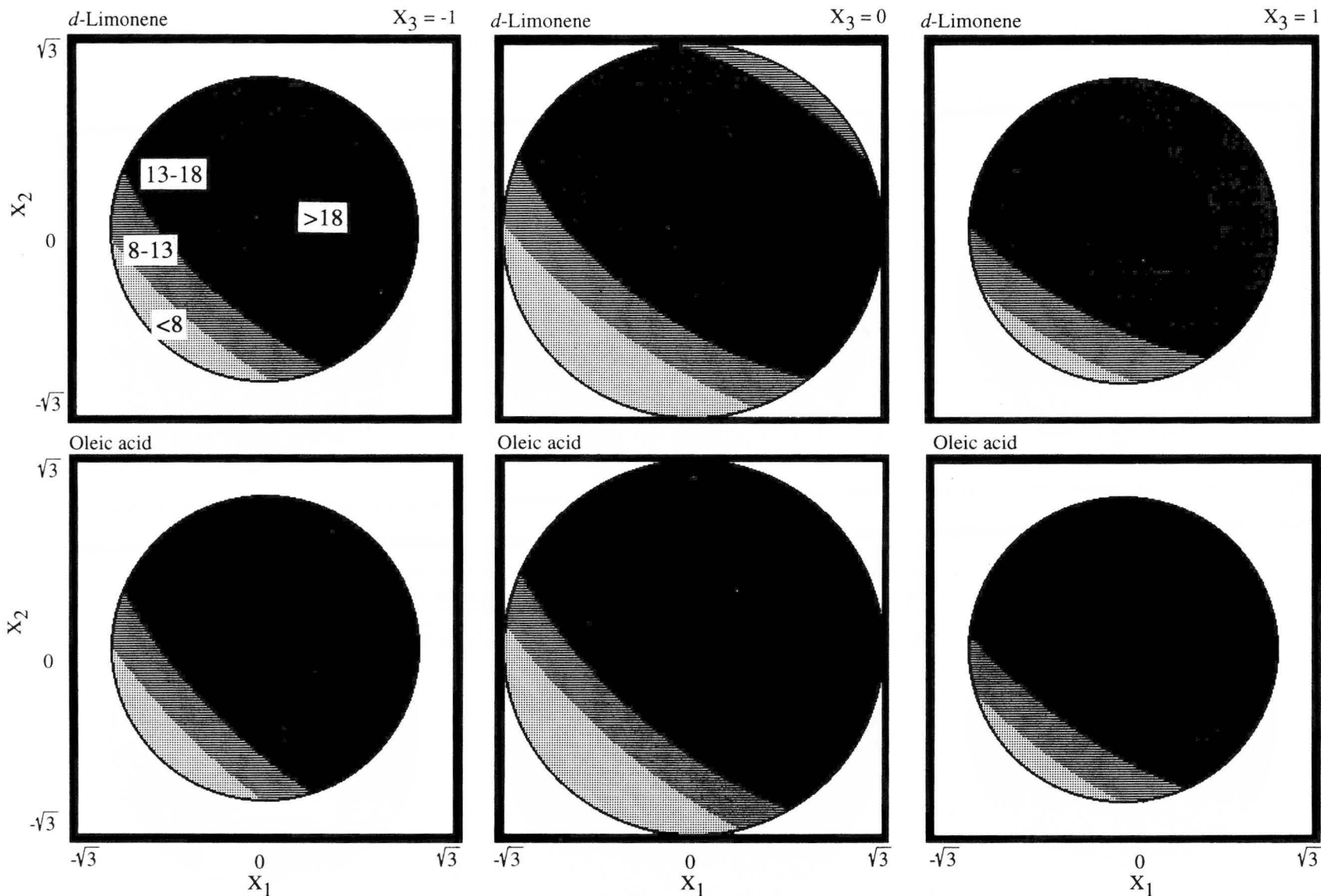


Fig. 27 Contour diagrams of TIS as a function of ethanol (X_1), penetration enhancer (X_2) and temperature (X_3)

においては、*d*-リモネンの場合、刺激が最大となるエタノール (X_1) と促進剤 (X_2) の組み合わせが存在し、この組み合わせが適用温度の上昇とともに、エタノール濃度 (X_1) のより低い側にシフトする傾向が見られた。一方、オレイン酸における TIS は R_p と同様にエタノール (X_1) と促進剤 (X_2) が高濃度になるほど増大した。以上のように *d*-リモネンとオレイン酸では R_p 、TIS のいずれの相図に対しても異なる傾向が認められ、両化合物の促進作用や刺激性に対して、エタノールおよび温熱の併用が異なる効果を及ぼすと推察された。また、 R_p と TIS の相図より判断すると、*d*-リモネンの場合、温度の上昇に伴い R_p の増大は認められるが、TIS はそれほど大きくなっていない。したがって、温熱の併用によりさほど強い刺激を惹起することなく、透過性の増大を期待することができると考えられる。しかしながら、オレイン酸においては、 R_p または TIS のいずれにおいても温度上昇による相図の変化はあまり認められず、温熱適用による透過性の著しい改善は期待できないと考察される。

第 5 節 適用条件の最適化

Table 10 に示した R_p と TIS の回帰式を (4) 式によって統合し、最適解の探索を行なった。Fig. 28 は汎距離関数 $S(\mathbf{X})$ を Fig. 26 と同様にエタノール (X_1)、促進剤 (X_2) および温度 (X_3) の関数として表し、さらに同時最適解を示したものである。*d*-リモネンの同時最適解は R_p の最適解の近傍に位置しているが、TIS の最適解からは大きく隔たっている。一方、オレイン酸の同時最適解は *d*-リモネンとは逆に TIS の最適解の近傍に位置し、 R_p の最適解からは大きく隔たる結果となった。得られた同時最適解を Table 11 に、また Table 12 に同時最適解における特性値の予測値と実測値を示した。どちらの促進剤においても、

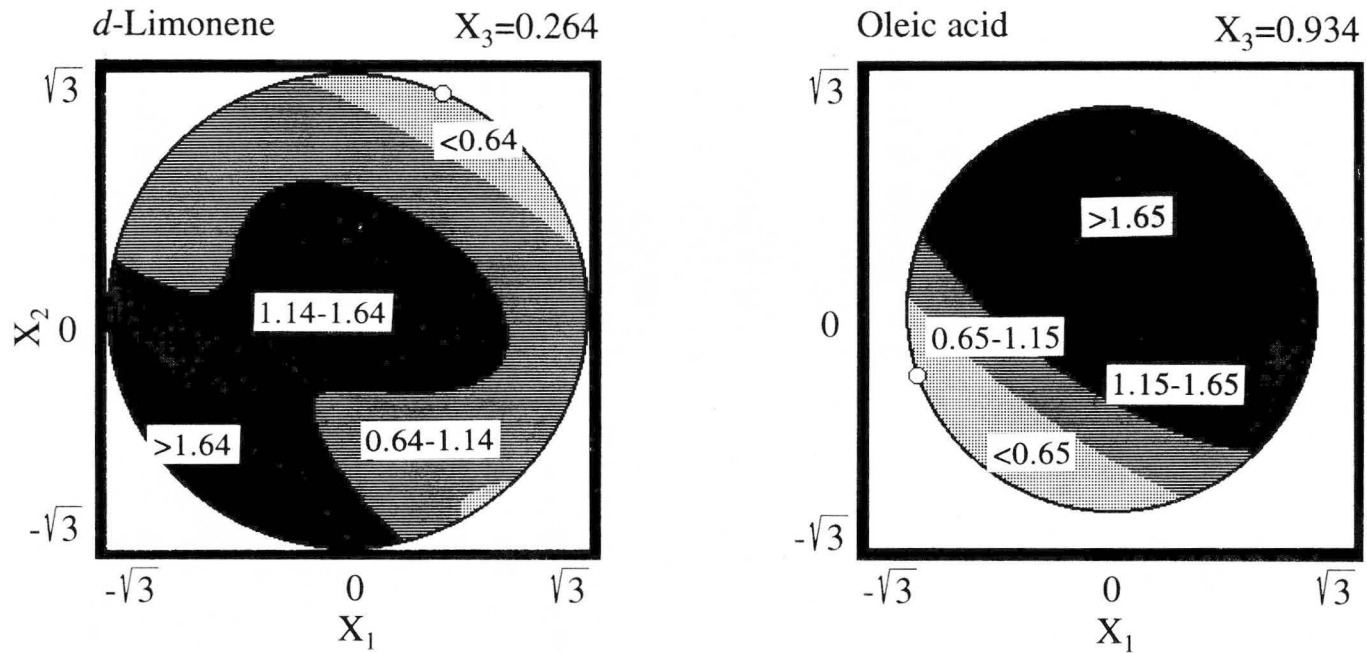


Fig. 28 Contour diagrams of combined objective function, $S(X)$, ($P=2$) as a function of ethanol (X_1), penetration enhancer (X_2) and under the optimal value of temperature (X_3). O, Simultaneous optimal point.

Table 11
Optimal condition of *d*-limonene and oleic acid systems for three factors

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

Table 12
Response variables of the optimal condition

Response		Predicted	Experimental ^{a)}
<i>d</i> -Limonene	<i>R</i> _p	0.954	0.999 ± 0.164
	TIS	10.4	16.8 ± 0.8
Oleic acid	<i>R</i> _p	0.620	0.623 ± 0.168
	TIS	6.83	7.20 ± 1.30

^{a)}Represented as the mean ± S.D. for five determinations.

R_p の予測値と実測値は高精度に一致した。TIS においては d -リモネンの予測値 (10.4) に対し、実測値はやや高い値 (16.8) となったが、オレイン酸においては高精度に一致した。 d -リモネンでやや値が異なった理由としては、TIS が組織学的検査から得られる値であるため、定量性に欠ける面があるとともに、主観によるバラツキが生じた可能性が考えられる。以上より、 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、それに対応して皮膚への刺激性も比較的強い適用条件であると考えられた。これに対し、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わかった。

次にエタノールと温熱の併用条件下において、 d -リモネンとオレイン酸の吸収促進作用と皮膚刺激性をより詳細に比較するために、以下の検討を行なった。すなわち、多目的同時最適化法の適用によって得られた各特性値の同時最適値を制約条件として設定し、各促進剤における R_p もしくは TIS の最適化を再度実施した (Fig. 29)。 d -リモネンで得られた R_p の最適値 (0.954) を満たすという制約条件下ではオレイン酸の TIS の最適値はかなり高い値 (17.0) を示し、 d -リモネンと同等の吸収促進作用をオレイン酸で得ようとする、重篤な皮膚傷害を避けることができないと考えられる (Fig. 29a)。また、 d -リモネンでの TIS の最適値 (10.4) の制約下ではオレイン酸の R_p は 0.687 であり、Table 12 に示した同時最適解に比べてさほど大きな改善は認められなかった (Fig. 29b)。一方、オレイン酸で得られた R_p の最適値 (0.620) を制約として d -リモネンの TIS を求めると、その値は 8.82 であり、 R_p を制限することによる刺激性の改善はわずかであった (Fig. 29c)。またオレイン酸における TIS の最適値 (6.83) を制約条件とした場合には d -リモネンの R_p は 0.521 と非常に低い値を示した (Fig. 29d)。したがって、オレイン酸で d -リモネンと同等の促進活性を得よ

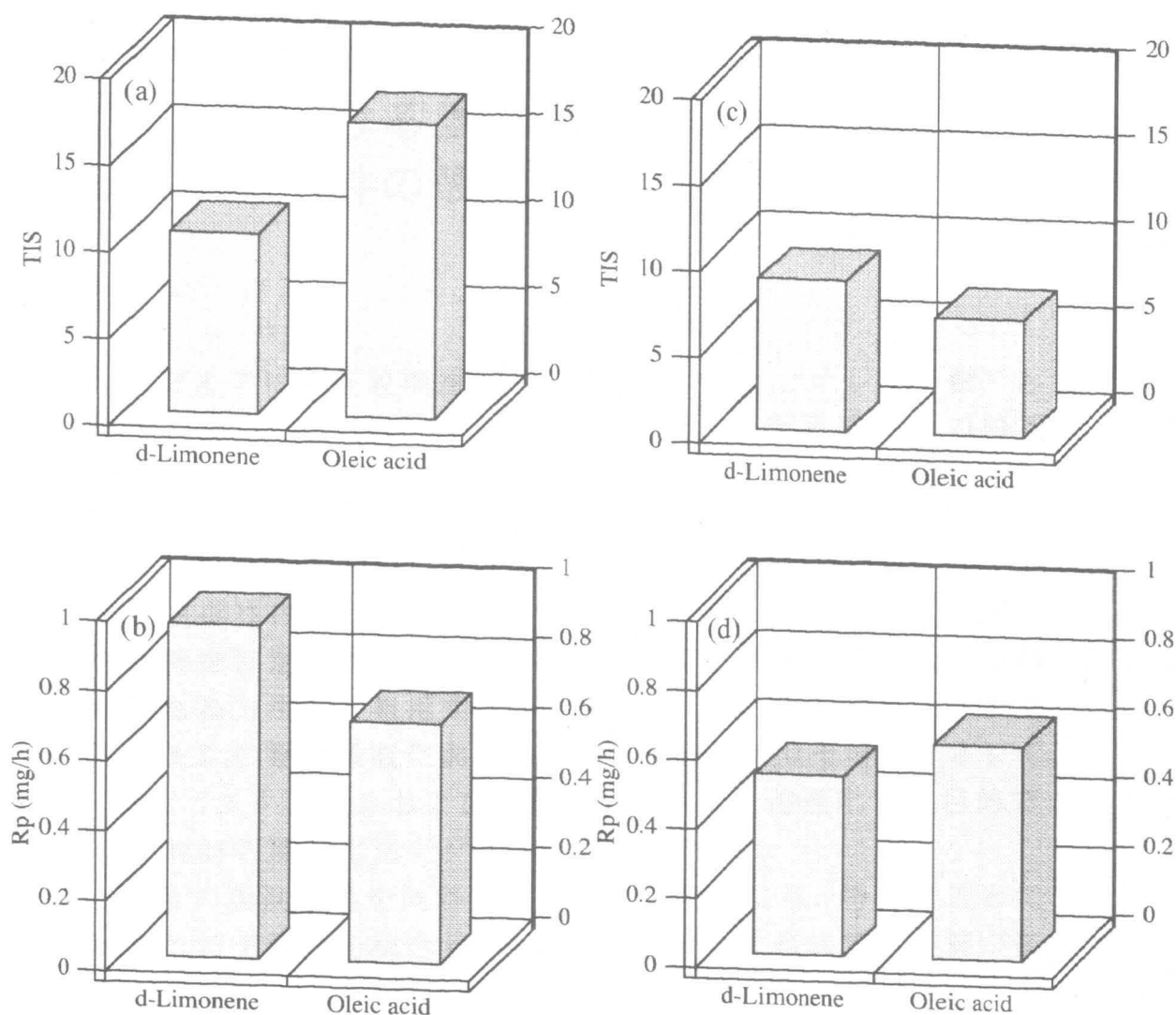


Fig. 29 Trade-off analysis of R_p and TIS in *d*-limonene and oleic acid systems. (a) Optimal TIS values subject to the equality constraint of $R_p=0.954$. (b) Optimal R_p values subject to equality constraint of $TIS=10.4$. (c) Optimal TIS values subject to the equality constraint of $R_p=0.620$. (d) Optimal R_p values subject to equality constraint of $TIS=6.83$.

うとすると、皮膚刺激は著しく増大することが予想される。一方、*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推察された。

第6節 本章のまとめ

以上の結果より、温熱の適用にはオレイン酸よりも *d*-リモネンが適していることが示された。これは吸収促進剤によって、温度上昇による透過促進の機構が異なることを意味し、温熱の併用に適した促進剤が存在することが示された。またエタノール、*d*-リモネンおよび温熱適用の組み合わせによる製剤は高い経皮吸収性があり、刺激もある程度回避できると考察された。臨床での応用には人への外挿等の問題が残されてはいるが、温熱などの物理的手段と吸収促進剤の併用は、刺激性の回避からも優れていることが示唆された。他の促進剤について同様の検討を行なえば、製剤設計上、有用な基礎資料になると考えられる。

総 括

薬物の皮膚透過における吸収促進剤と温熱の併用効果について、透過実験、刺激性評価および最適化の検討を行ない、以下に示す知見を得た。

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。

謝 辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました星薬科大学薬剤学教室 永井恒司教授、高山幸三助教授に深甚なる謝意を表します。

また、皮膚組織の検定を行なって頂きました日本生物科学センター 磯和弘一博士に深く感謝申し上げます。

さらに本研究の遂行に当たり、絶えざる御助言、御協力を賜りました星薬科大学薬剤学教室教室員の方々に深く感謝致します。

参考文献

- 1) 瀬崎仁, ドラッグ デリバリー システム, **1**, 南山堂 (1986).
- 2) 高山幸三, 永井恒司, 日本臨床, **47**, 1197 (1989).
- 3) 奥山泰久, 高山幸三, 永井恒司, 治療, **73**, 111 (1991).
- 4) 瀬崎仁, 医薬品の開発, **13**, pp.87 広川書店 (1989).
- 5) B. W. Barry, *J. Contr. Rel.*, **6**, 85 (1987).
- 6) Y. W. Chien, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **9**, 497 (1983).
- 7) 杉林堅次, 薬物動態, **1**, 71 (1987).
- 8) E. M. Niazy, *Int. J. Pharm.*, **67**, 97 (1991).
- 9) 東條角治, 膜, **15**, 296 (1990).
- 10) K. Sato, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **43**, 31 (1988).
- 11) B. W. Barry, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **10**, 281 (1988).
- 12) B. W. Barry, *J. Contr. Rel.*, **15**, 237 (1991).
- 13) H. Okabe, Y. Obata, K. Takayama and T. Nagai, *Drug Design Delivery*, **4**, 313 (1988).
- 14) B. W. Barry and A. C. Williams, *Proceed. Intern. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, **16**, 33 (1989).
- 15) H. Okabe, Y. Obata, K. Takayama and T. Nagai, *Drug Design Delivery*, **6**, 229 (1990).
- 16) Y. Obata, K. Takayama, H. Okabe and T. Nagai, *Drug Design Delivery*, **6**, 319 (1990).
- 17) Y. Obata, K. Takayama, Y. Machida and T. Nagai, *Drug Design Discovery*, **8**, 137 (1991).
- 18) Y. Obata, K. Takayama, Y. Maitani, Y. Machida and T. Nagai, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 312 (1993).
- 19) 児玉美智子, 油化学, **39**, 530 (1990).

- 20) A. Rolland, A. Brzokewics, B. Shroot and J. C. Jamouille, *Int. J. Pharm.*, **76**, 217 (1991).
- 21) G. M. Golden, D. B. Guzek, R. R. Harris, J. E. Mckie and R. O. Potts, *J. Inv. Dermat.*, **86**, 255 (1986).
- 22) B. Ongpipattanakul, R. R. Burnette, R. O. Potts and M. L. Francoeur, *Pharm. Res.*, **8**, 350 (1991).
- 23) G. M. Golden, D. B. Guzek, A. H. Kennedy, J. E. Mckie and R. O. Potts, *Biochemistry*, **26**, 2382 (1987).
- 24) 寺田弘, 辻 彰, 続医薬品の開発, **4**, pp.3 広川書店 (1991).
- 25) R. B. Stoughton and W. C. Fritsch, *Arch. Dermat.*, **90**, 512 (1964).
- 26) W. C. Fritsch and R. B. Stoughton, *J. Inv. Dermat.*, **41**, 307 (1967).
- 27) T. Arita, R. Hori, T. Anmo, M. Washitake, M. Akatsu and T. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1045 (1970).
- 28) H. I. Blank, R. J. Scheuplein and D. J. Macfarlane, *J. Inv. Dermat.*, **49** 582 (1967).
- 29) 佐々木均, 久保田祐輔, 富田寿広, 中村純三, 柴崎寿一郎, 大屋郁夫, 芦沢敏之, 宮里和広, 薬剤学, **46**, 259 (1986).
- 30) H. Sasaki, J. Nakamura, J. Shibasaki, Y. Ishino, K. Miyasato and T. Ashizawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4883 (1987).
- 31) I. Nozawa, Y. Suzaki, S. Sato, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *J. Contr. Rel.*, **15** 29 (1991).
- 32) H. Okamoto, M. Hashida, H. Sezaki, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 418 (1988).

- 33) T. Ogiso, M. Iwaki, K. Bechako and Y. Tsutsumi, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 762 (1992).
- 34) J. A. Bouwstra, L. J. C. Peeschier, J. Brussee and H. E. Bodde, *Int. J. Pharm.*, **52**, 47 (1989).
- 35) J. A. Bouwstra, M. A. deVries, G. S. Gooris, W. Bras, J. Brussee and M. Ponec, *J. Contr. Rel.*, **15**, 209 (1991).
- 36) M. L. Francoeur, G. M. Golden and R. O. Potts, *Pharm. Res.*, **7**, 621 (1990).
- 37) P. G. Green, R. H. Guy and J. Hadgraft, *Int. J. Pharm.*, **48**, 103 (1988).
- 38) L. R. Hsu, Y. B. Huang, P. C. Wu and Y. H. Tsai, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **20**, 1425 (1994).
- 39) A. Ruland, J. Kreuter and J. H. Rytting, *Int. J. Pharm.*, **101**, 57 (1994).
- 40) A. Ruland, J. Kreuter and J. H. Rytting, *Int. J. Pharm.*, **103**, 77 (1994).
- 41) N. Ohara, K. Takayama, Y. Machida and T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, **105**, 31 (1994).
- 42) C. J. Lauter and E. G. Trams, *J. Lipid Res.*, **3**, 136 (1962).
- 43) S. Naito and Y. Tsai, *Int. J. Pharm.*, **8**, 263 (1981).
- 44) S. Naito, S. Nakamori, M. Awatoguchi, T. Nakajima and H. Tominaga, *Int. J. Pharm.*, **24**, 127 (1985).
- 45) K. Takayama and T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, **74**, 115 (1991).
- 46) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa and T. Udo, *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 879 (1981).

- 47) Y. Wada, K. Nakajima, J. Yamazaki, T. Seki, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 600 (1993).
- 48) P. M. Elias, *J. Inv. Dermatol.*, **20**, 1 (1981).
- 49) N. Ohara, K. Takayama and T. Nagai, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 439 (1995).
- 50) N. Ohara, K. Takayama and T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, **123**, 281 (1995).
- 51) J. H. Draize, Austin, TX, Assoc., *Food and Drug Officials of the U.S.* 46 (1959).
- 52) Federal Register, **Vol. 43, No. 163** Tuesday, August 22, 37360, 37359 (1987).
- 53) Federal Register, **Vol. 43, No. 163** Tuesday, August 22, 37359 (1987).
- 54) U. T. Lashmar, J. Hadgraft and N. Thomas, *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 118 (1989).
- 55) D. Quan, K. Takayama, T. Mitsuzono, K. Isowa and T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, **68**, 239 (1991).
- 56) N. Ohara, K. Takayama, K. Isowa and T. Nagai, *STP Pharm. Sci.*, in press (1995).
- 57) M. R. Okum and L. M. Edelstein, Dermatopathology Foundation Press, Boston, pp. 10 (1976).
- 58) Y. W. Chien, Transdermal controlled-release drug administration. Novel drug delivery systems. Dekker. New York., pp.149 (1982).
- 59) A. H. Mehregen, Appleton-Century-Crofts. Norwalk. CT (ACC)., pp. 77 (1986).
- 60) 高山幸三, 製剤処方最適組成の決定法に関する研究, 薬学研究の進歩, **10**, 薬学研究奨励財団編 pp.125 (1994).

- 61) 高山幸三, *Pharm. Tech. Japan*, **10**, 333 (1994).
- 62) 大原長夫喜, 高山幸三, 磯和弘一, 永井恒司, 薬剤学, in press (1996).
- 63) A. I. Khuri and M. Conlon, *Technometrics*, **23**, 363 (1981).
- 64) K. Kraph, K. Takayama, K. Isowa, K. Okabe and T. Nagai, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 1367 (1994).
- 65) 芳賀敏郎, 竹内 啓, 奥野忠一, 重回帰分析における変数選択の新しい基準, *品質*, **6**, 73 (1976).