

多成分油性皮膚透過促進システムの有効性及び作用機構に関する研究

城西大学 薬学部

杉 林 堅 次

Utility and action mechanism of a multi-component lipophilic skin-penetration enhancer, L-lactic acid-ethanol-isopropyl myristate (IPM) system (LEI system) were investigated. Silicone fluid, IPM, ethanol-IPM (EI) system, and L-lactic acid-IPM (LI) system were used for comparison with the LEI system. Rank order of the permeation of a model compound, ketotifen (KT) through excised hairless rat skin was silicone fluid < IPM < LI system << EI system < LEI system. Addition of ethanol in the lipophilic vehicles markedly increased the permeation of L-lactic acid as well as KT. Enormous effect by IPM on the ethanol permeation was found from a skin permeation experiment where the systems were applied on the dermis surface (not the stratum corneum surface). These results suggest that the penetration-enhancing effect of the LEI system is complicatedly related to the effects by each component in the system. The KT permeation through two artificial membranes, silicone membrane and porous polypropylene membrane was then measured for further understanding the mechanism of the LEI system. Although both membrane permeations were increased by ethanol, the ethanol effect on the polypropylene membrane permeation was much greater than the silicone one. Addition of L-lactic acid promoted the KT permeation through the polypropylene membrane. These results using artificial membranes suggest that the LEI system acts on the lipophilic domain in the skin barrier and that the solvent drag of KT by ethanol is one of the enhancement mechanism by the LEI system. The skin permeation experiments were finally done using nine drugs. This data pointed out that ethanol increased the skin permeation of ethanol-soluble drugs and that the addition of L-lactic acid was useful to increase basic drugs containing amino groups but acidic drugs containing carboxyl groups.

1 緒 言

薬物の皮膚透過性を促進する添加剤（促進剤）の作用発現部位は、ごく一部の促進剤を除き、皮膚の薬物透過バリアーにある。したがって、十分な安全性と効果を兼ね備えた促進剤を開発するためには、皮膚バリアーの性質とその中での促進剤の作用機構について十分理解しておく必要がある。皮膚最外層に位置する角質層がこの最大のバリアーと考えられているが、ここには極性の異なる2つの領域、すなわち多孔性で親水性に富んだドメインと親油性に富んだドメインが存在する¹⁾。薬物はその親油性に応じて各々のドメインを浸透・透過するが、促進剤もその親油性に依存して

各ドメインに移行し透過促進効果を発揮するものと考えられる。促進剤のこのような選択的な皮膚バリアー移行性は種々の薬物に対する促進効果の違いと密接に関係する²⁾。

したがって、促進剤が皮膚バリアー中のどこに作用するかを評価することが重要となる。このような知見が得られたことに並行して、異なった吸収促進作用を示す添加剤を併用することによって効果や安全性がより高い促進システムを模索するようになった。著者らが報告したメントール/エタノール/水システムはその代表例である^{3,4)}。この促進系は水ベースの基剤中で大きな効果を発揮する。我々はさらに脂溶性基剤でも高い効果を示す促進剤を探索し、有機酸、低級アルコール、および脂肪酸エステルからなる親油性多成分システムがケトチフェン (KT) のヘアレスラット皮膚透過性を著しく促進することを報告した⁵⁾。また、最も強力な促進作用が乳酸 (1%)、エタノール (10%)、及びミリスチン酸イソプロピル (IPM) (89%) の組合せ (LEI系) で得られるこ



Skin penetration enhancement and mechanism by multi-component lipophilic systems

Kenji Sugibayashi

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Josai University

とも明らかにした。しかし、LEI系を構成する各成分が皮膚バリアーのどの部位に影響するのかは明らかとなっていない。

そこでこの問題を解明することを目的に、ヘアレスラット皮膚に加えて親油性のドメインおよび多孔性で親水性のドメインの典型的なモデルとしてシリコン膜および多孔性ポリプロピレン膜^{6~8)}を選択してKT透過性を測定した。また、乳酸、エタノール、IPMの一部または全てを含有する油性基剤からこれらの膜を介するKT透過性を測定した。さらに物理学的性質を指標に種々薬物の皮膚促進効果の差異を評価し、このシステムの有効性と特徴を明らかにすることとした。

2 実験

2.1 試薬

フマル酸ケトチフェンはサンド薬品(株)から供与されたものを用いた。インドメタシン (IDM) および硝酸イソソルビド (ISDN) は東光薬品工業(株) (東京) から、イブプロフェン (IP)、ジクロフェナクナトリウム (DCナトリウム) はそれぞれ日清製粉(株)および浜理薬品工業(株)から供与された。また、アミノピリン (AMP) は和光純薬工業(株) (大阪) から、アンチピリン (ANP)、メチルパラベン (MP) およびエチルパラベン (EP) は東京化成工業(株) (東京) から購入した。医療用シリコン膜 (Silastic[®]、厚さ0.005inch) 及び対照基剤として用いた医療用シリコン液 (Medical fluid 360、粘度19mPa·s) はダウコーニングアジア (神奈川) から供与された。多孔性ポリプロピレン膜 (セルガード[®]2400、空隙率38%、ポア径 $0.2 \times 0.02 \mu\text{m}$ 、厚さ $25 \mu\text{m}$) はヘキストセラニーズ(株) (米国) から入手した。他の基剤成分であるエタノール、乳酸 (L-乳酸)、IPM およびその他溶媒や試薬は特級品を購入後そのまま用いた。

2.2 皮膚及び人工膜試料の作成

雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht系、体重180 g、城西大学生命科学研究センター、埼玉) の

腹部皮膚をペントバルビタール麻酔下摘出後、直ちに用いた。シリコン膜は微温湯中で洗い、室温にて一晩乾燥させた。多孔性ポリプロピレン膜はそのまま用いた。

2.3 透過実験法

透過実験にはすべて横型の2チャンバー拡散セル (有効拡散面積; 0.95 cm^2 、容積; 2.5 ml) を用い、このセルに摘出皮膚、シリコン膜あるいは多孔性ポリプロピレン膜をはさんだ。薬物を懸濁させたシリコン液、IPM、乳酸 (1%) - IPM (99%) 系 (LI系)、エタノール (10%) - IPM (90%) 系 (EI系) またはLEI系の各基剤を片方のセル (ドナー側) に適用し、もう一方のレシーバ側セルには同量の蒸留水を満たした。なお透過実験は 37°C の温度条件下で行った。試料溶液 ($0.2 \sim 1.0 \text{ ml}$) を定期的にレシーバ側から採取し、容量を保つため同量の蒸留水を加えた。また、実験中の薬物と基剤成分の熱力学的活動度の減少を防ぐため、ドナー側の基剤を定期的に交換した。

2.4 分析法

すべての薬物はHPLC法で定量した。また、エタノール、乳酸、およびIPMの定量にはガスクロマトグラフィーを用いた。

3 結果および考察

3.1 ケトチフェンおよび基剤成分の皮膚透過に及ぼすLEI系の促進効果

LEI系の皮膚透過促進メカニズムを明らかにするため、LEI系に加え、IPMのみ、LI系およびEI系を用いた。なお、対照基剤として、この系が油性基剤であることを考慮して、皮膚に対して不活性なシリコン液を用いた。Table 1にこれら各基剤からのKTのヘアレスラット皮膚を介する定常状態透過速度とラグタイムを基剤中溶解度と共に示す。基剤をシリコン液からIPMにすることで、KTの溶解度および透過速度が増加し促進効果が認められた。またラグタイムも短縮され、

IPM が皮膚に作用していることが推察された。IPM への乳酸の添加 (LI 系) はさらに KT の透過を促進した。一方、IPM または LI 系にエタノールを添加する (EI、LEI 系) と非常に高い促進効果が得られ、LEI 系での促進メカニズムにエタノールが大きな役割を果たしていることが示唆された。

次に基剤成分であるエタノール、IPM および乳酸の各基剤系からの透過性を調べた。すべての系

で IPM の透過は認められなかった。しかし、IPM の高い脂溶性と促進効果を考慮すれば、IPM は角質層中に移行すると考えられる。Table 2 には LI、EI および LEI 系からのエタノールおよび乳酸の透過速度を示す。LI 系からの乳酸の透過速度はエタノールの添加 (LEI 系) により 6.5 倍と大きく促進された。したがって、乳酸の透過性にもエタノールが関与していることが明らかとなった。一方、EI 系からのエタノールの透過は乳酸を添加 (LEI 系) することにより若干増加した程度であった。

基剤中の個々の構成成分の促進効果へのかかわりをさらに明らかにするために、皮膚の角質層側あるいは真皮側に各基剤系を適用し、KT および基剤成分の透過性の変化を検討した。Fig. 1 に角質層あるいは真皮側にそれぞれの基剤系を適用したときの KT の透過挙動を示す。シリコン液を各側に適用したときの KT 皮膚透過性は等しかった (○、●、Fig. 1 a)。このことはシリコ

Table 1 KT solubility in various vehicle system, and flux and lag time of KT through hairless rat skin

vehicle	solubility (mg/mL)	flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	lag time (h)
silicone fluid	8.41×10^{-3}	0.3 ± 0.1	7.5 ± 2.0
IPM	0.105	2.5 ± 0.2	5.0 ± 0.3
LI system	0.106	18.5 ± 1.4	2.9 ± 0.1
EI system	0.855	2044.4 ± 121.8	2.2 ± 0.3
LEI system	2.22	2785.2 ± 254.2	0.6 ± 0.1

Table 2 Ethanol and L-lactic acid fluxes through hairless rat skin from various vehicle system

vehicle	ethanol ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{h}$)	L-lactic acid ($\text{mg}/\text{cm}^2/\text{h}$)
LI system	—	0.76 ± 0.07
EI system	40.0 ± 4.81	—
LEI system	49.0 ± 3.35	4.88 ± 0.16

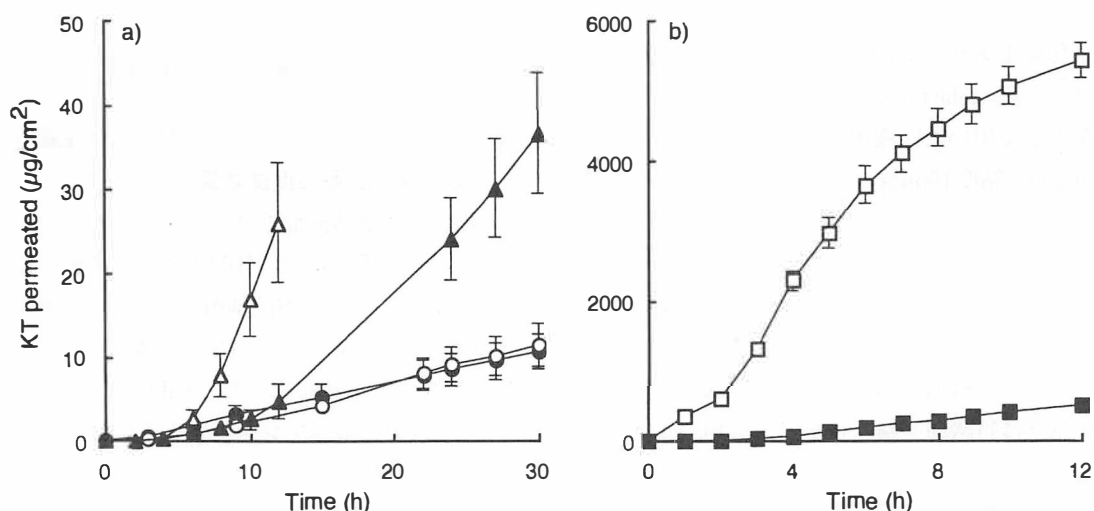


Fig. 1 ヘアレスラット皮膚角質層側から真皮側および真皮側から角質層側へのKTのin vitro透過性
オープンシンボル：角質層側から真皮側透過、クローズドシンボル：真皮側から角質層側透過、
a) シリコン液 (○、●)、IPM (Δ、▲)、b) EI系 (□、■) それぞれは平均値±S.E. (n=3-9) を示す。

ーン液が皮膚に対して何ら作用を及ぼさないことを示している。角質層側に IPM を適用した場合の KT の透過速度 (Δ) は真皮側に IPM を適用したとき ($\blacktriangle$) に比べ 2 倍高かった。また真皮側適用時には実験開始より 12 時間まではシリコン液と同じ透過速度を示し、それ以降に KT の透過促進が認められた。これは親水性の高い真皮中での IPM の拡散が極めて遅いことに起因していると考えられる。一方 IPM にエタノールが添加されると (すなわち EI 系とすると)、同様に角質層側適用時の KT の透過 ($\square$) は真皮側適用時 ($\blacksquare$) より 50 倍も高かった (Fig. 1 b)。また IPM で認められたような促進効果の遅れはなかった。Fig. 2 にこのときのエタノールの透過性を示す。エタノールの皮膚透過性も角質層側への基剤の適用で高くなった。Fig. 1 b と Fig. 2 の結果を併せて考えれば、IPM の真皮中拡散はエタノールにより改善されていることが予測された。一方、エタノールは比較的速やかに真皮を透過するので、エタノールの角質層透過も IPM により促進されていることが推測できる。ここで認められたエタノールの両方向での皮膚透過性の差は、真皮の存在によって角質層中の IPM 濃度が低くなることが原因

となっていると推察され、また、その結果が KT の透過性の差に反映されたと考えられる。

LEI 系の作用機序は複雑であり、KT の透過促進効果には基剤成分相互の皮膚透過あるいは皮膚移行の増加が関係していると考えられる。これまでの結果から最も促進効果発現に寄与が大きいのはエタノールであると予測される。エタノールには溶媒牽引 (共輸送あるいは solvent drag) と呼ばれる効果があることが知られている⁹⁾。この効果の出現は基剤中の薬物の溶解性 (度) に密接に関係している。すでに Table 1 に示したように促進効果の増大に伴って基剤中の薬物溶解度も大きく増加している。また、エタノールの透過性の増加とともに KT の透過も増加している。したがってエタノールの皮膚透過が KT の透過促進メカニズムに関連していると推定できる。また、エタノールと乳酸により作り出される酸性の環境も KT 溶解度の増加、ひいては薬物の透過促進に寄与していると考えられる。

3.2 人工膜に対する促進効果

前述したように、角質層は単純な脂質膜ではなく、親水性および親油性の部分の合わせ持った不均一な膜であると考えられる。LEI 系の吸収促進機構を解明するためには、これらのどちらの経路にどの程度作用するのかを知ることが重要である。そこで皮膚の脂質部分のモデル膜としてシリコン膜を、また水溶性の部分のモデル膜として多孔性ポリプロピレン膜を用いて LEI 系の主な作用部位について検討した。Fig. 3 にシリコン膜 (a) およびポリプロピレン膜 (b) を通る KT の各基剤系からの透過推移を示す。シリコン膜の KT の透過は IPM にエタノールを添加 (EI 系) することにより増加したが、この基剤系に乳酸を添加 (LEI 系) すると透過の抑制が観察された。この現象は IPM に乳酸を添加 (LI 系) することによっても認められた。またポリプロピレン膜透過においても IPM へのエタノール添加の効果は大きく、さらに乳酸の添加により透過の促進が認め

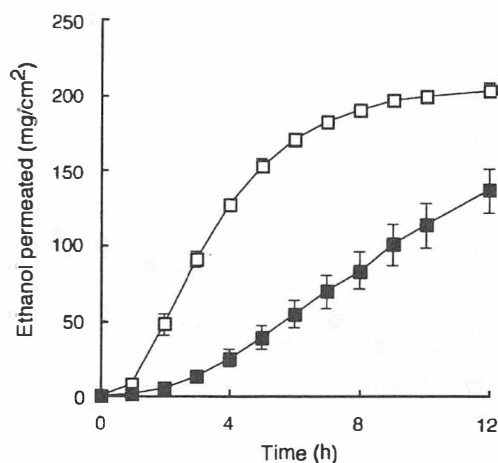


Fig. 2 ヘアレスラット皮膚角質層側から真皮側および真皮側から角質層側へのエタノールの in vitro 透過性
オープンシンボル：角質層側から真皮側透過、クローズシンボル：真皮側から角質層側透過、それぞれは平均値±S.E. (n=3-6) を示す。

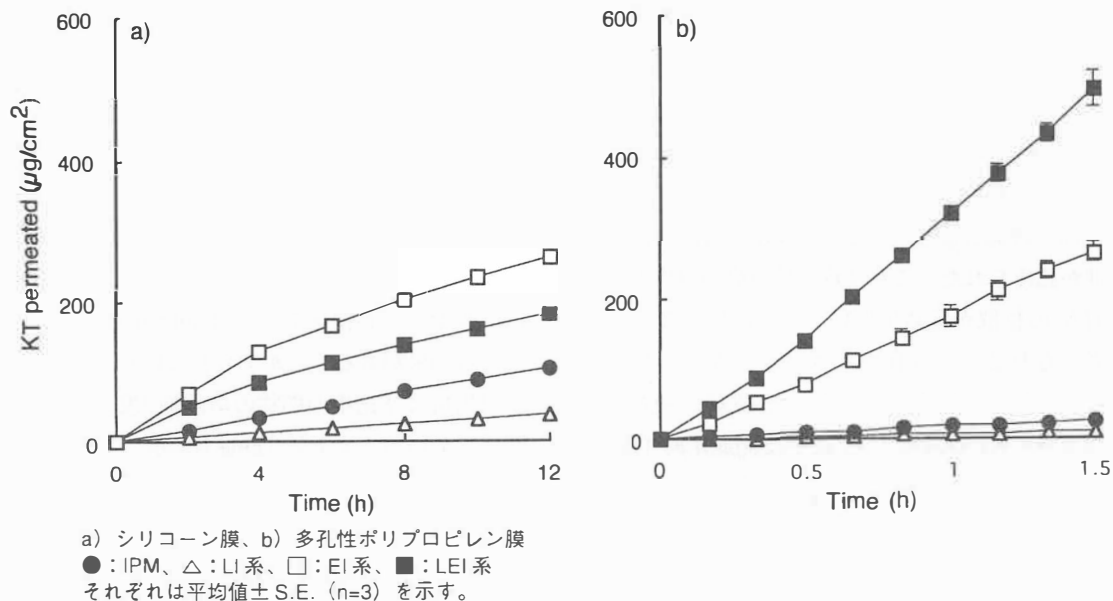


Fig. 3 人工膜を介した KT 透過性

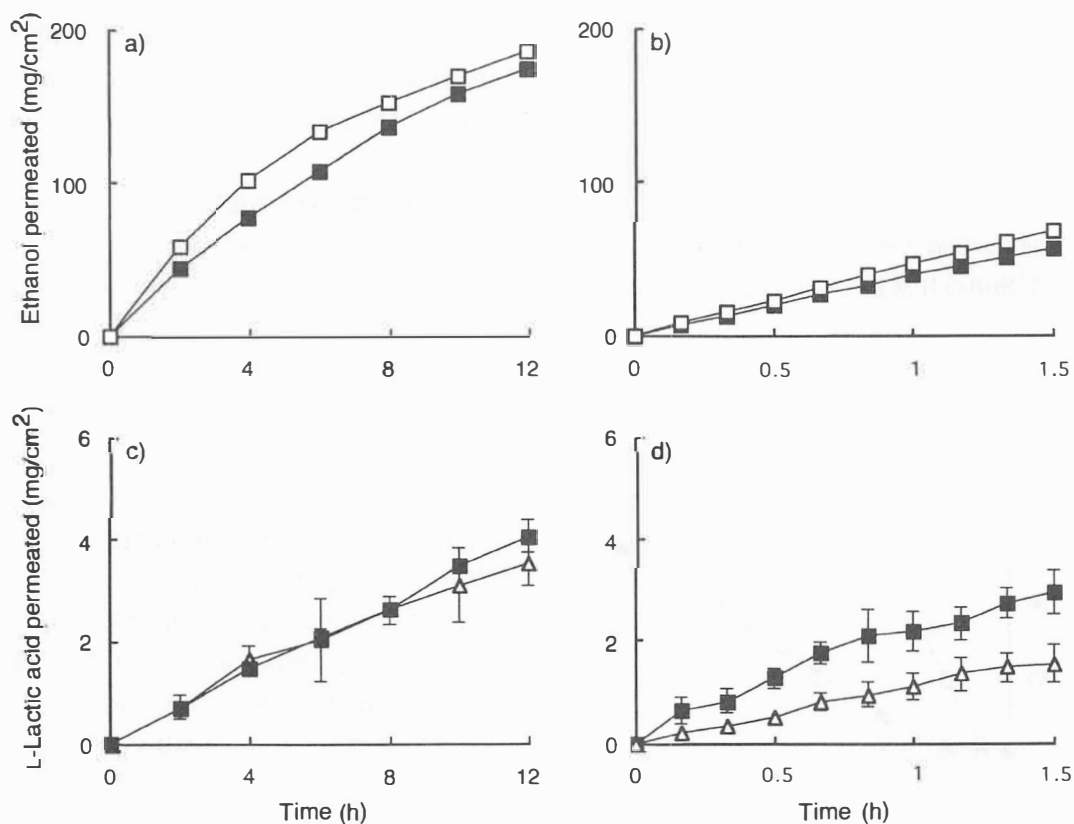


Fig. 4 人工膜を介したエタノールおよび乳酸透過性

られた。しかしながら LI 系においてはシリコン膜の場合と同様に IPM よりも KT の透過が抑制された。Fig. 4 はエタノール (a, b) および乳酸 (c, d) の各人工膜透過を示す。エタノールの透過性は用いた 2 つの人工膜で EI 系、LEI 系のどちらの基剤系を適用しても等しかった。また、LI、LEI 系からの乳酸のシリコン膜透過性の差は認められなかったが、乳酸のポリプロピレン膜透過性はエタノールが添加されることによって上昇することが認められた。

これらの結果から、エタノールはシリコン膜およびポリプロピレン膜両者での KT 透過促進効果に関係しているが、乳酸に関しては脂溶性膜では作用せず水溶性透過経路でエタノールと協力的に効果を示すことが示唆された。また皮膚においても LEI 系が最も優れた促進効果を示していることから、LEI 系は皮膚の水溶性の透過経路に主に作用して KT の透過を促進していると考えられる。

3.3 種々薬物に対する LEI 系の促進効果¹⁰⁾

次にいくつかの薬物に対する促進効果を調べ、

その物理化学的性質から LEI 系の促進効果メカニズムについて検討した。Table 3 に実験に用いた薬物の pKa、溶解度パラメータ (S.P.)、分子量 (M.W.) および各基剤中の溶解度を示す。Factors の官能基寄与法¹¹⁾により求めた溶解度パラメータは 10.22 から 13.31 (cal/cm³)^{1/2} の範囲であった。分子量は皮膚中の拡散係数に大きく影響を及ぼすが、本実験で用いた薬物の分子量は最小 (MP) と最大 (フマル酸ケトチフェン) で 1.7 倍の差であり、拡散への影響は無視できると考えられた。一方、基剤中の溶解度は薬物により大きく異なり、すべての基剤中で小さな溶解度パラメータをもった薬物が高い溶解度を示した。例外として ISDN と 2 つのパラベン類 (MP および EP) が溶解度パラメータから予測されるより高いシリコン液および IPM 中溶解度を示した。IPM 中の溶解度はすべての薬物でシリコン液中よりも高い値を示した。また IPM へのエタノールの添加 (EI 系) は ISDN 以外の薬物の溶解度を著しく増加させた。一方 LEI 系中の溶解度は AMP とフマル酸ケトチフェンのみが EI 系よりも高く、これには 2 つの薬物のもつアミノ基と乳酸のもつカルボキシル基

Table 3 Physicochemical properties of drugs

	pKa (acid / base)	S.P. (cal/cm ³) ^{1/2}	M.W.	solubility (mg/mL)			
				silicone fluid	IPM	EI system	LEI system
Ibuprofen (1, IP)	5.20 acid	10.22	206.27	2.56	172.59	301.95	274.41
Aminopyrine (2, AMP)	5.00 base	10.86	231.29	2.36	24.03	52.96	136.83
Antipyrine (3, ANP)	1.50 base	11.27	188.23	0.31	7.35	43.72	44.23
Ketotifen fumarate (4, KT: Ketotifen)	6.05 base	11.89	425.50	0.01	0.10	0.86	2.23
Ethyl paraben (5, EP)	8.4 acid	12.82	166.17	0.05	28.70	134.58	137.38
Diclofenac sodium (6, DC: Diclofenac)	4.00 acid	12.93	318.13	0.02	0.06	1.03	0.618
Indomethacin (7, IDM)	4.50 acid	13.03	357.81	0.02	2.47	15.24	17.36
Isosorbide dinitrate (8, ISDN)	—	13.09	236.14	1.31	23.67	26.22	24.17
Methylparaben (9, MP)	8.4 acid	13.31	152.14	0.04	38.64	103.22	100.86
		ketotifen					

S.P.: solubility parameter, M.W.: molecular weight

の相互作用もしくは乳酸添加によるアニオン型分率の増加が関係している可能性が考えられた。

Fig. 5 に各々の薬物の溶解度パラメータと基剤間の透過速度の比の関係を示す。IPMからの各薬物の透過速度はシリコン液からより高かった (ISDNで2.1倍、ANPで16.7倍) (Fig. 5 a)。またこの促進比は溶解度パラメータの増大とともに減少する傾向を示した。次にエタノールの効果を明らかにするため、IPMからとEI系からの透過速度の比を溶解度パラメータに対してプロットした (Fig. 5 b)。IPMにエタノールを添加するとエタノールと同程度の溶解度パラメータを示す薬物の透過速度が増加し、透過速度の比と溶解度パラメータの関係はベル型となった。本結果からもエタノールの solvent drag 効果の存在が推定された。

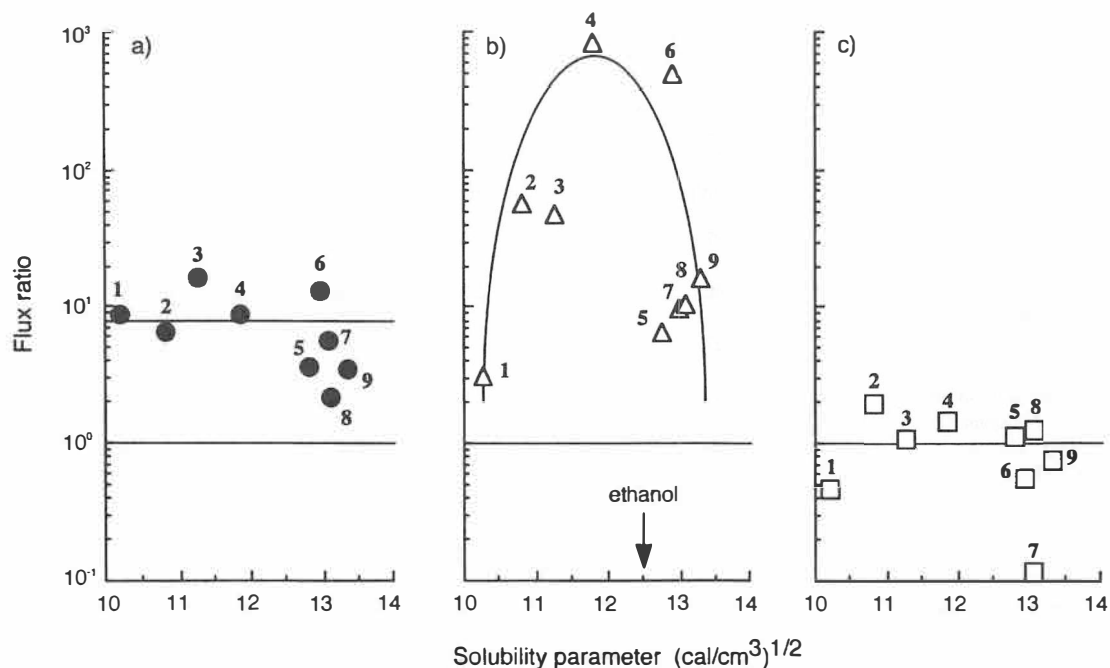
Fig. 5 cはEI系とLEI系の透過速度の比の関係を示している。この比は乳酸の添加により3級アミンを構造中にもつ塩基性薬物の AMPとKTで

1より大きく (つまり促進効果が認められ)、カルボキシル基をもった酸性薬物のIP、DCおよびIDMで1より小さな値を示した。乳酸はカルボキシル基を有していることから、酸性、塩基性薬物の間の促進効果の違いには薬物と乳酸の相互作用が関係していることが推察された。

本検討からIPMが不活性基剤であるシリコン液と比べ様々な物理化学的な性質を有する薬物の皮膚透過性を上昇させること、またエタノールのIPMへの添加による透過促進効果はエタノールに溶けやすい薬物に対してより効果的に現れることが明らかとなった。さらにLEI系の乳酸はその酸性が塩基性薬物との相互作用により、薬物の皮膚中の拡散性を増大し、薬物の皮膚透過を促進していることが示唆された。

4 総括

本研究で用いたような多成分系の促進剤の作用機序は非常に複雑である。基剤の各構成成分を組



a) IPMのみ/シリコン液、b) EI系/IPMのみ、c) LEI系/EI系

Fig. 5 各薬物の溶解度パラメータと皮膚透過速度比の関係

み合わせて検討を行うことにより、各々の成分の果たしている役割が明らかとなり、基剤成分相互の促進効果により薬物の皮膚透過促進が達成されていることがわかった。また促進効果には薬物の物理化学的性質も関係し、いくつかの条件が合致したときに大きな効果が現れることが明らかとなった。このような促進メカニズムを検討することで、応用可能な薬物を選択することができるとともに、さらに新しい促進系の発見の糸口ともなると考えられる。経皮吸収型製剤の開発にはまだまだ多くの障害が存在している。本研究がその一助となれば幸いである。

参考文献

- 1) Ghanem AH, Mahmoud H, Higuchi WI, et al., : The effects of ethanol on the transport of β -estradiol and other permeants in hairless mouse skin. II. A new quantitative approach. *J. Controlled Release*, 6, 75-83, 1987.
- 2) Barry BW, : Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *J. Controlled Release*, 15, 237-248, 1991.
- 3) Morimoto Y, Sugibayashi K, Kobayashi D, et al., : A new enhancer-coenhancer system to increase skin permeation of morphine hydrochloride *in vitro*, *Int. J. Pharm.*, 91, 9-14, 1993.
- 4) Kobayashi D, Matsuzawa T, Sugibayashi K, et al., : Analysis of the combined effect of l-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model. *Pharm. Res.*, 11, 96-103, 1994.
- 5) Nakamura H, Pongpaibul Y, Hayashi T, et al., : Effect of lipophilic multicomponent system on the skin permeation of ketotifen fumarate. *Int. J. Pharm.*, 141, 71-80, 1996.
- 6) Lee SJ, Kurihara-Bergstrom T, Kim SW, : Ion-paired drug diffusion through polymer membranes. *Int. J. Pharm.*, 47, 59-73, 1987.
- 7) Hatanaka T, Inuma M, Sugibayashi K, et al., : Prediction of skin permeability of drugs. I: Comparison with artificial membrane. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 3452-3459 (1990).
- 8) Hatanaka T, Inuma M, Sugibayashi K, et al., : Prediction of skin permeability of drugs. II. Development of composite membrane as a skin alternative. *Int. J. Pharm.*, 79, 21-28, 1992.
- 9) Karino A, Hayashi M, Horie T, et al., : Solvent drag effect in drug intestinal absorption. I. Studies on drug and D₂O absorption clearances. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 5, 410-417, 1982.
- 10) Nakamura H, Kobayashi Y, Sugibayashi K, et al., : Effect of L-lactic acid-ethanol-isopropyl myristate mixed system on the skin permeation of several drugs, *Drug Delivery System*, 12, 101-106, 1997.
- 11) Fedors RF, : A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids. *Polymer Eng. Sci.*, 1, 147-154, 1974.