

令和 6 年 4 月 11 日現在

機関番号：32519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06650

研究課題名（和文）Azone構造類似のイオン液体型アンテエンハンサー設計と薬物の経皮吸収促進効果

研究課題名（英文）Design of an Ante-enhancer with an Azone-Mimic Structure and skin permeation enhancing effect of drug using Ionic Liquid

研究代表者

押坂 勇志（Oshizaka, Takeshi）

城西国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：80884030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Azone構造類似のante-enhancer（効果を示した後、副作用が出る前に分解する添加剤）をデザインした。Ante-enhancerのデザインにはイオン液体（IL）作成法を用いた。Ante-enhancerの設計には、 $\epsilon$ -caprolactamとミリスチン酸を用いた。これらの試薬より、イオン液体型のAzone（IL-Azone）を作製することが可能であった。本研究で作製したIL-Azoneは、経皮吸収促進効果があり、皮膚刺激性もAzoneより低減された。また、IL-Azoneに最適な基剤は白色ワセリンであり、有効成分と同時に皮膚適用するとAzoneよりも高い透過促進効果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、イオン液体技術に着目して、Azone構造類似のイオン液体型アンテエンハンサーを設計することで、経皮吸収促進効果があり、かつAzoneよりも低刺激性の経皮吸収促進剤を設計することができた。この結果は、Azoneだけでなく、その他の経皮吸収促進剤についても、イオン液体型アンテエンハンサーの設計の可能性があり、より安全な製剤の開発を可能にすると示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we considered designing Azone-mimic structure ante-enhancers (additives that degrade after showing effect but before side effects). Ionic liquid (IL) preparation method was used to design the ante-enhancers. The reagents used for the design of the ante-enhancers were,  $\epsilon$ -caprolactam and myristic acid. It was possible to prepare an IL form of Azone (IL-Azone) from  $\epsilon$ -caprolactam and myristic acid. The IL-Azone prepared in this study had a skin permeation enhancing effect and reduced skin irritation compared to Azone. The best base material for IL-Azone was white petrolatum, which showed higher skin permeation enhancement effect than Azone when applied to the skin at the same time as the active ingredient.

研究分野：薬学

キーワード：Azone イオン液体 ante-enhancer 皮膚透過 経皮吸収促進効果

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚を適用部位とする外皮用薬や経皮吸収型製剤 (Transdermal Delivery System, TDS) が経口製剤や注射剤に次ぐ第3の医薬品投与方法・製剤としての位置を占めてからすでに数10年が経過したが、2020年1月にキナーゼ阻害剤である分子標的薬デルゴシチニブがアトピー性皮膚炎治療薬として承認され<sup>1)</sup>、今後はこのような分子標的薬を含む外皮用薬やTDSの開発も活性化されると考えられる。しかし、より多くの治療薬を外皮用薬やTDSに含有させるには物理学的経皮吸収促進法や化学的経皮吸収促進剤 (以後、促進剤と略記) を利用して角層 (SC) バリアを克服することが有効である。促進剤の利用は物理的促進法に比べ非侵襲的であり、すでにいくつかの市販品に応用されている。

促進剤はその開発の歴史から3つの世代がある。第1世代促進剤はそれまで医薬品添加剤として使われていたものを促進剤として転用したものである。エタノールやミリスチン酸イソプロピルなどの脂肪酸エステルが挙げられる。第2世代促進剤は経皮吸収性を著しく上げる促進剤の探索で生まれたものである。1980年代に多くの化学物質の経皮吸収に対して顕著な促進作用が認められ「the 促進剤」とも考えられた Laurocapram (Azone、図1)<sup>2,3)</sup>がその代表である。しかし、開発途中にSC下に侵入した後に皮膚刺激性<sup>4)</sup>が生じることが判明したため実用化には至らなかった。この反省があって、第3世代促進剤として biodegradable enhancer<sup>5)</sup>の開発が活発になった。外用剤でよく使われた ante-drug (投与した部位では強く作用するが、体内に吸収された後は急速に代謝、不活性化することで、全身性の副作用が少なくなるように分子構造を工夫した薬)<sup>6)</sup>にヒントを得て、SCで作用しSC下で皮膚刺激を起こさない化合物に代謝または不活性化する促進剤がいくつか開発された。低刺激性を示す促進剤が見いだされたが、いまだ多くの薬物の経皮吸収に対し Azone ほどの吸収促進能を示す化合物は開発されていない。

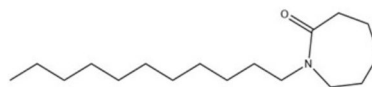


図1 Azone 構造式

## 2. 研究の目的

Ante-enhancer として種々 Azone 構造類似イオン液体 (IL-Azone)<sup>7,8)</sup> を調製し、さらにその皮膚透過促進能、皮膚刺激低減能について調査することを目的とする。本研究では第4世代促進剤の開発にチャレンジする。すなわち「デザイナーソルベント」と呼ばれているイオン液体に注目し、ante-enhancer と定義することができる「SCで吸収促進効果を発揮しSC下で分解する Azone 構造類似イオン液体」をアミン化合物 (カチオン) と酸性化合物 (アニオン) から調製することを考えた。すなわち、本促進剤はSCの細胞間脂質に構造変化を引き起こして Azone 様の高い吸収促進作用を示した後、SC下に移行するやいなや元のアミン化合物と酸性化合物に乖離するように設計される。本剤は強力な吸収促進作用を有することに加えて、低刺激性でかつ物性が異なる幅広い物質の経皮吸収促進剤として利用が期待できる。

- (1) カチオン性物質とアニオン性物質より IL-Azone が作製可能であるか検討した。
- (2) IL-Azone の皮膚刺激性および皮膚透過促進効果を検討した。
- (3) IL-Azone に最適な基剤選定を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) Azone 構造類似イオン液体の作製

Azone の構造を図1に示した。Azone の炭素が11個連なっている部分に関しては、脂肪酸 (ミリスチン酸) を選択した。Azone の  $\epsilon$ -caprolactam の構造の部分に関しては、 $\epsilon$ -caprolactam、L-ヒスチジン、ピロドキシン、トラネキサム酸を選択し、イオン液体となるか検討した。得られたサンプルは、DSC および  $^1\text{H-NMR}$  にて測定した。

### (2) Azone 構造類似イオン液体の皮膚刺激性試験<sup>9)</sup>

Azone、IL-Azone、1,3-ブタンジオール (1,3-BG) の皮膚刺激性は、ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験によって確認した。なお、皮膚刺激性試験を行ったサンプルは、以下の6つとした。Neat Azone、neat IL-Azone、3% Azone、3% IL-Azone、neat 1,3-BG、control。得られた結果は、Draize法に従って採点した。

### (3) Azone 構造類似イオン液体を用いた皮膚透過試験

食用豚の雌雄 (LWD、5-6ヶ月齢) の耳を使用して皮膚透過試験を行い、IL-Azone の皮膚透過促進効果を確認した。ブタ耳皮膚は、37°Cの水を循環させた横型2-チャンパー拡散セルに挟んだ。ドナー側に各種経皮吸収促進剤 (neat Azone および neat IL-Azone は精製せずにそのまま使用した。また、低濃度の Azone および IL-Azone の場合においても、経皮吸収促進効果が得られるか確認するため、それぞれ3%となるように1,3-BGに溶解し、経皮吸収促進剤として使用した。さらに、経皮吸収促進効果の比較対照として、neat 1,3-BGを使用した。) を3mL、レシーバー側に生理食塩液を3mL適用し、16時間前処理を行った。前処理後、ドナー側の経皮吸収促進剤を取り除き、精製水を含んだ脱脂綿を用いて清拭した。清拭後、各種ドナー水溶液 (硝酸イソソルピド (ISMN)、FD-4は、10 mg/mLとなるように精製水に溶解した。アンチピリン (ANP) は、1 mg/mLとなるように精製水に溶解した。) を3mL適用し、24h皮膚透過試験を行った。

#### (4) Azone 構造類似イオン液体に適した基剤選定

白色ワセリンとマクロゴール軟膏は精製せずに使用した。JP グレードの親水性クリームと吸収性クリームには防腐剤として p-ヒドロキシ安息香酸塩が含まれている。この防腐剤はモデル薬物である ANP と同様に皮膚から透過しやすい。HPLC を用いた ANP の定量を阻害する可能性がある。そこで、両クリームを調製し使用した。

各製剤は Azone または IL-Azone を 5% の濃度で含有し、モデル薬物 ANP (10 mg/g) を添加した。ε-caprolactam およびミリスチン酸を 1.7% および 3.3% の濃度で ANP (10 mg/g) と共に添加した (ε-caprolactam [M.W. : 113.2] およびミリスチン酸 [M.W. : 228.4] の等価モル濃度)。さらに、IL-Azone と精製水をそれぞれ 5% と 3% の濃度で含有する白色ワセリンと ANP (10 mg/g) を試験した。軟膏板に各組成物を必要量配置した後、軟膏べらを用いて必要量の Azone または IL-Azone と ANP を 5 分間混合した。これらの製剤はすべて o/o 乳剤である。内相 (IL-Azone 相) は軟膏またはクリーム相に微細に分散した。1,3-BG (液体) の場合、IL-Azone は溶媒に均一に溶解した。

ブタ耳の前処理は、「(3) Azone 構造類似イオン液体を用いた皮膚透過試験」と同様である。得られたブタ耳皮膚を縦型拡散セル (透過面積 : 3.14 cm<sup>2</sup>) にセットした。生理的食塩水で 1 h 水和後、各製剤 (3.0 g) を SC 側に添加した。

## 4. 研究成果

### (1) Azone 構造類似イオン液体の作製

ε-caprolactam とピリドキシンの組み合わせにおいて、IL-Azone を作製することができた。その結果を図 2, 3 に示す。ε-caprolactam、ミリスチン酸、IL-Azone の吸熱ピークはそれぞれ 70.6、60.7、26.6°C であった (図 2)。ε-caprolactam とミリスチン酸の吸熱ピークは IL-Azone では検出されなかった。ミリスチン酸の約 12 ppm に現れたシグナルのみを調べた (図 3b)。このシグナルは酸化重水素の添加により消失した。したがって、このシグナルは分子内カルボン酸を作るヒドロキシルプロトンであると考えられた。図 3c に示すように、IL-Azone では 12 ppm のピークプロファイルが消失した。これらの結果は、ε-caprolactam とミリスチン酸との間で IL が形成されたことを示唆している。ε-caprolactam のプロトン化は蒸留水中ではごくわずかであった。以前の研究では、ε-caprolactam は DMSO 中でわずかにプロトン化されていた (pKa = 27.2)。一方、ミリスチン酸の pKa は 4.9 である。ミリスチン酸の存在下において ε-caprolactam はプロトン化され、ミリスチン酸と IL 化すると考えられた。

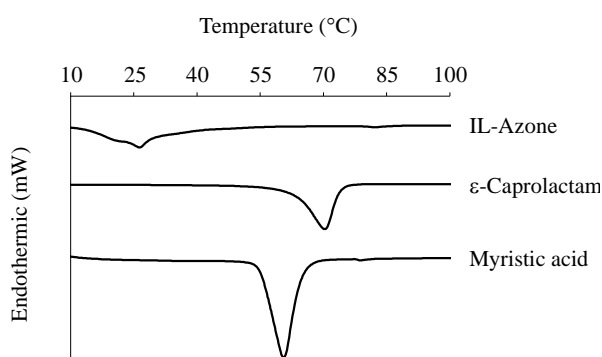


図 2 DSC による ε-caprolactam、ミリスチン酸、IL-Azone の吸熱ピーク

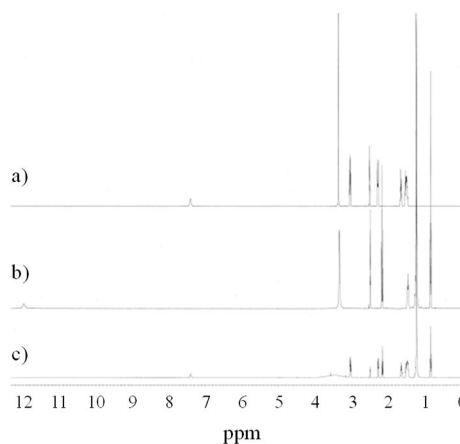


図 3 <sup>1</sup>H-NMR による測定、ε-caprolactam (a)、ミリスチン酸(b)、IL-Azone (c)

図 4 に IL-Azone の写真を示す。IL-Azone は 26.6°C より低い温度で凝固した。凝固した IL-Azone は 37°C で加熱すると溶けて液状に戻った。したがって、IL-Azone は溶媒を使用せずに液状で皮膚に適用できる可能性が考えられた。IL-Azone に水を加えると、すぐに白濁し、固体が沈殿した。この物質は 37°C に加熱しても融解することなく固体のままであった。したがって、IL-Azone は水分含量の少ない SC では液体であり、水分含量の多い生きた表皮や真皮では ε-caprolactam とミリスチン酸に解離するため、IL-Azone による皮膚刺激は Azone による皮膚刺激よりも少なくなると推測された。

## (2) Azone 構造類似イオン液体の皮膚刺激性試験

図5はウサギにおけるP.I.I.を示す。紅斑、痂皮および浮腫の皮膚一次刺激性スコアは以下の順であった。IL-Azoneの皮膚刺激性スコアはAzoneより低く、後者は「重度刺激性」(P.I.I.値:6.9)、前者は「中等度刺激性」(P.I.I.値:4.9)に分類された。この違いは、生きた表皮および真皮においてIL-Azoneが $\epsilon$ -caprolactamとミリスチン酸に解離することに起因すると考えられる。IL-Azoneが「中程度の刺激性」に分類されたことは、高濃度のIL-Azoneが皮膚で完全に解離しなかった可能性が考えられた。今後、低含水率で解離する *ante-enhancer* の合成が望まれる。AzoneとIL-Azoneの低濃度(3%)におけるDraizeスコアは、それぞれ「軽度刺激性」であった。しかし、3% IL-Azoneの刺激性は、製剤剥離後、0.5時間で1例のみにわずかな紅斑と浮腫が観られたが、それ以外の測定時間およびその他の2例について紅斑および浮腫は観られなかった。なお、全ての経皮吸収促進剤の皮膚刺激性において、紅斑、痂皮、浮腫以外の皮膚反応は観られなかった。3% IL-Azoneによる皮膚刺激はごくわずかであったため、臨床への応用が可能であると示唆された。

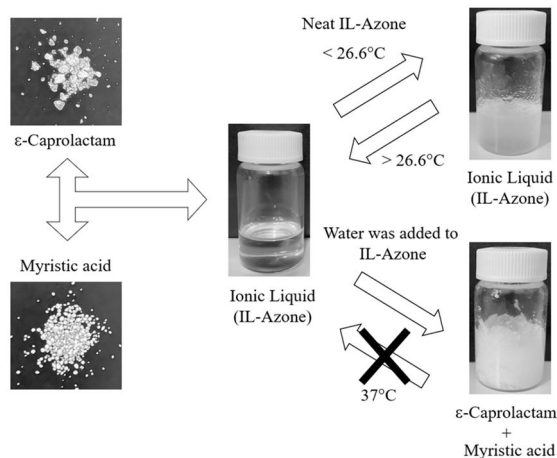


図4 IL-Azoneと関連化合物の外観写真

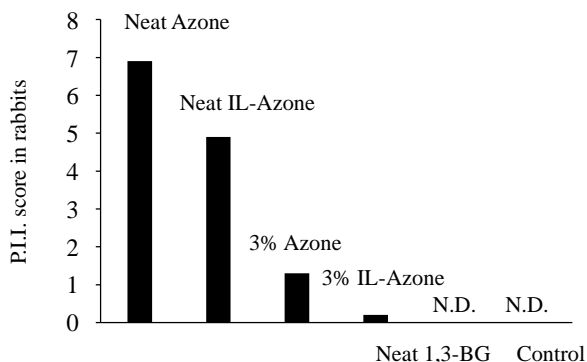


図5 Neat Azone、IL-Azone、3% Azone、3% IL-Azone および 1,3-BG のウサギにおける皮膚一次刺激性指数 (P.I.I.)

## (3) Azone 構造類似イオン液体を用いた皮膚透過試験

図6に各種モデル薬物の皮膚透過量を示す。Azoneは、SCの細胞間脂質と相互作用して脂質のゆらぎを促進し、多くの種類の薬物のSCからの皮膚透過を促進する。IL-AzoneはAzoneと類似の作用機序を有すると考えられるが、IL-Azoneの皮膚透過促進作用はAzoneよりも低かった。Azoneの効果は、親水性で低分子の薬剤ISMNで最も高く、次いで $\text{clogP}$ が0.2のANP、親水性で高分子の化合物FD-4であった。一方、IL-Azoneの皮膚透過促進効果は、3種類のモデル薬物で同程度であった(皮膚透過促進比:4.0-4.7)。これらの結果から、IL-Azoneによる細胞間脂質のゆらぎはAzoneによるゆらぎよりも小さいことが示唆された。FD-4の主な透過経路は毛包であるが、AzoneやIL-Azoneを使用すると細胞間脂質のゆらぎが大きくなることから、FD-4は皮膚から透過しやすいことが示唆された。一方、FD-4では、AzoneとIL-Azoneの皮膚透過促進作用は同等であったが、Azoneの皮膚透過促進作用はISMNよりも弱かった(図7)。細胞内脂質のゆらぎに対するAzoneの作用はIL-Azoneのそれよりも著しく高いため、Azoneの皮膚透過促進作用はISMNよりもFD-4の方が弱かった。

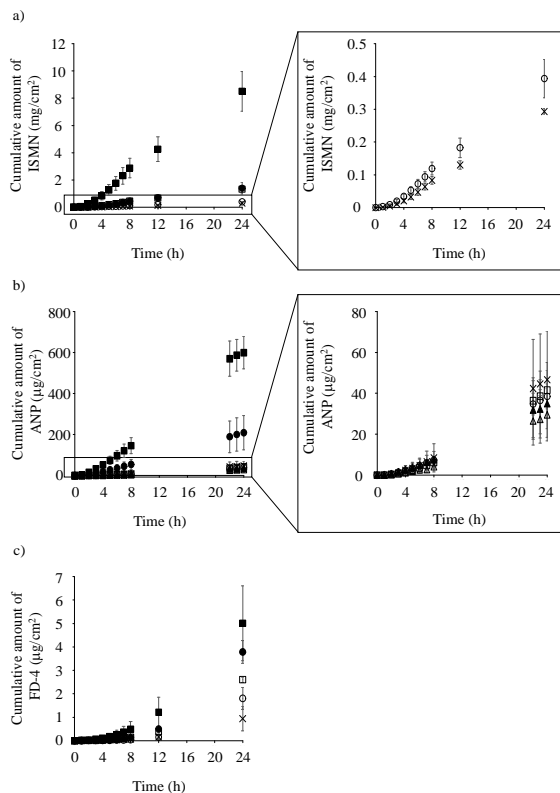


図6 ISMN (a)、ANP (b)、FD-4 (c) を皮膚透過促進剤で前処理したブタ耳の皮膚に適用させたときの累積量と時間の関係。シンボル: Azone (■)、IL-Azone (●)、3% Azone (□)、3% IL-Azone (○)、1,3-BG (×)、3%  $\epsilon$ -caprolactam in 1,3-BG (△)、3% ミリスチン酸 in 1,3-BG (▲)。Mean  $\pm$  S.D. (n = 3-4)。

#### (4) Azone 構造類似イオン液体に適した基剤選定

ANP と同時適用した 1,3-BG、マクロゴール軟膏、親水クリーム、吸水クリーム中の 5% IL-Azone では、皮膚透過促進作用は認められなかった(図 8)。1,3-BG は吸水性の高い溶媒であるため、IL-Azone は 1,3-BG 中で元の $\epsilon$ -caprolactam とミリスチン酸にある程度解離し、その結果、ANP との同時適用では、透過促進効果が弱くなったと考えられる。親水性クリームおよび吸収性クリームには、水分が含まれるため、IL-Azone が元の $\epsilon$ -caprolactam とミリスチン酸に解離し、皮膚透過促進効果が得られなかったと考えられる。マクロゴール軟膏はマクロゴール4000とマクロゴール400の1:1混合物であるため、水は軟膏に吸収されやすい(マクロゴール軟膏5gは1.5gの水を保持する)<sup>10)</sup>。マクロゴール軟膏に吸収された水によって皮膚透過促進効果が得られなかったと考えられる。

一方、白色ワセリン中の 5% IL-Azone からの ANP の皮膚透過率は、白色ワセリン中の同濃度の Azone からのそれよりも高かった(図 9)。また、白色ワセリン中の 1.7%  $\epsilon$ -caprolactam と 3.3% ミリスチン酸の混合物からの ANP の累積量はコントロールとほぼ同じであった。したがって、IL-Azone とすることで、皮膚透過促進効果が得られると考えられた。白色ワセリン中の 5% IL-Azone と 3% 精製水の混合物からの ANP 透過性は、コントロールとほぼ同じであった。白色ワセリンでも、水の存在により IL-Azone が解離し、ANP の皮膚透過促進効果が減少した。Azone の皮膚透過促進作用は、一般的にブタ皮膚よりも薬物透過性の高いラット皮膚で試験した場合、薬物透過プロファイルに 8~10 時間のラグタイムを示すことが報告されている。このような Azone の皮膚透過促進効果のラグタイムは、ブタの皮膚でも観察された。一方、白色ワセリン中の IL-Azone の皮膚透過促進効果は、ブタ皮膚に塗布してから 3 時間後に観察された。したがって、IL-Azone による皮膚透過促進作用の発現時間は Azone によるそれよりも短く、24 時間における ANP の累積透過量は Azone 含有製剤よりも高かったと示唆された。

<引用文献>

- 1) <https://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/all/series/drug/update/202002/564138.html>
- 2) Stoughton R.B., et al., *Arch Dermatol*, **118**, 474 (1982).
- 3) Sugibayashi K., et al., *J. Pharm. Sci.*, **74**, 1157 (1985).
- 4) Phillips C.A., et al., *Int. J. Pharm.*, **125**, 63-71 (1995).
- 5) Wong O., et al., *J. Pharm. Sci.*, **77**, 967-971 (1988).
- 6) Takeda K., et al., *Drugs*, **36**(Suppl 5), 15-23 (1988).
- 7) Egorova K., et al., *Chem. Rev.*, **117**, 7032-7189 (2017).
- 8) Dias A.R., et al., *Curr. Med. Chem.*, **26**, 7520-7532 (2019).
- 9) Draize J.H., *Dermal toxicity.*, 1959. 46-59 (1959).
- 10) Shigeyama M., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 129-133 (2001).

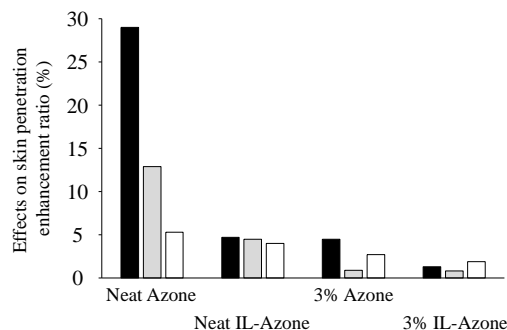


図 7 ISMN、ANP、FD-4 の皮膚透過促進率。シンボル： ISMN (黒)、ANP (灰色)、FD-4 (白)。

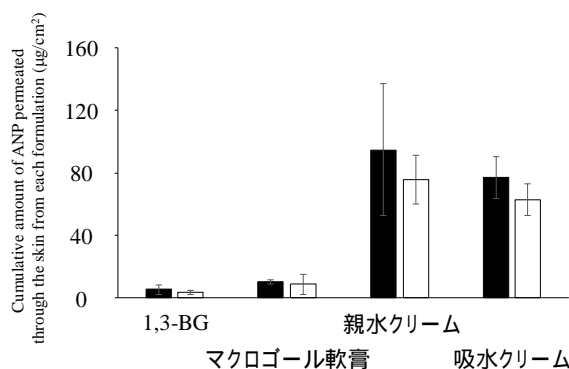


図 8 各基剤からの 24 時間目の ANP の皮膚透過量。シンボル： コントロール(黒)、5%-ILAzone(白)。

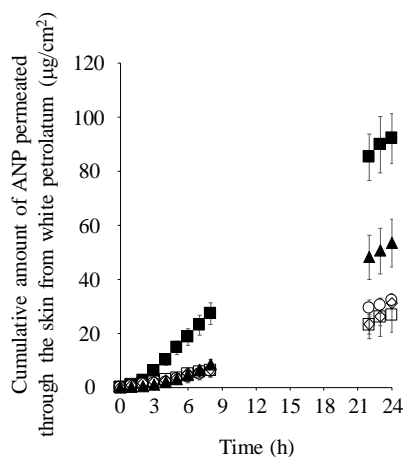


図 9 ANP による皮膚透過に対する白色ワセリンに含有させた Azone と IL-Azone の効果。シンボル： 白色ワセリン単独(○)、5% Azone (▲)、5% IL-Azone (■)、1.7%  $\epsilon$ -caprolactam と 3.3% ミリスチン酸(□)、5% IL-Azone と 3% 精製水(□)。Mean  $\pm$  S.D. (n = 3-4).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oshizaka Takeshi, Hayakawa Mao, Uesaka Mayu, Yoshizawa Kota, Kamei Tomoyo, Takeuchi Issei, Mori Kenji, Itakura Shoko, Todo Hiroaki, Sugibayashi Kenji	4. 巻 40
2. 論文標題 Design of an Ante-enhancer with an Azone-Mimic Structure using Ionic Liquid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 1577-1586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-023-03515-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshizaka Takeshi, Yamamoto Aki, Tanaka Hikaru, Takeuchi Issei, Mori Kenji, Sugibayashi Kenji	4. 巻 未
2. 論文標題 Design of Ionic Liquid Formulations with Azone-Mimic Structures for Enhanced Drug Skin Permeation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 未
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2023.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上坂 真由、早川 真央、吉澤 幸汰、板倉 祥子、藤堂 浩明、竹内 一成、押坂 勇志、森 健二、杉林 堅次
2. 発表標題 イオン液体型ante-enhancerの薬物経皮吸収促進効果
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本 亜季、田中 光、押坂 勇志、竹内 一成、森 健二、杉林 堅次
2. 発表標題 Azone模倣構造を有するイオン液体型アンテエンハンサーを含む適切な製剤の選択
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>・城西国際大学 News一覧 <a href="https://www.jiu.ac.jp/news/detail/id=15994">https://www.jiu.ac.jp/news/detail/id=15994</a></p> <p>・アカデミックフォーラム2023</p> <p>・アカデミックフォーラム2024（予定）</p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森 健二  (Mori Kenji)  (60439023)	城西国際大学・薬学部・教授   (32519)	
研究分担者	武井 千弥  (Takei Chihiro)  (70838466)	城西国際大学・薬学部・助教   (32519)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	杉林 堅次  (Sugibayashi Kenji)		
研究協力者	藤堂 浩明  (Todo Hiroaki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------