

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590057

研究課題名(和文)薬物の選択的毛嚢デリバリーによる皮膚透過促進法の開発

研究課題名(英文)Development of enhanced skin permeation of drug by its selective hair follicle delivery.

研究代表者

藤堂 浩明(Hiroaki, Todo)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：10383184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬物の皮膚透過に対する毛嚢ルートの寄与率は、薬物の油水分配係数の減少とともに増大し、 $\log K_o/w < 0$ でかつ分子量 $< 500$  Daの薬物では、毛嚢の寄与率がほぼ100%となることが明らかとなった。また、脂溶性が $\log K_o/w < 0$ の薬物は、短時間で毛嚢内濃度が一定となることが分かった。さらに、ピエゾ感圧アプリケーターと定電流付加デバイスを併用により、効率的に微量薬物を毛嚢ルートを介して皮内送達でき、適用した薬物の皮膚透過性を促進することができた。これらの結果から、毛嚢内選択的デリバリーが可能となれば、新たな経皮薬物透過促進手段となることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The contribution of hair follicle route against the total skin permeation was increased with an increase of its lipophilicity. Almost one hundred percent of the contribution of hair follicle route against the total skin permeation was observed when a low molecular of hydrophilic drug ( $\log K_o/w < 0$  and less than 500 Da molecular weight) was applied topically. In addition, a steady-state hair follicle concentration was observed in a short time after topical application of lipophilic drugs ( $\log K_o/w < 0$ ). Furthermore, combined application of a piezo applicator and constant voltage type iontophoresis could effectively deliver a small amount of drug into hair follicle and significantly improve the skin permeation. These results suggest that selective drug delivery to hair follicle with a piezo applicator would be useful to improve drug permeation through skin.

研究分野：薬剤学

キーワード：経皮吸収 毛嚢デリバリー 毛嚢寄与率

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー治療薬、注意欠陥・多動性障害治療薬、尿崩性治療薬などの中枢系に作用する薬物や、副甲状腺ホルモンPTH(1-34)などの骨粗鬆症治療薬などのタンパク質の投与部位として皮膚が注目されている。皮膚を介した薬物吸収の特徴として、肝初回通過効果を回避できること、長時間にわたって血中濃度の維持が容易であること、投与方法および投与中断が簡便であることが挙げられる。皮膚に適用した薬物の主な透過ルートは“角層ルート”であり、この角層を突破するために化学的吸収促進剤や物理的促進手段が利用されている。薬物の経皮透過・浸透ルートには、“角層ルート”だけでなく、わずかではあるが毛嚢や汗腺などの“付属器官ルート”がある。我々は、水溶性薬物の皮膚透過量を求め、全体の皮膚透過量に対する付属器官を介した薬物の透過量を算出している。

毛嚢などの付属器官は皮膚全体の表面積のわずか0.1%程度の面積しか存在しないため、付属器官が主な透過ルートである水溶性薬物の皮膚透過は角層が主な透過ルートである薬物と比較すると著しく低い。選択的に毛嚢などの付属器官への薬物送達が可能となり、毛嚢を介して皮膚を透過する薬物量を増大することができれば、経皮適用製剤としては不向きであった薬物による局所作用もしくは全身作用を期待できる可能性がある。毛嚢は、皮膚内に陥入している袋状の組織であり、毛母には毛細血管が豊富に存在している。また、毛嚢は漏斗状に開いており、その毛孔部は未成熟な角層により覆われている(Wosicka H., et al., J. Dermatol Sci., 57, 83-89, 2010)。したがって、薬物の選択的毛嚢デリバリーが可能となれば、高分子医薬品のデリバリーでは必須とされていた物理的促進法を使用せず、それらの経皮デリバリーを行うことができる可能性を有している。

### 2. 研究の目的

欧米ではマイクロニードルやneedle-free injectorなどの促進デバイスを用いた経皮適用型製剤が多く臨床試験段階にあり、経皮適用製剤は非常に注目されている。高分子薬物の経皮適用では、皮膚の再外層に位置する角層バリアの突破が最大のポイントとなるため促進デバイスを用いた投与が不可欠となっており、簡便な投与が難しい。そこで、本研究では、促進法デバイスを使用しない新たな経皮薬物透過促進手段の確立を目指し、薬物の選択的毛嚢デリバリーに着目した。

### 3. 研究の方法

#### 試薬

Fluorescein isothiocyanate-dextran 4

kDa (FD-4)、sodium calcein (Ca-Na)、sodium fluorescein (FL-Na)、lidocaine hydrochloride (LC) および ibuprofen (IP) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。Isosorbide dinitrate (ISDN) は東光薬品工業株式会社から供与された。Aminopyrine (AMP) および diisopropyl fluorophosphate (DFP) は和光純薬工業株式会社(大阪、日本)から購入した。Butyl paraben (BP)、clindamycin phosphate (CP)、calcein disodium (Cal) および isosorbide mononitrate (ISMN) は東京化成工業株式会社(東京、日本)から購入した。Nile red は関東化学株式会社(東京、日本)から購入した。これら試薬はすべて試薬特級を用いた。その他の試薬および溶媒は試薬特級または高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用を使用した。

#### 動物摘出皮膚:

動物摘出皮膚は、三元豚の耳(ブタ耳)(株式会社埼玉実験動物供給所、埼玉、日本)より購入し、ブタ耳皮膚表面を傷つけないように丁寧にメスを用いて必要面積部分を摘出した。

#### 毛嚢プラグニング剤調製法:

シリコングリスとシアノアクリレート系接着剤を1:1で混合し、2剤混合毛嚢プラグニング剤を調製した。なお、シアノアクリレート系接着剤には毛嚢プラグニング処理面積を明らかにするために、シアノアクリレート系接着剤全量に対してナイルレッドを0.1%添加した。

毛嚢プラグニング処理方法:直径0.5 mmのポリプロピレン製スティックの先端に毛嚢プラグニング剤を少量含ませ、摘出ブタ外耳皮膚の薬物の有効透過面積中(1.77 cm<sup>2</sup>)に存在する毛嚢開口部に実体顕微鏡観察下にて毛嚢プラグニング剤を塗布した。なお、実体顕微鏡観察下で確認できる有効透過面積中の全毛嚢数は56±3本であったため、その半数である28カ所に毛嚢プラグニング処理を施すこととした。また、皮膚透過実験後に毛嚢プラグニング剤の表面積を測定し、薬物の有効透過面積を補正した。

#### In vitro 皮膚透過実験:

毛嚢プラグニング処理皮膚もしくは毛嚢プラグニング未処理皮膚を縦型拡散セルに装着した。角層側には物理化学的性質の異なる種々薬物(Table 1)を、真皮側にpHを調整した緩衝液を適用し皮膚透過実験を行った。経時的に真皮側からサンプリングを行い、サンプル中薬物濃度を測定した。なお、蛍光物質(fluorescein isothiocyanate dextran、sodium calcein、sodium fluorescein)とbutyl paraben以外の種々解離型薬物に関してはpHを調整し、イオン型および分子型分率を約100%として適用した。

#### 毛嚢寄与率の算出法:

毛嚢プラグニング未処理(HF\* non-plugged skin)もしくは処理皮膚(HF

plugged skin)を介した薬物の透過プロファイルの定常状態より *flux* を算出し、さらに *flux* を薬物適用濃度で除することで透過係数(*P*)を算出した。また、毛嚢ブラッキング処理の有無による薬物透過性の差より、薬物の皮膚透過減少率を算出し、薬物の皮膚透過に対する毛嚢寄与率を算出した。

#### 毛嚢内薬物動態評価法：

皮膚透過実験を終了し、皮膚を拡散セルより取り外し、1 mL の種々 pH に調整した緩衝液（適用薬物水溶液と同じ pH）にて皮膚の角層側、真皮側を三回ずつ洗浄した。その後、皮膚有効透過面積中から毛を 30 本採取し、1.5 mL マイクロチューブに入れた。マイクロチューブに緩衝液を 400  $\mu$ L 加え、15 分間攪拌した。遠心分離（15000 rpm、5min、4°C）後、上澄液を回収し、薬物濃度を測定した。得られた薬物濃度から毛一本あたりの薬物量を算出し、毛嚢中薬物量とした。

#### 毛嚢への薬物投与方法：

薬物を毛嚢部のみに適用することは、現行の皮膚透過試験では非常に難しい。そこで、本研究では、薬液を数ピコリットルから数マイクロリットル噴出可能なピエゾ素子を利用した特殊ノズル（ピエゾ感圧アプリケーション、クラストテクノロジー株式会社、東京、日本）および顕微鏡が付属したマニピレータを用いて、薬液を毛嚢へ直接適用した。

#### 定電流負荷条件：

定電流負荷は、AgCl 電極、Ag 電極をそれぞれニードル型電極とし、Ag/AgCl 電極を薬液適用直後に組織表面に適用された薬液に浸け、組織表面に電極が押し込まれないように固定し、一方、Ag 電極はレシーバー側に設置して行った定電流の負荷条件は ADIS-HP( 6.0 ver. X ADVANCE、東京、日本)にて制御し、皮膚に一定電流（0.16 mA）を適用した。

#### 4. 研究成果

図 1 に毛嚢ブラッキング処理による種々薬物の皮膚透過減少率に及ぼす  $\log K_{o/w}$  の影響を示す。 $\log K_{o/w}$  が -4 から 0 の範囲では薬物の毛嚢ルートへの寄与が大きいことがわかった。また、 $\log K_{o/w}$  が -4 から 0 の範囲では、毛嚢ブラッキング処理による皮膚透過減少率に変化がみられなかった。さらに、 $\log K_{o/w}$  が 0 から 4 の範囲では  $\log K_{o/w}$  の増加に伴い、毛嚢ブラッキング処理による皮膚透過減少率が低下した。本検討では、有効透過面積内に存在する毛嚢の内、半分の毛嚢をブラッキング処理して得ているため、 $\log K_{o/w} < 0$  の薬物皮膚透過は毛嚢透過ルートであることが分かった。

次に、 $\log K_{o/w} < 0$  の薬物を用いて ISMN（pH7.4）BA（pH7.4）LC（pH5.0）CP（pH10.0）および Ca-Na（pH7.4）の

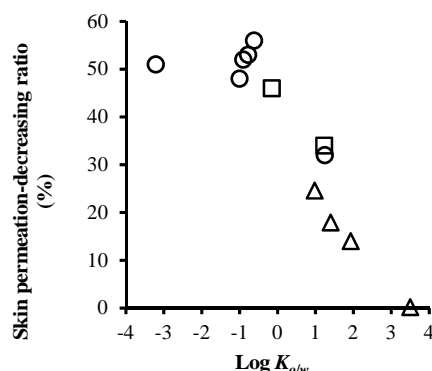


図 1 薬物の皮膚透過減少率と薬物の油水分配係数の関係

毛嚢中薬物量の経時的変化を調べた。その結果、水溶性薬物 ( $\log K_{o/w} < 0$ ) の  $\log K_{o/w}$  が -0.2 の ISMN (pH7.4)  $\log K_{o/w}$  が -0.4 の BA (pH7.4) および  $\log K_{o/w}$  が -0.9 の LC (pH5.0) は毛嚢薬物量が約 1 時間で一定値となることが分かった。

ピエゾ感圧アプリケーションを用いて抽出皮膚の毛嚢部位もしくは角層部位へ FD-4 を適用し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLMS) にて皮内分布を調べた。その結果、いずれ適用方法でも FD-4 は毛嚢を介した皮内浸透が認められ、また毛嚢から皮内への FD-4 の移行が確認できた。この結果から、微量投与後の FD-4 の皮内分布は、皮膚のバリア能や皮膚中拡散性に強く依存すると考えられた。ピエゾ感圧アプリケーションにて、毛嚢へ薬物を直接投与できることが明らかとなったが、顕微鏡が付属したマニピレータによる薬物投与方法は現実的ではない。そこで、ピエゾ感圧アプリケーションと電気的エネルギーを利用した定電流付加デバイスとの併用による、薬物の選択的毛嚢送達の可能性を調べた。

ピエゾ感圧アプリケーションと定電流付加デバイスを併用すると、適用わずか 5 分で皮膚に溶液のみを 8 時間塗布した時と同程度の毛嚢（皮膚）中薬物量が得られた。本研究結果から、物理促進手段フリーな皮膚透過促進技術の開発まで至らなかったものの、ピエゾ感圧アプリケーションと定電流付加デバイスを併用は、微量薬物を毛嚢ルートを通じて皮内送達する有用な手段であることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. D. Horita, H. Todo, K. Sugibayashi, Analysis of hair follicle penetration of lidocaine and fluorescein isothiocyanate-dextran 4 using hair

follicle-plugging method, 査読有、  
Drug Develop. Ind. Pharm., **40**(3),  
345-351 (2014).

2. S. Kijima, R. Masaki, W.R. Kadhum,  
H. \_\_\_\_\_ Todo, T.Hatanaka, K.  
Sugibayashi, Potential of imaging  
analysis in establishing skin  
concentration-distance profiles for  
topically applied FITC-dextran 4  
kDa, 査読有, ADMET & DMPK 2(4)  
(2014) 221-234; doi:  
10.5599/admet.2.4.42

[学会発表](計 12 件)

- ・ 小宅 哲史、大竹 厚史、喜島 小翔、  
堀田 大介、藤堂 浩明、杉林 堅次、  
磁性粒子と磁場併用による水溶性高  
分子の毛嚢選択送達性の修飾、城西大  
学 薬学部、第 29 回日本 DDS 学会  
学術集会、2013 年 7 月、京都
- ・ 喜島 小翔、正木 涼介、Wesam R.  
Kadhum、藤堂 浩明、畑中 朋美、  
杉林 堅次、画像解析による物質の皮  
膚中濃度評価法の確立、城西大学 薬  
学部、第 29 回日本 DDS 学会学術集  
会、2013 年 7 月、京都
- ・ 吉元 将人、堀田 大介、藤堂 浩明、  
杉林 堅次、毛嚢プラグング法を用  
いた薬物の皮膚透過に及ぼす毛嚢ル  
ートの寄与評価、城西大学 薬学部、  
第 29 回日本 DDS 学会学術集会、2013  
年 7 月、京都
- ・ Shosho Kijima, Wesam R. Kadhum,  
Hiroaki Todo, Tomomi Hatanaka,  
Kenji Sugibayashi、Usefulness of  
nano-dose applicator to deliver nano  
or pico-order dosage to minimal  
tissues, Josai University, Faculty of  
Pharmaceutical Sciences、2nd  
International conference  
nutraceutical and cosmetic sciences、  
2013 年 10 月、Indonesia, Jakarta
- ・ Shosho Kijima, Wesam R. Kadhum,  
Hiroaki Todo, Tomomi Hatanaka,  
Kenji Sugibayashi, Imaging analysis  
of drug distribution and diffusion in  
minimal tissues after application  
with nano-dose applicator、Josai  
University、Faculty of  
Pharmaceutical Sciences、Asian  
federation for pharmaceutical  
sciences 2013、2013 年 11 月、Republic  
of Korea, Jeju
- ・ 吉元 将人、堀田 大介、Mohm Fadli  
Mohm Asmani、藤堂 浩明、杉林 堅  
次、毛嚢プラグング法を用いた薬物  
の皮膚透過に及ぼす毛嚢ルート寄与率  
の算出、城西大学 薬学部、日本薬学  
会 第 134 年会、2014 年 3 月、熊本
- ・ 矢野 翔大、Mohm Fadli Mohm

Asmani、藤堂 浩明、杉林 堅次、局  
所適用薬物の毛嚢中薬物動態の評価、日  
本薬学会 第 134 年会、2014 年 3 月、熊  
本

- ・ 喜島 小翔、Wesam R. Kadhum、藤堂  
浩明、杉林 堅次、画像解析による微少  
量薬物投与後の微小組織内分布に関す  
る研究、城西大学 薬学部、日本薬劑学  
会 第 29 年会、2014 年 5 月、大宮。
- ・ 喜島 小翔、正木 涼介、Wesam R.  
Kadhum、藤堂 浩明、畑中 朋美、杉  
林 堅次、画像解析による物質の皮膚中  
濃度評価法の確立、第 39 回日本化粧品  
学会、2014 年 6 月、東京。
- ・ 安田 勇太郎、Mohm Fadli Mohm  
Asmani、矢野 翔大、Wesam R.  
Kadhum、藤堂 浩明、Eddy Yusuf、杉  
林 堅次、薬物の毛嚢移行性に関する基  
礎研究、城西大学 薬学部、第 30 回日  
本 DDS 学会学術集会、2014 年 7 月、東  
京。
- ・ Shosho Kijima, Wesam R. Kadhum,  
Hiroaki Todo, Kenji Sugibayashi,  
Usefulness of constant  
current-assisted nano-dose delivery to  
minimal target site after drug  
application with a new nano-dose  
applicator, Faculty of Pharmaceutical  
Science, Josai University, 3<sup>rd</sup>  
International conference nutraceutical  
and cosmetic sciences, 2014 年 11 月、  
Shinjuku.
- ・ Yutaro Yasuda, Fadli Mohd, Wesam R.  
Kadhum, Hiroaki Todo, Eddy Yusuf,  
Kenji Sugibayashi, Evaluation of drug  
disposition in hair follicles after  
topical application, 3<sup>rd</sup> International  
conference nutraceutical and cosmetic  
sciences, 2014 年 11 月、Shinjuku.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

藤堂 浩明 ( TODO, Hiroaki )

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号 :

### (2)連携研究者

杉林 堅次 ( SUGIBAYASHI, Kenji )

城西大学・薬学部・教授

### (2)研究協力者

喜島 小翔 ( KIJIMA, Shosho )

吉元 将人 ( YOSHIMOTO Masato )