

経皮吸収型製剤開発のための評価時間を考慮した
人工高分子膜の利用に関する研究
—ポリマーナノフィルムの有効性の提示を含めて—

2023年 3月

鈴木 貴大

目次

略号	…3
記号	…5
総論の部	
緒言	…6
第1章 pH-shift 法による過飽和状態の形成とユーザー活性化システムを組み合わせた新規経皮吸収型製剤に関する研究	…10
第1節 pH-shift 法による過飽和状態の形成と皮膚透過促進を示す薬物の検討	…13
第2節 24時間確実な透過促進性を示すケトコナゾールの過飽和条件	…20
第3節 過飽和状態を形成したケトコナゾールの膜透過メカニズムの評価	…25
第4節 小括	…33
第2章 経皮吸収型製剤開発のためのハイスループットスクリーニングに利用可能なポリマーナノフィルムに関する研究	…34
第1節 ポリマーナノフィルムの調製とポリマーアロイ化がポリマーナノフィルムの特性に与える影響の評価	…35
第2節 ポリマーナノフィルムの薬物透過性評価	…42
第3節 ヒト皮膚との薬物透過類似性の比較	…55
第4節 小括	…64

第3章 皮膚透過促進剤による皮膚の薬物透過性変化を短時間で予測可能な ポリマーナノフィルムに関する研究	・・・65
第1節 皮膚透過促進剤適用時の Strat-M [®] および各種ポリマーナノフィルムの 薬物透過性変化	・・・65
第2節 脂質処理を施したポリマーナノフィルムの調製と皮膚透過促進剤に対する 応答性の評価	・・・71
第3節 モノステアリン酸グリセロールによる脂質処理がポリマーナノフィルムの膜特性 に与える影響の評価	・・・80
第4節 小括	・・・88
結論	・・・89
謝辞	・・・91
実験の部	
第1章 実験の部	・・・93
第2章 実験の部	・・・98
第3章 実験の部	・・・104
参考文献	・・・107

略号

5-FU	5-フルオロウラシル
AMP	アミノピリン
ANP	アンチピリン
ANS	8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム
API	医薬品有効成分
BCS	生物薬剤学的分類システム
CB	シクロバルビタール
CDCl ₃	重水素化クロロホルム
CF	5(6)-カルボキシフルオレsein
D ₂ O	重水
DC-Na	ジクロフェナクナトリウム
DCI	重塩酸
DPH	ドーパミン塩酸塩
DSC	示差走査熱量測定
EDS	エネルギー分散型 X 線分析法
FD-10	フルオレsein イソチオシアネート-デキストラン (平均 M.W. 10,000)
FE-SEM	電界放出形走査電子顕微鏡
FT-IR	フーリエ変換赤外分光法
GMS	モノステアリン酸グリセロール
HPC	ヒドロキシプロピルセルロース
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HPMC	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
HSP	ハンセン溶解パラメータ
HTS	ハイスループットスクリーニング
IDM	インドメタシン
IPH	イソプロテレノール塩酸塩
KCZ	ケトコナゾール
KP	ケトプロフェン
LC	リドカイン
L-DP	レボドパ
LLPS	液-液相分離
MWCO	分画分子量
NaOD	重水酸化ナトリウム
NMP	N-メチル-2-ピロリドン

NMR	核磁気共鳴
PBS	りん酸塩緩衝液
PLLA	ポリ(L-乳酸)
PMHS	ポリ(メチルヒドロシロキサン)
PNF	ポリマーナノフィルム
PVA	ポリビニルアルコール
TMS-Na	3-(トリメチルシリル)プロピオン酸ナトリウム-2,2,3,3- <i>d</i> ₄
TTS	経皮吸収型製剤
UAS	ユーザー活性化システム
UWL	非攪拌水層

記号

Atom%	原子組成比率
AUC	溶解薬物濃度－時間曲線下面積
<i>CL</i>	膜クリアランス
<i>D</i>	拡散係数
<i>DK</i>	<i>DK</i> パラメータ
D_t	累積透過量
<i>E</i>	β -フォームの割合
<i>J</i>	薬物透過流束
<i>K</i>	分配係数
K_{ow}	<i>n</i> -オクタノール/水分配係数
<i>L</i>	膜厚
M_n	数平均分子量
M_w	重量平均分子量
M.W.	分子量
<i>P</i>	透過係数
pH*	重水を溶媒とした場合に測定される pH
pK_a	酸解離定数
<i>r</i>	ピアソン相関係数
r_i	分子半径
<i>R</i>	膜細孔の等価半径
R^2	決定係数
S.D.	標準偏差
$t_{1/2}$	消失半減期
T_g	ガラス転移温度
T_m	融点
T_{lag}	ラグタイム
<i>w</i>	ポリマーの重量混合比
<i>x</i>	モル分率
ε/L	細孔占有率/長さ比
τ	曲路率
ΔH	エンタルピー変化
δ_D	分散パラメータ
δ_P	極性パラメータ
δ_H	水素結合パラメータ

総論の部

緒言

皮膚を介して全身循環に薬物を移行させる経皮吸収型製剤 (Transdermal therapeutic system: TTS) は、アメリカ食品医薬品局にてスコポラミンを利用した初の TTS が 1979 年に承認されて以降、様々な TTS が国内外にて承認され、利用されている。[1] Table 1 には国内外における TTS の利用例を示す。国内では 2018 年にエメダスチンフマル酸塩、2019 年にはブロナンセリン、ロピニロール塩酸塩が承認され、その適用疾患はアレルギー、精神および中枢神経系の疾患にまで拡大しており、薬物治療に対する TTS の重要性は年々高まっている。[2-7] TTS を利用するメリットは、皮膚への貼付のみで投与が可能であるという投与の容易性にあり、注射投与と比較して患者のコンプライアンスの向上が期待できる。[8,9] さらに、肝代謝に伴う生物学的利用能低下の回避や、消化管へのダメージ軽減といった経口投与により生じる欠点を回避するメリットもある。TTS はこれらのメリットから、2000 年代以降その市場規模は拡大傾向にあり、世界的にさらなる TTS 開発の進展が予想されている。[10,11] しかし、皮膚の薬物透過性は一般的に乏しい。十分な治療効果が得られる TTS を開発するためには、創薬初期において多くの新薬候補化合物から、開発可能性がある化合物をスクリーニングにより選択する必要がある。開発が難しい状況であれば、皮膚透過促進技術の利用による製剤の最適化を行う必要がある。しかしながら、これらの評価試験数は膨大であるため、動物を利用する *in vivo* での評価は、コスト、試験時間、動物愛護の観点から避けられつつある。[12-15] そのような状況から、試験時間の短縮、実験条件の制御性などのメリットを有する *in vitro* による皮膚透過性の予測が重要となる。なかでもポリマーから構成された人工膜である人工高分子膜の利用は、生体皮膚や 3 次元培養皮膚と比較して、良好なデータの再現性、使用の簡便さ、材料安定性などの観点から有効性が高いとされ、皮膚透過性予測のための *in vitro* 透過試験に利用されている。[16]

皮膚モデル膜として報告されている人工高分子膜としては、シリコーン膜、シリコーンオイルとイソプロピルミリスチン酸、またはシリコーン系ブロックコポリマーから構成された含浸膜などが報告されている。[17-19] そして、2012 年には皮膚透過試験用の人工高分子膜である Strat-M[®] がメルクミリオア社より提供が開始され、TTS 開発に対する人工高分子膜の需要を高めたと考えられる。[16,20-23] TTS 開発に対する人工高分子膜の利用例としては、短時間で薬物の皮膚透過性を予測するハイスループットスクリーニング (High throughput screening: HTS) や皮膚透過促進剤共存下における薬物の皮膚透過予測への利用が挙げられる。[15,18-21] さらに、生体皮膚の利用では分析が複雑化するような薬物の透過性評価にも利用される。例を挙げると、溶液中に溶解度以上の薬物を含んでいる状態、すなわち過飽和状態を形成した薬物の透過性評価への利用が挙げられる。[24-28] なかでも、人工高分子膜の一種であるシリコーン膜は過飽和状態を形成した薬物の透過性に関する解析を単純化することから選択、利用されている。

動物愛護の観点からも、人工高分子膜の利用は有効である。[16] 2009 年より欧州では化粧品分野に対する動物実験規制が施行され、今後世界的な化粧品・医薬品開発に対する動物実験規制の厳格化に伴い、動物実験代替法となる人工高分子膜の需要増加が予想される。[29] そして、TTS 開発関連研究においてもより一層、人工高分子膜の需要の増加が考えられる。しかし、皮膚透過予測のための *in vitro* 透過試験に対して利用可能な人工高分子膜に関する報告は少なく、その種類は乏しいため新規人工高分子膜の開発が期待されている。[20–22] そこで、本稿では新規人工高分子膜として、ポリマーナノフィルム(Polymer nanofilm: PNF)に注目した(Fig. 1)。PNF はポリマーから構成された数ナノメートルから数百ナノメートルの膜厚を有する人工高分子膜の一種と報告されており、新規人工高分子膜として近年研究、開発が進められている。[30–32] PNF は膜断面における長辺と短辺の比、すなわちアスペクト比が高く、高いアスペクト比に由来した高い柔軟性と接着性を有する。また、調製時の成分ポリマーの変更やホモジナイズによる破砕などにより、利用目的に応じて特性や形状を仕立てることも可能である。これらの特性を活かし、ナノ絆創膏、化合物あるいはタンパク質担体や細胞組織のための足場といった創傷被覆、組織工学または細胞デリバリーシステムへの利用が検討されており、次世代を担う新たな医療材料として国内外から注目されている。[30–32] しかし、PNF に対する薬物透過性の詳細は評価されておらず、TTS 開発のための皮膚透過予測に対する PNF の有効性は明らかにされていない(Fig. 1)。

TTS 開発のための薬物透過試験を実施する際、シリコーン膜および PNF のような人工高分子膜は試験の評価時間を考慮することで、生体皮膚よりも高い有効性を示すことが考えられる。24 時間以上の長時間にわたる薬物透過性評価に対する生体皮膚の利用は、性質維持の観点から推奨されていない。[33] したがって、TTS 開発のための長時間にわたる評価系の構築には、シリコーン膜のような材料安定性に優れる人工高分子膜の利用が有効であり、新規 TTS 開発をサポートすることが考えられる。[34,35] また、新規人工高分子膜である PNF はナノメートルオーダーの膜厚を有するため、短時間で薬物透過流束(J)あるいは透過係数(P)といった膜透過パラメータの評価が可能であることが予想される。つまり、TTS 開発のための HTS といった短時間の薬物透過性評価への有効性が期待でき、TTS 開発をサポートする人工高分子膜になることが考えられる。

本稿では、評価時間の考慮による TTS 開発に対する人工高分子膜の有効性の提示を目的とした。そこで、人工高分子膜を用いた *in vitro* 評価系を構築して、最適な評価時間が異なる 2 つの研究題目(「薬物の過飽和状態を利用した新規 TTS 開発」、「TTS 開発のためのハイスループットスクリーニング(HTS)」)に取り組むことで、TTS 開発に対する人工高分子膜の有効性を検討することとした。さらに、PNF の薬物透過性の詳細を明らかにすることで、TTS 開発に対する PNF の有効性を検討した。

Table 1. Examples of transdermal therapeutic system approved in Japan and United States

Drug	Brand name	Approval indication	Approval year of Japan
Nitroglycerin	Nitroderm® TTS®	Angina pectoris	1979
Tulobuterol	Hokunalin® Tape	Asthma bronchial	1998
Nicotine	Nicotinell® TTS®	Smoking cessation	1998
Estradiol	Estrana® Tape	Hormone replacement therapy	1999
Fentanyl	Drotep® MT Patch	Analgesia	2001
Isosorbide dinitrate	Frاندol® Tape	Angina pectoris	2006
Estradiol/Norethisterone acetate	Menoaid®	Hormone replacement therapy	2008
	Combipatch		
Buprenorphine	Norspan® Tape	Analgesia	2011
Rivastigmine	Rivastach® Patch	Alzheimer dementia	2011
Rotigotine	Neupro® Patch	Parkinson disease	2012
Oxybutynin hydrochloride	Neoxy® Tape	Overactive bladder	2013
Bisoprolol	Bisono® Tape	Hypertension	2013
Emedastine fumarate	Allesaga® Tape	Allergic rhinitis	2018
Blonanserin	Lonasen® Tape	Schizophrenia	2019
Ropinirole hydrochloride	Haruropi® Tape	Parkinson disease	2019
Diclofenac sodium	Zicthoru® Tape	Analgesia	2021
Scopolamine	Transderm Scōp®	Motion sickness	— (1979) ^a
Clonidine	Catapres-TTS®	Hypertension	— (1984) ^a
Testosterone	Androderm®	Hypogonadism	— (1995) ^a
Selegiline	Emsam®	Depression	— (2006) ^a
Methylphenidate	Daytrana®	Attention deficit hyperactivity disorder	— (2006) ^a
Granisetron	Sancuso®	Nausea and vomiting	— (2008) ^a
Asenapine maleate	Secuado®	Schizophrenia	— (2019) ^a

^a Food and drug administration approval year listed.

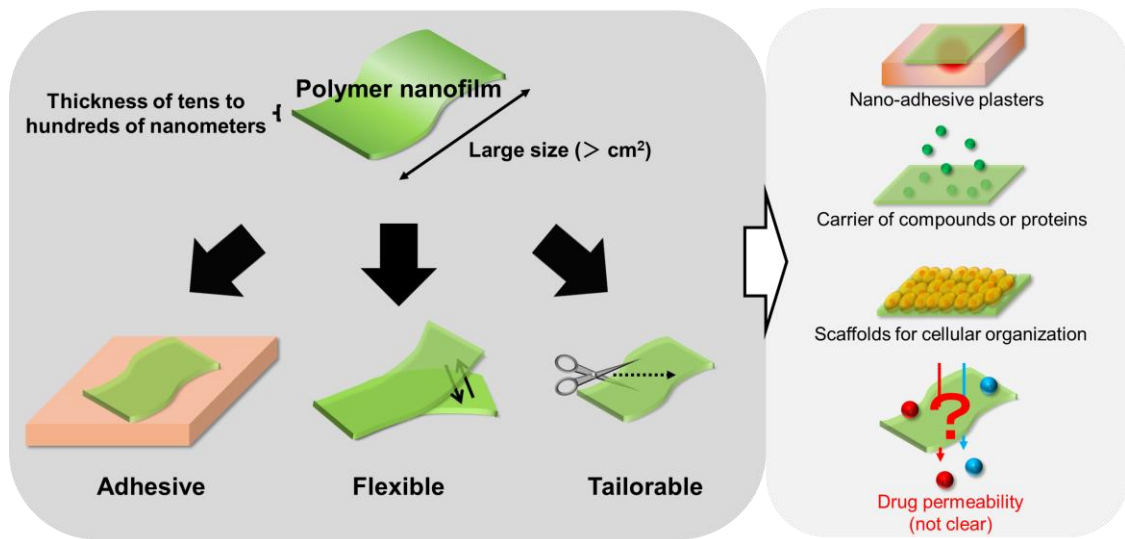


Fig. 1 Characteristics of PNF and examples of research

第1章 pH-shift 法による過飽和状態の形成とユーザー活性化システムを 組み合わせた新規経皮吸収型製剤に関する研究

新規 TTS の開発において、薬物の十分な皮膚透過性を得ることは重要な課題である。そのため、皮膚透過促進技術に関する研究が行われており、薬物濃度が溶解度以上となる過飽和状態の形成は新規 TTS 開発に対する新たな技術戦略の 1 つとして研究されている。[24,36,37] 薬物の過飽和状態は、物理的特性(薬物の状態)または周囲環境を変化させることにより形成が可能であり、一時的な溶解度の増加、すなわち速度論的溶解度の増加というシンプルなメカニズムにより皮膚透過性を増加させる。[38] Figure 2 には薬物の溶解性および膜透過性に基づきクラス分類を行う、生物薬剤学的分類システム(Biopharmaceutics classification system: BCS)における、4 つのクラスに対する溶解性と膜透過性の関係を表す。[39] 過飽和状態の形成は BCS クラス II に属するような薬物、つまり高い膜透過性を有する一方で、低い溶解性により膜透過性が制限される薬物の透過性を大幅に増加させる可能性がある。[38,40–42]

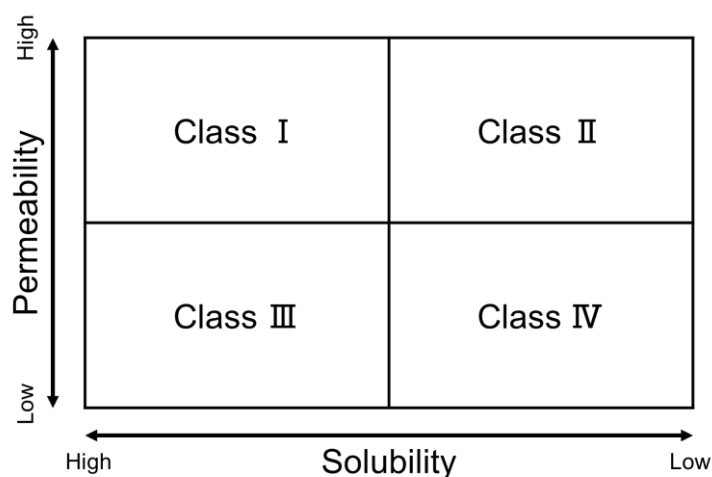


Fig 2. Biopharmaceutics classification system

十分な皮膚透過が得られない薬物の透過性を改善するには、ラウロカプラム(別名: Azone)などの透過促進剤、エレクトロポレーション、ソノフォレシスなどの透過促進手法が利用されることがある。[43–45] しかし、これらの方法は、角質層の脂質膜構造の変化や膜構造の直接的な破壊を伴い、炎症などの問題を引き起こすおそれがあり、一部の方法は高価な装置が必要となる。[27,46–48] 一方、過飽和状態の形成には高価な機器を必要とせず、角質への影響も少ないと考えられており、過飽和状態の利用は既存の皮膚透過促進技術の欠点をもたず、新規 TTS の開発を促進すると考える。[24,36,37] 過飽和状態の形成方法はいくつか存在するが、中でも急激な pH 変化に伴い、薬物の非イオン形を増加させることで過飽和状態を形成する方法(pH-shift 法)がある。この手法は、透過薬物から構成された薬物溶液と pH 調整剤のみで過飽和を形成できるため、安全性の高い新規 TTS の開発を可能にすることが期待される(Fig. 3)。[49–51]

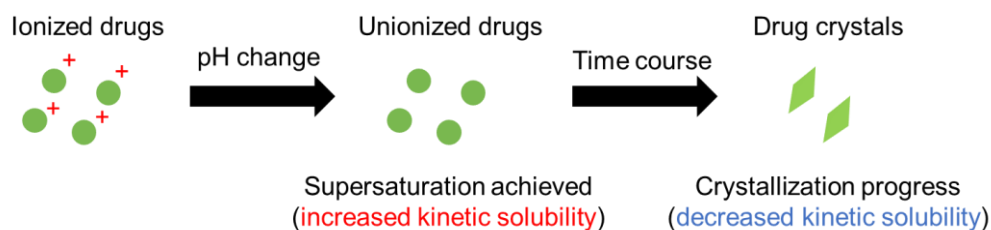


Fig. 3 Achievement of supersaturation by pH-shift method and progress of crystallization

しかし、過飽和状態を形成した薬物は準安定な状態であり、時間依存的に結晶化が進行することで速度論的溶解度の増加が解消され、透過促進性を損なう。[52,53] この例のように薬物の過飽和状態を利用した新規 TTS の実現にはいくつかの課題が挙げられる。重要な課題の一つとして、保管期間中における過飽和状態の維持が挙げられる。この課題は製剤使用直前に薬物の活性化を行う、ユーザー活性化システム (User activated system: UAS) を利用することで解決できる。UAS は Ebert 等が提唱した TTS の設計デザインであり、薬物溶液と pH 調整剤の分割が可能である。[54,55] 本稿の第 1 章では Figure 4 のような pH-shift 法による過飽和状態の形成と UAS を組み合わせた新規 TTS を提案した。この TTS デザインを採用することで、製剤使用直前にて薬物は過飽和状態の形成が可能であり、保管期間中、安定な状態にて薬物は保持される。薬物の過飽和状態を利用した新規 TTS の重要なもう一つの課題は、皮膚適用期間における過飽和状態の維持が挙げられる。これには、再現性のある皮膚透過を得るために過飽和状態が持続する時間を十分に制御する必要がある。したがって、低速結晶化を有する薬物や過飽和状態の維持に有効な添加剤の選択が必要となる。さらに、慢性疾患への利用を想定する場合、TTS は治療管理を向上させるために、24 時間以上利用される場合もある。例として、狭心症に利用されるニトログリセリンの TTS は 24 時間、疼痛に利用されるフェンタニルの TTS は 72 時間、高血圧に利用されるクロニジンの TTS は 168 時間利用可能な製剤が存在する。[56-58] 慢性疾患に利用される薬物を医薬品有効成分 (Active pharmaceutical ingredient: API) として利用する場合、Figure 4 のような薬物の過飽和状態を利用した新規 TTS においても使用期間中における過飽和状態の維持が要求される可能性がある。そして、少なくとも 24 時間は過飽和状態の維持が望まれる。このような製剤の開発を目指し、24 時間以上にわたる *in vitro* 透過試験を行う場合、生体皮膚は性質維持の観点から、利用は推奨されていない。[35] そこで本稿の第 1 章では、pH-shift 法による過飽和状態の形成と UAS を組み合わせた新規 TTS の実用化のため、生体皮膚のように時間とともに性質が変化することなく、安定性に優れた人工高分子膜を 24 時間以上の *in vitro* 透過試験のモデル膜として採用した。そして、24 時間確実な過飽和状態の維持と、それに伴う安定な透過促進を提供する過飽和条件を評価した。さらに、上記の評価により、長時間にわたる薬物透過性評価に対する、人工高分子膜の有効性を検討した。

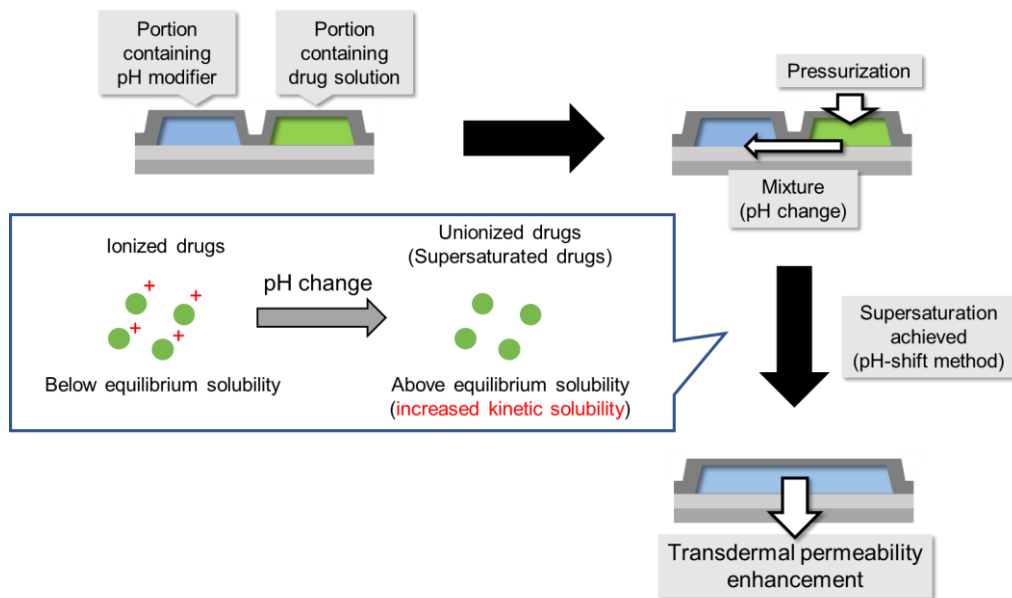


Fig. 4 Schematic diagram of the novel TTS that combines the achievement of supersaturation by the pH-shift method and UAS

第 1 節 pH-shift 法による過飽和状態の形成と皮膚透過促進を示す薬物の検討

本研究にて、モデル薬物にはフルルビプロフェン (Flurbiprofen: FP) とケトコナゾール (Ketoconazole: KCZ) を選択した (Fig. 5)。経皮製剤として利用する場合、FP は疼痛、KCZ は皮膚真菌症に利用されている。[3,4] これらは過飽和状態の形成に伴う皮膚透過促進により、さらなる鎮痛効果の向上や皮膚深部の真菌症に対する効果の向上が期待できると考えられる。さらに、FP および KCZ は BCS クラス II に分類される薬物であり、薬物自体の膜の透過性は高いが、低い溶解性により透過性が制限されている可能性が考えられる。したがって、過飽和状態の形成に伴う、速度論的溶解度の増加により大幅な膜透過性の向上が期待できる。[42,59,60] そこで pH-shift 法による過飽和状態の形成や皮膚透過促進が実際に得られるか検証するため、摘出皮膚を利用して過飽和状態を形成した FP あるいは KCZ の透過性を評価した。

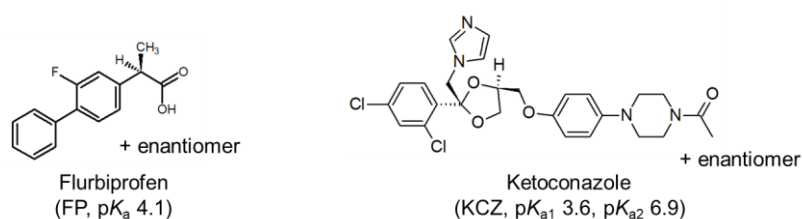


Fig. 5 Structures of FP and KCZ used as model drugs [66]

FP と KCZ の平衡溶解度は振とうフラスコ法により評価された。[61] FP は 100 mM リン酸塩緩衝液 (Phosphate buffered saline: PBS, pH 2.00)、KCZ は 100 mM PBS (pH 7.40) 中での平衡溶解度を測定した。結果より、FP および KCZ の平衡溶解度 (平均 \pm 標準偏差 (S.D.), $n = 3$) はそれぞれ $12.7 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ および $3.33 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$ であった。そこで、両薬物が過飽和状態を形成する $50 \mu\text{g/mL}$ 過飽和溶液を利用し、過飽和状態を形成した FP および KCZ の皮膚透過性を評価した。過飽和溶液の調製条件を Table 2 に示し、*in vitro* 透過試験に利用した評価系の概要図を Figure 6 に示す。*In vitro* 透過試験はフランツ型拡散セルを利用し、各種薬物の $50 \mu\text{g/mL}$ 過飽和溶液は pH-shift 法によりドナー側で調製した。[43–45] レシーバー側およびドナー側から経時的に一定量のサンプリングを行い、高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography: HPLC) 法により定量することで FP と KCZ の薬物透過プロファイルとドナー側での溶解薬物濃度の経時変化を観察した。 J は、薬物透過プロファイルの線形部分の勾配 (最大勾配) から、勾配を有効表面積で除して計算した。

Table 2. Conditions for achieving supersaturation by the pH-shift method

Drug	Dissolution solution for drug		pH of 190 mM phosphate buffer	pH of supersaturated solution ^a
	Solvent	pH		
FP	10 mM Na ₃ PO ₄ (in water)	11.9	1.80	2.00
KCZ	10 mM H ₃ PO ₄ (in water)	2.20	7.60	7.40

^aSupersaturation was achieved by mixing each concentration of drug solution and 190 mM phosphate buffer at a ratio of 1:1.

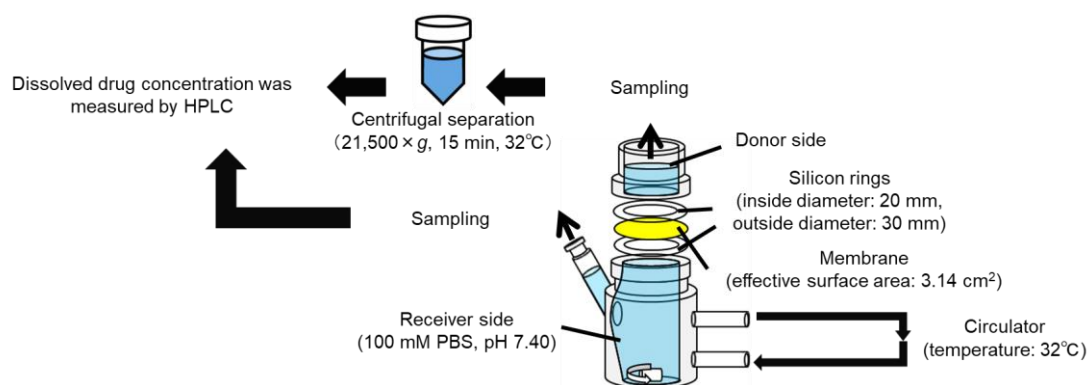


Fig. 6 Schematic diagram of *in vitro* permeability test system

皮膚に対するFPとKCZの*in vitro*透過試験の結果をFigure 7に示す。ドナー側の薬物濃度は遠心分離後の上清の薬物濃度(溶解薬物濃度)を表す。さらに、Figure 8には顕微鏡にて観察された、試験6時間後のドナー側における薬物溶液の状態を表す。FP懸濁液の J (平均 \pm S.D.)は $6.66 \pm 2.16 \mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$ であった。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FP過飽和溶液の J (平均 \pm S.D.)は $6.84 \pm 0.84 \mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$ であることが確認された。Figure 7 (b)の過飽和溶液ではドナー側におけるFPの溶解薬物濃度は懸濁液と比較して増加しており、見かけ上の薬物濃度は平衡溶解度以上となっていた。一般的に、薬物は過飽和状態を形成した場合、速度論的溶解度の増大に伴い化学ポテンシャルが増加し、膜の透過性が増大する。[61]しかし、懸濁液と比較して、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のFP過飽和溶液は J と累積透過量の増加が確認されなかった。(Fig. 7 (a))したがって、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のFP過飽和溶液は見かけ上平衡溶解度以上の薬物濃度を示すが、過飽和状態が形成あるいは維持されていない可能性が考えられる。

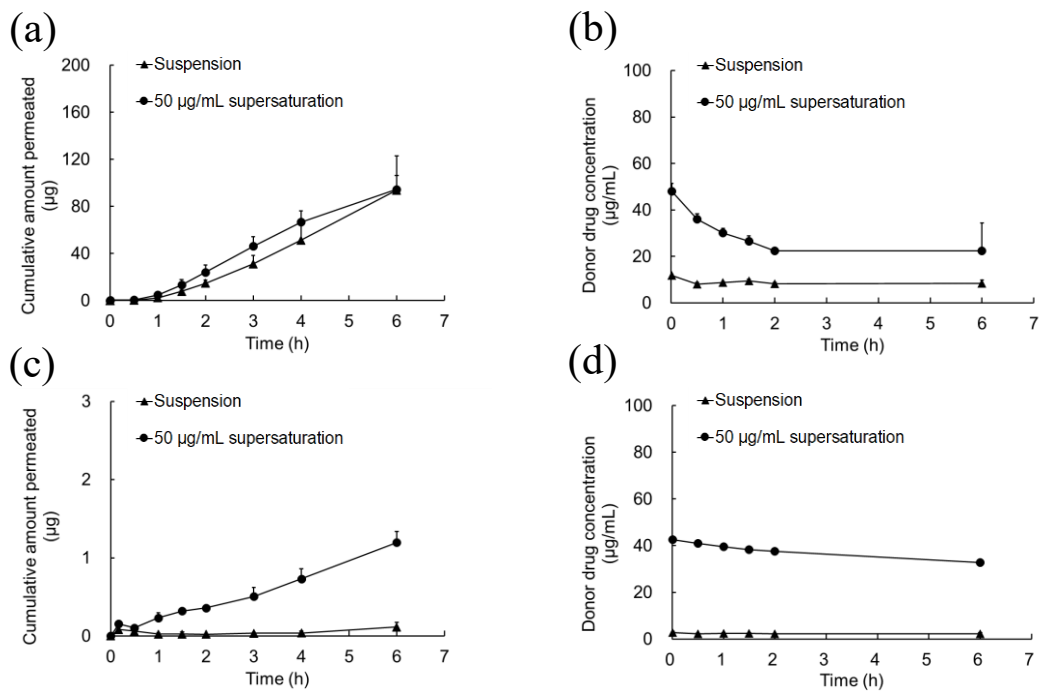


Fig. 7 The results of *in vitro* permeation experiment with suspension and 50 µg/mL supersaturated solution (FP, (a), (b); KCZ, (c), (d)). Error bars indicate standard deviation (n = 3)

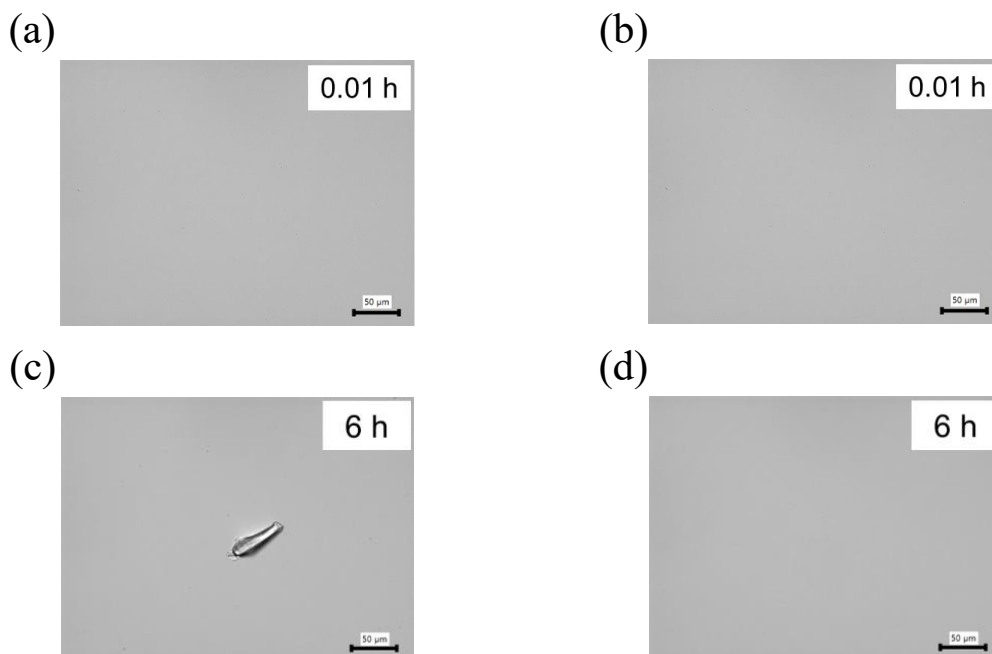


Fig. 8 Observation of the supersaturated drug solution on the donor side by an optical microscopy. The observation duration is 0.01 or 6 h (FP, (a), (c); KCZ, (b), (d))

過飽和状態を形成後、皮膚透過性が増加しなかった要因としては過飽和溶液中における FP イオン形の存在が考えられる。皮膚に対するイオン形薬物の透過性は非イオン形と比較して乏しいため、過飽和状態を形成後、溶液中に FP のイオン形が残存している場合、見かけ上の薬物濃度の増加が観察される一方で、皮膚透過性の増加を示さないと考えられる。[62] そこで、FP のメチル基に由来したプロトンの化学シフト変化を核磁気共鳴(Nuclear magnetic resonance: NMR) スペクトル測定にて観察することで、過飽和状態の形成した際の FP のイオン形および非イオン形の割合を評価した。NMR 活性核(^1H など)の化学シフトは、隣接する酸性または塩基性部位のプロトン化状態を含む化学環境に依存する。[63,64] FP の場合、イオン形は非イオン形と比較して、プロトンの解離に伴いカルボキシ基が負電荷を帯び、プロトン周囲の電子密度の増加に伴い FP のメチル基に由来したプロトンのピークは高磁場シフトすることが予想される。したがって、pH 変化による化学シフト変化を ^1H NMR により評価することで、FP のイオン形および非イオン形割合の算出が可能となる。本測定において、溶媒は水の代わりに重水(Deuterium oxide: D_2O)を使用して、各種溶液を調製した。 D_2O の使用による、pH の変化は以下の式(1)により補正した。[65]

$$\text{pH} = 0.929 \text{pH}^* + 0.42 \quad (1)$$

ここで、pH は水を溶媒とした場合に pH メーターにて測定される pH、 pH^* は D_2O を溶媒とした場合に測定される pH を示す。さらに、FP のイオン形薬物および非イオン形薬物の割合は以下の式(2)、(3)により算出した。[63]

$$x_{A^-} = \frac{\text{chemical shift in acid} - \text{observed chemical shift}}{\text{chemical shift in acid} - \text{chemical shift in base}} \quad (2)$$

$$x_{HA} + x_{A^-} = 1 \quad (3)$$

ここで、 x_{A^-} はイオン形のモル分率、 x_{HA} は非イオン形のモル分率を示す。酸性条件の化学シフトは pH 1.35 ($\text{pH}^* 1.00$)、塩基性条件の化学シフトは pH 7.86 ($\text{pH}^* 8.01$) のメチル基の化学シフトを利用した。Figure 9 には測定した ^1H NMR スペクトルを示し、Table 3 に過飽和状態を形成した前後の計算より算出された x_{A^-} および x_{HA} を示す。Figure 9 のエントリー2~12 は pH^* を変えて ^1H NMR を測定した結果であり、 pH^* に依存した FP メチル基の化学シフトの変化が確認された。Figure 9 のエントリー1 に示す 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FP 過飽和溶液にて測定した FP メチル基の化学シフトは、エントリー11 の pH 2.29 の FP メチル基の化学シフトと一致した。FP の pK_a は 4.1 であり、pH 2.29 の化学シフトは FP の分子形に由来するものである。[66] 過飽和状態を形成した際の FP は分子形であり、 x_{HA} は 1.00 であった(Table 3)。すなわち、過飽和条件においてイオン形の FP は残存しておらず、透過促進を示さなかった要因は、イオン形の FP の残存ではないと考えられた。

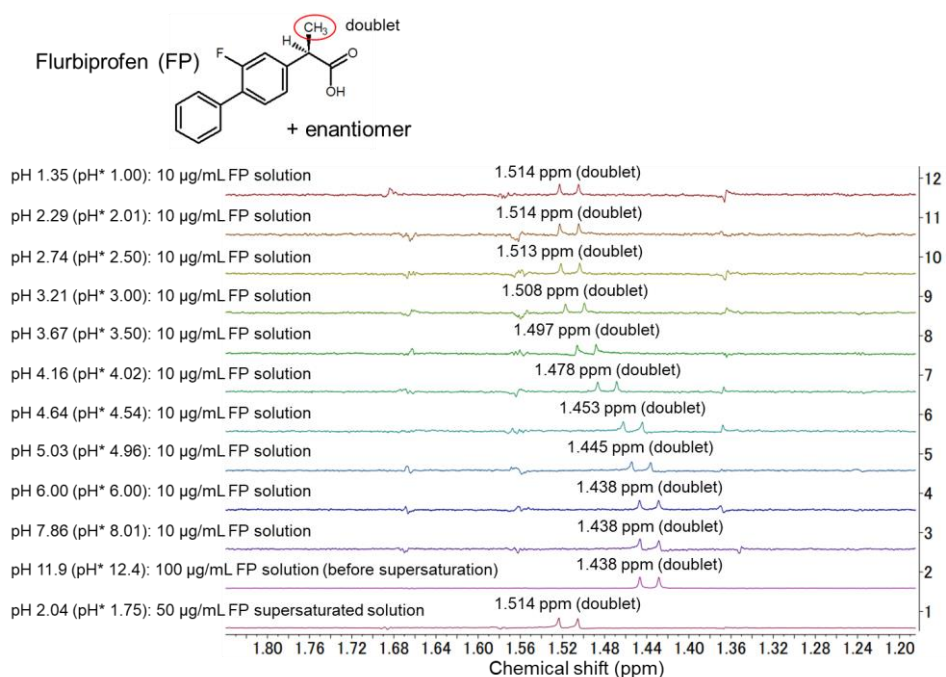


Fig. 9 ^1H NMR spectra of various FP solutions with different pH, 100 $\mu\text{g/mL}$ FP solution (pH 11.9) and 50 $\mu\text{g/mL}$ FP supersaturated solution (pH 2.04). pH* represents the pH measured with a pH meter when D_2O is used as a solvent (values before correction). The pH was corrected with the formula $\text{pH} = 0.929 \text{pH}^* + 0.42$ [65]

Table 3. pH of FP solutions, measured chemical shifts, or calculated molar fractions of ionized (x_{A^-}) and unionized form (x_{HA})

Solution	pH	Observed chemical shift (ppm)	x_{A^-}	x_{HA}
100 $\mu\text{g/mL}$ FP solution (before supersaturation; solvent, 10 mM Na_3PO_4)	11.9	1.44	1.00	0.00
50 $\mu\text{g/mL}$ FP supersaturated solution (solvent, 100 mM PBS) ^a	2.04	1.51	0.00	1.00

^aSupersaturation was achieved by mixing 100 $\mu\text{g/mL}$ FP solution (solvent, 10 mM Na_3PO_4) and 190 mM phosphate buffer at a ratio of 1:1.

透過試験 6 時間後におけるドナー側の 50 $\mu\text{g/mL}$ FP 過飽和溶液を光学顕微鏡にて観察したところ、約 50 μm の微結晶が確認された (Fig. 8 (c))。過飽和状態でも透過性の増加を示さなかった要因として、過飽和状態を形成した後の急速な結晶生成が関与していると予想される。すなわち、FP は過飽和状態を形成後、短時間で速度論的溶解度の増加が解消された可能性がある。過飽和状態から薬物が結晶化する際には、次のような過程を経ることが知られている。[67] 過飽和状態を形成した後、薬物はクラスターと結晶形成の起点となる安定した核 (臨界核) の形成に伴い微結晶を形成する。その後、薬物濃度の低下が観察される。しかし、本実験では結晶形成が確認されたにもかかわらず、50 $\mu\text{g/mL}$ FP 過飽和溶液において溶解薬物濃度の低下が確認されなかったことから、遠心分離にて除去できなかった微結晶が、溶解薬物濃度に反映されているおそれが示唆された。そこで微結晶を取り除くため遠心ろ過デバイス (ナノセップ[®]、分画分子量 (MWCO) 10,000) を利用した限外ろ過による処理を行い、従来の遠心分離したものと、濃度を比較した (Fig. 10)。50 $\mu\text{g/mL}$ FP 過飽和溶液を調製した後に限外ろ過で処理した方は、過飽和状態を形成した 0.01 時間後には FP の濃度は平衡溶解度付近まで低下していた。一方、遠心分離の処理の方は平衡溶解度より高く、見かけ上、過飽和状態が維持されているような結果が得られた。したがって、急速な結晶生成に伴う過飽和状態の解消により、FP は膜透過性が増加しなかったことが考えられる。

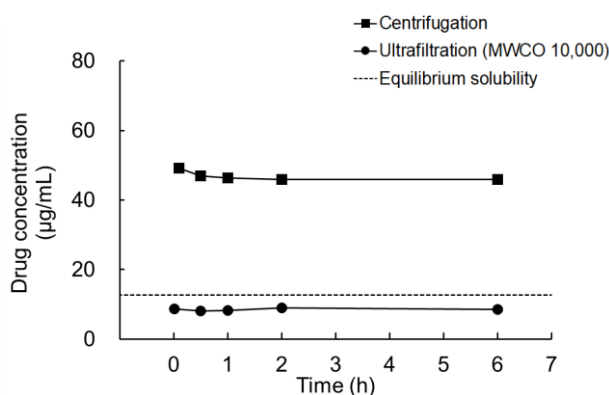


Fig. 10 Concentration change over time of 50 $\mu\text{g/mL}$ FP supersaturated solution. Supersaturated solutions were processed by centrifugation or ultrafiltration (n = 3)

FP とは対照的に、KCZ では過飽和状態の形成により、 J の増加が見られた (Fig. 7 (c))。KCZ 懸濁液の J (平均 \pm S.D.) は $7.92 \pm 4.26 \text{ ng/h/cm}^2$ なのに対し、50 $\mu\text{g/mL}$ の KCZ 過飽和溶液の J (平均 \pm S.D.) は $73.2 \pm 3.6 \text{ ng/h/cm}^2$ であることが確認された。また、KCZ のドナー側の溶解薬物濃度は大幅な減少を示さなかった (Fig. 7 (d))。さらに、光学顕微鏡にて結晶は観察されなかった (Fig. 8 (d))。したがって、KCZ は過飽和状態を形成後、試験時間内において結晶化が進行せず、速度

論的溶解度の増加を維持したと考えられる。一方、ドナー側の 0.01 時間における溶解薬物濃度は、理論濃度である 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ との若干の差異が確認された。(Fig. 7 (d)) これは結晶化が進行して生じたおそれがある。しかし、過飽和溶液では結晶等の形成は確認されなかった。(Fig. 8 (b)) したがって、過飽和状態を形成した後の結晶生成が要因ではなく、遠心分離による処理過程におけるポリプロピレン製のチューブへの KCZ の吸着等が理論濃度と実測値の差異をもたらした要因であると考えられる。

過飽和状態を形成した際の FP および KCZ の皮膚に対する透過促進性の違いは、結晶化速度の違いに由来すると考えられる。以前の報告にて、Van 等は X 線回折を用いた Solvent-shift 法と偏光顕微鏡を用いた Melt quench 法により、各種化合物の結晶化速度を評価した。[68] 化合物は、クラス I (rapid crystallization)、クラス II (intermediate crystallization)、クラス III (slow crystallization) の 3 つのクラスに分類され、FP は結晶化速度が速いことが報告されており (Solvent shift 法 クラス II、Melt quench 法 クラス I)、KCZ は結晶化速度が遅い薬物であると報告されている (Solvent shift 法 クラス III、Melt quench 法 クラス III)。したがって、低速結晶化を示す KCZ は、過飽和状態を形成後、速度論的溶解度の増加を 6 時間維持することにより、皮膚の透過性が増加したと結論付けられる。

一方で、KCZ は皮膚真菌症に利用される API であり、慢性疾患である脂漏性皮膚炎に対する治療の場合、少なくとも 3 から 4 週間以上の利用が考えられる。[69] このような疾患において、24 時間以上利用可能な TTS の実現は、患者の治療管理を向上させる可能性がある。したがって、KCZ を API とし、薬物の過飽和状態の形成を利用した新規 TTS を実用化する際、安定した治療効果を得るため、24 時間以上は確実な過飽和状態の維持に伴う安定な透過促進性が担保されることが要求される。そこで、24 時間以上の透過性の評価が必要となるが、生体皮膚は 24 時間以上の *in vitro* 透過試験における性質維持は困難である。[35] 過飽和状態の形成は、基材側 (薬液) の物性変化により影響を受け、皮膚透過性が変化する。すなわち、角質層の脂質流動性の変化など、皮膚特有の形態変化に基づく透過促進法ではない。このような場合、透過性はシリコーン膜のような材料安定性に優れた人工高分子膜の利用により正確に評価可能であると考えられる。

さらに、KCZ は 7.9 時間の長い消失半減期 ($t_{1/2}$) を有するため、TTS の API として利用することで、クロニジン ($t_{1/2}$ 11 時間) のように、長期利用可能な TTS となることが期待できる。[57,70] したがって、その後の研究では、モデル薬物として KCZ を採用し、材料安定性に優れた人工高分子膜の利用により 24 時間確実に過飽和維持可能な条件を検討するため、54 時間の *in vitro* 透過試験を行った。

第 2 節 24 時間確実な透過促進性を示すケトコナゾールの過飽和条件

過飽和状態の維持および透過促進に有効な条件は、バイアル実験にて薬物濃度を測定することで予測できる可能性もある。しかし、FP のような高速結晶化を示し、見かけ上の薬物濃度の増加を示すが、膜透過性が増加しない場合もある。KCZ は低速結晶化を示す薬物である。しかし、非常に高い過飽和度の場合、KCZ においても FP のように見かけ上の薬物濃度の増加を示すが、膜透過性が増加しない場合も考えられる。過飽和状態を形成した薬物の透過促進性を予測するには、実際に生体膜を利用した透過試験による評価が有効であると考えられる。しかし、経済協力開発機構ガイドラインでは 24 時間以上の薬物透過試験に対する摘出皮膚利用は推奨されておらず、性質を維持することが困難であり、データの解釈を複雑化する可能性がある。[24]

そこで本節では、人工高分子膜の一種であるシリコーン膜を利用することで透過性の評価を試みた。シリコーン膜は材料安定性に優れた人工高分子膜であり、24 時間以上の薬物透過性の評価を可能にすると考えられる。[33,34] さらにシリコーン膜は、イオン形薬物の透過性は乏しく、非イオン形薬物の濃度に依存して薬物の透過性変化を示す溶解拡散膜である。[24,71] すなわち、実際に溶液中の非イオン形薬物の割合が増大し、過飽和状態を形成しているかを透過性から評価することが可能と考えられる。[72] そこで、本稿ではシリコーン膜を利用することで、24 時間確実な過飽和状態の維持と、それに伴う安定な透過促進性を示す KCZ の過飽和条件を検討した。透過試験はフランツ型拡散セルを利用した Figure 6 の評価系を利用して実施した。この研究では、KCZ の過飽和状態を 24 時間確実に維持できることを実証することを目的とした。そこで、*in vitro* の実験室環境での目標を 54 時間と設定して *in vitro* 透過試験を採用した。さらに、KCZ の過飽和状態を 24 時間以上維持するため、結晶化抑制作用により速度論的溶解度の増加を維持することが期待できるポリマー（抗核化ポリマー）を過飽和溶液中に添加した。抗核化ポリマーにはポリビニルアルコール (Poly(vinyl alcohol): PVA、重量平均分子量 (M_w) 95,000)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (Hydroxypropyl methylcellulose: HPMC、 M_w 30,000) またはヒドロキシプロピルセルロース (Hydroxypropyl cellulose: HPC、 M_w 420,000) を選択し、1.00 mg/mL となるように溶解した状態で 500 μ g/mL KCZ 過飽和溶液中に共存させた。[73] Table 4 に適用した懸濁液および過飽和溶液の条件を示す。7 種類の条件にて検討を行い、透過試験の結果より、J、KCZ の 0.01 時間から 54 時間のドナー側の溶解薬物濃度－時間曲線下面積 ($AUC_{Donor, dissolved}$)、54 時間後の累積透過量といった各パラメータを算出した。

Table 4. Condition of applied suspension and supersaturated solutions

Drug	Prepared concentration	Additive polymer
Ketoconazole	Suspension	-
	50 µg/mL (Supersaturation)	-
	200 µg/mL (Supersaturation)	-
	500 µg/mL (Supersaturation)	-
	500 µg/mL (Supersaturation)	1.00 mg/mL PVA
	500 µg/mL (Supersaturation)	1.00 mg/mL HPMC
	500 µg/mL (Supersaturation)	1.00 mg/mL HPC

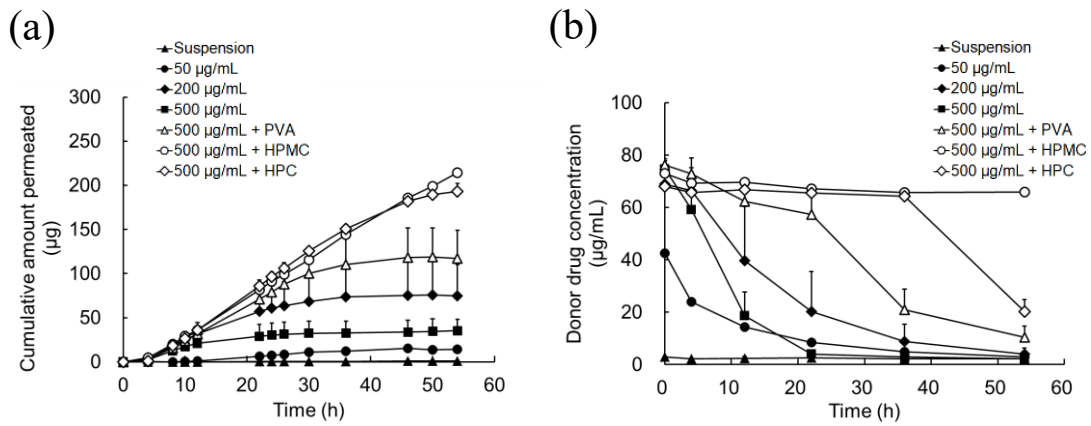


Fig. 11 Results of 54 h KCZ *in vitro* permeation experiment. (a) shows changes in the cumulative amount permeation of KCZ, and (b) shows changes in the dissolved drug concentration for KCZ in donor side. Error bars indicate standard deviation (n = 3–6)

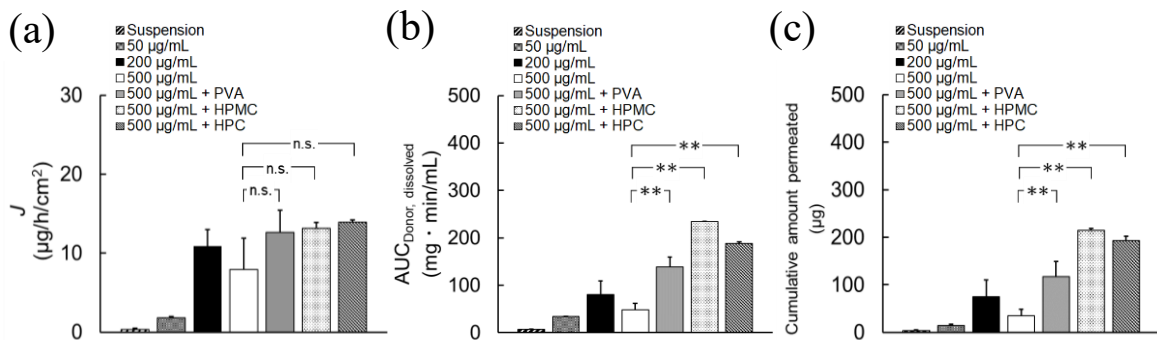


Fig. 12 Calculated KCZ permeation flux (*J*) (a), AUC_{Donor, dissolved} (b), and the cumulative permeation after 54 h (c). (n = 3–6, significant differences compared to 500 µg/mL supersaturation without polymer, ** p < 0.01)

Figure 11 にはシリコーン膜を利用した 54 時間の *in vitro* 透過試験の結果を示す。摘出皮膚と同様にシリコーン膜に対しても KCZ 過飽和溶液は、懸濁液と比較して、 J が増加することが確認された。Figure 12 には算出した 50~500 $\mu\text{g/mL}$ KCZ 過飽和溶液のシリコーン膜に対する J と 54 時間後の累積透過量、 $\text{AUC}_{\text{Donor, dissolved}}$ の結果を示す。50 $\mu\text{g/mL}$ 過飽和溶液と比較して 200 $\mu\text{g/mL}$ および 500 $\mu\text{g/mL}$ 過飽和溶液は J と累積透過量、 $\text{AUC}_{\text{Donor, dissolved}}$ の増加が確認された。さらに、抗核化ポリマーである PVA、HPMC および HPC の添加は、ドナー側の 500 $\mu\text{g/mL}$ KCZ 過飽和溶液に対する累積透過量とドナー側の溶解薬物濃度、 $\text{AUC}_{\text{Donor, dissolved}}$ への影響が確認され、 $\text{AUC}_{\text{Donor, dissolved}}$ と累積透過量は、 $\text{HPMC} > \text{HPC} > \text{PVA} > \text{ポリマー非添加}$ の順となった。中でも HPMC の添加は、54 時間にわたって約 60~70 $\mu\text{g/mL}$ の高い溶解薬物濃度を維持し、KCZ の継続的な透過性の増加が維持されることがシリコーン膜の利用により明らかとなった (Fig. 11)。この結果は、KCZ と HPMC の組み合わせが 54 時間、速度論的溶解度の増加を維持したことを示唆している。つまり、24 時間にわたる確実な過飽和状態の維持とそれに伴う透過促進の維持が期待でき、例えば、1 日 1 回の使用頻度で一定の薬物透過性が得られる TTS として利用できる可能性が考えられた。

これら抗核化ポリマーにおける過飽和状態の維持能力の違いは結晶化抑制作用の違いにより説明できると考えられた。過飽和状態を形成した薬物の結晶化過程は、結晶核の生成とその後の成長過程に分けられ、抗核化ポリマーはこれらの結晶化過程を抑制することで薬物の過飽和状態を維持することが報告されている。[52,53] そこで、本実験では KCZ の種結晶を用いた濃度変化の観察、いわゆるシーディング試験により各種抗核化ポリマーの結晶成長抑制作用を評価することにした。Figure 13 より、PVA、HPMC、HPC の添加はポリマー非添加条件と比較して、0.01 時間から 6 時間にわたり、KCZ に対するバイアル内での溶解薬物濃度-時間曲線下面積 ($\text{AUC}_{\text{dissolved}}$) を優位に増加させ、各種抗核化ポリマーは結晶成長抑制作用を有することが確認された。そして抗核化ポリマーの結晶成長抑制作用と、*in vitro* 透過試験より得られた $\text{AUC}_{\text{Donor, dissolved}}$ の増加順との一致が確認された。さらに、Figure 14 には各条件でのバイアル内における光学顕微鏡の画像を示す。各種抗核化ポリマー添加条件では、ポリマー非添加条件と比較して小さい粒子径の結晶が確認され、過飽和状態を形成した KCZ に対して各種抗核化ポリマーが結晶成長抑制作用を示した。(Fig. 14) 以上から、抗核化ポリマーの添加は、過飽和状態を形成した KCZ の結晶成長過程を抑制することで、速度論的溶解度の増加を長時間にわたり維持し、それに伴う透過促進性の維持を示したと結論付けられる。なかでも、結晶成長抑制作用の最も強い HPMC の添加は、KCZ の速度論的溶解度の増加を 54 時間維持することで、透過性の増加を最も安定して維持できたと考えられる。

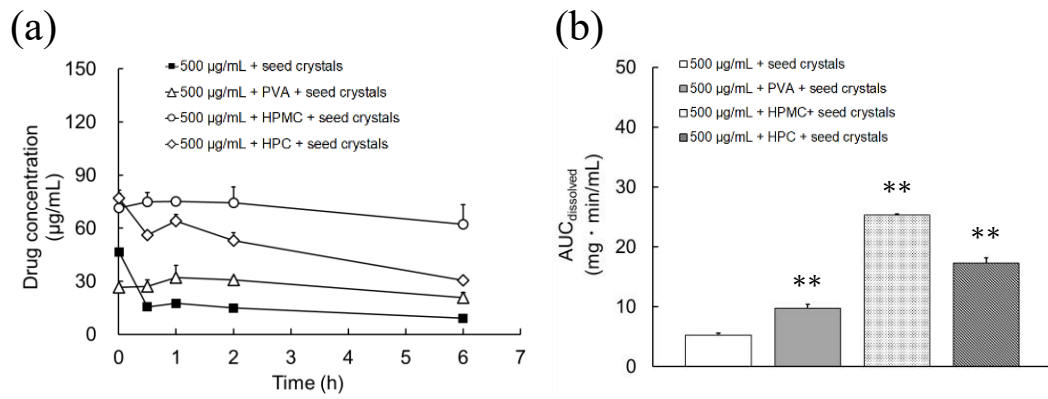


Fig. 13 Time course of dissolved KCZ concentration of 500 µg/mL supersaturation due to presence of KCZ seed crystals (a) and area under the dissolved concentration-time curve in vial (AUC_{dissolved}) (b). (n = 3, significant differences compared to non-polymer condition, ** p < 0.01)

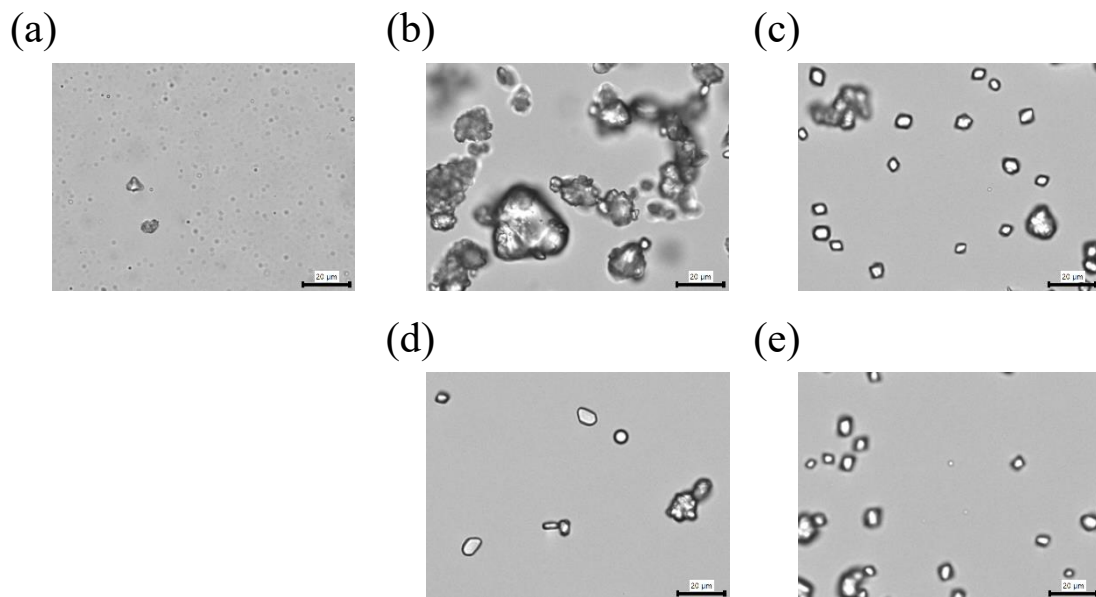


Fig. 14 Optical microscope images of 500 µg/mL supersaturated KCZ solution under coexistence condition of 100 µg/mL KCZ seed crystals; (a) without polymer, after 0.01 h (b) without polymer, after 6 h (c) 1.00 mg/mL PVA, after 6 h (d) 1.00 mg/mL HPMC, after 6 h (e) 1.00 mg/mL HPC, after 6 h

Table 5 に、レオメーターにて測定した 100 mM PBS (pH 7.40) 中における 1.00 mg/mL PVA、HPMC、HPC の静的粘度を示す。PVA と比較して、HPMC、HPC では粘度が高いことが確認された。HPMC と HPC の結晶成長抑制作用は、粘度の増加に起因している可能性もある。そのため、同種のポリマーでも異なる分子量 (M.W.) のものを使用した場合、KCZ の運動性に影響を与え、過飽和持続の時間が変化する可能性も考えられた。

Table 5. Static viscosity of various polymer solutions

Solution	Viscosity (mPa·s) ^b
100 mM PBS (pH 7.40)	0.957 ± 0.023
1.00 mg/mL PVA ^a	0.977 ± 0.007
1.00 mg/mL HPMC ^a	1.13 ± 0.02
1.00 mg/mL HPC ^a	1.28 ± 0.01

^a100 mM PBS (pH 7.40) was used as the solvent.

^b Measured at 150 rpm at 32°C (mean ± S.D., n = 5).

第3節 過飽和状態を形成したケトコナゾールの膜透過メカニズムの評価

Figure 4 のような新規 TTS の実用化に向け、本節では過飽和状態を形成した KCZ の膜透過メカニズムをより詳細に調査し、さらなる透過促進をもたらす過飽和条件を見出すこととした。

1-1. 累積透過量とドナー側の溶解薬物濃度—時間曲線下面積の関係

シリコーン膜を利用した *in vitro* 透過試験の結果を基に 54 時間後の累積透過量と $AUC_{\text{Donor, dissolved}}$ との関係性を評価した。Figure 15 には 54 時間後の累積透過量と $AUC_{\text{Donor, dissolved}}$ との関係を示す。相関性はピアソン相関係数 (r) を算出し、評価した。抗核化ポリマーの有無にかかわらず、54 時間後の累積透過量と $AUC_{\text{Donor, dissolved}}$ との間に良好な相関性が確認された。したがって、 $AUC_{\text{Donor, dissolved}}$ と累積透過量の関係は、以下の式 (4) に従うと考えられる。

$$D_t = AUC_{\text{Donor, dissolved}} CL \quad (4)$$

ここで、 D_t (mg) は累積透過量、 CL (mL/min) は膜クリアランスを表す。式 (4) に従う場合、膜クリアランスは一定である。抗核ポリマーの添加後の $AUC_{\text{Donor, dissolved}}$ と累積透過量の関係は、非ポリマー条件下で得られた関係と同様に同じ直線上に得られた (Fig. 15 (b))。したがって、膜クリアランスは非ポリマー条件下でのクリアランスと同様であると見なされ、溶解した KCZ と 1.00 mg/mL の PVA、HPMC または HPC との間の分子間相互作用は、KCZ の透過性を抑制しなかったと考えられる。それゆえ、1.00 mg/mL の PVA、HPC および HPMC の添加により溶解薬物濃度が長期間維持され、 $AUC_{\text{Donor, dissolved}}$ が増加することは、過飽和状態を形成した KCZ の膜分配の増加に効果的であり、高い薬物透過性を得る際に有効な過飽和条件であると結論付けられた。

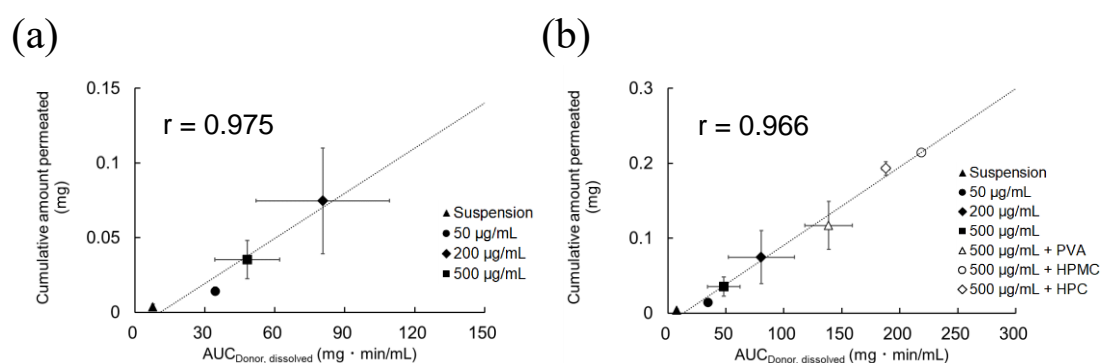


Fig. 15 Correlation between cumulative permeation after 54 h and $AUC_{\text{Donor, dissolved}}$ under non-polymer (a) and polymer coexistence condition (b). Error bars indicate standard deviation (n = 3-6)

1-2. 薬物濃厚相の形成がケトコナゾールの膜透過性に与える影響

熱力学的な観点から、過飽和状態を形成した薬物の水相での溶解量には限界値が存在する。[52,61,74] 熱力学的に許容される特定の過飽和濃度以上の薬物は、水相中に溶解せず、系全体の化学ポテンシャルを低い状態にするため凝集し、直径数百ナノメートル程度の液滴(薬物濃厚相)を形成する。そして、薬物濃厚相が溶液内に形成されることで一種の相分離状態が引き起こされる。過飽和状態を形成した際に薬物濃厚相が形成される現象は液-液相分離(Liquid-liquid phase separation: LLPS)、LLPSが引き起こされる濃度はLLPS濃度とそれぞれ呼ばれている。[61] LLPS濃度は水相に溶解可能な最大の薬物濃度を示すため、LLPS濃度以上の過飽和溶液では、溶解薬物濃度は一定となることが予想される。そして、溶解薬物のみが膜透過に寄与すると考えると、LLPS濃度以上の過飽和溶液を適用した際の J は一定の値を示す可能性が考えられる。Figure 11に54時間の*in vitro*透過試験結果を示す。ポリマーの有無に関わらず200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のKCZ過飽和溶液では、KCZのドナー側の溶解薬物濃度は一時的あるいは54時間、約60~70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で維持された(Fig. 11 (b))。さらに、KCZの J は一定値を示した(Fig. 12 (a))。したがって、本検討にて調製した200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のKCZ過飽和溶液はLLPSを形成することで同様の J を示した可能性が考えられる。

そこで、光学顕微鏡にて50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のKCZ過飽和溶液を観察した。Figure 16に各種KCZ過飽和溶液の外観写真を示し、Figure 17は光学顕微鏡の観察結果を示す。Figure 16のように、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KCZ過飽和溶液は外観が透明であったが、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KCZ過飽和溶液は溶液の白濁が確認され、薬物濃厚相を形成している可能性が考えられた。Figure 17の光学顕微鏡画像より、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KCZ過飽和溶液ではKCZから構成された数百ナノメートルの粒子が確認された。一方、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KCZ過飽和溶液で、粒子は観察されず、KCZは50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度でLLPSが引き起こされている可能性が考えられた。観察された粒子は薬物濃厚相ではなく微結晶であるおそれもある。そこで、KCZから形成された薬物粒子と結晶状態のKCZの形態を比較した。(Fig. 18) 観察するサンプルにはバイアル内で形成させた500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KCZ過飽和溶液とKCZ懸濁溶液を利用した。過飽和状態を形成した6時間の時点で、KCZは液滴(非結晶状態)を形成していた。さらに、KCZの結晶とは異なる形態を示した。したがって、Figure 17で観察された粒子は、KCZから構成された薬物濃厚相であることが考えられる。

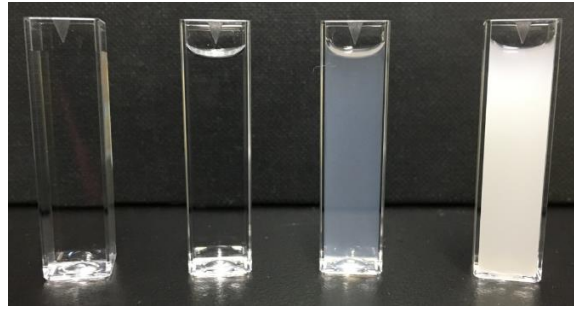


Fig. 16 Appearance image of supersaturated KCZ solution from left to right, solutions with 0, 50, 200, and 500 $\mu\text{g/mL}$ supersaturation are shown

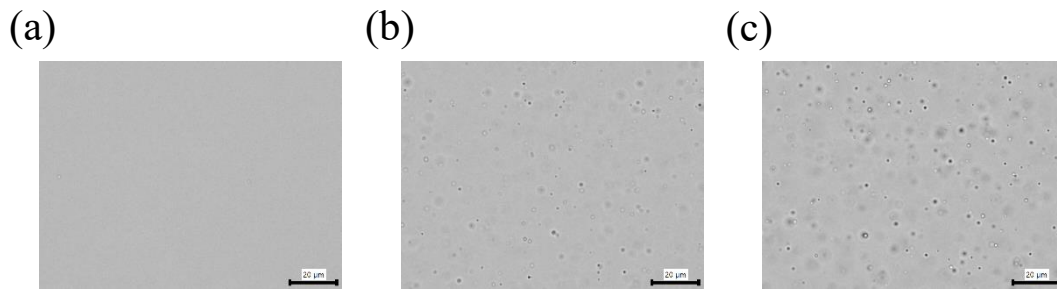


Fig. 17 Optical microscope images of supersaturated KCZ solution (50 $\mu\text{g/mL}$ (a), 200 $\mu\text{g/mL}$ (b), 500 $\mu\text{g/mL}$ (c))

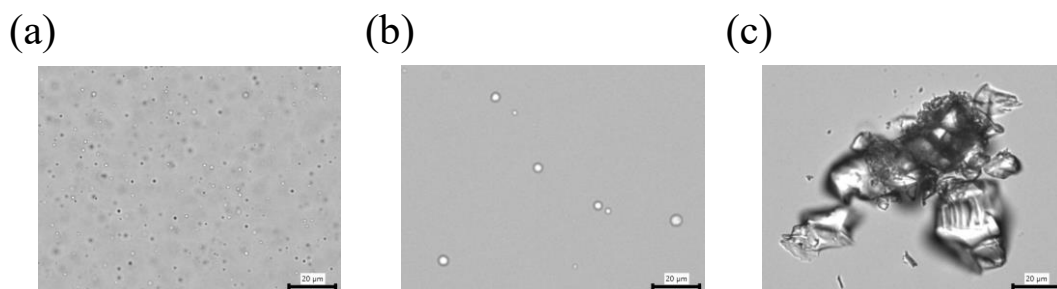


Fig. 18 Optical microscope images of supersaturated KCZ solution (a), (b), and KCZ suspension (c). Figures represent microscopic images after supersaturation 0.01 h (a), 6 h (b)

さらに、環境応答蛍光プローブを利用した Fluorescence 法により、薬物濃厚相が形成される LLPS 濃度の評価を行った。[75,76] 環境応答蛍光プローブは、pH、溶媒の極性、粘度などの周囲環境に応じて、蛍光強度と蛍光波長の変化を示す。薬物濃厚相の内部は低極性、高粘度の状態であることが知られている。[75] したがって、LLPS 状態の不連続相(薬物濃厚相)への環境応答蛍光プローブの取り込みは、測定される蛍光強度と蛍光波長に変化をもたらすと考えられる。本検討では、環境応答蛍光プローブの 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム (Ammonium 8-anilino-1-naphthalenesulfonate: ANS) を利用し、LLPS 濃度を決定した。Figure 19 には、ポリマー非添加条件での各種 KCZ 過飽和溶液における ANS の最大蛍光強度および最大蛍光波長の変化を表す。特定の過飽和濃度以上で ANS の最大蛍光波長は短波長にシフトし、最大蛍光強度は上昇した。この蛍光特性変化は、ANS 周囲の局所環境の変化が影響しており、周囲環境の低極性化に伴う溶媒緩和の変化が要因であると考えられる。[75] Figure 20 に溶媒極性の異なる各種溶媒中の ANS の蛍光スペクトルを示す。溶媒の低極性化に伴い、ANS は最大蛍光波長の短波長シフトと最大蛍光強度の上昇を示すことが確認された。[77] したがって、ANS の蛍光特性の変化は、低極性の薬物濃厚相が過飽和溶液中に形成されたことを裏付けると考えられる。

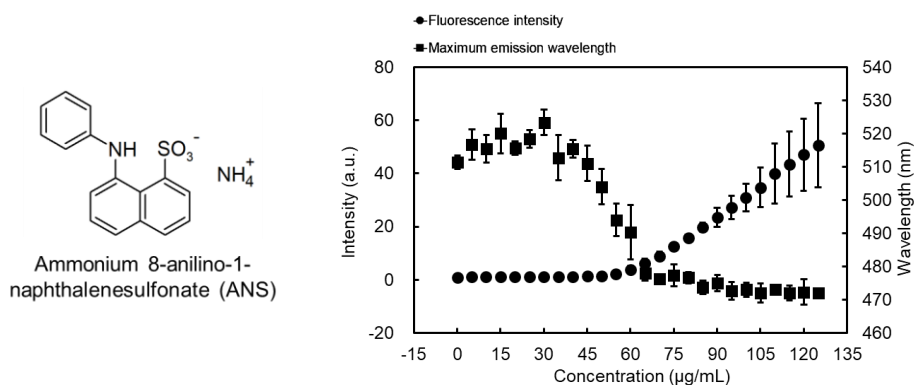


Fig. 19 Structure of ANS, fluorescence intensity and maximum emission wavelength change of ANS depending on supersaturated KCZ concentration (n = 3, error bars indicate standard deviation)

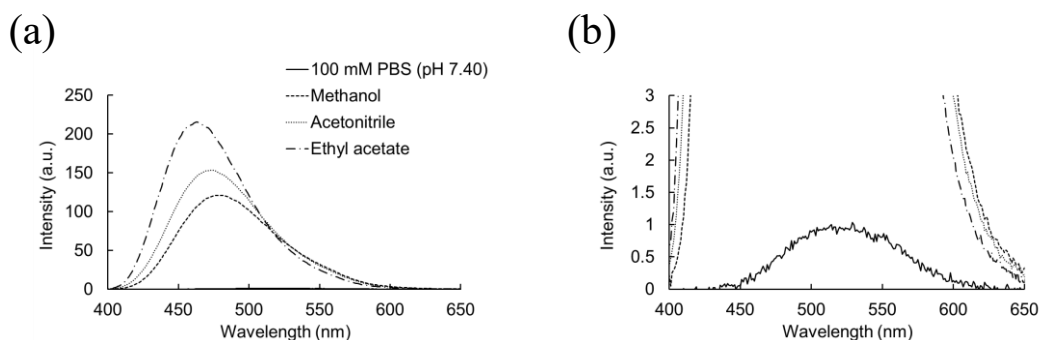


Fig. 20 Fluorescence spectrum of ANS. (a) represents the result of ANS and (b) the enlarged view

LLPS 濃度は Figure 21 に示した過飽和溶液の濃度と蛍光強度の関係における各直線部分の交点から算出された。そして、決定した LLPS 濃度を Table 6 に示す。抗核化ポリマーの添加は LLPS 濃度に影響を与える可能性も考えられる。しかし、本検討の条件では抗核化ポリマーの添加にかかわらず LLPS 濃度は同様の値を示しており、LLPS 濃度への抗核化ポリマーの影響は非常に少ないと考えられる。Figure 11 の *in vitro* 透過試験の結果より、200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の過飽和溶液で、ドナー側の溶解薬物濃度は一時的あるいは 54 時間の間、抗核化ポリマーの有無にかかわらずほぼ一定の溶解薬物濃度で維持された。そして、維持された濃度は LLPS 濃度に類似していた。したがって、抗核化ポリマーの有無にかかわらず、ドナー側で形成した 200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の各種過飽和溶液は LLPS を形成していることが考えられる。そして、溶解薬物のみが透過に寄与することで、 J は一定値を示したと考えられる。

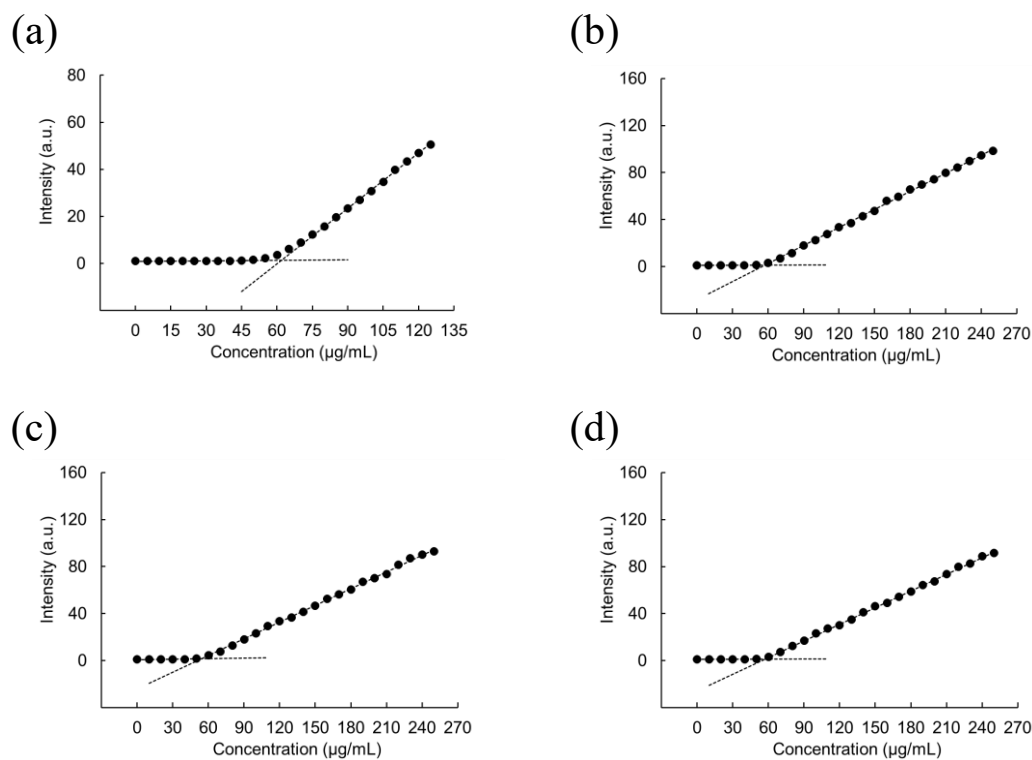


Fig. 21 Fluorescence intensity change of ANS depending on supersaturated KCZ concentration (without polymer (a), 1.00 mg/mL PVA (b), 1.00 mg/mL HPMC (c), 1.00 mg/mL HPC (d), $n = 3$)

Table 6. LLPS of KCZ for each additive polymer^a

Drug	Additive polymer	LLPS ($\mu\text{g/mL}$)
	-	61.0 ± 5.2
KCZ	1.00 mg/mL PVA	57.8 ± 1.4
	1.00 mg/mL HPMC	56.5 ± 1.3
	1.00 mg/mL HPC	54.8 ± 3.6

^aErrors indicate standard deviation (n = 3).

Figure 22 に、500 $\mu\text{g/mL}$ KCZ 過飽和溶液の抗核化ポリマー共存および非共存下における ^1H NMR スペクトルを示す。抗核化ポリマーが薬物濃厚相内に取り込まれた場合、薬物濃厚相内部は高粘度状態にあるため、ポリマーの運動性に影響を与える。そして、横緩和時間の短縮に伴い、ポリマー由来のピークはブロードニングを示すことが報告されている。さらに、LLPS 状態の不連続相（薬物濃厚相）への抗核化ポリマーの取り込みは、LLPS 濃度に影響を与えることが報告されている。[74] しかし、Figure 22 に示すよう、ポリマー由来ピークのブロードニングは確認されなかった。したがって、抗核化ポリマーは薬物濃厚相内部に取り込まれておらず、LLPS 濃度に影響を与えなかったと結論づけられる。

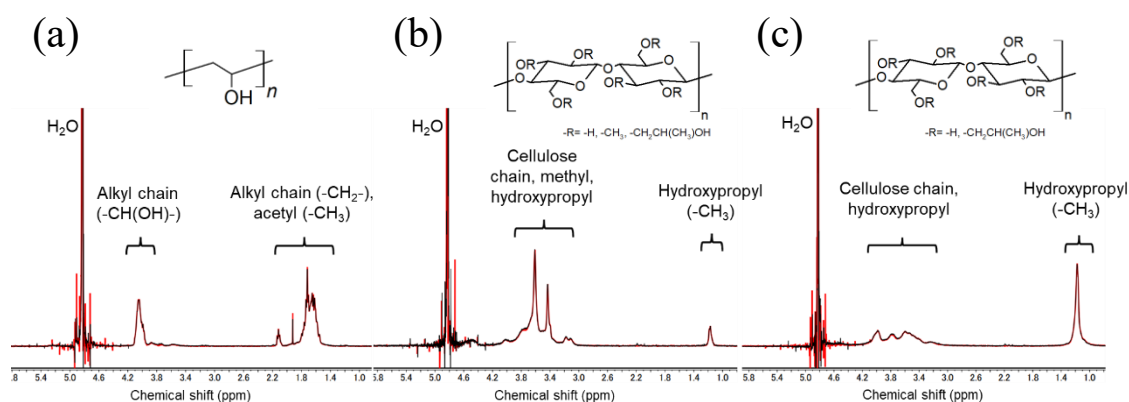


Fig. 22 ^1H NMR spectrum of 1.00 mg/mL polymer solution (black line) and coexisting with 500 $\mu\text{g/mL}$ KCZ supersaturation (red line, pH 7.40, pH* 7.55, PVA, (a); HPMC, (b); HPC, (c))

以前の報告で、Raina 等により LLPS 濃度を超える過飽和状態の薬物溶液を適用した場合、セルロース透析膜を通過する J は一定値を示すことが報告されている。[61] シリコン膜を利用した本研究より、KCZ においても J は溶解薬物濃度に依存することが考えられる。そして、LLPS を形成した過飽和溶液では、溶解薬物濃度は上限値になることで J は一定になると結論付けられる。しかし、溶解薬物濃度の増加を LLPS 濃度で維持することは安定した最大の J をもたらし、安定した高い血中濃度、さらには高い治療効果をもたらす可能性が考えられる。本研究結果より LLPS 濃度を増加させることが、高い膜透過性を得る際に有効な過飽和条件であることが示唆された。

一方で、Figure 23 に遠心分離前後の光学顕微鏡により観察された 500 $\mu\text{g/mL}$ KCZ 過飽和溶液の状態を示し、遠心分離後の上清に薬物濃厚相が存在しないことを確認した。つまり、同様の操作を行って算出した $\text{AUC}_{\text{Donor, dissolved}}$ には、薬物濃厚相は反映されていないと考えられる。薬物濃厚相が膜の直接的な分配に寄与する場合、累積透過量は薬物濃厚相とドナー側の溶解薬物濃度の合計に依存すると考えられるが、累積透過量は遠心分離により薬物濃厚相を除去した薬物濃度に関する $\text{AUC}_{\text{Donor, dissolved}}$ との相関が確認された。(Fig. 15) 本実験で利用したシリコン膜に対するイオン形薬物の透過性は非常に乏しい。[71] それゆえ、膜の透過には非イオン化状態で水相に溶解した薬物の濃度のみが寄与しており、薬物濃厚相は直接的な膜分配には寄与していないと考えられる。

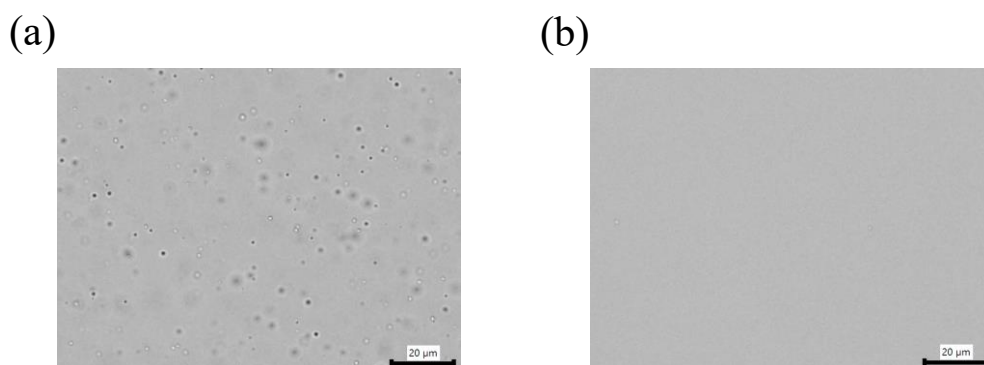


Fig. 23 Optical microscope images of 500 $\mu\text{g/mL}$ KCZ supersaturated solution before and after centrifugation (before centrifugation (a), after centrifugation (b))

本研究にて検討したモデル薬物である KCZ は皮膚透過性が乏しく、外用剤である KCZ フォーム剤や KCZ のローション剤を 28 日使用した場合の血漿濃度は 0.745 ng/mL あるいは 0.479 ng/mL であると報告されている。[78] 一方で、全身性の真菌症にはケトコナゾールの錠剤が利用され、ピーク時の血漿濃度は約 4.00 µg/mL に到達し、治療効果を発揮する。[70] したがって、KCZ を API とした TTS は過飽和状態の形成により速度論的溶解度を増加させた場合でも、全身作用を得ることは難しい可能性も考えられる。対照的に、白癬や脂漏性皮膚炎といった皮膚の局所的な疾患治療の場合、血漿中濃度の増加は必要なく、皮膚中の KCZ 濃度の増加が重要である。[78] 本研究より、懸濁液と比較して過飽和状態の形成による速度論的溶解度の増加に伴い、KCZ は皮膚透過性の増加が見込めることが判明した。したがって、従来の外用剤と比較して皮膚中の薬物濃度を高められる可能性があり、より深い皮膚深度への薬物送達を望むことができる。それゆえ、過飽和状態を形成した KCZ の利用は他の外用剤では到達しにくい皮膚深部の真菌に対して効果を発揮する製剤としての利用が期待でき、皮膚真菌症治療薬としての利用が有効である可能性も考えられる。

第4節 小括

pH-shift 法による過飽和状態の形成と UAS の組み合わせは、Figure 4 のような新規 TTS を提示できる可能性を有している。さらに、pH-shift 法と UAS による投与直前の患者自身による過飽和状態の形成は、保存期間内における安定した過飽和状態の維持に対する課題を解決することができる。FP は過飽和状態の形成後、急速に結晶化が進行することで皮膚透過性が得られなかった。一方で、KCZ は過飽和状態の形成により皮膚に対する透過性の著増が確認され、この結果は KCZ の低速結晶化に由来する可能性が示唆された。さらに、シリコーン膜を利用した 54 時間の *in vitro* 透過試験の結果より、水相に溶解した KCZ 濃度の長期間維持に伴う $AUC_{\text{Donor, dissolved}}$ の増加は、KCZ の累積透過量の増加に有効であることが判明した。一方、抗核化ポリマーである PVA、HPMC および HPC の添加は、KCZ の結晶成長を抑制することで速度論的溶解度の増加を維持し、 $AUC_{\text{Donor, dissolved}}$ の増加に伴う累積透過量の増加をもたらした。中でも、結晶成長抑制作用が最も強い HPMC の添加は、54 時間 LLPS 濃度付近で溶解薬物濃度を維持し、KCZ の透過促進性を維持した。したがって、KCZ と HPMC の組み合わせは、pH-shift 法によって過飽和状態を形成した後、54 時間の期間安定した過飽和状態の維持に伴う透過性の増加が期待できることが、シリコーン膜の利用により明らかになった。

本研究結果より、シリコーン膜は基材中の薬物の透過性変化を評価可能な人工高分子膜としての利用可能性が示唆された。さらに、長時間の *in vitro* 透過試験に対してシリコーン膜は有効であり、24 時間以上といった長時間にわたる薬物の透過性評価に対する利用可能性が示唆され、シリコーン膜を利用することで、UAS と過飽和状態を利用した新規 TTS の開発を支援できると考えられた。

第2章 経皮吸収型製剤開発のためのハイスループットスクリーニングに 利用可能なポリマーナノフィルムに関する研究

本章では TTS 開発に対する PNF の有効な利用方法を提示するため、短時間での薬物透過予測に対する PNF の有効性を評価した。新規 TTS 開発では、一般的に皮膚の薬物透過性は低い
ため、開発の可能性がある化合物をスクリーニングして、多くの候補の中から選択する必要がある
一方、新薬候補化合物の種類は膨大であるため、HTS による短時間での皮膚透過性の予測が望
まれる。しかし、人工高分子膜を利用した皮膚透過予測試験に必要とされる評価時間については
あまり議論されておらず、一部、皮膚並行人工膜透過性試験に関して報告が存在するのみである。
[15,19] 人工高分子膜を利用した TTS 開発に対する HTS を可能とするには、皮膚を透過する薬
物の透過速度を短時間で予測する必要があるため、皮膚透過予測に利用される人工高分子膜の
様々な薬物の定常状態到達時間に関連するラグタイム (T_{lag}) は、人工高分子膜を利用した HTS を
実現する際の重要なパラメータとなる。

PNF はナノメートルオーダーの膜厚を持つ人工高分子膜であるため、式(5)に示した T_{lag} と膜厚
の関係式から予測されるように短い T_{lag} による短時間での薬物透過予測が期待できる。[22,79]

$$T_{lag} = \frac{L^2}{6D_{app}} \quad (5)$$

ここで、 L は評価された膜の膜厚、 D_{app} は見かけの拡散係数を表す。PNF は HTS のような短時間
での透過予測試験に対して非常に高い有効性を示すと考えられる。さらに、多成分ポリマーの混
合、すなわちポリマーアロイ化により PNF の薬物透過性は大幅に変化することが予想される。ポリ
マーアロイ化により複数種ポリマーの相溶および相分離状態が形成されることで、薬物拡散性の増
加や複数の薬物透過経路の形成に伴い、PNF の薬物透過性を制御できる可能性がある。例えば、
さらなる T_{lag} の短縮などの高い機能性をもたらし、人工高分子膜を利用した TTS 開発に対する HTS
を実現できると考えられる。本章では PNF の調製、薬物透過性評価および、ポリマーアロイ化によ
る PNF の改質を行うことで HTS に利用可能な PNF を検討した。さらに、皮膚透過予測試験に対
する需要が近年増加している人工高分子膜である Strat-M®との薬物透過性を比較することで、短
時間の皮膚透過予測試験に対する PNF の有効性を提示した。[16,20–22]

第 1 節 ポリマーナノフィルムの調製とポリマーアロイ化がポリマーナノフィルムの特性に与える影響の評価

1-1. スピンコート法によるポリマーナノフィルムの調製

PNF の調製には、結晶性ポリマーであるポリ(L-乳酸) (Poly(L-lactic acid): PLLA, $M_w \sim 90,000$) と液性ポリマーであるポリ(メチルヒドロシロキサン) (Poly(methylhydrosiloxane): PMHS、数平均分子量(M_n) 1,700~3,200)を利用した (Fig. 24)。

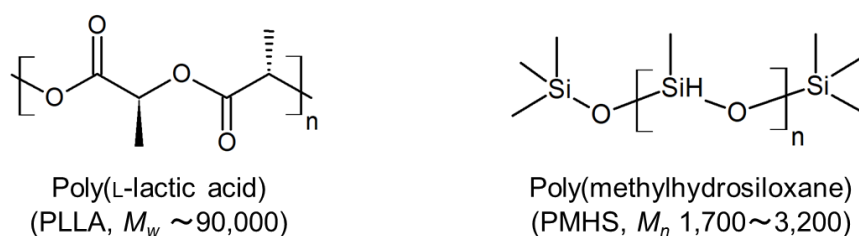


Fig. 24 Structures of PLLA and PMHS

PNF 調製方法に関する概略図を Fig. 25 に示す。本検討での膜透過試験用の各種 PNF は、スピナーを利用したスピンコート法と水溶性ポリマーを利用した犠牲膜法の組み合わせにより調製した。[80–82] 各種 PNF の膜厚は非接触膜厚モニターで測定し、膜厚測定時のサンプルはシリコン基盤上に直接コーティングすることで調製した。膜透過試験用の各種 PNF のポリマー混合比と調製の可否、呼称と膜厚を Table 7 に示す。本検討では 5 種類の PNF の調製を試み、4 種の膜透過試験用 PNF が得られた。PMHS 単独の PNF の調製も試みたが、調製の際、PNF の形状を維持することができず調製が不可能であった。一方、PLLA 単独の PNF (PLLA PNF)、ポリマーアロイ化を利用した PLLA と PMHS の重量混合比が 3 対 1 の PNF (PLLA/PMHS (3/1) PNF)、1 対 1 の PNF (PLLA/PMHS (1/1) PNF)、3 対 5 の PNF (PLLA/PMHS (3/5) PNF) の調製は可能であった。

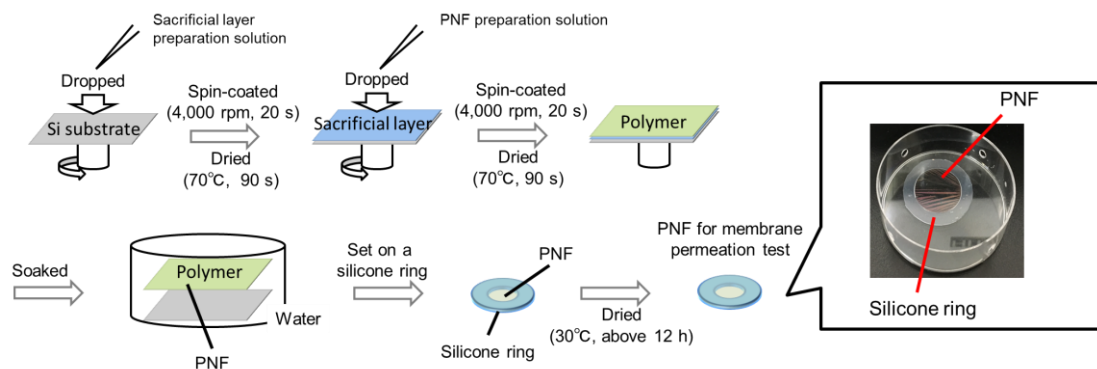


Fig. 25 Schematic of PNF preparation using the spin-coating method

Table 7. Polymer mixing ratios, availability of preparation, names and film thicknesses of various PNFs for membrane permeation tests

Polymer ratio (polymer 1 /polymer 2, wt/wt)	Polymer 1	Polymer 2	Preparation of PNF for membrane permeation test	Polymer nanofilm name	Thickness (nm) ^a
1/0	PLLA	PMHS	○	PLLA PNF	801 ± 54
0/1	PLLA	PMHS	×	–	–
3/1	PLLA	PMHS	○	PLLA/PMHS (3/1) PNF	609 ± 3
1/1	PLLA	PMHS	○	PLLA/PMHS (1/1) PNF	527 ± 2
3/5	PLLA	PMHS	○	PLLA/PMHS (3/5) PNF	521 ± 13

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–5).

1-2. ポリマーアロイ化がポリマーナノフィルムの特性に与える影響の評価

ポリマーアロイ化を利用した各種 PNF への PMHS の組み込みをフーリエ変換赤外分光法 (Fourier transform infrared spectroscopy: FT-IR)を用いて確認した (Fig. 26)。PMHS の Si-H 基由来のピーク (約 2166~2168 cm^{-1}) が観察され、ポリマーアロイ化を利用した各種 PNF への PMHS の組み込みを確認した。

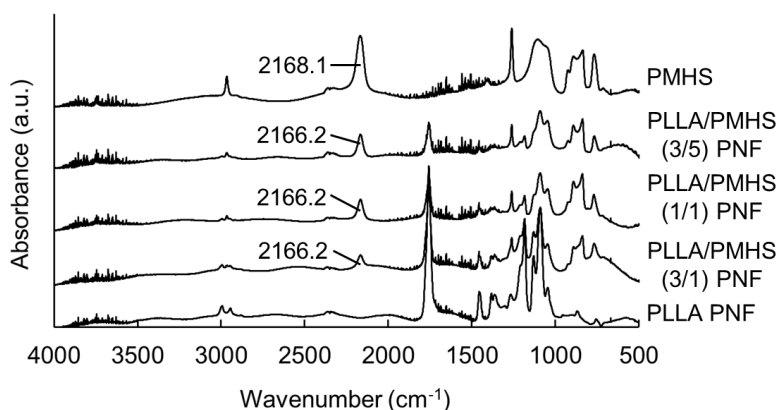


Fig. 26 FT-IR spectra of various PNFs and PMHS solution

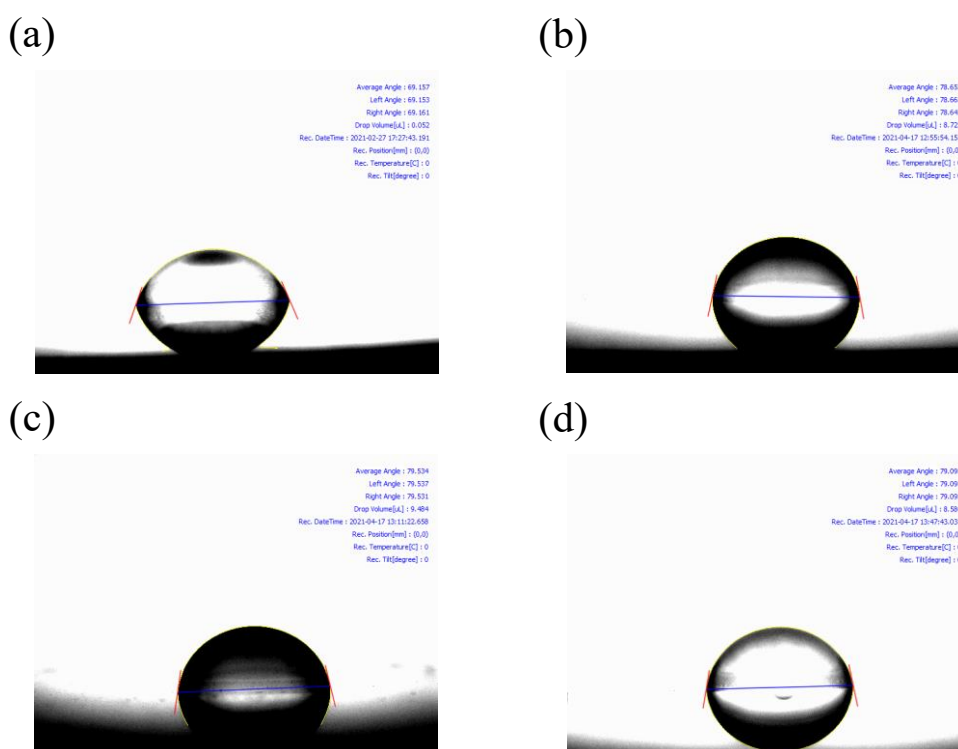


Fig. 27 CDC camera image of ultrapure water on PNF surface (PLLA PNF (a), PLLA/PMHS (3/1) PNF (b), PLLA/PMHS (1/1) PNF (c), PLLA/PMHS (3/5) PNF (d))

Table 8. Contact angles measured by dropping ultrapure water on various PNFs

Membrane	Contact angle (°)
PLLA PNF	69.4 ± 1.0
PLLA/PMHS (3/1) PNF	79.2 ± 0.2
PLLA/PMHS (1/1) PNF	79.4 ± 0.3
PLLA/PMHS (3/5) PNF	79.4 ± 0.1

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4).

さらに、超純水を利用した接触角の測定により、各種 PNF の表面における親水性を評価した (Fig. 27、Table 8)。PLLA PNF と比較して、ポリマーアロイ化を利用した各種 PNF は表面親水性の低下が確認され、PMHS の親油性が PNF の特性に反映されている可能性が示唆された。

各種 PNF の膜形態は電界放出形走査電子顕微鏡 (Field emission scanning electron microscope: FE-SEM) にて観察された (Fig. 28)。各種 PNF の膜形態は異なっており、調製時の PMHS 混合比率の増加は PNF の細孔径、細孔の存在密度を増加させる傾向にあり、ポリマーアロイ化は PNF の細孔特性に影響を与える可能性が示唆された。各種 PNF の膜表面における元素マッピングはエネルギー分散型 X 線分析法 (Energy dispersive X-ray spectroscopy: EDS) により実施した。(Fig. 29) 各種 PNF の元素マッピングは、炭素に由来する特性 X 線 (C-K)、酸素に由来する特性 X 線 (O-K)、ケイ素に由来する特性 X 線 (Si-K) を利用することで解析した。元素マッピングにより得られたイメージング画像より、PMHS 比率の増加に伴い Si 元素の不均一性が確認されたことから、調製時の PLLA と PMHS 比率の違いは、各種ポリマーの相分離状態にも影響を与えている可能性が示唆された。

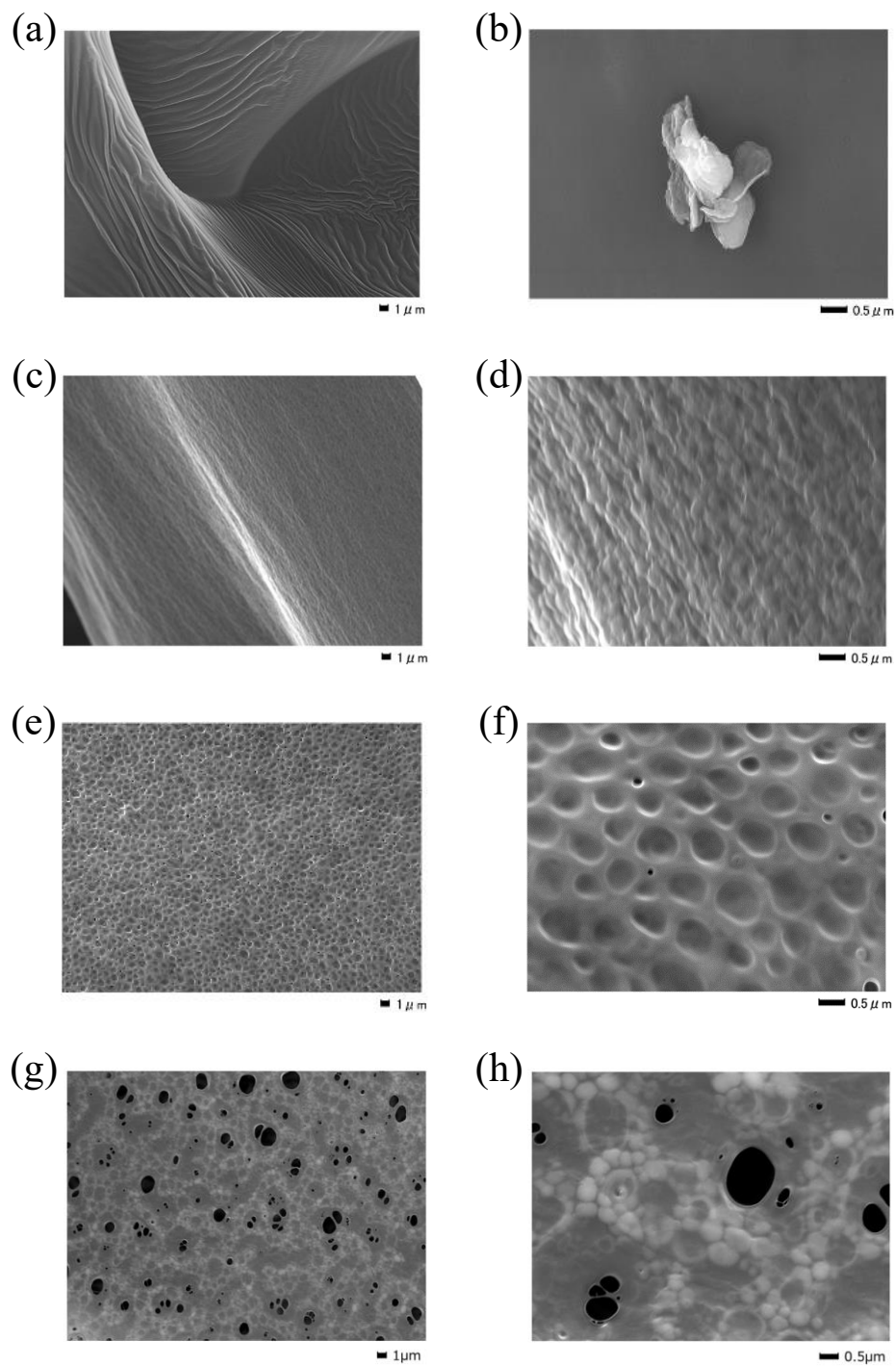


Fig. 28 Morphologies of PLLA PNF, PLLA/PMHS (3/1) PNF, PLLA/PMHS (1/1) PNF and PLLA/PMHS (3/5) PNF using FE-SEM (PLLA PNF, (a), (b); PLLA/PMHS (3/1) PNF, (c), (d); PLLA/PMHS (1/1) PNF, (e), (f); PLLA/PMHS (3/5) PNF, (g), (h))

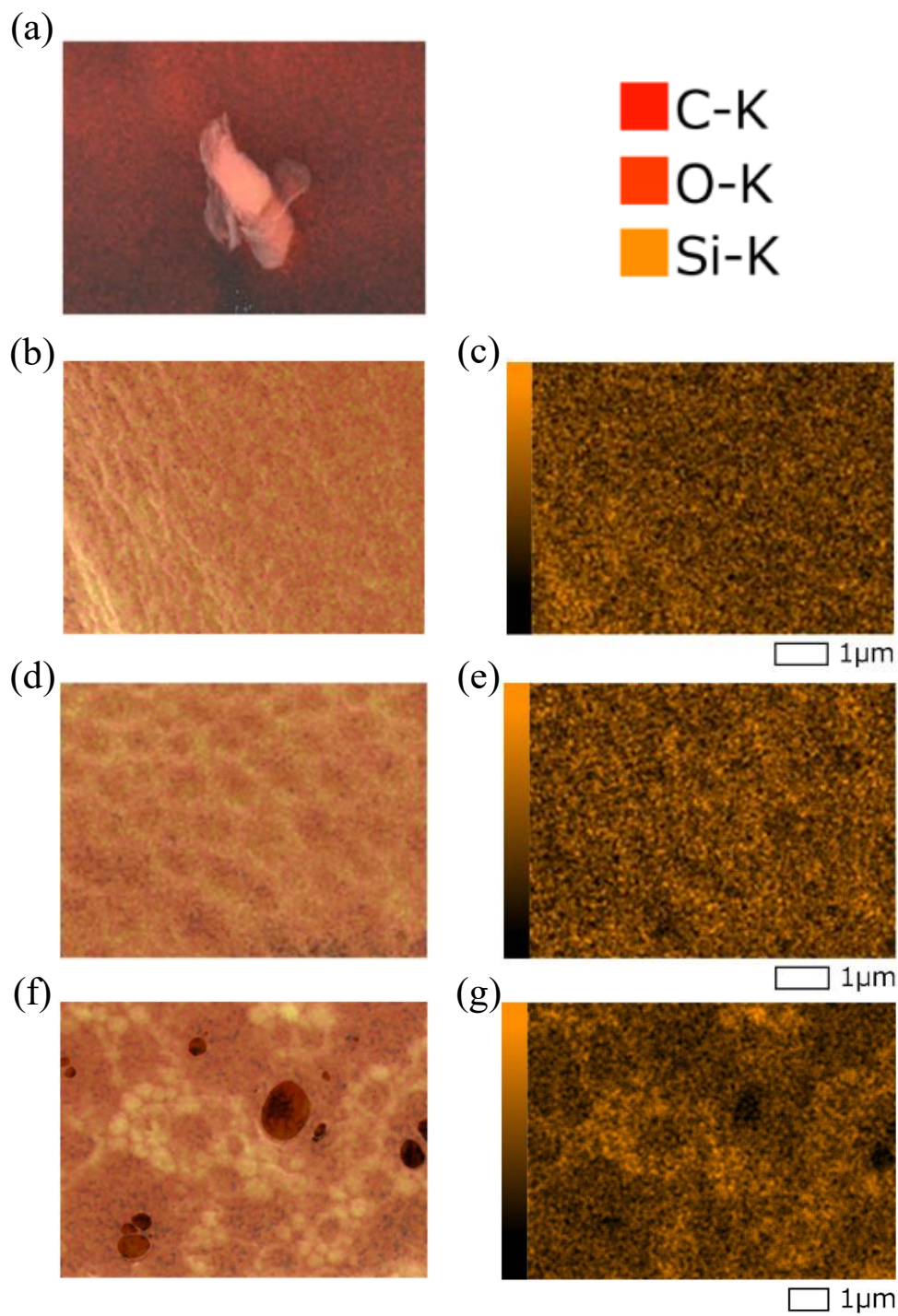


Fig. 29 Elemental mapping images of PLLA PNF, PLLA/PMHS (3/1) PNF, PLLA/PMHS (1/1) PNF and PLLA/PMHS (3/5) PNF using EDS (PLLA PNF, (a); PLLA/PMHS (3/1) PNF, (b), (c); PLLA/PMHS (1/1) PNF, (d), (e); PLLA/PMHS (3/5) PNF, (f), (g)). Samples were platinum-coated. (c), (e), (g) Only shows the distribution of Si

1-3. ポリマーアロイ化による細孔形成要因の評価

PMHS 比率の上昇に伴う細孔形成の要因を明らかにするため、¹H NMR により PNF 調製後の PMHS 量を測定し、調製前の PMHS 量(仕込み量)と比較することで、PMHS 損失率を算出した。Table 9 には各種 PNF における PMHS 損失率を示す。調製時の PMHS 割合の増加に伴い、PMHS 損失率の増加が確認された。したがって、PNF 内の細孔形成要因は、膜調製時の PMHS 損失に起因している可能性がある。例えば基盤状から PNF を剥離する際などに、PNF 中に存在する液性ポリマーである PMHS が損失を受けることで、PNF に細孔が形成したと考えられる。

Table 9. PMHS content before, and after PNF preparation and loss rate in various PNFs

Membrane	PMHS content, before PNF preparation (wt%)	PMHS content, after PNF preparation (wt%)	The loss of the PMHS content (wt%)
PLLA/PMHS (3/1) PNF	25.0	24.1	0.90
PLLA/PMHS (1/1) PNF	50.0	48.6	1.40
PLLA/PMHS (3/5) PNF	62.5	59.2	3.30

FE-SEM の観察から、PLLA/PMHS (3/5) PNF は数 μm 以上の孔を多数形成していることが確認された (Fig. 28)。このような膜は、多孔膜としての性質が大きく反映されることが予想される。多孔膜の場合、皮膚のように薬物の *n*-オクタノール/水分配係数 (K_{ow}) の違いが薬物透過性に反映されることは困難と考えられる。[83] したがって、PLLA/PMHS (3/5) PNF は皮膚モデル膜としては不適であると考え、以降の膜透過性評価には、PLLA/PMHS (3/5) PNF を除いた 3 種の PNF に対する薬物透過性を評価することとした。

第 2 節 ポリマーナノフィルムの薬物透過性評価

2-1. Strat-M®と各種ポリマーナノフィルムのインドメタシン透過性の比較

親油性薬物であるインドメタシン (Indomethacin: IDM) に対する各種人工高分子膜の透過性評価を行った。膜透過性は Figure 30 に示すフランツ型拡散セルを利用した *in vitro* 透過試験により評価した。評価された人工高分子膜は PLLA PNF、PLLA/PMHS (3/1) PNF、PLLA/PMHS (1/1) PNF および Strat-M® の 4 種でした。Strat-M® はメルクミリポア社より販売されている皮膚透過試験用の人工高分子膜であり、薬物透過試験に対する高い再現性、材料安定性、皮膚と比較した高い薬物透過性を有し、近年多くの経皮透過の予測に関連した研究に利用されている。[16,20–22] Strat-M® は Figure 31 に示すような構成をしており、最上層には人工脂質処理が施されているため、皮膚透過促進剤に対する応答性もよく、皮膚透過予測に対して非常に有効な人工高分子膜であることが報告されている。[20] 一方で、Strat-M® を使用した薬物透過性評価に要する時間の詳細に関しては評価されていない。Strat-M® は約 300 μm の膜厚を有するため、薬物種によっては長い評価時間を必要とする可能性がある。そこで本検討では、PNF および Strat-M® を試験用のモデル膜として使用した際に、必要とされる評価時間を明らかにした。さらに、各種 PNF と Strat-M® の薬物透過性を比較することで、TTS 開発のための HTS に対する PNF の有効性を検討した。

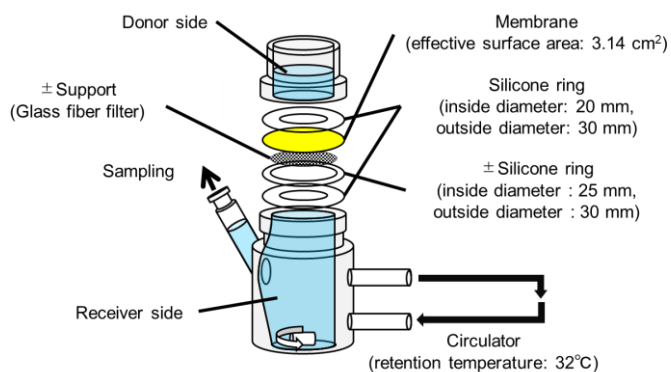


Fig. 30 Schematic showing the membrane permeation measurement system used for the *in vitro* permeation tests

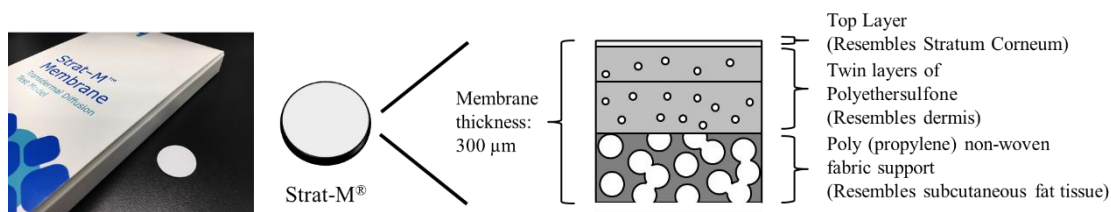


Fig. 31 Multilayered structure of Strat-M® membrane

Figure 32 は、Strat-M[®]および調製された各種 PNF における IDM の透過プロファイルを示す。Figure 32 (b)は、Figure 32 (a)の拡大図を示す。IDM の累積透過量は時間依存的に増加し、最終的に定常状態に達した。計算された IDM に対する T_{lag} を Figure 32 (c)に示す。PLLA PNF、PLLA/PMHS (3/1) PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF は、Strat-M[®]と比較して有意に短い T_{lag} が確認され、人工高分子膜はナノフィルム化により、 T_{lag} を短縮できる可能性が示唆された。さらに、ポリマーアロイ化の利用により、 T_{lag} のさらなる短縮が確認された。興味深いことに、調製時の PLLA と PMHS の比率の違いは T_{lag} に影響を与え、PLLA/PMHS (1/1) PNF は最も短い T_{lag} を示した。一方で、PLLA と PMHS 比率の違いは透過速度にも影響を与え、PLLA/PMHS (1/1) PNF は Strat-M[®]と比較して有意に高い J が確認された。したがって、ポリマーアロイ化を利用して調製された PLLA/PMHS (1/1) PNF は、TTS 開発における HTS への利用可能性が示唆された。

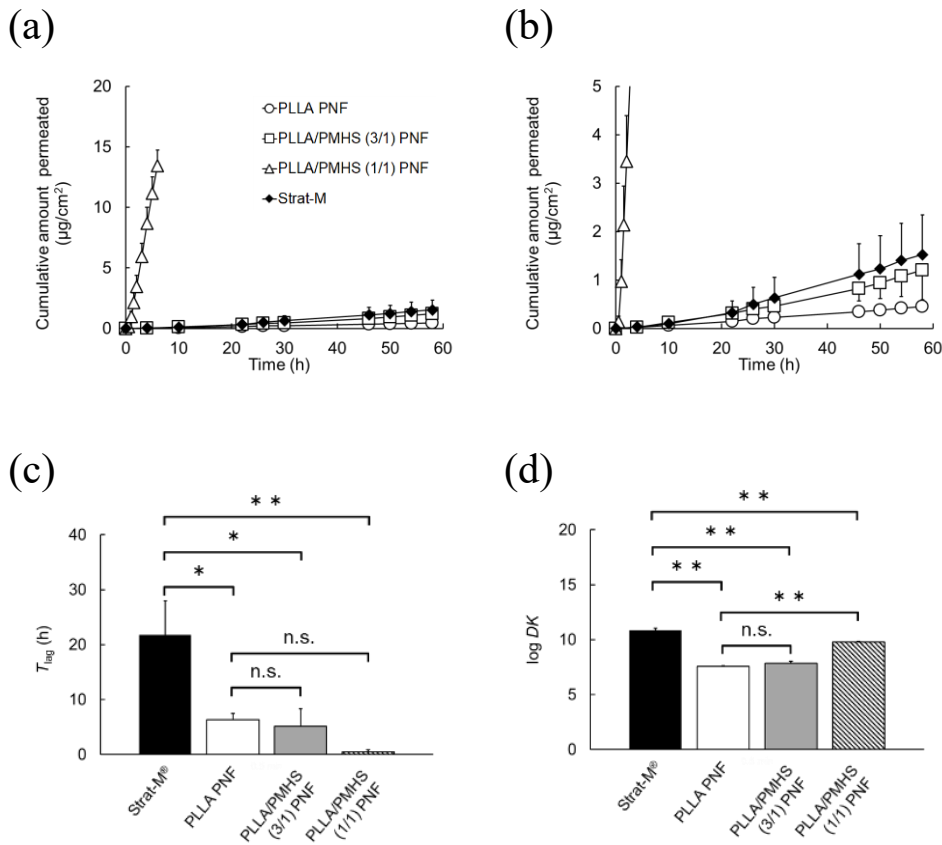


Fig. 32 IDM permeation profiles ((a), (b)); (b) is enlarged view of (a) and calculated lag times (T_{lag}) (c) for IDM. (d) Comparison of logarithmic values of DK parameters ($\log DK$). Error bars indicate standard deviation ($n = 3$, significant difference, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Figure 32 (d)は、各人工高分子膜における IDM の見かけの透過係数(P_{app})を膜厚で補正した値である DK パラメータ(DK)の対数值($\log DK$)を示す。 DK は式(6)から誘導した式(7)を用いて算出した。[22,79]

$$J = \frac{C_v DK}{L} \quad (6)$$

$$DK = P_{app} L \quad (7)$$

ここで、 J は薬物透過流束、 C_v はドナー側に適用した薬物の初期濃度、 P_{app} は見かけの透過係数を表し、 L は人工高分子膜の膜厚を表す。 $\log DK$ は、PLLA PNF と PLLA/PMHS (3/1) PNF 間での有意差は確認されなかった。一方、PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF 間で $\log DK$ に対して有意差が観察された。したがって、ポリマーアロイ化を利用して調製された PLLA/PMHS (1/1) PNF は、PLLA PNF と比較して膜厚以外の特性が大幅に変化した可能性が考えられる。そこで、以降の検討では、IDM に対する非常に短い T_{lag} と高い薬物透過性を示した PLLA/PMHS (1/1) PNF の薬物透過性に注目して検討を進めた。

2-2. 極性の異なる薬物に対するポリマーナノフィルムの薬物透過性

極性の異なる 12 種の薬物 (K_{ow} の対数值 ($\log K_{ow}$) -4.70~3.86、M.W. 130~318) を用いて、Strat-M[®] と PLLA PNF および、ポリマーアロイ化 PNF の中で非常に短い T_{lag} と高い薬物透過性を示した PLLA/PMHS (1/1) PNF の薬物透過性を評価した。評価に利用した薬物の略称、物理化学的特性と平衡溶解度を Table 10 に示す。[83,84] 本実験では、便宜上、 $\log K_{ow} \geq 0$ の薬物を親油性薬物とし、 $\log K_{ow} < 0$ の薬物を親水性薬物と定義した。Table 11 に、Strat-M[®] と比較した PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF の各種薬物に対する T_{lag} を示す。Strat-M[®] は、 $\log K_{ow} < -2.00$ のイソプロテレノール塩酸塩 (Isoproterenol hydrochloride: IPH)、ドーパミン塩酸塩 (Dopamine hydrochloride: DPH) およびレボドパ (Levodopa: L-DP) に対して、48 時間の評価時間で薬物の検出限界を下回っていたため評価不能であった。一方、PLLA PNF は 9 種の薬物の T_{lag} が Strat-M[®] と比較して優位に短かった。さらに、PLLA/PMHS (1/1) PNF では 10 種類の薬物の T_{lag} が Strat-M[®] と比較して優位に短かった。Figure 33 に、各種人工高分子膜での T_{lag} と適用された薬物の $\log K_{ow}$ との関係を示す。PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF は、Strat-M[®] と比較して $\log K_{ow} > 3.00$ のケトプロフェン (Ketoprofen: KP)、IDM および FP の T_{lag} が非常に短いことが確認された。また、 $\log K_{ow} < -2.00$ の DPH、IPH、L-DP は Strat-M[®] で評価不可能であったが、PNF によって評価可能であった。上記より、Strat-M[®] と比較して $\log K_{ow} > 3.00$ または $\log K_{ow} < -2.00$ のような親油性または親水性の非常に高い薬物の透過性評価に対して PNF は高い有効性を示すことが期待される。

Table 10. Drug species used for *in vitro* permeation test and, abbreviation, molecular weight (M.W.), logarithmic values of *n*-octanol/water partition coefficient ($\log K_{ow}$), and concentration of applied drug solution

Drug	Abbreviation	M.W. ^a	$\log K_{ow}$ ^a	Applied drug concentration (mg/mL) ^b
Flurbiprofen	FP	244	3.86	$2.82 \times 10^{-2} \pm 0.05 \times 10^{-2}$
Indomethacin	IDM	358	3.19	$1.99 \times 10^{-3} \pm 0.17 \times 10^{-3}$
Ketoprofen	KP	254	3.11	$1.66 \times 10^{-1} \pm 0.03 \times 10^{-1}$
Lidocaine	LC	234	2.37	3.68 ± 0.14
Cyclobarbitol	CB	236	0.873	1.91 ± 0.07
Aminopyrine	AMP	231	0.497	$5.65 \times 10^1 \pm 0.33 \times 10^1$
5-Fluorouracil	5-FU	130	-0.860	$1.43 \times 10^1 \pm 0.03 \times 10^1$
Diclofenac sodium	DC-Na	318	-0.962	$2.20 \times 10^1 \pm 0.06 \times 10^1$
Antipyrine	ANP	188	-1.55	$1.01 \times 10^2 \pm 0.02 \times 10^2$
Isoproterenol hydrochloride	IPH	248	-2.69	$1.00 \times 10^2 \pm 0.01 \times 10^2$
Dopamine hydrochloride	DPH	190	-3.40	$1.01 \times 10^2 \pm 0.02 \times 10^2$
Levodopa	L-DP	197	-4.70	4.80 ± 0.07

^aRef.) [83] (the logarithmic value of *n*-octanol/water partition coefficient at 37°C).

^bSolubility in water at 32°C (mean \pm S.D., n = 3–4).

Table 11. Lag times (T_{lag}) for Strat-M[®], PLLA PNF, and PLLA/PMHS (1/1) PNF for 9 or 12 kinds of drugs with different polarities^a

Membrane	Strat-M [®]		PLLA PNF		PLLA/PMHS (1/1) PNF	
Drug	T_{lag} (h)		T_{lag} (h)		T_{lag} (h)	
FP (log K_{ow} 3.86, M.W. 244)	33.2 ± 7.0	-	13.2 ± 0.1	**	0.813 ± 0.288	**
IDM (log K_{ow} 3.19, M.W. 358)	21.7 ± 6.3	-	6.37 ± 1.11	**	0.645 ± 0.162	**
KP (log K_{ow} 3.11, M.W. 254)	17.4 ± 5.0	-	8.78 ± 3.10	*	1.34 ± 0.04	**
LC (log K_{ow} 2.37, M.W. 234)	0.686 ± 0.229	-	2.07 ± 0.95	*	0.151 ± 0.067	n.s.
CB (log K_{ow} 0.873, M.W. 236)	0.835 ± 0.124	-	2.10 ± 1.23	n.s.	0.214 ± 0.114	n.s.
AMP (log K_{ow} 0.497, M.W. 231)	1.01 ± 0.11	-	0.767 ± 0.016	**	0.0455 ± 0.0281	**
5-FU (log K_{ow} -0.860, M.W. 130)	3.69 ± 1.14	-	1.63 ± 0.64	**	0.108 ± 0.045	**
DC-Na (log K_{ow} -0.962, M.W. 318)	0.628 ± 0.036	-	0.837 ± 0.184	n.s.	0.107 ± 0.070	**
ANP (log K_{ow} -1.55, M.W. 188)	1.04 ± 0.08	-	0.302 ± 0.182	**	0.0450 ± 0.0281	**
IPH (log K_{ow} -2.69, M.W. 248)	— ^b	-	0.121 ± 0.061	-	0.126 ± 0.072	-
DPH (log K_{ow} -3.40, M.W. 190)	— ^b	-	0.245 ± 0.055	-	0.0712 ± 0.0261	-
L-DP (log K_{ow} -4.70, M.W. 197)	— ^b	-	1.31 ± 0.32	-	0.237 ± 0.071	-

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4, significant differences compared with Strat-M[®], * p < 0.05, ** p < 0.01).

^bNo permeability of the drugs through the membranes was detected until 48 h.

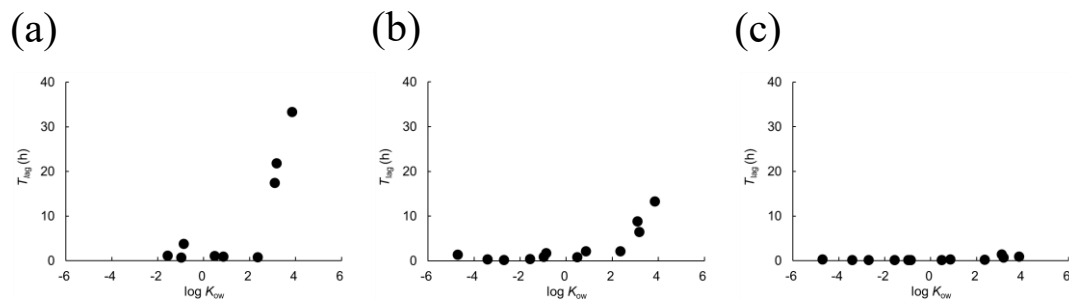


Fig. 33 Relationship between lag time (T_{lag}) for Strat-M[®] (a), PLLA PNF (b) and PLLA/PMHS (1/1) PNF (c), and the logarithmic value of n -octanol/water partition coefficient ($\log K_{ow}$) for 9 or 12 types of drugs

Strat-M[®]と比較して PNF の短い T_{lag} は、PNF のナノメートルオーダーの膜厚に由来すると考えられる。膜厚と T_{lag} の関係式(式(5))より、膜厚と T_{lag} は比例関係にあることが示されており、各 PNF と Strat-M[®]の膜厚を比較すると、PLLAPNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF の膜厚(平均 \pm S.D.)は 801 ± 55 nm と 527 ± 2 nm、Strat-M[®]の膜厚は $300 \mu\text{m}$ である。したがって、PNF のナノメートルオーダーの膜厚が、短い T_{lag} を示した要因であると結論付けられる。12 種の薬物に対する Strat-M[®]、PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF の J 、 P_{app} を Table 12 および Table 13 に示す。さらに、12 種の薬物に対する PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF の $\log DK$ 値を Table 14 に示す。Strat-M[®]、PLLA PNF、PLLA/PMHS (1/1) PNF の P_{app} はそれぞれ、 $P_{Strat-M}$ 、 P_{PLLA} 、 $P_{PLLA/PMHS (1/1)}$ と表した。ポリマーアロイ化した PLLA/PMHS (1/1) PNF は極性の異なる 12 種類の薬物に対し、PLLA PNF より高い薬物透過性と非常に短い T_{lag} を示した。PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF は膜厚が異なるため、薬物透過性の違いは膜厚の差異に依存した可能性が考えられる。しかし、 $\log DK$ を比較すると、12 種の薬物に対して PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF の間で有意差が確認された。 $\log DK$ は膜厚の影響を補正したパラメータであるため、ポリマーアロイ化による薬物透過性変化は膜厚以外の要因、すなわち膜内における薬物拡散性と膜分配性の変化に起因すると考え、この要因としては PNF 内における相分離状態の形成が関与していると考えられた。

Table 12. Drug permeability fluxes (J) of Strat-M[®], PLLA PNF, and PLLA/PMHS (1/1) PNF for 9 or 12 types of drugs with different polarities^a

Membrane	Strat-M [®]	PLLA PNF	PLLA/PMHS (1/1) PNF
Drug	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)
FP (log K_{ow} 3.86, M.W. 244)	7.01 ± 3.36	2.15 $\times 10^{-1}$ $\pm 0.661 \times 10^{-1}$	2.60 $\times 10^1$ $\pm 0.151 \times 10^1$
IDM (log K_{ow} 3.19, M.W. 358)	4.04 $\times 10^{-2}$ $\pm 1.67 \times 10^{-2}$	8.70 $\times 10^{-3}$ $\pm 0.942 \times 10^{-3}$	2.53 ± 0.403
KP (log K_{ow} 3.11, M.W. 254)	5.88 ± 2.30	2.80 $\times 10^{-1}$ $\pm 1.65 \times 10^{-1}$	4.31 $\times 10^1$ $\pm 0.122 \times 10^1$
LC (log K_{ow} 2.37, M.W. 234)	1.32 $\times 10^2$ $\pm 0.0387 \times 10^2$	3.74 ± 1.50	7.01 $\times 10^2$ $\pm 1.27 \times 10^2$
CB (log K_{ow} 0.873, M.W. 236)	1.32 $\times 10^1$ $\pm 0.0420 \times 10^1$	1.51 $\times 10^{-1}$ $\pm 0.525 \times 10^{-1}$	1.31 $\times 10^2$ $\pm 0.0513 \times 10^2$
AMP (log K_{ow} 0.497, M.W. 231)	4.17 $\times 10^2$ $\pm 0.505 \times 10^2$	1.44 $\times 10^1$ $\pm 0.241 \times 10^1$	3.61 $\times 10^3$ $\pm 0.349 \times 10^3$
5-FU (log K_{ow} -0.860, M.W. 130)	4.62 $\times 10^{-1}$ $\pm 1.40 \times 10^{-1}$	7.89 $\times 10^{-1}$ $\pm 3.61 \times 10^{-1}$	9.11 $\times 10^2$ $\pm 1.27 \times 10^2$
DC-Na (log K_{ow} -0.962, M.W. 318)	3.54 $\times 10^2$ $\pm 0.169 \times 10^2$	1.64 ± 0.283	6.69 $\times 10^2$ $\pm 1.13 \times 10^2$
ANP (log K_{ow} -1.55, M.W. 188)	1.37 $\times 10^2$ $\pm 0.142 \times 10^2$	1.35 $\times 10^1$ $\pm 0.465 \times 10^1$	3.17 $\times 10^3$ $\pm 0.288 \times 10^3$
IPH (log K_{ow} -2.69, M.W. 248)	— ^b	6.69 ± 6.01	1.90 $\times 10^3$ $\pm 0.346 \times 10^3$
DPH (log K_{ow} -3.40, M.W. 190)	— ^b	3.45 ± 1.36	4.20 $\times 10^3$ $\pm 1.85 \times 10^3$
L-DP (log K_{ow} -4.70, M.W. 197)	— ^b	4.61 $\times 10^{-1}$ $\pm 2.13 \times 10^{-1}$	1.30 $\times 10^2$ $\pm 0.146 \times 10^2$

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4, significant differences compared to Strat-M[®], ** p < 0.01).

^bPermeabilities of some drugs through the membranes were not detected until 48 h.

Table 13. Apparent permeability coefficients of Strat-M® ($P_{Strat-M}$), PLLA PNF (P_{PLLA}), and PLLA/PMHS (1/1) PNF ($P_{PLLA/PMHS (1/1)}$) for 9 or 12 types of drugs with different polarities^a

Membrane	Strat-M®	PLLA PNF	PLLA/PMHS (1/1) PNF
Drug	$P_{Strat-M}$ (cm/s)	P_{PLLA} (cm/s)	$P_{PLLA/PMHS (1/1)}$ (cm/s)
FP (log K_{ow} 3.86, M.W. 244)	7.47×10^{-5} $\pm 3.62 \times 10^{-5}$	- $\pm 0.600 \times 10^{-6}$	** 2.86×10^{-4} $\pm 0.122 \times 10^{-4}$
IDM (log K_{ow} 3.19, M.W. 358)	7.12×10^{-6} $\pm 2.76 \times 10^{-6}$	- $\pm 0.121 \times 10^{-6}$	n.s. 3.15×10^{-4} $\pm 0.502 \times 10^{-4}$
KP (log K_{ow} 3.11, M.W. 254)	1.15×10^{-5} $\pm 0.441 \times 10^{-5}$	- $\pm 3.40 \times 10^{-7}$	** 7.23×10^{-5} $\pm 0.221 \times 10^{-5}$
LC (log K_{ow} 2.37, M.W. 234)	9.56×10^{-6} $\pm 0.103 \times 10^{-6}$	- $\pm 1.15 \times 10^{-7}$	n.s. 5.50×10^{-5} $\pm 0.958 \times 10^{-5}$
CB (log K_{ow} 0.873, M.W. 236)	2.00×10^{-6} $\pm 0.0195 \times 10^{-6}$	- $\pm 0.772 \times 10^{-8}$	* 1.92×10^{-5} $\pm 0.148 \times 10^{-5}$
AMP (log K_{ow} 0.497, M.W. 231)	2.06×10^{-6} $\pm 0.265 \times 10^{-6}$	- $\pm 1.16 \times 10^{-8}$	n.s. 1.72×10^{-5} $\pm 0.167 \times 10^{-5}$
5-FU (log K_{ow} -0.860, M.W. 130)	1.03×10^{-8} $\pm 0.315 \times 10^{-8}$	- $\pm 0.871 \times 10^{-8}$	n.s. 1.75×10^{-5} $\pm 0.206 \times 10^{-5}$
DC-Na (log K_{ow} -0.962, M.W. 318)	4.28×10^{-6} $\pm 0.179 \times 10^{-6}$	- $\pm 0.305 \times 10^{-8}$	** 8.57×10^{-6} $\pm 1.43 \times 10^{-6}$
ANP (log K_{ow} -1.55, M.W. 188)	3.61×10^{-7} $\pm 0.392 \times 10^{-7}$	- $\pm 1.21 \times 10^{-8}$	n.s. 8.49×10^{-6} $\pm 0.899 \times 10^{-6}$
IPH (log K_{ow} -2.69, M.W. 248)	— ^b	- $\pm 1.62 \times 10^{-8}$	- 5.36×10^{-6} $\pm 1.05 \times 10^{-6}$
DPH (log K_{ow} -3.40, M.W. 190)	— ^b	- $\pm 3.70 \times 10^{-9}$	- 1.16×10^{-5} $\pm 0.501 \times 10^{-5}$
L-DP (log K_{ow} -4.70, M.W. 197)	— ^b	- $\pm 1.31 \times 10^{-8}$	- 7.49×10^{-6} $\pm 0.904 \times 10^{-6}$

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4, significant differences compared with Strat-M®, * p < 0.05, ** p < 0.01).

^bPermeabilities of some drugs through the membranes were not detected until 48 h.

Table 14. Logarithmic values of *DK* parameter (log *DK*) for PLLA PNF, and PLLA/PMHS (1/1) PNF for 12 types of drugs with different polarities^a

Membrane	PLLA PNF		PLLA/PMHS (1/1) PNF	
Drug	log <i>DK</i>		log <i>DK</i>	
FP (log <i>K_{ow}</i> 3.86, M.W. 244)	7.74 ± 0.15	-	9.73 ± 0.02	**
IDM (log <i>K_{ow}</i> 3.19, M.W. 358)	7.58 ± 0.04	-	9.77 ± 0.07	**
KP (log <i>K_{ow}</i> 3.11, M.W. 254)	7.18 ± 0.21	-	9.14 ± 0.01	**
LC (log <i>K_{ow}</i> 2.37, M.W. 234)	6.86 ± 0.22	-	9.01 ± 0.07	**
CB (log <i>K_{ow}</i> 0.873, M.W. 236)	5.77 ± 0.16	-	8.56 ± 0.03	**
AMP (log <i>K_{ow}</i> 0.497, M.W. 231)	6.28 ± 0.08	-	8.51 ± 0.04	**
5-FU (log <i>K_{ow}</i> -0.860, M.W. 130)	5.68 ± 0.21	-	8.52 ± 0.05	**
DC-Na (log <i>K_{ow}</i> -0.962, M.W. 318)	5.75 ± 0.07	-	8.20 ± 0.08	**
ANP (log <i>K_{ow}</i> -1.55, M.W. 188)	6.00 ± 0.13	-	8.20 ± 0.05	**
IPH (log <i>K_{ow}</i> -2.69, M.W. 248)	5.56 ± 0.36	-	8.00 ± 0.08	**
DPH (log <i>K_{ow}</i> -3.40, M.W. 190)	5.38 ± 0.20	-	8.30 ± 0.20	**
L-DP (log <i>K_{ow}</i> -4.70, M.W. 197)	5.85 ± 0.21	-	8.15 ± 0.05	**

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4, significant differences compared with PLLA PNF, ** p < 0.01).

そこで、PLLA/PMHS (1/1) PNF の相分離状態をラマン顕微鏡にて評価した。Figure 34 は、ラマン顕微鏡にて観察された PLLA/PMHS (1/1) PNF のマッピング画像を示す。PLLA 領域は赤色で示され、PMHS 領域は青色で示されている。PLLA および PMHS の両ポリマーは各濃厚相を形成していることが確認され、PLLA/PMHS (1/1) PNF は海島構造を形成している可能性が示唆された。さらに、赤色と青色の混合領域も確認されたことから、部分的に混和状態にある領域が存在しており、PLLA/PMHS (1/1) PNF は部分相溶状態を形成していると結論付けられた。

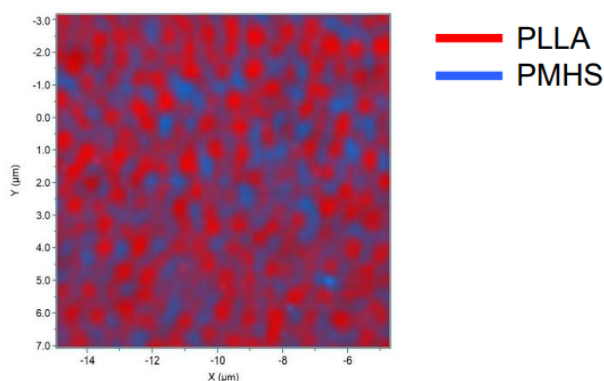


Fig. 34 Mapping image of PLLA/PMHS (1/1) PNF obtained using the raman microscope (PLLA: red area; PMHS: blue area)

相分離状態は、ガラス転移温度(T_g)からも予測することが可能である。 T_g はポリマーの温度特性の一つであり、ガラス状態からゴム状態に変化する温度を示す。この T_g は分子量等の影響を受けるが、一般的にポリマー種により固有の値を示す。[85,86] 一方で、 T_g はポリマー同士の混合により変化する。式(8)に、Fox が提唱した完全相溶状態を形成した際の、ポリマー混合時の T_g 変化に関する式を示す。[85]

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_2}{T_{g2}} + \frac{w_1}{T_{g1}} \quad (8)$$

ここで、 T_g は混合により変化したガラス転移温度、 T_{g1} と T_{g2} は成分ポリマー由来のガラス転移温度、 w_1 と w_2 は各成分ポリマーの重量混合比を表す。ポリマー同士が完全な相溶状態を形成する場合、観察される T_g は理論的には式(8)に従う。一方で、完全な相分離状態を形成する場合は、各成分ポリマー由来の T_g がそれぞれ観察される。[87] さらに、成分ポリマーの混合は部分相溶状態を形成する場合もある。部分相溶状態を形成した場合、ポリマー材料中では各成分ポリマーの濃厚相と部分的に混和状態にある領域が混在する。そして、材料全体の T_g は各成分ポリマー由来の T_g に近い値を示すが、完全には一致せず、高温側あるいは低温側へのシフトが観察される。[87,88]

Figure 35 に PLLA 粉末、PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF の示差走査熱量測定 (Differential scanning calorimetry: DSC) により得られた DSC 曲線を示す。DSC 測定から、PLLA/PMHS (1/1) PNF における PLLA 由来の T_g は 58.0°C であり、PLLA PNF の T_g (60.1°C) よりもわずかに低い値を示した。PMHS の T_g は -135°C であることが報告されており、PLLA の T_g は 60.1°C であった。[89] Fox が提唱した完全相溶状態を形成時の T_g の変化式(式(8))に従う場合、1 対 1 の重量混合比 (w_1 0.5、 w_2 0.5) で PLLA と PMHS が相溶状態を形成する際、PLLA 由来の T_g は 60.1°C 付近では観察されず、 -77.8°C 付近での観察が予測される。このことから、PLLA/PMHS (1/1) PNF は完全相溶状態を形成していないことが考えられる。PLLA/PMHS (1/1) PNF の PLLA 由来の T_g は 58.0°C で観察され、PLLA PNF の T_g (60.1°C) と比較してわずかな低下を示した。したがって、DSC 測定結果からも PLLA/PMHS (1/1) PNF は部分相溶状態を形成しているものと考えられた。

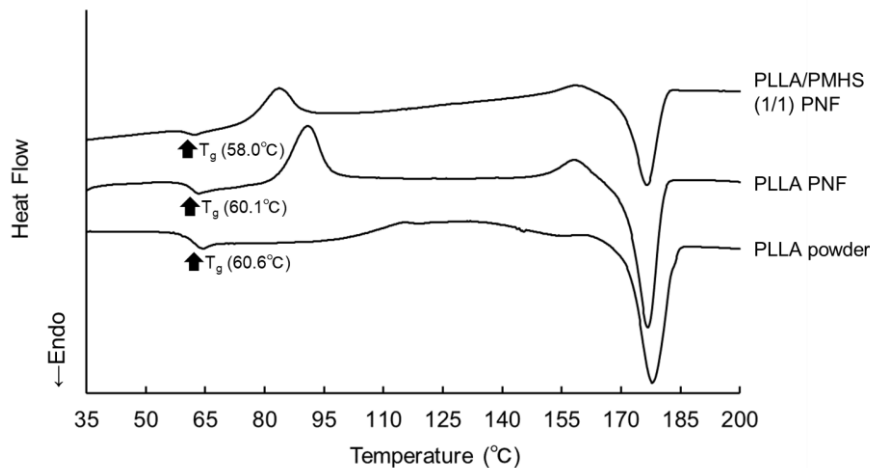


Fig. 35 Heat flow curves for PLLA powder, PLLA PNF, and PLLA/PMHS (1/1) PNF using DSC

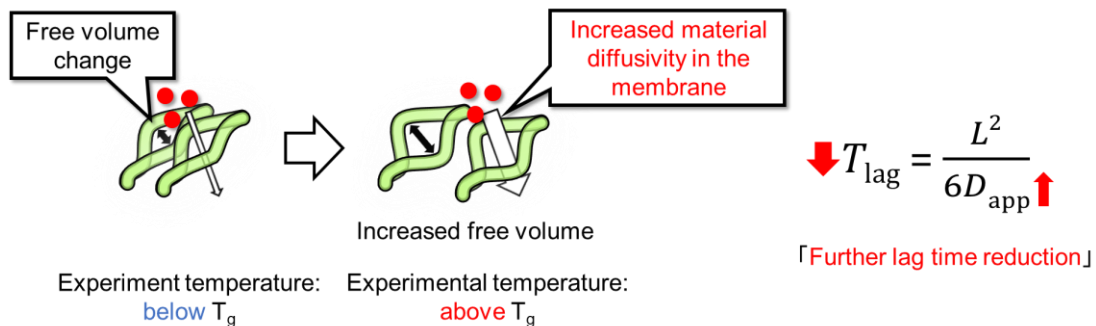


Fig. 36 Effect of glass transition temperature (T_g) on material diffusivity through polymer membranes

さらに、ポリマーアロイ化による部分相溶状態の形成は、PNF 内に海島構造が形成されることで膜の分配性と膜中での薬物拡散性に影響を与えた可能性が考えられる。特にポリマーアロイ化により形成された PMHS 濃厚相は、薬物透過性の変化に非常に重要であると、以下に示す理由から考えられる。人工高分子膜内での成分ポリマーを介した物質拡散は、ポリマーの自由体積変化の影響を受けるとされる。[90,91] 成分ポリマーの T_g 以上の温度では、成分ポリマーのセグメント運動が非常に活発になり、自由体積が温度依存的に増加し、膜内の物質拡散性が非常に高くなることが予想される (Fig. 36)。PMHS は親油性の高いポリマーであり、室温では透明な液状のシリコーンオイルである。さらに、PMHS の T_g は -135°C と非常に低く、 32°C の実験温度では非常に高いセグメント運動が発生するため、PLLA/PMHS (1/1) PNF 中の PMHS の自由体積は非常に大きいことが予想される。[89] したがって、PLLA/PMHS (1/1) PNF は自由体積の大きい PMHS 濃厚相が膜内にて形成され、薬物拡散性を増加させることで非常に短い T_{lag} を示したと予想される。

第 1 節の PNF 表面における親水性評価より、PMHS の混合は膜表面の親油性を増加させたことが示された (Fig. 27)。したがって、親油性ポリマーである PMHS の PNF への組み込みは、膜の親油性を増加させることで薬物の膜分配性を変化させ、薬物の透過性に影響を与えた可能性も考えられる。さらに、本章の第 1 節では、EDS により各種 PNF の元素マッピングが観察されており、PMHS 構成元素である Si 分布の不均一性が確認された。したがって、EDS の結果からも、PLLA/PMHS (1/1) PNF 内における、PMHS 濃厚相の形成が予想された (Fig. 29)。そして、PMHS 濃厚相の存在が各種薬物の膜内における拡散性に大きな影響を与えたことが考えられる。

第3節 ヒト皮膚との薬物透過類似性の比較

3-1. 各種ポリマーナノフィルムとヒト皮膚の薬物透過性の比較

本章の第3節では各種 PNF が皮膚モデル膜として利用可能であるか確認するため、ヒト皮膚との薬物透過類似性を評価した。Figure 37 にはヒト皮膚の見かけの透過係数の対数值 ($\log P_{hum.}$) と各種人工高分子膜の見かけの透過係数の対数值 ($\log P_{Strat-M}$ 、 $\log P_{PLLA}$ 、 $\log P_{PLLA/PMHS (1/1)}$) との相関を示す。 $\log P_{hum.}$ は Morimoto 等が報告した文献値を使用した。[84] Strat-M[®] はヒト皮膚の透過性と比較して、IPH、DPH、L-DP を除いた極性の異なる 9 種類の薬物に対して高い相関性を有することが判明した ($r = 0.856$)。対照的に、PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF は、 $\log K_{ow} < -2.00$ の薬物を含む 12 種類の薬物に対して非常に高い相関性を有することが確認された ($r = 0.939$ 、 0.929)。

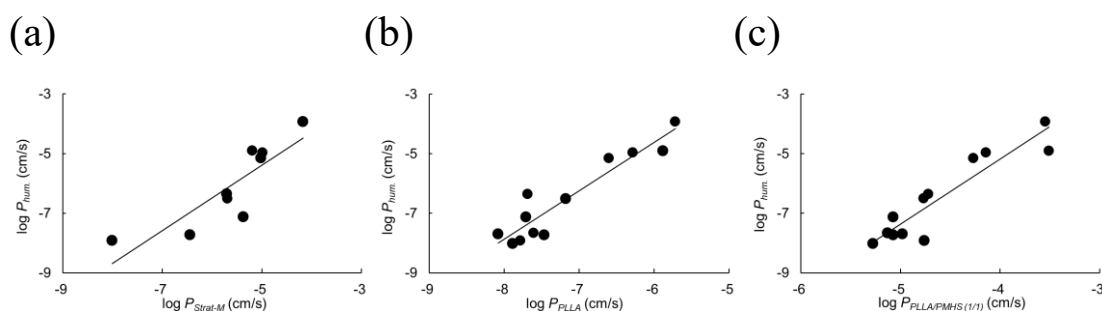


Fig. 37 Relationship between the logarithmic value of the apparent permeability coefficient of human skin for 9 or 12 types of drugs ($\log P_{hum.}$, literature value) and the logarithmic value of the apparent permeability coefficient of Strat-M[®] ($\log P_{Strat-M}$), PLLA PNF ($\log P_{PLLA}$), and PLLA/PMHS (1/1) PNF ($\log P_{PLLA/PMHS (1/1)}$) (Strat-M[®], (a); PLLA PNF, (b); PLLA/PMHS (1/1) PNF, (c)). Straight line represents the regression line (Strat-M[®], $n = 9$; PLLA PNF, $n = 12$; PLLA/PMHS (1/1) PNF, $n = 12$). $\log P_{hum.}$ was obtained from a previous study [84]

Figure 37 の各結果から算出された回帰直線の式と決定係数 (R^2) を以下に示す。

$$\log P_{hum.} = 1.10 \log P_{Strat-M} + 0.10 \quad (R^2 = 0.743)$$

$$\log P_{hum.} = 1.63 \log P_{PLLA} + 5.14 \quad (R^2 = 0.881)$$

$$\log P_{hum.} = 2.18 \log P_{PLLA/PMHS (1/1)} + 3.56 \quad (R^2 = 0.860)$$

Strat-M[®]の傾きは比較的 1.0 に近く、PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF の傾きは約 1.6 と 2.2 であることが確認された。ヒト皮膚の透過性を予測するモデル膜として用いる場合、傾きが大きいほどデータのバラツキに伴い、予測結果と実測値間での大きな誤差を生じる可能性が考えられる。しかし、PLLA/PMHS (1/1) PNF は非常に高い R^2 値を示したことから、十分な信頼性を持って皮膚透過の予測を行うことが可能であると考えられる。さらに、ポリマーアロイ化を利用して調製された PLLA/PMHS (1/1) PNF は 12 種の薬物に対する非常に短い T_{lag} と高い薬物透過性により、通常では定量限界が問題となる薬物の皮膚透過予測が短時間で実行可能であることが予想され、TTS 開発に対する HTS に有効な PNF であると考えられる。

3-2. 脂質経路と細孔経路の模倣

各種 PNF は Strat-M®と比較して、親水性薬物の透過性に優れており、 $\log K_{ow} < -2.00$ の薬物である DPH、IPH、L-DP の評価が可能であった。(Table 11) Strat-M®と各種 PNF の親水性薬物に対する透過性の差異は、膜内の脂質経路と細孔経路透過の模倣性の違いによるものであると考えられる。Morimoto 等は脂質経路と細孔経路を組み合わせた Parallel permeation pathway モデルにより、皮膚の薬物透過性を単純化した(Fig. 38)。[83,84] 報告によると、皮膚の薬物透過性を単純にモデル化した場合、溶解拡散理論が適用される脂質経路と細孔理論が適用される細孔経路により説明が可能である。そして、式(9)に示す P に関する式が成り立つことが示された。[83,84]

$$P = \frac{D_L(1 - \varepsilon)K_{LV}}{\tau_L L} + \frac{D_V \varepsilon}{\tau_P L} \quad (9)$$

ここで、 D_L 、 D_V は脂質経路および細孔経路(基材中)の拡散係数、 K_{LV} は脂質経路/基材分配係数、 τ_L および τ_P は脂質経路あるいは細孔経路の曲路率、 L は膜厚を表す。このモデルに従う場合、脂質経路を透過する親油性薬物の $\log P_{app}$ は $\log K_{ow}$ と相関を示し、細孔経路を透過する親水性薬物の $\log P_{app}$ は、膜成分への分布過程を伴わないため、分子量が大きく異なる限り一定値を示すことが式(9)より説明できる。つまり、各種薬物の $\log K_{ow}$ と各種人工高分子膜の利用により測定された $\log P_{app}$ の関係を解析し、このモデルへの一致性を評価することで、各種人工高分子膜の脂質経路と細孔経路の模倣性を予測できることが考えられる。

Figure 39 には、透過試験にて得られた各種薬物の $\log K_{ow}$ と $\log P_{Strat-M}$ 、 $\log P_{PLLA}$ および $\log P_{PLLA/PMHS (1/1)}$ との関係と、親油性薬物領域($\log K_{ow} \geq 0$)の回帰直線を示す。Strat-M®は高い相関性($r = 0.887$)を示した。したがって、親油性薬物の透過予測に適しており、脂質経路が模倣されていることが考えられる。しかし、親水性薬物の予測精度は低いことから、親水性経路の模倣は意図されていないことが考えられる。PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF は、 $\log K_{ow}$ と親油性薬物の $\log P_{PLLA}$ 、 $\log P_{PLLA/PMHS (1/1)}$ との間に高い相関性を示した($r = 0.943, 0.933$)。さらに、親水性薬物の $\log P_{PLLA}$ 、 $\log P_{PLLA/PMHS (1/1)}$ はほぼ一定値を示したことから、脂質経路と細孔経路の両経路が模倣されていることが考えられる。

既報より、Strat-M®の $\log K_{ow} < -2.00$ の薬物透過性と細孔経路の存在については議論されておらず、Strat-M®は細孔経路の模倣が意図されていないことが本研究において考えられた。一方で、親水性薬物の $\log P_{app}$ は PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF に対してほぼ一定値を示したことから、細孔経路の存在が予測された。したがって、PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF は、本章第 1 節の FE-SEM 測定により観察された細孔が PNF の細孔経路として機能することで、皮膚の細孔経路が模倣されており、IPH、DPH および L-DP の透過性評価が可能であったと結論付けられる(Fig 28)。

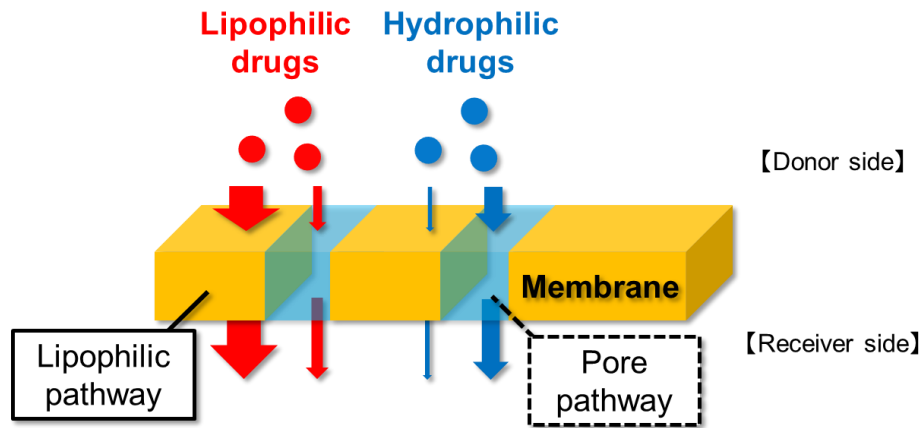


Fig. 38 Parallel permeation pathway model

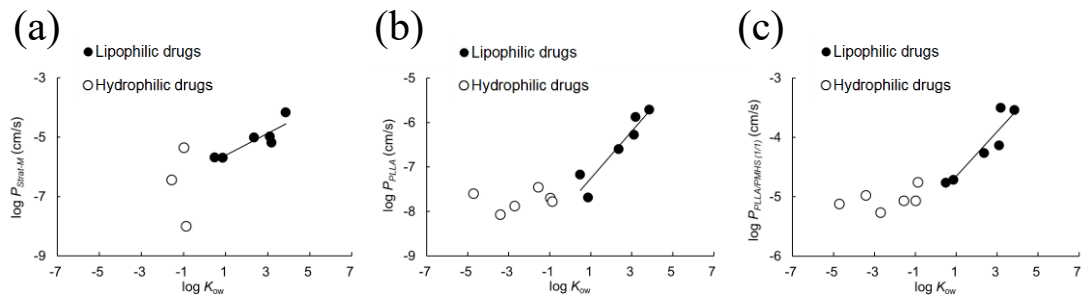


Fig. 39 Relationship between the logarithmic value of the apparent permeability coefficient of Strat-M[®] ($\log P_{Strat-M}$), PLLA PNF ($\log P_{PLLA}$), and PLLA/PMHS (1/1) PNF ($\log P_{PLLA/PMHS (1/1)}$) to the logarithmic value of the n-octanol/water partition coefficient ($\log K_{ow}$) of 9 or 12 kinds of drugs (Strat-M[®], (a); PLLA PNF, (b); PLLA/PMHS (1/1) PNF, (c)). The regression line is represented by the lipophilic drug ($\log K_{ow} \geq 0$) site ($n = 6$). $\log K_{ow}$ was obtained from a previous study [83]

3-3. ポリマーナノフィルムの細孔特性の評価

前項の検討より、PNF 中の細孔は親水性薬物が透過可能な細孔経路として機能することが示唆された。そこで、調製された各種 PNF の細孔特性を評価し、ヒト皮膚の濾胞性付属器経路や細胞間隙経路の細孔状態との類似性を比較した。さらに、調製時の PMHS 混合比率の違いが細孔特性に与える影響を評価するため PLLA/PMHS (3/1) PNF の細孔特性も評価した。PNF の細孔特性は、*in vitro* 透過試験により親水性薬物の P_{app} を算出し、Renkin 式を用いて決定した。[92–94] モデル薬物には、5(6)-カルボキシフルオレセイン (5(6)-Carboxyfluorescein: CF, M.W. 376.3) およびフルオレセインイソチオシアネート-デキストラン (Fluorescein isothiocyanate–dextran: FD-10、平均 M.W. 10,000) を使用した。算出に利用した Renkin 式(式(10))を以下に示す。[92–94]

$$P_{app} = D_i \frac{\varepsilon}{L} \left[1 - \left(\frac{r_i}{R} \right)^2 \right] \left[1 - 2.14 \left(\frac{r_i}{R} \right) + 2.09 \left(\frac{r_i}{R} \right)^3 - 0.95 \left(\frac{r_i}{R} \right)^5 \right] \quad (10)$$

ここで、 D_i は拡散係数、 r_i は分子半径、 R は膜細孔の等価半径、 ε/L は細孔占有率/長さ比を表す。算出に使用した CF と FD-10 の D_i 、 r_i および透過試験より得られた P_{app} を Table 15 に示す。[93] さらに、式(10)より算出された PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF の R および ε/L を Table 16 に示す。PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF の R は式(10)により算出され、PLLA PNF は $6.51 \mu\text{m}$ 、PLLA/PMHS (1/1) PNF は $34.6 \mu\text{m}$ の細孔を有することが確認された。したがって、この細孔が親水性薬物の透過経路として機能することで、PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF は非常に親水性の高い IPH、DPH、L-DP の透過性評価が可能であったと考えられる。また、調製時の PMHS 比率の増加は、 R および ε/L の増大に寄与することが確認された。このことから、本章の第 1 節にて予想されたように、調製時の PMHS 混合比率の増加は細孔径と存在密度を増大させ、PMHS を利用したポリマーアロイ化は PNF の細孔特性に影響を与えると結論付けられる。

既報より、皮膚の濾胞性付属器経路に関連する R は約 $50 \sim 700 \mu\text{m}$ であるのに対し、正常および拡張状態の皮膚の細胞間隙経路に関連する R は約 $0.5 \sim 40 \text{ nm}$ であることが報告されている。[95–97] したがって、PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF の R は、皮膚の細胞間隙経路に類似している可能性が考えられる。対照的に、報告されている ε/L は、皮膚の濾胞性付属器経路では $1.8 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ 、細胞間隙経路では $3.3 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ であることが報告されており、PLLA/PMHS (1/1) PNF は皮膚と比較して細孔の密度が高い可能性が考えられる。[97] したがって、PNF を皮膚の透過性を予測するモデル膜として使用する場合、細孔密度の違いに注意する必要があると考えられた。

Table 15. Molecular weights (M.W.), diffusion coefficients (D_i), and molecular radii (r_i) of CF and FD-10, and the apparent permeability coefficients (P_{app}) of various PNFs for CF and FD-10

Drug	M.W.	$D_i (\times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s})^a$	$r_i \text{ (nm)}^a$
CF	376.3	5.87	0.556
FD-10	10000	1.61	2.03
Apparent permeability coefficient ^b			
	PLLA PNF	PLLA/PMHS (3/1) PNF	PLLA/PMHS (1/1) PNF
Drug	$P_{app} \text{ (cm/s)}$	$P_{app} \text{ (cm/s)}$	$P_{app} \text{ (cm/s)}$
CF	5.75×10^{-7}	8.41×10^{-7}	9.76×10^{-6}
	$\pm 4.82 \times 10^{-7}$	$\pm 1.58 \times 10^{-7}$	$\pm 4.98 \times 10^{-6}$
FD-10	4.42×10^{-8}	1.61×10^{-7}	2.23×10^{-6}
	$\pm 0.0698 \times 10^{-8}$	$\pm 0.670 \times 10^{-7}$	$\pm 0.771 \times 10^{-6}$

^aRef.) [93].

^bMean \pm S.D. (n = 3–4).

Table 16. Characteristic parameters for the pore pathways in various PNFs (n = 3–4)

Membrane	$R \text{ (nm)}$	$\varepsilon/L \text{ (cm}^{-1}\text{)}$
PLLA PNF	6.51	0.143
PLLA/PMHS (3/1) PNF	24.3	0.158
PLLA/PMHS (1/1) PNF	34.6	1.78

3-4. ポリマーナノフィルムの薬物透過性に対する非攪拌水層の影響評価

本研究にて各種 PNF の薬物透過性評価はフランツ型拡散セルを利用して実施された。したがって、セルのドナー側は非攪拌状態にて薬物透過評価が行われており、PNF の薬物透過性は非攪拌水層 (Unstirred water layer: UWL) の影響を受けることで、PNF の膜特性が試験結果に正確に反映されていないおそれがある。UWL は膜表面にて構成される水層であり、非攪拌条件での人工高分子膜を利用した透過試験においては約 1,500~4,000 μm の UWL が形成されることが報告されている。[98-100] 特に、UWL は親油性薬物の薬物透過性に大きく影響し、親油性薬物の膜透過律速層として機能することで、薬物透過性を損なうおそれがある。本実験にて利用した PNF は約 500~800 nm の膜厚を有するため、UWL と比較して非常に薄い膜厚を形成しており、PNF に対する親油性薬物の透過性は UWL が膜透過律速となっている可能性も考えられる。そこで、透過試験に利用した薬物の水中拡散性と薬物の透過性を比較することで、PNF に対する UWL の影響を予測した。UWL の透過性を考慮した場合の三層モデルの模式図を Figure 40 に示す。このモデルに従う場合、直列抵抗は付加的であるため以下の式 (11) が成り立つ。[98,100]

$$\frac{1}{P_e} = \frac{1}{P_u^D} + \frac{1}{P_m} + \frac{1}{P_u^R} = \frac{1}{P_u} + \frac{1}{P_m} \quad (11)$$

ここで、 P_e は UWL および人工高分子膜全体の透過係数、 P_u^D および P_u^R はドナー側およびレシーバー側の UWL の透過係数、 P_u は両側の UWL における透過係数、 P_m は人工高分子膜の透過係数を表す。

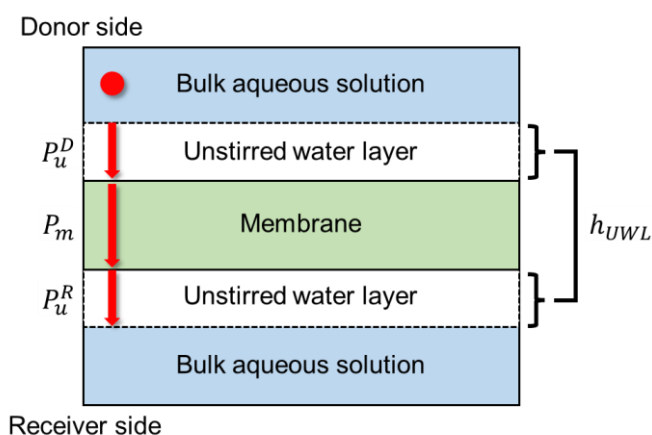


Fig. 40 Schematic diagram of three-layer model considering UWL permeability

さらに、PNF の薬物透過性が非常に高く、UWL が透過律速となる場合 $P_u \ll P_m$ が成り立ち、以下の式(12)が誘導される。

$$P_e = P_u \quad (12)$$

したがって、 P_e 値は、UWL の透過係数と一致することが式(12)より示唆される。さらに、Fick の第一法則から、UWL の透過性は式(13)のように水中での拡散係数(D_{aq})に関連しているとの報告がされている。[98,100]

$$P_u = \frac{D_{aq}}{h_{UWL}} \quad (13)$$

ここで、 h_{UWL} は膜バリアの両側における UWL の厚さの合計を表す。したがって、UWL が親油性薬物の透過律速となる場合、UWL の厚さが一定であると仮定すると P_e は各種薬物の D_{aq} に比例することが考えられる。そこで、各種薬物の D_{aq} を以下の D_{aq} と M.W. の関係式(式(14))より算出した。[98]

$$\log D_{aq} = -4.11 - 0.461 \log M.W. \quad (14)$$

式(14)は、96 の実験的に算出された拡散係数の対数値と分子量の対数値に対して最小二乗法フィッティングを行うことで Avdeef 等により提唱された経験式である。計算された親油性薬物の D_{aq} と透過試験より得られた P_e を Table 17 に示す。さらに、高い薬物透過性を示し、UWL の影響が最も懸念される PLLA/PMHS (1/1) PNF の各種薬物に対する $\log P_e$ と $\log D_{aq}$ の関係を Figure 41 に示す。この時、 P_e には本章の第 2 節にて算出された P_{app} を利用した。さらに、幅広い D_{aq} を有する薬物の透過性を評価するため、親油性薬物であるクラリスロマイシン (Clarithromycin: CM, $\log K_{ow}$ 3.24) および、シクロスポリン A (Cyclosporin: CyA, $\log K_{ow}$ 2.92) の評価を追加で行った。[101, 102]

その結果、PLLA/PMHS (1/1) PNF に対する各種薬物の P_e と D_{aq} の相関に優位性は確認されなかった ($r = 0.336$)。したがって、PNF を利用した薬物透過試験において親油性薬物の透過性は UWL 律速ではなく、PNF の透過性が試験結果に反映されていると考えられる。一方で、本結果より PNF の透過性に対して UWL が影響しないと断言することはできず、これには UWL の厚さやドナー側攪拌条件での薬物透過性評価といった UWL の影響に関する詳細な評価が必要となる。[98,100] しかし、PNF の薬物透過性に対する UWL の影響は少ない可能性が、本検討より示唆され、PLLA/PMHS (1/1) PNF の短い T_{lag} と高い薬物透過性は、PNF の特性が反映された結果であると結論付けられた。

Table. 17 Molecular weights (M.W.) of various drugs, calculated diffusion coefficients in water (D_{aq}) and apparent permeability coefficient of measured PLLA/PMHS (1/1) PNF (P_e)

Chemical	M.W.	D_{aq}^a (cm^2/s)	P_e^b (cm/s)
AMP	231	6.27×10^{-6}	1.72×10^{-5}
LC	234	6.24×10^{-6}	5.50×10^{-5}
CB	236	6.21×10^{-6}	1.92×10^{-5}
FP	244	6.12×10^{-6}	2.26×10^{-4}
KP	254	6.01×10^{-6}	7.23×10^{-5}
IDM	358	5.13×10^{-6}	3.15×10^{-4}
CM	748	3.65×10^{-6}	7.35×10^{-5}
CyA	1203	2.93×10^{-6}	7.57×10^{-6}

^aCalculated from $\log D_{aq} = -4.11 - 0.461 \log \text{M.W.}$ [98]

^bMean values are shown ($n = 3-4$).

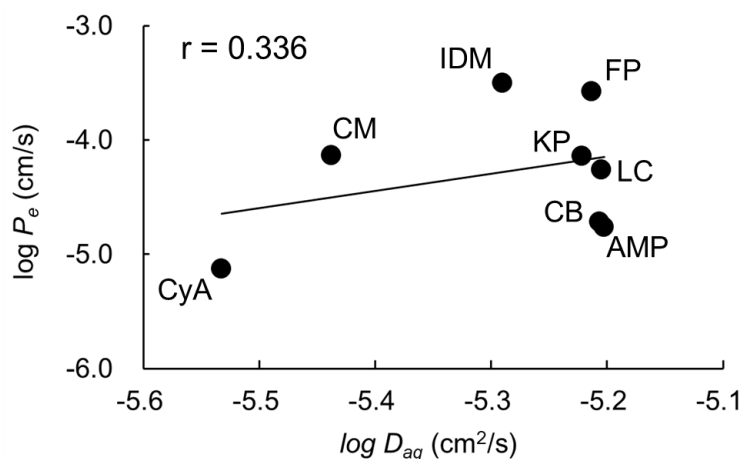


Fig. 41 Relationship between logarithm value of apparent permeability coefficient for PLLA/PMHS (1/1) PNF ($\log P_e$) and logarithm value of diffusion coefficient in water for lipophilic drugs ($\log D_{aq}$). The straight line represents the regression line ($n = 8$)

第4節 小括

本研究結果より、Strat-M®と比較して PLLA PNF とポリマーアロイ化を使用して調製された PLLA/PMHS (1/1) PNF は薬物透過において非常に短い T_{lag} を提供し、ナノメートルオーダーの膜厚形成がその要因であることが示唆された。さらに、ポリマーアロイ化による PMHS 濃厚相の形成は PNF に対する薬物分配性と拡散性に影響を及ぼし、薬物透過性の大幅な増加と T_{lag} のさらなる短縮をもたらした (Fig. 42)。加えて、PLLA/PMHS (1/1) PNF は $\log K_{ow}$ が $-4.70 \sim 3.86$ の異なる極性を有する薬物に対して、0.0450 時間～1.34 時間の非常に短い T_{lag} を示し、ヒト皮膚との高い薬物透過類似性が確認されたことから、TTS 開発のための HTS に利用可能な人工高分子膜になりうることを示された。PNF は短時間の薬物透過予測に対して高い有効性を示すことが明らかとなり、特に Strat-M®では短時間で皮膚透過予測が難しいとされる、 $\log K_{ow} > 3.00$ または $\log K_{ow} < -2.00$ のような親油性または親水性の非常に高い薬物の HTS を可能にすると考えられる。また、PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF は、ヒト皮膚の細胞間隙経路に孔径が類似した細孔を PNF 中に形成していることが明らかとなった。この細孔が親水性経路として機能することで、 $\log K_{ow} < -2.00$ の非常に高い親水性を有する薬物の透過性評価を可能にしたと考えられた。

人工高分子膜の PNF 化やポリマーアロイ化が膜透過性にさまざまな機能と特性を与える可能性を示した事実は重要である。例えば、皮膚透過促進剤などの透過促進手法の適用時において、親水性薬物の透過経路は皮膚の薬物透過において重要な役割を担うことが知られている。PNF とポリマーアロイ化の組み合わせは、親水性薬物の透過経路の設定やその透過性の予測が可能である。したがって、皮膚に対する透過促進手法を適用した際の薬物透過予測に対して、有効である可能性が考えられる。そこで、研究の次のステップでは薬物透過性が変化した条件での透過性予測への適応性の評価などに興味を持たれる。

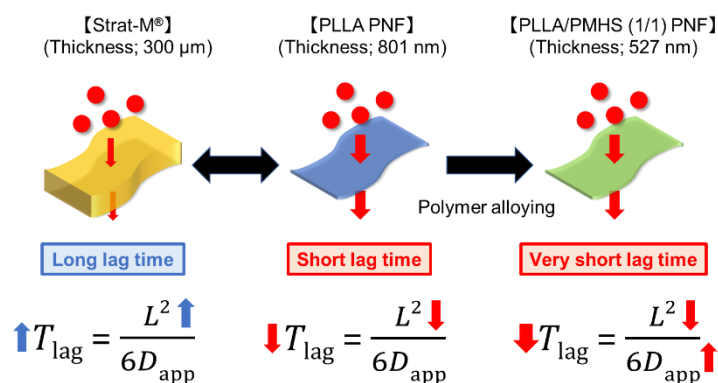


Fig. 42 Effect of nanofilm formation and polymer alloying of artificial polymer membranes on lag time

第3章 皮膚透過促進剤による皮膚の薬物透過性変化を短時間で予測可能なポリマーナノフィルムに関する研究

TTS 開発においては、薬物の十分な皮膚透過を得るため、皮膚透過促進剤の利用により薬物の皮膚分配や拡散性に影響を与えることで、製剤の最適化が行われる。[43] 皮膚透過促進剤としては、様々な化合物が報告されており、例として皮膚透過促進剤として特別に設計された化合物である *Azone* が有名である。[103] さらに、アルコール、界面活性剤、ピロリドン、テルペノイド、脂肪酸、尿素も皮膚透過を増強させる化合物として報告されており、薬物の十分な皮膚透過性を得るために利用されている。[20,43] 皮膚透過予測を行う PNF においても、皮膚透過促進剤でヒト皮膚に類似した薬物透過性変化を示すことが期待されるが、PNF の皮膚透過促進剤に対する応答性は明らかでない。PNF はナノメートルオーダーの膜厚を有するため、皮膚透過促進剤による薬物透過性変化を短時間で予測可能な人工高分子膜としての有効性が考えられる。そこで第 3 章では、PNF の薬物透過性に対する皮膚透過促進剤の応答性を評価し、皮膚透過促進剤の影響を短時間で予測可能な PNF の提示を試みた。

第1節 皮膚透過促進剤適用時の Strat-M[®]および各種ポリマーナノフィルムの薬物透過性変化

初めに、第 2 章にて評価された Strat-M[®]、PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF の皮膚透過促進剤に対する応答性の評価を行った。本検討において、PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF は第 2 章と同様の方法にて調製した。評価薬物にニコチンを選択し、各種皮膚透過促進剤共存下における透過性を評価した。さらに、各種人工高分子膜に対する透過性とヒト皮膚に対する透過性との比較を行うことで、皮膚透過促進剤に対する人工高分子膜の応答性を確認した。皮膚透過促進剤には既報を参考に、*Azone*、1,8-シネオール(別名: *Eucalyptol*)、*N*-メチル-2-ピロリドン(*N*-Methyl-2-pyrrolidone: NMP)、ポリソルベート 80(別名: TWEEN80)を用いた(Fig. 43)。[20]

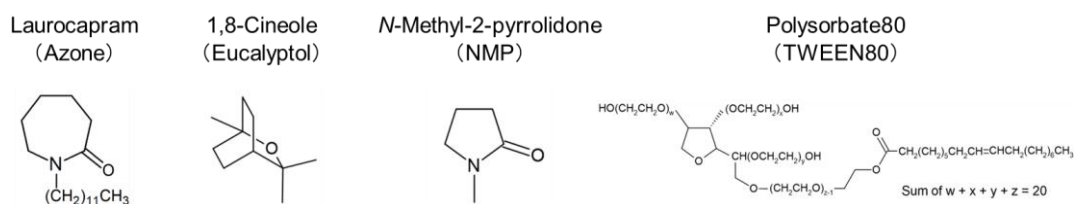


Fig. 43 Applied skin penetration enhancers

Figure 44 に皮膚透過促進剤の共存下における各種人工高分子膜のニコチンの透過プロファイルを示し、Table 18 には透過プロファイルから得られた T_{lag} を示す。皮膚透過促進剤の共存下においても各種 PNF は Strat-M[®] と比較して、優位に短い T_{lag} を示した。この結果は、第 2 章から考察されたように、Strat-M[®] と比較した各種 PNF のナノメートルオーダーの膜厚が、短い T_{lag} を提供した要因であると考えられ、PNF は Strat-M[®] と比較して、皮膚透過促進剤による透過性変化を短時間で予測できると期待される。Table 19 には各種人工高分子膜の J を示す (Strat-M[®], $J_{Strat-M}$; PLLA PNF, J_{PLLA} ; PLLA/PMHS (1/1) PNF, $J_{PLLA/PMHS (1/1)}$)。PLLA PNF とポリマーアロイ化した PLLA/PMHS (1/1) PNF の T_{lag} と J を比較すると、ポリマーアロイ化によりさらなる T_{lag} の減少と J の増加が確認された。第 2 章では、ポリマーアロイ化を利用した PLLA/PMHS (1/1) PNF は極性の異なる 12 種の薬物に対して非常に短い T_{lag} と高い J を示した。さらに、薬物拡散性が高く、親油性領域として機能する PMHS 濃厚相の形成が、高い薬物透過性の主な要因であると結論付けた。本検討においてもポリマーアロイ化による PMHS 濃厚相の形成が薬物の拡散性と分配性の上昇に寄与することで、ニコチンの薬物透過性に変化を与えた可能性が考えられる。

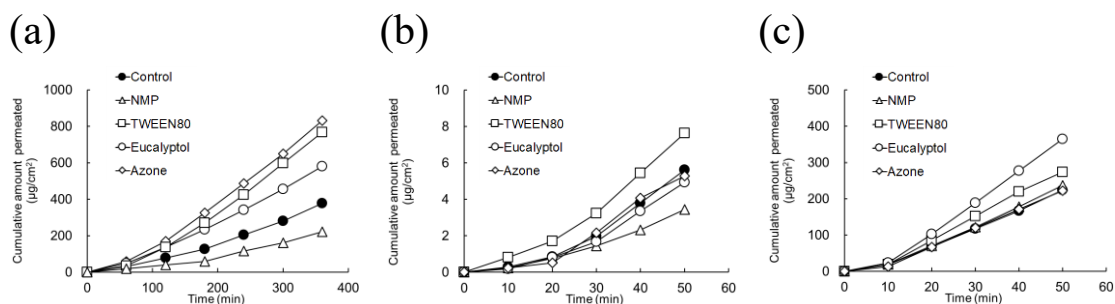


Fig. 44 Permeation profile of nicotine through various artificial polymer membranes in the presence of skin permeation enhancers (Strat-M[®], (a); PLLA PNF, (b); PLLA/PMHS (1/1) PNF, (c))

Table 18. Effect of skin permeation enhancers on lag time (T_{lag}) of nicotine through various artificial polymer membranes

Skin permeation enhancer	Control	NMP	TWEEN80	Eucalyptol	Azone
Membrane	T_{lag} (h)	T_{lag} (h)	T_{lag} (h)	T_{lag} (h)	T_{lag} (h)
Strat-M [®]	1.64 ± 0.64	1.54 ± 0.66	0.919 ± 0.142	1.15 ± 0.10	1.19 ± 0.32
PLLA PNF	0.292 ± 0.061	0.269 ± 0.016	0.267 ± 0.064	0.298 ± 0.105	0.274 ± 0.021
PLLA/PMHS (1/1) PNF	0.103 ± 0.003	0.105 ± 0.033	0.146 ± 0.037	0.120 ± 0.016	0.115 ± 0.030

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4, significant differences compared with Strat-M[®], ** p < 0.01).

Table 19. Effect of skin permeation enhancers on nicotine permeation flux (J) through various artificial polymer membranes

Skin permeation enhancer	Control	NMP	TWEEN80	Eucalyptol	Azone
Membrane	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)
Strat-M [®]	82.8 ± 26.8	69.3 ± 30.2	134 ± 6	119 ± 10	171 ± 10
PLLA PNF	10.5 ± 2.7	6.01 ± 0.92	13.5 ± 0.5	9.73 ± 3.10	9.97 ± 1.98
PLLA/PMHS (1/1) PNF	295 ± 33.3	306 ± 21	424 ± 44	494 ± 101	309 ± 36

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4).

Figure 45 には Azone を除いた透過促進剤の共存下におけるヒト皮膚に対するニコチンの J ($J_{hum.}$ 、文献値) と $J_{Strat-M}$ 、 J_{PLLA} および $J_{PLLA/PMHS (1/1)}$ との関係を示している。[20] 以下に Figure 45 から算出された近似曲線の式を示す。

$$J_{hum.} = 0.154 \times J_{Strat-M} - 4.79 \quad (R^2 = 0.862)$$

$$J_{hum.} = 0.946 \times J_{PLLA} + 1.35 \quad (R^2 = 0.334)$$

$$J_{hum.} = 0.0510 \times J_{PLLA/PMHS (1/1)} - 8.61 \quad (R^2 = 0.965)$$

Strat-M[®] およびポリマーアロイ化を利用した PLLA/PMHS (1/1) PNF は非常に高い相関が確認された。それと比べ、PLLA PNF の相関性は低いことが確認された (Strat-M[®]、 $r = 0.929$; PLLA PNF、 $r = 0.583$; PLLA/PMHS (1/1) PNF、 $r = 0.982$)。PMHS を利用したポリマーアロイ化は Azone を除く透過促進剤 (NMP、TWEEN80、Eucalyptol) に対する PNF の応答性を改善させ、透過性の評価に適用することが可能となると考える。これは、ポリマーアロイ化に伴う、PNF に対する透過促進剤の分配性と拡散性の改善が要因であると考えられる。

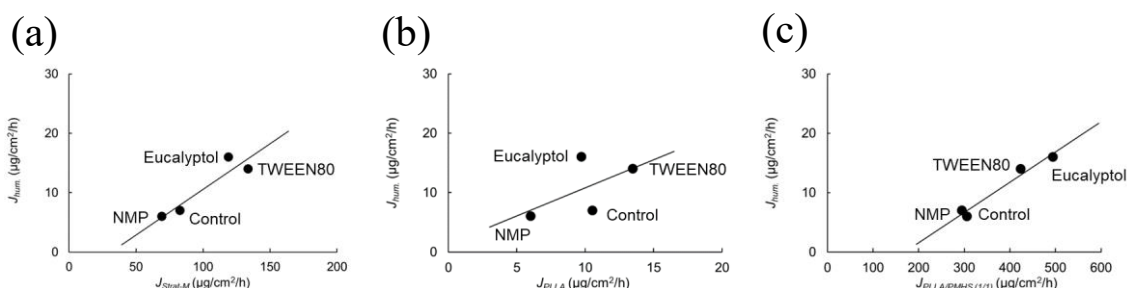


Fig. 45 Relationship between nicotine permeation flux through human skin in the presence of skin permeation enhancers ($J_{hum.}$, literature value) and nicotine permeation flux through Strat-M[®] ($J_{Strat-M}$) (a), PLLA PNF (J_{PLLA}) (b), PLLA/PMHS (1/1) PNF ($J_{PLLA/PMHS (1/1)}$) (c). $J_{hum.}$ was obtained from a previous study [20]

報告されている各透過促進剤の透過促進メカニズムは以下のように説明される。NMP は膜内に分配後、膜中の溶媒の性質に変化を与え、膜内にリザーバーを形成することで膜への分配性と拡散性に影響を与えるとされており、TWEEN80 および Eucalyptol は膜内に分配後、ミセル内への薬物取り込み、あるいは薬物の膜分配性と拡散性を改善することにより薬物透過性に影響を与えるとされている。[20,43] つまり、皮膚透過促進剤が機能するためには、促進剤自身の十分な膜内への分配と膜中での拡散が担保される必要がある。第 2 章にて、ポリマーアロイ化を利用した PLLA/PMHS (1/1) PNF は PLLA PNF と比較して、幅広い極性の薬物に対して非常に高い膜分配性と拡散性が確認された。したがって、PMHS によるポリマーアロイ化は、皮膚透過促進剤に対する PNF の膜分配性と拡散性を改善することで、Azone を除くこれらの透過促進剤に対する応答性を改善させた可能性が考えられた。

Figure 46 には、Azone を含めた透過促進剤の共存下における $J_{hum.}$ と $J_{Strat-M}$ 、 J_{PLLA} および $J_{PLLA/PMHS (1/1)}$ との関係を示す。[20] さらに、Figure 46 から算出された近似曲線の式を以下に示す。

$$J_{hum.} = 0.149 \times J_{Strat-M} - 4.40 \quad (R^2 = 0.935)$$

$$J_{hum.} = 0.955 \times J_{PLLA} + 3.31 \quad (R^2 = 0.163)$$

$$J_{hum.} = 0.0261 \times J_{PLLA/PMHS (1/1)} + 3.24 \quad (R^2 = 0.137)$$

Strat-M[®]と比較して、PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF では低い相関性が確認され、各種 PNF は Azone の影響を評価しにくいことが確認された (Strat-M[®], $r = 0.967$; PLLA PNF, $r = 0.404$; PLLA/PMHS (1/1) PNF, $r = 0.370$)。各種人工高分子膜の Azone に対する応答性が乏しいのは、脂質領域の有無に由来すると考える。皮膚の角層には、セラミド、脂肪酸等の脂質成分が含まれており、角層内にてこれら脂質は炭素鎖由来のパッキング構造を形成している。[104] 皮膚透過促進剤の一種である Azone の皮膚透過促進性は脂質領域での相互作用に由来しており、脂質領域内への取り込みに伴う脂質のパッキング構造の乱れにより生じることが報告されている。[20,43,104] Azone 添加時にニコチンの透過促進を示した Strat-M[®]は人工脂質処理が膜表面に施されており、脂質由来のパッキング構造が模倣されていると考えられる。[20] 一方、PLLA PNF と PLLA/PMHS (1/1) PNF は脂質領域(脂質のパッキング構造)を膜内に有していないため、Azone の適用時に透過性の変化を生じなかったと考えられる。そこで、本章の第 2 節では、Azone を含めた皮膚透過促進剤の影響を短時間で予測可能な PNF を提示するため、PNF に対して脂質処理を施し、PNF 内に脂質のパッキング構造を形成させることで、Azone に対する応答性の改善を試みた。

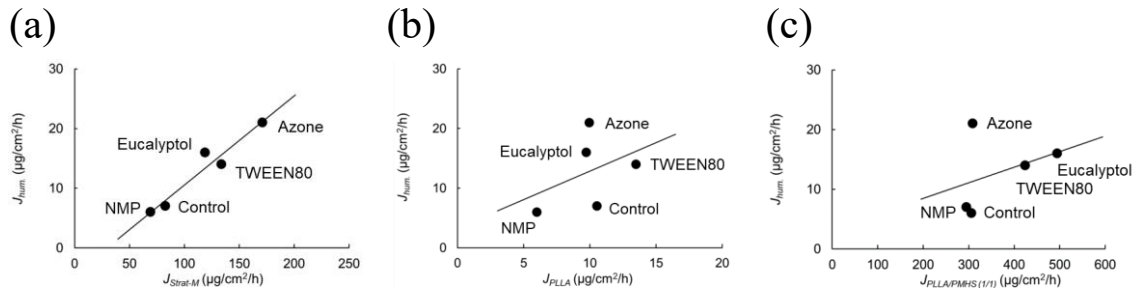


Fig. 46 Relationship between nicotine permeation flux through human skin in the presence of skin permeation enhancers (J_{hum} , literature value) and nicotine permeation flux through Strat-M[®] ($J_{Strat-M}$) (a), PLLA PNF (J_{PLLA}) (b), PLLA/PMHS (1/1) PNF ($J_{PLLA/PMHS (1/1)}$) (c). J_{hum} was obtained from a previous study [20]

第2節 脂質処理を施したポリマーナノフィルムの調製と皮膚透過促進剤に対する応答性の評価

2-1. 脂質処理を施した各種ポリマーナノフィルムの調製

本節では、PLLA/PMHS (1/1) PNF に対して脂質処理を施すことで、Azone に対する応答性の改善を試みた。脂質にはグリセロールエステル的一种であるモノステアリン酸グリセロール (Glycerol monostearate: GMS) を選択した。GMS は α -フォームおよび β -フォームといった、脂質パッキング構造有する結晶形態を形成することが知られており、PNF 内への GMS の組み込みに伴い、Azone に対する応答性の改善が期待できる。[105–107] PNF の調製と脂質処理の概略図および GMS 構造を Figure 47 に示す。脂質処理は、シリコン基盤上に調製された PLLA/PMHS (1/1) PNF に GMS 溶液 (溶媒 *n*-ヘキサン/エタノール (2/1)) を滴下し、スピコートすることにより調製した。Table 20 に調製した PNF の混合ポリマーの種類と比率、GMS 処理溶液の濃度、PNF の呼称および測定された膜厚を示す。本検討では、20 mg/mL、40 mg/mL、60 mg/mL GMS 溶液を利用して脂質処理を施し、処理を施した PNF を GMS 20 PNF、GMS 40 PNF、GMS 60 PNF とそれぞれ表記した。PLLA/PMHS (1/1) PNF (膜厚 527 nm) に対する GMS による脂質処理は膜厚に影響を与えた。しかし、脂質処理を施した各種 PNF の膜厚は約 500~700 nm であり、非常に薄い膜厚を保持していることが確認され、GMS による脂質処理を施した PNF においても短い T_{lag} で薬物透過性の評価が行える可能性が考えられた。

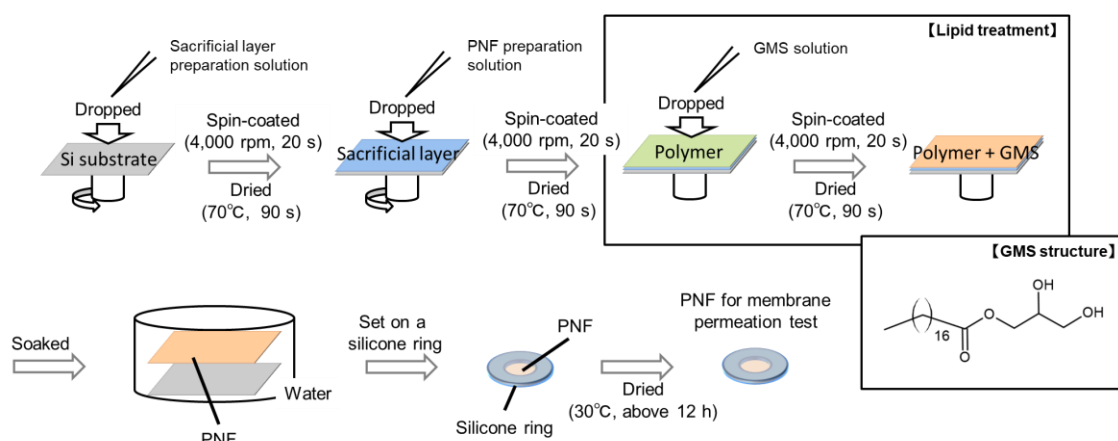


Fig. 47 Schematic diagram of PNF preparation and lipid treatment processing, and GMS structure

Table 20. Polymer ratios, processing solutions, PNF name and measured film thicknesses of PNFs

Polymer ratio (Polymer 1 /Polymer 2, wt/wt	Polymer 1	Polymer 2	Processing solution ^a	Polymer nanofilm name	Thickness (nm) ^b
1/1	PLLA	PMHS	20 mg/mL GMS	GMS 20 PNF	530 ± 3
1/1	PLLA	PMHS	40 mg/mL GMS	GMS 40 PNF	599 ± 8
1/1	PLLA	PMHS	60 mg/mL GMS	GMS 60 PNF	684 ± 6

^aDissolved in *n*-hexane/ethanol (2/1).

^bErrors indicate standard deviation (n = 3).

2-2. ポリマーナノフィルム内におけるモノステアリン酸グリセロールの結晶形態の評価

GMS は非晶質形態、あるいは六方晶充填構造を有する α -フォームおよび三斜晶充填構造を有する β -フォームといった結晶形態を形成することが報告されており、 α -フォームおよび β -フォームを形成した GMS は、ステアリン酸残基の炭素鎖に由来したパッキング構造を形成することが知られている。[105–107] さらに、 α -フォームと比較して β -フォームは高密度の脂質パッキング構造を有することが報告されている。そこで DSC により GMS の β -フォームの割合 (E) を評価することで、各 PNF の GMS に由来したパッキング構造の程度を予測した。 E の算出には Kawashima 等が報告した以下の式(15)を利用した。[106]

$$E = \frac{1.51(\Delta H_1 - \Delta H_2)}{\Delta H_2} \quad (15)$$

この時、 ΔH_1 は 1 回目の加熱過程により得られたエンタルピー変化、 ΔH_2 は 2 回目加熱過程により得られたエンタルピー変化を表す。[106] 得られた DCS プロファイルを図 48 に示し、Table 21 には算出された各種 PNF の熱特性と PNF における GMS の E を示す。購入時の GMS 粉末は主に β -フォームを形成していることが知られており、本検討においても E は 95.1% であることが確認された。 α -フォームの GMS サンプルは 120°C への加熱と室温への冷却過程により作成した。[105,106] 加熱と冷却過程により作成した GMS サンプルの E は 3.30% であり、既報通り GMS は α -フォームの形成が示唆され、Kawashima 等が報告した式(15)により、 E を算出することが可能である。算出した PNF 中における GMS の E は 50% 以上形成されていることが確認され、PNF 中において GMS は高密度のパッキング構造を形成していると考えられる。したがって、GMS 処理を施した PNF は Azone に対する応答性の改善が期待できる。

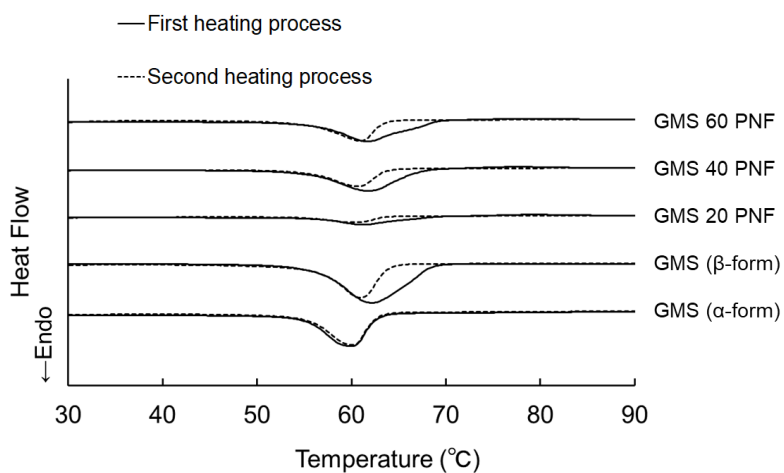


Fig. 48 Heat flow curves of various PNFs with GMS and GMS powder using DSC

Table 21. Enthalpy changes for first heating process (ΔH_1), second heating process (ΔH_2) and β -form ratios (E) of GMS powder and various PNFs calculated by DSC measurement

Materials	ΔH_1 (J/g)	ΔH_2 (J/g)	E (%)
GMS (α -form)	95.8	93.8	3.30
GMS (β -form)	140	85.6	95.1
GMS 20 PNF	38.8	27.5	61.9
GMS 40 PNF	66.7	41.5	91.5
GMS 60 PNF	80.6	51.7	84.3

2-3. 皮膚透過促進剤に対する脂質処理を施した各種ポリマーナノフィルムの応答性の評価

GMS を利用した PLLA/PMHS (1/1) PNF に対する脂質処理は、PNF 内において脂質由来のパッキング構造を形成することで、Azone に対する応答性の改善が期待された。そこで、本章の第 1 節と同様に、皮膚透過促進剤共存下における各種 PNF のニコチンの透過性を評価することで、GMS による脂質処理を施した各種 PNF の皮膚透過促進剤 (Azone、Eucalyptol、NMP、TWEEN80) に対する応答性を評価した。Figure 49 にコントロールおよび皮膚透過促進剤の共存下における脂質処理を施した各種 PNF のニコチンの透過プロファイルを示し、Table 22 に透過プロファイルから得られた T_{lag} 、Table 23 には J を示す (GMS 20 PNF、 $J_{GMS 20}$; GMS 40 PNF、 $J_{GMS 40}$; GMS 60 PNF、 $J_{GMS 60}$)。これらの結果より、脂質処理を施した GMS 20 PNF、GMS 40 PNF および GMS 60 PNF のニコチンに対する透過性は、各種皮膚透過促進剤の共存により変化を示し、Strat-M® と比較して優位に短い T_{lag} が観察された。さらに、Figure 50 に Azone を含む透過促進剤の共存下における J_{hum} と $J_{GMS 20}$ 、 $J_{GMS 40}$ および $J_{GMS 60}$ との関係を示し、以下に Figure 50 から算出された近似曲線の式を示す。

$$J_{hum.} = 0.0244 \times J_{GMS 20} + 5.08 \quad (R^2 = 0.552)$$

$$J_{hum.} = 0.0280 \times J_{GMS 40} + 4.92 \quad (R^2 = 0.845)$$

$$J_{hum.} = 0.0360 \times J_{GMS 60} + 4.82 \quad (R^2 = 0.923)$$

脂質処理を施した GMS 20 PNF、GMS 40 PNF および GMS 60 PNF の透過促進剤添加時の透過性変化は処理 GMS 濃度の増加に伴い、Azone に対する応答性の改善とヒト皮膚に類似した薬物透過透過性の変化が確認された (GMS 20 PNF、 $r = 0.743$; GMS 40 PNF、 $r = 0.919$; GMS 60 PNF、 $r = 0.961$)。以上より、GMS による脂質処理は PNF 中に脂質由来のパッキング構造を形成させることで、PLLA/PMHS (1/1) PNF の Azone に対する応答性を改善させたと考える。GMS を利用した脂質処理は、Azone に対する応答性の改善に対して有効であり、特に GMS 60 PNF は精度良く、皮膚の薬物透過性変化を短時間で予測可能な PNF としての利用が期待できる。

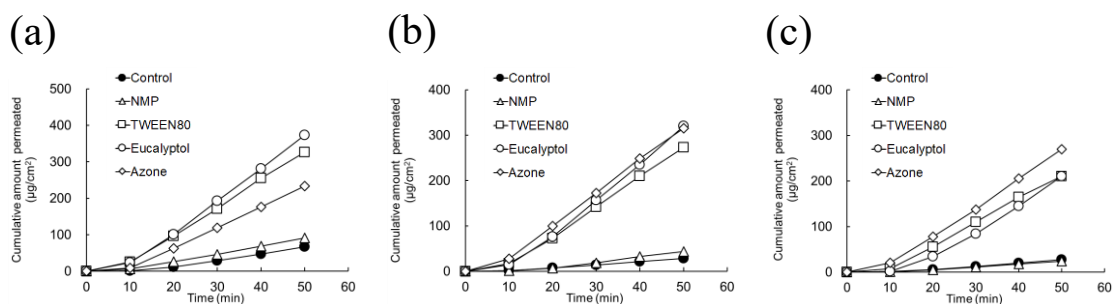


Fig. 49 Permeation profile of nicotine in various PNFs in the presence of skin permeation enhancers (GMS 20 PNF, (a); GMS 40 PNF, (b); GMS 60 PNF, (c))

Table 22. Effect of skin permeation enhancers on lag time (T_{lag}) of nicotine through various PNFs

Skin permeation enhancer	Control	NMP	TWEEN80	Eucalyptol	Azone
Membrane	T_{lag} (h)	T_{lag} (h)	T_{lag} (h)	T_{lag} (h)	T_{lag} (h)
GMS 20 PNF	0.229 ± 0.026 **	0.123 ± 0.003 **	0.120 ± 0.011 **	0.135 ± 0.019 **	0.149 ± 0.010 **
GMS 40 PNF	0.176 ± 0.054 **	0.235 ± 0.052 **	0.130 ± 0.035 **	0.161 ± 0.019 **	0.102 ± 0.005 **
GMS 60 PNF	0.186 ± 0.045 **	0.188 ± 0.029 **	0.147 ± 0.021 **	0.235 ± 0.035 **	0.123 ± 0.026 **

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4, significant differences compared with Strat-M[®] (Table 18),

** p < 0.01).

Table 23. Effect of skin permeation enhancers on nicotine permeation flux (J) through various PNFs

Skin permeation enhancer	Control	NMP	TWEEN80	Eucalyptol	Azone
Membrane	J	J	J	J	J
	($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)
GMS 20 PNF	111 \pm 16.8	128 \pm 17	464 \pm 35	533 \pm 45	347 \pm 70
GMS 40 PNF	42.9 \pm 6.27	72.5 \pm 9.7	387 \pm 30	472 \pm 16	435 \pm 8
GMS 60 PNF	41.7 \pm 3.54	37.0 \pm 5.3	309 \pm 40	343 \pm 0.2	378 \pm 43

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4).

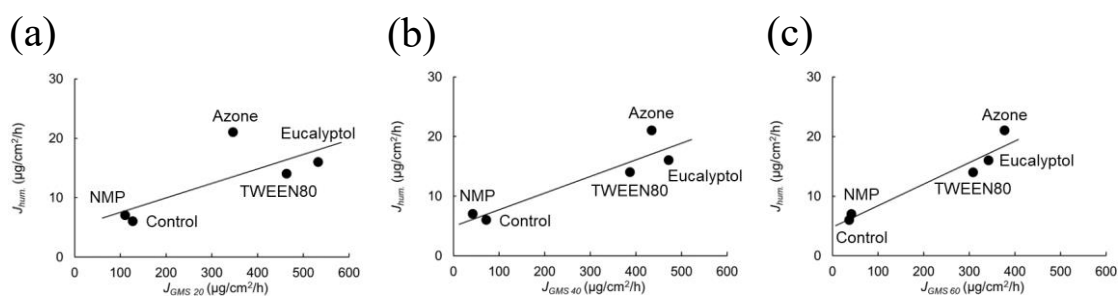


Fig. 50 Relationship between nicotine permeation flux through skin in the presence of skin permeation enhancers (J_{hum} , literature value) and nicotine permeation flux through GMS 20 PNF ($J_{GMS\ 20}$) (a), GMS 40 PNF ($J_{GMS\ 40}$) (b), GMS 60 PNF ($J_{GMS\ 60}$) (c). J_{hum} was obtained from a previous study [20]

2-4. 皮膚透過促進剤の添加がモノステアリン酸グリセロールの結晶形態に与える影響

GMS を利用した PLLA/PMHS (1/1) PNF に対する脂質処理は、PNF の Azone に対する応答性を大幅に変化させた。これには、GMS 由来のパッキング構造に対し、Azone が相互作用することを想定している。そこで、GMS 由来の脂質パッキング構造に対する Azone の影響を確認するため、各種皮膚透過促進剤と共存させた GMS 60 PNF の DSC プロファイルを観察した (Fig. 51)。既報より、パッキング構造を有する GMS の結晶形態である α -フォームと β -フォームに由来した融点 (T_m) は、約 60~70°C にて観察されることが報告されており、皮膚透過促進剤の添加により、脂質のパッキング構造に大幅な変化が生じている場合、GMS に由来した T_m の大幅な変化が予想される。[105,106] NMP、TWEEN80、Eucalyptol 共存下において GMS の α -フォームあるいは β -フォーム由来の T_m は大幅な変化を示さず、GMS に由来した T_m は Control の値と同様であった。対照的に、GMS の α -フォームおよび β -フォーム由来の T_m は Azone の共存により消失し、GMS の T_m は 38.8°C まで大幅な低下を示した。これは Azone の膜内への取り組みにより、GMS 由来のパッキング構造に乱れが生じることで大幅な T_m 降下を示したと考えられる。したがって、GMS による脂質処理は PNF 中に Azone の相互作用領域となる脂質のパッキング構造を形成することで、Azone に対する応答性を改善したと結論付けられた。

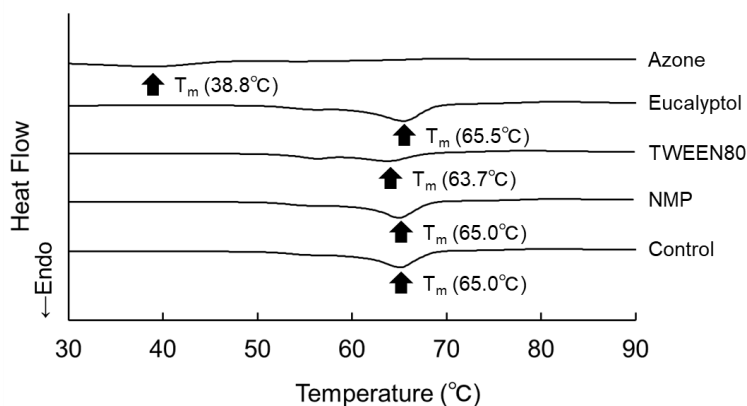


Fig. 51 Heat flow curve of GMS 60 PNF after treatment with various skin penetration enhancers. Arrows represent melting points (T_m) of GMS

GMS による脂質処理は Azone だけでなく、NMP、TWEEN80、Eucalyptol 共存下でのニコチンの透過性にも影響を与えた。これには GMS と皮膚透過促進剤との親和性が関係していると考えられる。以前の研究にて、ヒト皮膚のハンセン溶解パラメータ (Hansen solubility parameter: HSP) が報告されており、HSP は物質間の親和性の指標であることが知られている。[108,109] HSP は分散パラメータ (δ_D)、極性パラメータ (δ_P) および水素結合パラメータ (δ_H) から構成され、ヒト皮膚の δ_D は 17.0、 δ_P は 8.0、 δ_H は 8.0 との報告がされており、GMS の HSP (δ_D 17.7; δ_P 9.5; δ_H 8.9) に類似している。したがって、PLLA/PMHS (1/1) PNF 内に GMS が組み込まれることで、PNF の HSP がヒト皮膚に類似した可能性がある。それに応じて、脂質処理を施した PNF は皮膚透過促進剤共存下において、ヒト皮膚と類似した薬物透過性を示した可能性も考えられる。

第3節 モノステアリン酸グリセロールによる脂質処理がポリマーナノフィルムの膜特性に与える影響の評価

本章第1節の結果より、GMSを利用した PLLA/PMHS (1/1) PNF に対する脂質処理は、皮膚透過促進剤に対する応答性を改善することが判明した。また、脂質処理は PNF の膜特性を大幅に変化させた可能性もある。脂質処理に伴う PNF 特性の改質に関する情報は、皮膚透過促進剤共存下における透過性の変化要因を明らかにするのみではなく、人工皮膚やナノ絆創膏といった医療材料への応用を考慮した場合の特性制御に対しても有用な情報になり得ると考えられる。そこで、本章の第3節では GMS による脂質処理が PNF の膜特性に与える影響を詳細に評価した。

3-1. 電界放出形走査電子顕微鏡観察、接触角測定およびフーリエ変換赤外分光法による膜特性評価

Figure 44、Figure 49 のニコチンに対する各種 PNF の透過プロファイルの結果より、 $\log DK$ を算出し、その結果を Table 24 に示した。算出方法は第2章と同様である。PLLA/PMHS (1/1) PNF と GMS による脂質処理を施した各種 PNF の $\log DK$ を比較したところ、有意差が確認されたことから、GMS による脂質処理は PLLA/PMHS (1/1) PNF の膜特性を変化させ、ニコチンの分配性と拡散性に影響を与えた可能性が示唆された。そこで、FE-SEM を用いて GMS による脂質処理後の膜形態変化を観察した。

Table 24. Logarithm value of DK parameter ($\log DK$) of nicotine through various PNFs^a

Membrane	$\log DK$	
PLLA/PMHS (1/1) PNF	8.20 ± 0.05	-
GMS 20 PNF	7.79 ± 0.07	**
GMS 40 PNF	7.40 ± 0.07	**
GMS 60 PNF	7.45 ± 0.04	**

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4, significant differences compared with PLLA/PMHS (1/1) PNF ** p < 0.01).

Figure 52 には FE-SEM により観察された、GMS による脂質処理を施した PNF の膜形態画像を示す。GMS 20 PNF は PLLA/PMHS (1/1) PNF に比較的類似している膜形態が観察され、対照的に GMS 40 PNF と GMS 60 PNF の膜形態は大きく異なっており、膜特性が大幅に変化している可能性が示唆された。さらに、Table 25 には EDS にて測定された各種 PNF の原子組成比率 (Atom%) を示す。Atom% は炭素原子 (C)、酸素原子 (O)、ケイ素原子 (Si) に関して分析を行っており、Figure 52 内の全領域での平均値を表している。

PLLA/PMHS (1/1) PNF は GMS による脂質処理により C 割合の増加と Si 割合の低下が確認された。これは、PNF 表面が 21 個の C から構成される GMS にて加工が施されている裏付けになると考えられる。さらに、GMS 処理濃度の上昇は、PNF 表面における O 割合を増加させた。GMS は親油性のステアリン酸残基と、親水性のグリセロール残基から構成される。したがって、GMS 処理濃度の増加に伴い、グリセロール残基部分のヒドロキシ基が PNF 表面に露出している可能性があり、膜表面にて PNF の親水性を増加させている可能性が考えられた。

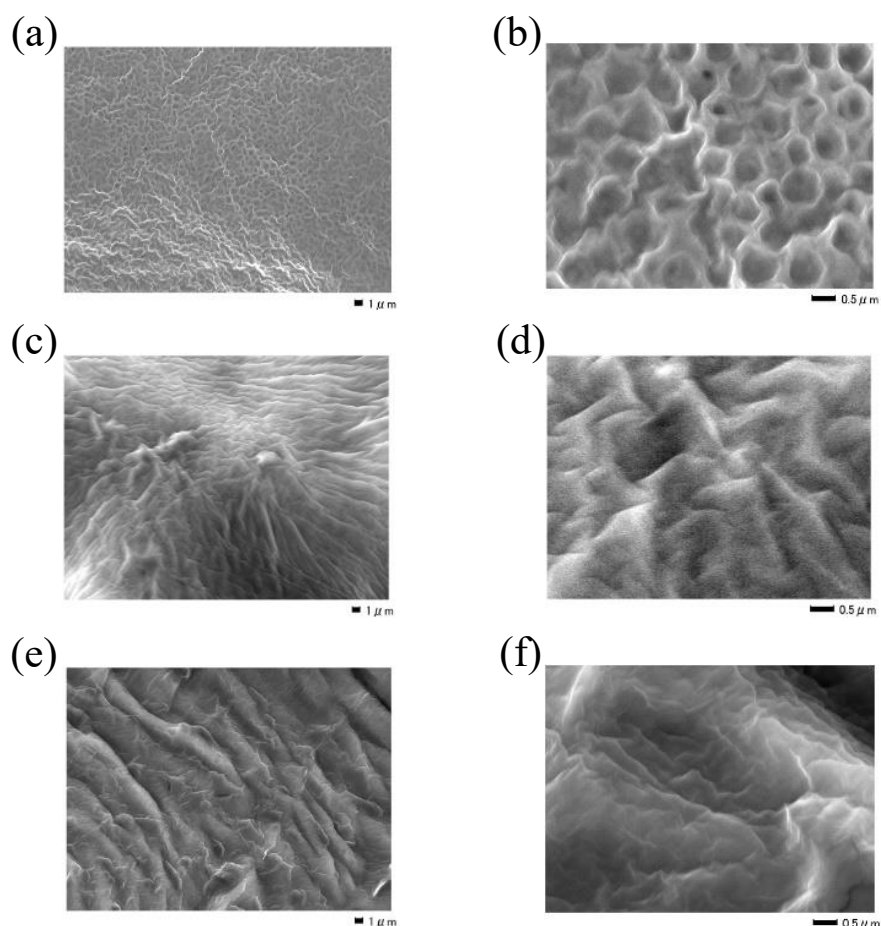


Fig. 52 Morphologies of GMS 20 PNF, GMS 40 PNF and GMS 60 PNF observed using FE-SEM (GMS 20 PNF, (a), (b); GMS 40 PNF, (c), (d); GMS 60 PNF, (e), (f))

Table 25. Atomic composition ratio (Atom%) of PNF surface measured by EDS^a

Element	C	O	Si
Membrane	Atom%	Atom%	Atom%
PLLA/PMHS (1/1) PNF	69.6	28.7	1.63
GMS 20 PNF	91.8	7.94	0.233
GMS 40 PNF	85.6	14.2	0.220
GMS 60 PNF	85.9	13.9	0.140

^aThe results reflect an atomic composition ratio of the entire area in Fig. 28 (f) and Fig. 52 (b), (d), (f).

さらに、Figure 53 には超純水滴下時に接触角計にて測定された CDC カメラの画像を示しており、Table 26 には測定された接触角を示す。結果より、GMS 処理濃度の増加に伴い、接触角の低下が確認され、GMS による脂質処理は PNF の親水性を増加させたと結論付けられる。ニコチンの $\log K_{ow}$ は約 1.00 であり親水性領域と比較して親油性領域への良好な分配が考えられる。[110] したがって、GMS による脂質処理に伴う PNF におけるニコチンの透過性低下は、GMS による脂質処理に伴う、膜表面の親水性増加に起因すると考えられた。

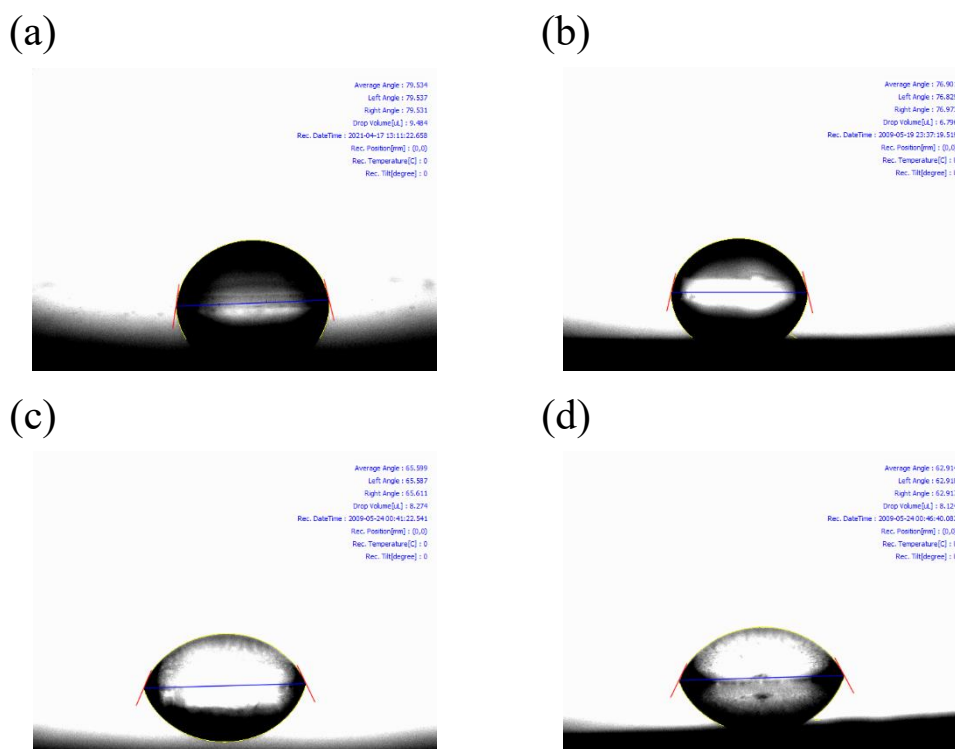


Fig. 53 CDC camera image of ultrapure water on PNF surface (PLLA/PMHS (1/1) PNF, (a); GMS 20 PNF, (b); GMS 40 PNF, (c); GMS 60 PNF, (d))

Table 26. Contact angles measured by dropping ultrapure on various PNFs^a

Membrane	Contact angle (°)
PLLA/PMHS (1/1) PNF	79.4 ± 0.3
GMS 20 PNF	77.4 ± 0.5
GMS 40 PNF	65.5 ± 0.6
GMS 60 PNF	63.8 ± 0.8

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4).

GMS 処理を施した各種 PNF は、PLLA/PMHS (1/1) PNF との比較で、ニコチンに対する $\log DK$ に有意差が確認された (Table 24)。このことから、GMS による脂質処理は PNF 中でのニコチンの拡散性にも影響を与えたと考えられる。Figure 54 に PLLA/PMHS (1/1) PNF と GMS 60 PNF の裏面に対する FE-SEM 画像、Table 27 に測定された Atom%を示す。PNF 表面と同様に C 割合の増加と Si 割合の低下が裏側でも確認された。

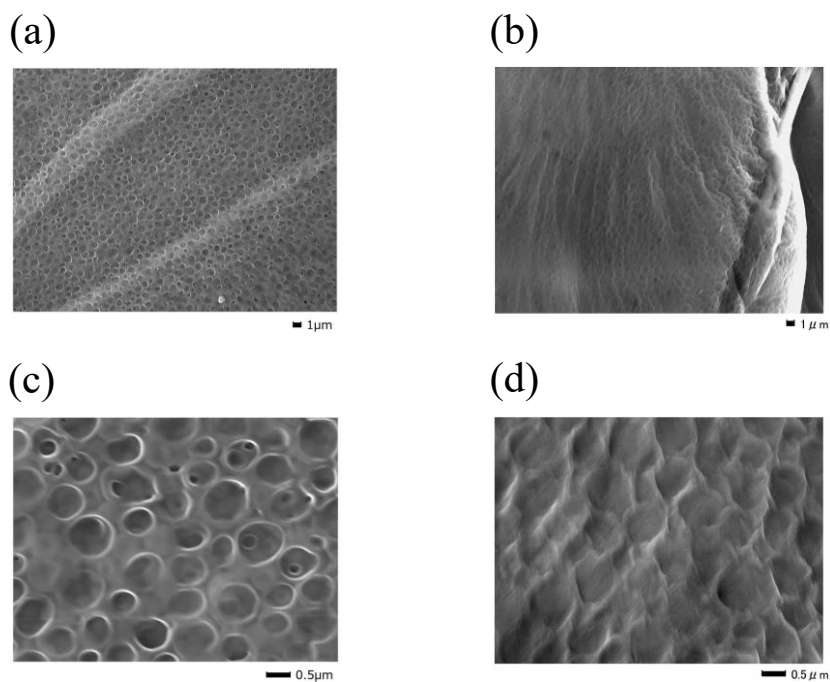


Fig. 54 Backside image of various PNFs using FE-SEM (PLLA/PMHS (1/1) PNF, (a), (b); GMS 60 PNF, (c), (d))

Table 27. Atomic composition ratio (Atom%) of PNF backside measured by EDS^a

Element	C	O	Si
Membrane	Atom%	Atom%	Atom%
PLLA/PMHS (1/1) PNF (backside)	41.4	46.2	12.4
GMS 60 PNF (backside)	89.9	9.79	0.340

^aResults reflect an atomic composition ratio of the entire area in Fig. 54 (c), (d).

本実験では、スピコート法により脂質処理を施しており、PNF の裏面まで脂質処理を施すには PNF 内部に GMS が取り込まれる必要がある。したがって、裏面での GMS による変化は、PNF 内部への GMS の取り込みを裏付けると考えられる。すなわち、脂質処理を施した PNF は表面だけでなく、膜内部への GMS 取り込みに伴い、ニコチンの透過性が変化した可能性が考えられる。そこで、FT-IR にて GMS と PNF の構成ポリマーである PLLA あるいは PMHS の相互作用を確認することで、PNF 内部への GMS の取り込みを測定することとした。

Figure 55 には各種 PNF と GMS、PMHS の FT-IR スペクトルを示す。GMS は文献値に類似したメチレン基由来の吸収ピークが確認され(対称伸縮振動 2849 cm^{-1} 、非対称伸縮振動 2917 cm^{-1})、PMHS は 2967 cm^{-1} のメチル基由来の吸収ピークおよび 2168 cm^{-1} の Si-H 基由来の吸収ピークが確認された。[111] GMS 処理を施した各種 PNF においても GMS および PMHS に由来した吸収ピークが確認された。しかし、ピーク位置は異なっており、PNF 内における GMS のメチレン基の対称伸縮振動の由来した吸収ピークは高波数シフトを示し、PMHS のメチル基と Si-H 基由来のピークは低波数シフトを示した。したがって、GMS のメチレン基と PMHS のメチル基あるいは Si-H 基は相互作用している可能性が考えられる。このことから、PNF 内の PMHS 領域に GMS 本体、あるいはステアリン酸残基が取り込まれている可能性があり、GMS による脂質処理は PNF 内において薬物拡散性の高い PMHS 領域に影響を与えることで、ニコチンの透過性を低下させたと考えられる。

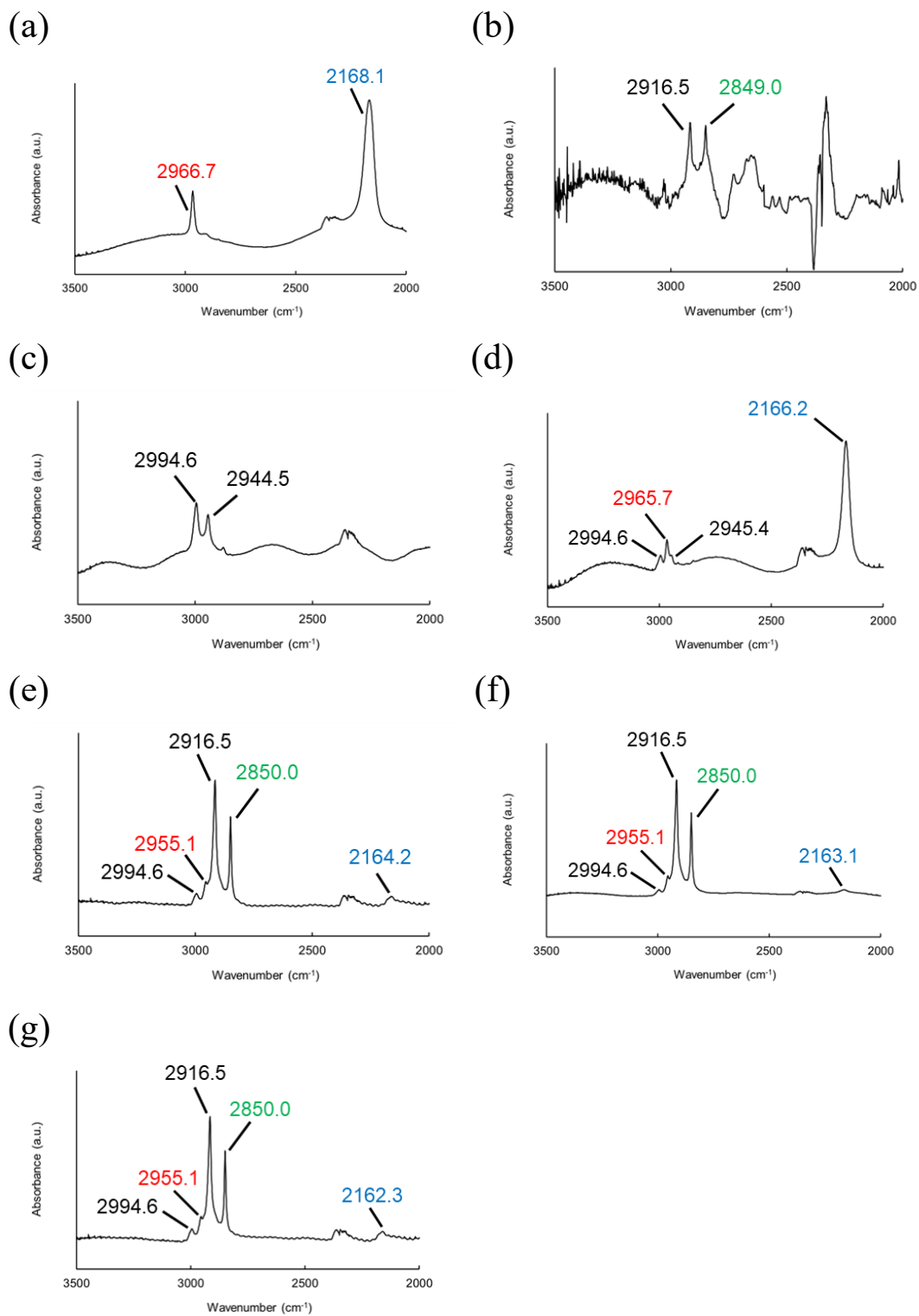


Fig. 55 FT-IR spectra of various PNFs, PMHS and GMS (PMHS, (a); GMS, (b); PLLA PNF, (c); PLLA/PMHS (1/1) PNF, (d); GMS 20 PNF, (e); GMS 40 PNF, (f); GMS 60 PNF, (g))

3-2. モノステアリン酸グリセロールによる脂質処理を施したポリマーナノフィルムの細孔特性

Figure 52 の FE-SEM 結果より、脂質処理に伴い PNF 中の細孔の消失が確認されたことから、ニコチンの透過性は細孔特性の変化に由来する可能性も考えられる。そこで、各 PNF の細孔特性を評価した。細孔特性は第 2 章と同様の方法にて、CF と FD-10 の P_{app} を評価し、Renkin 式(式(10)) に導入することで算出した。[92–94] Table 28 には計算に利用した P_{app} 、Table 29 には算出した R と ε/L を示す。[93] 算出した R と ε/L は GMS 処理濃度の増加により減少していた。

したがって、GMS による脂質処理は PLLA/PMHS (1/1) PNF の親水性、PNF 内部の PMHS 領域だけでなく、細孔特性にも影響を与えることで、ニコチンの分配性と拡散性に影響を与え、透過性を変化させたと考えられる。正常および拡張状態の皮膚の細胞間隙経路に関連する R は約 0.5 ~ 40 nm、 ε/L は $3.3 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$ であることが報告されている。[95–97] したがって、PLLA/PMHS (1/1) PNF に対する脂質処理は、ヒト皮膚に対する PLLA/PMHS (1/1) PNF の細孔特性の差を小さくしたといえる。なかでも GMS 60 PNF はヒト皮膚の細胞間隙経路に非常に近い細孔特性を有しており、皮膚のモデル膜として非常に有効な人工高分子膜となる可能性が考えられた。

Table 28. Apparent permeability coefficients (P_{app}) of CF and FD-10 through various PNFs^a

Membrane	GMS 20 PNF	GMS 40 PNF	GMS 60 PNF
Drug	P_{app} (cm/s)	P_{app} (cm/s)	P_{app} (cm/s)
CF	1.15×10^{-6}	5.45×10^{-7}	3.35×10^{-7}
	$\pm 4.49 \times 10^{-7}$	$\pm 2.06 \times 10^{-7}$	$\pm 1.53 \times 10^{-7}$
FD-10	2.61×10^{-7}	7.38×10^{-8}	2.29×10^{-8}
	$\pm 1.27 \times 10^{-7}$	$\pm 9.07 \times 10^{-9}$	$\pm 5.96 \times 10^{-9}$

^aErrors indicate standard deviation (n = 3–4).

Table 29. Characteristic parameters for pore pathways in various PNFs

Membrane	R (nm)	ε/L (cm ⁻¹)
GMS 20 PNF	33.5	0.210
GMS 40 PNF	10.5	0.116
GMS 60 PNF	6.10	0.0850

第4節 小括

本章の結果から、PNF を利用することで Strat-M®と比較して、皮膚透過促進剤の影響を短時間で予想できる人工高分子膜を構築できたといえる。PMHS を利用したポリマーアロイ化はニコチンに対しても T_{lag} の減少をもたらした。また、Azone を除いた皮膚透過促進剤に対する PNF の応答性を改善させることが確認された。これは、ポリマーアロイ化によって皮膚透過促進剤の拡散性と分配性が増加したためと考えられる。一方、PLLA/PMHS (1/1) PNF への GMS による脂質処理は、Strat-M®と比較して優位に短い T_{lag} を損なうことなく、Azone を含めた皮膚透過促進剤に対する PNF の応答性を改善した。特に GMS 60 PNF は精度良く、皮膚の薬物透過性の変化を短時間で予測可能であると結論付けられた (Fig. 56)。その理由としては、脂質処理に伴う PNF 内での GMS 由来の脂質パッキング構造の形成があげられる。また、HSP がヒト皮膚に類似している GMS の組み込みに伴う、皮膚透過促進剤と PNF 間での親和性の改善が要因であることも考えられた。これらの結果より、GMS による脂質処理を施した GMS 60 PNF は、皮膚に対する透過促進剤の影響を短時間で予測可能なモデル膜としての利用が期待できる。さらに、皮膚透過予測のための *in vitro* 透過試験に対する人工高分子膜の需要をさらに高めると期待される。

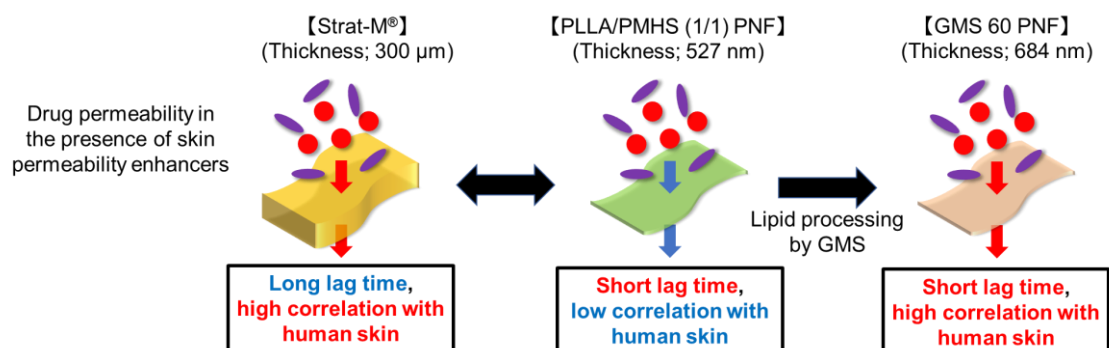


Fig. 56 Lag time of various artificial polymer membranes and similarity of human skin permeation with skin permeation enhancers

結論

本稿では、評価時間の考慮により、薬物透過試験に対する人工高分子膜の有効性を示すため、「薬物の過飽和状態を利用した新規 TTS 開発」と「TTS 開発のための HTS」という、最適な評価時間が異なる2つの研究題目に対し、人工高分子膜を利用して薬物透過性を評価することとした。そして、短時間あるいは長時間にわたる薬物透過試験に対する有効性をそれぞれ検討することで、TTS 開発における評価時間を考慮した人工高分子膜の有効性を提示した。さらに、PNF の薬物透過性の詳細を明らかにすることで、TTS 開発に対する PNF の有効性を提示した。

第1章に示した過飽和状態を利用した新規 TTS 開発においては、24 時間以上の薬物透過評価には材料安定性に優れるシリコーン膜の利用が有効であった。シリコーン膜を利用した 54 時間の透過試験により、結晶化速度の遅い KCZ と結晶成長抑制作用が強力な HPMC の組み合わせは、速度論的溶解度の増加を 54 時間にわたり維持することが確認され、24 時間確実な過飽和状態の維持とそれに伴う安定な皮膚透過促進が期待できる過飽和条件であることが示唆された。さらに、長時間にわたり LLPS 濃度付近で溶解薬物濃度が維持され、 $AUC_{\text{Donor, Dissolved}}$ が増加することは、累積透過量を増加させるのに有効であることが、シリコーン膜の利用により明らかになった。

第2章では TTS 開発のための HTS を想定した、PNF の有効性を検討した。Strat-M[®]と比較して、PLLA PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF は優位に短い T_{lag} を示し、人工高分子膜のナノフィルム化は T_{lag} の短縮に有効であることが確認された。PLLA/PMHS (1/1) PNF は $\log K_{\text{ow}}$ が -4.70 ~ 3.86 の異なる極性を有する薬物に対して、0.0450 時間 ~ 1.34 時間の非常に短い T_{lag} を提供し、精度の高い透過予測が可能であることが確認された。さらに、PNF は Strat-M[®]では短時間での皮膚透過予測が難しい、 $\log K_{\text{ow}} > 3.00$ または $\log K_{\text{ow}} < -2.00$ のような親油性または親水性の非常に高い薬物に対する HTS への利用が有効であることが本研究より考えられた。以上から、TTS 開発のための HTS に利用可能な人工高分子膜であることが明らかになった。

第3章では、PNF は Strat-M[®]と比較して、皮膚透過促進剤の影響を短時間で予想できることが確認された。PMHS を利用したポリマーアロイ化は、Azone を除いた皮膚透過促進剤に対する PNF の応答性を改善させた。その要因として、ポリマーアロイ化による皮膚透過促進剤に対する拡散性と分配性の増加が示唆された。また、PLLA/PMHS (1/1) PNF への GMS による脂質処理は、Strat-M[®]と比較した優位に短い T_{lag} を損なうことなく、Azone を含めた皮膚透過促進剤に対する PNF の応答性を改善した。これは PNF 内における GMS 由来のパッキング構造の形成が、応答性の改善要因であると結論付けた。なかでも GMS 60 PNF は、非常に高い精度での皮膚透過性の予測が可能であり、皮膚透過促進剤の影響を Strat-M[®]よりも短時間で予測可能な PNF であることが明らかになった。

本研究結果より、人工高分子膜であるシリコーン膜は、生体皮膚では推奨されていない 24 時間以上にわたる長時間の薬物透過性評価に対する利用可能性が期待される。そしてシリコーン膜の利用により明らかになった、24 時間確実な透過促進性を示す過飽和条件に関する情報は、今後

新たな TTS 開発をサポートすると考えられる。さらに、新規人工高分子膜である PNF はナノメートルオーダーの非常に薄い膜厚により、短時間の薬物透過性評価に対して、高い有効性が期待される。PNF はポリマーアロイ化や脂質処理に伴う改質により、薬物透過性の制御が可能である。したがって、本研究を基礎として今後の検討により、さらなる高機能性を発現させた PNF の調製が期待でき、TTS 開発における人工高分子膜の需要をさらに引き上げると考えられる。そして、新規人工高分子膜である PNF の詳細な膜特性に関する情報の提示は、動物実験代替法の確立や新規人工皮膚およびナノ絆創膏の創造といった医療材料研究においてもさらなる発展に寄与するものとなる。

謝辞

本研究は、城西大学大学院薬学研究科薬学専攻薬剤学講座にて行われました。本研究を終えるにあたり、ご助力頂きました先生方、城西大学大学院薬学研究科薬学専攻薬剤学講座、城西大学薬学部薬学科薬剤学研究室を修了・在籍中の先輩、学生方、城西大学大学院薬学研究科薬学専攻薬品物理化学講座、城西大学薬学部薬学科薬品物理化学研究室を修了した、同期、先輩、学生方に感謝の意を申し上げます。

城西大学大学院薬学研究科薬剤学講座教授 関 俊暢 先生におかれましては、学部から大学院の9年間、指導教員として終始あたたかいご指導とご鞭撻を賜りました。大学院生活の4年間で研究・臨床・教育に関する能力の向上に努めながら、このように博士論文をまとめるに至れたのは、先生のお力添えによるものであります。ここに深甚なる謝意を表します。

城西大学大学院薬学研究科薬品物理化学講座教授 江川 祐哉 先生におかれましては、学部生時代から研究に関する丁寧かつ熱心なご指導と、本論文作成、学位論文審査にあたり、ご教示とご校閲を賜りました。ここに深謝の意を表します。

城西大学大学院薬学研究科病院薬剤学講座教授 上田 秀雄 先生におかれましては、本研究に際して、経皮吸収に関する専門的は観点から、終始ご指導並びに多大なるご助言を賜りました。ここに深謝の意を表します。

城西大学大学院薬学研究科分子栄養学講座教授 清水 純 先生におかれましては、本研究に際して、研究の応用、実用化の観点から、終始ご指導並びに多大なるご助言を賜りました。ここに深謝の意を表します。

城西大薬学部薬学科薬剤学研究室助教 関 智宏 先生におかれましては、日々のディスカッションを通して、研究の進捗、発表、投稿論文作成などに関して、多大なるご助言を賜りました。このように博士論文をまとめるに至れたのは、先生のお力添えによるものであります。ここに深謝の意を表します。

城西大薬学部薬学科製剤学研究室助教 三木 涼太郎 先生におかれましては、学部生時代に指導教員として、丁寧かつ熱心なご指導と多大なるご助言を賜りました。また、実験の面白さを教えていただき、研究に打ち込むきっかけを与えてくださいました。ここに深謝の意を表します。

城西大学大学院薬学研究科薬粧品動態制御学講座准教授 藤堂 浩明 先生、城西大学薬学部薬学科教育支援室教授 沼尻 幸彦 先生におかれましては、本論文の作成、学位論文審査にあたり、ご指導、ご校閲を賜りました。ここに深謝の意を表します。

城西大学薬学部薬学科教育支援室助教 小島 裕 先生におかれましては、学部生時代から研究や後輩指導に関するご助言を賜りました。ここに深謝の意を表します。

日本赤十字社医療センター薬剤部長 細谷 治 先生、埼玉医科大学病院薬剤部係長 鈴木 善樹 先生、小泉 盛 先生におかれましては、臨床現場経験からの確かな経験と知見に基づき、研究内容へのご指摘や薬に関する専門知識だけでなく、今後、薬剤師として必要な視点、研究の進め方、薬剤師教育の在り方に関する多大なるご助言を賜りました。ここに深謝の意を表します。

最後に、博士課程へ進学する機会を与えてくれ、どんなにつらい時も支え、励まし続けてくれた両親、弟と在学中に亡くなった祖母に心より感謝いたします。

実験の部

第 1 章 実験の部

1-1. 実験材料

KCZ、FP、ANS、*n*-プロピルパラベン、*n*-ブチルパラベンは東京化成工業株式会社(東京、日本)から購入した。りん酸、りん酸二水素ナトリウム・二水和物、りん酸水素二ナトリウム、HPC (M_w 420,000)、1-オクタンスルホン酸ナトリウム、アセトニトリル、1,4-ジオキサン、3-(トリメチルシリル)プロピオン酸ナトリウム-2,2,3,3- d_4 (Sodium 3-(Trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3- d_4 : TMS-Na)は富士フィルム和光純薬株式会社(大阪、日本)、りん酸三ナトリウム・十二水和物はナカライテスク株式会社(京都、日本)から入手した。HPMC (M_w 30,000)はアルファ・エイサー社(マサチューセッツ州、アメリカ)、PVA (M_w 95,000)はアクロス・オーガニクス社(ニュージャージー州、アメリカ)から購入した。D₂O (99.8% D)は関東化学株式会社(東京、日本)、重水酸化ナトリウム (Sodium deuterioxide: NaOD, $\geq 99\%$ D, 30wt% in D₂O) および重塩酸 (Deuterium chloride: DCl, $\geq 99\%$ D, 35wt% in D₂O) はシグマ-アルドリッチ(ミズーリ州、アメリカ)から購入した。ろ過フィルター(孔径 0.45 μm 、オレフィン系ポリマー)はトスク株式会社(東京、日本)、シリコーン膜(厚さ 30 \pm 15 μm)は扶桑ゴム産業株式会社(広島、日本)から購入した。

1-2. 実験動物

雄のヘアレスラット(WBM / ILA-Ht, 8 週齢)は、城西大学(埼玉、日本)の生命科学研究センターから購入した。すべての動物実験は城西大学の倫理委員会によって承認され、委員会の指示に従って実施した。摘出皮膚はヘアレスラットの腹部から摘出し、切除後 1 ヶ月以内に使用した。

1-3. 非イオン形薬物の平衡溶解度の評価

各種薬物の平衡溶解度は、振とうフラスコ法によって決定した。FP および KCZ 粉末を 100 mM PBS に添加し、各種懸濁液を調製した。FP および KCZ の懸濁液は、非イオン形を維持するため、りん酸、りん酸二水素ナトリウム・二水和物およびりん酸水素二ナトリウムを使用して調製した 100 mM PBS (pH 2.00 または pH 7.40) に加え振とうした。懸濁液を 32°C で約 48 時間攪拌することにより平衡化し、ろ過フィルター(孔径 0.45 μm 、オレフィン系ポリマー)でろ過した。ろ液を HPLC にて測定し、平衡溶解度となる濃度を算出した。

1-4. 過飽和溶液の調製

過飽和溶液は、pH-shift法により調製した。過飽和溶液の調製条件は本文中の Table 2 に示す。薬物溶液は、FP または KCZ を 10 mM りん酸三ナトリウムまたは 10 mM りん酸溶液に溶解することで調製した。pH-shift 法として、りん酸、りん酸二水素ナトリウム・二水和物、りん酸水素二ナトリウムを用いて調製した 190 mM PBS と薬物溶液を 1:1 の比率で混合し、薬物溶液の pH を変化させ、過飽和溶液を調製した。過飽和溶液調製時の pH は、FP (pK_a 4.1) では 2.00、KCZ (pK_{a1} 3.6、 pK_{a2} 6.9) では 7.40 に調整することで、十分な割合の非イオン形薬物が生成するようにした。

1-5. 高速液体クロマトグラフィーによる定量分析

モデル薬物の FP および KCZ は、島津 HPLC クラス 10A シリーズ(島津製作所、京都、日本)を使用した HPLC により分析した。LC-10AT ポンプ(島津製作所)は、0.25 mL/min の流量に設定した。SPD-10A UV 検出器(島津製作所)の検出波長は、FP では 245 nm、KCZ では 210 nm に設定した。カラムは逆相 HPLC カラム Mightysil RP-18 GP (150 mm × 2.0 mm id、粒子径 3 μm、関東化学株式会社)およびガードカラム Mightysil RP-18 GP (5 mm × 2.0 mm id、粒子径 3 μm、関東化学株式会社)を使用した。カラム温度は、HIC-6A カラムオーブン(島津製作所)を用いて 45°C に設定した。調製したサンプルは、SCL-6B システムコントローラーと自動注入装置(島津製作所)を使用してフローチャンネルに注入し、薬物濃度は内標準法を利用して決定した。FP は *n*-プロピルパラベン、KCZ は *n*-ブチルパラベンを内標準物質として利用した。FP の測定にはアセトニトリル/水 (50/50) の移動相を使用し、KCZ の測定にはアセトニトリル/水 (30/70) を使用した。20 mM りん酸は各移動相に添加した。6 mM の 1-オクタンスルホン酸ナトリウムは KCZ の定量に用いたアセトニトリル/水 (30/70) に添加した。

1-6 核磁気共鳴スペクトル測定によるフルルビプロフェンのイオン形と非イオン形割合の評価

イオン形と非イオン形の割合は、 ^1H NMR により FP のメチル基に由来した化学シフトの変化を評価することで算出した。測定には Varian 400-MR (アジレント・テクノロジー株式会社、カルフォルニア州、アメリカ)を利用した。pH は pH/ion メーター (F-53、株式会社堀場アドバンスドテクノ、京都、日本) と pH 電極 (9680S-10D、株式会社堀場アドバンスドテクノ) により測定した。本測定において、溶媒は水の代わりに D_2O を使用して、各種溶液を調製した。 D_2O の使用による、pH の変化は式 (1) により補正した。100 μg/mL FP 溶液(溶媒 10 mM りん酸三ナトリウム、pH 11.9、 pH^* 12.4) および 190 mM PBS (pH 1.80、 pH^* 1.52) を調製し、1 対 1 の割合で混合することで 50 μg/mL FP 過飽和溶液を調製した。 ^1H NMR にて調製した 50 μg/mL FP 過飽和溶液を測定し、スペクトルを得た。pH 変化に伴う化学シフトの変化は、10 μg/mL FP 溶液のスペクトルを測定することで評価した。10 μg/mL FP 溶液の pH は、20.5 mg/mL (0.5 M) NaOD 溶液あるいは 18.7 mg/mL (0.5 M) DCl 溶液を加えて調整した。そして、各 pH (pH 1.35~7.86) の 10 μg/mL FP 溶液を ^1H NMR にて測定した。

各測定溶液に内標準として 1,4-ジオキサンを加え、メチレン基由来のピーク(3.75 ppm)を利用し、化学シフトを補正した。FP のイオン形薬物および非イオン形薬物の割合は式(2)、(3)により算出した。

1-7 バイアル実験による 50 µg/mL フルルビプロフェン過飽和溶液の経時的な濃度変化の観察

バイアル内で、50 µg/mL FP 過飽和溶液を調製し、32°Cの条件で経時的にサンプリングを行い、薬物の濃度変化を観察した。過飽和溶液は Table 2 と同様の方法、条件で調製した。サンプル中の薬物濃度は、遠心分離あるいは限外ろ過した後、HPLCにて測定した。遠心分離は himac CT-15RE 卓上微量高速遠心機(日立工機株式会社、東京、日本)にて行った。条件は 21,500 × g、32°C、15 分に設定した。限外ろ過は遠心ろ過デバイス(ナノセップ®、MWCO 10,000、日本ポール株式会社、東京、日本)を利用して行った。サンプルは限外ろ過デバイスに加え、14,000 × g、32°C、15 分の条件で遠心分離することで、限外ろ過を行った。さらに、遠心分離あるいは限外ろ過前の過飽和溶液の薬物状態を光学顕微鏡で観察した。

1-8. 過飽和状態を形成した薬物の透過性評価

フランツ型拡散セルを利用して *in vitro* 透過試験を行った。100 mM PBS (pH 7.40)をレシーバーチャンバーに加え、過飽和溶液または懸濁液をドナーチャンバーに加えた。温度は、サーマルロボ TR-1A(アズワン株式会社、大阪、日本)を利用して 32°Cにコントロールし、有効表面積は 3.14 cm²の条件で測定した。過飽和溶液は、薬物溶液と 190 mM PBS をドナーチャンバー内で 1:1 の比率で混合することにより調製した。摘出皮膚を使用する場合、FP および KCZ 過飽和溶液は 50 µg/mL の濃度に調製した。シリコーン膜を使用する場合は 50~500 µg/mL の KCZ 濃度で過飽和溶液を調製した。さらに、1.00 mg/mL となるように各抗核ポリマー(PVA、HPMC、HPC)を 500 µg/mL KCZ の過飽和溶液に添加した。懸濁液は使用前に約 48 時間平衡化した。過飽和溶液もしくは懸濁液をドナーチャンバーに加えた後、一定量をドナー側とレシーバー側からサンプリングした。サンプル中の薬物濃度は、HPLCにて測定した。本検討では、薬物透過プロファイルの線形部分の傾き(最大勾配)を有効表面積で除することで、 J を計算した。さらに、経時的なドナー側の溶解薬物濃度変化も評価した。ドナー側の過飽和溶液は himac CT-15RE 卓上微量高速遠心機(日立工機株式会社、東京、日本、21500 × g、32°C、15 分)で遠心分離した。そして、上澄みの薬物濃度を HPLCにて測定した。ドナー側の懸濁液はろ過フィルターを使用してろ過した後、ろ液の薬物濃度を HPLCにて測定した。さらに、ドナー側の溶解薬物濃度から、KCZ の $AUC_{Donor, dissolved}$ を線形台形法にて計算した。

1-9. 光学顕微鏡による薬物状態の評価

FP と KCZ の結晶化速度の違いおよび、KCZ から形成された薬物濃厚相と経時的な薬物状態の変化を確認するため、光学顕微鏡にて各種薬物溶液および懸濁液を観察した。観察には、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X810(フィルター 明視野/位相差) (株式会社キーエンス、大阪、日本) を使用した。

1-10. 液-液相分離濃度の測定

LLPS 濃度は Fluorescens 法により決定した。ANS の励起波長は 382 nm とし、KCZ の濃度範囲は 0~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で検討した。過飽和溶液は pH-shift 法により四面透明石英セル内で調製され、pH は 7.40 に調整した。測定時の ANS の濃度は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。測定には 500 rpm のマグネチックスターラーによる攪拌と 32°C の保持温度条件を使用した。過飽和溶液を調製した 20 秒後に各溶液の蛍光スペクトルを測定した。抗核ポリマーの影響を評価する場合、1.00 mg/mL となるように PVA、HPMC または HPC を溶液内に追加した。測定には RF-5300PC 蛍光光度計(島津製作所) と恒温セルホルダー(島津製作所)を使用した。ANS の環境応答性は異なる極性示す溶媒(PBS (pH 7.40)、メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル)に ANS を溶解させることで確認した (Fig. 20)。

1-11. シーディング試験による抗核ポリマーの結晶成長抑制作用の評価

500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KCZ 過飽和溶液の調製時に 1.00 mg/mL の各抗核ポリマー (PVA、HPMC、HPC) および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の KCZ 種結晶を溶液内に共存させた。そして、0.01~6 時間にわたりサンプリングを行い、経時的な溶解薬物濃度の変化を観察した。サンプルは、himac CT-15RE 卓上微量高速遠心機(日立工機株式会社、21,500 \times g、32°C、15 分)を用いて遠心分離した。そして上澄みの薬物濃度を HPLC にて測定した。AUC_{dissolved} は線形台形法を使用して計算した。温度は CN-40A インキュベーター(三菱電機エンジニアリング株式会社、東京、日本)を利用して 32°C に保持した。

1-12. 静的粘度の測定

モジュラーコンパクトレオメータ (MCR 102、株式会社アントンパール、グラーツ、オーストラリア) にて、静的粘度を測定した。温度は高低温サーキュレーター (300F、ユラボジャパン株式会社、大阪、日本) で、32°C に制御した。測定は共軸円筒システムにより実施した。回転速度は 150 rpm に設定し、測定開始 1 分後の粘度を測定した。

1-13. 抗核化ポリマーの薬物濃厚相内への取り込み評価

1.00 mg/mL 抗核化ポリマーの共存下にて 500 µg/mL KCZ 過飽和溶液 (pH 7.40、pH* 7.55) を調製した。そして、Varian 400-MR (アジレント・テクノロジー株式会社) にて ^1H NMR スペクトルを測定した。さらに、KCZ 過飽和非共存下での 1.00 mg/mL 抗核化ポリマー溶液の測定を行った。各種サンプルは、水の代わりに D_2O を用いて調製し、内標準物質として TMS-Na を各サンプルに加え、測定時の化学シフトを補正した。pH* は pH/ion メーター (F-53、株式会社堀場アドバンスドテクノ) と pH 電極 (9680S-10D、株式会社堀場アドバンスドテクノ) により測定し、式 (1) を用いて pH に補正した。

1-14. 統計処理

統計的有意差は Dunnet 検定により評価し、54 時間後の累積透過量と $\text{AUC}_{\text{Donor, dissolved}}$ 間の相関性は、 r を算出して評価した。統計処理には、Bell Curve[®] for Excel (バージョン 3.21、社会情報サービス、東京、日本) を使用した。

第2章 実験の部

2-1. 実験材料

PLLA ($M_w \sim 90,000$) はポリマーサイエンス株式会社(インディアナ州、アメリカ)、PMHS (M_n 1,700~3,200)、ポリ(ジアルリジメチルアンモニウムクロリド) (Poly(diallyldimethylammonium chloride): PDAC)、CF、FD-10 はシグマ-アルドリッチから購入した。ポリエチレングリコール 400、PVA、KP、アセトニトリル、1-オクタンスルホン酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、りん酸、りん酸二水素カリウムは富士フィルム和光純薬株式会社から入手した。FP、IDM、LC、CB、AMP、5-FU、DC-Na、ANP、IPH、DPH、L-DP、テトラ-*n*-ブチルアンモニウム水素硫酸塩、メチルパラベン、エチルパラベン、*n*-プロピルパラベン、*n*-ブチルパラベン、*n*-ヘプチルパラベンは東京化成工業株式会社から購入した。重水素化クロロホルム(Deuterated chloroform: $CDCl_3$, 99.8% D, with 0.03%TMS) は関東化学株式会社から購入した。Strat-M[®]はメルクミリポア(マサチューセッツ州、アメリカ)、ガラスファイバーフィルター(GS-25、孔径 約 1 μ m)はアドバンテック東洋株式会社(東京、日本)から入手した。シリコンウェーハは、武田理化工業株式会社(東京、日本)から購入した。

2-2. スピンコート法を用いたポリマーナノフィルムの調製

各種 PNF はスピンコート法を用いて調製した。Figure 25 に PNF 調製方法の概略を示す。スピナーはオプティコート(MS-B100、ミカサ株式会社、東京、日本)を使用した。シリコン基板は、シリコンウェーハの一边を 3.5 cm 切り出して使用した。溶媒として水を使用し、5 mg/mL PVA / 10 mg/mL PDAC を調製し、犠牲層調製溶液とした。PNF 調製溶液は、40 mg/mL PLLA、30 mg/mL PLLA / 10 mg/mL PMHS、20 mg/mL PLLA / 20 mg/mL PMHS または 15 mg/mL PLLA / 25 mg/mL PMHS を利用した。これら溶液調製時の溶媒にはジクロロメタンを使用した。1 mL の犠牲層調製溶液をシリコン基板上に滴下し、スピナーによって 4,000 rpm および 20 秒の条件下でスピンコートした。そして、70°C、90 秒の条件下で乾燥させた。乾燥工程では、ホットプレート(HSH-1D、アズワン株式会社)を使用した。次に、1 mL の PNF 調製溶液を基板上に滴下し、4,000 rpm、20 秒の条件でスピンコートを施した。そして 70°C、90 秒の条件で乾燥させた。乾燥後、PNF を水中にて剥離し、膜透過試験用の PNF を入手した。調製した PNF はシリコーンリング(扶桑ゴム産業株式会社、内径 20 mm、外径 30 mm)に取り付け、インキュベーター(LWO-600、東京理化工業株式会社、東京、日本)内で 30°C、12 時間の条件で乾燥した。調製した PNF はデシケーター(アズワン株式会社)内に保管し、調製後 2 週間以内に使用した。PNF を取り扱う際、シリコーンリングの部位のみに触れるようにし、PNF の状態(細孔の状態、膜の形態など)に影響を与えないよう注意した。

2-3. フーリエ変換赤外分光法による測定

FT-IR によるスペクトル測定は、フーリエ変換赤外分光光度計 IR Affinity-1 (島津製作所) を使用して行った。測定は液膜法により実施し、窓板には臭ヨウ化タリウム (KRS-5) を使用した。KRS-5 窓板にて各種サンプルを挟み込み、ホルダーにセットした後、波数範囲 $500\sim 4,000\text{ cm}^{-1}$ 、分解 2 cm^{-1} 、積算回数 64 回の条件で測定した。

2-4. 非接触膜厚測定

PNF の膜厚は、PNF 調製溶液をシリコン基板上に直接コーティングした後、膜厚モニター FE-300 (大塚電子株式会社、大阪、日本) を使用して測定した。アルミニウムを基準サンプルとして校正を行い、波長範囲を $450\sim 800\text{ nm}$ に設定し、絶対反射モードで測定した。

2-5. 接触角測定

各種 PNF の表面親水性は接触角測定により評価した。接触角は PNF 調製溶液をシリコン基板上に直接コーティングした後、PHOENIX-I 接触角計 (サーフェイスエレクトロ-optics、京畿道、韓国) にて測定した。接触角は、超純水約 $10\text{ }\mu\text{L}$ を PNF 上に滴下した後、CDC カメラにて撮影後、ヤングラプラス法にて算出した。

2-6. 高速液体クロマトグラフィーによる定量分析

HPLC による定量分析には、第 1 章と同様の HPLC システムを利用した。各種薬物に対応する条件を Table 30 に示す。LC-10AT ポンプの流量は CM および CyA を除いた薬物の分析の際は 0.25 mL/min 、CM および CyA の分析の際は 1.00 mL/min に設定した。分析カラムは、CM および CyA を除いた薬物の分析に、逆相 HPLC カラム Mightysil RP-18GP ($150\text{ mm} \times 2.0\text{ mm i.d.}$ 、粒子径 $3\text{ }\mu\text{m}$ 、関東化学株式会社) およびガードカラム Mightysil RP-18 GP ($5\text{ mm} \times 2.0\text{ mm i.d.}$ 、粒子径 $3\text{ }\mu\text{m}$ 、関東化学株式会社) を使用した。そして、カラム温度は、HIC-6A カラムオープン (島津製作所) を用いて 45°C に設定した。CM および CyA の分析には、逆相 HPLC カラム Mightysil RP-18GPII ($150\text{ mm} \times 4.6\text{ mm i.d.}$ 、粒子径 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、関東化学株式会社) およびガードカラム Mightysil RP-18 GPII ($5\text{ mm} \times 4.6\text{ mm i.d.}$ 、粒子径 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、関東化学株式会社) を使用した。カラム温度は CM の分析では 45°C 、CyA の分析では 70°C に設定した。サンプルは SCL-6B システムコントローラーと自動注入装置 (島津製作所) を使用してフローチャンネルに注入した。薬物の濃度は内標準法を使用して算出した。

Table 30. HPLC measurement conditions for various drugs

Drug	Mobile phase	Detection	Internal Standard
FP	Acetonitrile/water (50/50), 20 mM phosphoric acid	UV 245 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -propyl ester
IDM	Acetonitrile/water (50/50), 20 mM phosphoric acid	UV 210 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -propyl ester
KP	Acetonitrile/water (50/50), 20 mM phosphoric acid	UV 254 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -butyl ester
LC	Acetonitrile/water (33/67), 20 mM phosphoric acid, 6 mM 1-octansulfonic acid sodium	UV 245 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -propyl ester
CB	Acetonitrile/water (35/65), 20 mM phosphoric acid	UV 205 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid ethyl ester
AMP	Acetonitrile/water (40/60), 20 mM phosphoric acid, 5 mM sodium dodecyl sulfate	UV 254 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -propyl ester
5-FU	Acetonitrile/water (20/80), 20 mM phosphoric acid	UV 265 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid methyl ester
DC-Na	Acetonitrile/water (50/50), 20 mM phosphoric acid	UV 286 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -propyl ester
ANP	Acetonitrile/water (30/70), 20 mM phosphoric acid, 5 mM tetra- <i>n</i> -butylammonium hydrogensulfate	UV 245 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid methyl ester
IPH	Acetonitrile/water (45/55), 20 mM phosphoric acid, 5 mM sodium dodecyl sulfate	UV 280 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -propyl ester
DPH	Acetonitrile/water (35/65), 20 mM phosphoric acid, 5 mM sodium dodecyl sulfate	UV 280 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -propyl ester
L-DP	Acetonitrile/water (35/65), 20 mM phosphoric acid, 5 mM sodium dodecyl sulfate	UV 280 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -propyl ester
CM	Acetonitrile/water (35/65), 66.7 mM KH ₂ PO ₄	UV 205 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -propyl ester
CyA	Acetonitrile/water (80/20)	UV 210 nm	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid <i>n</i> -heptyl ester

2-7. *In vitro* 透過試験

PNF の薬物透過性はフランツ型拡散セルを用いた *in vitro* 透過試験で評価した (Fig. 30)。ドナー側には薬物溶液あるいは懸濁液を加え、レシーバー側には蒸留水または 40%ポリエチレングリコール溶液を加えた。 J の算出には、レシーバー側でシンク条件を維持することが必要である。FP、IDM、KP は水への溶解度が非常に低いため、シンク条件を維持するのが困難である。したがって、これまでの報告を参考にこれらの薬物の評価には 40%ポリエチレングリコール溶液を使用し、シンク条件を維持した。[19,83] PNF の薬物透過性を評価する場合、支持体としてガラスファイバーフィルター-GS-25 (アドバンテック東洋株式会社) を使用した。温度はサーマルロボ TR-1A (アズワン株式会社) にて 32°C で保持され、有効表面積は 3.14 cm² の条件で評価した。透過性評価には、12 種類の薬物 ($\log K_{ow}$ -4.70~3.86, M.W. 130~318) を使用した。評価した人工高分子膜は PLLA PNF、PLLA/PMHS (3/1) PNF、PLLA/PMHS (1/1) PNF および Strat-M[®] の 4 種とした。各種薬物の濃度は HPLC 法により定量した。適用した懸濁液の濃度はメンブレンフィルター (孔径 0.45 μ m、オレフィン系ポリマー) でろ過し、ろ液中の薬物濃度を HPLC で測定した。薬物の種類、略語、分子量、 $\log K_{ow}$ 、適用薬物の濃度は本文中の Table 10 に示した。本実験では、便宜上、 $\log K_{ow} \geq 0$ の薬物を親油性薬物とし、 $\log K_{ow} < 0$ の薬物を親水性薬物と定義した。 J は透過プロファイルの定常状態部分から計算され、 P_{app} は J を適用した薬物の初期濃度にて割ることで算出した。 T_{lag} は透過プロファイルの定常勾配と時間軸 (X 軸) の交点から計算した。さらに、式 (7) を使用して DK を計算した。

2-8. ラマン顕微鏡によるポリマー分布の観察

アルミ平板ミラー (シグマ光機株式会社、東京、日本) 上に PNF 調製溶液 (20 mg/mL PLLA / 20 mg/mL PMHS (溶媒 ジクロロメタン)) を 1 mL 滴下し、スピコーターにて 4,000 rpm、20 秒の条件でスピコートした。そして、HSH-1 ホットプレート (アズワン株式会社) を使用して、70°C、90 秒の条件下で乾燥させた。アルミ平板ミラー上に PNF を調製した後、ポリマーの分布を XploRA PLUS ラマン顕微鏡 (株式会社堀場製作所、京都、日本) にて観察した。レーザー波長は 532 nm、取得時間は 3 秒、測定ステップは 0.2 μ m \times 0.2 μ m、合計測定時間は 2 時間の条件にて測定した。マッピング画像は、各成分の参考スペクトルを利用した Classical least squares 解析により入手した。

2-9. 電界放出形走査電子顕微鏡による観察とエネルギー分散型 X 線分光法による分析

膜の形態とポリマーの分布は、FE-SEM と EDS を使用して分析した。装置は電界放出形走査電子顕微鏡 JSM-IT800 (SHL) (日本電子株式会社、東京、日本) を使用した。評価サンプルには、膜透過試験用に準備された各種 PNF を使用した。サンプルは、蒸着法によって白金コーティングを施した。観測の際、加速電圧は 15 kV に設定した。EDS による分析は C、O、Si に関して行った。

2-10. 示差走査熱量測定による熱特性の評価

測定サンプルをアルミニウムパンに封入し、DSC 曲線を取得した。測定には、示差走査熱量計 Thermo Plus EVO DSC8230 (株式会社リガク、東京、日本) を利用した。内標準にはアルミニウムを使用した。PLLA 粉末は、非晶質を形成させるため 2 回の加熱過程を施した。最初の加熱過程では、昇温速度 10°C/min で 20°C から 200°C まで昇温させ、200°C で 1 分間保持した。その後、冷却速度 10°C/min で 20°C まで冷却した後 1 分間保持した。2 回目の加熱過程では、昇温速度 10°C/min で 20°C から 200°C まで昇温させ、DSC 曲線を入力した。PNF はシートあたりの質量が非常に低い。そのため、数枚の PNF を組み合わせて測定サンプルとして使用した。PNF は、1 回の加熱過程にて評価された。DCS 曲線を得るために、温度を 10°C/min の速度で 20°C から 200°C まで昇温させ、熱量変化を測定することで DSC 曲線を入力した。

2-11. 核磁気共鳴スペクトル測定によるポリ(メチルヒドロシロキサン)損失率の評価

PNF 調製時における、PMHS 損失率は ^1H NMR 測定を行うことで計算した。測定サンプルは、膜透過試験用 PNF を各種調製した後、PNF を重ね合わせることで、約 5 mg の PNF 塊を調製した。そして、5 mg/mL となるように CDCl_3 中に溶解させて測定サンプルとした。サンプルは Varian 400-MR (アジレント・テクノロジー株式会社) にて ^1H NMR スペクトルを測定した。入手した ^1H NMR スペクトルから、PMHS の Si-H 基由来ピークの強度を算出し、検量線に当てはめることで、PMHS 濃度を算出した (Fig. 57)。測定の際、1,4-ジオキサンを内標準物質として加え、内標準法にてサンプルの PMHS 濃度を算出した。サンプルの濃度から PMHS の質量を算出後、PNF 調製前の PMHS の質量にて除することで、PMHS 損失率を算出した。

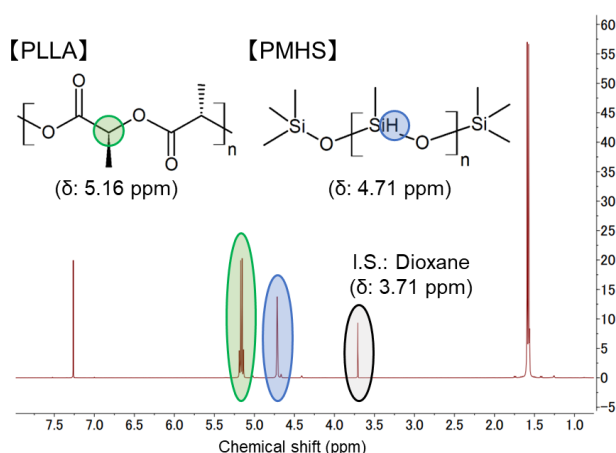


Fig. 57 ^1H NMR spectrum (400 MHz) of PLLA/PMHS (1/1) PNF

2-12. ポリマーナノフィルムの細孔特性の評価

調製された各種 PNF の細孔経路の特徴的なパラメータは、*in vitro* 透過試験にて親水性薬物の P_{app} を評価し、それを Renkin 式(式(10))に当てはめることで計算した。親水性薬物には CF (M.W. 376.3) および FD-10 (平均 M.W. 10,000) を選択して、各種 PNF の透過性を評価した。ドナー側に適用した CF 溶液は 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、FD-10 溶液は 2.00 mg/mL の濃度に調製した。溶媒には 100 mM PBS (pH 7.40) を使用し、レシーバー側は 100 mM PBS (pH 7.40) を満たした。溶液中の親水性薬物の濃度は SpectraMax M2e マイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイス、カルフォルニア州、アメリカ) を使用して測定した。励起波長は 488 nm、測定した蛍光波長は 515 nm に設定した。計算に利用した CF と FD-10 の D_i 、 r_i および P_{app} は Table 15 に示した。

2-13. 統計処理

回帰直線と R^2 は、Excel Office 2019 (バージョン 2203、マイクロソフト、ワシントン州、アメリカ) の分析ツールを使用して決定した。2 つのグループ間の統計的有意差は Dunnett 検定、Tukey-Kramer 検定を使用して評価し、相関性は r を使用して評価した。評価には Excel 用の BellCurve® (バージョン 3.21、株式会社社会情報サービス) を計算に使用した。

第3章 実験の部

3-1. 実験材料

Eucalyptol、TWEEN80 はシグマ-アルドリッチから購入した。GMS、プロピレングリコール、りん酸水素二ナトリウム、りん酸二水素カリウム、塩化ナトリウムは富士フィルム和光純薬株式会社から入手した。ニコチン、NMP、Azone は東京化成工業株式会社から購入した。塩化カリウムは関東化学株式会社から入手した。その他の試薬類は第2章(2-1.)と同じものを用いた。

3-2. スピンコート法を用いたポリマーナノフィルムの調製

実験に利用した PLLA PNF、PLLA/PMHS (3/1) PNF および PLLA/PMHS (1/1) PNF は第2章(2-2.)と同様の装置、条件にて調製した。

3-3. 脂質処理を施したポリマーナノフィルムの調製

PLLA/PMHS (1/1) PNF をシリコン基板上に調製した後、GMS 溶液(溶媒 *n*-ヘキサン/エタノール(2/1))を 1 mL 滴下して、4,000 rpm、20 秒の条件で、オブティコート(MS-B100、三笠株式会社)によりスピンコートした。GMS 溶液の濃度は 20 mg/mL、40 mg/mL、60 mg/mL に調製した。スピンコート後、70°Cおよび 90 秒の条件下で HSH-1D ホットプレート(アズワン株式会社)により乾燥させた。乾燥後、PNF を水中で剥離し、膜透過試験用の脂質処理を施した PNF を入手した。GMS により処理された PNF は、シリコンリング(内径 20 mm、外径 30 mm)に装着し、インキュベーター(LWO-600、東京理化工学株式会社)内で 30°C、12 時間の条件で乾燥した。調製した PNF はデシケーター(アズワン株式会社)内で保管し、2 週間以内に使用した。調製した 20 mg/mL、40 mg/mL または 60 mg/mL GMS 溶液で処理した PLLA/PMHS (1/1)PNF をそれぞれ、GMS 20 PNF、GMS 40 PNF、GMS 60 PNF と記載した。

3-4. フーリエ変換赤外分光法による測定

第2章(2-3.)と同様の装置、条件にて測定した。

3-5. 非接触膜厚測定

第2章(2-4.)と同様の装置、条件にて測定した。

3-6. 接触角測定

第 2 章 (2-5.) と同様の装置、条件にて測定した。

3-7. 高速液体クロマトグラフィーによる測定

ニコチンの濃度は HPLC 法にて定量した。装置は第 2 章 (2-6.) と同様の装置にて測定した。分析カラムには、逆相 HPLC カラム Mightysil RP-18GP (150 mm × 2.0 mm i.d., 粒子径 3 μm, 関東化学株式会社) およびガードカラム Mightysil RP-18 GP (5 mm × 2.0 mm i.d., 粒子径 3 μm, 関東化学株式会社) を利用した。ポンプ (LC-10AT, 島津製作所) の流量は 0.25 mL/min に設定した。移動相には、アセトニトリル/水 (35/65) を使用して、20 mM となるようにりん酸を加えた。カラム温度は、HIC-6A カラムオープン (島津製作所) を用いて 45°C に設定した。UV 検出器 (SPD-10A, 島津製作所) の検出波長は 245 nm に設定した。調製したサンプルは、SCL-6B システムコントローラーと自動注入装置 (島津製作所) を使用してフローチャンネルに注入した。溶液中の薬物濃度は、内標準法を使用して算出した。内標準物質には *n*-エチルパラベンを使用した。

3-8. ニコチンの透過性評価

ニコチンの透過性はフランツ型拡散セルを利用した *in vitro* 透過試験により評価した。評価系の構成は第 2 章 (2-7.) と同様である。ドナー側には 1%ニコチン溶液 (溶媒 プロピレングリコール) を加えた。さらに、皮膚透過促進剤の影響を評価する場合は 1%ニコチン溶液内に 5%の濃度となるように皮膚透過促進剤 (Azone, Eucalyptol, TWEEN80, NMP) を加えた。レシーバー側は pH 7.40 の PBS で満たした。PBS はりん酸水素二ナトリウム、りん酸二水素カリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウムを用いて調製した。PNF の薬物透過性を評価する場合、支持体としてガラスファイバーフィルター GS-25 (アドバンテック東洋株式会社) を使用した。温度はサーマルロボ TR-1A (アズワン株式会社) にて 32°C で保持され、有効表面積は 3.14 cm² の条件で評価した。溶液中のニコチン濃度は HPLC により測定した。各種膜透過パラメータは第 2 章と同様の方法で算出した。

3-9. 膜形態の観察と元素マッピングによるイメージングおよび原子組成比率の評価

各種 PNF の膜形態、Atom% は FE-SEM と EDS を使用して分析した。装置は第 2 章 (2-9.) と同様に、電界放出形走査電子顕微鏡 JSM-IT800 (SHL) (日本電子株式会社) を使用した。サンプルは、蒸着法によって白金コーティングを施した。観測時の加速電圧は 15 kV に設定した。Atom% はエリアモードにて測定された。EDS による分析は C、O、Si に関して行った。

3-10. ポリマーナノフィルムの細孔特性の評価

調製された各種 PNF の細孔経路の特徴的なパラメータは、第 2 章 (2-12.) と同様に *in vitro* 透過試験にて CF、FD-10 の P_{app} を評価し、Renkin 式 (式 (10)) に当てはめることで計算した。測定は第 2 章 (2-12.) と同様の装置、条件にて行った。

3-11. モノステアリン酸グリセロールの特性評価

脂質処理後の GMS 特性は DSC 測定により評価した。装置は、示差走査熱量計 Thermo Plus EVO DSC8230 (株式会社リガク) を利用した。サンプルはアルミニウムパンに封入して測定した。内標準にはアルミニウムを使用した。α-フォームの GMS は、既報を参考に GMS 粉末をホットプレート (HSH-1D、アズワン株式会社) 上で 120°C の条件で溶解し、その後室温まで冷却することで作成した。各サンプルの熱特性は 2 段階の加熱過程により評価した。最初の加熱過程では 10°C/min の昇温速度で、30°C から 90°C まで昇温させ、DCS 曲線を入力した。そして 5 分間、90°C で保持した後、30°C まで 10°C/min の冷却速度で冷却し、30°C で 5 分間保持した。その後、2 回目の加熱過程にて、10°C/min の昇温速度で 30°C から 90°C まで昇温させ、熱量の変化を測定することで 2 つの DCS 曲線を入力した。入手した DCS 曲線から T_m と融解エンタルピー (ΔH_1 、 ΔH_2) を算出し、PNF 中における GMS の E の割合を評価した。 E の算出には式 (15) を利用した。

3-12. 皮膚透過促進剤がモノステアリン酸グリセロールの特性に与える影響の評価

皮膚透過促進剤の添加による GMS 特性の変化は DSC により評価した。膜透過試験用に調製された PLLA/PMHS (1/1) PNF および GMS 60 PNF を、スナップカップ内に加えた 5 mL プロピレングリコール溶液あるいは 5% Azone、Eucalyptol、TWEEN80、NMP 溶液 (溶媒 プロピレングリコール) 中に 32°C の条件下で 1 時間浸漬させた。温度は CN-40A インキュベーター (三菱電機エンジニアリング株式会社) を利用して保持した。浸漬後、各種 PNF を蒸留水で洗浄し、インキュベーター (LWO-600、東京理化学器械株式会社) 内で 30°C、12 時間の条件で乾燥した。乾燥後、PNF をシリコンリングから取り除き、数枚の PNF を組み合わせて測定サンプルとした。サンプルはアルミニウムパン内に封入し、示差走査熱量計 Thermo Plus EVO DSC8230 (株式会社リガク) にて測定し、DSC 曲線を入力した。内標準にはアルミニウムを使用した。加熱過程は 10°C/min の昇温速度で実行され、30°C から 90°C の温度範囲にて測定した。そして、GMS 由来の T_m を評価した。

3-13. 統計処理

統計処理は第 2 章 (2-13.) と同様のソフトウェアを利用して行った。

参考文献

- [1] Prausnitz M. R., Langer R., Transdermal drug delivery, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1261–1268 (2008). <https://doi.org/10.1038/nbt.1504>
- [2] El-Tokhy F. S., Abdel-Mottaleb M. M. A., El-Ghany E. A., Geneidi A. S., Transdermal delivery of second-generation antipsychotics for management of schizophrenia; disease overview, conventional and nanobased drug delivery systems, *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.*, **61**, 1021404 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102104>
- [3] PMDA web site. <https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuSearch/>
- [4] FDA web site. <http://www.accessdata.fda.gov/Scripts/cder/Drugsatfda/>
- [5] Yamaguchi H., Semi-solid dosage forms and transdermal drug delivery system usefulness of topical and systemic patches, *Oleo Science*, **17**, 559–565 (2017). <https://doi.org/10.5650/oleoscience.17.559>
- [6] Watanabe T., 皮膚適用製剤の現状と展望, *Drug Delivery System*, **22**, 450–457 (2007). <https://doi.org/10.2745/dds.22.450>
- [7] Sugino M., Todo H., Sugibayashi K., Skin permeation and transdermal delivery systems of drugs: history to overcome barrier function in the stratum corneum, *YAKUGAKU ZASSHI*, **129**, 1453–1458 (2009). <https://doi.org/10.1248/yakushi.129.1453>
- [8] Bhowmik D., Pusupoleti K. R., Duraivel S., Sampath K. K., Recent approaches in transdermal drug delivery system, *The Pharma. Innovation*, **2**, 99–108 (2013).
- [9] Romita P., Foti C., Calogiuri G., Cantore S., Ballini A., Dipalma G., Inchingolo F., Contact dermatitis due to transdermal therapeutic systems: a clinical update, *Acta. Biomed.*, **90**, 5–10 (2019). <https://doi.org/10.23750/abm.v90i1.6563>
- [10] Pyo S. M., Maibach H. I., Skin metabolism: relevance of skin enzymes for rational drug design, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **32**, 283–293 (2019). <https://doi.org/10.1159/000501732>

- [11] Priyanka M. P., Kinjal P. S., Vipul A. M., Recent advancements in transdermal drug delivery system, *IJPCR*, **10**, 65–73 (2018). <https://ijpcr.com/volume10issue3/>
- [12] Lipinski C. A., Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **44**, 235–249 (2000).
[https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00107-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00107-6)
- [13] Karande P., Mitragotri S., High throughput screening of transdermal formulations, *Pharm. Res.*, **19**, 655–660 (2022). <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015362230726>
- [14] Ayalasonmayajula L. U., Kumari M. K., Earle R. R., An insight into delivery of drug through the skin: transdermal drug delivery system, *RJTC*, **12**, 4–12 (2021).
<https://doi.org/10.52711/2321-5844.2021.00002>
- [15] Sinkó B., Garrigues T. M., Balogh G. T., Nagy Z. K., Tsinman O., Avdeef A., Takács-Novák K., Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **45**, 698–707 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.01.011>
- [16] Ponmozhi J., Dhinakaran S., Varga-medveczky Z., Fónagy K., Bors L. A., Iván K., Erdő F., Development of skin-on-a-chip platforms for different utilizations: factors to be considered, *Micromachines*, **12**, 1–25 (2021). <https://doi.org/10.3390/mi12030294>
- [17] Uchida T., Yakumaru M., Nishioka K., Higashi Y., Sano T., Todo H., Sugibayashi K., Evaluation of a silicone membrane as an alternative to human skin for determining skin permeation parameters of chemical compounds, *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 1338–1346 (2016).
<https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00322>
- [18] Ottaviani G., Martel S., Carrupt P. A., Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability, *J. Med. Chem.*, **49**, 3948–3954 (2006). <https://doi.org/10.1021/jm060230>
- [19] Miki R., Ichitsuka Y., Yamada T., Kimura S., Egawa Y., Seki T., Juni K., Ueda H., Morimoto Y., Development of a membrane impregnated with a poly(dimethylsiloxane)/poly(ethylene glycol) copolymer for a high-throughput screening of the permeability of drugs, cosmetics, and other chemicals across the human skin, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **66**, 41–49 (2015).
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.09.024>

- [20] Haq A., Goodyear B., Ameen D., Joshi V., Michniak-Kohn B., Strat-M[®] synthetic membrane: permeability comparison to human cadaver skin, *Int. J. Pharm.*, **547**, 432–437 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.012>
- [21] Uchida T., Nishioka K., Motoki A., Yakumaru M., Sano T., Todo H., Sugibayashi K., Effect of esters on the permeation of chemicals with different polarities through synthetic artificial membranes using a high-throughput diffusion cell array, *Chem. Pharm. Bull.*, **64**, 1597–1606 (2016). <https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00480>
- [22] Uchida T., Kadhum W. R., Kanai S., Todo H., Oshizaka T., Sugibayashi K., Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M[™], *Eur. J. Pharm. Sci.*, **67**, 113–118 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.11.002>
- [23] Merck millipore web site. https://www.merckmillipore.com/JP/ja/20150505_165407
- [24] Leveque N., Raghavan S. L., Lane M. E., Hadgraft J., Use of a molecular form technique for the penetration of supersaturated solutions of salicylic acid across silicone membranes and human skin in vitro, *Int. J. Pharm.*, **318**, 49–54 (2006).
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.03.015>
- [25] Davis A. F., Hadgraft J., Effect of supersaturation on membrane transport: 1. hydrocortisone acetate, *Int. J. Pharm.*, **76**, 1–8 (1991). [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90337-N](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90337-N)
- [26] Hou H., Siegel R., Enhanced permeation of diazepam through artificial membranes from supersaturated solutions, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 896–905 (2006).
<https://doi.org/10.1002/jps.20600>
- [27] Iervolino M., Raghavan S. L., Hadgraft J., Membrane penetration enhancement of ibuprofen using supersaturation, *Int. J. Pharm.*, **198**, 229–238 (2000).
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00346-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00346-X)
- [28] Kumprakob U., Kawakami J., Adachi I., Permeation enhancement of ketoprofen using a supersaturated system with antinucleant polymers, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1684–1688 (2005).
<https://doi.org/10.1248/bpb.28.1684>

- [29] Toyada H., Regulation of the animal experiments and testing in EU, *Environ. Mutagen Res.*, **27**, 125–128 (2005). <https://doi.org/10.3123/jems.27.125>
- [30] Pérez-Madrigal M. M., Armelin E., Puiggali J., Alemán C., Insulating and semiconducting polymeric free-standing nanomembranes with biomedical applications, *J. Mater. Chem. B.*, **3**, 5904–5932 (2015). <https://doi.org/10.1039/C5TB00624D>
- [31] Fujie T., Development of free-standing polymer nanosheets for advanced medical and health-care applications, *Polym. J.*, **48**, 773–780 (2016). <https://doi.org/10.1038/pj.2016.38>
- [32] Moreira J., Vale A. C., Alves N. M., Spin-coated freestanding films for biomedical applications, *J. Mater. Chem. B.*, **9**, 3778–3799 (2021). <https://doi.org/10.1039/D1TB00233C>
- [33] Yilgör E., Yilgör I., Silicone containing copolymers: synthesis, properties and applications, *Prog. Polym.*, **39**, 1165–1195 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.003>
- [34] Wolf M. P., Salieb-Beugelaar G. B., Hunziker P., PDMS with designer functionalities—properties, modifications strategies, and applications, *Prog. Polym.*, **83**, 97–134 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.06.001>
- [35] OECD. Test No. 428: Skin absorption: in vitro method, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4, OECD publishing; 2004. <https://doi.org/10.1787/9789264071087-en>
- [36] Inoue K., Ogawa K., Okada J., Sugibayashi K., Enhancement of skin permeation of ketotifen by supersaturation generated by amorphous form of the drug, *J. Control. Release.*, **108**, 306–318 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.08.008>
- [37] Leichtnam M. L., Rolland H., Wüthrich P., Guy R. H., Enhancement of transdermal testosterone delivery by supersaturation, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 2373–2379 (2006). <https://doi.org/10.1002/jps.20669>
- [38] Chavda D., Chavda S., Patel J., Chauhan P., Gandhi T., Supersaturated drug delivery system: a novel technique to overcome lacunas of topical formulation, *Sys. Rev. Pharm.*, **13**, 324–333 (2022).

- [39] Gordon L. A., Hans L., Vinod P. S, John R. C., A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vitro* bioavailability, *Pharm. Res.*, **12**, 413–420 (1995). <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1016212804288>
- [40] Ahad A., Al-Saleh A. A., Akhtar N., Al-Mohizea A. M., Al-Jenoobi F. I., Transdermal delivery of antidiabetic drugs: formulation and delivery strategies, *Drug Discovery Today*, **20**, 1217–1227 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.06.002>
- [41] Baghel S., Cathcart H., O'Reilly N. J., Polymeric amorphous solid dispersions: a review of amorphization, crystallization, stabilization, solid-state characterization, and aqueous solubilization of biopharmaceutical classification system class II drugs, *J. Pharm. Sci.*, **9**, 2527–2544 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2015.10.008>
- [42] Chatterjee B., Reddy A., Santra M., Khamanga S., Amorphization of drugs for transdermal delivery-a recent update, *Pharmaceutics*, **14**, 983 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050983>
- [43] Williams A. C., Barry B. W., Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 128–137 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.032>
- [44] Prausnitz M. R., Bosset V. G., Langer R., Weavert J. C., Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 10504–10508 (1993). <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10504>
- [45] Park D., Park H., Seo J., Lee S., Sonophoresis in transdermal drug deliveries, *Ultrasonics*, **54**, 56–65 (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.2013.07.007>
- [46] Zeng L., Huang F., Zhang Q., Liu J., Quan D., Song W., Molecular perspective of efficiency and safety problems of chemical enhancers: bottlenecks and recent advances, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **12**, 1376–1394 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13346-021-01044-y>
- [47] Denet A. R., Vanbever R., Pr at V., Skin electroporation for transdermal and topical delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 659–674 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.027>
- [48] Merino G., Kalia Y. N., Guy R. H., Ultrasound-enhanced transdermal transport, *J. Pharm. Sci.*, **92**, 1125–1137 (2003). <https://doi.org/10.1002/jps.10369>

- [49] Mellaerts R., Mols R., Kayaert P., Annaert P., Van H. J., Van M. G., Martens J. A., Augustijns P., Ordered mesoporous silica induces pH-independent supersaturation of the basic low solubility compound itraconazole resulting in enhanced transepithelial transport, *Int. J. Pharm.*, **357**, 169–179 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.049>
- [50] Sugihara H., Taylor L. S., Evaluation of pazopanib phase behavior following pH-induced supersaturation, *Mol. Pharm.*, **15**, 1690–1699 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00081>
- [51] Sakhare S. D., Anand V. S.K., Karan A., Sree K. N., Vasantharaju S. G., Pai G., Dengale S. J., The assessment of pH-induced supersaturation and impact of an additional drug on the solution phase behavior of saquinavir, *J. Pharm. Innov.*, **14**, 305–315 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12247-018-9357-6>
- [52] Ilevbare G. A., Liu H., Edgar K. J., Taylor L. S., Maintaining supersaturation in aqueous drug solutions: impact of different polymers on induction times, *Cryst. Growth Des.*, **13**, 740–751 (2013). <https://doi.org/10.1021/cg301447d>
- [53] Chavan R. B., Thipparaboina R., Kumar D., Shastri N. R., Evaluation of the inhibitory potential of HPMC, PVP and HPC polymers on nucleation and crystal growth, *RSC Adv.*, **6**, 77569–77576 (2016). <https://doi.org/10.1039/c6ra19746a>
- [54] Ebert C. D., Heiber W., Andriola R., Williams P., Development of a novel transdermal system design, *J. Control Release*, **6**, 107–111 (1987). [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90068-X)
- [55] Kurihara-Bergstrom T., Good W. R., Feisullin S., Signor C., Skin compatibility of transdermal drug delivery systems, *J. Control Release*, **15**, 271–277 (1991). [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90119-X](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90119-X)
- [56] Karlson B. W., Henning R., Comparison of nitroglycerin-TTS and long-acting nitroglycerin tablets in the treatment of angina pectoris: a double-blind controlled study, *Clin. Cardiol.*, **10**, 573–577 (1987). <https://doi.org/10.1002/clc.4960101012>

- [57] Jane E. S., Pharmacokinetics of nitroglycerin and clonidine delivered by the transdermal route, *Am. Heart J.*, **108**, 217–223 (1984). [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(84\)90578-7](https://doi.org/10.1016/0002-8703(84)90578-7)
- [58] Margetts L., Sawyer R., Transdermal drug delivery: principles and opioid therapy, *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, **7**, 171–176 (2007).
<https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkm033>
- [59] Clarysse S., Psachoulias D., Brouwers J., Tack J., Annaert P., Duchateau G., Reppas C., Augustijns P., Postprandial changes in solubilizing capacity of human intestinal fluids for BCS class II drugs, *Pharm. Res.*, **26**, 1456–1466 (2009).
<https://doi.org/10.1007/s11095-009-9857-7>
- [60] Usta D. Y., Teksin Z. Ş., Evaluation of in vitro dissolution characteristics of flurbiprofen, a BCS class IIa drug, *FABAD J. Pharm. Sci.*, **43**, 27–34 (2018).
- [61] Raina S. A., Zhang G. G. Z., Alonzo D. E., Wu J., Zhu D., Catron N. D., Gao Y., Taylor L. S., Enhancements and limits in drug membrane transport using supersaturated solutions of poorly water soluble drugs, *J. Pharm. Sci.*, **103**, 2736–2748 (2014). <https://doi.org/10.1002/jps.23826>
- [62] Swarbrick J., Lee G., Brom J., Gensmantel N. P., Drug permeation through human skin II: permeability of ionizable compounds, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1352–1355 (1984).
<https://doi.org/10.1002/jps.2600731006>
- [63] Gift A. D., Stewart S. M., Kwete B. P., Experimental determination of pK_a values by use of NMR chemical shifts, revisited, *J. Chem. Educ.*, **89**, 1458–1460 (2012).
<https://doi.org/10.1021/ed200433z>
- [64] Bezençon J., Wittwer M. B., Cutting B., Smieško M., Wagner B., Kansy M., Ernst B., pK_a determination by ¹H NMR spectroscopy – An old methodology revisited, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **93**, 147–155 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.12.014>
- [65] Krężel A., Bal W., A formula for correlating pK_a values determined in D₂O and H₂O, *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 161–166 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2003.10.001>

- [66] Blaabjerg L. I., Lindenberg E., Löbmann K., Grohganz H., Rades T., Is there a correlation between the glass forming ability of a drug and its supersaturation propensity?, *538*, 243–249 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.013>
- [67] Mullin J. W., “Crystallization,” 4th ed. by Mullin J. W., Butterworth-Heinemann, Oxford, 2001, pp. 181–215.
- [68] Van E. B., Raina S., Hsieh Y. L., Augustijns P., Taylor L. S., Classification of the crystallization behavior of amorphous active pharmaceutical ingredients in aqueous environments, *Pharm. Res.*, **31**, 969–982 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1216-z>
- [69] Dall’oglio F., Nasca M. R., Gerbino C., Micali G., An overview of the diagnosis and management of seborrheic dermatitis, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatology*, **15**, 1537–1548 (2022). <https://doi.org/10.2147/CCID.S284671>
- [70] Huang Y. C., Colaizzi J. L., Bierman R. H., Woestenborghs R., Heykants A. J., Pharmacokinetics and dose proportionality of ketoconazole in normal volunteers, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**, 206–210 (1986). <https://doi.org/10.1128/AAC.30.2.206>
- [71] Lee S. J., Kurihara-Bergstrom T., Kim S. W., Ion-paired drug diffusion through polymer membranes, *Int. J. Pharm.*, **47**, 59–73 (1987). [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(87\)90199-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(87)90199-2)
- [72] Smith J. C., Irwin W. J., Ionisation and the effect of absorption enhancers on transport of salicylic acid through silastic rubber and human skin, *Int. J. Pharm.*, **210**, 69–82 (2000). [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00561-5](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00561-5)
- [73] Valenta C., Auner B. G., The use of polymers for dermal and transdermal delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **58**, 279–289 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.02.017>
- [74] Ueda K., Higashi K., Moribe K., Direct NMR monitoring of phase separation behavior of highly supersaturated nifedipine solution stabilized with hypromellose derivatives, *Mol. Pharm.*, **14**, 2314–2322 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00178>

- [75] Raina S. A., Alonzo D. E., Zhang G. G. Z., Gao Y., Taylor L. S., Using environment-sensitive fluorescent probes to characterize liquid-liquid phase separation in supersaturated solutions of poorly water soluble compounds, *Pharm. Res.*, **32**, 3660–3673 (2015).
<https://doi.org/10.1007/s11095-015-1725-z>
- [76] Uchiyama S., Kimura K., Gota C., Okabe K., Kawamoto K., Inada N., Yoshihara T., Tobita S., Environment-sensitive fluorophores with benzothiadiazole and benzoselenadiazole structures as candidate components of a fluorescent polymeric thermometer, *Chem. Eur. J.*, **18**, 9552–9563 (2012). <https://doi.org/10.1002/chem.201200597>
- [77] Wyatt V. T., The effects of solvent polarity and pK_a on the absorption of solvents into poly(glutaric acid-glycerol) films, *J. Appl. Polym. Sci.*, **131**, 40434 (2014).
<https://doi.org/10.1002/app.40434>
- [78] Wang K., Wu Y., Chi Z., Shu C., Li L., Wei J., Tao L., Ma P., Ding L., A highly sensitive LC–MS/MS method for determination of ketoconazole in human plasma: Application to a clinical study of the exposure to ketoconazole in patients after topical administration, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **128**, 504–509 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.025>
- [79] Flynn G. L., Yalkowsky S. H., Roseman T. J., Mass transport phenomena and models: theoretical concepts, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 479–510 (1974).
<https://doi.org/10.1002/jps.2600630403>
- [80] Okamura Y., Kabata K., Kinoshita M., Saitoh D., Takeoka S., Free-standing biodegradable poly(lactic acid) nanosheet for sealing operations in surgery, *Adv. Mater.*, **21**, 4388–4392 (2009). <https://doi.org/10.1002/adma.200901035>
- [81] Hatanaka T., Saito T., Fukushima T., Todo H., Sugibayashi K., Umehara S., Takeuchi T., Okamura Y., Potential of biocompatible polymeric ultra-thin films, nanosheets, as topical and transdermal drug delivery devices, *Int. J. Pharm.*, **565**, 41–49 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.059>
- [82] Baxamusa S. H., Stadermann M., Aracne-Ruddle C., Nelson A. J., Chea M., Li S., Youngblood K., Suratwala T. I., Enhanced delamination of ultrathin free-standing polymer films via self-limiting surface modification, *Langmuir*, **30**, 5126–5132 (2014).
<https://doi.org/10.1021/la5011665>

- [83] Hatanaka T., Inuma M., Sugibayashi K., Morimoto Y., Prediction of skin permeability of drugs. I. comparison with artificial membrane, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3452–3459 (1990).
<https://doi.org/10.1248/cpb.38.3452>
- [84] Morimoto Y., Hatanaka T., Sugibayashi K., Omiya H., Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 634–639 (1992).
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1992.tb05484.x>
- [85] Fox T. G., Influence of diluent and of copolymer composition on the glass temperature of a polymer system, *Bull. Am. Phys. Soc.*, **1**, 123 (1956).
- [86] Baiardo M., Frisoni G., Scandola M., Rimelen M., Lips D., Ruffieux K., Wintermantel E., Thermal and mechanical properties of plasticized poly(L-lactic acid), *J. Appl. Polym. Sci.*, **90**, 1731–1738 (2003). <https://doi.org/10.1002/app.12549>
- [87] Zhang G., Zhang J., Zhou X., Shen D., Miscibility and phase structure of binary blends of polylactide and poly(vinylpyrrolidone), *J. Appl. Polym. Sci.*, **88**, 973–979 (2003).
<https://doi.org/10.1002/app.11735>
- [88] Chan W. Y., Hillmyer M. A., Disordered triblock polymers for nanoporous materials with tunable surface properties for ultrafiltration applications, *ACS Appl. Polym. Mater.*, **4**, 8009–8020 (2022). <https://doi.org/10.1021/acspapm.2c00065>
- [89] Inoue Y., Atsumi Y., Kawamura A., Miyata T., Thermoresponsive liquid crystalline polymer membranes that undergo phase transition at body temperature, *J. Membr. Sci.*, **558**, 117213 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117213>
- [90] George S. C., Thomas S., Transport phenomena through polymeric systems, *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 985–1017 (2001). [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00036-8)
- [91] Fujimori J., Yoshihashi Y., Yonemochi E., Terada K., Application of eudragit RS to thermo-sensitive drug delivery systems: II. effect of temperature on drug permeability through membrane consisting of eudragit RS/PEG 400 blend polymers, *J. Control Release*, **102**, 49–57 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.09.027>

- [92] Seki T., Harada S., Hosoya O., Morimoto K., Juni K., Evaluation of the establishment of a tight junction in caco-2 cell monolayers using a pore permeation model involving two different sizes, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 163–166 (2008). <https://doi.org/10.1248/bpb.31.163>
- [93] Hosoya O., Chono S., Saso Y., Juni K., Morimoto K., Seki T., Determination of diffusion coefficients of peptides and prediction of permeability through a porous membrane, *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 1501–1507 (2010). <https://doi.org/10.1211/0022357044878>
- [94] Seki T., Kiuchi T., Seto H., Kimura S., Egawa Y., Ueda H., Morimoto Y., Analysis of the rat skin permeation of hydrophilic compounds using the renkin function, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1915–1918 (2010). <https://doi.org/10.1248/bpb.33.1915>
- [95] Aguilera V., Kontturi K., Murtomäki L., Ramirez P., Estimation of the pore size and charge density in human cadaver skin, *J. Control Release*, **32**, 249–257 (1994). [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)90235-6)
- [96] Cevc G., Vierl U., Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal, *J. Control Release*, **141**, 277–299 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.016>
- [97] Kasting G. B., Miller M. A., LaCount T. D., Jaworska J., A composite model for the transport of hydrophilic and lipophilic compounds across the skin: steady-state behavior, *J. Pharm. Sci.*, **108**, 337–349 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.09.007>
- [98] Avdeef A., Nielsen P. E., Tsinman O., PAMPA - a drug absorption in vitro model: 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **22**, 365–374 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.04.009>
- [99] Alberti M., Dancik Y., Sriram G., Wu B., Teo Y. L., Feng Z., Bigliardi-Qi M., Wu R. G., Wang Z. P., Bigliardi P.L., Multi-chamber microfluidic platform for high-precision skin permeation testing, *Lab on a Chip*, **17**, 1625–1634 (2017). <https://doi.org/10.1039/c6lc01574c>
- [100] Nielsen P. E., Avdeef A., PAMPA - a drug absorption in vitro model: 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **22**, 33–41 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.02.003>

- [101] Jurado A., Pujades E., Walther M., Diaz-Cruz M. S., Occurrence, fate, and risk of the organic pollutants of the surface water watch list in european groundwaters: a review, *Environ. Chem. Lett.*, **20**, 3313–3333 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01441-w>
- [102] Tayar N. E., Mark A. E., Vallat P., Brunne R. M., Testa B., van Gunstren W. F., Solvent-dependent conformation and hydrogen-bonding capacity of cyclosporin a: evidence from partition coefficients and molecular dynamics simulations, *J. Med. Chem.*, **36**, 3757–3764 (1993). <https://doi.org/10.1021/jm00076a002>
- [103] Richard R. S., William O. M., Azone[®]: a new non-toxic enhancer of cutaneous penetration, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **9**, 725–744 (1983). <https://doi.org/10.3109/03639048309044701>
- [104] Barry B. W., Mode of action of penetration enhancers in human skin, *J. Control Release.*, **6**, 85–97 (1987). [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90066-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90066-6)
- [105] Xia D., Cui F., Gan Y., Mu H., Yang M., Design of lipid matrix particles for fenofibrate: effect of polymorphism of glycerol monostearate on drug incorporation and release, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **103**, 697–705 (2014). <https://doi.org/10.1002/jps.23830>
- [106] Yajima T., Itai S., Takeuchi H., Kawashima Y., Determination of optimum processing temperature for transformation of glyceryl monostearate, *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1430–1433 (2002). <https://doi.org/10.1248/cpb.50.1430>
- [107] Ali S., Tiwari A., Yeoh T., Doshi P., Kelkar N., Shah J. C., Seth J. R., Crystallization and rheology of mono- and diglycerides and their role in stabilization of emulsion droplets in model topical, *Langmuir*, **38**, 8502–8512 (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c00202>
- [108] Abbott S., An integrated approach to optimizing skin delivery of cosmetic and pharmaceutical actives, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **34**, 217–222 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00710.x>
- [109] Nuruddin M., Hamlin J., Clarkson C. M., Howarter J. A., Szczepanski C. R., Youngblood J. P., Processing and characterization of food-grade plasticizer-compatible cellulose nanocrystals and ethylene vinyl alcohol copolymer nanocomposites, *ACS Appl. Polym. Mater.*, **3**, 5000–5011 (2021). <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00756>

- [110] Pastore M. N., Kalia Y. N., Horstmann M., Roberts M. S., Transdermal patches: history, development and pharmacology, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 2179–2209 (2015).
<https://doi.org/10.1111/bph.13059>
- [111] Ke H., Li D., Wang X., Wang H., Cai Y., Xu Y., Huang F., Wei Q., Thermal and mechanical properties of nanofibers-based form-stable PCMs consisting of glycerol monostearate and polyethylene terephthalate, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **114**, 101–111 (2013).
<https://doi.org/10.1007/s10973-012-2856-7>