

スイッチングイオントフォレシスによるグリベンクラミドの経皮吸収促進効果の検討

高橋由里,^{*,a,b} 岩田政則,^{a,b} 町田良治^b
横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター薬剤部,^a
星薬科大学医療薬剤学教室,^b

Enhancing Effect of Switching Iontophoresis on Transdermal Absorption of Glibenclamide

Yuri TAKAHASHI,^{*,a,b} Masanori IWATA,^{a,b} and Yoshiharu MACHIDA^b
Department of Pharmacy, Yokohama City University Medical Center,^a 4-57, Urafune-cho, Minami-ku,
Yokohama 232-0024, Japan and Department of Drug Delivery Research, Hoshi University,^b
2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

(Received August 1, 2000; Accepted November 24, 2000)

Glibenclamide (GLI) is widely used as an oral hypoglycemic drug in the treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). We investigated the enhancing effect of switching iontophoresis on the transdermal absorption and reduction of skin irritation to develop a transdermal dosage form of GLI. The 0.1% of GLI suspensions in 0.2 M tris-HCl buffer of pH 7.4, 8.0 and 8.5 were prepared as donor solutions. We examined drug permeation through the excised rat abdominal skin, drug absorption in rats and reduction of skin irritation after application of switching iontophoresis for 1 h using DC 10 V. The solubility of GLI in 0.2 M tris-HCl buffer increased with a rise in pH. In the permeation study, GLI was permeated continuously and the cumulative amount of permeated GLI increased using an alkaline donor solution. In the drug absorption study, the application group of pH 8.5 gave higher plasma concentration levels than those of pH 7.4 and 8.0 groups. The skin irritation evoked by the application of iontophoresis was pathologically studied. A total irritation score (TIS) was estimated as a judging standard for the skin damage. The TIS value increased dependently with a rise in pH. However, it was considered that the skin irritations were not serious and small matters. The results demonstrate the possibility of iontophoretic transdermal administration of GLI and the effect of drug solubility in the donor solution on the absorption of GLI.

Key words—glibenclamide; transdermal dosage form; switching iontophoresis; skin irritation

緒言

グリベンクラミド (GLI)¹⁾は、インスリン非依存型糖尿病患者の治療において、経口投与で用いられる薬剤であり、スルフォニル尿素系薬剤 (SU 剤) の中では最も汎用されている。SU 剤は長期にわたり、安定した血糖維持のために服用されている。近年、全身投与を目的とした経皮吸収型製剤^{2,3)}が開発され、長時間安定した血中薬物濃度の維持が可能となり、臨床治療において広く使用されている。そこで著者らは、安定した血中濃度維持のために GLI の経皮吸収に着目した。GLI の経皮吸収性については、半固形外用剤にすることで、皮膚を透過することを既に報告した。⁴⁾

イオントフォレシスは、皮膚に電位差をかけることにより、電気的環境を変え、イオン性薬物の電気化学的ポテンシャルを上昇させて、薬物を能動的に送りこむシステムである。イオントフォレシスによる透過促進の機構として、電位勾配が与えられることによる、イオン化された薬物分子の推進力の増加、⁵⁾ 電流によって引き起こされる溶媒流、⁶⁻⁹⁾ 電流

によって起こる皮膚抵抗の減少などの皮膚特性の変化¹⁰⁻¹³⁾などが知られている。本研究では、薬物の皮膚透過性を改善する目的で、GLI のイオントフォレシスによる経皮吸収促進効果に注目した。イオントフォレシスの問題点として、通電による皮膚への刺激、皮膚の分極による薬物透過性の低下などが挙げられる。その問題を軽減するため、今回著者らは定期的に電流の方向を逆転させるスイッチング方式イオントフォレシス¹⁴⁾を採用し、イオントフォレシスが皮膚に与える刺激性についても検討した。

実験の部

1. 試薬及び試料

グリベンクラミドは Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。アセトニトリルは和光純薬社製の高速液体クロマトグラフ用を用いた。その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

2. 使用動物

In vitro 皮膚透過実験及び、*in vivo* 実験において、Wistar 系雄性ラット (体重 290 g~340 g) を東京実験動物株式会社より購入し使用した。

3. ドナー溶液の調製

pH 7.4, 8.0, 8.5 の 0.2 M トリス-塩酸緩衝液を用い、GLI の 0.1% 懸濁液をドナー溶液として調製した。調製は、ドナー溶液の粘性を高め GLI の分散を均一にする目的で、0.5% ヒドロキシプロピルセルロースを加えたトリス-塩酸緩衝液に GLI を添加した後、24 時間攪拌することにより行った。

4. 溶解度の測定

GLI が水に難溶性であることから、pH 7.4, 8.0 及び 8.5 の 0.2 M トリス-塩酸緩衝液への GLI の溶解度を測定した。各緩衝液 50 ml 中に GLI をそれぞれ 0.1 g ずつ加え、24 時間室温で攪拌した後、溶液中薬物濃度を分光光度計 (島津製作所 UV2000) により波長 228 nm における吸光度から測定した。溶液中の GLI 濃度はあらかじめ作成した検量線より算出した。

5. *In vitro* 皮膚透過実験

5-1. 電極並置型セル Fig. 1 に示すようなアクリル製の電極並置型セルを用いて実験を行った。露出部の皮膚の大きさは 3.0 cm × 6.5 cm であり、皮膚上にガラス製の電極セル (内径 2.2 cm, 適用面積 3.8 cm²) を 2 つ並置し、両電極とした。本研究ではスイッチングを行うため、両電極セル下に薬物を含むドナー溶液を注入した。電極は、直径 2.0 cm, 厚さ 0.1 mm の白金円板を使用し、0.05% 塩化ナトリウムを含む 1.0% 寒天ゲルで固定した。(Fig. 2)

5-2. 皮膚透過実験 ラットをエーテル過麻酔により安楽死させ、除毛した腹部皮膚を摘出し、電極並置型セルに装着した。

皮膚上に電極セルを接着剤 (アロンアルファ A 「三共」, 東亜合成株式会社製) で固定し、接着剤が

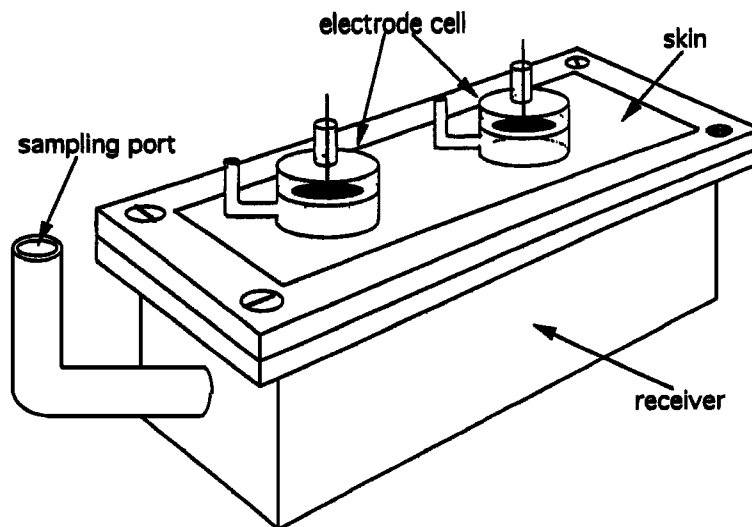


Fig. 1. Schematic Representation of Diffusion Cell Used for Permeation Studies

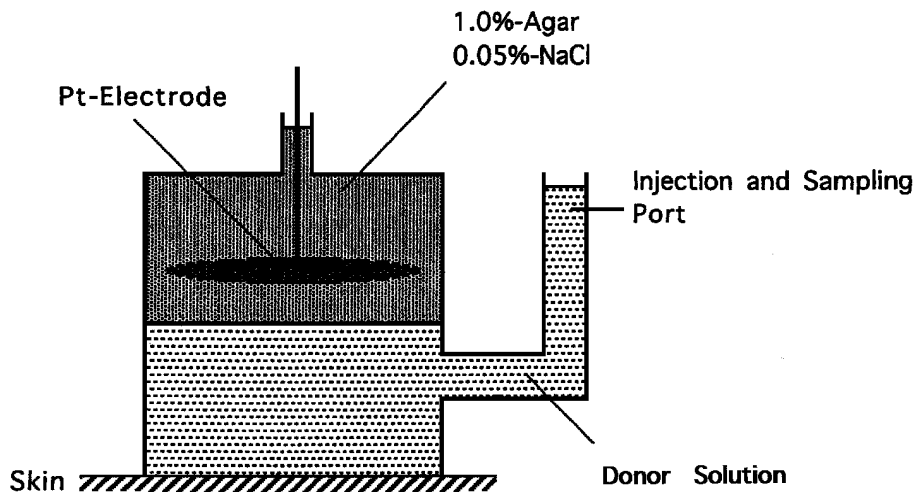


Fig. 2. Schematic Representation of Electrode Cell Used for Permeation Studies

完全に乾いた後、寒天層下にドナー溶液として0.1% GLI懸濁液を注入した。レシーバー側には、pH 7.4リン酸緩衝液を満たし、攪拌しながら37°Cに保った。また、溶液の蒸発による誤差を防ぐために、サンプリングポートはパラフィルムで密栓した。

次に、両極間にプログラマブル直流電圧/電流源(R6145, 株式会社アドバンテスト製)により10Vの直流低電圧を印加し、10分間隔のスイッチング方式で、イオントフォレシスを実験開始直後から1時間適用した。サンプリングは0.5, 1, 2, 4時間後にレシーバー溶液を約1ml採取し、GLIの皮膚透過量を測定した。サンプリング後はレシーバー溶液の量を一定にするため、同量のpH 7.4リン酸緩衝液を補充した。試験は3回行い、その平均値を算出した。

5-3. グリベンクラミド透過量の測定 採取したサンプルを、液体クロマトグラフィー用フィルターユニット(エキクロディスク13, 0.45 μ m, ゲルマンサイエンスジャパン株式会社)で濾過後、サンプル中のGLI量をEmilssonらの方法¹⁾に準拠して高速液体クロマトグラフィー(クロマトグラフ: LC-6AD, クロマトパック: C-R7A plus, 検出器: SPD-10AV, いずれも島津製作所製)により定量した。HPLCの測定条件を以下に示す。

検出波長: 228 nm

カラム: 内径4.6 mm, 長さ250 mmのODSカラム (NEOPACK, 西尾工業株式会社製)

カラム温度: 室温

移動相: 0.01 M pH 3.5リン酸緩衝液/アセトニトリル (50/50)

流速: 1.6 ml/min

試料注入量: 80 μ L

5-4. ドナー溶液のpH測定

ドナー溶液のpHが通電により変化することが考えられるため試験開始4時間後の薬物溶液のpHをpHメーター(pH BOY-P2, 新電元工業株式会社製)を用いて測定した。

6. *In vivo* 実験

6-1. 経皮吸収実験 ラットを25%ウレタン生理食塩水で麻酔し(3 ml/kg, i.p.), 背位固定して腹部を除毛した後、5-1.と同様の一組の電極セルを除毛した腹部に接着剤で固定し、接着剤が完全に乾いた後、薬物を含むドナー溶液を寒天層下に注入した。次に、皮膚透過実験と同様の条件で、10分間隔のスイッチングイオントフォレシスを1時間行った。試験開始1, 2, 4時間後にラットの頸静脈より血液約1 mlを採取し、3000 rpm, 5分間の遠心分離により、血漿を分取した。血漿中のGLI濃度はHPLC法により測定した。実験は3回行い、その平均値を算出した。また、0.1% GLI含有pH 0.2 M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)をドナー溶液として

用い、一組の電極セルを除毛したラットの腹部に固着し、通電を行わずに1, 2, 4時間後にラットの頸静脈より採血し血漿中のGLI濃度を測定した。

6-2. 血漿中グリベンクラミド濃度の測定 血漿中GLI濃度は、高速液体クロマトグラフィーにより測定した。血漿0.5 mlに、0.05 M 塩酸1.0 mlと、内標準物質としてトルブタミドのメタノール溶液(10 μ g/ml) 25 μ Lを加え、ベンゼン3.0 mlを加えて15分間攪拌した。攪拌後3000 rpmで5分間遠心分離し、ベンゼン相を分取し減圧乾燥した。残渣に移動相を50 μ L加えて溶解した後、40 μ LをHPLCに注入した。測定条件は5-3.と同様に設定した。

6-3. 皮膚刺激性の評価 6-1.の経皮吸収実験終了後、実験開始時陽電極側であった電極下の皮膚を摘出し、10%ホルマリン溶液中に24時間以上保存し、組織の固定を行った。その後、濃度を順次増加したエタノール溶液で組織中の水分を置換し、脱水後硬パラフィンに包埋した。次にマイクロームにより厚さ約3 μ mの切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジンによって染色した。組織の観察は光学顕微鏡により100倍で行った。拡大された皮膚垂直断面を表皮、表皮下、真皮、皮下組織、皮膚付属器官の5種類に分け、表皮の液化、表皮下の浮腫、真皮コラーゲン繊維の膨潤、真皮炎症細胞の浸潤、皮下組織コラーゲン繊維の膨潤、皮下組織炎症細胞の浸潤、皮膚付属器官の変性の7項目についてそれぞれ0から4の5段階で刺激性評点(Irritation score)を算出し、その合計を総刺激性評点(Total irritation score, TIS)とした。

結果

1. グリベンクラミドの溶解度

GLIは水に難溶解性の薬物であることから各種pHにおける溶解度を測定したところ、pH 7.4, 8.0, 8.5のトリス塩酸緩衝液へのGLIの溶解度はそれぞれ7.6, 40.1, 69.1 μ g/mlであり、溶液のpHの増加に伴い増大した。GLIは pK_a 6.8 \pm 0.15の酸性薬物であり、アルカリ溶液中で溶解度は増大するものと考えられる。ちなみにpH 8.5におけるGLIの溶解度はpH 7.4に比べて約10倍の値であった。

2. *In vitro* 皮膚透過実験によるグリベンクラミドの皮膚透過量

In vitro 皮膚透過実験において、*in vivo*でのイオントフォレシスによる経皮吸収促進効果を予測するために、皮膚上の電極の位置関係が*in vivo*での実験と同様になるように、電極を並置する形態の拡散セルを作製した。GLIの皮膚透過量をFig. 3に示す。ドナー溶液のpHの増加に伴いGLIの皮膚透過量が増大した。これにより、GLIのドナー溶液への溶解度の上昇がイオントフォレシスによる薬物皮膚透過量を増大させることが示された。いずれのpHにおいても、通電を終了しても透過量はすぐに

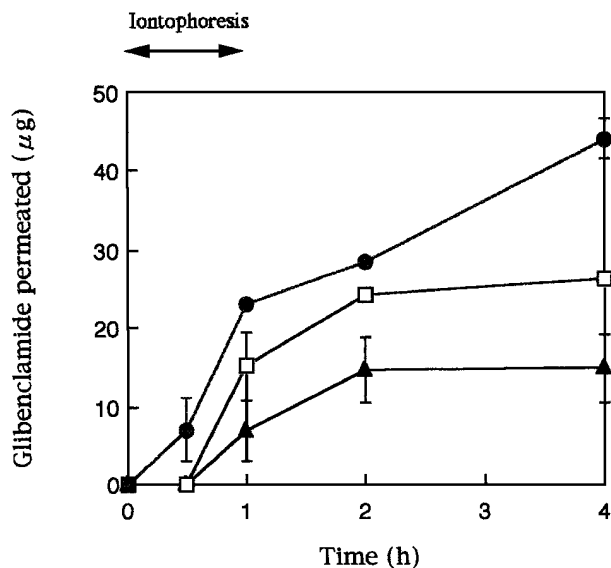


Fig. 3. Skin Permeation of Glibenclamide during Iontophoresis
0.2 M tris-HCl buffer was used as donor solution. Each point represents the mean \pm S. E. ($n=3$). —▲— pH 7.4 —□— pH 8.0 —●— pH 8.5

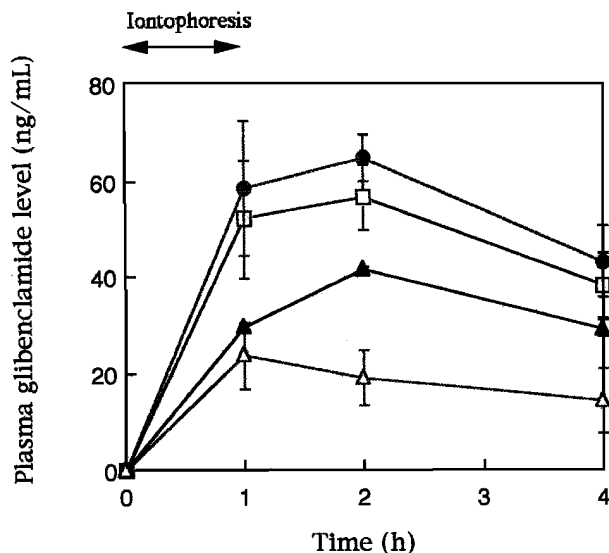


Fig. 4. Plasma Level Profiles of Glibenclamide during Iontophoresis
0.2 M tris-HCl buffer was used as donor solution. Each point represents the mean \pm S. E. ($n=3$). —▲— pH 7.4 —□— pH 8.0 —●— pH 8.5 —△— Control (pH 8.0)

はコントロールレベルにまで落ちなかった。これは皮膚内に残留する薬物の影響と、通電により皮膚の透過量が増加するといった皮膚特性の変化が生じたためではないかと考えられる。

実験終了時である4時間後のドナー溶液のpH変化は、pH 8.5群のうち1例で、イオントフォレシス開始時に陰極下のドナー溶液がpH 8.6となった以外は、いずれの群においてもpHの変化はみられなかった。これにより、10分間隔のスイッチングによるpH変化の抑制効果が認められた。

3. 経皮吸収実験におけるグリベンクラミドの血漿中濃度

経皮吸収実験におけるGLIの血漿中濃度をFig. 4に示す。いずれのpH群においても無通電時(コントロール, pH 8.0)に比べて、通電により血漿中薬物濃度が増加する結果が得られ、イオントフォレシスによる薬物の経皮吸収促進効果がみられた。通電群はいずれも2時間後に最も薬物濃度が増大しており、イオントフォレシス終了後も薬物が経皮吸収される結果が得られた。しかしながら、4時間後はいずれの群においても薬物濃度は減少した。

以上の測定結果から、台形法より薬物血漿中濃度曲線下面積(AUC 0—4 h)を算出した。無通電, pH 7.4, pH 8.0及びpH 8.5群のAUCはそれぞれ 62.1 ± 18.2 , 121.4 ± 7.7 , 167.0 ± 31.0 , 198.7 ± 17.4 ng·h/ml (平均 \pm S.E.)でありpH 7.4群では無通電群の2倍、pH 8.5群においては約3倍の値を示した。

4. 皮膚刺激性の検討結果

病理組織学的検査結果をTable 1に示す。また、皮膚を縦断面で切り出して染色を行った病理組織像をFig. 5に示す。スイッチングイオントフォレシスにおいては、両電極側の皮膚刺激性は著しく相違のないことが確認されていることから、今回我々は片側のみで評価を行った。¹⁶⁾ pH 7.4群では特記すべき変化は認められなかった。pH 8.0群で、ごく軽度ないし軽度の表皮の融解像が3/3例に認められた。pH 8.5群では、軽度の表皮の融解が3/3例に、ご

Table 1. Individual Total Irritation Score

| Sample No. | pH 7.4 | | | pH 8.0 | | | pH 8.5 | | |
|--------------------------------|--------|---|---|--------|---|---|--------|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Epidermis | | | | | | | | | |
| Liquefaction | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| Subepidermis | | | | | | | | | |
| Edema | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dermis | | | | | | | | | |
| Collagen fiber swelling | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| Inflammatory cell infiltration | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hypodermis | | | | | | | | | |
| Collagen fiber swelling | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Inflammatory cell infiltration | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Skin appendages | | | | | | | | | |
| Degeneration | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Total irritation score | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 1 | 4 | 2 | 3 |

Score 0: no change, 1: very slight, 2: slight, 3: moderate, 4: marked.

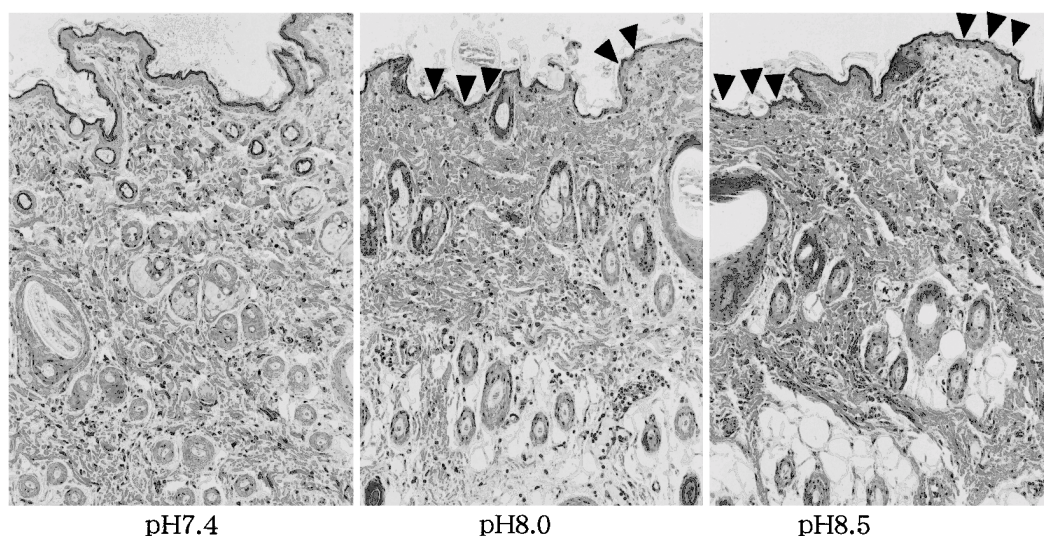


Fig. 5. Microphotographs of Vertical Section of Rat Skin after Iontophoresis

く軽度又は軽度の真皮膠原線維の膨化が2/3例に認められた。刺激性評点を合計した総刺激性評点(TIS)では、ドナー溶液のpHの増加に伴い、TISが増強する傾向が認められた。

考察

グリベンクラミドはSU剤の中では作用時間が長く、食後過血糖を改善するよりはむしろインスリンの基礎分泌を促進する効果のある薬物である。経皮吸収型製剤とすることで制御された速度で薬物の送達ができる、投与の中断ができる、悪心などの消化器症状が防げるなどの効果が期待される。しかしながら、皮膚表面に適用された薬物が血管中に移行するためには、表皮、真皮を移行してさらに毛細血管壁を透過しなければならない。さらに表皮にある角質細胞は水分の蒸散や外部からの物質侵入に対するバリアーとなっており、角質層を介する透過速度が、ほとんどの薬物にとって経皮吸収の律速段階である。そこで、皮膚透過性を改善するための種々の方法が報告されている。¹⁷⁾イオントフォレシスは物理的吸収促進法であり、今回の実験では、無通電群に比べて通電時にはすべての群において血漿中薬物濃度が増大し、イオントフォレシスによる経皮吸収促進効果が認められた。

GLIは分子量494.0の薬物であり、経皮吸収システムに適用するには分子量の大きい物質であると考えられる。また、メタノールやエタノールに溶けにくく、水やエーテルにほとんど溶解しない薬物であり、イオントフォレシスを適用するにあたり、薬物がイオン化した状態で溶液中に溶解している必要があると考えた。Fig. 4にみられるように、GLIのドナー溶液への溶解度に比例して血漿中薬物濃度が増大した。また、*in vitro* 皮膚透過量 (Fig. 3) は、*in vivo* の結果 (Fig. 4) をよく反映しており、電極並

置型セルの有用性が示された。一般的に、イオントフォレシスを行う場合には、ドナー溶液に緩衝液は用いないか、用いるとしても希釈したものを使用するのが望ましいとされている。今回は、GLIを溶解させる目的で、pHの異なる緩衝液を使用した。トリス塩酸緩衝液は、それ自身生理活性を示さず、細胞膜を透過しないことが知られており、緩衝液中の成分が生体に与える影響は比較的少ないと考えられる。しかしながら、多くの報告¹⁸⁾によるとイオン化していない分子型薬物分子も吸収促進を受けることが認められていることから、緩衝液を最少の使用量にとどめながら、GLIの溶解度を増加させる溶媒の使用の検討も必要であると考えられる。

今回用いたスイッチングイオントフォレシスは非スイッチング方式に比べて、通電による皮膚の分極を防ぎ、薬物の経皮吸収を高めることが報告されている。¹⁴⁾また、イオントフォレシスにおける問題点の1つである皮膚刺激についても、スイッチングにより脱分極されることから軽減される可能性がある。さらに、非スイッチング方式ではドナー溶液のpHが陽極側では低下、陰極側では上昇し、これが皮膚刺激を増大させるという報告があるが、¹⁶⁾今回ドナー溶液のpH変化が実験終了時に認められなかったことから、pH変化に伴う皮膚への刺激性の増大が抑制されたと考えられる。また、電極下の皮膚断面の病理組織学的評価においては、pH増加に伴い皮膚刺激が増強したが、いずれのpHにおいてもすでに報告されている非スイッチングでの刺激に比較して、¹⁶⁾ごく軽度の変化であり、スイッチングによる皮膚刺激の軽減が示唆された。

スイッチングイオントフォレシスにより経口糖尿病薬を経皮的に送達して有効な治療を行うには、投与量や投与時期など薬物の血中濃度を最適な時期に

得るための検討が必要である。しかしながら、スイッチングイオントフォoresisによる吸収量の増大と皮膚刺激の軽減化は、今後さらに多くの薬物について経皮的送達を実現するうえで、有効な利点であると考えられる。

謝辞 本研究を行うにあたり皮膚刺激性の評価においてご協力を賜りました。株式会社日本生物化学センターの磯和弘一氏及び、星薬科大学薬剤学教室の高山幸三教授に深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Tsunoi K., *Medicine and Drug Journal*, **31**, 1097-1102 (1995).
- 2) Urae A., Irie S., Amamoto T., Yoshiie H., *Rinshouiyaku*, **10**, 3-34 (1994).
- 3) Miyamoto T., Takishima T., Takahashi T., Nakajima S., Yamakido M., Nakashima M., *Rinshouiyaku*, **11**, 761-782 (1995).
- 4) Takahashi Y., Furuya K., Iwata M., Onishi H., Machida Y., Shirotake S., *Yakugaku Zasshi*, **117**, 1022-1027 (1997).
- 5) Tyle P., *Pharm. Res.*, **3**, 318-326 (1986).
- 6) Sims S. M., Higuchi W. I., Srinivasan V., *Int. J. Pharm.*, **69**, 109-121 (1991).
- 7) Sims S. M., Higuchi W. I., Srinivasan V., *Int. J. Pharm.*, **77**, 107-118 (1991).
- 8) Pikal M. J., *Pharm. Res.*, **7**, 118-126 (1990).
- 9) Delgado-Charro M. B., Guy R. H., *Pharm. Res.*, **11**, 929-935 (1994).
- 10) Srinivasan V., Higuchi W. I., Su Muh-Hwan, *J. Cont. Rel.*, **10**, 157-165 (1989).
- 11) Burnette R. R., Ongpipattanakul B., *J. Pharm. Sci.*, **77**, 132-137 (1988).
- 12) Wang Y., Allen, Jr. L. V., Li L. C., Tu Yu-Hsing, *J. Cont. Rel.*, **11**, 1140-1144 (1993).
- 13) Kalia Y. N., Guy R. H., *Pharm. Res.*, **12**, 1605-1613 (1995).
- 14) Tomohira Y., Machida Y., Onishi H., Nagai T., *Int. J. Pharm.*, **155**, 231-239 (1997).
- 15) Emilsson H., Sjoberg S., Svedne M., Christenson I., *J. Chromatogr.*, **383**, 93-102 (1986).
- 16) Takehana J., Onishi H., Machida Y., Abstracts of papers, the 117th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Tokyo, March 1997, No. 4, p. 38.
- 17) Sugibayashi K., Morimoto Y., *Jpn. J. Clin. Med.*, **56**, 67-75 (1998).
- 18) Yata N., *Jpn. J. Clin. Med.*, **56**, 56-60 (1998).