脂肪酸/シクロデキストリン併用系によるプロスタサイクリン
誘導体ベラプロストの経皮吸収の制御

緒方裕二・安達博敏・入江徹美・上釜兼人*

Controlled transdermal delivery of beraprost, a prostaglandin I₂ analogue, by combined use of fatty acids and cyclodextrins

Saturated and unsaturated fatty acids enhanced the permeation of beraprost sodium, a chemically stable prostaglandin I₂ analogue, from a silicone oil through the skin of hairless mice *in vitro*. The percutaneous permeation of beraprost showed a parabolic dependence on the lipophilicity of the saturated fatty acids, where capric acid was the most potent enhancer. Of the unsaturated fatty acids tested, oleic and linoleic acids showed greater enhancing effects on the percutaneous permeation of beraprost. When a pressure sensitive silicone adhesive tape containing beraprost sodium was applied onto the shaved skin of rats *in vivo*, oleic and capric acids enhanced the percutaneous absorption of beraprost, the former being more effective. In particular, the topical application of beraprost sodium with oleic acid significantly inhibited the progress of the laurate-induced peripheral vascular occlusive sequelae in the ear of rabbits.

Spectroscopic studies indicated that cyclodextrin derivatives (CyDs) formed inclusion complexes with beraprost sodium with efficacy increasing in the order: sulfated β -CyD (S- β -CyD) < dimethyl- β -CyD (DM- β -CyD) < hydroxypropyl- β -CyD (HP- β -CyD). When the hairless mouse skin was pretreated with oleic acid, the *in vitro* percutaneous permeation of beraprost from the silicone oil was sustained by the complexation with DM- β - and HP- β -CyDs, while S- β -CyD tended to increase the percutaneous permeation of the drug. Furthermore, HP- β -CyD eliminated undesirable properties of oleic acid in the silicone adhesive tape such as the reduction in the detachment force of the tape and the lability

against oxidation.

These results suggest that a combination of oleic acid with HP- β -CyD is particularly useful for controlling the transdermal delivery of beraprost from topical preparations intended for the systemic use.

Yuji Ogata · Hiroto Adachi ·
Tetsumi Irie · Kaneto Uekama*

key words : beraprost sodium,
cyclodextrin derivatives,
transdermal delivery, oleic acid,
pressure sensitive silicone adhesive

ベラプロストナトリウム(BPS)は化学的に安定なプロスタサイクリン誘導体であり、強力な血小板凝集抑制作用や血管拡張作用を有することから、閉塞性動脈硬化症や閉塞性血栓性血管炎に伴う潰瘍、疼痛および冷感の病状改善に経口投与剤として用いられている¹⁾。

BPSは生体内半減期が短く(ヒトで約1時間)²⁾、微量で強力な活性を示すため、経皮吸収型製剤により全身循環系への送達を精密に制御すると、薬効の持続化や治療効果の増強が期待される。しかし、BPSは経皮吸収性が低いため、経皮適用製剤の設計に際して皮膚透過性を改善するための製剤処方上の工夫を要する。

筆者らは先に、末梢循環障害の局所治療を目的としたプロスタグランジンE₁(PGE₁)の経皮適用軟膏剤の処方設計において、カルボキシメチルエチル- β -シクロデキストリンが基剤中におけるPGE₁の安定性を改善し、さらにアザシクロアルカン系吸収促進剤を併用するとPGE₁の皮膚移行性が顕著に増大することを報告した³⁻⁶⁾。

そこで本研究では、BPSの全身作用を期待した

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862 熊本大学薬学部製剤学教室
Offprint requests to : Kaneto Uekama, Ph. D.

経皮治療システムを構築することを目的として、シリコーン系感圧接着剤中の吸収促進剤として脂肪酸類、吸収制御用担体として各種シクロデキストリン誘導体(CyDs)を配合して、BPS のヘアレスマウスまたはラットにおける経皮吸収の制御およびウサギ動脈閉塞症モデルに対する治療効果に関する基礎的検討を行った。

方 法

(1) 試 薬

BPS は東レ(株)基礎研究所, SH-1107 基剤および X7-2920 接着剤はダウコーニング・シリコーン(株)より恵与されたものを使用した。2-ヒドロキシプロピル- β -CyD(HP- β -CyD, 平均置換度: 4.0)および 2, 6-ジ-O-メチル- β -CyD(DM- β -CyD)は日本食品化工(株)より恵与されたものを使用した。硫酸化 β -CyD(S- β -CyD, 平均置換度: 10.2)は Folkman らの方法⁷⁾に準じて合成した。脂肪酸類はナカライテスク(株)製を用いた。

(2) BPS : CyD 固体複合体の調製

BPS と各 CyD を重量比 1 : 100 でメノウ乳鉢中で混和し、水 : メタノール = 1 : 1 (v/v) 混合溶液を適量加え、ペースト状になるまで混練した。得られた複合体は室温で約 2 日間減圧乾燥後、篩過(<200 メッシュ)し、実験に用いた。

(3) BPS 含有テープ剤の調製

BPS (120 μ g), 脂肪酸類 (3.6 mg), または CyD (1.2 mg) を X7-2920 接着剤 (1 g) に混合し、希釈剤 (1, 1, 2-トリクロロ-1, 2, 2-トリフルオロエタン) を適量加えて攪拌した。得られた溶液あるいは懸濁液を脱気したのち、支持体 (Akrosil (株)製, Akrosil NAT 2.0 PET Silox B5Y) 上に展延し、25°C で一昼夜乾燥させて、BPS 含有テープ剤を調製した。

(4) *In vitro* 皮膚透過実験

Loveday 型垂直拡散セルを用い、隔膜には 9 週齢前後の雌性ヘアレスマウスの背部皮膚を使用し、25°C で実験を行った。BPS 懸濁液 (BPS として 0.01 w/v% 相当量, SH-1107 基剤 (0.5 ml)), または BPS 含有テープ剤 (BPS として 10 μ g/cm² 相当量, 0.85 cm²) を角質層側の皮膚に適用

し、レセプター相には等張リン酸緩衝液 (9 ml, pH7.4) を用いた。経時的にレセプター相から溶液 (0.5 ml) を採取し、検液中の BPS 濃度を高速液体クロマトグラフィ⁸⁾により定量した。

(5) *In vivo* 経皮吸収実験

Wistar 系雄性ラット (約 200 g) の背部皮膚をアニマルクリッパーを用いて除毛後、24 時間絶食した。背部皮膚上に BPS 含有テープ剤 (BPS として 500 μ g/cm² 相当量, 20×20 mm) を 1 箇所貼付した。エーテル麻酔下、経時的に頸静脈より 0.5 ml 採血し、血漿中 BPS 濃度はエンザイムイムノアッセイ⁹⁾により定量した。

(6) ウサギ末梢動脈閉塞症モデルに対する治療効果の評価

日本白色種雄性ウサギ (体重 2.5~3.0 kg) を用い、両耳をアニマルクリッパーで除毛した。ラウリン酸ナトリウム (5% w/v, 等張リン酸緩衝液 (0.1 ml, pH7.4, 5% v/v エタノール含有)) をウサギの右耳の後耳介動脈から注入し、末梢動脈閉塞を誘発させた。BPS (0.1% w/v) または脂肪酸 (3% w/v) を含有する SH-1107 基剤 (100 μ l) をパッチテスト用絆創膏 (鳥居薬品(株)製) に浸み込ませ、ウサギの左耳に貼付した。各 BPS 含有貼付剤を 1 日 1 回投与し、病変の進行状態を肉眼的に評価した⁹⁾。

(7) 粘着テープ剤のタック値の測定

(3) の方法により調製したテープ剤のタック値は理学工業(株)プローブタックテスターを用いて測定した。測定条件: 接触時間; 1 sec, 引き剥がし速度; 5 mm/sec, 接触荷重; 100 g/cm², プローブ; ベークライト (直径 5 mm), 温度; 25°C。

結果と考察

(1) 脂肪酸類による BPS の経皮吸収の改善

図 1 は BPS 含有 SH-1107 基剤からの薬物の *in vitro* ヘアレスマウス皮膚透過に及ぼす各種脂肪酸の影響を示す。横軸は Hansch らの方法⁹⁾により算出した各脂肪酸の *n*-オクタノール/水系分配係数の対数値 (Log *P*) を、縦軸は各脂肪酸存在下での BPS の定常状態における皮膚透過速度 (flux) の対数値を示す。図中、数字は各脂肪酸の炭

図1 Relationship between steady-state flux of BPS through hairless mouse skin and Log P of fatty acids for BPS(0.01% w/v)-fatty acids(3% w/v)systems

●: saturated fatty acids with cited number of carbon atoms
○: unsaturated fatty acids with cited number of carbon atoms

Each number in parentheses represents the number of double bonds. Each point represents the mean of 3~4 experiments.

素数を, カッコ内の数字は不飽和度を示す. 図から明らかなように, BPS の flux 値の対数値と各飽和脂肪酸の Log P 値との間にパラボリックな関係が認められた. 実線は飽和脂肪酸に関する回帰曲線 ($\text{Log} [\text{flux}] = -0.044 [\text{Log P}]^2 + 0.391 [\text{Log P}] - 0.615, r^2 = 0.878$) を示し, Log P 値が5付近の飽和脂肪酸が BPS の皮膚透過をもっとも促進した.

一方, 不飽和脂肪酸に関しては透過促進効果と Log P 値との間に相関性は認められなかった. 脂肪酸類は角質層中の主に細胞間脂質類と相互作用することにより脂質の流動性を増大し, 薬物の皮膚透過性を亢進するものと考えられる¹⁰⁾. その際, 各脂肪酸の皮膚透過促進作用は, 脂肪酸の皮膚への移行量(あるいは角質層中濃度)や角質層中に侵入したあとに周囲の脂質構造を乱す能力などに依存するものと推察される.

図1から明らかなように, 中鎖飽和脂肪酸は BPS の皮膚透過を促進する傾向が大きいことからこれら飽和脂肪酸は皮膚への親和性が高く, 角

図2 *In vitro* permeation profiles of BPS from X7-2920 tape (0.85 cm²) containing BPS (10 μg/cm²) and fatty acids (300 μg/cm²) through hairless mouse skin into isotonic phosphate buffer (pH 7.4) at 25°C

○: BPS alone ●: with capric acid △: with oleic acid

Each point represents the mean ± SE of 3 experiments.

質層へ速やかに移行し透過促進作用を示すものと推察される. 一方, 不飽和脂肪酸の至適な Log P 値が飽和脂肪酸のそれと異なるのは, 両者の皮膚移行後の脂質構造を乱す能力や脂質類との相互作用様式の違いなどによるものと推測される. そこで, BPS の皮膚透過を顕著に促進したカプリン酸とオレイン酸を用いて以下の検討を行った.

図2は BPS 含有 X7-2920 感圧接着剤テープ剤からの薬物の *in vitro* ヘアレスマウス皮膚透過に及ぼすカプリン酸およびオレイン酸の影響を示す. BPS 単独にくらべて, 両脂肪酸添加系では BPS の皮膚透過速度が著しく増大した. SH-1107 基剤ではカプリン酸とオレイン酸は同程度の透過促進効果を示したが, X7-2920 接着剤ではカプリン酸よりもオレイン酸が強い透過促進効果を示した. これは, SH-1107 基剤中には両脂肪酸が溶解するが, X7-2920 接着剤中にはオレイン酸が乳濁状態で存在するため, 熱力学的活動度が高まって皮膚へ移行しやすくなり, BSP に対する透過促進効果が強くあらわれたものと推察される.

図3は各 BPS 含有テープ剤を除毛ラット背部

図3 Plasma levels of immunoreactive BPS (IR-BPS) after topical application of X7-2920 tape (4 cm²) containing BPS (500 μg/cm²) and fatty acids (3 mg/cm²) onto skin of rats

○: BPS alone ●: with capric acid △: with oleic acid

Each point represents the mean ± SE of 2~4 rats.

**p* < 0.05 versus BPS alone

皮膚に貼付後の血漿中 BPS 濃度の時間推移を示す。カプリン酸およびオレイン酸添加系では血漿中 BPS 濃度が速やかに上昇し、少なくとも 48 時間以上持続する血漿中濃度パターンが得られた。

つぎに、ウサギ耳介動脈にラウリン酸ナトリウムを投与して末梢循環障害を惹起したモデルを作成し、BPS 含有貼付剤の治癒効果を検討した。BPS の全身性の治癒効果を評価するため血栓誘発部位と異なる部位に BPS 含有貼付剤を 1 日 1 回適用した。

図4に示すように、ラウリン酸ナトリウムを動脈内投与すると、強度の血管閉塞が起こり、投与 7 日後には組織病変が進行し、耳介先端の広範囲にわたり変色や組織の壊死が認められた。BPS 含有貼付剤を連日投与すると基剤のみにくらべて病変の進行がわずかに抑制された。

一方、脂肪酸添加系では、先に述べた *in vitro* および *in vivo* における BPS の経皮吸収の増大に対応して顕著な病変の進行が抑制された (BPS 単独系 < カプリン酸添加系 < オレイン酸添加系)。特に、オレイン酸添加系では貼付 3 日目以降は治

図4 Effects of daily topical application of patches (2.25 cm²) containing SH-1107 (100 μl) with BPS (0.1% w/v) and fatty acids (3% w/v) on laurate-induced peripheral arterial occlusive sequelae in ears of rabbits

●: SH-1107 alone ○: with BPS ▲: with BPS and capric acid △: with BPS and oleic acid

Each point represents the mean ± SE of 3 rabbits.

**p* < 0.05 versus BPS alone

癒傾向を示し、7 日後にはほぼ正常な状態に回復した。

以上の結果から、吸収促進剤としてカプリン酸やオレイン酸を用いて BPS の皮膚透過性を改善すると、全身作用を目的とした BPS の経皮吸収型製剤の処方設計が可能なものと推察された。

(2) CyD による BPS の経皮吸収の制御

近年、CyD との複合体形成を利用して、薬物や吸収促進剤の皮膚移行を制御する試みが活発に行われている¹¹⁾。本研究では、吸収促進剤にオレイン酸を用い、吸収制御用担体に親水性 CyD を併用し、BPS の経皮吸収の制御を試みた。

筆者らは先に、天然 CyD が BPS の親化合物であるプロスタサイクリンと複合体を形成し、その酸加水分解を γ -< α -< β -CyD の順に抑制することを報告した¹²⁾。今回の蛍光スペクトルによる検討から、HP- β -CyD は HP- α -や HP- γ -CyD よりも BPS との相互作用が強く、 β -CyD 誘導体について比較すると、S- β -CyD (530 ± 40

図5 *In vitro* permeation profiles of BPS from SH-1107 containing BPS: CyD complexes (0.01% w/v as BPS) through hairless mouse skin treated with oleic acid (0.1% w/v in ethanol (100 μ l) for 12 h) into isotonic phosphate buffer (pH 7.4) at 25°C

○: starch kneading mixture ●: HP- β -CyD complex $\triangle$: DM- β -CyD complex $\blacktriangle$: S- β -CyD complex

Each point represents the mean $\pm$ SE of 3 experiments.

M^{-1}) < DM- β -CyD ($760 \pm 90 M^{-1}$) < HP- β -CyD ($890 \pm 70 M^{-1}$) の順に BPS 複合体の安定度定数 (K_c) が増大した。さらに、核磁気共鳴 (NMR) スペクトルによる検討から、HP- β -CyD は BPS 分子の 5 員環およびベンゾフラン環付近を包接することが示唆された。

つぎに、SH-1107 基剤からの BPS のヘアレスマウス皮膚透過挙動に及ぼす β -CyD 誘導体の影響を検討した (図 5)。なお、CyD は基剤中において薬物だけでなくオレイン酸の熱力学的活動度にも影響を及ぼすため、予めオレイン酸溶液を 12 時間皮膚に適用して皮膚透過性を高めた系について CyD 複合体化による薬物の皮膚透過挙動の変化を観察した。ここで、BPS: デンプン混練体あるいは BPS: CyD 複合体は、基剤中に懸濁状態で存在した。

図 5 から明らかなように、デンプン混練体に比較して、S- β -CyD 複合体では薬物の皮膚透過が促進され、HP- β -CyD および DM- β -CyD 複合体では

図6 Changes in detachment force of X7-2920 tape containing oleic acid and HP- β -CyD, measured by a probe-tack tester at 25°C. Each point represents the mean $\pm$ SD of 3 experiments. The detachment force of X7-2920 tape without additives was 569 ± 133 gF.

抑制された。特に、HP- β -CyD 複合体を用いた場合、ゼロ次に近い皮膚透過プロファイルが得られた。このような BPS の皮膚透過性の変化は、薬物: CyD 複合体の基剤中における溶解性や拡散性の違いを反映しているものと考えられる。しかし、CyD による BPS の経皮吸収抑制の度合は、複合体の K_c 値に依存しないことから、CyD による基剤の物性変化や皮膚角質層への影響などの複雑な要因が関与しているものと推察される。

さらに、各 BPS: CyD 複合体およびオレイン酸を含有する X7-2920 接着剤からの薬物の皮膚透過挙動を比較した結果、BPS の皮膚透過は、デンプン混練体 > S- β -CyD 複合体 > HP- β -CyD 複合体の順に低下した。S- β -CyD 複合体を用いた場合、SH-1107 基剤では BPS の透過を促進したが、X7-2920 接着剤では逆に抑制した。

これまでの報告によると、プロプラノロールやプロゲステロンのように溶解パラメータが 8 ~ 9 付近の疎水性薬物は、X7-2920 接着剤からの放出がすぐれることが知られている¹³⁾。したがって、CyD による BPS の皮膚透過抑制効果は、水溶性の CyD 複合体を形成して BPS の X7-2920 接着剤からの放出が抑制されることに起因するものと推察される。また、HP- β -CyD はオレイン酸と安

定な水溶性複合体を形成することから¹⁴⁾、オレイン酸の接着剤からの放出や皮膚移行の減少に伴い、吸収促進効果が減弱し、BPSの皮膚透過が抑制されたものと考えられる。

通常、オレイン酸はシリコーン系感圧接着剤の接着力やタック値を著しく低下させるため問題となるが、HP- β -CyD複合体として配合すると、タック値の低下が抑制された(図6)。さらに、オレイン酸の不飽和結合は容易に自動酸化を受けるため、吸収促進剤として処方配合する際、安定性の確保が課題となる。これまでの筆者らの検討から、HP-CyDはオレイン酸：HP-CyD複合体のKc値の増大(HP- γ -<HP- α -<HP- β -CyD)に対応して、オレイン酸の自動酸化を顕著に抑制することから¹⁴⁾、不飽和脂肪酸を含有する製剤の品質確保のうえでもHP- β -CyDの有用性が高いものと思われる。

以上述べたように、オレイン酸を吸収促進剤に用い、吸収制御用担体としてCyDを併用すると、BPSの全身作用を期待した経皮治療システムからの薬物の経皮吸収を精密に制御可能なことが示唆された。

本研究の一部は第11回日本DDS学会(広島)において発表した。本研究に協力頂いた鳥栖景子嬢ならびに庵地奈々嬢に感謝致します。テープ剤の粘着力を測定して頂いた久光製薬(株)開発本部鳥栖研究所、BPSの提供ならびに血漿中濃度を測定して頂いた東レ(株)基礎研究所に深謝致します。

文 献

- Ohno K, Nagase H, Matsumoto H, Nishiyama K, Nishio S : Stereoselective synthesis of 5,6,7-trionor-4,8-inter-m-phenylene-PGI₂ derivatives and their inhibitory activities to human platelet aggregation. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 15 : 279-281, 1985.
- 加藤隆一, 宇治康明, 松本和久 : 経口 prostacyclin 誘導体 beraprost sodium (TRK-100) の第1相臨床試験—単回投与試験—. *臨床薬理* 20 : 515-527, 1989.
- Uekama K, Adachi H, Irie T, Yano T, Saita M, Noda K : Improved transdermal delivery of prostaglandin E₁ through hairless mouse skin : Combined use of carboxymethyl- β -cyclodextrin and penetration enhancers. *J. Pharm. Pharmacol.* 44 : 119-121, 1992.
- Adachi H, Irie T, Hirayama F, Uekama K : Stabilization of prostaglandin E₁ in fatty alcohol propylene glycol ointment by acidic cyclodextrin derivative, *O*-carboxymethyl-*O*-ethyl- β -cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* 40 : 1586-1591, 1992.
- Adachi H, Irie T, Uekama K, Manako T, Yano T, Saita M : Inhibitory effect of prostaglandin E₁ on laurate-induced peripheral vascular occlusive sequelae in rabbits : Optimized topical formulation with β -cyclodextrin derivative and penetration enhancer HPE-101. *J. Pharm. Pharmacol.* 44 : 1033-1035, 1992.
- Adachi H, Irie T, Uekama K, Manako T, Yano T, Saita M : Combination effects of *O*-carboxymethyl-*O*-ethyl- β -cyclodextrin and penetration enhancer HPE-101 on transdermal delivery of prostaglandin E₁ in hairless mice. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1 : 117-123, 1993.
- Folkman J, Weisz PB, Joullie MM, Li WW, Ewing WR : Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. *Science* 243 : 1490-1493, 1989.
- 山本尚三, 鹿取信(編) : プロスタグランジン研究法(上). 現代化学(増刊6) : 1986.
- 富田 豊, 小沢 満, 勝浦 洋 : *n*-オクタノール/水系分配係数の新しい求め方—HPLC法および計算法によるアプローチ—. *生薬化学* 6 : 3-11, 1984.
- Williams AC, Barry BW : Skin absorption enhancer. *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9 : 305-353, 1992.
- Uekama K, Hirayama F, Irie T : Application of cyclodextrins. *Drug Absorption Enhancement : Concepts, Possibilities, Limitations and Trends.* (ed. De Boer AG), Harwood Academic Publishers, Netherlands, 1994, p 411-456.
- Hirayama F, Kurihara M, Uekama K : Improvement of chemical instability of prostacyclin in aqueous solution by complexation with methylated cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 35 : 193-199, 1987.
- Pfister WR, 浦部洋輔 : シリコーン感圧接着剤のTTS製剤への応用(下). *PHARM TECH JAPAN* 7 : 869-885, 1991.
- Abe K, Irie T, Uekama K : Enhanced nasal delivery of luteinizing hormone releasing hormone agonist buserelin by oleic acid solubilized and stabilized in hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* 43 : 2232-2237, 1995.