

全身作用を目的とする zidovudine 経皮吸収製剤の開発に関する基礎的検討

川口 健夫・関 俊 暢・従二 和彦

城西大学薬学部薬剤学教室*

(平成2年3月31日受付・平成2年6月1日受理)

後天性免疫不全症候群 (AIDS) 治療薬 Zidovudine (AZT) を経皮的に投与する剤形の開発の可能性について、ヒト皮膚およびラットを用いて *in vitro* ならびに *in vivo* で基礎的検討を行った。

ラット腹部皮膚を用いて AZT の透過性を *in vitro* で測定し、経皮吸収促進剤 (methylpyrrolidone, Azone) および製剤中 AZT 濃度の透過性におよぼす影響について検討した。ラット腹部皮膚に麻酔下 AZT 製剤を適用し、血漿中 AZT 濃度を経時的に測定した。また外科的に摘出したヒト胸部皮膚を用いて AZT 製剤からの薬物透過性を測定し、その結果と AZT のヒトにおける薬動学的パラメーターから、同製剤の臨床適用時の血中薬物濃度の変化を予測した。

水溶液からの AZT のラット皮膚透過性は、Azone (3%), Azone + methylpyrrolidone (3% + 20%) の添加でそれぞれ 153 倍および 492 倍促進された。ラットの *in vivo* 実験結果は経皮吸収によって有効性の期待できる血中濃度が得られることを示した。ヒト皮膚にゲル製剤を適用した際の AZT 透過性から、ヒトに 100 cm² 程度の大きさの製剤を適用することで有効血中濃度が得られることが示唆された。

Key words : Zidovudine, Transdermal, Azone, AIDS

Zidovudine (azidothymidine, AZT) は逆転写酵素阻害を作用機作とする抗レトロウイルス薬で、AIDS および AIDS 関連症候群に対して臨床的に経口投与で有効性が確認されている^{1,2)}。AZT の消化管吸収は良好であるが³⁾、1) 肝臓での初回通過効果により吸収量の約 40 % が分解されること⁴⁾、および、2) 血漿中からの消失半減期が約 1 時間と短いこと³⁾から AIDS ウイルスに対する有効血中濃度 (1 μM 前後⁵⁾) を経口投与で維持するためには 2.5~5.0 mg/kg を 4 時間毎に経口投与しなければならないとされている^{3,6)}。一方、このような処方で投与された AZT の副作用は、特に骨髓増血系に対して重篤で^{7~9)}その理由として AZT は高濃度では逆転写酵素だけでなく、宿主の DNA ポリメラーゼ活性も阻害するためと考えられている¹⁰⁾。このような薬物の至適投与方法においては、薬物をその標的酵素 (逆転写酵素) を阻害しうる濃度で、なるべく低濃度で長時間作用させることが重要と考えられるが、そのためには一定速度で持続的に薬物を吸収させる剤形の適用が望ましい。

全身作用を目的とした経皮吸収型製剤としては、冠血管拡張薬 (ニトログリセリン、硝酸イソソルビド) の製剤がすでに実用化されており、長時間 (24 時間以上) にわたって一定した血中濃度を持続することが確認されている。今回

我々は、AZT の有効血中濃度を長時間にわたって持続させる経皮吸収型製剤の開発を目的として、ヒト皮膚およびラットを用いて基礎的検討を行ったのでその結果を報告する。

I 材料と方法

Azone (1-dodecylazacycloheptan-2-one) は住商ネルソン株式会社より提供された。Zidovudine (3'-azido-3'-deoxythymidine) はヤマサ醤油株式会社より購入した。Methylpyrrolidone (N-methyl-2-pyrrolidone) は東京化成工業株式会社より購入した。

1) ラットおよびヒト摘出皮膚を用いた透過性試験

Wistar 系雄性ラット (180~220 g) の腹部皮膚を除毛後ウレタン麻酔下に摘出し、脂肪および筋肉組織を除去して有効透過面積 0.95 cm² の横型拡散セルに装着した。角質層側 (donor 側) に薬物溶液、真皮側 (receptor 側) に生理食塩水を満たし、セル全体を温水で 37℃ に保って薬物を透過させた。receptor 側から経時的にサンプリングして、25 % アセトニトリル-75 % 酢酸水溶液 (0.03 M) を溶出液とした逆相型高速液体クロマトグラフィー (LiChrospher RP-18, 5 μm, 4 ×

*坂戸市けやき台 1-1

250 mm) を用いて薬物を分離し、265 nm における紫外吸収強度によって透過薬物量を定量した。定量結果から薬物透過速度を単位面積 (1 cm²) 当たりの単位時間 (1 時間) 内の薬物透過量 (μmol) として求めた。

外科的に摘出したヒト胸部皮膚 (女性, 50 歳) の脂肪および筋肉組織を除去した後、有効透過面積 4.9 cm² の縦型拡散セルに角質層側 (donor 側) を上向きに装着した。真皮側 (receptor 側) を生理食塩水で満たし 37℃ に保って、donor 側に塗布した製剤からの薬物透過速度を receptor 側の薬物濃度を経時的に測定すること求めた。

2) ラットにおける *in vivo* 吸収性試験

Wistar 系雄性ラットをウレタン麻酔下に背位固定し、除毛した腹部皮膚に有効放出面積 4.9 cm² のガラスセルを接着剤 (アロンアルファ) を用いて密着させた。セル内に試験溶液を満し、経時的に鎖骨下静脈より採血して、遠心、脱タンパク処理後の血漿中 AZT 濃度を逆相型高速液体クロマトグラフィーで定量した。

II. 結 果

1) ラット皮膚透過性

Fig. 1 に AZT のラット皮膚透過性に対する Azone および methylpyrrolidone の影響を示した。水溶液 (5 mg/ml) からの透過速度 ($1.5 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$) は Azone (3%) の添加で 153 倍 ($2.3 \times 10^{-1} \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$) に促進された。Azone (3%) に methylpyrrolidone (20%) を加えることで透過はさらに促進 (7.4×10^{-1}

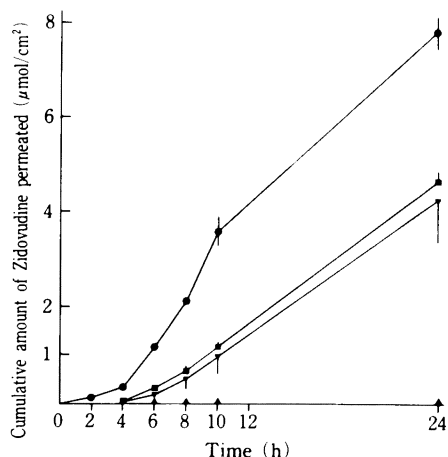


Fig. 1. Permeability through rat skin of Zidovudine solution (5 mg/ml) in water (▲), +3%-Azone (▼), +3%-Azone+5%-N-methyl-2-pyrrolidone (■), +3%-Azone+20%-N-methyl-2-pyrrolidone (●)

μmol/cm²/h) されるとともに、試験液を皮膚に接触してから receptor 側に一定速度で薬物が透過するまでの時間 (lag time) も 10 時間前後から 3 時間前後まで短縮された。

Fig. 2 に Azone, methylpyrrolidone 添加時の透過速度に対する試験液中の AZT 濃度の影響を示す。AZT 濃度の増加とともに透過速度が大きくなり、製剤中の AZT 濃度をできるだけ高くすることが高い透過速度を得るのに有効であることが示された。なお、AZT の水に対する溶解度はおよそ 30 mg/ml であるが、Azone, methylpyrrolidone の添加によって見掛けの溶解度が上昇するため、最高濃度の試験液 (30 mg/ml) 中でも AZT は完全に溶解している。

2) ラット *in vivo* における吸収性

Fig. 3 に Azone (3%) と methylpyrrolidone (20%) を含有する試験液 (AZT 濃度 1 mg/ml) 1 ml をラット腹部皮膚に適用した後の血漿中 AZT 濃度を示した。試験液を適用してから血漿中に薬物を検出するまでに 4 時間を要したが、その後は比較的安定した濃度を 6 時間に渡って維持した。

3) ヒト皮膚透過性

Fig. 4 にヒト皮膚に Azone および methylpyrrolidone を含有したゲル剤 (Table 1) を塗布した場合の AZT の透過性を示した。

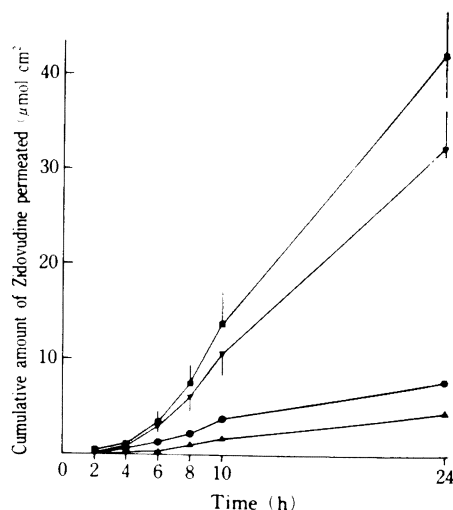


Fig. 2. Permeation through rat skin of Zidovudine solution in water containing Azone (3%) and N-methyl-2-pyrrolidone (20%). Zidovudine concentration of 1 mg/ml (▲), 5 mg/ml (●), 15 mg/ml (▼), 30 mg/ml (■)

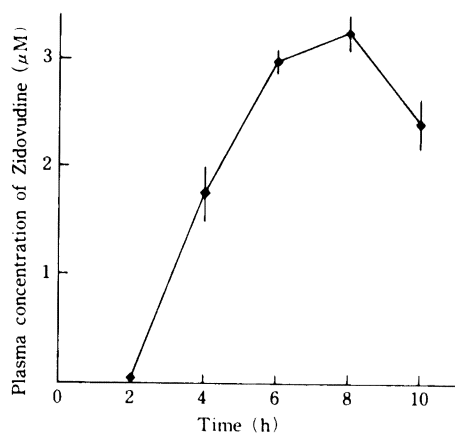


Fig. 3. Plasma concentration of Zidovudine after application of Zidovudine solution (1 mg/ml) containing Azone (3 %) and N-methyl-2-pyrrolidone (20 %) to rat abdominal skin (4.9 cm²) n=3, ± SEM

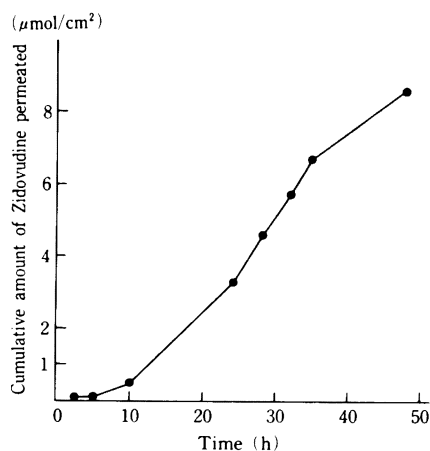


Fig. 4. Permeability through human skin of Zidovudine from a gel formulation containing Zidovudine (3 %), Azone (3 %), and N-methyl-2-pyrrolidone (20 %)

ゲル剤を塗布してから receptor 側に薬物を検出するまでに 5 時間を要したが、10 時間目以降はほぼ一定の透過速度 ($3.0 \times 10^{-1} \mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$) が 40 時間以上に渡って持続した。

III. 考 察

一般に皮膚を介した薬物吸収は消化管などの粘膜からの吸収速度と比較すると著しく遅いため、全身作用を目的とした経皮吸収型製剤の主薬としてはなるべく低用量で有効な薬物が好ましい。一方 AZT の投与量

Table 1. Ingredients of gel formulation

Zidovudine	3 %
Azone	3 %
N Methyl 2 pyrrolidone	20 %
Polyacrylate (Carbopol 934)	1 %
Hydroxypropylcellulose	3 %
Sodium Hydroxide	q.s.
Water	q.s. to 100 %

はすでに経皮製剤が開発されている他の薬物に比べかなり多く、臨床的には 2.5~5.0 mg/kg が 4 時間ごとに静注あるいは経口投与されている。したがって、臨床的に現実的な大きさ（面積）の経皮製剤で有効血中濃度 ($1 \mu\text{M}$ 前後) を得るためには、かなりの吸収促進を行う必要があると考えられた。

今回の検討では、まずラット皮膚を用いた *in vitro* 実験で皮膚透過促進剤の効果を評価し、その結果から選択した製剤処方 (Azone 3 % + methylpyrrolidone 20 %) を用いてラット *in vivo* およびヒト皮膚での AZT 透過性を測定した。Azone の経皮吸収促進効果^{11,12)}については多くの報告があるが、その刺激性、毒性など安全性に関する検討も進められている。また methylpyrrolidone はすでに化粧品などの添加物として使用されているが、近年その吸収促進効果が注目されている¹³⁾。

今回調製したゲル製剤を実験にヒトに適用した場合、どの程度の血中濃度が得られるかを予測することは経皮製剤開発の可能性を評価する上で重要と考えられる。

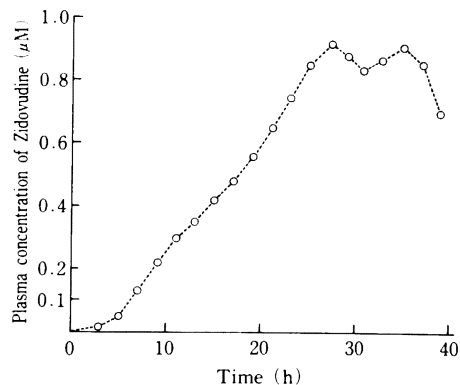


Fig. 5. Calculated plasma concentration of Zidovudine after an application of the gel formulation on human skin (100 cm²)

Fig. 5はこのゲル製剤を体重60 kgのヒトに100 cm²の面積で適用した際の血中濃度変化を、すでに報告されているAZT静注時の薬動力学的パラメーター ($kel = 0.63 \text{ h}^{-1}$, $Vd = 1.4 \text{ l/kg}$)³⁾を用いてconvolution法で予測したものである。100 cm²は実際に臨床使用された初期の硝酸イソソルビド経皮製剤(フランドルテープ)の大きさであるが、予測値はこの面積の適用、ほぼ有効血中濃度に相当する $0.9 \mu\text{M}$ が得られている。

最初にも述べたが、AZTの作用はその作用機序から時間依存性であると考えられる。AZTと類似の特徴を示す薬物として代謝拮抗型の抗腫瘍薬(Ara C, 5FUなど)をあげることができるが、これらの薬物については主に副作用の軽減を目的として、投与計画、化学修飾、剤形などが工夫されている。酵素阻害を作用機序とするこれらの薬物を用いる化学療法では、標的酵素(ウイルスの逆転写酵素や腫瘍細胞の核酸合成酵素、DNAポリメラーゼなど)と宿主の酵素の感受性の差を効果の選択性(作用>副作用)の拠り所としている。しかし一般にウイルスや腫瘍の酵素系と宿主の正常な酵素系の間の差異は小さく、細菌感染に対する抗生物質の効果に比較して、充分な選択性を得るのが困難である。酵素の感受性のわずかな差を最大限に利用して、選択性を得るための一方法として、生体内薬物濃度を標的酵素は阻害するが、宿主酵素は致死的には阻害しない濃度に、長時間正確に制御することが考えられる。今回検討した経皮吸収型製剤は長時間の薬物血中濃度の制御という点で有望な製剤であり、今後は化学修飾などのアプローチとの組み合わせも含めて、AZT至適投与のためにさらに検討を進める予定である。

謝 辞

本研究に関して、多くのご助言を賜った本学森本憲雅教授ならびに杉林堅次助教授に感謝致します。

なお、本論文の要旨は第38回日本化学療法学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Yarchoan R, et al.: Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* i: 575~580, 1986
- 2) Fischl M A, et al.: The efficacy of azidothymidine in the treatment of patients with AIDS and AIDS related complex. A double blind, placebo controlled trial. *N Eng J Med* 317: 185~191, 1987
- 3) Klecker R W, et al.: Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Clin Pharmacol Ther* 41: 407~412, 1987
- 4) Rescetar A, Spector T: Glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Biochem Pharmacol* 38: 1389~1393, 1989
- 5) Mitsuya H, et al.: 3'-azido-3'-deoxythymidine: an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. *Proc Nat Acad Sci USA* 82: 7096~7100, 1985
- 6) Henry K, et al.: Concurrent zidovudine levels in semen and serum determined by radioimmunoassay in patients with AIDS and AIDS-related complex. *J Amer Med Assoc* 259: 3023~3026, 1988
- 7) Gill P S, Rarick M, Brynes R K, Causey D, Loureiro C, Levine A M: Azidothymidine associated with bone marrow failure in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med* 107: 502~505, 1987
- 8) Mir N, Costello C: Zidovudine and bone marrow. *Lancet* ii: 1195~1196, 1988
- 9) Shaunak S, Bartlett J A: Zidovudine-induced neutropenia. *Lancet* ii: 91~92, 1989
- 10) Inoue T, et al.: *In vitro* bone marrow toxicity of nucleoside analogs against human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 576~579, 1989
- 11) Stoughton R B, McClure W O: AZONE: a new non-toxic enhancer of cutaneous penetration. *Drug Develop Indust Pharm* 9: 725~744, 1983
- 12) Stoughton R B: Enhanced percutaneous penetration with 1-dodecylazacycloheptan-2-one. *Arch Dermatol* 118: 474~477, 1982
- 13) Sugibayashi K, Sakanoue C, Morimoto Y: Utility of topical formulations of morphine hydrochloride containing azone and N-methyl-2-pyrrolidone. *Selec Cancer Ther* 5: 119~128, 1989

PERCUTANEOUS ABSORPTION OF ZIDOVUDINE THROUGH RAT AND HUMAN SKIN

Takeo Kawaguchi, Toshinobu Seki and Kazuhiko Juni

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University,

1-1 Keyakidai, Sakado-shi, Saitama 350-02, Japan

In an attempt to develop a transdermal therapeutic system for Zidovudine, percutaneous absorption of the drug was examined in rats and human skin.

The ability of several penetration enhancers to increase transdermal delivery of Zidovudine was evaluated in excised rat skin. Azone (1-dodecylazacycloheptan-2-one) showed a significant enhancing effect at a concentration of 3% in water. The enhancing effect was increased in the presence of N-methyl-2-pyrrolidone (MP); Zidovudine solution (5 mg/ml) containing 3% Azone and 20% MP showed 492-fold enhanced permeation compared to application of Zidovudine alone.

A Zidovudine solution containing Azone (3%) and MP (20%) was applied on rat abdominal skin, and the plasma concentration was measured. Zidovudine was detected in plasma at 4 h after the application, and a constant plasma concentration (2–3 μ M) was maintained for 6 h.

The permeation of Zidovudine was also examined in human skin. A gel formulation containing Azone and MP showed a considerable permeation rate of Zidovudine. Our results suggest that transdermal application of Zidovudine can be useful in obtaining an effective plasma concentration (1 μ M) and maintaining it for a long time.