

眼組織イオントフォレシスによる薬物透過促進の特徴

関島 秀久

鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

博士論文紹介

眼組織イオントフォレシスによる薬物透過促進の特徴

関島 秀久

鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

キーワード： 眼内薬物送達, ドラッグデリバリーシステム, イオントフォレシス, 角膜, 結膜, 薬物透過促進効果, 電気生理学的手法, タイトジャンクション

要 旨

イオントフォレシス (IP) は、微弱電流を利用した物理的吸収促進法として知られており、皮膚および眼粘膜を含めた種々粘膜を介する薬物吸収を向上させることを目的に広く研究されている。これまでに、眼内への薬物送達を目的とした多くの眼組織 IP 研究は *in vivo* で行われており、特に角膜および結膜 IP はそれぞれ、前眼部 (角膜や水晶体など) および後眼部 (網膜や黄斑部など) の疾患に対する薬物吸収促進技術としての進展を期待されている。しかしながら、IP の吸収促進特性について十分に特徴づけられていないことから、眼組織 IP は実用化に至っていない。そこで著者は、眼組織 IP の促進特性を *in vitro* 研究で特徴づけることを試みた。その結果、低分子イオン性および高分子非イオン性薬物の角膜および結膜透過は IP 適用により増大し、特に高分子薬物の IP 透過促進効果は低分子薬物に比べて高かった。加えて、角膜では 2.0 mA/cm^2 、結膜では 10 mA/cm^2 までの電流値の適用は上皮タイトジャンクション (TJ) 関連タンパク質を可逆的に変化させたことから、角膜および結膜上皮の可逆的な TJ 開口が眼組織 IP による薬物透過促進に寄与していることが示唆された。これら知見は、眼組織 IP が眼内への高分子薬物送達を可能にする有益な非侵襲的手法になることを意味する。

1. はじめに

動物は、目、鼻、舌、耳や皮膚などの感覚器から得られる情報に基づいて生命活動を営んでいる。一般的に、ヒトでは生命活動に必要な情報の約 8 割を目から得ており、quality of life (QOL) を維持するために重要な器官である。近年、パーソナルコンピューターやスマートフォンの普及、さらには超高齢社会などの背景から、視力低下や眼疾患を伴う生活者の割合が増加しており、これらを原因とする目の不具合は著しい QOL の低下につながる。

眼疾患は、疾患の原因除去もしくは進行抑制を目的とした外科的処置や薬物療法により治療される。外科的処置は、薬物治療を行えない、もしくはそれによる改善を期待できない場合に実施される。薬物治療では、点眼もしくは眼内注射により薬剤が投与され、治療目的に合わせてそれら投与方法は使い分けられている。眼内注射は、薬剤を目的部位へ確実に投与できることから治療効果が高いとされている。しかしながら、外科的処置や眼内注射は、眼圧上昇や感染症などの有害事象も報告されている¹⁾。点眼薬は、主に緑内障、ドライアイ、角膜炎や結膜炎などの眼疾患に対する薬物治療の第一選択として用いられる。点眼された薬物は眼表面に拡散し、角膜および結膜/強膜を介し、それぞれ房水中および硝子体液中へ浸透するが²⁾、点眼された薬物量に対する眼内へ浸透する薬物量の割合は極めて少ない。その理由として、涙液による薬物の希釈・排泄や眼表面の上皮組織の高いバリア能などの複合的な要因が関係している³⁾。そのため、十分な効果を得るためには頻回投与や眼表面での滞留性の改善などの工夫が必要となる。

眼内への薬物送達の改善を目的とした Drug Delivery System 研究では、薬物のプロドラッグ化、リポソームへの内封、シクロデキストリンとの複合体形成、化学的および物理的吸収促進法の利用に関する知見が報告されている^{4, 5)}。吸収促進法は、眼内への吸収性の低い薬物の吸収改善を期待する方法であり、眼内注射に代わる薬物投与システムに応用することが期待されている。

イオントフォレシス (IP) は、微弱な電流を利用した物理的吸収促進法として知られており、皮膚および眼粘

膜を含めた種々粘膜を介する薬物吸収を向上させることを目的に広く研究されている⁶⁻⁸⁾。IP は、その電流を ON または OFF することにより促進効果を ON / OFF 制御できることに加え、電流値や適用時間などの適用条件を調節することによっても制御できる⁶⁾。Fig. 1 は、最も研究が進んでいる経皮 IP の模式図を示している。皮膚表面に隣接するように電極を設置し、薬液を介して微弱な電流を適用することで、皮膚表面に電場が形成され、その電場によって発生する電気的な反発力 (electrorepulsion, ER) と電気浸透流 (electroosmosis, EO) により皮内への移行が促進される⁷⁾。ER は、電場と荷電薬物の電気的な相互作用であり、主にイオン性薬物の吸収促進に寄与している (Figs. 1a および b)。また、生体膜は生理学的 pH において負にチャージしているため、溶媒中の水和した陽イオンと電気二重層を形成する。電場影響下では、水和した陽イオンの移動によって EO を引き起こし、陽極から陰極側へ溶媒の流れが発生する。その流れに従い、イオン性薬物のみならず非イオン性薬物の吸収促進も引き起こすことが知られている (Fig. 1c)。このような原理により IP は様々な薬物の吸収を促進することから、その利用は眼組織局所へも効率的な薬物送達を可能にするものと期待されている。

眼内への薬物送達を目的とした多くの眼組織 IP 研究は *in vivo* で行われており⁹⁻¹¹⁾、特に角膜および結膜 IP はそれぞれ、前眼部および後眼部疾患に対する薬物吸収促進技術としての進展を期待されている。IP の利用は、ドライアイ患者を対象とした臨床研究により点眼薬に比べ薬理効果が高いことも明らかにされているが¹²⁾、現在のところ、生きた角膜および結膜における IP の吸収促進特性について十分に特徴づけられていないことから、眼組織 IP は実用化に至っていない。眼内への薬物吸収促進法として眼組織 IP を実用化するためには、角膜および結膜における薬物の透過促進特性と生存性および integrity などの安全性を関連付けて眼組織 IP を特徴づける必要がある。

そこで著者は、電流影響下の角膜と結膜の生存性および integrity を考慮した眼組織 IP の促進特性を *in vitro* 研究で特徴づけることを目的とし、家兎摘出角膜および

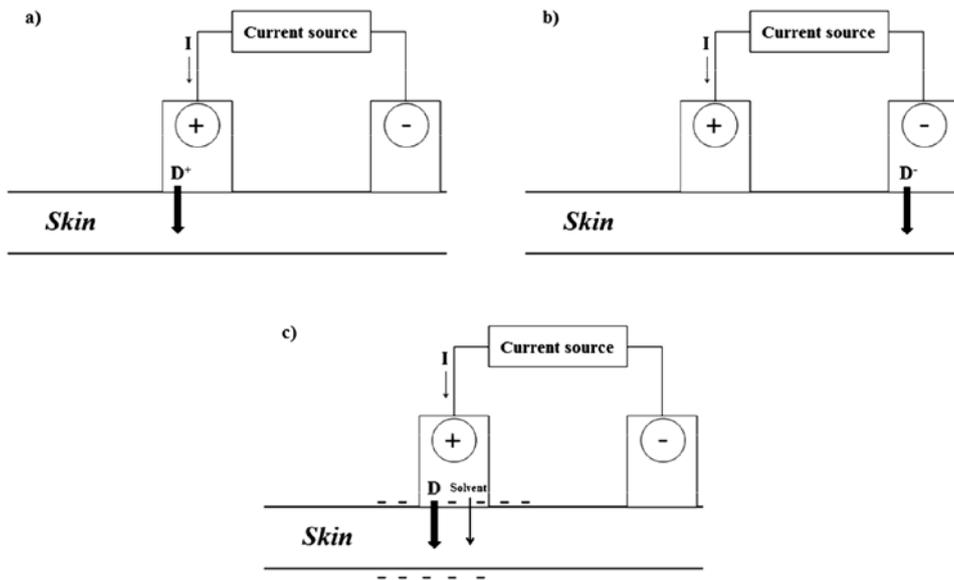


Fig. 1 経皮 IP におけるイオン性および非イオン性薬物の吸収促進特性
 a) カチオン性薬物 (D⁺), b) アニオン性薬物 (D⁻) および c) 非イオン性薬物 (D)

結膜を用いて眼組織 IP の薬物透過促進効果を研究し、透過促進機構を明らかにすることを試みた。

2. 眼組織イオントフォレシスによる薬物透過促進効果の特徴づけ¹³⁾

上田らは結膜 IP 透過促進効果に関する研究を行い¹⁴⁾, 0.85 mA/cm² までの定電流適用の範囲で、電流適用時のみイオン性薬物および非イオン性薬物の結膜透過性が一過的に増大し、その効果は電流値依存的事であることが明らかとなっている。また、結膜固有の電気生理学的パラメータが電流適用中に変動し、電流適用後に適用前のレベルと近い値まで回復した。これらのことから、結膜 IP は、組織生存性に対して明らかな影響を及ぼさずに効率的な薬物送達を可能にする吸収促進技術になり得ると示唆された。しかしながら、眼組織 IP の *in vivo* 研究において吸収促進効果が得られている電流値は ~28.2 mA/cm², ヒトでの臨床研究において安全性が高いとされる電流値は ~3.65 mA/cm² であることを考慮すると⁹⁻¹²⁾, *in vivo* 研究で用いられている電流値の範囲を網羅した IP 条件での促進効果を評価する必要がある。加えて、*in vitro* での角膜 IP に関する検討はこれまで行われておらず、摘出角膜を用いた特徴づけが有効な情報を提供するものと期

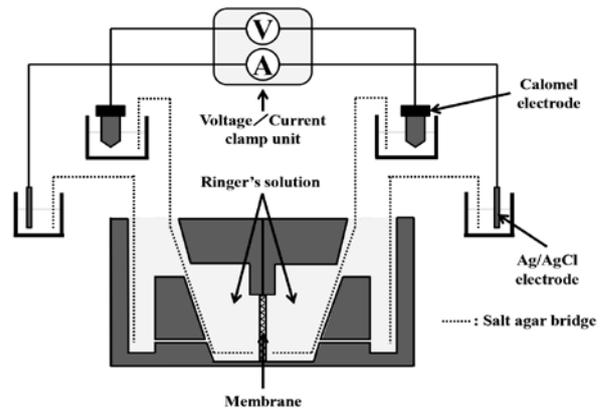


Fig. 2 IP 適用および電気生理学的パラメーター測定のための Ussing-type chamber system

本システムは、Voltage / Current clamp unit, カロメル電極, Ag / AgCl 電極, リンゲル液および塩橋を連結することにより、膜を介した電気回路として機能する

待できる。そこで、家兎摘出角膜および結膜を介した薬物透過性に対する IP の適用電流値の影響を検討した。

2-1. イオン性薬物の角膜および結膜透過に対するイオントフォレシスの影響

IP 薬物透過促進効果と角膜および結膜の状態を併行して評価するために、IP を適用でき、かつ電気生理学的パラメータの評価に特化した Ussing chamber system (Fig. 2)

を使用し, chamber 内液には重炭酸リンゲル液 (BRS) を用いた。まず初めに, モデル透過物質としてイオン性薬物にリドカイン塩酸塩 (LC, MW: 288.81, pKa 7.9) および安息香酸ナトリウム塩 (BA, MW: 144.11, pKa 4.21) を用いて, イオン性薬物の角膜および結膜透過に対する適用電流値の影響を評価した。電気生理学的パラメータである膜電位差 (PD), 短絡電流 (Isc) および経上皮電気抵抗値 (TEER) を組織生存性および integrity の指標として測定した。透過実験開始から 120 分経過後, LC 透過実験の場合, 上皮側を陽極として, 角膜では 5.0 mA/cm^2 まで, 結膜では 10 mA/cm^2 までの電流値を, BA 透過実験の場合, 上皮側を陰極として, 角膜では 2.0 mA/cm^2 まで, 結膜では 7.5 mA/cm^2 までの電流値を 30 分間適用した。また, 電流適用直前の単位面積当たりの薬物透過速度 (flux) を baseline とした。

その結果, 角膜および結膜ともに, LC flux は IP 適用前に比べ, IP 適用中に増大し, IP 適用終了後には IP 適用前の baseline flux のレベルまで回復した (Fig. 3)。その透過促進は, 電流値依存的な効果であった。BA flux に対しても LC と同様の挙動が認められた。

TEER は, 角膜および結膜において陽極および陰極に関係なく, 電流適用により急激に低下した。上皮側を陽極とした LC 透過実験において, 角膜では 2.0 mA/cm^2 ま

での電流値の範囲で, 低下した TEER は適用前のレベルまで回復したのに対し, 結膜では 10 mA/cm^2 までの電流値の範囲で, TEER は回復した。さらに, 結膜 TEER の回復速度の遅延が, 10 mA/cm^2 の電流適用時に認められた。一方, 上皮側を陰極とした BA 透過実験においても, 角膜では 2.0 mA/cm^2 まで, 結膜では 5.0 mA/cm^2 までの電流値の範囲で, TEER の低下および回復が認められた。PD および Isc は, 電流適用中に変動したが, TEER の回復と共に電流適用前のレベルまで回復した。

2-2. 非イオン性薬物の角膜および結膜透過に対するイオントフォレシスの影響

眼内注射で使用される抗体や核酸医薬品は親水性高分子イオン性薬物である。Guy らは, 高分子イオン性薬物の IP 透過促進に対して ER よりも EO の寄与が大きく, その寄与率は分子量依存的であることを報告した⁷⁾。そこで, 高分子薬物の IP 透過促進効果を見積もるために, 親水性高分子非イオン性薬物である fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4, MW: 4400) をモデル透過物質として用い, イオン性薬物の検討と同様に角膜および結膜 IP に対する適用電流値の影響を検討した。透過実験開始から 120 分後に, 上皮側を陽極として角膜では 5.0 mA/cm^2 , 結膜では 20 mA/cm^2 までの電流値を 30 分間適用した。

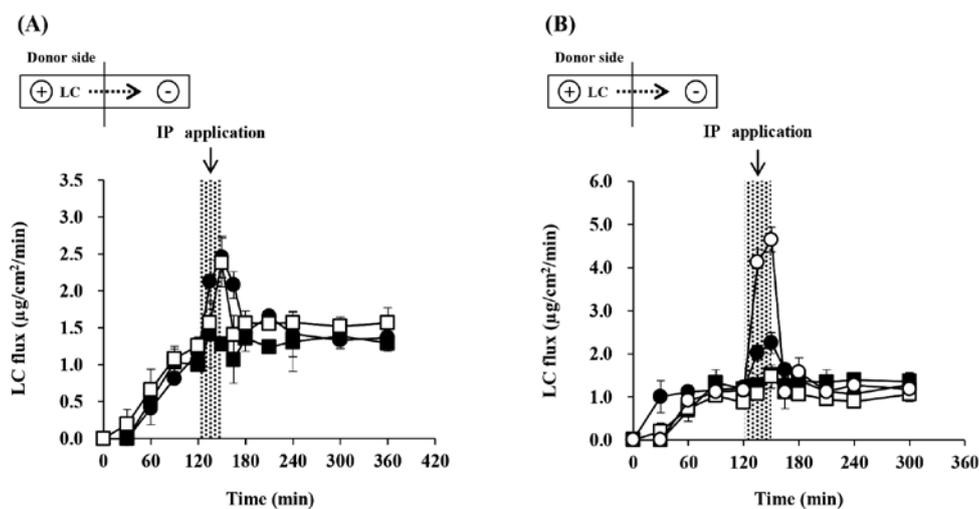


Fig. 3 IP 実験における角膜 (A) および結膜 (B) を介した LC flux の経時的変化

■, 0.5 mA/cm^2 ; □, 2.0 mA/cm^2 ; ●, 5.0 mA/cm^2 ; ○, 10 mA/cm^2 . Data represent mean \pm S. E. (n = 3-5)

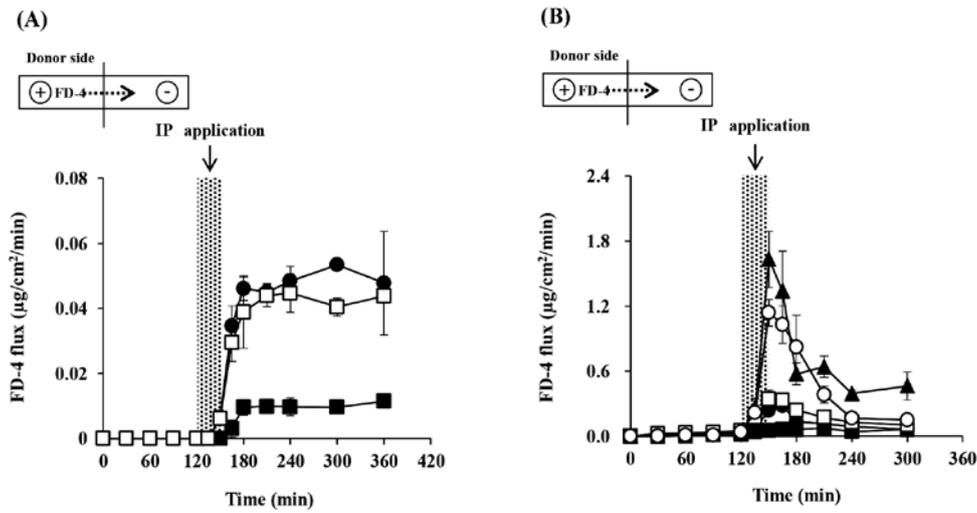


Fig. 4 IP 実験における角膜 (A) および結膜 (B) を介した FD-4 flux の経時的変化
 ■, 0.5 mA/cm²; □, 2.0 mA/cm²; ●, 5.0 mA/cm²; ○, 10 mA/cm²; ▲, 20 mA/cm². Data represent mean ± S. E. (n = 3-8)

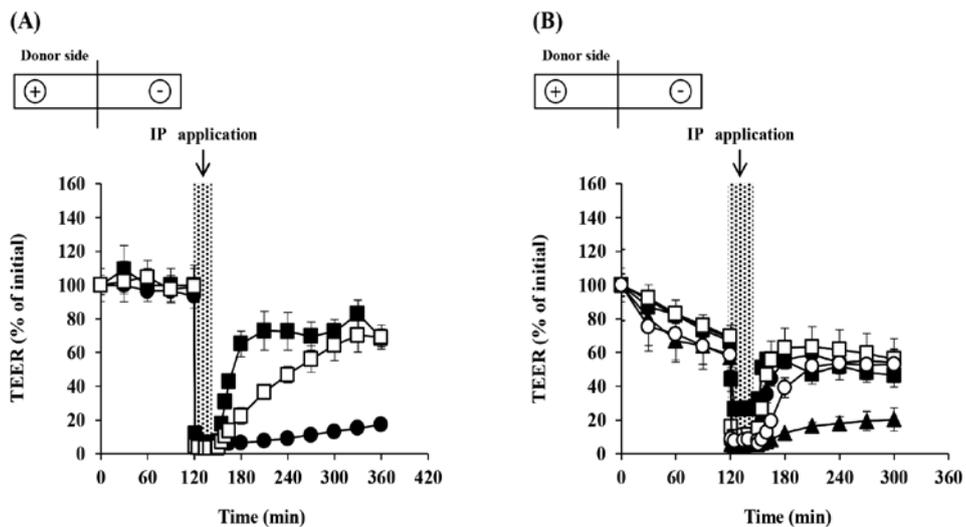


Fig. 5 FD-4 透過実験における角膜 (A) および結膜 (B) TEER の経時的変化
 ■, 0.5 mA/cm²; □, 2.0 mA/cm²; ●, 5.0 mA/cm²; ○, 10 mA/cm²; ▲, 20 mA/cm². Data represent mean ± S. E. (n = 3-8)

角膜では、IP 適用により FD-4 透過が促進され、IP 適用終了後から透過実験終了時まで FD-4 flux は高いレベルで持続した (Fig. 4A)。結膜では、IP 適用による FD-4 flux の増大と電流適用終了後の回復が観察された。しかし、その回復は 10 mA/cm² までの適用電流値においてであり、20 mA/cm² では、baseline まで回復しなかった (Fig. 4B)。これらのことから、IP 適用終了後に得られた透過促進の違いは、角膜と結膜で高分子薬物の IP 促進特性

が異なることを意味している。

角膜および結膜 TEER は、低分子イオン性薬物に対して上皮側を陽極とした実験結果と同様に、IP 適用直後に急激に低下した (Fig. 5)。IP 適用終了後の角膜の TEER は、2.0 mA/cm² までの条件では TEER に電流値依存的な回復時間の遅れはあるものの、IP 適用前のレベルまで回復した (Fig. 5A)。5.0 mA/cm² の適用電流値では、IP 適用終了後に TEER は回復しなかった。結膜においても

TEER の回復に電流値依存的な時間の遅れが認められたが、10 mA/cm²までの条件で IP 適用前のレベルまで回復した (Fig. 5B)。同様に PD および I_{sc} は、電流適用中に変動したが、TEER の回復と共に電流適用前のレベルまで回復した。

Fig. 4 の結果から、角膜において受動拡散しない FD-4 が IP 適用中に電流値依存的な EO 効果により角膜へ移行し、その後角膜内に滞留していることが推測された。そこで、IP 適用終了後の角膜および結膜内 FD-4 の滞留性を評価し、比較した。薬物ドナー側を陽極として、角膜では 0.5 および 2.0 mA/cm²、結膜では 2.0 および 10 mA/cm² の電流を 30 分間適用した。また、電流を適用していない条件 (0 mA/cm²) を control とした。IP 適用終了直後にドナー側およびレシーバー側の chamber 内溶液を新しい BRS で置換し、IP 適用終了直後および IP 適用終了から角膜では 210 分後、または結膜では 150 分後の実験終了時の組織内 FD-4 量を測定した。IP 適用終了直後の角膜および結膜内 FD-4 量は電流値依存的に増大した (Fig. 6)。IP 適用終了 210 分後および 150 分後の角膜および結膜内それぞれの FD-4 量は適用終了直後に比べて低下したが、210 分後の角膜内 FD-4 量はいずれの適用電流値でも control に比べて有意に高く (0.5 mA/cm² で 5.74 倍、2.0 mA/cm² で 8.23 倍)、一方、結膜ではいず

れの電流値でも IP 適用後 150 分で control と有意な差はなかった。

2-3. 本章の考察

眼組織 IP の *in vivo* 研究は、経皮 IP 薬物送達における電流値 (~0.5 mA/cm²)⁶⁾ と比較して高い電流値 (0.8~28.2 mA/cm²)⁹⁻¹²⁾ で評価されてきた。したがって、生きた組織における IP の場合、生存性および integrity の観点からの組織機能に対する電流適用の影響を知ることが重要である。本章の結果から、角膜および結膜の TEER 値は、上皮側を陽極または陰極を設置したいずれの条件でも IP 適用により急激に低下し、IP 適用終了後に回復することが明らかとなった。組織 TEER の回復は、上皮側を陽極にした場合では、角膜で 2.0 mA/cm²、結膜で 10 mA/cm²、また上皮側を陰極にした場合では、角膜で 2.0 mA/cm²、結膜で 5.0 mA/cm² の適用電流適用値で観察された。電流適用後の PD および I_{sc} の回復もまた TEER の挙動と一致したことから、これら適用電流値までは角膜および結膜の生存性および integrity を IP 適用後も維持していると考えられた。以上のことから、眼組織 IP における組織生存性および integrity における適用電流に対する感受性は、組織により異なることが明らかとなり、

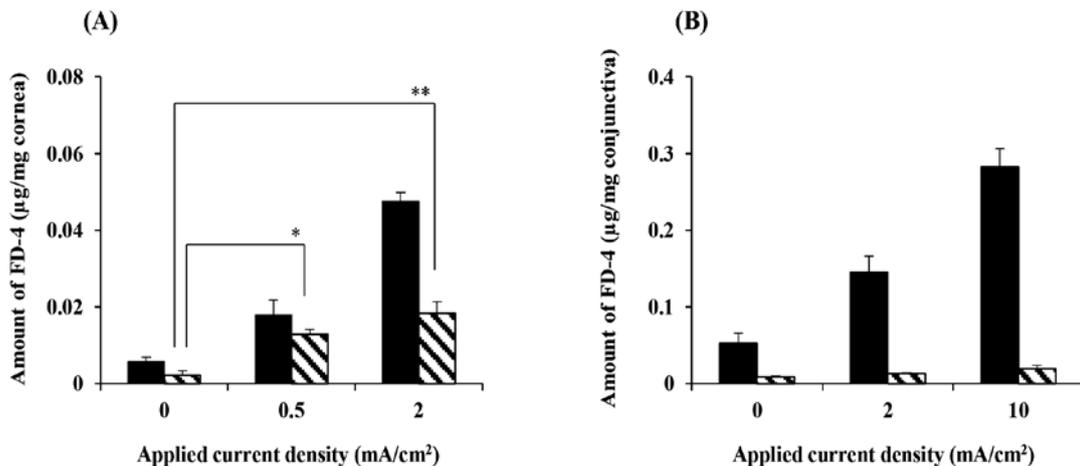


Fig. 6 IP 適用後の角膜内 (A) および結膜内 (B) の FD-4 滞留量

塗りつぶしは IP 適用終了直後の FD-4 濃度である。斜線は IP 適用後、角膜では 210 分、結膜では 150 分における FD-4 濃度である。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. significantly different from 0 mA/cm² (Tukey-Kramer test). Data represent mean \pm S. E. (n = 3-4)

さらに電極の設置方向、すなわち電流向きにも依存することが明らかとなった。

角膜および結膜において、LC では上皮側を陽極、BA では上皮側を陰極としたとき、IP 適用により flux が可逆的に増大した。このことは、イオン性薬物の透過が ER 効果に依存したことを示している。IP により得られた LC および BA の促進率（約 2-4 倍）は、経皮 IP で得られる典型的な促進効果と比較して高いものではなかった^{15, 16)}。その原因として、角膜および結膜を介した IP flux において、LC および BA の輸率が低いことが考えられる。電流適用下でのイオンの透過速度は膜を流れる総電流量 (I) に依存し、Eq. 1 で表される。

$$I = F \left(\sum_C J_+ + \sum_A J_- \right) \cdot \text{Area} \quad (\text{Eq. 1})$$

ここで、F はファラデー定数 (96485 C/mol)、Area は電流の有効面積である。Eq. 1 で示すように、I は、膜を介した陽イオンの透過速度 (J_+) と陰イオンの透過速度 (J_-) の総和であることが理解できる。すなわち、電流適用時に移動する荷電には、薬物イオンだけでなく、共存する同符号や異符号のイオンも含まれ、イオン性薬物の透過速度は同槽に共存するイオン種易動度の影響を受ける。輸率を考慮した薬物イオンの透過速度 (J_D) および薬物イオンの輸率 (t_D) は以下の式 (Eqs. 2 および 3) で表される⁶⁾。

$$J_D = \frac{1}{Z_D \cdot u_D \cdot c_D} \cdot t_D \cdot I \quad (\text{Eq. 2})$$

$$t_D = \frac{z_D \cdot u_D \cdot c_D}{\sum_{i=0}^i z_i \cdot u_i \cdot c_i} \quad (\text{Eq. 3})$$

ここで、z はイオン価数、u は易動度、および c はイオン濃度である。添え字の D および i は薬物およびその他のイオンを示す。Eq. 2 は電流適用下でのイオン性薬物の flux が薬物イオンの輸率に依存し、Eq. 3 は薬物イオンの輸率が、溶液中に含まれるイオン種の総量と易動度の積の比で決まることを意味している。本研究では、眼

組織の生存性を維持するために必要なイオン種が BRS 中に多量に含まれているため、定電流影響下、LC や BA よりもイオン移動度の高いイオン種の I に対する寄与、すなわち BRS 中のイオンの輸率が高くなっているものと考えられる。実際に算出した LC および BA イオンの輸率は、易動度の高い Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- および HCO_3^- のような共存イオンの輸率 (Na^+ : 0.42, K^+ : 0.02, Cl^- : 0.48, HCO_3^- : 0.07) に比べて極めて低いことが分かった。このことから、適用した電流のほとんどは薬物イオンによるものではなく、共存イオンの移動によるものであると推測された。したがって、IP により低分子イオン性薬物の高い透過促進効果を得るためには、薬物イオンの妥当な輸率が得られる溶媒イオン組成を考慮する必要があると考えられる。事実、点眼薬や結膜下注射に比べて眼内局所で数十倍の薬物濃度が得られている眼組織 IP の *in vivo* 研究では、共存イオンの影響を受けない水を薬物リザーバー溶液に使用している^{9, 17, 18)}。以上より、低分子イオン性薬物の眼組織 IP では、共存イオンの影響を考慮した条件設定が重要であることが示唆された。

非イオン性親水性高分子のモデルとして用いた FD-4 の角膜および結膜を介した透過に対して、上皮側を陽極として種々電流値で IP 適用したとき、flux の増大が観察された。このことから、FD-4 の flux の増大は、生理的 pH で負に荷電した生体膜において、陽極から陰極方向へ生じる EO 効果⁶⁾に起因すると思われた。実際に、結膜において FD-4 flux の増大は IP 適用中のみ観察されており、EO による溶媒流の一過的な誘導に起因していることを強く示唆している。一方、角膜を介した FD-4 flux は、結膜での挙動とは異なり、IP 適用後も持続した。これは角膜中に FD-4 が滞留していることによると推測されたため、IP 適用から 210 分後の角膜内 FD-4 量を測定したところ、IP 適用群の FD-4 量は、IP 非適用群と比較して明らかに高かった。このことから、IP により角膜へ移行した FD-4 が組織内に滞留することによって、flux が保たれているものと推察された。これは角膜と結膜の構造的な違い^{19, 20)}によるものかもしれない。すなわち、角膜は上皮細胞層、ボーマン膜、基質層、デュア層、デスメ膜および内皮細胞層から成り、特に上皮細胞層と内皮細胞層

に挟まれた領域に高分子薬物が滞留し、内皮細胞層もバリアとして機能して、flux が持続化した可能性が考えられる。対して、結膜は上皮細胞層および粘膜炎層から成り、組織中で高分子薬物が滞留できる領域が少ないものと考えられる (Fig. 7)。

3. イオンフォレシスにより細胞間隙が受ける影響と促進機構との関連性

結膜では、FD-4 のような親水性高分子は、その見かけの透過係数は TEER の逆数に比例し、その透過経路は細胞間隙であることが知られている²¹⁾。また、poly-L-arginine のようなポリカチオン性透過促進剤の処理による結膜 TEER の可逆的な低下、すなわち細胞間隙経路の可逆的な拡大により、FD-4 のような親水性高分子の透過が増大することが報告されている²¹⁾。電流適用により角膜および結膜 TEER の可逆的な低下が引き起こされたことから、IP 適用が細胞間隙の機能に影響を及ぼしている

ことが考えられた。

上皮組織を介した薬物の細胞間隙透過はタイトジャンクション (TJ) により制限され、それは 4 回膜貫通タンパク質である claudins や occludin、膜裏打ちタンパク質である zonula occludens (ZOs)、さらには細胞骨格である actin filament (F-actin) などのタンパク質複合体で形成される (Fig. 8)^{22, 23)}。Leonald らは、小腸結腸のモデルとして広く利用されている Caco-2 単層膜を用いた IP 研究を行い、TEER の低下に伴い親水性高分子薬物の透過が促進され、電子顕微鏡画像に基づき IP 適用が TJ 開口を導くことを報告した²⁴⁾。すなわち生きた上皮組織では、IP は TJ 関連タンパク質の会合状態を変化させることで細胞間隙経路を拡大し、通常は制限されている親水性高分子の膜透過促進に関与していることが考えられる。しかしながら、重層上皮細胞層から成る角膜や結膜における薬物の IP 透過促進機構に関する研究はほとんど行われておらず、細胞間隙透過性の制限に重要な TJ 機構に対して IP がど

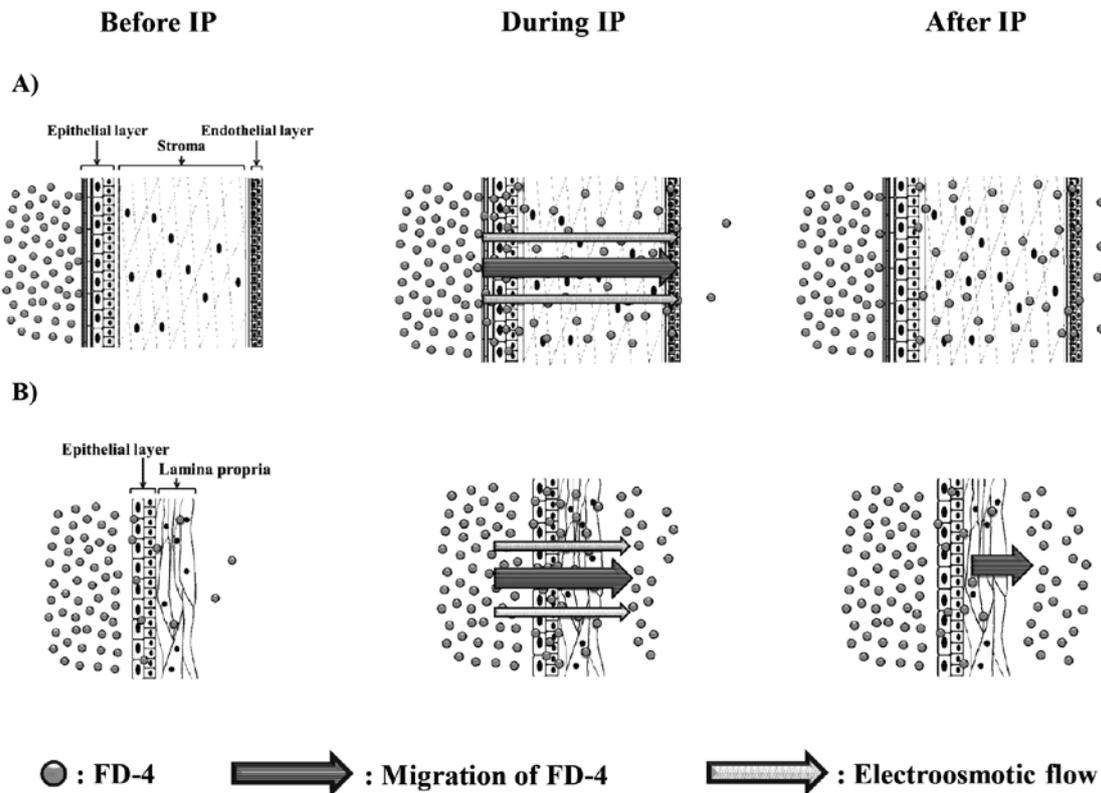


Fig. 7 角膜 (A) および結膜 (B) を介した FD-4 透過の IP 促進特性の違い

角膜 (A) : FD-4 は IP 適用中に組織内へ移行し、IP 適用終了後、組織に滞留し、徐々に放出される。結膜 (B) : FD-4 は IP 適用中に透過促進し、IP 適用終了後、組織には滞留せずに、すぐに放出される

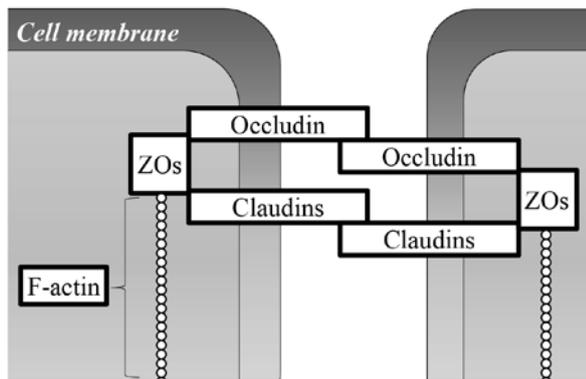


Fig. 8 上皮および内皮細胞間において claudins, occludin, ZOs および F-actin から成るタイトジャンクション複合体

のような影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。そこで本章では、非イオン性親水性高分子薬物に対する眼組織 IP の透過促進機構を明らかにするために、細胞間隙部位に存在する TJ 機構に対する電流適用の影響について検討した。

3-1. 角膜および結膜上皮タイトジャンクション関連タンパク質の局在性に対する電流適用の影響

初めに、角膜および結膜上皮 TJ 関連タンパク質の局在性を免疫染色法により評価した。前章の研究において、IP 適用終了後の角膜および結膜 TEER の回復速度が電流値に依存し、電流値増大に伴い回復が遅れることが認められたため、適用電流値が TJ 関連タンパク質の会合状態の回復過程に影響しているかどうかを評価した。適用電流値は、TEER の回復速度の違いから、上皮側を陽極として、角膜では 0.5 および 2.0 mA/cm²、結膜では 0.5 および 10 mA/cm² を 30 分間適用した。その結果、角膜および結膜ともに、電流適用前に細胞辺縁部に局在していた claudin-1, claudin-4, occludin および ZO-1 の蛍光シグナルは、適用終了直後に全てのタンパク質において低下した。低下した TJ 関連タンパク質の蛍光シグナルは、本検討で適用した電流値に関係なく、角膜では適用終了から 210 分後、結膜では適用終了から 90 分後に細胞辺縁部に再び確認された。しかし、適用電流値が低い条件 (0.5 mA/cm²) では、角膜では電流適用終了から 30 分後、結膜では電流適用終了から 15 分後の結果から、蛍光シ

グナルの細胞辺縁への再局在が確認できるが、高い条件ではそうではなく、適用電流値が高い場合、再局在に長い時間が必要と考えられた。

3-2. 角膜および結膜タイトジャンクション関連タンパク質の発現量に対する電流適用の影響

3-1. の検討において、電流適用により角膜および結膜上皮細胞辺縁の TJ 関連タンパク質の蛍光シグナルの低下が観察され、TJ 関連タンパク質の局在性変化や分解もしくは消失が生じているものと示唆された。そこで、IP が角膜および結膜組織内における TJ 形成に重要な役割を果たす claudin-1²⁵⁾ および高分子薬物の透過制限に重要な occludin²⁶⁾ の発現量に影響するかどうかをウェスタンブロット法により評価し、IP によるバリア機能低下や高分子薬物の透過促進に関与しているかを考察した。上皮側を陽極として、角膜では 2.0 mA/cm²、結膜では 10 mA/cm² の電流を 30 分間適用し、適用終了直後の組織中 claudin-1 および occludin の発現量を測定した。その結果、角膜および結膜ともに、電流適用前および適用終了直後の claudin-1 および occludin の発現量に有意な差は無かった。本結果は、角膜および結膜における TJ 関連タンパク質の発現量に対して電流適用が明らかな影響を及ぼさないことを意味する。

3-3. 角膜および結膜上皮の細胞骨格に対する電流適用の影響

IP は強制的な電位勾配を生じさせることにより、細胞内外のイオン環境を変化させ、細胞形態に影響を及ぼすことが推測される。そこで、電流適用が細胞形態に対して影響を及ぼすのかを評価するため、細胞骨格である F-actin の局在性を評価した。電流適用は、上皮側を陽極として、角膜では 2.0 mA/cm²、結膜では 10 mA/cm² の電流を 30 分間適用した。角膜および結膜において電流適用前に細胞辺縁部に局在していた F-actin の蛍光シグナルは、適用後も細胞辺縁に維持していた。これらのことから、電流適用は F-actin の局在性に対して明らかな影響を及ぼさないものと考えられ、細胞骨格に対する影響は考慮する必要がないものと考えられる。

3-4. 本章の考察

本章では、TJ 機構に対する電流適用の影響を明らかにするために、まず角膜および結膜上皮 TJ 関連タンパク質の局在性を評価した。角膜および結膜上皮の claudin-1, claudin-4, occludin および ZO-1 のような TJ 関連タンパク質の局在性は、上皮側を陽極とした条件で電流適用により可逆的に変化し、前章で明らかとなった TEER の可逆的な変化とよく対応することから、電流適用は TJ 関連タンパク質の会合と分布の状態に可逆的な影響を与えるものと推察された。また、電流適用終了直後の TJ 関連タンパク質の免疫染色画像において、いずれのタンパク質でも蛍光シグナルの低下が観察されたことから、細胞辺縁からの TJ 関連タンパク質の局在性変化だけでなく、タンパク質の分解も生じている可能性が考えられた。そこで、高い TJ バリア能の形成に重要な claudin-1 および occludin の量的変化をウェスタンブロット法で解析した。その結果、角膜および結膜のいずれのタンパク質においても、電流適用前と適用終了直後の発現量に明らかな違いは認められず、発現バンドも定位置から変化しなかった。したがって、電流適用により細胞辺縁からの TJ

関連タンパク質の蛍光シグナルの消失は、細胞質内への内在化によるものと確認された。さらに、IP は膜を介して強制電位を生じさせるため、細胞内外のイオン環境を変化させ、細胞形態に影響を及ぼすことも考えられたが、F-actin の局在性は明らかな影響を与えないことも確認された。これらのことから、角膜および結膜に対する IP 適用は角膜上皮および結膜上皮細胞の形態を維持したまま、TJ 関連タンパク質の局在性を変化させ、可逆的な TJ 開口を誘導すると考えられた。また、電流適用終了後に TJ 関連タンパク質が再局在する時間が、電流値間で異なることが明らかとなった。このことは、TEER の回復に対する適用電流値依存性は、細胞辺縁から局在変化した TJ 関連タンパク質の再局在性の違いによるものと考えられた。最近、腎上皮 A6 細胞層において静水圧や浸透圧のような細胞に対する物理的な作用が、claudin-1 のような TJ 関連タンパク質の局在性に影響することが報告されている^{27, 28)}。IP は、適用中に陽極から陰極方向へ溶媒流が生じることから、EO のような物理的な作用が TJ 関連タンパク質の会合に対して何かしらの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

以上、眼組織を介した親水性高分子薬物透過に対す

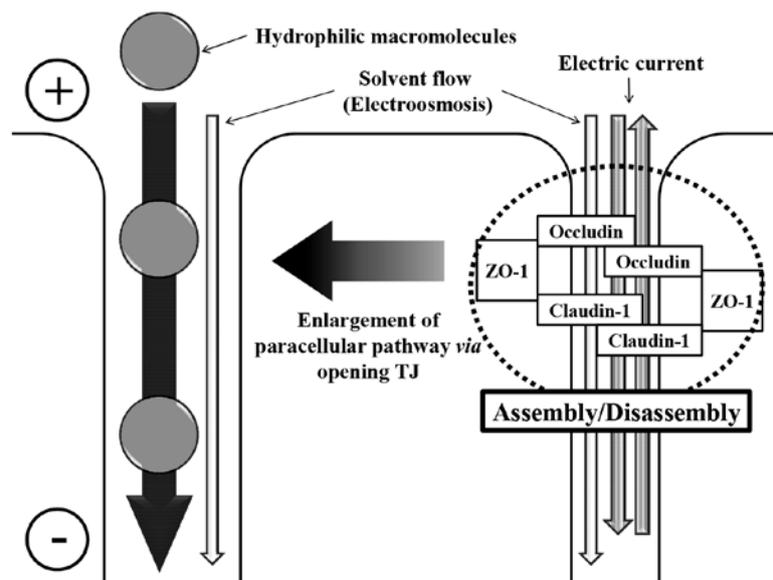


Fig. 9 眼組織 IP による親水性高分子の細胞間隙透過促進機構

IP の適用は、細胞間隙に局在する TJ 関連タンパク質の会合を変化させ、TJ 開口に伴う細胞間隙経路の拡大を誘導する。拡大した細胞間隙に電気浸透流が生じることで、親水性高分子の透過が促進する

る IP の促進効果は Fig. 9 のようにまとめることができる。通常、親水性薬物は細胞間隙を透過すると考えられ、特に親水性高分子の透過の場合には、上皮 TJ によるバリア機能によりそれが制限されている。上皮組織への電流適用は、細胞辺縁に局在している TJ タンパク質の会合と局在の状態を変化させることにより、高分子薬物の細胞間隙透過性を増大させる。電流適用下では、陽極から陰極方向に EO 効果による溶媒流を生じ、それが、これらの変化の引き金となって親水性高分子の膜透過が増大するものと推測される。

4. 結 論

著者は博士研究において、低分子イオン性および非イオン性高分子薬物を用いて、眼組織 IP の透過促進効果および細胞間隙を介した透過促進機構について特徴づけを行った。その結果、眼組織 IP は角膜および結膜の細胞間隙の拡大した状態で薬物透過を促進するものと考えられた。特に、眼組織 IP は細胞間隙バリアにより制限される高分子薬物で高い透過促進効果を示すことから、抗体や核酸医薬品のような高分子薬物に対する眼内薬物送達の有効な技術として期待できると考えられ、これらの結果は今後の眼組織 IP のシステム開発や電流適用条件の決定に対して有益な知見となるものとする。

5. 参考文献

- 1) Sutter FKP, Gillies MC : Pseudo-endophthalmitis after intravitreal injection of triamcinolone. *Br J Ophthalmol* 87, 972-974, 2003.
- 2) Hosoya K, Lee VHL, Kim K-J : Roles of the conjunctiva in ocular drug delivery: a review of conjunctival transport mechanism and their regulation. *Eur J Pharm Biopharm* 60, 227-240, 2005.
- 3) Urtti A, Salminen L : Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs. *Surv Ophthalmol* 37, 435-457, 1993.
- 4) Kompella UB, Kadam RS, Lee VHL : Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv* 1, 435-456, 2010.
- 5) Souza JG, Dias K, Pereira TA, et al : Topical delivery of ocular therapeutics: carrier systems and physical methods. *J Pharm Pharmacol*, 66, 507-530, 2013.
- 6) Kalia YN, Naik A, Garrison J, et al : Iontophoretic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 619-658, 2004.
- 7) Guy RH, Kalia YN, Delgado-Charro MB, et al : Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. *J Control Release*, 64, 129-132, 2000.
- 8) Binstock EE, Domb AJ : Iontophoresis: A non-invasive ocular drug delivery. *J Control Release*, 110, 479-489, 2006.
- 9) Grossman RE, Chu DF, Lee DA : Regional ocular gentamicin levels after transcorneal and transscleral iontophoresis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 909-916, 1990.
- 10) Choi TB, Lee DA : Transscleral and transcorneal iontophoresis of vancomycin in rabbit eyes. *J Ocul Pharmacol Ther*, 4, 153-164, 1988.
- 11) Eljarrat-Binstock E, Raiskup F, Frucht-Pery J, et al : Transcorneal and transscleral iontophoresis of dexamethasone phosphate using drug loaded hydrogel. *J Control Release* 106, 386-390, 2005.
- 12) Patane MA, Cohen A, From S, et al : Ousler, Ocular iontophoresis of EGP-437 (dexamethasone phosphate) in dry eye patients: results of a randomized clinical trial. *Clin Ophthalmol* 5, 633-643, 2011.
- 13) Hidehisa S, Ehara J, Hanabata Y, et al : Characterization of ocular iontophoretic drug transport of ionic and non-ionic compounds in isolated rabbit cornea and conjunctiva. *Biol Pharm Bull* 39, 1-10, 2016.
- 14) Ueda H, Lee VHL : Characterization of iontophoretic drug transport in the rabbit conjunctiva. *Proceed Int'l Symp Control Rel Bioact Mater* 28, 754-755, 1998.
- 15) Nicoli S, Cappellazzi M, Colombo P, et al : Characterization of the permselective properties of rabbit skin during transdermal iontophoresis. *J Pharm Sci* 92,

- 1482-1488, 2003.
- 16) Numajiri S, Sugibayashi K, Morimoto Y : Analysis of in vitro iontophoretic skin permeation of sodium benzoate by transport numbers of drug and additives. *Chem Pharm Bull* 44, 1351-1356, 1996.
- 17) Hobden JA, Rootman DS, O'callaghan RJ, et al : Iontophoretic application of tobramycin to uninfected and *pseudomonas aeruginosa*-infected rabbit corneas. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 978-981, 1988.
- 18) Behar-Cohen FF, El Aouni A, Gautier S, et al : Transscleral coulomb-controlled iontophoresis of methylprednisolone into the rabbit eye: Influence of duration of treatment, current intensity and drug concentration on ocular tissue and fluid levels. *Exp Eye Res* 74, 51-59, 2002.
- 19) Sunkara G, Kompella UB : Membrane transport processes in the eye. In : *Ophthalmic Drug Delivery Systems* (Mitra AK, ed), Marcel Dekker, New York, 13-58, 2003.
- 20) Dua HS, Faraj LA, Said DG, et al : Human corneal anatomy redefined: A novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmol* 120, 1778-1785, 2013.
- 21) Nemoto E, Takahashi H, Kobayashi D, et al : Effect of poly-L-arginine on the permeation of hydrophilic compounds through surface ocular tissues. *Biol Pharm Bull* 29, 155-160, 2006.
- 22) Denker DM, Nigam SK : Molecular structure and assembly of tight junction. *Am J Physiol* 274, F1-F9, 1998.
- 23) Shen L, Weber CR, Raleigh DR, et al : Tight junction pore and leak pathway: A dynamic duo. *Annu Rev Physiol* 73, 283-309, 2011.
- 24) Leonard M, Creed E, Brayden D, et al : Evaluation of the Caco-2 monolayer as a model epithelium for iontophoretic transport. *Pharm Res* 12, 1181-1188, 2000.
- 25) Furuse M, Hata M, Furuse K, et al : Claudin-1-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156, 1099-1111, 2002.
- 26) Sadi RA, Khatib K, Guo S, et al : Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelium tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300, 1054-1064, 2011.
- 27) Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, et al : Hydrostatic pressure regulates tight junctions, actin cytoskeleton and transcellular ion transport. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 1315-1321, 2009.
- 28) Tokuda S, Miyazaki H, Nakajima K, et al : NaCl flux between apical and basolateral side recruits claudin-1 to tight junction strands and regulates paracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 390-396, 2010.

Characterization of the enhancement effect of drug transport by ocular iontophoresis

Hidehisa SEKIJIMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Suzuka University of Medical Science

Key words: Ocular drug delivery, drug delivery system, iontophoresis, cornea, conjunctiva, enhancement effect of drug transport, electrophysiology, tight junction

Abstract

Iontophoresis (IP) is known as a physical technique for drug absorption enhancement using electricity, which has been studied widely to enhance drug absorption through the skin and mucosa such as ocular surface tissues. A number of ocular IP studies for intraocular drug delivery have investigated in *in vivo*, especially, corneal and conjunctival IP are expected to be developed as an enhancing technique for drug absorption on the anterior (cornea and lens etc.) and posterior (retina and macular area etc.) eye diseases, respectively. Currently, ocular IP has not been used practically, since iontophoretic enhancement properties of drug absorption in the viable cornea and conjunctiva have not been characterized well to date. The author investigated to characterize enhancement properties of ocular IP using *in vitro* technique. The permeability of small molecular ionic and large molecular non-ionic drug across cornea and conjunctiva was increased by IP application. The iontophoretic enhancing effect of transport of large molecular drug was higher than that of small molecular drug. Since application of electric current up to 2.0 mA/cm² in cornea and up to 10 mA/cm² in conjunctiva was induced to change reversibly the localization of tight junction (TJ)-associated protein in epithelium, it was suggested that reversible opening TJ in the corneal and conjunctival epithelium contributes to enhancement of drug transport by ocular IP. These findings indicate that ocular IP may be a useful non-invasive technique to achieve drug delivery of large molecules into the eyes.

略 歴

関島 秀久 (博士 [薬学]) 鈴鹿医療科学大学 薬学部 病態・治療学分野 助手

学歴：

平成 24 年 城西大学 薬学部 薬学科 卒業

28 年 城西大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程 修了

職歴：

平成 28 年 鈴鹿医療科学大学 薬学部 病態・治療学分野 助手

受賞歴：

平成 27 年 日本薬学会第 135 年会 優秀発表者賞

学会活動：

日本薬学会 (正会員)

日本薬剤学会 (正会員)

日本 DDS 学会 (正会員)

日本医療薬学会 (正会員)

日本老年薬学会 (正会員)

主な研究内容：

イオントフォoresisを利用した薬物吸収促進に関する研究

ライフステージに応じた薬物の経皮・経粘膜吸収に関する研究