

ルドステロンは、レニン-アンジオテンシン系の調整下にあるため正常である。そのため、臨床症状としては、高ACTH血症による皮膚や粘膜の色素沈着、低コルチゾール血症による痙攣や昏睡の低血糖症状、哺乳力低下、成長障害などで、アルドステロン低下に伴う血圧低下、電解質異常を認めることはない<sup>10)</sup>。しかしAllgrove症候群と診断された中に、一部、低アルドステロン血症を伴う症例の報告も認める<sup>11)~16)</sup>。Clark等は、約15%にアルドステロン低下を伴っている<sup>2)</sup>。また、発症年齢は様々だが、副腎不全は先天性のものであるとし、患者の同胞で乳児早期に死亡した例を複数認め、副腎不全が原因と予想されるとする報告もある<sup>2) 11) 12)</sup>。Lanes等は、この原因として、副腎と自律神経系のdegenerationが関与している可能性を示している<sup>11)</sup>。本症例は、出生時より皮膚色素沈着を認め、日齢5に低血糖、低血圧、電解質異常が出現した。高ACTH血症、低コルチゾール血症に、アルドステロンの低下を伴っており副腎不全と診断した。超低出生体重児であったために、先天性副腎皮質機能低下症の鑑別のための負荷試験は行っていない。本症例の副腎不全は、ハイドロコルチゾン投与にて症状は改善した。経過とともに血液検査所見も改善を認めていたため死亡原因とは考え難い(表2)。

無涙症は、出生時から指摘されている報告を散見する<sup>9) 17)</sup>。Allgrove症候群のなかで、最も早く発症し、最も共通していると言われている<sup>2) 18)</sup>。しかし、本症例の様に潰瘍を合併することは稀である。

アカラシアは、発症年齢は様々である。成人発症のAllgrove症候群では、繰り返す嘔吐で疑われることが多い<sup>16) 19)</sup>。また、小児例では、繰り返す低血糖発作の経過フォロー中に、アカラシアが発症したことから本疾患を疑われた例も報告されており<sup>4)</sup>臨床に注意すべき点である。本症例は、誤嚥を繰り返すことをきっかけで精査、診断された。乳児期にアカラシアが発症するものは稀で、今までの報告を見るかぎり、生後5ヶ月での発症が最も早い<sup>2)</sup>。今回の症例は、生後3ヶ月頃から症状が出現、4ヶ月で診断しており、最も早い発症例かもしれない。

小児では、それぞれ単独でも稀な疾患を3つとも合併しており、遺伝子診断による確定には至らなかったが、本症例もAllgrove症候群と診断した。また、Allgrove症候群(3A症候群)に自律神経障害や、様々

な神経学的異常を合併する(Autonomic and other neurological abnormalities) 4A症候群という概念も報告されている<sup>2) 12) 16) 18) 20)</sup>。神経所見に関しては、様々な報告を認めるが、本症例は、視神経の委縮と、骨折していたにも関わらず、多動で、開放創となったことから知覚障害も疑われる。また、骨粗鬆症の合併の報告もあり<sup>16)</sup>、上腕骨の骨折があったことから、この可能性も疑われる。これらの合併症からもAllgrove症候群の疾患概念と合致すると考えられる。

## 結 び

これまでのAllgrove症候群の報告をみると、症状の発現は、ほとんど幼児期以降で、乳児の診断例は認めない。まして、超低出生体重児の報告例は認めない。子宮内発育遅延との関連は不明であるが、本症例は発症時期だけでなく、それぞれの症状も重症であり、治療に難渋した。

謝辞 本症例の遺伝子解析をして頂いた、国立成育医療センター内分泌代謝研究部の勝又規行先生、診断および治療に御助言頂いた、大阪府立母子保健総合医療センター、企画調査部 岡本伸彦先生、同第1小児内科 位田忍先生、同外科・川原央好先生、同眼科・初川嘉一先生に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Allgrove J, Clayden GS, Grant DB, et al. Familial glucocorticoid deficiency with achalasia of the cardia and deficient tear production. *Lancet* 1978; 1: 1284-1286.
- 2) Clark AJ, Weber A. Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. *Endocr Rev* 1998; 19: 828-843.
- 3) Katsumata N, Hirose H, Kagami M, et al. Analysis of the AAAS gene in a Japanese Patient with Triple A Syndrome. *Endocrin Journal* 2002; 49 (1): 49-53.
- 4) 広瀬宏之, 川口裕之, 奥井雅人他. ACTH 不応症に無涙症を合併し Allgrove 症候群と考えられた 1 例. *日本小児科学会雑誌* 1998; 102 (8): 912-915.
- 5) Kinjo S, Takemoto M, Katsumata N, et al. Two cases of Allgrove syndrome with mutations in the AAAS Gene. *Endocrine Journal* 2004; 12: 1401.
- 6) 篠田恵一, 辻久仁子, 勝又規行他. Triple A 症候群の本邦成人例に関する臨床的検討. *臨床神経学* 2002; 12: 1401.
- 7) Weber A, Wienker TF, Jung M, et al. Linkage of the gene for the triple A syndrome to chromosome 12q13 near the type II keratin gene cluster. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 2061-2066.
- 8) Tullio-Pelet A, Salomon R, Hadj-Rabia S, et al. Mutant WD-repeat protein in triple-A syndrome. *Nat Genet*

- 2000 ; 26 : 332-335.
- 9) Handschug K, Sperling S, Yoon SJ, et al. Triple-A syndrome is caused by mutations in AAAS, a new WD-repeat protein gene. *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 283-290.
  - 10) 佐々木悟郎. ACTH 不応症. *小児内科増刊号* 2002 ; 22 : 399-400.
  - 11) Lanes R, Plotnick LP, Bynum TE, et al. Glucocorticoid and Partial Mineralocorticoid deficiency associated with Achalasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1980 ; 50 : 268-270.
  - 12) Grant DB, Barnes ND, Dumic M, et al. Neurological and adrenal dysfunction in the adrenal insufficiency/alacrima/achalasia (3A) syndrome. *Archives of disease in Childhood* 1993 ; 68 : 779-782.
  - 13) Sandrini F, Farmakidis C, Kirschner LS, et al. Spectrum of Mutation of the AAAS Gene in Allgrove syndrome : Lack of Mutation in Six kindreds with Isolated Resistance to Corticotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86 (11) : 5433-5437.
  - 14) Houlden H, Smith S, De Carvalho M, et al. Clinical and genetic characterization of families with triple A syndrome. *Brain* 2002 ; 125 : 2681-2690.
  - 15) Reshmi-Skarja S, Huebner A, Handschug K, et al. Chromosomal fragility in patients with Triple A syndrome. *Am J Med Genet* 2003 ; 117 A : 30-36.
  - 16) Ozgen AG, Ercan E, Ozutemiz O, et al. The 4A Syndrome association with Osteoporosis. *Endocrine Journal* 1999 ; 46 (1) : 227-230.
  - 17) S. Zucchini, et al. Adrenocortical insufficiency associated with achalasia and alacrima : Variability of clinical finding in two cases. *Pediatr Res* 1988 ; 24 : 544.
  - 18) Moore. P.S, Couch. R.M, Perry Y.S, et al. Allgrove syndrome: an autosomal recessive syndrome of ACTH insensitivity, achalasia and alacrima. *Clin Endocrinol* 1991 ; 34 : 107-114.
  - 19) Kimber J, McLean BN, Prevett M, et al. Allgrove or 4A syndrome: an autosomal recessive syndrome causing multisystem neurological disease. *J Neurol neurosurg Psychiatry* 2003 ; 74 : 654-657.
  - 20) Gazarian M, Cowell CT, Bonney M, et al. The 4A syndrome : Adrenocortical insufficiency associated with achalasia, alacrima, autonomic and other neurological abnormalities. *Eur J Pediatr* 1995 ; 154 : 18-23.

#### A Case of Extremely Low Birth Weight Infant with Allgrove Syndrome

\*1 Department of Pediatrics, Kitasato University

\*2 Department of Neonatology, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health

Manabu KEMMOCHI \*1, Hiroyuki KITAJIMA \*2, Masanori FUJIMURA \*2

Allgrove syndrome (AAAS) is characterized by the clinical triad of adreno-corticotropic hormone resistance adrenal failure, achalasia, and alacrima. We experienced an ELBW case with AAAS.

CASE : GA 30wks, BW 666g. At day 5, she showed adrenal failure with prolonged alacrima. Within several months, corneal ulcer and achalasia, were noticed. The pattern of serum mineral corticoid level was different from that of other AAAS patients. Although the association of achalasia and alacrima has not yet been explained without this syndrome. Moreover, AAAAS, including autonomic and other neurological abnormalities to AAAS, was known. she had optic atrophy later, which confirms to the criteria of AAAAS syndrome.

This syndrome is caused by AAAS gene mutation, plays a major pathogenic rule. Although we could not find any mutations in the case, this is the first report on an ELBW case with AAAS.

Allgrove 症候群 (AAAS) は、ACTH 不応症と、アカラシア、無涙症を合併する疾患である。今回、我々は、AAAS の超低出生体重児例の 1 例を経験したので報告する。【症例】在胎 30 週、出生体重 666g で出生した。日齢 5 に副腎不全が出現した。その後、数ヶ月の間に角膜潰瘍と、アカラシアを合併した。AAAS は、通常は ACTH 不応症のために血清アルドステロン値は正常で、我々の症例とは異なる。しかし、アカラシアと無涙症を合併する疾患は他には認めない。血清アルドステロン値低下の原因として、副腎皮質と自律神経系の変性の可能性が指摘されている。また、4A 症候群は Allgrove 症候群に自律神経系を含む、神経系の異常を伴うものとされている。本症例も、視神経委縮があり、これを充たすものであった。現在までに、Allgrove 症候群は AAAS 遺伝子の変異であることがわかっている。我々の症例も遺伝子解析を施行したが、同定することができなかった。我々が知る限りでは、Allgrove 症候群、初の乳児例で、かつ、超低出生体重児例である。

## 症例報告

## 先天性気管狭窄・憩室症を合併した超低出生体重児の一例

(平成19年5月15日受付)

(平成19年6月22日受理)

大阪府立母子保健総合医療センター新生児科<sup>1)</sup>, 同小児外科<sup>2)</sup>木下 大介<sup>1)</sup> 和田 芳郎<sup>1)</sup> 田中 真也<sup>1)</sup> 白石 淳<sup>1)</sup>  
北島 博之<sup>1)</sup> 藤村 正哲<sup>1)</sup> 川原 央好<sup>2)</sup>

## Key words

congenital tracheal stenosis  
tracheal diverticulum  
IUGR  
3D-CT

**概要** 子宮内発育遅延 (Intrauterine growth retardation; 以下 IUGR) を呈した超低出生体重児に先天性気管狭窄 (Congenital tracheal stenosis; 以下 CTS) と気管憩室を合併するというまれな症例を経験した。症例は在胎28週4日、622gで出生した女兒。呼吸窮迫症候群のため気管内挿管のうえ、人工呼吸器管理を開始したが、気管チューブ位置がわずかに深くなるだけでまったく換気不能となる問題が続き、気管ファイバー、気管3D-CT、気管造影検査による精査の結果、気管憩室を合併したCTSと診断した。低出生体重児であり、換気可能であったため、呼吸器症状に留意し体重増加、気管狭窄部の成長を待ち日齢61 (1,144g) に人工呼吸器より離脱しえた。

狭窄部の形態、成長の把握に3D-CTが有用であった。今後の呼吸器症状により手術適応の有無を検討していく必要がある。

## 緒言

CTSは主に乳幼児期に気付かれ、喘鳴を主訴とするきわめてまれな疾患である。

今回我々はIUGRを呈した超低出生体重児にCTSと気管憩室 (tracheal diverticulum) を合併するという過去に報告がない症例を経験したので報告する。

## 症例

母体28歳、0経妊0経産、自然妊娠。在胎25週からIUGRを指摘されていた。母体の血液検査にてTORCH症候群はすべて否定され、胎児超音波では胎児奇形、羊水量の異常は認めなかった。胎内での発育停滞と遅発性一過性徐脈が頻発したため在胎28週4日に帝王切開にて出生した。

体重622g (-2.3S.D)、身長30cm (-2.7S.D)、頭囲23.5cm (-1.4S.D) の女兒であり、APGAR scoreは1分6点、5分8点、単一臍帯動脈を認めた。

出生後、陥没呼吸が進行し気管内挿管を施行 (内径2.5mmの気管チューブでチューブの深さは口唇にて6.5cm) した。胃液のマイクロバブルテストはweakであり、呼吸窮迫症候群と判断し、サーファクタントの気管内投与により呼吸状態は改善したが、蘇生中気管

内チューブがわずかに深くなるだけで全く換気不能となるエピソードがあった。

人工呼吸器管理開始後も努力呼吸は持続し、生後数時間から著明な腹部膨満が出現した。メコニウム関連イレウスを疑い、注腸造影を施行したが否定的であった。

気管チューブ位置の変化により急激な徐脈、低酸素発作を繰り返し、胸郭の上がり方は不良で、吸引チューブ先端のつかかり感などの気管チューブの閉塞感とともに著明なリークを認めたために、留置位置を浅くしたり、気管チューブを入れ替えることで当初は対応していた。日齢13に気管構造異常を疑い気管ファイバー (図1) を施行したところ気管チューブ先端がおよそ鎖骨線上に留置してあるにもかかわらず、チューブの先端付近に盲端 (図1a, b: 矢印, c, d) と思われる異常な分岐の存在と気管狭窄 (図1a, b: 矢頭) を認めた。日齢14に施行した気管3D-CT (図2a) では、気管分岐部から約12mm上方に5mm程度の範囲で最狭部0.5mmの気管狭窄部を認め、加えて狭窄部直上に奥行き2mmの盲端らしき病変を認めた。気管・食道造影 (図3) では気管食道間の瘻孔形成は否定的であり、心

図1 気管ファイバー (日齢13)

a~d: 図上方が背側, 下方が腹側  
 a, b: 気管内チューブ直下の異常分岐, 腹側は狭窄部 (矢頭), 背側は盲端様病変 (矢印)  
 c, d: 盲端様病変の拡大像

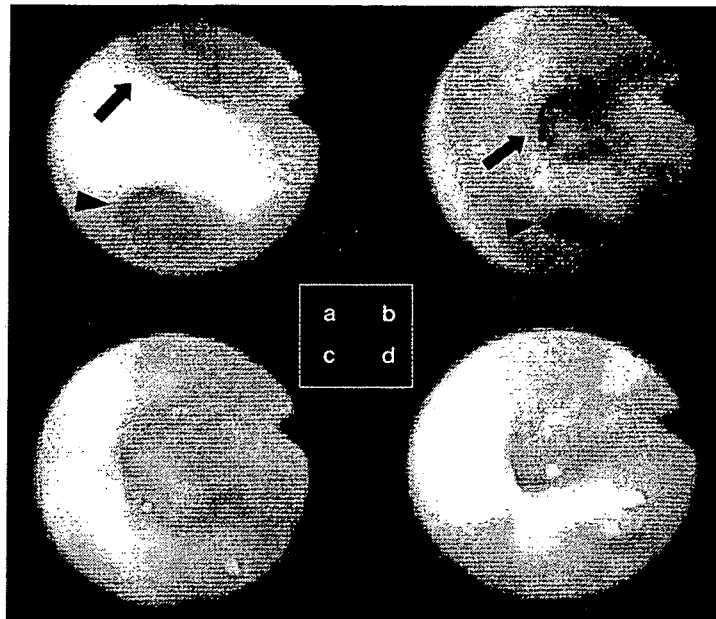
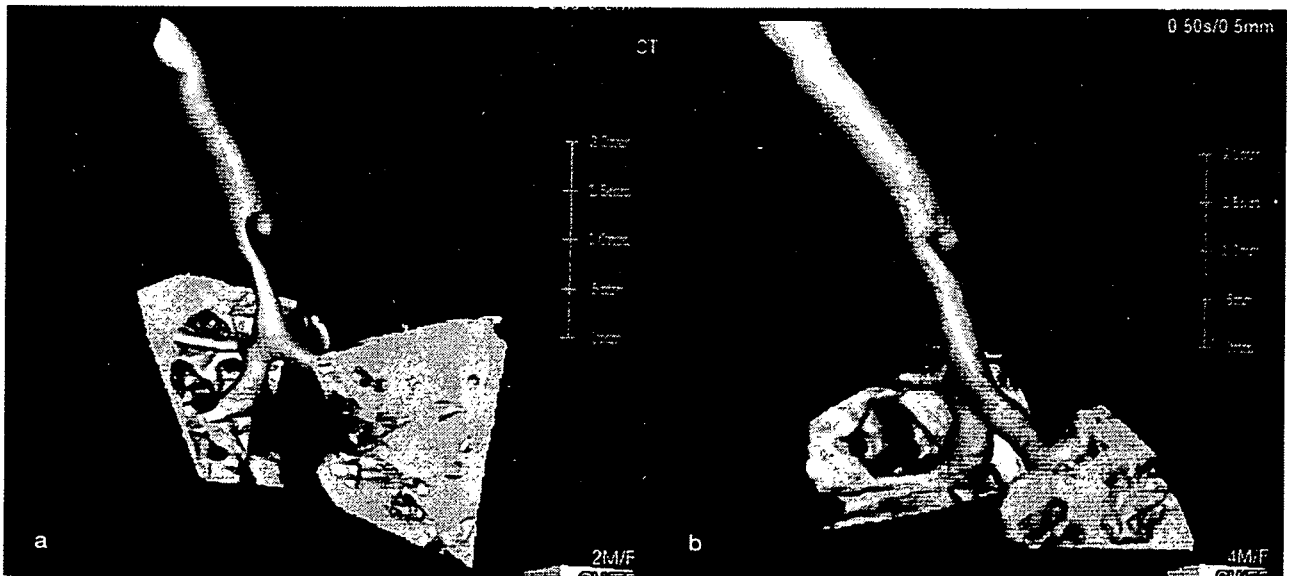


図2 気管3D-CT (日齢14)

a: 日齢14 最狭部約1.5mm, 狭窄範囲約5mm  
 b: 日齢132 最狭部約3mm, 狭窄範囲約8mm



臓超音波, 胸部造影CT検査でも気管狭窄の原因となる異常血管は認めなかった. チューブ位置に留意し換気可能であり, 低体重であることも考慮し外科的介入は行わず, 体重増加および気管狭窄部の成長を待ち, 日齢61 (体重1,144g) に計画的に抜管した. 陥没呼吸を認めたが, 酸素化は良好であり人工呼吸器からの離脱に成功し日齢148で退院となった. 現在修正1歳である

が, 身長・体重は-1.5~-1.0S.Dでキャッチアップ傾向にあり, 頭囲成長と精神運動発達は正常範囲内である. 感冒時に原疾患を考慮され2回入院したが, 呼吸状態の悪化は認めなかった.

考察

本症例は呼吸窮迫症候群も発症しており, 当初積極的に気管病変を疑っていなかったが, 人工呼吸器管

図3 気管・食道造影(日齢15)

左側：側面像 右側：正面像 気管食道間の瘻孔は認めない



理中のトラブルを契機に気管病変を疑い気管ファイバー、気管3D-CT、気管食道造影を施行し、先天性気管狭窄・憩室症と診断しえた。メコニウム関連イレウスが否定的な早期の腹部膨満も気管病変を疑う一つの契機となった。

気管、気管支異常は持続性の咳、喘鳴、反復性の気管支炎、肺炎の原因ともなり、ときには突然死につながる可能性もある<sup>1)</sup>。気管狭窄は気管軟骨の形成異常のため生じ、気管の発生する胎生4週～胎生3カ月半ばまでの間に感染、薬剤等なんらかの因子が加わって起こると推察されている。組織型としては気管膜様部が存在せず気管壁の全周を軟骨がドーナツ様に取り囲んでいる(complete tracheal ring)場合が多く<sup>1)~4)</sup>、気管ファイバー、造影、CT、MRI検査が診断に際して有用である<sup>2) 3)</sup>。Cantrellは狭窄の形態、範囲により、全長型、漏斗型、限局型の3タイプに分類している<sup>4)</sup>。肺・気管支奇形、心血管系の奇形・位置異常やその他の肺外奇形を合併することも多い<sup>1) 3)</sup>。予後を規定する因子としては狭窄の範囲があげられている<sup>1) 3) 5)~7)</sup>。先天性気管憩室は位置異常あるいは分岐過剰の頓挫型と考えられるが、異常交通の頓挫型でも有りえるとされる<sup>1)</sup>。

本症例は限局型の気管狭窄であり、狭窄部直上に憩室を認めた。単一臍帯動脈、第5腰椎椎体の楔状変形が見られた以外には、血管輪等の肺外合併症は認めなかった。本症例における呼吸器症状は、気管チューブが狭窄部を通過できないことに加え、憩室部にチューブが入り込み換気不能になっていたこと、迷走神経反射が容易に誘発されていたことなどが原因と推察された。

CTSの治療では、手術療法あるいは対症療法が選択肢される。重症度も考慮し、安全に手術が行えるなら

手術療法(バルーン拡張術・ステント留置術、切除端々吻合術、肋軟骨移植法、スライド気管形成法等)を優先するが<sup>3) 7)</sup>、手術療法に伴う危険性が高い・または症状が軽度の場合、対症療法を優先し、成長により狭窄症状の軽快が期待できることも報告されている<sup>6) 8)</sup>。憩室症に関しては、おおむね保存的対症療法が選択される<sup>9)</sup>。本症例は限局型CTSであり気管憩室の合併の存在も呼吸管理を困難にしていたが、経時的な観察で気管狭窄部の成長が認められた(図2b)。今後も感染症時における呼吸状態の観察が必要である。超低出生体重児においても呼吸器管理中の説明の付き難い呼吸障害をみた場合、CTS・憩室を念頭に置いた、積極的な気道病変の検索が肝要と思われた。

#### まとめ

人工呼吸器管理中の説明の付き難い呼吸障害を呈した超低出生体重児に対して気管ファイバー、気管3D-CT、気管造影検査を含めた精査を施行することにより、CTS・憩室症と診断しえた。今後手術適応について検討していく必要がある。

尚、本論文の要旨は第41回日本周産期・新生児医学会(2005年、於：福岡)において発表した。

#### 文献

- 1) 辻志津佳. 先天性気管・気管支形態異常の臨床的検討. 日本小児科学会雑誌 1991; 95: 1344-60
- 2) 山本哲郎. 先天性気管狭窄症. 日本小児呼吸器疾患雑誌 1993; 4: 43-6
- 3) Elliott M, Roebuck D, Noctor C, et al. The management of congenital tracheal stenosis. Int. J. Pediatric Otorhinolaryngology 2003; 67: 183-92
- 4) Cantrell JR, Guild HG. Congenital stenosis of the trachea. Am J Surg 1964; 108: 297-305
- 5) Grillo HC, Wright CD, Vlahakes GJ, et al. Management of congenital tracheal stenosis by means of slide tracheoplasty or resection and reconstruction, with

- long-term follow-up growth after slide tracheoplasty. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002 ; 123 : 145-52
- 6) Rutter MJ, Willqing JP, Cotton RT. Nonoperative Management of Complete Tracheal Rings. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004 ; 130 : 450-2
- 7) Maeda K, Yasufuku M, Yamamoto T, et al. A new approach to the treatment of congenital tracheal stenosis : balloon tracheoplasty and expandable metallic stenting. *Journal of pediatric surgery* 2001 ; 36 : 1646-9
- 8) Manson D, Filler R, Gordon R. Tracheal growth in congenital tracheal stenosis. *Pediatr Radiol* 1996 ; 26 : 427-30
- 9) Miles Dinner, Robert Ward, Esther Yun. Ventilation Difficulty Secondary to a Tracheal Diverticulum. *Anesthesiology* 1992 ; 77 : 586-7

#### A Case of extremely low birth weight infant with a congenital tracheal stenosis and tracheal diverticulum

Daisuke Kinoshita<sup>1)</sup>, Yoshirou Wada<sup>1)</sup>, Shinya Tanaka<sup>1)</sup>, Jun Shiraishi<sup>1)</sup>,  
Hiroyuki Kitajima<sup>1)</sup>, Masanori Fujimura<sup>1)</sup>, Hisayoshi Kawahara<sup>2)</sup>

Department of Neonatal Medicine, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health<sup>1)</sup>  
Department of Pediatric Surgery, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health<sup>2)</sup>

We are reporting a case of extremely low birth weight with a congenital tracheal stenosis and tracheal diverticulum, where tracheal 3 dimensional computed tomography (3D-CT) was useful for establishing diagnosis and clinical follow-up. A female, intrauterine growth restricted infant was born at 28weeks gestation, weighing 622grams. She was intubated and pulmonary surfactant (120mg/kg) administered immediately after birth. During mechanical ventilation, as the endotracheal tube was positioned slightly deeper, difficulties in ventilation with a large amount of leakage of inspired air was encountered. In order to rule out tracheal abnormalities, an endotracheal fiber scope, 3D-CT, broncho-esophagealgraphy and enhanced chest CT were performed, revealing a 5mm long tracheal stenosis at the point of 12mm above the carina with the narrowest internal diameter of 0.5mm. A diverticulum was also located in the posterior wall of the trachea just above the stenotic portion. There was no sign of pulmonary sling. Her general condition remained stable with occasional desaturation. She was weaned off from ventilator and was extubated at 61 days of life (1144grams). Although her breathing has been somewhat constrained, air way pressure support has not been required.



## NICU における院内感染対策

北 島 博 之\*

### 要 旨

NICU 入院児における感染予防の原則は、正常皮膚および口腔内・腸内細菌叢（ビフィズス菌叢）の早期確立と、医療者の介助による院内感染原因菌による汚染（水平感染）の排除にある。後者の実施のためには、厳密な手洗いと児に使用する物品を個別にしなければならない。特に感染を起こしやすい部位（気管吸引物、便、皮膚病変）のグラム染色と日常的に細菌の監視を行うことが予測的診断・治療に結びつく。主な原因菌は MRSA・緑膿菌、そしてカンジダであり、GBS III 型菌やエンテロウイルスの水平感染予防も重要である。

### はじめに

分娩室で問題のない正常新生児には、母親固有の正常菌叢を児に積極的に定着させることである。そして正常細菌叢の定着により、病原性細菌の定着を防ぐ。そのためには以下の5項目を遂行することで、かなりの院内感染予防の効果がある。NICU 入室の児は②が実施できないだけで基本的には変わりがない。

- ① 分娩後早期からのだっこ・カンガルーケア（皮膚へ）と早期授乳（口腔内・腸管内）
- ② 母子同室・同床の徹底（他者の介助による水平感染を排除する）
- ③ 母乳哺育でビフィズス菌の腸内での定着をはかること
- ④ 児に触れる前後の消毒剤による手洗いと沐浴の個別化（1回ごとに浴槽の消毒）
- ⑤ 計測器具の個別化や消毒（体温計・聴診器などを個人別にする）

NICU 入院児においては、上述した出生時の母子の濃厚接触がないだけでなく、さまざまな感染ルートになるラインを伴って入院してくる。感染を起こしやすい部位のグラム染色を行うことで、日常的に細菌の監視を行うことが予測的診断ならびに治療に結びつく。もちろん監視培養データも重要である。さらに院内感染原因菌株の保存という重要な役割が細菌検査室にあり、院内感染予防対策の基本的な解析手順が決まる。NICU における院内感染症の監視が効果的な部位は、気管吸引物、便、皮膚病変である。また対象菌は、MRSA、緑膿菌その他の腸内細菌群、カンジダなどである。すべて病棟内ですすでによく分離されている菌群で、グラム染色により判別が容易である。

一方、新生児側からみると無菌的な皮膚で母親以外の他者にケアされることは、細菌学的にはもっとも危険なことであり、できるだけ正常細菌叢を定着させながら他者のケアを受けるこ

\* Hiroyuki KITAJIMA 大阪府立母子保健総合医療センター新生児科  
[連絡先] ☎ 594-1101 大阪府和泉市室堂町 840 大阪府立母子保健総合医療センター新生児科

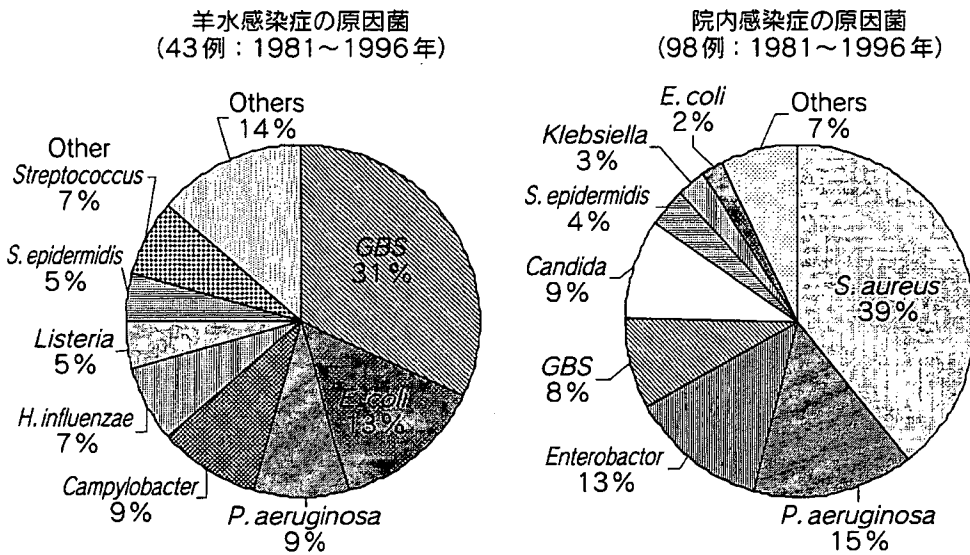


図1 大阪府立母子保健総合医療センターNICUにおける新生児感染症の原因菌の内訳

とがもっとも望ましい。以上のような観点から感染予防対策を述べることにする。

### I. NICUにおける院内感染症の最近の傾向<sup>1)2)</sup>

大阪府立母子保健総合医療センターNICUにおける羊水感染症・院内感染症の起炎菌の内訳を図1に示す。

羊水感染症は早発型感染症の原因となり、院内感染症は主に水平感染による遅発型感染症といえることができる。前者では、GBS、大腸菌(K株が多い)、緑膿菌、キャンピロバクター、ヘモフィルス・インフルエンザ、リステリアと続く。後者では、MRSA、緑膿菌、エンテロバクター、GBS、カンジダと続く。後者のGBSは水平感染であった。

一方、全国のNICUでの院内感染はどのようなだろう。2001年1月に新生児医療連絡会会員施設169施設にアンケート調査用紙を送り、90施設から回答を得た。2000年の1年間における各施設の極低出生体重児(very low birth weight infant: VLBW)平均入院数は48.9±21.7

(SD)、院内感染症の平均発症率は12.4±9.7%であった(平均MRSA感染症発症率は5.1±5.7%)。

感染症のもっとも多い起炎菌はMRSAで165例(165/359, 46.0%)、次いで緑膿菌21例(5.8%)、コアグラウゼ陰性ブドウ球菌(CNS)18例(CNS感染症例は同一施設で11例もあった)(5.0%)、カンジダ18例(5.0%)、その他の菌によるもの36例(10.0%)、不明101例(28.1%)であった(表)。

一方感染部位別数と死亡率をともにみると敗血症166例(死亡率22.2%)、軽症も含む肺炎88例(2.0%)、壊死性腸炎を含む腸炎39例(35.7%)、臍帯・皮膚病変32例(0%)、関節炎/骨髄炎3例(0%)、膿瘍5例(0%)、髄膜炎/脳室炎9例(33.3%)、その他7例(0%)、そして新生児発疹性疾患(neonatal toxic-shock syndrome-like exanthematous disease: NTED)が34例(0%)であった。VLBWの全院内感染による平均死亡率は17.6±26.7(SD)%, MRSA感染による平均死亡率は14.9±24.5%であった。死亡例の89%を超低出生体重児(extremely low birth weight infant: ELBW)が占めており、起炎菌別の死亡率はカンジダ



表 全国の NICU 90 施設における院内感染症の内訳 (2000 年入院児)

疾患名	VLBW	ELBW	ELBW/VLBW (%)	原因菌	VLBW	ELBW	ELBW/VLBW (%)
敗血症	92	69	75	MRSA	165	92	55.8
敗血症疑い	74	51	68.9	緑膿菌	21	15	71.4
血流感染	6	5	83.3	カンジダ	18	16	88.9
肺炎	88	59	67	CNS	18	15	83.3
NTED	34	5	14.7	エンテロバクター	7	5	71.4
NEC	29	27	93.1	クレブシエラ	6	4	66.7
皮膚炎	18	9	50	大腸菌	5	4	80
臍帯炎	14	4	28.6	腸球菌	4	3	75
腸炎	10	3	30	セラチア	4	2	50
尿路感染	8	3	37.5	GBS	2	1	50
髄膜炎	9	6	66.7	アシネトバクター	2	2	100
膿瘍	5	2	40	ヘモフィルス・	1	1	100
関節炎	3	3	100	インフルエンザ			
その他	7	2	28.6	その他	5	3	60
総計	397	248	62.5	不明	101	58	57.4
感染率	12.30%	21.00%		総計	359	221	61.6
全入院数	3,214	1,185	36.7	全入院数	3,214	1,185	36.7

NTED : neonatal toxic-shock-syndrome-like exanthematous disease (新生児 TSS 様発疹症)

NEC : necrotizing enterocolitis (壊死性腸炎)

53%, 緑膿菌 46%, CNS 21%, MRSA 19% の順であった。

## II. 院内感染症への予防対策

院内感染の原因となる菌群は、病棟での予防的管理がもっとも重要である。特に在胎 26 週未満の超早産児や ELBW は重症化しやすいので、特に予防的管理が必須となる。前述したように、対象となる菌は黄色ぶどう球菌 (特に MRSA) とグラム陰性桿菌 (特に緑膿菌) そしてカンジダである。

### 1. MRSA 対策<sup>2)3)</sup>

#### a) 母親の正常細菌叢による児への MRSA 定着阻止

MRSA に対抗するためには、より分裂の早い代謝経路の近似した、そして定着力の強い同種の細菌を正常細菌として定着させることがもっとも肝要である<sup>4)</sup>。

まず口腔内では、産道通過時に母親の腔内の菌叢に曝露される。出生後口腔には母親の乳房を早期に含むことで母親の皮膚の菌をもらい、そのなかでもっとも繁殖しやすい *Streptococcus* や *Neisseria*, そして各種の嫌気性細菌が増える。福田らのデータ<sup>5)</sup>によると、出生後早期より母子同室で頻回授乳を行った正常新生児では、母乳中そして口腔内で同じように  $\alpha$  あるいは  $\gamma$ -*Streptococcus* などの常在菌が急速に増加していた。また中村らの報告<sup>6)</sup>では、 $\alpha$  あるいは  $\gamma$ -*Streptococcus* などの常在菌が定着していると、その菌により MRSA などの定着が阻止されることが証明されている。さらに中村らは、NICU に入院した ELBW に積極的に母親の搾母乳を早期に口腔内に塗布をして、口腔内の MRSA の定着率を下げたことを報告している<sup>7)</sup>。

MRSA の定着は、皮膚や臍帯が無菌的であるほど容易になる。NTED の報告では、発症時期は帝王切開児のほうが経腔分娩児に比べると早

く、発症率も高い。この場合、MRSAの保菌者は医療従事者であり、それによる水平感染と考えられる。皮膚における正常細菌叢とは、*Staphylococcus epidermidis* (表皮ブドウ球菌)である。この菌はすべてのおとながもっている。MRSAやMSSAは毛嚢内に定着するので、毒性のない表皮ブドウ球菌と競合関係にあるため、この菌でその生息部位を占拠してもらうことがもっとも効率的である。つまり生後すぐに新生児の皮膚と母親の皮膚を直接接触させて、母親のもっているよい表皮ブドウ球菌を移せばよい。これは生まれてすぐからの『カンガルーケア』あるいは『タッチケア』ともよべる。これは新生児皮膚における感染防止の第1段階である。

#### b) 児に触る前後の厳密な手洗い

これはなかなか実施できない項目であるが、基本的にはこれがもっとも大切なポイントである。流水であれば、消毒剤は使わなくともかなりきれいになる。MRSAの多くは、グルコン酸クロルヘキシジンやその他逆性石鹸にはほとんど耐性になっているので、それを手洗いに使用している施設は、流水でよく流しているだけの効果しかないと知るべきである。

#### c) 手袋の着用

手袋も使用し始めるとMRSA検出頻度が下がり、一定の効果がもたらされることが多い<sup>8)</sup>。ただ後に述べる予防対策項目がともに行われないう限り、病棟からの一時的な駆逐(MRSAが検出されなくなることも)も困難であろう。

#### d) MRSA除菌はどうするか<sup>2)</sup>

一度保菌してしまうと新生児は長期保菌者になりやすい。それはMRSAに対抗すべき一般細菌が、児の周りにいないからだといえる。以下の4つを同時に行うと、70%以上が除菌できる。特に気管チューブの周りの消毒は、気管切開児の除菌にかなり効果がある。

気管内の抗生剤トイレットリングも一部効果があるが、カニューレの真下の菌は粘膜内に隠

れて消毒しえない。気管チューブの挿入される部分の外側に薄くバクトロバン軟膏を付けて入れ替えるだけでよい。当NICUで出生後2年以上気管切開していた児2名ともがこの方法を他の部位の消毒と併用することで除菌ができた。ただし、バクトロバンで常時消毒を行っている耐性菌が出現することが、すでにわが国のNICUでいくつか報告されているので、前回の消毒から2カ月以上間隔をあけて1クールだけ保菌者全員を除菌する。もちろん、親からの承諾を得る必要がある。

#### <バクトロバン鼻腔および耳腔消毒と気管チューブの周りの消毒・皮膚消毒>

① 鼻腔塗布は1日3回3日間から最長1日3回7日間まで(平均1日2回7日間)

② 耳腔塗布は1日1回7日間

③ 気管チューブは交換時に挿入部位の周囲に薄く軟膏を塗り挿入

④ 皮膚消毒は1日1回沐浴後に酸性水シャワーを7日間

#### e) 職員が保菌しないこと

職員が保菌することでケア中に患児に移すことがある。その背景を調べると、MRSA保菌児やその保育器周りの物品の汚染から移されている。この場合には、職員がケア中にマスク(きちっと鼻を覆う必要あり)を着用することが、移されない一つの方法である<sup>9)</sup>。また保菌をしやすい方は、新しいNICUの勤務者であり、まだ厳密な手洗いが体得できていないうちに、感染を受けて保菌者になることが多い。特に自分の癖をよくわきまえないで、保菌患児のケア中に自分の顔・髪の毛・メガネを触って移される。

#### f) 保菌職員がケアしないこと

職員の保菌状態をチェックするには、MRSAスクリーニング用の簡易培養キット(マーサチェック(鼻腔用):日研生物医学研究所)が市販されているので、それを利用する。新しい勤務者は、入室前に1回は保菌状態のチェックをすることが勧められる。次いで職員の保菌状態

をなくすには、バクトロバン軟膏を鼻腔に1日2回7日間朝夕で塗布すると消毒可能である。以後、本人の自覚もあるせいか再度検出されることはほとんどない<sup>10)</sup>。

**g) 環境の汚染監視**

環境を清潔に保つ第1は、基本的に患児個人に日常使うものはすべて個別化することである。聴診器・体温計・メジャー・はさみ・テープ・ワセリン・グリセリン・TcPO<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>のゲル・センサーのテープなど。またフローシート記載用のボールペンなどの個別化も必要となる。

次いで、保育器を含めた器具類の汚染のチェックが必要である。保育器の汚染は、毎日の清拭前後に保育器の各個所あるいは数本のswabで保育器全体を拭き取る。前後で、菌の種類あるいは陽性個所の減少がみられなければ、消毒剤は効果なしと判定できる。特に保育器の終末消毒は大切である。CDCで推奨されていないが、ガス滅菌器（メディエート社など）は消毒後にホルマリンガスを熱によって水と炭酸ガスまで分解してしまうので、環境汚染の心配はなくなった。2001年度に厚生科学研究で行った全国NICUのアンケート調査によると、病院間のMRSA感染症発症率の高低で、その背景因子を探ると、保菌患児を予防治療すること、保育器の終末消毒をすることの2点が、MRSA感染症率を低下させる因子として働いていることがわかった<sup>11)</sup>。

以上のようにして、2003年から院内感染対策を実施すると、2005年にはいったんMRSAの感染症をNICUから撲滅することができた<sup>11)</sup>。その後は院外出生入院児の長期MRSA保菌者がたびたび小さなアウトブレイクの原因になることがあるが、大きなアウトブレイクは経験しなくなった。また全国的にも、各NICUの職員の努力によりMRSAの保菌率が減少していることが報告されている（図2）<sup>12)</sup>。

**2. 緑膿菌対策<sup>13)</sup>**

簡単に以下にまとめる。

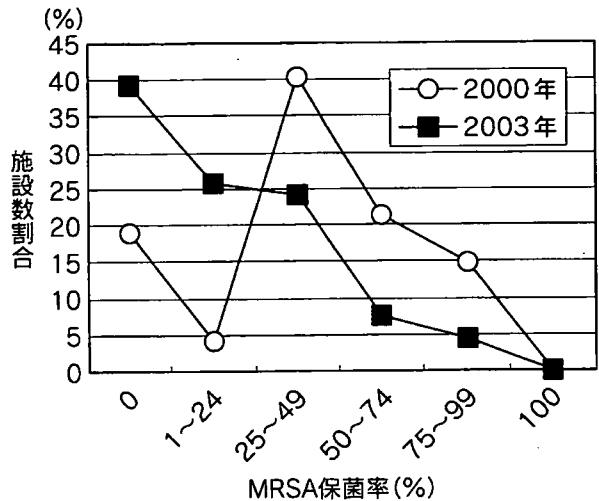


図2 全国NICUにおけるMRSA保菌率の変化（高橋尚人ほか，2005<sup>12)</sup>）

**a) 母親からの垂直感染予防**

重症児の多くは母親からの垂直感染であり早産で生まれる。予防には産科の協力（例えば腔内の保菌検査と予防的消毒など）が必要である。

**b) 病原緑膿菌を病棟から駆逐する**

院内感染で強毒菌の場合には特別の看護体制が必要となり、ゾーンで隔離体制を取らざるを得ない。MRSA対策ができていない病棟では基本的に手洗いはできていることが多いので、菌を病棟から追い出すことが最終目標となる。

**c) 皮膚消毒と臍帯の乾燥**

皮膚は早期に消毒剤で清拭し、臍帯はできるだけ早く乾燥させる。

**d) ビフィズス菌の早期投与**

ビフィズス菌の早期投与により、腸内細菌叢を安定させる。

**3. カンジダ対策<sup>14)</sup>**

**a) 腔でのカンジダ保菌阻止とハイリスク新生児の把握**

経腔分娩症例では、必ず問題となるため分娩前に腔錠などで除菌をしてもらう。また妊娠中期であっても、母親が排便後に陰部を後ろ前に拭くと保菌率が上昇するので注意が必要である<sup>15)</sup>。

ELBWを対象として、特に以下の児には注意

が必要である。

① 腔培養でカンジダが検出されている母親から出生した児（特に経腔分娩例）

② 一度でも身体の一部からカンジダが検出されたことのある児

③ ステロイド投与中の児（生後早期の低血圧症や慢性肺疾患に対する）

④ 各種のカニューレを挿入しており、一般の抗生物質投与期間の長い児

#### b) 腸管カンジダ症を疑わせるもの

まずカンジダをグラム染色で早期に見つけることが大切である。皮膚塗抹や胃内容のグラム染色で芽胞を確認すれば、早期から抗真菌薬を経口投与して腸管カンジダ症を予防する。

次いで臨床上治療を必要とする所見をあげる。

① 高血糖がみられる（一定のブドウ糖の輸注速度で栄養しているのに）。

② 腸管の動きが低下し、ミルクが停滞。腸内ガスの消失もみられることが多い。

③ 血小板数の低下（10万/mm<sup>3</sup>を少し下回る程度で維持される）。

④ オロソムコイドは軽度上昇することが多い。

⑤ CRPやハプトグロビンは上昇しないか、一部で軽度上昇のみ。

⑥ 白血球は正常あるいは低下。好酸球の上昇がよくみられる。

⑦ 低ナトリウム血症を認めることもある。

以上のように、それほど激しい症状も明らかに敗血症や菌血症を疑わせる所見もない。腹部の症状とそれに付随する検査上の変化を細かく捉えてゆくと、明らかになってくる。血小板や白血球のさらなる低下とともにCRPやハプトグロビンが急上昇すれば、菌が流血中に入り菌血症が起こっていることを示唆する。さらにβ-グルカンテストワコー（比濁時間分析法リムルステスト）が、カンジダ由来の血中βグルカンを測定するのに開発され、カンジダの体表、

腸管などへの早期定着の有無を評価するのに意味があると考えている<sup>16)</sup>。

26週未満のELBWの便からカンジダが分離され、治療しないで放置しておくとも全身感染症となる可能性がある。予防的治療としては硝酸ミコナゾール（注射薬を6~10 mg/kg/日、分3~6）、あるいはファンギゾン（注射薬0.25~1 mg/kg/日、分3~6）を3週間経鼻カテーテルより胃内投与すればカンジダはほぼ消失する。これらの薬剤は腸管からの吸収が悪くまた耐性菌が少ない。ただ22週出生の400gの児に1 mg/kg/日のファンギゾンの胃内投与を4日以上続行すると1.2 μg/mlの血中濃度にまで上昇したので、吸収率はかなり高いと考えられるので注意を要する。効果判定は常に便でのモニタリングを行い、芽胞の消失を培養検査とともに確認してゆくことが大切である。

また肛門からの上行性のカンジダ増殖も便の排泄の悪い子どもたちでは起こりうる。この場合には、ミコナゾールやファンギゾンを10~50倍に希釈した生理食塩水による注腸が効果的と考える。

#### c) 気道の管理

気管の培養検査陽性例やグラム染色で芽胞が確認されれば、硝酸ミコナゾールを約50~200倍に希釈して0.2 ml（1回10~40 μg/dose 1日3回）で約1週間トイレットイングを行っている。これも予防的治療として効果的である。

#### d) 早期の保育器加湿を下げる

保育器内加湿を70~80%ぐらいに下げて、皮膚を乾燥させることにより皮膚病変を減らす。

#### 4. GBS対策<sup>17)</sup>

1986~1988年にかけて、9例のVLBW、ELBWに遅発型敗血症・髄膜炎がみられた。ほとんどの症例がNICUからGCUへ移る安定期に無呼吸発作を伴って急に重症化した。血清IgGが300 mg/dl以下と非常に低くなっている時期で、2例が死亡し1例が後遺症を残した。すべてIII型菌の水平感染によるものであった。

### ＜感染の予防的管理＞

入院患児の菌の分布を調べ、職員の保菌者も調べた。早期からのⅢ型菌保菌児は個別隔離して、ガウンテクニックで接触感染予防をした。また全入院児をNICUからGCUに移る時に咽頭培養を行い、GBSの保菌状態をチェックした。GBSⅢ型菌保菌職員は抗生剤で治療した。この後1989年以降の発症は認められていない。

### 5. エンテロウイルス対策

新生児期での発症頻度が高い疾患であり、特にこれからの注意が必要な感染症である。鳥居によると、HSVを1とすると、CMV 1.3, 風疹 0.3 に対してエンテロウイルス (EV) 感染症は13と圧倒的に症例が多い<sup>18)</sup>。金子らによると、新生児期あるいは乳児期早期に無菌性髄膜炎を起こした場合には、脳のCT所見の異常が40%に、言葉の遅れが30%にみられる<sup>19)</sup>。

他の母子垂直感染に比べて発症率は非常に高い。7～10月の夏かぜの原因ウイルスであり、8月をピークとする。妊娠早期の母体の初感染では、流・死産を起こすこともある。もっとも多い型は、分娩前数日に母体が発症し、経胎盤的に感染した児を分娩する（この場合には重症化することも多い）か、無症状キャリアの母親（児の兄姉から感染を受け、一過性のキャリアとなる）から生まれた児が分娩時に感染して2～3日後に発症するかである。さらには施設内の沐浴で他の感染児から、また勤務職員の上気道炎から水平感染する場合もよくある。

エコー11やコクサッキーB5などは脳炎・心筋炎などで重症化することがある。また1998年清水らは、大阪の手足口病様症状で発症し脳炎・呼吸不全で死亡した乳児例から分離されたEV 71と、マレーシア（1997）や台湾（1998）で流行した手足口病（同様に乳児が重症化して死亡）の株との相同性を報告しており、EV 71株も注意が必要である<sup>20)</sup>。

### ＜感染機序と診断＞

症状は無症状から、髄膜炎、心筋炎、脳炎、

肝炎などにより重症化あるいは劇症型で死亡もある。夏かぜ症状（発熱・発疹）であることが多く、見逃されやすい。ただし、発熱時に機嫌の悪い不穏な状態があれば多くは髄膜炎を併発している。また発疹も風疹様で、足の裏にも出ることが多い。CRPはほとんど上昇しないが、ハプトグロビンや $\alpha$ 1酸性糖蛋白の上昇を認めることが多い。ただウイルスの抗原型が多種類あるために、血清による特異抗体上昇で診断することは困難である。診断には便・髄液・のどの拭い液などでウイルス分離をすることがもっとも確実である（検体を $-80^{\circ}\text{C}$ に凍結しておけば後日提出可能）。

### ＜感染の予防的管理＞

治療は対症的でしかない。鳥居は妊娠中・分娩中と後の母体管理の重要性を説いている。つまり、妊婦は①人混みに近づかない、②手洗いの励行、③家族内に保育園や幼稚園に通う児があれば、感染源として注意する、④夏季・冬季はマスクの着用がウイルス感染防止において重要である、⑤うがい、特に抗ウイルス薬（ヨード剤）によるうがいが適切である。また母体からの垂直感染が起こった場合でも、母乳中には早期から中和抗体が高力価で証明されるので、母乳栄養がその重症化予防に役立つ<sup>21)</sup>。

院内感染対策としては、腸管で増殖するために、母子同室による個室隔離と感染児の便の扱い・沐浴の個別化などに注意が必要で、勤務者はマスク・ヨード系消毒剤による厳密な手洗いが必要である。

### おわりに

新生児感染症予防においては、無菌の新生児に正常な菌叢を定着させることが早期新生児期のもっとも自然なそして強力な感染予防となり、それが院内感染を未然に防ぐ最良の策であることが自覚されるようになる。病原性細菌に対抗するためには、人間が太古から伝えてきた共生菌としての、皮膚の表皮ブドウ球菌そして

腸内のピフィズス菌などを活用することである。しかし今の NICU 入院児は、病棟で待ち受けている菌(特に MRSA)に容易に汚染される。この状態を引き起こすのは、NICU へ MRSA を導入した職員の手である。しかしその背景には大病院における成人病棟の MRSA の蔓延と、職員の定期的な交代によりその伝播が起こったと考えるのがもっとも妥当である。今後、NICU 内でいかに対策を図ろうとも、同じ病院の他病棟で MRSA が蔓延している状態では、手術部や放射線部などの共通部門における職員間、あるいは看護職員の勤務交代による伝播を防ぐことは不可能であり、全病院的な予防対策を考える必要がある。

#### 文 献

- 1) 北島博之：新生児集中治療室 (NICU) における院内感染対策サーベイランスシステム構築。「新生児及び乳幼児の MRSA 感染等の院内感染のリスク評価及び対策に関する研究」平成 13 年度報告書, pp 35-39, 2002
- 2) Kitajima H: Prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in neonates. *Pediatr Int* 45: 238-245, 2003
- 3) 北島博之：新生児病棟/NICU—MRSA 感染症の予防と対策. *周産期医学* 32: 967-973, 2002
- 4) 北島博之：感染予防の基本. 特集正常新生児のケア. *ペリネイタルケア* 21: 300-306, 2002
- 5) 福田雅文ほか：母乳, 授乳, 母と子のスキンシップが感染症に及ぼす影響 (第 2 報) 授乳による母乳中細菌と口腔内細菌の相互作用. *未熟児新生児誌* 9: 369, 1997
- 6) Uehara Y et al: Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of oral cavities in newborns by viridans group streptococci. *Clin Infect Dis* 15: 1399-1407, 2001
- 7) 中村友彦：超低出生体重児の上気道常在細菌叢の獲得と MRSA 保菌に関する検討。「新生児及び乳幼児の MRSA 感染等の院内感染のリスク評価及び対策に関する研究」平成 13 年度報告書, pp 27-30, 2002
- 8) 大城 誠ほか：新生児集中治療室におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌保菌児の減少—手袋着用の効果. *日本小児科学会雑誌* 102: 1171-1175, 1998
- 9) 北島博之：院内感染コントロール. シンポジウム周産期感染症. *新生児誌* 29: 77-82, 1993
- 10) 側島久典：医療従事者の鼻腔 MRSA と陽性者へのムピロシン軟膏塗布後の追跡に関する研究。「新生児及び乳幼児の MRSA 感染等の院内感染のリスク評価及び対策に関する研究」平成 13 年度報告書, pp 31-33, 2002
- 11) 北島博之ほか：新生児集中治療室 (NICU) における MRSA 感染撲滅対策. *日本未熟児新生児学会雑誌* 18: 232-238, 2006
- 12) 高橋尚人ほか：新生児集中治療室における MRSA 保菌に関する全国調査. *日本小児科学会雑誌* 109: 1009-1014, 2005
- 13) 北島博之：超低出生体重児と緑膿菌, 院内感染の落とし穴. *Neonatal Care* 10: 1040-1048, 1997
- 14) 北島博之：超低出生体重児のカンジダ症, 院内感染の落とし穴. *Neonatal Care* 10: 928-934, 1997
- 15) 横尾さち子ほか：腔内微生物と妊婦生活—助産婦としての援助を考える. *大阪府立助産婦生研究業績集*, pp 283-286, 1997
- 16) 北島康司ほか：超低出生体重児における真菌の colonization の迅速診断—リムルステストによる  $\beta$ -D-グルカン測定の有用性について. *未熟児新生児誌* 10: 376, 1998
- 17) 北島博之：新生児感染症と NICU 管理. *周産期医療の理論と実践*, メディカ出版, pp 207-222, 1992
- 18) 鳥居昭三：エンテロウイルス. 予防対策から考える周産期感染症. *ペリネイタルケア* 18(増刊): 116-124, 1999
- 19) 金子堅一郎, 金沢千佳子, 井上成彰：エンテロウイルス 25: 151-155, 1993
- 20) 清水博之ほか：死亡例および手足口病患者から分離したエンテロウイルス 71 の分子学的解析. *日本ウイルス学会第 46 回学術集会抄録集*, 1998
- 21) Micheals RH: Studies of antiviral factors in human milk and serum. *J Immunol* 94: 262-271, 1965

# Preclinical Investigation of the Topical Administration of Phenserine: Transdermal Flux, Cholinesterase Inhibition, and Cognitive Efficacy

Tadanobu Utsuki,<sup>1</sup> Nao Uchimura, Mitsuru Irikura, Hiroshi Moriuchi,<sup>2</sup> Harold W. Holloway, Qian-Sheng Yu, Edward L. Spangler, Jacek Mamczarz,<sup>3</sup> Donald K. Ingram,<sup>1</sup> Tetsumi Irie, and Nigel H. Greig

*Drug Design and Development Section, Laboratory of Neurosciences, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland (T.U., H.W.H., Q.-S.Y., N.H.G.); Pennington Biomedical Research Center, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana (T.U., D.K.I.); Division of Clinical Chemistry and Informatics, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan (N.U., M.I., H.M., T.I.); and Laboratory of Experimental Gerontology, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland (E.L.S., J.M., D.K.I.)*

Received December 1, 2006; accepted January 16, 2007

## ABSTRACT

Phenserine (PS) was designed as a selective acetylcholinesterase (AChE) inhibitor, with a tartrate form (PST) for oral administration in mild to moderate Alzheimer's disease (AD). Recent phase 3 trials of PST in Europe indicate that any clinically relevant activity of PST may be limited by its duration of action. Like many oral drugs, bioavailability and plasma concentrations of PST are regulated by hepatic and gastrointestinal first-pass effects. To minimize the kinetic limitations of first-pass metabolism, transdermal formulations of PS and PST (ointment/patch) were developed and characterized *in vitro* and *in vivo*. Initial *in vitro* kinetic characterization of PS or PST formulations used a diffusion cell chamber and skin samples isolated from hairless mice. Liquid paraffin and fatty alcohol/propylene glycol

(FAPG) were found to be suitable vehicles for ointment formulation. Addition of a penetration enhancer, 1-[2-(decylthio)ethyl]-azacyclopentane-2-one (HPE-101), improved stratum corneum permeability. Application of the optimal formulation of PS/HPE-101/FAPG to the shaved back of rats resulted in significantly lowered plasma and brain AChE activities and improved cognitive performance in animals with scopolamine-induced cognitive impairment. These results suggest that the transdermal application of AChE inhibitors may represent an effective therapeutic strategy for AD. Particular benefits over oral therapies might include avoiding first-pass metabolic effects and improved dosing compliance.

Accompanying the increased geriatric population of most industrialized countries is an upsurge in the prevalence of

dementia, particularly Alzheimer's disease (AD). AD is characterized by progressive neuronal loss leading to cognitive decline and a plethora of accompanying psychiatric problems. Pathologically, AD is characterized by the presence of 1) senile plaques, extracellular deposits primarily composed of  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) being derived from amyloid precursor protein (APP) (Sambamurti et al., 2002; Selkoe, 2005); 2) neurofibrillary tangles of phosphorylated  $\tau$  protein (Tanzi, 2005); and 3) cholinergic synaptic and neuronal loss, with associated brain atrophy (Whitehouse et al., 1982; Doucett et al., 1986).

Cholinesterase inhibitors (ChE-Is) attenuate the cholinergic deficit considered to underlie the dysfunctions in AD, and, to date, they represent the most widely used treatment strategy (Lahiri et al., 2004). Four ChE-Is are approved in the United States (tacrine, Cognex; donepezil, Aricept; riv-

This work was supported in part by the Intramural Research Program of the National Institute on Aging, National Institutes of Health, and by Kumamoto University, Kumamoto, Japan.

T.I. and N.G. contributed equally to this work and are joint final authors. For information regarding transdermal delivery (tirie@gpo.kumamoto-u.ac.jp) and for information regarding phenserine (greign@grc.nia.nih.gov).

<sup>1</sup> Current affiliation: Nutritional Neuroscience and Aging Laboratory, Pennington Biomedical Research Center, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana.

<sup>2</sup> Current affiliation: Laboratory of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University, Kumamoto, Japan.

<sup>3</sup> Current affiliation: University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.  
doi:10.1124/jpet.106.118000.

**ABBREVIATIONS:** AD, Alzheimer's disease;  $A\beta$ ,  $\beta$ -amyloid; APP, amyloid precursor protein; ChE-I, cholinesterase inhibitor; AChE, acetylcholinesterase; PS, phenserine; PST, phenserine tartrate; BChE, butyrylcholinesterase; HPE-101, 1-[2-(decylthio)ethyl]azacyclopentane-2-one; FAPG, fatty alcohol propylene glycol; LSD, least significant difference; LP, liquid paraffin.

astigmine, Exelon; and galantamine, Reminyl). Whereas this drug class and the recently Food and Drug Administration-approved *N*-methyl-D-aspartate-receptor antagonist memantine (Namenda) are the only agents to have been consistently associated with improvements in cognitive function in AD (Leo et al., 2006), such improvements are, unfortunately, generally small. This modest efficacy has provided impetus to develop a new generation of ChE-Is with activity beyond symptomatic benefits and to maximize the efficacy of current agents based on a more complete understanding of time- and concentration-dependent enzyme/inhibitor interactions. Our research in both areas has focused on mechanisms that reduce levels of neurotoxic A $\beta$ , in addition to cholinesterase inhibition.

We designed and developed the acetylcholinesterase (AChE)-selective inhibitor phenserine [PS; (-)-phenylcarbamoyl eseroline] (Fig. 1), which possesses additional non-cholinergic actions to lower the rate of APP synthesis and thereby reduce A $\beta$  levels (Shaw et al., 2001; Greig et al., 2005b). Clinical trials to date with phenserine and the other approved ChE-Is have involved oral administration and water-soluble salt forms of the compounds, e.g., PS tartrate (PST). The oral route is most often used to administer therapeutics to humans, because it is convenient, safe, and inexpensive. However, oral administration has limitations associated with bioavailability loss through first-pass metabolic and transport effects in the intestinal wall and liver. To avoid these critical metabolic sites, alternative administration routes have been investigated.

Transdermal application provides a potential approach for efficient and effective administration. Although the transdermal route is most often used in local treatment, there may be therapeutic advantages for systemic therapy that include ready maintenance of steady-state drug levels, amelioration of peak concentration effects, and a lack of hepatic first-pass metabolism and gastrointestinal transport effects. Moreover, and of particular relevance for treatment of dementia, transdermal application may help achieve dosing compliance.

Transdermal delivery necessitates optimization of permeability by modulating the physicochemical characteristics of the therapeutic, such as solubility, diffusion, and enzymatic stability (Okuyama et al., 1999). It has been suggested that preferred characteristics of a therapeutic for transdermal application might include a molecular weight <500 and a lipid/water partition coefficient (log P) value of approximately 2.5 (Ozawa et al., 1988).

PS is a crystalline compound developed through optimizing the structure/AChE-activity relationships of hexahydropyrrolo[2,3b]indole carbamates (Greig et al., 2005b), the backbone of the classic anticholinesterase, and natural alkaloid physostigmine. The unsubstituted phenylcarbamate of eseroline, PS (C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>·C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>) is used biologically as a L(+)-tartrate salt to aid its aqueous solubility. The free base form of PS has a mol. wt. of 337.4 and is lipophilic, with a log P value of 2.2. It has a high brain penetration (brain/plasma ratio of 10:1), a moderately long duration of action in rodents (half-life, *t*<sub>1/2</sub> of 8.25 h), and a preferential selectivity for AChE versus butyrylcholinesterase (BChE) of approximately 70-fold (Greig et al., 2000). Such characteristics have been purported to make ChE-Is more tolerable in humans (Greig et al., 1995, 2005b), and furthermore, they make PS suitable for transdermal administration.

Clinical studies with phenserine have indicated that it is well tolerated by the oral route and dose-limited by classic cholinergically mediated adverse events, primarily nausea and vomiting (Greig et al., 2005a,b). The onset of AChE inhibition was rapid and occurred shortly after oral administration, reaching a maximum at 1.5 to 2.0 h and then declining relatively slowly, with a dose-dependent *t*<sub>1/2</sub> of 5 to 11 h. However, extensive metabolism occurred, with plasma drug levels falling rapidly beyond the *C*<sub>max</sub>, which occurred at 1.5 h postoral administration (Greig et al., 2005a). These findings indicated that transdermal administration might provide pharmacokinetic advantages, both for maintenance of AChE inhibition and plasma drug concentrations to optimize noncholinergic actions on lowering A $\beta$ . Therefore, stud-

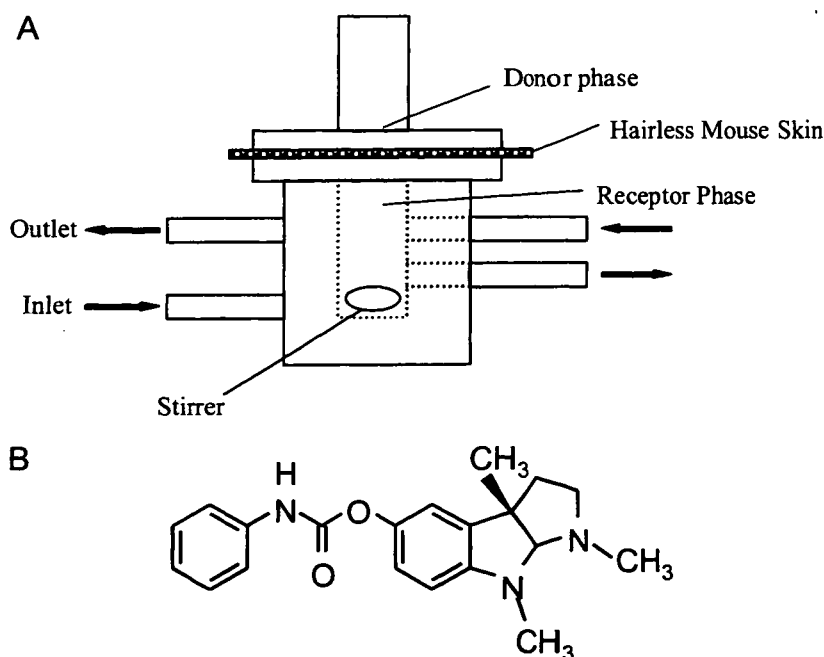


Fig. 1. A, diffusion cell setup. B, structure of PS.



ies were initiated to characterize the suitability of PS for transdermal formulation.

## Materials and Methods

**Materials.** PS and PST (>99.9% optically and chirally pure) were synthesized as described previously (Yu et al., 2001). HPE-101 was obtained from Hisamitsu Pharmaceutical Co. (Saga, Japan). Other chemicals were purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

**Drug Formulation.** Solids of PS or PST were mixed with various ointment vehicles, as listed in Table 1. Fatty alcohol/propylene glycol (FAPG) ointment was prepared with various alcohols and propylene glycol. In brief, 9.5 g of stearyl alcohol, 8.0 g of cetyl alcohol, and 12.0 g of 1-docosanol were melted at 85°C and stirred into 70.5 g of propylene glycol at 90°C. During subsequent cooling, the agents were continuously mixed for 20 min to form a paste (FAPG ointment). The permeability enhancer HPE-101 was added to some formulations, with further mixing, at concentrations of 1 to 5% (w/w). Finely ground PS or PST was then blended into the FAPG ointment. The final concentration of PS or PST within vehicle was 1% (w/w) for in vitro studies and 10 or 20% (w/w) for in vivo studies.

**In Vitro Transdermal PS Permeability.** A diffusion cell chamber (flow-through cell; Fig. 1) was used (Addicks et al., 1987; Sclafani et al., 1993) to assess the availability of PS from vehicle, and subsequent transdermal permeability. Because the stratum corneum has been characterized as a major barrier to transdermal permeability (Sheuplein and Blank, 1973; Smith et al., 1982; Madison et al., 1987) and barrier integrity may be variably affected by age (Ghadially et al., 1995), permeabilities were investigated through both intact and tape-stripped skin. Intact skin or tape-stripped skin was isolated from the back of hairless mice and placed between the donor and the acceptor phase of the flow-through cell, allowing a permeation surface area of 1 cm<sup>2</sup>. Stripped skin without the stratum corneum was prepared by stripping with Scotch tape (Scotch 845) over some 30 occasions. Formulated ointment was placed on the skin within the donor phase. Thereafter, saline (37°C) was circulated within the acceptor phase at a rate of 5 ml/h. Serial 2-ml samples were collected from the acceptor phase at specified times. PS concentrations were quantified by high-performance liquid chromatography under the following conditions: column, octadecyl silica gel reversed phase (C18; 5 μm; 4 mm i.d. × 150 mm); mobile phase, methanol/water [9:1 (v/v)]; flow rate, 0.2 ml/min; and detection, UV at 246 nm. The cumulative permeated amount of PS ( $Q$ , micrograms per square centimeter) and steady-state flux rate (flux; micrograms per hour per square centimeter) were determined from PS concentrations of each fraction ( $i$ ) as follows:  $Q(ti) = Q(ti - 1) + (C(ti) \times V(ti)/A)$  and  $\text{flux}(ti) = [Q(ti) - Q(ti - 1)] / [(ti) - (ti - 1)]$ , where  $i$  is number of fractions,  $ti$  is sampling time (hours),  $Q(ti)$  is cumulative permeated amount of PS at  $ti$  (micrograms per square centimeter),  $C(ti)$  is concentration of PS in sample at  $ti$  (micrograms per milliliter),  $V(ti)$  is sampling volume between  $ti - 1$  and  $ti$  (milliliters),  $A$  is area available for permeability (square centimeters), and  $\text{flux}(ti)$  is flux at  $ti$  (hours).

Further in vitro studies investigated the effects of modulating the surface area available for transfer of the PS in the diffusion cell. This was necessary before undertaking in vivo efficacy studies to ensure that sufficient transdermal PS flux occurred to sustain systemic

levels within the previously established therapeutic range for the rat.

**In Vivo Transdermal PS Permeability and Efficacy on Cognitive Performance and AChE Activity.** Animals were lightly anesthetized (fluorothane) and carefully shaved to the skin in the mid-riff region of their back, facilitating the attachment of transdermal patches. FAPG ointments ( $\pm$  PS) were applied to the shaved backs of adult (4-month-old) male Fischer-344 rats (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) using two pads (250 mg of ointment per 4-cm<sup>2</sup> surface area pad; 500 mg of total ointment in 8-cm<sup>2</sup> surface area for each animal). Ointments were formulated with PS at 10% (w/w) with and without HPE-101 [5% (w/w)]. Plasma AChE activity was then monitored in tail-blood, plasma samples for 8 h. At the end of the experiment, animals were killed by fluorothane overdose. Brain and plasma samples were collected, and they were immediately frozen at -70°C for later determination of AChE activity by the Ellman method (Ellman et al., 1961). Plasma was additionally analyzed for biochemical markers of hepatic, renal, and muscle function (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, leucine aminopeptidase, leucine aminopeptidase, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase, albumin, creatine kinase, total protein, serum creatinine, blood urea nitrogen, triglycerides, total and free cholesterol, and phospholipids).

Adult (4-month-old) male Fischer-344 rats (Harlan, Indianapolis, IN) were also used to assess the in vivo efficacy of transdermal PS on cognitive performance and cholinesterase activities in plasma and brain (cerebral cortex). Using previously described protocols, we investigated the ability of transdermal PS to correct learning impairment induced pharmacologically with scopolamine, and we assessed in a 14-unit T-maze (Ingram 1988). Animals were first trained to criterion in one-way active avoidance in a straight runway. Thereafter, trials that involved negotiation of five maze segments to avoid footshock were conducted in a 14-unit T-maze. On day 1, each rat was trained in a straight runway to move from a start box to a goal box (~1 m) within 10 s while avoiding a mild footshock (0.8 mA). Training success was indicated by 13 of 15 correct avoidances (maximal trials 30). Training ensured that the animals had learned footshock avoidance before the maze learning trials.

The respective Animal Care and Use Committee's of the Intramural Research Program, National Institute on Aging, and Kumamoto University approved the experimental protocols used in compliance with the guidelines for animal experimentation of the National Institutes of Health (Department of Health, Education, and Welfare publication 85-23, revised, 1995).

**Drug Treatment.** On day 2, animals were lightly anesthetized (fluorothane) and carefully shaved to the skin in the mid-riff region of their back, facilitating the attachment of transdermal patches. Thereafter, animals were randomly assigned to one of three treatment groups: 1) control, physiologic saline (i.p., 1 ml/kg body weight) + transdermal vehicle ointment; 2) scopolamine treatment, scopolamine (0.75 mg/kg i.p. in 1 ml/kg physiological saline) + transdermal vehicle ointment; and 3) scopolamine and PS cotreatment: scopolamine (0.75 mg/kg i.p. in 1 ml/kg physiological saline) + transdermal PS ointment. Two adhesive bandages (3.5 × 3.5 cm with a 2.0 × 2.0-cm gauze pad), containing 250 mg of PS ointment or vehicle, were applied to the shaved area on the back of each rat. Rats in the PS treatment group received 50 mg of PS formulated into vehicle ointment, as described above. Three hours before maze testing on day 3,

TABLE 1  
Vehicles studied

Vehicle	Classification
LP	Oleaginous base
Hydrophilic ointment	Emulsion base
Hydrophilic petrolatum	Emulsion base
Polyethylene glycol	Water soluble base
FAPG	Suspension
	Mineral [Oil/water] emulsion
	[Water/oil] emulsion
	Water soluble base
	Lyogel

the adhesive bandages were removed and replaced with bandages containing fresh applications of PS ointment or vehicle. Following transfer to the testing room, and 30 min before testing in a 14-unit T-maze, i.p. injections of either physiological saline or scopolamine were administered.

**Cognitive Performance and Cholinesterase Inhibition.** All rats performed 20 trials in a 14-unit T-maze with an intertrial interval of 2 min. The performance measure was the number of errors committed on each trial. Immediately following the final maze run, animals were killed by fluorothane overdose. Plasma and brain samples were collected, and they were immediately frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cholinesterase levels were later determined by the Ellman method (Ellman et al., 1961).

**Data Analysis.** All data are reported as means  $\pm$  S.E.M. of at least four trials or animals. Statistical significance was determined by analysis of variance with post hoc LSD test, Dunnett's test, and unpaired *t* tests as appropriate.

### Results

**Permeability of PS and PST in Vitro.** Phenserine was used as free base (PS) and tartrate (PST) forms in studies to identify the most suitable ointment vehicle (Table 1) and active agent for a transdermal formulation. The actions of the penetration enhancer HPE-101 were also assessed. PS or PST [1% (w/w)] was formulated in various vehicles containing 0 to 5% (w/w) HPE-101.

Figure 2 shows the permeation profiles of PS from various

vehicles containing PS or PST through intact skin from the hairless mouse into receptor phase. Only the LP and FAPG vehicles allowed sufficient permeation of PS through the intact dermal barrier. Cumulative amounts of PS from the PS-containing vehicle recovered during the 8 h of the study were greater than those from the PST-containing vehicle, although the flux of PS for the PST-containing vehicle began earlier than that for the PS-containing vehicle. Subsequent studies focused on PS formulated within LP and FAPG vehicles.

Figure 3 and Table 2 present data regarding the effects of the penetration enhancer HPE-101 [0–5% (w/w)] on total flux and steady-state flux rates of PS, from LP and FAPG formulations, through intact skin. Permeabilities of PS were markedly improved by the addition of HPE-101. Maximum benefits of HPE-101 addition were observed between 3 and 5% (w/w) HPE-101 concentrations.

Because the stratum corneum is an impediment to transdermal permeability in intact skin and its integrity may be reduced by age, we also examined PS permeability from formulated LP and FAPG ointments using stripped skin from the hairless mouse. Figure 4 shows the permeation profiles of PS from these vehicles through both intact and stripped skin. Cumulative flux of PS was increased in stripped versus intact skin, by 2.9- and 1.8-fold for LP and FAPG ointments, respectively.

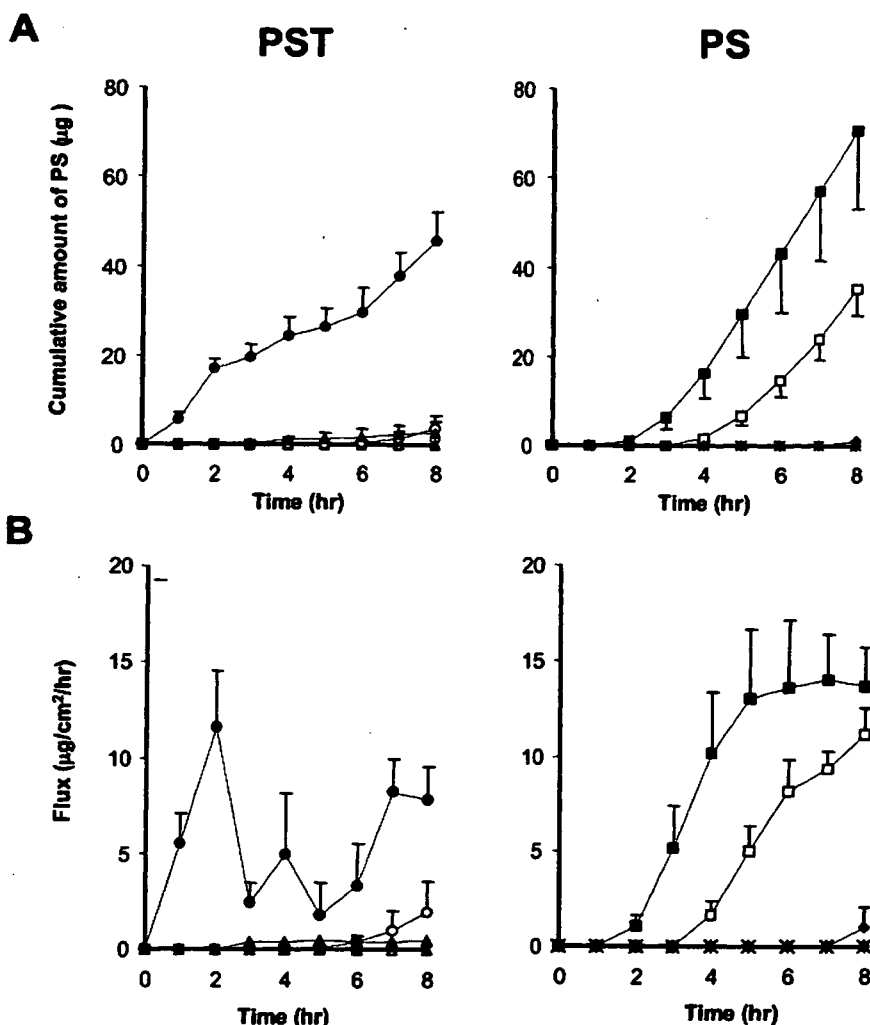


Fig. 2. In vitro permeation profiles of PS from vehicles containing PS [1% (w/w)] or PST [1% (w/w)] supplemented with HPE-101 [3% (w/w)], through 1-cm<sup>2</sup> intact skin into saline at 37°C. A, cumulative amounts of PS. B, flux of PS: ●, PST from FAPG; ○, PST from LP; ▲, PST from PG; △, PST from hydrophilic ointment; ×, PST from hydrophilic petrolatum; ■, PS from FAPG; ◻, PS from LP; ◆, PS from PG; ◇, PS from hydrophilic ointment; and \*, PS from hydrophilic petrolatum. Each point represents mean  $\pm$  S.E.M. (*n* = 4).

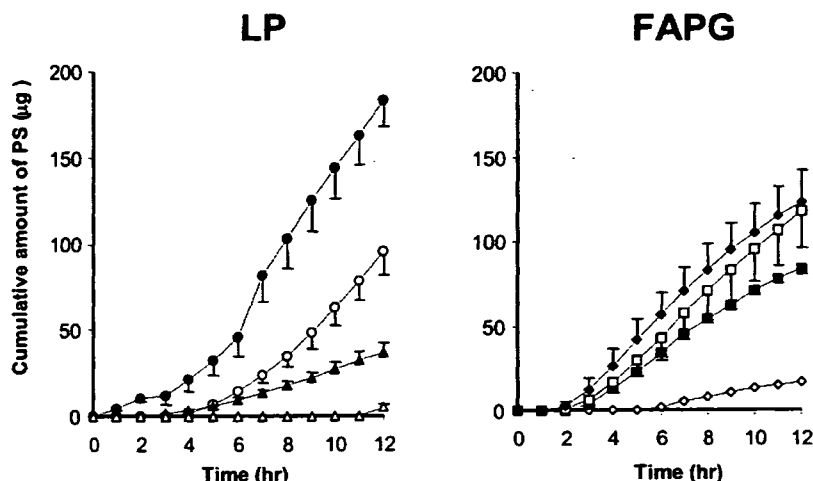


Fig. 3. In vitro permeation profiles of PS from LP and FAPG vehicles containing PS [1% (w/w)] supplemented with HPE-101 [0–5% (w/w)] through 1-cm<sup>2</sup> intact skin into saline at 37°C. ●, from LP with HPE [5% (w/w)]; ○, from LP with HPE [3% (w/w)]; ▲, from LP with HPE [1% (w/w)]; △, from LP without HPE; ■, from FAPG with HPE [5% (w/w)]; □, from FAPG with HPE [3% (w/w)]; ◆, from FAPG with HPE [1% (w/w)]; and ◇, from FAPG without HPE. Each point represents mean ± S.E.M. (n = 4).

TABLE 2

Steady-state fluxes and cumulative amounts of in vitro transdermal permeation of PS [1% (w/w) in vehicle] across 1-cm<sup>2</sup> intact skin into saline at 37°C

Transdermal preparations were formulated with LP or FAPG vehicles and HPE-101 at 0 to 5% concentrations (w/w) (n = 4).

Drug	Formulation		Steady-State Flux $\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$	Cumulative Amount for 12 h $\mu\text{g}$
	Vehicle	HPE-101 [% (w/w)]		
PS	LP	0	$0.6 \pm 0.1$	$5.2 \pm 41.2$
		1	$4.6 \pm 0.7$	$37.0 \pm 15.6$
		3	$17.4 \pm 3.3$	$95.6 \pm 14.3$
		5	$20.1 \pm 0.3$	$182.9 \pm 15.4$
	FAPG	0	$2.4 \pm 0.2$	$16.6 \pm 10.2$
		1	$11.0 \pm 1.3$	$122.3 \pm 19.4$
		3	$12.3 \pm 1.5$	$117.3 \pm 21.9$
		5	$8.2 \pm 0.8$	$83.3 \pm 13.2$

tion is in the region of 50–100 nM (Greig et al., 2000), which is in accord with its brain AChE IC<sub>50</sub> value of 36 nM (Greig et al., 2005b). To reach this therapeutic concentration with transdermal application, the optimal flux of PS was calculated using various pharmacokinetics parameters assessed in previous studies using intravenous administration of PS. The optimal flux rate was calculated using flux =  $k_e \times V_d \times C_{ss}/A$ , where  $k_e$ ,  $V_d$ ,  $C_{ss}$ , and  $A$  are rate constants for elimination, distribution volume, systemic PS level at steady state, and area available for transfer, respectively. Based on approximately 200 g body weight,  $k_e$  and  $V_d$  were calculated to be 3.3 h<sup>-1</sup> and 1103.2 ml, respectively. To achieve the necessary systemic PS level, a flux rate of 60 to 120  $\mu\text{g}/\text{h}$  was calculated to be necessary. Data presented above (Table 2) show that the experimental fluxes of PS in the series of experiments using a 1-cm<sup>2</sup> area of intact skin for permeation within the diffusion cell, were approximately 5-fold lower than that required to achieve systemic levels of PS within the therapeutic range. However, the flux rate could theoretically be increased by providing a greater surface area for absorption.

Having determined the need for a flux of 60 to 120  $\mu\text{g}/\text{h}$  to achieve appropriate systemic PS levels, we investigated PS fluxes using a diffusion cell with 5-cm<sup>2</sup> area of intact skin for permeation to compare with 1-cm<sup>2</sup> data reported above (Malcom and Thomas, 1995). Formulations also contained 5% (w/w) HPE-101. Figure 5 shows permeation profiles of PS from LP and FAPG vehicles for 1- and 5-cm<sup>2</sup> diffusion cell areas using intact hairless mouse skin. The 5-fold increase in available diffusion area resulted in 4.3- and 8.2-fold increases in total accumulated transdermal flux over a 12-h period, for LP and FAPG formulations, respectively. Figure 6 shows that fluxes of PS from both vehicles entered the range of 60 to 120  $\mu\text{g}/\text{h}$  with 5-cm<sup>2</sup> diffusion areas of intact skin, in the presence of 5% (w/w) HPE-101. It should be noted that the time necessary to reach the sufficient flux of PS from the FAPG vehicle was shorter than that from the LP vehicle. This would be theoretically sufficient to support systemic PS levels within the therapeutic dose window.

The in vitro findings suggest that LP and FAPG vehicles have almost the same performance for delivering PS through hairless mouse skin and into the systemic circulation. To develop a final dosage form for transdermal PS, the LP vehicle requires an additional pharmaceutical processing. In

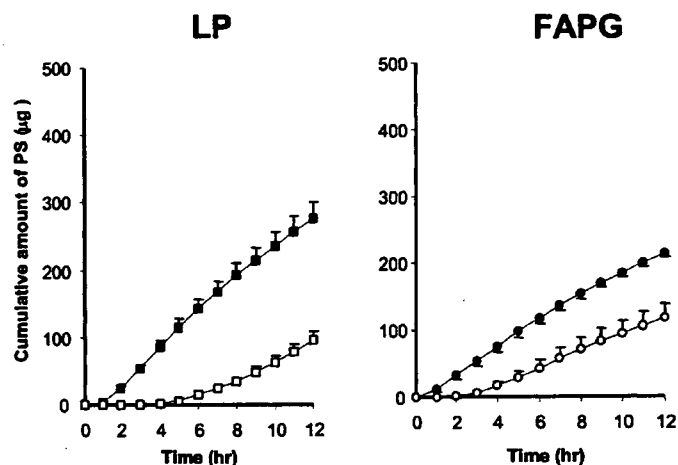
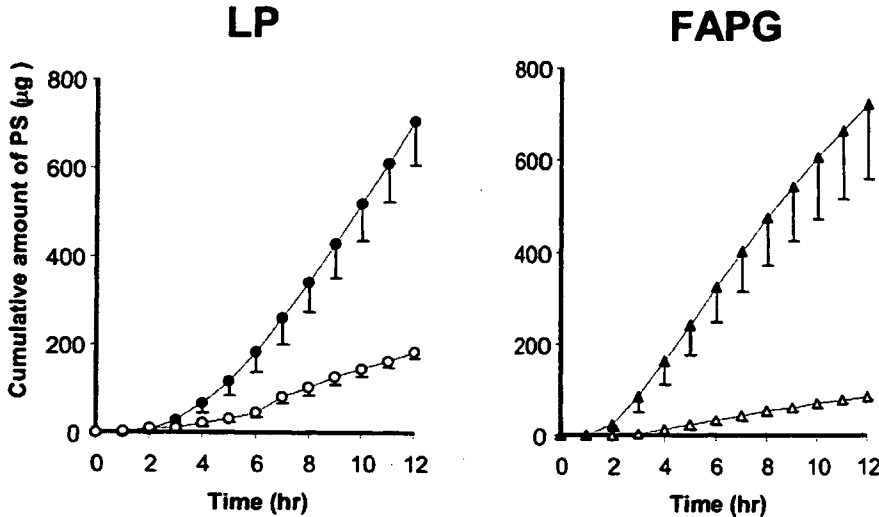
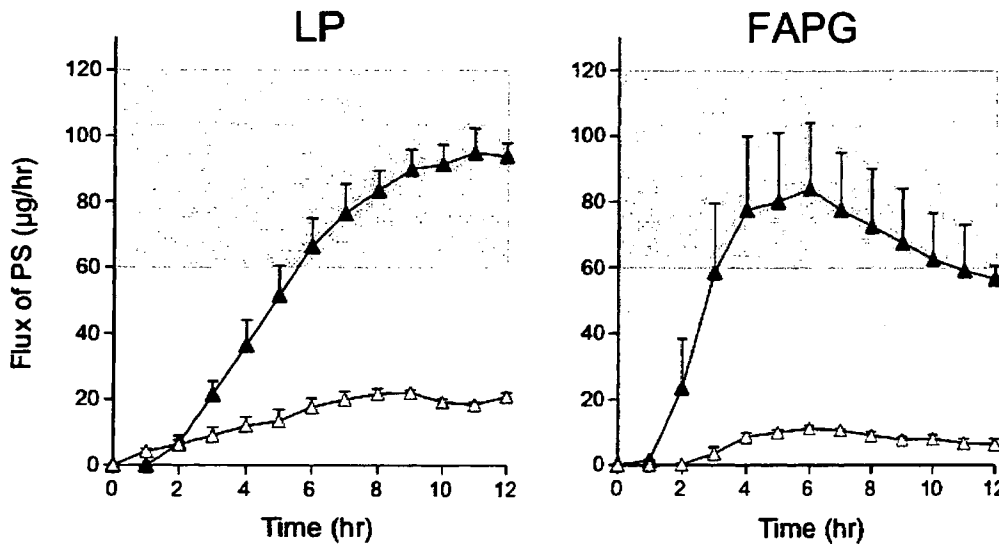


Fig. 4. In vitro permeation profiles of PS from LP and FAPG vehicles containing PS [1% (w/w)] supplemented with HPE-101 [3% (w/w)] through 1-cm<sup>2</sup> intact or stripped skin into saline at 37°C. ■, PS from LP through stripped skin; □, PS from LP through intact skin; ●, PS from FAPG through stripped skin; and ○, PS from FAPG through intact skin. Each point represents mean ± S.E.M. (n = 4).

To study the in vivo efficacy of transdermal PS, it was necessary to ensure sufficient total transdermal flux of PS to achieve systemic levels within the therapeutic window for PS in the rat. It has been reported that the therapeutic window for PS in rat plasma for maintenance of brain AChE inhibi-



**Fig. 5.** In vitro permeation of PS from LP and FAPG vehicles containing PS [1% (w/w)] supplemented with HPE-101 [5% (w/w)] through 1- or 5-cm<sup>2</sup> intact skin into saline at 37°C. ●, from LP through 5-cm<sup>2</sup> intact skin; ○, from LP through 1-cm<sup>2</sup> intact skin; ▲, from FAPG through 5-cm<sup>2</sup> intact skin; and △, from FAPG through 1-cm<sup>2</sup> intact skin. Each point represents mean ± S.E.M. (n = 4).



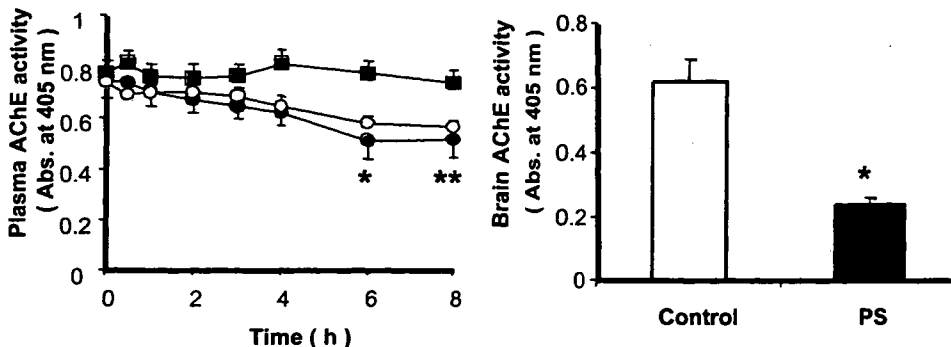
**Fig. 6.** In vitro flux of PS from LP and FAPG vehicles containing PS [1% (w/w)] supplemented with HPE-101 [5% (w/w)] through 1- or 5-cm<sup>2</sup> intact skin into saline at 37°C. ●, from LP through 5-cm<sup>2</sup> intact skin; ○, from LP through 1-cm<sup>2</sup> intact skin; ▲, from FAPG through 5-cm<sup>2</sup> intact skin; and △, from FAPG through 1-cm<sup>2</sup> intact skin. Each point represents mean ± S.E.M. (n = 4).

contrast, the FAPG vehicle enables us to prepare the ointment of PS without any processing. Based on the aforementioned consideration, we decided on the continued use of FAPG vehicle for in vivo studies.

**In Vivo Transdermal PS Permeability and Efficacy Effects on Cognitive Performance and AChE Activity.** FAPG vehicle application alone, with or without HPE-10, did not affect plasma AChE activity compared with untreated animals (data not presented). As shown in Fig. 7, plasma AChE activity was significantly reduced by 30% after treatment with PS ointment containing HPE-101 [5% (w/w)] ver-

sus controls receiving vehicle ointment alone. Concomitant inhibition of AChE activity in brain at 8 h was 60% ( $p < 0.05$ ) after treatment with PS ointment containing HPE-101 [5% (w/w)] versus controls. PS ointment without HPE-101 resulted in reductions in plasma AChE activity versus controls that did not achieve statistical significance. Plasma levels of biochemical markers of hepatic, renal, and muscle function assessed at 1 and 8 h remained within their biological range for both PS treatments and controls (data not shown).

Figure 8 shows the effects of transdermal PS on cognitive impairment (errors in trial negotiation) induced with scopol-



**Fig. 7.** Left, in vivo, rat plasma AChE activity during 8-h transdermal administration of FAPG ointment containing PS [10% (w/w)], supplemented with or without HPE-101 [5% (w/w)]. ■, untreated control; ○, FAPG ointment with PS [10% (w/w)]; ●, FAPG ointment with PS [10% (w/w)] and HPE-101 [5% (w/w)]. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.001$  versus untreated control. Each point represents mean ± S.E.M. (n = 5). Right, brain AChE activity at 8 h in control rats and those administered FAPG ointment with PS [10% (w/w)] and HPE-101 [5% (w/w)] ( $p < 0.05$  PS treatment versus control).