

開放型セルを用いたレーザー光音響法による経皮吸収測定

東京大学工学部

澤田 嗣 郎

The feasibility of percutaneous absorptiometry technique utilizing an open-ended Photoacoustic (PA) cell are reported. This PA system is capable of measuring percutaneous absorption *in vivo* with both high sensitivity and accuracy. In addition, it provides the means for very simple measurement, compared with conventional methods such as radioisotopes.

An *in vitro* percutaneous absorptiometry was attempted using 1% indomethacin (IDM) ointment applied to an extracted hairless mouse skin. By this experiment, both the decrease in the amount of IDM on the donor side by the PA signal and the increase in the concentration of IDM in the receiver side by UV absorbance were observed along with penetration of IDM through the skin.

An *in vivo* percutaneous absorptiometry was attempted using the 1% IDM ointment applied to a hairless mouse. The diffusion coefficient of IDM through the skin *in vivo* obtained by this PA method was calculated to be $6.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$. This was in good agreement with the results obtained by the conventional *in vitro* method using a longitudinal diffusion cell.

Based upon the results shown above, it was concluded that the laser PA method using an open-ended cell was applicable to percutaneous absorption.

1. はじめに

近年、経皮吸収促進剤や基剤の開発など、外用剤の経皮吸収に関する基礎的な研究から開発研究まで盛んに行われている。これは内服剤と比較して外用剤は、効果の持続時間が長いことや副作用が小さいことなどの利点を有するからである。しかしながら最大の課題は、外的環境に対してバリア機能を有する皮膚(角層)にいかにして薬剤を吸収させるかである。医薬品や化粧品などの外用剤を開発する際にも、ドラッグデリバリーシステム(DDS)という言葉が盛んに使われている。このDDS研究において、薬剤の経皮吸収評価は

重要な鍵である。そのため、拡散セルやラジオアイソトープ(RI)などの様々な方法が開発されているが、簡便にかつ正しく物質の経皮吸収性を評価可能な測定法は定まっていない。特に *in vivo* 測定においては *in vitro* 法よりさらに定まっていないのが現状である。 *in vivo* 法においては一般的に RI が用いられているが、対象薬剤に放射性物質をマーカーとして施す必要性があり、測定も極めて困難なため、スクリーニング法としては不適当と思われる。さらに当然のことながらヒト(*in vivo*)には適用できない。簡便にかつ正しく *in vivo* 測定の可能な評価法が望まれている。

我々はこれまでに、簡便かつ高感度に経皮吸収評価の可能な開放型セルを用いた光音響(PA)法を開発し、*in vitro*、*in vivo* 経皮吸収測定への適用を行ってきた^{1), 2)}。さらにより測定対象物質を拡大するため、UVレーザー光源を用いた高感度で高精度に適用可能な開放型セルを用いたUVレーザーPA法を新規に開発した³⁾。そして、本法によるヘアレスマウスの *in vitro*、*in vivo*

Percutaneous Absorptiometry by Laser Photoacoustic Method Using an Open-ended Cell.



Tsuguo Sawada

Faculty of Engineering,
The University of Tokyo

経皮吸収測定を行い、対象薬物の皮膚中拡散速度を求めた。本論文において本法の経皮吸収測定法としての有効性を報告する。

2. 実験

図1にライトガイドと一体型の開放型PAセルを用いた *in vivo* 経皮吸収測定システムを示す。

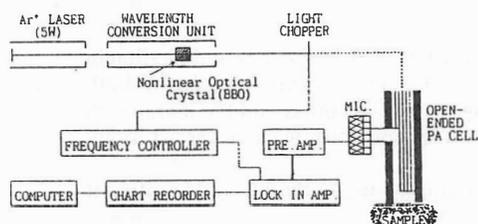


図1. UV-PAS法を用いた簡便かつ高精度な経皮吸収測定システム

光源として257nmのUV光を用いた。UV光は、5W（マルチ）のアルゴンレーザー（Spectra Physics, Model-2020）に非線形光学結晶（ β -BaB₂O₄ : BBO）を備えた光学微調整の可能なUV発振ユニット（Ascal Corp., UVA-4）を取り付けることで得られた。レーザービームをPAセルの共鳴周波数である2.2kHzにライトチョッパ（NF Corp.）によって変調し、UVライトガイド（Asahi Glass Corp., 5mm in diameter × 1m）と一体型の開放型PAセルに導いた。このPAセルは、ライトガイドの末端をセルの試料室とし、最適化の図られた90°に折れ曲がった音響パイプをその末端に取り付けることで作成した。このデザインによってセルのデッドボリュームは小さくなり、測定もより簡便となった。また、S/Nをさらに向上させるため、脈拍や環境ノイズの影響を受けにくい周波数（kHz）で共鳴を起こすようにPAセルの構造をデザインした。この共鳴周波数は音響パイプの長さを変えることで調整可能であった。試料から発生する音波をこのPAセルを用いて高感度に検出し、ロックインアンプで解析することでPA信号を得た。

モデル試料として、257nm光を吸収するイン

ドメタシン（IDM；C₁₉H₁₆ClNO₄, Wako Pure Chemical, Reagent class ; for biochemistry）を、ポリエチレングリコールと混合させた1.0% IDM軟膏を作成した。尚、一般的にIDMは消炎剤として用いられている。

3. 結果と考察

3.1 PAS-吸光度同時測定によるIDMの *in vitro* 経皮吸収測定

脂肪部を除去したヘアレスマウスの摘出皮膚に1.0%のIDM軟膏を10mg塗布し、拡散セルには生理食塩水を用い、PAS-吸光度同時測定を行った。このシステムは皮膚上のIDMの残存量をPA法で、皮膚透過したIDM量を吸光度で、連続かつ同時に測定可能なシステムである。図2に示した結果のように、PA信号の減少に伴い吸光度の増加が確認された。PA信号の変化と比較して吸光度は8時間程のラグタイムが存在するが、これはIDMが皮膚の真皮層内に保持されやすいことによるものと思われる。

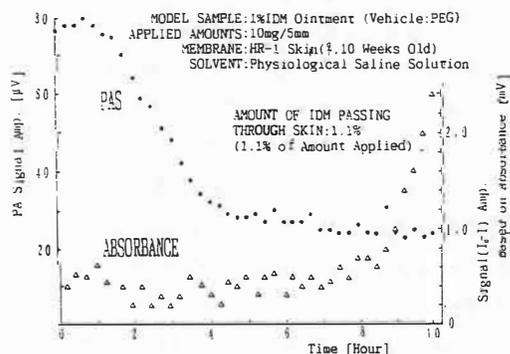


図2. UV-PAS・吸光度同時測定法によるIDMの *in vitro* 経皮吸収測定

3.2 UVレーザーPAS法による *in vivo* 経皮吸収測定と皮膚中拡散係数の算出

1%のIDM軟膏を実使用量（6mg/10mmφ）、ヘアレスマウスの背部に塗布し *in vivo* 経皮吸収測定を行った。この時、UVレーザー光の温熱に

よる経皮吸収促進の影響を防ぐため5分ごとに測定を行い、ロックインアンプなどの微小信号器の機能を考慮して1回の測定にかかる時間を15秒とした。優れたS/N（40以上）で得られた *in vivo* 測定の結果を図3に示す。基剤のみ塗布し同条件

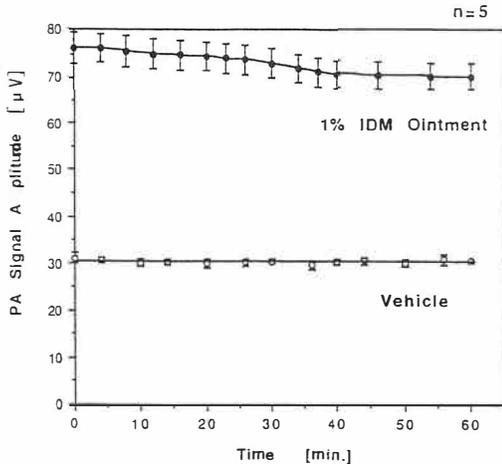


図3. UV-PAS法によるIDMの *in vivo* 経皮吸収測定 (対象: ヘアレスマウス)

で測定を行った参照信号とIDM軟膏を塗布した場合を比較すると、前者は時間に対してほぼ一定であるが後者は60分後に初期PA信号に対して5%の信号の減少が認められた。UVレーザー照射によるIDMの破壊や光変化は認められず、このPA信号の減少はIDMの経皮吸収に伴うものと考えられた。そこで、IDMのヘアレスマウスの *in vivo* 皮膚における皮膚中拡散係数を、得られたPA信号から求めることを試みた。これは、PA信号の経時変化から時定数を定めることで求めることができる⁴⁾。皮膚上の物質の濃度の減少変化は基本的に指数関数で表されるので、時定数はPA信号を対数でプロットすることで得られる。また、膜中の物質の拡散理論より、時定数 τ は次の式で記述される。

$$\tau = 4L^2 / \pi^2 D$$

(L: 膜厚、D: 物質の膜中拡散係数)

この原理を得られたPA信号 (Fig.2) に適用すると、図4に示したようには τ (607分) は相関係数0.948で得られ、これより拡散係数は $6.7 \times$

$10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min.}$ となった。(ヘアレスマウスの皮膚厚(L) = 0.1cm) この値は、従来の *in vitro* 拡散セル法により得られた値 ($3.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min.}$) とオーダーで一致した。この結果より、本法の経皮吸収評価法としての妥当性が得られた。

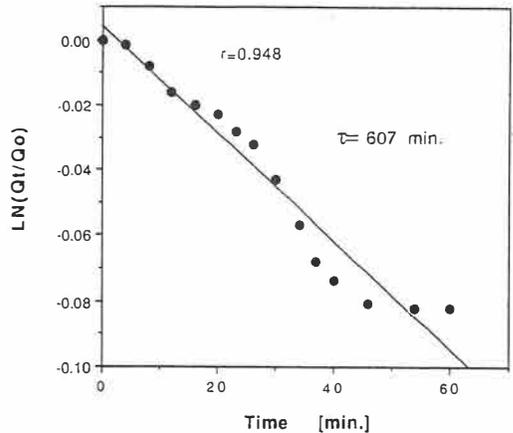


図4. 経皮吸収理論に基づいた対数法による時定数の決定 (IDMの皮膚中拡散係数の算出)

4. まとめと今後の課題

開放型セルを用いたレーザーPA法は、高感度かつ高精度に *in vivo* 経皮吸収測定が可能であり、RIなどの従来法と比較して極めて測定が簡便である。さらに、本法を用いれば、経皮吸収に関する新たな情報を得られる可能性があり、測定法としての有効性も示された。また、本報告においては光源としてレーザー光を用いているが、高出力のキセノンランプあるいは重水素ランプなどを用いればより多くの物質に本法を適用できる。

現在、本法のヒト *in vivo* 皮膚への適用を検討中である。この際の唯一の課題は、UV光の皮膚の安全性についてである。可視光を光源とする場合は、皮膚に対する波長と照射エネルギーの最大許容値がわかっているので問題はほとんどない。しかしながら、波長が300nm以下のUV光の場合には、実験例が少ないことやこれらの光が地表に到達していないこともあって、最大許容値は明

確に定められていない。従って、光強度を可能な限り小さくし、十分安全性を検討した上で適用することが必要である。

引用文献

- 1) Takamoto, R. ; Namba, R. ; Nakata, O. ; Sawada, T. Anal. Chem. 1990, 62, 674-677.
- 2) Takamoto, R. ; Namba, R. ; Matsuoka, M. ; Sawada, T. Anal. Chem. 1992, 64, 2661-2663.
- 3) Takamoto, R. ; Yamamoto, S. ; Namba, R. ; Takamatsu, T. ; Matsuoka, M. ; Sawada, T. Anal. Chem. 1994, (in press).
- 4) Steven, D. C. ; Sinclair, S. Y. ; Martin, A. A. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 1976, BME-26 (4), 220-227.