

超音波の薬物皮膚透過促進に関する研究

甲第11号

上 田 秀 雄

# 超音波の薬物皮膚透過促進に関する研究

上 田 秀 雄

# 目次

総論の部	1
緒言	1
第1章 薬物の皮膚透過性に対する超音波の影響	4
第1節 超音波周波数の選定	4
第2節 超音波出力の測定	6
第3節 種々薬物の皮膚透過に対する超音波の効果	9
第4節 小括並びに考察	15
第2章 超音波の薬物皮膚透過促進機構	17
第1節 水力学的細孔理論による超音波の効果の解析	17
第2節 超音波による皮膚の電気化学的性質の変化	21
第3節 薬物の皮膚透過パラメータに対する超音波の影響	26
第4節 薬物透過係数のアレニウスプロットによる超音波の促進効果の解析	29
第5節 角質層脂質に対する超音波の影響	32
第6節 小括並びに考察	35
第3章 薬物の皮膚透過性に対する超音波と経皮吸収促進剤の併用効果	39
第1節 超音波と各種促進剤の併用効果	40
第2節 超音波と促進剤の併用効果に対する超音波照射時間及び促進剤濃度の影響	42

第3節 超音波と促進剤の併用系における超音波の役割	44
第4節 小括並びに考察	47
結論	50
謝辞	54
実験の部	55
第1章 実験の部	55
第2章 実験の部	59
第3章 実験の部	65
引用文献	69

## 総論の部

# 総論の部

## 緒言

疾病の原因や薬物の生体内での作用機構等が徐々に明らかにされるに伴い、効率的かつ安全に薬物治療が行える投与剤形が望まれるようになってきた。また高齢化社会を控えた昨今、服用あるいは適用が簡便で患者のコンプライアンスを改善できる剤形も望まれている。ドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System, DDS) はこれらのニーズに応えるべく考案された新しい投与剤形であり、従来あるいは新規の投与経路を利用して、主に薬物の放出制御 (controlled release) と標的化 (targeting) を基本として設計されるシステムである。<sup>1,2)</sup>

DDS の概念を有する製剤の中でも、従来から用いられている外用剤に製剤学的な工夫を付与した経皮治療システム (Transdermal Therapeutic System, TTS) は、システムから生体への薬物送達を長時間にわたり制御できるばかりでなく、肝臓での初回通過効果を回避できること、及び薬剤の投与と中断が容易であることなど優れた特性を有している。<sup>1-4)</sup> しかしながら、皮膚は本来体内からの水分の蒸発を防いだり、体外からの異物や化学物質の進入を防ぐためのバリアーとして機能しているため、<sup>5)</sup> 治療上必要とされている薬物を有効なレベルで体内に導入することは必ずしも容易ではない。この問題点を克服するために、薬物を化学修飾 (プロドラッグ化) することによってその物理化学的性質を変更する方法、<sup>6)</sup> あるいは吸収促進剤を用いることにより皮膚バリアー能を低下させる方法<sup>7,8)</sup> が広く検討されている。また、外部駆動力として電気エネルギーを用いることによってイオン化した薬物を体内に導入するイオントフォレーシス (iontophoresis)<sup>9-11)</sup> は、電流を ON または OFF することにより

薬物送達速度をコントロールすることが可能である。さらに高電圧パルス電流を瞬間的に皮膚に適用するエレクトロポレーション (electroporation)<sup>12)</sup> とイオントフォレーシスを組み合わせることでペプチド医薬品のような高分子化合物の経皮送達をコントロールする試みも行われている。<sup>13)</sup> このような物理的エネルギーを利用した促進法は、その適用エネルギーを調節することにより薬物の皮膚透過を制御できる可能性があり、TTS 開発に対して特に魅力的な方法である。

一方、超音波エネルギーもまた物理的方法として吸収促進のために用いられ、この方法はフォノフォレーシス (phonophoresis)<sup>14,15)</sup> として知られている。超音波はそれ自身生体に対して温熱作用、血行促進、あるいはマッサージ効果等を有し、フォノフォレーシスは本来このような超音波の物理的特性を利用して神経痛、リウマチ、あるいは関節炎のような疾患に対する局所薬物療法の効果を高めようとするものである。フォノフォレーシスは Fellingner と Schmid<sup>16)</sup> がヒドロコルチゾン軟膏による指多関節炎の治療に対し補助的手段として用いたのが最初である。また、Benson ら<sup>17)</sup> は健常人に対するリドカインのクリーム剤塗布後の超音波適用が局所麻酔作用の作用発現時間を短縮し、持続時間を延長したことを報告している。このように、フォノフォレーシスは臨床的に用いられているという歴史的背景から、実用化しやすい方法であると考えられる。しかしながら、フォノフォレーシスに関する研究は *in vivo* あるいは局所薬理効果をもとにその効果を評価しているものが多く、<sup>18-22)</sup> 薬物の皮膚透過過程に注目して超音波の効果を検討した報告は少ない。超音波を経皮吸収促進法として効果的に利用するためには、促進メカニズムを含めた基礎的なデータを集積する必要がある、このような情報は候補薬物や超音波条件の選択に対して有用であると考えられる。

そこで本研究において著者は、薬物の皮膚透過過程をより明確に見積もるこ

とができる *in vitro* 実験法を用いて、薬物のヘアレスラット皮膚透過性に対する超音波の影響及びその促進メカニズムについて検討した。第1章では本研究で用いた超音波条件について概説し、この超音波を用いて種々極性薬物の皮膚透過に対する影響を見積もった。第2章では超音波の促進メカニズムについて、種々の皮膚透過パラメータ及び電気化学的手法を用いて検討し、また角質層脂質に対する影響も見積もった。さらに第3章では超音波を吸収促進に対してより効果的に利用するために、吸収促進剤との併用効果について検討した。



# 第1章 薬物の皮膚透過性に対する超音波の影響

前述のように、フォノフォレーシスに関する研究は臨床的な評価をもとにしたものが中心であるため、薬物の皮膚透過性に対する影響を正確に見積もることは困難である。一方、実験条件を正確にコントロールでき、数学的あるいは物理化学的取扱いが容易である *in vitro* 透過実験法は薬物の皮膚透過に対する超音波の効果をより明確に記述できると考えられる。<sup>23)</sup> Brucksら<sup>24)</sup> はイブuproフェンの皮膚透過性に対する超音波の効果を *in vitro* ヒト皮膚透過実験から検討した。しかし、彼らが用いた基剤中にはプロピレングリコールのような吸収促進効果を有する成分が含まれているため、純粋な超音波の促進効果を評価するには至っていない。したがって、超音波の促進効果をより明確に見積もるためには、まず簡単な実験系で超音波の促進現象を把握する必要があると思われる。

そこで本章では超音波による促進現象を把握するために、超音波伝播性の良好な水を基剤として用い、極性の異なる種々薬物の皮膚透過に対する超音波の効果を拡散セルを用いた *in vitro* 法により見積もった。また実験に先立ち、用いた超音波装置から放射される超音波出力の測定を行った。

## 第1節 超音波周波数の選定

この研究で用いた超音波発生装置の概略をFig. 1に示す。この装置は基本的には電氣的発振器 (oscillator) , 電力増幅器 (amplifier) , 及び電気音響変換器 (transducer, トランスデューサー) からなり、電氣的発振器からの電気信号は電力増幅器を介してトランスデューサーに送られ、ここで圧電素子の振動に伴い超音波に変換される。また、超音波周波数は電氣的発振器の周波数とトラン

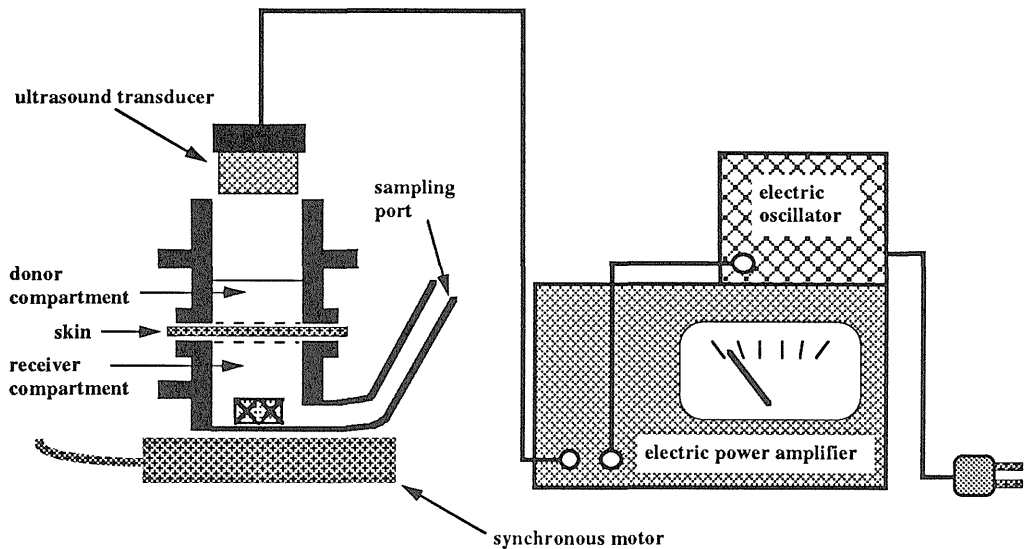


Fig. 1 Schematic diagram of experimental apparatus for ultrasonic-enhanced skin permeation experiment

スデューサーの形状で決まるものである。

超音波は一般に周波数 20 kHz 以上の音波であると定義される。医療の分野では超音波は疾病の診断及び治療に利用され、用途に応じて主に 20 kHz-10 MHz という広範囲の周波数が用いられている。<sup>25)</sup> 一般に超音波エネルギーの浸透する距離は周波数に反比例するので、超音波を生体に適用する場合には低周波数ほどより体の深部に到達することが知られている。<sup>26)</sup> また、生体に対してさまざまな作用を及ぼすキャビテーション効果、物理的攪拌作用、あるいは音圧などの効果も超音波周波数に依存する。<sup>27)</sup> フォノフォレーシスに関する研究では、これまで 20 kHz-16 MHz の広範囲の周波数域が検討されているが、現時点では効果的な周波数域は明らかになっていない。一方、Griffin と Touchstone はコルチゾールの皮下組織移行性に対する超音波周波数の影響について 90, 250, 500, 1000 及び 3600 kHz の周波数を用いて検討し、超音波治療域でよく用いられている 1000 kHz や 3600 kHz の超音波周波数よりも 90 kHz や 250 kHz の比較的低周波数域の超音波が効果的であることを示した。<sup>28,29)</sup>

彼らは、低周波数超音波が高周波数超音波よりも大きな超音波エネルギーを伝播できるので、薬物の皮下移行性を大きく促進したのであろうと考察した。そこで本研究を開始するにあたり、彼らのこの仮説をもとに周波数選択を行い、150 kHz の超音波を用いることとした。

## 第2節 超音波出力の測定

通常、超音波出力は電氣的発振器またはトランスデューサーへ供給される電氣的なエネルギー量として扱われる。本研究で用いた超音波装置において、電氣的発振器に供給される電氣的エネルギーは極大値で $3.7 \text{ W/cm}^2$ であった。しかしながら、この電気エネルギーが超音波エネルギーに変換されるまでの間にエネルギーが損失するため、この値がトランスデューサーから皮膚表面に放射される超音波エネルギーを示しているわけではない。したがって、超音波トランスデューサーから皮膚表面に供給される超音波エネルギーを定量的に見積もるために、超音波出力の測定を行った。超音波出力の測定法としてはハイドロフォン (hydrophone) あるいは天秤を用いた放射圧測定が一般に用いられている。<sup>30)</sup> 本研究では超音波診断装置に対して日本電子機械工業会規格で定められている「天秤法による超音波出力測定方法」<sup>31)</sup> をもとに測定装置を作成し、トランスデューサーからの超音波出力を測定した。この方法はトランスデューサーから水中に放射される超音波の放射圧を天秤に連結した受圧板により重量変化として検出し、超音波出力に換算するものである。以下にその測定原理を述べる。

受圧板に入射する超音波の平均エネルギーを $E$ とすると、受圧板がうける平均放射圧 $P$ は(1)式で与えられる。

$$P = E (1 + |R|^2 - |1 - R^2|^2 \exp(-2\alpha d)) \cdot \cdot \cdot (1)$$

ここで  $R$  は受圧板の音圧反射率，  $d$  は受圧板の厚さ，  $\alpha$  受圧板の音圧吸収率である。トランスデューサーの超音波出力 ( $W$ ) はトランスデューサーから放射される単位時間当たりの音響エネルギーなので，受圧板に入射する平均エネルギー密度  $E$  によって (2) 式のように表される。

$$W = cES \cdot \cdot \cdot (2)$$

ここで  $c$  は水中音速，  $S$  は受圧板の面積である。(1) 式を (2) 式に代入すると (3) 式が得られる。

$$W = cSP [1 / (1 + |R|^2 - |1 - R^2|^2 \exp(-2\alpha d))] \cdot \cdot \cdot (3)$$

また，受圧板に連結された天秤が検出する重量変化  $\Delta m$  と  $P$  の間には以下のような関係がある。

$$PS = \Delta m g \cdot \cdot \cdot (4)$$

ここで  $g$  は重力加速度 ( $9.8 \text{ m/s}^2$ ) である。(3) 式に (4) 式を代入すると，

$$W = [\Delta m c g / (1 + |R|^2 - |1 - R^2|^2 \exp(-2\alpha d))] \cdot \cdot \cdot (5)$$

もし  $\alpha$  と  $d$  が十分に大きければ，(5) 式は (6) 式のように書き換えられる。

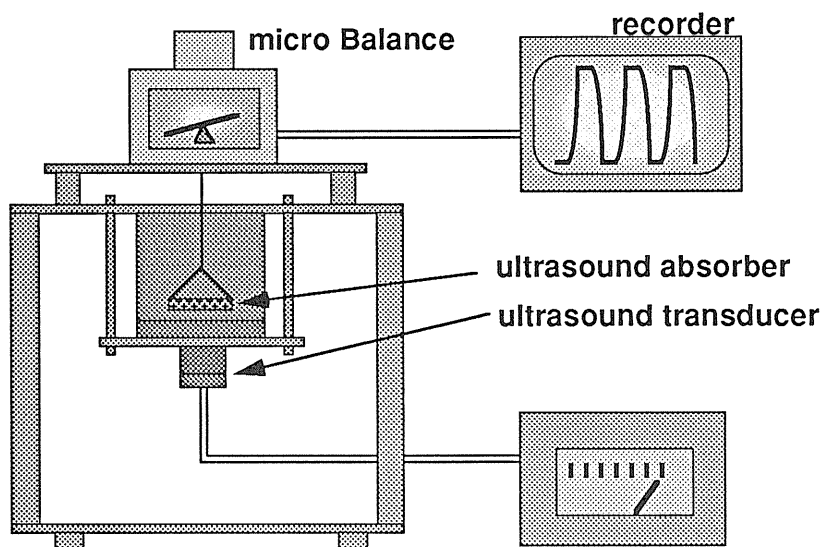


Fig. 2 Schematic diagram of the radiation force balance method

Table 1 Output power of ultrasound measured by the radiation force balance method

No.	1	2	3	4	5	
$\Delta m$ (mg)	32.38	38.86	37.90	49.75	30.56	
output power (mW/cm <sup>2</sup> )	92.59	111.12	108.38	142.26	87.39	
	6	7	8	9	10	Mean
	39.54	41.99	30.56	55.87	33.48	
	112.65	119.61	87.39	159.76	95.74	111.41

$$W = [\Delta m c g / (1 + 10^{R(\text{dB})/10})] \cdot \cdot \cdot \quad (6)$$

ここで、 $R = P_2 / P_1$  ( $P_1$ 及び $P_2$ はそれぞれ入射波音圧及び反射波音圧) で表されるが、 $\text{dB} = 20 \log (P_1 / P_2)$  の関係を用いて dB 単位として示してある。したがって、 $R$  (dB) がわかれば天秤によって測定した重量変化からトランスデューサーから放射される超音波出力を計算できる。

今回作成した天秤法装置の概略を Fig. 2 に示す。受圧板には超音波吸収材としてシリコンゴム (Wallgone®) を用い、その反射率は -2 dB として計算に用いた (実験の部, Fig. 26)。測定は発振器を 30 秒ごとに ON-OFF し、これを 1 サイクルとして 10 サイクル行い 1 回の測定とした。このときの重量変化を記録計に記録し、10 サイクルの平均  $\Delta m$  値から (6) 式を用いて超音波出力を計算した。Table 1 に本研究で用いた超音波装置への電気量の供給を極大 ( $3.7 \text{ W/cm}^2$ ) にしたときのトランスデューサーから放射される超音波出力の計算値を示す。その結果、トランスデューサーからの平均超音波出力は  $111 \text{ mW/cm}^2$  であり、フォノフォレーシスでよく用いられる超音波出力 ( $1\text{-}2 \text{ W/cm}^2$ ) に比べて低いことがわかった。なお、超音波発振器の出力調節範囲が狭いため、以後の実験ではすべてこの超音波出力を用いることにした。

### 第 3 節 種々薬物の皮膚透過に対する超音波の効果<sup>32)</sup>

本節では、まず今回使用した超音波による皮膚透過促進効果を把握するために、9 種の薬物の皮膚透過に対する超音波の効果を見積もった。この実験で用いた薬物の構造式及び物理化学的性質をそれぞれ Fig. 3 及び Table 2 に示す。

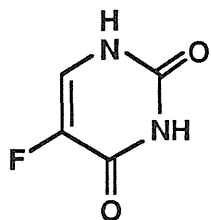
**Table 2 Physicochemical properties of drugs used in this study**

	MW <sup>1)</sup>	log Kow <sup>2)</sup>	Cw (mg/ml) <sup>3)</sup>
5-Fluorouracil (5-FU)	130.1	-1.70	12.2
Antipyrine (ANP)	188.2	-0.69	634
Aminopyrine (AMP)	236.1	0.38	62.1
Cyclobarbitol (CB)	236.3	0.87	3.07
Isosorbide dinitrate (ISDN)	236.1	1.20	0.972
Lidocaine (LC)	234.3	2.30	3.03
Ketoprofen (KP)	254.3	3.11	0.17
Ibuprofen (IP)	206.3	3.80	0.051
Flurbiprofen (FP)	244.3	3.86	0.027

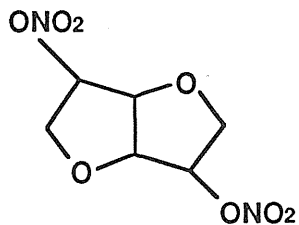
1) Molecular weight

2) Log octanol/water partition coefficient at 32 °C

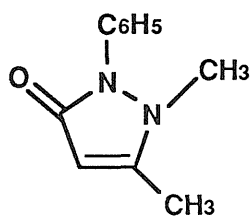
3) Solubility in water at 32 °C



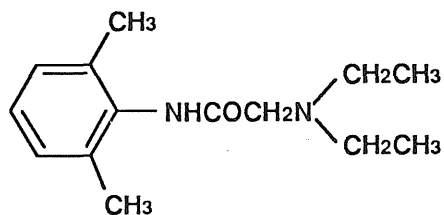
5 - Fluorouracil (5-FU)



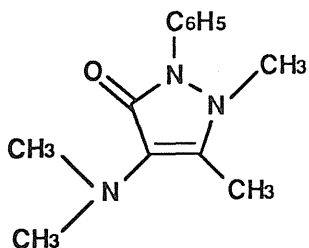
Isosorbide dinitrate (ISDN)



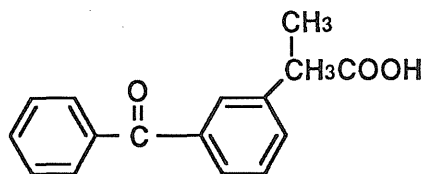
Antipyrine (ANP)



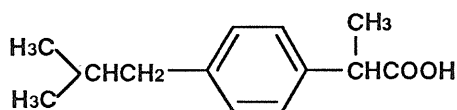
Lidocaine (LC)



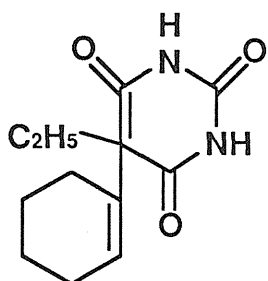
Aminopyrine (AMP)



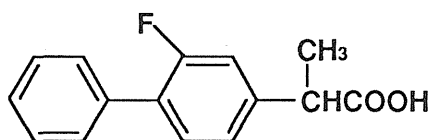
Ketoprofen (KP)



Ibuprofen (IP)



Cyclobarbital (CB)



Flurbiprofen (FP)

Fig. 3 Structures of drugs used in the permeation study

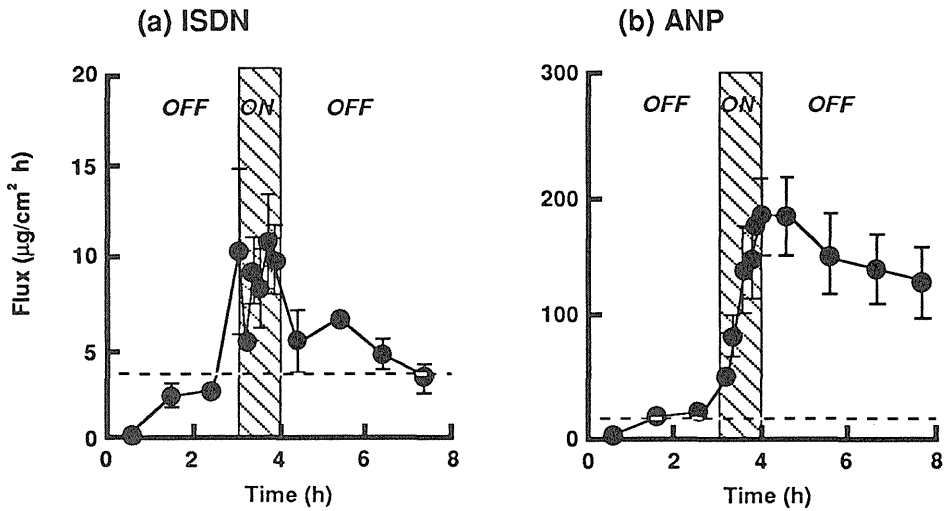


Fig. 4 Effect of ultrasound on the flux of ISDN and ANP; (a) typical lipophilic drug ISDN and (b) hydrophilic drug ANP. Shadowed area shows the duration of ultrasonic irradiation. Dotted lines mean the average flux without ultrasonic irradiation in the separate experiments. Each data point represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments.

これらの薬物間の分子量 (MW) の差は約2倍であるのに対し、オクタノール／水分配係数 ( $K_{ow}$ ) の差は、水溶性が最大の5-FU ( $\log K_{ow} = -1.70$ ) から脂溶性が最大のFP ( $\log K_{ow} = 3.86$ ) まで約  $4 \times 10^5$  倍であり、極性が著しく異なる薬物群である。皮膚透過実験は薬物溶液適用後最初の3-6時間を passive 条件 (OFF), その後1時間超音波照射し (ON), 再び passive 条件 (OFF) とした。また、通常のリソソームでは超音波適用は5-20分程度であるが、本研究で用いた超音波出力が一般に用いられている強度より低いことを考慮して60分間とした。

Fig. 4a 及び b はそれぞれ典型的な親油性及び親水性薬物である硝酸イソソルビド (ISDN) とアンチピリン (ANP) の8時間の実験中にわたる皮膚透過速度 (flux) の経時変化を示している。また、Fig. 5 にこの実験中にわたる角



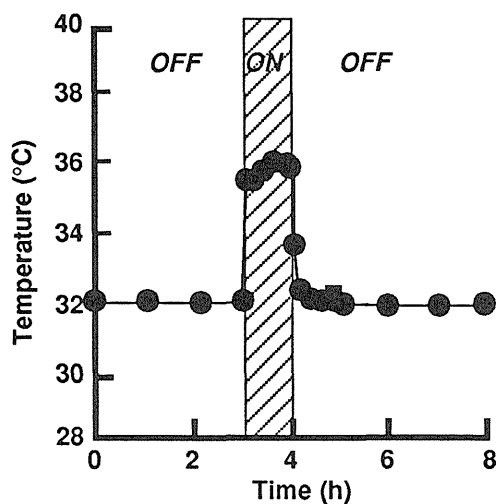


Fig. 5 Time course of donor temperature during phonophoretic experiment

Table 3 Fluxes of drugs through hairless rat skin before, during and after ultrasonic irradiation

	5-FU	ANP	AMP	CB	ISDN	LC	KP	IP	FP
$J_1^{1)}$	1.04	22.1	7.37	0.56	2.67	21.7	0.83	1.42	0.65
$J_{max}^{2)}$	7.73	186	52.7	8.43	11.2	66.9	2.64	3.23	1.40
$J_2^{3)}$	7.27	152	51.3	4.74	5.42	43.8	2.12	1.55	0.99

1); average flux before irradiation      2); maximum flux during irradiation      ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \text{ h}$ )  
 3); average flux after irradiation

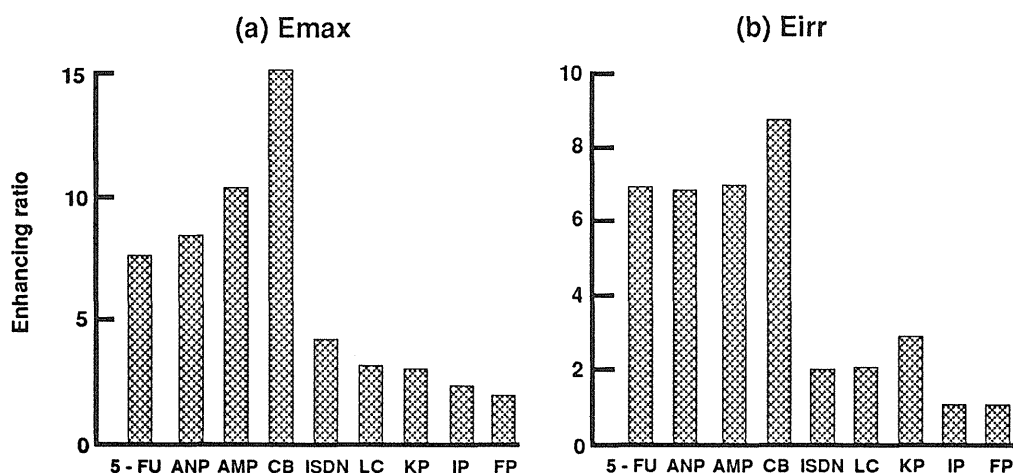


Fig. 6 Enhancing ratios of drugs during and after ultrasonic irradiation

質層側溶液温度の経時変化を示す。8時間までの実験データをもとに超音波の促進効果を評価すると、ISDNのfluxは超音波照射によって照射前に比べて有意に増加したが、照射後には照射前と同じレベルに戻る傾向が認められた。ANPのfluxもまた超音波照射によって有意に増加したが、照射後のfluxは照射前のレベルには戻らなかった。この結果は超音波の促進効果が、超音波照射中に認められる可逆的效果と超音波照射後にも残存する非可逆的效果に分けられることを示している。Fig.5に示したように、本実験では拡散セルの角質層側溶液温度は温度は passive な状態では 32 °C に保たれているが、超音波照射中には約 36 °C まで上昇した。一般に温度上昇は分子の運動性を高め、薬物拡散性を上昇させるので、超音波の可逆的促進効果にこの温度上昇が関与しているものと考えられた。また、このような現象は試験した他の薬物でも認められた。そこで、各薬物に関する超音波照射中及び照射後の促進率、 $E_{\max}$  及び  $E_{\text{irr}}$  を Table 3 に示す flux を用いて次式から算出し、薬物間で比較した (Fig. 6a 及び b)。

$$E_{\max} = J_{\max} / J_1 \cdots (7)$$

$$E_{\text{irr}} = J_2 / J_1 \cdots (8)$$

ここで  $J_1$  及び  $J_2$  はそれぞれ超音波照射前 (実験開始後 2-3 または 5-6 時間) 及び照射後 (実験開始後 6-8 または 9-11 時間) の flux,  $J_{\max}$  は超音波照射中の最大 flux である。 $E_{\max}$  の値は 5-FU の  $\log K_{\text{ow}}$  値から 1 に近づくにつれて高くなり、CB で最大値を示したが、1 以上の親油性の高い薬物では極端に低くなる傾向が認められた (Fig. 6a)。また、 $E_{\text{irr}}$  の値も同様に  $\log K_{\text{ow}} = 1$  を境に大きく異なり (Fig. 6b)、超音波の非可逆的な促進効果は親水性薬物に対して高く現れるものと考えられた。これらの結果から、薬物の皮膚透過に対する超

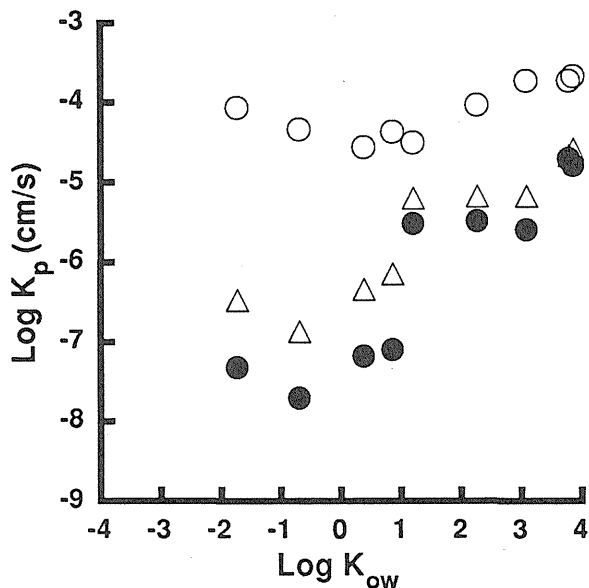


Fig. 7 Relationship between  $\log K_p$  through the hairless rat skin and  $\log K_{ow}$  of drugs  
 ●, before ultrasonic irradiation; Δ, after ultrasonic irradiation;  
 ○, stripped skin.

音波の促進効果は薬物の極性に大きく依存することが明らかとなった。

皮膚の透過バリアーは最外層の角質層に由来するものであり、超音波が角質層に非可逆的な影響を及ぼしていることが考えられる。次に、この透過バリアーに対する超音波の影響を見積もるために、超音波照射前及び照射後の flux から (9) 式を用いて透過係数  $K_p$  を算出し、 $K_{ow}$  に対してプロットした (Fig. 7)。

$$K_p = J / C_v \cdot \cdot \cdot \quad (9)$$

ここで、 $C_v$  は基剤中薬物濃度である。Fig. 7 に示したように、 $\log K_{ow}$  が約 1 以上の親油性の高い薬物では照射前と照射後の  $K_p$  値は大きく変わらなかったが、 $\log K_{ow}$  が約 1 以下の親水性の高い薬物の  $K_p$  値は超音波照射によって約 1 オーダー増加した。また、超音波照射後の  $K_p$  値は角質層バリアーを除去した

皮膚 (stripped skin) のそれに近づき、このことから超音波は角質層の透過バリアー能を非可逆的に低下しているものと考えられた。

#### 第4節 小括並びに考察

本章ではまず、用いる超音波の周波数を選定し、超音波装置からの超音波出力を測定した。比較的low周波数の超音波が局所でのフォノフォレーシスに対して効果的であったという Griffin と Touchstone らの報告<sup>28,29)</sup> を参考にして、本研究では 150 kHz の周波数を用いることにした。次に、用いた 150 kHz の超音波装置のトランスデューサーから放射される超音波出力を天秤法により測定した。その結果、この実験で用いた超音波装置からの最大超音波出力は平均 111 mW/cm<sup>2</sup> であることがわかった。一般に、フォノフォレーシスに対しては 1-2 W/cm<sup>2</sup> の強度が用いられ、これと比べると低強度である。一方、超音波周波数が低いほど低強度でキャビテーション効果を生じやすくなることも知られている。<sup>33)</sup> Mitragotri らは最近、超音波による薬物の皮膚透過促進の原因が角質層中でのキャビテーションに起因し、20 kHz, 225 mW/cm<sup>2</sup> という低周波数、低強度の超音波がキャビテーション効果の結果としてインスリンのような高分子薬物の経皮送達を促進することを述べている。<sup>34)</sup> したがって、この実験で用いた超音波もまた、十分に促進効果を期待できるものと思われる。また、超音波装置への電氣的供給エネルギーとトランスデューサーからの超音波出力の間にはエネルギー損失が存在することが明らかとなった。多くの超音波装置は電氣的エネルギーをそのまま超音波出力としているものが多く、このような装置では超音波への変換効率が問題となる。したがって、皮膚表面に適用される超音波エネルギーを定量的に評価する際には、トランスデューサーからの超音波出力を直接測定するか、あるいは装置の変換効率から超音波出力を求めておく必要があると思われた。

この超音波による促進効果を極性の異なる9種の薬物の皮膚透過性をもとに見積もった。Fig. 4の結果から明らかなように、超音波は照射中に一時的に薬物の皮膚透過を促進する可逆的な促進効果と照射後にも残存する非可逆的な促進効果を有することが明らかとなった。Fig. 5に示したように、本実験系では超音波照射中に一時的な温度上昇（約4℃）が認められ、このことは可逆的な促進効果の一つの要因となっているものと思われた。また、Fig. 6bの結果から、超音波は親水性薬物の皮膚透過に対して非可逆的な効果が強く現れるものと考えられた。超音波照射前と照射後の透過係数を比較すると、超音波が皮膚バリアー能を非可逆的に低下していることを示していた（Fig. 7）。皮膚最外層の角質層が、親水性薬物に対して高いバリアー能を発揮しているため、もともと透過性の低い親水性薬物に対して高い促進効果を示したものと考えられる。また、角質層中には薬物の透過領域として、親水性領域と親油性領域が存在すると考えられており、<sup>35-37)</sup> 超音波処理により親水性薬物の  $K_p$  値が主に増加していることから、超音波は親水性領域を薬物透過性を非可逆的に高めているものと推測された。これらの結果をもとに次章では超音波の薬物皮膚透過促進機構について述べる。

## 第2章 超音波の薬物皮膚透過促進機構

薬物の皮膚透過促進に対する超音波の作用機構を理解することは、超音波照射条件あるいは候補薬物の選択といった観点から重要な課題である。これまでに吸収促進法としての超音波の利用に関していくつかの報告がなされ、大きく分類すると2つの促進機構が提唱されている。1つは超音波が角質層の構造的な変化を、<sup>34,38-40)</sup> もう1つは皮膚付属器官を介した共輸送 (convective transport) を引き起こすという考え方である。<sup>41,42)</sup> 前者は主に組織化した脂質構造が超音波のキャビテーション効果によって乱雑にされていること、また後者は超音波の放射圧やマイクロストリーミングに起因することが考えられている。しかしながら、このような促進機構に関する研究は非常に少なく、未だ結論には至っていない。したがって、超音波の促進機構を明らかにしていくためには機構論的な情報を与える実験データを集積していくことが必要であると考えられる。

第1章において、著者は150 kHz、111 mW/cm<sup>2</sup>の超音波の効果が可逆的効果と非可逆的効果に分けられること、及び主に水溶性薬物に対して促進効果が顕著であることを明らかにした。本章ではこの結果をもとに、このような促進効果を示す原因を明らかにし、皮膚に対する超音波の作用様式について検討した。

### 第1節 水力学的細孔理論による超音波の効果の解析<sup>32)</sup>

皮膚は表皮と真皮から構成され、このうち表皮最外層に存在する角質層が薬物透過の最大のバリアーである。また、皮膚には毛嚢や汗腺のような付属器官も存在し、角質層の実質部分に加えてこれらの器官を介したルートも透過ルー

トとして考えられる。しかしながら、付属器官の占有面積が皮膚全体の 0.1% 以下に過ぎず、一般に薬物の透過経路は角質層の実質であるという考え方が定説である。<sup>4)</sup> 角質層は扁平な角化細胞が重積し、その間隙を極性基をもつ脂質の多重層が満たした構造をしており、このような構造的特徴から角質層には透過ルートとして親水性及び親油性ルートが存在すると考えられている。<sup>35-37)</sup> 前章の結果から、超音波はこれらの領域のうち親水性領域を介した薬物透過性を非可逆的に高めていることが推測された。そこで、本節では超音波の非可逆的な促進効果の原因を見積もるために、薬物の皮膚透過に関する水力学的細孔理論<sup>43)</sup>を利用して親水性領域を介した透過性について解析した。以下にこの理論の原理を示す。

定常状態における薬物 flux ( $J$ ) が親水性及び親油性領域を介した flux の和として表せると仮定すると、

$$J = J_L + J_p \cdots (10)$$

ここで下付の L 及び P はそれぞれ親油性及び親水性領域を示す。  $J_L$  については Fick の拡散第一法則、  $J_p$  については Fick の拡散第一法則及び Kedem と Kachalsky の理論<sup>44)</sup>を導入すると、(11) 及び (12) 式のように表される。

$$J_L = CL_L C_0 \cdots (11)$$

$$J_p = CL_p C_0 + (1-\delta) J_{\text{solvent}} C_0 \cdots (12)$$

ここで CL は薬物の皮膚透過クリアランス ( $\mu\text{l/h}$ )、  $C_0$  は角質層側薬物濃度 ( $\text{mg/ml}$ )、  $J_{\text{solvent}}$  は溶媒の容積流 (influx,  $\mu\text{l/h}$ )、  $\delta$  は薬物の反発係数を示している。反発係数は溶質と溶媒を区別する能力を示す指標である。また、

(12) 式は極性ルートを介した flux が濃度勾配を駆動力とする拡散と容積流 (convective flow) の項からなることを示している。(11) 及び (12) 式を (10) 式に代入し式を整理すると、薬物の皮膚透過クリアランス ( $CL_{drug}$ ) は (13) 式のように表され、 $J_{solvent}$  と  $CL_{drug}$  の関係から親水性領域を介した透過性に関する情報が得られる。

$$CL_{drug} = CL_L + CL_P + (1-\delta) \cdot J_{solvent} \cdot \dots \quad (13)$$

この実験では親水性薬物としてアンチピリン (ANP)、溶媒として重水 ( $D_2O$ ) を用い、1時間超音波前処理した皮膚の水力学的パラメータを算出して未処理皮膚のそれと比較した。角質層または真皮側に塩化ナトリウムを添加し、異なる浸透圧条件下で容積流を誘導した。また、この実験で得られるパラメータの中で  $D_2O$  の flux ( $J_{D2O}$ ) を親水性領域を介した透過性の指標とした。

Fig. 8a 及び b はそれぞれ超音波処理及び未処理皮膚に関する ANP の透過クリアランス ( $CL_{ANP}$ ) と  $J_{D2O}$  の関係を示している。このグラフから求めた水力学的パラメータを Table 4 に示す。Fig. 8 の結果からわかるように、超音波で前処理することにより  $J_{D2O}$  及び  $CL_{ANP}$  は増加したが、プロットの傾きは有意に変化しなかった (Table 4)。このことから、親水性の領域が薬物と溶媒とを区別する能力、すなわち親水性領域を介した ANP の通りやすさは超音波処理によりほとんど影響を受けないと考えられた。一方、超音波前処理した皮膚での平均  $J_{D2O}$  は未処理皮膚のその約 4 倍であり、超音波により角質層中の親水性領域を介した透過性が増大していることが明らかとなった。

皮膚を介した薬物透過係数 ( $K_p$ ) は (14) 式で表される。<sup>45)</sup>

$$K_p = D_L(1-\epsilon)k_{LV}/\tau_L h + D_V\epsilon/\tau_P h \cdot \dots \quad (14)$$



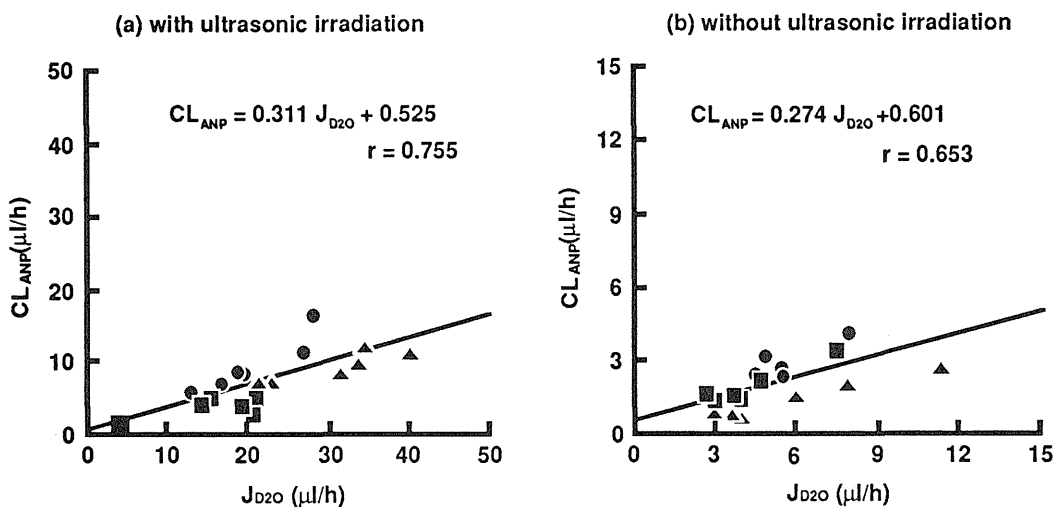


Fig. 8 Relationship between permeation clearance of ANP ( $CL_{ANP}$ ) and flux of  $D_2O$  ( $J_{D_2O}$ )

Lines and equations were obtained by linear regression analyses.

●, 3.08 Osmol/l; ▲, 0 Osmol/l; ■, -3.08 Osmol/l.

**Table 4 Hydrodynamic parameters of hairless rat skin with and without ultrasonic pretreatment**

	$J_{D_2O}$ ( $\mu\text{l/h}$ )	$1 - \delta$
without ultrasound	$5.300 \pm 0.558$	$0.274 \pm 0.221$
with ultrasound	$22.427 \pm 2.096$	$0.311 \pm 0.218$

ここで、 $D_L$  及び  $D_V$  はそれぞれ親油性領域及び基剤中薬物拡散係数、 $h$  は膜厚、 $k_{LV}$  は薬物の親油性領域／基剤間分配係数である。 $\varepsilon$  は空隙率であり、膜中の親水性領域の占有率を示している。 $\tau$  は曲路率であり、屈曲した透過経路の経路長を補正するパラメータである。この (14) 式の中で右辺第2項は親水性領域を介した透過係数を示している。すなわち、超音波前処理した皮膚で認められた親水性領域を介した透過性の増大は、空隙率の上昇による親水性領域の拡大、あるいは曲路率の低下による有効拡散距離の短縮に関係しているものと考えられる。

## 第2節 超音波による皮膚の電気化学的性質の変化<sup>46)</sup>

前節において、超音波は角質層中の親水性領域に対して非可逆的に作用し、親水性薬物の皮膚透過性を高めていると考えられた。このような状況下では、親水性領域を容易に透過するイオンの透過性も影響を受け、皮膚の電気的性質が未処理の場合に比べて変化すると推測される。そこで本節では、10 Hz の交流電流を用いて皮膚インピーダンスを測定し、薬物 flux との関係を見積もり、また *in vitro* イオントフォレーシス法を利用して超音波の効果を解析した。

皮膚を抵抗とコンデンサーからなる等価回路としてモデル化し、皮膚の電気的性質を評価する試みが多く研究者によって行われている。<sup>47-50)</sup> Yamamoto ら<sup>51)</sup> は種々周波数の交流電流に対する皮膚インピーダンスの影響を検討し、低周波数 (10 Hz) の交流電流で測定した皮膚インピーダンスが角質層の電気抵抗を反映することを述べている。また、Kohli ら<sup>52)</sup> は水和した皮膚では10 Hzで測定した皮膚インピーダンスが低下すると述べている。したがって、10 Hzで測定した皮膚インピーダンスは親油性薬物よりも親水性薬物に対する角質層の抵抗を反映すると考えられる。Fig.9 にイオン性薬物として用い

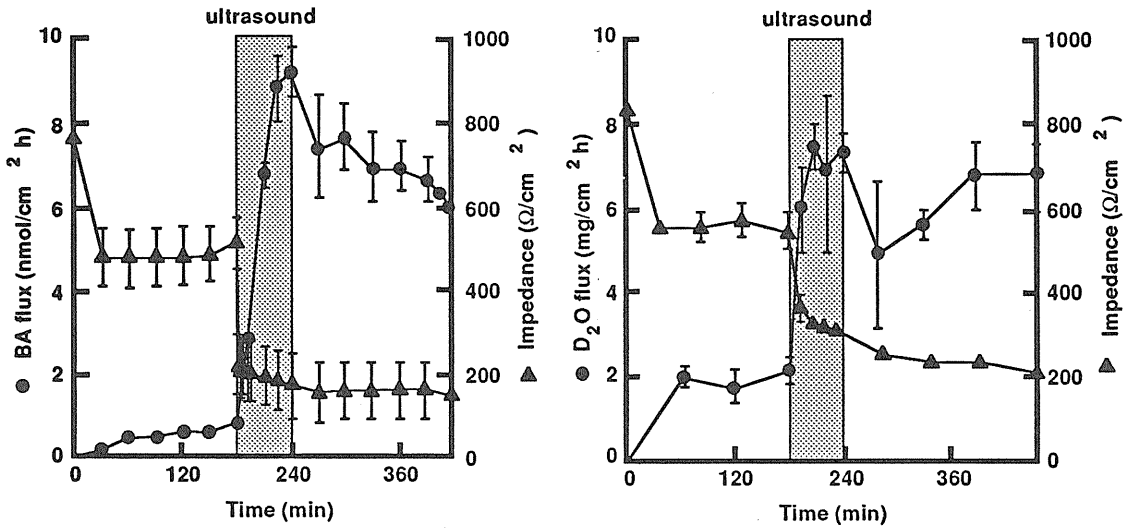


Fig. 9 Time courses of BA and D<sub>2</sub>O fluxes through excised hairless rat skin and skin impedance measured at a frequency of 10Hz

た安息香酸イオン (BA) と溶媒として用いた D<sub>2</sub>O の経時的 flux を示し、そのときの皮膚インピーダンスを併記した。超音波照射前の皮膚インピーダンスは 550-600 Ω/cm<sup>2</sup> で一定であったが、超音波照射により低下し (150-200 Ω/cm<sup>2</sup>)、照射後も低下したままであった。一方、BA 及び D<sub>2</sub>O の flux は超音波を照射することにより増加した。このように超音波処理により電気抵抗が非可逆的に低下し、BA 及び D<sub>2</sub>O の flux の増加がこの電気抵抗の低下とよく対応していることから、超音波が角質層の親水性領域に対して非可逆的な作用を及ぼし、このことが親水性薬物に対する透過促進に直接関係しているものと考えられた。

次に、*in vitro* イオントフォレーシス法を用いて親水性領域に対する超音波の影響を解析した。イオントフォレーシスは電場の影響下で荷電した分子の皮膚透過を促進する方法であり、皮膚を介した電位勾配とイオンの皮膚透過の関係を物理化学的に評価することができる。<sup>10)</sup>

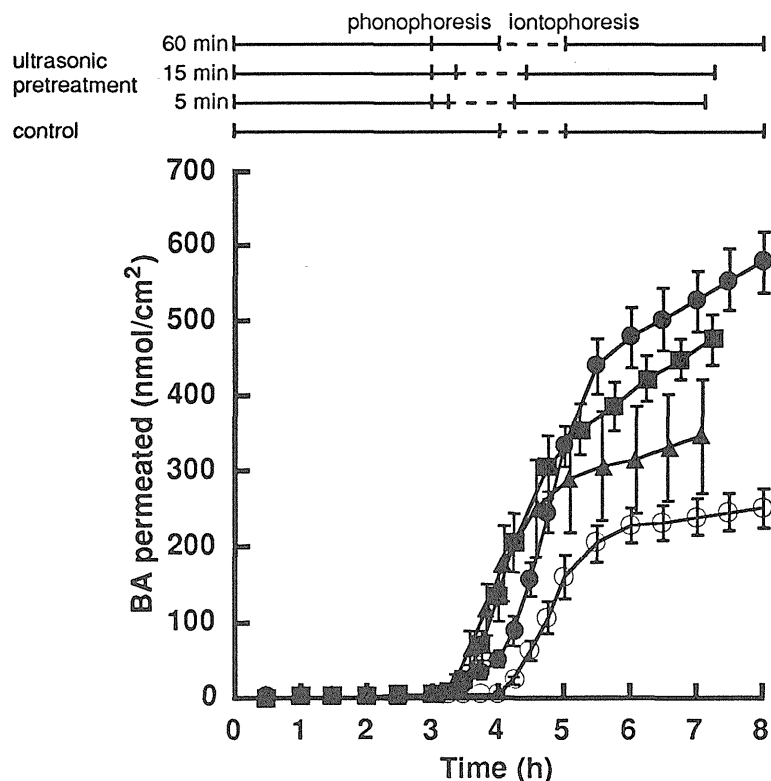


Fig. 10 Effect of iontophoresis on the ultrasonic pretreated skin  
 The symbols represent iontophoresis with ultrasonic pretreatment for 0 (○), 5 (△), 15 (■), and 60 min (●).  
 Each data point represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments.

本実験では超音波前処理または未処理皮膚を用いて定電流イオントフォレーシスを行い、このときのイオンの flux と膜を介した電位差を測定した。実験は角質層及び真皮側溶液としてそれぞれ 0.021 M の BA 及び生理食塩液を用いて行い、超音波を 15-60 分間照射した直後から  $0.1 \text{ mA/cm}^2$  定電流を 60 分間適用した。また、両側の皮膚近傍に塩橋を施し、膜を介した電位差を測定した。Fig. 10 は超音波処理した後にイオントフォレーシスを適用したときのヘアレスラット皮膚を介した BA の累積透過量を示している。BA flux, すなわち Fig. 10 の傾きはいずれの処理でもイオントフォレーシス中に増加しその後低下した。

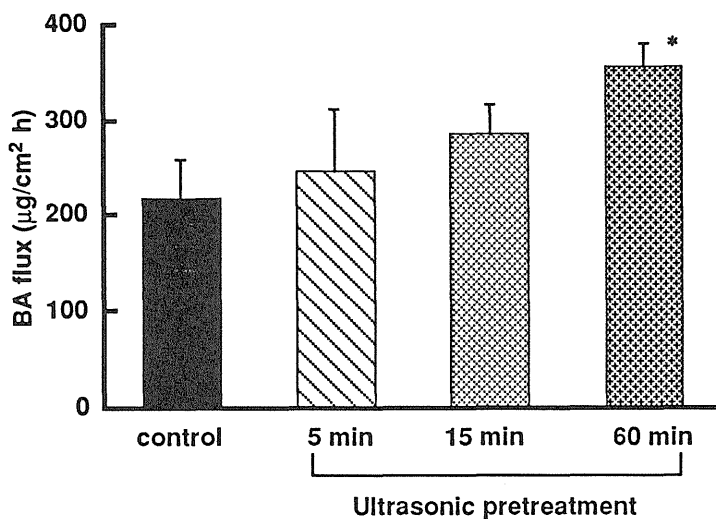


Fig. 11 Comparison of maximum flux of BA during iontophoresis on the ultrasonic pretreated skin

\*,  $p < 0.05$  (compared to control)

Each value represents the mean  $\pm$  SE of three experiments.

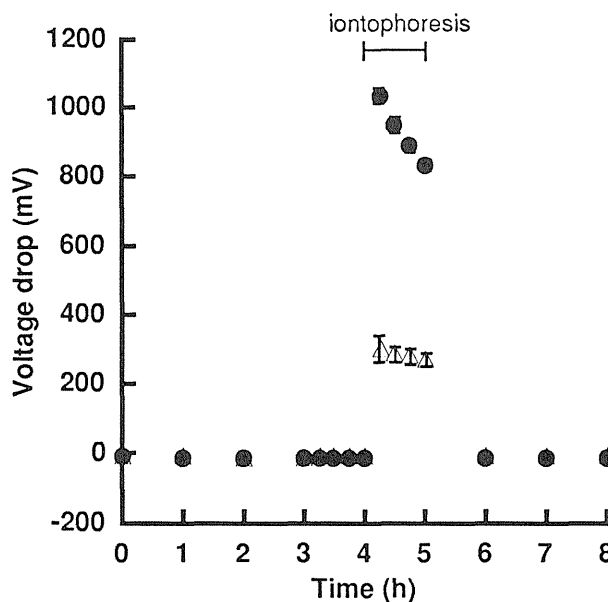


Fig. 12 Effect of ultrasonic pretreatment on the voltage drop during iontophoretic experiments

The symbols represent iontophoresis with ultrasonic pretreatment for 0 (●) and 60 min (Δ). Each data point represents the mean  $\pm$  SE of three experiments.

しかし、超音波前処理した皮膚でのイオントフォレーシス後の BA flux はイオントフォレーシス単独処理のそれよりも高かった。イオントフォレーシスに対する超音波処理の効果を評価するために、Fig. 10 のデータを用いてイオントフォレーシス中の BA flux を比較した (Fig. 11) 。イオントフォレーシス中の BA flux は超音波処理時間の増加に伴い増大する傾向を示した。一方、60分間超音波前処理した皮膚とイオントフォレーシス単独処理のイオントフォレーシス中の皮膚を介した電位差を比較すると (Fig. 12), 超音波前処理した皮膚で明らかに電位差が低下し、イオントフォレーシスの駆動力が低下していることがわかった。この結果を物質の膜透過に関する一般式である Nernst-Planck 式 (15 式)<sup>10,53)</sup> を用いて考察した。

$$J_i = -u_i [R \cdot T (dc_i/dx) + z_i \cdot F \cdot c_i (d\Psi/dx)] \cdot \cdot \cdot \quad (15)$$

$$\text{ここで, } (c_i)_{x=\text{skin surface to donor solution}} = \beta_i \cdot c_d \cdot \cdot \cdot \quad (16)$$

式中の  $J_i$ ,  $u_i$ ,  $\beta_i$ ,  $c_i$  及び  $c_d$ , 及び  $z_i$  はそれぞれ  $i$  種の flux ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ), 移動度 ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{cal}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), 皮膚/角質層側溶液間分配係数, 皮膚中及び角質層側溶液濃度 ( $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), 及び荷電である。  $\Psi$ ,  $x$ ,  $F$ ,  $R$ , 及び  $T$  はそれぞれ膜を介した電位差 (mV), 膜厚 (cm), ファラデー定数 ( $96,485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), 気体定数 ( $1.9872 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ), 及び絶対温度 (K) である。

この実験でのイオントフォレーシス中の BA の皮膚に關与する駆動力は (15) 式に示すように濃度勾配と電位勾配である。(15) 式では実測値として得られる  $J_i$  と  $d\Psi/dx$  を除き, 皮膚中濃度  $c_i$  及び移動度  $u_i$  以外は定数である。したがって, 超音波前処理によりイオントフォレーシス中の駆動力 ( $d\Psi/dx$ ) が低下するにもかかわらず BA flux ( $J_i$ ) が増加傾向にあるという結果は, 超

音波で前処理したことにより  $c_i$  または  $u_i$  が変化しているためであると考えられる。(16) 式中の分配係数  $\beta_i$  はイオン種の  $c_i$  に関する補正因子であり、角質層中の親水性領域の量的なパラメータである。<sup>54)</sup> また移動度  $u_i$  は Einstein の関係式 (17 式)<sup>55)</sup> から拡散係数と関係したパラメータであり、イオン種の移動度を考える場合、親水性領域中での拡散性に関係していると考えられる。

$$D_i = u_i \cdot R \cdot T \cdot \dots \quad (17)$$

これらのことから、角質層の親水性領域への薬物分配性あるいは親水性領域を介した薬物拡散性が超音波処理により非可逆的に変動していることが考えられた。

### 第3節 薬物の皮膚透過パラメータに対する超音波の影響<sup>56)</sup>

前節において超音波が薬物の皮膚への分配または皮膚中の拡散性に対して非可逆的な影響を及ぼしていることが示唆された。そこで本節では、超音波前処理皮膚での皮膚透過パラメータ (分配係数及び拡散係数) を算出し、未処理皮膚のそれと比較した。また、親水性及び親油性薬物での超音波の促進効果の違いについても検討するために、第1章で用いた ISDN 及び ANP をモデル薬物とした。解析は Scheuplein の式 (18 式)<sup>57)</sup> に時間  $t$  での累積薬物透過量  $Q_t$  をあてはめ、非線形最小二乗法プログラム、MULTI<sup>58)</sup> (アルゴリズム ; Damping Gauss Newton) を用いて拡散係数  $D$  及び分配係数  $k$  を算出した。

$$Q_t = kC_v h [Dt/h^2 - 1/6 - 2/\pi^2 \sum \{ (-1)^n / n^2 \exp(-Dn^2 \pi^2 t / h^2) \}] \cdot \dots \quad (18)$$

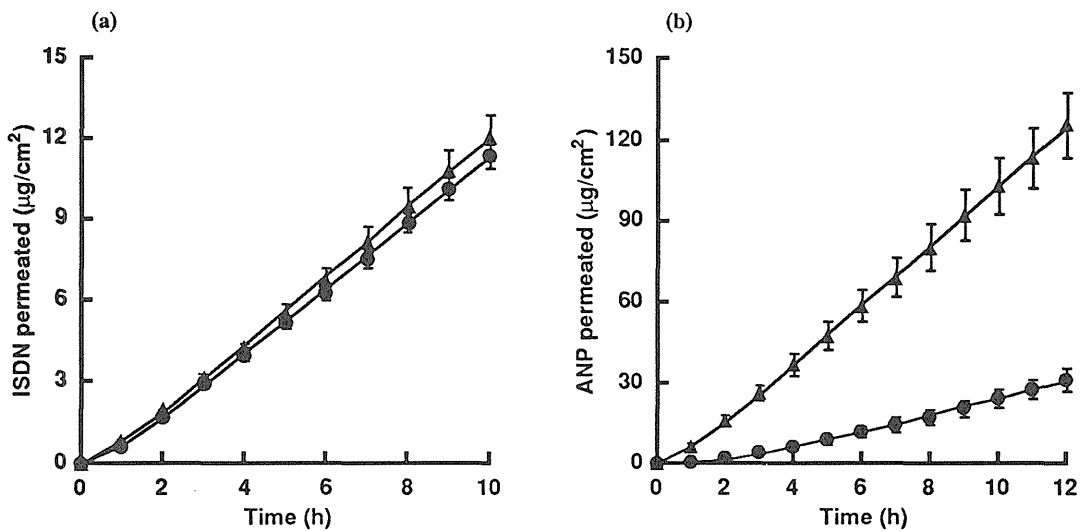


Fig. 13 Permeation profiles of ISDN (a) and ANP (b) through hairless rat skin with (▲) and without (●) ultrasonic pretreatment  
 Solid lines represent the fitting curves to Eq. 1.  
 Each data point represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments.

Table 5 Permeation parameters of ISDN and ANP through hairless rat skin with and without ultrasound

	ISDN		ANP	
	without ultrasound	with ultrasound	without ultrasound	with ultrasound
$T_{lag}$ (h)	0.64 $\pm$ 0.33	0.57 $\pm$ 0.06	2.18 $\pm$ 0.08	0.59 $\pm$ 0.02*
D (cm <sup>2</sup> /s)	1.72 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	1.93 $\times$ 10 <sup>-10</sup>	5.93 $\times$ 10 <sup>-11</sup>	20.3 $\times$ 10 <sup>-11</sup> *
k	29.9	28.2	2.27	2.31

\*  $p < 0.05$  (compared with non-ultrasound)

D and k values were calculated from fitting curves to equation (18).



ここで  $C_v$  及び  $h$  はそれぞれ基剤中薬物濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 及び膜の厚さ ( $\text{cm}$ ) である。また、 $h$  は超音波によって有意に変化しないものと仮定し、ヘアレスラット角質層の厚さ、 $15.4 \mu\text{m}$  を用いた。<sup>59)</sup> また、式中の  $D$  は  $D=h^2/6T_{\text{lag}}$  ( $T_{\text{lag}}$  は透過の lag time) で表され、 $T_{\text{lag}}$  を用いて拡散係数を分離評価できる。

Fig. 13a 及び b は超音波処理後及び未処理皮膚での ISDN 及び ANP の累積透過量の実測値とあてはめ曲線を示している。Table 5 に Fig. 13 のデータから計算した  $D$  及び  $k$  を示す。Fig. 13a からわかるように、超音波前処理した皮膚を介した ISDN の皮膚透過は未処理の皮膚と比べてほとんど同じであり、計算した  $D$  及び  $k$  も未処理のそれらと有意な差はなかった。このことから、ISDN の透過する領域に対して超音波はほぼ可逆的に作用しているものと考えられた。一方、超音波前処理した皮膚を介した ANP の皮膚透過は未処理に比べて明らかに増加し、拡散係数は約 4 倍増加した。しかし、 $k$  の値は未処理の場合とほとんど差がなく、超音波による ANP の皮膚透過性の増大は皮膚中での拡散性の上昇に起因していると考えられた。

水力学的細孔理論を用いた解析結果 (第 1 節) から、超音波による促進効果は親水性領域の量的な増大あるいは有効拡散距離の短縮に起因しているものと推測された。Yamashita ら<sup>60,61)</sup> は皮膚に対する促進剤、1-geranylazacycloheptane-2-one (GACH) の作用を分配及び拡散パラメータをもとに評価し、その作用メカニズムについて述べた。分配パラメータ ( $k_i'$ ) は分配係数 ( $k_i$ ) と有効拡散体積 ( $V_i$ ) の積、すなわち  $k_i'=k_i V_i$  で表され、親水性経路に注目する場合、その経路に関する量的なパラメータである。拡散パラメータ ( $D_i'$ ) は拡散係数 ( $D_i$ ) に対する拡散距離 ( $h_i$ ) の 2 乗の商、すなわち  $D_i'=D_i/h_i^2$  で表され、薬物の有効拡散距離に関するパラメータである。ここで、下付の  $i$  は親水性 P または親油性 L 透過経路のいずれかを示す。GACH は親水性経路に関する分配パラメータを増加させるが拡散パラメータにほとんど影響せず、これは

GACHが角質層の水和の亢進，すなわち親水性経路の量的な増加によるものであることが述べられている．一方，超音波はANPの拡散係数を増加するが分配係数にほとんど影響しなかった（Table 5）．これらのことから，超音波は親水性経路の量的な増加よりむしろ有効拡散距離を短縮することにより親水性領域を介した薬物透過性を高めているものと考えられた．

#### 第4節 薬物透過係数のアレニウスプロットによる超音波の促進効果の解析<sup>56)</sup>

超音波を媒質中に放射するとき，媒質による超音波エネルギーの吸収のため，温度上昇が起こることが知られている．<sup>26,40)</sup> 一方，薬物の拡散性は温度上昇に伴い増加するため（17式），超音波照射に伴う媒質の温度上昇は薬物の皮膚透過に影響すると考えられる．第1章で述べたように，拡散セルの循環水の温度を32℃としたときの角質層側溶液の温度は約36℃まで上昇し（Fig. 5），このことが超音波の可逆的な促進効果に関係しているものと思われた．本節では超音波の可逆的な促進効果の原因を明らかにするために，超音波処理及び未処理条件下でのヘアレスラット皮膚を介した透過係数， $K_p$  値をアレニウスプロットにより解析した．モデル薬物として前節と同様 ISDN 及び ANP を用いた．

Fig. 14 及び 15 はそれぞれ 27-42℃ の温度範囲における ISDN 及び ANP flux の経時変化を示している．超音波処理群に関しては実験中にわたり超音波を照射し，超音波照射中の温度上昇は循環水の温度を調節することにより防いだ．すべての処理で ISDN flux は一定値を示したため（Fig. 14 a 及び b），それぞれの平均 flux と角質層側薬物適用濃度から  $K_p$  値を算出し，絶対温度の逆数に対してプロットした．一方，超音波照射中の ANP flux には経時的な増加が認

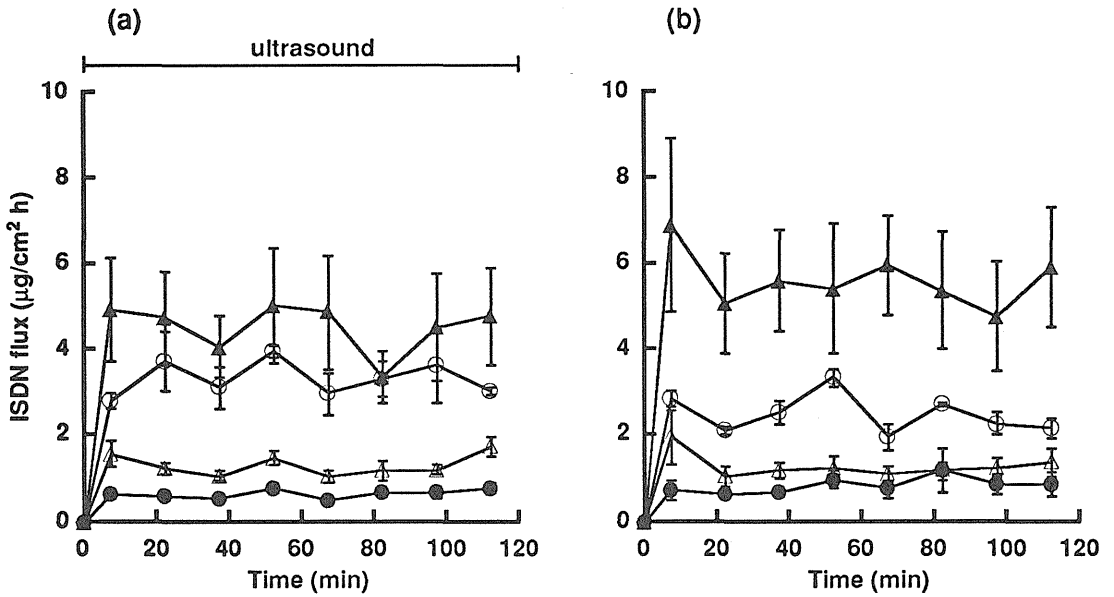


Fig. 14 Time courses of ISDN flux through hairless rat skin at various temperatures with (a) and without (b) ultrasonic irradiation  
 ●, 27 °C; △, 32 °C; ○, 37 °C; ▲, 42 °C  
 Each data point represents the mean  $\pm$  SE of 3-6 experiments.

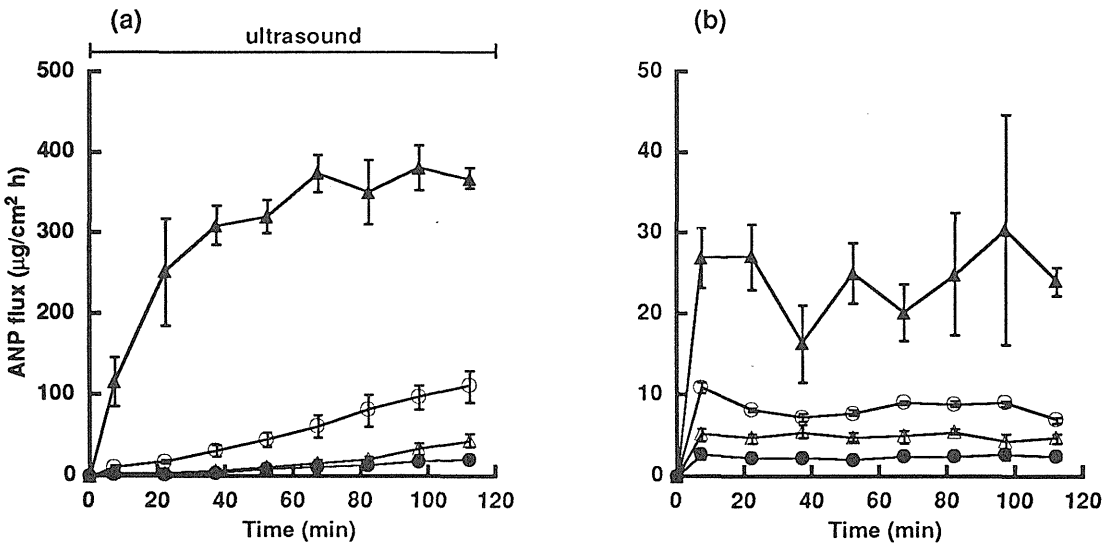


Fig. 15 Time courses of ANP flux through hairless rat skin at various temperatures with (a) and without (b) ultrasonic irradiation  
 ●, 27 °C; △, 32 °C; ○, 37 °C; ▲, 42 °C  
 Each data point represents the mean  $\pm$  SE of 3-6 experiments.

められたため、90-120分のfluxから $K_p$ 値を算出した (Fig. 15)。Fig. 16はISDN及びANPの超音波処理及び未処理皮膚における $K_p$ 値のアレニウスプロットを示している。また、超音波照射中に角質層側溶液温度が約36℃まで上昇した第1章の実験系における超音波照射中の $K_p$ 値も共に示した (Fig. 16, O)。Fig. 16aから明らかなように、超音波処理及び未処理のISDNの $K_p$ 値のアレニウスプロットの回帰直線はほぼ一致し、それぞれの回帰直線の傾きから計算した皮膚透過の活性化エネルギー ( $E_a$ ) に有意な差はなかった (Table 6)。また、第1章で得られた超音波照射中の $K_p$ 値も超音波未処理の回帰直線上に一致していることから、第1章で認められた可逆的な促進効果は超音波の温度の作用によるものであることが明らかとなった。

一方、超音波処理のANPのプロットの回帰直線は実験中の温度を正確に維持したにもかかわらず、未処理の回帰直線から明らかに異なっていた (Fig.

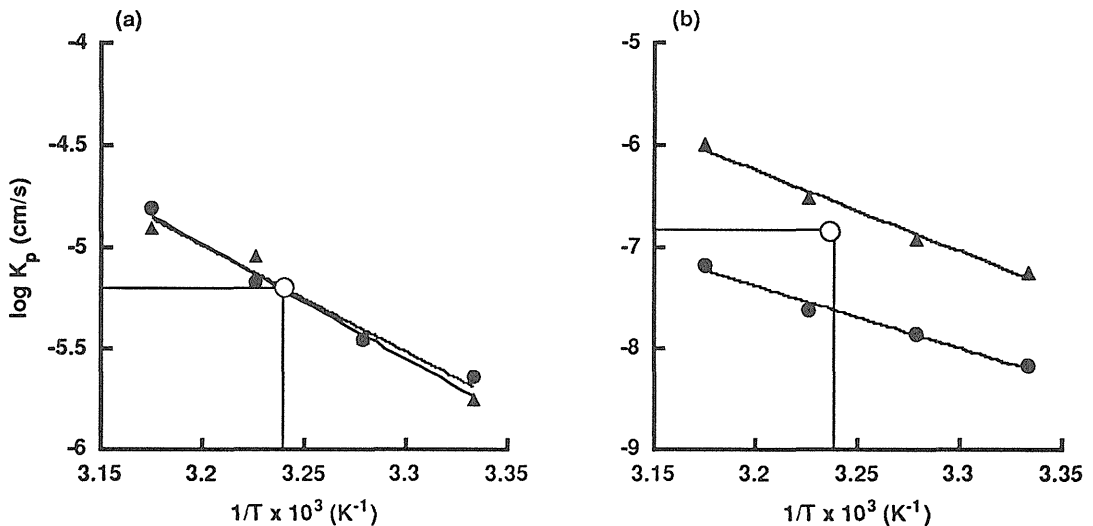


Fig. 16 Arrhenius plots of the permeability coefficients,  $K_p$  for ISDN (a) and ANP (b) with ( $\blacktriangle$ ) and without ( $\bullet$ ) ultrasonic irradiation. The open symbols represent the  $K_p$  values during ultrasonic irradiation in chapter 1.

**Table 6 Activation energies of ISDN and ANP for the permeation through hairless rat skin with and without ultrasound**

	without ultrasound	with ultrasound
ISDN	24.07 ± 10.56	25.70 ± 13.09 (n.s.)
ANP	28.34 ± 12.10	36.18 ± 12.29 (n.s.)

(kcal/mol)

n.s.; no significant compared to the data without ultrasound (p=0.05)

15b) . また、第1章の結果から得られた  $K_p$  値は超音波未処理の回帰直線上に一致しなかった。これらの結果は ANP の皮膚透過促進に対して温度上昇以外の超音波の効果が影響していることを示している。さらに、プロットの回帰直線は ISDN よりも ANP で超音波の影響を大きく受けていることから、超音波が親油性領域よりもむしろ親水性領域を介した透過性を高めていることがこれらの結果からも考えられた。Mitragotri ら<sup>38)</sup> は超音波の物理的現象の中でキャビテーション効果がフォノフォレーシスに対する最も重要な作用因子であることを報告した。したがって、ANP を含めた親水性薬物の皮膚透過促進に対してキャビテーション効果のような温度上昇以外の超音波の物理的現象が関与しているものと考えられる。

#### 第5節 角質層脂質に対する超音波の影響<sup>46)</sup>

ここまでの検討から超音波が皮膚中の親水性領域を介した透過性を促進することが示唆された。しかしながら、皮膚が超音波によってどのような影響を受けているのかについては明らかではない。薬物の皮膚透過のバリアーは角質層であり、高度に組織化した角質層の構造は、特に親水性薬物に対する透過バリアーとなっていることが明らかにされている。<sup>62)</sup> 促進剤を用いた研究ではそ

の促進機構を解明するために脂質の構造変化に関する研究がフーリエ変換赤外分光法 (FTIR) や示差走査熱量分析法 (DSC) を用いて行われ、促進剤の効果が脂質の構造変化の程度と関係していることが報告されている。<sup>63-65)</sup> そこで本節では、角質層の脂質バリアーに対する超音波の効果を評価するために、角質層からの脂質漏出量及び皮膚の角質層表面の FTIR スペクトルを測定した。

角質層脂質は主にセラミド、コレステロール、コレステロール硫酸、及び遊離脂肪酸などから構成されており、これらが脂質二重層の多重ラメラ構造を形成して角化細胞間を満たしている。<sup>5,66)</sup> このうちセラミド類は種によっても異なるが、角質層脂質の約 40 - 50%、ステロール類は約 25 - 30% を占めている。特にセラミド類は角質層下の生きた表皮組織中に含まれるリン脂質が細胞の角化過程で代謝されることにより生成するため、角質層中に特異的に存在している。そこで本節ではセラミド類及びステロール類の漏出量を指標として超音波による角質層脂質への影響を見積もった。なお、セラミド類及びステロール類はそれぞれセラミド IV 及びコレステロール量として換算した。また、これらの脂質が水に不溶であり、角質層側に水を加えたときに漏出が認められなかったので界面活性剤として 0.1% Tween 20 を添加した。Fig. 17a 及び b はそれぞれ超音波照射後の皮膚から角質層側溶液へのステロール類及びセラミド類の漏出量を示している。これらの脂質の漏出量は超音波によって有意に増加し、超音波照射時間に依存していた。このことから、超音波は皮膚の角質層脂質に影響を与え促進効果を示していることが示唆された。しかしながら、全反射型 FTIR 法で測定した角質層側皮膚表面の吸収スペクトルには超音波処理と未処理で明らかな差は認められなかった (Fig. 18)。ヘアレスラットの角質層中のステロール類及びセラミド類の総量はそれぞれ 240 及び 170  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  であることが以前に見積もられている。<sup>67)</sup> したがって、この実験で測定したこれら脂質の漏出量は総量の約 2.5-3.5% であり、このことは角質層脂質に対する超

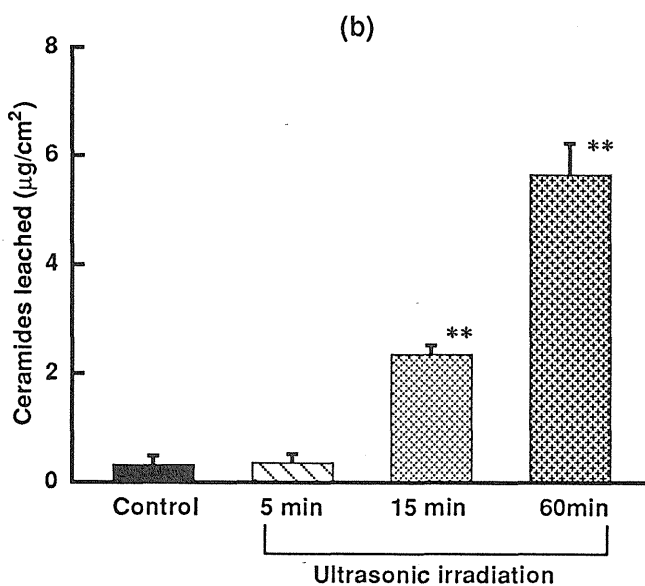
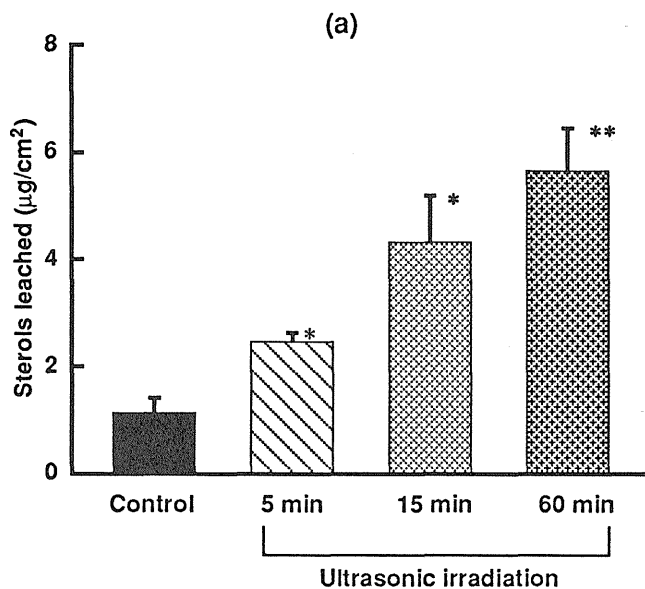


Fig. 17 Effect of ultrasound on the leaching of (a) sterols and (b) ceramides from hairless rat skin

\*,  $p < 0.05$  (compared to control); \*\*,  $p < 0.01$  (compared to control)

Each value represents the mean  $\pm$  SE of three experiments.

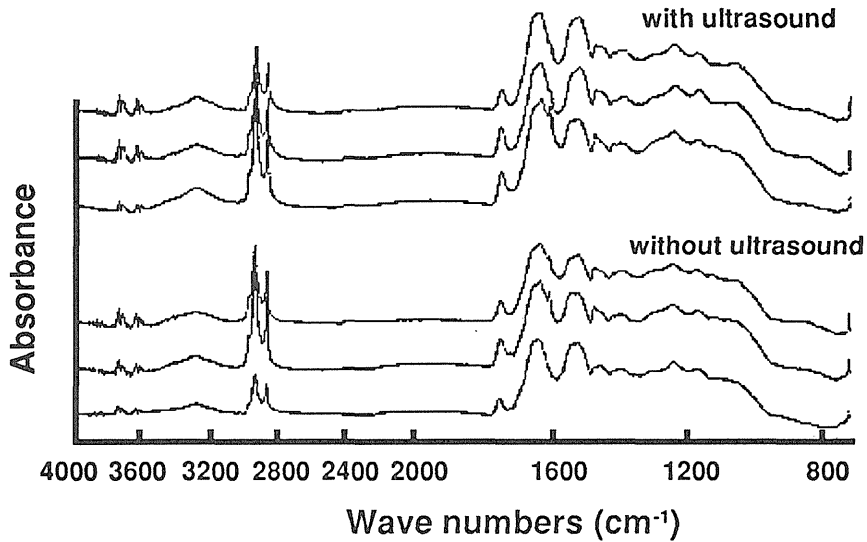


Fig. 18 ATR-FTIR spectra of hairless rat skin surface with and without ultrasound application

音波の影響は部分的なものであることを示している。Mak ら<sup>68)</sup> はまた、皮膚の水和が薬物の皮膚透過を促進するにも関わらず FTIR スペクトルは変化しないことを示し、これは角質層脂質の相分離により部分的な脂質欠損部位 (permeable defect) が形成されるためであることを述べている。したがって、超音波処理によって FTIR スペクトルは変化しないものの、皮膚の水和と同様の現象が起こっていることが推測できる。

## 第6節 小括並びに考察

前章において 150 kHz, 111 mW/cm<sup>2</sup> 超音波の薬物皮膚透過促進効果について検討し、超音波による促進効果が可逆的及び非可逆的効果に分けられることを述べた。本章ではその結果を受けて、はじめに非可逆的促進効果の原因について検討した。水力学的細孔理論を用いた解析から、超音波が角質層中の親水



性領域を介した薬物透過性を増大していることがわかった。親水性領域を介した薬物透過性の増大は空隙率の上昇または曲路率の低下によって説明されるため、超音波が角質層中の親水性領域を量的に拡大していること、あるいは有効拡散距離を低下していることが考えられた。また、皮膚電気抵抗の低下と親水性化合物 (BA 及び  $D_2O$ ) の flux の増加がよく対応していたことから、親水性領域を介した透過性の増加が超音波による非可逆的促進効果の直接的な原因となっているものと思われた。親水性領域を介した透過性の上昇について物理化学的に評価するためにイオントフォーシス法を用いて超音波の促進効果を評価したところ、超音波前処理した皮膚ではイオントフォーシスの駆動力である電位勾配が未処理に比べて低下するにも関わらず、BA flux は有意に増加した。この結果を Nernst-Planck の式にあてはめて考察すると、超音波がイオン種の膜への見かけの分配あるいは膜中での拡散性を変えているためであると考えられた。そこで、ISDN 及び ANP の皮膚透過パラメータ (拡散係数  $D$  及び分配係数  $k$ ) から超音波の非可逆的促進効果を解析した。ISDN の  $D$  及び  $k$  の値は超音波前処理により有意に変化しないことから、ISDN のような親油性薬物の透過する領域に対して超音波はほぼ可逆的に作用しているものと考えられた。一方、ANP については超音波前処理により  $D$  の値は増加するが、 $k$  は変化しなかった。この結果から、超音波が親水性領域の量的な拡大よりむしろその領域の有効拡散距離を低下させているものと考えられた。

次に、超音波の可逆的な促進効果を明らかにするために透過係数  $K_p$  のアレニウスプロットを用いて検討した。ISDN の超音波処理及び未処理のプロットの回帰直線はほとんど一致し、また第 1 章の実験系で得られた超音波照射中の  $K_p$  値が未処理の回帰直線上にほぼ一致した。このことから、超音波の可逆的な促進効果は超音波の温度上昇に伴う角質層中の薬物拡散性の上昇によるものと考えられた。一方、ANP の超音波処理のプロットの回帰直線は未処理の回帰直

線から明らかに変動し、また第1章から得られた $K_p$ 値も未処理の直線上に一致しなかった。このことから、親水性薬物に対する促進効果は超音波の温度の効果だけでは説明できず、キャビテーション効果のような温度上昇以外の超音波の物理的現象が超音波の促進作用に関係しているものと思われた。

また、0.1% Tween 20 を用いて角質層脂質の漏出を測定した結果は超音波がコントロールに比べて有意な脂質漏出を起こし、脂質領域に対して有意な影響を及ぼしていることを示しているものの、その量は総脂質量の2-2.5%程度であり脂質の絶対量はほとんど変化していないものと考えられた。さらに、FTIRの結果は超音波が角質層の脂質領域に有意な影響を及ぼしていないことを示していた。これらの結果から、超音波は角質層の脂質領域に対して量的及び構造的に有意な変化を与えていないものと考えられた。また、この結果は角質層の水和が促進されたときに薬物透過性が促進されるが、脂質領域に有意な変化が現れないという報告<sup>68)</sup>とよく類似している。この角質層の水和による薬物の透過促進は角質層中での親油性領域と親水性領域との相分離に起因することが述べられている。したがって、超音波処理した皮膚でも同様の現象が起こり、このことが親水性領域を介した薬物透過性の上昇に関係しているかもしれない。

以上の結果から超音波の薬物皮膚透過促進機構を推測した。超音波照射中には温度上昇に伴う分子の運動性の増大により角質層中での薬物拡散性が上昇するが、照射を中止することにより運動性はもとの状態に戻ると考えられる。このことが超音波の可逆的な促進効果として現れたものと思われた。一方、角質層中の薬物が透過する主たる部位は細胞間脂質であり、曲路として存在している。この脂質中に存在する親水性領域は占有率が極めて小さく、<sup>36,62)</sup> 超音波が薬物の有効拡散距離を短縮するように親水性領域に対してわずかに影響を与えたとしても、この領域を透過しやすい親水性薬物に対する有意な促進効果と

して現れたものと考えられる。このことは非可逆的な促進効果に関係しているものと思われた。

本章の結果から、フォノフォレーシスは主に親水性薬物に対する吸収促進法になるものと思われ、候補薬物の選択の点で有用な情報を提供するものと思われる。しかしながら、キャビテーション効果や音圧効果などの超音波の物理的効果が薬物の皮膚透過促進に対してどのような作用をもつかについては明らかではない。薬物の皮膚透過に対する超音波の作用様式を理解することは、超音波照射条件の最適化のための重要な課題になるものと考えられる。

### 第3章 薬物の皮膚透過性に対する超音波と経皮吸収促進剤の併用効果<sup>69)</sup>

ここまでの研究で透過促進法としての超音波の利用について検討し、基剤として水を用いた系では超音波が角質層の親水性領域の拡散性を増大し、主に親水性化合物に対する促進法として超音波が利用できることを示した。しかしながら、この研究で用いた超音波装置での最大促進率は10倍程度であり、全身レベルでの薬物送達を目的とする場合にはより高い促進効果が必要な場合もあると思われる。超音波は物理的エネルギーとして皮膚に適用されるため、そのエネルギーの変更により促進効果を調節することが可能であると考えられる。しかしながら、用いた超音波装置が低強度域であるため、出力の影響を見積もることはできなかった。また、より高出力の超音波の皮膚への適用はキャビテーションや温度の効果の結果として、皮膚あるいは皮下組織へのダメージを誘発する可能性があることを十分に考慮する必要がある。<sup>26)</sup> 一方、数種の促進剤や促進法を組み合わせた多成分促進システム、すなわちl-メントール/エタノール/水 (MEW) , <sup>70)</sup> ミリスチン酸イソプロピル/エタノール/乳酸 (LEI) <sup>71)</sup> あるいはd-リモネン/温熱<sup>72)</sup> 併用システムが最近提案され、これらのシステムがTTS開発に対して有用であることが報告されている。したがって、もし他の促進法と超音波のような組合せが効果的な吸収促進効果を示せば、TTS開発における超音波の利用価値をさらに拡張できると考えられる。そこで著者は低強度の超音波でも高い吸収促進効果を期待できる促進法を調査する目的で経皮吸収促進剤と超音波の併用効果について検討した。

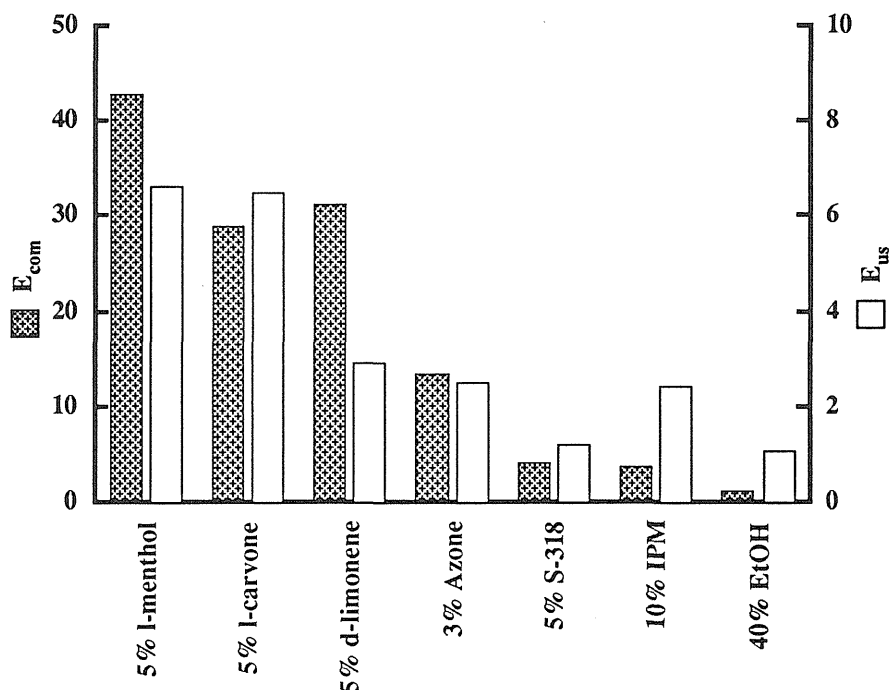
## 第1節 超音波と種々促進剤との併用効果

はじめに、高い促進効果が得られる超音波と促進剤の組み合わせを検索するために、数種の代表的な促進剤を選び促進効果を見積もった。促進剤としてモノテルペン類 (*l*-メントール, *d*-リモネン, 及び*l*-カルボン), <sup>73,74)</sup> ラウロカプラム (Azone®), <sup>75)</sup> モノカプリル酸グリセリド (Sefsol 318®, S-318), <sup>76)</sup> ミリスチン酸イソプロピル (IPM), <sup>77)</sup> 及びエタノール (EtOH) <sup>74)</sup> を用いた。促進剤の適用濃度はこれらの促進剤の研究で用いられている典型的な濃度を用いた。また、モデル透過物質として、適度な極性と水溶解度を有するAMPを用いた。Table 7 は各促進剤単独適用時 ( $J_{en}$ ) 及び 60 分間超音波併用時 ( $J_{com}$ ) の6 - 8 時間の定常状態fluxを示している。この実験では促進剤を可溶化するために 0.1% Tween 20 を基剤に添加したので、0.1% Tween 20 溶液をコントロール基剤として同様の透過実験を行った。コントロール基剤に関する超音波処理 ( $J_{us}$ ) 及び未処理 ( $J_{cont}$ ) の定常状態 flux はそれぞれ  $5.13 \pm 0.22$  及び  $9.00 \pm 0.90 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$  であり、超音波の促進効果は 1.8 であった。促進効果を比較するために併用の促進率,  $E_{com}$  ( $J_{com}/J_{cont}$ ) を算出した (Fig. 19, クローズドカラム)。S-318, IPM, または EtOH と超音波との併用は AMP の皮膚透過に対して高い促進効果を示さなかったが ( $E_{com} = 1.2-4.2$ ), モノテルペン類との併用は著しい促進効果を示した ( $E_{com} = 29-42$ )。このことから、モノテルペン類と超音波の組合せも他の多成分促進システム同様、有用な促進システムになり得ると考えられた。また、ここでは超音波を外部駆動力として用いているので、高い促進効果を得ることと共に、超音波による促進効果を比較することも重要である。したがって、それぞれの促進剤に対して  $E_{us}$  ( $J_{com}/J_{en}$ ) を計算し、併用系における超音波による促進効果を比較した (Fig. 19, オープンカラム)。  $E_{us}$  は促進剤の種類に依存し、*l*-メントール及び*l*-カルボンの値は他の

**Table 7 Comparison of AMP flux treated with l-menthol alone or combination of l-menthol and ultrasound**

	AMP flux ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ )	
	$J_{\text{cont}}^{\text{a}}$	$J_{\text{us}}^{\text{b}}$
0.1% Tween 20	5.13±0.22	9.00±0.90
	$J_{\text{en}}^{\text{c}}$	$J_{\text{com}}^{\text{d}}$
5% l-menthol	33.06±2.27	219.32±11.35
5% l-carvone	22.90±0.97	148.68±11.08
5% d-limonene	55.06±2.10	159.85±9.60
3% Azone	27.56±1.97	69.09±7.66
5% S-318	18.05±1.06	21.79±1.49
10% IPM	7.76±0.58	18.60±1.09
40% EtOH	5.69±0.34	6.12±0.27

<sup>a</sup>AMP flux of 0.1% Tween 20 without ultrasound; <sup>b</sup>AMP flux of 0.1% Tween 20 with ultrasound; <sup>c</sup>AMP flux of enhancer alone; <sup>d</sup>AMP flux of combined application  
Each datum represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments.



**Fig. 19** Enhancement ratio for the combination of ultrasound and chemical enhancers and ultrasound alone

$E_{\text{com}}$ ,  $J_{\text{com}}/J_{\text{cont}}$  ratio;  $E_{\text{us}}$ ,  $J_{\text{com}}/J_{\text{en}}$  ratio for each enhancer

促進剤よりも高かった。このことは*l*-メントールや*l*-カルボンと超音波との併用系では他の系よりも超音波照射条件等を変更することにより flux を調節しやすいことを示唆し、これらの促進剤は超音波との併用システムに適していると思われた。

## 第2節 超音波と促進剤の併用効果に対する超音波照射時間及び促進剤濃度の影響

超音波を利用した促進システムではその照射条件等を変更することにより flux を調節できることが望ましいと考えられる。本節ではその可能性を見積もるために、超音波照射時間及び基剤中促進剤濃度の効果を試験した。前節において  $E_{com}$  及び  $E_{us}$  が最大であった *l*-メントールとの併用系をモデルシステムとして用いた。Fig. 20 は 5% *l*-メントールを適用し、超音波照射時間を 10, 30, 及び 60 分としたときの AMP の定常状態 flux を示している。また、Fig. 21 は超音波照射時間を 60 分で固定したときの AMP flux に対する基剤中 *l*-メントール濃度 (1, 2.5, 及び 5%) の影響を示している。5% *l*-メントールを適用したとき、超音波照射時間に依存した AMP flux の増加が認められた (Fig. 20)。また、超音波未処理の場合、*l*-メントール濃度に関係なく flux はほぼ一定であったが、60 分間超音波処理することにより基剤中促進剤濃度に依存した flux の増加が認められた (Fig. 21)。これらの結果から、超音波照射時間や基剤中促進剤濃度のような条件を変更することにより薬物の経皮吸収速度を調節できるものと考えられた。また、Fig. 21 に示したように超音波処理群でのみ AMP flux が基剤中 *l*-メントール濃度に依存したことから、超音波が *l*-メントールの皮膚への移行を増加していることが推測された。併用系における超音波の役割については次節で述べる。

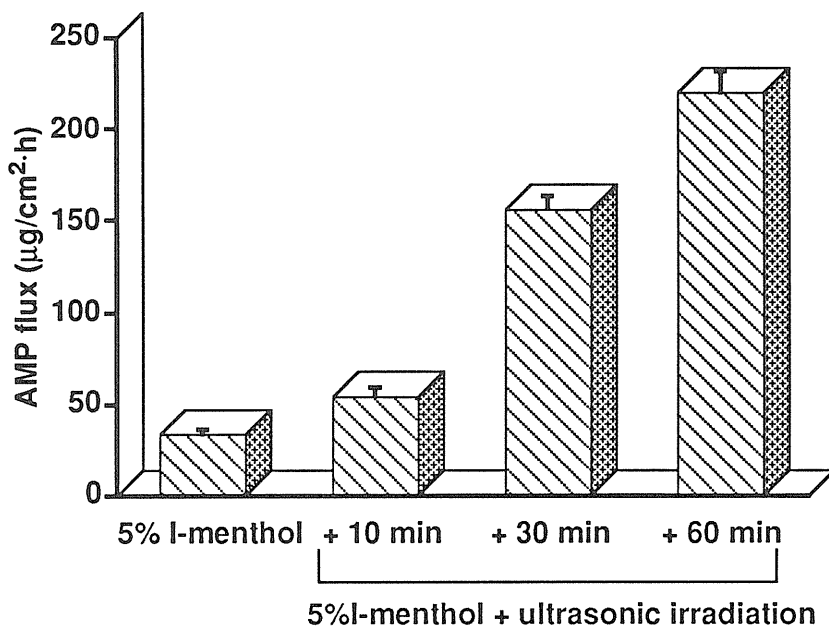


Fig. 20 Effect of ultrasonic duration on the combination of ultrasound and *l*-menthol  
 Each datum represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments.

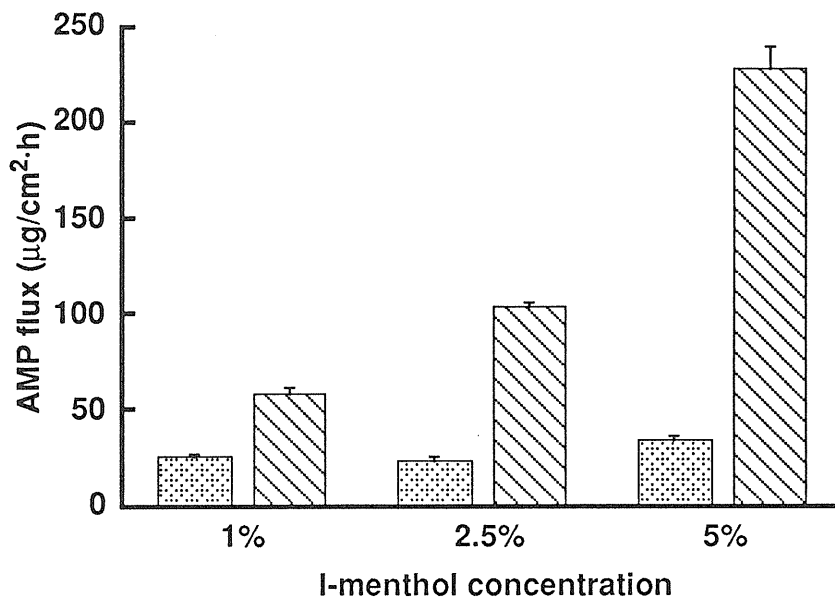


Fig. 21 Effect of *l*-menthol concentration on the combination of ultrasound and *l*-menthol  
 Shaded and hatched bars mean AMP flux with and without ultrasound, respectively. Each datum represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments.



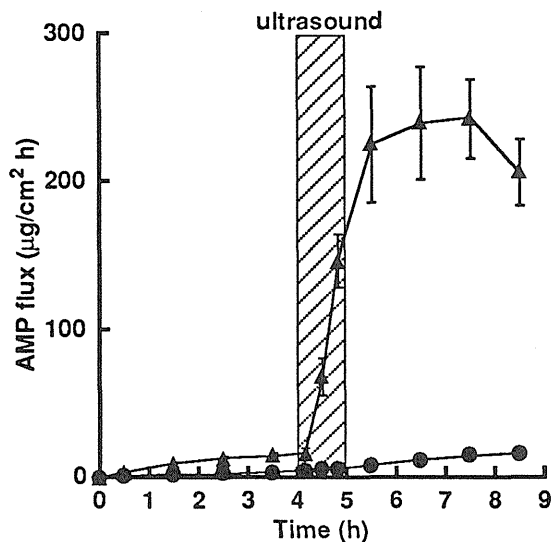


Fig. 22 Time course of AMP flux in the pretreatment experiment with ultrasound or *l*-menthol  
 ●, pretreatment with ultrasound; ▲, pretreatment with *l*-menthol  
 Each data point represents the mean  $\pm$  SE of 3 experiments.

### 第3節 超音波と促進剤併用系での超音波の役割

本節では超音波と促進剤との併用系における超音波の役割について、*l*-メントールとの併用系を用いて検討した。はじめに超音波と*l*-メントール共存及び非共存下での促進効果を比較した。Fig. 22は5%*l*-メントール処理後に60分間超音波処理したとき（超音波と*l*-メントール共存）、及び60分間超音波処理後に5%*l*-メントールを適用したとき（超音波と*l*-メントール非共存）のAMP fluxの経時変化を示している。超音波処理後の*l*-メントール適用ではAMP fluxは*l*-メントール単独処理のそれとほとんど同じであった。一方、*l*-メントール処理しておいた皮膚に超音波を適用したとき、AMP fluxの明らかな増加が認められた。この結果は促進剤との併用系で高い促進効果を得るためには両者を同時適用する必要があり、超音波が重要な役割を果たしていることを示してい

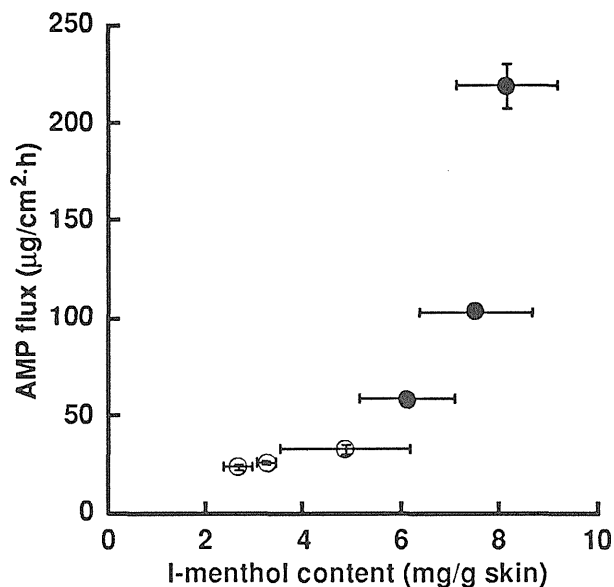


Fig. 23 Relationship between *l*-menthol content in the skin and AMP flux through the hairless rat skin  
 ○, without ultrasound; ●, with ultrasound  
 Each data point represents the mean  $\pm$  SE of 3-6 experiments.

**Table 8 Comparison of *l*-menthol content in the skin after treatment with *l*-menthol**

	<i>l</i> -menthol concentration		
	1%	2.5%	5%
without ultrasound	3.24 $\pm$ 0.19	2.66 $\pm$ 0.30	4.84 $\pm$ 1.33
withultrasound	6.10 $\pm$ 0.97*	7.51 $\pm$ 1.15*	8.15 $\pm$ 1.03*

(mg/g skin)

US, ultrasound

\* $p < 0.05$  (compared with non US)

Each datum represents the mean  $\pm$  SE of 3-6 experiments.

る。また、この結果は超音波が *l*-メントールの促進効果を増強していることを示唆している。

次に 1, 2.5, 及び 5 % *l*-メントールを含有した基剤を用い、超音波処理及び未処理の場合の皮膚中 *l*-メントール量を比較した。Table 8 は *l*-メントール単独及び超音波との併用処理後の皮膚中 *l*-メントール量を示している。皮膚中 *l*-メントール量は概ね適用した基剤中 *l*-メントール濃度に依存した。また、同じ基剤中 *l*-メントール濃度で比較するとき、すべての濃度で皮膚中 *l*-メントール量は超音波によって有意に増加した。皮膚中 *l*-メントール量と促進効果の関係を見積もるために、それぞれの基剤中濃度に対応する皮膚中 *l*-メントール量と AMP flux (前節) の関係をプロットした (Fig. 23)。AMP flux は皮膚中 *l*-メントール量に依存して増加し、*l*-メントール量が約 6 mg/g skin 以上のときに著しく増加した。これらの結果から、基剤中 *l*-メントールの皮膚への移行を増

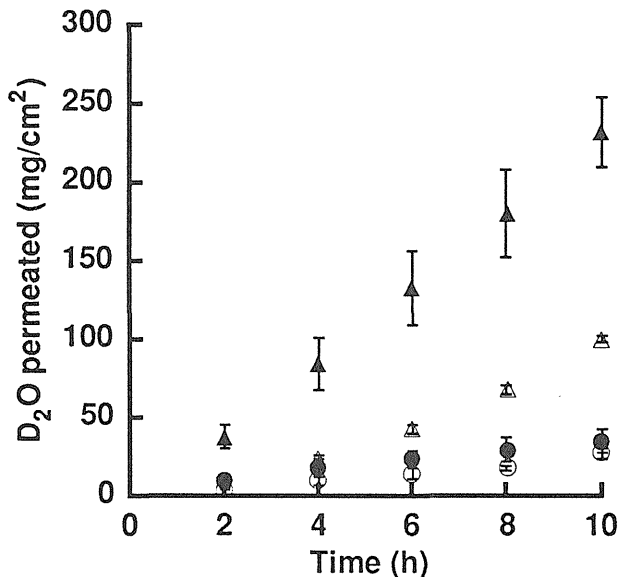


Fig. 24 Combined effect of ultrasound and *l*-menthol on the skin permeation of D<sub>2</sub>O  
○, 0.1% Tween 20 without ultrasound; ●, 0.1% Tween 20 with ultrasound;  
△, 5% *l*-menthol without ultrasound; ▲, 5% *l*-menthol with ultrasound  
Each data point represents the mean ± SE of 3 experiments.

加させることが超音波の役割であると考えられ、併用系で高い促進効果を示す一つの原因であると考えられた。一方、Williams と Barry<sup>73)</sup> はモノテルペン類が極性化合物の角質層中での拡散性を増加することを報告している。また、皮膚の2層モデルを用いた解析では、*l*-メントールが角質層側適用基剤中の水性溶媒の角質層への移行を増加することが見積もられている。<sup>74)</sup> そこで基剤中溶媒としてD<sub>2</sub>Oを用いてその透過性を見積もり、*l*-メントールの促進作用に対する超音波の効果について検討した。Fig. 24 は基剤として用いたD<sub>2</sub>Oの透過プロファイルを示している。*l*-メントール単独適用はコントロールとして用いた超音波未処理の0.1% Tween 20に比べてD<sub>2</sub>Oの皮膚透過を促進したが、超音波単独適用はほとんど促進しなかった。また、*l*-メントールと超音波の併用処理は*l*-メントール単独に比べてさらにD<sub>2</sub>Oの透過を促進し、併用系ではD<sub>2</sub>Oの透過を促進するような*l*-メントールの作用が増強されていることが示された。

#### 第4節 小括並びに考察

超音波を用いて高い促進効果を得るために、吸収促進剤との併用効果について検討した。この実験で用いたすべての促進剤で促進剤単独よりも高い併用効果 ( $E_{com}$ ) が認められたが、その効果は特にモノテルペン類との併用で顕著であった。モノテルペン類との併用効果は超音波なしの0.1% Tween 20と比べて30-40倍であり、このような併用系もまた他の多成分促進システム同様に全身送達を目的とした薬物の皮膚透過促進法として有用であることが示された。超音波と促進剤との併用系では超音波を物理的エネルギーとして適用しているため、超音波による促進効果 ( $E_{us}$ ) を比較することも重要である。 $E_{us}$  は促進剤の種類によって異なり、*l*-メントール及び *l*-カルボンで高い値を示した (Fig.

19) . すなわち、これらの促進剤との併用は超音波照射条件の変更により薬物の透過 flux を容易に調節できると考えられ、皮膚透過促進法としての超音波の有用性をより高めるものと思われる。また、MEW システムを *in vivo* で適用したとき、エタノールや *l*-メントールのような基剤成分の生きた表皮あるいは真皮層への移行に伴う皮膚刺激により、皮膚血流クリアランスが低下し、*in vitro* データからの予測よりも低い血中濃度をもたらすことが懸念されている。<sup>79,80)</sup> このような現象を引き起こす原因についてはまだ明らかになっていないが、基剤への添加物の種類を低減できることから、超音波のような駆動力を併用することは少なくとも MEW システムでのエタノールのような化学種に起因する刺激性を減弱できるとと思われる。

$E_{com}$  及び  $E_{us}$  が最大であった *l*-メントールを用いて超音波照射時間及び基剤中 *l*-メントール濃度の影響を見積もった。AMP flux はこれらの条件を変更することによって変化した。したがって、これらの条件を変更することにより薬物の経皮送達速度を調節できる可能性が示された。また、*l*-メントール単独適用系での AMP flux は基剤中 *l*-メントール濃度に関係なくほぼ一定値を示したのに対し、超音波との併用系での flux は基剤中 *l*-メントールに依存して増加した (Fig. 21) . *l*-メントールは角質層中に移行することで促進作用を示すため、高い促進効果を得るためには基剤中の *l*-メントールの熱力学的活量を高く保つ必要があることが述べられている。<sup>79)</sup> しかしながら、本実験で用いた基剤中 *l*-メントールは乳濁しており、すべての基剤で *l*-メントールの活量は最大となっている。このことは *l*-メントール単独系で一定の flux を示した理由であろうと思われる。一方、これらのことを考慮すると、超音波との併用系が高い促進効果を示した原因として超音波が *l*-メントールの皮膚への移行を増加していることが推測された。

そこで、併用系における超音波の役割について *l*-メントールを用いて検討し

た。超音波とL-メントール共存下では高い促進効果が認められたものの、非共存下ではL-メントール単独適用の効果と同じであり (Fig. 22) , 高い促進効果を得るためには両者を同時適用することが必須であることが示された。また、併用系で処理後の皮膚中L-メントール量は超音波処理によって明らかに増加した。皮膚中L-メントール量と AMP flux の関係は AMP の皮膚透過に対する促進効果が皮膚中L-メントール量に依存していることを示していた (Fig. 23) 。さらに、併用系では極性溶媒である D<sub>2</sub>O の皮膚透過がL-メントール単独系に比べて亢進した (Fig. 24) 。これらのことから、促進剤との併用系において、超音波は促進剤の皮膚への移行量を増加する役割をもつことが明らかとなった。このことは超音波と促進剤の併用系で高い促進効果が得られる一つの理由であると考えられ、結果として促進剤の作用が増強されているものと考えられる。したがって、この併用効果は促進剤のもつ促進能力、あるいはその物理化学的性質に関連して皮膚への分布量に大きく依存するであろう。今後、このような併用システムを効果的に利用していくためには、促進メカニズムと皮膚刺激性に関する情報を集積する必要があると思われる。

以上、超音波とモノテルペン類のような促進剤を併用することにより高い吸収促進効果を期待できることが本章で明らかとなり、吸収促進法としての超音波の利用価値をさらに高めることができるものと考えられた。

## 結論

TTSは優れた治療特性を有しているため、高齢者や薬剤の服用困難な患者に対する投与剤形として今後重要な位置を占めるものと考えられる。現在治療に用いられている薬物の多くは皮膚透過性が非常に低いため、安全かつ効果的に透過性を改善できる経皮吸収促進法の開発に多くの努力が注がれてきた。しかしながら、一般に高い促進効果が得られる方法は皮膚刺激性が強いことも事実であり、TTS開発の大きな障壁となっている。一方、フォノフォレーシスは治療を目的として臨床的に用いられていることから、安全性の面では有用な促進法になると考えられる。しかしながら、この方法をTTS開発に応用していくためには臨床効果だけではなく、皮膚に対する超音波の作用機構を理解し、それをもとに実際の適用を考えるべきである。そこで著者はフォノフォレーシスにおける超音波の作用機構、さらにはより効果的なフォノフォレーシスを可能にする方法として、促進剤との併用効果について検討した。以下に得られた知見について要約する。

(1) まずはじめに超音波周波数を選択した。フォノフォレーシスでは20 kHz-16 MHzの広範囲の周波数が研究されているが、GriffinとTouchstoneの仮説をもとに150 kHzの超音波を用いることにした。また、超音波トランスデューサーからの超音波出力を天秤法により測定した。その結果、本研究で用いた超音波装置からの電氣的出力が $3.7 \text{ W/cm}^2$ のとき、超音波出力は $111 \text{ mW/cm}^2$ であり、通常フォノフォレーシスで用いられる強度よりも低強度であった。また、装置への電氣的エネルギー量と超音波エネルギー量の間で差があることから、皮膚に適用される超音波を定量的に評価する際には装置の変換効率から超音波出力を換算するか、あるいは出力を直接測定することが必要である

と考えられた。

この超音波を用いて極性の異なる9種の薬物の皮膚透過に対する超音波の効果を見積もった。その結果、この超音波による促進効果は可逆的及び非可逆的効果に分けられ、その効果は親水性薬物に対して高く現れることが明らかとなった。また、薬物の透過係数と分配係数の関係から、超音波は角質層中の親水性の透過領域を介した透過性を非可逆的に増大しているものと考えられた。

(2) 超音波の可逆的及び非可逆的促進効果の原因について検討した。はじめに非可逆的な効果について検討した。超音波前処理及び未処理皮膚での水力学の細孔理論を用いた解析から、超音波が非可逆的な角質層の親水性透過領域の量的な増大または有効拡散距離の短縮を引き起こしていることが示唆された。電気化学的手法(皮膚インピーダンス測定及びイオントフォーシス法)を用いた解析から、親水性領域に対する超音波の非可逆的作用が親水性薬物への非可逆的透過促進に直接関係していることが明らかとなった。また、イオントフォーシスを用いた解析では、超音波がイオン種の皮膚への分配または拡散性に影響していることが示唆された。そこで、ISDN及びANPを用いて超音波前処理及び未処理の皮膚の皮膚透過パラメータ(拡散及び分配係数)を比較した。ISDNのこれらパラメータは超音波前処理により変化せず、親油性薬物が透過する領域に対して超音波は可逆的に作用していると思われた。一方、ANPでは超音波前処理により拡散性は増大したが分配性はほとんど変化しなかった。これらのことから、超音波の非可逆的な促進効果は、親水性透過領域の量的な増大ではなく、むしろ有効拡散距離の短縮に起因しているものと考えられた。

薬物の透過係数のアレニウスプロットから超音波の可逆的な促進効果について解析した。超音波処理及び未処理のアレニウスプロットの回帰直線がほぼ一致し、第1章の超音波照射中のISDNの透過係数が未処理の回帰直線上にプ



ロットされたことから、超音波の可逆的促進効果は超音波の温度上昇の効果によるものであることが明らかとなった。また、超音波処理した ANP のプロットの回帰直線が未処理の回帰直線と明らかに異なっていたことから、親水性薬物の皮膚透過に対して温度上昇以外の超音波の作用が影響していることが明らかとなった。

薬物の皮膚透過に対する最大のバリアーである角質層脂質への影響を脂質漏出量及び FTIR スペクトル測定から検討した。超音波はコントロールに比べて角質層脂質の有意な漏出を起こしたが、漏出量は角質層中に存在する絶対量と比べて僅かであった。さらに、FTIR による皮膚表面の解析においても超音波は有意な影響を及ぼしていなかった。これらのことから、超音波は角質層脂質に対して量的及び構造的に有意な影響を与えていないものと考えられた。しかしながら、角質層中の親水性領域は本来量的に極めて少ないため、角質層脂質に対する超音波の作用が僅かであったとしてもこの領域を介した透過性が有意に増加したのと考えられた。

以上の結果から、超音波は角質層の親水性領域を介した見かけの薬物透過性を高め、主に親水性薬物に対する経皮吸収促進法として有用であると考えられた。

(3) 超音波を皮膚透過促進法として効果的に用いるために、促進剤との併用効果を検討した。モノテルペン類と超音波の併用は高い促進効果を示し、特に *l*-メントールとの併用は超音波の効果が高く現れることがわかった。*l*-メントールとの併用系では超音波適用時間及び基剤中促進剤濃度に依存して薬物 flux が増加したことから、これらの条件は薬物の経皮吸収に対する制御因子になると考えられた。また、超音波と *l*-メントール共存下でのみ高い促進効果を示したことに加えて、超音波が皮膚中 *l*-メントール量を増加し、それに伴い薬物の透過 flux が増加したことから、この併用系において超音波は促進剤の皮膚

への移行を増大する役割をもつことが明らかとなった。このような促進剤と超音波との併用は、超音波強度が低くても十分に高い促進効果を期待でき、有用な経皮吸収促進法になると考えられた。

以上、超音波の薬物皮膚透過促進について、*in vitro* 実験法を用いて論じた。本研究で得られた知見はフォノフォレーシスを利用する際の候補薬物の選択に関し、有用な情報を提供できるものと考えられる。また、促進剤と超音波の併用は吸収促進法としての超音波の利用価値をさらに高めることができると考えられ、今後期待される物理的方法を利用したより機能的な TTS 開発に対しても有益な情報を提供するものと考えられる。

## 謝辞

本研究に際し、素晴らしい研究テーマを与えていただくとともに終始ご指導並びにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部教授 森本雍憲先生に深甚なる謝意を表します。

実験研究の細部にわたる有益なご助言並びにご激励を賜りました城西大学薬学部助教授 杉林堅次先生に深く感謝いたします。

城西大学薬学部講師 夏目秀視先生並びに同助手 沼尻幸彦先生には終始有益なご助言を戴き、研究を一層深めることができました。ここに深謝いたします。

また、超音波装置をご提供戴いた第一高周波工業（株）に感謝いたします。

最後に、研究室関係諸氏のご協力並びにご理解の下に本研究を遂行できたことに感謝いたします。

## 実験の部

# 実験の部

## 第1章 実験の部

### 1. 実験材料

硝酸イソソルビド (ISDN) 及びフルルビプロフェン (FP) は東光薬品工業 (株) から, イブプロフェン (IP) は日清製粉 (株) から, ケトプロフェン (KP) は日産化学工業 (株) からそれぞれ分与された. アミノピリン (AMP) 及びリドカイン (LC) は和光純薬工業 (株) から, アンチピリン (ANP), シクロバルビタール (CB), 及び5-フルオロウラシル (5-FU) は東京化成工業 (株) からそれぞれ購入した. その他の試薬はすべて市販の特級品または高速液体クロマトグラフ用のものを購入して用いた.

### 2. 超音波発生装置

電氣的発振器 (150 kHz), 電力増幅器, 及び超音波トランスデューサー (150 kHz, 照射面積  $3.14 \text{ cm}^2$ ) は第一高周波工業 (株) より提供された. Fig. 1 の概略図に示したようにそれぞれを接続し, 実験に用いた.

### 3. 超音波出力の測定

「天秤法による超音波出力測定方法」<sup>31)</sup> (日本電子機械工業会規格, AM-29) に準じて装置を作成し, 超音波出力を測定した. 理学電機社製熱天秤 (CN 8078 B1) の下部にナイロン単線 (東洋ナイロン工業 (株), 直径 0.1 mm) で固定したシリコンゴム製超音波吸収板 (Wallgone®, Consumer Usage Laboratories, 直径 3 cm) を接続し, Fig. 25 に示すようにアクリル製水槽中に吊り下げた. 水槽下部のステンレススチール製反射コーンの内部は脱気水で満

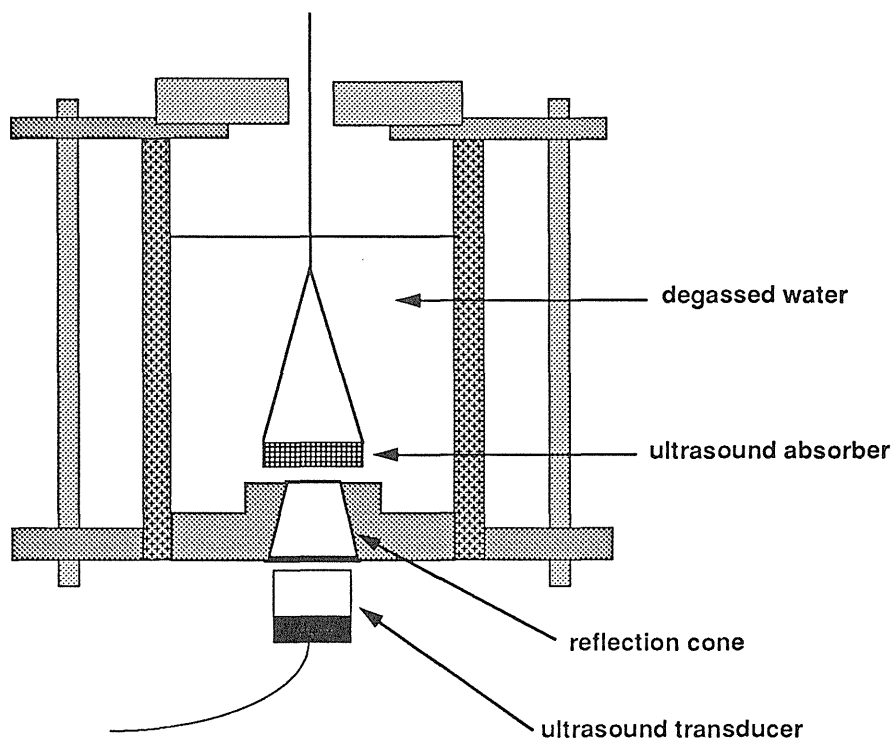


Fig. 25 Schematic diagram of water tank for the radiation force balance method

たし、水槽に対して内部及び外部側にそれぞれ厚さ 20 及び 50  $\mu\text{m}$  の塩化ビニル膜を貼ることによって水の漏出を防いだ。水槽内もまた脱気水で満たした。反射コーン下部に超音波トランスデューサーを固定して受圧板方向に向けて超音波を照射し、受圧板が超音波放射圧を受けるときの重量変化 ( $\Delta m$ ) を測定した。なお、超音波の伝播を確実にするために、超音波トランスデューサーと外部膜の間に音響結合材 (Sonogelly<sup>®</sup>; (株) 東芝) を塗布した。測定は 30 秒ごとに超音波を ON または OFF し、これを 1 サイクルとして 10 サイクル行い、これを 1 回の測定とした。重量変化は熱天秤に付属した記録計で記録し、その平均値を (6) 式に代入して超音波出力を算出した。なお、受圧板の音圧反射率 ( $R$ ) は Fig. 26 に示した超音波反射率の周波数特性から求め、-2 dB と

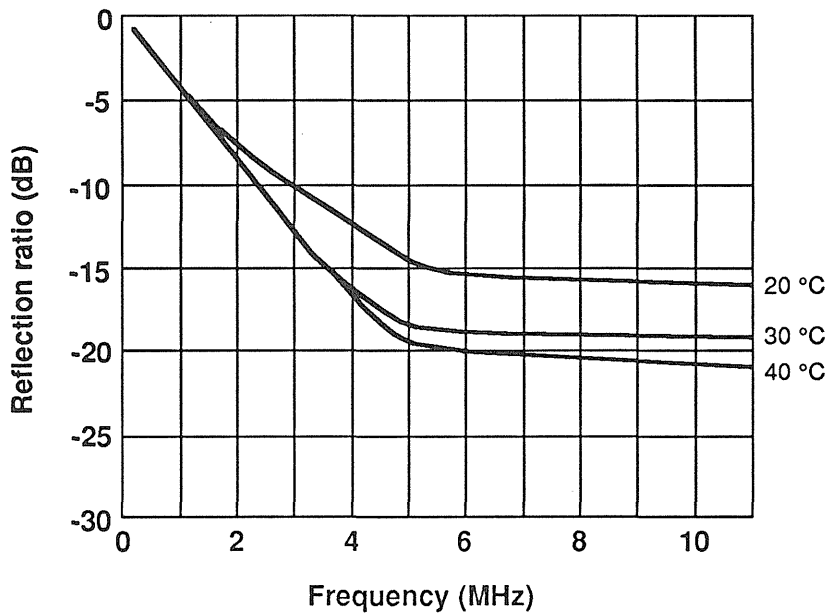


Fig. 26 Effect of frequency on the reflection ratio of ultrasound for the ultrasound absorber (Wallgone®) として計算に用いた.

#### 4. 実験動物

石川実験動物（株）から購入，もしくは城西大学生命科学研究センターから分与された雄性ヘアレスラット（WBN/ILA-Ht，7-8 週令，160-180 g）をすべての動物実験に用いた。

#### 5. 皮膚の調製

ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール® 注射液，ダイナボット（株））麻酔下（50mg/kg, i.p.），ヘアレスラット腹部皮膚を摘出し，皮下脂肪を切除した後に透過実験に供した。stripped skin は，麻酔後セロハンテープ（セロテープ®，ニチバン（株））で角質層を 20 回剥離した後同様に摘出した。<sup>84)</sup>

## 6. *In vitro* 皮膚透過実験

ヘアレスラット摘出皮膚を縦型拡散セル (Fig. 1, 角質層及び真皮側容積それぞれ 5 及び 12.5 ml, 有効拡散面積 4.91 cm<sup>2</sup>) に装着した。角質層側溶液にはその皮膚透過に伴う薬物の熱力学的活量の低下を防ぐために薬物懸濁液がよく用いられるが, 懸濁粒子による超音波の吸収あるいは反射を防ぐために, 溶解度の 50% 濃度の溶液を適用した。真皮側は蒸留水または pH 7.4 リン酸緩衝液で満たし, スターヘッドスターラーバーを入れ, マグネティックスターラー (マルチスターラー® MC-301, サイニックス (株)) を用いて 1200 rpm で攪拌した。超音波トランスデューサーを皮膚表面から約 1 mm の距離に固定し, 透過実験開始 3-6 時間後から 1 時間超音波を照射した。超音波照射後にも透過実験を引き続き行い, 超音波照射前, 照射中, 及び照射後の薬物の皮膚透過性を見積もった。実験中の拡散セルの温度は循環水によって 32 °C に保ったが, 超音波照射中の角質層側溶液は約 35-36 °C に上昇した (Fig. 5)。経時的に真皮側液を採取し, 同量の蒸留水または緩衝液を補充して容量を一定に保った。

## 7. 薬物の定量

薬物の定量は HPLC を用いて行った。透過実験で得た試料溶液に内標準物質のアセトニトリル溶液を同量加え, 混合した後 16000 rpm で 2 分間遠心分離した上清の一部を HPLC に注入した。以下に示す HPLC 装置を用いた。

ポンプ : LC-6A (島津製作所 (株))

検出器 : SPD-6A (島津製作所 (株))

データ処理 : C-R6A (島津製作所 (株))

カラム : Nucleosil 5C<sub>18</sub> (Macherey Nagel 社), 4.6 X 250 mm

その他の測定条件は Table 9 に示した。



**Table 9 HPLC conditions for the analysis of drugs used in the present study**

Drug	Mobile phase	Detection	Internal standard
5-FU	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (2 : 98)	UV 265 nm	_____ a)
ANP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (35 : 65)	UV 245 nm	p-hydroxybenzoic acid methyl ester
AMP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (45 : 55) + 5 mM sodium dodecylsulfonate	UV 254 nm	p-hydroxybenzoic acid propyl ester
CB	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (35 : 65)	UV 205 nm	_____ a)
ISDN	acetonitrile : Water (50 : 50)	UV 220 nm	p-hydroxybenzoic acid butyl ester
LC	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (35 : 65) + 5 mM sodium 1-hexanesulfonate	UV 245 nm	p-hydroxybenzoic acid methyl ester
KP	methanol : 0.1% phosphoric acid (75 : 25)	UV 262 nm	p-hydroxybenzoic acid amyl ester
IP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (70 : 30)	UV 262 nm	p-hydroxybenzoic acid butyl ester
FP	acetonitrile : 0.1% phosphoric acid (60 : 40)	UV 245 nm	p-hydroxybenzoic acid hexyl ester

a) Absolute calibration method was used.

## 8. 統計処理

統計的有意差は両側 t 検定により評価した。

## 第2章 実験の部

### 1. 実験材料

安息香酸ナトリウム (BA, 局方品) は山田製薬 (株) から, 重水 ( $D_2O$ ) は Merck 社から, FITC-デキストラン, セラミド IV 及びトリプシン (Type II, from porcine pancreas) は Sigma 社から, シアン化銀カリウム, ポリオキエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (Tween 20), 及びコレステロールは和光純薬工業 (株) からそれぞれ購入した。その他の試薬は第1章1. と同じものを用いた。

## 2. 超音波装置

第1章2. と同じものを用いた.

## 3. 実験動物

第1章4. と同じものを用いた.

## 4. 皮膚の調製

第1章5. と同様に調製した.

## 5. 水力学的パラメータの測定<sup>43)</sup>

第1章6. と同様に皮膚を 32 °C の水を循環した縦型拡散セルに装着した. 1 mg/ml ANP の D<sub>2</sub>O 溶液 5 ml を角質層側に, 体積マーカーとして 20 ng/ml FITC-デキストラン (平均分子量 71,200) 溶液を真皮側に加え, 真皮側を攪拌した. 皮膚を介した溶媒の流れを誘導するために, 角質層及び真皮側に 3.08, 0, または -3.08 Osmol/l NaCl のいずれかの濃度を加えた. 角質層側に超音波を 1 時間照射し, その後 ANP の皮膚透過を定常状態とするために 12 時間保った. その後角質層及び真皮側溶液を同じ溶液と新たに交換し, 6 時間そのまま保った. 6 時間後, 真皮側溶液を採取し, ANP, D<sub>2</sub>O, 及び FITC-デキストラン濃度を測定した. ANP のクリアランス ( $CL_{ANP}$ ,  $\mu\text{l/h}$ ) 及び D<sub>2</sub>O flux ( $J_{D2O}$ ,  $\mu\text{l/h}$ ) はそれぞれの透過係数 ( $K_p$ , cm/s) と有効拡散面積 ( $\text{cm}^2$ ) の積として算出した.

## 6. 皮膚インピーダンスの測定

第1章6. と同様に皮膚を 32 °C の水を循環した縦型拡散セルに装着し, 0.9% NaCl を含有する 0.021 M BA の H<sub>2</sub>O または D<sub>2</sub>O 溶液を, 真皮側に生理食

塩液を加え、真皮側を攪拌した。両側に白金電極を挿入し、インピーダンスメーター（アドバンス（株））に接続した。測定時のインピーダンスメーターの出力端子からの電圧は 2.5 V（10 Hz 正弦波）であることをオシロスコープによって確認した。また、皮膚を装着していない拡散セルを用いてインピーダンスを測定し、皮膚インピーダンスを補正した。皮膚インピーダンスがほぼ一定値を示した、実験開始 3 時間後から 1 時間角質層側に超音波を照射し、さらに実験を 8 時間まで行った。経時的に皮膚インピーダンスを測定し、また同時に真皮側溶液を採取し、同量の生理食塩液を補充して容量を一定に保った。試料溶液中の BA または  $D_2O$  濃度からそれぞれの flux を算出し、皮膚インピーダンスの変化との比較に用いた。

## 7. *In vitro* イオントフォレーシス実験

イオントフォレーシス用電極として銀-塩化銀電極を用いた。陽極は白金線をシアン化銀カリウム溶液中で銀メッキすることにより作成し、陰極はさらにこれを 0.1 N 塩酸溶液中で電気分解して作成した。

イオントフォレーシス実験は Fig. 27 に示したタイムスケジュールにしたがって行った。第 1 章 6. と同様に皮膚を 32 °C の水を循環した縦型拡散セルに装着し、0.021 M BA 及び生理食塩液をそれぞれ角質層及び真皮側に加え、真皮側を攪拌した。陰極及び陽極となる電極をそれぞれ角質層及び真皮側に挿入し、直流電源装置 Phoresor<sup>®</sup>（PM 600, IOMED 社, Salt Lake City, UT, USA）と接続した。実験開始 3 時間後から角質層側に 5, 15, または 60 分間超音波を照射し、その後 60 分間 0.1 mA/cm<sup>2</sup> 直流電流を皮膚に適用した。経時的に真皮側溶液を採取し、同量の生理食塩液を補充して容量を一定に保った。コントロール実験は超音波照射なしでイオントフォレーシス適用のみとした。

実験中の皮膚を介した電位差は皮膚を挟んで両側の皮膚近傍に挿入した一対

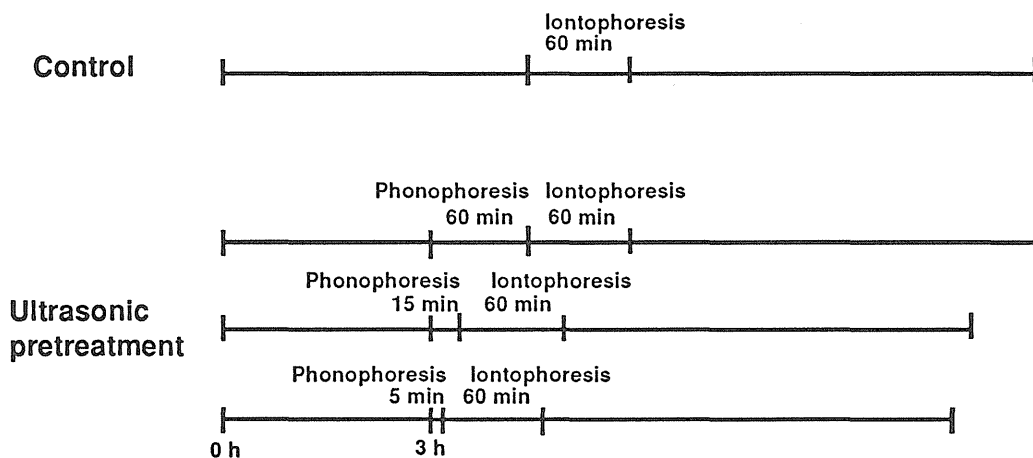


Fig. 27 Time schedules of iontophoretic experiments using ultrasonic pretreated skin

の塩橋（3 M塩化カリウム含有 3% 寒天ゲル）の間で測定した。これらの塩橋の逆の端をカロメル電極に導き、カロメル電極をデジタルマルチメーター（TR 6843, 竹田理研（株））に接続した。

## 8. 皮膚透過パラメータの測定

第1章6.と同様に皮膚を32℃の水を循環した縦型拡散セルに装着し、角質層及び真皮側に蒸留水を加えて真皮側を攪拌した。皮膚を水和させるために12時間保った後、角質層側に1時間超音波を照射した。その後直ちに角質層側溶液を1 mg/ml ANP または 0.1 mg/ml ISDN と交換し、透過実験を開始した。経時的に真皮側から試料を採取し、同量の蒸留水を補充して容量を一定に保った。コントロール実験は超音波の適用を除きすべて同じ操作を行った。得られた皮膚透過量の値を(18)式へのあてはめ計算に用いた。

## 9. 薬物透過係数のアレニウスプロットのための *in vitro* 皮膚透過実験

第1章6. と同様に皮膚を 27, 32, 37, または 42 °C の水を循環した縦型拡散セルに装着し, 角質層側に 100 mg/ml ANP または 0.1 mg/ml ISDN, 真皮側に蒸留水を加え, 真皮側を攪拌した. 定常状態 flux を得るために 12 時間保った後, 両側の溶液を新たに交換し, 透過実験を開始した. その直後から 2 時間角質層側に超音波を照射し, その間経時的に真皮側溶液を採取した. 同量の蒸留水を補充し, 容量を一定に保った. 角質層側溶液中にデジタル温度計 (PC-9400, 佐藤計量器 MFG. (株)) を挿入して温度をモニターし, 各温度を正確に維持した. コントロール実験は超音波の適用を除きすべて同じ操作を行った.

#### 10. 摘出皮膚からの脂質溶出量の測定

第1章6. と同様に皮膚を 32 °C の水を循環した縦型拡散セルに装着し, 0.1 % Tween 20 及び蒸留水をそれぞれ角質層及び真皮側に加え, 真皮側を攪拌した. 3 時間そのまま保った後, 角質層側に超音波を 5, 15, または 60 分間照射した. その後角質層及び真皮側溶液 3 ml を採取し, ステロール類及びセラミド類の定量に供した. コントロール実験では, 超音波照射なしで実験開始 4 時間後に試料を採取した.

#### 13. 皮膚表面の FTIR 測定

第1章6. と同様に皮膚を 32 °C の水を循環した縦型拡散セルに装着し, 角質層及び真皮側にそれぞれ D<sub>2</sub>O 及び水を加え, 真皮側を攪拌した. 開始 3 時間後から 1 時間角質層側に超音波を照射し, その後皮膚をセルから除いた. 皮膚に付着した水分を十分に拭い, 減圧デシケーター中で 2 日間乾燥した. 乾燥した皮膚表面はフーリエ変換赤外分光光度計 (JIR-3510, 日本電子 (株)) を用い, 全反射 (ATR) 法により測定した. IR 測定セルには亜鉛化セレン単結晶

**Table 10 HPLC conditions for the analysis of BA**

Mobile phase	Detection	Internal standard
acetonitrile : pH 2.5 phosphate buffer (2 : 98)	UV 230 nm	p-ethyl benzoic acid

( $\theta = 45^\circ$ ) を用いた。測定条件は解像度  $2 \text{ cm}^{-1}$ ，スキャン回数 254 回とした。

### 1 1. 薬物の定量

ANP 及び ISDN は第 1 章 7. と同様に定量した。BA は第 1 章 7. と同じ HPLC 装置を用い、Table 10 の条件で測定した。

### 1 2. $\text{D}_2\text{O}$ の定量

$\text{D}_2\text{O}$  は  $2512 \text{ cm}^{-1}$  の O-D 伸縮振動の吸収強度から定量した。<sup>67)</sup> 2 枚のフッ化カルシウム単結晶の間隙 (0.025 mm) に試料溶液を注入し、赤外分光光度計 (260-30, (株) 日立製作所) を用いて吸収強度を測定した。

### 1 3. 脂質の定量

ステロール類は Sugibayashi らの方法<sup>75)</sup> に準じて定量した。試料溶液 3 ml を遠沈管に取り、窒素気流下蒸発乾固した。0.1 %  $\text{FeCl}_3$  の酢酸溶液 6 ml を加え、脂質を溶解した。遠心分離 (2000 rpm,  $10^\circ\text{C}$ , 5 分間) 後、上清 3 ml を別の遠沈管に取り、硫酸 2 ml と混合した後、十分発色するまで約 30 分間放置した。この溶液の 565 nm での吸光度を紫外可視分光光度計 (UV-160A, 島津製作所 (株)) で測定した。ステロール類の量はコレステロール量として換算した。

セラミド類は Lauter と Trams の方法<sup>81)</sup> に準じて定量した。前述のように試料 3 ml を蒸発乾固した後、2 N 塩酸のメタノール溶液 1 ml を加え、溶液を 5

時間加熱環流した (80 °C) . 7 N 水酸化ナトリウム溶液及び蒸留水 0.5 ml を加えて液をアルカリ性とし, 酢酸エチル 5 ml を加えて振り混ぜ, 遠心分離後酢酸エチル相を分取した. 酢酸エチル相を蒸留水で2回洗い, 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.65) 及び0.5%メチルオレンジ0.1 mlを加え, 混合した. 遠心分離後, 酢酸エチル相を分取し, 415 nm での吸光度を紫外可視分光光度計で測定した. セラミド類はセラミドIV量として換算した.

#### 1 4. 統計処理

統計的有意差は両側 t 検定により評価した.

### 第3章 実験の部

#### 1. 実験材料

Azone<sup>®</sup>は住商ネルソン (株) から, S-318は日光ケミカル (株) から提供されたものをそれぞれ用いた. *l*-メントール (局方品) は保栄薬工 (株) から, IPMは東京化成工業 (株) から, *l*-カルボン, *d*-リモネン, 及びEtOHは和光純薬工業 (株) からそれぞれ購入した. その他の試薬は第1章1. 及び第2章1. と同じものを用いた.

#### 2. 超音波装置

第1章2. と同じものを用いた.

#### 3. 実験動物

第1章4. と同じものを用いた.

#### 4. 皮膚の調製

第1章5. と同様に調製した。

#### 5. *In vitro* 皮膚透過実験

すべての促進剤は 0.1% Tween 20 水溶液で乳化して実験に用いた。促進剤濃度は Table 8 に示した濃度を用い、これらは他の研究で用いられている典型的な濃度を選んだ。第1章6. と同様に皮膚を 32℃ の水を循環した縦型拡散セルに装着し、角質層及び真皮側にそれぞれ 1% AMP を含有する促進剤溶液及び蒸留水を適用し、真皮側を撹拌した。超音波は実験開始直後から 60 分間角質層側に照射した。経時的に真皮側から試料を採取し、同量の蒸留水を補充して容量を一定に保った。超音波照射中の温度上昇は水槽の温度を制御することにより防いだ。

*l*-メントールを用いた検討では、超音波照射時間を 60 分間に固定して角質層側適用基剤中 *l*-メントール濃度を 1, 2.5, 及び 5% と変化させるか、もしくは *l*-メントール濃度を 5% に固定して超音波照射時間を 10, 30, 及び 60 分間と変化させた。

#### 6. 超音波または *l*-メントール前処理実験法

この実験のタイムスケジュールを Fig. 27 に示す。超音波前処理の実験ははじめに *l*-メントールを含有しない 1% AMP 溶液を角質層側に加え、実験開始 4 時間後から 60 分間超音波を適用した。その後、角質層側溶液を 5% *l*-メントールを含有する 1% AMP 溶液に交換し、超音波と促進剤が共存しない条件とした。*l*-メントール前処理では、角質層側に 5% *l*-メントールを含有する 1% AMP をはじめから適用し、実験開始 4 時間後から超音波を 60 分間照射する



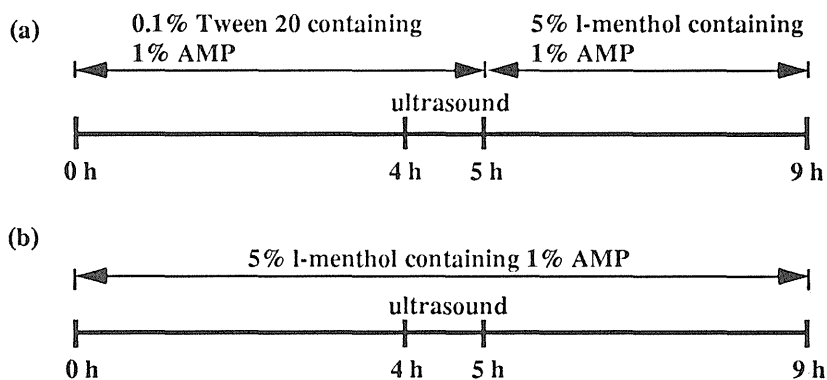


Fig. 28 Time schedules for pretreatment experiment with ultrasound or l-menthol

ことで、超音波と促進剤が共存する条件とした。超音波照射後に角質層側溶液を新たに交換した。他の方法は第3章5.と同様に操作した。

## 7. 皮膚中 *l*-メントール量の測定<sup>82)</sup>

第1章6.と同様に皮膚を32℃の水を循環した縦型拡散セルに装着し、角質層側に1, 2.5, または5% *l*-メントール溶液, 真皮側に蒸留水を加えて, 真皮側を攪拌した。実験開始4時間後から60分間角質層側に超音波を照射し, その後皮膚を拡散セルから取り除いた。皮膚表面を蒸留水で3回洗った後, 表面の水を拭い, 有効拡散面積部分を切り取り, 正確に重量を量った。この皮膚組織を遠沈管に取り, 内標準物質として0.1% *l*-カルボンを含有する1,4-ジオキサン溶液を加えた。遠沈管を超音波洗浄器 (Branson 5200, ヤマト科学) に浸し, 20分間超音波処理することにより *l*-メントールを抽出した。遠心分離後上清を分取し, ガスクロマトグラフ法にて *l*-メントールを定量した。

## 8. 薬物の定量

AMP は第 1 章 7. と同じ条件で定量した.

## 9. l-メントールの定量

l-メントールの定量は FID 検出器付きガスクロマトグラフ装置 (GC-14A, 島津製作所 (株)) を用いて行った.<sup>82)</sup> 測定条件は以下の通りとした.

カラム	: OV-17 (GL サイエンス (株))
カラム温度	: 120 °C
インジェクション温度	: 160 °C
検出器温度	: 160 °C
キャリアガス	: N <sub>2</sub>
流速	: 50 ml/min

## 10. 統計処理

統計的有意差は両側 t 検定により評価した.

## 引用文献

- 1) 中野眞汎, 森本雍憲, 杉林堅次 編, " ドラッグデリバリーシステム ", 南山堂, 東京, 1982.
- 2) 橋田 充, " ドラッグデリバリーシステム ", 化学同人, 京都, 1995.
- 3) Y. W. Chien *ed.*, " Transdermal Controlled Systemic Medications ", Marcel Dekker, New York, 1987, p.1.
- 4) A. Kydonius *ed.*, " Treatise on Controlled Drug Delivery ", Marcel Dekker, New York, 1992, p. 341.
- 5) B. W. Barry *ed.*, " Dermatological Formulations ", Marcel Dekker, New York, 1983, p.1.
- 6) K. B. Sloan *ed.*, " Prodrugs ", Marcel Dekker, New York, 1992.
- 7) B. W. Barry, *J. Controlled Rel.*, **6**, 85 (1987).
- 8) J. Hadgraft and R. H. Guy *eds.*, " Transdermal Drug Delivery ", Marcel Dekker, New York, 1989, p.197.
- 9) P. Tyle, *Pharm. Res.*, **3**, 318 (1986).
- 10) A. K. Banga and Y. W. Chien, *J. Controlled Rel.*, **6**, 85 (1987).
- 11) R. M. Brand and R. H. Guy, *J. Controlled Rel.*, **33**, 285 (1995).
- 12) M. R. Prausnitz, U. Pliquett, R. Langer and J. C. Weaver, *Pharm. Res.*, **11**, 1834 (1994).
- 13) D. B. Bommannan, J. Tamada, L. Leung and R. O. Potts, *Pharm. Res.*, **11**, 1809 (1994).
- 14) D. M. Skauen and G. M. Zentner, *Int. J. Pharm.*, **20**, 235 (1984).
- 15) P. Tyle and P. Agrawala, *Pharm. Res.*, **6**, 355 (1989).
- 16) K. Fellingner and J. Schmid *eds.*, " Klinik und Therapie des Chronischen

Gelenkrheumatismus ", Wilhelm Maudmich, Wien, 1954, p. 549.

- 17) H. A. E. Benson, J. C. McElnay and R. Harland, *Int. J. Pharm.*, **44**, 65, (1988).
- 18) D. Levy, J. Kost, Y. Meshulam and R. Langer, *J. Clin. Invest.*, **83**, 2074 (1989).
- 19) A. R. Williams, *Ultrasonics*, **28**, 137 (1990).
- 20) H. A. E. Benson, J. C. McElnay, R. Harland and J. Hadgraft, *Pharm. Res.*, **8**, 204 (1991).
- 21) D. Bommaman, H. Okuyama, P. Stauffer and R. H. Guy, *Pharm. Res.*, **9**, 559 (1992).
- 22) M. E. Franklin, S. T. Smith, T. C. Chenier and R. C. Franklin, *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, **22**, 103 (1995).
- 23) 杉林堅次, 薬物動態, **2**, 71 (1987).
- 24) R. Brucks, M. Nanavaty, D. Jung and F. Siegel, *Pharm. Res.*, **6**, 697 (1989).
- 25) 超音波医学会 編, " 超音波医学 ", 医学書院, 東京, 1973.
- 26) K. S. Suslick ed., " Ultrasound ", VCH Publishers, New York, 1988, p. 287.
- 27) K. A. Walters and J. Hadgraft eds., " Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement ", Marcel Dekker, New York, 1993, p. 293.
- 28) J. E. Griffin, J. C. Touchstone and A. C-Y Liu, *Am. J. Phys. Med.*, **44**, 20 (1964).
- 29) J. E. Griffin and J. C. Touchstone, *Am. J. Phys. Med.*, **51**, (1972).
- 30) 根岸勝雄, 高木堅志郎, " 超音波技術 ", 東京大学出版, 東京, 1984, p. 55.
- 31) 日本電気機械工業会規格, " 天秤法による超音波出力測定方法 ", AM-29, 1987.
- 32) H. Ueda, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *J. Controlled Rel.*, **37**, 291 (1995).
- 33) W. Gaertner, *J. Acoust. Soc. Am.*, **26**, 977 (1954).
- 34) S. Mitragotri, D. Blankschtein and R. Langer, *Science*, **269**, 850 (1995).
- 35) B. D. Anderson, W. I. Higuchi and P. V. Raykay, *Pharm. Res.*, **5**, 556 (1988).

- 36) B. W. Barry, *J. Controlled Rel.*, **15**, 237 (1991).
- 37) T. Hatanaka, M. Inuma, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 3452 (1990).
- 38) S. Mitragotri, D. Edwards, D. Blankschtein and R. Langer, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 697 (1995).
- 39) D. Bommannan, G. K. Menon, H. Okuyama, P. M. Elias and R. H. Guy, *Pharm. Res.*, **9**, 1043 (1992).
- 40) V. M. Meidan, A. D. Walmsley and W. J. Irwin, *Int. J. Pharm.*, **118**, 129 (1995).
- 41) J. C. McElnay, H. A. E. Benson, R. Harland and J. Hadgraft, *Pharm. Res.*, **10**, 1726 (1993).
- 42) J-P. Simonin, *J. Controlled Rel.*, **33**, 125 (1995).
- 43) T. Hatanaka, E. Manabe, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Pharm. Res.*, **11**, 654 (1994).
- 44) O. Kedem and A. Katchalsky, *J. Gen. Physiol.*, **45**, 143 (1961).
- 45) 日野朋美, 薬学博士学位論文, 1992, 城西大学薬学研究科.
- 46) H. Ueda, M. Ogihara, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **137**, 217 (1996).
- 47) J. L. Leveque and J. de Rigal, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **34**, 419 (1983).
- 48) K. Kontturi, L. Murtomäki, J. Hirronen, P. Paronen and A. Urtti, *Pharm. Res.*, **10**, 381 (1993).
- 49) L. M. A. Nolan, J. Corish and O. I. Corrigan, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **89**, 2839 (1993).
- 50) Y. N. Kalia and R. H. Guy, *Pharm. Res.*, **12**, 1605 (1995).
- 51) T. Yamamoto and Y. Yamamoto, *Med. Biol. Eng.*, **14**, 151 (1976).
- 52) R. Kohli, W. I. Archer, J. M. C. Roberts, A. J. Cochran and A. L. W. Po, *Int. J.*

- Pharm.*, **26**, 275 (1985).
- 53) S. G. Schultz, " Basic Principles of Membrane Transport ", Cambridge University Press, Cambridge, 1980.
- 54) S. Numajiri, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, in press.
- 55) J. O'M. Bockris and A. K. N. Reddy, " Modern Electrochemistry ", Plenum Press, New York, 1973.
- 56) H. Ueda, M. Ogihara, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, accepted.
- 57) R. J. Scheuplein, *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79 (1967).
- 58) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa and T. Uno, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 879 (1981).
- 59) K. Sato, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 104 (1991).
- 60) F. Yamashita, T. Yoshioka, Y. Koyama, H. Okamoto, H. Sezaki and M. Hashida, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 690 (1993).
- 61) F. Yamashita, H. Bando, Y. Koyama, S. Kitagawa, Y. Takakura and M. Hashida, *Pharm. Res.*, **11**, 185 (1994).
- 62) P. M. Elias, *Arch. Dermatol. Res.*, **270**, 95 (1981).
- 63) G. M. Golden, D. B. Guzek, A. H. Kennedy, J. E. McKie and R. O. Potts, *Biochemistry*, **26**, 2382 (1987).
- 64) B. Ongpipattanakul, R. R. Burnette, R. O. Potts and M. L. Francoeur, *Pharm. Res.*, **8**, 350 (1991).
- 65) D. Bommaman, R. O. Potts and R. H. Guy, *J. Controlled Rel.*, **16**, 299 (1991).
- 66) D. T. Downing, *J. Lipid Res.*, **33**, 301 (1992).
- 67) T. Hatanaka, M. Simoyama, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *J. Controlled Rel.*, **23**, 247 (1993).

- 68) V. H. Mak, R. O. Potts and R. H. Guy, *Pharm. Res.*, **8**, 1064 (1991).
- 69) H. Ueda, R. Isshiki, M. Ogihara, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, in press.
- 70) Y. Morimoto, K. Sugibayashi, D. Kobayashi, H. Shoji, J. Yamazaki and M. Kimura, *Int. J. Pharm.*, **91**, 9 (1993).
- 71) H. Nakamura, Y. Pongpaibul, T. Hayashi, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, in press.
- 72) N. Ohara, K. Takayama, Y. Machida and T. Nagai, *Int. J. Pharm.*, **105**, 31 (1994).
- 73) Y. Morimoto, T. Hatanaka, M. Oguchi, K. Sugibayashi, M. Kobayashi and M. Kimura, *S. T. P. Pharma Sci.*, **2**, 253 (1992).
- 74) D. Kobayashi, T. Matsuzawa, K. Sugibayashi, Y. Morimoto and M. Kimura, *Pharm. Res.*, **11**, 96 (1994).
- 75) K. Sugibayashi, S. Nakayama, T. Seki, K. Hosoya and Y. Morimoto, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 58 (1992).
- 76) M. Okumura, Y. Nakamori, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Drug Des. and Delivery*, **7**, 147 (1991).
- 77) K. Sato, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **43**, 31 (1988).
- 78) A. C. Williams and B. W. Barry, *Pharm. Res.*, **8**, 17 (1991).
- 79) 小林大介, 薬学博士学位論文, 1995, 城西大学薬学研究科.
- 80) 川鱈昌吾, 関俊暢, 杉林堅次, 森本雍憲, *薬剤学*, **54**, 140 (1994).
- 81) C. J. Lauter and E. G. Trams, *J. Lipid Res.*, **3**, 136 (1962).
- 82) K. Sugibayashi, D. Kobayashi, E. Nakagaki, T. Hatanaka, N. Inoue, M. Kusumi, M. Kobayashi, M. Kimura and Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, **113**, 189 (1995).