

親水性化合物の経皮吸収促進のための  
超音波の利用に関する研究



甲第26号

武藤 香絵

親水性化合物の経皮吸収促進のための  
超音波の利用に関する研究

武藤 香絵



# 目次

## 総論の部

緒言	7
第1章：超音波による親水性化合物の皮膚透過促進効果	10
第1節：超音波照射条件の決定	10
第2節：カルセインの皮膚透過に対する超音波周波数と強度の影響	12
第3節：皮膚透過促進効果と溶媒透過の関係	17
第4節：本章の小括および考察	21
第2章：超音波によって促進される皮膚透過経路の検討	23
第1節：水力学的細孔理論を用いた考察	23
第2節：共焦点レーザー走査型顕微鏡による評価	28
第3節：本章の小括および考察	31
第3章：超音波による皮膚透過促進効果とキャビテーションの関係	35
第1節：媒質中に発生するキャビテーション量の測定	36
第2節：キャビテーション発生量と皮膚透過促進効果の関係	38
第3節：固体-液体界面でのキャビテーション非対称圧壊に伴うマイクロジェ ット発生の評価	40
第4節：本章の小括および考察	42
結論	44
謝辞	47

実験の部

第1章 実験の部 . . . . . 51

第2章 実験の部 . . . . . 55

第3章 実験の部 . . . . . 58

引用文献 . . . . . 61

## 総論の部



## 緒言

皮膚を介した薬物の投与は、長時間にわたる血中濃度の維持、副作用発現時の迅速な投与中断、使用の簡便さ等の点から患者の QOL やコンプライアンスの向上が期待できる有益な薬物投与方法である。また、経口投与では肝臓での初回通過効果のために薬効を示さないようなペプチド性薬物の投与方法としても有用性が高い。しかし、実際に臨床で経皮的に適用されている薬物は、ニトログリセリン、硝酸イソソルビド、スコポラミン、ツロブテロールなど極僅かである<sup>1)</sup>。その理由は皮膚の角質層 (SC)<sup>2)</sup>や近年顆粒層に存在が確認されたタイトジャンクション<sup>3,4)</sup>が体内からの水分の蒸散防止や、外界からの物理的・化学的刺激から内臓諸器官を防御するバリアー機構として機能しているため、薬物の透過性が低いことによる。従って、この有益な投与方法を多くの薬物に拡大するためには、皮膚透過性を向上させることが必要である。

これまでに、吸収促進剤の添加<sup>5,6)</sup>や薬物のプロドラッグ化<sup>7)</sup>などの化学的促進法、皮膚に電流を適用することにより薬物の皮膚透過速度を増大させるイオントフォーシス<sup>7,8)</sup>、皮膚に高電圧を一時的に負荷することで薬物の新規透過経路を形成するエレクトロポレーション<sup>9,10)</sup>、ヘリウム圧などの高圧を利用して薬物を固体粉末のまま皮内および皮下に送達するパウダーインジェクション<sup>11,12)</sup>、マイクロメートルサイズの極小の針を用いて SC にナノメートルサイズの小孔を形成し高分子やナノパーティクルを透過させるマイクロニードル法などの物理的促進法<sup>13,14)</sup>、更にこれらの方法を組み合わせたシステムが検討されてきた<sup>15,16)</sup>。近年実用化された E-TRANS<sup>®</sup>システムはイオントフォーシスによりフェンタニールを経皮的に投与する方法であり、電流が適用されている間のみ薬物が送達される<sup>17,18)</sup>。このように外部駆動力を利用した促進方法は、その駆動力を制御することにより、必要に応じた薬物送達を可能にする on demand 型の製剤設計に利用できるため、Drug Delivery System の中でも sophisticated method として注目を浴びている。

超音波 (US) エネルギーを用いたソノフォーシスは物理的方法の 1 つである<sup>19)</sup>。US は人間の耳で聞くことを目的としない音波と定義され、目安として 20 kHz 以上の音波とされている<sup>20)</sup>。医療領域ではその使用目的によって大きく次の 3 つの周波数領



域、すなわち 5~100 kHz の power US (低周波数)、0.7~3 MHz の治療 US (中周波数)、そして 2~10 MHz の診断 US (高周波数) に分類される。US エネルギーの経皮吸収への応用は、1954 年の Fellingner らによる温熱効果やマイクロマッサージ効果を期待して関節炎の治療に用いられていた治療 US を手指関節炎治療に対して利用し、ヒドロコルチゾン軟膏と併用したことに端を発する<sup>21)</sup>。初期にはステロイド、NSAIDs、および抗生物質の局所送達に対する効果が検討されていたが、Levy らによってインスリン、D-マンニトール、フィゾクチグミンの全身循環系への吸収増大が報告されてからは、全身作用を目的とした応用へと研究が拡大した<sup>22)</sup>。近年、Mitragotri らによって 20 kHz の低周波数 US を 225 mW/cm<sup>2</sup> の強度で照射することでインスリン (~6 kDa)、インターフェロングamma (~25 kDa)、およびエリスロポエチン (~30 kDa) といった水溶性ペプチド化合物の皮膚透過が促進されることが報告された<sup>23)</sup>。

これまでに、20 kHz から 16 MHz<sup>24)</sup> までの広範な周波数の US の薬物皮膚透過促進効果が試験されているが、高周波数および治療周波数領域の US に比べ低周波数領域の US が有意に高い促進効果を示すことから、最近では低周波数領域の US を用いた薬物皮膚透過促進に関する研究が数多く行われている<sup>25-29)</sup>。US による促進効果には、US を水などの溶媒中に照射することによって発生する物理現象の 1 つである、キャビテーション (空洞の形成、振動、および圧壊)<sup>30)</sup> が主に関係していると考えられている<sup>19,31,32)</sup>。促進効果は溶質の物理化学的性質によっても異なり、親油性化合物に比べ、親水性化合物でより高く、さらに、US 照射によって皮膚伝導度が非可逆的に増大することから、キャビテーションによって SC 脂質二重層がランダム化され、水性経路が形成されるものと考えられている<sup>33)</sup>。最近の研究で、低周波数 US において、US 照射中に媒質中に発生する convective flow が促進効果に付加的に寄与している可能性が報告されており<sup>31,34,35)</sup>、ソノフォレーシスもイオントフォレーシスのように薬物を適用時のみに経皮送達させる外部駆動力として応用できる可能性がある。しかし、このような一過性の作用に関する詳細な検討や促進効果との関係について系統的な研究は行われていない。

そこで本研究では、親水性化合物に対する US の皮膚透過促進効果を種々周波数および強度を用いて系統的に評価した。第 1 章では、皮膚透過に対する US 周波数およ

び強度の影響を明らかにし、さらに、US が駆動力として利用可能であるかについて検討した。適用する超音波の周波数は、その特性から経皮吸収促進に対して異なる影響を及ぼすことが既に知られているが、詳細は明らかではなく、今後の超音波の実用に向けて必要となる知見である。さらに、薬物の皮膚透過促進に関係する定性的な要因、溶媒流の関与についても検討を加えた。

次に、第2章ではUSによって促進される皮膚透過経路を、水力学的細孔理論、更に、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用い検討した。薬物の皮膚透過ルートについてはこれまでに大きく水性ルートと脂溶性ルートの2つが議論されてきたが超音波照射によってこれらのルートがどのように影響を受けるのかを、上記の方法を用いて研究した。特に、水性ルートの関与については、脂溶性ルートが溶解-分配理論で説明されるのに対して、透過物質の分子サイズが存在する water filled pore の細孔径と密接に関係しているので、その点からの評価は透過挙動全体を理解する上で重要な事項である。また、視覚的なエビデンスは理解を深める上で有用と思われる。

さらに、第3章では親水性化合物の経皮吸収促進効果に対するキャビテーションの関与を評価した。経皮吸収促進効果と超音波周波数の関係が、キャビテーションにあることもこれまでに報告されていることであるが、定性的な説明の域を出ていない。キャビテーションの圧壊の影響を明らかにすることは、吸収促進現象の本質に迫るものであり、臨床応用に向けて重要な超音波選択基準を与えることにつながるものである。周波数とキャビテーション発生量の関係を明らかにするとともに、固体表面の圧壊に伴うマイクロジェット流の挙動を視覚的に観察し、経皮吸収に対する影響を検討した。

以上のように、超音波の経皮吸収促進に対する影響について、照射する超音波の周波数、生じた溶媒流、透過経路および皮膚表面におけるキャビテーションとその圧壊に関する研究を行ったので、その結果について以下3章にわたって詳述する。

# 第1章 超音波による親水性化合物の皮膚透過促進効果

低周波数 US による水溶性高分子薬物の皮膚透過促進メカニズムは、非可逆的に角質層に水性経路を形成することによると考えられており<sup>33)</sup>、その経路については詳細な検討が行われ、適用する US の周波数や強度により大きさや分布状態が異なることが示されている<sup>36-38)</sup>。これまで、20 kHz～16 MHz の周波数が、12.5 mW/cm<sup>2</sup>～19 W/cm<sup>2</sup> の強度で検討されてきた。一方、最近の研究で、US の皮膚透過に対する駆動力としての可能性について示されたものの<sup>35)</sup>、未だその程度は明らかにされておらず、この効果に関する詳細な検討や透過促進効果との関係についての系統的な研究は行われていない。

そこで本章では、親水性化合物の皮膚透過に対する US 周波数および強度の影響を明らかにし、更に、皮膚透過促進効果と溶媒透過の関係について検討することで、US が駆動力として利用可能であるかについて評価を試みた。

## 第1節 超音波照射条件の決定

本研究で用いた実験装置を Fig. 1 に示す。US は、発振回路 (synthesizer) で特定周波数の電気信号を出力し、その電気信号を電圧増幅器 (amplifier) で増幅し、振動子を駆動することにより発生させた。振動子には圧電素子と呼ばれる物質が用いられており、素子の厚み、素材、形状などによって振動子の最適な駆動周波数が異なる<sup>39)</sup>。駆動周波数が適していない場合、効率よく US を発生させることができなくなる。治療に用いられている 700 kHz 以上の周波数は促進効果が低いことが既に報告されているため<sup>19)</sup>、駆動力としての可能性を検討する本研究においても、それ以下の周波数、20～700 kHz の範囲で駆動される振動子を用いることとした。そこで今回、20、150、そして 500 kHz 付近で駆動される 3 種の horn タイプ振動子を新たに作成した。

促進効果に対する US 条件の影響を正確に調べるために、まずこれら振動子に最適の駆動周波数を決定した。

US を液体中に照射すると、キャビテーション、加熱、放射圧、音響流などの様々な物理現象が発生することが知られている<sup>20,29)</sup>。これらの中からキャビテーションを指標として用いた。最適な周波数で駆動した場合、媒質中に発生する超音波が増すため、それに対応してキャビテーション発生量も増大する。そこで、キャビテーション発生量が多く、安定して超音波が発生している周波数を horn の駆動周波数とした。

Fig. 2 に様々な周波数で駆動したときの、3つの horn におけるキャビテーション発生量を示した。horn 1 ではキャビテーション発生量が高く、より安定して超音波が発生した 41 kHz を、horn 2 ではキャビテーション発生量の最も高い 158 kHz、そして horn 3 では 445 kHz を駆動周波数とし、以後の実験に用いた。

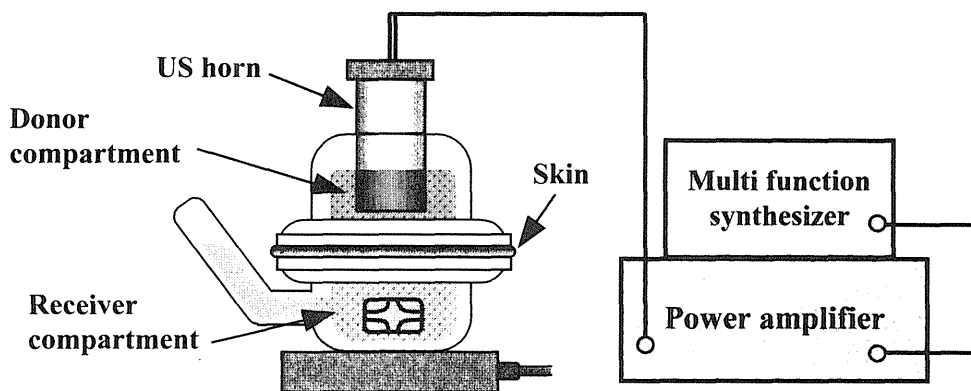


Fig. 1 Schematic diagram of experimental apparatus

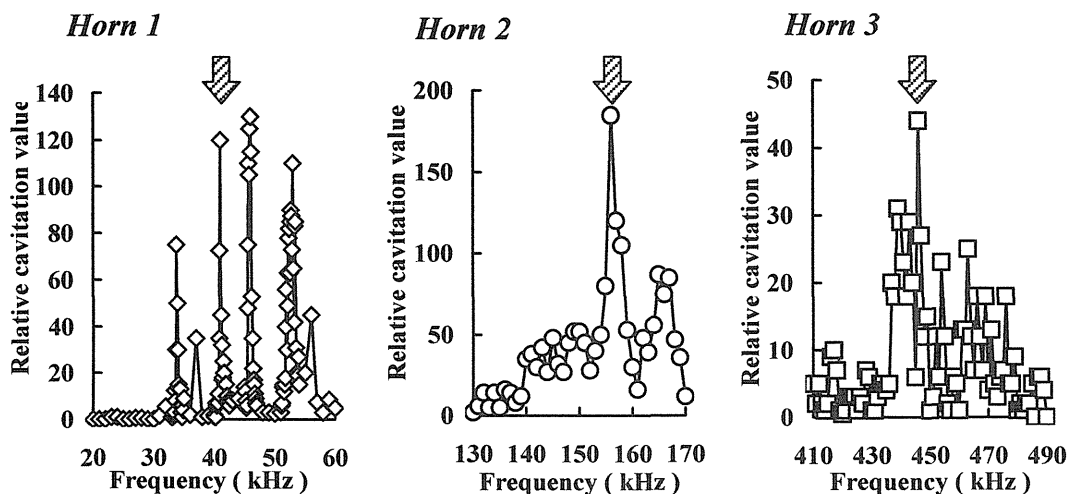
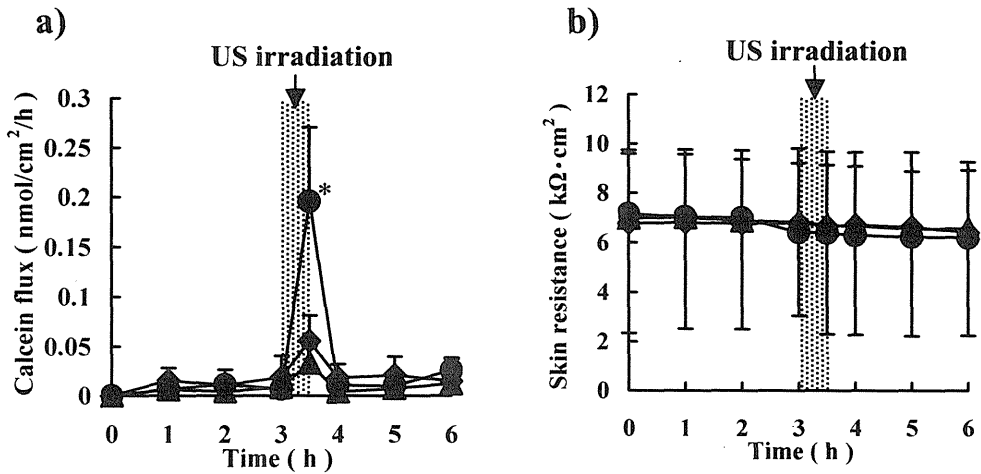


Fig. 2 Generation of cavitation at various driving frequency

## 第 2 節 カルセインの皮膚透過に対する超音波周波数と強度の影響

前節で決定した 3 種の周波数を用いて強度を変えて照射したときの親水性モデル化合物カルセイン (MW 623) の皮膚透過性を評価した。透過実験では、まずドナーに 1 mM カルセイン溶液を、レシーバーに PBS を満たし 12 時間前処理をした後、ドナー溶液を入れ換えて実験を開始し、カルセイン透過が定常状態に達した 3 時間目から US を 30 分間照射した。また、透過実験中の皮膚の integrity、すなわち、構造変化や水和の程度を評価するために同時に皮膚電気抵抗値も測定した。ただし、US 照射中は発振装置からの電気ノイズの影響により抵抗値を測定することが困難であったため、US 照射直後の抵抗値を示した。Figs. 3a および b はそれぞれ、 $60 \text{ mW/cm}^2$  の強度で US を照射したときのカルセイン皮膚透過速度 (flux) および皮膚電気抵抗値の経時変化を示している。カルセイン flux は US 照射時に一過的に増大し、その後照射を中止することでコントロールレベルまで回復した。この可逆的な促進効果は全ての周波数において US 照射中に認められたが、その程度は周波数により異なり、41 kHz でコントロールの約 15 倍、158 kHz で約 7 倍、および 445 kHz で約 4 倍であり、より

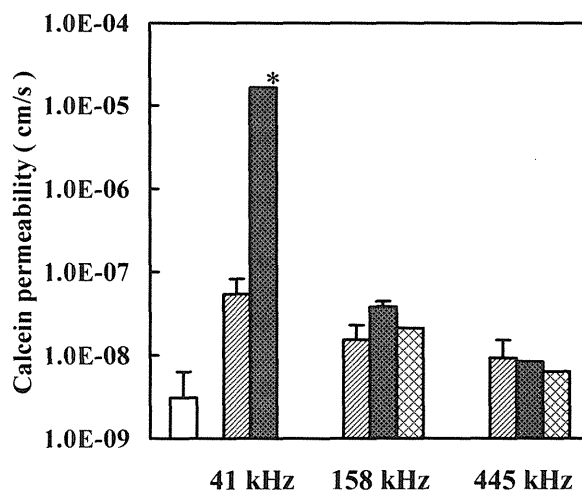


**Fig. 3** Calcein flux (a) and skin resistance (b) across the hairless rat skin at intensity of  $60 \text{ mW/cm}^2$

● 41 kHz, ◆ 158 kHz, ▲ 445 kHz

\*  $p < 0.05$ , compared with baseline.

Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.



**Fig. 4** Calcein permeability coefficient across hairless rat skin by ultrasound at various intensity

▨  $60 \text{ mW/cm}^2$ , ▩  $120 \text{ mW/cm}^2$ , ▤  $240 \text{ mW/cm}^2$ , □ control

\*  $p < 0.05$ , compared with calcein permeability at  $60 \text{ mW/cm}^2$ .

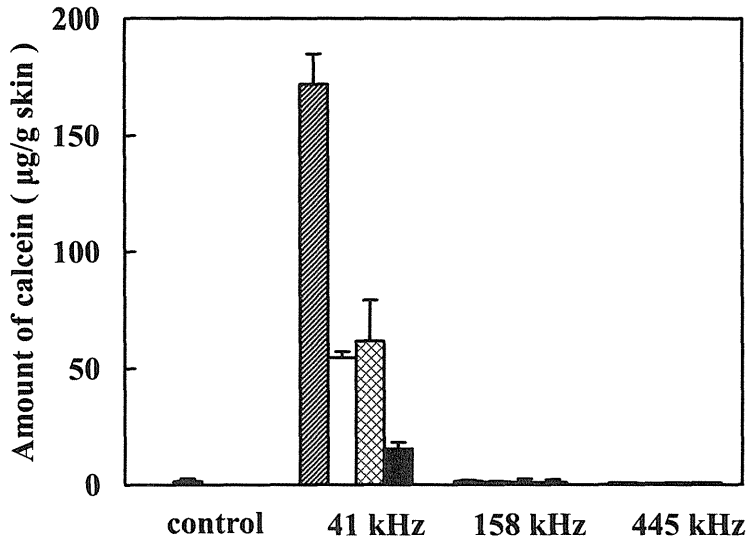
Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.

低い周波数で高い促進効果が得られた。一方、皮膚電気抵抗値は全ての周波数において US 照射前後で有意な変化を示さなかった。

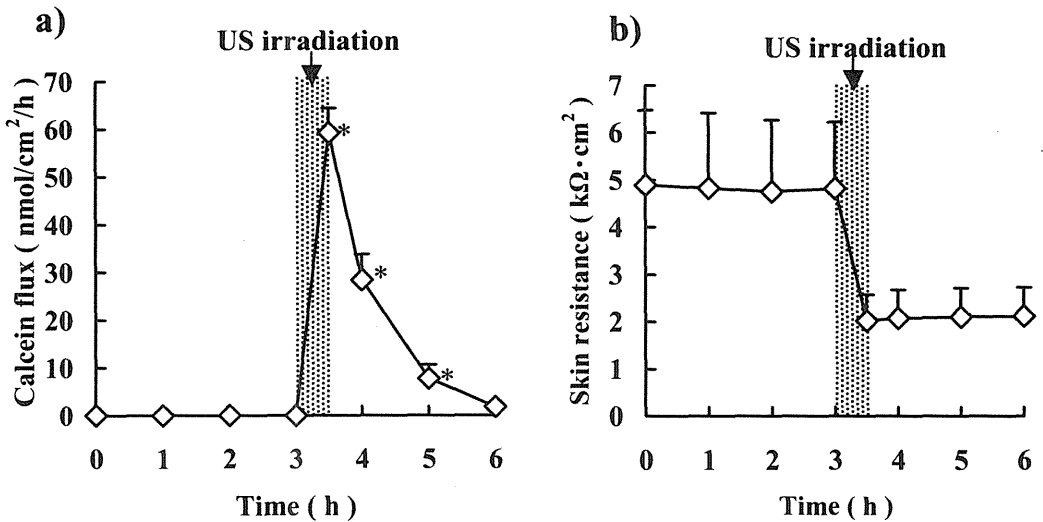
次に照射強度を  $240 \text{ mW/cm}^2$  まで増大し、強度の影響を調べた。しかし、41 kHz の場合は、用いた電圧増幅器で  $240 \text{ mW/cm}^2$  の強度の US を安定して駆動することが出来なかったため、60 および  $120 \text{ mW/cm}^2$  の強度についてのみ評価した。いずれの場合にも Fig. 3a と同様に一過的な flux の増大が認められた。Fig. 4 は  $60\text{--}240 \text{ mW/cm}^2$  の強度における US 照射中のカルセイン透過係数を示している。41 kHz US では照射強度を上げることによって US 照射中のカルセイン透過係数が有意に増大したが、158 および 445 kHz では強度の増大による更なる促進効果の増大は認められなかった。

これまでに US 照射によってヘアレスラット皮膚を介した薬物の透過が一過的に促進されるという報告はされていない。そこで、この効果を確認するために、 $120 \text{ mW/cm}^2$  の US 照射直後および透過実験終了時の皮膚中カルセイン濃度を測定した。Fick の第 1 法則より、物質の透過 flux は濃度勾配に比例するため、一過的に flux が増大する場合、US 照射時には濃度勾配、すなわち線速度が大きくなり、結果として皮膚中濃度が増大していることが考えられる。Fig. 5 に示すように、41 kHz US 照射後、horn 直下領域の皮膚中濃度はコントロール ( $2.5 \pm 1.6 \mu\text{g/g skin}$ ) から  $172 \pm 33 \mu\text{g/g skin}$  に増大し、透過実験終了時（照射終了から 2.5 時間後）には  $62 \pm 15 \mu\text{g/g skin}$  に低下した。これより、US 照射によってカルセインの皮膚透過が一過的に促進されていることが確かめられた。また、horn 周辺皮膚のカルセイン濃度は horn 直下よりも低く、US による皮膚へのカルセインの導入が horn 直下領域で有意に高いことが明らかとなった。一方、158 および 445 kHz US 照射後の皮膚中濃度はコントロールと同等であったが、これは促進効果が小さいために増大が顕著でなかったことと一致するものと考えられる。

この興味深い促進効果を詳細に検討するために、促進効果が最も高かった 41 kHz、 $120 \text{ mW/cm}^2$  の US 条件を用いて更なる実験を行った。Fig. 6 に示すように、この条件で US を照射したとき、カルセインの flux は一過的に増大したが、皮膚電気抵抗値はベースラインの約 1/2 に低下した。抵抗値の逆数とカルセイン透過係数との関係をプロットすると、US 照射時の透過係数は抵抗値から予測される値よりも明らかに高い



**Fig. 5** Calcein content in the hairless rat skin immediately after US irradiation (▨, □) and at the end of the sonophoretic experiment (▩, ■)  
 (▨, ▩) skin under the horn, (□, ■) skin out of the horn  
 Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.



**Fig. 6** Calcein flux (a) and skin resistance (b) across the hairless rat skin at intensity of 120 mW/cm<sup>2</sup> and frequency of 41 kHz

\*  $p < 0.05$ , compared with baseline.

Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.



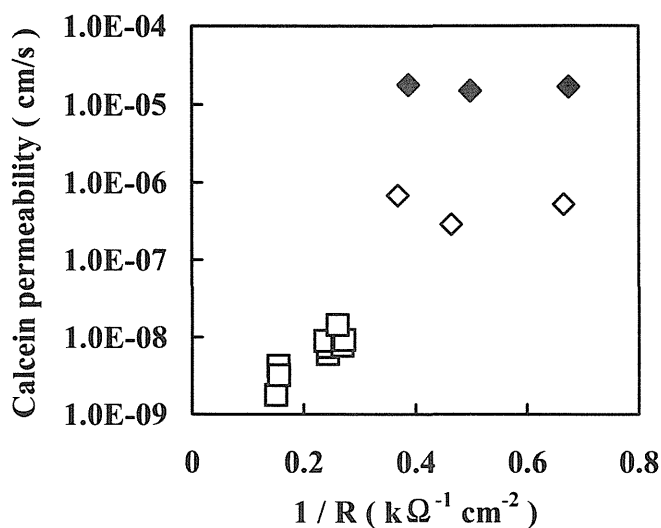


Fig. 7 Relationship between calcein permeability and skin resistance across the hairless rat skin

◆during sonophoresis, ◇post-sonophoresis, □control

値を示した (Fig. 7)。従って、Fig. 7 の結果、さらには Fig. 3 に示した強度  $60 \text{ mW/cm}^2$  での照射では抵抗値の変化が見られないという結果から、US 照射による促進効果は皮膚電気抵抗値の低下、すなわち SC 構造の変化や水和の亢進だけでは説明することができず、US 照射時に一過的に生じる他の要因、特に周波数に関連するものが促進効果に働いていることが推測された。

以上の結果より、US は用いる周波数や強度によって促進効果を調節することが可能であり、また照射時のみに強い効果を示すことから、親水性化合物の皮膚透過促進方法として有用である可能性が明らかとなった。

### 第3節 皮膚透過促進効果と溶媒透過の関係

US 照射によって媒質中に溶媒の流れが発生することが知られている<sup>20,29)</sup>。そこで、親水性化合物の透過に関連すると考えられる溶媒流の関与を明らかにするために、重水素ラベルした水 ( $D_2O$ ) を溶媒として透過実験を行った。Fig. 8 に 41 kHz、 $120 \text{ mW/cm}^2$  の US 照射時のカルセインおよび  $D_2O$  の flux 変化を示す。カルセインと  $D_2O$  の flux は US 照射により一過的に増大し、その flux の変化も類似しており、さらに照射を中止することでベースライン付近まで回復することが明らかとなった。この結果から、カルセインと  $D_2O$  透過の関係を評価した。Fig. 9 に示すように、US 照射前、照射中、照射後にわたりカルセインと  $D_2O$  の透過係数の間に良好な相関性が認められたことから、US による促進効果には溶媒の流れが関係していることが明らかとなった。そこで、この溶媒流を詳細に特徴付け、さらに皮膚構造への影響の関与を明らかにする

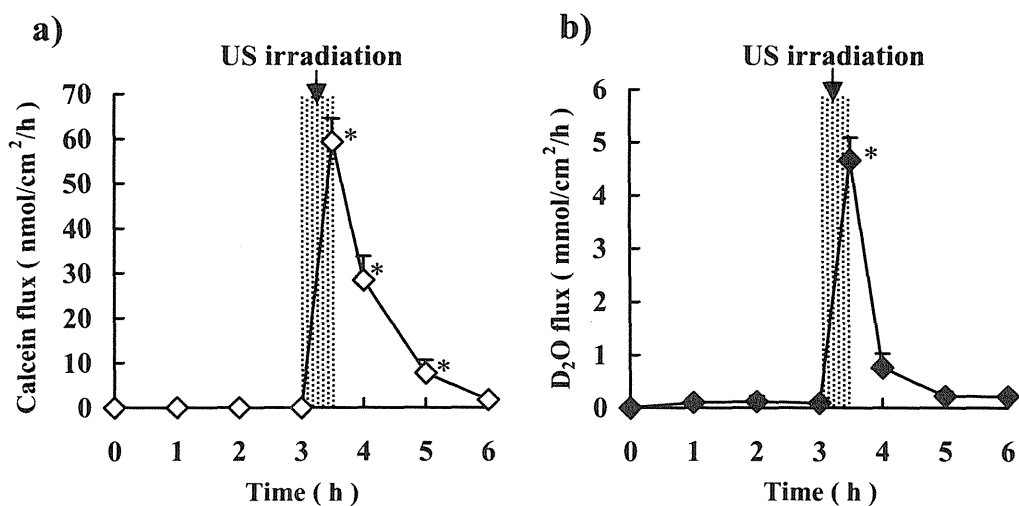


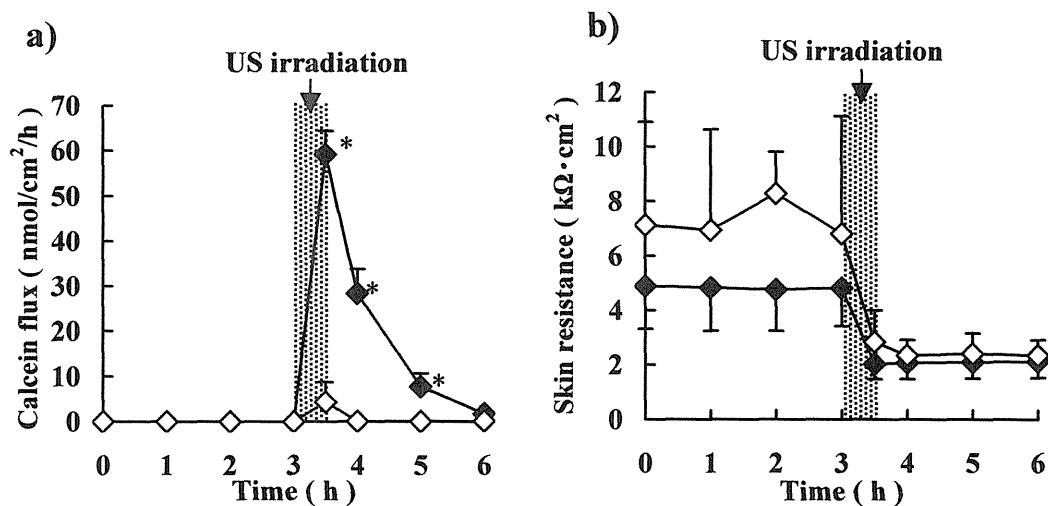
Fig. 8 Calcein (a) and  $D_2O$  fluxes (b) across the hairless rat skin at intensity of  $120 \text{ mW/cm}^2$  and frequency of 41 kHz

\*  $p < 0.05$ , compared with baseline.

Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.



一能には直接関係していない可能性が考えられた。そこで、US エネルギーが直接 SC に当たらない条件でも促進効果が得られるのかどうかを確認した。Fig. 12 に真皮側に US を照射した場合の、カルセイン flux および皮膚電気抵抗値の変化を、SC 側に照射したときの結果と比較して示す。真皮側に US を照射しても伝播方向へのカルセインの皮膚透過は全く促進されず、このとき皮膚電気抵抗値も有意な変化を示さなかった。これらのことから、US により高い促進効果を得るためには、SC が US に直接暴露される必要があるものと考えられた。

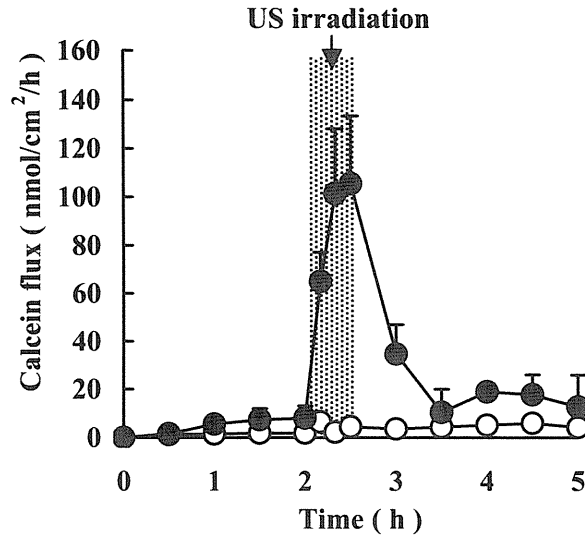


**Fig. 10 Calcein flux (a) and skin resistance (b) across the hairless rat skin in the US irradiation to SC**

◆SC to dermis, ◇dermis to SC

\*  $p < 0.05$ , compared with calcein flux in the direction of dermis to SC.

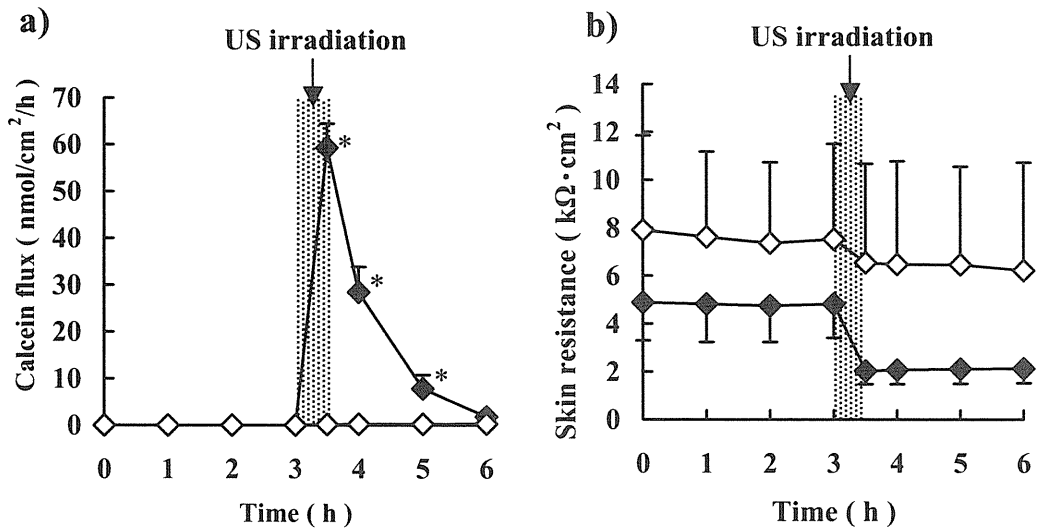
Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.



**Fig. 11 Calcein flux across the hairless rat skin in the US irradiation to stripped skin**

●epidermis to dermis, ○dermis to epidermis

Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.



**Fig. 12 Calcein flux (a) and skin resistance (b) across the hairless rat skin in the US irradiation to either SC (◆) and dermis (◇)**

\*  $p < 0.05$ , compared with calcein flux in the US irradiation to dermis.

Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments.

## 第4節 本章の小括および考察

本章では最初に、振動子に最適の駆動周波数をキャビテーション発生量を指標として用いて決定した。その結果、今回作製した3種のhornタイプ振動子に最適の周波数は41、158 および 445 kHz であることがわかった (Fig. 2)。

これら周波数を用いて、親水性化合物カルセインの皮膚透過に対するUSの周波数および強度の影響を検討した。Fig. 3の結果から明らかのように、カルセインの皮膚透過はUS照射によって一過的に促進され、その促進効果は周波数により異なり、低い周波数でより高い促進効果を示すことが明らかとなった。またFig. 4に示すように、US強度を変えた場合、41 kHzではUS照射中のカルセイン皮膚透過係数が強度の増大に伴って増加したが、158 および 445 kHzでは強度によらず一定の促進効果を示した。これらの結果から、照射するUSの周波数や強度が水溶性化合物の促進効果に大きく影響することが明らかとなった。このようなUS条件による促進効果の違いはTezelらによっても報告されており、その原因として促進効果発現には最低限必要とされるUSエネルギー、すなわち閾値エネルギーが存在し、これが周波数によって異なるためであると説明している<sup>36)</sup>。彼らは19.6~93.4 kHzの周波数を用いて実験を行い、それぞれの周波数における閾値エネルギーが、19.6 kHzで10 J/cm<sup>2</sup>、36.9 kHzで63 J/cm<sup>2</sup>、58.9 kHzで103 J/cm<sup>2</sup>、76.6 kHzで304 J/cm<sup>2</sup>、そして93.4 kHzで1305 J/cm<sup>2</sup>であることを明らかにした。本研究で用いたエネルギー (J/cm<sup>2</sup>) を照射強度 (W/cm<sup>2</sup>) と照射時間 (sec) から算出すると、60 mW/cm<sup>2</sup>のとき108 J/cm<sup>2</sup>、120mW/cm<sup>2</sup>のとき216 J/cm<sup>2</sup>、そして240 mW/cm<sup>2</sup>では324 J/cm<sup>2</sup>であったことから、158 および 445 kHzでは照射したUSエネルギーが閾値エネルギーよりも低かったために、得られた促進効果が低く、強度を上げてその効果に変化しなかった可能性が考えられる。

近年、低周波数の20 kHz USを用いたソノフォレーシスの促進効果には、皮膚の構造変化に加えて、溶液中に発生するconvective flowも関与している可能性が報告されている<sup>35)</sup>。本研究においても、41 kHz、120 mW/cm<sup>2</sup>の条件を用いてカルセインの透過と皮膚電気抵抗値の関係を評価したところ (Fig. 7)、US照射中のカルセイン透過係数の増加は抵抗値の低下から予測される値よりも有意に高かったことから、促進効

果には皮膚構造への影響だけでなく何らかの付加的な駆動力が関与していることが考えられた。そこで、促進効果と溶媒透過の関係について検討した結果、カルセインと D<sub>2</sub>O の透過は良好な相関性を示したことから (Figs. 8 and 9)、カルセインは溶媒の流れによって皮膚を透過していることが示唆された。さらに、カルセインの透過は US 伝播方向の透過がその反対方向の透過よりも高いことから (Fig. 10)、US 照射により溶質の皮膚透過は伝播方向に特異的に促進されることが明らかとなった。同様の方向性が透過バリアーである SC を取り除いたストリプトスキンでも認められたことから (Fig.11)、US による促進効果に SC のバリアーが直接関与していない可能性が考えられた。しかし、SC に直接 US エネルギーを暴露しない真皮側照射では、US 照射によるカルセインの皮膚透過の増大が全く認められなかった (Fig. 12)。Mitragotriらは 20 kHz US のマンニトール皮膚透過促進は皮膚電気伝導度の増大、すなわち SC 構造の変化によるものであることを報告している<sup>40)</sup>。従って、これらの知見を総合すると US 照射によって、SC の構造変化や水和の亢進が生じることが、高い促進効果を得るためには必要であることが考えられた。

これまでに US 照射は薬物の皮膚透過促進における前処理法として非常に有用であると考えられていたが<sup>27,34,41)</sup>、本章において、低周波数、低強度の US は伝播方向へ溶媒流を発生させ、その溶媒牽引効果により親水性化合物の透過を一過的に促進することが明らかとなり、US が照射時のみに皮膚を介して薬物を送達する、駆動力として利用できる可能性が示唆された。

## 第2章 超音波によって促進される皮膚透過経路の検討

前章において、US は照射中にその伝播方向への溶媒流を生じ、溶媒牽引により溶質の皮膚透過を促進し、薬物の皮膚透過を促進する駆動力として利用可能であることが明らかとなった<sup>42)</sup>。さらに、高い促進効果を得るためには薬物皮膚透過のメインバリアーである SC が US に直接暴露されることが必要であった。一方、41 kHz US で認められたように、分子量 623 のカルセインに対する 3000 倍 ( $120 \text{ mW/cm}^2$ ) に達する非常に高い促進効果は、従来の薬物皮膚透過の概念<sup>43)</sup>、すなわち、分子量 500 以上の薬物に適用することは困難であるという考え方に照らすと、それをはるかに超越したものである。これまでに 20 kHz の US が親水性高分子の皮膚透過を促進することが明らかになっているものの、これら高分子がどのように皮膚を透過するかについてはほとんど明らかになっていない。

そこで本章では、水力学的細孔理論を用いて親水性化合物の透過経路について考察し、さらに分子量 4 万までの FITC-ラベルしたデキストランを用いて US がどの程度の大きさの分子まで皮膚透過を促進することが可能であるのかを明らかにし、さらに、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてどのような部位を通過して透過が起こっているのかを観察した。

### 第1節 水力学的細孔理論を用いた考察

Manabe らは 20-100%のエタノール-水混合系<sup>44)</sup>またはイオントフォーシス<sup>45)</sup>による経皮薬物吸収促進効果に対する水の体積流の影響を Kedem-Katchalsky の式に基づく水力学的細孔理論<sup>46)</sup>によって解析し、その結果から皮膚中に作成された細孔経路の大きさを見積もることによって薬物の透過経路を考察した。US による促進効果にも溶媒牽引効果に関与していることが明らかとなっているため、促進効果と溶質分子量の関係の検討に、この考え方をを用いて同様に評価することが可能であると考えられる。



細孔経路を介した薬物の透過が溶質濃度勾配を駆動力とする拡散の項とある種の条件下で生じる溶媒流項の和からなるという、水力学的細孔理論の考え方によると、定常状態における薬物の皮膚透過は脂質経路および細孔経路を介した拡散の項と溶媒流による透過の項の和で表すことができる (式 1)。

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

ここで、 $CL_{\text{drug}}$  は薬物の透過クリアランス、 $CL_L$  は脂質経路を介した薬物の透過クリアランス、 $CL_P$  は細孔経路を介した薬物の透過クリアランス、 $\delta$  は薬物に対する皮膚の反発係数、および  $J_{\text{solvent}}$  は溶媒の flux である。(1) 式に基づいて溶媒 flux と薬物のクリアランスをプロットすると傾き  $1 - \delta$  の直線を得ることができ、得られた  $\delta$  から細孔経路の半径を Levitt 式を用いて算出することが可能である<sup>47)</sup>。 $\delta$  は膜の細孔と溶質の両者のサイズによって決まる係数であるため、溶質分子のサイズが大きくなると透過は低下し、 $\delta$  値は大きく、すなわち回帰直線の傾きが小さくなると考えられる。従って、分子量の異なる溶質を用いて細孔半径の見積りを行えば、US により促進されている透過経路を考察することができる。SC 側溶液中には溶媒の流れを感度良く正確に評価するためにトリチウムラベルした水 ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ) をトレーサーとして添加した。カルセイン (MW 623)、fluorescein isothiocyanate-dextrans (MW 4400; FD-4 and MW 38000; FD-40) 溶液を SC 側、PBS を真皮側に適用し、透過実験を行った。Fig. 13 に周波数 41 kHz で US 強度を 60、120、300、そして  $60 \text{ mW/cm}^2$  と段階的に変えてそれぞれ 30 分間照射した (総照射時間 2 時間) ときのカルセインおよび  $^3\text{H}_2\text{O}$  flux 変化を示す。カルセイン flux は照射強度の増大に伴って、それぞれコントロール ( $1.1 \times 10^{-2} \text{ nmol/cm}^2/\text{h}$ ) の約 120 倍、約 8900 倍、約 23000 倍および約 5100 倍まで増加した。また、 $^3\text{H}_2\text{O}$  flux はそれぞれコントロール ( $8.1 \times 10^{-2} \text{ mmol/cm}^2/\text{h}$ ) の約 2 倍、約 74 倍、約 140 倍および約 20 倍まで増大し、照射を中止することでコントロール付近まで回復した。この結果は、41 kHz US 照射によるカルセインおよび  $^3\text{H}_2\text{O}$  の透過促進効果は強度  $300 \text{ mW/cm}^2$  まで一過的であり、US 照射中のカルセインと  $^3\text{H}_2\text{O}$  の透過パターンが一致していることを示している。Fig. 13 の flux データを適用濃度と有効拡散面

積を用いてクリアランスデータに変換し両者の関係を解析すると、US 照射中のカルセイン透過クリアランスと  $^3\text{H}_2\text{O}$  flux との間には良好な相関性が認められ、このとき回帰直線の傾きは約 1 であった (Fig. 14)。この結果から、溶媒の動きと溶質の動きが完全に一致していることが明らかとなった。すなわち、皮膚に対するカルセインの反発は溶媒のそれと変わらないものであった。Levitt 式は、溶媒分子と溶質分子の膜透過が両者の分子サイズの違いに起因して異なることを想定している。しかし、今回の実験結果は両者の透過が一致しており、式を適用できない系であったことから、Levitt 式<sup>47)</sup>による細孔半径の見積りは不可能であった。さらに、US 照射中の溶媒 flux ( $1465 \pm 512 \mu\text{L/h}$ ) はコントロール ( $12 \pm 5 \mu\text{L/h}$ ) に比べ顕著に増大しており、US 照射中には分子量 623 のカルセインが皮膚からの反発を受けることなく透過することが明らかとなった。

同様の実験を FD-4 および FD-40 を用いて行ったところ、いずれの溶質も  $^3\text{H}_2\text{O}$  flux と良好な相関を示し、その回帰直線の傾きは約 1 であった (Table 1)。US によりこのような高分子が何の抵抗も無く溶媒と同じ様に皮膚を透過する現象はこれまでに報告されていない。また、US には物質を破壊する作用もあることからこれらの溶質が分解され、free の fluorescein や低分子量化した FD の透過が特異的に促進されている可能性も考えられる。そこで、US 照射後のレーザー溶液中に FDs の分解物が存在するかどうかを Gel Permeation Chromatograph 法 (GPC) により確認した (Fig. 15)。FD-4 および FD-40 の US 照射前のドナー溶液中のピーク fraction はそれぞれ No. 30 (Fig. 15a) および No. 26 (Fig. 15c) であり、US 照射後のレーザー溶液で得られたピーク位置も全く同じであった (Figs. 15b and d)。この結果より、41 kHz、 $300 \text{ mW/cm}^2$  の US 照射により、FD-4 および FD-40 は intact な状態で皮膚を透過していることが確認された。

以上の結果より、41 kHz US 照射中の親水性高分子の透過している部位の細孔径および形状は分子量 4 万の FD-40 が透過できる状態にあると考えられた。

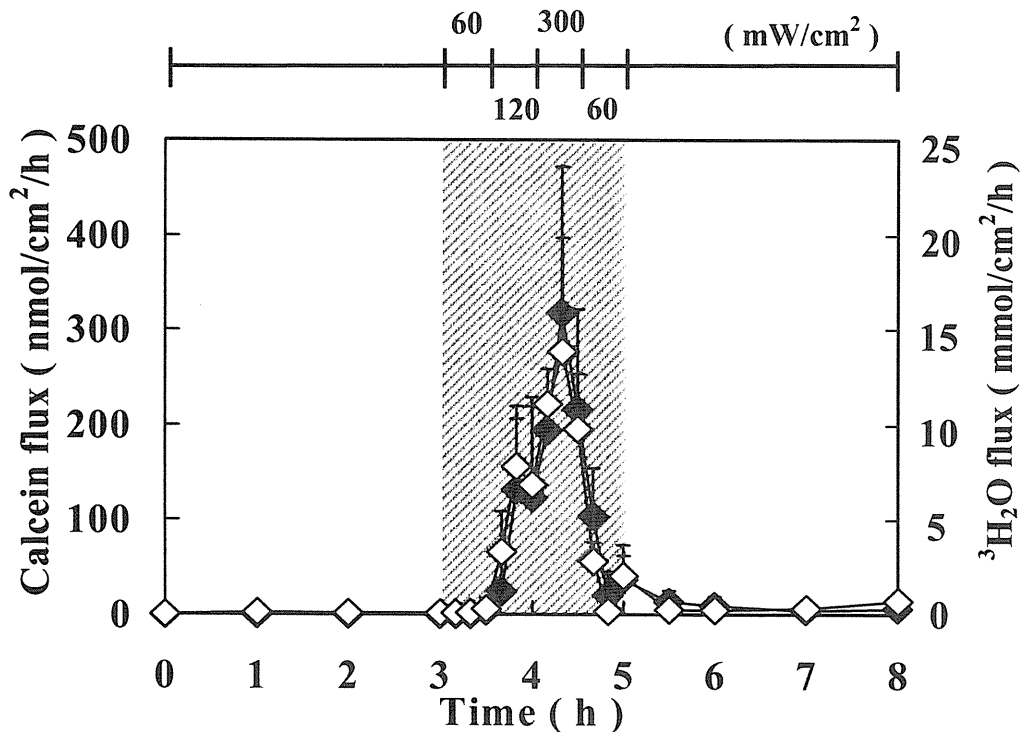


Fig. 13 Time course of calcein (◆) and <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O (◇) flux through hairless rat skin at frequency of 41 kHz  
 Each data point represents the mean ± SD of four experiments.

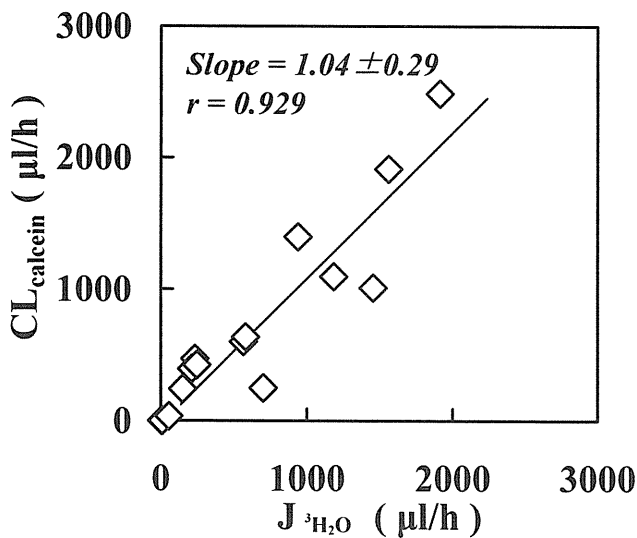


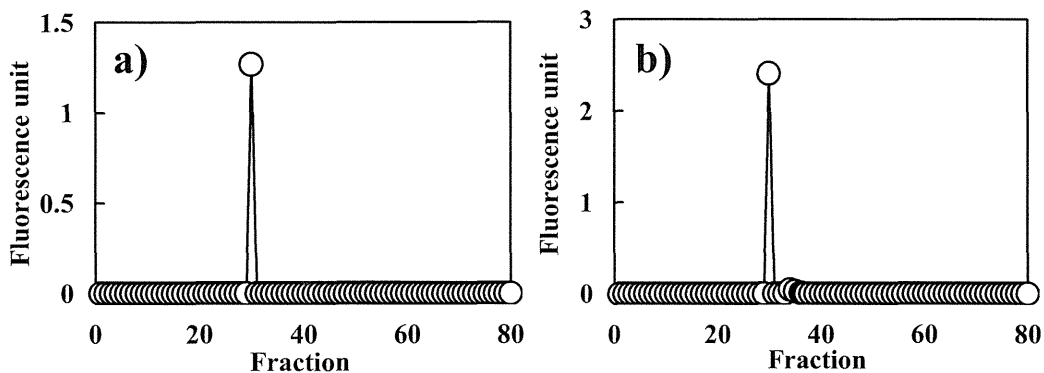
Fig. 14 Relationship between <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O flux and calcein clearance across the hairless rat skin

**Table 1** Slope and correlation coefficient (*r*) of the  $^3\text{H}_2\text{O}$ -solute clearance plots for calcein, FD-4 and FD-40.

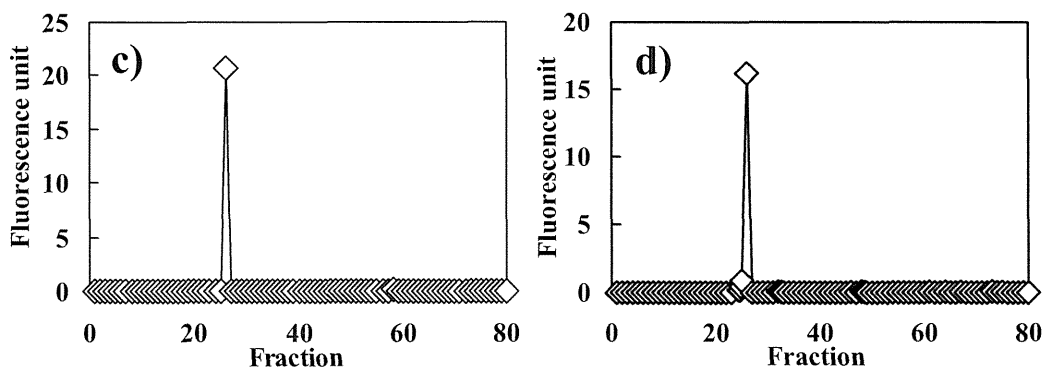
	Calcein (MW 623)	FD-4 (MW4400)	FD-40 (MW 38000)
Slope	$1.04 \pm 0.29$	$1.07 \pm 0.17$	$1.08 \pm 0.23$
<i>r</i>	0.929	0.923	0.974

Each data point represents the mean  $\pm$  SD of four experiments

### FD-4



### FD-40

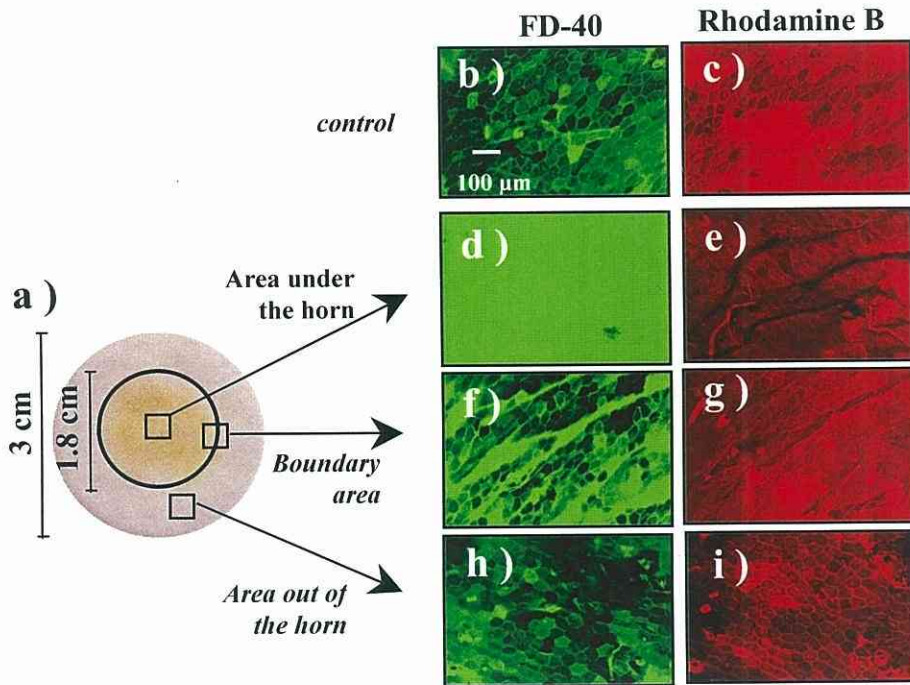


**Fig. 15** Fluorescence gel permeation chromatograms for FD-4 (a, b) and FD-40 (c, d) in the donor solution before US irradiation (a, c) and receiver solution after US irradiation (b, d)

Each fraction represents one minute.

## 第2節 共焦点レーザー走査型顕微鏡による評価

本来皮膚はバリアーとして機能していることを考えると、一般的に分子量4万もの親水性高分子が皮膚を何の抵抗も無く透過することは考え難い。そこで、FD-40 溶液を適用し US (41 kHz、120 mW/cm<sup>2</sup>) を照射した皮膚について、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて透過経路の視覚的な観察を行った。なお、US による SC への影響を評価するために、US 照射後に溶液をローダミン B 溶液に置換し、2 時間後染色した皮膚を観察した。



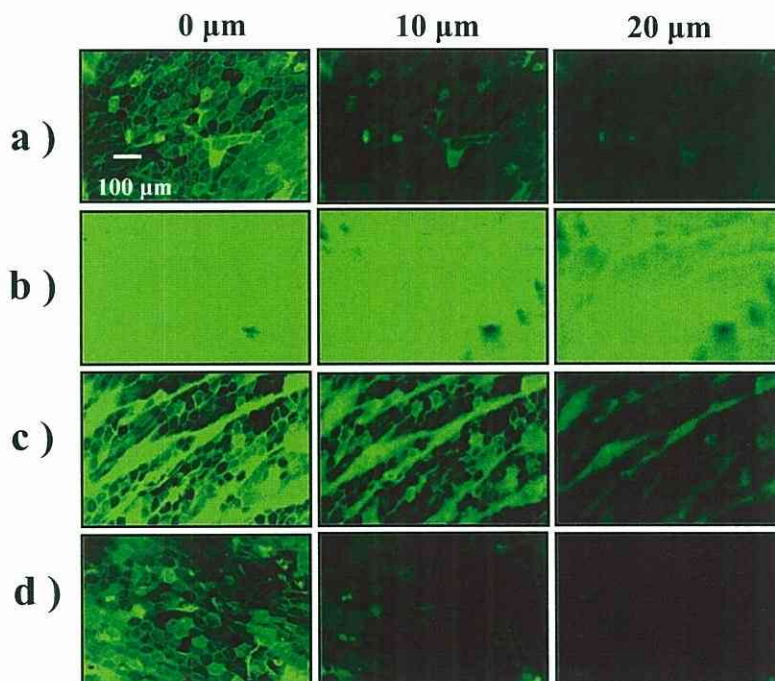
**Fig. 16 Skin surface images observed by (a) digital camera and (b-i) confocal microscopy. Image of the entire transport area obtained after US irradiation at 41 kHz and 120 mW/cm<sup>2</sup> for 30 min**

Confocal images obtained following passive diffusion of FD-40 (b) and rhodamine B (c) for 12 h and 2 h, respectively. (d-i) Confocal images obtained after sonophoresis of FD-40 at 41 kHz and 120 mW/cm<sup>2</sup> for 5 min (d, f and h) followed by passive delivery of rhodamine B for 2 h (e, g and i). As shown in panel (a), the confocal observations were carried out in three different areas, the area under the horn (d, e), the boundary area (f, g), and the area outside the horn (h, i), and each area was examined. All confocal images were obtained at a magnification of  $\times 200$ .

Figure 16a は 41 kHz US を強度  $120 \text{ mW/cm}^2$  で 30 分間照射後の典型的なヘアレスラット皮膚表面の digital camera 画像を示している。Horn 直下の US 照射領域（円で囲まれた部分）では非常に強い FD-40 による着色が観察され、一方、horn 周辺領域では着色はほとんど認められなかった。そこで、皮膚を horn 直下、境界、および周辺領域の 3 つに分け、共焦点レーザー走査型顕微鏡により観察した。Figs. 16b-i は、SC 側に FD-40 を適用し 5 分間、41 kHz US ( $120 \text{ mW/cm}^2$ ) を照射し、さらにローダミン B で後染色した皮膚表面の FD-40 (b, d, f および h) とローダミン B (c, e, g, および i) 共焦点顕微鏡画像を示している。Fig. 16b は US 照射をしていないコントロールにおける FD-40 の皮膚表面画像を示している。画像中に SC の特徴的な構造である角化細胞の六角形構造が明らかに認められる。Horn 直下領域では FD-40 の強い蛍光が SC 全体に広がっていた (Fig. 16d)。一方、同じ部位で得たローダミン B の後染色画像より、SC の六角形構造のゆがみや崩壊は起こっていなかったが、裂け目様の構造変化が認められた (Fig. 16e)。境界領域では FD-40 の蛍光は直下領域に比べ弱くなっているが、コントロールと比べると強い蛍光が認められた (Fig. 16f)。また、ローダミン B 画像よりこの領域においても SC に裂け目様の構造変化が認められ (Fig. 16g)、その部位に FD-40 の蛍光が集中していた。Horn 周辺の領域では FD-40 (Fig. 16h) およびローダミン B (Fig. 16i) 画像ともに、コントロールと同等の蛍光分布が得られた。

Figure 16 で観察した皮膚と同一部位における、異なる深度 (0, 10, 20  $\mu\text{m}$ ) での FD-40 蛍光画像を Fig. 17 に示す。コントロール画像 (Fig. 17a) に比べ、horn 直下領域 (Fig. 17b) では非特異的に SC 全体を介して深部まで FD-40 が浸透していることが明らかとなった。また、境界領域では蛍光は弱くなっているが、裂け目様の構造変化が認められた部位を介して 20  $\mu\text{m}$  の深部まで FD-40 が浸透していた (Fig. 17c)。一方、horn 周辺領域では FD-40 の蛍光強度はコントロールと同等であり、US による浸透の増加は認められなかった (Fig. 17d)。

以上の結果から、US 照射によって親水性化合物は horn 直下の SC 全体を非特異的に浸透していることが示唆され、さらに部分的な構造変化が認められた領域も透過経路として関与しているものと考えられた。一方、US が直接当たっていない horn 周辺



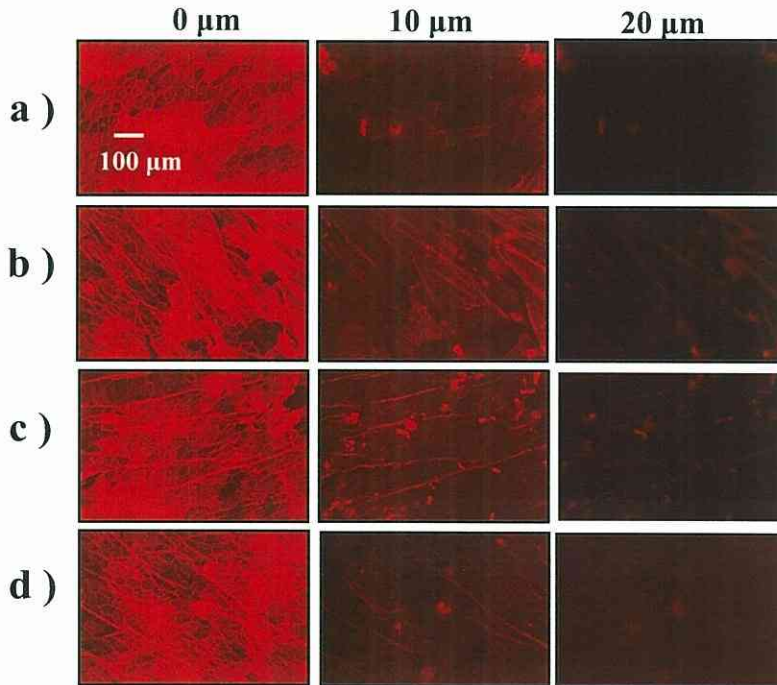
**Fig. 17 Confocal images of the SC at depth with FD-40**

(a) Confocal images obtained following passive diffusion of FD-40 for 12 h. (b, c, and d) Confocal images obtained after sonophoresis of FD-40 at 41 kHz and 120 mW/cm<sup>2</sup> for 5 min. (b) images of the area under the horn, (c) the boundary area, and (d) the area outside the horn. All confocal images were obtained at a magnification of  $\times 200$ .

部位では FD-4 および ローダミン B の蛍光画像はコントロールと同様であり、親水性化合物の浸透も皮膚構造の変化も起こっておらず、US による促進効果は US 照射部位に限定されていることが明らかとなった。

Figure 18 に親油性化合物ローダミン B を拡散セルのドナー側に適用し、41 kHz、120 mW/cm<sup>2</sup> の US を 5 分間照射したときの皮膚を異なる深度 (0、10、20  $\mu\text{m}$ ) で観察したときの蛍光画像を示す。FD-40 に比べ、ローダミン B の場合、US horn 直下領域および境界領域においても蛍光分布はコントロールとほぼ同程度であり、US による浸透の増大は認められなかった。この結果は、ローダミン B の皮膚中分布が脂溶性領域であり、この部位の透過が US 照射によって有意な影響を受けないことを示している。もちろん、ローダミン B は水溶性ルートも経由して透過するが、その寄与





**Fig. 18 Confocal images of the SC at depth with rhodamine B**  
 (a) Confocal images obtained following passive diffusion of rhodamine B for 12 h. (b, c, and d) Confocal images obtained after sonophoresis of rhodamine B at 41 kHz and 120 mW/cm<sup>2</sup> for 5 min. (b) images of the area under the horn, (c) the boundary area, and (d) the area outside the horn. All confocal images were obtained at a magnification of  $\times 200$ .

が小さいため共焦点レーザー走査型顕微鏡の観察ではUS照射の影響が認められなかったものと考えられる。

### 第3節 本章の小括および考察

前章でUSは親水性化合物の皮膚透過に対して非常に高い促進効果を示し、その効果は溶媒牽引によることが明らかになったため、水力学的細孔理論の考え方をを用いて分子量の影響を試験し、透過経路を考察した。Fig. 14に示すようにカルセインクリア



ランスと  $^3\text{H}_2\text{O}$  flux の間に良好な相関が認められ、回帰直線の傾きが約 1 となったことから、US 照射中カルセインは溶媒と全く同じ様に、皮膚から反発を受けずに透過することが明らかとなった。また、41 kHz US 照射時の溶媒 flux は 60、120、および 300  $\text{mW}/\text{cm}^2$  で、それぞれ  $19 \pm 40$ 、 $757 \pm 453$ 、および  $1465 \pm 512$   $\mu\text{l}/\text{h}$  であった。これは経皮吸収促進のために用いられているイオントフォーシス ( $\sim 0.5$   $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) で得られる値よりも 100 倍以上高く<sup>45)</sup>、US により非常に大きい溶媒流が起こっていることが示された。しかし、分子量 623 のカルセインが溶媒と全く同じように皮膚を透過することから、US はより分子量の大きい親水性化合物の皮膚透過も促進するものと考えられた。そこで、先に述べたように、分子量の増大から期待される  $\delta$  値の低下をもとに、US がどの程度の分子量まで促進できるかという推定を試みたところ、Table 1 に示したように、US は分子量 4 万までの親水性化合物のヘアレスラット皮膚透過を水と全く同様に促進することがわかった。Fig. 15 に示したように、真皮側に透過してきた FD-4 および FD-40 は US 照射による分解などを受けておらず intact であった。これらの結果から、41 kHz US 照射中は、SC 中に分子量 4 万もの分子が容易に透過できる経路が存在しているものと考えられた。

皮膚を介した薬物の透過経路は、角化細胞間を満たした脂質経路、脂質間に存在すると考えられている細孔経路、および毛のうや汗腺のような皮膚付属器官に大別される。このうち、薬物の主な透過経路は脂質および細孔経路を介した拡散であり、親水性薬物に対しては細孔経路が主な透過経路になっていると考えられている<sup>48)</sup>。Manabe らが行った解析では、皮膚に存在する細孔経路の大きさは  $0.69 \pm 0.60$  nm であり<sup>49)</sup>、空腸や直腸のそれ<sup>50)</sup>の約 1/2 であった。さらに、これらの組織における水のクリアランスの比較から、皮膚における細孔経路の占有率は空腸や直腸の 1/25 $\sim$ 1/50 であることが報告されている。このような皮膚の性質を考慮すると、US が FD-4 や FD-40 の皮膚透過をほとんど抵抗が認められない状態で促進することは考え難いことである。Fig. 16d に示すように 41 kHz、120  $\text{mW}/\text{cm}^2$  の US を 5 分間照射後の FD-40 の蛍光は horn 直下では SC 全体に一樣に広がっており、20  $\mu\text{m}$  の深部までそのまま浸透していた (Fig. 17b)。この結果は、US が SC の角化細胞と細胞間脂質を区別することなく、非特異的に溶質の透過を促進していることを示している。しかし、これまで

の皮膚透過促進経路の考え方によると、角化細胞は主な薬物透過経路として考えられていないため、その可能性について裏づけが必要である。Bouwstra らは<sup>51)</sup>SC が高度に水和した条件下（～300%）では角化細胞が著しく膨潤し、水性経路を形成していることを報告した。さらに、Warner らは<sup>52)</sup>SC の水和が角化細胞の水和を導くと同時に細胞間脂質の水和を引き起こし、cisternae と呼ばれる細胞間脂質の構造的な変化を伴った水の pool を形成することを示した。US が SC への水の移行を顕著に増すことを考慮すると、US が直接影響している horn 直下で同様に著しい角化細胞と細胞間脂質の水和が起こっていることが推定される。

ローダミン B の後染色画像から明らかのように、US horn 直下領域の皮膚表面に裂け目様の構造変化が認められ (Figs. 16e and g)、このような部位に FD-40 の蛍光が集中していた (Fig. 17c)。41 kHz、120 mW/cm<sup>2</sup> の US 照射により、前章で示したように皮膚の電気抵抗値が約 1/2 に低下することや、<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O の透過係数が US 照射後、コントロールの約 4.5 倍高くなっている（データは示していない）ことを考慮すると、この条件の US はある程度の SC 構造変化 (SC の水和亢進、角化細胞の水和増大、cisternae の発生など) を引き起こすことが考えられた。

以上の結果より、低周波数 US は、SC の水和の亢進と部分的な構造変化を同時に引き起こし、それらの結果として親水性化合物の透過領域が拡大し、水の流れが増大する環境が生じることにより、溶媒流が亢進して親水性高分子の皮膚透過が促進するものと考えられた。

一方、ローダミン B 存在下で US を照射したとき、いずれの領域においても浸透の増大は認められなかった (Fig. 18)。この結果は、US が親油性薬物の皮膚透過を有意に促進しないという報告<sup>19,21,33)</sup>と一致するものの、US が SC への溶媒の移行を増大していることを考えると、ローダミン B のような親油性化合物であっても US horn 直下では、溶媒とともに非特異的に角質層に分布すると予期される。しかし、US によって誘導される経路は親水性であり、脂溶性化合物であるローダミン B のその領域を介した透過は相対的に低いため、共焦点顕微鏡を用いた観察では US 照射による影響が認められなかったものと考えられる。US の促進効果が溶媒流によるものであるというこれまでの結果から、低周波数ソノフォレーシスが水の溶解性に乏しい親油性化

合物に対する促進法としては適したものではないということは予測されるが、今後透過性を含めた詳細な検討が必要である。

本章の結果より、経皮吸収の old dogma にある吸収される分子サイズの限界が 1000 であるという考え方に相違して、41 kHz US は分子量 4 万までの親水性高分子のヘアレスラット皮膚透過を顕著に増大することが明らかとなった。これは US 照射部位で、US が SC 中への水の移動を非特異的に増大し、さらに新たな透過経路を形成しているためであると考えられた<sup>53)</sup>。

### 第3章 超音波による皮膚透過促進効果とキャビテーションの関係

US を液体中に照射すると、温熱効果、振とう作用、キャビテーション、放射圧、音響流など様々な物理現象が生じる<sup>20,30)</sup>。この中で、前章までに得られた促進効果に関与するのは、US 伝播方向へ溶媒の流れを発生させるような現象、すなわち、キャビテーション、放射圧、音響流が考えられる。放射圧はUS 伝播領域中に置かれた物体を物理的に押す力であり、音響流はUS が媒質を伝播中に吸収、拡散などを受けて生じるエネルギーの密度差によりバルク中に発生する流れである。しかし、これらの現象は MHz 領域の高周波数で主に発生するものであり、低周波数でより高い促進効果が得られるという前章までの結果からみると、促進効果の発現に対する寄与は大きくないと考えられる。一方、キャビテーションは低周波数域で発生しやすく、周波数の増大に伴って指数関数的に発生し難くなるという性質を持つ<sup>20,39)</sup>ことから、促進効果にはこの現象が主に関与していることが考えられる。そこで、キャビテーションに焦点を当てて、促進効果との関係を検討した。

音波は疎密波であり、媒質中に伝播させると周期的に密度の高い、高圧の部分と、密度の低い、低圧の部分が現れる (Fig. 19)。この低圧領域で液体中にほとんど真空の気泡が発生し、これをキャビテーションと呼ぶ。キャビテーションは、**stable** キャビテーションと **transient** キャビテーションの二つに大きく分けられる。**Stable** キャビテーションは気泡の平均半径がほとんど変化せず、圧壊を伴わない振動のみをする気泡である。一方、**transient** キャビテーションは繰り返される高圧、低圧領域で圧縮と膨張を繰り返し (US 周波数の数サイクルで急速に成長)、ある一定の大きさになると高圧相で急激に押し潰されて圧壊する気泡である<sup>20)</sup>。Tezel らは低周波数 (20-100 kHz) ソノフォレーシスにおいて、**acoustic spectroscopy** による測定で **transient** キャビテーションの指標となる **broadband** ノイズが皮膚伝導度の増大と良好な相関を示すことから、促進効果には **transient** キャビテーションが主要な役割を果たしている<sup>31)</sup>と示唆している。キャビテーションが圧壊すると、媒質中に局所的な高温、高圧の部位および等方性の衝撃波を発生する。バルク中でキャビテーションの圧壊を生じても方向性のあ

る媒質の流れを起さないが、この圧壊が固体と液体の界面で発生した場合、気泡は非対称に崩壊し、固体表面の壊食および表面方向へ数百 m/s にも達するほどの速い流れである、マイクロジェットが発生する (Fig. 20) <sup>54)</sup>。前章までに得られた一過的な促進効果には、このように生じる溶媒の流れが関係していることが考えられる。

本章では、まず種々条件下でのバルク中キャビテーション発生量を測定し、発生量と促進効果との関係性を評価した。次いで、当然予想されるキャビテーション発生と溶媒流との関係を明らかにするため、固体-液体界面でのキャビテーション非対称圧壊に伴うマイクロジェットの発生を検討し、US 照射と皮膚透過促進機構を考察した。

## 第 1 節 媒質中に発生するキャビテーション量の測定

バルク中のキャビテーション発生量は、US horn と向き合うようにキャビテーションメーターのプローブを設置して測定した。Fig. 21a は第 1 章で用いた 41、158、および 445 kHz の周波数で US を水中に照射したときのキャビテーション発生量を示している。キャビテーション発生量は周波数により異なり、41 kHz で多く、周波数の増加に伴って減少することが明らかとなった。また、41 kHz では強度の増大に伴って発生量も有意に増加したが、158 および 445 kHz では強度を増しても発生量は増加しなかった。Fig. 21b はキャビテーション発生を抑制するために脱気水を溶媒として用いて 41 kHz US を照射したときの発生量を示している。脱気水に US を照射した場合、脱気していない水と比較して 60 および 300 mW/cm<sup>2</sup> では発生量に差は認められなかったが、120 および 240 mW/cm<sup>2</sup> ではキャビテーション発生量が有意に低下した。これらの結果から、41 kHz から 158 および 445 kHz に周波数を上げると、US 照射によるキャビテーション発生量が明らかに減少し、さらに 41 kHz において通常の水では 120 mW/cm<sup>2</sup>、脱気水では 300 mW/cm<sup>2</sup> 程度の強度で発生量が飽和に近付くことが認められ、本研究で用いている条件下でも US 周波数や溶媒の違いによりバルク中キャビテーション発生量が大きく異なることが確認された。

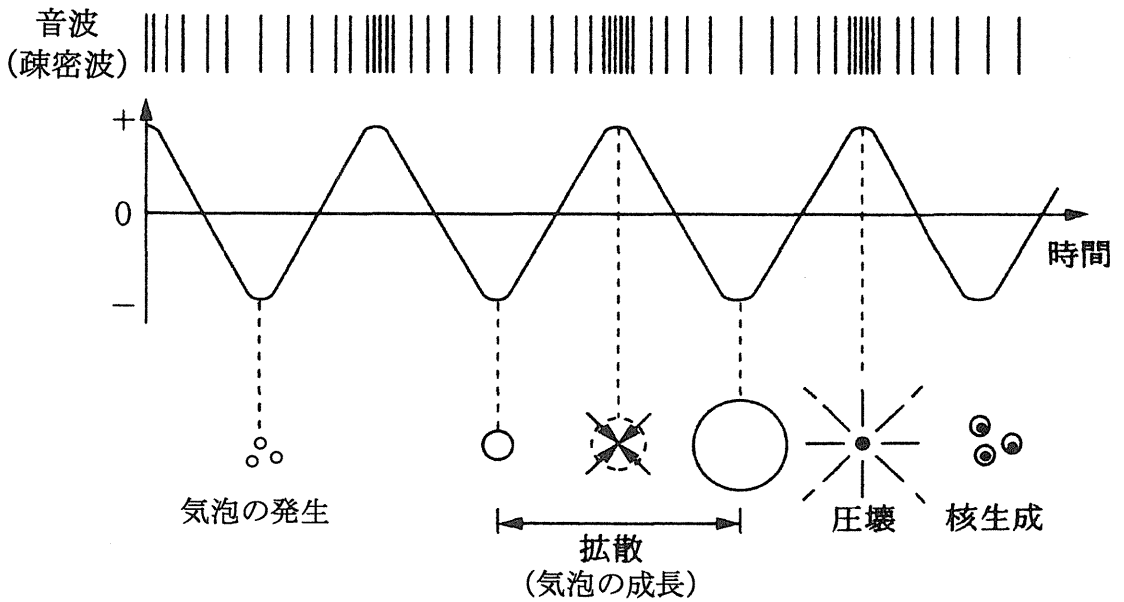


Fig. 19 Cavitation cycles in a series of generation, growth, and collapse<sup>20)</sup>

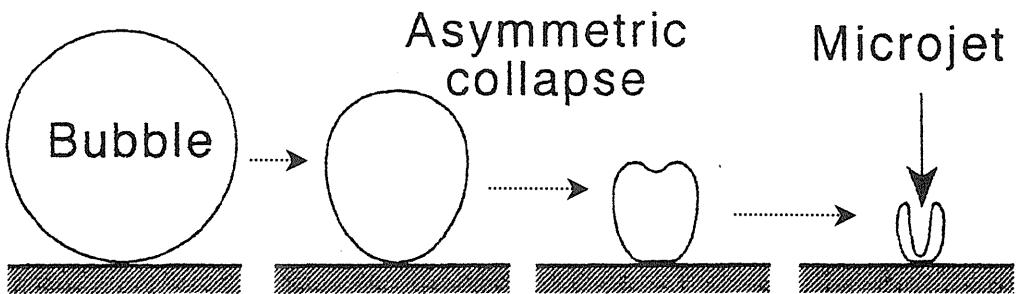
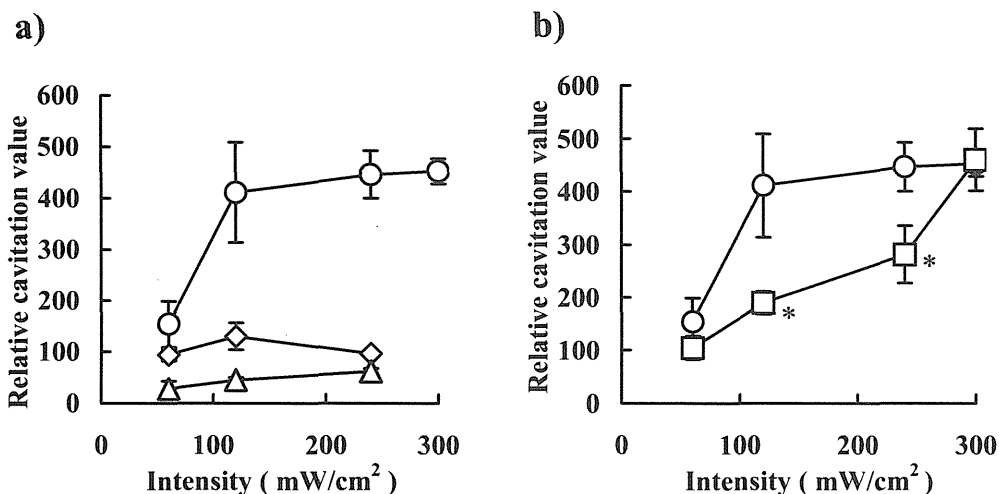


Fig. 20 Schematic diagram showing the occurrence of a microjet when a bubble collapses at surface<sup>54)</sup>

Solid arrow indicates direction of liquid flow at solid-liquid interface.



**Fig. 21 Cavitation generation at various frequency (a) and vehicle (b)**

○41 kHz, ◇158 kHz, △445 kHz, □41 kHz (degassed water)

\*  $p < 0.05$ , compared with non-treated water.

Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three-eight experiments.

## 第2節 キャビテーション発生量と皮膚透過促進効果の関係

親水性化合物の皮膚透過促進効果と前節で得られたキャビテーション発生量との関係を明らかにするために、前節で脱気水に41 kHz USを照射したときに、キャビテーション発生量に有意差の認められた120 mW/cm²と差の認められなかった300 mW/cm²の強度を用いて透過実験を行った。両者の関係をFig. 22に示す。強度120 mW/cm²では脱気水における相対的キャビテーション発生量が411から190に低下し、このときカルセイン透過fluxも206 nmol/cm²/hから16 nmol/cm²/hに低下した。キャビテーション発生量に差の無かった300 mW/cm²では促進効果にも有意な差は認められなかった。これらの結果と第1章で得られた各周波数におけるUS照射中の透過係数を用いて、バルク中のキャビテーション発生量とUS照射中のカルセイン透過係数

の関係をプロットしたところ (Fig. 23)、両者の間に良好な相関が認められた。このことから、周波数によって促進効果が異なる原因が、US 照射に伴って発生するキャビテーション量の相異に関係していることが明らかとなった。以上の結果より、媒質中に発生するキャビテーションが US によるカルセイン皮膚透過促進効果に重要な役割を果たしていることが示され、これまで明らかとなっている透過促進における溶媒流の関与を想起すると、キャビテーション発生と溶媒流の関係について検討することが必要となる。

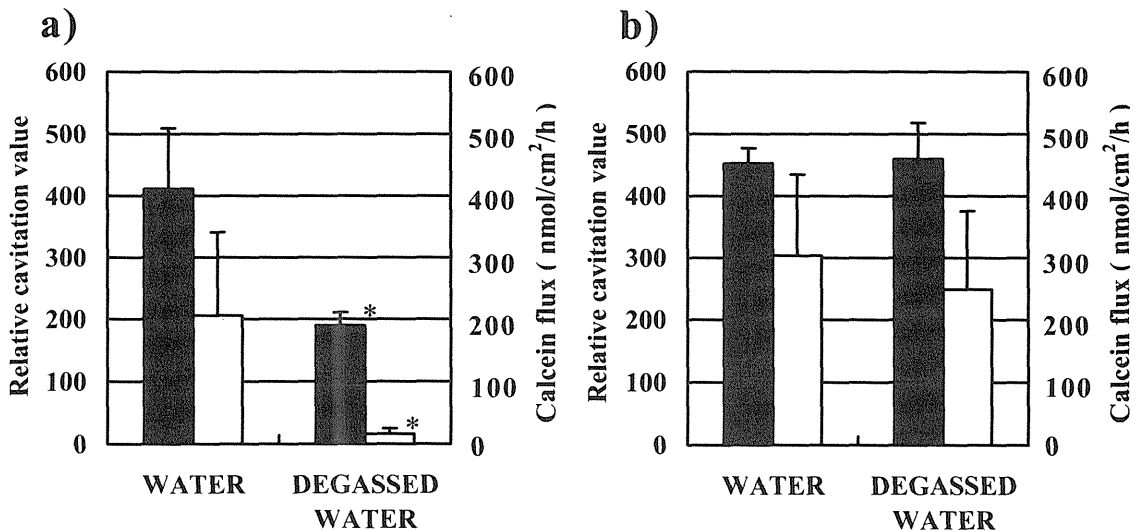


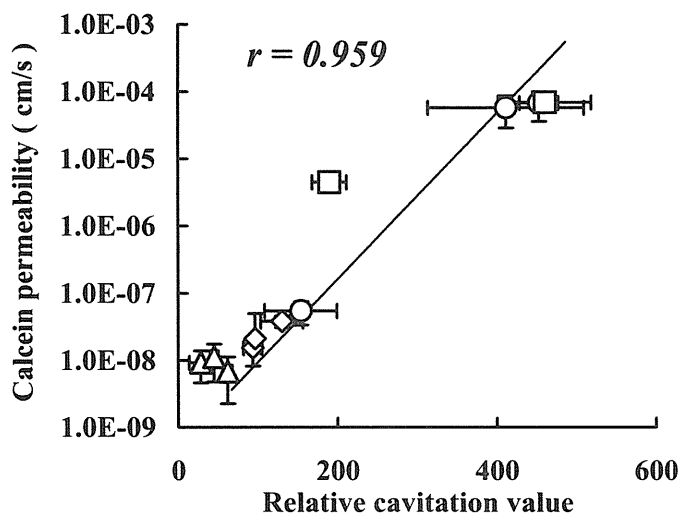
Fig. 22 Calcein flux and relative cavitation value at intensity of 120 (a) and 300 mW/cm<sup>2</sup> (b)

□calcein flux, ■relative cavitation value

\* p < 0.05, compared with non-treated water.

Each datum represents the mean ± SD of three-eight experiments.





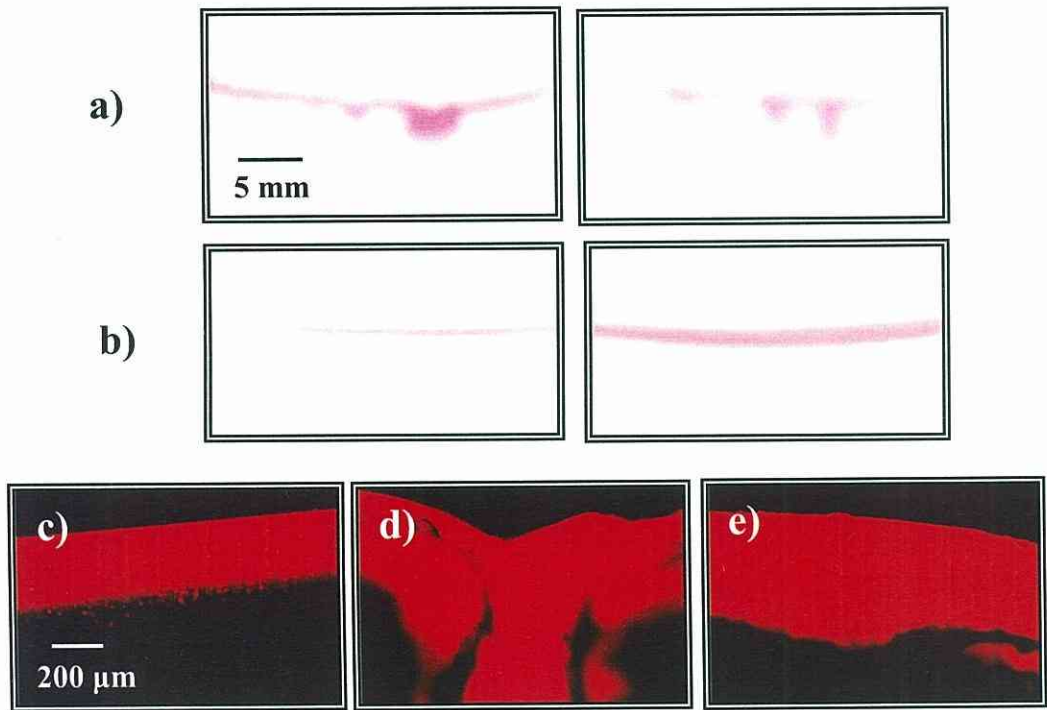
**Fig. 23 Relationship between cavitation value and calcein permeability**  
 ○41 kHz, ◇158 kHz, △445 kHz, □41 kHz (degaussed water)  
 Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three-eight experiments.

### 第3節 固体-液体界面でのキャビテーション非対称圧壊に伴うマイクロ ジェット発生の評価

前節においてキャビテーション発生が低周波数USによる促進効果に関与していることが明らかとなった。これまでに報告されている促進効果発現に対するキャビテーションの主な作用は角質層中での発生、振動、そして崩壊による脂質二重層のランダム化によるものと考えられていた<sup>21,23,40,41</sup>。しかし、前章までの41 kHz、120 mW/cm<sup>2</sup> USで得られる促進効果が一過的であり、皮膚電気抵抗の低下がコントロールの1/2程度であったこと、さらには透過促進効果と溶媒流の大きさに相関関係が認められることなどを考えると、キャビテーションの効果は角質層内での発生が主な要因であるとは考え難い。近年、周波数20 kHz、強度1.6-33.5 W/cm<sup>2</sup>の低周波数ソノフォレーションにおいて、アルミ箔表面でのキャビテーション圧壊によるpit形成量と皮膚電気伝

導度との間に良好な相関性が認められ、SC 表面でのキャビテーション圧壊が促進効果発現に重要であることが示されている<sup>32)</sup>。固体-液体界面でキャビテーション圧壊が生じると、数百 m/s にも達する固体表面方向への強い流れ、マイクロジェットが発生することは、物理的パラメータを用いた数学的解析によりモデル化され<sup>55)</sup>、また、電極表面で圧壊が起こることにより発生する電流スパイクの測定<sup>57,58)</sup>や、ゼラチン層表面での圧壊に伴うゼラチン内部への貫入の高速写真撮影<sup>54,55)</sup>などを用いて実験的にも確認されている。その中で、著者は簡便なゼラチン層を用いた方法を応用し、貫入部位を色素で染色することで、これまでの各実験条件下でキャビテーションによる固体-液体界面でのマイクロジェットの発生を確認した。

拡散セルのレシーバーを 30%ゼラチンで満たし、ドナーにローダミン B 溶液を適用し、強度  $120 \text{ mW/cm}^2$  の US を 1 分間照射した。周波数は、キャビテーションの発生量が多く、促進効果の高かった 41 kHz、そしてキャビテーション発生量が少なく、促進効果の低かった 158 kHz を選択した。US 照射後、直ちにゼラチン層を取り出し、その切片についてデジタルカメラと共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてマイクロジェットによるローダミン B 溶液の貫入を観察した。Fig. 24 はゼラチン切片のデジタルカメラおよび共焦点顕微鏡の観察画像を示している。41 kHz US 照射によりゼラチン層内部方向に向かってローダミン B 色素の局所的な貫入が horn 直下領域で観察された (Fig. 24a)。また、貫入が認められた部位の表面では、キャビテーション圧壊によると思われる壊食が起こっていることが明らかとなった (Fig. 24d)。一方、158 kHz US ではゼラチン層へのローダミン B の貫入は認められず (Fig. 24b)、また horn 直下領域の表面もコントロール (Fig. 24c) と同様の蛍光像であり、キャビテーション圧壊による壊食は認められなかった (Fig. 24e)。以上の結果から、高い促進効果の認められた US 条件下では、皮膚表面でキャビテーションが圧壊し、それに伴って皮膚内部方向への溶媒の流れと固体表面の壊食が発生していることが明らかとなった。



**Fig. 24** Cross section of gelatin gel after US irradiation at 41 kHz (a and d) and 158 kHz (b and e)  
 (a and b) digital camera images, (c, d, and e) confocal microscope images,  
 (c) control image

#### 第4節 本章の小括および考察

本章ではUS照射に伴う物理現象であるキャビテーションの促進効果に対する関与を、バルク中発生量とカルセインの透過性との関係および固体-液体界面でマイクロジェットの発生を観察することにより評価した。

バルク中でのキャビテーション発生は US 条件や伝播する溶媒によって大きく変動し (Fig. 21)、その発生量はカルセインの皮膚透過係数と良好な相関を示した (Fig. 23)。この結果から本研究で用いた US 照射により得られる促進効果にはキャビテーションの発生が深く関与していることが示唆された。キャビテーションの発生は US 照射時に一過的に生じ、そのときほぼ同時発生的にマイクロジェットが生じる。この一過的な促進効果をもたらしていると考えられるマイクロジェットの発生をゼラチン層を用いて確認したところ、促進効果の高かった 41 kHz US 照射時のみ明らかな色素の貫入と表面の壊食が認められた (Figs. 24a and d)。一方、158 kHz では色素の貫入が全く見られなかったが、これはキャビテーションの相対的な発生量が低く、固体表面ではキャビテーションの圧壊がほとんど起こっていないためであると考えられる。

さらにこれらの結果から、第 1 章で明らかにすることができなかった、真皮側への 41 kHz US 照射ではカルセイン透過促進の認められない原因が、SC 側に照射した場合には、透過バリアーとなっている SC 表面に直接 US エネルギーが当たるために、キャビテーションの強い圧壊による SC 構造の変化を引き起こすが、真皮側に照射した場合は真皮側で強い圧壊が起こり、反対側の SC にはほとんど影響を及ぼしていないためであると考えられる。もちろん、US は生体内を水中と同様に伝播するため、SC 側にもキャビテーションが発生することが考えられるが、伝播してくる US エネルギーは表面 (真皮) でその一部が反射され、さらに、伝播距離に反比例して強度が減衰するため、SC 側では相対的な US 強度が低下していることが考えられる。従って、キャビテーション気泡の成長や圧壊を引き起こすための US 強度が低下するために、真皮側照射では反対側に存在する SC においては顕著な変化が発生せず、そのバリアー能が保たれていることが考えられる。

これまで、ソノフォレーシスによる促進効果はキャビテーションによる SC 脂質二重層構造の破壊によるものであると一義的に説明されてきた。しかし、ゼラチン層を用いた検討から、本研究で用いた US による非常に高い促進効果には、SC 表面でのキャビテーション圧壊による壊食に加え、SC 内部方向へのマイクロジェットの発生が重要な役割を果たしているものと考えられた。

## 結論

US を用いた経皮薬物送達は親水性高分子量の薬物送達をも可能にする有益な促進方法である。近年、これまでに考えられていた SC の非可逆的な構造変化だけでなく、US 照射に伴う convective flow が付加的に関与している可能性が報告された。従って、US は薬物を必要時のみに経皮送達させる外部駆動力としても応用できる可能性が考えられるが、このような効果について詳細な検討は未だ十分に行われていない。

著者は US が薬物経皮送達の駆動力として利用可能であるかについて、促進効果、促進されている透過経路、および促進効果に関与する US 現象について詳細に検討した結果、以下の結論を得た。

(1) 低周波数 (41–445 kHz)、低強度 (60–240 mW/cm<sup>2</sup>) の US を用いて、親水性化合物の皮膚透過に対する促進効果について検討した結果、US 照射によって親水性モデル化合物カルセイン (MW 623) の皮膚透過が一過的に促進され、その効果は周波数により異なり低い周波数でより高いことが明らかとなった。また、41 kHz US では適用強度の増加に伴って促進効果も有意に増加したが、158 および 445 kHz では強度によらずほぼ一定の促進効果を示した。以上の結果から、照射する US の周波数や強度によりカルセインの透過促進効果が大きく異なることが明らかとなった。41 kHz、120 mW/cm<sup>2</sup> の US 照射によって非常に高い透過促進効果が得られ、皮膚電気抵抗値もコントロールの約 1/2 に低下したが、US 照射中の透過係数は抵抗値から予測される値よりも有意に高くなっていたことから、促進効果は SC 構造の変化や水和の亢進のみでは説明することができなかった。さらに、カルセインの透過性が溶媒の透過性と良好な相関を示し、その透過は US 伝播方向に特異的に促進されることから、透過には US 照射時のみに発生する溶媒流が付加的な駆動力として関与していることが考えられた。一方、SC が直接 US に暴露されない条件では、US を照射してもカルセインの透過は増大せず、皮膚抵抗値も変化しなかった。以上の結果より、本章で用いた US は伝播方向へ溶媒流を発生させ、その溶媒牽引効果により親水性化合物の透

過を一過的に促進していることが明らかとなり、さらにこの効果には SC 構造の部分的な変化や水和の亢進も関与しているものと考えられ、US が照射条件を工夫することで必要時にのみ必要量の薬物を経皮透過させる駆動力として利用できる可能性が示唆された。

(2) 41 kHz US により促進されている親水性化合物の透過経路について、まず水力学の細孔理論を用いて、モデル化合物カルセイン、FD-4 (MW 4400)、および FD-40 (MW 38000) の透過と溶媒透過の関係から考察した。その結果、41 kHz の US 照射によりカルセイン透過と溶媒透過の間に良好な相関関係が認められ、回帰直線の傾きは 1 となったことから、US 照射時の溶質の動きと溶媒の動きが完全に一致していることが明らかとなった。さらに、FD-4 および FD-40 でも同様の結果が得られたことから、41 kHz US によって促進されている透過経路の大きさはこれらの溶質よりも有意に大きいことが考えられた。次に、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて水溶性高分子 FD-40 が実際にどのように透過しているのかを評価した。US horn 直下領域では FD-40 は SC 全体 (脂質二重層およびコルネオサイト) を非特異的に深部まで浸透しており、このとき SC 表面に部分的な裂け目様の構造変化を認めたが、角化細胞の六角形構造の崩壊や消失は起こっていなかった。境界領域では裂け目様の構造変化が認められた領域を介して主に FD-40 が深部まで浸透していることが明らかとなった。また、horn 周辺領域では SC 構造の変化も FD-40 の浸透も認められなかった。以上の結果より、US に直接暴露されている領域では US が SC 中への溶媒の移動を非特異的に増大し、さらに新たな透過経路を形成することにより、少なくとも分子量 4 万までの分子が容易に皮膚を透過できることが明らかとなった。一方、脂溶性化合物ローダミン B を用いた同様の観察では、US 直下領域でも皮膚への浸透増大は全く認められなかった。これは US により促進されている経路が水溶性であり、溶質の水への溶解性が促進効果の発現に関与しているためと考えられた。

(3) バルク中でのキャビテーション発生量を種々条件下で測定した結果、41 kHz での発生が最も多く、周波数の増大に伴って減少した。また、41 kHz では照射強度

の増大に伴って発生量も増加したが、158 および 445 kHz では有意な変化を示さなかった。脱気水に 41 kHz US を照射した場合、120 および 240 mW/cm<sup>2</sup> の強度でキャビテーション発生量が有意に低下した。バルク中キャビテーション発生量とカルセイン透過性の間に良好な相関が認められたことから、溶媒中に発生しているキャビテーションが透過促進効果に関与していることが明らかとなった。キャビテーションは固体-液体界面で圧壊されるとき、固体表面方向にマイクロジェットと呼ばれる流れを発生させ、これが方向性のある透過促進効果に主に関与していることが考えられるため、次にゼラチン層を用いて固体-液体界面でのマイクロジェットの発生をデジタルカメラおよび共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて確認した。その結果、41 kHz US 照射により、ゼラチン内部方向へ色素の局所的な貫入が認められ、その部位の表面でキャビテーション圧壊による壊食が起こっていることが明らかとなった。以上の結果より、本研究で用いた US による促進効果には媒質中でのキャビテーション発生、特に皮膚表面での非対称圧壊に伴って一過的に発生するマイクロジェットが関与していることが示唆された。

以上、本研究で得られた知見から、キャビテーションを発生しやすい低周波数 US を利用した経皮送達システムは、必要に応じた薬物投与を可能とする駆動力として利用できるものと考えられた。また、FD-40 のような高分子化合物の皮膚透過も顕著に促進することから、これまで皮膚からの治療域濃度までの送達が困難であると考えられていた生理活性ペプチドやタンパク性医薬品の経皮送達を可能にする有益な促進方法であると考えられる。

## 謝辞

本研究に際し、城西大学薬学部 病院薬剤学講座教授 森本雍憲先生には、素晴らしい研究テーマを与えて頂くとともに、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り衷心より深甚なる謝意を表します。

城西大学薬学部 病院薬剤学講座講師 小林大介先生には研究の細部にわたり終始御指導並びに御助言を賜り、深謝の意を表します。

城西大学薬学部 病院薬剤学講座助手 上田秀雄先生には終始研究を見守って頂き、研究の遂行に多大なる御尽力を賜りました。ここに、あらためて深く感謝致します。

また、ディスカッション等を通して有益な御助言を賜り、研究を一層深めて頂きました、城西大学薬学部 臨床薬物動態学講座教授 杉林堅次先生、城西大学薬学部 薬物治療学講座助教授 夏目秀視先生、並びに城西大学大学院薬学研究科助手 沼尻幸彦先生に深謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行に当たり、有益な御助言を賜りました東京工業大学 大学院 総合理工学研究科講師 跡部真人先生に深謝の意を表します。

また、超音波発生装置を作製して頂き、その使用方法等について御教授くださいました第一高周波工業株式会社 平山鋼太郎氏に深謝の意を表します。

最後に、本研究に終始御協力頂きました城西大学病院薬剤学講座の諸氏に深く感謝致します。





## 実験の部



## 第1章 実験の部

### (1) 実験材料

カルセインは東京化成工業株式会社(東京)から、D<sub>2</sub>OはMerk Co., Ltd. (Darmstadt, Germany)から購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

### (2) US装置

発振器(WF1943)および電力増幅器(HSA4012)はNF回路設計ブロック株式会社(神奈川)より、三種のUSトランスデューサー(41 kHz、照射面積 2.54 cm<sup>2</sup>; 158 kHz、照射面積 3.14 cm<sup>2</sup>; 445 kHz、照射面積 10.17 cm<sup>2</sup>)は第一高周波工業株式会社(東京)より購入した。Fig. 1に示すように全ての機器を接続して実験に使用した。

### (3) US強度の測定

USエネルギーの熱変換を利用した、カロリメトリー法<sup>40)</sup>により媒質中での実際のUS強度を測定した。Fig. 25に示すように、断熱したビーカーに水 40 mLを適用し、USトランスデューサーを一定の位置に設置した。種々駆動出力で30分間USを照射し、このときの水温上昇速度を測定し、次式を用いてUS強度  $I$  (W/cm<sup>2</sup>)を算出した。

$$I = \frac{M_{\text{water}} C_{p,\text{water}}}{A} \frac{\Delta T}{\Delta t}$$

ここで、 $M_{\text{water}}$ はUSを照射した水の量(40 g)、 $C_{p,\text{water}}$ は水の比熱(4.18 J/(g·°C))、 $A$ はUSトランスデューサーの面積、そして $\Delta T/\Delta t$ は水の温度変化速度を示している。

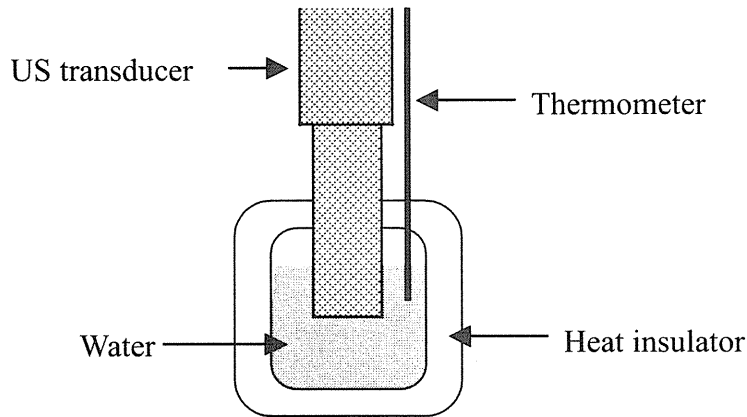


Fig. 25 Schematic diagram of the calorimetric

#### (4) キャビテーション発生量の測定

水中でのキャビテーションの発生量はキャビテーションメーター（アロック工業株式会社、東京）を用いて測定した。ビーカーに蒸留水を入れ、US horn を浸し、US 照射領域内にキャビテーション測定のためのプローブを挿入した。このとき、horn およびプローブがビーカーに触れないように設置した。

キャビテーションメーターは音場内に存在するキャビテーションが振動・圧壊するときに発生するキャビテーションノイズ（原振周波数 $f$ の倍音 $2f$ 、 $3f$ …および低調波 $1/2f$ 、 $1/3f$ …）を感知し、相対的キャビテーション発生量として値を示す。感知する周波数は100-800 kHz の範囲であるため、原振周波数が41 kHz の場合、測定値への影響は無いが、158 および 445 kHz では原振周波数成分もキャビテーションノイズとして測定され、発生量を実際よりも大きく見積もってしまうことが考えられる。そこで、感知周波数域におけるキャビテーション測定では原振周波数をカットするフィルターを使用して測定した。

## (5) 実験動物

石川実験動物（埼玉）または埼玉実験動物（埼玉）より購入、もしくは城西大学生命科学センター（埼玉）より得た雄性 WBN/ILS-Ht ヘアレスラット（体重 220-300 g）を全ての実験に用いた。

## (6) 皮膚の調製

ペントバルビタールナトリウム（ネンプタル® 注射液、大日本製薬株式会社、大阪）麻酔下（50 mg/kg、i.p.）、ヘアレスラット腹部皮膚を摘出し、皮下脂肪を丁寧に切除したものを透過実験に使用した。ストリプトスキンは皮下脂肪切除後にコルクボードに固定し、セロハンテープ（セロテープ®、ニチバン株式会社、東京）を用いて角質層が完全に無くなるまで（約 20 回）剥離し、調製した。

## (7) *in vitro* 皮膚透過実験

ヘアレスラット腹部摘出皮膚を縦型拡散セル（有効拡散面積：41 および 158 kHz / 7.065 cm<sup>2</sup>、445 kHz / 19.625 cm<sup>2</sup>）に挟み、ドナー側（US 照射側）に水または D<sub>2</sub>O で調製した 1 mM カルセイン含有 PBS（pH 7.4）溶液を 10 mL（41 および 158 kHz）または 20 mL（445 kHz）適用した。レシーバー側は水で調製した PBS で満たし（41 および 158 kHz / 20 mL、445 kHz / 38.5 mL）、スターヘッド型攪拌子を入れ、マグネティックスターラー（MC-301、サイニクス株式会社、東京）を用いて約 1200 rpm で攪拌した。全層皮膚を用いる場合、定常状態の溶質透過を得るために 12 時間の前処理を行った後、ドナー溶液を新しい溶液に入れ換えて透過実験を開始した。ストリプトスキンの実験では、前処理を行わずに透過実験を開始した。経時的にレシーバー側溶液を一定量採取し、直ちに同量の PBS を補充した。実験中の拡散セル内温度は循環水により 32°C に保った。

US トランスデューサー（41、158、または 445 kHz）は皮膚表面から 3 mm の位置に設置した。カルセインおよび D<sub>2</sub>O flux が定常状態に達した後（全層皮膚：実験開始 3 時間目から、ストリプトスキン：実験開始 2 時間目から）、US をドナー側に 30 分間照射した（適用強度：60、120、または 240 mW/cm<sup>2</sup>）。US 中止後、更に 2.5 時間

サンプリングを続けた。

レシーバーからドナーへの溶質の移行を調べる実験では、レシーバー側とドナー側の溶液のみを入れ換えて、上述した方法と同様に実験を行った。

#### (8) 皮膚中カルセイン濃度の測定

US 照射後および透過実験終了後直ちに拡散セルから皮膚を取り出し、表面に残存するカルセインを取り除くために PBS で 3 回洗浄した。表面の水分を丁寧に拭き取った後、US トランスデューサー直下の皮膚を切り取り、重さを測定した。得られた皮膚サンプルを更に細かく切断してからサンプルチューブに入れ、5 mL の PBS を加えてホモジナイザー (Diox 600、Heidolph Instruments、Germany) を用いて氷冷下ホモジナイズした。得られた皮膚ホモジネート (0.5 mL) に 1 mL のメタノールを添加し、充分に攪拌した後、5°C、3000 g で 5 分間遠心分離して上清を採取し、カルセイン含有量測定に用いた。カルセイン含有量は皮膚重量でノーマライズした。

#### (9) 皮膚電気抵抗値の測定

透過実験中の皮膚を介した電位差 ( $\Delta V$ ) を二対の Ag/AgCl 電極を用いて測定した。両側の皮膚近傍に一对の塩橋 (3 M 塩化カリウム含有 4% 寒天ゲル) を挿入し、逆の端を Ag/AgCl 電極へと導き、Ag/AgCl 電極を短絡電流測定装置 (CEZ-9100、日本光電工業株式会社、東京) に接続した。直流電流 (100  $\mu$ A、 $\Delta I$ ) は皮膚から離れた位置に挿入した一对の塩橋で連結したもう一对の Ag/AgCl 電極により短時間適用した。測定した電位差から以下に示すオームの法則に従って、皮膚電気抵抗値 ( $R_t$ ) を算出した。

$$R_t = \Delta V / \Delta I$$

#### (10) カルセインの定量

カルセイン濃度は蛍光分光光度計 (RF-5000、株式会社島津製作所、京都) を用いて測定した。サンプル 50  $\mu$ L をハウ砂リン酸緩衝液 (pH 8.5) で 100 倍希釈した溶液

を、励起波長 488 nm、蛍光波長 515 nm にて測定し得られた蛍光光度から濃度を決定した。

#### (11) D<sub>2</sub>O の定量

D<sub>2</sub>O は 2512 cm<sup>-1</sup> の O-D 伸縮振動の吸収強度から定量した。2 枚のフッ化カルシウム単結晶の間隙 (0.025 mm) にサンプル溶液を注入し、赤外分光光度計 (260-30、株式会社日立製作所、東京) を用いて吸収強度を測定した。

#### (12) 統計処理

統計解析を Student's t-test により評価した。危険率 (p) が 0.05 以下のときに有意差があると判定した。

## 第 2 章 実験の部

---

#### (1) 実験材料

<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O (37 GBq/mmol) は American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO, USA) より購入した。FD-4 および FD-40 は Sigma Chemical Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA) より、ローダミン B は Acros Organics (Geel, Belgium) より購入した。その他の試薬は第 1 章 (1) と同じ物を用いた。

#### (2) US 装置

第 1 章 (2) と同じ物を用いた。

#### (3) 実験動物

第 1 章 (5) と同じ物を用いた。



#### (4) 皮膚の調製

透過実験に使用した皮膚は第 1 章 (6) と同様に調製した。共焦点レーザー顕微鏡観測には、ペントバルビタールナトリウム麻酔下ヘアレスラットの腹部の毛を注意深く除毛した後、表面のごみやうぶ毛を取り除くためにセロハンテープで 2 回ストリッピングした皮膚を使用した。

#### (5) *in vitro* 皮膚透過実験

ヘアレスラット腹部摘出皮膚を縦型拡散セル (有効拡散面積:  $7.065 \text{ cm}^2$ ) に挟み、ドナー側 (US 照射側) に  $10 \mu\text{Ci/mL}$  の  $^3\text{H}_2\text{O}$  を含有する PBS (pH 7.4) で調製した  $1 \text{ mM}$  カルセインまたは  $5\%$  FDs 溶液を  $10 \text{ mL}$  適用した。レシーバー側は PBS で満たし ( $22 \text{ mL}$ )、スターヘッド型攪拌子を入れ、マグネティックスターラーを用いて約  $1200 \text{ rpm}$  で攪拌した。定常状態の溶質透過を得るために 12 時間の前処理を行った後、ドナー溶液を新しい溶液に入れ換えて透過実験を開始した。経時的にレシーバー側溶液を一定量採取し、直ちに同量の PBS を補充した。実験中の拡散セル内温度は循環水により  $32^\circ\text{C}$  に保った。

US トランスデューサーは皮膚表面から  $3 \text{ mm}$  の位置に設置した。溶質の flux が定常状態に達した実験開始後 3 時間目から  $41 \text{ kHz}$  US を角質層側に照射した。US は強度を  $60$ 、 $120$ 、 $300$ 、そして  $60 \text{ mW/cm}^2$  と段階的に変化させて、それぞれの強度で 30 分間ずつ適用した (総適用時間: 2 時間)。US 中止後、更に 2.5 時間サンプリングを継続した。

#### (6) カルセインおよび FDs の定量

カルセインは第 1 章 (10) と同様に定量した。FDs の濃度は蛍光分光光度計を用いて測定した。サンプル  $50 \mu\text{L}$  をホウ砂リン酸緩衝液 (pH 8.5) で 100 倍希釈した溶液を、励起波長  $495 \text{ nm}$ 、蛍光波長  $515 \text{ nm}$  にて測定し得られた蛍光光度から濃度を決定した。

### (7) $^3\text{H}_2\text{O}$ の定量

サンプル 800  $\mu\text{L}$  にシンチレーションカクテル (アマシャム バイオサイエンス株式会社、東京) を 10 mL 加え、十分に攪拌した後、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100、アロカ株式会社、東京) を用いて測定した。

### (8) US 照射時の FDs の安定性評価

US 照射によって FDs が分解されていないことを確かめるために、ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) を US 照射前のドナー溶液および 41 kHz、300 mW/cm<sup>2</sup> の US を 30 分間照射後のレシーバー溶液について行った。最適な濃度に希釈したサンプル溶液 20  $\mu\text{L}$  を GPC システムに注入した。用いた GPC システムは送液ユニット (LC-10AS、株式会社島津製作所)、蛍光分光光度計 (RF-10AXL、株式会社島津製作所)、システムコントローラー (SCL-10A、株式会社島津製作所)、カラムオーブン (CTO-10A、株式会社島津製作所)、オートインジェクター (SIL-10AXL、株式会社島津製作所) に順相分離カラム (Asahipak GS-620 HQ、昭和電工株式会社、東京) を装着し、クロマトパック (C-R5A、株式会社島津製作所) を用いて得られたピーク面積から解析した。定量条件を Table 2 に示す。

Table 2 Assay condition for FDs

Column temp.	40 °C
Detection	Ex 495 nm、Em 515 nm
Mobile phase	PBS
Flow rate	0.4 mL/min

### (9) 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた皮膚透過経路の検討

調製したヘアレスラット腹部摘出皮膚を縦型拡散セル (有効拡散面積 : 7.065 cm<sup>2</sup>) に挟み、レシーバー側を PBS で満たした (22 mL)。ドナー側に PBS で調製した 1 mM

カルセインまたは 18 mg/mL FD-40 溶液を 10 mL 適用し、41 kHz、120 mW/cm<sup>2</sup> の US を 5 分間照射した。US 処理後、皮膚の状態を評価するために、ドナー側溶液を 4 : 6 の methanol-PBS 混液で調製したローダミン B 溶液に置き換えて 2 時間受動拡散させた。その後直ちにセルから皮膚を取り出し、PBS で表面に残存する蛍光色素を取り除くために洗浄し、丁寧に表面の水分を拭き取った。皮膚サンプルを US horn 直下領域、境界領域、horn 外領域の 3 片に切り分け、それぞれの皮膚小片をスライドガラス上に乗せ 1 : 1 の PBS-グリセリン溶液を滴下してカバーガラスで挟み、顕微鏡観察した。共焦点イメージは、正立型顕微鏡 Zeiss Axioplan に対物レンズ Zeiss Neofluar (20 倍、Carl Zeiss、Oberkochen、Germany) を装備した MRC-600 レーザーシャープシステム (Bio-Rad Laboratories、Richmond、CA、USA) にて観察した。FD-4 およびローダミン B の蛍光をそれぞれ 488 nm のアルゴンレーザーおよび 568 nm のクリプトンレーザーにて励起させた。同様にローダミン B 溶液をドナー側に適用し、上記条件で US を照射後顕微鏡観察した。

### 第 3 章 実験の部

#### (1) 実験材料

Gelatin powder は関東化学株式会社 (東京) より購入した。その他の試薬は第 1 章 (1) および第 2 章 (1) と同じ物を用いた。

#### (2) US 装置

第 1 章 (2) と同じ物を用いた。

### (3) 実験動物

第1章(5)と同じ物を用いた。

### (4) 皮膚の調製

第1章(6)と同様に調製した。

### (5) キャビテーション発生量の測定

US horn と対面するようにキャビテーションメーターのプローブを設置し、41、158 および 445 kHz US を種々強度で照射時の水中でのキャビテーション発生量を第1章(4)と同様に測定した。また、水中の溶存気体を減圧下で取り除いた脱気水を用いて 41 kHz US 照射によるキャビテーション発生量を測定した。

### (6) 脱気水を用いた *in vitro* 皮膚透過実験

ヘアレスラット腹部摘出皮膚を縦型拡散セル（有効拡散面積：7.065 cm<sup>2</sup>）に挟み、ドナー側（US 照射側）にあらかじめ脱気しておいた 10 μCi/mL の <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O を含有する PBS（pH 7.4）で調製した 1 mM カルセイン溶液を 10 mL 適用した。レシーバー側は PBS で満たし（22 mL）、スターヘッド型攪拌子を入れ、マグネティックスターラーを用いて約 1200 rpm で攪拌した。定常状態の溶質透過を得るために 12 時間の前処理を行った後、ドナー溶液を新しい溶液に入れ換えて透過実験を開始した。経時的にレシーバー側溶液を一定量採取し、直ちに同量の PBS を補充した。US 照射中、ドナー溶液の脱気状態を維持するために、10 分毎にドナー溶液を新しい溶液と入れ換えた。実験中の拡散セル内温度は循環水により 32°C に保った。

US トランスデューサーは皮膚表面から 3 mm の位置に設置した。溶質の flux が定常状態に達した実験開始後 3 時間目から 41 kHz US を角質層側に照射した。強度は 120 または 300 mW/cm<sup>2</sup> で 30 分間適用し、US 中止後も更に 2.5 時間サンプリングを継続した。

(7) カルセインの定量

カルセインは第 1 章 (10) と同様に定量した。

(8)  $^3\text{H}_2\text{O}$  の定量

$^3\text{H}_2\text{O}$  は第 2 章 (7) と同様に定量した。

(9) ゼラチン層の作成

水中にゼラチンを 30%の濃度になるように加え、80°Cの温浴中でかき混ぜながら完全に溶かした。出来た溶液を縦型拡散セルのレーザー側に満たし、冷蔵庫に 12 時間放置し固まらせ、ゼラチン層を作成した。

(10) 固体-液体界面でのマイクロジェット発生の観察

ゼラチンで満たされたレーザーセルにドナーセルを重ね、ドナー側に 1mM ローダミン B 溶液を適用した。41 および 158 kHz の US を  $120 \text{ mW/cm}^2$  の強度で 1 分間照射した後、直ちにゼラチン層を取り出して切片を作成した。ゼラチン断面をデジタルカメラ (DSC-F55V、ソニー株式会社、東京) および共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

(11) 統計処理

統計解析を Student's t-test により評価した。危険率 (p) が 0.05 以下のときを有意差があると判定した。

## 引用文献

1. 長谷川哲也, 杉林堅次, 医薬ジャーナル 35, 1733-1737 (1999).
2. R.O. Potts, in *Transdermal Drug Delivery*, J. Hadgraft and R.H. Guy, Eds. (Marcel Dekker, New York, 1990).
3. M. Furuse, M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo, S. Tsukita, *J. Cell Biol.*, 156, 1099-1111 (2002).
4. K. Morita, M. Furuse, Y. Yoshida, M. Itoh, H. Sasaki, S. Tsukita, Y. Miyachi, *J. Invest. Dermatol.*, 118, 1073-1079 (2002).
5. R.B. Walker, E.W. Smith, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 18, 295-301 (1996).
6. T.M. Suhonen, J.A. Boustra, A. Urtti, *J. Control. Release*, 59, 149-161 (1999).
7. K.C. Sung, J.Y. Fang, O.Y.P. Hu, *J. Control. Release*, 67, 1-8 (2000).
8. R.H. Guy, *J. Pharm. Pharmacol.*, 50, 371-374 (1998).
9. L. Ilic, T.R. Gowrishankar, T.E. Vaughan, T.O. Herndon, J.C. Weaver, *J. Control. Release*, 61, 185-202 (1999).
10. L. Ilic, T.R. Gowrishankar, T.E. Vaughan, T.O. Herndon, J.C. Weaver, *J. Invest. Dermatol.*, 116, 40-49 (2001).
11. T.L. Burkoth, B.J. Bellhouse, G. Hewson, D.J. Longridge, A.G. Muddle, D.F. Sarphe, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 16, 331-384 (1999).
12. M. Uchida, Y. Jin, H. Natume, D. Kobayashi, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *J. Pharm. Pharmacol.*, 54, 781-790 (2002).
13. S. Henry, D.V. McAllister, M.G. Allen, M.R. Prausnitz, *J. Pharm. Sci.*, 87, 922-925 (1998).
14. D.V. McAllister, P.M. Wang, S.P. Davis, J.H. Park, P.J. Canatella, M.G. Allen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 13755-13760 (2003).
15. H. Ueda, M. Ogihara, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, 137, 217-224 (1996).
16. Y.N. Kalia, R.H. Guy, *J. Control. Release*, 44, 33-42 (1997).

17. K. Mystakidou, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 3, 463-469 (2002).
18. S.K. Gupta, M. Southam, G. Sathyan, M. Klausner, *J. Pharm. Sci.*, 87, 976-981 (1998).
19. V. Meidan, in *Transdermal Drug Delivery: Second edition, revised and expanded*, R.H. Guy and J. Hadgraft, Eds. (Marcel Dekker, New York, 2003).
20. 超音波便覧編集委員会編, 超音波便覧 (丸善, 1999).
21. E. Camel, in *Percutaneous Penetration Enhancers*, E.W. Smith and H.I. Maibach, Eds. (CRC, Boca Raton, FL, 1995), chap. 15.2.
22. D. Levy, J. Kost, Y. Mechulam, R. Langer, *J. Clin. Invest.*, 83, 2074-2078 (1989).
23. S. Mitragotri, D. Blankschtein, R. Langer, *Science*, 269, 850-853 (1995).
24. D. Bommannan, H. Okuyama, P. Stauffer, R.H. Guy, *Pharm. Res.*, 9, 559-564 (1992).
25. H. Ueda, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *J. Control. Release*, 37, 291-297 (1995).
26. J.Y. Fang, C.L. Fang, K.C. Sung, H.Y. Chen, *Int. J. Pharm.*, 191, 33-42 (1999).
27. S. Mitragotri, J. Kost, *Pharm. Res.*, 18, 1151-1156 (2001).
28. A. Boucaud, L. Machet, B. Arbeille, M.C. Machet, M. Sournac, A. Mavon, F. Patat, L. Vaillant, *Int. J. Pharm.*, 228, 69-77 (2001).
29. D. Monti, R. Giannelli, P. Chetoni, S. Burgalassi, *Int. J. Pharm.*, 229, 131-137 (2001).
30. K.S. Suslick, Ed., *Ultrasound: Its chemical, physical, and biological effects* (VCH, New York, 2004).
31. A. Tezel, A. Sens, S. Mitragotri, *J. Pharm. Sci.*, 91, 444-453 (2002).
32. H. Tang, C.C.J. Wang, D. Blankschtein, R. Langer, *Pharm. Res.*, 19, 1160-1169 (2002).
33. S. Mitragotri, D. Blankschtein, R. Langer, *Pharm. Res.*, 13, 411-420 (1996).
34. S. Mitragotri, J. Kost, *Biotechnol. Prog.*, 16, 488-492 (2000).
35. H. Tang, S. Mitragotri, D. Blankschtein, R. Langer, *J. Pharm. Sci.*, 90, 543-566 (2001).
36. A. Tezel, A. Sens, J. Tuchscherer, S. Mitragotri, *Pharm. Res.*, 18, 1694-1700 (2001).
37. A. Tezel, A. Sens, J. Tuchscherer, S. Mitragotri, *J. Pharm. Sci.*, 91, 91-100 (2002).
38. L.J. Weimann, J. Wu, *Ultrasound Med. Biol.*, 28, 1173-1180 (2002).
39. (社) 日本電子機械工業会編, 超音波工学 (コロナ社, 1995).

40. S. Mitragotri, J. Farrell, H. Tang, T. Terahara, J. Kost, R. Langer, *J. Control. Release*, 63, 41-52 (2000).
41. J. Kost, S. Mitragotri, R.A. Gabbay, M. Pishko, R. Langer, *Nature Med.*, 6, 347-350 (2000).
42. M. Mutoh, H. Ueda, Y. Nakamura, K. Hirayama, M. Atobe, D. Kobayashi, Y. Morimoto, *J. Control. Release*, 92, 137-146 (2003).
43. B.C. Finnin, T.M. Morgan, *J. Pharm. Sci.*, 88, 955-958 (1999).
44. E. Manabe, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *Int. J. Pharm.*, 129, 211-221 (1996).
45. E. Manabe, S. Numajiri, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *J. Control. Release*, 66, 149-158 (2000).
46. S.G. Schultz, Basic principles of membrane transport (Cambridge University Press, Cambridge, 1980).
47. D.G. Levitt, *Biophys. J.*, 15, 533-551 (1975).
48. R.O. Potts, R.H. Guy, Eds., *Mechanisms of Transdermal Drug Delivery* (Marcel Dekker, New York, 1997).
49. T. Hatanaka, E. Manabe, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *Pharm. Res.*, 11, 654-658 (1994).
50. M. Hayashi, T. Hirasawa, T. Muraoka, M. Shiga, S. Awazu, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 2149-2152 (1985).
51. J.A. Boustra, A. de Graaff, G.S. Gooris, J. Nijssse, J.W. Wiechers, A.C. van Aelst, *J. Invest. Dermatol.*, 120, 750-758 (2003).
52. R.R. Warner, K.J. Stone, Y.L. Boissy, *J. Invest. Dermatol.*, 120, 275-284 (2003).
53. Y. Morimoto, M. Mutoh, H. Ueda, L. Fang, K. Hirayama, M. Atobe, D. Kobayashi, *Eur. J. Pharm. Sci.*, submitted (2004).
54. F.J. del Campo, J. Melville, J.L. Hardcastle, R.G. Compton, *J. Phys. Chem. A*, 105, 666-674 (2001).
55. J.R. Blake, B.B. Taib, G. Doherty, *J. Fluid. Mech.*, 170, 479-497 (1986).



56. E. Maisonhaute, P.C. White, R.G. Compton, *J. Phys. Chem. B*, 105, 12087-12091 (2001).
57. P.A. Lush, Y. Tomita, O. Onodera, K. Takayama, N. Sanada, M. Kuwahara, N. Ioritani, O. Kitayama, *AIP Conf. Proc.*, 208, 831-835 (1990).
58. 高山和喜編, 衝撃波ハンドブック (シュプリンガー・フェアラー東京, 1995).

