

総合論文*

光音響分光法による経皮吸収測定法の開発と応用

高本 隆一^{®**}, 難波隆二郎^{**}, 山本 信也^{**},
高松 翼^{**}, 松岡 昌弘^{**}, 澤田 嗣郎^{***}

Percutaneous absorptiometry by a laser photoacoustic
method and its applications (Accounts)

Ryuichi TAKAMOTO, Ryujiro NAMBA, Shinya YAMAMOTO,
Tasuku TAKAMATSU, Masahiro MATSUOKA^{**} and Tsuguo SAWADA^{***}

^{**} Safety & Analytical Research Center, Shiseido Company, Ltd.,
1050, Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama 223

^{***} Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113

(Received 21 September 1995)

Skin plays not only a physical role as the shelter for the living body but also many important biological roles. Observing the out- or inside of skin by the photoacoustic (PA) method, new information that is difficult to measure can be detected. We have attempted to measure the percutaneous absorption of chemical substances in order to investigate the effect and the toxicity of medicinal compounds. To do this, we had to develop a PA cell that could detect a chemical substance on skin with high sensitivity and accuracy. Several such investigations have been reported; however the conventional open-ended PA cells had unfavorable signal to noise ratio (S/N) and sensitivity. We have reported the development of percutaneous absorptiometry using the laser PA method. A series of *in vitro* and *in vivo* percutaneous absorptiometries was performed. As a result, it was concluded that this PA method is applicable to percutaneous absorption *in situ*.

Keywords : PAS; percutaneous absorption; percutaneous absorptiometry; skin permeation; *in vivo* measurement

1 緒 言

近年、皮膚を通した化学物質の吸収（経皮吸収）は、体内への重要な侵入ルートとして注目されるようになって

きた。これは内服剤（経口投与）と比較して外用剤（経皮投与）は、効果の持続時間が長いことや副作用が小さいことなどの利点を有するからである。皮膚に適用した外用剤の有効成分が、皮膚内部にどの程度浸透し、皮膚細胞にどのような作用を示し、最終的にその成分が機能をどのように発揮するのか、有効性や安全性に関する情報を得る上でも、経皮吸収は医薬品や化粧品の開発者にとって重要な課題である。しかし、皮膚（最外層の

* 関東支部創立 40 周年記念

** (株)資生堂安全性・分析センター分析研究グループ:
223 神奈川県横浜市港北区新羽町 1050

*** 東京大学大学院工学研究科: 113 東京都文京区本郷
7-3-1

角層)は異物や微生物などの侵入を防御するバリアー機能を有しており、化学物質についても同様に作用するため、経皮吸収研究においては物質の皮膚、特に角層の透過状況を把握しなければならない。従って、この分野の研究において重要なかぎとなるのが、経皮吸収量や速度を測定する評価方法である。ヒトで行われている試験法としては、経時的に血液、尿を採取し、目的物質あるいはその代謝物等の微小な濃度変化を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などで定量する方法がある。この方法では、定量法の条件設定の困難さや被試験者の負荷を考えるとスクリーニング法として適さないのは言うまでもない。そのため、一般的に用いられているのが動物を用いた試験法であり、通常の HPLC 分析法などの感度の不足を補うため、対象薬剤に放射性物質をマーカーとして施すアイソトープ (RI) 法などである。in vitro 法では摘出皮膚を用い、膜透過した量を HPLC などで測定する拡散セル法が、in vivo 法では対象薬剤に放射性物質をマーカーとして施して測定する RI 法などが用いられている。その他、様々な方法が開発されているが、正確かつ簡便に、そして比較的早く物質の経皮吸収性を評価可能な測定法はいまだに定まっていない。特に in vivo 測定においては、in vitro 法より更に定まっていないのが現状である。これは、正しくかつ簡便にヒト in vivo 経皮吸収性を測定可能な方法が皆無に等しいため、人工膜や動物の皮膚を代用し、ヒト in vivo の臨床系を模擬して測定系を構築しているからである。このため、正確性の議論 (再現性などの測定精度及び得られた結果とヒト in vivo との対応性) は後を絶えない。又、in vitro (拡散セル) 法では対象成分ごとに定量法を設定する必要性があったり、in vivo (RI) 法では標識化合物の調製が必要であることや測定操作が極めて困難であることなどの制約条件が大きいことから、はん用性に乏しいといった欠点がある。そのため正確性を議論する上で測定条件の不統一性やデータの不足が指摘されていることも事実である。従って、物質の経皮吸収性を正しくかつ簡便、迅速にそして、ヒト (in vivo) にも適用可能な測定法が切望されている。

この要望を満たす測定法の一つとして、光音響分光法¹⁾ (photoacoustic spectroscopy; PAS) が注目されている。それは、この分析法が以下に示す特徴を有するため、強散乱性物質である皮膚などの生体試料の測定に極めて適しているからである。

(1) 光を用いる分光法であるため、非破壊で測定ができる、(2) 分光法でありながら散乱光の影響をほとんど受けない、(3) 試料の形態を問わず、あるがままの状態

で測定が可能である、(4) 非破壊で深さ方向分析が可能である。

これらの特徴を有する PAS を経皮吸収測定に適用することで、簡便かつ高精度な経皮吸収評価が実現できる。更には、従来の評価法では測定が困難であった新たな経皮吸収挙動に関する情報を得ることも期待される。本論文において、経皮吸収測定に適用可能な PAS システムと、その有効性及び可能性を論じる。

2 原 理

2.1 PAS の原理

物質が光を吸収して一定のエネルギーを得たとき、そのエネルギーの一部は蛍光や化学反応のために費やされるが、一般に大部分のエネルギーは熱として物質外に放出される。PAS は、このような熱として放出されたエネルギーを適当な方法で検出し、分光として物質の性質を調べる手法である。物質に、ある周波数 (ω) で断続する光を照射して光吸収を起こさせると、光吸収に伴って物質から断続的に熱エネルギーが放出され周囲の気体を膨張・収縮させるため、そこから音波が発生する。この音波 (圧力変化) をマイクロフォンなどで検出することで、PA 信号を得ることができる。PAS はこのような光熱現象を通じて光吸収スペクトルを得るものであるが、通常の光吸収法と異なる点は、PA 信号が物質の光学的性質 β (光吸収係数) のみならず熱的性質 α (熱拡散係数) や試料の厚さ l などにも大きく依存することであり、それらは PA 信号の位相情報の中に反映されてくる。すなわち、試料からの熱放射が励起光の断続に十分追従して行われる場合 (熱緩和時間が十分長い場合)、得られるスペクトルは in-phase スペクトルであり、光吸収量に比例した PA 信号強度が記録されるので、PA スペクトルは光吸収スペクトルと一致することになる。又、励起光に対して 90 度位相の遅れた信号のスペクトル (out-of-phase) を得るなどの位相変化を追跡記録することも可能である。PAS についての理論的考察は、試料の形態 (気体、液体、固体など) や PA 信号の検出方法 (マイクロフォン、圧電素子など) 等によって取り扱いが異なり、すべてに通ずる統一的な理論はないと思われる。しかし、固体試料からの PA 信号強度をマイクロフォンで検出する場合を扱った Rosencwaig-Gersho (RG) 理論²⁾ は、多くの測定結果をよく説明できるのでしばしば用いられている。RG 理論によれば、光音響信号強度 Q は、試料厚 l [cm]、光透過長 μ_β [cm] $= 1/\beta$ 、熱拡散長 μ_s [cm] $= (2\alpha/\omega)^{1/2}$ の大小関係によって決まり、以下の六通りのケースが考えられる。

(A) 光学的に透明な試料 ($\mu_\beta > \iota$) の場合

(A1) $\mu_s > \mu_\beta > \iota$, このとき $Q \propto \beta \iota \omega^{-1}$

(A2) $\mu_\beta > \mu_s > \iota$, このとき $Q \propto \beta \iota \omega^{-1}$

(A3) $\mu_\beta > \iota > \mu_s$, このとき $Q \propto \beta \mu_s \omega^{-3/2}$

(B) 光学的に不透明な試料 ($\mu_\beta < \iota$) の場合

(B1) $\mu_s > \iota > \mu_\beta$, このとき $Q \propto \omega^{-1}$

(B2) $\iota > \mu_s > \mu_\beta$, このとき $Q \propto \omega^{-1}$

(B3) $\iota > \mu_\beta > \mu_s$, このとき $Q \propto \beta \mu_s \omega^{-3/2}$

ケース A1 及び A2 では PA 信号強度は β と ι に比例し, かつ ω^{-1} に比例する. ケース A3 では PA 信号強度は β と μ_s に比例し, 試料表面から μ_s までに吸収された光エネルギーのみが観測され, 更に $\omega^{-3/2}$ 依存性を示す. ケース B1 と B2 の場合は Q に β 依存性が見られないので, 試料の光吸収スペクトルは得られない. しかし, このような場合でも励起光の断続周波数 ω を大きくして μ_s が十分に小さくなるようにすればケース B3 の条件が成立するので光学的特性を反映させることが可能となる. 又, ケース A3 及び B3 から ω を大きくしていくことで, PA 信号強度は試料の表面層近くの情報のみを与えることになり, これにより深さ方向分析が可能となる.

2.2 PAS による経皮吸収測定法の考え方

PAS による経皮吸収測定は, 皮膚上に塗布した目的物質のみからの PA 信号強度を経時的にとらえ, その量的変化を測定することで可能となる. つまり, 皮膚上に存在する目的物質の経皮吸収に伴って減少する過程を PAS により測定し, 得られた PA 信号強度の経時変化を解析することで, 目的物質の経皮吸収性 (吸収量や皮膚への拡散係数) を評価しようとするものである. 従って, 目的物質の皮膚への塗布厚及び熱拡散長をそれぞれ, ι , μ_s とすると, 理論的にはケース A3 に相当し, この条件を満たすように励起光の断続周波数や試料の塗布厚を定める必要がある.

これらの考え方に基づき, PAS による経皮吸収測定を実現化する最大のかぎとなるのは, 用いる PA セルである. PA セルは, 試料をセル内に入れる密閉型 (closed cell) と試料に押し当てることによってセル内を密閉にする開放型 (open-ended cell) の二つに分けられるが, *in situ*, *in vivo* 測定を行うためには開放型セルが必要である. 開放型セルは密閉型セルより外部からのバックグラウンドノイズ (機械の作動音や人の声などの環境雑音や皮膚に適用した際の脈拍など) の影響を直接受けやすく, 測定法としての正確性は, S/N (信号/ノイズ) によって決定される. 皮膚の任意局部での経皮吸収に伴

う薬剤量の微小変化を正確にとらえなければならない. 従って, いかにしてこれらのバックグラウンドノイズを取り除き, PA 信号成分を増幅させるかが, 開放型セルを開発する上での最大のポイントである.

3 実験

3.1 共鳴型差動式ダブルセルを用いた測定装置系⁷⁾

著者らは以下の考えに基づいて, 従来の開放型セル^{3)~5)}の改良を行い, 更なる高感度 (S/N) 化を図った.

(1) レーザー光の使用: 本測定法は皮膚上の物質量を測定する定量分析である. 従って, 光源としては従来法^{3)~5)}が用いている Xe ランプより光源強度が大きいレーザーを利用するほうが PA 信号強度は大きくなる.

(2) 共鳴効果による PA 信号の増幅: 脈拍や環境ノイズ等 (数十~数百 Hz) の影響を受けにくい数 kHz でヘルムホルツ共鳴が起こるようにセルの構造 (試料室・マイクロフォン室の容積, パイプの長さ・断面積の値) を決定した. なお, PA セルのヘルムホルツ共鳴周波数 f_R は, 以下の式によって決定される⁹⁾.

$$f_R = (cd/4\pi) [(V_{MC} + V_{SC}) / (V_{MC} * V_{SC} (L + 0.85d))]^{1/2} \quad (1)$$

c : PA セル内のガスの音速, V_{MC} : マイクロフォン室の容積, V_{SC} : 試料室の容積, d : マイクロフォン室と試料室を結ぶ音響パイプの内径, L : 音響パイプの長さ
更に, 測定時に設定した周波数で共鳴による PA 信号の増幅が最大になるように, 測定セルの容積を微調節可能に設計した.

(3) 差動方式によるバックグラウンドノイズの除去: 皮膚を開放型 PA セルで測定するとき, 測定対象物からの光音響信号に皮膚や環境からのノイズ成分が含まれており, これが感度や S/N , 精度に影響を及ぼす. このノイズ成分を可能な限り除去するため, 測定セルと同一のセルに光を導くファイバーのないものを参照セルとして用いた. この場合, 考慮しなければならないことは, 測定セルと参照セルを圧着する部位が若干異なるため, 脈拍等から受けるノイズの大きさが異なることである. つまり, 両方のセルのノイズレベルを近似させて差動させる必要がある. そこで, 測定セルのノイズレベルに参照セルのノイズレベルを近似させるため, 参照セルの容積を調節可能となるように設計した.

(4) 使用の簡便なセル形状: 皮膚の任意部位を圧着して測定するため, セルは可能な限り小さくした.

これらについて検討を行った結果, Fig. 1 に示した

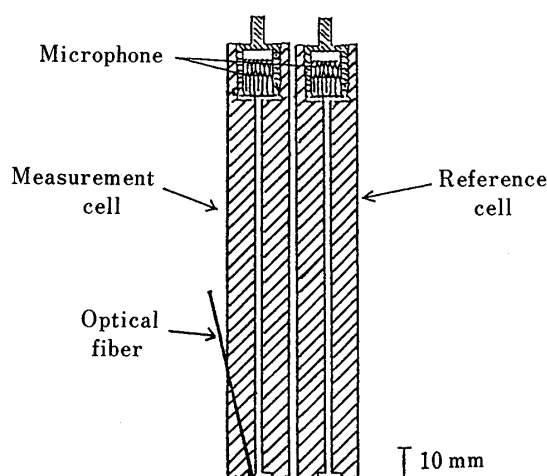


Fig. 1 Diagram of a portable and double open-ended PA cell for *in vivo* measurement

レーザー光を光源とし、光ファイバーにて光をセルまで導く、スティックタイプのダブル式開放型 PA セルを開発した⁷⁾。この PA セル（材質：真ちゅう）は光ファイバーを有する測定部セル、及び参照部セルより構成され、マイクロフォンはセル内の容積調節を行うため両者ともねじ込み式で設けられている。セル内の空気層の容積及び厚さはそれぞれ、 0.1 cm^3 、 0.2 cm で、試料室とマイクロフォン室を結ぶパイプの長さは 12 cm である。これらの値は皮膚の変動や環境ノイズなどの影響を受けにくい、数 kHz で共鳴を起こすよう定めた。更に、測定時において、PA 信号の共鳴による増幅を最大にするため測定部セルのマイクロフォン室を移動させ、セル容積を調節した。又、開放型 PA セルにおいて最大の問題となるノイズの影響を最小にするため、差動方式にした。つまり、光を導く測定部セルには PA 信号とノイズ、参照部セルにはノイズがそれぞれ得られ、両者を差動させることで S/N の向上を図った。このとき、参照部セルのマイクロフォン室を移動させ、セル容積を調節することで、測定部セルと参照部セルのノイズレベルを近似させ、ノイズを最大限除去した。

次に、測定操作条件を以下に記す。光源として用いた Ar^+ レーザー光（波長： 488 nm 、Spectra Physics 製、Model-164）を光変調器（Intra Action Corp., AOM-40）により、セルの共鳴周波数 3.3 kHz （信号発生器：NF, 1925）で強度変調を行い、光ファイバー（Mitsubishi Rayon, SK-40, $1\text{ mm}\phi \times 1\text{ m}$ ）に導いた。そして、得られた PA 信号をロックインアンプ（NF, 5610A：時定数 3 秒 ）により解析し、チャートレコーダー（理化電機工

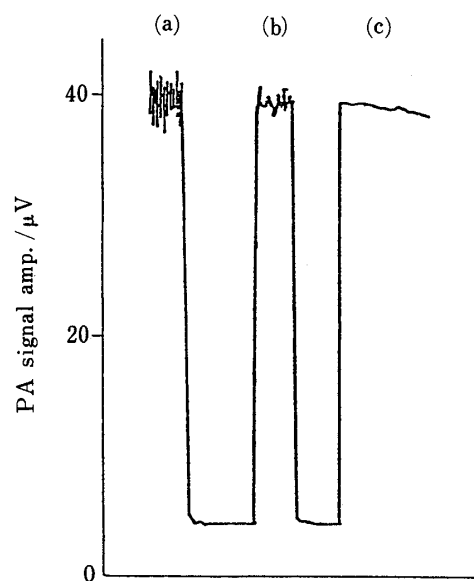


Fig. 2 Comparison of S/N of this PA cell when applying

(a): PA signal using only the measurement cell in the resonance mode; (b): the resonance and the differential mode; (c): the resonance and the differential mode with adjusted volume of the PA cell.

業、NP-0393) に記録した。

本測定装置を用いてヒト皮膚に適用したときの S/N を Fig. 2 に示す。皮膚に照射した光強度は 10 mW である。光を皮膚に照射しないときのバックグラウンド信号が $4.5\text{ }\mu\text{V}$ により、皮膚から得られる PA 信号は $35.5\text{ }\mu\text{V}$ となる。測定セルのみで測定した場合 (a)、共鳴効果によってノイズ $3.4\text{ }\mu\text{V}$ 、 S/N 10.4 であった。次に、参照セルも用い、皮膚からのノイズ成分を差動させる (b) と、ノイズ $1.7\text{ }\mu\text{V}$ で S/N は 20.9 と 2 倍向上した。更に、参照セルの容積を調整することで、測定セルのノイズ成分の大きさに参照セルで測定できるノイズ信号強度をほぼ等しくする (c) と、ノイズ $0.3\text{ }\mu\text{V}$ 、 S/N は 118 と極めて優れ、測定セルのみのときと比較すると S/N は一けた以上向上した。従って、共振、差動、容積調整の機能を十分に活用することで、ヒト皮膚において優れた S/N で測定可能であることが分かった。

又、ヒトの前腕に抗炎症剤のシコニン ($\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 、和光純薬製)軟こう(膏)を実使用量塗布し測定を行うと、基剤(ワセリン)中の $1.3\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のシコニンに対して S/N は 12 、 $\text{RSD } 15\%$ で検出可能であった。

3・2 新規なライトガイド一体型セルを用いた測定装置系¹⁰⁾

このタイプは先に示した共鳴差動タイプより更なる高感度化と使用の簡便化を図ったものである。本法による経皮吸収測定をより多くの薬剤へ適用しようとした場合, より高感度かつ測定の簡便な開放型 PA セルの開発が必要となった。これは以下に示す理由による。一般に多くの薬剤は 300 nm 以下で 250 nm 付近を中心とした波長光に吸収バンドを有するため, 紫外 (UV) 領域の光を光源とする必要がある。この場合, UV 光の皮膚に与える影響を安全性の面から考慮しなければならない。可視光の皮膚に対する光強度の最大許容値⁹⁾ (MPE: maximum permissible exposure) は明確に定められているが, 波長が 300 nm 以下の UV 光に関しては地表に到達していないことや, 実験例が少ないため UV 光強度の皮膚に対する MPE は明確に定められていない。従って, 試料を塗布した皮膚に極力低出力の光を照射して, 皮膚上の薬剤量の微小変化を測定しなければならない。又, 共鳴差動型セルは *in vivo* 経皮吸収測定の前段として, 測定セルや参照セルの容積を調節してバックグラウンドノイズの除去を行う必要がある。測定の部位が変われば再度このような調整を施さなければならない。実際に測定を行っていくと, これらの作業はかなりの手間となる。そこで, 筆者らは共鳴型の PA セルの感度の最適化とそのためのセル構造を検討することで, これらの問題の解決を図った。

セル内の空気容積は, ある程度小さいほど感度は向上する⁹⁾。これを念頭に置いて, 共鳴させる周波数を考えて PA セル内の各パラメーター (試料室の容積, マイクロフォン室の容積, 音響パイプの長さや断面積等) を定め, セルの構造をデザインする。しかし, 従来までの共鳴型 PA セル^{3)~5)7)}のデザインでは, 製作の都合上, セル内の空気容積は必要以上に大きくなってしまい, それが感度の低下を生じさせている。この必要以上の空気容積がデッドボリュームであり, これを小さくするセルのデザインを構築する必要がある。又, これらの PA セルは, PA 信号の増幅を図るため, ヘルムホルツ共鳴理論 {式(1)} に基づいて設計されている。

この式から分かるように, 試料室やマイクロフォン室に, ある程度の容積を設ける必要があり, 全体としてセル内の容積を小さくすることに限界がある。試料室の容積は試料から発生する熱が音波に変換するのに必要であるが, マイクロフォン室の容積は結果として PA セル内の全体のガス容積を大きくしている。そこで, 本開発のポイントとしては, 以下の 4 点を挙げた。

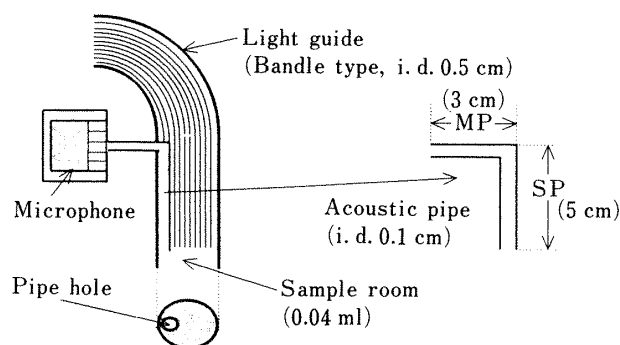
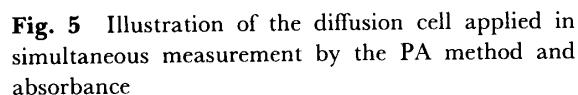
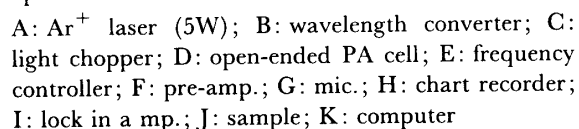


Fig. 3 Diagram of novel open-ended PA cell combined with a light guide

(1) セル内の全体のガス容積を最小にするため, マイクロフォン室の容積を 0 とし, この状態で共鳴を起こすことの可能な, ヘルムホルツ共鳴に変わる共鳴方式で PA セルをデザインすること, (2) ノイズの影響を受けにくい構造であること, (3) PA セルのデッドボリュームを可能な限り小さくすること, (4) PA セルの小型化, 及び測定の簡便性。

任意部位を測定可能にすることや光学調整の簡便性を考えて, 光源からの UV 光を PA セルまでライトガイドを用いて導くことにした。そして, デッドボリュームを極力小さくするため UV ライトガイドの末端に試料室を設け, 音響パイプをその末端サイドに取り付けることで, PA セルの開発を図った。そして, マイクロフォン室の容積を 0 にした状態で共鳴を起こさせるようにし, PA セル内の全体のガス容積を最小化した。更に, 音響パイプを直角に折り曲げたことで, 散乱光の影響も受けにくい構造としたために, 感度及び測定精度の向上が期待された。

Fig. 3 に新規に開発したポータブル開放型 PA セル¹⁰⁾を示す。この PA セルは UV ライトガイドの末端を試料室とし音響パイプをその末端サイドに組み込んだ, ライトガイドと一体の新規なタイプである。用いた UV ライトガイド (旭ガラス) は内径 5 mm ϕ , 全長 1 m のバンドル型で, 波長 257.2 nm の UV 光を 85%/m 透過する。ライトガイドの末端 (材質: ステンレス鋼) を加工して設けた試料室の容積は 0.04 ml (断面積 0.2 cm²) であり, 従来の PA セル⁷⁾のおよそ 40% となっている。この方法によりデッドボリュームを極力小さくすることができ, 又ライトガイドを用いることによって, 測定前のめんどろな光学調整が不要となった。そして, ライトガイドの自由性と皮膚と接する検出部の面積が 10 mm ϕ と小さくすることにより, 皮膚の任意部位が測



in vivo 経皮吸収測定装置系のブロック図を Fig. 4 に示す。Ar⁺ レーザー {Spectra Physics 製 2025, 最大出力: 5 W (マルチモード)} に BBO (β-BaB₂O₄) 結晶を有する UV 発振ユニット (アスカル製) を組み込むことで波長 257.2 nm の UV レーザー光を得ることができた。UV レーザー光をライトチョッパー (NF) によって変調し、波長 257 nm の UV 光において透過率 (内径: 5 mmφ) の高透過性を示した UV ライトガイドと一体型の PA セルに導いた。このとき、試料に照射する UV レーザー光強度が 3 mW になるように元の Ar⁺ レーザーの強度を調節した。その他の装置や PA 信号の解析方法は Fig. 1 の装置系で記述したとおりである。

従来の拡散セル法を用いた *in vitro* 経皮吸収測定は皮膚透過した薬物量を定量することで経皮吸収量や速度を求めているため、皮膚中に保持されやすい（薬物の皮膚への拡散速度と皮膚中の拡散速度が大きく異なる）物質についての経皮吸収量や速度の評価は困難であった。そこで、皮膚上の残存量を PAS で測定し、同時に皮膚透過した薬物量を吸光度で測定する新たな *in vitro* 経皮吸

薬剤の *in vitro* 経皮吸収測定法として一般に用いられている拡散セルと開放型 PA セル (Fig. 1 の測定部セルのみ使用) を組み合わせた測定系を開発した。この結果、PAS により膜に塗布した薬剤の残存量を、吸光度により膜から拡散セルへ透過した薬剤量を同時にリアルタイムで測定可能になった。装置系を Fig. 5 に示す。光源はアルゴンレーザーを用い光変調器で変調した後、2 方向に分割し、それぞれ PAS、吸光度測定に用いた。PA セルは開放型を用い、ロックインアンプを通して PA 信号を記録した。吸光度測定は石英の垂直型拡散セルを用い、拡散セルからの透過光 (I) 及び参照光 (I_0) 強度により求めた。モデル試料として、抗炎症効果のあるシコニン軟膏 (基剤: 炭化水素系) に対し、以下の感度・精度で測定が可能であった。

相関係数 0.998

新規に開発したライトガイドと一体型の開放型 PA セルの特性を以下に記す.

4・1・1 デザインした PA セルの共鳴理論

マイクログラフ室の容積を 0 とし, PA セル内のガス容積が最小になるようにデザインされた PA セルの, 音波の伝達模式図を Fig. 6 に示す. そして, この系での共鳴発生機構を考えると以下ようになる. パイプの中心軸に沿って座標 x をとり, 音響パイプの長さを L とする. 本 PA セルは Fig. 6 に示したように, $X=0$ の点に速度 $U_0 \sin \omega t$ で振動している振動板があり, $X=L$ (音響パイプの長さ) の端はマイクロフォンによって閉ざされている音場と想定できる. このとき, 音波の波長がパイプの断面の寸法に比べて大きいと, そのパイプの中の空気にはパイプの軸に沿って進む平面波しか起こり得ない. 従って, 音響パイプの音場は以下のように解析される¹⁰⁾. $X=L$ で音波の完全反射が起こるので, 反射音の音圧振幅 (P_r) は入射音の音圧振幅 (P_i) に等しい定在波 (stationary wave) である. 又, $x=L$ では音圧が同位相であるから, そこの音圧振幅 (P) は最高で $P_{\max} = 2P_i$ となり, 粒子速度 (U) の振幅は最小で $U_{\min} = 0$ である. 従って, パイプ内の音圧分布 $p(t, x)$ は, 時間 (t) と音響パイプ中の位置 (x) の関数で,

$$p(t, x) = 2P_i \cos[kx - (\phi_{oi} - \phi_{or})/2] \sin[\omega t + (\phi_{oi} + \phi_{or})/2] \quad (2)$$

k : 位相定数, ϕ_{oi} : 入射音波の初期位相,

ϕ_{or} : 反射音波の初期位相, ω : 角振動数

と表される. ここで, $x=L$ で, この振幅が $2P_i$ であるためには,

$$\phi_{oi} - \phi_{or} = 2kL - 4n\pi \quad (n=0, 1, 2, \dots) \quad (3)$$

従って,

$$p(t, x) = 2P_i \cos[k(L-x)] \sin(\omega t + \phi_{oi} - kL) \quad (4)$$

同様に, 粒子速度分布 $u(t, x)$ は,

$$u(t, x) = (2P_i/\rho_c) \sin[k(L-x)] \cos(\omega t + \phi_{oi} - kL) \quad (5)$$

ρ_c : 固有音響抵抗

式(5)が $x=0$ で $U_0 \sin(\omega t)$ であるから,

$$U_0 \sin(\omega t) = (2P_i/\rho_c) \sin(kL) \cos(\omega t + \phi_{oi} - kL) \quad (6)$$

である. このためには,

$$\phi_{oi} = kL + (2n+1)\pi/2 \quad (n=1, 2, \dots) \quad (7)$$

$$\cos(\omega t + \phi_{oi} - kL) = \sin(\omega t) \sin[(2n-1)\pi/2] \quad (8)$$

であり, よって,

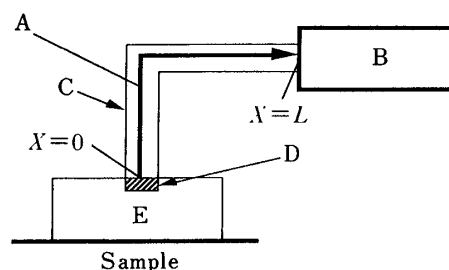


Fig. 6 A new resonance model based on the generation of the PA signal in the novel open-ended cell
A: X coordinates (along the axis of the pipe); B: microphone, $V_{MC}=0$; C: acoustic pipe; D: diaphragm [$U_0 \sin(\omega t)$]; E: sample chamber, $V_{SC}=0.04$ ml U_0 : initial particle velocity; ω : angular frequency; t : time

$$(2P_i/\rho_c) = U_0 / [\sin(kL) \sin\{(2n-1)\pi/2\}] \quad (9)$$

従って, 音響パイプ内の音圧分布は,

$$p(t, x) = \rho_c U_0 / [\sin(kL)] \cos[k(L-x)] \cos(\omega t + \pi) \quad (10)$$

粒子速度分布は,

$$u(t, x) = U_0 / [\sin(kL)] \sin[k(L-x)] \sin(\omega t) \quad (11)$$

共鳴は式(9), (10)から,

$$kLm\pi \quad (m=1, 2, 3, \dots, \text{自然数}) \quad (12)$$

$$L = (m\lambda)/2 \quad (m=1, 2, 3, \dots, \text{自然数}) \quad \lambda: \text{波長} \quad (13)$$

のときに起こり, そのときの共鳴波長 (λ), 共鳴周波数 (f_m) は

$$\lambda = 2L/m \quad (m=1, 2, 3, \dots: m=1 \text{ は基本波長}) \quad (14)$$

$$f_m = m(c/2L) \quad (15)$$

f_m : 共鳴周波数 (Hz), c : 音速 (340 m/s), L : パイプの全長 (SP+MP) (cm)

m : 自然数 $m=1$ のとき, 基本共鳴周波数

これは, $X=0$ の音圧が与えられたときの開管の共鳴と同じである. そこで, 音響パイプの長さ (L) を変えて, 共鳴周波数 (f_m) を測定した. Fig. 7 に示した結果のように, 測定値は共鳴理論式(15)と良い一致を示した. 従って, 本セルの共鳴周波数は, パイプの長さによって決定されることが分かった. そこで, 脈拍や環境ノイズの影響を受けにくい, 2 kHz 付近に共鳴するように, 音響パイプの長さを 8 cm とした.

4・1・2 音響パイプの全長とその形状 次に, パイ

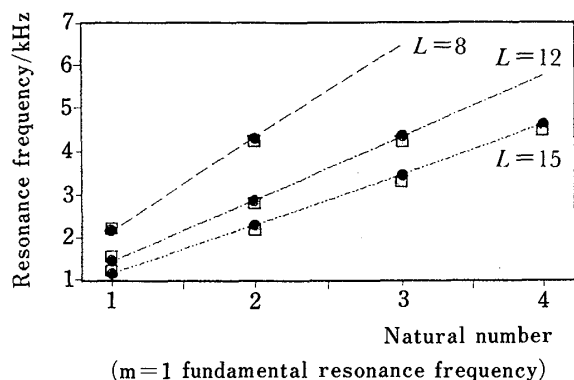


Fig. 7 Theoretical treatment of the resonance frequency caused by changing the total length of the acoustic pipe

●: theoretical value; □: experimental value

ブを直角に折り曲げる位置を変えたときの PA 信号強度の周波数特性カーブを Fig. 8 に示す。共鳴周波数は SP の長さ依存せず 2.2 kHz と同じであったが、PA 信号強度は $(5,3) > (8,0) > (4,4) > (1,7) > (3,5) > (6,2) > (2,6)$ となったので、パイプの折り曲げは $(5,3)$ とした。この SP の長さによる PA 信号強度の変化は 2.2 kHz の音波の波長 {室温で 16 cm, 式 (12) より共鳴波長を算出} と音響パイプの屈折点及びそこからの反射波との関係により生じたものと思われる。以上の結果から、現有の $(8,0)$ のタイプより共鳴による増幅効果の大きいセル構造を見いだすことができた。なお、パイプの折り曲げる角度については、 0° (直線) と 90° の検討を行うことで、他の中間の角度の際の挙動も予測できる。これは、音波の管内伝達に関する性質を考えると、穏やかな角度では 0° に、シャープな角度では 90° に近い挙動を示すと考えられるからである。Fig. 8 の結果より、パイプの折り曲げは $(5,3)$ としたが、測定周波数を変えて行く深さ方向分析においても感度よく測定できるようにパイプの全長 (L) を変えられるように設計した。SP は 5 cm に固定して、MP の長さ (マイクロフォン室に接続する部分で 3 cm は固定) をねじ込み式で変えられるようにした。MP の長さを変えていくと共鳴周波数は $L=8$ cm (全長) のときの基本共鳴周波数 2.2 kHz から、共鳴の理論式 (14) に従って変化した。なお、測定周波数が低くなると、PA 信号もノイズ信号も大きくなるので、皮膚 *in vivo* 測定における S/N (5 以上) を考慮すると、共鳴周波数の調整は 5.0~0.8 kHz の間で有効であると思われる。従って、PA 測定の周波数に応じて感度が最大になるように PA セル自体を調節できる機能

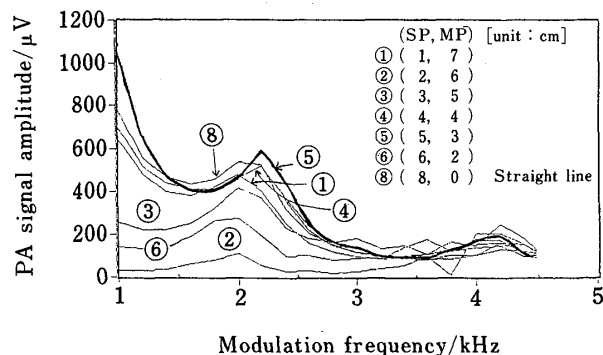


Fig. 8 Comparison of the PA signal amplitude with change in the length of SP and MP (SP+MP=8 cm)

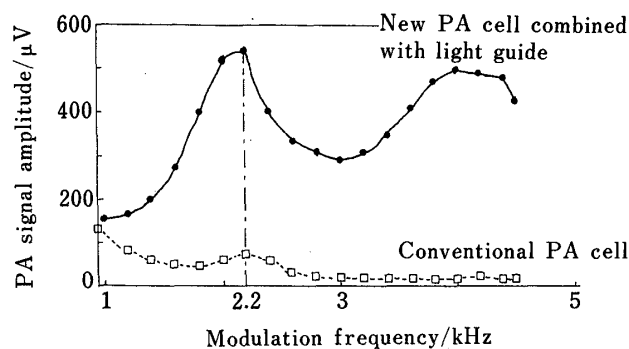


Fig. 9 Comparison of the sensitivity of the new PA cell and the conventional PA cell utilizing the Helmholtz resonance theory. (temp.=22 K)

を設けることで、深さ方向分析にも有効であることが期待された。

4.1.3 感度と精度 新たに開発した開放型 PA セルの感度を、従来の PA セル⁷⁾と比較検討した。PA 測定には黒ゴムを試料として用いた。波長 488 nm の Ar^+ レーザー光を光源とし、ライトチョッパーで変調した。光源の強度は試料への照射強度が 3 mW になるように調節した。そして、PA 信号の周波数特性を両者で比較した。Fig. 9 に示したように、両者は 2.2 と 4.0 kHz (倍波) 付近に共鳴ピークを示し、新たに開発した開管共鳴型 PA セルのピーク強度は、従来のヘルムホルツ共鳴型 PA セルのそれぞれ 7 倍 (2.2 kHz), 26 倍 (4.0 kHz) であった。特に両者の 4.0 kHz に出現した倍波の共鳴ピークの大きさの違いは、ヘルムホルツ共鳴と本共鳴の違いによる結果であり、表面分析において本共鳴方式のほうが有効であることを示している。又、1 kHz か

ら基本共鳴周波数である 2.2 kHz までの両者の共鳴曲線も共鳴方式の違いによる結果であり, ヘルムホルツ共鳴より, 本共鳴のほうが共鳴の鋭さを示す Q 値が大きいことが分かる. これらの結果より, 本セルは測定周波数 2.2 kHz において, 従来の開放型セルの 10 倍近くの感度の向上が達成された. 次に, 抗炎症剤であるインドメタシン (IDM: $C_{19}H_{16}ClNO_4$, 和光純薬製) 軟膏 [基剤: ポリエチレングリコール (PEG) 系] をモデル試料として, PA セルの検出の正確性を UV レーザー PA 測定システムを用いて検討した. 0.2% (IDM 量: $4 \mu\text{g}/5 \text{ mm}\phi$) と 1.0% (IDM 量: $22 \mu\text{g}/5 \text{ mm}\phi$) の IDM 軟膏を石英板にドグターブレードを用いて $100 \mu\text{m}$ の厚さで塗布し, PA 測定を行うことで本システムの測定精度を求めた. 10 回の繰り返し測定において, S/N は 46 以上, RSD 値は 3% 以下と, 優れた感度と精度が得られた. 又, 同条件で検量線を求めると, 実際の *in vivo* 測定にかかわってくる IDM 量である 0.1~1.2% (IDM 量: $2\sim 24 \mu\text{g}/5 \text{ mm}\phi$) に対して, 相関係数 $r=0.996$ と優れた定量性が得られた. 更に, 測定のダイナミックレンジをより拡大した $2\sim 120 \mu\text{g}/5 \text{ mm}\phi$ の IDM 量に対しては, 相関係数 0.990 で測定可能であった. これらの結果より, 本測定システムの *in vivo* 経皮吸収測定に対する有効性について考察すると以下のようなものである. 石英板と皮膚に試料を塗布して測定した場合の S/N を両者で比較すると, 前者のほうが S/N は劣る. これは, 前者の石英は硬く, 弾力性も著しく小さいために, PA セルとの密閉性が悪くなるためである. 一方, 皮膚の場合も脈拍などの影響が考えられるが, これらは 100 Hz 以下の低い周波数のため, 本 PA セルへの影響はほとんど無視できる. 石英上の試料を高精度で検出できたということは, 密閉性がより良い皮膚においては更に高精度の測定が可能になることを示唆している.

4・2 *in vitro* 経皮吸収測定への応用

4・2・1 人工膜を用いたモデル実験¹¹⁾ 本法による測定は皮膚上の物質を正確にとらえることができるのか, すなわち, PA 信号の変化が物質の経皮吸収に伴う変化と対応しているのかどうか, 検証するため, PAS で測定する皮膚上物質の残存量の減少変化と膜を透過した物質の上昇変化の対応について検討した. Fig. 5 に示したシステムを用い, モデル皮膚としてシリコン膜上の薬物残存量を PAS で, 吸光度により膜透過した薬物量を同時にリアルタイムで連続測定した. Ar^+ レーザー (波長 488 nm, 光強度 10 mW) を光源とし, シリコン膜に 1.0% シコニン軟膏 (抗炎症剤) を $1.3 \text{ mg}/5$

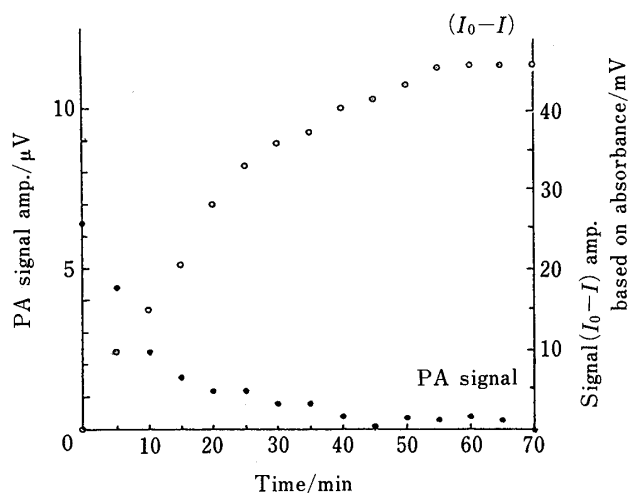


Fig. 10 Permeability *in vitro* experiment with artificial membrane

mm ϕ 適用 (シコニン量: $13.1 \mu\text{g}$, 塗布厚: $500 \mu\text{m}$) し, 拡散セルのレシーバー溶液としてイソプロピルアルコール (IPA) を用いて測定を行うと, Fig. 10 に示したように, シコニンの膜透過に伴う, PA 信号強度の減少と吸光度の上昇が同時に測定された. 次に, PAS・吸光度の経時変化をそれぞれ定量すると, シコニンの IPA に対する溶解性が大きいため, 膜内でのシコニンの拡散速度が非常に速く, 60 分後には膜上のシコニンがすべて膜透過したことが吸光度測定より確認された. このような膜透過の非常に速い条件の系において, PA 信号強度 (軟膏からの放出量) と吸光度 (膜透過量) の信号変化は量的かつ経時的に対応しており, 良好な相関を示した. 以上の結果より, 経皮吸収などの物質の膜透過現象を本法で測定できることを証明できた¹¹⁾.

4・2・2 ヘアレスマウス (HM) の皮膚を用いた *in vitro* 経皮吸収実験¹¹⁾¹³⁾ 脂肪部を除去した HM の摘出皮膚に, 3% シコニン軟膏を $6 \text{ mg}/10 \text{ mm}\phi$ 適用し, 拡散セルには生理食塩水をレシーバー溶液として用い, PAS・吸光度の同時測定を行った. その結果を Fig. 11 に示す. 25 時間の連続測定で, PA 信号の減少に伴う吸光度の上昇が確認された. 吸光度による定量結果より, 塗布量の 3.7% のシコニンが皮膚透過したことが認められた. 又, 軟膏からのシコニンの放出量に対応する PA 信号 ($Q_0 - Q_t$) は, Higuchi の経皮吸収理論¹²⁾ (基剤からの薬物の放出量は時間の平方根に比例) と良い相関を示した. 次に, 257 nm の UV 光 (3 mW) を光源とし, 1.0% IDM 軟膏を $6 \text{ mg}/10 \text{ mm}\phi$ 塗布して測定を行うと, Fig. 12 に示した結果のように, PA 信号の減少

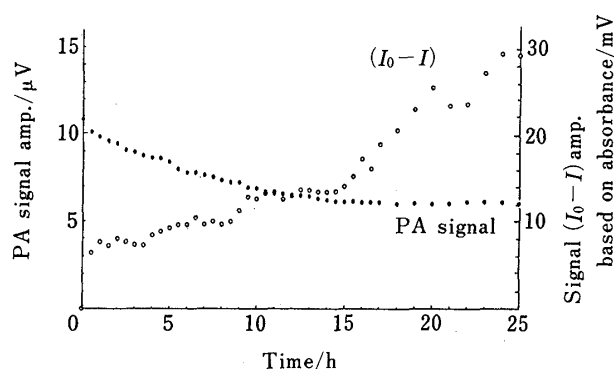


Fig. 11 *In vitro* percutaneous absorptiometry using hairless mouse skin

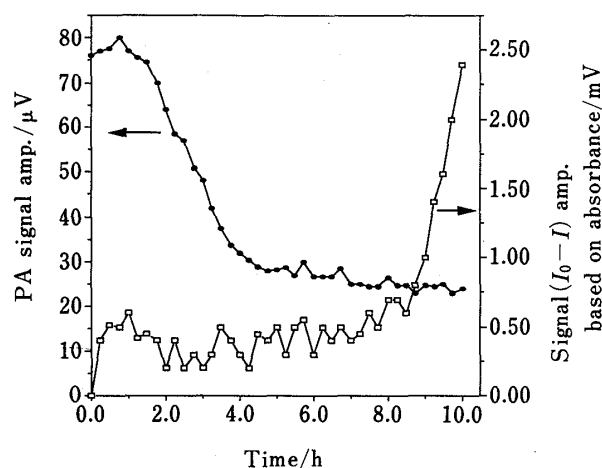


Fig. 12 *In vitro* percutaneous absorptiometry of the IDM ointment

と吸光度の上昇が確認され、10 時間後には塗布量の 1.1% の IDM が皮膚透過した。吸光度曲線の変動は、皮膚由来の水不溶物の影響が原因と思われる。ここで、PA 信号の減少度合いと比べて、7 時間以上の長いラグタイムが吸光度曲線において観測された。これは、IDM の皮膚中拡散速度によるものであり、IDM が皮膚内で保持（結合）されやすいことを示唆している¹³⁾。以上の *in vitro* 実験において、PA 信号と吸光度の経時変化が対応していることを実証し、皮膚中に保持されやすいシコニンや IDM 軟膏を試料とした測定で本法の有効性を示した。

4・3 *in vivo* 経皮吸収測定への応用

4・3・1 測定上で注意すべき条件 実際の測定において、注意しなければならない条件を記す。

(1) 光強度（試料への照射強度）：照射強度は当然のことながら、試料やその被適用物である膜や皮膚などを物理的、あるいは化学的に破壊しないように設定する必要がある。特に、生きた (*in vivo*) 皮膚に適用する際には光の照射エネルギー量を皮膚の MPE 以下に設定しなければならない。この最大許容値は光の波長 (300 nm 以上)、強度、照射時間のファクターであり、世界保健機関 (WHO) で明記されている。

(2) 試料の熱的特性と塗布厚との関係：前述したように、本法は膜や皮膚上の試料の残存量を測定する技法である。従って、適用する試料から発生する PA 信号のみを検出することが望ましい。これは試料の塗布厚で制御できる。塗布厚を変えて試料を適用していくと、未塗布（皮膚のみ）を測定したときの PA 信号から指数関数的に減少していくのが観測される。初期段階での PA 信号は皮膚と試料の両方からの信号が加わった信号である。減少しているのは、塗布厚の増加による試料量の増加に伴う PA 信号の増加より、皮膚からの PA 信号が塗布厚の増加によって逆に抑えられているからである。又、試料からの PA 信号は皮膚面で反射された光によって発生した PA 信号成分も含まれている。それにもかかわらず、減少していくことは、適用試料からの PA 信号よりも皮膚からの信号のほうがはるかに大きいことに由来する（試料の励起波長に対する吸光係数の大きさにもよるがほとんどの場合、このようになるであろう）。しかし、ある程度の塗布厚になると、PA 信号は一定値を示してくる。これは、皮膚からの PA 信号が関与せず、試料のみから発生しているからであり、測定周波数における試料の熱拡散長よりも塗布厚のほうが大きい系であると言える（ケース A3）。測定は、この状態から開始すればよい。適当な塗布厚 (ℓ [cm]) は、測定周波数 (f [s⁻¹]) における試料中の主たる物質の熱拡散長 (μ_s [cm]) によって異なり、次式を満たすように塗布厚を定める必要がある。

$$\ell > (2\kappa/\rho C\omega)^{1/2} = (\kappa/\rho C\pi f)^{1/2}$$

κ : 物質の熱伝導率 [cal cm⁻¹ s⁻¹ K⁻¹]

ρ : 物質の密度 [g cm⁻³]

C : 比熱 [cal g⁻¹ K⁻¹]

これらの事前検討は、測定精度に大きく影響を与えるので注意深く行うことが必要である。

(3) PA セルの膜及び皮膚への圧着度：これについては、圧着したときに皮膚がセル内部に大きく盛り上がりないように注意すべきである。これによって、セル容量が大きく変わったり、音響パイプの入り口をふさいで

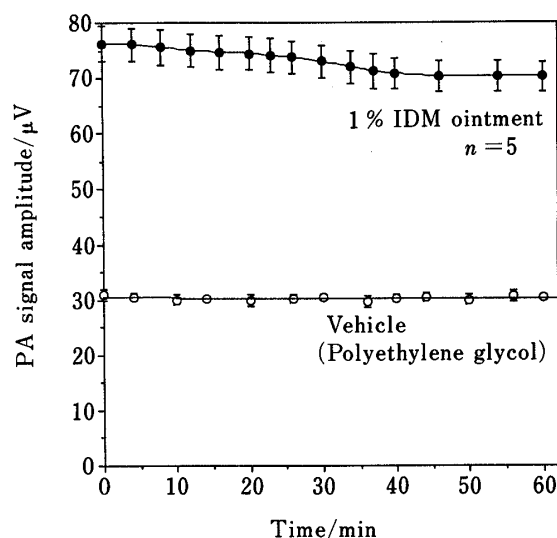


Fig. 13 PA signal versus time when measuring hairless mouse *in vivo* percutaneous absorption

しまつては正しい測定はできない。軽く押し当てる程度で測定は可能であり、音響パイプの入り口さえふさがなければ、圧着度が多少変化しても測定精度には特に影響を与えない。これは、初期信号によって確認でき、初期信号の変動がおよそ 10% 程度であれば問題はない。

4・3・2 薬物の皮膚中拡散係数の算出¹⁰⁾ 本法を適用することで、目的物質の皮膚中拡散係数を簡便に求めることができる。1% IDM 軟膏を HM の背部に塗布し、本法を用いて *in vivo* 経皮吸収測定を行った。測定は、UV レーザー光 (波長: 257 nm, 光強度: 3 mW) の温熱による経皮吸収促進の影響を防ぐため、約 5 分ごとに行った。1 回の測定にかかる時間は 15 秒であり、S/N (40) の改善により共鳴差動型 PA セルの半分の時間となった。これは、*in vivo* 皮膚に可能な限り損傷を与えないためにも有効である。Fig. 13 に IDM 軟膏の *in vivo* 経皮吸収測定の結果 ($n=5$) を示す。基剤のみ塗布し同条件で測定を行った参照信号と IDM を塗布した場合を比較すると、前者は時間に対してほぼ一定であるが、後者は 60 分後に初期信号に対して 5% の信号の減少が認められた。UV レーザー照射による IDM の破壊や光変化は認められず、この PA 信号の減少は IDM の皮膚吸収に伴うものと考えられた。そこで、本法によって得られた結果から、IDM の皮膚 (*in vivo* HM) 中拡散係数を求めてみた。これは、PA 信号の時間に対する減少変化の時定数を定めることで得られる¹⁵⁾。皮膚上の物質の濃度の減少は基本的に指数関数で表されるので、時定数は PA 信号を対数でプロットすることで得ら

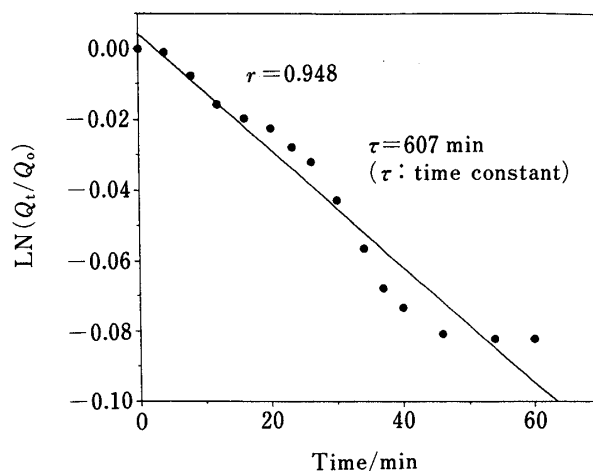


Fig. 14 Determination of the diffusion coefficient of IDM across the skin of a hairless mouse *in vivo*

れる (Fig. 14)。又、膜中の物質の拡散理論¹⁵⁾より、時定数 τ は次の式で記述される。

$$\tau = 4L^2 / \pi^2 D \quad (L: \text{膜厚}, D: \text{物質の膜中拡散係数})$$

この原理を得られた PA 信号の経時変化に適用すると、 τ は相関係数 0.948 で 607 分と定まり、これより拡散係数 (D) は $6.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$ となった。なお、HM の皮膚厚 (L) は摘出皮膚を実測し、0.1 cm とした。PAS により求められた拡散係数は、従来の垂直型拡散セルを用いた *in vitro* 法により得られた値 ($3.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$) とオーダーで一致した。この結果は、定量することなく皮膚中拡散係数を求めることのできる本法の経皮吸収評価法としての有効性を示した。なお、ここでは皮膚を 1 層膜とみなし被験物質の皮膚中拡散係数を算出したが、皮膚を多層膜 (少なくとも 3 層以上) として、それぞれの拡散係数を解析する手法を検討している。以上、RI などの従来法と比較して非常に簡便な本法の、経皮吸収評価法としての有効性を示した。加えて、本法はヒト *in vivo* 経皮吸収測定法として、十分に適用可能であることが示唆された。著者らは HM の *in vivo* 皮膚より、ヒト *in vivo* のほうが S/N が平均的に 5 倍ほど良くなることを経験的に知っている。つまり、ヒト *in vivo* 皮膚では、測定中に意識的に皮膚からの大きな振動 (ノイズ) を抑えることができるが、HM *in vivo* ではこの制御ができないため、ノイズ信号がヒトに適用した場合より大きくなるからである。HM *in vivo* 皮膚における結果を示すことは、PA セルとしての性能を明確に示ことになる。従って、ヒト *in vivo* 皮膚に本法を適用した場

合, Fig. 13 に示した結果より, より高い S/N と優れた測定精度が得られるはずである.

4・3・3 角層のバリアー特性の検討¹⁴⁾ 前述したように, 角層は薬物の経皮吸収にとって最大のバリアーである. 目的薬物の皮膚への浸透にとって, 角層がどの程度バリアーとなっているのか, それを検討することは化学物質の構造特性による経皮吸収性を予測する際の一つの指標となる. 著者らは本法の新たな応用として, 薬物の角層に対するバリアー特性を調べる検討を行っている. 一例として, 鎮しろう (痒) 剤であるピコリン酸亜鉛 (PZ) を薬物とし, グリセリンと水を 40:60 で配合した基剤で調製した 0.8% PZ 溶液を試料として, モルモットの *in vivo* 測定を行った結果を示す. Fig. 15 に示したように, 正常皮膚 (N. S) の場合, 角層がバリアーとなっているため, 経皮吸収速度は角層をはく離した皮膚 (S. S) の約 1/5 であることが認められた. 対象薬物の角層に対するバリアー特性は, S. S に対する N. S の速度比を求めることで定義できると考えると, PZ のバリアー特性は 0.21 となった. 以上のように, 本法を用いれば対象薬物の角層に対するバリアー特性を簡単に数値化できるので, 化学物質の構造特性による経皮吸収予測等の検討に威力を発揮できるものと期待される.

4・3・4 ヒト *in vivo* 経皮吸収実験⁷⁾ 3% シコニン軟膏を実使用量 (6 mg/10 mm ϕ), ヒトの前腕に塗布し, Fig. 5 に示した装置を用い *in vivo* 測定を行った. 測定時の写真を Fig. 16 に示す. このとき, レーザー光の温熱による経皮吸収促進の影響を防ぐため 5 分ごとに測定を行い, 1 回の測定にける時間はロックインアンプ等の微小信号解析の機能を考慮して 30 秒とした. この際, S/N は 60 と極めて優れ, 5 回の繰り返し測定において変動度 10% 以内と良好な再現性を得た. 基剤のみを塗布し, 同条件で測定を行った参照信号とシコニンを塗布した場合を比較すると, 前者は時間に対してほぼ一定であるが, 後者は 100 分後に初期信号のおよそ 25% の減少が認められた. これは光照射によるシコニンの破壊に伴う PA 信号の減少ではないことを確認している. 又, 同条件で HM を測定 (繰り返し回数 5 回) したところ, 基剤のみと比較して, 40 分までに再現性よく, 初期信号の 33% の減少が観測された. 両者の PA 信号の変化からシコニンの皮膚への拡散速度を求めると (Fig. 17), HM のほうがヒトより経皮吸収性が大きく, これは HM のほうがヒトよりバリアーである角層が薄いためであり, 妥当性のある結果が得られた. 更に, 動物の場合は一定の速度を示したが, ヒトでは 2 段階の異なる速度が認められた. これは高感度か

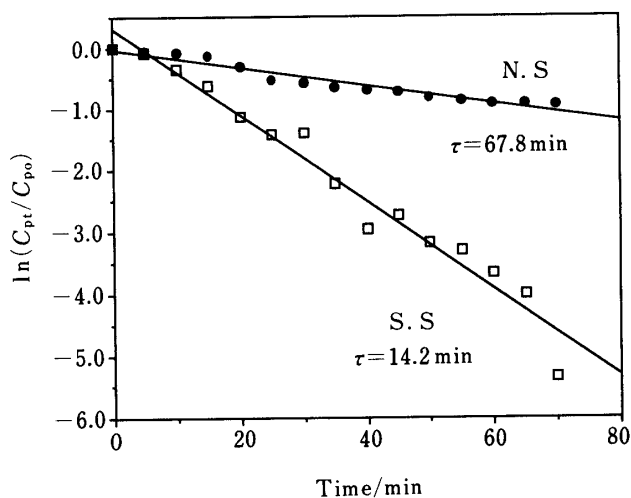


Fig. 15 *In vivo* percutaneous absorption of a normal skin (N. S) compared to that of stripped skin (S. S)

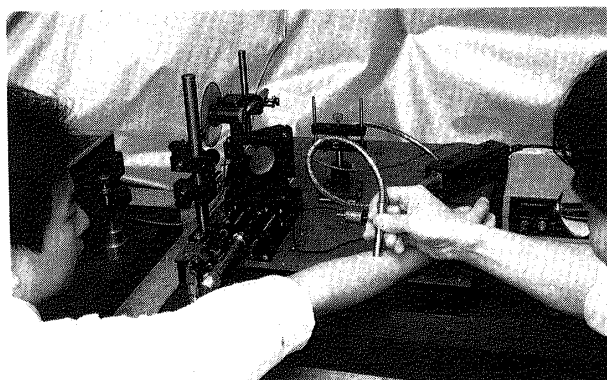


Fig. 16 Photograph showing the measurement of *in vivo* percutaneous absorption of a human by the open-ended PA cell

つ高精度な本法によって初めて得られた知見であり⁷⁾, その理由の一つとして, ヒト皮膚中のシコニンの局所的な結合が考えられる. すなわち, 被験物質の濃度が皮膚表面から内部まで指数関数的に分布しているのであれば, 1 段階の時定数が得られる¹⁶⁾. しかし, 皮膚内部で被験物質が一部保持されれば, 濃度こう配も変わり, 2 段階の時定数が得られるはずである. このことは, 本法によって正確に測定される皮膚上の被験物質の残存量の経時変化を解析することで, 深さ方向の情報を探り出すことの可能性を示唆している. 得られる PA 信号の減衰率 (時定数) は, 皮膚表面から内部に浸透した被験物質の濃度こう配に対応していると考えられるので, その時

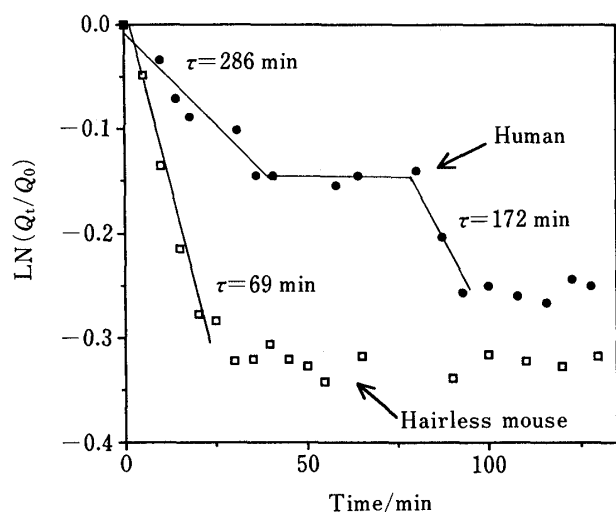


Fig. 17 Comparison of the percutaneous absorption of a human with that of a hairless mouse

定数を解析することで、皮膚内部の濃度分布を推測しようとする全く新しい技法である。つまり、Fig. 15 (1段階として処理したが2段階として見ることもできる)及び Fig. 17 で観測できる変曲点を有する時定数曲線をシミュレーションすることで、皮膚表面からどの程度の深さにどれくらいの量保持されているのか、推定しようとする試みである。現在、Fick の第2方程式 (物質の膜への拡散) と PA 信号理論を融合させ、シミュレーションを行うためのプログラムを開発中である。

5 結 語

以上の結果のように、本法は開発した開放型セルを聴診器のように皮膚に当てるだけで、高感度かつ高精度に経皮吸収測定ができることが分かった。又、本法は従来法では測定が困難、あるいはできなかった、物質の皮膚中拡散係数や経皮吸収挙動を簡単に探ることができる可能性が認められた。なお、本論文においては得られる PA 信号の強度のみを取り扱ったが、位相変化を追跡することで皮膚上の試料と皮膚の境界面における吸収挙動をとらえるなどの、新たな情報が得られる可能性がある。今後の進展を期待したい。最後に本法の経皮吸収測定への応用について、今後の展望を幾つか記す。

(1) 本法のはん用性について: レーザーを励起光源とした場合、高感度ではあるが波長の関係ではん用性が乏しいのではといった懸念がある。しかし、非線形光学結晶を組み合わせた Ar^+ レーザー {244, 257 nm (488, 514 nm の 1/2 波長), 280 nm (Ar^+ レーザーの UV 発

振波長)} や He-Cd レーザー (325 nm) などの UV 光を用いれば比較的多くの物質に適用可能である。最近では、Ti-サファイアレーザーなどの波長可変レーザーもコスト面で手に入りやすくなっており、更に進歩していくものと期待している。又、田村ら¹⁷⁾は、280 nm の Xe ランプ光を励起光として、皮膚由来の PA 信号を経時的にとらえることで、被験物質の経皮吸収性を間接的に測定する手法の開発に成功した。これは励起光を被験物質の吸収波長に設定する必要がなく、はん用性の面において非常に有効な方法である。現在は、密閉型 PA セルを用いる *in vitro* 測定法であるが、開放型 PA セルでこの手法が可能になれば応用範囲は更に広がるものと考えられる。

(2) 深さ方向測定について: *in vivo* 皮膚の深さ方向に存在する経皮吸収物質の分布状態を簡単に測定できる手法の確立は、この分野の研究者にとっての一つの夢である。PAS はこの夢を実現できる分析法として大いに期待されている。通常、PAS による深さ方向の測定は、試料に光を当てる間隔 (周期) を変えることによって行われている。すなわち、間隔を長くすれば内部の情報が、短くすれば表面の情報が検出される。断続光の周期と表面からの深さの関係は、被験物質の密度、比熱、熱伝導度によって決定される。例えば、断続光の周期を 600 Hz にすれば、皮膚表面からおよそ 10 μm の深さの情報が得られ、数百 μm の深さの情報を得るためには断続光の周期を 50 Hz 以下に設定しなければならない¹¹⁾。しかし、前述したように周期を小さくすればするほどノイズが大きくなるため、PAS 信号の音のみを区別して正確にとらえることは、非常に困難である。著者らの開発した PA セルでは数 μm の深さ方向分析は可能と思われるが、より内部を測定するためにはノイズを除去するためのハード及びソフト面からの工夫が更に必要である。現在開発中の時定数曲線シミュレーションプログラムは、有効な手法の一つとして期待している。

(3) UV-PAS のヒト *in vivo* 皮膚への適用について: 本法をヒト皮膚に適用するために残された唯一の障害は、照射 UV 光の *in vivo* 皮膚に対する安全性のみである。これについても、本測定法による UV 照射量はごくわずかなものであり、安全性の問題はないレベルと思われる。今回、257 nm の UV 光を照射した HM の皮膚に異常は観察されなかった。しかし、UV 光の皮膚に対する MPE 値が明確に定められていないため、安全性の立証が困難な状況にある。現在、著者らも UV 光の照射エネルギー量と皮膚の安全性について検討を行っている。更に、皮膚科学の分野において、PAS は経皮

吸収に関する研究のほかに、表皮組織層の水和特性の研究¹⁵⁾、角質層の研究¹⁸⁾、 β -カロテンなどの生体色素の研究¹⁹⁾等にも用いられており、この分野における本法の応用は興味が尽きない。皮膚科学は皮膚の変化を肉眼で見ることから発達した臨床医学の一分科であるが、従来の“見る皮膚科学”から“計測する皮膚科学”へと動き出している。皮膚をあるがままの状態で測定できるPASがその発展の一端を担うことを期待している²⁰⁾。なお、本研究に興味を持たれ、より詳細に内容を知りたい方は、1996年に専門書²¹⁾が発行される予定なので参照していただきたい。

最後に、本研究は澤田嗣郎教授（東京大学工学部応用化学科）の下で行われたものであり、先生のご指導に対して心から感謝の意を表したい。澤田研究室の北森武彦助教授、原田 明助手にも多くの助言をいただいた。感謝の意を表す。又、このような研究の場を与えてくれた（株）資生堂安全性・分析センターの小林敏明所長、分析研究グループの皆さんの多大な協力に感謝申し上げる。

文 献

- 1) 澤田嗣郎編：“光音響分光法とその応用—PAS”，(1982)，(学会出版センター)。
- 2) A. Rosencwaig, A. Gersho: *J. Appl. Phys.*, **47**, 64 (1976)。
- 3) P. Poulet, J. Chambron: *J. Photoacoustics*, **1**, 329 (1983)。
- 4) K. Kolmel, B. Sennhenn, K. Giese: *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **37**, 375 (1986)。
- 5) K. Giese, A. Nicolaus, B. Sennhenn, K. Kolmel: *Can. J. Phys.*, **64**, 1139 (1986)。
- 6) M. M. Thompson, R. A. Palmer: *Anal. Chem.*, **60**, 1027 (1988)。
- 7) R. Takamoto, R. Namba, M. Matsuoka, T. Sawada: *Anal. Chem.*, **64**, 2661 (1992)。
- 8) 黒岩 魯，老門泰三：電気学会雑誌，**10**，212 (1974)。
- 9) L. C. Aamodt, J. C. Murphy, J. G. Parker: *J. Appl. Phys.*, **47**, 64 (1976)。
- 10) R. Takamoto, S. Yamamoto, R. Namba, T. Takamatsu, M. Matsuoka, T. Sawada: *Anal. Chem.*, **66**, 2267 (1994)。
- 11) R. Takamoto, R. Namba, O. Nakata, T. Sawada: *Anal. Chem.*, **62**, 674 (1990)。
- 12) T. Higuchi: *J. Pharm. Sci.*, **50**, 874 (1961)。
- 13) R. Takamoto, S. Yamamoto, R. Namba, M. Matsuoka, T. Sawada: *Anal. Chim. Acta*, **299**, 387 (1995)。
- 14) R. Takamoto, S. Yamamoto, R. Namba, M. Matsuoka, T. Sawada: *J. Phys. Colloque.*, **C7**, 453 (1994)。
- 15) S. D. Campbell, S. S. Yee, M. A. Fromowitz: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering BME*, **26**(4), 220 (1979)。
- 16) J.-C. Tsai, M. J. Cappel, N. D. Weiner: *Intern. J. Pharm.*, **68**, 127 (1991)。
- 17) 田村 成，武本尚子，鈴木雄二，澤田嗣郎：油化学，**41**，558 (1992)。
- 18) K. Giese, K. Kolmel: *J. Phys. Colloque.*, **C6**, 373 (1983)。
- 19) M. A. Dennis, A. M. Thomas: *Photochem. and Photobiol.*, **39**, 635 (1984)。
- 20) 高本隆一：化学と工業，**48**，125 (1995)。
- 21) 澤田嗣郎編：“光熱変換分光法とその応用”，第8章，(1996年発行予定)，(学会出版センター)。

要 旨

皮膚は身体の表面を被い、物理的に生体内部を保護するばかりでなく、種々の生物学的役割を担っている。光音響分光法 (PAS) を用い、皮膚の表面や内部を測定すると、従来の方法ではとらえることが困難、あるいはできなかった情報を簡便かつ正確に得ることができる。著者らは PAS で化学物質の皮膚への吸収 (経皮吸収) 挙動をとらえることを試みた。本研究は、医薬品や化粧品などの外用剤の開発者にとって、薬効や安全性を左右する重要な課題である。本研究を達成するためには、皮膚上の化学物質を高感度かつ高精度に測定の可能な光音響セルを開発しなければならない。いままでに、幾つかの研究例が報告されているが、感度や精度に極めて問題があった。著者らは、高感度かつ高精度に経皮吸収測定の可能な光音響セルの開発に取り組み、*in vitro*, *in vivo* 経皮吸収測定への適用を行ってきた。本論文において本法の経皮吸収測定法としての有効性を報告する。