

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590045

研究課題名（和文） MN・EP システムを付与した経皮パッチによるバイオ治療薬デリバリーシステム

研究課題名（英文） Biopharmaceutical delivery using transdermal patches having MN and EP systems.

研究代表者 杉林 堅次（SUGIBAYASHI KENJI）

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：000105834

研究成果の概要（和文）：マイクロニードル（MN）およびエレクトロポレーション（EP）を付与した経皮パッチは、MN や EP の単独使用と比較して著しく高分子化合物の皮膚透過性を改善することができた。さらに、MN・EP システムは、高分子化合物の皮膚透過性だけでなく、粒子径 50 nm および 500 nm のポリスチレン粒子の皮内浸透性を高めることが可能であった。この結果は、MN・EP システムを付与した経皮パッチは、バイオ治療薬デリバリーに有効であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Transdermal patch incorporating microneedle (MN) and electroporation (EP) improved skin permeation of high molecular weight of compound compared with MN or EP alone application. In addition to improvement of skin permeation for high molecular weight of compound, polystyrene particles having particle sizes of about 50 nm and 500 nm were delivered into the deeper part of skin with MN・EP systems. These results suggested that transdermal patch having MN・EP system would be a useful delivery system for biotherapeutics agents into skin.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2010 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：マイクロニードル、エレクトロポレーション、経皮パッチ、ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代を迎え、今まさに遺伝子工学、細胞工学、さらにはタンパク質工学の急速な発展に伴うバイオ治療薬の実用化が進んでいる。現在、バイオ治療薬は主に注射により投与されているが、汎用化のためには自己投与可能な製剤としなければならない。

我々はこれまで、治療薬の投与部位として皮膚を用いた送達システムについて検討してきた。特に物理的吸収促進法である、イオントフォレーシス、エレクトロポレーション（EP）、マイクロニードル（MN）、さらには無針注射器の研究を通して、すでに皮膚（角層）バリアーを考慮に入れる必要のない経皮

投与システムが可能となる時代が近いことを感じていた。一方、バイオ医薬品の急激な市場への導入は、従来型製剤を根本的に見直す時期が来ていることを認識させたとともに、バイオ治療薬を安定に製剤中に封入させることも重要であることを感じさせるようになった。

2. 研究の目的

皮膚局所やその近傍さらには全身作用を目的とした治療薬の投与部位として注目されている皮膚に着目し、バイオ治療薬を吸着や分解から防ぎ、かつ皮内、皮下、さらには全身循環系に確実にバイオ治療薬を送達できる経皮パッチシステムの開発を目指す。なお、治療薬の安定化に際しては、リポソームなどの脂質分散体やポリ乳酸などを素材とするナノパーティクルの利用を考える。さらに、確実にバイオ治療薬を皮膚送達するため、マイクロニードルシステムやエレクトロポレーションを用いた経皮送達促進を狙う。また、それぞれのマイクロニードルを交互に陽極と陰極電極として、皮内・皮下エレクトロポレーション（マイクロニードル・エレクトロポレーションシステム）を行う。本方法により、バイオ治療薬を含有したリポソームやナノパーティクル製剤が皮内・皮下に送達され、最終的に全身循環系にも吸収させることが可能であると考えられる。

3. 研究の方法

皮膚から薬物作用部位へのデリバリーシステムが注目されている。表在性ガン、乾癬、肝斑などの局所治療を目的とした場合、目的とする部位に効率的に薬物を皮膚表面から皮内に送達する技術が求められる。また、肝臓での初回通過効果の高い薬物の投与部位として皮膚からの薬物デリバリーは有用であり、かつ投与方法が簡便であるため患者のコンプライアンスや Quality of Life の改善につながる。しかし、皮膚最外層に位置する角層は薬物の皮膚透過に対する強力な透過バリアーとなっており、効果的な経皮投与のためには、この障壁を突破しうるシステムの開発が必要である。また、今後の薬物療法として、生体高分子物質、とりわけ遺伝子や生理活性蛋白質、抗原分子などの最適デリバリーによる遺伝子治療やサイトカイン療法、また、免疫・ワクチン療法や抗体療法などがますます増加すると考えられる。このため、ペプチド、蛋白、オリゴヌクレオチドなどの生体高分子の効果的な投与方法の確立が重要となる。微粒子化はバイオ治療薬を物理化学的に安定な製剤として投与することが可能となり、かつ製剤からの薬物放出性を制御することで、持続的なデリバリーをも可能となる。

我々はすでに、マイクロニードルシステムが、分子量の異なる蛍光物質の皮内分布や皮膚透過速度を制御できることを報告している。また、マイクロニードルシステム単独では高分子医薬品の皮膚透過性を大きく改善することが難しいこと、マイクロニードルシステムにイオントフォーシスを併用したシステムは高分子医薬品の顕著な皮膚透過性改善が可能であることを報告している。そこで、皮膚バリアーを突破し、バイオ医薬品の新規経皮投与方法を構築・実現するため、各種ナノ微細加工技術を用いて、圧力や電場などの物理的エネルギーを治療薬の吸収駆動力とした、マイクロニードル・エレクトロポレーションシステムの構築を計画した。

4. 研究成果

図 1 に作成したマイクロニードルアレイ (MN) を電極とした経皮パッチデバイスを示す。本デバイスは、シリコン膜 (厚さ: 1.1 mm、長さ: 15×15mm)、塩化ビニルテープおよび

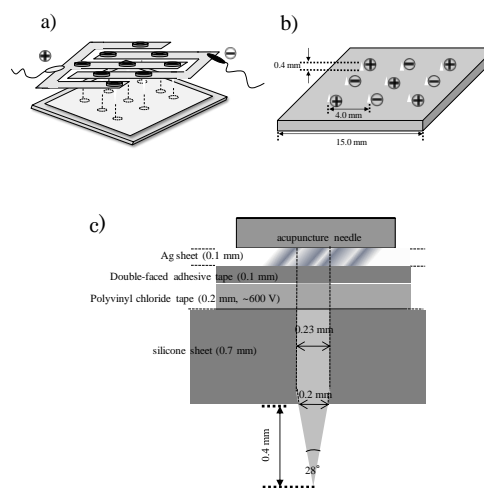


図 1 Schematic illustration of MN electrode-array made by acupuncture needles. a) Top view, b) Back view, c) Side view, for ON-SKIN EP.

び銀板を支持体とし、MN 電極は、9本の微小鍼灸針を 4 mm 間隔で配置し、微小鍼灸針が電極となるよう配設されている。本デバイスによる高分子薬物の皮膚透過促進効果を確認するため、分子量 4,400 Da の FITC-dextran (FD-4) の皮膚透過促進効果を確認した。

MN を電極とした経皮パッチデバイスにて MN 処理を施した後、エレクトロポレーション (IN-SKIN EP) を行い FD-4 の皮膚透過性を評価した結果、MN 単独処理や皮膚表面でのエ

レクトロポレーション (ON-SKIN EP) 処理と比較して著しく FD-4 の皮膚透過性を高めることが分かった (図 2)。また、電子顕微鏡観察により、IN-SKIN EP は MN 単独や EP 単独処理と比較して角層に形成する小孔のサイズ

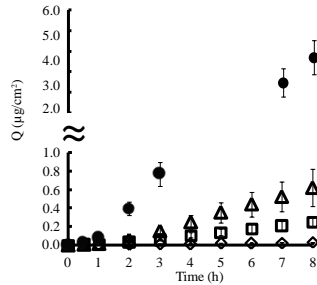


図 2. Time course of the cumulative amount of FD-4 that permeated through intact skin, skin treated with MN alone, skin treated with ON-SKIN EP and skin treated with IN-SKIN EP. Symbols: \diamond , no pretreatment (intact skin); \square , MN alone; \triangle , EP alone (200 V, 10 ms, 10 pulses); \bullet , IN-SKIN EP (200 V, 10 ms, 10 pulses).

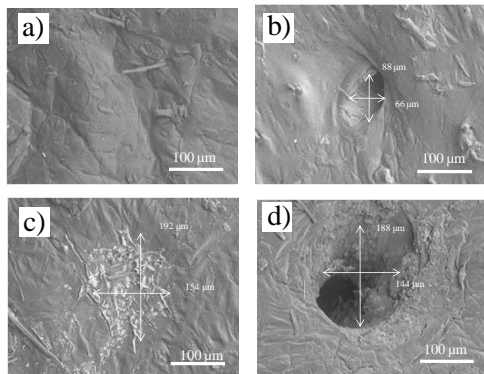


図 3. SEM observation of skin surface after treatment with different devices. a) Intact skin, b) MN alone, c) ON-SKIN EP (200 V, 10 ms, 10 pulses, d) IN-SKIN EP (200 V, 10 ms, 10 pulses).

が大きいことが分かった (図 3)。これらの結果より、IN-SKIN EP は皮膚表面に新たに大きな薬物の皮膚透過ルートを形成することで高分子医薬品の皮膚透過性を改善する方法であることが分かった。

MN と EP を併用した IN-SKIN EP による薬物の皮膚透過促進効果は、電圧、パルス幅、パルス回数などの EP 付加条件に影響を受ける可能性がある。そこで次に、IN-SKIN EP による EP 付加条件が、FD-4 の累積透過量に及ぼす影響について調べた。図 4 に結果を示す。パルス幅と付加電圧を変化させた結果、パルス幅もしくは電圧の増大にともない FD-4 の累積透過量は高くなることが分かった。電圧

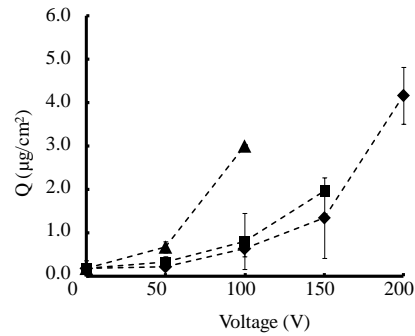


図 4. Effect of pulse width and voltage of EP on the time course of the cumulative amount of FD-4 that permeated hairless rat skin. Symbols: \diamond , 10 ms; \square , 50 ms; \triangle , 100 ms. Each data point represents the mean \pm S.E. of four or five experiments.

50 V、パルス幅 100 ms、パルス回数 10 回の IN-SKIN EP は、電圧 200 V、パルス幅 10ms、パルス回数 10 回の EP 単独適用と同程度の FD-4 の累積透過量を示した (図 2)。この結果より、50V と低い電圧でも十分に高い FD-4 透過性を得られることが分かった。

さらに、薬物透過性に及ぼす EP の電場が FD-4 の皮膚透過性に及ぼす影響を調べるために、電極配列が異なる IN-SKIN EP デバイスを作成し、FD-4 の皮膚透過性に及ぼす影響

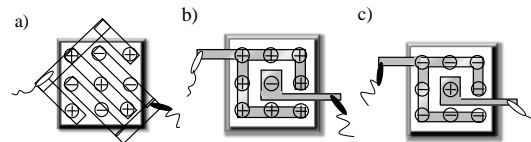


図 5. Schematic representation of three kinds of MN-electrodes array patches.

MNs are arranged as a 3-by-3 array in any device. a) 5-anodes and 4-cathodes, b) 8-anode and 1-cathode, c) 1-anode and 8-cathode.

について調べた。図 5 に電極配列の異なるデバイスを示す。これまでの検討に用いた電極を交互に配置したデバイス A に加えて、中央に陰極をその周囲に陽極を配置したデバイス B、中央に陽極をその周囲に陰極を配置したデバイス C を用いた。

電極の配列の違いにより FD-4 の皮膚透過量が異なり、IN-SKIN EP 処理 8 時間経過後の FD-4 累積透過量は、デバイス B > デバイス A \approx デバイス C の順となった。この結果より、EP の電気付加条件だけでなく、電極の配列も高分子薬物の皮膚透過性に影響を及ぼすことが明らかとなった (図 6)。

皮膚に適用した薬物の局所濃度は薬効と強く関係するため、ナノスフェアなどの薬物含有したキャリアが皮膚の生きた表皮や真皮まで送達できれば、薬物の皮膚局所濃度を著しく高めることが可能となる。そこで、IN-SKIN EP 処理による微粒子の皮内送達の有用性について MN 単独や ON-SKIN EP 処理と比較・検討した。

MN 単独処理により皮膚に形成された新規透過ルートを通じて粒子径が 50 nm や 500 nm のポリスチレン粒子は、皮膚表面から約 20 μm の深さまで送達可能であった。しかし、粒子径が 6 μm もの大きさになると粒子は MN 単独処理では皮内に移行しないことが分かった。

MN 処理を施さず、エレクトロポレーションのみ (ON-SKIN EP) を 100 V、10 ms、10 pluses の電気条件下で行うと MN 単独処理と同様に微粒子を皮内に送達可能であったが、粒子の送達部位は皮膚の浅層部までとなった。一方、デバイス B を用いて 100 V、10 ms、10 pluses の電気条件下で IN-SKIN EP を施すと、いずれのサイズの粒子も皮内に送達され、その到達部位は粒子径に依存し、50 nm の粒子は新たに形成された小孔の最深部まで (約 100 μm) 送達されていることが分かった (図 7)。本検討では、ポリスチレン微粒子を生分解性の高分子や脂質ベシクルのモデル粒子として選択したが、モデル粒子が皮内へ到達されたことから、IN-SKIN EP は生きた表皮や真皮への微粒子や脂質ベシクルを送達可能である有用な方法であると考えられた。

新規透過促進デバイスを開発するには、有効性だけでなく安全性についても考慮する必要がある。そこで、高い薬物の皮膚透過性改善が認められたデバイス B を用いて

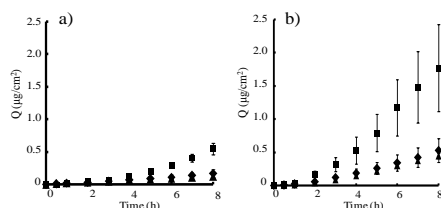


図 6. Time courses of the cumulative amount of FD-4 that permeated through skin pretreated by ON-SKIN EP (a) and IN-SKIN EP (b) with three kinds of devices.

Symbols: ◆, device A; ■, device B; ▲, device C. (EP condition: 50 V, 100 ms, 10 pulses)

IN-SKIN EP 処理後の皮膚局所刺激性を皮膚血流の変化や皮膚の赤みより評価した。50 V、100 ms、10 pulses の電気条件では、IN-SKIN EP 処理後の血流や皮膚の赤みは、無処理皮膚と同程度であった。一方、100 V、100 ms、10

pulses の電気条件にて処理を行うと、処理直後に一過性の血流および赤みの増大が認められたものの、処理 90 分後には血流や赤みが無処理皮膚と同程度まで戻ることが分か

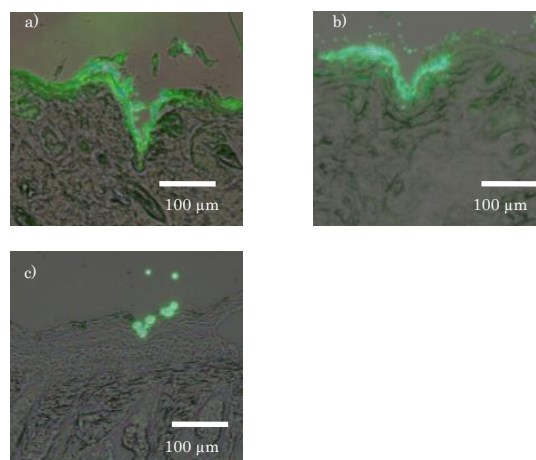


図 7. Distribution of nanoparticles, a) 0.05, b) 0.5, and c) 6.0 μm , in hairless rat skin 8h after IN-SKIN EP. The electric condition was 100 V-10 ms-10 pluses. Green fluorescence shows nanoparticle.

った。これらの結果より高電圧 (>100 V) での IN-SKIN EP 適用は十分な注意が必要であると考えられた。

MEMS 技術により様々なタイプのマイクロニードルが作成可能になりつつある。また現在は印刷技術の発展に伴い、非常に薄い皮膚に貼ることが可能な電池の作成が可能である。これらの技術の組み合わせで作成可能な IN-SKIN EP は、バイオ医薬品やこれら含有したキャリアの経皮送達を促進する有用なデバイスであると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

杉林堅次、薬物の皮膚透過促進技術：エレクトロポレーション、マイクロニードル単独効果、そしてマイクロニードル電極アレイを用いたエレクトロポレーションの効果、Progress in drug delivery system, XVIII, 5-9, 2009.

Yan K, Todo H, Sugibayashi K. Transdermal drug delivery by in-skin electroporation using a microneedle array. Int J Pharm, 397, 77-83, 2010.

Nanthida W, Tanasait N, Praneet O, Todo H, Sugibayashi K, A hollow microneedle carrier for enhancing skin penetration of large molecular compounds, Adv. Mater.

Res., 194-196, 549-553, 2011.

〔学会発表〕(計6件)

杉林堅次, 薬物の皮膚透過性促進技術: エレクトロポレーション、マイクロニードル単独効果、そしてマイクロニードル電極アレーを用いたエレクトロポレーションの効果、第18回 DDS カンファランス, 2009, 静岡コンベンションアーツセンター

杉林堅次、経皮吸収促進技術とその評価法、半固形製剤 教育研修会、2009年

杉林堅次ら、マイクロニードル電極を用いたエレクトロポレーションによる高分子薬物の経皮送達、日本薬剤学会第24回、2009年

杉林堅次ら、マイクロニードル電極を用いたエレクトロポレーションによる高分子薬物の経皮送達、第25回日本 DDS 学会、2009年

喜島小翔、Yan Keshu、藤堂浩明、杉林堅次、マイクロニードル電極を用いたエレクトロポレーション適用によるナノ粒子の皮内到達の可能性、日本薬学会第131年会、2011年3月、静岡

藤堂浩明、透過促進機能を有する経皮吸収型製剤の可能性、日本 DDS 学会、2011年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉林堅次 (KENJI SUGIBAYASHI)
城西大学薬学部
研究者番号: 00105834

(2) 研究分担者

藤堂浩明 (HIROAKI TODO)
城西大学薬学部
研究者番号: 10383184

石井宏 (HIROSHI ISHII)
城西大学薬学部
研究者番号 90383182