

## 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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：34306  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010 年度～2012 年度  
 課題番号：22590155  
 研究課題名（和文） 生体分解性マイクロニードルを用いたインクレチンの次世代型経皮吸収製剤の開発  
 研究課題名（英文） Development of novel transdermal delivery formulation of incretin using biodegradable microneedle arrays  
 研究代表者  
 山本 昌（Yamamoto Akira）  
 京都薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：00166779

研究成果の概要（和文）：本研究では、Exenatide (Exendin-4) を選択し、Exendin-4 を封入した生体分解性マイクロニードルを調製し、本マイクロニードルをラット皮膚に適用後の有効性について検討した。2型糖尿病のモデル動物である GK/Slc ラットを用いて Exendin-4 含有マイクロニードルの皮膚適用後の有効性について検討したところ、グルコース耐糖効果ならびにインスリン分泌の増大が観察され、その効果は皮下投与の場合とほぼ同等であることが認められた。したがって、Exendin-4 含有マイクロニードルは、2型糖尿病治療の際に Exendin-4 の皮下投与に代わるきわめて有用な投与形態であることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate the characteristics of exendin-4 tip-loaded microneedle arrays and to compare their acute efficacy with subcutaneous injections in type 2 diabetic GK/Slc rats. Intraperitoneal glucose tolerance tests after application of exendin-4 tip-loaded microneedle arrays were also compared with those after subcutaneous injection in type 2 diabetic GK/Slc rats. Glucose tolerance was improved and the insulin secretion was enhanced after application of exendin-4 tip-loaded microneedle arrays, and these effects were comparable to those after subcutaneous injection of exendin-4. Similar plasma concentration profiles were seen after application of exendin-4 tip-loaded microneedle arrays, as was the case with subcutaneous injection in type 2 diabetic GK/Slc rats. These findings indicate that exendin-4 tip-loaded microneedle arrays can be used as an alternative to achieve sufficient delivery of exendin-4 for treatment of type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：マイクロニードル、経皮吸収、インクレチン、吸収改善

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、「インスリン作用の不足により生じる慢性の高血糖を主徴とする代謝症候群」であり、生活習慣の変化に伴い、現在、世界的に患者数が増加していることが知られている。本邦においても最近の統計によると糖尿病患者は約 820 万人、またその予備軍は約 1,050 万人であり、これらを合計すると 2,000 万人に近い患者およびその予備軍が存在することになり、その予防・治療は社会的にもきわめて重要な課題の一つである。現在、糖尿病の治療薬として、経口血糖降下薬である  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害薬、グリニド系薬、スルホニル尿素薬、ビグアナイド薬、チアゾリジン薬や各種インスリン製剤などが用いられており、糖尿病患者におけるインスリン抵抗性の増大ならびにインスリンの分泌障害の改善が行われている。しかしながら、これら既存の糖尿病治療薬を用いた場合、(1) 食後高血糖をコントロールする際に次の食事の前や夜間などに低血糖症状が生じやすくなる、(2) 血糖コントロールを優先すると体重増加が生じやすくなる、(3) 経口糖尿病薬を投与していると徐々に効果が減弱し、血糖コントロールの目標範囲を逸脱しやすくなるなどの様々な問題点がみられ、臨床上これらの問題を解決することが重要になっている。

こうした中、近年、2 型糖尿病の新たな治療薬として、「インクレチン」とよばれる消化管ホルモンが脚光を浴びている。「インクレチン」は、食事摂取に伴い消化管から分泌され、膵  $\beta$  細胞に作用してインスリン分泌を促進するホルモンの総称であり、これまでに

glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の 2 つのホルモンが「インクレチン」として機能することが確認されている。インクレチンは、従来の糖尿病治療薬と異なり、生理的に体内に存在する物質であり安全性が高く、またスルホニル尿素系とは異なる作用機構でインスリン分泌を促進することが知られており、既存の薬物に耐性を生じた糖尿病患者にも効果を発現しやすいという特徴を有している。また、最近の研究ではインスリン分泌作用以外に膵  $\beta$  細胞に直接作用し、膵  $\beta$  細胞を増殖する作用も有する可能性が指摘され、新しい作用機序を有する糖尿病治療薬として大いに期待されている。しかしながら、インクレチンはアミノ酸が多数つながったポリペプチドであり、分子量が大きくまた dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) により速やかに分解されるため経口投与では効果がみられず、臨床では注射により投与されているのが現状であるが、注射は患者に痛みを伴い、またアレルギーやアナフィラキシーなどの副作用も発現しやすいため、非侵襲的で安全なインクレチンの投与形態が望まれている。

一方、薬物の経皮投与は、古くから湿疹や皮膚アレルギーの治療などを目的として薬物を局所に適用する投与方法として用いられてきたが、最近、皮膚を介して薬物を全身的に送達することを目的とした投与方法としても注目されている。しかしながら、皮膚の最外層には“角質層”と呼ばれる薬物透過のバリアーがあり、通常、分子量が 400 以上の水溶性薬物の場合、経皮吸収がほとんど期待でき

ないことが知られている。したがって、現在までに、皮膚透過性の悪い薬物の経皮吸収を改善するため、(1) 経皮吸収促進剤の利用、(2) 薬物のプロドラッグ化修飾、(3) イオントフォレシス、超音波（ソノフォレシス）などの利用、(4) エレクトロポレーションの利用、あるいはこれら複数の促進方法の組み合わせなどが用いられている。

これら様々な経皮吸収改善方法のうち、最近、長さ数百ミクロンの微小な針中に薬物を含有させた“マイクロニードル”を皮膚に適用することにより薬物の経皮吸収性を改善することが試みられている。本法は、本来、水溶性が高く高分子であるため皮膚の角質層を透過できない難吸収性薬物を微小な針を利用することによって真皮層にまで到達させることができるため、水溶性薬物や高分子薬物など数多くの薬物の経皮吸収改善に適用可能であり、きわめて有効性の高い新規経皮吸収改善方法として注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、インクレチンの新規投与形態として、生体内で分解するヒアルロン酸で調製した安全性の高いマイクロニードルを新たに開発し、本マイクロニードル中にインクレチンの一種である Exendin-4 を封入した後、皮膚に適用し、Exendin-4 の次世代型新規経皮吸収剤の開発ならびに糖尿病の治療を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

Exendin-4 含有マイクロニードルはコスメディ製薬から供与されたものを使用した。また、Wistar 系雄性ラット（体重 220-240 g）を清水実験材料から購入し、本ラットの皮膚の状態を顕微鏡にて観察した。また、GK/S1c 雄性ラット(7-8 週令、体重 190-200 g) を別途

購入し、Exendin-4 の薬理作用評価の一つの方法であるグルコース耐糖試験に用いた。

### (2) マイクロニードル中の薬物含有量の測定

マイクロニードルを調製した後のマイクロニードル中の薬物含有量を確認するために、FD4 を含有させたマイクロニードル中のニードル部分の FD4 含有量を測定した。マイクロニードルの base 部分を除いたニードル部分を集め、pH7.4 の PBS 溶液中に浸し、ニードルを完全に溶解させた後、ニードル中の FD4 含有量を HPLC にて測定した。

### (3) マイクロニードルからの薬物放出実験

マイクロニードルからの FD4 の放出性は、改良した Franz 型セルを用いて行った。すなわち、FD4 含有マイクロニードルを人工膜に適用後、膜をセルに装着し、レセプター側に出現する FD4 の量を測定してマイクロニードルからの薬物放出性を評価した。

### (4) マイクロニードル皮膚適用後の組織学的観察

FD4 含有マイクロニードルをヒト皮膚に適用後、そのまま 5 分間放置した。その後、マイクロニードルを取り除き、皮膚組織をパラフィンなどで固定した後、マイクロトームを用いて皮膚切片を作製した。こうして作製した皮膚切片を蛍光顕微鏡で観察して FD4 の拡散性を検討することによりマイクロニードルの皮膚内への挿入性などを評価した。

一方、Wistar 系雄性ラットの皮膚にマイクロニードルを適用し、そのまま 5 分間放置した。その後、マイクロニードルを取り除き、0 時間、24 時間、72 時間後の皮膚の状態を顕微鏡で観察した。

#### (5) Exendin-4 含有マイクロニードル適用後の薬理効果

2型糖尿病モデルラットである GK/Slc ラットを用いて Exendin-4 含有マイクロニードル適用後の薬理効果について皮下投与と比較した。まず、14 時間絶食した GK/Slc ラットの毛をペントバルビタール麻酔下、シェーバーで除毛し、以下の3群に分けた。すなわち、グルコース投与の30分前に、(1) 10~50 µg/kg の Exendin-4 を封入したマイクロニードルを剃毛したラット皮膚に適用し、テープで固定する群、(2) 10~50 µg/kg の Exendin-4 溶液を皮下投与する群、(3) 薬物を封入していないマイクロニードルを剃毛したラット皮膚に適用し、テープで固定する群 (コントロール群) に分類し、それぞれの群に 2 g/kg のグルコースを腹腔内に投与し、血糖値の経時変化を測定した。また、血漿中 Exendin-4 の濃度も ELISA を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Exendin-4 含有マイクロニードルの作製

本研究では、インクレチンのうち、GLP-1 のアナログである Exenatide (Exendin-4) を選択し、Exendin-4 を封入した生体分解性マイクロニードルを調製し、本マイクロニードルをラット皮膚に適用後の有効性について検討した。調製したマイクロニードルの形状などを観察したところ、長さが 800 µm、base 部分の直径が 160 µm、マイクロニードル先端部の直径が 40 µm のマイクロニードルを調製することに成功した。

##### (2) マイクロニードル中に含有された薬物量の評価

次に、高分子のモデル薬物である平均分子量約 4,000 の fluorescein isothiocyanate-dextran (FD4) をマイクロニードルに封入する

際に、3種類の含有量の異なるマイクロニードルを調製したところ、マイクロニードル1枚当たり 1,2 及び 4 µg の FD4 を含有するマイクロニードルを調製することに成功した。また、FD4 の含有量のロット当たりの誤差などについて検討したところ、FD4 の含有量の誤差はいずれの含有量のマイクロニードルにおいても10%以下であり、ほぼ均一な薬物を含有するマイクロニードルが調製できることが確認された。

##### (3) マイクロニードルからの薬物の放出性

また、マイクロニードルからの薬物の放出性について、モデル薬物として FD4 を封入したマイクロニードルを用いて検討した。その結果、本マイクロニードルからの FD4 の放出はきわめて速やかであり、放出実験開始30秒で既に FD4 の放出が始まり、また大部分の FD4 は実験開始5分以内でマイクロニードルから放出されることが明らかとなった。

##### (4) Exendin-4 含有マイクロニードル適用後の薬理効果

2型糖尿病のモデル動物である GK/Slc ラットを用いて Exendin-4 含有マイクロニードルの皮膚適用後の有効性について検討した。その結果、Exendin-4 含有マイクロニードルの皮膚適用後、グルコース耐糖効果ならびにインスリン分泌の増大が観察され、その効果は皮下投与の場合とほぼ同等であることが認められた。したがって、Exendin-4 含有マイクロニードルは、2型糖尿病治療の際に Exendin-4 の皮下投与に代わるきわめて有用な投与形態であることが確認できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 劉 妹、権 英淑、神山文男、勝見英正、坂根稔康、山本 昌: GLP-1 受容体アゴニスト exendin-4 封入生分解性マイクロニードルを用いた新規経皮吸収剤の開発と 2 型糖尿病の治療. 第 27 回日本 DDS 学会 (東京), 2011.6.
- 2) 劉 妹、権 英淑、神山文男、勝見英正、坂根稔康、山本 昌: GLP-1 受容体アゴニスト exendin-4 封入生分解性マイクロニードルを用いた新規経皮吸収剤の開発と 2 型糖尿病の治療. 日本薬剤学会第 26 年会 (東京), 2011.5.
- 3) 劉 妹、権 英淑、神山文男、勝見英正、坂根稔康、山本 昌: GLP-1 受容体アゴニスト exendin-4 封入生分解性マイクロニードルを用いた新規経皮吸収剤の開発と 2 型糖尿病の治療. 日本薬学会第 131 年会 (静岡), 2011.3.

[図書] (計 1 件)

- 1) 権 英淑、神山文男、勝見英正、山本 昌: マイクロニードルを用いる難吸収性薬物の経皮吸収改善. 難吸収性薬物の吸収性改善と新規投与剤の開発, 山本 昌監修, pp.250-256, シーエムシー出版 (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 昌 (Yamamoto Akira)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00166779

(2) 研究分担者

勝見英正 (Katsumi Hidemasa)  
京都薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 30434666