

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14150

研究課題名(和文) in vivo経皮吸収計測法の開発と塗込による浸透促進効果の解明

研究課題名(英文) Development of in vivo measurement of drug permeation and enhancement of transdermal drug delivery

研究代表者

菊地 謙次(Kikuchi, Kenji)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00553801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：経皮吸収薬の薬剤浸透量を能動的に制御するには、皮膚内部の三次元構造と薬剤物性および皮膚表面のひずみと薬液浸透量の関係を結びつける定量的解析が必要不可欠である。本研究では、経皮吸収薬の浸透を表皮における塗込動作による能動的制御を目的とし、二光子顕微鏡を用いた革新的な非侵襲皮膚三次元構造の計測と、共焦点顕微鏡を駆使した独創的な薬剤皮膚表面のひずみおよび浸透量計測を行い経皮吸収量の能動的制御法の開発を行った。塗込動作を付加した皮膚表面のひずみと皮膚内部への薬剤浸透量を計測し、定量評価することで、塗込動作による浸透促進効果について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To control a drug permeation from the skin surface, a three dimensional skin structure and precise drug permeation measurements are needed. We measured non-invasively the three dimensional skin structure by using a two photon microscopy and the drug permeation through the skin surface by using a confocal microscopy. As our results, the qualitative measurements of the strain of skin surface and the amount of permeated drug through the skin were succeeded. We found the mechanism of drug permeation through the skin surface with the skin extension.

研究分野：生体流体工学

キーワード：経皮吸収促進 薬剤浸透 in vivo計測 二光子顕微鏡 機械的刺激

### 1. 研究開始当初の背景

近年、薬液を皮膚表面から浸透させて投与する経皮吸収薬が注目されているが、詳細なメカニズムは解明されておらず、個体や薬剤ごとの浸透制御や予測は出来ていない。経皮吸収では、経口と比べ体内の主な消化・代謝経路となる小腸・肝臓を介することなく、皮膚から直接血流に乗って全身へと運搬でき、効率的に投薬が可能であるため、将来的にはインスリンや抗がん剤等の分子量の比較的大きい薬や薬価の高い貴重な薬において経皮吸収での投与が期待されている。また、貼付による投薬のため、飲み遅れや飲み忘れを防ぐだけでなく、消化や代謝による効能時間の制限が少ないため定期投与や長時間投与といった利点を持っている。しかし、皮膚の最上層にあたる角質層には、ウイルスや害的物质などの外界からの侵入から身を守るバリア機能(約 500 Da 以下のみ透過)を有するため、分子量の大きい薬剤の透過量は低く、十分な生理的効果を現状では得られていない。また、薬剤の皮膚透過量は、薬剤の物性のみならず、皮膚の構造や状態に強く依存するため、個体差や部位ごとに浸透速度や浸透量を予測・制御するのは極めて困難な状況にある。

### 2. 研究の目的

経皮吸収薬の薬剤浸透量を能動的に制御するには、皮膚内部の三次元構造と薬剤物性および塗込せん断速度と薬液浸透量の関係を結びつける定量的解析が必要不可欠である。本研究では、経皮吸収薬の浸透を表皮における塗込動作による能動的制御を目的とし、二光子顕微鏡を用いた革新的な非侵襲皮膚三次元構造の計測と、共焦点顕微鏡を駆使した独創的な薬剤せん断速度計測および浸透量計測を行い経皮吸収量の能動的制御法の開発を目指した挑戦的研究である。経皮吸収における皮膚内部の *in vivo* 計測と皮膚表面上の薬剤流動計測を融合し、薬理学と生体医学、流体工学の学際的経皮吸収プラットフォームの構築を目指す。

### 3. 研究の方法

経皮吸収薬の塗込動作による浸透促進効果について定量化するためには、皮膚内部の組織構造と薬剤物性および薬の濃度分布の詳細な計測が必要である。そのため、皮膚内部の三次元的な組織構造を計測可能な光学顕微鏡を用いた *in vivo* 計測法を確立し、薬剤の物理化学的性質(分子量と油水分配係数)の違いによる皮膚への三次元的な浸透分布について実験的に計測を行う。また、塗込動作を付加した皮膚表面上の薬剤すり速度と皮膚内部への薬剤浸透量を同時に計測し、定量評価することで、塗込動作による浸透促進効果について明らかにする。さらに、皮膚へ浸透する薬物濃度を能動的に制御するために、皮膚組織の三次元構造の特徴抽出と浸透促進効果との関係について浸透モデルを構

築し、皮膚構造と薬剤浸透特性について明らかにする。

### 4. 研究成果

薬物浸透の *in vivo* 濃度計測手法の開発：ニポウディスク方式の共焦点レーザー顕微鏡を用いることで高い空間・時間分解能を有する計測を実現した。488 nm のレーザーでウラニンを励起し、500-550 nm バンドパスフィルタを通過させることで蛍光のみを観測した。さらに、図 1 のように試料を傾斜させる( $\theta=25^\circ$ ) ことで表面から深部の輝度情報を含んだ画像を一度に取得し、一回の計測におけるレーザー照射時間を最低限に抑えることで蛍光染料の褪色が濃度計算に与える影響を小さくした。

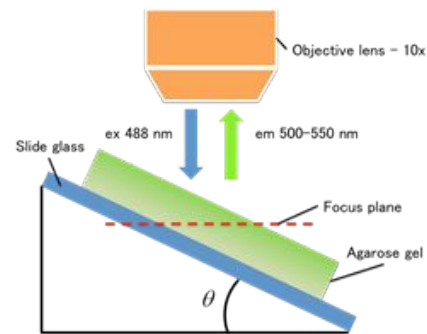


図 1 傾斜共焦点レーザー顕微鏡観察による奥行き濃度計測手法概要

実験により得られた画像は 12bit モノカラー 1024\*1024 pixels (1.2  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ) で、画像処理ソフトウェア ImageJ を用い輝度情報を解析し、バックグラウンドノイズを補正した後、その輝度値より蛍光強度を求めた。初期濃度が 50  $\mu\text{M}$  のウラニン溶液を薬剤モデルとし、そのウラニンが下層へと浸透した結果、薬剤層の濃度の時間的変化を計測し(図 2)、その濃度の変化量から下部への浸透量を見積もった。

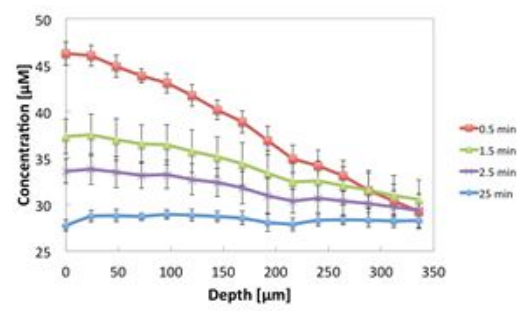


図 2 薬剤層内の薬剤濃度の時間変化

皮膚内部の三次元構造：正立型の多光子励起レーザー走査型顕微鏡(FV1000MPE, OLYMPUS, Japan)による皮膚乳頭層の観察を行った。観察用の搭載レーザーの波長を 900 nm に設定し、対物レンズは 20 倍の水没対物レンズ(XLUMPLFL 20XW, N.A.=1.0, W.D.=2.0 mm OLYMPUS, Japan)を使用し

た.皮膚内部の乳頭層構造変化の評価方法として、皮膚伸展前、伸展中、伸展後の乳頭部配向角度とアスペクト比に着目して観察を行った(Fig. 2.7). 配向角度については伸展方向に対する乳頭層の角度を計測し(図3), アスペクト比  $h$  については乳頭部の長軸を  $L$ , 短軸を  $S$  として, 式(2.3)から算出した. 乳頭部の配向角度と長軸及び短軸の長さは, 画像解析ソフト ImageJ によって計測を行った. 伸展前, 伸展中, 伸展後においてそれぞれ乳頭部を計測回数が  $n \geq 50$  となるように計測した. その結果, 皮膚内部は伸展によって, 乳頭部の配向とアスペクト比が伸展方向に変形することから, 内部構造が塑性変形していることが明らかとなった.

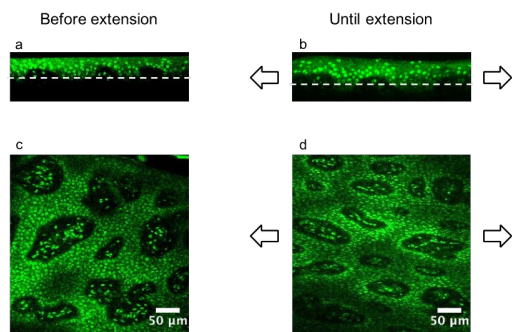


図3 皮膚内乳頭層の3次元計測による側面および上面図, (左)皮膚伸展前, (右)皮膚伸展中

皮膚伸展刺激と薬剤吸収促進: 皮膚モデルの伸展は図のような自動繰り返し皮膚伸展装置を設計及び組立てを行った. この装置は同期された2つのステッピングモーター(PMSA-U42D1-SD, Shinano Kenshi, Japan)が回転することで, ベルトとプーリーを介して皮膚に伸展刺激を与える. 与える伸展方向と伸展速度は, 付属しておるモーターコントローラによって操作を行う.

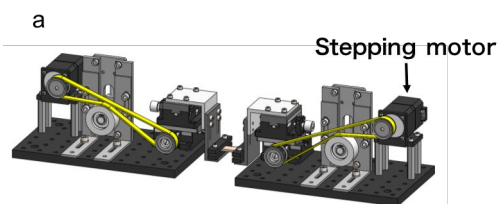


図4 皮膚モデルの自動繰り返し伸展装置の概要図

上記の伸展装置を用いて皮膚に伸展を加えた場合の皮膚のしわ構造観察結果を図5に示す. これは皮膚にマクロひずみ  $\epsilon_{macro}=0.1$  を与えた時の伸展前と伸展後のしわ構造を表している. ImageJ による画像解析結果を図6示す. ImageJ のトラッキングツールである Track Mate を使用することで皮膚伸展中のしわ構造の変化を追跡し, 微小領域におけるしわ構造の変化を定量的に計測することを可能にした. は皮膚に対してそれぞれマ

クロひずみ  $\epsilon_{macro}$  を 0.12, 0.22 を与えた時の解析結果である. それぞれの観測点の座標変化から, ミクロひずみ  $\epsilon_{micro}$  の算出を行った. ひずみ量計測結果を Fig. 2.19 に示す. マクロひずみ  $\epsilon_{macro}$  とミクロひずみ  $\epsilon_{micro}$  を比較した結果, 2つのひずみ量の関係が線形的な関係にあることが明らかとなった.  $\epsilon_{macro}$  よりも  $\epsilon_{micro}$  の値が小さい原因については, 皮膚に伸展刺激を与えた時に皮膚固定部に近いほど大きな変形が生じ, 皮膚の中央部では比較的変形が小さくなると考えられる. ミクロひずみの観察では皮膚中央部のひずみ量の変化を観察したため, マクロひずみよりも小さくなるような結果が得られた.

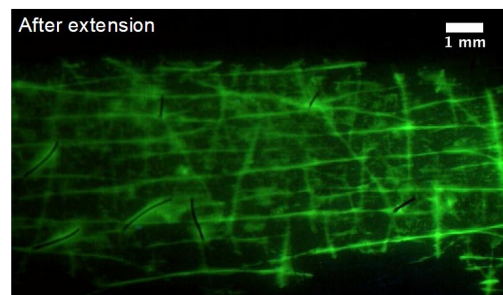


図5 皮膚伸展後における皮膚しわ構造の可視化

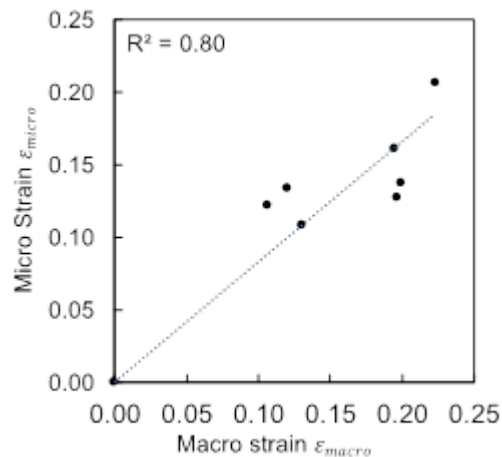


図6 機械的に与えたひずみ量 (Macro Strain) と皮膚しわ構造の変化から計測した微小ひずみ量 (Micro Strain)

皮膚伸展のひずみ量を変化させた時の皮膚の薬剤浸透量を計測し, 皮膚ひずみと薬剤浸透促進について調査を行った. 図7はひずみ量データ群の中央値と浸透量を示している. データ群で双方に正規性が認められなかったため, ノンパラメトリック解析方法である Mann-Whitney U 検定を行った. その結果,  $\epsilon_{micro}=0$  と 0.10 及び  $\epsilon_{micro}=0$  と 0.17 において優位水準5%および1%で有意差がみられた. 以上に結果より, 伸展刺激によって有意に経皮吸収促進効果が得られることを明らかにした.

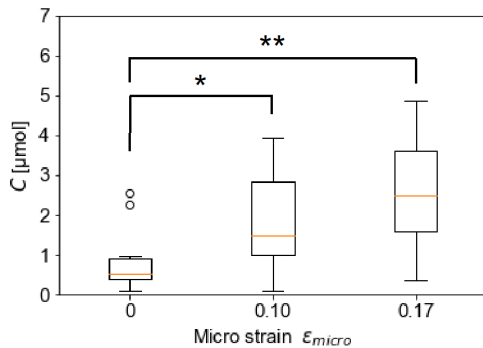


図7 皮膚伸展ひずみと薬剤浸透量

菊地謙次 (Kenji Kikuchi)  
 東北大学・大学院工学研究科・准教授  
 研究者番号：00553801

## 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)

[学会発表](計 7件)

菊地謙次, 生体流動の可視化と生体ポンプの特性評価, 第38回エアロ・アクアバイオメカニズム学会(招待講演), 2018年

菊地謙次, 生物における流れの可視化とバイオイメーjing, フロンティアバイオイメーjing研究会(招待講演), 2017年

菅原尚, 菊地謙次, 沼山恵子, 石川拓司, 伸展刺激による薬剤経皮吸収, 日本機械学会第28回バイオフロンティア講演会, 2017年

Sho Sugawara, Kenji Kikuchi, Shunsuke Shigeta, Keiko Numayama-Tsuruta, Takuji Ishikawa, Transdermal drug delivery enhancement by unidirectional skin extension, The 26th Congress of the International Society of Biomechanics, 2017年

菅原尚, 重田俊輔, 菊地謙次, 沼山恵子, 石川拓司, 伸展刺激による皮膚構造変化と薬剤浸透, 日本機械学会29回バイオエンジニアリング講演会, 2017年1月19日, ウィンク愛知(愛知県名古屋市)

重田俊輔, 菊地謙次, 沼山恵子, 石川拓司, 機械的刺激による経皮吸収促進, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 2017年1月19日, ウィンク愛知(愛知県名古屋市)

Shunsuke Shigeta, Kenji Kikuchi, Keiko Numayama-Tsuruta, Takuji Ishikawa, Measurement of drug permeation in the skin by a two photon microscopy, 22<sup>nd</sup> Congress of the European Society of Biomechanics, 2016年7月11日, Lyon (France)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者