

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：34429

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22831

研究課題名(和文) 化学的・物理的促進法を用いた経皮的薬剤投与に基づく新たな発汗研究手法の開発

研究課題名(英文) Development of transdermal drug delivery technique for sweating research by using chemical and physical enhancers

研究代表者

井上 芳光 (Inoue, Yoshimitsu)

大阪国際大学・人間科学部・名誉教授

研究者番号：70144566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：従来から良く用いられてきた発汗研究のための薬理手法としてイオントフォレーシスがあるが、この方法では角質層が厚い部位や分子が大きい薬剤に用いることが難しかった。本研究では、イオントフォレーシスとエレクトロポレーション(電気パルスを負荷して皮膚に薬剤の通り道を形成する方法)を組み合わせた方法およびイオントフォレーシスとマイクロニードル(微小ニードルパッチを皮膚に貼り付けて穿孔を形成する方法)を組み合わせた方法から新しい発汗研究法を検討した。その結果、後者の方法で経皮薬剤送達効率が大きく改善して、従来研究が難しかった厚い皮膚でも発汗の薬理研究ができることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

暑熱環境下における発汗には体内の熱を体外に放散する役割があり、体温の過度な上昇の抑制につながっている。近年では地球温暖化によって熱中症問題がより一層深刻化していることもあり、体温調節機能としての発汗の重要性がより高まっている。しかし、発汗のメカニズムには不明な点が多く残されている。その一つの理由が発汗の研究手法の限界があった。本研究で得られた成果より、従来は経皮的な方法で評価が難しかった皮膚が厚い部位の発汗応答を評価できるようになる。さらに分子が大きい薬剤への効果も期待できる。これら成果は、将来的には発汗機能を効果的に高めて熱中症を予防する方策の提言につながるため、意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to develop a new transdermal drug delivery method to evaluate sweating response in humans. We evaluated two potential methods to deliver drugs (MW of 200-4000) into thick or thin skins. The first method was a combination of iontophoresis and electroporation whilst it did not work well. Secondly, we applied microneedles on the skins prior to iontophoresis. We found that treatment of microneedles before iontophoresis augments pilocarpine-induced sweat rate compared with control site on thick but not thin skins. Sex differences might affect this response. In addition, microneedle application was likely well tolerable even in elderly whilst this possibility needs further investigation. It is concluded that the combination of microneedles and iontophoresis would be a reasonable method to evaluate sweat production on both thin and thick skins by using small and probably large molecules over a range of age.

研究分野：温熱生理学

キーワード：マイクロニードル イオントフォレーシス 経皮薬剤送達 エクリン汗腺 熱中症 体温調節 エレクトロポレーション

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

夏の猛暑によって子どもから高齢者まで熱中症事故が全国で相次いでおり、熱中症問題の深刻さが突き付けられている。申請者らはこれまで子どもや高齢者の体温調節機能（熱を放散する発汗機能）やその性差を検討し（井上：H16-18, 20-22, 23-27年度基盤A, 28-31年度基盤B, 後述）、その成果の一部は熱中症予防のマニュアル（環境省）やガイドブック（日本スポーツ協会）にも盛り込まれてきた。しかし、子どもや高齢者の発汗機能が劣っている理由（メカニズム）の多くが不明なこともあり、子どもや高齢者の発汗機能を高め、熱中症を確実に食い止める効果的な施策の提案には至らなかった。これまで子どもや高齢者の発汗機能を十分に検討できなかった理由として、汗腺への薬剤投与方法の問題がある。具体的には、これまで世界的にも用いられてきたマイクロダイアリシス（専用ファイバーを皮膚内に留置して薬剤を投与方法）やイオントフォレーシス（電気の力で経皮的に薬剤を皮膚に投与方法）という薬理手法について、前者は穿刺やファイバー留置を伴うため子どもを含む対象者への汎用性が極めて低く、後者は穿刺を伴わないものの、皮膚（特に皮膚バリアを形成する角質層）が厚い人や部位には応用が難しく、さらに安定して投与できる薬剤は低分子に限られていた（ $MW < 500$ ）。そこで本研究では、イオントフォレーシスによる経皮薬剤送達を基にした新しい発汗研究手法の開発に挑戦する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①エレクトロポレーション法（皮膚に電気パルスを負荷して角質層に小孔を作って薬物の皮膚透過性を高める方法）とイオントフォレーシス法を組み合わせた発汗研究法および②マイクロニードルパッチとイオントフォレーシス法を組み合わせた発汗研究法を開発することとした。

3. 研究の方法

【研究Ⅰ】エレクトロポレーション法とイオントフォレーシス法を組み合わせた発汗研究法

先行研究を参考にしながら、皮膚に電気パルスを負荷するためのエレクトロポレーション装置を製作した。最初のデバイスは負荷できる電圧が $\sim 80V$ であったが（図1）、この電圧範囲では痛みは感じないものの、これでは皮膚バリア機能が低下する反応（例：皮膚からの蒸発水分量である不感蒸泄量が増加するなど）が認められなかった。そこで試作機2号として、電圧を $200V$ まで高めることができる装置を用意した。理論上は電極間の距離が狭い程痛みが感じなくなることから、先行研究を参考に、電極間距離や配列を変えて電極を作成して痛みの有無について検討を行った（図2）。

申請者自身でパルス幅や電圧を調節しながら検討を進めたが、 $200V$ の電圧をパルス幅 $1.0ms$ 、周波数 $1Hz$ で5分間手掌部に当てても手掌部の角質層のバリア機能（不感蒸泄量から測定）は低下しなかった。手掌部では $200V$ はほとんど痛みを感じないものの、前腕部では我慢できないほど痛かった。装置の電圧を $\sim 500V$ まで上げることで手掌部への処置も可能になるかもしれないが、安全性の観点から、仮にそれが可能であったとしても、将来的な実用性が低いという結論に達した。

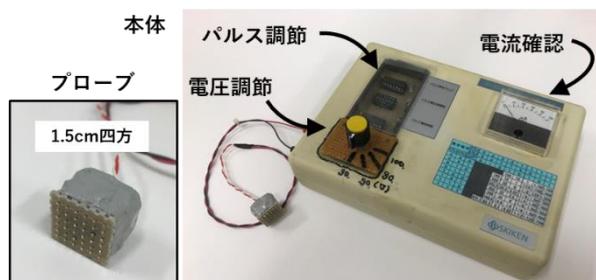


図1. エレクトロポレーション装置の試作1号機。

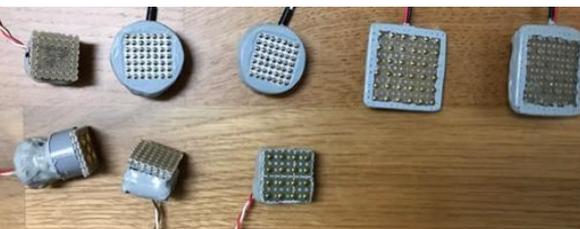


図2. ハイパワーのエレクトロポレーション装置の試作2号機（右）および様々な電極（下）。

【研究Ⅱ】マイクロニードルパッチとイオントフォレーシス法を組み合わせた発汗研究法

研究Ⅱ-①：マイクロニードルパッチ処置に伴う穿刺孔の確認

環境温度 $25^{\circ}C$ 、相対湿度 40% の人工気象室内で若年成人 22 名がマイクロニードルパッチ（コスメディ製薬社製、長さ $900\mu m$ 、 200 本、直径 $1cm$ ）を専用のアプリケーターで手掌部と前腕部の皮膚に打ち込み、その後染色試薬（クリスタルバイオレット）を用いて穿刺孔の数の経時変化を調べた。

研究Ⅱ-②：マイクロニードルパッチ処置に伴う皮膚バリア機能の確認

環境温度 25℃、相対湿度 40%の人工気象室内で若年成人 22 名を対象にマイクロニードルパッチ (MN) を皮膚に打ち込み、その後皮膚バリア機能の指標となる不感蒸泄量 (TEW) の変化を 2 時間観察した。なお、TEW は手掌部と前腕部の MN 処置部と非処置部 (Control) においてテヴァメーターを用いて測定した。

研究Ⅱ-③：マイクロニードルパッチ処置後のイオントフォレーシスによるピロカルピン発汗反応の評価

環境温度 25℃、相対湿度 40%の人工気象室内で若年成人 44 名がマイクロニードルパッチ皮膚に打ち込み、その後ピロカルピンのイオントフォレーシス (電氣的に薬物を皮膚に投与する方法) を行ってから発汗量を測定した。

研究Ⅱ-④：マイクロニードルパッチ処置後のイオントフォレーシスによるピロカルピン投与量の評価 (図 3)

研究Ⅱ-③に参加した被験者のうち、22 名においては、イオントフォレーシスによるピロカルピン投与後の残検体 (薬剤を含んでいたコットン、治具、皮膚上に残る溶液) を回収した。これらの検体は乾燥機内で乾燥させたのち、超純水で希釈して冷凍保存した (-80℃)。このピロカルピン溶液は現時点で未解析のままであるが、今後速やかに質量分析器で定量する予定である。



図 3. ピロカルピンイオントフォレーシスによる薬剤投与量の推定。

4. 研究成果

前述のように研究Ⅰは安全上の問題により断念した (方法参照)。そのため、体系的に研究を行った研究Ⅱについて成果を報告する。なお研究Ⅱ-③の解析は取得データ数の半数しか終わっていないため、またデータ固定しておらず、現時点での中間解析となる。研究Ⅱ-④についてもまだ解析が終わっていない。

研究Ⅱ-①：マイクロニードルパッチ処置に伴う穿刺孔の確認

前腕部ではマイクロニードルパッチを処置すると穿刺孔を十分に可視化でき、形成した穿刺孔のほとんどは 2 時間近く持続していた (図 4 右)。前腕部における穿刺孔の数や応答に性差は認められなかった (図 4 右)。一方、手掌部では染色試薬が角質に湿潤してしまい、鮮明な画像を撮影することができなかった (図 4 左)。他の染色試薬も予備的に試したものの (例：インドシアニングリーン)、手掌部では明瞭な画像データは得られなかった。定量的に評価できるほど画像が鮮明ではなかったものの、顕微鏡下では手掌部でも穿刺孔の存在を確認できたため、穿刺

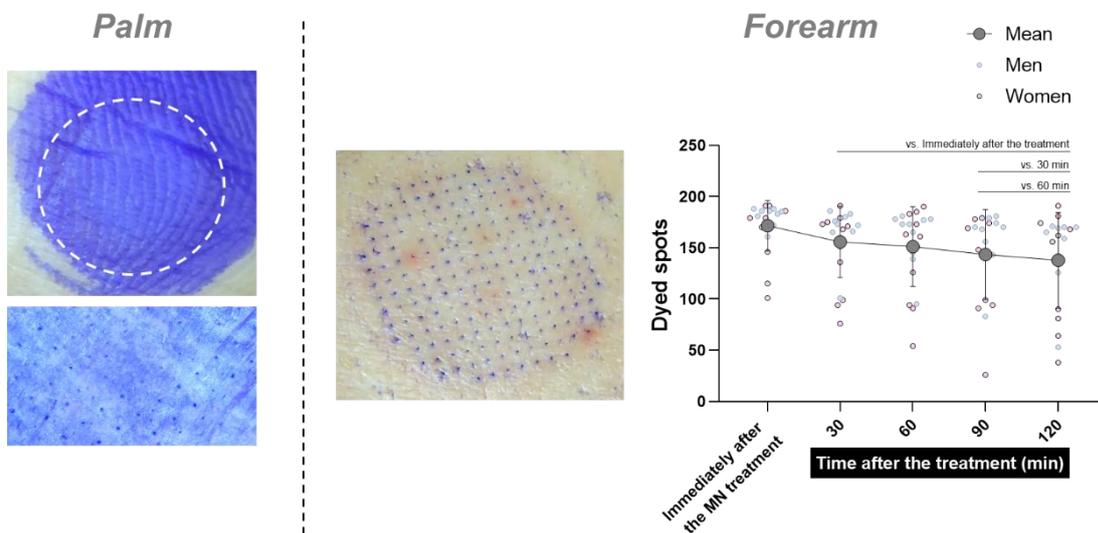


図 4. マイクロニードルパッチ処置後に可視化した皮膚の穿刺孔写真とその時間変化。

孔は手掌部でも形成されているようであった (図 4 左下)。

研究 II-②：マイクロニードルパッチ処置に伴う皮膚バリア機能の確認

図 5 は手掌部と前腕部におけるマイクロニードルパッチ処置部 (MN) と非処置部 (Control) の TEW を示す。手掌部においてはパッチ処置後に TEW が安静時の 3 倍程度に増加したものの、その後急激にベースラインレベルまで低下した。一方、前腕部においてはパッチ処置後 2 時間程度高い値で推移しており、この応答に男女差は認められなかった。これらの結果は、手掌部においては TEW の増加 (皮膚バリア機能の低下) は一過性であることを示しており、手掌部の角質層が前腕部よりも 10 倍程度厚いとされていることが関係していると考えられる。

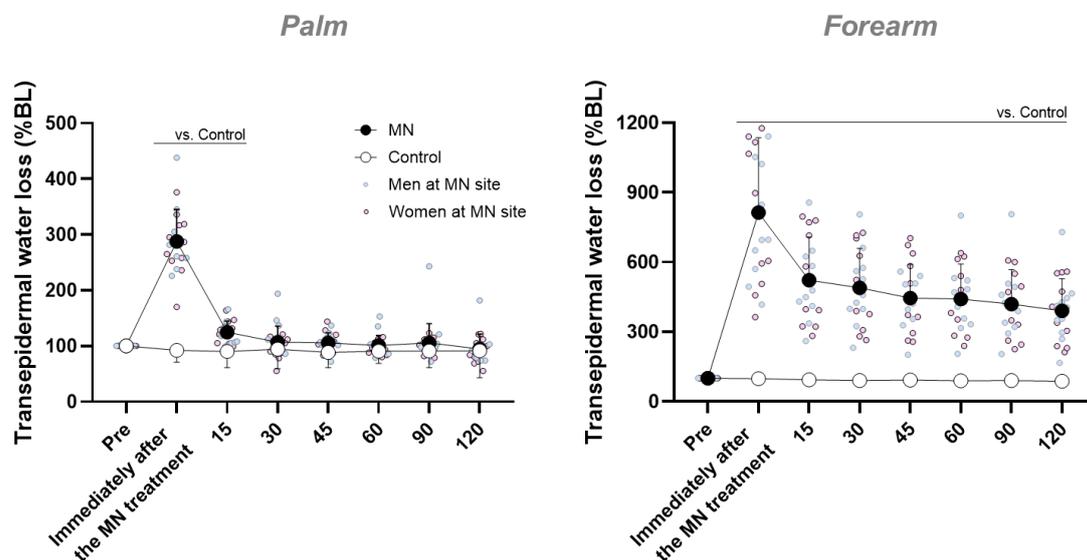


図 5. マイクロニードルパッチ処置後の不感蒸泄量 (TEW) の変化。

研究 II-③：マイクロニードルパッチ処置後のイオントフォレーシスによるピロカルピン発汗反応の評価

手掌部ではマイクロニードルパッチ処置部 (MN) におけるピロカルピン誘発性の発汗量が大きく増加した (図 6 上段左)。さらにこの応答には性差があり、女性より男性での変化が顕著であった (図 6 上段右)。前腕部ではこのような応答は認められなかった (図 6 下段)。

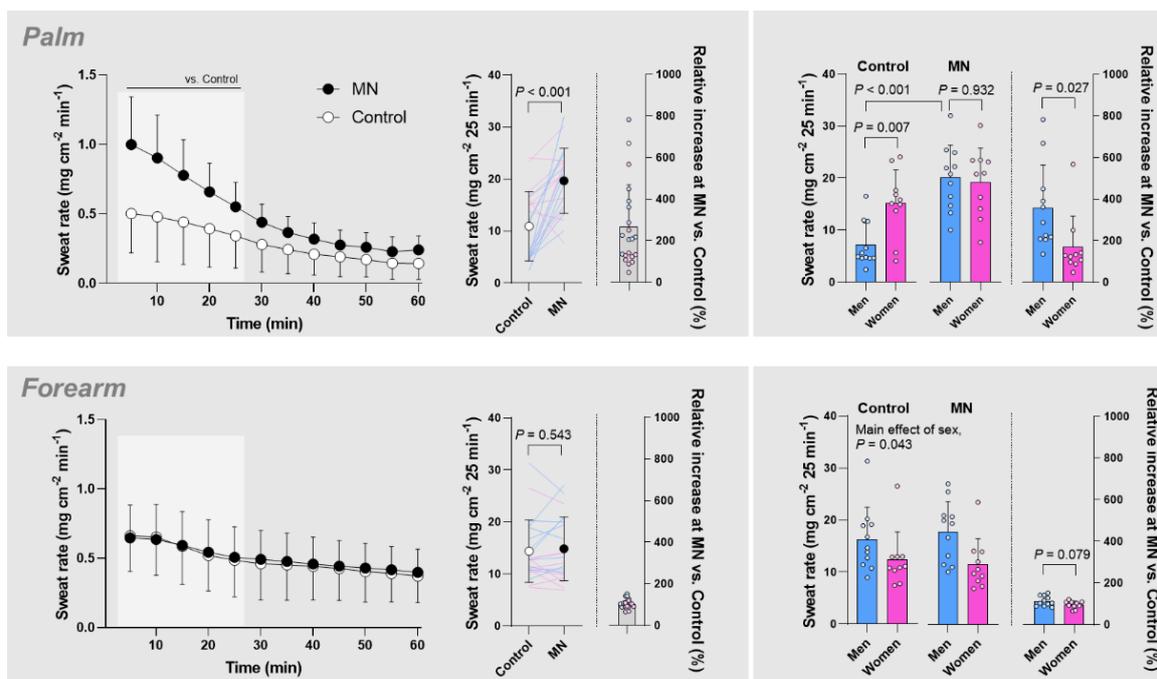


図 6. マイクロニードルパッチ処置後のピロカルピン誘発性発汗反応。

まとめ

本研究で得られた結果より、従来は経皮薬剤投与による発汗研究が困難とされていた部位でも事前に物理的に薬品が通過する小孔を形成することで、それが可能になることが明らかになった。また予備的にはあるがこれらの応答についてピロカルピンより大きな分子のカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) で検討を行ったものの、CGRPの投与ではマイクロニードルパッチの有無にかかわらず発汗が生じなかったことから、ピロカルピンより大きなサイズの分子の効果的な投与につながるかどうかは今後更なる検討が必要になる。また、高齢者においてもこれらの取り組みが可能であることを予備的に検討できたため、今後は幅広い対象者に対して様々な薬剤を組み合わせ、発汗のメカニズムを明らかにする研究が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天野達郎
2. 発表標題 経皮ドラッグデリバリー技術を用いたヒト運動時の発汗研究
3. 学会等名 第34回運動と体温の研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 天野 達郎, 藤井 直人, 梶山 健次, 権 英淑, 近藤 徳彦, 井上 芳光
2. 発表標題 マイクロニードルとイオントフォレーシスを用いた手掌部のピロカルピン誘発性発汗反応
3. 学会等名 第77回日本体力医学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	天野 達郎 (Amano Tatsuro) (60734522)	新潟大学・人文社会科学系・准教授 (13101)	
研究分担者	近藤 徳彦 (Kondo Narihiko) (70215458)	神戸大学・人間発達環境学研究所・教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------