

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293038

研究課題名(和文) マイクロニードル製剤の物理化学的特性解析と皮膚疾患に対する新規治療法創出への活用

研究課題名(英文) Analysis of physicochemical characteristics of microneedle patch, and development of novel therapeutic approach for seborrheic keratosis treatment

研究代表者

中川 晋作 (Nakagawa, Shinsaku)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70207728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、皮膚疾患(脂漏性角化)に対して皮膚内溶解型マイクロニードル(MN)を応用した新規薬物治療法の創出に取り組んだ。皮膚にオールトランスレチノイン酸(ATRA)装填MN製剤を貼付すると、皮膚表層にHB-EGFの発現が増加し、角質層のターンオーバーが促進された。そこでATRA装填MN製剤のヒト臨床研究を実施したところ、ATRA装填MNは重篤な副作用を誘発することなく、ATRAを確実に皮膚内に送達出来ること、またこれにより脂漏性角化症や老人性色素斑の症状を改善しうる製剤になる可能性が示された。また我々は新たに針部強度に優れる新規ソリッド型MNとしてPGA-MNの開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Seborrheic keratosis is one of the most common skin benign tumors in humans with a high occurrence rate in people over 50 years of age. We aimed to evaluate the use of all-trans retinoic acid (ATRA)-loaded microneedle (MN) patches as a simple, alternative therapeutic option to traditional surgical treatments. ATRA-loaded MN patch induced epidermal hyperplasia and marked expression of HB-EGF mRNA and protein corresponding to ATRA activity in the skin of mice. The acceleration of stratum corneum turnover was also observed. In the safety test in human, although the weak positive reaction of erythema due to patch application was identified in all subjects, these reactions disappeared within 30 days. Desquamation of the stratum corneum was observed following four ATRA-MN applications at 1-week intervals, but ATRA-MN applications did not induce severe local or systemic adverse effects. And we have also developed the novel solid microneedle patch for transcutaneous drug delivery.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：マイクロニードル 皮膚疾患 臨床研究 経皮投与製剤

1. 研究開始当初の背景

皮膚疾患治療において病巣部に直接薬物送達できる経皮投与は多くの利点を有しているが、皮膚には固有のバリア機能である角質層が存在するため、治療効果が得られる十分な量を皮膚表面から受動的に拡散できる薬物分子となるとそのサイズと種類が限定されてしまう。この障壁を打開するアプローチとして、痛みを伴うことなく如何なる薬物をも表皮・真皮へと送達できるマイクロニードル(MN)技術が注目されている。しかし、このMN技術を応用した貼付剤の開発は世界的な関心を深めつつある分野であるが、チタンやステンレススチール等を素材とする従来のMNは、適用した際の金属アレルギー反応や折れた微小針が皮膚組織内に残留する危険性が指摘されており、実用化されるまでには至っていない。そこで申請者は、コスメディ製薬(株)との共同で針部が皮膚内で溶解することによって含有薬物を放出し、貼付に伴う針の折れ残りの心配がない皮膚内溶解型MNを開発した。皮膚内溶解型MNは皮膚構成成分であるヒアルロン酸を主成分とすることから安全性に優れるとともに、薬物の分子量、物性、形態に拘らず微小針部に装填した如何なる薬物をも痛みを伴う事無く、確実に皮膚の病態部位(表皮・真皮、或いは炎症部位等)へと送達することができる。事実、皮膚内溶解型MNを応用した先行研究である経皮ワクチン製剤の開発において、申請者らはワクチン抗原を装填したMN製剤が注射型ワクチン製剤と同等もしくはそれ以上の有効性を発揮することを動物実験において明らかとし、さらにはインフルエンザ抗原をMNに装填した経皮ワクチン製剤が安全かつ有効であることをヒト臨床研究において実証した。これら先行研究の成果を踏まえて本研究課題では、現在臨床で使用されている軟膏剤では皮膚の肥厚や極度の角質化の為、治療効果が低い、或いは外用剤としての治療薬が無い代表的な皮膚疾患としてアトピー性皮膚炎(AD)と老化性皮膚疾患の老人性色素斑・脂漏性角化症を取り上げ、これら疾患に対するMN技術を活用した新規治療法の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

昨今のストレス社会の進展に伴ってADの罹患者は増加の一途をたどっており、特に皮膚が肥厚した重症患者においては、現在治療に繁用されている軟膏薬では有効成分であるステロイド(ベタメタゾン:BM)が十分に皮膚透過できず治療が困難であるため、優れた薬物送達手法が求められている。

また脂漏性角化症(年寄りイボ)や老人性色素斑(シミ)は皮膚の老化現象であり、致死的な疾患ではないものの外見がネガティブな印象を与えることから、中高年者の皮膚の大きな悩みとなり精神的・社会的QOLの低下につながっている。これらの治療にはハ

イドロキノンやオールトランスレチノイン酸(ATRA)等の外用薬が候補として挙げられるが、これら薬物の皮膚透過が十分でなく、十分な治療効果が得られていない為、実際の医療現場では、安全性、簡便性、コスト等多くの問題を有するケミカルピーリングやレーザー治療が行われている。

そこでMNを応用すれば、皮膚内に効率良く薬物を送達でき、これら皮膚疾患に対する簡便かつ安全で有効性に優れる薬物治療が可能になるのではないかとこの着想に至った。そこで本研究では、皮膚疾患治療薬装填皮膚内溶解型MNの安全性および有効性について、マウスを用いた前臨床研究ならびにヒト臨床研究を実施し、皮膚疾患に対するMN技術を活用した新規治療法を開発することを目的とした。また、本研究を通じて明らかになった問題点を解決すべく、針部強度に優れる新規ソリッド型MNを開発し、その製剤特性を検討すると共にヒト臨床研究にてその安全性を評価することにした。

3. 研究の方法

皮膚内溶解型MNの製剤特性評価

皮膚内溶解型MNの作製はコスメディ製薬に依頼した。製剤特性評価として、皮膚内溶解型MNを0~75%の種々の湿度条件下に1週間静置し、その水分活性ならびに針部強度を測定した。

BM装填皮膚内溶解型MNを用いた前臨床研究

AD病態モデルとして、2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)を背部皮膚に反復塗布して炎症を誘発したマウスを使用し、皮膚炎症部位に対しBM装填皮膚内溶解型MN(0.8cm²、針長800μm、BM10μg)を6時間貼付した。この操作を2週間継続し(1週間に5回、計11回貼付)、貼付部位を経時的に観察するとともに、背部皮膚の厚さを測定することで治療効果を評価した。対照群のマウスには、皮膚炎症部位に同様のスケジュールにてプラセボMNを貼付、またはBM軟膏を塗布した。

ATRA装填皮膚内溶解型MNを用いた前臨床研究

ATRA装填皮膚内溶解型MN(0.8cm²、針長300μm、ATRA1.4μg)のマウス背部皮膚への貼付(2時間)を4日連続で行い、最終処置から12時間後の皮膚を回収した。ATRAの表皮細胞への作用については、qRT-PCR法および免疫組織染色法によるヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子(HB-EGF)の発現レベルを指標に評価した。また、HE染色により皮膚肥厚を観察するとともに、角質層をダンシルクロライドで染色することで皮膚のターンオーバー(角質層の落屑までの期間)を評価した。

ATRA 装填皮膚内溶解型 MN を用いた臨床研究

ATRA 装填皮膚内溶解型 MN のヒトでの安全性と有効性を評価するための臨床研究を実施した。まず 1.6 μg の ATRA を装填した MN を脂漏性角化症或いは老人性色素斑の病変部位に 6 時間貼付し、皮膚刺激性を評価した。さらに本 MN の貼付を 1 週間隔で 4 回繰り返した条件でも実施した。処置前後の血液検査を行うと共に、経時的に皮膚局所反応と治療効果を肉眼的に観察し、安全性と有効性を評価した。

新規ソリッド型 MN の作製と、製剤特性および穿刺特性評価

新規ソリッド型 MN の作製は、コスメディ製薬に依頼し、生分解性ポリマーであるポリグリコール酸 (PGA) および生体適合性高分子である Nylon-6 を用いて、押し出し鋳込射出成形法により作製した。Texture analyzer を用いて針部強度を測定した後に針の折損、湾曲を観察した。また蛍光物質をコーティングしたソリッド型 MN を用いて、ヒト摘出皮膚に対して貼付し、皮膚切片を蛍光顕微鏡で観察することで、穿刺特性を評価した。

新規ソリッド型 MN のヒト臨床研究における安全性評価

22~60 歳の健康男性被験者 10 名の左上腕外側皮膚に PGA を用いたソリッド型 MN (PGA-MN) 或いは Nylon-6 を用いたソリッド型 MN (Nylon-MN) を 30 分間貼付し、貼付 30 分後に MN を剥離した。MN 剥離後、直ちに MN 適用部位の皮膚水分蒸散量 (TEWL) を、携帯型閉鎖チャンバー方式水分蒸散量測定装置を用いて測定した。また、MN のヒト皮膚貼付には、カセット型の MN をセットして用いるパネ式アプリケーターを使用した。MN 貼付から 2 日後および 7 日後に皮膚局所を観察し、皮膚刺激性を評価した。

抗原装填ソリッド型 MN による経皮免疫誘導

三価季節性インフルエンザ HA 抗原 (各 HA 1.35 μg) を装填した PGA-MN を作製し、BALB/c マウスの背部皮膚に 2 時間貼付した。また、4 週間後に同様の方法で 2 回目の経皮投与を行った。1 回目および 2 回目の投与から、それぞれ 2 週間後に採血し、血清中の抗体価を ELISA にて測定した。また同様に鶏卵白アルブミン (OVA) を抗原として用い、Nylon-MN についても経皮免疫誘導能を評価した。

4. 研究成果

皮膚内溶解型 MN の製剤特性評価

皮膚内溶解型 MN の保管環境の湿度上昇に伴い、皮膚内溶解型 MN は水分吸収量の増加と針強度の低下を示し、皮膚内溶解型 MN の安定性に湿度が影響することが判明した。そのため、皮膚内溶解型 MN に空気中の水分を

遮断する包装を施し、各温度条件下で長期保管したところ、針部の形態および溶解性に保管前と変化はなく、維持できることを明らかにした。

BM 装填皮膚内溶解型 MN を用いた前臨床研究

DNFB を用いて作製した AD モデルマウスの皮膚に BM 装填皮膚内溶解型 MN を貼付したところ、Day 15 において無治療群では背部皮膚の赤みを帯びた炎症が認められたのに対し、プラセボ MN 貼付群ではやや落屑は認められるものの炎症が軽減しており、BM 装填皮膚内溶解型 MN 貼付群と BM 軟膏塗布群では明らかな炎症状態の軽快が観察された。背部皮膚の厚さを測定すると、BM 装填皮膚内溶解型 MN 貼付群において無治療群に対する有意な皮膚肥厚の抑制が観察された。したがって、BM 装填皮膚内溶解型 MN の貼付は確かに BM を皮膚内へと送達し、炎症抑制効果を発揮したと考えられる。しかし、Day 15 における背部皮膚の厚さは BM 軟膏塗布群 (有効成分; 60 μg) と同程度であり、また BM 装填量を減少させると皮膚肥厚の抑制効果が低減した。皮膚内へ薬物を直接送達する MN を用いることで、使用する薬物量を減らしたとしても軟膏塗布群を上回る治療効果を期待したが、本結果から MN への適当な薬物装填量を検討しなければならないことが示された。また、プラセボ MN 貼付群の Day 15 における皮膚の厚さは無治療群よりも低く、MN 構成成分であるヒアルロン酸の保湿効果が AD 病態を緩和することが示唆された。

ATRA 装填皮膚内溶解型 MN を用いた前臨床研究

ATRA を装填した皮膚内溶解型 MN を作製し、その製剤学的評価を行った。今回 ATRA の MN への装填量として最高 25.3 $\mu\text{g}/\text{patch}$ まで検討したが、皮膚に穿刺するのに必要な針強度を維持した状態で MN が作製できる事を明らかにした。また ATRA の皮膚内へのデリバリー効率は、120 分間の貼付で 90% 以上であり、的確にケラチノサイトにデリバリー可能であった。さらに、ATRA 装填皮膚内溶解型 MN は、4 で保存した場合、6 ヶ月以上安定である事も判明した。

次に 1.4 μg の ATRA を装填した皮膚内溶解型 MN の貼付により皮膚内にデリバリーされた ATRA の活性を動物実験において評価した。その結果、貼付部位での表皮の肥厚とケラチノサイト層の増加、および Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor と Cellular retinoic acid binding protein II の発現上昇が確認された。これらの結果を反映して、表皮のターンオーバーが促進されることが明らかとなり、ATRA を皮膚内へ送達させる為のツールとして皮膚内溶解型 MN が有用であることが示された。さらに、ATRA 装填皮膚内溶解型 MN は真皮におい

てコラーゲン繊維の産生を促進することも明らかとなった。このことは、ATRA 装填皮膚内溶解型 MN の適用拡大を示唆する知見であり、脂漏性角化症や老人性色素斑の治療のみならず光線性皮膚障害治療薬としての効能拡大の可能性も考えられ、今後の研究の進展に期待が持たれる。また貼付部位において重篤な皮膚刺激性は認められず、安全性の面においても問題は無いと判断された。

ATRA 装填皮膚内溶解型 MN を用いた臨床研究

前臨床研究の結果を踏まえて ATRA 装填皮膚内溶解型 MN を用いた臨床研究を実施した。脂漏性角化症や老人性色素斑の病変部位に ATRA 装填皮膚内溶解型 MN を貼付したところ、貼付 1 日後において全ての被験者で紅斑が認められた。しかしその紅斑は軽微であり時間と共に消失した。さらに 4 回貼付においては、最終貼付 1 週間後においても半数以上の方で軽微な紅斑が観察されたが、約 3 ヶ月後には完全に消失した。これらの皮膚刺激性は軽微であり治療中断につながる重篤なものではない事、また血液の生化学的検査においても異常は認められなかった事から、本条件下では安全性に大きな問題は無いと判断した。

一方、有効性については、4 回目の ATRA 装填皮膚内溶解型 MN 貼付から約 3 か月後において約 20% の被験者で病変部位の褪色が認められ、さらに約半数の被験者において角質層の落屑が観察された。これらの現象は、ヒト皮膚においても ATRA 装填皮膚内溶解型 MN によって ATRA が活性を保ったまま皮膚内に送達された結果を反映したものであると思われる。

以上の結果は、本手法が脂漏性角化症や老人性色素斑の新たな治療法になり得る可能性を示唆するものであり、今後更なる検討を進めて行く予定である。

新規ソリッド型 MN の作製と、製剤特性および穿刺特性評価

今回の研究において、AD に対する皮膚内溶解型 MN を用いた臨床研究を行うにあたり解決すべき問題点が明らかになった。AD の場合、病変部位に瘡蓋が出来、皮膚表面が異常に硬くなっているケースが多い。これまで使用してきた皮膚内溶解型 MN では、瘡蓋状態の皮膚に対しては、穿刺出来る十分な針部強度を有しているとは言えず、動物実験では穿刺出来ても、実際の AD の患者さんの皮膚に対しては、的確に穿刺出来る保証は無い。そこで、瘡蓋状態の皮膚に対しても穿刺出来る針部強度を有した MN を新たに作製することが重要であると判断した。今回、高い針部強度を有する MN を作製するにあたり、材料として生分解性ポリマーである PGA および生体適合性高分子である Nylon-6 を用い、ソリッド型 MN として作製した。その結果、PGA-MN およ

び Nylon-MN は、皮膚に穿刺出来る針部強度を有しており、また針部強度測定後の微小針は湾曲していたものの、折損した微小針は全く認められなかった。また両 MN ともコーティングした蛍光物質をヒト切除皮膚へ確実に送達できることを明らかにした。

新規ソリッド型 MN のヒト臨床研究における安全性評価

ヒト皮膚穿刺能評価の一つとしてソリッド型 MN をヒト皮膚へ貼付し、MN 剥離後の TEWL を測定した。その結果、全被験者において、ソリッド型 MN の皮膚貼付により、無処置群と比較して TEWL の上昇が認められたことから、いずれのソリッド型 MN も貼付後において、ヒト皮膚角質層の穿孔が示唆された。また皮膚局所反応を経時的に観察した結果、両ソリッド型 MN 適用群とも極少数の被験者において、貼付 2 日後に軽度の紅斑所見が観察された。しかし両ソリッド型 MN 適用群とも貼付 7 日後は、全被験者において元の皮膚状態にまで回復していた。したがって、全て皮膚科領域において容認可能な一過性局所反応所見であると結論付けた。以上の結果から、両ソリッド型 MN とも、適用局所において重篤な副作用を誘発するようなことはない安全な経皮デバイスであることが確認された。

尚、ヒト切除皮膚組織を用いた皮膚内物質送達性およびヒト皮膚貼付後におけるソリッド型 MN 貼付部位の TEWL 測定の結果、並びに針部強度の結果より、PGA-MN の方が Nylon-MN よりもヒト皮膚穿刺能力に優れることが示唆された。

抗原装填ソリッド型 MN による経皮免疫誘導

ソリッド型 MN による皮膚内への薬物送達能を経皮免疫誘導能を指標に評価した。PGA-MN の針部に、三価季節性インフルエンザ HA 抗原をコーティングし、BALB/c マウス背部皮下へ貼付した時の抗原特異的免疫応答誘導能を確認した。その結果、A/H1N1、A/H3N2 および B の三価 HA 抗原それぞれに対して、特異的な IgG 抗体の産生が血清中に検出された。また、それらの抗体価は皮下注射免疫群と比較して、初回免疫後では上回っており、二回免疫後では同程度であった。

また、OVA を針部にコーティングした Nylon-MN を C57BL/6 マウス背部皮下へ貼付し、抗原特異的免疫応答誘導能を確認した結果、経皮免疫群における OVA 特異的抗体価は、皮下注射免疫群と同程度であった。したがって、本研究にて開発した新規ソリッド型 MN はいずれも、ワクチン製剤の基本機能である抗原特異的免疫応答を誘導できる経皮デバイスであると判断された。

今後は、このソリッド型 MN を用いて皮膚疾患に対する新規治療法の開発を進めていく予定である。

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7件)

Hirobe S, Otsuka R, Iioka H, Quan YS, Kamiyama F, Asada H, Okada N, Nakagawa S, Clinical study of a retinoic acid-loaded microneedle patch for seborrheic keratosis or senile lentigo. Life Sci, 査読有, in press, 2016
DOI: 10.1016/j.lfs.2015.12.051.

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, マイクロニードルワクチンの可能性, 最新醫學, 査読無, 69, 2014, 872-879

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, 貼るワクチン製剤の開発, PHARM TECH JAPAN, 査読無, 30, 2014, 717-723

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, 経皮ワクチン, BIOINDUSTRY, 査読無, 31, 2014, 18-26

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, ワクチン開発における DDS, 医薬ジャーナル, 査読無, 50, 2014, 1797-1803

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, 予防接種を簡便にする「貼るワクチン」の開発, 臨床と微生物, 査読無, 41, 2014, 711-717

Hiraishi Y, Hirobe S, Iioka H, Quan YS, Kamiyama F, Asada H, Okada N, Nakagawa S, Development of a novel therapeutic approach using a retinoic acid-loaded microneedle patch for seborrheic keratosis treatment and safety study in humans., J Control Release, 査読有り, 171, 2013, 93-103
DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.06.008.

〔学会発表〕(計4件)

廣部祥子, 小野彰彦, 権英淑, 神山文男, 中川晋作, 岡田直貴, 生体適合性材料を用いた新規ソリッドマイクロニードルパッチの開発, 日本薬学会第136年会, 2016年3月26日~2016年3月29日, パシフィコ横浜

Otsuka R, Hiraishi Y, Hirobe S, Iioka H, Quan YS, Kamiyama F, Asada H, Okada N, Nakagawa S, Development of a novel therapeutic approach using a retinoic acid-loaded microneedle patch for seborrheic keratosis treatment. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences (AFPS) 2013, 2013年11月20日~2013年11月22日, Ramada Plaza Jeju Hotel (韓国, 済州島)

大塚梨沙, 平石恭大, 権英淑, 神山文男, 浅田秀夫, 廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, レチノイン酸装填マイクロニードル製剤のヒトにおける安全性・有効性評価、

第63回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2013年10月12日, 同志社女子大学(京田辺キャンパス)

大塚梨沙, 平石恭大, 廣部祥子, 権英淑, 神山文男, 浅田秀夫, 岡田直貴, 中川晋作, 脂漏性角化症治療を目指したレチノイン酸装填マイクロニードル製剤の開発, 第29回日本DDS学会学術集会, 2013年7月4日~2013年7月5日, 京都テルサ

〔図書〕(計6件)

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, 情報機構、経皮吸収型製剤開発における基礎と実務への応用, 2015年, 298

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, 技術情報協会、注射剤・経口製剤に代わる新しい薬剤投与デバイスの開発, 2014年, 363

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, エヌ・ティー・エス、応用が広がるDDS 人体環境から農業・家電まで, 2013年, 578

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, シーエムシー出版、非経口投与製剤の開発と応用 ~次世代型医薬品の新規投与形態の開拓を目指して~, 2013年, 257

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, 技術情報協会、DDS 製剤の開発・評価と実用化手法, 2013年, 680

廣部祥子, 岡田直貴, 中川晋作, メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK 別冊 ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 古くて新しいドラッグデリバリーシステム (DDS) 、2013年, 376

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: レチノイン酸マイクロニードル
発明者: 神山文男, 斎藤美生, 中川晋作, 岡田直貴, 廣部祥子, 浅田秀夫

権利者: コスメディ製薬株式会社, 大阪大学, 奈良県立医科大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2013/079665

出願年月日: 2013年11月1日

国内外の別: 外国

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/work.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 晋作 (NAKAGAWA Shinsaku)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 70207728

(2) 研究分担者

浅田 秀夫 (ASADA Hideo)

奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：60252681

廣部 祥子 (HIROBE Sachiko)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：70644582

岡田 直貴 (OKADA Naoki)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：90312123