

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460052

研究課題名(和文) 生体分解性マイクロニードルを用いたテリパラチドの次世代型経皮吸収剤の開発

研究課題名(英文) Development of next-generation transdermal dosage form of teriparatide using a self-dissolving microneedles

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規骨粗鬆症治療薬であるテリパラチド(hPTH)をマイクロニードル(MN)に封入した hPTH 封入 MN (hPTH-MN) を作製し、その皮膚透過性の改善を試みた。放出試験において、MN に含有された hPTH は、試験開始後5分までにほぼ全量が速やかに放出された。また、hPTH-MN 皮膚適用後の血清中 hPTH 濃度は速やかに上昇し、高い吸収性を示した。さらに、骨粗鬆症モデルに hPTH-MN を適用後、薬理効果を示すことが明らかとなった。最後に、hPTH-MN 適用後、水分蒸散量の上昇が一時的であったことから、皮膚への障害性はほとんどみられないことが認められた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared a self-dissolving microneedle arrays (MN) containing teriparatide (hPTH), a novel drug for the treatment of osteoporosis to improve the transdermal absorption of hPTH. In the release studies, the release of hPTH from MN was very rapid and almost 100% of drug was released from MN within 5 min. In addition, a rapid increase in the plasma concentration of hPTH was observed after the application of hPTH-MN to the skin. Furthermore, hPTH-MN has pharmacological effect for the treatment of osteoporosis in animal model. Finally, it was found that after the application of hPTH-MN to the skin, the transepidermal water loss (TEWL) value slightly increased, but was recovered to the control level, suggesting the safety of hPTH-MN. These findings indicated that the application of hPTH-MN to the skin is a very effective and safe administration method for the treatment of osteoporosis.

研究分野：薬剤学

キーワード：経皮吸収 テリパラチド マイクロニードル 吸収改善 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、加齢やホルモンバランスの変化を原因として骨量低下が起こり、骨折しやすくなる疾患である。日本における骨粗鬆症患者は、女性が約 800 万人、男性が約 200 万人、合計 1000 万人と推定されており、高齢化社会に伴って、骨粗鬆症患者の割合はさらに高くなることが予想される。

テリパラチド (hPTH) はヒト副甲状腺ホルモンの 1-34 番目のアミノ酸に相当するペプチドであり、骨吸収を抑制する従来の骨粗鬆症治療薬とは異なり、断続的に投与することで骨形成促進作用を有することが報告されている。しかしながら、hPTH の投与方法は皮下注射に限定されており、注射時の痛みは患者の QOL を低下させる原因となる。

そこで本研究では、優れた骨形成促進作用を有する hPTH 治療を必要とする骨粗鬆症患者の QOL 改善を目的として、薬物封入型マイクロニードル (MN) を用いた hPTH の新規経皮吸収型製剤の開発を試みた。

2. 研究の目的

MN は、長さ数百マイクロンのアレイ状微細針を利用して、薬物吸収の最大のバリアーである角質層に、痛みを感じさせることなく小さな穴 (微孔) を開けることにより、薬物の吸収を増大させる製剤である。一般に MN は金属製やシリコン製が多く、近年では微細針の先端部に薬物が搭載されており、皮膚中の体液により溶解するコーティング型の MN が開発されている。しかしながら、これらの MN は折れた針が皮膚中に残存する可能性や、薬物剥離による投与の不確実性が懸念されるといった欠点を有する。一方、これに対して本研究で開発を目指す MN は、生体適合性のあるヒアルロン酸を主構成素材とし、皮膚に適用後、微細針全体に封入された hPTH が皮膚中の体液により膨潤、溶解、吸収されるのが特徴であり、本 MN を用いることで hPTH の有効かつ安全な投与が可能になるも

のと考えられる。また、皮膚中で溶解する微細針にテリパラチドを封入することで、皮膚に折れた針が残存する懸念がなくなるばかりでなく、患者自身の投与による確実な薬物吸収が可能になることが期待できる点も本 MN の大きな特徴である。本研究を通じて、hPTH を有効かつ安全に投与可能な新規経皮吸収システムが構築できれば、骨粗鬆症患者の QOL の向上に大きく貢献できると考えられる。

そこで本研究では、ヒアルロン酸で構成された薬物封入自己溶解型 MN を用い、その微細針全体に hPTH を封入した hPTH-MN を創製し、機能性と安全性について評価を行った。

3. 研究の方法

【試薬】

hPTH ペプチド (20 mg)、hPTH-MN はコスメディ製薬 (Kyoto, Japan) より提供して頂いた。なお、今回使用した MN は、微細針に hPTH が 20 μ g 封入されている。その他試薬は研究用グレードあるいはそれに準ずるものを使用した。

【hPTH-MN の作製】

MN の主構成素材には、生体適合性の観点からヒアルロン酸を選択し、微細針の全体に hPTH を封入した MN を作製した。すなわち、1 製剤 (直径: 10 mm) あたり 20 μ g の hPTH を封入する円錐状の微細針を 220 本有し、真皮への薬物の確実な送達を目的として、微細針の長さが 800 μ m の MN を調製した。

【hPTH 濃度の測定】

PBS 中の hPTH 濃度は Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit を用いて以下の方法で測定した。ラットの sample serum を EIA buffer で濃度 0.16 ng/mL になるように希釈し、抗 hPTH モノクローナル抗体がコーティングされている 96 穴プレートに sample 50 μ L、antiserum 25 μ L を各ウェルに添加し 60 rpm で振とうさせな

から 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、biotinylated tracer 25 μ L を各ウェルに添加し、2 時間インキュベーションした。その後、結合していない hPTH を除去するために、キットに付属してある EIA buffer 300 μ L で各ウェルを 5 回洗浄した。そして streptavidin-HRP 100 μ L を各ウェルに添加し 60 rpm で振とうさせながら 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、EIA buffer 300 μ L で各ウェルを 5 回ずつ洗浄した。次に TMB solution 100 μ L を各ウェルに添加し 60 rpm で振とうさせながら 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後、stop solution 100 μ L を各ウェルに添加しマイクロプレートリーダー (Gen5, DS ファーマバイオメディカル, Osaka, Japan) を用いて波長 450 nm で吸光度を測定した。全てのインキュベーションは室温で行った。また検量線には hPTH ペプチドを用い、濃度 0.01, 0.04, 0.16, 0.63, 2.5, 10 ng/mL になるよう EIA buffer で調製した。

【放出実験】

PBS を 5mL 入れたスクリュー瓶に MN を添加後、スクリュー瓶を 32 の恒温槽で攪拌 (72 rpm) しながら、経時的に PBS 溶液 (200 μ L) をサンプリングした。その際に同じ容積の PBS を補充した。サンプル中の hPTH の濃度は ELISA 法により測定した。サンプリングは 0, 1, 5, 60, 90, 150, 180 分に行った。

【実験動物】

SD 系雌性ラット (8 週齢, 体重約 180 g) は Shimizu Laboratory Supplies Co. Ltd. (Kyoto, Japan) より購入した。

【hPTH-MN 経皮投与実験】

SD 系雌性ラット (8 週齢, 体重約 180 g) をペントバルビタール麻酔下で腹部を除毛し、hPTH-MN を適用後、テープで固定した。頸静脈より経時的に採血 (300 μ L) した。採取した血液はタンパク分解酵素アプロチニンを含む抗凝固剤 EDTA で処理し、12000 rpm

で 5 分間遠心分離し、上清の血清を分離した。血清サンプルは分析時まで、-80 で保存した。サンプル中の hPTH の濃度は ELISA 法により測定した。

【皮下注射投与実験】

ペントバルビタール麻酔下の SD 系雌性ラット (8 週齢, 体重約 180 g) に 200 μ g/mL の hPTH PBS 溶液を 20 μ g/rat となるように背中より皮下投与した。頸静脈より経時的に採血 (300 μ L) した。得られた全血は 12000 rpm で 5 分遠心分離し、上清の血清を分離した。血清サンプルは分析時まで、-80 で保存した。サンプル中の hPTH の濃度は ELISA 法により測定した。

【皮膚適用後の hPTH-MN】

SD 系雌性ラットをペントバルビタール麻酔下で腹部を除毛し、hPTH-MN を適用後 0, 30, 60 分で hPTH-MN を除去した。除去した hPTH-MN をデジタル顕微鏡 (SHODENSHA) により観察した。

【皮膚染色及び切片観察】

SD 系雌性ラットをペントバルビタール麻酔下で腹部を除毛し、hPTH-MN を 60 分適用した。hPTH-MN を剥離した後に 0.4% trypan blue/water 溶液で 10 分間染色し、キムワイプで拭き取った。その後、皮膚を摘出し O.C.T.compound に埋め込み、液体窒素で凍らせた後、-80 で保存した。クリオスタットで厚さ 10 μ m の皮膚切片を作製し、顕微鏡 (BIOZERO[®], KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した。

【薬理効果実験】

ペントバルビタール麻酔下、SD 系雌性ラット (8 週齢, 体重約 180 g) に無処置な群を control 群、卵巣を摘出した群を OVX 群とし、それぞれ 8 週間飼育した。一方、卵巣を摘出して 4 週間後から hPTH (20 μ g) を週 2 回皮下投与した群と、hPTH-MN (20 μ g) を週 2 回適用した群を治療群とし、4 週間にわたり投与を行った。実験終点において各群のラ

ット脛骨を摘出し、その組織切片を作製した。その後、顕微鏡で観察した。

【皮膚障害性実験】

ペントバルビタール麻酔下、SD 系雌性ラット（8 週齢、体重約 180 g）の腹部の毛を除毛後に hPTH-MN を適用し、テープ、ガーゼで固定した。適用後 24 hr で MN を除去し、経時的に皮膚からの水分蒸散量（transepidermal water loss, TEWL 値）を測定した。

【皮膚刺激性実験】

ペントバルビタール麻酔下、SD 系雌性ラット（8 週齢、体重約 180 g）の腹部の毛を除毛後に hPTH-MN を適用し、テープ、ガーゼで固定した。適用後 24 hr で MN を除去し、経時的に皮膚の紅斑などを撮影した。

【統計解析】

データは mean ± S.E. として示した。

4. 研究成果

放出試験において、hPTH-MN に含有された hPTH は、試験開始後 5 分までにほぼ全量が速やかに放出された。以上のことから、皮膚に MN を適用した際に、MN が速やかに溶解し、薬物が放出されることが示された。

また、hPTH-MN 皮膚適用後の MN を顕微鏡で観察した。その結果、今回開発した MN が皮膚適用後 60 分までに溶解することが明らかとなった。一方、hPTH-MN 適用後、皮膚に微孔が観察されたことから、調製した MN は皮膚を穿刺する十分な強度を有することが明らかとなった。

次に、hPTH-MN 皮膚適用後の血清中 hPTH 濃度について検討した。その結果、hPTH-MN 皮膚適用後の血清中 hPTH 濃度は、速やかに上昇し、高い吸収性を示した。また、hPTH の吸収率は、hPTH 溶液の皮下注射投与時の吸収率と比較してほぼ同等かそれ以上の値を示すことが認められた。

さらに、骨粗鬆症モデルに hPTH-MN を適用後、薬理効果についても検討した。その結

果、骨粗鬆症モデルに hPTH-MN を適用後、脛骨の骨密度が OVX に比べて顕著に増加していたことから、hPTH-MN は薬理効果を示すことが明らかとなった。

最後に、hPTH-MN 適用後、皮膚障害性についても検討した。その結果、hPTH-MN 適用後、TEWL 値の上昇が一時的であったことから、皮膚への障害性はほとんどみられないことが明らかとなった。また、hPTH-MN 適用後、紅斑等は観察されなかったことから、皮膚への刺激性はほとんどないことが明らかとなった。

これらの研究成果から、hPTH-MN を用いた経皮投与は、骨粗鬆症治療を目的とした hPTH の有効かつ安全な投与方法であることが示された。

以上、本研究で得られた知見は、骨粗鬆症の治療を目的とした hPTH の新規経皮吸収剤の開発に有用な基礎的情報を提供すると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：

〔その他〕
ホームページ等

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

草森 浩輔 (KUSAMORI, Kosuke)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：90707407