

学位論文要旨

Studies on the drug diffusion in minimal tissues to evaluate Nano-dose applicator for nano- or pico dose-drug delivery

Shosho Kijima

Drug Delivery Systems (DDSs) can be designed to improve the pharmacological and therapeutic effects of administered drugs in a target site. Conventional DDSs can deliver a definite amount of drug into a target tissue to achieve its therapeutic effects. However, most of these systems are unselectively deliver drugs to the healthy tissues or to the other parts than the targeted site. Moreover, limited studies have been conducted to significantly reduce dosage to a targeted region and avoid drug distribution to the other untargeted parts. Therefore, in order to establish nano- or pico-order dosage delivery system to a target site, a piezoelectric pressure-sensitive device (Nano-dose applicator) was used to improve the effectiveness of the drug delivery to a definite targeted region. In addition, I aimed to establish precise and quantitative method for analyzing the applied drug concentration at the targeted site. Quantitative determination of applied drugs in the targeted site is important for evaluating their safety and efficacy. In this study, the potential of the applicator was evaluated as a DDS that enables to efficiently deliver a minimal required dose to the targeted site. In addition, promising analysis methods have been established to quantitatively analyze the applied drug concentration via Nano-dose applicator at the targeted site. The present investigations were summarized by three chapters as follows:

1. Imaging analysis of fluorescence drug concentration-distance profile.

Quantitatively determining the skin concentration-distance profiles of topically applied drugs is important for evaluating their safety and efficacy. Several conventional methods were reported to determine drug concentration in skin. However, these methods can measure just the average drug concentration in the total area of excised whole skin instead of that in each depth of skin. Therefore, the aim of the present study was to develop a quantitative, visual, simple, sensitive, and effective method to analyze the concentration-distance profile of topically applied drugs using a confocal laser scanning microscopy (CLSM). FITC-dextran with a molecular weight of approximately 4 kDa (FD-4) was selected as a model fluorescent drug in the present study. The skin distribution of FD-4 in its section was evaluated by an imaging analysis for fluorescence intensity. The obtained skin concentration-distance profile of FD-4 was analyzed using Fick's second law of diffusion, and was markedly similar to those estimated using skin permeation parameters obtained from the skin permeation study. These results suggest that the present CLSM method may be a promising tool for quantitatively visualizing the concentration-distance profiles of drugs through the skin.

2. Imaging analysis of non-fluorescence drug concentration-distance profile.

In the previous chapter, the skin concentration of fluorescence labeled drug was evaluated by CLSM image analysis. However, this technique can be applied only for fluorescence labeled drugs. Thus, in this chapter, a quantitative analysis method was developed to determine skin concentration-distance profile of topically applied non-fluorescence drugs using an imaging mass

spectrometer (IMS). IMS based imaging advantageously allows to obtain quantitative determination of skin concentration-distance profile of topically applied non-fluorescence drugs. Lidocaine hydrochloride and nicotinic acid were selected as non-fluorescent drugs in the present study. The skin concentration-distance profile of non-fluorescence drug models that obtained using IMS was compared to those calculated by skin permeation parameters by Fick' s second law of diffusion. Obtained results using IMS showed an approximate similar drug disposition behavior compared to those obtained by Fick' s law, although, the skin concentration-distance profile using IMS of Fick' s law was not completely matched. In addition, this analysis technique using IMS does not require to excise and/or homogenize the targeted site of tissue to determine the drug concentration compared to conventional methods. Our findings in this study suggest that the present IMS method could be a novel evaluation tool for determining the skin concentration-distance profile of compounds with a wide range of physicochemical properties without using fluorescent or radiolabeled compounds.

3. Distribution o fluorescence drugs in minimal tissues after administration by a Nano-dose applicator.

In general, relatively high dose are administered in conventional DDSs. However, only a small part of drugs can be delivered to the targeted sites to have therapeutic effects, and the most drugs are distributed to the other organs and tissues, which sometimes causes severe side effects. Thus, effective drug delivery to a specific part of the targeted organ is greatly required to achieve a higher therapeutic effect with a lower side effect. In the present study, a Nano-dose applicator was used to improve the effectiveness of the drug delivery. The usefulness of Nano-dose applicator was evaluated by a CLSM. FD-4 was selected as a model drug. Certain site in the skin, brain and liver in experimental animals was selected as target sites. In addition, the influence of Nano-dose applicator with an aid of a constant electric current (CEC) was evaluated after its application to promote the penetration amount into the tissue using imaging analysis. Calcein (Cal) was used as a model drug. A certain site of experimental animal skin was set to target sites. The possibility of Nano-dose applicator to the target site was evaluated by a CLSM. Semi-ellipse-shaped FD-4 distributions were observed in the viable skin, brain and liver after application with the Nano-dose applicator. This is because the drug rapidly moved to the tissue surface (x and y surface), and then diffused into the deep regions of the tissues (z -axis). Interestingly, FD-4 was mainly distributed to the hair follicles, not in the stratum corneum beneath the application site after topical application. In addition, the skin permeation of Cal was markedly improved on the treated skin area by using Nano-dose application with an aid of CEC. The cumulative amount of Cal permeated was increased 3-7 times with an increase of loading current (0.3-5.1 mA/cm²). The presently observed results suggested that the nano-dose applicator would create new opportunities for DDSs.

This novel application with established imaging analysis could create a new accurate dosed drug delivery system. Further studies have to be conducted in order to evaluate the blood flow effect on the analysis methods using this applicator.

学位論文要旨

微小組織投与を目的とした Nano-dose applicator の可能性を評価するための
薬物の微小組織内拡散に関する研究

喜島 小翔

Drug Delivery System (DDS) とは薬物を必要な部位に必要な量を必要な時間だけ作用させるような最適化を目的に設計された投与システムと定義されている。すでに、薬物の生体膜透過（または吸収）促進能や徐放能を有する DDS に関して多くの報告がある。しかし、これらに用いられた方法論のほとんどは経口投与と注射を念頭において研究されており、必要でない部位への薬物分布を避け、用量を著しく軽減するような技術についてはまだあまり研究されていない。そこで、極少量の薬液を限定された部位のみに送達するために、数ピコ～ナノリットル単位で吐出量を制御出来るピエゾ感圧アプリケーション（Nano-dose applicator）に注目した。本研究では、副作用を抑え、かつ最大限の治療効果を引き出すために、最少量の薬物を目的部位である微小病巣組織へ直接的にかつ効率的に送達するシステムの開発のための基礎的検討として、微小組織中の薬物分布を評価する方法について以下の 3 章に分けて検討した。

1. 蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価

皮膚局所で作用を示す医薬品や医薬部外品（機能性化粧品）の安全性・有効性の予測には、特に各作用部位（各深度）におけるそれらに含有された薬物の皮内動態を正しく評価することが重要である。しかし、従来の皮膚中濃度評価法は主に表皮や真皮の平均濃度や角層のみの濃度分布を測定対象としており、安全性や有効性評価でより有効と考えられる表皮や真皮中各深度での濃度分布は測定していない。本章では、薬物の皮内分布を、直接的にかつ簡便に評価が可能と考えられる共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) を用いた画像解析法を用いて検討した。蛍光モデル薬物として FITC-dextran (FD-4) を選択して *in vitro* 皮膚透過試験を行い、得られた透過プロファイルより皮膚中濃度分布を Fick の拡散則より解析した。また、透過試験後の皮膚組織切片の CLSM 像を用いて、化学物質の皮膚中濃度の深度方向における分布を求めた。その結果、本画像解析法で得た定常状態時および非定常状態時の FD-4 の皮膚中 concentration-distance profile は数学的解析から得られた値と極めて近似した。以上より、本方法は蛍光標識薬物の生きた表皮・真皮中の各深度濃度評価に極めて有用であると考えられた。

2. 非蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価

前章では、CLSM 画像解析による蛍光標識薬物の皮膚中濃度評価について検討した。その結果、CLSM を用いた画像解析方法は薬物の皮内各部位（各深度）での薬物分布を直接的にかつ簡便に評価する方法になることが明らかになった。しかし、CLSM を用いた手法は応用できる薬物が蛍光標識体に限られることから、より広く画像解析方法を応用するためには非蛍光標識薬物を用いた画像解析測定法の確立も重要である。本章では、質量分析装置を用いて病理組織切片上にある生体分子や代謝物の局在を直接可視化する Imaging mass spectrometer (IMS) 法に注目した。モデル薬物として Lidocaine hydrochloride および Nicotinic acid を選択し、質量顕微鏡 (iMScope) を用いた画像解析および皮膚透過試験から得られる皮膚透過挙動より concentration-distance profile を算出・比較することで、iMScope 画像によ

る皮膚中濃度評価の有用性について検討した。その結果、画像解析より得られた皮膚中 concentration-distance profile の観測値は数学的解析から得られた値と同様な傾向は見られたものの一致するものではなかった。両方法のどちらかがより正確であるか結論を出せないが、iMScope を用いることで皮膚組織の各部位に分布する薬物の存在を直接的に評価できると考えられた。このことから、iMScope を用いた画像解析法は、生体組織を破碎、抽出することにより薬物を測定する従来手法より簡便に組織内での詳細な薬物濃度分布を調べるのに用いられると考えられた。さらに、数学的予測法では評価できない特定な部位での詳細な薬物分布を直接的に評価できることで本手法の幅広い応用が期待できると示唆された。

3. ピエゾ感圧アプリーケーター (Nano-dose applicator) により投与された蛍光標識薬物の種々微小組織中の分布評価に関する検討

従来の DDS による薬物送達、標的部位に一定量の薬物を送達することができるものの、多くの薬物は標的部位へ到達するまでに正常な組織にも分布する欠点があり、これらが重篤な副作用を引き起こす可能性がある。そこで、副作用を抑え、かつ最大限の治療効果を期待するには、最少量の薬物を標的部位である病巣組織へ直接的にかつ効率的に送達させる必要がある。本章では、数ピコリットル単位で吐出量を制御できるピエゾ感圧アプリーケーター (Nano-dose applicator) をデバイスとして選択し、モデル薬物である FD-4 の微量薬液を皮膚、脳および肝臓に適用された後の皮内濃度分布を第 1 章で検討した CLSM を用いた画像解析方法にて検討した。その結果、各組織表面に適用された微量 FD-4 溶液は組織内に半楕円形に分布し、その浸透パターンから FD-4 の組織表面での横方向への広がりがそれらの組織内分布に大きく影響すると考えられた。また、適用した薬物の各組織での浸透深さが異なることから、組織表面に適用した微量薬物はその組織中拡散性に強く依存すると考えられた。一方、角層を有する全層皮膚に適用し FD-4 は、角層を介した皮内への浸透が認められなかったものの、毛嚢を介して皮内に浸透したことが認められた。さらに、full-thickness pig ear skin のように高いバリア能を持つ組織に適用された微量薬物の組織内への浸透量を促進させるため CEC (constant electric current) を併用することとした。そこで、皮膚表面に適用した微量の水溶性高分子薬物 Calcein (Cal) 溶液に異なる電流密度 (0.3-5.0 mA/cm²) の CEC を負荷した。その結果、Cal の皮膚累積透過量は 3-7 倍増大した。加えて、短時間 (5 min) の CEC 適用で、Cal は角層バリアを透過し、皮内深部へ送達したことが CLSM 画像とその画像解析により確認された。以上のことより、Nano-dose applicator は必要最少量の薬物を微小病巣組織に直接的に投与できる新たな方法になりうると考えられた。また、薬物の組織内分布を可視化出来る本画像解析法は薬物の微小組織内動態評価に有用と示唆された。

以上のことより、本研究で用いた Nano-dose applicator による微量薬物の微小組織送達は新しい accurate dosed drug delivery system (adDDS) を構築するために有用と考えられ、本研究で示した画像解析法はそのための基盤研究に有用であると考えられた。今後は血流による影響など、より実使用を考慮した評価法へと発展させることが必要と考えられる。

論文審査の結果の要旨

Drug Delivery System (DDS) とは薬物を必要な部位に必要な量を必要な時間だけ作用させるような最適化を目的に設計された投与システムと定義される。既存の DDS や投与デバイスに関しては、薬物の生体膜透過（または吸収）促進法や徐放能を有する製剤についての報告は多数あるものの、経口投与と注射における検討が中心で、用量を著しく軽減する局所投与技術については、これまで十分な研究がない。そこで喜島氏は、極低量の薬液を限定された部位のみに適用するために、数ピコ〜ナノリットル単位で吐出量を制御できるピエゾ感圧アプリケーション（Nano-dose applicator）に注目した。

本研究では、Nano-dose applicator による薬物投与を念頭に置き、副作用を抑え、かつ最大限の治療効果を引き出すために、最少量の薬物を目的部位である微小病巣組織へ直接的にかつ効率的に送達するシステムの開発のための基礎的検討として、微小組織中の薬物分布を評価する方法について検討し、その結果を3章構成で論じている。

1. 蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価

皮膚局所で作用を示す医薬品や医薬部外品、機能性化粧品の安全性・有効性の予測には、特に各作用部位（各深度）におけるそれらに含有された有効成分の皮内濃度を正しく評価することが重要とされる。喜島氏は、従来の皮膚中濃度評価法は主に表皮や真皮の平均濃度や角層のみの濃度分布を測定対象としており、安全性や有効性評価でより重要と考えられる表皮や真皮中各深度での濃度分布を、より詳細に評価する新しい手法が必要であることに注目した。

そこで本章では、薬物の皮内分布を直接的にかつ簡便に評価が可能と考えられる共焦点レーザー走査型顕微鏡（CLSM）を用いた画像解析法を用いて検討している。蛍光モデル薬物として分子量約 4000 の FITC-dextran（FD-4）を選択して *in vitro* 皮膚透過試験を行い、得られた透過プロファイルより皮膚中濃度分布を Fick の拡散則に基づいて予測する一方、透過試験後の皮膚組織切片の CLSM 像を用いて、化学物質の皮膚中濃度の深度方向における分布を求めている。その結果、本画像解析法で得た定常状態時および非定常状態時の FD-4 の concentration-distance profile は数学的解析から得られた値と極めて近似することが判明し、蛍光標識薬物の生きた表皮・真皮中の各深度濃度評価に本手法は極めて有用であると結論している。

2. 非蛍光標識薬物の組織中濃度の画像解析による評価

前章において、CLSM 画像解析による蛍光標識薬物の皮膚中濃度評価について検討した結果、CLSM を用いた画像解析方法は薬物の皮内各部位（各深度）での薬物分布を直接的にかつ簡便に評価できることを確認した。しかし、CLSM を用いた手法は応用できる薬物が蛍光標識体に限られるため、喜島氏はより広く画像解析方法を応用するためには非蛍光標識薬物を用いた画像解析測定法の確立も必要であるとの考えに至った。

本章では、質量分析装置を用いて病理組織切片上にある生体分子や代謝物の局在を直接可視化する imaging mass spectrometer（IMS）法に注目し、モデル薬物として lidocaine hydrochloride monohydrate および nicotinic acid を選択し、質量顕微鏡（iMScope）を用いた画像解析および皮膚透過試験から得られる皮膚透過挙動より concentration-distance profile を算出・比較することで、iMScope 画像によ

る皮膚中濃度評価の有用性について検討している。

その結果、画像解析より得られた皮膚中 concentration-distance profile の観測値は数学的解析から得られた値と同様な傾向は見られたもの一致するものではないことが判明した。喜島氏は、両方法のどちらかがより正確であるか結論を出せないものの、iMScope を用いることで、皮膚組織の各部位に分布する薬物の存在を、イオン対の形成状態を含めて直接的に評価できることに注目した。iMScope を用いた画像解析法は、生体組織を破碎、抽出する従来の手法より簡便に組織内での詳細な薬物濃度分布を調べることが可能であると推察し、数学的予測法では評価できない特定な部位での薬物分布を直接的に評価できることで本手法の幅広い応用が期待できると論じている。

3. Nano-dose applicator により投与された蛍光標識薬物の種々微小組織中の分布評価に関する検討

従来の DDS による薬物送達は、標的部位に一定量の薬物を送達することができるものの、多くの薬物は標的部位へ到達するまでに正常な組織にも分布する欠点があり、これらが重篤な副作用を引き起こす可能性がある。このため喜島氏は、副作用を抑え、かつ最大限の治療効果を期待するには、最少量の薬物を標的部位である病巣組織へ直接的にかつ効率的に送達する必要があるとの考えに至り、以下の検討を行っている。

Nano-dose applicator をデバイスとして選択し、モデル薬物である FD-4 の微量薬液を皮膚、脳および肝臓に適用した後の組織内濃度分布を CLSM を用いた画像解析方法にて検討している。その結果、各組織表面に適用された微量 FD-4 は組織内に半楕円形に分布することが示され、その浸透パターンから FD-4 の組織表面での横方向への広がりが見られ、これらの組織内分布に大きく影響すると結論付けている。また、適用した FD-4 の浸透の深さが各組織で異なることから、組織表面に適用した微量薬物の分布は、その組織中での拡散性の違いに強く依存すると結論した。例えば、角層を有する全層皮膚に適用された FD-4 では、角層を介した皮内への浸透が認められなかったものの、毛嚢上に適用された場合には皮内に浸透し、これは両部位での FD-4 の拡散性の違いに起因すると結論した。

さらに喜島氏は、角質層のように高いバリア能を持つ組織に適用された微量薬物の組織内への浸透への constant electric current (CEC) の併用効果についても本手法により検討している。すなわち、皮膚表面に適用した微量の水溶性モデル薬物 calcein (Cal) 溶液に異なる電流密度 (0.3-5.0 mA/cm²) の CEC を負荷したところ、Cal の皮膚累積透過量は 3-7 倍増大することを示し、さらに短時間 (5 min) の CEC 適用で、Cal は角層バリアを透過し、皮内深部へ送達されたことを CLSM 画像とその画像解析により明瞭に提示した。

以上より、Nano-dose applicator は必要最少量の薬物を微小病巣組織に直接的に投与できる新たな方法になる可能性が示され、また、薬物の組織内分布を可視化出来る本画像解析法は薬物の微小組織内動態評価に有用であることが示された。

以上より、喜島氏は、本研究において新しい accurate dosed DDS を構築するために有用となる、Nano-dose applicator による微量薬物の微小組織適用および画像解析法の確立に向けて多大な貢献をしたと考えられ、博士 (薬科学) の学位を授与するに値するものと判断する。