

薬物の経皮吸収及び経皮免疫接種への応用に向けたマイクロニードルの利用に関する研究

学 位 申 請 者 氏 名 竹内 亜砂佳

現在、上市されている医薬品の有効成分は、低分子化合物からペプチド、ワクチン等の高分子化合物まで多岐にわたる。これら医薬品の主な剤形は、経口剤あるいは注射剤である。経口剤は、一般に利便性が高くかつ安価に調製できるが、消化管分解を受ける薬物には適さない剤形である。また注射剤は、速やかな薬効発現が期待できるが、医療従事者による投与が必要で、かつ疼痛や感染症などのリスクも伴う。このような状況下で、経口剤や注射剤に代わる剤形として、経皮投与製剤が注目を集めている。経皮投与製剤は、肝初回通過効果を回避でき、さらに投与方法が容易で自己投与が可能である。ただし、高分子化合物や親水性化合物は、角層バリアの影響で皮膚透過が制限されるため、経皮投与製剤への適用は難しいと考えられている。この課題を解決するため、薬物の皮膚透過性を向上させる技術として、物理的透過促進技術を利用した Transdermal Drug Delivery System (TDDS) の研究が進められてきた。その一つであるマイクロニードル (MN) は、数百 μm の微小なニードルを利用して皮膚透過の律速段階である角層バリアに小孔を開け、薬物透過ルートを形成する皮膚透過促進デバイスである。さらに MN は、その微小構造により神経が存在する真皮深部に達せず、疼痛を伴わない。これまでに様々な材料や薬物送達機構を有する複数のタイプの MN が研究されてきた。しかし、いずれも医療用として実用化までには至っていない。TDDS として MN を実用化するためには、その基本的な特性を把握することを通じて有用性を明らかにすることが必要である。本研究ではまず、生分解性物質であるコンドロイチン硫酸ナトリウムを基剤とした底面 $300\ \mu\text{m}$ 、高さ $500\ \mu\text{m}$ の円錐状の形状を有する溶解性 MN を調製した。本 MN はその円錐上部に薬物を含有し、下部は基剤のみで形成された 2 層構造を基本としている。本 MN は皮膚に適用後、皮内で溶解し、含有薬物を放出する仕組みとなっている。また、一般に皮膚透過後の薬物の血中移行性は適用薬物の分子量に依存することから、比較的低分子の薬物に対して、MN は全身への経皮吸収デバイスとして、高分子の薬物に対しては、皮膚局所へ薬物を送達する皮内投与デバイスとして利用できるものと期待されている。しかし、これら薬物を含有する溶解性 MN の有用性は十分に検討されていない。一方、皮膚は単に外界との物理的バリアとしてだけではなく、免疫学的バリアとしても機能し、近年、皮膚樹状細胞をターゲットとした経皮ワクチンの有効性が多数報告されている。さらに、ワクチンが感染症領域の枠を超え、がんやアレルギー疾患の領域にも適用が拡大してきている背景から、経皮免疫分野での MN の利用が期待されている。しかし、経皮ワクチンへの MN の利用に際して、その基本的特性についてほとんど検討されておらず、経皮免疫の初期ターゲットとされる皮膚樹状細胞への MN の適用の影響についても明らかになっていない。

以上を踏まえ、申請者は、経皮吸収及び経皮免疫 (ワクチン) 製剤としての MN の実用化に向けた MN の有用性評価と基本的特性を明らかにすることを目的に、第 1 章では、水溶性低分子化合物を含有する溶解性 MN について、全身送達を目的とした経皮吸収型製剤としての MN のキャラクタリゼーションを行った。第 2 章では、経皮ワクチン分野への MN の応用を見据え、高分子化合物 (モデル抗原) 含有溶解性 MN について、抗原の皮内送達と抗体産生に着目した検討を行い、さらに経皮免疫製剤としての MN のキャラクタリゼーションを行った。第 3 章では、MN の投与に伴う物理的な刺激に着目し、皮膚の免疫担当細胞に対する影響を評価した。

第 1 章 経皮吸収型製剤としての MN のキャラクタリゼーション

全身への経皮吸収を目的とした水溶性低分子化合物含有溶解性 MN の調製及びその評価を行った。モデル薬物として、難皮膚透過性薬物である水溶性低分子化合物のグラニセトロンを選択した。本検討では、 $1\ \text{cm}^2$ あたり 100 本の MN を有する製剤を調製した。本製剤を皮膚に適用した時、グラニセトロンの速やかな全身循環系への移行及び約 95% という高いバイオアベイラビリティが確認された。薬物含有量の異なる MN を適用した検討を行った結果、血中濃度の時間的推移は投与量依存性を示した。これらの結果は、本製剤が含有薬物の速やかな血中への移行という点で有用であることを示している。以上より、薬物の全身送達を目的とした水溶性低分子化合物含有溶解性 MN

は、経皮吸収型製剤として有用なデバイスになりうると考えられた。

第2章 経皮免疫製剤としてのMNのキャラクタリゼーション (抗原の皮内送達と抗体産生)

第2章第1節では、経皮免疫を目的とした高分子化合物含有溶解性MNの調製及びその評価を行った。モデル抗原として、高分子タンパクであるオブアルブミンを選択した。本製剤は、第1章から改良を行い、 2.25 cm^2 あたり225本のMNを有するよう調製した。皮膚は、他臓器に比べて高密度で樹状細胞が存在している。そのため、皮内に抗原を直接送達するMNは、従来の皮下注射による投与方法に比べ、より高い免疫反応を惹起出来ると考えられる。実験の結果、本製剤投与後、皮下注射と同等以上の血漿中Ig (G+A+M) 抗体価が得られた。この結果は、本製剤により高分子化合物であるオブアルブミンが、皮内に送達出来たこと及び経皮免疫が誘導出来たことを示唆している。また、本製剤投与後にIgE抗体は産生されなかったことから、本製剤によるアレルギー反応は誘発されないことも明らかになった。これらの結果から、高分子化合物含有溶解性MNはワクチン接種に応用可能な皮内送達型製剤として、有用性が高いと考えられた。

第2章第2節では、MNからのモデル抗原の皮内送達部位について検討を行った。皮膚は外側から、表皮、真皮及び皮下組織の3層に分けられる。表皮層に、高い抗原提示能を有するランゲルハンス細胞が高密度に分布していることに着目し、表皮層に抗原を送達するよう設計した3層構造の溶解性MNを調製した。本製剤は円錐中層部に抗原を含有し、円錐上部及び下部は基剤のみで成形されている。3層性MNと基本構造である2層性MNとの皮内送達部位を比較した結果、3層性MNは主に表皮層及び真皮層上部に、また2層性MNは主に真皮層に抗原を送達することが明らかとなった。さらに、免疫応答実験の結果、3層性MN投与群の血漿中Ig (G+A+M) 抗体価は、皮下注射群及び2層性MN群と比べ有意に高かった。これらの結果、溶解性MNの抗原保持部位を調整し、強力な抗原提示能を有するLCが分布する表皮層へ抗原を送達することで、より効率的なワクチン接種が可能になることが明らかになった。

第3章 経皮免疫製剤としてのMNのキャラクタリゼーション (物理的刺激に関する初期評価)

テープストリッピングによる皮膚への物理的刺激が樹状細胞を活性化し、免疫作用の活性化に関与することが報告されている。そこで、MN投与に伴う皮膚への物理的刺激が、皮膚樹状細胞へ与える影響について検証した。樹状細胞の活性化すなわち自然免疫の活性化は、アジュバント作用によるアウトプットの一つと考えられている。MN投与にも皮膚への物理的刺激が伴うことに着目し、MN投与後の表皮ランゲルハンス細胞及び真皮樹状細胞の活性化について評価した。その結果、MN投与後のランゲルハンス細胞において、活性化分子であるMHC class-II及びCD86等の共刺激分子の発現が顕著に増加した。真皮樹状細胞においては、ランゲルハンス細胞よりも低い傾向ではあったものの、これら分子の発現が顕著に増加した。また、皮膚への物理的刺激の強度差による樹状細胞への影響を評価するため、針の長さを異とするMNを用いて実験を行った。500 μm あるいは300 μm の針の長さを有するMNは、皮膚への刺入深度にも差があることを確認した。500 μm MN処置群は300 μm MN処置群と比べ、樹状細胞における活性化分子の発現が高い傾向を示した。これらの結果から、MN投与に伴う刺激が、皮膚樹状細胞を活性化させることが明らかとなった。これらの結果は、皮膚へのMN投与による物理的刺激そのものが免疫系を活性化するアジュバント様作用を有する可能性を示しており、MNによる抗原の皮内送達と合わせて、経皮ワクチン投与の合理性をサポートする結果であると考えられる。

本研究により、MNの基本的特性を把握することができ、初期製剤開発及びその有用性を引き出すための知見を得ることができた。本研究で得られた知見を生かしてMNの開発を行うことで、より有用な経皮投与製剤の創出に繋がると考える。

Studies on the use of microneedle for the application of the percutaneous absorption and transdermal immunization of drug

Asuka Takeuchi

Pharmaceutical active ingredients currently marketed vary from low-molecular-weight to high-molecular-weight compounds, such as peptides and vaccines. Dosage forms for those compounds are mainly oral preparations and injections. The oral preparations have advantages in terms of accessibility and cost. However, the gastrointestinal tract is a hostile environment for degradable drugs. On the other hand, an instantaneous and direct effect without the absorption process can be expected for injections. However, trained professionals are required for injections, in addition, potential pain by injection and risk of infection diseases will be concerned. Recently, transdermal patches have received attention as an alternative dosage form to the oral preparation and injections. The transdermal patch has superior characteristics such as avoidance of the first pass metabolism, easy-to-use and self-administration. However, these are difficulties in transdermal patches to deliver water-soluble compounds and high-molecular-weight substances because of barrier properties of the stratum corneum. To overcome this problem, the Transdermal Drug Delivery System (TDDS) using physical enhancing techniques has been widely studied. In recent years, the use of microneedle (MN), has emerged as a novel technique. MN with lengths of several hundred micrometers penetrates through the stratum corneum and creates a direct permeation pathway for the drug into the skin, thus improve the delivery of drugs without pain. In a previous study, many types of materials and aspects of MN were examined. However, fundamental properties of MN as a TDDS have not been characterized at present. In this study, the author designed dissolving MN with 500 μm of length and 300 μm of diameter at their bases, composed of biodegradable chondroitin sulfate. The drug is formulated at the acral portion of the MN, which has a two-layered structure. After administration transcutaneously, the MN is expected to be dissolved for releasing loaded drugs. Systematic absorption of drugs across the blood vessel depends on their molecular weight. MN is anticipated to be available for systemic delivery of low-molecular-weight compounds, as well as intradermal delivery of high-molecular-weight compounds for transcutaneous immunization (TCI). However, it is not clear whether MN is useful for these compounds. Further, skin serves as an immunological barrier, and dendritic cells distributing in skin is a target of effective TCI. As vaccine application has been extended to treatment of cancer and allergic diseases in addition to infection, MN is expected to be a useful technique to achieve TCI. However, basic information regarding potential influence of MN to the dendritic cells is not provided sufficiently. The purpose of this study was to characterize the MN in terms of systemic absorption of low-molecular-weight drugs and potency for TCI. In chapter 1, the author characterized the MN containing water-soluble low-molecular-weight compounds as a preparation for systemic absorption. In chapter 2, intradermal delivery of high-molecular-weight compounds was characterized to prove potency as a TCI. In chapter 3, influence of application of MN on activation of dendritic cells was investigated.

Chapter 1: The characterization of MN as a percutaneous absorption formulation

For systemic drug absorption, the author prepared a dissolving MN array chip (MNAC) containing a water-soluble low-molecular-weight compound. Granisetron (GST) is used as a model drug, which has low skin permeability. In this study, 100 dissolving MNs, containing GST were prepared on a 1.0 cm^2 chip. From the feature of blood concentration, it has been ascertained that GST was immediately absorbed with high bioavailability (95%) into the systemic circulation after application of the dissolving MN. Dose-dependency was observed in C_{max} and AUC when MNs containing different amount of GST were applied. These results indicate that the MNAC can be useful for achieving rapid systemic absorption of water soluble low-molecular-weight compounds.

Chapter 2: Characterization of MN as a TCI formulation (antigenic protein delivery and antibody production)

MNAC containing a high-molecular-weight compound (model antigen) was prepared for evaluation of TCI. Ovalbumin (OA)

was chosen as a model antigen. The MNAC, consists of 225 dissolving MNs on the area of approximately 2.25 cm². As compared to subcutaneous and muscular tissues, the epidermal and dermal layers of the skin contain a large number of antigen-presenting cells (APCs), including Langerhans cells (LCs) and dermal dendritic cells (dDCs). Therefore, MN, which can directly delivers an antigen into the skin, is expected to be a tool for vaccinations with the least amount of antigen. Application of MNAC containing OA induced equal to higher amount of total Ig (G+A+M) antibody titer compared with subcutaneous injection of OA solution at 2 and 4 weeks after application. These results indicate that the MNAC can be used for TCI. The MNAC did not change anti-OA IgE levels compared with control, suggesting that no allergic reaction can be occurred by the MNAC application. Thus, MNAC containing a vaccine antigen can be a useful for TCI.

Two different types of MN, i.e. a three-layered dissolving MN and a two-layered dissolving MN were designed to deliver OA mainly into epidermis and dermis, respectively. A large number of LCs exist in viable epidermal layer. Based on these facts, I designed a three-layered dissolving MN with OA formulated in the second layer to deliver the OA to the epidermis. From the histological study, it appeared that the two-layered dissolving MN delivered OA into mainly dermal layer, whereas the three-layered MN into both epidermal and top of dermal layers. Furthermore, induction of OA-specific total Ig (G+A+M) antibody the index of systemic immune response in plasma were increased by 2.5-7 fold by the three-layered dissolving MN compared to the two-layered dissolving MN. Results suggest that target site of drug delivery can be controlled by adjusting the drug-loading site in the MN. Thus, MN formulation achieves efficient TCI.

Chapter 3: Characterization of MN as a TCI formulation (the initial assessment about the physical stimuli)

Since physical stimulus to the skin such as tape stripping are reported to activate immunocompetent dendritic cells, physical stimulus by MN may induce similar activation of the immune cells in skin. The activation of the dendritic cells, the innate immune system, is considered due to adjuvant effect. In this chapter, activation of immunocompetent cells was evaluated after application of MN as physical stimulus.

The expression of MHC class-II and costimulatory molecules of LCs in skin was demonstrated in an upward trend after application of MN. Expression of their molecules in dDCs was also increased by the MN application, but their expression level was lower than in the LCs. Thus, it is evident that physical stimuli given by MN can induce activation of APCs or an adjuvant-like effect. Two different needle lengths (500 and 300 µm) of MN devices were used in this study to evaluate the effect of the penetration depth on APCs activation in skin. The 500 and 300 µm MNs could penetrate the skin by depths of approximately 230 and 130 µm from the skin surface, respectively. Activation of APCs indicated by MHC class-II and CD86, expression were higher in 500 µm MN than in 300 µm. In conclusion, the use of MN allows efficient TCI by direct delivery of antigen into skin and adjuvant-like effect by physical stimulus.

In this study, the author demonstrated the fundamental characteristics of MN and usefulness of MN as a TDDS. The information identified in this study could contribute to the preparation of useful MN devices.

論文審査の結果の要旨

新薬創出が年々難しくなっている中、創剤研究は、創薬研究の中でも非常に重要な研究として位置づけられている。現在、上市されている医薬品の多くは、経口剤あるいは注射剤である。経口剤は、利便性が良くかつ安価に調製できるため、最も使用頻度が高い。しかし、ワクチンや抗体医薬といったバイオ医薬品は、消化管による分解を受けやすいので、経口剤には適さない。さらに、高齢化社会が進む中で、嚥下困難な高齢患者の服用を考えると、経口剤に代わる投与剤形が望まれている。近年、多くの企業においては、代替製剤として経皮投与製剤の開発に取り組むことが多くなってきた。しかし、水溶性の低分子や高分子医薬品は、皮膚最外層に存在する角層バリアの影響で、皮膚透過が制限されるため、経皮投与製剤としての開発は難しい。この課題を解決するため、薬物の皮膚透過性を向上させる技術として、外部駆動力を利用した物理的促進法による Transdermal Drug Delivery System (TDDS) の研究が行われている。近年はマイクロニードル (MN) の研究も盛んに行われるようになってきた。MN は、数 100 μm の微小な針を利用して皮膚に小孔を開けることで新規の薬物透過ルートを形成させる経皮透過促進デバイスである。皮膚透過の律速段階である角層を物理的に貫通させるため TDDS の中でも特に注目を集めている。竹内 亜砂佳 氏は、水溶性の低分子医薬品や高分子化合物を含有する溶解性 MN の調製とキャラクタリゼーションおよび、MN 適用による免疫系活性化作用についての検討を行なった。

第 1 章では、経皮吸収製剤として、難皮膚透過性薬物である水溶性の低分子化合物で、速やかな薬効発現が必要と考えられるグラニセトロン (GST) を含有させた溶解性 MN のキャラクタリゼーションを行なった。本 MN は、その円錐上部に GST を含有し、下部は基剤のみで形成された 2 層性構造が特徴である。また、1 cm^2 あたり 100 本の溶解性 MN を有する GST 含有 MN Array Chip (MNAC) を調製し、本製剤適用後の GST の生物学的利用率 (BA) を評価した。その結果、GST の BA は約 95% という良好な結果が得られた。これは、MN により角層に新規薬物透過ルートが形成され、含有する GST のほぼ全てが皮内に送達できたことを意味しており、MN によって難皮膚透過性である水溶性低分子化合物の全身循環系への移行を、大幅に改善できることが明らかとなった。また最高血中濃度到達時間 (Tmax) は、MNAC 適用後 10 分で得られた。MNAC 適用後、MN の基剤であるコンドロイチン硫酸ナトリウムが速やかに溶解することにより、含有されていた GST が放出され血中に移行したことを示唆している。これらの結果から、本製剤は含有薬物の速やかな薬効発現の点からも有用である。自己投与可能で、注射剤と類似した血中濃度推移を示すことは、極めて有用な製剤であることが考えられ、即効性を期待する他の薬物に対しても利用できるものと思われる。本章の結果、薬物の全身送達を目的とした低分子化合物含有 MNAC は、経皮吸収製剤として有用なデバイスになり得ることが考えられた。

第 2 章では、経皮免疫製剤としての MN のキャラクタリゼーションを行った。第 1 節では、水溶性高分子化合物 (モデル抗原であるオボアルブミン (OA)) を含有させた溶解性 MN を調製し、その経皮免疫性を評価した。さらに、第 2 節では、発展途上国を含む国々で安価で利用できる溶解性 MN の調製を試みた。経皮免疫分野での発展を見据え、皮膚樹状細胞との関わりに着目し、高分子化合物 (OA) の皮内送達部位の検証を行い、経皮免疫用 MN における適切な薬物保持部位及び皮内送達部位について検証した。その結果、円錐上部に OA を含有し、下部は基剤のみで形成された 2 層性構造の溶解性 MN からなる MNAC を適用したラット群の血漿中 Total Ig (G+A+M) 抗体価は、同投与量の皮下注射投与群と

同等以上であった。また OA 含有 MNAC 適用群では、抗原量を 10 倍にした皮下注射投与群とほぼ同等の抗体価が得られた。少量の抗原投与によって、アレルギー反応を誘発せず、皮下注射と同等以上の免疫応答を惹起できる OA 含有 MNAC は注射に代わる有用な経皮ワクチンデバイスになり得ることが示唆された。さらに、表皮から真皮上部で免疫が賦活されるように、MN の中心部にのみ OA を含有させた溶解性 MN (3 層性で OA 量として第 1 節の MN の半分量) から成る MNAC は、第 1 節で調製した 2 層性の MN から成る MNAC 以上に血漿中 Total Ig (G+A+M) 抗体価が増大した。このように、OA 含有の 3 層性 MNAC の調製に、世界で初めて成功した。以上の結果から、高分子であるワクチン抗原を含有させた 3 層性 MNAC は、経皮的免疫獲得を目的とした安価な皮内送達型ワクチン接種製剤として開発できるものと考えられる。

第 3 章では、MN の刺入による物理刺激が表皮のランゲルハンス細胞 (Langerhans Cell, LC) や皮膚樹状細胞 (Dermal Dendritic Cell, dDC) の活性化度に与える影響を分子生物学的に評価した。物理的刺激のみを評価するため、本章では非溶解性 MN から成る MNAC を用い、MN の刺入距離の異なる MNAC について評価した。MN 適用した後の LC において、活性化分子である MHC class-II 及び CD86 等の共刺激分子が顕著に増大した。dDC においては、LC よりも低い傾向ではあったものの、これら分子の発現が増加した。これらの結果は、MN 適用に伴う物理的刺激が皮膚樹状細胞を活性化させることを示唆している。さらに、皮内 230 μm の深さまで到達した 500 μm MN 処置群は、皮内 130 μm の深さまで到達した 300 μm MN 処置群と比べ、活性化分子の発現率は高い傾向を示し、物理的刺激の強さの程度が樹状細胞活性化に影響することが示唆された。さらに、LC における活性化分子の発現は、早期かつ一過性であることが確認された。このように、MN 適用による物理的刺激そのものが免疫系を活性化するアジュバント様作用を有する可能性があることを初めて見出した。

以上、本論文は、MN の TDDS としての有用性と実用性に対して、有益な情報を提供するものであり、新規経皮投与製剤の開発において、有用な情報をもたらす重要な研究であると評価できる。新規性の高いことが認められる本論文は、その独創性および研究意義の観点から、本研究科において課程によらない博士 (薬科学) の論文として十分に値するものであると判断した。