

# 学位論文要旨

学位申請者氏名 二木 美香

## 中空型マイクロニードルによる穿刺および注入に及ぼす要因とモデル中分子薬物 FD-4 の吸収動態制御

マイクロニードル (MN) は、長さ数百マイクロの微細針により皮膚透過バリアである角層を貫通し、角層下の組織へ直接薬物を送達することができる新しい投与形態のデバイスであり、注射剤と経皮適用製剤の 2 つの側面を有する。なかでも、中空型 MN はより注射の投与形態に近く、皮下注射と同様に薬液を単回投与することができる。このような特徴を有することから、中空型 MN は経皮適用が困難な中・高分子薬物の投与デバイスとして注目されている。しかしながら、微小針の穿刺により薬液を確実に皮内に注入することが必須となるにもかかわらず、穿刺・注入に及ぼす中空型 MN の微小針設計や、注入された薬液分布が薬物の体内動態に及ぼす影響について検討した報告は少ない。中空型 MN の穿刺・注入に及ぼす MN 形状や皮膚特性などの要因や投与薬物の皮内分布など薬物動態に及ぼす因子を明らかとなれば、注射製剤と経皮適用製剤の両方の特性を有する製剤の開発が可能となり、目的に応じた薬物投与の実現が期待できる。そこで本研究では中空型 MN による投与後の薬物の皮内および体内動態に及ぼす投与条件の影響と中空型 MN の皮膚への穿刺・注入に及ぼす要因の解明を明らかにし、加えて投与薬物の皮内動態制御の可能性について、電場を用いた経皮薬物送達促進デバイスとして知られているイオントフォーシス (IP) を用いて試みた。まず、1 章では投与濃度、投与容量や投与速度などの要因が中空型 MN で投与したモデル中分子薬物の体内動態に及ぼす影響について調べた。第 2 章では、第 1 章の結果をふまえて、針の長さやなど形状の異なる中空型 MN を用い、皮膚への穿刺・注入に及ぼす形状の影響について調査し、穿刺性や薬液注入成功率に及ぼす中空型 MN の形状特性との関係について明らかにした。第 3 章では、薬物の皮内動態制御能に及ぼす IP 負荷効果 (電気浸透流や電氣的反発作用) を調査し、中空型 MN と IP 併用による体内動態制御の可能性を検討した。

### 第 1 章 中空型 MN で投与したモデル中分子薬物 FD-4 の体内動態に及ぼす種々要因の解明

中空型 MN を用いて皮内 (*i.d.*) 投与したモデル中分子薬物 Fluorescein isothiocyanate-dextran (*M.W.* 4,000、FD-4) の体内動態に及ぼす可能性のある種々因子 (投与容量、投与速度および針本数等) の影響について調査した。中空型 MN はすでに FDA に認可されている MicronJet を用いた。投与容量が 5、20 および 80  $\mu\text{L}$  と増加するにつれて FD-4 血中濃度-時間推移より算出した最高血中濃度到達時間 ( $T_{\max}$ ) および最高血中濃度 ( $C_{\max}$ ) が変化することがわかった。FD-4 溶液の代わりに X 線造影剤であるヨウ素溶液を *i.d.* 投与し、X 線 CT 装置により、投与溶液の皮内分布を測定した結果、注入溶液の投与容量の増大に伴いヨウ素溶液の一部が皮下に分布していることがわかった。これらの結果から、*i.d.* 投与した薬物の体内動態を皮膚の浅い層 ( $S_{\text{upper}}$ ) および深い層 ( $S_{\text{deeper}}$ ) から異なる吸収速度で全身循環系に移行すると仮定したコンパートメントモデルを構築し解析を行ったところ、実測値とコンパートメントモデルにて解析した結果はほぼ一致した。さらに、20  $\mu\text{L}$  の薬液を分割投与 (5  $\mu\text{L} \times 4$  回) すると、単回投与 (20  $\mu\text{L} \times 1$  回) と比較して  $T_{\max}$  の短縮および  $C_{\max}$  の増加が確認され、薬物の皮内分布が体内動態に影響を及ぼしていることがわかった。以上の結果より、薬液の投与容量は体内動態に影響を及ぼす因子であることがわかり、針の本数や配列など中空型 MN の設計を工夫することで体内動態を制御できる可能性が示された。

### 第 2 章 中空型 MN の穿刺および注入に及ぼす要因解明および皮内への確実な投与を可能とする中空型

## MN 設計の最適化

第 2 章では、ポリ乳酸からなる様々な形状の中空型 MN を用い、穿刺および薬液の注入に及ぼす種々要因の解明を行った。中空型 MN は針全長 1,000、1,300 および 1,500  $\mu\text{m}$  の針 (hMN<sub>1000</sub>、hMN<sub>1300</sub> および hMN<sub>1500</sub>) に加え、円柱状の支柱を針周辺に設けた中空型 MN (hMN<sub>1000S</sub>、hMN<sub>1300S</sub> および hMN<sub>1500S</sub>) の計 6 種類の中空型 MN を用いて検討を行なった。硬度の異なる皮膚に中空型 MN を穿刺し、メチレンブルー染色により、穿刺性を評価した。また、注入成功率はローダミン溶液を 20  $\mu\text{L}$  注入し、その成否により評価した。さらに X 線 CT を用いて造影剤が分布している最大深度を測定し、*i.d.* 投与により形成される膨疹のサイズを計測した。高い皮膚硬度 (A25) では、穿刺および注入成功率はともに高く、hMN<sub>1300S</sub>、hMN<sub>1500</sub> および hMN<sub>1500S</sub> は、A25 硬度の皮膚で 90% 以上の高い注入成功率を示した。膨疹サイズおよび注入溶液の深度評価では、hMN<sub>1300S</sub> では 10  $\text{mm}^2$  以上の大きな膨疹が確認され、hMN<sub>1500</sub> および hMN<sub>1500S</sub> では膨疹は確認されなかった。X 線 CT の結果より、hMN<sub>1500</sub> および hMN<sub>1500S</sub> を用いた場合、溶液は皮下に、hMN<sub>1300S</sub> では皮内に分布していた。これらの結果より、中空型 MN に支柱を設けることは、注入溶液の深さ制御を行うための有用な方法であると考えられた。万能試験機を用いて中空型 MN を人工皮膚膜へ穿刺した際に得られる試験力-ストローク曲線から膜破断時の応力やストロークなどの物理パラメータを算出した。その結果、針周辺に配置した支柱は、薬物の深度制御だけでなく、穿刺により変形した皮膚と MN 土台との接触を防止する役割が期待できることがわかった。本検討結果は、穿刺・注入性に優れた中空型 MN の設計に非常に有益な情報を提供すると考えられた。

## 第 3 章 外部デバイスと中空型 MN の影響

第 3 章では、正電荷、負電荷そして電荷を持たない中性の低分子および中分子を選択し、電気反発力や電気浸透流により薬物の皮膚拡散性・透過性を制御できる IP を用いて、中空型 MN にて *i.d.* 投与した薬物の皮内動態制御の可能性について調べた。ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を含有させた種々薬物溶液を調製し、任意の深さに薄切したブタ耳皮膚の真皮に薬物溶液を 200  $\mu\text{L}$  投与し IP 適用 (0.3  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) した。結果、低分子薬物では電荷の有無に関わらず IP 負荷による皮内動態制御 (透過促進及び抑制) は認められなかった。一方、同様の試験をアニオン性中分子薬物において評価した結果、アノードル負荷により有意に透過が抑制されたことが見出された。電荷を持たない中性中分子薬物では IP 負荷による効果が認められなかった。以上の結果から、皮膚組織内でも同様に、IP により物質の移動が制御でき、中空型 MN により投与された薬物をより吸収性の高い皮膚上層に集めることができると期待された。

中空型 MN は、注射剤と経皮適用製剤の 2 つの側面を有する新しい投与形態のデバイスである。本検討結果より、中空型 MN にて投与された中分子モデル薬物 FD-4 の体内動態に及ぼす影響や穿刺および注入成功率に影響する要因が明らかとなった。さらに、電場駆動力とした IP との併用による皮内動態制御の可能性が示唆された。本検討より、中空型 MN の設計・開発に有用な知見を提供でき、また中・高分子薬物の投与デバイスとしての有用性を示したことから、中空型 MN の今後の発展に大きく貢献できる有益なデータを示すことができたと考える。

## **Effect of hollow microneedle design on the successful intradermal delivery and pharmacokinetics of fluorescein isothiocyanate dextran (*M.W.* 4,000)**

Microneedles (MNs) are novel drug delivery devices that can create micropores in the stratum corneum, the primary skin permeability barrier to protect the body, by means of several hundred fine needles. Therefore, MNs have main uses as administration devices for injections and delivering transdermal formulations. In particular, hollow MNs (hMNs) resemble injection systems, and drug solutions can be administered in the same manner as a subcutaneous injection. Therefore, hMNs have attracted interest as a delivery device for medium- and high-molecular-weight drugs that are typically challenging to administer percutaneously. However, research on such use of hMNs has been limited due to the low probability of skin puncture, and there are few reports on the effect of drug distribution in the skin and the pharmacokinetics of administered drugs. Elucidation of factors that affect skin puncture and drug injection by hMNs, such as needle geometry and skin characteristics, as well as factors that affect the drug pharmacokinetics, will provide useful information for the development of hMNs. In the present study, the effect of administration conditions on the pharmacokinetics, as well as factors that affect skin puncture and injection using hMNs were investigated. In addition, the possibility of controlling the intradermal pharmacokinetics of administered drugs was explored with iontophoresis (IP), which is known for enhancing transdermal drug delivery by means of an electric field.

Chapter 1 discusses the effect of various factors such as drug concentration, formulation volume, and administration rate on the pharmacokinetics of a model medium-molecular-weight drug administered using hMNs. In Chapter 2, based on the findings in Chapter 1, the effect of needle length and shape on the successful rate of skin puncture and injection with different types of hMNs are discussed. In Chapter 3, electroosmotic flow and electrical repulsive effects induced by IP on the dermatopharmacokinetics of an administered drug were investigated, and the possibility of controlling dermatopharmacokinetics using a combination of hollow MNs and IP was examined.

### **Chapter 1: Effect of administration factors on the pharmacokinetics of FD-4 after *i.d.* administration with hMNs**

In this chapter, the effect of administration factors such as administration volume, administration rate, and the number of hMNs on the pharmacokinetics of fluorescein isothiocyanate-dextran (*M.W.* 4,000, FD-4). MicronJet, which is approved by the United States Food and Drug Administration (FDA), was used as an hMN system. The time to maximum blood concentration ( $T_{max}$ ) and the maximum blood concentration ( $C_{max}$ ) changed with increasing administration volumes of 5, 20, and 80  $\mu\text{L}$ . When iodine was administered as an X-ray tracer instead of FD-4, partially distributed iodine was observed in the subcutaneous layer as the dose increased. Based on these results, a compartment model was developed to analyze the pharmacokinetics of FD-4 after administration using hMNs. When the model was developed with the hypothesis that the drug is absorbed from the broad injected site of the skin into blood vessels in the upper ( $S_{upper}$ ) and lower ( $S_{deeper}$ ) dermis by rapid and slow first-order absorption rates, respectively, a better agreement of observed and theoretical values was obtained. Furthermore, earlier  $T_{max}$  and higher  $C_{max}$  were confirmed after four successive 5  $\mu\text{L}$  administrations compared with a single administration of 20  $\mu\text{L}$ , suggesting that drug distribution in the skin significantly influences its pharmacokinetics. The drug distribution in the skin may be related to the obtained pharmacokinetic parameters, suggesting that the number of needles in the MN system and the total administration volume should be considered in designing hMN systems. Understanding the characteristics after *i.d.* administration of drugs with hMNs may be helpful in clarifying the usefulness of this administration route for biotherapeutics.

### **Chapter 2: Elucidation of factors that affecting successful skin puncture and drug injection by hMNs**

In this chapter, several types of hMNs with or without a rounded blunt tip micropillar, which suppresses skin deformation, around a hollow needle, and the effect on the successful needle insertion and administration of a drug solution was investigated. Six different types of hMNs with needle lengths of 1000, 1300, and 1500  $\mu\text{m}$  with (hMN<sub>1000S</sub>, hMN<sub>1300S</sub>, and hMN<sub>1500S</sub>) or without a micropillar

(hMN<sub>1000</sub>, hMN<sub>1300</sub>, and hMN<sub>1500</sub>) were used. The creation of a micropore after pressing hMNs against the skin was evaluated by staining with a blue dye. In addition, injection of rhodamine B solution into the skin was investigated to evaluate the successful administration rate (%) with different types of hMN. Furthermore, X-ray computed tomography (CT) was used to reveal the intradermal distribution of iodine, as an X-ray tracer, and the size of observed wheals due to iodine injection was measured after injection using hMNs. When skin with a higher skin stiffness (type A durometer value of A25) was used, the success rate (%) of skin penetration was higher than skin with a lower stiffness (type A durometer value of A15). hMN<sub>1300S</sub>, hMN<sub>1500</sub>, and hMN<sub>1500S</sub> showed >90% successful injection rates with A25 stiffness skin. A large wheal, larger than 10 mm<sup>2</sup>, was consistently observed when hMN<sub>1300S</sub> was used for injections. On the other hand, no wheals were observed after injection of iodine solution into the skin with hMN<sub>1500</sub> and hMN<sub>1500S</sub>. According to X-ray CT, the injected iodine with hMN<sub>1500</sub> and hMN<sub>1500S</sub> was distributed across the region from the intradermal to subcutaneous layers. Therefore, a micropillar may be a good solution for depth control of the needle array. Mechanical parameters such as puncture force and displacement caused by the fracture of an artificial skin membrane showed that a micropillar can be effective for depth control of the injected solution as well as prevention of contact between the hMN pedestal and the deformed membrane. The obtained results will help in the development of hMNs that ensure successful injection of an administered drug.

### **Chapter 3: Effect of iontophoresis on the intradermal migration rate of medium-molecular-weight drugs**

In this chapter, whether IP accelerates the intradermal migration rate of intradermally administered medium-molecular-weight drugs was evaluated. The promoting mechanism by IP is electrorepulsion and electroosmosis. Here, IP effects were determined and mathematically evaluated on the intradermal migration of medium-molecular-weight acidic and non-electrolyte (uncharged) drugs (about 4 and 10 kDa) using sodium polystyrene sulfonate (PSA) and FD, respectively. Low-molecular-weight acidic and non-electrolyte drugs were also used for comparison. Drug solution (200  $\mu$ L) containing hydroxypropyl cellulose was applied onto a 600  $\mu$ m lower skin, and an upper skin was layered onto the lower skin containing the drug solution as onto untreated skin to prepare split-layered skin. The skin was set in a vertical-type diffusion cell, and IP was applied throughout the drug migration experiments with a current density of 0.3 mA/cm<sup>2</sup> (constant current IP). Low-molecular-weight drugs, not only non-electrolyte but also acidic drugs, had high migration rates (high passive diffusion by concentration gradient) through the skin, so little IP effect was found. The intradermal migration of medium-molecular-weight non-electrolytes FD-4 and FD-10 was not increased by cathodal or anodal IP. On the other hand, the intradermal migration of PSA-4 (*M. W.* 4 kDa), which are medium-molecular-weight acidic drugs, was delayed by anodal constant-current IP. This IP-facilitated migration of PSA was probably due to electrorepulsion. These results suggest that IP can be used to retain the intradermal migration of medium molecular weight charged drugs. Thus, IP may be an effective tool to help the effective delivery of medium-molecular-weight electrolytes by hMN.

hMNs are a novel drug delivery device that can be used for both injection and transdermal administration. This study investigated the factors that affect the pharmacokinetics of FD-4, a medium-sized model drug, delivered by hMNs, as well as successful insertion and injection rates. Additionally, the study suggested the potential of using IP to control the dermatopharmacokinetics of intradermally administered drugs. The findings of this study provide valuable insights for the design and development of hMNs and highlight their potential as drug delivery devices for medium- and high-molecular-weight drugs. The data presented in this study can contribute significantly to the future advancement of hMN development.

## 論文審査の結果の要旨

近年、新たに開発、治療に適用されている中分子・高分子からなるバイオ医薬品は高額であることが多く、よりバイオアベイラビリティ (BA) が高い投与方法が用いられることが期待される。また、高い BA が期待される注射等は定期的な通院が必要となり患者に対する時間的負担も大きい。二木美香氏は、薬物は皮下投与に比べて皮内投与の方が BA が高いとの報告があること、そして、マイクロニードル (MN) は簡便で侵襲性の低いことから、中空型 MN を使用した中分子薬物の自己投与の有用性を考えた。これまで MN を用いて皮内投与した薬物の体内動態に関する報告はあるが、薬物の皮内分布に関する報告は無いことから、本論文では、麻酔下のラットを用い、様々な条件下で中空型 MN を用いて腹部に投与したモデル中分子薬物 FD-4 の皮内及び体内動態を比較解析し、中空型 MN による皮内投与の有用性を検証する課題に取り組んだ。その結果は、「中空型マイクロニードルによる穿刺および注入に及ぼす要因とモデル中分子薬物 FD-4 の吸収動態制御」としてまとめられている。以下、その内容を要約する。

### 第 1 章 中空型 MN で投与したモデル中分子薬物 FD-4 の体内動態に及ぼす種々要因の解明

中空型 MN を用いて投与された薬液 (ヨウ素溶液) の投与直後の皮内分布は X 線 CT 撮影画像を用いて解析すると共に、投与された FD-4 の動態は頸静脈から採取した血液中の濃度を測定することにより体内動態解析を行っている。

長さ 0.6 mm の 3 本のピラミッド状の針からなる中空型 MN を用いて 5、20、80  $\mu\text{L}$  の FD-4 を投与した結果、5  $\mu\text{L}$  では皮内の局在が確認されたが、投与量の増加に伴い、皮下への漏出の増加が確認された。皮下への漏出が認められなかった 5  $\mu\text{L}$  投与においては、同量を皮下注射により投与した場合と比較して最高血中濃度 (Cmax) は有意に大きく、最高血中濃度到達時間 (Tmax) は有意に早いことが確認されたが、皮下への漏出量の増加に伴い、この投与方法間の差が少なくなった。なお、薬液の投与速度の影響は見出されていない。また、同じ 20  $\mu\text{L}$  投与においても、5  $\mu\text{L}$  を 4 回と投与部位を広くとることにより薬液は皮内に局在されると、短縮させた Tmax を維持しながら Cmax が 4 倍に高まることが確認された。これらの結果から、皮内に局在して薬液を投与することにより、Tmax を短縮し、Cmax を高めることができること、すなわち、より少ない投与量で早い効果を得ることができることを見出している。さらに、投与後の薬物動態評価を、コンパートメントモデルを用いて解析した結果、皮膚を均一な単一組織としてのコンパートメントモデルでは解が得られず、皮膚内でも上層と下層で動態が異なり、皮内でも特に皮膚上層に薬液が存在するときに、高い効果が得られることが新たに見出された。そして、その手法として中空型 MN が有効である可能性を見出している。

### 第 2 章 中空型 MN の穿刺および注入に及ぼす要因解明および皮内への確実な投与を可能とする中空型 MN 設計の最適化

第 1 章において簡便でかつ、吸収効率の良い薬物投与方法として中空型 MN の有用性を見出したことから、より効率的に穿刺投与が行われる条件を検討している。なお、本評価においては 1 本の円錐状の針からなる中空型 MN を用い、針の長さは 1,000  $\mu\text{m}$ 、1,300  $\mu\text{m}$ 、1,500  $\mu\text{m}$  の 3 種類において評価を行っている。

ラット腹部皮膚を硬度 (デュロメータータイプ A) 15 もしくは 25 に調整し、各長さの中空型 MN

について 10 回穿刺，注入有効性を評価した結果、硬度が低いと皮膚が変形し穿刺成功率が低下することから皮膚の変形を抑制することの必要性を確認し、針から周囲 4 点に高さ 950  $\mu\text{m}$  の支柱を有する中空型 MN を設計した結果、いずれの皮膚硬度においても穿刺効率を高めることに成功している。また、針の長さが長い方が、穿刺効率は高いが、1,500  $\mu\text{m}$  においては皮下組織への漏出を確認している。

これらの結果から、中空型 MN を用いて薬液を効率的に皮内投与するためには、皮膚厚に応じた針の長さの選択が必要であること、さらに針の周囲に支柱を付加することにより皮膚の変形を抑制し、穿刺効率を向上させ得ることを見出している。

### 第 3 章 外部デバイスと中空型 MN の影響（イオントフォレシスによる中空型 MN による薬物投与効果向上性の検討）

薬液の経皮吸収を高める外部デバイスとしてイオントフォレシス（IP）がある。IP は薬物の電荷に伴う分子の移動のみならず、水溶液のイオンの動きに伴う水の流れにより薬物の移動が生じるため、電荷をもたない薬物でも皮膚外から皮膚内への移動が可能になる。皮膚組織内でも同様に、IP により物質の移動が制御できれば中空型 MN により投与された薬物をより吸収性の高い皮膚上層に集めることができること期待される。そこで、ブタ皮膚の上層と下層の間に FD4 を挟み込み、縦型拡散セルを用いての皮膚透過における IP 負荷の影響を解析した。その結果、電荷をもたない FD-4 は IP 負荷の影響を受けないことが確認された。ただし、同様の試験をアニオン性中分子薬物において評価した結果、アノード負荷により有意に透過が抑制されたことが見出された。このことは薬物の電荷によっては、中空型 MN により皮内に投与された薬物の皮膚下層への移行を IP 負荷により抑制し、より効率的な全身的な薬物投与ができる可能性を示唆している。

以上、皮内、特に皮膚上層内に薬物を投与することがより効率的な薬物投与方法であることを体内動態解析から明らかにし、さらに中空型 MN により簡便に皮膚上層内に薬物の投与が可能になることが示された。さらに、中空型 MN の形状検討や、投与量、速度の検討、さらには、IP のような外部デバイスとの組み合わせの検討など、より有効な中空型 MN も明らかになってきている。

現在の医学の進歩に伴いより効果の高い薬物が見出されているが、その価格や、その投与のための時間的拘束や、医療機関への移動の必要性等、その恩恵を受けることができる患者には限りがあるのが現状である。本研究の結果は、投与された薬物の効率が高まることからの経済的負担の軽減、そして医療機関への移動が不要になることからの時間的拘束の軽減や、移動の困難な患者でも簡便に治療を行なえる可能性を提供したのもとして、高く評価できる。

これらの実験は、論理的に計画され、また実施されており、研究倫理における問題も指摘されない。その研究成果は、投稿論文として公表されており、本論文は本研究科課程による博士（薬科学）の学位を与えるに十分値するものである。従って、論文審査結果を合格と判断する。