

2023 年度 博士論文

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

2024 年 3 月

城西大学大学院 薬学研究科 薬科学専攻

薬粧品動態制御学講座

二木 美香

目次

緒言	1
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	4
第 1 節 実験方法	6
1.1.1. 試薬および材料	6
1.1.2. 実験動物	7
1.1.3. 投与溶液の分布評価	7
1.1.4. <i>In vivo</i> 体内動態評価	7
1.1.5. 分散投与した際の血中濃度評価	8
1.1.6. 体内動態解析法	9
1.1.7. 統計処理	12
第 2 節 結果	13
1.2.1. 薬液投与後の皮内での薬液分布評価	13
1.2.2. 体内動態パラメータの算出	14
1.2.3. 投与容量の影響	15
1.2.4. 注入速度の影響	19
1.2.5. 針本数の影響	20
1.2.6. 分散投与の影響	21
第 3 節 考察	23
第 4 節 小括	27
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	28
第 1 節 実験方法	30
2.1.1. 材料	30
2.1.2. 中空型 MN の調製および投与方法	30
2.1.3. 実験動物	33
2.1.4. 投与部位の観察	33
2.1.5. <i>In vivo</i> 体内動態評価	33
2.1.6. <i>In vivo</i> 穿刺試験	34

2.1.7. <i>In vivo</i> 注入試験	34
2.1.8. ラット皮膚への注入溶液の分布確認試験	34
2.1.9. 人工皮膚モデルを用いた中空型 MN の穿刺特性試験	35
2.1.10. 重回帰分析	36
第 2 節 結果	37
2.2.1. 投与部位の観察	37
2.2.2. 投与溶液の分布評価	37
2.2.3. 体内動態評価	38
2.2.4. 中空型 MN 適用による <i>in vivo</i> 穿刺評価	39
2.2.5. 中空型 MN 適用による <i>In vivo</i> 注入評価	41
2.2.6. X 線 CT による中空型 MN で投与したヨウ素溶液の分布確認	41
2.2.7. 中空型 MN にて溶液投与直後の膨疹サイズおよび深度評価	42
2.2.8. 試験力-ストローク曲線	43
2.2.9. 重回帰分析	47
第 3 節 考察	49
第 4 節 小括	53
3 章 外部 IP デバイスと中空型 MN 併用の予備的検討	54
第 1 節 実験方法	56
3.1.1. 試薬および実験材料	56
3.1.2. 実験試料	58
3.1.3. 種々ドナー溶液の調製	58
3.1.4. 真皮透過試験	58
3.1.5. IP 適用条件	59
3.1.6. 各薬物の定量方法	60
第 2 節 結果	62
3.2.1. 真皮透過試験	62
3.2.2. 真皮膜透過速度論の解析	64
第 3 節 考察	66
第 4 節 小括	69

結論	70
謝辭	75
引用文獻	76

略語

<i>AUC</i>	Area under curve
BA	バイオアベイラビリティ
DDS	Drug delivery system
FD-4	Fluorescein isothiocyanate-dextran (<i>M.W.</i> 4,000)
FD-10	Fluorescein isothiocyanate-dextran (<i>M.W.</i> 10,000)
FDA	Food and Drug Administration (アメリカ食品医薬品局)
FL-Na	Fluorescein sodium salt
HPC	ヒドロキシプロピルセルロース
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
hMN	Hollow microneedle
<i>i.d.</i>	皮内投与
<i>i.m.</i>	筋肉投与
IP	イオントフォレシス
<i>i.p.</i>	腹腔内投与
ISMN	Isosorbide 5-mononitrate
<i>i.v.</i>	静脈内投与
MB	Methylene blue
MEMS	Micro electro mechanical systems
<i>M.W.</i>	Molecular weight
PBS	Phosphate buffered saline
PLA	ポリ乳酸
PSA-4	Sodium polystyrene sulfonate (<i>M.W.</i> 4,000)
PSA-10	Sodium polystyrene sulfonate (<i>M.W.</i> 10,000)
SA	Sodium 4-ethylbenzenesulfonate
<i>s.c.</i>	皮下投与
<i>S_{upper}</i>	皮膚浅部
<i>S_{deeper}</i>	皮膚深部
UHPLC	超高速液体クロマトグラフィー

記号

k_a	薬物の皮膚から全身循環系コンパートメントへの一次速度定数
k_{12}	薬物の全身循環系から末梢系コンパートメントへの一次速度定数
k_{21}	薬物の末梢系から全身循環系コンパートメントへの一次速度定数
k_{10}	薬物の全身循環系からの一次消失速度定数
k_{deep}	薬物の S_{upper} から S_{deeper} への一次速度定数
k_{rapid}	薬物の S_{upper} から全身循環系への一次速度定数
k_{slow}	薬物の S_{deeper} から全身循環系への一次速度定数
Q	単位面積あたりの薬物透過量
T_{max}	最高血中薬物濃度の到達時間
C_{max}	最高血中薬物濃度

緒言

近年、皮内投与デバイスとしてマイクロニードル (MN) が注目されている。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。MN は皮膚に微細小孔を形成できる中実型²⁴⁻³²⁾および薬物溶液を皮内へ直接注入可能な中空型³³⁻³⁵⁾に分類される。中でも中空型 MN は注射と同様の仕様を有することからバイオ医薬品および核酸医薬品の投与デバイスとして注目されている。MN の素材にはステンレスやチタンなどの非生体分解性の他、安全性の観点からポリ乳酸 (PLA) やヒアルロン酸などの生体分解性の素材が用いられている¹⁸⁻²⁰⁾。MN は皮膚に適用することで生じる穿刺孔を介し薬物の皮内送達を促進することができる¹⁷⁾。未だ MN は医薬品の投与デバイスとして承認された実績はないものの、MN デバイスの開発は世界的に加速しており、MN によるワクチンの皮内 (*i.d.*) 投与は皮下 (*s.c.*) 投与や筋肉 (*i.m.*) 投与と比較して少量のワクチン量で高い免疫応答が得られることが多く報告される²¹⁻²³⁾など、MN を用いたペプチド、タンパク質、核酸、遺伝子、脂質ナノ粒子など様々な中分子・高分子薬物やナノ粒子投与に関する研究に関心が集まっている。しかし、中実型 MN 投与を用いた薬物の体内動態とその因子については多く報告されているが、中空型 MN に関する報告は少ない³⁶⁾。これは中空型 MN の製造難易度が高いことに加え、投与手技の難度も高いこと、皮内に穿刺した針深度の制御などの問題などが考えられる。報告数が限られるものの、中空型 MN を用いた研究では、バイオ医薬品を *i.d.*投与すると *s.c.*投与と比較して高い血中濃度 (C_{max}) および早い最高血中濃度到達時間 (T_{max}) を得られることが報告されている^{37,38)}。体内での分解速度が速く、迅速な薬効発現が求められる中高分子薬物では *i.d.*投与が有用となると考えられる。しかし、体内動態に及ぼす因子についての調査報告は少ないため、本研究では吸収動態に及ぼす中空型 MN 投与条件の影響を明らかにすることとした。

Figure 1 に中空型 MN の皮膚穿刺性や吸収動態に及ぼすと考えられる要因を示す。中空型 MN の穿刺に及ぼす要因および投与後の薬物動態に及ぼす因子を明らかにし、また、Fig. 1 に示すように投与後の薬物を外部デバイスから制御することができれば、中空型 MN を使用した自己投与型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。

これらの背景を踏まえ、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することとした。第 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、皮膚への穿刺および薬液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。中空型 MN を用いた研究発展にともない、中空型 MN を備えた貼付剤製剤の研究開発や MN にて投与した薬物の皮内動態制御に関する研究が進むと考えられる。中分子・高分子薬物の皮膚透過性を高める方法として知られているイオントフォoresis (IP) は、微弱電流を皮膚に負荷することにより、投与した薬物との電的反発作用や皮膚内のイオンの流れにより生じる水の流れ (電気浸透流) を利用して薬物の皮膚透過性を制御できる方法である。すでに、MN と IP の併用に関する研究では、MN 適用にて角層に形成された小孔を介して皮膚上に適用した薬物を皮内に電気浸透流の効果にて皮膚透過性を高めることが報告されている³⁹⁾。しかしながら、中空型 MN にて皮内に投与した薬物の皮内動態制御に関する報告はない。そこで、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 と外部デバイスである IP を併用することを想定し、中空型 MN 投与を模倣して皮内に適用した薬物の皮内動態制御を試みた。

第 2 章で用いた中空型 MN は花王株式会社より提供された。その他、開示すべき利益相反関連事項はない。

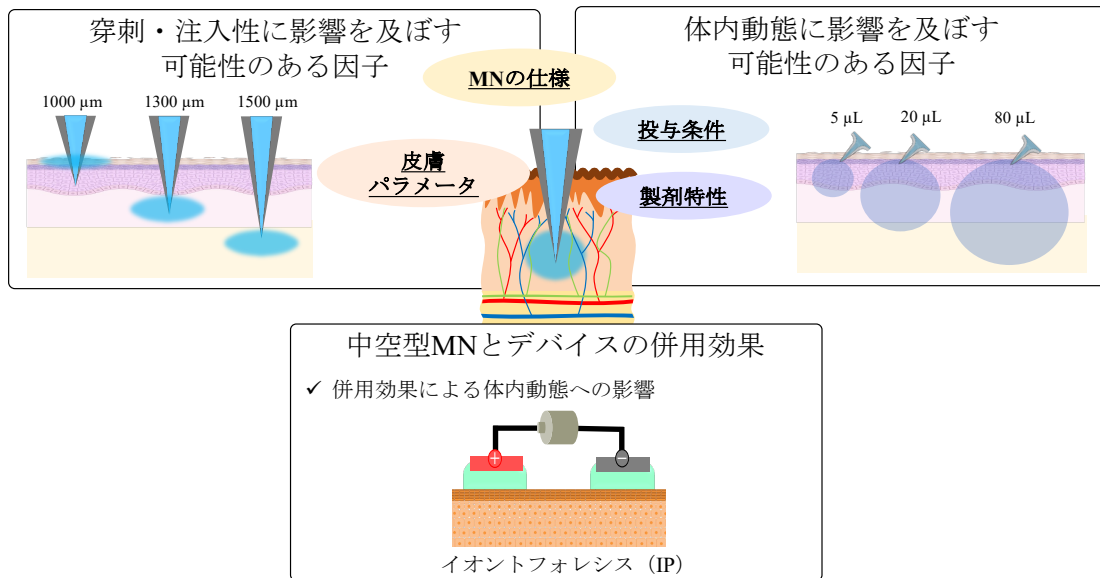


Fig. 1 Various possible factors that affect successful insertion and pharmacokinetics of drugs administered by the hollow microneedle (hMN).

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

皮膚を介した薬物投与は非常に簡便であることから、半固形剤、エアゾールフォーム剤、スプレー剤、固形剤、経皮パッチ剤など、多くの種類の製剤が、局所および全身への効果を期待した薬物送達に用いられている⁴⁰⁾。しかし、表皮の最外層である角層は高いバリア能を有しており、外来の病原体や化学物質が体内に侵入するのを防いでいる^{5,6)}。そのため、角層の高いバリア機能を克服するための化学的・物理的手段が利用されている。特に、マイクロサイズの針をプレート上に配列した MN デバイスは、表皮や真皮に直接薬剤を投与できる手段として注目されており、MN を用いた薬物送達の可能性が多くの論文にて報告されている²⁴⁻³⁵⁾。さらに、MN による薬物送達法は従来の注射器を用いた手法と比較して低侵襲的と考えられており、MN の利用により、これまで経皮適用では困難であった中分子・高分子医薬品やナノ粒子の投与など、幅広い医薬品や製剤の投与方法として注目されている^{41,42)}。

MN は薬物送達方法によって、固体 MN²⁴⁻²⁶⁾、コーティング型 MN²⁷⁻²⁹⁾、溶解型 MN³⁰⁻³²⁾、中空型 MN³³⁻³⁵⁾の 4 種類に分類することができる。このうち、固体 MN、コーティング型 MN および溶解型 MN は中実型 MN 大別される。現在、中実型 MN を用いた研究が盛んに行われているものの、薬物搭載部位が針表面や針先端などに限られていることから、確実な穿刺投与を必要とするだけでなく、投与容量を高めるための工夫が必要とされている。中空型 MN は、他のタイプの MN と比較して、大容量・高濃度の製剤を短時間で角層下に送達できるという利点を有している。すでに針の長さ、本数、素材（シリコン、チタン、ステンレス鋼、ガラスおよびポリマー）などを用いた中空型 MN 作成に関する研究報告がなされている¹⁸⁻²⁰⁾。これら報告の多くは、作製した MN の皮膚や人工膜への穿刺性についての調査や中空型 MN を用いて薬液を *i.d.* 投与した後の薬物体内動態を評価した研究のみであり、例えば、Kochba らは、中空型 MN を用いて皮内投与したインスリンの体内動態を³⁷⁾、また、Harvey らは、中分子薬物であるソマトトロピン、高分子薬物であるエタネルセプトを中空型 MN にて投与し、それらの薬物動態を *s.c.* 投与時と比較し、報告している³⁸⁾。中空型 MN を用いた薬物投与は、最小限の侵襲的適用で、吸収性を *s.c.* 投与時と比較して改善する可能性があることがこれらの報告から明らかとなっている。しかしながら、針の長さ、針の本数、配列などの中空型 MN の構造は、穿刺性や薬液注入性に関係するだけでなく、薬物の皮内

分布に影響すると考えられるが、中空型 MN にて *i.d.* 投与したと報告されている論文でさえ、薬物の皮内分布に関して調査されておらず、薬物の皮下への移動が中空型 MN により投与した薬物の吸収動態に影響を及ぼす可能性について十分な議論がなされていない。そこで、本研究では、核酸医薬やペプチド医薬の分子量範囲（約 3,000～10,000）と同程度の分子量を有し、生体内で安定で、かつ製剤設計を行う上で様々な用途で使用されるデキストランをフルオレセインイソシアネートにて標識した Fluorescein isothiocyanate-dextran (*M.W.* 4,000、FD-4) をモデル薬物として選択し、FD-4 を中空型 MN および 27G 注射針を用いてそれぞれ *i.d.* および *s.c.* 投与した後の皮膚内分布および血中濃度-時間プロファイルを検討した。また、薬物の皮内分布に影響を及ぼすと考えられる要因として、投与容量や投与速度、針本数などが考えられる。そこで、これら要因が吸収動態に及ぼす影響についてもあわせて調査した。

第1節 実験方法

1.1.1. 試薬および材料

FD-4 は、Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。ヘパリン Na 注5千単位/5 mL は、持田製薬株式会社 (東京, 日本) より購入した。希ヨードチンキ (ヨウ素溶液) は、健栄製薬株式会社 (大阪, 日本) より購入した。すべての試薬は分析グレードであり、精製せずにそのまま使用した。中空型 MN は、NanoPass Technologies Ltd. (Ness Ziona, Israel) より購入した。

Figure 2 に使用した中空型 MN を示す。本研究で使用した中空型 MN は、長さ 0.6 mm の3つのピラミッド型マイクロニードル (MicronJet™) である⁴³⁾。中空型 MN は、従来の注射針の代わりに、標準的な注射器とルアーロックシリンジ (50 および 100 μ L、Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) に取り付け、薬液投与に用いた。MicronJet™ はシリコン製で、先端が非常に鋭く、表皮を貫通した後、3つのチャネルを通して薬物を送達することができる。中空型 MN の注射は、注射針を約 45 度の角度で挿入し、投与中は同じ位置を保つよう用いた。

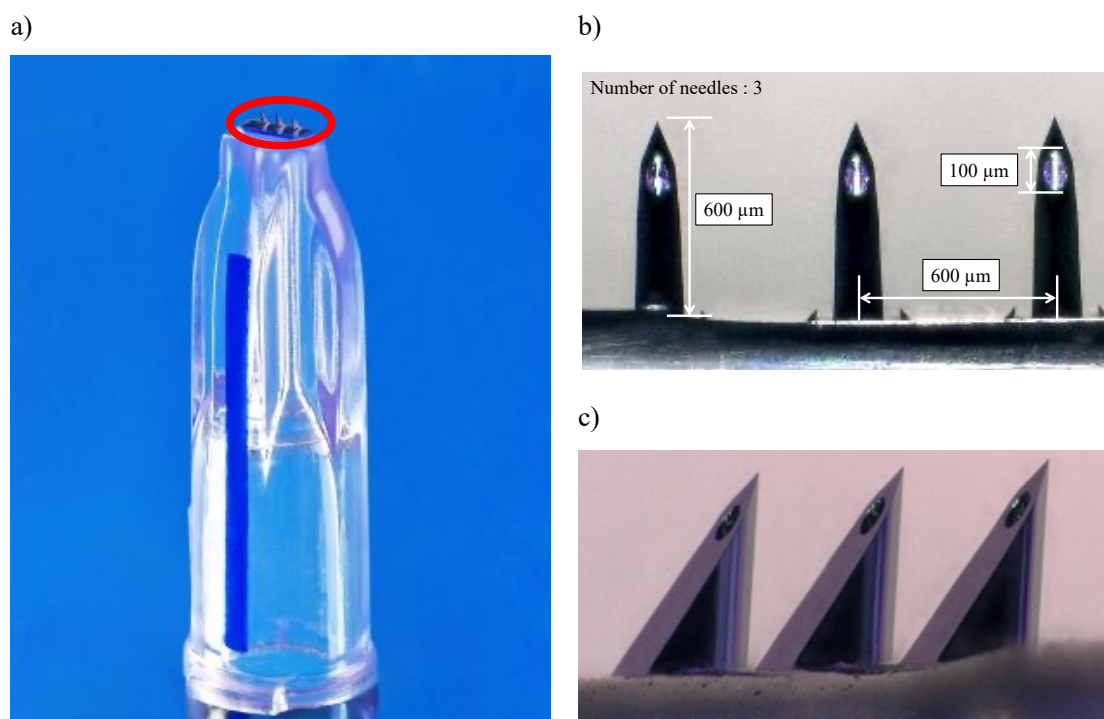


Fig. 2 The hollow MN used in this experiment. a) Overall view, b) Enlarged view of needle tip (front view), and c) Enlarged view of needle tip (oblique view of the front).

1.1.2. 実験動物

雄性ウイスターラット（体重 200-220 g、8 週齢）は三協ラボサービス株式会社（東京、日本）から購入した。また、ウイスターラットは 12 時間ごとに明暗サイクル（on、off 時間：9:00-21:00）を繰り返し、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ に調節された部屋で飼育した。また、水と餌（MF、オリエンタル酵母工業、東京、日本）は自由に摂取可能とした。なお、動物の飼育および実験は城西大学動物実験管理委員会の承諾（JU21004）を得た後、城西大学全学実験動物規定に従った。

1.1.3. 投与溶液の分布評価

三種混合麻酔下（塩酸メドミジン：0.2 mg/kg ミダゾラム：2 mg/kg 酒石酸ブトルフェール：2.5 mg/kg、*i.p.*）で、X 線 CT（CosmoScan GX II、株式会社リガク、昭島、東京、日本）を用いて薬物分布を評価した。X 線 CT による分布評価には、投与溶液としてヨウ素溶液を用いた。投与部位を剃毛したラットに中空型 MN もしくは注射針を用いてヨウ素溶液を投与した後、X 線 CT 撮影を行った。CosmoScan GX II の測定条件は、管電圧 90 kV、管電流 88 μA 、FOV（視野）45 mm、ボクセルサイズ 90 μm （等方性）、スキャン時間 4 分とした。ヨウ素溶液の分布深度は Cosmo Scan Viewer Pack Software（株式会社リガク）を用いて数値化した。

1.1.4. *In vivo* 体内動態評価

三種混合麻酔下（塩酸メドミジン：0.2 mg/kg ミダゾラム：2 mg/kg 酒石酸ブトルフェール：2.5 mg/kg、*i.p.*）で腹部を剃毛した雄性ウイスターラットにリン酸緩衝生理食塩水（PBS；pH7.4）で調製した 15.7 mg/mL 濃度の FD-4 溶液を 27G 注射針を用いて *s.c.* 投与、または中空型 MN を用いて手動で投与した（hMN 投与）。*s.c.* および hMN 投与する際は左側腹部より投与した。それぞれ経時的に右側頸静脈よりヘパリン処理をしたシリンジおよびニードルで血液を採取し、その都度同量の生理食塩液を左側頸静脈より注入した。なお、試験中はウイスターラットの体温を $36.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持させた。採取した血液を遠心分離（ $21,500 \times g$ 、5 min、 4°C ）した後、FD-4 の濃度を測定した。すなわち、得られた血漿 100 μL を PBS 400 μL と混合し、攪拌後、再度遠心分離後、上清を蛍光分光光度計（FP-8300、日本分光株式会社、八王子、東京、日本）を用いて蛍光強度を測定し、FD-4 濃度を求めた。FD-4 の励起波長は 495 nm、蛍光波長は 515 nm とした。*s.c.* および hMN 投与の注入速度は、急速投与（1 秒に 20 μL 投与）を手動で制御を行なった。また、FD-4 溶液の静脈内（*i.v.*）投与試験も実

施した。FD-4 溶液 (15.7 mg/mL で 20 μ L) を頸静脈より *i.v.*投与し、所定の時間ごとに対側の頸静脈から採血し、同様の手順にて FD-4 濃度を測定した。採血および FD-4 の測定に関する手順は、すべての検体について上記と同じであった。

さらに、投与容量と濃度を变化させた一定量の FD-4 (ラット 1 匹あたり 78.5 μ g) の hMN 投与も行った (15.7 mg/mL で 5 μ L、3.93 mg/mL で 20 μ L、0.98 mg/mL で 80 μ L)。加えて、注入速度 (20 μ L/sec および 20 μ L/min、投与容量 20 μ L および 80 μ L) を变化させた条件下で FD-4 溶液の投与を行い、FD-4 の血中濃度推移を評価した。さらに、3 本針からなる MicronJet™ の針を中央に位置する針 1 本となるよう、中央の針に隣接する針を 2 本除く加工を施し、FD-4 体内動態に及ぼす針の本数 (各針から注入される容量) の影響について評価した。MicronJet™ 1 本針は MicronJet™ の 3 本針のうち両端 2 本の針を除去し、瞬間接着剤 (アロンアルファ™、コニシ株式会社、大阪、日本) を切削部に少量滴下後、孔を塞ぐことで得た。Figure 3 に加工後の MicronJet™ の針先端の拡大画像を示す。

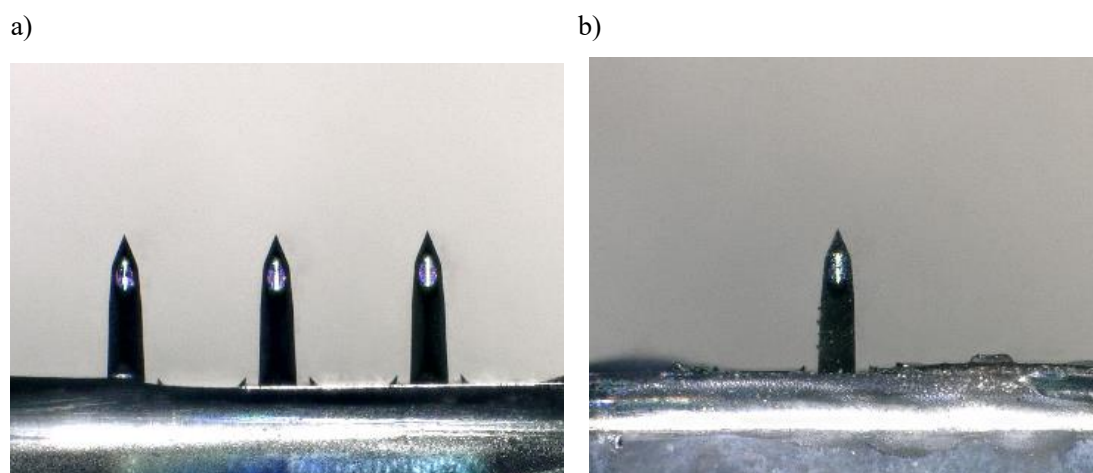


Fig. 3 Enlarged view of needle tip of tripe-needle (a) and single-needle (b). The single-needle type of hollow microneedle was obtained by removing two needles at both end of three needles.

1.1.5. 分散投与した際の血中濃度評価

投与した薬物の体内動態に及ぼす投与分散の影響を調べるため 15.7 mg/mL に調製した FD-4 溶液 20 または 80 μ L を 4 箇所 (皮内投与部位が直線方向に 1~2 mm 間隔となるように投与した) に分散し、ラット腹部皮膚に 20 μ L \times 1 回および 5 μ L \times 4 回、また、80 μ L \times 1 回および 20 μ L \times 4 回 hMN 投与した。

1.1.6. 体内動態解析法

皮内投与後の薬物の皮膚および筋肉における局所薬物動態を評価する前に全身循環系からの薬物の消失挙動を調べた。*i.v.*投与後の FD-4 の血中濃度推移については、全身循環コンパートメント (C) および末梢組織コンパートメント (P) からなる線形 2-コンパートメントモデルを仮定し、非線形最小二乗法によるカーブフィッティングをして、薬物動態パラメータを算出した。Figure 4 に用いた線形 2-コンパートメントモデルを示す。

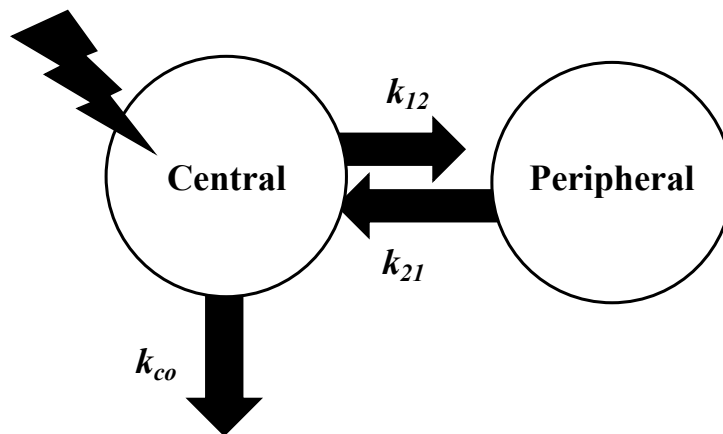


Fig. 4 Pharmacokinetic model of drugs following intravenous injection (*i.v.*).

*i.d.*投与後の薬物動態評価は、適用部位の皮膚、全身循環 (C) および末梢組織 (P) からなる線形コンパートメントモデルを用いて解析した。Figure 5 に用いた 3 種のコンパートメントモデルを示す。モデル A では薬物が投与部位である皮膚 (S) からラグタイムあり (比率 $1-F$)、なし (比率 F) の一次速度で吸収されると仮定した。皮膚の浅い層 (S_{upper}) に投与した薬物は皮膚の深い層 (S_{deeper}) に移行する速度が遅いと仮定し、Fig. 5 のモデル B の様に薬物が投与部位 (比率 F) および一次速度 (k_{deeper}) で薬物が移動する皮膚深部 (S_{deeper} , 比率 $1-F$) から同一の一次速度定数 (k_a) で吸収されると仮定した。さらに、皮膚の比較的浅い層に投与した薬物は皮膚の比較的深い層に速やかに移行すると考え、 S_{upper} からは毛細血管を介し中枢に吸収され、 S_{deeper} からは皮下の血管から吸収されると仮定し、モデル C を構築した。すなわち、モデル C では適用部位で薬物が皮膚浅部 (S_{upper}) および皮膚深部 (S_{deeper}) に速やかに分配し (比率 F および $1-F$)、 S_{upper} からは比較的速い速度 (k_{rapid}) で、 S_{deeper} からは比較的遅い速度 (k_{slow}) で全身系に吸収されると仮定した。

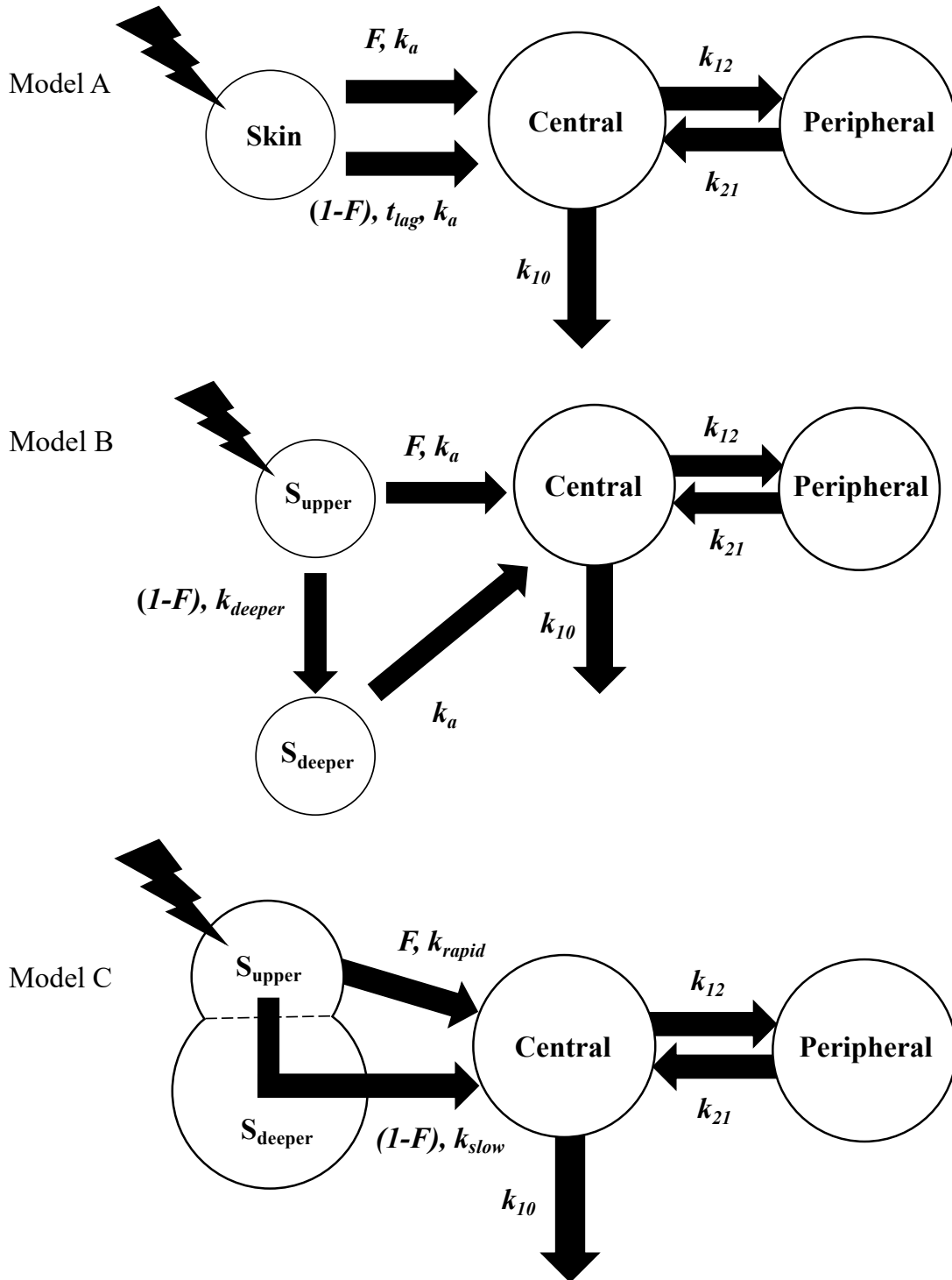


Fig. 5 Proposed model structures for FD-4 pharmacokinetics in rats after hMN and *s.c.* injections. Model A is based on a drug that is absorbed with a first-order constant (k_a) with and without lag time. Model B is based on that of a drug that is absorbed from a deeper site of the skin, S_{deeper} , and the injection site with a first-order constant. The drug migration rate constant (k_{deeper}) is considered

in the rate from the drug injection site to the deeper site of the skin. Model C is the final model used to describe FD-4 absorption after hMN and *s.c.* injections. The drug is absorbed from the injection site into the blood vessels in the upper and lower dermis by rapid and slow first-order absorption rates, respectively (rate constants; k_{rapid} and k_{slow}). F is the fraction of the administered dose absorbed. k_a , k_{12} , k_{21} , and k_{10} represent the first-order rate constants for the processes of absorption, distribution, redistribution, and elimination, respectively.

以下に各コンパートメントの物質の移行を表す微分方程式を示す。

モデル A

$$S: \quad dS_1/dt = -k_a S F \quad (1)$$

$$dS_2/d(t - t_{\text{lag}}) = -k_a S (1 - F) \quad (2)$$

ただし、 $t < t_{\text{lag}}$ のとき $S_2 = 0$

$$C: \quad dC/dt = dS_1/dt + dS_2/dt - (k_{10} + k_{12}) C + k_{21} P \quad (3)$$

$$P: \quad dP/dt = k_{12} C - k_{21} P \quad (4)$$

モデル B

$$S: \quad dS_{\text{upper}}/dt = -k_a S_{\text{upper}} F - k_{\text{deeper}} S_{\text{deeper}} (1 - F) \quad (5)$$

$$dS_{\text{deeper}}/dt = k_{\text{deeper}} S_{\text{upper}} (1 - F) - k_a S_{\text{deeper}} \quad (6)$$

$$C: \quad dC/dt = k_a S_{\text{upper}} F + k_a S_{\text{deeper}} - (k_{10} + k_{12}) C + k_{21} P \quad (7)$$

$$P: \quad dP/dt = k_{12} C - k_{21} P \quad (8)$$

モデル C

$$S: \quad dS_{\text{upper}}/dt = -k_{\text{rapid}} S F \quad (9)$$

$$dS_{\text{deeper}}/dt = -k_{\text{slow}} S (1 - F) \quad (10)$$

$$C: \quad dC/dt = k_{\text{rapid}} S_{\text{upper}} + k_{\text{slow}} S_{\text{deeper}} - (k_{10} + k_{12}) C + k_{21} P \quad (11)$$

$$P: \quad dP/dt = k_{12} C - k_{21} P \quad (12)$$

上記に示した微分方程式 1-4 は差分法により、それぞれ式 1'-11'に変換できる。

モデル A

$$S: S_{1i+1} = -k_a S F \Delta t \quad (1')$$

$$S_{2i+1} = -k_a S (1 - F) \Delta(t - t_{lag}) \quad (2')$$

ただし、 $t < t_{lag}$ のとき $S_2 = 0$

$$C: C_{i+1} = \{S_{1i+1} + S_{2i+1} - (k_{10} + k_{12}) C + k_{21} P\} \Delta t + C_i \quad (3')$$

$$P: P_{i+1} = (k_{12} C - k_{21} P) \Delta t + P_i \quad (4')$$

モデル B

$$S: S_{\text{upper } i+1} = (-k_{\text{rapid}} S_{\text{upper}} F - k_{\text{deeper}} S_{\text{deeper}} (1 - F)) \Delta t + S_{\text{upper } i} \quad (5')$$

$$S_{\text{deeper } i+1} = \{-k_{\text{slow}} S (1 - F) - k_a S_{\text{deeper}}\} \Delta t + S_{\text{deeper } i} \quad (6')$$

$$C: C_{i+1} = \{k_a S_{\text{upper}} + k_a S_{\text{deeper}} - (k_{10} + k_{12}) C + k_{21} P\} \Delta t + C_i \quad (7')$$

$$P: P_{i+1} = (k_{12} C - k_{21} P) \Delta t + P_i \quad (8')$$

モデル C

$$S: S_{\text{upper } i+1} = (-k_{\text{rapid}} S F) \Delta t + S_{\text{upper } i} \quad (9')$$

$$S_{\text{deeper } i+1} = \{-k_{\text{slow}} S (1 - F)\} \Delta t + S_{\text{deeper } i} \quad (10')$$

$$C: C_{i+1} = \{k_{\text{rapid}} S_{\text{upper}} + k_{\text{slow}} S_{\text{deeper}} - (k_{10} + k_{12}) C + k_{21} P\} \Delta t + C_i \quad (11')$$

$$P: P_{i+1} = (k_{12} C - k_{21} P) \Delta t + P_i \quad (12')$$

ここで、 S_i 、 C_i および P_i はそれぞれ時間 i の時間の皮膚、全身循環および末梢組織中の薬物量、 k_a は吸収速度定数、 k_{10} は消失速度定数、 k_{12} 、 k_{21} は体循環および末梢組織間における薬物移行速度定数を示す。なお、 Δt は $t_{i+1} - t_i$ を表す。初期条件 $t = 0$ は $S_0 = \text{dose}$ 、 $C_0 =$ 投与量、 $P_0 = 0$ とした。得られたデータは表計算ソフト Microsoft® Excel 中のソルバー機能を用いて非線形最小二乗法によりカーブフィッティング（アルゴリズム：準ニュートン法）を行った。残差に対して異なる重みを与えず、各パラメータの重みはそれぞれ 1 として計算した。なお、 k_{10} 、 k_{12} 、 k_{21} は静脈内投与から算出した値を用いた。

1.1.7. 統計処理

統計解析は、JMP® Pro version 16.0.0 (https://www.jmp.com/en_us/home.html, SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて t 検定を行った。 $s.c.$ および hMN 投与により得られた T_{max} および C_{max} について、 p 値 < 0.05 を統計的に有意とみなした。

第2節 結果

1.2.1. 薬液投与後の皮内での薬液分布評価

Figures 6 a-c にヨウ素溶液を中空型 MN にて皮内または 27G ニードルで皮下にそれぞれ 5、20 および 80 μL 投与 (20 $\mu\text{L}/\text{sec}$) した際の X 線 CT 撮影画像を示す。灰色の部位は皮膚、白色の部位はヨウ素溶液、赤いラインは皮膚表面から約 800 μm の深さ (真皮) を示す。また、Figs. 6 a-c において、各投与容量で右側は *s.c.* 投与、左側は hMN 投与を示す。*s.c.* 投与では、いずれの投与容量においても赤いラインの下である皮下にヨウ素溶液が分布した。一方、5 μL hMN 投与では、皮内にヨウ素溶液が分布していることが確認できたが、投与容量が増加するにつれてヨウ素溶液の一部が皮下に分布した (Figs. 6 a-c)。

次に、高容量を投与するための工夫として、投与容量を分割して投与したときのヨウ素溶液の分布を評価した。Figures 6 d および e にヨウ素溶液 20 および 80 μL をそれぞれ 5 $\mu\text{L}\times 4$ 回および 20 $\mu\text{L}\times 4$ 回に分散して hMN 投与した際の X 線 CT 撮影画像を示す。5 $\mu\text{L}\times 4$ 回の分散投与では 20 $\mu\text{L}\times 1$ 回投与と比較して投与したヨウ素溶液が皮内上に分布していた。20 $\mu\text{L}\times 4$ 回投与では 80 $\mu\text{L}\times 1$ 回投与と同様に投与したヨウ素溶液の一部は皮下に分布していた。

Figure 6 f に 3 本針の MicronJet™ (写真左) および針本数を 1 本に加工した MicronJet™ (写真右) を用いてヨウ素溶液を 20 μL 投与した際の X 線 CT 撮影画像を示す。ヨウ素溶液の分布はどちらの中空型 MN で投与した場合も大きな変化は認められなかった。

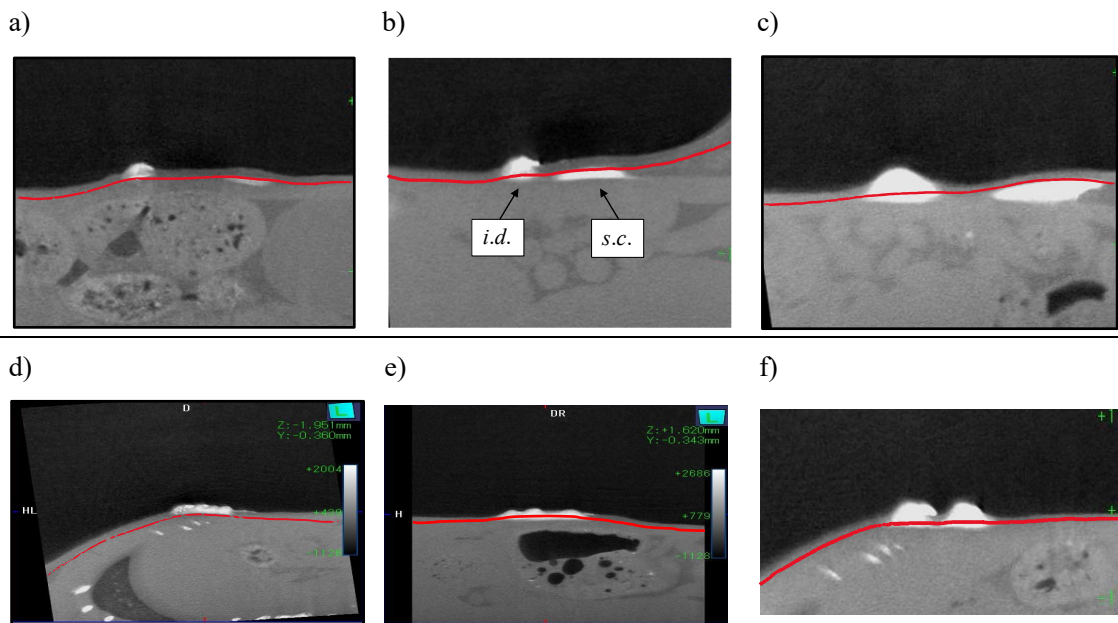


Fig. 6 X-ray analysis of iodine distribution in the skin after *s.c.* and hMN injection of 3% iodine solution with different administration volumes. White areas indicate the distribution of iodine. The red line represents a depth of 800 μm from the surface. a) 5 μL in a single administration, b) 20 μL in a single administration, c) 80 μL in a single administration, d) 5 μL \times four successive administrations, e) 20 μL \times four successive administrations, f) 20 μL administration with MicronJet composing three- (left) and single-needles (right).

1.2.2. 体内動態パラメータの算出

Figure 7 に 15.7 mg/mL の FD-4 (20 μL) を *i.v.*投与した時の血中プロファイル (a-i : 普通プロット、a-ii : 片対数プロット) を、Table 1 に Fig. 4 に示した 2-コンパートメントモデルに *i.v.*投与により得られた血漿中 FD-4 濃度推移を当てはめて算出した薬物動態パラメータを示す。また、本検討での FD-4 投与後の血中濃度の範囲では消失挙動は線型であることも確認した。この得られた体内からの消失パラメータを用いて hMN 投与後の薬物動態を解析した。

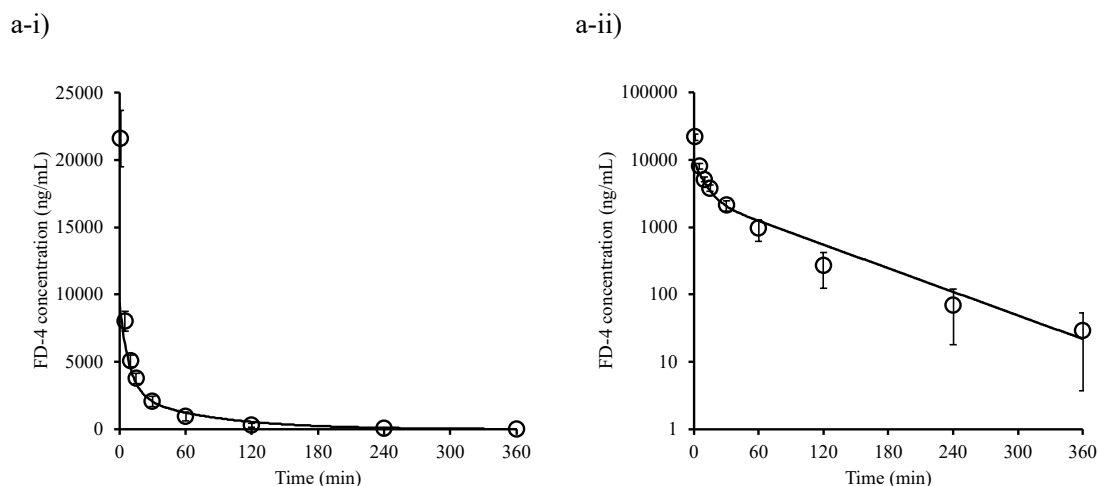


Fig. 7 Blood concentration–time profiles after *i.v.* injection of FD-4 solution at a concentration of 15.7 mg/mL. The scale on the Y-axis is normal i) and logarithmic ii). The lines were obtained by curve fitting. The data represent mean \pm S.D. (n=3).

Table 1 Pharmacokinetic parameters of FD-4 following *i.v.* injection.

Drug	k_{12} (min^{-1})	k_{21} (min^{-1})	k_{10} (min^{-1})	V_1 (mL/kg)	V_2 (mL/kg)
FD-4	3.5×10^{-2}	4.5×10^{-2}	4.1×10^{-2}	34	30

1.2.3. 投与容量の影響

Figure 8 に 15.7 mg/mL の FD-4 を 5 μL 、20 μL そして 80 μL の容量で hMN (○) および *s.c.* (●) 投与時の血中濃度プロファイルを示す。Table 2 にモデルに依存しない薬物動態パラメータを示す。FD-4 溶液を 5 μL (Figs. 8 a-i, 8a-ii) および 20 μL (Figs. 8 b-i, 8b-ii) を hMN 投与した場合、それぞれ同量を *s.c.* 投与した場合と比較して、 T_{max} の短縮と高い C_{max} が確認された。一方、80 μL の FD-4 溶液を注入すると (Figs. 8 c-i, 8 c-ii)、5 μL および 20 μL とは異なり、hMN 投与により得られた T_{max} および C_{max} は *s.c.* 投与の値との差は小さくなった。なお、Fig. 8 の実線および点線は、hMN 投与もしくは *s.c.* 投与し得られたデータをそれぞれモデル C のコンパートメントモデルに当てはめ、非線形最小二乗法によりカーブフィッティングを行って得られた血中濃度を示す。モデル A およびモデル B のコンパートメントモデルでは最小二乗法処理で解が発散したため解析には用いなかった。算出された薬物動態パラメータを Table 3 に示す。この時、*s.c.* 投与では S_{upper} からの吸収は生じないと考え (k_{rapid} および F 値を 0)、その速度定数を k_{slow} 値と等しいと仮定し、hMN 投与ではその値は固定して、 k_{rapid} と F を算出したところ、得られた理論曲線は実測値とほぼ一致した (Fig. 8 a)。hMN 投与後

のパラメータは、1.2.1 で得られた X 線 CT の結果より、投与容量の増加により皮膚内での溶液の分布が皮膚深部に移行していたことから、投与容量が増加するにつれて、 S_{deeper} への移行性のみが変化すると仮定したとき ($1-F$ のみが増加し、 k_{rapid} 、 k_{slow} 、 k_{12} 、 k_{21} および k_{10} 値を固定)、計算し得られた理論値は消失過程でやや解離が見られたが、実測値とほぼ一致した (Figs. 8 b, c)。

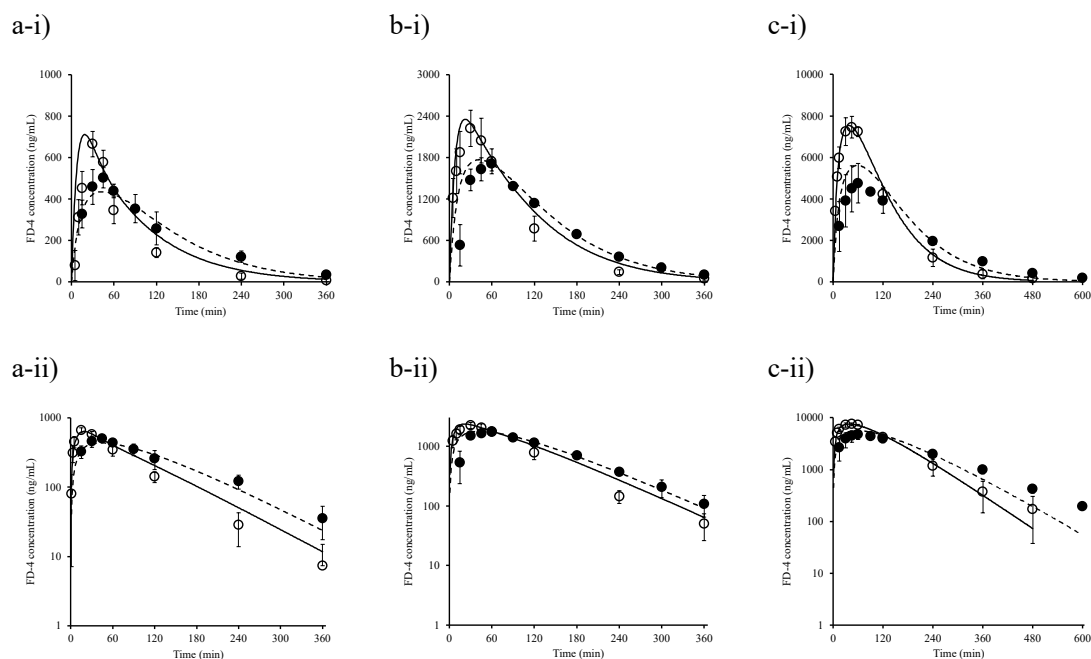


Fig. 8 Blood concentration–time profiles after hMN (○) and *s.c.* (●) injection of FD-4 solution at a concentration of 15.7 mg/mL with different administration volumes. The scale on the Y-axis is normal i) and logarithmic ii). The lines were obtained by curve fitting. Solid lines indicate hMN administration and dotted lines indicate *s.c.* administration. Administration volume: 5 μL (a-i, a-ii), 20 μL (b-i, b-ii), and 80 μL (c-i, c-ii). The data represent mean \pm S.D. ($n=3-4$).

Table 2 C_{\max} and T_{\max} obtained from blood concentration profiles of hMN or *s.c.* injection of FD-4 at concentration of 15.7 mg/mL with different volumes.

Volume	Route	C_{\max} (ng/mL)	T_{\max} (min)
5 μ L	<i>i.d.</i>	$6.7 \times 10^2 \pm 0.6 \times 10^{2**}$	$19 \pm 8^{**}$
	<i>s.c.</i>	$5.0 \times 10^2 \pm 0.5 \times 10^2$	45 ± 1
20 μ L	<i>i.d.</i>	$2.2 \times 10^3 \pm 0.3 \times 10^3^*$	$30 \pm 0^*$
	<i>s.c.</i>	$1.8 \times 10^3 \pm 0.7 \times 10^2$	55 ± 9
80 μ L	<i>i.d.</i>	$7.5 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3^*$	45 ± 0
	<i>s.c.</i>	$4.8 \times 10^3 \pm 0.3 \times 10^3$	55 ± 9

Compared with *i.d.* and *s.c.* administrations with the same volume $^{**}p < 0.01$, $^*p < 0.05$ (Mean \pm S.D. n=3-4).

Table 3 Pharmacokinetics parameters following hMN and *s.c.* injection of FD-4.

Route	Volume	k_{rapid} (min^{-1})	k_{slow} (min^{-1})	F	$1-F$
hMN	5 μ L	0.06	0.02	0.7	0.3
	20 μ L	0.06	0.02	0.4	0.6
	80 μ L	0.06	0.02	0.01	0.99
<i>s.c.</i>	5 μ L	---	0.02	---	1
	20 μ L	---	0.02	---	1
	80 μ L	---	0.02	---	1

Pharmacokinetics parameters of k_{12} , k_{21} , k_{10} , V_1 , and V_2 were used the same parameters obtained from *i.v.* injection.

次に、薬物投与量を固定し（ラット 1 匹あたり 78.5 μ g）、濃度を調整することで投与容量のみを変化させたときの体内動態について評価した（5 μ L : FD-4 濃度 15.7 mg/mL、20 μ L μ L : FD-4 濃度 3.93 mg/mL、80 μ L : 0.98 mg/mL）。Figure 9 に濃度の異なる FD-4 溶液を *i.d.* 投与時の血中濃度プロファイルを、Table 4 に薬物動態パラメータを示す。Figure 8 に示した結果と同様に、投与薬物量を固定した場合でも、FD-4 溶液を 5 μ L 投与した場合には、 T_{\max} は短く、 C_{\max} は高い値を示し、投与容量が増加するにしたがって T_{\max} の遅延および C_{\max} の減少が確認された。また、Fig. 9 に示す実線は Table 3 に示した薬物動態パラメータ値を用

いて算出した理論曲線を示す。算出して得られた結果は、後期の消失過程でやや解離が見られたが、吸収過程および早期の消失過程では実測値とほぼ一致した。

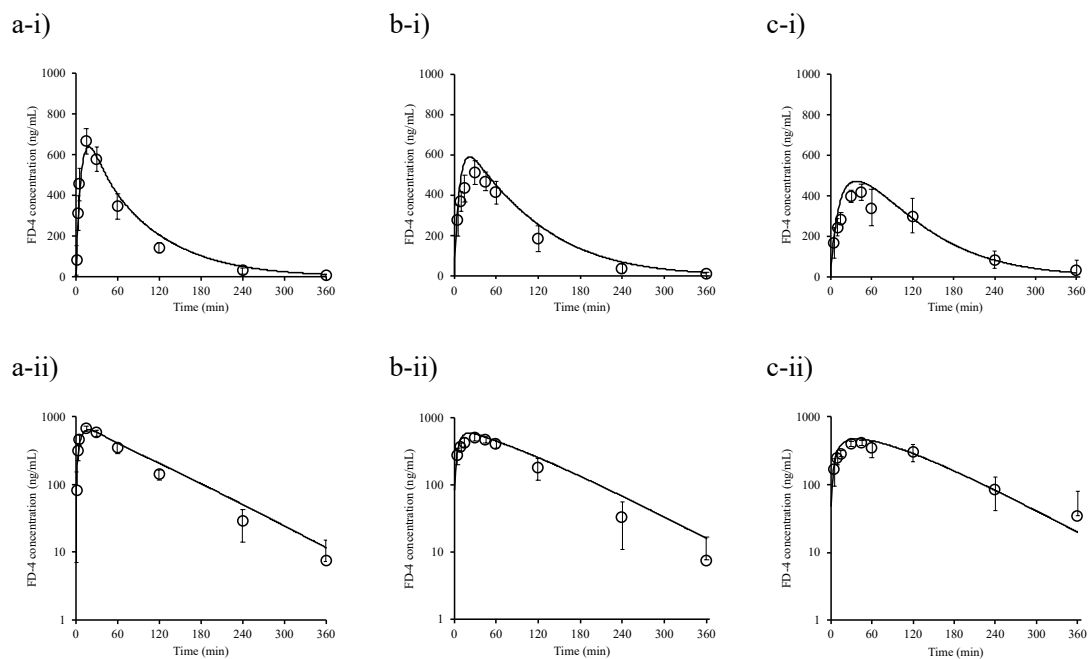


Fig. 9 Blood concentration–time profiles after hMN (○) injection of FD-4 solution at the same dose (78.5 μg per rat) with different administration volumes. The scale on the Y-axis is normal i) and logarithmic ii). Administration volume: 5 μL (a-i, a-ii), 20 μL (b-i, b-ii), and 80 μL (c-i, c-ii). The data represent mean ± S.D. (n=3-4).

Table 4 C_{\max} and T_{\max} obtained from blood concentration profiles of hMN injection of FD-4 at the same amount of 78.5 μg per rat with different volumes.

Volume	Route	C_{\max} (ng/mL)	T_{\max} (min)
5 μL	hMN	$6.7 \times 10^2 \pm 0.6 \times 10^2$	19 ± 8
20 μL		$5.9 \times 10^2 \pm 0.2 \times 10^2$	23 ± 9
80 μL		$4.5 \times 10^2 \pm 0.8 \times 10^2$	38 ± 8

Mean ± S.D. n=3-4

1.2.4. 注入速度の影響

15.7 mg/mL の FD-4 を 20 μ L および 80 μ L の容量を異なる速度 (20 μ L/sec および 20 μ L/min (10 秒毎 1 μ L の速度で手動投与)) で hMN 投与したときの吸収動態を比較した。Figure 10 に異なる速度で FD-4 溶液を各容量 hMN 投与した時の血中濃度プロファイルを、Table 5 に血中濃度プロファイルから得られた C_{max} および T_{max} を示す。急速投与 (20 μ L/sec) および低速投与 (20 μ L/min) で FD-4 溶液を投与した場合、20 μ L および 80 μ L 投与のいずれの場合においても C_{max} および T_{max} に差は認められなかった。本結果においては差が認められなかったことから、フィッティングにより求めた理論曲線は、Figs. 8 b, c と同じであり、Fig. 10 のグラフには記載していない。

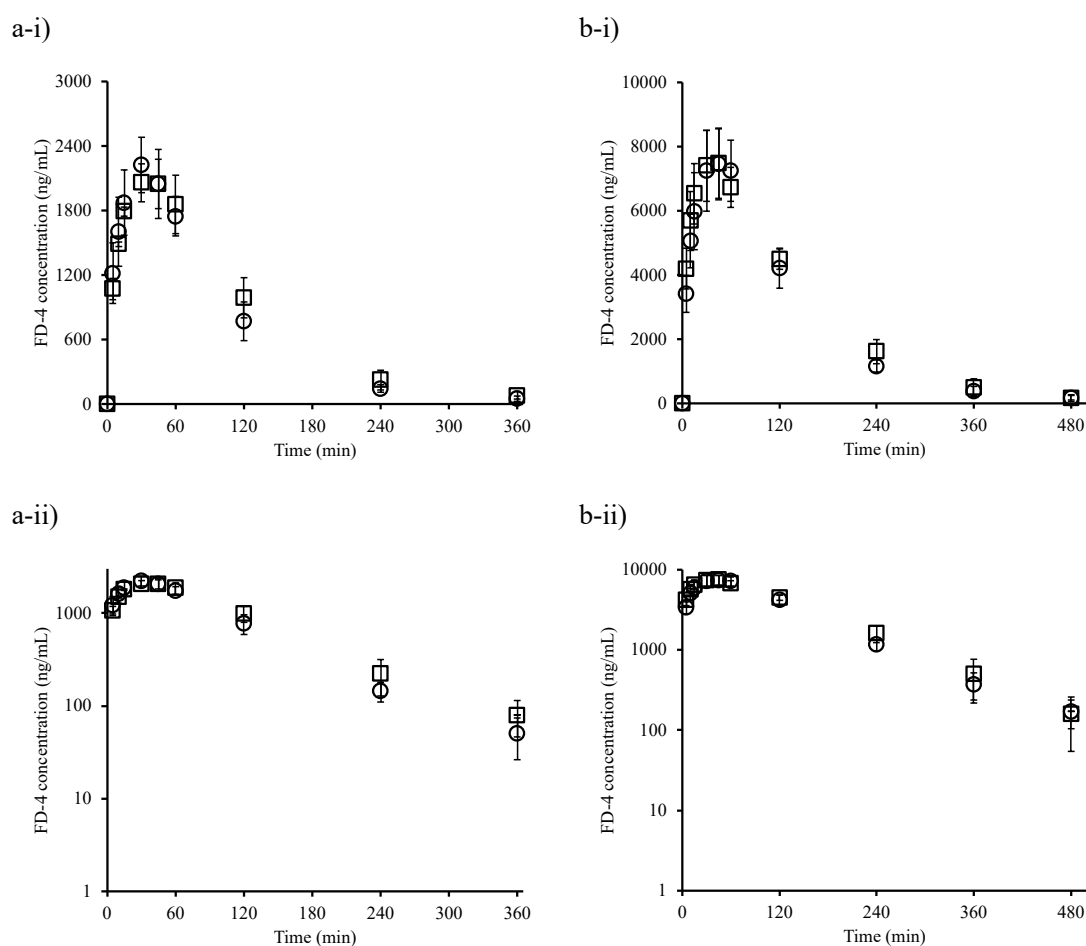


Fig. 10 Effect of hMN injection speed on the blood concentration–time profiles of FD-4.

The scale on the Y-axis is normal i) and logarithmic ii). Symbols: (○) hMN injection speed: 20 μ L/sec and (□) 20 μ L/min. Administration volume: 20 μ L (a-i, a-ii), and 80 μ L (b-i, b-ii). The data represent mean \pm S.D. (n=3-5).

Table 5 C_{\max} and T_{\max} obtained from blood concentration profiles of hMN injection of FD-4 at concentration of 15.7 mg/ mL with different injection speeds.

Volume	Route	Speed	C_{\max} (ng/mL)	T_{\max} (min)
20 μ L	hMN	20 μ L/sec	$2.2 \times 10^3 \pm 0.3 \times 10^3$	30 ± 0
		20 μ L/min	$2.1 \times 10^3 \pm 0.2 \times 10^3$	34 ± 8
80 μ L	hMN	20 μ L/sec	$7.5 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$	45 ± 0
		20 μ L/min	$7.6 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$	42 ± 7

Mean \pm S.D. n=3-5

1.2.5. 針本数の影響

針本数を1本に加工した MicronJet™ を用いて 15.7 mg/mL の FD-4 を 20 μ L の容量で 20 μ L/sec の速度で hMN 投与したときの血中濃度推移を評価した。Figure 11 に針本数1本および3本の MicronJet™ を用いて FD-4 溶液を hMN 投与した時の血中濃度プロファイルを、Table 6 に血中濃度プロファイルから得られた C_{\max} および T_{\max} を示す。針本数を1本に減少させて FD-4 溶液を投与した場合、3本針で投与した場合と比較して、有意差は認められなかったが、 T_{\max} は遅延、 C_{\max} は減少する傾向にあった。

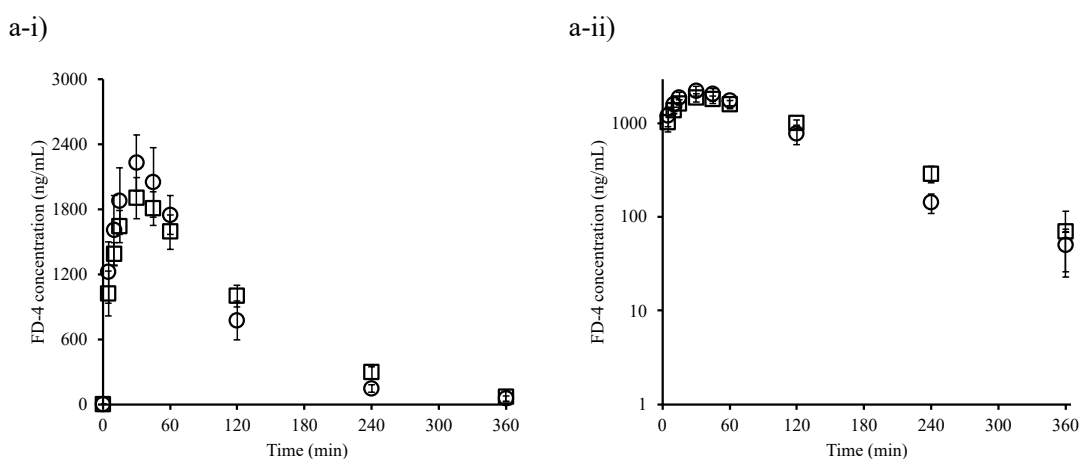


Fig. 11 Blood concentration–time profiles after i.d. injection of FD-4 solution at a concentration of 15.7 mg/mL injected using different number of needles. The scale on the Y-axis is normal i) and logarithmic ii). Number of needle: 3 (○) and 1 (□). Administration volume: 20 μ L (a-i, a-ii). The data represent mean \pm S.D. (n=3-4).

Table 6 C_{\max} and T_{\max} obtained from blood concentration profiles of hMN injection of FD-4 at concentration of 15.7 mg/ mL injected using different number of needles.

Volume	Route	Number of needle	C_{\max} (ng/mL)	T_{\max} (min)
20 μ L	<i>i.d.</i>	3	$2.2 \times 10^3 \pm 0.3 \times 10^3$	30 ± 0
		1	$1.9 \times 10^3 \pm 0.3 \times 10^3$	36 ± 8

Mean \pm S.D. n=3-4

1.2.6. 分散投与の影響

Figure 12 にラット腹部皮膚に 20 μ L \times 1 箇所（投与速度 20 μ L/sec）および 5 μ L \times 4 箇所（1 箇所あたりの投与速度 20 μ L/sec）、また、80 μ L \times 1 箇所（投与速度 20 μ L/sec）および 20 μ L \times 4 箇所 hMN 投与（1 箇所あたりの投与速度 20 μ L/sec）および 20 μ L および 80 μ L を *s.c.* 投与（投与速度 20 μ L/sec）した時の血中濃度プロファイルを、Table 7 に投与により得られた薬物動態パラメータを示す。同容量の FD-4 溶液を投与した場合でも、投与容量 20 μ L の場合、1 回投与と比較して 4 回に分散して投与すると T_{\max} の短縮および C_{\max} の増加が確認された。一方で、投与容量 80 μ L の場合、1 回投与および 4 回投与のいずれの投与回数でも T_{\max} および C_{\max} の値に有意な差は認められなかった。

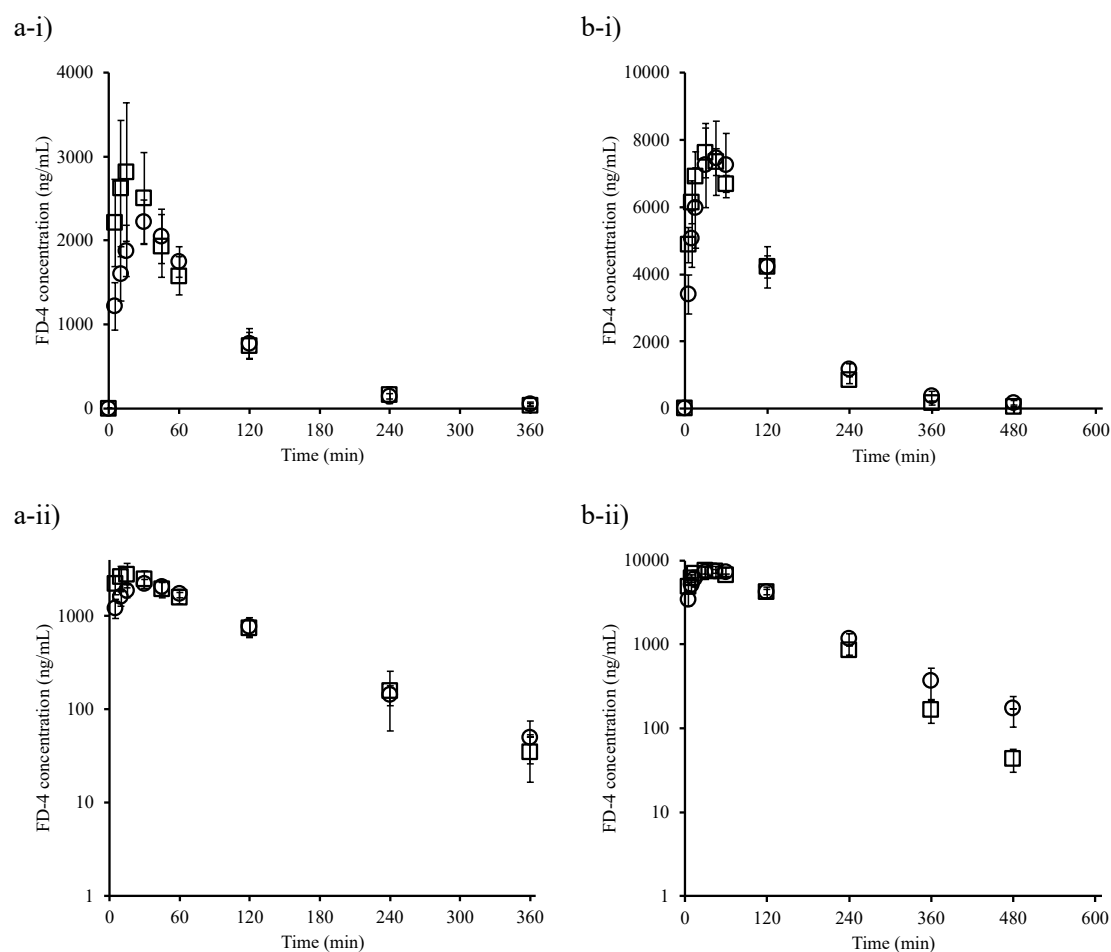


Fig. 12 Effect of divided administration of FD-4 solution on the blood concentration–time profile. Symbols; □: hMN injection with 5 μL×four successive administrations, ○: hMN injection in a single administration of 20 (a) or 80 μL (b). The scale on the Y-axis is normal i) and logarithmic ii). Administration volume: 20 μL (a-i, a-ii) and 80 μL (b-i, b-ii). The data represent mean ± S.D. (n=4).

Table 7 C_{max} and T_{max} obtained from blood concentration–time profiles after divided hMN injection of FD-4.

Volume	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)
5 μL×four successive administrations	$2.8 \times 10^3 \pm 0.8 \times 10^3$	$19 \pm 8^*$
20 μL × 1 administration	$2.2 \times 10^3 \pm 0.3 \times 10^3$	30 ± 0
20 μL×four successive administrations	$7.7 \times 10^3 \pm 0.6 \times 10^3$	34 ± 8
80 μL × 1 administration	$7.5 \times 10^3 \pm 0.1 \times 10^4$	45 ± 0

Compared with single administration with the same volume * $p < 0.05$ (Mean ± S.D. n=3–4).

第3節 考察

中空型 MN を用いた *i.d.*投与は *s.c.*投与の代替経路として注目されており、慢性疾患治療に対するバイオ医薬品の投与デバイスとして注目されている。Alfred ら³⁸⁾は中空型 MN によるバイオ医薬品 (エタネルセプト:132 kD、ソマトロピン:22 kD およびインスリン:5.8 kD) の *i.d.*投与において、注射針を用いた *s.c.*投与と比較して投与後の薬物動態が、分子量に依存せず T_{max} の短縮および高い C_{max} が得られることを報告している。さらに、Norman ら⁴⁴⁾は1型糖尿病の小児および青年において、中空型 MN によるインスリンの *i.d.*投与の方が、血中濃度中のグルコース濃度の低下が速いことを報告している。Burton ら⁴⁵⁾は皮内に最大 1.5 mL の溶液を可能とする中空型 MN にてナロキソン (*M.W.* 327.2) を *i.d.*投与すると *s.c.*投与と比較して T_{max} が遅延することを確認している。これは、中空型 MN を用いたナロキシソンの投与に 5 分以上の時間がかかったためだと述べられている⁴⁵⁾。これらの報告では、主に中空型 MN による *i.d.*投与と注射針による *s.c.*投与後の薬物血中濃度推移の変化を調査しているが、中空型 MN にて投与された薬物の皮内分布に着目した研究は行われていない。そこで、本研究では、皮膚に投与した薬液の分布に着目し、吸収過程に関わる体内動態パラメータに及ぼす影響について調査した。薬物の *s.c.*投与においては、投与容量は通常 2.0 mL までに制限されているが⁴⁶⁾、結合組織のヒアルロン酸を加水分解することで、*s.c.*投与する薬物の浸透性や分散性が改善可能である。hMN 投与も同様に、投与可能な薬液量には制限があり、皮内ではヒアルロン酸の加水分解の効果は期待できないことから、投与容量が限られている場合は薬効を発現させるために薬物濃度を上げる必要がある。しかし、薬物濃度の過度な増加は、薬液粘度を増加させ、製剤の安定性や製造性および送達・投与方法に影響を及ぼす可能性がある。さらに、*s.c.*投与で報告されているように、薬液の粘度が増加すると注射時の痛みが増加する可能性がある⁴⁷⁾。表皮や真皮からなる *i.d.*投与部位の厚みは、皮下組織と比較して薄いため、投与容量が *s.c.*投与と比較してより限定されると考えられるが、中空型 MN にて *i.d.*投与後の皮内分布や薬物の吸収動態に及ぼす投与容量や投与速度、針本数の影響についての報告はほとんどない。

今回の検討において、20 および 80 μL のヨウ素溶液を hMN 投与した場合、投与したヨウ素の一部が皮下に分布していることが確認された。なお、ヨウ素溶液は体内動態で使用した中分子モデル薬物である FD-4 と分子量は異なるものの、X 線 CT の結果はヨウ素溶液を投与して直後の分布を測定しているため、溶液の分布に分子量による皮膚内拡散による影響は非常に小さく、ヨウ素の分布と溶液の分布は等しいと考えられる。体内動態評価の結果より、80 μL の FD-4 溶液を hMN 投与した場合、FD-4 溶液を 5 および 20 μL の投与容量で

hMN 投与と比較して S_{upper} から吸収される薬物率 (F 値) は著しく低値となり、80 μL の *s.c.* 投与と同様の血中濃度プロファイルが得られた。また、5 $\mu\text{L} \times 4$ 回の分割皮内投与では、20 $\mu\text{L} \times 1$ 回 *i.d.* 投与と比較して T_{max} の短縮および C_{max} の増加が認められた。これは、5 $\mu\text{L} \times 4$ 回の分割 *i.d.* 投与では、20 $\mu\text{L} \times 1$ 回 *i.d.* 投与と比較して投与溶液が確実に皮内に分布していたためと考えられ、この考えは、ヨウ素溶液を用いた分割投与時の薬液皮内分布評価でも皮膚の浅い部位に溶液が分布していた結果からも支持される。以上の結果より、溶液の皮膚中分布は体内動態に影響を及ぼす因子であり、hMN 投与において、投与する溶液量の増加により投与した薬物の一部が皮膚深部の S_{deeper} に移行し、また、 S_{upper} と S_{deeper} では薬物の吸収速度が異なることが示唆された。Kim ら⁴⁸⁾は皮下および筋肉組織に注入速度を変えてインスリンを投与した際、低速投与および高速投与間で注入溶液の分布が異なり、それに伴い薬物の吸収が変化することを報告している。また、彼らは皮下投与後の薬液分布が変化することについて、低速度投与の場合、皮膚の細胞組織に沿って溶液は垂直方向よりも水平方向に沿って広がり、一方、高速投与の場合、注入によって組織にかかる圧力が低速投与と比較して高くなることから、溶液は組織を破壊しながら広く水平方向に分布すると考察している。しかし、本検討での範囲において、投与速度は体内動態に変化を及ぼす因子ではなかった。これは本検討での速度条件ではどちらの速度で注入した場合においても、注入速度による皮内組織の破壊などの状態変化がなく、溶液の分布に大きな差がなかったため、吸収動態にも投与速度は影響を及ぼさなかったと考えられる。

本検討で用いた MicronJetTM は3本の針からなり、投与した容量の1/3ずつが各針先より皮内に注入される。そのため、投与薬物の皮内分布に影響を及ぼす要因として、MN を構成している MN 針の本数も体内動態に影響を及ぼすと考えられた。本検討においては、針本数を少なくすることで C_{max} や T_{max} に関して有意差は認められないものの、 T_{max} は遅延、そして C_{max} は減少する傾向にあった。また、体内動態と同様に X 線 CT による皮内分布評価の結果では、針本数の違いによる薬液分布に明確な差は認められなかった。針のピッチ間隔が狭い場合は、針1本あたりから吐出される薬液量が少ない場合でも、皮膚内で投与溶液が合わさる可能性があることから、本検討では、投与溶液が皮内であわさり、薬液分布や体内動態に明確な差が確認できなかった可能性が考えられた。

皮膚に局所投与された薬物の体内動態を評価するためには、乳頭下血管叢のサイズ、乳頭下血管叢の血管密度および血流速度を考慮する必要があるかもしれない。Donnelly ら⁴⁹⁾は中空型 MN にて皮膚を穿刺することで皮膚表層の毛細血管の深度が 430 μm から 240 μm と浅くなり、血管密度が 9% から 40% に増加することを光干渉断層撮影 (OCT) 観察画像から

確認している。そのため、中空型 MN の皮膚穿刺による皮内の血管系の深度や密度の変化は皮内に投与された薬物の拡散距離や吸収速度に影響し、その結果、 T_{\max} の短縮および C_{\max} の増大に寄与している可能性が考えられる。吉田ら⁵⁰⁾は *i.d.* 投与後の薬物の体内動態を、皮膚、筋肉、全身循環系および末梢系の 4-コンパートメントからなるモデルを構築して解析し、血流の変化が体内動態に影響を及ぼす因子であることを報告している。Xu ら⁵¹⁾は穿刺針（ランセット）の穿刺によって血管内皮が壊れることを報告している。したがって、これらの報告では、皮膚の血管の深度や密度の変化や血管壁の損傷が *i.d.* 投与した薬物の吸収動態に影響を及ぼしたと考えられる。

本検討では、hMN 投与したヨウ素分布の X 線 CT の結果を参考に、 S_{upper} および S_{deeper} からの薬物吸収率を示す F および $1-F$ の値をモデル C に当てはめることで決定した。その結果、FD-4 溶液の hMN 投与および *s.c.* 投与後の血中濃度推移はモデル C のコンパートメントモデルにて算出された理論曲線とほぼ一致した。これは、 S_{upper} に分布した一部の薬物が速やかに S_{deeper} に移行し、その後全身循環されることを示唆している。また、投与容量が増加するにしたがって S_{deeper} に分布する薬物の比率は増加した。すなわち、 S_{upper} からの吸収速度である k_{rapid} および S_{deeper} からの吸収速度である k_{slow} は吸収部位に関係する可能性があり、hMN 投与後に S_{upper} に分布した薬物は真皮の浅い部位に存在する毛細血管網と真皮のより深部に位置する毛細血管を介して全身吸収される可能性があると考えられた⁵²⁾。X 線 CT 結果では、皮膚表面から約 800 μm を境に皮内と皮下を分け、それぞれの部位の分布を観察した。モデル C のコンパートメントモデルを用いた解析結果では、80 μL を hMN 投与した時の S_{deeper} からの吸収率を示す $1-F$ 値は 0.99 と高値であり、多くの薬物が速やかに皮下に分布する可能性を示唆した。しかしながら、X 線 CT により 80 μL を hMN 投与した時のヨウ素分布を観察したところ、多くが皮内に分布していたことから、 S_{upper} および S_{deeper} は、それぞれ皮内および皮下に完全に対応しているわけではないと考えられた。これは、前述したように、皮膚に MN を穿刺した際に生じる血管深度や密度の変化⁴⁹⁾が関係しており、組織学的に S_{upper} や S_{deeper} を区別できるわけではないのかもしれない。

上述したように、5 $\mu\text{L} \times 4$ 回の分割皮内投与において 20 $\mu\text{L} \times 1$ 回皮内投与よりも T_{\max} の短縮および C_{\max} の増加が認められたのは、X 線 CT の結果より、投与した溶液の分布が 4 回分割投与では 1 回投与と比較して浅く分布しているためと考えられる。一方で、20 $\mu\text{L} \times 4$ 回投与では 80 $\mu\text{L} \times 1$ 回投与と比較して体内動態パラメータに差は認められなかった。これは 20 $\mu\text{L} \times 1$ 回皮内投与においても投与した溶液の一部が皮下に分布することから 20 $\mu\text{L} \times 4$ 回の分

割皮内投与の際、4箇所投与部位が融合し、一つの投与部位となったことから吸収に関わる体内動態パラメータに差が認められなかった可能性がある。

本検討で構築したコンパートメントモデルは一次速度定数で吸収されると仮定しているが、時間の経過とともに投与部位から筋肉へ移行した薬物の吸収も関与している可能性があり^{53, 54)}、そのことが体内動態評価から得られた血中濃度実測値が計算曲線の後半部とわずかに異なった要因である可能性がある。皮膚に局所投与した薬物の局所動態は拡散モデルおよび Fick の第 2 法則により解析できることが知られている^{55, 56)}。今回の体内動態に及ぼす投与容量の影響について拡散モデルを用いて解析を行うことも可能かもしれないが、その場合には、深さの異なる皮膚中の薬物濃度を経時的に測定する必要がある。異なる皮膚深度での薬物濃度を測定する方法の一つとして、皮膚水平切片を作成し、薬物を各切片から抽出し、皮膚中濃度-深度分布を得ることができる。しかしながら、この手法では、皮膚からの薬物抽出率も考慮する必要があることから皮膚中濃度データを正確な位置の関数として得るのは困難である。したがって、今回用いた差分法による解析は投与容量に及ぼす体内動態の影響を調査するために適した解析方法であると考えられる。

ヒトの表皮および真皮の厚みはラット皮膚よりも厚いことが報告されている^{57, 58)}。したがって、皮内に投与可能な投与容量はヒトと動物で異なる可能性がある。また、 S_{upper} や S_{deeper} の寄与もヒトとラットでは異なる可能性がある。しかしながら、本検討結果により、中空型 MN で薬液を投与する際のデバイスの設計および薬液の投与容量については、動物種に関わらず考慮する必要があると考えられる。皮内に投与した薬物の体内動態に及ぼす投与容量の影響は投与する薬物の分子量あるいは極性によって変化すると考えられる。すなわち、低分子薬物を皮膚中に投与する場合、中高分子薬物よりも拡散性が高いことから速やかに真皮に移行するため、投与容量の影響はわずかであり、薬物の分子量が大きくなるにつれて S_{upper} へ分布する薬物の寄与率は増加すると予想される。

中空型 MN を用いた *i.d.* 投与後の体内動態に及ぼす薬物分布の影響をさらに解明するには、薬物の物性や皮膚の厚み、中空型 MN の設計などを考慮した試験が必要となると考えられる。

第4節 小括

第1章において、中空型 MN を用いた *i.d.* 投与において投与容量は T_{\max} および C_{\max} などの体内動態に影響する因子であることを明らかにした。ヨウ素溶液を用いた X 線 CT による溶液分布評価結果より、投与容量や形状の異なる針によって皮内分布が変わることが確認された。皮下に投与溶液が浸潤している像が確認できた場合、 T_{\max} の遅延、 C_{\max} の低下が確認できた。この結果より、投与容量や針の形状によって変化する皮膚内での溶液の分布は吸収動態パラメータに関係している可能性があり、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。さらに、X 線 CT とヨウ素を造影剤として用いた薬物分布の評価は、中空型 MN の皮内投与を評価する方法として非常に有効な手段になりうると考えられた。本検討で、中空型 MN にて投与した中分子薬物の吸収動態や投与容量は中空型 MN 形状の影響を受けることがわかった。この結果を受けて、中空型 MN は、確実な穿刺と皮内への溶液注入が可能であるが、皮内に確実に投与溶液を届けることが期待する体内動態を得るためには必要であることが示された。しかしながら、中空型 MN の研究において、皮内分布を制御する手法についての既存の検討はなく、本研究はその点において先駆的である。

中空型 MN を用いた皮内投与後の吸収動態特性を把握することは、バイオ医薬品やワクチンにおける *i.d.* 投与経路の有用性を明らかにする上で必要であると考えられる。本研究により、中空型 MN による *i.d.* 投与において、薬物の投与容量の調整または中空型 MN の設計を変更することで目的に応じた薬効発現が可能であると考えられた。

以上、本章の結果は、中空型 MN を用いた皮内投与デバイス開発において有益な知見を提供すると考えられる。

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

緒言で述べたように、中空型 MN は皮内に中高分子薬物を送達することができることから、皮内投与デバイスとして注目されている。中空型 MN は中実型 MN と比較して高容量の薬物溶液を送達できるが、一般的に注射投与で用いられているミセルや脂質ナノ粒子などの製剤も皮内に直接投与することが可能である⁴²⁾。ただし、MN により薬物や製剤を皮内送達し、それを体循環に吸収させて一定の BA を得るためには、確実な MN の皮内穿刺が必須となる。

MN にて投与した後に皮膚に形成される穿刺孔形状や穿刺深度などの穿刺性の評価には、OCT^{59,60)}や X 線 CT⁶¹⁾を用いた皮膚断層観察が行われている。OCT は、光の干渉性を利用して試料内部の構造を撮影する技術であり、皮膚に形成された穿刺孔のサイズを観察することができるが、針の長さが長い MN の評価の場合は、十分な解像度が得られない欠点がある。一方、X 線 CT による穿刺深度評価は、MN 表面に金属コーティングを施すなどして皮膚と MN の X 線透過率に差を生じさせ、穿刺深度の測定を行う方法であり、本手法は MN の針が長い場合にも評価が可能である。OCT や X 線 CT による MN 適用による穿刺性評価は、一般的にヒト摘出皮膚やブタ、ラットおよびマウスなどの皮膚を用いて行われる。しかし、これらの皮膚は倫理的な観点から入手が困難であること、また皮膚状態の違いにより部位による不均一性の問題があることから穿刺性を正確かつ再現性よく評価することは難しい。そのため、これら問題を解決することが可能である人工膜を用いた穿刺性評価が注目されている。穿刺性評価に用いられる代替膜としてパラフィルム^{®62)}やアガロースゲル⁶³⁾、また皮膚のヤング率に近い値を示すシリコーンやウレタン素材からなるゴムシートがある⁶⁴⁾。また、食品用ラップフィルムを角層に見立て、MN 穿刺時の抵抗を評価する方法も報告されている⁶⁵⁾。

中空型 MN は、針先に薬物を塗布、あるいは、溶解型の針先に薬物を搭載している中実型 MN とは異なり、溶液を皮内に投与することで薬物を送達する。したがって、針の皮膚穿刺が不十分であれば、一度投与した溶液が体外に漏れ出るなどにより、投与量が一定とならず、結果として患者の転帰に重大な影響を及ぼす可能性がある。第1章より *i.d.*投与後のモデル中分子薬物 FD-4 の皮内分布は体内動態に影響を及ぼす因子であることを明らかにしており、特に、分子量数千ダルトン以上の大きな分子量を有する薬物に対しては、穿刺性だけで

なく中空型 MN 投与での溶液の”注入部位の状態”についても考慮すべきパラメータである。これまで様々な形状の異なる中空型 MN を用いて、穿刺性についての報告がなされているものの^{94, 95)}、その薬液投与の確実性や穿刺部位の状態に関して調査した報告はない。そのため、形状の異なる中空型 MN を用い、穿刺性、薬液投与の確実性、そして注入部位の状態に及ぼす要因を明らかにすることは、確実な穿刺・薬液投与を可能とする中空型 MN の設計を行う上で重要である。そこで、本章では、様々な形状の MN を用いて穿刺に及ぼす種々要因の解明とラット腹部皮膚への安定した穿刺および皮内への注入を可能とする条件およびそれらに関わる中空型 MN の形状について調査した。さらに、皮膚人工膜を用いた万能試験機による *in vitro* 中空型 MN 穿刺時の試験力-ストローク曲線を解析し、*in vivo* 穿刺・注入試験結果と比較することで溶液の注入成功率に及ぼす要因を明らかにし、*in vitro* 人工膜穿刺試験モデル系の構築を行なった。なお、本章では、様々な形状の中空型 MN が生体分解性高分子である PLA を用いることで作製可能であることから、前章で用いた金属の針 3 本を有する MicronJetTMではなく、PLA を用いた中空型 MN にて検討を行った。

第1節 実験方法

2.1.1. 材料

FD-4 は、Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。ヘパリン Na 注 5 千単位/5 mL は、持田製薬株式会社 (東京, 日本) より購入した。希ヨードチンキ (ヨウ素溶液) は、健栄製薬株式会社 (大阪, 日本) より購入した。Methylene blue (MB) は、富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪, 日本) から購入した。Rhodamine B (Rd-B) は、Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A) より購入した。すべての試薬は分析グレードであり、精製せずにそのまま使用した。ウレタンシートは、株式会社ミスミグループ本社 (東京, 日本) から購入した。食品用ラップフィルム (サランラップ®、厚さ 10 μm) は、旭化成ホームプロダクツ株式会社 (東京, 日本) から購入した。マニュアルシリンジ (ルアーロック型 50 および 100 μL) は、Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) より購入した。

2.1.2. 中空型 MN の調製および投与方法

中空型 MN は花王株式会社 (東京, 日本) から提供された。用いた中空型 MN は、その素材が PLA であり、PLA フィルム (厚さ 400 μm 、*M.W.* 200,000) に金型を超音波による熱加工で延伸形成後、レーザー (2.5 W、355 nm) により針先端から 250 μm の部位に開孔 (楕円、100 μm ×70 μm) を作製し、その後、得られた針部分とベース部分を熱接着し、中空型 MN としたものである。調製した中空型 MN はマニュアルシリンジに接続し、使用した。Figure 13 に使用した中空型 MN の設計図、Table 8 に顕微鏡観察画像を示す。本検討では針全長の異なる 1 本針の中空型 MN および先端が丸い 4 本の支柱 (長さ 950 μm) を針の周りに有する 2 種類の中空型 MN を使用した。4 本の円柱上の支柱は 5.9 mm の間隔で正方形に配置した。なお、有効高さとは支柱を持たない中空型 MN の場合は針全長のことを、支柱を有する中空型 MN の場合は針全長から支柱の長さ (950 μm) を差し引いた長さのことを示す (Fig. 13 b)。なお、本章では中空型 MN の”土台”は針や支柱の根本が接する面のことを示す (Fig. 13 c)。

PLA からなる中空型 MN の投与方法は針を皮膚に対して 45 度の角度に傾けて挿入する MicronJet™ とは異なり、皮膚に対して垂直に穿刺した。

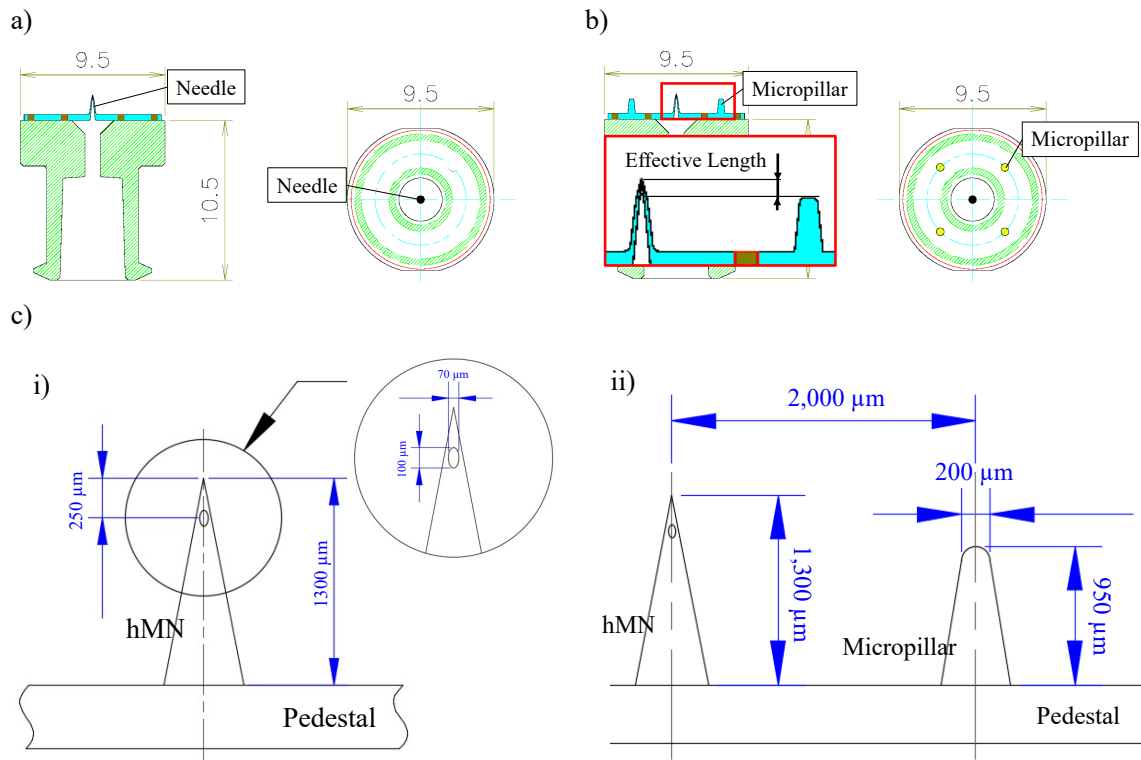
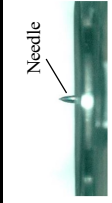
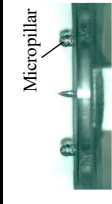




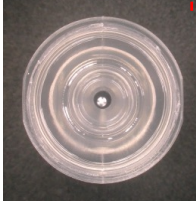
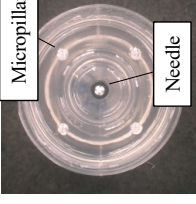
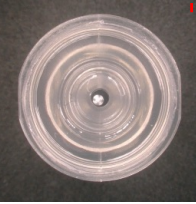
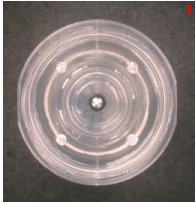

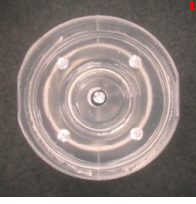


Fig. 13 Schematic design of hMN used in the present study. a) hMN without micropillar, b) hMN with micropillar, c) Enlarged needle tip of hMN without micropillar (i) and with micropillar (ii), which has the center of the oval pore located at 250 μm from the needle tip.

Table 8 hMNs used in this experiment.

	hMN ₁₀₀₀	hMN _{1000S}	hMN ₁₃₀₀	hMN _{1300S}	hMN ₁₅₀₀	hMN _{1500S}
Side view						
Top view						
Needle length (μm)	1,000	1,000	1,300	1,300	1,500	1,500
Micropillar length (μm)	---	950	---	950	---	950
Micropillar pitch (mm)	---	5.9	---	5.9	---	5.9

2.1.3. 実験動物

第1章と同様の試験方法を用いた。なお、すべての動物試験は城西大学動物試験規定に従い、城西大学動物実験管理委員会の承諾（JU22008 および JU23008）を得て実施した。

2.1.4. 投与部位の観察

三種混合麻酔下（塩酸メドミジン：0.2 mg/kg ミダゾラム：2 mg/kg 酒石酸ブトルフェール：2.5 mg/kg、*i.p.*）で腹部を剃毛した雄性ウィスターラットの腹部皮膚に精製水で調製した Rd-B 溶液（1 mg/mL）20 μ L を針本数を1本に加工した MicronJet™ および MN_{1300S} を用いて hMN 投与した。MicronJet™ を用いた Rd-B 溶液の投与は第1章と同様の方法で行なった。MN_{1300S} を用いた Rd-B 溶液の投与は、ウィスターラットの腹部皮膚を摘み、その皮膚の下に硬度 A25 の土台を置き、皮膚を張ることで表面硬度を A25 になるように調節した（Fig. 14）。皮膚硬度は JIS K 6253-2006 準拠のタイプ A デュロメーター（株式会社テクロック、岡谷、長野、日本）にて測定した（測定可能硬度範囲：1-100 A）。皮膚表面硬度を調節後、マニュアルシリンジの先端に中空型 MN を装着後、40-50 mm/s の速度で皮膚に対して垂直になるように手動で穿刺し、Rd-B 溶液を 10 μ L/sec の速度で注入した。hMN 投与後、ただちにデジタルマイクロスコープにて投与部位の観察を行なった。

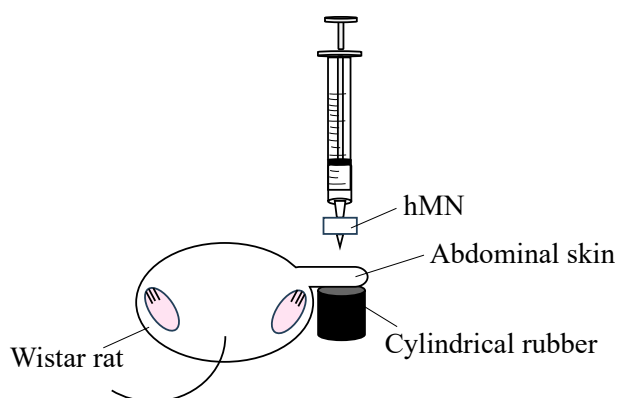


Fig. 14 Hardness adjustment of wistar rat abdominal skin.

2.1.5. *In vivo* 体内動態評価

第1章 1.1.4 と同様の試験方法で実施した。中空型 MN は針本数を1本に加工した MicronJet™ および hMN_{1300S} を使い、15.7 mg/mL 濃度の FD-4 溶液を 20 μ L、hMN 投与した。MicronJet™ を用いたラット腹部皮膚への穿刺・注入方法は第1章 1.1.4 の方法で実施し、hMN_{1300S} を用いた投与は本章 2.1.4 と同様の方法で行なった。

2.1.6. *In vivo* 穿刺試験

三種混合麻酔下（塩酸メドトミジン：0.2 mg/kg ミダゾラム：2 mg/kg 酒石酸ブトルフェール：2.5 mg/kg、*i.p.*）で腹部を剃毛した雄性ウィスターラットの腹部皮膚の下に硬度 A15 の円柱土台（直径 20 mm、高さ 20 mm）または A25 土台を置き皮膚を張ることで表面硬度が A15 および A25 になるように調節した。皮膚硬度はデュロメーターにて測定した。本試験では、皮膚硬度をヒトの腹部または前腕の硬さになるよう調節した。皮膚表面硬度を調節後、マニュアルシリンジの先端に中空型 MN を装着後、40-50 mm/s の速度で皮膚に対して垂直になるように手動で穿刺した。穿刺後、hMN を取り除いた穿刺部位に精製水で 10 mg/mL に調製した MB 溶液を 200 μ L 滴下し、3 分静置後、精製水で湿らせた脱脂綿で過剰な溶液を拭き取り、穿刺孔をデジタルマイクロスコープ（VHX-5000、株式会社キーエンス、大阪、日本）で確認した。なお、MB 溶液で穿刺孔がはっきりと染色された場合を穿刺成功とし、穿刺成功率を比較した。

2.1.7. *In vivo* 注入試験

本章 2.1.6 と同様の方法でラット腹部皮膚硬度を A15 または A25 に調節し、種々中空型 MN にて 40-50 mm/s の速度で穿刺し、Rd-B 溶液を 20 μ L 注入した。注入後、皮膚表面を脱脂綿で拭き取り、重量を測定することで皮膚への投与容量を算出した。投与容量に対して 90%以上（18 μ L）の注入された場合を注入成功とした。

2.1.8. ラット皮膚への注入溶液の分布確認試験

本章 2.1.6 と同様の方法でラット腹部硬度を A25 に調節し、種々中空型 MN にて 40-50 mm/s の速度で穿刺し、ヨウ素溶液を 20 μ L 注入した。注入後、皮膚表面を脱脂綿で拭き取り、重量を測定することで皮膚への投与容量を算出した。投与容量に対して 90%以上（18 μ L）の注入された場合を注入成功とした。注入した溶液の膨疹のサイズをノギス（新潟精機株式会社、三条、新潟、日本）で 0.05 mm まで測定した。また、測定した膨疹サイズから式 13 を用いて膨疹の面積を算出した。

$$Area = \pi \times (\text{maximum diameter}/2 \times \text{minimum diameter}/2) \quad (13)$$

また、上記と同様の方法でヨウ素溶液を注入し、X 線 CT（株式会社リガク）にて投与部位の薬液分布の観察を行った。ヨウ素溶液をラット腹部皮膚に中空型 MN にて投与後、CosmoScan GX II system（株式会社リガク）にて注入溶液を観察した。CosmoScan GX II の測

定条件は 1.1.3 と同様に設定した。得られたデータは Cosmo Scan Viewer Pack Software（株式会社リガク）にて解析した。

2.1.9. 人工皮膚モデルを用いた中空型 MN の穿刺特性試験

顆粒層以下皮膚の代替膜としてウレタンシート（厚さ 1.1 mm、ヤング率 0.42 MPa）を、角層の代替膜として使用報告のあるサランラップ（厚さ 10 μm ）を選択した^{92,93}。ウレタンシートのヤング率はヒト皮膚のヤング率（0.1~83 MPa^{66,73-75}）の範囲内であった。ウレタンシートの上にサランラップを重ね、皮膚人工膜とした。なお、サランラップの張り具合を調節することで表面硬度が A15 および A25 となるように調整した。Figure 15 に穿刺特性試験時の中空型 MN および皮膚人工膜の設置方法および試験から得られる試験力-ストローク曲線の一例を示す。中空型 MN が皮膚人工膜へ接触すると負荷がかかり、試験力-ストローク曲線が立ち上がる。中空型 MN によって角層代替膜として用いたサランラップが破断されると変位は大きく変化する（破断点）。その後、ウレタンシートが圧縮され、試験力-ストローク曲線は再度立ち上がる（Fig. 15 b）。

種々中空型 MN を人工皮膚モデルへ穿刺したときの破断点におけるそれぞれの最大荷重（N）および最大荷重時のストローク（mm）を万能試験機（EZ-SX、株式会社島津製作所、京都、日本）の圧縮モードにて測定した。中空型 MN は両面テープ（ニチバン株式会社、東京、厚さ 100 μm ）を貼付した接続アダプターにセットし、ロードセル（測定可能最大荷重 10 N）に取り付けた。ロードセルに取り付けた中空型 MN は 0.01 N の荷重が負荷されるまで 0.5 mm/min の速度で皮膚人工膜に押し付けた。試験は 3~4 回繰り返し行い、サランラップおよび中空型 MN は測定毎に交換した。得られたデータは Trapezium X（株式会社島津製作所）にて解析した。なお、両面テープの弾性特性は無視できるものとした。

穿刺した時の最大荷重が小さくかつ穿刺までのストロークが短い中空型 MN が穿刺性に優れていることを表す。試験力-ストローク曲線より、破断点時の試験力（N）、破断時のストローク（mm）、中空型 MN とサランラップ表面が接してからストローク 0.1 mm までに測定される試験力-ストロークの傾き（*slope A*）および破断点から手前のストローク 0.1 mm までの傾き（*slope B*）を穿刺パラメータとして試験力-ストローク曲線より得た。

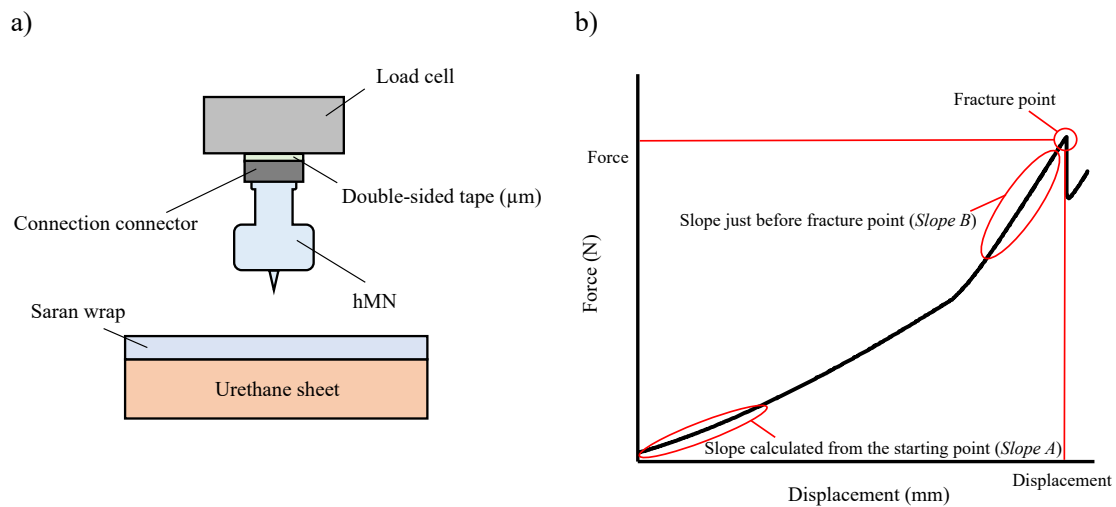


Fig. 15 Illustrated setup of evaluation of insertion properties of hollow MN with an artificial skin model (a) and a typical result of displacement-force profile (b).

2.1.10. 重回帰分析

重回帰分析は JMP[®] Pro version 17.0.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行なった。重回帰分析法としてステップワイズ法を採用し、決定係数 (r^2) を使用して最適な説明変数を選択した。また、ステップワイズ法により試験から得られたパラメータより選択した説明変数から R^2 値に基づき *in vivo* 注入の成功を予測する因子を選択した。本検討では説明変数として破断点時の試験力およびストローク、破断点直前の傾き、皮膚表面硬度、穿刺力および中空型 MN 有効長さを選択し、目的変数はヨウ素送液が 90%以上注入される確率を意味する *in vivo* 注入成功率とした。

第2節 結果

2.2.1. 投与部位の観察

第1章で用いた MicronJet™ は、針先穴を有した中空型 MN であった。一方、本章では、Fig.16 に示した通り、針先ではなく、針先端から 250 μm の位置に楕円状の穴を有している。MicronJet™ では、20 μL 投与では、投与薬液の一部が皮下に漏出していたものの、本章で用いた中空型の MN_{1300s} を用いた場合は、皮内への分布が 20 μL 投与でも完全な注入が確認され、さらに、20 μL 投与時に生じる膨疹のサイズも、MicronJet™ と比較して大きいことが確認できた (Fig. 16)。そこで、以下、本章では *i.d.* 投与容量を 20 μL とした。

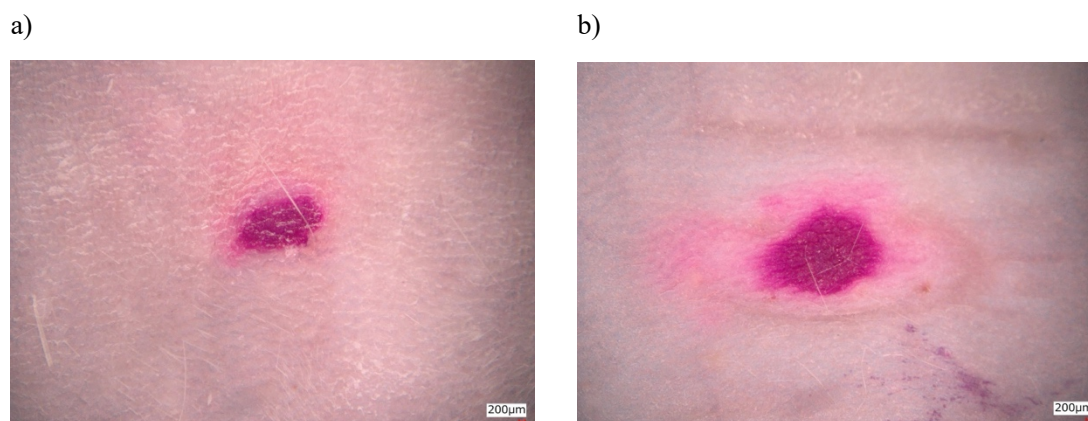


Fig. 16 Visible observation of the size of wheal after *i.d.* administration of 20 μL of Rd-B solution with MicronJet™ (a) and PLA-based hollow microneedle (b). A large wheal was observed by *i.d.* administration with PLA-based hollow microneedle.

2.2.2. 投与溶液の分布評価

Figure 17 に針本数を1本に加工した MicronJet™ および MN_{1300s} を用いてヨウ素溶液を 20 μL 投与した際の X 線 CT 撮影示す。PLA を基材とした中空型 MN は長さ 1300 μm の針で、針先のから 250 μm の位置に楕円 (長径 100 μm) の開口部を有している。PLA を基材とした中空型 MN で投与すると、MicronJet™ と比較してヨウ素は浅くかつ広範囲に分布していた。

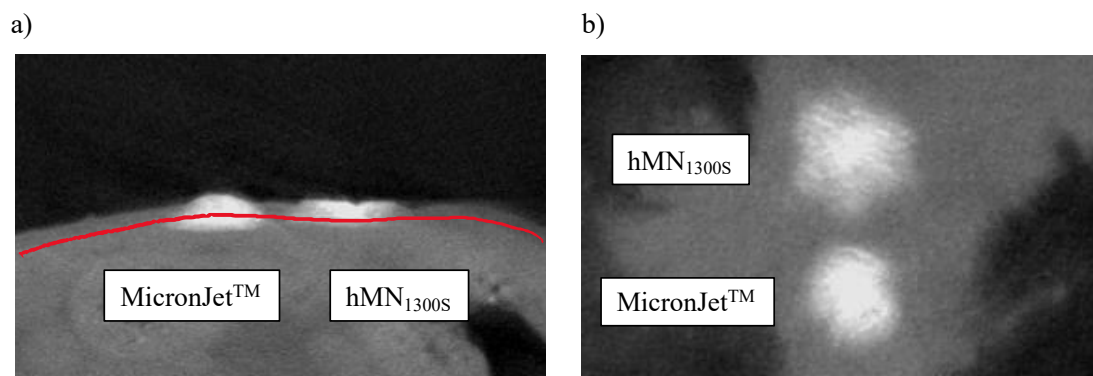


Fig. 17 X-ray analysis of iodine distribution in the skin after hMN injection of 3% iodine solution with different hMN. White areas indicate the distribution of iodine. The red line represents a depth of 800 μm from the surface. a) 20 μL administration with modified MicronJet™ (single-needle) and PLA-based hMN (single needle with the length of 1300 μm), and b) iodine distribution in photo observed from the top view.

2.2.3. 体内動態評価

Figure 18 に 1 本に加工した MicronJet™ および MN_{1300S} を用いて 15.7 mg/mL の FD-4 を 20 μL の容量で hMN 投与したときの血中濃度推移を、Table 9 に血中濃度プロファイルから得られた C_{max} および T_{max} を示す。PLA を基材とした 1 本針の中空型 MN を用いて FD-4 溶液を投与した場合、1 本に加工した MicronJet™ を用いて FD-4 の溶液を投与した場合と比較して T_{max} は短縮し、 C_{max} は増加傾向にあった。

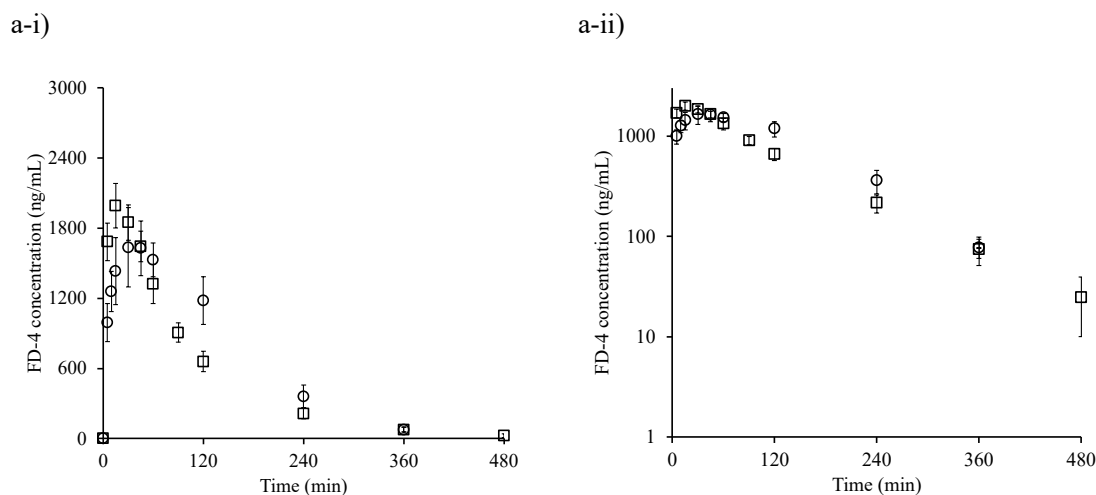


Fig. 18 Blood concentration–time profiles after hMN injection of FD-4 solution at a concentration of 15.7 mg/mL injected using different number of needles. The scale on the Y-axis is normal i) and logarithmic ii). hMN: Single needle type MicronJet™ (○) and Different designs of hMN (□). Administration volume: 20 μL (a-i, a-ii). The data represent mean ± S.D. (n=3-4).

Table 9 C_{max} and T_{max} obtained from blood concentration profiles of *i.d.* administration of FD-4 at concentration of 15.7 mg/mL injected with modified MicronJet™ (single-needle) and PLA-based hMN.

Volume	Route	Needle type	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)
20 μL	<i>i.d.</i>	Modified MicronJet™ (single-needle)	$1.9 \times 10^3 \pm 0.3 \times 10^3$	36 ± 8
		PLA-based hollow MN (hMN _{1300S})	$2.0 \times 10^3 \pm 0.2 \times 10^3$	15 ± 0

PLA: polylactic acid

Mean ± S.D. n=3-4

2.2.4. 中空型 MN 適用による *in vivo* 穿刺評価

PLA からなる種々中空型 MN をラット腹部皮膚に穿刺後、形成される穿刺孔を MB 溶液で染色し、評価した。MB はタンパク質との親和性が高いことから、傷のない正常皮膚では、短時間で色素が角層を浸透せず、検出されない。この特徴を利用して、MB を MN の穿刺確認評価に用いた。Figure 19 に示すように、MB 溶液滴下により形成された穿刺孔がしっかりと染色された場合を穿刺成功とした。Figure 19 に表面硬度 A15 皮膚に MN_{1300S} および MN₁₅₀₀ を適用した際の皮膚画像を示す。Table 10 に表面硬度 A15 および A25 の皮膚に種々中空型 MN を適用後の穿刺成功率を示す。hMN₁₀₀₀、hMN₁₃₀₀ および hMN₁₅₀₀ では、表面硬度 A25 皮膚へ適用するといずれの中空型 MN においても穿刺成功率は 100%を示した。一方で、表面

硬度 A15 皮膚へ適用した場合には穿刺成功率は針全長が長くなるにつれて向上したが、針全長が最も長い hMN₁₅₀₀ においても 90%の成功確率にとどまった。次に、針の穿刺に伴う皮膚形状の変化を抑制する目的で、中空型 MN の針周辺に長さ 950 μm の先端が丸みを帯びた支柱を配した hMN_{1000S}、hMN_{1300S} および hMN_{1500S} を用いた検討を行った。これらの中空型 MN を用いた場合には、表面硬度 A25 皮膚へ適用すると穿刺確率は MN_{1000S} では 40%、MN_{1300S} および MN_{1500S} では 100%の穿刺成功確率を示した。表面硬度 A15 皮膚へ適用した場合、MN₁₅₀₀ では穿刺成功確率は 90%にとどまったが、MN_{1500S} では 100%であった。MN_{1000S} および MN_{1300S} では、MN₁₀₀₀ および MN₁₃₀₀ と比較して、表面硬度 A15 皮膚では穿刺成功確率は低かった。なお、穿刺成功とした MB 溶液で染色されたすべての穿刺孔のサイズは 100 μm 以上を示した。穿刺孔の大きさは使用した中空型 MN の先端部分の直径の大きさとほぼ同程度であった。

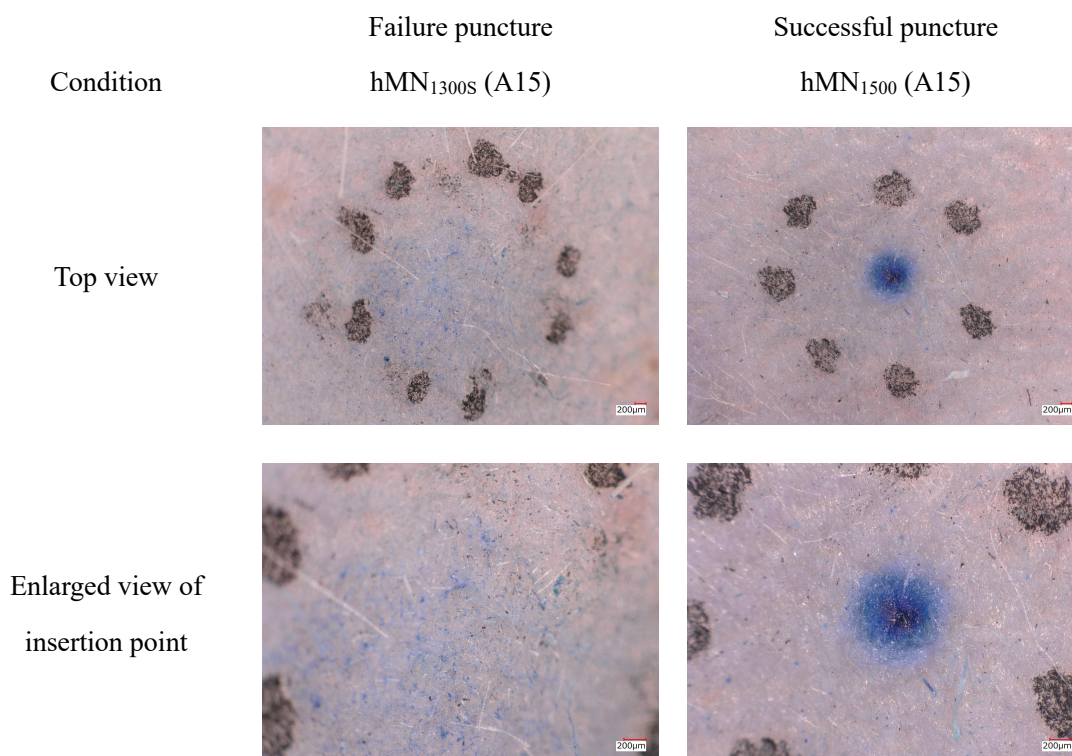


Fig. 19 A blue dye, 1% MN, was used to evaluate insertion of hollow MN into the skin. A distinct dye stained was confirmed for the successful injection. On the other hand, obscure blue dye stained was observed on the skin surface for the failure injection. Black dots was draw on the skin surface before insertion, for the purpose of identifying the insertion site later. Scale bar shows 200 μm.

Table 10 Successful insertion rate into the skin with different types of hMN[#]

Skin stiffness	MN ₁₀₀₀	hMN ₁₃₀₀	hMN ₁₅₀₀	hMN _{1000S}	hMN _{1300S}	hMN _{1500S}
A15	4/10	7/10	9/10	3/10	3/10	10/10
A25	10/10	10/10	10/10	4/10	10/10	10/10

[#]Successful rates were calculated by ten-times repeated experiments

2.2.5. 中空型 MN 適用による *In vivo* 注入評価

種々中空型 MN を用いて Rd-B 溶液をラット腹部皮膚に 20 μ L 注入し、注入成功率を評価した。Table 11 に種々中空型 MN を用いて Rd-B 溶液を投与した際の注入成功率を示す。表面硬度 15 皮膚において、注入成功率は支柱なしの中空型 MN おいても針全長が長くなるにつれて向上したものの、注入成功率は、A25 皮膚と比較して低値であった。一方、支柱を有する中空型 MN は、hMN_{1000S} のみ A15 皮膚への注入が確認できなかったものの、他の条件では皮膚表面硬度とは関係なしに支柱を持たない中空型 MN と比較して注入成功率は高くなる傾向が確認された。

Table 11 Successful injection rate of Rh-B solution into the skin with different type of hMN[#]

Skin stiffness	hMN ₁₀₀₀	hMN ₁₃₀₀	hMN ₁₅₀₀	hMN _{1000S}	hMN _{1300S}	hMN _{1500S}
A15	1/10	1/10	3/10	0/10	2/10	4/10
A25	2/10	5/10	9/10	4/10	9/10	9/10

[#]Successful rates were calculated by ten-times repeated experiments

2.2.6. X 線 CT による中空型 MN で投与したヨウ素溶液の分布確認

Figure 20 に中空型 MN を用いて硬度 A25 のラット腹部皮膚にヨウ素溶液を 20 μ L 注入した際の X 線 CT 観察画像を示す。灰色の部位は皮膚、白色の部位はヨウ素溶液を示している。なお、結果は注入に成功した例のみを示す。ヨウ素溶液の分布は hMN₁₀₀₀、hMN_{1000S}、hMN₁₃₀₀ および hMN_{1300S} と比較して hMN₁₅₀₀ および hMN_{1500S} では皮膚深部で観察された。なお、赤いラインは皮膚深度 800 μ m を示す。

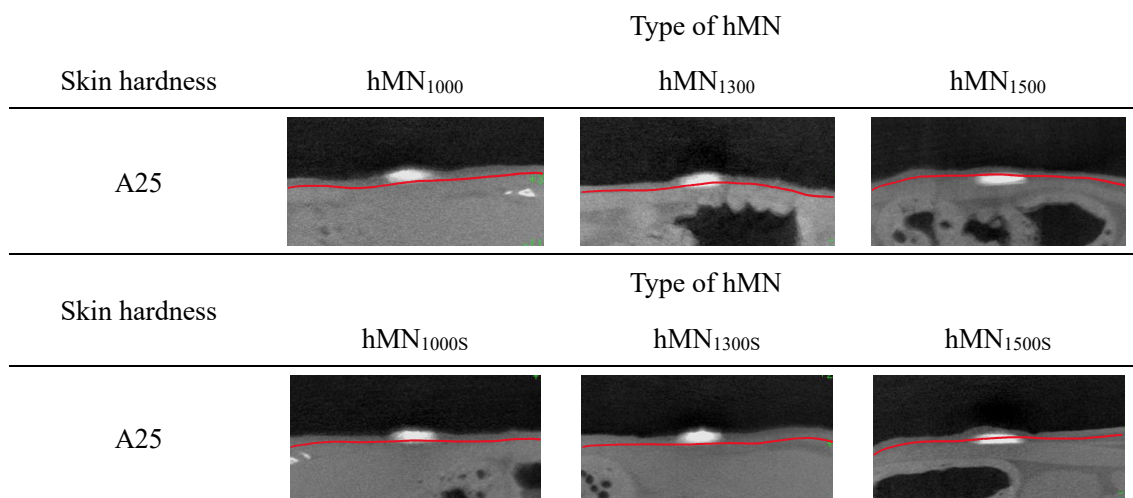


Fig. 20 Evaluation of iodine distribution in the skin just after injection with X-ray μ CT imaging. White color indicates the distribution of iodine, an X-ray tracer. The red line represents a depth of 800 μ m from the surface.

2.2.7. 中空型 MN にて溶液投与直後の膨疹サイズおよび深度評価

種々中空型 MN にてヨウ素溶液投与直後に形成される膨疹のサイズをノギスで測定した。また、最も深い位置に到達しているヨウ素溶液の皮膚表面からの垂直方向の深度を Cosmo scan viewer pack software を用いて数値化した。皮膚表層に溶液を注入すると溶液が注入されていない周囲の皮膚よりも隆起した膨疹が観察される。そのため、Fig. 21 a の赤色破線で示すように、皮膚表面からのヨウ素溶液の分布の深さは周囲の隆起していない皮膚を起点として算出した。なお、本検討では、薬液の注入成功率の高い表面硬度 A25 皮膚でのみ評価した。

Figure 21 b に表面硬度 A25 皮膚へヨウ素溶液を注入した際に皮膚表面に形成された膨疹の長半径および短半径から計算した膨疹面積と X 線 CT により測定したヨウ素溶液の最大深度の関係を示す。Figure 21 b に示すデータはヨウ素溶液の注入に成功した例の膨疹面積および溶液最大深度を表しており、注入が失敗した場合のデータは含まれていない。注入成功率が低値であった hMN₁₀₀₀ を除く中空型 MN にて評価し、成功率にかかわらず、注入に成功した 4 例のデータを示している。なお、hMN₁₃₀₀、hMN_{1300S} および hMN₁₀₀₀ の中空型 MN にてヨウ素溶液を投与すると、溶液の深度は約 800 μ m であり、面積 10 mm² 以上の大きな膨疹が確認されたが、hMN₁₅₀₀ および hMN_{1500S} では 10 mm² 未満または膨疹は確認されなかった。また、膨疹が確認された hMN₁₃₀₀ では膨疹の大きさにばらつきが確認された。hMN₁₅₀₀ およ

び hMN_{1500S} の中空型 MN を用いてヨウ素溶液を投与した場合、投与した溶液は皮膚の皮下の深い部位に分布していた。

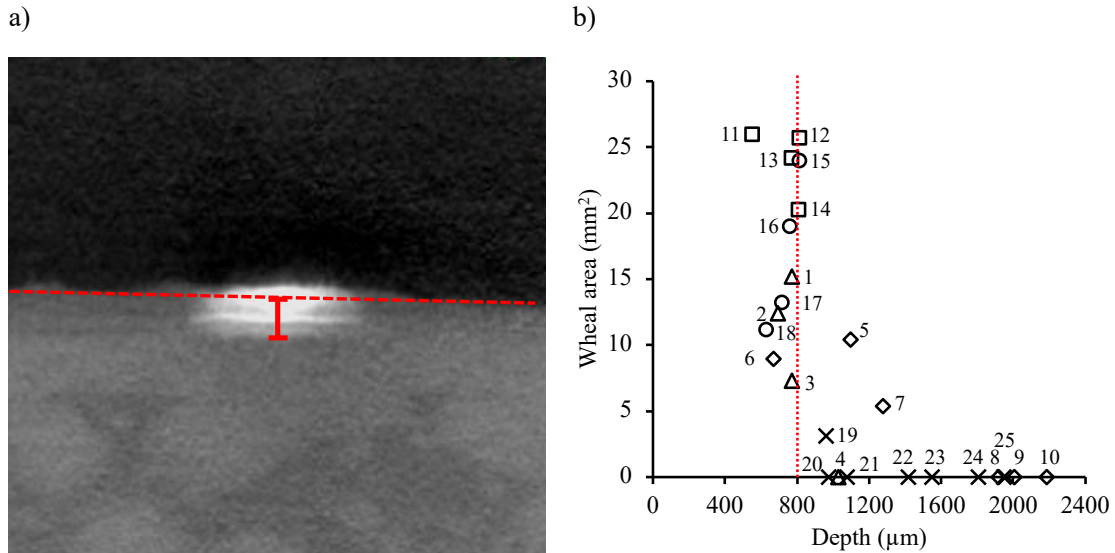


Fig. 21 An example of the measurement of the distribution depth of iodine (a) and relationship between wheal area and distribution deepest depth of iodine (b).

Observed wheal area was calculated from the measurement size (maximum and minimum diameters) with vernier scale ($\text{Wheal area} = \pi \times (\text{maximum diameter} / 2 \times \text{minimum diameter} / 2)$). The depth of iodine distribution from the skin surface was calculated based on the position of the unelevated skin (shown in a red line), as shown in Fig. 21a. Symbols; □: hMN_{1000S}, △: hMN₁₃₀₀, ○: hMN_{1300S}, ◇: hMN₁₅₀₀, ×: hMN_{1500S}. The number adjacent to symbol (1 to 25) shows the experimental number. Regardless of successful injection rate four cases of successful injection of iodine solution were used.

2.2.8. 試験力-ストローク曲線

Figure 22 に人工皮膚膜に種々中空型 MN を穿刺した際の試験力-ストローク曲線を示す。ほとんどの試験条件において、応力は中空型 MN のストローク (変位) の増加に伴って穿刺応力が增大した後、膜の破断による急激な応力低下が確認された。hMN₁₀₀₀、hMN₁₃₀₀、hMN₁₅₀₀ および hMN_{1500S} を用いた試験ではいずれの人工皮膚膜の硬度条件においても破断点が認められた。試験力-ストローク曲線から得られた各種パラメータを Table 12 に示す。角層代替膜の破断に要する力は、硬度 A15 よりも A25 の条件下で穿刺した場合において低いことが示された。hMN₁₀₀₀ を硬度 A15 の人工皮膚膜に穿刺した際の破断力は 0.33 N であり、支柱

を有さない中空型 MN のすべての条件の中で最も高い値を示し、また、破断点直前の曲線から算出した *slope B* も最も高い値を示した。hMN_{1000S} では、破断力は硬度 A15 および 25 の試験条件でそれぞれ 2.16 N および 1.50 N、*slope B* はそれぞれ 2.61 N/mm および 2.03 N/mm を示し、これらの値は hMN₁₀₀₀ よりも高い値であり、かつすべての中空型 MN の中で最も高い値を示した。hMN₁₃₀₀ および hMN_{1300S} を比較した場合、支柱を有する hMN_{1300S} で破断力および *slope B* の値は高くなる傾向を示した。hMN_{1000S} および hMN_{1300S} を比較すると hMN_{1300S} の方が破断力および *slope B* の値は低値を示した。hMN₁₅₀₀ および hMN_{1500S} においては、硬度 15 および 25 の試験条件において、支柱の有無にかかわらず破断力および *slope B* の値はほぼ同値を示した。硬度 15 の試験条件のみ、hMN₁₅₀₀ と比較して hMN_{1500S} で *slope B* が高い値を示した。針全長が同じ中空型 MN を比較すると、hMN₁₅₀₀ を除いた硬度 A15 および A25 のいずれの試験条件においても支柱を有する中空型 MN の方が破断に必要な応力およびストローク値は大きくなる傾向にあった。

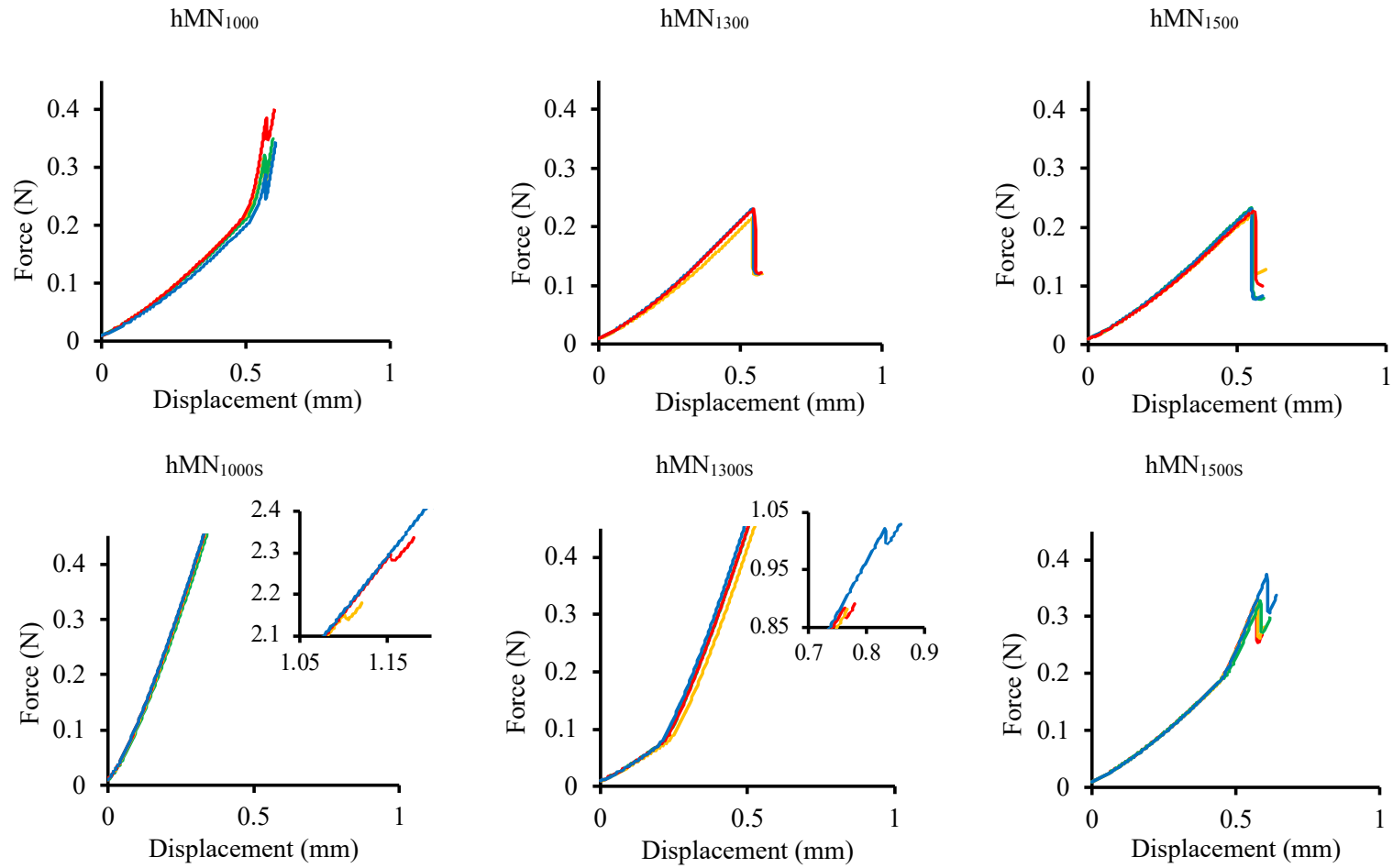


Fig. 22 Displacement-force profiles. The enlarged profiles of hMN_{1000S} and hMN_{1300S} were displayed to indicate the fracture points.

Continued to the next page

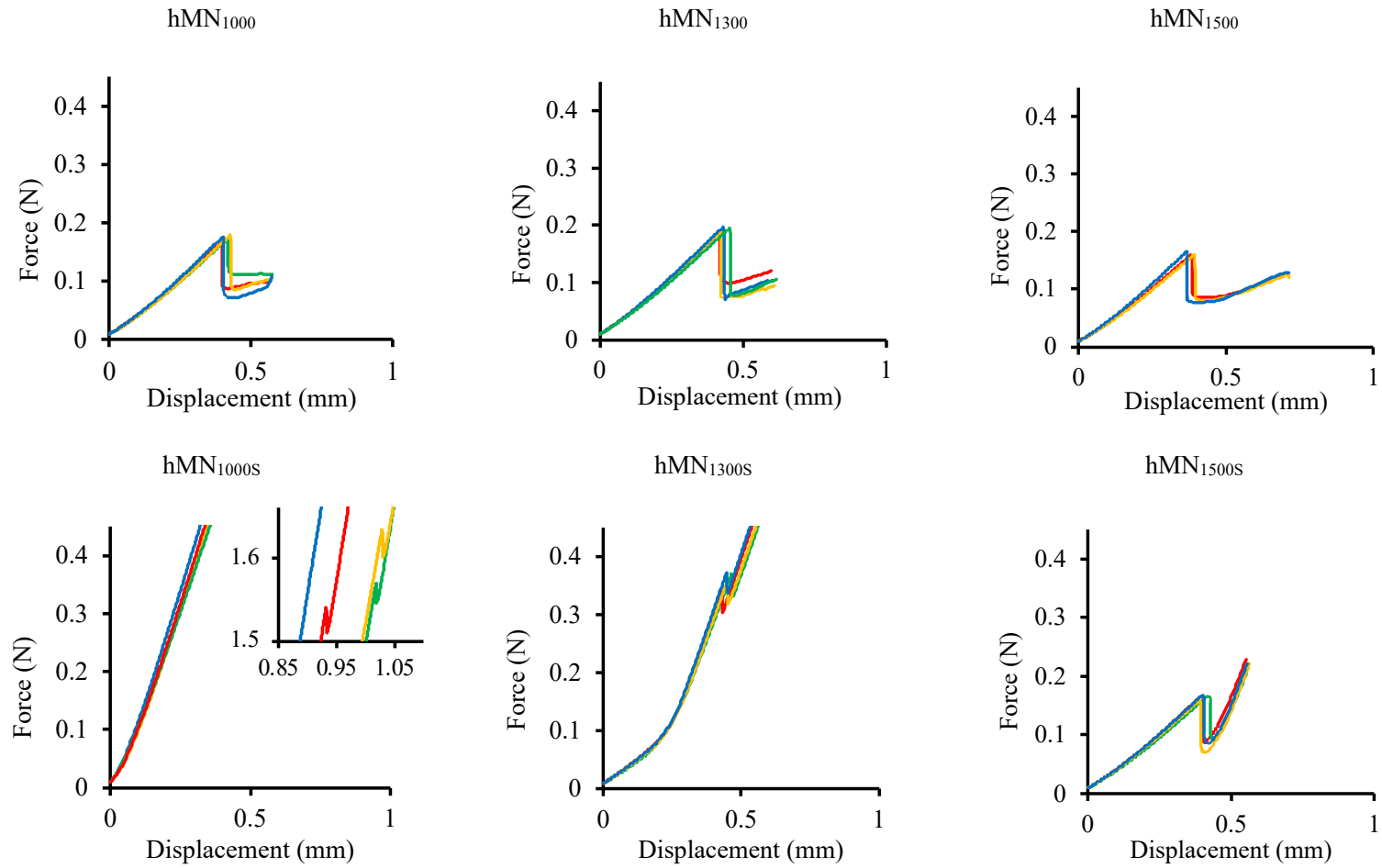


Fig. 22 Displacement-force profiles. The enlarged profiles of hMN_{1000s} was displayed to indicate the fracture points.

Table 12 Parameters the obtained from force-displacement profile.

Hardness of membrane	Type of hMN	Puncture force (N)	Displacement (mm)	<i>Slope A</i> (N/mm)	<i>Slope B</i> (N/mm)
A15	hMN ₁₀₀₀	0.328 ± 0.041	0.567 ± 0.004	0.275 ± 0.015	1.230 ± 0.398
	hMN _{1000S}	2.157 ± 0.132	1.106 ± 0.048	0.983 ± 0.035	2.614 ± 0.049
	hMN ₁₃₀₀	0.226 ± 0.009	0.545 ± 0.005	0.271 ± 0.015	0.468 ± 0.008
	hMN _{1300S}	0.872 ± 0.116	0.754 ± 0.059	0.272 ± 0.010	1.725 ± 0.047
	hMN ₁₅₀₀	0.229 ± 0.006	0.554 ± 0.006	0.274 ± 0.007	0.449 ± 0.031
	hMN _{1500S}	0.346 ± 0.027	0.591 ± 0.018	0.285 ± 0.005	1.208 ± 0.049
A25	hMN ₁₀₀₀	0.174 ± 0.007	0.409 ± 0.018	0.321 ± 0.011	0.442 ± 0.025
	hMN _{1000S}	1.580 ± 0.025	0.994 ± 0.053	0.934 ± 0.036	2.032 ± 0.135
	hMN ₁₃₀₀	0.193 ± 0.005	0.432 ± 0.017	0.344 ± 0.013	0.470 ± 0.010
	hMN _{1300S}	0.361 ± 0.014	0.450 ± 0.015	0.313 ± 0.017	1.329 ± 0.045
	hMN ₁₅₀₀	0.160 ± 0.003	0.382 ± 0.011	0.324 ± 0.018	0.448 ± 0.018
	hMN _{1500S}	0.165 ± 0.004	0.397 ± 0.006	0.311 ± 0.011	0.439 ± 0.008

Slope A: Slope calculated from the starting point

Slope B: Slope calculated from the position before the fracture position

Mean ± S.D. n=3-4

2.2.9. 重回帰分析

Figure 23 に試験力-ストローク曲線より得られたパラメータを説明変数とし、*in vivo* 注入成功率を目的変数として重回帰分析を行なった結果を示す。回帰モデルは変数増減法により統計的に有意 ($p < 0.001$) な変数の選択を行い、最適化した。その結果、*in vivo* 注入確率は破断時のストローク、破断点直前の傾き、膜の表面硬度および中空型 MN の針全長を説明変数とした式 14 が得られた。得られた式より、*in vivo* 注入成功率は *Slope B*、膜の表面硬度および中空型 MN の針全長の値が増大すると高くなり、破断時のストロークが増加すると低くなることが示された。

$$\begin{aligned}
 \text{Successful injection rate (\%)} = & \\
 & -63.3 \times \text{displacement (mm)} + 27.0 \times \text{Slope } B \text{ (N/mm)} + 4.50 \times \text{membrane stiffness} \\
 & + 105 \times \text{needle array length (mm)} - 173 \quad (14) \\
 & (R^2=0.93, p<0.001)
 \end{aligned}$$

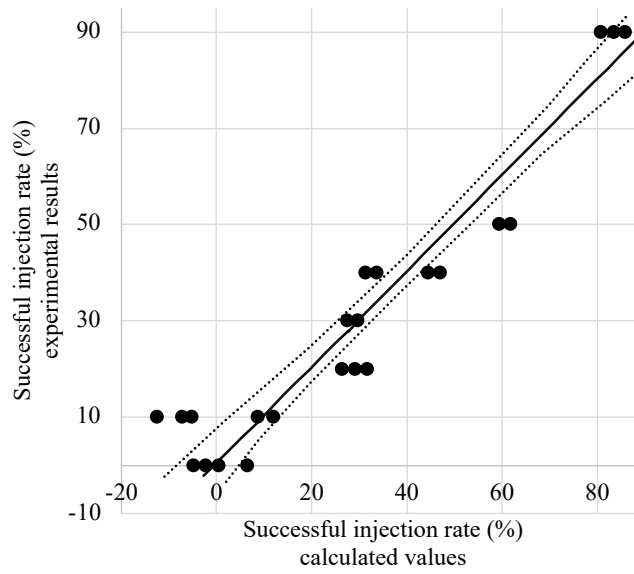


Fig. 23 A regression analysis to reveal the relationship between successful injection rate (%) and parameters that obtained from displacement-force profile. Solid line represents the regression line, dash line represents the corresponding 95% confidence interval.

第3節 考察

PLA を基材とした中空型 MN を用いた体内動態の評価では、MicronJet™ を用いた場合と比較して、 T_{\max} の短縮が認められた。 C_{\max} は高値を示したが有意差は認められなかった。X線 CT の結果から、中空型 MN の設計の違いにより注入した溶液の分布が異なることが示された。溶液が浅く分布する中空型 MN で FD-4 溶液を投与した場合に T_{\max} の短縮および C_{\max} の増加傾向が確認されたことから、第1章でも明らかとなったように、溶液の分布は吸収動態に影響を及ぼす因子であることが示された。これらの結果より、穿刺・注入性に加えて、穿刺深度制御が必要であることが示唆された。中空型 MN の皮膚への確実な穿刺および薬液の生体内への確実な投与は一定の BA を得るために非常に重要である。特に、投与時における中空型 MN の皮膚への穿刺ができない、または穿刺が不十分であることによる薬液の皮膚上の漏れは BA の著しい低下につながる。Ailin ら⁶⁷⁾は MN の穿刺性が低くなる原因として、MN 穿刺時の皮膚の変形が影響していると報告している。このことから、中空型や中空型 MN の皮膚への高い穿刺性を実現するためには針の配列や長さなどのデバイス設計が必要となる。本検討では hMN₁₅₀₀ と比較して hMN_{1500S} では高い穿刺性が得られることを示した (Table 10)。また、重回帰分析の結果より、膜の表面硬度および中空型 MN の針の長さが *in vivo* 注入成功確率に大きく影響する因子であることが示され、一方で、*Slope B* の増大は、中空型 MN の針以外の部位との接触を意味し、注入成功率低下につながると考えられたが、注入性を向上する要因であると示された (Fig. 23)。

MN の皮膚穿刺性に関しては、Seunghee ら⁶⁸⁾は溶解型 MN において、溶解型の薬物搭載針に一定の高さの土台を設置することで針の全長を長くし、皮内への薬物送達効率を向上させることに成功している。Matthew ら⁶⁹⁾が皮膚のひずみと剛性について反比例の関係があることを報告しており、Pramudita ら⁷⁰⁾は刃による皮膚への押し切り試験より、著しく皮膚変形が認められる箇所の高いひずみが確認できることを報告している。本検討の *in vivo* 穿刺性評価において、硬度 A15 の皮膚へ穿刺を行なった場合、硬度 A25 の膜と比較して穿刺成功確率は低値であった。硬度 A15 の皮膚では、中空型 MN を皮膚へ押し付けた際、皮膚のひずみにより針周辺の皮膚が盛り上がり、中空型 MN の土台と接触するため、皮膚穿刺が妨げられ、穿刺性が低下したと考えられた。皮膚のひずみと剛性には反比例の関係があることから、個人差により剛性が多様な皮膚に対して MN を確実に穿刺するためには、針押しあて部位周辺の皮膚変形を小さくするための MN 設計が必要であると考えられた。

第1章にて、中空型 MN を用いて薬物を皮膚へ投与した場合、 S_{upper} および S_{deeper} からの吸収速度が異なり、 S_{upper} でより速いことが示唆されており、薬物の皮膚内での深さ方向の分

布を制御することが体内動態を制御する上で重要な要素であることを示している。すなわち、速やかな吸収を期待する場合には、投与溶液を皮膚の浅い部位に確実に送達することが望まれる。Römgens ら⁷¹⁾は経皮 MN ワクチンの免疫応答に及ぼす MN 配列の影響について調査し、表皮および真皮における活性化された抗原提示細胞の比率は MN の長さが長くなるにつれ減少すると報告している。したがって、MN による薬物投与は確実な穿刺性と穿刺深度制御の両方を可能とする設計が重要であると考えられる。

In vivo 注入評価より、硬度 A25 の条件において hMN_{1300S}、hMN₁₅₀₀ および hMN_{1500S} を用いて Rd-B 溶液を注入した場合、注入成功確率は高い値を示した。また、hMN₁₅₀₀ および hMN_{1500S} においては、溶液注入後、皮膚に膨疹は確認されなかった。X 線 CT の解析結果より、hMN₁₅₀₀ および hMN_{1500S} の中空型 MN でヨウ素溶液を投与した場合、注入溶液は皮下である皮膚表面から 800 μm 以上の深さに分布していることが、皮膚に膨疹が生じないことと関係すると考えられた (Fig. 21 b)。すなわち、hMN₁₅₀₀ および hMN_{1500S} で溶液を投与すると、注入した溶液が皮内だけではなく皮下にも投与され、膨疹が確認されなかったと考えられる。hMN_{1300S} を投与に用いた場合、10 mm² を超える膨疹がすべてのケースで確認された一方で、同じ針長さである hMN₁₃₀₀ では 10 mm² を超える膨疹が確認されるケースもあったものの、膨疹が確認されない場合もあり、膨疹サイズにばらつきが認められた。これは、支柱がない場合には注入深度がばらついていることを示唆しており、したがって、中空型 MN に支柱を設けることは、注入深さの制御において有効であると考えられた。しかし、hMN_{1300S} を用いて投与を行なった場合でも、支柱があるにも関わらず膨疹サイズに 11 mm² から 24 mm² とばらつきが見られた。皮膚組織は細胞が緻密に存在しているため、投与部位の状況のわずかな違いにより、生じる膨疹のサイズに変化が現れる可能性があり、膨疹のサイズを定量的に取り扱うことには制限があると考えられる。しかし、X 線 CT による溶液の分布および膨疹サイズの結果より、膨疹形成が認められたケースについては本検討で使用したラット腹部皮膚の真皮の深さに対応する 800 μm より浅い深度に溶液は位置しており、一方、膨疹形成が認められなかった例については 800 μm 以下の皮下にも溶液が分布していたことから、ある一定面積以上の膨疹が認められかつ溶液の漏れ出しがない条件が、確実な投与と速やかな吸収を期待する上で理想的であり、その二つを基準として皮内への投与成功を判定することが妥当であると考えられた。

上述したように、支柱の設置により注入溶液の深さ方向の分布を制御できると考えられる。しかし、hMN_{1000S} および hMN_{1500S} の場合、支柱を有するものの、注入溶液の注入成功率と分布深度は理想的ではなかった。人工皮膚モデルを用いた穿刺特性評価より、hMN_{1000S} は、

硬度 A15 の場合、角層代替膜を破断するために高い応力およびストローク値が必要であった。これは hMN_{1000s} の有効長さ（針全長-支柱長さ）が小さいことが原因であると考えられる。すなわち hMN_{1000s} では、針が人工皮膚膜に接触し膜がわずかに変形後、ただちに支柱が膜に接触したことにより針の先端への負荷応力が減少し、膜を破断するために必要な応力が増加したと考えられた。一方、hMN_{1500s} では、角層代替膜の破断に必要な応力は硬度 A15 で 0.35 N、硬度 A25 で 0.17 N と hMN₁₅₀₀ とほぼ同値（それぞれ 0.29 N および 0.16 N）を示し、また、硬度 A25 の人工皮膚に適用した場合の試験力-ストローク曲線から得られた穿刺特性パラメータは、支柱を持たない hMN₁₀₀₀、hMN₁₃₀₀ および hMN₁₅₀₀ とほぼ同値を示した。これは、角層代替膜破断時のストローク値が hMN_{1500s} の有効長さである 550 μm よりも小さい値であり、hMN_{1500s} では支柱が人工皮膚膜に接触する前に角層代替膜を破断したためだと考えられ、したがって hMN_{1500s} は有効長さが過剰であると判断できる。これらに対して hMN_{1300s} は有効長さが適切であり、硬度 A25 の人工皮膚膜に適用した場合、角層代替膜の破断に必要な応力および *slope B* は高値であるが、ストロークの値は前述した hMN₁₀₀₀、hMN₁₃₀₀ および hMN₁₅₀₀ とほぼ同値であり、人工皮膚膜を針で押した場合、針先端部分の膜は下方方向に、針周辺の膜は上方方向への変形が起こることと考え合せると、hMN₁₃₀₀ と角層代替膜の破断に必要な応力は異なるものの、ストローク値はほぼ同値であり、hMN_{1300s} では針による角層代替膜の破断と支柱の接触がほぼ同時に起こっている可能性が考えられた。

2.2.3 体内動態評価に示した結果も hMN_{1300s} を用いた結果であり、理想的な吸収動態が確認されている。したがって、ラット腹部皮膚への安定した穿刺および皮内への注入を可能とする中空型 MN の形状として hMN_{1300s} は適切なものであり、このことは用いた人工皮膚膜が妥当なものであったことを意味すると判断することもできる。

試験力-ストローク曲線の *Slope B* の増大は、中空型 MN の針の先端以外の部位とのプローブの接触を意味していることから、注入成功率低下につながると考えられたが、角層代替膜の破断試験結果より、支柱が中空型 MN の針先端が膜に接触することで起こる皮膚のひずみを軽減する役割を有し、重回帰分析の結果において注入性成功率に *Slope B* が正の効果を表す理由として、このひずみを防ぐ効果が関わっていると考えられた。

本検討では、中空型 MN の穿刺特性および注入成功率を硬度 A15 および A25 の条件で評価した。一般的に皮膚の硬さは体の部位によって異なり、皮膚の物性はヤング率で表されることが多い。本検討で設定した硬度を変換式⁷²⁾によりヤング率に変換するとそれぞれ 0.56 MPa および 0.92 MPa となる。*In vivo* における皮膚の生体力学的特性を測定する方法として最も多く利用されている手段の一つである押し込み試験により算出されたヒト皮膚の腹部

および背部のヤング率はそれぞれ 4.02 MPa⁷³⁾および 83.3 MPa⁷⁴⁾であり、吸引試験より求めたヒト前腕内側部のヤング率は 0.1~2.4 MPa の範囲にある⁷⁵⁾。このことから、本検討での試験条件はヒトの前腕内側部の皮膚に MN を適用した場合に近いと考えられ、またラットの腹部皮膚も同じレベルにあると推察できる。本検討の結果より、膜の硬度は *in vivo* 注入成功率を高める要因の一つであることが示されており、多様な使用方法や個人差を考慮すべき臨床適用を実現するためには、さらなる解析が必要である。本検討では、中空型 MN の針自体の形状、支柱の形状および針と支柱のピッチ間隔などが穿刺成功率および注入成功率に及ぼす要因について検討は行なっていない。これらの要因が穿刺性の向上に寄与することは他の研究者によって報告されているので^{76, 77)}、これらの要因も調査対象に加えることで、実臨床においても高い穿刺成功率および注入成功率を達成し、理想的な吸収動態を得ることが可能な中空型 MN の設計が可能となると考えられる。

第4節 小括

第2章では、支柱を有する hMN_{1300S} を用いることで高い穿刺性および確実な皮内への投与が行えることを示した。また、中空型 MN を用いた溶液の穿刺・注入成功率は、皮膚の硬度に依存するが、針全長および支柱の配置により改善可能であることを明らかにした。本検討での結果は中空型 MN の設計に非常に有益な情報を提供すると考えられる。特に支柱は注入する溶液の深度制御に有用であり、また穿刺により変形した皮膚と MN の土台との接触を防止する役割も期待できる。硬度 A25 の試験条件において、*in vivo* 注入成功率は最大 90%であったが、中空型 MN による薬物の確実な投与は実臨床における多様な皮膚の状態においても達成しなければならない。したがって、皮内への確実な薬物送達を可能とするためには、中空型 MN の針と支柱の距離、針形状などのさらなる要因を調査する必要がある。さらに、安定した穿刺を行うために、穿刺デバイスなどのアプリーケーターの使用を検討する必要も考えられる。また、本検討では溶液の注入量を 20 μ L と設定し、hMN_{1300S} を用いてラット腹部に適用して、20 μ L の皮内への注入が可能であることを示したが、溶液の注入量により皮膚内の分布は変化する可能性があり、またその影響は皮膚の部位や動物種により異なることも考えられる。したがって、溶液の総注入量や針あたりの負荷容量に関係する針の本数や針間の距離の影響も明らかにしていく必要がある。

3 章 外部 IP デバイスと中空型 MN 併用の予備的検討

近年、遺伝子組み換え技術や細胞培養技術により生産されるタンパク質を有効成分としたバイオ医薬品が世界の医薬品の売り上げの上位を占めている。バイオ医薬品は分子量が数万から数十万と大きく、消化管から吸収されないため現在最も汎用されている錠剤やカプセル剤などの経口製剤は使用できず、投与手段としては *s.c.* もしくは *i.v.* 注射が主となっている。バイオ医薬品は一般的に高額であり、患者に経済的負担を課すだけでなく各国の医療保険制度の健全な運営にも悪影響を及ぼしている。さらに、注射を用いた薬物投与は医療従事者の助けが必要であるため、患者は治療を受けるために頻回通院や入院が必要となる。これらの問題を解決するには (1) 低コストでのバイオ医薬品の開発、(2) 頻回投与を必要なく血中濃度を維持することができるバイオ医薬品の開発、(3) 自己投与型バイオ医薬品の開発が手段として挙げられる。すでに、患者が自分で投与できる自己注射製剤も上市されているが、侵襲的であり、乳幼児や高齢者などの介護が必要な患者には自己投与による服用管理は困難である。また、バイオ医薬品の注射投与では *infusion reaction* が副作用として発現することがある⁷⁸⁾ため、投与量や投与速度をコントロールする必要がある。

皮膚は薬物の適用部位として最もアクセスが容易である投与経路であるが、皮膚の最大のバリア機能である角層が存在しており、角層を突破するための手法として中空型 MN やエレクトロポレーション (EP)¹⁰⁾、サーマルポレーション⁷⁹⁾およびイオントフォレシス (IP)¹¹⁻¹³⁾等、様々なデバイスが開発研究されてきた。これらのうち、IP は皮膚に比較的弱い電流を適用することで角層上に適用した薬物の透過を高める方法として広く研究されている。IP は、電気反発 *electrorepulsion* を駆動力とするだけでなく、陽極から陰極への溶媒流である *electroosmosis* も駆動力とすることができる⁸⁸⁾。そのため、薬物の電荷の有無にかかわらず皮膚透過を促進することが可能であり、これまでに、皮膚上に適用した中分子薬物の透過性を IP 負荷により透過が促進させることが報告されている³⁹⁾。しかし、物理的促進法は、IP や EP のように角層上にデバイスを置いて薬物の透過を促進させる方法や MN、無針注射器⁸⁰⁾などの皮下または皮内に直接薬物を投与する方法であり、これらの技術に付随して生じる *i.d.* 投与後の薬物の組織移行性や全身循環系へ移行を制御する方法に関する問題についてはほとんど研究がなされていない。第 1 章にて、中空型 MN にて *i.d.* 投与した薬物の吸収性は、薬液の皮内分布の影響を受け、*S_{upper}* や *S_{deeper}* からの中高分子薬物の全身移動速度が異なることを明らかにし、皮膚および皮下における薬物の分布が吸収過程における重要な要因であることを示していることから、本章では、負電荷もしくは電荷を持たない中性の低分子およ

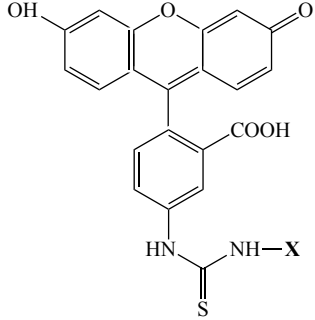
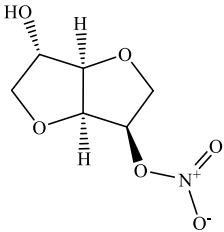
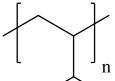
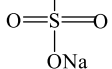
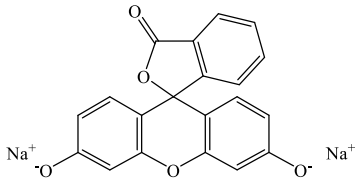
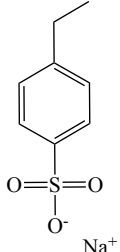
び中分子を選択し、電気反発力や電気浸透流により薬物の皮膚拡散性・移動性の修飾が可能な IP を用いた場合における、中空型 MN にて皮内に投与された後の薬物の皮内動態における変化の可能性について予備的な検討を行うこととした。なお、1 章および 2 章ではラット腹部皮膚を投与部位としていたが、使用する薬物の定量感度の問題や、高容量（数百 μL ）での投与が難しいことからラット皮膚よりも膜厚（1.0～1.5 mm⁷⁾ のあるブタ皮膚を用いて、皮膚を 400 μm の厚みに薄切し、その部位に直接薬液を投与することで中空型 MN にて皮内に投与された状況を模倣した。中空型 MN にて薬液を投与したときは、1 章および 2 章で示したように、針注入部位を中心として円柱状もしくは楕円柱状に皮内で水平方向に薬物溶液が広がるとともに、皮膚上層（角層方向）と皮膚下層（皮下組織を含む部位）に薬物溶液は広がるので、本検討での皮膚上層（角層を含む）と皮膚下層の特定の面に薬液を投与することは実際の薬液分布とは異なるが、*i.d.* 投与後の薬物吸収は、真皮の浅い部位に存在する毛細血管網と真皮のより深部に位置する毛細血管を介して生じると考えられており^{文献}、*in vitro* で薬物の皮膚内移動動態を解析した結果は、全身循環系への薬物の吸収速度を予想するために利用可能と考えた。なお、本検討では、高容量の薬液を均一に投与するために、製剤に粘性を付与した。

第 1 節 実験方法

3.1.1. 試薬および実験材料

Fluorescein sodium salt (FL-Na)、は富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入したものを用いた。Sodium 4-ethylbenzenesulfonate (SA)、isosorbide 5-mononitrate (ISMN) は、東京化成工業株式会社 (東京、日本) から購入したものを用いた。FD-4 (*M.W.* 4,000)、FD-10 (*M.W.* 10,000) および sodium polystyrene sulfonate (*M.W.* 4,000, PSA-4 および *M.W.* 10,000, PSA-10) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入した。Hydroxypropyl cellulose (Grade H, HPC) は、日本曹達株式会社 (東京、日本) より購入した。その他の溶媒および試薬は市販の液体クロマトグラフ (HPLC) 用または特級品を用いた。なお、これらの溶媒および試薬は分析グレードであり、精製せずにそのまま用いた。Table 13 に本研究に用いたモデル化合物の構造式および分子量 (*M.W.*) を示す。

Table 13 Chemical structure and molecular weights of various compounds.

Charge	Compound	Chemical structure	<i>M.W.</i>
Nonelectrolyte	FD-4		4,000
	FD-10	<p>X = Dextran</p>	10,000
	ISMN		191.1
Anion	PSA-4		4,300
	PSA-10		10,000
	FL-Na		376.3
	SA		208.2

3.1.2. 実験試料

食用として飼育されていた三元豚の耳介（ブタ耳介）を全農飼料畜産中央研究所（つくば、茨城、日本）から購入し、搬入後は -30°C で冷凍保存した。

3.1.3. 種々ドナー溶液の調製

FL-Na は 0.5 mM 、ISMN、SA、FD-4、FD-10、PSA-4 および PSA-10 は 10 mg/mL となるよう 5% HPC 水溶液を用いて粘性溶液として調製し、これを投与溶液とした。

3.1.4. 真皮透過試験

冷凍状態のブタ耳介皮膚を 32°C の温水中にて解凍した。解凍後、ブタ耳介の皮膚の表面を傷つけないよう丁寧に精製水で洗った。水分をよく拭き取り、バリカンとシェーバーを用いて剃毛し、精製水で皮膚表面を再度洗った。その後、メスを用いてブタ耳介皮膚を切り取り、ハサミを用いて真皮側の脂肪を丁寧に取り除いた。摘出したブタ耳介皮膚の真皮側をダーマトーム（GA670 アキュラン 3Ti デルマトーム、ビー・ブラウンエースクラップ株式会社、メルズンゲン市、ヘッセン州、ドイツ）にて薄切し、厚さ $1,000\ \mu\text{m}$ に調整後、さらに上部皮膚 $400\ \mu\text{m}$ および下部皮膚 $600\ \mu\text{m}$ の二枚に薄切した。皮膚厚はハンドクリッパー（SM-112、シックネスゲージ、株式会社テクロック、長野、日本）を用いて測定した。なお、本検討ではブタ耳介皮膚の外耳皮膚のみを用いた。

薬物溶液 $200\ \mu\text{L}$ を処理したブタ耳介皮膚の上部皮膚と下部皮膚（面積 1.77 cm^2 ）の間にディスペンサーを用いて投与（ $200\ \mu\text{L}/1.77\text{ cm}^2$ ）し、縦型拡散セル（セル容量： 6.0 mL 、有効透過面積： 1.77 cm^2 ）に挟んだ（Fig. 24）。レシーバ溶液として pH7.4 の $1/30\text{M}$ リン酸塩緩衝生理食塩水（PBS） 6.0 mL を真皮側に充填した。なお、この上部皮膚と下部皮膚の間への薬液投与により中空型 MN にて薬液を *i.d.* 投与した状態を模倣したが、上部皮膚に MN 処理により生じる孔の形成などを行っていない。

試験中、真皮側のセルはマグネティックスターラーで常時攪拌した。経時的に真皮側から 0.5 mL 採取し、その都度、同量の PBS を補充した。

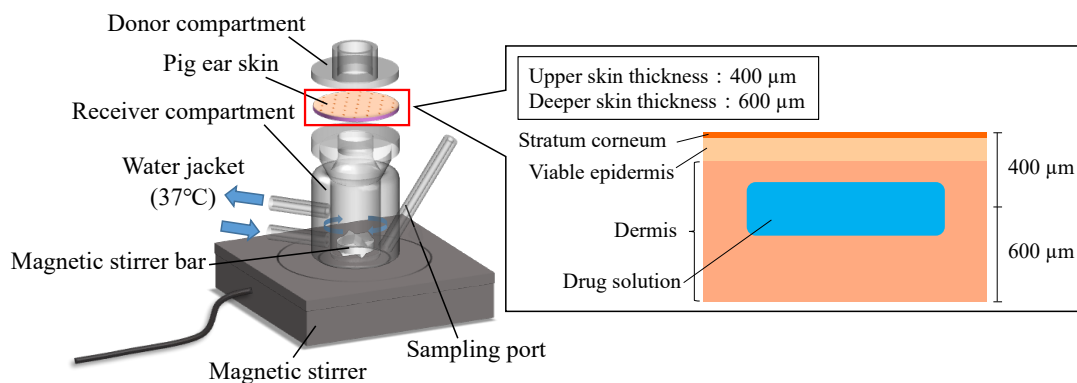


Fig. 24 Set-up of vertical type diffusion cell for dermal skin permeation.

3.1.5. IP 適用条件

Figure 25 に IP 適用時の模式図を示す。Cathodal IP の場合、角層側に陰極を、真皮側に陽極となるよう電極を設置した (Anodal IP は電極の配置を角層側に陽極、真皮側に陰極とした)。IP 装置として VI1002 (プレサイスゲージ株式会社、静岡、日本) を用い、陽極には Ag 電極を、陰極には AgCl 電極をセットし、電流密度が 0.3 mA/cm^2 と一定になるよう電圧を負荷した。なお、IP は、透過試験開始時より終了時まで負荷した。この電極の設置状態は、*in vivo* で IP を実施する場合と異なるが、実験により得られる薬物の深さ方向への移動の動態は、*in vivo* における薬物全身移行を予測するための有用な情報になると考えた。

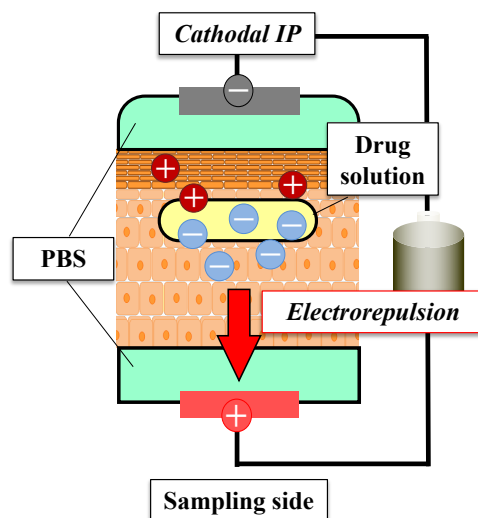


Fig. 25 Schematic Representation of the Experimental Setup for IP Application.

Electrode setting in the case of cathodal IP (*vice versa* for anodal IP). Each electrode is in PBS, whereas the drug solution is applied in the skin tissue.

3.1.6. 各薬物の定量方法

真皮透過試験で得られた FL-Na、FD-4 および FD-10 のサンプル溶液 200 μL を石英ガラスセル (T-9-UV-10-1、東ソー・クォーツ株式会社、東京、日本) に注入し、分光蛍光光度計 (RF-5300PC、株式会社島津製作所、京都、日本) を用いて測定し、各薬物濃度を求めた。FL-Na の励起波長は 485 nm、発光波長は 535 nm とし、FD-4 および FD-10 の励起波長は 490 nm、発光波長は 520 nm とした。

真皮透過試験で得られた ISMN、PSA-4 および PSA-10 サンプル溶液はアセトニトリルと 1 : 1、PSA-4 および PSA-10 サンプル溶液は 6 : 4 の割合で混和した後、遠心分離器 (HimacCT15RE、日立工機株式会社、東京、日本) で遠心分離 (21,500 \times g、5 min、4 $^{\circ}\text{C}$) し、その上清 (ISMN は 10 μL 、PSA-4 および PSA-10 は 30 μL) を HPLC に注入した。用いた HPLC システムは送液ユニット (LC-20AD、株式会社島津製作所)、インジェクタ (SIL-20AC、株式会社島津製作所)、カラムオープン (CTO-20AC、株式会社島津製作所)、UV-VIS 検出器 (SPD-M20A、株式会社島津製作所) または分光蛍光検出器 (RF-10AXL、株式会社島津製作所)、システムコントローラ (CBM-20AC、株式会社島津製作所) から成り、ISMN は ODS カラム (Inertsil[®] ODS-3、5 μm 、4.6 \times 150 mm、ジーエルサイエンス、東京、日本) を用い、波長 220 nm とし、PSA-4 および PSA-10 はポリマー系 SEC 用カラム (GF-7M HQ、

レゾナック・ホールディングス、東京、日本) を用い、励起波長 267 nm、発光波長 381 nm で分析した。なお、流速は ISMN は 1.0 mL/min、PSA-4 および PSA-10 は 0.6 mL/min とした。移動相は ISMN はアセトニトリル：精製水=10：90、PSA-4 および PSA-10 はアセトニトリル：50 mM リン酸水素二ナトリウム溶液=10：90 を用いた。得られたデータは分析データ処理システム (LC solution、株式会社島津製作所) を用いて解析した。

真皮透過試験で得られた SA サンプル溶液はアセトニトリルと 75：25 の割合で混和した後、遠心分離器で遠心分離 (21,500 × g、5 min、4°C) し、その上清 8 μL を超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) に注入した。用いた UHPLC は送液ユニット (LC-30AD、株式会社島津製作所)、インジェクタ (SIL-30AC、株式会社島津製作所)、カラムオープン (CTO-20AC、株式会社島津製作所)、UV-VIS 検出器 (SPD-20A、株式会社島津製作所)、システムコントローラ (CBM-20A、株式会社島津製作所) から成り、ODS カラム (Shim-pack GIS C18、2 μm、3.7 × 75 mm、株式会社島津製作所) を用いし、波長 254 nm で分析した。得られたデータは分析データ処理システム (LCsolution、株式会社島津製作所) を用いて解析した。なお、流速は 0.8 mL/min とし、移動相はアセトニトリル：0.1%リン酸溶液=25：75 を用いた。

第2節 結果

3.2.1. 真皮透過試験

Figure 26 に皮内投与した薬物の真皮透過性に及ぼす IP 負荷の影響について示す。低分子薬物は、中分子薬物よりも皮膚中での拡散性が高いため、試験時間を 4~6 時間とし、一方中分子薬物は、試験時間を 8~60 時間とした。中分子薬物である FD-4 および FD-10 は、アニオン性である PSA-4 および PSA-10 の試験時間より短くして実施した。その理由としては、FL-Na を含め、FD-4 および FD-10 は蛍光物質であり、その定量感度は溶液中の pH によって変化するので、IP を長時間適用することによるレシーバー溶液の pH 変化を試験時間を短くすることで回避することを意図したことによる。なお、FD はデキストランをフルオレセインイソシアネートにて標識した薬物であり、フルオレセインイソシアネートは pH 7.4 の PBS 中では負に荷電するが、標識したデキストランの寄与が大きいことから中性薬物として取り扱った。アニオン性低分子である FL-Na と SA および非解離型の中性低分子である ISMN (Figs. 26 a, b, c) は、IP 負荷 (Anodal および Cathodal IP) の有無に関わらず高い透過性を示した。その透過率は 4~6 時間で 70%以上であった。すなわち、低分子薬物では非解離型薬物 (ISMN) はもちろんのことアニオン型薬物 (FL、SA) も皮内拡散に及ぼす IP の効果はほとんど見られず、濃度勾配をエネルギーとする薬物移動が中心であることが確認された。また、非解離型中分子である FD-4 や-10 (Figs. 26 e, g) では、低分子薬物と比較して真皮透過性は低下したものの、低分子薬物と同様に透過性に及ぼす IP 負荷の影響は認められなかった (Figs. 26 d, f)。非解離型中分子薬物の透過率は低分子薬物と比較して約 1/10 であった。一方、アニオン性中分子薬物である PSA-4 や-10 (Figs. 25 e, g) においては、Cathodal IP 負荷により薬物透過性が顕著に促進された。Cathodal IP によって促進された PSA-4 および PSA-10 の透過率は 70 および 60%に増加し、低分子薬物の ISMN、FL-Na および SA の透過率と同程度であった。中分子薬物である FD および PSA の Anodal IP 適用群では IP 未処理と比較して透過量に差が認められなかった。促進効果が確認された PSA-4 および PSA-10 を比較すると PSA-10 は PSA-4 と比較して促進率は増加した。また、PSA-4 においては Anodal IP による透過抑制効果が認められた。

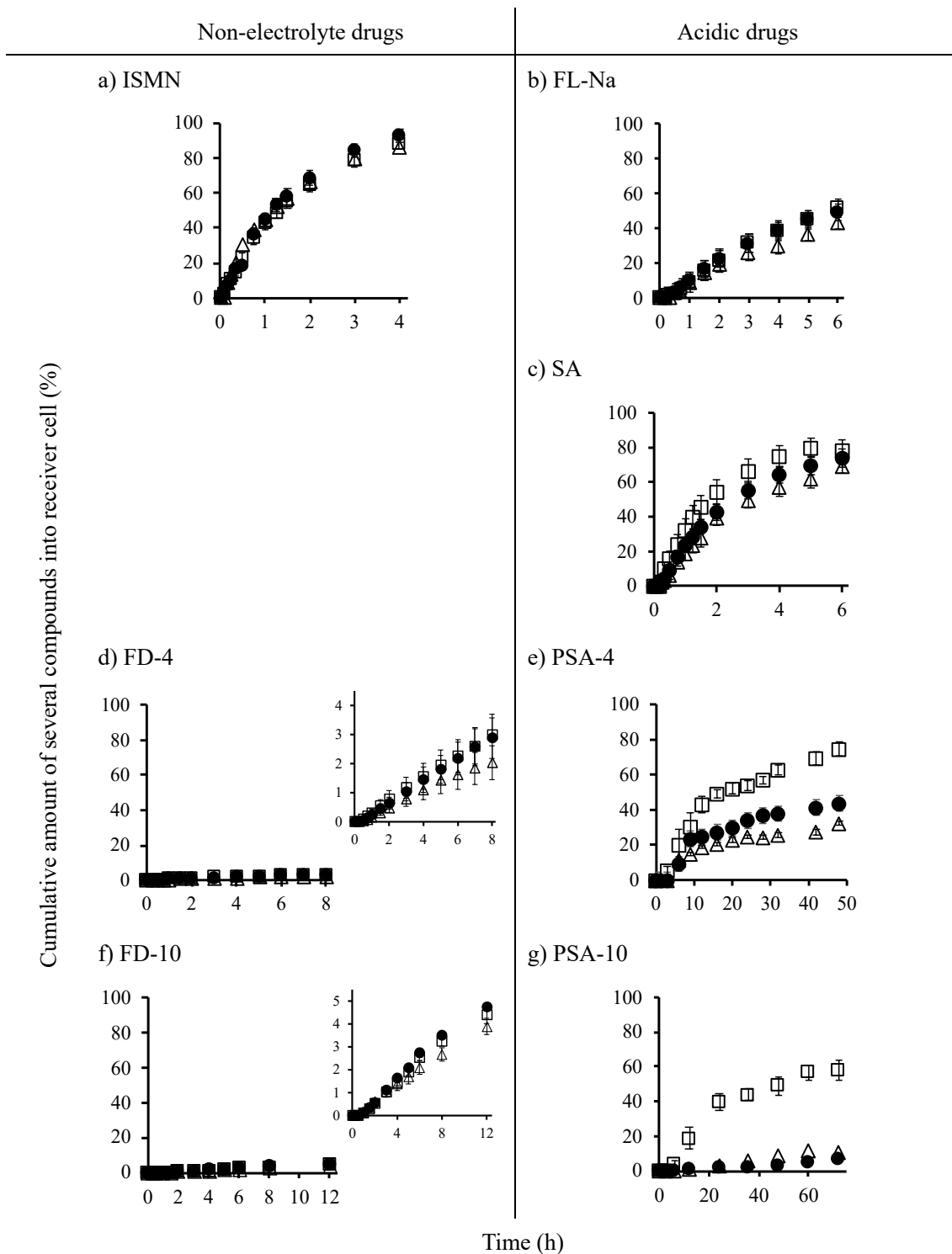


Fig. 26 Effect of IP on the Time Course of the Cumulative Amount of Several Drugs Migrating from Excised Skin through the Dermis End to the Receiver. Symbols: \square : cathodal IP, Δ : anodal IP, \bullet : without IP. Each point represents the mean \pm standard error (S.E.) (n = 4).

3.2.2. 真皮膜透過速度論の解析

真皮透過試験からの薬物透過プロファイルは以下の Korsmeyer-Peppas 式 15⁸¹⁾で解析した。もし、薄切した下層の真皮は均一な拡散膜とみなすことができ、また、薬物の真皮内の拡散が瞬時に起こり、真皮全層を均一な薬物含有マトリックスとみなすことができなどの条件が整えば、式 15 を用いた状況の理解が可能となる。

$$Q = kt^n \quad (15)$$

ここで、 Q は時間 t における単位面積当たりの累積薬物透過量、 k は透過速度定数を示す。 $n=0.5$ の場合、単純なマトリックスにおける Fick の法則に従う拡散 (Fickian 拡散) に対応し、薬物透過量プロファイルは W. I. Higuchi のマトリックスからの薬物放出式と一致する⁸²⁾。これは、上述の真皮が均一な薬物含有マトリックスとなっている条件と一致する。一方、薬物の真皮内の拡散が比較的遅く、投与溶液が薬物リザーバーとして機能する場合、真皮下層が均一な拡散膜として機能し、 n 値は 1.0 を示し、透過速度プロファイルは 0 次となる。 n の値が 0.5 より大きく 1.0 より小さい場合 ($0.5 < n < 1$) non-Fickian 拡散となり、溶媒の浸透などによる膜の膨潤などが推察できる。

本検討では式 15 を 15' に変換し、薬物透過プロファイルを解析した。

$$\log Q = \log k + n \log t \quad (15')$$

Table 17 に算出した n 値の結果を示す。低分子薬物ではすべての条件で n 値は 0.5 (0.43-0.69) を示した。一方、非解離型中分子 (FD-4 および FD-10) ではすべての条件にて n 値は 1.0 (0.85-1.10) を示した。また、Cathodal IP 適用群において、PSA-4 および PSA-10 の n 値は IP 適用から 24 時間までは 1.0 (0.98 および 1.08) を示したが、時間の経過とともに透過の実測値は予測される値よりも低値を示した。

Table 17 n -Value in Eqs. 15 and 15' for Several Drugs.

Drug category	Drug	Drug conc.	n		
			Without IP	Cathodal IP	Anodal IP
Acidic with medium	PSA-4	10 mg/mL	1.06	0.95	0.69
<i>M.W.</i>	PSA-10	10 mg/mL	1.01	1.08	1.04
Non-electrolyte with	FD-4	10 mg/mL	1.08	1.01	0.85
medium <i>M.W.</i>	FD-10	10 mg/mL	1.10	1.02	0.94
Acidic with low <i>M.W.</i>	FL-Na	0.5 mM	0.59	0.69	0.66
	SA	10 mg/mL	0.54	0.43	0.66
Non-electrolyte with	ISMN	10 mg/mL	0.57	0.65	0.56
low <i>M.W.</i>					

Each n -value was obtained by double logarithmic plotting as follows: $\log Q = \log k + n \log t$ Eq. (15').

第3節 考察

第3章では中空型 MN にて薬液を *i.d.*投与した状況を想定し、投与後の薬物の皮膚内での移動が IP を併用した場合に変化するか *in vitro* にて検討した。表皮を透過する薬物の透過速度は、真皮中での拡散や血管への取り込み過程、皮膚血流速度が律速過程にならなければ、血中への吸収速度とみなすことができる⁸³⁾。一方、第1章において、中空型 MN にて *i.d.*投与した薬物の吸収性は、薬液の皮内分布の影響を受け、 S_{upper} からの吸収速度は S_{deeper} からの吸収速度より速いことを明らかにし、このことは、表皮から血管が存在する真皮への移動は吸収において必要であるが、真皮から皮下への移動は吸収速度の低下を引き起こすことを意味している。また、吉田ら⁸⁴⁾は、*i.d.*投与した体内動態に及ぼす薬物の分子量について報告している。今回の異なる分子量のモデルを用いた検討において、*i.d.*投与した低分子薬物は電荷の有無に関わらず、すべての薬物において IP 適用による促進効果が得られなかった。Korsmeyer-Peppas 式より薬物の透過挙動を解析したところ、*i.d.*投与後の低分子薬物の透過挙動は Higuchi 式に従い、*i.d.*投与した低分子薬物は、実験開始直後に速やかに真皮膜中に均一になるよう移動し、その後時間の経過とともに薬物がレシーバ中に放出していき、その過程に IP は影響しないと考えられた。同様に FD-4 および FD-10 においても IP に適用による促進効果は得られなかったが、低分子薬物を用いた場合の結果と異なり、FD-4 および FD-10 の透過速度が時間に依存しない 0 次挙動を示したことから、実験開始直後の真皮膜中への移動は生じることなく、真皮での移動が律速過程となることが示された。

Figure 27 に、中分子薬物における皮膚中濃度-吸収方向プロファイルを仮想的に示す。Figure 27 での皮膚中濃度-吸収方向プロファイルは、 n 値の算出に用いた薬液を皮内に適用して皮膚中濃度が定常状態となった時間（真皮透過速度が一定に到達した時間）から Fig. 26 での時間スケールで 8 時間程度後までのプロファイルに対応する。皮膚深度 400 μm の上層皮膚における薬物の移動係数は厚さ 600 μm の下層皮膚での移動係数と同様であることが期待できるが⁸⁵⁾、角層のバリア機能が顆粒層以下皮膚のバリア機能よりもはるかに高いことから、角層における薬物の移動速度は顆粒層以下皮膚よりもはるかに低く、角層へ薬物はほとんど移動せず、角層下から薬物溶液適用部位まで中分子薬物の濃度勾配は認められないと仮定した ($dC/dx = 0$, Fig. 27)。皮内に薬物を適用後、中分子薬物は顆粒層以下皮膚に拡散し、角層下部の方へ均一に分布し、一方皮膚下部へはレシーバーがシンク条件に保たれているため薬物濃度が直線的に減少する濃度勾配が得られると考えられるが、その後の時間経過において適用部位の濃度減少がわずかであることから、 $n=1$ の 0 次の移動速度が見られたと考えられる。一方、低分子薬物では、Fig. 27 に示すような直線的な皮膚中濃度-吸収方向プ

ロファイルを示すことはなく、曲線的なプロファイルを示すことが推察できる。また、本検討では、分子量サイズに関わらず薬物を 5% HPC 溶液に溶解させ適用している。薬物の拡散性は、分子量の 3 乗根や粘性に反比例することが知られている⁸⁶⁾。中分子薬物の場合は、分子サイズの大きさもあり、HPC を基材として用いたことによる粘性の増大にともなう薬物拡散性の低下が、投与部位において投与溶液がリザーバーとして機能したことに影響している可能性も考えられた。

PSA-4 および PSA-10 においては、Cathodal IP にて透過促進効果が確認された。透過挙動は FD-4 および FD-10 と同様に膜制御型の放出を示した。PSA-4 および PSA-10 が FD-4 および FD-10 よりも高い促進効果を示した理由の一つとして電荷の有無が考えられる。つまり、PSA-4 はアニオン性であるため、負電荷を有しているが、FD-4 は電荷を有していない。そのため、*i.d.*投与された PSA-4 および PSA-10 は、電気反発力の作用を受け、FD-4 および FD-10 よりも透過性が高かったと考えられる⁸⁷⁾。なお、Cathodal IP の効果が時間とともに減少したが、その原因のひとつとして、電圧値の増加が確認されたことから (約 1 V→10 V)、Ag および AgCl 電極の消耗が考えられた⁸⁷⁾。また、PSA-4 においては、Anodal IP による透過抑制効果が確認された。これは正極と PSA-4 の負電荷が引き合うことで、皮膚深部への拡散性が低下し、PSA-4 の透過が抑制されたと考えられる。一方で同様に負電荷である PSA-10 は透過抑制効果が確認されなかった。PSA-4 よりも PSA-10 は分子量が大きく、皮膚内の拡散性が低いため、正極と PSA-10 の負電荷が引き合う効果が低減したことがその理由として考えられる。さらに水の溶媒流である *electroosmosis* の効果が透過促進に寄与したため、PSA-10 では透過抑制効果が見られなかったと推察できる。

Guy ら⁸⁷⁾は、皮膚上に適用した薬物に対する IP において、高分子薬物は低分子薬物と比較して促進率が高いことを報告している。本検討により、皮内投与した PSA においても PSA-4 と比較して分子量が大きい PSA-10 は促進効果が高く、分子量が向上するにつれて透過促進率は向上することが示された。IP は角層に適用した薬物の透過性を促進すること期待した技術であるが、本検討では、IP が電荷を有する中分子薬物の皮内移動を促進させることを示したが、低分子薬物では効果が得られないことも明らかにした。本研究結果より、中空型 MN にて投与した電荷を有する分子量 4,000 程度の中分子薬物の全身への吸収性の評価において、IP 負荷により皮内移動が促進されることも考慮すべきであることが示唆された。

Medium molecular weight drugs

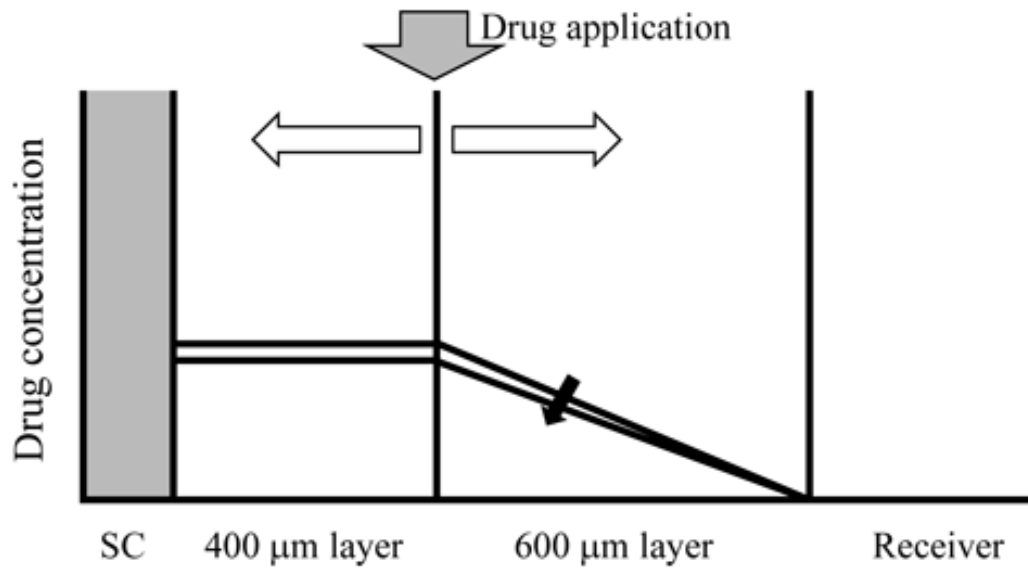


Fig. 27 Schematic Diagram of Concentration–Distance Profiles after Drug Application at 400 μm from the Skin Surface.

Open arrows indicate the intradermal migration direction of drugs, and closed arrows indicate the concentration decrease with the passage of time after drug application.

第4節 小括

本検討では、*i.d.*投与した高分子量のイオン型薬物の皮内拡散を修飾する方法として IP が利用できることが示した。第1章では、中分子モデル薬物 FD-4 の中空型 MN を用いた *i.d.*投与後の血中濃度は投与後速やかに上昇したことから、同程度の分子量を有する荷電した薬物および皮膚内での拡散性が高い低分子薬物の IP 併用による皮膚内移動の促進は、その促進自体があまり期待できず、また逆に皮下への移送の促進が吸収性の低下の要因になることも考えられた。一方、IP 併用による促進効果は、皮膚内での拡散が極端に遅い分子量が大きい分子、例えば、分子量数万程度のペプチド等の吸収速度を高める方法として優れているのかもしれない。すなわち、IP による皮内動態制御に基づく薬物吸収の促進は限られた物性をもつ薬物でのみでしか利用可能ではない。IP を皮膚に負荷するのではなく、**electroosmosis** による電気浸透流を駆動力とし、中空型 MN に充填された薬液を皮内に送液することができるマイクロポンプとしての利用するのであれば、幅広い物性を有する薬物への利用が可能であると考えられた。

結論

近年、医薬品開発のパラダイムシフトが進んでおり、低分子医薬品だけでなく抗体や核酸医薬品などの開発が盛んに行われるようになった⁹¹⁾。抗体や核酸医薬品の主な投与方法は注射であり、治療を受けるために通院が必要となることから、解決する手段の一つとして投与製剤の自己投与製剤化が注目されている。これら製剤の自己投与部位として筋肉、皮下および皮内が挙げられ、MEMS 技術の発展により MN などの新しい投与デバイスの開発が進んだこともあり、皮内への薬物送達が目されている。ワクチンを皮内投与すると、その *s.c.* 投与や *i.m.* 投与と比較して少量で高い感染予防効果が得られることが報告されたことも、皮内への薬物送達手法が目された一因となった。

このような背景のもと、様々なタイプの MN が開発され、世界中で医薬品投与デバイスとして利用すべく MN の研究開発が進んでおり、なかでも中空型 MN は、中実型 MN と比較して高い薬物用量を投与可能であることに注目が集まり、いまさらに確実な穿刺性や薬物注入性を有する中空型 MN の開発が望まれている。また、中空型 MN にて特定の領域（皮内）に薬物を投与するためには、針の長さなどの中空型 MN のデザインだけでなく、投与容量も関係する。そこで、本検討では、中空型 MN にて投与した薬物の皮内分布が体内動態に及ぼす影響について、種々投与容量を用いて検討した（第 1 章）。次に、中空型 MN の穿刺・注入性に及ぼす要因を明らかにするため、針の長さだけでなく、針の穿刺に伴う皮膚形状の変化制御を目的とした支柱を有する中空型 MN を用いた検討を皮膚人工膜を用いて評価した（第 2 章）。最後に、薬物の経皮吸収において、IP などの電場を駆動力としたデバイスは、薬物の皮内動態を促進する手法として数多くの研究報告がなされていることから、中空型 MN と IP を併用し、中空型 MN で皮内投与した薬物の IP 負荷による皮内動態制御の可能性について調査した（第 3 章）。

第 1 章では、モデル中分子薬物として FD-4 を選択し、異なる薬物投与容量および濃度の異なる薬物をラット腹部皮膚に投与した。その結果、投与容量の増加にともない、 T_{max} の遅延および C_{max} の低下を確認した。投与容量の増大に伴う、薬物体内動態の変化を明らかにするため、異なる容量の X 線造影剤（ヨウ素溶液）をラット腹部皮膚に投与し、X 線 CT によりそれぞれの投与容量におけるヨウ素溶液の皮膚中分布を確認したところ、投与容量が増加するにつれて皮内投与した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。*i.d.* 投与した薬物の、皮膚の浅い層 (S_{upper}) および深い層 (S_{deeper}) からの 2 つの吸収速度の

異なるルートからなるコンパートメントモデルを構築し解析を行なった結果、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。また、MN を皮膚に穿刺することで、皮膚表層の毛細血管の深度が 430 μm から 240 μm と浅くなり、血管密度が 9%から 40%に増加することが OCT 観察画像から確認されている⁴⁹⁾ことから、これらの変化も MN により投与した薬物の吸収性が投与容量の増加に伴い変化する要因であると推察された。また、同容量の薬液を分割投与 (5 μL ×4 回) することで単回投与 (20 μL ×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、投与方法または中空型 MN の設計により皮内分布を考慮することで投与した薬物の吸収動態を制御できる可能性を示した。

第 1 章で得られた結果については下記の論文にて報告した。

M. Futaki, K. Inamura, M. Hashimoto, S. Motegi, S. Itakura, K. Sugibayashi, H. Todo, Effects of Intradermal Administration Volume Using a Hollow Microneedle on the Pharmacokinetics of Fluorescein Isothiocyanate Dextran (*M.W.* 4,000), *Pharm. Res.*, **40**, 1953-1963 (2023).

第 2 章では、中空型 MN 投与による *in vivo* 注入成功率に及ぼす要因を調査した。針全長 1,000、1,300 および 1,500 μm の中空型 MN に加えて、それぞれの針全長の中空型 MN に対して、針の穿刺に伴う皮膚形状変化制御を目的とした円柱状の支柱を針周辺に設けた中空型 MN の計 6 種類の中空型 MN を用い、検討を行なった。まず、*in vivo* 条件下にて中空型 MN を穿刺したラットの皮膚に、MB 溶液を滴下し、穿刺部位の MB の染色状態より穿刺成功率を評価した。穿刺性の試験結果より、ラットの皮膚表面硬度が高い方が (A25)、低い表面硬度 (A15) と比較して穿刺成功率が高くなること、また中空型 MN の針全長が長くなるにつれて穿刺成功率が高くなることが示された。さらに、針周辺に配置した円柱状の支柱は穿刺性向上に寄与していると考えられ、特に、針全長 1,500 μm の中空型 MN では支柱を設けることで穿刺成功確率が 90%から 100%へ向上した。次に、Rh-B 溶液を中空型 MN にてラットへ *i.d.* 投与することで注入性を評価した。その結果、皮膚硬度 A25 の条件では *in vivo* 穿刺性試験と同様に針全長が長くなるにつれて注入成功確率は向上したが、皮膚硬度 A15 の低硬度条件では、いずれの中空型 MN においても注入成功確率は著しく低下することがわかった。また、支柱を有する針全長 1,000 μm の中空型 MN (hMN_{1000s}) は皮膚硬度 A15 条件下では、支柱を持たない hMN₁₀₀₀ の中空型 MN と比較して注入成功率は低下したものの、他の針長さの中空型 MN では円柱状の支柱の配置は皮膚硬度に関わらず注入成功率の向上に寄与することがわかった。ヨウ素を注入後、皮膚表面に形成された膨疹面積を算出したところ MN₁₃₀₀、MN_{1300s} および MN₁₀₀₀ では 10 mm² 以上の大きな膨疹が認められたのに対し、

MN₁₅₀₀ および MN_{1500S} では認められなかった。また、膨疹面積の測定と合わせて、X 線 CT により注入したヨウ素溶液の皮内分布を観察し、最も深い位置に分布しているヨウ素溶液の皮膚表面からの距離（皮内最深度）を測定したところ、10 mm² 以上の大きな膨疹が皮膚表面で観察された例では、投与されたヨウ素は皮内に分布しており、膨疹が小さいまたは認められなかった例では、投与されたヨウ素が皮下にも分布していることがわかった。大きな膨疹が認められた支柱のない MN₁₀₀₀ および MN₁₃₀₀ は支柱を有する MN_{1300S} と比較してヨウ素の最深度にばらつきが確認された。以上の結果から、支柱は穿刺性を向上させる役割をもち、かつ安定した注入溶液の深さ制御を行うための有用な手段であることが示された。In vivo における注入成功確率に及ぼす因子を調査するために、人工皮膚膜を用いた穿刺特性評価を行い、中空型 MN が膜を破断する際の試験力-ストローク曲線から得られたパラメータを用いて回帰分析を行なった。その結果、膜の硬度および中空型 MN の針全長が注入成功確率に影響を及ぼす因子であることが明らかとなった。

これらについては現在投稿中である。

M. Futaki, K. Inamura, T. Nishimura, T. Niitsu, T. Tojo, K. Sugibayashi, H. Todo, A hollow microneedle equipped with a micropillar for improved needle insertion and injection of drug solution (submitted).

第3章では、電荷を有する低・中分子薬物および電荷を持たない低・中分子薬物を選択し、*i.d.*投与後の皮内動態制御に及ぼす IP 負荷の効果について調査した。薬物の定量感度の問題から、ブタ耳介皮膚を任意の厚みに（上部皮膚（角層を含む）および顆粒層以下皮膚）薄切し、その間に種々薬液を投与することで中空型 MN による *i.d.*投与を想定し検討を行った。IP は、微弱電流を皮膚に負荷することにより、投与した薬物との電气的反発作用や皮膚内のイオンの流れにより生じる水の流れ（電気浸透流）を利用して薬物の皮膚透過性を制御できる方法であるが、低分子薬物の *i.d.*投与を想定した場合、低分子薬物では電荷の有無にかかわらず、IP 負荷による皮内動態制御（透過促進および抑制）が認められなかった。一方、中分子薬物ではアニオン性物質（PSA-4 および PSA-10）の場合、Cathodal IP 負荷により透過促進効果が認められ、分子量が大きくなるにつれ透過促進率は増加した。また、Cathodal IP によって促進された PSA-4 および PSA-10 の透過率は 70 および 60%に増加し、低分子薬物の透過率と同程度であった。PSA-4 では、Anodal IP による透過抑制効果が確認された。一方、中分子薬物である FD および PSA-10 の Anodal IP 適用群では IP 未処理と比較して透過量に差が認められなかった。これらの結果をもとに、速度論解析を行ったところ、低分子

薬物では自身の拡散性の高さから電荷の有無にかかわらず真皮からの薬物の透過挙動は Higuchi 式に従い、IP 適用による影響は認められなかった。非解離型中分子薬物および解離型中分子薬物では、低分子薬物と同様に透過挙動は IP 適用による影響を受けなかったがその挙動は 0 次挙動を示したことから、膜透過律速となることがわかった。

IP 併用による促進効果は分子量が大きくなるにつれて高くなったことから、分子量数万程度のペプチド等の吸収速度を高める方法として優れている。しかしながら、IP による皮内動態制御は分子量と荷電に依存しており、解離型中分子薬物では薬物の促進だけでなく抑制効果が確認された。すでに、皮内に投与した中分子薬物が皮下へ移行することで吸収速度が遅くなることを示しており、皮膚の浅い層に薬物を滞留させることで薬物の吸収を高めることを明らかにした。さらに IP を適用することで、皮内に投与した薬物の拡散を抑制し、皮膚内での薬物の滞留時間を延長することで、薬物が毛細血管から体内への吸収される割合を高めることが可能になると考えられた。しかし、IP は限られた物性を有する薬物にしか適用できないため、皮膚の浅い層に薬液を微量かつ長時間投与できるデバイスが必要であると考えられる。以上を踏まえ、より幅広い薬物種に対応するためには、中空型 MN に充填された薬液を皮内に送液するマイクロポンプとの併用が好ましいと考えられた (Fig. 28)。近年、微小電気機械システム技術に基づく DDS が注目されており、電気浸透流を用いたマイクロポンプの開発が進んでいる^{88, 89)}。従来のマイクロポンプ装置に比べて近年のマイクロポンプは装置自体の重量やサイズを軽減できるだけでなく、微量の薬液を投与できる正確で信頼性の高い送達が可能である。また、電気浸透流を用いたマイクロポンプは、安価に製造ができ、負荷電圧に応じて流量を調整できる、高圧で脈動のない溶液汲み上げが低消費電力で得られる、装置を小型化できるなどの多様な利点がある⁹⁰⁾。本検討では、電気浸透流を用いたマイクロポンプによる皮内動態制御の可能性に調査することができなかったものの、IP と中空型 MN の併用は、MN による薬物投与の有用性を高める方法となる可能性がある。

これらについては下記の論文にて報告した。

K. Sugibayashi, M. Futaki, M. Hashimoto, A. Fukuhara, K. Matsumoto, T. Oshizaka, S. Itakura, H. Todo, Effect of Iontophoresis on the Intradermal Migration Rate of Medium Molecular Weight Drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, **69**, 639-645 (2021).

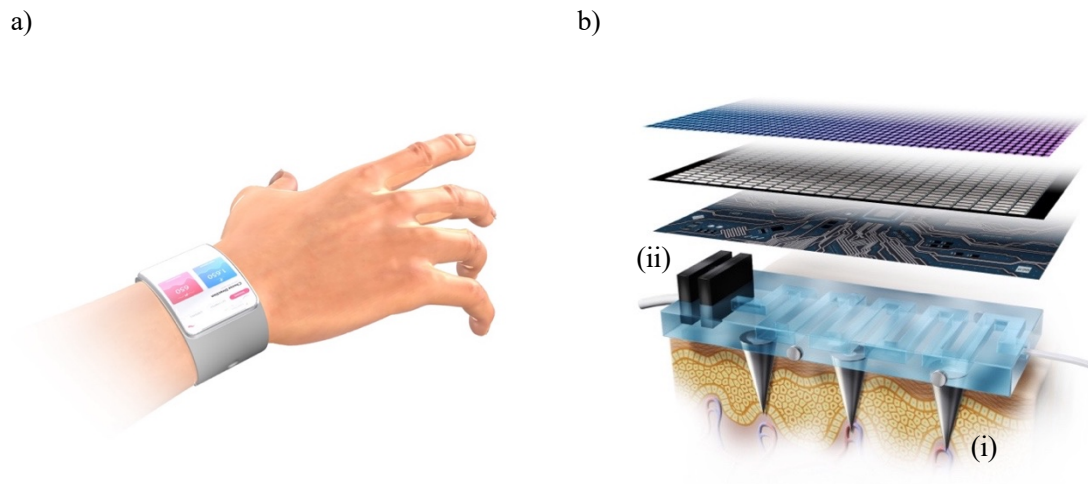


Fig. 28 Image of wearable IP-assisted hMN system (a) and its components (b) (i): hMN, (ii): pump system equipped with electro-osmotic flow actuators.

中空型 MN は穿刺性の難しさから投与した薬物の体内動態に関する報告が少なく、また、未だ医薬品としての実績はない。しかしながら、経皮適用が困難とされてきた中分子・高分子医薬品の薬物の投与経路として中空型および中実型 MN を用いた *i.d.* 投与は、非常に注目されている。本検討にて、体内動態に及ぼす影響、穿刺および注入成功確率に影響する要因が明らかとなったことから、今後の中空型 MN の開発に役立つ知見を提供できると考えられる。また、中空型 MN によるバイオ医薬品などの中高分子薬物の皮内投与は中空型 MN の設計や投与方法、デバイスとの併用で目的に応じた治療が可能になると考えられた。

謝辞

本研究に際して、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院 薬学研究科薬科学専攻 薬粧品動態制御学講座 准教授 藤堂 浩明 先生、城西国際大学 学長・城西大学薬学部 特任教授 杉林 堅次 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究遂行にあたりご指導頂きました城西大学大学院 薬学研究科薬学専攻 生化学講座 教授 畑中 朋美 先生、同 薬品作用学講座 教授 岡崎 真理 先生に厚く御礼申し上げます。

本論文校閲において適切な御助言を頂きました城西大学大学院 薬学研究科薬科学専攻 皮膚生理学講座 教授 高木 豊 先生、同 生物薬品科学講座 教授 田中 享 先生、城西大学大学院 薬学研究科薬学専攻 薬剤学講座 教授 関 俊暢 先生に深謝いたします。

本研究の実施にあたり、御助言ならびに御激励を賜りました、東京理科大学薬学部 生物薬剤学研究室 助教 板倉 祥子 先生、城西大学薬学部 招聘教授 高山 幸三 先生に心より感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、中空型マイクロニードルの提供ならびに有益な御意見ならびに御協力を賜りました花王株式会社 加工・プロセス開発研究所3室 新津 貴利 氏、椎葉 諒太 氏、後藤 実 氏、東城 武彦 氏、花王株式会社 包装技術研究所4室 西村 朋也 氏に心から感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、実験の御協力を頂きました、城西大学大学院 薬学研究科薬科学専攻 薬粧品動態制御学講座 修了生 橋本 美優 氏、茂木 俊作 氏、福原 明華 氏、修士課程学生 稲村 一也 学士に深く感謝致します。さらに彼らをはじめとし、研究室生活において多大なる御協力を頂いた城西大学 薬学部 薬粧品動態制御学研究室諸氏に深く感謝致します。

最後に、実験する上で犠牲になった動物に深く感謝し、追悼の意を表します。

引用文献

- 1) C. Liu, Y. Kou, X. Zhang, H. Cheng, X. Chen, and S. Mao, Strategies and industrial perspectives to improve oral absorption of biological macromolecules, *Expert Opinion Drug Del.*, **15**, 223-233 (2018).
- 2) Y. Zhang, J. Yu, A. R. Kahkoska, J. Wang, J. B. Buse, and Z. Gu, Advances in transdermal insulin delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, **139**, 51-70 (2019).
- 3) D. E. Kamen, G. Crotts, C. Narasimhan, Q. Hu, A. C. Bhargava, K. Muthurania, L. Burton, F. O. Gbormittah, L. Mathews, B. Mills, T. Hodge, S. Saluja, S. N. Singh, T. Tabish, Y. Wu, and E. S. E. Stokes, An intercompany perspective on compatibility and in-use stability studies to enable administration of biopharmaceutical drug products, *J. Pharm. Sci.*, **111**, 1092-1103 (2022).
- 4) V. M. Knepp, J. Hadgraft, and R. H. Guy, Transdermal drug delivery: Problems and possibilities, *Critic. Rev. Ther. Drug Carrier Systems*, **4**, 237 (1987).
- 5) M. N. Pastore, Y. N. Kalia, M. Horstmann, and M. S. Roberts, Transdermal patches: History, development and pharmacology, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 2179-2209 (2015).
- 6) A. Naik, Y. N. Kalia, and R. H. Guy, Transdermal drug delivery: Overcoming the skin's barrier function, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **3**, 318-326 (2000).
- 7) D. Horita, H. Todo, and K. Sugibayashi, Effect of ethanol pretreatment on skin permeation of drugs, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1-6 (2012).
- 8) M. Okumura, Y. Nakamori, Y. Yoshida, H. Niwa, K. Sugibayashi, and Y. Morimoto, Effect of monoglycerides on the percutaneous absorption of papaverine hydrochloride, *Drug Des. Deliv*, **6**, 137-148 (1990).
- 9) K. Sugibayashi, K. Hosoya, Y. Morimoto, and W. I. Higuchi, Effect of the absorption enhancer, Azone, on the transport of 5-fluorouracil across hairless rat skin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 578-580 (1985).
- 10) M. R. Prausnitz, V. G. Bose, R. Langer, and J. C. Weaver, Electroporation of mammalian skin: A mechanism to enhance transdermal drug delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 10504-10508 (1993).
- 11) B. Priya, T. Rashmi, and M. Bozena, Transdermal iontophoresis, *Expert Opinion Drug Del.*, **3**, 127-138 (2006).
- 12) P. Bakshi, D. Vora, K. Hemmady, and A. K. Banga, Iontophoretic skin delivery systems: Success and failures, *Int. J. Pharm.*, **586**, 119584 (2020).

- 13) Y. Wang, L. Zeng, W. Song, and J. Liu, Influencing factors and drug application of iontophoresis in transdermal drug delivery: an overview of recent progress, *Drug Del. Translat. Res.*, **12**, 15-26 (2021).
- 14) J. Yang, Y. Li, Y. Zheng, X. Li, Y. Chen, X. Xie, and L. Jiang, Smartphone-powered iontophoresis-microneedle array patch for controlled transdermal delivery, *Microsyst. Nanoeng.*, **6**, 1-14 (2020).
- 15) S. Kusama, K. Sato, Y. Matsui, N. Kimura, H. Abe, S. Yoshida, and M. Nishizawa, Transdermal electroosmotic flow generated by a porous microneedle array patch, *Nature Commun.*, **12**, 658 (2021).
- 16) K. Ita, Transdermal delivery of drugs with microneedles-potential and challenges, *Pharmaceutics*, **7**, 90-105 (2015).
- 17) H. An, Z. Gu, Z. Huang, T. Huo, Y. Xu, Y. Dong, and Y. Wen, Novel microneedle platforms for the treatment of wounds by drug delivery: A review, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **223**, 113636 (2023).
- 18) R. Zhang, Q. Miao, D. Deng, J. Wu, Y. Miao, and Y. Li, Research progress of advanced microneedle drug delivery system and its application in biomedicine, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **226**, 113302 (2023).
- 19) M. S. Giri Nandagopal, R. Antony, S. Rangabhashiyam, N. Sreekumar, and N. Selvaraju, Overview of microneedle system: A third generation transdermal drug delivery approach, *Microsystem Technol.*, **20**, 1249-72 (2014).
- 20) J. Gupta and R. G. Vanshita, Microneedle technology: An insight into recent advancements and future trends in drug and vaccine delivery, *Assay Drug Dev. Technol.*, **19**, 97-114 (2021).
- 21) J. Hassan, C. Haigh, T. Ahmed, M. J. Uddin, and D. B. Das, Potential of microneedle systems for COVID-19 vaccination: Current trends and challenges, *Pharmaceutics*, **14**, 1066 (2022).
- 22) I. Menon, P. Bagwe, K. B. Gomes, L. Bajaj, R. Gala, M. N. Uddin, M. J. D'Souza, and S.M. Zughair, Microneedles: A new generation vaccine delivery system, *Micromachines*, **12**, 435 (2021).
- 23) C. Caudill, J. L. Perry, K. Iliadis, A. T. Tessema, B. J. Lee, B. S. Mecham, S. Tian, and J. M. DeSimone, Transdermal vaccination via 3D-printed microneedles induces potent humoral and cellular immunity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, **118**, e210259511 (2021).
- 24) C. S. Kolli and A. K. Banga, Characterization of solid maltose microneedles and their use for transdermal delivery, *Pharm. Res.*, **25**, 104-113 (2008).
- 25) S. P. Narayanan and S. Raghavan, Solid silicon microneedles for drug delivery applications, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, **93**, 407-422 (2017).

- 26) L. Wei-Ze H. Mei-Rong, and Z. Jian-Ping, Super-short solid silicon microneedles for transdermal drug delivery applications, *Int. J. Pharm.*, **359**, 122-129 (2010).
- 27) Y. Zhang, K. Brown, K. Siebenaler, A. Determan, D. Dohmeier, and K. Hansen, Development of lidocaine-coated microneedle product for rapid, safe, and prolonged local analgesic action, *Pharm. Res.*, **29**, 170-177 (2012).
- 28) Y. Chen, B. Z. Chen, Q. L. Wang, X. Jin, and X. D. Guo, Fabrication of coated polymer microneedles for transdermal drug delivery, *J. Control. Release*, **265**, 14-21 (2017).
- 29) J. Chen, Y. Qiu, S. Zhang, G. Yang, and Y. Gao, Controllable coating of microneedles for transdermal drug delivery, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **41**, 415-422 (2015).
- 30) M. C. Chen, M. H. Ling, and S. J. Kusuma, Poly-c-glutamic acid microneedles with a supporting structure design as a potential tool for transdermal delivery of insulin, *Acta Biomater*, **24**, 106-116 (2015).
- 31) C. R. Jung, S. F. Lahiji, H. Jung, Y. Kim, and H. Kim, Rapidly separable micropillar integrated dissolving microneedles, *Pharmaceutics*, **12**, 581 (2020).
- 32) H. Kim, S. Lee, B. Lee.S. Kim, C. Sung, N. Jang, J. Kim, D. Jeong, H. Ryu, and S. Lee, A comparative study of dissolving hyaluronic acid microneedles with trehalose and poly(vinyl pyrrolidone) for efficient peptide drug delivery, *Biomater. Sci.*, **6**, 2566-2570 (2018).
- 33) S Shimizu., R tanaka., E Itoh., M Maekawa-Matuura., and Y iwase., Performance and usability evaluation of novel intradermal injection device Immucise™ and reanalysis of intradermal administration trials of influenza vaccine for the elderly, *Vaccine.*, **40**, 873-879 (2022).
- 34) Y. Levin, E. Kochba, I. Hung, and R. Kenney, Intradermal vaccination using the novel microneedle device MicronJet 600: Past, present, and future, *Hum. Vaccines Immunother*, **11**, 991-997 (2015).
- 35) K. C. L. Beyers, M. N. M. Rbeihat, D. S. Vasconcelos, D. Pasmans, S. Verwulgen, and V. V. J. Vankerckhoven, Preclinical evaluation of performance, safety and usability of VAX-ID®, a novel intradermal injection device, *Vaccine*, **41**, 4609-4615 (2023).
- 36) M. Kirkby, A. R. J. Hutton, and R. F. Donnelly, Microneedle mediated transdermal delivery of protein, peptide and antibody based therapeutics: Current status and future considerations, *Pharm. Res.*, **37**, 117 (2020).
- 37) E. Kochba, Y. Levin, I. Raz, and A. Cahn, Improved insulin pharmacokinetics using a novel microneedle device for intradermal delivery in patients with type 2 diabetes, *Diabetes Technol. Ther.*, **18**, 525-531 (2016).

- 38) A. J. Harvey, S. A. Kaestner, D. E. Sutter, N. G. Harvey, J. A. Mikszta, and R. J. Pettis, Microneedle-based intradermal delivery enables rapid lymphatic uptake and distribution of protein drugs, *Pharm. Res.*, **28**, 107-116 (2011).
- 39) X. M. Wu, H. Todo, and K. Sugibayashi, Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis, *J. Control. Release*, **118**, 189-195 (2007).
- 40) A. Bakshi, A. Bajaj, G. Malhotra, M. Madan, and N. Amrutiya, A novel metered dose transdermal spray formulation for oxybutynin, *Indian J. Pharm. Sci.*, **70**, 733-739 (2008).
- 41) S. Golombek, M. Pilz, H. Steinle, E. Kochba, Y. Levin, D. Lunter, C. Schlensak, H. Wendel, and M. Avci-Adali, Intradermal delivery of synthetic mRNA using hollow microneedles for efficient and rapid production of exogenous proteins in skin, *Mol. Ther. Nucleic Acids.*, **11**, 382-392 (2018).
- 42) H. Abd-El-Azim, H. Abbas, N. S. El Sayed, A. M. Fayez, and M. Zewail, Non-invasive management of rheumatoid arthritis using hollow microneedles as a tool for transdermal delivery of teriflunomide loaded solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, **644**, 12334 (2023).
- 43) Y. Levin, E. Kochba, I. Hung, and R. Kenney, Intradermal vaccination using the novel microneedle device MicronJet600: Past, present, and future, *Hum. Vaccines Immunother.*, **11**, 991-997 (2015).
- 44) J. J. Norman, M. R. Brown, N. A. Raviele, M. R. Prausnitz, and E. I. Felner, Faster pharmacokinetics and increased patient acceptance of intradermal insulin delivery using a single hollow microneedle in children and adolescents with type 1 diabetes, *Pediatr. Diabetes*, **14**, 459-65 (2013).
- 45) S. A. Burton, C. Y. Ng, R. Simmers, C. Moeckly, D. Brandwein, T. Gilbert, N. Johnson, K. Brown, T. Alston, G. Prochnow, K. Siebenaler, and K. Hansen, Rapid intradermal delivery of liquid formulations using a hollow microstructured array, *Pharm. Res.*, **28**, 31-40 (2011).
- 46) P. Ng, D. Incekol, R. Lee, E. Paisley, C. Dara, I. Brandle, M. Kaufman, C. Chen, S. Trudel, R. Tiedemann, D. Reece, and V. Kukreti, Tolerability of Velcade (Bortezomib) subcutaneous administration using a maximum volume of 3 mL per injection site, *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **21**, 258-292 (2015).
- 47) I. Usach, R. Martinez, T. Festini, and J. E. Peris, Subcutaneous injection of drugs: Literature review of factors influencing pain sensation at the injection site, *Adv. Ther.*, **36**, 2986-2996 (2019).
- 48) H. Kim, H. Park, and S. J. Lee, Effective method for drug injection into subcutaneous tissue, *Sci. Rep.*, **7**, 9613 (2017).

- 49) R. F. Donnelly, Microneedle array patch (MAP) *Impact on Vascular Perfusion* (<https://www.vivosight.com/wp-content/uploads/sites/7/2020/11/VivoSight-Dx-OCT-Brochure-com.pdf>) (Feb. 28, 2023, accessed).
- 50) D. Yoshida, H. Todo, T. Hasegawa, and K. Sugibayashi, Effect of vasoactive agents on the dermatopharmacokinetics and systemic disposition of model compounds, salicylate and FITC-dextran 4 kDa, following intracutaneous injection of the compounds, *Int. J. Pharm.*, **356**, 181-186 (2008).
- 51) J. Xu, J. W. McKeage, B. P. Ruddy, P. M. F. Nielsen, and A. J. Taberner, Jet-induced tissue disruption for blood release, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **69**, 1850-1859 (2022).
- 52) J. J. Calcutt, M. S. Roberts, and Y. G. Anissimov, Predicting viable skin concentration: Modelling the subpapillary plexus, *Pharm. Res.*, **39**, 783-793 (2022).
- 53) D. Yoshida, H. Todo, T. Hasegawa, and K. Sugibayashi, Dermatopharmacokinetics of salicylate following topical injection in rats: Effect of osmotic pressure and injection volume on salicylate disposition, *Int. J. Pharm.*, **337**, 142-147 (2007).
- 54) D. Yoshida, T. Hasegawa, and K. Sugibayashi, Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats, *Int. J. Pharm.*, **231**, 177-184 (2002).
- 55) R. J. Scheuplein, Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration., *J. Invest. Dermatol.*, **48**, 79-88 (1967).
- 56) R. Notman and J. Anwar, Breaching the skin barrier - Insights from molecular simulation of model membranes, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **65**, 237-250 (2013).
- 57) E. C. Jung and H. I. Maibach, Animal models for percutaneous absorption, *J. Appl. Toxicol.*, **35**, 1-10 (2015).
- 58) S. Nicoli, C. Padula, V. Aversa, B. Vietti, P. W. Wertz, A. Millet, F. Falson, P. Govoni, and P. Santi, Characterization of rabbit ear skin as a skin model for in vitro transdermal permeation experiments: Histology, lipid composition and permeability, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **21**, 218-226 (2008).
- 59) J. Enfield, M.-L. O'Connell, K. Lawlor, E. Jonathan, C. O'Mahony, and M. Leahy, *In-vivo* dynamic characterization of microneedle skin penetration using optical coherence tomography, *J. Biomed. Opt.*, **15**, 046001 (2010).
- 60) S. Coulman, J. Birchall, A. Alex, M. Pearton, B. Hofer, C. O'Mahony, W. Drexler, and B. Považay, *In vivo*, in situ imaging of microneedle insertion into the skin of human volunteers using optical coherence tomography, *Pharm. Res.*, **28**, 66-81 (2011).

- 61) E. Z. Loizidou, N. T. Inoue, J. Ashton-Barnett, D. A. Barrow, and C. J. Allender, Evaluation of geometrical effects of microneedles on skin penetration by CT scan and finite element analysis, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **107**, 1-6 (2016).
- 62) A. C. Q. Silva, B. Pereira, N. S. Lameirinhas, P. C. Costa, I. F. Almeida, P. Dias-Pereira, I. Correia-Sá, H. Oliveira, A. J. D. Silvestre, C. Vilela, and C. S. R. Freire, Dissolvable carboxymethylcellulose microneedles for noninvasive and rapid administration of diclofenac sodium, *Macromol. Biosci.*, **23**, e2200323 (2023).
- 63) D. Zhang, D. B. Das, and C. D. Rielly, Microneedle Assisted Micro-Particle Delivery from Gene Guns: Experiments using skin-mimicking agarose gel, *J. Pharm. Sci.*, **103**, 613-627 (2014).
- 64) T. Asakura and H. Seino, Basic Study on a Micro-tapered needle (TN-3305) Used for Insulin Prefilled Products, *Iryo Yakugaku (Jap. J. Pharm. Heal. Care Sci.)*, **30**, 368-376 (2004).
- 65) D. Han, R. S. Morde, S. Mariani, A. A. L. Mattina, E. Vignali, C. Yang, G. Barillaro, and H. Lee, 4D printing of a bioinspired microneedle array with backward-facing barbs for enhanced tissue adhesion, *Adv. Funct. Mater.*, **30**, 1909197 (2020).
- 66) P. G. Agache, C. Monneur, J. L. Leveque, and J. De Rigal, Mechanical properties and Young's modulus of human skin *in vivo*, *Arch. Dermatol. Res.*, **269**, 221-232 (1980).
- 67) A. Hou, G. Quan, B. Yang, C. Lu, M. Chen, D. Yang, L. Wang, H. Liu, X. Pan, and C. Wu, Design of rapidly separating dissolving microneedles for precise drug delivery by balancing the mechanical performance and disintegration rate, *Adv. Healthc. Mater.*, **8**, e1900898 (2019).
- 68) P. Makvandi, M. Kirkby, A. R. J. Hutton, M. Shabani, C. K. Y. Yiu, Z. Baghbantaraghdari, R. Jamaledin, M. Carlotti, B. Mazzolai, V. Mattoli, and R. F. Donnelly, Engineering microneedle patches for improved penetration: Analysis, skin models and factors affecting needle insertion, *Nano-Micro Letters*, **13**, 93 (2021).
- 69) M. R. Potts, S. L. Evans, R. Pullin, S. A. Coulman, J. C. Birchall, and H. Wyatt, An analysis of the relationship between microneedle spacing, needle force and skin strain during the indentation phase prior to skin penetration, *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, **26**, 1719-1731 (2022).
- 70) A. P. Jonas, T. Yamada, Y. Shimizu, Y. Tanabe M. Ito, and R. Watanabe, Deformation Behavior of Skin Simulant during Penetration of Blunt Object, *J. JSEM.*, **15**, s111-s116 (2015).
- 71) A. M. Römgen, D. L. Bader, J. A. Bouwstra, and C. W. J. Oomens, Predicting the optimal geometry of microneedles and their array for dermal vaccination using a computational model, *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.*, **19**, 1599-1609 (2016).

- 72) A. N. Gent, On the relation between indentation hardness and Young's modulus, *Rubber Chem. Technol.*, **34**, 46–57 (1958).
- 73) M. Zak, P. Kuropka, M. Kobielarz, A. Dudek, K. Kaleta-Kuratewicz, and S. Szotek, Determination of the mechanical properties of the skin of pig fetuses with respect to its structure, *Acta Bioeng. Biomech.*, **13**, 37-43 (2011).
- 74) M. F. Griffin, B. C. Leung, Y. Premakumar, M. Szarko, and P. E. Butler, Comparison of the mechanical properties of different skin sites for auricular and nasal reconstruction, *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, **46**, 33 (2017).
- 75) A. Kalra, A. Lowe, and A. M. Al-Jumaily, Mechanical Behaviour of Skin: A Review, *J. Mater. Sci. Eng.*, **5**, 1-7 (2016).
- 76) S. Aoyagi, K. Okuda, T. Takahashi, and M. Suzuki, Effect of microneedle cross-sectional shape on puncture resistance: Investigation of polygonal and star-shaped cross sections, *J. Robot. Mechatronics*, **32**, 371-381 (2020).
- 77) O. Olatunji, D. B. Das, M. J. Garland, L. Belaid, and R. F. Donnelly, Influence of array interspacing on the force required for successful microneedle skin penetration: Theoretical and practical approaches, *J. Pharm. Sci.*, **102**, 1209-1221 (2013).
- 78) R. Rachid, M. Castells, C. Cunningham-Rundles, and F. A. Bonilla, Association of anti-IgA antibodies with adverse reactions to γ -globulin infusion, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **128**, 228-230 (2011).
- 79) N. A. Belsey, N. L. Garrett, L. R. Contreras-Rojas, A. J. Pickup-Gerlaugh, G. J Price., J. Moger, and R. H. Guy, Evaluation of drug delivery to intact and porated skin by coherent Raman scattering and fluorescence microscopies, *J. Control. Release*, **174**, 37-42 (2014).
- 80) N. Inoue, H. Todo, D. Iidaka, Y. Tokudome, F. Hashimoto, T. Kishino, and K. Sugibayashi, Possibility and effectiveness of drug delivery to skin by needle-free injector, *Int. J. Pharm.*, **391**, 65-72 (2010).
- 81) P. L. Ritger and N. A. Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *J. Control. Release*, **5**, 23-36 (1987).
- 82) W. I. Higuchi, Analysis of data on the medicament release from ointments, *J. Pharm. Sci.*, **51**, 802-804 (1962).

- 83) K. Sato, T. Oda, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, Estimation of blood concentration of drugs after topical application from *in vitro* skin permeation data. I. Prediction by convolution and confirmation by deconvolution. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2232–2238 (1988).
- 84) D. Yoshida, H. Todo, T. Hasegawa, and K. Sugibayashi, Effect of molecular weight on the dermatopharmacokinetics and systemic disposition of drugs after intracutaneous injection, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **35**, 5-11 (2008).
- 85) K. Sugibayashi, H. Todo, T. Oshizaka, and Y. Owada, Mathematical model to predict skin concentration of drugs: Toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, *Pharm. Res.*, **27**, 134-142 (2010).
- 86) G. H. Weiss, A perturbation analysis of the Wilemski-Fixman approximation for diffusion-controlled reactions, *J. Chem. Phys.*, **80**, 2880 (1983).
- 87) R. H. Guy, Y. N. Kalia, M. B. Delgado-Charro, V. Merino, A. López, and D. Marro, Iontophoresis: Electrorepulsion and electroosmosis, *J. Control. Release*, **64**, 129-132 (2000).
- 88) X. Wang, C. Cheng, S. Wang, and S. Liu, Electroosmotic pumps and their applications in microfluidic systems, *Microfluidics Nanofluidics*, **6**, 145-162 (2009).
- 89) P. C. Pandey, S. Shukla, S. A. Skoog, R. D. Boehm, and R. J. Narayan, Current advancements in transdermal biosensing and targeted drug delivery, *Sensors (Switzerland)*, **19**, 1082 (2019).
- 90) A. Ito, S. Itakura, Y. Hasegawa, M. Hashimoto, A. Okada, M. Hirafuji, H. Nakamura, K. Sugibayashi, and H. Todo, Usefulness of direct intratumoral administration of doxorubicin hydrochloride with an electro-osmosis–assisted pump, *Front. Drug Deliv.*, **3**, 1-8 (2023).
- 91) L. Urquhart, Top companies and drugs by sales in 2019, *Nature Reviews. Drug Discovery*, **19**, 228-228 (2020).
- 92) A. C. Q. Silva, B. Pereira, N. S. Lameirinhas, P. C. Costa, I. F. Almeida, P. Dias-Pereira, I. Correia-Sa, H. Oliveira, A. J. D. Silvestre, C. Vilela, and C. S. R. Freire, Dissolvable Carboxymethylcellulose Microneedles for Noninvasive and Rapid Administration of Diclofenac Sodium, *Macromol Biosci.*, **23**, e2200323 (2023).
- 93) A. Panda, P. K. Sharma, T. McCann, J. Bloomekatz, M. A. Repka, and S. N. Murthy, Fabrication and development of controlled release PLGA microneedles for macromolecular delivery using FITC-Dextran as model molecule, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **68**, 102712 (2022).

- 94) F. J. Verbaan, S. M. Bal, D. J. van den Berg, W. H. Groenink, H. Verpoorten, R. Luttge, J. A. Bouwstra, Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin, *J Control Release*, **117**, 238-245 (2007).
- 95) G. Yan, K. S. Warner, J. Zhang, S. Sharma, B. K. Gale, Evaluation needle length and density of microneedle arrays in the pretreatment of skin for transdermal drug delivery, *Int J Pharm.*, **391**, 7-12 (2010).