

研究報告 2020 (KISTEC Annual Research Report,2020)

【研究開発部】

有望シーズ展開事業

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト	
◆総括.....	147
	プロジェクトリーダー 松元 亮
◆Totally synthetic, mechanical strong microneedle patch.....	150
	Siyuan Chen
◆生体内におけるマイクロニードルからのインスリン放出動態の解析.....	154
	伊藤 美智子
◆ポリマーコーティングによるマイクロニードルの力学的強度の増大および機能評価.....	157
	宮崎 拓也
◆業績.....	159

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

プロジェクトリーダー 松元 亮

【基本構想】

糖尿病は、インスリンの絶対的あるいは相対的な作用不足に起因するため、これに対する最も有効かつ安全な治療法はインスリン療法である。これは、血糖値のモニタリングや個人の生活習慣等に基づいて、即効性から遅効性のインスリン製剤を組み合わせ投与し、血糖値をできる限り正常域にコントロールするものである。一方、インスリン療法は患者の生活の質を著しく損なううえ、意識障害等の重篤な症状に繋がる低血糖の危険性がある。心筋梗塞等の心血管合併症を予防するためには、より精密な血糖コントロールが有効であるが、頻回の低血糖症状はむしろ予後を悪化させる可能性も指摘されている。この急性かつ重篤なリスク（低血糖発作）を避ける結果、実臨床上、十分な血糖コントロールが得られていない。最近では、マイクロコンピューター制御による装着型のインスリンポンプが欧米を中心に普及しつつあるが、あらかじめ設定されたアルゴリズムに従ってインスリンを投与するか基礎分泌相当を供給するに留まり、オーダーメイド医療とはほど遠いものである。従って、より正確かつ連続的にインスリン供給制御が可能な代替技術が強く要請されている。我々は、糖との結合能で知られるボロン酸をキーコンポーネントとし、これを導入した水溶性アクリルアミドゲル構造を最適化することで、生体由来材料やエレクトロニクスを一切用いない上記目的のインスリン供給機構を実証してきた。本プロジェクトでは、究極的な低侵襲性を志向したマイクロニードル融合型（「貼るだけ人工膵臓」）デバイスの開発を進めている。生活習慣病を中心とする非感染性疾患（non-communicable disease: NCD）は世界の医療費の43%を占め、2020年には60%に増加するとともに、全死亡の73%に関与すると予測されている。世界に類を見ない速度で高齢化が進行する本邦では、糖尿病等の生活習慣病が国民医療費の約15%、死亡数割合では約30%を占める。「貼るだけ人工膵臓」の技術は、糖尿病治療におけるアンメットメディカルニーズ（長期的な血糖管理、低血糖の回避、患者負担の軽減）を解決し、「健康寿命」と「平均寿命」の差“ゼロ”の実現を図る革新的な医療技術として期待される。

1. 2019年度の研究目的

プロジェクト1年目となる2019年度は、以下の各項目を重点項目として実施した。

(1) 小・中・大動物実験用デバイスの開発の開発

順次スケールアップする動物モデルでの評価結果、数理モデル化の結果に基づき、外力からの保護とインスリン供給に最適ナゾーバー構造と挿入補助デバイス（アプリケーション）等周辺技術をパートナー企業と連携して開発する方針として実施した。患者の体重差や異なる病態に対応するためのプロダクト・ラインアップの整備を目指した。また、大量・均一製造プロセスの開発も重要課題の一つであり、滅菌プロセスについては、エチレンオキシド法を第一の候補として検討した。

(2) 放出動態の数理モデル構築

本項目では、外部の専門企業との共同研究により、インスリン放出動態を数理モデル化し、デバイスの形状やサイズなど、大動物（ブタ）およびヒト用デバイスの定量的な設計指針を得ることを目的とした。なお、本項目は、PMDA相談時および米国FDA関係者との面談時にその重要性を指摘されており、認可申請プロセスにおいて重要な位置付けである。

(3) 医学的機能評価

様々なサイズの動物モデルを用いてデバイスの医学的

機能評価を行い、デバイスの段階的なスケールアップと様々な病態適応性の判断を得ることを目的とした。正常および1型糖尿病（ストレプトゾトシン誘導性）モデル動物（マウス、ラット、ブタ）の皮下または表皮にデバイスを留置（貼付）し、血糖値やインスリン値等の血液パラメーター、インスリン標的臓器におけるインスリンシグナル遺伝子発現変化、グルコース負荷試験による急激な血糖上昇に対するデバイスの即応性やインスリン放出挙動、in vivo 共焦点顕微鏡を用いた皮内環境での薬物動態等、多角的に評価することとした。

2. 2019年度の研究成果

以下に挙げるのは、2019年度の代表的な研究成果である。

インスリン放出挙動が温度に依存しないマイクロニードルの開発

マイクロニードルの温度応答性を抑制するために、ゲル組成の最適化を行った。具体的には、「主鎖」、「ボロン酸ユニット」、ネットワーク全体の親水性の向上とともにボロン酸ユニットとの分子内架橋度を調節する目的で導入した「水酸基含有ユニット」からなる3元共重合体ゲルを様々な組成で調整し、それらの相図を評価することで最適組成を探索した。従来型（温度依存型）のマイクロニードル

ドルと同様に多孔性の構造を有し、温度依存性が顕著に抑制されたゲル組成を見出した（図 1）。

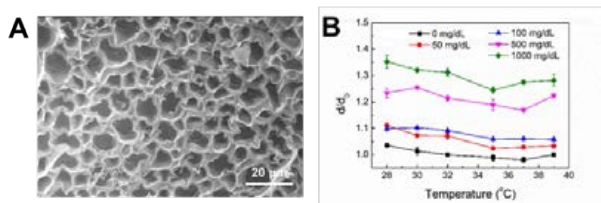


図 1. (A) ゲル断面の SEM 画像、(B) ゲルの相図。

生分解性ポリマー被覆によりマイクロニードルの力学的強度を向上させる手法の開発

マイクロニードルの皮膚刺入時の力学的強度を一時的に向上させることを目的とし、これを生分解性ポリマーの被覆により達成する手法を検討した。具体的には、可視化のための蛍光物質ローダミン B を含むポリビニルアルコール（PVA、分子量：89-98 kDa）溶液をマイクロニードルに添加し、蛍光顕微鏡により観察した（図 2）。マイクロニードルへの PVA 溶液の添加回数に応じて被覆の厚みと力学強度が線形に増大した。ニードル形状保存性の観点も考慮して最適な添加回数を決定した。また、当該 PVA 被覆は生理食塩水中で 30 分程度で溶解することで下地のゲル本来の特性が迅速に回復することを確認した。本手法の開発により、ゲル単独ではマイクロニードルとしての力学的強度が乏しい場合にも、簡便な操作でこれを解決する手法を確立した。

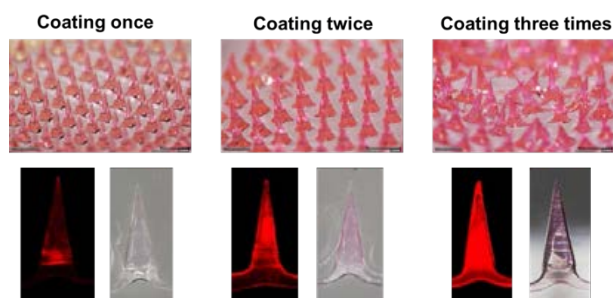


図 2. マイクロニードルへの PVA 溶液添加後の共焦点顕微鏡像。

皮内環境下でのインスリン動態の評価

生体組織は光透過性が低いいため、通常は固定後に薄切をほどこして組織学的な解析を行うが、処理に伴う変化や 3 次元情報が失われてしまうといった点が問題になる。組織透明化技術は組織内部まで構造を維持したまま観察が可能であるが、処理に時間がかかり、薬剤動態を捉えるような実験には適さない。組織の表面であれば共焦点あるいは多光子顕微鏡を用いて組織内部を観察可能な場合があるため、様々な蛍光プローブを利用し、皮膚におけるインスリン放出を捉える方法を検証した。マイクロニードル側からの観察はそれ自体の厚みや色調によって観察の障壁と

なるため、本年度は皮下脂肪側からのアプローチを検討した。その結果、*ex vivo*・*in vivo* いずれの条件においても生体の皮膚組織内部を共焦点顕微鏡によって観察可能であることを明らかにした。

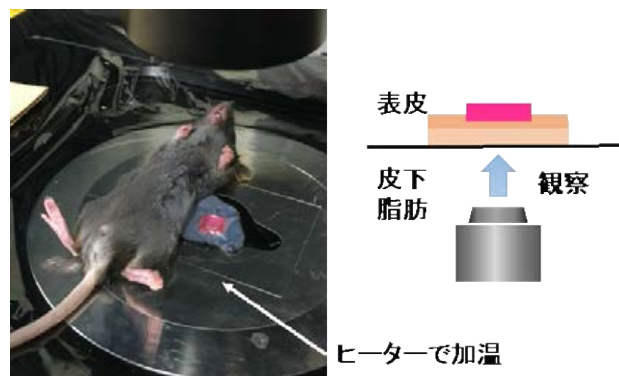


図 3. In vivo 共焦点顕微鏡観察の様子。

糖尿病モデルブタでの機能評価

内因性インスリンがほぼ枯渇した重症 1 型糖尿病モデル 3 頭に対して、インスリン含有デバイスを皮下留置したところ、2 頭で明らかな効果を確認したものの、血糖コントロールは不安定であり、7 日後までには効果が消失した。中程度（およそ 400 mg/dL）の高血糖を呈した 3 頭に対してインスリン含有デバイスを装着したところ、皮下留置では顕著に血糖値が低下し、効果が 7 日後まで持続したのに対し、皮膚貼付では弱い効果にとどまった。これらの結果は、持続血糖モニタリング装置（FreeStyle リブレ）でも確認され、デバイスは、食事や日内リズムに関係なく、安定した血糖コントロールをもたらした。一方、ほぼ正常血糖を呈したブタ 2 頭に対してインスリン含有デバイスを装着したところ、初期の一過性低血糖を除いて、血糖値は概ね正常範囲内に維持され、デバイスからの血糖依存性インスリン放出が確認できた。さらに装着 7 日後に、生体適合性を確認したところ、病理組織像では、皮下留置群において明らかなマイクロニードルの刺入が確認でき、末梢血白血球数はデバイス装着の前後でほぼ同程度であった。これに対して、皮膚貼付群では、血糖改善効果が認められなかった。血清インスリン量は、これらの結果に合致する結果が得られた。以上の結果より、プロジェクト開始時からの最大懸案であったヒト体重規



図 4. ブタ実験の様子。

模でのパワー（放出量）確保や安全性については一定の目処が立った一方、皮膚刺入性については課題が浮き彫りとなった。

3. 総括

2019 年度計画では、「小・中・大動物実験用デバイスの開発」、「放出動態の数理モデル構築」、「ex vivo および in vivo 評価系の開発」、「医学的機能評価」を予定し、概ね予定通り進捗した。特に、共焦点顕微鏡を利用した評価系は、高い学術性に加え、今後実施するデバイスのブラッシュアップ作業において中心的な評価プラットフォームとして利用できる水準で達成した。次年度（2020 年度）より着手予定としていたブタモデルでの実験を半年前倒して年度 10 月より着手する方針に変更した。本項目は、文科省・地域エコプロジェクトの中で「プロジェクトの加速化」に寄与するものと認められ、追加予算が処置されて実施したものである。これに伴い、いくつかの変更点および追加の検討課題が生じたが、連携企業らの協力を得て遂行することができた。3 回のブタ実験を通じ、本技術の「現在地」と課題について明確に認識することができた。すなわち、プロジェクト開始時からの最大懸案であった「スケール=パワー」や安全性については一定の目処が立った一方、皮膚刺入性については困難が浮き彫りとなった。目下の技術課題は、当該刺入性の改善とともに、デバイスの小型化、リザーバーやアプリーター等周辺デザインの具体化と考えている。これらの要素項目については、連携企業と協力して 2020 年度の中心課題として取り組む予定である。

Totally synthetic, mechanical strong microneedle patch

Siyuan Chen

1. Introduction

Phenylboronic acid, a synthetic material that will not be denatured nor trigger the immune system, is an attractive candidate to realize glucose-responsive insulin delivery system.¹⁻³ Although our previous studies have reported a microneedle (MN) patch with silk fibroin/boronate semi-interpenetrating network hydrogel that possible to provide a week-long on-demand insulin release, its glucose-sensitive release profile was highly dependent on the temperature.⁴ In order to eliminate the safety concerns for clinical application, we further improve the gel formulation and mechanical property. The study mainly focusses on the following two parts:

1.1. Fabrication of totally synthetic MNs with temperature independent release profile

For a remaining challenge, the previous reported hydrogel was highly dependent on the temperature,¹⁻⁶ posing a potential safety concern. In this study, a new totally synthetic glucose-responsive microneedle patch was developed. The MNs could provide on-demand glucose-responsive release in a temperature-independent manner within clinically a relevant range.

1.2. MNs surface coating to enhance the mechanical strength

The mechanical strength of totally synthetic MNs is not high enough. To ensure efficient skin penetration, surface coating with dissolvable polymer was applied to enhance the mechanical property. The surface coated polymer could be dissolved after skin insertion and therefore will not hamper the insulin release.

2. Results and discussion

2.1. Fabrication of totally synthetic MNs with temperature independent release profile

A number of factors including exercise, illness, environment temperature, could easily cause variation of the skin temperature. In order to achieve glucose-responsive insulin release independent of temperature change, the fraction of thermo-sensitive *N*-Isopropylacrylamide (NIPAA_m) was decreased and the fraction of boronate component (A_mECFPBA) was increased compared with previous formulation.⁴⁻⁶ To maintain the hydrophilic/hydrophobic balance of the network, *N*-hydroxyethylacrylamide (NHEAA_m) bearing hydroxyl group that can crosslink with boronic acid was introduced the hydrogel formulation as a third monomer to further control the hydrophobic/hydrophilic balance of the hydrogel and avoid unwanted loosen of polymer network (Figure 1).

The hydrogel with optimized formulation displayed microporous and interconnected structure, which aids in smooth diffusion of insulin (Figure 2A). Figure 2B shows phase diagrams of the hydrogel for various temperatures and glucose concentrations. In the presence of glucose, the binding of PBA with glucose leads to an increased fraction of boronate and hence promotes hydration of the gel. More importantly, these gels are only marginally sensitive to the temperature for the range of investigation (28-39°C). Note that in these gels the molar contents of A_mECFPBA is significantly higher (10.7 %) than that used in the previous system (7.5 %)²⁻⁵ and, correspondingly, the contents of thermos-sensitive main-chain components (NIPAA_m) is much lower (60.7 mol%) as compared to the our previous formulation²⁻⁵ (91.5 mol% of

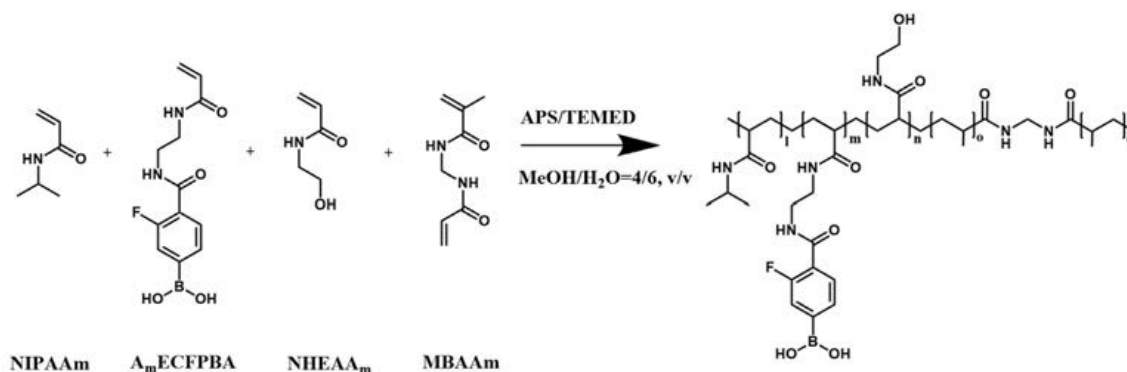


Figure 1. Chemical structure of hydrogel with monomers kept at optimized molar fraction (1:m:n:o=60.7:10.7:23.8:4.8) to decrease the impact of temperature to the glucose-responsive functionality of the hydrogels.

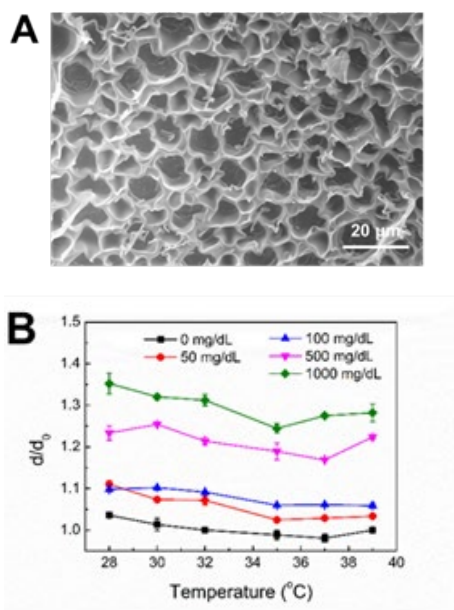


Figure 2. (A) Cross-sectional SEM image and (B) glucose-dependent volume change of the boronate-containing hydrogel.

NIPMAAm). These factors, along with the hydrophobicity-modulating effect by the use of NHEAAm, collectively aided in making the gel practically insensitive to the temperature.

In order to achieve painless and convenient transdermal delivery of insulin, the temperature-independent, glucose-responsive hydrogel was fabricated into MN format. The tip region of the MN patch was fabricated with the glucose-responsive hydrogel, thus allowing sensing the glucose level change in the interstitial fluid after skin insertion (Figure

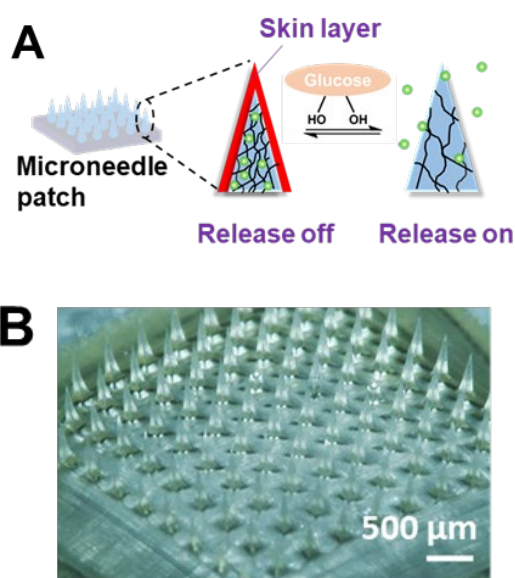


Figure 3. (A) Schematic of glucose-responsive insulin release from the MN patch. (B) Morphology of totally synthetic MNs.

3A). The height of the MN patch was set to be 700 μm , which is an ideal length to ensure efficient stratum corneum disruption but without touching nerve fibers and blood vessels (Figure 3B). The base layer part was formed by biocompatible PVA instead of hydrogel to avoid deformation during the manufacturing process. To improve the aqueous stability of PVA, it was heat treated at 130 $^{\circ}\text{C}$ for 1h for crystallization. No detachment between the needle region formed by glucose-responsive hydrogel and the base layer fabricated by crystallized PVA was observed, indicating the two-layer MN patch was successfully manufactured.

Figure 4 shows the *in vitro* insulin release profile of thus-obtained two-layer MN patch, with an insulin reservoir attached at the back of the MNs patch to ensure sufficient amount of insulin loading. Rapid response of the two-layer MNs to the programmed glucose pattern was observed at the

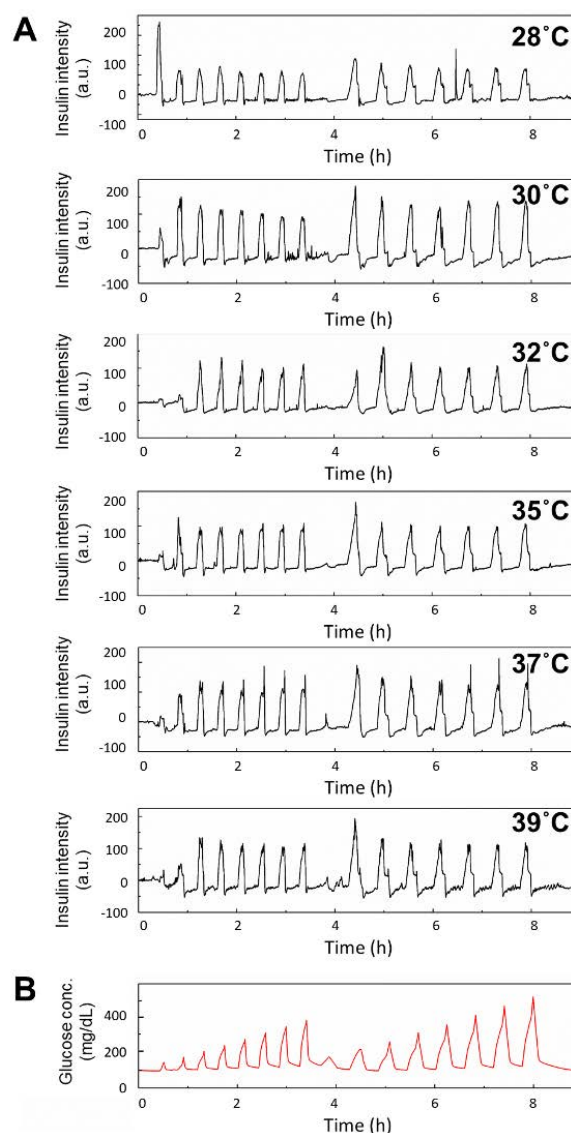


Figure 4. (A) *In vitro* FITC-labeled insulin release from MNs at various temperatures, pH 7.4. (B) Temporal pattern of the fluctuation in glucose concentration.

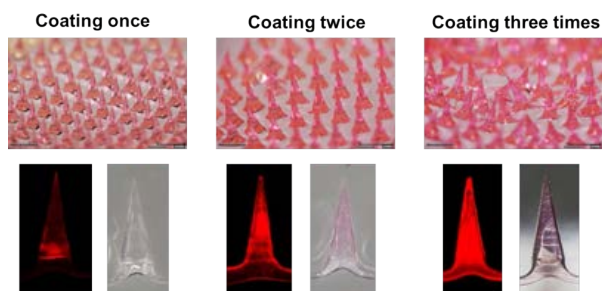


Figure 5. Morphology of MNs coated with Rhodamine B blended PVA for different times.

mean skin temperature (32°C) and other clinically relevant temperature conditions (28-39 °C), similar to the release profile of hydrogel. These results suggest the temperature independent, glucose-responsive functionality of the hydrogel 2 was well reproduced after incorporating into MN patch.

2.2. MNs surface coating to enhance the mechanical strength

One drawback of the totally synthetic MNs is relatively low mechanical strength. In order to overcome this disadvantage, the needle region was coated with dissolvable polymer layer. The polymer will dissolve after skin insertion and thus not affect the glucose-responsiveness.

MNs were coated with 5 wt% PVA (Mw 89-98 kDa)

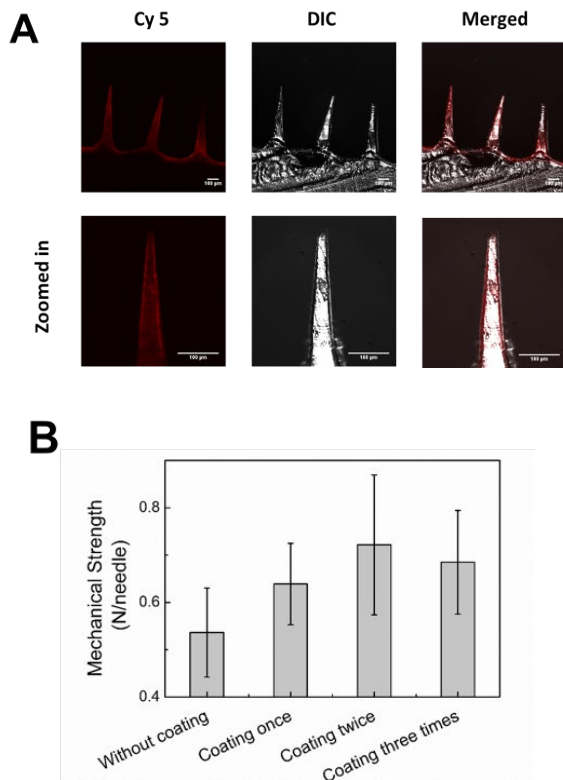


Figure 6. (A) Confocal microscopy images showing the distribution of Cy5-PVA in MNs. (B) Mechanical strength of MNs with or without PVA coating.

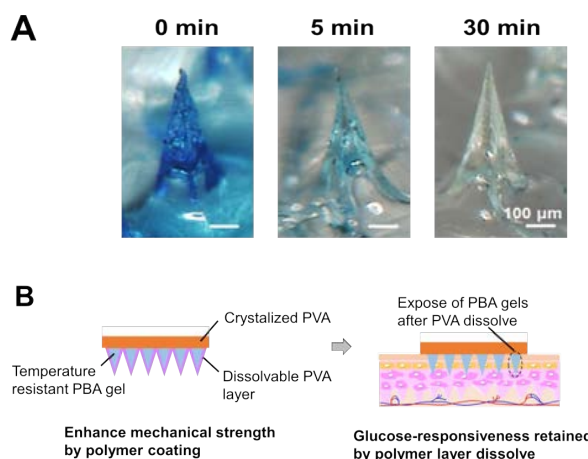


Figure 7. (A) Morphology of Cy5-PVA coated MNs immersed in PBS for various time. (B) Mechanical strength of MNs with or without PVA coating.

solution by dip-coating method. Coating was performed 1, 2 and 3 times. Rhodamine B were added in the polymer solution to indicate the location of PVA. As shown in Figure 5, Rhodamine B not only present on the MNs surface but also diffused into the inner core of needles, possibly due to the pore opening after gel hydration. Fluorescence intensity increase with coating time, indicating increased coating thickness with coating time. However, increase coating time to three may increase the possibility of deformation.

In order to further characterize the polymer distribution, MNs were coated with cy5 conjugated PVA for twice. As seen in the confocal microscopy images (Figure 6A), the accumulation of red fluorescence derived from Cy5 indicates the successful surface polymer coating. In the meanwhile, red fluorescence was also observed in the core of MNs. This is possibly because during the dip process, the hydrogel in the MNs needles hydrated with the polymer solution, and thus part of the polymer diffused into the gel network. Polymer coating increased the mechanical property of the MNs. The mechanical strength of PVA coated twice MNs was 34.5% higher than the one without coating (Figure 6B).

The coated polymer is dissolvable. As seen in Figure 7A, after immersing in PBS for 5 min, the colour of cy5-PVA coated MNs faded compared to the one without hydration. After 30 min, majority of the coated PVA was removed from the MNs surface, indicating coating MNs with dissolvable polymer will not affect the functionality of the MNs after skin application (Figure 7B). As shown in Figure 8, almost no difference was noted in the release profiles of the PVA coated and uncoated MNs, possible due to the rapid dissolution of the coated PVA layer. This result shows the polymer coating did not hamper the glucose-responsiveness of the MNs.

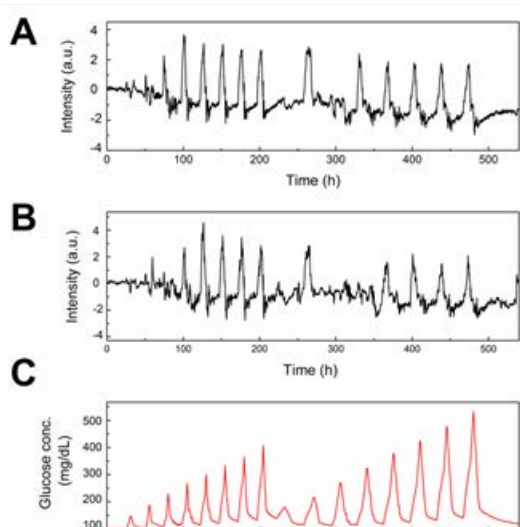


Figure 8. Time-course changes in the fluorescence intensity of FITC-labelled insulin released from MNs (A) without and (B) with PVA coating. (C) Temporal patterns of the fluctuation in glucose concentration.

3. Conclusion and future plan

Compared to all reported GO_x loaded nanoparticles containing glucose-responsive MN patches that could only provide hours-long duration and associated with safety concerns caused by immunotoxicity and denaturation risks of GO_x and toxic byproduct hydrogen peroxide, this diffusion-driven, skin layer controlled release mode offers

several advantages; no production of harmful byproducts upon reaction with glucose, sustainable and suitable for large-scale production, and no cold chain requirement. This totally synthetic MNs patch showed potential to achieve persistent glycemic control and is promising to improve the quality of life for diabetic patients.

Future research will be conducted to prepare new types of MNs. E.g. use photopolymerization to synthesize glucose-responsive hydrogels in tips, and prepare porous non-glucose responsive hydrogel to serve as base layer and reservoir. This strategy is aim to increase the fluid transportation speed and to facilitate skin penetration. Detailed in vitro and in vivo characterization will be carried out for further evaluation.

【References】

1. A. Matsumoto et al., Chem. Commun., 2010, 46, 2203-2205.
2. A. Matsumoto et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51(9), 2124-2128.
3. A. Matsumoto et al., Sci. Adv., 2017, 3(11), eaaq0723.
4. S. Chen, A. Matsumoto et al., Adv. Funct. Mater., 2019, 29(7), 1807369.
5. S. Chen, A. Matsumoto et al., ACS Biomater. Sci. & Eng, accepted.
6. A. Matsumoto and S. Chen, Japanese patent, No. 2018-053817, patent pending.

生体内におけるマイクロニードルからの インスリン放出動態の解析

伊藤 美智子

1. はじめに

様々な薬剤投与経路の中で、経皮投与は表皮から真皮へと薬剤が浸透・拡散し、皮下組織の毛細血管から吸収される。経口投与や静脈内投与と比較して、経皮投与では血中濃度が緩やかに上昇し、血中濃度が長く持続する特徴があり、経口投与ができない患者にも容易に用いることができる。一方で、角質層というバリアが存在するため、経皮投与可能な薬剤の性質や分子量には制限がある。マイクロニードル技術は数 100 μm の針が角質層を通過して表皮へと到達するため、タンパクや難経皮吸収薬剤を投与することが可能であり、今後臨床応用への展開が期待される分野である [1]。

1. 1 マイクロニードルの種類と特徴

マイクロニードルの針の構造には複数のタイプがあり、中空の微細な針から薬剤を注入する方法や、中実な針で皮膚を穿刺し、針の表面あるいは穿刺後の皮膚に塗布した薬剤を浸透させる方法がある [2]。また、生分解性の中実針に薬剤を担持させ、皮膚に留置することで針の溶解とともに皮膚内に薬剤を拡散させる様式も開発されている [2]。これまでに我々の研究グループではインスリンを含有するグルコース応答性ゲルを中空系に充填し、血糖値に応じてインスリンを放出する皮下埋め込み型デバイスを確立した [2]。現在、この技術をさらに応用し、マイクロニードル自体にグルコース応答性をもたせ、自律的にインスリンを放出する「貼るだけ人工膵臓」の開発を目指している。すなわち、通常短時間で除去するマイクロニードルを長期間（日から週）にわたって皮膚に留置し、さらに針自体が周辺環境への応答性を有するという、従来のマイクロニードルとは全く異なるコンセプトに基づいている。本技術が確立することで、食事摂取に応じて複数回の自己注射が必要であった糖尿病の管理が大幅に簡便化し、さらに生理的な血糖コントロールに近づくことが期待される。そのためには皮膚環境において適切なグルコース応答性とインスリン放出能を担保することが必要不可欠である。

1. 2 マイクロニードルの機能評価系

マイクロニードルの性能は多くの要因によって決定される。マイクロニードル自体の材質による刺入性や強度、形状、有効面積、耐久性などに加え、薬剤側の要因として、分子量や溶解性、修飾、濃度などが関わる。また、生体側

の要因として皮膚構造（角質層の厚さ、皮膚の硬さ、毛孔・汗腺の存在など）、バリア障害の有無、血流、体温などもマイクロニードルの性能を発揮する上で重要な要素となる。従来、マイクロニードルの機能評価はニードル自体の物性や構造に基づく検証と、*in vitro* における薬剤放出の検出によってなされることが多く、生体における効果は個体全体としての変化（結果）が検討されてきた。例えば、ワクチン投与に対する抗体獲得や、薬剤投与後の血中薬剤濃度測定や病態に対する治療効果などが挙げられる [4, 5]。刺入性や皮膚内の拡散について皮膚片を用いた検討もなされているが [6]、正常な血流のない状態では生体内における皮膚環境を反映しているとは言い難く、皮膚局所でマイクロニードル自体が受ける影響や薬剤の放出動態は十分に検討されてこなかった。「貼るだけ人工膵臓」は長期間にわたって皮膚に留置され、皮膚環境に応答して機能を発揮するという性質上、生体側の要因がその性能に多大な影響を与える。皮膚におけるインスリンの放出動態を明らかにすることが、安定で有効なデバイスの開発・改良に重要であると考えられる。

2. 実験と結果

生体組織は光透過性が低いため、通常は固定後に薄切をほどこして組織学的な解析を行うが、処理に伴う変化や3次元情報が失われてしまうといった点が問題になる。組織透明化技術は組織内部まで構造を維持したまま観察が可能であるが、処理に時間がかかり、薬剤動態を捉えるような実験には適していない。組織の表面であれば共焦点あるいは多光子顕微鏡を用いて組織内部を観察可能な場合があるため、様々な蛍光プローブを利用し、皮膚におけるインスリン放出を捉える方法を検証した。マイクロニードル側からの観察はそれ自体の厚みや色調によって観察の障壁となるため、今回は皮下脂肪側からのアプローチを検討した。

2. 1 *ex vivo* 評価系

一晩絶食下においた野生型マウスの背部にマイクロニードルを装着し、グルコース投与後 60 分まで経時的に皮膚をサンプリングし、*ex vivo* における共焦点顕微鏡（Olympus, FLUOVIEW FV10i）観察を試みた。①マイクロニードルを装着した状態で皮膚を切り出し、皮下脂肪側から水平面を観察するとともに、②マイクロニードルを除去

して皮膚を1mm厚の短冊状に切り、断面がカバーガラスに接するように配置することで垂直面の観察を行った(図1)。Cy5 標識ポリエチレングリコール (PEG: polyethylene glycol) を静脈内投与して血管を可視化し、脂肪細胞はBODIPY を皮下投与することで染色した。また、マイクロニードルを Rhodamine、インスリンを FITC にて標識した。

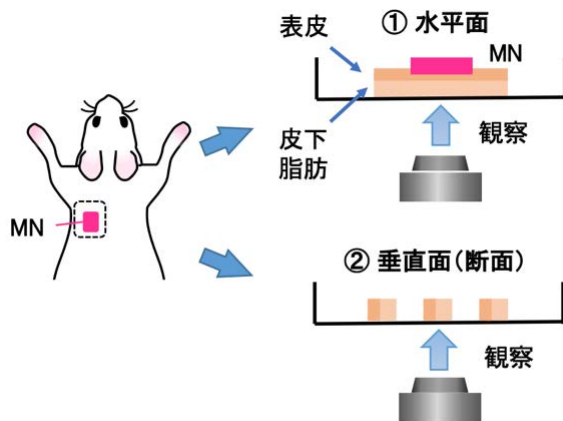


図1. *ex vivo* 評価系概要
MN: マイクロニードル

①の皮下脂肪側から観察する方法では、皮下脂肪層を走行する血管、およびその周囲の脂肪細胞が観察された(図2A)。さらに焦点を皮膚表面にずらしていくことで、表皮層の血管やマイクロニードルの横断面が確認できたが(図2B)、針の刺入度合いやカバーガラスからの距離によって、観察可能な面積や蛍光強度に大きな開きがあり、定量的な比較はやや困難であった。

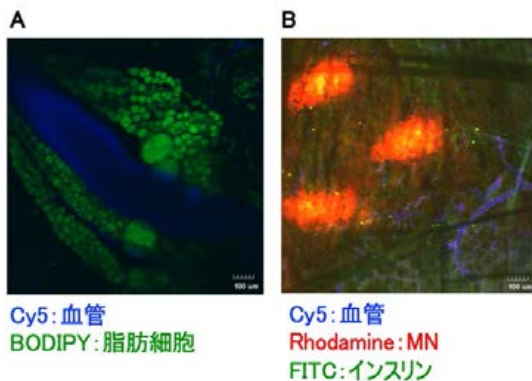


図2. 共焦点顕微鏡による皮膚構造の観察
(*ex vivo*, 水平面)

②の皮膚垂直面(断面)の観察では、血管を染める Cy5-PEG の蛍光強度の違いによって表皮・真皮と皮下脂肪を区別することが可能だった。また、マイクロニードル自体を観察することはできないものの、グルコース投与後に表皮・真皮層において FITC 蛍光強度の増強が認められた(図3)。また、皮膚表面からの深度に応じた蛍光強度の変化を定量的に捉えることも可能であった。

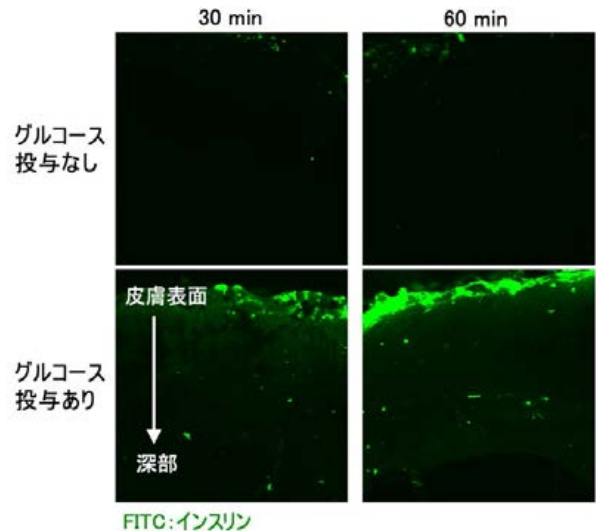


図3. グルコース投与後のインスリン拡散(*ex vivo*, 垂直面)

2. 2 *in vivo* 評価系

ex vivo 評価系では解析のタイムポイントごとに別個体を用いて解析することになるため、1つのデバイスから放出されるインスリン動態を捉えることはできない。そこで、マウス背部にデバイスを装着し、血管が豊富な部分を避けるように皮膚に切開を入れ、デバイス付きの皮膚弁をカバーガラスに展開して麻酔下に皮下脂肪側から経時的な観察を試みた(図4)。共焦点顕微鏡(Nikon, 共焦点レーザー顕微鏡システム C2+)、試料台に Thermo Plate (TOKAI HIT) を設置し、観察期間中マウスを被覆することで体温維持を図った。

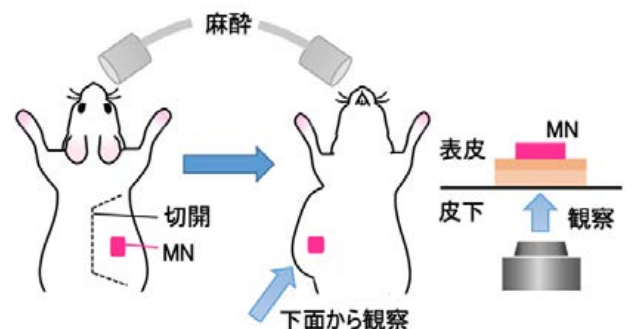


図4. *in vivo* 評価系概要

透過光にて皮下脂肪層の脂肪細胞や血管を確認し、さらに皮膚表面に視野を移すことで Rhodamine 標識のマイクロニードルが確認された。Rhodamine にてマイクロニードルが確認できる視野を確保し、グルコース投与後に FITC-インスリンの経時的な変化を検討した(図5)。グルコース投与後60分の範囲ではマイクロニードル断面を指標にした視野には大きな変化はなく、同一個体内での FITC 強度比較は可能であると考えられた。一方で、マイクロニードルの刺入具合によって観察可能な視野の広さや皮膚深度に差があるため、刺入性の向上と安定した装着方法の開発が必要であると考えられた。

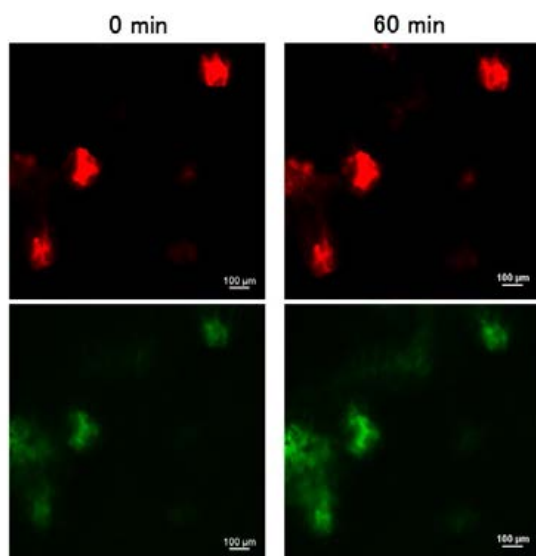


図5.グルコース投与後のインスリン拡散 (*in vivo*)

3. 考察及び今後の展望

本年度の検討により、*ex vivo*・*in vivo* いずれの条件においても生体の皮膚組織内部を共焦点顕微鏡によって観察可能であることが明らかとなった。固定や薄切などの手順を bypass してリアルタイムに観察できることから、生体内におけるマイクロニードルからのインスリン放出動態を理解する重要な情報が得られる。*ex vivo* 評価系では皮膚表面に装着したマイクロニードルからの水平・垂直方向のインスリン拡散動態を把握できる可能性があるが、異なる個体同士の比較になってしまう点や、皮膚片を細切する際の手技的なバラツキが撮像に影響する可能性がある。一方で、*in vivo* 評価系では生きているマウスの皮膚における変化を同一視野で経時的に評価することができる。しかしながら、皮膚弁としてカバーガラス上に展開するため、通常の皮膚とは温度や血流量が異なる可能性が否定できな

い。また、深部を観察するためにレーザー強度を上げる必要があり、蛍光同士の漏れ込みについて注意深く観察条件を設定する必要がある。

現在、マイクロニードル素材や形状の改良を続けていることから、*ex vivo*・*in vivo* 評価系を用いて刺入性やインスリン放出能の検証を行っていく。また、皮膚弁局所の温度や血流量測定を導入し、さらにそれらの条件を変えることで、皮膚環境がインスリン放出動態に与える影響を明らかにする。

【参考文献】

1. R. J. Pettis, A. J. Harvey. Microneedle delivery: clinical studies and emerging medical applications. *Ther. Deliv.* **3**: 357-371, 2012.
2. M. Kirkby, A. R. J. Hutton, R. F. Donnelly. Microneedle mediated transdermal delivery of protein, peptide and antibody based therapeutics: current status and future considerations. *Pharm. Res.*, **37**: 117 (2020).
3. A. Matsumoto, H. Kuwata, S. Kimura, et al. Hollow fiber-combined glucose-responsive gel technology as an *in vivo* electronics-free insulin delivery system. *Commun. Biol.* **3**: 313 (2020).
4. M. Leone, J. Monkare, J. A. Bouwstra, et al. Dissolving microneedle patched for dermal vaccination. *Pharm. Res.* **34**: 2223-2240 (2017).
5. J. Wang, J. Yu, Y. Zhang, et al. Charge-switchable polymeric complex for glucose-responsive insulin delivery in mice and pigs. *Sci. Adv.* **5**: eaaw4357, 2019.
6. A. D. Permana, M. T. C. McCrudden, R. F. Donnelly. Enhanced intradermal delivery of nanosuspensions of antifilaria drugs using dissolving microneedles: a proof of concept study. *Pharmaceutics* **11**: 346 (2019).

ポリマーコーティングによるマイクロニードルの 力学的強度の増大および機能評価

宮崎 拓也

1. 緒言

マイクロニードル(MN)は非侵襲的かつ持続的に薬剤を投与することのできる医療機器として注目されている^[1]。しかしながら、ニードル部の力学的強度が低いことが課題として挙げられ、皮膚への貼付によりニードル部が変形することにより MN と生体との接触面積が減少し、薬剤の投与が困難となる。そこで、MN の生体応用に向けてはニードル部の力学的強度の向上により内包した薬剤を皮下に確実に投与することが必要である。

そこで、本研究では MN のニードル部にポリマーを添加することにより力学的強度を増大し皮膚刺入性を向上することを目指した。ポリビニルアルコール(PVA)が優れた力学特性を有することに注目し、MN の表面に PVA コーティングを行うことにより MN の力学的強度の増大を目指した。また、MN 表面への PVA の導入により MN からの薬剤放出が阻害される可能性があるため、生理条件下における MN 表面からの PVA の脱離および MN の機能評価を行った。

2. 実験結果

2. 1 MN 表面への PVA コーティング

MN は既報^[2]に従って調製した。具体的には、N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)およびフェニルボロン酸モノマー(AmECFPBA)、N-ヒドロキシエチルアクリルアミド(NHEAAm)、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBAAm)を水/メタノール混合溶媒に溶解し、開始剤および触媒を添加し、鋳型中での重合反応により MN を調製した(Figure 1)。また、調製した MN を PVA 溶液(分子量: 89-98 kDa、100 mg/mL)に添加することによりニードル部を PVA コーティングした。ここで、PVA のヒドロキシル基にエステル結合を介して蛍光色素 Cy5 を導入することにより Cy5 標識 PVA を合成し、PVA 溶液に添加することにより PVA 層の蛍光による可視化を目指した(Figure 2)。蛍光顕微鏡による観察から、MN 表面での Cy5 由来の蛍光シグナルが確認されたことから、MN 表面への Cy5 標識 PVA の導入が示唆された(Figure 3a-c)。また、MN への PVA コーティング回数を1回から3回に増やすと MN 表面の PVA 層の厚みが 10 μm から 25 μm に増大したことから、PVA コーティングの回数により PVA 層の厚みを制御できることを確認した(Figure 3d)。

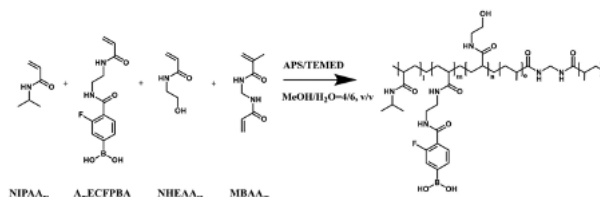


Figure 1. MN の合成スキーム。

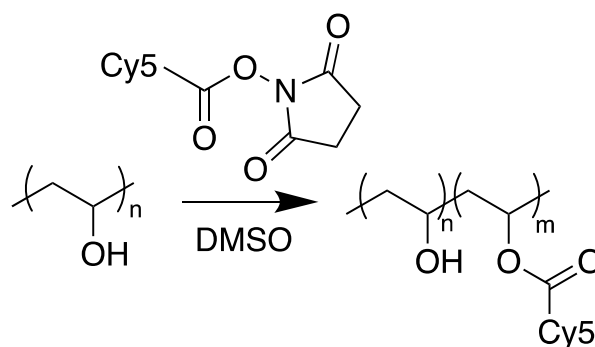


Figure 2. Cy5 標識 PVA の合成スキーム。

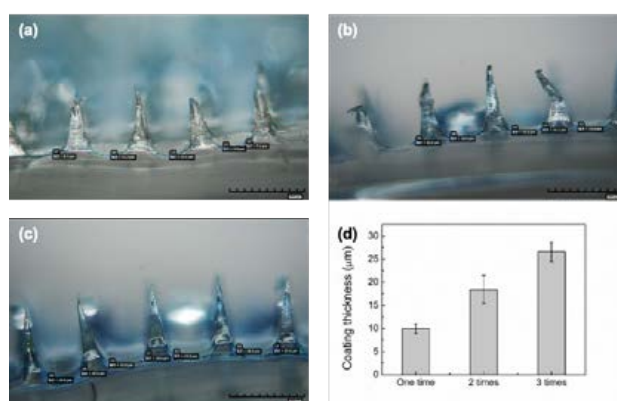


Figure 3. Cy5 標識 PVA を添加した MN の蛍光顕微鏡像。 (a) PVA を1回添加した MN。 (b) PVA を2回添加した MN。 (c) PVA を3回添加した MN。 (d) MN 表面の PVA の厚さ。

2. 2 PVA コーティングによる力学的強度の増大

マイクロニードル表面への PVA の導入が確認できたことから、マイクロニードルの力学的強度の評価を行った。具体的には、マイクロニードルのニードル部にせん断応

力を印加し、降伏応力を測定することにより力学的強度の指標とした。PVA 層が形成されたマイクロニードルの降伏応力がコーティングを行っていないマイクロニードルよりも高いことから、PVA 層形成によるマイクロニードルの力学的強度の向上が示唆された(Figure 4)。また、PVA コーティングの回数を 2 回以上にしても力学的強度の改善がみられなかったことから、最適な溶液の添加回数は 2 回であることが示唆された(Figure 4)。よって、今後の評価においては MN への PVA コーティングの回数は 2 回とした。

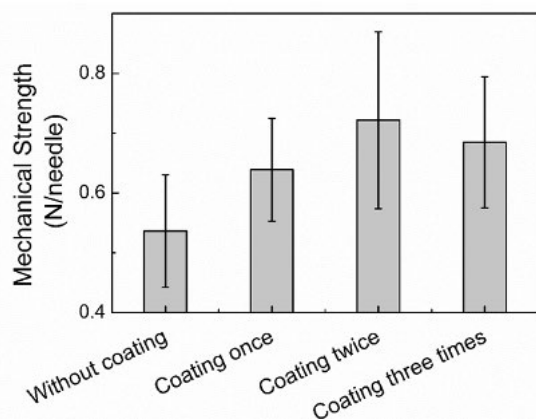


Figure 4. PVA コーティング後の MN の力学的強度。

2. 3 PVA コーティングの生分解性および MN の機能評価

MN 表面での PVA 層の形成および PVA 層の導入による力学的強度の向上が確認できた一方で、MN 表面での PVA 層の形成による薬剤放出量の減少が懸念されることから、PVA 層の分解性および PVA 層分解後の薬剤放出量の評価を行った。具体的には、アガロースを PBS に添加することによりアガロースゲル(アガロース濃度: 1%)を調製し、Cy5 標識 PVA コーティング後の MN を添加することにより、MN 表面の Cy5 の観察およびアガロース中の Cy5 の蛍光強度の測定を行った。また、アガロースをグルコース溶液(100 mg/dL)に添加することによりグルコース含有アガロースゲル(アガロース濃度: 1%)を調製し、MN からの FITC 標識インスリンの放出量をアガロース中の FITC の蛍光強度を測定することにより評価した。PBS 添加 35 分後に MN 表面から Cy5 由来の蛍光が消失し、その Cy5 由来の蛍光がアガロースゲル中において検出されてことから、生理塩条件下での MN 表面からの PVA の速やかな脱離が示唆された(Figure 5a-c)。さらに、アガロースゲルへのグルコース溶液の添加によりゲル中の FITC 由来の蛍光強度が増加していることから、PVA 層の消失による MN のグルコース応答性の回復およびインスリン放出が示唆された(Figure 5d)。

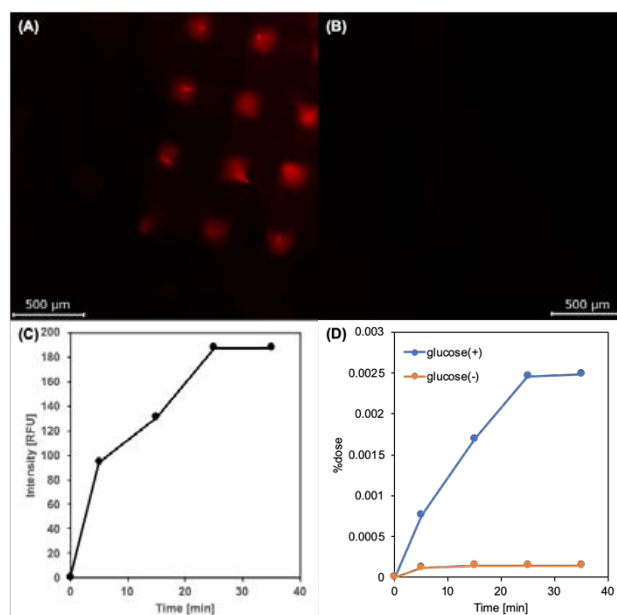


Figure 5. (a) PBS 添加前. (b) PBS 添加 35 分後の Cy5 標識 PVA 層を有するマイクロニードルの共焦点顕微鏡像. (c) PBS 添加後のマイクロニードルからの Cy5 標識 PVA の放出. (d) インスリン溶液 (mg/dL) 添加後の PVA 層分解後のマイクロニードルからの FITC 標識インスリンの放出。

3. 結言及び今後の展望

MN を PVA 溶液に添加することにより溶液の添加回数に依存した MN 表面への PVA の導入に成功した。また、PVA の導入によりニードル部の力学的強度を増大し、PVA 溶液の最適な添加回数を 2 回に決定した。さらに、生理塩条件下において PVA は速やかに分解し、分解後にはグルコース濃度依存的にインスリンを放出したことから、PVA コーティングは MN の機能に影響を与えないことを確認した。本研究の MN の力学特性を向上する手法は MN の構造および特性に依存しないことから、様々な MN の皮膚刺入性を向上することのできる一般的な手法になる可能性が高いと考えられる^[3]。

MN に求められる機能として、①優れた力学的強度、②優れた吸水性、③週レベルでの持続性、が挙げられ、本研究では力学特性の改善に成功したことから、今後は優れた吸水性を有する持続型 MN の開発を進める。具体的には、吸水性の高い新規ポリマーを MN に添加することにより皮膚刺入後の速やかな吸水を目指す。また、MN に持続的に薬剤を供給することのできるレザーバーの設計を行う。

【参考文献】

1. Y-C. Kim, J-H. Park, M. R. Prausnitz. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 1547-1568 (2012).
2. S. Chen, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto. *Adv. Funct. Mater.*, **29**, 1807369 (2019).
3. S. Chen, T. Miyazaki, M. Itoh, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto. *ACS Appl. Polym. Mater.* (2020) in press.

業 績

【原著論文】

1. S. Chen, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto. Smart microneedle fabricated with silk fibroin combined semi-interpenetrating network hydrogel for glucose-responsive insulin delivery. ACS Biomater. Sci. Eng. 5: 5781-5789 (2019).
2. S. Chen, T. Miyazaki, M. Itoh, Y. Morooka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto, Temperature-stable Boronate Gel based Microneedle Technology for Self-Regulated Insulin Delivery, ACS Applied Polymer Materials, **in press**
3. T. Miyazaki, S. Uchida, S. Nagatoishi, K. Koji, T. Hong, S. Fukushima, K. Ishihara, K. Kataoka, H. Cabral. Polymeric nanocarriers with controlled chain flexibility boost mRNA delivery in vivo through enhanced structural fastening. Adv. Healthc. Mater. **in press**
4. M. Asakawa, M. Itoh, T. Suganami, T. Sakai, S. Kanai, I. Shirakawa, X. Yuan, T. Hatayama, S. Shimada, Y. Akiyama, K. Fujiu, Y. Inagaki, I. Manabe, S. Yamaoka, T. Yamada, S. Tanaka, Y. Ogawa. Upregulation of cancer-associated gene expression in Activated fibroblasts in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. Sci. Rep. **9**: 19601, (2019).
5. M. Kawakubo, M. Tanaka, K. Ochi, A. Watanabe, M. Saka-Tanaka, Y. Kanamori, N. Yoshioka, S. Yamashita, M. Goto, M. Itoh, I. Shirakawa, S. Kanai, H. Suzuki, M. Sawada, A. Ito, M. Ishigami, M. Fujishiro, H. Arima, Y. Ogawa, T. Suganami. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition prevents nonalcoholic steatohepatitis-associated liver fibrosis and tumor development in mice independently of its anti-diabetic effects. Sci. Rep. **10**: 983, (2020).
1. 陳思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中都, 越智梢, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元亮 Enzyme-Free and Nanoparticle Free Polymeric Microneedle-Array Patch Serves as An On-Skin Pancreas for Sustained On-Demand Insulin Delivery 第 68 回高分子学会年次大会, 2019 年 5 月, 大阪
2. 陳思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中都, 越智梢, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元亮 Two layer microneedles fabricated with Semi-Interpenetrating Network Hydrogels for smart transdermal insulin delivery 第 68 回高分子討論会, 2019 年 9 月, 福井
3. 陳思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中都, 越智梢, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元亮 Enzyme free Microneedle Array Patch Composed of Boronate-Containing Hybrid Hydrogel for On-Demand Transdermal Insulin Delivery, 32nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2019 年 10 月, 広島
4. 陳 思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 宮崎拓也, 伊藤美智子, 田中 都, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元 亮 Protein-free insulin delivery microneedle patch integrated with temperature independent, glucose-responsive hydrogel, 第 31 回高分子ゲル研究討論会, 2020 年 1 月, 東京
5. 宮崎拓也, 内田智士, 片岡一則, Horacio Cabral 最適化したアミノ酸側鎖を有するポリエーテル骨格生分解性ポリカチオンを用いた mRNA 内包高分子ミセルの安定化 第 25 回次世代医工学研究会, 2019 年 7 月, 京都
6. 宮崎拓也, 内田智士, 片岡一則, Horacio Cabral mRNA の生体応用に向けた柔軟な生分解性ポリカチオンの開発 遺伝子・デリバリー研究会第 19 回夏季セミナー, 2019 年 9 月, 京都
7. 宮崎拓也, 内田智士, 長門石曉, 津本浩平, 福島重人, 片岡一則, Horacio Cabral メッセンジャーRNA の生体応用に向けた柔軟性ポリカチオンを用いたポリイオンコンプレックス型ミセルの構築 第 68 回高分子討論会, 2019 年 9 月, 福井
8. 宮崎拓也, 鈴木研資, 永松健, 片岡一則, Horacio Cabral. 妊娠期の化学療法に向けたナノ医薬の開発

【書籍】

1. T. Miyazaki, N. Nakagawa, H. Cabral. Strategies for Ligand-Installed Nanocarriers in Handbook of Nanotechnology Applications. Elsevier, 2020.

【口頭発表】

【研究開発部】貼るだけ人工臓臓

第 26 回次世代医工学研究会, 2019 年 12 月, 香川

9. T. Miyazaki, S. Uchida, H. Cabral.

Development of polymeric micelles for mRNA delivery
through stable complexation with flexible block ionomer.

1st French-Japanese Symposium on Polymer Science,
2020.1, Montpellier, France

【特許】

(1) 国内特許出願 2 件

【受賞】

1. 第 68 回高分子学会年次大会 (2019 年度) 広報委員会
パブリシティ賞

陳 思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中 都, 越智 梢, 宮原裕
二, 菅波孝祥, 松元 亮

2. 32nd International Microprocesses and Nanotechnology
Conference (2019) Most Impressive Presentation

陳 思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 田中 都, 越智 梢, 宮原裕
二, 菅波孝祥, 松元 亮

3. 第 31 回高分子ゲル研究討論会 (2020 年度) Soft Matter
Presentation Prize

陳 思淵, 松本裕子, 諸岡由桂, 宮崎拓也, 伊藤美智子,
田中 都, 宮原裕二, 菅波孝祥, 松元 亮