

平成23年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「薬物先端部搭載型新規マイクロニードルの開発と

その育毛製剤への応用」

研究開発成果等報告書

平成24年3月

委託者 近畿経済産業局

委託先 財団法人京都高度技術研究所

目 次

第1章 研究開発の概要

- 1 研究開発の背景・研究目的及び目標・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
- 2 研究体制・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3
- 3 成果概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
- 4 当該研究開発の連絡窓口・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

第2章 本論

- 1 医療用マイクロニードルの新規素材、サイズ、および皮膚挿入性・・・・・・・・ 6
- 2 マイクロニードルの安全性評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12
- 3 育毛実験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16
- 4 治験薬製造体制の樹立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19
- 5 総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

第1章 研究開発の概要

1 研究開発の背景・研究目的及び目標

マイクロニードルの現状

高齢化社会を迎える中、医療の必要性は日ごとに高まりつつありその趨勢の中で医薬品とその投与方法に関する適正化が重要性を増している。経皮吸収治療システム（TTS）は皮膚に貼って治す薬物投与方法として内服薬、注射剤などにはない数々の利便性を備えている。内服薬のように消化管や肝臓などに負担をかけず、注射剤のように針の侵入に伴う痛みがなく、また薬物の投与量をコントロールして一時的な過度の薬物吸収による副作用を軽減できることなどから、患者の不安・負担を和らげることができる。

このように優れたポテンシャルを有する TTS ではあるがその全医薬品中の TTS の売上高は1%に満たない。その理由は TTS で投与できる薬物が限定されることにある。皮膚は本来生体のバリエーとしてヒトを外界からの異物の生体内侵入を防御する機能を持つことから薬物皮膚吸収量は一般に少なく特に高分子薬物（蛋白質医薬、ワクチン抗原、など）を経皮投与しても体内へ吸収させることはほぼ不可能である。

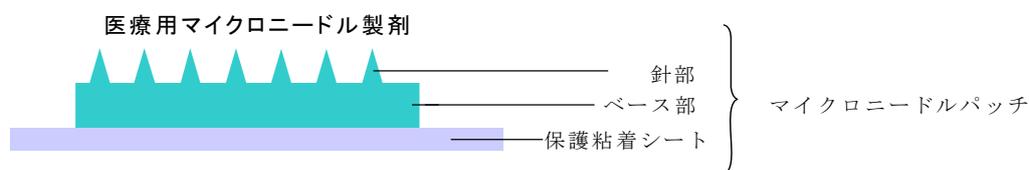
TTS の欠点をクリアする新しい薬剤投与方法としてマイクロニードルによる薬物の経皮投与が世界的に注目されてきた。マイクロニードル法は TTS の1つであり、長さ数百ミクロンの微細針の表面に薬剤をコーティング又はニードル内部に含有させ皮膚に刺し、薬剤が皮膚中で溶解することにより薬剤の体内導入を実現する方法である。米国が研究開発の発祥地であるがそこでの材料の主流はチタンや金属の微細針で形成されるものであり、これらは皮膚内折損による体内留置のリスクや、また大量生産が困難であるなどの欠点を有し実用化・製品化へのネックとなっており、未だに製品化には至っていない。

報告者らはマイクロニードルの医薬品、化粧品用途への応用に関していち早く注目し、マイクロニードル使用時における生体安全性を十分に確保、担保するために生体由来材料としてヒアルロン酸やコラーゲンを用いるマイクロニードルを作成することに着目した。特に、マイクロニードルを化粧品の応用を目的としてニードルを超微細化し、ヒアルロン酸やコラーゲンの本来の生理活性を活かし高機能性化粧品を企画し、独自の成形法を開発することにより世界で初めてマイクロニードル製品の工業生産を可能とすることに成功した。コスメディ製薬製の化粧品用マイクロニードルはすでに上市を果たしているが、医療用マイクロニードルは現在目的にあわせた性能に十分満たしているとはいえず研究段階にとどまっている。

業界から求められているマイクロニードル研究開発課題

現在のコスメディ製薬の医療用マイクロニードル製剤は薬剤をヒアルロン酸針部とベース部（図1 青色部）全体に含有させる成形法でマイクロニードルパッチを作製している。さらにマイクロニードルパッチを皮膚に適用した後皮膚に安定的に保持するため保護粘着シート（紫色）で裏打ちして製剤としている。しかしながら現状の製剤では皮膚適用後に針部に含有する薬物のみが皮膚に吸収されベース部の薬物は未利用となり、いわゆる薬物の生物利用度が極めて低い。それゆえ高価な蛋白質薬物を針部のみに搭載し生物利用度を注射と同様に 100%とすることが重要な研究開発課題である。同時に医療用目的として製造工程ではマイクロニードル製剤中薬物含有量が精密にコントロールできるか否かが実用化のための必須要件である。

図1 現在の医療用マイクロニードル断面模式図



研究目的および目標

マイクロニードル製剤に期待される性能を技術的ブレークスルーにより達成し世界に新しい TTS として定着させることを研究目的とする。上記のような3つの研究開発課題をクリアしなければならない。最終的には工業製造に移行し開発品を効率的に製造するためにも克服課題は多い。

それらを踏まえた具体的高度化目標を下表にまとめる。

* 業界要望を踏まえた高度化目標

項目	高度化目標
1 マイクロニードルの材料、サイズ	生体安全性の高い生分解性高分子を使用し、成形性、皮膚刺激性、薬物皮膚内放出性、に最も優れた材料を選定し、皮膚の適切な深さに挿入されるサイズを決定する
2 薬物の針部への高度濃縮	①薬剤を針部のみを含浸させることによりマイクロニードルの皮膚アプライ後の薬物の高度利用を可能とする ②薬剤の針部への搭載は再現性よく定量的であること
3 パイロット製造体制	実験室的製造段階から準工業的製造段階へレベルアップし、ユーザーへの安定した製品の供給を可能とする

業界要望を踏まえた高度化目標を達成するために下記の研究開発を実施するにあたり、マイクロニードル製剤の高性能化検討を実践するためにはより具体的応用を選定して技術検討を進める必要がある。

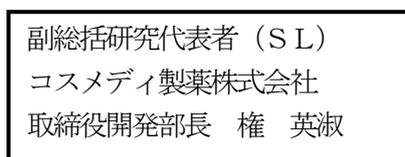
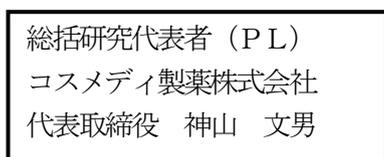
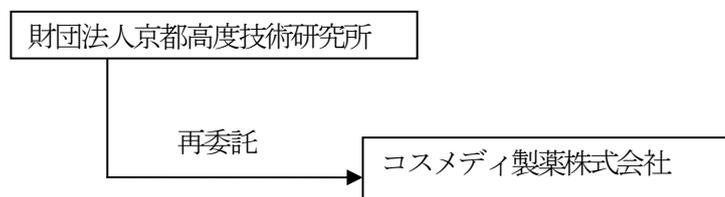
具体的内容は以下の5項目とする。

- 1) 医療用マイクロニードルの新規素材、サイズ設計
- 2) マイクロニードル針部への薬物の高度かつ定量的搭載
- 3) マイクロニードル製剤の安全性評価
(上記1, 2プロセスの中で最適化されたマイクロニードルを用いて将来のボランティア試験に先立ち系統的な皮膚安全性試験を実施する)
- 4) 医療用マイクロニードル製剤の生産技術的検討
- 5) マイクロニードルの応用研究 育毛蛋白用マイクロニードル製剤の開発

2 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制

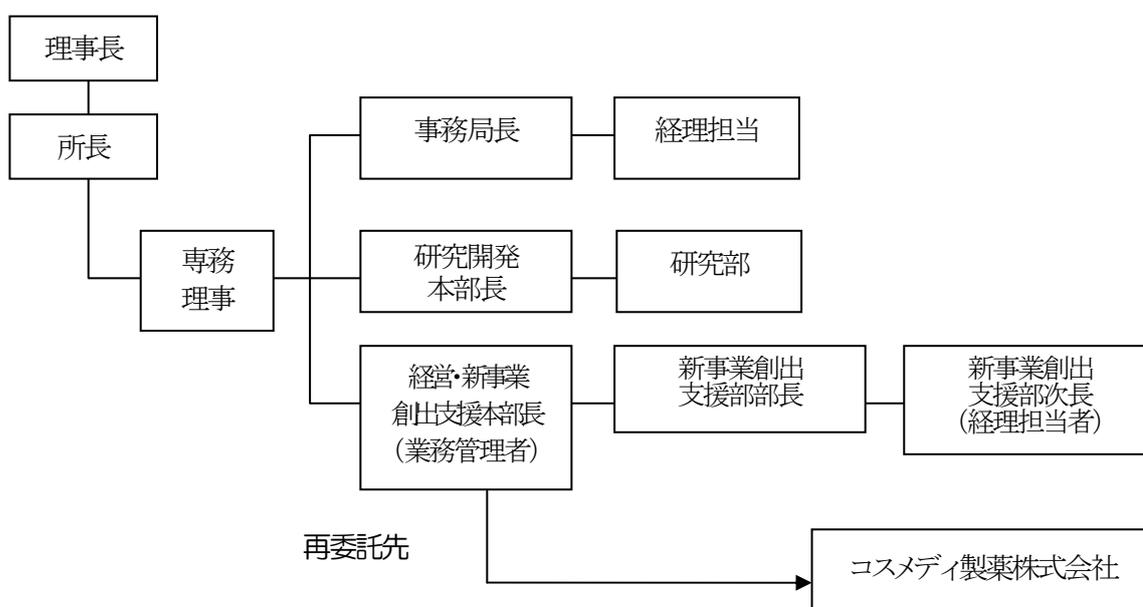
1) 研究組織 (全体)



2) 管理体制

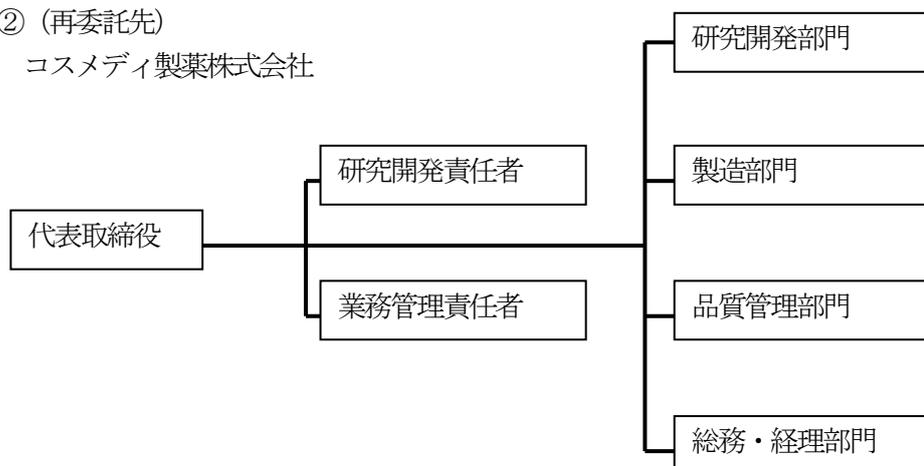
①事業管理機関

[財団法人京都高度技術研究所]



② (再委託先)

コスメディ製薬株式会社



3) 研究者氏名

コスメディ製薬株式会社

氏名	所属・役職
神山 文男	代表取締役
権 英淑	取締役
熊本 諭	研究開発部門・主任研究員
長谷川 純也	研究開発部門・研究員
川崎 一馬	研究開発部門・研究員

4) 協力者

氏名	所属・役職
中村 卓爾	クリエイション・コア京都御車 インキュベーションマネージャー

3 成果概要

1) 医療用マイクロニードルの新規素材、サイズ設計 (平成22年度実施)

育毛蛋白 (PEDF) を頭部へ投与するためのマイクロニードルの材料に関し検討し医薬品添加物として実績を有する【ヒアルロン酸+デキストラン+ポリビニルピロリドン】、からなる組成が最適であることを見出した。本マイクロニードル組成と PEDF の組み合わせに関して特許を1件出願した。

マイクロニードルのサイズ、形状に関しては、いくつかの成形金型を購入しそれらを使用して鋳型成型法による多くのサイズ形状のマイクロニードルを作成評価し、医療用マイクロニードル候補を絞り込んだ。

2) マイクロニードル針部への薬物の高度かつ定量的充填 (平成22年度実施)

高価なPEDFを効率的にマイクロニードル先端部に高濃度かつ定量的に搭載する方法を確立した。

3) マイクロニードルの安全性評価（平成23年度実施）

将来のヒト適用を考慮して安全性を十分に保証されたマイクロニードルでなければならない。臨床試験にPEDF搭載マイクロニードルを供するに際してはGLPに準拠した施設における安全性試験データが必須である。報告者らはGLP施設を選定し、マイクロニードル投与方法に関して実地説明した後試験を依頼した。実施した試験内容は、(1)皮膚一次性刺激試験、(2)皮膚累積刺激性試験、(3)皮膚感作性試験、の3種であり、いずれも問題がないことを確認した。

4) 医療用マイクロニードルの生産性技術検討（平成23年度実施）

パイロット生産用装置（特別設計品）を使用してマイクロニードル製造のための最適運転条件に関して検討し、安定した品質のマイクロニードル生産条件の最適化を実現した。

5) 育毛剤マイクロニードルの開発と研究臨床試験用パイロット製造（平成23年度実施）

- ① PEDF含量を変化させたマイクロニードルを作成し脱毛動物モデルを使用する実験によりPEDFマイクロニードルの育毛活性を確認した、同時にPEDF必要量を決定した。
- ② 育毛用PEDF製剤の規格および試験方法、ならびに仮規格値を設定した。
- ③ 育毛用PEDF製剤の安定的製造条件を確立した。
- ④ 来年度実施予定の研究臨床試験のための治験薬GMP体制を内部に整備した。

4 当該研究開発の連絡窓口

コスメディ製薬株式会社 代表取締役 神山 文男
〒602-0841 京都府京都市南区東九条河西町32
TEL: 075-950-1510 FAX: 075-950-1512
E-mail: kamiyama@cosmed-pharm.co.jp

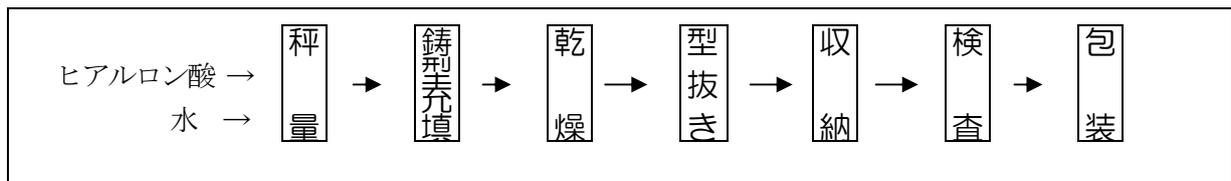
財団法人京都高度技術研究所 経営・新事業創出支援本部長 孝本 浩基
〒600-8813 京都市下京区中堂寺南町134番地
TEL: 075-315-3625 (代表) FAX: 075-315-3614
E-mail: komo@astem.or.jp

第2章 本論

1 医療用マイクロニードルの新規素材、サイズ、および皮膚挿入性

1-1 生体溶解型マイクロニードルの作成法の概要

コスメディ製薬におけるマイクロニードルの成形法を下記にまとめる。ヒアルロン酸を主とする生体内溶解性素材（及び必要に応じ薬物）を「秤量」し水を加えて水溶液とした後「鑄型充填」し、「乾燥」し、鑄型から「型抜き」し、ケースに「収納」して「検査」後、「包装」する。



「鑄型充填」、「乾燥」、「型抜き」に関する概要を述べる。

図2はマイクロニードルの製造方法の一例を示す断面図である。図中1は、感光性樹脂に光照射するリソグラフィ法により所定形状のマイクロニードルパターンを形成した後、電鑄加工することにより所定形状のマイクロニードルパターンを転写したマイクロニードル形成用凹部11が形成された鑄型である。また2は、マイクロニードル素材の水溶液である。

コスメディ製薬製マイクロニードル800の作成に関する詳細としては、マイクロニードル形成用凹部11は根元の直径（b）が0.2mm、先端直径（c）が0.04mm、深さ（a）0.8mmの円錐台状であり、0.6mm間隔（d）に格子状に配列されており、1cm²あたり260個形成されている。又、マイクロニードル形成用凹部11は1辺が10cmの正方形内に形成されている。素材の混合物を水に溶解させて5~20%固形分水溶液とする。本溶液を室温下マイクロニードル形成用凹部に充填し水分を蒸発して乾燥した後剥離してマイクロニードルを作製する。

1-2 新規素材の探索と試作

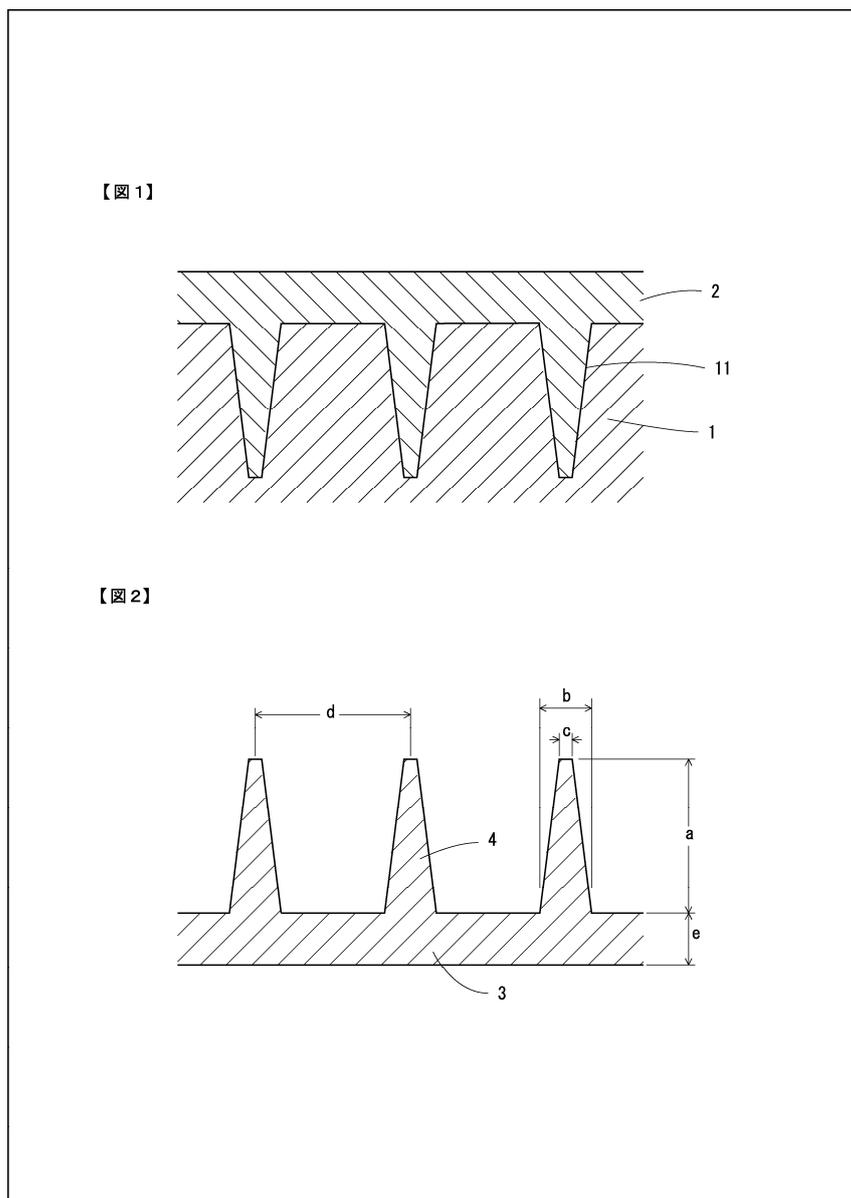
報告者らが開発を進めているマイクロニードルは生分解性合成高分子を構成材料として用いるものである。より具体的にはヒアルロン酸、コラーゲン、等を用いるマイクロニードルである。これら生分解性合成高分子からなるマイクロニードルのシリコンマイクロニードルなどに比べての大きな特徴は薬剤をマイクロニードル内部に含有させることが可能となる点である。さらに構成材料が水溶性であるので構成材料が挿入時皮膚中で水分により溶解し薬物の体内放出するようなデザインが可能となる。

報告者らはヒアルロン酸とコラーゲンとのブレンド物を構成材料とする針高さ200μmのマイクロニードルパッチを化粧品用途に開発、上市しており、本素材の安全性と化粧品としての有効性は実証済みである。しかしながら本素材の医療用への使用を考えるとコラーゲンは医薬品添加物（注射用途）としての実績を有するものでなく本開発プロジェクトで使用する材料としては不相当である。

本開発において育毛蛋白（PEDF）を搭載したマイクロニードルを開発し将来の臨床試験に供するためにはマイクロニードル素材は医薬品添加物としての実績を有するものであることが必須である。

検討するにあたって、（1）マイクロニードルの成形性の容易さ、（2）皮膚内に折れることなく容

図2 マイクロニードルの作製法模式図



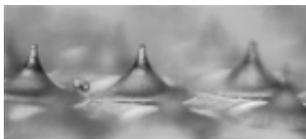
易且つ均一に刺入できること、(3)皮膚内で速やかに溶解すること、等を評価項目とし試作を進めた。

その結果、ヒアルロン酸、デキストラン及びポリビニルピロリドンにより構成されるマイクロニードルは医薬品添加物（注射用途）でありかつ上記3評価項目を満たすことが分かった。

1-3 長さの異なるマイクロニードルの試作

報告者らはマイクロニードルの長さや形状に関して数年検討を進め、数種の長さ、形状の異なるマイクロニードルを完成しそれぞれの用途に適用してきた。これまでの最も基本的なマイクロニードル3種に関する詳細を図3にまとめる。

図3 マイクロニードル3種

名称	MicroHyal (MH) 800	MicroHyal (MH) 300	MicroHyal (MH) 200
製剤構成			
主構成材料	ヒアルロン酸	ヒアルロン酸	ヒアルロン酸
形状	円錐形	コーン形	コーン形
高さ(μm)	800	300	200
針間隔(μm)	600	600	600
皮膚到達 深度目標(μm)	600	100	20
到達部位	真皮	表皮	角質
顕微鏡写真			
用途・目的	(医療用、医療器具) 高分子薬液経皮送達	(医療用、医療器具) ワクチン接種	(医療用、医療器具、化粧品) 化粧品、医薬部外品
装着感	弱い痛み	ほぼ無痛	無痛

1-4 各種マイクロニードル適用後の皮膚断面組織切片観察

各種マイクロニードルをヒト摘出皮膚に適用することにより皮膚刺入挙動、到達深さなどを観察した。

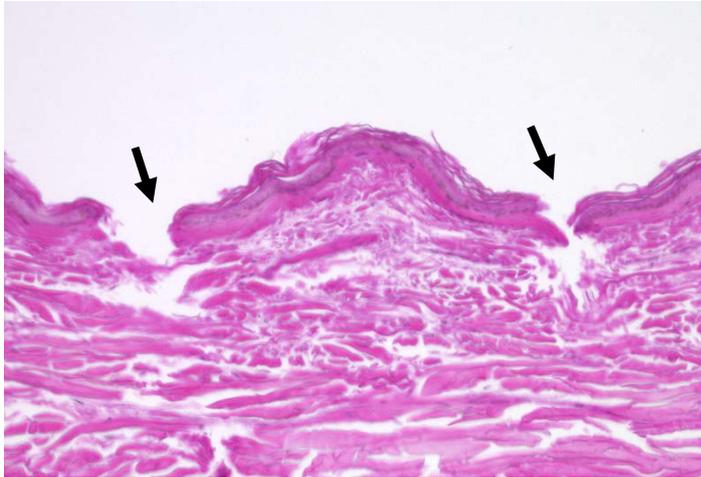
実験方法

MH200、MH 300、MH 800 を摘出したヒト皮膚に貼付し、1 時間後マイクロニードルパッチを剥し皮膚を直ちに液体窒素に浸漬して凍結ブロックを作製した。厚さ 6 μm の凍結組織切片を作製し、HE 染色し顕微鏡観察を行った

結果・考察

各種マイクロニードルの皮膚挿入性を検討した。代表例として MH800 について図 4 に示す。MH800 は皮膚の真皮まで挿入され、育毛効果を最大に発揮するため薬物を毛孔深部まで送達可能性があると考えられる。

図4 MH800 適用後の皮膚断面の顕微鏡写真



マイクロニードルは角質、表皮を
通過し真皮に至っている

1-5 長さの異なるマイクロニードルの皮膚障害性評価

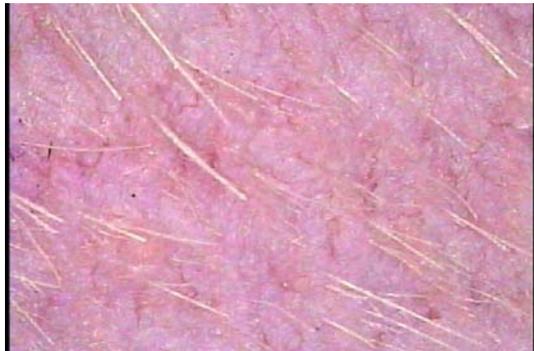
実験方法

MH800、MH200 を Wistar 系ラットの徐毛した皮膚に適用して 30 分後に剥離した。剥離直後と剥離 24 時間後に表面の顕微鏡写真を撮影しマイクロニードル適用面皮膚損傷度を観察した。

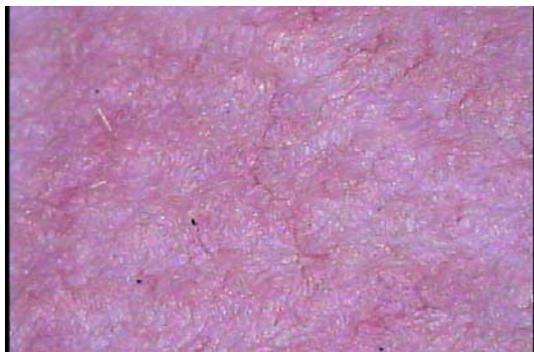
結果・考察

得られた結果を図5に示す。MH200 適用皮膚はマイクロニードル剥離直後においても健常皮膚とほぼ同一の性状を示し、皮膚損傷がほとんどないことが分かる。MH800 適用の場合は、剥離直後に明瞭な針挿入跡が観察される。しかしながら 24 時間後にはまったく観察されず健常皮膚と同等まで回復していることが分かる。すなわち、マイクロニードルによる皮膚侵襲は一時的、可逆的であることが明瞭となった。一方、通常皮下注射用 26G 注射針は 24 時間後にも傷跡が明瞭に観察される。

図5 マイクロニードル使用後の皮膚の性状変化
使用前



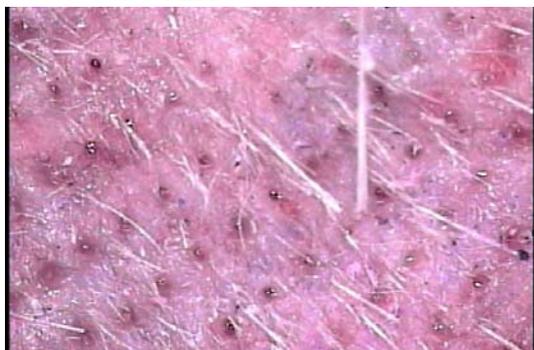
MH200 使用直後



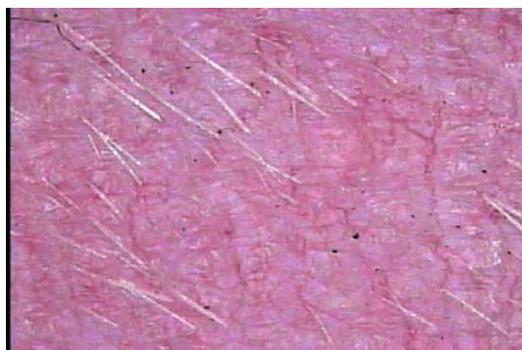
MH200 使用 24 時間後



MH800 使用直後



MH800 使用 24 時間後



通常皮下注射用 26G 注射針使用直後



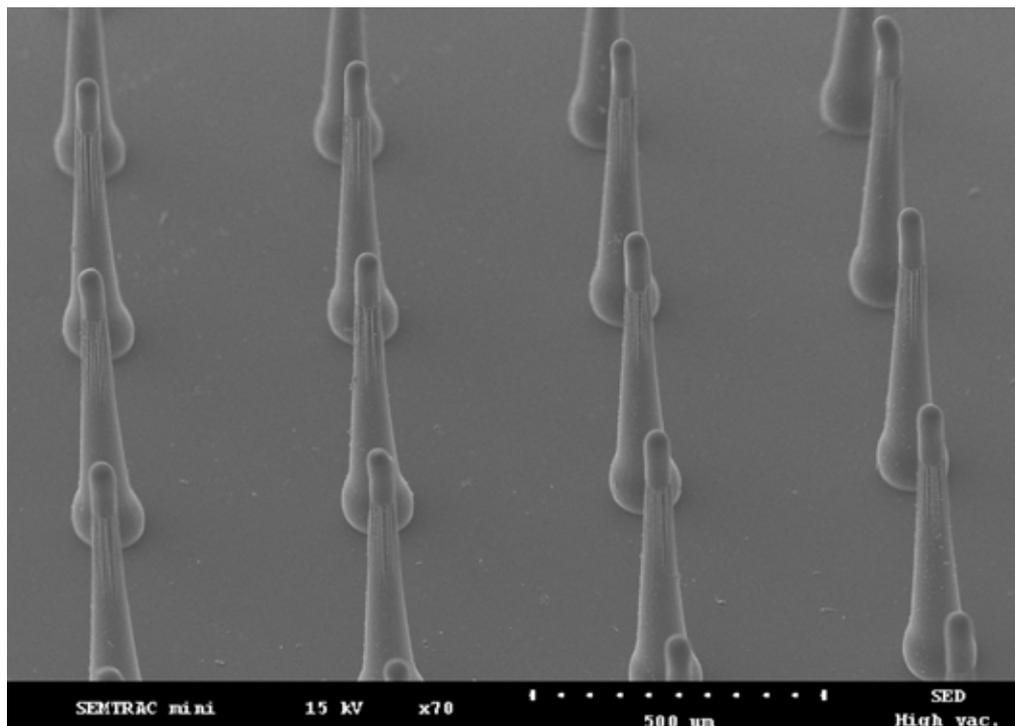
26G 注射針使用 24 時間後



1-6 先端薬物搭載マイクロニードルの作成

PEDF を効率よく使用するために薬物の針先への装填法に関して検討し精度よく薬物を搭載できる方法を確立した。本法を用いてモデル薬物を先端搭載したマイクロニードルの電子顕微鏡写真を図6に示す。薬物としてはモデル薬物 (FITC デキストラン) を用いた。

図6 薬物先端搭載マイクロニードル (MH800)



2 マイクロニードルの安全性評価

医薬品の安全性はヒト投与に先だち厳密に評価され安全性が担保される必要がある。注射薬、経皮吸収製剤、その他の医薬品は既に多くの実績の中からいかなる安全性試験を実施すべきかが決定されており[医薬品製造指針]などに公にされている。マイクロニードルは新しい投与形態でありその安全性試験は当然ながら必要項目や試験法の詳細は未だ決定されていない。

マイクロニードルの基剤はヒアルロン酸を用いているがそれらは全て注射薬としての実績を有するグレートであり、安全性は担保されている。しかしながら、安全性が担保されている基剤と薬物の組み合わせであっても一般的には投与経路が異なれば新しい製剤となりその安全性試験は実施されなければならない。

PEDF と基剤とを組み合わせマイクロニードル製剤としての経皮投与法に関する安全性試験は将来の開発を進めるために必須である。製剤及び基剤の安全性試験はGLPに準拠して実施されなければならない。報告者らは複数のGLP施設を候補として折衝し、最終的にボゾリサーチセンター（株式会社ボゾリサーチセンター 函南研究所 静岡県田方郡函南町桑原三本松 1308-125）を第一候補とし現場を訪問し施設を査察してボゾリサーチセンターに決定してサンプルを送付し試験を実施した。

マイクロニードルの針長さは200、500、800 μm の3種を用いた。200 μm は化粧品、医薬部外品用途のマイクロニードルである。500、および800 μm は医薬品用途のマイクロニードルである。なお安全性試験は200、500 μm に関してはプラセボマイクロニードルとPEDF入りマイクロニードルとをペアとして実施した。800 μm に関してはプラセボのみの安全性試験を実施した。

2-1 ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験（200および500 μm ）

2-1-1 被験物質

被験物質1

被験物質名	: 200 Placebo
ロット番号	: H122701
剤型	: マイクロニードル剤（ニードル長さ200 μm ）
性状	: 直径1 cmのマイクロニードルアレイの裏に直径2 cmの粘着テープが被っている。マイクロニードルアレイは無色~微白色半透明である。

被験物質2

被験物質名	: 200 containing PEDF
ロット番号	: H122702
薬剤含量	: PEDF 10 μg /枚
剤型	: マイクロニードル剤（ニードル長さ200 μm ）
性状	: 直径1 cmのマイクロニードルアレイの裏に直径2 cmの粘着テープが被っている。マイクロニードルアレイは無色~微白色半透明である。

被験物質 3

被験物質名	: FX Placebo
ロット番号	: H122703
剤型	: マイクロニードル剤 (ニードル長さ 500 μ m)
形状	: 直径 1 cm のマイクロニードルアレイの裏に直径 2 cm の粘着テープが被っている。マイクロニードルアレイは無色~微白色半透明である。

被験物質 4

被験物質名	: FX containing PEDF
ロット番号	: H122704
薬剤含量	: ニードル部 PEDF 10 μ g/枚
剤型	: マイクロニードル剤 (ニードル長さ 500 μ m)
性状	: 直径 1 cm のマイクロニードルアレイの裏に直径 2 cm の粘着テープが被っている。マイクロニードルアレイは無色~微白色半透明である。

2-1-2 試験法

プラセボ 200、PEDF 含有 200、プラセボ FX 及び PEDF 含有 FX の皮膚一次刺激性を、日本白色種雌ウサギ 12 匹 (2 被験物質/6 匹) を用いて検討した。

刈毛したウサギの背部に健常皮膚及び損傷皮膚を各 2 区画、計 4 区画設けて投与部位とした。マイクロニードル製剤である各被験物質を健常皮膚及び損傷皮膚 (各 1 区画) の投与部位にアプリケーターを用いて投与した。その後、テープ等で被覆し、各被験物質を 24 時間閉塞貼付した。被験物質投与 24、48 及び 72 時間後に投与部位を観察し、Draize の基準に従って皮膚刺激反応を判定した。

2-1-3 結果

1) 皮膚一次刺激性

プラセボ 200、PEDF 含有 200、プラセボ FX 及び PEDF 含有 FX を投与した全例の健常皮膚及び損傷皮膚には、いずれの観察時期にも皮膚刺激反応は認められなかった。各被験物質の皮膚一次刺激性指数 (P.I.I.) はいずれも 0 であり、Draize 法を参考とした刺激性区分より「無刺激物」に分類された。

2) 一般状態及び体重

一般状態及び体重では、全例に異常は認められなかった。

2-1-4 結論

以上の結果から、本試験条件下において、プラセボ 200、PEDF 含有 200、プラセボ FX 及び PEDF 含有 FX には、皮膚一次刺激性はないと判断された。

2-2 ウサギを用いた皮膚累積刺激性試験 (200 および 500 μ m)

2-2-1 被験物質

被験物質は 2-1 における物質と同じ。

2-2-2 試験方法

プラセボ 200、PEDF 含有 200、プラセボ FX 及び PEDF 含有 FX の皮膚累積刺激性を、日本白色種雌ウサギ 12 匹 (2 被験物質/6 匹) を用いて検討した。

刈毛したウサギの背部に健常皮膚及び損傷皮膚を各 2 区画、計 4 区画設けて投与部位とした。マイクロニードル製剤である各被験物質を健常皮膚及び損傷皮膚 (各 1 区画) の投与部位にアプリケーターを用いて投与した。その後、テープなどで被覆し、各被験物質を約 6 時間閉塞貼付した。この操作を、プラセボ 200 及び PEDF 含有 200 は 1 日 1 回、計 14 回連続で実施し、プラセボ FX 及び PEDF 含有 FX は 2 日に 1 回、計 7 回実施した。投与 2 日から投与 15 日まで各被験物質の投与部位を観察し、Draize の基準に従って皮膚刺激反応を判定した。

2-2-3 結果

1) 皮膚累積刺激性

プラセボ 200、PEDF 含有 200、プラセボ FX 及び PEDF 含有 FX を投与した全例の健常皮膚及び損傷皮膚には、投与 2 日から投与 15 日までの観察期間を通して、皮膚刺激反応は認められなかった。

2) 一般状態及び体重

一般状態では、全例に異常は認められなかった。

体重では、投与 15 日 (観察終了日) の測定値が投与開始日に比べて 10/12 例で減少 (70~220 g) したが、2 日に 1 回あるいは毎日実施したアプリケーターを用いての投与操作あるいは閉塞貼付に因る影響と考えられた。

2-2-4 結論

以上の結果から、本試験条件下において、プラセボ 200、PEDF 含有 200、プラセボ FX 及び PEDF 含有 FX には、皮膚累積刺激性はないと判断された。

2-3 モルモットを用いた皮膚感作性試験 (200 および 500 μm)

2-3-1 被験物質

被験物質は 2-1 における物質と同じ。

2-3-2 試験方法

プラセボ 200 及び PEDF 含有 200 の皮膚感作性を検討するため、ハートレー系白色雌モルモットを用いて Adjuvant and Patch Test 法により皮膚感作性試験を実施した。

試験群は、被験物質感作群、プラセボ感作群、陰性対照群及び陽性対照群の 4 群 (各群 10 匹) とした。

被験物質感作群は、プラセボ 200 で感作誘導し、プラセボ 200 及び PEDF 含有 200 で惹起した。プラセボ感作群は、PEDF 含有 200 で感作誘導し、プラセボ 200 及び PEDF 含有 200 で惹起した。陰性対照群は、リント布パッチのみで感作誘導し、プラセボ 200 及び PEDF 含有 200 で惹起した。陽性対照群は、0.1%DNCB (1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene) 溶液で感作誘導し、0.1%DNCB 溶液及びアセトン (媒体) で惹起した。惹起貼付除去 24 及び 48 時間後に皮膚反応を観察した。

2-3-3 結果

1) 皮膚感作性

被験物質感作群及びプラセボ感作群では、プラセボ 200 及び PEDF 含有 200 の両被験物質の惹起部位に皮膚反応は認められず、陽性率はいずれも 0%であった。

陰性対照群においても、プラセボ 200 及び PEDF 含有 200 の両被験物質の惹起部位に皮膚反応は認められず、陽性率はいずれも 0%であった。

一方、陽性対照群では、0.1%DNCB 液の惹起部位に明らかな皮膚反応が認められ、陽性率は 100%であった。アセトンの惹起部位には皮膚反応は認められず、陽性率は 0%であった。

2) 一般状態及び体重

各群全例の一般状態及び体重推移に異常は認められなかった。

2-3-4 結論

以上のように、本試験条件下において、プラセボ 200 及び PEDF 含有 200 に皮膚感作性はないと判断された。

2-4 800 μ m プラセボマイクロニードルの皮膚安全性試験

2-4-1 ウサギを用いた皮膚一次刺激性試験

プラセボマイクロニードルの皮膚一次刺激性を、日本白色種雌ウサギ 6 匹を用いて検討した。

本試験条件下において、プラセボ EX には皮膚一次刺激性はないと判断された。

2-4-2 ウサギを用いた皮膚累積刺激性試験

プラセボマイクロニードルの皮膚累積刺激性を、日本白色種雌ウサギ 6 匹を用いて検討した。

本試験条件下において、プラセボ EX に皮膚累積刺激性はないと判断された。

2-4-3 モルモットを用いた皮膚感作性試験

プラセボマイクロニードルの皮膚感作性を検討するため、ハートレー系白色雌モルモットを用いて Adjuvant and Patch Test 法により皮膚感作性試験を実施した。本試験条件下において、プラセボマイクロニードルに皮膚感作性はないと判断された。

3 育毛実験

PEDFの含有量を異にするMNを用いてマウスの育毛試験を実施しPEDF-MNの育毛効果を確認した。プラセボ群としてはPEDFを含まないマイクロニードルを投与して比較した。

3-1 試験方法

マウスはコリン欠乏食を与えることにより脱毛させその状態で PEDF-MN を投与して効果を判定した。試験開始から 4~8 週で、背中から頭部にかけて脱毛が進んだ。マウスの体毛の状態は 1 日 1 回観察した。

脱毛が生じるにつれ、体毛の色は薄くなり肌色の皮膚を露出するようになった。

マイクロニードル試験は、被験物質を含むマイクロニードルを、印を付けた皮膚の脱毛部位に貼り付け、その周囲を包帯で固定することで、2 時間刺入状態を保った。この貼付は、1 週間に最初の 2 週間は 3 回、その後は週 2 回実施した。

実験群としては、プラセボ群、PEDF10 μ g 群、PEDF20 μ g 群の 3 群のマウスに投与した。

群名	用量	匹数
プラセボ群	0 μ g/patch	5
10 μ g 群	10.0 μ g/patch	5
20 μ g 群	20.0 μ g/patch	5

①発毛量測定方法

発毛量測定は、PEDF-MN 投与後 6 週間後に電動バリカンを用いて、発毛した（あるいは残存した）毛量だけを測定して、比較した。

②病理試験方法

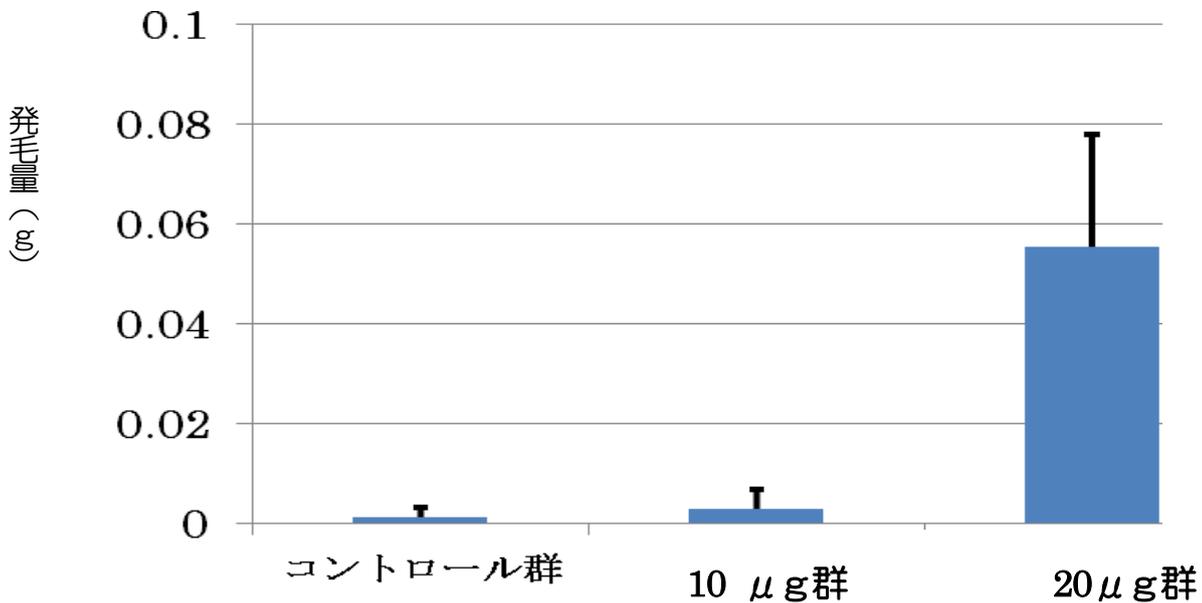
皮膚切片標本を Apop-Tag およびメチルグリーンでも染色した。Apop-Tag では、アポトーシスを起こした細胞の核が茶色に染まる。メチルグリーンでは、核中の DNA が緑青色に染まり、核小体中の RNA が赤色に染まるので、細胞の核が茶色に染まる。Apop-Tag 染色は、ApopTag（登録商標）In Situ Apoptosis 検出キット（ケミコン社から販売）を用いて行った。このキットでは、アポトーシス細胞の DNA 断片末端を TdT（末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ）を使用してインサイチュで標識し、特異的染色によってアポトーシス細胞を検出する。メチルグリーン染色は、以下の手順で行った：(1)脱パラフィンおよび蒸留水による洗浄、(2)10~15分メチルグリーン・ピロニン液に浸漬、(3)急いで蒸留水で水洗（スライドの染色液が落ちる程度）、(4)n-ブタノール I・II、IIIで分別し、脱水、(5)透徹、封入する。

3-2 結果

①発毛量測定結果

PEDF パッチ投与後 6 週間後に毛髪量の測定を行い、PEDF 含量 10 μ g 以上において発毛が観察された。20 μ g/patch において明瞭な発毛が見られ、コントロール群と統計的有意差が見られた（図 7）。縦軸は、毛重量（g）である。

図7 PEDF-MN 投与による発毛効果

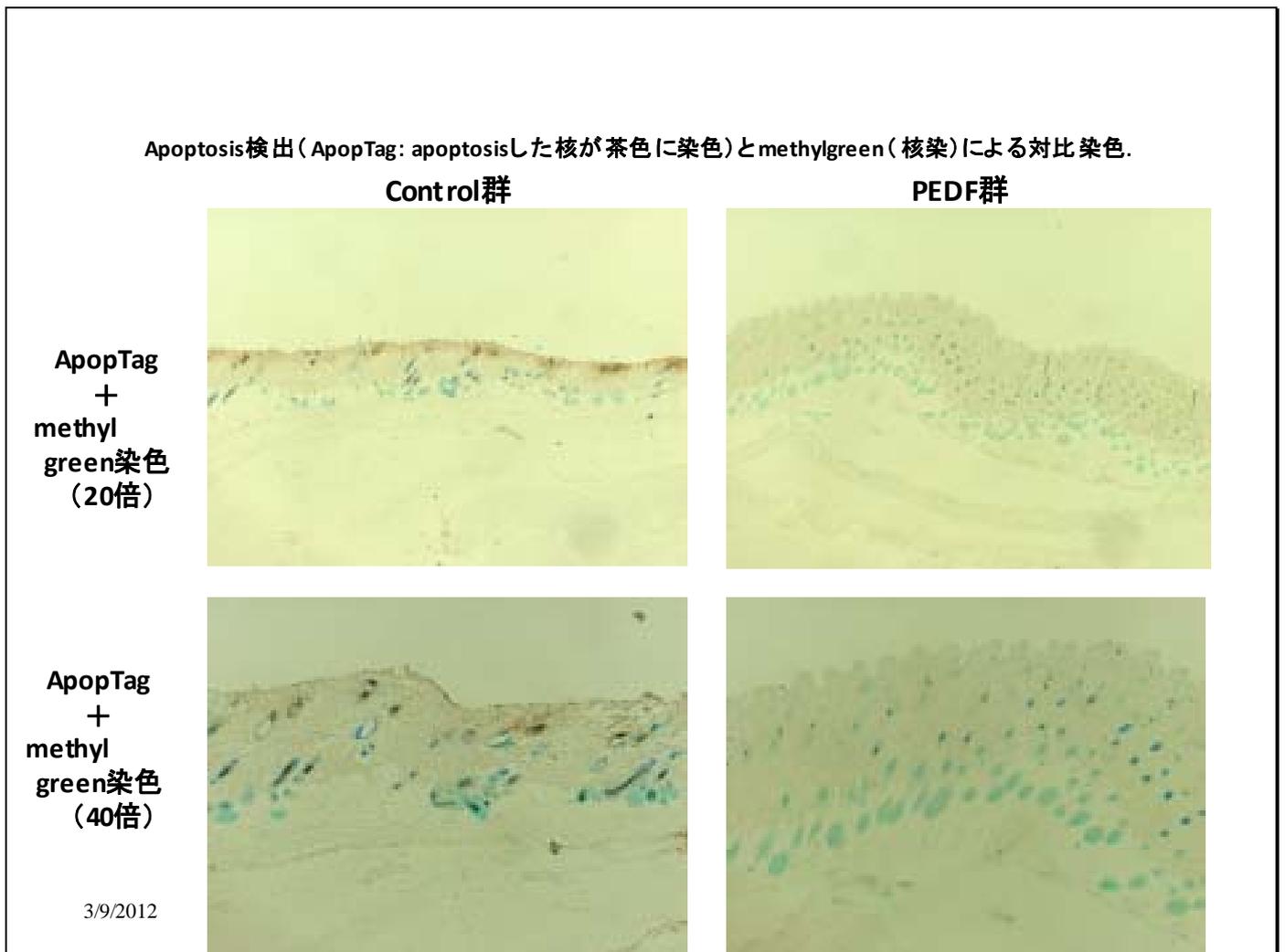


② 病理試験結果

PEDF-MN 群 (20 μg) とコントロール群の「Apop-Tag およびメチルグリーン」染色結果を図8に示す。コントロール群においてはApoptosisにより死滅した表皮細胞が表面に累積し茶色に見えている。マウスに持続的にコリン欠乏食を与えると酸化ストレスにより毛母細胞を含めた表皮細胞がダメージを受けて毛の生育不可となり結果的にハゲの症状を呈するものである。PEDF は酸化ストレスに対抗して毛母細胞、表皮細胞の活性化を促す。PEDF-MN 群における表皮はApoptosisをおこさずに正常であることが分かる。毛母細胞 (青く染色されている) はPEDF-MN 群において多数健全な形でみられる。それに反しコントロール群では毛母細胞自身もダメージを受けて変形しており健全な形のものがないことが見て取れる。

結論的に、PEDF-MN はマウスの発毛に極めて効果的でありまた細胞レベルでの表皮の毛母細胞への活性化が確認された。

図8 病理試験結果（「Apop-Tag およびメチルグリーン」染色結果）



4 治験薬製造体制の樹立

本プロジェクト終了後、来期には研究臨床試験を実施することを計画している。研究臨床試験そのものは医師の管理下で実施されるが報告者らは治験薬の製造を分担実施することになる。治験薬の製造においては製剤製造技術を確立し単に製造するのみでは不十分であり、治験薬 GMP をコスメディ製薬社内に立ち上げその仕組みを動かして治験薬を製造供給することが必要となる。

治験薬 GMP の法的根拠は、医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成9年3月27日厚生省令第27号18条）「治験依頼者は、治験薬の製造のための必要な構造設備を備え、かつ適切な製造管理、品質管理の方法がとられている製造所において製造された治験薬を実施医療機関に交付しなければならない」による。

コスメディ製薬においては化粧品用マイクロニードルを現在市販しているので化粧品 GMP は社内で整備し稼働している。報告者らは既に実働している化粧品 GMP 組織をベースとして PEDF マイクロニードル治験薬 GMP 体制を立ち上げ、基準書を作成し、教育訓練を実施し GMP を稼働させた。

5 総括

5-1 研究開発のまとめ

当初計画においての達成した2年間の実施事項はをまとめると以下の内容となる。

（背景）

本研究開発は以下の2つのシードを基にスタートした。一つはマイクロニードル技術である。コスメディ製薬は生体内溶解性のマイクロニードルに関する高度の知見、技術を有しニードルの材料、サイズ、等を異にする多くのマイクロニードルを作成し得るベースを有していた。もう一つのシードは育毛活性を有する蛋白質 PEDF（Pigment Epithelium-Derived Factor）である。PEDF は高分子であるので経皮から吸収させることが極めて困難であった。そこで蛋白等の高分子を経皮投与させるための新しい技術であるマイクロニードルと組み合わせることにより PEDF の優れた育毛ポテンシャルを生かした新しい経皮吸収型育毛剤を開発することを目的として本プロジェクトをスタートさせた。

（マイクロニードルの材料・サイズ・PEDF の針への装填）

PEDF を搭載するためのマイクロニードルの材料に関して検討し、ヒアルロン酸を主材料としさらにポリビニルピロリドンとデキストランを添加した混合物が皮膚挿入性、皮膚内溶解性、等において極めて優れたマイクロニードルとなることを見出した。

マイクロニードルのサイズ、形状に関しては、動物試験を繰り返して適切なサイズ・形状のマイクロニードルを選定した。サイズに関しては、本製剤は医薬品、医薬部外品、化粧品、の3分野へ上市することを予定しているのでそれぞれの分野においての最適サイズ・形状を決定した。医薬品用途には高さ 800 μ m の円錐形針、医薬部が品・化粧品用途には高さ 200 μ m のコニーデ型針を選定した。

PEDF をマイクロニードルへ装填するためには（１）針全体に PEDF を溶解・含浸する、（２）針の先端のみに含浸させる、の２法がある。これら２法に関して PEDF 装填精度を向上させる検討を実施した。

（PEDF マイクロニードルの安全性、有効性の確認）

PEDF 装填マイクロニードルの皮膚投与安全性に関して G L P 準拠の評価試験施設によって評価し、皮膚投与の安全性に問題がないことを確認した。有効性に関してはラットを用いて脱毛のモデルを作成しその部位に PEDF マイクロニードルを投与した。コントロール群に比べて著しい発毛を観察し PEDF マイクロニードルの育毛特性を確認できた。

（今後の開発、事業化のための準備）

本開発研究終了後も本プロジェクトをさらに進捗させ、医師主導の研究臨床試験によりヒトにおける安全性、有効性を確認し、事業化に結び付けたい。そのための治験薬 GMP 体制を樹立し今後の PEDF マイクロニードル製剤の安定供給に備えた。