

微弱電流による薬剤の皮内送達

Intradermal delivery of drugs by weak electric current

小暮健太郎

徳島大学大学院医歯薬学研究部（薬学域）衛生薬学分野

1. はじめに

イオントフォoresis (IP) は、微弱電流を用いる経皮デリバリー技術であるが、従来その適用は荷電を有する疎水性化合物に限定され、親水性高分子には適用できないと考えられてきた。しかし我々は、核酸医薬 siRNA やナノ粒子の IP による皮内送達に成功した。本稿では、最新の知見も交えて IP による薬剤の皮内送達について紹介する。

2. 微弱電流による経皮薬物送達技術イオントフォoresis

これまで、物質の経皮送達を促進するための様々な技術が開発されており、化学的促進技術と物理的促進技術に大別される。化学的促進技術は、*l*-メントールなどの化学的促進剤により皮膚を処理することで透過性を向上させるものである。一方、物理的促進技術は、電気や超音波などの物理的刺激によって皮膚の透過性を亢進させる¹⁾。例えば、エレクトロポレーション法は、高電圧パルスによって細胞膜に一過的な穿孔を形成して物質透過を促進する方法であり、大腸菌やエクソソーム、培養細胞への遺伝子導入などにも用いられている。このような物理的促進技術の一つにイオントフォoresis (IP) がある²⁾。IP はエレクトロポレーションとは異なり、微弱な電流 (0.3~0.5 mA/cm² 程度) によって荷電性物質を皮内に押し込む一種の電気泳動技術である。従来考えられてきた IP に適用可能な物質の性質として、荷電を有する、ある程度の疎水性を有する、低分子量、などの制約があるため、あらゆる物質への適用は困難だと言われていた。しかしながら、IP による経皮送達は、投与コントロールが可能ならぬコンプライアンスが良好であるなど利点が多く、これまで適用が困難だと思われてきた高分子医薬品への展開が期待されてきた。IP は、電極と皮膚の間に充填した荷電性薬物を、微弱電流の負荷により、電氣的反発とイオンの動きに伴う水の流れ（電気浸透流）を利用して、皮膚を傷つけることなく皮内に送達できる非侵襲的な薬物送達技術である（図1）。米国では、リドカインなどの局所麻酔剤を短時間で皮膚内に送達するための IP 装置が一時期上市されていたが、我が国では上市されるまでには至っていない。

3. イオントフォoresisによる核酸医薬等の皮内送達

著者らは、IP による核酸医薬の非侵襲的な皮内送達に取り組んできた。siRNA やオリゴDNA などの核酸医薬は、特異的遺伝子の発現制御や免疫誘導等の機能性を有しており、様々な疾患の治療薬として期待されている。例えば、皮膚における siRNA の対象疾患としてア

トピー性皮膚炎や乾癬、皮膚がん等があるが、siRNA などの核酸医薬は親水性高分子であるため、皮内には浸透しない。しかし我々は、核酸が豊富な負電荷を有している点に着目し、IP による皮内送達が可能ではないかと考え、抗原タンパク質（卵白アルブミン）への暴露により炎症を誘導したラット背部皮膚に対して、siRNA の IP を行った。siRNA の皮膚塗布だけでは、皮内浸透は全く認められなかったが、IP を行うことにより表皮細胞層深部に蛍光標識 siRNA が観察されたことから、siRNA 分子（分子量 12,000 以上）を IP によって皮膚内部に送達可能であることが明らかとなった（図 2）³⁾。しかし siRNA は、細胞質にまで到達しなければ RNA 干渉能を発揮できない。そこで、抗原タンパク質処理によってサイトカイン interleukin-10 (IL-10) 遺伝子の発現を上昇させた皮膚に対して、抗 IL-10 siRNA の IP を行ったところ、12 時間後に 70% 以上も IL-10 mRNA 量を抑制することに成功した³⁾。この結果は、これまで IP に適用困難と考えられてきた分子量 10,000 を超える親水性高分子が、IP によって角質層を突破して皮膚組織内部に浸透しただけでなく、皮膚細胞に取り込まれ細胞質に到達することで、その機能を発揮したことを意味している。

筆者らは、これまでリポソームを基盤とした研究に従事してきたことから、IP に適用困難な親水性高分子医薬品も荷電性リポソームに封入することで、適用可能になるであろうと発想した。リポソームはリン脂質二分子膜からなるナノメートルサイズの脂質小胞であり、中空に水相を有しているため、脂溶性薬物は脂質膜中に、親水性物質は内水相に封入可能であり、抗がん剤等の DDS キャリアーとして汎用されている。そのため、荷電性リポソームは IP に適用困難な物質のキャリアーとして適していると考えたが、ウイルスなどよりも大きい構造体であるため、当初皮内浸透は不可能かと思われた。そこで我々は、皮膚の毛孔（毛穴）に着目し、リポソームと IP を組み合わせた経毛孔送達システムの構築を試みた。小胞構造を保持した状態で荷電性リポソームを IP によって毛孔内に送達可能であるのかを評価するために、NBD 蛍光標識した荷電性リポソームに水溶性蛍光色素ローダミンを封入し、ラット背部皮膚上で IP を行ったところ、毛孔内だけでなく毛孔周辺の皮膚組織内部にも 2 種類の蛍光が広範囲に共局在していることが確認された（図 3）⁴⁾。このことは、リポソームが小胞構造を保持した状態で毛孔から皮膚内部にまで送達されたことを意味しており、リポソームのような巨大物質（ナノ粒子）が毛孔内細胞層を透過したことが示唆された。そこで次に、インスリン（分子量約 5,800）を荷電性リポソームに封入し、ストレプトゾトシン誘発性 I 型糖尿病モデルラットの背部皮膚において IP を行った。インスリン水溶液を単独で腹腔内投与した場合（コントロール）には、血糖値が短時間で低下したが 4 時間後にはインスリンが分解されることで再び上昇した。一方、インスリン封入リポソームの IP を行った場合、投与後徐々に血糖値が低下し、12 時間後には約 25% にまで達し、18 時間後まで持続した⁴⁾。皮内動態観察の結果から、毛孔から皮内に送達されたリポソームが徐々に壊れてインスリンが徐放されることで緩やかに血糖値が低下したとともに、リポソーム内に封入されたインスリンは分解酵素から保護されることで高い持続性を示したことが示唆された。

このように、これまで IP への適用が困難であると考えられてきた核酸医薬やナノ粒子も、IP による経皮デリバリーが可能であり、さらに siRNA などは細胞質にまで送達できることが明らかとなっている。次項では、そのメカニズムに関する知見について紹介する。

4. 微弱電流処理による皮内浸透と細胞内取込みメカニズム

前述のように、siRNA や CpG-ODN 等の核酸医薬は親水性の高分子物質であるため、容易には皮内に浸透できないと思われたが、IP (微弱電流処理) により皮膚深部まで送達された。従来、IP による薬物の皮内浸透メカニズムとしては、前述のように電位差および電気浸透流が提唱されてきた²⁾。しかし我々は、核酸医薬のような親水性高分子が皮膚組織内に浸透するメカニズムは、従来提唱されてきたものとは異なるのではないかと考えた。すなわち、微弱電流の処理によって皮膚組織細胞の間隔が広がることで核酸医薬分子が浸透できるようになるのではないかと仮説を立て、検証を行った⁵⁾。その結果、IP (微弱電流処理) により、細胞外の Ca^{2+} イオンが細胞内に流入し、PKC などを含むシグナル伝達系が活性化され、Cx43 のリン酸化やアクチンの脱重合などが誘起されることで、細胞間隙が開裂し、siRNA 等の高分子が皮膚組織深部にまで浸透できたことが示唆されている⁵⁾。

このように、親水性高分子医薬が IP (微弱電流処理) によって組織内に浸透するメカニズムは明らかとなったが、前述のように siRNA の IP によって標的 mRNA 発現が抑制されたことは、siRNA が組織細胞間だけでなく細胞質にまで到達したことを意味している。我々はこの点に興味を持ち、まず細胞内への siRNA の送達に細胞本来の取り込みメカニズム (エンドサイトーシス) であるのか、物理的な細胞膜の変化 (細孔の形成等) によるのかを検証するため、低温処理および各種エンドサイトーシス阻害剤の影響を調べた⁶⁾。その結果、微弱電流処理 (IP) による核酸医薬の細胞内送達は、エンドサイトーシスによることが明らかとなった⁶⁾。さらに、微弱電流処理により膜電位が低下し、それに伴って細胞外のカチオン (Ca^{2+} など) が細胞内に流入することでシグナル伝達系が活性化され、エンドサイトーシスが誘起された可能性が示唆された⁶⁾。また、分子量の異なる FITC 標識化デキストラン存在下で培養細胞を微弱電流処理したところ、分子量 10,000 の FITC 標識化デキストランは 24 時間後に細胞質全体に広がっていたのに対して、分子量 70,000 の FITC 標識化デキストランは 24 時間後でも点状の蛍光が細胞内に確認されたことから、エンドソームを脱出できていないことが推察された⁷⁾。このことから、微弱電流処理によって誘起されたエンドサイトーシスによって生じるエンドソームは、通常のエンドソームと異なり、ある程度の分子量 (70,000 以下) の物質が漏出可能な構造を有するユニークなものであることが示唆された。この微弱電流処理によってエンドサイトーシスが誘起された状態を電子顕微鏡によって観察したところ、通常球状のエンドソームではなく、チューブ状であることが明らかとなった⁸⁾。さらに、エンドソーム内の物質が細胞質に漏出するメカニズムとして、エンドソーム膜に物質が透過できる細孔が生じているのではないかと考え、ミトコンドリア膜などで細孔を生じることが報告されているセラミドに着目して、微弱電流処理した培養細胞

におけるセラミドの変化を免疫染色によって評価した。その結果、微弱電流処理によって細胞内セラミドが有意に増加することが明らかとなった⁸⁾。この結果から、微弱電流処理によってエンドソーム膜のセラミドが増加することで細孔が形成されたため、エンドソーム内の siRNA 等が細胞質に漏出できたのではないかと考えている。また、細孔のサイズ制限のため一定分子量以上のものは漏出できないのではないかと推察している。

5. 生体高分子医薬の IP による皮膚疾患治療

本項では、IP を利用した生体高分子医薬の皮内送達を利用した皮膚疾患治療に関する最新の成果を紹介する。乾癬は、全身的な慢性炎症を伴う皮膚疾患の一つである。その詳細な発症機構は不明な点が多いが、IL-6 や Tumor necrosis factor (TNF)- α 等の過剰な産生が病態の進行に関与していることから、抗 TNF- α 抗体医薬であるインフリキシマブやアダリムマブ、完全ヒト型可溶性 TNF- α レセプター製剤エタネルセプト（融合タンパク質製剤）が乾癬の治療薬として用いられている。これら治療薬の生体内への投与は皮下注射により行われるが、炎症が生じた乾癬皮膚への皮下注射は、さらなる炎症の拡大につながる恐れがあると同時に、投与部位での血管炎症や発赤・発疹等の副作用の懸念がある。これら問題点を解決し、抗体医薬や融合タンパク質製剤等の生体高分子医薬を非侵襲的かつ効率的に乾癬皮膚へ送達する技術として、我々は IP に着目した。初めに、抗体医薬モデルとして FITC 標識 IgG をヘアレスラットの背部皮膚において IP 投与し、一定時間後の皮内動態を共焦点顕微鏡により観察した。その結果、IP 投与した群においては FITC 標識 IgG 由来の蛍光が表皮層から真皮層まで広く分布している様子が観察された。このことから、核酸医薬に比べて分子量が約 150,000 と巨大な抗体医薬の皮内送達においても、IP が適用可能であることを世界で初めて明らかとした⁹⁾。次に、炎症を誘導した乾癬モデルラットに対し、抗 TNF- α 医薬であるエタネルセプトを IP 投与した際の機能性を評価した。エタネルセプトの IP 投与により、皮膚組織中における IL-6 mRNA レベル上昇が有意に抑制された。また、乾癬皮膚においては、炎症性サイトカインにより表皮の肥厚化が生じるが、エタネルセプトの IP 投与により表皮の肥厚化が有意に抑制された。

エタネルセプトの IP によって乾癬による炎症性サイトカインの発現上昇および皮膚の肥厚化の改善が認められたが、病態皮膚ではエタネルセプトのような高分子医薬の皮内への浸透効率は必ずしも高くなかった⁹⁾。これは、炎症によって肥厚化した病態皮膚は、健常な皮膚に比べて微弱電流による細胞間隙の開裂が起こりにくい状態であることを示している。この問題を解決するために我々は、タイトジャンクション開裂ペプチド AT1002 を IP と組み合わせることを発想した。AT1002 は、可逆的にタイトジャンクションを開裂できる Zonula occludens toxin (Zot) の構造活性相関研究から見出された 6 残基 (Phe-Cys-Ile-Gly-Arg-Leu) のペプチドである¹⁰⁾。我々は、予め AT1002 を IP によって皮内に浸透させ肥厚化病態皮膚のタイトジャンクションを開裂しやすくしておくことで、高分子薬物の IP によって病態皮膚であってもより深部まで高分子医薬を送達できるのではないかと考えた。そこで、AT1002 を

IP に供するために荷電性アミノ酸のアルギニンを追加した IP 用 AT1002 誘導体 (Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Leu-Gly-Cys-Arg-Phe-Ile) を設計・合成し、乾癬により肥厚化した病態皮膚に対する核酸医薬 NF- κ B デコイオリゴ DNA (NF- κ B-ODN: 分子量 13,200) の IP における組み合わせ効果を検討した。まず、健常皮膚を用いて蛍光 (FAM) 標識 NF- κ B-ODN の IP における AT1002 誘導体の事前 IP 投与の効果を検討した結果、AT1002 誘導体の事前 IP 処理により NF- κ B-ODN の皮内浸透深度が約 3 倍 (約 80 μ m \rightarrow 約 240 μ m) に増大した (図 6)。次に乾癬モデル皮膚を用いて NF- κ B-ODN の IP を行ったところ、肥厚化した病態皮膚のため皮内への浸透効率はかなり低下 (約 20 μ m) したが、AT1002 誘導体の事前 IP 投与によって約 8 倍 (約 160 μ m) の深度まで浸透させることに成功した (図 4)¹¹⁾。さらに、抗炎症作用を有する NF- κ B-ODN の乾癬皮膚への IP による炎症性サイトカインの mRNA 発現量および皮膚肥厚化への影響を検討したところ、AT1002 誘導体/IP 前処理後の NF- κ B-ODN の IP によって、TNF- α の mRNA 発現量が有意に減少するとともに、肥厚化が半分程度に抑制された¹¹⁾。

6. おわりに

以上紹介したように、微弱電流を用いる経皮薬物送達技術のイオントフォレシスは、教科書的には親水性高分子薬物への適用は難しいと考えられてきたが、実は様々な高分子薬物の皮内送達が可能で DDS 技術であることが明らかになってきた。従来無理だと思われてきた親水性高分子物質が、実は IP で皮内投与可能であることが分かってきた原因は、実験に用いる皮膚が「生きていた」のか「死んでいたのか」によるのではないかと考えている。すなわち、微弱電流刺激に対して組織細胞生理が変化するためには、細胞が生きている必要があるが、多くの研究では切り取った皮膚切片を用いられていたため、組織細胞の生理的応答ができなかったのではないかとと思われる。我々は、微弱電流による組織細胞生理の変化は、皮膚に限定されず、体内臓器にも同様に起こると考え、現在その可能性について検討を行っている。このように、イオントフォレシスは、大きな可能性を秘めた薬物送達技術であり、今後様々な薬物の DDS として広く用いられるようになると期待している。

謝辞

今回、執筆の機会を与えていただきました太田誠一先生 (東京大学)、大石孝洋先生 ((株) カネカ) に、深く感謝申し上げます。また、本稿で紹介した研究は、気賀澤郁博士 (元北海道大学大学院薬学研究院)、Hasan Mahadi 博士 (金沢大学疾患モデル総合研究センター助教)、濱 進博士 (武蔵野大学薬学部講師)、梶本和昭博士 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) のご協力のもとに実施されたものであり、この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 肥後成人: *薬学雑誌*, **127**, 655-662 (2007)
- 2) Kalia, Y.N. *et al.*: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**(5), 619-658 (2004)
- 3) Kigasawa, K.. *et al.*: *Int. J. Pharm.*, **383**(1-2), 157-160 (2010)
- 4) Kajimoto, K *et al.*: *Int. J. Pharm.*, **403**(1-2), 57-65 (2011)
- 5) Hama, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **289**(4), 2450-2456 (2014)
- 6) Hasan, M. *et al.*: *J. Control. Release.*, **228**, 20-25 (2016)
- 7) Hasan, M. *et al.*: *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **17**(1), 554-562 (2016)
- 8) Torao, T. *et al.*: *Int. J. Pharm.*, **576**, 119010 (2020)
- 9) Fukuta, T. *et al.*: *J. Control. Release*, **323**, 323-332 (2020)
- 10) Goldblum, S.E. *et al.*: *FASEB J.*, **25**(1), 144-158 (2011)
- 11) Tanaka, D. *et al.*: *Int. J. Pharm.*, **602**, 120601 (2021)

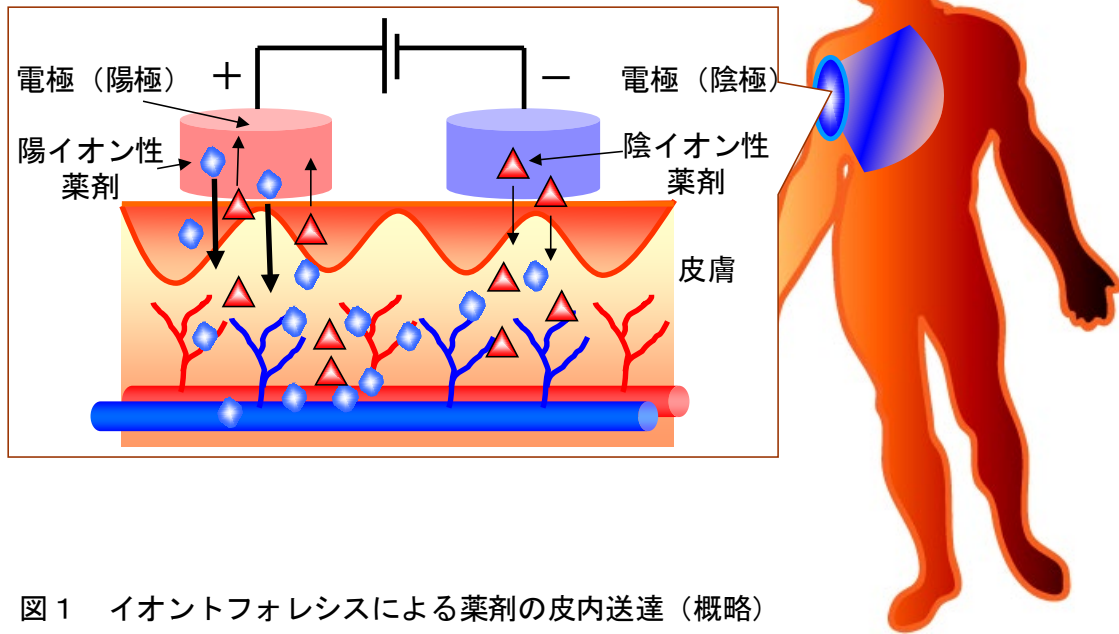


図1 イオントフォoresisによる薬剤の皮内送達 (概略)

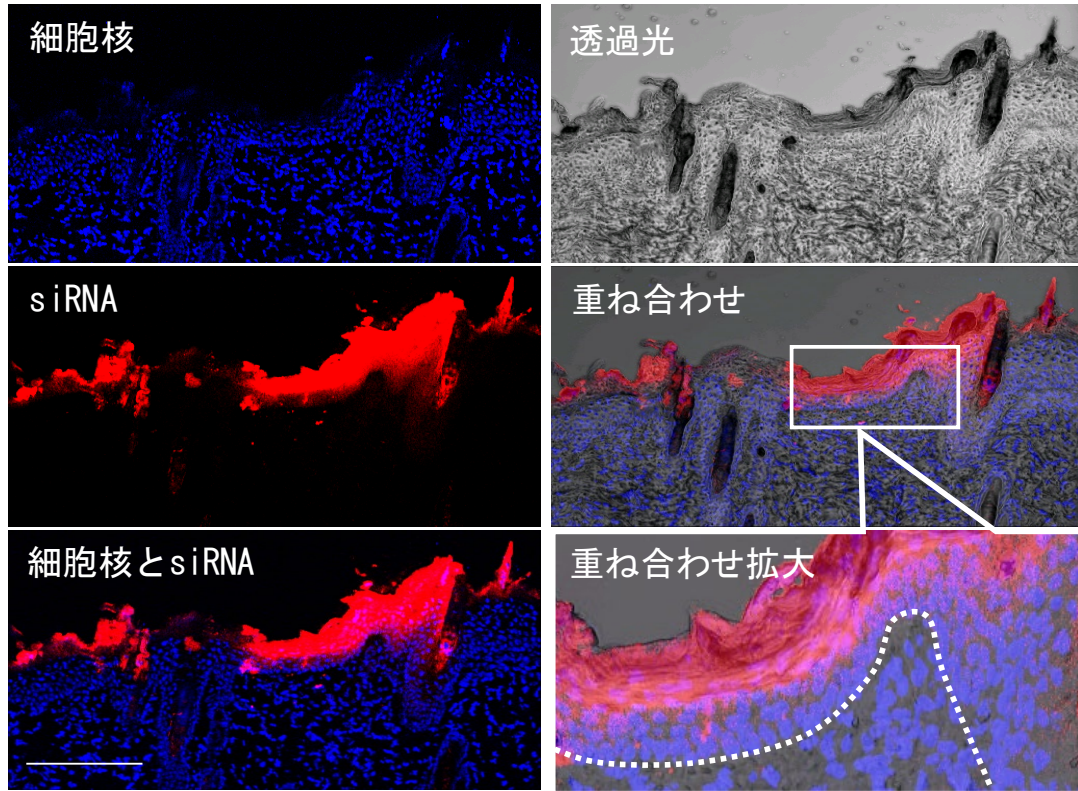


図2 IP投与したsiRNAの皮内動態

ローダミン蛍光標識siRNAをラット背部皮膚にIPした後、皮膚凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡によって観察。写真中の白バーは200 μ m。

NBD標識リポソーム

ローダミン

重ね合わせ

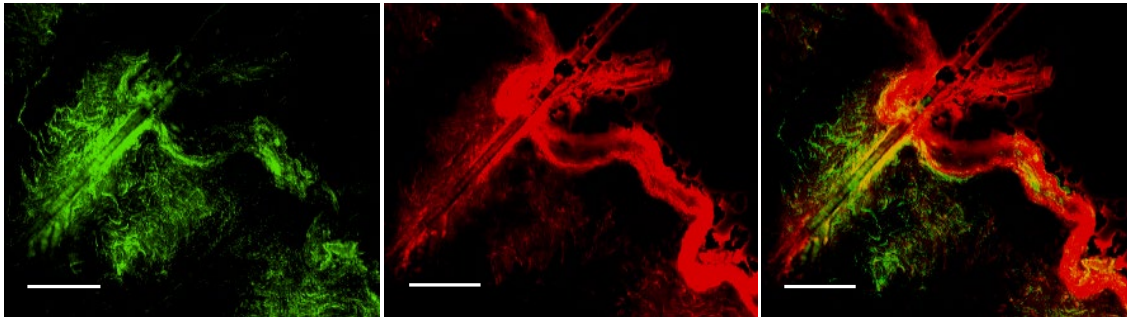


図3 IP投与したローダミン封入NBD標識リポソームの皮内動態
ローダミンを封入したカチオン性NBD標識リポソームをラット背部皮膚にIP投与した後、皮膚凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡によって観察。写真中の白バーは100 μ m。

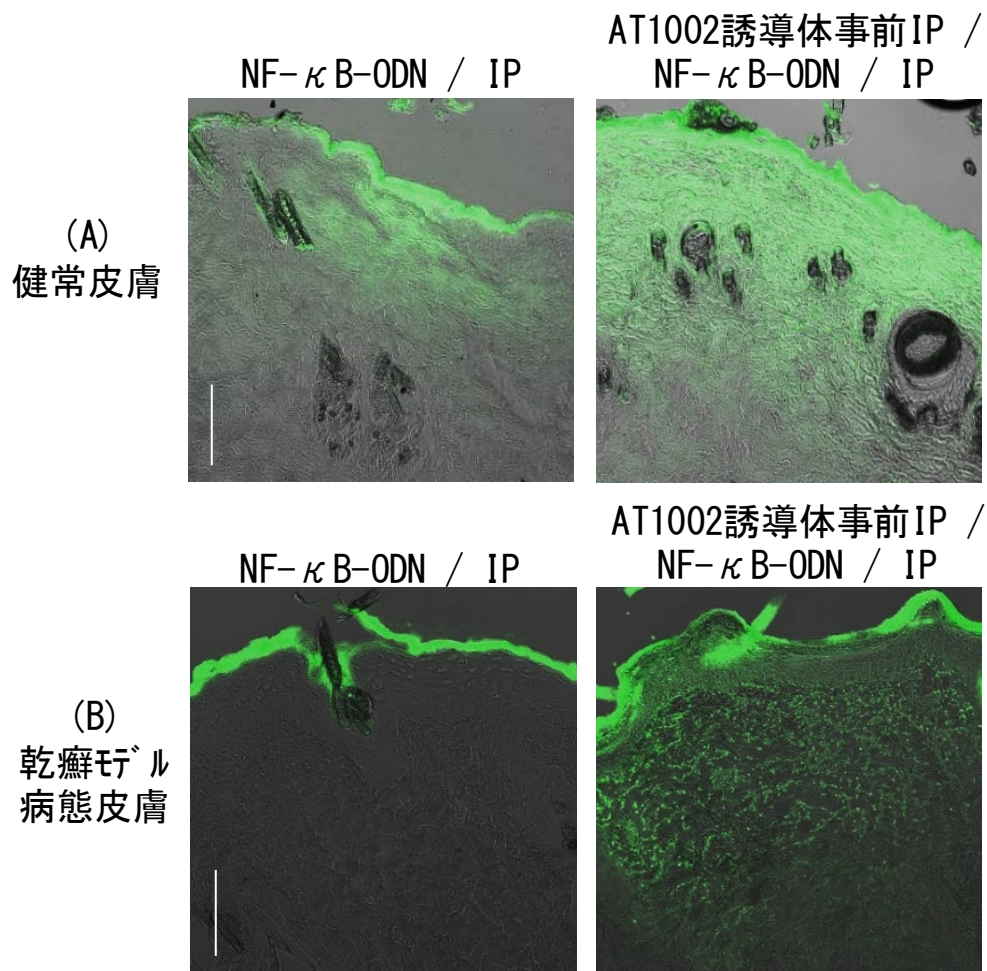


図4 IP投与したNF- κ B-ODNの皮内動態に対するAT1002誘導体事前IPの影響

(A) 健常皮膚および(B) 乾癬モデル病態皮膚におけるFAM蛍光標識NF- κ B-ODNの単独IP (左) およびAT1002誘導体事前IP後のFAM-NF- κ B-ODNのIP (右) 後の皮膚切片の共焦点レーザー顕微鏡観察像。図中の白バーは100 μ m。