日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) マイクロニードルアレイ医薬品の合理的開発に向けた品質評価試験法に関する研究

(英語) Research on methods to quality evaluation and rational development of microneedle array pharmaceuticals

研究開発実施期間: 令和3年4月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 伊豆津 健一

(英語) Ken-ichi Izutsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 学校法人 国際医療福祉大学 薬学部 教授

(英語) Professor, School of Pharmacy, International University of Health and Welfare

II 研究開発の概要

本研究ではマイクロニードルアレイ医薬品(MNA、ワクチンを含む)の品質評価法について、関連する剤形および海外の規制状況を整理して課題点を明確化するとともに、新たな剤形としての構造や機能、および安全性確保のための評価法を検討した。また得られた結果から開発時のキャラクターゼーションや製品化後の品質管理に求められる評価法を整理し、モデル剤形での案を示した。

マイクロニードルアレイ医薬品の品質指針作成と物性制御に関する研究として、まず構造や機能と規制状況および開発動向についての文献および公表資料を中心とした調査を行なった。活発な開発状況とコロナ禍を契機とした新モダリティ医薬品のデリバリー手段としての注目が高まる一方で、皮膚穿刺機能を中心とした新たな評価技術の必要性と、医薬品と医療機器の中間的な特性によるレギュレーション上の位置づけの難しさによる各国での制度整備の遅れが製品化への隘路となっていることが確認され、検討はその対応を中心に進めた。MNAの物性制御手段として、ヒアルロン酸を基材する溶解型をモデルとし、想定される有効成分や他の高分子添加剤との組み合わせについて、キャスト法による作成過程で起きる相分離現象が、針の強度や透明度など外観に大きな影響を持つことを確認するとともに、熱分析による混合性予測法を示した。溶解型製剤を主対象とした開発時の技術指針案を学会等で公表し、医薬品領域での無菌性確保など品質面についての考え方は概ね理解が得られた。一方で穿刺性能のより具体的な提示への要請、中空型MNAと超短針の皮内注射との区分などの課題も示された。

溶解型MNA医薬品を対象とした品質評価法に関する研究として、薬事と行政面の調査・研究を行うとともに、既存の評価法の妥当性を検討し、新たな評価法が求められる微細構造や主薬分布等の技術開発を進めた。具体的な検討項目として、①溶解型MNAの品質評価技術・海外規制動向に関する調査、②溶解型MNAのモデル製剤試作及び基本性能の評価法開発、③製剤イメージング技術を活用した新規評価法開発に取り組んだ。医薬用途のMNAの実用化に向けた品質に係る課題について産官学で議論を重ね、MNAの基本構造を整理するとともに、溶解型MNAを例に製造方法、品質特性及び関連するレギュレーションの現状について総説を発表した。マイクロモールディング法を用いた溶解型MNAのラボスケール製造法を確立し、モデル製剤を用いて既報の品質評価法(形状、薬物含量、針の物理的強度、皮膚穿刺性能および溶解性など)の検証を進めた。アポモルヒネ塩酸塩を含有する溶解型MNAをモデル製剤として、非臨床において製剤の特性解析結果を発表した。また、溶解型MNAの針の物理的強度試験に影響を及ぼす要因として、試験機の圧縮速度と圧縮する針の本数が針強度に有意に影響することを明らかにした。微小針内における薬物の分布状態について共焦点顕微鏡イメージング法による評価の有用性を示した。また、微小針を皮膚に適用した状態で穿刺状態を観察する手法としてマイクロX線CTイメージングの活用を図り、針表面の金コーティングにより定性的・定量的な評価が可能であることを示した。

経皮ワクチン領域でのマイクロニードル(MN)技術の活用における有効性・安全性に対する科学的・理論的根拠を提示すべく、経皮免疫誘導機序の解明および創薬・創剤標的とすべき免疫担当細胞および免疫関連分子の同定に取り組んだ。MNを貼付した皮膚局所では、穿刺に伴う物理的な刺激によって炎症性サイトカインやAlarminの遺伝子発現レベルが顕著に増大し、これに伴って皮膚常在性樹状細胞の所属リンパ節への遊走が亢進し、抗原特異的CD4陽性T細胞が強力に感作・活性化されることを明らかとした。さらに、MNによる経皮抗原送達は、皮下注射投与と比較して所属リンパ節における抗原特異的CD4陽性T細胞のメモリーT細胞への分化や胚中心形成を高めることも明らかとし、これら一連の免疫イベントによるB細胞の活性化および抗体産生細胞への分化の促進が経皮ワクチン製剤の優れた抗原特異的抗体産生につながったと結論付けた。また遺伝子発現レベルが上昇したIRF7、STINGおよびIL-1 β に着目し、IRF7ノックアウトマウスを用いた検討では、抗体産生に影響は及ぼさないが、皮膚常在性樹状細胞の所属リンパ節への遊走や抗原特異的CD4陽性T細胞の分化増殖に影響することを明らかにした。

STING 変異マウスおよび IL-1R ノックアウトマウスでは、遺伝子改変マウスにおいて抗体産生が有意に低下し、野生型マウスで認められる皮膚常在性樹状細胞の所属リンパ節への遊走や活性化が遺伝子改変マウスで減少した。さらに、経皮アジュバント活性が見出された Toll-like receptor (TLR) 9 ligand である CpG-ODN (K3) を経皮ワクチン製剤に適用し、その経皮アジュバント活性発現機序の解明に資する基礎情報を収集した。経皮ワクチン製剤への K3 併用は Th2 型 IgG サブクラス抗体価の速やかな誘導のみならず、Th1 型 IgG サブクラス抗体価をも強力に誘導し、抗原特異的免疫応答に Th1 偏向性を有する可能性が示された。また経皮投与した K3 のアジュバント活性発現には、TLR9 を介した直接的な B 細胞活性化が大きく寄与することが示された。以上の検証から、局所皮膚への物理的刺激や MN を用いた経皮免疫は、自然免疫シグナルに関わる物質 (Alarmin など) の発現増加を介して、皮膚常在樹状細胞の遊走低下から抗体産生の低下までに影響を与えることが明らかとなった。

マイクロニードル製剤の開発時に検討が求められる評価のうち安全性の観点から、生体内外を隔てる障壁としての皮膚機能に与える適用部位の局所傷害を許容可能な範囲とするための、皮膚バリア機能回復特性とそれに対する MNA の影響の評価法を検討した。具体的には、まず *in vitro* ヒト皮膚バリア機能評価系の構築を進めるとともに、溶解性マイクロニードルの検討班と連携し、溶解型 MNA 成分 17 種類についてヒト皮膚細胞に対する安全性を評価した。第 2 年度は皮膚重層上皮バリア機能を指標にした皮膚バリア回復特性評価系の構築を進めた。具体的には、claudin-1 レポーター発現系および claudin-4 レポーター発現系を用いて、溶解型 MNA 成分について評価を行った。また、ヒト皮膚 3 次元培養表皮モデルを用いて、溶解型 MNA 成分 7 種類についてバリア機能に対する影響を解析した。「*In vitro* ヒト皮膚バリア機能評価系」を用いた溶解型 MNA 成分の皮膚バリア機能への影響解析結果を踏まえ、MNA 医薬品の非臨床評価系としての「*In vitro* ヒト皮膚バリア機能評価系」の妥当性を考究した。溶解型 MNA 成分を用いた解析から、皮膚バリア構成蛋白質発現レポーター遺伝子への影響とヒト皮膚細胞株・ヒト皮膚初代培養系への細胞毒性の間に相関性が観察された。ヒト皮膚 3 次元培養表皮モデルのバリア機能評価でも同様の傾向が観察されており、汎用性・利便性の点からヒト皮膚細胞株 (HaCaT) とヒト皮膚初代培養系を用いた安全性評価が *in vitro* 皮膚バリア機能評価系として有用であると推察された。

非溶解型の針へ有効成分を保持させたコーティング型のマイクロニードルアレイ (MNA) について、医療機器を併用したコンビネーション製品としての特性評価が重要となることから、品質と安全性確保に必要な重要項目を明らかにすると共に、評価法の構築を目指した。MNA の皮膚組織への穿刺性能の確認方法としてパラフィルムや動物皮膚を利用した評価を実施し、穿刺の均一性評価でのパラフィルムの有用性が判明した。また、X線マイクロ CT は、MNA の針折や、ニードル毎の穿刺深度評価が可能であった。これらの結果から、MNA を適用する皮膚 (モデル含む) の硬さ及び水分量や、皮下組織の特性が MNA の穿刺性に大きな影響を与えることが判明した。ローダミンを塗布した MNA を適用した場合のラットの体内動態は、筋注又は皮下注様の経時変化を示し、良好な薬剤透過性が確認された。また、組織切片を作製し、イメージング MS を利用した評価を実施し、当該手法が薬剤透過性評価に有用であることを示した。力学特性評価法の開発に関して、MNA におけるニードル毎の特性を検証する試験法を構築し、試験条件が試験結果に与える影響を評価し、ニードル毎の特性のばらつきが明らかになった。また、試験速度や同時に試験に供するニードルの本数などの試験条件、試験角度の影響、マイクロニードル土台部の剛性の影響が確認できた。滅菌要否に関してラットを用いて検証し、周辺組織の病理組織学的解析を行った。緑膿菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌等の皮膚塗布後に MNA を適用した個体の組織切片では陰性対象と比較して、囊胞等が確認されたことから、MNA においては滅菌または無菌製造が必要であることが判明した。

This research project was performed to investigate methods for evaluating the structure and function of microneedle array (MNA) pharmaceuticals, a new dosage form that is attracting attention for use in pharmaceuticals. We conducted a literature survey first to find the regulations and development trends of pharmaceutical MNA products, which showed importance of evaluating needle microstructure and needle puncture property. Property of MNAs that having the characteristics of both a pharmaceutical and a medical device also made it difficult to establish regulations for MNA products. We discussed drafts for technical guidelines of MNA development, mainly targeting dissolvable products, and discussed researchers in academia and industry. Some issues such as a requirement for more specific description of puncture performance and clarifying boundaries from of the differentiation between MNAs and short needle intradermal injection were raised. Studies on physical property of hyaluronic acid-based dissolving MNAs showed relevance of component miscibility on the appearance and strength of the needles prepared by micro-molding method.

In a group to study quality evaluation methods for dissolving microneedle array (MNA) drugs, we showed relevance of Raman spectroscopy for determining the microscopic spatial distribution of active gradient in dissolving MNAs. X-ray micro-computed tomography showed clear images of MNAs inserted into the skin. We published the results and a review on quality attributes of the MNAs. Some dissolving MNAs containing apomorphine hydrochloride were fabricated by the micro-molding method to study applicability of the analysis methods on their physical properties and structure of the punctured area. The MNAs also showed rapid absorption of the active ingredient.

Some of us worked on elucidating the transdermal immunity induction mechanism, including identification of immunocompetent cells and immune-related molecules upon application of microneedle vaccines. There was a marked increase in the gene expression levels of inflammatory cytokines and Alarmin upon application of the MNAs. Migration of skin-resident dendritic cells to regional lymph nodes was also accelerated. It was revealed that CD4-positive T cells were strongly sensitized and activated by the MNAs. We also studied MNA-induced activation of B cells and the promotion of differentiation into antibody-producing cells at the gene level, as well as in experiments using knockout mice.

We also studied an in vitro evaluation system to assess the skin barrier function and to understand the effects of MNA drugs on skin function, which serves as a critical barrier between the internal and external environments of the body. We developed An in vitro human skin barrier function evaluation system, and evaluated the safety of 17 types of dissolving MNA components against human skin cells. Then we constructed a skin barrier recovery characteristic evaluation system to estimate epidermal barrier-function, utilizing promoter-driven reporter gene expression. Specifically, we evaluated soluble MNA components using the claudin-1 reporter expression system and the claudin-4 reporter expression system. The validity of the "Functional Evaluation System." was analyzed and discussed. Through analysis using soluble MNA components, a correlation was observed between the effects on skin barrier constituent protein expression reporter genes and cytotoxicity to human skin cell lines (HaCaT) and human skin primary culture systems.

We also studied property of coated MNAs. We have developed a skin puncture evaluation method using a skin model, a chemical analysis method for drug permeability using skin tissue and animals, and a mechanical property evaluation method that simulates actual clinical conditions. TA study on puncture evaluations showed usefulness of Parafilm as a standard model to evaluate puncture uniformity. X-ray micro-CT was able to evaluate needle breakage of MNAs and each needle puncture. These results indicated significance of choosing appropriate skin and subcutaneous tissue model to study the puncture ability of MNA. Study on the characteristics of each needle of MNA indicated importance of setting appropriate test conditions. Histopathological analysis performed to study the effects of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* on rat skin showed relevance of sterile or aseptic preparation of MNA.