

新規ヒアルロン酸製剤を用いた
骨粗鬆症治療薬の経皮吸収性の改善
ならびにヒト iPS 細胞由来三次元培養皮膚を用いた
薬物の経皮吸収性の評価

2019

博士学位論文

内藤 千尋

本論文は、以下の報告の内容を総括したものである。なお、論文の転載については出版社の規約より許可されている。

- 1) Chihiro Naito, Hidemasa Katsumi, Tomoko Suzuki, Ying-shu Quan, Fumio Kamiyama, Toshiyasu Sakane, Akira Yamamoto. Self-dissolving microneedle arrays for transdermal absorption enhancement of human parathyroid hormone (1-34). *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 215. [第 2 章]

- 2) Chihiro Naito, Tomoko Yamaguchi, Hidemasa Katsumi, Suyo Kimura, Sachi Kamei, Masaki Morishita, Toshiyasu Sakane, Kenji Kawabata, Akira Yamamoto. Utility of three-dimensional skin from human-induced pluripotent stem cells as a tool to evaluate transdermal drug permeation. *J. Pharm. Sci.*, **2019**, 108, 3524-3527. [第 3 章]

- 3) Chihiro Naito, Hidemasa Katsumi, Kunio Yoneto, Mao Omura, Mayuko Nishidono, Sachi Kamei, Akiya Mizoguchi, Ayaka Tamba, Akiko Tanaka, Masaki Morishita, Akira Yamamoto. Development of a phosphoric acid-mediated hyaluronic acid gel sheet for efficient transdermal delivery of alendronate for anti-osteoporotic therapy. *Pharmaceutics*, **2019**, 11, 643. [第 1 章]

目次

略語一覧

序論.....	1
本論.....	4
第1章 ヒアルロン酸ゲルシートを用いた骨粗鬆症治療薬アレンドロネートの経皮吸収性の改善..	4
1-1 緒言.....	4
1-2 結果.....	6
1-2-1 HA ゲルシートの物性評価.....	6
1-2-2 ALN 封入 HA ゲルシート適用後の ALN の経皮吸収性の評価.....	9
1-2-3 骨粗鬆症治療効果の評価.....	12
1-3 考察.....	14
第2章 ヒアルロン酸マイクロニードルを用いた骨粗鬆症治療薬 hPTH ₁₋₃₄ の経皮吸収性の改善..	16
2-1 緒言.....	16
2-2 結果.....	19
2-2-1 hPTH ₁₋₃₄ -loaded MNs の特性.....	19
2-2-2 hPTH ₁₋₃₄ -loaded MNs の有効性及び安全性.....	23
2-3 考察.....	27
第3章 ヒト iPSC 細胞由来三次元培養皮膚を用いた薬物の経皮吸収性評価系の構築.....	29
3-1 緒言.....	29
3-2 結果.....	31
3-2-1 iPSC-based skin の作製.....	31
3-2-2 iPSC-based skin の経皮吸収評価系への応用.....	35
3-3 考察.....	37
結論.....	38
実験の部.....	39

第1章 実験の部.....	39
第2章 実験の部.....	43
第3章 実験の部.....	46
引用文献.....	51
謝辞.....	60

略語一覽

ALN	Alendronate
ATRA	All-trans retinoic acid
AUC	Area under the curve
BA	Bioavailability
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
CaCl ₂	Calcium chloride
CF	5(6)-Carboxyfluorescein
C _{max}	Maximum plasma concentration
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDS	Drug delivery system
DKSFM	Defined keratinocyte-serum-free medium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum
FD4	Fluorescein isothiocyanate dextran 4000
HA	Hyaluronic acid
HE	Hematoxylin and eosin
hPTH ₁₋₃₄	Human parathyroid hormone (1-34), teriparatide
IgG	Immunoglobulin G
iPS cells	Induced pluripotent stem cells
ITS-A supplement	Insulin-Transferrin-Selenium-Sodium Pyruvate supplement
MNs	Microneedle arrays
OVX	Ovariectomy
PBS	Phosphate buffered saline
PET	Polyethylene terephthalate
PTH	Parathyroid hormone
QOL	Quality of life
RP-HPLC	Revers phase high performance liquid chromatography
SE	Standard error
TEWL	Transepidermal water loss
T _{max}	Time to maximum plasma concentration
TGFβ ₂	Transforming growth factor beta-2

序論

薬物治療において、薬物の投与経路は薬物の治療効果や副作用の発現を左右する重要な要因であり、経口投与は、その簡便さから最も汎用されている。しかしながら、経口投与には、消化管から吸収された薬物が、初回通過効果により代謝されやすく、また消化管障害を惹起しやすいことなどの課題がある。一方、注射による投与では、投与量を調節しやすく、また初回通過効果の影響を受けることなく、確実に薬物が血中へ移行するなどの利点があるが、通院の必要性や投与時の疼痛、高い侵襲性による感染症罹患の可能性が問題となる。これまでに、経肺投与^{1,3}、経鼻投与^{4,5}、経皮投与^{6,7}など経口投与や注射投与に代わる新たな投与方法を利用した治療法が報告されているが、これらの投与経路にはそれぞれ長所欠点があることから、薬物治療においては、治療薬の選択とともに、患者背景を考慮した上で、その治療薬が効果的に薬効発現し、かつ副作用を最小限に抑えられるような投与経路の選択、剤形設計を行うことが重要となる。

近年の高齢化により、嚥下困難及び寝たきりなどによる治療薬の服薬困難者のさらなる増加が予想される昨今、経皮投与に注目が集まっている。経皮投与は、投与が簡便であり、投与時の痛みを伴いにくい、初回通過効果を回避できる、など多くの利点を有するため、狭心症治療薬ニトログリセリンや喘息治療薬ツロブテロールのように、経皮適用型製剤として臨床応用がなされてきた^{8,9}。さらに、一目で投与の有無を判別できる、容易に投与を中断できるなどの特長は、介護における投薬管理の点からも有用であり、認知症治療薬リバスチグミン及びパーキンソン病治療薬ロチゴチンも貼付剤として実用化されている^{10,11}。したがって、経皮投与は高齢化社会において益々重要視される投与方法と考えられ、加齢による骨粗鬆症の薬物療法などへの応用も期待される。

皮膚は、主に表皮層と真皮層及び皮下組織で構成される人体最大の臓器であり、生体と外環境の境界としての機能を担う。特に皮膚最外層に位置する角質層は、生体内外の物質移動を制御する構造を有しており、薬物の経皮投与時には薬物の皮膚吸収における最大のバリアとなる。すなわち、皮膚表面に投与された薬物の吸収は、角質層により大きく制限されており、分配係数が小さい水溶性薬物やペプチド・タンパク性医薬品を含む分子量が 500 以上の薬物の皮膚透過は極めて困難である (Figure 1)^{12,13}。

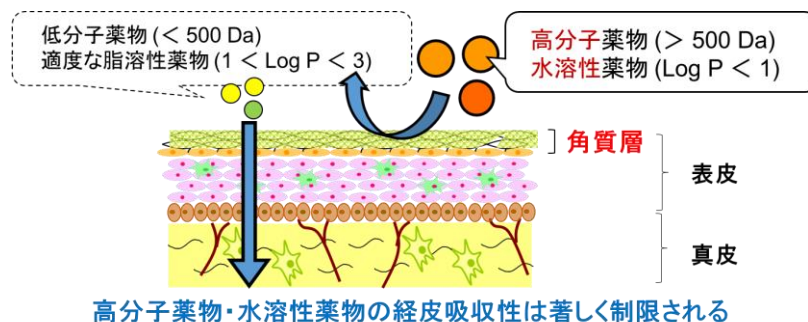


Figure 1. Physicochemical properties of drugs for transdermal delivery

これまでに、こうした難吸収性薬物の経皮吸収を促進する方法として、薬物のプロドラッグ化や吸収促進剤、リポソームの利用に代表される化学的促進法や、電気エネルギーを利用して薬物の吸収を促進するイオントフォレシス¹⁴、エレクトロポレーション¹⁵、超音波を利用したソノフォレシス¹⁶などの物理的促進法が多数試みられている。また最近では、ペプチド・タンパク性医薬品を含む水溶性薬物の吸収を促進する新規ナノエマルジョン製剤¹⁷やハイドロゲル製剤¹⁸が報告されている。しかしながら、いずれも吸収促進効果あるいは安全性が不十分であるため、未だ医薬品として実用化に至るものではなく、より安全性の高い基剤の利用や新しい概念に基づく経皮吸収製剤の開発が求められている。

水溶性高分子であるヒアルロン酸 (HA) は、生体由来で安全性が高く多くの機能性を有することから、経皮吸収製剤用の基剤としての利用が期待されている。HA は N-アセチルグルコサミンと D-グルクロン酸が直鎖状に繰り返し連結した構造をとる。生体内では、皮膚や軟骨など生体内に幅広く分布し、組織の構造安定化、保護及び衝撃吸収などの機能を担っている^{19,20}。微生物発酵技術の進歩により、動物由来成分を含まない HA の商業化が実現し²¹、変形性関節炎治療や形成外科手術、組織工学などの生体医療材料への応用、受容体を介したがん標的治療ドラッグデリバリーシステム (DDS)、疾患細胞に特異的に発現した受容体の認識によるイメージングなど、HA の医療への応用が発達してきた²²。また、HA の高い粘弾性、水分保持能及び良好な生体適合性といった特長を活かして、医薬品や化粧品の製剤基剤としても、幅広く利用されている^{20,23}。したがって、こうした HA の特性はペプチド・タンパク性医薬品を含む水溶性薬物の経皮吸収製剤化や高機能化による吸収促進に有利であると考えられる。

一方、経皮吸収製剤を開発する際には、様々な動物種やヒトの皮膚を用いた薬物透過性や毒性評価が必須である²⁴。しかしながら、現在実施される動物皮膚を用いた薬物の皮膚透過性及び安全性評価には、実験動物の使用に伴う倫理的な問題、組織構造の違いから生じる動物とヒトとの種差の問題がある。また、近年開発が進む三次元培養皮膚を用いた動物実験代替法においても、組織作製に用いる初代培養細胞の増殖性は有限であることから、継続的な皮膚供給は困難である。さらに、ヒト皮膚についても入手が困難であり従来の試験方法には未だ課題があることから、経皮吸収の新しい評価系の構築が切望される。

このような背景から、筆者は、高齢社会に資する新たな経皮吸収製剤と評価系の構築を目指して、難吸収性薬物を有効かつ簡便に皮膚から投与可能な各種 HA 製剤を開発するとともに、ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPS 細胞) から作製した三次元培養皮膚 (iPSC-based skin) の経皮吸収評価における有用性を評価した。

はじめに、水溶性で難吸収性薬物であるアレンドロネート (ALN; ビスホスホネート系骨粗鬆症治療薬) の経皮吸収改善を目指して、HA にリン酸を加えて生じるゲル化現象を利用した新規ゲルシートに ALN を封入し、ALN の経皮送達を試みた。これまでも、HA を化学修飾により分子間で結合

させた様々な経皮吸収用ゲルシートが報告されている²⁵⁻³⁰。しかしながら、このようなゲルシートは、化学修飾による調製が煩雑で作製が簡便でない。また、化学修飾された HA は天然成分とは構造が異なるため、皮膚に対する安全性も懸念される。本研究の HA ゲルシートは、HA、多価アルコール（プロパンジオール及びグリセリン）とリン酸を物理的に混合する単純な操作で作製可能であり、また HA の水和層に水溶性の ALN を高濃度に封入可能であることから ALN の高い濃度勾配と皮膚の水和を駆動力とした ALN の効率的な皮膚透過が期待できる。そこで筆者は、ALN を安全に皮膚から効率よく送達可能な経皮吸収システムの構築を目指して、HA にリン酸を加えて生じるゲル化現象を利用した新規 HA ゲルシートに ALN を封入した ALN 封入 HA ゲルシートを調製し、その機能性、ラット及びヒト摘出皮膚における透過性及び骨粗鬆症モデルラットにおける治療効果を評価した。

続いて筆者は、皮膚からの吸収が困難である高分子薬物の経皮吸収改善を目指して、骨形成作用を示す骨粗鬆症治療薬であるヒト副甲状腺ホルモン 1-34 (hPTH₁₋₃₄) を取り上げ、HA 製の微細針に hPTH₁₋₃₄ を封入した溶解型マイクロニードル (hPTH₁₋₃₄-loaded MNs) を開発した。過去に報告されている hPTH₁₋₃₄ 封入 MNs (ZP-PTH[®]) は、長さ 190 μm のチタン製の針の表面に、hPTH₁₋₃₄ をコーティングしたものであるが、hPTH₁₋₃₄ の吸収率が低かったために、開発が中断されている。また、金属、シリコン、ガラスを素材とする MNs³¹ は、適用時に針が折れて皮膚内に針が残存するなどの皮膚に対する安全性が懸念される。そこで筆者は、hPTH₁₋₃₄ を効率よく安全に皮膚から吸収可能な経皮適用製剤の開発を目指して、HA で構成される微細針に hPTH₁₋₃₄ を封入し、皮膚の水分で針が膨潤・溶解する溶解型 hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を開発し、MNs 中における hPTH₁₋₃₄ の安定性や機能性を評価するとともに、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs をラットへ適用した後の hPTH₁₋₃₄ の体内動態及び骨粗鬆症に対する治療効果、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用後の皮膚刺激性を検討した。

さらに、種差、倫理面、供給面の課題を克服できる新しい経皮吸収予測モデルの構築を目指して、iPSC-based skin を用いて薬物の皮膚透過性を系統的に評価した。iPS 細胞は、分化多能性及び無限増殖能を有する細胞で、再生医療や創薬の現場で幅広く研究が進められている³²。さらに、皮膚移植を目的として iPS 細胞から作製した皮膚の報告はあるものの³³⁻³⁶、未だ iPS 細胞由来皮膚を創薬へ応用した報告は見られない。新しい経皮吸収評価系の構築において、iPS 細胞から作製する皮膚は、種差、倫理面、供給面の課題を克服できる可能性がある。したがって、ヒト iPS 細胞を用いて皮膚を作製できれば、既存の評価系の種差の問題や、ヒトや実験動物の摘出皮膚使用における倫理面の問題を克服できる。さらに、iPS 細胞の無限増殖能を活かし、ヒト皮膚に類似の評価用皮膚モデルの安定供給をも実現できると考えられる。そこで筆者は、薬物の経皮吸収評価における iPSC-based skin の有用性を評価することを目的として、iPSC-based skin を培養し、分子量の異なる水溶性モデル薬物の iPSC-based skin における透過特性を評価した。

以下、これらの結果について 3 章にわたり論述する。

本論

第1章 ヒアルロン酸ゲルシートを用いた骨粗鬆症治療薬アレンドロネートの経皮吸収性の改善

1-1 緒言

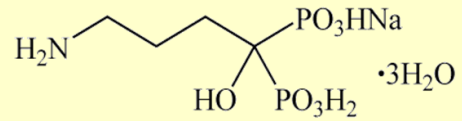
ビスホスホネート系骨粗鬆症治療薬 ALN は、閉経後骨粗鬆症患者において、破骨細胞の骨吸収を抑制することで³⁷、骨密度を増大させるため、骨折のリスク増大を抑制する^{38,39}。しかしながら、ALN は高極性かつ水溶性薬物であることから、経口投与後の ALN の消化管吸収は制限される⁴⁰。さらに、ALN は吐気や腹痛、炎症、潰瘍などの上部消化管障害を惹起する^{41,42}。服用者は、この重篤な副作用予防のために、服用後最低 30 分間の座位保持が必要となるが、高齢患者や寝たきりの患者にとっては負担が大きいのが現状である (Figure 2)。そのため、これらの課題を克服できる新たな投与方法の開発は、患者のアドヒアランスや生活の質 (quality of life; QOL) を改善し、効果的な骨粗鬆症治療法になり得ると考えられる。

様々な投与方法の中で、経皮投与は、嚥下困難者であっても簡便に投与でき、投与時に座位保持を必要としないことから、高齢者や寝たきり患者にも適した投与方法であると考えられる。さらに、経皮投与の場合には消化管障害も回避可能となる。近年、ALN の経皮吸収に関するいくつかの報告があり、Choi ら^{43,44}と Boche ら⁴⁵は、経皮投与用の ALN 製剤を報告している。さらに、当研究室においても、親水性粘着剤⁴⁶やマイクロニードル^{47,48}を用いて ALN の経皮送達を試みてきた。しかしながら、これらの作製方法や使用方法は煩雑であり、今日まで実用化には至っていない。

一方、HA は、高い粘弾性、水分保持能及び良好な生体適合性を有し、製剤基剤として広く使用されており、これまでに、HA を化学修飾により分子間で結合させた様々な経皮吸収用ゲルシートが報告されている²⁵⁻³⁰。しかしながら、このようなゲルシートは、化学修飾による調製が煩雑で作製が簡便でない。また、化学修飾された HA は天然成分とは構造が異なるため、皮膚に対する安全性も懸念される。そこで筆者は、ALN を安全に皮膚から効率よく送達可能な経皮吸収システムの構築を目指して、HA にリン酸を加えて生じるゲル化現象を利用した新規 HA ゲルシートの開発を試みた (Figure 3)。本研究の HA ゲルシートは、HA、多価アルコール (プロパンジオール及びグリセリン) とリン酸を物理的に混合する単純な操作で作製可能であり、また HA の水和層に水溶性の ALN を高濃度に封入可能であることから ALN の高い濃度勾配と皮膚の水和を駆動力とした ALN の効率的な皮膚透過が期待できる。本章では、こうした概念に基づき ALN 封入 HA ゲルシートを調製し、その機能性、ラット及びヒト摘出皮膚における ALN 封入 HA ゲルシートの透過性及び骨粗鬆症モデルラットにおける治療効果を評価した。

アレンドロネート (ALN)

- **ビスホスホネート系** (骨吸収抑制作用)
- 骨粗鬆症治療の**第一選択薬**
- 投与経路: **経口投与**
- 分子量: 325.12
- 分配係数: 1×10^{-4} 以下 (**水溶性薬物**)



問題点

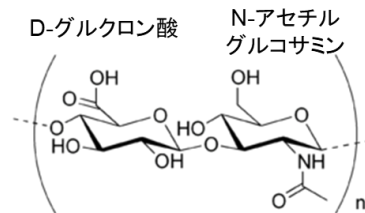
- **消化管吸収性が低い**
- **上部消化管障害**
(服用後 **30 分間の座位保持が必要**)

Figure 2. Structure and physicochemical properties of ALN

ヒアルロン酸 (HA)

- **高い粘弾性**
- **高い水分保持能力**
- **生体適合性が良好**

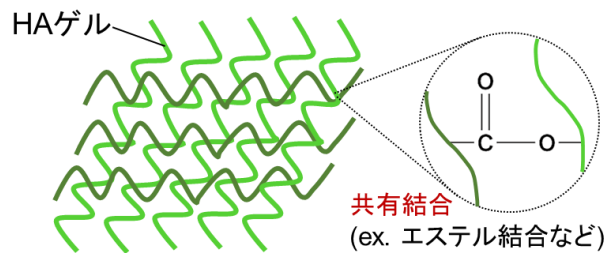
→ 製剤基剤として、
幅広く利用



HA の構造

これまでの HA ゲル

化学修飾により、
HA が構造変化
↓
安全性が懸念される



HA のゲル化現象

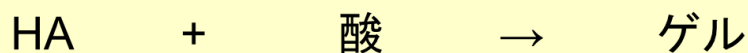


Figure 3. Preparation of gel sheet using HA

1-2 結果

1-2-1 HA ゲルシート物の物性評価

【ALN 封入 HA ゲルシートの作製】

Figure 4 には、ALN 封入 HA ゲルシートの作製方法を、また Figure 5 には作製の各段階における HA の物性変化を写真で示した。HA 水溶液 (Figure 4a, 5a) に多価アルコールを混合した HA-多価アルコール混合液 (Figure 4b, 5b) に、ALN 及びリン酸を添加したところ、HA の粘度が顕著に上昇し (Figure 4e, 5c)、加熱乾燥後に HA ゲルシートが形成された (Figure 4f, 5d)。

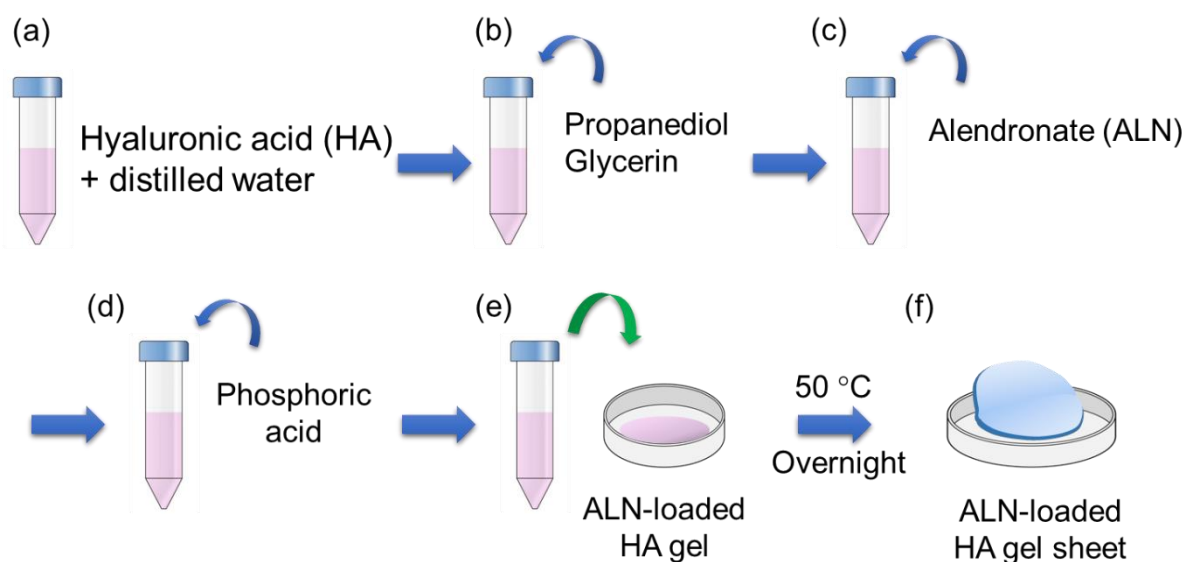


Figure 4. Preparation methods of ALN-loaded HA gel sheet

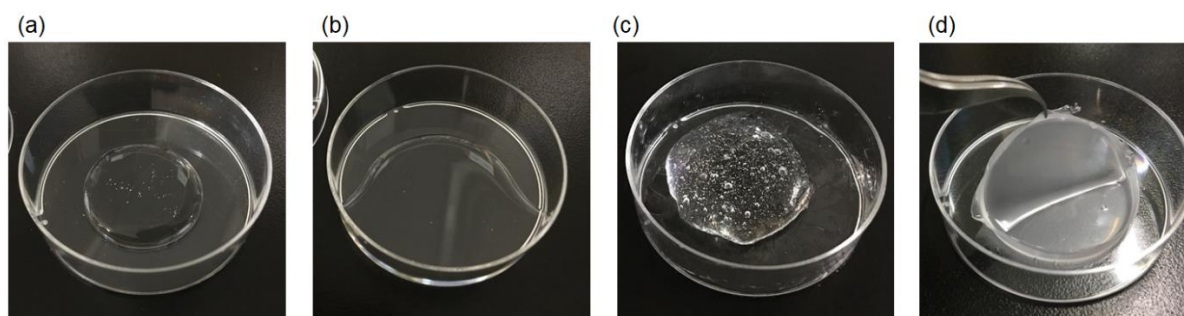


Figure 5. Preparation of ALN-loaded HA gel sheet. Mixture of (a) HA and distilled water; (b) HA, distilled water, glycerin, and propanediol; (c) HA, distilled water, glycerin, propanediol, ALN, and phosphoric acid before heated drying and (d) after heated drying.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Figure 1A)

【ゲルシート作製時の HA の粘度変化】

HA のゲル化を定量的に評価するため、HA ゲルシート作製の各段階における粘度を回転粘度計で測定した (Table 1)。リン酸を添加した HA-多価アルコール溶液の粘度は約 $8 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ であり、リン酸を添加していない HA-多価アルコール混合液の粘度 (約 $1.5 \text{ Pa} \cdot \text{s}$) と比べて高い値を示した。さらに、リン酸添加後の HA-多価アルコール混合液を加熱乾燥させたところ、溶液の流動性は消失し、粘度は測定範囲外まで上昇した。

Table 1. Effect of phosphoric acid on viscosity of HA-polyhydric alcohol solution.

	Viscosity ($\text{Pa} \cdot \text{s}$)	
	Before dry	After dry
Phosphoric acid (+)	7.90 ± 0.93	out of range
Phosphoric acid (-)	1.45 ± 0.06	50.71 ± 2.38

Results are expressed as the means \pm SE of three experiments.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Table 1)

【ALN 封入 HA ゲルシートの水への溶解性】

HA のゲルシート化機構の一端を明らかにするため、HA のゲルシート化の可逆性を評価した。作製した ALN 封入 HA ゲルシートに作製途中で添加した量と同量の精製水を添加したところ、ゲルシートは水に溶解し、60 分以内に加熱乾燥前の高粘度状態に戻った。(Figure 6)

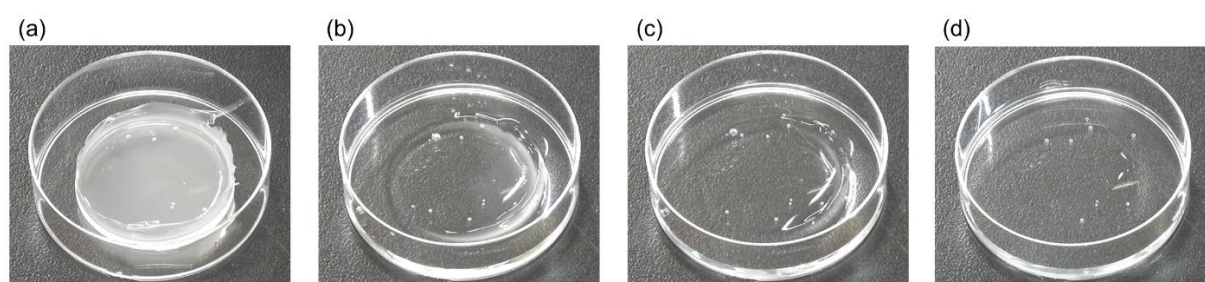


Figure 6. Reversibility process of ALN-loaded HA gel sheet after addition of distilled water. (a) Before addition of distilled water, (b) 15 min, (c) 30 min, and (d) 60 min after addition of distilled water.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Figure 1B)

【HA ゲルシートの皮膚刺激性】

HA ゲルシートの皮膚に対する刺激性を評価するために、HA ゲルシートを除毛したラット腹部に24時間適用した。その結果、HA ゲルシート除去から6日後まで、皮膚の適用部位表面に紅斑や浮腫は観察されなかった。(Figure 7)

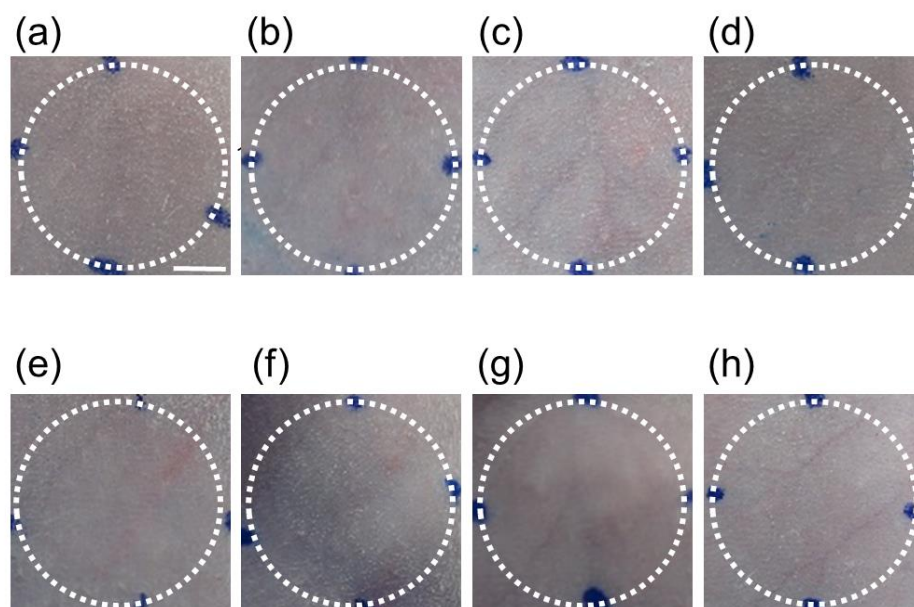


Figure 7. Skin irritation after application of HA gel sheet to rats. Representative images of rat skin (a) before application of HA gel sheet, (b) 1 day, (c) 2 days, (d) 3 days, (e) 4 days, (f) 5 days, (g) 6 days, and (h) 7 days after application of HA gel sheet. Scale bar represents 5 mm.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Figure 2)

1-2-2 ALN 封入 HA ゲルシート適用後の ALN の経皮吸収性の評価

【ALN 封入 HA ゲルシート適用後の ALN のラット皮膚透過性】

Figure 8 には、ALN 封入 HA ゲルシート適用後のラット皮膚における ALN の透過プロファイルを示した。ALN 封入 HA ゲルシート適用後、ALN は持続的に皮膚を透過し、適用後 24 時間での ALN のラット皮膚透過量は、 $109 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり比較的高い透過性を示した。

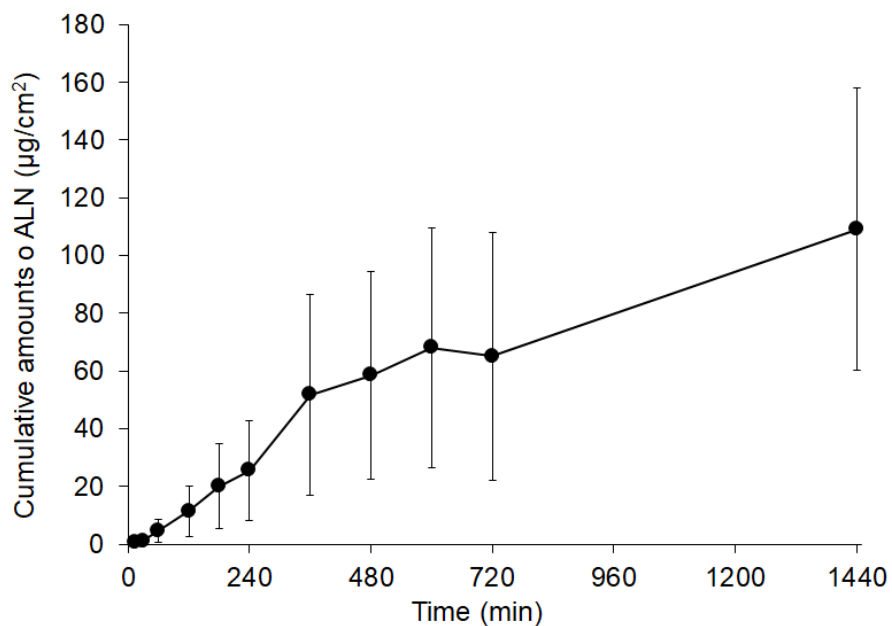


Figure 8. Skin permeation profiles of ALN after application of ALN-loaded HA gel sheets to rat skin. Results are expressed as the means \pm SE of three experiments.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Figure 3A)

【*In vivo* における ALN 封入 HA ゲルシート適用後の ALN 皮膚吸収性】

透過実験により、ALN は HA ゲルシートを用いることで、ラット皮膚を透過することが明らかとなった。そこで次に、ALN 封入 HA ゲルシートを *in vivo* でラットに適用後の体内動態を評価した。Figure 9 及び Table 2 には、血漿中 ALN 濃度プロファイル及び薬物動態学的パラメータを示した。Figure 9 に示すように、ALN は静脈内投与後 90 分以内に速やかに消失した。一方、ALN 封入 HA ゲルシート適用後の血漿中 ALN 濃度は緩やかに上昇し、適用後 360 分に最高値に達し、その濃度は適用後 24 時間まで維持された。また、ALN 静脈内投与に対する ALN 封入 HA ゲルシート適用後の ALN のバイオアベイラビリティ (BA) はゲルシート適用から 24 時間後までで約 20% を示した。

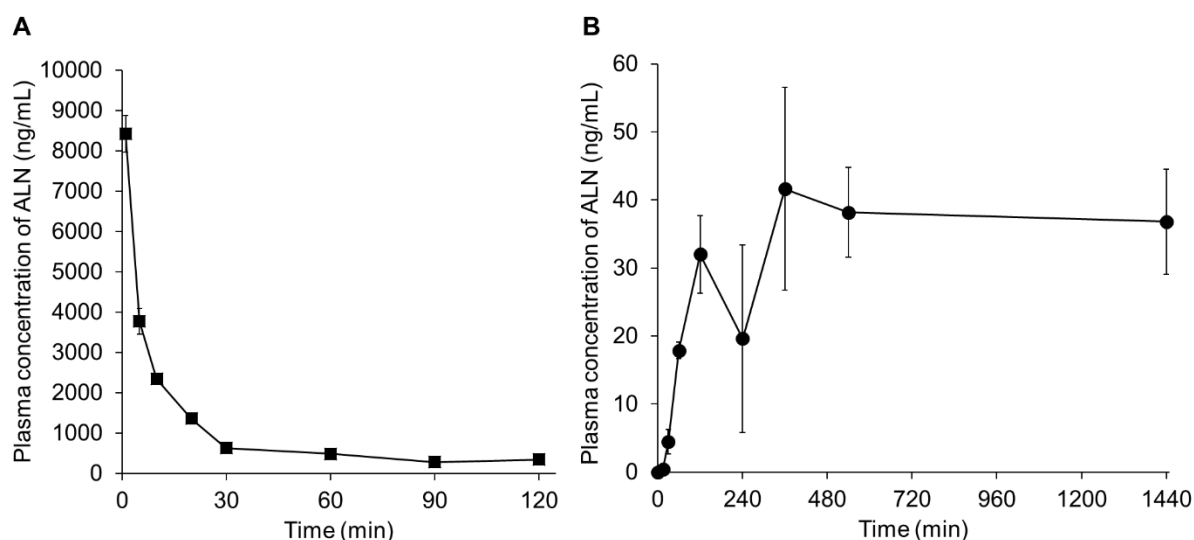


Figure 9. Plasma concentration profiles of ALN (A) after intravenous administration of ALN or (B) after application of ALN-loaded HA gel sheets. Results are expressed as the means \pm SE of three experiments.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Figure 4)

Table 2. Pharmacokinetic parameters of ALN after application of ALN-loaded HA gel sheet.

	Dose (mg/kg)	T _{max} (min)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-24 h} (µg/mL · min)	BA _{0-24 h} (%)
Intravenous injection	1	-	-	105 \pm 12 †	-
ALN-loaded HA gel sheet	2.5	720 \pm 360	53 \pm 10	50 \pm 6.5	20 \pm 2.6 ‡

Results are expressed as the means \pm SE of three experiments.

† AUC after intravenous administration of ALN was calculated by extrapolation to infinite time based on the 2-compartment model.

‡ BA was the bioavailability of ALN within 24 h after application of the ALN-loaded HA gel to rats.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Figure 3A)

【ALN 封入 HA ゲルシート適用後の ALN のヒト皮膚透過性】

一般的にヒトの皮膚における薬物の透過は、動物の皮膚における透過よりもはるかに低いことが知られている⁴⁹⁻⁵¹。そのため、新たな経皮吸収製剤を臨床応用するためには、動物を用いた評価のみでは不十分であり、最終的にヒト皮膚における吸収を評価する必要がある。そこで、ALN 封入 HA ゲルシート適用後のヒト皮膚における ALN の透過性を評価した (Figure 10)。その結果、実験初期には ALN の吸収にラグタイムが見られたものの、その後持続的な透過を示し、適用後 24 時間における ALN のヒト皮膚透過量は、 $7.17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となった。

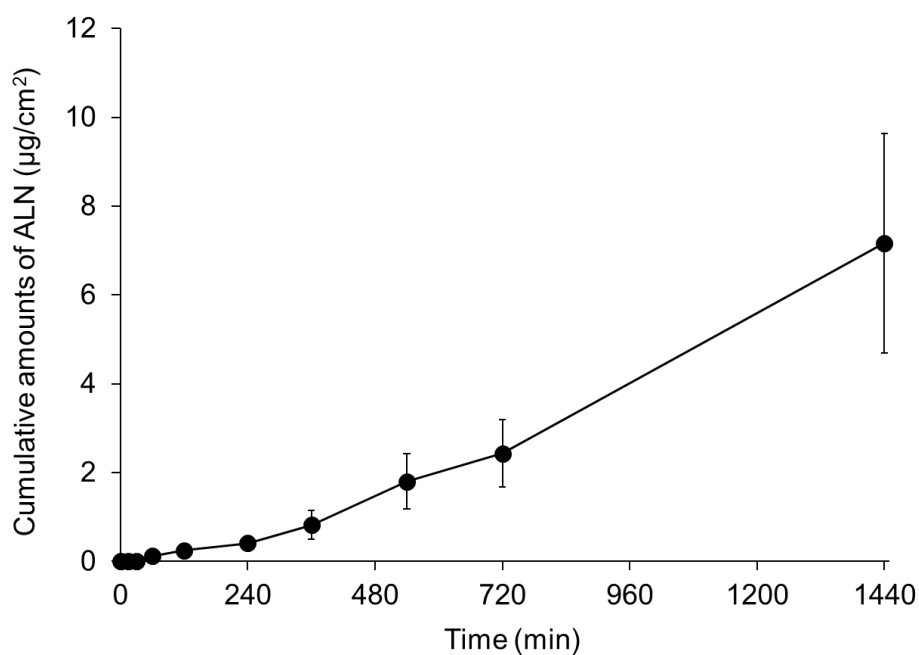


Figure 10. Skin permeation profiles of ALN after application of ALN-loaded HA gel sheets to human skin. Results are expressed as the means \pm SE of three experiments.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Figure 3B)

1-2-3 骨粗鬆症治療効果の評価

【ALN 封入 HA ゲルシート適用後の血漿中カルシウム濃度変化】

前節までにおいて、ALN は、HA ゲルシートを用いることで効率よく皮膚から吸収されることが明らかとなった。そこで、次に ALN の薬理効果の指標として血漿中カルシウム濃度及び骨粗鬆症治療効果の評価した。ALN 封入 HA ゲルシートのラットへの適用による血漿中カルシウム濃度変化への影響を評価したところ、ALN 封入 HA ゲルシートの適用後 3 日目に、血中カルシウム濃度が有意に低下した。(Figure 11)

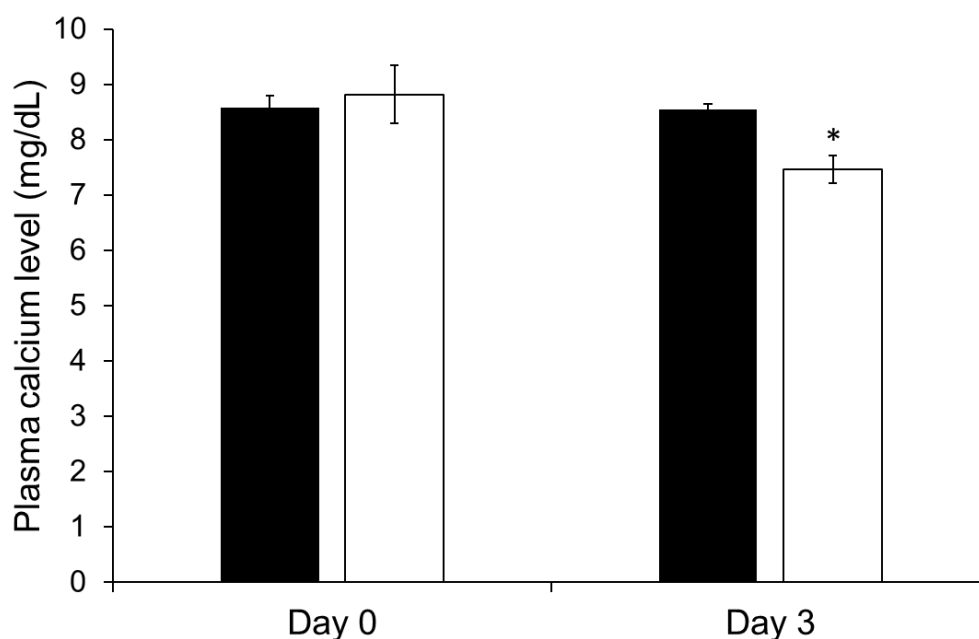


Figure 11. Effect of ALN-loaded HA gel sheet on the plasma calcium level in rats. Keys: (■) naïve group and (□) application of ALN-loaded HA gel sheets at 6.0 mg/rat. Results are expressed as the means \pm SE of 3–4 experiments. * $p < 0.05$; significant difference, compared with plasma calcium level in the naïve group on day 3.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Figure 5)

【ALN 封入 HA ゲルシートの骨粗鬆症モデルラットに対する骨量変化】

Figure 12 には、雌性ラットの卵巣摘出 (OVX) により作製した骨粗鬆症モデルラットに、ALN を皮下注射あるいはHA ゲルシートで経皮投与後に摘出したラット下肢脛骨の切片画像を示した。健常ラットである Naive 群 (Figure 12a) に対して、OVX 群 (Figure 12b) では、ピンク色で示される骨基質の割合が減少したことから、卵巣を摘出することで、骨密度の低い骨粗鬆症モデルラットが作製できることが示された。作製した骨粗鬆症モデルラットに対して、ALN を HA ゲルシート (Figure 12c) または皮下注射 (Figure 12d) で投与した場合には、いずれもピンク色の骨基質の割合は Naive 群と同程度を示し、ALN 封入 HA ゲルシートの貼付により骨量減少が抑制されることが明らかとなった。

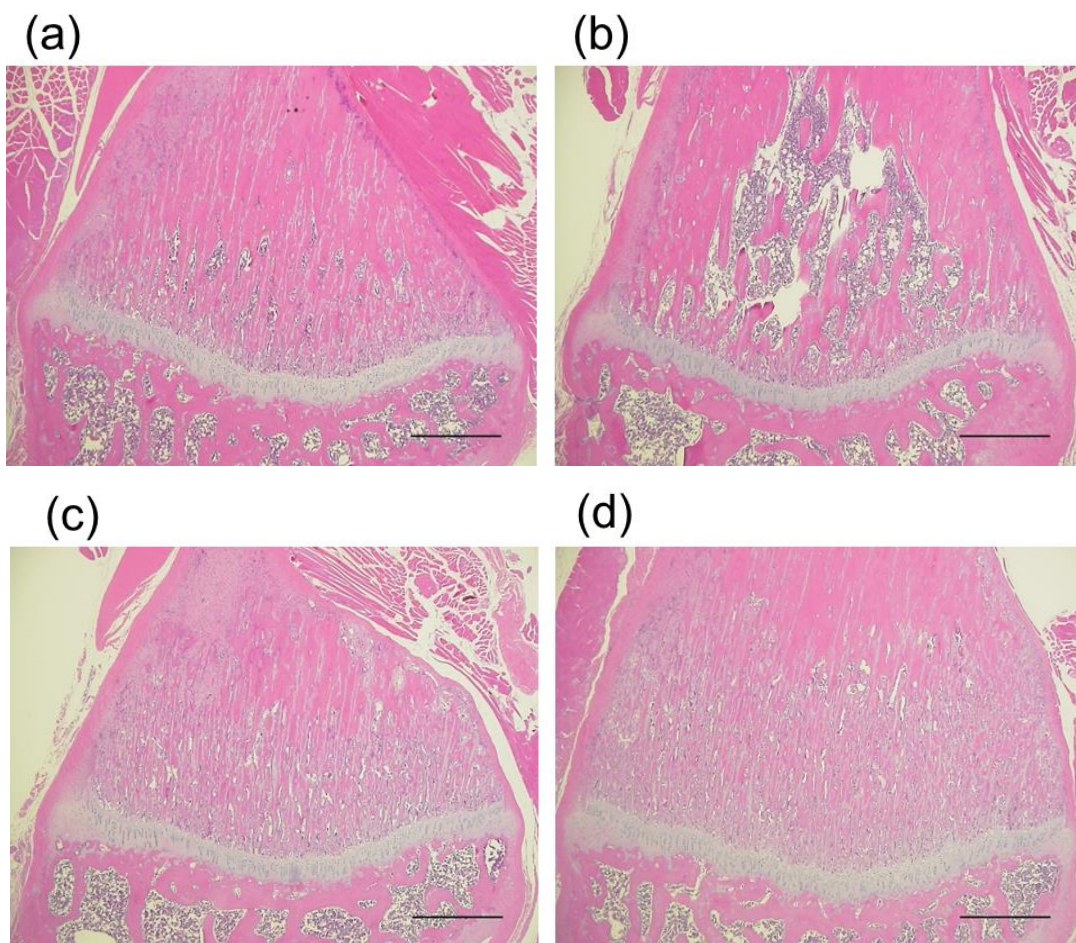


Figure 12. Representative histological micrographs of bone tissue from rat tibias in (a) naïve rats, and rats following application of (b) OVX, (c) OVX + ALN-loaded HA gel sheets, and (d) OVX + subcutaneous administration of ALN. Scale bars represent 500 μm .

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2019, 11, 643, Figure 6)

1-3 考察

本章では、HA 以外にゲル化剤を必要としない HA ゲルシートの開発に成功した。HA は生体由来成分であり、高い粘弾性と水分保持能、良好な生体適合性を有することから、生体に対する高い安全性が期待され、医薬品の製剤基剤としても幅広く利用されている²⁰。これまでに、クリックケミストリー²⁵、酵素的な架橋形成²⁶、ジスルフィド結合²⁷、ラジカル重合化²⁸など、HA を分子間で結合させた様々なゲルシートが報告されているが、このような方法により HA に化学修飾した場合には、HA の構造が変化し天然の HA とは構造が異なるため、皮膚に対する安全性が懸念される。その一方で、HA 本来の構造を維持した状態で、HA をゲル化させた報告はほとんどない。本研究では、HA にリン酸を添加後に溶液の粘度が上昇したことから、リン酸が HA のゲル化に重要な役割を果たすことが示唆された。また、水を添加すると、HA ゲルシートは加熱乾燥前の高粘度状態へ戻ったことから、リン酸による HA のゲル化は非共有結合を介した可逆的な反応であることが示唆された。HA のゲル化に関するメカニズムの詳細は不明であるが、中性の HA 水溶液が、リン酸添加により酸性へとシフトすることで、HA の分子型分率が上昇し、水素結合や疎水結合のような非共有結合の形成を促進したことによるものと考えられる⁵²。また、HA ゲルシートが、HA にリン酸を添加するという簡便な操作で作製できたこと、皮膚に対して高い安全性を示したことを踏まえると、本研究におけるゲルシート製剤は、HA 特有の機能や生体適合性などの性質と構造の保持が可能なユニークな製剤であると言える。

In vitro 皮膚透過性試験及び *in vivo* 血中動態試験の結果から、ALN は、HA ゲルシートを用いることで、皮膚から効率良く吸収されることが明らかとなった。*In vivo* で ALN 封入 HA ゲルシートをラットに適用してから 360 分以降に示した定常状態は、*in vitro* 皮膚透過性プロファイルにおける ALN の持続的な皮膚透過性と相関した。また、血液中に移行した ALN は一部尿中排泄されるが、多くは速やかに骨へ移行し、骨で長期的に蓄積されて、骨吸収抑制作用を示すことが知られている⁵³。そのため、本研究の ALN 封入 HA ゲルシートのように、ALN が持続的に吸収された場合でも、ALN は骨へ移行し蓄積されることが予想され、骨粗鬆症治療効果を発揮すると考えられる。ラット皮膚は、齧歯類の中で最もヒト皮膚と類似した構造を有する⁵⁴。しかしながら、一般的にラット皮膚における薬物透過性は、ヒト皮膚よりも高い値を示すことが知られている⁴⁹⁻⁵¹。従って、臨床応用を目指して、ヒトにおける薬物の経皮吸収を予測する場合には、ヒト皮膚における薬物透過性を評価するのが望ましい。ヒト皮膚における ALN の透過性と ALN の経口吸収性にに基づき、経口投与用の ALN 35 mg 含有錠剤服用時⁵³と同等の 315-630 μg の ALN 吸収を得るためのゲルシートの面積を算出したところ、その必要面積は 44-88 cm^2 であった。ケトプロフェンパッチに代表されるように⁵⁵、現在臨床で使用される貼付剤の面積は約 50-400 cm^2 であることから、今回開発した ALN 封入 HA ゲルシートは、十分に臨床応用が見込める吸収性を示したと言える。一般的に、ALN のように高極性かつ水溶性の高

い薬物は、皮膚最外層に存在する角質層が障壁となるために、通常皮膚からはほとんど吸収されることがない。また、貼付剤に使用される粘着剤の多くが脂溶性基剤であるために、水溶性薬物の経皮吸収製剤化はほとんど報告がなかった。過去に当研究室で開発した ALN 封入親水性パッチは、水溶性粘着剤に ALN を高濃度に封入することを可能にした⁴⁶。この報告において、ALN 封入親水性パッチは、皮膚表面に ALN の高い濃度勾配を形成することで、高効率な ALN の経皮吸収（静脈内投与に対する BA;8.3%）が達成されたと考察されている。本研究で開発した ALN 封入 HA ゲルシートは、高い経皮吸収を示した ALN 封入親水性パッチよりもさらに高い吸収性 (BA;20%) を示した。従って、HA ゲルシートによる経皮吸収促進には、ALN の高い濃度勾配形成だけでなく、他の要因も寄与する可能性があると考えられる。その詳細は明らかではないが、HA ゲルシート固有の特長である HA の高い水分保持能により、角質層が水和されたことも、経皮吸収促進の要因になると考えられる⁵⁶。一方で、ALN 封入 HA ゲルシートは、適用開始後 2 日以降に遅発性の皮膚刺激を示したが、適用後 1 日目には皮膚刺激性は観察されなかった (data not shown)。このことから、ALN 封入 HA ゲルシートによる高い ALN の吸収性は、ALN の皮膚刺激性には起因しないと考えられる。

ALN は、破骨細胞の機能を抑制することで、骨粗鬆症に伴う骨量の減少を抑制し、骨粗鬆症治療効果を示すことが知られている³⁷。過去には、ALN を経口投与や経肺投与により効率良く吸収させた場合の ALN の薬理活性として、ALN の投与から 3 日後に血中カルシウム濃度低下作用が見られ、さらに頻回投与により骨量減少抑制作用が見られた⁵⁷⁻⁶⁰。これらの知見に加えて、本研究の治療効果試験における ALN 封入 HA ゲルシートの適用 3 日後での血漿中カルシウム濃度低下作用や骨量減少抑制作用を考慮すると、ALN は、HA ゲルシートにより効率良く経皮吸収されるとともに、骨において薬理作用を示したものと考えられる。

第2章 ヒアルロン酸マイクロニードルを用いた骨粗鬆症治療薬 hPTH₁₋₃₄ の経皮吸収性の改善

2-1 緒言

第1章では、低分子の水溶性薬物である ALN の経皮吸収製剤化について検討し、ALN の効率的かつ安全な経皮送達に成功した。そこで本章では、水溶性高分子薬物である副甲状腺ホルモンの経皮吸収製剤化を目指して、マイクロニードル (MNs) を用いた経皮送達法の開発を試みた。

ヒト副甲状腺ホルモン (PTH) は、84 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、体内におけるカルシウムの恒常性維持を担っている⁶¹。副甲状腺ホルモンの活性本体とされるのが、N 末端 1-34 アミノ酸領域であり、この領域を組み換え合成したのが、近年上市された骨粗鬆症治療薬テリパラチド (hPTH₁₋₃₄) である。他の多くの骨粗鬆症治療薬が、骨吸収抑制作用による骨量減少抑制を示すのに対して、hPTH₁₋₃₄ は、間欠投与することで骨形成を促進させ、骨量増大を示す唯一の医薬品である。一方、hPTH₁₋₃₄ のようなペプチドやタンパク性医薬品は高分子であることから、消化管吸収性は著しく乏しく⁶²、hPTH₁₋₃₄ の投与は 1 日 1 回または 1 週間に 1 回の皮下注射に限定される^{63,64}。しかしながら、頻回の注射は患者の QOL を低下させる。そこで、現在の皮下注射投与の課題を克服できる新たな hPTH₁₋₃₄ 投与方法の開発が強く望まれている。

上述のように、経皮投与は、投与に際して痛みを伴いにくい、投与が簡便であるなど多くの利点を有することから、hPTH₁₋₃₄ の経皮吸収製剤化を実現できれば、患者の QOL 向上が期待できる。しかしながら、hPTH₁₋₃₄ のような高分子薬物は、角質層が障壁となり、通常皮膚から吸収されることはほとんどない¹³。これまでに、角質層の透過障壁を克服するための経皮吸収促進法として、化学的経皮吸収促進剤⁶⁵、イオントフォレシス¹⁴、エレクトロポレーション¹⁵、ソノフォレシス¹⁶、ジェットインジェクション⁶⁶ など数多くの検討がなされている。

なかでも、hPTH₁₋₃₄ のような高分子を効率良く経皮送達するために、角質層に細孔を形成し、物理的に角質層を克服可能な MNs が近年注目を集めている (Figure 13)。MNs は支持体上にミクロンサイズの微細な針が多数に整列した貼付型の製剤であり、針が角質層を貫通することで難吸収性薬物の良好な吸収が期待できる上に、痛みを伴いにくいなどの特長を有する。さらに、皮膚の深層まで穿刺する注射と比較して、MNs は皮膚に対する侵襲性が低いことから感染症リスクをも低減させる。

hPTH₁₋₃₄ を封入した MNs は、過去に報告されている⁶³。すなわち、長さ 190 μm のチタン製の針の表面に、hPTH₁₋₃₄ をコーティングした ZP-PTH[®] は、骨粗鬆症の新たな治療法として開発されていたが、hPTH₁₋₃₄ の吸収率が低かったために、開発が中断された。また、金属、シリコン、ガラスを素材とする MNs³¹ は、適用時に針が折れて皮膚内に針が残存するなどの皮膚に対する安全性が懸念される。

MNs には、中空型、コーティング型、溶解型、中実型といった異なるタイプが存在し、適用時の有効性や安全性を考慮して、適したタイプ及び様々な素材が選択される (Table 3, 4)。そこで本章では、

hPTH₁₋₃₄ を効率よく安全に皮膚から吸収可能な経皮適用製剤の開発を目指して、MNs の素材に HA を選択し、HA で構成される微細針に hPTH₁₋₃₄ を封入し、皮膚の水分で針が膨潤・溶解する溶解型の hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を開発した。すなわち、MNs 中における hPTH₁₋₃₄ の安定性や機能性を評価するとともに、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs をラットへ適用した後の hPTH₁₋₃₄ の体内動態及び骨粗鬆症に対する治療効果を検討した。さらに、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用後の皮膚刺激性についても評価した。

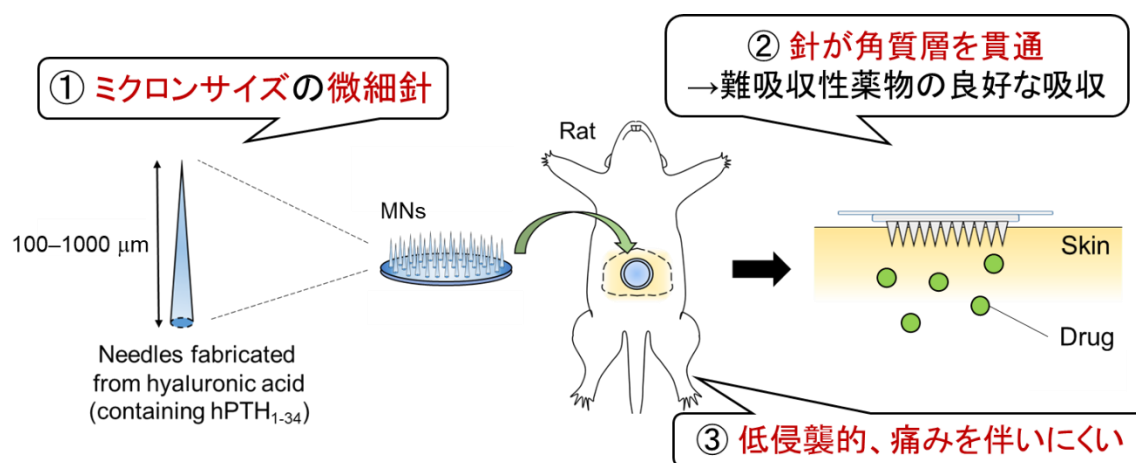


Figure 13. Concept of MNs

Table 3. Classification of MNs

タイプ	特長	素材
中実型 MNs	薬物を封入しないタイプ。 MNsで皮膚に小さな穴をあけた後、適用部位にパッチ製剤及び外用剤を適用することで、薬物の皮膚透過性を向上。	シリコン、金属、ポリマー
コーティング型 MNs	針の表面に薬物がコーティングされたタイプ。 皮膚に適用後、針の表面から薬物が速やかに溶解し、皮膚内に放出。	シリコン、金属、ポリマー
溶解型 MNs	針が溶解するタイプ。 適用後、皮膚の水分により針が膨潤・溶解することで、針に内包された薬物が放出。	CMC, コンドロイチン硫酸, デキストラン, デキストリン, PVP, PLGA, フィブロイン, ヒアルロン酸
中空型 MNs	針の中心の空間に薬液が搭載された既存の注射針を小さくしたタイプ。薬液のリザーバーと薬液注入のためのアクチュエーターを有するのが特徴。	シリコン、金属、ポリマー

Table 4. Various materials of MNs

	構成材料	長所	短所
非生分解性	金属 (ステンレスチール) 非金属 (シリコン)	剛性に優れるため、角質層を貫通しやすい。	折れた針が体内に残存する危険性。
	合成高分子 (ポリカーボネートなど)	成型しやすいため、大量生産しやすい。	折れた針が体内に残存する危険性。
生分解性	ポリ乳酸、PLGA	安全性が高い。製造しやすい。	溶解速度が遅い。 体内での代謝が速い。
	ヒアルロン酸、デキストラン、 マルトースなど	安全性が高い。韌性に優れる。 皮膚内での溶解性に優れる。	剛性が若干低い。吸湿しやすい。

2-2 結果

2-2-1 hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の特性

【hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の作製】

Figure 14 には、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の顕微鏡画像を示した。本 MNs には、直径 1 cm の円形支持体上に長さ 800 μm 、根元部の直径 160 μm 、先端部の直径 40 μm の針が、600 μm の間隔で 220 本存在した。また、1 枚の hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の針部分に含まれる hPTH₁₋₃₄ 量は、 $20.5 \pm 3.0 \mu\text{g}$ であった。

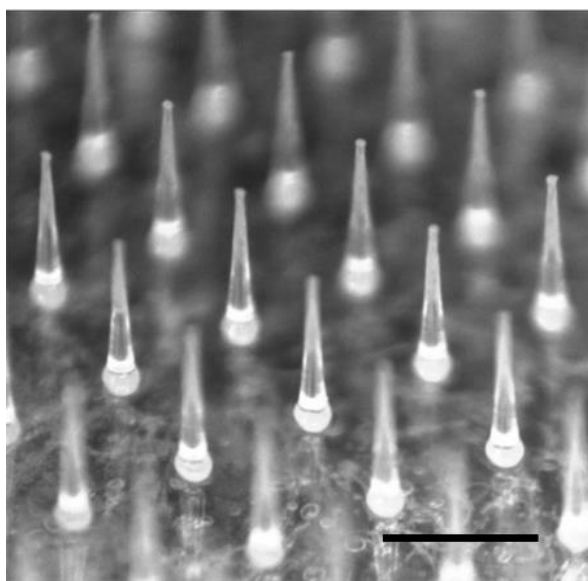


Figure 14. Typical photomicrograph of hPTH₁₋₃₄-loaded MNs. Scale bar represents 800 μm .

(Naito et al. *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 215, Figure 1)

【hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 中における hPTH₁₋₃₄ の安定性】

hPTH₁₋₃₄ は、34 個のアミノ酸からなるペプチドであることから、薬物自体が不安定であることが予想される。そこで、初期の MNs 中の hPTH₁₋₃₄ 含有量に基づき、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を異なる温度条件で 1 ヶ月間保存した際の hPTH₁₋₃₄ の残存率を評価した (Figure 15)。-20 °C、4 °C、室温 (15-20 °C) 条件下で保存した hPTH₁₋₃₄ 溶液中の hPTH₁₋₃₄ の残存率は、それぞれ 98%、84%、13%であったのに対して、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs においては、いずれの温度においても約 80%以上の残存率を示した。-20 °C、4 °C で保存した場合には、MNs と溶液状態で hPTH₁₋₃₄ の安定性に差は見られなかったが、室温で保存した場合には MNs 中の hPTH₁₋₃₄ は溶液の約 6 倍安定であることが示された。

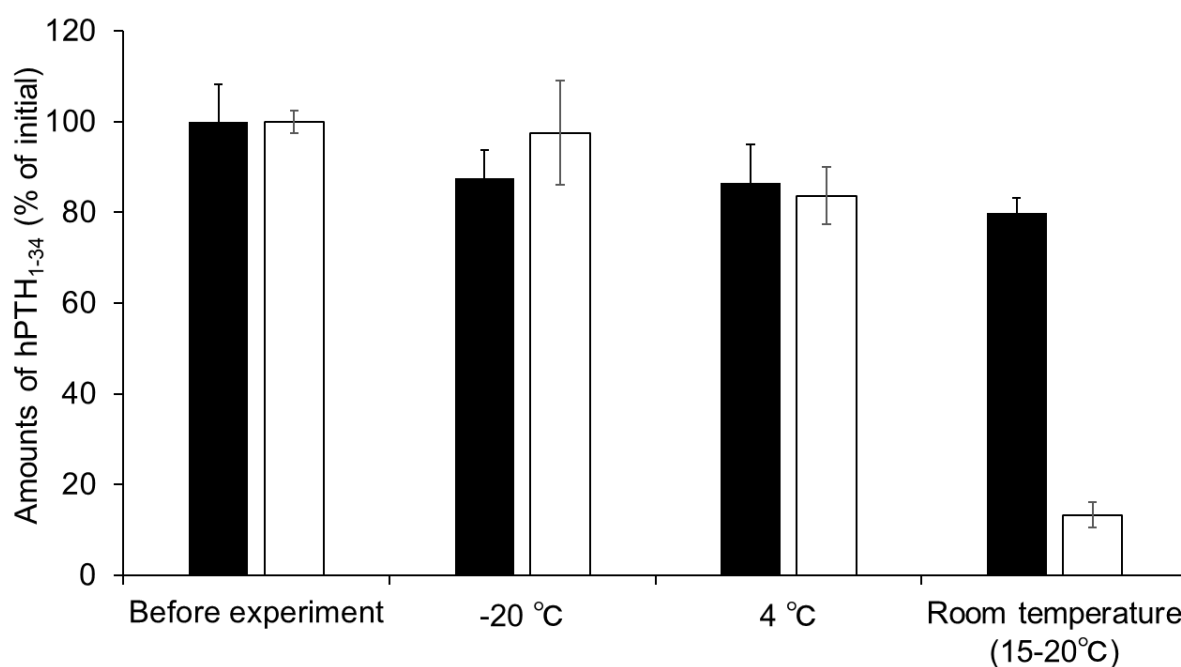


Figure 15. Stability of hPTH₁₋₃₄ in MNs and solution stored at -20, 4, and 15–20 °C for one month. Keys: (■) hPTH₁₋₃₄-loaded MNs and (□) hPTH₁₋₃₄ solution. Results are expressed as the means ± SE of three experiments.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 215, Figure 2)

【hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の皮膚貫通性】

hPTH₁₋₃₄のような高分子薬物の皮膚透過において、最大の障壁は皮膚最外層に存在する角質層である。MNs 製剤化の利点は、適用により MNs の針が角質層を貫通することで高分子薬物の経皮吸収を促進できることにある。そこで、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の針が、角質層を貫通可能な強度を有することを評価するため、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用後の皮膚状態及び皮膚切片を観察した (Figure 16)。その結果、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を適用したラット皮膚において、皮膚表面に均等に針が穿刺され (Figure 16b)、また、皮膚の切片画像 (Figure 16d) から、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs が角質層を貫通していることが確認された。

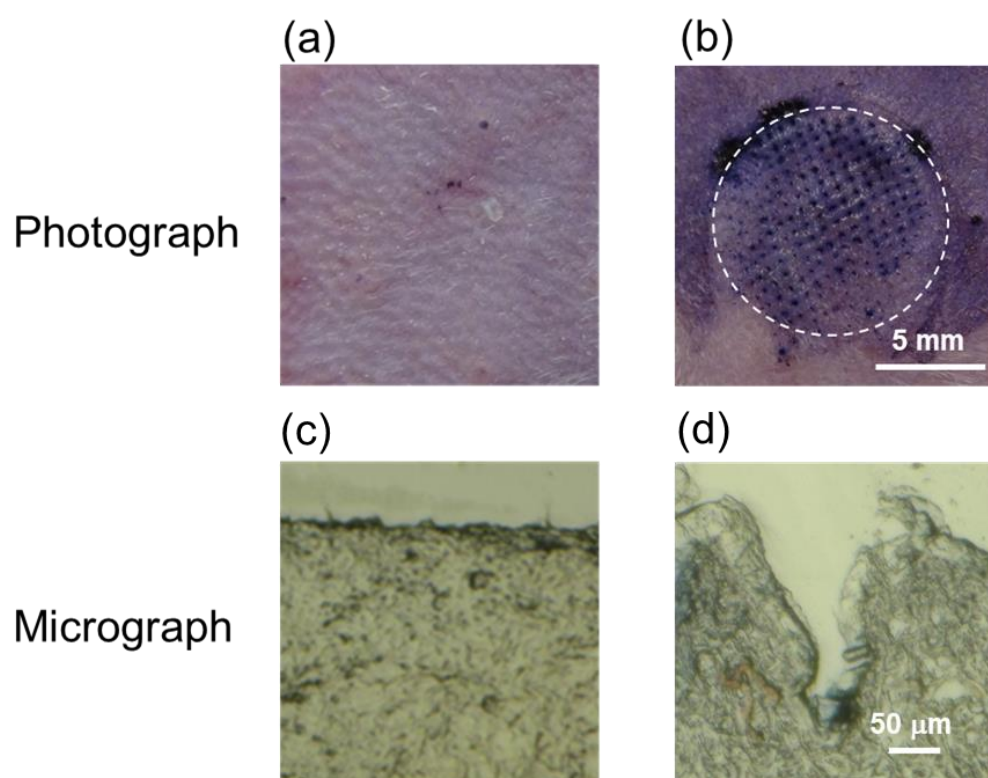


Figure 16. Photograph and micrograph of rat skin following application of hPTH₁₋₃₄-loaded MNs. (a) Photographs of untreated skin and (b) skin after applying hPTH₁₋₃₄-loaded MNs and (c) micrographs of untreated skin and (d) skin after applying hPTH₁₋₃₄-loaded MNs.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 215, Figure 3)

【hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用後の皮膚バリア機能の評価】

皮膚、特に角質層は、体液の生体内への保持や外敵侵入の防御といった生体内外の境界バリアとしての機能を担う。皮膚からは常に一定量の水分が蒸散しているが、角質層のバリア機能が低下した場合には、その蒸散量が上昇し、薬物の経皮吸収性も上昇すると予想される。そこで、皮膚からの水分蒸散量として経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定することで、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用による皮膚バリア機能への影響を評価した (Figure 17)。陰性対照である無処置皮膚においては、TEWL 値が約 8.5 g/m²/h を示したのに対し、陽性対照として角質層をテープstrippingで除去した場合の TEWL 値は、約 75 g/m²/h と高い値を示した。一方、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を除去直後の TEWL は約 52 g/m²/h となり、一時的に上昇したものの、その後速やかに回復した。

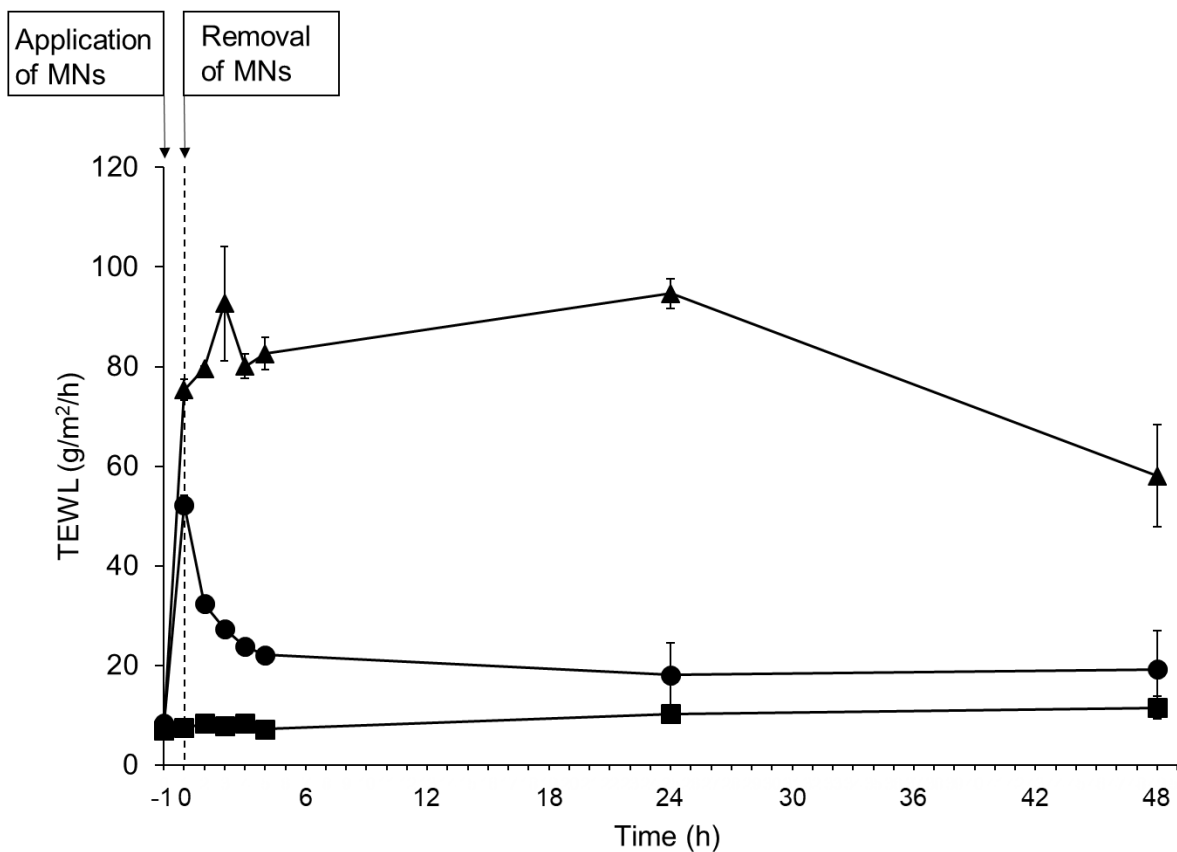


Figure 17. Effects of hPTH₁₋₃₄-loaded MNs application on transepidermal water loss (TEWL) of rat skin *in vivo*. Keys: (●) hPTH₁₋₃₄-loaded MNs, (▲) tape stripping treatment, and (■) intact skin. Results are expressed as the means \pm SE of three rats.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, 2018, 10, 215, Figure 4)

【hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用後の針の溶解性】

hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の皮膚内溶解性を評価するため、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs をラットに適用後の針の状態を観察した (Figure 18)。hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の針は適用 30 分後で先端部から約 4 分の 3 が溶解し (Figure 18b)、60 分後には完全に消失した (Figure 18c)。

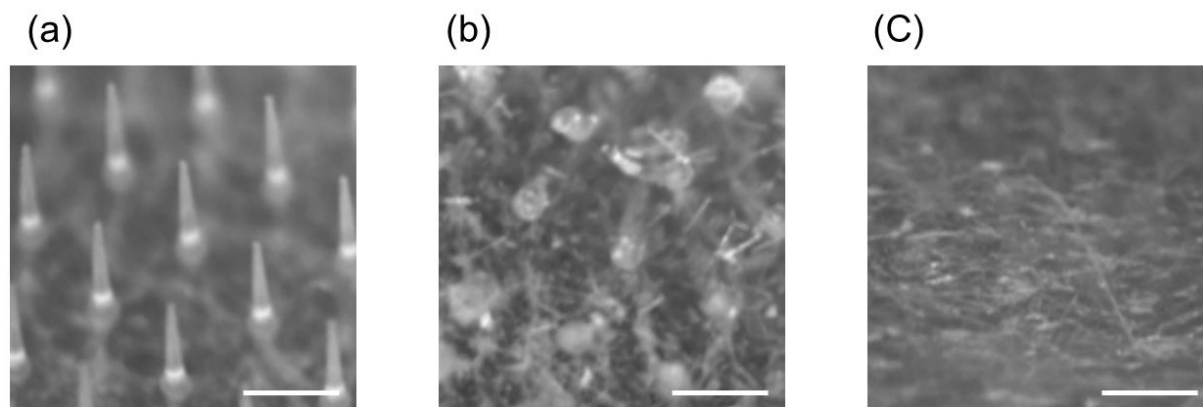


Figure 18. Dissolution process of microneedles after application of hPTH₁₋₃₄-loaded MNs. (a) Before application, (b) 30 min, and (c) 60 min after application. Scale bars represent 800 μm .

(Naito et al. *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 215, Figure 5)

2-2-2 hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の有効性及び安全性

【hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用後の *in vivo* hPTH₁₋₃₄ 皮膚吸収性】

Figure 19 及び Table 5 には、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs をラットに適用した際の血漿中 hPTH₁₋₃₄ 濃度プロフィールと薬物動態学的パラメータを示した。hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用後の血漿中 hPTH₁₋₃₄ 濃度を測定したところ、最高血中濃度到達時間 (T_{max}) は皮下注射と比べ若干の遅れが見られたものの、血漿中濃度は速やかに上昇した後、減少する傾向を示し、皮下注射とほぼ同様の推移を示した。さらに皮下注射及び hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 経皮投与後の hPTH₁₋₃₄ の血漿中薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) は、それぞれ 1354、1355 $\text{ng/mL} \cdot \text{min}$ であり、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の皮下注射に対する相対的 BA は約 100%であった。

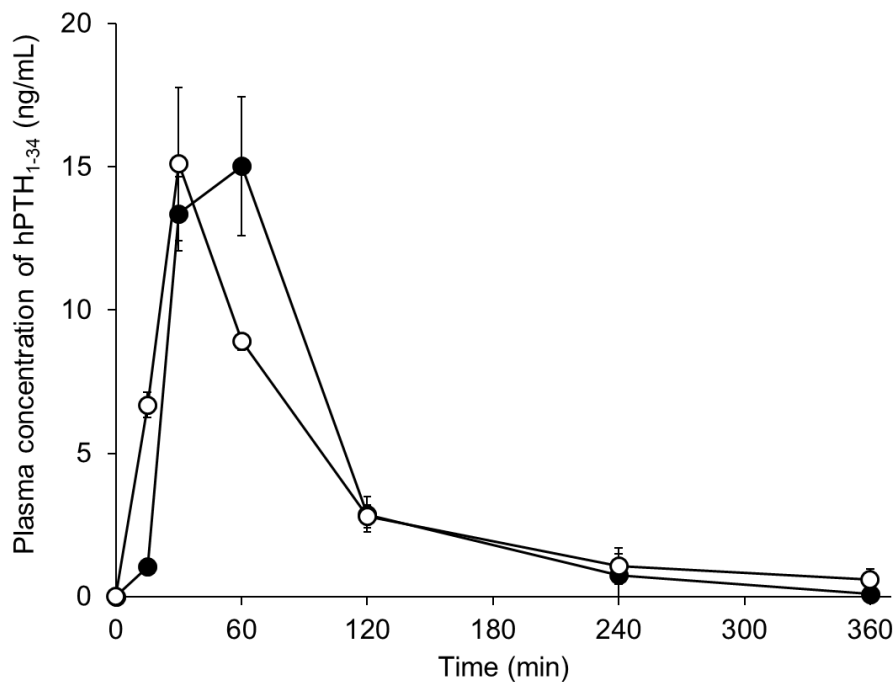


Figure 19. Plasma concentration-time profiles of hPTH₁₋₃₄ following either application of MNs or subcutaneous injection. Keys: (●) hPTH₁₋₃₄-loaded MNs and (○) subcutaneous injection of hPTH₁₋₃₄. Results are expressed as the means ± SE of three rats. (Naito et al. *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 215, Figure 6)

Table 5. Pharmacokinetic parameters of hPTH₁₋₃₄ after administration of hPTH₁₋₃₄-loaded MNs or subcutaneous injection of hPTH₁₋₃₄.

	Dose (μg)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (min)	AUC _{0-∞} (ng/mL · min)	BA (%)
hPTH ₁₋₃₄ s.c.	20	15.1 ± 2.7	30 ± 0	1354 ± 279	-
hPTH ₁₋₃₄ -loaded MNs	20	15.3 ± 2.1	50 ± 10	1355 ± 31	100 ± 2

Results are expressed as the means ± SE of three rats. (Naito et al. *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 215, Table 1)

【hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の皮膚刺激性】

hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の皮膚に対する刺激性を評価するために、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs をラットに適用した。その結果、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 除去から 48 時間後までに、皮膚の適用部位表面に紅斑や浮腫は観察されなかった (Figure 20)。

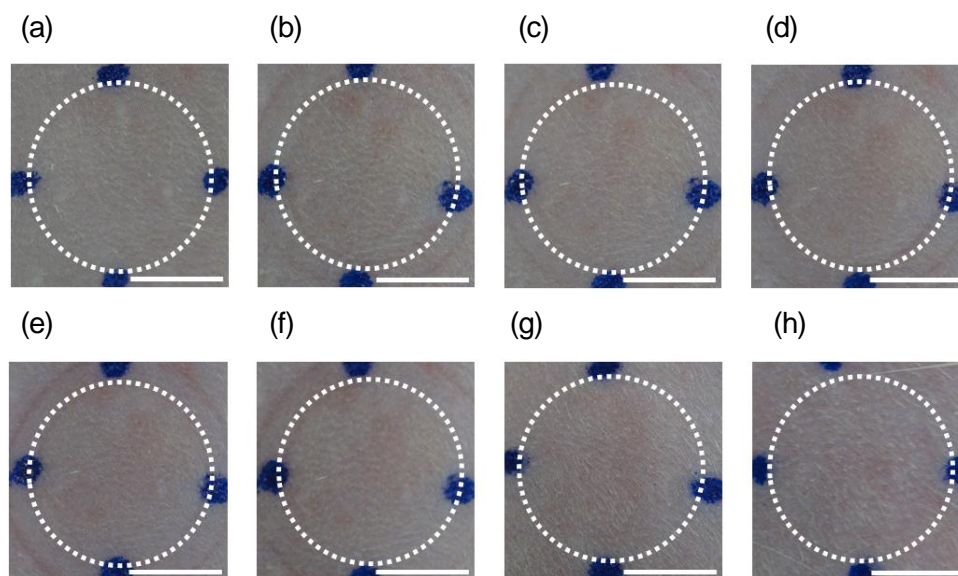


Figure 20. Skin irritation observed following application of hPTH₁₋₃₄-loaded MNs. Typical images of rat skin (a) before application of hPTH₁₋₃₄-loaded MNs, (b) immediately after removal, and (c) 1 h, (d) 2 h, (e) 3 h, (f) 4 h, (g) 24 h, and (h) 48 h after application of hPTH₁₋₃₄-loaded MNs. Scale bars represent 5 mm.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 215, Figure 7)

【hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の骨粗鬆症モデルラットに対する骨量変化】

Figure 21 には、雌性ラットの卵巣摘出 (OVX) により作製した骨粗鬆症モデルラットに、hPTH₁₋₃₄ を皮下注射あるいは MNs で経皮投与後に摘出したラット下肢脛骨の切片画像を示した。健常ラットである Naive 群 (Figure 21a) に対して、OVX 群 (Figure 21b) では、ピンク色で示される骨基質の割合が減少したことから、卵巣を摘出することで、骨密度の低い骨粗鬆症モデルラットが作製されることが示された。作製した骨粗鬆症モデルラットに対して、hPTH₁₋₃₄ を皮下注射 (Figure 21c) または hPTH₁₋₃₄-loaded MNs (Figure 21d) で投与したところ、いずれもピンク色の骨基質の割合が Naive 群と同程度に維持された。

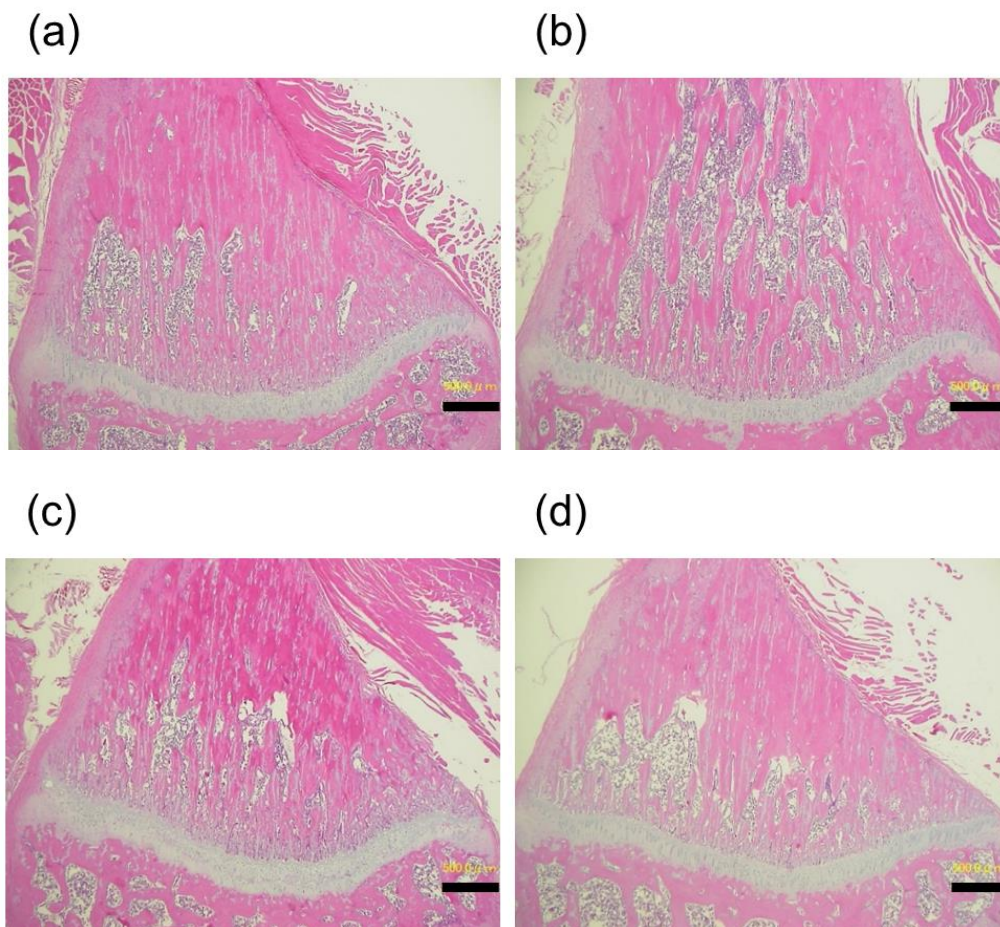


Figure 21. Histological micrographs of bone tissue from rat tibias following application of hPTH₁₋₃₄-loaded MNs in rats with OVX-induced osteoporosis. (a) Naive, (b) OVX, (c) subcutaneous administration of hPTH₁₋₃₄, and (d) hPTH₁₋₃₄-loaded MNs. Scale bars represent 500 µm.

(Naito et al. *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 215, Figure 8)

2-3 考察

本研究においては、MNs 中に臨床用量である 20 μg の hPTH₁₋₃₄ を封入し、その経皮吸収性について系統的に評価した。安定性試験の結果から、MNs に封入した hPTH₁₋₃₄ は、溶液状態に比べ安定に保存できることが示された。hPTH₁₋₃₄ は、高湿度状態や酸化により分解されることが知られている^{67,68}。MNs 中での hPTH₁₋₃₄ の高い安定性は、MNs 作製時に十分に乾燥させ水分を蒸発させたこと、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を窒素置換した密封状態で保管することで酸化を抑制したことに起因すると考えられる。また、以前の研究報告では、薬物の封入量の増大に伴い、針の強度が減弱することが報告されている^{69,70}。皮膚貫通性試験の結果において、本 hPTH₁₋₃₄-loaded MNs をラットに適用することにより、針が皮膚表面から約 150 μm の深さまで到達しており、この深さは一般的なヒト角質層の厚みである 10-20 μm を超えるものであった。このことから、MNs 中に hPTH₁₋₃₄ を臨床用量の 20 μg を封入しても、MNs は角質層を貫通できる十分な強度を有することが示された。一般的に、経皮投与後に薬物を全身循環へ移行させる場合には、薬物を毛細血管の存在する真皮層まで到達させる製剤学的工夫が必要である。ヒト角質層及び表皮の厚さはそれぞれ 10-20 μm 、70-100 μm である⁷¹。hPTH₁₋₃₄-loaded MNs をラットに適用後に針が到達した深さは、皮膚の弾性や変形などの影響により、MNs の針自体の長さよりも短かったが、針は真皮層に到達する深さまで穿刺できており、薬物の通過経路を形成することで、薬物の全身循環への移行に寄与したと推察できる。また、本研究においては、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 除去直後に、適用部位において TEWL 値の上昇が見られたものの、その後速やかに減少した。TEWL 値は、皮膚バリア機能の指標であることから^{72,73}、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs は、皮膚バリア機能を一時的に減少させることにより、薬物の経皮吸収を促進させる可能性が示された。

Daddona ら^{63,67}は、チタン製の針の表面に hPTH₁₋₃₄ をコーティングした MNs システムとして、ZP-PTH[®]を報告している。しかしながら、既存の hPTH₁₋₃₄ 皮下注射製剤であるフォルテオ[®]に対する ZP-PTH[®]の BA は 37.4% であり、低い吸収率を示した。この低い吸収率は、MNs の皮膚への穿刺の段階で、ZP-PTH[®]の 190 μm という短い針が十分に真皮層に到達できなかったことによるものと考えた。一般的に、薬物の全身循環への移行を目的とする場合、MNs の針の長さは 600 μm を超える値に設定されている場合が多い^{74,75}。そこで本研究では、hPTH₁₋₃₄ の効率的な経皮送達を目指して、針の長さを 800 μm とした。その結果、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を適用することにより、hPTH₁₋₃₄ 皮下注射に匹敵する hPTH₁₋₃₄ の吸収が見られた (BA; 100%)。

hPTH₁₋₃₄ は、骨形成と骨吸収、両方の作用を示すとされる⁷⁶。過去の報告では、ラットに hPTH₁₋₃₄ を間欠的に皮下注射した場合に、骨形成作用による骨量増大作用を示したことから^{76,77}、hPTH₁₋₃₄ を用いた骨粗鬆症治療において、hPTH₁₋₃₄ の血中濃度推移は重要であると考えられる。本研究の *in vivo* 吸収性試験では、T_{max} に多少の遅れは見られたものの、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用後に速やかな hPTH₁₋₃₄ の血中濃度の上昇と消失が認められ、皮下注射と同等の血中濃度推移を示した。骨粗鬆症治療効果試

験では、1週間に2回の頻度で hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を頻回投与したところ、明瞭な骨量減少抑制作用が確認された。このことから、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用は、皮下注射と同等の骨量減少抑制作用を示し、骨粗鬆症治療に有用であることが示された。

また、皮膚刺激性試験から、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs は比較的安全性の高い製剤であることが示された。これは、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の適用により、薬物が通過可能な細孔を形成するために、一時的に皮膚バリア機能が低下するものの、その後速やかに回復するという TEWL 測定の結果からも説明できる。したがって、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs による皮膚刺激は比較的軽度であると考えられる。また、HA は生体由来成分であり、生体適合性の高い化合物であることから、皮膚に対してほとんど刺激性を示すことがない。さらに、溶解性試験の結果から、本研究における hPTH₁₋₃₄-loaded MNs は、ラットに適用後に針が溶解・消失することからも、針の皮膚への残存も回避出来ると思われる。臨床応用に向けては、さらに詳細な安全性の検討が必要であるが、本研究で用いた MNs は安全かつ高効率に hPTH₁₋₃₄ を経皮送達可能であり、hPTH₁₋₃₄ の経皮送達による骨粗鬆症治療に有用であると考えられる。

第3章 ヒト iPS 細胞由来三次元培養皮膚を用いた薬物の経皮吸収性評価系の構築

3-1 緒言

第2章までにおいて、HA 製剤を利用した骨粗鬆症治療薬の経皮送達に成功した。一方、こうした新たな経皮吸収製剤を開発する際には、摘出皮膚または三次元培養皮膚を用いて薬物の経皮吸収性及び毒性を評価する必要がある²⁴。これまで摘出皮膚を用いた薬物の経皮吸収性の評価には、齧歯類やブタの皮膚が用いられてきた^{24,78}。なかでも齧歯類は、安価で扱いやすく、過去のデータ蓄積も豊富であることから、*in vitro* 及び *in vivo* における経皮吸収及び皮膚毒性評価において最も頻繁に利用されている。特にラットの角質層 (18 μm) は、齧歯類の中ではヒトの角質層 (17 μm) と最も近い厚みを有するため、ラット皮膚を用いた薬物透過がヒト皮膚での薬物透過性予測に用いられている。しかしながら、ヒト皮膚とラット皮膚では、表皮 (ヒト: 46.9 μm 、ラット: 32 μm) や皮膚全層 (ヒト: 2.97 mm、ラット: 2.09 mm) の厚み²⁴、汗腺、脂腺、毛包などの付属器官の数や角質層の脂質組成が異なる⁵⁴。Jung らは、21 種類の薬物のうち 14 種類の薬物でヘアレスラット皮膚における透過性がヒト皮膚よりも高く、そのうち 7 種類の薬物の透過性は 10 倍以上にもなると報告している⁵⁴。また、Schmook らの報告においても、ラット皮膚における terbinafine や hydrocortison の透過 flux は、ヒト皮膚の約 50 - 55 倍であることが示されており⁵⁰、ラット皮膚における薬物の透過性はヒト皮膚と比べて顕著に高いことが知られている。また、ブタ皮膚はさらにヒト皮膚に近い構造を持つとされるが、血管新生の頻度やエクリン汗腺とアポクリン汗腺の割合、脂質組成がヒト皮膚と異なるため、脂溶性薬物の皮膚透過及び吸収性に差異が生じ得る⁵⁴。すなわち、齧歯類やブタの皮膚を用いた薬物の経皮吸収性評価の結果から、ヒトでの吸収性を予測することは難しい^{50, 54, 79}。そのため、経皮吸収製剤を臨床応用するためには、ヒト摘出皮膚を用いて経皮吸収性を評価する必要がある。しかしながら、ヒト摘出皮膚の使用には、倫理面や供給面に課題がある上に、ドナーの個体差や部位差が薬物の透過性に大きく影響する。そこで、近年これら摘出皮膚に代わるモデルとして、EpiSkin[®]、Skin Ethic[®]、EpiDerm[®]に代表されるように⁷⁹⁻⁸²、初代培養の表皮基底層 keratinocytes を用いた三次元培養モデルが多数報告されている。これらの三次元培養皮膚モデルは、移植や新たな製剤の経皮吸収性及び毒性評価、化粧品の安全性評価など幅広く利用されているものの、もとなる初代培養 keratinocytes が有限増殖であるために、実験資源としての組織供給量に限界があるという問題点がある。さらに、三次元培養皮膚 EpiDermTM、Skin Ethic[®]における caffeine の透過係数は、ヒト表皮と比べてそれぞれ 23 倍、102 倍高いと Schreiber らが報告しているように⁸³、このような三次元培養皮膚についても、皮膚のバリア機能は低く、透過性はヒト皮膚と比べて数十～数百倍高い。そのため、新たな製剤の経皮吸収性の予測や安全性の評価には、増殖能に優れる細胞を用いた新たな評価系の構築が求められている。

一方、iPS 細胞は、分化多能性及び無限増殖能を有する細胞で、再生医療や創薬の現場で幅広く研

究が進められている^{32,84}。iPS 細胞の無限増殖能を活かし、ヒト iPS 細胞からヒト皮膚に類似の組織を作製できれば、動物皮膚使用時の種差の問題を克服可能であり、ヒト皮膚により近い構造とバリア機能を有する組織を用いて経皮吸収性評価を安定的に実現できると考えられる。また疾患 iPS 細胞由来の三次元培養皮膚を用いれば、皮膚疾患罹患時の経皮吸収や毒性評価も可能になると考えられる。これまでに、表皮水疱症や脊髄髄膜瘤などの皮膚疾患に対する皮膚移植を目的として、iPS 細胞を用いた皮膚組織の作製方法が複数報告されてきた³³⁻³⁶。しかしながら、iPS 細胞由来の皮膚組織を経皮吸収や毒性予測の評価系に応用した報告はない。

そこで本章では、薬物の経皮吸収評価における iPSC-based skin の有用性を評価するために、分子量の異なる水溶性薬物として、5(6)-carboxyfluorescein (CF) 及び fluorescein isothiocyanate dextran 4000 (FD4) を選択し、これらモデル薬物の iPSC-based skin における透過特性を評価した。

3-2 結果

3-2-1 iPSC-based skin の作製

皮膚は、表皮層と真皮層で構成されている。皮膚構造をさらに詳細に見ると、表皮は積層構造をとり、内側の基底層から有棘層、顆粒層へと分化し、最終的に皮膚バリア機能を担う角質層が形成されることが知られている⁸⁵⁻⁸⁷ (Figure 22)。そこで iPSC 細胞を用いて皮膚を作製する場合にも、本来の皮膚構造の形成過程に基づき、iPSC 細胞から分化させた表皮基底層の keratinocytes と真皮層の fibroblasts を用いて、表皮の分化を促すことで皮膚作製を試みた (Figure 23)。

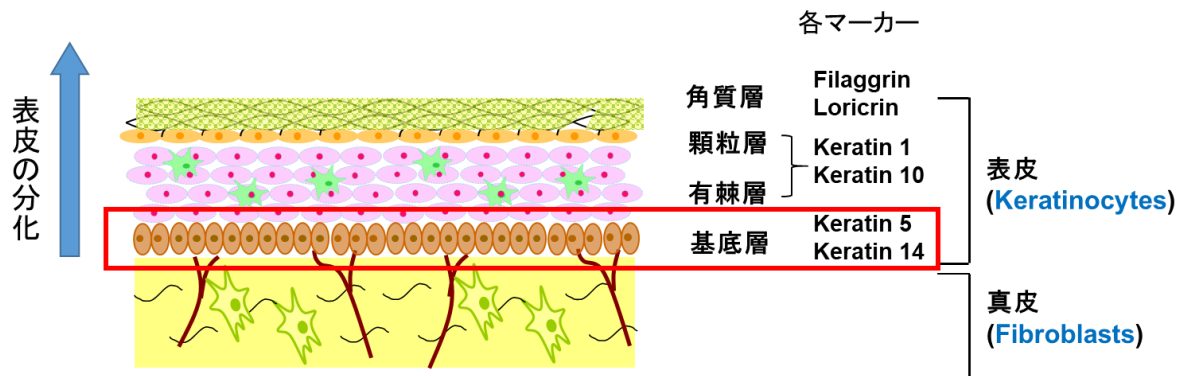


Figure 22. Skin turnover and their markers

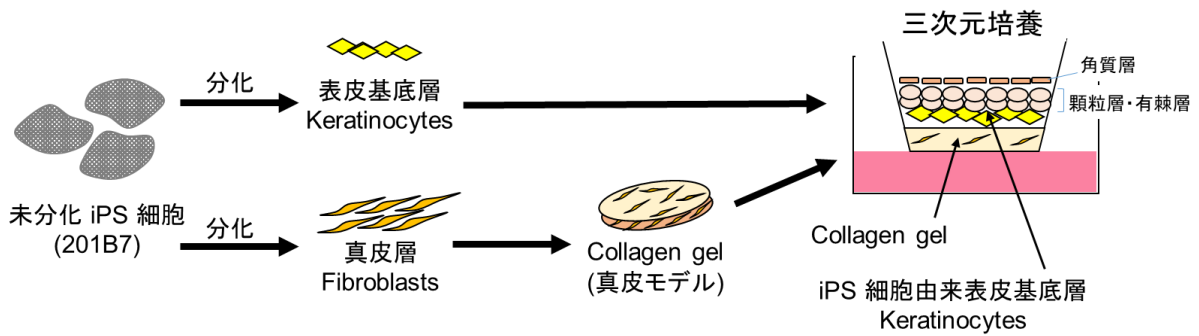


Figure 23. Preparation methods of human iPSC-based skin

【ヒト iPS 細胞から皮膚細胞への分化】

iPS 細胞から表皮基底層 keratinocytes 及び fibroblasts へ分化したことを確認するために、細胞形態の観察及びマーカー発現の評価を行った。分化した分化前後の細胞の形態を顕微鏡観察したところ、分化後の細胞は、keratinocytes (Figure 24b) 及び fibroblasts (Figure 24c) 様へと形態変化し、その形状は未分化 iPS 細胞株である 201B7 (Figure 24a) とは明らかに異なっていた。さらに、分化後の細胞は、免疫細胞染色により、それぞれ表皮基底層 keratinocytes 及び fibroblasts の代表的なマーカーである keratin14 (表皮基底層 keratinocytes、Figure 24d)、collagen I (fibroblasts、Figure 24e)、vimentin (fibroblasts、Figure 24f) のタンパク発現が確認された。

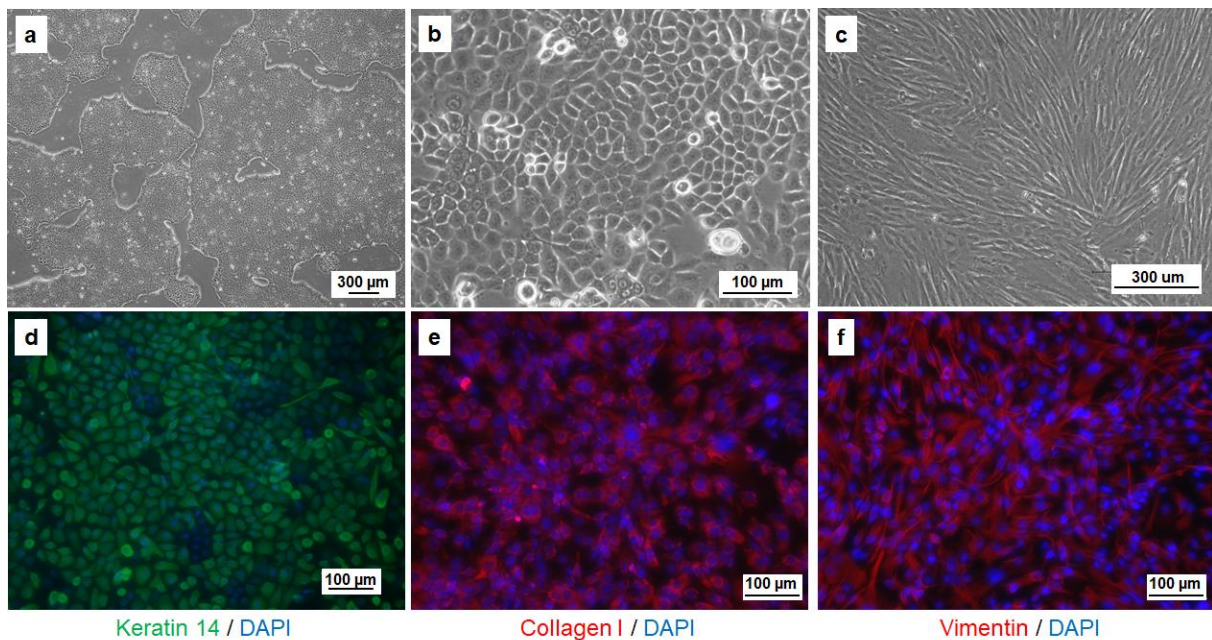


Figure 24. Morphological characteristics of human iPS cells-derived keratinocytes and fibroblasts. iPS cells were differentiated into keratinocytes and fibroblasts. To confirm the differentiation of iPS cells into keratinocytes or fibroblasts, we observed cellular morphology and expression of cellular markers. Representative images were shown; Morphology of (a) undifferentiated iPS cells (201B7 cells), (b) iPS cells-derived keratinocytes and (c) iPS cells-derived fibroblasts. Immunocytochemistry of (d) keratin 14 in iPS cells-derived keratinocytes, (e) collagen I and (f) vimentin in iPS cells-derived fibroblasts. (Naito et al., *J. Pharm. Sci.* **2019**, 108, 3524-3527. Figure S1)

【iPS 細胞由来 keratinocytes 及び fibroblasts を用いた皮膚組織の作製】

iPS 細胞由来 keratinocytes 及び fibroblasts から作製した組織が皮膚様組織であることを確認するために、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色あるいは免疫組織学的染色後の組織断面の構造及びマーカータンパク発現を評価し、市販の三次元培養皮膚である EpiDerm™、ヒト皮膚と比較した (Figure 25, 26)。iPS 細胞由来組織における HE 染色の画像 (Figure 25a) において皮膚に類似の積層構造が見られ、免疫組織学的染色の画像 (Figure 25b) では基底層マーカーの keratin 14、有棘層、顆粒層マーカーである keratin 10 の発現が確認された。これらの結果は、EpiDerm™ (Figure 26A)、ヒト摘出皮膚 (Figure 26B) の結果と同様であった。

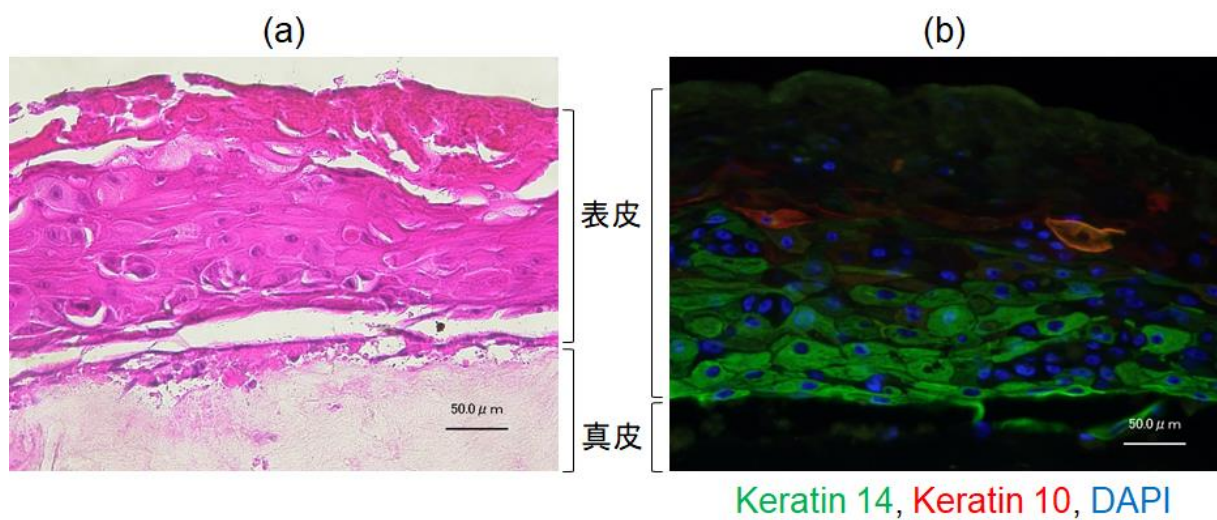
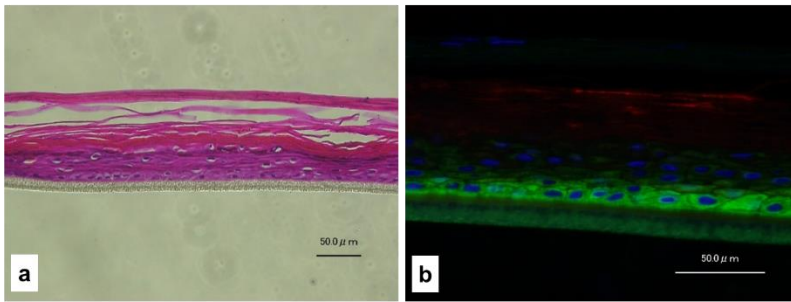


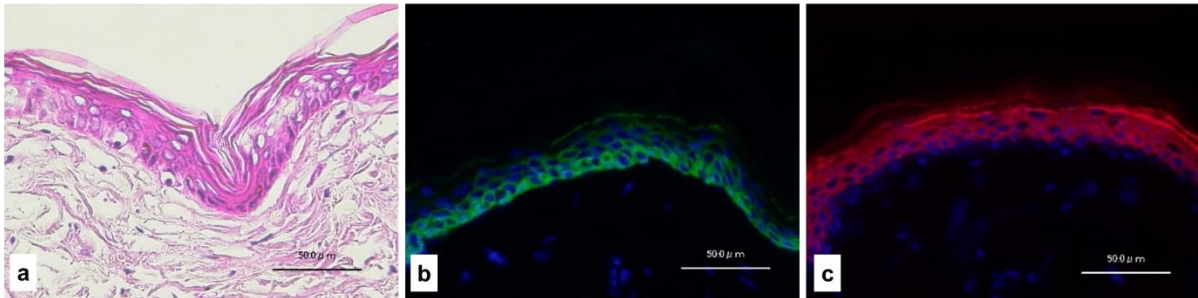
Figure 25. Structural characteristics of iPSC-based skins. Human skin-like structures were exhibited in iPSC-based skin. Representative images are shown; (a) histology and (b) immunohistochemical analysis of iPSC-based skin.

(Naito et al., *J. Pharm. Sci.* **2019**, 108, 3524-3527. Figure 1a, d)

A EpiDerm™



B Human skin



Keratin 14 / Keratin 10 / DAPI

Figure 26. Structural characteristics of other skins. Representative images are shown; (A) (a) histological and (b) immunohistochemical analysis of three-dimensional epidermis model, EpiDerm™. (B) (a) histological and (b, c) immunohistochemical analysis of human skin. (Naito et al., *J. Pharm. Sci.* **2019**, 108, 3524-3527. Figure 1b, c, e-g)

3-2-2 iPSC-based skin の経皮吸収評価系への応用

【分子量の異なる化合物の iPSC-based skin における透過性】

経皮吸収評価における iPSC-based skin の有用性を評価するため、iPSC-based skin を用いて分子量の異なるモデル薬物の透過性を評価した。すなわち、分子量の異なる水溶性化合物として CF と FD4 を選択し、iPSC-based skin における透過性 (Figure 27) を評価するとともに、その他の皮膚における透過性の結果 (Figure 28) と比較した。表皮層のないコラーゲンゲル (Figure 27a) においては、実験初期に化合物の透過性が増大した一方で、iPSC-based skin における CF、FD4 の皮膚透過 (Figure 27b) では、それぞれ実験開始 30 分及び 120 分で薬物透過初期のラグタイムが見られた。また、iPSC-based skin における FD4 の透過ラグタイムには若干の遅れが見られ、ラット皮膚 (Figure 28a)、EpiDerm™ (Figure 28b)、ヒト臍出皮膚 (Figure 28c) においても類似の透過ラグタイムが見られた。さらに、iPSC-based skin における透過性は、他の皮膚と同様に、分子量依存的な透過を示したものの、その累積透過量は他の皮膚よりも高い値を示した。

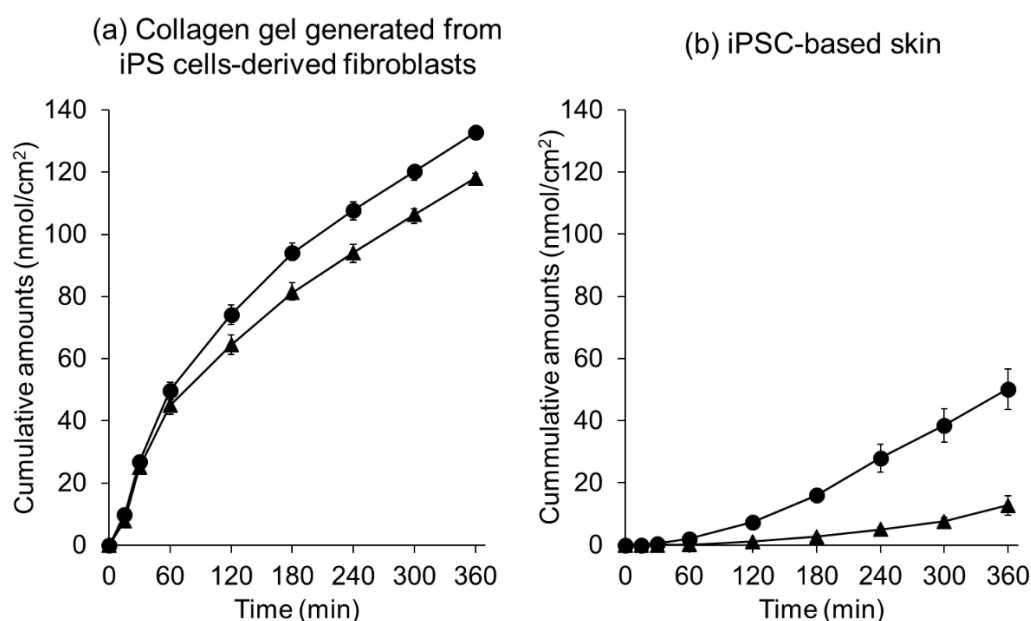


Figure 27. Transdermal permeability of model drugs across skins generated from iPS cells. Model drugs permeated across the iPSC-based skin in a molecular weight-dependent manner with lag time. (a) Transdermal permeability of CF and FD4 through collagen gel generated from human iPS cells-derived fibroblasts; (b) transdermal permeability of CF and FD4 through iPSC-based skin (iPS cells-derived keratinocytes and collagen gel generated from human iPS cells-derived fibroblasts) through rat skin. Results are expressed as the means \pm SE of 3-4 experiments. Keys : (●) CF and (▲) FD4.

(Naito et al., *J. Pharm. Sci.* **2019**, 108, 3524-3527. Figure 2a and S2)

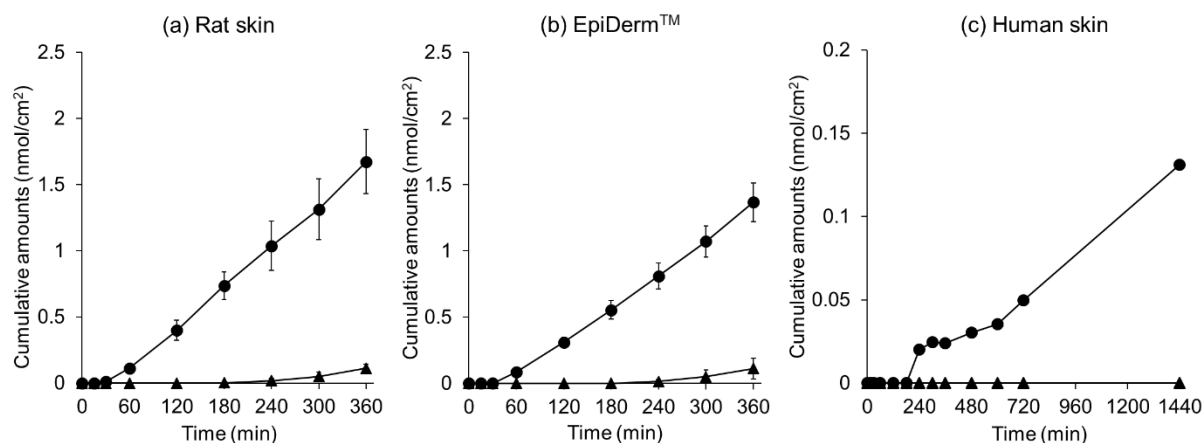


Figure 28. Transdermal permeability of model drugs across other skins. (a) Transdermal permeability of CF and FD4 through rat skin; (b) transdermal permeability of CF and FD4 through EpiDerm™; (c) transdermal permeability of CF and FD4 through human cadaver skin. Results for rat skin and EpiDerm™ are expressed as the means \pm SE of 3-4 experiments. Results for human skin are representative data of single experiment. Keys: (●) CF and (▲) FD4.

(Naito et al., *J. Pharm. Sci.* **2019**, 108, 3524-3527. Figure 2b, 2c and S3)

3-3 考察

本研究では、既存の動物皮膚、ヒト皮膚、三次元培養皮膚を用いた経皮吸収評価系に代わる評価モデルの構築を目指して、iPSC-based skin の経皮吸収評価系としての有用性を評価した。皮膚は主に keratinocytes からなる表皮と fibroblasts からなる真皮で構成される^{86,88,89}。これまでに、iPS 細胞を分化させた keratinocytes と初代培養の fibroblasts を用いて、iPS 細胞由来皮膚を作製した例がいくつか報告されてきた^{33,36}。しかしながら、初代培養細胞はドナー由来のロット差が大きいため、毎回安定した皮膚を作製するためには、どちらも iPS 細胞由来の keratinocytes と fibroblasts を用いることが望ましい。さらに、iPS 細胞由来の細胞は無増殖能を有することから、iPS 細胞由来皮膚の安定供給も実現可能になる。そこで、本研究では、keratinocytes 及び fibroblasts の両者とも iPS 細胞から分化させ、iPSC-based skin の作製に用いた。分化した keratinocytes 及び fibroblasts の評価として、代表的なマーカーである keratin14、collagen I 及び vimentin の発現を確認した。また、以前の報告によると、初代培養 keratinocytes 由来の皮膚作製においては、表皮基底層マーカーである keratin14、有棘層及び顆粒層マーカーである keratin10、終末分化の角質層マーカーである loricrin、involucrin など、マーカータンパクの発現を評価することで、作製した組織が皮膚であることを裏付けていた^{90,91}。一方、本研究において作製した iPSC-based skin は、角質層様の構造や loricrin の発現はほとんど観察されなかった (data not shown)。この完全な角質層構造が分化されない現象は、従来の報告でも見られており、その結果と一致した³⁶。しかしながら、本研究で作製した iPS 細胞由来の組織は、過去の報告と同様に積層構造を有し、さらに keratin14 や keratin10 の発現が見られた。またこの傾向は、三次元培養皮膚である EpiDerm™ やヒト摘出皮膚においても確認されたことから、作製した iPS 細胞由来の組織は完全な皮膚とは言い難いものの、皮膚に類似の構造や性質を有することが示された。

一般的に、ヒト皮膚は、ブタ皮膚、ラットのような齧歯類の皮膚、既存の三次元培養皮膚モデルに比べ高いバリア能を有する⁷⁹。iPSC-based skin におけるモデル薬物の透過性評価では実験初期に透過のラグタイムが見られ、さらに、iPSC-based skin における薬物の透過性は分子量依存的な透過を示した。一方、その累積透過量は、ヒト摘出皮膚における透過量と比較して高い値を示した。このことから、本研究で作製した iPSC-based skin は部分的にはあるものの皮膚に類似のバリア機能を有し、CF、FD4 のような分子量の異なる薬物の経皮吸収性評価が可能であることが示された。ヒト皮膚における薬物透過を予測可能な評価系構築のためには、完全な角質層を有する iPS 細胞由来皮膚の作製方法を検討した上で、より幅広い物性を持つ薬物を用いた透過性評価を行うなど、さらなる検討が必要である。しかしながら、本研究は、ヒト皮膚における薬物透過を予測可能な新たな評価系の構築として、iPS 細胞から作製した皮膚を用いた初めての報告であり、その開発の第一ステップとして、有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

結論

筆者は3章にわたり、高齢社会に資する新たな経皮吸収製剤と評価系の構築を目指して、骨粗鬆症治療薬を有効かつ簡便に皮膚から投与可能なHA製剤を開発するとともに、経皮吸収評価におけるヒトiPSC-based skinの有用性を評価し、以下の結論を得た。

第1章 HAゲルシートを用いた骨粗鬆症治療薬ALNの経皮吸収性の改善

HAにリン酸を加えて生じる非共有結合を介したゲル化現象を利用してHAゲルシートの作製に成功した。このHAゲルシートは、皮膚に対する安全性が比較的高く、骨粗鬆症治療に十分なALNの経皮吸収性を示すことを明らかにした。

第2章 HAを素材とするMNsを用いた骨粗鬆症治療薬hPTH₁₋₃₄の経皮吸収性の改善

HAを素材とするMNsは、骨粗鬆症治療薬であるhPTH₁₋₃₄を比較的安定に封入可能であること、適用後に皮膚内で溶解しhPTH₁₋₃₄を放出すること、hPTH₁₋₃₄を有効かつ安全に経皮送達可能であることを明らかにした。

第3章 ヒトiPSC-based skinを用いた薬物の経皮吸収性評価系の構築

本研究では、薬物の経皮吸収評価を目的として、ヒトiPS細胞からiPSC-based skinを作製した。iPSC-based skinを用いた薬物の透過性評価では、薬物透過初期のラグタイムと薬物の分子量に依存した透過性が得られ、分子量の異なる薬物の経皮吸収評価が可能であることを明らかとした。一方、その累積透過量は、ヒト摘出皮膚における透過量と比較して高い値を示したことから、ヒトにおける薬物透過の予測に向けては、皮膚バリア機能を向上させる改良が必要であることも明らかとした。

以上、筆者は、皮膚から吸収されにくい水溶性薬物ALN及び高分子薬物hPTH₁₋₃₄を効率よく経皮送達可能なHA製剤化に成功した。さらに、iPSC-based skinにおけるモデル薬物の経皮透過性を系統的に評価することで、iPSC-based skinの経皮吸収評価用皮膚モデルとしての可能性を明らかにした。本研究で得られた知見は、新たな経皮吸収製剤の開発に対して有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

実験の部

第1章 実験の部

【試薬】

アレンドロン酸ナトリウム三水和物は、Toronto Research Chemicals, Inc. (North York, ON, Canada) より購入した。¹⁴C 標識アレンドロン酸ナトリウムは、Moravek, Inc. (Brea, CA, USA) より購入した。ヒアルロン酸 (HYALURONSAN HA-LQSH, average molecular weight; 2300 kDa) は、Kewpie Corporation (Tokyo, Japan) より購入した。プロパンジオール、グリセリン及びリン酸は FUJIFILM Wako Pure Chemicals Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。

【ヒト摘出皮膚】

ヒト摘出皮膚は、Platinum TRAINING (Henderson, NV, USA) より購入したものをを用いた。以後すべてのヒト摘出皮膚を用いた実験は京都薬科大学倫理審査委員会による承認を得て実施した。

【実験動物】

Wistar 系雄性ラット (250-270 g) 及び Sprague Dawley 系ラット (180-200 g) は、Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) から購入した。以後すべての動物実験は京都薬科大学動物実験実施規程に準じて行った。

【ALN 封入 HA ゲルシートの作製】

ALN 封入 HA ゲルシートは以下の手順に従って作製した。すなわち、HA 100mg を精製水 10g に添加し、水和するまで 60℃ で加熱することで、HA 溶液を調製した。HA 溶液にグリセリン 0.8g とプロパンジオール 3.2g を加え、十分に攪拌することで、HA-多価アルコール混合液を得た。4g/tube で分注した HA-多価アルコール混合液に 1% リン酸水溶液 1420 μL と 5 mg/mL ALN 水溶液 1164 μL を添加・混合後、全量を 6 ウェルセルカルチャーインサートに移し、50℃ で 2 日間加熱乾燥させた。加熱乾燥後の最終生成物における HA、プロパンジオール、グリセリン、リン酸、ALN の理論濃度は、それぞれ 2.4、76.7、19.2、1.2、0.5 w/w% とした。ALN を含まない HA ゲルシートも同様の方法で作製した。

【ゲルシート作製時の HA の粘度測定】

リン酸添加あるいは未添加の HA-多価アルコール混合液を 50℃ で 2 日間加熱乾燥させた試料を Brookfield Digital Rotational Viscometer (DV2THACJ0, Brookfield Engineering Labs., Inc., Middleboro, MA, USA) 専用のテフロンカップ皿に移し、スピンドル回転速度 1 rpm 及びせん断速度 3.84 s⁻¹、25℃ の条件で 2 分間粘度計測を行った。

【ALN 封入 HA ゲルシートの水への溶解性】

作製した ALN 封入 HA ゲルシートに、作製途中で添加した量と同量の精製水を添加し、経時的に溶解の様子を観察した。

【HA ゲルシートの皮膚刺激性評価】

三種混合（メデトミジン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、ブトルファノール 2.5 mg/kg）腹腔内投与による麻酔下で剃毛した Wistar 系雄性ラットの腹部に、HA ゲルシートを適用し、24 時間後に剥離した。その後、適用部位における刺激性を経日的に観察した。

【ALN 封入 HA ゲルシートの皮膚透過性試験】

三種混合（メデトミジン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、ブトルファノール 2.5 mg/kg）腹腔内投与による麻酔下で、Wistar 系雄性ラット腹部を電気バリカン及び電気カミソリを用いて剃毛後、頸椎脱臼法にて安楽死させた。安楽死後のラットから皮膚を摘出し、真皮側に付着している皮下脂肪を脱脂綿で除去した後、phosphate buffer solution (PBS) で洗浄し、使用時まで -30℃ で保存した。直径 20 mm（面積：3.14 cm²）の円形に打ち抜いたラット腹部皮膚あるいはヒト皮膚をフランツ型拡散セルのレセプター部に皮膚の真皮側が接するように皮膚を装着した。ALN 封入 HA ゲルシート（面積：0.785 cm²、ALN 0.5 mg 含有）あるいは ¹⁴C 標識 ALN 封入 HA ゲルシート（面積：0.95 cm²、ALN 0.625 mg 含有）を、それぞれラット皮膚あるいはヒト皮膚の角質層側に適用後、上からラップで皮膚全体を覆った。また、レセプター部には、3 mL の PBS を満たした。セルは恒温槽中で 32℃ を維持し、レセプター内の溶液は攪拌子とスターラーを用いて常時攪拌した。透過実験開始後、レセプター溶液（0.3 mL）を経時的にサンプリングし、その際と同じ容積の PBS を補充した⁴⁶。ラット皮膚を透過した ALN 濃度は、逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）により、Wong らの報告⁹²を参考に、次項の条件により測定した。ヒト皮膚を透過した ALN 濃度は、サンプル 100 μL に、Clear-Sol I (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) 5 mL を混合して一晩静置した後、液体シンチレーションカウンタ（LSC-6100,

Aloka, Tokyo, Japan) により放射活性を測定することで算出した。

【RP-HPLC 定量条件】

HPLC system	LC-10AS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)
Column	5C18-PAQ (4.6 × 150 mm, (Nacalai Tesque Co. Ltd., Kyoto, Japan)
Mobile phase	1 mM Na ₂ EDTA-methanol (pH 6.5) / acetonitrile = 98 / 2 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Wave length	Excitation / Emission = 395 nm / 480 nm
Column temperature	40 °C

【*In vivo* 経皮吸収性試験】

三種混合（メデトミジン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、ブトルファノール 2.5 mg/kg）腹腔内投与による麻酔下で、電気バリカン及び電気カミソリを用いて剃毛した Wistar 系雄性ラット腹部に、¹⁴C 標識 ALN 封入 HA ゲルシート (Dose 2.5mg/kg) を適用した。比較対照として、¹⁴C 標識 ALN (Dose 1 mg/kg) をラットの大腿静脈より静脈内投与した。その後、頸静脈より経時的に採血を行い、遠心分離後、上清を分取することで血漿サンプルを得た。血漿サンプル 100 μL に 30% 過酸化水素を 100 μL 添加することで酸化させ、Clear-Sol I 5 mL を混合して一晩静置した後、液体シンチレーションカウンタにより放射活性を測定した。静脈内投与後の血漿中 ¹⁴C 放射活性 (% of dose/mL) は、ALN 濃度 (ng/mL) に変換した後、非線形最小二乗法プログラム MULTI により分析した⁹³。静脈内投与後の AUC は、2-コンパートメントモデルにより算出した。¹⁴C 標識 ALN 封入 HA ゲルシート適用後の AUC は、台形法により算出した⁹⁴。

【血漿中 Ca²⁺ 濃度測定】

三種混合（メデトミジン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、ブトルファノール 2.5 mg/kg）腹腔内投与による麻酔下で、Sprague Dawley 系雄性ラットの腹部を電気バリカン及び電気カミソリを用いて剃毛した。Day 0 において、剃毛後のラット腹部に ALN 封入 HA ゲルシート（1枚当たり ALN 2.0 mg 含有、面積：3.14 cm²）3枚を 24 時間適用した。Day 0 及び 3 において、麻酔下でラット頸静脈から採血を行い、遠心分離後上清を分取することで、血漿を得た。血漿中 Ca²⁺ 濃度は、カルシウム E-テストワコー (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて測定した⁴⁶。

【骨粗鬆症モデルラットにおける ALN 封入 HA ゲルシートの骨粗鬆症治療効果試験】

無処置の Sprague Dawley 系雌性ラットを naïve 群、三種混合（メドトミジン 0.3 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、ブトルファノール 2.5 mg/kg）腹腔内投与による麻酔下で、閉経後骨粗鬆症を想定して OVX した群を OVX 群とし、それぞれ 8 週間飼育した。一方、ALN 封入 HA ゲルシート 群には、卵巣を摘出した 4 週間後から、2 週間に 1 回の頻度で、剃毛したラット腹部に ALN 封入 HA ゲルシート（1 枚当たり ALN 2.0 mg 含有、面積：3.14 cm²）3 枚を 24 時間適用した。また、比較対照である皮下注射群には、卵巣を摘出した 4 週間後から、2 週間に 1 回の頻度で、ALN 1 mg/kg を皮下注射した。すべての群において、卵巣摘出より 8 週間後にラットを安楽死させ、右下肢脛骨を摘出し、作製した組織切片を HE 染色後、顕微鏡で観察した^{47,95}。

【統計解析】

多重比較には、Student Newman Keuls 法を用いた。

第2章 実験の部

【試薬】

ヒアルロン酸は、Kikkoman Biochemifa Company (Tokyo, Japan) より購入した。hPTH₁₋₃₄ は、CosMED Pharmaceutical Co., Ltd. (Kyoto, Japan) より供与された。200 mg C18 含有 SEP カラムは、Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Burlingame, CA, USA) より購入した。トリパンプルーは、Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) より購入した。Tissue-TeK[®] O.C.T. Compound は、Sakura Finetek Japan Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。パラホルムアルデヒド、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、アプロチニン、Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。その他のすべての試薬については、市販の特級試薬を用いた。

【動物】

Wistar 系雄性ラット (250-270 g) 及び Sprague Dawley 系雌性ラット (180-200 g) は、Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) から購入した。

【hPTH₁₋₃₄-loaded MNs の作製】

15% HA 水溶液に、酸性条件下で hPTH₁₋₃₄ 溶液を添加し、混合した。室温条件下で、この混合液 0.3 mL を 2 cm × 2 cm の鋳型に添加した。デシケーターで 2 時間乾燥させた後、鋳型の表面に残った液体成分を除去し、20% HA 水溶液 0.1 mL を鋳型の同じ場所に添加した。鋳型を完全に乾燥させた後、支持体側に 2 cm × 2 cm のポリエチレンテレフタレート (PET) 製粘着シートを被せた。乾燥後の物質を鋳型から取り外すことで、シート状の hPTH₁₋₃₄-loaded MN を得た。さらに、直径 1 cm の円形にくり抜くことで、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を得た^{47,96}。

【MNs 中の hPTH₁₋₃₄ 含量測定】

MNs の針に含まれる hPTH₁₋₃₄ 量を測定するために、MNs の支持体から針を分離し、針を PBS 5mL の入ったバイアルに移し、32 °C, 72rpm で 1 時間振盪することで溶解させた⁹⁷。サンプルに含まれる hPTH₁₋₃₄ 量は、PTH (1-34) ELISA kit (PTH (1-34), Human, EIA Kit, High Sensitivity, Peninsula Laboratories International, Inc. San Carlos, CA, USA) を用いて測定した。

【安定性試験】

hPTH₁₋₃₄-loaded MNs は窒素置換したアルミニウム製の袋に密封し、-20℃、4℃または、室温 (15-20℃) 条件下で保存した⁶⁷。比較対照として、hPTH₁₋₃₄を PBS に溶かした hPTH₁₋₃₄溶液を同じ温度で保存した。1 ヶ月保管後に、MNs の支持体から針を切り離し、PBS で溶解させた。MNs の針部分に残存する hPTH₁₋₃₄ 量は、PTH (1-34) ELISA kit (PTH (1-34), Human, EIA Kit, High Sensitivity, Peninsula Laboratories International, Inc. San Carlos, CA, USA) を用いて測定した。

【皮膚貫通性試験】

ペントバルビタール (ペントバルビタールナトリウム塩として 52 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下で、Wistar 系雄性ラットの腹部を電気バリカン及び電気カミソリを用いて剃毛した後、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を剃毛したラット腹部に適用した。hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 適用から 1 時間後に、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を除去し、適用部位を 0.4% トリパンプルー水溶液で 10 分間染色した。トリパンプルー水溶液をティシュペーパーで除去した後、皮膚表面を観察した。さらに、ラットを安楽死させた後に、適用部位の皮膚を摘出し、O. C. T. コンパウンドによる包埋、液体窒素による凍結の後、低温マイクロトーム (CM1950; Leica, Wetzlar, Germany) を用いて、10 μm の厚さにスライスすることで、切片を作製した。その後、作製した切片を光学顕微鏡 (BIOZERO®; KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した^{47,48}。

【経皮水分蒸散量測定】

ペントバルビタール (ペントバルビタールナトリウム塩として 52 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下で、Wistar 系雄性ラットの腹部を電気バリカン及び電気カミソリを用いて剃毛した後、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を剃毛したラット腹部に適用し、1 時間後に除去した。適用部位における TEWL 値は、Tewameter (TM 300, Courage and Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) を用いて測定した。すなわち、測定は、皮膚にプローブを当てた後、測定値が安定したときに記録した。同時に、テープストリッピングを 20 回施した陽性対照群と無処置の陰性対照群についても、TEWL 測定を行った⁹⁸。

【溶解性試験】

ペントバルビタール (ペントバルビタールナトリウム塩として 52 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下で、Wistar 系雄性ラットの腹部を電気バリカン及び電気カミソリを用いて剃毛した後、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を剃毛したラット腹部に適用した。経時的に hPTH₁₋₃₄-loaded MNs を除去し、針の様子をデジタル顕微鏡 (Shodensha, Osaka, Japan) を用いて観察した⁴⁸。

【*In vivo* 経皮吸収性試験】

ペントバルビタール（ペントバルビタールナトリウム塩として 52 mg/kg）の腹腔内投与による麻酔下で、Wistar 系雄性ラットの腹部を電気バリカン及び電気カミソリを用いて剃毛した後、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs (20 µg/rat) をラット腹部に適用した。MNs 中の hPTH₁₋₃₄ の投与量は、針部分に含まれる hPTH₁₋₃₄ 量に基づいて計算した。同時に、比較対照として、hPTH₁₋₃₄ (20 µg/rat) を皮下注射により投与した。経時的に頸静脈より採血を行い、EDTA 0.3 mg 及びアプロチニン 150 KIU を含むエッペンチューブに回収した。遠心分離後、上清を分取することで血漿サンプルを得た。得られたサンプルは、濃度測定まで -80°C で保管した。最高血中濃度 (C_{max}) 及び T_{max} は、血漿中薬物濃度時間曲線より直接算出した。hPTH₁₋₃₄ の MNs による経皮投与あるいは皮下注射後の AUC は、台形法により算出した⁹⁴。

【血漿中 hPTH₁₋₃₄ 濃度測定】

血漿サンプル中の hPTH₁₋₃₄ は、200 mg C18 含有 SEP カラムを用いて抽出、精製した。得られた溶液は凍結乾燥後、ELSA キットに付属の EIA buffer で再溶解した。血漿中 hPTH₁₋₃₄ 濃度は、PTH (1-34) ELISA kit (PTH (1-34), Human, EIA Kit, High Sensitivity, Peninsula Laboratories International, Inc. San Carlos, CA, USA) を用いて測定した。

【皮膚刺激性評価】

ペントバルビタール（ペントバルビタールナトリウム塩として 52 mg/kg）腹腔内投与による麻酔下で剃毛した Wistar 系雄性ラットの腹部に、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs (20 µg/rat) を適用し、1 時間後に剥離した。その後、適用部位における刺激性を経日的に観察した。

【骨粗鬆症治療効果試験】

無処置の Sprague Dawley 系雌性ラットを naïve 群、ペントバルビタール（ペントバルビタールナトリウム塩として 52 mg/kg）腹腔内投与による麻酔下で、閉経後骨粗鬆症を想定して OVX した群を OVX 群とし、それぞれ 8 週間飼育した。一方、hPTH₁₋₃₄-loaded MNs 群には、卵巣を摘出した 4 週間後から、1 週間に 2 回の頻度で、剃毛したラット腹部に hPTH₁₋₃₄-loaded MNs (20 µg/rat) を 24 時間適用した。また、比較対照である皮下注射群には、卵巣を摘出した 4 週間後から、1 週間に 2 回の頻度で、hPTH₁₋₃₄ (20 µg/rat) を皮下注射した。すべての群において、卵巣摘出より 8 週間後にラットを安楽死させ、右下肢脛骨を摘出し、作製した組織切片を HE 染色後、顕微鏡で観察した^{47,95}。

第3章 実験の部

【試薬】

Essential 8 Flex Media、vitronectin、defined keratinocyte-serum-free medium (DKSFM)、Insulin-Transferrin-Selenium-Sodium Pyruvate (ITS-A) supplement、24-well polycarbonate cell culture inserts with 0.4 μm pore size、keratinocyte-serum-free medium (KSFM) は、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) より購入した。Matrigel は、BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ) より購入した。mTeSR1 media は、STEMCELL Technologies Inc. (Vancouver, Canada) より購入した。Y-27632、all-trans retinoic acid (ATRA)、gelatin、ascorbic acid、normal goat serum はFUJIFILM Wako Pure Chemicals Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) は、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) より購入した。Epidermal growth factor (EGF) は、PeproTech, Inc. (Rocky Hill, NJ) より購入した。Accutase は、Merk-Millipore (Billerica, MA) より購入した。Fibronectin は Corning (NY)より購入した。Collagen type I は、Advanced BioMatrix (San Diego, CA) より購入した。Repro Stem medium は、ReproCELL (Yokohama, Japan) より購入した。Transforming growth factor beta-2 (TGF β -2) は R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) より購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (DMEM)、Triton X-100 は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) より購入した。Fetal bovine serum (FBS) は、Biosera (Marikina, Philippines) より購入した。Atelocollagen は、KOKEN CO., LTD. (Tokyo, Japan) より購入した。DAPI は、Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) より購入した。CF、FD4 は、Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO) より購入した。

【抗体】

以下の抗体を、記載の濃度で使用した。

Rabbit anti-keratin 14 antibodies (clone: Poly19053, BioLegend, San Diego, CA) (1:1000)

Rabbit anti-collagen I antibodies (Abcam plc., Cambridge, UK) (1:500)

Mouse anti-vimentin antibodies (clone: V9, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX) (1:50)

Mouse anti-keratin 10 antibodies (clone: RKSE60, Abcam plc., Cambridge, UK) (1:500)

Goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) conjugated with Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) (1:1000)

Goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) conjugated with Alexa 594 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) (1:1000)

【三次元培養皮膚モデル】

EpiDerm™ は、MatTek corporation, Ashland, MA より購入した。

【培養細胞】

ヒト iPS 細胞株 201B7 は、山中伸弥先生（京都大学）より供与を受け⁸⁴、Essential 8 Flex Media を用いて vitronectin を表面コーティングしたディッシュ上で維持した。

【ヒト皮膚】

ヒト皮膚は、Platinum TRAINING (Henderson, NV, USA) より購入した。

【実験動物】

Wistar 系雄性ラット (250-270 g) は、Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) から購入した。

【培地組成】

Keratinocytes medium 1

Defined keratinocyte serum free medium (DKSFM)

+ All-trans retinoic acid (ATRA, final concentration 1 μ M)

+ Bone morphogenetic protein 4 (BMP4, final concentration 25 ng/mL)

Keratinocytes medium 2

Defined keratinocyte serum free medium (DKSFM)

+ Epidermal growth factor (EGF, final concentration 20 ng/mL)

Keratinocytes medium 3

Defined keratinocyte serum free medium (DKSFM)

+ Epidermal growth factor (EGF, final concentration 20 ng/mL)

+ Y-27632 (final concentration 10 μ M)

Fibroblast differentiation medium

Repro Stem medium (bFGF (−))

+ Transforming growth factor beta 2 (TGF β 2, final concentration 10 ng/mL)

+ Y-27632 (final concentration 10 μ M)

+ Insulin-Transferrin-Selenium-Sodium Pyruvate (ITS-A) supplement

+ Ascorbic acid (final concentration 0.3 mM)

Fibroblast medium 1

Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (DMEM)

+ 20% Fetal bovine serum (FBS)

+ Ascorbic acid (final concentration 0.3 mM)

Fibroblast medium 2

Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (DMEM)

+ 10% Fetal bovine serum (FBS)

3D medium

Keratinocyte serum free medium (KSFM) 50%

+ Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (DMEM) 45 %

+ Fetal bovine serum (FBS) 5%

+ Calcium chloride (CaCl₂, final concentration 1.8 mM)

【iPS 細胞から keratinocytes への分化】

iPS 細胞から keratinocytes への分化は、以前の報告^{33,36}に従った。すなわち、201B7 を 0.5 mM EDTA/PBS を用いて剥離し、コロニーの状態では matrigel コートディッシュに播種後、終濃度として 10 μ M Y-27632 を添加した mTeSR1 media により 24 時間培養した。Day 0 で培地を Keratinocyte medium 1

に切り替え、4日間培養した。Day 4で、培地を Keratinocyte medium 2 に切り替え、さらに10日間培養した。Accutaseにより細胞を剥離し、終濃度として0.01 mg/mL fibronectin 及び0.03 mg/mL collagen I をコートしたディッシュに継代し、Keratinocyte medium 3 で播種した。細胞は、播種した後、室温(15-20°C)で30分間静置した後、培地交換することで、急速に接着した細胞のみを残した。三次元培養皮膚の作製には、5回継代後の細胞を用いた。

【iPS細胞から fibroblasts への分化】

iPS細胞から fibroblasts への分化は、以前の報告⁹⁹に従った。すなわち、201B7を低接着ディッシュに播種し、Fibroblast differentiation medium で3日間培養することで胚様体を形成させた。胚様体はgelatinをコートしたディッシュに移し、Fibroblast medium 1を用いて11日間培養した。Day 14において、細胞を継代し、Fibroblast medium 2で培養した。三次元培養皮膚の作製には、5回継代後の細胞を用いた。

【コラーゲンゲルの作製】

真皮様組織としてのコラーゲンゲルは、以前の方法¹⁰⁰に従い、iPS細胞由来 fibroblasts を用いて作製した。すなわち、氷上で終濃度として250 µM アスコルビン酸添加の Atelocollagen 溶液に、10% FBS 添加の DMEM に懸濁した iPS細胞由来 fibroblasts を混合した。混合液を低接着ディッシュに播種し、37°C, 5% CO₂ インキュベータで1時間静置した。その後、インキュベータ内に設置したオービタルシェイカーで、ディッシュを60 rpm で回転培養した。培地は2-3日毎に交換した。三次元培養皮膚の作製には、1週間培養して形成したコラーゲンゲルを用いた。

【iPSC-based skin の作製】

iPSC-based skin の作製は、以前の方法³⁶に従った。すなわち、ポアサイズ0.4 µm のポリカーボネート製支持膜を有する24-well セルカルチャーインサートに設置したコラーゲンゲル上に iPS細胞由来 keratinocytes を播種し、インサート内外を Keratinocyte medium 3 で満たした。2日間培養後、keratinocyte 側の表面を空気暴露し、3D medium でインサート外部を満たした。培地は1週間に3回の頻度で交換し、30-40日間培養した。

【組織学的評価】

iPS 細胞由来 keratinocytes、iPS 細胞由来 fibroblasts、iPSC-based skin の組織学的評価及び免疫組織化学染色は、以前の報告^{33,36}に従った。すなわち、細胞は PBS に溶かした 4% パラホルムアルデヒド溶液で 15-20℃、5 分間静置することで、固定した。三次元培養皮膚は、PBS に溶かした 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定後、パラフィン包埋し、マイクロトームを用いて切片をスライスした。組織切片は、HE 染色後、顕微鏡により組織学的に観察した。免疫組織学的染色においては、パラフィン切片を 95℃ で 20 分間、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で浸漬することで、抗原賦活化した。続いて、切片を 10% 正常ヤギ血清及び 0.1% Triton X-100 含有の PBS に浸し、15-20℃ で 1 時間静置した。その後、一次抗体を 4℃ で一晩反応させた。PBS で洗浄後、蛍光標識二次抗体を 15-20℃ で一晩反応させた。核は PBS に溶かした 2 µg/mL DAPI を 15-20℃ で 15 分間反応させることで染色した。細胞及び組織におけるタンパク発現は、蛍光顕微鏡 (BIOZERO®; KEYENCE, Osaka, Japan) により観察した。

【透過性試験】

皮膚透過実験は、インサート内側にそれぞれ PBS に溶かした 0.25 mM CF または FD4 を 0.5 mL、インサート外側に PBS 1.7 mL を満たした状態で開始した¹⁰¹⁻¹⁰³。インサートを入れたプレートは 32℃ に維持した恒温槽に設置し、持続的に 100 rpm で振とうした。経時的にインサート外側のレセプター液を採取し、さらに新鮮な PBS を等量添加した。比較対照として、ラット皮膚、市販の三次元培養表皮 (EpiDerm™)、ヒト摘出皮膚においても同様に、これらの薬物の透過性を評価した。

引用文献

1. Bayat, M.; Cook, A. M., Intrapulmonary administration of medications. *J. Neurosci. Nurs.* **2004**, *36* (4), 231-235.
2. Scheuch, G.; Siekmeier, R., Novel approaches to enhance pulmonary delivery of proteins and peptides. *J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, *58 Suppl 5* (Pt 2), 615-625.
3. Liang, Z.; Ni, R.; Zhou, J.; Mao, S., Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (3), 380-389.
4. Türker, S.; Onur, E.; Ozer, Y., Nasal route and drug delivery systems. *Pharm. World Sci.* **2004**, *26* (3), 137-142.
5. Kumar, H.; Mishra, G.; Sharma, A. K.; Gothwal, A.; Kesharwani, P.; Gupta, U., Intranasal drug delivery: A non-invasive approach for the better delivery of neurotherapeutics. *Pharm. Nanotechnol.* **2017**, *5* (3), 203-214.
6. Prausnitz, M. R.; Langer, R., Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (11), 1261-1268.
7. Pastore, M. N.; Kalia, Y. N.; Horstmann, M.; Roberts, M. S., Transdermal patches: history, development and pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (9), 2179-2209.
8. Todd, P. A.; Goa, K. L.; Langtry, H. D., Transdermal nitroglycerin (glyceryl trinitrate). A review of its pharmacology and therapeutic use. *Drugs* **1990**, *40* (6), 880-902.
9. Tamura, G.; Ichinose, M.; Fukuchi, Y.; Miyamoto, T., Transdermal tulobuterol patch, a long-acting beta(2)-agonist. *Allergol. Int.* **2012**, *61* (2), 219-229.
10. Amanatkar, H. R.; Grossberg, G. T., Transdermal rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: current and future directions. *Expert Rev. Neurother.* **2014**, *14* (10), 1119-1125.
11. Benitez, A.; Edens, H.; Fishman, J.; Moran, K.; Asgharnejad, M., Rotigotine transdermal system: developing continuous dopaminergic delivery to treat Parkinson's disease and restless legs syndrome. *Ann. NY Acad. Sci.* **2014**, *1329*, 45-66.
12. Morimoto, Y.; Hatanaka, T.; Sugibayashi, K.; Omiya, H., Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin. *J. pharm. pharmacol.* **1992**, *44* (8), 634-639.
13. Bos, J. D.; Meinardi, M. M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* **2000**, *9* (3), 165-9.

14. Ita, K., Transdermal iontophoretic drug delivery: advances and challenges. *J. Drug Target.* **2016**, *24* (5), 386-391.
15. Ita, K., Perspectives on transdermal electroporation. *Pharmaceutics* **2016**, *8* (1), 9.
16. Park, D.; Park, H.; Seo, J.; Lee, S., Sonophoresis in transdermal drug delivery. *Ultrasonics* **2014**, *54* (1), 56-65.
17. Rai, V. K.; Mishra, N.; Yadav, K. S.; Yadav, N. P., Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *J. Control. Release* **2018**, *270*, 203-225.
18. Rehman, K.; Zulfakar, M. H., Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2014**, *40* (4), 433-440.
19. Fraser, J. R.; Laurent, T. C.; Laurent, U. B., Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **1997**, *242* (1), 27-33.
20. Brown, M. B.; Jones, S. A., Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2005**, *19* (3), 308-318.
21. Boeriu, C. G.; Springer, J.; Kooy, F. K.; van den Broek, L. A. M.; Eggink, G., Production methods for hyaluronan. *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2013**, *2013*, 1-14.
22. Tripodo, G.; Trapani, A.; Torre, M. L.; Giammona, G.; Trapani, G.; Mandracchia, D., Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97* (Pt B), 400-416.
23. Bukhari, S. N. A.; Roswandi, N. L.; Waqas, M.; Habib, H.; Hussain, F.; Khan, S.; Sohail, M.; Ramli, N. A.; Thu, H. E.; Hussain, Z., Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120* (Pt B), 1682-1695.
24. Godin, B.; Touitou, E., Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (11), 1152-1161.
25. Fisher, S. A.; Anandakumaran, P. N.; Owen, S. C.; Shoichet, M. S., Tuning the microenvironment: Click-crosslinked hyaluronic acid-based hydrogels provide a platform for studying breast cancer cell invasion. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25* (46), 7163-7172.
26. Xu, K.; Narayanan, K.; Lee, F.; Bae, K. H.; Gao, S.; Kurisawa, M., Enzyme-mediated hyaluronic acid-tyramine hydrogels for the propagation of human embryonic stem cells in 3D. *Acta Biomater.*

- 2015, 24, 159-171.
27. Bermejo-Velasco, D.; Azémar, A.; Oommen, O. P.; Hilborn, J.; Varghese, O. P., Modulating thiol pKa promotes disulfide formation at physiological pH: An elegant strategy to design disulfide cross-linked hyaluronic acid hydrogels. *Biomacromolecules* **2019**, 20 (3), 1412-1420.
 28. Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F., Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54 (1), 13-36.
 29. Larrañeta, E.; Henry, M.; Irwin, N. J.; Trotter, J.; Perminova, A. A.; Donnelly, R. F., Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels crosslinked using a solvent-free process for potential biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 181, 1194-1205.
 30. Montanari, E.; D'Arrigo, G.; Di Meo, C.; Virga, A.; Coviello, T.; Passariello, C.; Matricardi, P., Chasing bacteria within the cells using levofloxacin-loaded hyaluronic acid nanohydrogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, 87 (3), 518-523.
 31. Bariya, S. H.; Gohel, M. C.; Mehta, T. A.; Sharma, O. P., Microneedles: an emerging transdermal drug delivery system. *J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, 64 (1), 11-29.
 32. Takahashi, K.; Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, 126 (4), 663-676.
 33. Itoh, M.; Kiuru, M.; Cairo, M. S.; Christiano, A. M., Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2011**, 108 (21), 8797-802.
 34. Petrova, A.; Celli, A.; Jacquet, L.; Dafou, D.; Crumrine, D.; Hupe, M.; Arno, M.; Hobbs, C.; Cvorov, A.; Karagiannis, P.; Devito, L.; Sun, R.; Adame, L. C.; Vaughan, R.; McGrath, J. A.; Mauro, T. M.; Ilic, D., 3D *In vitro* model of a functional epidermal permeability barrier from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **2014**, 2 (5), 675-689.
 35. Takagi, R.; Ishimaru, J.; Sugawara, A.; Toyoshima, K.E.; Ishida, K.; Ogawa, M.; Sakakibara, K.; Asakawa, K.; Kashiwakura, A.; Oshima, M.; Minamide, R.; Sato, A.; Yoshitake, T.; Takeda, A.; Egusa, H.; Tsuji, T., Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an *in vivo* transplantation model. *Sci Adv* **2016**, 2 (4), e1500887.
 36. Kajiwara, K.; Tanemoto, T.; Wada, S.; Karibe, J.; Ihara, N.; Ikemoto, Y.; Kawasaki, T.; Oishi, Y.; Samura, O.; Okamura, K.; Takada, S.; Akutsu, H.; Sago, H.; Okamoto, A.; Umezawa, A., Fetal therapy model of myelomeningocele with three-dimensional skin using amniotic fluid cell-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **2017**, 8 (6), 1701-1713.

37. Eiken, P.; Vestergaard, P., Treatment of osteoporosis after alendronate or risedronate. *Osteoporos. Int.* **2016**, *27* (1), 1-12.
38. Liberman, U. A.; Weiss, S. R.; Bröll, J.; Minne, H. W.; Quan, H.; Bell, N. H.; Rodriguez-Portales, J.; Downs, R. W., Jr.; Dequeker, J.; Favus, M., Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The alendronate phase III osteoporosis treatment study group. *New Engl. J. Med.* **1995**, *333* (22), 1437-1443.
39. Fink, H. A.; MacDonald, R.; Forte, M. L.; Rosebush, C. E.; Ensrud, K. E.; Schousboe, J. T.; Nelson, V. A.; Ullman, K.; Butler, M.; Olson, C. M.; Taylor, B. C.; Brasure, M.; Wilt, T. J., Long-term drug therapy and drug discontinuations and holidays for osteoporosis fracture prevention: A systematic review. *Ann. Intern. Med.* **2019**, *171* (1), 37-50.
40. Gertz, B. J.; Holland, S. D.; Kline, W. F.; Matuszewski, B. K.; Freeman, A.; Quan, H.; Lasseter, K. C.; Mucklow, J. C.; Porras, A. G., Studies of the oral bioavailability of alendronate. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1995**, *58* (3), 288-298.
41. Graham, D. Y.; Malaty, H. M., Alendronate gastric ulcers. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1999**, *13* (4), 515-519.
42. Strampel, W.; Emkey, R.; Civitelli, R., Safety considerations with bisphosphonates for the treatment of osteoporosis. *Drug Saf.* **2007**, *30* (9), 755-763.
43. Choi, A.; Gang, H.; Chun, I.; Gwak, H., The effects of fatty acids in propylene glycol on the percutaneous absorption of alendronate across the excised hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* **2008**, *357* (1-2), 126-131.
44. Choi, A.; Gang, H.; Whang, J.; Gwak, H., Pharmacokinetic characteristics of formulated alendronate transdermal delivery systems in rats and humans. *Drug Deliv.* **2010**, *17* (4), 249-254.
45. Boche, M.; Pokharkar, V., Positive effect of alendronate on bone turnover in ovariectomised rats' osteoporosis: comparison of transdermal lipid-based delivery with conventional oral administration. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2018**, *8* (5), 1078-1089.
46. Kusamori, K.; Katsumi, H.; Abe, M.; Ueda, A.; Sakai, R.; Hayashi, R.; Hirai, Y.; Quan, Y. S.; Kamiyama, F.; Sakane, T.; Yamamoto, A., Development of a novel transdermal patch of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, for the treatment of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25* (12), 2582-2591.
47. Katsumi, H.; Liu, S.; Tanaka, Y.; Hitomi, K.; Hayashi, R.; Hirai, Y.; Kusamori, K.; Quan, Y. S.; Kamiyama, F.; Sakane, T.; Yamamoto, A., Development of a novel self-dissolving microneedle array of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate: evaluation of transdermal absorption, safety,

- and pharmacological effects after application in rats. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (9), 3230-3238.
48. Katsumi, H.; Tanaka, Y.; Hitomi, K.; Liu, S.; Quan, Y. S.; Kamiyama, F.; Sakane, T.; Yamamoto, A., Efficient transdermal delivery of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, using tip-loaded self-dissolving microneedle arrays for the treatment of osteoporosis. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (3), 29.
 49. Barber, E. D.; Teetsel, N. M.; Kolberg, K. F.; Guest, D., A comparative study of the rates of *in vitro* percutaneous absorption of eight chemicals using rat and human skin. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1992**, *19* (4), 493-497.
 50. Schmook, F. P.; Meingassner, J. G.; Billich, A., Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in *in-vitro* percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* **2001**, *215* (1-2), 51-56.
 51. Hughes, M. F.; Edwards, B. C., In vitro dermal absorption of pyrethroid pesticides in human and rat skin. *Toxicol Appl Pharmacol* **2010**, *246* (1-2), 29-37.
 52. Ahmed, E. M., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.* **2015**, *6* (2), 105-121.
 53. Porras, A. G.; Holland, S. D.; Gertz, B. J., Pharmacokinetics of alendronate. *Clin. Pharmacokinet.* **1999**, *36* (5), 315-328.
 54. Jung, E. C.; Maibach, H. I., Animal models for percutaneous absorption. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35* (1), 1-10.
 55. Mazières, B.; Rouanet, S.; Velicy, J.; Scarsi, C.; Reiner, V., Topical ketoprofen patch (100 mg) for the treatment of ankle sprain: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am. J. Sports Med.* **2005**, *33* (4), 515-523.
 56. Marwah, H.; Garg, T.; Goyal, A. K.; Rath, G., Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv.* **2016**, *23* (2), 564-578.
 57. Katsumi, H.; Nakatani, M.; Sano, J.; Abe, M.; Kusamori, K.; Kurihara, M.; Shiota, R.; Takashima, M.; Fujita, T.; Sakane, T.; Hibi, T.; Yamamoto, A., Absorption and safety of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, after intrapulmonary administration in rats. *Int. J. Pharm.* **2010**, *400* (1-2), 124-130.
 58. Sato, M.; Grasser, W.; Endo, N.; Akins, R.; Simmons, H.; Thompson, D. D.; Golub, E.; Rodan, G. A., Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J. Clin. Invest.* **1991**, *88* (6), 2095-2105.
 59. Sahni, M.; Guenther, H. L.; Fleisch, H.; Collin, P.; Martin, T. J., Bisphosphonates act on rat bone

- resorption through the mediation of osteoblasts. *J. Clin. Invest.* **1993**, *91* (5), 2004-2011.
60. Azuma, Y.; Sato, H.; Oue, Y.; Okabe, K.; Ohta, T.; Tsuchimoto, M.; Kiyoki, M., Alendronate distributed on bone surfaces inhibits osteoclastic bone resorption *in vitro* and in experimental hypercalcemia models. *Bone* **1995**, *16* (2), 235-245.
 61. Potts, J. T., Jr.; Kronenberg, H. M.; Rosenblatt, M., Parathyroid hormone: chemistry, biosynthesis, and mode of action. *Adv. Protein Chem.* **1982**, *35*, 323-396.
 62. Lee, V. H. L.; Yamamoto, A., Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1989**, *4* (2), 171-207.
 63. Daddona, P. E.; Matriano, J. A.; Mandema, J.; Maa, Y. F., Parathyroid hormone (1-34)-coated microneedle patch system: clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics for treatment of osteoporosis. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (1), 159-165.
 64. Sugimoto, T.; Shiraki, M.; Fukunaga, M.; Hagino, H.; Sone, T.; Nakano, T.; Kishimoto, H.; Ito, M.; Yoshikawa, H.; Kishida, M.; Irie, C.; Nakamura, T., 24-Month open-label teriparatide once-weekly efficacy research trial examining bone mineral density in subjects with primary osteoporosis and high fracture risk. *Adv. Ther.* **2017**, *34* (7), 1727-1740.
 65. Li, Y. Z.; Quan, Y. S.; Zang, L.; Jin, M. N.; Kamiyama, F.; Katsumi, H.; Tsutsumi, S.; Yamamoto, A., Trypsin as a novel potential absorption enhancer for improving the transdermal delivery of macromolecules. *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, *61* (8), 1005-1012.
 66. Walther, W.; Siegel, R.; Kobelt, D.; Knosel, T.; Dietel, M.; Bembenek, A.; Aumann, J.; Schlee, M.; Baier, R.; Stein, U.; Schlag, P. M., Novel jet-injection technology for nonviral intratumoral gene transfer in patients with melanoma and breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14* (22), 7545-7553.
 67. Ameri, M.; Daddona, P. E.; Maa, Y. F., Demonstrated solid-state stability of parathyroid hormone PTH(1-34) coated on a novel transdermal microprojection delivery system. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (11), 2454-2463.
 68. Ameri, M.; Wang, X.; Maa, Y. F., Effect of irradiation on parathyroid hormone PTH(1-34) coated on a novel transdermal microprojection delivery system to produce a sterile product--adhesive compatibility. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (4), 2123-2134.
 69. Park, J. H.; Allen, M. G.; Prausnitz, M. R., Biodegradable polymer microneedles: fabrication, mechanics and transdermal drug delivery. *J. Control. Release* **2005**, *104* (1), 51-66.
 70. Zhu, Z.; Luo, H.; Lu, W.; Luan, H.; Wu, Y.; Luo, J.; Wang, Y.; Pi, J.; Lim, C. Y.; Wang, H., Rapidly dissolvable microneedle patches for transdermal delivery of exenatide. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (12),

3348-3360.

71. Sandby-Moller, J.; Poulsen, T.; Wulf, H. C., Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm. Venereol.* **2003**, *83* (6), 410-413.
72. Roskos, K. V.; Guy, R. H., Assessment of skin barrier function using transepidermal water loss: effect of age. *Pharm. res.* **1989**, *6* (11), 949-953.
73. Gomaa, Y. A.; Morrow, D. I.; Garland, M. J.; Donnelly, R. F.; El-Khordagui, L. K.; Meidan, V. M., Effects of microneedle length, density, insertion time and multiple applications on human skin barrier function: assessments by transepidermal water loss. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24* (7), 1971-1978.
74. Yan, G.; Warner, K. S.; Zhang, J.; Sharma, S.; Gale, B. K., Evaluation needle length and density of microneedle arrays in the pretreatment of skin for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *391* (1-2), 7-12.
75. Verbaan, F. J.; Bal, S. M.; van den Berg, D. J.; Groenink, W. H.; Verpoorten, H.; Luttge, R.; Bouwstra, J. A., Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin. *J. Control. Release* **2007**, *117* (2), 238-245.
76. Silva, B. C.; Costa, A. G.; Cusano, N. E.; Kousteni, S.; Bilezikian, J. P., Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J. Endocrinol. Invest.* **2011**, *34* (10), 801-810.
77. Dobnig, H.; Turner, R. T., The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats. *Endocrinology* **1997**, *138* (11), 4607-4612.
78. Chandra, S. A.; Stokes, A. H.; Hailey, R.; Merrill, C. L.; Melich, D. H.; DeSmet, K.; Furst, S. M.; Peterson, R. A.; Mellon-Kusibab, K.; Adler, R. R., Dermal toxicity studies: factors impacting study interpretation and outcome. *Toxicol. Pathol.* **2015**, *43* (4), 474-481.
79. Todo, H., Transdermal permeation of drugs in various animal species. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (3), 33.
80. Ponec, M.; Boelsma, E.; Gibbs, S.; Mommaas, M., Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2002**, *15 Suppl 1*, 4-17.
81. Netzlaff, F.; Lehr, C. M.; Wertz, P. W.; Schaefer, U. F., The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *60* (2), 167-178.

82. K uchler, S.; Str uver, K.; Friess, W., Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, **2013**, *9* (10), 1255-1263.
83. Schreiber, S.; Mahmoud, A.; Vuia, A.; Rubbelke, M. K.; Schmidt, E.; Schaller, M.; Kandarova, H.; Haberland, A.; Schafer, U. F.; Bock, U.; Korting, H. C.; Liebsch, M.; Schafer-Korting, M., Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. *Toxicol. In Vitro* **2005**, *19* (6), 813-822.
84. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131* (5), 861-872.
85. Fuchs, E., Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.* **1990**, *111* (6 Pt 2), 2807-2814.
86. Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G., The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (4), 328-340.
87. Sandilands, A.; Sutherland, C.; Irvine, A. D.; McLean, W. H., Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J. Cell Sci.* **2009**, *122* (Pt 9), 1285-1294.
88. Schaefer, H.; Redelmeier, T. E., *Skin barrier: principles of percutaneous absorption*. Karger: Basel ; New York, 1996.
89. Orioli, D.; Dellambra, E., Epigenetic regulation of skin cells in natural aging and premature aging diseases. *Cells* **2018**, *7* (12), 268.
90. Lamb, R.; Ambler, C. A., Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e52494.
91. Reijnders, C. M.; van Lier, A.; Roffel, S.; Kramer, D.; Scheper, R. J.; Gibbs, S., Development of a full-thickness human skin equivalent *in vitro* model derived from TERT-immortalized keratinocytes and fibroblasts. *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21* (17-18), 2448-2459.
92. Wong, J. A.; Renton, K. W.; Crocker, J. F. S.; O'Regan, P. A.; Acott, P. D., Determination of pamidronate in human whole blood and urine by reversed-phase HPLC with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* **2004**, *18* (2), 98-101.
93. Yamaoka, K.; Tanigawara, Y.; Nakagawa, T.; Uno, T., A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobiodyn.* **1981**, *4* (11), 879-885.
94. Yamaoka, K.; Nakagawa, T.; Uno, T., Statistical moments in pharmacokinetics. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1978**, *6* (6), 547-558.

95. Xiang, A.; Kanematsu, M.; Mitamura, M.; Kikkawa, H.; Asano, S.; Kinoshita, M., Analysis of change patterns of microcomputed tomography 3-dimensional bone parameters as a high-throughput tool to evaluate antiosteoporotic effects of agents at an early stage of ovariectomy-induced osteoporosis in mice. *Invest. Radiol.* **2006**, *41* (9), 704-712.
96. Liu, S.; Jin, M. N.; Quan, Y. S.; Kamiyama, F.; Katsumi, H.; Sakane, T.; Yamamoto, A., The development and characteristics of novel microneedle arrays fabricated from hyaluronic acid, and their application in the transdermal delivery of insulin. *J. Control. Release* **2012**, *161* (3), 933-941.
97. Liu, S.; Wu, D.; Quan, Y. S.; Kamiyama, F.; Kusamori, K.; Katsumi, H.; Sakane, T.; Yamamoto, A., improvement of transdermal delivery of exendin-4 using novel tip-loaded microneedle arrays fabricated from hyaluronic acid. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (1), 272-279.
98. Wu, D.; Quan, Y. S.; Kamiyama, F.; Kusamori, K.; Katsumi, H.; Sakane, T.; Yamamoto, A., Improvement of transdermal delivery of sumatriptan succinate using a novel self-dissolving microneedle array fabricated from sodium hyaluronate in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2015**, *38* (3), 365-373.
99. Itoh, M.; Umegaki-Arao, N.; Guo, Z.; Liu, L.; Higgins, C. A.; Christiano, A. M., Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *PLoS One* **2013**, *8* (10), e77673.
100. Tsunenaga, M.; Kohno, Y.; Horii, I.; Yasumoto, S.; Huh, N. H.; Tachikawa, T.; Yoshiki, S.; Kuroki, T., Growth and differentiation properties of normal and transformed human keratinocytes in organotypic culture. *Jpn. J. Cancer Res.* **1994**, *85* (3), 238-244.
101. Cao, D.; Kitamura, T.; Todo, H.; Yoo, S. D.; Sugibayashi, K., Pretreatment effects of moxibustion on the skin permeation of FITC-dextran. *Int. J. Pharm.* **2008**, *354* (1-2), 117-25.
102. Fukushima, S.; Kishimoto, S.; Horai, S.; Miyawaki, K.; Kamiyabu, S.; Kamata, Y.; Yamaoka, Y.; Takeuchi, Y., Transdermal drug delivery by electroporation applied on the stratum corneum of rat using stamp-type electrode and frog-type electrode *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24* (9), 1027-1031.
103. Tokudome, Y.; Sugibayashi, K., The effects of calcium chloride and sodium chloride on the electroporation-mediated skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26* (10), 1508-1510.

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始懇篤なるご指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 薬剤学分野 山本 昌教授に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、直接の御指導、御助言を賜りました京都薬科大学 薬剤学分野 勝見英正准教授に謹んで感謝致します。

さらに、種々の貴重な御指導、御助言を賜りました神戸薬科大学 製剤学研究室 坂根稔康教授、京都薬科大学 薬剤学分野 森下将輝助教、米戸邦夫博士、神戸薬科大学 製剤学研究室 田中晶子助教に心から感謝の意を表します。また、種々の御指導と御協力を頂きました医薬基盤・健康栄養研究所 幹細胞制御プロジェクト 川端健二教授、山口朋子博士、コスメディ製薬株式会社 神山文男博士、権 英淑博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するに当たり、多大なる御協力、御助言を頂きました、鈴木智子学士、丹波綾香学士、木村思瑤学士、亀井咲知氏、溝口瑛弥氏、大村麻緒氏、西殿麻友子氏をはじめとする京都薬科大学薬剤学分野の諸氏に心より感謝致します。

研究に専念できる時間と自由を与えて下さり、終始温かく見守り支えて下さった、父 康志、母 幸子をはじめとする家族に心から感謝致します。