

氏名	ふじもと たかひろ 藤本 幸弘
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第4618号
学位授与の日付	平成29年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Transcutaneous drug delivery by liposomes using fractional laser technology (近赤外波長フラクショナル・レーザーアシストによるナノリポソームの経皮デリバリー促進効果についての研究)
論文審査委員	(主査) 教授 金澤 秀子 (薬学博士) (副査) 教授 中村 智徳 (博士(薬学)) 准教授 齋藤 義正 (博士(医学)) 医学部教授 貴志 和生 (博士(医学))

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

近年、薬物の本来持ち得る薬理効果の発現や副作用の抑制など、薬物投与の最適化という考え方が強く認識されるようになり、ドラッグデリバリーシステム(Drug delivery system, DDS)の開発が注目され、新しい薬剤投与経路として経皮治療システム(Transdermal therapeutic system, TTS)の研究が進められている。この利点は、1) 高齢者や乳児などの経口投与の困難な患者においても投与可能であること、2) 肝臓での初回通過効果を回避できること、3) 薬物濃度を長時間必要レベルに維持しやすいこと、4) 容易に薬物の投与を中断できること、5) 針を使用しないこと、6) 組織内圧の高い部位に投与可能であることなどがあげられる。しかし皮膚には強固なバリアとして最外層に角質層が存在しており、多くの薬剤の皮膚透過性は低い。経皮吸収の促進と制御方法には、化学的手法(基剤や吸収促進剤等の利用: リポソーム、高分子ミセル、ナノエマルジョン等)と物理的手法(電場や超音波等の利用: イオントフォーシス、エレクトロポレーション、超音波、テープストリッピング、マイクロニードル等)に大別され、それぞれの特徴を活かした吸収促進法が試みられてきた。それらを基に多角的なアプローチから開発が行われ、それぞれの特徴を活かした DDS について精力的に研究されている。なかでもレーザー (Light amplification by stimulated emission of radiation, LASER: 輻射の誘導放出による光増幅) の機械的作用を利用した DDS が評価されつつある。レーザー光は指向性や収束性に優れており、また、発生する電磁波の波長を一定に保つ性質をもつ。レーザーの基礎的理論は、1905 年 Albert Einstein が論文 Zur

Quantentheorie der Strahlung (放射の量子論について) にて、電磁放射の吸収、自然放出、誘導放出についての確率係数 (Einstein 係数) に基づき、マックス・プランクの輻射公式から新たな公式を導き出したことに端を発する。一方で工学的な技術の完成には 1960 年 Theodore Maiman の最初のレーザー発生装置の開発まで 50 年を待たねばならなかった。レーザーの医学分野への応用は、大きく二つの分野に分けて考えることができる。一方はレーザー光の特徴である単位周期性の波長をセンサープローブとして用いる、がんの診断や細胞分析への情報応用、すなわち、光の「時間的」コヒーレンス(Longitudinal Coherence)の応用である。他方はレーザー光の集光性を利用し、微小な局所に集中できるエネルギー源としてメスのように用いる応用、つまり、光の「空間的」コヒーレンス (Transverse Coherence) の応用である。現在レーザーは、医療現場において主に形成外科、眼科、歯科口腔外科、外科、泌尿器科の 5 分野で日常的に使用されており、特に皮膚形成外科領域での利用は群を抜いている。レーザーの皮膚形成外科的利用は、1970 年代に皮膚の蒸散への応用から始まった。CO<sub>2</sub> レーザーをはじめとした蒸散系レーザーを皮膚や臓器に焦点を合わせて照射すると、レーザー光は細胞や細胞外構成物質の水分に吸収され、熱エネルギーに変換される。単位体積あたりのレーザーエネルギー密度が材料の蒸散閾値を越えると、蒸散飛散物による反力が発生する。さらにレーザー光強度が高くなり約 1012 W/cm<sup>2</sup>を越えると、光学的絶縁破壊が起きる。発生した高温・高圧のプラズマは、初期に極超音速(hypersonic)で膨張し、その膨張波が減速するときに衝撃波が発生する。またレーザーと媒質との 2 次的相互作用としてキャビテーションが発生し、その圧壊による音響波の発生も存在する。高出力のレーザーを生体に吸収させ生体自体に高温部を形成し切除を行なうため、吸収・切除に適切なレーザー光源を選択すると装置は大型となり、Nd:YAG (neodymium-doped yttrium aluminum garnet: 1064nm)、Er:YAG (erbium: 2940nm) などの波長をもつ巨大なレーザーが用いられてきた。近年の半導体レーザーなどの工学的進化により機器も小型化し、ドット状に照射したレーザー光を先端の微小領域で吸収させ、熱エネルギーに変換することで皮膚真皮まで入れ替えるフラクショナルレーザー照射技術が発達した。フラクショナルレーザーを「物理的」経皮吸収デバイスと考えれば、画期的な経皮 DDS の増強ツールとなりうる。これに加え「化学的」経皮吸収キャリアとして膜融合性リポソームを併用することでフラクショナルレーザーの経皮 DDS 増強効果を評価すべく、本研究を行った。

#### 【実験方法】

疎水性の増大による皮膚透過性の向上、細胞取り込みの向上を目的とし、ペプチド内封

リポソームを作製した。リポソームの内封物として、CF(カルボキシフルオレセイン)、OVA-FITC を用いた。CF の分子量は 376.32 であり低分子のモデルとして、OVA-FITC は分子量が約 45,000 で、ワクチンのモデルタンパクとして使用した。DDS には epidermal junction が大きくかかわっているために、まずユカタンピッグの皮膚を用い、角質の有無による CF 内封リポソームの皮膚透過率の比較検討を行った。その後 OVA-FITC 内封リポソームを利用して、レーザー波長を 10,600 nm に固定したのち、パワー (W)、照射時間 ( $\mu$  秒)、照射密度 (%) をそれぞれ変化させた場合の皮膚透過率及び透過速度の比較を、フランチセルを用いて行った。施術時の皮下の活性酸素の発生状況をヘアレスマウスの皮膚スライスサンプルにて ESR(electric spin echo)法を用いて調べ、生成されたフリーラジカルの量を測定した。3次元人工培養皮膚 (LabCyte EPI-MODEL : J-TEC) を用い、フラクショナルレーザーとリポソーム併用時の 48 時間毒性試験を行った。

#### 【結果】

レーザー波長を 10,600 nm、パルス幅を 500  $\mu$  秒に固定した場合は、0 W、10 W、20 W とそれぞれパワー依存性に透過率が上昇した。20 W 1,500  $\mu$  秒以上の長さで照射した場合は角質を除去した皮膚と、未処理の皮膚の透過率がほぼ同一になった。照射パワーが大きいほど穴の深さが深くなり、透過率、透過速度ともに上昇した。同様に照射時間が長いほど直径の大きな穴が生じるため、みかけの透過速度と透過係数も増大した。照射密度が高いほど穴の個数が増加するため、透過率が増大した。ESR 法では皮下で発生した酸素ラジカル、ヒドロキシラジカル、アスコルビン酸ラジカルの発生比率が有意に変化することがわかり、近赤外線のフラクショナルレーザー波長で、皮下に反応を生じることがわかった。三次元培養皮膚による試験では、CO<sub>2</sub>フラクショナルレーザーとリポソーム併用による毒性は認められないと考えられた。

#### 【考察】

皮膚形成外科においてレーザー技術を大きく変えたのは、1983年に Anderson および Parrish らが発表した、選択的光熱融解論 (Selective Photothermolysis) である。選択的光熱融解論は、レーザー光の波長 (nm)、照射持続時間 (Pulse duration :  $\mu$  秒)、そして単位面積当たりのパワー (W) (またはエネルギー量 (Fluence : J/cm<sup>2</sup>) の3つのパラメータを調節して照射することにより特定の標的 (メラニン色素、ヘモグロビン色素、水分子)、細胞内構築物を選択して融解するという理論である。Anderson らは、紫外線～赤外線領域の波長の光を皮膚に照射した際に、光をよく吸収する物質 (Chromophore) と波長における吸光度を調べ詳細な吸収特性曲線を作成した。この技術は、皮下の色素斑や刺青、レーザー脱毛などの治療技術に応用されており、工学的

に多くの波長が作られてきたが、本研究では水の高吸収帯であり生体内の水に吸収のような皮膚付属器を経由するルートに大別される。付属器の有効表面積は皮膚全体の0.1%程度であるので、高分子など特殊な薬物を除いて、角質層を通るルートの方が重要であると考えられている。角質層を経由するルートはさらに角質細胞の実質を経由するルートと細胞間隙の脂質を経由するルートに分けられるが、これら2つのルートの寄与を組織学的に区別するのは困難である。レーザー照射方法で大きな革命を遂げたのは、2004年に登場したフラクショナルレーザーである。この機器はレーザー光線を分離し、皮膚表面に1 cm<sup>2</sup>あたり約2000個の、直径数10 μm単位のレーザー光をドット状に照射してすることで、表皮から真皮にかけて極小の凝固柱を作り、古い角質を除去(punch out)すると同時に、孔のすぐ周囲の正常な表皮基底細胞により創傷治癒効率を上げる効果を持つ。フラクショナルレーザー技術により、レーザー治療において新たな第四のパラメータとして照射密度(spots/cm<sup>2</sup>)が登場した。

創傷が非常に小さいため角質バリア機能は早期に復活し、炎症が少なく治癒が早い。この手法をDDSに併用すると、従来の物理的手法と比較し、1) 時間的・空間的制御性(照射密度依存性)に優れ、2) 創面を湿潤もしくは乾燥にコントロール(波長依存性)ができ、3) 穴の深さ(パワー依存性)および4) 大きさ(照射時間依存性)をコントロールできる点で、経皮ドラッグデリバリーシステムの飛躍的な効率改善につながる事が期待される。先行研究では、フラクショナルレーザーにより皮下への局所麻酔薬、NSAIDs、オピオイド、癌化学療法薬、コルチコステロイド、ワクチン、ビタミンC、ボツリヌストキシンを導入した報告があるが、本研究のようにフラクショナルレーザー機器を用いて自由な深さ及び大きさの穴を皮膚に開け、リポソームなどの化学的キャリアを併用すれば、多くのペプチドやメラノサイトなどの細胞を皮下にデリバリーすることが可能となる。本研究では、CO<sub>2</sub>レーザーの波長で20 W 1500 μ秒以上照射するとレーザーによる皮膚の蒸散が真皮まで到達し、角質を取り除いた皮膚と全く同じ経皮透過率を示した。さらに実際の皮膚の凍結切片を用いて、皮下への薬剤透過率の上昇を確認した。ESR法を用いて、実際にこの近赤外線波長が生体に影響があることを突き止めたが、これは筆者の先行研究にて抗酸化剤フラベンを使用して除去できることを報告している。3次元培養皮膚の照射実験では毒性は認められず、本手法は人体に影響なく施術が可能であると考えられる。

#### 【結語】

本研究は、近赤外線フラクショナルレーザーがリポソーム併用による経皮ドラッグデリバリーの効率を上げることを確認した。物理的デバイスと化学的キャリアによる薬学ドラッグデリバリーの融合した研究分野においては、フラクショナルCO<sub>2</sub>レーザーとリポソームを用いた報告はなく、透過率上昇率も他の機器と比較して、効率が極めて高い。

今後レーザーは美容目的だけではなく、インシュリンやワクチン投与の内科的疾患や、ケロイドなどの内圧の高い組織に対しての注入薬の改善などに利用が期待できる。フラクショナル・レーザーアシストによる経皮ドラッグデリバリーの改善は、生体情報の取得への応用、そして生体切除および改質への応用に次ぐ、レーザーの第三の医学的応用になりうると考える。

## 論文審査結果の要旨

博士論文発表会は、平成 29 年 2 月 24 日（金）に、慶應義塾大学薬学部 1 号館マルチメディア講堂において、研究科委員会のメンバーなどの出席の下、学内公開の形で実施された。25 分間の口頭発表では、研究の背景並びに問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の 15 分間の試問では、質問に対して概ね的確な応答がなされた。博士論文発表会に先立ち、平成 29 年 1 月～2 月に医学部形成外科学教室の貴志和生教授を含む副査 3 名による事前の個人面接が行われており、論文内容に関する疑問点の指摘並びに改善に関する指導が行われた。

論文申請者は、レーザー治療を専門とする医師として美容外科クリニックに勤務しながら、当大学院薬学研究科の社会人博士課程学生として研究を実施してきた。本研究は、ドラッグデリバリーシステム（DDS）用ナノキャリアの物理的医療デバイスを用いた効果的な薬物送達法の確立を目的とし、近赤外波長フラクショナル・レーザーアシストによる機能性ナノリポソームの経皮デリバリー促進効果について検討したものである。本研究は、ドラッグキャリアの中でも、ナノリポソームに着目した。現在がん性疼痛の鎮痛剤や認知症の治療薬など様々な医薬品について新しい薬剤投与経路として経皮治療システム（Transdermal therapeutic system, TTS）の研究が進められている。一方で皮膚には強固なバリアとして最外層に角質層が存在しており、多くの薬剤の皮膚透過性は低く、リポソームも、これまで経皮からの吸収は汗腺などの附属器官を介するルート以外は困難であるとされてきた。本研究では、現在美容形成外科領域で使用されている近赤外線フラクショナルレーザーが、リポソーム併用による経皮ドラッグデリバリーの効率を上げることを確認した。物理的医療デバイスとキャリアによる DDS の融合した研究分野においては、フラクショナル CO<sub>2</sub> レーザーとリポソームを用いた報告はなく、本研究により皮膚透過率の向上が確認されたことから、今後このような物理的医療デバイスと DDS キャリアの組み合わせにより、インシュリンやワクチン投与の内科的疾患や、ケロイドなどの内圧の高い組織に対しての注入薬の改善などへの応用が期待できる。

筆頭著者及び責任著者としてレーザー医療分野では専門的な国際学術誌を含め英文原著論文 2 報が掲載されていることから、博士（薬科学）の学位に値する業績であると判定した。申請者の博士論文発表会での発表、試問に対する応答も妥当で、周辺の知識

も十分であり、これらに関しても博士（薬科学）の学位に十分値するものである。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

- 1) Fujimoto T, Baba K, Oki Y, Jian W, Ito S, Ito M, Hiruta Y, Kanazawa H: Transcutaneous drug delivery by liposomes using fractional laser technology. *Lasers Surg Med.* 2016 Dec 19. doi: 10.1002/lsm.22616. [Epub ahead of print]
- 2) Fujimoto T, Ito S, Ito M, Kanazawa H, Fractional laser-assisted percutaneous drug delivery via temperature-responsive liposomes, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2017Feb22:1-11. doi: 10.1080/09205063.2017.1296346. [Epub ahead of print]

### 【参考論文】

- 1) Fujimoto T, Ito S, Tujino S, Kanazawa H: Comparison Study Of Rapid Repetition Rate And Continuous Near Infrared (Nir) Light Devices: Detection Of The Different Reactive Oxygen Species Induced Oxidative Stress In Skin During Irradiation, Respectively: *Lasers Surg Med.*: **47**(S26), 9-10 (2015)
- 2) Fujimoto T, Imai Y, Tei Y, Ito S, Kanazawa H, Yamaguchi S :High temperature heat source generation with 4-6W power level quasi-cw (continuous wave) semiconductor lasers for medical use: *J. Biomed. Opt.* **19** (10) , 101502 (2014)
- 3) Fujimoto T, Imai Y, Tei Y, Yamaguchi S Development of A Semiconductor Laser Based High Temperature Fine Thermal Energy Source in an Optical Fiber Tip for Clinical Applications. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **52**, 052501 (2014)
- 4) Fujimoto T Metabolic syndrome treatment with the ACBODY low-frequency rotating stimulation device, *Bio Clinica.* **29** (4), 76-83 (2014)
- 5) Fujimoto T, Nagata T, Yoshioka M, Ito S, Masaki H, Kanazawa H Effects of Novel Vitamin C Derivative GO-VC, After Treatment of Fractional CO<sub>2</sub> Laser in Asian Patients, *Lasers Surg Med.* **46** (S25), 9 (2014)
- 6) Fujimoto T, Imai Y, Tei Y, Fujioka T, Yamaguchi S High temperature heat source generation with a very low power level quasi-cw (continuous wave) semiconductor laser for medical use *SPIE2013-Proceedings*: 856569
- 7) Fujimoto T, Ito S, Ito M, Kanazawa H, Yamaguchi S :Induction of different reactive oxygen species in the skin during various laser therapies and their inhibition by fullerene: *Lasers Surg Med.* **44**(8), 685-94 (2012).