

ガス透過性金型による高溶解型無痛ナノマイクロニードルの開発

富山県立大学大学院工学研究科

竹井 敏、山岸 里緒、三浦 早耶香

This study aimed to expand the surface nano and micro-patterning techniques of highly dissolvable painless microneedle materials such as hyaluronic acid, collagen, and other substances in imprint lithography techniques using the developed inorganic gas-permeable porous molds for cosmetic applications. The microneedle materials have superior properties of skin appearance and transdermal drug delivery systems. However, because hyaluronic acid and collagen are either solid or semisolid at room temperature, and because the use of water and volatile solvents in microneedle can be a cause of pattern failure in surface nano and micro-patterning techniques, these materials have been of limited utility as microneedle for high resolution cosmetic applications. Excellent resolution nano-microneedle patterning can be achieved by diluting water or volatile solvents in imprint lithography techniques using the gas-permeable molds. Based on this study, acceptable chemistries for the imprinted materials have been expanded, which will be beneficial for future applications with various cosmetic and pharmaceutical materials containing dilution water using the gas-permeable porous molds.

1. 緒言

ヒアルロン酸を成分とするマイクロニードルは、痛みや恐怖を伴う注射に代わる新規薬剤投与手段として化粧品や医薬品のライフサイエンス分野で注目されている^{1,2)}。ヒアルロン酸はグリコサミノグルカンの一種でD-グルクロン酸とN-アセチル-D-グルコサミンの繰り返し構成単位二糖からなる直鎖状の高分子多糖である。生体内において、皮膚、関節、眼球の硝子体に多く含まれ、保水性が非常に高く、1g当たり2～6Lの水を保持して高粘度のゲルを形成できることから、皮膚の水分保持や関節の保護の重要な機能を果たしている。ヒアルロン酸は、紫外線や加齢によって減少することが報告されており、その減少が皮膚のシワやたるみに大きく影響している。シワやたるみなどの肌老化を改善するためには、ヒアルロン酸を皮膚内に浸透させることが求められる。

しかし、皮膚の最外層に位置する角質層は外部からの刺激や異物の侵入を防ぐバリア機能を有している。角質層はケラチンや繊維状タンパク質、セラミドや中性脂質から成り立っており、水溶性物質や分子量が500以上の物質の透過を制限している。そのため、適度に脂溶性であり、分子量が500以下である物質でなければ、角質層を通過することができない。分子量500を超える水溶性化合物の皮膚透過性は極めて低く、ヒアルロン酸のような水溶性高分子の

皮膚への浸透は困難であるとされている。

化粧品や医薬品において、高分子量の有効成分を生きた細胞層に届ける方法としては、有効成分を封入したエマルションやリボソームの微粒子キャリアを用いる方法³⁾や、高電圧の負荷により薬剤を細胞内へ導入するエレクトロポレーション法⁴⁾、電気エネルギーを利用して薬物の皮膚透過性を促進するイオントフォoresis法⁵⁾、超音波を利用したソノフォoresis法⁶⁾の物理的経皮吸収促進法が報告されている。

しかしながら、これらの方法では、投与時に特別な装置を必要とするという欠点があることや、電圧・超音波による処理後の皮膚バリアの障害、角質層下の生きた細胞・組織への影響が懸念されている。そこで、マイクロニードルを用いた経皮吸収促進法が期待されている。マイクロニードルとは、マイクロメートルサイズの超微細針を皮膚に適用することにより角質層に微小孔を開け、有効成分を皮膚内で放出させる投与方法である。マイクロニードルの素材としてヒアルロン酸を使用したもの、または金属製の微細針にヒアルロン酸をコーティングしたものを皮膚に適用することにより、針の先端が角質層に穿刺され、ヒアルロン酸を直接角質層に浸透させることができる。

マイクロニードルを用いた経皮投与の特徴として、安全かつ簡便な投与形態により自己投与が可能であること、ニードルの微小化により痛みを伴わず、出血がないこと、薬物分子量・油水分配係数の物理化学的性質に依存せず、水溶性の高分子や粒子状の物質を皮膚内に送達できること、固形製剤により保管・輸送に便利であること、生分解性・自己溶解性の成分を使用したマイクロニードルにおいては注射針の産業廃棄物のコスト削減が可能であることが挙げられる。国内外で現在市販されているマイクロニードルの針先の形状は、三角錐、富士山型、四角錐、円錐と多種多



Development of Highly Dissolvable Painless Nano-microneedles Using Gas Permeable Porous Molds

*Satoshi Takei, Rio Yamagishi, Sayaka Miura

Graduate School of Engineering, Toyama Prefectural University

様である。皮膚への穿刺の際に先端半径が小さいほどよく刺さり、皮膚刺激性や痛みは少ないとされている。

しかし、既存品は針が神経に到達するサイズであり適用時の痛みや違和感を伴う課題になる場合がある。既存のマイクロニードルの針の大きさは、底面直径が約 $150\mu\text{m}$ ～ $900\mu\text{m}$ 、高さが約 $200\mu\text{m}$ ～ $350\mu\text{m}$ である。これは、注射針と比較してはるかに微細であるが、神経の通る真皮層に到達するサイズであるため、適用時の痛みや違和感を生じるという欠点がある (図 1)。

マイクロニードルの製造法としては、主に Droplet-born Air Blowing (DAB) 方式と Molding 方式の 2 つの微細加工技術に大別される。Droplet-born Air Blowing (DAB) 方式では、インクジェット技術を用いてヒアルロン酸などの生分解性ポリマー溶液の液滴を基板上に等間隔に付着させ、その上に別の基板を重ねゆっくり引き離す⁷⁾。粘度の高いポリマー液滴は引き延ばされ、送風機により空気を吹きかけ乾燥させることでマイクロニードルを作製する。DAB 方式では、液滴の引き上げにより作製するため、ニードルの長さや形状に制限があり、解像度が低く微細加工が困難であることや、ニードルの高さにばらつきがあること、機械的な強度が弱いことの欠点がある。

一方、Molding 方式は、ヒアルロン酸の生分解性ポリマー溶液を、微細加工が施された金型に流し込む、または金型を押し当て、加熱し硬化することによりマイクロニードルを作製する⁸⁾。Molding 方式は微細加工ができるためマイクロニードルの更なる微細化が可能となる。しかし、石英や金属製の金型を使用する従来の Molding 方式の過程では、加熱時の水や溶剤によるガスの発生、成形不良、金型の破損の課題があった。特に、ヒアルロン酸やコラーゲンの高分子量の高分子美容成分は高粘度であることや溶剤や水を用いて調製をすることから、自己溶解型マイクロニードルの微細化が困難であるという課題があった。

そこで、我々は、成形時に金型と美容成分溶液の間に巻き込まれるガスを除去することが可能な「ガス透過性多孔質金型」を用い^{9, 10)}、Molding 法の一つであるインプリントリソグラフィを用いた自己溶解型マイクロニードルパッチの製造技術を見出した。

本研究では、無機系 TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質金型によりヒアルロン酸素材の自己溶解型マイクロニードルを既存の約 20 分の 1 以下のサイズに超微細化する技術を報告する。具体的には、微細加工技術の一つであるインプリントリソグラフィを用いて超微細マイクロニードルの作製を試みた。インプリント加工において、従来の非ガス透過性金型では、金型と被転写材間のガスの巻き込みにより成形不良を生じるが、新たに試作した TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系ポリマーと 3 次元光造形法で積層したガス透過性金属を組み合わせた TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性

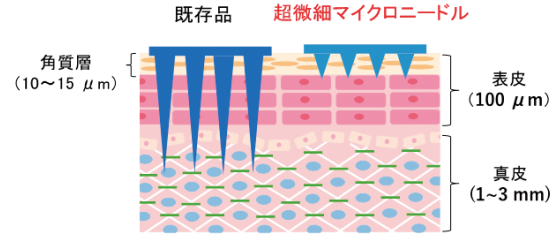
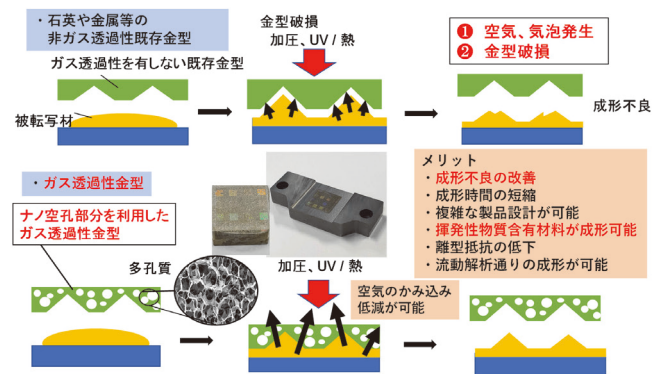


図 1 皮膚の断面図と既存の自己溶解型マイクロニードルのサイズ

ガス透過性多孔質金型の有用性



ガス透過性多孔質金型によるマイクロニードルの微細化・成形不良改善

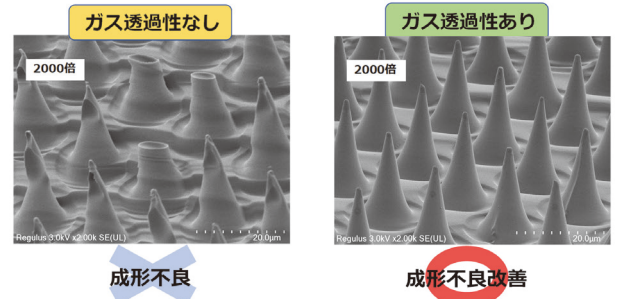


図 2 目的：ガス透過性多孔質金型によるマイクロニードルの微細化・成形不良改善

多孔質無機系金型を用いると、発生したガスは金型の多孔質構造を通過し金型外へと除去されるため、成形不良を改善できた (図 2)。

2. 方法

2.1. TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型

酸化チタンカップリング剤と酸化ケイ素カップリング剤を混合後ゾル-ゲル重合を行い、 TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系ポリマーを合成した^{11, 12)}。ガス透過性多孔質金型の多孔質度と機械的強度とマイクロニードル成分のヒアルロン酸との離脱性はそれぞれトレードオフの関係となるため、超微細マイクロニードルの製造用に新たな分子

設計を施した TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型を開発した。 TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型の多孔質度を増加させるために、螺旋構造を有する新たな分子系を、微細マイクロニードルのナノ突起構造を形成する TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜に使用した。 TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜の設計要素（分子構造・分子量・分散値・架橋反応基濃度・水酸基濃度・反応抑制基の濃度・機械的強度・ガス透過率・陽電子寿命法による自由体積分布・ガス透過性下地基板との密着性・表面エネルギー）について最適化条件を確立した。合成した TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型と架橋剤と触媒からなる TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型形成組成物を調製した（図3）。 TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質金型を用い、従来の約 20 分の 1 のサイズのマイクロニードルの設計及び製造により、皮膚に適応する際の痛みや違和感の低減、表面積増大による美容成分の

浸透性向上を目指した。

2. 2. ガス透過性多孔質金型による高溶解型無痛ナノマイクロニードルの製造法

TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質金型、並びにヒアルロン酸系高溶解型無痛ナノマイクロニードルへの製造法を示す（図4）。本研究で行うナノインプリントリソグラフィプロセスは、①凸型石英マスター金型を、3次元光造形法で積層したガス透過性金属下層基板の上に TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜材料に転写し、 TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜を作製する工程と、② TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型を高純度加水分解ヒアルロン酸の溶液に転写する工程の2段階で構成される。①の工程では、凸型石英マスター金型を TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型上層膜材料に乗せて加圧し、加熱またはUV照射により硬化することで TiO_2 - SiO_2 系ガ

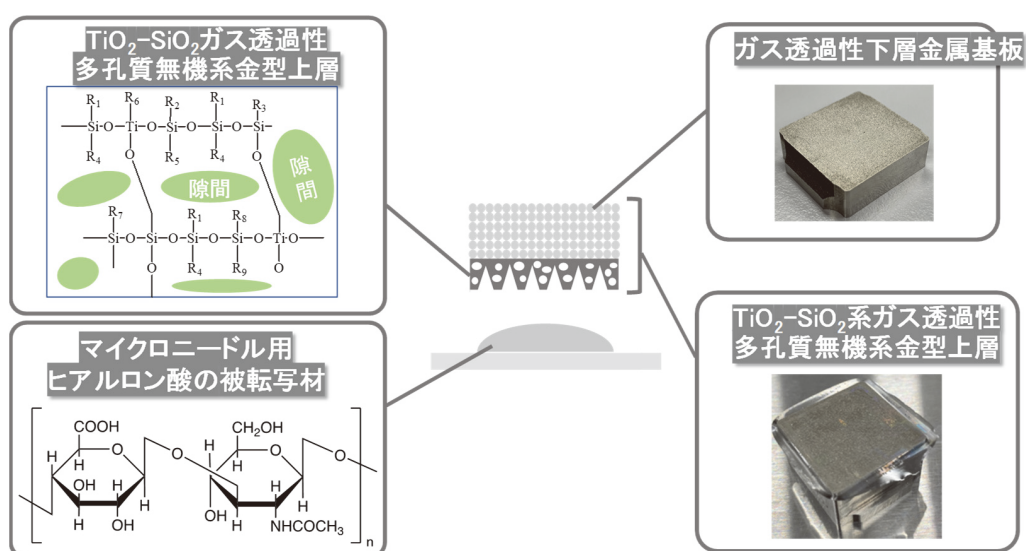


図3 TiO_2 - SiO_2 系ガス透過性多孔質無機系金型と被転写材ヒアルロン酸

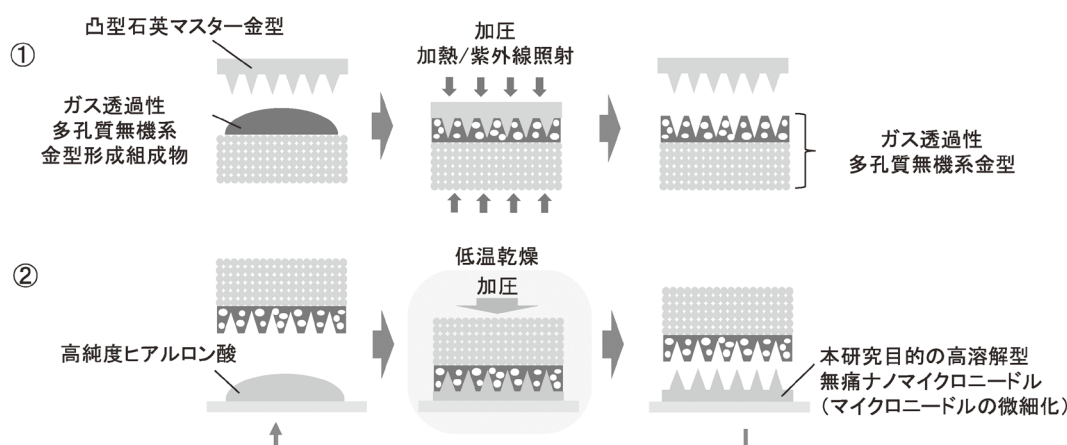


図4 ガス透過性多孔質金型とヒアルロン酸系ナノマイクロニードルの製造法

ス透過性多孔質無機系金型上層膜を得た。②の工程では、ヒアルロン酸溶液の被転写材を塗布した基板の上に、①で作製した $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ 系ガス透過性多孔質無機系金型を乗せて加圧し、低温乾燥によりニードルパターンを得た。同じ一つのガス透過性金型により②の工程を繰り返すことによって、超微細マイクロニードルパッチの大量生産が可能となる製造法を適用した。

3. 結果

3.1. 加水分解ヒアルロン酸マイクロニードル形状のインプリント回数依存性

$\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ 系ガス透過性多孔質無機系金型を用いて製造した、底面直径 $13\mu\text{m}$ 、高さ $24\mu\text{m}$ （従来の約20分の1のサイズ）の高純度加水分解ヒアルロン酸の超微細マイクロニードルに対する評価を行った。 $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ 系ガス透過性多孔質無機系金型を用いた微細加工結果及び回数依存性測定結果を示す（図5）。従来の凹型石英マスター金型を使用して成形した場合の超微細マイクロニードルは、水や揮発性溶剤の影響により針の先端が尖っておらず、成形不良を

生じている。一方で、 $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ 系ガス透過性多孔質無機系金型を使用した場合、先端まで加水分解ヒアルロン酸が充填されており、成形不良が改善されていることが分かる。また、 $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ 系ガス透過性多孔質無機系金型を使用した加水分解ヒアルロン酸への転写を14回繰り返したところ、1回目と14回目の転写結果に大きな差は見られなかった。同じ一つの金型で繰り返し転写が可能であることから、 $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ 系ガス透過性多孔質無機系金型は有機系材料である加水分解ヒアルロン酸との離型性に優れ、金型の汚れ・剥離を防止できることが実証された。本実験では、手動のナノインプリント加工であったが、自動のナノインプリント装置を使用した場合、さらなる転写回数の向上が実現できる可能性があり、生産技術の確立を今後進める。

3.2. 加水分解ヒアルロン酸へのインプリント加工後の熱分解・化学変性

加水分解ヒアルロン酸系超微細マイクロニードル成形時の熱分解・化学変性を確認するため、 80°C 、90分間の加熱前後における加水分解ヒアルロン酸のフーリエ変換赤外

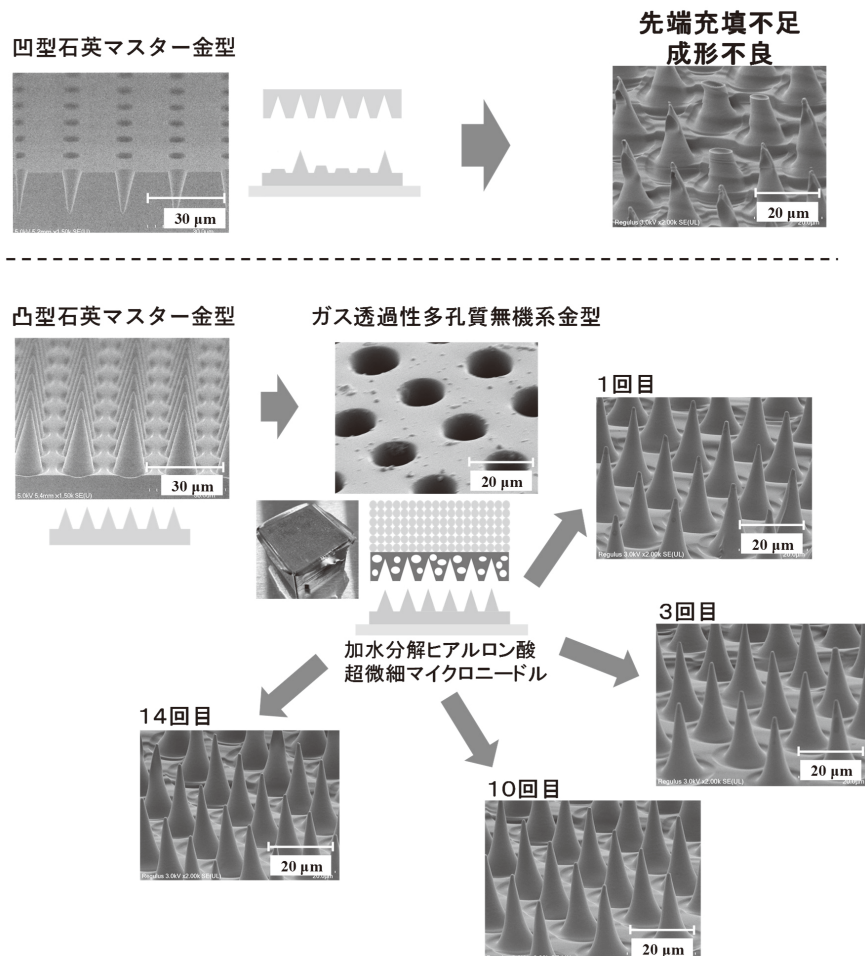


図5 $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ 系ガス透過性多孔質無機系金型を用いた加水分解ヒアルロン酸マイクロニードル形状のインプリント回数依存性

分光器 (FT-IR) スペクトルを測定した結果を図6に示す。加熱前のスペクトルでは 3400cm^{-1} (O-H結合)、 2880cm^{-1} (C-H結合)、 1740cm^{-1} (エステル)、 1649cm^{-1} (アミドI型)、 1554cm^{-1} (アミドII型)、 1045cm^{-1} (C-O結合) にピークが検出された。加熱後のスペクトルにおいても同様に 3375cm^{-1} (O-H結合)、 2885cm^{-1} (C-H結合)、 1735cm^{-1} (エステル)、 1640cm^{-1} (アミドI型)、 1551cm^{-1} (アミドII型)、 1033cm^{-1} (C-O結合) にピークが検出され、加熱による加水分解ヒアルロン酸の成分変化、化学変性はほとんど見られないことが分かった。

3. 3. 加水分解ヒアルロン酸の超微細マイクロニードルの溶解挙動

加水分解ヒアルロン酸の超微細マイクロニードル溶解挙動を環境試験装置により測定した結果を図7に示す。(a)

及び (b) は、底面の一辺の長さが $364\mu\text{m}$ 、高さが $346\mu\text{m}$ の市販マイクロニードル、(d) は、直径が約 $13\mu\text{m}$ 、高さが $24\mu\text{m}$ の超微細マイクロニードルの走査電子顕微鏡の画像である。市販のマイクロニードルの先端は尖っておらず、加水分解ヒアルロン酸超微細マイクロニードルの先端と比較して平坦である。

また、 31°C 、湿度 $90\sim95\%$ の環境下で静置した際の各マイクロニードルの溶解挙動について、(e) 加水分解ヒアルロン酸素材の超微細マイクロニードル (無添加) は、(c) ヒアルロン酸ナトリウムのほかに、高湿度下で溶解しやすい吸湿性を持つグリセリンやブチレングリコールなどの各種添加物を配合した市販のマイクロニードルと同様に、35分間で体積の 60% 以上が溶解していた。したがって、加水分解ヒアルロン酸素材の超微細マイクロニードルは、溶解を促進する添加剤不使用であるにも関わらず、よ

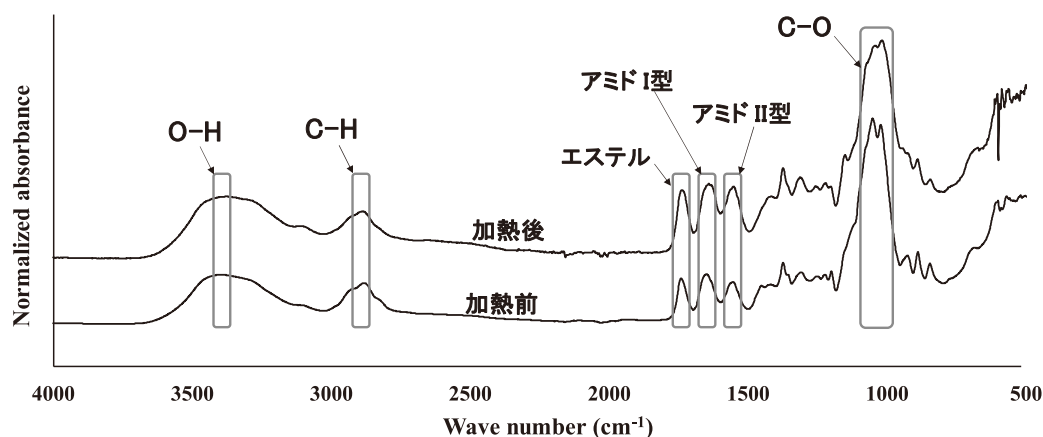


図6 インプリントによる成形加熱前後での高純度加水分解ヒアルロン酸の化学変性分析

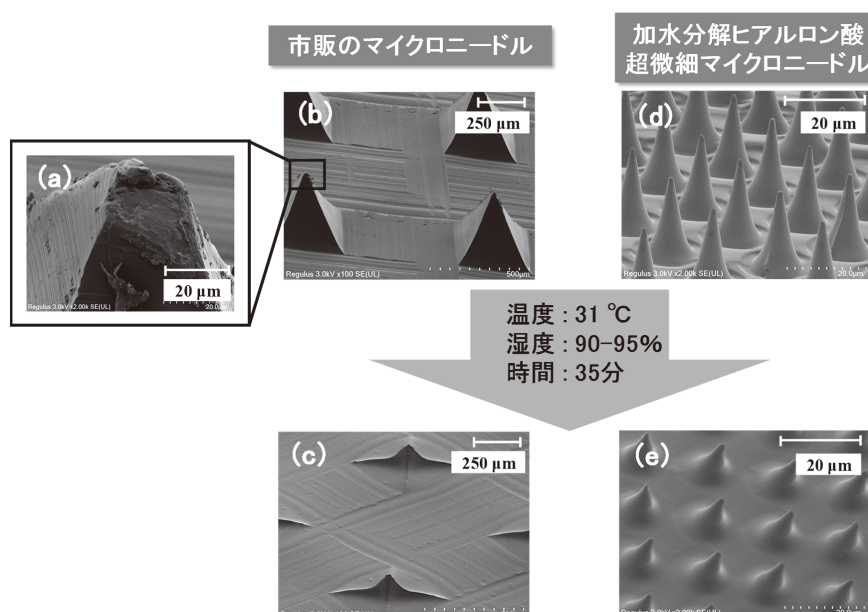


図7 恒温高湿度環境下でのマイクロニードルの溶解挙動の比較

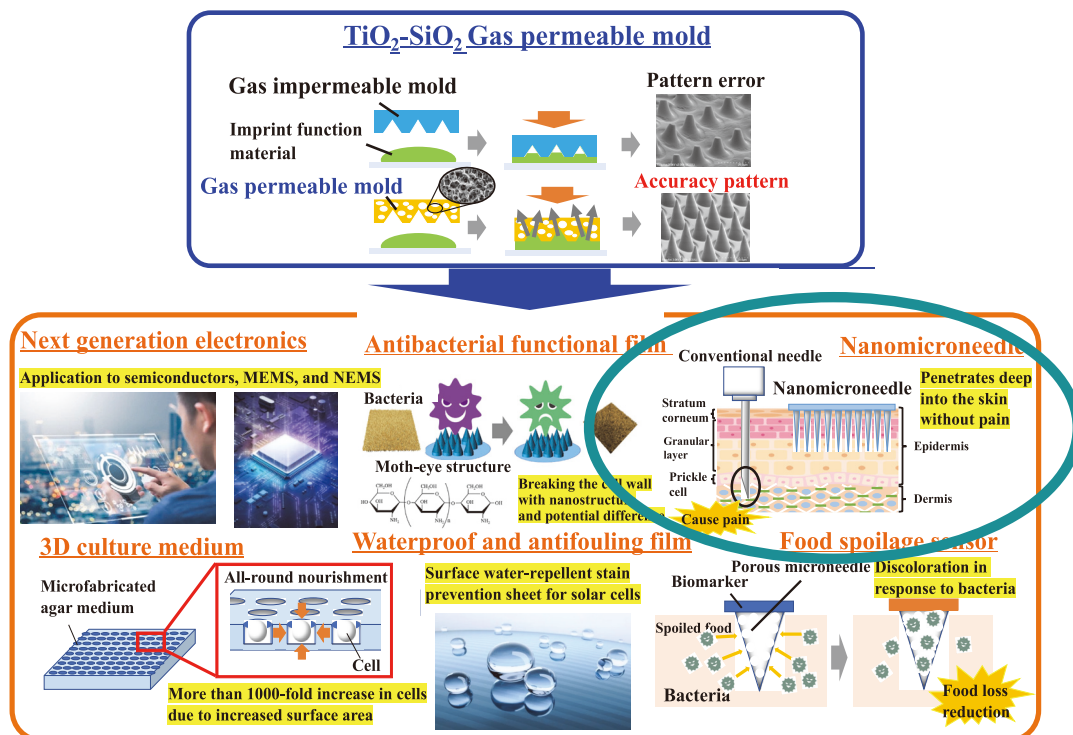


図 8 TiO₂-SiO₂ 系ガス透過性多孔質無機系金型で切り開くナノ加工による素材表面の機能発現

り短時間で皮膚に作用する点で有利であることが分かった。

試作した加水分解ヒアルロン酸系超微細マイクロニードルは、真皮に届かず痛みを伴わず、②1時間以内で溶解し、③皮膚にまんべんなく浸透させる高溶解型無痛ナノマイクロニードルとなる初期的な学術成果が得られた。

4. 考察・まとめ

次世代の化粧品・美容製品の差別化・高付加価値化を鍵となる「浸透性」を画期的に改善できる1 cm²当たり100万本以上の高溶解型無痛ナノマイクロニードルを目指して、新たに分子設計を施したTiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型による、化粧品用の超微細マイクロニードルパッチの初期的な生産技術を提案できた¹³⁾。具体的には、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型の活用により、従来の約20分の1のサイズの超微細マイクロニードルの成形が実現できることを確認し、評価にて優れた溶解性及び熱安定性を評価した。マウスやブタ等を用いた皮膚への浸透性・有効性の評価など、より高精度な生体適合性評価を今後行う。本研究成果は、化粧品分野にとどまらず、高純度加水分解ヒアルロン酸を基材・マトリクスとして、インスリン等の高分子量バイオ医薬品・薬剤を塗布またはヒアルロン酸溶液に含有させ微細加工をすることにより、自己投与可能かつ痛みを伴わない経皮投与製剤への展開が期待できると思われる。

また、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型は、酸

化チタンと酸化ケイ素のハイブリッド化によるフレキシブル性の制御に優れる利点があり、金型表層の多孔質化による優れた水・ガスを除去できるガス透過性を有することから、複雑な微細構造の離型を可能とし、成形できる構造の多様化が期待できると考えられる¹⁴⁾。具体的には、TiO₂-SiO₂系ガス透過性多孔質無機系金型を用いたエレクトロニクスからライフサイエンス用途への微細加工技術の具体的な期待される用途を図8に示す。超微細マイクロニードルの製造の他にも、モスアイ構造を付与した抗菌性ナノ突起フィルムや細胞の成長を促進する3次元培養培地、食品腐敗を検知し食品ロスの低減に貢献できる食品腐敗センサーへの応用が期待され、幅広い分野への用途展開を加速していくことにより新たな社会基盤の構築が進むことが予想される。

(引用文献)

- 1) I. Saha, V. K. Rai, Carbohydrate Polymers 267, 118168 (2021).
- 2) S. Miura, R. Yamagishi, R. Miyazaki, K. Yasuda, Y. Kawano, Y. Yokoyama, N. Sugino, T. Kameda, S. Takei, Gels, 8, 785 (2022).
- 3) H. Zhou, D. Luo, D. Chen, X. Tan, X. Bai, Z. Liu, X. Yang, W. Liu, Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 14, 867 (2021).
- 4) X. Chen, L. Zhu, R.

- Y. Jin, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 151, 105410 (2020).
- 5) A. Liatsopoulou, A. Varvaresou, F. Mellou, E. Protopapa, International Journal of Cosmetic Science, 45(2), 117 (2023).
- 6) D. Park, H. Park, J. Seo, S. Lee, Ultrasonics, 54 (1), 56 (2014).
- 7) J. D. Kim, M. Kim, H. Yang, K. Lee, H. Jung, Journal of controlled release, 170 (3), 430 (2013).
- 8) H. R. Nejad, A. Sadeqi, G. Kiaee, S. Sonkusale, Microsystems & nanoengineering, 4 (1), 1 (2018).
- 9) S. Takei, Kaori Yasuda, Appl. Phys. Express, 13106506 (2020).
- 10) S. Takei, Applied Physics Express, 12 (4), 046501 (2019).
- 11) S. Miura, R. Yamagishi, N. Sugino, Y. Yokoyama, R. Miyazaki, K. Yasuda, M. Ando, Y. Hachikubo, T. Murashita, T. Kameda, Y. Kawano, S. Takei, Journal of Photopolymer Science and Technology, 36, 3 183 (2023).
- 12) R. Yamagishi, S. Miura, K. Yasuda, N. Sugino, T. Kameda, Y. Kawano, Y. Yokoyama, S. Takei, Appl. Phys. Express, 15, 046502 (2022).
- 13) R. Yamagishi, S. Miura, S. Takei, COSMETIC STAGE Vol.18, No.1 (2023).
- 14) R. Yamagishi, S. Miura, M. Ando, Y. Hachikubo, T. Murashita, N. Sugino, T. Kameda, Y. Yokoyama, Y. Kawano, K. Yasuda, S. Takei, Journal of Photopolymer Science and Technology, 36 (2), 83 (2023).