

マイクロニードルを用いた皮膚疾患治療

大阪大学大学院薬学研究科先進医薬学分野^{*1)}・大阪大学大学院薬学研究科附属実践薬学教育研究センター臨床薬理学プロジェクト^{*2)}・大阪大学大学院薬学研究科附属創薬センターワクチン・免疫制御学プロジェクト^{*3)}・大阪大学大学院薬学研究科ワクチン・免疫制御学(BIKEN)共同研究講座^{*4)}

廣部祥子^{*1,2)}・岡田直貴^{*3,4)}

Treatment of skin diseases applying the microneedle technology

Seborrheic keratosis is characterized as sharply demarcated brownish plaques with verrucous surfaces. This lesion is considered unattractive and disfiguring and may have negative psychological impacts. Thus, they are often removed for cosmetic reasons by surgical treatments, such as cryotherapy and laser surgery. However, these treatments require regular outpatient treatments for complete removal of the lesions, incurring high costs. Drug therapy for seborrheic keratosis is an attractive treatment option for self-treatment at home but is not well established, because skin permeability of candidate ingredients for seborrheic keratosis is relatively low by keratinization of stratum corneum. In this review, we introduce the development of a novel drug therapy using a self-dissolving microneedle patch which can directly deliver candidate ingredients to the epidermis by puncturing the stratum corneum.

脂漏性角化症は、一般的に“年寄りイボ”や“シミ”と呼ばれ、致命的な病気ではないが、見た目が悪く、患者の精神的な QOL 低下につながっている。治療は外科的療法が行われているが、頻繁な通院や高額な治療費を要するなど患者への負担が大きいことから、患者自身が自宅で行える簡便な薬物療法の開発が望まれている。しかしながら、脂漏性角化症では角質層が肥厚するため薬物が皮膚内へと十分に浸透することができず、満足の治療効果を得ることが難しい。本稿では、筆者らが開発を進めている微小な針により直接皮膚内へ薬物を送達するマイクロニードルを用いた脂漏性角化症に対する新規薬物療法の開発について紹介する。

Sachiko Hirobe^{*1,2)}, Naoki Okada^{*3,4)}

Keywords: Microneedle, Seborrheic keratosis, All-trans retinoic acid, Clinical study

1. はじめに

皮膚は容易に目に触れる人体最大の器官である。皮膚疾患は生死に直結するものが少ないとはいえ、慢性的な痒みや痛みに加えて、人から見られて恥ずかしいなどの精神的な苦痛を伴うケースが多く認められる。また、治療が長期にわたったり、症状が突然再燃したりすることも多いため、患者は治療の見

通しへの不安から大きなストレスを感じ、そのストレスによってさらなる症状の悪化を招く場合もある。このように、さまざまな疾患の中でも皮膚疾患は、精神的、社会的な QOL の低下が特に大きい疾患であるといえる。

皮膚疾患に対しては内服薬・注射薬はもちろんのこと、病変部局所へ塗布する軟膏剤やクリーム剤といった外用薬など、種々の投与経路を使用した薬物療法が開発されている。皮膚疾患治療における薬物療法では、病巣部に直接薬物送達できる経皮投与は多くの利点を有しているが、皮膚には物質透過の最大のバリアとなる角質層が存在するため、治療効果を得るために十分な薬物量を病巣部に送達することは困難であり、皮膚表面から受動的に拡散できる薬

^{*1)} Advanced Research of Medical and Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

^{*2)} Project of Clinical Pharmacology and Therapeutics,

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

^{*3)} Project for Vaccine and Immune Regulation,

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

^{*4)} Laboratory of Vaccine and Immune Regulation (BIKEN),

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

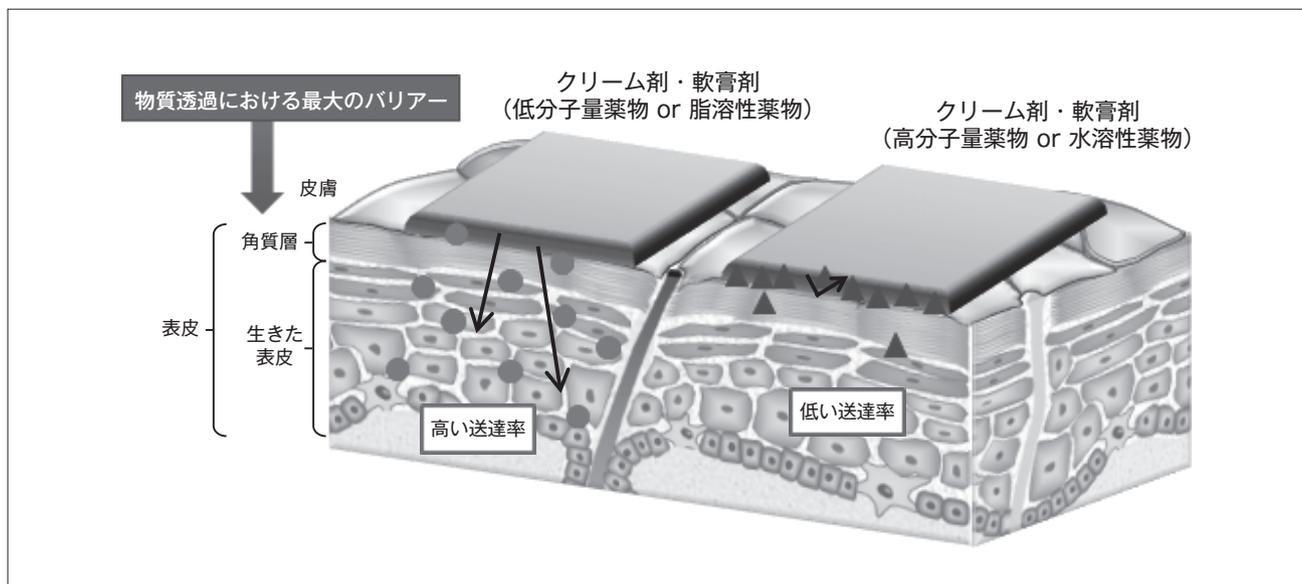


図1 経皮薬物送達の模式図

皮膚の最外層にある角質層は異物の侵入を防ぐ物理的バリアとして機能しているため、薬物の皮膚内への透過は制限される。特に、分子量500を越える物質や水溶性の高い物質は角質層を透過しにくく、クリーム剤や軟膏剤として薬物を投与しても皮膚内への送達率は低い。

物分子は限定されてしまう(図1)。そのため、いまだ薬物療法の適用が難しく侵襲的な外科的療法に頼らざるを得ない皮膚疾患も存在しており、新たな経皮投与手法による新規薬物療法の開発に期待が寄せられている。

本稿では、薬物療法の適用が難しいとされる皮膚疾患の1つである脂漏性角化症について、筆者らが開発を進めているマイクロニードル技術を用いた新規経皮薬物療法を紹介する。

2. 脂漏性角化症に対する外科的療法

脂漏性角化症は50歳以上において80~100%の割合で起こり、掌および足の裏以外の全身で発症する大きさが数mmから数cmの良性腫瘍である(図2A)^{1,2)}。死に至る疾患ではないが刺激性や痒みを伴い、見た目も悪く、精神的にもNegativeインパクトを与える。その高い発症率にもかかわらず、その研究報告は驚くほど少なく、年齢や紫外線がリスクファクターとして考えられているものの発病メカニズムは明らかになっていない^{3,4)}。近年、脂漏性角化症部位でFibroblast growth factor receptor 3(FGFR3)の変異が高い確率で確認されており、発病メカニズムの一端が明らかにされつつある⁵⁾。

脂漏性角化症の一般的な治療方法は、液体窒素により病変部の細胞を壊死させる凍結療法、レーザーによって病変部を蒸散・蒸発させるレーザー治療といった外科的療法である(図2B)。これらの治療法は傷跡、色素沈着、再発といった問題があるとともに、医療機関でしか施術できないため患者は複数回の通院を余儀なくされる^{3,6)}。患者のほとんどが高齢者であることを考えると治療の負担が大きく、外科的治療に代わる新しい治療方法の提供はQOLの向上といった観点で大きな意義をもつと考えられる。

3. レチノイドを用いた薬物療法の開発動向

脂漏性角化症の外科的療法に代わる治療戦略として、自宅で患者自身が治療を行うことができる薬物療法の開発に大きな期待が寄せられている(図2B)。完治には至らないものの、レチノイド(ビタミンAとその類縁化合物の総称)を用いた脂漏性角化症に対する薬物治療の報告が散見される。Tazarotene cream 0.1%を病変部に1日2回適用することで、15人中7人で脂漏性角化症に対する治療効果が認められている⁷⁾。また、脂漏性角化症様患者に0.075%レチノイン酸溶液を6週間外用するこ

とによる症状の緩和が報告されている⁸⁾。レチノイドは、生体内で形態形成制御、細胞の分化増殖制御等の作用がある。レチノイドの中でもオールトランスレチノイン酸(All-trans retinoic acid; ATRA)は、生体内における主要な活性本体であり、表皮角化細胞の強い増殖促進作用を促して表皮を肥厚させる(図2C)。これは ATRA の作用により基底層直上のケラチノサイトから Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor(HB-EGF)が分泌され、表皮全体に分布している Epidermal growth factor receptor(EGFR)を介して基底細胞の増殖

が促進されることによる。EGFR はケラチノサイト増殖による再上皮化に重要な役割を果たしており、ATRA を適用することにより表皮のターンオーバーが加速される⁹⁻¹³⁾。このような ATRA の作用により、脂漏性角化症の病変部位が新しい皮膚細胞に押し出されるかたちで落屑すると考えられ、ATRA の効果が脂漏性角化症の薬物治療法の確立につながるとされている。

しかしながら、ATRA は熱や光に対して非常に不安定であるため、日光に曝される部位に ATRA を外用すると光分解が進み、期待される効果を十

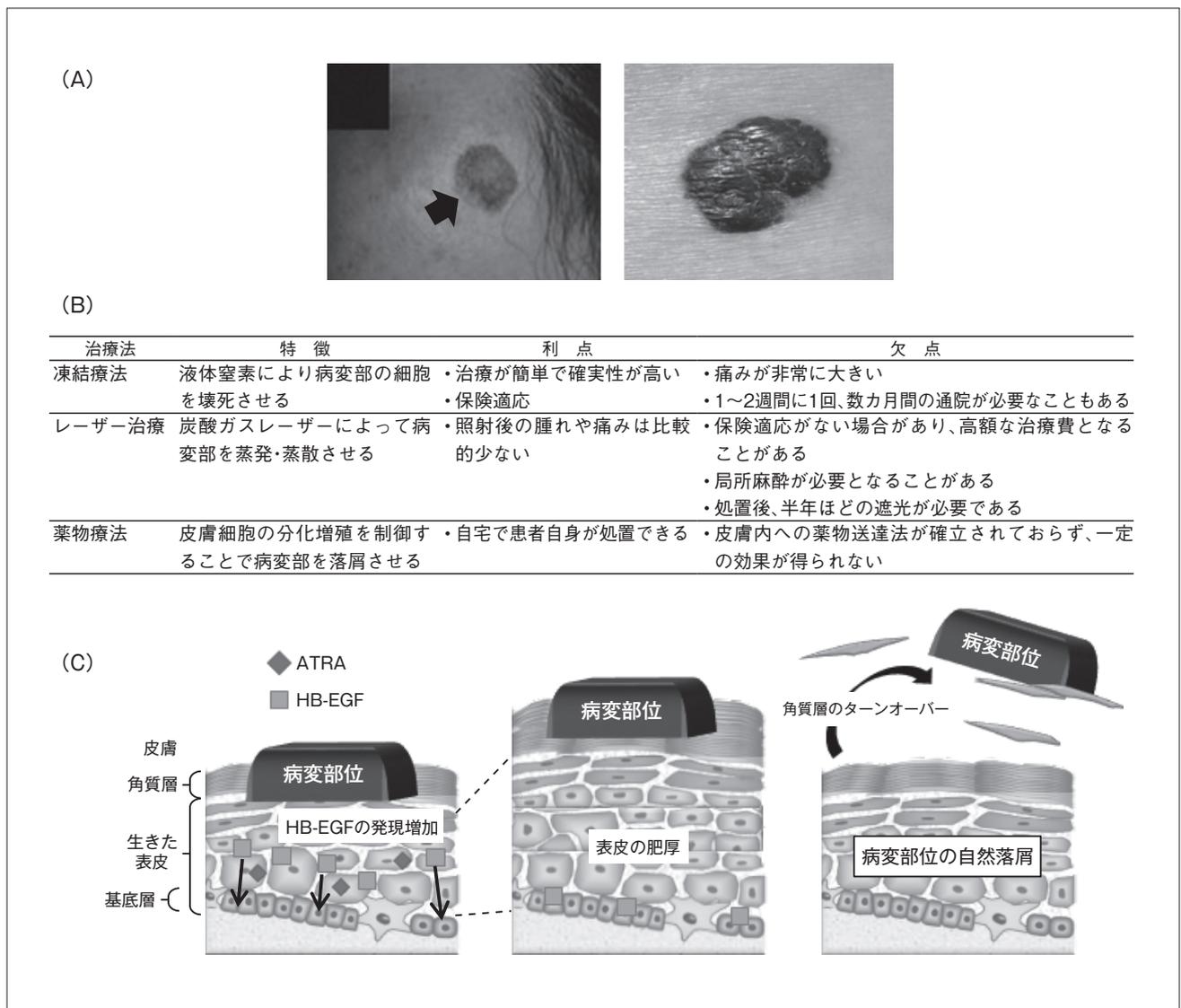


図2 脂漏性角化症に対する薬物療法の開発

(A) 脂漏性角化症の病変部位。

(B) 脂漏性角化症に対する治療法。

(C) ATRA はケラチノサイトからの HB-EGF 分泌を促進する。HB-EGF が基底層に作用することで細胞増殖、それに伴う表皮肥厚が進行し、角質層のターンオーバー促進によって皮膚表面の病変部位が落屑する。

分に発揮できない可能性がある¹⁴⁾。また、ATRAの皮膚透過性は低く、皮膚表面に塗布しても表皮・真皮には適用量の数%程度しか送達できない。例えば、米国で市販されている ATRA クリーム (Retin-A) を適用したブタ皮膚における ATRA 透過率は約5%であることが報告されている¹⁵⁾。投与量や投与回数を増やすことで皮膚内送達量を増やすといった方法も考えられるが、全身的な副作用や Retinoid dermatitis と呼ばれる炎症を引き起こす可能性が高い。また、脂漏性角化症では乾癬など他の皮膚疾患と比べて外用剤による効果が得にくい。前述のとおり、角質層が異物侵入に対する皮膚の物理的バリアを担っており、乾癬やアトピー性皮膚炎といった皮膚疾患では角質層のバリア機能が低下している。一方、脂漏性角化症の患者においては角質層が健康な状態、あるいは角化した状態であり、外用した薬物が十分に透過できず薬効が発揮されない。したがって、ATRA を用いた脂漏性角化症の薬物治療には、既存の軟膏剤やクリーム剤に代わる新たな経皮投与デバイスの開発が望まれている。

4. マイクロニードルを用いた経皮薬物送達

マイクロニードルは長さ1 mm以下の微小針であり、神経終末が存在する真皮の深部にまで針が到達しないことから痛みを伴うことなく、皮膚内への確実な薬物送達を可能にする。マイクロニードルという概念は1976年に Gerstel と Place らによって初めて報告されて以降¹⁶⁾、製造技術が困難であることから費用対効果の面が問題となり開発研究は停滞していた。しかしながら、1990年代になって電子工業が発展することで、微細加工技術が容易になり、現在ではさまざまなマイクロニードルの開発が進められている^{17,18)}。第一世代マイクロニードル(図3A左)は、剛性に優れる、成形しやすいといった利点を有するシリコンや金属(ステンレス、チタン)を構成材料として作製され、皮膚内への薬物送達手法の違いにより大きく3種類に分けられる。

4-1. ソリッドマイクロニードル

ソリッドマイクロニードルはシリコンや金属など

で作製された剣山のような微小針であり、これを貼付することで生じた穿刺孔を介して薬物を皮膚内へ送達することができる(図3B)。マイクロニードルの前処置による薬物送達手法は簡便ではあるが、薬物の投与量やデバイスの貼付時間などの設定が難しいという課題がある。

4-2. 中空マイクロニードル

前述のソリッドマイクロニードルを用いた経皮薬物送達手法では、薬物の皮膚内への送達はマイクロニードルによる穿刺孔を介した受動拡散に依存するため、皮膚内に入る薬物量を厳密に制御することは困難である。中空マイクロニードルは、注射針と同様にニードルの中心に空洞がある微小な針であり、シリンジやポンプを用いることで、その空洞を通して皮膚内の特定部位に一定量の薬物を注入できる(図3B)。しかしながら、本デバイスの実用化に向けては、注入した薬物が皮膚内から漏れ出さないように、投与部位の深さや投与速度を最適化する必要がある。

4-3. コーティングマイクロニードル

ソリッドマイクロニードルや中空マイクロニードルを用いた手法では、薬物を含む溶液を別に用意する必要がある、手技が煩雑となる。一方、ソリッドマイクロニードルの表面に薬物をコーティングし、その微小針を皮膚に穿刺することで薬物を皮膚内へ拡散させるコーティングマイクロニードルであれば、自宅で患者自身が治療を行うことができる薬物療法を可能にすると考えられる(図3B)。現在、マイクロニードルの素材やコーティング溶液の組成を最適化することで、薬物をより多く、より安定に保持できるコーティングマイクロニードル製剤の開発が進められている。

5. 生分解性および溶解型マイクロニードル

第一世代マイクロニードルはチタン、ステンレス、シリコン等を素材としているため、適用した際のアレルギー反応や微小針が生体内で折れ残り、重篤な組織傷害を引き起こす危険性が払拭できないため

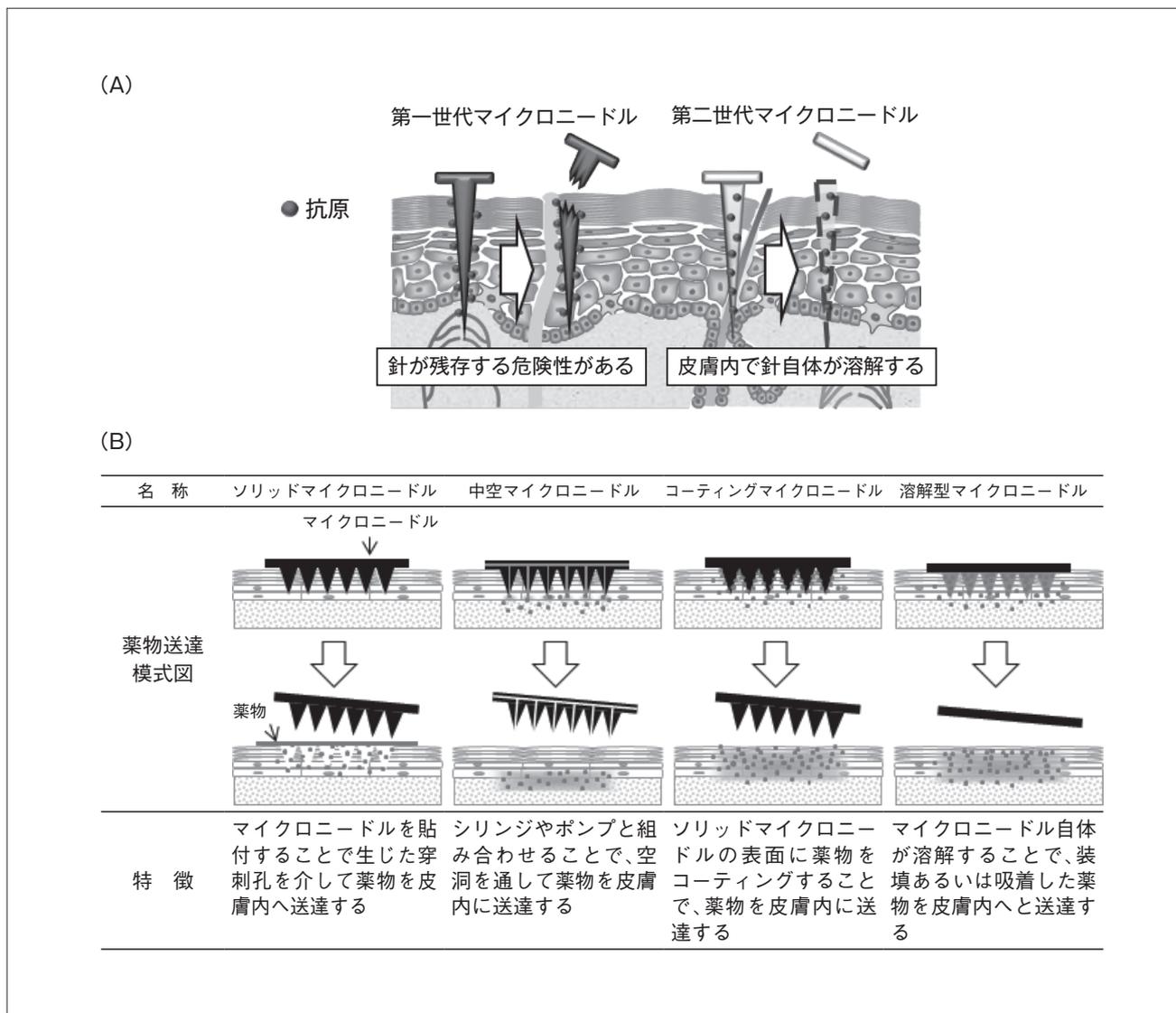


図3 マイクロニードルを用いた経皮薬物送達技術

(A) マイクロニードル法は、皮膚に貼るだけで痛みを伴うことなく薬物を皮膚内へと直接送達できる手法である。シリコンや金属で作製された第一世代マイクロニードルには針が皮膚内で折れて残存する危険性があるが、第二世代マイクロニードルは針自身が皮膚内で分解・溶解するため安全性が高く、実用化が期待できる。

(B) さまざまなマイクロニードルを用いた経皮薬物送達技術。

に、実用化するうえで大きな課題を抱えている。そこで、第二世代マイクロニードル(図3A右)として、ポリ乳酸(poly lactic acid ; PLA)や乳酸・グリコール酸共重合体(poly lactic-co-glycolic acid ; PLGA)といった生分解性バイオポリマーを用いることで、たとえ微小針が皮膚内で折損したとしても針自身が分解し、残存することがないマイクロニードルが作製された¹⁹⁾。さらに、皮膚内への薬物送達効率ならびに薬物送達速度の向上を目的に、生体成分であるヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸を利用した溶解型マイクロニードルが開発された²⁰⁾。溶解型マイク

ロニードルは、微小針自体が溶解することによって装填あるいは吸着した薬物を皮膚内へと送達することができるという特徴を有する(図3B)。このように、第二世代マイクロニードルは針が生分解性あるいは溶解性の素材を用いて作製されることから、第一世代マイクロニードルが抱える安全面の問題を克服できると考えられ、臨床応用・実用化が期待される。

筆者らは、コスメディ製薬株式会社との共同で針部が皮膚内で溶解することによって含有薬物を放出し、貼付に伴う針の折れ残りの心配がない皮膚内溶

解型マイクロニードルパッチ(MicroHyal; MH)を開発した²¹⁻²³⁾。この第二世代マイクロニードルは皮膚組織成分であるヒアルロン酸を主成分としており、マイクロニードルの形状や長さは自在に調節することができる(図4 A)。ヒト皮膚に貼付した針長800 μm のMHは、1時間後には針の約半分が、6

時間後には針全体が溶解し(図4 B)、穿刺孔は角質層を突破して生きた表皮に到達していることが確認された(図4 C)²⁴⁾。また筆者らは、このMHにインフルエンザ抗原を装填した経皮ワクチン製剤がヒトにおいて安全かつ有効であることも臨床研究において実証している²⁵⁾。

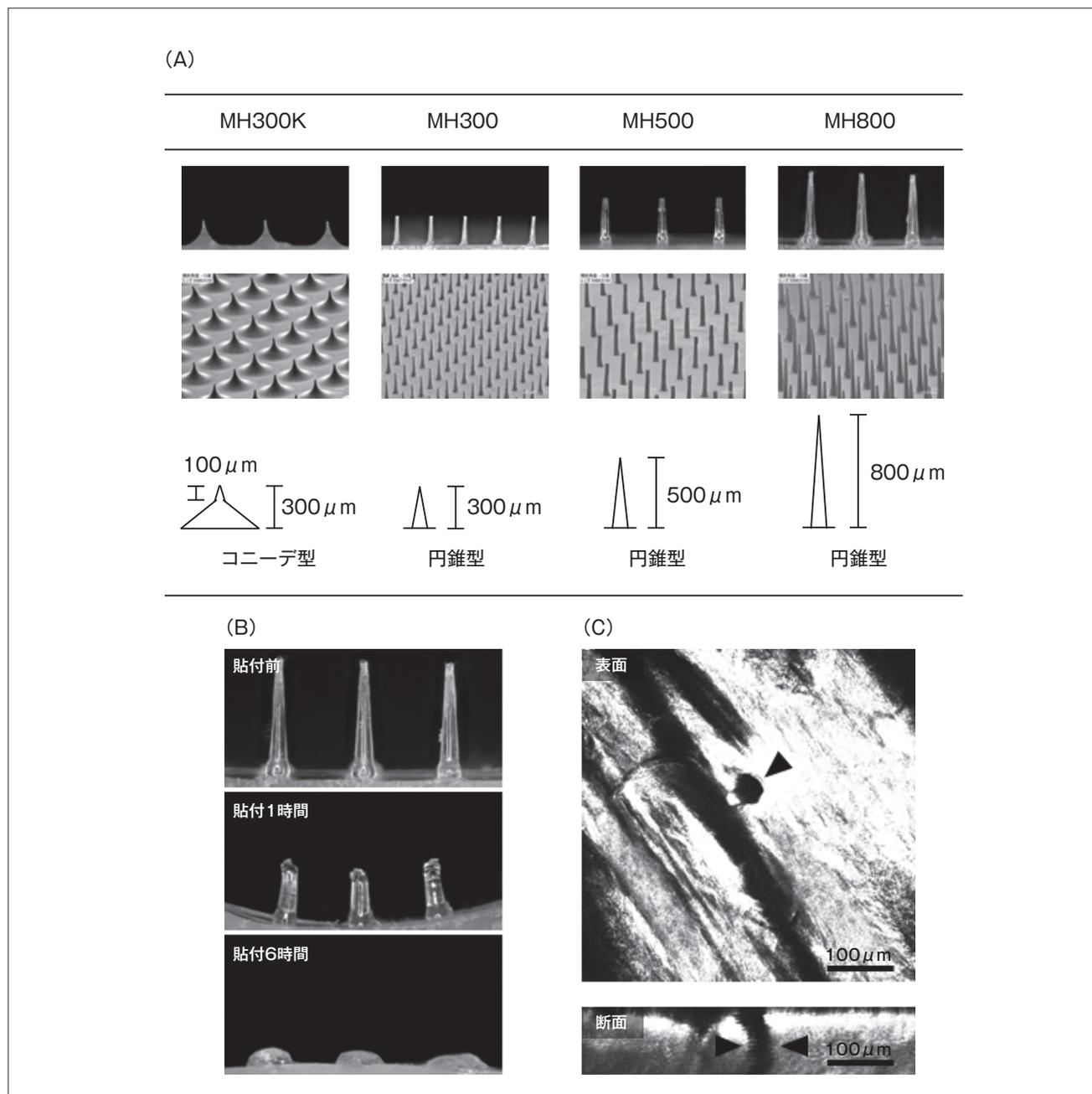


図4 皮膚内溶解型マイクロニードル(MH)の開発

(A) MHの針部形状および針長は使用目的にあわせて調整できる。
 (B) MH800を成人健康男性の左上腕外側皮膚に1時間あるいは6時間貼付し、剥離後のマイクロニードルを実体顕微鏡により観察した。1時間後には針部の約半分が、6時間後には針部が完全に溶解した。
 (C) MH800を成人健康男性の左上腕外側皮膚に5秒間貼付し、剥離直後の貼付部位を共焦点レーザー生体顕微鏡により観察した。皮膚表面には穿刺孔が確認され、三次元構築した皮膚断面像から穿刺孔は角質層を突破し、生きた表皮に到達していることが明らかとなった。

6. ATRA 装填マイクロニードル製剤を用いた薬物療法の開発

筆者らは、前述した脂漏性角化症に対する ATRA 治療の課題を解決するために、MH を応用して必要最低限の ATRA を皮膚内に的確に送達できる新規経皮薬物療法の開発に着手した^{26,27}。ATRA を装填した MH (ATRA MH) をマウス背部皮膚に貼付したところ、経時的に針部の溶解とそれに呼応した皮膚内への ATRA 送達が進み、120 分後には針部の完全な溶解と 90% 以上の皮膚内 ATRA 送達率を達成することができた(図 5 A)。また、ATRA MH 貼付によって表皮の肥厚が観察され(図 5 B)、ATRA MH が ATRA を薬効発現部位である角質層下の生きた表皮へと確実に送達できる製剤であることが実証された。興味深いことに、ATRA を含まない Placebo MH の貼付においても表皮の肥厚が認められたが、これはマイクロニードルアレイを皮膚に圧着するとマイクロメートルスケールの孔が皮膚表面に多数形成されることから、孔の形成から塞がるまでのプロセス、つまりは創傷治癒のプロセスが関与した結果と考えられる。実際に、角質層の破壊により創傷治癒の過程が進行すると表皮の肥厚が引き起こされることが報告されている²⁸。したがって、ATRA MH の適用は ATRA の薬効作用に加えてマイクロニードル製剤がもたらす特有の効果もあわせて表皮肥厚が亢進する可能性が示された。

皮膚内に送達された ATRA の活性評価として HB-EGF mRNA 発現レベルを測定したところ、ATRA MH 適用群と ATRA アセトン溶液塗布群(陽性対照群)において明らかな増加が認められ(図 5 C)、ATRA アセトン溶液塗布と比較して ATRA MH 貼付は皮膚内 ATRA 活性の個体間変動(ばらつき)を抑えられることが判明した。すなわち、各個体の皮膚状態により ATRA 透過率が影響される皮膚表面への ATRA 外用とは異なり、マイクロニードル技術を用いた ATRA の皮膚内送達はより確実な薬効発現を達成できる投与形態であることが示唆された。さらに、ATRA MH の貼付によって皮膚のターンオーバー促進作用に基づく角質層の落

屑が認められ(図 5 D)、ATRA MH が脂漏性角化症に対する新規薬物療法の開発に適う経皮製剤として有望であることが示された。

ATRA が抱える課題の1つに、化学的に非常に不安定であり、熱や光に不安定で、酸化を受けやすいといった特性がある^{14,29,30}。ATRA MH を 25°C で保管すると、6 カ月後には装填した ATRA の約半分が分解されて消失したが、4°C で保管することによって製剤の安定性は担保されることが明らかとなった(図 5 E)。処方後 6 カ月間の使用期限は、自宅で患者自身が治療を行うのに十分な期間であろうと考えるが、利便性を向上させるためには添加剤や包装などの工夫・改良を通して ATRA MH の室温保管対応を実現することが望ましい。ATRA の化学的安定性を向上させる製剤研究が進められており³¹⁻³³、固体脂質ナノ粒子を用いた ATRA 安定性の向上²⁹など今後の進展に期待したい。

もう1つの ATRA による皮膚疾患治療における課題が、ATRA の頻回局所投与によって誘発される紅斑や炎症を伴う Retinoid dermatitis と呼ばれる副作用である^{9,34,35}。ATRA アセトン溶液を 4 日間連続塗布したマウス皮膚では中等度から重度の紅斑やかぶれが認められたが、ATRA MH の連続貼付では紅斑は軽度に抑えられた(図 5 F)。ATRA の外用により炎症が起こることはこれまでに多数報告されているが、炎症誘発メカニズムは明確になっていない³⁶。ATRA MH 適用による炎症誘発についてさらに詳細な検討は必要とされるものの、マイクロニードルにより ATRA を直接皮膚内へ送達する手法は、皮膚表面への ATRA 塗布よりも刺激性・起炎性が少なく、安全性に優れる可能性が示唆された。

7. ATRA 装填マイクロニードル製剤の臨床研究

前述の動物実験の結果を踏まえて、筆者らは ATRA MH の安全性および有効性を検証する臨床研究を実施した³⁷。ヒト皮膚に ATRA MH を 1 回貼付したところ、貼付直後に投与部位に軽度の紅斑が認められたが、貼付 1 週間後にはほぼ消失し、1 カ月後には完全に消失した。また、血液検査の結

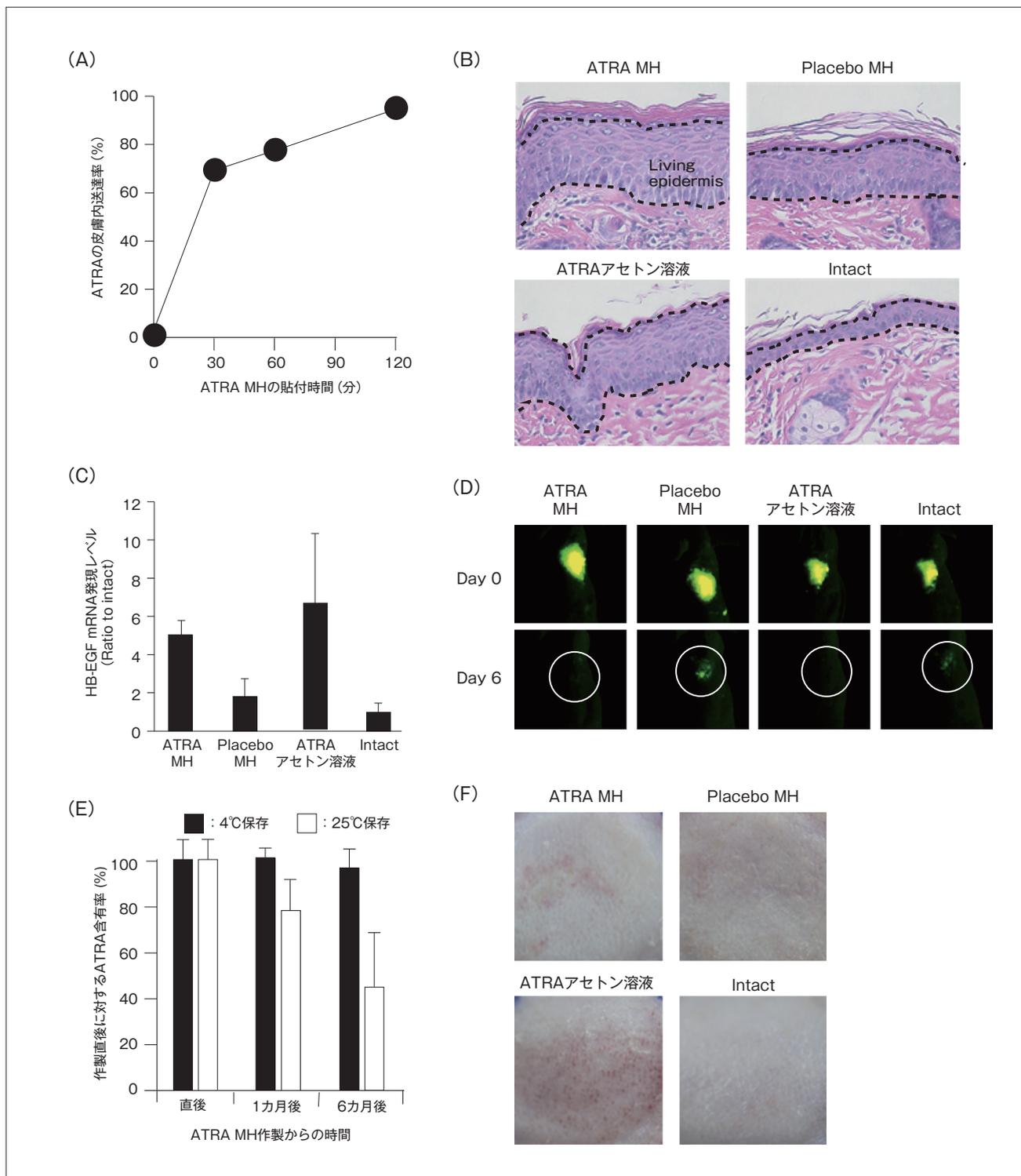


図5 ATRA装填マイクロニードル製剤を用いた薬物療法の開発

- (A) マウス背部皮膚に貼付した ATRA MH を経時的に回収し、MH に残存した ATRA を定量することで ATRA の皮膚内送達率を算出した。
- (B) マウス背部皮膚に ATRA MH あるいは Placebo MH の貼付、または ATRA アセトン溶液の塗布を連続4日間行い、最終処置から12時間後に摘出した皮膚を HE 染色した。
- (C) マウス背部皮膚に ATRA MH あるいは Placebo MH の貼付、または ATRA アセトン溶液の塗布を連続4日間行い、最終処置から12時間後に摘出した皮膚における HB-EGF mRNA の発現量を qRT-PCR により評価した。
- (D) ダンシルクロライドにより角質層を染色したマウス背部皮膚に ATRA MH あるいは Placebo MH の貼付、または ATRA アセトン溶液の塗布を行い、処置前 (Day 0) と処置後 (Day 6) の皮膚における角質層の残存を *in vivo* 蛍光イメージング装置により観察した。
- (E) ATRA MH を 4°C あるいは 25°C 条件下で保存し、MH に残存する ATRA を経時的に定量した。
- (F) マウス背部皮膚に ATRA MH あるいは Placebo MH の貼付、または ATRA アセトン溶液の塗布を連続4日間行い、最終処置から12時間後に皮膚の紅斑・かぶれを観察した。

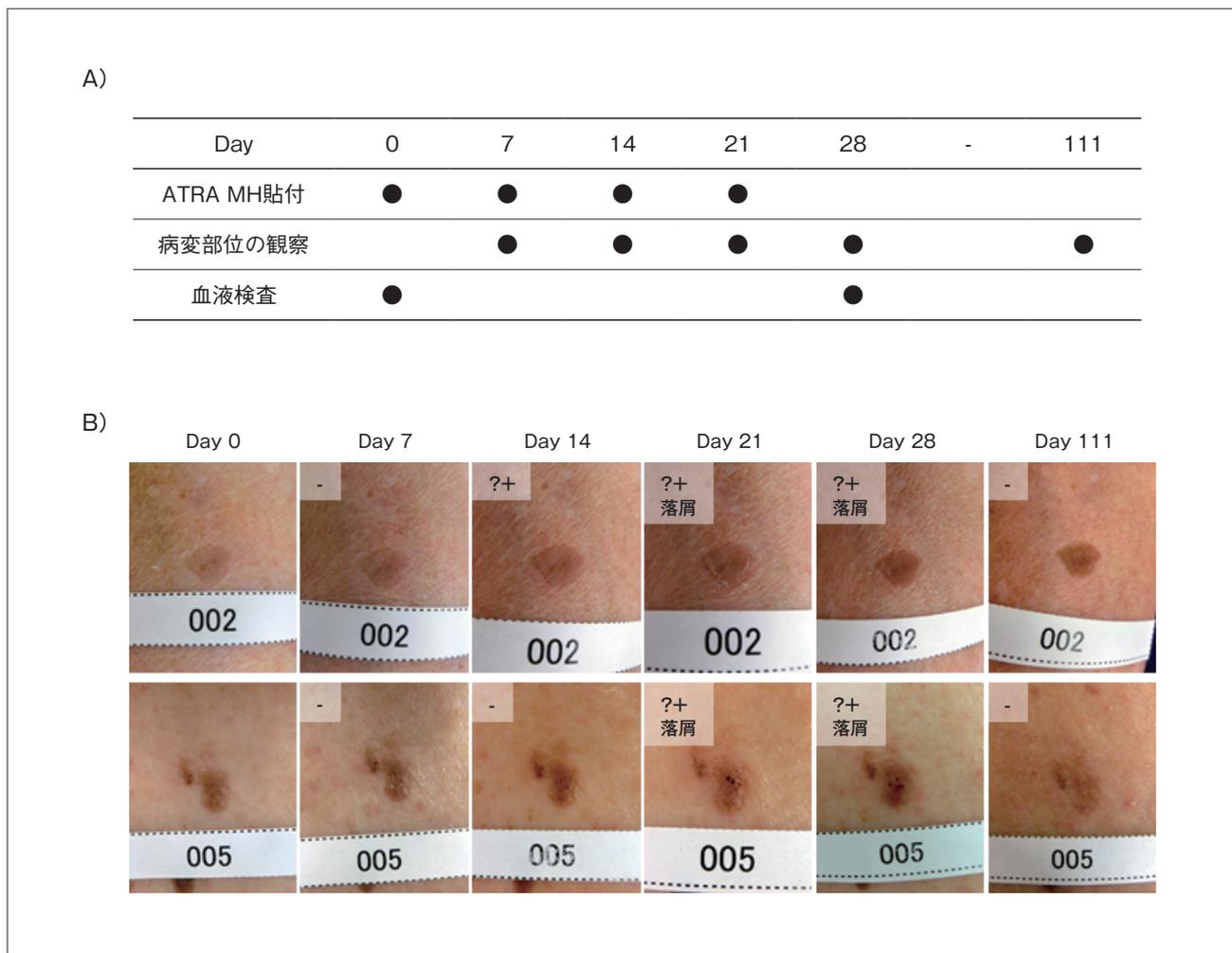


図6 ATRA装填マイクロニードル製剤の臨床研究

(A) 臨床研究スケジュール。

(B) 脂漏性角化症被験者2名について病変部の経過観察を示す。ATRA MH貼付期間に軽微な紅斑(?+)とともに角質層の落屑を認め、治療後2～3カ月後には紅斑は消失(-)した。

果から、ATRA MHの貼付による全身性の有害事象は認められず、ATRA MHのヒトへの貼付は安全性に大きな問題はないと判断した。そこで、1週間隔で4回ATRA MHを貼付する試験を行ったところ(図6A)、2回目の貼付1週間後から紅斑が確認される人数が増加する傾向が認められた。しかし、これらの紅斑はいずれも軽微であり、試験終了2～3カ月後においては消失したことから、ATRA MHの頻回投与は重篤な副作用の誘発にはつながらないことが示唆された。また、3回目の貼付後に2名の被験者において角質層の落屑が認められ(図6B)、ヒト皮膚においてもATRA MHによってATRAが活性を保ったまま皮膚内に送達されていることが示された。以上の結果より、ATRA MHはヒトに

複数回投与しても安全に適用できる製剤であり、脂漏性角化症治療薬として有望である可能性が示された。

一方、数名の被験者では6時間貼付後にATRA MHの針が完全に溶解していないことが確認され、皮膚の弾力や厚みが患者や部位によって異なると針が刺さらなかったり、あるいは刺さった後に押し返されたりする可能性が考えられた。今後、実用化するためには、患者や部位にかかわらず病変部皮膚に確実に貼付するための改良・工夫が必要である。また、今回の臨床研究では最終的に脂漏性角化症の完治は認められなかったことから、ATRA MHの実用化に際しては投与量や投与スケジュールについての最適化も必要とされる。

8. おわりに

マイクロエレクトロニクス産業の発展に伴い、マイクロニードル作製技術は目覚しく進歩しており、マイクロニードルアレイを応用した経皮ワクチンや副甲状腺ホルモンによる骨粗鬆症治療などの臨床研究に関する報告が近年増加している。本稿で紹介した研究では、加齢に伴い高頻度で発症する脂漏性角化症について、凍結療法やレーザー治療といった従来の外科治療に代わる新規薬物治療の提供を目的とした。脂漏性角化症の新規治療法として ATRA MH のコンセプト、およびヒトでの安全性と薬効発現を実証し、マイクロニードル技術の適用領域を皮膚疾患に対する薬物治療に拡大できる可能性を示すことができた。今後、安全性を担保しつつ完治を

目指した長期反復投与ならびに高用量での ATRA MH 臨床研究が必要とされるが、筆者らの基礎から臨床にわたる成果は、マイクロニードル技術を応用した脂漏性角化症の新規薬物治療法の確立に少なからず貢献するものと考えられる。

謝辞

本稿にて紹介した研究内容は、「文部科学研究費補助金(挑戦的萌芽26670076)」からの研究助成によるものであり、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたりご協力いただきましたコスメディ製薬株式会社 神山文男先生、権英淑先生、奈良県立医科大学 浅田秀夫先生、小豆澤宏明先生に深謝いたします。

文献

- 1) Yeatman J.M., et al., *Br. J. Dermatol.*, **137**, 411-414 (1997)
- 2) Kwon O.S., et al., *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **19**, 73-80 (2003)
- 3) Hafner C., Vogt T., *J. Dtsch Dermatol. Ges.*, **6**, 664-677 (2008)
- 4) Ming M., et al., *J. Invest. Dermatol.*, **131**, 1583-1586 (2011)
- 5) Hafner C., et al., *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 1883-1885 (2007)
- 6) Mehrabi D., Brodell R.T., *Dermatol. Surg.*, **28**, 437-439 (2002)
- 7) Herron M.D., et al., *Int. J. Dermatol.*, **43**, 300-302 (2004)
- 8) Asawanonda P., et al., *Dermatol. Online J.*, **11**, 18 (2005)
- 9) Fisher G.J., Voorhees J.J., *FASEB J.*, **10**, 1002-1013 (1996)
- 10) Varani J., et al., *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1335-1341 (2001)
- 11) Barrientos S., et al., *Wound Repair Regen.*, **16**, 585-601 (2008)
- 12) Xiao J.H., et al., *EMBO J.*, **18**, 1539-1548 (1999)
- 13) Chapellier B., et al., *EMBO J.*, **21**, 3402-3413 (2002)
- 14) Brisaert M., Plaizier-Vercammen J., *Int. J. Pharm.*, **199**, 49-57 (2000)
- 15) Sinico C., et al., *J. Control. Release*, **103**, 123-136 (2005)
- 16) Gerstel M.S., Place V.A., *Drug delivery device. US Patent*, **3**, 482 (1976)
- 17) Hirobe S., et al., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **10**, 485-498 (2013)
- 18) Matsuo K., et al., *Vaccine*, **31**, 2403-2415 (2013)
- 19) Park J.H., et al., *J. Control. Release*, **104**, 51-66 (2005)
- 20) Naito S., et al., *Vaccine*, **30**, 1191-1197 (2012)
- 21) Matsuo K., et al., *J. Control. Release*, **161**, 10-17 (2012)
- 22) Matsuo K., et al., *J. Control. Release*, **160**, 495-501 (2012)
- 23) Matsuo K., et al., *J. Neuroimmunol.*, **266**, 1-11 (2014)
- 24) Hirobe S., et al., *Pharm. Res.*, **30**, 2664-2674 (2013)
- 25) Hirobe S., et al., *Biomaterials*, **57**, 50-58 (2015)
- 26) Hiraishi Y., et al., *J. Control. Release*, **171**, 93-103 (2013)
- 27) Hiraishi Y., et al., *Int. J. Pharm.*, **441**, 570-579 (2013)
- 28) Denda M., et al., *J. Invest. Dermatol.*, **109**, 84-90 (1997)
- 29) Lim S.J., et al., *J. Control. Release*, **100**, 53-61 (2004)
- 30) Ioele G., et al., *Int. J. Pharm.*, **293**, 251-260 (2005)
- 31) Hattori M., et al., *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **250**, 557-563 (2012)
- 32) Ozpolat B., Lopez-Berestein G., *Leuk. Lymphoma*, **43**, 933-941 (2002)
- 33) Zuccari G., et al., *J. Control. Release*, **103**, 369-380 (2005)
- 34) Kim B.H., et al., *Toxicol. Lett.*, **146**, 65-73 (2003)
- 35) Kang S., et al., *J. Invest. Dermatol.*, **105**, 549-556 (1995)
- 36) Lee J.E., et al., *Ann. Dermatol.*, **22**, 290-299 (2010)
- 37) Hirobe S., et al., *Life Sci.*, **168**, 24-27 (2017)