

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月22日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20721

研究課題名(和文)肥満者に対する適正な経皮的ドラッグデリバリー方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of appropriate percutaneous drug delivery method for obese people

研究代表者

伊吹 愛 (Ibuki, Ai)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：60738805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、肥満者の皮膚生検組織を用いて、経皮的ドラッグデリバリーに関わる皮膚バリア機能および皮膚内の薬物代謝酵素の発現動態を明らかにすることである。形成外科手術時に採取した対象者の皮膚組織からディスペーゼを用いて表皮を分離し、表皮バリア機能構成因子(セラミド、フィラグリン)、フェンタニルパッチの薬物代謝酵素であるCYP3A4発現量の肥満の有無による発現量の差を解析した。その結果、肥満の有無によりセラミド量に差は認められなかった一方で、CYP3A4発現量はBMIの増加に伴い上昇する可能性が示唆され、肥満度の上昇が経皮的ドラッグデリバリーに影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、肥満者の皮膚生検組織を用いて、経皮的ドラッグデリバリーに関わる皮膚バリア機能および皮膚内の薬物代謝酵素の発現動態を明らかにすることである。本研究の結果、肥満の有無によりセラミド量に差は認められなかった一方で、CYP3A4発現量はBMIの増加に伴い上昇する可能性が示唆され、肥満度の上昇が経皮的ドラッグデリバリーに影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、これらの知見をより詳細に解析することで、肥満者の皮膚特性を考慮した新しい経皮吸収方法の確立が可能になると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the skin barrier function involved in transdermal drug delivery and the expression dynamics of drug metabolizing enzymes in the skin using skin biopsy tissue of obese persons. The epidermis is separated from the skin tissue of the subject collected at the time of plastic surgery using dispase, and 1 epidermal barrier functional component (ceramide, filaggrin), and the presence or absence of obesity of CYP3A4 expression amount of drug metabolizing enzyme of 2 fentanyl patch The difference in expression level was analyzed. As a result, while there was no difference in the amount of ceramide depending on the presence or absence of obesity, it is suggested that the expression level of CYP3A4 may increase with the increase of BMI, and the increase in the degree of obesity affects transdermal drug delivery The possibility was suggested.

研究分野：基礎看護学

キーワード：肥満 経皮吸収 皮膚バリア機能 薬物代謝酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満は皮膚の生理機能を脅かす内的因子の一つであるといわれている。臨床において、肥満は疼痛管理等に頻用される経皮吸収型薬剤の経皮吸収率(ドラッグデリバリー)に影響を及ぼし、薬剤の効用期間を短縮させ、患者の疼痛管理を困難にすることが報告されているが、そのメカニズムや適正な経皮吸収を促す看護ケア方法に関する研究は極めて少ない現状がある。

薬剤の経皮吸収率には、表皮の角層バリア機能が担う薬剤透過性と皮膚中の薬物代謝酵素の作用が主に関与している。これまでに、肥満ラットを用いて経皮吸収による鎮痛剤の薬物動態を検討した先行研究では、鎮痛剤経皮吸収時の皮膚内残存率が低下すること、さらに、皮膚の代表的な薬剤代謝酵素である Cyp3a2 の皮膚内発現レベルが低下することが報告されている。これらの結果は、肥満は薬剤の皮膚透過量の増加および体内暴露量を変化させることを示唆している。しかしながら、実際のヒトの皮膚における検討は、皮膚生検を伴う侵襲度の高い処置が必要となることから実施が困難であった。

2. 研究の目的

本研究は、形成外科手術時に回収されるヒトの皮膚組織を解析サンプルとし、肥満度の上昇による表皮バリア機能構成因子および薬物代謝酵素の発現動態の変化を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 研究デザイン

横断的研究を実施した。

(2) 対象者

乳がん術後、腹直筋皮弁法による乳房再建術を受けた日本人女性を対象とし、手術により生じた残余腹部皮膚組織を解析に使用した。手術前1年以内に化学療法を受けた者、慢性炎症性皮膚疾患を有する者、糖尿病および感染症を有する者、カルバマゼピン等の強力な CYP3A4 誘導作用を有する薬剤を常用している者は除外した。

(3) 基本属性

対象者の基本属性(体重、身長、年齢、現病歴、既往歴、喫煙歴、内服薬の内容)はカルテから収集した。サンプル採取時の体重と身長から BMI を算出し、日本肥満学会の基準に基づき、BMI25 以下を非肥満群、BMI25 以上を肥満群とした。

(4) サンプル採取

乳房再建時に残余皮膚として回収される腹部の皮膚組織を解析サンプルとし、皮膚組織からディスペーゼを用いて表皮を分離し、表皮バリア機能構成因子(セラミド、フィラグリン)、フェンタニルパッチの薬物代謝酵素である CYP3A4 発現量の肥満の有無による発現量の差を解析した。

バリア機能構成因子であるセラミドは、液体クロマトグラフ質量分析を用いた。乳房再建術当日に採取された腹部残余皮膚組織より皮下脂肪組織を除去し、その後、ディスペーゼを用いて表皮のみを採取し、解析まで -80°C で保存した。その後、有機溶剤を用いてサンプルを調整し、Bligh & Dyer 変法によりセラミドを含む総脂質分画を抽出した。トリプル四重極質量分析装置を用いてセラミド2の10分子種の高感度分析を実施した。

バリア機能構成因子であるフィラグリンは、抗フィラグリン抗体を用いた免疫組織化学染色法で評価した。パラフィンに包埋した皮膚組織を $3\sim 4\mu\text{m}$ の厚みで薄切し、スライドガラスに貼付した。抗フィラグリン抗体(抗体濃度 $5.0\sim 10.0\mu\text{g}/\text{mL}$)を用いて、抗原賦活化条件は加熱処理 $90\sim 20$ 分間とした。

薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現量は、RT-PCR 法にて評価した。RT-PCR 法に関して、表皮からのトータル RNA の抽出は、RNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて実施した。cDNA の合成には、PrimeScript RT Reagent Kit (タカラバイオ、滋賀、日本)を用いた。7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Bio System, California, USA) を用いて 95°C で1分間の初期変性後、 95°C で15秒間の熱変性、 60°C で45秒間の伸長反応を40サイクル繰り返した。PCR 増幅産物の特異性は融解曲線解析にて確認した。mRNA 発現量は検量線法を用いて解析し、内部標準には *ACTB* を用いた。

(5) 統計解析

統計解析には、統計ソフト SPSS を用い、非肥満群、肥満群の群間比較では、t 検定およびカイ二乗検定を行った。BMI と CYP3A4 発現量の相関解析には、Spearman の順位相関係数を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

(6) 倫理的配慮

本研究は、横浜市立大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認(170928016)を得て

実施した。

4. 研究成果

(1) 対象者の基本属性

表皮バリア機能構成因子（セラミド、フィラグリン）の解析対象者は 20 名（非肥満群 10 名、肥満群 10 名）であった。BMI の平均値は、非肥満群で 20.3 ± 1.6 、肥満群で 29.2 ± 2.1 であった。平均年齢は非肥満群 49.2 ± 3.1 歳、肥満群で 50.9 ± 4.3 歳であり、両群に有意な差は認められなかった。現病歴、喫煙の有無等についても差は認められなかった。

CYP3A4 の発現量の解析対象者は 68 名であり、平均 BMI は 23.3 ± 3.1 であった。

(2) 表皮バリア機能構成因子（セラミド 2）の定量

図 1 にセラミド 2 各分子種の定量結果を示す。非肥満群、肥満群の 2 群の比較において、セラミド量に有意な差は認められなかった。また、図 2 に全セラミド量の 2 群間の比較結果を示す。全セラミド量においても、2 群間で有意な差は認められなかった。

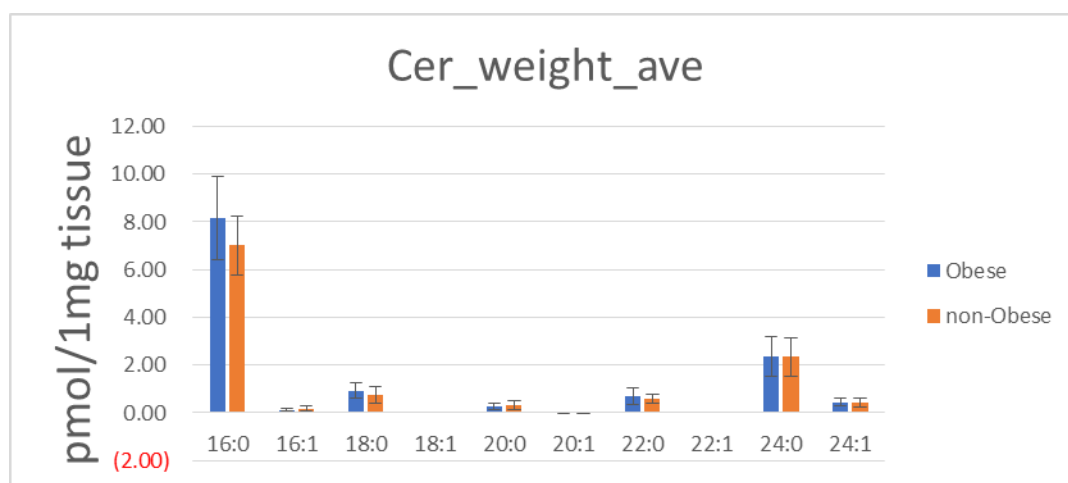


図 1 : セラミド 2 各分子種の 2 群の比較

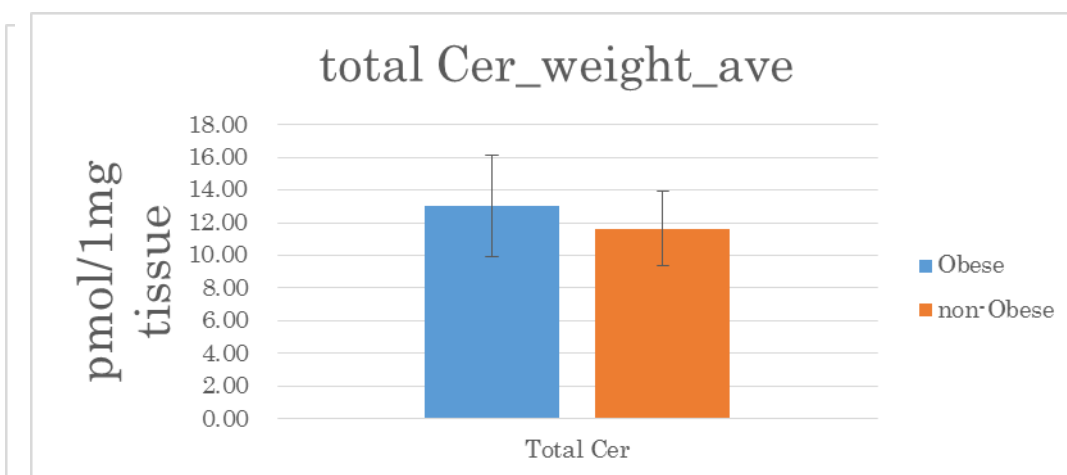


図 2 : 全セラミドの 2 群の比較

(3) 表皮バリア機能構成因子(フィラグリン)の同定

図3に非肥満群、肥満群におけるフィラグリンの免疫組織染色結果を示す。

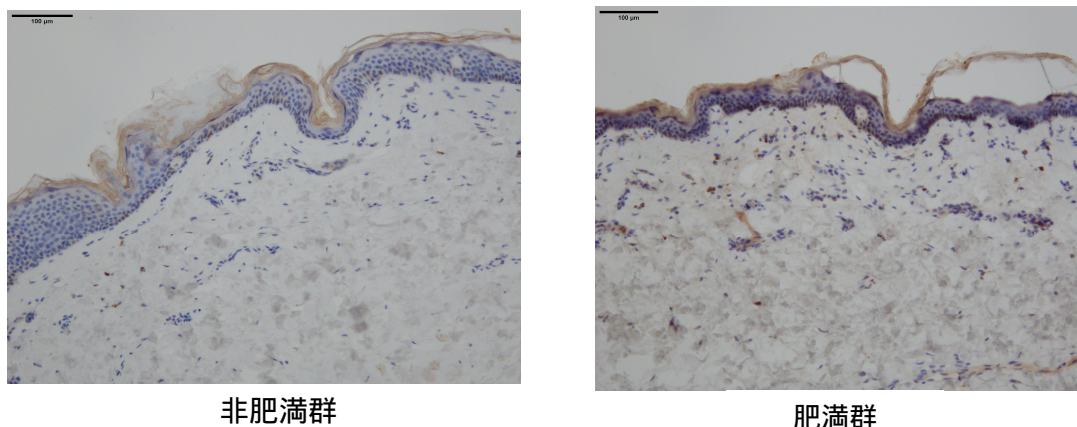


図3. フィラグリン免疫組織染色

(4) CYP3A4の発現量

CYP3A4の発現量は、非肥満群、肥満群に有意な差は認められなかった。BMIとCYP3A4の発現量の関係をSpearmanの順位相関係数を用いて解析したところ、BMIと表皮のCYP3A4の発現量には有意な相関関係が認められなかったが、相関係数は0.23を示した(Spearman's相関係数=0.23、 $p=0.06$)。

本研究は、ヒトの皮膚組織を用いて経皮吸収に関わる表皮バリア機能の構成因子(セラミド2、フィラグリン)、薬物代謝酵素のCYP3A4の発現量を明らかにした初めての研究である。本研究の結果、非肥満群と肥満群の表皮セラミド2の量には差は認められなかった一方で、CYP3A4のmRNA発現量はBMIの増加に伴い上昇する可能性が示唆された。表皮内CYP3A4の発現量の上昇は、肥満者においてフィンタニル等の薬剤の代謝が亢進し、血中濃度の低下を招く可能性が考えられる。今後、さらに詳細な解析を重ねることで、肥満者が皮膚のドラッグデリバリーに与える影響を明らかにし、肥満者の皮膚特性を考慮した適性な経皮的ドラッグデリバリー手法の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

前澤美佳、榎原弘子、伊吹愛、福田真佑、赤瀬智子. 肥満者に対するフェンタニル貼付剤の適切な与薬方法の確立ー皮膚内薬物代謝酵素CYP3A4の発現変動に着目してー. 第6回看護理工学会学術集会(2018年10月14日)(東京)

前澤美佳、榎原弘子、伊吹愛、赤瀬智子. 肥満者に対する最適な経皮的与薬方法の検討ー皮膚内シトクロムP450発現変動の検証. 第5回看護理工学会学術集会(2017年10月15日)(金沢)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。