

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590152

研究課題名(和文) タクロリムスの皮膚適用後の皮膚内動態と表皮構造の関係に関する研究

研究課題名(英文) Study on the relationship between dermal structure and disposition of tacrolimus in skin after the topical application

研究代表者

関 俊暢 (SEKI TOSHINOBU)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：60196946

研究成果の概要(和文)：タクロリムスの皮膚適用後の皮膚内動態を解析する目的で、摘出皮膚薬物透過実験と新たに開発した人工膜積層皮膚モデル透過実験を行った。その結果、タクロリムスは角質層のバリアー機能が低下した皮膚においては水孔経路を介して移動すると考えられ、その経路はタイトジャンクションによって制御されていると考えられた。また、皮膚中での成分や漏出血漿タンパクとの結合がその移動速度に影響していることが示された。

研究成果の概要(英文)：In vitro permeation experiments using excised rat skin and new established skin models consisted of laminated artificial membranes were used to examine disposition of tacrolimus after the topical application. Tacrolimus permeated through the skin via aqueous channel in the damaged skin and the channel was controlled by tight junction structures. Skin components and leaching serum proteins influenced the transfer rate of tacrolimus in skin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：物理薬剤学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：タクロリムス、経皮吸収、動物実験代替法

1. 研究開始当初の背景

(1) タクロリムスは、免疫抑制剤であり、その軟膏がアトピー性皮膚炎の治療に使用されている。しかし、局所での作用のみを期待した製剤であるにも関わらず、悪性腫瘍の発生頻度の増加のような全身性の副作用が指摘され問題となっている。また、アトピー性皮膚炎が生じた皮膚は、角質層のバリアー機能が障害しており、組織間液の状態や血管透過性なども正常皮膚と大きく異なり、それらの変化とタクロリムスの経皮吸収動態の関

係を明らかにする研究が必要である。

(2) 皮膚の薬物透過に関するバリアーの本体は最外層の角質層であり、その以下の生きた表皮や真皮の透過抵抗は無視可能であると考えられてきた。しかし、最近角質下の表皮に他の上皮組織と同様タイトジャンクション構造が存在することが示され、その薬物透過への影響について興味を持たれている。角質層の薬物透過バリアー機能を修飾し、そこでこの薬物透過性を高める研究は多くあり、

これまで多くの成果が得られているので、角質層下の生きた表皮と真皮の薬物透過性に関する研究の重要性は増している。

(3) 動物愛護の観点から、動物実験代替法に関する検討が行われており、経皮吸収の研究においても適切な代替法の活用が期待されている。しかし、薬物の皮膚内動態の評価が可能なような動物実験代替法はまだ確立されていない。これは、上述の通り、薬物の経皮吸収速度が最外層の死んだ細胞の層である角質層の透過性で決定されると考えられてきたことと関係し、動物実験代替法に用いる膜として、単純な脂溶性膜であるシリコン膜などが利用されてきている。しかし、炎症を生じた組織などを模倣できる動物実験代替法とするためには、より複雑な構造を持つ膜の開発が必要となる。

2. 研究の目的

(1) タクロリムスの皮膚適用後の皮膚内動態とそれに及ぼす影響要因を明らかにし、より安全で有効な薬物治療を提供するための基礎情報を得る。特に生きた表皮に存在するタイトジャンクション構造との関係に着目し、皮膚内の拡散過程をより定量的に解析するとともに、タイトジャンクションのバリアーとしての寄与を明確にする。また、拡散の過程での皮膚組織成分との結合についても検討する。さらに、炎症が生じ、血管透過性の亢進や血漿タンパク質の漏出が生じた皮膚における皮膚内動態の変化について詳細に検討する。

(2) 上記目的を達成するための方法論として、新たに薬物の皮膚内動態の解析に利用可能な人工材料からなる動物実験代替実験法を構築する。この動物実験代替実験法においては、角質層下の組織における血漿タンパク質の漏出なども再現し、その薬物皮膚内動態への影響について明らかにする。得られた情報は、将来の使用実験動物数の抑制に寄与するものと期待できる。

3. 研究の方法

(1) 人工膜積層皮膚モデル実験： 角質層のモデルとしてシリコン膜を、角質層下の生きた表皮および真皮のモデルとしてセルロース透析膜を選択し、それらを積層して人工膜積層皮膚モデルを作成した。予備的検討として、モデル薬物としてフルルビプロフェン(FP)を用い、膜透過速度と膜中濃度の関係について検討を行った。膜中濃度の測定には、膜間にマイクロダイアリス(MD)のプロローブを挿入し、定量的MD法を利用して行った。また、炎症時の血漿タンパク質の漏出の模倣を目的として、セルロース透析膜の間に各種

タンパク質の溶液を設置して、薬物の膜透過と膜中濃度への影響について検討した。タクロリムスにおいても同様な実験を行って、透過過程に及ぼすタンパク結合の影響を評価した。

(2) ヘアレスラット摘出皮膚透過実験： 皮膚の構造と薬物透過性の関係を明らかにするため、ヘアレスラットの腹部および背部の摘出皮膚を用いた。皮膚角質層のバリアーとしての役割を明らかにするため、角質層をセロハンテープで取り除いたストリップドスキンを作成した。生きた表皮の細胞間のタイトジャンクションのバリアー機能を評価するため、種々分子量を有する非代謝性の糖類(エリスリトール～イヌリン)を同時適用し、Renkin式に結果を当てはめることで、細胞間の間隙の大きさを評価した。さらに、タクロリムスの透過プロファイルと糖類のそれを比較することで、タクロリムスの皮膚内透過経路と透過過程における皮膚内成分との相互作用について評価した。

4. 研究成果

(1) 人工膜積層皮膚モデル実験

① 人工膜積層皮膚モデルから得られる結果の定量性についてFPを用いて検討した。用いたシリコン膜および透析膜の1枚の透過係数から、シリコン膜1枚の下に透析膜を4枚重ねた積層膜の透過係数を計算したところ、実測値とよく一致した。また、4枚の透析膜の中央部へのMDプロローブの設置、すなわち2枚ずつの透析膜でMDプロローブを挟み、それにシリコン膜を1枚重ねた系で、膜間の薬物濃度を測定した結果、その膜間濃度は薬物の受容側への透過速度と透析膜の透過係数からFickの拡散理論を用いて予測した値とよく一致した。これらの結果から、本人工膜積層皮膚モデルは、薬物の皮膚内動態に及ぼす影響を再現し、それを定量的に解析するためのモデルとして有効であると考えられた。

② 人工膜積層皮膚モデルを用いて、膜間漏出タンパク質の薬物透過挙動への影響を評価した。シリコン膜化に設置されたMDプロローブを挟む2枚ずつの透析膜の間、すなわちシリコン膜とMDプロローブの間の2枚の透析膜の間もしくはMDプロローブ下の2枚の透析膜の間にウシ血清アルブミン(BSA)の溶液を設置し、FP透過実験を行った。その結果、BSA溶液の設置により、透過が定常状態に達するまでの時間の遅れが観察されたが、定常状態の透過速度は未設置の場合と大きな変化はなく、透過プロファイルにBSA溶液設置位置の影響は認められなかった。しかし、膜中濃度の推移はBSA溶液の設置位置で大きく異なり、炎症の発生深度による皮

膚内薬物動態の違いが示唆された(図 1)。

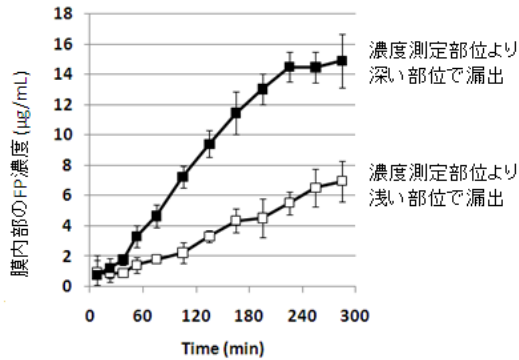


図1 人工膜積層皮膚モデルにおける血漿タンパク質漏出の再現: 漏出部位の違いによる膜内薬物濃度推移の変化。漏出のモデルとして、1% BSA溶液20μLを膜間に添加

さらに、タンパク結合を置換するケトプロフェンを MD プローブを介して膜間に送り込んだ条件で同様な検討を行った結果、BSA 溶液を膜間に設置した影響が消失した。これは、ケトプロフェンが BSA と結合することで FP の結合が阻害されたことによると考えられ、皮膚内でも生じる可能性がある複雑なプロセスにおける薬物相互作用を再現可能であることが示された。

③ 人工膜積層皮膚モデルを用いて、タクロリムスの膜透過過程におけるタンパク結合の影響を評価した。タクロリムスは、正常な皮膚からはほとんど吸収されず、損傷した皮膚のみで吸収が観察されるので、膜質層のモデルであるシリコン膜を取り除いた透析膜のみを積層した皮膚モデルで実験を行った。タクロリムスは、血漿中でもっとも多いアルブミンに対しては結合性はそれほど高くなく、 $\alpha 1$ -酸性糖タンパクに対して結合性が高いことが知られているので、透過過程におけるそれらの影響を比較した。その結果を図 2 に示す。

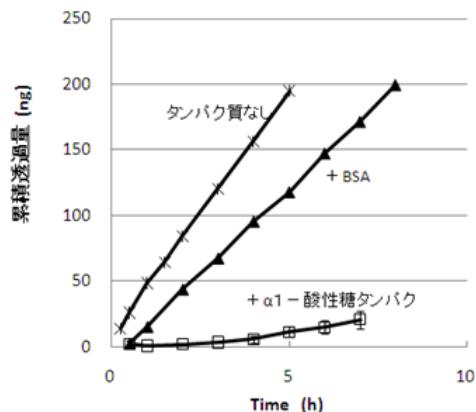


図2 人工膜積層皮膚モデルを用いたタクロリムスの膜透過に及ぼす膜内共存タンパク質の影響の評価

BSA 溶液(1%, 20 μ L)の設置では、透過速度にわずかな減少が観察されただけであった

のに対し、 $\alpha 1$ -酸性糖タンパク(1%, 20 μ L)の設置では、タクロリムスの透過が抑制され、タンパク結合性の違いを反映した結果が得られた。

(2) 摘出ヘアレスラット皮膚透過実験

① タクロリムスの透過に対する皮膚バリア一部分の検討を行った。すなわち、厚さの異なる腹部、側腹部、背部の皮膚の定常状態透過速度を比較することで、真皮の透過抵抗を明らかとした。また、角質層をセロハンテープで取り除いたストリップドスキンの透過速度を比較することで、角質層の透過バリア機能を評価した。その結果、定常状態のタクロリムスの透過速度には部位の違いがほとんどなく、真皮層は透過のバリアーとして重要ではないと考えられた。角質層を取り除いたストリップドスキンでは、定常状態での透過速度が 10 倍以上上昇し、正常皮膚では角質層が透過バリアーの主体であると考えられた。しかし、タクロリムスがアトピー性皮膚炎が生じた損傷皮膚に適用されることを考えると、正常皮膚を用いて検討するのは適当でないと考えられ、以後の実験では角質層を取り除いたストリップドスキンを用いることとした。

② 角質層を取り除いたストリップドスキンにおいては、生きた表皮の細胞層が透過バリアーの本体となると考えられ、そこに存在するタイトジャンクションの役割に興味を持たれる。そこで、上皮細胞単層膜の透過性評価にも用いられている Renkin 式の適用を試みた(式 1)。

$$f\left(\frac{r}{R}\right) = \left(1 - \left(\frac{r}{R}\right)\right)^2 \left[1 - 2.104\left(\frac{r}{R}\right) + 2.09\left(\frac{r}{R}\right)^3 - 0.95\left(\frac{r}{R}\right)^5\right] \quad (1)$$

Renkin 式は、円柱形の透過経路に適用される式であるが、薬物の拡散係数から計算される分子半径 r と透過係数の関係の評価することで、仮想的な透過経路の半径 R を計算できる。さらに、下記のような分子量 MW と拡散係数 D の間の関係(式 2)を利用することで、分子量と透過係数の関係をシミュレートすることも可能となる。

$$\log D_i = -0.4145 \cdot \log MW - 4.111 \quad (2)$$

ストリップドスキンにおける透過経路の半径を決定するため、非代謝性の糖アルコールおよびオリゴ糖、さらにインスリンを用いて先ず透過実験を行った。その結果、半径 10 nm と 0.4 nm の 2 種類のサイズの透過経路の存在が示された。この小さいほうの透過経路の半径は、消化管粘膜やそのモデルとして汎用されている Caco-2 細胞単層膜、気道上皮のモデルである Calu-3 細胞単層膜などで報告されている半径とほぼ等しく、角質層下の生きた表皮においてもタイトジャンクションが透過のバリアーとして機能していることが強く支持された。用いた糖類の分子量と透

過係数の間の関係のシミュレーションカーブを図3に示す。

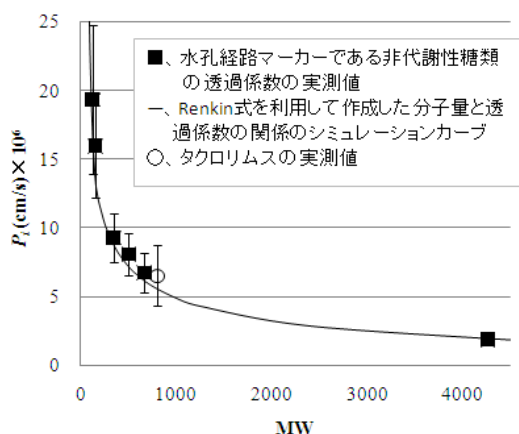


図3 ラットストリップドスキン(損傷皮膚)の透過性: 非代謝性糖類とタクロリムスの比較

③ タクロリムスの透過係数の値を前項のシミュレーションカーブにプロットすることで、タクロリムスの生きた表皮および真皮における透過経路の推定を行った。もし、タクロリムスが皮膚内で代謝されないのであれば、分子量から先の予測曲線で得られる予測上の透過係数値が、期待される最低値であり、その値が実測値と等しければ、タクロリムスは細胞間隙経路のみを通過して透過すると推察できる。一方、細胞内を通過するトランスセルラーの経路もタクロリムスが利用する場合、透過係数の実測値はその分加算されると期待できる。タクロリムスの透過係数の実測値と予測値の比較を図3に示す。タクロリムスの透過係数の実測値は予測値とよく一致しており、タクロリムスは細胞間隙経路のみを通過して透過すると推察された。

④ タクロリムスが他の細胞間隙透過マーカーと同じ経路を通過して透過している場合、その透過に関するラグタイム(LT)は、その拡散係数に依存し、 $LT=L^2/6D$ の関係で表せると考えられる。ここでLはバリアー層の有効距離であり、透過経路が等しい場合には同じ値となる。例えば、ニストースとタクロリムスは、その分子量がほぼ等しいので、共に細胞間隙経路のみを通過するとすると、LTも同等になると期待できる。そこで、ストリップドスキン透過におけるLTをニストースとタクロリムスで比較した(図4)。その結果、タクロリムスのLTは、ニストースの約2.5倍であり、タクロリムスのLTが異常に長いことが明らかとなった。このような、定常状態での透過速度が同等で、LTのみ延長する現象は、前出の人工膜積層皮膚モデルを用いた膜間漏出タンパク質の薬物透過挙動への影響を評価した実験でも観察されており、タクロリムスが皮膚内成分と結合することがその理由であると考えられる。この結果は、

炎症部位を含めたタクロリムスの皮膚内挙動を理解する上で、非常に重要な知見であると考えられる。

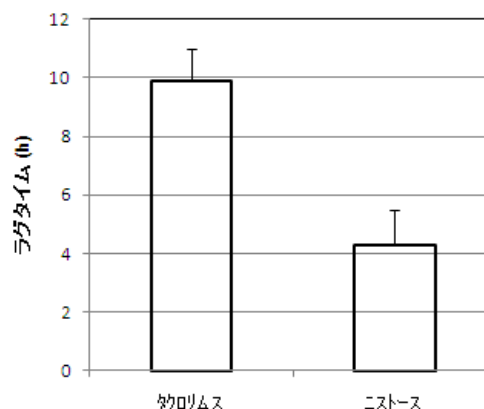


図4 タクロリムスとニストースのストリップドスキン透過におけるラグタイムの比較

これまでの一連の研究成果は、何れも新規でかつ有用性が高い知見であり、今後さらに研究を進めることで、タクロリムスの安全かつ有効な皮膚適用が可能となるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① S. Oshima, T. Sashida, Y. Egawa, O. Hosoya, K. Juni, T. Seki, Study of a drug interaction involving the permeation process using an artificial skin model as an alternative to animal skin, *AATEX*, 査読有, Vol.15, No.2, 2010, 97-105
- ② T. Seki, T. Kiuchi, H. Seto, S. Kimura, Y. Egawa, H. Ueda, Y. Morimoto, Analysis of the rat skin permeation of hydrophilic compounds using the Renkin function, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, Vol.33, No.11, 2010, 1915-1918
- ③ T. Seki, T. Sashida, S. Oshima, Y. Egawa, H. Nakagawa, O. Hosoya, K. Juni, Novel experimental system as an alternative to animal experiments to study the skin permeation of drugs, *AATEX*, 査読有 Vol.14, No.2, 2009, 887-897

[学会発表] (計9件)

- ① 木内貴章、関 俊暢、瀬戸宏樹、上田秀雄、江川祐哉、木村聡一郎、森本雍憲、皮膚における水孔経路を介する高分子薬物の吸収性の評価のための実験系に関する検討、日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡

- ② 鈴木千尋、佐藤鷹也、江川祐哉、大島新司、細谷 治、從二和彦、関 俊暢、人工膜積層とマイクロダイアリシスを組み合わせた皮膚モデル実験系の評価、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 29 日、静岡
- ③ 佐藤鷹也、鈴木千尋、木内貴章、江川祐哉、大島新司、細谷 治、從二和彦、関 俊暢、皮膚内におけるタクロリムスの移動動態に関する基礎的研究、2011 年 3 月 29 日、静岡
- ④ 鈴木千尋、指田達也、大島新司、江川祐哉、從二和彦、関 俊暢、薬物皮膚適用後の皮膚内動態解析のためのマイクロダイアリシスの利用、第 21 回マイクロダイアリシス研究会、2010 年 12 月 11 日、昭和女子大学
- ⑤ 指田達也、大島新司、江川祐哉、細谷 治、関 俊暢、從二和彦、膜積層型皮膚モデルを用いた薬物透過に対するアルブミンの影響評価、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山
- ⑥ 木内貴章、関 俊暢、上田秀雄、江川祐哉、中川弘子、木村聡一郎、森本雍憲、多孔膜の薬物透過性の評価のための実験系に関する検討、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山
- ⑦ 関 俊暢、拡散を考慮した皮膚透過促進の解析、日本薬剤学会経皮投与製剤 FG ミニシンポジウム、2009 年 11 月 26 日、汐留
- ⑧ 木内貴章、関 俊暢、上田秀雄、江川祐哉、中川弘子、木村聡一郎、森本雍憲、コロナ荷電化粒子検出器 (CAD) を用いた糖類の同時定量法の検討および膜透過性評価への適用、第 53 回日本薬学会関東支部大会、2009 年 10 月 3 日、坂戸
- ⑨ 指田達也、大島新司、江川祐哉、細谷 治、関 俊暢、從二和彦、人工膜の積層による人工皮膚モデルの作成と皮膚内薬物動態変動要因の解析、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 俊暢 (SEKI TOSHINOBU)
城西大学・薬学部薬学科・教授
研究者番号：60196946

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

江川 祐哉 (EGAWA YUYA)
城西大学・薬学部薬学科・助教
研究者番号：90400267