

令和元年6月20日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15523

研究課題名（和文）新たな褥瘡治療の概念の構築-外用剤、基剤および添加剤の及ぼす影響の解明-

研究課題名（英文）Construction of novel concept of ulcer treatment -Elucidation of the effects of topical product, ointment base and excipient-

研究代表者

笹津 備尚（Masanaho, Sasatsu）

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60421210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、創傷面の滲出液に対して外用剤そのものや基剤および添加剤が有する吸水特性や吸水した水の状態などを解明し、さらにはそれらが滲出液に含まれるタンパク質等に及ぼす影響の解明を試みた。

その結果、同じ分類で定義されたいた外用剤でも、水とのかかわり方やタンパク質に及ぼす影響に違いがあることが明らかとなった。

今後、臨床との比較により、外用剤の適用に関して再評価が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外用剤の褥瘡治療において、薬効成分だけでなくその基剤や添加剤の有する特性を把握し、適切に適応することが治療時間を短縮するのに大きく影響すると考えられている。しかしながら、科学的エビデンスが示されていないことも多い。本研究は明らかとなった外用剤が有する吸水特性やその水の状態、治癒に関わる蛋白質への影響の違いから、同じ分類の外用剤でも有している特性に違いがあることが明らかとなった。今回得られた知見を実臨床と比較検討することで、より外用剤を適応することによる褥瘡治療が適正に行われ、患者のQOL向上のみならず医療費の削減などにつながると考えられる。

研究成果の概要（英文）： In this study, we tried to show the water absorption of the external preparation and its base or additives to the exudate on the wound surface and the state of the water absorbed. Furthermore, we tried to elucidate the effect of them on proteins contained in the exudate.

As a result, it has been revealed that there is a difference in the interaction with water and the effect on proteins even for external preparations defined in the same classification. Thus, it will be necessary to re-evaluate the application of external preparations in comparison with clinical practice.

研究分野：医療薬剤学

キーワード：褥瘡治療 外用剤 基剤 外用剤 水

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

### 1. 研究開始当初の背景

褥瘡は、身体部位が床に接することで自重により持続的に圧迫されることによって生じる虚血性皮膚壊死のことである。近年、在宅での褥瘡治療が行われる機会も増えており、規模に関係なく褥瘡のケアや治療は QOL の観点からみても社会的に大きな課題となっている。褥瘡治療において、Moist wound healing (湿潤環境下療法)の考え方が重要であるとされ、創傷面の湿潤環境を保つために適切な外用剤やドレッシング剤の選択が治療期間を短縮する重要な鍵となる。特に外用剤においては、製剤に含有する薬効成分のみならず、基剤や添加剤が褥瘡面の滲出液等に大きく影響すると近年考えられるようになってきた。しかし、外用剤による褥瘡治療は日本独特のものが多く、基剤や添加剤が創傷面に及ぼす影響に関して学術的なエビデンスが乏しいという現状もある。

申請者はこれまで、褥瘡治療製剤の開発をテーマに研究を進めてきた。その中で、基剤および添加剤の配合比率などを変化させることで、創傷面の治療効果に影響を与えることを見出した。そこで、現在褥瘡治療に用いられている外用剤の基剤および添加剤には、創傷治療に関わる滲出液、すなわち「水」の制御と創傷治療に関連したタンパク質に対して影響を及ぼすのではないかという着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、褥瘡治療に重要な役割を持つ滲出液に対して外用剤が有する「水」に及ぼす影響、すなわち吸水特性や外用剤が吸水した水の状態などを解明し、さらに創傷治療に関係するタンパク質等に及ぼす影響の解明に焦点を当てた。また、得られた結果を評価することで、経験的に行っている褥瘡治療に対する新たな知見や概念を構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 吸水試験による外用剤および基剤・添加剤の吸水特性の解明

2 つの異なる吸水試験法を用いて、一般的に使用されている外用剤と基剤および添加剤の吸水能を比較検討した。吸水試験法として、吸水試験法 I: Nakamura の方法 (Int. J. Pharm., 134, 1996, 173-181) 吸水試験法 II: Nada の方法 (Int J Pharm. 394, 2010, 85-91) を用いて比較した。なお、本検討において外用剤として、水溶性基剤に分類されヨード系化合物を含有するヨードコート®軟膏 0.9%(YO)、ユーパスタコーワ軟膏(U)、カデックス軟膏(CA)、O/W 型乳剤性基剤であるオルセノン®軟膏(OR)、ゲーベン®クリーム(GE)を選択し評価した

#### (2) 核磁気共鳴画像法(MRI)による外用剤の水の状態の違いおよび吸水特性の解明

MRI を用いて T2 緩和時間画像を撮像し、画像から MR パラメータ(T2 緩和時間)を求め、水の分子運動を可視化した(Chem. Pharm. Bull. 63, 2015, 457-462)。なお、これらは製剤中の水分子運動性を表わすパラメータとして使用した。この解析結果より、水分子の状態変化を非侵襲的に評価した。

#### (3) 外用剤が蛋白に及ぼす影響の解明

外用剤が褥瘡治療に関係するタンパク質に及ぼす影響を解明するために、水に関係するタンパク質であるアクアポリン 3(AQP3)に標的を定め検討を行った。ヒト表皮角化細胞を用い、培養した細胞に外用剤を添加することで、mRNA の発現量に影響を及ぼすか評価した。また、AQP3 以外のタンパク質として、褥瘡早期の治療効果に関係する炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(TNA- $\alpha$ )、上皮成長因子(EGF)についても評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 吸水試験による外用剤および基剤・添加剤の吸水特性の解明

外用剤の吸水特性の違いを、2 つの吸水試験法を用いて評価した。吸水試験法の特徴として、吸水試験法 I は受動的吸水能を、吸水試験法 II は能動的吸水能の評価に適している。受動的吸水能とは滲出液を創面に保持し乾燥などを防ぐ力であり、能動的吸水能は浸透圧などにより創面の組織内部より水を吸水し創面の乾燥の促進や浮腫を防ぐ力とされている。水溶性基剤の外用剤である YO、U、CA を比較した(図 1)。

吸水試験法 I より YO は受動的吸水能が高く、一方吸水試験法 II より U は能動的吸水能が高いことが示された。比較した外用剤はともにヨード系化合物を含有する外用剤であることから、結果の違いは主薬によるものではなく、外用剤を成

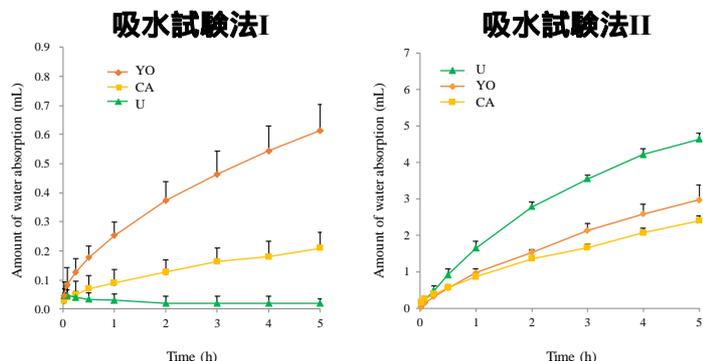


図 1 水溶性基剤外用剤の吸水試験法による評価

(mean  $\pm$  S.D., n = 3)

形する基剤の違いからくるものであると考えられる。これまでの外用剤の考え方からすると、主薬以外の外用剤を成形するためのものは全て「基剤」としていた。しかしながら、添加するものが異なれば、その特性に違いが出ることは明確である。YO、U、CAはともにマクロゴールを含有した外用剤であるが、各々が持つ吸水性は異なっている。そこで、YO、U、CAに含有されている添加剤に関して、吸水試験による評価を行った。各外用剤は、マクロゴールの他に、YOは水溶性高分子のカルボキシメチルセルロース(CMC)、Uは白糖、CAはポリマービーズが主な添加剤となる。従って、マクロゴール軟膏とそれぞれの添加剤の比較をした。

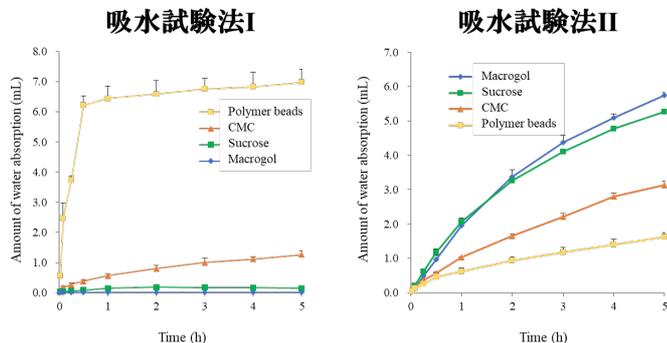


図2 添加剤の吸水試験法による評価

(mean ± S.D., n = 3)

なお、ポリマービーズとしてカデックス散を用いた。その結果、CMCおよびポリマービーズは水分保持能が高く、白糖は浸透圧による吸水能の高いこと示された(図2)。また、マクロゴール軟膏は高い能動的吸水能を示した。各添加剤の結果はマクロゴールと吸水能が異なる結果となったため、各々の添加剤が吸水に対して機能的な役割に違いがあると考えた。そこで、軟膏基剤に添加することで特定の機能を追加もしくは増強することのできる添加剤を「機能性添加剤」として定義した。これら機能性添加剤の特性を理解することで、外用剤の性質を知ることや機能の違いを添加剤を組み合わせることで両者の性質をもつ外用剤が得られると考えられる。

添加剤が吸水など外用剤の特性に影響を与えることが明らかとなったことから、より多くの添加剤で構成されている乳剤性基剤の外用剤であるORとGEの吸水特性を検討した。その結果、ORは能動的吸水能が高く、GEは受動的吸水能が高いことが示された(図3)。ORとGEの含水率は70%前後と高いO/W型乳剤性基剤の外用剤である。その高い含水率のため、臨床では乾燥した創面に対して補水を目的として使用することがあり、同じO/W型乳剤性基剤という理由からORとGEは区別なく使用されることがある。しかしながら、結果からORとGEは吸水特性に違いあり、外用剤と水との関係性は異なっていることが示された。

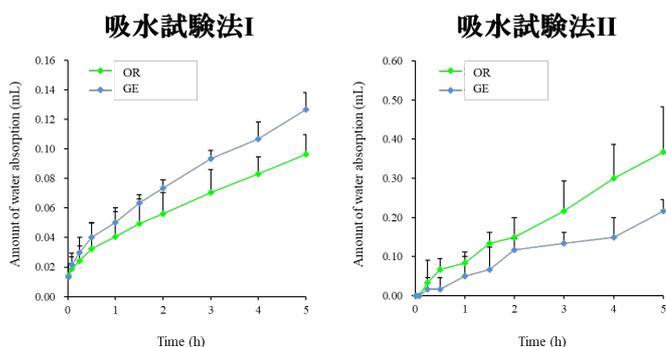


図3 O/W型乳剤性基剤外用剤の吸水試験法による評価

(mean ± S.D., n = 3)

## (2) 核磁気共鳴画像法(MRI)による外用剤の水の状態の違いおよび吸水特性の解明

MRIにより外用剤のT2緩和時間画像(T2マップ)を撮像し、その画像からMRパラメータ(T2緩和時間)を求め、水の分子運動を可視化した(図4、5)。結果より、外用剤中の水分子の状態に

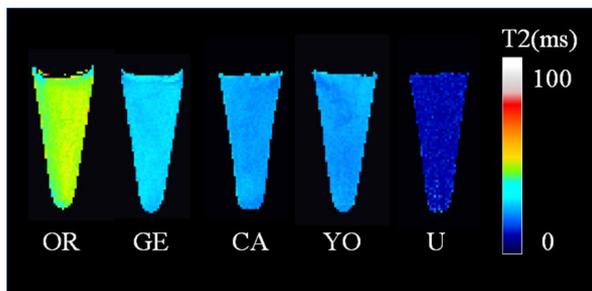


図4 T2 mapによる、外用剤の比較

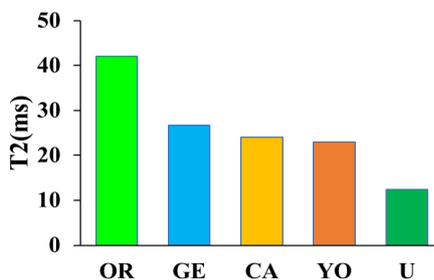


図5 外用剤のT2緩和時間

違いがあることが認められた。T2 緩和時間は水分子と周りの分子の相互作用の強さが反映され、T2 緩和時間が低値であれば、分子同士の相互作用が強いことを示している。検討した外用剤の中で、OR と GE が顕著な差が示された。OR と GE はともに含水率が 70% 前後の O/W 型乳剤性基剤の外用剤であるが、OR 中水分子の方が周囲の分子と相互作用が少ないことが考えられる。

次に、外用剤に精製水を添加し、外用剤への水の浸透を非侵襲的に画像化した。水溶性基剤である CA、YO、U を比較した結果を示した(図 6)。外用剤との間に明確な界面を示し、界面より上部の相で違いが認められた。この違いは、水と接触後の外用剤の状態を表している。CA は水との接触によりポリマービーズが水を吸水し外用剤の膨潤を示し、YO は CMC などにより外用剤のゲル化を示しているものと考えられる。画像やパラメータより CA および YO は膨潤相もしくはゲル相が水を保持しているものと考えられる。一方 U はマクロゴールと白糖からなり、水との接触により溶解してしまう。画像にも外用剤の溶解が反映され、溶解により添加した精製水相の T2 緩和時間が全体的に低下していることが示された。次に O/W 型乳剤性基剤の外用剤である OR と GE を比較した(図 7)。外用剤と添加した精製水との界面の位置が、時間が経過しても大きく変化しないことが示された。さらに、界面より外用剤側に変化が認められ、MR パラメータより値が時間経過に伴い連続的な低下を示した。これは精製水が外用剤中に浸透しているためと考えられる。さらに MR パラメータより、OR に比べ GE の方がより水が浸透している結果となった。水の浸透の違いに関し詳細な検討が必要であるが、添加した水分子と添加剤などの相互作用が関係している可能性が高いと考えられる。添加した水分子と添加剤の相互作用が高ければ、水分子の拡散が抑えられ、外用剤内部まで浸透しない可能性が示唆された。

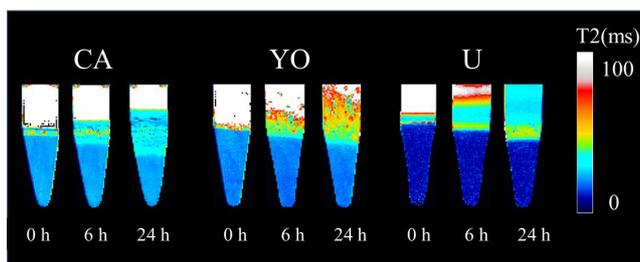


図 6 T2 map による、水溶性外用剤中への水の浸透に関する比較

画像やパラメータより CA および YO は膨潤相もしくはゲル相が水を保持しているものと考えられる。一方 U はマクロゴールと白糖からなり、水との接触により溶解してしまう。画像にも外用剤の溶解が反映され、溶解により添加した精製水相の T2 緩和時間が全体的に低下していることが示された。次に O/W 型乳剤性基剤の外用剤である OR と GE を比較した(図 7)。外用剤と添加した精製水との界面の位置が、時間が経過しても大きく変化しないことが示された。さらに、界面より外用剤側に変化が認められ、MR パラメータより値が時間経過に伴い連続的な低下を示した。これは精製水が外用剤中に浸透しているためと考えられる。さらに MR パラメータより、OR に比べ GE の方がより水が浸透している結果となった。水の浸透の違いに関し詳細な検討が必要であるが、添加した水分子と添加剤などの相互作用が関係している可能性が高いと考えられる。添加した水分子と添加剤の相互作用が高ければ、水分子の拡散が抑えられ、外用剤内部まで浸透しない可能性が示唆された。

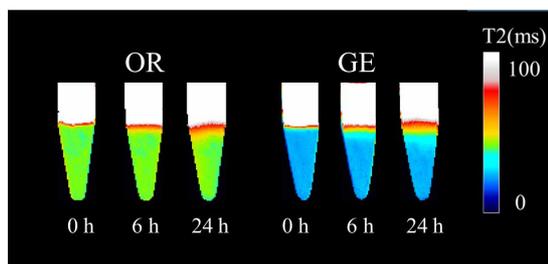


図 7 T2 map による乳剤性外用剤中への水の浸透に関する比較

### (3) 外用剤が蛋白に及ぼす影響の解明

外用剤が創傷治癒に関係するタンパク質に及ぼす影響を解明するために、ヒト表皮角化細胞を用いて mRNA の発現量について検討した。まず、AQP3 の mRNA 発現量に対する影響を確認したところ、OR、GE および YO において発現量の低下が認められた(図 8)。吸水試験法により明らかとなった吸水特性と特に相関性を示していないことから、外用剤が持つ受動的および能動的吸水能との関係は認められないと考えられる。mRNA の発現量に影響を及ぼした外用剤は、及ぼさなかったものに比べ多くの添加剤が含有している。それら添加剤の何れかが AQP3 の発現量低下に影響を及ぼした可能性が高いと考えられる。今後 mRNA だけでなく AQP3 のタンパク質発現量の確認や臨床の検討で得られた結果との比較などが必要となるが、外用剤の選択により創面の湿潤環境保持などに影響を与える可能性があることが示唆された。

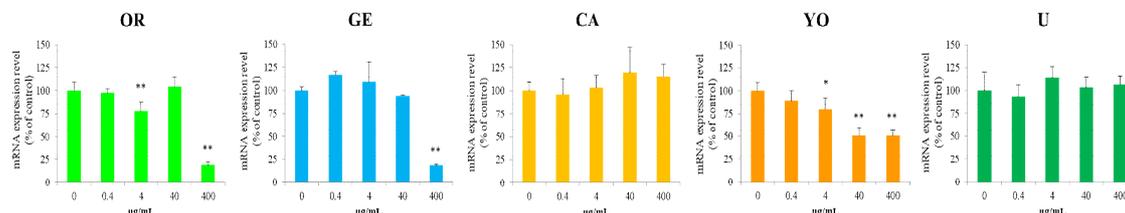


図 8 外用剤を添加した際の AQP3 の mRNA の発現量の変化

( mean  $\pm$  S.D., n = 4, Dunnett's test: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. Control. )

次に、外用剤が EGF の mRNA に及ぼす影響を確認した(図 9)。O/W 型乳剤性基剤の外用剤は EGF の mRNA の発現に影響を及ぼす可能性が有るものの、有意な差は示されなかった。また、

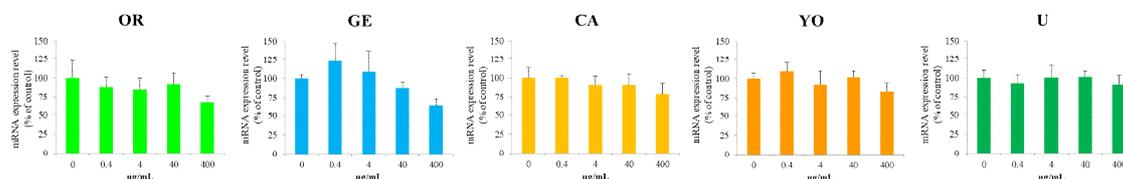


図 9 外用剤を添加した際の EGF の mRNA の発現量の変化

(mean ± S.D., n = 4, Dunnett's test: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. Control.)

TNF-α の mRNA に対する影響も確認した(図 10)。OR を 400 µg/mL 添加した細胞において TNF-α の mRNA の発現量が顕著に増大した。WST-1 法により細胞毒性を確認したところ OR の 400 µg/mL において、細胞生存率の減少が認められていた(data not shown)。その結果、TNF-α の発現量の増加につながったものと考えられる。

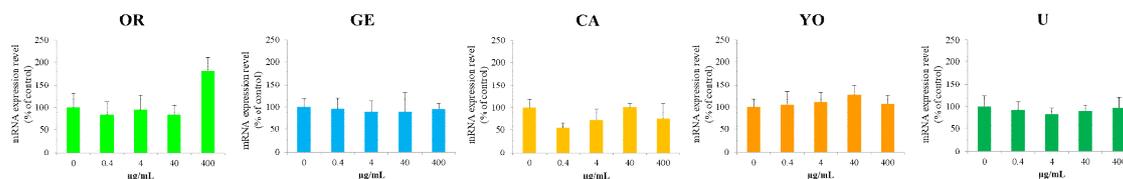


図 10 外用剤を添加した際の TNF-α の mRNA の発現量の変化

(mean ± S.D., n = 4, Dunnett's test: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. Control.)

本研究の結果より、同じ分類の外用剤でもその吸水特性に違いがあるものが存在することが明らかとなった。その違いは添加剤によるものが多く、外用剤に特定の機能を与える添加剤が存在する。その添加剤の機能を把握することが、外用剤を用いた褥瘡治療の効果を高めることにつながると考えられる。加えて、O/W 型乳剤性基剤の外用剤である OR の GE の吸水特性の違いが明らかとなった。これまで、OR と GE は同じ O/W 乳剤性基剤の外用剤として分類され、その機能は乾燥した創面に水を与える「補水」とされてきた。しかしながら明らかとなった吸水特性や水との関係性から OR と GE は同じものとは考えにくく、これまでの考え方に対して再評価が必要になると考えられる。さらに、外用剤によっては褥瘡面の治癒などに関わるタンパク質の mRNA の発現量に影響を及ぼすものがあることが確認された。今後、外用剤に用いられる添加剤の滲出液やタンパク質に及ぼす影響に関する更なるエビデンスの構築と、そのエビデンスを基本として臨床との比較を行うことで、外用剤に関する概念の再構築と適性使用の再評価が必要であると考えられる。

#### < 引用文献 >

- Fumihiko Nakamura, Ryoko Ohta, Yoshiharu Machida, Tsuneji Nagaic, Int. J. Pharm., 134, 1996, 173-181
- Yasuhiro Noda, Satoshi Fujii, Critical role of water diffusion into matrix in external use iodine preparations, Int J Pharm. 394, 2010, 85-91
- Yoshinori Onuki, Yoshiaki Machida, Takashi Yokawa, Chieko Seike, Shotaro Sakurai, Kozo Takayama, Magnetic Resonance Imaging Study on the Physical Stability of Menthol and Diphenhydramine Cream for the Treatment of Chronic Kidney Disease-Associated Pruritus, Chem. Pharm. Bull. 63, 2015, 457-462

#### 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

- 吉澤麗香、**笹津備尚**、関根祐介他、外用剤の新規評価 - O/W 型クリーム剤の違い - 、第一回皮膚褥瘡外用薬学会、2019年2月10日
- 笹津備尚**、外用薬の特性を活かした褥瘡治療 外用剤の新たな評価、第20回日本褥瘡学会学術集会、2018年9月28-29日
- 月江 瑛莉子、**笹津 備尚**、中ノ瀬 千尋他、MRI を用いた褥瘡治療用外用剤の新たな評価法、日本薬学会第138年会 金沢 2018年3月25-28日
- 笹津 備尚**、横川 雅光、大貫 義則、関根 祐介、入澤 亮吉、坪井 良治、輪千 浩史、外用剤の MRI を用いた吸水特性の評価、第19回日本褥瘡学会学術集会、2017年、9月14日-15日