

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590197

研究課題名(和文)ハイブリッド型人工皮膚モデルの構築とそれを用いたタクロリムスの皮膚内動態の解析

研究課題名(英文)Studies on disposition of tacrolimus after topical application using several experimental models including a new hybrid skin-model

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：ハイブリッド型皮膚モデルを含めた各種実験モデルを用いて、皮膚適用後のタクロリムスの吸収動態に影響する要因を調査した。角質層のバリア機能に依存したタクロリムスの全身吸収が、ヘアレスラットのモデルとこの新しいハイブリッド型モデルで示された。経表皮水分蒸散量を前もって測定することがこの全身移行を回避するのに有効である。炎症皮膚において、真皮に漏出した血清タンパク質への結合がタクロリムスの全身移行の遅延を引き起こすが、血流の増加や血管透過性の上昇は、血中濃度が上昇する原因となることが示された。本研究の結果は、タクロリムス軟膏によるアトピー性皮膚炎の安全な治療に有用な情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined factors affecting disposition of tacrolimus after topical application using several experimental models including a new hybrid skin-model. Systemic absorption of tacrolimus depended on the barrier function of stratum corneum was shown in hairless rat model and the new hybrid skin-model. Trans Epidermal Water Loss (TEWL) was correlated with the systemic absorption of tacrolimus and it was suggested that preliminary determination of TEWL is useful to avoid the systemic side effect. In inflamed skin, although delayed absorption was caused by tacrolimus binding to leaching plasma proteins in the dermis, increased blood flow and blood vessel permeability in the inflamed skin can be related with high blood concentration of tacrolimus in the later phase. The results obtained in this study can be applicable for safe medication of atopic dermatitis using tacrolimus ointment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態 代謝学 経皮吸収

1. 研究開始当初の背景

タクロリムスは、その皮膚適用によるアトピー性皮膚炎の治療を目的として、プロトピック軟膏として、0.1%の成人用と0.03%の小児用が開発されており、高い効果が確認されている。しかし一方で、その使用により、皮膚がんのリスクが増加するだけでなく、全身性の悪性腫瘍や悪性リンパ腫の発生頻度が増加するとの指摘もあり、その安易な使用を批判する声もある。プロトピック軟膏の開発コンセプトは、タクロリムスを皮膚局所に適用することで、全身への吸収を回避し、全身性の副作用を防ぐ、というものであるが、実際の症例では、全身への吸収もかなりの程度生じていると推察できる。タクロリムスは、その比較的大きな分子量から、正常な皮膚からはほとんど吸収されないと考えられており、バリア機能が低下した炎症を伴う皮膚において適用される。炎症を伴った皮膚では、表皮の有するバリア機能だけでなく血流や血管の物質透過性の変化、各種サイトカインの放出など生理的状態は多様であり、それらとタクロリムスの皮膚内動態の関係は、種々実験系を組み合わせ、詳細に検討されるべきである。

2. 研究の目的

本研究代表者は、経皮吸収研究に関して多くの経験を有し、皮膚内薬物動態の解析のための独自の実験方法をいくつか開発している。また、動物実験代替法としての人工膜皮膚モデルについても最近研究を行い、多くの成果を得ている。本研究は、これらの実験・解析法に加え、新たにハイブリット型の人工皮膚モデルを開発してそれも用いる。このモデルは、表皮部分は培養したケラチノサイトからなり、真皮部分は積層したセルロース透析膜とマイクロダイアリスのプロープからなる。これを含めた種々実験モデルによりタクロリムスの炎症皮膚適用後の動態に及ぼす影響を解析していき、その知見に基づいてタクロリムスによるアトピー性皮膚炎の治療の適正化に有効な情報を提供する。

3. 研究の方法

ハイブリット型の人工皮膚モデルは、ヒト由来ケラチノサイトを培養し、さらにコラーゲンコート膜上でエアインターフェース状態にて培養を続けることで分化を促した。

角質層のバリア機能が低下したモデルとして、ヘアレスラットの角質層を部分的に除去したモデルを用いた。角質層のバリア機能の評価には、経表皮水分蒸散量(TEWL)を用いた。

炎症による皮膚内の変化に関するモデルとしては、起炎剤を皮膚内に投与する急性炎症モデル、及びヘアレスラットにおいて高頻度で生じる自然発症の皮膚炎モデルを用いた。

結果の解析は、血中濃度からデコンボリュ

ーションにより計算される吸収速度の値、及びマイクロダイアリスにより求めた皮膚組織中タクロリムス濃度の値と、皮膚の炎症を表わす各種指標との関係を考察していくことを行った。

皮膚中に漏出する血漿タンパク質を分析するため、高分子の回収が可能なマイクロダイアリスのプロープを用いて、起炎剤投与皮膚内を灌流し、その成分を SDS-PAGE により分析した。また、浮腫の確認にはエバンスブルーを用いた。

4. 研究成果

4-1 皮膚角質層のバリア能とタクロリムス全身移行の関係

タクロリムス軟膏をヘアレスラット背部皮膚(正常皮膚と角質層を除去した皮膚)に適用し、血中濃度を比較した(図1)。その結果、角質層除去により血中濃度は上昇し、角質層がバリアとして機能していることが示された。タクロリムスは、正常な皮膚からは吸収されないといわれているが、正常皮膚における角質層の健全性が、タクロリムスの吸収を阻止していると考えられる。

軟膏適用後の血中 TL 濃度推移

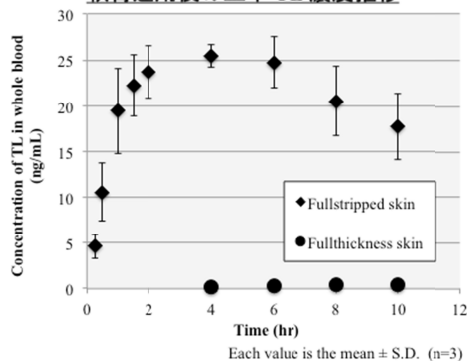


図1 タクロリムス(TL)ヘアレスラット適用後の血中濃度(角質層除去の影響)

アトピー性皮膚炎患者における角質層のバリア機能は、その病態により様々であり、そのことは、患者ごとに全身に移行してしまうタクロリムスの量も様々に変化してしまうことを意味する。このことから、安全な薬物治療のためには、患者の病態に関係する皮膚のバリア能を評価しながら治療を行うことが望ましい。

軟膏適用後 30 分の血中 TL 濃度と TEWL の関係

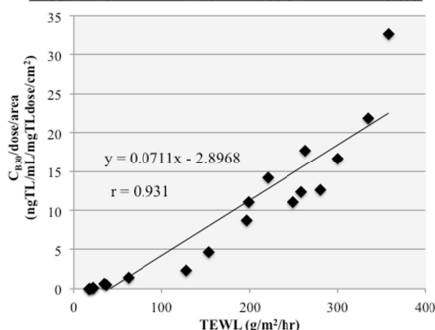


図2 タクロリムス(TL)軟膏適用後の血中濃度(30分値)とTEWL測定値の関係

患者の皮膚のバリア能を評価する方法に、TEWL の測定がある。そこで、タクロリムス軟膏適用 30 分後の血中濃度と、適用直前の TEWL 値の関係を評価した。TEWL の値、すなわち皮膚バリアの状態は、テープストリッピングの回数を調整することで多様な条件を再現した。図 2 にその結果を示す。TEWL 値と血中濃度の間には直線関係で表わされる正の相関が存在し、このことから、患者の TEWL 値を前もって測定することで患者個人のバリア能を予測でき、軟膏を希釈するなどの処理を行うことで、過剰な全身への移行を回避できるものと考えられる。この知見は、タクロリムスの安全な治療において、有用なものである。

4-2 皮膚組織内に漏出する血漿タンパク質のタクロリムス吸収への影響

タクロリムスは、血漿タンパク質、特に炎症時にその濃度が上昇することが知られている 1-酸性糖タンパク質 (AGP) と強く結合することが明らかとなっている。そこで、起炎剤の皮膚投与後の組織へのエバンスブルーの漏出と皮膚組織細胞外液中のタンパク質の分析を行った。起炎剤の投与により、組織へのエバンスブルーの漏出、すなわち血管透過性の亢進が確認され、組織液中における AGP の存在も確認された。

角質層を除去し、その影響を除いた皮膚において、タクロリムス軟膏を適用し、起炎剤による急性炎症の有無がタクロリムスの全身移行に及ぼす影響を評価した。その結果を図 3 に示す。結果は、デコンボリューション演算を実施して得た吸収速度の時間変化として示す。起炎剤を投与した群では、適用初期の吸収速度が遅く、1 時間後にはその速度は逆転している。この現象、特に初期の吸収速度の抑制は、タクロリムスが組織中に漏出したタンパク質と結合して、血流への移行が妨げられたことによると考えられる。

軟膏適用後の TL 吸収速度推移

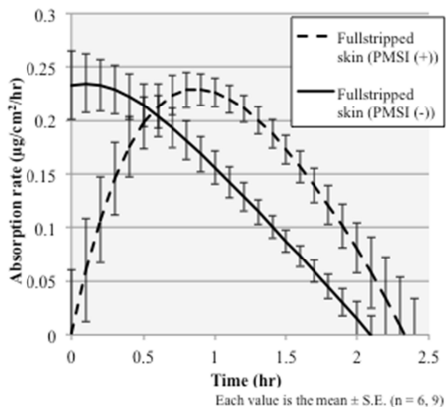


図 3 ヘアレスラットのストリップドスキンにタクロリムス軟膏 (0.003% に希釈して適用) を適用した場合の全身への吸収速度の時間変化 (起炎剤 PMSI 皮膚内投与の影響)

4-3 皮膚内循環の変化によるタクロリムスの全身移行への影響

上述のコンボリューションの結果から、適用初期の炎症皮膚におけるタクロリムス吸収の遅延は、組織中におけるタンパク質との結合によると考えられたが、炎症を有する皮膚では多様な変化が起こっており、それらとタクロリムスの全身移行との関係も調査する必要がある。特に、適用後 1 時間経過した後では吸収速度の逆転が生じており、吸収を高める要因も存在するものと考えられる。図 4 には、適用後 90 分後における血中タクロリムス濃度とタクロリムスの全身への吸収速度への起炎剤投与の影響を示す。起炎剤投与によりどちらも高い値を示しており、これらは、皮膚内の血流循環の変化に関係していると考えられる。

軟膏適用後 90 分の浮腫の有無による TL 血中濃度・吸収速度の比較

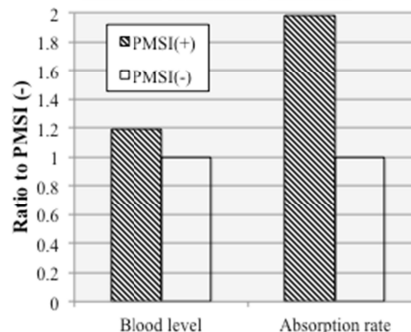


図 4 タクロリムス軟膏適用後の血中濃度及び吸収速度への起炎剤 (PMSI) 投与の影響 (投与条件は図 3 と同じ)

皮膚適用してある程度時間が経過した後のタクロリムスの炎症皮膚における高い全身移行は、炎症による血流速度の上昇が関係していることが推察できる。マイクロダイアリスのプローブを皮膚内に設置して測定した皮膚組織中タクロリムス濃度は、血中濃度より高く、組織中と血液中には吸収過程で濃度勾配が存在しており、血流の増加がこの濃度勾配をさらに高め、タクロリムスの吸収速度の上昇を引き起こすことが考えられる。

軟膏適用後 90 分における血中 TL 濃度と血流量の関係

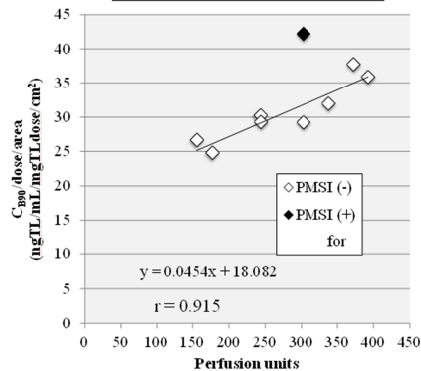


図 5 皮膚血流速度と皮膚適用 90 分後のタクロリムスの血中濃度の関係

図5は、ヘアレスラット背部ストリップドスキンにタクロリムス軟膏を適用した場合の90分後の血中濃度と適用直前における皮膚血流量の関係を示したものである。ほとんどのプロットは、起炎剤を投与していない皮膚での結果であり、血中濃度と血流速度の間に炎症の有無にかかわらず相関があることが示された。起炎剤を適用した1例の結果は、この相関の右上にプロットされており、このことから、起炎剤の投与は、血流の上昇とそれに伴うタクロリムスの全身移行の増加を引き起こすが、起炎剤投与と皮膚での高い血中濃度は、血流の増加だけでは説明できない。炎症による血管壁の透過性の向上自体がタクロリムスの全身移行性の上昇につながるものと考えられる。

4-4 まとめ

本研究では、新規に開発したハイブリット型皮膚モデルを含めた各種実験手技を用いて、タクロリムスの皮膚適用後の皮膚内動態を解析し、タクロリムスを用いたアトピー性皮膚炎の治療で問題となる全身へのタクロリムスの移行に影響する要因を明らかにした。特に患者個人のバリア機能をTEWLの測定により前もって評価することで過度な全身への移行を回避できる可能性を示したことや、皮膚血流の上昇や血管透過性の亢進と全身移行の関係性を明らかにした結果などは、今後のタクロリムスの安全なアトピー性皮膚炎の治療に大変意義深い情報を提供したものと考える。さらにこれらの知見に基づいて、より安全なタクロリムスの外用剤の開発についても試みる予定である。

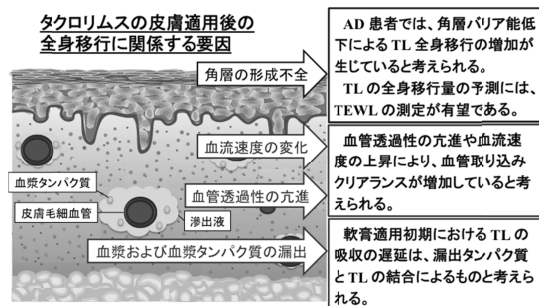


図6 炎症皮膚でのタクロリムスの全身移行

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 0件)

[学会発表](計 8件)

間 祐太郎、三木涼太郎、大島新司、江川祐哉、関 俊暢、タクロリムス炎症皮膚適用後の角層バリア能及び皮内状態に依存した吸収動態の解析、日本薬学会第134年会、2014年3月27~30日、熊本

間 祐太郎、増田裕行、三木涼太郎、江川祐哉、関 俊暢、マイクロダイアリシスを用

いたタクロリムス皮膚適用後の皮膚内動態解析法の検討、第24回マイクロダイアリシス研究会、2013年12月14日、文京区

増田裕行、間 祐太郎、佐藤鷹也、三木涼太郎、大島新司、江川祐哉、関 俊暢、炎症皮膚における血管外へのタンパク質の漏出とその薬物経皮吸収動態への影響、日本薬学会関東支部大会、2013年10月26日、板橋

間 祐太郎、増田裕行、茂木拓也、三木涼太郎、江川祐哉、関 俊暢、タクロリムス選択的皮内送達のための基礎的研究、日本DDS学会学術集会、2013年7月4~5日、京都

間 祐太郎、佐藤鷹也、三木涼太郎、大島新司、江川祐哉、関 俊暢、ヘアレスラット炎症皮膚における軟膏塗布後のタクロリムス吸収動態、日本薬学会第133年会、2013年3月28~30日、横浜

佐藤鷹也、木内貴章、江川祐哉、大島新司、細谷 治、從二和彦、関 俊暢、炎症を有する皮膚におけるタクロリムスの吸収動態に関する基礎的研究、日本薬学会第132年会、2012年3月29~31日、北海道

鈴木千尋、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132年会、2012年3月29~31日、北海道

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、第55回日本薬学会関東支部大会、2011年10月8日、千葉

[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
<http://www.josai.ac.jp/~butuyaku/>

6. 研究組織

(1)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

(2) 連携研究者

江川 祐哉 (EGAWA, Yuya)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号： 90400267

(3)連携研究者

大島 新司 (OSHIMA, Shinji)
城西大学・薬学部・助手
研究者番号： 00438798