

ゼブラフィッシュを用いた薬剤の経皮吸収性評価モデルの構築

THE DEVELOPMENT OF EVALUATION METHOD FOR TRANSDERMAL ADSORPTION TEST USING ZEBRAFISH

守金大蔵¹⁾²⁾, 奥田正¹⁾, 臧黎清¹⁾, 西村訓弘¹⁾

Daizo Morikane¹⁾²⁾, Tadashi Okuda¹⁾, Liqing Zang¹⁾, Norihiro Nishimura¹⁾

1) 三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻環境社会医学講座トランスレーショナル医科学

2) ダイア製薬株式会社

*1) Translational Medical Science, Social and Environmental Medicine,
Graduate School of Medicine, Mie University*

2) DIA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

はじめに

医薬品において貼付剤や液剤をはじめとする経皮吸収型の外用剤においては、皮膚から薬剤が吸収されないと有効性が得られないことから、経皮吸収性試験は、重要な評価項目の一つである^{1,2)}。この評価方法としてよく使われる試験は、人もしくは、人の皮膚に近い構造を持つ哺乳類（主に、ラット、マウス、ブタ、サル等）を用いて、皮膚から透過した薬剤の血中濃度や皮膚透過量を評価することで行われる³⁾。

開発初期段階のスクリーニングでは、少ない薬剤の量で、より短期間に結果が判明することが望まれるが、人を用いた試験は、非常に高価であり、また、倫理的な問題もあり、また、厚生労働省のガイドラインでも示される通り、専ら上記の動物を用いた実験が行われているが、哺乳類を用いる試験は、時間、費用もかかり、さらに、動物愛護の面からも、代替法が望まれている。

このような背景をもとに本研究では、簡易に、安価に且つ迅速に薬剤の経皮からの吸収性を確認する評価方法としてヒトとの相溶性が高い魚類であるゼブラフィッシュを題材として、皮膚経由での薬剤投与の効果を測定するためのモデル（経皮吸収モデル）の構築を目的として研究を行っ

た。ゼブラフィッシュは魚類であるが、全ゲノム配列ではヒトと 80%の相溶性があり遺伝子数もヒトとほぼ同じである。主要臓器・組織の発生・構造もヒトと良く似ており、受精卵から分化して各臓器が形成される過程が透明な体を通して観察できる。このような特徴から、ゼブラフィッシュは、主に発生学の研究題材として使用されてきたが、近年、ヒトとの遺伝子レベルおよび疾患表現型の相溶性が実証されてきたことから、マウス、ラットに続く第三のモデル動物であると認知されており、ゼブラフィッシュを利用したヒト疾患モデルが多数形成され研究に用いられるようになっている。

試験材料及び方法

1)ゼブラフィッシュ経皮吸収性モデルの構築

ゼブラフィッシュは魚類であり水中で薬剤に暴露する必要があるが、頭部には口、エラがあり、これらの部分を介して、体内に薬剤が吸収される可能性がある。また、皮膚表面には人間の耳に相当する有毛細胞につながる微細な穴が数多く開いており、その部分を通した薬剤吸収の可能性が考えられた。このため、本研究では、毛細血管が綿密に張り巡らされている尾部のみを特異

的に薬剤暴露する方法を考案し、その性能を確認した。具体的な方法は以下の通り。

○材料：試験を行ったゼブラフィッシュには3カ月齢AB strain(091103生まれ)のメスを使用した。

○手順

1. ゼブラフィッシュに麻酔を施すため0.168mg/ml Tricaine 溶液に個体を浸した。
2. 麻酔を施したゼブラフィッシュを、0.5mlPCRチューブの下部を切断したものを括らせ、頭部と鰓を穴から出した後、チューブの中に溶融したAgaroseを注入し、尾部のみがPCRチューブ内に入るようにした。その後、尾部のみが入っているPCRチューブ内に、1mM濃度、5mM、10mMのDASPEI(蛍光試薬)溶液をそれぞれ100 μ lを注入し、蓋をした(Fig.1写真右を参照)。
3. このようにゼブラフィッシュ尾部のみをPCR中部内でDASPEI(蛍光試薬)溶液に暴露した状態で、ゼブラフィッシュをチューブ立てに挿し、頭部を薄めたTricaine水(0.06mg/ml)中に沈めることで呼吸を確保し、3時間暴露した(Fig.1中央参照)。
4. 暴露後、Agarose固定を解除し、PCRチューブから取り出したゼブラフィッシュを、飼育水を流水循環した飼育槽の中で泳がせることで30分間洗浄した。
5. ゼブラフィッシュを再び麻酔し、蛍光顕微鏡で観察した。
6. 蛍光顕微鏡下で観察を行った後、ゼブラフィッシュ個体から全身の血液を採取し、3,000rpmで遠心した。上澄み部分の血漿を50倍希釈し、Varioskanで吸光度を測定することで血中へのDASPEIの移行の有無を確認した。

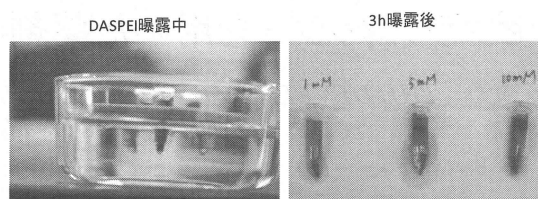


Fig.1 ゼブラフィッシュの尾部からの経皮吸収方法の検討

2) ゼブラフィッシュ経皮吸収モデルの評価

前項1)で構築したゼブラフィッシュ経皮吸収モデルに対して、ヒトでの経皮吸収型の薬剤であるフェルビナクと、ヒトでは皮膚を介した血中への移行が認められていないグリチルレチン酸を投与することで、これらの薬剤の経皮吸収の有無を確認した。

○被検薬剤：

フェルビナク($C_{14}H_{12}O_2$:212.24g/mol)⁴⁾

グリチルレチン酸($C_{30}H_{42}O_4$:470.68g/mol)⁵⁾

○材料：4カ月齢のゼブラフィッシュ Rose Strainのメスを使用した。

○手順

前項1)で構築した試験方法を用いて、各薬剤の投与濃度を1mM、5mM、10mMとし、暴露時間は3時間とした。

○分析方法：

各薬剤に暴露させたゼブラフィッシュの血液を採取し、HPLC法で有効成分の血中濃度を測定した。

3) ゼブラフィッシュ経皮吸収モデルを用いたパップ剤の評価

ダイヤ製薬株式会社が開発している貼付剤技術を確認するために、尾部への薬剤投与を目的に調製したパップ剤に、前項1)に改良を加えることで試験個体を暴露し、パップ剤による経皮吸収に対する能力を確認した。ゼブラフィッシュは4カ月齢のRose Strainのメスを使用した。

結果

1)ゼブラフィッシュ経皮吸収性モデルの構築

3 時間の暴露後に、30 分間、十分に洗浄を行った各ゼブラフィッシュ個体を蛍光顕微鏡下で観察し、結果を Fig.2 に示した。

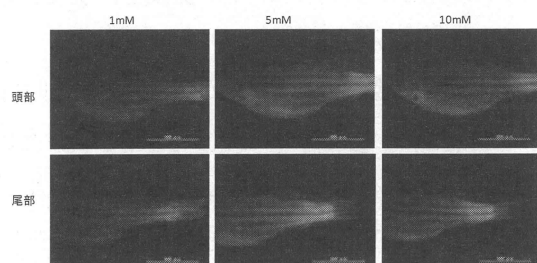


Fig.2 3 時間暴露後の各ゼブラフィッシュの蛍光顕微鏡観察結果

この結果、各個体の尾部のみが蛍光を発していることが分かり、頭部への蛍光物質 (DASPEI) の流出 (漏れ) がなかったことが確認できた。このため、尾部の表面からの蛍光物質 (DASPEI) の血中への移行を確認するための実験系が十分に確立できていることが確認できた。また、血中における DASPEI 濃度を算出するために DASPEI の吸収ピークである OD450 との相対値を求めるための検量線を作成した (Fig.3)。

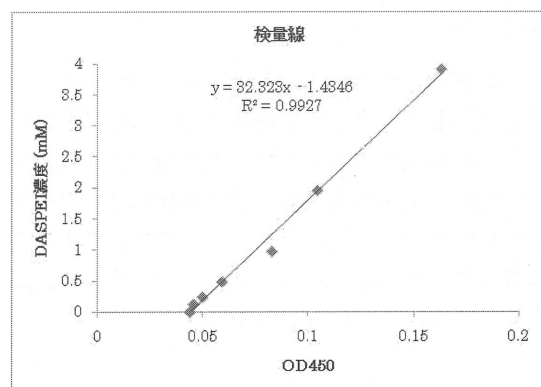


Fig.3 DASPEI と OD450 との相関

検量線を基に、各濃度の DASPEI 溶液に暴露したゼブラフィッシュから採取した血清中に含ま

れる DASPEI 濃度を OD450 の値から算出し、Fig.4 に結果を示した。

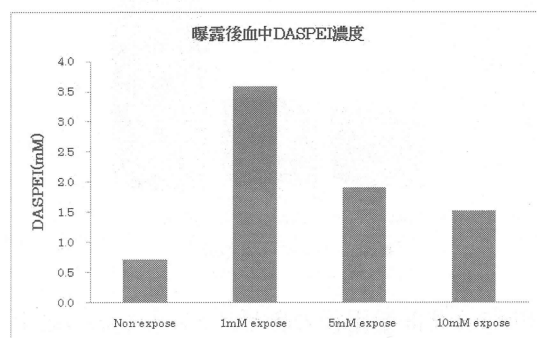


Fig.4 3 時間暴露後の各ゼブラフィッシュの血中から検出された DASPEI 濃度

この結果、微量であり、濃度応答は確認できなかったが、明らかに血中に DASPEI が血中に移行していることが確認され、本方法が「経皮吸収モデル」として利用できる可能性が示唆された。

2)ゼブラフィッシュ経皮吸収モデルの評価

前項1)で確立したゼブラフィッシュ経皮吸収モデルを、ヒトでの経皮吸収型薬剤であるフェルビナクと、ヒトでは皮膚を介した血中移行が認められないグリチルレチン酸に暴露したところ、グリチルレチン酸では暴露した 1mM、5mM、10mM のいずれの条件下でも血中からはグリチルレチン酸が検出されなかった。これに対してフェルビナクでは、各血漿中からフェルビナクが濃度応答に検出されることが確認できた。(Fig5)

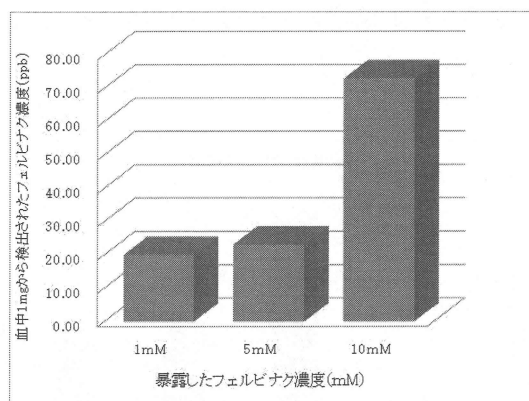


Fig.5 3 時間暴露後の各ゼブラフィッシュの血中から検出されたフェルビナク濃度

3) ゼブラフィッシュ経皮吸収モデルを用いたパップ剤の評価

ダイヤ製薬株式会社が開発している貼付剤技術を用いることでフェルビナクを含有させたパップ剤を、ゼブラフィッシュ経皮吸収モデルに適用したところ、3 時間暴露後に採取した血漿中から 158.79ppb フェルビナクが検出された。

結論

本研究では、ヒトとの相同性が高い魚類であるゼブラフィッシュを題材として、皮膚経由での薬剤投与の効果を測定するためのモデル(経皮吸収モデル)の構築を目的として研究を行った。さらに、ヒトで用いられている薬剤を用いて、ゼブラフィッシュ経皮吸収モデルの性能確認を行った。

この結果、ゼブラフィッシュの尾部だけを薬剤溶液に特異的に暴露する経皮吸収の評価法を開発し、本法によって尾部の毛細血管から、薬剤が吸収され血中に移動することが確認できた。以上から、ゼブラフィッシュを題材とすることで、皮膚経由での薬剤投与の効果を測定するためのモデル(経皮吸収モデル)が構築できることを示した。

さらに、ヒトで利用されている経皮吸収型の薬剤と、経皮吸収されない薬剤を本ゼブラフィッシュ経皮吸収モデルに経皮投与することを試みたところ、ヒトで利用されている経皮吸収型の薬剤のみが血中に移行することが確認され、ゼブラフィッシュを用いることがヒトでの現象を再現できそうであることが示唆された。

また、ダイヤ製薬株式会社が開発している貼付剤技術を確認するために、フェルビナクを含有させたパップ剤を尾部に暴露したところ、フェルビナクが良好にゼブラフィッシュ経皮吸収モデルに吸収され血中に移行したことから、薬剤を用いた製剤についても、薬剤の経皮吸収性評価試験が実施可能であることが確認された。

参考文献

- 1) 森本雍憲、他：新しい図解薬剤学、株式会社南山堂、(1997)
- 2) 橋田充：ドラッグデリバリーシステム、(株)化学同人(1995)
- 3) 谷口彰敏：最新・経皮吸収剤、株式会社情報機構(2008)
- 4) 第十四改正日本薬局方(2006)
- 5) 日本薬局方外医薬品規格 2002(2002)

謝辞

本研究は、全国中小企業団体中央会のものづくり中小企業製品開発等支援補助金(実証等支援事業)の支援を基に行ったものであり、ここに感謝申し上げます。最後に、今回の実験及び論文の作成にあたり、多大なご指導を賜りました三重大学大学院医学系研究科環境社会医学講座トランスレーショナル医科学の諸先生方に厚く御礼申し上げます。