

新規 Drug Delivery System としての
培養皮膚型貼付剤の有用性に関する研究

甲第34号

羽田 乃武子

新規 Drug Delivery System としての
培養皮膚型貼付剤の有用性に関する研究

羽田 乃武子

目次

記号と略語	1
緒言	2
第1編	抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の有用性 評価	5
第1章	数学的アプローチに基づく抗生物質含有培養皮 膚型貼付剤の有用性評価	5
第1節	理論	7
1.	Drug-loaded LSE-high からの薬物放出挙動 の解析	7
2.	薬物 PBS 溶液からの薬物皮膚透過挙動 の解析	8
3.	2層膜モデルの構築と drug-loaded LSE-high から の薬物皮膚透過挙動の解析	12
4.	3層膜モデルの構築と drug-loaded LSE-high から の薬物皮膚透過挙動の解析	14
第2節	実験の部	16
1.	実験材料	16
2.	n -オクタノール/pH7.4 PBS 分配係数 ($K_{o/w}$) の測定	16
3.	Drug-loaded LSE-high の調製	17
4.	Drug-loaded LSE-high 中薬物初濃度の測定	17

5.	Drug-loaded LSE-high からの薬物放出実験	18
6.	薬物 PBS 溶液からの皮膚透過実験	18
7.	Drug-loaded LSE-high からの皮膚透過実験	19
8.	薬物の定量法 (HPLC 分析)	19
9.	MTT 試験	20
第 3 節	結果および考察	23
1.	Drug-loaded LSE-high からの TC と CP の 放出挙動	23
2.	PBS 溶液からの TC と CP の皮膚透過	24
3.	Drug-loaded LSE-high からの TC と CP の 皮膚透過	27
4.	Drug-loaded LSE-high の皮膚透過実験時の皮膚中 薬物濃度のシミュレーション	28
5.	MTT 試験結果	30
第 4 節	小括	34
第 2 章	Polystyrene microspheres を用いた抗生物質放出制 御に関する検討	35
第 1 節	実験の部	37
1.	実験材料	37
2.	TC の PSMS への吸着性評価	37
3.	TC-PSMS-loaded LDM の調製	37
4.	TC-loaded または TC-PSMS-loaded LDM からの TC 放出実験	38
5.	TC-loaded または TC-PSMS-loaded LDM からの TC 皮膚透過実験	38

6.	TC の定量法 (HPLC 分析)	39
7.	LDM または PSMS-loaded LDM を介した高分子物質の透過性評価	39
8.	蛍光 PSMS を用いた PSMS-loaded LDM の組織学的観察	39
第 2 節	結果および考察	41
1.	TC の PSMS への吸着性	41
2.	TC-PSMS-loaded LDM からの TC 放出性および皮膚透過性に及ぼす PSMS 径の影響	41
3.	TC-PSMS-loaded LDM からの TC 放出性および皮膚透過性に及ぼす PSMS 含量の影響	43
4.	LDM または PSMS-loaded LDM を介した高分子物質の透過性	49
5.	蛍光 PSMS-loaded LDM の組織学的観察	51
第 3 節	小括	55

第 2 編 遺伝子導入培養皮膚型貼付剤の調製に関する検討 56

第 1 節	実験の部	58
1.	細胞培養	58
2.	3 次元培養真皮モデル (CDM) の調製	58
3.	プラスミド DNA	60
4.	遺伝子導入および遺伝子導入培養真皮の調製	60
5.	組織学的評価	64

6.	蛍光強度測定	64
7.	MTT 試験	65
8.	統計学的解析	65
第2節	結果および考察	66
1.	線維芽細胞への遺伝子導入	66
2.	遺伝子導入培養真皮	67
第3節	ヒト由来内因性抗菌ペプチド ~human- β -defensin-2~	72
第4節	小括	76
総括的考察		77
結論		81
謝辞		88
引用文献		89

記号と略語

	略語		
CDM	Three-dimensional cultured dermal model	C_{LSE}	LSE-high 中薬物濃度
CP	クロラムフェニコール	C_{skin}	Stripped skin 中薬物濃度
DDS	Drug Delivery System	C_{SL}	Stagnant layer 中薬物濃度
FD-4	Fluorescein isothiocyanate-dextran (分子量: 3,820)	D_{LDM}	薬物の LDM 中拡散係数
FR cell	ラット皮膚由来線維芽細胞	D_{LSE}	薬物の LSE-high 中拡散係数
GFP	Green Fluorescent Protein	D_{skin}	薬物の stripped skin 中拡散係数
hBD-2	Human- β -defensin-2	D_{SL}	薬物の stagnant layer 中拡散係数
HDF	ヒト真皮由来線維芽細胞	J	皮膚透過速度 (フラックス)
HVJ-E	Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector	$K_{o/w}$	薬物の n -オクタノール/pH7.4 PBS 分配係数
LDM	Living Dermal Model	$K_{skin/d}$	薬物の stripped skin/ドナー液分配係数
LSE-high	Living Skin Equivalent-high	$K_{skin/LSE}$	薬物の stripped skin/LSE-high 分配係数
MIC	最小発育阻止濃度	$K_{skin/SL}$	薬物の stripped skin/stagnant layer 分配係数
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide	$K_{SL/LDM}$	薬物の stagnant layer/LDM 分配係数
M.W.	分子量	$K_{SL/LSE}$	薬物の stagnant layer/LSE-high 分配係数
PBS	Phosphate buffered saline	L_{LDM}	LDM の厚み
PSMS	Polystyrene latex microspheres	L_{LSE}	LSE-high の厚み
TC-HCl	塩酸テトラサイクリン	L_{skin}	Stripped skin の厚み
	記号	L_{SL}	Stagnant layer の厚み
C_0	LSE-high または LDM 中の薬物初濃度	Q	単位面積当たりの累積放出量または累積透過量
C_d	ドナー液中薬物濃度	Q_b	バースト効果による放出実験開始直後の累積放出量
C_{LDM}	LDM 中薬物濃度		

緒言

近年、再生医療 (tissue engineering) の分野において「代替臓器」の考え方が急激に進んできている¹⁻⁴⁾。Tissue engineering のキーワードは、「生体材料」、「細胞」および「細胞成長因子」である^{5,6)}。細胞あるいは細胞成長因子を単独で適用して組織の修復を行う治療法も tissue engineering の範疇に入るが、さらに一步進んだ治療法として生体材料に細胞を組み込んだ医療用具を適応して組織の修復を促進する治療法が注目されている^{5,6)}。中でも培養表皮、培養真皮および培養皮膚のような「培養皮膚代替物」の研究はいち早く進み、すでに様々な創傷治療に対して成果を挙げており、広範囲重症火傷患者の救命率向上にも大きく寄与している⁷⁻⁹⁾。培養皮膚代替物の種類として、角化細胞 (keratinocytes, ケラチノサイト) を利用したものを「培養表皮」、線維芽細胞 (fibroblasts) を利用したものを「培養真皮」、角化細胞と線維芽細胞を利用したものを「培養皮膚」としている。そして、患者自身の細胞を使用したものには「自家」を付け、他人の細胞を使用したものには「同種」あるいは「他家」を付ける¹⁰⁻¹²⁾。

角化細胞をフラスコ内で培養して表皮のシート (培養表皮) を作製する技術が 1979 年に Green らによって発見され¹³⁾、その後さらに研究が進められ 1986 年に製品化に至った (Biosurface Technology 社、現在は Genzyme Tissue Repair 社、商品名 : Epicel™)^{14,15)}。一方、線維芽細胞は、角化細胞のように分化重層化して自発的にシート状になる特性を持たないため、培養真皮では、適切な細胞の「足場 (scaffold)」すなわちマトリックスを利用する必要がある。すでに 2 種類の同種培養真皮が米国で企業化されており¹⁶⁾、1 つは生体吸収性の合成高分子からなるネット (商品名 : Vicryl®) 上に線維芽細胞を播種して培養した

ものであり（Advanced Tissue Sciences 社、商品名：Dermagraft[®]）^{17,18)}、他の 1 つはシリコン膜にナイロンネットを貼付した創傷被覆材（商品名：Biobrane[™]）のナイロンネット側に線維芽細胞を播種して培養したものである（Advanced Tissue Sciences 社、商品名：Trans Cyte[®]）^{19,20)}。日本では、黒柳らが牛皮由来のコラーゲンを酵素処理して得られたアテロコラーゲンからなるスポンジ状シートに線維芽細胞を播種して培養する方法を開発し、臨床応用を展開した^{21,22)}。角化細胞から種々のサイトカインが産生および放出されることが明らかとなり^{23,24)}、これらが創傷治癒促進に有効であることから、培養表皮が生物学的創傷被覆材として注目され、分層皮膚欠損創を対象とした多くの臨床報告がなされた²⁵⁻²⁸⁾。これに対して、線維芽細胞は種々のサイトカインを産生、放出する他にコラーゲンやフィブロネクチンなどの創傷治癒に必要な細胞外マトリックスを産生する²⁹⁻³¹⁾ため、培養真皮は全層皮膚欠損創のようなより深い創傷面に対する生物学的創傷被覆材として期待されている。

培養皮膚は、角化細胞および線維芽細胞から産生、放出されるサイトカインと線維芽細胞から産生される細胞外マトリックスによって創傷治癒促進効果が期待できる。Bell らにより開発された培養皮膚は、コラーゲンを溶解した培養液に線維芽細胞を浮遊させてゲル化させ、この上に角化細胞を播種して培養するものである^{32,33)}。その後、同種培養皮膚として商品化された Apligraf[®]（Organogenesis 社）³⁴⁻³⁶⁾は、静脈潰瘍の治療用具として FDA から承認を得られ、さらに熱傷や糖尿病性潰瘍などの皮膚損傷を対象に臨床試験が進んでいる^{37,38)}。

しかしながら、このような培養皮膚代替物の移植の際問題となることの 1 つに微生物による 2 次感染が挙げられる^{39,40)}。現在その防止のため、抗生物質軟膏等による薬物治療が行われているが、この場合移

植皮膚表面に薬物を適用するよりも予め薬物を封入した培養皮膚代替物を製剤として直接適用する方が効果的な治療が期待できると思われる。現在、このような創傷被覆材（ドレッシング材）として、抗菌物質を含有した細胞非組込み型の創傷被覆材がいくつか研究されている⁴¹⁻⁴³⁾が、これは細胞を含まないため、サイトカインなどによる有益な効果が期待できない。一方で、tissue engineering 技術に基づく細胞組込み型の培養皮膚代替物は、細胞非組込み型の創傷被覆材に比べて生体親和性に優れ、微小な切片を培養することで供給源に活路が見出せ、さらに種々の生理活性物質（サイトカインや細胞外マトリックス）の放出により創傷治癒の促進効果が期待できるという多くの利点がある⁴⁴⁾。

そこで、本研究では重症火傷や褥瘡などの重篤な皮膚損傷に用いることのできる新しい Drug Delivery System (DDS) として、損傷皮膚の保護作用ばかりでなく 2 次感染の防止作用をも併せ持つような培養皮膚型貼付剤の調製および有用性について検討した。本研究論文の第 1 編では、抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の有用性評価について論じる。第 1 編、第 1 章では抗生物質含有培養皮膚型貼付剤について数学的解析によりその有用性を評価した。また、第 2 章では polystyrene microspheres を含有した培養皮膚に抗生物質を負荷することにより抗生物質放出制御能をもつ培養皮膚型貼付剤を調製し、その有用性について評価した。さらに第 2 編では、ヒト内因性抗菌ペプチドである human- β -defensin-2 (hBD-2) の分泌能を有する遺伝子導入培養皮膚の構築を目指し、まず最初のアプローチとしてモデルたん白質を発現する遺伝子導入培養皮膚の調製法について検討した。

第 1 編 抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の有用性評価

第 1 章 数学的アプローチに基づく抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の有用性評価⁴⁵⁾

緒言でも述べたように、再生医療 (tissue engineering) の進歩に伴い様々なタイプの培養皮膚が研究され、実用化されている。3 次元培養ヒト皮膚モデルはその 1 例で、ヒト線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルからなる真皮と多層分化したヒト角化細胞からなる表皮 (角層を含む) を有し、実際のヒト皮膚組織に最も類似しているといわれているものの 1 つである⁴⁶⁾。これは、特に真皮を欠損したような重症な火傷や創傷治療への有用性が期待されている⁴⁷⁾。

本章では、損傷皮膚の保護作用ばかりでなく 2 次感染の防止作用をも併せ持つような新しい DDS として、3 次元培養ヒト皮膚モデルである Living Skin Equivalent-high (LSE-high; 東洋紡績株式会社、大阪) に抗生物質を封入した抗生物質含有培養皮膚型貼付剤”drug-loaded LSE-high”を調製し、その有用性について数学的アプローチから評価した。LSE-high は、Organogenesis 社で開発された LSE を原型とするが、角層のバリアー能が LSE と比較して約 3 倍ほど強くなっている⁴⁸⁾。また、封入するモデル抗生物質としては、塩酸テトラサイクリン (TC-HCl) またはクロラムフェニコール (CP) を選択した。それぞれの薬物を含有するアクロマイシン[®]軟膏およびクロロマイセチン[®]軟膏は、どちらも外傷、火傷および手術創等の 2 次感染に適応がある。

本システムは重症火傷のみでなく糖尿病性皮膚潰瘍や褥瘡といった難治性の皮膚損傷にも応用が可能であると考えられる。しかし、本システムの良否の判定は、再生医学および薬学の両方のアプローチが必

要であろう。そこで、本研究では、まず調製した”drug-loaded LSE-high”からの薬物の放出性や皮膚透過性を測定し、得られたデータと拡散理論に基づく計算による数学的アプローチから抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の有用性について評価した。さらに MTT 試験を用いて抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の cell viability についても評価を行った。

第1節 理論

1. Drug-loaded LSE-high からの薬物放出挙動の解析

均一な matrix layer 中に存在する薬物が放出液中へ移動する挙動を解析する場合、matrix 中で薬物が溶解している場合と懸濁している場合とに分けて考える必要がある。Drug-loaded LSE-high 調製時、培地から LSE-high 中に移行する薬物は溶解型のみであるので、本実験系では薬物が溶解している場合の放出挙動を示すと考えられる。Fig. 1 は、drug-loaded LSE-high から放出液 (pH7.4 phosphate buffered saline, PBS) 中への薬物の放出挙動を模式的 (concentration-distance profile) に示す。W.I. Higuchi⁴⁹⁾によれば、drug-loaded LSE-high から放出液中 (sink 条件) への薬物の累積放出量 Q ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) は以下の式で表される。

$$Q = L_{\text{LSE}} C_0 \left[1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{(2m+1)^2} \exp\left(-\frac{D_{\text{LSE}} (2m+1)^2 \pi^2 t}{4L_{\text{LSE}}^2}\right) \right] \quad (1)$$

ここで、 L_{LSE} は LSE-high の厚み (ca. 300 μm)、 C_0 は LSE-high 中の薬物の初濃度、 D_{LSE} は薬物の LSE-high 中の拡散係数である。得られた累積放出データを式 (1) に非線形最小二乗法を用いて当てはめることにより、薬物の LSE-high 中拡散係数 D_{LSE} と初濃度 C_0 を求めることができる。ここで得られる拡散係数 D_{LSE} は、実際には $D_{\text{LSE}}/\tau_{\text{LSE}}$ (τ : 曲路率) で表される有効拡散係数である⁵⁰⁾。曲路率 τ は主に薬物の分子容と関係し、薬物の拡散経路に影響するパラメータである⁵¹⁾。

なお、matrix の表面に薬物が吸着現象のように弱いエネルギーで結合している場合があり、このような場合では実験初期にバースト放出現象がみられる。初期にバースト現象が起きる場合、放出実験開始直

後の累積放出量を Q_b とおき、式 (1) を $Q + Q_b$ と変形して非線形最小二乗法を用いたカーブフィッティングを行うことにより D_{LSE} を算出できる。

最小二乗法の計算では表計算ソフト Microsoft® Excel 中のソルバー機能を用いた⁵²⁾。ソルバーの条件としては、制限時間が 100 秒、反復回数が 100 回、精度が 0.000001、交差が 5%、収束が 0.001 であり、解の検索のアルゴリズムは準ニュートン法を用いた。

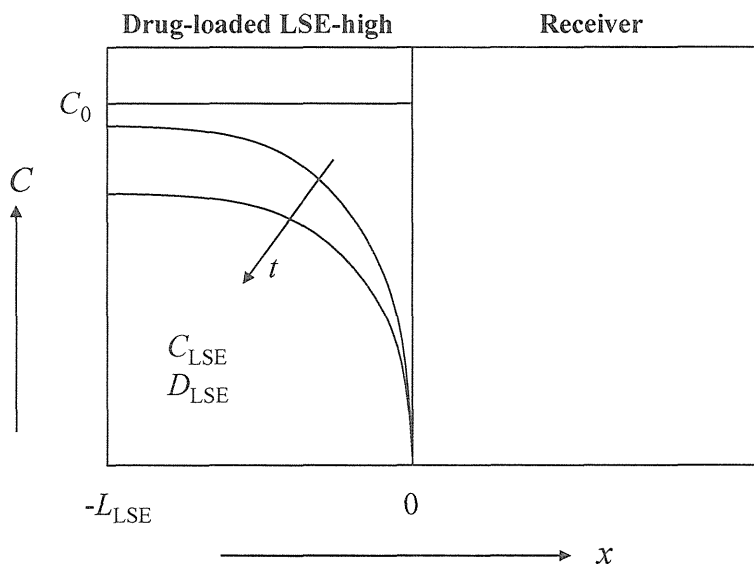


Fig. 1 A typical concentration-distance profile of TC and CP in drug-loaded LSE-high and receiver solution at the release experiment.

2. 薬物 PBS 溶液からの薬物皮膚透過挙動の解析

本実験では損傷皮膚モデルとして、ヘアレスラットの stripped skin を用いたので、この皮膚を生きた表皮・真皮からなる 1 層膜モデル⁵³⁾

と仮定した。また、本実験は有限用量系で行い、かつレシーバ側の sink 条件が成り立っている。Fig. 2 に有限用量系における薬物の 1 層膜透過の模式図 (concentration-distance profile) を示す。

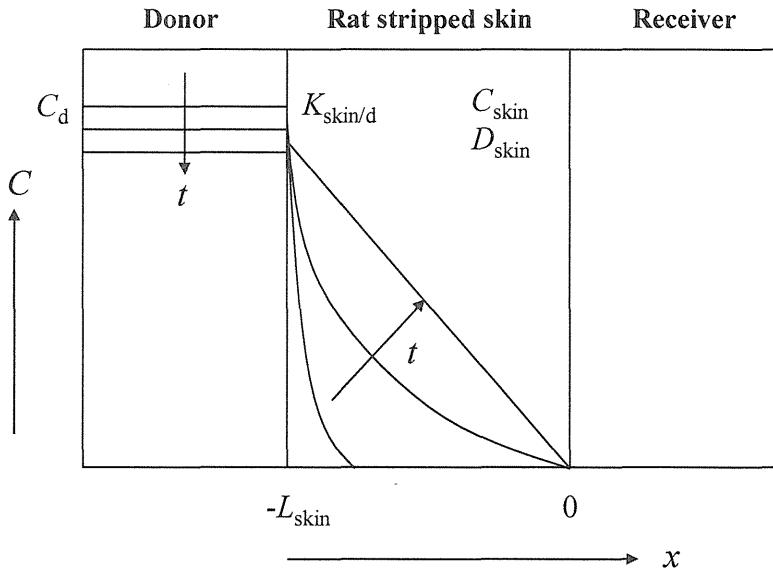


Fig. 2 A typical concentration-distance profile of TC and CP in the drug donor (PBS solution) and stripped skin at this skin permeation experiment (finite system).

Stripped skin (角層をテープストリッピングで取り除いた皮膚) における位置 x 、時間 t の薬物濃度 C_{skin} は、Fick の拡散第 2 法則から以下のように表すことができる。

$$\frac{\partial C_{\text{skin}}}{\partial t} = D_{\text{skin}} \frac{\partial^2 C_{\text{skin}}}{\partial x^2} \quad (2)$$

ここで、 D_{skin} は薬物の stripped skin 中の拡散係数である。この拡散係数 D_{skin} も D_{LSE} と同様に、実際には $D_{\text{skin}}/\tau_{\text{skin}}$ で表される有効拡散係数である。

本実験における初期条件と境界条件を以下に示す。

$$t = 0 \quad 0 < x < L_{\text{skin}} \quad C_{\text{skin}} = 0 \quad (3)$$

$$t > 0 \quad x = 0 \quad C_{\text{skin}} = K_{\text{skin/d}} \cdot C_{\text{d}} \quad \text{および} \quad \frac{dC_{\text{d}}}{dt} = D_{\text{skin}} \frac{dC_{\text{skin}}}{dx} \quad (4)$$

$$x = L_{\text{skin}} \quad C_{\text{skin}} = 0$$

ここで、 L_{skin} は stripped skin の厚み (570 μm)、 $K_{\text{skin/d}}$ は薬物のドナー側から stripped skin への分配係数、 C_{d} はドナー側の薬物濃度を示す。

位置 x 、時間 t における C_{skin} は、式 (2)、初期条件 (式 (3)) および境界条件 (式 (4)) によって算出される。また、薬物のレシーバ側への透過速度 J は Fick の第 1 法則である式 (5) で表すことができる。さらに、 J を積分することにより薬物の累積皮膚透過量 Q が求められる (式 (6))。

$$J = -D_{\text{skin}} \left(\frac{dC_{\text{skin}}}{dx} \right)_{x=L_{\text{skin}}} \quad (5)$$

$$Q = -D_{\text{skin}} \int_0^t \left(\frac{dC_{\text{skin}}}{dx} \right)_{x=L_{\text{skin}}} dt \quad (6)$$

Fick の第 2 法則は差分法により、式 (7)、(8) に変換できる⁵⁴⁾。

$$\frac{dC_{i,j}}{dt} = \frac{1}{\Delta t} (C_{i,j+1} - C_{i,j}) \quad (7)$$

$$\frac{d^2C_{i,j}}{dx^2} = \frac{1}{\Delta x^2} (C_{i-1,j} - 2C_{i,j} + C_{i+1,j}) \quad (8)$$

ここで、 C_{ij} は皮膚における表面側から i 番目の位置の j 番目の時間の濃度を表す (i, j 共に自然数である)。 Δx は $x_{i+1} - x_i$ を表し、 Δt は $t_{j+1} - t_j$ を表す。式 (7)、(8) を式 (1) に代入すると以下のようなになる。

$$C_{i,j+1} = rD_{\text{skin}} C_{i-1,j} + (1 - 2rD_{\text{skin}}) C_{i,j} + rD_{\text{skin}} C_{i+1,j} \quad (9)$$

ここで、 r は $\Delta t / \Delta x^2$ を示す。また、式 (5) は差分法を用いると式 (10)、式 (6) は式 (11) で表すことができる。

$$J_j = -D_{\text{skin}} \frac{C_{n+1,j} - C_{n,j}}{\Delta x} \quad (10)$$

$$Q_j = Q_{j-1} + J_j \cdot \Delta t \quad (11)$$

ここで、 n は皮膚の分割数を示す。 J_j を以上の方法に従って表計算ソフト Microsoft® Excel を用いて計算した。計算には $n=10$ を用いた。また、計算では $D_{\text{skin}} \cdot \Delta t / \Delta x^2$ が 0.5 以下となるように Δt を設定した (0.5 以上を設定すると解は発散する)。さらに、式 (11) から Q_j を求めた。拡散係数 D_{skin} と分配係数 $K_{\text{skin/d}}$ は累積透過量 Q_j の実測値を非線形最小二乗法を用いてカーブフィッティングすることにより算出した。最小二乗法には、放出実験解析と同様の方法を用いた。

3. 2層膜モデルの構築と drug-loaded LSE-high からの薬物皮膚透過挙動の解析

Drug-loaded LSE-high からの薬物の皮膚透過性および皮膚中挙動を解析するために、LSE-high と stripped skin からなる 2 層膜モデルを構築した。Fig. 3 に 2 層膜モデルの模式図を示す。

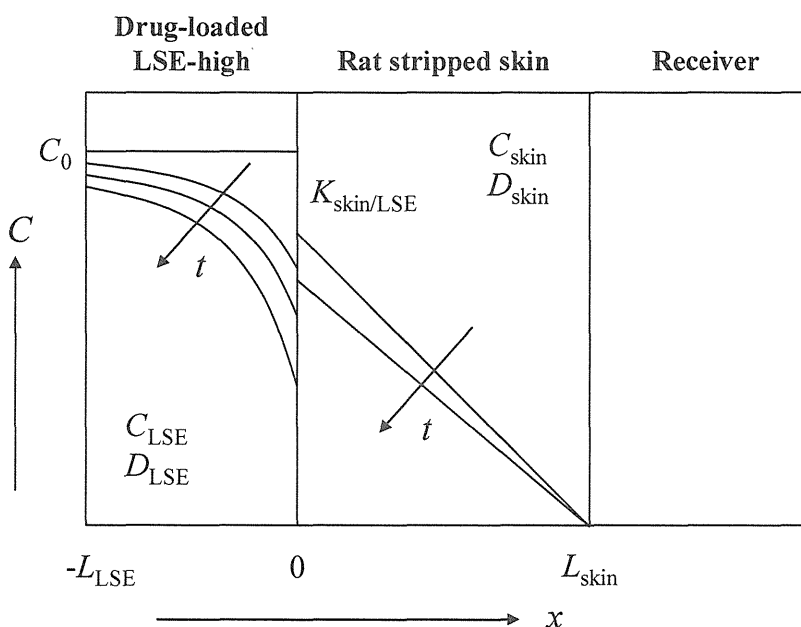


Fig. 3 A typical concentration-distance profile of CP in the LSE-high and stripped skin at the skin permeation experiment (two-layered diffusion model).

LSE-high における位置 x 、時間 t の薬物濃度 C_{LSE} は Fick の第 2 法則から、

$$\frac{\partial C_{\text{LSE}}}{\partial t} = D_{\text{LSE}} \frac{\partial^2 C_{\text{LSE}}}{\partial x^2} \quad (12)$$

Stripped skin における位置 x 、時間 t の薬物濃度 C_{skin} は、式 (2) で表される。

初期条件と境界条件は以下のようになる。

$$\begin{aligned} t = 0 \quad -L_{\text{LSE}} < x < 0 \quad C_{\text{LSE}} = C_0 \\ \quad \quad \quad 0 < x < L_{\text{skin}} \quad C_{\text{skin}} = 0 \end{aligned} \quad (13)$$

$$\begin{aligned} t > 0 \quad x = -L_{\text{LSE}} \quad C_{\text{LSE},i} = C_{\text{LSE},i+1} \\ \quad \quad \quad x = 0 \quad C_{\text{skin}} = K_{\text{skin/LSE}} \cdot C_{\text{LSE}} \end{aligned} \quad (14)$$

$$\text{および } D_{\text{LSE}} \frac{dC_{\text{LSE}}}{dx} = D_{\text{skin}} \frac{dC_{\text{skin}}}{dx}$$

$$x = L_{\text{skin}} \quad C_{\text{skin}} = 0$$

差分法により、式 (12)、(2) は式 (15)、(16) に変換できる。

$$C_{\text{LSE},i,j+1} = rD_{\text{LSE}} C_{\text{LSE},i-1,j} + (1 - 2rD_{\text{LSE}}) C_{\text{LSE},i,j} + rD_{\text{LSE}} C_{\text{LSE},i+1,j} \quad (15)$$

$$C_{\text{skin},i,j+1} = rD_{\text{skin}} C_{\text{skin},i-1,j} + (1 - 2rD_{\text{skin}}) C_{\text{skin},i,j} + rD_{\text{skin}} C_{\text{skin},i+1,j} \quad (16)$$

薬物のレシーバ側への透過速度 J は前述の式 (10) で、薬物の累積皮膚透過量 Q は式 (11) でそれぞれ表すことができる。薬物溶液からの皮膚透過実験解析と同様に、非線形最小二乗法を用いて実測データをカーブフィッティングすることにより LSE-high から stripped skin への

分配係数 $K_{\text{skin/LSE}}$ を算出した。なお、LSE-high 中薬物初濃度と拡散係数は、放出実験および薬物溶液からの皮膚透過実験の解析から算出された C_0 、 D_{LSE} 、 D_{skin} を用いた。

以上の解析から算出されたパラメータと 2 層膜モデルを用いて、薬物の皮膚中濃度のシミュレーションを行った。

4. 3 層膜モデルの構築と drug-loaded LSE-high からの薬物皮膚透過挙動の解析

TC-HCl の drug-loaded LSE-high からの皮膚透過性および皮膚中挙動の解析では、前述の LSE-high と stripped skin からなる 2 層膜モデルの間に stagnant layer という仮の層（均一層）を挟んだ 3 層膜モデルを構築した。Fig. 4 に 3 層膜モデルの模式図を示す。TC-HCl では LSE-high から stripped skin への薬物の移行性に遅れが見られるため、このモデルを採用した。3 層膜モデルでは、stagnant layer/LSE-high 分配係数 $K_{\text{SL/LSE}}$ 、stripped skin/ stagnant layer 分配係数 $K_{\text{skin/SL}}$ 、stagnant layer 中薬物分配係数 D_{SL} および stagnant layer の厚み L_{SL} が新たなパラメータとなる。解析は 2 層膜モデルと同様に、Fick の第 2 法則に基づく差分法を用いた非線形最小二乗法によって行った。

なお、この 3 層膜モデルを用いて CP の drug-loaded LSE-high からの皮膚透過性および皮膚中挙動を解析することも可能である。この場合、 L_{SL} が 0 となり、結果として 2 層膜モデルを用いて解析した場合と同じになる。今回は、解析の簡便性から TC と CP で 3 層膜および 2 層膜モデルをそれぞれ使い分けた。

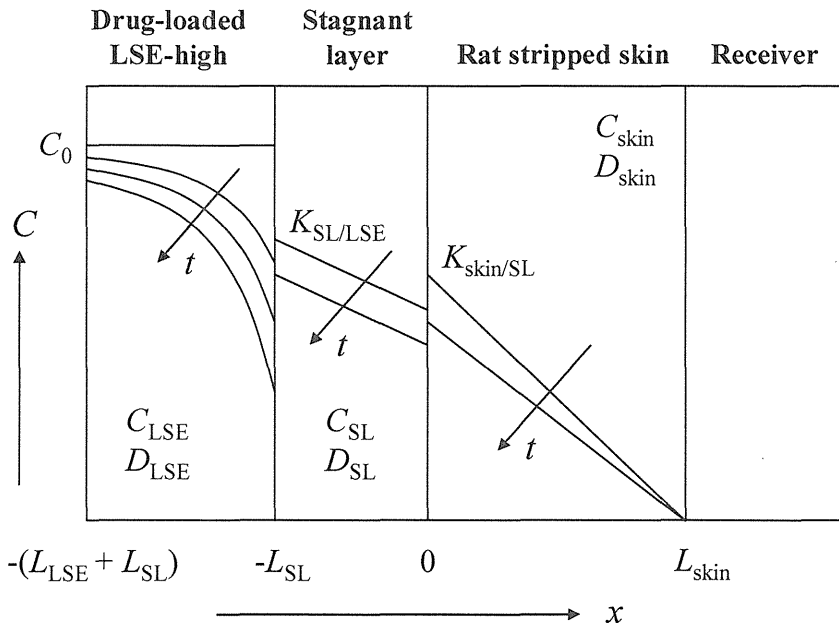


Fig. 4 A typical concentration-distance profile of TC in the LSE-high, stagnant layer and stripped skin at the skin permeation experiment (three-layered diffusion model).

第2節 実験の部

1. 実験材料

塩酸テトラサイクリン (TC-HCl) およびクロラムフェニコール (CP) は Sigma Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。TC-HCl 軟膏であるアクロマイシン[®]軟膏は株式会社科薬 (東京) より、CP 軟膏であるクロロマイセチン[®]軟膏は三共株式会社 (東京) よりそれぞれ購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級または HPLC 用を用いた。これらの試薬は精製せずにそのまま使用した。3次元培養ヒト皮膚モデル (LSE-high) は東洋紡績株式会社 (大阪) から供給された。

2. *n*-オクタノール/pH7.4 PBS 分配係数 ($K_{o/w}$) の測定

過量の *n*-オクタノールと pH7.4 PBS を混和し、室温で 24 時間攪拌した後の水相を回収し *n*-オクタノール飽和 PBS を得た。また、過量の PBS と *n*-オクタノールを混和し、同様の方法で PBS 飽和 *n*-オクタノールを得た。次に、既知量の TC-HCl または CP を *n*-オクタノール飽和 PBS (水相) に溶解させ、これと同容量の PBS 飽和 *n*-オクタノール (油相) と混和し、室温で 30 分間振とう攪拌した。水相および油相中の薬物濃度を HPLC にて測定した。両相の薬物濃度の比から $K_{o/w}$ を求めた。

Table 1 に TC-HCl と CP の構造式、分子量 (M.W.) および測定した $K_{o/w}$ を示す。

みで細断し、pH7.4 PBS 500 μ L を加えてハンディータイプのホモジナイザーで5分間ホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離(14,000 \times g、5 min、4°C)後、上清をPBSにて希釈した。この液にHPLC分析の内部標準物質(後述)を含有したアセトニトリルを加えて除たん白し、遠心分離した上清の薬物濃度をHPLCにて測定した。測定した薬物濃度からホモジネート中薬物絶対量を算出し、これを直径8 mm LSE-high 切片の体積(0.015 mL)で除することにより drug-loaded LSE-high 中薬物初濃度を求めた。

5. Drug-loaded LSE-high からの薬物放出実験

調製した drug-loaded LSE-high を2-チャンバー拡散セル(セル容量2.5 mL、有効拡散面積0.95 cm²)⁵⁵⁾に挟み、ドナー側を空に、レシーバ側に放出液を適用することで真皮側からの薬物放出性を測定した。レシーバ液にはpH7.4 PBS 2.5 mLを用い、温度は32°Cに保った。レシーバ側のセル内はセル中のスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラー(マルチスターラーMC-301、(株)サイニクス、東京)により1,200 rpmで回転させることで攪拌した。経時的にレシーバ側から200 μ L サンプルングし、その都度同容量のPBSを補充した。サンプル溶液中の薬物濃度はHPLCを用いて測定した。

6. 薬物PBS溶液からの皮膚透過実験

体重230-280 gの雄性ヘアレスラット(WBN/ILA-Ht)は、城西大学生命科学センター(坂戸、埼玉)または石川実験動物研究所(深谷、埼玉)から購入した。ペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg)麻酔下、ヘアレスラットの腹部皮膚を剃毛処理した後セロハンテープ(セロテープ、ニチバン(株)、埼玉)で20回ストリッピング処理し、角

層を完全に除去した⁵⁶⁾。全ての皮膚透過実験には、この皮膚を摘出し損傷皮膚モデルとして用いた。

それぞれの薬物溶液の皮膚透過実験は、この摘出皮膚を放出実験と同型の2チャンバー拡散セルに装着して行った。ドナー側（表皮側）には0.25% TC-HClまたは0.1% CP PBS溶液2.5 mLを、レシーバ側（真皮側）には同容積のpH7.4 PBSを適用した。両セル内は前述の方法で32°Cに保ち攪拌を行った。サンプリングおよび薬物濃度の測定も放出実験と同様に行った。

7. Drug-loaded LSE-highからの皮膚透過実験

調製したdrug-loaded LSE-high (4.5 cm²)の真皮側をrat stripped skinの表皮側に貼付し、同型の拡散セルに挟んでdrug-loaded LSE-highからの薬物皮膚透過性を測定した。このとき2つの膜がセルの間でよく接着していることを確認してから実験を行った。レシーバ液にはpH7.4 PBS 2.5 mLを用い、セル内の保温、攪拌、サンプリングおよび薬物濃度の測定は前述の方法で行った。

8. 薬物の定量法（HPLC分析）

$K_{o/w}$ の測定実験、放出実験および皮膚透過実験で得られた各薬物サンプルは、内部標準物質を含有したアセトニトリルと1:1で混和し、遠心分離した上清20 μLをHPLCに注入した。HPLC分析に用いた移動相、検出波長および内部標準物質をTable 2に示す。また、使用したHPLCシステムを以下に示す。

送液ユニット	LC-10AS ((株) 島津製作所、京都)
UV 検出器	SPD-10A ((株) 島津製作所)
レコーダー	C-R5A ((株) 島津製作所)
システムコントローラー	SCL-10A ((株) 島津製作所)
オートインジェクター	SIL-10A _{XL} ((株) 島津製作所)
カラムオープン	CTO-6A ((株) 島津製作所)
カラム	Inertsil ODS 10C18, 4.6 × 250 mm, 5 μm (GL Science (株)、東京)

なお、ポンプ流速は 1 mL/min、カラム温度は 40°C に設定した。

Table 2 HPLC conditions for the drug assay

	TC-HCl	CP
Mobile phase	methanol : 0.1% phosphoric acid 7 : 3 (with 5 mM sodium dodecyl sulfate)	methanol : water 3 : 7
Detection (nm)	254	280
Internal standard	hexyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	methyl <i>p</i> -aminobenzoate

9. MTT 試験^{57,58)}

抗生物質は、その作用機序から少なからず細胞傷害性があると考えられる。抗生物質含有皮膚型貼付剤 (drug-loaded LSE-high) では、培養皮膚細胞が抗生物質に直接暴露されるため、その cell viability の低下が懸念される。そこで、MTT 試験により drug-loaded LSE-high 中の cell

viability を評価することとした。MTT 試験の原理は、細胞内ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素が 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を還元してホルマザンを生成することを利用しており、生成されたホルマザンを測定して生細胞数 (率) として表す。MTT 試験は、LSE-high のような培養皮膚の刺激性 (細胞毒性) を評価する方法の 1 つとして用いられている。

MTT 試験で評価した LSE-high は、以下のとおりである。Control として未処理の LSE-high (A)、サンプルとして調製直後の drug-loaded LSE-high (B)、調製した drug-loaded LSE-high を *in vivo* でヘアレスラットの stripped skin (腹部) に 6 時間貼付した後はがしたもの (C)、調製した drug-loaded LSE-high を新鮮な培地上に移し 24 時間インキュベートしたもの (D)、positive control として TC または CP 含有軟膏を角層側に 24 時間適用した LSE-high (E)。

(A)、(B) では、LSE-high および TC または CP を含む drug-loaded LSE-high をそのまま MTT 試験に用いた。(C) では、ヘアレスラット腹部皮膚をテープストリッピング処理し (本節 6 参照)、アロンアルファを用いて TC または CP を含む drug-loaded LSE-high をセルカルチャーインサートごと皮膚に貼付した。LSE-high の乾燥を防ぐため、セルカルチャーインサートはパラフィルムで覆った。6 時間後これを剥がし、MTT 試験を行った。(D) では、TC または CP を含む drug-loaded LSE-high を新鮮な培地上に移し、37°C、CO₂ 濃度 5% で 24 時間インキュベートして MTT 試験に用いた。(E) では、アクロマイシン[®]軟膏 (3% TC-HCl 含有) またはクロロマイセチン[®]軟膏 (2% CP 含有) それぞれ 100 mg を LSE-high の角層側に適用し、温度 37°C、CO₂ 濃度 5% で 24 時間インキュベートした。インキュベート後、角層上の軟膏をスパーテルで除去し、さらに培地で洗い流して MTT 試験に用いた。

(A) から (E) の前処理を行ったそれぞれの LSE-high の真皮側に 0.333 mg/mL MTT-培地を 1.2 mL 適用し、37°C、CO₂ 濃度 5% で 3 時間インキュベートした。インキュベート後、余分な MTT-培地を培地で洗い流した。これらの LSE-high は、生検パンチを用いて直径 8 mm にくり抜き、それぞれマイクロチューブに移した。それぞれのチューブに 0.04 M HCl-イソプロパノールを 1.0 mL ずつ加えてから暗所で 2 時間放置し、LSE-high 中で生成されたホルマザンを抽出した。ホルマザンの測定は、分光光度計 (UV-160A、島津製作所、京都) を用い、検出波長 570 nm にて行った。

第3節 結果および考察

本研究では、真皮を欠損したような重症火傷の応急処置に用いることができる新しい DDS として抗生物質含有培養皮膚型貼付剤を調製し、その有用性について数学的アプローチから評価した。

まず、三次元培養ヒト皮膚モデルである LSE-high の真皮側から培養培地を介して2種類の物性の異なる抗生物質 (TC-HCl および CP) を封入し、”drug-loaded LSE-high”を作成した。この drug-loaded LSE-high の調製法は簡便であり、かつ薬物封入が確実で、また培地中の薬物濃度を変えることである程度薬物放出量をコントロールできると考えられた。

1. Drug-loaded LSE-high からの TC と CP の放出挙動

Fig. 5 は、LSE-high から pH7.4 PBS への TC と CP の放出プロファイルを示す。TC と CP では、放出プロファイルが大きく異なった。TC では W.I. Higuchi の式 (式 (1)) に従う典型的な拡散制御の放出プロファイルを示したが、CP では初期にバースト現象が見られた。そこで、TC では W.I. Higuchi の式をそのまま用い、CP ではバースト現象を考慮した式 (第1節、理論の項参照) を用いて非線形最小二乗法によるカーブフィッティングを行った。どちらの薬物においても良好なフィッティングラインが得られ (Fig. 5)、LSE-high 中の薬物拡散係数 D_{LSE} および LSE-high 中の薬物初濃度 C_0 を算出することができた。得られたパラメータを Table 3 に示す。TC および CP の C_0 の値から、2つの薬物の培地から LSE-high への薬物移行量はほとんど変わらなかったが、LSE-high 中の拡散係数 D_{LSE} は CP で TC の約2倍であることが示された。また、実際に測定した drug-loaded LSE-high 中薬物初濃度 C_0 は、

TC および CP でそれぞれ 3.1×10^3 、 3.9×10^3 $\mu\text{g/mL}$ であり、計算値と近い値を示した。

2. PBS 溶液からの TC と CP の皮膚透過

次に、TC および CP の損傷皮膚透過性を評価するため、PBS 溶液からのそれぞれの薬物の rat stripped skin 透過実験を行った。Fig. 6 は、角層を除去したヘアレスラット皮膚を介した TC および CP の累積透過量-時間プロファイルを示す。実験系は有限用量系で行ったため、それぞれの薬物の皮膚透過性は Fick の拡散則に基づく差分式を用いた非線形最小二乗法により解析した（第 1 節、理論の項参照）。両薬物においてフィッティングラインは実測値と良好な一致を示し、皮膚中の薬物拡散係数 D_{skin} を算出することができた。Table 3 にはまた TC と CP の D_{skin} の値を示す。TC の D_{skin} は CP の約 2.5 倍の値を示した。一般に、matrix 中での拡散性は、拡散物質の分子サイズに依存する⁵⁹⁾が、TC と CP の分子量には大きな差はない。したがって、両薬物の D_{LSE} または D_{skin} の違いには、これ以外のファクターが関与していると考えられる。

Drug-loaded LSE-high からの薬物放出実験および薬物 PBS 溶液からの皮膚透過実験のデータ解析により得られたパラメータから、TC では、LSE-high より stripped skin 中のほうが薬物拡散性が高く、CP では、逆に LSE-high 中のほうが高い結果となった。LSE-high 中には培地が多く残存しているため、皮膚中に比べると Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などの金属イオンが豊富に含まれていると考えられる。TC は、このような金属カチオンと難溶性のキレートを形成しやすいという特徴を持っており、このことが TC の LSE-high 中の拡散性を低下させる原因の 1 つとなっていると考えられる。

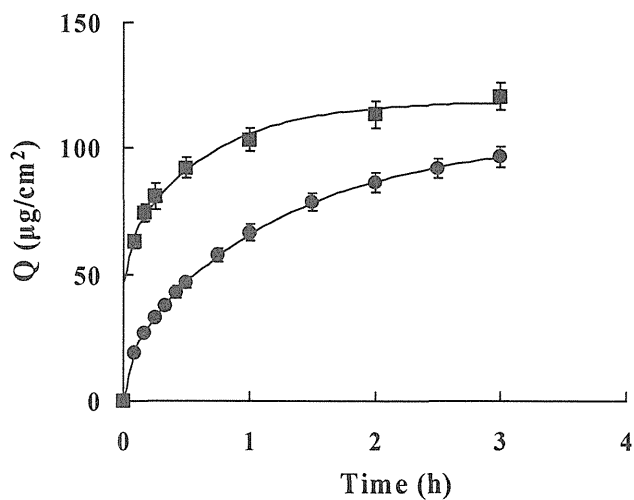


Fig. 5 Release profiles of TC (circles) or CP (squares) from drug-loaded LSE-high. Lines show theoretical values. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=6).

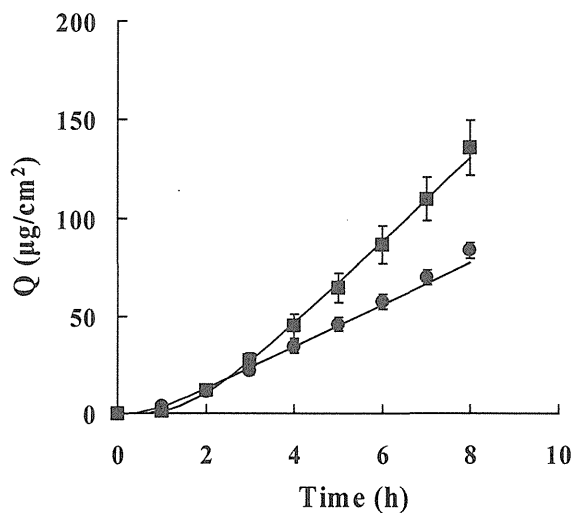


Fig. 6 Permeation profiles of TC (circles) or CP (squares) through the excised stripped skin from the drug solution. Lines show theoretical values. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=6).

Table 3 Parameters calculated by data from release and skin permeation experiments

Parameters	TC-HCl	CP
D_{LSE} (cm ² /h)	2.8×10^{-4}	5.5×10^{-4}
D_{skin} (cm ² /h)	7.1×10^{-4}	3.0×10^{-4}
$K_{skin/LSE}$	8.6	5.3×10^4
C_0 (μg/mL)	3.5×10^3	4.1×10^3

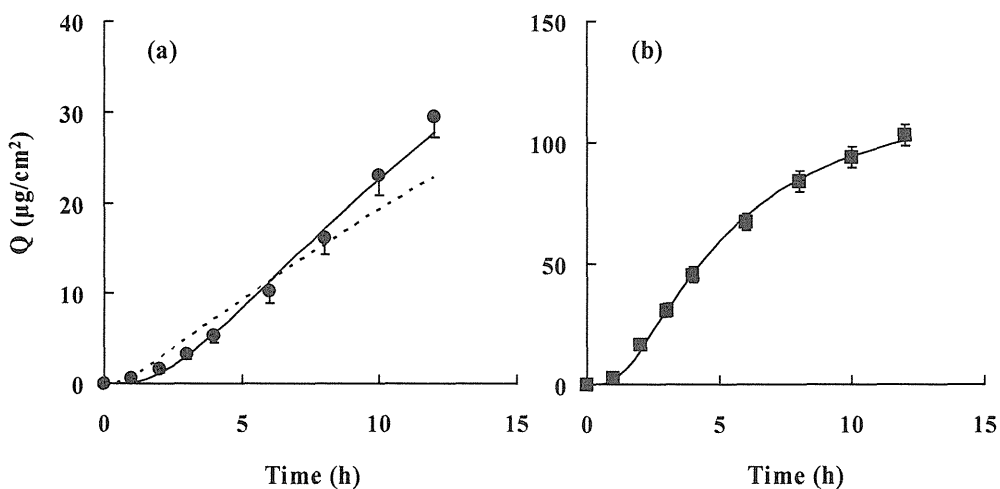


Fig. 7 Permeation profiles of TC (a) or CP (b) through the excised stripped skin from drug-loaded LSE-high. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=6). (a): The solid line and the broken line show the theoretical curve evaluated by a three- and two-layered diffusion model, respectively. (b): The line shows the theoretical curve evaluated by two-layered model.

3. Drug-loaded LSE-high からの TC と CP の皮膚透過

Fig. 7a,bは、角層を除去したヘアレスラット皮膚を介した drug-loaded LSE-high からの TC および CP の累積透過量-時間プロファイルを示す。TC の LSE-high から rat stripped skin への分配さらにはそれに続く stripped skin 透過プロファイルを、Table 3 に示した C_0 、 D_{LSE} 、 D_{skin} を固定して、構築した 2 層膜モデルを用いて非線形最小二乗法により解析したところ、得られたフィッティングラインは透過データと満足する一致を示さなかった (Fig. 7a)。これに対して、CP の LSE-high からの分配とそれに続く stripped skin 透過性についても同様に解析したところ、LSE-high と stripped skin の 2 層膜モデルで良好なフィッティングラインを得ることができた (Fig. 7b)。これは TC-HCl では LSE-high から stripped skin への薬物の移行性に遅れが見られるために起こると考えられた。そこで、TC の透過プロファイルを stagnant layer を組み込んだ 3 層膜モデルを用いて解析したところ、良好なフィッティングラインが得られた (Fig. 7a)。これらの違いは、2 つの薬物間で物性が異なることに起因していると考えられる。特に TC では、前にも述べたように Ca^{2+} や Mg^{2+} のような金属カチオンと難溶性のキレートを形成しやすいという物性から、LSE-high、培地および皮膚中のイオンとの相互作用が示唆される。また、両薬物では K_{ow} が大きく異なることから、LSE-high から stripped skin への薬物の分配性に大きな違いが見られると考えられる。

このことから、TC では 3 層膜モデルを、CP では 2 層膜モデルを用いて皮膚透過性および皮膚中挙動を解析することとした。それぞれの解析で得られたパラメータを Table 3 にまとめた。TC の stripped skin/LSE-high 分配係数 $K_{skin/LSE}$ は、解析から求めた $K_{SL/LSE}$ と $K_{skin/SL}$ をかけることで算出した。

4. Drug-loaded LSE-high の皮膚透過実験時の皮膚中薬物濃度のシミュレーション

つづいて、3 層膜モデルおよび 2 層膜モデルと得られたパラメータを用いて drug-loaded LSE-high からの薬物皮膚透過時の TC および CP の stripped skin 中濃度をシミュレーションした。差分法を用いることで皮膚におけるある位置のある時間での濃度が求められることは前述のとおりである。厚み 570 μm の stripped skin を表皮表面から真皮（深さ）方向に 10 分割し、それぞれの層での薬物濃度の時間推移をシミュレーションした結果を Fig. 8a,b に示す。図から明らかなように、両薬物の皮膚中挙動は大きく異なった。TC では、stripped skin 中の薬物濃度の立ち上がりが緩やかで、薬物の消失も遅い。これは、TC の stripped skin 中の拡散係数より基剤となる LSE-high 中の拡散係数の方が小さいこと（基剤律速）により、薬物の LSE-high から stripped skin への薬物の移行性に遅れが見られるためであると示唆された。また、両薬物の stripped skin/LSE-high 分配係数 $K_{\text{skin/LSE}}$ の違いが、それぞれの薬物の皮膚中絶対量の大きな違いの原因と考えられる。

また、薬物の皮膚中濃度の目安として、それぞれの抗生物質の種々微生物に対する最小発育阻止濃度（MIC）を図中に示した。TC および CP の皮膚中挙動は大きく異なるものの、drug-loaded LSE-high 中濃度は両薬物共 MIC を十分満たすことが予想された。このことから、本実験での drug-loaded LSE-high の調製方法が有用な手段の一つであることが示唆された。また本実験での解析方法で、drug-loaded LSE-high を皮膚適用したときの TC および CP の LSE-high 中および皮膚中挙動がある程度予測可能であり、drug-loaded LSE-high への必要薬物封入量の算出も可能であることが示唆された。

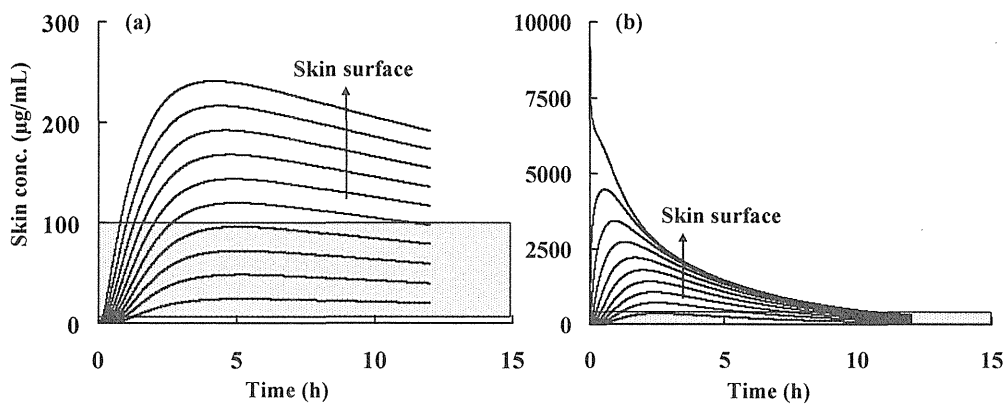


Fig. 8 Simulated steady state TC (a) or CP (b) concentration in each skin layer. The upper to lower lines correspond to the upper to lower layer of skin. Meshed columns show MIC of the antibiotics.

5. MTT 試験結果

Fig. 9 に MTT 試験により測定した LSE-high の cell viability を示す。本調製法で調製した drug-loaded LSE-high の cell viability は、TC で $39.6 \pm 0.8\%$ 、CP で $19.9 \pm 0.5\%$ まで低下することが示された。しかしながら、それぞれの薬物を含む軟膏を LSE-high の角層側に適用した場合でも、viability の低下が見られた。特に TC では、軟膏適用後の viability が $36.8 \pm 0.5\%$ と drug-loaded LSE-high とほぼ同等の結果となった。このように、drug-loaded LSE-high では、封入する薬物によっては従来の薬物治療をしたときとほぼ同等の viability を保ったまま、新しい DDS の機能を果たすことができると考えられる。

また、調製した drug-loaded LSE-high を損傷皮膚モデルである rat stripped skin に 6 時間貼付した後の viability は、調製直後の drug-loaded LSE-high と比較し大きな変化は見られなかった。しかし、drug-loaded LSE-high を新たな培地上でインキュベートしたところ、その viability は TC および CP でそれぞれ $45.3 \pm 0.6\%$ 、 $24.5 \pm 0.9\%$ と回復する傾向が見られた。

Drug-loaded LSE-high 中に封入する薬物やその薬物の封入量をコントロールすることで viability の問題点は解決できるものと思われる。

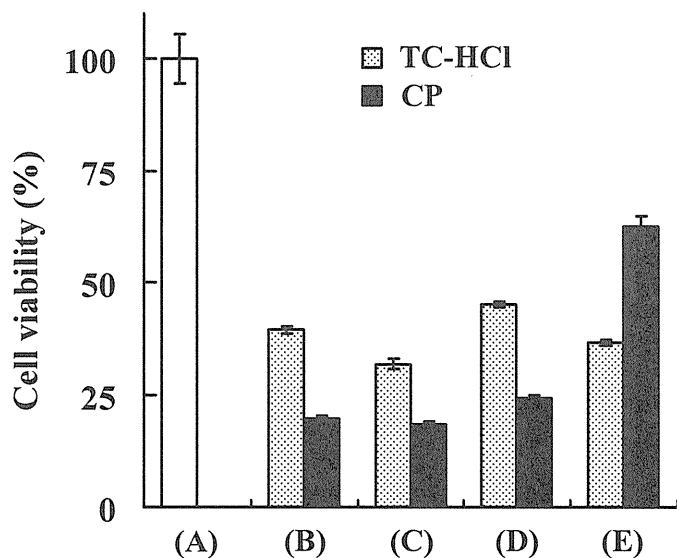


Fig. 9 Cell viability (%) of LSE-high by MTT assay. (A), control; (B), drug-loaded LSE-high; (C), drug-loaded LSE-high applied to rat stripped skin for 6 h; (D), drug-loaded LSE-high incubated on fresh medium at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator for 24 h; (E), LSE-high after application of antibiotic ointments for 24 h. Data are shown as mean ± S.E. (n=3).

今回調製した drug-loaded LSE-high を損傷皮膚モデルである stripped skin に適用した。LSE-high に封入した両薬物は、損傷皮膚モデル中で様々な微生物に対するそれぞれの最小発育阻止濃度 (MIC) を満たしており、本システムの有用性が示唆された。また、本実験で構築された拡散現象に基づくモデルを用いた解析により drug-loaded LSE-high を皮膚適用したときの TC および CP の挙動がある程度予測可能であることが示唆され、さらにこの方法は他の薬物への応用も可能であると思われた。本システムを他の薬物へ応用した場合、その薬物の物性が示されていれば、この数学的解析法を用いることで、実験を行わなくても drug-loaded LSE-high 皮膚適用時の薬物の挙動がある程度予測できると考えられる。

しかし、問題点も残されている。火傷や皮膚潰瘍等の処理には薬物等を過負荷 (overdose) しない LSE-high が最も優れていると述べる研究者もいる。すなわち、LSE-high 中にはそれ自身に炎症を和らげるようなサイトカイン類も多く含まれている。今回のように TC や CP といった外因性薬物を封入すると LSE-high 中の角化細胞や線維芽細胞の viability が減少することがある。MTT 試験法を用いた実験から、これら物質を多量封入すると LSE-high の viability が減少する傾向にあることが示された。薬物は人にとって両刃の剣であるがごとく、LSE-high にとっても good side と bad side があることに注意しなければならない。しかしながら、pure な (薬物を過負荷しない) LSE-high を皮膚損傷の処理に用いた場合にも、抗菌物質等による薬物治療は必要となる。これは、LSE-high のような血管を持たない培養皮膚が、微生物汚染を受けやすい⁶⁰⁾ことに起因する。MTT 試験法を用いた実験により、抗生物質軟膏を LSE-high の角層側に適用した場合にも viability の減少が示されたことから、drug-loaded LSE-high 中に封入する薬物や薬物の封入量

をコントロールして細胞傷害性を持たない drug-loaded LSE-high を調製することが望まれる。

薬物の歴史を考えてみると、現在は旧来から使用されていた低分子有機化合物だけではなくペプチドやオリゴヌクレオチドなどの内因性物質またはその類似体も用いられるようになった。今後を考えてみると、健康な生体中の細胞そのものが最も優れた医薬品と考えることもできよう。しかし、細胞そのものを体内に投与してもすぐに分解、失活するか、逆に失活しなくとも効果の予測がつきにくい。皮膚、特にバリアーである角層を取り除いた皮膚に細胞を適用することは、細胞医薬の中でも最も実現性が高い手段と考えられる。たとえば、インスリンを含有する LSE-high があれば、糖尿病患者の皮膚潰瘍部に適用して有効なインスリンレベルを維持するという治療法も考えられる。現在、インスリン遺伝子を導入された線維芽細胞を含有するプロインスリン分泌性ハイブリッド型人工皮膚による糖尿病動物の実験的治療に関する研究⁶¹⁾も進められており、実用化の期待が高まっている。しかし、これらの研究はまだ始まったばかりであり、今後多くの研究が必要である。

第4節 小括

本研究で構築された拡散モデルを用いた解析により、“drug-loaded LSE-high”を皮膚適用したときの TC および CP の挙動がある程度予測可能であった。また、“drug-loaded LSE-high”を用いた方法は他の薬物への応用も可能であり、細胞や組織医薬の草分け的研究になると思われる。特に、抗生物質や抗菌薬を含有した培養皮膚型貼付剤は重症火傷や褥瘡等の治療に対する新しい DDS として有望であろう。

第 2 章 Polystyrene microspheres を用いた抗生物質放出制御に関する検討

重症火傷や褥瘡のような皮膚損傷の治療では、創を直ちに覆うことが、創傷処置の基本の一つである⁶²⁾。同時にこのような皮膚損傷では、2 次感染の危険性が高く死亡の原因ともなるため、2 次感染に対する処置も必要となる⁶³⁾。それゆえ前章で調製、評価してきた”drug-loaded LSE-high”は、創傷の初期段階に最も効果を発揮すると考えられる。しかし、drug-loaded LSE-high を一時的な創傷被覆材と考えた場合、最終的には永久生着が期待できる自家移植が必要となる。患者から十分な自家皮膚を摘出するのが困難な場合（広範囲に及ぶ火傷や患者への侵襲性が問題となる場合など）には、患者自身の皮膚を必要最小限の範囲摘出して角化細胞および線維芽細胞を分離、培養し、これらの細胞から構築した自家培養表皮や自家培養皮膚を創傷部位に移植することで、永久生着による創傷治癒が期待できる^{10,64)}。しかしながら、これらの自家培養皮膚片を構築するには 2 週間から 1 ヶ月程度を要するため、この期間の創傷部位のバリアー能を護り、かつ微生物による 2 次感染をいかに防ぐかということが創傷治療のカギの 1 つとなる¹¹⁾。

そこで、本章では第 1 章で用いた抗生物質含有培養皮膚型貼付剤に薬物放出制御能を持たせることを目的とした。すなわち、重症火傷などの 2 次感染を防ぐのに十分な薬物放出持続時間を得るために、表面にスルホン酸基を修飾し負電荷を持った polystyrene latex microspheres (PSMS, 粒子径: 0.20-2.0 μm) にカチオン性抗生物質である TC を吸着させた放出制御型培養皮膚型貼付剤を調製した。この有用性について、TC の PSMS への吸着性と 3 次元培養ヒト真皮モデル (Living Dermal Model; LDM) のコラーゲン層に TC および PSMS を分散させた放出制

御型培養真皮 (TC-PSMS-loaded LDM) からの TC の放出性および皮膚透過性を測定することにより評価した。なお、LDM は、第 1 章で用いた LSE-high の真皮部分に相当する。本来、創傷治療には、表皮、特に皮膚の最大のバリアーである角層を有する LSE-high のような培養皮膚 (全層皮膚) が望ましいが、表皮 (角層を含む) 部分の培養にはより長い時間と高い技術を必要とする。本章では、放出制御型培養皮膚型貼付剤の評価をより簡便に行うため、敢えて LDM を用いることとした。

抗生物質含有培養皮膚型貼付剤に薬物放出制御能を持たせることは、培養皮膚自身および損傷皮膚表面を 2 次感染から十分に防御できるだけでなく、薬物が損傷皮膚側に徐々に放出されることにより損傷皮膚組織の高濃度の薬物による傷害性を避けることにつながるとも考えられる。

第1節 実験の部

1. 実験材料

TC-HClは第1章と同じものを用いた。市販のPSMS (Polybead[®] Sulfate Microspheres, 粒子径: 0.20, 0.50, 1.0, 2.0 μm) は Polysciences, Inc. (Warrington, PA, U.S.A.) より購入した。LDM の材料であるヒト真皮由来線維芽細胞およびコラーゲングルキット (ウシ由来酸性タイプ I コラーゲン溶液、コラーゲン中和培地およびウシ血清を含む) は東洋紡績株式会社 (大阪) より購入した。その他の試薬および溶媒は市販の特級または HPLC 用を用いた。これらの試薬は精製せずにそのまま使用した。

2. TC の PSMS への吸着性評価

粒子径 0.20、0.50、1.0 および 2.0 μm の PSMS を pH7.4 PBS にそれぞれ分散させ、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PSMS 懸濁液を調製した。これらの懸濁液に TC-HCl (分子量 480.9) を溶かして種々濃度の TC-HCl + PSMS 懸濁液を調製した。これらを 37°C で 24 時間インキュベートした後 Microcon[®] に 0.5 mL ずつ分注し、10,000 $\times g$ で 50 分間遠心ろ過することでふるい分け (分子量 3,000 cut off) を行った。ろ液の TC 濃度を HPLC にて測定し、遊離型および吸着型 TC 濃度を算出した。なお、ブランクとしてサンプルと同濃度の TC-HCl PBS を用いて同様の操作を行い、補正を行った。

3. TC-PSMS-loaded LDM の調製

まずヒト真皮由来線維芽細胞を、炭酸水素ナトリウム、10% fetal bovine serum (FBS; ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, U.S.A.)、penicillin

(50 U/mL) および streptomycin (50 µg/mL) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 日本製薬株式会社、東京) 中で、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した後、トリプシン処理にて細胞を回収し 1.875×10⁵ cells/mL の線維芽細胞浮遊培地を調製した。氷中にてコラーゲン溶液 8.0 mL に中和培地 16 mL、ウシ血清 2.0 mL および調製した線維芽細胞浮遊培地 4.0 mL を順番に加え混合、攪拌した後、さらに PSMS 懸濁液 (それぞれ必要量) を加え混合、攪拌した。この混和液 4.0 mL を直径 24 mm のセルカルチャーインサートに分注し、37°C、5% CO₂ 存在下で 7 日間培養することにより PSMS-loaded LDM を得た。この PSMS-loaded LDM を 2.0 mg/mL TC-HCl 懸濁培地 (上述の線維芽細胞培養培地) 上に設置し、5% CO₂、37°C で 24 時間インキュベートすることにより LDM 中に TC を封入して TC-PSMS-loaded LDM (4.5 cm²、0.015 cm 厚み) とした。

なお、control として、PSMS を含有しない LDM を 2.0 mg/mL TC-HCl 懸濁培地上に設置して同条件でインキュベートすることにより TC-loaded LDM (4.5 cm²、0.015 cm 厚み) を調製し、以下同様の評価を行った。

4. TC-loaded または TC-PSMS-loaded LDM からの TC 放出実験

調製した TC-loaded または TC-PSMS-loaded LDM を 2-チャンバー拡散セル (セル容量 2.5 mL、有効拡散面積 0.95 cm²) に挟み、第 1 章、第 2 節の 5 と同様の方法で TC 放出性を測定した。

5. TC-loaded または TC-PSMS-loaded LDM からの TC 皮膚透過実験

調製した TC-loaded または TC-PSMS-loaded LDM を rat stripped skin の表皮側に貼付し、拡散セルに挟んで第 1 章、第 2 節の 7 と同様の方

法で TC 皮膚透過性を測定した。なお、損傷皮膚モデルとして同章、同節の 6 の方法で調製した hairless rat stripped skin を用いた。

6. TC の定量法 (HPLC 分析)

第 1 章、第 2 節の 8 と同様の方法で TC を定量した。

7. LDM または PSMS-loaded LDM を介した高分子物質の透過性評価

PSMS を負荷することによる LDM の物質透過性の変化を評価するために、モデル高分子化合物である Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4; 分子量 3,820) (Sigma Aldrich Co. Ltd., St. Louis, MO, U.S.A.) の LDM または PSMS-loaded LDM を介した透過性を測定した。

LDM または PSMS-loaded LDM をこれまでの放出および透過実験と同型の拡散セルに挟み、ドナー側 (LDM の表皮界面側) に 0.25 mM FD-4 PBS 溶液 2.5 mL を、レシーバ側 (LDM の培地界面側) に同容積の pH7.4 PBS をそれぞれ適用して透過性を測定した。セル内の保温、攪拌およびサンプリングは前述 (第 1 章、第 2 節参照) の方法で行った。

得られた各サンプルは、蛍光分光光度計 (RF-5300PC、(株) 島津製作所、京都) を用いて定量した。測定波長には、励起波長 490 nm、蛍光波長 520 nm を用いた。各時間のサンプルの蛍光強度は、0 時間目のサンプルの蛍光強度で補正した。

8. 蛍光 PSMS を用いた PSMS-loaded LDM の組織学的観察

蛍光色素により標識された polystyrene latex microspheres (蛍光 PSMS) を用いて PSMS-loaded LDM を調製し、組織観察することにより LDM 中での PSMS の分布を評価した。

蛍光 PSMS には、市販の Fluoresbrite[®] Yellow Green (YG) Carboxylate

Microspheres 0.50 μm (Polysciences, Inc.) を用いた。この蛍光 PSMS の励起および蛍光スペクトルは Fluorescein isothiocyanate (FITC) と類似している。この蛍光 PSMS を用いて、本節の 3 に述べた方法に従い PSMS-loaded LDM (蛍光 PSMS-loaded LDM) を調製した。この LDM 中の蛍光 PSMS の含量は、4 mg PSMS/LDM とした。

調製した蛍光 PSMS-loaded LDM を Tissue-Tek[®] OTC compound (Miles, Inc., Elkhart, IN, U.S.A.) に包埋し、 -20°C イソペンタン中で速やかに凍結させ、凍結ミクロトーム (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて垂直方向に 10 μm の厚みに薄層化し、スライドガラスに回収した。切片の観察には、共焦点レーザー顕微鏡 C1 plus ((株) ニコン、東京) を用いた。

第2節 結果および考察

1. TC の PSMS への吸着性

pH7.4 PBS 中での TC の PSMS (粒子径 0.20、0.50、1.0 および 2.0 μm) への吸着量を Fig. 10 に示す。本研究で用いた PSMS は、粒子径に関わらず中性条件下で濃度依存的に TC と吸着することが示唆された。このことから、放出制御型培養皮膚型貼付剤の構築のために、TC と PSMS の吸着現象が利用可能であると予想された。

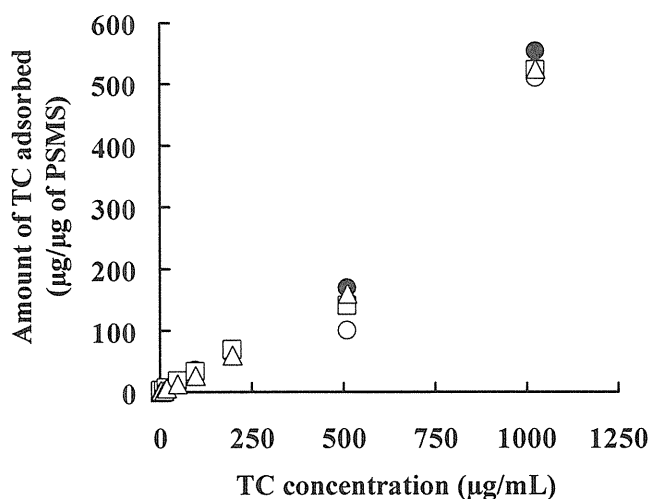


Fig. 10 Adsorption of TC on PSMS with mean diameters of 0.20 (●), 0.50 (○), 1.0 (□) and 2.0 μm (△).

2. TC-PSMS-loaded LDM からの TC 放出性および皮膚透過性に及ぼす PSMS 径の影響

吸着実験で用いた PSMS のうち、0.50 および 2.0 μm 径の PSMS を選択して TC-PSMS-loaded LDM (PSMS 含量はそれぞれ 400 $\mu\text{g/LDM}$) を調製し、TC 放出性および皮膚透過性を測定することにより、これらに

及ぼす PSMS 径の影響を評価した。

TC-PSMS-loaded LDM からの TC の放出および皮膚透過プロファイルを Fig. 11 と 12 にそれぞれ示す。放出プロファイルから、TC-PSMS-loaded LDM は PSMS 径に関わらず LDM からの TC の初期放出を抑制することが示唆された (Fig. 11)。一方、透過プロファイルから、0.50 μm 径を用いた TC-PSMS-loaded LDM では TC の皮膚透過性が低下したものの、2.0 μm 径では認められなかった (Fig. 12)。

そこで、TC の放出および皮膚透過性共に抑制効果の見られた 0.50 μm 径の PSMS を用いて LDM 中 PSMS 含量のこれらに及ぼす影響を評価することとした。

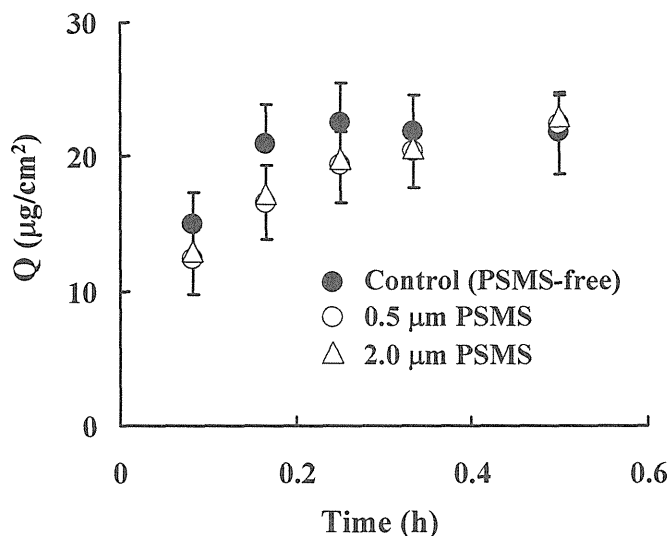


Fig. 11 Release profiles of TC from TC-loaded LDM or TC-PSMS-loaded LDM with different diameters of PSMS. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=4-6).

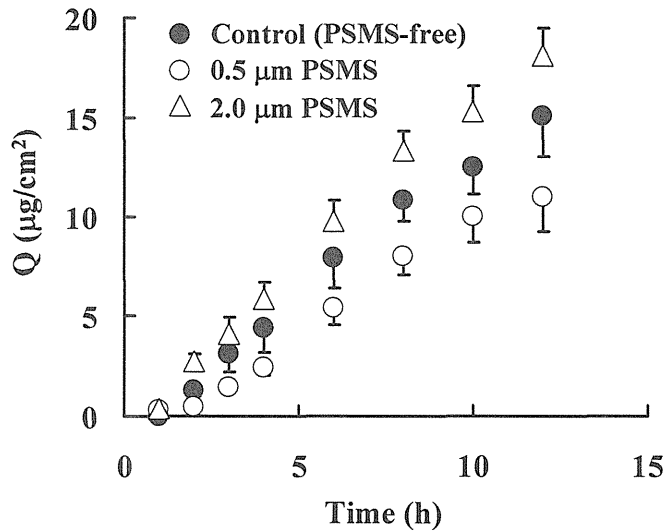


Fig. 12 Permeation profiles of TC through the excised stripped skin from TC-loaded LDM or TC-PSMS-loaded LDM with different diameters of PSMS. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=4-6).

3. TC-PSMS-loaded LDMからのTC放出性および皮膚透過性に及ぼすPSMS含量の影響

0.50 μm 径のPSMSを用いてPSMS含量40、400 μg および4.0 mg/LDMのTC-PSMS-loaded LDMをそれぞれ調製し、TC放出性および皮膚透過性を測定することにより、これらに及ぼすPSMS含量の影響を評価した。

TC-PSMS-loaded LDMからのTCの放出および皮膚透過プロファイルを図13と14にそれぞれ示す。放出プロファイルから、PSMS含量の低いTC-PSMS-loaded LDMほどTCの放出抑制効果が高いことが示された。PSMS含量の最も高い4.0 mg/LDMでは、controlとほぼ同様のTC放出挙動を示し、放出抑制はほとんど見られなかった (Fig. 13)。これらの放出プロファイルを図1章、第1節の1で述べた方法に従い

それぞれ解析した。すなわち、放出データを W. I. Higuchi の式に非線形最小二乗法を用いて当てはめることにより、TC-loaded または TC-PSMS-loaded LDM 中の TC の拡散係数 D_{LDM} および初濃度 C_0 を算出した。LDM の厚み L_{LDM} は 0.015 cm として計算した。Fig. 13 に示すように、どのデータにおいても良好なフィッティングラインが得られ、 D_{LDM} および C_0 を算出することができた。算出した D_{LDM} および C_0 の数値を Table 4 に示す。異なる PSMS 含量の TC-PSMS-loaded LDM からの TC 放出性の違いは、LDM 中の TC 初濃度 C_0 には関係なく、LDM 中の TC 拡散性 D_{LDM} の変化によるものであると示唆された。

透過プロファイルから、全ての TC-PSMS-loaded LDM で TC 皮膚透過性の抑制が見られたが、放出プロファイルと同様に、PSMS 含量の低いものの方がその効果が高いことが示された (Fig. 14)。これらの透過プロファイルを第 1 章、第 1 節の 4 で述べた 3 層膜モデルを用いて解析した。TC の LDM から stagnant layer への分配とそれに続く透過、さらに stagnant layer から rat stripped skin への分配とそれに続く透過の模式図 (concentration-distance profile) を Fig. 15 に示す。透過データの解析には、放出データから算出した D_{LDM} および C_0 (Table 4) と第 1 章で算出した TC の stripped skin 中拡散係数 D_{skin} ($7.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{h}$) を用いた。Fig. 14 から明らかなように、どのデータにおいても良好なフィッティングラインが得られ、それぞれの膜界面の分配パラメータを算出することができた。

つづいて、3 層膜モデルと得られたパラメータを用いて、TC-loaded または TC-PSMS-loaded LDM からの皮膚透過実験時の TC の stripped skin 中濃度をシミュレーションした。差分法を用いることで皮膚におけるある位置のある時間での濃度が求められることは第 1 章で述べたとおりである。厚み 570 μm の stripped skin を表皮表面から真皮 (深さ)

方向に 10 分割し、その最外層、つまり表皮表面から 1 層目 (厚み 57 μm) の平均皮膚中 TC 濃度の時間推移をシミュレーションした結果を Fig. 16 に示す。Control (TC-loaded LDM) では、皮膚中 TC 濃度の立ち上がりが速く、皮膚からの TC の消失も速いことが示唆された。一方、TC-PSMS-loaded LDM では、その PSMS 含量が低いものほど皮膚中 TC 濃度の立ち上がりが遅く、消失も遅いことが示された。このことから、PSMS 含量の低い TC-PSMS-loaded LDM は、皮膚中 TC 濃度を持続することが可能であると期待される。PSMS の粒子径や LDM 中含量を調整することで、TC の放出性、皮膚透過性さらには皮膚中濃度を制御できることが示唆された。

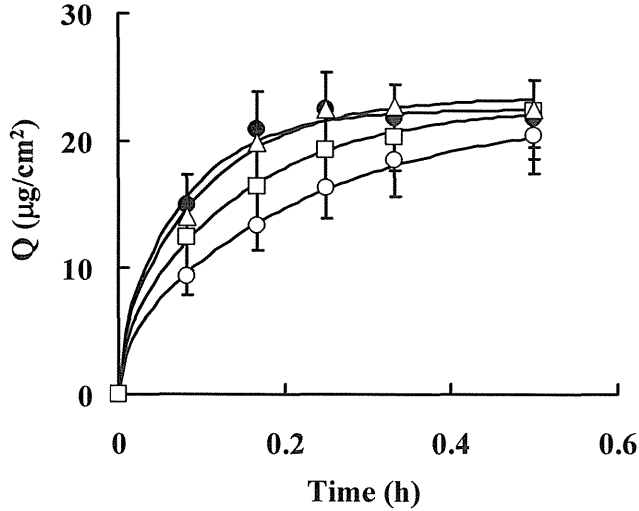


Fig. 13 Release profiles of TC from TC-loaded LDM (●) or TC-PSMS-loaded LDM with different PSMS contents, 40 $\mu\text{g/LDM}$ (○), 400 $\mu\text{g/LDM}$ (□) and 4.0 mg/LDM (△). Data are shown as the mean \pm S.E. (n=4-6). Lines show theoretical values.

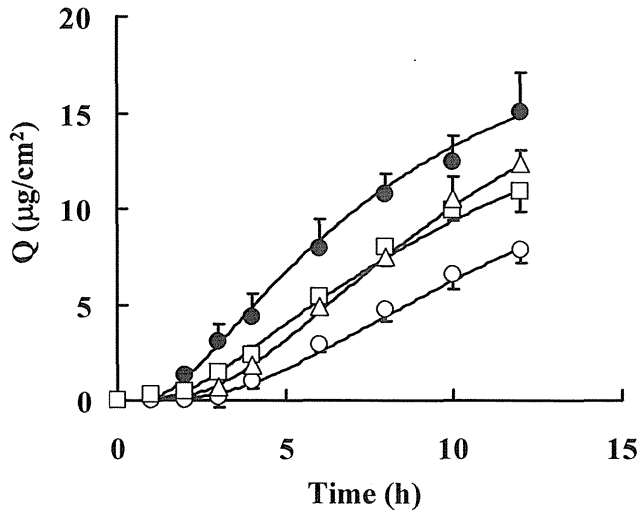


Fig. 14 Permeation profiles of TC through the excised stripped skin from TC-loaded LDM (●) or TC-PSMS-loaded LDM with different PSMS contents, 40 $\mu\text{g/LDM}$ (○), 400 $\mu\text{g/LDM}$ (□) and 4.0 mg/LDM (△). Data are shown as the mean \pm S.E. (n=4-6). Lines show theoretical values.

Table 4 Parameters calculated by release profiles

Parameters	Control	40 $\mu\text{g/LDM}$	400 $\mu\text{g/LDM}$	4.0 mg/LDM
D_{LDM} (cm^2/h)	1.1×10^{-3}	3.9×10^{-4}	6.0×10^{-4}	8.5×10^{-4}
C_0 ($\mu\text{g/mL}$)	1.5×10^3	1.5×10^3	1.5×10^3	1.6×10^3

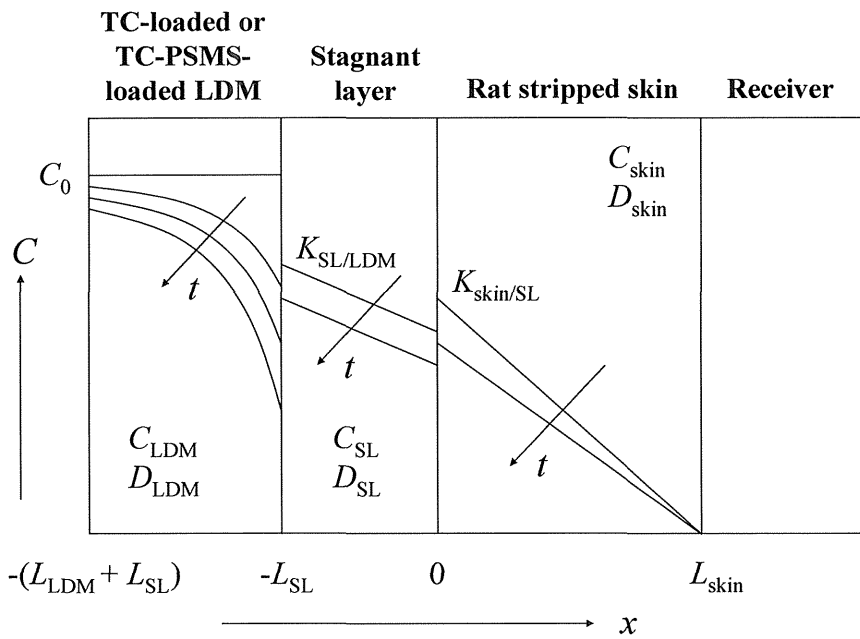


Fig. 15 A typical concentration-distance profile of TC in the LDM, stagnant layer and stripped skin at the skin permeation experiment (three-layered diffusion model).

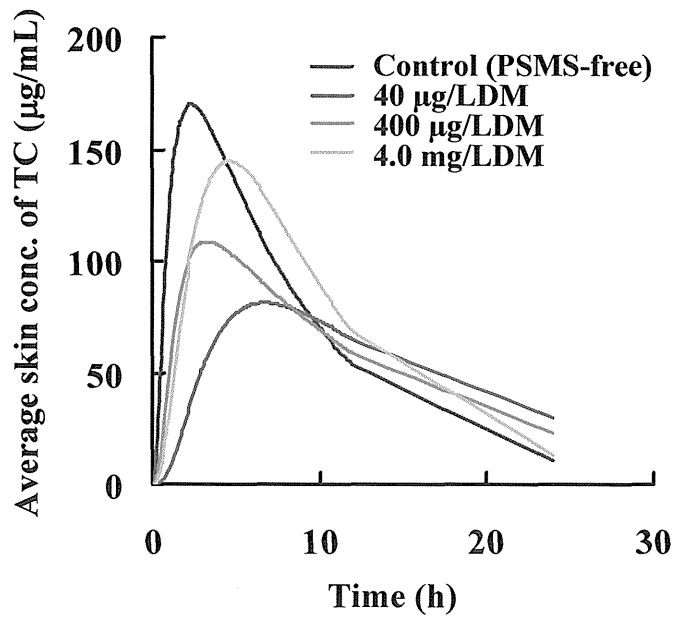


Fig. 16 Simulated steady state average concentration of TC in the outermost layer of wound skin model.

4. LDM または PSMS-loaded LDM を介した高分子物質の透過性

これまでの結果から、我々の予想に反し、TC-PSMS-loaded LDM の PSMS 含量が低いほど TC の放出性・皮膚透過性の抑制効果および皮膚中濃度の持続効果が高いことが示唆された。また、これらの効果の違いは、TC の LDM 中拡散係数 D_{LDM} の違いによるものであることが示唆された。つまり、TC の PSMS への吸着性評価から TC の PSMS への吸着は濃度依存的に起こることが示されたにもかかわらず、TC-PSMS-loaded LDM の PSMS 含量が低いほど TC の D_{LDM} が低下するということである。そこで、TC と PSMS との吸着現象以外にも D_{LDM} が低下する原因があると考え、まず PSMS を負荷することによる LDM の物質透過性の変化を評価することとした。

LDM および 0.50 μm 径の PSMS 40 μg または 4.0 mg/LDM を含有した PSMS-loaded LDM を調製し、これらを介したモデル高分子物質の透過性を測定した。モデル高分子物質として、PSMS との吸着がほとんど無視できると考えられる FD-4 を用いた。結果を Fig. 17 に示す。PSMS 含量の低い PSMS-loaded LDM の方が FD-4 の透過性が高い結果となった。PSMS 含量が 4.0 mg/LDM では、control や 40 μg /LDM に比較して FD-4 の透過性が顕著に低下した。このことから、PSMS を高含量で負荷すると、LDM の構造に何らかの変化（コラーゲンゲル層の不均一化など）が起き、物質透過性に変化が見られることが示唆された。

そこで、蛍光 PSMS を負荷した LDM（蛍光 PSMS-loaded LDM）を調製し、その切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察することで、LDM の構造および LDM 中の蛍光 PSMS の分布を観察した。

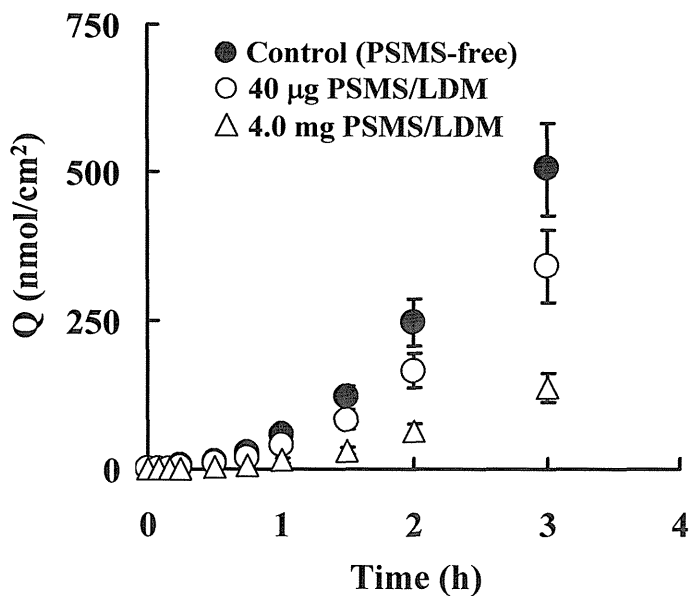


Fig. 17 Permeation profiles of FD-4 through the LDM or PSMS-loaded LDM with different PSMS contents from FD-4 solution. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=4-6).

5. 蛍光 PSMS-loaded LDM の組織学的観察

0.50 μm 径の蛍光 PSMS を用いて、含量 4.0 mg/LDM の蛍光 PSMS-loaded LDM を調製した。この切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果を Fig. 18 に示す。Fig. 18c から、PSMS を負荷することによる LDM 構造の顕著な変化は認められなかった。また、Fig. 18d から、PSMS-loaded LDM 中の PSMS の分布が明らかとなった。PSMS は LDM 中のコラーゲン層に均一に分散しているのではなく、コラーゲン層に PSMS 濃度の高い部分が局在し、これが層状の構造を形成していることが示唆された。本節の 4 で述べたように、4.0 mg PSMS/LDM (高 PSMS 含量) の PSMS-loaded LDM の FD-4 透過性が低かった原因は、この層状になった PSMS の存在により高分子物質である FD-4 の拡散性が低下したことによると考えられる。また、本節の 3 で述べたように、4.0 mg PSMS/LDM (高 PSMS 含量) の TC-PSMS-loaded LDM で TC 放出性の抑制効果が見られなかったことは、PSMS が層状になることで TC の吸着できる表面積が低下し、TC の吸着に飽和が起こると考えれば説明できる。これらのことから、LDM からの TC の放出性、皮膚透過性さらには皮膚中濃度を制御できる TC-PSMS-loaded LDM を調製するためには、LDM 中の PSMS 含量の設定が重要になると考えられる。

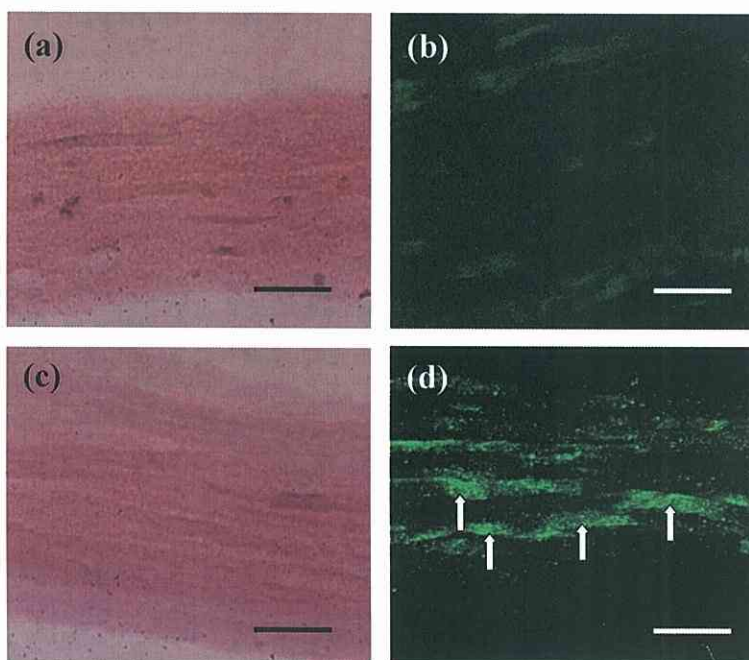


Fig. 18 Microscopic observation of LDM cross-section (a and b) or fluorescent-PSMS-loaded PSMS cross-section (c and d) by phase-contrast microscope (HE-stain) (a and c) and confocal laser scanning microscope (b and d). Scale bars shows 50 μm . Arrows show fluorescent-PSMS.

前述のように、第 1 章で調製、評価してきた”drug-loaded LSE-high”は、重症火傷のような創傷の初期段階に最も効果を発揮できる DDS (もしくは創傷被覆材とも捉えられる) であると考えられる。しかし、永久生着を目的とした自家培養皮膚片を構築するのに要する 2 週間から 1 ヶ月の間、患者を感染から守るためには、この DDS に薬物放出制御能を持たせることが望ましいと考えられる。

本章では、TC 放出制御能をもつ放出制御型培養皮膚型貼付剤として、TC と PSMS の吸着現象を利用した TC-PSMS-loaded LDM を構築した。結果から、PSMS の粒子径や LDM 中含量を調整することで、TC-PSMS-loaded LDM からの TC の放出性、皮膚透過性さらには皮膚中濃度を制御できることが示唆された。特に、LDM 中に負荷する PSMS 量の設定が重要であると考えられた。これは、蛍光 PSMS-loaded LDM の組織学的観察から PSMS を負荷することによる LDM 構造の顕著な変化は認められなかったものの、LDM 中の線維芽細胞に対しては少なからず傷害を与えると懸念されるためである。今回、LDM 中の cell viability に関する評価は行わなかったが、PSMS の負荷が線維芽細胞の viability を低下させる可能性は十分に考えられる。本検討で用いた TC-PSMS-loaded LDM では、PSMS 含量が低いほど TC の放出性、皮膚透過性の抑制効果および皮膚中濃度の持続効果が高いことが示された。LDM への PSMS 負荷量が低いほど線維芽細胞への影響も少ないと考えられるので、これは望ましい結果であるといえる。十分な TC 放出制御能と高い cell viability を保持した TC-PSMS-loaded LDM の構築のためには、risk/benefit を考慮した PSMS の至適負荷量の設定が必要であろう。

本章の評価では、培養皮膚モデルとして LSE-high の真皮部分に相当する LDM を用いた。本来、創傷治療には、表皮、特に皮膚の最大の

バリアーである角層を有する培養表皮や LSE-high のような培養皮膚（全層皮膚）が望ましい。しかし、TC-PSMS-loaded LDM 上に表皮（角層を含む）を培養することも可能であると考えられる。また、損傷皮膚に適用した TC-PSMS-loaded LDM の上に培養表皮シートや創傷被覆材を適用する治療法も有効であろう。このように、様々な応用ができることから、LDM を用いた本システムの有用性が示唆された。

第3節 小括

TC の PSMS への吸着性評価から、放出制御型培養皮膚型貼付剤の構築のために、TC と PSMS の吸着現象が利用可能であると予想された。PSMS の粒子径や LDM 中含量を調整することで、TC-PSMS-loaded LDM からの TC の放出性、皮膚透過性さらには皮膚中濃度を制御できることが示唆された。本研究で用いた PSMS は、2 次感染を防ぐのに十分な薬物放出持続時間を得られる TC 放出制御型培養皮膚型貼付剤を調製するための放出制御材料として有用であることが示唆された。

第 2 編 遺伝子導入培養皮膚型貼付剤の調製に関する検討

近年の細胞工学、組織工学、遺伝子工学分野の発展により、薬物治療は低分子化合物からタンパク質およびペプチドなどの高分子化合物や DNA および RNA などの核酸を用いた治療に移行しつつある⁶⁵⁾。また、培養細胞から組織や臓器を構築する tissue engineering が注目され、細胞さらには培養組織を医薬として用いた新しい治療が期待されている⁶⁶⁾。

第 1 編では、tissue engineering 技術に基づいた培養皮膚に抗生物質を封入した抗生物質含有培養皮膚型貼付剤を調製し、培養皮膚の機能のみならず 2 次感染防止作用をも併せ持つ新しい DDS としての有用性を評価してきた。培養皮膚からの抗生物質の放出性および皮膚透過性を数学的に解析した結果、損傷皮膚モデル表面において 2 次感染を防止するのに十分な抗生物質濃度を得ることができた。一方で、封入した抗生物質自身の細胞毒性により、培養皮膚細胞の viability が低下する傾向にあることも明らかとなった。

そこで、抗生物質の代替として内因性抗菌ペプチドの発現遺伝子を培養皮膚の細胞に導入することができれば、培養皮膚の viability を低下させることなく抗菌活性を得ることができると考えた。ヒト由来の内因性抗菌ペプチドには human- β -defensin-2 (hBD-2) がある。 β -defensin 類は上皮組織に特有の抗菌ペプチドであり、hBD-2 は皮膚、泌尿生殖器、気管支および肺に発現していることが報告されている⁶⁷⁻⁷⁰⁾。また、皮膚中で hBD-2 は炎症時の感染防御に関与していると考えられている^{67,71)}。このような皮膚に存在する内因性抗菌ペプチドの遺伝子を培養皮膚に導入することで、より従来の培養皮膚に近くかつ 2 次感染防止

作用を持つ培養皮膚型貼付剤が調製可能であると考えられる。さらに、内因性抗菌ペプチドを用いることで、抗生物質や合成抗菌薬の繁用を避けることができ、医療現場で問題となる多剤耐性菌の出現を防ぐことにもつながると期待される^{67,72)}。

我々は、このような hBD-2 の分泌能を有する遺伝子導入培養皮膚の構築を目指し、まず最初のアプローチとして、モデルたん白質を発現する遺伝子導入培養皮膚の調製法について検討した。今回、モデル遺伝子として *Aequorea victoria* (オワンクラゲ) から単離された化学発光たん白質である Green Fluorescent Protein (GFP) の発現遺伝子が組み込まれたプラスミド DNA、pQBI25 を、培養皮膚としてラットまたはヒトの 3 次元培養真皮モデル (three-dimensional cultured dermal model; CDM) を用いて異なる調製法で遺伝子導入培養真皮を構築し、GFP 発現を観察した。なお、本編で用いたヒト CDM は、第 1 編、第 2 章で用いた LDM と同じものであるが、本編ではラット培養真皮も用いており、表現を簡潔にするため CDM と表すこととした。また、遺伝子導入には、遺伝子治療や遺伝子機能解析等に極めて有力なツールとして期待されている HVJ (hemagglutinating virus of Japan) envelope vector (HVJ-E)^{73,74)} を利用した。HVJ-E はセンダイウイルスのゲノム RNA を完全に不活化し、細胞膜融合能を残した非ウイルス性のトランスフェクションツールである。

第1節 実験の部

1. 細胞培養

ラット皮膚由来線維芽細胞 (FR cell, ATCC CRT 1213) は大日本製薬株式会社 (大阪) より、ヒト真皮由来線維芽細胞 (HDF) の primary cells は東洋紡績株式会社 (大阪) よりそれぞれ購入した。これらの細胞は、炭酸水素ナトリウム、10% fetal bovine serum (FBS; ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, U.S.A.)、penicillin (50 U/mL) および streptomycin (50 $\mu\text{g/mL}$) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 日本製薬株式会社、東京) 中で、37°C、5% CO₂ 存在下にて培養した。Fig. 19 にそれぞれの細胞の位相差顕微鏡像を示す。

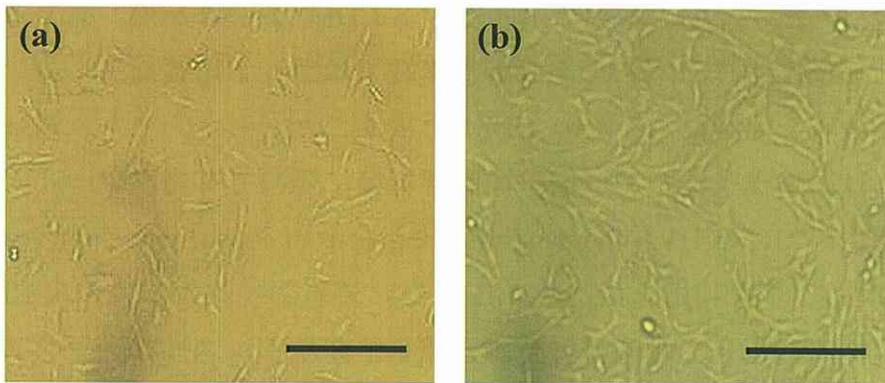


Fig. 19 Phase-contrast microscopic observation of FR (a) or HDF (b). Scale bars show 20 μm .

2. 3次元培養真皮モデル (CDM) の調製

ラットまたはヒトの CDM は、培養した FR cell または HDF と東洋紡績 (株) から購入したコラーゲングルキット (ウシ由来酸性タイプ

I コラーゲン溶液、コラーゲン中和培地およびウシ血清を含む) を用いて調製した。調製法を簡単に述べると、氷中にてコラーゲン溶液 8.0 mL に中和培地 16 mL、ウシ血清 2.0 mL および線維芽細胞浮遊液 (1.875×10^5 cells/mL) 4.0 mL を順番に加え混合、攪拌した後、この液 4.0 mL を直径 24 mm のセルカルチャーインサートに分注し、37°C、5% CO₂ 存在下で 7 日間培養した。CDM の培養には、細胞培養と同様の培地を用いた。Fig. 20 に CDM の肉眼的観察像と HE 染色された切片の顕微鏡観察像を示す。

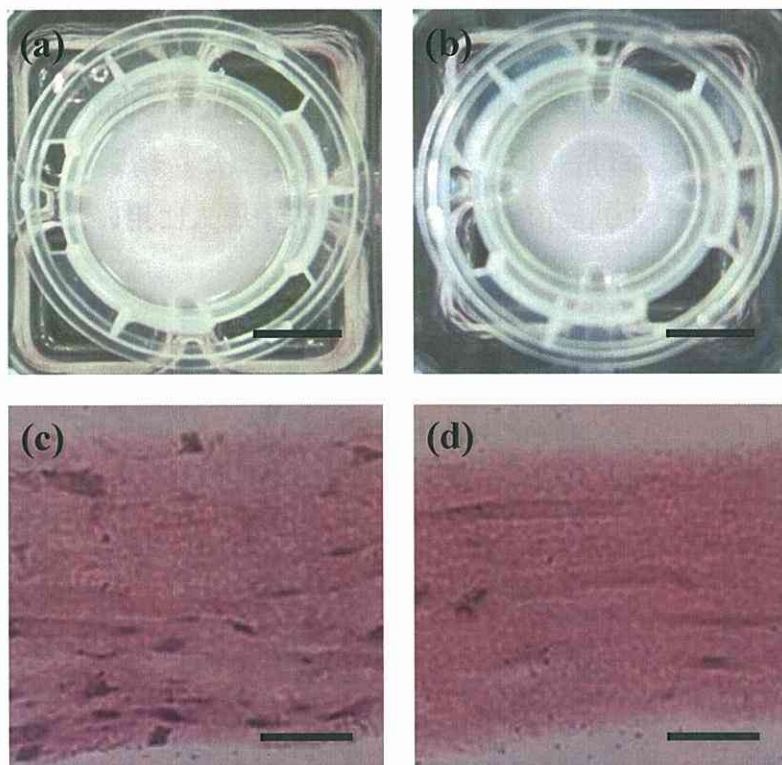


Fig. 20 Macroscopic observation of rat (a) or human (b) CDM, and microscopic observation of HE-stained CDM cross-section of rat (c) or human (d). Scale bars shows 10 mm (a, b) and 50 μ m (c, d).

3. プラスミド DNA

Green Fluorescent Protein (GFP) 発現プラスミド DNA、pQBI25 は、タカラバイオ株式会社（滋賀）より購入した。pQBI25 は、レポーター遺伝子である GFP 遺伝子のほかに、アンピシリン耐性遺伝子 (*Amp^r*) を有している (Fig. 21)。pQBI25 の *E. coli* への形質転換は、*E. coli* competent cell HB101 (タカラバイオ(株)) 50 μ L に対して pQBI25 1.0 μ g を加え、熱ショックを与えることで行った。その後、菌液を 50 μ g/mL ampicillin 含有 LB 寒天培地上に播種し、37°C にて約 12 時間培養後に出現したコロニーから菌を採取して形質転換細胞とした。この形質転換細胞を 50 μ g/mL ampicillin 含有 LB 培地 (250 ml) に接種し、37°C にて約 16 時間振とう培養を行った後に菌体を回収し、Qiafilter Plasmid Maxi Kit ((株) キアゲン、東京) を用いて pQBI25 の回収を行った。操作は、キットに添付されたプロトコルに従った。精製した pQBI25 は、TE buffer にて 3.0 μ g/ μ L に希釈し、遺伝子導入に用いた。

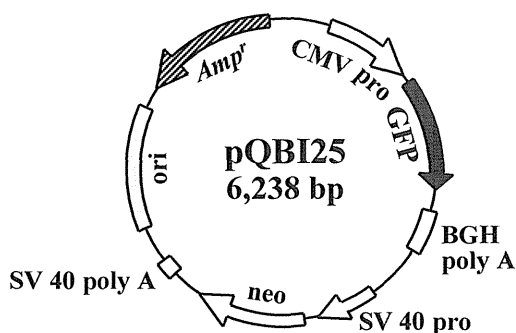


Fig. 21 Structure of pQBI25

4. 遺伝子導入および遺伝子導入培養真皮の調製

細胞 (FR cell または HDF) および培養真皮モデル (ラット CDM またはヒト CDM) への pQBI25 の導入には、市販の HVJ-E である HVJ

Envelope VECTOR KIT、GenomONE[®]-Neo（石原産業（株）、大阪）を用いた。この導入原理は、HVJ-E 上の HN たん白が標的細胞膜上のシアル酸レセプターと特異的に結合し、続いて HVJ-E 上の F たん白の作用により膜融合が起こることを利用して、標的細胞質内に目的の分子を導入する（Fig. 22）。シアル酸レセプターは、ほとんどの動物細胞・組織の細胞膜上に存在するとされており、幅広い対象に対して適用が可能である⁷³⁾。また、この方法は、カチオン性脂質によるエンドサイトーシスを利用した遺伝子導入法と異なりリソソームによる分解を受けないため、高い導入効率が得られると考えられる。GenomONE[®]-Neo の基本的操作は、キットに添付されたプロトコルの第 2 法に従った。すなわち、HVJ-E に pQBI25 および封入試薬を添加、混合し、遠心分離（10,000 ×g、4°C、5 min）後、緩衝液および導入エンハンサーで再懸濁した液を遺伝子導入処理液とした（Table 5）。

細胞への遺伝子導入では、FR cell または HDF 1.0×10^5 cells/4 mL of medium を直径 60 mm の culture dish に播種し 24 時間 pre-incubate した後、新たな培地 4.0 mL に交換して処理液 70 μ L/dish を滴下した。これらの細胞を 37°C、5% CO₂ 存在下にて培養し、24 時間後に培地交換により HVJ-E を除去した。さらに 24 時間培養後（遺伝子導入処理後 48 h）の細胞を transfected FR cell または HDF として蛍光顕微鏡（オリンパス（株）、東京）観察および蛍光強度測定を行い、細胞中の GFP 発現を評価した（Fig. 23a）。

遺伝子導入培養真皮の調製は、以下の 2 種類のプロトコルに従った。1 つめは、まずそれぞれの細胞に遺伝子導入して得られた transfected FR cell または HDF を回収し、これらを用いて本節 2 の方法に従いラットまたはヒトの CDM を調製する方法である（Fig. 23b）。これは、まず線維芽細胞に遺伝子導入（transfection）し、続いてこの細胞を用いて CDM

を調製するという方法であることから pre-transfection 法と呼ぶこととした。また、この方法で得られた遺伝子導入培養真皮を pre-transfected CDM と表すこととした。もう1つは、まず遺伝子導入していない未処理の線維芽細胞を用いてラットまたはヒト CDM を調製し、続いてこれらに遺伝子導入処理を行う方法である。すなわち、CDM 培養7日目に CDM の培地交換を行い、セルカルチャーインサートの上部に 2.0 mL の培地を適用後、ここに遺伝子導入処理液 35 μ L を滴下した。37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間インキュベート後、培地交換により HVJ-E を除去し、さらに 24 時間培養後（遺伝子導入処理後 48 h）、遺伝子導入培養真皮を得た（Fig. 23c）。これは、予め CDM を調製し、後から遺伝子導入（transfection）するという方法であることから post-transfection 法と呼ぶこととした。また、この方法で得られた遺伝子導入培養真皮を post-transfected CDM と表すこととした。

Pre-および post-transfected CDM の一部は切片作成後、共焦点レーザー顕微鏡 C1 plus（（株）ニコン、東京）にて観察し、他は蛍光強度測定および MTT 試験に用いた。

Table 5 Reaction mixture for the second method of GenomONE[®]-Neo

Step	Component	Volume (μ L)	
		per 60 mm dish	per CDM
Entrapment	HVJ-E (Neo)	80	40
	Buffer	20	10
	DNA/TE solution (3 μ g/ μ L)	20	10
	Reagent B (entrapping reagent)	4	2
Transduction	Buffer	50	25
	Reagent C (transducing enhancer)	20	10
	Treatment suspension	70	35

I. Entrapment of plasmid DNA into HVJ-E

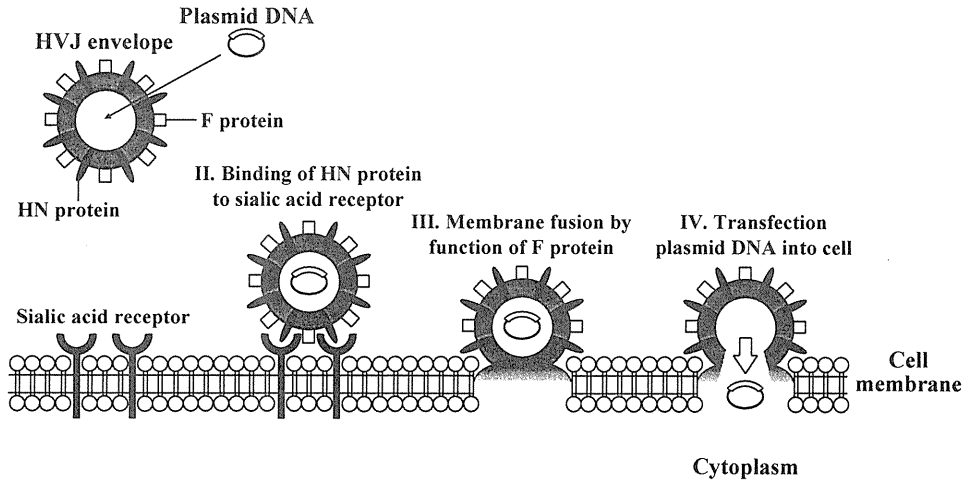


Fig. 22 Schematic of gene transfection into cells by HVJ-E.

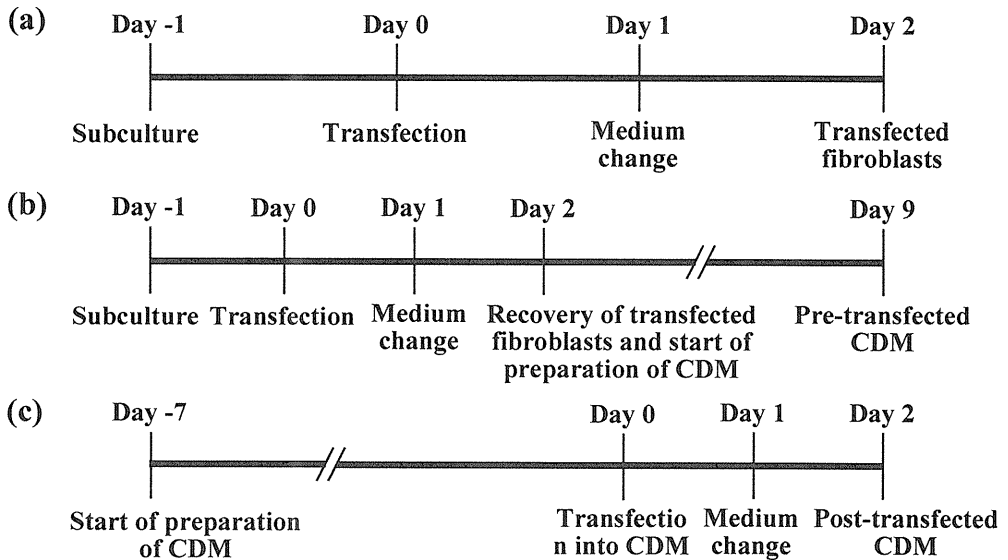


Fig. 23 Time course of preparation of transfected fibroblasts (a), pre-transfected CDM (b) and post-transfected CDM (c).

5. 組織学的評価

ラットまたはヒトの non-treated (control)、pre-transfected および post-transfected CDM を Tissue-Tek[®] OTC compound (Miles, Inc., Elkhart, IN, U.S.A.) に包埋し、-20°C イソペンタン中で速やかに凍結させ、凍結マイクロトーム (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて垂直方向に 6-8 μm の厚みに薄層化し、スライドガラスに回収した。切片は蛍光の退色を防ぐため、FluoroGuard[®] Antifade Reagent (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ (株)、東京) を用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡 ((株) ニコン、東京) にて観察した。

6. 蛍光強度測定

Non-treated (control) または transfected cells (FR cell または HDF) を回収後、0.1% Tween 20 溶液 300 μL を加えてホモジナイズした細胞懸濁液を 2~3 回凍結融解することにより細胞を破壊した。この懸濁液を遠心分離 (17,500 \times g、室温、10 min) し、上清に含まれるたん白質量を測定した。総たん白質の定量には Coomassie Brilliant Blue (CBB) 法の原理に基づく Bio-Rad Protein Assay Kit (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ (株)) を用いた。GFP 量は、標準 GFP (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY, U.S.A.) を用い、蛍光光度計 VersaFluor[™] Fluorometer (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ (株)) により測定した。測定波長には、励起波長 510 nm、蛍光波長 490 nm を用いた。蛍光強度は、測定した GFP 量を総たん白質量で補正し μg GFP/mg total protein として表した。

ラットまたはヒトの non-treated (control)、pre-transfected または post-transfected CDM の 1 cm \times 1 cm 切片をそれぞれマイクロチューブに回収した後はさみで細断し、0.1% Tween 20 溶液 300 μL を加えホモジ

ナイズした。このホモジネートを3~4回凍結融解後、遠心分離（17,500 ×g、室温、10 min）し上清に含まれるたん白質量を測定した。総たん白質および GFP 量の測定は、細胞と同様の方法で行った。

7. MTT 試験

CDM 中の FR cell または HDF の viability 評価には MTT 試験^{57,58}を用いた。Non-treated (control)、pre-transfected または post-transfected CDM を 0.333 mg/mL MTT-培地 1.2 mL/well を分注した 6-well プレート上に設置し、37°C、5% CO₂ 存在下で 3 時間インキュベートした。インキュベート後、CDM の余分な MTT-培地を pH7.4 PBS で洗い落とし、生検パンチを用いて直径 8 mm にくり抜いた。くり抜いた CDM をマイクロチューブに回収し、0.04 M HCl-イソプロパノールを 1 mL 加え、室温、暗所で 2 h インキュベートすることにより CDM 中のホルマザンを抽出した。ホルマザンの測定には分光光度法（波長: 570 nm）を用いた。

8. 統計学的解析

数値はすべて平均値±標準誤差（standard error of mean; SE）にて表した。また、統計学的解析には Student's *t*-test または ANOVA（analysis of variance）を用いた。

第2節 結果および考察

1. 線維芽細胞への遺伝子導入

ラットまたはヒトの真皮由来線維芽細胞 (FR cell または HDF) に市販の HVJ-E である GenomONE[®]-Neo を用いて pQBI25 を導入し、transfected FR cell または HDF を得た。遺伝子導入処理の 48 時間後に蛍光顕微鏡により GFP の発現を観察した結果、transfected FR cell および HDF 共に GFP の発現が確認された (Fig. 24)。また、これらの細胞の蛍光強度を定量化した結果、遺伝子導入処理していない control に比べて有意に高い蛍光強度を示し、GFP の高い発現が確認された (Fig. 25)。

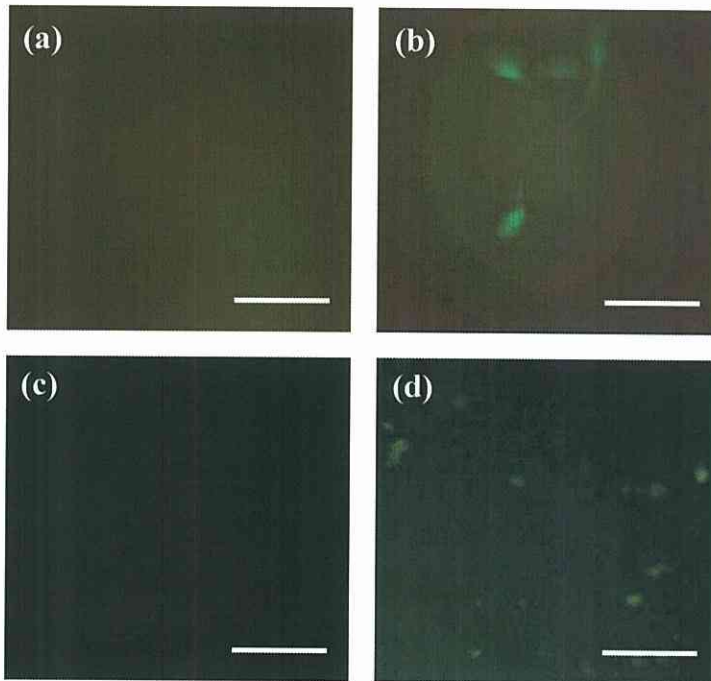


Fig. 24 Fluorescence-microscopic observation of FR cell (a, b) or HDF (c, d). (a) and (c) are control, and (b) and (d) are transfected fibroblasts. Scale bars show 20 μm .

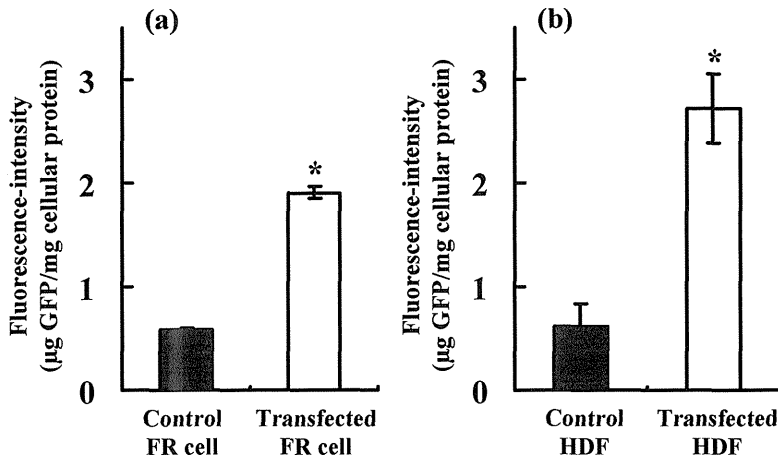


Fig. 25 Measurement of GFP expression in control and transfected FR cell (a) or HDF (b) by fluorescence spectrophotometry. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=4-6). * $p < 0.05$ vs. control.

これらの transfected FR cell または HDF を回収して CDM を構築し、ラットまたはヒトの pre-transfected CDM を調製した。

2. 遺伝子導入培養真皮

ラットまたはヒトの control、pre-および post-transfected CDM 切片の共焦点レーザー顕微鏡観察結果を Fig. 26 に示す。結果から、pre-および post-transfection 法どちらの調製法でも GFP の発現が観察され、HVJ-E を用いることで 3 次元構築した培養真皮に遺伝子導入することも可能であることが示唆された。また、これはラットおよびヒトの両方で認められた。さらに、pre-transfected CDM では、GFP の発現が CDM 中のコラーゲン層に比較的均一に観察されたのに対し、post-transfected CDM では、GFP の発現にバラツキが見られた。これは、調製法に起因していると考えられ、pre-transfection 法では transfected FR

cell または HDF を CDM 中のコラーゲンゲル層に均一に分散させることができると考えられる。しかし、post-transfection 法でも、CDM 内部で GFP の発現が見られることから、CDM 内部の細胞への遺伝子導入が可能であることが示唆された。

これらの CDM の蛍光強度測定結果を Fig. 27 に示す。ラットおよびヒトではほぼ同様の結果が得られた。すなわち、蛍光強度は pre-および post-transfected CDM 共に control CDM の 3~5 倍を示した。また、有意差はなかったもの pre-よりも post-transfected CDM の方が GFP 発現量が高い傾向にあった。HVJ-E は、細胞だけでなく *in vivo* での動物組織への遺伝子導入の報告⁷⁵⁻⁷⁷⁾もあることから、3 次元構築した培養真皮への遺伝子導入にも有効であると考えられる。

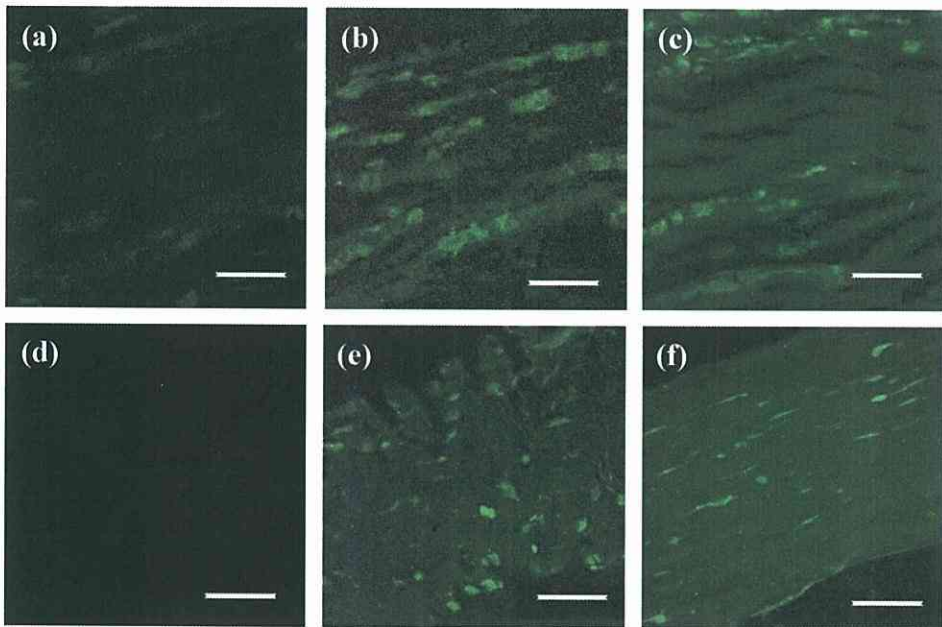


Fig. 26 Confocal laser scanning microscopic observation of CDM cross-section. (a), (b) and (c) are rat CDM, and (d), (e) and (f) are human CDM. (a) and (d) are control CDM, (b) and (e) are pre-transfected CDM, and (c) and (f) are post-transfected CDM. Scale bars show 50 μ m.

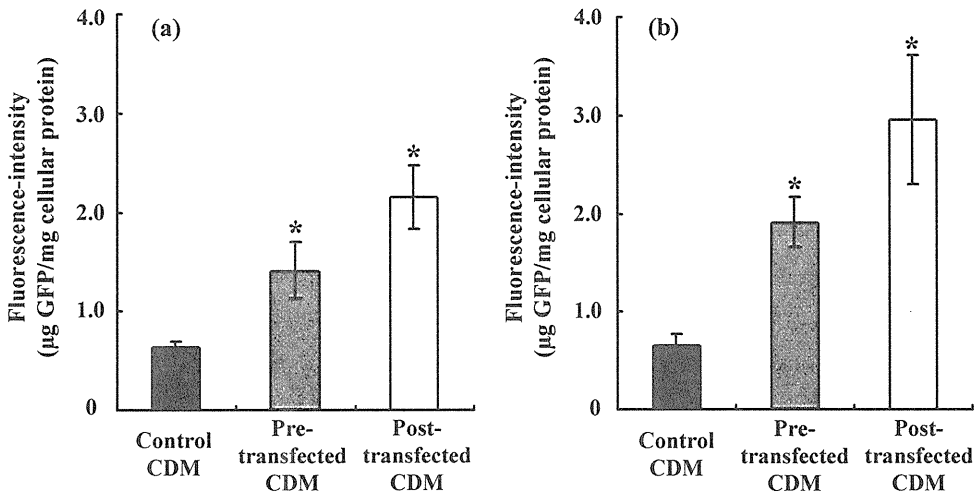


Fig. 27 Measurement of GFP expression in control, pre-transfected and post-transfected CDM of rat (a) or human (b) by fluorescence spectrophotometry. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=4-6). * $p < 0.05$ vs. control CDM.

つづいて、これらの CDM の viability を MTT 試験により測定し、遺伝子導入が CDM 中の線維芽細胞の viability に及ぼす影響を評価した。Fig. 28 に MTT 試験の結果を示す。Cell viability (%) は、調製直後の未処理の CDM の値を 100% として表した。ラットおよびヒトでほぼ同様の結果が得られた。すなわち、Pre-よりも post-transfected CDM で viability のわずかな減少が見られた。これは、post-transfection 法では遺伝子導入後の CDM の培養日数が短いことによると考えられる。Pre-transfection 法では、線維芽細胞への遺伝子導入から 9 日間の培養期間があるため、viability の回復が期待できる。Pre-および post-transfection 法での遺伝子導入による viability の減少は 10% 前後と小さく、本調製法により CDM の viability を保持したまま遺伝子導入培養真皮を構築できることが示唆された。

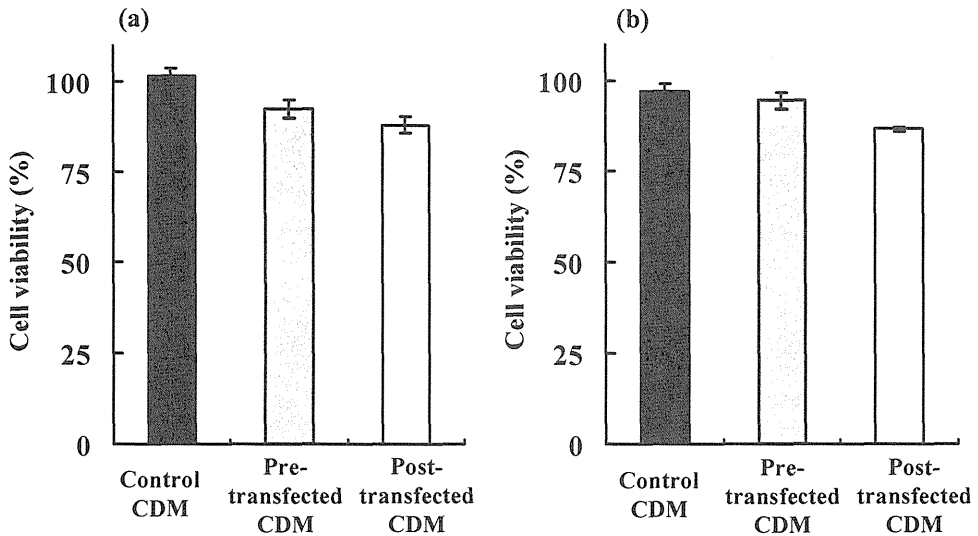


Fig. 28 Cell viability (%) of control, pre-transfected and post-transfected CDM of rat (a) or human (b) by MTT assay. Data are shown as the mean \pm S.E. (n=3-5).

遺伝子治療は皮膚損傷の治療を改善する可能性を秘めている。本研究では、ヒト由来の内因性抗菌ペプチドである hBD-2 の分泌能を有する遺伝子導入培養皮膚の構築を目指し、まず最初のアプローチとして、モデルたん白質を発現する遺伝子導入培養皮膚の調製法について検討した。Pre-または post-transfection 法を用いることで、ラットまたはヒトの遺伝子導入培養真皮が調製できることが示された。また、これらの方法で調製した遺伝子導入培養真皮の cell viability の低下は、ほとんど見られなかった。これらの結果は、本実験で用いた調製法が実際に創傷治癒を促進するような機能を持つ遺伝子導入培養皮膚型貼付剤を調製するための実現可能な技術となりうることを示唆している。

しかしながら、このような遺伝子導入培養皮膚型貼付剤を皮膚損傷

の治療に適用し創傷治癒の促進を期待する場合、導入する目的遺伝子を過剰発現させる必要がある^{78,79)}。これには、遺伝子導入法の改善が必要となる。臨床応用のためには、高い遺伝子導入効率を持ちかつ毒性を持たないかまたは低いという方法が望まれる。HVJ-E はセンダイウイルスのゲノム RNA を完全に不活化し、細胞膜融合能を残した非ウイルス性のトランスフェクションツールであるため、遺伝子導入効率は高く、ウイルスベクターに比べ安全性は高いと考えられる。HVJ-E は目的遺伝子と導入する細胞の組合せにより遺伝子導入効率が大きく異なる⁸⁰⁾。導入効率の高い遺伝子を選択することで目的遺伝子の培養皮膚中での過剰発現も可能であると考えられる。また、HVJ-E に他の非ウイルス性導入法（例えば electroporation 法など）を併用することも、遺伝子導入効率の改善に有用であると考えられる。

さらに、皮膚損傷の治療に遺伝子導入培養皮膚型貼付剤を適用するためには、培養皮膚中の遺伝子発現やペプチド・たん白質の分泌の間も調整する必要があるだろう。本実験での遺伝子導入法では、遺伝子の発現は一過性であるため、この点については今後さらなる検討が必要であると思われる。

このように、いくつかの問題点はあるものの、遺伝的修飾した培養皮膚は皮膚損傷の治療を改善するのに有用であると考えられる。近年では、培養皮膚が遺伝子治療の媒体 (vehicle) として注目されており、創傷治療のみでなく皮膚や全身の遺伝子疾患の治療への応用も期待されている^{81,82)}。しかし、まだこれらの研究は始まったばかりであり、今後さらなる発展が期待される。

第3節 ヒト由来内因性抗菌ペプチド~human- β -defensin-2~

Defensin 類は、様々な微生物に対して抗菌活性を持つ内因性宿主防御因子である⁷²⁾。ヒト抗菌ペプチドは、その構造から主に α -または β -defensin ファミリーに分類される。 α -defensin は主に好中球のような細胞により産生される。一方、 β -defensin は上皮組織特有のものであり、ヒト表皮角化細胞は human- β -defensin (hBD) -1、2、3 を産生することがわかっている^{67,72,83)}。

我々は、ヒト由来内因性抗菌ペプチドの中でも hBD-2 に着目した。hBD-2 は、初めに乾癬の皮膚落屑から分離された⁶⁷⁾ことから、皮膚の防御と炎症に関係する抗菌ペプチドであると考えられ、様々な研究が行われた。hBD-2 は、皮膚では表皮、毛包および汗腺上皮に発現しており、それ以外の組織では小腸⁸⁴⁾、気管支および肺などに発現している。皮膚での共焦点レーザー顕微鏡による検討で、hBD-2 は有棘層では細胞質内に、角層では角質細胞間に局在することが明らかとなった⁸⁵⁾。角層中に抗菌ペプチドが存在することは、外からの微生物侵入の防御のためには利になかった分布であるといえる。また、hBD-2 は誘導性の抗菌ペプチドであり、緑膿菌、ブドウ球菌などの菌体成分による刺激やある種のサイトカインにより発現が誘導される^{71,86)}。これらのことから、hBD-2 発現遺伝子を培養皮膚の細胞に導入することができれば、培養皮膚の viability を低下させず、より従来の培養皮膚に近くかつ2次感染防止作用を持つ培養皮膚型貼付剤が調製可能であると考えられる。我々は、まずヒト表皮角化細胞から hBD-2 発現遺伝子を抽出できるか検討した。

hBD-2 の作用機序は、陽性に荷電した defensin dimer が微生物の細胞膜表面の陰性荷電部に結合して細胞膜に pore を形成することにより殺

菌作用を発現する。グラム陰性菌（大腸菌、緑膿菌など）に強い抗菌活性を持つが、黄色ブドウ球菌にはそれほど強い抗菌活性を示さない⁸⁷⁾。Fig. 29 に分泌型 hBD-2 のアミノ酸配列を示す。hBD-2 のアミノ酸配列（下線部）の N 末端側には多くの疎水性アミノ酸が結合していることから hBD-2 は分泌型ペプチドであり⁶⁷⁾、後に分泌型にするために修飾する必要はないと考えられる。

Met- Arg- Val- Leu- Tyr- Leu- Leu- Phe- Ser- Phe- Leu- Phe- Ile-
Phe- Leu- Met- Pro- Leu- Pro- Gly- Val- Phe- Gly- Gly- Ile- Gly-
Asp- Pro- Val- Thr- Cys- Leu- Lys- Ser- Gly- Ala- Ile- Cys- His-
Pro- Val- Phe- Cys- Pro- Arg- Arg- Tyr- Lys- Gln- Ile- Gly- Thr-
Cys- Gly- Leu- Pro- Gly- Thr- Lys- Cys- Cys- Lys- Lys- Pro

Fig. 29 Amino acid sequence of secretory hBD-2. The underline is amino acid sequence of hBD-2.

培養した正常ヒト表皮角化細胞（東洋紡績（株））から RNeasy Mini Kit（（株）キアゲン）を用いて total RNA を抽出し、Mini Cyclor (MJ Research, Boston, MA, U.S.A.) にて RT-PCR を行った。用いたプライマー、反応溶液の調製条件および RT-PCR のタイムコースをそれぞれ Table 6、7 および 8 に示す。

Table 6 The nucleotide sequences of primers for amplification of secretory hBD-2 gene. Sense and anti-sense primers were modified by restricted enzymes *Hind* III (a ↓ agctt) and *Xba* I (t ↓ ctaga), respectively.

Primers	Nucleotide sequences
Secretory hBD-2 (sense)	5'-aaaagcttatgagggcttgatctcctcttc-3'
Secretory hBD-2 (anti-sense)	5'-aatctagatcatggctttttgcagcattttgtcca-3'

Table 7 Reaction mixture for amplifying RNA templates by RT-PCR

Component	Volume (μL)	Final concentration
QIAGEN One step RT-PCR Enzyme Mix	2	-
5x QIAGEN One step RT-PCR buffer*	10	1x
dNTP mixture (10mM each)	2	dNTP 400 μM each
Primer (sense)	1	1 μM
Primer (anti-sense)	1	1 μM
RNA template	each (1 μg)	1 μg/50 μL
DEPC-treated water	up to 50	-

* containing 12.5 mM MgCl₂

Table 8 Temperature cycling for amplification of RNA templates by RT-PCR

Temperature (°C)	Time	Cycle
50 (reverse transcription)	30 min	1
95 (initial denaturation)	5 min	1
95 (denaturation)	50 s	35
56 (annealing)	30 s	
72 (extension)	40 s	
72 (final extension)	5 min	1

PCR 生成物を 2%アガロース電気泳動にて確認したところ、分泌型 hBD-2 の cDNA に由来した単一のバンドが得られた (Fig. 30)。分泌型 hBD-2 は 192 bp であるが、プライマーの末端がそれぞれ 8 bp で修飾されているため、合計の大きさは 208 bp となる。したがって、電気泳動にて得られた単一バンドは、分泌型 hBD-2 の cDNA であると考えられる。

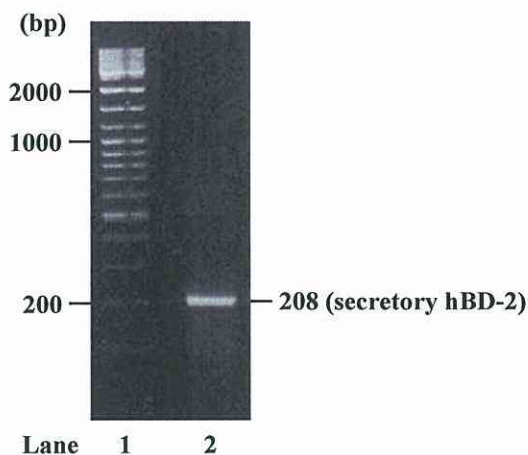


Fig. 30 Expression of secretory hBD-2 cDNA in cultured human epidermal keratinocytes. Lane 1 is DNA size marker, while lane 2 is secretory hBD-2.

今回、予備検討によりヒト表皮角化細胞から hBD-2 の cDNA を抽出できることが示された。これをプラスミドベクターに組み込み hBD-2 発現プラスミド DNA を構築し、HVJ-E を用いて培養皮膚細胞に導入することで、hBD-2 分泌能を有する遺伝子導入培養皮膚型貼付剤の調製が可能になると考えられる。

第4節 小括

本実験で用いた pre-および post-transfection 法は、培養真皮の viability を保持したまま遺伝子導入培養真皮を構築できることが示唆された。また、これらの調製法と実際に生理活性を持つペプチド（抗菌ペプチドなど）の発現遺伝子を用いることで、目的に応じた遺伝子導入培養皮膚型貼付剤を調製することが可能であると示唆された。

総括的考察

皮膚は人体における最大の臓器であり、その主要な役割は外部環境に対するバリアーとして機能することにある。他の重要な機能として、体液の恒常性の維持、体温調節、免疫機能調節、知覚作用および自己修復作用などが挙げられる⁸⁸⁾。外傷や疾患により広範囲に皮膚が損傷されると、深刻な障害、あるいは死をも招きかねない。重大な皮膚損傷の最も多い原因の1つは火傷である。この他の皮膚損傷として、褥瘡、糖尿病性潰瘍、静脈性潰瘍、外傷および皮膚腫瘍の切除などが挙げられる。褥瘡、糖尿病性潰瘍、静脈性潰瘍などの慢性皮膚潰瘍は、比較的一般的で特に高齢者でよく起こり、難治化しやすいため、これらの医療および経済に与える影響はきわめて大きい^{82,89)}。

皮膚欠損創が小範囲で皮膚全層に至らない場合には自然治癒が期待できる⁹⁰⁾。しかし、広範囲重症火傷（III度火傷）のような全層皮膚欠損創では、健常部位から採取した分層皮膚を創面に移植する「自家移植」を必要とする。また、狭い範囲の難治性皮膚損傷を閉鎖する場合にも自家の分層または全層皮膚の移植が適用される。従来一般的なこれらの治療法では、ドナー部位の侵襲性が問題となる。さらに、難治性皮膚損傷では、患者の全身状態の低下により、ドナー部位の創閉鎖も遅延すると考えられる。

これらいずれの創傷治癒過程においても、外部からの細菌の侵入を阻止して湿潤環境を保持することが必要不可欠であり、皮膚欠損部位を被覆保護することが治療の基本となる。Table 9 に創傷治療に用いられている創傷被覆材および培養皮膚の分類を示す。Tissue engineering 技術の向上から、これらの進歩には目覚ましいものがある。本研究で用いた LSE-high は同種培養皮膚に、LDM は同種培養真皮にそれぞれ

属している。これらの同種培養皮膚類（表皮、真皮および全層皮膚）を全層皮膚欠損創に移植しても永久生着は望めないが、角化細胞および線維芽細胞から産生、放出される生理活性物質（サイトカインや細胞外マトリックスなど）による治癒促進効果を有することから、生物学的創傷被覆材（培養細胞を含む創傷被覆材）として期待できる。臨床では、深達性Ⅱ度またはⅢ度火傷、褥瘡、難治性皮膚潰瘍および外傷性皮膚欠損創を対象に、基本手技として壊死組織を切除後、同種培養皮膚類を適用し、その上に抗菌薬含有軟膏ガーゼや抗菌薬含有創傷被覆材を適用するという方法がとられている。

このような背景から、本研究で調製、評価した抗生物質含有培養皮膚型貼付剤は、同種培養皮膚と抗菌薬含有創傷被覆材の機能を併せ持っていることから、現時点で非常に実現可能性の高い DDS（もしくは創傷被覆材）であると言えよう。抗生物質を培養皮膚に封入することによる cell viability の低下も起こりうるが、本研究で、培養皮膚表面に抗生物質軟膏（塩酸テトラサイクリン含有軟膏）を適用した場合にも同程度の cell viability の低下が起こるといふ興味深い結果が示された。また、抗生物質含有培養皮膚型貼付剤に放出制御能を持たせることは、永久生着を目的とした自家移植に必要な自家培養皮膚片を調製する期間（2週間から1ヶ月）の2次感染予防を可能にするだろう。現在市販されている抗菌薬含有創傷被覆材は、薬物が徐々に放出されるよう設計されている。これは、薬物放出の持続化以外にも、薬物の徐放化により損傷組織の高濃度薬物の暴露による組織傷害性を避けられるという効果がある。

近年では、皮膚損傷の治療に創傷治癒促進効果を持つ生理活性物質が用いられるようになってきた。創傷被覆材と生理活性物質を複合させた生理活性物質含有創傷被覆材は、より効果的な創傷治癒が期待で

きる⁹¹⁻⁹³⁾。しかし、このような生理活性物質は、基剤中での活性の低下や適用後の持続時間の不足などが問題となるだろう。我々が考案した機能性ペプチドの放出能を持つ遺伝子導入培養皮膚型貼付剤の調製が可能となれば、これらの問題が克服できると思われる。これは、現在研究段階であるが、遺伝子の発現量や発現時間の設計、あるいは生理活性物質放出の on-off 機能（必要なときにのみ放出が起こる）の設計等が可能となれば、将来的には創傷治療に対する最も優れた DDS（もしくは創傷被覆材）の 1 つとなるだろう。また、現在、温度応答性ゲルを用いた細胞シート作成技術が研究、開発されており^{94,95)}、このような技術を用いることで損傷皮膚面を傷つけることなく創傷被覆材を脱着することが可能になると考えられる。

以上、臨床の観点から考えると、現時点では、本研究の第 1 編で述べた抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の方がはるかに実用化の可能性が高いが、将来的には、第 2 編で述べたような遺伝子導入培養皮膚型貼付剤が皮膚損傷の治療に最も有効な DDS の 1 つとなりうると考えられる。

Table 9 創傷被覆材および培養皮膚の分類と機能¹¹⁾

分類	機能
I. 創傷被覆材	
① 生体組織を基材とする創傷被覆材 同種皮膚（冷凍保存死体ヒト皮膚） （凍結真空乾燥ヒト真皮） 異種皮膚（凍結真空乾燥ブタ真皮）	一時的被覆保護
② 抗菌薬非含有創傷被覆材 合成材料を基材とする創傷被覆材 生体材料を基材とする創傷被覆材 合成/生体材料を基材とする創傷被覆材	一時的被覆保護
③ 抗菌薬含有創傷被覆材	一時的被覆保護
④ 生理活性物質含有創傷被覆材	一時的被覆保護
II. 培養皮膚	
① 本人の細胞を利用した皮膚代替物 自家培養表皮（角化細胞） 自家培養皮膚（角化細胞と線維芽細胞）	永久生着 永久生着
② 他人の細胞を利用した皮膚代替物 同種培養表皮（角化細胞） 同種培養真皮（線維芽細胞） 同種培養皮膚（角化細胞と線維芽細胞）	

結論

近年の細胞工学、組織工学、遺伝子工学分野の発展により、再生医療（tissue engineering）や遺伝子治療の実現可能性が高まっている。中でも皮膚を対象とした研究は、最も進んでいる分野のひとつであり、皮膚損傷の治療を目的とした「培養皮膚代替物」の開発や皮膚をターゲットとした遺伝子治療の研究が注目されている。

皮膚損傷部位に培養皮膚代替物を適用（移植）する際問題となることの1つに細菌による2次感染が挙げられ、現在その防止のために抗生物質軟膏等を用いた薬物治療が一般的に行われている。しかし、この場合移植皮膚表面に抗菌薬を適用するよりも予め抗菌物質（抗生物質、抗菌ペプチドまたはその発現遺伝子）を封入した培養皮膚代替物を製剤として直接適用する方が効果的な治療が期待できると思われる。そこで、本研究では、重症火傷や褥瘡などの重篤な皮膚損傷に用いることのできる新しいDDSとして、損傷皮膚の保護作用ばかりでなく2次感染の防止作用をも併せ持つような培養皮膚型貼付剤の調製および有用性について検討した。

1. 数学的アプローチに基づく抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の有用性について

3次元培養ヒト皮膚モデルであるLSE-highにTC-HClまたはCPを封入した抗生物質含有培養皮膚型貼付剤を調製し、その有用性について数学的解析から評価を行った。

まず、LSE-highにその真皮側から培養培地を介して薬物を封入し“drug-loaded LSE-high”を調製した。この薬物封入LSE-highの調製法は簡便でかつ確実に薬物を封入でき、また培地中の薬物濃度を変える

ことである程度薬物放出量をコントロールできると考えられた。その drug-loaded LSE-high からの薬物放出性を試験し、得られた放出プロファイルを用いて W.I. Higuchi の式を用いてカーブフィッティングすることにより、LSE-high 中の薬物の拡散係数 (D_{LSE}) と初濃度 (C_0) を算出した。TC では典型的な拡散制御の放出プロファイルを示したので W.I. Higuchi の式をそのまま当てはめたが、CP では放出初期にバースト現象が見られたためこれを考慮して解析を行った。その結果、どちらの薬物においても良好なフィッティングラインが得られ、 D_{LSE} と C_0 を算出することができた。TC および CP の C_0 の値から、両薬物の培地から LSE-high への薬物移行量はほとんど変わらなかったが、CP の LSE-high 中の拡散係数 D_{LSE} は TC のその約 2 倍であることが示された。

次に、水溶液からの TC および CP の hairless rat stripped skin を介した透過実験を行い、得られた透過プロファイルを Fick の第 2 法則に基づく差分法を用いてカーブフィッティングすることにより viable epidermis and dermis 中の薬物拡散係数 (D_{skin}) を算出した。なお、この hairless rat stripped skin は、物質透過の最大のバリアである角層を欠いた損傷皮膚モデルとして用いた。両薬物においてフィッティングラインは実測値と良好な一致を示し、 D_{skin} を算出することができた。TC の D_{skin} は CP の約 2.5 倍の値を示した。

次に、stripped skin を介した drug-loaded LSE-high からの薬物の透過性を試験し、得られた透過プロファイルについて、これまでに算出したパラメータ (C_0 , D_{LSE} , D_{skin}) と構築した 3 および 2 層膜拡散モデルを用いて薬物溶液からの透過プロファイルと同様の方法で解析した。TC の透過プロファイルを 2 層膜拡散モデルを用いてカーブフィッティングしたところ、得られたフィッティングラインは実測値と満足する一致を示さなかったが、stagnant layer を組み込んだ 3 層膜拡散モデル

を用いたところ良好なフィッティングラインが得られた。これは TC-HCl では LSE-high から stripped skin への薬物の分配に遅れが見られるために起こると考えられた。一方、CP では 2 層膜拡散モデルを用いることで良好なフィッティングラインが得られた。これらの結果は、2 つの薬物間で分配係数などの物性が異なることに起因していると考えられる。特に TC では Ca^{2+} や Mg^{2+} などの金属カチオンと難溶性のキレートを形成するという物性から、LSE-high、培地および皮膚中の Ca^{2+} との相互作用が示唆される。このことから、TC では 3 層膜モデルを、CP では 2 層膜モデルを用いて皮膚透過性および皮膚中挙動を解析することとした。

つづいて、それぞれの拡散モデルから、viable epidermis and dermis (損傷皮膚モデル) 中薬物濃度挙動について時間および位置の関数としてシミュレーションを行った。その結果、表皮表面付近の両薬物濃度は、様々な細菌に対するそれぞれの最小発育阻止濃度 (MIC) 以上であり、本システムの有用性が示唆された。また、本実験での薬物封入方法が有効な手段の一つであると考えられた。さらに、本研究で構築された拡散モデルを用いた解析方法により drug-loaded LSE-high を皮膚適用したときの TC および CP の挙動がある程度予測可能であることが示唆され、またこの方法は他の薬物への応用も可能であると思われた。

以上の結果から、抗生物質含有培養皮膚型貼付剤は重症火傷の治療に対する新しい DDS として有望であることが示唆された。

2. Polystyrene microspheres を用いた抗生物質放出制御型培養皮膚型貼付剤について

これまでに評価した抗生物質含有培養皮膚型貼付剤に重症火傷の 2 次感染を防ぐのに十分な薬物放出持続時間を持たせることを目的とし、

表面にスルホン酸基を修飾し負電荷を持った polystyrene latex microspheres (PSMS) にカチオン性抗生物質である TC を吸着させた放出制御型培養皮膚型貼付剤を調製した。この有用性について、TC の PSMS への吸着性と 3 次元培養ヒト真皮モデル (LDM) のコラーゲン層に TC および PSMS を分散させた培養皮膚型貼付剤 (TC-PSMS-loaded LDM) からの TC の放出性および皮膚透過性を測定することにより評価した。

pH7.4 PBS 中での TC の PSMS (粒子径 0.20、0.50、1.0 および 2.0 μm) への吸着量から、本研究で用いた PSMS は、粒子径に関わらず中性条件下で濃度依存的に TC と吸着することが示唆され、放出制御型培養皮膚型貼付剤の構築のために、TC と PSMS の吸着現象が利用可能であると予想された。

次にこれらの PSMS のうち 0.50 および 2.0 μm 径の PSMS を選択して TC-PSMS-loaded LDM (PSMS 含量はそれぞれ 400 $\mu\text{g/LDM}$) を調製し、TC 放出性および皮膚透過性を測定することにより、これらに及ぼす PSMS 径の影響を評価した。放出プロファイルから、TC-PSMS-loaded LDM は PSMS 径に関わらず LDM からの TC の初期放出を抑制することが示唆されたが、透過プロファイルから、0.50 μm 径を用いた TC-PSMS-loaded LDM では TC の皮膚透過性が低下したものの、2.0 μm 径では認められなかった。

そこで、TC の放出および皮膚透過性共に抑制効果の見られた 0.50 μm 径の PSMS を用いて PSMS 含量 40、400 μg および 4.0 mg/LDM の TC-PSMS-loaded LDM をそれぞれ調製し、TC 放出性および皮膚透過性を測定することにより、これらに及ぼす PSMS 含量の影響を評価した。全ての TC-PSMS-loaded LDM で TC の放出性および皮膚透過性の抑制が見られたが、PSMS 含量の低いものの方がその効果が高かった。ま

た、これらのデータを解析して皮膚透過実験時の皮膚中 TC 濃度をシミュレーションした結果、PSMS 含量の低い TC-PSMS-loaded LDM では、皮膚中 TC 濃度を持続することが可能であることが示唆された。これらのことから、PSMS の粒子径や LDM 中含量を調整することで、TC の放出性、皮膚透過性さらには皮膚中濃度を制御できることが示唆された。

以上の結果から、polystyrene microspheres は、TC 放出制御型培養皮膚型貼付剤を調製するための放出制御材料として有用であることが示唆された。

3. 遺伝子導入培養皮膚型貼付剤の調製について

これまでの検討により抗生物質含有培養皮膚型貼付剤の有用性が示唆されたが、一方で、封入した抗生物質の細胞毒性により培養皮膚の cell viability が低下することも明らかとなった。そこで、抗生物質の代替として内因性抗菌ペプチドの発現遺伝子を培養皮膚の細胞に導入することができれば、培養皮膚の cell viability を低下させることなく抗菌活性を得ることができると考えた。hBD-2 のようなヒト皮膚に存在する内因性抗菌ペプチドの遺伝子を培養皮膚に導入することで、より従来の培養皮膚に近くかつ 2 次感染防止作用を持つ培養皮膚型貼付剤が調製可能であると考えられる。

hBD-2 の分泌能を有する遺伝子導入培養皮膚の構築を目指し、まず最初のアプローチとして、モデルたん白質を発現する遺伝子導入培養皮膚の調製法について検討した。モデル遺伝子として GFP の発現遺伝子が組み込まれたプラスミドベクター pQBI25 を、培養皮膚としてラットまたはヒトの 3 次元培養真皮モデル (CDM) を用いて異なる調製法で遺伝子導入培養真皮を構築し、GFP 発現を観察した。遺伝子導入

には、センダイウイルスのゲノム RNA を完全に不活化し、細胞膜融合能を残した非ウイルス性のトランスフェクションツールである HVJ-E を利用した。

遺伝子導入培養真皮は以下の 2 種類の方法で調製した。

i) まず、ラットまたはヒトの線維芽細胞に pQBI25 を HVJ-E により導入し、蛍光顕微鏡観察によりそれぞれの細胞中に GFP が発現していることを確認した。次に、これらの遺伝子導入細胞を回収し、ラットまたはヒトの CDM を構築した。この方法で調製した遺伝子導入培養真皮を pre-transfected CDM と呼ぶこととした。

ii) また、先にラットまたはヒトの未処理の線維芽細胞を用いてそれぞれの CDM を構築し、つづいてこれらの CDM に pQBI25 を HVJ-E により導入した。この方法で調製した遺伝子導入培養真皮を post-transfected CDM と呼ぶこととした。これら 2 種類の遺伝子導入培養真皮について、切片作成後の共焦点レーザー顕微鏡観察、蛍光強度測定および MTT 試験を行った。

ラットまたはヒトの線維芽細胞に pQBI25 を HVJ-E により導入した結果、どちらの細胞でも GFP の発現が確認された。これらの細胞を用いて pre-transfected CDM を調製した。Pre-および post-transfected CDM 切片の共焦点レーザー顕微鏡観察結果から、どちらの調製法でも GFP の発現が観察され、構築した培養真皮に遺伝子導入することも可能であることが示唆された。蛍光強度は pre-、post-transfected CDM とともに non-treated CDM の 3~5 倍を示した。また、有意差はなかったもの pre-よりも post-transfected CDM の方が GFP 発現量が高い傾向にあった。CDM 中の cell viability は、どちらの調製法でもほとんど減少しなかった。また、これらはラットとヒトでほぼ同様の結果を示した。

以上のことから、本調製法は、培養真皮の viability を保持したまま

遺伝子導入培養真皮を構築できることが示唆された。また、今回の調製法と実際に生理活性を持つペプチド（抗菌ペプチドなど）発現遺伝子を用いることで、目的に応じた遺伝子導入培養皮膚を調製することが可能であると示唆された。

以上、本研究で構築した抗生物質含有培養皮膚型貼付剤は、重症火傷や褥瘡などの重篤な皮膚損傷に用いることのできる新しい DDS として有望であることが示唆された。また、この抗生物質含有培養皮膚型貼付剤に polystyrene microspheres を組み込むことで薬物放出制御能を持たせることが可能であると示された。拡散則に基づく数学的解析は、これらのシステムの評価に有用であると思われる。さらに、モデルたん白質を発現した遺伝子導入培養皮膚の調製が可能であることが示され、本研究で用いた方法を応用することで創傷治癒に関連する様々な機能を持つ遺伝子導入培養皮膚型貼付剤の調製も可能であると考えられる。

謝辞

終わりに望み、本研究に際して終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西大学臨床薬物動態学講座杉林堅次教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行に当たり終始有益な御指導、御助言を賜りました城西国際大学薬学部長谷川哲也講師ならびに城西大学臨床薬物動態学講座藤堂浩明助手に心から感謝の意を表します。

さらに、3次元培養ヒト皮膚モデル (LSE-high) に関する情報ならびに取り扱い方法を御教授いただきました東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所石橋卓也氏、高橋秀和氏に厚く御礼申し上げます。

さらに、遺伝子導入に関する実験の遂行に当たり多くの御助言を賜りました姫路獨協大学駒田富佐夫教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、有益なご意見ならびに実験のご協力をいただきました城西大学臨床薬物動態学講座関係諸氏に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) H. Green, Cultured cells for the treatment of disease, *Sci. Am.* 265 (5) (1991) 96-102.
- 2) R. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering, *Science* 260 (5110) (1993) 920-926.
- 3) M. McCarthy, Bio-engineered tissues move towards the clinic, *Lancet* 348 (9025) (1996) 466.
- 4) M. Muhart, S. McFalls, R.S. Kirsner, G.W. Elgart, F. Kerdel, M.L. Sabolinski, J. Hardin-Young, W.H. Eaglstein, Behavior of tissue-engineered skin: a comparison of a living skin equivalent, autograft, and occlusive dressing in human donor sites, *Arch. Dermatol.* 135 (8) (1999) 913-918.
- 5) 黒柳能光, 皮膚の再建を可能にする Tissue Engineering, *遺伝子医学* 5 (4) (2001) 594-598.
- 6) 黒柳能光, 再生組織工学による皮膚の再建: 培養皮膚代替物の開発現状, *生体材料* 19 (5) (2001) 166-176.
- 7) N.E. O'Connor, J.G. Muliken, S. Banks-Schlegel, O. Kehinde, H. Green, Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells, *Lancet* 1 (8211) (1981) 75-78.
- 8) G.G. Gallico, N.E. O'Connor, C.C. Compton, O. Kehinde, H. Green, Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium, *N. Engl. J. Med.* 311 (7) (1984) 448-451.
- 9) 田中秀治, 重症熱傷治療の進歩: 培養皮膚・人工真皮・スキンバンクの現状, *Emergency nursing* 10 (1997) 1118-1125.
- 10) 黒柳能光, 細胞組み込み型人工皮膚, *熱傷* 23 (1999) 1-19.

- 11) 黒柳能光, 人工皮膚の開発: 創傷被覆材と培養皮膚, 人工臓器 28 (1) (1999) 24-35.
- 12) Y. Kuroyanagi, Advances in wound dressing and cultured skin substitutes, *J. Artif. Organs* 2 (1999) 97-116.
- 13) H. Green, O. Kehinde, J. Thomas, Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 (11) (1979) 5665-5668.
- 14) K.A. Wright, K.B. Nadire, P. Busto, R. Tubo, J.M. McPherson, B.M. Wentworth, Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury, *Burns* 24 (1) (1998) 7-17.
- 15) H. Carsin, P. Ainaud, H. Le Bever, J. Rives, A. Lakhel, J. Stephanazzi, F. Lambert, J. Perrot, Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients, *Burns* 26 (4) (2000) 379-387.
- 16) G. Naughton, The Advanced Tissue Sciences story, *Sci. Am.* 280 (4) (1999) 84-85.
- 17) M.L. Cooper, J.F. Hansbrough, R.L. Spielvogel, R. Cohen, R.L. Bartel, G. Naughton, In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh, *Biomaterials* 12 (2) (1991) 243-248.
- 18) J.F. Hansbrough, C. Dore, W.B. Hansbrough, Clinical trials of a living dermal tissue replacement placed beneath meshed, split-thickness skin grafts on excised burn wounds, *J. Burn Care Rehabil.* 13 (5) (1992) 519-529.
- 19) J.F. Hansbrough, D.W. Mazingo, G.P. Kealey, M. Davis, A. Gidner,

- G.D. Gentzkow, Clinical trials of a biosynthetic temporary skin replacement, Dermagraft-Transitional Covering, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds, *J. Burn Care Rehabil.* 18 (1 Pt. 1) (1997) 43-51.
- 20) G.F. Purdue, J.L. Hunt, J.M. Still Jr, E.J. Law, D.N. Herndon, I.W. Goldfarb, W.R. Schiller, J.F. Hansbrough, W.L. Hickerson, H.N. Himel, G.P. Kealey, J. Twomey, A.E. Missavage, L.D. Solem, M. Davis, M. Totoritis, G.D. Gentzkow, A multicenter clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds, *J. Burn Care Rehabil.* 18 (1 Pt. 1) (1997) 52-57.
- 21) N. Yamada, N. Shioya, Y. Kuroyanagi, Evaluation of an allogeneic cultured dermal substitute composed of fibroblasts within a spongy collagen matrix as a wound dressing, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 29 (3) (1995) 211-219.
- 22) Y. Kuroyanagi, N. Yamada, R. Yamashita, E. Uchinuma, Tissue-engineered product: allogeneic cultured dermal substitute composed of spongy collagen with fibroblasts, *Artif. Organs* 25 (3) (2001) 180-186.
- 23) M. Eisinger, S. Sadan, I.A. Silver, R.B. Flick, Growth regulation of skin cells by epidermal cell-derived factors: implications for wound healing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (6) (1988) 1937-1941.
- 24) I.A. McKay, I.M. Leigh, Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing, *Br. J. Dermatol.* 124 (6) (1991) 513-518.
- 25) M.R. Madden, J.L. Finkelstein, L. Staiano-Coico, C.W. Goodwin, G.T. Shires, E.E. Nolan, J.M. Hefton, Grafting of cultured allogeneic

- epidermis on second- and third-degree burn wounds on 26 patients, *J. Trauma* 26 (11) (1986) 955-962.
- 26) T.J. Phillips, O. Kehinde, H. Green, B.A. Gilchrest, Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts, *J. Am. Acad. Dermatol.* 21 (2 Pt. 1) (1989) 191-199.
- 27) T.J. Phillips, B.A. Gilchrest, Cultured epidermal allografts as biological wound dressings, *Prog. Clin. Biol. Res.* 365 (1991) 77-94.
- 28) 矢永 (田辺) 博子, 田井良明, 培養表皮, 救急医学 20 (1996) 68-70.
- 29) L.B. Nanney, Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair, *J. Invest. Dermatol.* 94 (5) (1990) 624-629.
- 30) N.T. Bennett, G.S. Schultz, Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing, *Am. J. Surg.* 166 (1) (1993) 74-81.
- 31) 石倉直敬, 創傷治癒と細胞成長因子, 創傷の治療: 最近の進歩, 克誠堂出版 (1993) 36-45.
- 32) E. Bell, H.P. Ehrlich, D.J. Buttle, T. Nakatsuji, Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness, *Science* 211 (4486) (1981) 1052-1054.
- 33) E. Bell, S. Sher, B. Hull, C. Merrill, S. Rosen, A. Chamson, D. Asselineau, L. Dubertret, B. Coulomb, C. Lapiere, B. Nusgens, Y. Neveux, The reconstitution of living skin, *J. Invest. Dermatol.* 81 (1 Suppl) (1983) 2s-10s.
- 34) W.H. Eaglstein, M. Iriondo, K. Laszlo, A composite skin substitute (graftskin) for surgical wounds. A clinical experience, *Dermatol. Surg.* 21 (10) (1995) 839-843.
- 35) V. Falanga, D. Margolis, O. Alvarez, M. Auletta, F. Maggiasco, M.

- Altman, J. Jensen, M. Sabolinski, J. Hardin-Young, Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. Human Skin Equivalent Investigators Group, Arch. Dermatol. 134 (3) (1998) 293-300.
- 36) J.F. Trent, R.S. Kirsner, Tissue engineered skin: Apligraf, a bi-layered living skin equivalent, Int. J. Clin. Pract. 52 (6) (1998) 408-413.
- 37) V. Falanga, Apligraf treatment of venous ulcers and other chronic wounds, J. Dermatol. 25 (12) (1998) 812-817.
- 38) J.T. Shen, V. Falanga, Innovative therapies in wound healing, J. Cutan. Med. Surg. 7 (3) (2003) 217-224.
- 39) R.G. Teepe, R.W. Kreis, E.J. Koebrugge, J.A. Kempenaar, A.F. Vloemans, R.P. Hermans, H. Boxma, J. Dokter, J. Hermans, M. Ponc, The use of cultured autologous epidermis in the treatment of extensive burn wounds, J. Trauma 30 (3) (1990) 269-275.
- 40) K. Kawai, S. Suzuki, Y. Tabata, T. Taira, Y. Ikada, Y. Nishimura, Development of an artificial dermis preparation capable of silver sulfadiazine release, J. Biomed. Mater. Res. 57 (3) (2001) 346-356.
- 41) Y. Kuroyanagi, E. Kim, N. Shioya, Evaluation of a synthetic wound dressing capable of releasing silver sulfadiazine, J. Burn Care Rehabil. 12 (2) (1991) 106-115.
- 42) K. Matsuda, S. Suzuki, N. Isshiki, K. Yoshioka, R. Wada, S.H. Hyon, Y. Ikada, Evaluation of a bilayer artificial skin capable of sustained release of an antibiotic, Biomaterials 13 (2) (1992) 119-122.
- 43) Y.S. Cho, J.W. Lee, J.S. Lee, J.H. Lee, T.R. Yoon, Y. Kuroyanagi, M.H. Park, H.J. Kim, Hyaluronic acid and silver sulfadiazine-impregnated polyurethane foams for wound dressing application, J. Mat. Sci. Mat.

- Med. 13 (9) (2002) 861-865.
- 44) Y.M. Bello, A.F. Falabella, W.H. Eaglstein, Tissue-engineered skin. Current status in wound healing, *Am. J. Clin. Dermatol.* 2 (5) (2001) 305-313.
 - 45) N. Hada, T. Hasegawa, H. Takahashi, T. Ishibashi, K. Sugibayashi, Cultured skin loaded with tetracycline HCl and chloramphenicol as dermal delivery system: mathematical evaluation of the cultured skin containing antibiotics, *J. Control. Release* 108 (2-3) (2005) 341-350.
 - 46) E. Bell, H.P. Ehrlich, S. Sher, C. Merrill, R. Sarber, B. Hull, T. Nakatsuji, D. Church, D.J. Buttle, Development and use of a living skin equivalent, *Plast. Reconstr. Surg.* 67 (3) (1981) 386-392.
 - 47) M.L. Sabolinski, O. Alvarez, M. Auletta, G. Mulder, N.L. Parenteau, Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: experience in venous ulcers, *Biomaterials* 17 (3) (1996) 311-320.
 - 48) 石橋卓也, 三次元培養ヒト皮膚モデル, *組織培養工学* 25 (1999) 121-124.
 - 49) W.I. Higuchi, Analysis of data on the medicament release from ointments, *J. Pharm. Sci.* 51 (1962) 802-804.
 - 50) D.F. Young, W.P. Ball, Estimating diffusion coefficients in low-permeability porous media using a macropore column, *Environ. Sci. Technol.* 32 (17) (1998) 2578-2584.
 - 51) S.J. Desai, A.P. Simonelli, W.I. Higuchi, Investigation of factors influencing release of solid drug dispersed in inert matrices, *J. Pharm. Sci.* 54 (10) (1965) 1459-1464.
 - 52) K. Sugibayashi, T. Hayashi, K. Matsumoto, T. Hasegawa, Utility of a three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate the

- simultaneous diffusion and metabolism of ethyl nicotinate in skin, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 19 (5) (2004) 352-362.
- 53) R.J. Scheuplein, I.H. Blank, Mechanism of percutaneous absorption. IV. Penetration of nonelectrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids, *J. Invest. Dermatol.* 60 (5) (1973) 286-296.
- 54) K. Sugibayashi, T. Hayashi, T. Hatanaka, M. Ogihara, Y. Morimoto, Analysis of simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin, *Pharm. Res.* 13 (6) (1996) 855-860.
- 55) M. Okumura, K. Sugibayashi, K. Ogawa, Y. Morimoto, Skin permeability of water-soluble drugs, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 37 (5) (1989) 1404-1406.
- 56) M. Washitake, T. Yajima, T. Anmo, T. Arita, R. Hori, Studies on percutaneous absorption of drugs. 3. Percutaneous absorption of drugs through damaged skin, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 21 (11) (1973) 2444-2451.
- 57) T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1-2) (1983) 55-63.
- 58) C.L. Cannon, P.J. Neal, J.A. Southee, J. Kubilus, M. Klausner, New epidermal model for dermal irritancy testing, *Toxicol. In Vitro* 8 (4) (1994) 889-891.
- 59) T.X. Xiang, B.D. Anderson, The relationship between permeant size and permeability in lipid bilayer membranes, *J. Membr. Biol.* 140 (2) (1994) 111-122.
- 60) M.D. Harriger, G.D. Warden, D.G. Greenhalgh, R.J. Kagan, S.T. Boyce, Pigmentation and microanatomy of skin regenerated from composite

- grafts of cultured cells and biopolymers applied to full-thickness burn wounds, *Transplantation* 59 (5) (1995) 702-707.
- 61) S. Yoshida, C. Yamasaki, K. Yoshizato, Proinsulin-secreting hybrid skin which can be used to treat diabetic animals, *Tissue Eng.* 3 (3) (1997) 243-255.
- 62) A.J. Singer, R.A. Clark, Cutaneous wound healing, *N. Engl. J. Med.* 341 (10) (1999) 738-746.
- 63) F. Berthod, O. Damour, In vitro reconstructed skin models for wound coverage in deep burns, *Br. J. Dermatol.* 136 (6) (1997) 809-816.
- 64) 熊谷憲夫, 培養表皮移植による創傷治癒, *熱傷* 18 (1992) 59-70.
- 65) G. Orive, R.M. Hernandez, A. Rodriguez Gascon, A. Dominguez-Gil, J.L. Pedraz, Drug delivery in biotechnology: present and future, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (6) (2003) 659-664.
- 66) Y. Tabata, Present position and future expectations of regenerative medicine, *Biotherapy* 18 (2) (2004) 91-105.
- 67) J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J.M. Schroder, A peptide antibiotic from human skin, *Nature* 387 (6636) (1997) 861.
- 68) R. Bals, X. Wang, Z. Wu, T. Freeman, V. Bafna, M. Zasloff, J.M. Wilson, Human β -defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung, *J. Clin. Invest.* 102 (5) (1998) 874-880.
- 69) T. Hiratsuka, M. Nakazato, Y. Date, J. Ashitani, T. Minematsu, N. Chino, S. Matsukura, Identification of human β -defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249 (3) (1998) 943-947.
- 70) L. Liu, L. Wang, H.P. Jia, C. Zhao, H.H. Heng, B.C. Schutte, P.B. McCray Jr, T. Ganz, Structure and mapping of the human β -defensin

- HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation, *Gene* 222 (2) (1998) 237-244.
- 71) A.Y. Liu, D. Destoumieux, A.V. Wong, C.H. Park, E.V. Valore, L. Liu, T. Ganz, Human β -defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation, *J. Invest. Dermatol.* 118 (2) (2002) 275-281.
- 72) D.M. Supp, A.C. Karpinski, S.T. Boyce, Expression of human β -defensins HBD-1, HBD-2, and HBD-3 in cultured keratinocytes and skin substitutes, *Burns* 30 (7) (2004) 643-648.
- 73) Y. Kaneda, T. Nakajima, T. Nishikawa, S. Yamamoto, H. Ikegami, N. Suzuki, H. Nakamura, R. Morishita, H. Kotani, Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system, *Mol. Ther.* 6 (2) (2002) 219-226.
- 74) Y. Kaneda, New vector innovation for drug delivery: development of fusigenic non-viral particles, *Curr Drug Targets* 4 (8) (2003) 599-602.
- 75) H. Nakamura, T. Kimura, H. Ikegami, K. Ogita, S. Koyama, K. Shimoya, T. Tsujie, M. Koyama, Y. Kaneda, Y. Murata, Highly efficient and minimally invasive in-vivo gene transfer to the mouse uterus using haemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector, *Mol. Hum. Reprod.* 9 (10) (2003) 603-609.
- 76) M. Ono, Y. Sawa, Y. Miyamoto, N. Fukushima, H. Ichikawa, T. Ishizaka, Y. Kaneda, H. Matsuda, The effect of gene transfer with hepatocyte growth factor for pulmonary vascular hypoplasia in neonatal porcine model, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 129 (4) (2005) 740-745.
- 77) Y.D. Kim, K.G. Park, R. Morishita, Y. Kaneda, S.Y. Kim, D.K. Song, H.S. Kim, C.W. Nam, H.C. Lee, K.U. Lee, J.Y. Park, B.W. Kim, J.G.

- Kim, I.K. Lee, Liver-directed gene therapy of diabetic rats using an HVJ-E vector containing EBV plasmids expressing insulin and GLUT 2 transporter, *Gene Ther.* 13 (3) (2006) 216-224.
- 78) K.W. Liechty, M. Nesbit, M. Herlyn, A. Radu, N.S. Adzick, T.M. Crombleholme, Adenoviral-mediated overexpression of platelet-derived growth factor-B corrects ischemic impaired wound healing, *J. Invest. Dermatol.* 113 (3) (1999) 375-383.
- 79) S.A. Eming, J. Lee, R.G. Snow, R.G. Tompkins, M.L. Yarmush, J.R. Morgan, Genetically modified human epidermis overexpressing PDGF-A directs the development of a cellular and vascular connective tissue stroma when transplanted to athymic mice--implications for the use of genetically modified keratinocytes to modulate dermal regeneration, *J. Invest. Dermatol.* 105 (6) (1995) 756-763.
- 80) Y. Kaneda, S. Yamamoto, T. Nakajima, Development of HVJ Envelope Vector and Its Application to Gene Therapy, *Adv. Genet.* 53PA (2005) 307-332.
- 81) D.M. Supp, S.M. Bell, J.R. Morgan, S.T. Boyce, Genetic modification of cultured skin substitutes by transduction of human keratinocytes and fibroblasts with platelet-derived growth factor-A, *Wound Repair Regen.* 8 (1) (2000) 26-35.
- 82) D.M. Supp, S.T. Boyce, Cutaneous gene therapy with cultured skin substitutes, *Tissue Engineering and Novel Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc. (2003) 155-172.
- 83) P.A. Raj, A.R. Dentino, Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity, *FEMS Microbiol. Lett.* 206 (1) (2002) 9-18.

- 84) D.A. O'Neil, E.M. Porter, D. Elewaut, G.M. Anderson, L. Eckmann, T. Ganz, M.F. Kagnoff, Expression and regulation of the human β -defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium, *J. Immunol.* 163 (12) (1999) 6718-6724.
- 85) W.K. Huh, T. Oono, Y. Shirafuji, H. Akiyama, J. Arata, M. Sakaguchi, N.H. Huh, K. Iwatsuki, Dynamic alteration of human β -defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin, *J. Mol. Med.* 80 (10) (2002) 678-684.
- 86) J.G. Dinulos, L. Mentele, L.P. Fredericks, B.A. Dale, G.L. Darmstadt, Keratinocyte expression of human beta defensin 2 following bacterial infection: role in cutaneous host defense, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 (1) (2003) 161-166.
- 87) K. Midorikawa, K. Ouhara, H. Komatsuzawa, T. Kawai, S. Yamada, T. Fujiwara, K. Yamazaki, K. Sayama, M.A. Taubman, H. Kurihara, K. Hashimoto, M. Sugai, Staphylococcus aureus susceptibility to innate antimicrobial peptides, β -defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes, *Infect. Immun.* 71 (7) (2003) 3730-3739.
- 88) K.A. Holbrook, K. Wolff, The structure and development of skin, *Dermatology in General Medicine*, Mcgraw-Hill Book Co. Ltd. (1993) 97-145.
- 89) T.J. Phillips, J.S. Dover, Leg ulcers, *J. Am. Acad. Dermatol.* 25 (6 Pt. 1) (1991) 965-987.
- 90) R.A. Clark, Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I, *J. Am. Acad. Dermatol.* 13 (5 Pt. 1) (1985) 701-725.
- 91) H. Kageyama, Y. Kuroyanagi, Pre-clinical experiment of hyaluronic acid spongy sheet; the effect of a synthetic antithrombin agent, *WOUNDS* 7

- (1995) 220-227.
- 92) H. Shibata, N. Shioya, Y. Kuroyanagi, Development of new wound dressing composed of spongy collagen sheet containing dibutyl cyclic AMP, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 8 (8) (1997) 601-621.
- 93) M. Inoue, I. Ono, T. Tateshita, Y. Kuroyanagi, N. Shioya, Effect of a collagen matrix containing epidermal growth factor on wound contraction, *Wound Repair Regen.* 6 (3) (1998) 213-222.
- 94) M. Yamato, M. Utsumi, A. Kushida, C. Konno, A. Kikuchi, T. Okano, Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature, *Tissue Eng.* 7 (4) (2001) 473-480.
- 95) A. Kikuchi, T. Okano, Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs, *J. Control. Release* 101 (1-3) (2005) 69-84.

