

生体膜透過性高エネルギー担体ホスホエノールピルビン酸(PEP)を用いた 難治性皮膚潰瘍の治癒促進

○ 入江徹美、森内宏志（熊本大学大学院薬学研究科病態・生体情報学講座）

緒 言

Phosphoenolpyruvate (PEP) は、生体内で最も高いエネルギーを有するリン酸化合物であるが、adenosine triphosphate (ATP) など他の高エネルギーリン酸化合物とは異なり、唯一媒介輸送で細胞膜を透過することが知られている。細胞外に添加したPEPは直ちに細胞内へ取り込まれてATPへ変換され細胞を賦活化する。このPEPの生体膜透過現象を利用して、輸血時の赤血球の活性化や腎臓保護液への応用などが試みられている。

褥瘡は、自発的運動の低下、運動麻痺、知覚障害、関節拘縮や骨の突出などが原因で、身体の一部に持続的な圧迫が加わり皮膚や深部組織の血行が阻害されるために発生する潰瘍、あるいはそれに至る病変である。褥瘡の治療は、合併する基礎疾患の治療とともに、潰瘍面に対しては切除および分層植皮術等や種々の外用剤（壊死組織除去剤、抗菌剤、肉芽形成促進剤等）による保存的治療が行われている。

PEPが細胞に効率よくエネルギーを運搬すると、細胞増殖や肉芽形成促進などが期待されるため、褥瘡治療薬または皮膚潰瘍治療薬としての可能性が示唆される。また、褥瘡や皮膚潰瘍部位は循環血流不足による局所的な酸素不足・栄養不足状態に陥っている。PEPによる赤血球の酸素親和性の低下が起こり、酸素を赤血球から病巣部位へ効率良く供給できると、従来の褥瘡・皮膚潰瘍治療と異なる作用機序で治癒促進が期待

できる。このような背景のもと、本研究では、PEPの褥瘡・皮膚潰瘍治療薬としての可能性を検討した。

結果と考察

1) PEPの化学的安定性

PEPを水に溶解すると酸性を示す。例えば、PEP 1.0 gを水10 mLに溶解すると、pHは1.8～2.2を示す。PEPの細胞膜透過性はpH 4付近で最大となり、中性に近づくにつれ低下するため、PEPの製剤化に当たっては、細胞膜透過性が良く、化学的安定性が高いpHを選択する必要がある。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 2.0、60℃) 中において、100 μM PEPの分解反応を経時的に追跡した結果、PEPはほぼ定量的にピルビン酸とリン酸に加水分解されることが明らかとなった。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 2.0～8.0、60℃) 中、pHの上昇に伴いPEPの化学的安定性は向上し、pH 3～4およびpH 6～7付近に変曲点が観察された。PEPの医療への応用を考える上で、化学的安定性と細胞膜透過性の2つの要素を考慮しなければならない。PEPの細胞膜透過性はpH 4で最大となるが、酸性溶液を皮膚へ適用すると局所刺激性が懸念させる。一方、PEPはpHの上昇に伴い化学的安定性が向上する。以上の結果を考えあわせると、褥瘡や皮膚潰瘍の治療薬として処方設計に際して、溶液製剤であればpH 6付近に設定するのが妥当であると考えられる。

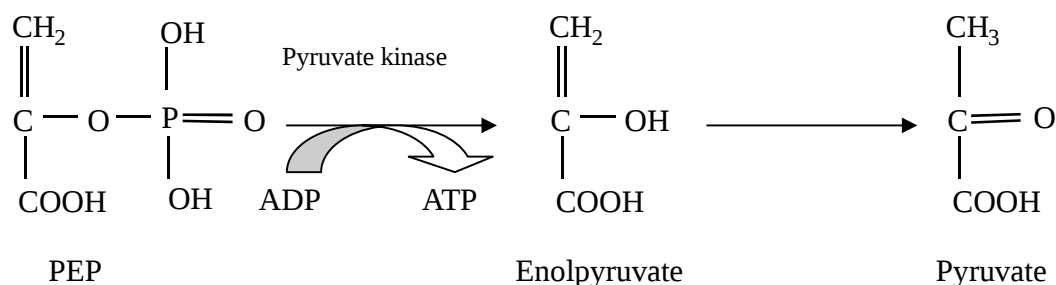


Fig. 1. Bioconversion of PEP into Pyruvate

次に、PEP含有軟膏を調製し、各軟膏基剤中でのPEPの安定性を検討した。ここで、軟膏基剤として、PEPの水溶液中での安定性を考慮し、比較的水分含量の少ない油脂性基剤として白色ワセリンおよびプラスチックベース、水溶性基剤としてマクロゴールを選び、軟膏中のPEP含有量は3 %w/wとした。各軟膏剤の冷所（4℃）保存2ヶ月後、室温（25℃）保存2ヵ月後、40℃保存1ヶ月後および2ヶ月後のPEP残存量を比較すると、PEP含有軟膏剤の安定性は、軟膏基剤としては油脂性基剤である白色ワセリンやプラスチックベースでは高く、40℃、2ヶ月間保存においても95%以上残存した。

一方、外用液剤での検討では、4℃保存の状態では3 %w/v溶液（pH 6.0）では6週間、20 %w/v溶液では4週間までの安定性は確保できた。今後、PEPを医療へ応用する上で、その化学的安定性をさらに向上させ、室温でも長期保存できるような安定化剤や保存剤の検討が必要である。

2) PEP外用剤の実験的創傷モデルに対する治癒促進効果

褥瘡および皮膚潰瘍などの病態動物モデルとして、ラットの皮膚熱傷創モデル、皮膚欠損創モデルを作成し、ジブチルサイクリックAMP含有軟膏（アクトシン軟膏®）を比較対照として、PEP含有軟膏の治癒促進効果を検討した。アクトシン軟膏®は、ジブチルサイクリックAMPをマクロゴール中に3 %w/w含有する軟膏であり、末梢血管拡張作用をもつことから難治性皮膚潰瘍部位の血液循環を改善し、潰瘍の治療に有用な薬剤である。以下の検討において、略号M、P、およびWは、それぞれマクロゴール、プラスチックベース、および白色ワセリン基剤を示す。なお、基剤中のPEP含有率は、アクトシン軟膏®と同じく3 %w/wとした。

「ラット皮膚熱傷創モデルを用いた検討」

熱傷創作成4日目以降、各PEP含有軟膏はcontrolと比較して、熱傷創部の面積を縮小させる傾向が認められた。また、3 %w/w PEP軟膏（M）は熱傷創作成7、8および9日後に、3 %w/w PEP（P）は熱傷創作成4、9、11および15日後に、アクトシン軟膏®は熱傷創作成4、7および9日後において、それぞれcontrolに対して有意な治癒促進効果を示した。ここで、3 %w/w PEP軟膏（P）はcontrolと比較して治癒（創面の痂皮が脱落

し創面が完全に塞がった場合を治癒と判定）までに要する日数を約2日、3 %w/w PEP（W）およびアクトシン軟膏®は、controlと比較して治癒までに要する日数を約1日、それぞれ短縮した。

「ラット皮膚欠損創モデルを用いた検討」

3 %w/w PEP軟膏（W）およびアクトシン®は欠損創作成5、7、9および10日後に、また、3 %w/w PEP軟膏（P）は欠損創作成7、9および10日後において、それぞれcontrolに対し有意な面積比の縮小すなわち治癒促進効果が認められた。一方、3 %w/w PEP軟膏（M）は殆ど効果を示さなかった。また、3 %w/w PEP軟膏（P）およびアクトシン軟膏®はcontrolと比較して治癒までに要する日数を約2日、3 %w/w PEP軟膏（W）は約1日、それぞれ短縮した。

以上の結果から、基剤の違いにより創傷治癒促進効果が若干異なる傾向が認められた。プラスチックベース、白色ワセリンの油脂性基剤を用いたPEP含有軟膏がより高い創傷治癒促進効果を示した。油脂性基剤は塗布後皮膚表面に貯留し、油脂性の薄い膜を形成することによって、被覆保護作用を示すことによって、付加的な効果が期待される。今後、糖尿病病態ラットモデル、もしくは治癒能力が低いと思われる高齢・低栄養ラットモデルを用いた同様の検討を行うことによって、PEPの創傷治癒促進効果が明確化するものと思われる。

まとめ

本研究では、細胞膜透過性エネルギー運搬・供給体であるPEPの褥瘡・皮膚潰瘍治療薬としての可能性を検討した。今回得られた知見は、PEP含有経皮適用剤を開発する上で有用な基礎資料になるものと考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、バイオテクノロジー研究推進会からの研究助成金により行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、ご指導・ご教示いただきました九州大学大学院医学研究院濱崎直孝教授に深謝いたします。また、軟膏の調製および動物実験にご協力いただきました祐徳p品工業株式会社から感謝いたします。