神戸学院大学ライフサイエンス産学連研究センター

２０１２年度研究成果発表会
プログラム

平成２５年３月１日（金）９：２０～

於：Ｃ号館ＬＳＣカンファレンスルーム

およびピロティー

主　催

神戸学院大学ライフサイエンス産学連研究センター

共　催

文部科学省・私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「創剤・創薬・創材支援を企図した医用ナノパーティキュレートシステム
基盤研究拠点の形成」

日本私立学校振興・共済事業団　学術研究振興資金
「エビデンスに基づく緩和ケアの普及・推進に向けた基礎的研究」

協　賛

神戸学院大学薬学部　製剤学研究室

プログラム

9:20〜9:25　開会の挨拶　センター長　福森義信

9:25〜 9:30（O-1）
私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・採択研究プロジェクト「創剤・創薬・創材支援を企図した医用ナノパーティキュレートシステム基盤研究拠点の形成」の研究概要紹介*
MEXT-supported Program for “the Strategic Research Foundation at Private Universities, 2012-2016”
Introductory Remarks on “Research Center Initiative for Medical Nanoparticulate Systems as Innovative Tools & Technologies in Drug Delivery, Drug Discovery and Medical Materials”
○市川秀喜（研究プロジェクト代表者）
神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室

一般演題口頭発表
（座長：北條恵子）

9:30〜 9:45（O-2）
J774. 1 マクロファージにおける貪食微粒子の挙動*
Fate of phagocytized nano and micro particles byJ774.1 macrophages
○鶴田裕文，佐々木祐太，村山可菜実，鈴木　慧，塚本拓也，
榎本理世，李　英培
神戸学院大学　薬学部　薬理学研究室

9:45〜10:00（O-3）
ナノ粒子の標的化技術としての表面加工システムの開発　ー表面加工システムに用いるタンパク転移酵素 SrtA 用の基質化システムの開発と検討ー*
Development of surface-processing systems as targeting technology of nano-particles　- Development and investigation of SrtA substrate-producing system for surface processing -
○田端厚之，大久保行将，安養寺夏希，友安俊文，長宗秀明
徳島大学大学院　ソシオテクノサイエンス研究部

10:00‐10:15（O-4）
ナノマテリアルの血管系への影響*
Nanoparticles in vascular systems
○屋山勝俊，小野寺 章，河合裕一，岡本　博
神戸学院大学　薬学部　生命薬学部門

10:15〜10:25　休憩

（座長：日置和人）

10:25～10:40
（O-5）

ペプチド性小分子化合物による DNA ポリメラーゼ β 分子種選択的阻害作用と抗腫瘍活性*

DNA polymerase β selective inhibitory effect and anti-tumor activity of peptidic small compounds

○宮崎杏奈[1,2]，伊藤梨紗[1]，榎本　章[1]，津田裕子[1, 2]，栗山磯子[3]
吉田弘美[3]，水品善之[2, 3]
[1]神戸学院大学　薬学部　薬品化学研究室
[2]神戸学院大学ライフサイエンス産学連携研究センター
[3]神戸学院大学　栄養学部　食・健康学部門

10:40～10:55
（O-6）

がん中性子捕捉療法用 Gd 含有キトサンナノ粒子製剤（Gd-nanoCP）の開発： 表面改質型 Gd-nanoCP の調製とその担がん動物における体内動態評価*

Gadolinium-loaded chitosan nanoparticle (Gd-nanoCP) for neutron capture therapy of cancer: Preparation of surface-modified Gd-nanoCPs and their biodistribution in tumor-bearing animals

○安藤　徹[1]，片山洋輔[1]，藤本卓也[2]，新戸浩幸[3]，深澤智典[3]，
福森義信[1]，市川秀喜[1]
[1]神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室，[2]兵庫県立がんセンター
[3]京都大学 工学研究科 化学工学専攻

10:55～11:10
（O-7）

動物細胞と粒子の相互作用に関する基礎的研究*

Fundamental study of interactions between mammalian cells and particles

○深澤智典，新戸浩幸
京都大学 工学研究科 化学工学専攻

11:10～11:20

休憩

（座長：宮崎杏奈）

11:20～11:35
（O-8）

イソブトキシカルボニル基を保護基として用いたフェノール酸グリセロールエステルの合成

Synthesis of Phenolic Acid Glycerol Esters Using Isobutoxycarbonyl Group as a Protecting Group

○瀧本竜哉[1]，篠原理沙[1]，前田由佳里[1]，戸谷永生[2]，佐々木秀明[1]
[1]神戸学院大学　薬学部　有機薬化学研究室
[2]神戸学院大学　栄養学部　栄養生理学研究室

11:35～11:50
（O-9）

水分散型アミノ酸ナノ粒子を用いる水中マイクロ波固相合成：合成困難配列ペプチドの水中合成*

Aqueous Microwave-Assisted Solid-Phase Synthesis Using Amino Acid Nanoparticles : In-Water Synthesis of Difficult Sequence Peptides

○北條恵子[1]，原　麻生[1]，大西真玲[1]，福森義信[2]，市川秀喜[2]
[1]神戸学院大学　薬学部　薬品分子化学研究室，
[2]神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室

11:50～12:05（O-10）
縮合剤含有型ポリマーを用いたブロック共重合反応に関する検討*
Approach to block copolymerization of polymer containing dehydrating agent
○安倍一実，日置 和人
神戸学院大学　薬学部　機能分子化学研究室

12:05～13:05　お昼休み

13:05～14:00　一般演題ポスター口頭発表

P-1　微粒子投与マウスの in vivo イメージング*
In vivo imaging after tail vein injection of nano and micro particles
○福水寛史，田井芳香，半田真紀，榎本理世，李　英培
神戸学院大学　薬学部　薬理学研究室

P-2　微少量流動層コーティング装置による微粒子への薬物レイヤリング技術の開発*
Drug-layering technology of fine core particles by miniature fluid-bed process
○守谷路子，武田理沙，市川秀喜，福森義信
神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室

P-3　がん中性子捕捉療法用 Gd 含有キトサンナノ粒子製剤（Gd-nanoCP）の開発： Gd-nanoCP の腫瘍内直接投与後の腫瘍内分布挙動の評価*
Gadolinium-loaded chitosan nanoparticle (Gd-nanoCP) for neutron capture therapy of cancer: Evaluation of distribution in tumor tissue after intratumoral injection of Gd-nanoCP
○有田裕也[1]，三谷真也[1]，山下千明[1]，安藤　徹[1]，藤本卓也[2]，
新戸浩幸[3]，深澤智典[3]，藤井文彦[4]，福森義信[1]，市川秀喜[1]
[1]神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室，[2]兵庫県立がんセンター
[3]京都大学工学研究科化学工学専攻，[4]JT 生命誌研究館

P-4　タンパク質デリバリーのための生分解性徐放型微粒子製剤の開発：キトサンナノ粒子を被覆した多孔性微粒子からの薬物放出特性の検討*
Biodegradable sustained-release microcapsule for protein delivery: Characteristics of drug release from microcapsules coated with nanoparticulate chitosan
○馬場隆文，井上愛理，市川秀喜，福森義信
神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室

P-5　難水溶性薬物の製剤化研究： 薬物のナノ粒子化と腸溶性基材を利用した腸散性微粒子製剤の開発*
Formulation consideration on poorly water-soluble drugs: Enteric-dispersible microparticles using nanoparticulated drugs with an enteric polymer
○大谷知奈美，鳥居絢子，市川秀喜，福森義信
神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室

P-6 ホウ素中性子捕捉療法用L-BPAナノサスペンションの投与法が及ぼす体内動態への影響*

Effect of administration routes on biodistribution of nanopaticulate L-BPA formulations in tumor-bearing mice for boron neutron-capture therapy

○多治川哲平[1]，安藤　徹[1]，大倉久敬[1]，藤本卓也[2]，福森義信[1]，
市川秀喜[1]
[1]神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室，[2]兵庫県立がんセンター

P-7 ペプチド性薬物の経口送達用 core-shell 型ナノゲル粒子の小腸粘膜付着性評価*

Evaluation of intestinal muco-adhesion behavior of core-shell nanogel particles for oral peptide delivery

○三宅弘峰，荒井真琴，福森義信，市川秀喜
神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室

P-8 ガラス製アンプルカットにおけるサブミクロンサイズの不溶性微粒子の発生とコンタミネーションに関する基礎的評価*

Studies on generation and contamination of insoluble submicron-sized particles in glass-ampoule opening

○中西清和[1]，町田 遥[1]，新戸浩幸[2]，深澤智典[2]，佐野紀彰[2]
福森義信[1]，市川秀喜[1]
[1]神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室
[2]京都大学 工学研究科 化学工学専攻

P-9 乾式コーティングに用いる高分子ナノパウダーの調製とその苦みマスクへの応用*

Preparation of polymeric nanopowders for dry-particle coating and their application to bitter-taste masking

○後藤　静，市村奈都美，市川秀喜，福森義信
神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室

P-10 植物フラボノイドのDNA合成酵素阻害活性と抗がん機能性の研究*

Study on the DNA polymerase inhibitory and anticancer activities by plant flavonoids

○塩見一明，栗山磯子，吉田弘美，水品善之
神戸学院大学 栄養学部 食･健康学部門

P-11 植物精油および含有成分における生理活性の探索*

Screening of bioactive compounds form plant essential oils and their components

○見通真衣，栗山磯子，吉田弘美，水品善之
神戸学院大学 栄養学部 食･健康学部門

14:00～14:55

P-12 視床下部-延髄系を介した Orexin-A による脳虚血性耐糖能異常および神経障害の発現抑制機構†

The suppressive mechanism of orexin-A in the development of post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage through hypothalamus-medulla oblongata axis

○原田慎一，山﨑由衣，徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

P-13 脳内 sodium-glucose transporter を介した脳梗塞の発現機序解明†

Involvement of sodium-glucose transporter on the exacerbated cerebral ischemic neuronal damage through the post-ischemic glucose intolerance

○小野安紀子，西岡宏記，山﨑由衣，原田慎一，徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

p-14 中枢性疼痛病態を模するモデル動物の確立†

The development of hyperalgesia followed by global cerebral ischemia in mice

○中本賀寿夫，民谷繁幸，原田慎一，徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

P-15 全脳虚血モデルにおける中枢性疼痛の発現に対する長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の関与†

Involvement of long-chain fatty acid receptor GPR40 on the development of central post-stroke pain in global ischemic model

○春名柚佳，民谷繁幸，原田慎一，中本賀寿夫，徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

P-16 モルヒネ反復投与による鎮痛耐性形成における中脳グリア細胞の関与†

The involvement of midbrain astrocyte in the development of morphine tolerance

○木村麻希，清水あすか，矢野大輔，原田慎一，中本賀寿夫，
徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

P-17 抗がん剤エトポシドによる小腸 P-glycoprotein の発現増加機構における足場タンパク質 ERM の関与†

Involvement of ERM, scaffold proteins, in the mechanism by which repeated oral treatment with etoposide increases the expression of P-glycoprotein in the small intestine

○小堀宅郎[1]、原田慎一[1]、中本賀寿夫[1]、
岸岡史郎[2]、徳山尚吾[1]
[1]神戸学院大学 薬学部 臨床薬学
[2]和歌山県立医科大学 医学部 薬理学

P-18 エトポシドによるモルヒネ鎮痛効果の減弱機構における小腸 P-glycoprotein、RhoA/ROCK および ERM 活性の時間依存的変化†
Time-dependent changes of the activity of P-glycoprotein, RhoA/ROCK and ERM in the small intestine in the mechanism of attenuated morphine analgesia induced by repeated oral treatment with etoposide
○藤原周平[1]，辻田司[1]，小堀宅郎[1]，原田慎一[1]，中本賀寿夫[1]
岸岡史郎[2]，徳山尚吾[1]
[1]神戸学院大学 薬学部 臨床薬学
[2]和歌山県立医科大学 医学部 薬理学

P-19 炎症性疼痛モデルマウスに対する脳内長鎖脂肪酸受容体 GPR40 アゴニスト GW9508 の抗侵害作用†
Antinociceptive effect of GPR40, a long chain fatty acid receptor, agonist GW9508 in an inflammatory pain mouse model
○相澤風花[1]，里　尚也[1]，西中　崇[1]，中本賀寿夫[1]，万倉三正[2]
小山　豊[3]，糟谷史代[4]，徳山尚吾[1]
[1]神戸学院大学 薬学部 臨床薬学，[2]備前化成株式会社
[3]大阪大谷大学 薬学部 薬理学研究室
[4]神戸学院大学 薬学部 毒性学研究室

P-20 炎症性疼痛モデルマウスにおける長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の発現変動におけるアストロサイトの関与†
The involvement of astrocyte on changes of GPR40, a long chain fatty acid receptor, protein expression in an inflammatory pain mouse model
○里　尚也[1]，西中　崇[1]，中本賀寿夫[1]，万倉三正[2]，小山豊[3]
糟谷史代[4]，徳山尚吾[1]
[1]神戸学院大学 薬学部 臨床薬学，[2]備前化成株式会社
[3]大阪大谷大学 薬学部 薬理学研究室
[4]神戸学院大学 薬学部 毒性学研究室

P-21 母子分離ストレスによる情動および疼痛行動に対する影響†
The Influence of maternal separation stress on emotional and nociceptive behavior
○西中　崇，中本賀寿夫，徳山尚吾
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室

P-22 長期完全静脈栄養による消化管萎縮時の探査的薬物動態検討
An exploratory study of pharmacokinetics in rats with intestinal atrophy induced by long-term parenteral nutrition
○福島恵造[1]，三木隆弘[1]，山崎彩加[1]，中本賀寿夫[2]，徳山尚吾[2]
杉岡信幸[1]
[1]神戸学院大学　薬学部　臨床薬物動態学研究室
[2]神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

P-23　新規小型高圧乳化機によるエマルジョン製剤の調製
New high-pressure homogenizer for small volume
○福島昭二[1]，中野　満[2]
[1]神戸学院大学薬学部　臨床薬剤学研究室，[2]株式会社　美粒

14:55～15:55　ポスター討論（ピロティー）

一般講演口頭発表

（座長：福島恵造）

15:55～16:10（O-11）　私学事業団学術研究振興資金による研究成果報告（総括）
エビデンスに基づく緩和ケアの普及・推進に向けた基礎的研究†
Research report for "The Science Research Promotion Fund, Promotion and Mutual Aid Society for Private Schools of Japan "Basic study for the promotion and dissemination of evidence-based palliative care
○徳山尚吾（研究プロジェクト代表者）
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

16:10～16:25（O-12）　薬物キャリヤーとしての血中滞留性ビタミンEエマルジョンの開発
Long circulating Vitamin E emulsion as drug carrier
○貞森美知子，伊丹寛人，岸本修一，鈴木亮佑，福島昭二
神戸学院大学　薬学部　臨床薬剤学研究室

16:25～16:40（O-13）　ホウレン草糖脂質 MGDG 内包ナノ粒子（リポソーム製剤）の作製と抗腫瘍活性*
Antitumor activity of the nanoparticles (liposomes) containing a glycolipid, MGDG, from spinach
○水品善之，栗山磯子，吉田弘美
神戸学院大学　栄養学部　食・健康学部門

16:40～16:50　休憩

16:50～17:50　特別講演　（座長：徳山尚吾）

薬食相互活用による脳疾患の予防・治療法開発を目指して

京都大学　大学院　薬学研究科　薬品作用解析学
准教授　久米利明　先生

17:50～17:55　閉会の挨拶　LSC 運営委員長　李　英培

18:00～20:00　懇親会（於：ジョリポー）

* 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・採択研究課題
† 私学事業団学術研究振興資金・採択研究課題

【特別講演】

「薬食相互活用による脳疾患の予防・治療法開発を目指して」

久米　利明
京都大学　大学院薬学研究科　薬品作用解析学分野

アルツハイマー病、パーキンソン病などを含む神経変性疾患や脳卒中などの脳疾患は、脳内のニューロン群が細胞死を起こし、ニューロン数が著明に減少することが特徴である。近年、ニューロンは細胞分裂を行わないという説は崩壊してきているが、海馬歯状回などの特殊な部位を除けば、多くの脳部位において、減少したニューロンが増殖によって十分に補われることはないと考えられている。したがって、ニューロン脱落時の機能の代償は主に残存ニューロンによる突起伸展、シナプス形成によって行われ、このような代償能を上回る規模のニューロンの脱落により脳機能の低下・破綻が生じると考えられる。このような背景から、難治性神経疾患を対象とする薬物には、対症療法的に症状を改善する作用を示すものだけではなく、疾患の進行を遅延あるいは阻止する薬理作用をもつ薬物の開発が望まれている。しかし、現状では、対症療法を目的とした薬物が治療薬として用いられているに留まっており、疾患の根本原因であるニューロン死を阻止する薬物は未だに開発に至っていない。さらに、神経変性疾患は数年以上の長い期間にわたって症状が徐々に進行すること、また脳卒中などの脳疾患においても危険因子は食生活を含む生活習慣と密接に関わっていることから、薬物治療のみでこれら脳疾患を克服することは極めて困難であると考えられる。このような背景から、生活習慣の改善を含めた予防医学的な観点からの対応の重要性が認識されるようになってきている。さらに、認知症や脳卒中などの老齢化リスクへの対応として、酸化ストレスの軽減や神経保護・再生などの作用により脳機能を保護する効果をもつ食品を補助的に用いることにより、疾患予防と進行の緩徐化を図ることが重要になると考えられてきている。そこで我々は、脳疾患におけるニューロン死を抑制しうる薬物による治療を目指した研究のみならず、野菜や果物といった食品中に存在する機能性成分にも注目し予防的な観点からのアプローチを想定し検討を進めている。本講演では、生体内に存在する神経保護活性物質を用いた治療戦略へのアプローチと食品に含まれる機能性成分に基づいた予防的なアプローチにおける最近の研究成果を報告し、薬と食品を相互活用することによる新しい予防・治療戦略に向けた取り組みを紹介したい。

【O-1】

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・採択研究プロジェクト

「創剤・創薬・創材支援を企図した医用ナノパーティキュレートシステム基盤研究拠点の形成」の研究概要紹介

市川　秀喜
神戸学院大学　薬学部　製剤学研究室

神戸学院大学は，ポートアイランドキャンパス内に「ライフサイエンス産学連携研究センター」を設置し，平成 18～22 年度には「高齢化社会における加齢性疾患の予防・治療薬と機能性食品の開発研究」を学術フロンティア推進事業として遂行した．同時に，神戸医療産業都市構想における大学が果たすべき貢献の観点から，産業界や臨床施設との研究連携体制の開拓整備を進めてきた．本プロジェクトは，それを発展・加速させるためのものと位置づけ，上記推進事業で創出した研究成果を基に，それらの実用化を考える上で共通課題となっている医用ナノパーティキュレートシステムに関する学際研究拠点の基盤作りを担うものとして計画したものである．

ナノテクノロジーの有用性が謳われて以来，これを駆使して製されるナノ粒子の医療応用が脚光を浴びている．その中心は，DDS（Drug Delivery System）への応用であるが，現在までの研究は断片的なものに留まっており，治療効果の担保に必須となるナノ粒子の体内挙動は未明な部分が多く，合理的設計のための挙動解析や評価法の確立が待たれている．一方，ナノ粒子のサイズや大きな比表面積に由来する特異な性質は，DDS に留まらず，固液界面反応場を利用した医薬品・医療用材料の新規な合成システムの構築など従来無かった科学技術の創出をも可能にしうる．

こうした背景から，本プロジェクトでは，ナノ粒子の生体内挙動の系統的理解と制御因子の解明のための「ナノ粒子－生体間相互作用の階層的評価とその解析法の確立」と新しい創剤・創薬・創材のための「ナノ粒子を基盤とする新規 DDS および創薬・創材支援ツールの開発」に焦点を当て，生命科学，製剤学，合成化学，材料工学など多方面の専門家との有機的連携体制で基盤研究拠点の形成を目指す．これら一連の研究は，従来の国内外の開発研究では明確に意識されてこなかった「ナノ粒子を適用して創剤・創薬・創材にいたるトータルシステム」の具現化を通じて，国内外で断片的に展開しているナノテクに立脚した医薬研究に対して技術的にも学術的にも普遍性のある新しい方法論を提供しうる点に特徴があると考えている．

研究着手からほぼ１年が経過し，本プロジェクトメンバーによる計 20 件の今年度研究報告にみられるように，着実に成果を挙げつつあると自負しているが，研究課題の最終目標への到達にはまだまだ時間を要する．進捗状況の詳細は各メンバーのご報告に譲り，本発表ではプロジェクトのアウトラインを紹介させていただき，諸兄のご批評を賜りたい．

【O-2】

J774.1 マクロファージにおける貪食微粒子の挙動

○鶴田裕文，佐々木祐太，村山可菜実，鈴木　慧，
塚本拓也，榎本理世，李　英培

神戸学院大学薬学部薬理学研究室

近年，微粒子の産業応用が活発に進められる一方で，生体に対するその微粒子の影響が懸念されている．また，生体内におけるこのような微粒子の除去にはマクロファージが大きな役割を担っていると考えられている．これまで本研究室において，マクロファージ様株細胞である J774.1 マクロファージによる種々の基材，粒子径，および表面修飾の蛍光微粒子の取り込みの違いについて調べてきた．今回，J774.1 マクロファージが微粒子を細胞内に取り込むことによって細胞機能が変化するか否かを検討する一端として，J774.1 マクロファージによる微粒子貪食が細胞の生存に影響を与えるかどうかを調べた．ポリスチレンおよびシリカ基材の微粒子を使用して，J774.1 マクロファージに粒子径 1000 nm および 100 nm の蛍光微粒子をそれぞれ貪食させたのち，セルソーターを用いて貪食していない細胞および過剰に貪食した細胞を分取し，再培養を行った．貪食反応終了直後，再培養開始から 24 および 48 時間後にヨウ化プロピジウム染色を行ったが，微粒子の粒子径および基材の違いに関わらず，微粒子貪食細胞における著しい細胞死の増加はみられなかった．さらに，これらの細胞をそれぞれ継代培養したところ，各群の細胞増殖に差はみられなかった．これらの結果から，種々の蛍光微粒子は J774.1 マクロファージに対し，顕著な細胞死を誘導しないことが判明した．また，J774.1 マクロファージが増殖するという特徴を利用して，細胞が分裂するときに取り込まれた微粒子を一方の細胞に保持したまま分裂するのか，または両方の細胞に分散して分裂するのかどうかについて検討した．微粒子貪食後の細胞をそれぞれ分取して再培養し，一定時間経過後に細胞に含まれる微粒子量を測定したところ，培養時間を延長するにつれて 1 細胞あたりに含まれる蛍光微粒子の数が減少した．このことから，貪食された蛍光微粒子は細胞分裂時にひとつの細胞に偏在せず，ふたつの細胞に分散することが示唆された．以上のことから，J774.1 マクロファージはいずれの粒子径，基材の蛍光微粒子を貪食しても細胞の生存に大きな影響を受けず，さらに，蛍光微粒子を貪食した細胞は貪食した微粒子と共にふたつの細胞に分裂することが示された．

【O-3】

ナノ粒子の標的化技術としての表面加工システムの開発 -表面加工システムに用いるタンパク転移酵素 SrtA 用の 基質化システムの開発と検討-

○田端厚之, 大久保行将, 安養寺夏希, 友安俊文, 長宗秀明
徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部
ライフシステム部門 生命システム工学講座

【背景・目的】我々の研究室では, 細菌由来の機能性タンパク質の応用に関する研究を行っている。その一環として、これまでに黄色ブドウ球菌由来のペプチド転移酵素である sortase A（SrtA）に注目し、その可溶性組換え体（His-ΔN SrtA）の発現系の構築、および SrtA 認識配列（LPXTGG）を有す基質の転移反応条件の最適化について検討してきた。ところで、SrtA については黄色ブドウ球菌由来の SrtA で最も研究が進んでいるが、他のグラム陽性細菌も SrtA（或いはそのホモログ）を産生し、さらに優先的に認識される SrtA 認識配列中の「X」に該当するアミノ酸は菌種により異なる可能性があることなどが示唆されている。そこで本研究では、より効率的な基質転移反応性を発揮する SrtA とその認識配列の組み合わせの最適条件を見出すことを目的として検討を行った。

【結果・考察】まず、SrtA 転移基質作製用の発現システムを構築した。このシステムを利用し、緑色蛍光タンパク質（GFP）の C 末側に 20 種類の SrtA 認識配列を有す転移基質パネル（GFP-X）を、N 末 His タグ化組換えタンパク質として大腸菌で発現させて Ni 親和性クロマトにより調製した。次に、SrtA の受容配列を含む合成ペプチド（G_5C）の SH 基とウシ血清アルブミンのアミノ基を架橋剤で結合した連結受容体を作製し、この連結受容体に対する GFP-X の転移反応を評価した。その結果、X に相当するアミノ酸配列によって SrtA の基質転移活性が異なることが示され、SrtA の認識性の高い配列群（X=R, H, T, G）を見出した。現在、本研究で構築したスクリーニングシステムを用いて、黄色ブドウ球菌由来の SrtA のみならず他のグラム陽性細菌由来の様々な SrtA の基質認識特性についても検討を継続しており、今後最適な SrtA・基質認識配列の組み合わせを見出して、SrtA 等を用いたナノ粒子の表面加工技術への応用展開を目指す予定である.

【O-4】

ナノマテリアルの血管系への影響

屋山勝俊、小野寺章、河合裕一、岡本博

神戸学院大学・薬学部・循環器薬理学研究室

ナノマテリアルは、化粧品、医薬品や食品添加物を始めとしヒトに直接適用される製品に使用されている。生体に適用されたナノマテリアルは、血管系を介し種々組織へと運ばれ組織に浸透するものと考えられ、マテリアルの粒子径を小さくすればするほど非特異的な組織移行や細胞内への侵入等がおこり、これまで予期しなかった毒性の発現も懸念されている。そこで我々は、生産量、使用量において、最も我々の生活に浸透しているナノマテリアルの一つナノシリカの血管系への影響について検討を行った。

予めフェニレフリンで収縮させたラット血管リング標本に粒子径 70 nm (nSP 70)、粒子径 300 nm（nSP 300)、粒子径 1000 nm（mSP 1000）のナノシリカ 1 μM を加えたところ、nSP 70 添加では約 75%、nSP 300 で約 15%、mSP 1000 で約 10% の弛緩を認めた。さらに、nSP 70 による弛緩の用量依存性について検討したところ、血管リング標本は添加した nSP 70 の用量に依存して弛緩した。しかし、nSP 70 をアミノ基あるいはカルボキシル基で修飾した nSP 70 修飾体はいずれも弛緩を惹起しなかった。次に、この血管弛緩応答へのプロスタグランジン類や一酸化窒素の関与を知る目的で、ジクロフェナクあるいは一酸化窒素合成酵素阻害薬、NG-nitro-L-arginine methylester（L-NAME）を用いて検討を行ったところ、ナノマテリアルによる血管の弛緩は、L-NAME 処置により抑制されたが、ジクロフェナクは血管弛緩に何ら影響を与えなかった。このことから、ナノマテリアルによる血管弛緩には一酸化窒素合成酵素（eNOS）の活性化が関与しているものと考えられた。一酸化窒素合成酵素の活性化には、カルシウム/カルモジュリン系、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ/Akt 系の関与が知られている。そこで、nSP 70 による血管弛緩に Akt 系が関与しているかを知る目的で、Akt 阻害剤ウォルトマニンを用いて検討したところ、nSP 70 による血管弛緩反応は、ウォルトマニン前処置により抑制された。さらに、ウシ大動脈血管内皮細胞を用い nSP 70 が、Akt, eNOS をリン酸化するかを検討したところ、nSP 70 が、Akt, eNOS をリン酸化することが明らかとなった。そして、このリン酸化は、ウォルトマニン前処置により抑制された。

これら結果より、ナノマテリアル nSP 70 による血管弛緩反応には、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ/Akt 系を介した eNOS の活性化が関与しているものと考えられた。

【O-5】

ペプチド性小分子化合物による DNA ポリメラーゼβ分子種選択的阻害作用と抗腫瘍活性

○宮崎杏奈[1,2]、伊藤梨紗[1]、榎本章[1]、津田裕子[1,2]、栗山磯子[3]、吉田弘美[3]、水品善之[2,3]

[1]神戸学院大学薬学部、[2]神戸学院大学ライフサイエンス産学連携研究センター、[3]神戸学院大学栄養学部

[目的]当研究室ではソマトスタチン-14 由来ペプチド（Tyr-D-Trp-Lys）を基盤とした構造活性相関研究を行い、それらが有する強力な抗腫瘍活性および細胞膜透過性について明らかにしてきた。それらの化合物の活性発現はソマトスタチン受容体非介在性のため、不要なソマトスタチン様作用を併発することなく、より効用性に長けた抗ガン剤となる可能性が大きいと言える。その中で、C 末にナフチルアミド基を有する化合物は、HCT116（ヒト大腸ガン）細胞に対して抗腫瘍活性および強力な DNA ポリメラーゼ（pol α, β, λおよびκ）活性阻害作用を示した。pol は、DNA 複製や修復に関与する DNA 合成酵素群であり、その分子種選択的阻害剤は抗炎症剤や抗ガン剤としてだけでなく各分子種の未知の機能解明にも役立つと期待される。その中でも pol βは DNA 修復・組換えに関与する分子種で最小分子量の pol であることから阻害剤探索の格好のターゲットと言える。標的分子を pol βとする抗ガン剤開発研究のうち、ペプチド性化合物に関する報告はない。そこで本研究では、pol β選択的阻害剤の開発を目指し、ナフタレン骨格を有するペプチド性小分子阻害剤の開発およびそれらの活性について評価した。

[結果および考察]今回合成した化合物のうち、Boc-Tyr-Ile(Phe)-naphthylamide は、pol βのみを選択的に強く阻害した。またこれらは HCT116 細胞に対しても非常に有効な抗腫瘍活性を示した。pol βにおける作用部位として知られる疎水性ポケットへの良好な適合性が示唆され、ドッキングシミュレーションを検討中である。さらに、最も強い活性を示した Boc-Tyr-Ile-naphthylamide はアルキル化剤である MMS（メチルメタンスルホン酸）と併用するとその効果が増強したことから、優れた抗ガン剤補助薬としても期待される。

【O-6】

がん中性子捕捉療法用 Gd 含有キトサンナノ粒子製剤（Gd-nanoCP）の開発：表面改質型 Gd-nanoCP の調製とその担がん動物における体内動態評価

○安藤 徹[1]，片山洋輔[1]，藤本卓也[2]，新戸浩幸[3]，深澤智典[3]，福森義信[1]，市川秀喜[1]

[1]神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室　　[3]京都大学 工学研究科 化学工学専攻

[2]兵庫県立がんセンター整形外科

【目的】

がん中性子捕捉療法（Neutron-Capture Therapy；NCT）は，ホウ素（^{10}B）やガドリニウム（^{157}Gd）などの放射線増感剤をあらかじめ選択的に蓄積させた腫瘍細胞・組織に対して熱中性子照射を行い，その結果起こる中性子捕捉反応により生じる放射線の細胞障害作用を利用したがん治療法である．^{157}Gd は増感元素として ^{10}B にはない数々の特徴を有するが，腫瘍への選択的送達手段が見出されていないのが現状である．生体適合性・分解性・粘膜付着性に優れる天然高分子のキトサンと MRI 用造影剤の主成分であるガドペンテト酸（Gd-DTPA）の複合体からなる Gd 含有キトサンナノ粒子（Gd-nanoCP）の開発を進めてきた．Gd-nanoCP は腫瘍内直接投与後の熱中性子照射による NCT 試験において，優れた腫瘍成長抑制効果を示すが，腫瘍組織を完全に死滅せしめるには至らないのが現状である．

本研究では，体循環経路からの Gd 送達による NCT 効果の増強を図ることを目的として，Gd-nanoCP の静脈投与型デバイスへの展開を試みてきている．Gd-nanoCP を静脈投与型のデバイスへと展開するため，レシチンおよび PEG-リン脂質を用いた粒子表面改質による粒子分散安定性，担がん動物投与後の体内動態に関する検討を行ったので報告する．

【方法】

Gd-nanoCP は，エマルション液滴融合法により調製した．別途，所定量秤量したレシチンおよび PEG-リン脂質をクロロホルムに溶解させ，ロータリーエバポレーターで溶媒留去して薄膜を調製した．この薄膜に対して先に調製した Gd-nanoCP 分散液を添加し，超音波を照射することで Gd-nanoCP の表面改質を行った．得られた表面改質粒子（LC-Gd-nanoCP，PEG-LC-Gd-nanoCP）について，粒子径，Zeta 電位，Gd 含量を測定した．*in vitro, in vivo* の評価として，B16F10 メラノーマ培養細胞における評価ならびに B16F10 担がん動物に静脈内投与し，体内動態評価を行った．

【結果・考察】

凝集・沈降しやすい特性を有する Gd-nanoCP をレシチンおよび PEG-リン脂質を用いて表面被覆することで，150 から 200 nm 程度の粒子径を維持しつつ，粒子分散安定性を改善することが可能となった．表面改質前後で Zeta 電位が正電荷から負電荷に転じたことから，レシチンおよび PEG-リン脂質による粒子の表面被覆が示唆された．培養細胞において双方の製剤は細胞の増殖能低下を示さなかった．担がん動物投与後の血中濃度は，LC-Gd-nanoCP が投与 2 時間後で検出不能となったのに対して，PEG-LC-Gd-nanoCP は投与 3 時間後まで血中に滞留することが示された．その腫瘍内の Gd 濃度は投与 12 時間後まで増大し，最大値は 46 μg ^{157}Gd/g wet tissue に達した．これらの結果から，レシチンおよび PEG-リン脂質による Gd-nanoCP の表面被覆は，特に PEG-リン脂質による改質が血中での粒子の安定性を維持する効果を示し，結果として腫瘍部への Gd 送達量の増大に有用であると示された．

【O-7】

動物細胞と粒子の相互作用に関する基礎的研究

○深澤 智典，新戸 浩幸
京都大学工学研究科化学工学専攻

細胞・粒子間親和性の理解は、再生医療、ドラッグデリバリーシステム、バイオリアクターなど幅広い分野で重要である。生体材料に要求される生体親和性は、その材料が使用される目的部位により異なる。例えば、人工骨では、短時間で強い生体親和性を示すことが求められ、人工血管では、抗血栓材料として吸着タンパク及び細胞が親和性を示さないことが求められる。また、免疫系細胞による粒子等の貪食においても、その親和性が重要となるであろう(Fig. 1)。原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope、以下 AFM)は、単一粒子、単一生細胞を対象とした直接測定を可能にし、微視的な情報を与える手法である。本研究では、AFM を用いて細胞・粒子間相互作用力を測定し、粒子の表面物性や培地成分が細胞との親和性に与える影響を検討した。

標的細胞としてマウス由来のマクロファージ細胞株 J774.1(JCRB0018, JCRB, Osaka, Japan)を用いた。ϕ50 mm ガラスベースディッシュに、1–5×10^5 cells/cm^2 で播種し、インキュベーター内（37℃、5% CO_2）で 24 時間培養したものをサンプルとして用いた。AFM 測定直前に培養液（RPMI 1640＋10%胎仔ウシ血清）を取り除き、リン酸緩衝液(D-PBS)で細胞表面を洗浄した後、血清不含の測定用培養液(RPMI 1640)に交換し、AFM 測定を行った。

モデル粒子として粒径 6 μm の COOH 修飾 polystyrene 粒子(Polysciences)を用いた。この粒子を AFM カンチレバーの先端にアラルダイトで接着した。このコロイドプローブと培養細胞を AFM（MFP-3D、Asylum Research）にセットし、細胞–粒子の接着力を室温で測定した(Fig. 2)。細胞と粒子の接触時間を 1 分とした。血清タンパクの影響を調べるため、コロイドプローブを 10%血清含有 RPMI1640 中に約 60 分間浸漬した後、接着力を測定した。

AFM 測定で得られるフォースカーブの一例を Fig. 3 に示す。血清タンパクの有無が接着力に及ぼす影響については当日述べる。

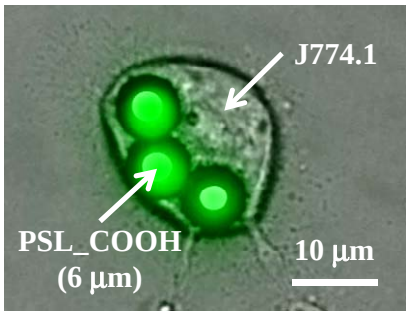


Fig. 1 J774.1 細胞による COOH 修飾 polystyrene 粒子の貪食の様子（血清不含 RPMI 1640 中、粒子曝露後 12 時間経過）

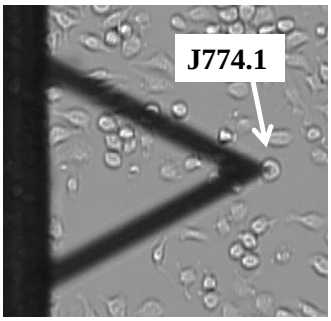


Fig. 2 J774.1 細胞と AFM カンチレバー

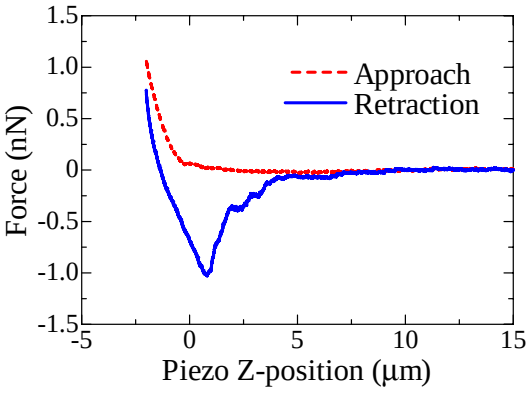


Fig. 3 COOH 修飾 polystyrene 粒子と J774.1 細胞との相互作用力曲線（血清による粒子の前処理後）

【O-8】

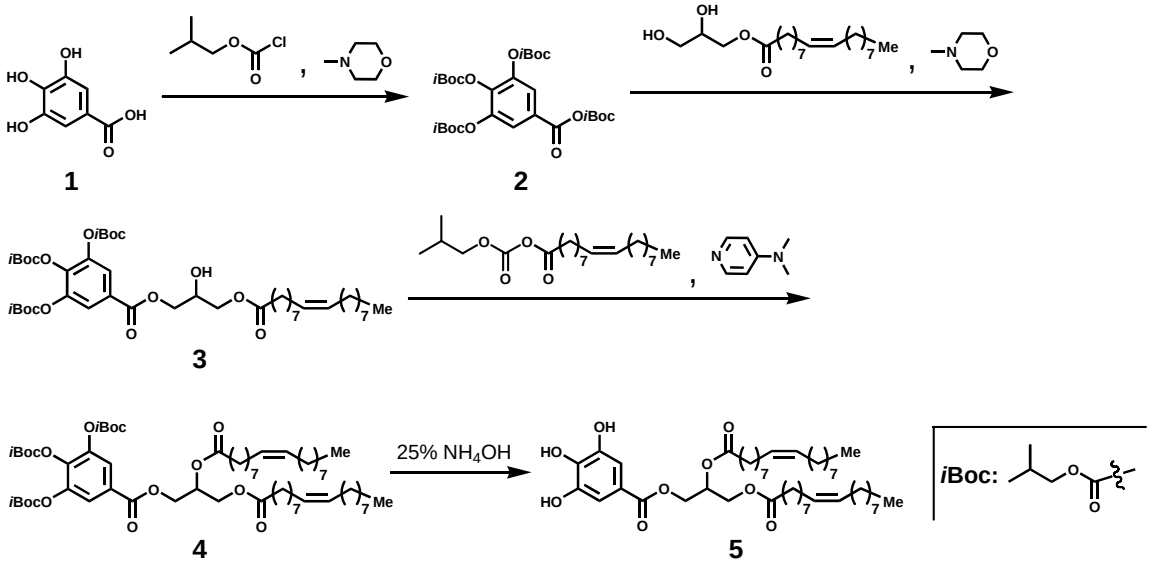
イソブトキシカルボニル基を保護基として用いた フェノール酸グリセロールエステルの合成

○瀧本竜哉[1]，篠原理沙[1]，前田由佳里[1]，戸谷永生[2]，佐々木秀明[1]
[1]神戸学院大学　薬学部　有機薬化学研究室
[2]神戸学院大学　栄養学部　栄養生理学研究室

【緒言】我々は生理活性能が期待される脂肪酸誘導体の合成を行なっており、今回はフェノール酸グリセロールエステルの合成法を検討した。本合成において、出発物質のフェノール酸へイソブトキシカルボニル(*i*Boc)基を導入し、フェノール酸のカルボキシ基のカルボニル炭素の活性化とヒドロキシ基の保護を同時に行なった。これにより、反応の段階数が減少し、また *i*Boc 基は穏和な条件で脱離するので、簡便に目的物が得られた。本講演において、*i*Boc 基がフェノール酸の化学修飾に有用であることを報告する。

【合成】フェノール酸グリセロールエステルの合成経路を Scheme に示す。フェノール酸 **1** とクロロギ酸イソブチル(ICBF)の反応により、フェノール酸のヒドロキシ基の保護とカルボキシ基のカルボニル炭素を活性化した **2** を得た。次いで、α－モノオレインとの反応によりジエステル体 **3** へと誘導した後、さらに、ICBF により無水物としたオレイン酸を用いて、**3** のグリセロール部位の水酸基へオレイン酸を導入しトリエステル体 **4** とした。得られた **4** にアンモニア水を加えると *i*Boc 基の脱離が室温で容易に起こり、目的物であるフェノール酸グリセロールエステル **5** が簡便に得られた。

Scheme　フェノール酸グリセロールエステルの合成



【O-9】

Aqueous Microwave-Assisted Solid-Phase Synthesis Using Amino Acid Nanoparticles : In-Water Synthesis of Difficult Sequence Peptides

Keiko Hojo[1], Asaki Hara[1], Mare Onishi[1], Yoshinobu Fukumori[2] and Hideki Ichikawa[2]

[1]*Laboratory of Medicinal Molecule Chemistry,* [2]*Laboratory of Pharmaceutical Technology*

Solid-phase peptide synthesis (SPPS) is a well-established technique for the facile and rapid preparation of peptides. As the procedure normally requires large quantities of organic solvents, the safe disposal of which is an important environmental issue, the ability to synthesize peptides in an aqueous medium would be preferable. In recent years, we have focused on the development of environmentally friendly, water-based methods for peptide synthesis. Currently, SPPS is commonly performed by the Fmoc strategy. However, Fmoc-amino acids are poorly soluble in water and therefore not suitable for use in water based SPPS. We have developed a technique for SPPS in water, which utilizes Fmoc-amino acids in the form of water-dispersible nanoparticles. This technology uses suspended nanoparticle reactants for the coupling reaction, to overcome the solubility problem and offers many advantages in terms of reaction efficiency.

The use of non-conventional energy sources, *viz.* microwave (MW) irradiation has become a popular choice for organic chemists, because they can lead to shorter reaction times and higher yields. MW assisted SPPS is particularly attractive because of the widespread availability of the new technology, including automated peptide synthesizers equipped with MW capability. In previous work, we have demonstrated MW assisted SPPS in water using Fmoc amino acid nanoparticles and achieved an efficient aqueous based synthesis of 5 and 7 mer oligopeptides.

Difficult sequences peptides are problematic to synthesize using a conventional method due to the aggregation of protected peptide chain on the resin. Peptide backbones, being polar structures, tend to align with the alternating electric field of the MW. MW irradiation is useful in breaking up the aggregation of a peptide chain. To further evaluate this MW assisted in-water synthesis method, we demonstrated the synthesis of ACP (65-74) peptide, Val-Gln-Ala-Ala-Ile-Asp-Tyr-Ile-Asn-Gly-NH_2, which is a well-known difficult sequence.

【O-10】

縮合剤含有型ポリマーを用いたブロック共重合反応に関する検討

○安倍 一実，日置 和人
薬学部　機能分子化学研究室

医療用としても頻用されるシアノアクリレート系接着剤は，微量の水分によりモノマーが活性化され，重合反応が進行することで接合できるが，多湿な環境下ではその効果を十分に発揮できない．これはシアノアクリレート系に限ったことではなく，水中で効果的に機能する接着剤は極僅かである．一方，水中でも脱水縮合反応を進行させる DMT-MM の反応性を利用し，予め調製したブロックポリマーをアミド結合により共重合させることができれば，新たな接着剤としての利用が可能と考えられる．そこで，縮合剤の活性点を鎖上に導入したポリマーに関する以下の検討を行った．

1.ポリマー型縮合剤としての検討

我々は既に縮合剤含有型ポリマーである Poly-Trz や ROMP-Trz-Cl を報告しているが，これらは有機溶媒中では高い反応性を示すものの，水中での反応性は乏しく，医療用接着剤として応用するには改良が必須となる．水中での反応性が低い原因として，ポリマー鎖の疎水性や架橋による柔軟性の低下が考えられる．そこで，主鎖に水と任意に混じり合う THF の繰り返し構造を持った新たなポリマー縮合剤 ROMP-bisTrz-Cl を設計し，架橋剤についても検討を加えた．その結果，従前に比べ，水中の膨潤率が 0%から 270%；アミド収率が 14%から 91%へと改善できた．

2.ブロック共重合を目指した検討

上述の ROMP ポリマーの改良を基に，縮合活性を示すクロロトリアジニル基だけでなくカルボキシル基とアミノ基をグループ分けして導入した２種の直鎖ポリマーを合成し，それらを混ぜることでポリマー間にアミド結合を形成させることを目指した．はじめにカルボキシル基の導入量から検討したところ，ポリマー鎖を有意に架橋させるためにはモノマー総量に対して 20 mol%以上が必要であった．次に，カルボキシル基 20%，クロロトリアジニル基 30%を含むポリマーA，およびアミノ基 20%を含むポリマーB を合成し，両者を混ぜ合わせたところへ N-メチルモルホリンを加えた．THF:水=85:15 の条件下では反応後１時間で沈殿が析出し，ポリマー間に架橋が形成されることが確認できた．

以上の検討の詳細および最新の経過について報告する．

【O-11】

私学事業団学術研究振興資金による研究成果報告（総括）

エビデンスに基づく緩和ケアの普及・推進に向けた基礎的研究

○ 徳山尚吾
神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室

高齢化社会を迎え、何らかの痛みを有する患者は増加の一途にあり、ある種の痛みに対して既存の鎮痛薬は、抵抗性を示す場合が見受けられる。そこで本研究プロジェクトでは、難治性疼痛の病態解析を多角的に行い、その発症機序を明らかにするとともに、それに基づく新規治療薬の開発を目的とした。ここでは本年度の研究成果について総括する。

① 脳卒中誘発疼痛動物モデルの確立とその発症機序に関する研究

脳卒中の合併症の 1 つである脳卒中誘発疼痛の発症機序の解明や新規治療法の開発が望まれている。本研究では、脳卒中病態を模倣する全脳虚血による痛覚過敏の発現に焦点をあて、脳卒中誘発疼痛を評価するための動物モデルとしての有用性とその発症機序について検討した。動物モデルは、マウスを用いて、30 分間の両側総頸動脈閉塞（BCAO）による全脳虚血処置を施すことで作製した。BCAO 処置 3 日後において、一次求心性線維の C 線維および Aβ 線維において知覚閾値の低下が認められ、機械的および熱的刺激に対する痛覚閾値も低下した。以上の結果から、BCAO を用いた本法は、脳卒中誘発疼痛を評価できる有用なモデルになる可能性が示された（Tamiya et al., J Pharma Pharmacol, 2013）。

② 長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した疼痛制御機構の解明に関する研究

ドコサヘキサエン酸（DHA）の抗侵害作用の発現機序として、脳内長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介したβ-エンドルフィンの遊離が重要な役割を果たしていることを報告してきた。本研究では、慢性疼痛時における GPR40 の関与について検討を加えた。その結果、脳内 GPR40 は疼痛制御に関与する神経細胞上に発現し、慢性疼痛時には、アストロサイトによって、その発現が調節されることを明らかにし、GPR40 を介したシグナルが、疼痛制御に寄与する新たな機構となる可能性が示された（Nakamoto et al., British Journal of Pharmacology, submitted）。

③ 抗がん剤エトポシドによる腸管 P-gp の変動とモルヒネの鎮痛作用に関する研究

P-糖タンパク質（P-gp）の基質となる抗がん剤エトポシド（ETP）の反復経口投与によって、腸管 P-gp の発現量および薬物排出活性が増加することで、経口投与したモルヒネの血中濃度および脳内含量が低下し、その鎮痛効果が減弱することを報告してきた。本研究では、ETP の反復経口投与による腸管 P-gp の機能変動機序における低分子量 G タンパク質の RhoA ならびに P-gp の足場タンパク質である ezrin/radixin/moesin（ERM）の関与について検討した。その結果、ETP による腸管における RhoA を介した ERM の活性化が、P-gp のタンパク質発現量の増加および薬物排出活性の亢進作用を引き起こすことが示唆された（Kobori et al., J Pharm Sci, 2013, Eur J Pharm Sci, 2012）。

【O-12】

薬物キャリヤーとしての血中滞留性ビタミンEエマルジョンの開発

○貞森美知子、伊丹寛人、岸本修一、鈴木亮佑、福島昭二
神戸学院大学　薬学部　臨床薬剤学研究室

【目的】

近年、脂溶性薬物のキャリアーとしてリポソームや Lipid Emulsion が開発されている。これらは薬物を封入した状態で血液中を滞留することで、EPR 効果が期待される。リポソーム製剤では PEG 化リン脂質で表面修飾された製剤が開発されているが、Lipid Emulsion では血中滞留性に優れた製剤は開発されていない。そこで我々は、α-トコフェロール酢酸エステル（VEA）を油相とした Emulsion を作製し、その安定性を評価するとともに、PEG 化リン脂質を付加させた場合の Emulsion の血中滞留性を評価した。

【方法】

注射用水にグリセリンと水添大豆レシチン（NC-61）を添加し、80℃に加温後、分散させた。その分散液をデュアルフィード型に組んだ高圧乳化機（DeBee2000, Nano3000）または小型高圧乳化機（BERYU mini）で循環させ、油相を添加しながら乳化した（乳化必要量は 10 数 mL）。PEG 化リン脂質は Emulsion 調製時に外水相へ添加、あるいは Emulsion 調製後に外水相へ添加した。9 週齢の Wistar 系雄性ラットの下肢静脈に Emulsion あるいは PEG 化 Emulsion を投与し、経時的に尾静脈から採血後、HPLC により血中滞留性を評価した。

【結果・考察】

粒子径の経時的測定で、VEA Emulsion および PEG 化 VEA Emulsion は長期間安定であった。また、検討に用いたいずれの PEG 化リン脂質でも、コントロールと比較し血中濃度の上昇と、半減期の顕著な延長が認められ、血中滞留性が著明に向上した。また、大豆油を油相に用いた Emulsion と比較すると、VEA Emulsion では顕著な血中滞留性の向上がみられた。PEG 化 VEA Emulsion は、脂溶性薬物を封入しうるキャリアーとして有用であることが示唆された。

【O-13】

ホウレン草糖脂質 MGDG 内包ナノ粒子（リポソーム製剤）の作製と抗腫瘍活性

Antitumor activity of the nanoparticles (liposomes) containing a glycolipid, MGDG, from spinach

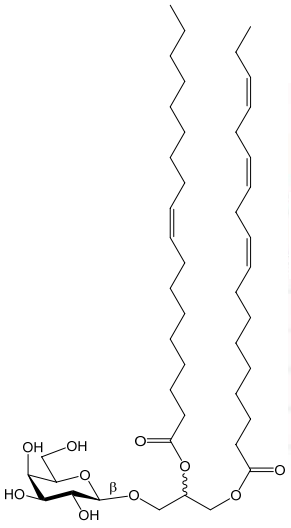
○水品　善之，栗山　磯子，吉田　弘美
神戸学院大学　栄養学部　食・健康学部門

【目的】 食品成分の新規な健康機能性を探索することを目的として、哺乳類の DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ, pol）阻害活性を調査した。そして、ホウレン草の糖脂質 MGDG（monogalactosyl diacylglycerol）【図1】が DNA 複製型の pol 分子種を選択的に阻害して、がん細胞増殖抑制活性や担がんヌードマウスに対する抗腫瘍活性を示すことを見出した[1, 2]。ホウレン草から精製した MGDG のナノ粒子（リポソーム製剤）を作製して、抗腫瘍活性が増強されるか調べた。

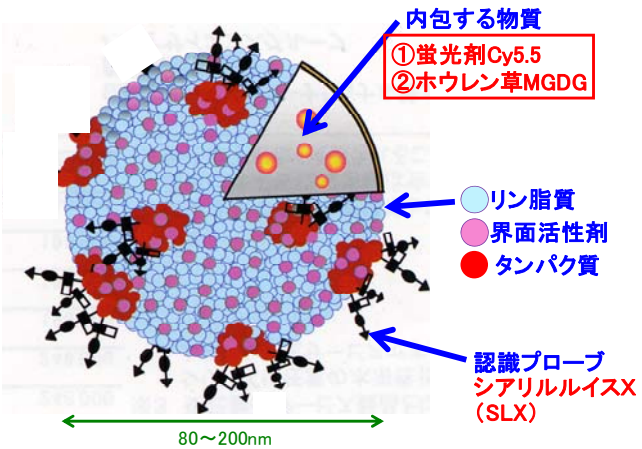
【方法】 ホウレン草から糖脂質 MGDG の精製は、乾燥ホウレン草をエタノールで抽出した後、疎水カラムクロマトグラフィーを用いて糖脂質画分を分画し [1]、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけて MGDG を精製した [2]。リポソーム製剤化は、薄膜法と水浴式超音波法を組み合わせる方法で作製した。リポソームの表面には、Sialyl Lewis X（SLX：がん・炎症系の細胞を特異的に認識する糖鎖）を結合させた【図2】。抗腫瘍活性は、ヌードマウス（Balbn/c, nu/nu）へヒト大腸がん細胞（HT-29 cells）を移植して、リポソーム化 MGDG の静脈注射による腫瘍体積変化を測定した。

【結果・考察】 PBS に懸濁したホウレン草 MGDG（0, 0.4, 2 mg/mL）を内包した SLX 結合リポソーム製剤は、粒子径が 222～285 nm であった。蛍光剤 Cy5.5 を内包した本リポソーム製剤を担がんヌードマウスへ投与すると、リポソーム製剤が 48 時間後に腫瘍部位へ完全に集積し 96 時間以上維持されることを確認した [3]。ホウレン草 MGDG を内包した本リポソーム製剤は、MGDG 単体やリポソームの基材よりも強い抗腫瘍活性を示した [3]。抗腫瘍活性においては、マウスの体重減少や臓器の形態異常などの副作用は見られなかった。ホウレン草 MGDG のような pol 阻害活性を有する食品由来成分のナノ粒子（リポソーム製剤）化による FDS（Food Delivery System：食品送達システム）の有用性が期待できる。

[1]特許第 4744297 号，特許権者：水品善之，発明者：水品他（2011.5.20 登録）
[2] N. Maeda, Y. Mizushina *et al.* (2007) *Curr. Med. Chem*, 14, 955-967.
[3] Y. Mizushina *et al.* (2012) *Oncol. Rep.*, 28, 821-828.



【図１】ホウレン草 MGDG



【図２】リポソーム製剤の構造

【P-1】

微粒子投与マウスの in vivo イメージング

○福水寛史，田井芳香，半田真紀，榎本理世，李　英培

神戸学院大学薬学部薬理学研究室

ナノ粒子は、粒子表面の活性化や表面積の増大などの特徴を有し、医療分野での応用が注目されている。しかしながら、微粒子の体内動態、生体への影響、および安全性に関する基礎的情報は極めて乏しい。今回、ナノ粒子を含めた微粒子の体内挙動を探る一環として、マウスに投与した微粒子の体内挙動を観察した。

微粒子は、20 nm 量子ドット（Qdots、705 ITK carboxy quantum dots）および 1,000 nm のシリカ粒子（sicastar-F DY676、surface COOH）を用いた。また、食餌由来の自家蛍光軽減のため、近赤外領域に蛍光を示すクロロフィルを除いた飼料 D10001 を 1 週間以上与えたマウスを実験に使用した。微粒子をマウス尾静脈に投与し、動物を非侵襲的に in vivo イメージングできる IVIS LuminaXR を用い、経時的に in vivo で蛍光観察した。

Qdots は投与直後全身に分布し、リンパ節にも蛍光がみられた。特に上腹部への集積がすみやかにみられ、投与後 10 分で蛍光強度がピークに達した。その後、時間の経過にしたがって徐々に蛍光強度が減少した。一方、シリカ粒子も Qdots と同様に投与後 10 分以降に上腹部への蛍光が観察されたが、その蛍光強度は 48 時間まで持続していた。また、いずれの粒子ともに一部は尿中への排泄が観察された。また、微粒子投与後 48 時間に各臓器を摘出し、それぞれの臓器の蛍光強度を比較したところ Qdots およびシリカ粒子は、主に肝おいて強い蛍光が観察された。肝における微粒子の蓄積がどの程度持続するかを知るため、微粒子投与後 14 日間追跡したところ、持続的に上腹部に蛍光がみられ、ex vivo によっても、肝臓に粒子が存在していることが示された。摘出した肝から肝細胞を調製し、得られた肝細胞をレーザー顕微鏡で観察した。その結果、微粒子を取り込んだ比較的小型の細胞がみられたが、肝実質細胞への取り込みはほとんど認められなかった。今後は、肝臓のどの細胞に微粒子の局在するのか等についてさらに検討する予定である。

【P-2】

微少量流動層コーティング装置による微粒子への薬物レイヤリング技術の開発

○守谷路子，武田理沙，市川秀喜，福森義信
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】 当研究室では，ナノ構造制御された微粒子コーティング製剤の製造技術の開発について検討を進めている. その中核はドラフトチューブ付き噴流層を用いた湿式スプレーコーティング技術であるが，本技術を，例えば，少量多品種製造を要する医療用のテーラーメイド製剤などへ展開する場合，設備のスケールダウン検討が必須となる．微少量流動層（MFB）は，数 g レベルの微少量での造粒・コーティングを可能にする装置として近年開発され，小規模なため，クリーンベンチやアイソレーター内での無菌環境における調製が可能と目されている．また，少仕込量で操作が可能なため，テーラーメイド医薬品やプレフォーミュレーション研究などの小規模な製剤調製に大いに役立つと期待されている. しかしながら，MFB の 100 μm 以下の微粒子に対するプロセッシング性能は未明であり，そのため当研究室では微粒子コーティング製剤の小規模微量調製技術を確立するための基礎的検討を重ねてきた. 本研究では, その一環として, 微小核粒子への薬物の被覆造粒（レイヤリング）について, 水溶解度の異なる 2 種の薬物を用いたモデル系で処方･操作条件の検討を行った.
【方法】 核粒子として，63-75 μm に分級した重質炭酸カルシウムを使用した．モデル薬物としてカルバゾクロムスルホン酸ナトリウム（CCSS，水に対する溶解度 44 g/L）およびアセトアミノフェン（APAP，水に対する溶解度 14 g/L，遊星ボールミルで粉砕してナノサスペンション化したものを使用）を選択し，これらを所定量含むヒドロキシプロピルセルロース（HPC-SSL，日本曹達）水溶液を噴霧液として調製した．MFB（不二パウダル）に核粒子 5 g を仕込み, 所定の操作条件にて上記の噴霧液をスプレーしてレイヤリングを施した.
【結果･考察】 これまでに CCSS を用いて標準 1 kg 仕込み量のコーティング装置（GM140, 不二パウダル）による炭酸カルシウム核粒子へのレイヤリング操作を検討してきた経緯から, 同処方での MFB による操作を比較検討した．その結果，GM140 および MFB における薬物レイヤリング収率は各々 71.4%，88.4% であり, 同等以上のレベルであった. ただし, GM140 に比べて MFB では 63 μm 以下の割れ欠けのある粒子の生成がやや多く認められ，これは装置層高（スプレーガンから天板までの距離）が短いがゆえの上向きに加速された粒子の天板への高速衝突が原因と推察される．一方，APAP を用いた系では，APAP 原末を用いてスプレー液を調製すると，スプレー送液流路に詰まりが生じてスプレー不能となったが，APAP をナノサスペンション化して均質化したスプレー液とすれば MFB での操作が可能となった. また，CCSS と同じ処方系では過度の凝集が起こることが判明し，これは HPC の減量により改善されたが，レイヤリング収率もやや低値（65.1%）となった．このように，MFB による薬物レイヤリングでは，薬物の水溶解性が製品特性に影響しやすいことが分かり，特に低水溶性の薬物に対して，今後，さらに最適な処方・操作条件の探索を続けたい.

【P-3】

がん中性子捕捉療法用 Gd 含有キトサンナノ粒子製剤（Gd-nanoCP）の開発：Gd-nanoCP の腫瘍内直接投与後の腫瘍内挙動の評価

○有田裕也[1]，三谷真也[1]，山下千明[1]，安藤　徹[1]，藤本卓也[2]，新戸浩幸[3]，
深澤智典[3]，藤井文彦[4]，福森義信[1]，市川秀喜[1]

[1]神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
[2]兵庫県立がんセンター 整形外科
[3]京都大学 工学研究科 化学工学専攻
[4]JT 生命誌研究館

【目的】中性子捕捉療法（NCT）は放射線増感剤（^{10}B，^{157}Gd）を蓄積させた腫瘍細胞・組織に対して熱中性子照射を行い, その結果起こる中性子捕捉反応により生じる放射線の細胞障害作用を利用したがん治療法である．現在，Gd を用いた NCT では，腫瘍選択性，滞留性を示す Gd キャリアが見出されていないため，いまだ臨床適応されていない．こうした背景から，当研究室では，Gd キャリアの一つとして，粘膜付着性に優れる高分子のキトサンと MRI 造影剤の主成分であるガドペンテト酸（Gd-DTPA）からなる Gd 含有キトサンナノ粒子（Gd-nanoCPs）の開発を進めてきた．これまでの検討で，Gd-nanoCPs の腫瘍内直接投与後の熱中性子照射試験においては高い腫瘍増殖抑制効果が得られた．しかし，完治例は見られず, Gd の腫瘍内分布の不均一性がその原因の一つであると考えられた. そこで本研究では, Gd-nanoCPs の腫瘍内直接投与後における腫瘍組織内の Gd およびナノ粒子の分布状態を評価するために，①腫瘍組織の分割による各区画の Gd 分布評価，②量子ドット（QD）封入型 Gd-nanoCPs の調製の 2 項目について基礎検討を行った.

【方法】Gd-nanoCPs はキトサン/Gd-DTPA 水溶液を用い，エマルション液滴融合法により調製した. ①B16F10 メラノーマ担がんマウスの腫瘍部 2 カ所へ Gd-nanoCPs 分散液を直接投与 5 分後, 24 時間後に腫瘍組織を摘出・分割し，18 区画の Gd 濃度を ICP-AES 法で測定した. ②QD 封入 Gd-nanoCPs（QD-Gd-nanoCPs）は, キトサン/Gd-DTPA 溶液に QD（Qdot®5451TK™, invtrogen，Cd/Se ナノ結晶の表面にカルボン酸を有する）を加え，同様に調製した.

【結果・考察】Gd-nanoCPs と QD-Gd-nanoCPs の粒子径は各々176 nm，172 nm，ゼータ電位は 23.6 mV，20.0 mV，Gd 含量は 24.0%，18.4%であった．①投与 5 分後に分割採取した腫瘍組織には Gd の偏在が見られた．特に投与した付近の区画で Gd が高濃度で検出され，この Gd の偏在は投与 24 時間後においても同様に観察された．これらのことから 2 点注入では投与部位からの Gd-nanoCPs の広範な拡散には限界があることが示唆され, Gd の腫瘍内分布の均一化には多点注入等の手技的工夫が必要と考えられる. ②QD-Gd-nanoCPs の粒子径，ゼータ電位は QD 封入前と比べて有意差はなかった．それに対して Gd 含量は統計的に有意な低下が見られた．これは Gd-DTPA のカルボン酸とキトサンのアミノ基間の相互作用に対して，カルボン酸を持つ QD が競合し，Gd 含量が相対的に低下したためと考えられる．QD-Gd-nanoCPs は，蛍光顕微鏡下で粒子全体に一様な蛍光を発することが確認され，組織内での粒子のトレースを可能にしうるものと考えられる．今後，本 QD-Gd-nanoCPs を用いて，光イメージングによってさらに詳細な腫瘍内分布の情報を得るべく，検討を進めたい.

【P-4】

タンパク質デリバリーのための生分解性徐放型微粒子製剤の開発：キトサンナノ粒子を被覆した多孔性微粒子からの薬物放出特性の検討

○馬場隆文，井上愛理，市川秀喜，福森義信
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】

当研究室では，キトサンナノ粒子（CNPs）からなる水系分散タイプの生分解型徐放性コーティング剤ならびにこれを用いたタンパク性医薬品の皮下埋込型徐放性微粒子製剤の開発を進めている. これまでの研究において, ナノ細孔を有するヒドロキシアパタイト（HAp）多孔質粒子を核粒子として用いて，細孔内にモデルタンパク薬物を吸着させた後に，少量のCNPsのスプレーコーティングによってその核粒子細孔を閉塞した構造を持つ微粒子製剤（CNPs-HAp-MPs）の調製と薬物放出制御を試みてきた．本CNPs-HAp-MPsは，内包するモデルタンパクを１週間にわたり徐放化できることを既に報告した．本研究では，さらに長期（２週間）における *in vitro* 放出挙動を評価することに加えて，ラット皮下への埋め込み時における *in vivo* での放出挙動に関する評価を行った.

【方法】

モデルタンパクとして，牛血清アルブミン（BSA）またはトレーサーとして蛍光標識型BSA（FITC-BSA）を選択した．HAp 粒子を BSA（または FITC-BSA を 10 wt% 相当含む）水溶液と 24 時間インキュベートした後，精製水による洗浄と減圧乾燥を行って，BSA 封入 HAp 粒子を得た．脱アセチル化度 98% 以上のキトサンを用いて水系中和析出法により調製した CNPs（平均粒子径 304 nm）を用いて，ワースター型コーターにより 5 wt% 量までスプレーコーティング後，篩い分けにより CNPs-HAp-MPs を回収した．BSA の放出試験はパドル法によりリン酸緩衝液（PBS，pH 7.4）中で行い，FITC-BSA 濃度は蛍光光度計で測定した．生体内における放出特性は，CNPs-HAp-MPs の水性分散液を 8 週齢の Wistar 系雄性ラットに皮下投与し，所定期間後に皮下から回収した CNPs-HAp-MPs 中の FITC-BSA 残存量を蛍光光度計で定量することによって評価した.

【結果・考察】

HAp への BSA 吸着率は BSA 単独で 11.0 wt%, BSA と FITC-BSA の混合系では各々10.1 wt%, 1.1 wt% （計 11.2 wt%）となった．CNPs-HAp-MPs の放出試験の結果，BSA の放出には若干の初期バーストが見られたが，その後ほぼ一定速度で放出され，14 日後における FITC-BSA の放出率は 48% となった．一方，ラット皮下投与から 1，3，7，14 日後における FITC-BSA の放出率はそれぞれ 57 ± 4.8%，68 ± 3.8%，72 ± 4.4%，91 ± 3.8% となり，全般的に *in vitro* に比べて放出速度の増大が認められた．これは，*in vitro* 放出試験で使用した PBS と体液の組成の相違に起因する FITC-BSA の拡散特性の変化や *in vivo* でのキトサンの生分解性に起因する放出速度の増大などが関係しているものと推察される．今後，低脱アセチル化度のキトサンの適用等により *in vivo* で生じた初期バーストの抑制について検討を進めたい.

【P-5】

難水溶性薬物の製剤化研究
-薬物のナノ粒子化と腸溶性基材を利用した腸散性微粒子製剤の開発-

○大谷知奈美, 鳥居絢子, 市川秀喜, 福森義信
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】薬物の溶解性は，生体内への吸収性に影響を及ぼす重要な物性である．難水溶性薬物の経口投与では，消化管液への溶解過程が吸収の律速過程になることから，結果として薬物のバイオアベイラビリティの低下をもたらす. 比表面積の増大による薬物の溶解速度の増加を期待して，湿式混合粉砕等による薬物結晶のナノ粒子化が試みられているが，得られるナノサスペンジョン（NS）は液状製剤であり，分散安定性や服薬利便性などに注意を払う必要がある．こうした NS の固形微粒子製剤化法として，当研究室では Nanosuspension Spray Coating System（NSCS）を考案した．本法に基づく製剤化では，モデル難水溶性薬物の水中での溶出は速やかであり，*in vivo* における薬物吸収性も改善された．しかし，十二指腸への直接投与に比べ, 経口投与での薬物吸収性の改善はそれほど顕著なものとはならなかった. この原因のひとつとして, 製剤から再分散した薬物ナノ結晶粒子の胃内での凝集が考えられた．そこで本研究では，胃内での凝集を抑制し，小腸近傍への到達後に製剤から薬物ナノ結晶粒子を再分散させるため, 腸溶性基材である Eudragit L30D-55®を用いて“腸散性”微粒子製剤（Enteric-Dispersible Microparticles, EDMPs）の処方設計を行い，特性評価を行った.
【方法】モデル薬物のグリベンクラミド（水に対する溶解 3 μg/mL）に，所定比の大豆レシチン，ポリビニルピロリドン，蒸留水を加え，遊星ボールミルで湿式混合粉砕することで NS 調製を行った．得られた NS と Eudragit L30D-55®（EL，Evonik）をスターラーで混合し，スプレー液とした. この混合液をドラフトチューブ付噴流層コーティング装置によって核粒子である乳糖粒子（75-106 μm）表面に被覆した．得られた EDMPs の特性評価は，別途，EL を混合せずに NS を単独噴霧した微粒子製剤（NS-MPs）と比較することで行った.
【結果・考察】調製した NS の平均粒子径は 160-180 nm の範囲内であり，EL 添加後もほぼ同程度であったため, EL 添加による NS の分散安定性は維持されることが分かった. NS-MPs と EDMPs の粒子径分布はいずれもシャープで, 目立った凝集物の生成は観察されなかった. EDMPs は，分布曲線が長粒子径側にシフトしたが，これはスプレー液量の増加による核粒子に対する被覆層厚が増大したためと考えられる．局方第 1 液，第 2 液における再分散性試験の結果，NS-MPs は，両液中とも再分散性は示さなかった．これに対し，EDMPs は，第 2 液中のみにおいて速やかな再分散性を示し, 再分散液中の NS の粒子径は 279 nm となった. これは EL に含まれている界面活性剤の再分散促進作用や，薬物被覆層において EL 粒子が薬物ナノ粒子間に存在することによる薬物ナノ粒子同士の接触の抑制が, EDMPs からの NS の良好な再分散性をもたらしたものと推察される．以上のように，EDMPs 化は薬物ナノ結晶の腸散性を可能にしたことから，今後は，EDMPs からの薬物の溶出挙動について評価を行い，さらには小動物における経口投与後の薬物吸収性評価の検討を進めたい.

【P-6】

ホウ素中性子捕捉療法用 L-BPA ナノサスペンションの投与法が及ぼす体内動態への影響

○多治川 哲平[1], 安藤 徹[1], 大倉久敬[1], 藤本卓也[2], 福森義信[1], 市川秀喜[1]
[1]神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
[2]兵庫県立がんセンター

【目的】

ホウ素中性子捕捉療法（Boron Neutron Capture Therapy，BNCT）は，^{10}B による熱中性子捕捉反応の結果生ずるα線により腫瘍を殺傷させるがん治療法である．BNCT では腫瘍内の ^{10}B 濃度が治療効果発現の重要因子であり，^{10}B の場合，20 μg/g wet tissue（ppm）以上が必要とされ，腫瘍へ ^{10}B をより効率的に高濃度で送達可能な製剤が望まれている．我々の研究室では,^{10}B 化合物として臨床で使用されている *p*-borono-L-phenylalanine（L-BPA）を選択し，そのナノサスペンション（NS）製剤化を試みてきた．この製剤は，L-BPA がアミノ酸類似体であることから有する腫瘍選択的な蓄積性に加えて，その NS 化により腫瘍内に蓄積し，長時間の滞留を意図したものである．これまでに界面活性剤である Solutol® HS 15（SO）と Soybean lecithin（SL）を用いて湿式混合粉砕を行った場合，L-BPA の微細化を認めている．本研究では，担がん動物への静脈投与ならびに腫瘍内直接投与による BPA-NS 体内動態の影響を調査した．

【方法】

BPA-NS の調製には，遊星ボールミルを用いた．調製した BPA-NS の粒子径分布は動的光散乱式粒径分布測定装置（LB-500）によって室温で測定し，BPA-NS 中の L-BPA 濃度は誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）で測定した．B16F10 細胞をマウスの右臀部に皮下移殖して作成した担がんモデル，および成長腫瘍の中心部から内容物を機械的に抜き取って疑似的にのう胞形成した担がん（のう胞）モデルを作成した．濃度既知の BPA-NS ならびに BPA-Fr（BPA のフルクトース錯体水溶液）をそれぞれ担がんモデルマウスの静脈またはのう胞モデルマウスの腫瘍内へ直接投与した．投与した所定時間後にマウスから採血し，さらに各臓器を摘出した．各サンプル中の ^{10}B 濃度を ICP-AES により測定した．

【結果・考察】

BPA-NS の平均粒子径は 183 nm であった．担がんモデルへの BPA-NS 静脈投与後の各臓器における ^{10}B 濃度プロファイルは，臨床使用されている BPA-Fr とほぼ同様の傾向を示し，投与 3 時間後には 19 ppm であった．それに対して，のう胞モデルへの BPA-NS 腫瘍内直接投与後の動態は BPA-Fr と大きく異なり，BPA-Fr より長時間，高度に腫瘍内で滞留し，投与 3 時間後において 257 ppm と高い値を示した．これは腫瘍組織内での固体粒子としての動態特性が反映したものと考えられる．この結果は，腫瘍内直接投与の適用対象となる固形がんに対して BPA-NS を用いた BNCT が新たな治療オプションと成り得る可能性を示唆した．

【P-7】

ペプチド性薬物の経口送達用 Core-Shell 型ナノゲル粒子の小腸粘膜付着性評価

○三宅弘峰，荒井真琴，福森義信，市川秀喜
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】 消化管吸収性の低いペプチド性薬物の経口剤開発には，薬物吸収の主なバリアとなる“酵素分解”と“消化管膜透過性”という 2 つの問題をクリアすることが求められる．微粒子キャリアーを利用する経口ペプチド送達法として, 当研究室では core-shell nanogel particles（CSNPs）を開発した．CSNPs は core が温度応答性 poly(*N*-isopropyl acrylamide)（32°C 以上で収縮），shell が pH 応答性 poly(Methacrylic acid- *g*-Ethylene glycol)（酸性 pH で収縮，中性 pH で膨潤）からなるナノハイドロゲル粒子である．CSNPs へのペプチド性薬物の封入によって，酸性条件下 shell 層が収縮することで胃内での薬物分解の回避が，また小腸では，膨潤した shell 層の粘膜付着作用，細胞間隙開口作用により薬物の消化管透過性の改善が期待できる．また，その粒子径がサブミクロンレベルであるがゆえに，比表面積の増大や小腸粘膜の深部への浸入をもたらし，小腸粘膜付着性の改善が期待できる．これまでの検討において，CSNPs は Caco-2 細胞に対して低毒性で細胞間隙開口作用を持つこと，*in vitro* 環境下において pH 依存性の消化管粘膜付着性を示すことを明らかにしてきた．本研究では，*in vivo* に近い環境下における CSNPs の粘膜付着性評価を目的とし，検討を行なった．

【方法】 CSNPs は紫外光を用いた水系分散重合法を用いて調製した．従前の検討で高い薬物含有量と所望の薬物放出挙動を示した N55/10（core：shell 重量比=55:10），N-MP8/2（core に shell 成分を一部含む処方）の各々にトレーサーとしてごく少量の蛍光アクリルモノマーを組み込んだ 2 処方を調製した．その後，37°C における局方Ⅰ液，Ⅱ液での粒子径測定を行い，膨潤収縮挙動を評価した．調製した蛍光標識化 CSNPs のうち，膨潤収縮挙動の温度・pH 応答性を比較的維持した粒子を用いて *in situ* ループ法によるラット小腸上部における粘膜付着性評価を行った．

【結果・考察】 CSNPs の調製時に蛍光モノマーを共重合した場合においても，サブミクロンサイズの粒子が得られた．N55/10 粒子の shell 部分に蛍光モノマーを加えたものは温度応答性を，core 部分に蛍光モノマーを加えた N-MP8/2 粒子は温度・pH 応答性を示した．粘膜付着性評価の結果， N55/10 粒子に比べて，N-MP8/2 粒子の方が高い付着性を有することが示された．N55/10 粒子は pH 応答性を示さなかったため，shell 層が十分に膨潤せずに付着性が低下したのに対して，N-MP8/2 粒子は N55/10 粒子と比べて多くの shell 成分を含んでおり，shell 層の膨潤能が維持されたことでより高い付着性が得られたものと推察される．今回，*in situ* での粘膜付着性が示唆されたことから，今後は，モデルペプチド医薬品を封入した CSNPs を調製し，その経口投与による *in vivo* でのペプチド性薬物の吸収動態の評価を進めたい．

【P-8】

ガラス製アンプルカットにおけるサブミクロンサイズの不溶性微粒子の発生とコンタミネーションに関する基礎的評価

○中西清和[1]，町田　遥[1]，新戸浩幸[2]，深澤智典[2]，佐野紀彰[2]，福森義信[1]，市川秀喜[1]
[1]神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室　　[2]京都大学大学院 工学研究科 化学工学専攻

【目的】　ガラス製アンプルのカットにより発生するガラス様不溶性微粒子の危険性は，かねてから指摘されてきた．薬液へ混入した微細なガラス様不溶性微粒子は，薬物と共に患者の体内に入り，肺・脳・腎臓・肝臓・脾臓といった様々な器官に障害を起こす可能性がある．5 μm 以上の不溶性微粒子については，細動脈や毛細血管を閉塞する可能性があると指摘されている．臨床現場では，この不溶性微粒子による組織障害のリスクを回避するため，5 μm フィルターによる不溶性微粒子の除去が実施されている．しかし，5 μm 未満の不溶性微粒子の危険性は明らかにされておらず，5 μm フィルターでは不十分との指摘もある．発生するガラス様不溶性微粒子がサブミクロンサイズならば，毛細血管内を移動することも可能であり，血管肉芽種・動脈塞栓・肺小結節化・静脈炎・肺の間質性変化などの有害事象を惹起することにもつながりうる．そのため，本研究では，5 μm 未満，特にサブミクロンサイズのガラス様不溶性微粒子が，アンプルカットによって発生しうるかを調査した．また，発生した微粒子の定性評価と，粒子の形態観察および生成数についても調査した．

【方法】　注射用水入りガラス製アンプル（5 mL 容量）の枝部をグローブ着用のもとでクリーンベンチ内にてカットした．アンプル内液を倒立型光学顕微鏡で観察し，微粒子が検出された場合は走査型電子顕微鏡-エネルギー分散型X線分析装置（SEM-EDS）による形態観察と定性分析を実施した．アンプル内の粒子数は，アンプル内液およびアンプル内を洗い込んだグリセリン溶液について，0.8 μm，0.45 μm，0.2 μm のメンブランフィルターを用いた吸引濾過法により微粒子を順次分級し，倒立型光学顕微鏡を用いて各フィルター上の微粒子数を計測した．また，6 名のアンプルカット経験者にアンプルカットを実施してもらい，個人の手技がアンプルカットによって発生する微粒子数に影響するか評価した．

【結果･考察】　アンプルカット後の内液に鋭利な形状のサブミクロンサイズの微粒子が観察され，当該粒子の SEM-EDS による定性分析によりガラスに特有な Si のピークが検出されたことから，アンプルに由来するものと推定した．一例として，1 名の実験者による 5 本のアンプルカットを 1 セットとして，3 セット実施時に検出された平均の生成微粒子数は，>0.8 μm：57 ± 7 個，0.45-0.8 μm：83 ± 18 個，0.2-0.45 μm：16 ± 4 個であった．また，6 名の実験者による評価においても，全例でサブミクロンサイズの微粒子の発生を認めたが，その粒子径分布には違いが見られた．実験者の手技を観察したところ，それぞれに癖があり，個々人の筋力差やアンプルをカットする速度の違いなどが発生する微粒子の大きさや，薬液への混入度合いに影響したことが考えられる．以上の結果は，アンプルカットによるサブミクロンサイズのガラス微粒子の発生を示唆したが，その混入による薬液投与が人体に及ぼす影響は定かではなく，今後，動物実験により毒性や体内動態の評価について検討を進めたい．

【P-9】

乾式コーティングに用いる高分子ナノパウダーの調製とその苦みマスクへの応用

○後藤 静，　市村 奈都美，　市川秀喜，　福森義信
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】薬物の苦みマスクに用いられる膜制御型製剤の調製は，湿式スプレーコーティング法が主であるが，長時間の操作を要し，コスト・環境負荷の増大などをもたらす．これらの欠点を改善すべく，溶媒を使用せずに粉体を被覆する方法である乾式コーティング法が注目されている．乾式コーティングに深く関与する概念である ordered mixture は，異種粒子間に付着力がある場合に大粒子が核となり，大粒子表面に小粒子が規則正しく付着・被覆した状態を指す．異種粒子を ordered mixing するためには，一般に，粒子径比が 10 以上であることが必要とされるため，例えば，微細な核粒子の乾式コーティングによる苦みマスクには，より微細化したコーティング基材粒子が必要となる．当研究室ではこれまでに自家合成したアクリル系高分子ラテックスの塩析操作とその後の凍結乾燥により得た nm サイズの一次粒子の緩い凝集体（ナノパウダー）が乾式コーティングに適した特性を示すことを見出している．本研究では，市販の水系分散型コーティング基材を利用し，そのナノパウダー化を試みるとともに，ordered mixture に基づく乾式コーティングの可能性を検討した．
【方法】コーティング基材に市販のラテックスタイプの Eudragit® FS30D と L30D-55 を選択し，それらの塩析処理と凍結乾燥によるナノパウダー化を実施した．NaCl による塩析処理後の基材は緩い粗大凝集塊を形成しているため，必要に応じて乳棒・乳鉢またはホモジナイザーを使用して解砕した後，凍結乾燥した．核粒子には，苦みを持つアセトアミノフェン（APAP）を使用し，結合剤として PEG6000 を使用した．核粒子に対するナノパウダーのコーティングは，温調可能なガラスジャケットと内部の回転パドルから構成される自製の PPT ミキサーにより行った．予め PEG6000 を被覆した APAP（75-106 μm）粒子 2 g と同量のナノパウダーをミキサーに仕込み，所定温度においてパドル回転数 100 rpm で 1 時間の混合により被覆操作を実施した．コーティング粒子の苦み制御能は，日局パドル法溶出試験によって評価した．
【結果・考察】塩析操作後の解砕操作にホモジナイザーを用いた場合に，凍結乾燥後の粒子収率（63 μm 以下）の顕著な増加が認められ，ナノパウダーを効率よく得るために有用であることが分かった．FS30D と L30D-55 の 63 μm 以下の粒子の SEM 観察ではいずれも nm サイズのポリマーの一次粒子が緩く凝集した構造を呈していたが，収率は FS30D が最大 70%程度であったのに対し，L30D-55 では 90%と差を生じた．これは，塩析時に用いた NaCl 添加によるポリマーナノ粒子間の静電反発力の抑制効果がポリマー組成に依存して異なることを反映した結果と推察される．一方，コーティング収率は，L30D-55 を用いた系では 13-18%と低値であったのに対し，FS30D を用いた系では最高 89%と著しく高い値を示した．FS30D のガラス転移温度（Tg）が混合操作温度付近であるのに対し，L30D-55 の Tg は操作温度よりも遥かに高いため，L30D-55 ナノパウダーが混合時に核粒子へ十分な付着性を示さなかったことがその一因と考えられる．コーティング粒子の薬物溶出試験の結果，FS30D では 1 分後の溶出率が 44%，L30D-55 では 1 分後の溶出率が 25%であり，双方とも 15 分時点でほぼ完全に溶出した．コーティング粒子の SEM 観察では，FS30D は APAP 粒子上での展延が不十分で粗な被覆状態を呈していたことから，被覆形成が不十分なことが早い薬物溶出をもたらしたものと考えられ，今後，混合条件の最適化についてもさらに検討を続けたい．

【P-10】

植物フラボノイドのDNA合成酵素阻害活性と抗がん機能性の研究

Study on the DNA polymerase inhibitory and anticancer activities by plant flavonoids

○塩見　一明, 栗山　磯子, 吉田　弘美, 水品　善之
神戸学院大学　栄養学部　食・健康学部門

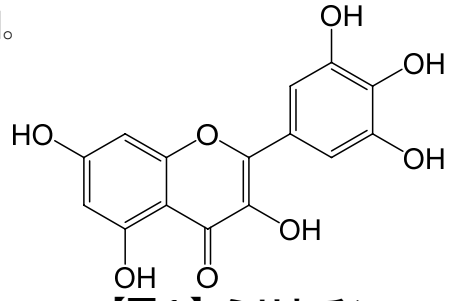
【目的】 ポリフェノールの一種であるフラボノイドは、野菜や果物など植物系食品素材に存在する。フラボンを母核とするフラボノイド類に注目して、哺乳類の DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ、pol）とDNA のねじれを巻き戻す DNAトポイソメラーゼ（topo）の阻害活性に基づいた抗がん機能性を検討した。また、フラボノイドによる pol 活性阻害の分子メカニズム（立体結合）を考察した。

【方法】 16 種類のフラボノイド類は、Sigma-Aldrich 社の市販品を使用した。pol は、精製酵素を準備して、*in vitro* の活性測定を実施した。pol によるヌクレオチドの取り込み活性は、DIG 標識の鋳型DNA を用いてシークエンスゲル電気泳動後、抗 DIG 抗体を用いて伸長した DNA を検出した。topo は、常法により Nicking/Catalytic 活性を測定した。ヒト大腸がん細胞（HCT116 cells）増殖抑制活性は、WST-1 法で測定した。細胞周期は、ヨウ化プロピジウム（PI）で細胞核を染色後、フローサイトメーターで解析した。アポトーシス誘導は細胞核 DNA の断片化と TUNEL 法で解析した。

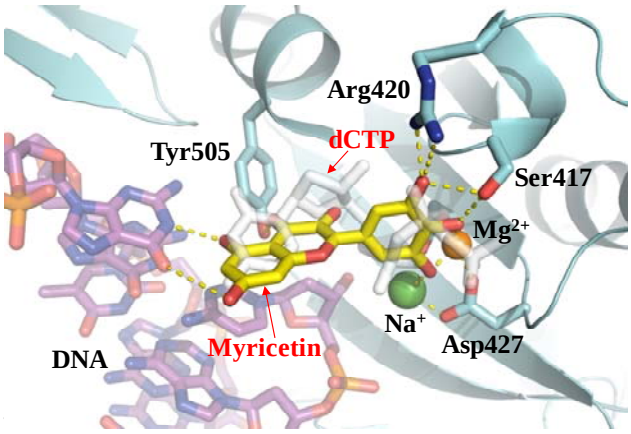
【結果・考察】 16 種類のフラボノイド類（100 μM）において、哺乳類 pol を阻害したのは、水酸基を有するものであり、その中で最も強い阻害活性を示したのは水酸基の数が最多（6つ）のミリセチン【図1】であった [1]。フラボノイドの配糖体よりもアグリコンの方が pol を強く阻害した [1, 2]。

ミリセチンによる DNA 複製型の pol α と DNA 修復型の pol κ の阻害様式は、鋳型 DNA に対して「拮抗型」、ヌクレオチドに対して「非拮抗型」であった。一方、DNA 修復・組換え型の pol λ に対する阻害様式は鋳型 DNA に対して「非拮抗型」、ヌクレオチドに対して「拮抗型」であった。pol λ のヌクレオチド取り込み対しては、dNTP＝dCTP＞dATP の順に強い阻害を示した。ミリセチンとヒト pol λ の立体結合解析（ドッキング・シミュレーション）の結果、ミリセチンは pol λ のヌクレオチド結合部位（ポケット）にはまり込んだ【図2】[3]。

ミリセチンは、ヒト topo I を阻害せず、ヒト topo II のみを阻害した。ミリセチンは、ヒト大腸がん細胞の増殖を抑制し（LD_{50}=28.2 μM）、細胞周期を G2/M 期で停止させて、アポトーシスを誘導したことから、がん細胞内では pol よりも topo II 阻害活性に基づいた細胞増殖抑制であると示唆される [1]。



【図１】ミリセチン



【図２】ミリセチンと pol λ の立体結合解析

[1] K. Shiomi *et al.* (2013) *Food Chem.*, in press.
[2] Y. Mizushina, K. Shiomi *et al.* 学術論文投稿中
[3] K. Shiomi *et al.* 学術論文投稿準備中.

【P-11】

植物精油および含有成分における生理活性の探索

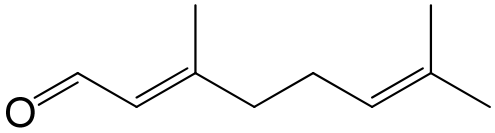
Screening of bioactive compounds form plant essential oils and their components

○見通　真衣, 栗山　磯子, 吉田　弘美, 水品　善之
神戸学院大学　栄養学部　食・健康学部門

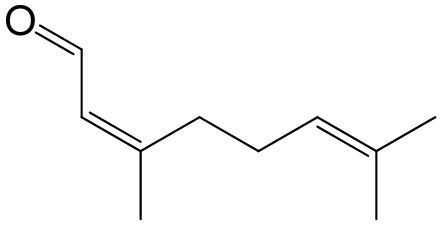
【目的】 ハーブやスパイスなど食品として利用される植物の香気成分には、抗菌作用やリラックス（ストレス緩和）作用などが知られている。植物精油の新規な生理活性として哺乳類 DNA 合成酵素（DNA ポリメラーゼ, pol）阻害活性に注目して、活性が強い精油の探索（スクリーニング）を行った。そして、その精油成分を分析して活性本体について考察した。

【方法】 植物由来の精油 20 種類（オレンジ、カモミール、キャラウェイ、キャロット、クミン、クラリセージ、クローブ、シトロネラ、サンダルウッド、スペアミント、セイジ、セロリシード、ナツメグ、タイムレッド、バジル、マジョラム、ユーカリ、ライム、レモン、レモングラス）は、水蒸気蒸留法により抽出された市販品を使用した。哺乳類の pol は精製酵素を準備して、*in vitro* の活性測定を実施した。抗酸化活性は ORAC 法で測定した。ヒト大腸がん細胞（HCT116 cells）増殖抑制活性は WST-1 法で測定した。ラット好塩基球性白血病（RBL-2H3）細胞における脱顆粒反応抑制活性は、顆粒に含まれるβ-ヘキソサミニダーゼの遊離量で評価した。マウス受身皮膚アナフィラキシー反応（PCA）抑制活性は、常法に従った。抗炎症活性は、マウス・マクロファージ（RAW264.7 細胞）への LPS 刺激による TNF-α の産生抑制活性およびマウス耳への起炎剤 TPA の塗布による浮腫重量差から測定した。

【結果・考察】 20 種類の精油において、①polα（DNA 複製型）阻害活性、②polλ（DNA 修復・組換え型）阻害活性、③抗酸化活性、④がん細胞増殖抑制活性、⑤脱顆粒反応抑制活性、⑥TNF-α 産生抑制活性の6つの活性を比較した結果、レモングラス精油がこれらの活性を強く阻害した [1, 2]。GS/MS によりレモングラス精油の成分を分析したところ、少なくとも 138 成分が検出され、42 成分を同定した。そのうち主要成分は、ゲラニアール（40.16%）【図1】とネラール（34.24%）【図2】であった。そこで、これら異性体で構成されるシトラールの試薬を Sigma-Aldrich 社から購入して活性を調査した。シトラールは、レモングラス精油と同様の強さで RBL-2H3 細胞の脱顆粒反応抑制を示し、マウス受身皮膚 PCA 反応抑制活性を示したことから抗アレルギー作用が期待される [2]。また、シトラールは、RAW264.7 細胞の TNF-α 産生抑制活性とマウス耳の浮腫抑制活性が見られたことから、抗炎症作用が期待できる [2]。



【図１】ゲラニアール



【図２】ネラール

[1] M. Mitoshi *et al.* (2012) *J. Agric. Food Chem.*, 60, 11343-11350.
[2] M. Mitoshi *et al.* 学術論文投稿準備中.

【P-12】

視床下部-延髄系を介した Orexin-A による脳虚血性耐糖能異常および神経障害の発現抑制機構

○原田慎一、山﨑由衣、徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

【目的】我々はこれまでに、脳虚血ストレス負荷後に、肝臓における insulin 感受性の低下が一過性の耐糖能異常（虚血後高血糖）を誘発し、神経障害を悪化させることを明らかにしてきた。さらに、視床下部から産生される神経ペプチドである orexin-A の脳室内投与よって、肝臓における insulin シグナル系の賦活化による虚血後の血糖値上昇が抑制されることで、神経障害の発現抑制に寄与する知見を得てきている。そこで、本研究では、orexin-A の視床下部を介した役割を検討するために、肝機能を制御する神経の一つである迷走神経に着目し、その起始核が存在する延髄を介した視床下部における orexin-A の脳虚血後の糖代謝異常および神経障害発現への関与について検討を行った。
【方法】実験には 5 週齢の ddY 系雄性マウスを用いて、中大脳動脈閉塞法 (MCAO, 2 h) によって一過性脳虚血モデルを作成した。神経障害の発現は、梗塞巣形成、行動障害ならびに学習・記憶障害を指標として評価した。Orexin-A (5 pmol/mouse) は、MCAO 後に単回視床下部内局所投与した。Orexin-1 受容体拮抗薬である SB334867 (200 pmol/mouse) は、orexin-A 投与 30 分前に延髄内局所投与した。MCAO 後の血糖値変化として空腹時血糖値 (FBG) を測定し、各種タンパク質の発現変化は western blot 法によって解析した。延髄における c-Fos（神経活性マーカー）の発現は、免疫組織染色により評価した。
【結果】Orexin-A の視床下部内局所投与により、MCAO 3 日後の梗塞巣形成、行動障害、ならびに学習・記憶障害発現は有意に抑制された。さらに、MCAO 1 日後の FBG の上昇は有意に抑制された。同時に、肝臓における insulin 受容体の発現減少ならびに糖新生関連酵素（phosphoenolpyruvate carboxykinase および glucose-6-phosphatase）の発現上昇は、有意に抑制された。この作用は、延髄への SB334867 処置 により有意に拮抗された。加えて、正常マウスにおいて、orexin-A を視床下部内局所投与することにより、延髄弧束核における c-Fos の陽性細胞数が増加した。
【考察】本研究から、脳虚血ストレス負荷後早期の肝臓における insulin 感受性の低下を介した糖新生の亢進による血糖値上昇は、視床下部内の orexin-A が重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、orexin-A の視床下部内投与により、肝臓を支配する迷走神経の起始核である弧束核において、神経の活性化が認められたことから、orexin-A による中枢領域（視床下部）から末梢組織へのシグナル伝達において、延髄の orexin-1 受容体が関与している可能性が示唆された。

（参考論文）Harada et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 344, 276-285, 2013.

【P-13】

脳内 sodium-glucose transporter を介した脳梗塞の発現機序解明

○小野安紀子、西岡宏記、山﨑由衣、原田慎一、徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

【目的】我々はこれまでに、脳虚血ストレス負荷後早期に insulin 感受性の低下に起因する虚血後高血糖状態が生じ、それが脳虚血性神経障害発現を増悪させる因子の一つであることを明らかにしてきた。さらに、この血糖値上昇を抑制することによって、神経障害増悪を改善される可能性を示唆してきた。しかしながら、虚血後高血糖が脳内で何を介して神経障害発現を増悪させるのかは未だ不明である。そこで今回、糖の作用点として、Na^+ 依存性グルコース輸送体である sodium-glucose transporter (SGLT) に着目し、脳虚血ストレス負荷後の血糖値変化と神経障害への関与について検討を行った。

【方法】5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、中大脳動脈閉塞 (MCAO, 2 hr) により一過性脳虚血モデルを作成した。偽手術群 (sham) は塞栓子を挿入しないものとした。SGLT ファミリーの広範な阻害薬である phlorizin は虚血再灌流直後に単回腹腔内投与 (40, 120, 200 mg/kg)、または、虚血再灌流直後および 6 時間後に脳室内投与 (10, 40 μg/mouse) した。また、glucose (25% (w/v)) は、phlorizin 投与の 30 分後に脳室内投与した。MCAO 1 日後の血糖値変化として空腹時血糖値を測定した。MCAO 3 日後の神経障害の発現は、梗塞巣形成、および行動障害をそれぞれ、2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride 染色、ならびに神経学的欠損スコアによって評価した。

【結果】MCAO 1 日後における空腹時血糖値は sham 群と比較して、MCAO 群で有意な上昇を示した。血糖上昇に対し、phlorizin 腹腔内投与は用量依存的に、有意な抑制作用を示したが、phlorizin 脳室内投与は、何ら影響を及ぼさなかった。一方、MCAO 3 日後における梗塞巣形成、および行動障害発現は、phlorizin 腹腔内投与及び脳室内投与により用量依存的に、有意に抑制された。MCAO 1 日後における梗塞巣形成は glucose 処置により、saline 群と比較して有意に増大し、その増大は、phlorizin 処置により有意に抑制された。

【考察】以上の結果から、脳虚血ストレス負荷による神経障害発現には、SGLT が関与する可能性が示唆された。全身投与の phlorizin では、腎尿細管における SGLT の阻害を介した糖再吸収抑制などによる虚血後高血糖抑制作用が神経障害抑制に寄与した一方で、脳内における SGLT 阻害の影響も考えられる。実際、脳内 SGLT の局所阻害では虚血後高血糖に影響を示さずに神経障害発現を抑制したことから、脳虚血ストレス負荷後に増加した糖が脳内 SGLT を活性化し、Na^+ の細胞内流入によって脳虚血性神経障害発現の増悪に関与していた可能性が示唆される。

（参考論文）Yamazaki et al., Brain Res., 1489, 113-120, 2012.

【P-14】

中枢性疼痛病態を模するモデル動物の確立

○中本賀寿夫、民谷繁幸、原田慎一、徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

【目的】脳血管疾患ではその障害部位や程度に依存した麻痺や学習記憶障害などの合併症の発症が患者の QOL を低下させる。中枢性疼痛は、脳卒中後の難治性合併症であり、神経障害性疼痛の一つとして知られる。その発症率は低いものの、従来の鎮痛薬治療が奏効しない場合が多く、その発症機序の解明および新規治療法の開発が必須の課題である。しかしながら現在、これらの病態を評価できるモデル動物が確立されておらず、課題の遂行が困難な状態である。そこで我々は、脳卒中病態を模倣する局所および全脳虚血動物モデルを用いて、それらが中枢性疼痛モデルとして有用であるか否かについて検討を行った。

【方法】5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、局所脳虚血処置は、2 時間の左中大脳動脈閉塞法 (middle cerebral artery occlusion; MCAO) により、全脳虚血処置は、30 分の両側総頸動脈閉塞法 (bilateral carotid arteries occlusion; BCAO) によって行った。MCAO モデルにおける梗塞巣形成は TTC 染色法、行動障害は neurological deficit score (NDS) を用いて評価した。BCAO モデルにおける組織障害はヘマトキシリン・エオジン染色により評価した。学習記憶障害の評価には step-through 法を用いた。後肢における知覚閾値の測定には Neurometer を用い、痛覚閾値の測定には、機械的刺激として von Frey test、熱的刺激として Plantar test を用いた。

【結果】MCAO 1 および 3 日後において、偽手術 (sham) 群と比較して、左脳領域に明らかな梗塞巣の形成が確認され、有意な行動障害の発現も観察された。 BCAO では、両側海馬に組織障害は認められた。さらに、両モデルにおいて、有意な学習記憶障害が認められた。MCAO 3 日後において、Aβ 線維および Aδ 線維の電流知覚閾値の低下が認められた。BCAO 3 日後における電流閾値の低下は、Aβ 線維および C 線維で観察された。MCAO 1 日後において、虚血側である左後肢に機械的刺激に対する痛覚閾値の低下が観察され、3 日後では有意であった。しかしながら、MCAO モデルに対する熱的刺激に対する影響は何ら認められなかった。BCAO 群の両後肢において、機械的および熱的刺激に対する有意な痛覚閾値の低下が BCAO 1 日後から有意に観察され、その低下は BCAO 3 日後まで持続した。

【考察】以上の知見から、局所および全脳虚血ストレス負荷による神経障害の発現時期において、両モデルともに、後肢における機械的痛覚過敏が発現することが明らかとなった。全脳虚血と異なり、局所脳虚血においては痛覚過敏の発現する体側が限局したが、これにはモデル間における、脳虚血ストレスにより障害される脳領域と範囲の差異が影響したと考えられる。

（参考論文）1. Takami et al., J. Pharm. Pharmacol., 63, 452-456, 2011.
2. Tamiya et al., J. Pharm. Pharmacol., in press.

【P-15】

全脳虚血モデルにおける中枢性疼痛の発現に対する長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の関与

○春名柚佳、民谷繁幸、原田慎一、中本賀寿夫、徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

【背景】神経障害性疼痛の一つである中枢性疼痛は、脳卒中後の難治性合併症として知られている。しかしながら、有効な治療薬がほとんど無く、治療法が確立されていないことから、明確な治療ターゲットが求められている。近年、n-3 系脂肪酸が関節リウマチ、関節炎および神経障害性疼痛などにおける痛みを抑制するとの報告がなされ、脂肪酸が疼痛制御に関与している可能性が提唱されている。我々もこれまでに、ドコサヘキサエン酸 (DHA) が各種疼痛モデルに対して抗侵害作用を示すこと、さらに、DHA などの長鎖脂肪酸が作用する受容体 GPR40 を介して β- エンドルフィンを遊離させ、疼痛制御に関与していることを明らかにしてきた。すなわち、GPR40 が生体内の疼痛制御機構において重要な役割をしている可能性が考えられている。しかしながら、中枢性疼痛下における長鎖脂肪酸および GPR40 の関与については全く不明である。そこで本研究では、我々が中枢性疼痛を模するモデルとして確立した全脳虚血モデルマウスを用いて、中枢性疼痛に対する GPR40 の関与について検討した。

【方法】5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、全脳虚血モデルは 30 分の両側総頸動脈閉塞法 (BCAO) により作成した。後肢の機械刺激に対する痛覚閾値の測定には、von Frey test を用いた。組織障害の評価には、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いた。BCAO 3 日後に、GPR40 の選択的アゴニスト GW9508 (0.1, 1 μg/mouse) を脳室内投与し、投与 10、20、30、60 分後の疼痛評価を行った。GPR40 の選択的アンタゴニスト GW1100 (10 μg/mouse) は、GW9508 投与 10 分前に脳室内投与した。

【結果】BCAO 3 日後において、海馬における組織障害および学習記憶障害の発現を確認した。さらに、BCAO 処置前と比較して 3 日後において、左右の両後肢に有意な痛覚閾値の低下が観察された。BCAO 3 日後の後肢において認められた機械的刺激に対する痛覚過敏反応は、GW9508 の処置によって用量依存的に抑制され、1 μg/mouse の用量では偽手術群に比較して有意に抑制された。この作用は、GW1100 によって有意に拮抗された。

【考察】以上の結果から、BCAO モデルにおける中枢性疼痛の発現制御に長鎖脂肪酸および GPR40 が一部関与している可能性が示唆された。今後は、GPR40 の下流の因子がどのように中枢性疼痛の発現を抑制しているのか詳細な機序解明を行う予定である。

（参考論文）1. Nakamoto et al., Brain Res., 1432, 74-83, 2012.
2. Tamiya et al., J. Pharm. Pharmacol., in press.

【P-16】

モルヒネ反復投与による鎮痛耐性形成における中脳グリア細胞の関与

○木村麻希、清水あすか、矢野大輔、原田慎一、中本賀寿夫、徳山尚吾
神戸学院大学　薬学部　臨床薬学研究室

【目的】モルヒネは、長期間の使用により鎮痛耐性が形成されることが知られている。近年、モルヒネの鎮痛耐性を調節する因子として、グリア細胞の役割が注目され、これらがモルヒネ鎮痛耐性形成に関与することが報告されている。しかし、その多くが脊髄での検討であり、脳内グリア細胞における役割は未だ不明である。そこで我々は、脳部位の中でも特に、モルヒネの作用点である μ オピオイド受容体が多く分布する中脳のアストロサイトに着目し、それがモルヒネ鎮痛耐性形成に及ぼす影響について解析した。

【方法】ddY 系雄性マウスを用いてモルヒネ（10 mg/kg）を 5 日間反復皮下投与した。対照群には生理食塩水を投与した。モルヒネによる鎮痛効果は tail flick 法により測定した。アストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) のタンパク質発現量は western blot 法により解析した。また、GFAP の中脳における発現は、蛍光免疫組織染色を用いて評価した。グリア細胞阻害剤のペントキシフィリンは 50 μg, 100 μg/10 μl を脳室内投与した。アストロサイト増殖抑制剤であるフラボピリドールは、5 nmol/10 μl を脳室内投与した。

【結果】モルヒネ反復投与によって、投与日数に依存した鎮痛効果の有意な減弱、すなわちモルヒネ鎮痛耐性形成が認められた。この耐性形成はペントキシフィリンの腹腔内または脳室内同時投与によって、有意に抑制された。さらに、耐性形成過程における中脳 GFAP タンパク質発現量は、saline 投与群と比較して、モルヒネ投与 1 日目から発現増加が認められ、3 日目まで続いたが 5 日目にはその発現は saline 群と同程度まで減少していた。この増加は、フラボピリドールの併用により有意に抑制された。加えて、モルヒネ投与 1 日後において、中脳水道灰白質の GFPA の陽性細胞が顕著に増加したが、フラボピリドールの処置によってその増加が抑制された。

【考察】本研究結果から、モルヒネの反復投与による鎮痛耐性形成機序において、脳内グリア細胞、特にアストロサイトが関与する可能性が示唆された。また、モルヒネ投与初期に発現誘導された中脳アストロサイトの発現増加が、耐性形成機構に影響している可能性が示された。

（参考論文）Harada et al., Eur. J. Pharmacol., submitted.

【P-17】

抗がん剤エトポシドによる小腸 P-glycoprotein の発現増加機構における足場タンパク質 ERM の関与

○小堀 宅郎[1]、原田 慎一[1]、中本 賀寿夫[1]、岸岡 史郎[2]、徳山 尚吾[1]
1 神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室, 2 和歌山県立医科大学 医学部 薬理学教室

【目的】これまでに我々は、エトポシド（ETP）の反復経口投与による小腸における RhoA/Rho-associated coiled-coil containing kinase（ROCK）の活性化を介した P-glycoprotein（P-gp）の発現増加および薬物排出活性の亢進が、経口投与したモルヒネの鎮痛効果を減弱させることを報告している[1-2]。近年、ezrin/radixin/moesin（ERM）が P-gp の足場タンパク質として機能し、P-gp の細胞膜上での安定発現・機能制御において重要な役割を果たすことならびに RhoA が ERM の活性化機構を制御することが示唆されている。一方、ROCK は ERM のリン酸化反応を担う主要なキナーゼであり、活性化した ERM をリン酸化することによって、その活性型状態の持続時間を延長することが知られている。そこで本研究では、ETP の反復経口投与による小腸 P-gp の細胞膜上での発現変動機構における ERM の関与と、これらの変化が経口投与したモルヒネの鎮痛効果へ及ぼす影響について検討を行った。

【方法】4 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、ETP（10 mg/kg/day, p.o.）は 7 日間反復投与した。RhoA 活性化の指標となる細胞膜移行を阻害するロスバスタチン（5 mg/kg/day, p.o.）または ROCK 活性を阻害するファスジル（5 mg/kg/day, p.o.）は、ETP と同時に反復投与した。小腸における各タンパク質の発現量は western blot 法によって解析した。また、モルヒネ（50 mg/kg, p.o.）の鎮痛効果は tail flick 法を用いて測定した。

【結果・考察】ETP の反復経口投与終了 24 時間後、小腸の細胞膜画分における ERM および phosphorylated ERM（p-ERM）の発現量は、ETP 未処置の対照群と比較して有意に増加した。一方、ロスバスタチンまたはファスジルを併用投与すると、ETP による ERM または p-ERM の増加はそれぞれ有意に抑制された。さらに、ETP による同画分における P-gp の発現増加ならびにモルヒネ経口投与後に観察された鎮痛効果の減弱作用は、ロスバスタチンまたはファスジルの併用投与によっていずれの場合も有意に抑制された[3-4]。以上の結果から、ETP の反復経口投与による小腸 P-gp の発現増加機構には、RhoA/ROCK 経路を介した ERM の活性化が関与し、これらの変化が経口投与したモルヒネの鎮痛効果を減弱させることが示唆された。

（参考文献）

1) Fujita-Hamabe et al., *J. Pharm. Pharmacol.,* 64, 496-504, 2012.
2) Kobori et al., *Eur. J. Pharm. Sci.,* 47, 934-40, 2012.
3) Kobori et al., *J. Pharm. Sci.,* 102, 1095-105, 2013.
4) Kobori et al., *J. Pharm. Sci.* (in press)

【P-18】

エトポシドによるモルヒネ鎮痛効果の減弱機構における小腸 P-glycoprotein、RhoA/ROCK および ERM 活性の時間依存的変化

○藤原 周平[1]、辻田 司[1]、小堀 宅郎[1]、原田 慎一[1]、中本 賀寿夫[1]、岸岡 史郎[2]、徳山 尚吾[1]

1 神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室, 2 和歌山県立医科大学 医学部 薬理学教室

【目的】これまでに我々は、抗がん剤であるエトポシド（ETP）の反復経口投与によって、小腸における P-glycoprotein (P-gp) の発現量および薬物排出活性が増加し、経口投与したモルヒネの鎮痛効果が減弱することを報告している[1)]。さらにこの機構には、RhoA/Rho-associated coiled-coil containing kinase (ROCK) 経路を介した P-gp の足場タンパク質として機能する ezrin/radixin/moesin（ERM）の活性化とそのリン酸化体 phosphorylated ERM (p-ERM) の発現増加が関与することも明らかにしてきた[2-3)]。しかしながら、ETP を含めた P-gp の基質薬物の反復投与中において、上記の因子について経日的な発現パターンを検討した報告はない。そこで本研究では、ETP の反復経口投与開始後からの小腸における RhoA/ROCK および ERM/p-ERM の活性変動に加え、細胞膜上における P-gp の発現変化と経口投与したモルヒネによる鎮痛効果の時間依存的な変化について検討を行った。さらに臨床において、ETP などの抗がん剤は反復投与後に休薬期間を設けることから、ETP 反復投与終了（休薬）後におけるこれらの因子の発現または活性変化についても解析を行った。

【方法】実験には 4 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、ETP (10 mg/kg/day, p.o.) を 1、3、5 または 7 日間投与した。また、小腸における各タンパク質の発現量は western blot 法を用いて解析し、モルヒネ（50 mg/kg, p.o.）鎮痛効果は tail flick 法によって測定した。

【結果・考察】ETP 投与開始 3 日目の小腸において、RhoA 活性化の指標となる細胞膜画分での発現量は、対照群と比較して有意に増加した。さらに 5 日目では、同画分における ROCK、ERM、p-ERM および P-gp の発現量も有意に増加し、経口投与したモルヒネの鎮痛効果は有意に減弱した。一方、ETP (7 日間の反復経口投与) の休薬 3 日後、これらの変化はすべて対照群と同レベルまで回復した[4)]。以上の結果から、ETP の反復経口投与によって、小腸において RhoA が先行して活性化した後、ROCK および ERM の活性化とそのリン酸化を誘導し、小腸の細胞膜における P-gp の発現量を増加させた結果、経口投与したモルヒネの鎮痛効果を減弱させた可能性が示された。

（参考文献）

1) Fujita-Hamabe et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 64, 496-504, 2012.

2) Kobori et al., *Eur. J. Pharm. Sci.,* 47, 934-40, 2012.

3) Kobori et al., *J. Pharm. Sci.,* 102, 1095-105, 2013.

4) Kobori et al., *J. Pharm. Sci.* (in press)

【P-19】

炎症性疼痛モデルマウスに対する脳内長鎖脂肪酸受容体 GPR40 アゴニスト GW9508 の抗侵害作用

○相澤風花[1)]、里尚也[1)]、西中崇[1)]、中本賀寿夫[1)]、万倉三正[2)]、
小山豊[3)]、糟谷史代[4)]、徳山尚吾[1)]
1）神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室，2）備前化成株式会社，
3）大阪大谷大学 薬学部 薬理学，4）神戸学院大学 薬学部 毒性学

【背景】脂肪酸が疼痛の惹起や制御において、重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。我々はこれまでに、種々の疼痛評価系においてドコサヘキサエン酸（DHA）がβエンドルフィンの遊離を介して抗侵害作用を示すこと、さらにこれらの作用には DHA を含む長鎖脂肪酸によって活性化される受容体 GPR40 を介していることを明らかにしてきた。最近では、complete Freund's aduvant (CFA) 誘発炎症性疼痛モデルマウスにおいて、脳内 GPR40 のタンパク質発現が変動していることを明らかにしている。このような背景から、脳内の GPR40 が疼痛制御機構において重要な役割をしていることが示唆されている。そこで本研究においては、GPR40 と疼痛制御機構の関係を明らかにするために、CFA 誘発炎症性疼痛モデルマウスを用いて GPR40 アゴニスト GW9508 の脳室内投与の影響について検討を行い、さらにこの抗侵害作用機構についても検討を加えた。

【方法】 5 週齢の ddY 系雄性マウスを用いた。慢性疼痛モデルは、マウスの右後肢足蹠内へ CFA (0.5 mg/kg) を投与することで作製した。疼痛評価には、von Frey test （機械的刺激）および Plantar test （熱的刺激）を用いた。GPR40 アゴニストの GW9508 （0.1-25 mg/mouse）または DHA (25-50 μg/mouse) は脳室内投与した。GPR40 アンタゴニストの GW1100（10 μg/mouse）は、GW9508 の投与 10 分前に脳室内へ投与した。各種神経細胞と GPR40 の局在解析には、蛍光二重免疫染色法を使用した。神経細胞マーカーには NeuN、β–エンドルフィン含有神経マーカーには proopiomelanocortin（POMC）を使用した。

【結果・考察】 CFA 投与 7 日後において、機械的アロディニアが認められた。これらの条件下において、GW9508 の脳室内投与は CFA 誘発の機械的アロディニアを用量依存的かつ有意に抑制した。これらの作用は、GW1100 の前処置によって有意に拮抗された。一方、CFA 投与 1 日後においては、これらのアゴニストの投与は何ら影響しなかった。蛍光免疫染色の結果から、GPR40 は POMC と共局在していることが明らかとなった。

以上の結果から、脳内 GPR40 を介したシグナル経路は、疼痛制御を担っている可能性が示唆され、これらの作用機構には β–エンドルフィン含有神経細胞上に発現している GPR40 が関与していることが示された。

（参考論文）Nakamoto et al., Brain Res., 1432, 74-83, 2012.
Nakamoto et al., British Journal of Pharmacology, submitted

【P-20】

炎症性疼痛モデルマウスにおける長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の発現変動におけるアストロサイトの関与

○里尚也[1)]、西中崇[1)]、中本賀寿夫[1)]、万倉三正[2)]、小山豊[3)]、糟谷史代[4)]、徳山尚吾[1)]
[1)] 神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室, [2)] 備前化成株式会社,
[3)] 大阪大谷大学 薬学部 薬理学, [4)] 神戸学院大学 薬学部 毒性学

【背景】脂肪酸由来の様々な因子が疼痛や炎症に関与していることが明らかになりつつある。これまでに我々は、ドコサヘキサエン酸（DHA）が種々の疼痛評価系において抗侵害作用を示し、さらに、脳内に発現する長鎖脂肪酸受容体 GPR40 が疼痛制御に関与することを明らかにしてきた。最近、脳内アストロサイトが脂肪酸の調節に関与していることが報告されている。そこで本研究においては、慢性疼痛時における GPR40 蛋白質の発現変動およびそれらに対するアストロサイトの関与についても検討を加えた。

【方法】慢性疼痛モデルは、マウスの右後肢足蹠内へ 0.5 mg/kg の complete Freund's adjuvant (CFA) を投与することで作製した。疼痛評価には、von Frey test（機械的刺激）および Plantar test （熱的刺激）を用いた。GPR40、神経細胞マーカーである NeuN、アストロサイトマーカーである glial fibrillary acidic protein（GFAP）およびミクログリアマーカーである Iba1 の蛋白質発現および細胞内局在解析は、ウエスタンブロット法または蛍光二重免疫染色法によって解析した。細胞増殖阻害剤である flavopiridol (5, 15 nmol) は CFA 投与前、および投与 10 時間後に 1 日 2 回脳室内へ投与した。

【結果・考察】 CFA 投与直後から、機械的および熱的刺激に対する疼痛過敏反応が認められた。脳内の GPR40 は、saline 群と比較して CFA 投与 7 日後の視床下部および延髄領域において、一過性に蛋白質発現が増加し、中脳においても増加傾向を示した。一方、大脳皮質に関しては、何らの変化は認められなかった。蛍光免疫組織染色の結果から、GPR40 は NeuN と共局在を示したが、GFAP や Iba1 とは共局在しなかった。一方、視床下部領域の GFAP 蛋白質の発現を測定したところ、CFA 投与 1 日後においてのみ有意な発現増加が認められ、7 日後には saline 群と同程度の値にまで回復していた。さらに、flavopiridol 処置によって 1 日後の GFAP 蛋白質発現の増加は抑制され、その後の機械的および熱的刺激に対する疼痛過敏反応も抑制され、CFA 投与 7 日後の GPR40 蛋白質の発現増加も認められなかった。疼痛時における一過性の脳内 GPR40 蛋白質発現の増加は、疼痛発症早期にアストロサイトの発現増加を抑制することによって消失したことから、この機構にはリガンドとなる脂肪酸の変動が関与しているかもしれない。以上の知見から、神経細胞上に発現している GPR40 は、脳内アストロサイトの脂肪酸調節を介して蛋白質発現を変動させ、疼痛を調節している可能性が示唆された。

（参考論文）Nakamoto et al., Brain Res., 1432, 74-83, 2012
Nakamoto et al., British Journal of Pharmacology, submitted

【P-21】

母子分離ストレスによる情動および疼痛行動への影響

○西中崇、中本賀寿夫、徳山尚吾
神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室

【背景】痛みは、長期間遷延することで不安や抑うつなどの情動変化を引き起こし、さらにこれらの変化によって痛みが増悪し、悪循環となることが知られている。したがって、疼痛治療において情動変化のコントロールが重要な要因となることが示唆されている。しかし、基礎研究において痛みに対する情動変化の影響を評価するためのモデルが確立しておらず、これらの関係性については十分に解明されていない。一方、過剰なストレスが不安障害や抑うつといった精神疾患の発症に関与していることは周知の事実であり、多くのストレス負荷モデルが精神疾患の研究に利用されている。本研究では、情動変化が感覚としての痛みに与える影響を解析するために、ストレス負荷モデルの一つである母子分離ストレスを用いて、ストレス負荷に対する情動行動ならびに疼痛行動の評価を行った。
【方法】母子分離ストレスは、1 日 3 時間母親マウスと仔マウスを別々のケージに移すことでストレス負荷を与え、これを出生後 1 日目から 19 日目までの計 19 日間行った。母子分離を与えない群を対照とした。出生 8 週間後において各種情動行動ならびに疼痛行動の評価を行った。情動行動の評価には、不安関連行動の評価系である高架式十字迷路試験ならびに抑うつ様行動の評価系である強制水泳試験を用いた。疼痛行動の評価には、von Frey 試験（機械的刺激）ならびに planter 試験（熱的刺激）を用いた。
【結果】高架式十字迷路試験において、open と enclosed 両方の arm に対する進入回数の合計は両群間に変化は認められなかったが、open arm 滞在時間に関しては母子分離ストレス群において有意な減少、つまり不安水準の増強が認められた。さらに、強制水泳試験では、母子分離ストレス群において抑うつ様行動の指標である無動時間の増加傾向が認められた。また、母子分離ストレス群では対照群と比較して、機械的刺激に対する反応回数の増加傾向が認められ、熱的刺激に対する反応潜時の有意な減少が認められた。
【考察】これらの知見から、母子分離ストレスにより情動行動ならびに疼痛行動の障害が引き起こされている可能性が示唆された。

【P-22】

長期完全静脈栄養による消化管萎縮時の探査的薬物動態検討

○福島恵造[1]，三木隆弘[1]，山崎彩加[1]，中本賀寿夫[2]，徳山尚吾[2]，杉岡信幸[1]
[1]神戸学院大学薬学部臨床薬物動態学研究室
[2]神戸学院大学薬学部臨床薬理学研究室

[PURPOSE] There have been many morphological and nutritional, but few pharmacokinetic studies on intestinal atrophy induced by long-term total parenteral nutrition (TPN). The aim of present study was to broadly investigate the effects of intestinal atrophy on drug absorption and disposition using two typical model compounds. [METHODS] Cyclosporin A (CyA) and phenolsulfonphthalein (PSP) were used as a hydrophobic and hydrophilic model compound, respectively. TPN-fed Rats (TPN rat) were prepared by 7-day TPN treatment, and then were morphologically examined in jejunum and ileum. CyA (5 or 10 mg/kg) or PSP (7.2 or 8.5 mg/kg) was administered to intravenous or intraloop of intestine of control and TPN rats. Pharmacokinetic parameters with non-compartment analysis including bioavailability (BA) were obtained from concentration profiles after different administration routes. [RESULTS AND DISCUUSION] The wet weights and protein contents of jejunum and ileum in TPN rats were decreased to approximately 30% and 60% of those in control rats, respectively. After intravenous and intraloop administration, the area under the concentration vs time curves (AUC) of PSP in TPN rats were increased to approximately 150% and 250%, respectively, resulting in 150% increase in BA of PSP; likewise, AUCs of CyA in TPN rats were also increased to approximately 200% and 120%, respectively, however, resulting in 40% decrease in BA of CyA. These results suggested that the drug metabolism might be diminished by long-term TPN, probably due to the hepatic impairment. In contrast, first-pass effect of a drug could be altered depending on its physicochemical and pharmacokinetic property. [CONCLUSION] With long-term TPN, drug therapy should be considered with these alterations, especially when is shifted from intravenous to oral or enteral administration.

【P-23】

新規小型高圧乳化機によるエマルジョン製剤の調製

○福島昭二[1]、中野 満[2]

[1]神戸学院大学薬学部臨床薬剤学研究室、

[2]株式会社 美粒

O/W 型エマルジョンは脂溶性薬物のキャリヤーとして有用であるが、調製には高圧乳化機などの高価な設備が必要であり、また１回あたりの調製量も数100ml以上必要であるなど、研究室レベルでのエマルジョン製剤の検討では制約が大きかった。そこで容易に入手可能な機材・部品を用い、数 10 ml のエマルジョンを調製可能な小型高圧乳化機を制作し、従来の高圧乳化機と比較した。新規小型高圧乳化機は、最大 250 MPa（約 2,500 kg／cm2、約 36,000 psi）対応の小型高圧ポンプ（シングル）に 0.09 mm のオリフィスおよび各種口径・長さのステンレス管を組み合わせた構成であり、ステンレス管は気泡の発生抑制のための背圧調整および冷却機能を有する。動力源はコンプレッサーあるいはガスボンベである。標準的な脂肪乳剤の処方で、従来の高圧乳化機（DeBee 2000, Nano 3000）と比較したところ、同一処方・圧力において、エマルジョンは全く同等に微粒子化された。すなわち 15,000 psi での調製では、粒子径はパス回数に応じて減少したが、いずれも 5 パス程度でほぼ一定の値となり 10 パスにおいて Nano 3000 では 216.7 nm、新型小型高圧乳化機では 220.8 nm となった。新規小型高圧乳化機で調製に必要な量は 20 ml 弱であった。製作費は従来の高圧乳化機に比較し、格段に低く抑えられた。また、新しい乳化部を従来の高圧乳化機に接続してエマルジョンを調製しても、これまでの乳化部を用いた場合と同様の結果が得られた。今回制作した小型高圧乳化機は、乳化原理は従来の高圧乳化機と同様であるが、性能においても同等であった。