

神戸学院大学ライフサイエンス産学連研究センター

2013年度研究成果発表会 プログラム

平成26年3月14日（金）9：25～

於：C号館LSCカンファレンスルーム

およびピロティ

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」

協 賛

神戸学院大学薬学部 製剤学研究室

プログラム

- 9:25~9:30 開会の挨拶 センター長 福森義信
- 一般演題口頭発表 (座長：屋山勝俊)
- 9:30~ 9:45 シリカ粒子によるマウス多形核白血球の機能変化*
(O-1) **Functional changes of polymorphonuclear leukocytes by silica particles**
○村山可菜実, 榎本理世, 吉田 博, 李 英培
神戸学院大学 薬学部 薬理学研究室
- 9:45~10:00 ホウ素中性子捕捉療法用 L-BPA ナノサスペンションの粒子径が及ぼす
(O-2) 体内動態への影響*
Effect of particle size on biodistribution of nanoparticulate L-BPA formulations in tumor-bearing mice for boron neutron-capture therapy
○安藤 徹¹, 多治川哲平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 整形外科
- 10:00~10:15 生体材料の表面改質とその細胞接着性の直接 AFM 測定*
(O-3) **Surface modification of biomaterials and their cell adhesion studied by AFM**
○新戸浩幸, 織田真由美, 深澤智典
京都大学工学研究科 化学工学専攻
- 10:15~10:25 休憩 (座長：日置和人)
- 10:25~10:40 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
(O-4) -GFP 基質パネルを用いた細菌由来タンパク転移酵素 Sortase A のペプチド転移反応の至適化とその応用に向けて-*
Development of surface-processing system as targeting technology of nano-particles
- Optimization of the transpeptidase reaction of bacterial sortase A using GFP-substrate panel and investigation for its applications -
○田端厚之¹, 安養寺夏希¹, 大久保行将¹, 北條恵子², 水品善之³, 友安俊文¹, 長宗秀明¹
¹徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部
²神戸学院大学 薬学部 薬品分子化学研究室
³神戸学院大学 栄養学部 食・健康学部門

- 10:40～10:55
(O-5) クルクミンとクルクミン内包リピッドエマルジョンの生理活性比較*
Bioactive comparison between curcumin and the lipid emulsion containing curcumin
栗山磯子¹, ○水品善之¹, 吉田弘美¹, 安藤徹², 市川秀喜²
¹神戸学院大学 栄養学部 食・健康学部門
²神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- 10:55～11:10
(O-6) 活性中心指向性プラスミン阻害剤の探索*
Research on the active center directing plasmin inhibitors
日高興士^{1,2}, 合田圭吾³, 手納直規⁴, 和中敬子⁵, ○津田裕子^{1,2}
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関西分子設計研究会
⁴広島国際大学 薬学部
⁵血栓止血研究神戸プロジェクト
- 11:10～11:20 休憩
- 特別講演 1
(座長：市川秀喜)
- 11:20～12:20 ナノ粒子の微生物細胞への付着・取込現象の解明
大阪府立大学大学院 工学研究科 化学工学分野
准教授 野村俊之先生
- 12:20～14:00 お昼休み
- 14:00～15:20 ポスター討論会
- P-1 食食微粒子の細胞内局在*
Intracellular distribution of phagocytized particles in macrophages
○鶴田裕文, 遠藤由里香, 塚本拓也, 丸岡由貴, 榎本理世, 李英培
神戸学院大学 薬学部 薬理学研究室
- P-2 ナノパーティクルによる血管弛緩はPI3キナーゼ系を介する*
Nanoparticles induce relaxation of thoracic arteries via PI3-kinases
○笹原智也, 屋山勝俊, 小野寺 章, 河合裕一, 岡本 博
神戸学院大学 薬学部 循環器薬理学教室

- P-3 C7orf24 (U7) の酵素活性を阻害するジペプチド型抗癌剤の設計*
Design of dipeptide type anticancer agents inhibiting enzyme activity of C7orf24 (U7)
○日高興士¹, 西澤庸介¹, 飯居宏美², 吉貴達寛², 吉矢拓³,
西内祐二³, 津田裕子
¹神戸学院大学 薬学部 薬品化学研究室
²京都薬科大学 臨床腫瘍学分野¹
³株式会社ペプチド研究所
- 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：
脱アセチル化度の異なるキトサンナノ粒子の被覆が薬物放出挙動に及ぼす影響*
Biodegradable sustained-release microcapsule for protein delivery: Effect of coating of chitosan nanoparticles with different deacetylation degrees on release behavior of protein
○山崎万純, 馬場隆文, 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 難水溶性薬物の腸散性製剤化とそのラット経口投与後の薬物吸収挙動の評価*
Preparation of enteric-dispersible microparticles of poorly water-soluble drugs and their adsorption behavior after oral administration to rats
○福田竜太, 大谷知奈美, 市川秀喜, 福森義信
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- P-6 多孔性微粒子を核とする薬物放出制御型コーティング製剤の設計*
Design of controlled-release formulations by using porous fine core-particles
○水谷瑤子, 市川秀喜, 福森義信
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- P-7 がん中性子捕捉療法における静脈投与型ガドリニウム含有キトサンナノ粒子の表面改質後の特性評価*
Characteristic evaluation of intravenously injectable gadolinium-loaded chitosan nanoparticles with surface modification for neutron capture therapy of cancer
○重儀拓哉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

- P-8 シリカナノ粒子による細胞膜破壊とその影響因子*
Cell lysis induced by silica nanoparticles and the influential factors
○深澤智典, 吉末幸祐, 新戸浩幸
京都大学工学研究科化学工学専攻
- P-9 2種のポリマーの接触により開始される架橋形成反応とその接着剤としての可能性*
The cross-linking reaction which is started by contact of two kinds of polymers, and its possibility as an adhesive
○安倍一実, 山根麻緒, 日置 和人
神戸学院大学 薬学部 機能分子化学研究室
- P-10 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 radixin の役割
Role of radixin in the increased expression of small intestinal P-glycoprotein by etoposide treatment
○小堀 宅郎, 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
- P-11 Morphine 反復投与による血液脳関門の P-glycoprotein 発現変化とその機序における ERM タンパク質の関与
Changes in P-glycoprotein on the blood brain barrier by repeated treatment with morphine and involvement of ERM proteins in this mechanism
○宮城 景, 藤原 周平, 小堀 宅郎, 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
- P-12 視床下部 orexin-A の脳虚血性耐糖能異常および神経障害発現に対する視床下部-延髄-迷走神経を介した抑制作用
The suppressive mechanism of orexin-A in the development of post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage through hypothalamus-medulla oblongata-vagus nerve axis
○原田慎一, 山崎由衣, 徳山尚吾
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学
- P-13 全脳虚血誘発神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter の関与
Involvement of sodium-glucose transporter on the development of ischemic neuronal damage induced by global cerebral ischemia
○荻原沙知, 西岡宏記, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学

- P-14 脳虚血後高血糖を介した神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter type 3 の関与
Neuroprotective effect mediated by sodium-glucose transporter type 3 in focal cerebral ischemia
○山崎由衣, 小野安紀子, 原田慎一, 徳山尚吾
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学
- P-15 虚血性神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter type 3 の acetylcholine 神経系を介した脳保護作用
Involvement of acetylcholine neuron on the neuroprotective effect mediated by sodium-glucose transporter type 3 in focal cerebral ischemia
○木村麻希, 山崎由衣, 原田慎一, 徳山尚吾
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学
- P-16 長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した抗侵害作用機構における下行性疼痛抑制系の関与
Involvement of descending pain inhibitory system in the antinociceptive effect through long chain fatty acid receptor GPR40
○中本賀寿夫¹, 里尚也¹, 西中崇¹, 相澤風花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
⁴神戸学院大学 薬学部 毒性学
- P-17 全脳虚血誘導性脳卒中後疼痛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
○松浦涉, 春名柚佳, 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
- P-18 長鎖脂肪酸受容体 GPR40 アゴニスト GW9508 の脳室内投与による抗うつ様作用
Antidepressant-like effect of long chain fatty acid receptor GPR40 agonist GW9508 by using intracerebroventricular administration
○西中崇¹, 山下琢矢², 中本 賀寿夫¹, 万倉三正³, 小山豊³, 糟谷史代², 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学
²神戸学院大学 薬学部 毒性学
³備前化成株式会社
⁴大阪大谷大学 薬学部 薬理学

- P-19 幼少期飼育環境ストレスによる情動機能の障害が神経障害性疼痛に及ぼす影響
Influence of the functional impairment of emotion by the rearing environment stress in early life on neuropathic pain
 ○ 木下恵, 西中崇, 相澤風花, 中本賀寿夫, 徳山尚吾
 神戸学院大学 薬学部 臨床薬学
- P-20 コエンザイム Q10 による培養皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響
Effect of coenzyme Q10 on collagen production of cultured skin fibroblast cells
 ○ 峯 幸稔¹, 松本 篤¹, 北條 重文¹, 奥野 正顕¹, 高橋 隆幸¹, 峯村 剛², 八幡 信広², 岡本 正志¹
¹神戸学院大学 薬学部 生化学研究室
²日清ファルマ株式会社 健康科学研究所
- P-21 コエンザイム Q10 の栄養学的評価
 –(1)魚類中のコエンザイム Q 同族体分布–
Nutritional evaluation of coenzyme Q10
 –(1)Distribution of coenzyme Q homologs in fishes–
 ○北條 重文, 松本 篤, 峯 幸稔, 奥野 正顕, 高橋 隆幸, 岡本 正志
 神戸学院大学 薬学部 生化学研究室
- 15:20~15:30 休憩
 一般演題口頭発表
 (座長：李 英培)
- 15:30~15:45
 (O-7) 2013 年度 研究活動の総括
 –基礎研究からの発信を臨床に還元するには?–
Generalization of the research activities 2013
 – From basic research to clinical application –
 ○徳山尚吾
 神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
- 15:45~16:00
 (O-8) カリックス[4]チアクラウンの合成とクラウン部位の硫黄原子数に依存する水銀イオン(II)との錯体挙動
Synthesis of *p-tert-butylcalix*[4]thiacrowns exhibiting sulfur number-dependent complexation with mercury(II) ion
 ○瀧本竜哉¹, 津江広人², 高橋弘樹², 田村 類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
²京都大学大学院 人間環境研究科
- 16:00~16:10 休憩

16:10～17:10 特別講演 2 (座長：徳山尚吾)

痛み・しびれの発生とその慢性化機構

京都大学医学部附属病院 薬剤部
准教授 中川貴之先生

17:10 閉会の挨拶 LSC 運営委員長 李 英培

* 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・採択研究課題

ナノ粒子の微生物細胞への付着・取込現象の解明

野村 俊之

大阪府立大学大学院 工学研究科 化学工学分野

現在、ナノテクノロジーの急速な進歩により、ナノ粒子が応用された製品が多数市販されている。ナノ粒子の環境中への放出を製造段階で抑制することは可能である。しかし、消費者が製品を使用する段階で、環境中への拡散を抑制することや分離回収することは極めて困難である。環境中に排出されたナノ粒子とその溶出イオンは、水中および土壌中を經由して微生物・植物細胞に取り込まれ、その機能に悪影響を与えることが危惧される。さらに、何らかの機能障害を受けた生体を他の生物が摂取して食物連鎖内に取り込まれると、人間を含めた上位の生物に伝播して濃縮され、生態系にダメージを与えることが懸念される。しかし、工業的に製造されたナノ粒子は、生体影響や潜在的なリスクに関する知見が不十分なまま使用されており、環境中に拡散・蓄積されたナノ粒子が生態系に及ぼすメカニズムの解明は社会的急務である。

ナノ粒子はたとえ組成が同じものでも、粒子径、凝集性、形状、官能基、帯電性、比表面積などの多様性を有している。一方、生物も細胞構造や進化過程により多種多様に分類されるため、ナノ粒子の環境毒性は、化学物質のように1対1対応させることが困難である。そのため、ナノ粒子が生態系に及ぼすリスクに関する知見は圧倒的に不足しているのが現状である。このような背景から、我々は、食物連鎖の底辺を支える微生物や植物に対するナノ粒子の毒性影響の解明と生態系に及ぼすリスク評価を重要課題と位置づけ、ナノ粒子の動的挙動に関わる物理化学的特性を中心としたコロイド科学的側面から検討を行っている。

本講演では、原核生物のモデル微生物である大腸菌、真核生物のモデル微生物である酵母をモデル細胞として、種々の表面修飾を施したラテックスナノ粒子の毒性評価に関するこれまでの研究成果を中心に紹介する。一般的に、微生物細胞の表面は負に帯電しており、正帯電のナノ粒子を暴露すると、静電引力によりナノ粒子は細胞表面に密に付着して、細胞死を誘発することを明らかにした。一方、細胞壁を持つ酵母を生理食塩水で正帯電ナノ粒子に暴露すると、通常は困難と考えられていたナノ粒子の細胞内への取込が起こって毒性が回避されることを、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)に用いた直接観察によって初めて明らかにした。本研究で得られた知見は、より複雑な上位生物へのナノリスクの理解、安全・安心なナノ粒子の開発に役立つだけでなく、ナノ粒子の細胞への作用機構を理解して、その付着・取込現象を制御できれば、農業、医療分野などへの応用が期待できる。

痛み・しびれの発生とその慢性化機構

中川 貴之

京都大学医学部附属病院・薬剤部

京都大学大学院薬学研究科・生体機能解析学分野

2010年に行われた大規模調査によると、日本成人の4.4人に1人にあたる約2,300万人が何らかの慢性的な痛みを訴え、そのうち約7割が、痛みが満足いく程度に緩和されておらず、新しい治療法があれば試みてみたいと考えているという。現在、国内でも様々な疼痛に対するガイドラインが作製され、がん性疼痛/非がん性慢性疼痛に対する各種鎮痛薬の使用法も整理されてきた。にもかかわらず、神経障害性疼痛など既存の鎮痛薬に対して抵抗性を示す難治性の慢性疼痛も少なからず存在し、依然として疼痛はアンメット・ニーズの高い領域である。一方、現在、用いられている鎮痛薬の多くは対症療法的な薬物であり、長期間持続する痛みの発生や慢性化を「治療」できる薬物は現在のところ存在しない。従って、慢性疼痛の病態を根本的に治療できる「慢性疼痛治療薬」が切望されており、そのためには、痛みの発生やその慢性化機構を解明する必要がある。

痛みは、熱/冷刺激、圧刺激、化学刺激など組織に障害を与えうる刺激(侵害刺激)が加わることにより発生するが、その刺激を受容する侵害受容器の分子実体が近年、明らかとなってきた。その多くはTRPチャンネルと呼ばれるCa²⁺透過性の非選択的カチオンチャンネルであり、様々な温度、圧、化学物質などにより開口し、感覚神経に活動電位を発生させる。このように、一次感覚神経末端で発生した痛覚情報は、脊髄へと入力され、脊髄後角神経によりさらに上位脳へと伝達され、はじめて痛みとして認識される。慢性疼痛は、急性疼痛とは異なり、これら痛覚の発生、伝達/抑制経路が過敏化した慢性疾患であり、その原因として、痛覚伝達に関与する末梢神経系および中枢神経系の免疫系細胞/グリア細胞による神経炎症応答が深く関与することが明らかとなってきた。このように、近年、慢性疼痛の発症機序の解明が進み、TRPチャンネルなど侵害受容器の分子実体の解明、末梢性/中枢性感作の概念、免疫系細胞/グリア細胞による痛覚情報伝達機構の神経炎症性修飾など、多くの新規知見が得られるに至り、これらの情報から新たな作用機序を持つ次世代鎮痛薬の開発も進められているところである。本講演では、これら疼痛研究の最新知見について、我々の知見も踏まえて概説する。

一方、しびれという感覚は、正座を崩した直後などに生じる誰しもが経験したことのある不愉快な感覚であり、異常感覚(錯感覚)や感覚鈍麻などを伴う。また、がん化学療法時や閉塞性末梢動脈疾患、糖尿病性神経障害、坐骨神経痛、脱髄性疾患など様々な疾患にも付随し、患者の日常生活に与える影響は大きい。しかしながら、現在、しびれ動物モデルは確立されておらず、その発症機構は全く理解されていない。我々は、疼痛研究を進めていく中で、しびれという痛みとは似て異なる感覚に興味を持ち、現在、動物モデル作製から検討を始めている。本講演では、しびれの正体とその発症機構解明へ向けた我々の取り組みについても紹介したい。

シリカ粒子によるマウス多形核白血球の機能変化

○村山可菜実, 榎本理世, 吉田博, 李英培

神戸学院大学薬学部薬理学研究室

多形核白血球は、細胞質に顆粒を含むことから顆粒球とも呼ばれており、好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞がある。顆粒球のうち、90%以上は好中球で占められる。私たちの研究室では、マウス尾静脈より投与したシリカ粒子の体内挙動について *in vivo* および *ex vivo* イメージングで調べており、シリカ粒子が脾臓および肝臓に集積することを明らかにした。尾静脈投与より血液中に入ったシリカ粒子は、最初に循環血液中に存在する好中球と接触する。また、好中球は血液中だけでなく、血管壁や脾臓にも多数存在することが知られている。好中球の生体内での主な役割は、細菌などの外来異物の貪食処理による生体防御であり、好中球は異物を貪食処理するための機構として高い走化能と貪食能を有している。好中球を含む古い血液細胞や血液中の死細胞は、脾臓で分解処理されることから、本研究では、脾臓へのシリカ粒子の集積における好中球の関与の有無を明らかにするため、多形核白血球を採取し、シリカ粒子を反応させて、種々の検討を行った。

粒子径 100 nm および 1000 nm の蛍光シリカ粒子を種々の量で多形核白血球に添加し、その貪食活性を調べた。粒子添加量の増加に伴って、粒子を貪食した細胞の割合が増加した。粒子との接触時間に依存して、粒子を貪食した細胞が増加することもわかった。つぎに、シリカ粒子の貪食が、好中球の代表的な機能の一つである走化能にどのような影響を及ぼすかについても検討した。好中球は細菌や損傷した細胞から放出される化学物質（走化因子）に向かって遊走することが知られている。そこで、多形核白血球を合成ペプチドの f-Met-Leu-Phe (fMLP) で刺激したときにみられる走化性が、1000 nm のシリカ粒子貪食により、どのように変化するかを測定した。fMLP を添加していないときの多形核白血球の遊走には、シリカ粒子貪食の影響は認められなかった。一方、シリカ粒子を貪食した多形核白血球では、走化因子の刺激による遊走が抑制されることが明らかとなった。

以上より、好中球がシリカ粒子を貪食すること、ならびに、シリカ粒子の貪食が好中球の走化性を抑制することが明らかとなった。尾静脈投与されたシリカ粒子の脾臓への集積は、シリカ粒子を貪食した好中球が機能不全に陥り、適切に処理されるために脾臓に集積し、留まっていることが原因の一つであると考えられた。

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

○安藤 徹¹, 多治川 哲平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 (BNCT) は, ^{10}B による熱中性子捕捉反応で生ずる α 線を利用して腫瘍を殺傷するがん治療法である. BNCT では腫瘍内の ^{10}B 濃度が治療効果の発現に重要であり, ^{10}B の場合, $20 \mu\text{g/g wet tissue (ppm)}$ 以上が必要とされ, 腫瘍内で ^{10}B をより高濃度で蓄積・保持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) 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 自体が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) を用いた湿式混合粉碎により BPA-NS が調製可能であること, 担がん動物への腫瘍内直接投与によって高度に腫瘍内で滞留することを示してきた. 本検討では, BPA-NS の粒子径を変化させることによって, 腫瘍内滞留の濃度・時間を制御できるのではないかと考え, 異なる粒子径を持つ BPA-NS の調製と評価を行った.

【方法】異なる粒子径を持つ BPA-NS は, 回転速度や粉碎媒体を変えた遊星ボールミルによる湿式混合粉碎法で調製した. 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た. B16F10 細胞をマウスの右臀部に皮下移植した担がんモデル, さらに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. BPA-NS ならびに BPA-Fr (L-BPA のフルクトース錯体水溶液) をのう胞モデルの腫瘍内へ直接投与した. 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 法により測定した.

【結果・考察】BPA-NS の平均粒子径はそれぞれ 183 nm, 358 nm であった. のう胞モデルへの BPA-NS 腫瘍内直接投与後の動態は 3 製剤ともに投与 5 分後には 290 ppm 以上と高度な滞留を示した. その後, 溶液製剤である BPA-Fr は投与 6 時間後に 29.3 ppm で投与 5 分後の 10%程度の保持であったのに対して, BPA-NS-183 は 108.7 ppm で 61%, NS-358 は 284.3 ppm で 80%の保持と BPA-Fr より長時間, 高度に腫瘍内で滞留し, 腫瘍組織内での固体粒子としての動態特性が反映した結果が得られた. また, BPA-NS 間での動態の違いについては粒子径や溶解速度が関係していると考えられる. 腫瘍血管壁に存在する間隙は 100—200 nm とされる. そのため, NS-183 では, 血管壁間隙を通過し, 腫瘍組織から血管への流出が起りやすい可能性がある. 一方, NS-358 では, 間隙より大きい粒子が大部分を占め, さらに NS-183 よりも溶解が緩やかに進行する可能性があるため, 投与 6 時間後においても高い腫瘍内滞留性を示したと考えられる. これらの結果は, 製剤の粒子径が腫瘍内直接投与後の腫瘍内における挙動をコントロールできる可能性を示唆した.

生体材料の表面改質とその細胞接着性の直接 AFM 測定

○新戸 浩幸, 織田 真由美, 深澤 智典
 京都大学工学研究科化学工学専攻

バイオマテリアルなどの人工材料表面への細胞接着は、物理化学的な相互作用のみならず、生物学的な作用も関与する極めて複雑な現象である。この生物学的な作用とは、細胞膜上に存在する細胞接着分子(インテグリン)を介した細胞接着機構のことを指し、細胞接着に重要な役割を果たしている。インテグリンは、細胞外基質(フィブロネクチン、ヴィトロネクチンなど)中に含まれる RGD (アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列を特異的に認識し、結合することが知られている。

本研究では、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy、以下 AFM)を用いて、タンパクまたは人工物質を吸着させ表面改質した粒子表面と細胞表面の相互作用力を測定することにより、生物学的な結合と物理化学的な結合について検討した。

標的細胞として、マウス由来メラノーマ B16F10 を用いた。モデル粒子として、直径 6 μm のカルボキシ修飾ポリスチレン(PS-COOH)球を用いた。材料-生細胞間接着力に寄与する生物学的な結合力と物理化学的な結合力を定量的に評価するため、生物由来タンパクとしてウシ血清アルブミン(BSA)・フィブロネクチン(FN)・ラミニン(LN)、人工物質として Polyethyleneimine (PEI)を用いた。

Fig. 1 に、AFM 測定から得られる典型的なフォースカーブを示す。Fig. 2 に、表面改質された PS-COOH 球の接着力(F_{adh})を示す。BSA(生物的に不活性なタンパク)では、表面改質前後で接着力に有意差はなかった。一方、FN・LN・PEI のいずれかで表面改質した場合、改質前に比べて接着力が2~3倍になった。阻害剤(RGD)を添加した場合、PEIでは高い接着力を維持している一方、FNとLNでは接着力が低下した。偽阻害剤(DGR)を添加した場合、FNの接着力が無添加の場合と同様に高かったことから、FNと細胞の接着はインテグリンを介した生物特有の接着であることが示された。LNの接着力は偽阻害剤の添加により低下した。これは偽阻害剤を加えることによる影響(pHの微妙な変化など)、LNの構造もしくは細胞内のLNと相互作用する部分は何らかの影響を受けたためであると考えられる。PEIでは、(偽)阻害剤の有無に関わらず接着力が大きいままであったことから、生物学的な接着ではなく、物理化学的な接着であることが示された。

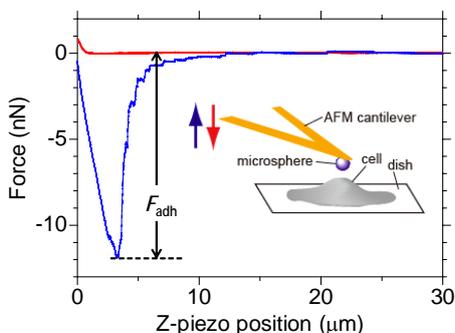


Fig. 1 FN吸着PS-COOH球-B16F10細胞間の相互作用曲線(接触時間 = 5 min)

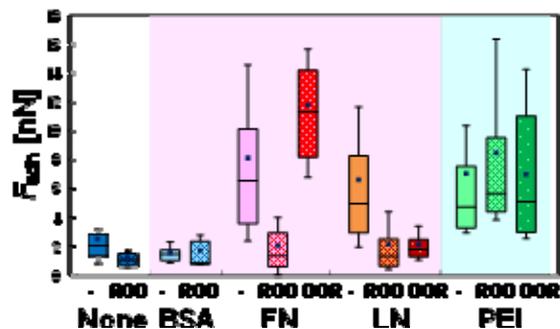


Fig. 2 PS-COOH 球-B16F10 細胞間の接着力に及ぼす表面改質剤の種類、(偽)阻害剤添加の影響

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
-GFP 基質パネルを用いた細菌由来タンパク転移酵素 Sortase A の
ペプチド転移反応の至適化とその応用に向けて-

○田端厚之¹, 安養寺夏希¹, 大久保行将¹, 北條恵子², 水品善之³, 友安俊文¹,
長宗秀明¹

¹徳島大学大学院 ソシオテクノサイエンス研究部

²神戸学院大学 薬学部 薬品分子化学研究室

³神戸学院大学 栄養学部 食・健康学部門

【背景・目的】我々は、細菌由来の機能性タンパク質の応用に関する検討を展開している。本年度は、昨年度に引き続いてペプチド転移酵素である sortase A (SrtA) を利用したリポソームなどのナノ粒子の表面加工システムの開発やその応用を目指し、そのための SrtA のペプチド転移反応の至適化に関する検討を行った。まず指標タンパク質の GFP に SrtA の認識配列を融合発現させた GFP 基質パネルを用い、黄色ブドウ球菌由来の SrtA (SrtA^{Sau}) の反応条件や転移基質の認識特性に関する検討を行った。また、他のグラム陽性細菌由来の SrtA についても発現系の構築を行い、その反応特性について GFP 基質パネルを用いて評価を行った。さらに、SrtA によるペプチド転移反応のリポソーム表面加工への応用のため、ペプチド転移の受容基質となるペプチド化脂質分子の開発のための候補分子を設計・合成し、その転移反応性の検討を行った。

【結果・考察】まず、作製した GFP 基質パネルを用いて、SrtA^{Sau} のペプチド転移反応条件の至適化に関する検討を行った。その結果、SrtA^{Sau} のペプチド転移反応は中性から弱酸性の pH 範囲で高い効率が確認され、転移させる基質タンパク質やリポソームの安定性を考慮して pH6.5 での反応が適切と考えた。また、転移配列モチーフ LPXTG の認識性については、X 位に常用される E とは逆荷電を持つ陽性荷電アミノ酸を持つ転移基質で優れた反応性が観察された。また、他菌種由来の SrtA についても上記と同じシステムで評価した結果、化膿性連鎖球菌由来 SrtA (SrtA^{Spy}) では、X 位は陽性荷電アミノ酸だけでなく疎水性アミノ酸でも高い反応性を示し、SrtA の由来菌種により転移配列モチーフの認識に異なる傾向が確認された。最後に、スペーサーの異なる数種のペプチド化脂質分子に対するペプチド転移反応を評価した結果、H-G₆SGGK (Pal) において転移が観察されたが、その転移効率にはさらなる改善の必要性が見受けられた。現在、上記の様々な検討結果を踏まえた上で、SrtA による転移効率のさらなる向上に向けて検討を継続している。本研究により得られた知見を利用して、SrtA を用いた DDS 用リポソームなどの表面加工技術への応用展開へと発展させていく予定である。

クルクミンとクルクミン内包リピッドエマルションの生理活性比較

栗山磯子¹, ○水品善之¹, 吉田弘美¹, 安藤徹², 市川秀喜²

¹栄養学部 食・健康学部門, ²薬学部 製剤学研究室

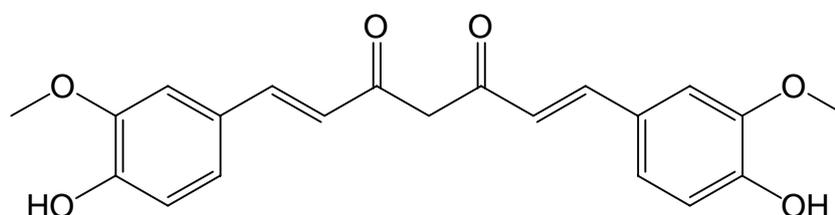
【目的】 哺乳類の DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ, pol と略す) は、15 種類の分子種が存在しており、各 pol 分子種が DNA の複製 (コピー)・修復・組換えを分業している。食品素材や栄養素から哺乳類 pol 分子種選択的阻害物質を見いだして、それを分子プローブとして用いることによる化学的ノックアウト解析および新しい生理活性 (健康機能性) の提唱を目指している。その中で、食品の黄色色素として知られているクルクミン【図 1】が DNA 修復・組換え型の pol λ を特異的に阻害活性することを見いだした^(1, 2)。クルクミンには抗炎症活性があることが知られているため、クルクミンによる pol λ 阻害活性に基づいた抗炎症活性の作用機序が推測される。

しかしながら、クルクミンは水には不溶な疎水性 (親油性) 物質であるため、生体内への投与が難しく扱づらい。そこで、クルクミンを内包したリピッドエマルションを作製して、クルクミンの懸濁液やナノサスペンションとの生理活性を比較した。

【方法】 pol 活性測定は定法に従った。リポ多糖 (LPS) で刺激したマウス・マクロファージ (RAW264.7 cells) が産生する TNF- α 量は ELISA 法で測定した。マウス受身皮膚アナフィラキシー反応 (PCA) による抗アレルギー活性は、常法に従った。

クルクミンを内包したリピッドエマルションは、クルクミンに大豆油、卵黄レシチン、Tween-80 を混合して、粒子径が 50 nm と 200 nm の 2 種類を作製した。

【結果と考察】 ①pol λ 阻害活性、②マクロファージ TNF- α 産生抑制活性、③マウス PCA 反応による抗アレルギー活性ともに、クルクミン内包リピッドエマルションの方がクルクミンの懸濁液やナノサスペンションよりも強い活性を示した。クルクミン内包リピッドエマルションの粒子径は、200 nm の方が 50 nm よりも活性が強かった。リピッドエマルションはクルクミンの生理活性を高めることが示唆された。



【図 1】クルクミンの構造

(1) Y.Mizushina *et al.* (2003) *Biochem. Pharmacol.* 66, 1935-1944.

(2) T.Takeuchi, Y.Mizushina *et al.* (2006) *Genes Cells* 11, 223-235.

活性中心指向性プラスミン阻害剤の探索

日高興士^{1,2}, 合田圭吾³, 手納直規⁴, 和中敬子⁵, ○津田裕子^{1,2}

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,
関西分子設計研究会, ⁴広島国際大学薬学部, ⁵血栓止血研究神戸プロジェクト

プラスミン(PL)は線溶系の中心的役割を果たす酵素として知られている。白血病や再生不良性貧血などに伴い出血傾向にある時や、手術中ならびに手術後の異常出血時には線溶系が活性化され、PL が過剰に産生される。線溶系の活性化による出血をコントロールするために臨床現場では、PL 阻害剤であるアプロチニン、トラネキサム酸 (Tra)、イプシロンアミノカプロン酸(EACA) が汎用されている。「PL=線溶」という図式が一般的であるが、PL はフィブリン分解作用による線溶への関与以外にも、たとえばマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の活性化によるガンの転移や浸潤への関与、また炎症反応にも関与していることが古くから知られている。PL 阻害剤は、病態時の PL の多機能性を解明する有用なツールとなるとともに、その病態を改善する治療薬にもなり得るものと考え、我々のグループでは新規の PL 阻害開発に取り組んでいる。

臨床的に汎用されている PL 阻害剤は(1) LBS (lysine binding sites) 指向型阻害剤と (2) 活性中心指向性阻害剤に大別され、前者は PL 上の LBS に結合することによりフィブリンへの結合を妨げ、結果的に PL によるフィブリン分解を阻害する。Tra や EACA は (1) に分類される。後者は PL の活性中心に直接結合して PL 活性を阻害するもので、アプロチニンがこれにあたる。PL の多様な作用を制御するためには後者が有効であると考えて、我々は活性中心指向性阻害剤の開発を進め、Y0-2 ($IC_{50}=0.53 \mu\text{M}$ for PL)を得ている [1]。Y0-2 は Tra、Tyr(ϕ Pic)、octylamine の 3 つの部分からなっている。ドッキング研究により、(a) Tra のアミノ基は S1 サイトの Asp735 と相互作用し、(b) Tyr(ϕ Pic)は S2 サイトの壁に沿って延びており、(c) オクチル基は疎水性に富んだトンネル状の S1' サイトと相互作用していることを明らかにした [2]。これらの情報を基に P1'、P1、P2 の修飾によるペプチド性 PL 阻害剤の合成、および 非ペプチド性 PL 阻害剤の開発を進めているが、本発表では P2 の修飾による PL 阻害剤の探索を紹介する。

最後に、Y0-2 を用いて線溶系以外での PL 活性を制御できる例を示す。

2013 年度 研究活動の総括

- 基礎研究からの発信を臨床に還元するには? -

徳山尚吾

神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室

我々はある種の神経精神疾患に焦点を当て、それらの発症機序の解明を目指して、日々活動を行っている。ここでは、本年度に実施した内容についてその概要を紹介する。

・GPR 40 を介する疼痛制御機構の解明

長鎖不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) が、その脳内受容体である GPR40 を介して、 β -エンドルフィンの産生・遊離を促進し、難治性疼痛の制御機構に重要な役割をしていることを世界に先駆けて提唱してきた。今年度は慢性疼痛の発症機序において、視床下部領域での GPR40 タンパク質の一過性の発現増加が、脳内アストロサイトの活性化や脳内遊離脂肪酸の変動を促すことが重要な役割を果たすことを報告した (Nakamoto et al., PLoS One, 2013)。興味あることに、うつ病などの発症においても、GPR 40 が新たな機序となりうる可能性を見い出した (Nishinaka et al., J. Pharmacol. Sci., revised)。さらに、脳卒中の後遺症の 1 つである脳卒中後疼痛の発症および制御機構に GPR40 が関与する可能性も明らかにした (Brain Res. in preparation)。

・P-glycoprotein を介するモルヒネによる鎮痛作用の影響

抗がん剤 Etoposide (ETP) の反復経口投与が、小腸において足場タンパク質 ezrin/radixin/moesin (ERM) の活性化 (特に, radixin) を介し、P-glycoprotein (P-gp) の発現量を増加させ、モルヒネ等の基質薬物の効果を減弱させることを報告した (Kobori et al., J. Pharm. Sci., 2013; Kobori et al., Biol. Pharm. Bull., 2013)。

・情動変化が疼痛制御機構に及ぼす影響、その他

幼少期における強度のストレス負荷によって、成熟期の疼痛制御機構を破綻させる可能性を明らかにした (Nishinaka et al., Physiol. Behav., submitted)。さらに、モルヒネの鎮痛耐性形成機構における脳内グリア細胞の関与についても報告した (Harada et al., Life Sci., 2013)、

・耐糖能障害による脳血管障害増悪機序の解明

脳虚血後の肝臓などにおける糖新生の亢進による血糖値上昇は、脳からの神経支配によって制御されることを明らかにした (Harada et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 2013; Harada et al., PLoS One, submitted)。さらに、脳虚血後の高血糖によって誘導される神経障害の増悪に脳内 sodium-glucose transporter (SGLT) が関与する知見も見い出した (Harada et al., Brain Res., 2013; Yamazaki et al., Neuroscience, submitted)。一方、予防戦略の観点からは、生薬天然物としてチョロギ、イチョウ葉を用いて、これらが脳卒中の予防に効果があることを確認した (Harada et al., J. Pharm. Pharmacol., submitted)。

以上のように、我々は臨床現場における問題点を基盤とした基礎研究を行っている。しかしながら、臨床への還元については、未だ殆ど貢献していないとの思いがある。日々の研究が一方向的な発信に留まらず、臨床との接点を見据えながら遂行していける様、今後も精進していきたい。

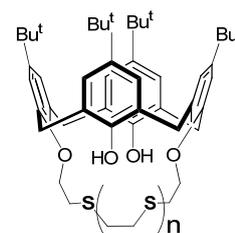
カリックス [4] チアクラウンの合成とクラウン部位の硫黄原子数に依存する水銀イオン(II)との錯体挙動

○瀧本竜哉¹、津江広人²、高橋弘樹²、田村 類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

²京都大学大学院 人間・環境学研究科 分子環境相関論

【緒言】 これまでに我々は、カリックスアレーン誘導体を吸着剤として用い、水環境中の有機・無機系汚染物質の吸着能について報告してきた。今回、水銀(II)イオンの吸着能の向上を目指し、硫黄原子をクラウン部位へ導入し(Fig. 1)、化合物 **1**, **2** と水銀(II)イオンとの錯体挙動を ¹H-NMR により追跡したので以下報告する。



1: n = 1, **2**: n = 2

Fig. 1. calix[4]thiacrowns

【方法】 ピクリン酸水銀 (Pic₂Hg) と calix[4]thiacrowns **1**, **2** を合成し、Pic₂Hg と化合物 **1** または **2** を CDCl₃ 溶液中に共存後、各化合物の ¹H-NMR スペクトルの変化を追跡した。(各化合物の濃度は 0.5 mM)。

【結果】 Figure 2 に示したように、化合物 **2** において水銀イオン共存下、クラウン部位のシグナルに大きな変化がみられた。本結果より、化合物 **2** は水銀イオンと主にクラウン部位で結合することが分かる。また、同条件下において、化合物 **1** にはシグナルの変化がほぼみられないため、水銀イオンを捕捉する因子として、クラウン部位の環サイズ、または硫黄原子数が考えられた。本講演においては、calix[4]thiacrown の合成及び構造についても併せて報告する予定である。

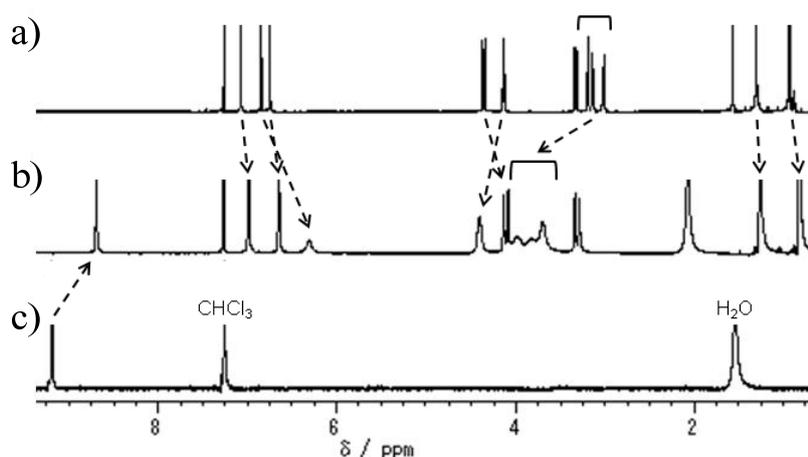


Fig. 2. ¹H-NMR spectra of calix[4]thiacrown **2** in the (a) absence and (b) presence of mercury(II) picrate in CDCl₃. (c) That of mercury(II) picrate.

貪食微粒子の細胞内局在

○鶴田裕文, 遠藤由里香, 塚本拓也, 丸岡由貴, 榎本理世, 李英培
神戸学院大学薬学部薬理学研究室

生体内でのマクロファージの主な機能の一つは外来異物や死細胞を貪食し、適切に処理することである。貪食された異物はファゴソームと呼ばれる細胞内小胞に取り込まれ、リソソームと融合し、ファゴリソソームを形成する。その後、内容物はリソソーム酵素により消化される。これまでの検討により、マクロファージが種々の粒子径のシリカ粒子やポリスチレン粒子を貪食することが明らかとなっている。しかしながら、シリカやポリスチレン基材の粒子が、リソソーム酵素による消化を受けるとは考えにくく、貪食後の粒子の挙動については不明な点が多い。そこで今回、マクロファージに貪食されたシリカ粒子やポリスチレン粒子が細胞内のどこに局在するかやリソソームへの影響、細胞障害の発生機構などについて調べた。

シリカ粒子やポリスチレン粒子がリソソームに局在するかどうかをあきらかにするため、蛍光微粒子を貪食させたマクロファージを、リソソームに特異的な蛍光色素である LysoTracker で染色した。その結果、微粒子の蛍光と LysoTracker の蛍光の共局在が観察され、微粒子のリソソームへの移動が明らかとなった。貪食されたシリカ粒子がマクロファージのリソソームにどのような影響を及ぼすかについても調べた。シリカ粒子を貪食したマクロファージでは、コントロールのマクロファージと比較して、リソソーム酵素の一つであるスルファターゼ活性の低下が認められた。シリカ粒子貪食が、他の細胞小器官の一つであるミトコンドリアに対して影響を及ぼすかどうかについても調べた。ミトコンドリアは、細胞のエネルギー産生の場であり、アポトーシス時に機能不全となることが知られている。シリカ粒子の貪食により、逸脱酵素である乳酸脱水素酵素の細胞外への漏出が起こることをすでに見いだしていたが、今回の検討により、ミトコンドリア膜電位の低下も確認された。ミトコンドリア膜電位の低下は、アポトーシスで見られる細胞機能変化の一つであることから、シリカ粒子はマクロファージにアポトーシス様の細胞障害を誘発する可能性が示された。一方で、シリカ粒子は炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン 1- β 産生を促進するという結果も得ており、アポトーシスとは別の機構でも細胞死が起こっている可能性がある。今後は、リソソームの機能変化と細胞障害の関連性などを明らかにしていく予定である。

ナノパーティクルによる血管弛緩はPI3 キナーゼ系を介する

○笹原智也、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

ナノパーティクルは、日用品、食品添加物や医薬品など様々な分野で使用されており、成体に直接塗布、あるいは摂取されるものにも含まれている。様々な形で、生体に適用されたナノパーティクルの一部は、血管内へと吸収され様々な組織に浸透するものと考えられる。特に、粒子径の小さなナノパーティクルは、非特異的に組織へ移行し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、ナノパーティクルの血管系へと進入した場合の血管系への影響を知る目的で、摘出血管並びに細胞を用いて検討を行った。

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 μ M を加え、収縮に対するナノパーティクルの影響を検討したところ、収縮は認められなかった。次に、予めフェニレフリンで収縮させたリング標本に、ナノシリカを添加し弛緩に対する影響を検討したところ、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 による弛緩は、血管リング標本に添加した nSP 70 の用量に依存していた。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) を用いて検討したところ、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。以上の結果より、ナノパーティク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。そこで、nSP 70 により eNOS の活性化がおこるかをウシ大動脈内皮細胞を用いて検討したところ、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 により eNOS のリン酸化が亢進していた。さらに、eNOS の活性化に Akt が関与するかについて検討したところ、nSP 70 は、Akt のリン酸化も亢進させた。さらに、Akt、eNOS のリン酸化は、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) の阻害薬、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、PI3K/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。

C7orf24 (U7) の酵素活性を阻害するジペプチド型抗癌剤の設計

○日高興士¹, 西澤庸介¹, 飯居宏美², 吉貴達寛², 吉矢拓³, 西内祐二³, 津田裕子¹

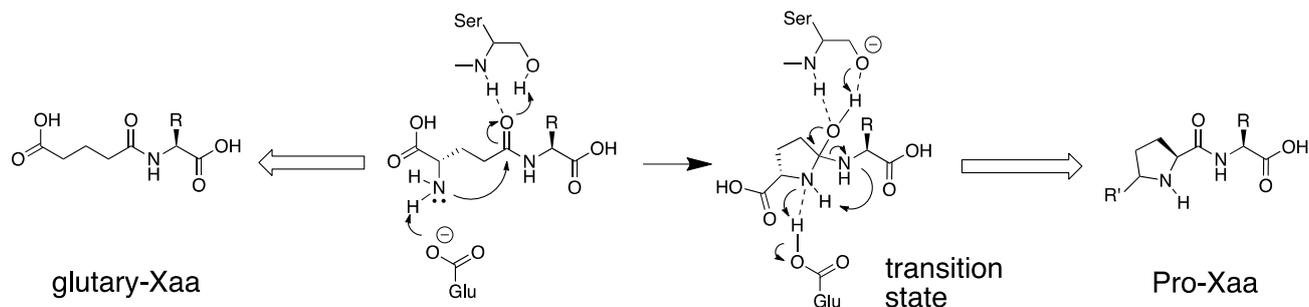
¹神戸学院大学 薬学部 薬品化学研究室 ²京都薬科大学 臨床腫瘍学分野

³株式会社ペプチド研究所

C7orf24(別名 U7)は尿路上皮癌組織より同定されたヒト第7染色体上の遺伝子産物であり[1]、各種癌組織で高発現していることが報告されている。C7orf24(U7)の特異的 siRNA は正常細胞に対する毒性がほとんどなく、癌細胞に対して増殖抑制作用があることから抗癌剤の標的として有望である。その C7orf24(U7)は近年、 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) と同一物であることが判明したことから、我々は GGCT 活性を阻害するペプチド型分子を設計して新規抗癌剤の創出を目指した。

GGCT の反応機構では、活性中心の Glu98 側鎖が基質の γ -グルタミルアミノ酸のアミノ基を活性化させ、分子内でカルボニル基への求核攻撃がおこる。生成するオキシアニオンは Ser24 残基により安定化され遷移状態を形成し、次いでピログルタミン酸とアミノ酸へと分解する。そこで、阻害剤として基質遷移状態の五員環を模倣した Pro-Xaa ジペプチド、分子内求核攻撃の原因であるアミノ基を除去したグルタリルアミノ酸を設計し、合成した。

酵素アッセイ法として、基質分解後のアミノ酸を基に GPT と LDH を介した NADH の検出、そして基質と 2,3-naphthalenedicarboxaldehyde を付加させた蛍光物の検出を行ったところ、Pro-Xaa 誘導体は 1 mM において弱い GGCT 阻害活性 (<20%) を示す一方で、グルタリルアラニンには顕著な阻害活性を示した (50-70%)。しかし、これらのアッセイ方法では間接的に GGCT 活性を測定するために阻害の強弱が議論し難いことから、我々は GGCT による切断後に O-to-N アシル基転位反応を起こして蛍光を発する基質 LISA-4 を考案した[2]。LISA-4 は GGCT 酵素活性を直接検出できる点で非常に優れており、アッセイの結果からグルタリルグリシンが μM レベルの IC₅₀ 値を示すことが分かった。LISA のような基質は構造活性相関研究に有用であり、C7orf24(U7)の酵素活性と癌細胞増殖作用との関連を明らかにするプローブとしても期待される。



[1] Kageyama, S. et al., *Proteomics Clin. Appl.*, **1**, 192 (2007).

[2] Yoshiya, T. et al., *ChemBioChem*, **14**, 2110 (2013).

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：
脱アセチル化度の異なるキトサンナノ粒子の被覆が薬物放出挙動に及ぼす影響

○山崎万純，馬場隆文，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（CNP）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きた．これまでに，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，少量のCNPのスプレーコーティングによりその核粒子細孔を閉塞した構造を持つ微粒子製剤（CNP-HAp-MP）の調製と薬物放出制御を試みてきた．その結果，*in vitro* および *in vivo* においてCNP-HAp-MPが内包するモデルタンパクを2週間にわたり徐放化できることが分かった．今回は生分解性に影響することが知られているキトサンの脱アセチル化度（DD）を変化させたCNPを調製し，その*in vitro*，*in vivo*での放出挙動に及ぼす影響を評価した．

【方法】モデルタンパクとして，牛血清アルブミン（BSA）および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/FITC-BSA（BSA：FITC-BSA=9：1）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い，BSA/FITC-BSA 封入 HAp 粒子を得た．水系中和析出法により調製した DD=84.4%，92%，99% の CNP 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を行った後，分級を行うことで DD の異なる CNP-HAp-MP 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．*in vivo* における放出特性は，CNP-HAp-MP 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 CNP-HAp-MP 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/FITC-BSA の吸着率は各々 11.1 wt%，1.2 wt%（計 11.2 wt%）となった．CNP-HAp-MP の *in vitro* 放出試験の結果，14 日後における FITC-BSA の放出率は DD=84.4%，92%，99% において，各々 30%，34%，41% となった．一方，ラット皮下投与から 14 日後における FITC-BSA の放出率は各々 $64\pm 11\%$ ， $68\pm 17\%$ ， $80\pm 11\%$ となった．*in vitro*，*in vivo* 共に初期バーストが見られ，DD の増加に従って放出速度の増大が認められた．また初期バースト以降において，*in vitro* では薬物放出速度はほぼ一定であったのに対し，*in vivo* では徐々に増加が見られた．さらに，DD の増加に従って薬物放出速度も上昇することが示された．これは，Ikeda ら¹⁾によって DD が高いものほどより早い分解を受けると報告されていることから，本検討においても，DD の増加に従って CNP 粒子の分解が早まり，より高い放出速度で薬物が放出されたものと推察される．

1) Ikeda T. et al, *Oral Med Pathol.* 10, 131-138 (2005).

難水溶性薬物の腸散性製剤化とそのラット経口投与後の薬物吸収挙動の評価

○福田竜太， 大谷知奈美， 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、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、湿式混合粉碎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ション (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。これらのことから当研究室では、Nanosuspension Spray Coating System (NSCS) と称する固形微粒子製剤化法を考案した。本法に基づく製剤化では、モデル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、経口投与での薬物吸収性の改善は十二指腸への直接投与ほどには至らなかった。この原因の一つとして、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、腸溶性基材である Eudragit L30D-55[®] (EL, Evonik) を用いて“腸散性”微粒子製剤 (ED-MPs) の処方設計を行った結果、ED-MPs は、日局第2液中のみにおいて速やかな再分散性を示すことが分かった。そこで、本研究では、ED-MPs の *in vivo* および *in vitro* での薬物溶出と吸収挙動の評価を行った。

【方法】モデル薬物のグリベンクラミド (水に対する溶解度 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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碎することで NS 調製を行った。得られた NS と EL 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 ED-MPs 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 nm 前後、EL 添加後もほぼ同程度であり、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。日局第1液中における溶出試験では、EL の添加・非添加に関わらず、どちらの MPs も 2 時間後で 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の溶出量となった。これに対して、日局第2液中における溶出試験では、NS-MPs で 5-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ED-MPs で 40-45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と同時間における第1液よりも高い溶出量を示した。次に、ラットへの経口投与における GLI の吸収特性について比較検討を行ったところ、ED-MPs は NS-MPs に比べ投与 2 時間後の GLI 血中濃度が約 2 倍高い値を示した。これは、再分散試験や溶出試験で示された ED-MPs が持つ日局2液中での良好な分散特性に起因しているものと考えられる。また、投与初期における ED-MPs では GLI 血中濃度の急速な増加が見られた。これは、ED-MPs のマトリックス層の表面から薬物が一部速やかに放出・溶解しているためと推察される。以上の結果は、“腸散性”機能を有する ED-MPs 化が酸性薬物であるグリベンクラミドの経口吸収を改善するのに有効な手段であることを示唆した。

多孔性微粒子を核とする薬物放出制御型コーティング製剤の設計

○水谷瑤子, 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】近年, 服薬の利便性を追求した製剤の開発が盛んに行われている中, 粒子径が 100 μm 以下の微粒子へのコーティング技術の開発に対するニーズが高まっている. 当研究室では, 粒径が小さく効率の良い製造を企図して, 多孔性微粒子を核粒子に用いた放出制御型コーティング製剤の開発を試みている. 核粒子に多孔性微粒子を用いることで, 薬物を核粒子内部に封入させることができる. そのため, スプレーコーティング装置を用いて薬物被覆した後に徐放性基剤をコーティングする従来型の製剤と異なり, 薬物封入された核粒子にコーティングを行う提案型の製剤は, 細孔を塞ぐことが可能なコーティング量で放出制御効果が期待できる. また, 従来型より少量のコーティングで済めば, 粒径を小さく抑えられることから, 例えば, 口腔内崩壊錠などへの製剤ユニットとして広い応用範囲を見込める. 多孔性微粒子に薬物を封入する研究は以前からなされてきたが, 薬物被覆粒子と比較して, その薬物含量の低さが課題となっていた. この課題を克服するべく, 計 4 種類の高い多孔性を有する微粒子を試料として選び, 薬物溶液を用いて連続封入方法による薬物封入粒子の調製を試みた. さらに, その薬物放出制御製剤への一応用例として, Aquacoat[®] ECD を用いた流動層スプレーコーティングによる苦味マスキングの検討を行った.

【方法】苦味を持つモデル薬物として, プロメタジン塩酸塩を用いた. 核粒子には, 75-106 μm の多孔性微粒子であるノイシリン S1, フジカリン, 気孔率が 23% と 35% のヒドロキシアパタイト(HAp)を用いた. 薬物封入粒子は, プロメタジン塩酸塩の 50 v/v% 含水エタノール溶液(20 w/v%)を滴下法により核粒子内へ浸透させた後, 凍結乾燥して調製した. また, 薬物を 2 回封入する場合は同様の操作を繰り返した. 薬物含量は紫外可視吸光度計を用いて測定した. 粒子強度は, 試料とジルコニアビースをコンカルフラスコに入れて一定時間回転させ, 仕込み量に対する摩砕物(75 μm 以下)の割合にて評価した. Aquacoat[®] ECD を薬物封入粒子にドラフトチューブ付き噴流層装置で被覆し, 得られた粒子の粒子径分布と日局パドル法溶出試験による薬物溶出挙動を評価した.

【結果・考察】薬物含量は, 薬物を 2 回封入したノイシリン S1 が, 29.6% で最も高く, 次にフジカリンの 20.2%, 気孔率 35% HAp の 17.4%, 気孔率 23% HAp の 14.1% となった. なお, 封入効率は, いずれも 70% 近い値となった. 粒子強度はノイシリン S1 が 40% と最も強度が低く, 次に気孔率 35% HAp の 9.5%, フジカリンの 6.0%, 気孔率 23% HAp の 3.4% となった. 本検討では, 薬物含量と強度を考慮し, フジカリンでコーティング粒子の調製を行った. 溶出試験においては, コーティング率 10-20 wt% で放出初期にバーストが見られたことより, 核粒子表面の全ての細孔が完全に塞がってはいないことが示唆された. コーティング率 40 wt% レベル以上においては, 放出初期バーストに改善傾向が見られたものの, 1 分以内の薬物放出は 20% 以上であり, 理想とする短時間遅延放出制御には至らなかった. これは上記と同様に細孔が塞がっていないことに加えて, 薬物を封入する段階において, 薬物が核粒子内に限局されずに, 粒子表面にも付着残存していることに起因する可能性も考えられる. 粒子表面に対する薬物の付着を低減することにより, 低いコーティング率で薬物放出の抑制が達成される可能性が残されており, 引き続き検討を続けたい.

がん中性子捕捉療法における静脈投与型ガドリニウム含有 キトサンナノ粒子の表面改質後の特性評価

○重儀拓哉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

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

⁴⁾ JT 生命誌研究館

【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) などの熱中性子捕捉断面積 (エネルギー順位の低い熱中性子を捕捉する確率) の大きい元素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。これまでに、当研究室では、 ^{157}Gd を含む MRI 用造影剤の主成分であるガドペンテト酸 (Gd-DTPA) と生体適合性・分解性・粘膜付着性に優れる天然高分子のキトサンからなる Gd-NCT のための新しいナノキャリアとして Gd 含有キトサンナノ粒子 (Gd-nanoCP) の開発を進めてきた。従前の検討では、同量の Gd を含み、粒子径が 200 nm および 400 nm と異なる Gd-nanoCP での腫瘍内直接投与試験において、200 nm の粒子は 400 nm の粒子と比較して、1 粒子当たりの Gd 含量が低いが、腫瘍組織に蓄積される粒子数は多く、Gd-NCT を施行した結果、有意に腫瘍成長を抑制することが示された。しかし、腫瘍組織内での分布に均一性を欠くと考えられ、腫瘍細胞を完全に死滅させるには至っていないのが現状である。本研究では、腫瘍組織内における Gd の不均一分布の改善を図ることを目的として、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果を受けやすい 200 nm の Gd-nanoCP 粒子表面をレシチンおよび PEG-リン脂質で修飾した静脈内投与型 Gd-nanoCP の開発し、粒子分散安定性と担がん動物への静脈内投与後の体内動態に関する検討を行ったので報告する。

【実験】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。この薄膜に対してエマルジョン液滴融合法で調製した 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。さらに、B16F10 メラノーマ培養細胞における *in vitro* 評価ならびに B16F10 担がん動物への静脈内投与後の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。B16F10 を用いた細胞毒性評価において、双方の製剤ともに細胞の増殖能にほとんど影響は与えなかった。担がん動物への静脈内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 $46 \mu\text{g Gd/g wet tissue}$ に達した。これらの結果から、レシチンおよび PEG-リン脂質により表面被覆された Gd-nanoCP の特性を比較すると、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ことが分かった。

シリカナノ粒子による細胞膜破壊とその影響因子

○深澤 智典, 吉末 幸祐, 新戸 浩幸
 京都大学工学研究科化学工学専攻

近年、ナノメートルサイズの粒子が世界中の工場や研究室で盛んにつくられ、高度な機能をもつ材料、医薬品、化粧品、食品、農薬などに使用されている。一般にナノ粒子は、比表面積が極めて大きいため、高い表面活性・反応性を示すだけでなく、バルク体とは異なる特性をも示す。このため、ナノ粒子材料の生体曝露や環境放出による影響が問題になる可能性があり、このナノリスク問題を慎重に検討することが極めて重要になる。

研究では、性状の大きく異なる動物細胞（赤血球 RBC、浮遊性細胞 Jurkat、付着性細胞 B16F10 と J774.1）に対して、種々のサイズ・濃度のシリカ粒子を種々の環境下（4~37°Cの培養温度、血清添加の有無）で曝露し、これらの細胞の膜損傷を評価した。

各細胞に対して様々な粒子径のシリカ粒子を曝露した後、その膜損傷性を評価した。Fig. 1 に示すように、細胞毒性は細胞の種類によらず、粒子の表面積量という尺度で評価できる事が確認された。B16F10 と J774.1 についても、同様の傾向が見られた。

種々の温度で赤血球に粒子径 51 nm のシリカ粒子をそれぞれ 4 h 曝露し、その膜損傷性を評価した結果を、Fig. 2 に示す。どのサイズのシリカ粒子についても、培養温度が下がるにつれて膜損傷性は低下した。同様な傾向は、動物細胞 Jurkat と B16F10 でも見られた。

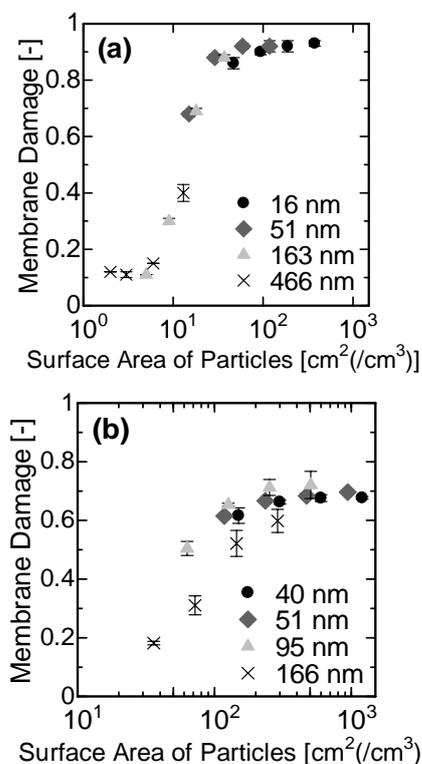


Fig. 1 膜損傷性に対する粒子総表面積量の影響:
 (a) Jurkat, $t_{exp} = 2$ h; (b) 赤血球, $t_{exp} = 4$ h.

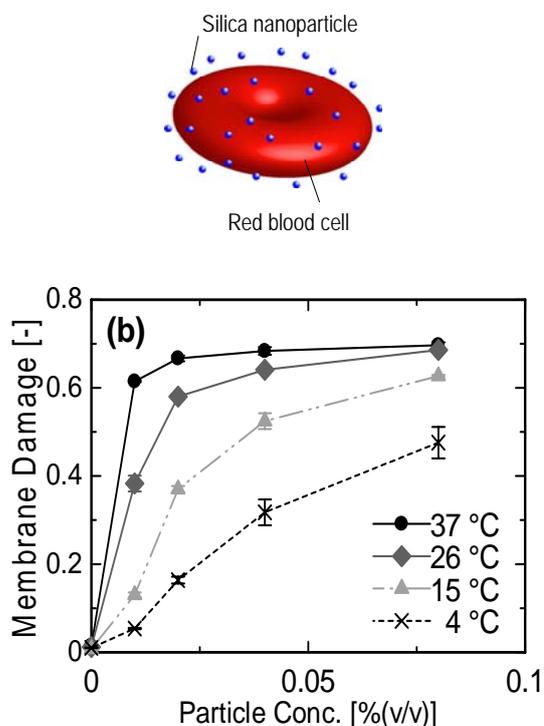


Fig. 2 赤血球の膜損傷性に対する温度の影響
 ($t_{exp} = 4$ h)

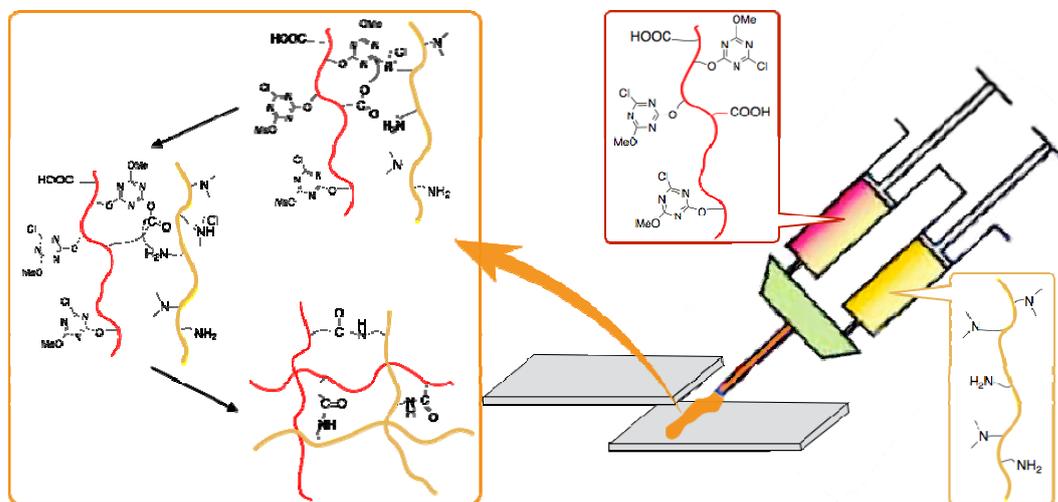
2種のポリマーの接触により開始される架橋形成反応と その接着剤としての可能性

○安倍一実, 山根麻緒, 日置和人
薬学部 機能分子化学研究室

我々は、水中でも効率よく脱水縮合反応を進行させる脱水縮合剤 DMT-MM の特性を応用し、それに関わる反応性基を2種類のポリマー上に意図的にちりばめ、両者の接触により始まるポリマー間のアミド結合を介した架橋形成システムの構築を目指している。この反応系を確立できれば、未反応物の漏出を抑え、主鎖の構造を選ばず、更なる機能性を付与できる医療用接着剤としての応用が期待できる。

これまでの検討において、ポリマー上にカルボキシ基が 20 mol%以上含有されていれば、ポリマーが溶媒に溶けなくなる程度に架橋を形成すること、また、カルボキシ基とクロロトリアジノ基を含む polymer A と“アミノ基のみを含む polymer b”を混合し (THF:水=85:15)、反応活性化剤として *N*-メチルモルホリン (NMM) を添加することでポリマー間にアミド結合による架橋形成が可能なことを確認している。

そこで今回は、上記の polymer A と polymer b, および NMM との反応において、溶媒条件を検討したところ、THF:水=2:8 の条件においても有意に反応が進行することがわかった。さらに、反応活性化剤としてジメチルアミノ基を導入した polymer B を新たに合成し、polymer A との反応を、THF:水=8:2, 1:1, および 2:8 の溶媒条件下で行ったところ、いずれの条件でも1時間以内にゲル状となった。IR による生成物の解析から、新たに生じたアミド結合由来のピークが観られ、架橋形成反応が進行していることが確認できた。この polymer A 及び B を用いて、金属に対する接着強度 (引張り接着強さ) の確認を行ったところ、1 kg/cm²以上の強度を発揮し、接着剤としての可能性が示唆された。



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 radixin の役割

○小堀宅郎、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】 これまでに我々は、抗がん剤 etoposide (ETP) の反復経口投与によって、小腸において RhoA/ROCK シグナルの活性化を介して P-glycoprotein (P-gp) の発現量が増加し、経口投与した morphine の鎮痛効果が減弱することを報告している。さらにこの機構には、P-gp の足場タンパク質として機能する ezrin/radixin/moesin (ERM) タンパク質の活性化が関与することも明らかにした。しかしながら、ERM タンパク質のいずれがこの機構に関与するかについて、詳細に検討した報告はほとんどない。そこで本研究では、ETP の反復投与による小腸 P-gp の発現増加機構に関与する ERM の同定を目的として検討を行った。

【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.) は 7 日間反復投与した。RhoA あるいは ROCK 活性化の阻害薬である rosuvastatin (5 mg/kg/day, p.o.) または fasudil (5 mg/kg/day, p.o.) は、ETP と同時に投与した。小腸における各タンパク質の発現量およびタンパク質間相互作用は、western blot 法あるいは免疫沈降法によってそれぞれ解析した。また、小腸における各タンパク質の局在解析は、二重免疫染色法によって行った。

【結果】 ETP の反復投与終了 24 時間後、小腸の細胞膜における P-gp ならびに ERM の発現量は、対照群と比較して有意に増加した。これらの変化は、rosuvastatin または fasudil の併用投与によっていずれも抑制された。同画分において、P-gp と共沈した radixin 量が増加した一方、ezrin ならびに moesin の量に変化は認められなかった。さらに小腸において、radixin と P-gp は共局在することが確認された。

【考察】 以上の結果から、ETP の反復投与による小腸細胞膜における P-gp の発現増加機構には、ERM の中でも特に radixin の増加が関与する可能性が示された。

Morphine 反復投与による血液脳関門の P-glycoprotein 発現変化と その機序における ERM の関与

○宮城 景、藤原周平、小堀宅郎、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

【結果】ETP の反復投与終了 24 時間後、小腸の細胞膜における P-gp ならびに ERM の
【目的】血液脳関門の実態である脳毛細血管内皮細胞 (brain capillary endothelial cells; BCEC) に発現する P-glycoprotein (P-gp) は、morphine などの麻薬性鎮痛薬の脳内移行を抑制し、その薬理作用を制御することが知られている。さらに morphine の反復投与によって、同部位における P-gp の発現量が増加し、その鎮痛耐性形成に一部関与する可能性も提唱されている。しかしながら、詳細な機構は未だ不明である。近年、ezrin/radixin/moesin (ERM) が P-gp の足場タンパク質として機能し、細胞膜上における安定発現・機能制御において重要な役割を果たすことが示唆されている。そこで本研究では、morphine 鎮痛耐性形成時における BCEC の P-gp の発現変化を観察し、この機構における ERM の関与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、morphine (10 mg/kg/day) を 5 日間皮下投与し、鎮痛効果を tail-flick test にて測定した。Morphine 最終投与の 24 時間後に摘出した全脳から BCEC 画分を調製し、各タンパク質発現量またはタンパク質間相互作用を western blot 法、免疫沈降法でそれぞれ解析した。

【結果・考察】Morphine 反復投与によって、投与日数に依存した鎮痛効果の減弱すなわち鎮痛耐性形成が認められた。BCEC の P-gp 発現量は、対照群と比較して morphine 投与群で著明に増加した。同画分において、radixin の発現量には変化が認められなかった一方で、ezrin の発現減少および moesin の発現増加が観察され、さらに moesin と P-gp が共沈降することが確認された。以上の結果から、morphine 反復投与による鎮痛耐性形成時には、BCEC の P-gp 発現量が増加し、この機構には moesin が一部関与する可能性が考えられた。

視床下部 orexin-A の脳虚血性耐糖能異常および神経障害発現に対する

視床下部-延髄-迷走神経を介した抑制作用

○原田慎一、山崎由衣、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早期に、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 の視床下部内局所投与によって、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。本研究ではその機序解明を目的に、糖代謝を担う肝臓の機能を制御する神経の一つであり、延髄から肝臓へ投射している迷走神経に着目し、それが orexin-A による脳虚血後の糖代謝異常および神経障害発現の抑制作用に及ぼす影響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、局所脳虚血モデルは、2 時間の中大脳動脈閉塞法 (MCAO)、vagotomy モデルは、肝臓枝迷走神経を切除することによって作成した。Orexin-A (5 pmol/mouse) は、MCAO 後に単回視床下部内局所投与した。神経障害発現は、梗塞巣形成、行動障害、ならびに学習・記憶障害を評価した。MCAO 後の血糖値変化として空腹時血糖値 (FBG) を測定し、各タンパク質の発現変化は western blot 法および蛍光免疫染色法によって解析した。

【結果】Orexin-A は、MCAO 1 日後の FBG の上昇、肝臓または骨格筋における insulin 受容体の発現減少ならびに糖新生関連酵素の発現上昇、および MCAO 3 日後の梗塞巣形成、行動障害ならびに学習・記憶障害発現を有意に抑制した。これらの作用は、肝臓枝迷走神経の切除によって有意に消失した。また迷走神経の起始核である延髄弧束核において、orexin-A の視床下部内投与によって上昇する神経活性マーカーである c-Fos と迷走神経のマーカーである choline acetyltransferase (ChAT)、および orexin-1 受容体と ChAT の共局在が認められた。

【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、迷走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、迷走神経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.

全脳虚血誘発神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter の関与

○荻原沙知、西岡宏記、山崎由衣、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、神経障害発現の増悪が改善される可能性を示唆してきた。脳神経障害と糖代謝異常は相互に影響を及ぼす可能性が考えられるが、脳虚血ストレス誘導性の耐糖能異常がどのように神経障害に影響を及ぼすかについては未だ不明な点も多い。そこで今回、糖の作用点として、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、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。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腹腔内投与 (200 mg/kg)、または虚血再灌流直後および再灌流 6 時間後に脳室内投与 (40 μ g/mouse) した。BCAO 1 日後の血糖値変化として空腹時血糖値 (FBG) を測定した。BCAO 3 日後の組織障害の評価には、hematoxylin eosin 染色を用いて、海馬 CA3 領域における核濃縮型細胞死を、行動学的な評価には Catwalk を用いた歩行解析により、マウス前後両肢の接地面積および指先間の間隔を評価した。

【結果】BCAO 1 日後において、FBG は偽手術群に比較して有意な上昇が認められた。さらに、BCAO 3 日後における海馬 CA3 領域の核濃縮型細胞死数、およびマウス前後両肢における固縮 (接地面積および指先間の間隔の減少) の発現も有意に増加した。これらは、phlorizin の腹腔内または脳室内投与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。Phlorizin の全身投与では、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 を介して、Na⁺ と共に細胞内へ流入すること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.
Harada et al., Brain Res., 1541, 61-8, 2013.

脳虚血後高血糖を介した神経障害の発現に対する

脳内 sodium-glucose transporter type 3 の関与

○山崎由衣、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】 これまでに我々は、脳虚血ストレス負荷後早期に誘導される高血糖状態が、その後の神経障害の発現増悪に関与する可能性を示唆してきた。しかしながら、上昇した糖がどのようにして神経障害の発現に関与するかは未だ不明である。そこで、糖が作用する点として、sodium-glucose transporter (SGLT) に着目し、検討を行ってきた。最近、SGLT ファミリー特異的阻害剤である phlorizin の脳室内投与により、脳虚血性神経障害が改善するという知見が得られた。しかしながら、脳内 SGLT のどのアイソフォームが神経障害の発現に関与するかは不明なままであった。そこで今回、他のアイソフォームとは異なり、糖輸送能が無く糖のセンサーとして機能することが知られている、SGLT-3 に注目し検討を行った。

【方法】 5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、SGLT-3 siRNA (1 µg/mouse) を脳室内投与することにより、脳内 SGLT-3 ノックダウンマウスを作成した。さらに、そのマウスに中大脳動脈閉塞 (MCAO, 2 hr) を施した。MCAO 1 日後に空腹時血糖値変化および梗塞巣形成、行動障害の評価を行った。SGLT-3 のタンパク質発現は western blot 法により解析した。

【結果】 SGLT-3 siRNA の脳室内投与 3 日後から 4 日後において、有意な脳内 SGLT-3 発現減少が認められた。MCAO 1 日後における空腹時血糖値の有意な上昇に対し、脳内 SGLT-3 のノックダウンは何ら影響を及ぼさなかった。一方、MCAO 1 日後における梗塞巣形成および行動障害は、SGLT-3 のノックダウンにより有意に増悪した。また、MCAO 1 日後における脳内 SGLT-3 の発現は、線条体において有意な減少を示した。

【考察】 以上より、SGLT-3 は予想に反して、脳保護的に作用する可能性が示唆された。また、SGLT-3 は梗塞巣のコア領域で機能している可能性が考えられた。加えて、脳内 SGLT を介した脳虚血性神経障害の発現増悪には SGLT-3 以外の脳内 SGLT アイソフォームが関与しているかもしれない。

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

Yamazaki et al., Neuroscience, submitted.

虚血性神経障害の発現に対する脳内 sodium-glucose transporter type 3 の

acetylcholine 神経系を介した脳保護作用

○木村麻希、山崎由衣、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】 これまでに我々は、脳虚血後早期の高血糖状態が、その後の神経障害の発現増悪に関与すること、さらに、糖の輸送体のひとつである sodium-glucose transporter (SGLT) が、神経障害の発現増悪に関与することを明らかにしてきた。その一方で、SGLT ファミリーのうち糖輸送能がなく、糖のセンサーとして働くことが知られている SGLT-3 が予想に反して、脳保護作用を有する可能性を見出した。SGLT-3 は末梢においてコリン作動性神経上に発現していることが知られている。さらに、アセチルコリンは脳血流量増加や抗炎症作用、抗アポトーシス作用を介して脳保護的に作用することが知られている。そこで、本研究では、脳内 SGLT-3 の脳保護作用に対するコリン作動性神経系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、一過性局所脳虚血モデルは 2 時間の中大脳動脈閉塞法 (MCAO) によって作成した。脳内 SGLT-3 ノックダウンマウスは、SGLT-3 siRNA (1 µg/mouse) の脳室内投与によって作成した。アセチルコリンエステラーゼ 阻害薬であるドネペジルは、虚血再灌流直後に 1, 3, 5 mg/kg の用量で腹腔内投与した。MCAO 1 日後に血糖値変化として空腹時血糖値を測定し、神経障害の発現は、梗塞巣形成ならびに行動障害を評価した。SGLT-3 の発現は western blot 法、または、蛍光免疫染色法を用いて解析した。

【結果】 MCAO 1 日後における空腹時血糖値の有意な上昇に、SGLT-3 siRNA およびドネペジルは何ら影響を示さなかった。一方、MCAO 1 日後における梗塞巣形成および行動障害は、SGLT-3 siRNA により有意に増悪し、その増悪はドネペジル投与により有意に改善した。また、大脳皮質および線条体において、SGLT-3 は神経細胞のマーカーである NeuN およびコリン作動性神経のマーカーであるコリンアセチルトランスフェラーゼと共局在した。

【考察】 以上より、脳内 SGLT-3 による神経保護作用機序の一部にコリン作動性神経系が関与する可能性が示唆された。

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

長鎖脂肪酸受容体 GPR40 を介した抗侵害作用機構における

下行性疼痛抑制系の関与

○中本賀寿夫¹⁾、里 尚也¹⁾、西中 崇¹⁾、相澤風花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, ⁴⁾ 神戸学院大学 薬学部 毒性学

【背景】我々はこれまでに、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などを含む長鎖脂肪酸によって活性化される G 蛋白質共役型受容体 GPR40 が、内因性の疼痛制御機構において重要な役割を担っていることを提唱してきた。培養系の実験系において、DHA はノルアドレナリンやセロトニンのような疼痛制御に関わる神経伝達物質の遊離調節に関係しているとの興味深い報告があるものの、その詳細は不明な点が多い。そこで、本研究においては、GPR40 が下行性疼痛抑制機構に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

【方法】疼痛評価には、ホルマリン試験、von Frey 試験 (機械的刺激) および Plantar 試験 (熱的刺激) を用いた。GPR40 アゴニストである GW9508 (1 µg) はホルマリン試験の 10 分前に脳室内へ投与した。GPR40 アンタゴニストである GW1100 (10 µg) は GW9508 投与の 10 分前に脳室内へ投与した。Proopiomelanocortin (POMC), dopamine beta hydroxylase (DBH) および triptophan hydroxylase (TPH) などの各種神経細胞マーカーと GPR40 または c-fos タンパク質との共局在解析には、蛍光二重免疫染色法を用いた。

【結果】免疫組織学的な検討から、脳内 GPR40 は POMC、TPH および DBH と共局在を示した。GW9508 の脳室内投与によって、弓状核、青斑核および大縫線核領域で c-fos 陽性タンパク質の発現増加が認められ、またこの発現増加は POMC、TPH および DBH 陽性細胞上で増加していた。さらに、GW1100 の脳室内投与はホルマリン誘発疼痛行動 (第二相) を有意に増強した。

【考察】以上の結果から、脳内 GPR40 は下行性疼痛抑制機構に関与する神経上に発現し、その機能調節を担っていることが示された。

(参考論文) Nakamoto et al., PLoS One, 2013, 8(12):e81563.

全脳虚血誘導性脳卒中後疼痛に対する長鎖脂肪酸受容体 GPR40 の関与

○松浦 渉、春名柚佳、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脳卒中後疼痛は、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。最近、我々は視床下部において、長鎖脂肪酸がその受容体である GPR40 を介して、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、その疼痛制御機構の一つに視床下部からの β -エンドルフィンの遊離が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。その一方で、グリア細胞であるアストロサイトが、長鎖脂肪酸の遊離を制御する因子の一つとして報告された。そこで本研究では、CPSP に対する GPR40 およびアストロサイト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。BCAO 3 日後に、GPR40 の選択的アゴニスト GW9508 (0.1, 1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) を脳室内投与し、投与 10、20、30、60 分後の疼痛評価を行った。また、BCAO 5 時間後に GW9508 (10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) を脳室内投与し、BCAO 1 および 3 日後に疼痛評価を行った。GPR40 の選択的アンタゴニスト GW1100 (10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) は、GW9508 投与 10 分前に脳室内投与した。さらに視床下部における GPR40 またはアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現量は western blot 法によって解析した。

【結果】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 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の用量では偽手術群に比較して有意に抑制された。BCAO 5 時間、1、3、7 日後の視床下部における GPR40 の発現量はなんら変化しなかった。一方で、BCAO 5 時間後において、GFAP の発現量が BCAO 群で有意に抑制された。BCAO 1 および 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 BCAO 1 日後の反応は抑制されたが、3 日後には消失していた。これらの作用は、GW1100 によって有意に拮抗された。

【考察】以上の結果から、BCAO モデルにおける脳卒中後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。

(参考論文) Nakamoto et al., PLoS One, e81563, 2013.

Tamiya et al., J. Pharm. Pharmacol., 615-20, 2013.

長鎖脂肪酸受容体 GPR40 アゴニスト GW9508 の

脳室内投与による抗うつ様作用

○西中 崇¹⁾、山下琢矢²⁾、中本賀寿夫¹⁾、万倉三正³⁾、小山 豊³⁾、
糟谷史代²⁾、徳山尚吾¹⁾

¹⁾ 神戸学院大学 薬学部 臨床薬学、²⁾ 神戸学院大学 薬学部 毒性学

³⁾ 備前化成株式会社、⁴⁾ 大阪大谷大学 薬学部 薬理学

【背景・目的】GPR40 は G タンパク質共役型受容体であり、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの長鎖脂肪酸により活性化される。GPR40 は膵臓 b 細胞に発現しておりインスリン分泌調節に関与していることが報告されている。一方、中枢神経系においても GPR40 の発現が認められているが、その生理作用に関してはほとんど明らかにされていない。本研究では、中枢神経系における GPR40 の機能を明らかにするために、脳内の脂肪酸との関係が注目されている気分調節における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た。抗うつ作用の評価には強制水泳試験を用いた。GW9508 は 1 µg/mouse の用量を用いた。単回投与の検討には、GW9508 を試験開始 15 分前に脳室内投与した。反復投与の検討には、GW9508 を 1 日 1 回を 5 日間脳室内投与し、最終投与 15 分後に強制水泳試験を行った。海馬における遊離 DHA ならびに アラキドン酸量を LC-MS/MS 法により測定した。GPR40 のタンパク質発現はウエスタンブロット法を用いて解析した。

【結果】GW9508 の単回投与では、対照群と比較して無動時間に変化は認められなかった。一方、GW9508 を 5 日間反復投与すると対照群と比較して無動時間の有意な短縮が認められた。強制水泳 (23°C、6 分間) 後の、海馬において DHA とアラキドン酸量の有意な低下が認められたが、GPR40 のタンパク質発現に変化はなかった。

【考察】以上の結果から、脳内の GPR40 の活性化により抗うつ作用を示すことが示唆された。また、強制水泳ストレスによる無動行動発現時に GPR40 のリガンドとなる遊離 DHA ならびにアラキドン酸量に変動が認められたことから、脳内 GPR40 シグナルが抑うつ様行動の調節に関与していることが示唆された。

幼少期飼育環境ストレスによる情動機能の障害が

神経障害性疼痛に及ぼす影響

○木下 恵、西中 崇、相澤風花、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】育児放棄や虐待といった幼少期ストレスは、中枢神経系の発達に影響を与え、様々な精神疾患の発症リスクとなる。さらに、成人期における慢性疼痛の発症とも関連することが報告されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、母子分離・隔離飼育ストレスモデルを用いて、幼少期の環境飼育ストレスが成人期の情動機能ならびに慢性疼痛に及ぼす影響について解析を行った。

【方法】生後 15 日から 21 日目の間に、1 日 6 時間仔マウスを別々のケージに移し母子分離を行い、生後 22 日 (3 週目) 以降は単独で飼育することで隔離飼育ストレスを与えた。坐骨神経部分結紮 (PSL) により神経障害性疼痛モデルを作製した。不安関連行動の評価には高架式十字迷路試験を用いた。疼痛行動の評価には、von Frey 試験 (機械的刺激) を用いた。中枢神経系における GFAP ならびに Iba-1 の発現変化をウエスタンブロット法により解析した。

【結果】生後 7 週目において高架式十字迷路試験を行ったところ、ストレス負荷を行った雌性マウスでは、対照群と比べて open arm への進入回数ならびに滞在時間の有意な減少が認められた。一方、雄性マウスではこれらの変化は認められなかった。次に、von Frey 試験を用いて機械的感受性の評価を行ったところ、機械的刺激に対する反応回数にはストレス負荷の影響は認められなかった。さらに、PSL 処置により痛みを惹起させたところ、ストレス負荷群においては対照群と比べて、雄性・雌性マウス共に機械的刺激に対する反応回数が有意に増加した。また、ストレスを負荷した雌性マウスの延髄において、Iba-1 の有意な発現低下が認められた。

【考察】以上の結果から、母子分離・隔離飼育ストレスは不安関連行動の障害に関係なく神経障害性疼痛を増悪させることが示唆された。さらに、この増悪機構に脳内のグリア細胞の変化が関与している可能性が示唆された。

コエンザイム Q10 による培養皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響

○峯 幸稔, 松本 篤, 北條 重文, 奥野 正顕, 高橋 隆幸, 峯村 剛*, 八幡 信広*, 岡本 正志
神戸学院大学薬学部・社会薬学部門・生化学研究室,
*日清ファルマ株式会社・健康科学研究所

[目的]

Coenzyme Q10(以下 CoQ10 と略す)は、ミトコンドリア電子伝達系の必須構成成分として、エネルギー産生系で重要な役割を担っている。また、CoQ10はミトコンドリアのほか、ゴルジ体やミクロソームなどの細胞小器官にも存在しており、それらの生理的意義については不明な点が多い。最近、MugoniらはCoQ10の新たな分子標的の可能性として、ミトコンドリア外、とくにゴルジ体のCoQ10不足が活性酸素の産生を惹起することを報告している(Cell, 152, 504-518 (2013))。生体中のCoQ10は酸化型と還元型の両方で存在しており、血清や肝臓中ではとくにCoQ10の還元比(還元型CoQ10/総(酸化型+還元型)CoQ10)が高い。さらに、還元型CoQ10は酸化型より抗酸化作用が強く、そのためCoQ10はさまざまな加齢性疾患の治療に応用され、その有効性が報告されている。一方、わが国では最近、CoQ10が化粧品に含有されるようになり、その有効性の科学的根拠は十分ではないものの、市場に数多く流通している。

この研究では、CoQ10の新たな分子標的の可能性を探索するため、CoQ10によるヒト培養皮膚線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響を検討した。さらに、紫外線照射や過酸化水素添加による酸化ストレスで誘発された皮膚細胞障害に対するCoQ10の防御効果についてもあわせて検討した。

[実験方法]

ヒト培養皮膚線維芽細胞(新生児由来)はLonza Inc. より購入し、培養5日目の細胞を実験に供した。コラーゲンI型、IV型、ならびにVII型のmRNA量はRT-PCR法にて測定した。細胞増殖能はMTTアッセイ法、細胞内ATP量はルシフェリン・ルシフェラーゼ法、過酸化水素により誘導した酸化ストレス(ROS)の抑制作用はCM-H2DCFDA試薬によりそれぞれ測定・評価した。細胞内のCoQ10量はHPLC-ECD法にて測定した。水溶性CoQ10(アクアQ10P40)は日清ファルマ株式会社より恵与を受けた。

[実験結果ならびに考察]

1 μ M以上の水溶性CoQ10の培養液への添加は、ヒト皮膚線維芽細胞のコラーゲンI型、IV型ならびにVII型のmRNA量をコントロール群(対照群、CoQ10を含まない溶剤)に比べて有意に上昇させた。また、その際、皮膚線維芽細胞内のCoQ10量は上昇し、さらに細胞増殖能や細胞内ATP量もコントロール群に比べて有意に上昇していた。一方、CoQ10は過酸化水素の添加や紫外線照射によって誘発した皮膚線維芽細胞障害を顕著に抑制することを認めた。

これらの結果は、CoQ10がヒト皮膚線維芽細胞の増殖能や細胞内ATP量の上昇をともなって、コラーゲンI型、IV型ならびにVII型の産生を増強する可能性を示唆した。さらには加齢性疾患のうち、CoQ10が酸化ストレスによる皮膚細胞障害に対して有効性を示すことから、これらの作用がミトコンドリア外のCoQ10の新たな生理作用に基づく可能性を示唆した。

コエンザイム Q10 の栄養学的評価 - (1)魚類中のコエンザイム Q 同族体分布 -

○北條 重文, 松本 篤, 峯 幸稔, 奥野 正顕, 高橋 隆幸, 岡本 正志
神戸学院大学薬学部・社会薬学部門・生化学研究室

[目的]

ヒト生体中のコエンザイム Q10 (以下 CoQ10 と略す, ubiquinone-10) は、食事由来の外因性 CoQ10 と生合成由来の内因性 CoQ10 の両者によって賄われている (J. Nutr. Sci. Vitaminol., 32, 1-12(1986))。したがって、食事由来の外因性 CoQ10 摂取の全くない完全静脈栄養施行患者では、血清 CoQ10 値は健常人や施行前に比べて有意に低値を示し、血清中には CoQ10 以外の CoQ 同族体は検出されない。また、コレステロールの生合成はファルネシルピロリン酸までは CoQ10 と同じ生合成経路をもつため、HMG-CoA reductase 阻害剤のスタチン系薬剤投与時には、コレステロール値と同様に血清 CoQ10 値も低下する。このように、生体中の CoQ10 は内因性(生合成)とともに外因性(食事由来)CoQ10 も重要な CoQ10 供給源である。しかしながら、外因性 CoQ10、つまり食品由来の CoQ 同族体分布とその含量の詳細については、いまだ不明な点も多い。

魚類中の CoQ10 はウシやブタ等の肉類と並んで、その経口摂取量は生体で大きな割合を占めると考えられる。本研究では、ヒトの CoQ10 の栄養学的評価を行う一環として、近年、日本人が栄養学上好んで摂取する魚類の CoQ 同族体分布とその含量について検討した。

[実験方法]

100 種類以上の魚類サンプルは、通常魚肉として食される可食部位から採取したものを実験に供し、内臓部分は使用しなかった。サンプルは大学近隣の魚店やマーケットなどから購入し、購入後は冷蔵庫(4℃)に保存して、賞味期限までに酸化型、還元型ならびに総(酸化型+還元型)CoQ 同族体含量を HPLC-ECD 法にて分別定量した。

[結果および考察]

魚類中の CoQ 同族体の同定は、HPLC 上の CoQ の保持時間、酸化・還元によるそれらのピークの消失と再出、ならびに質量分析計によって行った。新鮮魚肉を冷蔵保存すると、還元型 CoQ10 量は経時的に減少し、24 時間後にはその 80% が酸化型に変化した。総 CoQ10 量には変化が認められなかった。

CoQ のフードタキソミーとして、魚肉中に分布する CoQ 同族体には種差が認められ、魚類の主要 CoQ 同族体はすべてが CoQ10 ではなかった。今回実験に供した魚類中、総 CoQ10 量が最も高い魚はカツオであり、青魚のマイワシの約 1.4 倍、さらに海洋哺乳類の鯨肉ではカツオの約 1.2 倍の CoQ10 量を有していた。また、カサゴ目(アカメバル、ホッケ、オニオコゼ、カサゴなど)の魚肉中には CoQ10 は検出されず、その主要同族体は CoQ9 であった。さらに、CoQ9 を主要 CoQ 同族体とする魚類には、現在までに硬骨魚類の上記のカサゴ目やスズキ目の一部(ハタハタ、キジハタ)、さらに軟骨魚類ではサメなどの計 15 種類を同定した。

これらの結果から、ヒトは魚類から CoQ10 のみならず CoQ9 も経口摂取していることを明らかにした。また、摂取する CoQ の存在型は、還元型よりも酸化型 CoQ10 の方が多いことを認めた。

一方、最近の魚類分類学では、従来スズキ目に分類されたハタハタ科(ハタハタなど)の魚が、カサゴ目と近縁であることが指摘されているが、両者の主要 CoQ 同族体がともに CoQ9 であることを本研究より見出した。したがって、魚類分類学上の類縁関係を示す指標として、CoQ 同族体の同定がその一助となる可能性を示唆した。