

神戸学院大学ライフサイエンス産学連携研究センター

2014年度研究成果発表会 プログラム

平成27年3月7日（土）9：10～
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携研究センター

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

- 9:10～ 9:15 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)
- 9:15～9:30 シリカ粒子貪食マクロファージのリソソーム機能変化*
O-1 Lysosomal functions of peritoneal macrophages which phagocytized silica particles
○榎本理世, 丸岡由貴, 李英培
神戸学院大学 薬学部 薬理学研究室
- 9:30～9:45 SortaseA による標識化リポソームの作製と SortaseA 固定化ビーズの
O-2 作製*
Preparations of surface-labeled liposome using sortaseA and
sortaseA-immobilized beads
○長宗秀明¹, 田端厚之¹, 北條恵子²
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
- 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調製と投与方法
O-3 が及ぼす体内動態への影響*
Effect of administration routes on biodistribution of nanoparticulate L-BPA
formulations in tumor-bearing mice for boron neutron-capture therapy
○安藤 徹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
- 10:00～10:10 休憩 (座長：日置和人)
- 10:10～10:25 大食細胞へのマイクロ粒子の付着・取込現象のAFM/SEM観測*
O-4 Adhesion/uptake of microspheres onto/into macrophages studied by
colloid-probe AFM and SEM techniques
下村 亮¹, 竹前暁人¹, 吉田拓柁¹, 深澤智典², 廣橋由美子¹,
○新戸 浩幸¹
¹福岡大学 工学部 化学システム工学科
²京都大学大学院 工学研究科 化学工学専攻

- 10:25～10:40
O-5 粒子径が異なるクルクミン内包リピッドエマルジョン（ナノ製剤）の作製と *in vitro* および *in vivo* における生理活性の比較*
Influence of particle size on the *in vitro* and *in vivo* biological activities of a curcumin lipid nanoemulsion
○小野寺威文¹, 栗山磯子², 安藤 徹³, 市川秀喜³, 坂本裕香¹, 李 英培², 水品善之¹
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 薬理学研究室
³神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- 10:40～10:55
O-6 JC ウイルスアグノタンパク質由来 Cys 含有ペプチドの構造変化とオリゴマー化*
Structural conversion and oligomerization of Cys-containing peptides derived from JC virus agnoprotein
○日高興士¹, 北條恵子¹, 藤岡志緒¹, 奴久妻聡一², 津田裕子¹
¹神戸学院大学 薬学部 薬品化学研究室
²神戸市環境保健研究所 感染症部
- 10:55～11:10
O-7 ナノ粒子を用いるマイクロ波水中固相合成：Cys 及び HIs 含有ペプチドの水中合成*
Aqueous mw-assisted solid-phase synthesis: Synthesis of Cys and HIs containing peptides
○北條恵子¹, 篠崎夏紀¹, 日高興士¹, 津田裕子¹, 福森義信², 市川秀喜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 薬学部 製剤学研究室
- 11:10～11:20 休憩
- 11:20～12:20 特別講演 I
(座長：市川秀喜)
機能性ナノ粒子の製剤設計
名古屋市立大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野
教授 尾関哲也 先生
- 12:20～14:00 お昼休み

14:00～15:10 ポスター討論会

一般演題ポスター

- P-1 血管内皮細胞へのナノパーティクルの影響*
The effects of Nanoparticles in vascular endothelial cells
○屋山勝俊, 宮川葉月, 小野寺 章, 河合裕一
神戸学院大学 薬学部 循環器薬理学研究室
- P-2 プラスミン阻害剤の開発：P1'残基の探索*
The plasmin inhibitors : Exploration of the P1' residue
鈴木彩子¹, 草野真衣¹, 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 臨床栄養学部
⁵血栓止血研究プロジェクト
- P-3 高分子ナノパウダー (PNP) を用いた乾式微粒子コーティング技術の
開発：PNP のガラス転移温度が被覆特性に及ぼす影響*
**Dry particulate coating with the use of polymer nanopowders (PNP): Effect
of glass transition temperature of PNP on coating properties**
○安永峻也, 福森義信, 市川秀喜
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- P-4 ヒト体温付近で温度応答性パルス型薬物放出を示すマイクロカプセル
の設計*
**Design of microcapsules with pulsatile drug-release in response to
temperature changes at the vicinity of human body temperature**
○門田謙人, 角田圭佑, 安藤 徹, 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 難水溶性薬物の溶解性改善を目的とした Hydroxypropyl cellulose (HPC)
を用いたナノ結晶被覆製剤の開発*
**Development of particulate formulations with poorly water-soluble drug
nanocrystals using Hydroxypropyl cellulose (HPC) for improved solubility of
the drug**
○福田竜太¹, 兒玉智史², 杉澤賢司², 安藤 徹¹, 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日本曹達株式会社

- P-6 ペプチド性薬物の経口送達用 Core-Shell 型ナノゲル粒子の調製と評価*
Preparation and evaluation of core-shell nanogel particles for oral delivery of peptide-based drugs
○印藤佑次, 福森義信, 市川秀喜
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用 Gd 含有キトサンナノ粒子製剤 (Gd-nanoCP) の開発: 精製レシチンによる粒子表面改質とその特性評価*
Gadolinium-loaded chitosan nanoparticle (Gd-nanoCP) for neutron capture therapy of cancer:
Particle characterization after surface-modification of Gd-nanoCP with purified soybean lecithin
○重儀拓哉¹, 安藤 徹¹, 藤本卓也², 新戸浩幸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福岡大学 工学部 化学システム工学科
⁴JT 生命誌研究館
- P-8 2液混合型接着剤として機能するポリマーの成分評価, 並びに微粒子化に関する検討*
Evaluation of the component of the polymer which functioning as a two liquid mixed type adhesive, and examination about nanoparticulation of the polymer
日置和人, ○山根麻緒, 山内百合香, 安倍一実
神戸学院大学 薬学部 機能分子化学研究室
- P-9 NASH 形成過程と長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFA4 シグナルの関係
The relationship between hepatic GPR120/FFAR4 and nonalcoholic Steatohepatitis
○小畑友紀雄¹, 中本賀寿夫¹, 森本泰子², 原田慎一¹, 金 啓二³, 金 守良⁴, 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
²神戸学院大学 薬学部 健康支援研究室
³神戸朝日病院 薬剤部, ⁴神戸朝日病院 消化器科

- P-10 ddY マウスによるメチオニン低減・コリン欠乏高脂肪食誘発 NASH
モデルの作製
Development of mouse strain on a choline-deficient, L-amino acid-defined,
high-fat diet induced nonalcoholic Steatohepatitis with ddY mice
○藤本恵里花¹, 中本賀寿夫¹, 小畑友紀雄¹, 原田慎一¹,
森本泰子² 金 啓二³, 金 守良⁴, 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
²神戸学院大学 薬学部 健康支援研究室
³神戸朝日病院 薬剤部, ⁴神戸朝日病院 消化器科
- P-11 炎症刺激後のアストロサイトからの遊離脂肪酸の同定
Detection of astrocyte-induced free fatty acids after inflammatory stimulation
○中本賀寿夫¹, 相澤風花¹, 西中 崇¹, 山下琢矢², 小山 豊³,
糟谷史代², 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
²神戸学院大学 薬学部 毒性学研究室
³大阪大谷大学 薬学部 薬理学講座
- P-12 幼少期ストレス負荷マウスによる神経障害性疼痛後の情動機能障害に
おける脳内 BDNF の関与
Involvement of brain BDNF on the exacerbation of neuropathic pain-induced
emotional dysfunction after maturation by early life stress
○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-13 母子分離・社会隔離ストレスによる神経障害性疼痛増悪へのアストロ
サイトの関与
Involvement of astrocyte on the exacerbation of neuropathic pain by maternal
separation and social isolation stress
○木下 恵, 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-14 脳虚血後の糖代謝変化に対する迷走神経を介した orexin-A の作用
Effect of orexin-A mediated by vagus nerve on the changes in cerebral
ischemia-induced glucose metabolism
○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 脳虚血性神経障害発現に対する脳内 sodium-glucose transporter を介し
た Na⁺の細胞内流入の影響
Effect of Na⁺ influx into cell through cerebral sodium-glucose transporter on
the development of cerebral ischemic neuronal damage
○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

- P-16 脳内 sodium-glucose transporter-1 が脳虚血性神経障害に及ぼす影響
Effect of cerebral sodium-glucose transporter-1 on the development of cerebral ischemic neuronal damage
○有田恭子, 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
- P-17 脳虚血ストレス負荷後の神経障害発現に対する AMP-activated protein kinase の影響
Effect of AMP-activated protein kinase on the development of cerebral ischemic neuronal damage
○平良美沙登, 荻原沙知, 小野安紀子, 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
- P-18 脳虚血性耐糖能異常および神経障害発現に対するチョロギの効果
Effect of *Stachys sieboldii* (Chorogi) on the development of post-ischemic glucose intolerance and neuronal damage
○元日田まりな¹, 辻田 司¹, 原田慎一¹, 森 隆治², 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
²薬草と健康づくりの会
- P-19 大脳皮質神経初代培養を用いた過酸化水素/グルコース負荷後の神経細胞死に対する sodium-glucose transporter type 1 の関与
Involvement of sodium-glucose transporter type 1 on the development of hydrogen peroxide/glucose-induced cell death in primary cortical neuron
○荻原沙知, 小野安紀子, 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
- P-20 脳虚血ストレス負荷後の膵臓におけるインスリン量と TrkA の関連
Involvement of between TrkA and insulin after cerebral ischemic stress in pancreas
○宮城 景, 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-21 全脳虚血ストレス負荷後の機械的痛覚過敏に対する high mobility group box-1 の関与
Involvement of high mobility group box-1 on the development of global ischemia-induced hyperalgesia
○松浦 渉¹, 春名柚佳¹, 原田慎一¹, 劉 克約², 西堀正洋², 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
²岡山大学大学院 医歯薬総合研究科 薬理学

- P-22 全脳虚血ストレス負荷後の機械的痛覚過敏に対する鎮痛補助薬の影響
Effect of adjuvant analgesics on the global ischemia-induced hyperalgesia
 ○景山絵理香, 松浦 渉, 原田慎一, 徳山尚吾
 神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室
- 一般講演口頭発表
 (座長: 北條恵子)
- 15:10~15:25 2014 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
 O-8 には? -
Generalization of the research activities 2014 - 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
- 15:25~15:40 コエンザイム Q₁₀による皮膚繊維芽細胞へのアンチエイジング作用
 O-9 **Anti-aging Effect of Coenzyme Q10 in Skin Fibroblast Cells**
 ○峯 幸稔¹, 松本 篤¹, 北條重文¹, 長澤大空¹, 渡部えりこ¹,
 奥野正顕¹, 高橋隆幸¹, 峯村 剛², 八幡信広², 市橋正光³,
 岡本正志¹
¹神戸学院大学 薬学部 生化学研究室
²日新ファルマ株式会社 健康化学研究所
³同志社大学大学院生命医学研究所 アンチエイジングリサーチセンター
- 15:40~15:55 水銀イオン (II) を選択的に捕捉するカリックス [4] チアクラウン類
 O-10 の合成
Synthesis of p-tert-Butylcalix[4]thiacrowns adsorbing Mercury(II) Ion selectively
 ○瀧本竜哉¹, 津江広人², 井上 元¹, 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
- 15:55~16:05 休憩
- 16:05~17:05 特別講演 II
 (座長: 徳山尚吾)
- テーラーメイド疼痛治療法の開発
 公益財団法人東京都医学総合研究所
 参事研究員 池田和隆 先生
- 17:05~17:10 閉会の挨拶 LSC 運営委員長 李 英培

17:30～19:30 懇親会（於：クルーズカフェ）

* 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・採択課題

機能性ナノ粒子の製剤設計

尾関 哲也

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 薬物送達学分野

新しい DDS の開発においては、ナノ粒子の応用が期待されている。しかしながら、ナノスケールの粒子が分散した状態で存在することは困難である。我々は、ナノサイズの薬物やポリマー粒子を内部に分散したマイクロサイズの粒子を、one-step で容易に調製できる特殊なスプレーノズルを開発した。このナノテクノロジーの難溶性薬物の経口投与製剤、経粘膜投与製剤への応用について述べたい。

また、我々は血管内皮の炎症治療を目的に、善玉コレステロール(以下 HDL)を模倣したナノ粒子製剤(以下 HDL-NP)を開発した。HDL-NP は粒子の土台となる核の部分に金を用い、金ナノ粒子の表面に抗炎症効果があるとされるスフィンゴシン 1 リン酸(以下 S1P)とアポリポタンパク A1(以下 ApoA1)を結合させた。HDL-NP は粒子径が 8-12 nm であり、表面物性も生体内の HDL と類似しているものと推察される。その一方で HDL-NP は金ナノ粒子を核として調製しているため、保存面において安定であり溶液中における凝集は認められなかった(4°C、1 週間)。HDL-NP の物性評価を行った後、in vitro、in vivo 条件下における治療効果についても評価を行った。In vitro 実験の検討として、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)にリポ多糖(LPS)で炎症誘導した後 HDL-NP を添加し、抗炎症効果を評価した。その結果、ナノオーダー(S1P 濃度で換算)で HDL-NP は顕著な抗炎症効果を示した(標的遺伝子である PAI-1 遺伝子の mRNA レベルを顕著に抑制した)。S1P 単体、ApoA1 単体において同様の抗炎症効果が認められなかったことより、HDL-NP による抗炎症効果は S1P と ApoA1 が同時にかつ近距離に存在していることが必要であることが示唆された。次に in vivo 実験の検討としてマウスに LPS と HDL-NP を同時投与し、治療効果の評価を行った。代表的な部位として大動脈、心臓、血清について確認したところ、In vitro の結果同様に、HDL-NP は PAI-1 遺伝子の mRNA レベル(血清においてはタンパク発現量)を顕著に低下させていることがわかり、抗炎症効果を示していることが示唆された。さらに、LPS 単独投与によって、心臓の冠状動脈や、大動脈において血管の傷害(アポトーシス)が TUNEL 法によって確認されたのに対し、HDL-NP を同時投与した場合、アポトーシスの誘導は大幅に抑制された。以上の結果より、HDL-NP は炎症性血管治療に対して有用な製剤になりうることが強く示唆された。

テーラーメイド疼痛治療法の開発

○池田和隆

公益財団法人東京都医学総合研究所依存性薬物プロジェクト

疼痛感受性個人差と鎮痛薬感受性個人差には大きな個人差があり、効果的な疼痛治療を難しくしている。これらの個人差には、環境要因に加えて遺伝要因もある。最近のゲノム科学の急速な進歩により、遺伝要因の解析手法はすでに確立され、かつますます簡便化されてきている。演者らは、鎮痛薬投与患者を対象として、疼痛感受性および鎮痛薬感受性と遺伝子多型との関連を検討している。解析対象遺伝子としては、オピオイドの主要作用点であるミューオピオイド受容体(MOP)やそのシグナル伝達経路を担う分子群に注目した。マウスにおいて疼痛感受性および鎮痛薬感受性の系統差について、その遺伝子メカニズムを一部明らかにできたので、次にヒトにおける研究を行った。疼痛自体の個人差を最小限とするために、対象者は一定の手術を受け、鎮痛薬による術後痛管理を受けた患者とした。特に、下顎枝矢状分割術(SSRO)を受ける患者は、手術を受けるまでは痛みを持たず、若年者が多く、予定待機手術であるため状態が比較的安定しており、画一的で強い痛みを伴う侵襲を手術で受けることから、鎮痛薬感受性個人差の研究をする上で理想的な患者である。これらの研究の結果、解析した遺伝子の中で、MOP や G タンパク質活性型内向き整流性カリウム(GIRK)チャンネル、R型カルシウムチャンネル、P2X7受容体などの遺伝子における多型(遺伝子配列の違い)が、疼痛感受性や鎮痛薬感受性の個人差に関与することが判明した(Fukuda et al., Pain, 2009; Ide et al., Mol Pain, 2014など)。さらに、ゲノムワイド関連解析を行った結果、CREB1 遺伝子近傍の遺伝子多型が鎮痛薬感受性と強く関連すること(Nishizawa et al., Mol Psychiatry, 2014)、いくつかの遺伝子多型が術後の末梢神経障害発症脆弱性と関連すること(Kobayashi et al., Mol Pain, 2013)を見出した。そこで、これらの遺伝子検査を予め行うことで、患者ごとの鎮痛薬感受性を予測して鎮痛薬使用当初から適量に近い鎮痛薬量で疼痛管理を行う、いわゆるテーラーメイド疼痛治療法を開発して、実際にSSROの術後痛治療において実施している。急速に普及しつつある遺伝子検査技術の基礎とその疼痛治療への応用の展望、および問題点を紹介する。

シリカ粒子貪食マクロファージのリソソーム機能変化

○榎本 理世, 丸岡由貴, 李 英培
神戸学院大学薬学部薬理学研究室

マクロファージは貪食機能を有する代表的な細胞の一つであり、生体内での外来異物や死細胞の適切な処理に重要な役割を担っている。貪食された異物は、周囲の細胞膜が融合してできるファゴソーム内に取り込まれ、リソソームと融合してファゴリソソームを形成後、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、これらの基材の微粒子が、リソソーム酵素による消化を受けるとは考えにくく、貪食後の微粒子の細胞内挙動やリソソーム機能への影響についてはよくわかっていない。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、リソソームに局在するかどうかわかり、およびリソソーム機能への影響について調べた。

シリカ粒子のリソソームへの移行を確認するため、チオグリコール酸培地誘導マウス腹腔マクロファージに蛍光シリカ粒子を貪食させた後、リソソーム局在性蛍光色素である LysoTracker およびリソソーム特異的マーカーに対する免疫蛍光染色によりリソソームを標識した。その結果、蛍光シリカ粒子とリソソーム染色の共局在が観察され、シリカ粒子がリソソームに移行し、局在していることが確認された。蛍光ポリスチレン粒子についても同様の検討を行ったところ、リソソームへの移行に要する時間経過が異なるが、シリカ粒子と同様にリソソームに局在することが判明した。

次に、貪食された微粒子のリソソーム局在が、リソソーム機能にどのような影響を及ぼすかを調べた。今回の検討では、代表的なリソソーム酵素の一つであるスルファターゼ活性を、リソソーム代謝活性の指標とし、LysoLive Lysosomal Sulfatase Kit で細胞を活性染色して観察を行った。コントロールマクロファージでは、スルファターゼ活性を示す蛍光染色が細胞内で明らかな局在性を示していたが、シリカ粒子を貪食させたマクロファージでは、スルファターゼ活性を示す蛍光が細胞全体に分散したような染色像が観察された。本実験結果より、スルファターゼのリソソームから細胞質への漏出が疑われ、リソソームに取り込まれたシリカ粒子が、リソソーム代謝活性やリソソーム膜の機能に何らかの影響を及ぼす可能性が示された。今回は1000 nmシリカ粒子での検討を行ったが、ナノサイズのシリカ粒子でも、同様のリソソーム機能変化が起こるかどうかについても今後検討する予定である。

SortaseA による標識化リポソームの作製と SortaseA 固定化ビーズの作製

○長宗秀明¹, 田端厚之¹, 北條恵子²

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 薬品化学研究室

【緒言】 我々は細菌由来機能性タンパク質を利用したリポソームや生分解性ポリマー粒子等のナノ粒子表面の加工システムを開発するため、現在、グラム陽性細菌由来のペプチド転移酵素 sortase A (SrtA) を利用したペプチド標識化システムの構築を行っている。これまで、様々な菌種からの高活性 SrtA の検索、最適転移基質配列の解析、転移反応条件の検討等を行ってきた。本年度は昨年度に引き続いて、SrtA によるペプチド転移反応の転移配列及び受容配列を持ったリポペプチド分子 (LP) をアンカーとして担持したリポソームの表面標識化反応の検討に加え、SrtA の固定化カラムの開発を目指した SrtA の固相化を検討した。

【結果と考察】Alexa 蛍光標識した転移ペプチド基質及び受容ペプチド基質を用いて、スペーサーの異なる 5 種類の LP (2 種類が転移配列を有し、3 種類が受容配列を有する) を取り込ませた DPPC/CHL リポソーム (平均 d=100nm) へのペプチド転移反応の効率を検討した。これらの LP は取込効率 53-65% で安定にリポソームに取り込まれ、SrtA 量及び反応時間依存的にペプチド転移反応が検出された。しかしスペーサー長により反応性に差が認められ、また転移配列を持つ LP の方が高い転移効率を示した。従って標識物を受容基質化の方が効率的である可能性が考えられた。この LP を担持したリポソームの表面に肺癌指向性を示すアプタマーペプチドを転移させて修飾し、ヒト肺癌細胞 A549 とヒト線維芽細胞の混合培養系に作用させたところ、A549 細胞へのリポソームの標的化が観察された。次ぎに標識化物の回収を迅速・容易にするための SrtA 固定化カラムの開発を目指し、ポリスチレンビーズへの SrtA の固相化を検討した。スペーサーを介して SrtA 表面のアミノ基或いは N 末端に導入した His タグとビーズを連結した結果、His タグを介して一定方向で固相化した場合に安定なペプチド転移反応が確認された。この結果は、SrtA は菌体内と同様の方向性で固定化されることが望ましい可能性を示している。

現在、上記の LP を用いたリポソーム標識化と固相化 SrtA を用いたリポソーム標識化システムの構築について、継続して検討を行っている。今後これらの検討結果を総合し、有用な DDS 用ナノ粒子の表面加工技術の開発に繋げていく予定である。

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

○安藤 徹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、¹⁰B 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 ¹⁰B 濃度が治療効果の発現に重要であり、¹⁰B の場合、20 $\mu\text{g/g wet tissue}$ (ppm) 以上が必要とされ、腫瘍内で ¹⁰B をより高濃度かつ長時間、蓄積・保持可能な製剤が望まれている。我々の研究室では、¹⁰B 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 自体がアミノ酸類自体であるがゆえに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し、さらには 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・時間が変化することを明らかにしてきた。しかし、腫瘍内直接投与が適応となる可能性をもつ症例は少ない。そこで本研究では、より臨床適応が可能となりやすい局所投与の候補としてホウ素製剤の皮下投与が及ぼす体内動態への影響について評価した。

【方法】溶液型製剤である BPA-fructose complex (BPA-Fr) は、超純水に分散した L-BPA と fructose をスターラー攪拌下で 2M NaOH を添加することで錯体形成させて調製した。B16F10 細胞をマウスの臀部に皮下移植した担がんモデルを作成した。BPA-Fr を担がんモデルの頸部皮下へ皮下投与した。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 ¹⁰B 濃度を ICP-AES 法により測定した。

【結果・考察】溶液製剤である BPA-Fr は、静脈内投与後に高値な腫瘍内ホウ素濃度を示すものの血中から速やかに消失するため、腫瘍内からの消失も早いことが課題となっていた。それに対し、BPA-Fr の皮下投与は、投与後に皮下より血中へ吸収される過程が律速となり、血中移行が速やかでないことから、血中濃度を臨床研究で必要とされる 10-20 ppm の値を静脈内投与より 30 分長く維持することに成功した。さらに、腫瘍内ホウ素濃度においても、静脈内投与が投与後 30 分でピークを迎え、投与後 3 時間まで臨床研究で必要とされる 20 ppm 以上維持するのに対して、皮下投与では投与後 1 時間でピークを迎え、投与 6 時間後まで 20 ppm 以上を維持し、血中濃度の減衰を遅延させることが、腫瘍内ホウ素濃度の減衰を遅延させるといえる。この結果を受けて、現在、BPA-NS の皮下投与後の体内動態評価について検討を進めている。BPA-NS では血中移行に粒子の分散・溶解過程が付加されるものと考えられることから、さらなる血中消失の遅延、ひいては腫瘍内からの消失の遅延も期待できるものと予想しており、当日はその結果も合わせて報告する予定である。

大食細胞へのマイクロ粒子の付着・取込現象の AFM/SEM 観測

下村 亮¹, 竹前 暲人¹, 吉田 拓証¹, 深澤 智典², 廣橋 由美子¹, ○新戸 浩幸¹

¹ 福岡大学工学部化学システム工学科

² 京都大学大学院工学研究科化学工学専攻

動物細胞への微粒子の付着・取込み現象は、複数の物理化学的な相互作用力と細胞生物学的な諸因子が関与する極めて複雑な現象である (Fig. 1)。これを理解することは、微粒子の生体影響評価、医療用バイオマテリアルの表面設計など、多くの分野において極めて重要である。このため筆者は、単一粒子・単一細胞レベルの観測技術によって、動物細胞への微粒子の取込機構の解明とその制御・予測技術の開発を目指している。本研究では、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy、以下 AFM) と走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy、以下 SEM) を用いて、生体由来タンパクを吸着させて表面改質した微粒子の大食細胞への付着・取込の初期段階を観測した。

大食細胞として、マウス由来マクロファージ細胞株 J774.1 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。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)、免疫グロブリン G (IgG) を用いた。

種々の条件下で SEM 観察すると、曝露時間 5~20 min では粒子の付着から取込初期の大食細胞が多く観察され、曝露時間 1 hour では複数の粒子を完全に取込む大食細胞が多く観察された。粒子の大食細胞への取込の様子や速さは、粒子の表面被覆タンパク質の有無と種類によって異なっていた。例えば Fig. 1 に示すように、BSA 修飾の粒子では取込が速く、大食細胞は大きく穴を開けて取込もうとしていた。一方、FN 修飾の粒子では取込が遅く、大食細胞は仮足などで粒子全体を覆うように取込んでいた。Fig. 2 に、AFM 測定で得られるフォースカーブの一例を示す。脱離時に観測される引力の最大値 (付着力) は、粒子の表面被覆タンパク質の有無と種類によって大きく影響された。これらの SEM 観察と AFM 測定の詳細な相関関係については、発表当日述べたい。

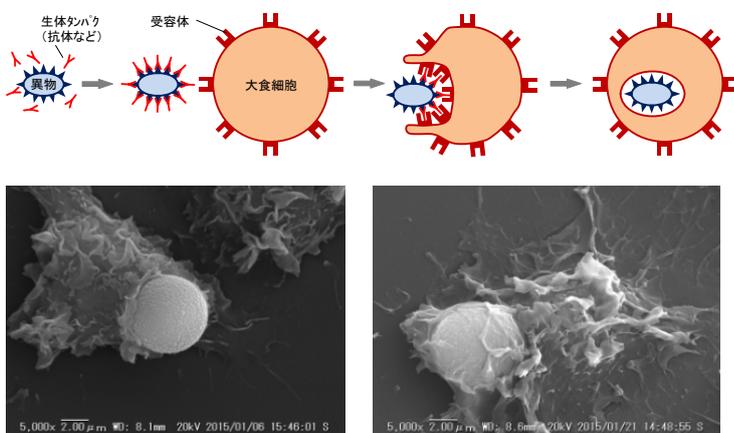


Fig. 1 血清不含の培養液中に懸濁された PS-COOH 粒子 (粒子径 6 μm) を取込む J774.1 細胞の SEM 像: (左) BSA 修飾; (右) FN 修飾。曝露時間は 5~15 分。

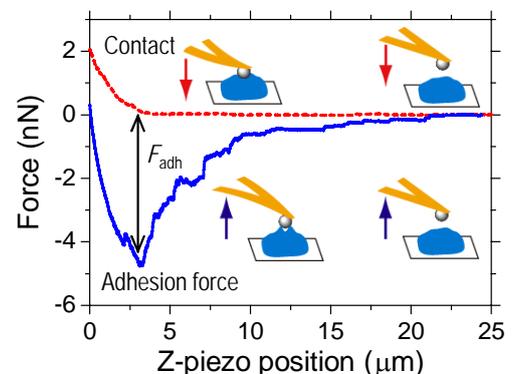


Fig. 2 血清不含 RPMI-1640 培養液中における FN 修飾 PS-COOH 粒子 (粒子径 6 μm) と J774.1 細胞間の相互作用力曲線。接触時間は 0.5~1 分。

粒子径が異なるクルクミン内包リピッドエマルジョン（ナノ製剤）の作製と *in vitro* および *in vivo* における生理活性の比較

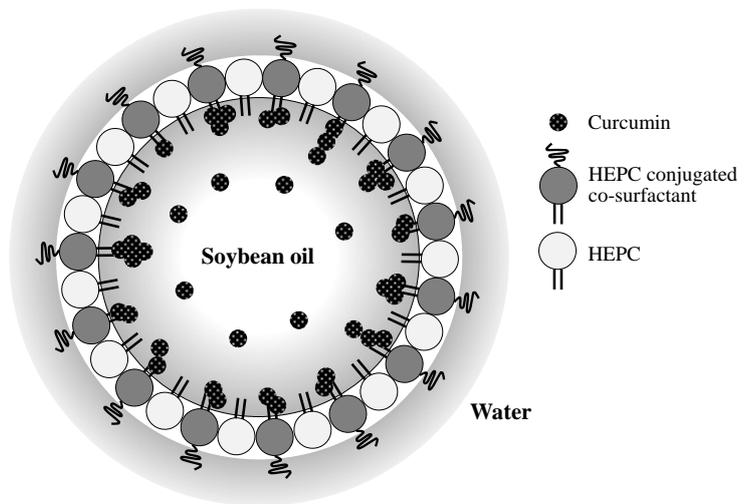
○小野寺威文¹, 栗山磯子², 安藤 徹³, 市川秀喜³, 坂本裕香¹,
李 英培², 水品善之¹

¹栄養学部 食・健康学部門, ²薬学部 薬理学研究室, ³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、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。クルクミンには抗炎症活性や抗アレルギー活性があることが知られているため、生体内においても、クルクミンによる Pol λ 阻害活性に基づいた抗炎症・抗アレルギー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性疎水性 (親油性) 物質であるため、生体内への投与が難しく扱いづらい。そこで、クルクミンを内包したリピッドエマルジョン、すなわち粒子径が異なるナノ製剤を作製して、クルクミンの懸濁液との生理活性を比較した。

【方法】 クルクミンを内包したリピッドエマルジョンは、クルクミンに大豆油、卵黄レシチン、Tween-80 を混合して、薄膜法と水浴式超音波法を組合せた方法で作製した。超音波の時間を変えることで 50 nm、100 nm、200 nm の 3 種類の粒子径のナノ製剤を調製した【図 1】。リポ多糖 (LPS) で刺激したマウス・マクロファージ (RAW264.7 cells) および 8 週令マウスが産生する TNF- α 量は ELISA 法で測定した。肥満細胞モデルである RBL-2H3 細胞の β -ヘキソサミニダーゼ放出抑制活性、および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。マウスへリピッドエマルジョンを経口投与後の血中クルクミン量の測定は、除タンパクした血清を HPLC 蛍光検出することで定量した。

【結果と考察】 抗炎症活性 (マクロファージおよびマウスの TNF- α 産生抑制活性)、抗アレルギー活性 (肥満細胞の β -ヘキソサミニダーゼ放出抑制活性およびマウス PCA 反応抑制活性) は、クルクミン内包リピッドエマルジョンの方がクルクミンの懸濁液よりも強かった。クルクミン内包リピッドエマルジョンのこれら生理活性の強さは、100 nm > 200 nm > 50 nm であった⁽¹⁾。本活性は、培養細胞系 (*in vitro*) と生体内 (*in vivo*) でも同じ傾向を示した。これらナノ製剤をマウスへ経口投与後 2 時間で血清中のクルクミン量は最大になり、クルクミン含量は粒子径 100 nm が最も多かった⁽¹⁾。これらの結果より、クルクミン内包リピッドエマルジョンには、生理活性に適した粒子サイズの存在が示唆された。 【図 1】 ナノ製剤 (リピッドエマルジョン) の構造



⁽¹⁾ T. Onodera *et al.* 学術論文投稿中

JC ウイルスアグノタンパク質由来 Cys 含有ペプチドの構造変化とオリゴマー化

○日高興士¹, 北條恵子¹, 藤岡志緒¹, 奴久妻聡一², 津田裕子¹

¹神戸学院大学薬学部 薬品化学研究室 ²神戸市環境保健研究所 感染症部

JC ウイルスは多くのヒトに潜伏感染しており、免疫不全になると進行性多巣性白質脳症 (PML) を引き起こす。多発性硬化症治療薬のナタリズマブ等を用いる際に PML の頻度が高くなることから、今後の PML 患者数の増加が懸念されるが PML 治療薬はない。JC ウイルスのもつタンパク質のうちでアグノタンパク質 (Agno) はウイルス増殖に必須であり、主に細胞質に局在して複数の機能をもち、特に、細胞膜上ではオリゴマーを形成して viroporin 活性を示すことが報告されている[1]。近年、17-52 残基ペプチドの NMR 解析により Agno がヘリックス構造をもつことが示された[2]が、オリゴマー化との関連は不明である。そこで、我々は Agno を標的とする PML 治療薬開発につなげるため、膜貫通領域と予想される 22-44 残基のペプチドを合成し、二次構造とオリゴマー化について検討した。

通常の Fmoc 固相合成法により、N 末端および C 末端がフリーのペプチド **1**、N 末端をアセチル基、また C 末端をアミドで保護したペプチド **2**、そして、**2** の 40 位の Cys 残基を Ala に置換したペプチド **3** を合成した (下図参照)。得られたペプチドは HPLC 精製を行い、TOF-MS により同定した。

CD スペクトルを測定したところ、合成ペプチド **1** から **3** の二次構造は水溶液中で β -シート構造をとっていた。また、その水溶液に SDS を添加すると α -ヘリックスへと変化した。次に、ペプチド **1** と **2** を 1 時間インキュベーションして SDS-PAGE を行ったところ、二量体が観察された。還元剤を添加すると二量体は消失し、N-エチルマレイミドの添加により二量体形成が阻害されたことから、ジスルフィド結合を介して二量体となることが分かった。興味深いことに、酸化剤を添加すると三量体、四量体が観察され、更に、ビスマレイミド架橋剤の添加により多量体形成が著しく促進することを見出した。一方、ペプチド **3** では多量体は形成しなかった。以上のことから、Agno のオリゴマー化には 40 位の Cys 残基が関与しており、Agno オリゴマー化阻害剤開発の標的となりうることが示された。

- 1**: H-KKRAQRILIFLLEFLLDFCTGED-OH
2: Ac-KKRAQRILIFLLEFLLDFCTGED-NH₂
3: Ac-KKRAQRILIFLLEFLLDFATGED-NH₂



[1] Suzuki, T., *et al.* (2010) *PLOS pathog*, **6**, e1000801.

[2] Coric, P., *et al.* (2014) *J. Viol.*, **88**, 6556.

ナノ粒子を用いるマイクロ波水中固相合成：
Cys 及び HIs 含有ペプチドの水中合成

○北條恵子¹、篠崎夏紀¹、日高興士¹、津田裕子¹、福森義信²、市川秀喜²

¹神戸学院大学薬学部 薬品化学研究室 ²製剤学研究室

持続可能な社会に向けた、環境に適合する化学合成が叫ばれて久しいが、未だ、多くの医薬品に代表されるファインケミカルの化学プラントでは、有機溶媒を使用した合成が行われている。一方、ペプチド合成は、液相合成、固相合成、さらに自動合成と展開され、すでにほぼ完成された合成技術として認知されている。しかし、E-ファクターと呼ばれる環境を規定する因子の大きさは、他のファインケミカルの数百から数万倍とされ、環境への適合といった点では、全く未発達な技術である。特に、近年大きく花開いた固相合成においては、各反応工程で使用する有機溶媒の消費量は膨大で、もし環境に適合する合成を標榜するならば、まず、この有機溶媒の消費量の削減が不可欠である。なぜ、有機溶媒を使用するのか。それは、反応ブロックである保護アミノ酸が水に溶けないからである。水での反応には、まず反応ブロックに水溶性を付与するというのが、一般的手法であるが、そのための反応工程を必要とし、White らによって提唱されたグリーンケミストリーの 12 原則に従えば、工程数は減らすべきであろう。そこで、本プロジェクトでは保護アミノ酸の水への不溶性解決の対策として、保護アミノ酸をナノサスペンションとして反応を行う手法について提案し、ナノサスペンションを用いる水中ペプチド合成として報告してきた。しかし、ペプチドの水中合成をさらに効率的に行うには、いくつかの問題を解決しなければならない。それは水中における反応速度、水中におけるペプチド鎖の凝集などである。これらの問題点の解決策として水中反応へのマイクロ波照射について検討を行ってきた。マイクロ波加熱は、誘電率に比例し、極性の低い有機溶媒では、その効果も限定的である。水は極性、誘電率も高く、マイクロ波照射によるエネルギーの吸収量が高い。またマイクロ波が、ペプチド同士の凝集を破壊することも報告されており、期待通り、照射により迅速に合成困難な配列の水中合成を達成することができた。しかし、マイクロ波照射下では、ラセミ化が起きやすいとされている。特に、システインとヒスチジン残基においてその傾向は顕著である。そこで、水中ペプチド合成の一般汎用化を目指して、本年度はラセミ化の検証、またラセミ化の抑制、システインとヒスチジン残基を含むペプチドの水中ペプチド合成について検討を行ったので報告する[1]。

[1] Hojo K, Shinozaki N, Hidaka K, Tsuda Y, Fukumori Y, Ichikawa H, Wade JD. *Amino Acids*. 46, 2347-54 (2014).

2014 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

我々は種々の疾患に焦点を当て、それらの発症機序の解明を目指して、日々研究活動を行っている。ここでは本年度に実施した内容の一部についてその概要を紹介する。

・GPR40/FFAR1 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/FFAR1 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 GPR40/FFAR1 が下降性疼痛制御機構を直接的に制御することを報告した (Nakamoto *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, 2015)。さらに、うつ病などの発症においても、本受容体機構が関与する可能性を見出した (Nishinaka *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.*, 2014)。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/FFAR1 を介する機構が関与する可能性も明らかにした (Harada *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 2014)。

・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、脳から末梢への神経支配 (延髄から肝臓に投射している迷走神経) によって制御されることを明らかにした (Harada *et al.*, *PLoS One*, 2014)。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出した (Yamazaki *et al.*, *Neuroscience*, 2014)。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. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, *in press*)。

・幼少期ストレスによる成熟期の情動および疼痛への影響とその発症機序の解明

幼少期における強度のストレス負荷が、成熟期における不安・うつ様症状の惹起および疼痛制御機構の破綻を引き起こす可能性を明らかにした (Nishinaka *et al.*, *Life Sci.*, 2015)。さらに、うつ様症状の発症機構に BDNF が関与する可能性を提唱した (Nishinaka *et al.*, *Neuro Sci. Lett.*, *in press*)。

・非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態モデル確立とその発症機序における GPR120/FFAR4 の関与

現在、肝臓疾患の中でも、NASH に対する注目は高い。我々も本年度から、NASH 関連の研究に着手した。現在までに、NASH モデルを確立し、長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 の欠損動物を用いて、それらの関与について検討を加えている。

以上のように、我々は常に臨床現場を意識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、未だ何の到達感も得られ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。

コエンザイム Q10 による皮膚線維芽細胞へのアンチエイジング作用

○峯 幸稔¹, 松本 篤¹, 北條 重文¹, 長澤 大空¹, 渡部 えりこ¹, 奥野 正顕¹,
高橋 隆幸¹, 峯村 剛², 八幡 信広², 市橋 正光³, 岡本 正志¹

¹神戸学院大学薬学部・社会薬学部門・生化学研究室

²日清ファルマ株式会社・健康科学研究所

³同志社大学大学院生命医科学研究所・アンチエイジングリサーチセンター

[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であり、エネルギー産生系で重要な役割を担っている。また、CoQ10 は生体内の種々の酸化ストレスに対して強い抗酸化作用を示す。このような二つの重要な生理作用を有する物質は生体内には存在しないことから、CoQ10 はさまざまな加齢性疾患への適応が期待されている。最近では、CoQ10 含有サプリメントや化粧品が健康食品・化粧品市場に数多く流通しているが、その有効な科学的根拠を示す知見はほとんど見当たらない。

この研究では、CoQ10 のアンチエイジング作用の可能性を探索する目的で、CoQ10 のヒト皮膚線維芽細胞に及ぼす影響について検討した。

[実験方法]

ヒト皮膚線維芽細胞(新生児由来)は Lonza 社より購入し、37°C、5%CO₂ 含有空気下、培養 5 日目の細胞を実験に供した。細胞増殖能は MTT アッセイ法、コラーゲン、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、Heat Shock Protein 47 (HSP47)ならびにエラスチンの mRNA 量は、RT-PCR 法にてそれぞれ測定した。細胞内の CoQ10 量は HPLC-ECD 法にて定量した。細胞内の酸化ストレス (ROS) の抑制作用は CM-H2DCFDA 試薬により測定し、細胞老化の特異的マーカーとして β ガラクトシダーゼ (SA- β gal) を測定した。CoQ10 は、日清ファルマ株式会社の水溶化 CoQ10 (アクア Q10 P40) を使用した。

[実験結果ならびに考察]

培養液への 1 μ M 以上の CoQ10 添加は、ヒト皮膚培養線維芽細胞内の CoQ10 量や細胞増殖能を対照群に比べて有意に上昇させた。また、この作用は CoQ9 添加でも同様に観察された。さらに、CoQ10 は線維芽細胞のコラーゲン、エラスチン、ならびに HSP47 の mRNA 量を有意に上昇させた。一方、CoQ10 は過酸化水素によって誘導される MMP や酸化ストレスによる細胞障害、ならびに細胞老化の特異的マーカーである SA- β gal 産生を有意に抑制することを認めた。

これらの結果は、CoQ10 が SA- β gal の陽性染色、細胞増殖能や抗酸化能の低下、コラーゲンを含む細胞外マトリックスの産生量の低下など、老化した皮膚線維芽細胞に特徴的な多くの細胞機能の低下を抑制できることを示した。したがって、CoQ10 が皮膚細胞に対してアンチエイジング作用を発揮できること、ならびに CoQ10 の加齢性疾患へのさらなる適用の可能性が示唆された。

水銀イオン (II) を選択的に捕捉するカリックス [4] チアクラウン類の合成

○瀧本 竜哉¹・津江 広人²・井上 元¹・高橋 弘樹²・田村 類²・佐々木 秀明¹¹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】 我々は水環境中に存在する有機・無機汚染物質の除去を目的として、カリックス[4]クラウンを用いた新規吸着剤の開発を行ってきた。最近、カリックスチアクラウン **2** (Fig. 1)のクラウン部位へ Hg^{2+} が捕捉される様子を、**2**の¹H-NMR スペクトルの化学シフト値が Hg^{2+} 共存下において遷移することより確認できた。本研究では、他の金属イオンに対する捕捉能について¹H-NMR または誘導結合プラズマ (ICP) 発光分光分析装置を用いて調べた。また **1**, **2**のクラウン部位の導入反応において条件最適化を行ない、DBU を用いると反応が促進され、良好な結果が得られたので併せて報告する。

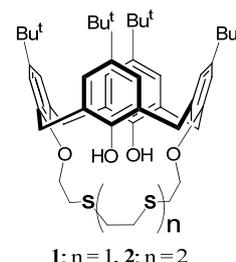
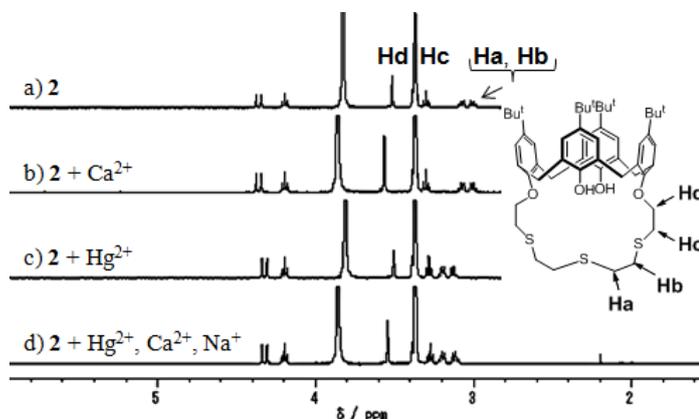


Fig. 1. calix[4]thiacrowns

【方法】 得られた **1**, **2** を、それぞれ CDCl_3 - CD_3OD 溶媒へ溶解し、さらに種々の金属イオン (Na^+ , K^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Hg^{2+}) を加えて **1**, **2** の¹H-NMR スペクトルの変化を追跡した (**1**, **2** および金属イオンの濃度は 0.5 mM)。また、重金属イオンについては、実際に吸着実験を行い ICP 発光分光分析装置により吸着率を求めた。

【結果】 紙面の都合上 Figure 2 には Ca^{2+} の結果のみ示したが、**2**において Na^+ , K^+ , Cs^+ , Ca^{2+} のいずれのイオン共存下においても、クラウン部位のシグナルに変化はみられなかった。この結果から、 Na^+ , K^+ , Cs^+ , Ca^{2+} は **2**のクラウン部位で捕捉されないことが分かる。一方で、 Na^+ , Ca^{2+} , Hg^{2+} の共存下、クラウン部位のシグナルが大きく低磁場シフトしたため、 Hg^{2+} は他の金属イオン共存下においても、クラウン部位で捕捉されることが示唆された。本講演においては、現在検討中である **2**のクラウン部位の導入反応における条件最適化、および **2**の重金属イオンに対する吸着実験の結果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 presence of (b) Ca^{2+} , (c) Hg^{2+} , (d) Hg^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ in CDCl_3 - CD_3OD .

血管内皮細胞へのナノパーティクルの影響

The effects of Nanoparticles in vascular endothelial cells

○屋山勝俊, 宮川葉月, 小野寺 章, 河合裕一

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、衣料用手入れ剤や花粉付着防止剤、抗菌・消臭剤、食品添加物や医薬品など様々な分野で使用されている。様々な形で利用されているナノパーティクルであるが、生体に適用された場合、その一部は、血管内へと吸収され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の影響を知る目的で、これまで摘出血管並びに細胞を用いて検討を行った。その結果、予めフェニレフリンで収縮させたリング標本に、ナノシリカを添加すると、nSP 70 添加では約 75%、nSP 300 で約 15%、mSP 1000 で約 10% の弛緩を認め、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。さらに、ナノ銀に血管弛緩応答があるかを検討したところ、ナノ銀にも血管弛緩応答があることを認めた。次に、この弛緩への一酸化窒素 (NO) の関与を明らかにすべく NO 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。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。

そこで、nSP 70 により eNOS リン酸化、あるいは Akt リン酸化が起きているかを、ウシ大動脈内皮細胞を用いて検討したところ、nSP 70 は、eNOS、Akt の両者のリン酸化を亢進させ、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。次に、nSP 70 の作用点を明らかにすべく検討を行ったところ、nSP 70 はウシ大動脈内皮細胞に取り込まれていること、加えて、ウシ大動脈内皮細胞への nSP 70 の添加は、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすことを認めた。しかしながら、nSP 70 がどのような分子に作用しているかについては明らかにできておらず、今後の課題である。

プラスミン阻害剤の開発：P1' 残基の探索

鈴木彩子¹, 草野真衣¹, 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広島国際大学臨床栄養学部, ⁵血栓止血研究プロジェクト

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う出血傾向や、手術中ならびに手術後の異常出血時には線溶系が亢進し、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。一方、PL は受容体表面で活性化されると、たとえばマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)を活性化し、このMMPsの活性化を介してガンの転移や浸潤に関わったり、また炎症反応に関わっていることが近年知られている。PL 阻害剤は、病態時のPL の多機能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 阻害剤の開発に取り組んでいる。

我々は既にPL に選択的阻害剤としてH-Tra-Tyr(*OPic*)-NH-Octyl (Y0-2) [$IC_{50} = 0.53$ and $5.3 \mu M$ for PL and urokinase (UK), respectively]を報告している[1]。計算化学を用いた研究により、P1' 残基の octyl 基はPL の S1' 部位と疎水性相互作用をしており、それがY0-2 とPL との結合に寄与していることを明らかにしている[2]。本研究では、H-Tyr(*OPic*)-OH と octyl 基のつなぎ手をアミド結合からエステル結合へ変換し、さらに octyl 基に酸素原子を挿入した(位置、数の検討)。つなぎ手としては、アミド結合の方が好ましく(アミド結合 vs エステル結合: $0.53 \mu M$ vs $13 \mu M$ for the IC_{50} values), 2個以上の酸素原子の導入はPL 阻害活性を低下させた。さらに octyl 基を-NH-X-Tyr-NH₂[X: -(CH₂)_n-COO-]で置換し、疎水性相互作用以外の相互作用を付け加える試みを行ったので、併せて報告する。

[1] Okada Y, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2217-2221(2000).

[2] Gohda K, *et al.*, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **27**, 571-577 (2012).

【P-3】

高分子ナノパウダー (PNP) を用いた乾式微粒子コーティング技術の開発：
PNP のガラス転移温度が被覆特性に及ぼす影響

○安永峻也, 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】現在, 口腔内崩壊錠やドライシロップに用いる $100\ \mu\text{m}$ 以下の放出制御性微粒子を低コストで製造しうるプロセスとして, 溶媒を使用せずに固体粒子を被覆する乾式微粒子コーティング技術の開発が望まれており, 市販の高分子コーティング剤の熱による軟化を利用した研究例が報告されている^{1),2)}. しかし, それら市販材料は必ずしも乾式プロセスに最適化されたものではないため, 実生産で汎用されている湿式スプレー法で成されるような pH 依存性放出や放出速度の制御には至っていない. このプロセスでは, 母粒子周囲に微細な粒子が配向する *ordered mixture* の概念が深く関与しており, 高効率の被覆には子粒子の粒子径を小さくする必要がある. 本研究では, ガラス転移温度 (T_g) の異なる 8 種類の高分子ナノ粒子分散液を合成し, 塩析操作の後, 凍結乾燥することでナノサイズの一次粒子が緩く凝集した高分子ナノパウダー (PNP) を調製し, 薬物封入核粒子への付着性を評価した.

【方法】薬物封入核粒子として陰イオン交換樹脂 (Dowex 1 x 2, $75\text{-}150\ \mu\text{m}$) にジクロフェナクナトリウムを封入したものをを用いた. 薬物含量は紫外可視吸光度法により測定した. アクリル酸エチル (EA), メタクリル酸メチル (MMA), メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEMA) を用いて $30\text{-}100^\circ\text{C}$ の範囲で T_g が 10°C 毎に異なる p (EA/MMA/HEMA) 三元共重合体のナノ粒子分散液を乳化重合により合成した. ナノ粒子分散液を塩析, 凍結乾燥し, PNP を得た. PNP の T_g は示差走査熱量計により求めた. 核粒子とそれに対して $10\ \text{wt}\%$ の PNP を高速楕円ローター型粉体混合装置 (Theta-Composer[®]) へ仕込んで乾式処理し, 被覆粒子を得た. 被覆粒子からアセトンで高分子を抽出し, 乾燥重量を測定することで PNP の被覆効率 (付着した PNP の重量 / 仕込んだ PNP の重量) を求めた. 被覆粒子の表面は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した.

【結果・考察】核粒子の薬物含量は 40.7% であった. 被覆効率は $T_g\ 30^\circ\text{C}$ の PNP では 8% と低いが, T_g に比例して被覆効率が増加し, $T_g\ 80^\circ\text{C}$ の PNP で最も高い 48% を示した. その後, T_g に反比例し, $T_g\ 100^\circ\text{C}$ の PNP では, 25% となった. SEM 観察の結果, 低 T_g の柔軟な PNP の場合, 核粒子表面へのマイクロサイズの二次粒子によるまばらな付着が見られた. 低 T_g の PNP は高分子の柔軟性に起因する付着性を持つが, 装置の剪断による二次粒子の解砕が不十分なため, *ordered mixture* の概念に従った核粒子表面への配向が起こらずに被覆効率が低下したと考えられる. 次に高 T_g の PNP では, ナノサイズの一次粒子が付着する様子が見られた. これは硬い二次粒子が装置の剪断により解砕され, 核粒子に配向するものの, $T_g\ 90^\circ\text{C}$ 以上の PNP では高分子の軟化が起こらず被覆効率が低下したと推察される. これに対し $T_g\ 80^\circ\text{C}$ の PNP では二次粒子の解砕と高分子の軟化のバランスが良く, 結果として被覆効率が増大したものと推察される.

- 1) K. Kido, K. Kondo, M. Itakura, T. Niwa. The 31th Symposium on Particulate Preparations and Designs, p140-141
- 2) K. Ukita, M. Kuroda, H. Honda, M. Koishi. *Chem. Pharm. Bull.* 37(12) 3367-3371 (1989)

ヒト体温付近で温度応答性パルス型薬物放出を示すマイクロカプセルの設計

○門田謙人, 角田圭佑, 安藤 徹, 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】温度応答性の薬物放出制御型マイクロカプセル (MC) の人体への適用を考慮した際, 平熱体温付近では薬物放出抑制され, 数 °C の温度上昇で薬物放出生起される人体に低侵襲なシステムが望ましい. そこで, 本研究では下限臨界共溶温度 (LCST) を持ち, 温度応答性膨潤収縮挙動を示す *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) に親水性モノマーとして *N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm) を組み込み, 架橋度を変化させた共重合体ナノ粒子 (d-TNPs) を新たに合成し, d-TNPs を用いた MC の微小温度幅での放出挙動を評価した.

【方法】NIPAAm に DMAAm を加えた d-TNPs は水系分散重合法により合成した. 温度変化に伴う d-TNPs の膨潤・収縮挙動は, 動的光散乱式粒子径分布測定装置 (LB-500, HORIBA) により粒子径を測定し, 評価した. MC の調製はボトムスプレータイプのドラフトチューブ付き噴流層装置 (Grow Max (140), 不二パウダル) により行った. 63-75 μm に分級した CaCO_3 芯粒子 (丸尾カルシウム) 25 g に, V.B_{12} (Mw 1355, DSM ニュートリションジャパン) 5 g を含む 0.8wt% HPC-SSL (日本曹達) 水溶液をスプレーし, 次いで温度応答性放出制御膜として Aquacoat® (AQ, 旭化成) と d-TNPs の混合物 500 g をスプレーした. AQ と d-TNPs の高分子固形分の重量比 (AQ/d-TNPs) は 87.5/12.5 とした. 薬物放出挙動は, カラム法による放出試験により評価し, 35°C と 41°C の周期的温度変化に伴う V.B_{12} の放出速度変化をフローセル型紫外可視分光光度計にてモニターした.

【結果と考察】合成した d-TNP の粒子径は, 20-60°C の範囲での昇温/冷却過程においてほぼ同一の軌跡を描いて変化したため, 水中では温度変化に応じて可逆的に膨潤・収縮することが示唆された. 粒子の膨潤が期待される 20°C における粒子径は, 架橋度 0.8wt% では約 460 nm, 0.5wt% では約 600 nm となり, 架橋度を下げると d-TNPs の膨潤度が大きくなった. これは架橋度を下げることで架橋密度が減少し, ポリマーの吸水力が増加するためと推察される. また, DMAAm を組み込んで合成した d-TNPs の下限ゲル収縮温度 (LGCT) は体温近傍の 43°C 付近に現れ, NIPAAm 単独での LGCT である 32°C よりも高温側にシフトした. LGCT より高温になると粒子径は 200 nm 付近に収束し, この時の d-TNPs は完全収縮状態であると考えられる. 次にコーティング率 200% の MC の放出試験において, 架橋度 0.8wt% では初期の低温側 (35°C) の段階でバーストを起こし, 温度応答性は維持されるが放出抑制が困難な傾向となった. それに対して, 架橋度 0.5wt% では薬物放出速度の平均値が, 低温側 (35°C) で 3.32 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$, 高温側 (41°C) で 8.72 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$ であり, 比較的明瞭な放出速度変化を示した. 低温側での放出の完全抑止には課題が残るが, 35°C からわずか 6°C の温度上昇で薬物放出速度の増大が認められたことから, 人体の体温付近の微小温度幅での温度応答性放出制御が可能であることが示された.

【P-5】

難水溶性薬物の溶解性改善を目的とした Hydroxypropyl cellulose (HPC) を用いたナノ結晶被覆製剤の開発

○福田竜太¹, 児玉智史², 杉澤賢司², 安藤 徹¹, 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日本曹達株式会社

【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 Nanosuspension (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 NS を被覆した固形微粒子製剤化の評価を行ってきた。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、NS 製剤処方中の大豆レシチン (SL, 分散剤) は吸湿性が高く、製剤化した際の安定性に問題があった。そこで、本研究では Hydroxypropyl cellulose (HPC) の持つ分散安定性を利用し、従来よりも SL 量を減じた固形微粒子製剤 (Microparticles : MPs) の処方設計および *in vitro* における薬物溶出に関する検討を行った。

【方法】モデル薬物のグリベンクラミド (GLI, 水への溶解度 3.0 µg/mL), HPC, 蒸留水に所定重量比の SL を加え、遊星ボールミルで湿式混合粉碎し NS を得た。得られた NS をスプレー液とし、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 MPs を得た。得られた MPs の溶出挙動評価は、別途、粗粉碎処理を施したグリベンクラミド (粗粉碎 GLI) と比較することで行った。

【結果・考察】SL 量を減じて調製した NS の平均粒子径は 150 nm 前後と SL 量を減じる前と同等であった。これは HPC により分散安定性が付与されたためと考えられる。各 MPs (重量比として HPC : SL=1:0, 1:1, 1:2.5) の収率は、各々 79.8%, 82.8%, 84.6% と比較的高値で SL 量に比例してやや増大し、薬物含有率は、各々 6.07%, 5.97%, 5.75% と SL 量に反比例してやや減少した。これらは、SL の添加が収率に与える影響は少なく、また、MPs の処方量が SL の添加分だけ増加していることから、処方量に対して薬物含有量が相対的に低下するためと考えられる。日局第 2 液中の再分散試験では、30 分間の積算超音波処理において、MPs (1:0) は再分散した粒子が全くみられなかったのに対し、MPs (1:1, 1:2.5) から再分散した粒子の粒子径は各々 153 nm, 149 nm であり、速やかな再分散性を示した。これは SL の分散安定作用に加えて、SL 粒子が薬物被覆層において薬物ナノ粒子間に存在することで、薬物ナノ粒子同士の接触が抑制され、MPs からの良好な再分散をもたらしたものと推察される。日局第 2 液中における溶出試験では、粗粉碎 GLI では 0.15 µg/mL と低い溶出量を示した。これに対して、MPs では 3.0-5.0 µg/mL と粗粉碎 GLI に比べて高い溶出量を示した。これは、再分散試験で示された日局第 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。以上のように、HPC を用いた NS は安定でありナノ結晶被覆製剤の溶解性を改善したことから、今後は、本 MPs を用いて錠剤等の汎用型固形製剤設計の検討を進めたい。

ペプチド性薬物の経口送達用 Core-Shell 型ナノゲル粒子の調製と評価

○印藤佑次, 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“消化管粘膜透過性”という2つの問題を解決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 1) pH 応答性薬物放出特性, 2) 小腸粘膜付着性, 3) Caco-2 細胞単層膜に対して低毒性であり、細胞間隙の開口作用に基づくペプチド薬物透過促進能を有することなどを明らかにしてきた。そこで、本研究では、ラットに経口投与することを目的とした CSNPs の調製とその特性評価、さらに *in vivo* における薬物吸収性の予備検討を行ったので報告する。

【方法】CSNPs は N-MP 9/1, 8/2, 7/3 (core に組み込む親水性モノマーの割合が異なる) の3処方水系分散重合法によって調製し、塩酸バンコマイシン (VCH, モデル薬物) の封入は平衡分配法を用いて行った。重合後5日間蒸留水で透析した粒子を希釈・凍結乾燥を行い、得られた乾燥粒子に VCH 含有 PBS 溶液 (pH=6-7) を加え 37°C で 30 分間インキュベートを行った後、室温で 24 時間静置させて薬物封入を行った。次に 0.1 N HCl を用いて 3 回洗浄し、炭酸ガスを 30 分以上吹き込んだ蒸留水 50 mL に分散させ、再び凍結乾燥を行った。薬物封入後に再凍結乾燥して得られた粒子の 37°C における日局第 1 液・2 液中での分散性は動的光散乱法により評価し、薬物放出挙動は拡散セルを用いた溶出試験法により評価した。

【結果・考察】N-MP 7/3 は薬物含有率が 10.5% と低く、pH 1.2 の環境下では温度に関わらず凝集したことより、温度応答性に乏しく、本研究の目的とするキャリアーとして不適と考えられた。粒子径は pH 1.2/20°C, pH 6.8/20°C, pH 6.8/37°C において、N-MP9/1 でそれぞれ 316 nm, 1993 nm, 925 nm, N-MP8/2 でそれぞれ 419 nm, 1024 nm, 905 nm となり、pH・温度変化に応じて膨潤・収縮することが示された。薬物含有率は N-MP 9/1 が 15.2%, N-MP 8/2 が 12.2% と N-MP 9/1 がやや高値であったが、薬物放出挙動の評価において N-MP 8/2 は日局第 2 液で十分に薬物放出をしつつ、日局第 1 液において 3 時間まで 20% 以下、日局第 2 液において開始 15 分で 100% の薬物放出を示した。この結果を受けて、N-MP8/2 についてラットへの経口投与における薬物吸収性の予備検討を実施した結果、ラット 3 匹中 2 匹において、一般に経口投与時には血中移行を認めないとされる VCH の経粘膜吸収が確認された。

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： 精製レシチンによる粒子表面改質とその特性評価

○重儀拓哉¹, 安藤 徹¹, 藤本卓也², 新戸浩幸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福岡大学 工学部 化学システム工学科

²兵庫県立がんセンター 整形外科 ⁴JT 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 (¹⁰B) やガドリニウム (¹⁵⁷Gd) 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、¹⁵⁷Gd 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・粘膜附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。Gd-nanoCP の腫瘍内直接投与試験において Gd-NCT を施行した結果、有意に腫瘍成長を抑制したが、腫瘍組織内での Gd 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らなかった。そこで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、Gd-nanoCP 粒子表面を大豆レシチン (SL) および PEG リン脂質で修飾した静脈内投与型 Gd-nanoCP の開発を試みてきた。粒子表面改質により担がん動物への静脈内投与後における体内動態は改善傾向を示すものの、腫瘍での Gd 蓄積濃度が治療濃度域である 150 ppm に到達しなかった。本研究では、Gd の腫瘍内蓄積濃度を向上させるべく、脂質二重膜の主な構成成分であるリン脂質純度が高い精製レシチン (PSL) を用いて、従来よりも少量の修飾材料で Gd-nanoCP の表面修飾を行い、その粒子特性を評価した。

【実験】所定量の各種レシチン (SL, PSL) 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することで薄膜を調製した。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 水分散液を添加し、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) について、調製後 1 時間と 24 時間で粒子径・Zeta 電位測定を行い、その後 Gd 含有率を ICP-AES 法により測定した。

【結果・考察】重量比で Gd-nanoCP : SL = 1 : 1, 1 : 1.5 の LC-Gd-nanoCPs は調製後ただちに凝集・沈殿したが、Gd-nanoCP : SL = 1 : 2, 1 : 2.5, 1 : 3 では分散状態を維持した。一方 PSL では、Gd-nanoCP : PSL = 1 : 1 は調製後ただちに凝集・沈殿するものの、Gd-nanoCP : PSL = 1 : 2, 1 : 2.5, 1 : 3 に加えて 1 : 1.5 の処方においても分散状態を維持した。さらに 1 時間後の粒子径測定では、PSL で調製した LC-Gd-nanoCP は SL で調製した粒子と比較して粒子径が約 20 nm 減少し、24 時間後の粒子径測定においても、SL で調製した粒子と比較して粒子径の減少が見られた。以上の結果から、Gd-nanoCP の表面改質に PSL を用いることで従来の SL を用いた手法よりも分散性が高い LC-Gd-nanoCP を調製できた。PSL は脂質二重層の構成成分であるリン脂質が約 70% であり、SL よりも約 10% 高いため、Gd-nanoCP の表面により安定化した膜が形成されたと考えられる。使用するレシチンが少量であるほど Gd 含有率の高い LC-Gd-nanoCP が調製でき、Gd-nanoCP : PSL = 1 : 3 では 5.9% であったが、1 : 1.5 では 9.9% と約 1.7 倍となった。これらの結果は、PSL を用いた Gd-nanoCP の表面修飾が、腫瘍組織に高濃度の Gd を蓄積させる Gd-nanoCP の表面修飾に有用な手法として期待できることを示唆している。

2液混合型接着剤として機能するポリマーの成分評価， 並びに微粒子化に関する検討

日置和人，○山根麻緒，山内百合香，安倍一実
薬学部 機能分子化学研究室

我々は、カルボキシ基、アミノ基、縮合剤前駆体、縮合剤活性化基の4種を2種類のポリマー上に任意に振分け、多湿な環境下でもアミド化による架橋形成が進行する2液混合型のポリマー系を開発し、このものが接着剤として機能しうることを報告してきた。しかしそのポリマーの組成に関しては、溶解性や含有官能基による影響などの理由から明確な結果が得られず、合成段階でのモノマー比（仕込み量）に対する主観的な判断でしか論ずることができていなかった。そこで、得られたポリマー中の成分比を明確にするための検討(1)を行った。一方、以降の展開に必須の、ポリマーの微粒子化に関する検討(2)についても報告する。

(1) ポリマー中の成分比を明確にするための検討

計画当初、カルボキシ基およびアミノ基の含量は、UVあるいは可視光吸収基をそれぞれの官能基と反応させることで定量できると考えていたが、実際には再現性が得られず、縮合剤前駆体のクロロトリアジニル基が悪影響を及ぼしていることが示唆された。また、初期に合成したカルボキシル基含有ポリマーは溶媒を一度蒸発乾涸させると、どの溶媒にも溶けにくくなると観察されており、その後の展開の障壁であった。幾つかの合成条件を検証し、改めて合成したポリマーを詳細に観察し直したところ、ゆっくりではあるがクロロホルムに溶解することが認められた。これにより、NMR検量によるポリマーの成分評価ができるようになった。仕込み量で10、20、30%のカルボキシ基含有モノマーを含む反応溶液から合成したポリマーそれぞれを解析したところ、カルボキシ基およびクロロトリアジニル基の含量が予定よりも高くなる傾向が認められた。この評価ができるようになり、ポリマー中の成分比の制御、すなわちポリマーの改質が可能になった。

(2) ポリマーの微粒子化に関する検討

我々が開発しているポリマーは、担体表面に官能基を導入する方法ではなく、官能基を有するモノマーを主鎖として繋げていくため、ポリマー粒子が大きくなるほど粒子内部に反応に与らない官能基が増えていくと考えられる。そこで、より効率的な機能性の発揮を目指して検討をはじめた。対象として既報のトリアジン型ポリマー縮合剤を用い、ブレイクダウン、ビルドアップの両法を試みた。ビルドアップ法については、合成法にいくつかの問題があがり検討をつづけているが、ブレイクダウン法により得られたポリマーを用いた水中でのアミド化反応において、微粒子化操作を行っていないものよりも良好な結果が得られた。

NASH 形成過程と長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFA4 シグナルの関係

○小畑友紀雄¹, 中本賀寿夫¹, 森本泰子², 原田慎一¹, 金啓二³, 金守良⁴, 徳山尚吾¹

¹神戸学院大薬・臨床薬学, ²神戸学院大薬・健康支援, ³神戸朝日病院・薬剤部, ⁴神戸朝日病院・消化器科

【背景】非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、肝臓への過剰な脂肪酸蓄積による脂質組成の変化が、その後の病態進行に関与していることが知られている。近年、過剰な脂肪酸暴露によって生じる長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFA4 の機能異常や欠損が、肥満やインスリン抵抗性、さらには肝機能障害を呈することが報告されている。そこで本研究は NASH 進行過程における GPR120/FFA4 の関与を明らかにするために、GPR120/FFA4 ノックアウト (KO) マウスを用いて検討を行った。

【方法】動物は 5 週齢の C57BL/6J (WT) および GPR120/FFA4 KO マウスを使用した。通常食または超高脂肪コリン欠乏メチオニン低減飼料 (CDAHFD ; メチオニン 0.1%、60 Kcal% 脂肪) は 6 週間摂取させ、その 3 週間後から、46% DHA トリグリセリド体 (0.1 ml) を 3 週間経口投与した。血清中の AST および ALT の測定は比色法を用いた。肝臓の形態学的変化はヘマトキシリン・エオジン染色、繊維化はマッソントリクローム染色により評価した。蛋白質発現およびその局在変化は、ウェスタンブロット法および二重免疫組織染色法を用いた。

【結果・考察】CDAHFD の 6 週間摂取により、WT と比較して AST および ALT 値の上昇、大滴性かつびまん性脂肪滴の沈着、炎症性浸潤細胞さらに門脈周囲における線維化が認められた。一方、GPR120/FFA4 KO マウスにおいては、WT と比較してクッパー細胞マーカーの F4/80 および肝星細胞活性化マーカーの α -平滑筋アクチン (α -SMA) の陽性率は、増加する傾向にあった。46% DHA トリグリセリド体投与は、AST および ALT 値の改善効果は認められなかった。現在、CDAHFD 誘発炎症および肝線維化に対する DHA 投与の影響については解析中である。

ddY マウスによるメチオニン低減・コリン欠乏高脂肪食誘発

NASH モデルの作製

○ 藤本恵里花¹, 中本賀寿夫¹, 小畑友紀雄¹, 原田慎一¹, 森本泰子², 金啓二³, 金守良⁴, 徳山尚吾¹

¹ 神戸学院大薬・臨床薬学, ² 神戸学院大薬・健康支援, ³ 神戸朝日病院・薬剤部, ⁴ 神戸朝日病院・消化器科

【背景】非アルコール性脂肪性疾患（NASH）は進行性の慢性肝疾患である。現在、ヒト NASH 病態を模したモデル動物の確立に向けた多くの研究が行われている。そのような中で、最近、Matsumoto らによって超高脂肪コリン欠乏メチオニン低減飼料（CDAHFD；コリン欠乏、メチオニン 0.1% 添加、60 Kcal% 脂肪）を C57BL/6J 雄性マウスに摂取させることによって、ヒト NASH 病態により近似したモデルを作製できることが報告されている。今回、我々は広く汎用されている ddY 系マウスを用いて NASH モデルマウスの作製を試みたので報告する。

【方法】NASH モデルマウスは、CDAHFD を ddY 系雄性マウスに 6、12 および 18 週間摂取させ作製した。コントロール群には、MF 飼料を与え、またポジティブコントロールとして C57BL/6J 雄性マウスを使用した。血清中の AST および ALT の測定は比色法を用いた。肝臓の形態学的変化はヘマトキシリン・エオジン染色、繊維化はマッソントリクローム染色により評価した。蛋白質発現およびその局在変化は、ウエスタンブロット法および二重免疫組織染色法を用いた。

【結果】CDAHFD の摂取によって、ddY 系雄性マウスは著明な体重増加が認められた。一方、C57BL/6J マウスの体重は摂取開始時期と比較して微増であった。いずれのマウスも CDAHFD の 6 週間摂取により、AST および ALT 値の上昇、大滴性かつびまん性脂肪滴の沈着、炎症性浸潤細胞が認められた。12 週間の摂取においては、上記の所見に加えて肝細胞膨潤や門脈周囲の線維化が観察された。さらに 18 週間の摂取では、重度な線維化が認められた。

【結語】ddY 系マウスにおいても CDAHFD を摂取させることで、ヒト NASH により近似した病態モデルを容易かつ安価に作製することが示された。

炎症刺激後のアストロサイトからの遊離脂肪酸の同定

○ 中本賀寿夫¹, 相澤風花¹, 西中 崇¹, 山下琢矢², 小山 豊³, 糟谷史代²,
徳山尚吾¹

¹神戸学院大・薬・臨床薬学、²神戸学院大・薬・毒性学、

³大阪大谷大・薬・薬理学

【目的】アストロサイトは、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの長鎖脂肪酸を神経細胞へ供給し、その活動や機能の調節を担っていることが知られている。しかし、炎症病態時における各種脂肪酸放出能、さらには放出された脂肪酸がアストロサイト自身に与える影響に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、初代培養アストロサイトを用いて、炎症性刺激により惹起される脂肪酸放出能および各種脂肪酸添加の影響について検討を行った。

【方法】 培養アストロサイトは生後 0～3 日齢 Wistar 系ラットの大脳皮質より調製した。リポポリサッカライド (LPS, 100-1000 nM)、腫瘍壊死因子 (TNF- α , 10-50 nM) または DHA などの各種脂肪酸 (1- 500 μ M) を培養アストロサイトへ添加し、24 時間培養を行った。アストロサイトマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) およびリン酸化 p-38 (p-p38) のタンパク質発現変化はウェスタンブロッティング法にて測定した。培養上清中の遊離脂肪酸含量は LC-MS/MS を用いて定量した。

【結果】 LPS および TNF- α 添加後の培養上清中の各種遊離脂肪酸含量は、炎症刺激に応じて増加し、特にパルミチン酸やステアリン酸などの飽和脂肪酸量の著明な増加が認められた。さらに、飽和脂肪酸をアストロサイトへ添加することによって GFAP および p-p38 の発現増加が認められた。これらの増加は、DHA の同時添加によって抑制された。一方、DHA などの不飽和脂肪酸は GFAP の発現を低下した。

【結論】 炎症刺激に伴って、アストロサイトから飽和および不飽和の遊離脂肪酸が放出されることが明らかとなった。また、アストロサイトは飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸のバランスによって、その発現が制御されている可能性が示された。

幼少期ストレス負荷マウスによる神経障害性疼痛後の 情動機能障害における脳内 BDNF の関与

○西中 崇, 中本賀寿夫, 徳山尚吾
神戸学院大学薬・臨床薬学研究室

【背景】幼少期ストレスは、中枢神経系の発達に影響を及ぼし、様々な精神疾患の発症リスクを増加させることが知られている。我々はマウスにおいて、幼少期ストレスが成熟後の神経障害性疼痛を増強させることを報告している。一方、長期間にわたり持続する痛みは、不安障害や抑うつといった情動機能の障害を引き起こすことも知られている。本研究では、神経障害性疼痛による情動機能の障害に対する幼少期ストレスの影響について検討を行った。また、情動機能の調節を担うことが報告されている brain derived neurotrophic factor (BDNF) に着目し、その発現変化について検討を加えた。

【方法】実験には ddY 系のマウスを使用した。幼少期ストレスとして生後 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。次に、9 週齢時において、坐骨神経部分結紮 (PSL) によって神経障害性疼痛モデルを作製した。情動機能の評価には、抑うつ様行動の評価系である強制水泳試験を用いた。脳内の BDNF タンパク質発現は、Western blot 法を用いて検討した。

【結果】PSL 処置 3 週間後に強制水泳試験を行ったところ、ストレス負荷された雌性マウスにおいてのみ無動時間の増加いわゆるうつ状態が認められた。一方、幼少期ストレス負荷後早期に、雄性マウスにおいてのみ脳内 BDNF 発現の増加が認められた。しかしながら、PSL 処置 3 週間後の脳内では、雄性・雌性マウス両方において BDNF 発現に変化は認められなかった。

【考察】以上の結果から、幼少期ストレスの負荷は、雄性マウスに比べ、雌性マウスにおいて神経障害疼痛による情動機能の障害機序に強く影響することが示唆された。この情動機能の障害増悪における性差には、幼少期ストレス負荷時もしくは直後の BDNF の変動が関与している可能性が示された。

母子分離・社会隔離ストレスによる神経障害性疼痛増悪への アストロサイトの関与

○木下恵, 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】痛みには、侵害刺激の部位や強度を認識するという感覚的側面だけでなく、その状況に対し不安や抑うつなどの感情を持つという情動的側面も含まれる。臨床においても、不快な感情が痛みを増悪することや心理学的療法によって痛みが軽減することが知られており、包括的な疼痛治療のためにも、近年この情動機能と疼痛制御の関係性が注目されている。また、疼痛や情動の研究において、様々な役割をもって神経活動に影響を与えるアストロサイトの機能変化が病態に寄与することが報告されている。そこで本研究では、アストロサイトの挙動を追うことによって、情動機能障害による疼痛増悪のメカニズムの解明を試みた。

【方法】実験には ddY 系雄性および雌性マウスを使用し、母子分離・隔離飼育 (MSSI) ストレスを負荷した (Life Sci., 2015)。不安様行動の評価には、高架式十字迷路試験 (EPM) を使用した。神経障害性疼痛モデルは坐骨神経を 1/3~1/2 部分結紮 (PSL) することで作製した。疼痛行動の評価には von Frey 試験 (機械的刺激) を用いた。アストロサイトのマーカータンパク質である glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現変化は、ウェスタンブロット法および免疫組織染色法で検討した。生理食塩水またはリポポリサッカライド (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をラット大脳皮質由来培養アストロサイトへ添加した 24 時間後の培養上清は、両側の青斑核領域へ 0.2 μL の容量で局所投与した。

【結果】MSSI ストレス負荷によって、雌性マウスにおいてのみ不安様行動の増加が認められた。この条件下において、雌性マウスでは青斑核領域の GFAP 発現量が有意に増加した。一方、雄性マウスでは何らの変化も認められなかった。PSL 処置後、機械的刺激に対する反応回数は、対照群に比較して MSSI ストレスを負荷した雄性および雌性マウスとも有意な増加が認められた。同条件下において、青斑核領域の GFAP 発現量は、ストレス負荷 + 偽手術群に比較して、雌性マウスにおいてのみ有意に低下した。さらに、LPS 処置培養アストロサイト上清の青斑核領域への局所投与は、対照群に比較して、雄性・雌性マウスとも不安様行動を増加させた。

【考察】MSSI ストレス負荷による青斑核領域のアストロサイトの活性化は、情動機能障害に関与し、PSL 処置後の機械的アロディニアの増悪に影響を与える可能性が示された。また、この機構は雄性および雌性マウスともに存在するものの、MSSI ストレス負荷に対しては雌性マウスにおいて強く関与することが示唆された。

脳虚血後の糖代謝変化に対する迷走神経を介した orexin-A の作用

○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、視床下部で産生される神経ペプチドである orexin-A (OXA) が、肝臓における insulin シグナル系を賦活化させ、脳虚血性耐糖能異常による神経障害の増悪を抑制することを明らかにした。そこで、本研究では、肝臓の支配神経の一つである迷走神経に着目し、それが OXA による脳虚血後の糖代謝異常および神経障害発現に及ぼす影響について検討した。

【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。OXA (5 pmol/mouse) は、MCAO 直後に単回視床下部内局所投与した。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。中枢移行性のない抗コリン薬である scopolamine butylbromide (10 mg/kg) は、orexin-A 投与 30 分前に腹腔内投与した。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。

【結果】OXA は、MCAO 1 日後の FBG の上昇、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の発現上昇、MCAO 3 日後の梗塞巣形成ならびに行動障害発現を有意に抑制した。この作用は scopolamine または vagotomy によって有意に消失した。また、延髄弧束核 (迷走神経の起始核) 領域において、OXA 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 choline acetyltransferase (ChAT)、orexin-1 受容体と ChAT の共局在が認められた。

【考察】以上の結果から、視床下部の orexin-A による insulin 感受性を改善する機序の一部に、迷走神経が関与している可能性が示唆された。

脳虚血性神経障害発現に対する脳内 sodium-glucose transporter

を介した Na^+ の細胞内流入の影響

○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の高血糖状態が脳虚血性神経障害の発現を増悪させること、さらにこの増悪機序の一部に脳内 sodium-glucose transporter (SGLT) が関与することを報告してきている。しかしながら、脳虚血ストレス負荷後の血糖値上昇と SGLT を介した神経障害の発現増悪機序および脳虚血性神経障害に対する細胞内に流入した Na^+ またはグルコースの直接的な関与については不明である。そこで今回、非代謝性のグルコースアナログで、SGLT によって特異的に輸送されることが知られている alpha-D-methylglucoside (α -MG) を用いて、SGLT を介した Na^+ の流入の神経障害発現への関与について検討を行った。

【方法】 一過性局所脳虚血モデルマウスは、5 週齢の ddY 系雄性マウスに中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion: MCAO, 2 hr) によって作成し、1 日後に空腹時血糖値 (FBG) の変化、梗塞巣形成および行動異常の評価を行った。Phlorizin (PHZ; 40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) および α -MG (2.5, 5.0 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) は再灌流直後および 6 時間後に脳室内投与した。胎生 18 日齢の ddY 系マウスの大脳皮質神経初代培養を用いた。細胞播種後 5 日目に α -MG (0.1, 1, 10, 100 μM) および PHZ (50, 100 μM) を添加し、24 時間後に細胞生存活性の評価を行った。

【結果】 MCAO 1 日後における FBG の有意な上昇は PHZ の脳室内投与によって影響を受けなかった。MCAO 3 日後における梗塞巣形成ならびに行動異常は PHZ の再灌流直後投与では改善しなかったが、6 時間後投与で有意に改善した。 α -MG は濃度依存的に神経生存率の有意な低下を示し、この低下は PHZ の共処置によって濃度依存的に改善した。また、 α -MG の脳室内投与は、MCAO 1 日後の FBG の変化には影響せず、用量依存的に神経障害の発現を増悪させた。

【考察】 以上の結果から、血糖値上昇が開始する脳虚血ストレス負荷 6 時間後に脳内 SGLT を抑制することが、脳虚血性神経障害の改善に有効である可能性が示された。また、SGLT を介した Na^+ の脳神経細胞内への過剰な流入が、脳虚血性神経障害の発現を増悪させる可能性が示唆された。

脳内 sodium-glucose transporter-1 が脳虚血神経障害

に及ぼす影響

○有田恭子、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

【背景】これまでに我々は、脳虚血誘導性の高血糖状態が脳内 sodium-glucose transporter (SGLT) を介して、神経障害の増強に関与することを明らかにしてきた。しかしながら、脳内に発現しているどの SGLT のアイソフォームが関与するのかはいまだ不明である。そこで、今回我々は脳神経上に発現することが報告されている SGLT-1 に着目し、脳虚血性神経障害への関与について検討を行った。

【方法】実験動物は 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 (middle cerebral artery occlusion; MCAO) によって作成した。脳内 SGLT-1 ノックダウンマウスは、SGLT-1 siRNA (2.5 mg/mouse) を脳室内投与することで作成した。MCAO 後の種々の生化学的および神経科学的評価として 1 日後の空腹時血糖値、3 日後の梗塞巣形成および行動異常を測定、観察した。SGLT-1、NeuN および glial fibrillary acidic protein (GFAP) のタンパク質発現は、二重免疫蛍光染色法または western blot 法を用いることによって解析した。

【結果】脳内 SGLT-1 のノックダウンは、MCAO 1 日後の血糖値上昇にはなんら影響を与えずに、3 日後の梗塞巣形成および行動異常を有意に改善した。SGLT-1 は虚血コア領域である大脳皮質および線条体において、神経のマーカである NeuN と共局在したが、アストロサイトのマーカである GFAP とは共局在しなかった。MCAO 処置の 12 時間後の大脳皮質および線条体において SGLT-1 の発現が有意に増加した。

【考察】以上の結果から、脳虚血後に上昇した糖は、脳内の神経上に発現する SGLT-1 を介して、脳虚血性神経障害を増悪する可能性が示唆された。

脳虚血ストレス負荷後の神経障害発現に対する

AMP-activated protein kinase の影響

○平良美沙登, 荻原沙知, 小野安紀子, 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

【背景】 これまでに我々は、脳虚血モデルマウスの糖代謝異常が、その後の神経障害の増悪に影響を与えることを明らかにしてきた。一方、AMP-activated protein kinase (AMPK) は脳神経細胞に局在し、脳虚血ストレス負荷時に活性化することが知られており、神経細胞死に関与することが報告されている。そこで本研究では、大脳皮質神経初代培養を用いて、過酸化水素負荷およびグルコース負荷による細胞死の発現に対する AMPK の関与について検討した。

【方法】 大脳皮質神経細胞は ddY 系マウス妊娠 18 日齢の胎児から単離し、神経初代培養を行った。細胞播種 5 日後に過酸化水素 (100 μ M)、グルコース (8.75, 17.5 mM) または compound C (AMPK 阻害剤: 10 μ M) を負荷し、その 1 日後に WST-8 assay により細胞生存活性を評価した。局所脳虚血モデルは、5 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、中大脳動脈閉塞法 (middle cerebral artery occlusion: MCAO、2 hr) によって作成した。MCAO 後の神経障害発現は、梗塞巣形成および行動障害を評価した。Metformin (AMPK 活性化剤: 100 μ g/mouse) および compound C (40 μ g/mouse) は、MCAO 直後から脳室内投与した。

【結果】 過酸化水素負荷 1 日後に観察された細胞死は、compound C によって有意に抑制された。またグルコースの (17.5 mM) 負荷 1 日後に観察された細胞死に対しても、有意に抑制した。過酸化水素/グルコース (8.75 mM) 併用処置は、過酸化水素単独時よりさらに細胞死が有意に増悪し、それは compound C によって有意に抑制された。MCAO 1 日後において、metformin は、MCAO 後の空腹時血糖値の上昇には何ら影響を与えなかったが、梗塞巣形成および行動障害を有意に増悪し、この作用は compound C の併用で消失した。

【考察】 以上のことから、脳内の AMPK は、脳虚血誘導性糖代謝異常を介した神経障害の発現に一部関与することが示された。

脳虚血性耐糖能異常および神経障害発現に対するチョロギの効果

○元日田まりな¹, 辻田司¹, 原田慎一¹, 森隆治², 徳山尚吾¹

¹神戸学院大薬・臨床薬学,²薬草と健康づくりの会

【目的】チョロギ (*Stachys sieboldii*, Labiatae) は、シソ科の植物であり、その根茎部は日本を含むアジア地域で食用とされている。その成分として、フェニルエタノイド配糖体などが報告されており、脳保護作用を有することが知られている。これまでに我々は脳虚血後早期に認められる高血糖状態を正常へ回復させることで予後が改善することを見出した。そこで、今回、チョロギの脳保護作用機序解明の一つとして、脳虚血後の血糖値変化および神経障害に及ぼす影響に着目し検討を加えた。

【方法】ddY 胎生 18 日齢のマウス大脳皮質を単離し、神経初代培養を行った。細胞播種 5 日後に過酸化水素 (100 μ M) および チョロギ (2.5 mg/mL) を負荷し、その 1 日後に WST-8 assay により細胞生存活性を評価した。5 週齢 ddY 系雄性のマウスを用い、チョロギ (5、10、20 g/kg) は虚血処置前の 5 日間 1 日 1 回経口にて反復投与した。対照群には水道水を投与した。全脳虚血モデルは、チョロギ投与終了 24 時間後に 30 分の両側総頸動脈閉塞法 (bilateral carotid artery occlusion: BCAO) によって作成した。BCAO 後の血糖値変化は、空腹時血糖値、学習・記憶障害および組織学的な細胞死の評価は、一試行性 step-through 型受動回避試験および hematoxylin-eosin 染色を用いた。肝機能および腎機能の評価には、血清中の AST、ALT およびクレアチニン量を比色法を用いて測定した。

【結果】過酸化水素負荷 1 日後に観察された神経細胞の生存率低下に対して、チョロギは有意な改善を示した。BCAO 1 日後の空腹時血糖値の上昇、BCAO 3 日後において認められた学習・記憶障害および細胞死の発現に対し、チョロギ投与群では用量依存的にそれらの改善が認められた。また、肝機能および腎機能には影響を与えなかった。

【考察】以上の結果から、チョロギの有する脳保護作用の機序に、脳虚血後早期における血糖値制御が一部関与している可能性が示唆された。

大脳皮質神経初代培養を用いた過酸化水素／グルコース負荷後の 神経細胞死に対する sodium-glucose transporter type 1 の関与

○荻原沙知, 小野安紀子, 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

【背景】我々は、脳虚血後早期の血糖値上昇による神経障害の増悪機序に、sodium-glucose transporter (SGLT) が関与していることを提唱してきた。さらに、脳梗塞コア領域において SGLT のアイソフォームの一つである SGLT-1 の発現が顕著に上昇することも報告している。そこで本研究では、脳虚血性高血糖誘導性神経障害に対する SGLT-1 の関与を検討するために、大脳皮質神経初代培養を用いて、過酸化水素およびグルコース負荷による細胞死の発現に対する SGLT-1 の関与について検討した。

【方法】胎生 18 日齢のマウス大脳皮質を単離し、神経初代培養を行った。細胞播種 5 日後に酸化ストレスとして過酸化水素 (100 μ M) またはグルコース (8.75, 17.5 mM) を負荷した。Phlorizin (SGLT 阻害剤: 5 μ M) は過酸化水素またはグルコースと同時に処置し、24 時間後に WST-8 assay により細胞生存活性を評価した。SGLT-1 のタンパク質発現は western blot 法を用いて評価した。

【結果】過酸化水素負荷 24 時間後に観察された細胞生存率の低下に対して、phlorizin は何ら影響を及ぼさなかった。一方、グルコース (17.5 mM) 負荷 24 時間後に観察された細胞死に対しては、その低下に対し有意な改善を示した。また、過酸化水素およびグルコース (8.75 mM) 併用処置は、過酸化水素単独処置による細胞生存率の低下よりさらに有意な低下が認められ、それは phlorizin によって有意に抑制された。SGLT-1 の発現は、過酸化水素あるいはグルコース (8.75 mM) をそれぞれ単独負荷した 24 時間後には、何らの変化も認められなかったが、過酸化水素およびグルコース (8.75 mM) の併用処置は、有意な発現上昇を誘導した。

【考察】以上の結果から、過剰のグルコースは細胞死を惹起し、その発現機序の一部に SGLT-1 を介した機序が存在する可能性が示唆された。

脳虚血ストレス負荷後の膵臓におけるインスリン量と

TrkA の関連

○宮城 景, 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に誘発される耐糖能異常（高血糖状態）の発現に、肝臓におけるインスリン感受性の低下が関与し、その高血糖状態は神経障害の増悪を誘発することを明らかにしてきた。しかしながら、その条件下におけるインスリン分泌の関与については、未だ検討が行われていない。近年、神経栄養因子の一種である *nerve growth factor*、またその受容体である *tropomyosin receptor kinase A (TrkA)* が膵臓からインスリン分泌の調節に関与することが報告されている。そこで本研究では、脳虚血ストレス負荷後のインスリン分泌に対する *TrkA* の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 (*middle artery occlusion: MCAO*) によって作成した。偽手術 (*sham*) は、塞栓子を挿入しないものとし、その他は *MCAO* と同様に行った。*MCAO* 後の血糖値変化として空腹時血糖値 (*FBG*) を測定した。血清インスリン量の測定には *ELISA* 法を用いて測定した。脳虚血ストレス負荷後の膵臓における *TrkA* またはインスリンのタンパク発現量は、*western blot* 法または蛍光免疫染色法を用いて測定した。

【結果】*MCAO* 12 時間および 1 日後において、*sham* 群に比較して、空腹時血糖値および血清インスリン量の有意な上昇が認められた。同時に、膵臓において、*insulin* 陽性細胞の有意な増加、*TrkA* の有意な発現量の減少が認められた。さらに、正常マウスの膵臓において、インスリンおよび *TrkA* 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のインスリン分泌制御に対し、その機序の一部に *TrkA* の発現変化が関与している可能性が示唆された。

全脳虚血ストレス負荷後の機械的痛覚過敏に対する

high mobility group box-1 の関与

○松浦渉¹, 春名柚佳¹, 原田慎一¹, 劉克約², 西堀正洋², 徳山尚吾¹

¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室

²岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬理学

【背景】神経障害性疼痛の一つである脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain: CPSP) 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、有効な治療法がほとんど無い。近年、核内 DNA タンパク質である high mobility group box 1 (HMGB1) は、敗血症や脳虚血などの様々な炎症性疾患に関与することに加え、神経障害性疼痛の発症に関わる重要な因子の一つであることが見出された。そこで本研究では、CPSP の発現に対する HMGB1 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 (bilateral carotid arteries occlusion : BCAO) によって作成した。BCAO 5、12、18 時間後、1、3、および 7 日後にマウス後肢の機械的刺激に対する疼痛閾値の変化を von Frey test を用いて行った。BCAO 3 日後に、抗 HMGB1 抗体 (100 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ または 20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) を静脈内または脳室内投与し、疼痛評価を行った。BCAO 後の HMGB1 のタンパク質発現は、western blot 法を用いて解析した。

【結果】BCAO 後に生じる痛覚閾値の低下、すなわち痛覚過敏反応は 1 日後から認められ、7 日後まで持続した。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、抗 HMGB1 抗体の静脈内投与によって、有意に抑制されたが、脳室内投与では影響はみられなかった。一方、BCAO 3 日後の坐骨神経および脊髄において、HMGB1 の有意な発現上昇が認められた。

【考察】以上の結果から、CPSP の発現の一部に、末梢領域における HMGB1 が関与している可能性が考えられた。

全脳虚血ストレス負荷後の機械的痛覚過敏に対する

鎮痛補助薬の影響

○景山絵理香, 松浦 渉, 原田慎一, 徳山尚吾
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室

【背景】脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain: CPSP) は、脳卒中後遺症の一つであり、神経障害性疼痛に分類されている。現在、CPSP に対する標準的に確立された薬物療法はないが、臨床において、神経障害性疼痛に対する治療法に準じて、治療が行われている。これまでに我々は、一過性の全脳虚血モデルを用いて、CPSP を模倣するモデル動物の確立を行った。そこで本研究では、本モデルに対する各種神経障害性疼痛治療薬 (鎮痛補助薬) の影響を検討した。

【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 (bilateral carotid arteries occlusion : BCAO) によって作成した。BCAO 3 日後に、三環系抗うつ薬イミプラミン (20 mg/kg)、抗てんかん薬ガバペンチン (30 mg/kg)、カルバマゼピン (20 mg/kg)、抗不整脈薬メキシレチン (30 mg/kg)、NSAIDs インドメタシン (10 mg/kg) を単回腹腔内、麻薬性鎮痛薬モルヒネ (10 mg/kg) を単回皮下投与し、投与 10、20、30、60 分後にマウス後肢の機械的刺激に対する疼痛閾値の変化を von frey test を用いて行った。

【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、イミプラミン、ガバペンチン、メキシレチンおよびモルヒネ投与群において、対照群に比較して有意な抑制が認められた。しかしながら、インドメタシンおよびカルバマゼピン投与群では、対照群と何ら変化が認められなかった。

【考察】以上の結果から、本モデルにおいて、NSAIDs およびカルバマゼピン以外の神経障害性疼痛治療薬が有効である可能性が示唆された。一方、臨床における CPSP に対して、NSAIDs およびカルバマゼピンは抵抗性を示すことが多いとの報告と今回の結果が一致したことから、CPSP のスクリーニングにおいて本モデルの有用性が高いことが示唆された。