

神戸学院大学ライフサイエンス産学連携研究センター

2015年度研究成果発表会 プログラム

平成28年3月18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」

神戸学院大学大学院 FD 部会

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)
- 9:30～9:50 マウス尾静脈より投与されたシリカ粒子の臓器内での局在*
O-1 The localization of silica particles injected from mouse caudal vein
○榎本理世, 栗山磯子, 李 英培
神戸学院大学 薬学部 薬理学研究室
- 9:50～10:10 生分解性多機能ナノ粒子の作製に向けた Sortase A によるキトサン粒子のタンパク質標識化*
O-2 Protein labeling of chitosan particle by sortase A reaction for preparation of biodegradable multifunctional nanoparticles
○田端厚之¹, 長宗秀明¹, 市川秀喜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
- 10:10～10:30 粒子径の異なる DNA 酵素活性阻害剤内包ナノ製剤の生理活性比較と体内動態観察*
O-3 Pharmacokinetics and bioactivity analysis of the nanoparticles containing DNA polymerases inhibitors
○小野寺威文¹, 栗山磯子¹, 安藤 徹², 榎本理世¹, 市川秀喜², 李 英培¹
¹神戸学院大学 薬学部 薬理学研究室
²神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- 10:30～10:40 休憩
(座長：榎本理世)
- 10:40～11:00 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皮下投与後に及ぼす体内動態への影響*
O-4 Effect of particle size on biodistribution of nanoparticulate L-BPA formulations after subcutaneous administration 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

- 11:00～11:20
O-5 シリカナノ粒子による種々の動物細胞の膜破壊*
Cell Membrane Disruption Induced by Silica Nanoparticles in Different Types of Mammalian Cells
○新戸浩幸¹, 深澤智典², 吉末幸祐³, 手塚幹人³, 織田真由美³
¹福岡大学 工学部 化学システム工学科
²広島大学大学院 工学研究科 物質化学工学部門
³京都大学大学院 工学研究科 化学工学専攻
- 11:20～11:40
O-6 2015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?–
Review of the research activities 2015
– 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
- 11:40～11:50 休憩
- 11:50～12:50 特別講演 I
(座長：市川秀喜)
外部エネルギーと局所増感型ナノデバイスによる低侵襲がん治療
東京工業大学 資源化学研究所 合成化学部門
中村浩之 先生
- 12:50～13:50 お昼休み
- 13:50～15:20 ポスター討論会
一般演題ポスター発表
- P-1 ナノパーティクルの血管応答性への影響*
The effects of Nanoparticles in vascular functions
○屋山勝俊, 宮川葉月, 岩本有希, 松尾愛子, 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 S1 サブサイトを標的としたプラスミン阻害剤の探索*
Exploration of plasmin inhibitors targeting an active site
村本凌太郎¹, 日高興士^{1,2}, 北條恵子^{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 LSC, ³関西分子設計研究会,
⁴広島国際大学 医療栄, ⁵血栓止血神戸プロジェクト

- P-3 JCV アグノタンパク質由来ヘリカルペプチドの poly-Arg 導入とオリゴマー化*
Poly-Arg incorporation and oligomerization of helical peptide derived from JCV agnoprotein
○日高興土, 北條恵子, 藤岡志緒, 津田裕子
神戸学院大学 薬学部 薬品化学研究室
- P-4 グリーンケミストリーを志向したナノ粒子を用いるペプチド合成: 側鎖無保護条件下でのマイクロ波水中ペプチド合成の検討*
Greens-sustainable chemistry oriented aqueous peptide synthesis using amino acid Nanoparticles: Trial of the minimum protection peptide synthesis in water with MW irradiation
○北條恵子^{1,2}, 日高興土^{1,2}, 津田裕子^{1,2}, 福森義信^{1,2}, 市川秀喜^{1,2}
¹神戸学院大学 薬学部, ²神戸学院大学 LSC
- P-5 ROMP 型縮合剤の調製における重合条件の検討*
Study of polymerization conditions in the preparation of a ROMP-type condensing reagent
○早川慎康, 西内祥子, 山口裕貴, 北川秀典, 日置 和人
神戸学院大学 薬学部 機能分子化学研究室
- P-6 ヒト由来乳癌細胞株を用いた乳癌に対するホウ素中性子捕捉療法の前臨床研究
Preclinical study on boron neutron capture therapy for breast cancer with human breast cancer cell lines
○内田裕樹¹, 安藤 徹¹, 藤本卓也², 須藤 保³, 福森義信¹, 市川秀喜¹
¹神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
²兵庫県立がんセンター 整形外科
³兵庫県立がんセンター 研究部
- P-7 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: 自製の振動型コーティング装置にて製した被覆粒子の評価*
Dry-coating of fine pharmaceutical particles using polymeric nano-powder (PNP): Evaluation of coating particles manufactured by self-made vibration coating machinery
○安永峻也¹, 安藤 徹¹, 福森義信², 市川秀喜^{1,2}
¹神戸学院大学 大学院薬学研究科 製剤研究室
²神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

- P-8 感温性パルス放出型マイクロカプセルの設計：ヒト体温付近での温度制御を目指した感温性ナノゲル素子の検討*
Design of microcapsules with pulsatile drug-release in response to temperature changes at the vicinity of human body temperature using thermosensitive nano-gel units
○門田謙人, 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-9 苦味マスクを目的とした多孔性微粒子を核とする薬物放出制御型製剤の設計*
Design of controlled-release formulations by using porous fine core-particles for taste-masking of bitter drugs
○古沢真琴, 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-10 がん中性子捕捉療法のための Gd 含有キトサンナノ粒子製剤 (Gd-nanoCPs) の開発：PEG 化による表面改質の検討とその粒子特性の評価*
Development of gadolinium-loaded chitosan nanoparticles (Gd-nanoCPs) for neutron capture therapy of cancer: Pegylation of Gd-nanoCPs and evaluation of its particle characteristics
○松本まり絵, 安藤 徹, 福森義信, 市川秀喜
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室
- P-11 難水溶性薬物ナノ結晶の固形微粒子製剤化：腸溶性基材を用いた被覆膜組成の検討*
Preparation of solid microparticles using nanocrystals of poorly water-soluble drugs: Formulation considerations on coating-layer of microparticles with an enteric polymer
○廣野ゆう, 福田竜太, 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-12 ガラス製アンプルカットにより発生したナノサイズの不溶性微粒子のリスク評価に向けた模擬ガラス粒子の調製*
Preparation of model glass-particles for the risk assessment of insoluble nano-sized particles generated by glass ampoule opening
○磯野絵梨香, 安藤 徹, 福森義信, 市川秀喜
神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

- P-13 タンパク質デリバリーのための生分解性徐放型微粒子製剤の開発:
キトサンナノ粒子の微細化と粒子間架橋が製剤特性に及ぼす影響*
Development of biodegradable microparticles for prolonged-release of
proteins: Effect of cross-linking and nano-sizing of chitosan particles on
properties of microparticles
○姫野智子, 山崎万純, 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-14 脳虚血後の肝臓における糖代謝および炎症マーカーの発現変化に対す
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 hepatic glucose metabolism and inflammatory makers
○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 脳内 SGLT を介した Na⁺ 流入による脳虚血性神経障害の亢進機序の解
明
Exacerbation of cerebral ischemia-induced neuronal damage mediated by Na⁺
influx through cerebral SGLT
○山崎由衣¹, 吉川絢華¹, 有田恭子¹, 和田哲幸², 吉田 繁³,
原田慎一¹, 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室, ²近畿大学 薬学部,
³近畿大学 理工学部 生命科学
- P-16 全脳虚血誘導性機械的痛覚過敏に対する脊髄 high mobility group
box-1 の関与
Involvement of spinal high mobility group box-1 on the development of
global ischemia-induced hyperalgesia
○松浦 渉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-17 全脳虚血誘導性機械的痛覚過敏に対するトラマドールの抑制作用とそ
の発現機序の解明
Suppressive effect of tramadol mediated through opioid receptors on the
global cerebral ischemia-induced mechanical allodynia
○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
- P-18 全脳虚血誘導性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 cerebral ischemia-induced
mechanical allodynia
○増田風香, 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

- P-19 脳虚血ストレス負荷後の視床下部における Foxa2 の発現変化
Changes in the expression of Foxa2 in hypothalamus after focal cerebral ischemia
○上野彩歌, 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 全脳虚血誘導性うつ様行動に対する評価系の確立
Establishment of evaluation against global cerebral ischemia-induced depression-like behavior
○野崎裕大, 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 高血糖状態が nonalcoholic fatty liver disease に及ぼす影響
Influence of hyperglycemia in nonalcoholic fatty liver disease
○小畑友紀雄¹, 原田慎一¹, 中本賀寿夫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 衛生化学-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-22 コリン欠乏メチオニン低減超高脂肪食誘発 NASH モデルマウスにおける高純度ドコサヘキサエン酸の効果
Effect of high purify docosahexaenoic acid on a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet induced nonalcoholic Steatohepatitis
○藤本恵里花¹, 宮城 景¹, 小畑友紀雄¹, 原田慎一¹, 中本賀寿夫¹, 森本泰子², 平澤 明³, 金 啓二⁴, 金 守良⁵, 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,
³京都大学大学院 薬学研究科 薬理ゲノミクス分野,
⁴神戸朝日病院 薬剤部, ⁵神戸朝日病院 消化器科
- P-23 NASH 病態形成時の脂肪組織炎症および線維化における長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 の関与
The involvement of a long chain fatty acid receptor GPR120/FFAR4 in the adipose inflammation and fibrosis during the development of nonalcoholic steatohepatitis
○島田幸季¹, 宮城 景¹, 小畑友紀雄¹, 原田慎一¹, 中本賀寿夫¹, 森本泰子², 平澤 明³, 金 啓二⁴, 金 守良⁵, 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,
³京都大学大学院 薬学研究院 薬理ゲノミクス分野,
⁴神戸朝日病院 薬剤部, ⁵神戸朝日病院 消化器科

- P-24 幼少期ストレス負荷後の神経障害性疼痛の増悪機構における青斑核アストロサイトの関与
Involvement of astrocyte Activation in Locus Coeruleus on the Exacerbation of Neuropathic Pain by Maternal Separation and Social Isolation Stress
○宮城 景, 木下 恵, 相澤風花, 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-25 母子分離・社会隔離ストレス負荷マウスにおける神経障害性疼痛の増強機構に対する脳内 ERK シグナルの関与
Involvement of brain ERK signaling pathway on the enhancement of neuropathic pain in mice subjected to maternal separation and social isolation
○藤本貴士¹, 春日壮挙¹, 西中 崇¹, 中本賀寿夫¹, 下條正仁², 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室, ²大阪医科大学 麻酔科
- P-26 術後痛時における脳内遊離脂肪酸解析
Analysis of free fatty acids in postoperative pain
○中本賀寿夫¹, 丸尾恵里佳¹, 相澤風花¹, 西中 崇¹, 山下琢矢², 万倉三正³, 小山 豊⁴, 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くらしき作陽大学 食文化学部, ⁴大阪大谷大学 薬学部 薬理学
- P-27 長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の欠損は痛みを増強する
The dysfunction of free fatty acid receptor GPR40/FFAR1 signaling relates the development of chronic pain
○京谷奈月¹, 相澤風花¹, 西中 崇¹, 中本賀寿夫¹, 山下琢矢², 万倉三正³, 小山 豊⁴, 糟谷史代², 平澤 明⁵, 栗原 崇⁶, 宮田篤郎⁶, 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究,
²神戸学院大学 薬学部 毒性学研究室,
³くらしき作陽大学 食文化学部, ⁴大阪大谷大学 薬学部 薬理学,
⁵京都大学大学院 薬学研究科 薬理ゲノミクス分野,
⁶鹿児島大学大学院 歯学総合研究科 生体情報薬理学
- P-28 長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 欠損雌性マウスにおける情動および母性行動
Analysis of emotional and maternal behavior in a free fatty acids receptor GPR40/FFAR1 deficient mice
○大垣圭弘¹, 西中 崇¹, 相澤風花¹, 中本賀寿夫¹, 平澤 明², 栗原 崇³, 宮田篤郎³, 徳山尚吾¹
¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究,
²京都大学大学院 薬学研究科 薬理ゲノミクス分野,
³鹿児島大大学院 歯学総合研究科 生体情報薬理学

P-29	反復社会敗北ストレス負荷後の情動機能障害に対する長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 アゴニストの効果 Effect of long-chain fatty acid receptor, GPR40/FFAR1, agonist on the emotional dysfunction by exposure to repeated social defeat 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
15:20～15:30	休憩
15:30～16:30	特別講演Ⅱ ペプチドを基盤とする創薬研究 京都大学大学院 薬学研究科 藤井信孝 先生 (座長：津田裕子)
16:30～16:40	休憩
16:40～17:40	特別講演Ⅲ 網膜疾患とその治療薬に関する研究 岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室 原 英彰 先生 (座長：徳山尚吾)
17:40～17:45	閉会の挨拶 LSC 運営委員長 李 英培
18:00～	意見交換会 (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

外部エネルギーと局所増感型ナノデバイスによる低侵襲がん治療

中村 浩之

東京工業大学 資源化学研究所 合成化学部門

我々は、外部からのエネルギーによって、がん組織といった生体内局所環境で増感可能なナノデバイスの開発を行うことにより、QOL の高い低侵襲がん治療法の確立を目指している。リポソームのようなナノ粒子は、血管構築が未熟な腫瘍血管から漏洩し、さらに腫瘍組織ではリンパ管回収機構が不完全なため蓄積することが知られている。我々は、リポソーム二分子膜を構成する生体リン脂質の構造を模倣することで、リポソーム膜への増感剤の導入を考案した。本講演では、中性子捕捉療法ならびに光線力学的療法のための、生体内局所増感型ナノデバイスについて紹介する。

中性子捕捉療法は、低エネルギーである熱・熱外中性子がホウ素との核反応により生ずる強力な粒子線を用いてがん細胞を殺傷する治療法である。がん部位へホウ素デリバリーと中性子線のダブルターゲティングが可能であることから、正常組織へのダメージもきわめて低く、治療後の患者への負担が極めて小さい特徴をもつ。我が国では、世界で初めて BNCT 用小型加速器の開発に成功し、2012 年からホウ素薬剤 BPA と加速器を用いた脳腫瘍ならびに頭頸部がんを対象とした第 1 相臨床試験が始められ、2016 年からは第 2 相臨床試験が計画されている。一方で、BPA 非感受性がん患者も多いことから、こういった患者への適応拡大を目的に、次世代ホウ素デリバリーシステムの構築に着手した。我々は、ホウ素脂質の合成し、そのリポソーム化に成功した。担がんマウスを用いた実験では、この高集積ホウ素リポソームは高濃度で腫瘍内に蓄積し、中性子照射によって高い抗腫瘍効果が得られた。

光線力学的治療法は、ポルフィリン化合物のような光感受性物質に対して、低エネルギーのレーザー光を照射した際に発生する活性酸素 (ROS: Reactive Oxygen Species) によって、腫瘍細胞を殺傷する治療法である。我々は、生体内でも生合成されている PPIX (protoporphyrin IX) に着目し、長鎖炭素鎖を導入した PPIX 脂質の合成に成功した。PPIX 脂質は容易にリポソーム膜に挿入することができ、効率よく細胞内に取り込まれることが分かった。また、がん細胞に対する光線力学的治療効果と光感受性化合物の局在に関係があることが報告された。そこで、PPIX 脂質の局在を明らかにし、その細胞死を引き起こす ROS の化学反応機構を検証した。その結果、光感受性物質は細胞質よりも細胞膜に局在する方が、光線力学的治療効果が高いことが分かった。これは ROS が細胞膜構成成分に含まれる脂質の二重結合部への酸化を引き起こし、それによって細胞膜が構造的に変化し、細胞内部の物質が漏出することで、高い細胞殺傷効果を誘導することを明らかにした。

ペプチドを基盤とする創薬研究

藤井 信孝

京都大学大学院薬学研究科

最近、中分子創薬のリソースとしてペプチドの活用に注目が集まっている。ペプチド性化合物の医薬品としての応用には生体内安定性や膜透過性等の問題を解決する必要がある。ペプチド結合は、蛋白質やペプチドの普遍的な共通構造であり、二次構造や高次構造の形成、蛋白質間相互作用、薬物と酵素や受容体との相互作用等に重要な役割を果たしていることが多い。演者らは、ペプチド結合の平面性に基づいて各種のアルケン型ジペプチドイソスターに着目し、有機銅試薬や遷移金属の特性を活用して、アミノ酸をキラルプールとする立体選択的合成法を確立した。更に、CXCR4、GPR54、NK3R等のG蛋白質共役型受容体のペプチド性リガンドへ導入して有用性を立証した。

演者らは兜蟹由来の抗菌ペプチドの構造活性相関研究により強力な抗HIV活性を有するT22 [ポリフェムシンII誘導体]を見出した。その後T細胞指向性HIVの第二受容体としてCXCR4が同定され、T22およびその短鎖誘導体(T140)は分子プローブとしてCXCR4の生理的役割、病理的役割の解明に広く利用されている。特に、各種の癌の転移や増殖へのCXCR4の関与が明らかにされ、BKT140はAML(急性骨髄性白血病)に対する臨床試験が実施されている。更に、T140の活性発現に必須なファルマコフォアを配置した環状5残基ペプチドライブラリーから、同等の活性を有するFC131を見出し、各種ジペプチドイソスターを活用した構造活性研究により、親化合物の約30倍の活性を有するアミジン型ペプチドミメティクスを見出している。

HIVは、表面蛋白質(gp41)のN-端側ペプチド領域(HR1)とC-端側ペプチド領域(HR2)が6-ヘリカルバンドル構造を形成することにより、宿主細胞との膜融合・感染が成立する。演者らは、HR2由来膜融合阻害ペプチド(C34やT20)に分子内アルファヘリックス構造を誘起するXEEXKKモチーフ(X:N-端側ペプチドとの相互作用に必須なアミノ酸、E:グルタミン酸、K:リジン)を連続的に導入する分子設計法を検証した。その結果、6-ヘリカルバンドル構造形成能と抗HIV活性を大幅に向上したSC34EKおよびT20EKを見出した。これらのペプチドは臨床で用いられているT20(フゼオン)耐性株にも強力な活性を示した。ここで用いた分子設計概念は同様なI型膜融合機構を利用する他のウイルスの膜融合阻害剤にも応用可能である。

本講演では、上記三つの研究に焦点を宛てて、ペプチドを基盤とする演者らの創薬研究について詳述する。

網膜疾患とその治療薬に関する研究

原 英彰

岐阜薬科大学薬効解析学研究室

本講演会では、(1) 網膜疾患とその治療薬について、並びに (2) ブルーライトによる視機能障害の 2 つのパートに分けて話しをする。

(1) 糖尿病網膜症や加齢黄斑変性症の病態には、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) が深く関与していることが明らかになってきた。事実、これら病態の治療には、抗 VEGF 薬が有効である。しかし、これら薬剤は硝子体への直接投与のために、患者へのコンプライアンス維持や身体的な負担、眼内炎などの副作用など課題もある。我々は基礎薬理学的な検討の結果、カリジノゲナーゼは VEGF を切断し、眼内での VEGF の増加を抑制している可能性を見出した。また新たなマウス網膜虚血モデルを確立した。そのモデルを用いてカリジノゲナーゼは、眼虚血による網膜障害に対して抑制作用を示し、その作用機序には eNOS のリン酸化上昇および NF- κ B のリン酸化抑制作用を介した網膜神経節細胞死および膜透過性亢進の抑制が関与している可能性を明らかにした。さらに、我々は最近マウス網膜静脈分枝閉塞症 (Branch Retinal Vein Occlusion: BRVO) モデルの確立も行った。これまでのモデルは嚢胞状浮腫が形成されず、病態を正確に反映しているとは言えなかったが、今回嚢胞状浮腫を伴うマウス BRVO モデルを確立することができた。本モデルを用いることによって、より詳細な病態解明を行うことが可能となった。以上、本講演では、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性症及び網膜虚血などによる網膜血管病変に対するカリジノゲナーゼの可能性について、基礎薬理学的視点から述べる。

(2) 近年、テレビ、パソコン、スマートフォン、タブレットなどの液晶ディスプレイが普及している。これら液晶ディスプレイには青色光が多く含まれており、さらに LED を備えたディスプレイも普及してきている。青色光はすでに眼に及ぼす影響が懸念されているが、青色 LED 光による眼に対する影響は未だ明らかにされていない部分が多い。当研究室では青色 LED 光の網膜視細胞への影響とそのメカニズムを明らかにすることを行ってきた。青色 LED 光は、白色および緑色 LED 光と比較して網膜視細胞への障害性が高いことが示唆された。その一因として ROS 産生量の増加、ストレス応答性タンパクの変化、S-opsin の凝集が関与している可能性が考えられている。また、培養細胞だけではなく、マウスにおいても青色 LED 光の照射により網膜障害が惹起され、網膜機能が低下することが示された。このように、青色 LED 光の視機能に及ぼす影響について考察したい。さらに最近確立したゼブラフィッシュやサルを用いた網膜疾患モデルについても紹介する。

マウス尾静脈より投与されたシリカ粒子の臓器内での局在

○榎本 理世, 栗山磯子, 李 英培
神戸学院大学薬学部薬理学研究室

生体のほぼすべての組織には恒常的にマクロファージが存在しており、それぞれの組織に特化した役割を担っていることが知られている。すなわち、肝臓のクッパー細胞、脳のミクログリア、骨の破骨細胞、脾臓マクロファージ、肺胞マクロファージ、腸管マクロファージなどである。マクロファージに共通の機能として貪食があり、生体内での異物や死細胞、毒素の処理などに大きな役割を果たしている。

私たちはこれまでに、マウス尾静脈から投与した蛍光シリカ粒子の生体内での分布を *in vivo* イメージングにより調べ、粒子が肝臓および脾臓に集積することを明らかにした。今回は、これらの粒子が臓器内でどのように分布しているかを明らかにするために、*in vivo* イメージング後に肝臓および脾臓を摘出し、凍結切片を作成して顕微鏡で観察を行った。

肝臓は直径約 0.1 cm の小葉という構造の集まりでできており、一個の小葉には約 50 万個の肝細胞が存在する。肝細胞は中心静脈を中心に放射状にならび、その間に類洞と呼ばれる毛細血管がある。クッパー細胞は類洞内皮細胞などともに類洞壁を構成する細胞であり、門脈枝から類洞を通して中心静脈に流れる血液中の異物を監視している。肝臓の凍結切片を観察すると、類洞内に粒子の集積が認められることから、クッパー細胞による粒子の貪食が示唆された。

脾臓は赤脾髄と白脾髄で構成されており、白脾髄は、免疫系の一部リンパ球を産生している。一方、赤脾髄は血液をろ過することによりウイルスや細菌などの微生物や古くなった赤血球を不要な物質として認識し、取り除く働きをしている。脾臓の血管は動脈と静脈がつながっていない開放系となっており、流れ出た血液が脾索のネットワークを通過する間にそこに存在する脾臓マクロファージによって不要な物質の貪食が行われる。脾臓の凍結切片を観察すると、赤脾髄にシリカ粒子の集積が認められることから、脾臓マクロファージによる粒子の貪食が、脾臓における粒子の集積に関与するものと考えられた。

以上より、肝臓および脾臓への粒子の集積には、組織に局在するマクロファージが関与していることが明らかとなった。

生分解性多機能ナノ粒子の作製に向けた Sortase A によるキトサン粒子のタンパク質標識化

○田端 厚之¹, 長宗 秀明¹, 市川 秀喜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 製剤学研究室

我々は、細菌由来の機能性タンパク質の応用に関する研究を展開している。本年度は、グラム陽性細菌由来のペプチド転移酵素 Sortase A (SrtA)を用いた表面加工システムを応用し、生分解性物質であるキトサンナノ粒子に対するペプチド転移反応性を、ポリスチレンビーズを担体とした SrtA 反応評価系と比較した。また、このキトサンナノ粒子を素材とした新たなドラッグデリバリーシステム(DDS)として、標的化分子とエフェクター分子を粒子表面に固定化して細胞外で機能することを企図した、多価性 DDS ツールによる細胞性免疫の活性化に基づく癌攻撃用 DDS の作製を進めることとした。標的化分子としては、癌胎児性抗原(CEA)に対する単クローン抗体(MAb)F33、エフェクター分子としては CD3 に結合し T 細胞を活性化できる MAb の OKT3 由来の可変領域を持ち、その C 末端側に SrtA の認識配列を持つ組換え一本鎖 Fv 抗体(scFv)を作製した。後者については scFvHL-OKT3 を選択し、SrtA によるペプチド転移反応によるキトサンナノ粒子の表面修飾も試みた。

まず、SrtA の典型的認識配列 LPETG を C 末側に持つ緑色蛍光タンパク質をモデル転移基質とし、受容基質ペプチド GGGGGC を固定化したキトサン粒子とポリスチレンビーズを受容体マトリクスとし、SrtA による転移反応をセルアナライザーで評価した。その結果、モデル転移基質濃度に依存的な転移反応が確認された。転移受容体マトリクスを真球と仮定して単位表面積あたりの蛍光値を比較した結果、基質転移反応はキトサン粒子の方が優れていた。これは、キトサン粒子が多孔性ネット構造であり、SrtA と反応できる受容基質末端がポリスチレンビーズより多く存在したことによると推察された。さらに scFvHL-OKT3 を転移基質として、キトサン粒子に対する SrtA による基質転移反応を検討した結果、キトサン粒子への scFvHL-OKT3 の転移を示唆する結果が得られた。これらのことから、今回新たに検討したキトサン粒子においても、従来のポリスチレンビーズと同様に SrtA 転移反応によるタンパク質標識化が可能であり、生分解性多機能ナノ粒子への応用が検討されているキトサン粒子をマルチプラットフォームとして利用した新規癌標的化 DDS ツールの開発が期待される。なお、年次計画で今年予定されていた DDS ツールの *in vivo* における評価は、次年度に実施する予定である。

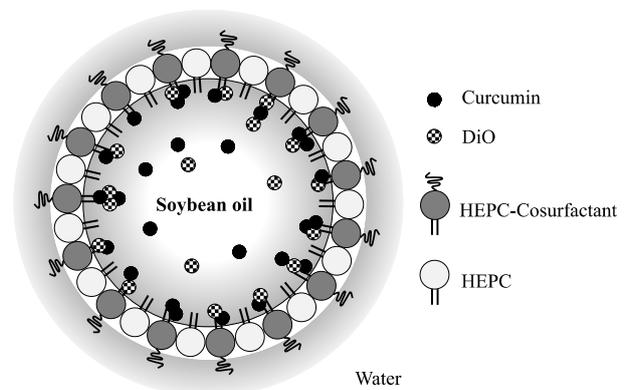
粒子径の異なる DNA 酵素活性阻害剤内包ナノ製剤の 生理活性比較と体内動態観察

○小野寺威文¹, 栗山磯子¹, 安藤 徹², 榎本理世¹, 市川秀喜², 李 英培¹
¹薬学部 薬理学研究室, ²薬学部 製剤学研究室

【目的】 食品の黄色色素として知られているクルクミンには、抗炎症や抗アレルギー活性があり、DNA 修復・組換え型の DNA ポリメラーゼⅡ (以下、PolⅡ) を特異的に阻害することが知られている。しかしながら、クルクミンは水に難溶な物質であるため、生体内への投与が難しく扱いづらい。これまでの研究から、クルクミンを内包したリピッドエマルジョン (ナノ製剤) を作製することで生体吸収効率の改善を行い、粒子径の違いによって細胞に対する生理活性が異なることが新たに見出された⁽¹⁾。なぜ粒子径が異なると生理活性に差が出るのか明らかにすることを目的として、蛍光色素とクルクミンを内包させたリピッドエマルジョンを作製し、共焦点レーザー顕微鏡観察、フローサイトメトリー解析にて、蛍光色素クルクミン内包エマルジョンの細胞内局在および取り込み量を比較した。

【方法】 クルクミンと蛍光色素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、脂溶性カルボシアニン蛍光色素 DiO 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様細胞株 (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ラット好塩基球白血球細胞株 (RBL-2H3) 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。また、細胞培養し、クルクミンおよび蛍光色素内包エマルジョンを添加して 24 時間後に細胞を固定して共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。同様に、クルクミンおよび蛍光色素内包エマルジョンを添加後、細胞を回収し、PBS に懸濁して細胞浮遊液とし、フローサイトメトリー解析を行った。

【結果と考察】 クルクミン内包リピッドエマルジョンの抗炎症活性、抗アレルギー活性は、粒子径が 100 nm > 200 nm > 50 nm の順に生理活性が高かった。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⁽¹⁾。顕微鏡観察により、蛍光色素クルクミン内包エマルジョンは細胞内に局在することが確かめられ、抗炎症および抗アレルギー作用は取り込まれたクルクミンによる生理活性であると考えられた。また、エマルジョンの粒子径の違いによる細胞への取り込み量は、生理活性の測定結果と同様に、粒子径が 100 nm > 200 nm > 50 nm の順に増大した。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、クルクミン由来の生理活性作用の差は、細胞のクルクミン内包リピッドエマルジョン取り込み量が異なるためであるということが明らかとなった。



【図1】 作製したリピッドエマルジョン(ナノ製剤)の構造

(1) Onodera *et al.* (2015) *Int. J. Mol. Med.*

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皮下投与後に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 整形外科

【目的】がんのホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) では、腫瘍内の ¹⁰B 濃度が治療効果の発現に重要であり、腫瘍内で 20 µg/g wet tissue (ppm) 以上が必要とされ、¹⁰B をより高濃度蓄積かつ長時間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 自体がアミノ酸類似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 化により腫瘍内や投与部位に蓄積し、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、担がん動物へ皮下投与によって高度ではないものの 20 ppm 以上の腫瘍内 ¹⁰B 濃度を 9 h 維持することを示してきた。本検討では、BPA-NS の微細化が血中移行速度を変化させ、腫瘍内 ¹⁰B 濃度を上昇させるものと考え、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 細胞をマウスの臀部に皮下移植した担がんモデルを作成した。BPA-NS または BPA-Fr を担がん動物の頸部皮下へ投与した。所定時間後に採血し、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】BPA-NS の平均粒子径はそれぞれ 144 nm (NS150), 283 nm (NS300) であった。BPA-Fr の皮下投与は、投与後速やかに血中へ移行し、血中での平均滞留時間 (MRT) が 7.2 h、腫瘍内 ¹⁰B 濃度は、投与後 1 h でピーク (43 ppm) を迎えた。それに対し、BPA-NS の皮下投与では、血中移行が BPA-Fr と比較して緩やかになり、血中 MRT は NS150 で 10.4 h、NS300 で 11.4 h と BPA-Fr の皮下投与より有意に延長した。これは投与 24 h 後まで皮下で粒子として残留していたことから、残留した粒子より一定の割合で血中に移行し続けたものと考えられる。微細化した NS150 では血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) が 148 µg·hr/mL と NS300 の 109 µg·hr/mL より有意に向上したことから、BPA-NS の微細化は血中移行速度の上昇をもたらし、皮下に残留する粒子が NS300 と比較して減少したものと考えられる。腫瘍内 ¹⁰B 濃度は、NS300 が投与後 9 h でピーク (28 ppm) を、NS150 が投与後 6 h でピーク (36 ppm) を迎え、それぞれ 20 ppm を投与後 3-12 h までの 9 h 維持した。さらに NS150 の腫瘍内 AUC は BPA-Fr および NS300 の皮下投与群のそれを有意に上回る結果を得た。これらは、BPA-NS の微細化がもたらす血中 AUC の向上に伴い、BPA-Fr の皮下投与では排泄、NS300 の皮下投与では残留されていた L-BPA が血中に移行・維持されることで、より腫瘍へ移行する可能性が高まったものと考えられる。今後、皮下に残留する粒子の割合をさらに減少させ、腫瘍内 ¹⁰B 濃度のさらなる向上を目指した検討を行いたい。

シリカナノ粒子による種々の動物細胞の膜破壊

○新戸 浩幸¹, 深澤 智典², 吉末幸祐³, 手塚幹人³, 織田真由美³¹ 福岡大学 工学部 化学システム工学科² 広島大学大学院 工学研究科 物質化学工学部門³ 京都大学大学院 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ので、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。

本研究では、現在多量に使用されているナノ粒子の1つであるシリカ粒子を取り上げる。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、大食細胞 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℃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。

Fig. 1 に、シリカ粒子による赤血球の膜損傷性を示す。表面積量という尺度でプロットすれば、シリカ粒子の膜損傷性は、粒子径に依存せずに、一本のマスターカーブで表させることが分かる。このようなシリカ粒子の膜損傷性の挙動は、他の動物細胞(Jurkat、B16F10、J774.1)でも見られた。

Fig. 2 に示すように、シリカ粒子の生体膜への付着力を検討するため、コロイドプローブ原子間力顕微鏡法により、シリカ球と B16F10 細胞または巨大ベシクルとの相互作用力を直接測定した。

【引用文献】 H. Shinto, T. Fukasawa, K. Yoshisue, M. Tezuka, M. Orita “Cell membrane disruption induced by amorphous silica nanoparticles in erythrocytes, lymphocytes, malignant melanocytes, and macrophages”, *Advanced Powder Technology*, 25, 1872-1881 (2014).

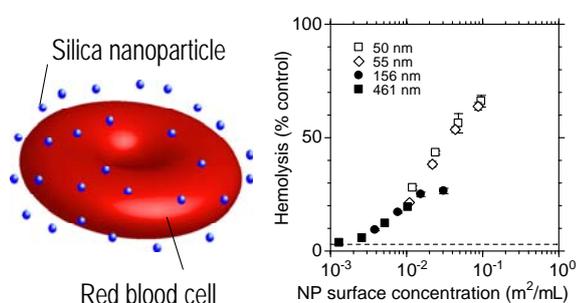


Fig. 1 Hemolysis of RBCs as a function of concentration of the NPs' surfaces, after 4-hours exposure of 50, 55, 156, and 461-nm silica NPs.

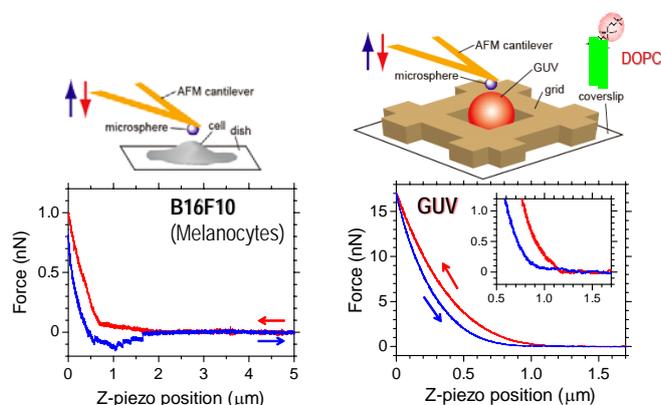


Fig. 2 Interaction between silica microsphere and cell surfaces measured by colloid-probe AFM.

2015 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

我々は種々の疾患の発症メカニズムの解明に焦点を当て、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

我々は、長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 を介して、疼痛制御を担っていることを世界に先駆けて提唱してきた (Nakamoto *et al.*, Br J Pharmacol., 2015)。最近、視床下部 GPR40/FFAR1 シグナルが、 β -エンドルフィン の切り出しを行う酵素 prohormone convertase (PC) 2 のタンパク質発現の調節を行うことを報告した。 (Nakamoto *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 2015)。

・耐糖能障害による脳血管障害増悪機序の解明

脳虚血後のインスリン抵抗性の発現に対し、膵臓における NGF/TrkA 系を介したインスリン分泌機構が関与する可能性を見出した (Miyagi *et al.*, Biol. Pharm. Bull., 2015)。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) およびそのアイソフォームの 1 つである SGLT-1 が関与する知見も見出した (Yamazaki *et al.*, Neuroscience, 2015; Yamazaki *et al.*, Neuroscience Lett., 2015)。

・脳卒中後疼痛の発現機序の解明および治療戦略の確立

脳卒中後疼痛を模する全脳虚血モデルに対し、神経障害性疼痛の治療薬として用いられている鎮痛補助薬に関し、その効果を検討した (Matsuura *et al.*, Biol. Pharm. Bull., in press.)。さらに、その発現に関与する因子をプロテオーム解析によって網羅的に解析し、関与する可能性のある 4 つの因子の同定に成功した (Harada *et al.*, Biol. Pharm. Bull., 2015)。

・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報告した (Nishinaka *et al.*, Life Sci., 2015; Neurosci. Lett., 2015)。最近、幼少期ストレス負荷後の疼痛関連脳領域において、神経活性化に雌雄差が生じることを発見し、これらの差異が情動や疼痛行動に影響する可能性を提唱した。(Nishinaka T, *et al.*, Eur J Pain, 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の解明

現在、肝疾患の中でも、NASH に対する注目は高い。現在までに、NASH モデルを確立し、その発症機序における長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 の関与やなど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。

ナノパーティクルの血管応答性への影響

○屋山勝俊, 宮川葉月, 岩本有希, 松尾愛子, 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

【目的】 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、ナノシリカ (nSP) を用い、ラット胸部大動脈血管平滑筋細胞に (VSMC) nSP を添加し細胞内のカルシウム濃度が変化するかを検討した。また、血管リング標本を用い nSP の血管収縮への影響も検討した。

【実験】 (1) 血管収縮実験：7週齢 Wistar 雄性ラットの胸部大動脈から血管内皮細胞を除去した血管リング標本を作製し、nSP による血管収縮応答を測定した。また、種々阻害剤の添加実験では、nSP の添加 15 分前に阻害剤の添加を行った。(2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定：VSMC に蛍光 Ca^{2+} インジケータFluo-4 を負荷した。この細胞に nSP を添加し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV-1000 を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。なお、阻害剤の添加実験では、nSP の添加 15 分前に阻害剤の添加を行った。今回の検討には、粒子径、10 nm (nSP10)、70 nm (nSP70)、200 nm (nSP200) の nSP を用いた。

【結果と考察】 血管リング標本に nSP を添加すると、nSP10、nSP70 では添加した nSP の濃度に応じて血管の収縮を認めた。一方、nSP200 の添加では、血管の収縮が認められなかった。次に、この収縮にラフトの形成並びに (Phosphoinositide 3-kinase) PI3K 系の関与があるかを知る目的で、ラフト形成阻害剤、メチルβシクロデキストリン、PI3K 阻害剤、ウオルトマニンを前処置し収縮への影響を検討したところ、これら阻害剤の添加は、nSP による収縮を有意に抑制した。さらに、VSMC に nSP を添加すると、nSP10、nSP70 の添加において細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められ、この Ca^{2+} 濃度の上昇は予めメチルβシクロデキストリンあるいはウオルトマニンを前処置することにより抑制された。以上の結果より、nSP10、nSP70 は血管を収縮させることが明らかとなった。そして、血管の収縮にはラフトの形成、PI3K 系の活性化、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇

S1 サブサイトを標的としたプラスミン阻害剤の探索

村本 凌太郎¹、日高 興士^{1,2}、北條 恵子^{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広島国際大学医療栄養学部, ⁵血栓止血研究プロジェクト

【目的】プラスミン(P1m)は血栓の除去に関わる線溶系において中心的役割を果たすトリプシン様酵素である。しかし、P1mは線溶系のみならず他の系のタンパク質を分解して、様々な病態に深く関わっている多機能性酵素でもある。P1mが a) 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組織浸潤および転移、b) サイトカインの活性化による炎症の発症、といった病態に関わっていることは広く知られている。我々は P1m の病態時の役割の解明、ならびに病態の改善を目的として、活性中心指向型 PL 阻害剤、Y0-2 ($IC_{50}=0.53 \mu M$ for P1m) [1]を基盤とした新規 PL 阻害剤の分子設計をおこなっている。

【結果および考察】Y0-2 [1]はトラネキサム酸(Tra) (P1 残基)、Tyr(*O*Pic) (P2 残基)、およびオクチルアミン (OA) (P' 1 残基)の3つのグループから構成されている[2]。今回は、P1 残基の置換、即ち 1) シクロヘキシル環のベンゼン環への置換、2) Tra のアミノ基の除去を試み、P1m 阻害活性への影響を検討した。合成はペプチド液相法合成の常法に従っておこない、HPLC で精製した最終生成物は、HPLC, ESI-TOF MS で同定した。P1m 阻害活性は合成基質 S-2251 を用いて測定した。これら化合物のうち、P1 残基として Tra の代わりにアミノメチル安息香酸を導入した化合物 (PSI-280) は、Y0-2 には及ばえないながら最も強力な P1m 阻害 ($IC_{50}=0.92 \mu M$) を示した。アミノ基をもたない各種チオフエンカルボン酸を導入した化合物 (PSI-212~218) は、1,000 μM の濃度で P1m を阻害しなかった。Tra と S1 サブサイトとの相互作用には、アミノ基ばかりではなく、P1 残基の疎水性部分の幅と深さが重要であることが示唆された。

[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).

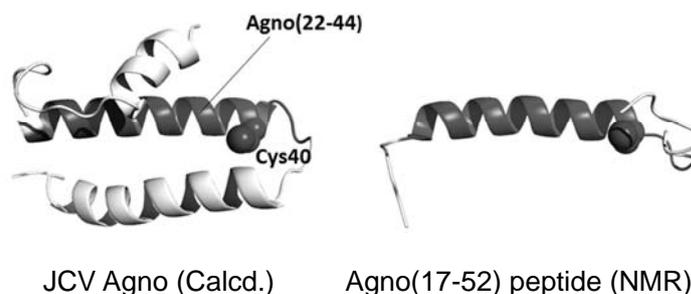
JCV アグノタンパク質由来ヘリカルペプチドの poly-Arg 導入とオリゴマー化

○日高興士, 北條恵子, 藤岡志緒, 津田裕子
神戸学院大学薬学部 薬品化学研究室

JC ウイルス(JCV)は世界中のヒトに広く蔓延しており、腎臓や骨髄に潜伏感染している。HIV 感染や免疫抑制剤により高度に免疫不全になると脳内で JCV が増殖してオリゴデンドロサイトを破壊し、重度の脱髄が起こる進行性多巣性白質脳症 (PML) を発症する。PML の予後は極めて悪く、現在治療薬はない。JCV がもつアグノタンパク質 (Agno) は転写、複製、アセンブリー、放出など様々な段階に関与してウイルス増殖に必須であり、抗 JCV 薬開発の標的である。Agno は細胞膜でオリゴマーを形成して viroporin 活性を示し、Agno 断片 (17-52) の NMR 解析からヘリックス構造をもつことが示されたが、構造とオリゴマー化の関係は不明である。そこで、我々の研究グループは膜貫通領域とされる 22-44 残基のペプチドを用いてオリゴマー化標的部位を特定し、オリゴマー化阻害剤の設計を目指した。

昨年の報告では Agno(22-44)ペプチドが水溶液中で β -シート構造をとり、SDS ミセルの存在下で α -ヘリックスに変化することを示した。また、酸化剤やビスマレイミド架橋剤による多量体形成の促進が見られ、C40A 変異体では見られないことから、オリゴマー化における 40 位の Cys 残基の関与を示した[1]。Agno(22-44)ペプチドは酸性および塩基性アミノ酸残基により静電的に中性で難水溶性であるため、多量体形成が凝集により引き起こされた可能性がある。そこで、我々は poly-Arg 残基を N 末端に導入した誘導体を合成した。poly-Arg 導入ペプチドは水溶性であり、PBS 中の CD スペクトルよりシート構造含有率は低く、チオフラビン T の蛍光値の増加は見られず、天然型や C40A 変異体ペプチドのように凝集しなかった。また、PBS 中で二量体を形成し、興味深いことに、ビスマレイミド架橋剤によりこれまでとは異なる高次多量体を形成した。今後は可溶化した多量体の解析と Agno の化学合成を進め、阻害剤設計を行う予定である。

Poly-Arg conjugated Agno(22-44) peptide: H-rrrrrrr-bA-KKRAQRILIFLLEFL LDFCTGED-NH₂
r, D-Arg; bA, beta-Ala



[1] Hidaka, K., et al., *Amino Acids*, **47**, 2205 (2015).

グリーンケミストリーを志向したナノ粒子を用いるペプチド合成：
側鎖無保護条件下でのマイクロ波水中ペプチド合成の検討

○北條 恵子^{1,2}, 日高 興士^{1,2}, 津田 裕子^{1,2}, 福森 義信^{1,2}, 市川 秀喜^{1,2}

¹神戸学院大薬, ²神戸学院大 LSC

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。また、水中反応の課題である、ペプチド鎖の凝集、遅い反応速度についてもマイクロ波を組み合わせることで、迅速な水中ペプチド合成を達成し、合成困難なペプチドの合成が可能であることも示してきた [1]。

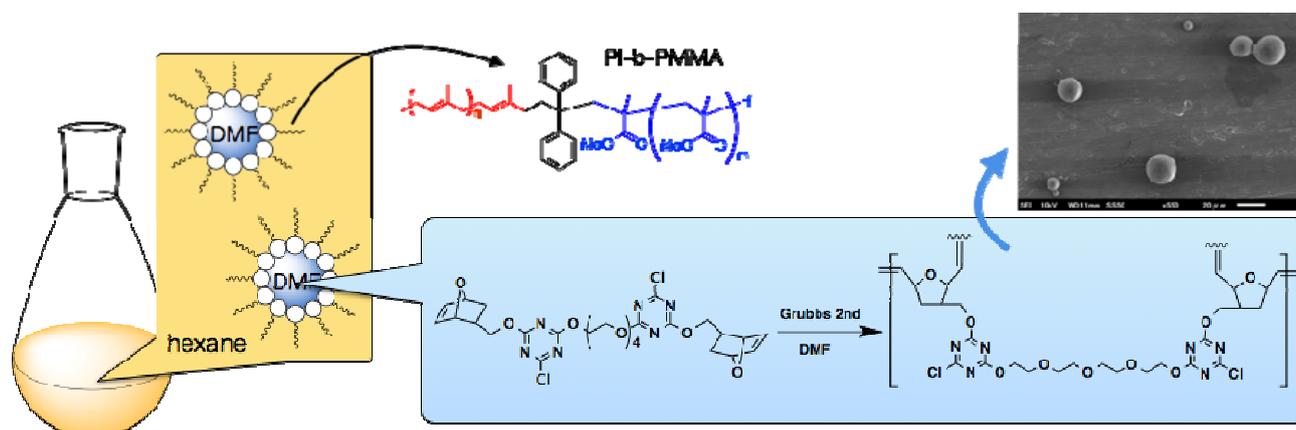
本年度は、更なる環境調和型の合成を目指し、グリーンケミストリー12原則にもあげられる最小保護条件下の合成について、検討を行った。ペプチド合成では、反応性の高い側鎖は副反応を避けるため、保護となりうる官能基で修飾しておくのが常である。極性の高い水中では、極性官能基が水和されることに着目し、まずは極性官能基である水酸基無保護の条件下でのペプチドの水中合成について検討を行ったので報告する。

ROMP 型縮合剤の調製における重合条件の検討

○早川慎康, 西内祥子, 山口裕貴, 北川秀典, 日置 和人
薬学部 機能分子化学研究室

我々はこれまでに、ポリマー鎖に複数の官能基を適切に導入することにより、それらの接触をきっかけとしたアミド結合形成カスケードをポリマー間で進行させる手法を見出した。この機能性ポリマーは、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。これを改善する次の段階として、より効率的な機能性の発揮を目指したポリマーのナノ粒子化の検討を既報のトリアジン型ポリマー縮合剤を用いて開始しているが、ブレイクダウン法（遊星ボールミルによる粉碎）では、物理的損傷または摩擦熱によると考えられる縮合活性の低下が起きてしまう。一方、乳化重合を利用するビルドアップ法においては、縮合活性部位の加水分解を避けるため一般的な O/W 型の条件が利用できず、有機溶媒同士の O/O 型エマルションが必須と考えられる。しかしながら文献情報が乏しく、イソプレンとメチルメタクリル酸より合成した O/O 用乳化剤によるミセル形成やポリマー粒子への影響などを検証する必要があった。今回は、イソプレン-メチルメタクリル酸ブロック共重合ポリマー (PI-*b*-PMMA) の合成法を見直すとともに、その組成比および分子量と乳化剤としての適否、ならびにそれらを用いた乳化重合による ROMP 型縮合剤の微粒子化への影響について検討した。

sec-ブチルリチウムを開始剤とするアニオン重合により、ポリイソプレン (PI) を生成、ジフェニルエチレンにてアニオン末端をトラップし、溶媒交換に引き続きメチルメタクリル酸を重合 (PMMA) させて、PI/PMMA 比 4 : 6-6 : 4、分子量 64,000-95,000 のコポリマー 8 種を合成した。それぞれをヘキサン/DMF=9 : 1 に加え、超音波処理および強振盪後に静置したところ、PI/MMA 比 5 : 5-6 : 4 の 6 種が安定なエマルションを生じることがわかった。乳化剤として期待ができるそれらのコポリマーを用いて、下図の反応式で示した ROMP 反応を O/O エマルション中で試みた。その結果、粒子径 4-20 μm の球状ポリマーの生成が確認できた。



ヒト由来乳癌細胞株を用いた乳癌に対するホウ素中性子捕捉療法の前臨床研究

○内田裕樹¹, 安藤 徹¹, 藤本卓也², 須藤 保³, 福森義信¹, 市川秀喜¹¹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兵庫県立がんセンター 研究部

【目的】 がんの治療は、その種類や進行度に応じて手術、放射線治療、化学療法を駆使した集学的治療がなされるが、乳癌はエストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PgR), human epidermal growth factor 受容体 type2 (HER2) の発現により、5つのサブタイプに分けられ、患者ごとに乳がんのサブタイプを診断で判別し適切な治療が選択されている。このような個別化治療の普及により乳がんの予後は改善しつつあるが一方で、生物学的悪性度が高く予後不良な Triple negative タイプ (TNBC) や再発乳がん等に対する新たな治療法の開発は、さらなる乳がんの予後改善に向けて克服すべき課題である。このような状況下で ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) は既存の治療法では効果が乏しい悪性腫瘍においても、腫瘍内へのホウ素の取込がみられれば BNCT による治療効果を期待できるため、新たな治療オプションとなる可能性が示唆されている。そこで本研究では、BNCT の乳癌への抗腫瘍効果の可能性を検討するため、まず 4 種類のヒト由来乳癌細胞における BNCT 用ホウ素化合物 (*p*-borono-L-phenylalanine-フルクトース錯体, BPA-Fr) の取込能を評価した。さらに、予後不良である TNBC 細胞株の担がん動物モデルを作成し、BPA-Fr を投与してその体内動態を評価した。

【実験】 4種のヒト由来乳癌細胞 (T47D, MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-468) を培養し、BPA-Fr 含有培地 (20 µg ¹⁰B/mL) に2時間暴露させた。そして、回収した細胞を灰化处理し、その ¹⁰B 濃度を ICP-AES 法を用いて計測した。さらに、TNBC 細胞株である MDA-MB-468 細胞 (5×10⁶ 個) を4週齢のヌードマウスの左胸部皮下に移植し担がん動物モデルを作成した。腫瘍形成が得られた移植4週後に、BPA-Fr を尾静脈より投与し所定の時間後、血液、正常組織および腫瘍を採取し、それらのホウ素濃度を ICP-AES 法によって測定した。

【結果・考察】 BPA-Fr 含有培地を用いた細胞内取込試験では、T47D, MCF-7, MDA-MB-453 の取込量はそれぞれ 52 ppm, 65 ppm, 67 ppm であった。これらは、動物実験段階であるが BNCT による抗腫瘍効果が確認されているヒト由来明細胞肉腫 (CCS) 細胞株 (MP-CCS-SY, 31 ppm) と比較して約2倍近くの高い取込能を示した。TNBC の MDA-MB-468 についても 31 ppm と CCS と同等の取込能を認めた。さらに、TNBC の担がん動物モデルを用いたホウ素の体内動態試験では、BPA-Fr 投与後5分から60分まで腫瘍内濃度は約 20 ppm を推移した。また、腫瘍/血液濃度 (T/B) 比は、投与後30分から150分まで2.0以上であった。TNBC の乳癌はホルモン療法および、分子標的治療薬 (Trastuzumab) に抵抗性であり、新たな治療方法が求められている。本研究の検討結果から、L-BPA の細胞内取込試験では、乳がんの全てのサブタイプにおいて ¹⁰B の高い取り込みを認め乳がんへの BNCT 適応の可能性が示唆された。一方、TNBC の乳がん担がん動物モデルでは、¹⁰B の腫瘍内濃度は比較的高いものの、腫瘍選択性が十分なレベルに至らないことが明らかとなり、今後のさらなる検討が必要である。

【P-7】

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： 自製の振動型コーティング装置にて製した被覆粒子の評価

○安永峻也¹, 安藤 徹¹, 福森義信², 市川秀喜^{1,2}

¹神戸学院大学 大学院薬学研究科 製剤学研究室

²神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

【目的】近年、口腔内崩壊錠やドライシロップに用いる 100 μm 程度の薬物放出制御能を有する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いる。市販の高分子コーティング剤の軟化を利用した研究例が報告されている^{1,2)}が、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く、高効率の被覆に最適な粒子径やガラス転移温度 (Tg) についての検討は成されていない。本研究では、薬物を封入したイオン交換樹脂を核粒子とし、コーティング剤として、異なる Tg を持つアクリル系高分子から調製した高分子ナノパウダー (PNP) と噴霧乾燥粒子 (SD) を用いたモデル系で、自製の振動型コーティング装置にてコーティングを行い、コーティング剤の粒子径と Tg が被覆特性に及ぼす影響を評価した。

【方法】陰イオン交換樹脂 (Dowex 1 x 2, 38-150 μm) にジクロフェナクナトリウム (DS) を封入したものを核粒子とした。3 種のアクリル系モノマーを用いて 30-80°C の範囲で Tg が 10°C 毎に異なる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。ナノ粒子分散液を噴霧乾燥することで SD を、塩析後に凍結乾燥することで PNP を得た。マイクロ形電磁振動ふるい器 M-2 形 (筒井理化学器械) を流用した振動型コーティング装置に核粒子に対して 3wt% のコーティング剤を仕込み、10 分間振動により混合し、直径 1.5 mm のジルコニアビーズを 30 g 仕込み、10 分間、同様に振動させ、コーティング剤を核粒子表面へ固定化した。混合と固定化を 3 回繰り返すことで被覆率 (コーティング剤の核粒子に対する wt%) を増大させた。得られた被覆粒子は Tg+20°C の温度で 12 時間加熱して成膜させた。粒子表面を走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-6010PLUS/LA, JEOL), コーティング剤の粒子径をレーザー回折式粒子径分布測定装置 (LDSA, Aerotrak LDSA-SPR3500A, Microtrac BEL) にて測定し、第 16 改正日局パドル法に準じて溶出試験を実施した。

【結果・考察】LDSA による二次粒子径測定の結果、PNP では全ての Tg で約 17 μm となったが、SD では、Tg=30°C, 40°C で二次粒子の凝集のために PNP を上回り、50°C 以上では、凝集が見られず、PNP を下回る結果となった。SD の被覆率は最大 2.3% にとどまったのに対し、PNP では、二次粒子径のサイズによらず全ての Tg において約 7wt% 程度となった。SEM 観察の結果、SD では、二次粒子径を保ったまま核粒子に付着しており、Tg の増加に伴い、付着している粒子のサイズは小さくなった。一方で PNP では、二次粒子の解砕が生じたため、被覆率が増大したと考えられる。SD の溶出試験では、DS の放出を抑制しなかったが、PNP では全ての Tg で DS の放出を抑制し、Tg=60°C では、未処理の核粒子に対して、1 時間後の DS の溶出が約 50% と最も抑制した。本検討において低 Tg の PNP では付着性が高い反面、二次粒子の解砕が生じにくく、被覆に最適な Tg の存在が示唆された。

1) K. Kondo, N.Ito, M. T. Niwa, K.Danjo, *Int. J. Pharm.* 453 523-532 (2013).

2) K. Ukita, M.Kuroda, H. Honda, M. Koishi. *Chem. Pharm. Bull.* 37(12) 3367-3371 (1989).

感温性パルス放出型マイクロカプセルの設計：
ヒト体温付近での温度制御を目指した感温性ナノゲル素子の検討

○門田謙人, 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. 当研究室ではこれまでにモノリシック構造の温度応答性ナノゲル粒子を用いた MC では, 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を示してきたが, ナノ粒子全体の体積変化によって薬物放出制御膜の破壊によるバーストの危険性も示唆された. そこで本研究では, 温度応答性ゲルをコアシェル構造化して膨潤収縮部をシェルのみに限局させて体積変化量を調節するコアシェル型 (CS-TNPs) を新たに合成し, CS-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】ethyl acrylate (EA) と methyl methacrylate (MMA) による core と, *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) と *N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm) による shell から成る CS-TNPs を, 乳化重合法により合成した. 温度変化に伴う CS-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することで評価した. 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コーティング装置 (Grow Max (140), ダルトン) 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) 20 g に, carbazochrome sodium sulfonate (CCSS, Mw 376, ダイト) 4 g を含む 2.5wt% 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 CS-TNPs を混合し, 固形成分として 25 g (重量比は AQ/CS-TNPs = 85/15, 90/10, 95/5) を分散させたコーティング液をスプレーした. 薬物放出挙動は, カラム法放出試験により評価し, 35-41°Cの周期的温度変化に伴う CCSS の放出速度変化をフローセル型紫外可視分光光度計 (UV-8000V, EYELA) でモニターした.

【結果と考察】合成した CS-TNPs の粒子径は, 10-60°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. また, CS-TNPs は 50°C 以上の高温になると粒子径が 75 nm 付近に収束し, この時の CS-TNPs は完全収縮状態であると考えられる. 次に放出試験において, 重量比 85/15 と 90/10 では初期の低温側 (35°C) の段階でバーストを起こした. これらは CS-TNPs の添加割合の増加に伴う薬物透過チャンネルの増加に由来するものと考えられる. これらに対して, 重量比 95/5 では薬物放出速度の平均値が, 低温側 (35°C) では 1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$, 高温側 (41°C) では 2.26 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$ となり, 比較的抑制された温度応答性を示した. ただし, 低温側での完全抑制や高温側 (41°C) での薬物放出速度の大きさはまだ十分なものとはいえない. 今後, 膜厚の増加に伴う低温側 (35°C) での放出抑制を目的としたコーティング率の増加や, 35-41°Cにおける CS-TNPs の粒子径変化の上昇に伴う薬物透過チャンネルの拡大を目的とした CS-TNPs の処方検討によって, 改善を図る検討を続けたい.

苦味マスクを目的とした多孔性微粒子を核とする薬物放出制御型製剤の設計

○古沢真琴, 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】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, 粒子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. 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ため, 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, 製品粒子径を小さく抑えられる. 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, 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, 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) を用いて共重合ナノ粒子 (EA/MMA/HEMA) を調製し, これをコーティング剤とした湿式スプレーコーティングによる苦味マスキングを検討した.

【方法】苦み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フジカリンを用いた. 薬物封入粒子は, プロメタジン塩酸塩の含水エタノール溶液 (20 w/v%) を滴下法によりフジカリン内へ浸透させた後に減圧乾燥することで調製した. さらに同様の封入操作を 3, 4, 5, 6 回繰り返してより高い薬物含量を目指した. 薬物含量は紫外可視吸光度計を用いて測定し, 粒子表面への薬物付着の有無は SEM 観察により評価した. 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, 仕込み量に対する欠け (75 μm 以下) の割合にて評価した. コーティング剤として用いる共重合ナノ粒子 (EA/MMA/HEMA) は水系分散重合法により合成し, 薬物封入粒子にドラフトチューブ付き噴流層コーティング装置で被覆した. 得られた被覆粒子について, 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】薬物含量と粒子強度について, 薬物封入回数に依存して高くなるが, 封入を 6 回繰り返した段階から粒子表面への薬物の付着が確認された. 薬物封入効率はいずれの封入回数においても 80% 近い値となった. 本検討では, 以上の結果を踏まえて封入を 5 回繰り返した粒子を用いてコーティング率 20 wt% の被覆粒子の調製を行った. 溶出試験においては, キュアリングの有無にかかわらず, いずれも 5 分後の薬物放出は 100% であったが, 1 分後の薬物放出は未処理の被覆粒子で 70%, キュアリング後の粒子では 50% であり, やや抑制傾向にあるものの理想とする短時間遅延放出制御には至らなかった. これはフジカリンの細孔径が最大 110 nm であるのに対し, コーティング剤の平均粒子径は 260 nm と細孔径より大きいため, 効率的な細孔の閉塞がなされなかったものと考えられる. 今後は, コーティング用ナノ粒子を細孔を塞ぐのに適したサイズに変更し, コーティング率 20 wt% での短時間遅延放出制御に向けた検討を引き続き進めたい.

がん中性子捕捉療法のための Gd 含有キトサンナノ粒子製剤の開発： PEG 化による表面改質の検討とその粒子特性の評価

○松本 まり絵, 安藤 徹, 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】当研究室では、先ががん中性子捕捉療法用に開発した Gd 含有キトサンナノ粒子 (Gd-nanoCP) がその腫瘍内直接投与後の中性子捕捉反応により腫瘍殺傷効果を示すことを明らかにしたが、腫瘍細胞を完全に死滅させるには至らず、腫瘍組織内における Gd の不均一分布が示唆された。そこで、その改善を目的に大豆レシチンと PEG リン脂質を用いた Gd-nanoCP の表面修飾による静脈内投与デバイス化を行ったが、体内動態評価において腫瘍内 Gd 集積は治療最低濃度の 100 ppm には至らず、肝臓や脾臓などの細網内皮系 (RES) への高度な集積が課題となった。そこで本研究では、静脈内投与後の RES への集積を回避すべく、Gd-nanoCP 粒子表面にあるキトサンのアミノ基に PEG を付加することで PEG 修飾 Gd-nanoCP (PEG-Gd-nanoCP) を調製した。PEG 添加量の検討に加え、動物モデルの動態評価に向けた製剤量・製剤含量の向上を企図したスケールアップと濃縮検討を行った。

【方法】エマルション液滴融合法により調製した Gd-nanoCP 懸濁液と所定濃度の PEG 溶液を添加した混合物に超音波を照射した後、スターラー攪拌下で 24 時間、PEG 化处理を行った。その後、遠心機で沈殿物を取り除き、得られた上清を PEG-Gd-nanoCP とした。次にスケールアップとして、PEG と Gd-nanoCP の重量比率を 1:2 で固定し、製剤の容量を 1.3 倍になるように調整し、濃度を 3.7 倍にして調製した。濃縮操作ではスケールアップした条件で、さらに濃度を 1.5, 2, 3 倍にして調製した。また、調製した各粒子について、平均粒子径と Zeta 電位をゼータサイザー ZSP (マルバーン) で、Gd 含有率を ICP-AES 法で測定した。

【結果・考察】PEG 量の検討において、粒子径は PEG : Gd-nanoCP (重量比) = 1:2, 1:1, 2:1 の場合、約 150 nm となり、Gd-nanoCP の粒子径 (196 nm) と比較して約 50 nm 減少した。Gd 含量は PEG 量の増加に伴い、Gd-nanoCP の Gd 含量 (28.2%) より減少し、1:2 では Gd 含量 (20.8%) とわずかな減少であったが、2:1 で Gd 含量 (14.8%) と約半分まで減少した。この結果から、Gd-nanoCP と比較して、粒子径が小さくかつ高含量である 1:2 の比率で、まずはスケールアップを行い、さらに濃縮検討をしたところ、粒子径は、PEG-Gd-nanoCP (1:2) のスケールアップ (等倍)、1.5, 2, 3 倍濃縮では大きな変化はなく、24 時間後の各粒子径も変わらないことから、スケールアップ、濃縮が分散安定性にもたらす影響は少ないことが示唆された。また、粒子中の Gd 含有率は等倍と比較すると 1.5, 2, 3 倍濃縮では約 2% 減少したが、分散剤としての Gd 濃度は 1.6, 2.1, 3.1 倍と増加しており、3 倍濃縮では 3688 ppm と高い Gd 濃度を示した。これらの結果から、PEG-Gd-nanoCPs は動物での動態評価に使用しうる高い Gd 濃度と安定した分散性を保持することが分かった。今後の体内動態評価において、腫瘍組織に分布し、高濃度の Gd を腫瘍に集積させることが期待され、引き続き検討を進めていく予定である。

難水溶性薬物ナノ結晶の固形微粒子製剤化： 腸溶性基材を用いた被覆膜組成の検討

○廣野ゆう，福田竜太，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】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．当研究室では，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ナノサスペンション（NS）を被覆した固形微粒子製剤化の評価を行ってきた．これまでの検討で，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，モデル薬物が酸性薬物であるため製剤から再分散した薬物ナノ結晶粒子が胃内で凝集する可能性が考えられた．この問題を改善するために腸溶性基材 Eudragit L30D-55[®]（EL，Evonik）を用いた“腸散性”微粒子製剤の処方設計と各粒子の評価を行った．

【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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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を調製した．得られたNS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75-106 μm の乳糖核に被覆し得られた粒子をナノ結晶被覆粒子（NS-MPs），NSとELの混合液を被覆したものを1層膜型腸散性粒子（ED-MPs15:0，30:0），ED-MPs15:0に続けてEL単体を被覆したものを2層膜型腸散性粒子（ED-MPs15:9）とし，各MPsで比較検討を行った．

【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，すべてのMPsにおいて2時間後で1%以下の溶出量となった．日局第2液中における溶出試験では，NS-MPsでは15分後に20%まで溶出するが過飽和に伴う再結晶により1時間後には10%にまで低下した．これに対して，腸散性粒子は2時間後においてED-MPs15:0で70-80%，ED-MPs30:0で85%，ED-MPs15:9で40%溶出とNS-MPsより高い溶出を示し，再結晶による薬物濃度の低下も抑えた．被覆膜組成の検討として，1層膜型腸散性粒子はELを増やすと溶出も幾分増加したが2層膜型にするとその溶出は1層膜型の半分程度となった．これはGLIにはELに一定の割合で分配される性質があり，NSと混合されていない2層目ELへの分配が律速または障壁となったと考える．これらを踏まえED-MPs15:0，15:9を用いて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，NS-MPsに比べAUCがED-MPs15:0で約1.3倍，ED-MPs15:9で約2.4倍高い値を示した．またCmaxはED-MPs15:0で30分，ED-MPs15:9で60分であった．こうしたAUCやCmaxの差は2層目にELをコーティングすることで1層目表面に存在する薬物ナノ結晶の胃酸による凝集がより抑制される結果として溶解速度が比較的高く保たれることが一因と考える．以上より，“腸散性”微粒子製剤は酸性難水溶性薬物の経口投与時のバイオアベイラビリティの向上に有効な手段のひとつであることが示唆された．

ガラス製アンプルカットにより発生したナノサイズの不溶性微粒子の リスク評価に向けた模擬ガラス粒子の調製

○磯野 絵梨香¹, 安藤 徹¹, 日置 和人², 市川 秀喜¹, 福森 義信¹

¹神戸学院大学 薬学部 製剤学研究室

²神戸学院大学 薬学部 機能分子化学研究室

【目的】注射用ガラス製アンプルのカットにより発生するガラス様不溶性微粒子の危険性は、かねてから指摘されてきた。現在、5 μm 以上の不溶性微粒子については、細動脈や毛細血管を閉塞する恐れがあるとの懸念から、これらのリスク回避のために、5 μm フィルターによる不溶性微粒子の除去が臨床現場においては推奨されている。しかし、5 μm 未満の不溶性微粒子の危険性については明確なエビデンスが得られていない。とりわけ、発生する微粒子がナノサイズならば、そのサイズ効果によって予期せぬ有害事象の惹起にもつながりうる。そこで当研究室では、これまでにガラスアンプルカットによるナノサイズの不溶性微粒子の発生の有無と、その形状や粒子径分布について調査してきた。その結果、アンプルカットにより鋭く尖った形状で、0.45-0.8 μm の大きさに不溶性微粒子が比較的多く発生していることが分かった。そこで、ナノサイズのガラスが生体に及ぼす影響について調べるべく、ガラス片の生体内挙動をトレースできるようにイメージング素子（量子ドット）を含む模擬ガラス粒子の調製を企図した。本検討では、まず、蛍光を持たないガラスのボールミル粉碎により、0.45-0.8 μm のガラスナノ粒子（GNPs）を得るための基本的な調製条件を調べた。

【方法】ガラスアンプルまたはイメージング素子を封入予定の自製のガラス粒子を模擬ガラス粒子調製のため使用した。まずアンプルのラベルを剥ぎ、カットして中の溶液を破棄した。アンプルまたは自製のガラス粒子を袋に入れ、金槌で叩いて粒子径 2-5 mm の大きさにした。これらのガラスを乳鉢、乳棒で砕き、目開き 850 μm の篩で篩過した。さらに遊星ボールミルを用いて様々な条件で、850 μm 以下のガラスを粉碎した。まず、1.5 mm ジルコニアビーズ（85 g）とガラスのみで乾式粉碎を行った。次に、この乾式粉碎物へ蒸留水（12 mL）を加えて湿式粉碎を行った。湿式粉碎物を目開き 45 μm の篩で篩下し、GNPs を得た。ボールミル粉碎での粉碎時間を固定し、回転数を 300, 400, 500 rpm と変化させたときの粒子径を動的光散乱式粒子径分布測定装置（LB-500, HORIBA）にて測定した。また走査型電子顕微鏡（SEM, JSM-6010PLUS/LA, JEOL）で粒子形状の観察を行った。

【結果・考察】遊星ボールミルでガラスを乾式粉碎さらに湿式粉碎することで、GNPs の調製に成功した。GNPs の平均粒子径は、回転数 300 rpm で 226.7 nm, 400 rpm で 311.2 nm, 500 rpm で 187.5 nm であった。また、45 μm 以下の回収率は回転数 300, 500 rpm では、10% 以下なのに対し、回転数 400 rpm で 43.2% と最も良い結果となった。GNPs の SEM 観察より、いずれの条件においても、粒子は球状ではなく角の尖った形状であった。また、自製のガラス粒子においても同様に GNPs の調製が可能であった。これらの結果を踏まえ、さらに回転数 400 rpm でガラスの仕込み量や、粉碎時間を変更し、粉碎に関わる力を適切に調節することで平均粒子径 0.45-0.8 μm の GNPs の調製を検討していきたい。

タンパク質デリバリーのための生分解性徐放型微粒子製剤の開発： キトサンナノ粒子の微細化と粒子間架橋が製剤特性に及ぼす影響

○姫野智子, 山崎万純, 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】ペプチドやタンパク性のバイオ医薬品の有効性を増大させるための注射型徐放性微粒子の開発には根強いニーズがある。当研究室ではキトサンナノ粒子 (CNPs) からなる水系分散タイプの生分解型徐放性コーティング剤を用いたバイオ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。これまでヒドロキシアパタイト (HAp) 多孔性粒子を核粒子として、細孔内にモデルタンパク薬物を吸着させた後に少量の CNPs でその細孔を閉塞した構造を持つ微粒子製剤 (CNPs-MPs) の開発を進め、その結果、*in vitro*, *in vivo* において薬物の2週間にわたる徐放化が可能であることを示してきた。しかし、CNPs は HAp 細孔径と比べて粒子径が大きく、さらに水分保持性が高いため、コーティング操作中に装置壁面への粒子の付着が頻発し、CNPs-MPs 調製時の製品回収に支障を来した。そこで本研究では、さらなる薬物放出抑制を目的に CNPs の微細化と、製品回収率の改善に向けたトリポリリン酸ナトリウム (TPP) による CNPs 表面の架橋を試み、製剤特性に及ぼす影響を評価した。

【方法】牛血清アルブミン (BSA) および蛍光標識 BSA (FITC-BSA) をモデル薬物とし、インキュベート法によって薬物封入 HAp 粒子を得た。CNPs は中和析出法で調製し、調製時には攪拌力の異なる3装置 (マグネティックスターラー, ヒスコトロン, クレアミックス) を用いてその効果を比較した。また、Hasanovic らの検討¹⁾を参考に所定の比率で TPP を CNPs に添加し、超音波照射下で反応させ TPP 処理化 CNPs (TPP-CNPs) を調製した。各 CNPs の粒子径とゼータ電位はゼータサイザー ZSP により測定した。薬物封入 HAp 粒子 (53-63 μm) に対して 5 wt% の各 CNPs をドラフトチューブ付噴流層コーティング装置によりコーティングし、53-63 μm を CNPs-MPs として回収した。MPs からの BSA 放出は溶出試験で評価した。

【結果・考察】HAp への BSA/FITC-BSA の吸着率は各々 16.61 wt%, 1.85 wt% (計 18.5 wt%) となった。CNPs の平均粒子径はクリアミックスを用いた場合が最小で 129 nm となった。TPP 処理については、元の CNPs の粒子径が 277 nm の場合、CNPs : TPP = 2 : 1 では 252 nm, この時ゼータ電位はそれぞれ 21.2, 23.0 mV で、TPP 処理後も大幅に平均粒子径は変化せず、ゼータ電位は正の値を維持することが示された。CNPs-MPs 調製については、TPP 処理によって装置壁面への付着がほとんど起こらないようになり、従来の CNPs コーティングでの収率 (34%) は 84% まで改善された。また、溶出試験の結果、TPP-CNPs コーティングにおいても 14 日間の徐放性が示されたことから、CNPs の TPP 処理は薬物放出特性に大きな影響を与えないことが示唆された。以上より、TPP による架橋はコーティング操作性の改善、長時間の放出制御に有用であることが明らかとなった。今後、微細化した CNPs についても、TPP 処理とコーティング後の評価を行っていきたい。

1) Hasanovic A., Zehl M., Reznicek G., Valenta C., J. Pharm. Pharmacol., 61(12), 1609-1616 (2009).

脳虚血後の肝臓における糖代謝および炎症マーカーの発現変化

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、視床下部において、神経ペプチドである orexin-A (OXA) が、延髄から肝臓に投射している迷走神経を介して、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知見を得ている。近年、脳虚血後の糖代謝異常に対し、肝臓における炎症因子の増加が関与することが報告された。そこで、本研究では、orexin-A が迷走神経を介して、脳虚血後の糖代謝異常および肝臓における炎症因子の増加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。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、炎症因子の一つである tumor necrosis factor- α ならびに interleukin-1 β の発現上昇、および 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。これらの作用は、vagotomy によって有意に消失した。

【考察】以上の結果から、視床下部の orexin-A は迷走神経を介して、脳虚血ストレス負荷によって増加した肝臓における炎症因子を抑制し、それが脳虚血後の糖代謝異常の抑制に一部関与している可能性が示唆された。

脳内 SGLT を介した Na⁺ 流入による脳虚血性神経障害の亢進機序の解明

○山崎由衣¹, 吉川絢華¹, 有田恭子¹, 和田哲幸², 吉田繁³, 原田慎一¹, 徳山尚吾¹
¹神戸学院大薬 臨床薬学, ²近畿大薬, ³近畿大理工 生命科学

【目的】 Sodium-glucose transporter (SGLT) はグルコースと Na⁺ を細胞内へ共輸送する二次性能動輸送体であり、脳内には SGLT-1, 3, 4, 6 が存在することが知られている。これまでに我々は、脳虚血ストレス負荷後の高血糖状態における脳虚血性神経障害の増悪機序において、脳内 SGLT-1 が関与することを報告してきている。今回我々は、本機序における SGLT-1 を介した Na⁺ の細胞内流入の関与について、非代謝性のグルコースアナログである alpha-D-methylglucoside (α -MG) を用いて検討を行った。

【方法】 蛍光画像解析装置 ARUGAS-50 を用いて、グルコース (5.5, 17.5, 35 mM) および SGLT 特異的阻害剤である phlorizin (200 μ M) 添加後の SH-SY5Y 細胞内への Na⁺ 流入を測定した。神経細胞死の実験には、胎生 17 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 3 日目に SGLT-1 siRNA (40 nM, 48 h) 処置によって SGLT-1 の発現をノックダウンした。培養開始 5 日後に H₂O₂ (100 μ M)、 α -MG (0.01, 100 μ M) を処置し、24 時間後に細胞生存活性の評価を行った。In vivo の検討において、脳内 SGLT-1 ノックダウンマウスは 5 週齢の ddY 系雄性マウスに SGLT-1 siRNA (2.5 μ g/mouse, i.c.v.) を投与することで作成した。一過性局所脳虚血ストレスは中大脳動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion: MCAO, 2 hr) によって誘導し、その 1 日後に空腹時血糖値変化、梗塞巣形成および行動異常の評価を行った。 α -MG (5.0 μ g/mouse) は再灌流直後および 6 時間後に脳室内投与した。

【結果】 高グルコース処置によって細胞内 Na⁺ 濃度は上昇し、この上昇は phlorizin 処置によって抑制された。H₂O₂ 処置による神経細胞死は α -MG の共処置によって有意に増悪し、この増悪は SGLT-1 ノックダウンによって有意に改善された。MCAO 1 日後における空腹時血糖値の有意な上昇は α -MG の脳室内投与および脳内 SGLT-1 ノックダウンによって影響を受けなかった。 α -MG の脳室内投与は、MCAO 1 日後の神経障害の発現を有意に増悪させ、この増悪は脳内 SGLT-1 ノックダウンによって有意に改善した。

【考察】 以上の結果から、脳内 SGLT-1 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。

全脳虚血誘導性機械的痛覚過敏に対する脊髄 high mobility group box-1 の関与

○松浦渉¹, 原田慎一¹, 劉克約², 西堀正洋², 徳山尚吾¹

¹神戸学院大薬 臨床薬学 ²岡山大院医歯薬 薬理学

【背景】神経障害性疼痛の一つとして定義されている脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain; CPSP) は脳卒中後に生じる難治性の合併症として知られている。しかしながら、確立された治療法がほとんど存在しないため、有効な治療戦略の開発が急務である。最近、核内 DNA タンパク質である high mobility group box-1 (HMGB1) が敗血症などの炎症性疾患の増悪に働くことや神経障害性疼痛の発症に関わる因子であることが報告されてきている。そこで我々は、CPSP の発症機序に対する 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 3 日後にマウス後肢の機械的刺激に対する逃避行動回数の変化を von frey test を用いて行った。BCAO 3 日後に、抗 HMGB1 抗体を静脈内 (50, 100 µg/mouse) 脳室内 (2, 20 µg/mouse) または髄腔内 (2, 20 µg/mouse) 投与し、疼痛評価を行った。各種タンパク質の発現変化は western blot 法によって解析した。また、ERK 阻害剤である U0126 を BCAO 3 日後に髄腔内 (1, 5, 10 µg/mouse) 投与した。

【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逃避行動回数の増加は、抗 HMGB1 抗体の静脈内または髄腔内投与によって有意に抑制されたが、脳室内投与によっては何ら影響が認められなかった。BCAO 3 日後において、脊髄における HMGB1 の発現が有意に上昇した。さらに、HMGB1 シグナル系の下流に存在する ERK の有意な活性化が認められ、それは抗 HMGB1 抗体の静脈内投与によって抑制された。また、BCAO 3 日後の機械的刺激に対する逃避行動回数の増加は、U0126 の髄腔内投与によって用量依存的かつ有意に抑制された。

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

全脳虚血誘導性機械的痛覚過敏に対するトラマドールの抑制作用と

その発現機序の解明

○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、神経障害性疼痛の一つとして知られている。現在その治療は、神経障害性疼痛治療ガイドラインに準じて行われているが、より効果的な薬物治療戦略の確立が求められている。弱オピオイドとして知られているトラマドールは、 μ オピオイド受容体の agonist として作用する。近年、トラマドールは、がん性疼痛だけでなく、神経障害性疼痛などの非がん性慢性疼痛にも適応が認められた。そこで、本研究では我々が確立した脳卒中後疼痛を模倣する全脳虚血モデルを用いて、CPSP に対するトラマドールの影響とその機序について検討した。

【方法】5 週齢の ddY 系雄性マウスに、30 分の両側総頸動脈閉塞法 (bilateral carotid arteries occlusion : BCAO) を施すことによって、全脳虚血モデルを作成した。BCAO 3 日後にマウス後肢の機械的刺激に対する逃避行動回数の変化を von Frey test を用いて行った。BCAO 3 日後に、トラマドール (10 または 20 mg/kg) を腹腔内投与し、疼痛評価を行った。オピオイド受容体 antagonist naloxone、 μ オピオイド受容体 antagonist β -funaltrexamine (β -FNA: 20 mg/kg)、 δ オピオイド受容体 antagonist naltrindole (5 mg/kg) は、トラマドール投与する 30 分前に腹腔内投与し、 κ オピオイド受容体 antagonist nor-binaltorphimine (nor-BNI: 10 mg/kg) は 24 時間前に腹腔内投与した。

【結果】BCAO 3 日後において認められた機械的刺激に対する逃避行動回数の増加は、トラマドールによって用量依存的かつ有意に抑制した。この抑制作用は、naloxone によって有意に拮抗された。トラマドールによる抗侵害作用は、投与 5 分後では、 β -FNA のみ、投与 10 分後では、 β -FNA および nor-BNI、投与 15 および 30 分後においては、全ての antagonist で有意に拮抗された。

【考察】以上の結果から、CPSP の緩和にトラマドールが有用である可能性が示唆された。トラマドールは、体内で代謝されることによって、 μ 、 δ および κ オピオイド受容体のアゴニストとして作用する M1 に変化することが知られている。すなわち、トラマドールによる抗侵害作用の一部には、その代謝物である M1 が関与しているかもしれない。

全脳虚血誘導性機械的痛覚過敏に対する鎮痛補助薬の影響

○増田風香, 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 に対する確立された薬物療法はないものの、現状では、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、全脳虚血モデル動物を用いて、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、本モデルを用いて各種神経障害性疼痛治療薬 (鎮痛補助薬) の効果を検討した。

【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 : B CAO) によって作成した。B CAO 3 日後に、三環系抗うつ薬イミプラミン (5, 20 mg/kg)、抗てんかん薬ガバペンチン (10, 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 (1, 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逃避行動回数を von frey test を用いて行った。

【結果】B CAO 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、神経障害性疼痛治療薬の一部が CPSP の緩和に有効である可能性が示唆された。

脳虚血ストレス負荷後の視床下部における Foxa2 の発現変化

○上野彩歌, 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の糖代謝異常が、神経ペプチドの一つである orexin-A の視床下部内投与によって抑制されることを明らかにしている。一方、脳虚血ストレス負荷によって、視床下部における orexin-A の発現量が減少していることも確認している。しかしながら、その機序は未だ不明である。Forkhead box a2 (Foxa2) は、forkhead ファミリーに属する転写因子の一つである。Foxa2 は、糖代謝制御に関与し、神経変性疾患の一つであるパーキンソン病の発症に関わる重要な因子であることが報告されている。さらに、orexin-A の発現調節に Foxa2 が関与することも報告されていることから、本研究では、脳虚血ストレス負荷後の orexin-A の発現に Foxa2 の関与を明らかにするために、脳虚血後の視床下部での Foxa2 の発現変化および orexin-A との共局在性を検討した。

【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) によって作成した。偽手術 (sham) は、中大脳動脈を閉塞しないものとし、その他は MCAO と同様に行った。Foxa2 mRNA または prepro-orexin mRNA の発現変化は real-time PCR 法によって解析した。Foxa2 および orexin-A の共局在性の解析は、二重蛍光免疫染色法を用いた。

【結果】 Foxa2 mRNA または prepro-orexin mRNA の発現は、MCAO 6 時間および 1 日後において、sham 群に比較して、MCAO 群で有意な減少が認められた。

さらに、正常なマウスにおいて、Foxa2 と orexin-A は、視床下部外側野において共局在性を示した。

【考察】 以上の結果から、視床下部における Foxa2 および orexin-A は、連動した発現変化を示す可能性が示唆された。すなわち、脳虚血後の視床下部における Foxa2 は、orexin-A の発現変化に一部関与する可能性が示唆された。

脳虚血ストレス負荷後の視床下部における Foxa2 の発現変化

○上野彩歌, 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の糖代謝異常が、神経ペプチドの一つである orexin-A の視床下部内投与によって抑制されることを明らかにしている。一方、脳虚血ストレス負荷によって、視床下部における orexin-A の発現量が減少していることも確認している。しかしながら、その機序は未だ不明である。Forkhead box a2 (Foxa2) は、forkhead ファミリーに属する転写因子の一つである。Foxa2 は、糖代謝制御に関与し、神経変性疾患の一つであるパーキンソン病の発症に関わる重要な因子であることが報告されている。さらに、orexin-A の発現調節に Foxa2 が関与することも報告されていることから、本研究では、脳虚血ストレス負荷後の orexin-A の発現に Foxa2 の関与を明らかにするために、脳虚血後の視床下部での Foxa2 の発現変化および orexin-A との共局在性を検討した。

【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) によって作成した。偽手術 (sham) は、中大脳動脈を閉塞しないものとし、その他は MCAO と同様に行った。Foxa2 mRNA または prepro-orexin mRNA の発現変化は real-time PCR 法によって解析した。Foxa2 および orexin-A の共局在性の解析は、二重蛍光免疫染色法を用いた。

【結果】Foxa2 mRNA または prepro-orexin mRNA の発現は、MCAO 6 時間および 1 日後において、sham 群に比較して、MCAO 群で有意な減少が認められた。

さらに、正常なマウスにおいて、Foxa2 と orexin-A は、視床下部外側野において共局在性を示した。

【考察】以上の結果から、視床下部における Foxa2 および orexin-A は、連動した発現変化を示す可能性が示唆された。すなわち、脳虚血後の視床下部における Foxa2 は、orexin-A の発現変化に一部関与する可能性が示唆された。

全脳虚血誘導性うつ様行動に対する評価系の確立

○野崎裕大, 原田慎一, 徳山尚吾
神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室

【目的】脳卒中後のうつ病は、脳梗塞後遺症の一つとして知られている。近年、脳卒中後のうつ病患者に対して、早期の治療がその予後に有意な改善をもたらすと報告されている。しかしながらその発現に対する機序は不明な点が多い。そこで本研究では、脳卒中後のうつ病病態を評価するために、それを模倣するモデル動物の確立を行った。

【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 (bilateral carotid arteries occlusion : BCAO) によって作成した。偽手術 (sham) は、両側総頸動脈を閉塞しないものとし、その他は BCAO と同様に行った。BCAO 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評価した。うつ様行動の評価には、強制水泳試験 (force swim test: FST) を用い、無動時間の変化をうつ様行動の指標とした。自発運動量の変化には、オープンフィールド試験を用いた。

【結果】BCAO 1 週間後における海馬 CA3 領域の核濃縮型細胞死数は、偽手術群に比較して BCAO 群において有意に増加した。BCAO 1、2、3 および 4 週間後の FST による無動時間は、sham 群に比較して BCAO 群において有意な延長が認められた。さらに、それは時間依存的に増加する傾向が観察された。一方、自発運動量に関しては、sham 群および BCAO 群間に差は認められなかった。

【考察】以上の結果から、BCAO モデルにおけるうつ様行動の発現は、1 週間後から発現し、それが 4 週間後まで持続することが明らかとなった。すなわち、本 BCAO モデルは脳卒中後のうつ病病態を評価するために有用なモデルである可能性が示唆された。

高血糖状態が nonalcoholic fatty liver disease に及ぼす影響

○小畑友紀雄¹, 原田 慎一¹, 中本賀寿夫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 衛生化学-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

【背景】非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) は、飲酒歴がないにもかかわらず、アルコール性肝障害に類似した脂肪性肝障害を呈する症候群である。NAFLD の多くは、肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧などを基盤に発症することから、メタボリックシンドロームの肝病変としてとらえられており、なかでも糖尿病との関連性が注目されている。しかしながら、高血糖状態が NAFLD の進展にどのように関与するかは知られていない。そこで本研究では、NAFLD モデルマウスにおいて高血糖状態が肝臓に与える影響について検討した。

【方法】動物は 4 週齢の ddY 系雄性マウスを用いた。Streptozotocin を投与し、7 日後の随時血糖値が 400 mg/dL 以上となったマウスを高血糖状態とした。飼料にはコリン欠乏メチオニン低減高脂肪飼料 (CDAHFD) を与えた。高血糖状態のマウスに対して CDAHFD を 3 日間負荷、あるいはそれらの動物に対してインスリンを投与した際の肝臓への影響を検討した。肝機能の評価は血清中の AST、ALT を比色法にて、炎症の評価は肝臓の TNF- α および F4/80 の mRNA、線維化の評価には I 型 collagen α 1 (COL1A1) の mRNA を real-Time PCR 法にて測定した。

【結果・考察】高血糖状態における CDAHFD 負荷群では、通常食群と比較して、血清 AST、ALT および肝臓における TNF- α 、F4/80 および COL1A1 の有意な上昇が認められた。一方、インスリンの処置によって、これらの値は正常化する傾向がみられた。今回の結果から、高血糖状態が NAFLD 進行の促進に密接に関与している可能性が示唆された。すなわち、糖尿病患者における NAFLD の治療には、早い段階での血糖値の正常化が肝要と考えられた。

コリン欠乏メチオニン低減超高脂肪食誘発 NASH モデルマウスにおける 高純度ドコサヘキサエン酸の効果

○藤本恵里花¹, 宮城 景¹, 小畑友紀雄¹, 原田慎一¹, 中本賀寿夫¹, 森本泰子²,
平澤 明³, 金啓二⁴, 金守良⁵, 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,
³京都大学大学院 薬学研究院 薬理ゲノミクス分野, ⁴神戸朝日病院 薬剤部,
⁵神戸朝日病院 消化器科

【背景】メタボリックシンドロームの肝病変として非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 患者が急増している。しかし、NASH の病態機序はほとんど解明されておらず、有効な治療法や非侵襲的なバイオマーカーも確立されていない。最近、NASH の予防および治療目的のためにドコサヘキサエン酸(DHA)などの n-3 系脂肪酸投与の効果に関する臨床試験が多数行われている。しかし、いずれの結果も肝臓への脂肪蓄積を軽減するのみで、組織学的な改善や病態進行の抑制に関するエビデンスは示されていない。そこで本研究では、高純度の DHA を用いて、NASH の病態進行に対する効果について検討を行った。

【方法】動物は 5 週齢の C57BL/6J (WT) マウスを使用した。通常食 (MF) 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 2 週間摂取させた。高純度 DHA (97%) は、CDAHFD 摂取 1 週間後から 1 週間または CDAHFD 摂取期間と同じ 2 週間で 1 匹あたり 50 μ l 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各種染色法により評価した。蛋白質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、mRNA はリアルタイム PCR 法により解析した。

【結果】CDAHFD の 2 週間摂取によって、WT と比較して AST および ALT 値の有意な増加が認められた。肝臓では、大滴性の脂肪滴沈着、炎症マーカー (F4/80, IL-6 および TNF- α) および線維化マーカー (collagen type 1 α および TGF- β) の mRNA 発現が有意に増加した。したがって、CDAHFD の 2 週間摂取によって、軽度な NASH を示していることが示唆される。これらのモデルに対して、CDAHFD 1 週間摂取後から DHA を投与した群では、炎症マーカーの改善は認められなかったが、線維化マーカーの増加を抑制した。一方、DHA を 2 週間同時投与置した群では、炎症および線維化マーカーの改善を示した。

【考察】以上の結果から、高純度 DHA は軽度の NASH に対して、進行を抑制できる可能性が示された。

NASH 病態形成時の脂肪組織炎症および線維化における

長鎖脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 の関与

○島田幸季¹, 宮城 景¹, 小畑友紀雄¹, 原田慎一¹, 中本賀寿夫¹, 森本泰子²,
平澤 明³, 金 啓二⁴, 金 守良⁵, 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,

³京都大学大学院 薬学研究院 薬理ゲノミクス分野, ⁴神戸朝日病院 薬剤部,

⁵神戸朝日病院 消化器科

【背景】肥満の脂肪組織において慢性炎症および線維化形成が生じることが報告されている。これらの現象はメタボリックシンドロームの一つである非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 病態形成に関与しているとの報告がある。脂肪酸受容体 GPR120/FFAR4 は白色脂肪組織に多く発現し、長鎖脂肪酸によって活性化されることが知られている。近年、これらの機能異常は肥満、炎症系の亢進、インスリン抵抗性や肝機能障害を呈するとの報告がある。本研究では NASH の進行過程における白色脂肪組織 GPR120/FFAR4 の関与を検討した。

【方法】動物は 5 週齢の C57BL/6J (WT) 雄性マウスを使用した。通常食 (MF) 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 2 週間摂取させた。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各種染色法によって評価した。蛋白質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、mRNA はリアルタイム PCR 法により解析した。

【結果】CDAHFD の 2 週間摂取によって、WT と比較して AST および ALT 値の有意な増加が認められた。肝臓では、大滴性の脂肪滴沈着、炎症マーカー (F4/80, IL-6 および TNF- α) および線維化マーカー (collagen type 1 α および TGF- β) の mRNA 発現が有意に増加した。一方、白色脂肪組織では TNF- α mRNA の発現増加および F4/80 陽性の王冠様構造が認められた。さらに、collagen type 1 α および TGF- β mRNA の発現も顕著に増加した。このような条件下、白色脂肪の GPR120/FFAR4 mRNA 発現は WT と比較して有意に増加し、この増加は、GPR120/FFAR4 アゴニストのドコサヘキサエン酸投与によって、抑制された。

【考察】以上の結果から、GPR120/FFAR4 は、白色脂肪細胞の炎症および線維化を抑制することで、NASH の病態進行を抑制することが示唆された。

幼少期ストレス負荷後の神経障害性疼痛の増悪機構における 青斑核アストロサイトの関与

○宮城 景, 木下 恵, 相澤風花, 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】長期間におよぶ痛みは、不安や抑うつなどの情動機能障害を引き起こし、またこれらの障害によって更なる痛みの増悪が引き起こされることが知られている。このように、痛みは感覚的および情動的な要因が互いに影響し合い制御されている。しかしながら、その関係性についてはいまだ不明な点が多い。グリア細胞の一つであるアストロサイトは、形態、分布および機能などを変化させることで、うつ病などの精神疾患の発症や維持、さらには慢性疼痛の形成と密接に関与している。本研究では、情動機能障害による疼痛増悪のメカニズム解明を目的として、アストロサイトに着目し検討を行った。

【方法】実験には ddY 系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。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 試験を用いた。アストロサイトのマーカータンパク質の glial fibrillary acidic protein (GFAP) 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 ストレス負荷は Sham 群と比較して不安様行動を増加させた。機械的刺激に対する反応回数もまた、対照群と比較して MSSI ストレス負荷により増加した。同条件下、青斑核領域において GFAP の発現増加が認められた。この増加は PSL 処置による疼痛を惹起させることで、ストレス負荷 + 偽手術群と比較して、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によって、対照群と比較して、不安様行動を増加させ、機械的刺激に対する反応回数も増加させた。

【考察】以上の成績から、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。

母子分離・社会隔離ストレス負荷マウスにおける神経障害性疼痛の 増強機構に対するリン酸化 ERK シグナルの関与

○藤本貴士¹, 春日壮拳, 西中 崇¹, 中本賀寿夫¹, 下條正仁², 徳山尚吾¹

¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室, ²大阪医科大学 麻酔科

【背景・目的】幼少期における虐待や育児放棄といったストレスは、成熟後に慢性疼痛を発症する要因となることが知られているが、そのメカニズムについては不明である。我々はこれまでに、母子分離・隔離飼育 (MSSI) ストレスを負荷したマウスにおいて、情動機能障害や疼痛行動を増悪させることを明らかにしてきた。本研究では、疼痛増悪を示した MSSI モデルマウスの脳内で神経機能変化を引き起こしている領域を特定するために、神経細胞の活性化マーカーとして用いられている p-ERK の発現変化について検討を加えた。

【方法】動物は、ddY 系のマウスを使用した。幼少期ストレスとして、母子分離と隔離飼育ストレスを組み合わせたモデルを用いた。生後 2 週目から 3 週目の間に、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 3 週目以降は単独で飼育した。神経障害性疼痛モデルは坐骨神経部分結紮 (PSL) によって作製した。疼痛行動の評価には、von Frey 試験を用いた。各脳部位における p-ERK の発現変化は、免疫組織学的手法を用いて解析した。

【結果】生後 9 週目において、PSL 処置によって痛みを惹起させたところ、ストレス負荷群は対照群と比べて、雄性・雌性マウスともに機械的刺激に対する反応性の有意な亢進が認められた。雌性マウスの前頭前皮質と側坐核では、PSL 処置に関係なくストレス負荷によって p-ERK 陽性細胞の増加が認められた。一方、雄性マウスでは何らの変化も認められなかった。雌性マウスの視床下部と扁桃体においては、ストレス負荷に PSL 処置を加えると p-ERK 陽性細胞の増加が認められた。

【考察】以上の結果から、MSSI ストレスは成熟期における神経障害性疼痛を増強させ、特定の脳領域における機能変化が観察された。しかしながら、それらの変化には、性差が認められた。(Nishinaka et al., Eur J Pain, in press)

術後痛時における脳内遊離脂肪酸の動態

○中本賀寿夫¹, 丸尾恵里佳¹, 相澤風花¹, 西中 崇¹, 山下琢矢², 万倉三正³,
小山 豊⁴, 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,
³くらしき作陽大学 食文化学部, ⁴大阪大谷大学 薬学部 薬理学

【背景】私達はこれまでに、視床下部の長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 シグナルを介して内因性の疼痛制御機構を活性化し、痛みを抑制することを提唱してきた。さらに、GPR40/FFAR1 アンタゴニストである GW1100 の反復投与によって、術後痛が悪化することも明らかにしている。しかしながら、術後痛時において、この受容体のリガンドとなる遊離脂肪酸の挙動については不明である。そこで術後痛モデルマウスを用いて、視床下部内の遊離脂肪酸挙動の解析を行った。

【方法】実験には、7 週齢の ddY 系雄性マウスを使用し、Brenan らの方法によって術後痛モデルマウスを作製した。疼痛の評価には、von Frey 試験および plantar 試験を用いた。脳内の遊離脂肪酸は LC-MS/MS を用いて解析した。

【結果】術後 1 日目から機械的刺激に対して過敏反応が認められ、これは 2 日目をピークとして 3 日間持続した。術後 4 日目の痛み閾値は sham レベルまで改善した。これらの条件下、術後 2 日目の視床下部では、ドコサヘキサエン酸 (C22:6)、オレイン酸 (C18:1) およびパルミチン酸 (C16:0) 含量が、sham 群と比較して有意に増加した。しかし、アラキドン酸 (C20:4) およびステアリン酸 (C18:0) は sham 群と何ら変化は認められなかった。また術後 1 および 4 日目にはこれら遊離脂肪酸の変動は sham 群と同程度であった。

【考察】術後痛の早期の段階において、視床下部の遊離脂肪酸含量が増加することが明らかとなった。以上の結果から、脂肪酸—GPR40/FFAR1 シグナルの活性化が、内因性の疼痛制御を担う重要な機構であることが示唆された。

長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の欠損は痛みを増強する

○ 京谷奈月¹, 相澤風花¹, 西中 崇¹, 中本賀寿夫¹, 山下琢矢²,
万倉三正³, 小山 豊⁴, 糟谷史代², 平澤 明⁵, 栗原 崇⁶, 宮田篤郎⁶, 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くらしき作陽大学 食文化学部, ⁴大阪大谷大学 薬学部 薬理学,
⁵京都大学大学院 薬学研究科 薬理ゲノミクス分野,
⁶鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 生体情報薬理学

【背景】我々は、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの長鎖脂肪酸によって活性化される長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 が、内因性の疼痛制御機構に関与していることを報告している。しかしながら、これらシグナル機構の欠損が、疼痛行動に与える影響については明らかにされていない。そこで本研究では、GPR40/FFAR1 欠損マウスを用いて各種疼痛モデルマウスを作製し、GPR40/FFAR1 シグナル欠損が疼痛行動に与える影響について検討した。

【方法】動物は、7 週齢の ddY 系雄性マウス、8-10 週齢の C57BL6J (WT) および GPR40/FFAR1 KO (KO) マウスを使用した。術後痛モデルは Brenann らの方法を用いて作製した。疼痛の評価には、tail flick、ホルマリン試験、von Frey 試験および plantar 試験を用いた。GPR40/FFAR1 アンタゴニストの GW1100 (10 µg) は 1 日 1 回 5 日間脳室内へ反復投与した。蛋白質の発現変化は、ウェスタンブロット法または免疫組織染色によって確認した。mRNA 発現はリアルタイム PCR 法によって解析した。

【結果】術後痛マウスは、術後 1 日目から機械的アロディニアが認められ、3 日間持続した後、4 日目には sham レベルまで消失した。GW1100 の反復処置によって、sham 群と比較して術後痛は 5 日目まで増悪された。同様に、KO マウスにおいても術後 1 日目より機械的アロディニアが認められ、これは 7 日目まで持続していた。一方、非疼痛刺激下においては、各種疼痛刺激に対して WT と KO マウス間の差異は認められなかった。

【考察】以上、GPR40/FFAR1 シグナルの欠損は、疼痛刺激を増悪させることから、痛みの慢性化にこれらシグナル機構の破綻が関与していると示唆される。

長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 欠損雌性マウスにおける 情動および母性行動

○大垣圭弘¹, 西中崇¹, 相澤風花¹, 中本賀寿夫¹, 平澤 明², 栗原 崇³,
宮田篤郎³, 徳山尚吾¹

¹神戸学院大学 薬学部 臨床薬学研究室, ²京都大学大学院 薬学研究科 薬理ゲノミクス分野,
³鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 生体情報薬理学

【背景】うつ病や統合失調症などの精神疾患の病態形成機構には、脳内の脂肪酸の組成変化やこれらを介したシグナル伝達機構の破綻が密接に関係しているとされている。さらに、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の摂取が、産後うつ病などの精神疾患の緩和やその発症率を低下させる可能性が示されている。しかしながら、これらのメカニズムについては不明である。近年、G-蛋白質共役型受容体の一つで、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの PUFA によって活性化される長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 が同定された。これら受容体は脳に豊富に存在しているが、その役割は不明な点が多い。そこで、本研究においては、GPR40/FFAR1 欠損マウスを使用し、PUFA-GPR40/FFAR1 シグナルが情動や母性行動に与える影響について検討を行った。

【方法】動物は 8-10 週齢の雌雄の C57BL6J (WT) および GPR40/FFAR1 欠損マウス (KO) を使用した。情動行動の評価には、オープンフィールド、高架式十字迷路、新規環境下摂食抑制試験、社会性行動試験およびスクロース嗜好性試験を行った。母性行動の評価には、出産から離乳までの期間における育児放棄や喰殺などの飼育状況を詳細に観察した。

【結果】高架式十字迷路試験において、KO マウスではオープンアームの滞在時間および侵入回数が WT と比較して有意に増加した。社会性行動試験では、KO マウスはターゲットマウスの存在の有無に関わらず、インターアクション領域への滞在時間が低下した。その他の行動は、両群間に顕著な変化は認められなかった。一方、KO マウスでは育児放棄および喰殺行動の個体数が WT と比較して上昇した。

【考察】以上の成績から、脳内の脂肪酸-GPR40/FFAR1 シグナル機構の破綻が、情動行動と関連することが明らかとなった。また、母性行動にも本シグナル機構が関与している可能性が示された。

反復社会敗北ストレス負荷後の情動機能障害に対する 長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 アゴニストの効果

○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】脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 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などの長鎖脂肪酸によって活性化される。これまでに、GPR40/FFAR1 のアゴニストである GW9508 を反復脳室内投与することによって、強制水泳試験において抗うつ様作用を示すことを報告しており、脳内 GPR40/FFAR1 が情動の調節に関与していることが示唆される。社会敗北ストレスは、大きなマウスに攻撃されるストレスを繰り返し負荷するモデルであり、情動障害の病態解明や治療薬の評価に使用されている。本研究では、社会敗北ストレス暴露によって惹起された行動障害に対する GW9508 の効果について検討を行った。

【方法】実験には C57BL/6J (C57) 系雄性マウスを用いた。C57 マウスを攻撃マウス (ICR 系雄性マウス) のケージに入れ、5 分間攻撃を受けさせた。その後、ケージ内に穴の開いた透明なパーテーションを設置し、攻撃マウスと分離することで、C57 マウスに非接触的なストレスを 24 時間暴露した。このストレスを 10 日間反復して行い、社会敗北ストレス負荷マウスとした。GW9508 (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$, i.c.v.) は攻撃暴露の 15 分前に脳室内投与し、ストレス負荷同様 10 日間投与を行った。最終日のストレス負荷 24 時間後に情動障害の評価として、社会性相互作用試験を行った。

【結果】ストレス負荷群では、ストレスを負荷していないコントロール群と比べて社会性行動の減少が認められた。しかし、GW9508 反復脳室内投与によって社会敗北ストレスによる社会性行動の減少が認められなかった。一方、GW9508 を投与したコントロール群の社会性行動は vehicle 投与群と同程度であった。

【考察】脳内 GPR40/FFAR1 シグナルの活性化は社会敗北ストレス負荷による情動障害を減弱させることが示唆された。