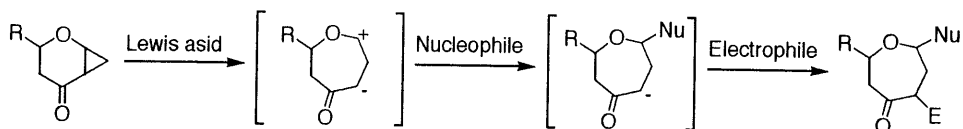


シクロプロパピラン体の環拡大反応を利用したオキセパン誘導体の合成

木村 爾沙 (横江一朗 教授)

電子求引性基および電子供与性基を隣接位に合わせ持つシクロプロパンは、1,3-双性イオンを生成し易いと考えられる。双性イオンは、親電子反応剤および求核反応剤の双方の性質を有しており、各種基質との反応が期待される。本研究は、環状1,3-双性イオン等価体として考えられるシクロプロパピラノン体の環拡大反応を利用したオキセパン体の簡便な環構築法の開発を目的とした。まずLewis酸存在下、シクロプロパピラノン体とシリルエノラートとのジアステレオ選択的環拡大反応を検討した。その結果、反応はシクロプロパピラノン体の側鎖に対してトランス選択的に進行することが判明した。この反応は、キラルオキセパノン体の合成にも展開可能であることが分かった。さらにこの環拡大反応は、トリアルキル置換オキセパノン体の合成にも展開できた。すなわちシクロプロパピラノン体、シリルエノラートおよびグリオキシレートとのタンデム反応を検討したところ、一挙にトリアルキル置換オキセパノン体が良好な収率で得られた。この反応は、双性イオンの機能を最大限に活用した手法であり、今後、オキセパン誘導体合成に応用されることが期待される。



1-Substituted 1-phenylhydrazines の合成及び phenylhydrazines と  $AlCl_3$  との反応

奈良 繁 (菊川靖雄 教授)

当研究室では、これまで N-O 結合の heterolytic な開裂により発生する nitrenium ion について研究しており、最近 *N*-phenoxyphthalimide を benzene 中  $AlCl_3$  と反応させると N-O 結合が開裂し phenoxonium ion ( $O^+-Ph$ ) が発生することがわかった。そこで、N-O 結合を N-N 結合に置き換えて同様な反応を行ったところ、今度は phenylnitrenium ion ( $N^+-Ph$ ) が発生することがわかった。次いで phthalimide 誘導体にしなくても phenylhydrazine 自身と  $AlCl_3$  との反応でも同様な反応が起こることがわかった。これまでの phenylnitrenium ion の反応は大過剰又は溶媒として benzene などの arenes を用いての反応ばかりであったが、著者はこの反応を少過剰又は等モルの arenes を用いる反応について検討した。まずはじめに cation を安定化する  $(CF_3)_2CHOH$  を溶媒として arenes に応用し、幾つかの例で成功することができた。更に、phenylhydrazine だけでなく 1-methyl-1-phenylhydrazine から  $NH_2$  が脱離して対応する *N*-methyl-*N*-phenylnitrenium ion が発生するので、一般に 1-substituted

1-phenylhydrazines から  $\text{NH}_2$  が脱離して、対応する nitrenium ions が発生する可能性がある。そこで、それら 1-substituted 1-phenylhydrazines の新しい簡易合成についても検討し、*N*-aminophthalimide と aldehydes との pyridine-borane を用いる reductive amination により対応する hydrazines を得ることができた。

#### *O*-Aryloxime 類と Lewis 酸との反応

辻 千穂 (菊川靖雄 教授)

最近、当研究室の宮沢らは  $\text{AlCl}_3$  と *N*-aryloxyamide 類との反応を検討し、 $\text{AlCl}_3$  が aryloxy 基の酸素原子に配位し N-O 結合が切断され、acylnitrenium ion を生成し amide 基が aryl 基の *ortho* 位へ分子内転位する反応を発見した。今回、著者は=N-O-結合を持つ化合物として *O*-aryloxime 類を選び、Lewis 酸との反応を検討した結果、*O*-arylketoxime 類は  $\text{ZrCl}_4$  により N-O 結合が切断され、imino 部が aryl 基の水酸基の隣に分子内転位した化合物が得られることを発見した。これまで *O*-aryloxime 類と酸との反応では、酸素原子が窒素原子に変わった arylhydrazone 類から Fischer の indolization により indole 類が合成されるのと同様の機構で、対応する benzofuran 類が合成されることが報告されていることを考えるとこの反応は大変興味深い反応と思える。

一方、*O*-arylaldoxime 類の場合は、ほぼ同様な条件下 phenol 誘導体を脱離して nitrile 類が得られる新反応を開発した。

#### 両親媒性ヘリセン分子をプローブとするキラル認識の研究

西村 ありさ (山田紘一 教授)

本研究は、キラルな場がゲスト分子のキラリティーを識別することをモニターする新しいキラル識別プローブの開発を目的としている。即ち、[5]チアヘテロヘリセン誘導体(5HM)に親水基を導入し両親媒性とした化合物 5TA のプローブとしての有効性を BSA およびミセルを用いて検討した。

5TA は自己会合性を持ち、電気伝導度測定および  $^1\text{H-NMR}$  滴定より cmc が  $0.9 \sim 1.0\text{mM}$  であり、 $^1\text{H-NMR}$  ではヘリセン部のピークはミセル形成前後に特徴的な高磁場シフトを示した。BSA に取り込ませると、5TA のらせん部は P 体に偏り CD 吸収が観測されたが、立体障害のため取り込まれる量は少なかった。一方、キラルなピラノシドミセルに 5TA を取り込ませると、グルコシドミセルでは CD 吸収が現れず、マルトシドミセル(CnM)では  $250 \sim 400\text{nm}$  に CD 吸収が観測され、らせん部は M 体へ偏ったことがわかった。アノマー炭素の立体配置の異なる -C12M では、5TA への認識は逆であり、型の方が強かった。これは 5TA のらせん部分とアノマー炭素の距離の違いにより説明された。ミセルによる 5TA

のキラル識別エネルギー測定は、5HM より 5 TA の方がミセルにより強く認識され、5 TA がミセル中でより強く配向していることを示唆した。次に、電子受容性が高いフルオレノン誘導体の(S)TAPA を含む DTAB ミセルに 5 TA を取り込ませる、ミセルによる 5 TA の認識能は濃度に依存していた。即ち、cmc 以下では DTAB 濃度を増すに従って CD 強度は徐々に強くなり、cmc 近くで最大となり、それ以降は急激に CD 強度が弱まりミセルの構造が強固になると完全に消失した。この現象も(S)TAPA とヘリセン部の距離の違いにより説明された。

以上より、5 TA は様々な種類のミセル構造の違いを敏感に感知し、キラルプローブとして有効であることが確認された。

反転の速いらせん構造を持つアミノ酸誘導体の BSA によるキラル識別

友利 美智瑠(山田紘一 教授)

本研究では、らせん不斉と四面体不斉を併せ持つ[5] チアヘテロヘリセンのアミノ酸誘導体(5AZ) が、BSA に取り込まれたときの二つのキラル中心間の相互作用を検討した。

5 AZ のらせんは速い反転のため溶液中では CD 吸収を示さないが、5-L-AlaZ を BSA 水溶液に取り込ませると弱い CD 吸収が現れ、時間とともに吸収が強くなった。HPLC 測定により、BSA は 5-L-AlaZ を取り込み、ゆっくり加水分解し、5 HM を生成することが確認された。CD 強度は反応開始から 3 ~ 4 時間は曲線的に増加し、それ以後は直線的に増加した。これを解析した結果、1 次反応と 0 次反応の連続反応が起こっており、1 次反応は BSA が 5-L-AlaZ を取り込む過程に、0 次反応は BSA が 5-L-AlaZ を加水分解する過程に対応していた。他のアミノ酸を持つ 5 AZ を用いて同様の実験を行い、1 次反応と 0 次反応の反応速度を算出し比較した。取り込み過程では、BSA のサイトに 5 AZ がよくフィットするか否かで速度に差が見られ、5-L-AlaZ が最も速かった。加水分解過程には、5 AZ と BSA との中間体の安定性が関与していた。加水分解過程の活性化エネルギーの大きさは、5 AlaZ と 5 PheZ では D 体と L 体が逆転するという興味ある事実が得られ、中間体の安定性により説明された。

5 AZ の BSA への取り込みサイトを調べるために、BSA に親和性のある薬物を用いて検討した。まず 5 HM を用いて BSA のサイト別に親和性を持つ薬物を調べたところ、5 HM はサイトに 取り込まれている可能性が高かった。又、5-L-AlaZ と BSA との反応に薬物を共存させたところ、取り込み過程ではサイトに 親和性を持つ薬物の阻害効果が見られたのに対し、加水分解過程ではほとんどの薬物に強い阻害効果が見られなかった。このように、取り込みに関しては 5-L-AlaZ と 5 HM とは異なった傾向を示した。

## マロンジアルデヒドの蛍光検出試薬の開発と尿試料への応用

滝口 秀之 (鮫島啓二郎 教授)

エチレンジアミン骨格をもつポリアミンのMDAとの高い反応性に着目し、遊離のMDAの選択的な蛍光検出試薬としてN,N'-ビス-[2-(2-ピリジルアミノ)エチル]エチレンジアミン(NPE)が当研究室で開発された。NPEによる従来のMDA測定法は、NPEとMDAを37℃で6時間反応させNaOHを添加してMDAが環状となり安定化した反応生成物を蛍光HPLCで分析する方法である。しかし、この測定法は微量なMDAの定量に対応していなかったため、ブタノール抽出操作の導入及びHPLC溶離液組成を再検討してNPEによるMDAの測定法を改良した。その改良法を尿試料に適用したところ、MDA濃度に換算すると著しく高い値を示す大きなピークが検出された。そこで、MDAの反応生成物と保持時間が一致したこのピークフラクションをIS/MSで分析したところ、MDAの反応生成物に相当する分子イオンピークは検出されなかった。

つぎに、新たなMDAの蛍光検出試薬としてエチレンジアミン構造をもつN-2,3-ジアミノプロピオニル-N'-4-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾリル)-1,4-ブタンジアミン(NBD-4DAP)をデザインして合成し、NBD-4DAPによるMDA測定法を作成した。このMDA測定法を尿試料に適用したところ、検量線法と標準添加法で求めたヒト尿中のMDA量は約0.2 μMであった。この測定値は、尿成分に結合しているMDAと遊離のMDAとの総量として測定されるTBA法のMDA量に対し約1割程度であった。NBD-4DAPが遊離のMDAのみを測定しているのかについては今後の課題であるが、NBD-4DAPがMDAの簡便な検出試薬となりうるものと考えられる。

## 質量分析と立体構造予測によるスペルミジン合成酵素の三次構造研究

竹田 昇 (鮫島啓二郎 教授)

本研究では一次構造の判明しているラットスペルミジン合成酵素(Spdsyn)の三次構造を解明することを目的として、含まれるシステイン残基(C)の同定(SHがS-Sか)に重点を置いて検討した。

まず、基質が結合した状態の酵素について調べるために、基質であるdeAdoMet存在下、Spdsynと架橋試薬であるプロモ酢酸の活性エステルとを反応させ、酵素の外側に露出しているリジンなどのアミノ酸残基を修飾した後、NTCB法により還元形システイン残基を化学的に切断し、得られるペプチド断片をTOF-MSにより測定した。その結果、Spdsynに含まれる10個のCのうち25番目のCがS-S結合で存在している証拠が得られた。

次に、S-S結合の位置の決定を試みるために、SH試薬(monoiodoacetic acid, N-ethylmaleimide)による修飾と選択的切断法(リジルエンドペプチダーゼ、アルギニルエンドペプチダーゼ、NTCB法)を組み合わせて得られるペプチド断片をTOF-MSにより解析した。また、deAdoMetを保持しているSpdsynをIAEDANSで蛍光標識したのちリジルエンドペプチダーゼ消化して得られたペプチドの解析から、標識さ

れたCが推定されているので、これらの結果を考えあわせて、Spdsynの10個のCのうちS-S結合を形成するものは25、209、251番目の3個のC、およびSHで存在するものは123、204、205、224、236番目の5個のCであることがわかった。

一方、Spdsynの1次構造に基づき、立体構造理論及び経験則を利用して作成した分子模型モデルと実験で得られた結果を比較することにより、実験的には決定できなかった2個のC (71、89番目) について、71番目はS-Sで、89番目はSHで存在していることがわかった。さらに25番目と71番目、209番目と251番目のCがそれぞれS-S結合を形成していることもわかった。

#### アルギニルトランスフェラーゼの活性測定法の改良

寺田 幹 秀 (鯨島啓二郎 教授)

本研究は、Asp(4)DNSを用いるアルギニルトランスフェラーゼの活性測定法をより有用で信頼性のある方法にするために、Asp(4)DNSの改良合成、内標準物質の導入、および標準添加法について検討した。

Asp(4)DNSの改良合成法では、ZAsp(OBzl)OSuを用いてより処理段階が少なく、純品の得られやすい方法を考案した。また、活性測定法の改良では、まずHPLC用内標準物質として (7)DNSを選び、それを使って標準添加法の信頼性を検討した。その結果、ATPとArgAsp(4) DNSが何らかの相互作用をして検出量が減少することがわかった。それを解決するためにスペルミジンを添加すると、ArgAsp(4)DNSの検出量の回復が見られたが、完全には回復できなかった。しかし、現状のArg-tRNA再生系を用いる方法では、活性測定系にスペルミジンを加えるべきであることがわかった。

#### 限外ろ過法を用いた細胞内遊離ポリアミン濃度測定のための基礎検討

薬学専攻 亀井 千恵子 (白幡 晶 教授)

ポリアミン (PA) は、細胞内ではタンパク質をはじめ核酸など、陰電荷を持つ細胞内高分子と相互作用するため、細胞内遊離 PA 濃度と機能の関係を明らかにすることは重要である。本研究では、培養細胞内遊離 PA の割合を簡便に測定する方法の開発を目指して、新規に考案した限外ろ過法 (市販のフィルターユニット中に組み込まれた限外ろ過膜上のオイルに細胞懸濁液を重層し、次に遠心により細胞を集め、凍結融解によりオイル中細胞膜を破壊した後遠心し、ろ液を採取する方法) の有用性について、詳細な基礎検討を行い、細胞試料への応用を試みた。

まず、細胞試料の限外ろ過を行う際にろ液中に得られる細胞内水容積を知るため、 $^3\text{H}_2\text{O}$ 、及び $^{14}\text{C}$ -inulin を用いた細胞内外の水容積のオイル法による測定を行い、両者の差から細胞内水容積の測

定が可能であることを確認した。次に、オイル法による細胞の分離法を限外ろ過法に応用し、ろ液中の細胞内水容積と細胞外水容積の割合について調べ、凍結融解を行った試料とそうでない試料とのろ液量の差が細胞内水に由来することを確かめた。更に、ろ液量が少ない場合の限外ろ過膜通過率を調べ、60%であることを明らかにした。

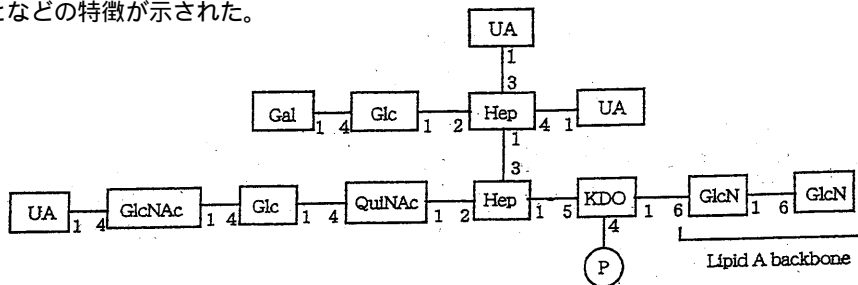
以上の結果をふまえ、長期間 PA を枯渇させた HTC 細胞に PA を投与することで PA を蓄積させた細胞系に本法を応用した。PA 合成酵素のひとつであるオルニチン脱炭酸酵素阻害剤を培地中 300 μM になるように投与して 4 日間 HTC を培養し、細胞内のプトレシン、及びスペルミジン (spd) を枯渇させた。この細胞に spd を投与すると、細胞は急激に spd を蓄積し、それに伴い細胞容積の急激な減少と容積調節機能の消失が起こり、細胞死が観察された。この時の急激な spd 蓄積と細胞容積の減少に着目し、spd の蓄積がピークに達したときの遊離 PA 量の変化を限外ろ過法により測定したところ、spd の過剰蓄積細胞は、コントロール細胞に spd を投与した細胞に比べて、遊離 spd 濃度は 60 倍以上にまで達しており、本法により初めて全 PA 量の蓄積よりも遊離 PA の蓄積倍率が著しいことを明らかにした。

*Vibrio cholerae* 0180の0抗原リポ多糖 (LPS) 多糖鎖の構造解析

松 葉 慎太郎 (川嶋洋一 教授)

*V. cholerae*は菌体表層抗原 (O抗原) の違いにより、現在、200種にも及びO抗原型に分類されている。これらのうち、急性感染症コレラの原因となるのは01および0139の二つのO抗原型であり、その他のものは食中毒の原因菌として知られる。01~0183 までO 抗原型のうち179種のO抗原型については、それらのO抗原型を決定するO抗原リポ多糖 (LPS) の多糖部について化学分類が行われ、130種の化学型に分類されることが示されている。この化学分類において、0180のLPS多糖部からは、ほとんどのグラム陰性菌LPSに共通する構成糖であるヘプトースが通常の検出法では検出されないことが報告されている。本研究では、この0180 LPSの多頭鎖の構造解析を行った。

LPS多糖鎖は、LPSまたはフッ酸処理により脱リン酸したLPSを0.1M塩酸で部分加水分解した後、Sephadex G-50ゲルろ過により調製した。このLPS多糖鎖および多糖鎖をさらに部分分解して得られたオリゴ糖の、メチル化分析やFAB-MSによる分子量測定などの構造解析の結果、0180 LPS多糖鎖は下図に示した構造をもち、13個の単糖で構成される低分子糖鎖であることや、コア部分にもウロン酸を含むことなどの特徴が示された。



*V. cholerae* 0180 LPS 多糖鎖の推定構造

## 新型コレラ菌 *Vibrio cholerae* 0139 と血清学的交叉反応原性を示す細菌のO抗原リポ多糖に関する免疫化学的研究

伊藤 康 弘 (川嶋洋一 教授)

*V. cholerae* 0139 (0139) は、1992 年 10 月頃よりカルカッタを発祥地として全世界に広がった、いわゆる新型コレラの原因菌である。0139 は *V. cholerae* 022 (022)、同 0155 (0155)、*V. mimicus* (*mimicus*) および *Aeromonas trota* (*trota*) と血清学的交叉反応原性を示す。これらの菌種の O 抗原特異性を決定するリポ多糖 (LPS) の O 抗原特異多糖側鎖の構造はすでに解明されているが、上記交叉反応原性に関与するエピトープは明らかにされていない。そこで本研究では、これら 5 菌種の LPS の O 抗原特異多糖側鎖上のエピトープを免疫化学的に追究した。

0139 と 0155 LPS の O 抗原特異多糖鎖の非還元末端部分に存在する共通構成成分は galactose-4,6-cyclic phosphate (Gal-4,6-P) である。また、0139、022 および *trota* の各 LPS の O 抗原特異多糖側鎖には colitose (Col) が非還元末端糖として存在する。一方、*mimicus* (N-1990株) LPS のそれには Gal-4,6-P が存在することが既に報告されているが、本研究で用いた *V. mimicus* (621-98 株) では、Gal-4,6-P は存在せず Col が非還元末端糖として検出された。各菌株 LPS を 1% 酢酸中で加熱または 50% フッ酸処理により、それぞれ Col のみと Col およびリン酸を段階的に除去した化学修飾 LPS を用いる血清反応により、0139 と 0155 LPS の共通抗原性には Gal-4,6-P が関与し、また 0139、022、*mimicus* および *trota* LPS 間の共通抗原因子はそれぞれの O 抗原特異多糖鎖に非還元末端糖として存在する Col であることが示された。さらに交叉吸収試験において、0139、022、*mimicus* および *trota* の各 LPS は独自の O 抗原因子をもつことや、*trota* LPS は 022 LPS の O 抗原特異多糖鎖に存在するすべての抗原因子を含むことも明らかにされた。

## 性ホルモンによるペルフルオロオクタン酸の尿中排泄調節機構

片倉 賢 紀 (川嶋洋一 教授)

ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) はオクタン酸の炭素結合水素がすべてフッ素に置換した化合物で、フッ素系界面活性剤として工業的に広く用いられている化合物である。PFOA は主として尿中から排泄されるが、その尿中への排泄量は雌雄のラットで著しく異なって散ることが明らかとなってきた。本研究では PFOA の尿中への排泄に性差が生じる機構について解析を試みた。

PFOA の 24 時間の尿中への排泄量は雄ラットを 3 週齢で去勢することによって 25% から 70% に増加した。これは雌ラットに匹敵していた。去勢した雄ラットにテストステロンを投与するとテストステロンの用量および投与期間に依存して低下した。去勢およびテストステロンの効果は 6 週齢で去勢を行った場合にも同様に観察された。また、雌ラットにテストステロンを投与した場合にも投与に数

に依存して尿中排泄の低下が認められた。これらの結果から、PFOA の尿中への排泄はテストステロンによって調節されること、また、性分化の初期に起こる刷り込み現象ではないことが明らかとなった。また、PFOA の尿中への排泄は生後 3 週齢では雌雄の差はなく、その後 5 週齢にかけて雌ラットでは増加し、雄ラットでは変化しないことが明らかとなった。ラット腎尿細管冊子縁膜および側底膜を調製し PFOA の輸送を検討したところ、いずれの膜でも PFOA の輸送が観察され、有機酸輸送耐障害剤プロベネシドによって阻害された。さらに、腎臓に発現している有機酸輸送体の一種である OAT2 の発現量を調べたところ、雌ラット腎臓では雄ラットの 10 倍も発現していることが明らかとなった。

以上の結果から、ラット腎では何らかの有機酸輸送体が PFOA を輸送し、その発現はテストステロンによって調節されること、OAT2 はその候補として上げられることが明らかとなった。

#### ペルフルオロ脂肪酸による肝オレイン酸増加の機構解析

内 藤 佳 奈 (川嶋洋一 教授)

フッ素化脂肪酸(PFCA) はフッ素系界面活性剤の原料などとして工業的に広く利用されている。PFCA の毒性として、肝ペルオキシソーム増殖作用、肝臓におけるミトコンドリアやマイクロソームの酵素誘導、脂肪蓄積などが報告されている。これらの研究には主としてラットが用いられ、また、炭素数 8 と 10 の PFCA が用いられてきた。しかし、マウスに対する影響および異なる炭素鎖長の PFCA の作用についてはほとんど報告がない。本研究ではマウス肝臓において異なる炭素鎖長の PFCA がオレイン酸の合成に対してどのような作用を示すかについて、系統的な研究を行った。

マウス肝臓の 9 デサチュラーゼ(SCD) および 1 アシルグリセロホスホコリンアシルトランスフェラーゼ(1-AT) 活性について、炭素数 6 および 7 の PFCA は弱い誘導効果を示した。また、炭素数 8 および 9 の PFCA は用量依存的に強い誘導作用を示した。一方、2 アシルグリセロホスホコリンアシルトランスフェラーゼ(2-AT) に対してはほとんど影響が認められなかった。

肝臓中の脂肪酸を分析したところ、オレイン酸の量は PFCA の投与によって著しく増加していた。特にホスファチジルコリン (PC) の 2 位における増加が顕著であった。また、これらの作用は炭素鎖長の PFCA ほど顕著であった。ラットでは炭素鎖長 7 以上の PFCA にマウスと同様の効果が認められ、炭素鎖長の長い PFCA ほど強い効果を示した。

以上の結果から、マウス肝臓において、種々の PFCA は SCD や 1-AT を誘導することによってオレイン酸の量を増加させること、マウスではラットでは効果のない、短い鎖長の PFCA にも作用が認められることが明らかとなった。



## フッ素化脂肪酸の消化管吸収に関する研究

野 城 理 絵 (川嶋洋一 教授)

フッ素化脂肪酸(PFCA)は脂肪酸の炭素結合水素がすべてフッ素に置換した化合物で、フッ素系界面活性剤の原料などとして工業的に広く利用されている。この化合物は飼料に混ぜて与えるとペルオキシソーム増殖作用などを引き起こすことが知られていることから、消化管からよく吸収されるものと推察される。消化管は環境中のPFCAの主要な取り込み経路になる可能性が高いので、本研究では消化管からの吸収の機構について解析を行った。

炭素数8のペルフルオロオクタン酸(PFOA)は経口投与すると約60%が投与後数時間で吸収された。反転腸管を用いた実験から、PFOAは回腸および空腸において、温度、濃度および時間に依存した取り込みを示すことから、取り込みには何らかのたんぱく質が介在していることが示唆された。そこで小腸腸子縁膜小胞を調製し、さらに詳細に取り込み機構を検討した。小腸腸子縁膜小胞においても温度、濃度依存的な取り込みが観察され、 $K_m$ および $V_{max}$ はそれぞれ0.846 mM, 51.4 nmol/min/mg proteinと計算された。この輸送の特性について検討したところ、プロトンや重炭酸イオンの濃度勾配には影響されなかった。また、小胞外液のpHは低い方が高い活性を示した。PFOAのとりこみは鎖長の異なるPFCAによって阻害され、炭素鎖長の長いPFCAほど強い効果を示した。また、ナトリウム非依存性グルコース輸送の阻害剤であるフロレチンによって取り込みは有意に阻害された。ラットに陰イオン交換樹脂コレステラミンを飼料に混ぜて与えると、PFDAの糞中への排泄は著しく増大したことから、PFCAは腸肝循環していると考えられた。

以上の結果から、PFCAは消化管より何らかの輸送体を介して取り込まれ、腸肝循環することによって長く体内にとどまるものと考えられた。

## ウサギ摘出耳介単回灌流法を用いたフルルビプロフェン皮膚適用後の組織内移行動態の評価

佐 藤 武 志 (従二和彦 教授)

経皮吸収型製剤適用後の薬物の適用部位組織における滞留性や血管内への移行性は、局所での薬効の発現や副作用の発生に関係しており、それらに影響を及ぼす要因を解明することは、製剤を設計、評価する上で重要である。そこで、ウサギ摘出耳介単回灌流法を用いて、フルルビプロフェン(FP)皮膚適用後の血管内移行性と組織滞留性を灌流条件を変化させて評価した。

日本白色種雄性家兔の耳介を摘出し、耳介中央部の動脈よりポリエチレンチューブ(PE50)を挿入し、また、耳介中央部に薬物適用のためのガラスセル(3.14cm<sup>2</sup>)を固定した。この耳介を37℃に保ち、O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>混合ガス(95:5)をバブリングしたタイロッド液を灌流させ、開始1時間後、セル内に1%FP含有水性ゲルを適用した。FP適用2時間後におけるFPの灌流液中累積回収量、適用部位直下組織中滞留量

及び適用部位以外の耳介組織中移行量を HPLC を用いて測定した。

皮膚適用後の薬物耳介組織内動態に関して、適用部位直下組織からの血管内移行過程と一度血管内に移行した薬物の他の部位への再分布について、灌流速度やタンパク結合の影響を検討した。適用部位直下組織からの血管への薬物移行は灌流速度や非結合形分率の変化に影響されず、適用部位直下からの血管内への移行過程では血管壁透過までの過程が律速段階であると考えられた。また、血管内から他の耳介組織中への薬物再分布は非結合形分率の減少や灌流速度の増加により減少し、再分布過程は血管壁透過が律速段階であると考えられた。

#### 一硝酸イソソルビドの PK-PD 相関と耐性の評価

佐藤 公洋 (従二和彦 教授)

硝酸薬は虚血性心疾患やうっ血性心不全の予防と治療に広く用いられている。硝酸薬は血管平滑筋や内皮細胞を含むさまざまな細胞で NO に変換され、血管が弛緩することで効果を発揮する。しかし、その一方で、硝酸薬の長期適用により耐性が生じることが指摘されている。FDA では無硝酸時間を設ける耐性克服法を推奨しているが、明確な設定法はいまだ確立していない。

そこで本研究では、NO 以外の活性代謝物を持たない硝酸薬として一硝酸イソソルビド (5-ISMN) を選択し、血中濃度が一定にならない投与方法として単回および繰り返し皮下注 (s.c.) を、また血中濃度が一定になる投与方法として点滴静注および皮膚適用を行い、PK-PD 相関から、5-ISMN の耐性克服のための投与方法について検討した。

単回投与と比較すると、繰り返し投与後の血中濃度動態には有意な差はみられなかったものの、薬効は減弱し、耐性現象が観察された。また、耐性には構築した PK-PD モデル上の速度定数 ( $k_{oc}$ ) が寄与していることが示唆された。さらに、点滴静注後では、血中濃度及び薬効は一定に保たれるが、耐性パラメーターである  $k_{oc}$  は単回 s.c. 時より大きい値を示し、耐性が発現したことが明らかとなった。また、皮膚適用における結果より、薬効は投与量より AUC に依存すること、さらに、耐性は投与量には依存しないことが示唆された。

以上より、5-ISMN では長期間の持続投与は避け、投与間隔をあげながら繰り返し投与することが理想的であると考えられた。また、経皮吸収型製剤に関しても血中濃度にピークとトラフのできるような投与方法や製剤設計が有用であると考えられた。

## 局所注射後のサリチル酸の組織滞留性に関する研究

吉田 大 介 (従二和彦 教授)

薬物の皮膚透過性は角質層のバリア能により制限されているが、近年の皮膚を介した DDS 研究の発展はめざましく、特に物理的吸収促進法である electroporation や jet injection 技術が皮内、皮下及び筋肉内への薬物送達剤の開発に結ばれつつある。これらの製剤は薬物を組織に直接投与できることから、従来の経皮吸収剤と比べて、投与部位から全身への吸収性及び筋肉への移行性など、局所的な薬物動態が変化している可能性がある。そこで本研究は薬物をラット腹部の皮内、皮下、筋肉内に注射し、投与部位における薬物の滞留性及び近傍組織への標的性について簡便な速度論モデルを用いて評価した。モデル薬物には非ステロイド性抗炎症薬であるサリチル酸ナトリウム(SA-Na)を選択し、ウレタン麻酔下、Wistar 系雄性ラットの腹部正中線上に皮内、皮下または筋肉内へ薬物水溶液(62.5, 3.08  $\mu\text{mol}/20\ \mu\text{L}$ )を投与した。皮膚適用の場合は腹部皮膚をテープストリッピング法で処理してから、薬物水溶液(1%SA-Na, 2mL)を適用した。その結果、筋肉内投与では、筋肉からの薬物消失は速く薬物が速やかに全身循環系へ移行した。また、皮膚への直接移行はなく、皮膚中薬物量は全身循環系からの再分布に起因していた。以上、筋肉内投与は局所標的には適さないことがわかった。一方、皮内、皮下投与では全身への移行は遅く、薬物は皮膚と筋肉に長時間滞留した。これより皮膚や筋肉を標的とした場合、薬物を筋肉に直接投与するより皮内または皮下に投与する方が有効である可能性が示唆された。また、得られた薬物動態パラメータより、皮内投与後は皮膚中血管からだけでなく、筋肉からも薬物が全身に移行することが示唆された。これらの結果より、物理的促進技術を用いた皮膚、皮下組織への直接注入は薬物滞留性を上げるのに有用である可能性が示唆された。

## 電場及びパルス解析による electroporation の薬物皮膚透過促進効果の評価

吉田 牧 (従二和彦 教授)

【目的】遺伝子導入法として実用化されている electroporation(EP)は薬物の経皮吸収促進法として応用できる。しかし、EP の促進効果を十分に引き出し、副作用を最小限に抑える最適条件に関する報告は少ない。本研究では EP の促進効果をより直接的に評価するために、角質層の電場解析を試みた。モデル薬物に安息香酸ナトリウム(BANa)を選択して透過実験を行い、電極形態・位置、薬物基剤が EP の促進効果に与える影響を電場解析及びパルス解析から評価した。

【方法】in vitro 透過実験：ヘアレスラット腹部皮膚を縦型拡散セルに挟み、角質層側に BANa 溶液を、真皮側に生理食塩液を適用した。皮膚中 BA 量の測定では、皮膚上に needle 電極 2 本を設置し、4 時間目に 300 V の指数関数減衰波を 1 pulse/min で 10 分間負荷し、皮膚中量を測定した。一方、皮膚透過量の測定では ring 電極を角質層側に、needle または point 電極を皮膚上 0-5 mm に設置し

た。なお、基剤の影響を評価するために薬物溶液は種々濃度の食塩液で調製した。8時間の透過実験のうち4-6時間目までの2時間、450 VでEP処理し、透過量を測定した。電場解析：有限要素法を用いて角質層中の電場分布及び平均電場強度を解析した。パルス解析：Storage oscilloscopeを用いて各電極設置時のEP負荷時に生じる波形を解析し、初期電圧( $V_0$ )と時定数( )を算出した。

【結果・考察】EPによる皮膚透過促進効果は適用電圧よりも角質層に形成される電場強度に依存した。また、電場強度は電極と皮膚の距離に著しく依存した。さらに、 $V_0$ 及び は電極と薬物溶液の接触面積及び溶液の電気抵抗に影響された。以上、電場及びパルス解析はより効果的なEP適用法を模索する上で有用であることが示唆された。

#### 放出制御膜を有するジヒドロエトルフィン含有テープ剤の調製と皮膚透過挙動に関する研究

杉山 洋平 (森本雅憲 教授)

【目的】オリパビン系オピオイド鎮痛薬である dihydroetorphine (DHE) は、モルヒネの1000から12000倍以上の強力な鎮痛効果を有し極めて微量で鎮痛効果を発現すること、効果の発現と消失が迅速であることなど経皮吸収型製剤に適した特徴を有している。しかし、皮膚の損傷などによりDHEの皮膚透過性が増大すると、血中濃度が上昇し副作用が発現する恐れがある。したがって、皮膚状態の変化による吸収量のバラツキを抑えるためには放出を制御することが安全かつ有効な治療を行なう上で必要である。そこで本研究では、エチレン-酢酸ビニル共重合体 (Ethylene-vinyl acetate copolymer, EVAc) を放出制御膜としDHE含有膜制御型テープ剤を調製し、製剤からのDHE放出挙動ならびに角質層損傷皮膚におけるDHE皮膚透過挙動について検討した。

【結果・考察】DHE累積放出量は、テープ剤単独系でマトリックス中の薬物拡散が律速となる放出挙動を示した (Fig. 1, Type I)。これにEVAc膜を放出制御膜として積層したテープ剤からのDHE放出挙動は0次放出を示し (Fig. 1, Type II)、さらに粘着層を積層すると放出面までの距離が増大するため lag time は増大したものの、DHE放出挙動はほぼ0次であった (Fig. 1, Type III)。このことからEVAc膜が放出制御膜として機能していることが確認された。さらに、ヘアレスラット角質層損傷皮膚を用いた *in vivo* 経皮吸収実験において、テープ剤単独 (Type I) を貼付した場合、血漿中DHE濃度の過度の上昇を招いたのに対し、膜制御型テープ剤 (Type III) では過度の上昇がなく有効濃度域に制御できる可能性が示唆された (Fig. 2)。

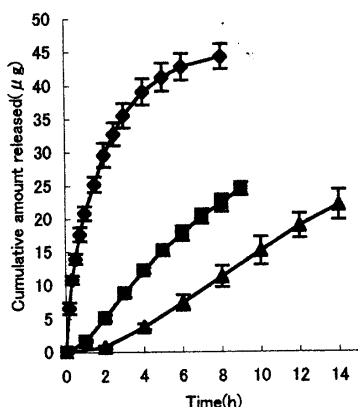


Fig. 1 Cumulative amount of DHE released from Type I (◆), Type II (■), and Type III tape (▲).

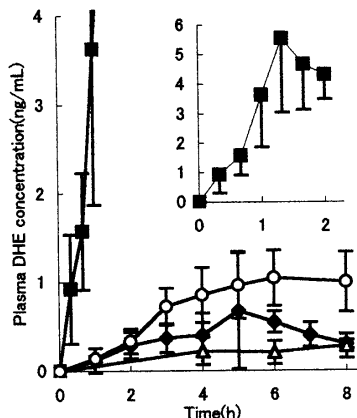


Fig. 2 Plasma DHE concentration during the application of Type I tape (close symbols) and Type III tape (open symbols) onto hairless rats skin with (■, ◆) and without (○, △) SC damage.

中毒救急医療における起因中毒薬物の分析法並びに臨床応用に関する研究

千葉健史 (森本雅憲 教授)

岩手医科大学附属病院薬剤部では、薬剤師が中毒患者の中毒起因薬物分析を行っており、6ヶ月間の病院実習の際にそれに参加することができた。そこで、現在中毒分析に汎用されている Triage-8<sup>®</sup>、TOXI-LAB<sup>®</sup>、高速液体クロマトグラフィー (MULTI-HPLC、REMEDi-HS<sup>®</sup>) について文献調査し、それらの臨床応用について評価した。

Triage は米国での乱用薬物に対応していることから、自殺企図による中毒の多い日本の実状に則した対応が望まれる。TOXI-LAB<sup>®</sup> は、Triage-8<sup>®</sup>同様、米国の中毒事情を背景にしているため、日本の実状に対応していない。MULTI-HPLC、REMEDi-HS<sup>®</sup> についても、データの分析が繁雑であること、酸性薬物の同定が困難であること等の欠点が指摘されている。

【中毒症例】51 歳、男性、自宅にていつもと違うようないびきをしているのを母親が発見し、起こそうとしたが覚醒せず、岩手医科大学高次救急センターへ搬入。自殺目的の薬物摂取が疑われ、搬入直後の尿と血清サンプルから中毒起因物質のスクリーニングを行った。Triage-8<sup>®</sup> の単独使用では、バルピツール酸系薬物としか判断できなかった。TOXI-LAB<sup>®</sup> のみの使用では、ペンバルピタール、アモバルピタールの他にメトクロプラミドが検出され起因薬物を同定することはできなかった。しかし、Triage-8<sup>®</sup> と TOXI-LAB<sup>®</sup> の結果から、まずバルピタール酸系薬物に絞ることができ、さらに HPLC、TDM 業務で使われている FPJA (フェノバルピタールをルーチンで測定) を組み合わせることにより、起因薬物をアモバルピタールと推定することができた。どのスクリーニング機器でも単独の使用では未知の薬物を同定することはできず、今回行ったように即応性、簡便性、分析精度等の異なる数種の分析機器を用い、分析を行うことが必要である。

棘融解性薬物のスクリーニングを目的とした皮膚中トランスグルタミナーゼ活性の測定方法に関する研究

安田 康 貴 (森本雍憲 教授)

新薬に高頻度で追加される副作用の一つに薬疹がある。一般に薬疹の機序は不明で、アレルギー的機序によるものと言われている。しかし、表皮剥離(棘融解)を来す場合には、皮膚の細胞間架橋形成を担う Transglutaminase (TGase) 活性の阻害と関連することを示唆する報告がある。そこで薬物の TGase 阻害活性をスクリーニングする方法について検討することとした。まず、ヒト死体皮膚およびヘアレスラット摘出皮膚を用いて、TGase 阻害実験が可能であるかを検討した。薬物にはカプトプリル、チオプロニン、D-ペニシラミン、プレオマイシン、エナラプリル、エナラプリラートを用いた。また、ヘアレスラット摘出皮膚を用いて酵素反応速度パラメーターを求めた。

添加薬物の TGase 阻害活性：カプトプリル、D-ペニシラミン、エナラプリラートでは、ラット皮膚およびヒト皮膚のどちらとも TGase 活性の阻害は見られなかった。チオプロニンでは酵素反応液中の濃度を上げていくと、どちらの皮膚でも阻害が確認できた。プレオマイシンではラット皮膚においてのみ阻害が見られた。エナラプリルではラット皮膚、ヒト皮膚ともに阻害が見られた。エナラプリルとエナラプリラートの結果より、エナラプリルの TGase 阻害作用は親化合物自身が関係していることが示唆された。酵素パラメーターの算出：得られた結果は Table 1 のようになった。今回と同様の実験条件で算出した精製モルモット肝 TGase の酵素パラメーターは、 $Km^{S1} = 2.00$ 、 $Km^{S2} = 0.02$ 、 $Vmax = 4.58$ であった。このことから基質親和性はラット皮膚ホモジネート中 TGase の方が低いと考えられた。また、酵素と基質の親和性は強すぎず、阻害実験に用いるのに適していることが示唆された。

Table 1. TGase の酵素パラメーター

Km (mM)	Benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine (S1)	13.21
	monodansylcadaverine (S2)	0.85
Vmax ( $\mu\text{g/mL/15min}$ )		1.8

アミノグリコシド系抗生剤保存溶液の濃度測定値に対する  $\beta$ -ラクタム系抗生剤の影響

相 場 大 樹 (杉林堅次 教授)

アミノグリコシド系抗生剤 (AG) の TDM に際し、 $\beta$ -ラクタム系抗生剤 ( $\beta$ -L) が併用された血液検体中で AG の濃度低下が起こると報告されているが、その影響が実際のどの程度なのかを推定するた

めの基礎検討として、AG 標準液の -L 共存時の濃度変化を種々保存条件で評価した。

Tobramycin (TOB)、Amikacin、Arbekacin に Ampicillin-Na (ABPC) を加えた試験液を種々濃度条件で、0~15 日間の種々保存期間、室温、冷蔵、冷凍の各温度で各条件 1 検体ずつ保存し、蛍光偏光免疫測定法で AG 濃度を測定した。さらに、TOB については各条件 6 検体調製し、試験液調製直後、12、24 時間後に TOB 濃度を測定し、ABPC の影響について統計的な評価を行った。

-L 併用により AG の経時的な濃度低下が確認された。保存温度における濃度低下は大きい順に室温 > 冷蔵 > 冷凍であり、AG 間の比較では TOB が最も濃度低下が大きかった。また、AG の濃度低下は併用した ABPC の濃度に依存する傾向が示された。各条件 6 検体調製した TOB の保存実験では、氷冷保存でも TOB 濃度は有意に減少しており ( $P=0.0107$ )、ABPC 併用により TOB の濃度が試験液調製直後から 24 時間で有意に減少することが確認された。

AG と -L が併用された患者の血液試料は採取後迅速に測定するか、測定まで必ず凍結保存すべきであると指摘されている。しかし、外部検査機関へ血中濃度測定を委託している場合、試料の温度管理に問題が生じることも考えられる。TOB が氷冷保存でも 24 時間以内に濃度低下を起こすという本研究の結果から、血液検体を凍結状態のまま運搬するシステムの確立が必要であると思われる。

#### 糖尿病教室における患者の理解度の調査および検討

西川 礼子 (杉林堅次 教授)

糖尿病の合併症の発症や進展を抑制するためには患者が治療法を含め糖尿病というものを十分に理解し、自ら進んで治療に参加する意欲を持つことが必要である。そこで杏林大学医学部付属病院では糖尿病教室を開催している。集団教育であるこの糖尿病教室における患者指導の問題点としては、患者ごとの病態、治療状況、理解力、糖尿病に対する意識などの違いに起因する理解レベルの差異が指摘できる。患者にとってわかりやすく、必要最低限の事項を理解できる糖尿病教室を目指すためには、現状で講義が患者にどの程度理解されているのか、さらにその理解度が患者側がもつ要因によりどのように変わるのかということを明らかにする必要がある。そこで今回、「薬物療法」の講義に対する患者の理解度を評価するための問題を作成して理解度の調査を実施し、患者側がもつ要因と理解度の関係について検討した。

実施に際し、解答は自由意思であることを説明した。解答終了時、患者には正答と解説を配布した。なお、この問題を講義終了後に行うことを患者に前もって触れず、抜き打ちで行った。試験結果について統計的な検討を行った。すなわち、正答率に影響を及ぼす患者側の要因として、年齢、性別、インスリン投与歴、経口糖尿病薬投与歴、糖尿病教室参加歴、薬の飲み方に関する一般問題の正答率を選び、それらの間の関係を解析した。

調査の結果、6 名の患者で 100% の正答率が得られたが、一方、正答率が 37.6% と極端に低い患

者が2名いた。解析の結果、理解度が低い患者の要因として、高齢者、女性、インスリンを使用していない者、薬の飲み方に関する一般的知識が低い者が挙げられたが、各患者の糖尿病教室に向けた意識の違いも大きく影響していると思われる。今後はこれを手がかりに、患者が正しく理解して退院できるように個別の指導も十分に行い、理解できない部分をフォローしていく必要があると思われる。

#### 薬物によるヒト肝培養細胞における CYP3A4、CYP3A5 および CYP3A7 の誘導に関する研究

白井達洋(駒田富佐夫 助教授)

【目的】薬物相互作用に関与する割合が大きい CYP3A4 を中心に、分子種である CYP3A5、CYP3A7 の mRNA 誘導経過を種々の薬物を用いて検討した。さらに、薬物によるこれら酵素の mRNA 誘導はグルココルチコイド受容体 (hGR) により増強されるとの報告があることから、これら酵素の誘導と hGR 誘導との関連についても併せて検討した。

【方法】薬物としてフェニトイン (Phe)、プレドニゾロン (Pre)、シクロスポリン (CyA)、クロトリマゾール (Clo)、カルバマゼピン (Car)、リファンピシン (Rif)、フェノバルビタール (PB) を使用した。Hep G2 を播種し、臨床治療濃度の薬物を添加した。その後、経時的に mRNA を抽出し、RT-PCR を用いて、hGR、CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の各 mRNA 量を測定した。さらにこれら mRNA 誘導量の経時変化についてクラスター分析を行った。

【結果・考察】Pre が最も強い CYP3A4 mRNA 誘導を示し、続いて Rif、Car、Phe の順であった。その際、Pre、Rif、Car において CYP3A4 mRNA の誘導速度は速やかであったが、PB、Phe のそれは緩徐であった。Clo は CYP3A4 活性を誘導すると言われているが、CYP3A mRNA の発現に変化は見られなかった。この理由として、既に報告されているように CYP3A 酵素蛋白の安定化によるものと考えられた。CYP3A5 mRNA では Phe において最も強い誘導が観察され、誘導も遅い時期より観察された。CYP3A7 mRNA の弱い誘導が Pre、Rif、Phe の添加において観察された。さらに、上記薬物による CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7 mRNA 誘導量と hGR mRNA 増加量の関連をクラスター分析を用いて解析した結果、上記薬物の誘導は大きく4種類に分類された。

#### 呼吸器・心臓疾患のリスクファクターとしての $\beta_2$ 受容体遺伝子多型に関する研究

寺嶋淑江(駒田富佐夫 助教授)

【背景・目的】一塩基遺伝子多型の解析・研究は臨床の場における病気の適正診断、患者個人の体質にあった治療法の選択等に重要な情報をもたらすことから注目を集めている。そこで、呼吸器および心臓疾患患者に焦点をあてて、日本人における  $\beta_2$  受容体遺伝子多型の頻度、疾患と多型の関連性な



らびに肥満や糖尿病等の危険因子との関連性について検討した。

【方法】被験者：被験者は日本大学医学部附属板橋病院にて心臓疾患および呼吸器疾患により治療を受けている患者、城西大学薬学部に所属する学生および職員とした。被験者には、試験の目的や内容を口頭と書面により説明し、直接書面による同意を得た。

遺伝子多型の決定：被験者より得た血液および口腔粘膜より抽出したゲノム DNA を用い、PCR-RFLP 法により行った。

【結果】呼吸器・心臓疾患患者における  $\alpha_2$  受容体遺伝子多型の発現頻度調査では、27 部位において呼吸器疾患患者と対照者で有意な差が認められたが、心臓疾患患者では差が認められなかった。また、16 部位、164 部位では呼吸器・心臓疾患患者において、対照との間に差は認められなかった。

全症例を疾患別(高血圧症、急性心筋梗塞、不整脈、狭心症、うっ血性心不全)に分類し、 $\alpha_2$  受容体遺伝子多型との関連性を調査した結果、高血圧症および狭心症において 16 部位に有意な差が認められた。さらにオッズ比は野生型 w/w で約 2~3、ヘテロ型 w/m では約 2、変異型 m/m で 0.2~0.3 であった。その他の疾患では差は認められなかった。

心臓疾患の危険因子とされる高脂血症、肥満、糖尿病、喫煙、飲酒等と  $\alpha_2$  受容体遺伝子多型との関連性の調査では有意な差は認められなかった。

#### 遺伝子導入細胞における活性酸素刺激と転写制御に関する研究

木 下 淳 (駒田富佐夫 助教授)

【目的】真核細胞の転写制御は DNA 上に存在するシスエレメントにトランス因子が相互作用を起こすことにより行われている。活性酸素発現系として汎用されているパラコート(PQ)により誘導されることが報告されている転写制御因子の一つである activator protein 1 (AP-1)は、TPA response element (TRE)に結合することで転写を活性化する。そこで本研究では、活性酸素が関与する疾患に対する遺伝子治療における発現制御を目指し、遺伝子導入細胞に対して活性酸素毒性を負荷した際の発現挙動ならびに転写因子との関連性を明らかにすることを目的とした。

【方法】レポーター遺伝子としてオワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白質 *rsGFP* を持ち、サイトメガロウイルス(CMV)の LTR を有する Plasmid ベクターである pQBI25 をラット皮膚線維芽細胞である FR 細胞に導入し、PQ を負荷した際の *rsGFP* mRNA 転写量の変化について検討を行った。また、AP-1 の構成蛋白質である *c-fos* および *c-jun* mRNA 転写量の変化についても検討を行った。さらに、CMV LTR を有する pRc/CMV にヒト *SOD* 遺伝子を組み込んだ pRc/CMV-SOD をラット肺内皮細胞である L2 細胞に導入し、PQ を負荷した際の *SOD* 活性の変動について検討した。

【結果】*rsGFP* 遺伝子を導入した FR-pQBI25 細胞において PQ を負荷した際、*rsGFP* mRNA 転写量は約 2 倍に増加した。また、その際の *c-fos* および *c-jun* mRNA 転写量に関して検討を行ったところ、*rsGFP*

mRNA 転写量と *c-fos* mRNA 転写量との間に正の相関性がみられ、導入遺伝子の発現制御にこれら転写因子が関与している可能性が示唆された。さらに、*SOD* 遺伝子を導入した L2-pRc/CMV-SOD 細胞に対して PQ を負荷した際においても、*SOD* 活性の有意な上昇が認められた。

#### 喘息患者向け服薬指導マニュアルの作成

矢野知子(林秀徳教授)

気管支喘息は、呼吸器領域では最重要疾患の一つにあげられている。喘息診療のガイドラインでは、気道の拡張とともに気道炎症をいかに制御するかに焦点が絞られている。新規薬剤の開発など喘息治療の著しい進歩にもかかわらず、喘息死の減少傾向はみられない。長期管理薬と発作治療薬を用いる薬物療法による喘息管理をより良く行うためには、適切な服薬指導が必要と思われる。

服薬指導は、患者に個人差があることから、指導の内容も臨機応変に対応しなくてはならない。限られた時間内で患者に正しく理解してもらう必要がある。本マニュアルは、的確にまた簡便に服薬指導を行えるように、4つの項目を設定し、簡易化をはかった。1. 喘息の病態、2. 喘息の原因、3. 治療薬について、4. 吸入手技についてである。1と2の項目では、理解しやすいように、簡単な絵を付け説明した。3に関しては、わかりやすい言葉で実際の服薬指導例を記載し、指導経験の浅い薬剤師でも指導できるように工夫した。4の項目では、メーカーの説明書をもとに一部改良して記載した。さらに、患者の吸入操作の確認のためのチェック事項を作成した。その横にはその根拠となる理由、指導のポイントを詳しく記載した。

患者本人の吸入手技の理解、薬剤師による患者の吸入手技の的確性の確認のために、実技を伴った指導は不可欠と考える。本マニュアルは、患者が特に理解してほしい事柄に焦点をあて、より迅速に対応できるように簡易化をはかった。実際の指導例を記載することで、新人薬剤師は指導が容易となり、熟練した薬剤師の場合は指導の向上がはかれると思われる。患者からの情報を得る一つの手段として、本マニュアルを用いることも可能であり、患者の治療目標に向かい系統だった指導を行うためにも本マニュアルは有用であると考えられる。今後、マニュアルを活用し、実状を考慮しながら、改善点などを検討して行きたい。

#### コレステロール低下薬投与における血清コレステロールとドリコールの挙動

鈴木智也(林秀徳教授)

ドリコールはコレステロールと同じように HMG-CoA 還元酵素を経て合成される。また、血中のドリコールは約 80% が HDL 中に存在することが知られている。高コレステロール血症の治療に用いられ

る薬物は、おもにスタチン系のコレステロール低下薬である。これらの薬物は HMG-CoA 還元酵素阻害作用を有し、HDL 含量を増加させる。このことから、本研究ではコレステロール低下薬（スタチン系）投与前後における血清コレステロールとドリコール濃度の変化について調べた。

本実験は、東京通信病院の薬剤部、臨床検査部および本学との共同研究である。当該病院で高コレステロール血症と診断された患者を対象に、コレステロール低下薬投与前および投与後 1 ヶ月の血清ドリコール濃度を測定した。ドリコール濃度の測定は Yamada らの方法を変法して行いアルコール型および脂肪酸エステル型の合計量を求めた。

高コレステロール血症患者の薬物治療開始前の血清総コレステロール濃度の平均値は  $268 \pm 38$  mg/dL であり、HDL-コレステロールの平均値は  $51 \pm 8$  mg/dL であった。一方、血清ドリコール濃度の平均値は  $142 \pm 20$  ng/mL であった。これらの患者において、スタチン系薬物を投与することによってコレステロールが大きく低下した患者と、あまり低下しなかった患者がみられた。コレステロールが大きく低下した患者では、HDL-コレステロールが増加する傾向にあり、ドリコールも増加傾向にあった。

しかし、コレステロールあまり低下しなかった患者では、HDL-コレステロールに変化はみられず、ドリコールは減少する傾向がみられた。

これらの結果は、ドリコールもコレステロール低下に関与しているかも知れないことを示している。

## スギ・ヒノキ科花粉飛散数と花粉症患者数・治療薬の処方件数との関係

関 理 絵（津田 整 教授）

わが国の花粉症の 7、8 割はスギ花粉症が占めており、有病率も 20% に上っている。また、スギおよびヒノキ科花粉は共通抗原性が知られており、飛散期間に鼻や目に異常を訴える花粉症患者の増加は、社会問題化している。最近ではスギ・ヒノキ科花粉飛散予測が地域花粉情報として提供されているが、2000 年のスギ・ヒノキ科花粉は大量に飛散することが予測されていた。一般に花粉飛散の多い年は、花粉症患者が増加するといわれている。本学臨床薬理学教室が埼玉県の花粉観測地点として、花粉調査を行なっていることから、実測した花粉飛散データと、埼玉医科大学付属病院耳鼻咽喉科での外来花粉症患者数、治療薬使用状況について検討した。

日本アレルギー協会の規定に従ってスギ・ヒノキ科花粉飛散数の測定を行なった結果、スギ花粉飛散量は過去 20 年で 2 番目の大量飛散を記録した。1991 年から 2000 年の 10 年間における花粉飛散数と花粉飛散時期（1 月～4 月）に耳鼻咽喉科に来院し、鼻アレルギーと診断された新患者数は高い相関性を示し、また、1998 年から 2000 年の 3 年間における鼻アレルギー新患者を対象にカルテ調査を行い、花粉症及び花粉症の疑いのある患者を選び出し、スギ花粉数との相関を求めたところ、より高い相関性を認めた。

一方、花粉症治療に使用されると考えられる薬剤については、1999 年と 2000 年の 1 月～4 月におけ

る処方箋（全診療科）より日ごとの処方件数を Microsoft Access を使用して検索した。その結果、処方件数はいずれも 1999 年より花粉飛散の多かった 2000 年の方が多く、耳鼻咽喉科の処方件数と飛散期（2 月中旬～4 月下旬）の花粉飛散数との関係を検討したところ、1999 年、2000 年ともに各種別薬剤処方件数は、花粉飛散数の増減に伴い処方件数も増減し、スギ花粉の最大飛散日に近い時期で、薬剤処方件数はピークを示した。また、本調査結果では 2000 年 1 月の抗アレルギー薬処方件数が増加しており、初期療法を積極的に取り入れていたことを示していた。

薬剤の処方件数と花粉飛散数が相関性を示したことより、花粉飛散予測・情報は、薬剤管理業務においても有益な情報になることが考えられた。

#### 臨床分離 *Staphylococcus aureus* 菌株の薬剤耐性と薬剤併用による増殖抑制効果

八 木 絵美子（近藤誠一 助教授）

*Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌）は日和見感染症の原因菌として重要である。中でもメチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) はグリコペチド系抗生物質以外のすべての薬剤に対して耐性を獲得した高度薬剤耐性菌であり、医療における大きな障害となっている。MRSA 感染症の第一選択薬としては VCM や TEIC が使用されるが、近年、VCM 耐性の腸球菌（VRE）の出現によって、事態はさらに深刻化しつつある。このため、VCM と TEIC のみに頼ることなく、MRSA 感染症を克服することは急務である。本研究では、臨床分離 *S. aureus* の VCM と TEIC に対する耐性の動向を検討するとともに、これら両薬剤と、単独では効果を示さない他の薬剤との併用による増殖抑制効果を検討した。使用した *S. aureus* の菌株は、日本大学医学部附属板橋病院臨床検査部において分離されたものを用いた。38 株の臨床分離株について VCM と TEIC に対する MIC を感受性ディスク法によって測定した結果、両薬剤に対する耐性菌は検出されなかったが、VCM に対する MIC (0.9～2.0 μg/ml) に比べ、TEIC に対するそれ (0.64～3.8 μg/ml) には、菌株間で差が認められた。これら 38 株の分離菌株の多く (33 株) は DMPPC に対して耐性を示したが、旧来の抗生物質に感受性を示すもの (ABPC11 株、FMOX27 株、IPM28 株、GM20 株、MINO38 株、CP38 株) も多く含まれていた。VCM または TEIC と他薬剤との併用による増殖抑制効果では、1 株においてのみ、VCM と ABPC との併用で増殖抑制が 2 時間延長されたが、用いたその他の薬剤では効果は認められなかった。VCM 耐性 MRSA の出現防止のためには、VCM の臨床での使用量を極力抑えることが重要であり、今後さらに多くの薬剤との併用効果を検討する必要があると考えられる。

## 市販パップ剤適用後の NSAIDs の皮内動態および皮下移行性に関する研究

伊藤 修 司 (杉林堅次 教授)

【目的】皮膚は局所のみならず全身作用を目的とした薬物投与経路として注目を集めている。皮膚適用製剤から皮膚に分布した薬物は、皮膚中血管から全身循環系へ吸収されるか、適用部位を拡散して周囲の皮膚や皮下へと移行するが、これらの皮内動態は未だ十分に解明されていない。特に筋肉などの適用部位下組織を標的とする非ステロイド性抗炎症薬(NSAID)含有製剤の皮内動態を評価することは有意義である。本研究室では既に、薬物の皮内動態を簡便に評価することが可能な *insitu* 実験法を構築している。本研究ではこの方法を用いて4種の市販 NSAID(インドメタシン, ケトプロフェン, フェルピナク, フルルビプロフェン: FP)含有製剤中の可溶化剤や促進剤などの基剤成分が薬物皮内動態に及ぼす影響を評価した。

【方法】雄性ヘアレスラットの腹部皮膚をストリッピング処理した後、下腹部皮膚を切開し、薬物レシーバーとして寒天ゲルを真皮と皮下組織の間に正中線を挟んで左右対称に挿入した。片方の寒天ゲル挿入部位の皮膚表面に各製剤または薬物含有水溶性ゲルを適用し、血漿中薬物濃度と寒天ゲル中薬物量を測定した。

【結果・考察】1%FP 含有水溶性ゲルの適用では、皮膚に分布した薬物量のうち、全身循環系への移行率が99.8%、血管系を回避したゲルへの直接移行率は0.2%であった。また、皮下に移行した薬物量のうち、84.0%が製剤からの直接移行で、16.0%が全身循環系から再分布したことがわかった。市販FP 含有製剤や他の3種の NSAID 含有製剤適用時にも同傾向の結果が得られ、皮膚に分布した薬物の大部分は全身循環系へ移行するにもかかわらず、皮下に存在する薬物の多くは製剤から直接移行したものであることが示された。これらの結果から市販 NSAID 含有製剤は適用部位直下の筋肉に効率よく薬物を送達していることが示唆された。