

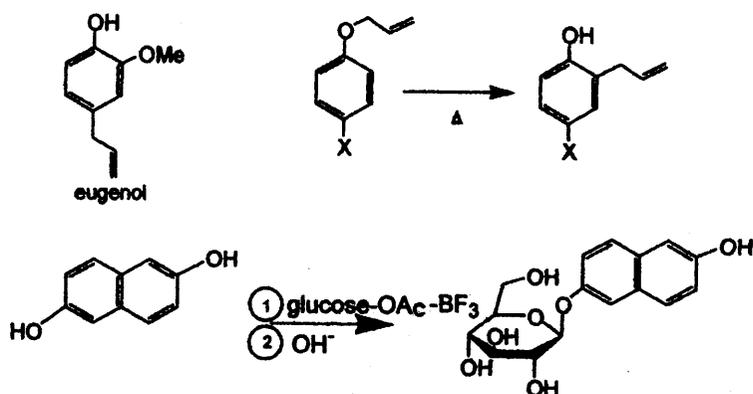
チロシナーゼ阻害作用を有するフェノール類の合成

中野文子(横江一朗 教授)

佐久間らは、ある種のフェノール類にチロシナーゼ活性を阻害することを報告している。より阻害作用の強い化合物を探索したところ、オイゲノールやイソオイゲノールなどに強い活性があることを見出した。そこでクライゼン転移反応を用いてアリル基を有する各種フェノール誘導体を合成し、その活性を検討し、2位にアリル基を有するフェノール類に強いチロシナーゼ阻害作用のあることを見出した。

また、ナフトール及びジヒドロキシナフタレン類には顕著な上記の活性があることが明らかとなり、刺激性の低下を目的として配糖体としたものも強い阻害活性をもつことから、化粧品原料になり得ることが示唆された。

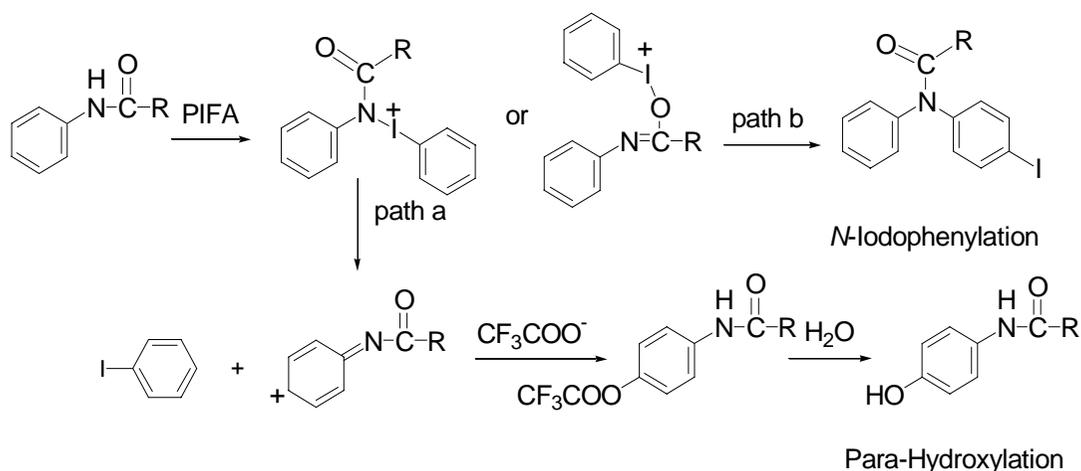
また、チロシナーゼによる酸化メカニズムを解明するためフェノール誘導体を基質とし反応させると、2量体が得られたため、ラジカルを経由して反応が進行したと考えられた。よってこのラジカルを消去する化合物が美白剤として有用であると考えられる。



Acetanilide 誘導体と Hypervalent Iodine 化合物との反応

伊藤 直樹 (菊川靖雄 教授)

近年 hypervalent iodine 化合物はいろいろな分野で汎用され多くの総説が発表されている。特に phenol 類や aniline 類の酸化及びいろいろな官能基との反応が数多く報告されているが、*N*-arylamide 類との反応はほとんど報告されていない。著者は acetanilide 誘導体と phenyliodine(III)bis(trifluoroacetate) (PIFA)との反応について詳しく検討し強酸から由来する *N*-arylamides、例えば trifluoroacetamide の場合及び phenyl 基に電子求引性基が置換されている場合はアミド窒素に *p*-iodophenylation がおこる。一方、弱酸から由来する *N*-arylamide 類及び phenyl 基に電子供与性基が置換されている *N*-arylamide 類からは PIFA 由来の CF₃COO 基が phenyl 基の *para* 位を攻撃し、結果として加水分解を受けた *para* hydroxy 体を与えるなど興味ある結果を得た。

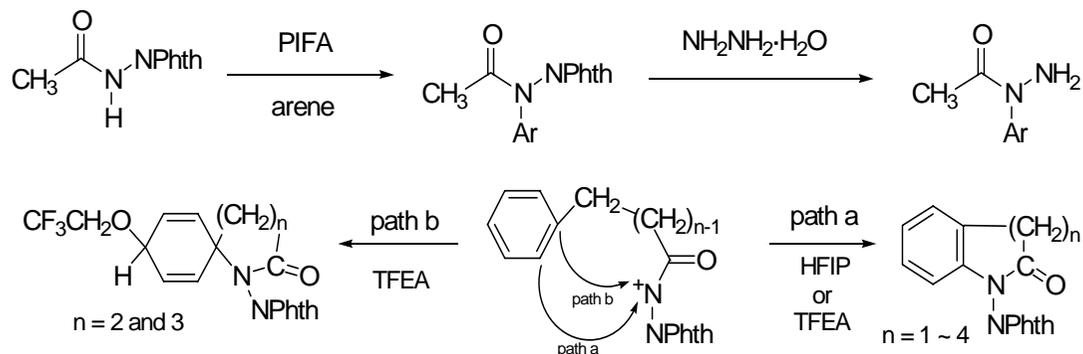


N-Acylaminophthalimide 類と Phenyliodine(III) Bis(trifluoroacetate)との反応

長島 章 (菊川靖雄 教授)

電子不足窒素である nitrenium ion の化学は Gassmann らの研究に始まり、現在もかなりの研究が報告されている。当研究室では、これまでに *N*-methoxyamide 類より *N*-methoxy-*N*-acylnitrenium ion の発生に成功し種々の求電子反応の研究を行ってきた。さらに、N-O 結合を N-N 結合に置き換えて electron deficient nitrogen (nitrenium ion) に関するいくつかの研究を行ってきた。今回、

N-acylaminophthalimide 類と phenyliodine(III) bis(trifluoroacetate) (PIFA) との反応から *N*-phthalimido-*N*-acylnitrenium ion の発生に成功し、arene 類を用いる *N*-aryl 化反応及び分子内閉環反応による含窒素複素環化合物の合成反応を開発した。



ミセルを反応場とする両親媒性ヘリセンのキラリティーの誘起と変換

高市 康宏 (山田紘一 教授)

生体反応場モデルとして、ジカルボン酸モノ[5]チアヘテロヘリセンメチルエステル 5CnA ($n=2,4,6,8$) をキララル認識プローブとして、キララルなフルオレノン誘導体(TAPA)を含む SDS ミセルおよびキララルなピラノシドミセルによるゲスト分子のキラリティー識別について検討した。 5CnA はカルボキシル基を持つため、ミセルに配向した状態や水素結合の存在下でのキララル認識が観察できる点に特徴がある。さらに、アルキル鎖の炭素数を変えることで分子の大きさ、疎水性の違いがキララル認識に与える影響についても検討した。

$5\text{C}2\text{A}$ と(R)TAPA を SDS ミセルに取り込ませると、すぐに負のコットン効果を示す CD 吸収が現れ、 $5\text{C}2\text{A}$ のらせんが M 体に偏っていることがわかった。この溶液を加熱または超音波照射するとコットン効果の符号は逆転し、らせんが P 体に変換した。 $5\text{C}4\text{A}$ では、コットン効果の逆転は見られず、 $5\text{C}6\text{A}$ では、350nm 付近での逆転はなかったが、短波長側のコットン効果の逆転が見られた。 $5\text{C}2\text{A}$ と $5\text{C}6\text{A}$ の錯体は、コットン効果が負のときも正のときも同じ 1 : 1 の組成比を持っていた。しかし、両者の CD 強度は非常に異なり、構造の異なる錯体であることが推定された。 $5\text{C}2\text{A}$ のキララル識別エネルギーを測定温度を変えたときの CD 強度の変化より調べ、その各温度での平衡定数の値から熱力学的パラメータを算出した。その結果キララル識別エネルギーは 23 kcal / mol と大きな値が得られ、ミセルによる P 体の認識が極めて効率よいことがわかった。このようなキラリティーの変換

が分子の持つ親水性に起因することが予測されたため、カルボキシル基を持つ 5C2A、TAPA、母核の 5TH、TAPA のメチルエステル体の TAPM を用いて比較した。5TH - (R)TAPA、5C2A - TAPM の組み合わせではキラリティーの誘起は見られたが、コットン効果の逆転は見られず、キラリティーの変換には水素結合が重要な役割を演じていることが結論された。

ヘリセンをプローブとするグリセロリン脂質二分子膜によるキララル識別

吉 田 麻衣子 (山田紘一 教授)

周囲のキララル環境により不斉変換を起こす[5]チアヘテロヘリセン(5HM)をプローブとして用いて、不斉炭素を有するホスファチジルコリン(PC)の作る二分子膜のキラリティー認識能力やコレステロール(Cho)やその類似体が共存した場合の影響を調べた。PC 二分子膜にラセミの 5HM を取り込ませると新しい CD 吸収帯が誘起され、D-PC 二分子膜では 5HM は P 体過剰に、L-PC では M 体過剰となり、5HM の偏りは PC の不斉が制御していた。さらに UV、CD 吸収の温度変化から温度上昇につれ二分子膜の流動性が増し、5HM のらせんの向きを固定する力が弱くなることが明らかになった。温度に対してプロットした UV 吸収強度曲線の極大値と、CD 吸収強度曲線の屈曲点から、PC 二分子膜の相転移温度が見積もられた。即ち、PC 二分子膜ではキラリティー認識と相転移温度とが深く関連しており、5HM が膜の相転移温度を調べるプローブとしての有効性が示唆された。次に、Cho やエピコレステロール(Epi)を 5HM を含む DPPC 二分子膜に添加すると、D 体では Cho はキララル認識能力を高めたが Epi は弱め、L 体ではそれぞれその逆の作用をした。これは、Cho 類が共存すると PC の配列を変え、それが 5HM のらせんの偏りに影響を与えたことを示し、また、Cho と Epi の C₃ の OH 基の立体配置の違いがキララル識別に大きな影響を与えていた。さらに、D-DPPC 膜に対して Cho はキララル認識能力を高め Epi は低下させ、L-DPPC 膜に対しては、副転移温度以下では Cho は低下 Epi は上昇、副転移温度以上では Cho と Epi のキララル認識能力が変わらないことを示し、Epi に比べ Cho の水素結合のし易さの違いが原因と推定された。次に、C₃の置換基の異なる様々なコレステロール類似体を 5HM を含む PC 二分子膜に添加しその効果を調べたところ、膜の流動性の変化とキララル識別能の変化とが関連することが明らかになった。

結晶場によるキラリティーの制御 ラセミ結晶とエナンチオマー結晶

吉 野 順 (山田紘一 教授)

「不斉な結晶場が分子のキラリティーを制御し得るのかどうか」を調べるために、Z 基を有し四面体不斉を持つアミノ酸(AZ)やジペプチド(AAZ)に、反転可能ならせん不斉を持つヘリセンを結合させ

た 5AZ や 5AAZ の結晶の X 線構造解析や CD スペクトルの測定を行った。溶液中でラセミ体で存在する D-5PheZ、D-5TrpZ、D-5ValZ は結晶中では、四面体不斉が全てのらせんを P 体に制御する不斉変換現象が確認された。この不斉制御が現れたエナンチオマー結晶では、L-アミノ酸を用いるとらせんは M 体に制御され、これら二つの結晶の CD スペクトルは互いに鏡像関係にあった。エナンチオマー結晶では D-アミノ酸の NH...OC による水素結合ネットワークが不斉な空間を形成し、らせんを一方に制御したと推定された。一方、D-5AlaZ ではエナンチオマー結晶を与えることは稀で、殆どの場合 P 体と M 体分子を等量含み、不斉間の制御を失ったジアステレオマー結晶を与えた。即ち、この結晶が安定結晶であり、エナンチオマー結晶が準安定結晶であることがわかった。このジアステレオマー結晶では P 体と M 体分子とが水素結合によりダイマーを形成していた。さらに、D-5AlaZ と L-5AlaZ を等量混ぜて得たラセミ結晶は、ジアステレオマー結晶と格子定数や密度がほぼ一致した安定構造であった。次に、ジアステレオマー結晶中の (P)-D-5AlaZ と (M)-L-5AlaZ 分子の安定性の違いを PM3 により計算した結果、P 体分子の方が僅かに安定であった。しかし D-5AlaZ はジアステレオマー結晶を主に形成することから、一分子の持つ安定性より、ラセミ結晶に類似し密で効率良いパッキングをとる結晶化エネルギーの方が優先されたことがわかった。ジペプチド構造の LD-5PhePheZ ではらせんは P 体に制御され、これは「鞠」状のコンフォメーションをとることにより、D-PheZ がらせんに接近していることにより説明された。

HPLC を用いる脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンの高感度定量法の開発

岩崎 聖子 (白幡 晶 教授)

脱炭酸化 S-アデノシルメチオニン (deAdoMet) は、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素 (AdoMetDC) により S-アデノシルメチオニン (AdoMet) から生成し、ポリアミン合成の律速物質として重要である。一般に、deAdoMet の定量は紫外検出 HPLC により行われるが、検出感度が十分でなく生体試料に適用するには多くの制約がある。本研究では、生体試料に適用可能な HPLC を用いる高感度な deAdoMet の定量法の開発を試みた。

deAdoMet の蛍光標識試薬としては短時間で標識可能なフルオレサミン、反応溶液としては、アルカリにおける deAdoMet の分解を抑制するホウ酸緩衝液を選択した。ホウ酸緩衝液中、合成標品の deAdoMet をフルオレサミンと室温で 30 分反応後、反応液を HPLC に注入したところ光学活性なスルホニウムに基づくジアステレオマーが 2 つのピークとして検出された。種々条件を検討後、内部標準物質として 5'-deoxyaminoadenosine を選択し、0.1 pmol の検出が可能なフルオレサミン標識 deAdoMet の HPLC 法を確立した。

本法を大腸菌の AdoMetDC 酵素活性測定に応用すると、従来の RI 法より高感度で活性測定が可能であった。試料の前処理としてリボースを吸着、分離するためのホウ酸カラム処理を行い、ラット

肝臓試料について分析すると、deAdoMet の S 体と同じ保持時間を持つピークをクロマトグラム上に検出し、定量値は約 1.5 nmol/g であった。本法は生体試料中の deAdoMet の高感度定量法として有用と思われる。

グアニジノ化合物投与による HTC 細胞における増殖とポリアミン量への影響

岡本政治 (白幡晶 教授)

ポリアミンの生合成、あるいはその作用を阻害する化合物は、抗癌剤の候補化合物として開発が進められてきたが、最近アグマチンや 1-アミノ-7-グアニジノヘプタンなどのアミノアルキルグアニジン化合物が、新たなポリアミンの作用部位を標的とする化合物として、注目されている。両者はそれぞれ、ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素の抑制、および増殖必須因子である eIF-5A タンパクのスペルミジンによる翻訳後修飾の阻害というように、全く異なる作用機序による増殖抑制試薬として報告されているが、共にアミノアルキルグアニジン構造を有しており、構造と増殖抑制機序との関係を調べる事はこれら化合物の作用を理解する上で重要である。

本研究では、メチレン鎖長の異なったものやアルキル基としてシクロヘキサンを用いたもの、アルキル基に窒素原子を含んだものなど 8 種のモノグアニジノ化合物を合成した。また、アグマチンのアミノ基がグアニジノ基となった 1,4-ビスグアニジノブタンやアルキル基鎖長の異なった 4 種のビスグアニジノ化合物を合成した。

次にグアニジノ化合物を HTC 細胞に 100 μ mol/L になるように投与し、細胞増殖に与える影響を検討した。その結果、グアニジノ化合物は 96 時間の培養で、増殖にほとんど影響を与えなかった化合物群、投与後 48~72 時間で増殖が抑制された化合物群、投与後 24 時間で強い増殖抑制が起きた化合物群に分けられた。その際、顕微鏡下で細胞死は観察されず、いずれもサイトスタティックな増殖抑制であることが示唆された。

次にこれら化合物の細胞内ポリアミン量への影響を調べた。その結果、投与後 48~72 時間で増殖抑制が観察されたアグマチンを含むグループでは、化合物投与後 24 時間でプトレシンが、48 時間でスペルミジンがほぼ完全に枯渇した。このグループでは細胞内ポリアミン量が減少したことにより細胞の増殖抑制が引き起こされたと考えられる。一方、投与後 24 時間で強い増殖抑制が観察された 1-アミノ-7-グアニジノヘプタンを含む化合物群では、プトレシン量の増加が観察され、スペルミジンの枯渇は観察されず、ポリアミン合成の低下に基づく増殖の停止ではないことが示唆された。

蛍光基質を用いた HPLC による スペルミジン / スペルミン- N^1 -アセチル転移酵素活性測定法の開発

深澤 一 昭 (白幡 晶 教授)

本研究では、スペルミジン/スペルミン N^1 -アセチル転移酵素 (SSAT) 阻害剤のスクリーニングに有用な、蛍光基質を用いた HPLC による SSAT 活性測定法 (HPLC 法) の開発を検討した。

まず、SSAT を得るためにヒト SSAT 遺伝子挿入プラスミド pQE-30 (pQE-30/h SSAT) をヒートショック法によって大腸菌に導入したのち、細胞溶解剤による酵素抽出及び、メタル樹脂による精製によってヒスチジンタグを結合したタンパク質を得た。また、SDS-PAGE、MALDI-TOF-MS 及び RI 法による SSAT 活性の確認から、この精製タンパクは導入遺伝子に基づく SSAT であることを確認し、測定法の検討に供した。

次に、HPLC 法で必要となる、SSAT に対する種々の蛍光基質としてノルスペルミン誘導体を合成した。合成した化合物について RI 法によるヒト SSAT に対する基質性の確認から N^1 -ダンシルノルスペルミン (DNS-NSpm) が合成した蛍光基質の中で最も SSAT に対する基質性が高いことを確認した。

そして、DNS-NSpm を用いて HPLC 条件を検討することにより、簡便で安価な HPLC 法を確立した。本法によりこれまでに報告された阻害剤及び、阻害作用を有するであろうと考えられる化合物の阻害強度の確認を行い、強力な阻害効果をもつ化合物を見出した。

ペルフルオロ脂肪酸の体内動態における血漿アルブミンの影響

佐藤 靖 典 (川嶋洋一 教授)

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ペルフルオロオクタン酸 (PFOA) はヒトにおける蓄積性が問題となっている化合物である。PFOA をラットに投与すると、体内では主として血液および肝臓中に見出される。限外ろ過法により PFOA は血漿中では 95% 以上が蛋白質と結合しているという結果が得られているが、その詳細は明らかではない。本研究では先天性無アルブミン血症ラット (Nagase analbuminemic rat, NAR) を用いて PFOA の体内動態に対するアルブミンの役割を検討した。

Splague-Dawley ラット (SDR) に $[^{14}\text{C}]$ PFOA を投与して、血漿を採取し、Sephadex-G75 ゲルろ過クロマトグラフィーを行ったところ、投与 15 分後から、ほとんどの PFOA はアルブミン画分に見出された。一方、SDR では遊離体として溶出した。PFOA は主として、肝臓および血液中に存在していた。NAR は SDR に比べて、PFOA の尿中への排泄率が約 5 倍高かった。NAR の腎クリアランス値は 127 nmol/h/kg で SDR (5.1 nmol/h/kg) の 25 倍高かった。NAR にアルブミンを投与する

と 2.5 nmol/h/kg に低下した。NAR における PFOA の腎クリアランスは、SDR と同様に有機アニオントランスポーター阻害剤であるプロベネシドの投与により、90%以上阻害された。

以上の結果から、PFOA は血漿中でアルブミンと結合して存在すること、その結果、PFOA は尿管からの分泌を受けにくくなっていることが明らかとなった。

ペルフルオロ脂肪酸の排泄における動物種差および性差の検討

住 谷 文須紗 (川嶋洋一 教授)

ペルフルオロオクタン酸(PFOA)はフッ素系界面活性剤として、テフロン重合の乳化剤などに使用されている化合物である。PFOA はラットにおける LD50 値が 189 mg/kg と高く、また、生物学的半減期も約 1 週間であり、比較的安全な化合物と考えられてきた。しかし、最近ヒトにおいて、長期に残留しているという報告がなされ、問題となっている。ラットにおける PFOA の半減期には顕著な種差があることが判明しているが、種差についての情報はほとんどない。本研究では、サル、ウサギ、ラットおよびマウスを用い、PFOA の動態における種差および性差を検討し、ヒトの半減期の推定を試みた。

PFOA 20 mg/kg を雄のマウスとラットに投与し 3 日後における肝臓のペルオキシソーム 酸化活性を調べたところ、それぞれ 7.4 倍、3 倍に上昇したが、ウサギでは変化がなかった。このときの肝臓における PFOA の濃度はマウス、ラット、ウサギの準で、ペルオキシソーム 酸化活性と性の相関が得られた。雌雄のマウス、ラット、ウサギおよびサルの半減期はそれぞれ、20、12、6.6、0.1、0.2、0.3、12 および 9 日と計算された。腎クリアランス値はそれぞれ、13、16、40、946、661、701、16 および 33 mL/day/kg 体重と計算された。検討した動物ではラットのみが PFOA の動態に顕著な性差を示した。体重と全身クリアランスの相関を調べたところ、雌ラットと雌雄ウサギが直線からはずれた。

以上の結果から、体重によってアニマルスケールアップを試みたが、ウサギと雌ラットが相関から外れて高い値になった。一方、工場労働者の血液濃度から算出した人の半減期は約 1 年と推定されており、人の推定クリアランス値は相関直線よりはるかに低い値であった。したがって、PFOA の生体残存性にはたのパラメーターが介在するものと推定された。

脂肪酸伸長酵素および不飽和化酵素に対するフッ素化脂肪酸の影響

外山 智章 (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。PFCAを投与すると肝臓の脂肪酸組成が大きく変化し、中でもオクタデセン酸の増加が著しい。オクタデセン酸には18:1(n-9)と18:1(n-7)があり、それぞれ、パルミチン酸から palmitoyl-CoA chain elongase (PCE) と stearoyl-CoA desaturase (SCD)による経路、SCD と palmitoleyl-CoA chain elongase (POCE) による経路で合成されている。本研究ではPFCA投与によりこの経路がどのように変化するかを検討した。炭素鎖長8-10のPFCA(C8, C9およびC10)をラット腹腔内に5日間連続投与したところ、SCD活性はC9とC10により、PCE活性はC10により有意に上昇した。一方、POCE活性には変化は認められなかった。正常ラット肝から調製したマイクロソームに *in vitro* でPFCAを添加したところ、SCD活性は400 μ MのC8, C9およびC10によってそれぞれ影響なし、25%阻害、75%阻害であった。同様にPCE活性はそれぞれ、70%、95%、99%の阻害を受けた。POCEもPCEとほぼ同様の結果であった。C8, C9またはC10を投与したラットの肝PFCA濃度はそれぞれ、117、461、419 nmol/g liverであった。PFCAを投与した肝臓中の脂肪酸組成を調べたところ、C9とC10により18:1(n-9)が顕著に増加していた。一方、18:1(n-7)量には変化が認められなかった。以上の結果から、PFCA投与によるオクタデセン酸の増加は18:1(n-9)の増加であり、これはSCDおよびPCEが誘導されたためであり、また、*in vitro*で観察された酵素活性の阻害は実際の生体内では起こっていないものと考えられた。

ポリプロピレングリコールを分散媒として用いたデンプンマイクロスフィアの調製法

篠原 克典 (従二和彦 教授)

薬物送達システム(DDS)として高分子マイクロスフィア(MS)の利用が研究されている。高分子性あるいは水溶性薬物の制御放出を達成する場合には、MS基剤として親水性の高分子を用いる方法が有用と考えられる。これまで多く報告されている親水性高分子を基剤とするMSの調製には、固化のための加熱や架橋剤の使用が必要である。これらの場合には、薬物の変性、架橋剤との反応などが問題となり、使用できる薬物が制限される。さらに調製法の確立に際しては、粒子径の制御も重要なポイントとなる。

本研究では、ポリプロピレングリコール(PPG)が、高温では親油性、低温では親水性を示す性質に注目し、MS調製への応用を検討した。すなわち、高温でW/Oエマルションを形成させた上で温度を低下させることにより、内相中の水分が除去され固化するとともに、温度設定により、粒子径の

制御をも可能とするという、新規の製法の開発を検討した。はじめに、PPG と水を種々の割合で混合し、種々の温度下における相状態を観察し、相互溶解に関する情報を得た。初期に高温に保った PPG 中にプロペラによる攪拌下で水相を加え、W/O エマルションを形成させた。その後温度を下降させることにより、MS の形成が可能であることが確認できた。得られた MS はその後、エタノールによる洗浄、乾燥を行い、走査型電子顕微鏡により形態、平均粒子径、粒子径分布を評価した。

種々の検討の結果、PPG を分散媒として用いる MS 調製法は、初期の PPG 温度の変更により広範囲に粒子径を制御しうる方法であり、その粒子形成には、調製初期における PPG への速やかな水の移行が起こる過程と、安定なエマルションの形成に続く比較的緩徐な水の移行が起こる二つの過程が関与することが示された。さらに本法は、界面活性剤を用いずに MS を調製しうることから、安全性の面からも有用であることが示された。

薬物の粘膜吸収における細胞間隙透過性の評価に関する研究

原 田 園 子 (従二和彦 教授)

消化管における薬物の吸収ルートは細胞内経路と細胞間隙経路に大別され、ペプチド性薬物などの吸収には細胞間隙経路の関与が考えられている。消化管上皮細胞間隙には Tight junction が存在するため、薬物の透過速度は細胞間隙の大きさと薬物分子の大きさの関係によって制限されることになる。ラット小腸および大腸粘膜における細胞間隙経路には、tight な部分だけでなく、比較的大きなポアルートも存在することが報告されている。本研究では、ウサギ摘出空腸もしくは Caco-2 細胞単層膜を用い、分子量の異なるマーカーを同時適用して、それらの透過性を比較することにより、個々の膜における細胞間隙の状態を評価することを試みた。

ウサギ摘出空腸を用い、粘膜側に尿素および D-マンニトールを含む溶液、もしくは 6-carboxyfluorescein (6-CF) および RITC-デキストラン (RD-10) を含む溶液を適用し、透過実験を行った。これらの結果から、RD-10 の分子半径 (2.1nm) より十分大きいポアルートの存在、さらに 6-CF (分子半径:0.56nm) が透過できないような小さいポアルートの存在が示唆された。さらに尿素、エリスリトール、マンニトール、FITC-デキストラン、Texas Red デキストランを同時適用し、ポアルートの数、膜におけるポアの占有面積に関して評価を行った。その結果、小さいポアルートは大きいポアルートより占有面積比において十分大きく、ペプチド薬物等が透過しうる大きいポアのルートはその数、占有面積ともに少ないことが示された。

また Caco-2 細胞単層膜を用いて、尿素、マンニトール、6-CF、RD-10 を同時適用しての透過実験を行った。その結果、培養 9 日目の単層膜では、2nm 以上の大きなポアのルートのみが存在するのに対し、13 日目にはマンニトール分子 (半径:0.34nm) と同程度の小さいポアルートが形成され、占有面積において優位となることが示された。

本研究では、数種のマーカーを同時適用する透過実験により、細胞間隙の状態を個々に評価でき、培養細胞単層膜の状態や吸収促進剤の影響の評価に有用であることが示された。

薬物の種々媒体中における拡散性の評価

持田 純子 (従二和彦 教授)

薬物の拡散性は製剤の特性や体内動態に影響を与える重要な要因であるが、体内における薬物の拡散挙動を直接測定することは一般に困難である。In vitro で、各種媒体中での薬物の拡散性とそれに及ぼす生体成分の影響を把握することは、生体内での拡散挙動を理解するための基礎的な情報を得るために重要である。本研究では、Chromatographic Broadening Method(CBM)により、水および1-オクタノール中での、パラベンおよびステロイドの拡散係数を測定し、両媒体中における拡散係数に影響する要因を評価した。また、生体成分の薬物の拡散性に対する影響を評価するための実験方法として液膜実験系を検討した。

パラベン4種およびステロイド18種類の結果から、水、1-オクタノール中いずれにおいても分子量に依存した拡散係数の減少が観察された。また、各薬物の水中での拡散係数は1-オクタノール中より全体的に高く、これらは粘度の違いでほぼ説明が可能であった。水中における拡散係数に影響する分子の大きさ以外の要因を評価したところ、脂溶性を表すLipophilic indexとの関連性が高い結果が得られ、分子の疎水基周辺の氷様構造増加により、水中での拡散係数が低下することが推察された。1-オクタノール中における拡散係数に影響する分子の大きさ以外の要因では、水素結合能が最も高い関連性を示し、薬物分子と1-オクタノール間の水素結合により、1-オクタノール中での拡散係数が低下することが示唆された。

吸収過程に関与する生体成分としてムチンを取り上げ、液膜透過実験にて検討した。メチルパラベンとプロプラノロールの透過において、液膜として10%ムチンを用いた場合、プロプラノロールの透過係数の低下がメチルパラベンよりも顕著に認められ、薬物-ムチン間のイオン性相互作用の寄与が示唆された。

以上、薬物の水および1-オクタノール中での拡散係数に及ぼすおもな要因を評価することができ、さらに生体成分が薬物の拡散性に及ぼす影響を検討するための実験系の例を示すことができたと考えられる。

ワルファリンとブコロームの併用とその有効性及び有用性について

羽 田 乃武子 (杉林堅次 教授)

ワルファリン療法を受けている患者には、治療域コントロールの目的で非ステロイド性抗炎症・痛風治療薬であるブコロームがしばしば併用されている。これは、ブコロームがワルファリンの抗凝固作用を増強するという相互作用を利用し、ワルファリンの投与量を減しながら治療域を確保することを目的とした投与方法である。この相互作用の機構は、たんぱく結合に係わるものであるという報告が多くされていたが、最近、ブコロームのワルファリン代謝阻害によるものであるという報告がなされた。そこで今回、ワルファリン/ブコローム併用時及び非併用時のワルファリン一日用量と薬効(TT)を処方箋等から調査し、相互作用の機構について考察するとともに、ワルファリン/ブコローム併用の有効性と有用性を薬物動態学的に考察した。

ワルファリンの一日用量はブコローム併用群で有意に低く、併用群の薬物用量は非併用群の薬物用量の約 40 % であった。また、TT 値についても併用群で有意に低く、さらに、併用群では非併用群に比べ TT 値のばらつきが小さく、治療域に近くなる傾向を示した。加えて、 CL_{int} は併用群で有意に低値を示し、個体間のばらつきも小さかった。以上より、ワルファリンとブコロームの相互作用は、ブコロームが (S)-ワルファリンの CYP2C9 介在性代謝反応を阻害して起こることが示唆され、これにより、ワルファリンの血中非結合型薬物濃度が上昇し、低用量でも効果が発現したと考えられた。また、代謝阻害により CL_{int} の個体間変動が小さくなったことが TT の個体間変動の減少につながり、適正に治療域が確保されていると考えられた。

以上のことから、ワルファリン療法におけるブコロームの併用はワルファリンの抗凝固作用をコントロールする上で有効な方法の一つであると考えられた。

パラベン類の皮膚透過に及ぼす高分子添加剤の影響とその解析

金 素 安 (杉林堅次 教授)

局所および全身循環系への薬物送達を目的とした皮膚適用製剤中には、種々の高分子化合物が成形性付与、主薬の吸収促進、または製剤および主薬の安定性増強を目的に添加されることがある。しかし、これら高分子添加剤の主薬の皮膚透過に及ぼす影響やそのメカニズムは、未だ十分に解析されていない。そこで、高分子添加剤を加えた場合の透過物質の皮膚透過挙動を測定し、皮膚透過に影響する様々な因子を検討することとした。高分子添加剤にはリン脂質を主成分とする生体適合性ポリマー poly (MPC-co-BMA) を、モデル透過物質には油/水分配率が異なる種々パラヒドロキシ安息香酸エステル類 (パラベン類) を選択した。

パラベン類の溶解度は高分子化合物の添加濃度が上がるにつれて増加し、その増加率は脂溶性の高

いパラベンほど顕著であった。また、皮膚透過性はパラベン溶液適用時では、高分子化合物を添加すると皮膚透過量が減少した。一方、パラベン懸濁液適用時では、高分子化合物の添加による溶解度の増加に従って透過係数が減少することが示された。次に、パラベン類の抗菌活性を測定したところ、高分子化合物を倍地中に添加した場合、MIC は上昇し抗菌活性が低下した。またこの時も、高分子化合物の影響は脂溶性が高いパラベン類ほど顕著であり、皮膚透過実験の結果と似た傾向を示した。さらに DSC 測定結果から、パラベン類の融点は高分子化合物と混合した時低下し、高分子化合物の混合比を上げることでさらに低下した。

以上の結果から、皮膚適用製剤中に高分子添加剤 poly (MPC-co-BMA) を添加することでパラベン類の皮膚透過は制御され、その減少は製剤中のパラベン類の活量の低下、もしくは皮膚への分配性の低下で説明できることが明らかとなった。また、高分子添加剤の皮膚透過に及ぼす影響には、薬物と高分子化合物の親和性も大きく関与することが示唆された。

サリチル酸の皮膚透過ならびに皮膚中および筋肉内濃度に及ぼす灸処理の影響

田 澤 悠 子 (杉林堅次 教授)

角質層は物質の透過性が極めて低く、薬物の経皮吸収の最大のバリアーとなっている。そこで皮膚透過性を改善するために様々な吸収促進法が研究され、その一部はすでに実用化されている。しかし、広範囲の薬物を安全かつ効果的に皮膚適用するためには、今までとは全く異なった皮膚透過促進法の開発が望まれる。そこで、東洋医学で用いられている灸療法に着目し、西洋医学の皮膚適用製剤と併用することでより高い効果を得ることを目的に本研究を行った。実験ではヘアレスラットの腹部に灸処理を施し、皮膚温度が完全に戻った後に、サリチル酸ナトリウムを含有した溶液を *in vitro* および *in vivo* で皮膚適用し、サリチル酸の皮膚透過性ならびに皮膚中および筋肉内濃度を調べ、灸処理の影響について検討した。

灸の煙は約 1 分半で消失したが、皮膚表面および皮下温度は約 3 分半で最高温度に達した。点火後 15 分では皮膚表面および皮下温度共、灸処理前の温度に戻った。サリチル酸の皮膚透過実験結果から、灸処理面積が大きいほど、また表皮表面と灸の距離が小さいほど高い透過促進効果が見られた。一方、全身循環系からの薬物消失動態は灸処理の影響をほとんど受けなかったが、全身循環系から皮膚や筋肉への分配量が増加する傾向が見られた。*in vivo* 皮膚適用実験でも灸処理により皮膚透過性は増加し、さらに適用部位から皮膚と筋肉への直接移行量が大幅に増加した。また灸処理ヘアレスラットのエバンスブルー静注実験結果から、静注後のエバンスブルーは灸処理部位に分布しやすく、これは灸処理により即時性の炎症が惹起され、血管内皮がルーズになりエバンスブルーが血管外に漏出したことによると考えられた。これがサリチル酸の皮膚および筋肉中への薬物移行率の増加の原因の一つと考えられた。

以上のことより、灸処理は皮膚透過を促進すること、また局所適用製剤のターゲティングを改善するのに有用な手段であることが示唆された。

皮膚中代謝及び担体輸送の研究における三次元培養ヒト皮膚モデルの有用性に関する検討

松本 かおり (杉林堅次 教授)

プロドラッグやペプチド性薬物のような代謝されやすい薬物や生きた表皮・真皮に対して作用を期待する薬物では、皮膚中での透過挙動及び代謝反応性を明らかにすることが、これらの皮膚適用製剤を開発する上で非常に重要である。一方、小腸、口腔、肺などの上皮粘膜にはアミノ酸、糖、乳酸等の栄養物や内因性物質、さらには薬物を輸送する数多くの薬物輸送担体が存在するが、上皮の一つである皮膚にも薬物輸送担体が存在し、これらが薬物の経皮吸収や皮内動態に影響すると考えられる。

本研究では、三次元培養ヒト皮膚モデル (LSE-high) を用いてニコチン酸エチル (EN) の代謝反応を検討し、既に得られているヘアレスラットでの結果と比較することにより、短時間評価モデルとしての LSE-high の有用性を評価した。さらに、二分割皮膚の正逆方向透過実験から皮膚中の酵素分布を明らかにし、ヘアレスラットの結果を比較することにより、皮膚中代謝の評価モデルとしての LSE-high の有用性を検討した。また、安息香酸の皮膚透過性を測定し、皮膚における薬物輸送担体の役割について評価した。

代謝評価の実験結果から、LSE-high の代謝・透過パラメータにはヘアレスラットと異なるものもあったが、薬物透過・代謝を評価する良いモデルであることが示唆された。また薬物輸送担体評価の実験結果から、LSE-high におけるモノカルボン酸の輸送は H⁺勾配を駆動力としていることが示唆され、LSE-high にはモノカルボン酸系輸送担体が存在することが明らかになったものの、安息香酸輸送への寄与は小さいことが示唆された。

²受容体プロモーター領域における遺伝子多型の頻度

岩崎 鉄尚 (駒田富佐夫)

ヒトアドレナリン ²受容体構造遺伝子領域については、主に3箇所 (塩基配列 49、79、491) の一塩基遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) によりコードされるアミノ酸が置換することで、受容体の機能に変化を及ぼし、その結果、疾患の重症度や薬効または副作用に影響を与えることが報告されている。さらに、最近、²受容体構造遺伝子の発現を調節する ²受容体プロモーター領域にも数箇所の SNPs が確認され、²受容体発現調節との関連性が報告されている。そこで、被験者を呼吸器疾患患者、心臓疾患患者ならびに対照者として呼吸器疾患や心臓疾患の治療を受

けておらずそれらの既往歴のない者の3群に分類し、被験者より得た血液から抽出したゲノム DNA を用い、² 受容体プロモーター領域の変異部位 (塩基配列 - 20、- 47、- 367、- 654、- 1023、- 1343 部位) について、PCR - RFLP 法により変異の有無を確認した。

その結果、

全被験者における² 受容体プロモーター領域の遺伝子多型の発現頻度は、- 20、- 47、- 367 および - 1023 部位では野性型(w/w)の頻度が、- 654 と - 1343 部位ではヘテロ型(w/m)や変異型(m/m)の頻度が高いことが明らかとなった。

全被験者を各種疾患 (喘息、心筋梗塞、不整脈、狭心症、心不全、高血圧症、糖尿病、高脂血症、その他) の有無により分類し、これと² 受容体プロモーター領域における対立遺伝子発現頻度との関連性について調査した。その結果、喘息ならびに糖尿病の発症において、- 654 部位多型の頻度に有意な差が認められた ($p < 0.025$)。

上記の喘息または糖尿病の解析に用いた被験者においては、² 受容体構造遺伝子における 27 部位での遺伝子多型の頻度に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

以上の結果から、アドレナリン² 受容体構造ならびにプロモーター領域の遺伝子多型を明らかにすることで、喘息や糖尿病の発症に対し有用な情報を与えるものと考えられる。

スタチン系抗高脂血症薬投与による血清コレステロールとドリコールの濃度変化

小 泉 宜 史 (林 秀 徳 教 授)

スタチン系抗高脂血症薬は HMG-CoA 還元酵素阻害作用を有し、また、HDL 含量を増加させる。血中のドリコールはほとんどが HDL に含まれること、ドリコールが HMG-CoA 還元酵素を介する反応系で合成されることから、血中ドリコール濃度はスタチン系抗高脂血症薬により影響を受けることが予想される。そこで、スタチン系薬物投与による血清コレステロールとドリコールの濃度変化について調べた。

本実験は、東京通信病院の内科、薬剤部、臨床検査科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、スタチン系抗高脂血症薬投与前、投与後 (1~4 ヶ月) の血清コレステロール濃度 (総コレステロール濃度、HDL-コレステロール濃度) とドリコール濃度 (アルコール型および脂肪酸エステル型の合計量) を測定した。血清コレステロール濃度は、日立生化学自動分析装置 7350 で測定キットを用いて測定した。血清ドリコール濃度は、Yamada らの方法を変法して行った。

スタチン系抗高脂血症薬投与前の血清総コレステロール濃度、ドリコール濃度、HDL-コレステロール濃度の平均値は、それぞれ 260 ± 36 mg/dL、 160 ± 33 mg/dL、 62 ± 15 mg/dL であった。血清総コレステロール濃度は、スタチン系抗高脂血症薬投与後 2、3 ヶ月でそれぞれ 0.87、0.79 倍と有意に

低下していた。ドリコールも 3、4 ヶ月後にそれぞれ 0.77、0.82 倍と有意に低下していた。一方、HDL-コレステロールに有意な変化はみられなかった。また、HDL-コレステロール濃度に対するドリコールの濃度の比率は、投与後 0.8 倍に有意に低下した。これらの結果は、スタチン系抗高脂血症薬は血清コレステロールとドリコール濃度を共に低下させるが、コレステロールとドリコールの低下に関係するリポタンパク質の種類が大きく異なることを示している。

不死化ヒト胎盤絨毛細胞の酵素活性とホルモン分泌に対するペルオキシソーム増殖剤ゲンフィブロジル、クロフィブリン酸の影響

小 口 敬 伸(林 秀徳 教授)

ゲンフィブロジルやクロフィブリン酸は血中脂質低下薬であり、またペルオキシソーム増殖剤でもある。しかし齧歯類のペルオキシソームは増殖させるが、ヒトには無効とされている。またヒトの生殖に関係する細胞に対する影響もほとんど分かっていない。本実験では増殖能を有し、正常細胞特性を保つ不死化ヒト胎盤絨毛細胞(細胞性栄養膜細胞、TCL)を用い、ペルオキシソーム酵素やホルモン分泌などに対するゲンフィブロジルやクロフィブリン酸の影響を調べた。

絨毛細胞を 10% ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地で 24 時間前培養したのち、ゲンフィブロジル、クロフィブリン酸を種々の濃度で加え反応を 4 日間行った。その間、経時的に細胞を採取し、DNA 含有量およびたん白質含量をそれぞれ測定した。またペルオキシソーム酵素のカタラーゼ、脂肪酸アシル CoA 酸化酵素、ミクロソーム酵素のエステラーゼなどの活性を測定した。さらに培養上清中のプロゲステロンとヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)の濃度も測定した。

絨毛細胞の DNA 含量は経日的に増加したが、ゲンフィブロジル(0.25mM 以上)やクロフィブリン酸(1mM 以上)の添加により増加速度は減少した。たん白質含量も同様な傾向を示した。カタラーゼ、脂肪酸アシル CoA 酸化酵素の活性が絨毛細胞に検出された。カタラーゼの比活性は両薬物により増加傾向、アシル CoA 酸化酵素は若干の増加が見られたが、エステラーゼは変化しなかった。培養液中のプロゲステロンの DNA 当たりの濃度も増加したが、hCG は減少した。

以上のことから両薬物がヒト絨毛細胞の細胞増殖を抑制するが、ゲンフィブロジルの方がクロフィブリン酸より低い濃度で抑制すること、ヒト絨毛細胞にペルオキシソームが存在することが分かった。また両薬物はペルオキシソームを少ないながら増殖させ、プロゲステロンの合成を促進させる可能性が示唆された。

健康食品に関する実態調査

山崎理恵(津田整教授)

近年、健康志向が高まり、多くのいわゆる健康食品が市場に出回るようになった。これらは、薬局・薬店などでも購入する事ができるため、薬剤服用患者が併用する可能性も高いと思われる。このような背景から患者のみならず医療従事者側からも健康食品に対する関心が高まっている。また、健康食品と医薬品との相互作用が報告され、相互作用にも関心が高まってきている。そこで今回、調剤薬局において患者の健康食品に対する関心度および利用度の実態調査を実施すると共に、患者が現在服用している医薬品と嗜好品、健康食品との相互作用報告の有無の検討を行った。

調査は2001年9月10日～10月6日の期間に院外調剤薬局に来局した患者で、調査への同意を得られた患者を対象にアンケート調査実施した。回答は、調査に同意した33人全員から得られ、回収率は100%であった。健康食品を「現在、摂っている」または「以前に摂ったことがある」と回答した健康食品摂取経験者は6割を超え、商品の種類も多種に渡っていることが判明した。さらに、健康食品を「現在、摂っている」と回答した群において、4割が健康食品摂取の旨を医師または薬剤師に伝えているという結果が得られた。また、「現在、健康食品を摂取している」群において、服用中の医薬品と健康食品または嗜好品との相互作用の検討を行ったところ、現時点では特に問題はないという結果に至った。

慢性疾患患者においても健康食品の普及率は高く、また医療従事者への健康食品摂取を報告しており、これは医薬品と食品の相互作用がマスメディアでも大きく取り上げられるようになったことに影響されていると考えられた。今後、厚生労働省が認可している「保健機能食品」とその他のいわゆる健康食品との違いを把握し、患者に的確に日常生活についてアドバイスできるよう薬剤師にも今後、食品・栄養の知識は必要であると思われる。

白血病治療の支持療法におけるH₂ブロッカー選択

赤津 勲(津田整教授)

白血病の化学療法における支持療法、特に消化管粘膜障害対策として投与されるH₂ブロッカーの使用は、胃部不快感の軽減、消化管出血の予防、悪心・嘔吐の抑制により患者のQOL向上の面からも必要とされているが、一方で免疫力が低下している患者へのH₂ブロッカーの投与は骨髄抑制による血液障害、胃の感染防御機能低下を理由に疑問視する考えもある。本研究では白血病治療の支持療法におけるH₂ブロッカーが患者の白血球数推移に影響を及ぼしたと思われる症例を基に、白血球数減少の発現頻度と白血球数の回復、H₂ブロッカー使用の関連性について検討した。

H₂ブロッカーを使用している白血病患者62例を抽出し、さらにAML、ALLで治療を受けていて

骨髄移植を行っていない患者を選抜し、24例について化学療法終了後の白血球数推移と使用された3種のH₂ブロッカーとの関連性について比較検討した。H₂ブロッカーの副作用として知られる白血球減少の発生と白血球数回復までの日数を比較すると、白血球減少の発生頻度の高いH₂ブロッカーでは、白血球数回復までの日数も長くなることが判明し、超大量化学療法におけるコースの進行に影響を与えることがわかった。また、H₂ブロッカーは好中球減少も知られており、3種の薬剤間で比較した結果、3種の薬剤間に有意な差が認められた。

H₂ブロッカーの使用目的とされる胃部不快感の軽減、消化管出血の予防、悪心・嘔吐の抑制は他の薬剤の使用で対処することも可能になっており、今回の結果からH₂ブロッカーの使用を避けるか、H₂ブロッカーを使用しなければならない場合は副作用としての白血球減少の発生頻度が低い薬剤を選択することが望まれる。

In vitro 経皮吸収試験法 OECDガイドライン（案）における皮膚integrityおよび物質収支の評価に関する研究

土 肥 大 典（荻原政彦 助教授）

本論文は、OECDガイドライン（案）*in vitro* 経皮吸収試験法に日本が対応する上での問題点である、皮膚のintegrityおよび透過実験後の物質収支について検討したものである。その結果、以下のような、新しい知見が明らかになった。1) 経皮的水分損失(TEWL)を測定することで、皮膚の損傷の強度を推測できることがわかった。2) 皮膚のintegrityを確認する上でTEWLの測定が有用であることがわかった。3) TEWLの測定値から、化学物質の透過性をある程度予測できることがわかった。4) 局所的な皮膚の損傷により、水溶性化学物質の透過性の方がより影響を受けやすいことが明らかとなった。5) HPLCを用いて、物質収支の見積もりが可能であることが明らかになった。6) 皮膚中で代謝される化学物質も代謝を含めて、物質収支の計算が可能であるが、皮膚中で代謝される割合が多い化学物質や未知の代謝物が生成する化学物質では、物質収支の見積もりは困難であることがわかった。

よって、TEWLの基準設定の際には、被験薬物の物理化学的性質の考慮および正常範囲を決定すること、また、物質収支に関しては、皮膚中で代謝される化学物質についてのより詳しい検討が必要である。