

Chirality, 15, 703-708 (2003).

“Study of chiral recognition of bilayered phosphatidylcholine vesicles using a helicene probe: Characteristic function of cholesterol.”

Hiroko Nakagawa (中川弘子), Maiko Yoshida (吉田麻衣子), Yuuki Kobori (小堀裕紀), and Koh-ichi Yamada (山田紘一)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University

Incorporated into bilayered chiral phosphatidylcholine (PC) vesicles, 2-hydroxymethyl[5]thiaheterohelicene having a labile helix that functioned as a chirality probe, exhibited induced CD absorptions. The Cotton effects demonstrated opposite signs according to the difference in chirality of PC applied, indicating the chiral recognition of the vesicles. The vesicles formed by PCs with unsaturation or acyl chains shorter than DPPC exhibited a slightly stronger CD, presumably because of an increase in the constraint by the vesicles. The vesicles formed with egg lecithin and bovine heart lecithin also induced CD similar to those of (L)PC vesicles. The influence of cholesterol (Cho) and four kinds of analogs on the CD intensities was investigated. Following addition of Cho, the CD intensities decreased slightly in the (L)DPPC vesicles and increased moderately in the (D)DPPC vesicles. On the other hand, by addition of Cho analogs the CD intensities were nearly unchanged in (L)DPPC vesicles and weakened moderately in the (D)DPPC vesicles.

J. Mol. Catal. A:Chem., 199, 65-71 (2003).

“STM observation of molecular chirality and alignment on solid surface.”

Masahiro Taniguchi, Hiroko Nakagawa (中川弘子) , Akihiro Yamagishi, and Koh-ichi Yamada (山田紘一)

Division of Biological Sciences, Graduate School of Sciences, Hokkaido University
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University
Department of Earth and Planetary Sciences, Graduate School of Sciences, The University of Tokyo

Two-dimensional adlayer of a helically shaped aromatic compound, [11]thiaheterohelicene ([11]TH), which consists of alternating benzene and thiophene rings, was prepared on Au(1 1 1), Au(1 1 0) and polycrystalline gold under UHV condition. LEED and STM were used for characterization of alignment, ordering and chirality of [11]TH on these Au substrates. A [11]TH monolayer on Au(1 1 1) showed the presence of an adlayer lattice with six-fold symmetry, while [11]TH on Au(1 1 0) did align along (1 -1 0) direction, and [11]TH adsorbed on a step bunching area formed chiral sensitive arrays, being one-dimensionally aligned chains. These observations are discussed in terms of stereoselective interaction among [11]TH's.

Chem. Lett., 32, 90-91 (2003).

“Helical assembly formed by chiral [11]thiaheterohelicene in crystals. Architecture with triple helix.”

Hiroko Nakagawa (中川弘子) , Jun Yoshino (吉野順) , Koh-ichi Yamada (山田紘一) , Motoo Shiro,

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University
Rigaku Corporation

Projection of the crystal structure of a right-handed enantiomer of [11]thiaheterohelicene (11H) with a helical structure of one and a half turn revealed huge helical assemblies along the a axis. In the assemblies, three crystallographically independent molecules formed a smaller right-handed helix, while no similar helical assembly was observed for the crystal structures of an 11H racemate and a [9]thiaheterohelicene enantiomer.

Synlett, 2003, 567-569

O-Allylic Substitution of Hydroxylamine Derivatives Having an -Withdrawing Substituent

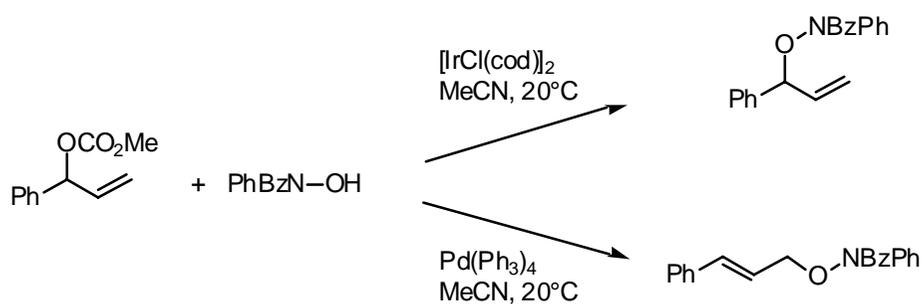
Hideto Miyabe,^a Kazumasa Yoshida,^a Akira Matsumura,^a Masashige Yamauchi (山内昌茂),^b Yoshiji Takemoto^a

^a Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

Received 27 January 2003 .

The O-Allylic substitution reaction of hydroxylamines having an N-electron-withdrawing substituent proceeded smoothly to afford O-allylated products by using $[\text{IrCl}(\text{cod})_2]$ or $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, in which the oxygen atom of hydroxylamines acted as a reactive nucleophile.



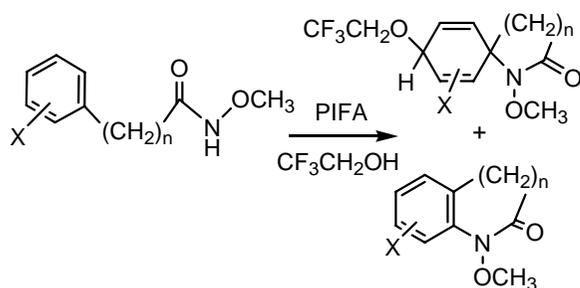
Heterocycles, 59, 149-160 (2003).

Synthesis of Spiro-Fused Nitrogen Heterocyclic Compounds via *N*-Methoxy-*N*-acylnitrenium Ions Using Phenyliodine(III) Bis(trifluoroacetate) in Trifluoroethanol

Etsuko Miyazawa (宮沢悦子), Takeshi Sakamoto (坂本武史), and Yasuo Kikugawa (菊川靖雄)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

Spirodienones and spirodienes having the nitrogen atom bound to the spiro carbon have been synthesized from *N*-methoxy-(4-methoxyphenyl)amides and *N*-methoxyphenylamides, respectively, by the intramolecular ipso attack of a nitrenium ion generated with phenyliodine(III) bis(trifluoroacetate) in trifluoroethanol.



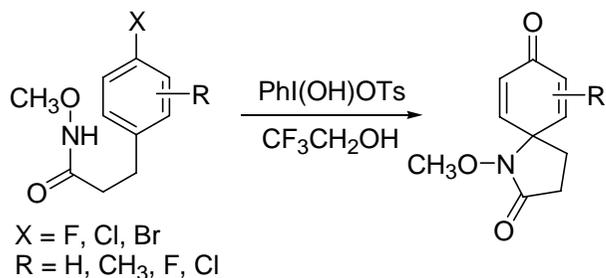
J. Org. Chem., 68, 5429-5432 (2003).

Synthesis of Spirodienones by Intramolecular *Ips*o-Cyclization of *N*-Methoxy-(4-halogenophenyl)amides Using [Hydroxy(tosyloxy)iodo]benzene in Trifluoroethanol

Etsuko Miyazawa (宮沢悦子), Takeshi Sakamoto (坂本武史), and Yasuo Kikugawa (菊川靖雄)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama

Spirodienones having the 1-azaspiro[4.5]decane ring system have been synthesized from *N*-methoxy-(4-halogenophenyl)amides by the intramolecular ipso attack of a nitrenium ion generated with [hydroxy(tosyloxy)iodo]benzene in trifluoroethanol.



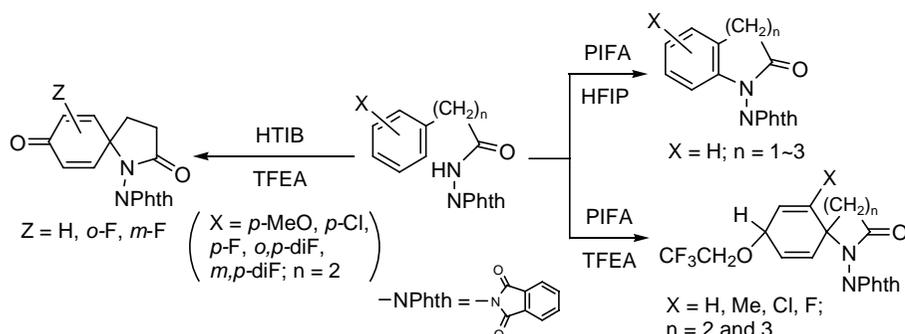
J. Org. Chem., 68, 6739-6744 (2003).

Intramolecular Cyclization with Nitrenium Ions Generated by Treatment of *N*-Acylaminophthalimides with Hypervalent Iodine Compounds: Formation of Lactams and Spiro-Fused Lactams

Yasuo Kikugawa (菊川靖雄), Akira Nagashima (長島 章), Takeshi Sakamoto (坂本武史), Etsuko Miyazawa (宮沢悦子), and Megumi Shiiya (椎谷 恵)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

N-Phthalimido-*N*-acylnitrenium ions are generated from *N*-acylaminophthalimides, a new class of precursors, by treatment with hypervalent iodine compounds (PIFA and HTIB). In HFIP the nitrenium ions undergo intramolecular electrophilic substitution reactions to afford *N*-amino nitrogen heterocycles in high yields. In TFEA, spirodienones bearing 1-azaspiro[4.5]decane skeleton are obtained by treatment of *N*-phthalimido-3-(4-halogenophenyl)propanamides with HTIB as a result of ipso attack of the intermediate nitrenium ion. Similarly, using PIFA in TFEA, *ipso* cyclization of unactivated benzenoid compounds occurs to give spirodiene derivatives. This involves loss of aromaticity despite the absence of other activating substituents on the phenyl group.



In Vivo, 17, 509-12 (2003).

Structural requirements of hydroxylated coumarins for *in vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity.

Kawase M (河瀬雅美),¹ Tanaka T (田中 享),¹ Sohara Y (蘇原由貴),¹ Tani S (谷 覺),¹ Sakagami H,² Hauer H,³ Chatterjee SS³

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan; ²Department of Dental Pharmacology, Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan; ³Department of Research and Development, Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany

We have previously found that a 7-hydroxycoumarin derivative has potent anti-*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) activity, comparable with metronidazole. In this report, we describe the structural requirement for the anti-*H. pylori* activity of several hydroxylated coumarins (**1-23**). It was found that 7-hydroxy-4-methylcoumarin (**6**), 6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin (**8**), 6-hydroxy-7-methoxy-4-methylcoumarin (**10**) and 5,7-dihydroxycyclopentanocoumarin (**21**) showed comparable anti-*H. pylori* activity with metronidazole. The presence of 7- and/or 6-hydroxyl groups seems to be essential to display higher anti-*H. pylori* activity. Their activities depended on the number and position of the hydroxyl group on the benzenoid ring of the coumarin system. Methylation of the hydroxy group generally diminished the activity. In hydroxylated coumarins, the methyl group at C-4 position enhanced the activity. The inhibitory activity of coumarins (**1-23**) against jack bean urease was examined, but no coumarins showed any inhibition at 160 micrograms/mL.

Int. J. Antimicrob. Agents, 22, 223-227 (2003).

Enhancement of plasmid curing by 9-aminoacridine and two phenothiazines in the presence of proton pump inhibitor 1-(2-benzoxazolyl)-3,3,3-trifluoro-2-propanone.

Spengler G,¹ Miczak A,¹ Hajdu E,¹ Kawase M (河瀬雅美) ,² Amaral L,³ Molnar J ¹

¹Faculty of Medicine, Albert Szent-Gyorgyi Medical University, Szeged, Hungary;

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan; ³Unit of Mycobacteriology, Universidade Nova de Lisbon, Lisbon, Portugal

Plasmid-containing bacteria often cause serious therapeutic failure during the treatment of infectious diseases. The antiplasmid effects of promethazine and 9-aminoacridine were studied on plasmid elimination of native plasmid DNA and plasmid DNA isolated from drug-treated cells of plasmid-containing *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*. The effects of some phenothiazines on plasmid profiles of bacterial strains isolated from urinary tract infections were analysed by agarose gel electrophoresis. Various complex of plasmid DNA were identified in the presence of promethazine, trifluoperazine and 9-aminoacridine in the agarose gel electrophoresis. Doxycycline resistance of tested enteric bacteria was the target of "curing" in the presence of promethazine and trifluoperazine. The frequency of elimination of tetracycline resistance was low despite the formation of antiplasmid compounds complex with isolated plasmid DNA. Tetracycline resistance plasmid was isolated and re-transformed. The plasmid curing effects of promethazine, trifluoperazine and 9-aminoacridine were increased in the presence of a trifluoroketone proton pump inhibitor on *E. coli* K12 LE140 strain in a model experiment. We propose that the inefficient penetration of antiplasmid compounds could be responsible for the weak plasmid-curing effect in some clinical isolates and that membrane active, calmodulin- and proton pump inhibitors may be combined for plasmid curing in antibiotic-resistant bacteria.

Arzneim.-Forsch./Drug Res., 53, 590-599 (2003).

Antimicrobial activity of *N*-acylphenothiazines and their influence on lipid model membranes and erythrocyte membranes.

Motohashi N,¹ Kawase M (河瀬雅美),² Molnar J,³ Ferenczy L,³ Wesolowska O,⁴ Hendrich AB,⁴ Bobrowska-Hagerstrand M,⁵ Hagerstrand H,⁵ Michalak K⁴

¹Meiji Pharmaceutical University, Kiyose, Tokyo, Japan; ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan; ³Faculty of Medicine, Albert Szent-Gyorgyi Medical University, Szeged, Hungary; ⁴Department of Biophysics, Wroclaw Medical University, Wroclaw, Poland; ⁵Department of Biology, Abo Akademi, Abo/Turku, Finland

The antibacterial activity and influence on lipid model membranes and erythrocyte membranes of 24 *N*-acylphenothiazines and trifluoperazine were studied. Among 24 phenothiazines, the antimicrobial activity of amino maleates was the highest. The influence of phenothiazines on model liposome and erythrocyte membranes was studied using *N*-phenyl-1-naphthylamine (NPN) as fluorescence probe. From the three types of phenothiazine substitution (H, Cl, CF₃) at position 2, CF₃-phenothiazines were the most effective in the interaction with liposomal membranes. As measured by the polarization degree of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) fluorescence, the alteration of membrane fluidity induced by CF₃-phenothiazines was the biggest. Surprisingly, phenothiazines induced stomatocytic shape alterations (invaginations) in erythrocytes and at higher concentrations, also hemolysis of erythrocytes was observed. The microcalorimetric measurements of influence of phenothiazines on thermal behaviour of synthetic lipid systems confirmed the previously obtained results. The main transition temperature and enthalpy of transition of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) were significantly modified by CF₃-phenothiazines, suggesting their penetration of the lipid bilayer. Above results show that phenothiazine maleates were generally more effective than other phenothiazines used in this study.

Chem. Biol. Interact., 143-144, 583-586 (2003).

Effect of antisense oligodeoxynucleotide for sepiapterin reductase on the viability of PC12 cells in the presence of exogenous carbonyl compounds.

Fujimoto K,¹ Sakurai M,¹ Kawase M (河瀬雅美) ,² Katoh S¹

¹Department of Biochemistry, Meikai University School of Dentistry, Sakado, 350-0283, Saitama, Japan. ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan

Sepiapterin reductase (SPR) is known as an essential enzyme for the biosynthesis of tetrahydrobiopterin. SPR belongs to the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family and also reduces various exogenous carbonyl compounds including phenylpropanedione. We found in the present study that phenylpropanedione decreased the rate of proliferation of PC12 cells and that this rate was further diminished by the transfection of the cells with antisense oligodeoxynucleotide for SPR mRNA. When the cells were treated with *N*-acetylserotonin, a specific inhibitor of SPR, in the presence of phenylpropanedione, the cell number decreased to almost the same level as when the cells were transfected with the antisense oligodeoxynucleotide. Thus, the SDR activity of SPR in PC12 cells may serve for detoxification of exogenous carbonyl compounds besides functioning as a specific enzyme for the formation of tetrahydrobiopterin.

Anesthesiology, 98, 643-650 (2003).

Comparative analysis of apoptosis-inducing activity of codeine and codeinone.

Hitosugi N,¹ Hatsukari I,¹ Ohno R,¹ Hashimoto K,² Mihara S,² Mizukami S,¹ Nakamura S,¹ Sakagami H,² Nagasaka H,² Matsumoto I,¹ Kawase M (河瀬雅美)³

¹Department of Anesthesiology, Saitama Medical School, Saitama, Japan; ²Department of Dental Pharmacology, Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan; ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan

The authors previously found that codeinone, an oxidation metabolite of codeine, among 10 opioids, showed the highest cytotoxic activity (DNA fragmentation-inducing activity) against human promyelocytic leukemic cell lines (HL-60). These findings prompted us to perform a more detailed study of apoptosis induction after codeinone treatment. Apoptosis was induced by treating HL-60 cells for 1-6 h with codeine or codeinone. DNA fragmentation was assessed by both agarose gel electrophoresis and fluorometric determination of the fragmented DNA after staining with diamidinophenylindole (DAPI). The release of cytochrome c and cytochrome oxidase from mitochondria and activation of caspase 3 were monitored by Western blot analysis. Intracellular caspase 3-like activity was confirmed by FACS, using cell permeable substrate. Mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase activity and mRNA expression were assayed by activity staining after separation on the polyacrylamide gel electrophoresis, and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively. Codeinone induced internucleosomal DNA fragmentation and production of Annexin-positive apoptotic cells more potently than codeine in HL-60 cells. Codeinone stimulated the release of both cytochrome c and cytochrome oxidase, and cleavage of procaspase 3 without significant changes in both the activity and expression of MnSOD. Codeinone was found to possess both apoptosis and necrosis-inducing activity, in addition to the reported antinociceptive activity, further substantiating its antitumor potential.

Anticancer Res., 23, 2569-2576 (2003).

Analysis of apoptosis signaling pathway in human cancer cells by codeinone, a synthetic derivative of codeine.

Hitosugi N,¹ Nagasaka H,¹ Sakagami H,² Matsumoto I,¹ Kawase M (河瀬雅美)³

¹Department of Anesthesiology, Saitama Medical School, Saitama, Japan;

²Department of Dental Pharmacology, Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan; ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan

We have recently found that codeinone, an oxidation metabolite of codeine, induced apoptosis, characterized by internucleosomal DNA fragmentation and mitochondrial cytochrome c release in HL-60 human promyelocytic leukemic cell lines, most effectively among 10 opioids. These findings prompted us to investigate whether codeinone induces apoptosis in other human cancer cells and possible changes in mitochondrial enzyme. FACS analysis demonstrated that codeinone induced the production of ANNEXIN-positive apoptotic cells in three different human cancer cells (HL-60, MCF7, A549). The apoptotic cells were visualized by microscopical observation after staining with Hoechst (H)-33342. Fluorometric assay showed that codeinone time-dependently activated caspase 3 and caspase 9, but not caspase 8, suggesting the activation of intrinsic apoptotic signaling pathway via mitochondria. Western blot analysis demonstrated that codeinone enhanced the Pro-apoptotic Bax protein expression, but reduced the anti-apoptotic Bcl-2 protein expression. Codeinone did not significantly change the manganese superoxide dismutase (MnSOD) activity nor its mRNA expression. This apoptosis-inducing activity, in conjunction with antinociceptive activity, further substantiated the antitumor potential of codeinone.

Anticancer Res., 23, 3243-3246 (2003).

Structure-cytotoxic activity relationships of simple hydroxylated coumarins.

Kawase M (河瀬雅美),¹ Sakagami H,² Hashimoto K,² Tani S (谷 覺),¹ Hauer H,³ Chatterjee SS³

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan;
²Department of Dental Pharmacology, Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan; ³Department of Research and Development, Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany

Several hydroxylated and/or methoxylated coumarin derivatives were tested for their relative cytotoxicity on four human tumor cell lines (oral squamous cell carcinoma HSC-2, HSC-3, melanoma A-375 and promyelocytic HL-60) and three normal human cells (gingival fibroblast HGF, periodontal ligament fibroblast HPLF and pulp cell HPC). Tumor cell-specific cytotoxicity was detected in all 6,7-dihydroxy-substituted coumarins only. The observations indicate that the tumor-specific cytotoxicity of the naturally occurring coumarin esculetin can be further enhanced by proper substitutions at 3- and/or 4-position(s) of the molecule. Agarose gel electrophoresis revealed that esculetin and its derivatives with tumor-specific cytotoxicity induce internucleosomal DNA fragmentation in HL-60 cells.

Anticancer Res., 23, 3237-3241 (2003).

Inhibition of LPS-stimulated NO production in mouse macrophage-like cells by Barbados cherry, a fruit of *Malpighia emarginata* DC.

Wakabayashi H,¹ Fukushima H,¹ Yamada T,¹ Kawase M (河瀬雅美),² Shirataki Y (白瀧義明),² Satoh K,³ Tobe T,³ Hashimoto K,⁴ Kurihara T,¹ Motohashi N,⁵ Sakagami H⁴

¹Faculty of Science, Josai University, Saitama, Japan; ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado, Saitama, Japan; ³School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Tokyo, Japan; ⁴Department of Dental Pharmacology, Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan; ⁵Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan

The extract of Barbados cherry (acerola fruit) has been reported to display diverse biological activities such as prevention of age-related diseases. We investigated here the possible effect of Barbados cherry extract on nitric oxide (NO) production by activated macrophages. Barbados cherry was roughly separated into 4 or 5 fractions by two different methods, using various organic solvents such as hexane, acetone, methanol (70% and 100%) and water, and assayed for its ability to inhibit NO production by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse macrophage-like Raw 264.7 cells. Among these fractions, AcOEt extracts [AE0] in Method I and acetone extract [A0] in Method II showed the highest inhibitory activity of NO production (SI > 20 and SI = 31, respectively). When these fractions were subjected to silica gel column chromatography, higher inhibitory activity for NO production was concentrated in AcOEt [AE6] (SI = 64) and benzene-AcOEt (1:4) [A10] fractions (SI > 59). Western blot analysis demonstrated that AE6 and A10 fractions reduced the intracellular concentration of inducible NO synthase (iNOS) by approximately one-third. ESR spectroscopy showed that these fractions scavenged various radical species such as superoxide anion (O₂⁻) and NO radicals. These data suggest that the inhibitory effect on NO production by Barbados cherry extracts is partly due to the inhibition of iNOS expression, and scavenging of O₂⁻ and NO radicals.

Phytother. Res., 17, 495-500 (2003).

Biological activity of persimmon (*Diospyros kaki*) peel extracts.

Kawase M (河瀬雅美),¹ Motohashi N,² Satoh K,³ Sakagami H,⁴ Nakashima H,⁵ Tani S (谷 覺),¹ Shirataki Y (白瀧義明),¹ Kurihara T,⁶ Spengler G,⁷ Wolfard K,⁷ Molnar J⁷

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado, Saitama, Japan; ²Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan; ³School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Tokyo, Japan; ⁴Department of Dental Pharmacology, Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan; ⁵Department of Microbiology, St. Marianna University School of Medicine, Kanagawa, Japan; ⁶Faculty of Science, Josai University, Saitama, Japan; ⁷Faculty of Medicine, Albert Szent-Gyorgyi Medical University, Szeged, Hungary

Fractionated extracts of persimmon (*Diospyros kaki*) peels were studied for cytotoxic activity, multidrug resistance (MDR) reversal activity, anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity and anti-*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) activity. The potent cytotoxic activity against human oral squamous cell carcinoma cells (HSC-2) and human submandibular gland tumor (HSG) cells was found in the acetone fractions [A4 and A5] with IC₅₀ ranging from 21 to 59 micro g/mL. However, the cytotoxic activity was not correlated with the radical intensity of the fractions. Three 70% MeOH extract fractions [70M2-4] produced radical and efficiently scavenged the O₂^{·-} produced by hypoxanthine and xanthine oxidase reaction. All of the fractions tested were not effective for anti-*H. pylori* and anti-HIV. Fractions H3 and H4 of hexane extract, and M2 and M3 of MeOH extract showed a remarkable MDR reversal activity comparable with that of (+/-)-verapamil (a positive control). These results indicate the therapeutic value of persimmon peel extracts as potential antitumor and MDR-reversing agents.

Oriental Pharm. Experimental Med., 3, 100-105 (2003).

Multidrug resistance reversal in mouse lymphoma cells by Indian tea leaves, Indian coffee seeds and chicory.

Rao BK, ¹ Motohashi N, ² Kawase M (河瀬雅美), ³ Spengler G, ⁴ Molnar J ⁴

¹Department of Chemistry, Nagarjuna University, Andhra Pradesh, India; ²Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan; ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Saitama, Japan; ⁴Faculty of Medicine, Albert Szent-Gyorgyi Medical University, Szeged, Hungary

Systematic analysis of caffeine from the commercial samples of India tea leaves was performed by a routine method and the content of caffeine was found to be 19.0-37.4 mg/100 g leaves. The caffeine contents from coffee seeds and chicory from Indian origin were analyzed and found to be 0.6540-1.4920 g/100 g seeds. Caffeine contents of roasted Indian chicory roots were lower than either those of Indian tea leaves or Indian coffee seeds. The multidrug resistance (MDR) reversing effects were tested on a mouse leukemia cell line of L-5178 cells by methanol extracts [M1-M15] of Indian tea leaves and coffee seeds, comparing to a control of verapamil. The effects were measured by fluorescence ratio between treated and untreated group cells. Among fifteen methanol extracts, a Gemini tea [M6](fluorescence activity ratio 5.26) had the most potent effect for L-5178 cells. The extract M6 was 0.63-fold of verapamil. We suggest that one of mechanisms of reversal by M6 might have strong affinity to dopamine D₁ and D₂ receptors. Further studies with many more tumor and normal cell lines are necessary to confirm the MDR reversal specificity of coffee methanol extracts.

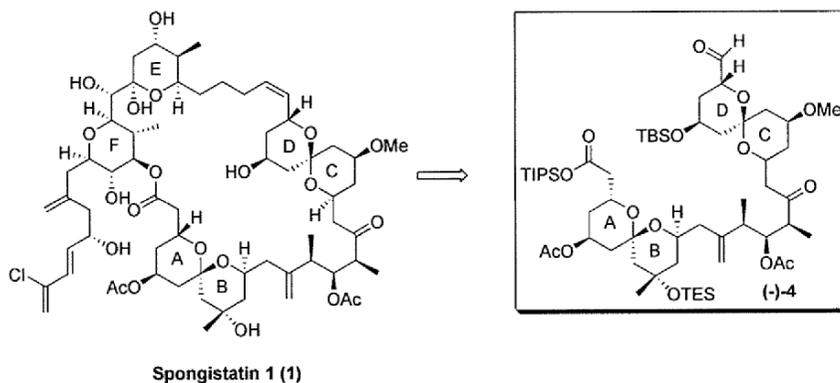
Organic letters, 4(5), 783-786 (2002)

Spongistatin Synthetic Studies. An Efficient, Second-Generation Construction of an Advanced ABCD Intermediate

Amos B. Smith, III, Victoria A. Doughty, Chris Sfougatakis, Clay S. Bennett, Jyunichi Koyanagi (小柳順一), Makoto Takeuchi

Department of Chemistry, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104

A short, efficient, and stereocontrolled synthesis of (-)-**4**, an advanced ABCD subunit of the spongistatins, has been achieved. Central to the synthetic strategy is the multicomponent linchpin union of silyl dithianes with epoxides to access both the AB and CD fragments. Fragment coupling was then achieved via an efficient stereoselective aldol reaction. The linear sequence required 22 steps and proceeded in 4.0% overall yield.



Heterocycles, 60, 159-166 (2003).

Six Flavonostilbenes from *Gnetum africanum* and *Gnetum gnemon*

Ibrahim Iliya¹, Toshiyuki Tanaka², Zulfiqar Ali², Muenekazu Inuma¹, Miyuki Furusawa², Ken-ichi Nakaya², Yoshiaki Shirataki (白瀧義明)³, Jin Murata⁴, Dedy Darnaedi⁵, Mobuyasu Matuura⁶, and Makoto Ubukata⁶

¹Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502-5858, Japan,

²Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences, 1-1 Nakafudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan, ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 keyakidai, Sakado Saitama 350-0295, Japan,

⁴Botanical Gardens, Koishikawa, Graduate School of Science, University of Tokyo, 3-7-1 Hakusan, Bunkyo-Ku, Tokyo 112-0001, Japan, ⁵Indonesian Institute of Sciences Jalan Ir. H. Juanda 13, Bogor 16122, Indonesia, ⁶Toyama Prefectural University, 5180 Kosugi-machi, Izumi-gun, Toyama 939-0298, Japan

Six new flavonostilbenes (gnetoflavanols A, B, C, D, E and F) were isolated from the stem of *Gnetum africanum* and the root of *G. gnemon*. The structures of the compounds were determined by spectroscopic analysis. The antioxidant activity of the compounds on lipid peroxide inhibition and superoxide scavenging activity were also investigated.

Chem. Pharm. Bull., 51, 85-88 (2003).

Three New Trimeric Stilbenes from *Gnetum gnemon*.

Ibrahim Iliya¹, Zulfiqar Ali², Toshiyuki Tanaka², Munekazu Iinuma¹, Miyuki Furasawa², Ken-ichi Nakaya², Yoshiaki Shirataki(白瀧義明)³, Jin Murata⁴, Dedy Darnaedi⁵, Nobuyasu Matsuura⁶, and Makoto Ubukata⁶

¹Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, Japan, ²Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences, 1-1 Naka-fudogaoka, Kagamigahara 504-0838, Japan, ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan, ⁴Botanical Gardens, Koishikawa, Graduate School of Science, University of Tokyo, 3-7-1 Hakusan, Bunkyo-ku, Tokyo 112-0001, Japan, ⁵Indonesian Institute of Sciences, Jalan Ir. H. Juanda 13, Bogor 16122, Indonesia, ⁶Toyama Prefectural University, 5180 Kosugi-machi, Izumi-gun, Toyama 939-0398, Japan

Three stilbene trimers (gnemonols D, E, F) were isolated from the root of *Gnetum gnemon*. The structures were determined by spectroscopic analysis. In addition, the antioxidant activity of the compounds on lipid peroxide inhibition and super oxide scavenging activity were also investigated.

Phytotherapy Research, 17, 348-352 (2003).

Cytotoxic and Multidrug Resistance Reversal Activity of a Vegetable, ‘Anastasia Red’, a Variety of Sweet Pepper.

Noboru Motohashi¹, Hidetsugu Wakabayashi², Teruo Kurihara², Yuko Takada², Shichiro Maruyama³, Hiroshi Sakagami³, Hideki Nakashima⁴, Satoru Tani(谷 覺)⁵, Yoshiaki Shirataki(白瀧義明)⁵, Masami Kawase(河瀬雅美)⁵, Kristina Wolfard⁶ and Joseph Molnar⁶

¹Meiji Pharmaceutical University, Kiyose, Tokyo, Japan, ²Faculty of Science, Josai University, Sakado, Saitama, Japan, ³Department of Dental Pharmacology, Meikai University, School of Dentistry, Saitama, Japan, ⁴Department of Microbiology, St. Marianna University, Kawasaki-shi, Kanagawa, Japan, ⁵Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado, Saitama, Japan, ⁶Faculty of Medicine, Institute of Medical Microbiology, University of Szeged, Szeged, Hungary

The vegetable, Anastasia Red, *Capsicum annuum* L. var. *angulosum* Mill. (Solanaceae) was successively extracted with hexane, acetone, methanol and 70% methanol, and the extracts were further separated into a total of 21 fractions by silica gel or octadecylsilane (ODS) column chromatography. The biological activities of extracts and fractions were determined. These extracts showed relatively higher cytotoxic activity against two human oral tumor cell lines (HSC-2, HSG) than against normal human gingival fibroblasts (HGF), suggesting a tumor-specific cytotoxic activity. The cytotoxic activity of these extracts was enhanced by fractionation on silica gel [H2, A2, M1-M3] or ODS column chromatography [70M]. Several fractions [H2, H4, H5, A1, A2, A3, A5, A6, A7, M2] reversed the multidrug resistance (MDR) phenotype with L5178 mouse lymphoma T cells, more efficiently than (+/-)-verapamil. The extracts and fractions did not show any detectable anti-human immunodeficiency virus (HIV) or anti-*Helicobacter pylori* activity. Thus, this study suggests the effective and selective antitumor potential of ‘Anastasia Red’ of sweet pepper for further phytochemical and biological investigation.

Tetrahedron, 59, 5347-5393 (2003).

New resveratrol oligomers in the stem bark of *Vatica pauciflora*

Tetsuro Ito¹, Toshiyuki Tanaka¹, Munekazu Iinuma², Ibrahim Iliya², Ken-ichi Nakaya¹, Zulfiqar Ali¹, Yoshiakazu Takahashi³, Ryuichi Sawa³, Yoshiaki Shirataki (白瀧義明)⁴, Jin Murata⁵ and Dedy Darnaedi⁶

¹Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan, ²Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, Japan, ³Institute of Microbial Chemistry, 3-14-23 Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141-0021, Japan, ⁴Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai Sakado, Saitama 350-0295, Japan, ⁵Botanical Gardens, Koishikawa, Graduate School of science, University of Tokyo, 3-7-1, Hakusan, Bunkyo-Ku, Tokyo, 112-0001, Japan, ⁶Indonesian Institute of Sciences, Jalan Ir. H.Juanda 13, Bogor 16122, Indonesia

Five new resveratrol oligomers; pauciflorols A-C (1-3), Isovaticanols B (6) and C (8), and three new oligostibene glucosides; pauciflorosides A (11), B(13), C(14), were isolated from the stem bark of *Vatica pauciflora* (Dipterocarpaceae) together with known 17 resveratrol oligomers (4, 5, 7, 9, 10, 12 and 15-25) and bergenin (26). The structures of isolates were established in the basis of detailed spectroscopic analysis. The typical and characteristic spectral properties of some resveratrol oligomers were also discussed.

Oncology Research, 13, 463-469 (2003)

Flavonoids as Inhibitors of MRP1-like Efflux Activity in Human Erythrocytes. A Structure-Activity Relationship Study

Malgorzata Bobrowska-Hagerstrand ¹, Anna Wrobel ², Lucyna Mrowczynska ³, Thomas Soderstrom⁴, Yoshiaki Shirataki(白瀧義明)⁵, Noboru Motohashi ⁶, Joseph Molnar ⁷, Krystyna Michalak ⁸ and Henry Hagerstrand ¹

¹Department of Biology, Abo Akademi University, FIN-20520 Abo/Turku, Finland, ²Institute of Physics, Wroclaw University of Technology, PL-50370 Wroclaw, Poland, ³Department of Cytology and Histology, AMickiewicz University, PL-61701, Poznan, Poland, ⁴Turku Center for Biotechnology, University of Turku and Abo Akademi University, FIN-20520 Abo/Turku, Finland, ⁵Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado, Saitama 350-0295 Japan, ⁶Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, 204-8588 Japan, ⁷Department of Microbiology, Albert Szent-Gyorgyi Medical University, H-6720 Szeged, Hungary, ⁸Department of Biophysics, Wroclaw Medical University, Poland

The potency of flavonoids (isoflavones, flavones, and flavanones) to inhibit efflux of 2',7'-bis-(carboxypropyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCPCF) from human erythrocytes was investigated. Structure-activity relationship analysis showed that the strongest inhibitors were found among flavanones bearing a hydrophobic prenyl, geranyl, or lavandulyl group at position 8 (and hydroxyl groups at 5 and 7) in ring A. A prenyl group at position 5' or stilbene at positions 4'-5' in ring B further seemed to increase inhibitor potency. The most efficient flavanones, euchrestaflavanone A and sophoraflavanone H, were approximately 20 times more efficient than genistein, and induced 50% inhibition of BCPCF efflux (IC₅₀) at 3 microM (60 min, 37 degrees C). This is comparable to IC₅₀ of benzbromarone (4 microM) and lower than IC₅₀ of indomethacin (10 microM), both known MRP1 (ABCC1) inhibitors. It is suggested that BCPCF efflux is mainly due to MRP1 activity. Our results indicate that flavonoid molecular structure provides a promising base for development of potent MRP1 inhibitors.

Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 3, 163-179 (2003).

Functional bioactivity of *Polygonatum* species

Noboru Motohashi¹, Guo-Wen Zang², and Yoshiaki Shirataki(白瀧義明)³

¹Meiji Pharmaceutical University, Kiyose-shi, Tokyo, Japan, ²Institute of Botany, Academia Sinica, Laboratory of Phytochemistry, 141, Xi Wai Da Jie, Beijing, China, ³Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

The genus *Polygonatum* species belongs to the family Liliaceae which is widely distributed over areas of the north temperature zone. There are about forty more plants of *Polygonatum* species in the world widely distributed in eastern Europe and south east Asia. The plants of *Polygonatum* species have been used not only as ornamental plants but also for their medicinal values. This article is concerned with the specific properties and flavour of the drug and its history as a medicine, showing the main functional components of *Polygonatum* species of flavonoids, steroidal glycoside, and saccharides.

Biol. Pharm. Bull., 26 (3), 285-288 (2003)

Fate of Orally Administered ^{15}N -Labeled Polyamines in Rats Bearing Solid Tumors

Masaki Kobayashi (小林正樹)¹, Yong Ji Xu (許 泳吉)², Keijiro Samejima (鮫島啓二郎)¹, Hitomi Goda (合田ひとみ)¹, Masaru Niitsu (新津 勝)¹, Masakazu Takahashi³, and Yoshiyuki Hashimoto⁴

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakasdo 350-0295, Japan

²Institute of Chemical & Molecular Technology, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, P.R. China

³Department of Pathology, Sasaki Institute, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

⁴Kyoritsu College of Pharmacy, Minato-ku, Tokyo 105-8512

We studied absorption, distribution, metabolism, and excretion of polyamines in the gastrointestinal tract using ^{15}N -labeled polyamines as tracers and ionspray ionization mass spectrometry. The relatively simple protocol using rats bearing solid tumors provided useful information. Three ^{15}N -labeled polyamines that were simultaneously administered were absorbed equally from gastrointestinal tract, and distributed within tissues at various concentrations. The uptake of ^{15}N -spermidine seemed preferential to that of ^{15}N -spermine since the concentrations of ^{15}N -spermidine in the liver and tumors were higher, whereas those of ^{15}N -spermine were higher in the kidney, probably due to the excretion of excess extracellular spermine. Most of the absorbed ^{15}N -putrescine seemed to be lost, suggesting blood and tissue diamine oxidase degradation. Concentrations of ^{15}N -spermidine and ^{15}N -spermine in the tumor were low. We also describe the findings from two rats that were administered with ^{15}N -spermine. The tissue concentrations of ^{15}N -spermine were unusually high, and significant levels of ^{15}N -spermidine were derived from ^{15}N -spermine in these animals.

Biol. Pharm. Bull., 26(7), 1005-1008 (2003).

Synthetic Decarboxylated S-Adenosyl-L-methionine as a Substrate for Aminopropyl Transferases

Hideki Dejima (出島秀樹), Masaki Kobayashi(小林正樹), Hideki Takasaki (高崎秀樹), Noboru Takeda (竹田 昇), Akira Shirahata (白幡 晶), and Keijiro Samejima (鮫島啓二郎)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado 350-0295, Japan

Synthetic decarboxylated S-adenosyl-L-methionine (dcAdoMet), a mixture of the absolute configuration of S and R at the sulfonium center, was evaluated as a substrate for the measurement of spermidine synthase activity. The diastereomers were separated by HPLC with an isocratic elution, and the constant for racemization at the sulfur was determined to be $2.4 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ at 37°C and pH 1.5 for the first-eluted biologically active isomer (S-dcAdoMet) and $2.0 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$ for the second-eluted biologically inactive isomer (R-dcAdoMet). The peak area ratio of S-dcAdoMet to R-dcAdoMet of 48 to 52 in HPLC supported the different racemization constants. Similar substrate activity of dcAdoMet to that of S-dcAdoMet was demonstrated by enzymatic spermidine synthesis. It was shown from the result that the racemized [methyl- ^{14}C]dcAdoMet prepared in this report was useful for measuring spermidine synthase activity.

Biol. Pharm. Bull., 26 (8) 1215 - 1218 (2003)

Relative Reactivities of Histamine and Indoleamines with Acetaldehyde

Takeshi Ohya (大谷武司) and Masaru Niitsu (新津 勝)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado 350-0295, Japan

Relative reactivities of histamine and indoleamines such as tryptamine, 5-hydroxytryptamine and 5-methoxytryptamine with acetaldehyde (AA) under physiological conditions were investigated. AA was found to have much higher reactivity towards histamine than towards indoleamines. For example, when a reaction mixture of AA (1 mM) and histamine or tryptamine (5 mM) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) was incubated at 37 °C for 24 h, AA decreased by 11 % in the case of tryptamine, while in the case of histamine, it decreased 88 %. In addition, the reaction product of AA with histamine was investigated. Mixtures of a fixed amount of histamine (5 mM) and various amounts of AA (1 - 20 mM) in phosphate buffer (pH 7.4) were incubated for 5 h at 37 °C. In all cases, only one product, 4-methylspinaceamine (4-MSPA), was observed. The yield of 4-MSPA was in approximate agreement with the losses of histamine and AA, indicating that the loss of histamine caused by the reaction of AA was quantitatively converted to 4-MSPA. These results show that the reaction of AA with histamine easily takes place to produce 4-MSPA in an aqueous medium close to physiological conditions.

Anticancer Research, 23, 4797-4803 (2003)

Changes in intracellular concentrations of polyamines during apoptosis of HL-60 cells.

C. Nakamura, E. Yasumoto, K. Nakano, T. Nakayachi, K. Hashimoto, K. Kusama, M. Fukuda, H. Sakashita, A. Shirahata (白幡 晶), H. Sakagami

Department of Meikai Pharmaco-medical Laboratory (MPL), Meikai University School of Dentistry, Sakado, Saitama, Japan.

Possible changes in the intracellular concentrations of polyamines were investigated during the apoptosis of human promyelocytic leukemic HL-60 cells. Treatment of HL-60 cells with gallic acid and epigallocatechin gallate (EGCG) resulted in the rapid decline of the intracellular concentration of putrescine, whereas that of spermidine and spermine was not significantly changed during the first 3 hours after treatments. Irradiation with UVB also selectively reduced the intracellular concentration of putrescine. On the other hand, cytotoxic concentrations of anticancer agents, such as etoposide and doxorubicin, only marginally reduced the intracellular concentration of putrescine during the first 3 hours. A significant decline of putrescine was observed at later stages when DNA fragmentation became more prominent. Three normal human cells (gingival fibroblast, pulp cell, periodontal ligament fibroblast) and human tumor cell lines (squamous cell carcinoma, submandibular carcinoma, malignant melanoma, hepatoma), which showed higher resistance to apoptosis inducer, had significantly higher putrescine concentrations than HL-60 cells. These data suggest that the intracellular concentration of putrescine may be a useful marker for the apoptosis induction or the sensitivity of the cells to apoptosis inducers.

Journal of Biochemistry 134, 197-202 (2003)

Effects of Peroxisome Proliferators Gemfibrozil and Clofibrate on Syntheses of Dolichol and Cholesterol in Rat Liver

Yasuo Shiota (塩田泰生), Masatoshi Ikeda (池田直俊), Fumie Hashimoto (橋本フミ恵) and Hidenori Hayashi (林 秀徳)

Department of Pathological Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, JAPAN

The effects of two peroxisome proliferators, gemfibrozil and clofibrate, on syntheses of dolichol and cholesterol in rat liver were investigated. Gemfibrozil did not affect the overall content of dolichyl phosphate, but it changed the chain-length distribution of dolichyl phosphate, increasing the levels of species with shorter isoprene units. Gemfibrozil suppressed synthesis of dolichyl phosphate from [³H]mevalonate and [³H]farnesyl pyrophosphate in rat liver. In contrast, clofibrate increased the content of dolichol (free and acyl ester forms). It remarkably enhanced dolichol synthesis from mevalonate, but did not affect dolichol synthesis from farnesyl pyrophosphate. Gemfibrozil elevated cholesterol synthesis from [¹⁴C]acetate, but did not affect the synthesis from mevalonate. Clofibrate suppressed cholesterol synthesis from acetate, but did not affect cholesterol synthesis from mevalonate. These results suggest that gemfibrozil suppresses synthesis of dolichyl phosphate by inhibiting, at the least, the pathway from farnesyl pyrophosphate to dolichyl phosphate. As a result, the chain-length pattern of dolichyl phosphate may show an increase in shorter isoprene units. Clofibrate may increase the content of dolichol by enhancing dolichol synthesis from mevalonate. Gemfibrozil may increase cholesterol synthesis by activating the pathway from acetate to mevalonate. Unlike gemfibrozil, clofibrate may decrease cholesterol synthesis by inhibiting the pathway from acetate to mevalonate.

Life Sci, 73, 2985-2990 (2003).

Urease inhibitory activity of simple alpha,beta-unsaturated ketones.

Tanaka T (田中 享) , Kawase M (河瀬雅美) , Tani S (谷 覺)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

A variety of alpha, beta-unsaturated ketones were evaluated for their effect on the jack bean urease. Of 35 compounds tested, 2-cyclohepten-1-one (**1**), 2-cyclohexen-1-one (**2**), 2-cyclopenten-1-one (**3**), and 5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one (**4**) showed potent inhibitory activities against the enzyme. The most potent compound (**1**) ($IC_{50}=0.16$ mM) showed similar inhibitory potency to hydroxyurea ($IC_{50}=0.095$ mM). The inhibitory effects of **1**, **2**, **3**, and **4** were significantly reduced by 2-mercaptoethanol or dithiothreitol. These data suggest that alpha,beta-unsaturated ketones inhibited the urease activity, possibly by a Michael-like addition of a protein SH group to the double bond of the alpha,beta-unsaturated carbonyl group.

Brain Research, 987, 126-130 (2003)

Possible correlation between abilities of a variety of polyamines to increase activator protein -1 DNA binding and to inhibit [3H]spermidine transport in nuclear fractions of murine brain.

Keiji Inoue, Nobuyuki Kuramoto, Katsura Takano, Hideo Taniura, Katsumi Sakata, Kiyokazu Ogita, Akira Shirahata (白幡 晶) and Yukio Yoneda

Laboratory of Molecular Pharmacology, Kanazawa University Graduate School of Natural Science and Technology, 13-1 Takara-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-0934, Japan. Department of Pharmacology University, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan. Department of Biochemistry, Josai University, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

The addition of a number of natural and synthetic polyamines significantly increased activator protein (AP1) DNA binding in nuclear extracts of murine whole brain, which occurred in a manner positively correlated with their potencies to inhibit temperature-dependent transport of [3H]spermidine in brain nuclear fractions.

These results suggest that polyamines may affect gene transcription by AP1 complex after incorporation into the nucleus in rodent brain.

European Journal of Human Genetics, 11, 937-944(2003)

X-linked spermine synthase gene (SMS) defect: the first polyamine deficiency syndrome.

A Lauren Cason , Yoshihiko Ikeguchi (池口文彦), Cindy Skinner, Tim C Wood, Kenton R Holden, Herbert A Lubs, Francisco Martinez, Richard J Simensen, Roger E Stevenson, Anthony E Pegg and Charies E Schwartz

J.C. Self Research Institute, Greenwood Genetic Center, 1 Gregor Mendel Circle, Greenwood, SC 29646, USA. Department of Cellular and Molecular Physiology, Pennsylvania State University, Hershey, PA 17033, USA. University of Miami, School of Medicine, FL 33101, USA. Unidad de Genética, Hospital Universitario La Fe, Valencia 46009, Spain.

We reported the first polyamine deficiency syndrome caused by a defect in spermine synthase (SMS). The defect results from a splice mutation, and is associated with the Snyder-Robinson syndrome (SRS, OMIM_309583), an X-linked mental retardation disorder. The affected males have mild-to-moderate mental retardation (MR), hypotonia, cerebellar circuitry dysfunction, facial asymmetry, thin habitus, osteoporosis, kyphoscoliosis, decreased activity of SMS, correspondingly low levels of intracellular spermine in lymphocytes and fibroblasts, and elevated spermidine/spermine ratios. The clinical features observed in SRS are consistent with cerebellar dysfunction and a defective functioning of red nucleus neurons, which, at least in rats, contain high levels of spermine. Additionally, the presence of MR reflects a role for spermine in cognitive function, possibly by spermine's ability to function as an 'intrinsic gateway' molecule for inward rectifier K⁺ channels.

Biochemical Journal, 373, 885-892 (2003)

Effect of spermine synthase on the sensitivity of cells anti-tumour agents

Yoshihiko Ikeguchi (池口文彦), Caroline A. Mackintosh, Diane E. McCloskey and Anthony E. Pegg

Department of Cellular and Molecular Physiology, Pennsylvania State University
College of Medicine, Hershey, PA 17033, U.S.A.

The role of spermine in the sensitivity of cells to various established and experimental anti-tumour agents was examined, using paired cell lines that possess or lack spermine synthase. All spermine synthase-deficient cells had no detectable spermine, and elevated spermidine content. Spermine content did not alter the cell growth rate. There was little or no difference in sensitivity of immortalized mouse embryonic fibroblasts to doxorubicin, etoposide, cisplatin, H2O2 and only a slight increase in sensitivity to vinblastine and nocodazole. However, the absence of spermine clearly increased the sensitivity to BCNU, suggesting that depletion of spermine may be a useful way to increase the anti-neoplastic effects of anti-tumour agents that form chloroethy-mediated interstrand DNA cross-links. The effects of spermine on the response to polyamine analogues (which have been proposed to be useful anti-neoplastic agents) were complex, and depended on the compound examined and on the cells tested. Sensitivity to CHENSpm was substantially greater in immortalized fibroblasts that lack spermine. In contrast, BE-3-4-3 and BE-3-3-3 were more active against cells that contained spermine. The presence of spermine correlated with a greater induction of SSAT by BE-3-3-3, which is consistent with suggestions that this induction is important for the response to this drug. These findings support the concepts that different polyamine analogues have different sites of action and that CHENSpm has a different site of action from BE-3-3-3.

Biological & Pharmaceutical Bulletin, 26, 1005-1008 (2003).

Carbohydrate Research, 338, 1055-1062 (2003)

Structural and serological characterization of 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexy-non-2-ulosonic acid isolated from lipopolysaccharides of *Vibrio parahaemolyticus* O2 and O-untypeable strain KX-V212

Noritaka Hashii (橋井則貴), Yasunori Isshiki (一色恭徳), Takehiro Iguchi (井口毅裕), Kazuhito Hitsatsune, Seiichi Kondo (近藤誠一)

Department of Microbiology, School of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

Lipopolysaccharides (LPS) of *Vibrio parahaemolyticus* O2 and O-untypeable (OUT) strain (KX-V212) isolated from a individual patient were shown to contain 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexy-non-2-ulosonic acid (NonIA) which was readily released from LPS by mild acid hydrolysis. GC-MS and NMR analysis identified the NonIA from LPS of O2 LPS to be 5,7-diacetamidido-3,5,7,9-tetradexy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (5NAc7NAcNonIA) and that from LPS of KX-V212 to be 5-acetamido-7-(N-acetyl-D-alanyl)amino-3,5,7,9-tetradexy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (5NAc7NAlaNAcNonIA). ELISA inhibition analysis using 5NAc7NAcNonIA, 5NAc7NAlaNAcNonIA and N-deacylated and N-acetylated 5NAc7NAlaNAcNonIA suggested that 5NAc7NAcNonIA might be related to the serological specificity of O2 LPS as one of main epitope(s) involved in O2 LPS.

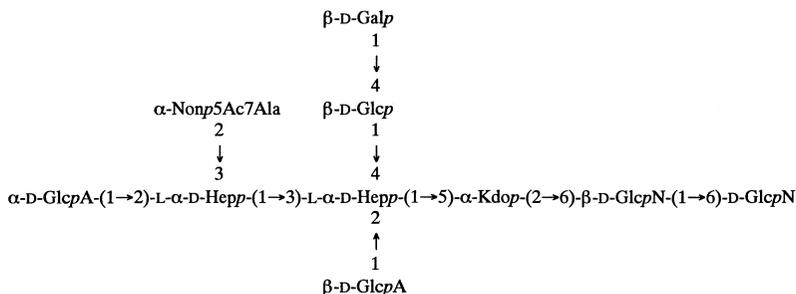
Carbohydrate Research, 338, 2711-2719 (2003)

Structural characterization of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide of *Vibrio parahaemolyticus* O-untypable strain KX-V212 isolated from a patient

Noritaka Hashii (橋井則貴), Yasunori Isshiki (一色恭徳), Takehiro Iguchi (井口毅裕), Seiichi Konod (近藤誠一)

Department of Microbiology, School of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

Vibrio parahaemolyticus strain KX-V212 of a novel serotype, which does not belong to any of the known 12 O-serotypes of this vibrio, was isolated from a patient. Its O-antigen harbors a unique strain-specific O-antigenic factor(s), in addition of that shared by the O-antigen of *V. parahaemolyticus* serotype O2. Structural analysis of isolated and deacylated lipid A and a carbohydrate backbone isolated from the lipopolysaccharide (LPS) by dephosphorylation, reduction and deacylation revealed that the carbohydrate backbone of the LPS of strain KX-V212 is a decasaccharide as shown below which consist of one residue each of D-galactose (Gal), D-glucose (Glc), 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) and 5-diacetamido-7-(N-acetyl-D-alanyl)amino-3,5,7,9-tetra-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulosonic acid (Non5Ac7Ala), and two residues each of D-glucuronic acid (D-GlcA), L-glycero-D-manno-heptose (L,D-Hep) and 2-amino-2-deoxy-D-glucose (D-glucosamine, GlcN). The initial LPS contains also D-galacturonic acid and phosphoethanolamine at unknown positions. Both similarity and differences are observed between the LPS of *V. parahaemolyticus* O2 and strain KX-V212.



Journal of Infectious Diseases, 187, 1085-1096 (2003)

Adaptive and inflammatory immune responses in patients infected with strains of *Vibrio parahaemolyticus*

Quadri F.¹, Alam MS.¹, Nishibuchi M.¹, Alam NH.¹, Christi J.¹, Kondo Seiichi² (近藤誠一), Sugiyama, J.¹, Bhuiyan, NA.¹, Mathan MM.¹, Sack DA.¹, Nair GB.¹

Antibody-secreting cell responses to thermostable direct hemolysin (TDH), lipopolysaccharide (LPS), and whole-cell bacteria were seen in patients with diarrhea caused by *Vibrio parahaemolyticus*. TDH- and LPS-specific responses were seen in serum samples, and immunoglobulin A antibody responses were observed in stool. Levels of C-reactive protein and nitric oxide metabolites increased in the systemic circulation at the onset of illness. During the acute stage, TNF- α and lactoferrin levels were high, whereas interleukin-1 β levels were high only in mucosal secretions. Duodenal and rectal biopsy specimens obtained at the onset of illness showed an acute inflammatory response. The lamina propria showed edema, congestion of blood vessels, and hemorrhage, with an increase in levels of polymorphonuclear neutrophils and macrophages. Strains belonging to different serotypes exhibited varying resistance to killing by serum; O8:K21 strain was most sensitive. Infection with *V. parahaemolyticus* results in B cell responses and an acute inflammatory response that is self-limiting.

Jpn. J. Drug Inform., 5(3), 167 - 174 (2003)

A survey on pharmaceutical information in daily newspapers

Yukiko Onobori (尾登由起子), Fusao Komada (駒田富佐夫), Yukiya Saitoh (齋藤侑也).

Department of Drug Informatics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama, 350-0295 Japan

[Purpose] We carried out a survey of pharmaceutical information in daily newspapers to clarify pharmaceutical information useful for the general public after its press release by the Ministry of Health Labour and Welfare.

[Methods] We searched for newspaper articles on “Emergency safety information” and “Pharmaceuticals and medical devices safety information” during a 6-year period from “Asahi Newspaper Web” and “Mainich/Yomiuri Newspaper, Nikkei Telecom 21” as newspaper article search sites and from reduced-size editions of newspapers using key words such as “side effects and drugs”, “emergency safety information”, and “medical devices and problems”.

[Results] As a result of search for newspaper articles using “side effects and drugs” as a key word, a total of 3,700 articles in the 3 newspaper publishing companies were found. After 1998, 100% of “Emergency safety information” articles appeared in newspapers. The date of every article on this information was the day or next day of its release by the Ministry of Health Labour and Welfare. The mean number of letters/article tended to increase in recent years, being about 500 in 2002. On the other hand, about 60% of “Pharmaceuticals and medical devices safety information” articles appeared in newspapers. The date of the article on this information was the day or next day of its release by the Ministry of Health Labour and Welfare for all articles excluding 3. The mean number of letters/article remained about 200-300 with negligible changes, being about 250 in 2002. In the articles, many technical terms concerning side effects were used.

[Conclusion] It is hoped that newspapers carry articles that can provide a certain amount and quality of pharmaceutical information to the general public.

Biol. Pharm. Bull., 26(4), 510-517 (2003)

Induction of CYP3As in HepG2 Cells by Several Drugs. - Association between Induction of CYP3A4 and Expression of Glucocorticoid Receptor - .

T.Usui (臼井達洋) , Y.Saitoh (齋藤侑也) , F.Komada (駒田富佐夫) .

Department of Drug Informatics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama, 350-0295 Japan

The cytochrome P-450 3A (CYP3A) enzyme family is responsible for most of the drug metabolism in the human liver. In this study, we demonstrated the inductive effects of phenobarbital, rifampicin, carbamazepine, phenytoin, prednisolone, ciclosporin and clotrimazole on CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 mRNA expression, and established the relationship between the expression of human glucocorticoid receptor α (hGR α mRNA and the induction of CYP3A4 mRNA in cultured HepG2 cells by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Treatment with prednisolone, rifampicin and carbamazepine rapidly induced the level of CYP3A4 mRNA expression by 3- to 6-fold. However, phenytoin and phenobarbital gradually induced CYP3A4 mRNA level by 3 to 4-fold. The induction of CYP3A4 mRNA expression by clotrimazole and ciclosporin was negligible. Treatment with phenytoin, rifampicin, carbamazepine and ciclosporin induced approximately 2-fold increases in the expression of CYP3A5 mRNA, although prednisolone, phenytoin and clotrimazole had no effect. Treatment with rifampicin, phenytoin, clotrimazole and ciclosporin resulted in approximately a 2-fold induction of the CYP3A7 mRNA level. Treatment with rifampicin and ciclosporin induced the expression of hGR α mRNA significantly in comparison with controls, although the induction of hGR α mRNA following treatment with other drugs was negligible.

In cluster analysis, the induced level of CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 and hGR α mRNA by these drugs could be classified into four major clusters. This suggested that each cluster might be associated with different mechanism(s) of induction by these drugs.

Furthermore, we studied the associations between the expression of hGR α mRNA and the induced level of CYP3A4 mRNA by prednisolone and ciclosporin. Treatment with both prednisolone and ciclosporin showed synergistic effects on induction of CYP3A4 mRNA and, following treatment with both drugs, the expression level of CYP3A4 mRNA was 2-fold greater compared with prednisolone alone after the fifth day. Positive correlations were observed between the levels of hGR α mRNA expression and those of CYP3A4 mRNA. This observation shows that the regulation of CYP3A4 gene expression was hGR α -dependent and that ciclosporin may function as a regulator of expression via hGR α .

S.T.P. Pharma Sciences, 13(3), 215-218 (2003).

Effect of chondroitin sulfate on the diffusion coefficients of drugs in aqueous solutions

Toshinobu Seki,^{a,b} Maiko Okamoto (岡本麻衣子),^c Osamu Hosoya,^b Daiki Aiba (相場大樹),^c Kazuhiro Morimoto,^a Kazuhiko Juni (従二和彦)^c

^a Hokkaido College of Pharmacy, 7-1 Katsuraoka-cho, Otaru, Hokkaido 047-0264, Japan. ^b Research Institute of TTS Technology, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan. ^c Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

In order to examine the effects of pH and the presence of chondroitin sulfate (ChS) on diffusion coefficients (D) of drugs in aqueous solutions, the chromatographic broadening method (CBM) was applied. ChS, a major component of the extracellular matrix, was used as an acid mucopolysaccharide model. D of methylparaben (MP) decreased by about 10% with ionization, and the smallest D value of cefalexin (CEX), an amphoteric electrolyte, were observed at pH 5.0 at which CEX is a zwitterion. These observations are consistent with the knowledge of the effects of hydration to ions on the movement of ionized drugs. The effects of ChS on D were examined at pH 5.0 for several drugs with different states of ionization. In the case of MP, which is non-ionized at pH 5.0, the D value decreased only by 6% with the addition of 1% of ChS, although the macro-viscosity of the solution increased by 83% with the addition of 1% ChS. These observations also are consistent with the fact that micro-viscosity mainly contributes to the diffusivity of drugs. In the cases of morphine (MOR) and isoproterenol (IP), which are cations at pH 5.0, the values of D decreased by 25 and 21%, respectively, with the addition of 1% ChS. The decrease extents in D of cationic MOR and IP (25 and 21%) were considerably larger than those of zwitterionic CEX (5%), and anionic flurbiprofen (8%) and salicylic acid (6%). Although the addition of sodium chloride (125 mM) did not affect D of MP, the effects of ChS on D, of MOR and IP, were significantly decreased by the addition of sodium chloride because of the reduction of ion-ion interactions with ionic strength. These results suggest that CBM is useful, as an *in*

vitro method, for examination of influence of ion-ion interactions on diffusion of drugs.

Chem. Pharm. Bull., 51(6), 734-736 (2003).

Measurement of diffusion coefficients of parabens and steroids in water and 1-octanol

Toshinobu Seki,^{a,b} Junko Mochida (持田純子),^c Maiko Okamoto (岡本麻衣子),^c Osamu Hosoya,^b Kazuhiko Juni (從二和彦),^c Kazuhiro Morimoto^a

^a Hokkaido College of Pharmacy, 7-1 Katsuraoka-cho, Otaru, Hokkaido 047-0264, Japan. ^b Research Institute of TTS Technology, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan. ^c Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

By using the chromatographic broadening method, diffusion coefficients (D) of parabens and steroids in water and 1-octanol were determined at 37 °C, and the relationships between the D values and the physicochemical properties of the drugs were discussed. The D values in 1-octanol were lower than those in water because of the higher viscosity of 1-octanol. The D values depend on not only the molecular weight (MW), but also the lipophilicity of the drugs in water and on the ability for hydrogen-bonding in 1-octanol. When the lipophilic index (LI), calculated from the retention time using in a reverse-phase column, was used as a parameter of drug lipophilicity, the following equation was obtained for D in water (D_w); $\log D_w = -0.215 \log MW - 0.077 \log LI - 4.367$. When the hydrogen bond index (HI), the logarithm of the ratio of the partition coefficient of the drugs in 1-octanol and cyclohexane, was used as an index of hydrogen-bonding, the following equation was obtained for D in 1-octanol (D_o); $\log D_o = -0.690 \log MW - 0.074 \log HI - 4.085$.

Pharm Res., 20, 153-160 (2003)

Poly-L-arginine predominantly increases the paracellular permeability of hydrophilic macromolecules across rabbit nasal epithelium in vitro

Kazuo Ohtake (大竹一男)^a, Takuya Maeno (前野拓也)^a, Hideo Ueda (上田秀雄)^a, Hideshi Natsume (夏目秀視)^{a,b}, Yasunori Morimoto (森本雍憲)^{a,b}

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan. ^bResearch Institute of TTS Technology, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

PURPOSE: The purpose of this work was to characterize the main transport pathway of hydrophilic macromolecules induced by poly-L-arginine (poly-L-Arg; molecular weight 42.4 kDa) across the excised rabbit nasal epithelium.

METHODS: Excised rabbit nasal epithelium was mounted in an Ussing-type chamber for measurement of fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FD-4; molecular weight 4.4 kDa) transport and transepithelial electrical resistance (TEER). The main transport pathway of FD-4 enhanced by poly-L-Arg was evaluated using confocal laser scanning microscopy. Immunolocalization of junction proteins (ZO-1, occludin, and E-cadherin) after treatment with poly-L-Arg was also observed.

RESULTS: After apical application of a poly-L-Arg (0.05, 0.5, and 5 mg/mL), the permeability coefficient of FD-4 increased by 1.6-, 2.9-, and 5.2-fold, respectively, compared with the control of $5.2 \pm 1.3 \times 10^{-7}$ cm/s. Consistent with the increase in transport, there was a concurrent reduction in TEER. At a concentration of 0.05 mg/mL poly-L-Arg, both FD-4 transport and TEER returned to the control level. A good correlation was obtained between the FD-4 permeability coefficient and 1/TEER. Basolateral application of poly-L-Arg at 5 mg/mL, however, did not increase FD-4 transport. Marked FD-4 fluorescence was located in the paracellular spaces after treatment with apical poly-L-Arg compared with that in the absence of poly-L-Arg. Immunofluorescence of ZO-1, occludin, and E-cadherin in cell-to-cell junctions was reduced and distributed into the cytoplasm by apical application of poly-L-Arg, suggesting that poly-L-Arg regulates the junction proteins to enhance

paracellular permeability across the nasal epithelium. After pretreatment with either 2,4-dinitrophenol or ouabain, the enhancing effect of apical poly-L-Arg was abolished, indicating the contribution of metabolic energy (cell viability) to the poly-L-Arg-mediated enhancing effect.

CONCLUSION: In the nasal epithelium, apical poly-L-Arg appears to increase predominantly the paracellular transport of hydrophilic macromolecules via disorganization of tight- and adherens-junction proteins. The regulatory mechanism of the poly-L-Arg effect is likely to be dependent on energy-requiring cellular processes.

城西情報科学研究, 13, 23-28 (2003)

学内 LAN を利用した実習希望施設エントリーシステムの構築とその評価

沼尻幸彦¹、上田秀雄¹、小林大介¹、森本雍憲¹、遠藤敏成²、野本 禎²

¹城西大薬、²東日本メディコム

薬学部における病院実習の依頼手続きを効率的に処理できるコンピュータープログラムを構築し、その有用性、問題点を評価した。学内 LAN に接続された各教員の端末からサーバーコンピューターの実習希望病院エントリープログラムを開き、実習学生の学籍番号、実習依頼手続きに必要なデータを入力する。これらのデータはサーバーコンピューター内で自動的に集計される。このシステムを用いることで、病院実習に関連する事務処理の煩雑さを軽減できるだけでなく、実習施設の希望状況を迅速かつ明確に把握できることから、実習学生の施設への割振り人数調整を簡略化できる可能性が示唆された。

Yakugaku Zasshi, 123(6), 469-474 (2003)

Area distribution of out-issued prescriptions from Saiseikai Kurihashi Hospital and behavior patterns of outpatients for selection of pharmacy

Akira Katayama^a, Saori Tsuchida (土田さおり)^b, Tomohide Kitabata^a, Masanori Shimamura^a, Hideo Ueda (上田秀雄)^b, Sachihiko Numajiri (沼尻幸彦)^b, Daisuke Kobayashi (小林大介)^b, Yasunori Morimoto (森本雍憲)^b

Department of Pharmacy, Saiseikai Kurihashi Hospital,^a 714-6 Kouemon, Kurihashi, Kitakatsushika-gun, Saitama 349-1105, Japan and Department of Hospital Pharmacy,^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

The area distribution of out-issued prescriptions for outpatients in Saiseikai Kurihashi Hospital was surveyed over 6 months from the first day of out-issue. Behavior patterns of outpatients in the selection of a pharmacy were also investigated. Our survey included the out-issued prescriptions in eight surrounding newly established pharmacies together with the first out-issue. Computer simulation indicated that 70% of the outpatients selected the surrounding pharmacies when they received their out-issued prescriptions the first time. However, the percentage of surrounding pharmacies selected by the patients decreased to 60% the second time, and then again increased to 80% the third time. The results suggest that most outpatients use surrounding pharmacies, although they try to use the pharmacies near their homes for a time.

Int. J. Pharm., 262, 13-22 (2003)

The use of complexation with alkanolamines to facilitate skin permeation of mefenamic acid

Liang Fang (方 亮)^a, Sachihiko Numajiri (沼尻幸彦)^a, Daisuke Kobayashi (小林大介)^a, Yasunori Morimoto (森本雍憲)^{a,b}

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

^bResearch Institute of TTS Technology, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

The preparation of mefenamic acid (MH)-alkanolamine [monoethanolamine, diethanolamine, triethanolamine and propanolamine] complexes was attempted to increase the transdermal flux of MH. A lipophilic enhancer system consisting of isopropyl myristate (IPM) and ethanol (9:1; EI system) produced a marked enhancement of MH flux from the alkanolamine complexes through hairless rat skin membrane. Among the alkanolamines examined, the propanolamine complex had the greatest enhancing effect on the permeation of MH. The observed permeation enhancement of MH-alkanolamine complexes by the EI system was explained by an analysis based on a two-layer diffusion model. The stratum corneum immersed in IPM forms a continuous phase of vehicle and stratum corneum and, from the phase, ethanol transport the MH-alkanolamine complexes to the epidermis and dermis, and the complexes, which are more water soluble than MH, exhibit increased partition into the epidermis and dermis, as flux increases.

J. Contr. Rel., 92, 137-146 (2003)

Characterization of Transdermal Solute Transport Induced by Low-Frequency Ultrasound in the Hairless Rat Skin

Mizue Mutoh (武藤香絵) ,¹ Hideo Ueda (上田秀雄) ,¹ Yasushi Nakamura (中村恭士) ,¹ Kotaro Hirayama,² Mahito Atobe,³ Daisuke Kobayashi (小林大介) ,¹ Yasunori Morimoto (森本雍憲) ^{1,4,5}

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

²Dai-ichi High Frequency Co., Ltd., 2-17-8 Tonomachi, Kawasaki 210-0821, Japan.

³Department of Electronic Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Nagatsuta, Yokohama 226-8502, Japan.

⁴Research Institute of TTS Technology, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

Sonophoretic drug transport with low-frequency (41-445 kHz) and low-intensity (60-240 mW/cm²) ultrasound was characterized using hydrophilic calcein and deuterium oxide (D₂O) as a solvent vehicle in excised hairless rat skin. The excised skin was mounted in vertical diffusion chambers for measurement of skin resistance and sonophoretic transport of calcein and D₂O. The calcein content of the skin was also measured after ultrasound application. When the stratum corneum (sc) side was exposed to ultrasound at an intensity of 60 mW/cm² for 30 min, the calcein flux in the sc-to-dermis direction was increased by 22.3-, 6.3-, and 3.8-fold from a baseline of 0.0088 ± 0.0100 nmol/(cm² · h) at frequencies of 41, 158, and 445 kHz, respectively, without significant changes in skin resistance. The ultrasonically-enhanced fluxes returned to baseline following cessation of the ultrasound application. At 41 kHz, there was a further increase in the magnitude of enhancement and a significant decrease in skin resistance (by 50% of the baseline resistance) on increasing the intensity from 60 to 120 mW/cm², whereas no further enhancement was observed at 158 and 445 kHz up to 240 mW/cm². Comparison of the calcein content in the skin before, during, and after ultrasound application at 41 kHz, 120 mW/cm², was consistent with a transient ultrasonically-induced

increase in calcein flux. In the sonophoretic transport experiments at 41 kHz, 120 mW/cm², calcein transport correlated well with D₂O transport. When 41 kHz ultrasound was applied to the sc side at 120 mW/cm², the calcein and D₂O fluxes in the sc-to-dermis direction were 13.7- and 5.2-fold higher than those in the dermis-to-sc direction. Similar directionality was also observed in tape-stripped skin, suggesting possible induction of convection in the direction of sound propagation. However, dermal application under the same ultrasound conditions induced neither an increase in calcein and D₂O transport nor a decrease in skin resistance. These results demonstrate that low frequency sonophoresis is a potentially useful technique for controlling transdermal drug transport. Convective solvent flow as well as structural alteration of the skin induced by ultrasound is likely to be responsible for the observed sonophoretic transport enhancement.

Biol. Pharm. Bull., 26, 1508-10 (2003)

The effects of calcium chloride and sodium chloride on the electroporation-mediated skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextrans in vitro

Yoshihiro Tokudome (徳留 嘉寛), Kenji Sugibayashi (杉林 堅次)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado 350-0295, Japan

We previously reported the substantial synergic effects of electroporation and electrolytes, particularly those containing CaCl_2 on the skin permeation of the model low-molecular weight compound, calcein. We then investigated the effects of electroporation (300 V, 10 ms x10 times) and 150 mM NaCl or CaCl_2 on skin permeation of higher molecular weight compounds, fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextrans (FD-4, FD-10 and FD-40; average molecular weight, 4.4, 9.6 and 35.6 kDa, respectively) using excised hairless rat skin. The observed steady state flux of FD-4 was 1.3 pmol/cm²/h after electroporation without NaCl or CaCl_2 . The flux did not differ greatly from that without electroporation. In contrast, a much higher steady state flux was observed after electroporation with NaCl or CaCl_2 (2.5 and 8.2 pmol/cm²/h, respectively). For FD-10 and FD-40, no flux was detected with electroporation in water (without electrolytes) or without electroporation. On the other hand, high skin permeation was observed after electroporation in NaCl or CaCl_2 solution (FD-10: 7.5 and 18.2 pmol/cm²/h, FD-40: 4.5 and 9.3 pmol/cm²/h in NaCl and CaCl_2 , respectively). The effects of CaCl_2 on FD permeation were greater than those of NaCl. The present finding suggests that electroporation application in the presence of electrolytes, particularly CaCl_2 , was very effective in increasing transdermal delivery of water-soluble macromolecules.

J. Control. Release, 92, 93-101 (2003)

The synergic effects of various electrolytes and electroporation on the in vitro skin permeation of calcein

Yoshihiro Tokudome (徳留 嘉寛), Kenji Sugibayashi (杉林 堅次)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado 350-0295, Japan

Various electrolytes in test solutions applied to the skin were evaluated with regard to their effects on enhanced skin permeation of calcein as a model permeant by electroporation (EP), which is a physical means to increase skin penetration by applying a high voltage pulse on the skin surface. Calcein solution (1.0 mM) containing different electrolytes at a concentration of 150 mM was applied to excised hairless rat skin, and a 10-ms electric pulse of 300 V was applied to the skin surface ten times (one pulse every second) at the beginning of the in vitro permeation experiments. The following results were obtained: (i) addition of several electrolytes, such as CaCl_2 and NaCl , further increased the EP-enhanced skin permeation of calcein when compared to treatment without these electrolytes; (ii) Ca^{2+} and Mg^{2+} exerted a greater effect than other cations (Na^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} and Al^{3+}); (iii) with simultaneous application of CaCl_2 and EP, the effect of anodal EP was much greater than that of cathodal EP; (iv) the penetration-enhancing effects of CaCl_2 were also obtained with EP pretreatment followed by calcein addition; and (v) skin permeation was greatly increased particularly with simultaneous application of EP and Ca^{2+} . These substantial combined synergic effects of EP and electrolytes, particularly those containing CaCl_2 , MgCl_2 and CaBr_2 , may be related to the disruptive and retrievable functions of the biggest barrier of skin, the stratum corneum, of these electrolytes.

J. Control. Release, 90, 171-9 (2003).

Effect of electric field on the enhanced skin permeation of drugs by electroporation

Kenji Mori ¹, Tesuya Hasegawa (長谷川 哲也) ², Shuji Sato ¹, Kenji Sugibayashi (杉林 堅次) ²

¹Tsukuba Research Laboratories, Hisamitsu Pharmaceutical Co Ltd, 1-25-11 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado 350-0295, Japan

Electroporation (voltage; 200 V) was applied using an exponentially decaying electric pulse generator on hairless rat skin using different shapes of electrodes, and the in vitro skin permeation of benzoate was measured as an index of the effectiveness of electroporation. Despite the same voltage of application, the skin permeation of benzoate was markedly different by the electrode shapes. Several experiments hereafter suggest that this reason was probably due to different 2-dimensional electric fields in the skin barrier, stratum corneum, and the voltage decreasing pattern applied. To confirm whether this phenomenon was specific for benzoate, diclofenac having a similar pKa was selected to carry out the same kind of examination. As a result, the skin permeability of diclofenac was influenced by 2-dimensional electric fields in the stratum corneum and the voltage decreasing pattern, similar to the benzoate permeation. Next, a rectangular pulse generator, where no decaying pattern was obtained for the application voltage, was used to measure the effect of electroporation on the skin permeation of diclofenac. As expected, the enhanced skin permeation of diclofenac was dependent only on the electric field when using the rectangular pulse generator. These results suggest that the electric field and time profile of the voltage (or AUC of voltage against time) at electroporation are very important factors to increase the efficacy of electroporation, and that the efficacy can be optimized by the shape of electrodes in addition to the application conditions of electroporation.

Pharm Res., 20, 1838-1845 (2003)

Poly-L-arginine enhances paracellular permeability via serine/threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium

Kazuo Ohtake (大竹一男)^a, Takuya Maeno (前野拓也)^a, Hideo Ueda (上田秀雄)^a, Masakiko Ogihara (荻原政彦)^a, Hideshi Natsume (夏目秀視)^{a,b}, Yasunori Morimoto (森本雍憲)^{a,b}

^aFaculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan. ^bResearch Institute of TTS Technology, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

PURPOSE: The purpose of the present study is to explore whether a poly-L-arginine (poly-L-Arg)-induced increase in tight junctions (TJ) permeability of fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (MW 4.4 kDa, FD-4) is associated with the Ca²⁺-dependent signaling and occurs following the phosphorylation/dephosphorylation of TJ proteins.

METHODS: Excised rabbit nasal epithelium was mounted in an Ussing-type chamber for measurement of FD-4 transport and membrane conductance (Gt) in the presence of various inhibitors that are involved in the Ca²⁺-dependent pathway and the phosphorylation/dephosphorylation of TJ proteins. The resultant distribution of TJ proteins was observed using confocal laser scanning microscopy (CLSM) in an immunostaining.

RESULTS: The increase in TJ permeability of FD-4 induced by 0.2 mg/ml poly-L-Arg was not altered by treatment with inhibitors of possible Ca²⁺ mobilization pathways followed by exposure of poly-L-Arg, suggesting that the promoting effect of poly-L-Arg is independent of Ca²⁺-related signaling. On the other hand, the protein kinase C (PKC) and tyrosine phosphatase inhibitors suppress the increase in TJ permeability by poly-L-Arg, indicating that serine/threonine phosphorylation by way of Ca²⁺-independent PKC and tyrosine dephosphorylation of junction proteins may have occurred. Furthermore, immunofluorescent monitoring of ZO-1, a TJ associated protein, and occludin, an

integral membrane protein localizing at TJ, after preincubation with PKC and tyrosine phosphatase inhibitors followed by poly-L-Arg treatment has shown that the internalization of ZO-1 and occludin occurred by way of serine/threonine phosphorylation by PKC activation and by way of tyrosine dephosphorylation, respectively, providing TJ disassembly.

CONCLUSIONS: We conclude that poly-L-Arg enhances the paracellular permeability of FD-4 (i.e., macromolecules), at least, by way of both serine/threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium.

Chem. Pharm. Bull., 51,617-9 (2003)

Design and feasibility assessment of topically applied drug formulations for electroporation

Kenji Mori ¹, Seiji Tokumoto ¹, Hiroyuki Kubo ¹, Naruhito Higo ¹, Iwao Nozawa ¹,
Shuji Sato ¹, Kenji Sugibayashi (杉林 堅次) ²

¹) Tsukuba Research Laboratories, Hisamitsu Pharmaceutical Co. Ltd.

²) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University

Few studies have been reported on the design of topical formulations consisting of electrodes and active drugs for electroporation as a means to increase skin permeability of the drugs, although many studies were reported for the effect of this physical means using aqueous drug solutions. We, therefore, designed a prototypic reservoir and matrix topical formulations that are suitable for electroporation in the present study. Plate-plate Ag electrodes and sodium diclofenac were used as model electrodes and the drug, respectively. The *in vitro* skin permeations of the drug obtained from the reservoir and matrix formulations were slightly higher than that from an aqueous suspension. This may be due to slightly higher electric field in the skin barrier for the presently designed formulations than that for the aqueous suspension. The present feasibility test suggests that these reservoirs and matrix formulations are useful prototypic topical formulations for electroporation application to improve the drug permeability through skin.

J. Trad. Med., 20, 208-215 (2003)

Effects of hardness on decoction of Chinese medicine

Seiichi Honma,^{a)} Akihiro Ogawa (小川哲寛) ,^{b)} Daisuke Kobayashi (小林大介) ,^{b)} Hideo Ueda (上田秀雄) ,^{b)} Liang Fang (方 亮) ,^{b)} Sachihiko Numajiri (沼尻幸彦) ,^{b)} Masayuki Kimura^{a,c)} Katsutoshi Terasawa,^{d)} and Yasunori Morimoto (森本雍憲) ^b

^{a)}Onko-Do Kampo Akebono Yakkyoku Co.Ltd., 1-3-10, Gakuennhigashi-cho, Kodaira-shi, Tokyo 187-0043, Japan

^{b)}Department of pharmaceuticals, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado-shi, Saitama 350-0295, Japan

^{c)}Department of Pharmacy Service, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, 1981 Kamoda-Tsujido, Kawagoe-shi, Saitama 350-8550, Japan

^{d)}Department of Japanese Oriental Medicine, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-0194, Japan

Influence of hardness of water on the decoction of ingredients from herbs to decoction formulation was investigated. The effect of hardness of water on sensory qualities such as color, turbidity, taste, and flavor which affect patient compliance were also surveyed. Sho-saiko-to (Xiao-Chai-Hu-Tang, 小柴胡湯) was selected as a model prescription. Saikosaponnin b₂ (SA), baicalin (BA) and glycyrrhizic acid (GL) were selected as index ingredients for quantitative analysis. Commercially available natural mineral waters, A (hardness, 83 mg/L) and B (hardness, 1500 mg/L), and tap water (hardness, 80 mg/L, T) were used for preparing decoction formulations. The amount of BA and GL decocted were not changed among commercial and tap water, while the SA amount decocted in B was about half of that in A and tap waters. Further studies were carried out using water of which the hardness (hardness 0-1000mg/L) was variously adjusted. The SA amount decocted was not affected by hardness of water up to 1000 mg/L. Since the pH of decoction formulation using B is higher than those with A and T, a different experiment in which pH was variously changed was carried out. It was shown that pH was a cause of the lowering of SA by B. In the sensory test for 50 pharmacists, 80% of

them answered that color and turbidity of the decoction formulations prepared with B were lightened compared to those with A and tap waters. These results demonstrate that hardness of water has mineral influence for extraction of index ingredients from Sho-saiko-to, even though it may have a visual affect.

Jpn. J. Drug Inform., 5, 159-166 (2003)

Comparison of drug prices between extracts and decoctions of Chinese medicine as ethical pharmaceuticals considering dispensing free and contents of index ingredients

Seiichi Honma¹⁾, Hajime Hirota (廣田 創)²⁾, Daisuke Kobayashi (小林大介)²⁾, Hideo Ueda (上田秀雄)²⁾, Sachihiko Numajiri (沼尻幸彦)²⁾, Fusao Komada (駒田富佐夫)³⁾, Yukiya Saito (齋藤侑也)³⁾ and Yasunori Morimoto (森本雍憲)²⁾

Onko-do Kanpou Akebono Yakkyoku Co., Ltd.,¹⁾ 1-3-10 Gakuenhigashi-cho, Kodaira-shi, Tokyo 187-0043, Japan.

Department of Hospital Pharmacy²⁾ and Department of Informatics³⁾, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

<Objective> The Chinese medicines available as ethical drugs include extracts and decoction formulations. Although the former are used widely, this is not the case with the latter. It is troublesome to carry out decoctions, however, the component titer of the decoction may be higher than the extract. Therefore, if there is no disadvantage in the price, it can be prescribed to patients with good compliance. Then, by taking the component content into consideration, both formulations were compared from an economical point of view.

<Methods> Comparison 1: The price of the extract and the corresponding decoction formulation were compared on the basis of the national health insurance drug price standards. Calculating the total price of the crude drug constituents gave the price of the decoction. Comparison 2: Because the technology fee was added, when the decoction was dispensed, the price which took the technology fee into consideration was used in the comparison. Comparison 3: The content of Baicalin, Saikosaponin b2 and Glycyrrhizic acid, which are representative crude drug components, were measured, and the price of these per unit content was compared.

<Results> In comparison 1, the decoction formulation was cheaper in the case of 126 prescriptions out of 128 published in the price standard. In comparison 2, the prescriptions that were cheap for decoction formulations decreased to 49 prescriptions. In comparison 3, the price of decoction per unit weight of each

component was cheap.

<Conclusion> Some of the decoction formulations are cheap, and it have a high titer. Therefore it is of benefit to the patient with good compliance.

医療薬学 29 卷 3 号 P357-366 (2003)

処方せん情報の医薬品開発へのフィードバック 2 経口徐放性製剤の適正使用について

Soan Kim (金 素安)¹, Yuko Tazawa (田澤 悠子)¹, Tetsuya Hasegawa (長谷川 哲也)¹, Daisuke Kobayashi (小林 大介)¹, 井上 直子², 田利 多加子², 木村 昌行², 山本 俊行³, 山口 正俊⁴, Kenji Sugibayashi (杉林 堅次)¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado 350-0295, Japan

²Department of Pharmacy, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Komada-Tsujido-cho, Kawagoe shi, 350-8550, Japan

³Department of Pharmacy, Sekishindo Hospital, Wakita-Honcho, Kawagoe shi, 350-1123, Japan

⁴Department of Pharmacy, Niigata Prefectural Muikamachi Hospital, Muikamachi, Muikamachi, Minami-Uonuma-gun, 949-6623, Japan

Sustained release oral formulations, which have various advantages such as a reduction in number of doses and the prevention of side effects by suppressing a rapid increase in blood level of drugs, are broadly used for medication. Although these formulations are frequently prescribed, their usage does not always correlate with the indications. One of the reasons for this problem is due to insufficient communication between the makers (pharmaceutical company) and the users (medical institution).

We surveyed the present usage of prescribed sustained release oral formulations at medical institutions. We then sent a questionnaire to both pharmaceutical companies and medical institutions (pharmacists) based on the investigation results. As a result, both groups generally agreed regarding the efficacy of sustained release oral formulations, while they have different points of view regarding the advantage of using these formulations. Pharmacists agreed that sustained release oral formulations could be administered with slight modifications in the prescription depending on each patient's particular condition. In contrast, R&D workers in pharmaceutical companies strongly believed that there should be no changes in the prescribed dosage

regimen. It is important to clarify and understand the similarities and differences for both sides regarding the usage of sustained release oral formulations. The obtained result may lead to a more effective usage of such medications.

J Pharm Biomed Anal., 32(2), 375-80 (2003)

Liquid chromatographic determination of unbound flecainide in therapeutic drug monitoring

Katori Kumi (香取 久美)¹, Homma M², Kuga K³, Yamaguchi I³, Kenji Sugibayashi (杉林 堅次)¹, Kohda Y²

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

²Department of Pharmaceutical Sciences, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Ten-nodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan.

³Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Ten-nodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan.

An assay method was developed for determining unbound flecainide in serum by reversed phase-high performance liquid chromatography (HPLC). Serum water including unbound flecainide was separated by ultrafiltration of the serum sample and subjected to C(18)-cartridge extraction followed by HPLC analysis. The recovery of flecainide from serum water was greater than 93%. The coefficient variations for intra- and inter-day assay of flecainide were smaller than 2.4 and 3.7%, respectively. We applied the method to determining unbound flecainide in serum samples collected from 20 patients receiving oral flecainide (150-300 mg/day) for tachyarrhythmia. Total and unbound concentrations for serum flecainide were 403.5±200.8 ng/ml and 180.2±95.0 ng/ml, respectively. Linear relationship was observed between total and unbound concentrations ($r=0.978$, $p<0.0001$). Percent unbound (44.3±5.7%) determined in the present study agreed with the reported values. The percentage unbound tended to increase in the samples with lower alpha(1)-acid glycoprotein (<60 mg/dl). The assay method can be applied to routine determination of unbound flecainide in therapeutic drug monitoring.

Biol. Pharm. Bull. 26, 927-30 (2003).

Postnatal changes and effects of glucocorticoid on MUC5AC mRNA expression in the rat stomach.

Tohru Tanaka (田中 享), Satoru Tani (谷 覺)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

Mucus is an important factor in gastric mucosal protection against acid, pepsin and various irritants such as alcohol and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. MUC5AC is a gel-forming mucin secreted from gastric surface mucous cells. However, little is known about expression of the MUC5AC gene. We examined developmental changes in rat MUC5AC mRNA expression and the effect of glucocorticoid on MUC5AC mRNA expression in infant rat gastric mucosa. Expression levels of MUC5AC mRNA in the stomach of 0 to 30-d-old and 8-week-old (adult) rats were evaluated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and by in situ hybridization. We also examined pepsinogen C (PgC) and F (foetal type) (PgF) mRNA expression by RT-PCR. The expression of MUC5AC mRNA increased from 10 d of age, which was about one week earlier than that of PgC mRNA. The expression of PgF mRNA decreased as that of PgC mRNA increased. The injection of hydrocortisone induced PgC mRNA expression in the infant rat stomach, whereas MUC5AC and PgF mRNA expression decreased. These results suggest that developmental changes of MUC5AC mRNA expression differ from those of Pgs, and are not induced by glucocorticoid.

Biol. Pharm. Bull., 26, 47-51 (2003)

Induction of Triglyceride Accumulation in the Liver of Rats by Perfluorinated Fatty Acids with Different Carbon Chain Lengths: Comparison with Induction of Peroxisomal β -Oxidation

Naomi Kudo (工藤なをみ) and Yoichi Kawashima (川嶋洋一)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1, Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

The potency to accumulate triglyceride (TG) was compared between perfluorinated fatty acids (PFCAs) having different carbon chain length in the liver of male and female rats, in comparison with induction of peroxisomal β -oxidation. In male rats, either perfluoroheptanoic acid (C7) or perfluorooctanoic acid (C8) had no effect, although perfluorononanoic acid (C9) and perfluorodecanoic acid (C10) markedly accumulated TG. In female rats, C7, C8 and C9 did not cause TG accumulation, whereas C10 caused TG accumulation at the same level as those in male rats. TG accumulation induced by C9 was regulated by the level of testosterone in male rats. In contrast with TG accumulation, peroxisomal β -oxidation was induced by C8, C9 and C10 in male rats and by C9 and C10 in female rats. Only slight difference was observed in the induction by C9 between male and female rats. The induction of TG accumulation by these PFCAs was in a dose-dependent manner and significantly correlated with hepatic concentrations of PFCA regardless of their carbon chain length, as was observed with induction of peroxisomal β -oxidation. There is, however, a striking difference in hepatic concentration of PFCA required to cause induction between TG accumulation and peroxisomal β -oxidation. Namely, the concentration of PFCA that is required to induce TG accumulation is much higher than that to induce peroxisomal β -oxidation.

Toxicology, 184, 135-140 (2003)

Comparison of the Toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with Different Carbon Chain Length

Kohtaro Ohmori (大森耕太郎)¹, Naomi Kudo (工藤なをみ)¹, Kazunori Katayama² and Yoichi Kawashima (川嶋洋一)¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1, Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan; ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Sugitani 1630, Toyama 930-0194, Japan

Toxicokinetics was compared between perfluoroheptanoic acid (PFHA), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorononanoic acid (PFNA) and perfluorodecanoic acid (PFDA) in male and female rats. Half lives ($t_{1/2}$) in male and female rats were calculated to be 0.10 and 0.05 days, respectively, for PFHA and 5.63 and 0.08 days for PFOA, 29.5 and 2.44 days for PFNA and 39.9 and 58.6 days for PFDA. CL_{tot} of PFHA was higher than those of other perfluorocarboxylic acids (PFCAs) in both male and female rats. By contrast, CL_{tot} of PFDA was extremely low in both sexes. PFCAs having shorter carbon chain length showed higher CL_{tot} . There was a significant sex-related difference in CL_{tot} of PFOA and PFNA. Distribution volumes in steady state (V_{ss}) were not much different between PFCAs and between sexes. To estimate the role of urinary excretion in plasma clearance of PFCA, renal clearance (CL_R) was determined for PFCAs. CL_R of PFCAs were in the order of PFHA>PFOA>PFNA~PFDA and PFHA~PFOA>PDNA>PFDA in male and female rats, respectively. There was a close relationship between CL_{tot} and CL_R ($r^2=0.981$). Plasma protein binding, estimated in vitro, was over 98% for all PFCAs tested. The results indicate that CL_R is responsible for the difference in CL_{tot} between PFCAs having different carbon chain length and between sexes.

J. Health Sci., 49, 233-238 (2003)

Sex Hormone Regulation of Rat Organic Anion Transporter3 (rOAT3) Expression in Rat Kidney

Masanori Katakura (片倉賢紀), Naomi Kudo (工藤なをみ), Mari Okazaki (岡崎真理), Yasuhide Hibino (日比野康英) and Yoichi Kawashima (川嶋洋一)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1, Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

Sex-related difference in the level of rat organic anion transporter 3 (rOAT3) protein was compared in rat kidney. Immunohistochemical staining indicated that rOAT 3 was expressed in cortex, outer medulla and, to a lesser extent, in inner medulla in male and female rats. rOAT3 was localized in basolateral membrane of tubules in all sections. Essentially the same results were obtained in castrated male rats, castrated male rats that were treated with testosterone, ovariectomized female rats and ovariectomized female rats that were treated with estradiol. Western blot analysis detected both major 130-kDa and minor 64-kDa proteins in kidney homogenates. 130-kDa protein was increased in ovariectomized female rats and treatment of ovariectomized female rats with estradiol reduced to normal level. These changes were observed in cytosolic fraction but not in plasma membrane fraction. These results suggest that cellular level of rOAT3 protein is regulated by, at least in part, estradiol, but in plasma membrane where it functions rOAT3 level is not altered by sex hormones.

Biochem. Pharmacol. 65, 2583-1591 (2003)

Effects of Dehydroepiandrosterone on Oleic Acid Accumulation in Rat Liver

Koichi Imai¹, Naomi Kudo (工藤なをみ)², Matajirou Koyama¹ and Yoichi Kawashima (川嶋洋一)²

¹Department of Pharmacy, Saitama Cardiovascular and Respiratory Center, 1696 Itai, Konan, Osato, Saitama 360-0105, Japan ; ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1, Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

The rates of hepatic de novo synthesis of both fatty acid and monounsaturated fatty acid, determined by incorporation of 3H from 3H₂ into fatty acid, were increased markedly when rats were fed a diet containing 0.5% (w/w) dehydroepiandrosterone (DHEA) for 14 days. The treatment of rats with DHEA also enhanced the conversion of [14C]stearic acid into oleic acid in the liver in vivo. DHEA did not suppress fatty acid degradation in the liver. Namely, mitochondrial palmitic acid oxidation was increased approximately 5-fold while peroxisomal palmitic acid oxidation was not altered in the hepatocytes from DHEA-treated rats. The rate of hepatic VLDL secretion in DHEA-treated rats was decreased markedly. These results indicate that the elevation of the hepatic fatty acid content, especially oleic acid, by DHEA feeding is due to an increase in both de novo fatty acid synthesis and the formation of oleic acid and to a decrease in the rate of hepatic VLDL secretion. Mitochondrial and peroxisomal fatty acid degradation does not appear to play a significant role in the accumulation of hepatic lipids.

Lipids, 38, 531-537 (2003)

Regulation by Carbohydrate and clofibric acid of palmitoyl-coA chain elongation in the liver of rats.

Naomi Kudo (工藤なをみ), Tomoaki Toyama (外山智章), Atsushi Mitsumoto (光本篤史) and Yoichi Kawashima (川嶋洋一)

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1, Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan

Regulation of palmitoyl-CoA chain elongation (PCE) and its contribution to oleic acid formation was investigated in rat liver in comparison with stearoyl-CoA desaturase (SCD). Hepatic PCE activity was induced by the administration of 20% wt/vol glucose or fructose for drinking in normal rats. In streptozotocin-induced diabetic rats, the activities of both PCE and SCD were suppressed and fructose, but not glucose feeding caused an increase in the activity of both enzymes. Treatment of normal rats with clofibric acid in combination with carbohydrate further increased PCE but not SCD activity. Fatty acid analysis of hepatic lipids revealed that oleic acid (18:1(n-9)) proportion was increased upon carbohydrate administration or clofibric acid. The treatment of rats with clofibric acid in combination with carbohydrate greatly increased 18:1(n-9) proportion. Significant correlation was observed between PCE activity and hepatic proportion of 18:1(n-9) ($r^2=0.874$, $P<0.01$), while the relationship between SCD activity and 18:1(n-9) proportion was not significant ($r^2=0.552$, $P>0.05$). Taken together, carbohydrate induces PCE activity as well as SCD to increase hepatic 18:1 content in rat liver, and the increased PCE activity seems to be responsible for the further increase in 18:1(n-9) when administered with carbohydrate in combination with clofibric acid.

厚生の指標, 50, 7-13 (2003)

Age-Period-Cohort モデルによる日本人中高年の損失寿命に関する分析

小田切陽一、内田博之

【目的】日本人中高年(40~64歳)の早期死亡による損失寿命の過去35年間の推移に対する年齢、時代およびコホート(同年代出生コホート)の影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】1960年から1994年までの全死因と主要死因(悪性新生物、心疾患、脳血管疾患、不慮の事故、自殺)の5年齢階級(40~44歳から60~64歳)のYPLL率を5年ごとの7期間について男女別に算出し、コホート表を作成した。それぞれのコホート表についてベイズ型Age-Period-Cohort分析を適用することにより、3要因(年齢、時代、コホート)の効果を分離して推定し、各要因の損失寿命に与える影響について考察した。

【結果】全死因の損失寿命に対し、男性では後年生まれのコホートほど効果が減少する出生年代の影響が顕著であった。さらに50~54歳を最大とし、60~64歳で大きく低下する年齢の影響も認められた。これとは対照的に、女性では年齢やコホートの影響は小さく、むしろ時代進行に伴って一貫した減少を示した時代の影響が大きかった。死因別の分析結果では、脳血管疾患の損失寿命に対しては、男女ともに時代の影響が顕著であり、加えて、男性では1916~1925年生まれを底としたV字状のコホートの影響が認められ、このコホート効果は同じ循環器疾患である心疾患の場合と類似していた。悪性新生物では、男性において50歳代における年齢影響が大きく、また、1921-1930年生まれ以降の効果減少を特徴としたコホートの影響を認めたが、女性では、3要因の影響は明瞭でなかった。不慮の事故についても、男性でのみ、年齢と時代の影響が強く認められたほか、1926~1935年生まれをピークとしたコホートの影響も認められた。自殺では、男女に共通して、年齢効果が相対的に大きく、若齢側の影響が大きかった。加えて、男性では1980~84年をピークとした時代の影響、さらには1916~1925年生まれから1936~1945年生まれにかけての効果の増大を特徴としたコホートの影響が認められた。

【結論】ベイズ型コホート分析によって、日本人中高年の早期死亡による損失寿命の推移に対する年齢、時代および同年代出生コホートの影響が明らかにされた。とくに男性の場合、全死因の損失寿命に対してだけでなく、主要死因別の損失寿命に対しても同年代出生コホートの影響が明らかになった。一方、女性ではコホートの影響は小さく、むしろ全死因と脳血管疾患死亡の損失寿命に対する時代の影響が特徴として把握された。

J Lipid Res. 44(2):369-379(2003)

A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: relationship to anti-obesity.

Nakatani T, Kim HJ (金 賢珠) , Kaburagi Y, Yasuda K, Ezaki O

Division of Clinical Nutrition, National Institute of Health and Nutrition, 1-23-1 Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8636, Japan.

Rodents fed fish oil showed less obesity with a reduction of triglyceride synthesis in liver, relative to other dietary oils, along with a decrease of mature form of sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) and activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α). Decrease of mature SREBP-1 protein by fish oil feeding was due to either inhibition of SREBP-1 proteolytic cascade or to decrease of its mRNA. To clarify its mechanism and relation to antiobesity effect, mice were fed fish oil in a range from 10 to 60 energy percent (en%). Fish oil feeding decreased body weight and fat mass in a dose-dependent manner, in parallel with PPAR α activation and a decrease of SREBP-1 mRNA. However, compared with 0 en% fish oil feeding, 10 en% fish oil feeding decreased mature SREBP-1 protein by 50% with concomitant decrease of lipogenic genes, while precursor SREBP-1 protein rather increased by 1.3-fold. These data suggest that physiological doses of fish oil feeding effectively decrease expression of liver lipogenic enzymes by inhibiting SREBP-1 proteolytic cascade, while substantial decrease of SREBP-1 expression is observed in its pharmacological doses, and that activation of PPAR α rather than SREBP-1 decrease might be related to the antiobesity effect of fish oil feeding.

J Bone Mineral Metab., 21: 268-275 (2003).

Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice.

Xinxiang Wang^{1, 2}, Jian Wu¹, Hiroshige Chiba (千葉大成)¹, Keizo Umegaki², Kazuhiko Yamada² and Yoshiko Ishimi¹

¹Division of Food Science, National Institute of Health and Nutrition, 1-23-1 Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo, 162-8636, Japan ; ²Division of Applied Food Research, National Institute of Health and Nutrition, Tokyo, Japan

Puerariae radix (PR), the root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi, a wild creeper leguminous plant, is one of the earliest and most important crude herbs used in Chinese medicine for various medicinal purposes. PR contains a high amount of isoflavonoids such as daidzein and genistein, which are known to prevent bone loss induced by estrogen deficiency. We have demonstrated that soybean isoflavones prevent bone loss in an osteoporotic animal model. To examine the possible role of PR in bone metabolism, female mice were ovariectomized (OVX), and some OVX mice were fed a diet containing low, middle, and high doses (5%, 10%, and 20% of diet, respectively) of PR for 4 weeks. In OVX mice, the uterine weight declined, and intake of PR at any dose did not affect uterine weight. The total femoral bone mineral density (BMD) was significantly reduced by OVX, and the decrease in BMD caused by OVX was significantly inhibited by intake of the diet with the low dose of PR and completely prevented by the middle dose of PR. Histological analysis of the femoral metaphysis showed that intake of the diet with the middle dose of PR completely prevented decrease in trabecular bone volume (BV/TV) and trabecular thickness (Tb.Th) and restored the increase in trabecular separation (Tb.Sp) in OVX mice. In contrast, intake of the diet with the high dose of PR further increased BV/TV and Tb.Th and decreased Tb.Sp in OVX mice compared with that in the sham-operated mice. These results suggest that PR may represent a potential alternative medicine for hormone replacement therapy (HRT) in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women.

J Nutr 133: 1892-1897 (2003)

Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice.

Hiroshige Chiba (千葉大成)¹, Mariko Uehara², Jian Wu¹, Xinxiang Wang¹, Ritsuko Masuyama², Kazuharu Suzuki², Kazuki Kanazawa³ and Yoshiko Ishimi¹

¹Division of Food Science and Division of Applied Food Research, National Institute of Health and Nutrition, Tokyo, Japan ; ²Department of Nutritional Science, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan ; ³Department of Life Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Kobe, Japan

The purpose of this study was to examine whether hesperidin inhibits bone loss in ovariectomized mice (OVX), an animal model of postmenopausal osteoporosis. Forty 8-wk-old female ddY mice were assigned to five groups: a sham-operated group fed the control diet (AIN-93G), an OVX group fed the control diet, an OVX+HesA group fed the control diet containing 0.5 g/100 g hesperidin, and an OVX+HesB group fed the control diet containing 0.7 g/100 g γ -glucosylhesperidin and an OVX+17 β -estradiol (E2) group fed the control diet and administered 0.03 μ g E2/d with a mini-osmotic pump. After 4 wk, the mice were killed and blood, femoral, uterine and liver were sampled immediately. Hesperidin administration did not affect the uterine weight. In OVX mice, the bone mineral density of the femur was lower than in the sham group ($P < 0.05$) and this bone loss was significantly prevented by dietary hesperidin or γ -glucosylhesperidin. The Ca, P and Zn concentrations in the femur were significantly higher in the hesperidin-fed and E2 groups than in the OVX group. Histomorphometric analyses showed that the trabecular bone volume and trabecular thickness in the femoral distal metaphysis were markedly decreased ($P < 0.05$) by OVX, and γ -glucosylhesperidin significantly prevented this bone loss. Furthermore, hesperidin decreased the osteoclast number of the femoral metaphysis in OVX mice, as did E2. Serum and hepatic lipids were lower in mice that consumed the hesperidin-containing diets ($P < 0.05$) than in the OVX group fed the control diet.

These results suggest a possible role for citrus flavonoids in the prevention of lifestyle-related diseases because of their beneficial effects on bone and lipids.

J Appl Physiol 94: 335-342 (2003)

Androgen Deficiency-induced Bone Loss Can Be Prevented by the Combined Intervention of Exercise and Genistein Administration in Mice.

Jian Wu¹, Xin Xiang Wang¹, Hiroshige Chiba (千葉大成)¹, Mitsuru Higuchi², Misao Takasaki³, Atsutane Ohta³, and Yoshiko Ishimi¹

¹Division of Food Science, and ²Division of Health Promotion, National Institute of Health and Nutrition, Tokyo 162 - 8636, Japan; and ³Nutritional Science Center, Bioscience Laboratories, Meiji Seika Kaisha, Saitama 350-0298, Japan

There is evidence that estrogen plays an important role in skeletal tissue in males as well as females. We have reported that phytoestrogens, such as genistein, selectively act on bone and exhibit cooperative effects on bone mass when combined with exercise in ovariectomized mice. In this study, we examined whether both interventions exhibit cooperative effects on bone loss in androgen-deficient mice similar to those in estrogen-deficient mice. Male mice aged 7 wk were either sham operated or orchidectomized (ORX) and divided into six groups: 1) sham; 2) ORX; 3) ORX and treated with genistein (0.4 mg/day) subcutaneously; 4) ORX, exercised on a treadmill daily for 30 min/day at 12 m/min; 5) ORX, given genistein, and exercised (ORX+ExG); and 6) ORX and treated with 17-estradiol (E₂). Four weeks after the intervention, seminal vesicle weight strikingly decreased in ORX mice, and it was not affected by administration of genistein or E₂. Bone mineral density of whole femur was significantly reduced by ORX, and bone loss was prevented by the combined intervention. Histomorphometric analysis showed that bone volume and trabecular thickness in the distal femoral cancellous bone were significantly lower in the ORX group than in the Sham group, and they were completely restored in the ORX+ExG group, as in the ORX with E₂ group. These results indicate that the combined intervention of moderate exercise and a low dose of genistein administration shows an additive effect in preventing bone loss in ORX mice similar to that in ovariectomized mice.

J Epidemiology 13: 23-50 (2003)

Food and nutrient intakes assessed with dietary records for the validation study of a self-administered food frequency questionnaire in JPHC Study Cohort I.

Sasaki, S., Takahashi, T., Itoi, Y., Iwase (岩瀬靖彦), Y., Kobayashi, M., Ishihara, J., Akabane, M., Tsugane, S.

Epidemiology and Biostatistics Division, National Cancer Center Research Institute East, Kashiwa, Chiba, Japan.

We present here the survey methods and basic results of dietary records which were used as reference values in the present validation study of a self-administered food frequency questionnaire (FFQ) for the 5-year follow-up survey of the JPHC study. A semi-weighed dietary record was kept for four seven consecutive days in each of the four seasons in 3 areas, i.e., Iwate, Akita, and Nagano, and for seven consecutive days in both winter and summer in Okinawa. The mean intakes were significantly different between areas for some nutrients and food groups. A significant seasonal difference in the mean intakes was also observed in some nutrients such as carotene and vitamin C, and in some food groups such as potatoes, vegetables, and fruits in both sexes, and alcoholic beverages in men and milks in women.

平成 12 年度学長所管

研究テーマ

「胃潰瘍原因菌：*Helicobacter pylori* のラットへの感染に関する基礎的検討、並びに抗菌物質の探索」

薬学部薬理学教室：谷 覺 (Satoru TANI)

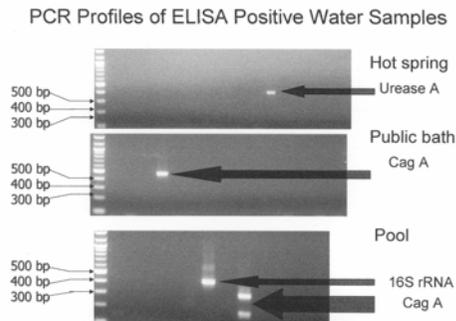
白瀧研究室：白瀧 義明 (Yoshiaki SHIRATAKI)

臨床薬物化学教室：河瀬 雅美 (Masami KAWASE)

現在、消化性潰瘍の 2 大リスクファクターは、*Helicobacter pylori* (以下 *H.pylori* と略す) が、この菌の感染と非ステロイド性抗炎症薬の服用であると考えられている。多くの消化性潰瘍が「感染症」として把握され、従来、いったん治癒しても 2、3 年以内に再発するといわれていたが、*H.pylori* の除菌によって再発さえも防止できるようになった。さらに *H.pylori* は国際がん研究機関 (IARH) により胃癌の第一特定発癌物質に認定されている。*H.pylori* の感染率は社会的かつ経済的な状態、衛生環境、年齢やライフスタイルと密接に関連することが示唆されている。すなわち、感染源と感染経路の解明は消化性潰瘍の予防や再感染防止に極めて重要であると言える。

1. 自然環境中の *H.pylori* の存在

環境中のどこに *H.pylori* が見出されるのかを検討した。対象として、河川、銭湯、プールを選び、水を採取後ごみを除き、メンブランフィルターで菌を捕捉し、*H.pylori* の抗体を用いた ELISA で検出したところ、全ての検体からの存在を示す反応が得られた。しかし、*H.pylori* はグラム陰性菌であることから、環境中には大腸菌など細胞壁成分の類似した菌の存在が考えられることから、PCR による菌の確認を行った。結果を下図に示すが、*H.pylori* の特徴ある遺伝子産物であるウレアーゼ、リボゾーム、カグ A、バック A 等の遺伝子産物が検出される場合もあったが、全てを持つ菌は存在せず、同じ遺伝子産物を産生する異なった菌であろうと推定された。



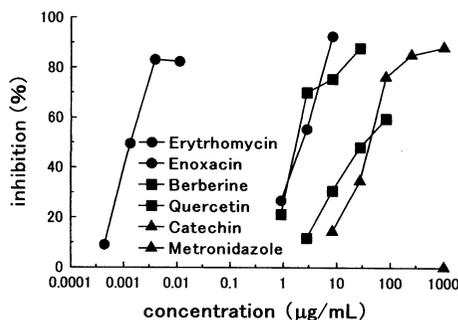
今回の結果からは、環境中には *H.pylori* は存在しないと考えられるが、発展途上国や環境が劣悪な場所で感染が起こることから、河川などに *H.pylori* が存在しないと考えるのは難しい。検討を行った場所は限られ例数も少ないことから、今回は、環境中に *H.pylori* がいないという結論には至らず、更に検討が必要である。

2. 種々化合物の *H.pylori* に対する抗菌活性

次に、除菌の問題点について検討した。除菌に用いられている clarithromycin, amoxicillin や metronidazole は消化性潰瘍以外の病気の治療にも広く用いられており、単独投与された場合、副次的に *H.pylori* に耐性菌を生じる可能性があり消化性潰瘍の除菌率の低下、それに伴う副作用の増加等の問題につながるおそれがある。そこで新規抗菌薬の検討を行った。

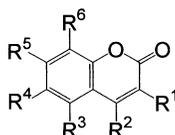
まず、現在用いられている抗菌薬の中でもっとも活性が弱い metronidazole を標準物質として、抗菌薬、天然由来の化合物を検討し、少なくとも metronidazole より有効、もしくはそれに近い活性をもつ化合物を調べた。その結果、抗菌薬としてはニューキノロン系のエノキサシンと植物由来のベルベリン、クエルセチン及びカテキンに有効性が認められた。

Anti-*H.pylori* Activities of Erythromycin, Enoxacin, Berberin, Quercetin and Catechin



更に新規抗菌薬を検討したところ、天然由来化合物より抗 *H.pylori* 活性をもつ化合物のうち、クマリン骨格を持つものに関しても幾つか化合物が見つかった。それらの化合物を次の表に示した。

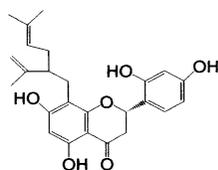
Anti-*H.pylori* Activities of Coumarins



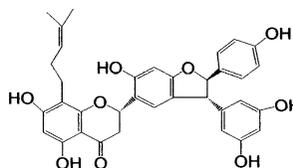
R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	MIC ₅₀ (µg/mL)
H	CH ₃	H	H	OH	H	28.3
H	CH ₃	H	OH	OH	H	23.0
H	CH ₃	H	OH	OCH ₃	H	32.6
-(CH ₂) ₃ -		OH	H	OH	H	28.0

更に、生薬成分として *Sophora* 属の *Sophora tomentosa* や *Sophora moorcroftiana* から得られた sophoraflavanone H, sophoraflavanone I, sophoraflavanone G に活性が見出された。

Anti-*H.pylori* Activities of Flavanones



Sophoraflavanone G



Sophoraflavanone H

Compound	MIC ₅₀ (µg/mL)
Sophoraflavanone G	6.15
Sophoraflavanone H	64

以上、様々な化合物に抗菌活性があることが判明した。今後更に多くの化合物を検討し、活性の強い化合物を見出していききたい。また、これら化合物の *in vitro* の結果を基に *in vivo* においても抗菌性を発揮できるかどうかを検討していききたい。

3. 感染経路に関する研究

次に妊娠しているスナネズミを用いて母子感染を検討したところ、*H.pylori* 感染が確認された。ケージ内の環境から考えると、この母子感染は糞便を介した経口感染であろうと推測された。しかし、成獣同士の感染は確認できなかった。母子感染に関しても得られたコロニーの数が少なく、断定するまでには至らなかった。

結語

以上の結果から、ヒトへの感染を考えたときに環境中において *H.pylori* の存在が確認できれば感染経路が特定できるのではないかと考え、環境中の *H.pylori* による汚染を検討した。河川、プール、風呂などからは交差反応をする菌の存在は確認されたが、PCR では *H.pylori* の存在は確認できなかった。今後は環境以外の他の感染経路、即ち、ローロの感染経路についても検討していききたい。

さらに *H.pylori* 除菌法の検討をしているが、現在、*H.pylori* を直接殺菌するために抗菌薬をいかに胃内に長く存在させることができるのかを検討している。そうすることによって、低用量の抗菌薬によって除菌でき、副作用の軽減を図ることができると考えられる。

平成14年度学長所管研究奨励金交付に伴う研究

研究課題 食品成分中のポリアミンによる腸管吸収の修飾

細胞生理化学講座 杉田 義昭 (Yoshiaki Sugita)

[緒言]

多くの脊椎動物では、腸の成熟は出生後、初期の週で起こることが知られている。この成熟は生物にとって新しい環境、特に新しい食物成分やアレルゲンに対する適応のための本質的（必須）なものである。乳児ラットに対するポリアミン経口投与は、幼児ラットと比較して腸粘膜における構造的、生化学的変化（種々の消化酵素活性の変化など）を引き起こすことが示され、ポリアミンが消化管の正常な発育において重要であることが示唆されている¹⁻³⁾。また、ポリアミンは豚の成熟を促し、豚酵素（トリプシン、キモトリプシンおよび α -アミラーゼ）の酵素活性を向上させることが知られており⁴⁾、ヒトにおいては、ポリアミンが食物アレルギーの予防に何らかの役割を果たしているのではないかと考えられている⁵⁾。

一方、ポリアミンは、授乳期での腸の成熟を促すのに加え、成熟期においても薬物やストレスによって引き起こされる消化管粘膜傷害の予防および修復に関わっていることが示唆されている⁶⁻⁸⁾。よって腸管腔内ポリアミンが、薬物やストレスでの粘膜傷害による消化不良および吸収異常（トランスポーター機能阻害による吸収不良、腸のバリア機能傷害での過剰吸収）を修復する可能性は高い。

ポリアミン（スペルミジン、スペルミン）は、真核細胞において細胞の増殖や分化過程に関わる増殖因子として作用する生体内物質あり、多くの生物材料食品に多量に存在している。したがって食物由来のポリアミンが消化管での消化・吸収を修飾している可能性は高いと考えられる。スペルミン、スペルミジンおよびスペルミジンの前駆体であるブトレシンは、メチレン鎖3個あるいは4個を単位とする極めて単純な構造をしており、細胞内の生理的条件下では、すべての窒素がイオン化したカチオン性物質である（図1）。

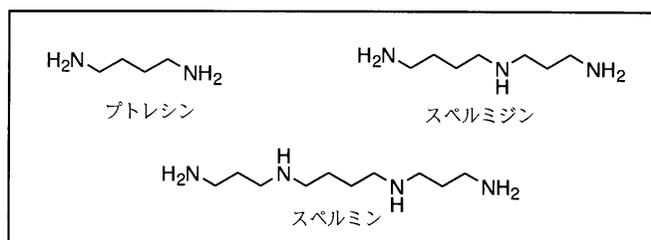


図1 ブトレシンおよびポリアミンの構造

消化管粘膜を介する物質透過は、上皮細胞層の構造および機能により制御されており、水溶性や高分子薬物にとっては、この上皮細胞層を介する透過が吸収の律速段階となっている。とくに腸管腔表面に面する吸収上皮細胞の刷子縁膜および上皮細胞間の接着部〔tight junction (TJ)〕が最大の透過障壁となっている。近年、カチオン性多糖類であるキトサンの誘導体が、水溶性物質の吸収性を著しく促進すると報告されている⁹⁾。さらに、カチオン性ポリマーのポリ-L-アルギニンが水溶性高分子物質の粘膜吸収を増加させるという報告もある¹⁰⁾。このように、カチオン性物質が薬物の吸収を促進する可能性は十分考えられる。

本研究は、食品成分の一つとして広範囲にかつ多量に存在するポリアミンに着目し、食品成分が薬物、アレルギー抗原等の消化管粘膜の吸収に影響を与える可能性を探る研究の一環として、ポリアミンによる水溶性高分子物質の腸上皮細胞に対する透過の影響を詳細に検討することを目的とする。

[方法・結果]

ポリアミン共存下による水溶性高分子物質の腸管吸収実験

In situ closed loop 法を用いて、ラット小腸におけるポリアミン共存下での水溶性高分子物質の膜透過実験を検討した。水溶性膜非透過性分子として fluorescein isothiocyanate dextran (分子量 4.4 kDa, FD-4) を用いた。loop 法は、ラット空腸部に 10 cm のループを作成した。ループ内に薬物を投与後、血液サンプルを頸静脈より経時的に採血し、遠心分離後、血漿サンプル中の FD-4 の蛍光強度を蛍光分光光度計により測定した。また上記実験と並立して、*in vivo* の実験系での腸管吸収実験を検討した。その結果、loop 法での FD-4 とスペルミンの同時投与は、FD-4 単独 (コントロール) に比べて顕著な FD-4 の血中濃度の上昇がみられた。ポリアミンとしてスペルミジンおよびその前駆体であるプトレシンについて同様な吸収実験を検討したところ、スペルミジンにはスペルミンと同様、FD-4 の血中濃度の上昇がみられたが、プトレシンでは吸収促進効果がみられなかった。スペルミンと FD-4 の経口投与による *in vivo* 実験系での腸管吸収実験では、コントロール (スペルミン溶液のかわりに生理食塩液を経口投与) に比べて有意差はないものの若干の FD-4 の血中濃度の上昇がみられた。

[考察]

本研究の結果、作用発現機構は明らかではないが、ポリアミンが水溶性高分子薬物の腸管吸収に対して影響を与えることが確認された。

一般的に成人は、一日の典型的な食事からポリアミンを数百 μmol 摂取しているとされている。ポリアミンを多量に含有する食事直後に、小腸上部の腸管内ポリアミン濃度が、局所的に mM レベルに達することもありうるであろう。本実験は、食品由来のスペルミンが腸管での吸収に対して影響を与える可能性を示唆するものであり、ポリアミンの過剰摂取が腸管のバリア機能を変化させ、健康状態に影響を与える可能性も十分に考えられるであろう。ポリアミンによる腸管での消化・吸収に対する

影響は、不明な点が多い。今後、同手法による低濃度でのポリアミンの効果および他の水溶性薬物に対する腸管吸収への影響を検討するとともに、*in vitro* の実験系での評価として、ラット摘出小腸上皮および細胞を用いての膜透過実験を行い、さらなるポリアミンの腸管吸収に対する影響を検討する予定である。

[謝辞]

本研究は、平成 14 年度学長所管研究奨励金を用いおこなわれました。ここに感謝いたします。

[参考文献]

- 1) E. Harada, Y. Hashimoto and B. Syuto, *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A, 667-673 (1994).
- 2) J.C.A. ter Steege, W. A. Buurman and P.-P. Forget, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 25, 332-340 (1997).
- 3) K. Shimizu, S. Mushiake, N. Yoshimura, T. Harada and S. Okada, *Cell. Biol. Int.*, 17, 543-546 (1993).
- 4) N. Romain, M. S. Gesell, O. Leroy, P. Forget, G. Dandrifosse and G.D. Luk, *Comp. Biochem. Physiol. A*, 120, 379-384 (1998).
- 5) G. Dandrifosse, O. Peulen, N. El Khefif, P. Deloyer, A.C. Dandrifosse and C. Grandfils, *Proc. Nutr. Soc.*, 59, 81-86 (2000).
- 6) J.-Y. Wang and L.R. Johnson, *Am. J. Physiol.*, 259, G584-G592 (1990).
- 7) C. Kummuerlen, N. Seiler, M. Galluser, F. Gosse, B. Knodgen, M. Hasselmann and F. Raul, *Digestion*, 55, 168-174 (1994).
- 8) J.-Y. Wang and L.R. Johnson, *Gastroenterology*, 102, 1109-1117 (1992).
- 9) N.G.M. Schipper, K.M. Varum and P. Artursson, *Pharm. Res.*, 13, 1686-1692 (1996).
- 10) M. Miyamoto, H. Natsume, S. Iwata, K. Ohtake, M. Yamaguchi, D. Kobayashi, K. Sugibayashi, M. Yamashina and Y. Morimoto, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 52, 21-30 (2001).

研究題目 イオントフォレシスによる抗白内障薬ジスルフィラムの眼組織送達に関する研究

病院薬剤学講座 上田秀雄 (Hideo Ueda)

【緒言】

白内障は、老化による代謝異常と外的要因によって水晶体タンパク質が水溶性を失い、水晶体が混濁し視力を失う眼疾患であり、高齢人口の増加に伴う今後の患者数の増加が予想される。現在、白内障治療として重症の場合には外科的療法が行われ、比較的軽度の場合には水晶体タンパク質代謝を改善する薬物の点眼及び内服が行われている。しかしながら、眼球内部と外界とを隔てる角膜や結膜のバリア能が高く、¹⁾ また点眼した薬液の多くは鼻涙管や頬を伝って流れ出てしまうため、²⁾ 水晶体のような眼球内部の組織に効率的に薬物を送達できているわけではない。また、内服で用いる場合には、全身レベルでの副作用の発現が懸念される。このような現状を考慮すると、より効率的な投与方法の開発が望まれる。結膜や角膜を介して電氣的に薬物を送達する方法 (イオントフォレシス) は、抗生物質や抗ウイルス薬の眼組織送達を改善し、眼組織感染症に対する有用性が認められており、³⁻⁶⁾ 他の眼疾患に対する応用も期待されている。

アルデヒドデヒドロゲナーゼ阻害剤であるジスルフィラム (DSF) は、点眼適用において亜セレン酸惹起白内障モデルラットにおける白内障の発生を抑制することが報告され、抗白内障薬としての有用性が報告されている。⁷⁾ DSFによる抗白内障効果は、DSFの眼粘膜透過過程で生成する活性代謝物ジエチルジチオカルバミン酸 (DDC) による活性酸素の捕捉によるものと考えられている。一方、DSFは水への溶解度が低く、水溶液としての適用には適さないため、シクロデキストリンを用いた可溶性 (包接化) した製剤⁸⁾ やリポソームに封入した製剤⁹⁾ の調製が試みられている。本研究では、白内障治療のためのイオントフォレシス法の確立を目標とし、DSFの家兎結膜透過性に対するイオントフォレシスの効果を試験した。また、シクロデキストリン包接化合物のような製剤を想定し、FITC-ラベルしたデキストランを用いイオントフォレシスの効果を見積もった。さらに、イオントフォレシスの安全性を簡便に評価するために、イオン輸送能を指標として結膜の生理機能評価を試みた。

【方法】

試薬 ジスルフィラム (DSF) 及びジエチルジチオカルバミン酸 (DDC) は和光純薬 (株) より購入した。Fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (平均分子量 4,400、FD-4)、8-bromoadenosine-3,5-cyclic monophosphate (8Br-cAMP)、およびforskolinはSigma Chemical Co., Ltd (St Louis, MO, USA) より購入した。Adenosine triphosphate (ATP)はResearch Biochemicals International (Navik, MA, USA)より購入した。その他の試薬は市販特級品またはHPLC用試薬を用いた。

実験動物 雄性日本白色種家兔（体重 2.5～3.0 kg）は、東京実験動物（株）より購入した。

緩衝液の調製 すべての実験にbicarbonated Ringer's solution (BRS、pH 7.4) を用いた。BRS は、111.5 mM NaCl、4.8 mM KCl、0.75 mM NaH_2PO_4 、29.2 mM NaHCO_3 、1.04 mM CaCl_2 、0.74 mM MgCl_2 、及び 5 mM glucoseからなる。

DSF 溶解度の測定 BRS 10 mL に DSF を懸濁して 37°C で攪拌した。36 時間後、懸濁液をメンブレンフィルター (0.45 μm) で濾過し、濾液中の DSF 濃度を HPLC にて測定した。

In vitro 結膜イオントフォレシス透過試験 Kompella らの方法 10) に従い結膜を摘出し Ussing 型チャンパー (有効拡散面積: 0.44 cm^2) に挟み、粘膜及び漿膜側を BRS で満たした。両側の液を攪拌し、また pH を 7.4 に保つために 5% O_2 /95% CO_2 でバブリングした。2 組の銀/塩化銀電極をチャンパーに挿入し、それぞれの電極は膜電位測定装置 (日本光電) に接続した。膜の近傍に挿入した銀/塩化銀電極の組合せを介して膜電位を測定し、膜から離れた位置に挿入した銀/塩化銀電極の組合せを電流適用に用いた。膜の電気生理学的パラメータ (膜電位 (PD)、短絡電流 (Isc)、及び抵抗値 (TEER)) が一定となった時点で、粘膜側を 0.1% DSF 懸濁液または 0.5% FD-4 溶液 (いずれも BRS で調製) と交換し、透過実験を開始した。経時的に漿膜側から 500 μL ずつ採取し、サンプル中の DSF 及び DDC は HPLC 法、FD-4 は蛍光分光光度法により定量した。

イオントフォレシス実験は、透過実験開始後 2 または 3 時間後から 30 分間、0.425 または 0.85 mA/cm^2 の定電流 (直流電流) を適用することにより行った。

薬物の定量 DSF 及び DDC は HPLC 法により定量した。採取したサンプル 200 μL に内標準物質のアセトニトリル溶液 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DSF に対して p-ヒドロキシ安息香酸アミル、DDC に対して p-ヒドロキシ安息香酸ヘキシル) 200 μL を混合し、定量用サンプルとした。HPLC 装置には LC-10AD (島津製作所) を使用し、カラムには Mightysil RP-18 50-2.0 (3 μm 、関東化学) を用いた。検出波長は 215 nm (UV)、移動相 (0.1% TFA:アセトニトリル、60:40) の流速は 0.5 mL/min 、温度は 50°C とした。

FD-4 は蛍光分光光度法により定量した。採取したサンプル 100 μL をホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で希釈し、蛍光分光光度計 (RF-5000、島津製作所) を用い、励起波長 495 nm、測定波長 515 nm で検出した。

電気生理学的手法による安全性の評価 上述のように家兔摘出結膜を Ussing 型チャンパーに挟み、電気生理学的パラメータが安定した時点から 30 分間、0.85 mA/cm^2 の定電流を適用した。電流適用中止 90 分後、粘膜側に能動的 Cl^- イオン分泌 modulator として 8Br-cAMP (0.5 mM)、forskolin (1.5 μM)、または ATP (0.5 mM) を添加し、添加後の Isc をモニターした。これら modulator 添加前後の Isc

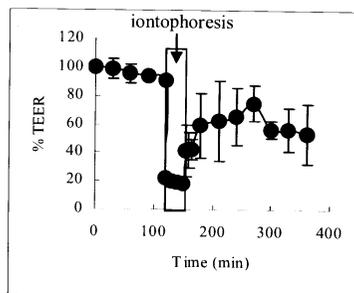


Fig. 2 Effect of iontophoresis at 0.85 mA/cm² on the conjunctival TEER.

2. FD-4 の結膜透過に対するイオントフォレシスの効果

我々の以前の検討において、粘膜側を陽極としてイオントフォレシスを適用したとき、電気浸透流の効果により D-マンニトールの結膜透過性が著しく増大することが観察された (unpublished data)。このことは、イオントフォレシスが溶液中で電荷をもたない化合物の透過促進に対しても有用であることを示唆している。一方、DSF を可溶化し安定性の向上をはかるために、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを用いた製剤化が検討されている。8) ヒドロキシβ-シクロデキストリンは溶液中で電荷をもたない比較的高分子量の化合物であるが、このような化合物の結膜におけるイオントフォレシスの効果は十分に特徴づけられていない。そこで、モデル高分子化合物として FITC ラベルしたデキストラン (平均分子量 4,400) を用い、結膜透過に対するイオントフォレシスの効果を試験した。

Fig. 3 は、粘膜側を陽極 (●, anodal iontophoresis) 及び陰極 (○, cathodal iontophoresis) としたときの FD-4 の結膜透過速度の経時変化を示している。Anodal iontophoresis を適用したとき、FD-4 の透過速度はイオントフォレシス適用時にのみ増大し、適用後には低下した。一方、cathodal iontophoresis を適用したときには透過速度の増大は認められるものの、粘膜側を陽極としたときとは明らかに異なる透過増大パターンを示した。これは、生体膜表面は生理的条件下で負電荷をもつため、12) 電流適用時に陽極から陰極方向に生じる電気浸透流により粘膜側に適用したデキストランが漿膜側に運ばれたものと考えられた。以上の結果から、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンのような包接化合物を用いた場合にも、イオントフォレシスによる薬物送達が可能になるものと考えられた。

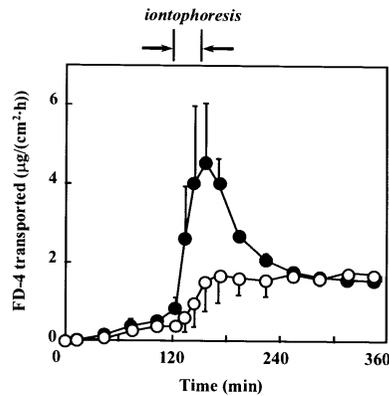


Fig. 3 Time courses of FD-4 fluxes across the conjunctiva induced by anodal (●) or cathodal (○) iontophoresis at 0.85 mA/cm² for 30 min.

3. イオン輸送能を指標とした安全性評価

Fig. 2 から推測されるように、イオントフォレシスの適用は結膜の integrity、すなわち膜構造には明らかな障害を与えないものと考えられる。しかしながら、上皮粘膜は生きた細胞層からなり、イオントフォレシス適用により機能的な障害を受けることも考えられる。そこで、結膜において能動的イオン輸送を modulate することが明らかとなっている化合物を添加し、その活性 (Isc) をモニターすることにより結膜の生理機能に対するイオントフォレシスの影響を評価した。

家兔結膜は、baselineで約 15 μ A/cm² (粘膜側が陰性) のIscを示し、この約 20%は粘膜側からの Na⁺イオンの吸収、80%は粘膜側への Cl⁻イオンの分泌により賄われている。10) 家兔結膜には Cl⁻イオンを粘膜側へ分泌するチャンネルとして PKA 感受性、PKC 感受性、および Ca²⁺ 感受性 Cl⁻チャンネルが存在していることが知られ、¹³⁾ これらチャンネルの modulator を添加することにより Cl⁻イオンの分泌が増大する。さらに、結膜の粘膜側には細胞膜には P2Y₂ 受容体が存在することが明らかとなっており、細胞外の ATP や UTP の存在により PKC および Ca²⁺ 感受性 Cl⁻分泌が増大することも知られている。¹⁴⁾ そこで、これら能動的な Cl⁻分泌の活性化能を指標として、イオントフォレシスがこれらの機能に影響するかどうかについて検討した。PKA 感受性 Cl⁻チャンネルに対する modulator として 8Br-cAMP および forskolin、PKC および Ca²⁺ 感受性 Cl⁻チャンネルに対する modulator として ATP を用いた。

Fig. 4 は、0.85 mA/cm² の定電流で 30 分間、anodal iontophoresis または cathodal iontophoresis 適用後に各 modulator を添加したときの Δ Isc を比較したものである。いずれの場合にもコントロールと有意差は認められず、電流適用後も Cl⁻分泌能は正常なレベルに保たれているものと考えられた。これらの結果から、0.85 mA/cm²、30 分までの適用電流は結膜の生理機能に対して明らかな影響を与えず、イオントフォレシスは眼組織に対する非侵襲的な薬物投与方法として有用であると思われた。

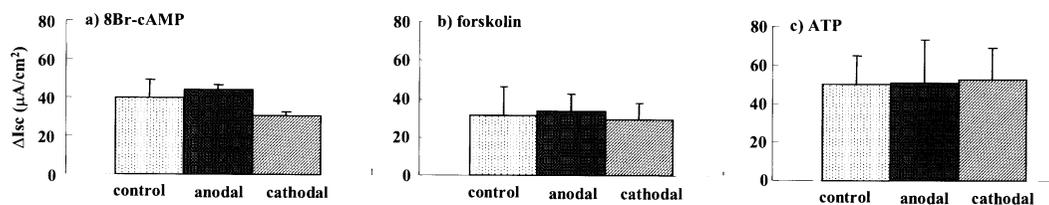


Fig. 4 Comparison of ΔI_{sc} induced by 0.5 mM 8Br-cAMP, 1.5 mM forskolin, and 0.5 mM ATP. In the iontophoresis experiments, constant current at 0.85 mA/cm² was applied for 30 min.

【まとめ】

本研究の結果から、イオントフォレシスにより抗白内障薬ジスルフィラムの結膜透過性を増大することが可能であることが明らかとなった。イオントフォレシス適用後の TEER および種々 modulator により誘導される I_{sc} の比較から、イオントフォレシスは結膜に対して明らかな障害を引き起こさないものと考えられ、眼組織に対する非侵襲的な薬物送達法として有用であることが示唆された。さらに、デキストランのような生理的条件下で電荷をもたない比較的高分子量の化合物の透過促進法としても有用であることが明らかとなり、その応用範囲は広いものと考えられた。しかしながら、ジスルフィラムのような、膜透過過程で代謝を受ける薬物については、親薬物と代謝物の透過過程についてさらに詳細な検討を加えることが必要であるものと考えられる。

【参考文献】

1. Acheampong, A.A. *et al.*, Drug Metab Dispos. 30:421-429 (2002).
2. Ikeda, H. *et al.*, Jpn.J.Hosp.Pharm. 24:596-600 (1998).
3. Yoshizumi, M.O. *et al.*, Am.J.Ophthalmol. 122:86-90 (1996).
4. Grossman, R.E. *et al.*, Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 31:909-916 (1990).
5. Rootman, D.S. *et al.*, Arch.Ophthalmol. 106:262-265 (1988).
6. Hobden, J.A. *et al.*, Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 31:1940-1944 (1990).
7. Ito, Y. *et al.*, Curr.Eye Res. 18:292-299 (1999).
8. 伊藤吉将ほか、日本薬学会 121 年会要旨集 3, p. 125 (2001).
9. Ito, Y. *et al.*, Biol.Pharm.Bull. 23:327-333 (2000).
10. Kompella, U.B. *et al.*, Curr.Eye Res. 12:1041-1048 (1993).
11. Nabekura, T. *et al.*, Biol.Pharm.Bull. 23:616-620 (2000).
12. Riviere, J.E. and Heit, M.C., Pharm.Res. 14, 687-697 (1997).

13. Shiue, M.H.I. *et al.*, *Exp. Eye Res.* 66:275-282 (1998).
14. Hosoya, K. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291:53-59 (1999).

口頭発表及びシンポジウム

日本薬学会（第123回）、長崎、2003年3月

- ・ [5]ヘリセンをプローブとして用いた種々のPCベシクルのゲル相と液晶相のキラル認識能の検討
中川弘子、林野守将、山田紘一
要旨集3 p.12
- ・ CT相互作用による両親媒性ヘリセンのキラリティー逆転現象へのミセル効果
増岡雄一、中川弘子、山田紘一
要旨集3 p.12
- ・ ハイドロキノン誘導体の合成研究、
渡部享子、尾崎裕、金相元
要旨集-2 P.60
- ・ *N*-Acylaminophthalimide類の高原子価ヨウ素化合物による分子内閉環反応
椎屋 恵、坂本武史、宮沢悦子、菊川靖雄
要旨集2 p.10
- ・ *Para*-Halogenophenyl-*N*-methoxyamide類の分子内閉環反応によるSpirodienone類の合成
宮沢悦子、坂本武史、菊川靖雄
要旨集2 p.10
- ・ Picoline-boraneを用いるAldehyde及びKetone類のOne-Pot Reductive
Amination
佐藤晋也、坂本武史、宮沢悦子、菊川靖雄
要旨集2 p.95
- ・ 3-Formylchromoneの反応（2）
小川竜也、杉田義昭、熊田稚子、松本俊介、横江一朗
要旨集2 P.79

- 2-メチレン 1, 3-ジカルボニル化合物の相関移動触媒によるエポキシ化
川又晶子、山内昌茂
要旨集Ⅱ p 20
- Lewis 酸触媒下におけるスチレン誘導体の反応 (3)
浅井雄太、杉田義昭、熊田稚子、横江一郎
要旨集 2 P.58
- チロシナーゼ阻害作用を有するフェノール類の合成 (4)
熊田稚子、吉橋信人、中野文子、山本勝美、杉田義昭、横江一郎、
(小川香料)佐久間克也
要旨集 2 P.58
- ヘテロスピロスタノール誘導体の合成とその薬理作用
全洪吉、小柳順一、(大鵬製薬)大森弘一、(関西大)上里新一、(関西大)土戸哲明、齋藤節生
要旨集 2 p.124
- アクロレインとスペルミジンの反応生成物について
新津 勝、大谷武司、鮫島啓二郎
要旨集 3 p. 63
- 安定同位体標識脱炭酸化 S-アデノシルメチオニンの合成と応用
小林正樹、渡邊寿子、鮫島啓二郎、合田ひとみ、新津 勝
要旨集 3 p.48
- プトレシン結合部位を目指したスペルミジン合成酵素阻害剤のデザインと合成
渡邊寿子、合田ひとみ、鮫島啓二郎、和田牧子、白幡 晶、長野晃三
要旨集 3 p.80
- 不死化ヒト胎盤絨毛細胞のペルオキシソーム酵素活性とホルモン産生に対する WY-14643 の作用に
ついて
森田美江子、橋本フミ恵、田中和香子、(埼玉医大総合医療センター産婦人科)松岡菊美、(埼玉医
大総合医療センター産婦人科)竹田 省、林 秀徳
要旨集 3 p. 124

- ・ 獨協医科大学病院における降圧薬の使用状況とその傾向分析
森田美江子、(獨協医大病院薬) 岩瀬利康、(獨協医大病院薬) 永井浩子、(獨協医大病院薬) 碓井幸則、(獨協医大病院薬) 越川千秋、(獨協医大病院循環器内科) 南順一、(獨協医大病院循環器内科) 石光俊彦、(獨協医大病院循環器内科) 松岡博昭、橋本フミ恵、林 秀徳
要旨集 4 p.112

- ・ 「HbA1C チャート」を利用した薬剤管理指導業務
金谷直紀、(社会保険大宮総合病院) 蜂谷正博、(社会保険大宮総合病院) 山崎眞一、塩田泰生、橋本フミ恵、林 秀徳
要旨集 4 p.144

- ・ 沖縄県における横紋筋融解症を起こす可能性のある薬剤の処方箋発行実態調査
翁長真一郎、(琉球大病院薬) 芳原準男、(琉球大病院薬) 池村政次郎、(琉球大病院薬) 平良智子、(薬研うえはら) 上原正徳、橋本フミ恵、林 秀徳
要旨集 4 p.158

- ・ ポリプロピレングリコールを分散媒として用いた水溶性高分子微粒子の調製法 (3)
加藤健司、相場大樹、(埼玉医大総合医療センター) 篠原克典、(埼玉医大総合医療センター) 木村昌行、(北海道薬大) 関 俊暢、(北海道薬大) 森本一洋、夏目秀視、從二和彦、森本雍憲
要旨集 4 p. 76

- ・ Whey protein およびその成分の薬物消化管吸収に与える影響の評価
加藤奈穂子、相場大樹、(北海道薬大) 関 俊暢、(北海道薬大) 森本一洋、從二和彦
要旨集 4 p. 101

- ・ 大学院病院実習における小課題報告の集計と評価
沼尻幸彦、上田秀雄、小林大介、森本雍憲
要旨集 3 p. 220

- ・ メフェナム酸-アミン複合体とEI系を用いた経皮吸収促進
小林大介、方亮、沼尻幸彦、森本雍憲
要旨集 4 p. 106

- ・電気生理学的手法による結膜イオントフォレシスの安全性の評価
向後徹生、金田洋昌、上田秀雄、森本雍憲
要旨集 3 p. 19
- ・外来患者の保険薬局選択様式
土田さおり、(済生会栗橋病院薬) 北原智英、(済生会栗橋病院薬) 嶋村正則、(済生会栗橋病院薬)
片山晃、小林大介、森本雍憲
要旨集 4 p. 154
- ・大規模母集団による降圧剤処方実態の調査と米国との比較
(株式会社あさひ調剤) 川崎祐司、(株式会社あさひ調剤) 中山恵、(株式会社あさひ調剤) 久津間信
明、上田秀雄、沼尻幸彦、小林大介、森本雍憲
要旨集 4 p. 112
- ・副作用情報提供支援プログラムの構築
(東日本メディコム株式会社) 遠藤敏成、(株式会社あさひ調剤薬局) 久津間信明、小林大介、沼
尻幸彦、上田秀雄、駒田富佐夫、齋藤侑也、森本雍憲
要旨集 4 p. 138
- ・非オーダーリングシステムにおける面分業への取り組み
(済生会栗橋病院薬) 嶋村正則、土田さおり、(済生会栗橋病院薬) 北原智英、(済生会栗橋病院薬)
片山晃
要旨集 4 p. 118
- ・皮下固形癌への薬物送達に及ぼす投与部位の影響 2
國松加奈子、吉田大介、長谷川哲也、杉林堅次
要旨集 4 p 66
- ・Iontophoresis 及び electroporation の経皮吸収促進作用に及ぼす electroosmosis
と皮膚表面荷電の影響
香取久美、長谷川哲也、杉林堅次
要旨集 4 p 104

- ・アルカリ還元水を用いた界面活性剤フリーエマルジョンの調製およびその有用性の検討. 2
中山寛之、代永恵、長谷川哲也、(明治薬大) 石井文由、杉林堅次
要旨集 4 p 105
- ・頻脈性不整脈患者におけるフレカイニド遊離型血中濃度の測定
香取久美、(筑波大臨床医学系) 本間真人、(筑波大臨床医学系) 久賀圭祐、(筑波大臨床医学系)
山口 巖、杉林堅次、(筑波大臨床医学系) 幸田幸直
要旨集 4 p 131
- ・デュロテップ[®]パッチ繰り返し適用時の血清中フェンタニル濃度挙動の予測
中山寛之、長谷川哲也、(癌研病院薬) 森川明信、杉林堅次
要旨集 4 p 131
- ・5 つの主要体内動態パラメータの活用とインタビューフォームからの調査
中川清世、長谷川哲也、杉林堅次、(埼玉医科大学総合医療センター薬) 木村昌行、(明治薬大) 緒
方宏泰
要旨集 4 p 133
- ・皮膚を介したペプチドデリバリーの現状と課題
Present status and issues for delivering therapeutic peptides through skin
杉林 堅次
要旨集 1 p 131
- ・ラット腎臓におけるペルフルオロオクタン酸の排泄機構の検討
片倉賢紀、工藤なをみ、川嶋洋一
要旨集 3 p189
- ・糖による脂肪酸伸長酵素と脂肪酸不飽和化酵素誘導に対するクロフィブリン酸の影響
外山智章、田代美由樹、工藤なをみ、川嶋洋一
要旨集 3 p78
- ・鎖長の異なるフッ素化脂肪酸の体内動態の比較検討
山田優樹、工藤なをみ、川嶋洋一
要旨集 3 p189

- ・マウスにおけるペルフルオロアルキルテロマーアルコールからのペルフルオロオクタン酸の生成
岩瀬由布子、工藤なをみ、川嶋洋一
要旨集 3 p189
- ・ペルフルオロオクタン酸の胆汁排泄の性差の検討
酒井絢子、工藤なをみ、川嶋洋一
要旨集 3 p 189
- ・ペルフルオロオクタン酸の尿排泄に対するクロフィブリン酸の影響
根岸裕一、工藤なをみ、川嶋洋一
要旨集 3 p 189
- ・糖尿病モデルラットにおける肝オレイン酸の合成活性とデヒドロエピアンドロステロンの影響
今井浩一、工藤なをみ、川嶋洋一
要旨集 3 p 79
- ・ラット胃粘膜培養細胞を用いた種々薬物の障害作用の検討
松田一希、田中 享、谷 覺
要旨集 p.36
- ・初代培養肝実質細胞の MAP キナーゼ活性に対するアドレナリン作動性調節機構の検討
木村光利、荻原政彦
要旨集 4 P.27
- ・医薬品情報の代価に関するアンケート調査、
金子紗弓、駒田富佐夫、齋藤侑也、(埼玉県薬剤師会) 大野俊、(埼玉県薬剤師会) 小嶋富雄、
要旨集 p128
- ・一般利用者の日刊新聞による医薬品情報入手に関する調査、
尾登由起子、駒田富佐夫、齋藤侑也、
要旨集 p129
- ・副作用情報提供支援プログラムの構築、
(東日本メディコム) 遠藤敏成、(あさひ調剤) 久津間信明、小林大介、沼尻幸彦、上田秀雄、駒

田富佐夫、齋藤侑也、森本雍憲、
要旨集 p138

- ・呼吸器・心臓疾患における β 2アドレナリン受容体遺伝子多型の関連性、
相澤夕紀、小川政彦、寺嶋淑江、岩崎鉄尚、駒田富佐夫、齋藤侑也、(日大光が丘病院)吉田美和、
(日大光が丘病院) 鏑木盛雄、(日大板橋病院) 和泉徹、
要旨集 p12

- ・遺伝子治療における遺伝子発現制御 — 活性酸素刺激による転写因子発現量と発現タンパク量との
関係、
新井昌代、駒田富佐夫、齋藤侑也、(東京通信病院) 木下淳、(東京通信病院) 内野克喜、(神戸大
学病院) 西口工司、(神戸大学病院) 奥村勝彦、
要旨集 p99

- ・ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット腸管における P-glycoprotein 発現パターンの解析
白井達洋、岡崎真理、日比野康英
要旨集 p4-51

- ・ペプチドの C 末端標識化とアミノ酸配列分析への影響
矢敷実希子、和田牧子、鮫島哲二郎、白幡 晶
要旨集 3 p.46

- ・Deoxyhypusine Synthase 阻害剤の HTC 細胞への効果
杉田英章、岡本政治、町田真弓、高尾浩一、白幡 晶
要旨集 3 p.80

- ・プロレシン結合部位を目指したスペルミジン合成酵素阻害剤のデザインと合成
渡邊寿子、合田ひとみ、鮫島啓二郎、和田牧子、白幡 晶、(都老研) 長野晃三
要旨集 3 p.80

- ・ラット各臓器のホモジネート限外ろ液ポリアミン濃度の測定
佐藤優子、鮫島啓二郎、白幡 晶
要旨集 4 p.101

日本ポリアミン研究会 第18回 (八王子) 2003年2月

- ・15N 標識プトレッシンを用いてのダイズ発芽時に於けるポリアミン代謝の研究
(獨協医大生化) 大江正人、小林正樹、新津 勝、(ボローニア大)
Valeria Scoccianti, Nello Bagni, (獨協医大生化) 松崎 茂
要旨集 p.12
- ・哺乳動物スペルミジン合成酵素の三次元構造と選択的阻害剤のデザイン
渡邊寿子、合田ひとみ、鮫島啓二郎、和田牧子、白幡 晶、長野晃三
要旨集 p15
- ・高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の speE 相同遺伝子の生化学的・遺伝学的解析
大沼みお、照井祐介、斎藤大祐、玉腰雅忠、鮫島啓二郎、大島泰郎
要旨集 p.24
- ・哺乳動物スペルミジン合成酵素の三次元構造と選択的阻害剤のデザイン
渡邊寿子、合田ひとみ、鮫島哲二郎、和田牧子、白幡 晶、(都老研) 長野晃三
要旨集 p.15
- ・蛍光基質を用いた細胞内 Spermidine/spermine N1-
acetyltransferase(SSAT)活性の測定
宮武晋司、深澤一昭、高尾浩一、白幡 晶
要旨集 p.16
- ・ポリアミンによる抗原提示阻害機序の解析ー内在性ポリアミン濃度との相関性についてー
(札幌医大) 鳥越俊彦、(札幌医大) 大島 真、高尾浩一、(札幌医大) 吉田 仁、
白幡 晶、(札幌医大) 差投昇志
要旨集 p.19
- ・蛍光標識ポリアミンの細胞への取り込み
高尾浩一、宮武晋司、深澤一昭、杉田義昭、白幡 晶
要旨集 p.20

城西大学エクステンション・プログラム、埼玉、2003年6月28日、

- ・医薬品情報(1)、

駒田富佐夫

城西大学エクステンション・プログラム、埼玉、2003年7月12日、

・医薬品情報(2)、

駒田富佐夫

埼玉県薬剤師会富士見・三芳支部研修会、埼玉、2003年9月17日、

・薬の効き方と体質 一遺伝子の多様性と薬物療法一、

駒田富佐夫

埼玉県薬剤師会彩の国健康フェア21、埼玉、2003年10月4日、

・現代食べ合わせ考 一おくすりと食べ物一、

駒田富佐夫

埼玉県社会福祉協議会平成15年度栄養士研修会、埼玉、2003年12月2日、

・薬と食事の相互作用、

駒田富佐夫

日本生化学会大会 (第75回)、横浜、2003年10月

・Significance of spermine synthesis in mammalian

Yoshihiko Ikeguchi, (Penn. State Univ. college of Medicine)Anthony E.Pegg

日本生化学会大会(第76回) 横浜 2003年10月

・Functional modulation of a nuclear matrix protein P130/Mat3 by phosphorylation

Tatsuhiko Usui, Mari Okazaki, (Sch Med Toyama Med & Pharma Univ) Koichi

Hiraga and Yasuhide Hibino

要旨集 p.957

日本薬剤学会 第18回(京都) 2003年4月

・41 kHz 超音波による薬物皮膚透過性促進に対する溶媒流の寄与

武藤香絵、中村泰士、(東工大院・総理工) 跡部真人、(第一高周波工業(株)) 平山鋼太郎、上田秀雄、森本雍憲

要旨集 p.226

- ・眼瞼皮膚から結膜への薬物移行に関する研究
中川暁彦、松本匡弘、長谷川哲也、杉林堅次
要旨集（2003年） p 81
- ・酸性及びアルカリ性電気分解水の外用性基剤としての有用性の検討
代永恵、中山寛之、長谷川哲也、杉林堅次
要旨集（2003年） p 82
- ・EP と IP 併用時における低分子・高分子薬物の皮膚透過促進に及ぼす影響
五十嵐崇、長谷川哲也、(久光製薬) 徳本誠治、杉林堅次
要旨集（2003年） p 83
- ・薬物局所適用後の皮膚動態に関する研究—繊維芽細胞成長因子で形成させた肉芽内への薬物分布と滞留性—
築地泰臣、長谷川哲也、吉田大介、杉林堅次
要旨集（2003年） p 116
- ・水溶性薬物を含有した貼付剤の調製と放出・皮膚透過挙動の改善
小林さつき、(リンテック) 畠中富男、長谷川哲也、杉林堅次、森本雍憲
要旨集（2003年） p 227
- ・新規アトピー性皮膚炎治療薬を含むワセリン基剤軟膏からの放出性と皮膚移行性の検討
石井宏、長谷川哲也、(第一ファインケミカル) 大島康一、杉林堅次
要旨集（2003年） p 228
- ・ポリスチレンスルホン酸ナトリウムビーズを用いた放出制御型培養皮膚型貼付剤の調製と評価
羽田乃武子、長谷川哲也、(東洋紡・バイオ研)高橋秀和、(東洋紡・バイオ研) 石橋卓也、杉林堅次
要旨集（2003年） p 229

Clinical Neuroscience-7th Jubilee Hungarian Conference on Alzheimer's disease
(Hungary) September 9-10, 2003

“Protease inhibitors in Alzheimer's disease”

(Univ. of Szeged) M. Pakaski, A. Bjelik, J. Molnar, M. Kawase (河瀬雅美), M. Hügyecz, P. Kasa, Z. Janka, J. Kalman

p. 341

International Conference on Circular Dichroism in Chemistry and Life Sciences

(第9回)、ブタペスト、2003年8月

- ・ Induced CD of amphiphilic heterohelicenes through charge-transfer interactions in micelles
H. Nakagawa, Y. Masuoka, A. Nishimura, K. Yamada
要旨集 p. 90

シンポジウム モレキュラー・キラリティー 2003、静岡、2003年10月

- ・ 温度変化が引き起こすミセル内電荷移動錯体の誘起 CD の振動現象
増岡雄一、中川弘子、山田紘一

International Symposium on Chirality (15回)、静岡、2003年10月

- ・ Effect of main phase transition of PC bilayered vesicles on chiral recognition
H. Nakagawa, K. Yamada
要旨集 p. 161
- ・ Dynamic chirality alterations of racemate to one enantiomer via the other enantiomer. CT complex of helicene in micelles
Y. Masuoka, H. Nakagawa, K. Yamada
要旨集 p. 229

日本栄養・食糧学会 (第57回)、福岡、2003年5月

- ・ 蛍光標識ポリアミンを用いたポリアミン取り込みメカニズムの解析
高尾浩一、宮武晋司、深澤一昭、杉田義昭、白幡 晶
要旨集 p.257
- ・ 卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおける骨量減少および脂質代謝に対する豆乳粉末摂取の効果
(城西大・薬) 千葉大成、(国立栄研) 呉堅、(東京農大) 上原万里子、(国立栄研) 石見佳子
pp.202
- ・ 骨代謝および脂質代謝に対する大豆イソフラボンと運動の併用効果
(国立栄研) 呉堅、(城西大・薬) 千葉大成、(国立栄研) 樋口満、江崎治、山田和彦、石見佳子
pp.202

- ・マグネシウム欠乏ラットの骨量減少に対するヘスペリジンの回復効果
(東京農大) 上原万里子、(国立栄研) 石見佳子、(城西大・薬) 千葉大成、(東京農大) 増山律子、鈴木和春
pp.204
- ・アスコルビン酸と DPPH ラジカルの反応機構の解明
山王丸靖子 (県立長崎シーボルト大学)、鈴木恵美子 (お茶の水女子大学)、大塚譲 (お茶の水女子大学)、倉田忠男 (新潟薬科大学)
日本・栄養食糧学会要旨集、p 174
- ・ビタミンD誘導性骨代謝調節因子 IF3
真野 博, 中谷祥恵, 松浦知和, 前橋はるか, 任 良焯, 舟田うらら, 和田政裕
講演要旨集 P.299
- ・前駆軟骨細胞における石灰化機構の解析
中谷祥恵, 真野 博, 任 良焯, 舟田うらら, 川嶋洋一, 和田政裕
講演要旨集 P.299
- ・Kothara himbutu による糖代謝関連遺伝子発現の調節
任 良焯, 真野 博, 中谷祥恵, 舟田うらら, 川嶋洋一, 和田政裕
講演要旨集 P.300

日本細菌学会総会 (第 76 回)、熊本、平成 15 年 4 月 1 日～3 日

- ・腸炎ビブリオ O2 血清型との共通抗原を有する同 O-untypeable 株の LPS 糖鎖構造
橋井則貴、一色恭徳、井口毅裕、近藤誠一
日本細菌学雑誌 Vol.58, pp.107 (2003)
- ・腸炎ビブリオ K68 抗原の糖鎖構造解析
和田朋子、一色恭徳、橋井則貴、近藤誠一
日本細菌学雑誌 Vol.58, pp.207 (2003)

毒素シンポジウム (第 50 回)、白浜、平成 15 年 7 月 9 日～10 日

- ・O-Untypeable 腸炎ビブリオ KX-V212 株の内毒素リポ多糖 (LPS) の化学的・血清学的性状
一色恭徳、橋井則貴、井口毅裕、近藤誠一

予稿集 pp.47～52 (2003)

腸炎ビブリオシンポジウム (第 37 回)、弘前、平成 15 年 11 月 6 日～7 日

- ・腸炎ビブリオ K6 および K68 抗原の化学的性状

和田朋子、一色恭徳、橋井則貴、近藤誠一

埼玉医療薬学懇話会 第 17 回学術講演会 (さいたま) 2003 年 5 月

- ・Whey protein およびその成分の薬物消化管吸収に与える影響

加藤奈穂子、相場大樹、(北海道薬大) 関 俊暢、(北海道薬大) 森本一洋、従二和彦
要旨集 p. 3

- ・大学院病院実習における小課題報告の集計と評価

沼尻幸彦、上田秀雄、小林大介、森本雍憲

要旨集 p. 4

- ・高血圧および狭心症の発症率と β 2 アドレナリン受容体遺伝子多型との関連性、

駒田富佐夫、相澤夕紀、小川政彦、寺嶋淑江、齋藤侑也、(日大光が丘病院) 鍋木盛雄、(日大板橋病院) 和泉徹、

要旨集

- ・デュロテップ[®]パッチ繰り返し適用時の血清中フェンタニル濃度挙動の予測

中山寛之、(癌研病院薬) 森川明信、杉林堅次

要旨集 p 7

The 30th Annual Meeting of the Controlled Release Society Glasgow Scotland(UK)

2003 年 7 月

- ・Poly-L-Arginine Enhances Paracellular Permeability via Serine/threonine Phosphorylation of ZO-1 and Tyrosine Dephosphorylation of Occludin

H.Natsume, T.Maeno, K.Ohtake, Y.Morimoto

- ・Possible involvement of convective solvent flow in ultrasound-associated transdermal solute transport

H. Ueda, M. Mutoh, Y. Nakamura, M. Atobe, K. Hirayama and Y. Morimoto

Proceeding pp. 860-861

鼻科学会総会（第 42 回）東京 2003 年 10 月

- ・シンポジウム「薬物の投与経路としての鼻粘膜—その基礎と臨床」

鼻粘膜からの薬物吸収性と製剤開発の可能性

夏目 秀視

鼻科学会誌

日本動物実験代替法学会（第 17 回）相模原市 麻布大学 2003 年 11 月

- ・経皮吸収試験

夏目 秀視

要旨集 P. 50

- ・獨協医科大学越谷病院における TDM 業務の経済性評価

佃慶一、上田秀雄、小林大介、森本雍憲、（獨協医科大学越谷病院）斎藤光弘

要旨集 p. 6

日本 DDS 学会 第 19 回（京都） 2003 年 6 月

- ・41 kHz 超音波の経皮吸収促進メカニズムに関する検討

武藤香絵、上田秀雄、中村恭士、（東工大院・総理工）跡部真人、（第一高周波工業（株））平山鋼太郎、小林大介、森本雍憲

要旨集 p. 300

- ・皮膚外用剤試験における TEWL 測定の問題点

佃慶一、小林大介、森本雍憲

要旨集 p. 302

- ・カルシウムによるエレクトロポレーション皮膚透過促進効果増強の作用機構に関する研究

（ポーラ化成工業）徳留嘉寛、杉林堅次

Drug Delivery System 18(3) p299

- ・電解水の製剤素材としての有用性の検討

代永恵、中山寛之、長谷川哲也、（AI システムプロダクト）岡島眞裕、杉林堅次

Drug Delivery System 18(3) p259

- ・加圧型リザーバー製剤と無針圧力型注射器を用いた水溶性薬物の皮膚透過促進

長谷川哲也、中川清世、畠中富男、（埼玉医大総合医療センター）

井上直子、(埼玉医大総合医療センター) 木村昌行、杉林堅次
Drug Delivery System 18(3) p280

日本医療薬学会 第13回(神戸) 2003年9月

- ・人工汗を試験液とした後発パップ剤の放出試験
平船寛彦、磯知輝、島村剛史、上田秀雄、沼尻幸彦、小林大介、森本雍憲
要旨集 p.175

日本薬物動態学会 第18回(札幌) 2003年10月

- ・ヒト乳腺上皮培養細胞の能動輸送に関する研究
木村聡一郎、内山玲子、岸本英利、森本恵子、上田秀雄、沼尻幸彦、小林大介、森本雍憲
要旨集 p.298

HAB研究機構学術年会(第10回)期間2003年5月29日(木)～30日(金)

- ・培養ヒト皮膚モデルを用いた薬物吸収試験と刺激性評価
杉林堅次

日本ビタミン学会(第55回)平成15年5月29日(木)～30日(金)

- ・繰り返し摂取後の栄養素の生体内動態の速度論的解析
寺田元美、長谷川哲也、東口みづか、野田淑子、江端みどり、岩瀬靖彦、
安田英之、杉林堅次
ビタミン77巻4号 p.237

粒子加工技術分科会・製剤と粒子設計部会 2003年6月6日

- ・今注目される皮膚適用製剤と今後の展望
杉林堅次

日本トキシコロジー学会学術年会(第30回)平成15年7月

- ・ペルフルオロオクタン酸の尿中排泄における性差の機構解析
片倉賢紀、工藤なをみ、佐藤靖典、川嶋洋一
要旨集 p.191

日本薬理学会(第76回)、福岡、3月

- ・グリチルリチンとその誘導体による肝実質細胞の増殖促進機構

木村光利、(ミノファージェン製薬) 井上秀雄、荻原政彦、
J. Pharmacol. Sci. Vol.91, pp.118P

- ・ ストレプトゾトシン糖尿病ラットの孤束核における低酸素誘発 c-fos 蛋白発現ニューロンの減少
岡崎真理、臼井達洋、(富山医薬大) 山崎弘美、(富山医薬大) 榎彰、(富山医薬大) 武田龍司、
日比野康英
要旨集 J. Pharmacol. Sci. 91 Suppl 251P (2003)

核ダイナミクス研究会 (第3回) 福島 2003年5月

- ・ 核マトリックス足場蛋白質 P130/mat3 のリン酸化による機能制御
臼井達洋、日比野康英、岡崎真理、(富山医薬大) 平賀絃一
要旨集 p.17

日本小児肺循環研究会 第9回 (東京) 2003年2月

- ・ 鼻腔一酸化窒素吸入 (鼻呼吸) による extrapulmonary effect
小林 順、内田博之、大竹一男、菌田 勝、古田葉子、小林俊樹、先崎秀明、増谷 聡、石戸博隆、
Mofeed Famaz、菰田二一
要旨集 p.21

日本公衆衛生学会総会 第62回 (京都) 2003年10月

- ・ 日本人中高年の悪性新生物死亡による損失寿命(YPLL)に対する年齢・時代・コホート効果
小田切陽一、内田博之
要旨集 p.47

**1st International Bone and Mineral Society Japanese Society for Bone and Mineral Research
(Osaka, Japan) June, 2003**

- ・ Hesperidin, A Citrus Flavonoid, Inhibits Bone Loss and Decreases Serum and Hepatic Lipids in Ovariectomized Mice.
(城西大・薬) Hiroshige Chiba, (東京農大) Mariko Uehara, (国立栄研) Jian Wu, Xin Xiang Wang, (東農大) Masuyama Ritsuko, Kazuharu Suzuki, (神戸大) Kazuki Kanazawa, (国立栄研) Yoshiko Ishimi
- ・ Effects of Soybean Isoflavone on Bone Marrow Lymphopoiesis and Bone Loss in Castrated Male Mice.

(国立栄研) Yoshiko Ishimi, Jian Wu, Xin Xiang Wang, (城西大・薬) Hiroshige Chiba, (東京理科大) Ken Takeda, (東京薬科) Chisato Miyaura

日本栄養改善学会学術総会 (第 50 回)、岡山、2003 年 9 月

- ・高齢者の自立に及ぼす個別栄養管理 (1) - 臨床検査結果からみた栄養状態と自立度との関連について -
(東京都立短期大学) 稲山貴代, 池本真二, 江端みどり, 牛山優, 土屋友美, 戸谷誠之, (福祉社会総合研究所) 和田勝, (国際医療福祉大学・総合研究所) 阿曾沼元博
要旨集 P.154
- ・高齢者の自立に及ぼす個別栄養管理 (2) - 栄養摂取状況と栄養・健康状態との関連について -
江端みどり, 池本真二, 牛山優, 角田伸代, (東京都立短期大学) 稲山貴代, (福祉社会総合研究所) 和田勝, (国際医療福祉大学・総合研究所) 阿曾沼元博
要旨集 P.155
- ・高齢者の自立に及ぼす個別栄養管理 (3) - 服薬状況と栄養・健康状態との関連について -
池本真二, 牛山優, 江端みどり, 角田伸代, (東京都立短期大学) 稲山貴代, (福祉社会総合研究所) 和田勝, (国際医療福祉大学・総合研究所) 阿曾沼元博
要旨集 P.155
- ・魚油摂取量の相違による糖質・脂質代謝への影響の比較
角田 伸代, 金 賢珠, 江端 みどり, 牛山 優, 池本 真二
要旨集 P.222
- ・学内集団給食実習施設における衛生管理の評価に関する研究
羽場亮太 (東京農業大学)、君羅満 (東京農業大学)、三浦務 (国立がんセンター)、岩瀬靖彦 (城西大学)、伊沢正利 (聖徳栄養短大)、高橋東生 (東京農業大学)、飯樋洋二 (東京農業大学)
日本栄養改善学会講演集、p.263
- ・生活習慣及び食生活から見た男子大学生の身体自覚症状の実態について
山王丸靖子 (県立長崎シーボルト大学)、武藤慶子 (県立長崎シーボルト大学)
日本栄養改善学会講演集、p.424

日本人間ドック学会、第 44 回 (京都) 2003 年 8 月

- ・会員制人間ドック受診者の食生活調査
野田章子 (三田スカイクリニック)、西井京子 (三田スカイクリニック)、大栗茂芳 (三田スカイクリニック)、野田淑子 (城西大学)、岩瀬靖彦 (城西大学)
人間ドック学会プログラム、p45

第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2003 年 12 月

・肝細胞分化と I F 3

真野 博, 前橋はるか, 中谷祥恵, 任 良懌, 清水 純, 和田政裕, 松浦知和
講演要旨集 P.621

・マグネシウムによる石灰化抑制

中谷祥恵, 任 良懌, 清水 純, 川嶋洋一, 和田政裕, 真野 博
講演要旨集 P.760

・Molecular mechanism of protective effect of peony root extract on neuron damage induced by cobalt focus epilepsy model in EL mice. (Aieido clinic)E. Sugaya, K. Sunaga, (Institute of Medical Science, Tokaversity) K. Kjiwara, T. Tsuda, A. Sugaya, (Institute of Medical Science, Tokaversity) M. Kimura, 25th International Epilepsy Congress, Lisbon, October, 2003, p175 (P549)

天然有機化合物討論会 第 45 回 (京都) 2003 年 10 月

・フタバガキ科植物のスチルベンオリゴマーの構造(第 3 報)

(岐阜県保環研) 伊藤哲郎, 田中稔幸, 中屋謙一, (岐阜薬大) 飯沼宗和, (微化研センター) 高橋良和, 澤竜一, (城西大・薬) 白瀧義明, (東大院・植物園) 邑田仁, (ボゴール植物園) Dedy Darnaedi
要旨集 pp305-310

著書・総説・Proceedings 類

杉林堅次

Drug Delivery Systems の投与部位としての鼻粘膜の役割

日本鼻科学会誌, 42 (1), 29-31 (2003)

北村 敏彦, 長谷川 哲也, 渡邊 哲也, 杉林堅次

水晶発振子を用いた薬物の *in vitro* 皮膚透過性の迅速定量

Ultrasonic Technology, 15(2), 69-72 (2003)

香取久美、杉林堅次

薬物の皮膚適用と吸収経路

日本医事新報, 4118, 95-96 (2003)

杉林堅次

薬科大学・薬学部をとりまく最近の状況

薬研, 39, 1-3 (2003)

小田切陽一、佐藤悦子、内田博之ら (共著)

山梨県の在宅要援護高齢者の分布と人口密度からみた関連要因の地域特徴

山梨県立看護大学紀要, 5(1), 1-10 (2003)

金賢珠, 角田伸代, 池本真二, 和田政裕、特定保健用食品「脂質の吸収・代謝の調整を保健の目的とする食品」(1) コレステロール

食生活, 97(9), 50-54 (2003)

角田伸代, 池本真二, 和田政裕、特定保健用食品「脂質の吸収・代謝の調整を保健の目的とする食品」(2) 中性脂肪

食生活, 97(10), 44-49 (2003)

池本真二, 角田伸代, 金賢珠, 和田政裕 (共著)

特定保健用食品「脂質の吸収・代謝の調整を保健の目的とする食品」(3) 脂質代謝・吸収阻害

食生活, 97(11), 48-53 (2003)

角田伸代, 金賢珠, 池本真二

油脂の肥満およびインスリン抵抗性に及ぼす影響

New Food Industry, 45(9), 39-45 (2003)

生活習慣病治療薬 基礎と活用

江端みどり, 岡崎真理, 須永克佳, 津田 整, 日比野康英, 真野 博, 和田政裕
フットワーク出版 2003

岡崎真理, 須永克佳, 和田政裕
生活習慣病治療薬最新事情 第19回: かぜ
食生活 97 (1) 98-102 (2003)

岡崎真理, 須永克佳, 和田政裕
生活習慣病治療薬最新事情 第20回: アレルギー
食生活 97 (2) 86-91 (2003)

須永克佳, 津田 整, 和田政裕
生活習慣病治療薬最新事情 第21回: その他の薬と食事の相互作用
食生活 97 (3) 88-93 (2003)

和田政裕, 真野 博, 川嶋洋一
保健機能食品—基礎と応用 1. はじめに: 新しい食品に関する考え方
食生活 97 (4) 48-53 (2003)

内田博之, 小林 順, 和田政裕
保健機能食品—基礎と応用 5. 特定保健用食品「血圧の調整を保健の目的とする食品」
食生活, 97(8), 49-53 (2003)

真野 博, 和田政裕, 川嶋洋一
保健機能食品—基礎と応用 2. 栄養指導に活用しよう保健機能食品、
食生活、97(5) 48-53 (2003)

和田政裕, 真野 博, 川嶋洋一
保健機能食品—基礎と応用 4. 特定保健食品 「整腸を保健の目的とする食品」
②プロバイオティクス
食生活 97 (7) 48-53 (2003)

真野 博, 小林 順, 和田政裕
保健機能食品—基礎と応用— 骨の健康に役立つトクホについて

食生活 97 (12) 48-53 (2003)

須永克佳 「食物と医薬品の相互作用」 *New Food Industry*, 45, 24-32 (2003) 食品資材研究会

川口健夫 (分担執筆)

科学技術と未来

財団法人帝人奨学会 (2003)

川口健夫

21 世紀の価値観創造

財団法人都市経済研究所 (2003)

川口健夫 (翻訳)

ハーブの安全性ガイド

フレグランスジャーナル社 (2003)

夏目 秀視 (共著)

薬物治療学

廣川書店 (2003)

夏目 秀視 (分担執筆)

新しい図解薬剤学

南山堂 (2003)

医学大辞典、伊藤正男、井村裕夫、高久史磨 総編集、医学書院、2003、駒田富佐夫 (執筆協力者)

Toxicity and Toxicokinetics of Perfluorooctanoic Acid in Humans and Animals

Naomi Kudo (工藤なをみ) and Yoichi Kawashima (川嶋洋一) *J. Toxicol. Sci.*, 28, 49-57 (2003)

M. Kawase *et al.*

“New multidrug resistance reversal agents”

Current Drug Targets, 4, 31-43 (2003) .

著書・総説・Proceedings 類

博士（薬学）

腸炎ビブリオ O 抗原リポ多糖（LPS）の化学的および血清学的性状に関する研究

橋井 則貴

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は 1950 年に大阪市南部で死者 20 名を含む総患者数 272 名を出した、いわゆる「シラス食中毒事件」の原因菌として発見された食中毒原因菌である。腸炎ビブリオは現在 13 種の血清型（O 抗原型）に分類されているが、これらの血清型を決定する因子は、細胞壁外膜に局在する O 抗原リポ多糖 (lipopolysaccharides : LPS) である。腸炎ビブリオでは 13 種の血清型のうち、その糖鎖の構造が解明されているのは O12 LPS のみで、その他の血清型 LPS の糖鎖および血清学的特異性に関与するエピトープの構造は未だに不明である。

一方、食中毒患者および原因食品から分離される腸炎ビブリオ菌株の中には、血清型別が困難な O-untypeable (OUT) 菌株がしばしば存在し、感染防止対策に大きな障害をもたらしている。従って、腸炎ビブリオ LPS の血清学的特異性に関与するエピトープを含む糖鎖の構造解析は、各血清型に特異的な人工抗原の開発、およびそれをを用いたより迅速且つ正確な血清学的診断につながることから臨床的および公衆衛生学的に有用性が高いと考えられる。

これらの状況をふまえ、本研究ではこれまでに分離された OUT 菌株の血清型別と腸炎ビブリオ LPS の糖鎖の構造解析を目的として以下 1～5 章に述べる研究を行なった。

第 1 章 腸炎ビブリオ OUT 菌株の LPS の化学的・血清学的性状

腸炎ビブリオの 13 種の血清型 LPS はその多糖部の糖組成に基づき 10 種の化学型に分類される。本研究では先づ、OUT 菌株として分離された 7 種の LPS の化学型を検討した結果、いずれも既知の化学型に分類された。

次にこれら OUT 菌株の血清型型別を、LPS を感作抗原として用いる受身溶血 (PH) 試験によって試みた。その結果、7 種類の OUT 菌株の中で 4 種類の OUT 菌株は既知血清型に属することを示した。一方、残りの 3 菌株のうち、AK-33473 の LPS は O5 と O8 に共通する抗原因子をもつものの、本菌株 LPS に特異的な抗原因子をもつことが示された。また他の 2 菌株 (90A-6611 と KX-V212) の LPS はいずれも既知血清型とは異なる特異抗原因子をもち、さらに両菌株の抗原因子は一致することが示された。以上の結果、患者由来の腸炎ビブリオ OUT 菌株の中には、従来知られていない新血清型に属する菌株が存在することが明らかにされた。

第 2 章 腸炎ビブリオ O2 および KX-V212 菌株 LPS の構成成分として見出された未同定物質の同定

O2 および KX-V212 LPS には弱酸加水分解によって遊離される、Folin 反応陽性物質 (O2-FP)

が存在することが明らかとなった。これらの物質は腸炎ビブリオの他の血清型 LPS からは見出されず、従って両 LPS の血清学的特異性を発現するエピトープに強く関与していると考えられる。そこで本章では両 LPS から分離、精製した FP の同定を試みた。

O2 および KX-V212 LPS から分離、精製した FP を NMR および GC-MS によって解析した結果、O2-FP は 5,7-di-(*N,N*-di-acetyl)-amino-3,5,7,9-tetradecoxy-D-*glycer*-D-*galact*-non-2-ulosonic acid (O2 NonIA) であり、OUT-FP は 5-(*N*-acetyl)- amino-7-[*N*(*N*-acetyl)-D-alanyl]-amino-3,5,7,9-tetradecoxy-D-*glycer*-D-*galact*-non-2-ulosonic acid (OUT NonIA) であることを明らかにした。LPS 構成糖としてアミノ酸結合型の NonIA が発見されたのは本研究が初めてである。

第3章 腸炎ビブリオ O2 LPS 多糖鎖の構造解析

腸炎ビブリオでは、O12 以外の血清型 LPS の多糖鎖の構造は未だ不明である。本章では腸炎ビブリオの全血清型 LPS についてその多糖鎖の構造を解明するための一環として O2 LPS 多糖鎖の構造解析を FAB-MS、MALDI-TOF MS、NMR およびメチル化分析によって行なった。その結果、O2 LPS 多糖鎖 1 mol の glucose (Glc)、galactose (Gal)、glucuronic acid (GlcA)、L-*glycer*-D-*manno*-heptose (L,D-Hep)、D-*glycer*-D-*manno* heptose、3-deoxy-D-*manno*-octo-2-ulosonic acid (Kdo)、O2 NonIA、および 2 mol の glucosamine (GlcN) の 8 種 9 個の糖で構成される糖鎖であり、その全構造が解明された。また O2 LPS 多糖鎖の特異的な構成成分である O2 NonIA は非還元末端糖として Glc の 6 位に結合していることも示された。

第4章 腸炎ビブリオ OUT 菌株 KX-V212 LPS 多糖鎖の構造解析

次に、本研究において新血清型であることが明らかにされた KX-V212 LPS についても同様にその多糖鎖の構造解析を行なった。KX-V212 LPS は O2 と血清学的に共通抗原性を持ち、また両 LPS には NonIA が構成糖として含まれる。その結果、本菌株の LPS 多糖鎖 1 mol の Glc、Gal、Kdo、OUT NonIA、2 mol の GlcA、L,D-Hep、GlcN の 7 種 10 個の糖で構成される糖鎖であり、その全構造が明らかにされた。KX-V212 LPS 多糖鎖においても、その特異的な構成成分である OUT NonIA は非還元末端糖として L,D-Hep の 3 位に結合していることが示された。本 LPS 多糖鎖は O2 LPS の多糖鎖と比較すると、非還元末端部に共通した部分構造を持ち、この構造類似性が両菌株の共通抗原性に関与するものと考えられる。一方で、O2 と KX-V212 の両 LPS 多糖鎖はそれぞれに特有の構造を持ち、この構造の相違が両 LPS の血清学的特異性に反映されるものと考えられる。

第5章 ELISA 阻止試験による O2 LP の血清学的特異性を示すエピトープの解明

O2KX-V212 の LPS の血清学的特異性に関与するエピトープの構造を解明する目的で、固定化抗原に LPS を用いる ELISA 阻止試験を行なった。その結果、O2 LPS 多糖鎖に非還元末端として存在する O2 NonIA は、O2 LPS の血清学的特異性を発現する主要エピトープの 1 つであることが強く示

唆された。一方、KX-V212 においては、その LPS の非還元末端として存在する OUT Non1A はそれ自身では主要エピトープとはならず、本菌株の血清学的特異性の発現には O2LPS におけるそれよりも、より複雑な構造が関与すると思われる。

結論

- 1) 分離当初 OUT とされた 7 種の菌株の中で 4 種類の菌株については、O 抗原因子そのものである LPS を用いる血清反応により、明瞭に型別することが可能であった。また 90A-6611 および KX-V212 菌株はこれまでに報告されていない新血清型であることが示された。
- 2) 腸炎ビブリオ O2 および OUT KX-V212 LPS 多糖鎖の全構造を明らかにするとともに、両菌株の LPS には他の既知血清型 LPS には見出されていない Non1A 存在することが示された。
- 3) O2 LPS において O2 Non1A はそれ単独で血清学的特異性を発現し得る主要なエピトープである。

キトサンの経皮吸収型製剤のためのゲル基剤への応用に関する研究

佐野 元彦

経皮吸収型製剤の設計は、主薬の皮膚透過性が十分であること、基剤中の薬物安定性が維持されること、一定面積の皮膚に安定した透過速度で薬物を供給できること、貼付・剥離などの取り扱いが容易であることなどを考慮する必要がある。これらの条件を満たすには、薬物を含有させる基剤の性能が重要であり、高分子を用いたゲルが非常に有用であると思われる。さらにその経皮吸収型製剤に用いるゲル基剤は、必要な透過面積が適用期間維持されることが特に重要であることから高い保形成（形を保持する能力）が求められる。

ゲル基剤に高い保形成を付与する方法には、架橋の挿入が考えられる。現在上市されているパップ剤は、イオン対の形成によるイオン架橋法が広く用いられており、主にアクリル酸誘導体などのポリアニオン性の水溶性高分子を多価の金属イオンで結合させることで、保形成が維持されている。この方法は技術の集積があることから全身作用性の経皮吸収型製剤への応用が期待されているが、いくつかの問題点もある。例えば、イオン架橋をしたゲルは経皮吸収促進剤として用いるアルコールなどの保持能力が低く、促進剤の使用に制限が生じる可能性がある。また、パップ剤に用いられている主薬のほとんどはアニオン性の化合物であるが、経皮吸収型製剤への応用が期待される薬物にはカチオン性の化合物も多い。この場合、カチオン性薬物とアニオン性の高分子鎖がイオン相互作用し、薬物皮膚透過性が減少することが懸念される。したがって、カチオン性薬物の経皮吸収型製剤への応用を考慮した場合、カチオン性高分子鎖を多価アニオンで架橋させて高い保形成を確保し、アルコール等の高い保持能力も有する、従来とは異なる新しい架橋ゲル系の構築が重要な研究になると思われる。

近年、機能的な材料として注目を集めているキトサン（CHI）は、自然界に存在する材料から無尽蔵に得ることができ、また多くの機能が期待できるカチオン性高分子である。CHIの分子内には、親水性であるアミノ基と疎水性であるアセチル基が混在している。そのため脱アセチル化度を変化させることで、その性質を自由にコンとローすることができる。カチオン性高分子を主鎖とする架橋ゲル系を構築する場合、その骨格となる高分子の選択は非常に重要となる。そのため、経皮吸収型製剤のゲル基剤に用いる材料として CHI は非常に有望であり、その応用性は非常に高くなるものと期待できる。

そこで本研究では、モデル薬物としてがん性疼痛の管理に有用であり、その経皮吸収型製剤の開発が期待されているカチオン性薬物の塩酸モルヒネ（MOR）を選択し、以下の検討を行った。

第1章では、荷電状態の異なる各種水溶性高分子を用いて調製した *l*-メントールとエタノールを吸収促進剤として含む溶液からの MOR の放出性ならびに皮膚透過性について検討を行った。

その結果、非イオン性およびカチオン性高分子溶液からの MOR の放出性の違いは、粘度の違いにより説明できたのに対し、アニオン性高分子溶液では、薬物と高分子鎖とのイオン相互作用による放

出の低下を考慮する必要があることが示唆された。吸収促進剤を含む各種高分子溶液をヘアレスラット腹部摘出皮膚に適用した場合、MORの皮膚透過速度は、アニオン性高分子共存時には高分子無添加時より低下するのに対し、カチオン性高分子共存時には高い透過速度が観察された。カチオン性高分子の共存時のMORの皮膚透過速度の増大は、Higuchiらによって半透膜で実証されているDonnan膜平衡の透過速度への効果であると考えられた。また、エタノールなどの吸収促進剤の共存によりその効果が強く現れたと推察できた。カチオン性高分子であるCHIは、MORの経皮吸収型製剤に用いる基剤として有望であると思われる。

第2章では、アセチル化度約50%のCHIを用い、経皮吸収促進剤として利用可能なアルコール、グリコール、グリセロールなどのアルコール類を種々割合で含む溶液へのCHIの溶解性を評価し、またその溶液のゲル化について検討を試みた。

その結果、本研究で用いたCHIは親水性の高分子であり、アルコール類の添加はCHIの溶解性を減少させた。シュウ酸を架橋剤として用いてCHIゲルを調製し、その粘弾性特性をレオメーターで評価した。CHIゲルの粘弾性は、溶媒の組成に大きく影響を受け、溶液中の高分子鎖の広がりとその熱力学的な活動度の両方が重要な要因であることが示唆された。CHIゲルの保形性は、高分子鎖と架橋剤間の相互作用が重要であり、アルコール類はその結合を安定化させる作用があると考えられた。

第3章では、第2章で検討したCHIゲルに更に*t*-メントールを添加した場合のゲル処方最適化を試み、また最終的にMOR含有CHIゲルを調製し、MORのヒト皮膚透過性を*in vitro*で評価した。架橋剤としては医薬品添加物としての使用前歴を考慮してコハク酸を用いた。

その結果、架橋剤としてコハク酸を用いた場合でも、CHIの溶解性に及ぼすアルコール類の影響は、シュウ酸を用いた場合と同様であった。CHIゲル中*t*-メントールの溶解度は、溶媒組成により大きく変化したが、その際、溶媒へのCHIの添加濃度による影響は示されなかった。*t*-メントールを飽和濃度で含むCHIゲルは、CHIの溶解度に近い溶媒組成で高い保形性を示した。CHIゲルからのMORのヒト皮膚透過速度は、非イオン性の高分子であるポリビニルアルコールを用いたゲルより有意に高かった。CHIゲルからのMORのヒト皮膚透過は、ラグタイムが比較的短く、一定した透過速度で長時間持続した。CHIを用いて調製したゲルは、MORの皮膚適用のための基剤として有用であると思われる。

以上、CHIなどのカチオン性高分子の共存により、塩基性薬物であるMORの皮膚透過が増大することを示し、カチオン性高分子の経皮吸収型製剤の基剤としての重要性を明らかにした。CHIのゲル形成におよぼす溶媒組成の影響を明らかにし、経皮吸収促進剤としてアルコール類を含むCHIゲルの処方設計を可能にした。MORを含むCHIゲルを調製し、そこからのMORのヒト皮膚透過が持続性に優れた特性を有することを明らかにした。CHIを用いて調製したゲルはMORなどの塩基性薬物の皮膚適用のための基剤として有用であると思われる。

親水性化合物の経皮吸収促進のための超音波の利用に関する研究

武藤香絵

経皮的な薬物投与は使用の簡便さや血中濃度の維持等の点から、患者の QOL やコンプライアンスの向上が期待できる有益な薬物投与方法である。しかし、薬物の皮膚からの吸収性は低いため、この投与方法を多くの薬物へと拡大するためには吸収性を改善する必要がある。これまでに、化学的促進法、物理的促進法、さらにこれらの方法を組み合わせたシステムが検討されており、特に外部駆動力を利用する物理的促進法はその駆動力を制御することにより、必要に応じた薬物送達を可能にする on demand 型の製剤設計に利用できることから、Drug Delivery System の中でも sophisticated method として注目を浴びている。

超音波エネルギーを利用したソノフォレーシスもまた物理的促進法の 1 つであり、20 kHz–16 MHz の周波数を用いて薬物の皮膚透過に対する促進効果が研究され、最近の研究で MHz 領域の高周波数に比べ低周波数の超音波で促進効果の高いことが明らかとなっている。また、低周波数超音波は皮膚の電気伝導度を非可逆的に増大し、それに伴い親油性化合物よりも親水性化合物の皮膚透過を増大することから、その促進効果は親水性経路を新たに形成することによると考えられている。さらに、超音波は薬物の皮膚透過促進に対する駆動力として利用できることを示唆する報告があるにもかかわらず、そのような効果に関する系統的な研究は行われていない。

本論文では、超音波が親水性化合物の皮膚透過促進に対する駆動力として利用可能であるかを検討し、さらに透過経路の検討および超音波物理現象の 1 つであるキャビテーションの関与を評価することで、親水性化合物に対する超音波の皮膚透過促進効果について 3 章にわたり詳細に検討した。

第 1 章では、低周波数 (41–445 kHz)、低強度 (60–240 mW/cm²) の超音波を用いて、親水性化合物の皮膚透過に対する促進効果について検討した。超音波照射によって親水性モデル化合物カルセイン (MW 623) の皮膚透過が一過的に促進され、その効果は周波数により異なり低い周波数でより高いことが明らかとなった。41 kHz 超音波では適用強度の増加に伴って促進効果も有意に増加したが、158 および 445 kHz では強度によらずほぼ一定の促進効果を示した。以上の結果から、照射する超音波の周波数や強度によりカルセインの透過促進効果が大きく異なることが明らかとなった。41 kHz、120 mW/cm² の超音波照射によって非常に高い透過促進効果が得られ、皮膚電気抵抗値もコントロールの約 1/2 に低下したが、超音波照射中の透過係数は抵抗値から予測される値よりも有意に高くなっていたことから、促進効果は角質層構造の変化や水和の亢進のみでは説明することができなかった。さらに、カルセインの透過性が溶媒の透過性と良好な相関を示し、その透過は超音波伝播方向に特異的に促進されることから、透過には超音波照射時のみに発生する溶媒流が付加的な駆動力として関与していることが考えられた。一方、角質層が直接超音波に暴露されない条件では、超音波を照射してもカルセインの透過は増大せず、皮膚抵抗値も変化しなかった。以上の結果より、本章で用いた超音波は伝播方向へ溶媒流を発生させ、その溶媒牽引効果により親水性化合物の透過を一過

的に促進していることが明らかとなり、さらにこの効果には角質層構造の部分的な変化や水和の亢進も関与しているものと考えられ、超音波が照射条件を工夫することで必要時にのみ必要量の薬物を経皮透過させる駆動力として利用できる可能性が示唆された。

第2章では、41 kHz 超音波により促進されている親水性化合物の透過経路について、カルセイン、FD-4 (MW 4400)、およびFD-40 (MW 38000) をモデル化合物として用いて考察した。まず、水力学的細孔理論を用いて、溶質透過と溶媒透過の関係から考察した結果、41 kHz の超音波照射によりカルセイン透過と溶媒透過の間に良好な相関関係が認められ、回帰直線の傾きは1となったことから、超音波照射時の溶質の動きと溶媒の動きが完全に一致していることが明らかとなった。さらに、FD-4 およびFD-40 でも同様の結果が得られたことから、41 kHz 超音波によって促進されている透過経路の大きさはこれらの溶質よりも有意に大きいことが考えられた。次に、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて水溶性高分子FD-40 がどのように透過しているのかを評価した。超音波 horn 直下領域ではFD-40 は角質層全体（脂質二重層およびコルネオサイト）を非特異的に深部まで浸透しており、このとき角質層表面に部分的な裂け目様の構造変化を認めたが、角化細胞の六角形構造の崩壊や消失は起こっていなかった。また、horn 周辺領域では角質層構造の変化もFD-40 の浸透も認められなかった。以上の結果より、超音波に直接暴露されている領域では超音波が角質層中への溶媒の移動を非特異的に増大し、さらに新たな透過経路を形成することにより、少なくとも分子量4万までの分子が容易に皮膚を透過できることが明らかとなった。一方、脂溶性化合物ローダミンBを用いた同様の観察では、超音波直下領域でも皮膚への浸透増大は全く認められなかったが、これは溶質の水への溶解性によるものであると考えられた。

第3章では、促進効果に対する超音波物理現象の1つであるキャビテーションの関与を調査した。はじめにバルク中でのキャビテーション発生量を種々条件下で測定した結果、41 kHz で最も多く、周波数の増大に伴って減少した。また、41 kHz では照射強度の増大に伴って発生量も増加したが、158 および445 kHz では有意な変化を示さなかった。脱気水に41 kHz 超音波を照射した場合、120 および240 mW/cm² の強度でキャビテーション発生量が有意に低下した。バルク中キャビテーション発生量とカルセイン透過性の間に良好な相関が認められたことから、溶媒中に発生しているキャビテーションが透過促進効果に関与していることが明らかとなった。キャビテーションは固体-液体界面で圧壊されるとき、固体表面方向にマイクロジェットと呼ばれる流れを発生させ、これが方向性のある透過促進効果に主に関与していることが考えられるため、次にゼラチン層を用いて固体-液体界面でのマイクロジェットの発生をデジタルカメラおよび共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて確認した。その結果、41 kHz 超音波照射により、ゼラチン内部方向へ色素の局所的な貫入が認められ、その部位の表面でキャビテーション圧壊による壊食が起こっていることが明らかとなった。以上の結果より、本研究で用いた超音波による促進効果には媒質中でのキャビテーション発生、特に皮膚表面での非対称圧壊に伴って一過的に発生するマイクロジェットが関与していることが示唆された。

以上、本研究で得られた知見から、キャビテーションを発生しやすい低周波数超音波を利用した経

学位論文要旨

皮送達システムは、必要に応じた薬物投与を可能とする駆動力として利用でき、さらにこれまで皮膚からの治療域濃度までの送達が困難であると考えられていた生理活性ペプチドやタンパク性医薬品の経皮送達を可能にする有益な促進方法であると考えられる。

エレクトロポレーションによる薬物の経皮吸収促進に関する研究

森 健二

薬物の投与部位として皮膚を用いる経皮吸収型製剤が注目され、現在までニトログリセリン、硝酸イソソルビド、エストラジオール、テストステロン、フェンタニル、ツロブテロール等の薬物を含有した経皮吸収型製剤が上市に至っている。しかし、薬物の経皮吸収性は低く、これを改善する試み（促進法）が数多くなされている。なかでも、電気エネルギーを用いたイオントフォーシス、超音波を利用したフォノフォーシス、極小の針を用いて角質層に孔を空け吸収を高めるマイクロニードルの利用等の物理的促進法が注目を浴びている。また、これらの他にエレクトロポレーションを利用した物理的促進法が報告されている。エレクトロポレーションは従来、細胞への遺伝子導入方法として用いられてきた技術で、数十から数百ボルトをマイクロ秒からミリ秒単位の極短時間負荷することにより細胞膜に可逆的な孔を生じさせ、そこから細胞内へ遺伝子を導入させる。近年、皮膚を介した薬物送達にもこの技術を応用した研究が報告され始めたが、その促進に関与する因子や解析はほとんど検討されていない。

そこで、本研究では非イオン性のマンニトールとイオン性の安息香酸ナトリウム（またはジクロフェナックナトリウム）を用いて、これらのヘアレスラット *in vitro* 皮膚透過性に及ぼすエレクトロポレーションの有用性を評価した。また、有限因子法による3次元電流密度解析や2次元電場解析を行ってエレクトロポレーションの効果に関与する電氣的パラメータを調べ、効率よく促進効果を得るための溶液系や電極の適用条件や形状について考察した。さらに、得られた最適条件を用いて、実用に耐える経皮エレクトロポレーション適用製剤を試作した。

最初に、リング型とニードル型電極を用いてマンニトールの皮膚透過性に及ぼすエレクトロポレーションの効果調べた。その結果、エレクトロポレーション発生装置の電気容量を増す（パルス電流適用時間を長くする）ことで、マンニトール透過量は増加し、エレクトロポレーションのような極短時間の電圧適用であっても、促進効果は電圧適用時間に依存することがわかった。また、パルスの頻度も促進効果に影響し、パルス適用回数が多いほど促進効果が増加することがわかった。しかし、電極材料（分極性・非分極性）や電極適用位置（対電極を角質層上に配置、または一方を角質層上にもう一方を真皮側に配置）を変えてもエレクトロポレーション促進効果はほとんど変化しなかった。

次に適用条件の影響を調べるため適用電解質濃度（0%、0.9%、9%NaCl）、電極形状（ニードル電極、ポイント電極、リング電極）、電極と皮膚表面との距離（0 または 5 mm）を変えて、安息香酸の皮膚透過性に及ぼすエレクトロポレーションの促進効果を比較した。その結果、電解質濃度が高くなるほど安息香酸透過量は減少する傾向が見られた。さらに、両電極を皮膚に接して設置した方が高い透過性が見られた。また、電極を皮膚から離れた場合は、ニードル電極、ポイント電極がほぼ同等の透過を示したものの、電極を皮膚上に設置した場合は、ポイント電極の方が高い透過性を示し

た。

そこで次に、角質層と適用溶液中の電流密度や電場強度を3次元解析し、さらにエレクトロポレーションパルス波形を測定した。その結果、電極を皮膚から離すと電流密度が電解質濃度の増加に伴って高くなったが、電極を皮膚に接した場合は電解質濃度によらず一定値を示した。しかし、電場強度はいずれの電極でも電解質濃度の影響を受けなかった。また、エレクトロポレーション適用時の初期電圧は450 Vにセットしたが、電極の形状や電解質濃度により皮膚に負荷される初期電圧は129～457 Vとなった。加えて、時定数も適用する電極形状により異なり、ポイント電極>ニードル電極となり、また、電解質濃度を上げることで短くなった。一方、エレクトロポレーション負荷で生じる安息香酸の透過性は、イオントフォーシスとは異なり電流には依存しなかった。しかし、皮膚透過性と電場強度には高い相関関係が見られ、角質上に負荷される電場がエレクトロポレーションの透過促進の一因であることが示唆された。そこでさらに、2次元の電場解析により皮膚バリアー中における電場分布と皮膚バリアー中への安息香酸の取り込み分布を調べた。その結果、電場強度の高い部位ほど皮膚に取り込まれる安息香酸量は多く、電場強度と安息香酸取り込み量はよく相関した。次に電極形状の影響を調べた結果、同じ電圧を負荷しているにもかかわらず、安息香酸の透過は電極形状により著しく異なり、プレートプレート電極が最も優れていた。さらに、皮膚に負荷される2次元電場強度やパルス波形を測定したところ、これらも電極形状により異なることが明らかになり、電場時間曲線下面積（総電場量）と安息香酸透過性が良く相関した。この現象は安息香酸に特異的ではなく、ジクロフェナックの透過性に関しても同様であった。

以上の結果をもとに、最後に電場の負荷に最適であったプレート電極を組み込んだリザーバー型製剤とマトリックス型製剤を試作し、これを用いてジクロフェナック透過性を調べた。その結果、溶液で適用した場合とほぼ同等の透過を得ることができ、ヒトへ適用可能な実用的なエレクトロポレーション経皮適用製剤を得ることができた。

以上、本研究からエレクトロポレーションが皮膚透過性を促進するのに有効であることが明らかになった。また、エレクトロポレーション適用時のより良い適用条件も明らかになり、これらの結果を元に試作した製剤が実用的にも十分使用できることが確認された。

Picoline-Borane を用いる Aldehyde 及び Ketone 類の One-Pot Reductive Amination

薬品製造化学教室 佐藤晋也 (菊川靖雄 教授)

Carbonyl化合物(aldehyde及びketone)とamine類と適当な還元剤の組み合わせによるreductive aminationは簡単な操作で目的とするalkyl化されたamine類が得られるので広く用いられている。これまでよく使用されている還元剤である NaBH_3CN や $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ は毒性や使用する溶媒に環境汚染の問題があるなどの欠点がある。当研究室ではこれまでamine-boraneの研究を行ってきたが、その中でpicoline-borane (pic-BH_3)が上記還元剤の欠点を補うものであることを発見した。そして(1) MeOH中でのreductive amination (2) 水溶媒中でのreductive amination (3) 無溶媒でのreductive aminationなどを行ない好結果を得た。特に水溶媒、無溶媒の条件下の反応は学術的だけでなく、実用的にも有用と思われる。

N-Acylaminophthalimide 類の高原子価ヨウ素化合物による分子内閉環反応

薬品製造化学教室 椎屋 恵 (菊川靖雄 教授)

当研究室は、これまでに*N*-methoxyamide類から発生した*N*-methoxy-*N*-acylnitrenium ionが、benzene環の*para*位にmethoxy基がある場合は*ipso*位を攻撃してspirodienone体を与えることを報告した。近年、1-azaspiro[4.5]decane骨格を持つ生理活性物質の合成が多く報告されているので、それらの原料となるspirodienone類は上記の反応を応用して*N*-methoxy-3-(4-methoxyphenyl)propionamide類の分子内閉環反応によって合成されている。さらに、当研究室ではN-O結合をN-N結合に変えた*N*-acylaminophthalimide類とpenyliodine(III) bis(trifluoroacetate) ($\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)_2$)との反応を検討し、phthalimide基を持つ上記のspirodienone類の合成に成功した。次いで、本反応を発展させbenzene環に隣接する炭素の代わりに酸素及び窒素の入った*N*-acylaminophthalimide類 ($\text{Ar}(\text{CH}_2)_n\text{-OCNHPhth}$ 及び $\text{Ar}(\text{CH}_2)_n\text{-NRCONHPhth}$)の分子内閉環反応について研究し、閉環による複素環化合物の合成に成功した。

分子内に二重結合をもつ *N*-Acylaminophthalimide 類と高原子価ヨウ素化合物との反応

薬品製造化学教室 塚本政都 (菊川靖雄 教授)

当研究室では、これまでに *N*-methoxyamide 類より *N*-methoxy-*N*-acylnitrenium ion の発生に成功した。このイオンと芳香環との反応は進行したが、二重結合との反応では産物が多数認められ、満足する結果は得られなかった。

最近の当研究室の研究で *N*-methoxyamide 類の N-O 結合を N-N 結合に変えた *N*-acylaminophthalimide 類と phenyliodine(III) bis(trifluoroacetate) (PhI(OCOCF₃)₂) (PIFA) との反応を検討し、*N*-phthalimido-*N*-acylnitrenium ion を発生させ、分子内閉環させることで含窒素複素環化合物の合成に成功した。今回、著者は、この nitrenium ion が分子内の C-C 二重結合へ求電子反応を行えば含窒素環状化合物が合成されると考え検討した。その結果、*N*-acylaminophthalimide 類と PIFA との反応により発生した nitrenium ion は、二重結合と反応し分子内閉環し、含窒素環状化合物を好収率で与えた。

パラグアイ産 *Melia sempervirens* (センダン科) の成分研究

朴 建華 (横江一朗 教授)

センダン科(Meliaceae)植物の中には民間薬や伝統薬として使用されているものが多い。たとえば苦楝皮 (*Melia azedarach*) や *Melia toosendan* の樹皮や根皮は回虫などの寄生虫の治療薬として用いられる。これまで各種センダン科植物から 300 種以上のリモノイド骨格を持つ化合物が単離されていて、有機化学的に魅力的な骨格と昆虫に対する強い摂食阻害活性があることから活発に研究されている。

南米パラグアイ産の *Melia sempervirens* は現地では *paraiso* と呼ばれ、その葉の水抽出エキスを除虫薬として用いているが、その成分研究の報告はない。

今回 *Melia sempervirens* の葉部を入手し、メタノール抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより、エーテルエキスから β -sitosterol、diethylhexylphthalate、 β -sitosterol- β -D-glucoside を得た。これらの化合物の構造は各種スペクトルデータ (1H-NMR、13C-NMR、MS など) および加水分解反応により決定した。さらに酢酸エチルエキスより nicotiflorin (5, 7, 4'-trihydroxyflavone-3-rutinoside) を単離し、また BuOH フラクションより rutin を得た。これらの構造は各種スペクトルデータ (1H-NMR、13C-NMR、MS など)、13C-NMR の重水添加によるケミカルシフトの移動および加水分解反応により決定した。

漢方薬の煎出に及ぼす水硬度の影響

小川哲寛 (齋藤節生 教授)

漢方煎液の薬効を左右する影響因子の一つとして、また日本と中国で用いる生薬量の違う原因の一つと考えられている水の硬度の違いに焦点をあて、水の硬度が、どの程度煎剤中の成分量に影響を及ぼしているかについて検討した。

今回の調査では、水の硬度による影響はかなり硬度が高くなると表れなかった。小柴胡湯の煎出で硬度の高いミネラルウォーターでは、水道水よりもsaikosaponin b2量が明らかに低下していた。この原因としては、水の硬度よりも、煎出後の煎液のpHが中性に近いによる影響が大きく関与している可能性が考えられた。pHの違いによりsaikosaponin aとdはsaikosaponin b1とb2へ変化するため、煎出液のpHが変化し、これらの割合が変化し薬効にも影響を与える可能性が危惧された。BaicalinとGlycyhizic acidでは、硬度が高くなると各成分量は全体的に減少する傾向がみられ、硬度1000mg/LではContrex[®]の時よりも指標成分量の減少が大きかった。水道水と2種のミネラルウォーターを比較した官能検査のアンケートでは、Contrex[®]の煎液で、80%以上の人に視覚的影響がみられたことから、患者のコンプライアンスの低下防止には漢方薬の煎出に用いる水の種類によっては煎液に何らかの変化があらわれることを患者に説明する必要があると考えられた。また、日本と中国で薬用量が異なる理由としてこれまで言われていた水の硬度が違うためであるという伝説は、中国の水が硬水であるといっても、硬度が500mg/Lには満たないことから、影響はないものと思われた。しかし、生薬中の有効成分の煎出には、溶解度やイオン強度、pHなどさまざまな因子が影響しているものと思われ、煎出される成分も多成分であるため、今回の結果が処方ごとに異なる可能性も否定できない。漢方薬は硬度の高い水ではできるだけ煎出しないほうが望ましいといえる。

沖縄県における高脂血症用剤の処方箋および黄紋筋融解症を引起す可能性のある薬剤の処方箋の発行実態調査

翁長真一郎 (齋藤節生 教授)

今回、沖縄県下の300床以上の病院、すなわち沖縄県立北部病院、県立中部病院、浦添総合病院、琉球大学医学部附属病院(琉球大学病院)、沖縄協同病院の5病院から発行された処方箋を対象とし、長寿県沖縄県における高脂血症用剤の処方箋発行実態を調査・解析した。

高脂血症用剤の処方箋発行実態の調査では地方の同じ県内の病院でも院外処方箋の発行率に大きな違いがあった。高脂血症用剤の処方箋発行枚数から女性では閉経が原因の高脂血症に罹患している可能性が高い結果を得た。高脂血症の薬物療法で使用されている薬剤はHMG・CoA還元酵素阻害薬

が7割を占めていた。HMG・CoA還元酵素阻害薬は最も強いコレステロール低下作用を有しているため、コレステロールのみが高い場合は第一選択薬となるベザフィブラートは併用療法での使用が多く、HMG・CoA還元酵素阻害薬との併用が50%以上を占めていた。この併用は横紋筋融解症を起こす危険性が高いため、併用された場合、特に高齢者では加齢による腎機能の低下に留意する必要があると考えられる。

横紋筋融解症が記載されている薬剤は、高脂血症用剤が最も多かったが、最も多く使用されていた薬剤は高脂血症用剤ではなく、消化性潰瘍用剤であった。また高脂血症用剤と併用される、横紋筋融解症を副作用に持つ薬剤で、最も併用頻度の高かった薬剤は消化性潰瘍用剤であった。横紋筋融解症を副作用に持つ薬剤を、診療科別における処方箋発行枚数からみた場合、小児科での使用が2番目に多く、使用された薬剤ではテオフィリンが60%以上を占めていた。テオフィリンは有効血中濃度域と中毒症状発現域が接近しているため、特に小児に処方された場合は用法・用量が適切であるか確認することが大切である。

今回の処方箋発行実態調査は処方箋情報のため、病名などの詳しい患者背景は不明という難点があったものの、上記のような薬物療法に関するいくつかの問題点を知ることができた。調査期間が1週間という短い期間であったので、今後の課題としては調査期間を最新かつ長期間とする必要がある。他府県でも同様の調査が行われると長寿県としての特徴をより明らかにすることができるであろう。

HbA1c チャートを利用した糖尿病患者に対する服薬指導

金谷直紀（齋藤節生 教授）

現在行われている服薬指導は、処方薬の説明やコンプライアンスの確認をするだけで各患者において同じである。しかし、糖尿病患者は血糖コントロール状態を悪化させている原因がそれぞれ異なるので、個別の指導が必要である。従って、糖尿病の血糖コントロール状態の指標には血糖値やヘモグロビン値（HbA1c）チャートで指導を行うことが可能である。

HbA1c チャートは、糖尿病患者を服薬指導する際に次のようなツールとして役に立つ。・生活習慣を見直す・治療に対する自覚・自主性を促す・コンプライアンスの判定・教育入院の効果の判定・糖尿病治療の効果の判定・チーム医療の情報源・合併症の危険性を知る・糖尿病の状態が一目で分かる・治療の目標を視覚的に明確化する・患者とのコミュニケーションをはかる・的確な指導を行う。

現在（平成15年2月）までのところ、HbA1c チャートを渡したすべての患者は、血糖コントロール状態が良好である。このことから、自己血糖測定（血糖値）とあわせてHbA1c チャートを糖尿病療養指導や服薬指導に用いることが、治療に対する自覚や自主性を促し、また糖尿病治療の成果をみていくうえで有用であると考えられる。このようにHbA1c チャートは2型糖尿病患者の服薬・療養指導

に多くの利益をもたらしてくれるが、問題点がないわけではない。今後、HbA1c チャートの有用性をアンケート調査や統計的手法を用いて評価することが課題としてあげられる。また、HbA1c チャートは糖尿病の合併症発現の抑制に有用であるかどうかを評価するために今後さらに患者の追跡調査を行うことも重要な課題である。

医薬品情報の代価に関するアンケート調査

金子紗弓（齋藤節生 教授）

平成9年から薬剤情報の提供が義務化され、調剤報酬の改正に伴い薬剤服用管理・指導料や薬剤情報提供料などが加算された。今回、適切な医薬品情報を提供するにあたり、利用者が本当に必要としている医薬品情報の種類や、その入手のために支払ってもよいと思う代価などを把握することを目的として、アンケート調査し検討を行った。

調査方法は、平成14年10月に越谷市のサンシティ小ホールにおいて行われた埼玉県薬剤師会主催「彩の国健康フェアの参加者の中から随意に選び、直接聞き取り調査により、アンケート調査を行った。回答者数は146人であり、そのうち医療関係者を除く有効回答数は男性43人、女性95人、計138人であった。

今回の調査では約8割の利用者が薬の情報を受け取ったことがあり、そして大部分がその情報に満足していた。その一方、何らかの欲しい情報があると回答したのは男女別では男性の方が関心が高く、女性は病院にかかったり、薬を飲んだりしている割合が低かった。副作用や相互作用などが欲しい情報として高率を占めているのは内用薬での副作用や相互作用などは予測することは難しく、予想もしないことが起こる可能性や、一般薬の風邪薬を服用後の Stevens-Johnson 痘候群が発症、副作用に対するニュース、医療ミスや副作用における報道も増え、利用者の副作用などに対する関心があるからだろう。医療保険制度の改正により、一部負担額が、被保険者2割から、外来・入院の区別なく3割負担となる。現在の調剤報酬170円、270円も実際患者がその時直接支払う金額としては51円、81円となる。アンケート調査による支払ってもよいと考えられる金額で多数を占めた100円、200円という結果は、実際に支払っている金額よりも高い額である。この結果から、利用者にとって、本当に欲しい情報を得るためなら現行の金額よりも高くなってもよいと考えているものと思われる。

エラスポール®を用いた全身性炎症反応症候群に伴う急性肺炎障害治療に関する調査

吉川 真 (齋藤節生 教授)

2003年の始めから全世界を震撼させた SIRS は、本来様々な内因性メディエーターによって惹起される非特異的全身性炎症反応による疾患 Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) と定義されている。日本医科大学付属病院における患者は救急救命センターで多く発生しており、本センターでは、2002年4月に承認され、同年6月から発売されたエラスポール[®]による治療を同年7月から開始した。エラスポール投与患者のカルテ調査可能数はわずか11例であったが、SIRSに伴う急性肺炎障害に有効であるという結果を得た。即ち、カルテ調査の結果では、エラスポール[®]の投与により PEEP と PaO₂/FiO₂ を肺障害スコアで換算したときの値の合計が、投与前と投与後で2点以上低下した患者では、FiO₂、PEEP、PaO₂/FiO₂の投与開始からの変動は3~5日目までにそれぞれの正常値に近づくか、もしくは、投与開始からほぼ一定の値で安定している患者が多く、FiO₂、PaO₂/FiO₂では悪化した例はなく、PEEPでは悪化した患者が2例あったが、肺障害スコアで見ると点数には変化がなかった。

投与前と投与後で変化しないあるいは±1点の変化であった患者では、FiO₂、PEEP、PaO₂/FiO₂の投与開始からの変動は、3~5日目までにそれぞれの値であり改善傾向がみられず、その後投与を続けても、改善傾向が見られない患者が多い (FiO₂では3例、PEEPでは4例、PaO₂/FiO₂では2例) という結果になった。また、PEEPでは悪化した患者 (2例) がおり、肺障害スコアで見ると1~2点上昇している例が見られた。今回、症例数が少なかったが、その有効性に関しては、今後、長期的かつ多数例での調査が必要であり、併用禁忌、併用注意、混注時の薬効の変化などについての情報を収集し、医師に提供していくことが重要であると考えられる。

IS-MSによるポリアミン分析法の癌研究への応用

小林正樹 (鮫島啓二郎 教授)

イオンスプレーイオン化マスマスプロトメトリー (IS-MS) によるポリアミン分析法に修飾を施して、癌の診断と治療に関する問題を検討し、有用な知見を得ることができた。

第1章 アセチルポリアミンの同時分析： 癌の診断と予後を占うのに役立つことが期待されている N¹, N¹²ジアセチルスペルミン (Ac₂Spm) を IS-MS法に組み込むことを主目的に、N¹または N⁸アセチルスペルミジン (AcSpd) も含めて方法の拡張を試みた。AcSpdについては、異性体の MS 応答に差があったため、分別定量は検討しなかった。内標準物質として新たに化学合成した ¹⁵N-Ac₂Spm を用いて、癌患者尿中の Ac₂Spm を定量した結果、得られた定量値が ELISA で測定した定量値とよく相

関することを見出した。このことは、同定と定量を同時に行うIS-MS法と多数検体測定が可能なELISA法が、いずれも信頼できる方法であることを証明した。

第2章 経口投与¹⁵N-ポリアミンのADME研究：ポリアミンを調節して癌を治療しようとする研究において、外部からのポリアミンの取り込みという必ず考慮しなければならない問題を取り扱った。IS-MS法で¹³C,¹⁵N-ポリアミンを内標準物質にすることにより、¹⁵N-ポリアミンをトレーサー化合物として利用でき、放射能汚染の心配なくラットへの経口投与のような実験が通常の実験室で行えるようになった。腹水癌細胞(AH109A)をドンリュウラット(♂)の皮下に移植して得られた固形癌担癌ラットを実験動物として、¹⁵N-ポリアミンを経口投与し、3時間後の組織への分布を調べた。その結果、腸管からのPut, Spd, Spmの吸収はほとんど差がなく、受動拡散機構によると思われること、肝臓、腫瘍ともにSpdの方がSpmより取り込まれやすいこと、腸管から吸収された過量のポリアミンは速やかに腎臓に集まること、Putはジアミン酸化酵素により速やかに代謝されるらしいこと、などがわかった。なお、本研究で見られた¹⁵N-Spmの異常取り込みの例は今後の研究に興味ある問題を投げかけた。

不死化ヒト胎盤絨毛細胞におけるペルオキシソーム酵素活性とホルモン分泌に対する WY-14643 の影響

森田美江子 (林 秀徳 教授)

WY-14643は、齧歯類のペルオキシソーム増殖剤であるが、ヒトの生殖に関係する細胞に対する影響はほとんど分かっていない。本実験では不死化ヒト胎盤絨毛細胞(細胞性栄養膜細胞)を用い、ペルオキシソーム酵素活性とホルモン産生に対するWY-14643の影響を調べ、フィブラート系の薬物(ゲンフィブロジル、クロフィブリン酸)と比較した。

絨毛細胞を24時間前培養したのち、WY-14643、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3日間反応させた。細胞を採取し、DNAやタンパク質の含量を測定した。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酸化酵素の活性を測定した。さらに培養液中に分泌されたプロゲステロンとヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)の濃度を測定した。

細胞のDNAとタンパク質の含量は、WY-14643、ゲンフィブロジル、クロフィブリン酸の添加濃度に依存して減少した。カタラーゼの比活性は、これらの薬物により増加傾向を示した。脂肪酸アシルCoA酸化酵素の活性は、ゲンフィブロジル、クロフィブリン酸により少ないながらも増加したが、WY-14643による明らかな増加はみられなかった。培養液中のプロゲステロンのタンパク質当たりの濃度は、全薬物の添加により増加したが、hCGの濃度は低下した。3種の薬物の中では、WY-14643が最も低い濃度で影響した。以上のことからWY-14643は、ヒト絨毛細胞の増殖とホルモン産生にお

いて、フィブラート系の薬物と同様に作用するが、ペルオキシソーム酵素には若干異なる作用をすることが示唆された。

鶏胚の発育過程におけるドリコールおよびコレステロール含量の変化

堀江竹虎 (林 秀徳 教授)

近年、細胞増殖におけるメバロン酸経路の重要性が示されイソプレノイドが注目を浴びている。ドリコールはこのメバロン酸経路を経て合成されるイソプレノイドの 1 種であるが細胞増殖が盛んな発育中の鶏胚におけるドリコールの含量化については知られていない。本実験では鶏胚発育過程におけるドリコールとコレステロール含量の変化とこれらのイソプレノイドの含量に対する HMG-CoA 還元酵素阻害薬の影響について調べた。

有精鶏卵をふ卵器に入卵し、全卵、胚、卵黄・漿尿膜・羊水および卵白のドリコールとコレステロール含量を経時的に測定した。有精鶏卵に HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるプラバスタチンナトリウムを投与し、ドリコールおよびコレステロール含量を測定した。

全卵のドリコール含量は、ふ卵開始から 10 日目以降に大きく増加した。また、胚と卵黄・漿尿膜・羊水のドリコール含量も増加したが、卵白では変化がみられなかった。全卵のコレステロール含量は、ふ卵開始後 15 日目までは一定であったが、その後、減少した。15 日目の卵黄・漿尿膜・羊水のコレステロール含量は、10 日目に比べ低下したが、胚では増加した。この卵黄・漿尿膜・羊水での低下量と胚での増加量は、ほぼ同量であった。プラバスタチンナトリウムの投与により、ドリコールおよびコレステロール含量は影響を受けなかった。以上のことから発育中の鶏胚においてドリコールとコレステロール挙動が異なり、コレステロールは卵黄から胚に輸送されるのに対し、ドリコールは活発に合成されていることが示唆された。また、有精鶏卵のドリコール合成において HMG-CoA 還元酵素はさほど重要でないかもしれない。

薬局製造医薬品に関する医薬品情報

細川玄機 (駒田富佐夫 助教授)

【目的】 薬局製造医薬品(薬局製剤)は、市中薬局の薬剤師が自ら製剤して顧客に提供できる唯一の重要な一般用医薬品である。それだけに市中薬局薬剤師は、製造上での医薬品情報の活用、販売時の情報提供、とくに使用上の注意事項に意を尽くさねばならない。平成13年11月現在、薬局製剤には局方品46品目、局方外品339品目(うち漢方212品目)、計385品目が収載されている。それらについて、薬局製剤業務指針(日薬編)、製剤方法の解説(日薬誌収載:日薬薬局製剤・漢方委員会)はあるが、副作用、相互作用など販売時における服薬指導上の情報がまとめられている形式の記述は少ない。また医薬品の使用上の注意は常に改変されている。そこで、それら各品目について、薬用量、副作用、使用上の注意、相互作用を中心に、製剤、服薬指導上で必要になるとと思われる情報の取り扱いと、薬局における情報の処理について検討する。

【方法】 一部の漢方品目を含む薬局製剤業務指針 第4版(日薬編、薬事日報)中の各品目について、処方、製造方法、規制等23項目を集約した基本データを抽出、Microsoft Excel 2000により基本データベースを構築し、File Maker Pro5へファイルを変換して本データベース(DB)とした。そのDBを用いて、処方を構成する各薬品に関する薬用量、相互作用、配合変化、薬物動態学的データの観点から薬局製剤全体について考察した。

【結果】 薬物動態学的に考察したとき、たとえば腎疾患患者に用いられる場合の薬用量の配慮についての情報記載が欠けている肝臓代謝薬物配合製剤がみられた。用語の統一性、たとえばある品目について「〇〇を起こしたことがある人」との記載が別の箇所では「〇〇の既往歴のある人」と記載されているような異なる表現・用語の使用が認められた。またたとえば、多くの品目に記されている「使用上の注意」中の単に「同時に服用しないでください」という記載は、併用によってどのような効果が表れるのか服薬指導に必要な情報が不足している点が認められた。これらの点を改良、充足することによって薬局製剤は一層有効かつ安全に用いられると考える。

呼吸器・心臓疾患における β_2 アドレナリン受容体遺伝子多型の関連性

相澤夕紀 (駒田富佐夫 助教授)

【目的】 β_2 アドレナリン受容体遺伝子のコード領域には数カ所の一塩基多型(SNP)の存在が確認されており、このSNPによりコードするアミノ酸が変化する。このうち、アミノ酸16部位(Arg16→Gly16)および27部位(Gln27→Glu27)の多型は、受容体のダウンレギュレーションに影響を与える。さらに164部位(Thr164→Ile164)のそれは受容体の反応性を低下すると報告されている。

また、これら遺伝子多型と疾患との関連性に関する研究報告が数多く発表されている。しかしながら、日本人を対象とした研究報告は少ない。そこで、日本人における β_2 受容体遺伝子多型の頻度を調査し、疾患と多型、さらにはリスクファクターとの関連性を明らかにすることを目的として検討した。

【方法】 喘息などの疾患の治療を受けている呼吸器疾患患者、心筋梗塞・狭心症などの治療を受けている心臓疾患患者、健常人および呼吸器・心臓疾患による治療を受けていない患者を対象とし、全被験者からインフォームドコンセントを得た。血液検体および口腔粘膜からゲノム DNA を抽出し、PCR-RFLP 法により遺伝子型を決定した。

【結果・考察】 β_2 受容体遺伝子多型と呼吸器疾患、不整脈・心筋梗塞・心不全などの心臓疾患に対しては、その関連性が認められなかった。しかしながら高血圧症および狭心症患者では、ともに 16 部位 Arg/Arg がその発症に関与していることが示唆された。また、糖尿病と 16 部位 Gly/Gly が心臓疾患のリスクファクターとなることも示唆された。日本人を対象としたこれらの結果は、 β_2 受容体遺伝子多型と疾患との関連性を明らかにすることで、発症の予防や早期治療に有用な情報を与えるものと考えられる。

遺伝子治療における遺伝子発現制御 — 活性酸素刺激による転写因子発現量と発現タンパク量との関係 —

新井昌代 (駒田富佐夫 助教授)

【目的】 遺伝子治療の問題点の一つに遺伝子導入後の発現調節がある。プラスミドベクター等を導入した遺伝子の発現量は、その上流に存在する種々ウィルスの long terminal repeat (LTR) により制御されており、そこに種々転写因子が付加することにより転写を調節されている。また、AP-1 などの転写因子は活性酸素刺激により誘導されることが報告されている。そこで、ヒト Cu/Zn SOD (SOD) 遺伝子に IL-2 分泌ペプチド遺伝子を付加し、細胞外分泌型とした ILSOD 遺伝子及び CMV-LTR を有するベクターをラット皮膚線維芽細胞 (FR 細胞) へ導入し、FR-ILSOD 細胞を樹立した。この細胞に対し、パラコート (PQ) を負荷することにより導入遺伝子及び転写因子発現量の時間的変動について検討した。

【方法】 FR 細胞ならびに FR-ILSOD 細胞に PQ (0, 5, 20, 50 μ M) を負荷し、4 時間、24 時間後の *c-fos*、*c-jun* mRNA 発現量の変動について検討した。さらに、FR-ILSOD 細胞に対して、PQ 負荷後の総 SOD 活性と ILSOD mRNA 発現量の変化について検討した。SOD 活性の測定には大柳の方法を用いた。mRNA 発現量の測定には RT-PCR 法を用い、 β -actin を対照としてその比を求めた。

【結果・考察】 FR 細胞ならびに FR-ILSOD 細胞において、PQ 負荷 4 時間、24 時間後の *c-fos*

及び *c-jun* mRNA 発現量は、PQ 非負荷時と比較して増加が認められた。また、PQ 負荷 4 時間、24 時間後の *ILSOD* mRNA 発現量では、PQ 非負荷時と比較し増加が認められた。しかし、細胞外総 SOD 活性は、両時間において変化は認められなかった。以上の結果から、活性酸素負荷による転写因子発現ならびに制御の可能性が示唆された。

Whey protein およびその成分の薬物消化管吸収に与える影響の評価

加藤奈穂子（從二和彦 教授）

生理活性ペプチド等の難吸収性薬物の吸収性改善のため、様々な吸収促進剤の利用が検討されている。しかし、吸収促進効果に伴い生体膜障害性が増大する場合も少なくないため、より安全性の高い物質の使用が求められている。また、地球環境の保持や資源の有効利用の面から、医薬品材料の選択についても十分な配慮が必要となる。そこで本研究では、チーズ製造時の副産物であり、現在そのほとんどが廃棄されている乳清タンパク質（whey protein ; WP）を用い、機能性製剤基剤としての可能性を評価する目的で、WP を基剤としたマイクロスフィア（MS）の調製、および薬物の消化管吸収におよぼす WP の影響について検討した。

ポリプロピレングリコールを分散媒に用いた乳化剤を使用しない MS 調製法により、WP を基剤とした MS が得られ、WP の製剤基剤への応用の可能性が示された。

ウサギ摘出空腸を用い、粘膜側に WP もしくは WP の主タンパク質である β -ラクトグロブリン (β -Lg) と α -ラクトアルブミン (α -La)、および FITC-デキストラン (FD-4) を同時適用し、透過実験を行った。これらの結果、FD-4 の粘膜透過性は WP の濃度依存的な増加傾向を示し、WP による透過促進効果が示唆された。しかし、 β -Lg、 α -La にはその効果は認められなかった。さらに、WP および FD-4 をラット腸管に灌流し、*in situ* 吸収実験を行った。この結果、WP 同時適用群において、薬物適用初期段階での FD-4 の吸収促進傾向が認められた。また、先に調製した WP MS は速やかに水に溶解することが認められたため、WP MS を水溶液とし、ウサギ摘出空腸を用いた透過実験を行った。この結果、WP は MS 調製の過程で先に観察された FD-4 の透過促進効果が消失することが認められた。

以上、WP の製剤分野における応用に向け、WP の機能性製剤基剤としての可能性を示した。

ヒト乳腺細胞の能動輸送に関する研究

木村聡一郎 (森本雍憲 教授)

授乳期間中、母親が薬物を服用した場合、乳汁を介する乳児の医薬品曝露が問題になる。これまでに、受動拡散に従った乳汁中薬物濃度予測式が報告されたが、予測値と *in vivo* データが合わない薬物があり、能動輸送の関与が示唆された。また、ヒトでは輸送担体の発現が mRNA で確認されているが、輸送特性は明らかとなっていない。本研究では、機能的に授乳期乳腺と同等なヒト乳腺上皮細胞単層膜 (HMEC monolayer) 培養法を確立し、有機カチオンおよび有機アニオン輸送系のモデル基質を用いて輸送特性を評価した。

まず、乳腺発達に関与するホルモンを培地に添加して、細胞の増殖および経上皮抵抗値 (TER) に対して優れた添加パターンを決定した。次に機能分化した monolayer の形成を目的として、三次元培養法および trypsin 抵抗性培養法を応用した。その結果、2 回の trypsin 処理に抵抗性を示した細胞 (double resistance HMEC) で、最も高い TER を示し、輸送特性の評価に用いた。有機カチオンおよび有機アニオン輸送系のモデル基質として、tetraethylammonium および p-aminohippuric acid を $0.41 \mu\text{M}$ で添加し、透過速度の比較により輸送特性を評価した。TEA では、B から A への輸送が逆方向の輸送に比べて有意に大きく ($p < 0.05$)、PAH の輸送に方向性は観察されなかった。

これらの結果から、double resistance HMEC monolayer は、授乳期乳腺に近い性質を示し、血液から乳汁方向へ有機カチオンを能動的輸送担体の発現が示唆された。さらに、能動輸送を評価できることが明らかとなり、トランスポーターの発現および機能を確認することにより、乳汁移行に関する情報収集が可能になると考えられる。

貼付剤の放出試験法の検討

島村剛史 (森本雍憲 教授)

現在、第 14 改正日本薬局方には、貼付剤について放出試験を行うことになっている。しかし、試験法が記載されている公定書は存在しない。そのため製造・品質管理のための放出試験法について検討した。放出試験法構築に際し、International Conference on Harmonization の考え方である国際調和の観点と、環境汚染物質である有機溶媒を使用しないことを前提とした。なお、多種類の貼付剤に同一試験条件を適用することは難しいため、最も繁用されている非ステロイド性消炎鎮痛薬について検討した。

溶出試験装置 (Puddle Over Disk) と我々が作成したホルダーおよび放出媒体として水を基本としたパップ剤の膨潤を抑制するための人工汗 (Artificial Sweat: AS) を用いた放出試験法を考案し、

インドメタシン (IM) 製剤 (A、B、C、D)、ケトプロフェン (KP) 製剤 (E、F) およびフルビプロフェン (FP) 製剤 (G、H、I) の先発医薬品 9 製剤の放出試験を行った。放出試験は 32°C、12 h で行った。

パップ剤は基剤として高吸水性ポリマーを含むため、水に浸漬すると極めて強く膨潤する。そこで、ヒト汗に含まれ、高吸水性ポリマーの膨潤を抑制すると報告のある金属イオンを用いて、AS を調製し、放出液とした。それぞれの製剤で膨潤の程度が違うことから、ヒト汗成分のうち膨潤抑制効果が最も高いと報告されている Ca²⁺濃度を、各々製剤について膨潤が完全に抑制される濃度まで上昇させ、他のイオンはヒト汗の上限の濃度にして AS を調製した。

溶解律速になっていないことを確認し、USP の条件に合わない製剤に関しては放出面を小さく、あるいは放出液の量を検討し、適合するようにしてから放出試験を行った。膨潤を完全に抑制した放出液を用いた放出試験では、IM 製剤で約 10%、KP 製剤ではほぼ 100%、FP 製剤では約 40%の薬物が放出された。この放出試験法を用いることで、膨潤および放出特性の違いが各製剤で顕著に見られるため、パップ剤の製剤・品質の評価に有用であると考えられる。

皮膚外用剤試験における TEWL 測定の有用性と問題点

佃 慶一 (森本雍憲 教授)

経表皮水分損失量 (TEWL) の測定は、臨床において皮膚の病状・機能評価に有用である。また、OECD ガイドラインにも記載され、透過皮膚試験を行う際の皮膚 integrity 評価に利用できるとされている。日本において経皮薬物透過試験を行う場合、ヒト死体皮膚の使用に規制があるため、ヘアレスラットが最も汎用されている。そこで本研究では、tape stripping により、皮膚に種々程度のダメージを与え、TEWL との関係进行调查することで、TEWL をヘアレスラット皮膚のダメージの指標にすることが妥当であるか検討した。intact 皮膚の場合、TEWL はどの skin sample でも一定の値が得られ、再現性が見られた。5 回目までの TS では、測定初期に TEWL の一過性の上昇が見られ、その後安定した値を示した。7 回目以降では一過性の上昇は見られず、その後も TEWL の不安定な変動が見られ大きなバラツキを示した。この結果の原因を調査するために stripping に用いたテープを観察したところ、7 回目以降の TS では SC がほとんど存在しないものや部分的に欠損しているものなど SC の状態が sample ごとに大きく異なっていた。TEWL は残存する SC が少なくなったときに顕著に上昇するので、観察された SC の状態のばらつきが測定結果に反映されたものと考えられる。20 回 TS した皮膚 (full stripped skin) では、測定初期に他の回数のものより低い値が得られた。これは理論と異なり、今後更なる検討が必要である。本研究の結果より、TEWL の測定は皮膚 integrity の評価に用いることは可能であるが、軽度のダメージを識別、また TEWL の値からダメージの程度

を予測することは困難であることが示唆され、さらに TS より角質抵抗を均一に段階減少させたと仮定して、TEWL や薬物透過速度を関連付けることは非常に困難であることが明らかになった。

院外処方せん発行に関する諸問題

土田さおり (森本雍憲 教授)

平成 14 年 4 月 1 日より済生会栗橋病院(以下、当院)は、全外来患者の院外処方せん発行に踏み切った。そこで、外来患者がどのように保険薬局を選択するかについて、調査・解析し、院外処方せん発行に関する諸問題について考察した。

当院では、薬剤部窓口前の FAX から患者の希望した薬局へ処方せんを送信するシステムが整っており、この FAX 利用率は 75.7%と高く、多くの外来患者が利用していることから、送信記録をもとに以下の調査を行なった。1. 院外処方せんの地域別(1)および病院周辺薬局(以下、周辺薬局)別(2)の送信件数を調査した。2. 患者の薬局選択様式を推定するために、周辺薬局利用率の月別推移を用いてシミュレーション分析を行なった。

1 (1): 処方せんは当院を中心とした周囲、車で 30 分以内の範囲に拡散したことから、この範囲が当院の通院距離圏であると思われた。(2): 周辺薬局の調査では、幹線道路から駐車場への車の流れがスムーズで駐車スペースが大きい薬局に多くの処方せんが送信された。2: シミュレーション分析による患者の薬局選択様式は、新患(18%)の 7 割の患者が初診時に周辺薬局を選択し、2 回目には 6 割に減少、3 回目以降は 8 割の患者が再度周辺薬局を利用するという結果であった。このような傾向を示したことには、患者が自宅近隣の(かかりつけ)薬局を利用した際に、備蓄医薬品不足による不自由を経験したことがあるためではないかと考え、調査したが説明できる結果は得られなかった。以上のことから、患者の薬局選択は車の利便性の追求により行なわれることが示唆され、今後、薬剤師は「かかりつけ薬局」を持つことが真に患者自身の利益に繋がるという社会的認識を持つように働きかけることが大変に重要であると思われた。

超音波による薬物の経皮送達促進に関する予備的検討—超音波照射条件の検討とモデル角質層脂質に対する超音波の影響—

中村恭士 (森本雍憲 教授)

超音波を用いた経皮吸収促進法は、外部駆動力を利用しているため、薬物送達をコントロールできる可能性がある点で注目されている。最近の研究では、数百 kHz 以下の低周波数超音波が親水性化合物の吸収促進に対して効果的であることが報告されているが、その効果は十分に特徴付けられていない。本研究では、低周波数域超音波を用い親水性化合物カルセインの皮膚透過に対する促進効果特徴づけ、さらにリポソームを用いて角質層脂質に対する影響を評価した。

実験は、縦型拡散セルにヘアレスラット腹部摘出皮膚を装着し、角質層または真皮側に 1 mM カルセイン溶液を適用した。41, 158 および 445 kHz の超音波 (強度: 60 または 120 mW/cm²) を角質層または真皮側から照射し、経時的にセル中の溶液を採取しカルセイン移行量を測定した。また、経時的に皮膚を介した電気抵抗値もモニターした。60 mW/cm² の強度で超音波を照射したとき、いずれの周波数においても超音波照射中にカルセイン flux の増大が認められ、照射後にはコントロール付近まで回復した。Flux 増大のランクオーダーは 41 kHz > 158 kHz > 445 kHz だった。41 kHz の超音波 (120 mW/cm²) を用い検討を加えたところ、カルセインの皮膚透過は超音波照射方向に特異的に促進されることが明らかとなった。また、真皮側に超音波照射した場合と比較したところ、角質層側から照射したときに顕著な促進効果が観察された。角質層側照射時には、皮膚電気抵抗値は base line の 50% まで低下していたことから、角質層脂質領域の構造的な変化が寄与していることが示唆された。角質層から抽出した脂質を用い、脂溶性の異なる種々蛍光物質を包含するリポソームを調製し、超音波照射前後の蛍光スペクトルの変化に基づき角質層脂質に対する 41 kHz 超音波の影響を試験したところ、超音波は角質層脂質の親水性領域の拡散性を増大していることが推察された。

医薬品の皮膚障害性副作用と Transglutaminase 活性との関連性

根本英一 (森本雍憲 教授)

薬疹は、体内に取り込まれた薬物やその代謝物により誘発される皮膚粘膜組織障害である。また薬疹は、有害反応の中で非常に起こりやすいものの 1 つであり、Stevens-Johnson 症候群などのように死に至る場合もある。著者は、架橋酵素 Transglutaminase (TGase) と、紅皮症や魚鱗癬、棘融解との関連性が示唆されていることから、TGase に着目し、薬物のヘアレスラット摘出皮膚中 TGase の阻害活性を調べ、薬疹の発症を回避するためのスクリーニング法が可能であるかを検討した。

以前の研究で TGase 阻害活性が検討されている薬物は、本検討においても同様の結果が得られた。

enalapril と bleomycin に TGase 阻害活性が認められたことから、両薬物による薬疹の発症には TGase 活性阻害が関与することが示唆される。薬疹発症の報告のある薬物は、TGase 阻害活性を示さなかった。したがって、これら薬物による薬疹の発症には TGase 活性ではなく、免疫的な機構等が関与するものと考えられる。enalapril と allopurinol の代謝産物である enalaprilat と oxipurinol には TGase 阻害活性が認められなかった。したがって、enalapril の poor metabolizer が enalapril による薬疹を発症しやすいことが示唆される。薬疹を発症しない薬物は、pentoxifylline を除いて TGase 阻害活性を示さなかった。

結論として、いくつかの薬物で薬疹との関連性がみられたが、ほとんどの薬物ではそのような関係は認められなかったことから、TGase 活性阻害のみでは薬疹の発症を予測することはできず、免疫的な機構を考慮した方法が必要であると考えられる。

花粉飛散数とアレルギー性鼻炎新規患者数の動向について

佐村 優 (森本雍憲 教授)

アレルギー性鼻炎は、その原因となるアレルゲンの違いから、通年性アレルギー性鼻炎と季節性アレルギー性鼻炎（以後花粉症と記す）に分類されている。前者はハウスダスト、ダニ、カビなどがアレルゲンとなって発症し、後者は様々な花粉がアレルゲンとなって発症する。アレルゲンとなる花粉は 50 種類以上あるが、これらの花粉の飛散は地域によって大きく異なると考えられている。そこで、城西大学薬学部薬物療法学講座の観測データをもとにスギ、ヒノキ科、ブタクサ花粉飛散数の年次変動と、当観測地点に近い埼玉医科大学付属病院におけるアレルギー性鼻炎新規患者数の動向と花粉飛散数との関連性について検討した。

空中飛散花粉調査は、日本アレルギー協会の空中花粉測定および花粉情報の標準化委員会の規定に従って行った。アレルギー性鼻炎新規患者数の動向は、埼玉医科大学付属病院耳鼻咽喉科外来において、1992 年から 2001 年の 10 年間に耳鼻科に来院した新規患者のうち、疾患名がアレルギー性鼻炎または鼻アレルギー、花粉症と診断された患者を対象とし、患者台帳より一日ごとに抽出した。

アレルギー性鼻炎新規患者数の動向と花粉飛散数との関連性を検討した結果、3 月のスギ花粉飛散数とアレルギー性鼻炎新規患者数で高い相関を示した。さらに、スギ花粉数にヒノキ科花粉数も加えると、より高い相関を示した。今回の調査の結果から、最も多くの患者が来院する 3 月の患者数と単独で高い相関を示したスギ花粉飛散数が、アレルギー性鼻炎新規患者数の動向に多大な影響を与える因子であることが示された。

花粉飛散数は、2800 億円に達するともいわれている花粉症関連の医療費や患者の QOL に多大な影響を与える。医療費軽減や QOL の向上には、セルフケア・薬物療法などが重要であるが、これらの

基準となる花粉飛散数予測・観測結果も重要な役割を担っていると考えられる。

間接熱量測定による肺癌治療評価の検討

清水祥正 (森本雍憲 教授)

公立藤岡総合病院では 1999 年からの日本静脈経腸栄養学会 (JSPEN) による栄養サポートチーム (Nutritional Support Team : NST) 結成促進運動に同調し、同年 NST を設立した。その NST 活動の一環に間接熱量測定器による安静時エネルギー消費量測定がある。慢性閉塞性肺疾患 (COPD) をはじめ多くの慢性呼吸器疾患に伴う栄養障害及び体重減少は予後と深く関連している。栄養評価を行う上でエネルギー消費量の算定は重要であり、NST 結成以来多くの患者を測定してきた。今回手技を同じくして間接熱量測定により栄養管理を行うと共に、肺癌患者の状態や化学療法の評価に使用できるか検討した。

入院中の肺癌患者を対象に、間接熱量測定器を用いて昼食後、患者それぞれのベッド上で横臥位にて測定した。測定時にはキャノピーを患者の顔面を覆うように被せ、付属のビニールシートを用い患者の呼気が周囲に逃げないようにした。測定時間は基本的には測定開始後 15 分間とし、測定し得られた REE が Harris Benedict の式から推測された pREE に対してプラス何%であったかで代謝の亢進度を評価した。化学療法の効果について、患者 2 人 (A、B とする) に対して化学療法のクール中及びクール終了後に REE を測定することで、また、患者の状態評価については、疼痛緩和目的の放射線療法中患者 1 人 (C とする) に対して REE を約 2 週間おきに 3 回測定した結果で判定した。

相対的な評価では、化学療法により腫瘍が縮小すれば患者のエネルギー消費量が減少するという傾向が示唆された。しかし、絶対的な代謝の亢進率ではどちらの治療後も亢進している状態と考えられる。特に患者 B においては減少幅も少なく依然として +28% と高値を示した。これらの亢進状態は腫瘍が縮小しているとはいえ完全に消失していないこと、および併発疾患によるものであるとすれば REE の減少は治療による改善傾向を示す可能性を示唆した。また、患者 C は疼痛緩和目的の放射線療法しか行っていなかった。よって基礎代謝を測ることにより治療の評価というよりも患者の状態を知ることはできなかったが代謝亢進により腫瘍の悪化を予想できる可能性が示唆された。

帯状疱疹後神経痛に対するリドカインの効果に関する検討

青木理佳 (森本雍憲 教授)

帯状疱疹後神経痛 (PHN) は、治療に難渋する疼痛疾患のひとつである。これまで、PHN 患者に対して様々な治療法が試みられているが、日本大学医学部附属練馬光が丘病院 (以下、光が丘病院) では、第一段階で lidocaine と epinephrine の併用 (LE) 療法、ついで第二段階で methylpredoniziron (MP) 溶液のイオントフォレシス (IP) 療法の実施を第一選択としている。本療法は、高い治療効果が得られ、副作用も認められていないが、他の治療法との比較検討は行われていない。そこで、本療法と他の治療法の有効性を比較し、また他の施設の IP 療法との比較も行った。さらにヘアレスラットを用いてリドカインの IP 適用を行い、血中および皮膚中リドカイン濃度を測定し有効性について考察を試みた。

方法は、平成 14 年 3 月～平成 15 年 6 月までの期間、PHN と診断された入院患者 7 名および外来 PHN 患者 1 名の合計 8 名に対して IP 療法を行った結果と、clinical evidence に記載されていた amitriptyline と gabapentin の治療効果、および key word として PHN、iontophoresis を用いて PubMed による文献検索を行い、該当した 4 報のデータを比較した。

光が丘病院の IP 療法の治療成績は、文献調査により得た amitriptyline および gabapentin の治療成績よりも有意に高く ($p < 0.05$)、有効性が示された。光が丘病院の IP 療法の効果は、他施設で報告されている LE および MP 溶液や aspirin DL-Lysine 溶液を用いた IP 療法の治療成績よりも有意に高く、indomethacin 溶液を用いた IP 療法よりも優れていた。これは、他施設での施行が定期的かつ条件付であったのに対し、光が丘病院では痛みに応じて随時施行する体制がとられていたためと考えられた。痛みの寛解に随時処置する方法では、副作用もみられておらず、有効性の高いことが示された。

水溶性高分子化合物の結膜透過および生理機能に対するイオントフォレシスの影響

金田洋昌 (森本雍憲 教授)

眼球を覆う角膜や結膜上皮は高いバリア能を有し、点眼による後眼部への薬物送達には困難である。イオントフォレシス (IP) は電流を適用することにより薬物を非侵襲的に送達することが可能であり、眼内薬物送達に関してもいくつかの検討がなされている。これらの研究は、IP が水溶性高分子化合物の眼内送達を増大することを示しているが、眼組織を介した高分子化合物の透過に対する IP の効果について詳細に検討されていない。本研究では、モデル眼組織として家兎摘出結膜、モデル化合物として FITC-デキストラン (4.4~150 kDa) を用いて IP の透過促進効果を試験し、併せて生理機能

に対する効果も評価した。

結膜を Ussing 型チャンバーに挟み、粘膜側から漿膜側への FITC-デキストランの透過量を測定した。実験開始 120 または 180 分後に種々電流密度の IP を 10 または 30 分間適用した。実験中にわたり経上皮抵抗 (TEER) をモニターした。また、IP 適用中止 90 分後に ATP、8-bromo-cAMP、または forskolin を粘膜側に適用したときの短絡電流値 (Isc) の変化を生理機能の指標として測定した。

粘膜側を陽極としたとき (anodal IP)、FITC-デキストランの結膜透過は電流依存的に増大した。適用電流を 0.85 mA/cm^2 、適用時間を 30 分としたとき、anodal IP は試験したすべての分子量のデキストランに対して有意な促進効果を示した。一方、このような効果は粘膜側を陰極とした cathodal IP では観察されず、促進効果は主に electroosmosis 効果によるものと考えられた。Anodal および cathodal IP とともに IP 適用中に TEER を低下させたが、一時的なものであった。さらに、ATP、8-bromo-cAMP、および forskolin により誘導される Isc 変化は、IP 処理とコントロールで有意な差はなかった。以上より、IP は結膜の生理機能を障害することなく水溶性高分子の結膜透過を促進するものと考えられた。

人工汗を用いた放出試験による先発パップ剤と後発パップ剤の比較

平松寛彦 (森本雍憲 教授)

以前の研究で、我々はパップ剤の放出試験法について検討を重ね、人工汗 (AS) の利用による方法を提唱した。本法は膨潤抑制を示す AS の組成を製品ごとに決定した後に放出試験を行うことから、膨潤性と放出性の両面からパップ剤の機能を評価できる。本放出試験法の目的は、本来製造管理に応用し、製剤の性能を鋭敏にとらえることが目的であるが、操作の簡便性を考慮すると、先発および後発製剤間の比較にも用いることができると考えられる。そこで、汎用性の高い NSAIDs 含有先発パップ剤と後発パップ剤の膨潤性と放出製を比較することとした。

試験製剤として、インドメタシン (IM) 製剤 8 種 (先発品 4 種および後発品 4 種)、ケトプロフェン (KP) 製剤 7 種 (先発品 2 種および後発品 5 種)、およびフルルビプロフェン (FP) 製剤 4 種 (先発品 3 種および後発品 1 種) を用いた。

各製剤の AS 中での膨潤を測定したところ、膨潤が完全に抑制される AS 中の Ca 濃度は製剤間で大きく異なり、最も高濃度の Ca を必要とした製剤は IM 製剤の先発品だった。また、KP 製剤の後発品および FP 製剤の先発品では、 3 mEq/mL の Ca を含有する AS (AS(3)) 中で基剤崩壊する製剤も認められた。12 時間後の薬物放出率は薬物によって大きく異なり、各製剤に最適な AS (AS(S)) を用いたときの放出率は、IM 製剤で約 10%、KP 製剤で約 90%、FP 製剤で約 50% だった。IM 製剤は先発品と後発品で放出率に差は認められなかった。KP 製剤では、先発品は AS(3) と AS(S) の両方で

約 90%の薬物が放出した。一方、後発品では AS(3)で基剤崩壊したもののほぼ 100%の放出率を示し、AS(S)での放出率は約 90%だった。FP 製剤では後発品は先発品と同様の放出率を示したが、FP 製剤間の放出率には約 1.5 倍の差が認められた。以上より、本放出試験法は製剤間の品質評価に利用できることを示しているが、放出率の低い製剤については感度の向上を目指した検討が必要であると思われる。

ゲフィチニブの治療効果と副作用に関する検討

茂木拓也 (森本雍憲 教授)

ゲフィチニブ (イレッサ®) は、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼを特異的に阻害する分子標的薬として開発された肺がん治療薬であり、わずか治験 50 例の臨床試験を経て承認され、2002 年 7 月に世界に先駆けて日本で発売された。しかし、その後の臨床使用において間質性肺炎による死亡例が多発し、その承認過程が大きくクローズアップされた。ゲフィチニブは、少数の治験例数で承認されたということから、治療効果と副作用に関する十分な情報が得られていない。そこで、埼玉県立循環器・呼吸器病センター (以下、センター) においてゲフィチニブ単独治療を受けている患者について、その治療効果と副作用について調査し、考察することとした。

センターにおけるゲフィチニブ服用患者の治療効果は、完全寛解率 1.1%、部分寛解率 20.7%であり、奏功率は 21.7%であった。この効果を他の抗がん剤の効果と比較すると、プレオマイシンの 50%には及ばないものの、ゲフィチニブが経口剤であることを考慮すると、外来患者に対する有用性は高いものと考えられた。生存患者と死亡した患者の服用期間の比較は、ゲフィチニブに対する感受性が明らかに異なる 2 群が存在することを示唆した。一方、副作用の発現率と治療効果の関係を調査したところ、下痢の副作用を発現した患者においてゲフィチニブの治療効果を期待できない可能性のあることが示唆された。さらに、下痢を発現した患者でがん病巣不変および増悪が多く見られたことから、ゲフィチニブ服用患者では、下痢の副作用が他の治療方法を検討する際の重要な指標になるものと考えられた。

薬物の乳汁移行性の速度論的解析

内山玲子 (森本雍憲 教授)

薬物の乳汁移行性と授乳による乳児への危険性に関する報告は少なく、しかもその指標として報告されている乳汁/血漿中濃度比 (M/P) に関しては、統一された考え方がない。そのため、M/P を定速静注時の定常状態における M/P と定義し、乳腺機能および乳汁産生を反映し、さらに乳汁への薬物移行を排泄過程と考えた速度論モデルより、薬物の乳汁移行および M/P について検討した。また、授乳安全性基準について動態学的に検討した。

モデルは、乳汁産生速度を Z (L/h) とし、① 1 コンパートメントモデル・乳汁排泄、② 2 コンパートメントモデル・セントラルからの排泄、③ 2 コンパートメントモデル・ペリフェラルからの乳汁排泄の3つのモデルを作成して定義した M/P 理論式を求めた。①および②では、M/P 理論値は、 k_m 、 V 、および Z 、③では k_m 、 k_{12} 、 k_{21} 、 V 、および Z のハイブリッドな式となった。ただし、 k_m は乳汁中排泄速度定数、 k はコンパートメント間の移行定数、 V は分布容積、下付きの「1」はセントラル、「2」はペリフェラル、を意味し、下付き数字の並び順は方向を示す。これらの式およびモデルから、体内動態パラメーター既知の薬物では、乳汁中濃度から M/P が予測でき、1 次吸収過程のある場合では、経時的な M/P が算出できる。なお、シメチジンの臨床データから M/P を計算したところ 1.67 となった。

授乳安全性は、Harnack 表より、新生児薬用量は成人量の 1/8 (未熟児 1/10) であり、授乳婦の服用量に対する乳児薬物摂取量比 (乳児/成人薬用量比) が 0.1 未満の場合は問題ないと仮定できる。そこで、分布容積と M/P 比を用いて授乳 1 回あたりの乳児/成人薬用量比が 0.1 未満となる範囲を求めた結果、分布容積 116L 以上の薬物は、母体での希釈効果により乳汁中濃度が低くなり、授乳安全性が高い可能性が示唆された。

エレクトロポレーション/イオントフォレシス併用系における薬物の皮膚透過促進作用に関する研究

五十嵐 崇 (杉林聖次 教授)

Electroporation (EP) や iontophoresis (IP) などの物理化学的促進法により、化学的促進剤ではほとんど吸収されなかった高分子薬物についても非侵襲的に投与することが可能となった。ここで、EP は細胞や組織への遺伝子導入にも用いられている技術で、ミリ秒オーダーの高電圧パルスを与えることにより生体膜に小孔を形成させる方法である。一方、IP は低電流を数分から数時間の適用し、薬物の生体膜透過を促進する技術である。そこで本研究では、多方面から広く研究されている EP と

IP を併用した場合の促進効果およびそのメカニズムの解明を試みた。

EP による薬物の皮膚透過促進効果と皮膚の *iontophoretic permselectivity* に及ぼす EP の影響を評価するため、アニオン性、カチオン性、非荷電性の低分子および非荷電性の高分子を用いて実験を行った。In vitro 皮膚透過実験の結果、IP 適用時による透過促進効果は、EP 前処理により非荷電性および荷電性低分子薬物とも減少した。これは、EP 前処理による皮膚の *permselectivity* の減少ならびに皮膚からの競合イオンの漏出によるものと推定された。また、低分子薬物では *electrorepulsion* の寄与が大きく、カチオン性薬物では皮膚の *permselectivity* の減少に伴う *electroosmosis* の低下が透過に大きく影響することが明らかとなった。これに対し、高分子薬物では EP/IP 併用により皮膚の *permselectivity* が減少したにも関わらず、EP によって形成された新規透過ルートの大さに依存して皮膚透過性が増大することが示唆された。以上より、EP による皮膚の *permselectivity* の変化と *pore size* が透過に大きく影響し、特に *electrorepulsion* に関与せずに促進されるアニオン性低分子薬物では陽極側から陰極側への *convective flow* の影響を考慮した投与設計が必要であると考えられた。

水溶性薬物の白色ワセリン基剤軟膏からの放出性および皮膚移行性に関する研究

石井 宏 (杉林堅次 教授)

アトピー性皮膚炎の治療に使われる外用剤基剤として刺激感が極めて少ない白色ワセリン軟膏が繁用される。アトピー性皮膚炎治療薬の中には水溶性のものも存在するが、白色ワセリンは疎水性で水溶性薬物の保持が悪い。加えて、これまでに水溶性薬物の白色ワセリンからの薬物放出性や皮膚移行性に関する詳細な研究はほとんどない。そこで、水溶性の新規アトピー性皮膚炎治療薬である TN-1b をモデル薬物として選択し、1(w/w)%TN-1b 白色ワセリン軟膏からの TN-1b 放出性と皮膚透過性を試験した。なお、基剤には未処理、未添加の白色ワセリン (コントロール)、10(w/w)%精製ラノリンまたは 1 もしくは 5(w/w)%セラミドを加えた白色ワセリン、さらに *intact skin* に 6 時間適用した白色ワセリン (適用後白色ワセリン) を用いた。

放出実験結果から、コントロール軟膏から放出された TN-1b は主に放出液との界面付近に存在していた TN-1b であることが示唆された。また、10(w/w)%精製ラノリンや 1 もしくは 5(w/w)%セラミドまたは適用後白色ワセリン軟膏からの TN-1b 放出性はコントロール軟膏からの値と比較して、高くなる傾向を示した。さらに、*stripped skin* を用いた透過実験結果から、10(w/w)%精製ラノリン、5(w/w)%セラミドと適用後白色ワセリンからの皮膚透過性はコントロール軟膏からより高くなる傾向を示した。また、これらの軟膏適用後の皮膚中量においてもコントロール軟膏と同等かもしくは増加する傾向を示した。*intact skin* に適用した場合は、全ての軟膏で皮膚透過は見られなかったが、

皮膚中量はコントロール軟膏より全ての軟膏で増加した。これらの結果から、角層から製剤中に TN-1b の放出を促す物質、おそらく角層脂質成分のセラミドが分泌・分配されている可能性が示唆された。

以上、白色ワセリン軟膏を皮膚に適用すると、含有された TN-1b が角層脂質成分であるセラミドの働きに助けられて皮膚に分配し、目的とした TN-1b の局所作用を発揮すると予想された。

水溶性薬物の疎水性粘着剤への封入性改善と放出・皮膚透過挙動の研究

小林さつき (杉林堅次 教授)

皮膚適用製剤に用いる感圧粘着剤 (Pressure Sensitive Adhesive : PSA) には主にシリコーン系、アクリル系、ゴム系の三種類があるが、これらは全て疎水性である。そのため、PSA に水溶性薬物を溶解・封入させることは困難で、水溶性薬物の貼付剤からの放出性や皮膚透過性も著しく低い。そこで、本研究では PSA からの水溶性薬物の放出・皮膚透過性の改善を目的として、疎水性 PSA に親水性の種々高分子、フィラーさらにはグリセリンを添加した貼付剤を調製し、水溶性薬物の PSA 中の溶解性と貼付剤からの放出性について検討した。なお、モデル水溶性薬物として塩酸ジフェンヒドラミン (Diphenhydramine Hydrochloride : DH) を、粘着基剤には比較的安価で、環境負荷が低く、ホットメルト製造が可能なゴム系のスチレン - イソプレン - スチレンブロック共重合体 (SIS) を選定した。

親水性高分子の添加により、DH が PSA 基剤に可溶化することが確認され、また、基剤中の水分量が可溶化量に関与していることが示唆された。さらに、これら貼付剤の放出プロファイルを線形速度論に基づいたコンパートメントモデルにあてはめて解析を行った結果、DH 皮膚透過性には累積放出量 (率) よりも PSA 中の DH 溶解量が深く関与していることが示唆された。また、DH の可溶化能は親水性高分子の種類により異なり、薬物の溶解性および放出性の改善には、添加する親水性高分子の選択が重要になると考えられた。

以上のことより、高い皮膚透過が得られる水溶性薬物含有貼付剤の選択が、放出実験とその理論的解析により可能であることが示唆された。

薬物局所適用後の皮内・皮下動態に関する研究

- 線維芽細胞成長因子で形成させた肉芽への薬物分布と滞留性 -

築地泰臣 (杉林堅次 教授)

一般に、皮膚に局所適用された薬物は皮膚に分配した後皮膚中毛細血管から全身循環へと移行するか、適用部位深部の皮下組織へと移行した後全身循環へと移行する。皮下局所での持続的薬効を期待する場合、皮下組織からの薬物の消失は緩徐であることが望ましい。標的部位を筋肉とした近年の我々の研究により、筋肉での薬物滞留性を高めるには、薬物を筋肉へ直接注入するよりも近傍の皮内に注入した方が良好であることが判明した。また、筋肉中での薬物滞留性には血流が関与していることが推定された。そこで、本研究では局所血流を変動させたモデル動物を作成し、薬物の皮内・皮下動態に及ぼす血流の影響について試験した。Wistar 系雄性ラットの腹部正中線上皮下に線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) を染み込ませた直径 1.5 cm の paper disk を埋め込み、5 日間飼育して標的部位としての肉芽を形成させた。このモデル動物に対し、モデル薬物としてのサリチル酸ナトリウムまたはカルセインナトリウムを静脈内急速単回注入 (i.v.)、標的組織内直接注入 (i.t.)、近傍皮内組織注入 (i.c.)し、血漿中薬物濃度と組織中薬物量の経時的推移を求め、得られたデータについて筋肉で検討した以前の研究結果と比較した。その結果、control, model 両群とも i.t.投与後に薬物は速やかに全身循環へと移行し、model 群でより急速な薬物消失が認められた。一方、i.c.投与後の標的組織からの薬物消失は control, model 両群とも i.t.投与後のそれと比べて遅く、薬物は標的組織に長時間滞留した。さらに、control 群では i.t.投与後に皮膚中に認められる薬物はすべて再分布に由来するものであったのに対し、model 群では標的組織から皮膚へ薬物が移行している可能性があること、model 群における標的組織及び皮膚からの薬物消失は control 群のそれと比べてより速いことが判明した。以上のことから、標的組織近傍皮内への薬物注入法は、標的組織に対する直接注入法に比べて標的組織での薬物滞留性を高める手段として有用であること、さらに血流の変動は局所薬物動態を変動させることが示唆された。

眼瞼皮膚から結膜への薬物移行に関する研究

中川暁彦 (杉林堅次 教授)

現在、眼科領域における薬物治療の大部分を占める点眼剤は、結膜囊の容量を超える投与ができないだけでなく、鼻涙管等を通じた排出が速いため、結膜、角膜、水晶体等への局所バイオアベイラビリティは低い。眼軟膏剤やゲル化点眼剤を用いることによりアベイラビリティは向上するが、使用感が悪いことコンプライアンスの低下が問題となっている。そこで今回、眼瞼皮膚から結膜へ薬物を直

接送達させることで、就寝中にも薬効を発揮でき、かつ眼粘膜への直接刺激のない眼瞼皮膚適用型外用剤の可能性について検討することとした。本研究では、始めに Franz 縦型拡散セルを用い *in vitro* 皮膚透過実験を行ない、異なる皮膚（腹部、上眼瞼および下眼瞼）からの皮膚透過性に関する検討を行った。さらに、その透過プロファイルを酵素パラメータの算出、光学顕微鏡による観察、さらには共焦点顕微鏡とエステラーゼの存在によって蛍光を発するフルオレセイン-5-イソシアナート二酢酸エステルを用いて視覚的に酵素分布を評価することで検証した。また、適用部位を下眼瞼に絞り NA もしくは EN を適用することで *in vivo* 吸収実験を行い NA 点眼実験時と結膜中濃度を比較した。

その結果、眼瞼皮膚は腹部皮膚とは異なり NE だけでなく NA をも透過させることが示され、比較的水溶性の薬物についても眼瞼皮膚適用型外用剤に含有できる可能性が示唆された。また、腹部皮膚のほうが眼瞼皮膚に比べ角層の構造が密であることが示された。さらに、各皮膚間（腹部、上眼瞼および下眼瞼）で酵素活性に相違は見られなかったが、眼瞼皮膚では、表皮に加えて結膜側にもエステラーゼが存在することが示された。加えて、経眼瞼投与は点眼に比べ、結膜中濃度の滞留性が延長することが示された。

以上より、眼瞼皮膚適用による経眼瞼投与は結膜への薬物標的能を有する投与方法として有用であることが示唆された。そして、プロドラッグは眼瞼皮膚透過における真皮律速を改善する方法になることが示された。

ビタミン入りガム型サプリメントの吸収性に関する動態学的研究

寺田元美（杉林堅次 教授）

高齢化や生活習慣病の増加に伴い、国民の健康への関心が高まり、近年数多くの保健機能食品や健康食品が市場に出回っている。しかし、その有用性や安全性に関する適切な試験・評価法が少ないため、科学的根拠のある評価が望まれる。これらの食品に含まれる栄養素は薬物と同様、ほとんどが消化管や他の上皮粘膜から吸収され、効果を発揮し、そして消失（代謝・排泄）されるので、これらの科学的評価には栄養素動態学（nutrient-kinetics）的な解析が必要となる。今回は、吸収部位特異性を持つリボフラビン（VB2）と消化管吸収が内因子量に依存するためバイオアベイラビリティが一定しないといわれているシアノコバラミン（VB12）をモデル栄養素とし、これらを含有したガム型サプリメント（機能性ガム）の吸収性を、健常人の尿中排泄量から評価した。

繰り返し投与による食事での栄養素（VB2, VB12）の動態解析を行い、これらビタミンの個人毎の動態パラメータを求めた。一部の栄養素については、非侵襲的に得られる尿サンプルをもとにした解析法で個人毎の栄養必要量を算出できる可能性が示唆された。

VB2 は食事のみに対して、顕著に吸収が増加し、口腔粘膜に由来すると思われる初期吸収もみ

られたので、サプリメントとしての有用性が認められた。しかし、経口サプリメントと比較すると、バイオアベイラビリティでは劣ることもわかった。一方、同じ水溶性ビタミンである VB12 については、今回の検討では個人差が大きく、明確な知見は得られなかった。

以上の結果より、ガム製剤の有用性を評価するには、含有する薬物や栄養素を選ぶ必要があるものの、本研究で示した解析法が用いることができることが示された。

機能水の外用剤基剤としての有用性に関する研究

代永 恵 (杉林堅次 教授)

外用剤に用いる添加剤は皮膚傷害性が少なく、かつ薬物放出性・皮膚透過性を制御できるものが望ましい。そこで本研究では、優れた洗浄作用や殺菌作用を有し、すでに消毒剤や食品添加物として認可を受けている強酸性電解水 (pH 約 2)、強アルカリ性電解水 (pH 約 12)、および後者の市販品である S-100 (pH 約 12) (エー・アイ・システムプロダクト (株)) の外用剤基剤としての有用性を検討した。また、これらが有すると考えられる活性酸素除去能を測定し、活性酸素が関与する疾患に対する有効性についても推定した。

安息香酸およびリドカインの皮膚透過性は、それぞれ強酸性電解水および強アルカリ性電解水を基剤とした時に精製水を基剤とした場合と比べ著しく高かった。また、これらの透過性は基剤中薬物の分子型分率に強く相関しており、強酸性および強アルカリ性電解水には皮膚刺激性に関係するような吸収促進効果はみられないことが示唆された。一方、MTT 試験から評価した皮膚障害性は、電解水と同 pH の HCl、NaOH 溶液と比べて低くなる傾向が見られた。さらに、各電解水を角質層側に適用したときの真皮側液の pH 変動は、同 pH の HCl や NaOH 溶液より小さかった。これらのことから、電解水の皮膚刺激性は、同 pH の酸性水、アルカリ水より低いことが示唆された。また、強酸性電解水にスーパーオキシドラジカルの発生抑制、除去能があることが示唆された。以上より、電解水は皮膚透過促進能を有する安全な外用剤基剤であると考えられた。さらに、酸性電解水については種々疾患の原因や健常組織の老化にも関与していると言われている活性酸素を除去する作用を持つことが示唆され、加えて酸化還元電位が低い機能水を用いることにより生体の酸化防止効果も望めると考えられるため、特に O₂⁻を発生する疾患に適用する基剤として期待が持てることが示唆された。

フッ素化脂肪酸の体内分布に関する研究

山田優樹 (川嶋洋一 教授)

フッ素系界面活性剤であるペルフルオロ脂肪酸(PFCA)は、その炭素鎖長によってラットにおける腎臓からのクリアランス値に大きな違いがある。しかしながら、生体内における臓器特異的な蓄積性についてはほとんど明らかになっていない。本研究では PFCA の生体内での蓄積機構を明らかにする目的で、炭素鎖長 8 のペルフルオロオクタン酸(PFOA) と炭素鎖長 10 のペルフルオロデカン酸について体内分布および細胞内分布を比較した。Wistar ラットに PFOA または PFDA を 5, 20, 48.6 $\mu\text{mol/kg}$ 体重投与し、投与後 5 分および 48 時間後に臓器を摘出し、また、肝臓に関しては細胞分画を行った。各臓器および画分中の PFCA を定量した。

PFOA および PFDA の主要な蓄積部位は血液と肝臓であった。PFOA の血漿と肝臓に於ける濃度はほぼ 1:1 であるのに対し、PFDA では 3:1 であった。また、肝細胞画分中では PFOA の場合、ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分および可溶性画分において蛋白質質量あたりほぼ同程度に分布していたのに対し、PFDA はミトコンドリア画分とミクロソーム画分で高かった。このような PFDA に特徴的な肝臓への蓄積および肝細胞内での膜画分への選択的な分布は、CCl₄ 投与により肝障害を誘発したラットでは認められなかった。

以上の結果から、PFCA のなかでも炭素鎖長の長い PFDA は肝臓中の膜画分に親和性が高いために、肝臓に蓄積され易いものと推察された。

ラット胃粘膜培養細胞を用いた種々薬物の障害作用、及びラットにおける胃粘膜損傷とアポトーシスの関連の研究

松田一希 (谷 覺 教授)

治療薬の中には副作用として胃腸障害を引き起こすものが多い。このうち特に胃粘膜に障害を引き起こすものを選び、培養したラットの胃粘膜上皮細胞に対する作用を検討した。胃障害を引き起こす薬物としてはイプリフラボン、インドメタシンを選び、対照の化合物としてエストラジオール、デキサメタゾンを選んだ。胃粘膜細胞の培養液にこれらの化合物を添加し、培養を行い、1 及び 48 時間後の生存率を検討したところ、添加 48 時間後の生存率を、イプリフラボンがインドメタシンやデキサメタゾンよりも強く投与量に依存して低下させた。この生存率の低下を検討したところ、DNA ラダーが観察された。そこで、イプリフラボンによる細胞死を回避させる薬物を検討したところ、プロスタグランジン E₂ では成功しなかったが、カスパーゼ阻害薬の Z-DEVE-FMK の添加によって、細胞死が回避された。このことはイプリフラボンによる細胞死がアポトーシスであることを示すもの

である。また、イプリフラボンを添加した培養細胞を TUNEL 染色したところ、無添加のものに比較し、多くの染色された細胞が観察された。

以上のことにより、イプリフラボンの消化管に対する副作用は、アポトーシスを引き起こすことによることが示した。

ポリ-L-アルギニンによる水溶性高分子物質の経鼻吸収に対する促進効果の解析に関する研究

前野拓也 (荻原政彦 教授)

鼻からのペプチド及びたん白質様高分子薬物の吸収は、他の粘膜部位に比べ高いものの良好とはいえず、改善が望まれる。一方、Poly-L-arginine (poly-L-Arg)はin vivoおよびin vitroにおいて、モデル水溶性高分子であるFITC-dextran (FD-4)の粘膜上皮細胞間隙透過性を、tight junction (TJ)を介して、一過性に増大させることが知られている。しかし、その生理的なメカニズムに関しては、これまで詳細に検討されていない。そこで、poly-L-Argの促進効果ならびにTJのassembly or disassemblyに対するキナーゼ及びホスファターゼの関与について、電気生理学的およびin vitro透過実験より評価した。

その結果、poly-L-Argはイオン輸送系を一過的に高めた後、膜電位を低下させながら細胞間隙を拡張し、FD-4の透過を増加させた。さらに、その自発的膜電位及び短絡電流の一過的な増加は、K⁺及びCl⁻チャンネル阻害剤により抑制された。一方、PKC阻害剤の処理では、透過係数(P_{app})の増加が、またチロシンホスファターゼ阻害剤の処理では、P_{app}及びGtの増加が有意に減少した。この時のZO-1とoccludinはTJから、poly-L-Argによって細胞内へ分散したが、PKC阻害剤の前処理では、occludinだけが細胞内に分散した。

以上の結果より、poly-L-Argは、(1)K⁺及びCl⁻の分泌と関連していると考えられ、この分泌障害を起こしているような疾患時の治療効果に興味を持たせるものである。(2)Ca²⁺非依存的なPKCの活性化を経てZO-1をリン酸化及びチロシンホスファターゼの活性化を介するoccludinの脱リン酸化により、これらを細胞内に分散させ、細胞間隙を拡張し、細胞間隙透過性を促進したと考えられた。

著者索引

- Aiba Daiki (相場大樹) 42
 Aida Hitomi (合田ひとみ) 26,92,97,98
 Aizawa Yuuki (相澤夕紀) 97,103,131
 Aoki Rika (青木理佳) 140
 Arai Masayo (新井昌代) 97,132
 Asai Yuta (浅井雄太) 92
 Chiba Hiroshige (千葉大成) 73,74,76,101,
 102,106,107
 Dejima Hideki (出島秀樹) 27
 Ebata Midori (江端みどり) 105, 107,110
 Fang Liang (方 亮) 49,58,93
 Fukazawa Kazuaki (深澤一昭) 98,101
 Funada Urara (舟田うらら) 102
 Hada Nobuko (羽田乃武子) 100
 Hasegawa Tetsuya (長谷川哲也) 54,62,94,
 95,100,104,105,110
 Hashii Noritaka (橋井則貴) 35, 36, 37,113,
 102,103
 Hashimoto Fumie (橋本フミ恵) 30,92,93
 Hayashi Hidenori (林 秀徳) 30,92,93
 Hayashino Morimasa (林野守将) 91
 Hibino Yasuhide (日比野康英) 68,97,99,106,
 111
 Higashiguchi Miduka (東口みづか) 105
 Hirayama Kotaro (平山鋼太郎) 163
 Hirota Hajime (廣田 創) 60
 Hosokawa Genki (細川玄機) 131
 Igarasi Takasi (五十嵐 崇) 143,100
 Iguchi Takehiro (井口毅裕) 35,36,37,102,
 Ikeda Masatoshi (池田直俊) 30
 Ikeguchi Yoshihiko (池口文彦) 30,34,99
 Ikemoto Shinji (池本真二) 107,109
 IM Ryang Hyok (任 良赫) 102,108
 Imai Koichi (今井浩一) 96
 Ishii Hiroshi (石井 宏) 100, 144
 Iso Tomoki (磯 知輝) 105
 Isshiki Yasunori (一色恭徳) 35,36,37,102,
 103
 Iwase Yasuhiko (岩瀬靖彦) 77,105,107
 Iwase Yuko (岩瀬由布子) 96
 Juni Kazuhiko (従二和彦) 42,44,93,103
 Kanaya Maki (金谷直紀) 126,93
 Kaneda Hiromasa (金田洋昌) 94,140
 Kaneko Sayumi (金子紗弓) 127
 Katakura Masanori (片倉賢紀) 68,95,105
 Kato Kenji (加藤健司) 93
 Kato Naoko (加藤奈穂子) 93,103,133
 Katori Kumi (香取久美) 64,94,95
 Kawaguchi Takeo (川口健夫) 112
 Kawase Masami (河瀬雅美) 9,10,11,12,13,
 14,15,16,17,18,22,31,78,100,111
 Kawashima Yoichi (川嶋洋一) 66,67,68,69
 70,95,96,102,105,108,110,111
 Kikugawa Yasuo (菊川靖雄) 5,6,7,8,91
 Kim Hyounju (金 賢珠) 72,107,110
 Kim Soan (金 素安) 62
 Kim Sougen (金 相元) 91
 Kimura misutoshi (木村光利) 96,106
 Kimura Soichiroh (木村聡一郎) 105,134
 Kishimoto Hidetoshi (岸本英利) 105
 Kitamura Toshihiko (北村敏彦) 110
 Kobayashi Daisuke (小林大介) 47, 48, 49, 50,
 58,60,62,93,94,96,103,104,105
 Kobayashi Jyun (小林 順) 106,111

- Kobayashi Masaki (小林正樹) 26, 2792,98,
128
- Kobayashi Satsuki (小林さつき) 100,145
- Kobori Yuuki (小堀裕紀) 1
- Komada Fusao (駒田富佐夫) 39,40,60,94,96,
97,99,103,112
- Kondo Seiichi (近藤誠一) 35, 36, 37, 38, 102,
103
- Kougo Tetuo (向後徹生) 94
- Koyanagi Jyunichi (小柳順一) 19
- Kudo Naomi (工藤なをみ)
66,67,68,69,70,95,96,105,111
- Kumada Chiko (熊田稚子) 91,92
- Kunimatsu Kanako (國松加奈子) 94
- Machida Mayumi (町田真弓) 97
- Maebashi Haruka (前橋はるか) 102,108
- Maeno Takuya (前野拓也)45,55,103,150
- Mano Hiroshi (真野 博) 102,108,111
- Masuoka Yuuichi (増岡雄一) 91,101
- Matsuda Kazuki (松田一希) 96
- Matsumoto Kunihiro (松本匡弘) 100
- Matsumoto Syunsuke (松本俊介) 91
- Matsuura Tomokazu (松浦知和) 102,108
- Mitsumoto Atsushi (光本篤史) 70
- Miyatake Shinji (宮武晋治) 98,101
- Miyazawa Etsuko (宮沢悦子) 5, 6, 7, 8, 91
- Mochida Junko (持田純子) 44
- Motegi Takuya (茂木拓也) 142
- Mori Kenji (森 健二) 121
- Morimoto Keiko (森本恵子) 105
- Morimoto Yasunori (森本雍憲) 45, 47, 48, 49,
50, 55,58,60,93,94,97,99,100,103,104,105
- Morita Mieko (森田美江子) 92,129
- Mutoh Mizue (武藤香絵) 99,104
- Nagano Kouzo (長野晃三) 92,98
- Nagashima Akira (長島 章) 7
- Nakagawa Akihiko (中川暁彦) 100,146
- Nakagawa Hiroko (中川弘子) 1, 2, 3,91,101
- Nakagawa Kiyose (中川清世) 95,104
- Nakamura Yasushi (中村恭士) 50,99,103,137
- Nakano Humiko (中野文子) 92
- Nakatani Sachie (中谷祥恵) 102
- Nakayama Hiroyuki (中山寛之) 95,100,
103,104
- Nara Shigeru (奈良 繁) 8
- Natsume Hideshi (夏目秀視),
45,55,93,103,104,112
- Negishi Hirokazu (根岸裕一) 96
- Nemoto Eiichi (根本英一) 137
- Niitsu Masaru (新津 勝) 26,28,92,98
- Noda Yoshiko (野田淑子) 105, 107
- Numajiri Sachihiko (沼尻幸彦) 47, 48, 49, 58,
60,93,94,96,103,105
- Odagiri Yohichi (小田切陽一) 71,106,110
- Ogawa Tatsuya (小川竜也) 91
- Ogawa Akihiro (小川哲寛) 58
- Ogihara Masahiko (荻原政彦) 96,106
- Ohmori Kohtaro (大森耕太郎) 67
- Ohtake Kazuo (大竹一男) 45,55,103,106
- Ohya Takeshi (大谷武司) 28, 92
- Okamoto Maiko (岡本麻衣子) 42, 44
- Okamoto Seiji (岡本政治) 97
- Okazaki Mari (岡崎真理) 68,97,99,106,111
- Onobori Yukiko (尾登由起子) 39,96
- Oosa Shinichiro (翁長真一郎) 93,125
- Ozaki Yu (尾崎 裕) 91
- Paku Kenka (朴 建華) 124
- Saitoh Setsuo (齋藤節生) 92

- Saitoh Yukiya (齋藤侑也) 39,40,60,94,96,
97,103,113
- Sakai Ayako (酒井絢子) 96
- Sakamoto Takeshi (坂本武史) 5, 6, 7, 8, 9, 1
- Sakizaki Hideaki(先崎秀明) 106
- Samejima Keijiro (鮫島啓二郎) 26,27,92,97
98
- Samur Yuu (佐村 優) 138
- Sano Motohiko (佐野元彦) 116
- Sato Etuko (佐藤悦子) 110
- Sato Sinya (佐藤晋也) 91,123
- Sato Yasunori (佐藤靖典) 105
- Sato Yu-ko (佐藤優子) 97
- Shiia Megumi (椎屋 恵) 7,91
- Shimizu Jun (清水 純) 108
- Shimizu syousei (清水祥正) 139
- Shiota Yasuo (塩田泰生) 30,93
- Shirahata Akira (白幡 晶) 27,29,32,92,97,
98,101
- Shirataki Yoshiaki (白瀧義明) 16, 17, 20, 21,
22,23,24,25,78,108
- Shironaga Megumi (代永 恵)
95,100,104,148
- Simamura Takeshi (島村剛史) 105,134
- Sohara Yuki (蘇原由貴) 9
- Sonoda Masru (藪田 勝) 106
- Sugibayashi Kenji (杉林堅次) 52,53,54,57,
62,64,94,95,100,103,104,105,110
- Sugita Hideaki (杉田英章) 97
- Sugita Yoshiaki (杉田義昭) 81,91,92,98,101
- Sunaga Katsuyoshi (須永克佳) 111,112
- Tairabune Tomohiko (平船寛彦) 105,141
- Takao Koichi (高尾浩一) 97,98,101
- Takasaki Hideki (高崎秀樹) 27
- Takeda Noboru (竹田 昇) 27
- Takeda syo (竹田 省) 27,92
- Tanaka Toru (田中 享) 9,31,65,96
- Tani Satoru (谷 覺) 9,15,17,22,31,65,78,96
- Tashiro Miyuki (田代美由樹) 95
- Tazawa Yuko (田澤悠子) 62
- Terada Motomi (寺田元美) 105,147
- Tokudome Yoshihiro (徳留嘉寛) 52,53
- Totani Masayuki (戸谷誠之) 107
- Toyama Tomoaki (外山智章) 70,95
- Tsuchida Saori (土田さおり) 48,94,136
- Tsuda Tadashi (津田 整) 111
- Tsukiji Yasuomi (築地泰臣) 100,146
- Tsunoda Nobuyo (角田伸代) 107,109
- Tuchiya Tomomi (土屋友美) 107
- Tukamoto Masato (塚本政都) 124
- Tukuda Keiichi (佃 慶一) 104,135
- Uchida Hiroyuku (内田博之) 71,106,110,111
- Uchiyama Reiko (内山玲子) 105,143
- Ueda Hideo (上田秀雄) 45,47,48,50,55,58,60,
84,93,94,96,99,103,104,105
- Usiyama Yuu (牛山 優) 107
- Usui Tatsuhiko (臼井達洋) 40,97,99,106
- Wada Makiko (和田牧子) 92,97,98
- Wada Masahiro (和田政裕) 102,108,110,111
- Wada Tomoko (和田朋子) 102,103
- Watanabe Kyouko (渡部享子) 91
- Watanabe Tetuya (渡邊哲也) 110
- Watanabe Toshiko (渡邊寿子) 92,97,98
- Xu Yong Ji (許 泳吉) 26
- Yamada Koh-ichi (山田紘一) 1,2,3,91,100,
101
- Yamada Masaki (山田優樹) 95
- Yamamoto Katsumi (山本勝美) 92

著者索引

Yamauchi Masashige (山内昌茂) 4,92

Yasiki Mikiko (矢敷実希子) 97

Yokoe Ichiro (横江一朗) 91,92

Yoshida Daisaku (吉田大介) 94, 100

Yoshida Maiko (吉田麻衣子) 1

Yoshino Jun (吉野 順) 3

Yosihasi Nobuto (吉橋信人) 92

Zen Koukichi (全 洪吉) 92