

博士學位論文

内容の要旨
および
審査の結果の要旨

薬学研究科

第41号

2019年5月

徳島文理大学

は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

目 次

| (学位記番号) | (氏 名) | (論 文 題 目) | (頁) |
|---------|---------|--|-----|
| 甲第51号 | 林 侑 加 子 | 結晶スポンジーレーザー脱離イオン化質量分析による微量構造解析法の開発 | 1 |
| 甲第52号 | 横 田 淳 子 | NSAIDsの微粒子化と皮膚透過性および炎症性サイトカイン・NO産生に及ぼす影響に関する研究 | 8 |

| | |
|---------|--|
| 氏名 | はやし ゆかこ 林 侑加子 |
| 本籍 | 香川県 |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 甲第 51 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 31 年 3 月 15 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士） |
| 学位授与の題目 | 結晶スポンジレーザー脱離イオン化質量分析による 微量構造解析法の開発 |
| 論文審査委員 | （主査）教授 藤島 利江 （副査）教授 加藤 善久 （副査）教授 代田 修 （副査）外部 東屋 功 （東邦大学 薬学部） |

論文の内容要旨

林 侑加子

質量分析法において、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) は高感度でソフトなイオン化法として知られており、タンパク質をそのまま検出できる手法である。しかし、マトリクスの選択やイオン化効率が非常に良い場所 (ホットスポット) の探索といった実験条件を経験的に最適化する必要がある。これまでに、金属や無機酸化物の表面を化学修飾することによる様々な相互作用を利用することで解決が試みられてきた。しかし、分析種とマトリクスの相互作用を直接観測することや、その数の評価といった定量的な議論は容易ではなく、未だに分析種に依存することなく幅広い質量数領域に渡って一様にイオン化、検出する方法は確立されていない。一方、これまで結晶スポンジ法 (Crystalline Sponge, CS) は、有機分子自身の結晶化を行わずに結晶性配位高分子の骨格構造 (ホストと呼ぶ) とともに細孔内有機分子 (ゲストと呼ぶ) の結晶構造解析を行う手法として用いられてきた。これまでに山口らは、CS を用いて、その細孔内へ stilbene 誘導体 (ゲスト) を取り込み、そのレーザー脱離イオン化から、CS 骨格に由来するイオンだけでなく、ゲストの分子イオンを検出できることを発見した。この際に、単結晶 X 線構造解析により、細孔内における CS 骨格と分析種との相対配置をナノスケールで明らかにし、 π - π 相互作用の存在を確かめた。本手法を結晶スポンジレーザー脱離イオン化質量分析法 (Crystalline Sponge Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry method, CS-LDI-MS) と呼ぶ。

そこで、本研究では CS-LDI-MS 法がナノ細孔内におけるゲストの分子間相互作用を明らかにできる点に着目し、有機分子の微量構造解析を可能とするために、CS 内に様々なゲストを系統立てて取り込ませることで、イオン化に必要な条件を分子レベルで確かめ、CS 法をレーザー脱離イオン化質量分析法と組み合わせることでゲストの情報がどの程度明らかに出来るか検討した。

本博士論文は7つの章からなり、第1章の緒論では本研究の背景および目的を示すと共に、本論文の構成について記述した。

第2章では、CS法の活用に際し、CS自体が持つゲストの形やサイズといった取り込みの制約について検討した。また、CS内へは芳香族化合物が取り込まれやすい傾向にある。そこでゲスト包接に π - π 相互作用が相関すると考え、CS細孔の周期的長さにおさまり、且つ末端に芳香環を有する直鎖状ene化合物の取り込みと単結晶X線構造解析およびLDI-MSを行った。その結果、単結晶X線構造解析により、すべてのゲストがCS骨格と π - π 相互作用していることが明らかになった。さらに、LDI-MSでは、結晶領域のみにイオンが観測されたことから、ホットスポット領域が可視化されたといえる。同時に、CS骨格もイオン化しており、CSはマトリクスとしての機能を有していることがわかった。

第4章では、CS法を用いて特定の母骨格に着目して系統的に調べられた例がないことから、CS内へ種々の1,3-benzodioxole誘導体の取り込みと単結晶X線構造解析およびLDI-MSを行った。単結晶X線構造解析により、ゲストの位置だけでなくCS骨格やハロゲンと1,3-benzodioxole骨格が π - π 相互作用などの弱い相互作用を多点で生じていることが明らかになった。LDI-MSでは、すべての場合でゲスト骨格に特有なイオンの検出に成功した。低質量数領域において、マトリクス機能を持つCS骨格の影響を受けず、ゲスト由来のイオンピークを観測できることが明らかになった。

第5章では、CS内へは芳香族化合物だけではなくcyclohexaneのような環状炭化水素の取り込みも起こりうることから、CS内へ異なる大きさの単環状化合物の取り込みを行った。ゲストのうち、Cp*H(5員環)は骨格と π - π 相互作用などの弱い相互作用を多点で生じていることがわかった。一方、zerumbone(11員環)とmuscone(15員環)は細孔内部の狭い空間に環を収縮しておさまっている様子は見られたが、CS骨格との相互作用はみられなかった。次にLDI-MSによってゲストの分子イオンピーク検出を行ったところ、Cp*H以外ではゲスト由来イオンピークは観測されなかった。一方、すべての場合でCS骨格およびそのフラグメントイオンが観測された。つまり、マトリクス機能を持つCS骨格にてレーザー光吸収が起きており、相互作用のない場合、そのエネルギーはゲストへ伝わらなかった。以上より環状化合物の取り込みは環の15員環程度ま

で、静電的相互作用がなくても取り込まれることがわかった。これによりイオン検出と相互作用の有無との相関から、エネルギー伝達のために相互作用を有していることが必要であることが分子レベルで明らかになった。これは第3章における単結晶 X 線構造解析と質量分析法において、どちらの検出感度が優れているかを見積もる実験結果とも一致しており、細孔内への相互作用を有した十分な取り込みがイオン化において重要であることがわかった。

第6章では、ゲストの分子イオンピークが得られる場合、CID (Collision-induced dissociation) により意図的にフラグメンテーションを起こすことで分子構造情報を得られることから、CS 内へ indole 誘導体を取り込み、単結晶 X 線構造解析、次いでレーザー脱離イオン化質量分析によるタンデム質量分析 (MS/MS) を行った。その結果、ゲストから methyl 基が脱離しているイオンピークや、ゲストの骨格に由来するフラグメントイオンピークパターンを検出することができた。すべてのゲストにおいてそのフラグメントイオンピークパターンが類似したことからパターン分析が行えた。

以上、本研究は、CS-LDI-MS 法は単一結晶へ単結晶 X 線構造解析と質量分析という異なる二種類の分析法を適用できることがわかった。その条件として、細孔内への十分な取り込みが必要であった。また質量分析から得られる分子イオンは、ゲストの分子構造情報、すなわち側鎖や骨格構造を与えることがわかった。同時に質量分析により、分子イオンからゲストの元素組成が明らかとなる。このことは、単結晶 X 線構造解析では得られない情報であり、未知化合物の解析に役立つ。さらに、フラグメンテーションの分子構造情報は、X 線構造解析を行う際、分子パーツをモデルとして当てはめることができるものと考えられる。本手法は、このような未知分子 単一結晶の構造解析法として、天然抽出物や微量試料の解析へ適用できることが期待される。

最後に第7章では、第1章から第6章までで得られた主要な知見をまとめて、本論文の総括とした。

論文審査結果の要旨

微量分析法としての質量分析 (MS) は、その分子イオンピークおよびフラグメントイオンピークから、分子量を基に構造を推定する方法である。マトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI 法) は高感度でソフトなイオン化法であり、分子量の大きい化合物の分子イオンピークを検出できる利点をもつ。一方で、マトリクスの選択やイオン化効率の良いホットスポットの探索など、測定条件を経験的に最適化する必要がある、分析種とマトリクスの相互作用を直接観測することや、その定量的な議論は容易ではない。藤田らの結晶スポンジ法 (Crystalline Sponge, CS) は、有機分子の結晶化を必要とせず、結晶性配位高分子の骨格構造 (ホスト) とともに細孔内有機分子 (ゲスト) の結晶構造解析を行う革新的手法として開発された。これまでに山口らは、CS を用いてその細孔内へゲストを取り込み、レーザー脱離イオン化から、CS 骨格に由来するイオンだけでなく、ゲストの分子イオンを検出できることを発見した。本手法を結晶スポンジ-レーザー脱離イオン化質量分析法 (Crystalline Sponge Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry method, CS-LDI-MS) と呼ぶ。

本論文は、CS 法において、細孔内における CS 骨格とゲストとの分子間相互作用が視覚化できる点に着目し、CS 内に様々なゲストを系統的に取り込ませ、X 線結晶構造解析を行うと共に、その結晶に対してレーザー脱離イオン化法による MS 測定および MS/MS 測定を行うことで、新たな微量構造解析法を開発し、その応用について詳述している。

第一章では、本研究の背景および目的、論文の構成が分かりやすく示されている。

第二章では、CS 法の活用の際して、まずは共役ゲストの形やサイズ等の取り込みの制約について検討している。CS 内には芳香族化合物が取り込まれやすい傾向にある。そこで、CS 単位細孔の周期的サイズに収まると考えられる stilbene および両端にベンゼン環を有するその同族体をゲストとして取り込ませ、単結晶 X 線構造解析および LDI-MS 測定を行っている。その結果、単結晶 X 線構造解析の結果から、すべてのゲスト分子が CS 骨格と π - π 相互作用していることを明らかとした。さらに、LDI-MS 測定では、結晶領域のみにゲスト分子の分子イオンが観測されたことから、ホットスポット領域が可視化されていた。これは、MALDI 測定におけるホットスポット探索の必要がないこと

を意味している。また同時に CS 骨格もイオン化しており、CS がマトリクスとして機能していることが確認された。従来の MALDI 法に比べ、低質量数領域にノイズが少なく検出しやすい MS スペクトルチャートが得られていることは、本手法を一般化するにあたり重要な点である。

第三章では、本手法における質量分析の検出下限を検討している。重原子である臭素原子を有する 9,10-dibromoanthracene を用い、CS への取り込み濃度 (2.7 mM, 2.7 μ M, 2.7 nM) を変化させて結晶を作成している。結果、2.7 μ M 以下の濃度で作成した CS では X 線結晶構造解析による分子構造の決定には至らず、LDI-MS 測定でもピークが観測されていない。以上により、CS-LDI-MS 法においては、細孔内への相互作用を有した十分な取り込みが検出において重要であることが示唆された。

第四章では、ゲストとしてカテコール誘導体の 1,3-benzodioxole 骨格を有する化合物を選び、CS への取り込みと単結晶 X 線構造解析および LDI-MS 測定を行い、分子イオンピークならびにそのフラグメントイオンから分子構造情報が得られるかどうかを系統的に調べている。単結晶 X 線構造解析により、CS 骨格やそのハロゲン原子とゲストの 1,3-benzodioxole 骨格間に π - π 相互作用、CH-ハロゲンや CH-O 相互作用などの弱い相互作用が多点で生じていることを明らかにした。用いたゲスト分子の共通骨格に由来する特徴的なイオンピークの検出に成功し、構造情報が得られることを確認した。さらに、CS 骨格の TPT 由来の 4-cyanopyridine に由来するフラグメントピークが観測されたことから、レーザー照射において CS 骨格の受け取ったエネルギーが配位結合の解離およびゲストのイオン化へのエネルギーに効率的に利用されたことを確認している。

第五章では、様々なサイズおよび電子状態の環状化合物をゲストとして選び、CS への取り込みを単結晶 X 線構造解析にて精査し、LDI-MS 測定を行っている。これらの包接状態とイオン化の相関について調べることで、CS とゲストとの相互作用の有無が LDI-MS 測定の結果に与える影響を明らかとした。すなわち、CS には静電的相互作用がなくても細孔内サイズにより 15 員環まで取り込みが可能であるが、相互作用のないゲストの場合、レーザー照射を受けた CS 骨格のエネルギーはゲストに及ばず、イオン化には至らないという重要な知見を得ている。

第六章では、ゲストの分子イオンピークに対して、CID (Collision-induced dissociation)

により積極的にフラグメンテーションを起こすことで、分子構造情報を取得するための手法を検討している。CS 内へ種々の indole 誘導体を取り込み、単結晶 X 線構造解析を行うと共に、タンデム質量分析 (CS-LDI-MS/MS) を行った。第三章における検討で得られた結果から CS への取り込みを最適濃度に統一し、包接体を結晶として得ている。すべてのゲストにおいて構造精密化には至らなかったものの、CS とゲスト分子との π - π 相互作用を確認している。これら結晶に対する LDI-MS 測定でゲスト分子の分子イオンピークを検出し、これに対して CID を用いた 2 回目の MS 測定を行ったところ、ゲスト分子のフラグメントイオン検出に成功した。すべてのゲスト分子において indole 誘導体に特徴的なフラグメントイオンピークパターン、ならびにゲスト分子それぞれの固有置換基に基づくフラグメントイオンピークが観測され、測定したゲスト分子の構造と対応させることができている。これらの結果から、ゲストを取り込んだ CS の単結晶 X 線構造解析によりゲストの骨格に関する情報が得られ、LDI-MS/MS により部分構造の元素組成を含む情報が得られたことから、本法が未知化合物の微量分子構造解析に応用可能であると結論している。

以上のように、本論文は CS-LDL-MS 法が微量構造解析において極めて有用な手法であることを明らかにした独創性の高い研究であり、広くサイエンスの発展に寄与する重要な新規の知見を含む内容である。既に、筆頭著者として査読付き学術論文 2 報を公表しており、業績としても充分である。したがって、本論文は博士 (薬学) の学位に値するものと認める。

| | | | |
|--------|---------|----|----|
| 論文審査委員 | 主査 (教授) | 藤島 | 利江 |
| | 副査 (教授) | 加藤 | 善久 |
| | 副査 (教授) | 代田 | 修 |
| | 副査 (外部) | 東屋 | 功 |

| | |
|---------|---|
| 氏名 | よこた じゅんこ 横田 淳子 |
| 本籍 | 高知県 |
| 学位の種類 | 博士（薬学） |
| 学位記号 | 甲第 52 号（課程博士） |
| 学位授与年月日 | 平成 31 年 3 月 15 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士） |
| 学位論文の題目 | NSAIDs の微粒子化と皮膚透過性および炎症性サイトカイン・NO 産生に及ぼす影響に関する研究 |
| 指導教員 | 教授 京谷 庄二郎 |
| 論文審査委員 | （主査）教授 櫻井 栄一 （副査）教授 加藤 善久 （副査）教授 吉岡 三郎 （副査）教授 土屋 浩一郎 |
| | （徳島大学 薬学部） |

論文の内容要旨

横田 淳子

皮膚に適用する製剤には、皮膚局所に作用する局所作用型外用剤と全身循環系に移行して作用を発揮する経皮吸収型製剤がある。これら製剤中のほとんどの薬物の皮膚透過性は皮膚最外層にある角質層の高い透過バリア能によって大きく制御されている。そのため、皮膚を介する薬物の透過性は、他の組織に比べて極めて低くなる。現在、薬物の皮膚透過性を増加させる方法として、様々な方法が検討されている。中でもナノ粒子は、皮膚に適用することで薬物の皮膚透過を高めることが報告されていることから、著者は、ナノ粒子を用いた局所作用型外用剤に注目した。

非ステロイド性消炎鎮痛剤 (Non-steroidal anti-inflammatory drugs、NSAIDs) は、優れた抗炎症作用と鎮痛作用を有しており、慢性関節リウマチ等の炎症性疾患、腰痛や関節痛の運動器慢性疼痛、術後の鎮痛を目的に局所作用型外用剤として幅広く使用されている。そこで、ナノ粒子化された NSAIDs の局所炎症作用型外用剤の開発は、皮膚患部への NSAIDs の効率的な薬物送達が可能になると考えた。

本研究では、著者は 3 章にわたり、NSAIDs を微粒子化した局所作用型外用剤を作製し、NSAIDs ナノ製剤の皮膚透過性に対する影響および *in vivo*、*in vitro* における抗炎症作用について検討した。

第一章では、微粒子化 NSAIDs を作製する方法を検討し、NSAIDs のナノ粒子の粒子径および安定性について調べた。ナノ粒子化の方法には、水分存在下で粉砕を行う湿式法と水を用いず混合粉末をそのまま粉砕する乾式法がある。これら従来の方法では、粉砕量が多量に必要であり、多工程を経た上に粉砕時間が長時間掛かり、粉砕時における試料の混入が問題となっており改善の余地がある。そこで、本研究においては、特殊な機器を用いず、入手が容易で工程が簡便な自転・公転ナノ粉砕機 (NP-100) を用いて行った。この方法は、有機溶媒や界面活性剤などの添加剤を用いず、粉砕効率を大幅に向上させることで、微量粉砕、微小粉砕、粒子径のばらつきを少なくでき、また短時間で

粉碎できる特徴を持っている。本研究では、インドメタシン(IMC)、ケトプロフェン(KET)、ピロキシカム(PXC)およびジクロフェナクナトリウム(DIC)の4種のNSAIDsを微粒子化に用いた。IMC、KET、PXCのナノ粒子化に成功し、68~75 nmの粒子となり、安定して、ばらつきの少ない粒子径のナノ粒子を得ることができた。安定した粒子径は粒度分布、電子顕微鏡による粒子観察からも確認できた。DICは懸濁溶媒に溶解したため微粒子化できなかつた。

第二章では、マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞におけるリポポリサッカライド(LPS)誘発性炎症のサイトカインおよびNO産生に及ぼすNSAIDsの粒子径の影響について検討した。NSAIDsは、RAW264.7細胞に対し、原末群、ナノ粒子群ともに、コントロール群と比較して10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において細胞生存率の有意な低下は認められなかつた。しかし、高濃度では、RAW264.7細胞に対しNSAIDsナノ粒子は、有意な細胞生存率の低下を認めた。高濃度のNSAIDsナノ粒子は、マクロファージ細胞内に多く取り込まれ細胞障害を引き起こし、生存率を低下させたと考えられる。そこで、抗炎症作用の検討は、細胞生存率に差が認められず、細胞障害も認められなかつた20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を用いて行った。RAW264.7細胞のLPS惹起性急性炎症に対するNSAIDsナノ粒子の抗炎症作用では、IMC、KET、PXCともにコントロール群に比べNSAIDs添加群が、炎症性サイトカインであるNO、IL-6、TNF- α 、PGE2の有意な産生抑制効果を示した。また、原末群に比べナノ粒子群は、NO、IL-6、TNF- α 、PGE2の有意な産生抑制効果が認められた。NSAIDsナノ粒子は、原末より炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、強い抗炎症作用を発現した。薬物キャリアがナノサイズ化されると生体との相互作用が発現し、ミクロンオーダーでは現れなかつた粒子径依存性の機能が発現することがあるためNSAIDsの粒子径の差異が抗炎症作用の差につながったものと推察した。

第三章では、局所作用型外用剤として微粒子化したNSAIDs含有クリームを作製し、皮膚への分配・拡散および皮膚透過性をヘアレスマウスの背部皮膚を用いて評価した。局所作用型外用剤のNSAIDs含有クリームの配合濃度は、本邦にて上市されている医薬品の濃度に準じ、1%IMCクリーム、3%KETクリーム、0.5%PXCクリームとした。基剤としては、最も透過性に優れていた親水クリームを用いた。さらに、ラットカラゲニン足

腫炎症モデル（急性炎症）およびラットアジュバント関節炎モデル（慢性炎症）を用いた抗炎症作用に及ぼす粒子径の影響について検討した。

NSAIDs の皮膚への分配・拡散および皮膚透過性は、透過促進剤および溶解補助剤を使用せずに、NSAIDs の微粒子化のみにより、原末に比べ皮膚透過性が向上した。薬物が皮膚への分配・拡散および皮膚透過する場合は、皮膚透過最大のバリアである角質層へ薬物が拡散する必要がある。皮膚を通過する経路は、細胞内を通る経細胞ルートと細胞間隙を通る細胞ルートがある。経細胞ルートでは、角質層の特性として疎水性が高く水溶性物質は分配、通過しにくい。本研究で使用した NSAIDs は脂溶性であるため角質層に分散でき、皮膚内へ分配・拡散させ、皮膚透過ができたものと考えられた。細胞間隙ルートでは、細胞間隙が 50~100 nm であることより、ナノ粒子化した NSAIDs は、細胞間隙より粒子径が小さいため細胞内への拡散が増大することにより透過性が向上したと推察される。これらのことより、原末よりナノ粒子が基剤への分散性に優れ適用後の局所効果が大きいことを示唆している。

この結果をもとに、急性および慢性炎症モデルに対する抗炎症効果について検討した。急性炎症において浮腫抑制効果を原末とナノ粒子とで比較すると、全ての NSAIDs においてナノ粒子で浮腫率が有意に低かった。カラゲニン足蹠炎症は、ラット後肢足蹠に起炎剤であるカラゲニンを皮下投与することで浮腫が現れる。カラゲニン足蹠浮腫に対する抑制効果は、臨床における抗炎症効果と相関性が高いとされている。NSAIDs ナノ粒子は、原末より急性炎症の初期および後期を効果的に抑制することが示唆された。また、慢性炎症に対してもアジュバント関節炎惹起後、NSAIDs を 7 日間反復塗布した結果、NSAIDs 原末およびナノ粒子ともに時間依存的に足腫脹抑制効果を示した。アジュバント関節炎モデルは、病態の形成過程や形成された病理組織所見がヒトの関節リウマチに類似していると考えられていることから、慢性炎症モデルとして汎用されている。被検薬物塗布後 7 日目の治癒率は、NSAIDs 原末およびナノ粒子を比較するとナノ粒子が有意に高い足腫脹抑制効果を示し、治癒率が有意に高かったことより、NSAIDs のナノ粒子化は、皮膚への分配・拡散および皮膚透過性を亢進させ、原末に比べ強い抗炎症作用を発揮したと考えられた。それ故に、NSAIDs ナノ粒子は、有効性に優れた局所作用型

外用剤の主薬となることが期待される。

以上、本研究で見出された結果は、局所作用型外用剤の製剤設計や適正使用、さらに新規適用方法に向けた有用な知見になると考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は、ナノ粒子を用いた局所作用型外用剤を開発し、皮膚局所へのより効率的な薬物送達の糸口を見つけることを目的として行われた研究について論じている。すなわち、非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAIDs) の微粒子化の検討を行い、この結果をもとに作製されたナノ粒子の局所作用型外用剤の皮膚への分配・拡散および皮膚透過性に対する新規な知見を含めた論文構成になっている。

まず初めに、微粒子化 NSAIDs を作製する方法を検討し、NSAIDs のナノ粒子の粒子径および安定性について調べた。微粒子化の方法には、特殊な機器を用いず、入手が容易で工程も簡便な自転・公転ナノ粉碎機 (NP-100) を用いて行っている。この方法は、従来法の課題を解決し、有機溶媒や界面活性剤などの添加剤を用いず、粉碎効率を大幅に向上させた。微粒子化の結果、著者はインドメタシン (IMC)、ケトプロフェン (KET)、ピロキシカム (PXC) のナノ粒子化に成功した。ナノ粒子の性状は、粒子径は粒度分布、電子顕微鏡により明らかとし、安定した粒子径のナノ粒子が確認できていた。作製したナノ粒子の 14 日後の粒子径を測定し、安定性を確認していた。ジクロフェナクナトリウム (DIC) は懸濁溶媒に溶解したため微粒子化できなかった。

次に、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に対する安全性およびリポポリサッカライド (LPS) 誘発性炎症のサイトカインおよび NO 産生に及ぼす NSAIDs の粒子径の影響についての検討を行っている。NSAIDs は、RAW 264.7 細胞に対し原末、ナノ粒子ともに、低濃度では細胞生存率の有意な低下は認められなかった。しかし、高濃度では、ナノ粒子は、細胞内への取り込みが増大したことで細胞障害を引き起こし、有意な細胞生存率の低下を認めた。LPS 惹起急性炎症に対する NSAIDs の抗炎症作用の検討では、NSAIDs の濃度を生存率に影響を与えなかった低濃度 (20 μ g/ml) を用いて実施していた。NSAIDs の抗炎症作用は、IMC、KET、PXC ともに原末に比べナノ粒子は、炎症性サイトカイン及び NO の有意な産生抑制効果が認められた。NSAIDs ナノ粒子は、原末より炎症性サイトカインの産生を抑制することにより、強い抗炎症作用を示していた。

続いて、局所作用型外用剤を予備実験において最も透過性に優れていた親水クリーム

を基剤として微粒子化した NSAIDs 含有クリームを作製し、皮膚への分配・拡散および皮膚透過性をヘアレスマウスの背部皮膚を用いて評価した。さらに、ラットカラゲニン足蹠炎症モデル（急性炎症）およびラットアジュバント関節炎モデル（慢性炎症）を用いた抗炎症作用に及ぼす粒子径の影響についての検討を行っている。

NSAIDs の皮膚への分配・拡散および皮膚透過性は、透過促進剤および溶解補助剤を使用せずに、NSAIDs の微粒子化のみにより、原末に比べ皮膚透過性が向上することを見出した。急性および慢性炎症モデルに対する抗炎症効果では、急性炎症において浮腫抑制効果を原末とナノ粒子とで比較すると、全ての NSAIDs においてナノ粒子で浮腫率が有意に低かった。また、慢性炎症に対しても被検薬物塗布後 7 日目の治癒率は、ナノ粒子が有意に高い足腫脹抑制効果を示し、治癒率が有意に高かった。これらのことより、NSAIDs のナノ粒子は、皮膚への分配・拡散および皮膚透過性を亢進させ、原末に比べ強い抗炎症作用を示した。それ故に、NSAIDs ナノ粒子は、有効性に優れた局所作用型外用剤の主薬となることが期待された。

以上、本研究で見出された結果は、局所作用型外用剤の製剤設計や適正使用、さらには新規適用方法に向けた有用な知見に繋がり、皮膚への効率的な薬物デリバリー戦略に欠かせない重要な意義を持つ。これらの結論を導くためのデータは質、量とも十分であり、今後の医療薬学の研究分野において大いに貢献できると考えられる。よって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

| | | |
|--------|--------------|---|
| 論文審査委員 | 主査（教授）櫻井 栄一 | 印 |
| | 副査（教授）加藤 善久 | 印 |
| | 副査（教授）吉岡 三郎 | 印 |
| | 副査（教授）土屋 浩一郎 | 印 |
| | （徳島大学 薬学部） | |

博士学位論文 内容の要旨および審査の結果の要旨(第41号)

2019年5月 発行

編集・発行

徳島文理大学大学院薬学研究科
徳島市山城町西浜傍180
〒770-8514 TEL 088-602-8210

印 刷

原田印刷出版株式会社
徳島市西大工町4丁目5
〒770-0903 TEL 088-622-2356
FAX 088-622-2357
E-mail : haradapp@khf.biglobe.ne.jp