

# 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45号

令和3年11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55号	小 原 依 里	ケースクロスオーバーデザインによる中枢神経系用薬使用と骨折発症との関連性に関する研究	1
甲第56号	田 中 成 枝	新規コメ発酵エキスY30およびcyclobakuchiols A, B, C, Dにおける抗インフルエンザ活性の研究	8

氏名	おはら えり 小原 依里
本籍	兵庫県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 55 号
学位授与年月日	令和 3 年 9 月 19 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	ケースクロスオーバーデザインによる 中枢神経系用薬使用と骨折発症との関連性に関する研究
指導教員	教授 飯原 なおみ
論文審査委員	（主査）教授 二宮 昌樹 （副査）教授 野地 裕美 （副査）教授 芳地 一 （副査）外部 細見 光一（近畿大学 薬学部）

## 論文の内容要旨

小原 依里

本博士論文は 5 つの章からなり、第一章では研究の背景と目的について述べている。わが国の総人口に占める高齢者人口の割合は 2020 年現在 28.7%である。平均寿命は男性およそ 81 年、女性 87 年であるが、WHO（世界保健機関）が日常的に介護や医療に依存しないで自立した生活ができる生存期間として健康寿命を提唱して以来、寿命の質が問われるようになった。平均寿命から健康寿命を差し引いた年数は、日常生活に制限があり何らかの介助や介護が必要となる期間を表しており、これが男性で約 9 年、女性で 12 年存在している。国民生活基礎調査によると、介護が必要となった原因として男性では高い順に脳血管疾患、認知症、高齢による衰弱が、女性では認知症、骨折・転倒、関節疾患があげられる。介護と医療は別々の保険制度の下で運営されているが、要介護認定者の一人当たり医療費は「要支援・要介護認定あり」が「要支援・要介護認定なし」の 2 倍以上である。疾病予防のみならず、介護予防によって平均寿命と健康寿命の差を短縮することができれば、個人の生活の質の低下を防ぐとともに、医療費や介護給付費の軽減も期待できる。

高齢者における薬物治療の特徴として、複数の疾患を有する頻度が高く、さまざまな診療科にかかって受診率が高くなり、薬剤数も多くなることが挙げられる。75 歳以上の外来患者を対象とした調査によると、一人当たりの処方薬剤数の中央値は 6 種類であると報告されているが、これは医師の専門化により臓器別医療が一般的であることや、患者自身が専門医志向であることも一因となっている。服用薬剤数の増加に加え、薬物動態の加齢変化により薬物有害事象の発現頻度が高くなるため、高齢者の薬学的管理には注意を要する。実際、急性期病院の入院症例では高齢者の 6-15%に薬物有害事象を認めており、60 歳未満に比べて 70 歳以上では 1.5-2 倍の出現率を示すという報告がある。薬物有害事象の回避には、投与量の調節と多剤併用への対策が不可欠である。

1990 年代から国内外で高齢者医療の研究が盛んになり、薬物治療の指針として海外では Beers criteria, STOPP/START criteria が、国内では高齢者の安全な薬物治療ガイドライ

ン、日本版ビアーズ基準が公表されている。しかし、日本における高齢者への薬剤処方のガイドラインはほとんど普及していないのが実情である。その理由として、ガイドラインはリスト化されたスクリーニングツールであり、疾患別治療ガイドラインのように診断と検査値に基づいた明確な指針ではなく拘束力が弱いことがあげられるのではないだろうか。そして、市販後の薬剤疫学調査のエビデンス不足も理由の一つとして考えられる。多くの場合、市販前における薬剤評価は高齢者を対象としてはおらず、また海外における研究は日本とは異なる住環境や生活様式の下で行われているため、結果をそのまま適応することは難しい。したがって、医薬品適正使用のエビデンスとなる、日本の高齢患者を対象とした疫学研究が必要である。そこで筆者は、薬物有害事象のひとつであり、介護が必要となった原因として高順位をとる骨折と、中枢神経系に作用する医薬品（CNS 薬）との関連性に関する研究を行った。これまでも、CNS 薬は特に高齢者において骨折のリスクを高めることが報告されているが、抗てんかん薬、抗うつ薬、統合失調症薬、ベンゾジアゼピン系薬剤、オピオイドなど、限られた薬効分類の、もしくはいくつかの限定された個別の CNS 薬にとどまり、CNS 薬を幅広く取り上げて骨折リスクとの関連性を解析した報告は存在しない。よって本書では、薬効分類別にみた CNS 薬の使用と、高齢者に特徴的な骨折である脆弱性骨折発症リスクとの関連性について、さらに CNS 薬の複数使用と脆弱性骨折発症リスクとの関連性について、それぞれ明らかにすることを目的とした。

第二章では本研究に用いたスタディデザインであるケースクロスオーバー法について述べている。まず、疫学研究の研究デザインであるコホート研究とケースコントロール研究について概説した。次に観察研究における限界を述べ、ケースクロスオーバーデザインの利点と特徴について、先行研究を紹介しながら解説した。

第三章では、CNS 薬の薬効別に脆弱性骨折発症リスクを推定した。データソースとして、NDB Japan のレセプトデータを使用した。高い悉皆性をもち、日本の診療状況を正確に把握することが可能である。研究デザインは、ケースクロスオーバーデザインを採用した。骨折発生直前の 3 日間をケースウィンドウと定義し、3 つのコントロールウィ



った。結果、脆弱性骨折の調整オッズ比は、1日あたりの CNS 薬成分数に応じてほぼ直線的に増加した。CNS 薬成分数が 0, 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5 超過の場合の調整オッズ比はそれぞれ、1.00, 1.21, 1.40, 1.58, 1.89, 1.80, 1.90 であった (図 3)。CNS 薬成分数と医療機関数とのスピアマンの相関係数は 0.27 で、弱い相関を示した (図 4)。

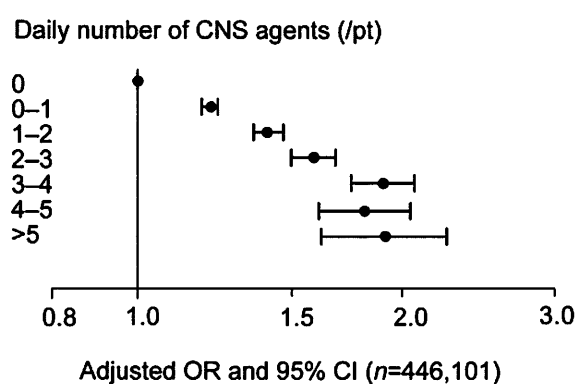


図 3 CNS 薬成分数と脆弱性骨折発症リスク

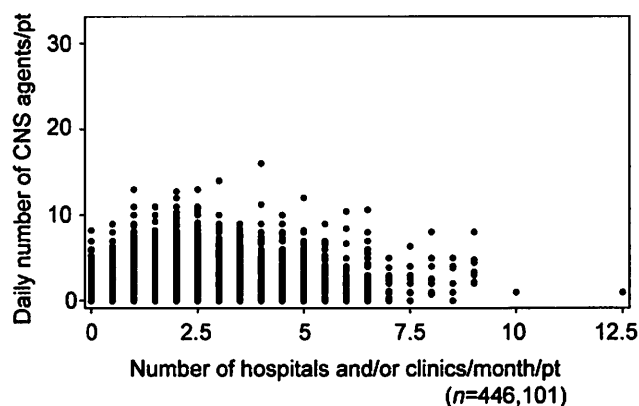


図 4 CNS 薬成分数と医療機関数

第五章は、総括として得られた知見をまとめた。本著では、日本の高齢者における CNS 薬と脆弱性骨折発症リスクとの関連性が明らかになった。特に薬効別では抗てんかん薬のリスクが高く、また同時に使用される CNS 薬の成分数が増えるほど骨折リスクは直線的に増加した。高齢者の医薬品適正使用のためには、すべての医療機関で共有可能な医薬品使用情報を一元管理することと、その情報を活用して薬物有害事象を未然に防ぐシステムの構築を同時に進める必要があると考える。

## 論文審査結果の要旨

本論文は5章からなり、高齢者の薬物有害事象のひとつである骨折リスクについて中枢神経系に作用する医薬品（以下、CNS薬）との関連性について疫学研究を行った。これまでにも、CNS薬は高齢者において骨折のリスクを高めることが報告されているが、限定された薬剤にとどまっており、CNS薬の幅広い薬効群について様々な患者背景における骨折リスクとの関連性を解析した報告は存在しない。そこで、リアルワールドデータである大規模レセプト情報を用いて、薬効分類別にCNS薬の使用と高齢者に特徴的な脆弱性骨折発症リスクとの関連性を解明した。

第1章では、日本の高齢化社会と医療の問題について研究の背景と目的について述べている。要介護の要因となる事象に認知症、転倒による骨折、関節疾患が挙げられるが、日本では、高齢者の安全な薬物治療にかかる明確な指針がなく、市販後の薬剤疫学調査のエビデンスも不足している現状がある。第2章では、疫学研究の研究デザインであるコホート研究とケースコントロール研究の観察研究における欠点について述べ、本研究のスタディデザインであるケースクロスオーバー法の利点と特徴について、本手法を用いた事由を解説した。第3章では、CNS薬の薬効別に脆弱性骨折発症リスクを推定した。薬効別分類では、調整オッズ比は抗てんかん薬が優位に高かった。従来報告されている睡眠薬と鎮静薬および抗不安薬は統計的に有意でなかった。第4章では、ポリファーマシーの観点から薬剤数と脆弱性骨折発症リスクを推定し、CNS薬の成分数と受診



医療機関数に弱い相関があることが分かった。第3章および4章では、ケースクロスオーバー法の特徴である、バイアスや交絡因子が少ないことを証明するために感度分析を検討した。また、頓服薬を使用している患者を除いた集団における解析でも、CNS薬の使用は脆弱性骨折発症リスクと関連していることを示し、結果の妥当性を確認した。第五章では総括として、薬効別では特に抗てんかん薬のリスクが高く、併用したCNS薬の成分数が増えるほど高リスクとなり、日本の高齢者におけるCNS薬と脆弱性骨折発症リスクとの関連性を明らかにした。

ケースクロスオーバー法による医療ビッグデータの解析手法は、今後の疫学研究の研究デザインの確立として重要であり、臨床薬学及び社会薬学分野における医薬品適正使用のエビデンスの構築へ貢献できる。既に、筆頭著者として査読付き学術論文2報を発表しており、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 二宮 昌樹

(副査) 教授 野地 裕美

(副査) 教授 芳地 一

(副査) (外部) 細見 光一

氏名	<small>たなか なるえ</small> 田中 成枝
本籍	愛媛県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 56 号（課程博士）
学位授与年月日	令和 3 年 9 月 19 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	新規コメ発酵エキス Y30 および cyclobakuchiols A, B, C, D における抗インフルエンザ活性の研究
指導教員	教授 葛原 隆
論文審査委員	(主査) 教授 角 大悟 (副査) 教授 喜多 紗斗美 (副査) 教授 深田 俊幸 (副査) 教授 鈴木 康夫 (中部大学 生命健康科学部)

インフルエンザは、毎年世界各地で流行するウイルス感染症である。この感染症の流行は、頻繁に発生するインフルエンザウイルスの変異が原因であり、これによる薬剤耐性ウイルス株の出現が問題となっている。現在一般的に使用されている抗インフルエンザ薬は、一定の効果を発揮するものの、これらの薬剤耐性ウイルス株が頻発している。したがって、耐性ウイルス株を生み出しにくく、耐性株にも効果の高い抗インフルエンザ薬の開発が急務とされている。

インフルエンザウイルスの感染は、ウイルスの宿主細胞への吸着から始まる。ウイルス表面にある hemagglutinin (HA) が、宿主細胞表面にあるシアル酸を含む糖鎖に吸着すると、ウイルス粒子はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。エンドソーム内では、ウイルス粒子内部が酸性化されることで、ウイルスエンベロープとエンドソーム膜が融合する。そして、ウイルス RNA ゲノムと核タンパク質の複合体 (RNP 複合体) が細胞内に放出された後、核内へ移行する。核内に移行した RNP は、ウイルス RNA 合成酵素 (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp) の働きにより、ウイルスゲノムの複製が起きると共に、ウイルス構成タンパク質の mRNA も合成され、宿主細胞の細胞質内にウイルス構成タンパク質が産生される。複製された RNP 複合体およびウイルス構成タンパク質は、宿主細胞表面膜下で再集合し、膜上に出芽された後、neuraminidase (NA) により細胞外に放出される。RdRp は、ウイルス遺伝子の複製ミス修復することは出来ないため、ウイルスゲノム複製の際に遺伝子変異が起こる。これにより、薬剤耐性ウイルスが発生し、薬剤存在下でもウイルスの増殖が可能となる。したがって、ウイルス側因子を標的とするのではなく、ウイルス粒子自体に影響するかウイルス生活環に関与する宿主細胞側因子に作用するような薬剤は、薬剤耐性ウイルス株に対して効果を発揮しやすいと考えられる。

本博士論文研究では、抗インフルエンザ薬の候補化合物の探索を行うため、コメ発酵エキスおよび cyclobakuchiols A-D の抗インフルエンザ活性を検討した。

第一章では、コメ発酵エキス Y30 の抗インフルエンザ活性について記した。コメ

発酵エキスは、日本古来のコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) を用いたコメ発酵抽出物であり、抗炎症作用や抗酸化作用を有し、抗インフルエンザ活性との関連性も報告されている。今回使用したコメ発酵エキス Y30 は、*A. oryzae*、酵母、乳酸菌などの微生物を用いて得られる新規のコメ発酵エキスである。

はじめに、A 型インフルエンザウイルスの H1N1 株および H3N2 株に対する Y30 の感染および増殖抑制効果を検討したところ、Y30 は H1N1 株選択的にウイルス感染および増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。Y30 の H1N1 株に対する感染抑制効果は、HA を阻害している可能性があると考え、HA の赤血球凝集活性を指標に、Y30 による HA 阻害効果を検討した。その結果、Y30 は HA の赤血球凝集活性を阻害しないことが明らかとなった。これらのことから、Y30 は HA 阻害とは異なる機序によって感染抑制効果を示す可能性が示唆された。次に、Y30 のウイルス増殖抑制効果に関して、ウイルス粒子の放出に関わる NA 活性およびウイルスゲノムの複製に関わる RdRp 活性における Y30 の阻害効果について検討した。NA アッセイの結果から、一部の濃度と時間でわずかに NA 活性抑制効果を示したが、Y30 の抗インフルエンザ活性の主な機序ではないと考えられた。一方、RdRp ミニゲノムアッセイの結果から、Y30 は RdRp 活性を阻害しなかった。これらの結果から、Y30 はウイルスが宿主細胞に感染する前に、ウイルス粒子自体に何らかの影響を与えているのではないかと考え、Y30 のウイルス粒子に対する直接作用を電子顕微鏡で観察した。その結果、Y30 はウイルス粒子の表面膜に作用し、ウイルス表面膜を変性することで殺ウイルス効果を示した。以上、Y30 は直接的なウイルス粒子の膜変性効果および作用標的は不明であるがウイルス増殖抑制効果など複数の機序を介して、抗インフルエンザ活性を示していることが示唆された。

第二章では、cyclobakuchiol 類の抗インフルエンザ活性について記した。bakuchiol は、以前に徳島文理大学薬学部生化学教室が光学異性体選択的に抗インフルエンザ活性を示すことを報告している。この類縁体である cyclobakuchiols A-C は、中国医学で使用されてきた植物のひとつであるオランダビユに含まれる化合物である。本章では、天然に存在する cyclobakuchiols A-C と非天然物である cyclobakuchiol D の 4 種類を合成したものをを用いて、それぞれの抗インフルエンザ活性を検討した。また、

cyclobakuchiols A-D はジアステレオマーおよびイソプロピル基の酸化状態が異なる関係であることから、抗インフルエンザ活性における構造活性相関についても考察した。

はじめに、A型インフルエンザ H1N1 ウイルスの PR8 株および WSN 株に対する cyclobakuchiols A-D の感染および増殖抑制効果を評価した。cyclobakuchiols A-D は PR8 株にのみ感染抑制および増殖抑制効果を示し、その効果は cyclobakuchiol D に比べて cyclobakuchiol A のほうが有意に強いものであった。これらの結果より、cyclobakuchiols A-D はウイルス株選択的にウイルス感染および増殖抑制効果を示し、cyclobakuchiols A-D の間で差があることが明らかとなった。次に、cyclobakuchiols A-D におけるインフルエンザウイルスの mRNA (NP, NS1, PA, PB1, PB2, M2) およびタンパク質 (NP, NS1) の量を定量的逆転写 PCR 法およびウエスタンブロットティング法にて検討した。その結果、cyclobakuchiols A-D は、宿主細胞内のインフルエンザウイルス mRNA およびタンパク質の量を減少させることが示された。さらに、宿主細胞にウイルスが感染した際に上昇する、*Ifn-β* および *Mx1* の mRNA 量を定量的逆転写 PCR 法にて検討したところ、cyclobakuchiols A-D 添加より、宿主細胞内における *Ifn-β* および *Mx1* の mRNA 量が有意に減少していた。これらの結果は、A型インフルエンザウイルス PR8 株で cyclobakuchiols A-D がウイルス感染または増殖を抑制したことを裏付けるものである。以上の結果から、cyclobakuchiols A-D は bakuchiol と同様の活性を示していると考えられた。そこで、bakuchiol が Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) 活性化を誘導することが報告されていることから、cyclobakuchiols A-D でも同様の活性があると考え、Nrf2 活性化誘導によって上昇する NAD (P) H dehydrogenase quinone 1 (*Nqo1*) の mRNA 量および Nrf2 の活性化誘導について定量的逆転写 PCR 法または Nrf2 レポーターアッセイ法で検討した。その結果、*Nqo1* mRNA 量は cyclobakuchiols A-D で有意に上昇したが、Nrf2 活性化は cyclobakuchiols A-C でのみ有意に誘導されていた。このことから、cyclobakuchiol 類は、宿主細胞側因子である Nrf2 活性化の誘導が抗インフルエンザ活性に関与すると考えられるが、Nrf2 経路以外にも抗インフルエンザ活性に関与するような宿主細胞内作用を有していることが考えられる。また、cyclobakuchiols A-D の構造活性相関を

考察した。cyclobakuchiols A-D の間で効果に差があるものの、いずれも抗インフルエンザ活性を示したことから、cyclobakuchiols A-D に共通する 1 位の絶対配置と 3 位のフェノール基が抗インフルエンザ活性を示すのに必要な構造と考えられる。また、抗インフルエンザ活性は cyclobakuchiol A で有意であったことから、4 位はイソプロピル基が脱水素化されたイソプロペニル基であること、およびフェノール基との立体配置が 3*R*, 4*R* であることが、より強い抗インフルエンザ活性に寄与する構造と考えられる。

本博士研究の結果は、微生物由来のコメ発酵エキスと植物由来の化合物が、薬剤耐性ウイルス株に影響されない新規抗インフルエンザ薬の開発において有力な候補となる可能性と、その化合物の構造決定に重要な知見を示すものである。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、変異や薬剤耐性を獲得したインフルエンザウイルス株に対して、有効な抗インフルエンザ薬のリード化合物を探索することを目的として行われた研究について論じられている。これまでに、インフルエンザウイルスは変異を繰り返しながらパンデミックを引き起こしており、現在一般的に使用されている抗インフルエンザ薬に耐性を示すウイルス株も検出されていることから、新規抗インフルエンザ薬の開発は急務である。

本研究で著者は、リード化合物の候補として天然由来物質に着目し、微生物由来のコメ発酵エキス Y30 および植物由来の cyclobakuchiol 類に抗インフルエンザ活性があることを明らかにした。これらをまとめた本論文は、次の二つの章から構成されている。

第一章では、微生物を用いて作製されたコメ発酵エキス Y30 における、抗インフルエンザ活性の有無およびその作用機序の検討を行なっている。その結果、Y30 は H1N1 株選択的にウイルス感染および増殖抑制効果を示すことを見出した。作用機序として、hemagglutinin (HA)、neuraminidase、ウイルス RNA 合成酵素 (RNA-dependent RNA polymerase) 活性をそれぞれ検討したが、いずれも有意な阻害は示さなかった。HA 活性を阻害しないにも関わらず、感染抑制作用を示したことから、Y30 のウイルス粒子への直接作用を検討している。その結果、Y30 はウイルス粒子表面膜を変性することによる殺ウイルス作用を示すことを明らかにし、ウイルス直接作用という作用機序を見出した。

第二章では、中国医学で使用される植物のひとつであるオランダビユに含まれる cyclobakuchiol 類における抗インフルエンザ活性の有無、その作用機序の候補および cyclobakuchiol 類の構造活性相関について考察されている。その結果、cyclobakuchiol 類はいずれも PR8 株選択的にウイルス感染および増殖抑制を示すことを明らかにした。cyclobakuchiol 類を添加することにより、ウイルス mRNA およびウイルスタンパク質発現量が減少していることから、抗インフルエンザ活性を示すと言える。同じオランダビユに含まれる類縁体の bakuchiol が、Nuclear factor-erythroid 2-related

factor 2 (Nrf2) 活性化を誘導することにより抗インフルエンザ活性を示すことから、cyclobakuchiol 類でも Nrf2 活性化について検討されている。Nrf2 の誘導は cyclobakuchiols A-C のみであったことから、cyclobakuchiol 類が抗インフルエンザ活性を示すには Nrf2 活性化誘導以外の関与も示された。また、cyclobakuchiol 類の間で抗インフルエンザ活性に差があったことから、構造活性相関を考察している。cyclobakuchiol 類の構造は、ジアステレオマーの関係と、4 位のイソプロピル基が脱水素化されたイソプロペニル基であるか、酸素化された 2-ヒドロキシイソプロピル基であるかの違いがある。抗インフルエンザ活性の結果から、共通構造として 1 位の絶対配置および 3 位のフェノール基が cyclobakuchiol 類の抗インフルエンザ活性を示すために必要な構造であることを見出した。また、4 位がイソプロペニル基であること、および 4 位の官能基と 3 位のフェノール基との立体配置が、抗インフルエンザ活性に影響を及ぼすことも示唆している。

以上、これらの研究結果は、天然由来物質がこれまでにない作用機序で抗インフルエンザ活性を示す可能性を見出した。本論文に記述された、直接的殺ウイルス作用や Nrf2 経路活性化といった作用機序は、薬剤耐性株に有用なリード化合物の候補になり得る。これらの結論を導くための方法、得られた結果は一定の成果があり、今後の抗インフルエンザ薬開発において貢献できることが期待される。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）	角	大悟
	副査（教授）	喜多	紗斗美
	副査（教授）	深田	俊幸
	副査（外部）	鈴木	康夫



**博士学位論文** 内容の要旨および審査の結果の要旨(第45号)

---

令和3年11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示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