

化学実習と薬理学実習の連携を目指した、 学生が合成した化合物の薬理活性の評価

～気管支喘息治療薬テオフィリンの合成と気管平滑筋弛緩作用～

Evaluation of pharmacological activity of chemical compound synthesized by students,
aiming at collaboration between chemistry practice and pharmacological practice

～Synthesis of bronchial asthma drug theophylline and
its relaxing effect on tracheal smooth muscle～

安 東 嗣 修

Tsugunobu ANDOH

青 柳 裕

Yutaka AOYAGI

福 石 信 之

Nobuyuki FUKUISHI

渡 邊 真 一

Shin-Ichi WATANABE

坂 梨 まゆ子

Mayuko SAKANASHI

永 津 明 人

Akito NAGATSU

要 旨

薬学部における化学系実習と薬理系実習の連携を図るため、学生が化学合成した薬物が薬理活性を有しているか調べた。本評価では、学生が合成をした気管支喘息治療薬であるtheophyllineを用いた。Histamineで収縮させたモルモット気管平滑筋は、学生が合成したtheophyllineによって弛緩した。このことから、化学系実習で合成したtheophyllineは、薬理活性を有していること示された。以上のことは、化学系実習と薬理系実習が連携する薬学部独特の新たな実習形態を構築することができることを示唆する。

緒言

薬学部では、薬剤師教育に加え、創薬教育も重要である。薬物の化学合成やその薬効評価を一度に学習できるのは、他の理系学部と違い薬学部のみである。また、薬学モデル・コア・カリキュラム（薬学教育モデル・コア・

カリキュラム－令和4年度改訂版－）において科目間のつながり（連携）の重要性を示す内容が盛り込まれている。本学薬学部では、講義に関しては、基礎科目が土台となって専門科目へのつながるような教育システムとなっているが、その一方で、実習に関しては、系ごとに行っており連携がなされていない。

現在、本学薬学部では、2年次の化学系実習においてtheophyllineの合成を行っている。Theophyllineは、phosphodiesterase阻害薬であり、cAMPの代謝を阻害することによりcAMPの濃度を高め平滑筋を弛緩させるため、気管支拡張薬として臨床で用いられている¹⁾。しかし、実習で合成したtheophyllineの薬理活性の評価はされていない。したがって、学生自身が薬理活性を有する医薬品を合成しているという認識や実習後の印象が乏しい。そこで、化学系実習並びに薬理系実習の連携が重要となってくる。本実験では、化学系実習で学生が合成したtheophyllineが、実際に薬理活性を有するものであるかどうか、モルモット気管平滑筋の弛緩作用を指標に評価した。

方法

実験動物

実験には、雄性のHartley系モルモット（6週令、日本エスエルシー、浜松）を用いた。飼育は、金城学院大学実験動物教育研究施設内〔室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間の明暗サイクル（明期8:00~20:00）、飼料CG-7（日本クレア株式会社、東京）〕で行った。本実験は、金城学院大学動物実験委員会の承認のもと行った（承認番号240）。

実験試薬

Histamine hydrochloride, theophylline, 及び6-amino-1,3-dimethyluracilは、東京化成工業株式会社（東京）より購入した。Sodium nitrite及びzincは、関東化学株式会社（東京）より購入した。Ammonium chloride, formic acid, 及びsodium hydroxideは、富士フィルム和光純薬株式会社（大阪）より購入した。Histamine hydrochloride, theophylline及び学生が化学合成したtheophyllineは、最終濃度の

1000倍の濃さで滅菌水に溶解あるいは懸濁し、保存溶液とした。Tyrode's液は、以下の組成で作製した〔(mmol/L) : NaCl (137), KCl (2.7), CaCl_2 (1.8), MgCl_2 (1.0), NaHCO_3 (12), glucose (5.6)〕。

Theophyllineの合成（学生）

6-Amino-1,3-dimethyluracilにsodium nitriteを反応させ、6-amino-1,3-dimethyl-5-nitrosouracilを合成する。6-Amino-1,3-dimethyl-5-nitrosouracilは、zinc存在下にammonium chlorideと反応させ5,6-diamino-1,3-dimethyluracilを作製し、formic acidと反応させ、6-amino-1,3-dimethyl-5-formylaminouracilとsodium hydroxideを反応させ閉環することで、theophyllineを合成した（図1）。

薄層クロマトグラフィー（TLC）

Theophyllineは、chloroform（富士フィルム和光純薬）に懸濁し、TLCアルミニウムシート（シリカゲル60F₂₅₄）（Merck, Darmstadt, Germany）にスポットした。展開溶媒（chloroform : methanol = 95 : 1）中で展開した。乾燥後、5% phosphomolybdic acid（Polysciences, Inc., USA）エタノール溶液を噴霧し、加熱した。

気管の摘出

モルモットは、麻酔下（Sodium pentobarbital 40mg/kg, 腹腔内注射 : Canadian Council on Animal Care, guide to the care and use of experimental animals), 開胸後、大静脈を切開し放血死させ、気管を摘出した。摘出後、Tyrode's液にいれ、気管を単離した。実験に使用するまで、Tyrode's液中、 4°C で保管した。また、組織の一部は、4% paraformaldehydeで固定し、30% sucrose溶液で処理後、O.C.T compound（サクラファインテックジャパン

化学実習と薬理学実習の連携を目指した、学生が合成した化合物の薬理活性の評価（安東嗣修ほか）

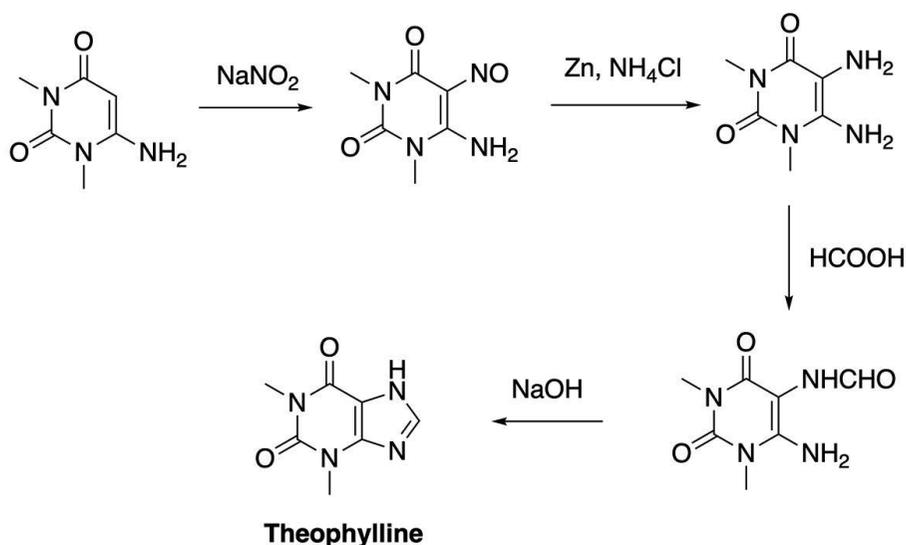


図1 化学系実習におけるtheophyllineの合成反応

株式会社, 東京)で包埋し, -80°C で保管した。

免疫組織化学染色

-80°C で凍結保管した組織をクリオスタット (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)で凍結切片 ($16\mu\text{m}$)を作製した。ブロッキング (Protein block, DAKO, Santa Clara, CA, USA)後, 切片は, 抗 α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA)と一晚 4°C で反応させた。Phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄後, Alexa488結合抗マウスIgG抗体と室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後, 封入剤 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)を用いて封入し, 顕鏡した。

気管平滑筋運動の評価

気管平滑筋運動の評価は, マグヌス装置 (スターメディカル株式会社, 東京)を用いて行った。つまり, Tyrode's液で保管しておいた気管を切開し, 両端に糸付きのセルフィン装着し, 一端はL型フックに固定し,

Tyrode's液の入ったマグヌス管内 (30°C の温水で灌流保温した)に気管平滑筋すべてが浸るように沈めた。もう一端は, 気管平滑筋に軽くテンションがかかるくらいにセルフィンについた糸を引っ張り等張性トランスデューサに固定し, 気管平滑筋の収縮及び弛緩を評価した。

結果

学生によって合成された化合物と市販標準品のTLCによる比較

化学系実習により学生が合成した化合物theophyllineは, TLCによる分析の結果, 市販標準品と同じ位置にスポットのシグナルを認めた (図2)。

モルモット気管平滑筋標本へのhistamine及びtheophyllineの作用

モルモット気管の平滑筋の分布を調べるために平滑筋のマーカーである α -SMAの抗体を用いて免疫組織学的染色を行った (図

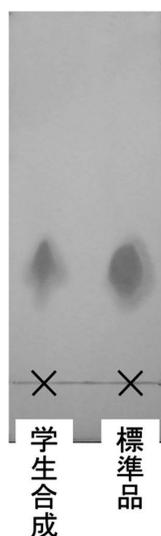


図2 学生による合成と市販標準品のtheophyllineの薄層クロマトグラフィー

3 a)。その結果、気管軟骨が認められる部分より、輪状靭帯下に α -SMA陽性の平滑筋が主として分布していた(図3 a)。 α -SMAの分布をもとに、気管を図3 b及びcのように切断し、両端にセルフィンを装着し(図3 d)、マグヌス装置にセットした(図3 e)。

モルモット気管平滑筋標本へ作用させた histamine (10 μ M) 及び theophylline (1 mM) の濃度は、それぞれ Reyes-García ら²⁾ 及び Bergendal ら³⁾ の報告に従った。モルモット気管平滑筋標本へ histamine (10 μ M) を適用すると、明らかな収縮作用が少なくとも10分以上観察された(図4 a)。Histamine (10 μ M) による気管平滑筋収縮は、theophylline (標準品: 1 mM) の適用により、抑制された(平滑筋が弛緩)(図4 b)。また、学生が合成した theophylline (1 mM) を適用しても histamine (10 μ M) 誘発の気管平滑筋収縮作用は、抑制された(図4 c)。

考察

本実験は、学生が化学系実習で合成した theophylline が、市販品の theophylline と同様の TLC による展開後の移動距離を示し、さらに、histamine 誘発の気管平滑筋収縮を抑制することが明らかとなった。これらのことは、学生が化学合成した theophylline が薬理活性を有することを示唆する。したがって、学生が化学合成した theophylline を用いて化学系実習と薬理系実習の連携が可能であると考えられる。

本実験では、気管平滑筋の弛緩の程度が学生が合成したものより市販品の方が大きかった。市販品の薬物の色は真っ白であったのに対し、学生の合成したものはクリーム色であった。今回行った簡易評価の TLC レベルでは不純物の混入は認められなかったが、TLC では検出が難しい不純物が混入している可能性は否定できない。学生実習レベルなので、その精製には限界があることから、薬効に差が出てきたかもしれない。

本実験の成果は、学生実習の連携で化学合

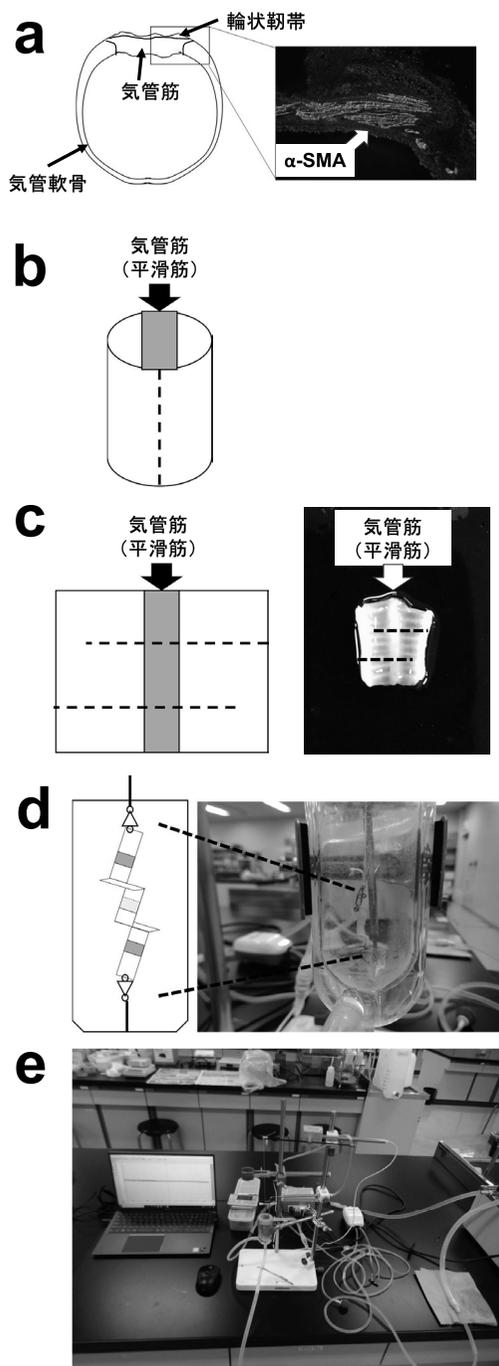


図3 气管平滑筋標本とマグナス装置

a) 气管凍結切片における平滑筋マーカー α -SMAの分布（蛍光写真：x10），b) 气管の切開（点線）模式図，c) [左パネル] 气管の切開（点線）模式図，[右パネル] 气管の切開（点線）写真，d) [左パネル] 切開气管のマグナス管へのセットアップの模式図，[右パネル] マグナス管にセットアップされた切開气管の写真，e) マグナス装置と伸収縮記録用コンピューターの全体写真

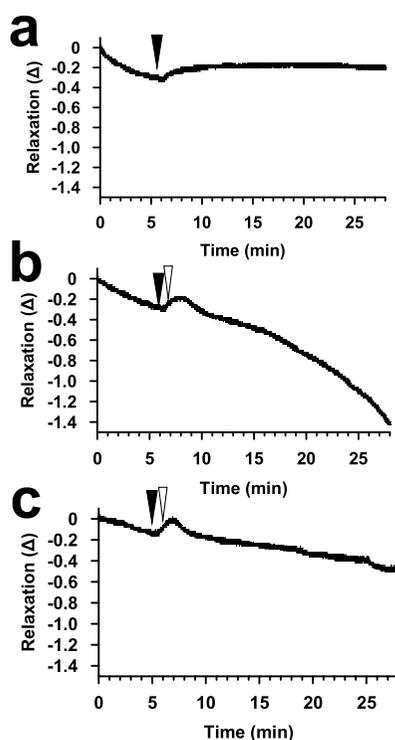


図4 モルモット気管平滑筋へのhistamine及びtheophyllineの効果（典型例）

a) Histamine (10 μ M), b) histamine (10 μ M) +市販標準theophylline (1 mM), c) histamine (10 μ M) +学生合成theophylline (1 mM). Theophylline (∇) は, histamine (\blacktriangledown) 適用1分後に適用した.

成から薬効評価できる教育プログラムの構築が可能であることを示した。このような連携は、他学部にはできない薬学部独自の薬に関するエキスパートの育成に重要である。本実験で、学生が合成したtheophyllineが薬効を有することが認められたことから、今後、薬理効果の評価だけでなく、薬剤系実習（薬物動態）など他の実習に本薬物の利用を進めることで様々な実習との連携が期待される。

謝辞

本研究は、金城学院大学教育改革助成費(2023)により実施した。

引用文献

- 1) Barnes PJ. Theophylline. *Am J Respir Crit Care Med* 188: 901-906 (2013).
- 2) Reyes-García J, Díaz-Hernández V, Carbajal-García A, Casas-Hernández MF, Sommer B, Montaña LM. Theophylline-induced relaxation is enhanced after testosterone treatment via increased KV1.2 and KV1.5 protein expression in guinea pig tracheal smooth muscle. *Int J Mol Sci* 24: 5884 (2023).
- 3) Bergendal A, Lindén A, Lötvall J, Ullman A, Skoogh BE, Löfdahl CG. In vitro tachyphylaxis to isoprenaline in guinea-pig trachea: influence of theophylline? *Pharmacol Toxicol* 71: 41-44 (1992).