

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	生体内で蜂毒由来毒素メリチンを吸着・中和する生分解性ナノ粒子の開発				
研究組織	代表者	所属・職名	食品栄養科学部・特任教授	氏名	大橋 典男
	研究分担者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	小出 裕之
		所属・職名		氏名	
		所属・職名		氏名	
	発表者	所属・職名	薬学部・准教授	氏名	小出 裕之

講演題目	生体内で蜂毒由来毒素メリチンを吸着・中和する生分解性ナノ粒子の開発
研究の目的、成果及び今後の展望	<p><b>【目的】</b> 静岡県では、蜂アレルギーが 97 件発生している。蜂毒の主要なペプチド成分であるメリチンは、細胞膜に穴を開ける作用を有しており、体内に侵入すると赤血球の溶血作用や、細胞死を誘導し、最悪の場合死に至る。そのため、静岡県内においては特に、体内に侵入してきたメリチンを速やかに吸着して、中和する材料の開発が必要とされている。申請者らはこれまでに、抗体-抗原間の結合を模倣して、抗体のように血液中で標的分子に強く結合し、その機能を中和する合成高分子を開発してきた。しかし、合成高分子は生体内で分解されにくいいため、臨床応用が困難である。そこで本研究では、アミノ酸を原料として、立体的に多点で標的分子に結合する架橋ペプチドを簡便な手法により合成することで、生体内にてメリチンに結合する安全性の高い中和剤の開発を試みた。</p> <p><b>【方法】</b> メリチンは正電荷と疎水性の領域を持つペプチドであることから、負電荷アミノ酸の L-Cysteic acid (CyA) と疎水性アミノ酸の L-tert-Leucine (Tle) を用い、それぞれのペプチドブロック (C pep、T pep) を合成した。合成したペプチドの鎖長は LC-MS を用いて解析した。次に、C pep、T pep をつなぎ合わせた C-T pep を合成し、メリチン中和効果が高い合成条件を探索した。続いて、C-T pep を架橋することで架橋ペプチド (C-T NP) の合成を試みた。C-T NP の形態を TEM にて観察した。また、C-T NP の <i>in vitro</i> におけるメリチン中和効果を赤血球溶血試験により検討した。最後にマウスを用いて C-T NP の <i>in vivo</i> におけるメリチン中和効果を評価した。</p> <p><b>【結果】</b> C pep、T pep の合成条件を最適化することで、高収率で均一性の高いペプチドブロックを得ることに成功した。鎖長解析の結果、合成した C pep は 4 mer、T pep は 3 mer のペプチドが約 8 割含まれており、均一性の高いペプチドブロックを再現良く合成することに成功した。C pep、T pep を用いて溶血試験を行うと、C pep はメリチンによる溶血活性を濃度依存的に阻害した。次に、C pep、T pep を縮合し C-T pep を合成したところ、C-T pep は C pep、T pep 単体よりも高いメリチン阻害効果を示した。そのため、正電荷と疎水性の 2 種類のペプチドを組み合わせることでメリチン中和能が向上することが示唆された。続いて、C-T NP の合成条件を最適化し、TEM にて観察した結果、C-T pep を架橋することで粒子が形成されていた。さらに、C-T NP は C-T pep よりも高いメリチン中和能を示した。また、<i>in vivo</i> においても C-T NP はマウス体内でメリチンを中和し、C-T pep と比較してマウスの生存率を顕著に向上させた。</p> <p>以上より、標的毒素を中和するペプチドの解毒剤としての有用性が示された。</p>