

生物化学工学から薬学への 40 年

八木 清 仁

Transition of the Field from Biochemical Engineering to Pharmaceutical Sciences during 40 Years of the Research

Kiyohito Yagi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University; 1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

(Received August 17, 2018)

This review reflects back over almost 40 years of the author's basic research conducted at Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Japan. After performing postdoctoral research in USA, the author became a research associate at Prof. Yoshiharu Miura's lab and started research on Biochemical Engineering in 1984. At that time, the main research purpose was to solve global environmental issues for maintaining human health. The author's achievements included novel useful material production system under inorganic conditions and genetically engineered whole-cell bacterial sensors detecting arsenite by naked eye without a detecting device. Another theme in the lab was to construct bioartificial liver support system. Various scaffolds for hepatocytes were newly prepared for constructing the compact reactor. Besides the bioreactor study, the author conducted cell transplantation research for the treatment of chronic liver diseases. It was shown that mesenchymal stem cells derived from third molars (wisdom teeth) could differentiate into hepatocytes and exhibit therapeutic effects in liver-damaged animals. After 2006, the lab started research on drug delivery systems, including noninvasive delivery of drugs such as peptides and nucleic acids by regulating epithelial tight junctions. Many substances enabling drug delivery through "paracellular" route were newly prepared. The author started basic research on Biochemical Engineering in the 1970s. Although these studies eventually shifted into the pharmaceutical field, the underlying concept was based on "engineering" throughout a 40-year research period. The author cordially thanks all colleagues for supporting engineering research in our lab.

Key words—biochemical engineering; biodegradable polymer; bioartificial liver; whole-cell biosensor; cell transplantation; drug delivery system

1. はじめに

日本薬学会学術誌編集委員会より退職記念総説執筆の依頼を受け、恩師、同僚、卒業生と共に過ごした約 40 年間の研究生活を振り返ってみることにした。1983 年 4 月 1 日助手に採用され、その後 35 年間大阪大学薬学研究科において研究教育に携わり 2018 年 3 月 31 日に停年を迎えた。まずは助手として採用される前に遡る。1974 年 4 月、破天荒であった学生生活に未練を残しつつも特別実習生として三浦喜温教授が主宰する薬品製造工学講座に所属した。学生紛争もおさまりつつある頃、さあ研究と

いう時期に豊中市の蛍池キャンパスから吹田キャンパスへの移転があった。何万という数の試験管やガラスシャーレの箱詰め、ヘルメットを被りながらのステンレスアングルの解体・組み立て、実験装置の移動・設置に数ヵ月を費やした。その後、1981 年薬学博士の学位を取得後、翌年米国メリーランド大学ボルチモア校の薬学部に移転して研究助手として留学した。渡米直後、ボルチモア市内での移動ではあったが新築の薬学部への移転を経験した。さらに翌年米国ノースキャロライナ州 Research Triangle Park 内の国立衛生研究所 (National Institute of Health; NIH) に転職した直後、ノースロップという航空機メーカーの社屋に間借りしていた研究室が新設の NIH ビルディングに移転をしている。学部生からポスドクに至る期間に 3 回の研究室移転を経験した人間はそれほど多くはないであろう。3 回の移転作

大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

e-mail: yagi@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、2017 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

業に費やした労力は別にして常に新しい研究室で実験できたことは幸運ではなかったかと今では思っている。

NIH に転職して 3 週間後、1983 年 2 月 23 日の早朝に日本から国際電話があった。筆者出身講座の助手の先生が私立大学の講師として栄転するので助手として戻ってきなさいという連絡であった。その日は米国初代大統領ワシントンの誕生日を祝う federal holiday ではあったが日本人の悪しき？習性でラボに向かった。日本に帰ることになるのかとぼんやり考えながらある交差点で信号待ちをしていた。そして青信号で前進したところ、左側から汽笛のような音が聞こえ、大型トラックが赤信号でありながら突っ込んでくるのが見えた。とっさに左ハンドルを離し助手席側に体を倒したところで運転席側からトラックが衝突してきた。フロントガラスが割れ、回転する車内で上を見上げ「助手としての採用が遠のいていく…」と思いながら真っ青に晴れ上がった空を眺めていた。救急車で搬送はされたが 2 つの幸運により軽い打撲で済み、無事帰国することができた。1 つ目の幸運は頑丈な 4000 cc クラスの米国製の車に乗っていたこと、2 つ目はシートベルトをしていなかったことであった（当時シートベルト着用の義務はなかった）。任官の手続き後、主任教授の三浦先生のご厚意によりさらに 1 年間 NIH での研究の機会に恵まれた。

1984 年 3 月 31 日に再び帰国し薬学部助手として研究をスタートすることになった。私が担当したテーマは三浦先生のライフワークであった光合成微生物の利用と固定化生体触媒の医療への応用であった。本誌では助手・助教授時代に行った独立栄養微生物研究と、その後筆者が主に推進してきた新規肝疾患治療法の開発研究を中心に述べていきたい。

2. 独立栄養微生物の利用

2-1. 微細藻類によるエネルギー生産 筆者が大学院生のとき、薬品製造工学講座の教授、助教授、助手（2 名）は全員が化学工学・発酵工学を専門とする工学博士であった。1965 年講座設立時に「生物化学工学」を看板として掲げ、以降大変ユニークな研究を展開していた。わが国の薬学部において工学系の教員が化学工学的な教育研究をしている研究室は皆無であった。筆者が博士前期課程のときに三浦先生から「光合成の初期過程を非平衡の熱力学

を用いて解析してみないか」と言われたことを今でも記憶している（そのテーマは幸か不幸か成立しなかった）。

20 世紀後半は地球温暖化を始めとする環境悪化が問題となり石油・石炭などの化石燃料に替わるクリーンなエネルギーに注目が集まる時期であった。筆者の学位論文のテーマとなった「Biophotolysis」は光合成生物を触媒的に利用し、太陽光を推進力として水を分解することにより水素燃料を生産する方法と定義される。無尽蔵な水を原料にクリーンエネルギー、水素を生産する Biophotolysis を化学工学的なアプローチにより実現することがミッションとなった。*Chlamydomonas* などの緑藻類は嫌気条件下で水素を生産するヒドロゲナーゼと呼ばれる酵素を有している。しかし光条件下では同時に発生する酸素が阻害的に働き光依存の水素発生は停止する。そこで装置の工夫により水素発生と酸素発生を時間的・空間的に分離し、安定にしかもガス分離操作を必要としないシステムを考案した。モデルとして淡水産緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を選択し、実験室内に 12 時間周期の明・暗の培養系を組んだ。明期に 1 L の培養ビンに 5% 二酸化炭素を含む空気を吹き込み 12 時間培養すると藻体量は 1.5–2 倍に増加した。続いて培養ビンに窒素ガスを吹き込み暗嫌気条件に移行させると、ほとんど Lag time なしに 12 時間の水素発生が認められた。明条件で藻体量が増加すると同時に藻体内にデンプンが蓄積され、暗嫌気条件では酸素による阻害から解放され水素発酵が持続したと考えられる。実験室内では 1 週間以上の明暗サイクル繰り返しによる水素発生が確認された (Fig. 1)。藻体の増殖、デンプンの蓄積はすべて光エネルギーを推進力とし、水を究極の電子供与体としていることから装置的な検討により実験室内での「Biophotolysis」を完成させることができた。¹⁾ また、暗嫌気条件では水素のみでなく培地



八木清仁

2018 年 3 月、大阪大学大学院薬学研究科を停年退職後、特任教授となり同研究科内で「新 PharmaTrain 教育コース」の世話役と学務会議のオブザーバーを務めている。PharmaTrain は医薬品開発のスペシャリストを養成するプログラムで、ほぼ毎週土曜日に大阪大学中之島センターに出向き運営を担当している。

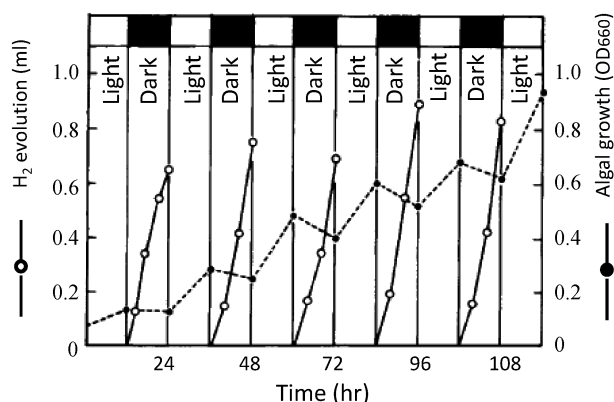


Fig. 1. H₂ Evolution by *Chlamydomonas reinhardtii* in a Light/Dark Cycle

Clear and shaded blocks represent light and dark periods, respectively. H₂ evolution was measured during dark period, and algal mass at a 12-h interval.

中に酢酸、ギ酸、エタノール等の有機物が放出される。水素生産効率をさらに上昇させるため、この有機物からも水素を回収するためのシステムを検討した。光合成細菌は水を分解しないことから酸素を発生させずに明条件下で水素を発生することが可能である。そこで暗条件下の緑藻発酵液を回収し光合成細菌の培養層に引き入れれば明条件で水素が回収される。すなわち緑藻の暗条件での水素発酵と光合成細菌の明条件での水素発酵を組みあわせ、切れ目のない水素生産が可能と考えた。このアイデアを基に緑藻と光合成細菌の組み合わせによる水素生産システムのパイロットプラント施設が1998年に関西電力の南港発電所敷地内に構築された (Fig. 2)。本施設は関西電力と三菱重工が共同で建設したものである。400 Lの緑藻培養槽2基、135 Lの緑藻発酵槽2基、20 Lの光合成細菌発酵槽6基からなるプラントで、実海水を用いるため三浦研究室で単離さ

れた海産性緑藻 MGA161 株と海産性光合成細菌 W-1S 株が用いられた。本システムは自然の昼夜のサイクルを利用し、緑藻培養のために吹き込む二酸化炭素は南港火力発電所の排気ガスから回収したものを使用している。実験室内で1 Lの培養槽からスタートした Biophotolysis 研究が産学共同の生物化学工学的研究により 800 倍にスケールアップされたパイロットプラント建設につながっている。このパイロットプラント建設は1994 停年退職された三浦先生と後任の溝口 正教授、そして前田 勇助手 (現宇都宮大農学部准教授) によって推し進められた。

2-2. 完全無機的条件下での有用物質生産

1992 年大阪大学大学院薬学研究科に環境生物薬学専攻 (独立専攻) が設置され三浦研究室は大学院においては協力講座「生物機能工学」、学部組織としては従来の「薬品製造工学」という2つの名称を持つ講座となった。4 月より助教授となった筆者は「二酸化炭素を唯一の炭素源として有用物質を生産する系の確立」をテーマとして環境関連の研究をスタートさせた。

高温・高圧環境が必要な化学的反応系は多大なエネルギー消費を伴い、環境に負荷をかけている。生物反応の中でも従来の糖蜜を原料とする富栄養供給型発酵生産においては生産物と原料との分離が困難で、その精製に時間とコストがかかっている。したがって二酸化炭素を唯一の炭素源とする完全無機的条件下での微生物による有用物質生産系が開発されれば上記の問題が解消され、さらに環境中に放出される二酸化炭素の再資源化が可能となる。そこで独立栄養的に増殖可能な細菌の遺伝子群をクローニングし有用物質生産菌に導入することにより完全無機

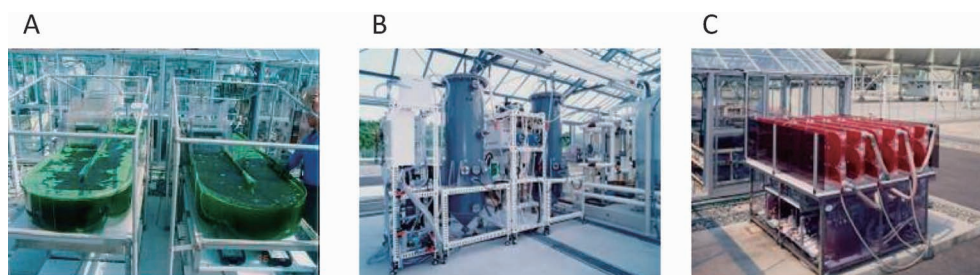


Fig. 2. H₂ Evolution System in Natural Day-Night Cycle Using Green Alga and Photosynthetic Bacterium

Chlamydomonas MGA161 was cultivated in the raceway type of cultivator (A). The alga was transferred to fermentation tank (B). Organic substances excreted by the fermentation were separated from the algal mass and transferred to photobioreactor (C), in which *Rhodospirillum rubrum* sp. W1-S degraded organic substances to produce H₂.

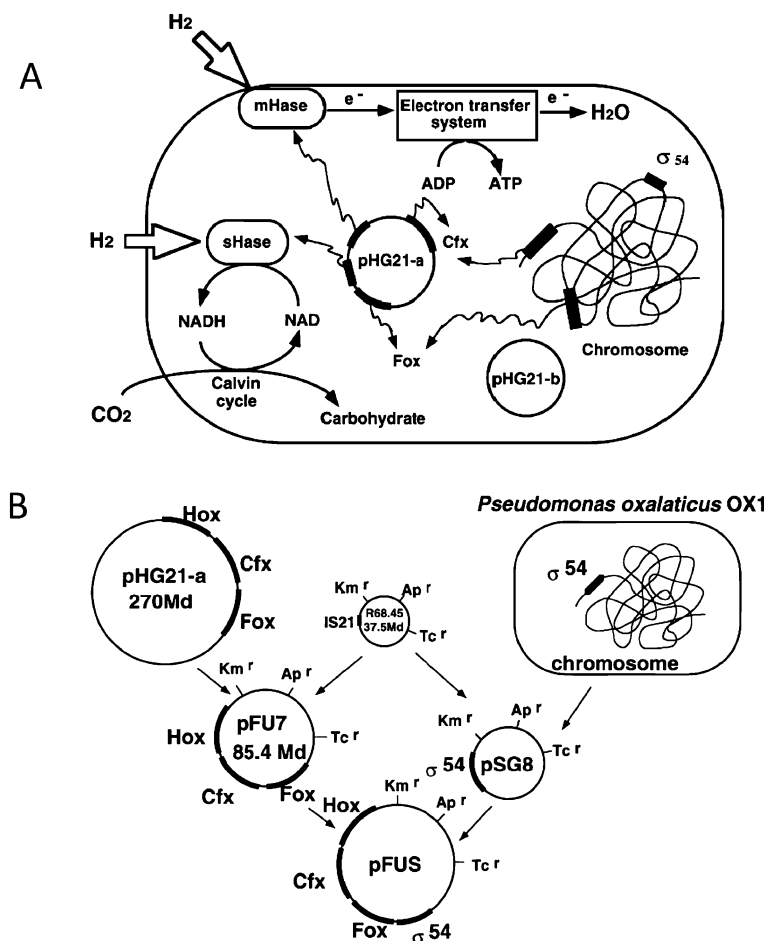


Fig. 3. (A) Profile of Hydrogen-oxidizing Bacterium, *Alcaligenes hydrogenophilus*, and (B) Construction of Recombinant Plasmid Conferring Autotrophic Growth Ability to Heterotrophic Bacteria

(A) Hydrogen is oxidized by membrane-bound hydrogenase (mHase) and soluble hydrogenase (sHase). Genes responsible for two hydrogenases, carbon fixation ability (Cfx), and formate oxidation ability (Fox) are coded on large plasmid pHG21-a.

的条件下での物質生産系の構築を目指した。

Alcaligenes hydrogenophilus は当研究室で単離された水素細菌で、水素、酸素、二酸化炭素、無機塩のみで増殖可能な独立栄養細菌である。本菌の水素酸化及び炭酸固定関連遺伝子群は巨大プラスミド pHG21-a 上に存在している。このプラスミドの宿主域は極めて狭く、巨大であるがゆえに *in vitro* の組換え実験は不可能であった。そこで同研究室の梅田房子技官は炭酸固定、水素酸化能を発現するために必要な約 100 kbp の領域を広宿主域ベクターである薬剤耐性因子 R68.45 を用いてクローニングすることを試みた。R68.45 は宿主の DNA を組み込んだ状態で接合により他の菌に伝達される能力を有する。そこでドナー側の宿主に pHG21-a と R68.45 を保持させ、レシピエント側の従属栄養細菌に接合伝達させて独立栄養的増殖能を獲得したレシピエン

トから組換えプラスミドをスクリーニングした。その結果 pHG21-a と同等の独立栄養的生育速度をもたらす pFU7 を得た。さらに組換えプラスミドの宿主域を広げるために水素酸化関連遺伝子群の発現に必要なシグマ因子を組み込んだ組換えプラスミド pFUS を得た (Fig. 3)。ColE1 系プラスミド、ファージ、コスミドベクターなど通常のクローニングベクターでは 30 kbp 程度の DNA 断片しか挿入できない時期であったので薬剤耐性因子 R68.45 なくしては 100 kbp を超す水素酸化及び炭酸固定関連遺伝子群の一括クローニングは不可能であった。²⁾

次に pFUS を導入して有用物質を完全無機的条件下で生産することを試みた。*Pseudomonas acidophila* は生分解性プラスチックの原料となるポリヒドロキシアルカン酸 (polyhydroxyalkanoate; PHA) を生産する菌として知られていた。この従

属栄養細菌に pFUS を導入し、水素、酸素、二酸化炭素から PHA を生産することを試みた。本研究は地球環境産業技術研究機構 (Research Institute of Innovative Technology for Earth; RITE)、新エネルギー・産業技術総合開発機構の優秀研究企画に採択され、その予算により 5 L のジャーファメンターを培養槽とする装置を作製することができた。無機塩培地に *P. acidophila* を播種し、水素、酸素、二酸化炭素 (8:1:1) の混合ガスを唯一の栄養源とする培養を行い、得られた菌体からポリマーを抽出した結果収量は乾燥菌体重量の約 10% でモノマーの構成比は 3-ヒドロキシブチレート 52.8%, 3-ヒドロキシオクタノエート 41.1%, 3-ヒドロキシオクタノエート 6.1% であった。これまで二酸化炭素を唯一の炭素源としてこのような PHA 共重合体の合成の報告はなく本研究が初の成功例である。³⁾

前項の「微細藻類によるエネルギー生産」においては自然界からスクリーニングにより単離した微生物を装置の工夫によって化学工学的に制御し、その特性を発揮させることを試みている。その後、本項で紹介した研究は 1980 年代から発展してきた組換え DNA の手法を駆使して微生物の特性を発現する遺伝子を単離し、異種微生物へ付与する生物工学的な研究へとシフトしたものである。

2-3. 光合成色素を利用したヒ素バイオセンサーの開発 1998 年大学院重点化による改組で研究室名は「生体機能分子化学分野」となり、正式名称から「工学」の文字が消えることとなった。1999 年に前任の溝口先生が停年され翌年 3 月、筆者が同分野主任教授を引き継ぎ、新たな研究活動をスタートさせた。4 名の教員が全員工学博士でありプロセス制御中心の「生物化学工学」的研究を展開していた時代、また遺伝子工学的手法を取り入れた「生物工学」的研究にシフトした時代は常に「ものづくり」を志向していた。筆者の代ではこの物質生産を目指す研究から離れ、分析化学、毒性学の領域となる「微生物バイオセンサー」の構築を目的とする研究を開始した。

微生物バイオセンサーは特異性が高く、高感度に安価で微量物質を検出することが可能で、物理化学的な手法に比べ大型装置を必要とせず可搬性に優れている。⁴⁾ これまで様々な物質に反応する微生物バイオセンサーが組換え DNA 技術によりルシフェ

ラーゼ、 β ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質をレポーター遺伝子として構築された。しかしこれらのセンサーは検出系として化学発光、蛍光を検知する装置を必要とし、発色のための基質添加など煩雑な操作が必要であった。当研究室では光合成細菌の有するカロテノイド合成系遺伝子をレポーターとして、検出装置や基質添加不要で肉眼によって色調変化を判別可能な新規バイオセンサーの開発を行った。

開発途上国では地下水や土壌の広範囲なヒ素汚染が深刻で、従来の機器分析では汚染地区全体の把握は非常に困難である。そこで大型機器を必要とせず、電気を利用できない地域においてもオンサイトモニタリングが可能なセンサー構築を目指した。当初、筆者らは赤色色素のスフェロイデノン (spheroidenone; SO) を蓄積する光合成細菌 *Rhodovulum sulfidophilum* を用いてヒ素応答性微生物バイオセンサー構築を目指した。⁵⁾ 当時助教の前田先生のアイデアで本テーマが推進されたが、スイスローザンヌ大学への留学が決定したことから、大学院生が引継ぎバイオセンサー完成までこぎつけている。

まず黄色色素であるスフェロイデン (spheroiden; SD) を SO に変換する酵素遺伝子 *crtA* を欠損させた黄色を呈する変異株を作製し、ヒ素に反応するレギュレータータンパク遺伝子 *arsR* とそのプロモーター領域 *Pars* を *crtA* の上流に連結したセンサープラスミドを構築して色素変異株に導入した。その結果、明条件下で 24 時間培養後、ヒ素添加に反応して SO の蓄積が観察され、6–600 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で肉眼観察可能な黄から赤への色調変化を観察することができた。⁶⁾ 用いたセンサー株は光合成細菌で色素変異株は不安定であったこと、また色調変化観察まで 24 時間の光照射が必要であったことから、宿主ベクター系が整備され扱い易い大腸菌をセンサー株として用いたヒ素応答微生物バイオセンサーの構築を試みた。

大腸菌は自身の膜成分の基質として farnesyl diphosphate (FPP) を産生する。大腸菌内に腸内細菌 *Pantoea ananatis* 由来の *crtE* と *crtB* を導入することにより菌体内で FPP からリコペンの前駆体である無色のフィトエンを合成させることを試みた。さらにヒ素誘導的に *R. sulfidophilum* 由来の

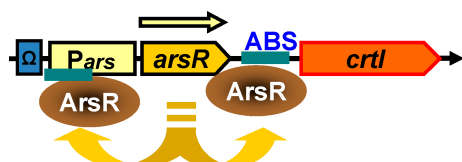


Fig. 4. DNA Construct Used for Arsenite Sensor

The region was inserted into multi-cloning site of pUC18, and the recombinant plasmid was introduced into *Escherichia coli*. Ω terminator, Pars promoter of ars operon, arsR regulatory gene conferring arsenite-resistance, ABS ArsR binding site, crtI gene responsible for lycopene synthesis.

*crtI*を発現させることにより橙色のリコペンを合成させ、視覚的なバイオセンサーの構築を行った。Figure 4 にセンサープラスミドの構成を示す。ArsR はリプレッサータンパク質でヒ素耐性に係わるオペロンの発現をそのオペレーター/プロモーター部位 (Pars) に強く結合して発現を抑制する。ヒ素が存在すると Pars から脱離し ars オペロンが発現する。フィトエンをリコペンに変換する酵素遺伝子 *crtI* を Pars と arsR の下流に連結しヒ素応答性を検討したところバックグラウンドが高く色調変化は観察されなかった。ArsR による制御不良が原因と考え ArsR 結合配列 (ABS) を *crtI* の直前に挿入したところヒ素の有無により明らかな色調変化がみられたため、この組換えプラスミドを導入した株をセンサー株として使用することとなった。60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒ素を添加し経時的に色調変化観察とリコペン含量の定量を行ったところ、1 時間後から色調変化が観察され、リコペン産生量は 3 時間後に最大となった。種々の濃度のヒ素を添加し検出感度を調べた結果、ヒ素濃度 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で色調変化が明らかとなった (Fig. 5)。特異性を検討したところ亜鉛、鉛、ニッケル、カドミウム、コバルト、ビスマスには全く反応せず、同族のアンチモンに対してのみ反応した。アンチモンの天然存在量はヒ素に対して少なく、アンチモンに対する応答はヒ素の現場モニタリングの妨げにはならない。WHO の環境基準では 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下が安全とされていることから構築したヒ素応答性大腸菌バイオセンサーはヒ素汚染地区において十分に機能することが示された。さらにアジアのヒ素汚染地区から採取した実サンプル (ヒ素濃度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を用いた実験でも色調変化を観察することができた。高い特異性を示し、短時間で光非依存的に応答するセンサーは非常に広範囲にわたるヒ素汚染地区において井戸水のヒ素濃度を

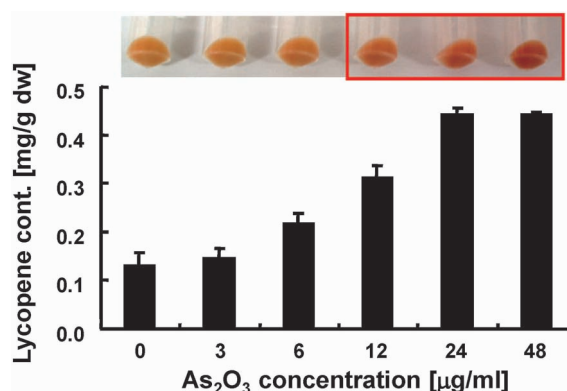


Fig. 5. Change of Color in the Arsenite Sensor Strain in Response to Addition of Low Concentrations of Arsenite
Image was taken 3 h after addition of arsenite.

現場でモニターできると期待している。

3. 肝疾患治療法の開発

3-1. バイオ人工肝臓の開発 三浦研究室においては 1970 年代後半から固定化生体触媒の医療への応用を目指した研究が行われていた。当時、不安定な酵素を基材に固定化することにより安定化させ、発酵産業など物質生産プロセスを改善する技術が発展してきていた。当研究室の別グループでは人工材料に酵素あるいはタンパク質を固定化することにより人工血管などに利用する抗血栓性医療材料開発の試みがなされていた。一方、筆者は固定化生体触媒の医療への応用を志し、酵素ではなく細胞を基材に固定化することにより安定な医療用バイオリアクターの構築を図った。

当時、急性肝不全に陥った患者の救命あるいは移植までの Bridge use に適用するための人工肝臓補助装置が国内外で注目を集めていた。1976 年 Seglen らによりコラゲナーゼ灌流法を用いて機能を維持した肝細胞の単離技術が確立され、生体外での培養が可能となった。⁷⁾ この時点から肝細胞をリアクターに充填して肝不全に陥った患者の血液を灌流させることにより体液の正常化、そして救命につなげる「バイオ人工肝臓」の構築が日米欧で活発に検討されるようになった。生存率 90% を超す肝細胞単離技術は確立したが単離肝細胞は極めて不安定で、数日以内に分化機能は消失することから筆者らは *in vitro* での分化機能を長期維持するための検討を行い、数多くの論文を報告した。⁸⁻¹¹⁾

米国の Demetriou らは 1993 年、ブタの肝細胞をコラーゲンコートしたマイクロキャリアに接着さ

せ、中空糸型カートリッジの膜外スペースに封入したバイオ人工肝臓を構築し、早くも 1994 年臨床試験を開始している。¹²⁾ 同じく米国の Sussman らは比較的分化機能を維持したヒト肝芽細胞腫由来の株化肝細胞を臨床試験に用いている。¹³⁾ わが国では米国のように上記の臨床試験実施が困難な土壌があり、将来ヒトでの臨床試験が可能となった時点で優れたバイオリアクターを供給できるようにするべく肝細胞の高機能化並びに安定化を目指した研究を継続した。

単離された肝細胞は上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) 存在下、プロテオグリカン进行コーティングした表面あるいは正電荷を持つ表面上で培養するとスフェロイドと呼ばれる大きさ 100–200 ミクロンの球状集合体を形成する。筆者らは肝臓に存在し、肝細胞の増殖、分化、機能発現に重要な役割を果たしている類洞壁内皮細胞、クッパー細胞、星細胞などの非実質細胞に着目した。肝細胞に種々の混合比で非実質細胞を存在させヘテロスフェロイドを形成させ、アルギン酸カルシウムゲル内に包埋し各種肝機能を観察した。その結果、ヘテロスフェロイドは肝細胞のみのものに比べ顕著に活性、安定性が向上した。通常の単層培養では 2–3 日で肝機能はほぼ消滅するがヘテロスフェロイドは 2 週間肝機能を維持していた。¹⁴⁾ また肝細胞と非実質細胞をコラーゲン層を挟んで培養する階層混合培養を考案し、非実質細胞依存の肝機能維持効果を示した。¹⁴⁾ 階層混合培養の結果から非実質細胞の促進効果発現に肝細胞との直接のコンタクトは必須ではないことが示唆された。また非実質細胞の培養上清でも同様の効果をもたらされたため、液性因子の分離精製、プロテオーム解析を試みたが残念ながら同定までは至らなかった。

以上の結果より肝細胞と非実質細胞の組み合わせがバイオ人工肝臓に有効であることを示したが、実際のリアクターを構築する際に細胞数の確保が必要となる。肝細胞は肝臓容積の 80% 以上を占め単離法は確立していること、また無限増殖能を有するヒト embryonic stem (ES) 細胞から分化させることが可能であることが報告されていた [induced pluripotent stem (iPS) 細胞が生まれる前のことである]。¹⁵⁾ 一方、非実質細胞は肝臓中に多くは存在せず機能を維持した状態で増殖させることは困難で

あった。そこで活発な増殖能を有する骨髄由来幹細胞から分化させることができれば細胞数確保は可能と推測し、実際に骨髄由来細胞から肝機能促進効果を有する細胞を分化させることが可能か否かを検討した。肝臓クッパー細胞の代替として骨髄細胞に IL-3, M-CSF を添加してマクロファージを誘導し階層混合培養を行ったところ肝機能促進効果が得られた。¹⁶⁾ 増殖能を有する幹細胞を用いて細胞数を確保し、その後に分化誘導を行うことにより異種の細胞や株化細胞を用いることなくヒト由来の分化細胞のみでバイオ人工肝臓を構築できることが示された。

同時期に細胞側の検討に加えて細胞の足場となる培養基材側の検討も行っている。足場依存性の細胞は培養基材の性質によって viability が著しく変動するため、機能維持の成否は優れた培養基材に依存しているといっても過言ではない。2000 年筆者が教授に就任した時点で以前から共同研究を行っていた香川大学教育学部の川瀬雅也助教授を当研究室に招き、基材開発のテーマを活発に推進した。1985 年 Tomalia らによって報告された dendrimer は樹木上多分岐高分子であり、様々な領域でその応用が検討されている。¹⁷⁾ 筆者らは世界に先駆けて培養基材の表面修飾に dendrimer を用いる機能性培養基材の開発に着手した。ポリアミドアミン dendrimer は中心部分のコア、骨格分子、末端アミノ基から構成され、中心コア分子から段階的に伸長反応を行うことで枝分かれ数を増加させることができる。末端のアミノ基は反応性に富んでいることから細胞が認識、結合するリガンドを修飾することにより細胞の接着、生存性を制御することが可能と考えた。¹⁸⁾ 予備検討からポリアミドアミン dendrimer 修飾基材上で肝細胞を培養すると集合体であるスフェロイドを形成し易いことを見出した。しかし形成したスフェロイドは容易に基材から遊離するため、強い接着性をもたらすリガンド修飾を試みた。肝細胞表面に存在するアシアロ糖タンパクレセプターのリガンドとなるガラクトースで修飾すると形成したスフェロイドが強く接着することを見出した。またフルクトースとガラクトースで共修飾することにより、さらに生存性、機能が維持されることを明らかとした。^{19,20)} リガンド修飾 dendrimer を基材表面に固定し細胞培養に用いるアイデアはわれわれ独自のものであり、細胞毎に異なるリガンドを

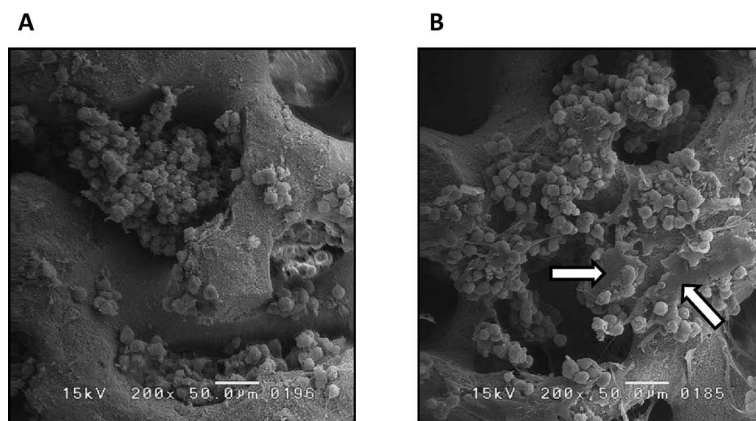


Fig. 6. Scanning Electron Micrographs of Cells Cultured on Hydroxyapatite Disk

Hepatocytes were monocultured on the disk for 2 d (A). Bone marrow cells were cultured for 2 weeks, then hepatocytes were cultured for an additional 2 d on the disk (B). White arrows indicate bone marrow cells.

用いることで最適な細胞培養表面の創出が可能であることを示した。大阪大学基礎工学研究科の田谷正仁先生、紀ノ岡正博先生との共同研究によりデンドリマー密度を変化させることにより軟骨細胞の形態や分化機能を制御することに成功した。²¹⁾ さらにD-グルコースとEGFをリガンドとして用いると細胞の増殖と運動性を亢進できることを示した。²²⁾ 今後、リガンド修飾デンドリマーは細胞毎に最適化したカスタマイズの培養基材表面創出のツールとなりバイオテクノロジーの発展に大きく貢献することが期待される。

3-2. 細胞移植による肝疾患治療 バイオ人工肝臓は肝細胞をバイオリアクターに封入し、急性肝不全に陥った患者の血漿を体外灌流させることを治療の根本としている。したがって基礎研究の主体は薬品製造工学講座発足当時から受け継がれる化学工学的な検討であった。2000年に筆者が主任教授となった時点で肝疾患治療を薬学的な観点からこれまでと異なる切り口で検討することとなった。すなわち細胞をリアクター内の生体触媒としてではなく、くすりとして見立て体内に投与する細胞移植により肝炎患者の肝線維化、肝硬変、肝がんへの進行を抑えるための基礎検討をスタートさせた。

初期段階として肝障害モデル動物を作製し肝細胞移植が有意に治療効果を示すか否かを検討した。肝細胞の足場となる基材は人工骨の材料であり生体適合性を有する多孔性のヒドロキシアパタイト(hydroxyapatite; HA)を使用した。なかでもHA内に血管新生可能な完全連通管構造を有する担体を

用い、マウスの肝細胞を播種し培養を行った(Fig. 6)。肝細胞はHAの小孔内で球状を保ったまま凝集して存在していることが観察された。肝細胞は伸展状態よりも球形を維持し凝集すると機能を維持することが知られていることから細胞移植に適していると判断した。様々な検討をした結果、骨髄細胞をHAに生着させたのちに肝細胞を播種させたHAの治療効果が最も顕著であることが示された。²³⁾ また腹腔へ移植3週間後にHAを摘出し内部を観察すると血管新生が確認された。したがって異所性の肝機能を発現する組織が構築され肝障害モデルマウスに対して治療効果を示したことが示唆された。

バイオ人工肝臓の項でも触れたが移植の際にも細胞源を確保することが重要である。肝細胞は単離した状態で増殖させることは困難で、しかも肝疾患を抱えた患者から肝細胞を単離するのは非現実的である。他人の肝細胞を免疫抑制下で移植可能であるが臓器移植と同様にドナー不足は解消されていない(将来的にはiPS細胞由来の肝細胞を移植する時代が来ると思われるが本検討を行っている時期にiPS細胞は生まれていない)。そこで筆者らは骨髄由来の間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)に着目し、*in vitro*で肝細胞へ分化させたのちに移植し、肝障害モデル動物に対して治療効果の有無を観察した。まず、ラット大腿骨より骨髄細胞を単離し、接着性細胞に対して増殖能、幹細胞としての評価を行った。増殖した細胞は骨分化能を有しており、単離した骨髄細胞にMSCが存在し、培養系で増幅可能であることが示された。次に、インスリ

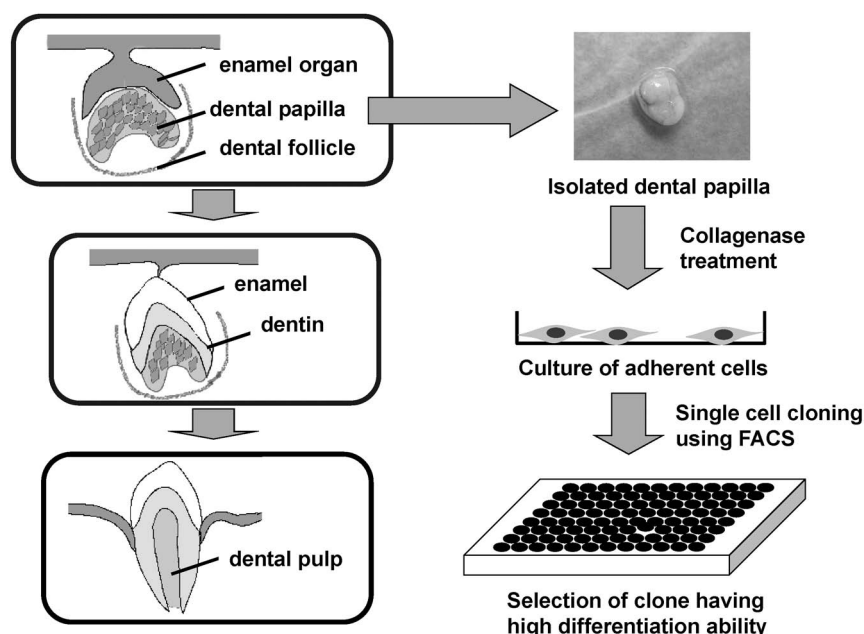


Fig. 7. Clonal Isolation of Stem Cells Having Rapid Growth and High Differentiation Abilities from Dental Papilla

ン、トランスフェリン、セレンを含む基本培地にデキサメタゾン (dexamethasone; DEX) と肝細胞への分化に必要と思われる肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) を添加し培養を行った。その結果、HGF と DEX 添加群では肝細胞様の形態変化とアルブミン分泌能など肝機能発現がみられた。ラット骨髄細胞を単離し、分化誘導処理又は無処理の細胞を蛍光色素 PKH26 で染色後、四塩化炭素誘導肝障害ラットに対して尾静脈より移植した。移植 4 週後に肝臓の凍結切片を作製し蛍光観察を行ったところ分化誘導処理を行った細胞を移植したラットで移植細胞の有意な生着が確認された。さらに肝障害マーカーである alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) の低下、血清アルブミン値の正常値までの回復、肝線維化の有意な抑制といった治癒効果が得られた。²⁴⁾ 本実験は骨髄細胞を分離し接着系の細胞を培養したものを使用している。したがって MSC 以外にも骨髄間質細胞と呼ばれるものも含んでおり MSC 単独の効果であるか否かはシングルセルクローニングを行い効果判定する必要があった。

2006 年人工多能性幹細胞である iPS 細胞が誕生し、細胞移植のソースとして注目された。既に存在していた ES 細胞は作製時に胚を利用すること、他人の細胞由来で拒絶反応があることから iPS 細胞

が一気に脚光を浴びることとなった。筆者らは iPS フィーバーが巻き起こる以前から、異なる観点で移植の細胞源を検討していた。当時、間葉系幹細胞は骨髄のみならず臍帯血、脂肪組織などに存在し肝細胞へ分化可能なことが報告されていた。前述の MSC 移植実験は産業技術総合研究所の大串 始博士 (整形外科医) との共同研究で実施されたが、同施設の研究員であった池田悦子歯科医と共同でヒトの歯に存在する幹細胞に着目し、優れた性質を有する幹細胞の探索をスタートさせた。歯髄には未分化な MSC が存在することが予想され、さらには歯科治療では日常的に抜歯が行われ廃棄されていることから細胞源としては有望であると考えた。虫歯となった後に抜歯される歯は病原菌が含まれ使用できないため、歯列矯正時に埋伏した状態から抜歯される第 3 大臼歯、通称「親知らず」に着目した。Figure 7 に示す歯乳頭組織は分化して象牙質、歯髄となるが、この部位に未分化な幹細胞が存在していると予想し検討を開始した。歯列矯正のため抜歯する患者よりインフォームドコンセントを得た後、廃棄された親知らずを譲り受け、内部の歯乳頭組織を単離した。コラゲナーゼで分散後、シングルセルクローニングを行い増殖能、分化機能の高いクローンを選択した。種々のマーカーを調査した結果、歯胚由来幹細胞は MSC であることが明らかとなった。

HGF などを用いて肝細胞への分化誘導を行った結果、10 日前後から肝分化機能であるアルブミン遺伝子の発現が上昇し、初期分化マーカーである α -フェトプロテイン遺伝子発現が減少傾向にあった。2 週間の分化誘導により、培養初期の細長い線維芽細胞様の形態から大型で多角形の細胞へと変化し、アルブミンタンパク質の分泌が確認された。これらの結果より歯胚由来幹細胞から肝細胞への方向付けが可能であることが示された。歯胚由来幹細胞は増殖能、分化能ともに骨髄由来 MSC に比べ高いことが示された。次に四塩化炭素誘導肝障害ラットに対する治癒効果を検討した。移植細胞はヒト由来のため免疫不全のヌードラットを使用し、門脈経由で移植を行った。その結果、非誘導培地で培養した細胞を移植したラットは治癒効果を示さなかったが肝細胞へ方向付けされた細胞移植群では AST・ALT 値、血中アルブミン濃度、血中ビリルビン濃度、肝線維化に関して顕著な治癒効果がみられた。²⁵⁾ 歯胚由来幹細胞は MSC として多分化能を有し、iPS 細胞・ES 細胞と比較し無限増殖能はないが、ES 細胞の持つ倫理的問題はなく、iPS 細胞のように強制的に未分化状態に回帰させたものでもないことからより安全な再生医療の細胞源になると確信している。

3-3. HCV 侵入・複製評価系の開発 第3大臼歯、通称「親知らず」由来の細胞移植に関する基礎研究に続き、C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) の新規感染評価系の開発に研究の軸足を置くこととなった。2010 年から 6 年間、肝炎等克服緊急対策研究事業 (厚生労働科学研究費補助金、代表者 脇田隆字) の分担研究者としてヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製評価系の確立を試みた。

わが国には 200 万人余りの HCV 感染者が存在し、慢性肝炎から肝硬変を経て肝がんに行進する可能性が高い。HCV は宿主域が非常に狭くヒト肝臓以外にはほとんど感染しないため、*in vitro* の感染評価系はヒト肝細胞を用いる必要がある。ヒト初代肝細胞は量的確保が困難でヒト肝がん細胞は正常機能を有している保証はない。そこで筆者らは厚労省の班研究において iPS 由来肝細胞が HCV 感染評価系として使用できるか否かを検討した。大阪大学薬学研究科の水口裕之教授はアデノウイルスベクターを利用した高い分化誘導効率を有する肝細胞誘導系

を開発していたこともあり共同で解析を行った。HCV シュードウイルスを用いて侵入実験を行った結果、iPS 細胞では全く感染は観察されなかったが iPS 由来肝細胞には容易に感染可能なことを明らかにした。HCV 感染受容体として同定されている CD81, SR-BI, claudin-1, occludin の発現解析を行ったところ初発の iPS 細胞は claudin-1, occludin を発現しておらず分化誘導の後期にすべての感染受容体を発現することが判明した。これらの結果から iPS 由来肝細胞の感染能獲得には肝細胞分化に伴う感染受容体、claudin-1, occludin の発現が必須であることが示唆された。次に細胞内での HCV 複製機能評価を行った。筆者らのグループでは転写制御型 RNA polymerase I 発現カセットを搭載したアデノベクターシステムを構築し、HCV ゲノム発現アデノウイルスベクターの創出に成功していた。²⁶⁾ そこで本システムを用いて iPS 細胞と iPS 由来肝細胞の HCV 複製評価を行った。その結果、iPS 細胞では複製能はみられず、iPS 由来肝細胞でのみ HCV RNA polymerase 依存的な HCV ゲノム複製が観察された。²⁷⁾ 本成果は世界に先駆けて iPS 由来肝細胞が HCV の感染・複製評価系として使用できることを示したものであり、抗 HCV 薬のスクリーニング系として有望であると考えている。

4. 細胞間隙経路を介した新規薬物送達法の開発

2000 年以降、生物化学工学的な研究から薬学的な要素を含む研究へのシフトを図るため、新たに非侵襲的な薬物送達法開発を目指した研究を開始した。当時の助教授であった川瀬先生の発案で日本薬局方に賦形剤として収載され安全性が高いベントナイトと呼ばれる粘土鉱物の利用を検討した。ベントナイトはタンパク質や DNA を吸着する能力を有し、安価で安定なことから経口デリバリーの担体として有望と推測し、検討を行った。DNA とベントナイトの複合体を作製しマウスに対して経口投与したところベントナイトが保護効果を示し小腸での遺伝子発現が確認された。²⁸⁾ 本研究は川瀬先生が大阪大谷大学へ教授として異動した時点で休止となったが、粘土鉱物は多様性に富み将来的にペプチド医薬、核酸医薬の安全なデリバリーの担体として魅力的な素材であると現在でも考えている。入れ替わりに赴任した近藤昌夫助教授は前職の昭和薬科大時代に細胞間隙経路を介した新規薬物送達法を研究し、

タイトジャンクションを制御することにより薬物送達が可能であることを見い出していた。²⁹⁾ 近藤先生はタイトジャンクションで物質透過を司るタンパク質である claudin と結合しバリア機能を阻害する分子としてウエルシュ菌エンテロトキシンの C 末断片と、さらに強力なバリア機能促進能を有するその誘導体の創製に成功し、ペプチド医薬などの腸管吸収を促進可能であることを示した。³⁰⁾ 大阪大学においてこれまで不可能と思われていた膜タンパク質 claudin に対する特異抗体の作製に成功し、当該抗体がバリア制御能を有することも実証している。³¹⁻³³⁾ 現在は血液脳関門での透過制御などを目指して研究が継続している。また 2018 年 4 月より厚生労働省に出向中の渡利彰浩講師はこれまで報告されていない低分子の TJ バリア制御分子を独自のスクリーニング系を利用し化合物ライブラリから単離することに成功している。^{34,35)} さらに単離した低分子を利用しタイトジャンクション制御による核酸医薬の経皮デリバリーが可能であることを実証している。

本項で記述した成果は当研究室の若手教員と大学院生、学部生のアイデアを基に得られたものである。更なる発展を期待したい。

5. おわりに

大阪大学薬学研究科では研究室の正式名称に加え略称が用いられており、「薬品製造工学」の略称は「工学」であった。1998 年の改組により正式名称が「生体機能分子化学」となっても筆者が停年を迎え研究室を閉じる 2018 年まで略称「工学」が用いられた。現在の若手教員はなぜ当分野が「工学」と呼ばれているかを認識していない。発足当初は教員すべてが工学博士であり、全国の薬学部でも非常にユニークなプロセス制御を目指す生物化学工学的研究を展開していた。1983 年筆者が初めて薬学博士号を持った教員となり、遺伝子工学的手法による細胞育種、バイオ人工肝臓・細胞移植による新規肝疾患治療法の開発研究、新規薬物送達法の開発など工学的研究を足場に薬学的要素を組み入れてきた。当研究科の取り決め（スクラップ&ビルド）により教授停年時に研究室を閉じることになり、2018 年 3 月、「工学」の歴史は幕を閉じることになった。工学の教員として在職した方々、卒業生の今後の発展を心より祈念して本総説の終わりとしたい。

謝辞 学部の特別実習、大学院博士課程、助手、助教授時代を通してご指導頂いた三浦先生に心より感謝申し上げます。三浦先生の後任となり筆者を常にサポートして頂いた前任教授の溝口先生には大変お世話になりました。停年後も工学の研究を気にかけて頂き感謝しております。博士課程での指導教員、1983 年 2 月 23 日に国際電話をかけて頂いた宮本和久先生には工学研究の基礎を教わり、たくさんの方々との交流の機会を与えて頂きましたこと、御礼申し上げます。以下、筆者の同僚についての紹介です。梅田技官は *in vivo cloning* 法を用いて水素酸化関連遺伝子群を挿入した組換えプラスミド pFUS の単離に成功し、薬学博士を取得後、2005 年停年退職しました。前田先生は光合成微生物による水素生産や微生物バイオセンサー開発で中心的な役割を果たし、ローザンヌ大学へ留学後宇都宮大学農学部助教授となりました。川瀬先生は生体材料関連の経験が豊富でデンドリマーや粘土鉱物を導入したユニークな研究を展開し、大阪大谷大学教授、のちに長浜バイオ大学教授として活躍中です。磯田勝広助教は肝細胞移植を担当し生物工学会論文賞を受賞後、現在帝京平成大学薬学部准教授として研究教育に邁進中です。近藤先生はタイトジャンクション制御による新規薬物送達法の研究を立ち上げ、厚生労働省への出向後大阪大学薬学研究科において 2018 年 4 月医薬品医療機器規制科学研究所の教授に就任しました。渡利先生は核酸医薬の非侵襲性投与法の開発に尽力し、現在厚生労働省でレギュラトリサイエンスに関する部署に出向中です。三浦研究室において異なる研究グループで活動されていた岡崎光雄先生、米虫節夫先生、藏野憲秀先生、平田收正先生には大変貴重なご助言を頂きました。上記、スタッフの方々の尽力で工学の研究が支えられてきました。この場をお借りしまして感謝申し上げます。また、最後になりましたが本稿を執筆する機会を与えて頂きました日本薬学会学術誌編集委員会の方々に心より御礼申し上げます。今後は両親からの永年にわたる支援と家族の理解に改めて感謝しつつ、停年後の新たな道を歩んでいきたいと思ひます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Miura Y., Yagi K., Shoga M., Miyamoto K., *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1555–1563 (1982).
- 2) Miura Y., Umeda F., *Yakugaku Zasshi*, **114**, 63–72 (1994).
- 3) Yagi K., Miyawaki I., Kayashita A., Kondo M., Kitano Y., Murakami Y., Maeda I., Umeda F., Miura Y., Kawase M., Mizoguchi T., *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1004–1007 (1996).
- 4) Yagi K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 1251–1258 (2007).
- 5) Maeda I., Yamashiro H., Yoshioka D., Onodera M., Ueda S., Kawase M., Miyasaka H., Yagi K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 397–402 (2006).
- 6) Fujimoto H., Wakabayashi M., Yamashiro H., Maeda I., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Miyasaka H., Yagi K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 332–338 (2006).
- 7) Seglen P. O., *Methods Cell Biol.*, **13**, 29–83 (1976).
- 8) Miura Y., Akimoto T., Kanazawa H., Yagi K., *Artif. Organs*, **10**, 460–465 (1986).
- 9) Miura Y., Akimoto T., Fuke Y., Yamazaki S., Yagi K., *Artif. Organs*, **11**, 361–365 (1987).
- 10) Miura Y., Yoshikawa N., Akimoto T., Yagi K., *Artif. Organs*, **14** (Suppl. 2), 273–275 (1990).
- 11) Yagi K., Tsuda K., Serada M., Kondo A., Yamada C., Miura Y., *Artif. Organs*, **17**, 929–934 (1993).
- 12) Rozga J., Holzman M. D., Ro M. S., Griffin D. W., Neuzil D. F., Giorgio T., Moscioni A. D., Demetriou A. A., *Ann. Surg.*, **217**, 502–511 (1993).
- 13) Sussman N. L., Gislason G. T., Conlin C. A., Kelly J. H., *Artif. Organs*, **18**, 390–396 (1994).
- 14) Yagi K., Sumiyoshi N., Yamada C., Michibayashi N., Nakashima Y., Kawase M., Miura Y., Mizoguchi T., *J. Ferment. Bioeng.*, **80**, 575–579 (1995).
- 15) Hamazaki T., Iiboshi Y., Oka M., Papst P. J., Meacham A. M., Zon L. I., Terada N., *FEBS Lett.*, **497**, 15–19 (2001).
- 16) Yagi K., Sumiyoshi N., Nakashima Y., Michibayashi N., Kawase M., Miura Y., Mizoguchi T., *Cytotechnology*, **26**, 5–12 (1998).
- 17) Tomalia D., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P. A., *Polym. J.*, **17**, 117–132 (1985).
- 18) Kawase M., Kurikawa N., Miura N., Shiomi T., Ozawa C., Higashiyama S., Mizoguchi T., Yagi K., *Artif. Organs*, **24**, 18–22 (2000).
- 19) Kawase M., Shiomi T., Matsui H., O uji Y., Higashiyama S., Tsutsui T., Yagi K., *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 519–524 (2001).
- 20) Higashiyama S., Noda M., Kawase M., Yagi K., *J. Biomed. Mater. Res.*, **64A**, 475–482 (2003).
- 21) Kim M.-H., Kino-oka M., Kawase M., Yagi K., Taya M., *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 192–199 (2007).
- 22) Kim M.-H., Kino-oka M., Kawase M., Yagi K., Taya M., *Tissue Eng.*, **13**, 1689–1690 (2007).
- 23) Takeda M., Yamamoto M., Isoda K., Higashiyama S., Hirose M., Ohgushi H., Kawase M., Yagi K., *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 77–81 (2005).
- 24) Oyagi S., Hirose M., Kojima M., Okuyama M., Kawase M., Nakamura T., Ohgushi H., Yagi K., *J. Hepatol.*, **44**, 742–748 (2006).
- 25) Ikeda E., Yagi K., Kojima M., Yagyuu T., Ohshima A., Sobajima S., Tadokoro M., Katsube Y., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Go M., Adachi H., Yokota Y., Kirita T., Ohgushi H., *Differentiation*, **76**, 495–505 (2008).
- 26) Yoshida T., Kondoh M., Ojima M., Mizuguchi H., Yamagishi Y., Sakamoto N., Yagi K., *Nucleic Acids Res.*, **39**, e64 (2011).
- 27) Yoshida T., Takayama K., Kondoh M., Sakurai F., Tani H., Sakamoto N., Matsuura Y., Mizuguchi H., Yagi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **416**, 119–124 (2011).
- 28) Kawase M., Hayashi Y., Kinoshita F., Yamato E., Miyazaki J., Yamakawa J., Ishida T., Tamura M., Yagi K., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 2049–2051 (2004).
- 29) Kondoh M., Masuyama A., Takahashi A., Asano N., Mizuguchi H., Koizumi N., Fujii M., Hayakawa T., Horiguchi Y., Watanabe Y., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 749–756 (2005).

-
- 30) Uchida H., Kondoh M., Hanada T., Takahashi A., Hamakubo T., Yagi K., *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1437–1444 (2010).
- 31) Nakajima M., Nagase S., Iida M., Takeda S., Yamashita M., Watari A., Shirasago Y., Fukasawa M., Takeda H., Sawasaki T., Yagi K., Kondoh M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **354**, 440–447 (2015).
- 32) Takigawa M., Iida M., Nagase S., Suzuki H., Watari A., Tada M., Okada Y., Doi T., Fukasawa M., Yagi K., Kunisawa J., Kondoh M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **363**, 444–451 (2017).
- 33) Hashimoto Y., Shirakura K., Okada Y., Takeda H., Endo K., Tamura M., Watari A., Sadamura Y., Sawasaki Y., Doi T., Yagi K., Kondoh M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **363**, 275–283 (2017).
- 34) Watari A., Hashegawa M., Muangman T., Yagi K., Kondoh M., *Biotechnol. Lett.*, **37**, 1177–1185 (2015).
- 35) Watari A., Kodaka M., Matsuhisa K., Sakamoto Y., Hisaie K., Kawashita N., Takagi T., Yamagishi Y., Suzuki H., Tsujino H., Yagi K., Kondoh M., *Sci. Rep.*, **7**, 14514 (2017).