

氏 名 <sup>マリア</sup> <sup>エステル</sup> <sup>ロドリゲス</sup> <sup>ロサス</sup> MARIA ESTHER RODRIGUEZ ROSAS  
 学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)  
 学位記番号 薬 博 第 425 号  
 学位授与の日付 平成 11 年 3 月 23 日  
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
 研究科・専攻 薬学研究科薬学専攻  
 学位論文題目 Enantioselective studies on plasma protein bindings of hydrophobic drugs using  
 high performance frontal analysis  
 (高性能先端分析法を用いた疎水性薬物の立体選択的血漿タンパク結合  
 研究)  
 (主査)  
 論文調査委員 教授 中川照眞 教授 半田哲郎 教授 多賀 徹

### 論 文 内 容 の 要 旨

薬物の血漿タンパク結合は薬理効果や副作用の発現、並びに、薬物の体内動態に大きな影響を及ぼす。血漿タンパク結合にはアルブミンや $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質 (AGP) が同時に関与するが、各々異なる結合特性を示すとともに、タンパク質の濃度や構造に個体間の相違や病態時の変動が見られる場合がある。従って、安全で効果的な医薬品の開発と臨床への適用を行う上で血漿タンパク結合の詳細な研究が不可欠である。一方、非結合型薬物の測定には、従来、試料を平衡透析や限外ろ過後、HPLC分析する方法が汎用されているが、薬物の膜への吸着や膜の破損による結合型薬物の漏れに伴い測定誤差が発生することや、平衡化に時間がかかり操作が煩雑である等の問題点があり、特に、血漿タンパク質と強く結合する薬物を分析することは困難あるいは不可能であった。

本研究では、従来法では不可能であった疎水性の高い薬物の血漿タンパク結合研究に高性能先端分析 (HPFA) 法を適用し、その有用性を明らかにすることを目的とした。モデル薬物として用いたセモチアジル (R体) はCaチャンネル遮断薬であり、その対掌体であるレボセモチアジル (S体) はCa並びにNaチャンネル遮断作用を有する。両異性体ともに血漿タンパク質と非常に強く結合するが、今回初めて定量的な立体選択的結合研究を行うことに成功した。

#### 1. オンラインHPFA-HPLCシステムの構築

HPFAカラム、濃縮カラム、分析用カラムを2つの切替バルブで連結した新規オンラインHPFA-HPLCシステムを構築した。十分量の薬物-タンパク質混合試料をHPFAカラムに直接注入すると、カラム内部で薬物とタンパク質は試料溶液中と同じ結合平衡状態に達する。試料注入終了後、薬物とタンパク質は結合平衡を保ちつつ分離される結果、非結合型薬物のゾーンが形成される。この非結合型薬物ゾーンはカラムから溶出後に台形状ピークとして検出され、プラトー部分の薬物濃度は試料溶液中の非結合型薬物濃度に等しい。結合型薬物はHPFAカラムの内部で非結合型薬物に変換された後で溶出されるので、大容量の非結合型薬物ゾーン (プラトー画分) がカラムから溶出する。この大容量のプラトー画分をオンラインで濃縮することにより、検出感度を飛躍的に向上できる。そこで、一定容量のプラトー画分をオンラインで濃縮カラムに移して非結合型薬物を捕捉・濃縮した後、分析カラムに接続する。これらの操作は2つの連結バルブの流路を切り替えるだけで達成できる。分析カラムから溶出した薬物ピークの面積から濃縮カラムに捕捉された非結合型薬物量 (モル数) が求まり、この値をプラトー画分の容積で除することにより非結合型薬物濃度が計算される。また、分析カラムとして光学分離用HPLCカラムを用いることに光学異性体別の非結合型濃度が求められる。

新規オンラインシステムを用いることにより、ヒト血漿中のセモチアジルとレボセモチアジルの非結合型濃度を再現性良く定量することに成功した。その結果、総薬物濃度が500nMの血漿試料中の非結合型濃度はR体が $3.02 \pm 0.08$ nM、S体が

4.32±0.06nM (n=5) であり、どちらも99%以上の強い血漿タンパク結合率を示すが、R体の方がより強く結合することが判明した。

## 2. ヒト血清アルブミンとの結合研究

9.98 μM~78.7 μMのR体ないしS体と100 μMのヒト血清アルブミン (HSA) 混合溶液をHPFA分析し、得られた結果を用いてScatchard解析を行った。HSAとの会合定数 (K) 並びに結合部位数 (n) は、R体が $K=2.15 \times 10^5 M^{-1}$ ,  $n=0.99$ , total binding affinity (nK値) が $2.13 \times 10^5 M^{-1}$ であるのに対してS体が $K=6.59 \times 10^5 M^{-1}$ ,  $n=0.97$ ,  $nK=6.40 \times 10^5 M^{-1}$ であり、S体がR体よりも3倍強くHSAと結合することが判明した。

HSA分子上にはワルファリン結合部位 (サイトI) とジアゼパム結合部位 (サイトII) が存在する。同一部位に結合する薬物を併用すると予期せぬ体内動態の変化や副作用発現を引き起こす可能性があるため、薬物結合部位の同定は重要な課題である。セモチアジル光学異性体とHSAとの結合のnK値は40 μMのジアゼパムを添加することにより54%~65%に低下するが、100 μMのワルファリンを添加しても有為な変化は見られなかった。このことから両光学異性体ともにHSAのサイトIIに結合することが明らかになった。

## 3. α<sub>1</sub>-酸性糖タンパク質との結合研究

2.98~7.87 μMの光学異性体と25 μMのヒトAGP混合溶液をHPFA分析し、得られた結果をもとにScatchard解析を行った結果、AGPとの結合パラメーターはR体が $K=3.17 \times 10^7 M^{-1}$ ,  $n=0.74$ ,  $nK=2.34 \times 10^7 M^{-1}$ , S体が $K=2.59 \times 10^7 M^{-1}$ ,  $n=0.74$ ,  $nK=1.92 \times 10^7 M^{-1}$ であり、R体がS体よりも約1.2倍強い親和性を示し、HSAとAGPは相反する立体選択性を示すことが判明した。また、AGPの血漿中濃度 (約25 μM) はHSAの血漿中濃度 (約600 μM) よりも低いがHSAよりも30倍~100倍強い親和性を示すので、AGPとの結合の特徴が血漿中で顕著に現れた結果、血漿中ではAGPと同じ立体選択性が見られたことが判明した。

次に、R体とS体を両方含むAGP試料溶液を分析したところ、各光学異性体の非結合型濃度は両光学異性体が競合的に結合すると仮定して計算した理論値と一致しており、両光学異性体がAGP分子上の同一部位で競合的に結合することが明らかになった。

以上の研究を通して著者はHPFA法を用いることにより従来法では不可能であった疎水性の高い薬物の血漿中非結合型濃度を再現性良く高感度分析できること、並びに各種血漿タンパク質との結合を定量的かつ立体選択的に解析・評価できることを明らかにした。著者が開発したシステムはHPLC条件を変更することにより他の疎水性薬物にも適用が可能な汎用性の高いシステムであり、今後、医薬品開発や安全な臨床使用に貢献するものとする。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、従来法では不可能であった疎水性の高い薬物の血漿タンパク結合研究に高性能先端分析 (HPFA) 法を適用し、その有用性を明らかにすることを目的として行なわれた。モデル薬物として用いたセモチアジル (R体) はCaチャンネル遮断薬であり、その光学対掌体であるレボセモチアジル (S体) はCa並びにNaチャンネル遮断作用を有する。両異性体ともに血漿タンパク質と非常に強く結合するが、本研究により初めて定量的な立体選択的結合研究を行うことに成功した。

### 1. オンラインHPFA-HPLCシステムの構築

HPFAカラム、濃縮カラム、分析用カラムを2つの切替バルブで連結した新規オンラインHPFA-HPLCシステムを構築した。十分量の薬物-タンパク質混合試料をHPFAカラムに直接注入すると、カラム内部で薬物とタンパク質は試料溶液中と同じ結合平衡状態に達する。得られた薬物の溶出曲線のプラトー高さから結合平衡状態における非結合型薬物濃度を定量できる。

新規オンラインシステムを用いることにより、ヒト血漿中のセモチアジルとレボセモチアジルの非結合型濃度を再現性良く定量することに成功した。その結果、総薬物濃度が500nMの血漿試料中の非結合型濃度はR体が $3.02 \pm 0.08 nM$ , S体が $4.32 \pm 0.06 nM$  (試行回数5) であり、どちらも99%以上の強い血漿タンパク結合率を示すが、R体の方がより強く結合する

ことが判明した。

## 2. ヒト血清アルブミンとの結合研究

9.98  $\mu\text{M}$ ~78.7  $\mu\text{M}$ のR体ないしS体と100  $\mu\text{M}$ のヒト血清アルブミン (HSA) 混合溶液をHPFA分析し、得られた結果を用いてScatchard解析を行った。HSAとの会合定数 (K) 並びに結合部位数 (n) は、R体が $K=2.15 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ ,  $n=0.99$ , total binding affinity (nK値) が $2.13 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ であるのに対してS体が $K=6.59 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ ,  $n=0.97$ ,  $nK=6.40 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ であり、S体がR体よりも3倍強くHSAと結合することが判明した。

HSA分子上にはワルファリン結合部位 (サイト I) とジアゼパム結合部位 (サイト II) が存在する。同一部位に結合する薬物を併用すると予期せぬ体内動態の変化や副作用発現を引き起こす可能性があるため、薬物結合部位の同定は重要な課題である。セモチアジル光学異性体とHSAとの結合のnK値は40  $\mu\text{M}$ のジアゼパムを添加することにより54%~65%に低下するが、100  $\mu\text{M}$ のワルファリンを添加しても有意な変化は見られなかった。このことから両光学異性体ともにHSAのサイト II に競合的に結合することが明らかになった。

## 3. $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質との結合研究

2.98~7.87  $\mu\text{M}$ の各光学異性体と25  $\mu\text{M}$ のヒトAGP混合溶液をHPFA分析し、得られた結果をScatchard解析したところ、AGPとの結合パラメーターはR体が $K=3.17 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ ,  $n=0.74$ ,  $nK=2.34 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ , S体が $K=2.59 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ ,  $n=0.74$ ,  $nK=1.92 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ であり、R体がS体よりも約1.2倍強い親和性を示し、HSAとAGPは相反する立体選択性を示すことが判明した。また、AGPの血漿中濃度 (約25  $\mu\text{M}$ ) はHSAの血漿中濃度 (約600  $\mu\text{M}$ ) よりも低いながらHSAよりもこれら異性体に対して30倍~100倍強い親和性を示すので、AGPとの結合の特徴が血漿中で顕著に現れた結果、血漿中ではAGPと同じ立体選択性が見られたことが判明した。

次に、R体とS体とを同時に含むAGP試料溶液を分析したところ、各光学異性体の非結合型濃度は両光学異性体が競合的に結合すると仮定して計算した理論値と一致しており、両光学異性体がAGP分子上の同一部位で競合的に結合することが明らかになった。

以上、本研究は疎水性の強い薬物・タンパク結合の新規微量分析法を開発しその立体選択的解析への適用性を明らかにしたものであり、医薬品の基礎研究の発展に貢献するものである。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

更に、平成11年2月18日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。