

|           |                                                                                                                                |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | 木 村 智 子                                                                                                                        |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (薬 学)                                                                                                                      |
| 学 位 記 番 号 | 薬 博 第 558 号                                                                                                                    |
| 学位授与の日付   | 平 成 17 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 創 薬 科 学 専 攻                                                                                                          |
| 学位論文題目    | Quantitative protein binding analysis of highly hydrophobic drugs<br>and endogenous substances<br>(高疎水性の薬物及び内因性物質の定量的タンパク結合解析) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 松 崎 勝 巳      教 授 加 藤 博 章      教 授 半 田 哲 郎                                                                         |

### 論 文 内 容 の 要 旨

血漿タンパク結合は薬物のみならず内因性物質の体内動態や活性発現に大きく影響する。血漿タンパク結合には複数のタンパク質が同時に関与するので、血漿中の overall な結合分析とともに各タンパク質の結合分析を行い、その結合特性を解明する必要がある。特にタンパク質分子上の同一部位で結合する物質が共存する場合には、結合率が低下する可能性がある。結合部位の特定が重要である。また個体間差、病態時変動が大きいタンパク variant (遺伝的にアミノ酸配列の異なる変異体) ごとの結合研究が必要不可欠である。

血漿タンパク結合の研究は高タンパク結合率を示す物質の場合特に重要となる。ところが、血漿タンパクと強く結合 (結合定数  $10^{-5} \sim 10^{-7} \text{M}^{-1}$ ) する場合には、平衡透析や限外ろ過などを利用する従来の結合分析法では薬物の膜や容器への吸着や結合型物質の膜からの漏れのため正確な解析が困難なことが多く、詳細な結合研究を行なう上での障害となっている。特に、高血漿タンパク結合性薬物の代謝に伴う結合性の変化や高タンパク結合性の内因性生理活性物質の結合特性には不明な点が多い。

当研究室で開発された高性能先端分析 (HPFA) 法は、膜を使用しないために従来法の技術的問題点を克服し、かつ微量、迅速化を可能とする。また血漿試料の直接注入、立体選択的な同時分析が可能であり、特に従来法では困難であったタンパク結合率の高い物質とタンパク質との結合解析に有用である。

著者は今まで詳細が不明であった疎水性の大きい高タンパク結合性薬物とその代謝薬物および内因性物質の光学異性体ごとの結合研究、variant ごとの結合特性の解明、及び生体試料中の高感度同時分析を、HPFA 法を用いて行った。

#### 第 2 章 高タンパク結合性薬物オキシブチニンとその代謝物の立体選択的タンパク結合解析

高タンパク結合性薬物とその代謝物のそれぞれの光学異性間での結合特性の違いを解明するために、モデル薬物として排尿障害治療薬であるオキシブチニン (OXY) とその脱エチル化代謝物であるデスエチルオキシブチニン (DEOXY) を用いて結合解析を行った。OXY は光学活性な薬物であり、R 体が薬理効果を示すが臨床ではラセミ体として使用されている。活性代謝物である DEOXY の薬理作用は親化合物より強いので、OXY と同様に DEOXY のタンパク結合研究が重要である。著者は HPFA 法を組み込んだ新規オンライン HPLC システムを構築し、主要な血漿タンパク質との光学異性体ごとの定量的結合解析、並びにタンパク分子上の OXY 及び DEOXY の競合的タンパク結合研究を行った。その結果、OXY, DEOXY の光学異性体はいずれも主に  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク (AGP) と強く結合し、AGP 分子上の同一部位で OXY と DEOXY が競合的に結合すること、及び OXY は脱エチル化されることによって AGP との結合が強くなり、さらに立体選択性が逆転する (R 体 < S 体  $\rightarrow$  R 体 > S 体) ことが明らかになった。一般に代謝物は親化合物よりも疎水性が低下するのでタンパク結合も弱くなるが、脱エチル化に伴う立体障害の低下により代謝物のタンパク結合が親薬物よりも強くなるという興味深い現象を見出した。

#### 第 3 章 OXY と $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質 (AGP) variant 間の結合解析

近年代表的な血漿タンパク質であるヒト血清アルブミン (HSA), AGP には variant が存在することが明らかにされた。しかし各 variant 間で異なる薬物結合能を示すと推察されるにも関わらず, これらに関する研究はほとんど行われていない。そこで AGP の代表的な variant である F1・S 及び A variant を分離, 精製し OXY 及び DEOXY との結合解析を行った。その結果 OXY, DEOXY は AGP の A variant より F1・S variant に強く結合し, 第2章で見られた立体選択性は, AGP の F1・S variant の立体選択性に起因することが判明した。

#### 第4章 高疎水性内因性物質チロキシンの立体選択的タンパク結合解析

血漿中でチロキシン (T4) は HSA などの T4 結合タンパク質と強く結合しているが, HSA 分子上の T4 光学異性体の結合に関する詳細は不明であった。そこでその結合特性を解明した結果, T4 エナンチオマーは HSA 上の同一部位に競合的に結合し, 代表的な薬物結合サイトであるサイト I, サイト II の両方に結合することが明らかになった。

#### 第5章 甲状腺ホルモン類の血漿中非結合型濃度の高感度同時分析

T4 の血漿中非結合型濃度は甲状腺機能の指標となる。しかしながら遺伝的疾患等でタンパク側に異常がある時など T4 のみでは甲状腺機能が正確に反映されない可能性があるため, T4 および関連物質を同時に測定し総合的に判断する必要がある。従来よりチロキシン類の定量には RIA キットや EIA キットが汎用されているが, チロキシン類の一斉分析には適用できない。一方血漿中チロキシン類の総濃度は, 高感度かつ選択的な HPLC 検出器である電気化学検出器 (ECD) により定量できるものの, 非タンパク結合型チロキシン類はその濃度が非常に低いために, これまで定量できなかった。

そこで著者は, HPFA と濃縮カラムをオンライン連結することにより, 非結合型物質を効率よく前濃縮することができると考えて, ECD を組み込んだ新規 HPFA システムを構築し, 血漿中チロキシン類の同時分析に適用した。その結果, 血漿中に微量に存在するチロキシン類 (T4, T3 と rT3) の非結合型濃度を非 RI 検出法により同時定量することに成功した。

以上のように, 著者は HPFA 法を高疎水性薬物の代謝に伴う結合性変化や高血漿タンパク結合性の内因性生理活性物質の結合研究に初めて適用し, OXY の脱エチル化に伴って AGP との結合が強くなる現象を見出すとともに, チロキシン異性体の結合部位を同定した。また, 電気化学検出器を組み込んだ新規 HPLC システムを構築することにより, 血漿中のチロキシン類の非結合型濃度の高感度同時測定に成功した。本研究で確立した結合分析法は, 他の高血漿タンパク結合性薬物や内因性生理活性物質の結合研究に適用可能であり, 個体間差や病態時変動を念頭においたオーダーメイド医療に向けた詳細な血漿タンパク結合研究に有用である。

### 論文審査の結果の要旨

血漿タンパク結合は薬物のみならず内因性物質の体内動態や活性発現に大きく影響し, 高タンパク結合率 (結合定数  $10^{-5} \sim 10^{-7} \text{M}^{-1}$ ) を示す物質の場合特に重要となるにもかかわらず, 平衡透析や限外ろ過などを利用する従来の結合分析法では薬物の膜や容器への吸着や結合型物質の膜からの漏れのため正確な解析が困難なことが多く, 詳細な結合研究を行なう上での障害となっている。当研究室で開発された高性能先端分析 (HPFA) 法は, 膜を使用しないために従来法の技術的問題点を克服し, かつ微量, 迅速化を可能とする。また血漿試料の直接注入, 立体選択的な同時分析が可能であり, 特に従来法では困難であったタンパク結合率の高い物質とタンパク質との結合解析に有用である。

木村智子氏は今まで詳細が不明であった疎水性の大きい高タンパク結合性薬物とその代謝薬物および内因性物質の光学異性体ごとの結合研究, variant ごとの結合特性の解明, 及び生体試料中の高感度同時分析を, HPFA 法を用いて行い, 以下の知見を得た。

1) 高タンパク結合性薬物とその代謝物のそれぞれの光学異性間での結合特性の違いを解明するために, モデル薬物として排尿障害治療薬であるオキシブチニン (OXY) とその脱エチル化代謝物であり薬理作用が親化合物より強いデスエチルオキシブチニン (DEOXY) を用いて結合解析を行った。HPFA 法を組み込んだ新規オンライン HPLC システムを構築し, 主要な血漿タンパク質との光学異性体ごとの定量的結合解析, 並びにタンパク分子上の OXY 及び DEOXY の競合的タンパク結合研究を行った。その結果, OXY, DEOXY の光学異性体はいずれも主に  $\alpha 1$ -酸性糖タンパク (AGP) と強く結合し, AGP 分子上の同一部位で OXY と DEOXY が競合的に結合すること, 及び OXY は脱エチル化されることによって AGP との結合が強くなり, さらに立体選択性が逆転する (R 体 < S 体  $\rightarrow$  R 体 > S 体) ことが明らかになった。

2) AGP の代表的な variant である F1・S 及び A variant を分離、精製し OXY 及び DEOXY との結合解析を行った。その結果 OXY, DEOXY は AGP の A variant より F1・S variant に強く結合し、第2章で見られた立体選択性は、AGP の F1・S variant の立体選択性に起因することが判明した。

3) 血漿中でチロキシン (T4) は HSA などの T4 結合タンパク質と強く結合しているが、HSA 分子上の T4 光学異性体の結合に関する詳細は不明であった。そこでその結合特性を解明した結果、T4 エナンチオマーは HSA 上の同一部位に競合的に結合し、代表的な薬物結合サイトであるサイト I, サイト II の両方に結合することが明らかになった。

4) HPFA と濃縮カラムをオンライン連結し電気化学検出器を組み込んだ新規 HPFA システムを構築し、従来法では不可能であった、甲状腺機能の正確な診断に不可欠な血漿中チロキシン類の同時分析を試み、血漿中に微量に存在するチロキシン類の非結合型濃度を非 RI 検出法により同時定量することに成功した。

以上のように、木村智子氏は HPFA 法を高疎水性薬物の代謝に伴う結合性変化や高血漿タンパク結合性の内因性生理活性物質の結合研究に初めて適用し、多くの有用な知見を得た。本研究で確立した結合分析法は、他の高血漿タンパク結合性薬物や内因性生理活性物質の結合研究に適用可能であり、個体間差や病態時変動を念頭においたオーダーメイド医療に向けた詳細な血漿タンパク結合研究に有用である。

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。

さらに平成17年2月28日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。