

氏名（本籍）	<small>もりいわ ゆきこ</small> 守岩 友紀子（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 310 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	金属イオンと薬物間の錯体形成を検出するためのハイスループットスクリーニング法の開発
論文審査委員	（主査）教授 柳田 顕郎 教授 藤原 泰之 教授 土橋 朗

論文内容の要旨

日本薬局方医薬品の中には、金属イオンに親和性の高い多座配位子構造を有するものが多数ある。また、金属イオンとの錯体形成反応に伴い、薬物の吸収挙動や薬効の変化や、予期せぬ副作用や配合変化が生じた事例などの報告もある。しかしながら、金属イオンと薬物の膨大な組合せに対して、両者間の金属錯体形成の有無を網羅的に検出できる分析法はいまだに確立されていない。また、薬物の金属錯体形成は生理的 pH やイオン強度条件下での観測が望ましいが、既存の分光機器分析手法は測定条件の制約が大きく、生理的条件下での相互作用の報告事例は非常に少ない。

以上の背景から、本研究では、金属イオンと薬物間の錯体形成を網羅的かつ迅速に検出するためのハイスループットスクリーニング法の構築を検討した。具体的にはまず、二相溶媒系中での金属錯体形成に伴う薬物の分配挙動の変化を、高速向流クロマトグラフィー（HSCCC）で検出するシステムを検討した。次に、任意の金属イオンをキレートさせた固相抽出（SPE）媒体に生理的 pH 条件下で薬物を通液し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で検出するシステムを検討した。さらに、銅イオンと薬物の錯体形成を、イオン選択性電極（ISE）で選択的に検出できるシステムを検討した。

第一章 金属イオン含有二相溶媒系を用いる高速向流クロマトグラフィーによる薬物の金属錯体形成検出法の検討

HSCCC は二相溶媒系を用いる液-液分配クロマトグラフィーであり、金属イオンによる固定相の劣化を心配する必要がない。ベンゾジアゼピン系抗不安薬のプロマゼパム（BMP）に対して、*t*-butylmethylether-CH₃CN-H₂O（2:2:3, v/v/v）の二相溶媒系の上相（UP）を固定相とする逆相分配モードでの HSCCC を行った（Fig. 1-A）。その結果、疎水的な BMP は移動相が下相（LP）では溶出しなかった（1-B (a)）。一方、二相

溶媒系にあらかじめ任意の金属イオンを添加して HSCCC を行ったところ、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} の各イオン添加時に親水的な BMP-金属錯イオンが移動相中で形成されて素早く溶出した (1-B (d~g))。すなわち、BMP はこれらの金属イオンと選択的に錯体形成すると判定できた。同様な手法で、BMP 以外の 4 種類の薬物と 7 種類の金属イオン間の錯体形成のスクリーニングを実施し、これまで報告例のない金属錯体の事例を複数見出した。さらに、 Cu^{2+} 含有二相溶媒系を用いる HSCCC により (Cu^{2+} との選択的な錯形成に基づく) 血中 BMP 濃度の迅速定量法も開発した。

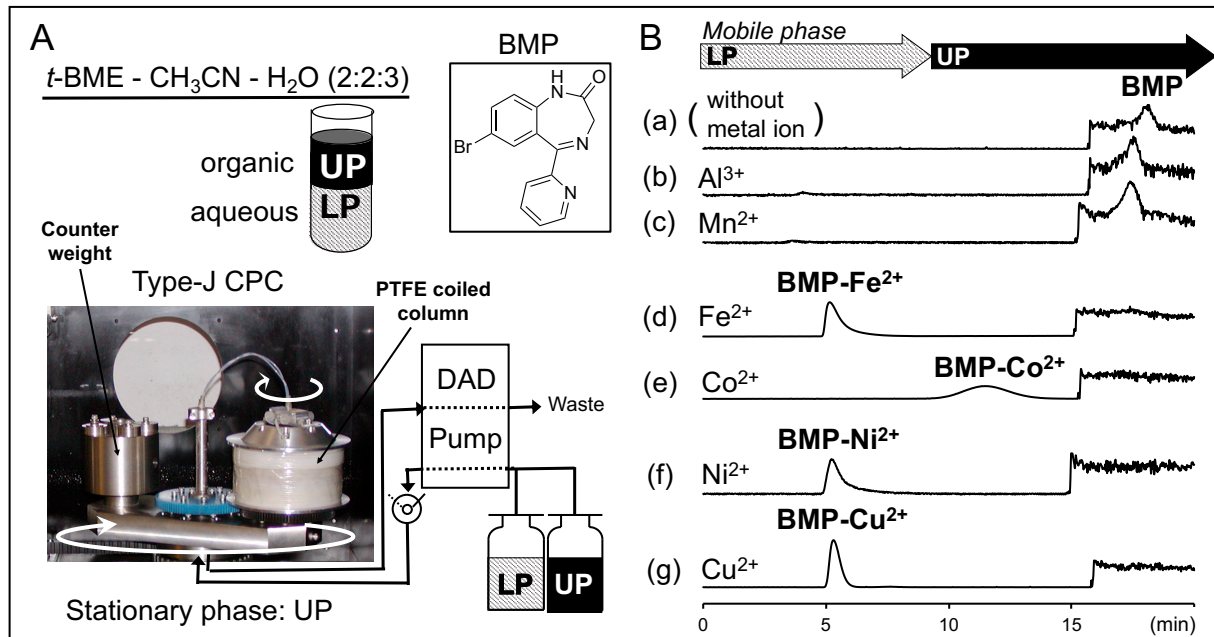


Fig. 1 **A:** The HSCCC apparatus and the two-phase solvent system of the present method. **B:** HSCCC chromatograms of bromazepam (BMP) in reverse-phase partition mode (stationary phase solvent: UP, mobile phase solvent: LP→UP) using the two-solvent system in the absence of a metal ion (a) and that containing Al^{3+} (b), Mn^{2+} (c), Fe^{2+} (d), Co^{2+} (e), Ni^{2+} (f), or Cu^{2+} (g).

第二章 固相抽出媒体を用いる薬物もしくは関連化合物の金属錯体形成検出のためのハイスループットスクリーニング法の検討

第一章の手法よりもスクリーニングの効率を飛躍的に向上させる目的で、SPE 媒体と HPLC 分析を組合せた手法を新たに検討した。任意の金属イオンをキレート保持させる SPE 媒体 (遠心用スピナカートリッジ) として、イミノ二酢酸基が修飾された MonoSpin ME とニトリロ三酢酸基が修飾された MonoSpin NTA を使用した。両カートリッジの金属キレート特性を把握した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いた擬似生理的条件下での金属イオンと薬物間の錯体形成検出手順を最適化した。具体的には、NTA カートリッジに任意の金属イオンをキレートさせた後、 CH_3CN 含有 PBS 溶液 (pH 7.4) で希釈した被験薬物溶液を通液した (Fig. 2-A)。次に、通液前後の溶液中薬物含量を HPLC 定量し (Fig. 2-B, 通液前: (a), 通液後: (b)~(m)), 各金属 (キレート

NTA カートリッジ) への吸着率 (%) を算出した (Fig. 2-C). 同図に示したように, BMP を被験薬物としてスクリーニングした結果, Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} に対する選択的な錯体形成が検出できた. 続けて, BMP 以外の 54 種類の薬物と 11 種類の金属イオン間の錯体形成の網羅的なスクリーニングを実施した. また, ME カートリッジを用いる生理的 pH 条件下 (1 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4) での実験系を構築し, 生体アミノ酸 (20 種類) 及びペプチド (5 種類) と 12 種類の金属イオン間のスクリーニングを行った. さらに, ME カートリッジでの 24 種類のポリフェノール化合物と 12 種類の金属イオン間のスクリーニングも試みた. 各手法の SPE 条件と結果の一部を Fig. 3 に示した.

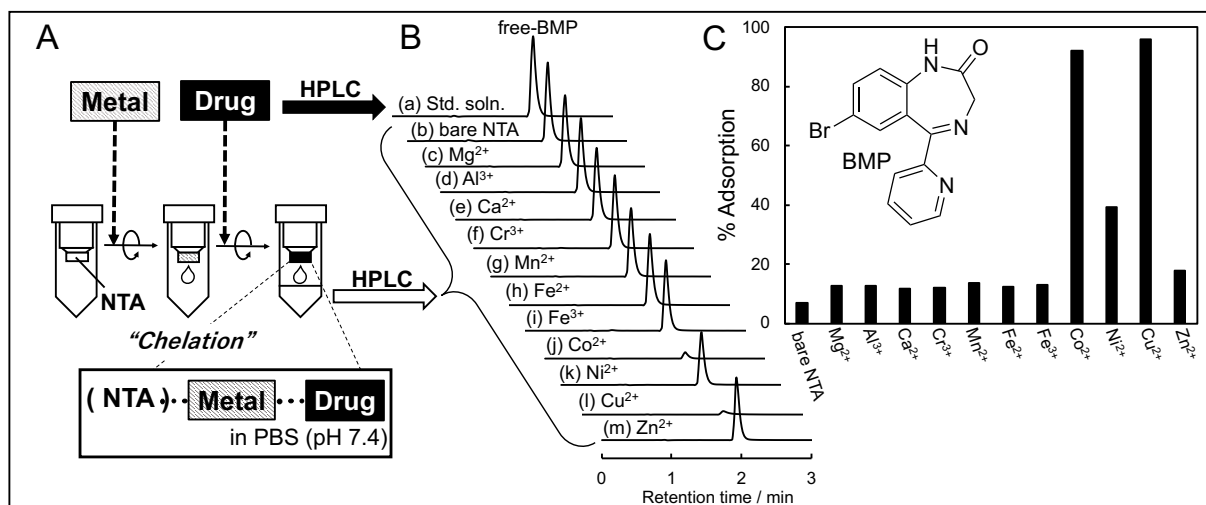


Fig. 2 **A:** Schematic showing a screening method for complex formation with a metal ion on a MonoSpin NTA cartridge. **B:** HPLC stacked chromatograms of BMP in eluates after passing a BMP test solution through a metal ion chelated NTA cartridge. **C:** Comparison of the adsorption capacity (%) of BMP to each of eleven different metal ions chelated onto the NTA cartridge.

SPE condition		Compound		Adsorption capacity (%)												
Cartridge	Solution*	Category	Name	no metal	Mg^{2+}	Al^{3+}	Ca^{2+}	Cr^{3+}	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{3+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Mo^{5+}
NTA	PBS (pH 7.4)	Drugs	BMP	7	13	13	12	12	14	12	13	92	39	96	18	
			LVX	13	12	18	11	15	11	36	50	42	94	90	38	
			LTG	13	20	20	20	42	20	21	21	35	22	32	21	
			⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
ME	1 mM HEPES (pH 7.4)	Amino acids & peptides	Trp	17	15	30	18	23	22	23	66	39	40	67	31	81
			Cys	16	12	14	17	11	7	23	32	12	10	64	12	9
			Tyr	8	7	7	6	7	7	11	19	9	13	37	12	28
			Tyr-Tyr-Tyr	5	21	73	23	23	59	69	99	95	98	93	89	98
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮		
ME	H_2O	Polyphenols	Catechin	6	0	1	4	3	1	7	70	2	1	4	4	0
			Quercetin	8	13	20	16	16	17	54	94	15	12	30	20	26
			Caffeic acid	3	11	30	15	29	20	53	83	17	18	33	26	24
			⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

*Each solution contains CH_3CN in arbitrary proportion.

Fig. 3 Comparison of the adsorption capacity (%) of various kinds of compounds to each of twelve different metal ions chelated onto a MonoSpin NTA or ME cartridge.

第三章 銅イオン選択性電極を用いる簡便迅速な銅-薬物錯体形成検出法の検討

第二章のスクリーニングの結果， Cu^{2+} と錯体形成する薬物が多数見出された．そこでさらに， Cu^{2+} との錯体形成のみを選択的かつ迅速に検出する新規なスクリーニング法について検討した．具体的には，生理的 pH 条件下（10 mM HEPES 緩衝液，pH 7.4）における（固定化されていない）遊離状態の Cu^{2+} と薬物間の錯体形成の有無について，銅イオン選択性電極を用いて（錯体形成に伴う遊離 Cu^{2+} 減少に基づく）電位変化量（電位減少率）を計測した．計測に際しては，市販の銅イオン選択性電極を活用して少量の試料液（500 μl ）の電位計測が可能な装置を自作し（Fig. 4），測定条件を最適化した．本装置により，44 種類の薬物に対する銅イオンとの錯体形成の有無のスクリーニングを実施した結果，19 種類において顕著な電位の減少（減少率 50 %以上）を確認できた（Fig. 5）．本法は極めて迅速かつ簡便な手法であり，薬物以外の生体成分にも適用できる．また，電極の種類を変更することで，他の金属イオン（ Ca^{2+} や Cd^{2+} など）との選択的な錯体形成の検出も可能と考えられる．

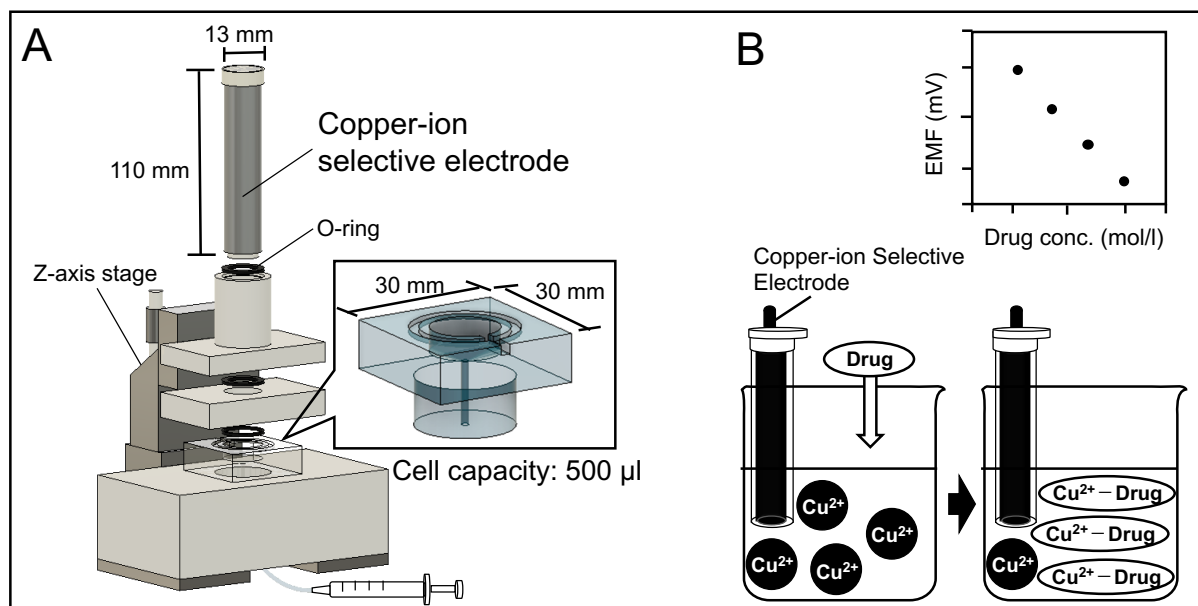


Fig.4 A: The ISE apparatus using a copper-ion selective electrode of the present method. B: Schematic showing a basic concept of the present method for selective detection of the complexation formation between Cu^{2+} and a test drug.

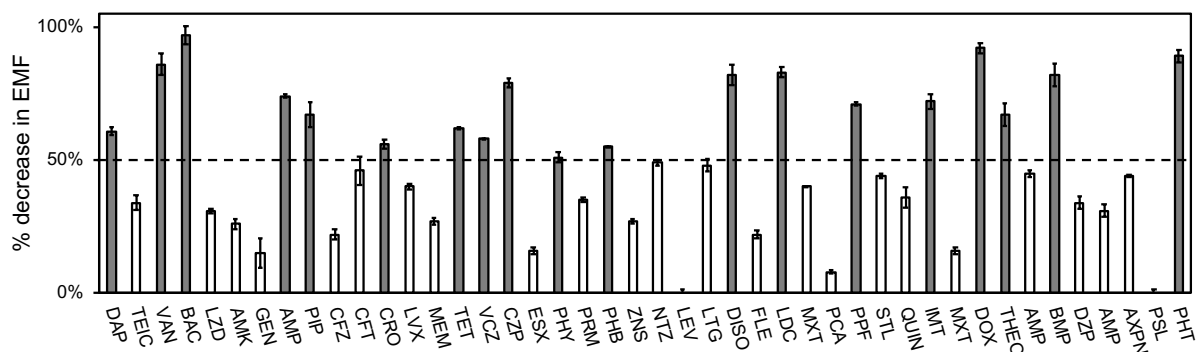


Fig. 5 Comparison of % decrease in EMF of 44 different drugs under the present ISE method.

総括

金属イオンと薬物間の錯体形成の有無を迅速に検出するためのスクリーニング法について、複数の新規手法を開発した。さらに、これらの手法を用いて、擬似生理的 pH 条件下における金属イオンと薬物（または生体成分）間の錯体形成に関する網羅的なスクリーニングを実施し、これまでに未報告の様々な錯体形成の組合せを発見した。構築した手法は金属錯体のさらなる研究促進ツールとして有用であり、発見した錯体形成の組合せは創薬・薬理・臨床薬学等の分野での有益な情報として価値が高い。

【研究成果の掲載誌】

Y. Moriiwa, *et al.*, *Anal. Sci.*, Accepted.

論文審査の結果の要旨

日本薬局方医薬品の中には、金属イオンに親和性の高い多座配位子構造を有するものが多数ある。また、金属イオンとの錯体形成反応に伴い、薬物の吸収挙動や薬効の変化や、予期せぬ副作用や配合変化が生じた事例などの報告もある。しかしながら、金属イオンと薬物の膨大な組合せに対して、両者間の金属錯体形成の有無を網羅的に検出できる分析法はいまだに確立されていない。また、薬物の金属錯体形成は生理的 pH やイオン強度条件下での観測が望ましいが、既存の分光機器分析手法は測定条件の制約が大きく、生理的条件下での相互作用の報告事例は非常に少ない。そこで申請者は、金属イオンと薬物間の錯体形成を網羅的かつ迅速に検出するためのハイスループットスクリーニング法の開発を試みた。学位論文は全三章で構成されており、第一章では、二相溶媒系中での金属錯体形成に伴う薬物の分配挙動の変化を高速向流クロマトグラフィー (HSCCC) で検出するシステム検討について、第二章では、任意の金属イオンをキレートさせた固相抽出 (SPE) 媒体に生理的 pH 条件下で薬物を通液し HPLC で検出するシステム検討について、第三章では、銅イオンと薬物の錯体形成をイオン選択性電極 (ISE) で選択的に検出するシステム検討について、それぞれ記述されており、各章での主な研究成果は以下のとおりである。

<第一章> ベンゾジアゼピン系抗不安薬のブロマゼパム (BMP) に対して、*t*-butylmethylether – CH₃CN – H₂O (2:2:3, v/v/v) の二相溶媒系の上相 (UP) を固定相とする逆相分配モードでの HSCCC を行った。その結果、疎水的な BMP は移動相が下相 (LP) では溶出しなかったが、一方で、あらかじめ二相溶媒系に任意の金属イオンを添加してから HSCCC を行ったところ、Fe²⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺の各イオン添加時に親水的な BMP-金属錯イオンが移動相中で形成されて素早く溶出した。すなわち、BMP はこれらの金属イオンと選択的に錯体形成すると判定できた。同様な手法で、BMP 以外の 4 種類の薬物と 7 種類の金属イオン間の錯体形成のスクリーニングを実施し、これまで報告例のない金属錯体の事例を複数見出した。さらに、Cu²⁺ 含有二相溶媒系を用いる HSCCC により (Cu²⁺ との選択的な錯形成に基づく) 血中 BMP 濃度の迅速定量法も開発した。

<第二章> 第一章よりもスクリーニング効率を飛躍的に向上させる目的で、SPE 媒体と HPLC 分析を組合せた手法を検討した。任意の金属イオンをキレート保持させる SPE 媒体 (遠心用スピンカートリッジ) として、イミノ二酢酸基が修飾された MonoSpin ME とニトリロ三酢酸基が修飾された MonoSpin NTA を使用した。両カートリッジの金属キレート特性を把握した後、NTA カートリッジを用いて、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いた擬似生理的条件下での金属イオンと薬物間の錯体形成検出手順を最適化した。BMP を被験薬物としてスクリーニングした結果、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺ に対する選択的な錯体形成が検出できた。また、BMP 以外の 54 種類の薬物と 11 種類の金属イオン間の錯体形成の網羅的なスクリーニングを実施した。次に、ME カートリッジを用いる生理的 pH 条件下 (1 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4) での実験系を構築し、生体アミノ酸 (20 種類) 及びペプチド (5 種類) と 12 種類の金属イオン間のスクリーニングを行った。また、ME カートリッジでの 24 種類のポリフェノール化合物と 12 種類の金属イオン間のスクリーニングも試みた。

＜第三章＞ 前章では Cu^{2+} と錯体形成する薬物が多数見出された。そこでさらに、 Cu^{2+} との錯体形成のみを選択的かつ迅速に検出する新規手法について検討した。具体的には、生理的 pH 条件下での遊離状態の Cu^{2+} と薬物間の錯体形成の有無について、銅イオン選択性電極を用いて（錯体形成に伴う遊離 Cu^{2+} 減少に基づく）電位変化量（電位減少率）を計測した。市販の銅イオン選択性電極を活用して少量の試料液（500 μl ）の電位計測が可能な装置を自作し、測定条件を最適化した。本装置により、44 種類の薬物に対する銅イオンとの錯体形成の有無のスクリーニングを実施した結果、19 種類において顕著な電位の減少（減少率 50 %以上）を確認できた

これらの結果のとおり、本研究論文においては、金属イオンと薬物間の錯体形成の有無を迅速に検出するためのスクリーニング法について複数の新規手法を開発し、各手法を用いて、擬似生理的 pH 条件下における金属イオンと薬物間の錯体形成に関する網羅的なスクリーニングを実施し、これまでに未報告の様々な錯体形成の組合せを発見した。また、本研究で構築した手法は金属錯体の研究促進ツールとして有用であり、発見した錯体形成の組合せは創薬・薬理・臨床薬学等の分野での有益な情報として価値が高いものである、と判断できる。さらに、学位論文発表会ならびに最終試験においても、上記内容に関する十分な口頭説明と質疑事項に対する正確な応答・解説がなされていた。

以上より、本学位論文は博士（薬学）に相応しい内容と成果を有するものであると評価できる。