

二面偏波式干渉計の血漿タンパク結合への適応

Application of Dual Polarization Interferometer to Plasma Protein-Drug Binding

大高 泰靖¹⁾・涌井 博充¹⁾・内藤 大介²⁾・杉本 幹治¹⁾・澁川 明正²⁾

Hiroyasu OHTAKA¹⁾, Hiromitsu WAKUI¹⁾, Daisuke NAITOU²⁾,
Kanji SUGIMOTO¹⁾ and Akimasa SHIBUKAWA²⁾

二面偏波式干渉計 (DPI) はセンサーチップ表面の状態を観測できる新しいフロー系分析装置で、センサーチップ表面に吸着 (固定化) した物質の密度・質量・厚さの絶対量を測定でき、優れた測定能力をもつが、十分な有用性が知られていない。医薬品開発では、本装置のようにフローセルを用い、連続的に多くの化合物を測定できる装置は、ハイスループットスクリーニングにおいて有効である。また、医薬品の薬理効果発現や体内動態を検討して安全で効果的な医療に結び付けるには、血漿タンパク質と薬物との結合定数が重要である。そのため、本研究では低分子の薬物とタンパク質との分子間相互作用 (結合等) に注目し、薬物の血漿タンパク結合に対するDPIの有効性を調査・検討した。その結果、結合の強さが異なる2種類の結合を得ることができ、それぞれの結合定数と血漿タンパク質1分子あたりの結合定数を得た。強い薬物結合の結合定数は文献値と同程度であり、DPIの有効性が示された。しかしながら、弱い薬物結合はタンパク質に対する非特異的な結合とみられ、非常に大きな結合個数が得られ、タンパク質を固定化したためと考えられる。これらの結果から、標的タンパク質に対して強い結合 ($>10^6 \text{ M}^{-1}$) を示す薬物の測定にはDPIは有効と考えられるが、比較的結合定数が低い血漿タンパク結合においては非特異的結合が多く観測され、適当でない測定方式と考えられる。

1. 序論

表面プラズモン共鳴測定 (SPR) は¹⁾、センサーチップ上に固定化した物質 (リガンド) に、相互作用があるか観測したい物質溶液 (アナライト) をセンサーチップに流すことで、リガンドとアナライトとの結合を観測できる装置である。抗原-抗体反応や酵素-基質反応などを観測できることから、医薬品開発でも用いられている。

連絡先: 大高泰靖 hohtaka@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

2) 千葉科学大学薬学部生命薬科学科

Department of Pharmaceutical and Life Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2018年10月1日受付, 2018年12月6日受理)

これに対して、二面偏波式干渉計 (DPI) は²⁻³⁾、SPRと同じくセンサーチップ表面の状態を観測できる新しいフロー系分析装置で、次の特徴をもつ。①電場・磁場の二種類の電磁波を用いることで、センサーチップ表面に吸着 (固定化) した物質の密度・質量・厚さの絶対量を測定できる (SPRでは相対量しかわからない)。②高分子 (タンパク質等) から低分子までの測定できる (SPRでも可)。③測定できる物質の厚み分解能が0.01nmである (SPRでは厚さの見積もりは不可)。このようにDPIは優れた測定能力をもつが、タンパク質⁴⁻⁹⁾、脂質分子集合体¹⁰⁻¹¹⁾、DNA¹²⁾ など、主に構造変化に関する報告しかされておらず、十分な有用性が知られていない。ウシ血清アルブミンと低分子化合物との相互作用に関する報告もあるが、詳細な検討がなされていない¹³⁾。

医薬品開発では、非常に多くの化合物の中から新薬候補薬物を見つけ出す必要がある。そのため、SPRやDPI

のようにフローセルを用い、連続的に多くの化合物を測定できる装置は、ハイスループットスクリーニングにおいて有効である。

多くの医薬品は、血液を経由して全身に広がり、薬理効果を発現する。医薬品はその過程で血液中の血漿タンパク質と可逆的に結合する。非結合型物質は血管壁を通して組織中の活性発現部位に到達し、活性発現に関与するが、結合型物質は組織に移行できない。また、非結合型物質のみが肝臓での代謝や腎臓での糸球体濾過を受け、体内動態に影響する¹⁴⁻¹⁵⁾。したがって、医薬品の薬理効果発現や体内動態を検討して安全で効果的な医療に結び付けるには、血漿タンパク質と薬物との結合定数が重要である。特に、血漿タンパク質の大部分を占めるヒト血清アルブミン (HSA) に対する結合定数が重要である。

本研究では、低分子の薬物とタンパク質との分子間相互作用 (結合等) に注目し、薬物の血漿タンパク結合に対するDPIの有効性を調査・検討した。

2. 二面偏波式干渉計の測定原理

DPIは、レーザー光源、偏光素子、センサーチップ、イメージセンサーからなる (図1)。センサーチップは図2のように、材質の異なる5層からなり、内2層 (図中のwaveguide層) が光路となる。この光路に対してレーザー光を照射し、センサーチップ内の光路を通過した2つの光は互いに干渉し、干渉縞が現れる。この干渉縞をイメージセンサーで観測する。

レーザー光がセンサーチップ内の光路を通過する際、光は全反射を繰り返すように設計されている。全反射が起こる際、表面プラズモン共鳴測定 (SPR) と同様に、非伝搬光であるエバネッセント光が生じる (図3)。エバネッセント光が観測される領域 (反射境界面から約300nmの領域) において媒体屈折率が変化すると、反射光の位相が変化する¹⁶⁾。本装置の場合、センサーチップ表面から約100nmまでの領域を観察する。

一方、測定溶液は、図1のようにセンサーチップ表面を流れる。例えば、タンパク質溶液を流すことにより、センサーチップ表面にタンパク質が吸着すると、エバネッセント光が観測される領域において媒体屈折率が変化する (図3)。その結果、センサーチップ表面の媒体屈折率変化 (環境変化) に応じて上段の光路を通過する光の位相が変化し、観測される干渉縞が移動する。つまり、その干渉縞の移動を追跡することで、位相差を求めることができる。また、光は磁場と電場の2種類の性質を持つ (図4)、DPIでは磁場に関する干渉縞の位相と電場に関する位相を別々に測定できる。電場に関する干渉縞も磁場に関する干渉縞もセンサーチップ上の環境変化 (薬物結合に伴うタンパク質分子の構造変化) に応じて

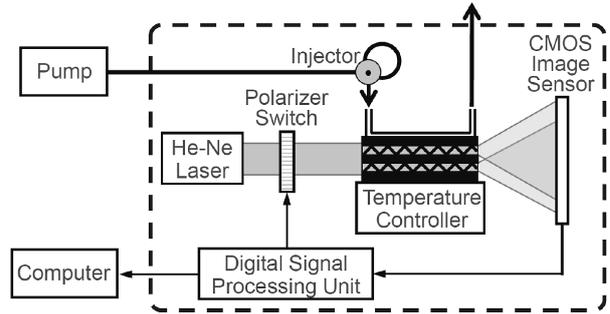


図1 DPI装置のシステム図

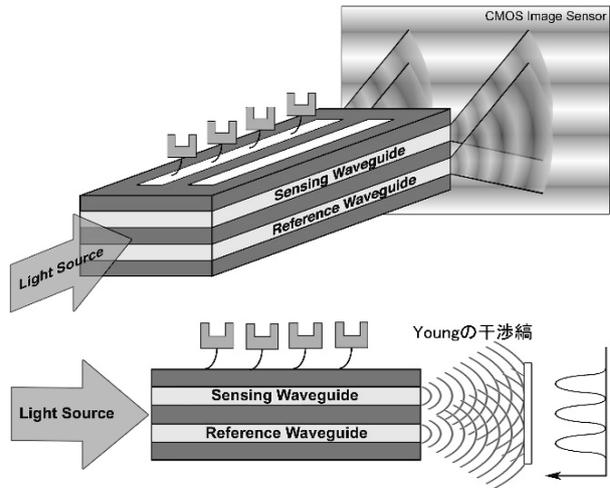


図2 センサーチップ模式図

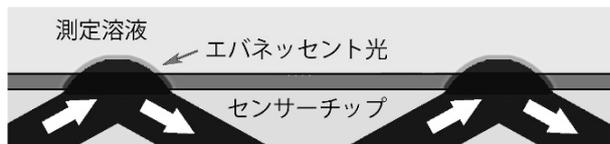


図3 センサーチップ表面に漏れ出すエバネッセント光

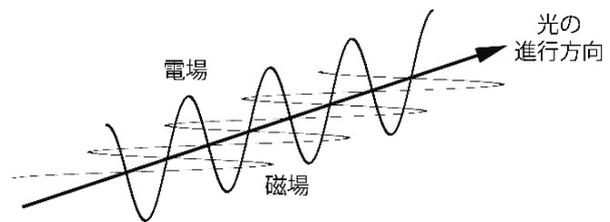


図4 光の性質

位相が変化する¹⁷⁾。DPIでは、両成分の干渉縞の位相変化を解析することにより、センサーチップ表面に吸着 (固定化) した物質の平均厚みと密度を求めることができる¹⁸⁾。

3. 機器・試薬と実験方法

【測定機器】

DPI 装置として、Farfield Sensors 製 AnaLight Bio 200 を用いた。

【試薬】

試料タンパク質として、ヒト血清アルブミン (HSA、Sigma-Aldrich、脂肪酸フリー、Lot#113K7601) を用いた。センサーチップとして、センサーチップの表面にアルキルアミノ基が修飾された FB80-amine (Farfield Sensors) を用いた (図 5a)。センサーチップとタンパク質を架橋する架橋剤として、BS³ (bis (sulfosuccinimidyl) suberate) (Pierce) を用いた (図 5b)。未反応の架橋剤を不活性化するためのブロック剤として、monoethanolamine (和光純薬工業、 $\geq 99\%$) を用いた。試料薬物として、(RS) -ibuprofen (東京化成工業、 $\geq 98\%$)、phenylbutazone (Alfa Aesar、99%) を用いた。緩衝液調製試薬として、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (和光純薬工業、特級)、水酸化ナトリウム (和光純薬工業、特級) を用いた。試料を調製する際に用いた精製水は、純水製造装置 (Millipore Milli-Q Gradient A10、Elix UV5) で作製した。

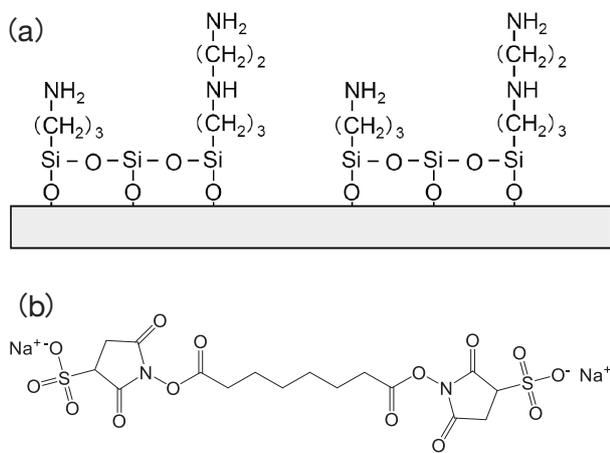


図5 センサーチップ (a) と架橋剤 (b) の構造

【センサーチップのキャリブレーション・測定操作】

センサーチップを装置本体に取り付けた後、測定溶媒として、65mM リン酸緩衝液 (pH7.4、イオン強度 0.17) を流速 50 μ L/min で流しながら (24.0 $^{\circ}$ C)、次の溶液①～⑦を流した (図 6)。溶液①～③はセンサーチップのキャリブレーションを実施するために流した。溶液④～⑥は、試料タンパク質をセンサーチップ上に固定化するために流した。ただし、試料タンパク質溶液は、Sample Channel のみに流した (図 7)。その後、濃度が異なる試料薬物溶液⑦を流した。

溶液①: 80.0w/w% エタノール (参照溶液)

溶液②: 精製水 (参照溶液)

溶液③: 測定溶媒 (測定溶媒の屈折率測定)

溶液④: 2 mg/mL BS³ 溶液 (架橋剤の導入)

溶液⑤: 1 mg/mL タンパク質溶液 (固定化)

溶液⑥: 1 mol/L monoethanolamine 溶液
(未反応の架橋剤のブロッキング)

溶液⑦: 試料薬物溶液 (0.2 ~ 1000 μ M、13 濃度)
(試料薬物の測定、薬物ごとに繰り返し)

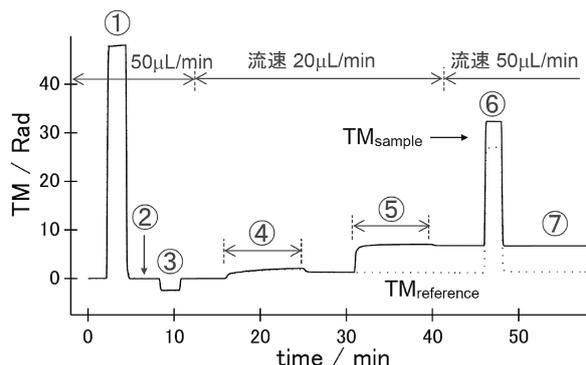


図6 センサーチップのキャリブレーション操作

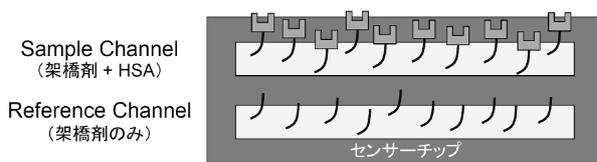


図7 本実験で使用したセンサーチップの状態

これらの溶液を流しながら、先に記載した測定原理に基づき、センサーチップのSample ChannelとReference Channelに光の電場成分と磁場成分を照射することで干渉縞を発生させ、干渉縞の位相を観測した。以降、Sample Channelの磁場に関する位相の値をTM_{sample}、電場に関する位相の値をTE_{sample}、Reference Channelの磁場に関する位相の値をTM_{reference}、電場に関する位相の値をTE_{reference}と略すことにする。

【測定条件】

全ての測定は、24.0 $^{\circ}$ Cの環境下で65mMリン酸緩衝液 (pH7.4、イオン強度0.17) を溶媒として用いて測定を行った。

【DPIデータ解析】

まず、80.0w/w%エタノール (溶液①) の屈折率 (1.3641, 24.0 $^{\circ}$ C) と蒸留水 (溶液②) の屈折率 (1.3326, 24.0 $^{\circ}$ C) を基準として、観測された位相の値 ϕ から式1を用いてセンサーチップ表面の屈折率 N を求めた。

$$N = N_0 + \frac{\lambda(\phi - \phi_0)}{2\pi L} \quad (1)$$

ここで、 N_0 は基準物質の屈折率（80w/w% エタノールないし蒸留水）、 ϕ_0 は参照溶液の位相の値、 λ は入射光の波長（633nm）、 L はセンサー部の長さ（15mm）である。

また、磁場成分を用いて観測された位相の値 ϕ_{TM} から、 ϕ_{TM} の値をみたく厚みと密度のデータセット（図 8 の実線）が Maxwell の関係式より得られる¹⁷⁾。そして、電場成分を用いて観測された位相の値 ϕ_{TE} から、同様に ϕ_{TE} の値をみたくデータセット（図 8 の破線）が得られる。図 8 の交点は ϕ_{TM} と ϕ_{TE} を同時にみたく値となり、その交点からセンサーチップ表面上の物質の厚みと密度を計算できる¹⁸⁾。

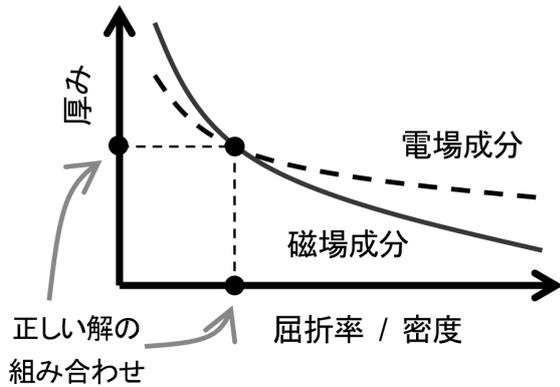


図8 厚みと密度の求め方¹⁷⁾

本実験では、Sample Channel の変化を観測することが目的であるため、Sample Channel のデータ (TM_{sample} 、 TE_{sample}) から Reference Channel のデータ ($TM_{reference}$ 、 $TE_{reference}$) をそれぞれ差し引いた値 (TM_{bind} 、 TE_{bind}) を用いてこれらの計算を行い、センサーチップ表面上の物質の厚みと密度を計算した。これらの計算は測定装置に付属する専用ソフトウェアを用いて実行した。



図9 タンパク質の被覆率を計算する際に用いる模式図

「被覆率(%)」=100×

$$\frac{(\text{式1から計算された屈折率}N) - (\text{溶媒の屈折率}(1.3343))}{(\text{タンパク質の屈折率}(1.465)) - (\text{溶媒の屈折率}(1.3343))} \quad (2)$$

次に、得られた厚み (m) と密度 (g/m^3) の積から、単位面積あたりの質量 M_a (g/m^2) を計算した。一般的なタンパク質の密度は $0.71g/cm^3$ で屈折率が 1.465 と得られていることから²⁾、式 2 を用いてセンサーチップ表面上の試料タンパク質の被覆率 (%) を計算した (図 9)。

【結合定数解析】

HSAと薬物が式3のように結合すると、結合定数 K_a と解離定数 K_d は式4で示される。



$$K_a = \frac{1}{K_d} = \frac{[\text{HSA} \cdot \text{Drug}]}{[\text{HSA}][\text{Drug}]} \quad (4)$$

このとき、HSA 1 分子あたりの薬物の結合個数を N とすると、式5が成立する。ここで、 N_{max} はHSA 1 分子あたりの薬物の最大結合個数である。

$$N = N_{max} \times \frac{[\text{Drug}]}{K_d + [\text{Drug}]} \quad (5)$$

また、2種類の結合定数をもつ場合には、

$$N = N_{max1} \times \frac{[\text{Drug}]}{K_{d1} + [\text{Drug}]} + N_{max2} \times \frac{[\text{Drug}]}{K_{d2} + [\text{Drug}]} \quad (6)$$

となる。ここで N_{max1} 、 N_{max2} は、それぞれ、タンパク質分子上の結合部位 1 ないし結合部位 2 に結合する最大薬物数である。

HSA 1 分子あたりの薬物の結合個数に関する測定結果に対して式5（一成分解析）、式6（二成分解析）の理論曲線を用いて、フィッティング解析を行うことで、結合定数 (K_d の逆数) および結合個数を得た。フィッティング解析は、MicroCal Originの非線形フィットプログラムを用いて実行した。

4. センサーチップ表面上のHSAの固定化状態

4. 1 HSAの被覆率

試料タンパク質としてHSAを用いた際のセンサーチップ上への固定化状況を検証した。最初に、HSAを固定化した直後の状態（図6の⑥直後の状態）を検証した。観測した4つの位相の値 (TM_{sample} 、 $TM_{reference}$ 、 TE_{sample} 、 $TE_{reference}$) を解析しHSAの厚みを求めたところ、平均厚みは2.4nmと得られた。このとき、Sample ChannelのデータからReference Channelのデータを差し引いているため、図10cに示すような、センサーチップに修飾されたアルキルアミノ基の厚み（約1nm）は含まれてい

ない。従って、その厚みを加えることで、試料タンパク質の実際の平均厚みは3.4nm (=2.4+1.0) となり、HSAの結晶構造 (PDB ID : 1BJ5)¹⁹ から得られる値 (2.5~4.5nm、図10bのように部位に依る) と一致する。また、センサーチップ表面のHSA被覆率は93%と計算された。これらのことから、HSAは図10aのように横たわって固定化されていると予測される。

次に、HSAを固定化したセンサーチップに試料薬物溶液 (0.2~1000 μ M) を繰り返し流した結果を図11に示す。試料薬物溶液を流しても、HSAの被覆率に大きな変化は見られず、HSAの脱離は見られなかった。しかしながら、観測された厚みは2.4nmから2.2nmにやや低下した。これはセンサーチップ上のHSAの配置が最

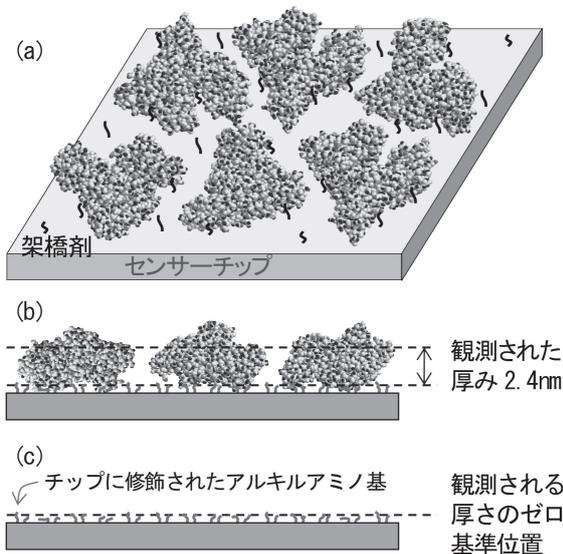


図10 推測されるセンサーチップ上のHSAの状態
(a) 俯瞰図、(b) 側面図、(c) HSAがない場合

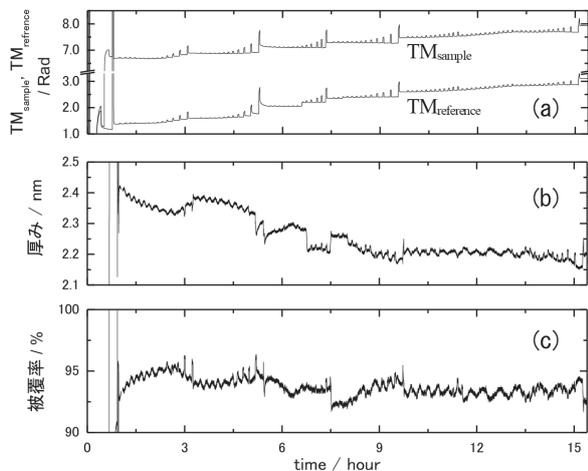


図11 磁場成分を用いて観測された位相の値
(a)、および解析から得られた厚み (b) とタンパク質 (HSA) の被覆率 (c)

適化され、よりセンサーチップ表面に近づいたと考えられる。

4. 2 HSA構造に及ぼすpHの影響

HSAは溶液のpH変化にともなってN-F転移などの構造転移を示す²⁰。そこで、流している測定溶媒のpHを7.4から4.0に変化させて (リン酸緩衝液の濃度は一定)、センサーチップに固定化したHSAの平均厚みを測定したところ、2.40nmから2.54nm (5.9%増加) に変化した。そして、pHを7.4に戻したところ、厚みが2.4nmに戻ったことから可逆的な変化が観測された。また、同時に観測された密度は0.66g/cm³から6.4%減少した。密度の減少量 (-6.4%) と厚みの増加量 (+5.9%) の絶対値がほぼ等しいことから、pHの変化に伴い、HSAのN-F転移を観測したと考えられる。これらのことから、DPIはHSA構造変化のモニターに適用できることが示唆された。

5. HSAに対する薬物結合解析

タンパク質は分子量が数万と非常に大きな分子である。一方、医薬品や化合物の平均的な分子量は数百であり、タンパク質に比べて極めて小さい。この小さな医薬品などの化合物がタンパク質に結合した際の僅かな変化をDPIが捉えることができるかについて検討した。

HSAを固定化したセンサーチップに非ステロイド

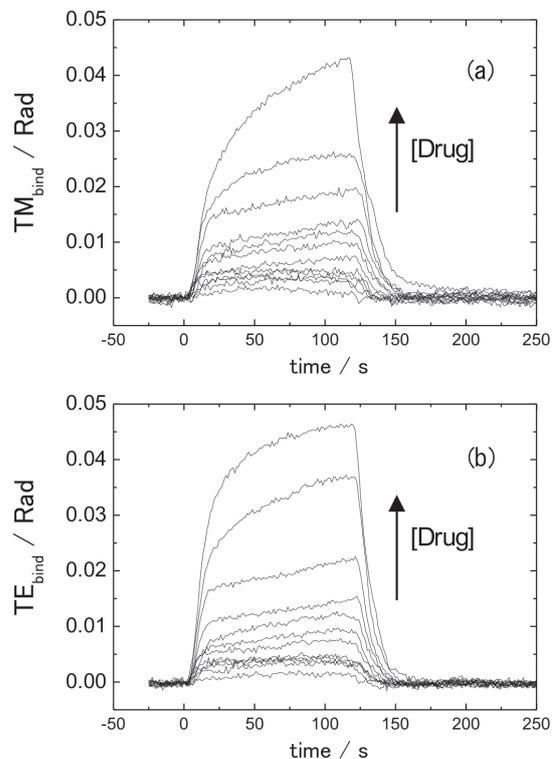


図12 TM_{bind} (a)、 TE_{bind} (b) のフェニルブタゾン濃度依存性 (0.2~1000 μ M)

性抗炎症薬の一つであるphenylbutazone溶液（0.2～1000 μM ）を流し、4つの位相の値（ $\text{TM}_{\text{sample}}$ 、 $\text{TM}_{\text{reference}}$ 、 $\text{TE}_{\text{sample}}$ 、 $\text{TE}_{\text{reference}}$ ）を測定し、 TM_{bind} 、 TE_{bind} を計算した（図12）。試料薬物溶液を流した際の TM_{bind} と TE_{bind} の時間変化を示した。その結果、phenylbutazone濃度が高くなるにつれ、 TM_{bind} と TE_{bind} のピークの大きさは大きくなった。

TM_{bind} と TE_{bind} の値を解析し、センサーチップ表面上の物質の厚みと密度を計算した。厚みの時間変化を図11bに示す。10分周期の揺らぎ（厚みの上下幅が0.01nm）が観測され、これは本機器が設置された部屋の空調による温度揺らぎ²¹⁾の影響である。本装置では、流速が低いためシリンジポンプを用いる。このシリンジポンプ内の測定溶液が室温変化により膨張・収縮を繰り返すため、厚みと密度に対して揺らぎを生じさせたと考えられる。ただし、密度の揺らぎは、厚みの揺らぎと逆相関となるため、両者の積から計算される単位面積あたりの質量 M_a には影響を与えず、室温による揺らぎは観測されない。

試料薬物溶液を流した際には、厚みは僅かに減少するが、測定ノイズ（上下幅が0.005nm）と区別が難しく、変化量の見積もりは困難であった。一方、密度は増加したため、試料薬物の結合によりHSAの構造変化が生じ、密な構造が出来たと考えられる。

厚みと密度の積からセンサーチップ単位表面積あたりの質量変化 M_a を得た（図13左軸）。ここで、HSAの結晶構造（PDB ID：1BJ5¹⁹⁾）を用いて計算された最も広い投影図（図14）の面積値（73.5nm²）を用いて、図13左軸の数値（ng mm⁻²）をHSA 1分子あたりの結合個数に換算した（図13右軸）。その結果、HSA 1分子あたりの結合個数変化を得ることができた。

phenylbutazone濃度に対するHSA 1分子あたりの結合個数を図15にプロットした。phenylbutazoneの結合個数は、濃度の増大と共に急激に増大することが示された。式5（一成分解析）、式6（二成分解析）を用いてフィッ

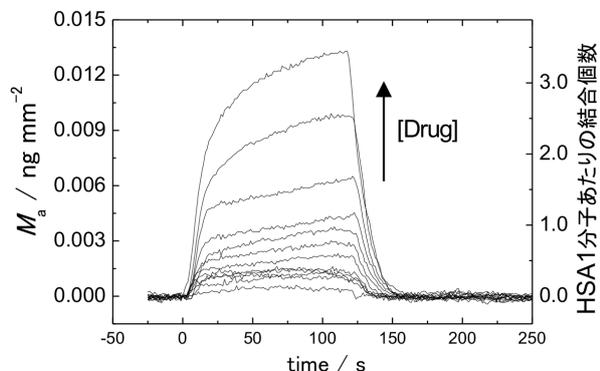


図13 フェニルブタゾン溶液の注入に伴う単位表面積あたりの質量変化(左軸)とHSA1分子あたりの結合個数の変化(右軸)

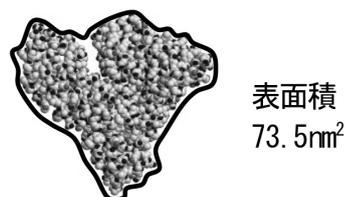


図14 HSA1分子あたり表面積

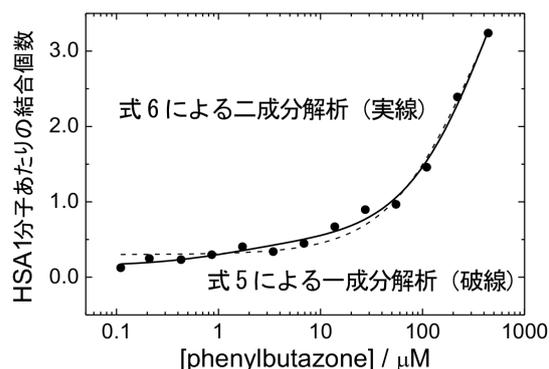


図15 HSA1分子あたり表面積

ティング解析を行ったところ、式5より式6の方がより良いフィッティングを示したことから、HSAに対するphenylbutazoneの結合は、結合力が異なる2種類の結合を有することが示された（表1）。強い結合についての結合定数は、 $7.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ となり、溶液状態のHSAとの結合定数（ $2.37 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、 20°C ²²⁾）と同程度の解析結果が得られた。本研究室で等温滴定型熱量計（ITC）を用いて測定した結合定数（ $3.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、 37.0°C ）とも近かった。

解析から得られたHSA 1分子あたりのphenylbutazoneの強い結合についての結合個数は0.33個であり、予測される結合個数1より小さい値が得られた。これは、HSAがセンサーチップ表面に吸着しているため、HSA分子の結合サイトのすべてが露出していないことが原因したものと考えられる（図10a）。

また、観測された弱い結合についての結合定数は $2.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、結合個数は6.0個と得られた。結合定数が低く、結合個数も非常に大きいことから、HSAに対する非特異的結合と考えられる。試料薬物として、別の非ステロイド性抗炎症薬であるibuprofenを用いた場合も同様に結合力が異なる2種類の結合を有することが示され、強い結合は文献値²³⁾、本研究室でITCにより測定した結果と同程度であった。ibuprofenについても非特異的結合を観測した（表1）。

表1 HSAに対する試料薬物の結合定数[†]

試料薬物		K_a / $10^5 M^{-1}$	N_{max}
phenylbutazone	強い結合	7.5	0.33
	弱い結合	0.020	6.0
ibuprofen	強い結合	5.2	0.30
	弱い結合	0.027	7.9

[†] 測定条件：溶媒65mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、24.0°C

6. DPIの血漿タンパク結合解析に対する有効性

DPIによるHSAとphenylbutazoneやibuprofen間の結合測定の結果から、DPIは低分子である薬物の結合を観測することができることが示された。センサーチップの感度は非常に高く、0.001ng/mm²の質量変化も観測することができる。さらに、DPIの特徴である結合した薬物の絶対量を見積もることもできた。得られた強い結合 ($10^5 M^{-1}$ 程度) は、他の測定装置で得られた結果とほぼ等しく、DPIの有効性が示された。

しかしながら、解析から得られた強い結合に関する結合個数は0.30~0.33個であり、予測される結合個数1より小さい値が得られた。これは、センサーチップ表面にタンパク質 (HSA) などを固定化すると、溶液中に存在するタンパク質に比べて、すべての結合サイトが露出せず、薬物の結合が制限されたものと考えられる (図10a)。

一方、いずれの測定においても、HSAに対する弱い結合が観測された。結合個数が6.0~7.9個と非常に大きいことから、特定の結合部位を持たない非特異的結合であると考えられる。それに対して、測定溶液を攪拌しながら測定するITCでは、DPIで観測した非特異的結合が観測されないことから、DPIはITCに比べて非特異的結合の測定に優れていると言える。タンパク質固定化カラムを用いるHPLCによる結合定数測定法でも、非特異的結合が大きく得られることから²⁴⁾、タンパク質などの測定対象物を固定化した影響と推測される。結合個数が非常に大きい値となった理由については、図16に示されるように、タンパク質とセンサーチップとの間の領域 (斜線部領域) では、試料薬物の運動・拡散が抑制され、見かけ上薬物が結合したように振る舞い、非特異的結合として観測されたものと考えられる。

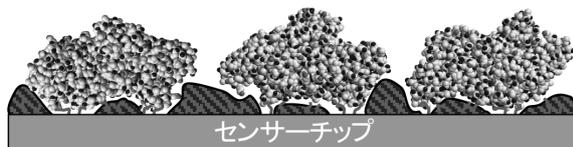


図16 タンパク質とセンサーチップとの間の薬物の運動・拡散が抑制された領域

したがって、DPIを用いてタンパク質-薬物の結合を観測する場合、薬物濃度を高くすると、非特異的結合が顕在化するため、比較的低い濃度でも測定ができる強い結合を示す観測対象が適切と考えられる。結合定数の大きさとしては、 $10^6 M^{-1}$ より強い方がよいと推定される。本研究で用いた試料タンパク質は血漿タンパク質の1つであるHSAであり、医薬品などの薬物は、標的タンパク質でないHSAに対してあまり強く結合しない (強くても $10^6 M^{-1}$ 程度)。そのため、DPIはHSAの測定には適さないと考えられる。しかし、標的タンパク質に対する結合は、HSAより強く結合することから、SPRと同様、DPIは有効な測定法と考えられる。

7. まとめ

DPI測定から、センサーチップ表面に吸着したHSA分子の平均厚みと密度変化を観測し、それらのデータからセンサーチップ上のHSA分子の固定化状態を評価できた。また、pHを変化させることで厚みの変化が観測され、HSAのpH変化に伴うN-F転移が観測できた。これらの結果から、DPIはタンパク質などの構造 (厚みや密度)、吸着 (固定化) 状態を測定するのに適する装置であると言える。

次に、固定化したHSAに試料薬物溶液を流すことで、それらのHSAに対するそれらの結合定数を得た。強い結合は文献値と同程度の結果が得られた。そして、弱い結合は、タンパク質 (HSA) に対する薬物の非特異的結合であると考えられ、その結合個数を評価できた。

これらの研究を通して、DPIはタンパク質と低分子の薬物との結合を観測できることが示された。本研究の成果は、連続的に多くの化合物を測定できるハイスループットスクリーニングに優れたDPIが医薬品開発に有用な結合分析法として利用できることを示すものである。

参考文献・補足資料

- 1) Owen V. (1997) *Biosens. Bioelectron.*, 12, i-ii.
- 2) Cross GH, Reeves A, Brand S, Swann MJ, Peel LL, Freeman NJ, and Lu JR. (2004) *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 37, 74-80.
- 3) Daghestani HN, and Day BW. (2010) *Sensors*, 10, 9630-46.
- 4) Swann MJ, Peel LL, Carrington S, and Freeman NJ. (2004) *Anal. Biochem.*, 329, 190-198.
- 5) Lin S, Lee CK, Wang YM, Huang LS, Lin YH, Lee SY, Sheu BC, and Hsu SM. (2006) *Biosens. Bioelectron.*, 22, 323-7.
- 6) Biehle SJ, Carrozzella J, Shukla R, Popplewell J, Swann M, Freeman N, and Clark JF. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, 1689, 244-51.
- 7) Thompsett AR, and Brown DR. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, 1774, 920-7.
- 8) Sonesson AW, Callisen TH, Brismar H, and Elofsson UM. (2007) *Colloids Surf. B : Biointerfaces*, 54, 236-40.
- 9) Sonesson AW, Callisen TH, Brismar H, and Elofsson, UM. (2008) *Colloids Surf. B : Biointerfaces*, 61, 208-15.
- 10) Terry CJ, Popplewell JF, Swann MJ, Freeman NJ, and Fernig DG. (2006) *Biosens. Bioelectron.*, 22, 627-32.
- 11) Lee TH, Hall KN, Swann MJ, Popplewell JF, Unabia S, Park Y, Hahm KS, and Aguilar MI. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, 1798, 544-57.
- 12) Wang J, Coffey PD, Swann MJ, Yang F, Lu JR, and Yang X. (2010) *Anal. Chem.*, 82, 5455-62.
- 13) Zwang TJ, Patel R, Johal MS, and Selassie CR. (2012) *Langmuir*, 28, 9616-20.
- 14) Hardy J, and Hardy KG. (1998) *Science*, 282, 1075-9.
- 15) Price DL, Sisodia SS, and Borchelt DR. (1998) *Science*, 282, 1079-83.
- 16) Hutchinson AM. (1995) *Mol. Biotechnol.*, 3, 47-54.
- 17) Tien PK. (1971) *Appl. Optics.*, 10, 2395-413.
- 18) Swann M, Freeman N, Carrington S, Roman G. and Barret P. (2003) *Lett. Pept. Sci.*, 10, 487-94.
- 19) Curry S, Mandelkow H, Brick P, and Franks N. (1998) *Nat. Struct. Biol.*, 9, 827-35.
- 20) Su TJ, Lu JR, Thomas RK, Cui ZF, and Penfold J. (1998) *J. Phys. Chem. B*, 102, 8100-8.
- 21) 日本で一般的に利用される個別空調方式（部屋ごとに温度調整ができる空調方式）では、約10分周期で冷媒の圧縮機が動作するため、冷媒の圧縮率が周期的に変動し、それに応じて冷却効率も変動する。そのため、空調機から送風される風の温度が周期的に3~4°C上下する。一方、欧米で利用されるセントラル空調方式では、熱源から部屋までの距離が遠く、部屋に送風されるまでに温度が均一化されるため、室温の変化が生じにくい。
- 22) Rosen A. (1970) *Biochem. Pharmacol.*, 19, 2075-81.
- 23) Whitlam JB, Crooks MJ, Brown KF, and Pedersen PV. (1979) *Biochem. Pharmacol.*, 28, 675-8.
- 24) Zhivkova Z, and Russeva V. (1998) *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 707, 143-9.