

高性能先端分析法 (High-performance Frontal Analysis) を用いた 薬物-血漿タンパク結合解析における試料中血漿タンパク濃度の影響

Effect of plasma protein concentration in sample solutions on drug-plasma protein binding analysis by using High-performance Frontal Analysis.

杉本 幹治¹⁾・小野 允寛¹⁾・櫻井 将洋¹⁾

宮内 勇弥¹⁾・大高 泰靖¹⁾・澁川 明正²⁾

Kanji SUGIMOTO, Yoshihiro ONO, Masahiro SAKURAI

Yuuya MIYAUCHI, Hiroyasu OHTAKA and Akimasa SHIBUKAWA

高性能先端分析 (High-performance Frontal Analysis, HPFA) 法は HPLC システムを利用する薬物 - 血漿タンパク結合分析法であり、オンラインで簡便、高感度な結合分析が可能となる。これまでの検討では、血中モデルタンパク質としてヒト血清アルブミン (HSA) を採用し、本法にて様々な薬物との解析を試みてきた。HSA は分子量約 66500 の主要な血漿タンパク質であり、通常 35~50 g/L \approx 500~750 μ M の濃度で血漿中に存在しているが、モデル試料においては HPFA 解析モデルの立証と再現性のみに注視し、100 μ M の濃度で固定して測定を行ってきた。そこで本研究では、試料中 HSA 総濃度を変更したときに、薬物-血漿タンパク結合解析から得られる結合定数に変化が見られるかを検討した。オンライン HPFA システムを構築し、HPFA 分離カラムに Develosil 100Diol-5 (6.0 mmI.D. \times 150mm, Nomura Chemical Co., Ltd.)、薬物定量カラムに 5C18-MS-II (2.0 mmI.D. \times 150 mm, nacalai tesque, Inc.) を使用、モデル薬物には phenylbutazone (PB) を採用し、100、50、10 μ M の HSA 総濃度に対し複数の PB 濃度で混合した試料を作成して、カラム温度 37 $^{\circ}$ C の条件で測定した。得られた非結合型薬物濃度から Langmuir 型のプロットより回帰計算 (Kaleida GraphTM ver.4.5, Synergy Software) を行い、結合定数を算出した。HSA 総濃度を変化させても Langmuir 型プロットは同一のものとなり、算出した結合定数、及び結合サイト数も同一の値となった。本検討結果より、HPFA 解析において HSA 濃度を変化させても影響はなく、薬物-血漿タンパク結合における評価の妥当性があることが示された。

1. 序論

血液中に投与された薬物は、一般にアルブミンや α_1 -酸

性糖タンパク質 (AGP) などの血漿タンパク質などと可逆的に結合平衡を保っており、その中で非結合型薬物は血管壁を透過して組織に移行するが、結合型薬物は移行しないという特徴がある。従って、薬物-血漿タンパク結合は薬理効果や副作用の発現に大きく影響する。また一方、結合型薬物は肝臓での代謝や腎臓での糸球体濾過を受けにくく、血管外に移行した薬物の補充をする貯蔵型薬物としての役割があるなど、薬物の体内動態にも影響を与える。以上のように、非結合型薬物濃度の定量は、薬物の薬理効果や体内動態などの研究において重要になっている¹⁾²⁾。

連絡先：杉本 幹治 ksugimoto@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学薬学部薬学科

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

(2020年9月24日受付, 2021年1月7日受理)

高性能先端分析法 (High-performance Frontal Analysis、

HPFA 法)とは、高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) システムを利用する薬物-血漿タンパク結合分析法である。HPFA 法では、サイズ排除と逆相保持の2つの性質を持つ、血漿試料直接注入分析用 HPLC カラムを使用している。これにより、従来非結合型薬物の定量に用いられている限外濾過法や平衡透析法などと比較して、

- 1) 膜を使用しないため、膜への吸着や漏れを回避できる。
- 2) 試料を直接注入するため HPLC と連動でき、操作が簡便である。
- 3) 濃縮ステップの組み込みが可能なることから強いタンパク結合試料を高感度に分析することもできる。

といった特徴があり、オンラインで簡便、高感度な結合分析が可能となる³⁻⁹⁾。

HPFA 法を用いたこれまでの検討では、血中モデルタンパク質として、ヒト血清アルブミン (HSA) を採用し、様々な薬物との解析を試みてきた。HSA は分子量約 66500 の主要な血漿タンパク質であり、通常 35~50 g/L \approx 500~750 μ M の濃度で血漿中に存在しているが¹⁰⁾、これまで検討に用いたモデル試料においては HPFA 解析モデルの立証と再現性のみに注視し、HSA 濃度を 100 μ M で固定して測定を行ってきた。そこで本研究では、試料中 HSA 総濃度を変更したときに、薬物-血漿タンパク結合解析から得られる結合定数に変化が見られるかを検討した。

2. 機器・試薬

【機器】

フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 SPD-M20A

・・・島津製作所社製

HPLC コントローラー SCL-10A VP

・・・島津製作所社製

ポンプ LC-20AD

・・・島津製作所社製

カラムオープン CTO-20AC

・・・島津製作所社製

分析カラム 5C18-MS-II (2.0 mmI.D.×150 mm)

・・・ナカライテクス社製

HPFA カラム Develosil 100Diol-5 (6.0 mmI.D.×150 mm)

・・・野村化学株式会社製

濃縮カラム ODS (4.0 mmI.D.×10.0 mm)

・・・自製

グラフ&回帰計算ソフト Kaleida Graph™ ver.4.5

・・・Synergy Software 社製

これら HPFA 分離カラム、濃縮カラム、定量分析カラムを2つのスイッチングバルブで接続した図1のようなオンラインシステムを構築し、測定に用いた。

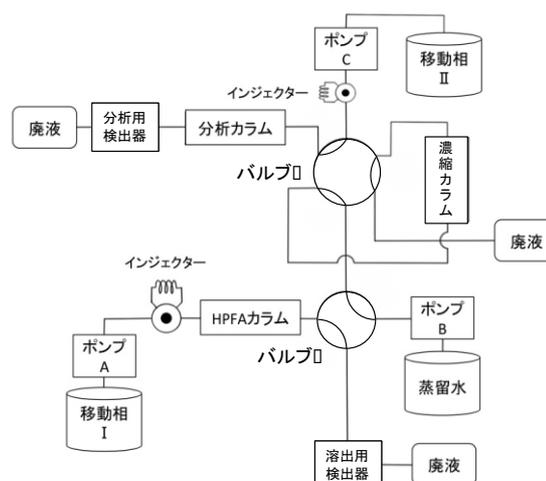


図1 オンライン HPFA システム

【試薬】

超純水

・・・Millipore 社製 Direct-Q® 3UV で作製
リン酸水素ナトリウム

・・・和光純薬工業株式会社製
リン酸二水素ナトリウム 二水和物

・・・和光純薬工業株式会社製
メタノール (MeOH) LC/MS 用

・・・関東化学株式会社製

酢酸 LC/MS 用

・・・和光純薬工業株式会社製

Albumin human, ~99 %, fatty acid free (~0.005 %) , essentially globulin free

・・・SIGMA-ALDRICH 社製

Phenylbutazone 99 %

・・・Alfa Aesar 社製

【測定試料の調製】

・HPFA カラム分離系統用の移動相：67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, I=0.17) 1 L の作製

…リン酸水素ナトリウム 2.15 g、リン酸二水素ナトリウム 7.39 g を天秤で秤量し超純水に溶かし、1 L に調製した後、必要に応じて塩酸または NaOH で pH 調整を行い作製した。

・100、50、10 μ M ヒト血清アルブミン (HSA) 20 mL の作製

…HSA 0.1342 g、0.0671 g、0.0336 g をリン酸緩衝液で溶かし、20 mL に調製した後、メンブレンフィルター (孔径 0.45 μ m) で濾過して作製した。

・Phenylbutazone (PB) 溶液の作製

…PB は MeOH を溶媒として作製し、使用時は窒素ガスを用いて溶媒を乾燥させ、新たにリン酸緩衝液や HSA 溶液

を加えたものを母液として希釈を行うことで様々な濃度になるように調製した。

3. HPFA 法の測定原理

HPFA 法では、サイズ排除と逆相保持の 2 つの性質を持つ HPLC 用カラムを使用している。具体的には、血漿タンパク質のような巨大分子はサイズ排除するが、薬物のようにサイズの小さい分子は充填剤の細孔内で分配保持されるカラムを用いている。血漿試料直接注入分析用 HPLC カラムは通常、薬物-タンパク質混合試料を注入すると試料が希釈され結合平衡がずれるため (図 2 の (1))、結合型薬物がすべてのタンパク質から解離し非結合型薬物と一緒に溶出する。その結果、サイズ排除されたタンパク質のピークが出現した後、すべての薬物が 1 本のピークとして出現し、そのピーク面積から薬物総濃度を求めることができる。しかし、タンパク結合を乱さないようなマイルドな移動相 (pH 7.4 のリン酸緩衝液 (PBS)) を使用し、試料を連続的に注入すると、タンパク質からの結合型薬物の解離が抑えられ、その結果、カラムの先端付近では薬物-タンパク結合平衡とクロマトグラフィックな分配平衡が同時に成立したゾーン (図 2 の (3) *印) が生じる。つまり、充填剤細孔内部では非結合型薬物の固定相-移動相間の分配平衡が達成しており、細孔外部 (充填剤粒子間) の移動相中では注入前の試料溶液と同じ薬物-タンパク結合平衡が再現されている。注入終了後、このゾーンの非結合型薬物が帯状となって溶出し台形状のプラトーピークとして観測される。このプラトー部分の薬物濃度は*ゾーンの細孔内部の移動相中の薬物濃度と細孔外部の移動相中の非結合型薬物濃度と等しくなる。従って、試料溶液中の非結合型薬物濃度と等しい。つまり、プラトーゾーンの薬物濃度を測定する事により、非結合型薬物濃度の測定が可能となる。これが本法の測定原理である。

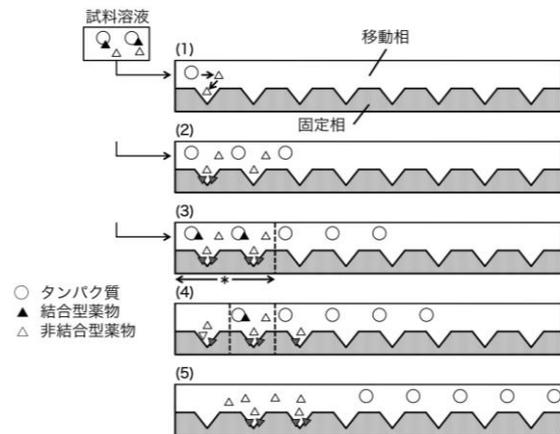


図 2 HPFA 法の原理

プラトーピークに入ると、スイッチングバルブ I を切り替えて、非結合型薬物を濃縮カラムに切り出す (ハートカット、図 3)。ハートカット終了後、スイッチングバルブ II を切り替えて、薬物を濃縮カラムから分析用の溶媒で脱離し、分析ラインで定量を行う。得られた定量値より、ハートカット領域における薬物の mol 数を算出し、これをハートカットした容積 (L) で除することで、非結合型薬物濃度 C_u 値 (M) を得ることができる。

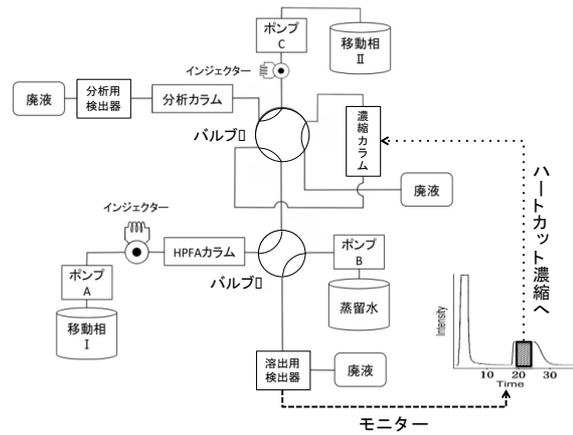


図 3 ハートカットによる濃縮

4. 理論式と結合定数の算出法

4.1 薬物-血漿タンパク結合理論

タンパク分子上に存在する結合サイトは互いに独立しており、サイト相互間の干渉はないものとした。薬物の結合していない結合サイトの濃度を P 、非結合型薬物濃度を C_u 、結合型薬物濃度を C_b 、結合平衡定数を K とするとき、平衡式、

$$P + C_u \rightleftharpoons C_b$$

より

$$K = \frac{C_b}{P \cdot C_u} \quad \dots (1)$$

が成立する。また、総タンパク濃度を P_t 、タンパク 1 分子あたりのサイト数を n 、これら n 個の薬物結合サイトはいずれも同一の親和性を持つものとするとき、全結合サイト濃度は nP_t となるため、

$$P + C_b = nP_t \quad \dots (2)$$

が成立する。ここで、タンパク 1 分子あたりの結合薬物数を r とすると、

$$r = \frac{C_b}{P_t} \quad \dots (3)$$

であり、(3)式に(1)(2)式を代入して、 r について解くと、

$$r = \frac{nKC_u}{1 + KC_u} \quad \dots (4)$$

が得られる。

薬物と HSA の結合様式については、互いに独立したプライマリーサイトとセカンダリーサイトの2つの結合反応を考慮した。これら2つの結合から得られるそれぞれの結合薬物数 r_1 、 r_2 とすると、総結合薬物数 r はその和の形として、

$$r = r_1 + r_2 = \frac{n_1 K_1 C_u}{1 + K_1 C_u} + \frac{n_2 K_2 C_u}{1 + K_2 C_u} \dots (5)$$

K_1 : プライマリーサイトの結合定数

n_1 : プライマリーサイトのサイト数

K_2 : セカンダリーサイトの結合定数

n_2 : セカンダリーサイトのサイト数

で表される。

なお、一般的にセカンダリーサイトへの結合は弱いため、薬物の臨床血中濃度範囲では、主要な結合部位はプライマリーサイトであり、セカンダリーサイトへの結合の寄与は小さいことが多い。しかしながら、セカンダリーサイトの存在も考慮したモデルで解析する方がプライマリーサイトの結合パラメーターをより正確に算出できるので、本研究では、上記の結合モデルを採用した。

4.2 結合定数の算出法

HPFA 法により C_u 値を算出することで、総薬物濃度と P から r 値が求められる。ここで(4)の関係式について、 C_u と r でプロットを作成すると、Langmuir 型のプロットが得られる。実際には(5)の関係式にあるように、2つの Langmuir 型のプロットの和の形となる。得られたプロットに対し回帰計算ソフト (Kaleida Graph™ ver.4.5, Synergy Software) を用い、(5)式を適用して回帰計算を行うことで結合定数を算出した ($n_1=1$ で回帰)。

5. 実験方法

5.1 実験方法

試料

HSA-PB 混合試料 : HSA 100、50、10 μ M + PB 1~800 μ M
リン酸緩衝液 (pH 7.4, I=0.17)

測定条件及び手順

作製した混合試料は注入前に 37°C でインキュベートして条件を揃えた。その後 HPFA システムに注入し、分離、分析を行った。分離、分析条件は以下のように設定した。

<HPFA 用分析条件>

カラム : Develosil 100Diol-5 (6.0 mmI.D. × 150 mm)

移動相 : PBS (pH 7.4)、カラム温度 : 37°C、流速 : 0.8 mL/min、

注入量 : 1~3 mL

<定量用分析条件>

カラム : 5C18-MS-II (2.0 mmI.D. × 150 mm)

移動相 : MeOH : H₂O : 酢酸 = 70 : 29 : 1、カラム温度 : 37°C、
流速 : 0.2 mL/min

<検出条件>

装置 : PDA 検出器

波長 : 237 nm

今回、HPFA カラムとしてジオールシリカカラムを使用した。ジオールシリカカラムはシリカゲル担体の表面(細孔内部の内表面や充填剤外表面)に多数のプロピルジオール基 (-CH₂-CH(OH)-CH₂OH) を導入した HPLC 用充填剤であり、充填剤の細孔によるサイズ排除効果とともに、プロピルジオール基のプロピル部分の疎水性に基づく逆相保持効果を示す。血漿タンパク質は細孔に侵入することなくサイズ排除されるが、小分子である薬物は細孔内外のプロピルジオール基に保持される。

HPFA 分析では試料タンパク質を変性させないようにマイルドな移動相 (PBS) を使用する必要があるため、充填剤の疎水性が強すぎると保持力が強くなって薬物がカラムから溶離せず、分析できなくなる恐れがある。今回モデル薬物として使用した PB は疎水性が強く、ODS 充填剤を用いて分析する場合には、移動相に MeOH のような有機溶媒を添加しないとカラムから溶出しない(定量用分析条件参照)。ところが、ジオールシリカカラムの逆相保持力は ODS 充填剤よりも弱いので、有機溶媒を添加しないマイルドな移動相でも薬物がカラムから溶出されて分析が可能になる (HPFA 用分析条件参照)。このように、逆相保持が強すぎないことがジオールシリカカラムを HPFA 用カラムとして使用する上での利点である。

HPFA 法では非結合型薬物が帯状となって溶出し台形状のプラトーピークとして観測されることが重要である。そこで、まず、プラトーピークが複数点の薬物濃度で観測されることを確認した。プラトーピーク確認のために作製した混合試料の HSA 濃度と薬物濃度の組み合わせを表 1 に示す。

表 1 プラトー確認に用いた混合試料濃度

HSA	PB			
100	10	200	400	800
50	5	100	200	400
10	1	20	40	80

(単位 : μ M)

次に、プラトーの収束点は流速に依存するため、10 分程度で収束するよう流速を調整し、0.8 mL/min で固定した。さらに、プラトーピークの幅は試料注入量に依存するが、数回のチャート形状確認を行い、2 mL の試料注入で濃縮に十分なプラトー幅が取れることを確認した。

プラトーピークが観測された条件において、非結合薬物濃度の定量を行った。ここで観測されたプラトーピークからは非結合型薬物溶液のハートカット濃縮を行うが、非結合型薬物が高濃度で溶出する場合、濃縮し過ぎるとピーク面積値が定量に用いる検量線の適用範囲から外れる恐れがあるので、濃縮容積は固定せず測定値に応じて適宜変更して対応した（0.04~0.80 mL）。非結合型薬物定量のために作製した混合試料の HSA 濃度と薬物濃度の組み合わせを表 2 に示す。測定は各濃度で 3 回ずつ行い、その平均値を用いた。

表 2 非結合型薬物定量に用いた混合試料濃度

HSA	PB					
100	50	100	200	400	500	800
50	25	50	100	200	250	400
10	5	10	20	40	50	80

（単位： μM ）

5.2 結果及び考察

HSA100、50、10 μM における HPFA 分離チャートの概形を図 4 に示す。いずれの HSA 濃度においても、非結合型薬物のプラトーピークが観測された。また、HSA 濃度を低くしても、プラトーピーク高が PB 濃度依存的に変化して現れた。

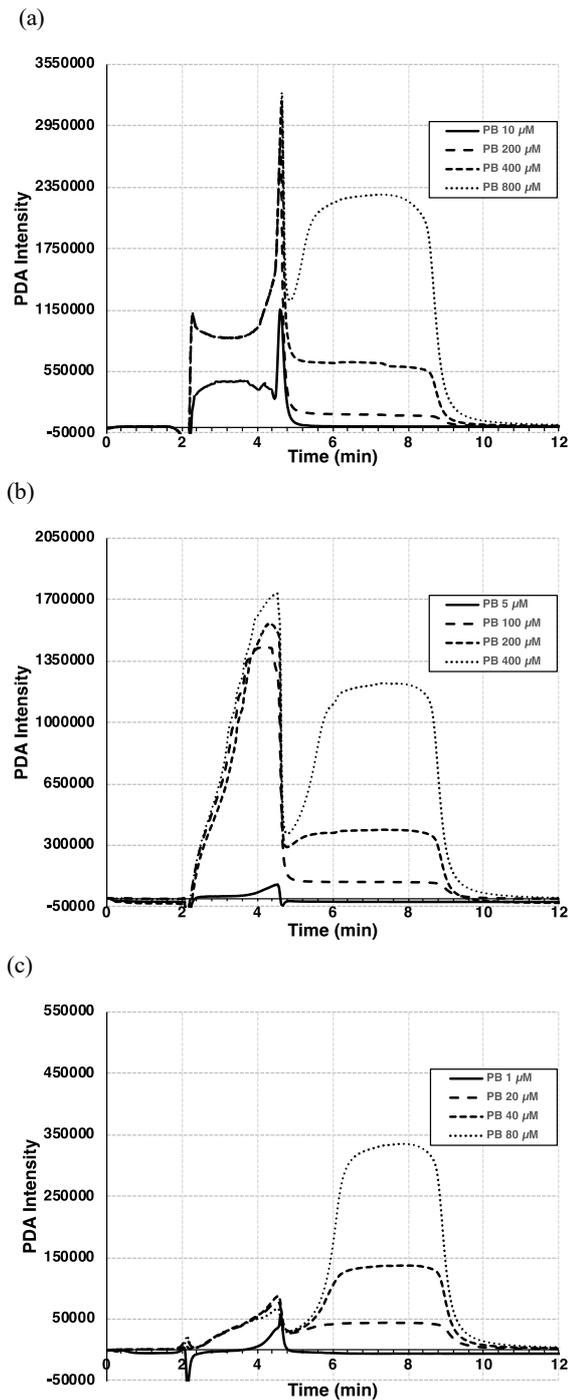


図 4 HPFA 分離チャートの比較

(a) HSA 100 μM 、(b) HSA 50 μM 、(c) HSA 10 μM

縦軸は PDA 検出器の出力値

上記の結果から、すべての HSA 濃度で非結合型薬物濃度の定量が可能と判断し、定量を行った。得られた定量値より作成した Langmuir 型プロットを図 5 に示す。

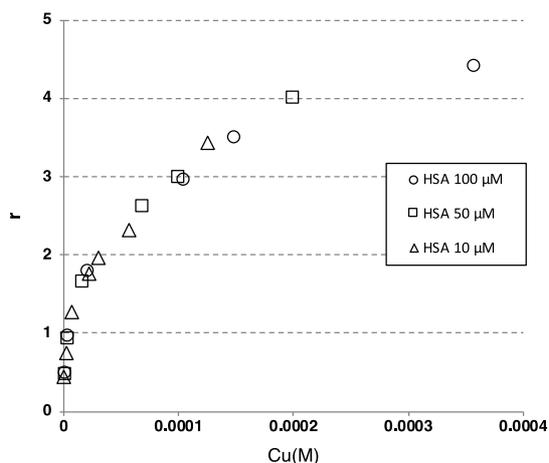


図5 Langmuir型プロット

Langmuir型プロットを重ね合わせて描出すると、HSA濃度に変化してもプロットの形状は同一のものとなった。このプロットより得られた結合定数及び結合サイト数の回帰計算値を表3に示す。今回の結果は、平衡透析法で解析された結果 ($K_1=2.3 \times 10^5 (M^{-1})$, $n_1=1$, $K_2=5.6 \times 10^3 (M^{-1})$, $n_2=4$) と同様に、フェニルブタゾンがHSAと強く結合することを示している¹¹⁾。

表3 回帰計算による結合定数及び結合サイト数

HSA	100 μM	50 μM	10 μM
$K_1 (M^{-1})$	1.45×10^6	1.51×10^6	1.41×10^6
n_1	1	1	1
$K_2 (M^{-1})$	8.32×10^3	4.54×10^3	7.70×10^3
n_2	4.53	6.61	4.90
R^2	0.989	0.996	0.989

また、Langmuir型プロットが一致することから自明な通り、薬物-血漿タンパク結合定数及び結合サイト数は同一の値となった。すなわち、HPFA法において、HSA濃度を変更しても算定される結合定数や結合サイト数に影響はなく、普遍的に結合定数の評価が可能であることが示唆された。

6. 結語

血漿タンパク結合は、薬物の薬理効果・副作用の発現、体内動態に影響を及ぼす。そのため、安全で効果的な医薬品の開発や臨床適用を行う上では、非タンパク結合型薬物濃度測定が不可欠である。本研究では、HPFA法による薬物-タンパク結合解析による非結合型薬物濃度の測定に対するHSA濃度の影響を検討した。HSA総濃度を変化させてもLangmuir型プロットは同一のものとなり、算出した

結合定数、及び結合サイト数も同一の値となった。本検討結果より、HPFA解析においてHSA濃度を変化させても影響はなく、薬物-血漿タンパク結合における評価の妥当性があることが示された。また、本結果はHPFA解析における試料のスケールダウン評価が可能であることを示しており、同一試料薬からの測定試行回数の増加や、実験費用の圧縮などに資することが考えられる。これらはHPFA分析に関して大きく貢献できるものである。

参考文献

- 1) Hardy J. and Hardy KG. *Science* 282, 1075-1079(1998).
- 2) Price DL, Sisodia SS, and Borchelt DR. *Science* 282, 1079-1083(1998).
- 3) Nakagawa T, Shibukawa A. *Bunseki Kagaku* 40(5), 203-214(1991).
- 4) Rosas M.E.R.R, Shibukawa A, Yoshikawa Y, Kuroda Y, Nakagawa T. *Anal. Biochem.* 274, 27-33(1999).
- 5) Shibukawa A, Yoshikawa Y, Kimura T, Nakagawa T, Wainer I.W. *J.Chromatogr.B.* 768, 177-188(2002).
- 6) Shibukawa A, Yoshikawa Y, Kimura T, Nakagawa T, Wainer I.W. *J.Chromatogr.B.* 768, 189-197(2002).
- 7) Kimura T, Nakanishi K, Nakagawa T, Shibukawa A, Matsuzaki K. *Pharmaceutical Research* 22(4), 667-675(2005).
- 8) Kimura T, Nakanishi K, Nakagawa T, Shibukawa A, Matsuzaki K. *J.Pharm.Biomed.Anal.* 38(2), 204-209(2005).
- 9) Shibukawa A, Nakagawa T. *Analytical Chemistry* 68, 447-454(1996).
- 10) Choi S, Choi EY, Kim DJ, Kim JH, Kim TS, Oh SW. *Clin Chim Acta.* 339, 147-156(2004).
- 11) Tillement J. -P, Zini R, D'Athis P, Vassent G. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 7, 307-313(1974).