

財団法人日中医学協会
2005年度共同研究等助成金 一調査・共同研究一報告書

財団法人 日 中 医 学 協 会 御中

提出日 2006/03/10

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 萩中 淳



所属機関名： 武庫川女子大学

所属部署： 薬学部 職名： 教授

〒 663-8179

所 在 地： 西宮市甲子園九番町 1 1 - 6 8

電話： 0798-45-9949 内線：

1. 助 成 金 額 920,000 円

2. 研 究 テ ー マ

人工抗体を用いた医薬品活性体のハイスループットスクリーニング

3. 成 果 の 概 要 (100字程度)

ドメインインプリント法を用いて、医薬品の活性部位に対する分子インプリントポリマー（＝人工レセプター、人工抗体）を調製した。さらに、西安交通大学薬学部 賀 浪中教授と共同研究を行い、得られた人工抗体を中国伝承薬中の活性体のハイプットスクリーニングに適用した。

4. 研 究 組 織

日本側研究者氏名： 萩中 淳 職名： 教授

所属機関： 武庫川女子大学 部署： 薬学部

中国側研究者氏名： 賀 浪中 職名： 教授

所属機関： 西安交通大学 部署： 薬学部

人工抗体を用いた医薬品活性体のハイスループットスクリーニング

日本側研究者氏名	教授 萩中 淳
研 究 機 関	武庫川女子大学薬学部
中国側研究者氏名	教授 賀 浪中
所 属 機 関	西安交通大学薬学部

要 旨

分子インプリント法は、ゲスト分子と相補的に相互作用するモノマーを重合させることにより、ゲスト分子に対する鑄型を得ようとする方法である。そこで、医薬品の薬理活性部位に対する分子インプリントポリマーの調製法である、ドメインインプリント法を用いて分子インプリントポリマー（＝人工抗体）を調製し、中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニングに適用するとともに質量分析装置を用いてオンラインで、活性体の構造情報を得ることを目的とした。まず、エピガロカテキンガレート [(-)-EGCg]、エピカテキンガレート [(-)-ECg] およびガロカテキンガレート [(+)-GCg] に対する人工抗体を、多段階膨潤重合法により調製した。次に、これらの分子認識能を水系の移動相を用いて評価した。その結果、2 位および 3 位が同じ立体配置を持つ (-)-EGCg および (-)-ECg をテンプレート分子を用いて調製した MIP の保持能および分子認識能は、それぞれのテンプレート分子に対して最も高く、さらに (-)-ECg あるいは (-)-EGCg に対して高い交差反応性を示した。しかし、2 位の立体配置が異なる (-)-GCg に対する、これら MIP の保持能および分子認識能は低かった。一方、(-)-GCg を用いて調製した MIP は、テンプレート分子に対して最も高い保持能および分子認識能を示したが、(-)-EGCg および (-)-ECg に対しては低かった。また、いずれの MIP も、(-)-ECg および (-)-EGCg よりガレート基が脱離したエピカテキンおよびエピガロカテキンに対して、ほとんど分子認識能を示さなかった。検討したカテキンガレート類の認識にはガレート基と 2 位の立体配置が重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、西安交通大学薬学部 賀 浪中教授との共同研究の結果、(-)-EGCg に対する人工抗体を用いることにより、中国伝承薬および薬草中からの活性体のハイスループットスクリーニング、さらには質量分析装置を用いることにより活性体の構造情報を得ることができた。

Key Words 分子インプリントポリマー、人工抗体、カテキン、中国伝承薬、丹参

緒 言：

分子インプリント法は、テンプレート分子の存在下、それと相補的に相互作用するモノマーを重合させることにより、テンプレート分子に対する鑄型を得ようとする方法である（図 1）。分子インプリントポリマー（molecularly imprinted polymer、MIP）は、人工レセプター、人工抗体とも呼ばれ、目的物質の特異的認識に利用されている。しかし、従来の分子インプリント法は、塊状重合法により調製されるため、1）鑄型構造がポリマー内部に形成され、分子認識能が発現しにくい、2）高性能、高分離能のポリマーが得られない、3）一般に非水系の分子認識に用いられ、水系では分子認識能が劣るなどの欠点を有していた。そこで、我々は、多段階膨潤重合法により粒子径単分散の新規 MIP を調製し、高性能、高分離能のポリマーを合成する方法を開発するとともに、水系での分子認識に適用した。その結果、この新規 MIP は、その分子認識に疎水性相互作用などに加えてイオン結合および水素結合も寄与すること、ならびに新規 MIP が種々の薬物および代謝物の水系での分子認識あるいは光学認識に適用できることがわかった。さらに、MIP 表面を親水性モノマーを用いて *in situ* で選択的に親水化することにより、生体試料の直接注入による薬物および代謝物の選択的濃縮分析に応用できることを明らかにしてきた。

一方、多段階膨潤重合法で調製された MIP は、水系での分子認識能に優れていることおよび高い群特異性を示す

ことも見出している。種々の薬物に対するレセプターは、当然のことながら、水系でその分子認識能を発現するとともに、高い群特異性を示す。そこで、医薬品の薬理活性部位に対する分子インプリントポリマー（＝人工の薬物受容体、人工抗体）を調製する方法であるドメインインプリント法を用いて、水系で優れた分子認識能を発現する分子インプリントポリマーの調製を行う。そして、得られた分子インプリントポリマーのレセプター様分子認識能を利用して、医薬品活性体のハイスループットスクリーニングに適用するという本研究の着想を得た。

そこで、本研究では、1) 水溶液中で、レセプター様分子認識能を示す分子インプリントポリマー（＝人工抗体）の調製法を開発する、2) 開発した調製法を薬理活性物質に対する人工抗体の調製に適用する、3) 得られた人工抗体を中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニングに適用する、4) 探索した活性体の構造情報をオンラインあるいはオフラインで得ることを目的とした。

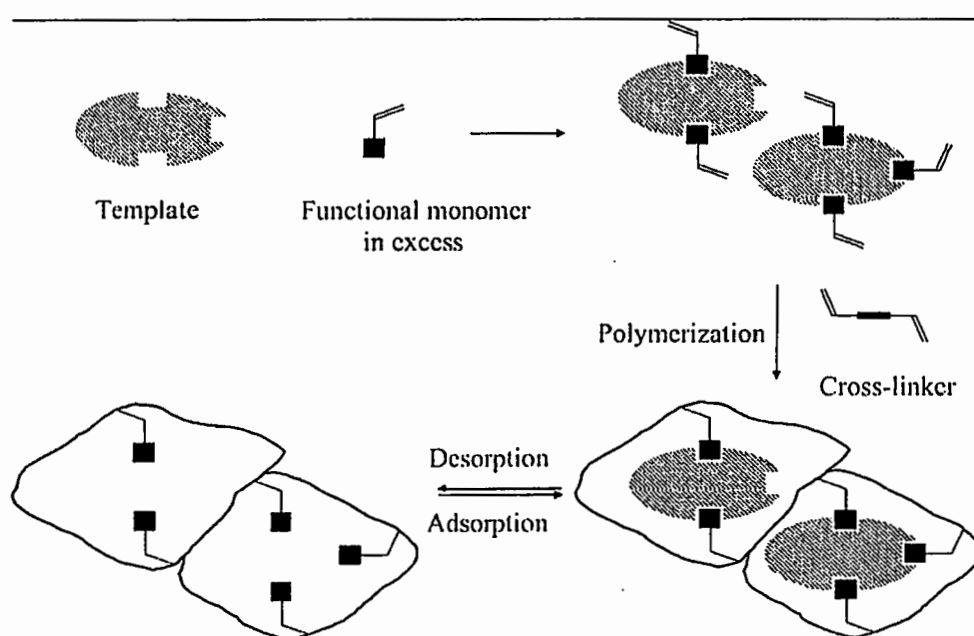


Figure 1 Concept of molecular imprinting

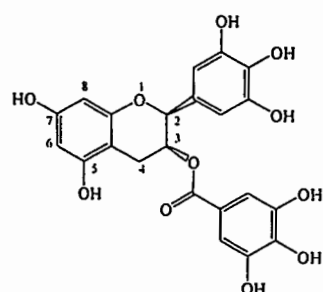
実験:

[1] カテキンに対する人工抗体の調製:

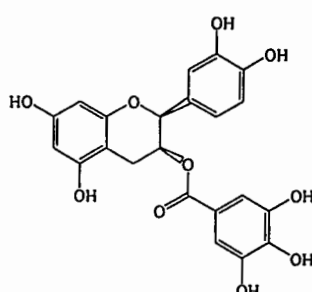
人工抗体は、粒子径の均一なポリマーを得るために、多段階膨潤重合法を用いて調製した。テンプレート分子にエピガロカテキンガレート [(-)-EGCg]、エピカテキンガレート [(-)-ECg] およびガロカテキンガレート [(+)-GCg]、機能性モノマーに4-ビニルピリジン、架橋剤にエチレングリコールジメタクリレート、希釈剤にシクロヘキサノールを用い、50℃で24時間重合した。また、比較のためにテンプレート分子を用いないで同一条件下で重合したノンインプリントポリマー (NIP) も調製した。得られたポリマーをステンレス製カラム (内径4.6 mm、長さ5 cm) にスラリー充填し、カテキン類に対する保持能および分子認識能を HPLC により評価した。移動相には、70%エタノールを用い、流速は0.5 mL/minとした。なお、分子認識能の評価には NIP との保持係数 (k) の比で定義した選択係数 ($S = k_{\text{MIP}}/k_{\text{NIP}}$) を用いた。

[2] 中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニング:

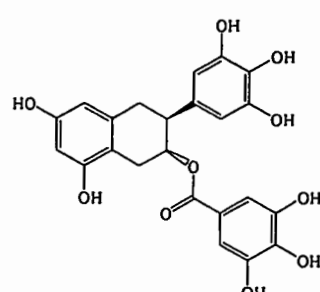
種々の中国伝承薬 (当帰、甘草、牡丹皮、元胡、蒲黄、丹参、杜仲など) を粉碎し、その0.1 g を秤量し、5 mLのメタノール加え、1時間超音波抽出した。抽出液を0.45 μmのメンブランフィルターを用いてろ過し、試料とした。試料を[(-)-EGCg]に対するMIPおよびNIPを充填したカラム (内径4.6 mm、長さ10 cm) に注入した。移動相には、80%アセトニトリルを用い、流速は1.0 mL/minとした。



(-)-Epigallocatechin gallate
[(-)-EGCg]



(-)-Epicatechin gallate
[(-)-ECg]



(-)-Gallocatechin gallate
[(-)-GCg]

結果および考察：

[1] カテキンに対する人工抗体の調製：

人工抗体 (MIP) のカテキン類に対する保持能および分子認識能を、移動相にエタノール-水混液を用いて評価した結果を表に示した。2 位および 3 位が同じ立体配置を持つ (-)-EGCg および (-)-ECg をテンプレート分子に用いて調製した MIP の保持能および分子認識能は、それぞれのテンプレート分子に対して最も高く、さらに (-)-ECg あるいは (-)-EGCg に対して高い交差反応性を示した。しかし、2 位の立体配置が異なる (-)-GCg に対する、これら MIP の保持能および分子認識能は低かった。一方、(-)-GCg を用いて調製した MIP は、テンプレート分子に対して最も高い保持能および分子認識能を示したが、(-)-EGCg および (-)-ECg に対しては低かった。また、いずれの MIP も、(-)-ECg および (-)-EGCg よりガレート基が脱離したエピカテキンおよびエピガロカテキンに対して、ほとんど分子認識能を示さなかった。検討したカテキンガレート類の認識にはガレート基と 2 位の立体配置が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

Table Retention and selectivity factors of catechin gallates on MIPs

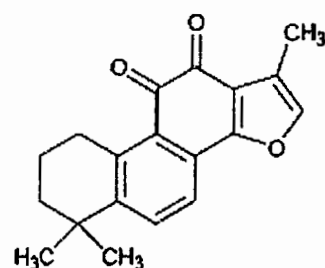
Catechin gallates	(-)-EGCg imprinted polymer		(-)-ECg imprinted polymer		(-)-GCg imprinted polymer	
	<i>k</i>	<i>S</i>	<i>k</i>	<i>S</i>	<i>k</i>	<i>S</i>
(-)-EGCg	22.8	10.8	10.9	3.98	3.81	1.35
(-)-ECg	17.2	7.04	15.1	5.02	4.00	1.37
(-)-GCg	4.49	1.83	4.21	1.37	15.2	5.34

HPLC conditions: column size, 4.6 mm i.d. × 50 mm; column temperature, 25 °C; eluent, 70 % ethanol; flow rate, 0.5 mL/min; detection, 210 nm; loaded amount, 1500 ng.

S is the selectivity factor, $k_{\text{MIP}}/k_{\text{NIP}}$.

[2] 中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニング：

平成18年1月11日から平成18年3月9日までの2ヶ月間、西安交通大学薬学部賀 浪中教授の研究室より張 倩倩 (修士課程2年在学中) を招き、種々の中国伝承薬 (当帰、甘草、牡丹皮、元胡、蒲黄、丹参、杜仲など) 中の活性成分の検索を(-)-EGCgに対するMIP (=人工抗体) を用いて行った。図2に、丹参の抽出液をMIPおよびNIPに注入後のクロマトグラムを示した。MIPでは、約12分に大きなピークが見られたが、NIPではこのピークは溶媒先端に溶出しているように思われる。これは、丹参中の成分の一部がMIPに選択的に保持された



Tanshinone IIA

ことによると推定した。丹参中には、Tanshinone IIA等多くの活性成分が含まれていると報告されている。現在、MIPカラムで約12分にみられたピークがTanshinone IIAによるものかどうかを質量分析装置を用いて確認中である。

このように、得られた人工抗体が中国伝承薬および薬草中の活性体のハイスループットスクリーニングに適用可能であることが明らかとなった。

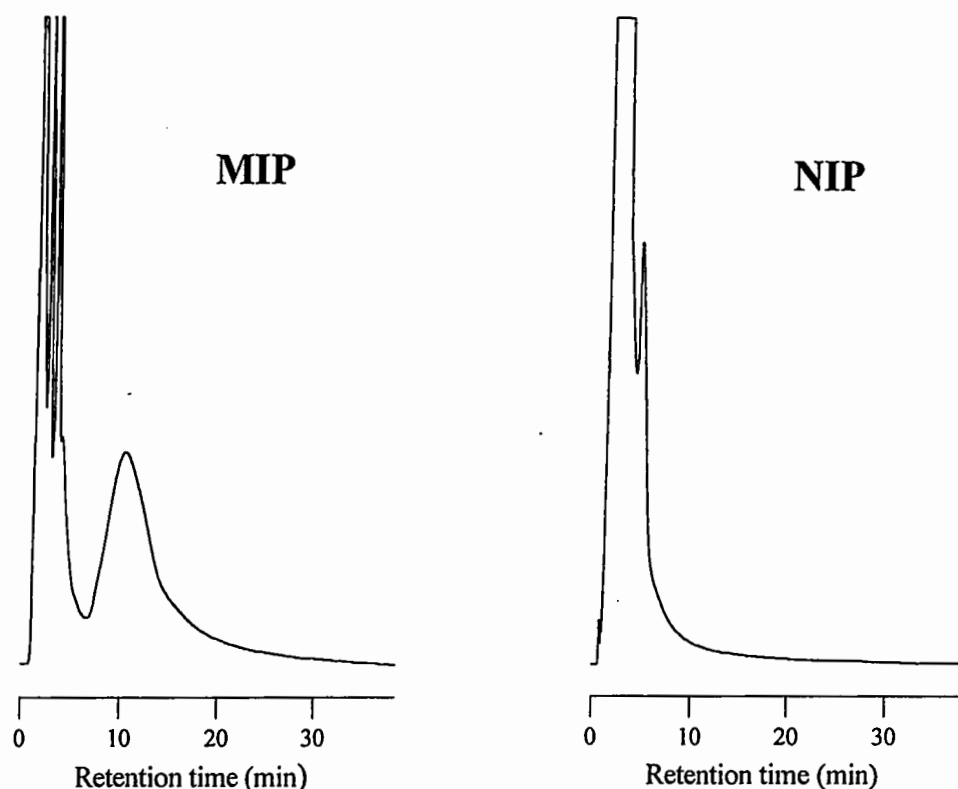


Figure 2 Separation of Danshen Root extracts on MIP and NIP

HPLC conditions: column size, 100 mm × 4.6 mm i.d.; column temperature, 25 °C; eluent, acetonitrile-H₂O (80/20, v/v); detection, 210 nm; flow rate, 1.0 mL/min; loaded amount, 1 µg

文 献

1. Jun Haginaka: Selectivity of affinity media in solid-phase extraction of analytes, Trends Anal. Chem., 24, 407-415 (2005).
2. Masanori Nakamura, Masaki Ono, Toshiaki Nakajima, Yuji Ito, Takao Aketo and Jun Haginaka, Uniformly sized molecularly imprinted polymer for atropine and its application to the determination of atropine and scopolamine in pharmaceutical preparations containing *Scopolia* extract, J. Pharm. Biomed. Anal., 37, 232-237 (2005).

作成日 : 2006 年 3 月 3 日