

阻害剤評価に関するフローインジェクション分析

神奈川工科大学応用バイオ科学科 飯田泰広

1. はじめに

J. FIA 誌において、FIA bibliography を高知大の受田先生が担当されている時に初めて見て、「これはすごい仕事だなあ」と思った記憶が強く残っている。それから時が経ち、徳島大の高柳先生（当時岡山大学）からその FIA bibliography を引き継ぎ（丁寧に指導していただき感謝している）、何となくすごい仕事に貢献できていると思いながら足かけ4年担当させていただいたが、私の代で終焉を迎えた。タイトルと雑誌、著者のみというシンプルな情報は、文献検索が容易になりかつほぼ全ての論文が PDF で手に入る現在では、労力の割に読み手が目を通さないページになってしまっていたためであり、仕方がなかったのだと考えた。その様な中、30巻1号より始まった FIA フロントラインでは、徳島大の竹内先生が書かれているように、執筆者の興味ある FIA や SIA に関するホットな話題を論文を引用しながら紹介するものであり[1]、大変魅力的に感じている。私としては、方向性を持った総括的な話はミニレビューに、FIA の新たな技術的な話はトピックスにお任せして、FIA bibliography のような散文的な文献紹介を、テーマを限定して行いたいと思った。そこで今回のテーマは、ここ5年位の FIA や SIA を用いた阻害剤評価に関するものとし、その文献を紹介することとした。

その傾向は、大きく、「スクリーニングに関するもの」、「毒性（安全性）を評価に関するもの」、「体内動態など薬剤の評価に関するもの」、「酵素活性が評価できているかなどの検証に関するもの」、「技術的なもの」、に分けることができると考えられた。ICP や HPLC のための試料調製として用いられているものや、Lab-on-a-chip やキャピラリー電気泳動のようなマイクロフローとして利用されているもの等、技術面からの分類も可能であったが、本稿では、上述の様な目的に合わせた分類に関して紹介していきたい。

2. 阻害剤スクリーニングに関するもの

阻害剤の評価に関するフローインジェクション分析に関して、スクリーニングに関する報告は多くはなく、ハイスループット化を達成するために、多くは 96 well や 384 well などのマイクロプレートリーダーによる汎用性の高い

バッチ法が採用されている傾向がある。しかし、フロー分析ならではの、目的評価に特化したユニークな系を構築して行っている報告がなされている。

N. Moonrungsee らは、しみやソバカスの原因となるメラニン抑制や、食品の劣化防止に効果を示すことが期待されている、チロシナーゼ阻害剤の評価をハイスループット化するために SIA を用いた系を開発している[2]。基質に 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(L-DOPA)を用い、マッシュルーム由来チロシナーゼと反応させて生じる *o*-ドーパキノンを吸光度計測することで活性の評価を行い、試料として各種抗酸化物質を用いてそれぞれのチロシナーゼ活性阻害能を評価している。バッチ法と比較して IC₅₀ 値はよく一致しており、微量で簡便迅速かつ正確性や自動化能も高く、優れた方法であることを報告している。

また、Z.-B. Shi らは、STAT3 阻害剤スクリーニングに関して報告している[3]。STAT3 は転写因子の一種であり、がん細胞において恒常的に発現していること、また、当該転写因子の機能を阻害するとがん細胞がアポトーシスすることが知られているため、その阻害剤は新たな抗がん剤として期待されている。本論文では、バイオインフォマティクスにより STAT3 阻害能を有する化合物をバーチャルスクリーニングし、候補に挙げた化合物およびその誘導体を合成し、実際の阻害能を FIA-QCM を構築して行っており、見出された化合物が、新たな抗がん剤としての可能性を有していることを報告している。

3. 毒性（安全性）の評価に関するもの

対象とする化合物の毒性や安全性を評価するためにフロー分析を用いることは、自動化の容易さを含め、理にかなっていると考えられる。ここではその様な毒性や安全性に関連した論文を報告する。

前出の N. Moonrungsee らは、モノアミンオキシダーゼ (MAO) の一種であるチラミンオキシダーゼ (TOD) 阻害剤の評価法について報告している[4]。MAO 阻害剤は、抗うつ剤など神経系の薬剤として使用されている一方、MAO 阻害剤服用時のチラミンを多く含む食品を摂取した際の副作用が問題となっており、その TOD 阻害能を評価することは重要な課題となっている。本論文では、既存の MAO 阻害評価法を挙げつつ、食品に含まれているフラボノイド

を対象に SIA を基礎とした独自の評価法を報告している。当該方法は、TOD により生成する過酸化水素をペルオキシダーゼ (POD) 存在下でパニリン酸と 4-アミノアンチピリンにより反応させて生じるキノンイミンをフロー式分光光度計で計測している。イソフラボノイドを対象に TOD の IC₅₀ を求めた結果、本法とバッチ法で大きな違いがなかったことから、バッチ法よりも便利で高感度かつ自動化が可能なシステムを提供できることが示されている。

また、E. Cunha らは、イオン液体の毒性評価に SIA を適用している[5]。イオン液体は揮発性が低く、従来の有機溶媒に比べて毒性が低く、グリーンケミストリーに適した化合物であると考えられている。しかし、実際のイオン液体の毒性の詳細は報告されていないため、そのイオン液体の毒性評価のための SIA システムを構築している。毒性の対象となる酵素にカルボキシエステラーゼを選定し、4-メチルウンベリフェリルアセタートを基質とし、触媒反応により生じる 4-メチルウンベリフェロンの蛍光計測により酵素活性を評価している。既存の阻害剤である *p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウムおよび試料であるイオン液体に対して当該酵素に対する阻害活性の評価を行った。それぞれの試料の EC₅₀ 値は 38~134 μ M であり、本方法は、再現性が高く (rsd = 5 %)、試薬使用量も少なく (2 mL/assay)、迅速に毒性評価を行うことができるシステムであることを報告している。

また、同グループである P. C. A. G. Pinto らは、[5]と同じく、イオン液体の影響をカタラーゼを対象に調べている。市販のイオン液体および、カタラーゼの阻害剤であるアジ化ナトリウムに対して評価を行っている[6]。

4. 体内動態など薬剤の評価をするためのもの

これまででは、分析対象が阻害能を示すことを評価することを目的としていたが (阻害能の有無が分かっていないものが対象)、本節では分析対象が阻害剤であるものについて評価したものを報告する。医薬品の多くに阻害剤が用いられており、その体内動態などを評価するためのフロー分析の報告が多く見られた。

アンギオテンシン変換酵素の阻害剤は血圧を低下させる作用があり、高血圧治療の第一選択薬として用いられている。カプトプリルはその阻害剤の 1 つであり、広く用いられている。Q. Chen らは、この化合物の定量のための FIA システムを開発している[7]。当該グループが合成した金ナノ粒子は非イオンフルオロ界面活性剤が結合しており、過酸化水素を捕捉し、ルミノール存在下で発光すること、また、当該金ナノ粒子がチオールと結合すると過酸化水素の補足量が減少し、ルミノールでの発光が減少することに基づき、チオール基を有するカプトプリルの定量に応用して

いる。計測範囲が 23.0 ~ 920 nM であり、検出下限は 4.6 nM、また、既存法で定量した場合との値も一致し、尿での標準添加法による回収率もよく、有用な測定法であることが報告されている。

また、W. T. Suarez らは、同じくカプトプリルを別の手法により定量する方法を報告している[8]。チオール基を Fe(III)で酸化し、生じた Fe(II)を過剰のヘキサシアノ鉄(III)カリウム溶液と反応させてプルシアンブルーを生成させ、700 nm で吸光度測定を行うものである。検出下限が 30 μ M であり、精度よく簡便迅速、高感度に定量できることが報告されている。本文献では、同様にチオール基を有する、粘液溶解薬 (去痰剤など) に用いられている *N*-アセチルシステインの定量にも本法が応用できることを示している。

一方、リシノプリルは、アンギオテンシン変換酵素の阻害剤の一種である。Y. Li らは、銀ナノ粒子存在下でリシノプリル添加により過マンガン酸カリウムとルミノールの反応に起因する発光計測を報告している[9]。これは、銀ナノ粒子にリシノプリルが吸着することにより銀ナノ粒子の酸化電位を低下させ、ルミノール-過マンガン酸カリウムでの発光が増加することを原理としている。リシノプリルの濃度に応じて発光強度が向上し、計測範囲が約 250 μ M ~ 50 mM であったこと、錠剤中の濃度が適切に測定でき、ヒト尿へ標準添加法を適用し、回収率が良かったことを報告している。

その他、A. F. Khorshid らは、コリンエステラーゼ阻害剤であるネオスチグミンを炭素電極を用いて 1.0 μ M~10 mM の範囲で計測できることを報告している[10]。

5. その他

5-1. 酵素活性が評価できているかなどの検証に関するもの

ここでは、構築した系が適正であるか、その精度や再現性などを評価するためにフロー分析を主とした阻害剤評価を行っている文献を報告する。

市販のタンパク質標準物質の純度は、表示されている値と異なる場合があるが、その原因が純度を求める方法にあるとされている。R. Wang らは、タンパク質を荷電化粒子検出器 (CAD) により求め、FIA を組み合わせて新たなタンパク質純度の測定法を提唱している[11]。本法では、TFA とアセトニトリルを移動相として用いることにより、試験した 6 種類すべてのタンパク質で精度よく純度を求めることができることがわかり、その応用として Bowman-Birk 阻害剤 (BBI) の純度決定を試みた。市販の標準物質の中に、天然型やイソ型 1、イソ型 2 が含まれていること、その含有量をそれぞれ求めることができたことが報告されている。

また、S. N. Tan らは、低コストかつ省スペースで簡便なバイオセンサを構築するため、紙ベースでのバイオセンサ用識別素子と試料注入用デバイスを一体化したシステムを開発し、その機能や精度を阻害剤を用いて評価している[12]。モデル酵素としてグルコースオキシダーゼを選定し、当該酵素を含浸させた紙ディスクを作製、その抑制剤として銀イオンを選定、回復剤として EDTA を選択して、グルコースオキシダーゼの活性の低下と回復をフローシステムにより評価している。

5-2. 技術的なもの

この節では、阻害剤の評価方法が技術的にユニークであると思われるものを紹介したい。

Erik らは、阻害剤評価のハイスループットスクリーニング用のマイクロフロー技術を開発している[13]。複数の目的のサンプルを、キャリアであるオイルに挟み込むようにセグメント化させたサンプル群をシリンジ内に作成、シリンジポンプで送液することにより、異なるサンプルがオイルで区切られて運ばれる系を構築、その溶液部（サンプル部）をセパレーションチャンネルにインジェクションするシステムを構築している。セパレーションチャンネルでは、キャピラリーによりサンプルに含まれる成分を分離することで、サンプルに添加しておいた基質を定量できるようにしている。酵素反応させた場合とさせない場合のサンプルに含まれる当該基質の残存量を比較することで、サンプル内の阻害剤の活性評価をすることができるようになっている。本報告では、モデル酵素としてタンパク質キナーゼ A (PKA) の阻害活性を蛍光ラベルした基質を用いて LIF（レーザー励起蛍光）検出器で評価している。当該システムにより、1 検体をサブ秒で評価できること、168 の候補化合物中 25 の化合物から PKA 阻害活性を評価できたことを報

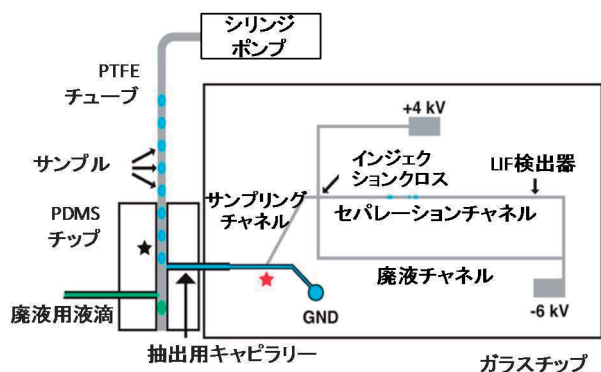


図1. セグメント化されたフローからの液滴抽出とセパレーションチャンネルへのマイクロフローインジェクションの概念図^[13]

告している。

Jessica らは、単一細胞内での酵素活性を直接評価する方法を開発、細胞内での定量に応用している[14]。具体的に

は、マイクロ流路に細胞固定ピペットを用いて細胞を設置、蛍光基質や阻害剤を送液した際の細胞内酵素活性（モデルとしてアルカリホスファターゼを対象としている）を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価している。その概略図を図2に示している。緩衝液を送液した際の酵素活性（実際には蛍光強度）をベースとし、基質や阻害剤を細胞に通過させるためのイオノフォアであるジギトニンを送液後、アルカリホスファターゼの蛍光基質である FDP（フルオレセインニリン酸）送液し活性を評価、続いて阻害剤であるレバミソールの存在下での活性を、連続的かつリアルタイムに評価している。本システムを用いることにより、ミカエリス定数や K_i 値の計測も行うことができることを報告している。

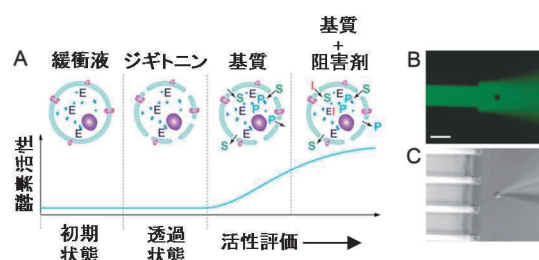


図2. 単一細胞内酵素活性評価用フローシステムの概略図^[14]

A: 計測対象細胞状態の概念図、E; 酵素（アルカリホスファターゼ）、S; 蛍光基質、I; 阻害剤、P; 生成物、B: 共焦点レーザー顕微鏡による細胞の蛍光像（細胞内酵素活性の評価にあたっては、バックグラウンドと細胞での蛍光の相対比から蛍光強度を求めている）、C: 明視野像

薬物代謝の動態を評価するために FIA の応用も試みられている。肝臓の薬物代謝は、薬剤設計において重要であり、薬剤の分解や修飾あるいは他の物質の共存による代謝機能の変化など評価すべき項目が多い。Paul らは、肝臓切片を用いて、その薬物代謝および薬物阻害の評価を図3の様な FIA を構築して行っている[15]。図中のバイオチップ内で肝切片を培養し、ペリスタリックポンプにて培地を送液、2 つのシリンジポンプでは、基質や阻害剤と基質を送液できるようにして、生きた組織切片を用いて不安定な代謝産物のリアルタイム計測を可能にしている。モデルケースとして、UDP-グルクロン酸転移酵素阻害剤の存在下および非存在下での当該酵素の機能を評価し、第二相代謝を経時的に定量することが可能になったことを報告している。

6. おわりに

阻害剤に関係するフロー分析について扱った論文を紹介

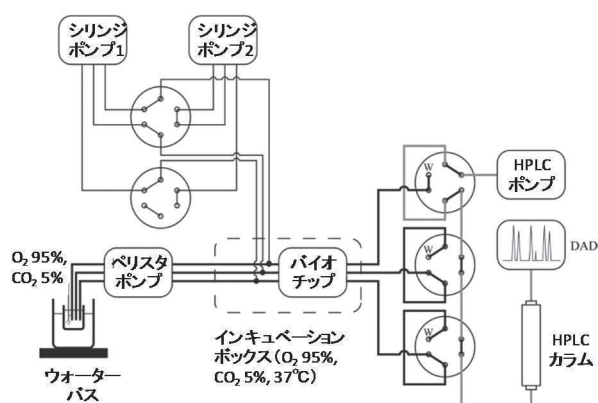


図3. 細胞代謝および阻害剤のオンライン分析フローシステムの概略図¹⁵⁾

介してきたが、いずれもフロー分析の強みである精度や再現性、定量性、自動化などを生かしたものが多くみられた。これは、阻害剤を探索する薬剤スクリーニングのハイスループット化や、既に使用されている阻害剤の分析、対象化合物の安全性評価などを目的としており、汎用性よりも、間違いのない分析、精度の高い評価に付加価値を見いだせる使用法が多かったと思われる。また、細胞ベースでのフロー分析も見られ、バイオテクノロジーとの融合は今後も進んでいくと思われる。微小化、集積化に関してはこれまで通り開発が進むであろうことから、その周辺技術であるポンプや送液システム、インジェクションの手法、ラインの切り替え法なども、今後の技術進展が期待される。

参考文献

- [1] 竹内政樹, *J. Flow Injection Anal.*, **30**, 55-56 (2013).
- [2] N. Moonrungeee, J. Jakmunee, T. Shimamura, T. Kashiwagi, H. Ukeda, K. Higuchi, *Talanta*, **101**, 233-239 (2012).
- [3] Z.-B. Shi, D. Zhao, Y. Du, J.-X. Li, Y.-Y. Huang, R. Zhao, X.-R. Cao, Z.-N. Gong, *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 1574-1580 (2012).
- [4] N. Moonrungeee, J. Jakmunee, T. Shimamura, T. Kashiwagi, H. Ukeda, K. Higuchi, *Talanta*, **122**, 257-263 (2014).
- [5] E. Cunha, P. C. A. G. Pinto, J. P. S. Carvalho, M. L. M. F. S. Saraiva, *J. Hazard Mater.*, **244**, 563-569 (2013).
- [6] P. C. A. G. Pinto, A. D. F. Costa, J. L. F. C. Lima, M. L. M. F. S. Saraiva, *Chemosphere*, **82**, 1620-1628 (2011).
- [7] Q. Chen, S. Bai, C. Lu, *Talanta*, **89**, 142-148 (2012).
- [8] W. T. Suarez, O. D. Pessoa-Neto, J. B. Campos, R. C. Faria,

O. Fatibello-Filho, H. J. Vieira, *Anal. Lett.*, **44**, 2394-2405 (2011).

- [9] Y. Li, Y. Li, Y. Yang, *Appl. Spectrosc.*, **65**, 376-381 (2011).
- [10] A. F. Khorshid, Y. M. Issa, *Biosensors Bioelectron.*, **51**, 143-149 (2014).
- [11] R. Wang, X. Wang, J. Paulino, L. Alquier, *J. Chromatogr. A*, **1283**, 116-121 (2013).
- [12] S. N. Tan, L. Ge, H. Y. Tan, W. K. Loke, J. Gao, W. Wang, *Anal. Chem.*, **84**, 10071-10076 (2012).
- [13] E. D. Guetschow, D. J. Steyer, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.*, **86**, 10373-10379 (2014).
- [14] J. Olofsson, S. Xu, G. D. M. Jeffries, A. Jesorka, H. Bridle, I. Isaksson, S. G. Weber, O. Orwar, *Anal. Chem.*, **85**, 10126-10133 (2013).
- [15] M. P. M. Van, J. Janssen, M. Merema, G. I. A. M. De, G. M. M. Groothuis, E. Verpoorte, *Anal. Chem.*, **83**, 84-91 (2011).