

# 固定化リポソームカラムクロマトグラフィーの 溶離パターンの解析：吸着及び解離速度定数の推定

## 学位論文内容の要旨

### 【はじめに】

経口投与された薬物は、消化管、特に小腸大腸の上皮細胞から吸収され血流によって全身に運ばれていく。従って、薬物のバイオアベイラビリティを大きくするためには、細胞膜における吸収速度が大きいことが必要であり、新薬開発のスクリーニングにおいて吸収速度を見積もることが重要になる。このため、細胞膜を模したモデルによる予測が必要とされる。現在までに、水／オクタノール分配法などの手法によって、薬物透過性の予測が行われてきた。しかし、生体膜により近い膜はリポソームである。近年、リポソームをカラム担体に固定化した、固定化リポソームカラムクロマトグラフィー(ILC)法が開発され、ILC法によって薬物とリポソームとの相互作用の解析が広く行われるようになった。しかし、この方法による相互作用の解析は、膜分配係数( $K_M$ )の算出のみに限られている。本研究では、薬物とリポソームとの相互作用において、ILCの溶離パターンが薬物の脂溶性が高まるにつれピークの幅がより広がることに注目し、この広がりから、 $K_M$ 以外の物理的パラメータが求められないか、溶離パターンの広がりが何で決まっているのかを考察した。

### 【結果と考察】

#### 1) Diffusion-reaction-transport 理論

HPLCの溶離曲線の理論式、すなわち平均滞留時間( $\bar{t}$ )とピークの広がり(分散(variance))に関して、古典的な理論である「diffusion-reaction-transport 理論」がある。この理論は、固定相と移動相の間で吸着速度定数( $k_1$ )及び解離速度定数( $k_{-1}$ )で溶質が吸着・解離を繰り返しながら、全体として溶質のバンドを形成し、カラムを上から下へ移動すると考えるものである。この理論をILCに適用すると、 $\bar{t}$ およびvarianceの理論式は、流速の逆数の比例式となった。そこで、脂質膜への透過性を持つため、細胞膜との相互作用の研究に多く用いられてきた脂溶性カチオン tetraphenylphosphonium(TPP<sup>+</sup>)とそのホモログ(Phen)<sub>3</sub>P<sup>+</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH<sub>3</sub> (n=0-6)をモデル化合物として使用し、流速の逆数に対し、 $\bar{t}$ およびvarianceをプロットした。その結果、 $\bar{t}$ は理論式に従っていたが、varianceは流速の逆数に対し曲線を示しており、理論式に従わないことがわかった。これは、diffusion-reaction-transport 理論が成り立たないことを示唆している。親水性であり、リポソームとはほとんど相互作用しないと考えられるアザイドを用いた場合でも、流速の逆数に対してvarianceが曲線を描いて増加する傾向が見られた。このことから、流速の逆数とvarianceが直線関係にならないのは、リポソームとモデル化合物の相互作用に起因するものではないと考えられた。そこで、新しい考え方、またはこの理論の不足部分を考える必要性が生じた。

## 2) Well-mixing zone model

HPLC用のゲル担体と異なり、リポソームカラムで用いるゲルは捻れた網目状となっており、またリポソームを固定化するのに十分な大きさの空隙があるため、攪拌が生じると考えられる。この効果により、ある容積の溶質を注入した場合、カラムはある厚みを持った層状のディスクに分割される。Diffusion-reaction-transport 理論と同様に、溶質は帯状となってカラムを移動するが、流れていく溶質そのものが乱流となっている可能性がある。溶質とリポソームの相互作用は、ディスク状になった微小区間の中で攪拌されながら行われ、さらに全体の流れに従い次のディスクへと連続的に移動していく。これを、「well-mixing zone model」と名付けた。この理論では、溶質が攪拌しながらリポソームと相互作用するディスクがいくつも繋がり、ひとつのカラムを構成していると考えている。その分割されたディスクの数を  $N$  とし、 $t$  および variance の理論式を誘導すると、 $t$  は diffusion-reaction-transport 理論と同じ理論式が得られた。また、variance の理論式は二次式となり、実験結果が曲線を描いていたことをよく説明できた。この結果より、well-mixing zone model の理論を用いることにより、リポソームカラムでリポソームと薬物との相互作用を解析できることが示唆された。

$t$  および variance の理論式には、 $K_{LM}$  が含まれている。そこで、 $K_{LM}$  が物理的条件に影響されるかどうか、流速、カラムに充填するゲル量、注入量を変化させて測定した。 $K_{LM}$  の算出式は、カラムクロマトグラフの基本式を ILC 用に書き換えたものである。固定相体積は固定化されたリポソームの総量で表される。この値で溶質保持容量とボイド体積の差を除算すると  $K_{LM}$  が求まるのだが、流速を変化させても溶質保持容量はほぼ一定の値を示したため、 $K_{LM}$  もまた一定の値となった。他の条件下でも同様の結果となり、 $K_{LM}$  は物理的な変化によらず求まることがわかった。

また、variance の理論式には、ディスクの数  $N$  と  $k_1$  も含まれている。理論式で実験結果をフィッティングすると、それらの値を算出できる。注入量を変化させてみたところ、注入量の増加に対し  $N$  が減少することがわかった。これは、ディスクの厚みが増すためと考えられる。カラム長を2倍にした場合も同様の結果となったが、 $N$  は約2倍に増加していた。しかし、 $N$  の算出時に同時に求まった  $k_1$  および  $k_1$  と  $K_{LM}$  の関係から求めた  $k_1$  は、注入量を変化させてもほぼ一定の値となっていた。さらに、この理論からモデル化合物の  $K_{LM}$ 、 $k_1$  および  $k_1$  を求めたところ、脂溶性が高まると  $K_{LM}$  は増大するが、 $k_1$  および  $k_1$  はモデル化合物のメチレン基の数が偶数か奇数かによってジグザグのパターンとなることが示された。ただし、脂溶性の高い化合物で  $k_1$  がメチレン基の増加とともに増大していた。これは、より疎水的なイオンは、脂質膜から早く除去されることを示唆している。もし、疎水性イオンが脂質二重層の中間部分である疎水的な部分までしか透過しないのであれば、この  $k_1$  の挙動が説明できる。しかし、この挙動の分子的解释は現在明らかになっていない。

## 3) 経口薬物を用いた測定

Well-mixing zone model の理論で経口薬物とリポソームとの相互作用を解析した。それぞれの薬物の  $k_1$  および  $k_1$  を算出したところ、モデル化合物と異なり、脂溶性が比較的高い薬物で、吸着が速いと解離が遅くなる傾向が見られた。これは、薬物が膜を深く貫通して相互作用しているためではないかと考えられる。しかし、経口薬物とモデル化合物とのこの違いは不明である。

HPLC では一般的に攪拌は好ましい物ではないため、リポソームカラムによる薬物と膜の相互作用の解析には well-mixing zone model が適していると考えられる。

## 学位論文審査の要旨

|    |     |      |
|----|-----|------|
| 主査 | 教授  | 加茂直樹 |
| 副査 | 教授  | 井関健  |
| 副査 | 助教授 | 宮内正二 |
| 副査 | 助教授 | 菅原満  |

### 学位論文題名

## 固定化リポソームカラムクロマトグラフィーの 溶離パターンの解析：吸着及び解離速度定数の推定

薬物のバイオアベイラビリティを大きくするためには、細胞膜における透過速度が大きいことが必要であり、新薬開発のスクリーニングにおいて透過速度を見積もることが重要になる。このため、細胞膜を模したモデルによる予測が必要とされている。この方法の1つとしてリポソームカラムの使用がある。これは、リポソームをカラムゲル担体に固定化し、カラムの考え方を用いて、薬物のリポソームへの分配率を推定しようとするものである。ある薬物をカラムに与え、溶離液をカラムに流して、薬物がカラムから溶離するまでの溶離液の体積 $V_e$ を求める。全くりポソームと相互作用しない化合物がカラムから溶離するまでの溶離液の体積を $V_0$ とし、固定相であるリポソームの膜の部分の体積 $V_s$ をとすれば、薬物のリポソームへの分配率 $K_{LM}$ は、次式で与えられる。

$$K_{LM} = \frac{V_e - V_0}{V_s}$$

この式は一般にカラムクロマトグラフィーの基本式と呼ばれ、この式がリポソームカラムクロマトグラフィーに対しても実験的に成立することは、すでに、先行研究によって明らかにされている。その結果を利用して、リポソームと種々の薬物との相互作用が調べられている。また、輸送担体やレセプターを再構成したリポソームを使用すれば、膜タンパクと薬物との相互作用が測定されるはずであり、今後の利用が期待されている。

リポソームカラムを用いて、薬物の溶離位置すなわち溶離ピークの位置から、分配率を求めることが従来なされてきた。学位申請者は、溶離の位置のみでなく、溶離ピークの広がりは何で決まっているかに興味を持ち、本研究を進めた。

まず、古典的な考えである diffusion-reaction-transport theory を検討した。これ

は、固定相と移動相の間で、ある吸着速度および解離速度定数で薬物が吸着・解離を繰り返しながら、全体として薬物のバンドを形成し、カラムを上から下へ移動すると考えている。この考えに従って、偏微分方程式をたて、ラプラス変換を使って、平均滞留時間とピークの広がり（偏差）を計算している。平均滞留時間は、上記カラムクロマトグラフィーの基本式と同じ結果を与えた。また、平均滞留時間は溶離液の流速の逆数に比例し、実験と理論との一致をみた。しかし、広がりについては、理論は流速の逆数に比例する結果を与えるが、実験値は曲線を与えた。すなわち、リポソームカラムはこの考えに従わないことを見い出した。

そこで、申請者はこの理論と実験との不一致の原因はつぎのようである考えた。すなわち、diffusion-reaction-transport theory が十分適用できる場合は溶離液が層流をなしており、通常の HPLC カラムに適用できる。一方、リポソームがゲル担体に固定されているという状況から、リポソームカラムでは溶離液は層流とはならず、液の攪拌が起こっていると考えた。そこで、リポソームカラムに対して well-mixing zone model を提唱した。この考えでは、リポソームカラムはいくつかの disk 状のカラムが直列につながったものであり、1つの disk では、溶離液はよく混ざりあっており均一であると仮定する。この仮定により、数学的展開が非常に易しくなっており、この大胆な近似法の採用が申請者の論文の大きな長所である。この新理論は、ピークの位置や広がりに対する実験データをきれいに説明した。ピークの位置については、上記カラムクロマトグラフィーの基本式と同一の式を得ている。さらに、溶離液の流速を変化させて得られたピークの偏差を解析すれば、リポソームへの吸着およびからの脱着の速度定数を推定出来る事が本新理論より得られ、種々の phosphonium 陽イオンに対してこれらの値を求め、過去のデータと矛盾しないことを示している。

このように、リポソームカラムを用いて、リポソームへの分配係数、吸着速度および脱着速度が推定出来るようになったので、本方法を経口薬物に対して適用し、これらの物理量を得ている。これらのデータを用い、ラットの腸管吸収速度のデータ解析を行っている。その結果、膜に隣接して溶液中に未攪拌層を考えなければならない事、および、薬物の膜からの脱着速度の薬物透過における重要性を示唆している。

このように、本論文は、リポソームカラムに対する新理論を構築し、それを用いて、リポソームと薬物との相互作用、および、細胞膜の薬物透過に対して考察を加えたものであり、薬学博士の称号を授与するに十分であると判定した。