

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03846

研究課題名(和文)細胞膜機能を模倣した3D固相による水現代病の認識と低減

研究課題名(英文) Recognition and reduction of modern water pollutions using 3D stationary phase having cell membrane functions

研究代表者

細矢 憲 (Hosoya, Ken)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00209248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は1)医薬品および生活関連ケア製品(PPCPと略)を水相から捕捉する疑似細胞膜層を構築する，2)捕捉されたPPCPを十分に保持できる疑似親水性相互作用分離層を創出する，3)PPCPの特徴を認識し，夾雑物を排除する多次元メカニズム分子鋳型層を構築する，である。3年間の検討によって，本研究の最終目的である抗うつ剤のスルピリドの実際の河川水からの捕捉濃縮，定量に成功し，研究目的を完遂した。この成果は，モデルとして用いたスルピリドに留まらず，最近問題となっている貝毒，サキシトキシンやドウモイ酸などの化合物に対しても有効であることを確認しており，発展性のある成果となった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to construct a pseudo-cell membrane layer that captures pharmaceutical and personal care products (PPCP) from the aqueous phase, 2) Create a pseudo-hydrophilic interaction separation layer capable of fully retaining captured PPCP, 3) Recognizing the characteristics of PPCP, A multidimensional mechanism to eliminate contaminants is to construct a molecular template layer. After three years of study, we succeeded in capturing concentration and quantification from the actual river water of sulpiride, the final purpose of this study, and completed the research purpose. This result has been confirmed to be effective for compounds such as shellfish poison, saxitoxin, and domoic acid, which have recently been a problem, not only the sulpiride used as a model, and has become a result of the developments.

研究分野：高分子有機化学，分析化学

キーワード：汚染除去材料 HPLC 3D固相 表面修飾 MPC 細胞機能 血液評価 スプレー法

1. 研究開始当初の背景

2010年欧州の学術雑誌「Aquatic Toxicology (Elsevier)」に衝撃的な論文が掲載された。タイトルは「**Anti-depressants make amphipods see the light**」(抗うつ剤がエビを岩陰から出す)というもので、ネットでも話題になった。また、京都大学の田中宏明教授は、2010年日本薬学会の会誌ファルマシアに「抗インフルエンザウイルス剤の河川環境への流出」というタイトルで寄稿され、医薬品や生活関連ケア商品(これらを **Pharmaceuticals and Personal Care Products** の頭文字から PPCP と略する)による環境水汚染が極めて深刻な**水現代病**であると警告を発している。

ダイオキシン類とは異なり、PPCPはその性質上、極めて親水性が高く、環境耐性が高いことが知られており、土壌、底泥などではなく、水中に存在する可能性が極めて高いことが懸念材料の一つとなっている。代表的インフルエンザ薬の**タミフル**は、分子内エステル部位が体内で代謝されてできる有効成分は極めて親水性が高く、体外へ**約7割**が放出され、前述報告によれば、患者数に相関して河川下水末端から検出されている。

さらに深刻なのが、**リレンザ**であり、水酸基、カルボン酸などの親水基を含み、**タミフルよりさらに親水性が高く**、現状、環境水から有効に捕捉する手法が無いのが実情である。市販されているすべての固相抽出剤でも定量的捕捉は困難だとされ、他のPPCPの抗生物質、抗菌剤を含めて、このような超親水性化合物を高回収率で環境水から捕捉し、正当に評価するには、今までに無い**多次元分離メカニズム**を備えた全く新しい固相が必須であることから、本研究を着想し、組み立てるに至った。

報告者は今までに以下の要素成果を個別に得ている。

- ☆新しい概念の分子鑄型による環境汚染物質の選択的捕捉メカニズムの創製
- ☆細胞膜成分を分離場とする固相の開発と親水性化合物に対する分子認識能の検証
- ☆親水性化合物に対する多次元分子認識固相の開発と官能基認識の可能性の検討
- ☆オンライン濃縮を備えた高速液体クロマトグラフィーによる高感度分析の達成

本研究では、これらの成果を一つの固相に層状に組み立て、集積し、計、3次元(3D)の分離メカニズムを機能させることにより、今まで捕捉が不可能とされてきた超親水性PPCPに対して有効な固相を開発し、**水現代病**の現状認識、およびその汚染低減に寄与することを最終目標と設定している。つまり、現状では認識が困難な水環境中のPPCPの正当な評価、分析、汚染の低減という**水現代病**の問題解決に寄与するという使命と意義を

持っている。

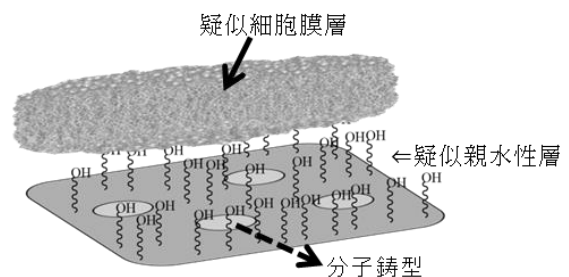
2. 研究の目的

本研究の目的は次に示す3つの個別目的から構成されている。

1. **医薬品および生活関連ケア製品(PPCPと略)を水相から捕捉する疑似細胞膜層を構築する**
2. **捕捉されたPPCPを十分に保持できる疑似親水性相互作用分離層を創出する**
3. **PPCPの特徴を認識し、夾雑物を排除する多次元メカニズム分子鑄型層を構築する**

これらの個別目的の相互の達成により、現状では環境水から捕捉困難で有効な濃縮手法が無いPPCPを疑似細胞膜層により捕捉し、選択的認識・保持濃縮可能な**多次元分子認識メカニズムの3D構築**を目的としている。つまり、本研究は単なる前処理剤の開発ではなく、現状有効な手法が無いPPCPによる汚染、つまり**水現代病**の正確な認識と低減につながる最終目的を有している。

以下に構築を目指す**3D固相**の模式図を示す。



3. 研究の方法

本研究では、下記の4項目について詳細に検討を実施し、**最後に複合化**を行った。

1. **フォスファチジルコリン基外表面修飾層**を持ち、その内部に**親水性有機層**を併せ持つ**疑似細胞膜層**を持つ固相を開発した。
 - ① フォスファチジルコリン基を有するモノマー(MPC)による固相の表面修飾法の開発を行った。
 - ② 上記検討で調製した3種類のMPC修飾固相による水媒体からのモデルPPCPの捕捉実験を行った。
2. **疑似細胞膜層の下層の有機層と親水性固定相の二相間で疑似親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)のメカニズム**で保持することが可能かを詳細に検討した。
 - ① 疑似親水性相互作用クロマトグラフィー環境の構築を行った。
 - ② 擬似的親水性相互作用クロマトグラフィーメカニズム発現の検討を行った。
3. 親水性固定相に**分子鑄型**を形成させ、ターゲット(実験欄に後述)化合物を選択的に捕捉し、親水性夾雑物を排除可能か詳細に

検討した。

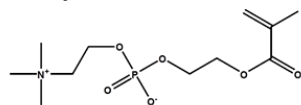
- ① PPCP に対する分子鑄型の構築を官能基間距離固定化法で行った。
 - ② 親水性夾雑物の排除メカニズムの構築を行った。
 - ③ 分子鑄型および疑似細胞膜層との共存についての検討を行った。
4. 得られた**3D 固定相**をオンライン濃縮媒体として用い、**高速液体クロマトグラフ**を用いることで環境水中の超親水性 PPCP を汎用検出器で高感度検出可能か、を詳細に検討する。
- ① オンライン濃縮高速液体クロマトグラフィーによる PPCP の高感度分析に関する検討を行った。
 - ② 得られたデータの発信および汚染低減への試みを行った。

4. 研究成果

以下4つの研究方法に沿って成果を記載する。

1. フォスファチジルコリン基外表面修飾層を持ち、その内部に親水性有機層を併せ持つ疑似細胞膜層を持つ固相の開発

フォスファチジルコリン基を有するモノマーとしては、以下に示す MPC モノマーを用いた。



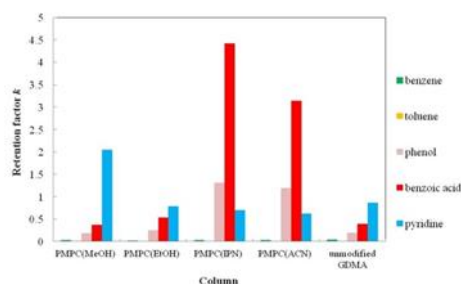
2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)
ホスホリルコリン基を有するモノマー

表面修飾用の溶媒(略号)としてメタノール (MeOH), エタノール (EtOH), 2-プロパノール (IPN), アセトニトリル (MeCN), アセトン (A), およびテトラヒドロフラン (THF)を用いて重合による表面修飾を行った。

その結果、MPC モノマーおよび MPC のポリマーの各溶媒に対する溶解度の違いにより、表面修飾状態が大きく異なることが分かった。基本的に溶解度の低い A および THF においては、多孔性表面を覆い尽くした状態であるのに対して、その他の溶媒では、基材の多孔性を維持しつつ、表面修飾が可能であることが明らかとなった。

興味あることに、この差はイオン性化合物に対する保持選択性の大きな差を生み出した。MPC ポリマーが疎に導入される MeOH 中での修飾では、MPC 中程のリン酸部分の寄与が機能し、塩基性の Pyridine の保持が増大するが、IPN 中での修飾では、MPC 先端部分のアンモニウム基の寄与により、benzoic acid のような酸性物質の保持が増大することが明らかとなった。このことは、簡便な方法

で MPC 導入形態の制御が可能であることを示唆しており、従来にはない成果となった。(下図)

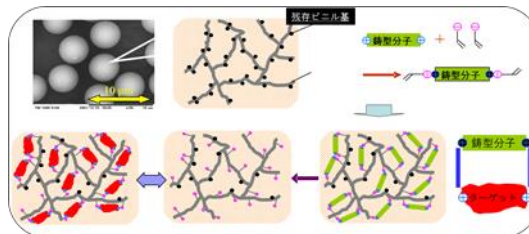


2. 疑似細胞膜層の下層の有機層と親水性固定相の二相間で疑似親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)のメカニズムで保持することの可能性の検討

上記1.における検討では、基材としてグリセンジメタクリレート (GDMA)を用いたが、親水性高分子化合物(河川水の夾雑物となりうる)に対する非特異的吸着が見られた。このため、ポリエチレンオキサイド鎖を含むジメタクリレートモノマー (9G)を用いたところ、水移動相中でも親水性高分子に対する非特異的吸着を示さず、かつ、親水性の低分子化合物に対して水移動相と同等の役割を担うことが明らかとなった。この 9G ポリマーを以下 3. の基材表面に用いることで、固定相に有利な疑似親水性相互作用モードが機能する可能性が得られた。

3. 親水性固定相に分子鑄型を形成させ、ターゲット化合物を選択的に捕捉し、親水性夾雑物の排除の可能性の検討

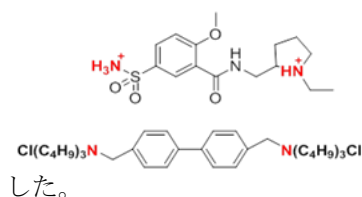
親水性化合物の分子鑄型の形成には、我々が開発した官能基間距離固定化法を用いた。(下図)



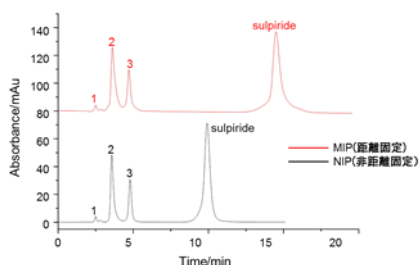
ターゲット(今回は抗うつ剤のスルピリド)の特徴的官能基間の距離と同等の距離を持つ疑似鑄型分子を用いて、その官能基間の距離を基材上に固定化し、疑似鑄型を取り去ることにより、その空間にターゲット分子を捕捉する方法である。

この方法では、本来水中では保持の短いイオン性の化合物であっても、静電的

相互作用により十分な保持を得ることが可能であることが証明されている。ここでは、スルピリド（下図上）の鑄型分子として図のジアンモニウム型の化合物（下図下）を用いて、分子鑄型を作成

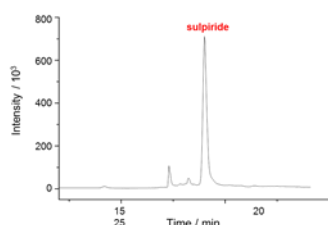


その結果、以下のクロマトグラムに示すように、分子鑄型を形成した固定相において、ターゲットとなるスルピリドの保持のみ長くなることが明かとなり、目的の分子鑄型を得ることに成功した。



4. 得られた 3D 固定相をオンライン濃縮媒体として使い、高速液体クロマトグラフを用いることで環境水中の超親水性 PPCP を汎用検出器での高感度検出の可能性の検討

本固定相をバルブスイッチング HPLC システムに濃縮カラムとしてセットし、京都市南部を流れる西高瀬川の河川水を分析したところ、以下に示すように河川水の中から選択的にスルピリドを捕捉、定量することが可能となった。濃度は概ね 88 ppt と極めて高感度での捕捉が可能となり研究目的を完遂した。



疑似細胞層の導入には、スプレー法も有効であることもあわせて示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. K. Shibata, T. Tanigawa, H. Ito, T. Kubo, and K. Hosoya, Effect of Solvents on the Surface Modification of Hydrophilic Macro-porous Particles with an Ion-exchange Monomer Having Both Anion and Cation Exchange Groups. *CHROMATOGRAPHY*, 37(3), 99 – 104 (2016).
2. T. Kubo, S. Arimura, Y. Tominaga, T. Naito, K. Hosoya, K. Otsuka, Molecularly Imprinted Polymers for Selective Adsorption of Lysozyme and Cytochrome C Using a PEG-Based Hydrogel: Selective Recognition for Different Conformations due to pH Conditions. *Macromolecules*, 48(12), 4081 – 4087 (2015).

[学会発表] (計 5 件)

1. 古川 麻由, 柴田佳那美, 細矢 憲 血球分離膜の開発 第 27 回クロマトグラフィー科学会議 平成 29 年, 京都大学薬学部
2. 柴田佳那美, 古川 麻由, 関 豊光, 細矢 憲 イオン交換基の働きで血液を分ける 第 26 回クロマトグラフィー科学会議 平成 28 年, 慶應義塾大学
3. 谷川 哲也, 上本 英雄, 永田 智浩, 細矢 憲 マイクロ球状粒子のクロマトグラフィー特性基礎検討 第 27 回クロマトグラフィー科学会議, 平成 28 年, 慶應義塾大学, (最優秀発表賞受賞)
4. 柴田佳那美, 関 豊光, 伊藤晴香, 細矢 憲 イオン交換基の“働き方”を制御する 第 26 回クロマトグラフィー科学会議, 平成 27 年, 九州大学 (最優秀発表賞受賞)
5. 氏松 蓮, 大隅 絢加, 塚本 聖花, 細矢 憲 均一粒子を基とするイオン交換基の導入方法と簡易判定法の開発 第 22 回クロマトグラフィーシンポジウム, 平成 27 年 5 月 29 日~30 日, 近畿大学

[図書] (計 1 件)

1. 久保拓也, 細矢 憲 (共著) 化学の基本シリーズ ②

有機化学 (1 - 153) 2017 年, 化学
同人 (京都)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: H b A 1 c 測定用流路構造体およびこれ
を備える H b A 1 c 測定装置

発明者: 田口 好弘, 酒井 修, 鮫島 健一
郎, 伊藤 淳子, 細矢 憲, 谷川 哲也, 水
口 博義

権利者: (株) アルプス電気, (株) 京都モノ
テック

種類: 特許

番号: 16-00246

出願年: 平成 28 年

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室 HP

[http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/poly
_mat_design/index.html](http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/poly_mat_design/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細矢 憲 (Hosoya, Ken)

京都府立大学・生命環境科学研究科・
教授

研究者番号: 00209248