

平成22年3月18日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390013
 研究課題名（和文） 中国伝承薬および薬草からの創薬シードのスクリーニング法の開発とその応用
 研究課題名（英文） Development and application of high-throughput screening method for drug-seeds discovery in Chinese traditional medicines
 研究代表者
 萩中 淳（HAGINAKA JUN）
 武庫川女子大学・薬学部・教授
 研究者番号：20164759

研究成果の概要（和文）：抗体は、抗原を認識して結合する働きを持っている。分子インプリントポリマーは、目的物質を特異的に認識して結合できる、人工的に作られた抗体（人工抗体）である。そこで、本研究では、中国伝承薬および薬草から活性成分およびその関連物質を特異的に抽出するための人工抗体の作製を検討した。その結果、苦参中に含まれる活性物質であるマトリンおよびオキシマトリンとそれらの関連物質、ウコンの主要成分であるクルクミンとそれら関連物質の特異的抽出に成功した。

研究成果の概要（英文）：An antibody can specifically recognize an antigen. A molecularly imprinted polymer, which is a synthetic antibody (artificial antibody), can specifically recognize a target compound, too. In this study, artificial antibodies for matrine and oxymatrine have been prepared to extract matrine, oxymatrine and their structurally related compound(s) in Chinese traditional medicines (TCMs). Furthermore, an artificial antibody for curcumin has been prepared to extract curcumin and its structurally related compound(s) in TCMs. The obtained results indicate that these antibodies work very well for specific extraction of the target compounds in TCMs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分子インプリントポリマー、中国伝承薬、創薬シード、ハイスループットスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

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

分子に対する特異的認識部位を得る方法である。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 MIP は塊状重合法により調製されるため、(1) 重合後、粉碎・分級する必要がある、(2) 得られたポリマーはサイズおよび形状が不均一なポリマーである、(3) 非水系での認識能は優れているが、水系での認識能は劣るなどの欠点を有していた。球状で、粒子径の均一な MIP、水系で優れた認識能を持つ MIP の調製法を開発することは、高性能、高機能な MIP を得るために有用である。そこで、我々は多段階膨潤重合法により粒子径単分散の MIP を調製する方法を開発した。一方、多段階膨潤重合法では、比較的疎水性の化合物に対する MIP の調製が可能であったが、親水性の化合物に対する MIP の調製が難しかった。そこで、親水性の化合物に対しては沈殿重合法により、粒子径単分散の MIP の調製を行ってきた。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の選択的濃縮分析、並びに環境試料中の超微量の物質の濃縮分析に応用できることを明らかにした。

一方、MIP は、レセプターあるいは抗体のように、交差反応性および群特異性をもっている。申請者により調製された 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を見出していた。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 MIP (=人工レセプター、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と水系で優れた分子認識能を発現する MIP の調製法である多段階膨潤重合法あるいは沈殿重合法と組合わせて、MIP の調製を行う。さらに、得られた MIP 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研究の着想を得た。そこで、平成 17~18 年度の萌芽研究 (ドメインインプリント法による医薬品活性体のスクリーニング) を申請した。その結果、エピガロカテキンガレートに対する MIP を用いることにより、丹参中の活性成分である Tanshinone IIA 等の活性成分の探索に成功した。

本研究課題では、中国伝承薬および薬草からの創薬シードのスクリーニング法への MIP の適用：すなわち、水溶性の高い活性成分あるいは微量な活性成分も含めた探索、それらのオンラインでの構造情報の取得、さらにはオフラインでの構造決定を行うシステムの開発をめざす。

国外では、比較的脂溶性が高く、大量に存在する活性成分を中国伝承薬中より抽出する試みが行われている。しかし、水溶液中でレセプター様分子認識能を示す系を確立し

た報告はなく、それ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した例はない。また、国内では、MIP の群特異性を利用し、漢方薬あるいは薬草中の活性成分のスクリーニングを行った報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 水系でレセプター様分子認識能を示す MIP の調製法を開発する、(2) 開発した調製法を医薬品の薬理活性部位に対する MIP の調製に適用する、(3) 得られた MIP を中国伝承薬および薬草中の活性体 (=創薬シード) のハイスループットスクリーニングに適用する、(4) オンラインで活性体の構造情報の取得、あるいはオフラインで新規活性体の構造決定を行う、(5) *in vitro* での薬理活性の評価を行い、創薬シードを選択することにより、当初の目的を達成することができる。

従来の分子インプリント法では、疎水性の大きなトルエンあるいはクロロホルムなどの有機溶媒を希釈剤として用いて、有機溶媒中で重合が行われていたため、比較的脂溶性の高い化合物の鑄型が合成されている、非水系での認識能は優れているが、水系での認識能が発現しにくいという欠点を有していた。申請者らが開発した多段階膨潤重合法は、水と有機溶媒との混合系での重合であり、沈殿重合法は、極性の高い有機溶媒中での重合であるため、球状で、粒子径の均一である粒子が得られることに加えて、水系で標的分子を認識できることが明らかとなった。種々の薬物に対するレセプターあるいは抗体は、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 MIP の調製を行うために、水系での分子認識が可能で、多段階膨潤重合法あるいは沈殿重合法と、医薬品の部分構造を認識する MIP を調製する方法である、ドメインインプリント法を組合せて、MIP を調製することが本研究の特色であるとともに、独創的な点である。

さらに、得られた MIP を中国伝承薬および薬草より水、あるいは溶媒で活性成分を抽出後、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 (MS) 装置を用いてオンラインで、活性体の構造情報を得る。MIP とノンインプリントポリマー (テンプレート分子を用いないで、重合を行ったポリマー) カラムで、抽出成分の保持を比較し、MIP により保持された成分を活性成分とみなす。活性成分フラクションをさらに、LC カラムで精密分離後、MS で構造情報を得る。既知の活性成分は、ライブラリーサーチあるいは文献検索より決定し、未知の活性成分は、MIP カラムおよび分取カラムを組み合わせるこ

とにより、単離を行い、構造決定を行う。従来は、比較的疎水性の大きな成分および多量に存在する成分に注目して探索が行われていた。しかし、本法では、水溶性の活性成分および微量の活性成分にも注目して探索を行うとともに、オンラインで活性体の構造情報を得、オフラインで未知の活性成分の構造決定を行うことが、本研究の特色であるとともに、独創的な点である。

その結果、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が可能となるとともに、未知の活性成分の構造決定が可能となる。中国伝承薬および薬草中には、多くの活性成分が含まれているが、水溶性の成分および微量成分に関心が払われることはこれまで少なかった。しかし、中国伝承薬および薬草も限りある資源であり、その水溶性の成分および微量成分にも注目し、創薬シードを探索することは意義深いことである。

3. 研究の方法

(1) レセプター様分子認識能を示す MIP の調製法の開発と医薬品の薬理活性部位に対する MIP の調製への適用

ドメインインプリント法を用いて調製した MIP は、群特異性をもち、医薬品の薬理活性部位を特異的に認識する MIP の調製法である。そこで、苦参中に含まれる活性物質であるマトリンおよびオキシマトリン、ウコンの主要成分であるクルクミンの薬理活性部位を選び、インプリントする。しかし、インプリント分子は、上記化合物に限定されるものではなく、種々の医薬品あるいは中国伝承薬中の活性成分等をインプリント分子として、選択可能である。したがって、優れた認識能が得られない場合あるいは群特異性が得られない場合は、適宜インプリント分子を選択する。一方、多段階膨潤重合法および沈殿重合法は、水系での分子認識が可能な MIP 調製法である。そこで、ドメインインプリント法と、①多段階膨潤重合法および②沈殿重合法を組み合わせることにより、MIP の調製を行い、③得られた粒子の親水化を行い、さらに④その調製法の最適化を検討する。

① 多段階膨潤重合法による MIP の調製

多段階膨潤重合法は、比較的疎水性の高い化合物に対する粒子径単分散 MIP を調製するための分子インプリント法であり、以下のように行う。i) 粒子径約 1 μm のポリスチレン種粒子を用いて、膨潤助剤であるジブチルフタレートを加え、一次膨潤を行う。ii) 重合開始剤および希釈剤を加え、二次膨潤を行う。iii) インプリント分子およびそれと相補的に相互作用する機能性モノマー（例えば水素結合、イオン結合、 π - π 相互作用および形状認識性等を発現する官能基を有するモ

ノマー）および架橋剤を加え、膨潤後、重合を行う。iv) テンプレート分子に対して、最適なモノマーの検討、重合条件の検討を行い、効率のよいインプリント効果が発現する調製法を確立する。

② 沈殿重合法による MIP の調製

沈殿重合法は、親水性の化合物に対する粒子径単分散 MIP を調製するための分子インプリント法であり、以下のように行う。i) テンプレート分子、機能性モノマー、架橋剤、重合開始剤をアセトニトリルおよびトルエンの混液に溶解し、ゆっくりと回転させながら重合を行う。ii) i) の調製過程において、分子インプリント効果が得られるかどうか、検討を行う。iii) テンプレート分子に対して最適な機能性モノマーの検討、重合条件の検討を行い、効率のよいインプリント効果が発現する調製法を確立する。

③ MIP の親水化

上記①および②で、インプリントを施した後、グリセリンモノメタクリレートおよびグリセリンジメタクリレートを用いてポリマー粒子表面の親水化を行う。あるいは、上記①あるいは②で、エポキシ基を有するモノマーを用いて、共重合で粒子を調製し、親水化を行う。親水化条件を最適化し、テンプレート分子の非特異的吸着を抑える系を確立する。

④ 調製の最適化

得られた MIP を LC カラムに充填し、その特異性、選択性を LC を用いて評価する。得られた結果を、MIP の調製法の最適化（テンプレート分子、モノマー、架橋剤、重合方法、重合温度、重合時間などの条件についての検討）にフィードバックする。

(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への適用

得られた MIP が中国伝承薬および薬草中の活性体（＝創薬シード）のハイスループットスクリーニングに使用可能か、萩中が予備的に検討する。良好な結果が得られた MIP については、多数の中国伝承薬および薬草中の活性成分のマスキングを、西安交通大学薬学部で賀浪中（研究協力者）が行う。まず、多量に存在する、比較的脂溶性の高い活性成分を中心にスクリーニングを行う。

① 得られた MIP およびノンインプリントポリマー {テンプレート分子を用いないで、重合を行ったポリマー、non-imprinted polymer (NIP)} (コントロールポリマーとして使用) を LC 用カラム (カラム内径、長さは、負荷量により適宜選択する) に充填する。(萩中担当)

② 中国伝承薬 (苦参、ウコンなど) を粉碎し、その一定量を秤量し、水あるいは溶媒を加え、1 時間超音波抽出する。抽出液をメンブランフィルターを用いてろ過し、試料とす

る。

③ 得られた試料を、MIP および NIP カラムに注入する。移動相は、水あるいは緩衝液と有機溶媒（アセトニトリル、メタノールあるいはエタノール）の混液を用いる。活性体は MIP カラムに保持されるために、MIP カラムと NIP カラムで、溶出した成分の保持時間および溶出パターンの比較を行う。MIP カラムで保持の大きなフラクション部分を活性成分とみなす。活性成分フラクション中には、いくつかの活性成分が含まれている可能性があるため、カラムスイッチングにより LC あるいは UPLC（超高压 LC）を用いた逆相分配モードで精密分離後、質量分析（MS）装置を用いてオンラインで活性体の構造情報を得る。ライブラリーサーチあるいは文献検索（それぞれの中国伝承薬および薬草中の活性成分が既知であれば、それらの成分の検索）により、既知の活性成分を特定する。未知の活性成分は、MIP カラムに保持された成分を、さらに分取カラムにより単離を行い、各種機器分析装置を用いてオフラインで構造決定を行う。

4. 研究成果

(1) マトリンおよびオキシマトリンに対する分子インプリントポリマーの調製

苦参中に含まれる活性物質であるマトリンおよびオキシマトリンに注目して、これらの活性物質に対する MIP を沈殿重合法により調製した。テンプレート分子にマトリンあるいはオキシマトリン、機能性モノマーにメタクリル酸、架橋剤にジビニルベンゼン、重合開始剤に AIBN を用い、これらをアセトニトリル/トルエン溶液に溶解した。次に、この溶液をゆっくりと攪拌し、60 °C で 16 時間重合を行った。その結果、粒子径の均一な MIP が得られた。次に、調製した MIP をステンレス製カラムに充填し、その保持能および分子認識能を移動相にリン酸塩緩衝液-アセトニトリル混液を用いて HPLC により評価した。その結果、マトリンに対する MIP は、マトリンおよびその類縁体を苦参中より選択的に抽出できた。一方、オキシマトリンに対する MIP は、オキシマトリンおよびその類縁体を苦参中より選択的に抽出できた。これらの類縁体の構造について検討した結果、マトリンに対する MIP はマトリンおよびマトリンの 13 位に二重結合をもつソフォカルピン、オキシマトリンに対する MIP はオキシマトリンおよびオキシマトリンの 13 位に二重結合をもつソフォカルピン N-オキンドを選択的に抽出できることが分かった。これらの結果は、群特異性をもち、医薬品の薬理活性部位を特異的に認識する MIP の調製法が可能であることを裏付けている。

(2) クルクミンに対する分子インプリント

ポリマーの調製

ウコンの主要成分であるクルクミンに対する MIP を沈殿重合法により調製した。機能性モノマーにメタクリルアミドおよび 4-ビニルピリジン、架橋剤にジビニルベンゼン、重合開始剤に AIBN を用い、これらをアセトニトリル/トルエン溶液に溶解した。次に、この溶液をゆっくりと攪拌し、60 °C で 16 時間重合を行った。その結果、粒子径の均一な MIP が得られた。メタクリルアミドをモノマーとして加えることにより、機能性モノマーとして 4-ビニルピリジンを用いた粒子径の均一な MIP の調製が可能であることを、はじめて明らかにした。また、得られた MIP をウコン中のクルクミンおよびその関連物質の選択的抽出分析に適用したところ、クルクミンおよびその脱メトキシ体の抽出が可能であった。さらに、クルクミンおよびその脱メトキシ体以外の成分もクロマトグラム上に認められたが、これらはクルクミンおよびその脱メトキシ体のケト体であると推定された。

(3) 磁性分子インプリントポリマーの調製

中国伝承薬あるいは生薬成分の抽出の簡略化を目的として、磁性粒子を種粒子として用いて多段階膨潤重合法による MIP (磁性 MIP、M-MIP) の調製を試みた。モデル化合物として、2-アシルプロピオン酸系抗炎症薬である (S)-ナプロキセンを鋳型分子に、機能性モノマーに 4-ビニルピリジンを用いて M-MIP を調製した。得られた M-MIP の (S)-ナプロキセンに対する光学認識能は、種粒子にポリスチレン粒子を用いて重合した MIP とほぼ同等であった。これらの結果から、多段階膨潤重合法を用いて、分子認識能を有する M-MIP の調製が可能であることが明らかとなった。現在、クルクミンに対する M-MIP の調製を行うとともに、ウコン中のクルクミンおよびその脱メトキシ体の抽出への適用を検討中である。

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 10 件)

(1) Yueqi Liu, Kaori Hoshina and Jun Haginaka, Monodispersed, molecularly imprinted polymers for cinchonidine by precipitation polymerization, *Talanta*, 80, 1713-1718 (2010) (査読有)

(2) Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymers as affinity-based separation media for sample preparation, *J. Sep. Sci.*, 32, 1548-1565 (2009) (査読有)

(3) Jun Haginaka and Aya Futagami, Addition of N-carbobenzyloxy-L-tryptophan as a

co-template molecule to molecularly imprinted polymer monoliths for (+)-nilvadipine, J. Chromatogr. A, 1185, 258-262 (2008) (査読有)

(4) Jun Haginaka, Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media, J. Chromatogr. B, 866, 3-13 (2008) (査読有)

(5) Jun Haginaka, Hiromi Tabo, Masaki Ichitani, Takanobu Takihara, Akio Sugimoto and Haruyo Sambe, Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for (-)-epigallocatechin gallate, -epicatechin gallate and -gallocatechin gallate by multi-step swelling and polymerization method, J. Chromatogr. A, 1156, 45-50 (2007) (査読有)

(6) Haruyo Sambe, Kaori Hoshina and Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymers for triazine herbicides prepared by multi-step swelling and polymerization method. Their application to the determination of methylthiotriazine herbicides in river water, J. Chromatogr. A, 1152, 130-137 (2007) (査読有)

[学会発表] (計 22 件)

(1) 船谷典子、(S)-ナプロキセンに対する磁性分子インプリントポリマーの調製と応用、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山

(2) 北島智子、沈殿重合法によるクルクミンおよびナプロキセンに対する分子インプリントポリマーの調製：形状、保持能および分子認識能に対する機能性モノマーの影響、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山

(3) Jun Haginaka, Molecularly Imprinted Polymers for Pharmaceutical and Bioanalytical Applications, 21st International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009 年 10 月 13 日、オランダ、米国

(4) 北島智子、クルクミンに対する分子インプリントポリマーの調製とウコン中のクルクミン関連物質の分析への適用、第 70 回分析化学討論会、2009 年 5 月 16 日、和歌山

(5) Jun Haginaka, Molecularly imprinted polymers as affinity extraction media, 20th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009 年 3 月 2 日、アグラ、インド

(6) 船谷典子、マトリンおよびオキシマトリンに対する分子インプリントポリマーの調製並びに苦参中の主成分の選択的分取への適用、日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 10 日、博多

(7) Jun Haginaka, Monodispersed,

molecularly imprinted polymers for pharmaceutical, biomedical and environmental analysis, 5th International Workshop on Molecularly Imprinted Polymers, 2008 年 9 月 8 日、神戸

(8) 船谷典子、マトリンに対する分子インプリントポリマーの調製および苦参中のマトリンの選択的分取への適用、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 28 日、横浜

(9) Yueqi Liu, Preparation of monodispersed, molecularly imprinted polymers for cinchonidine by precipitation polymerization, 第 18 回クロマトグラフィー科学会、2007 年 11 月 8 日、函館

(10) Jun Haginaka, Uniformly-sized molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatographic media, 30th International Symposium on Capillary Chromatography, 2007 年 6 月 6 日、大連、中国

[図書] (計 1 件)

(1) 萩中 淳、化学同人、新しい地平をひらく分析手法の最前線、2009、52-57

[その他]

ホ ー ム ペ ー ジ :

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~bunseki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩中 淳 (HAGINAKA JUN)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20164759

(2) 研究協力者

賀 浪中 (HE LANGCHONG)

西安交通大学・医学部・教授