

表面プラズモン共鳴法を用いた
抗菌薬の脂質膜親和性評価系構築に関する研究

2013

生化学

岡 雅子

表面プラズモン共鳴法を用いた
抗菌薬の脂質膜親和性評価系構築に関する研究

目次

目次	i
略語表	iii
序論	1
本論	13
第1章 表面プラズモン共鳴法を用いた Amphotericin B 及びその他の抗菌薬の モデル脂質膜親和性評価系の構築	
緒言	13
第1節 表面プラズモン共鳴法を用いた Amphotericin B とモデル脂質膜親和性評価系の 構築	
第1項 実験材料及び方法	
1.1 試薬及び溶媒	17
1.2 測定装置	18
1.3 リポソームの調製	18
1.4 リポソームの固定化	19
1.5 AmB と脂質膜の相互作用測定	19
1.6 データ解析	20
第2項 結果	
2.1 L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の最適化	22
2.2 AmB とモデル脂質膜の相互作用	26
2.3 治療領域の血漿中 AmB 濃度付近における脂質膜相互作用の変化	30
第3項 考察	32
第4項 小括	36
第2節 表面プラズモン共鳴法を用いた Amphotericin B とモデル脂質膜親和性評価系の 他剤への応用	
第1項 実験材料及び方法	
1.1 試薬及び溶媒	37
1.2 測定装置	38

1.3	リポソームの調製	38
1.4	リポソームの固定化	38
1.5	抗菌薬と脂質膜の相互作用測定	39
1.6	データ解析	39
第2項 結果		
2.1	L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の確認	40
2.2	抗菌薬とモデル脂質膜の相互作用	41
第3項 考察		
第4項 小括		

第2章 表面プラズモン共鳴法を用いた Fungizone の脂質膜親和性評価系の構築

第1項 緒言			50
第2項 実験材料及び方法			
2.1	試薬及び溶媒	52	
2.2	測定装置	52	
2.3	リポソームの調製	53	
2.4	リポソームの固定化	53	
2.5	Fungizone と脂質膜の相互作用測定	53	
2.6	データ解析	54	
第3項 結果			
3.1	L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の最適化	56	
3.2	Fungizone と脂質膜の相互作用	58	
3.3	医薬品添加物の脂質膜相互作用に対する作用と Fungizone と脂質膜の相互作用における測定温度の影響	62	
第4項 考察			69
第4項 小括			72
総括			73
謝辞			76
参考文献			77

略語表

AmB	Amphotericin B
CHAPS	3-[(3-cholamidpropyl)-dimethylammonio]propanesulfonate
CM	carboxymethyl
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HBS-N	0.01 mol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH7.4, 0.15 mol/L sodium chloride
HCl	hydrochloric acid
IFC	integrated fluidic cartridge
IPA	2-propanol
K_A	equilibrium affinity constant (for "Steady state affinity model")
K_D	equilibrium dissociation constant
K	affinity constant (for "Two-state reaction model")
k_a	association rate constant
k_d	dissociation rate constant
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PBS	phosphate buffered saline
PC	phosphatidyl choline
PE	phosphatidyl ethanolamine
PI	phosphatidylinositol
POPC	1-parmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPE	1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidyl-ethanolamine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidyl-glycerol
PS	phosphatidylserine
RSD	relative standard deviation
RU	response unit
SD	standard deviation
SM	sphingomyelin
SP	sphingophospholipid
SPR	surface plasmon resonance

序論

脂質は生体膜成分，エネルギー源，シグナル分子という3つの重要な機能を果たし，生命の起源といっても過言ではない．アメーバなどの単細胞から， 10^{13} 個の多細胞からなるヒトに至るまであらゆる生命体にとって，細胞は必須であり，細胞膜をつくる主成分が脂質であることは周知の事実である¹⁾．細胞膜に囲まれ，水などを容易に通過させない独自の環境をつくることで，生命は誕生し，また，効率の良いエネルギー産生やDNA複製，タンパク合成を可能とした．生体膜を形成するために脂質が使われたのは，多くの脂質が持つ両親媒性の化学的な特徴によるためと考えられる．生体膜では個々の脂質分子は水溶性部分を両側に，脂溶性部分を内側に置く二重膜構造が熱力学的に最

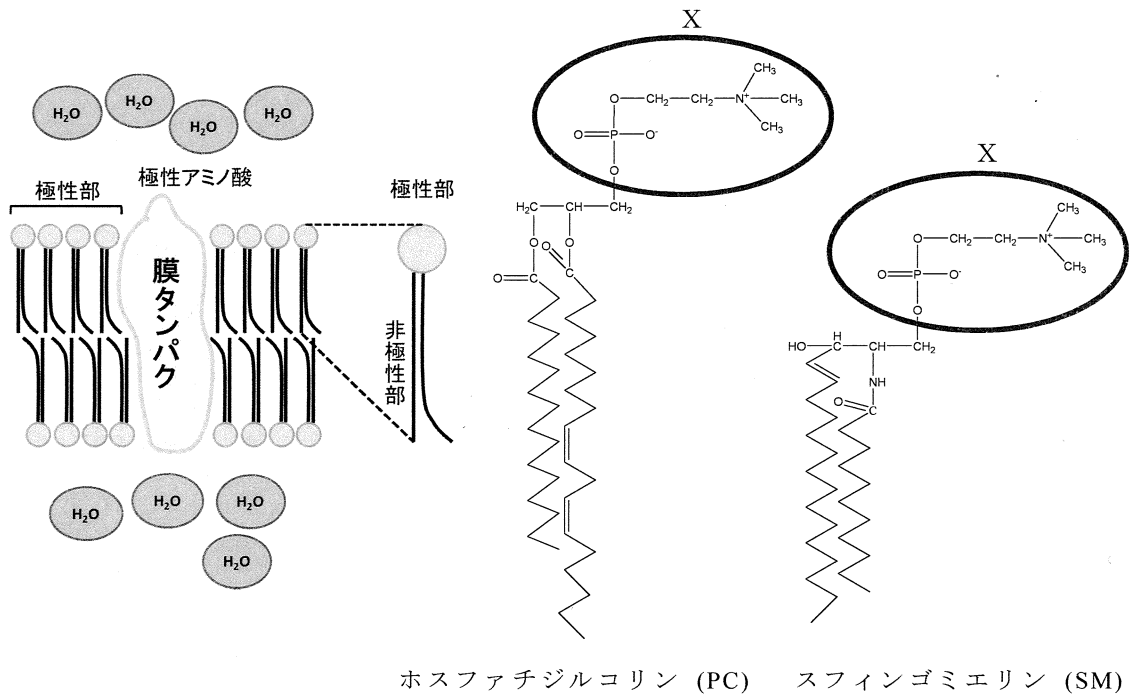


図1. 脂質分子の両親媒性と生体膜の組成(脂質二重膜構造)¹⁾

大きな溶液中で，固有の環境をつくるには水などを通さない膜が必要であり，生物はその大部分を脂質のもつ両親媒性を利用した．脂質分子(スフィンゴ脂質やグリセロ脂質)は図に示すような疎水性部分と親水性部分(極性基X)をもっている．X部分に水溶性の糖がつくと，スフィンゴ糖脂質(グルコシルセラミドなど)，グリセロ糖脂質(ガラキシルグリセリド)となる．あるいは，図示したようにリン酸基を挟んで，極性基がつくとスフィンゴミエリンやホスファチジルコリンなどとなる．

も安定した構造であり，これを脂質二重膜と呼ぶ．図 1 には脂質二重膜の模式図を示した．

脂質二重膜構成成分は，細胞膜の外側と内側でリン脂質種の分布が異なることがわかっている (図 2)¹⁾．細胞質側にはホスファチジルエタノールアミン，ホスファチジルセリンが多く，細胞の外側にはホスファチジルコリンやスフィンゴリン脂質が多く存在している．これは，小胞体膜に存在しているときにつくり上げられた非対称性によるものであり，細胞質側のホスファチジルセリンや高度にリン酸化されたイノシトールは細胞質タンパクとの会合に，細胞の外側に多く存在しているスフィンゴ脂質はラフト形成やシグナル伝達に重要な役割を果たしている．

また，創薬研究において薬物動態の分野では消化管からの薬物吸収や薬物の血液からの組織移行性において薬物の脂質二重膜との親和性

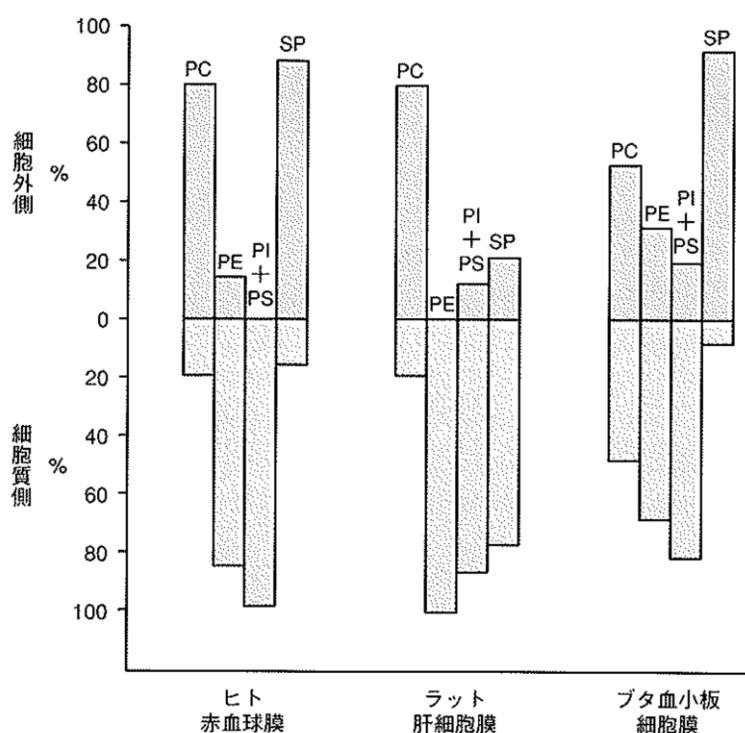


図 2. 細胞膜グリセロリン脂質の内外の非対称性¹⁾
 赤血球，肝細胞，血小板などで内側（細胞質側）と外側（細胞外側）では非対称性が保たれている．PC: ホスファチジルコリン，PE: ホスファチジルエタノールアミン，PI: ホスファチジルイノシトール，PS: ホスファチジルセリン，SP: スフィンゴリン脂質．

が大きく関与すると考えられ、創薬研究早期の段階では、薬物の脂溶性などの物性情報が薬物の脂質膜透過性の指標として利用されているのが現状である。しかしながら、薬物の体内動態は、必ずしも物性情報の理論通りの挙動を示すわけではなく、脂溶性が高く脂質膜透過性が高いことが予測される物性を持つ薬物であっても消化管吸収率が低かったり、またはその逆で、脂溶性が低く脂質膜透過性が低いと予測される薬物であっても消化管吸収率が良好なものもある。したがって、薬物動態の分野において、より創薬研究早期の段階で薬物の体内動態を反映させたデータを *in vitro* 評価系で得ることは非常に有用であり、*in vitro* 評価系で薬物の体内動態を反映させたデータを取得するためには、脂質二重膜の内側成分と外側成分それぞれと薬物の親和性を評価することも一つの有用な情報となり得ると考えられる。以上のように、脂質の研究は、単細胞生物から多細胞生物まで、分子生物学のような基礎的な分野から生理学や薬理・薬剤学、薬物動態学などの創薬研究分野に至るまで、多岐にわたって必要不可欠である。

カビ、キノコや酵母に代表される一群の微生物は、生物分類学上、真菌とよばれる生物群にまとめられる。すべての真菌は動・植物と同じ真核生物に共通する細胞学的特徴を備えており、細胞膜と細胞壁に顕著な特徴を有する。真菌細胞の基本的構造の特色を細菌と比較し、表 1 に示した。真核生物としての真菌は原核生物の細菌と異なり、細胞質内にはミトコンドリアや小胞体といった細胞小器官を持つ。さらに、細胞膜及び細胞壁は、いずれも真菌特有の成分によって構成されており、細胞膜では脂質成分としてのエルゴステロールが、細胞壁ではキチンや β -グルカンといった各種多糖の存在が特徴的である²⁾。また、一部の酵母は、細胞壁の外側に特異的なヘテロ多糖からなる莢膜をもつ。細胞壁や莢膜は真菌細胞の最外部分をなす構造であり、外部環境及び宿主細胞と直接接触することから、外来性の様々な刺激やストレスに対する受容体ほか、宿主細胞との相互作用や免疫応答に関与する分子を含み、真菌の生理学的状態の制御と環境への適応に、また宿主との相互作用にも重要な役割を果たす。

真核生物としての特徴をもつ真菌には多数の菌種が存在し、現在知られているだけでも7万以上にのぼるが、未知の菌種が多数存在することが予想され、その菌種の総数は150万にもおよぶと報告されている²⁾。これらの真菌の大部分は土壌中、水中、空気中をはじめ自然環境内に広く生息し、周囲の有機物・無機物を栄養源として繁殖することで、自然界における有機物分解者として物質循環と環境保全に重要な役割を果たしている。また、古くから真菌の発酵能力を利用して、アルコール飲料、パン、チーズ、味噌、醤油など多種多様な食品が作られており、近年では真菌を使ってビタミン、酵素、ステロイド剤、抗生物質、その他有用な化学物質の生産が行われている。さらに、真菌の遺伝子組換え体は、ワクチン、ホルモン、サイトカインといった高分子医薬品の製造にも利用され、真菌の活用の方がさらに広がっている。

このように私たちの生活と関わりの深い真菌であるが、一方で、真菌による有害な影響も無視できず、植物や栽培作物に寄生して病害をもたらす真菌は8000種を超すといわれ、真菌の繁殖が食品の変質・腐

表 1. 真菌と最近の細胞学的特徴の比較

	真菌	細菌
細胞小器官の形成：		
ミトコンドリア	+	-
小胞体	+	-
液胞（リソソーム）	+	-
ゴルジ囊	+	-
微小官系	+	-
リボソームのタイプ	80S (60S + 40S)	70S (50S + 30S)
細胞膜中のステロールの存在	+	-
細胞壁骨格物質の種類	キチン, β-グルカン*	ペプチドグ リカン

*接合菌のみは、キチンの代わりにキトサンを含み、また β-グルカンをほとんど含まない。

敗や建造物，日用品，産業製品などの劣化を引き起こすこともある．また，ヒトの健康に対する直接的な悪影響として，環境中に生息する真菌がアレルギー性鼻炎や気管支喘息などのアレルギー疾患を引き起こすことがよく知られている．しかし，注目すべき大きな問題は，一部の真菌がヒトに寄生・定着し，ときに組織内に侵入して原発性感染や続発性感染（日和見感染）を引き起こすことである．これは，深在性真菌症と言われる重篤な感染症であり，その大部分はいったん発症すると致命的な転帰をたどることが少なくない．通常みられる真菌症は，その大半が比較的病態の軽い表在性疾患（例えば水虫など）であったが，医療の進歩とともにがん患者や移植患者など免疫機能の低下した患者の人口が増加し，このような深在性真菌症の問題が顕著化され深刻な問題となっている．近年では，病原真菌や真菌症の理解が格段に進み，診断法や治療薬についても多くの研究がなされ成果が報告されている．これは著者らの所属する研究所においても例外ではなく，古くから感染症に関する研究が盛んに行われてきたが，真菌症，特に深在性真菌症の制圧にはほど遠いのが現状である．

一つの新薬を創り上げ，上市するまでには約 10 年かかるといわれているが，より良い薬をより早く患者さんにお届けしたいという思いから，近年，製薬企業において創薬研究開発のスピードアップと成功率の向上が重要な課題となっている．これらの課題を解決するためには，ハイスループットなスクリーニングによって，より早期の段階で多角的に各化合物の性質を捉え，数多くの化合物の中から新薬にできる開発候補化合物を選び出さなければならない．つまり，ある疾患の治療薬を創り出すには，その疾患のメカニズムを把握し，治療の鍵を握る標的分子を明らかにした上で，その分子に特異的かつ効果的に作用する化合物を合成，選定していくことが最も有用なアプローチであると考えられている．

生命活動において，生体分子は単独で機能することはなく，特定の相手分子と相互作用することによりその機能を発揮する．生命活動のメカニズムを紐解くには，生体分子間の相互作用を詳細に分析するこ

とが不可欠である。これまでに分子間相互作用の評価法として、**Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)** など様々な測定法が開発されてきた。しかし、これらの相互作用測定法は静的な状態の相互作用のみを測定するものであり、測定結果から得られる相互作用情報は、相互作用する分子が平衡状態に達した時点のものであった。1990年代になると表面プラズモン共鳴 (**surface plasmon resonance**, 以下 **SPR** と略す) という現象を利用した新たな装置の登場により、分子間相互作用の静的な状態の評価に加え、分子の結合の速さ、分子の結合により形成された複合体の安定性、複合体からの分子の解離の速さといった動的な情報、すなわち、反応速度論的な情報の提供が可能になった。このことにより、近年、**SPR** を利用した分子間相互作用解析は分子生物学や生化学などの基礎的な領域 (例えば糖鎖-タンパク質³⁾ やタンパク質-タンパク質⁴⁾ の相互作用など) から創薬・製剤などの製薬領域 (例えば新薬候補化合物-薬効標的分子や新薬候補化合物-毒性発現原因分子の相互作用など) に至るまで多岐にわたって生体内で起こる分子間相互作用を詳細に説明できる有用なツールのひとつとして広く用いられている。

1990年に **Pharmacia Biosensor** 社によって発売された **Biacore** は **SPR** を測定原理として、生体内分子の分子間相互作用を蛍光などのラベル標識なしでリアルタイムに検出できる分析装置である。**Biacore** を用いて分子間相互作用を測定するには、相互作用測定対象となる一方の分子をセンサーチップと呼ばれる基盤に固定化し、これに作用する分子を含むサンプルを固定化表面に送液する。このときセンサーチップの表面で起こる分子間の結合・解離に依存する微量の質量変化を **SPR** シグナルとして検出し、経時的にセンサーグラムと呼ぶグラフとしてモニターする。前述したように分子間の相互作用に関して、平衡状態における2分子間のアフィニティー (解離定数 K_D あるいは親和定数 K_A) だけでなく、結合・解離の速さ (結合速度定数 k_a , 解離速度定数 k_d) を得ることができるのが **Biacore** の大きな特徴である。

Biacore は大きく分けて **SPR** システム、マイクロ流路系 (**IFC**) 及び

センサーチップより構成される⁴⁾。また、**Biacore**ではセンサーチップに固定化する分子を「リガンド」、送液系を介してセンサーチップ表面に注入する分子を「アナライト」と呼ぶ。センサーチップは分子が相互作用を起こす場であり、その相互作用によって起こる質量変化を **SPR** シグナルに変換するシグナルトランスデューサーである。

SPR を発生させるためには、金や銀などの金属が必要であるが、**Biacore**では化学的不活性、**SPR** シグナルの発生効率のよさなどを考慮して金を採用している。また、センサーチップにはいくつかの種類があり、リガンドの固定化方法や測定サンプルによって適したものを選択する。**SPR** システムは、図 3 に示すようにセンサーチップのガラス面から偏光を当て、反対側の金膜上で起こる相互作用によって発生する **SPR** を利用して検出する。光源、センサーチップ、検出部位のすべてが固定されており、光学測定部分に駆動部がない構造とすることで、高精度のデータを得ることを可能にしている。光源として発光ダイオードを用い、波長 760 nm の偏光をプリズムでくさび形に集光して、全反射の条件下でセンサーチップに照射する。プリズムの下には、オプトインターフェースを介してセンサーチップを装着する。センサーチップのガラスと金膜の境界面で全反射するように光を照射すると、金膜側にエバネッセント波と呼ばれるエネルギー波が生じる。このエバネッセント波は、金膜の自由電子と相互作用を起こし、プラズモンと呼ばれる電子密度波が発生する。この際、反射光の一部の強度が減衰し、これを反射光の強度を固定化したダイオードアレイでモニターすると図 3 A (a) 中、I に示すように反射光強度が減衰した部位が認められる。これを「光の谷」と呼ぶ。反射光の消失角度 (**SPR** 角度) は金膜表面近傍の媒質の屈折率に依存して変動する。**Biacore**はこの現象を利用して、2 分子間の結合・解離を測定する。屈折率の変化に応じて、「光の谷」は図 3 B (c)中、I から II へと移動する。この「光の谷」の移動度の経時変化をセンサーグラムと呼ぶグラフに変換することで、分子間の相互作用をリアルタイムにモニターできる。「光の谷」の移動度を表す単位として、**SPR** 角度の 0.1 度の変化を 1000 レゾナンスユニ

ット (RU) と定義された。放射性同位体で標識したタンパク質を利用して、SPR シグナルとセンサーチップ表面でのタンパク質濃度の相関を調べた実験により、1000 RU はセンサーチップ表面でのタンパク質の 1 ng/mm^2 の質量変化に相当することが確認されている。この値はタンパク質の種類にかかわらずほぼ一定である。

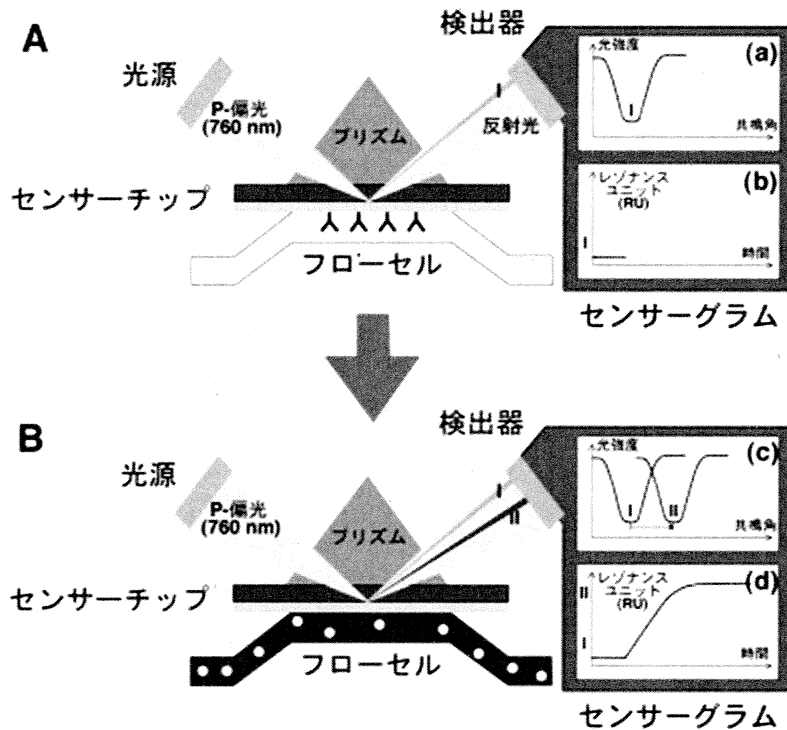


図 3. SPR システムの原理⁵⁾

SPR システムは図に示すようにセンサーチップの上部にプリズム、下部にフローセルが設置されており、760 nm の P-偏光をプリズムを通してセンサーチップに照射する。センサーチップには金膜部があり、この金膜部で P-偏光を反射させ、その反射光の共鳴角及び光強度を検出する。フローセルに緩衝液のみを流している場合、検出した光強度を縦軸に、共鳴角を横軸にプロットすると (a) に示すような曲線 I を得る。曲線の最小値を算出し、時間に対してプロットするとセンサーグラム (b) が得られる。フローセルに試料を流し同様に検出すると、センサーチップ上に固定したリガンドと試料として加えたアナライトの間に相互作用が観察され、センサーチップ上の P-偏光の反射光の共鳴角が変化し、図(c) に示すように、曲線 I は曲線 II の位置へシフトする。このように反射光 I の光強度の最小値と反射光 II の光強度の最小値で観察される共鳴角の差を時間に対してプロットしたセンサーグラムを作成すると、センサーグラム (d) のようになる。反射光 I で検出された共鳴角は、(d) のセンサーグラムではベースラインとなり、反射光 II の共鳴角へ変化することでセンサーグラムの曲線は立ち上がり、やがてプラトーに達する。このときベースラインとプラトーに達した時点でのレスポンスの差を、アナライトの結合量と見なすことができる。さらにこの曲線は、センサーチップに固定したリガンドとフローセルに添加したアナライトが高親和性であれば、曲線の立ち上がりが急激になり、低親和性であれば曲線の立ち上がりは緩和になる。

以上に記述したように、SPR を測定検出原理とする Biacore で得られるシグナルは、センサーチップ表面の溶媒の屈折率の変化を反映している。すなわち、SPR シグナルレスポンスの変化は、リガンドとアナライトの相互作用に伴う屈折率変化に伴うシグナルと、溶媒そのものの屈折率をもたらすシグナルの総和である。後者は、「バルク効果 (または、溶液効果)」と呼ばれ、溶液中のタンパク質濃度、塩濃度によって変化する。したがって、リガンドとアナライトとの相互作用に伴うシグナル変化の検出には、コントロールをおくことによって溶液効果を差し引くのが一般的である。

図 4 にセンサーグラムの例を示す。リガンドを固定化したセンサーチップ表面にアナライトを注入すると、特異的結合反応に伴うシグナル上昇が起こる。あらかじめ設定された時間にアナライトが注入された後、自動的にランニング緩衝液へ切り替わる。送液がランニング緩衝液に切り替わることでアナライトの供給が瞬時になくなり、リガンドと結合したアナライトの解離が観察され、解離に伴うシグナルの低下が起こる。引き続き、酸やアルカリ溶液、塩溶液などを添加して残っているアナライトを溶出することで、センサーチップ表面を元のリ

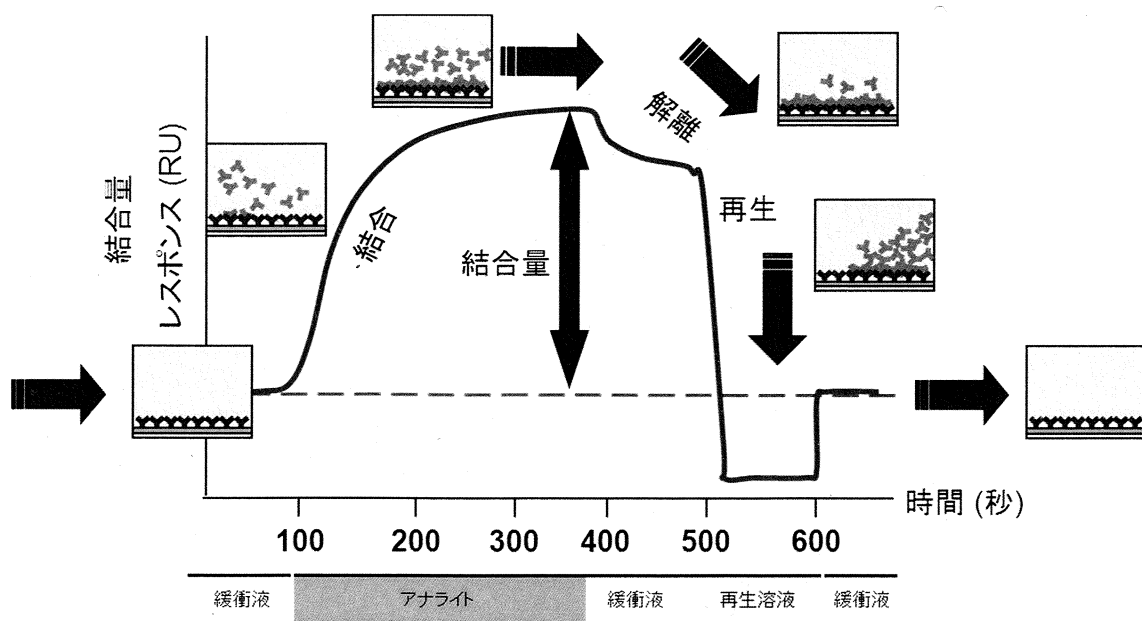


図 4. センサーグラム

リガンド表面に再生する。これが 1 サイクルの測定である。再生したリガンド表面は、繰り返しアナライトを添加することができ、リガンド固定化表面の寿命は、リガンドの安定性や再生条件によって異なるが、数十～数百回の繰り返し測定が可能である。近年、**Biacore** を用いた分子間相互作用解析によりセンサーチップ上に固定化したモデル脂質膜と様々な分子の親和性評価系が構築されている⁶⁻¹²⁾。

Biacore を用いた測定法は、ランニング緩衝液や再生溶液、洗浄溶液さえ決定できれば、その後の測定は操作も簡便であり、得られる測定データの精度も良好である。しかしながら、測定データの解析は **Biacore** を用いた実験操作ほど簡単ではなく、解析に用いる解析モデルが適当なものであるかどうか注意が必要である。**Biacore** により得られた測定データは解析用ソフトウェア **BIA evaluation** を用いて解析するが、このソフトウェアには様々な解析モデルがあり、測定した分子間相互作用の結合様式によって適切な解析モデルを選択しなければならない。測定により得られたセンサーグラムの形状からもある程度の結合様式は推測可能であるが、基本的には解明されているもしくは仮説が立てられている分子間相互作用の結合様式に従って使用する解析モデルを決定する。**Biacore** を用いた脂質膜親和性評価において、これまでに報告されている評価法ではその目的に応じて様々な組成の脂質膜と分子の相互作用を解析しているが、著者らは主に抗菌性ペプチドと脂質膜親和性評価系の相互作用データ解析に着目した。抗菌性ペプチドと脂質膜の相互作用は、**Two-state reaction model** と呼ばれる結合様式で結合していることが知られている¹³⁾。図 5 には **Two-state reaction model** の結合様式例を示した。図示したように、ペプチド類は脂質膜表面の極性基部分と静電的相互作用 (**Step 1**) により結合した後、脂質膜内部のアルキル鎖で構成される疎水性領域に侵入し、疎水性相互作用により結合する (**Step 2**) ことによりポアを形成する。このように 2 種類の親和性を利用して段階的に相互作用することによって構造を変化させる結合様式を **Two-state reaction model** といい、この **Two-state reaction model** の結合様式を持つ相互作用を反応速度論的に解析でき

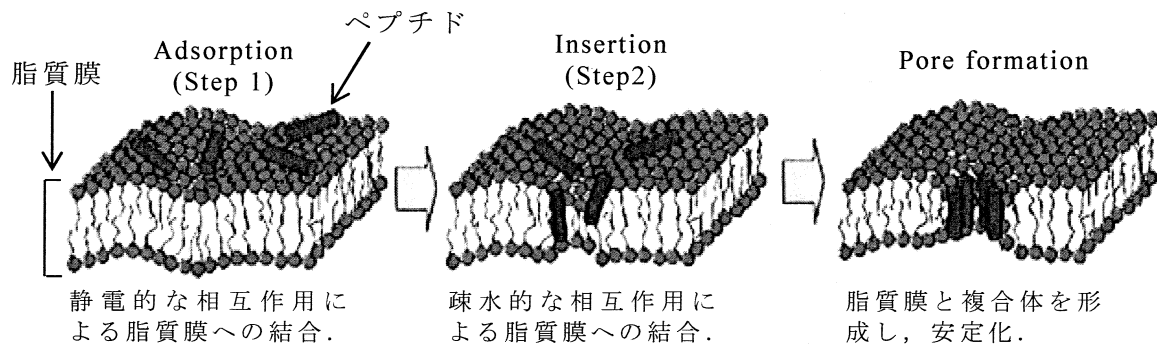


図 5. ペプチド類の脂質膜相互作用の結合様式例¹⁴⁾
(Two-state reaction model)

BIA evaluation ソフトウェアの Two-state reaction model (conformation change) モードである。抗菌性ペプチドと脂質膜の相互作用を BIA evaluation ソフト Two-state reaction model (conformation change) で解析することにより、Step 1, Step 2 それぞれの相互作用における反応速度論的パラメーター (結合定数及び解離定数, 親和定数) を算出することができ、全体的な親和性 (複合体形成後の平衡状態での相互作用) に加えて、各段階における相互作用の詳細を解析した結果を得ることが可能である。

今回の研究では、創薬開発研究分野の中でも主に、感染症領域に重点を置き、分子間相互作用解析装置 Biacore を用いて、第 1 章第 1 節では代表的な抗真菌薬であり、Two-state reaction model により脂質膜と相互作用していると作用機序の仮説が立てられている Amphotericin B (AmB) と真菌の細胞膜モデル及びヒト細胞膜モデルの脂質膜親和性の迅速かつ良好な再現性を持つ評価系を構築した。Biacore を用いた AmB の脂質膜親和性評価系に関してはこれまでも報告されていたが¹⁵⁾、それらの評価法の欠点である創薬研究において実用的に利用することのできないスループットの低さと再現性の悪さの改良を目指した。第 2 節では、第 1 節において構築した抗真菌薬とモデル脂質膜親和性評価系を基に、抗菌薬とモデル脂質膜との親和性評価への応用を試みた。ここでは、マクロライド系抗生物質であるエリスロマイシン、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus, MRSA) に対して高い抗菌活性を持つムピロシン, 結核治療薬である抗生物質 D-シクロセリンの 3 種類の薬物を評価対象として用い, 得られた結果より薬効作用機序のみならず, 薬物体内動態データとの相関についても考察した. また, 第 2 章では, 第 1 章第 1 節で構築した評価系を応用して AmB を製剤化した医薬品 Fungizone のモデル脂質膜親和性評価系を構築した. この評価系においては, 測定温度の変化による Fungizone-脂質膜相互作用への影響やアナライトとして医薬品を用いるため医薬品添加物の脂質膜に対する親和性の有無及び医薬品添加物存在下での Fungizone-脂質膜相互作用変化を調べ, SPR を用いた評価系により得られたデータと Fungizone のもつ薬効及び毒性発現との関係について考察した.

本論

第1章 表面プラズモン共鳴法を用いた Amphotericin B 及びその他の抗真菌薬のモデル脂質膜親和性評価系の構築

緒言

Amphotericin B (AmB) は *Streptomyces nodosus* 由来のポリエンマクロライド系抗真菌薬であり，多くの全身性真菌感染症患者または免疫不全患者や移植患者，がん患者のような重篤な疾患に罹患している人々の生命を脅かす“深在性真菌症”に対する臨床治療薬のゴールドスタンダードとして知られている¹⁶⁾．AmB は 50 年もの長きにわたり使用され続けてきたにも関わらず，その耐性菌の出現はいまだに稀であり，AmB 耐性獲得が起こりにくい理由として，AmB と真菌細胞膜との相互作用が複合的であり，膜傷害を引き起こすには複数の変化を必要とすることや真菌の AmB 感受性を低下させるような膜変化は真菌自身の毒性力も低下させることなどが考えられている．このように優れた薬効を持った AmB ではあるが，臨床使用においては，投与経路が点滴による静脈内投与に限られるため，治療には入院治療が必須とされることや安全性面においても問題があり，腎毒性などの重篤な副作用を伴うことが報告されており¹⁷⁻¹⁹⁾，現在，より簡便な治療法で副作用を軽減した新たな抗真菌薬の開発が求められている．

AmB は疎水性が高く，両親媒性で水に難溶な分子であり，AmB の医薬品への製剤化は非常に困難とされている¹⁹⁾．図 6 には AmB の化学構造式を示した．これまでにも，AmB 骨格を基盤とした新たな医薬品の製剤化方法が多数検討されてきたが，未だ経口投与による全身性真菌症治療が可能な AmB 製剤は開発されていない．また，薬効作用機序において，AmB の抗真菌活性は AmB が脂質二重膜にイオンチャネル様のポアを形成することにより細胞膜に脱分極が起こり， H^+ ， K^+ などの 1 価カチオン，その他の細胞内成分に対する透過性の亢進が引

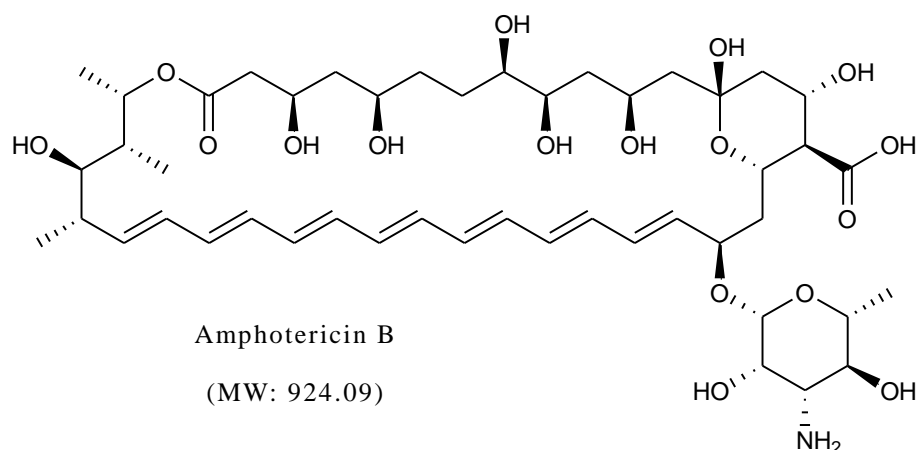


図 6. Amphotericin B の化学構造式

き起こされ，それによる膜結合性酵素の活性阻害及び酸化的膜傷害などにより細胞内環境を劣化させ真菌細胞を死滅させると考えられている．この脂質二重膜にイオンチャネル様のポアを形成する際に，AmB は主として真菌細胞膜構成成分中の主なステロールであるエルゴステロールへ選択的に結合して 8 量体を形成することで安定化すると考えられている^{21,22)}．この作用メカニズムは"barrel-stave model" 仮説とし

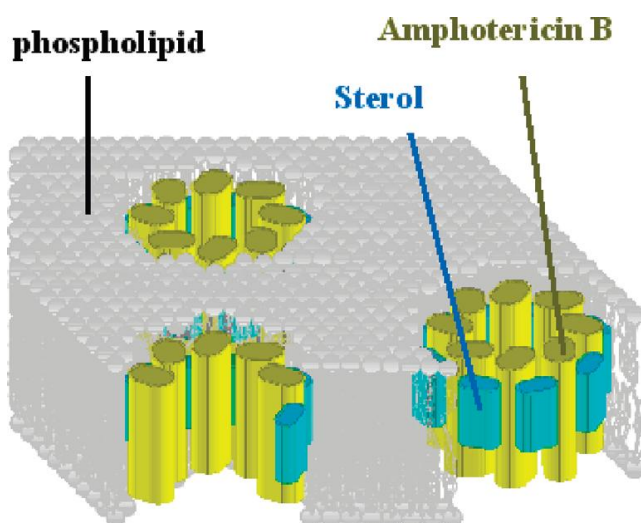


図 7. Am B イオンチャネルの"barrel-stave" model¹⁵⁾

AmB は真菌細胞膜中のエルゴステロールと結合して 8 量体となりポアを形成することにより細胞膜の脱分極を引き起こすと考えられている．

てよく知られている (図 7). よって, barrel-stave model が AmB の薬効作用メカニズムであるとする, 哺乳動物細胞膜構成成分中の主なステロールであるコレステロールよりも真菌膜構成成分中のエルゴステロールに特異的に高い親和性を示すことが AmB の薬効発揮に重要と考えられる²³⁻²⁶⁾. したがって, より良好な抗真菌活性を持ち, 腎毒性のような重大な副作用を軽減した AmB 骨格を基盤とする新たな医薬品を開発するためには, 新たな薬物候補化合物に対して真菌細胞膜の主構成成分であるエルゴステロール含有リン脂質膜と哺乳動物細胞膜の主構成成分であるコレステロール含有リン脂質膜の親和性を評価し, よりエルゴステロール含有リン脂質膜に特異的な親和性を示す化合物を選び出すことが不可欠であると考えられる.

AmB の脂質膜への親和性は, 副作用に関連する生体内分子への相互作用選択性と薬効に関連する薬物標的分子への親和性に影響を与える重要な因子の 1 つであると考えられる. つまり, ここでは AmB のエルゴステロール含有リン脂質膜への親和性とコレステロール含有リン脂質膜への親和性の差を測定することによって評価できる脂質膜選択性が副作用の発現に寄与しており, エルゴステロール含有リン脂質膜への結合後の安定性が薬効に関連している可能性が考えられる. SPR の原理を用いた分子間相互作用解析は, 薬効メカニズムの解明を目的として薬物の脂質膜結合特性の研究にすでに利用されてきている⁵⁻⁸⁾. これまでに, 著者ら及びその共同研究者らは SPR を利用した分子間相互作用解析装置 Biacore を用いて抗菌性ペプチドと脂質膜との相互作用を評価する方法を確立し, ペプチド-脂質膜相互作用のメカニズム解析の一助となる反応速度論的パラメーター算出による脂質膜相互作用の親和性を明らかにしてきた^{9-12,27,28)}.

本章第 1 節では, SPR 技術を利用した抗真菌薬と脂質膜との反応速度論的解析に焦点を絞り, 哺乳動物細胞膜と真菌細胞膜を模した 2 種類のモデル脂質膜と AmB との相互作用において, 分子間相互作用解析装置 Biacore S51²⁹⁻³¹⁾を用いた創薬研究に実用的に利用可能なハイスループットかつ高感度な AmB - モデル脂質膜親和性評価系の構築と

AmB 濃度の異なる複数のセンサーグラムを用いたグローバルフィッティングにより算出した2つのモデル脂質膜と AmB との反応速度論的相互作用解析について記述した³²⁾。さらに，治療領域の血漿中濃度付近での AmB のモデル脂質膜への結合特性についても考察した。本章第2節では，第1節において構築した評価系を基に，哺乳動物細胞膜と細菌細胞膜を模した2種類のモデル脂質膜と抗真菌薬以外の抗菌薬との親和性の評価を試みた。

第 1 節 表面プラズモン共鳴法を用いた Amphotericin B とモデル脂質膜親和性評価系の構築

第 1 項 実験材料及び方法

1.1 試薬及び溶媒

本研究で使用した Amphotericin B, エルゴステロール, コレステロール, ジメチルスルホキシド (DMSO) は Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入し, DMSO は無水物を使用した. クロロホルム及び 3-[(3-Cholamidpropyl)-dimethyl ammonio]propanesulfonate (CHAPS) は和光純薬工業株式会社 (大阪) 社製のクロロホルムは分光分析用, CHAPS は試薬特級を使用した. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC)¹⁵⁾ は Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, U.S.A.) より購入した. 10 倍濃縮 phosphate buffered saline (PBS) は GE Healthcare U.K. Ltd. (Buckinghamshire, UK) から購入した. 蒸留水はナカライテスク株式会社 (京都) 製の HPLC 用を使用した. エルゴステロール, コレステロールの化学構造式を図 8 に示した.

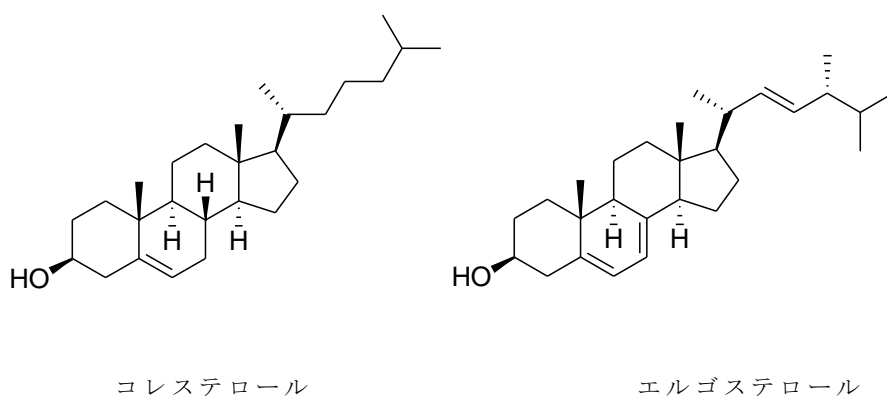


図 8. コレステロール及びエルゴステロールの化学構造式

1.2 測定装置

SPR を用いた分子間相互作用分析装置には GE Healthcare U.K. Ltd. 社 (Buckinghamshire, UK) 製 Biacore S51 を使用し, センサーチップにはリポソームの固定化に有効な Series S Sensor Chip L1 (GE Healthcare U.K. Ltd.社製, 以下 L1 センサーチップと略す) を用いた. ランニング緩衝液には, チップへのリポソームの固定化及び AmB と脂質膜との相互作用評価ともに 10% DMSO を含んだ PBS を使用した. サンプル注入ニードル洗浄溶液には 50% DMSO 溶液, センサーチップ再生溶液には 20 mmol/L CHAPS 溶液を用いた. これらのすべての溶液は用時調製し, 0.22 μm のフィルターでろ過後, 脱気して使用した.

1.3 リポソームの調製

個々のリポソーム溶液を調製するために, POPC 及びエルゴステロール, コレステロールはクロロホルムに溶解させた. 調製したリポソーム溶液を POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) の割合で混和し, 遠心エバポレータにより溶媒を留去, 乾燥させた後, PBS でリポソームを再溶解した. この再溶解液 (リポソーム濃度: POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) ともに 4 mmol/L) をほぼ透明になるまで超音波に照射し, 100 nm 孔径のポリカーボネートフィルター (LiposoFast 社製) により 21 回ろ過し, 100 nm に粒子径を揃えたリポソームを含む溶液を得た. 孔径 100 nm リポソームを含む溶液 (4 mmol/L) を 10% DMSO を含んだ PBS で 8 倍希釈し, リポソーム濃度 0.5 mmol/L POPC/ergosterol (4:1, v/v) 溶液及び 0.5 mmol/L POPC/cholesterol (4:1, v/v) 溶液を調製し, L1 センサーチップ上への固定化に用いた.

1.4 リポソームの固定化

Biacore S51 に L1 センサーチップを装着した後、流速 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で $20 \text{ mmol}/\text{L}$ CHAPS 溶液 $15 \mu\text{L}$ を 3 回注入してセンサーチップ表面を洗浄した。L1 センサーチップ洗浄後、 $0.5 \text{ mmol}/\text{L}$ リポソーム溶液を流速 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ で 500 秒間注入し、それぞれのリポソームを L1 センサーチップ上に固定化した (図 9)。

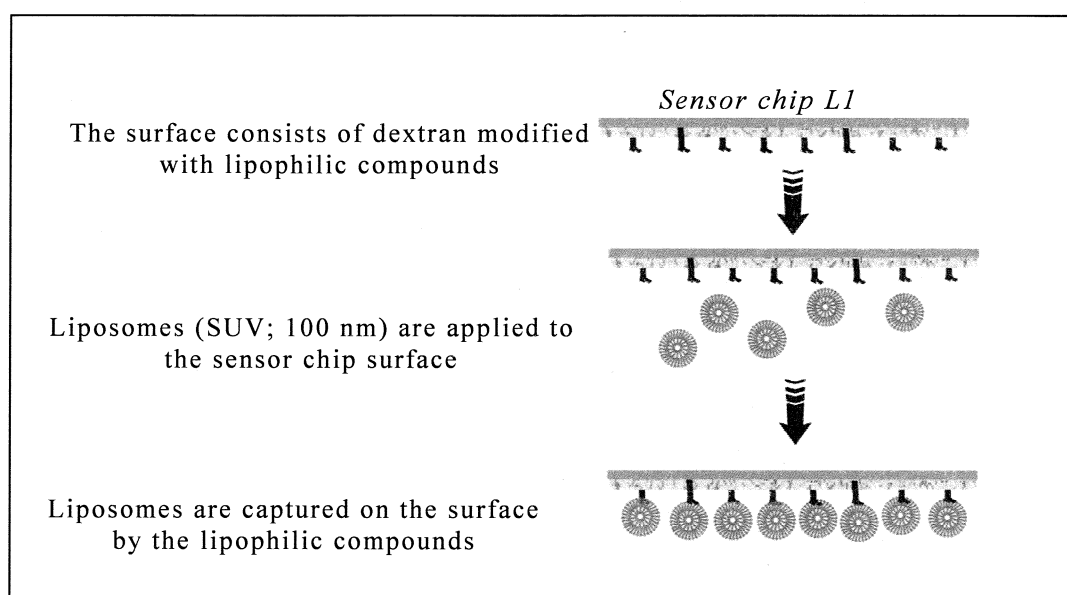


図 9. L1 センサーチップ上に固定化したリポソームの模式図

1.5 AmB と脂質膜の相互作用測定

AmB 測定溶液は $0.25 - 20 \mu\text{mol}/\text{L}$ の濃度範囲で 12 ポイント ($0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3.5, 5, 10, 20 \mu\text{mol}/\text{L}$) を 10% DMSO を含んだ PBS を用いて調製した。この AmB 測定溶液は、マストランスリミテーション (結合・解離速度が溶液中のアナライトの拡散率に律速されている状態) を避けるために、流速 $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で 200 秒間 ($100 \mu\text{L}$) 注入した。注入後、ランニング緩衝液を $30 \mu\text{L}/\text{min}$ で 400 秒間送液した。すべての測定は、SPR を用いた分子間相互作用測定にお

いて一般的に使用される測定温度 25°C で実施した. AmB 測定溶液を注入後, L1 センサーチップ表面から固定化したリポソーム及びリポソームから解離せずに残存した AmB をすべて取り除くために流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 20 mmol/L CHAPS 溶液を 15 μL 注入した. 以上の一連の測定を再現性を確認するために 3 回繰り返し実施した.

1.6 データ解析

AmB-脂質膜相互作用測定により得られた 12 濃度のセンサーグラムより, 1.5 - 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ の 6 濃度のセンサーグラムを採用し, BIA evaluation ソフトウェア (Ver. 4.1) を用いてグローバルフィッティングにより結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}), 解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 (K) を算出した. AmB-脂質膜相互作用評価の解析モデルには, ペプチド-脂質膜相互作用評価に用いられる Two-state reaction model (conformation change) を採用した⁹⁻¹²⁾.



A : AmB

L : 脂質膜

AL : AmB-脂質膜複合体 (静電的相互作用)

AL* : AmB-脂質膜複合体のコンフォメーション変化体
(疎水性相互作用)

AmB は脂質膜表面の極性基部分と静電的相互作用 (Step 1) により結合した後, 膜内部のアルキル鎖で構成される疎水性領域に侵入し, 疎水性相互作用により結合する (Step 2).

この解析モデルにおける各 Step の親和定数は, 以下に示した式により算出される.

$$dR_1/dt = k_{a1} \cdot C_A (R_{\max} - R_1 - R_2) - k_{d1} \cdot R_1 - k_2 \cdot R_1 + k_{d2} \cdot R_2$$

$$dR_2/dt = k_{a2} \cdot R_1 - k_{d2} \cdot R_2$$

R_1 : A と L の結合により形成された complex 1

R_2 : AL のコンフォメーション変化により形成された complex 2

R_{\max} : 最大アナライト結合量

C_A : アナライト濃度

親和定数 (K) は結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}) 及び解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) を用いて以下に示す式によって算出した.

$$K = k_{a1}/k_{d1} \cdot (k_{a2}+k_{d2})/k_{d2}$$

第 2 項 結果

2.1 L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の最適化

創薬研究で実用できる評価系を構築するためには、モデル脂質膜として 2 種類のステロールを含むリポソーム POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) を使用し、スループット及び再現性の良好な測定法が必須である。本評価系に使用した 2 種のリポソームはそれぞれ、POPC/cholesterol (4:1, v/v) は哺乳動物細胞膜モデルとして、POPC/ergosterol (4:1, v/v) は真菌細胞膜モデルとして用いた。近年、AmB の SPR システムを用いた脂質膜親和性評価系として報告された評価系は、センサーチップ上にリポソームを固定化できるリンカーを修飾するための過程に長時間を要する上にリンカー修飾精度も評価データのバラツキの要因になり得る。また、AmB の継続的な繰り返し注入によるセンサーチップ上に固定化したリポソームの劣化や各測定サイクルにおける前測定サイクルからの AmB のキャリーオーバーによる測定感度の低下、測定系のスループットなどの点に留意しなければならない。これらのことを踏まえ、各問題点を改善したより良い AmB-モデル脂質膜相互作用評価法の構築を目指した。そこで、脂質膜親和性評価に一般的に汎用されている L1 センサーチップを用いてハイスループット、高感度かつ再現性の良好な AmB-モデル脂質膜の親和性評価系の構築を試みた。

最初に固定化したリポソームの劣化及び AmB のキャリーオーバーの解消について検討した。AmB-モデル脂質膜相互作用測定において L1 センサーチップ上のリポソームに AmB 測定溶液を添加し、AmB の結合過程で強固にリポソームと相互作用して保持した AmB が解離過程で解離することなく残存した場合、続いて測定されるサンプルの反応速度論的評価に影響を与え得ることが考えられる。したがって、良好なデータを得るためには、残存した AmB を除去し、かつ、固定化したリポソームを良好な状態に保つ必要がある。これらの問題は、測定

サイクル毎にリポソームごと L1 センサーチップ上より除去し、新たにリポソームを固定化することで解決できると考え、AmB のキャリーオーバーの解消及びリポソーム固定化量の均一化を目的として、L1 センサーチップから残存した AmB 及び固定化したリポソームを剥離して再生するための最適な条件を検討した。L1 センサーチップ表面の再生条件を最適化した結果、L1 センサーチップ表面は各測定サイクル毎に 20 mmol/L CHAPS 溶液を 15 μ L 注入することによって元来の L1 センサーチップ表面へと完全に再生することが確認できた。最適なセンサーチップ表面の再生条件は、モニターしているセンサーグラムのベースラインにおいて、2 つのサンプルの測定開始時点を比較した時に、前のサンプルの測定開始時に比べて次の測定開始時のベースラインが同じレスポンスレベルを示すかどうかにより判断した。この操作は L1 センサーチップ表面が毎回の測定サイクルにおいて新鮮なりポソームで完全に覆われた状態にするために必須である。

一方、L1 センサーチップ上に固定化したリポソームから AmB のみを除去する再生方法も選択肢として挙げられるが、この再生方法は、リポソームの状態を良好に保ちつつ AmB のみを除去する再生溶液を最適化することが非常に困難であることに加え、測定中のリポソームの劣化を判断する基準の設定も必要となる。さらに、再生溶液添加後のリポソーム表面の安定化に数十分から数時間を要する。それに対して、リポソームを測定サイクル毎に除去し新たに固定化する方法は、リポソーム表面の安定化時間を約 3 分に短縮できスリープットの向上を図ることが可能であった。これらの理由により、本評価系において再生溶液によりリポソームから AmB のみを除去する再生方法は採用しなかった。

最適化した再生条件下で、L1 センサーチップ上に固定化した 2 種のモデル脂質膜の固定化量の均一性を確認するために、1 日に 12 サンプルずつ 2 日間 ($n = 24$) に分けて AmB のモデル脂質膜親和性測定を実施した。2 種のモデル脂質膜に対する平均固定化量 (Response units)、標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (RSD) をそれぞれ表 2 に、また、

表 2. L1 センサーチップへのリポソーム固定化量とその繰り返し精度

Lipid type	Response units		RSD ^a
	Mean (<i>n</i> = 24)	SD	(%)
POPC/ergosterol (4:1, v/v)	5622	29	0.5
POPC/cholesterol (4:1, v/v)	6759	96	1.4

a) Relative standard deviation

リポソームの固定化過程のセンサーグラムを図 10 に示した。図 10 において、リポソーム固定化のためのリポソーム溶液の注入を 500 秒まで実施し、その後、送液をランニング緩衝液に切り替え、センサーグラムの安定化に 200 秒の時間を設けている (500 ~ 700 秒)。センサーグラムを安定化後、この時点のレゾナンスユニットをベースラインとしてリポソーム固定化量を算出した(図 10 中矢印)。POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) のリポソーム固定化を繰り返し実施した結果 (表 2, *n* = 24), これらの平均固定化量はそれぞれ約 6800 RU と約 5600 RU, これらの固定化量の相対標準偏差は 1.3%未満と精度も良好であり, L1 センサーチップ上へのリポソームの固定化が良好な再現性を示すことが確認できた。また, 薬物-脂質膜相互作用解析において, 特に Two-state reaction model を使用する際には, リポソーム固定化量として約 4500 RU が必要であり, この基準を越えるリポソーム量が固定化できれば, 良好な再現性のあるセンサーグラムと反応速度論的解析が可能とされている⁹⁻¹²⁾。よって, 今回の測定系におけるリポソーム固定化量とその再現性は薬物-脂質膜相互作用解析に適用できるものであると判断した。

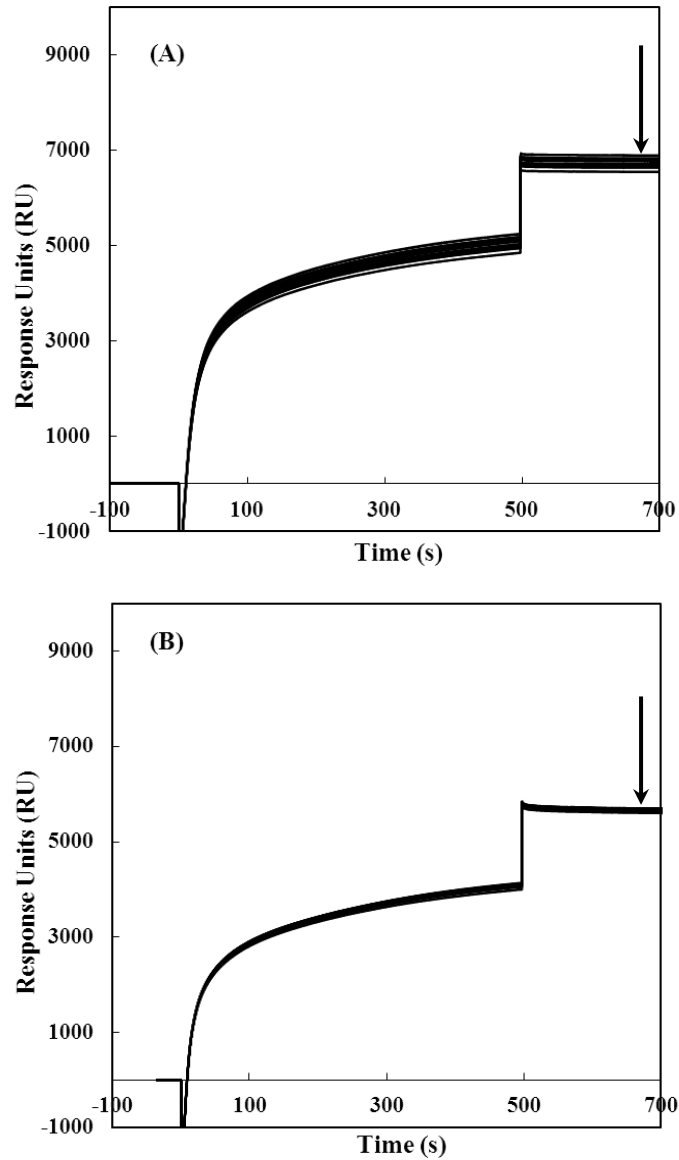


図 10. L1 センサーチップ上への POPC/cholesterol (4:1, v/v) (A) 及び POPC/ergosterol (4:1, v/v) (B) の固定化センサーグラムの再現性

リポソーム固定化直後 (500 秒の時点) のセンサーグラムに顕著なシグナルの跳ね上がりが認められる。これはランニング緩衝液のバルク効果によるものである。バルク効果とは、フローセルの中を流れる溶媒そのものが及ぼすセンサーチップの金膜表面での屈折率の変化のことであり、溶媒の種類やタンパク質濃度、塩濃度あるいは pH により大きく変化する。今回の測定系の場合、リポソーム固定化に使用した溶液は、リポソームを PBS に再溶解させた溶液をランニング緩衝液 10% DMSO を含んだ PBS で 8 倍希釈した試料であるため、測定のランニング緩衝液に用いている 10% DMSO を含んだ PBS と比べると DMSO 含有率が若干低く、溶媒組成が異なることになる。したがって、このセンサーグラムの上昇は、リポソーム固定化後に送液がリポソーム溶液からランニング緩衝液に切り替えられることによって、L1 センサーチップ表面を流れる溶液の溶媒組成が変化し、バルク効果が生じたものであり、AmB とモデル脂質膜相互作用評価に影響を及ぼすものではないと判断できる。

2.2 AmB とモデル脂質膜の相互作用

図 11 には AmB とセンサーチップ上に固定化したリポソーム POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) との相互作用を測定したセンサーグラムをそれぞれ示した。これらのセンサーグラムより、添加した AmB 濃度の増加に伴いセンサーグラムのレスポンスが上昇していることが確認できた。また、これらのセンサーグラムの形状は AmB 濃度の増加に伴ってセンサーグラムの上昇幅が狭くなることなく、ほぼ均等に上昇している。これらのセンサーグラムから AmB-脂質膜間の相互作用が飽和状態に達していないことが予測できる。一般的に、SPR による相互作用解析の際にはセンサーグラムが飽和状態に至るまで測定溶液のアナライト濃度を上げてデータを取得する。しかしながら、AmB については 20 $\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度の AmB 測定溶液を添加した際、センサーグラムのレスポンスが濃度依存的に上昇せず、良好なセンサーグラムを得ることができなかった。また、図 11 の AmB の POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) に対する親和性を検出した (A) 及び (B) のセンサーグラムを比較すると、特に解離領域において AmB は POPC/ergosterol (4:1, v/v) からの解離の方が POPC/cholesterol (4:1, v/v) からの解離よりも遅いことが認められた。この結果より、AmB はコレステロール含有脂質膜との結合よりもエルゴステロール含有脂質膜との結合の方が強いという毛利らの報告¹⁵⁾を再現できたことが確認できた。

表 3 には、図 11 に示した 6 濃度 (1.5 - 10 $\mu\text{mol/L}$) の AmB-モデル脂質膜相互作用のセンサーグラムを用いて、結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}) 及び解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2})、親和定数 (K_1 , K_2 , K) を分子間相互作用解析ソフト BIA evaluation (Ver. 4.1) の Two-state reaction model (Conformation Change) グローバルフィッティングにより算出した結果を示した。繰り返し測定 ($n = 3$) により算出した各パラメーターの再現性は良好であった。センサーグラムの解析に用いた解析モデルは、

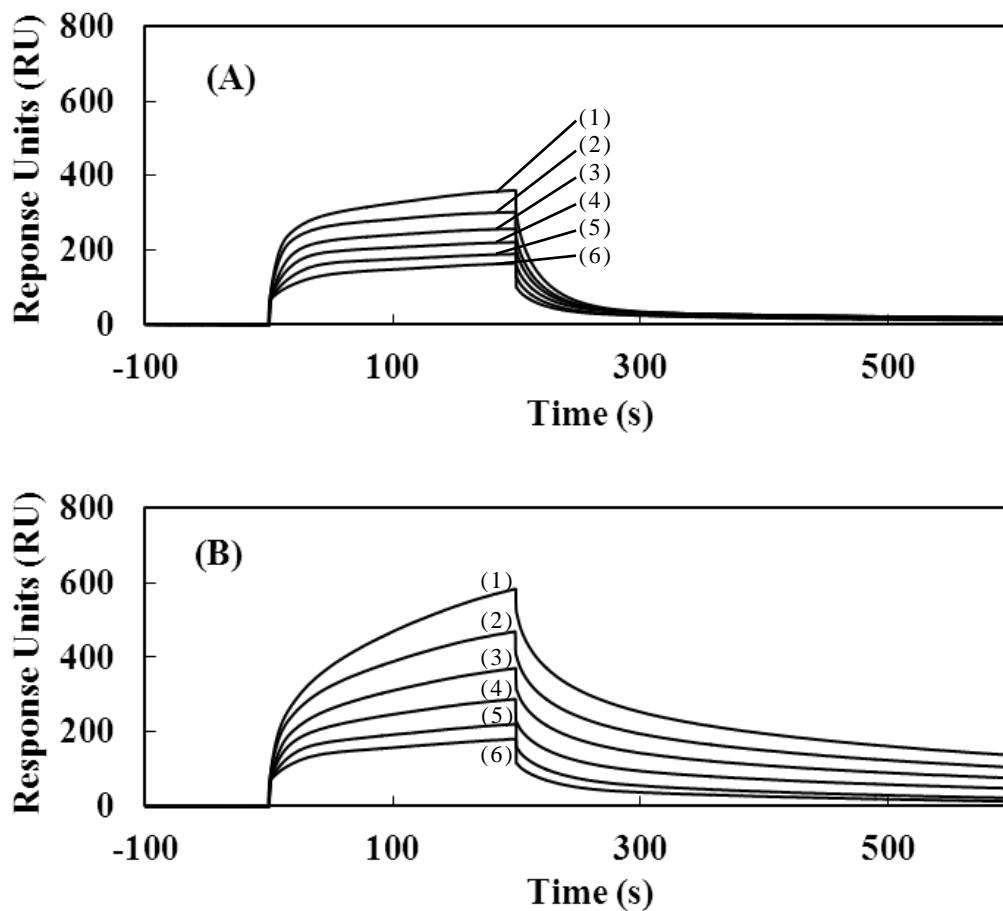


図 11. L1 センサーチップ上における AmB の 2 種のモデル脂質膜との相互作用センサーグラム

(A) POPC/cholesterol (4:1, v/v), (B) POPC/ergosterol (4:1, v/v)
 AmB 濃度 (1) 10, (2) 5.0, (3) 3.5, (4) 2.5, (5) 2, (6) 1.5 $\mu\text{mol/L}$

AmB-脂質膜またはペプチド-脂質膜などの 2 ステップの相互作用解析のこれまでの報告を基に Two-state reaction model (Conformation Change) を選択した。この解析モデルは、静電的な相互作用を含む初期の結合親和性、今回の研究では AmB とリポソームの親水性基部分のヘッドグループとの相互作用 (Step 1, k_{a1} , k_{d1} を算出) を経て、疎水的な相互作用によるアナライト AmB のモデル脂質膜内への侵入 (Step 2, k_{a2} , k_{d2} を算出) により脂質膜にポアを形成するような 2 段階の相

表 3. Two-state reaction model 解析により得られた AmB (1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$) とステロール含有 POPC リポソームとの相互作用における速度論的パラメーター及び親和定数 ($n = 3$)

Lipid type	$k_{a1}^{c)}$ (1/Ms)	$k_{d1}^{c)}$ ($\times 10^{-3}$, 1/s)	$k_{a2}^{c)}$ ($\times 10^{-4}$, 1/s)	$k_{d2}^{c)}$ ($\times 10^{-5}$, 1/s)	$K_1^{c)}$ ($\times 10^5$, 1/M)	$K_2^{c)}$	$K^{c)}$ ($\times 10^5$, 1/M)
POPC/ergosterol ^{a)}	1600 \pm 430 ^{c)}	7.52 \pm 1.85	3.96 \pm 2.41	3.44 \pm 2.00	2.12 \pm 0.34	12.8 \pm 3.7	28.5 \pm 4.9
POPC/cholesterol ^{b)}	9390 \pm 400	86.6 \pm 4.7	130 \pm 9	1800 \pm 200	1.09 \pm 0.09	0.724 \pm 0.091	1.87 \pm 0.06

Mean \pm standard deviation. a) POPC/ergosterol (4:1, v/v). b) POPC/cholesterol (4:1, v/v). c) 結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}), 解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 K_1 (k_{a1}/k_{d1}), K_2 (k_{a2}/k_{d2}), K ($K_1 + K_1K_2$).

相互作用を示すものに適していると、これまでの研究で報告されている (9-12),15) .

反応速度論的解析の結果、AmB のモデル脂質膜への親和定数 (K , 1/M) は POPC/cholesterol (4:1, v/v) では 1.87×10^5 , POPC/ergosterol (4:1, v/v) では 28.5×10^5 と POPC/cholesterol (4:1, v/v) よりも POPC/ergosterol (4:1, v/v) に約 18 倍高い親和性を示した (表 3). AmB のモデル脂質膜親和性作用様式の詳細を見てみると、AmB の静電的相互作用によるモデル脂質膜への Step 1 の相互作用は、結合速度定数 (k_{a1} , 1/Ms) においては、POPC/ergosterol (4:1, v/v) が 1600, POPC/cholesterol (4:1, v/v) が 9390 と AmB の結合速度は POPC/cholesterol (4:1, v/v) への方が約 6 倍速く、解離速度定数 (k_{d1} , 1/s) においては、POPC/ergosterol (4:1, v/v) が 7.52×10^{-3} , POPC/cholesterol (4:1, v/v) が 86.6×10^{-3} と AmB の解離速度は POPC/cholesterol (4:1, v/v) の方が約 12 倍速かった. これらの各速度定数を用いて Step 1 の親和定数を算出すると、POPC/ergosterol (4:1, v/v) と POPC/cholesterol (4:1, v/v) の 2 種のモデル脂質膜に対する K_1 値はそれぞれ 2.12×10^5 , 1.09×10^5 と約 2 倍の相違であった. この結果より、AmB のモデル脂質膜に対する静電的な相互作用にほとんど差はなく、同等であると判断した. 一方、Step 2 の疎水的な相互作用における結合速度定数 (k_{a2} , 1/s) は POPC/ergosterol (4:1, v/v) では 3.96×10^{-4} , POPC/cholesterol (4:1, v/v) では 130×10^{-4} と 2 種のモデル脂質膜の間で大きく異なった. これは、AmB のモデル脂質膜への疎水的な相互作用を利用した結合がエルゴステロール含有脂質膜への結合よりもコレステロール含有脂質膜への結合の方が約 33 倍強いことを示唆した. さらに、Step 2 の相互作用における AmB のモデル脂質膜に対する解離速度定数 (k_{d2} , 1/s) は POPC/ergosterol (4:1, v/v) では 3.44×10^{-5} , POPC/cholesterol (4:1, v/v) では 1800×10^{-5} とエルゴステロール含有脂質膜に対する解離速度定数はコレステロール含有脂質膜に対する解離速度定数の 500 分の 1 以下であった. この結果は、AmB のコレステロール含有脂質膜からの解離よりもエルゴステロール含有脂質膜からの解離の方が非常に遅いことを示唆した. この遅い解離はセンサーグラ

ム (図 11) にも顕著に検出されており, AmB のエルゴステロール含有脂質膜に対する高い親和性は, 主に疎水的な相互作用の中でも解離速度の遅さにあり, この解離速度の遅さが AmB の脂質膜内部でのイオンチャネルの形成・安定化を促進すると考えられる^{33,34)}.

2.3 治療領域の血漿中 AmB 濃度付近における脂質膜相互作用の変化

臨床における AmB 有効血中濃度である 0.25 – 1.5 $\mu\text{mol/L}$ の AmB 測定溶液と固定化したリポソーム POPC/ergosterol (4:1, v/v) との相互作用を示したセンサーグラムを詳細に確認した (図 12). AmB 測定溶液は 50 秒間 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ でリポソームを固定化した L1 センサーチップ表面に注入した. AmB 測定溶液の注入後, ランニング緩衝液を送液し 100 秒間 AmB のモデル脂質膜からの解離を観察した. AmB 濃度 0.25 – 0.5 $\mu\text{mol/L}$ のセンサーグラムにおいて, モデル脂質膜の親水性基部への静電的な相互作用のみ (Two-state reaction model の Step 1 部分のみ) が認められることがその形状から判断できる³⁵⁾. この結果より, AmB 濃度範囲 0.25 – 0.5 $\mu\text{mol/L}$ においては, エルゴステロール含有脂質膜の疎水的な相互作用による脂質膜内部への AmB の侵入は起こっていないと考えられる. 一方, AmB 濃度範囲 1.0 – 1.5 $\mu\text{mol/L}$ においては, 特に解離領域のセンサーグラムの形状に変化が認められ, AmB 濃度 0.25 – 0.5 $\mu\text{mol/L}$ のセンサーグラムと比較すると AmB のモデル脂質膜からの解離が遅くなっていることがわかった. このことより, AmB の脂質膜相互作用は, AmB 濃度 1.0 – 1.5 $\mu\text{mol/L}$ を境に AmB とエルゴステロール含有脂質膜との間にわずかに疎水的な相互作用 (Two-state reaction model の Step 2) が生じ始めていることが考えられた. ヒト血漿中 AmB 薬効濃度は 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 以上とされていることから³⁶⁾, AmB 濃度 1.0 $\mu\text{mol/L}$ を境に生じる AmB のエルゴステロール含有脂質膜への相互作用の変化は AmB の薬効と関連している可能性があることが示唆された. これは, センサーグラムの形状と治療における薬物の効果作用機序を関係づける可能性を示唆した初めての報告

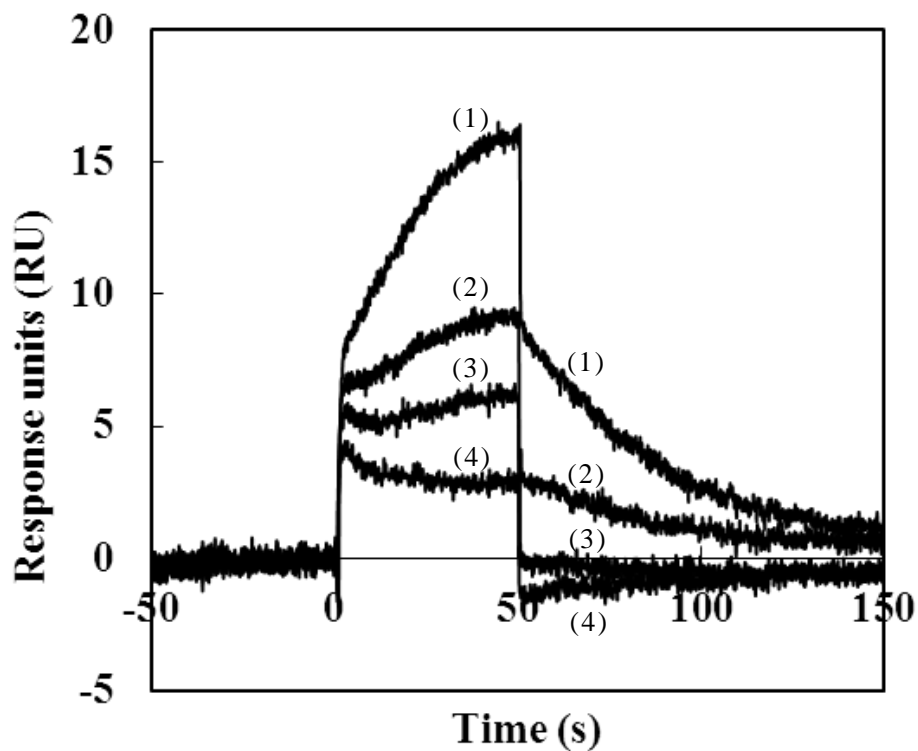


図 12. L1 センサーチップ上における AmB の固定化リポソーム POPC/ergosterol (4:1, v/v) との相互作用センサーグラム
AmB 濃度 (1) 1.5, (2) 1.0, (3) 0.50, (4) 0.25 $\mu\text{mol/L}$

である。

今回の SPR を利用した分子間相互作用解析研究において, AmB のモデル脂質膜親和性は 0.25 $\mu\text{mol/L}$ まで検出することができ, AmB のモデル脂質膜への相互作用解析の感度は以前報告された測定法¹⁵⁾と比べて約 20 倍の高感度を達成した。

第3項 考察

近年,大阪大学大学院理学研究科村田らの研究により **Biacore X** を用いて **AmB** の非特異的な結合を軽減するために独自に修飾した **CM5** センサーチップにリポソームを固定化し, **AmB** とステロールを含む脂質膜の親和性を評価する系が構築された. この研究結果より分子間相互作用解析ソフト **BIA evaluation** の **Two-state reaction model** ローカルフィッティングによる解析において **AmB** はコレステロール含有脂質膜よりもエルゴステロール含有脂質膜へ約 44 倍高い親和性を示すという **AmB** のステロール選択性が報告された¹⁵⁾. しかし, これらの研究で構築された測定法は, リポソームの固定化に通常使用する **L1** センサーチップを用いず, タンパク質の固定化に有効とされる **CM5** センサーチップを用いてリポソーム固定化用のリンカーを修飾することでリポソームを固定化できるセンサーチップにしているため, リポソームの固定化量の均一化という意味では, **CM5** センサーチップへのリンカー修飾精度もリポソーム固定化量のバラツキの原因となり得る. さらに, ベースラインの安定化に長時間を要し, 固定化したリポソームは繰り返し測定に供するなどアナライト測定のスループット及び再現性に乏しい欠点もあり, 創薬研究において実用的に使用することができなかった. 創薬研究に適用できる評価系には, 簡便に誰が実施しても同様の結果が得られる良好な再現性とより多数の化合物評価が可能となる迅速さが必要である. これらを実現するために, センサーチップの修飾など複雑な工程を必要としないリポソームの固定化に最も一般的に用いられる **L1** センサーチップを用いた評価系の構築を目指した. 非特異的な結合の有無やリポソーム固定化後のベースラインの安定に関しては, **SPR** システムの装置の状態も大きく影響を与えることが考えられる. そのため, より安定的に良好なデータを再現性よく取得するために, 日常のメンテナンスにおいても洗浄条件などを詳細に検討し, 常に **SPR** システムが良好な状態を保てるメンテナンス方法を設定した. 本実験において, 良好な再現性が可能になった一因には, このような

入念なシステムメンテナンスも挙げられると推測される。

図 10 に示したリポソーム固定化時のセンサーグラムにおいて、リポソーム固定化直後（500 秒の時点）のセンサーグラムに顕著なシグナルの跳ね上がりが認められる。これはランニング緩衝液のバルク効果によるものである。バルク効果とは、フローセルの中を流れる溶媒そのものが及ぼすセンサーチップの金膜表面での屈折率の変化のことであり、溶媒の種類やタンパク質濃度、塩濃度あるいは pH により大きく変化する。SPR を用いた相互作用解析を実施する際にはこのバルク効果を差し引くことが重要であり、一般的には、アナライトを含んだ測定溶液とランニング緩衝液の溶媒組成を同じものに揃え、このバルク効果を抑えている。今回の測定系の場合、リポソーム固定化に使用した溶液は、リポソームを PBS に再溶解させた溶液をランニング緩衝液 10% DMSO を含んだ PBS で 8 倍希釈した試料である。そのため、リポソーム溶液は、測定のランニング緩衝液に用いている 10% DMSO を含んだ PBS と比べると DMSO 含有率が若干低く、溶媒組成が異なることになる。したがって、このセンサーグラムの上昇は、リポソーム固定化後に送液がリポソーム溶液からランニング緩衝液に切り替えられることによって、L1 センサーチップ表面を流れる溶液の溶媒組成が変化し、バルク効果が生じたものであり、AmB とモデル脂質膜相互作用評価に影響を及ぼすものではないと判断できる。また、表 2 においては、POPC/cholesterol (4:1, v/v) 及び POPC/ergosterol (4:1, v/v) 間の L1 センサーチップ上への固定化量には相違が認められるが、その差を以下の式に従って算出したところ 10%未満であった。

$$\text{リポソーム固定化量の差 (\%)} = \frac{\text{POPC/ergosterol}^{\text{a}} \text{ or } \text{POPC/cholesterol}^{\text{b}}}{(\text{POPC/ergosterol} + \text{POPC/cholesterol})/2} \times 100$$

a: POPC/ergosterol (4:1, v/v) 固定化量

b: POPC/cholesterol (4:1, v/v) 固定化量

この結果より、L1 センサーチップ上に様々な脂質膜を固定化したこれ

までの研究データや今回の研究における反応速度定数を含む様々なパラメーターを踏まえ、分析学的な視点で考えてリポソーム固定化量の10%未満の相違が測定結果に大きな影響を与えるものとは考え難いので、これらの固定化量の違いは2種のモデル脂質膜への親和性の評価に影響を与えないと判断した。

AmBは強力な抗真菌薬として周知されており、治療領域と副作用領域の血漿中濃度が近いことでも知られている³⁷⁾。AmBの副作用を軽減し、安全かつ有効な治療を提供するためには、臨床施設においてAmBの血漿中濃度をモニターし、有効薬効濃度と毒性濃度に常に留意してAmBの血漿中濃度を制御しなければならないのが現状である。例えば、腎毒性のような重篤な副作用はAmBがコレステロール含有脂質膜に結合することによる細胞破壊によって引き起こされる可能性が考えられている^{38,39)}。抗真菌薬として有効な薬物の薬効作用機序の観点から考えると、コレステロール含有脂質膜とエルゴステロール含有脂質膜の間に劇的な親和性の違い、つまり、エルゴステロール含有脂質膜に対する高い選択性が必須であり、AmBが示した約18倍程度のエルゴステロール含有脂質膜の膜選択性ではまだ不十分なのかもしれない。AmBを凌駕する薬効を有し、且つ、副作用を軽減するためには、SPRを用いた評価系において少なくとも18倍以上のエルゴステロール含有脂質膜選択性が必要であることが推定できる。

AmBは、SPRによる分子間相互作用評価によってエルゴステロール含有脂質膜への膜選択性が認められたが、高い薬効を持ち副作用が少ない理想とする抗真菌薬はSPRを用いた親和性評価系において、より高いエルゴステロール含有脂質膜選択性を示さなければならない可能性が示唆された。今回の研究を通じて、薬効に関連する標的タンパク質や毒性に関連する哺乳動物細胞膜モデルなどと新薬開発候補化合物の親和性をSPRを用いて評価系を構築することによって、これらの評価法が新薬の研究開発において薬効と毒性のバランスを評価できる有用なツールとなると考える。つまり、創薬研究において、毒性がない化合物を創出するというのが最も理想ではあるが、薬物が外因性の物

質である限り，実際にはそのような化合物を創出することは不可能に等しいと考えられる．そこで，本研究で構築したような SPR を利用した評価系を用いて薬物と様々な標的分子との相互作用を評価することで，毒性もあるがそれよりも強力な薬効を示す可能性のある薬物を選出することが可能であると考えられる．

モデル脂質膜と薬物との反応速度論的な相互作用を評価する効果的かつ効率的な方法を確立するための試みの観点から，本評価法は 1 本の測定試料の測定サイクルが約 30 分であり，1 日に 10 化合物の評価を可能とするスループットの向上を達成し，これまでに報告されている方法と比べてハイスループットな SPR を用いた AmB-脂質膜相互作用解析法が確立できたと考える．また，本評価法はモデル脂質膜組成の変更やランニング緩衝液の変更により，抗真菌薬のみならず他の様々な薬物と脂質膜の相互作用評価に容易に適合できると考えられる．

第 4 項 小括

本評価法は 1 日に 10 化合物の評価を可能とするスループットの向上を達成し、これまでに報告されている方法と比べてハイスループットな SPR を用いた AmB-脂質膜相互作用解析法が確立できた。構築した評価法は、リポソームの L1 センサーチップ上への固定化及び AmB のモデル脂質膜への反応速度論的解析の評価について良好な再現性を示した。これらの結果は、本評価法が AmB の哺乳動物モデル脂質膜及び真菌細胞脂質膜との相互作用の選択性評価に利用できることを示唆した。また、本評価法により AmB のエルゴステロール含有脂質膜に対する親和性がコレステロール含有脂質膜への親和性よりも約 18 倍高いことを明示した。このエルゴステロール含有脂質膜に対する高い親和性は、特に AmB のコレステロール含有脂質膜からの解離よりもエルゴステロール含有脂質膜からの解離の方が非常に遅いことに起因すると考えられる。また、治療領域の血漿中 AmB 濃度付近の AmB のモデル脂質膜への相互作用変化が、センサーグラムの形状変化によって説明できる可能性を示唆した。

これらの結果より、今回確立した SPR を用いた AmB-脂質膜相互作用評価法が抗真菌薬の脂質膜結合の選択性や抗真菌活性の強弱を予測する有益なツールとなると期待される。

第2節 表面プラズモン共鳴法を用いた Amphotericin B とモデル脂質膜親和性評価系の他剤への応用

第1項 実験材料及び方法

1.1 試薬及び溶媒

本研究で使用したエリスロマイシン, ムピロシン, D-シクロセリン及び DMSO は Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入し, DMSO は無水物を使用した. クロロホルム及び CHAPS は和光純薬工業株式会社 (大阪) 製でクロロホルムは分光分析用, CHAPS は試薬特級を使用した. POPC, 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidyl-glycerol (POPG) 及び 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidyl-ethanolamine (POPE) は Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, U.S.A.) より購入した. メタノールは関東化学株式会社 (東京) 製の HPLC 用を使用した. 蒸留水はナカライテスク株式会社 (京都) 製の HPLC 用を使用した. HBS-N buffer は GE Healthcare U.K. Ltd. (Buckinghamshire, UK) から購入した. 図 13 にはエリスロマイシン, ムピロシン及び D-シクロセリンの化学構造式を示した.

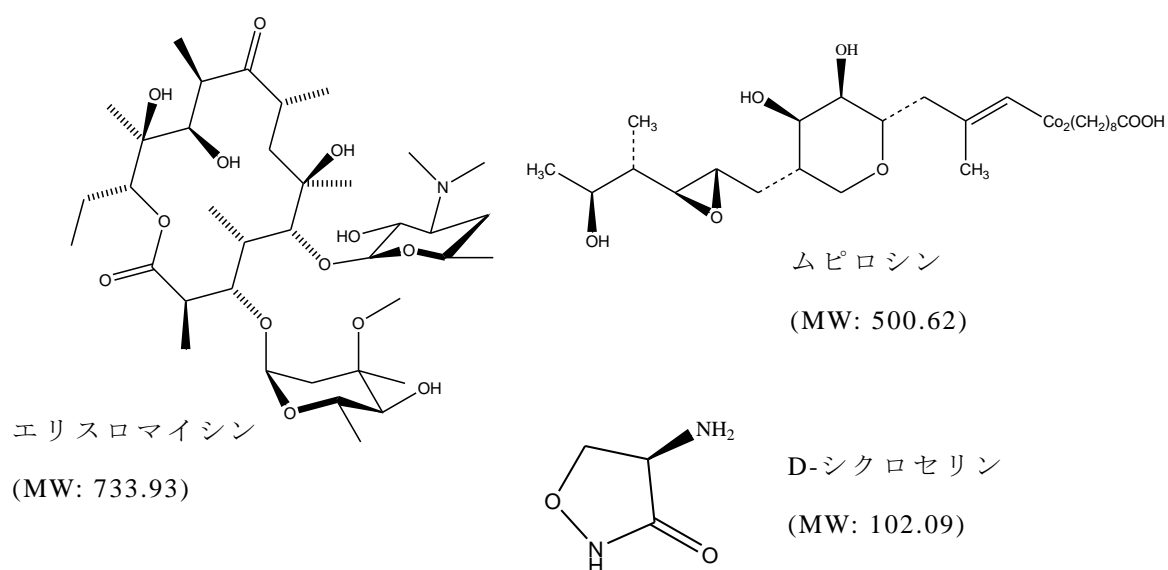


図 13. エリスロマイシン, ムピロシン及び D-シクロセリンの化学構造式

1.2 測定装置

SPR を用いた分子間相互作用分析装置には GE Healthcare U.K. Ltd. 社 (Buckinghamshire, UK) 製 Biacore S51 を使用し, センサーチップにはリポソームの固定化に有効な L1 センサーチップを用いた. ランニング緩衝液には, チップへのリポソームの固定化及び抗菌薬と脂質膜との相互作用評価ともに 5% DMSO を含んだ HBS-N buffer を使用した. サンプル注入ニードル洗浄溶液には 50% DMSO 溶液, センサーチップ再生溶液には 20 mmol/L CHAPS 溶液を用いた. これらのすべての溶液は用時調製し, 0.22 μm のフィルターでろ過後, 脱気して使用した.

1.3 リポソームの調製

個々のリポソーム溶液を調製するために, POPC 及び POPE¹⁰⁾, POPG¹⁰⁾をそれぞれクロロホルム/メタノール混液 (4:1, v/v) に溶解させた. 調製したリポソーム溶液 POPE 及び POPG は 4:1 (v/v) の割合で混和した. その後, リポソーム溶液 POPC 及び POPE/POPG (4:1, v/v) をそれぞれ遠心エバポレータにより溶媒を留去, 乾燥させた後, HBS-N buffer でリポソームを再溶解した. この再溶解液 (リポソーム濃度: POPC 及び POPE/POPG (4:1, v/v) とともに 20 mmol/L) をほぼ透明になるまで超音波に照射し, 100 nm 孔径のポリカーボネートフィルター (LiposoFast 社製) により 21 回ろ過し, 100 nm に粒子径を揃えたリポソームを含む溶液を得た. 孔径 100 nm リポソームを含む溶液を 5% DMSO を含んだ HBS-N buffer で 40 倍希釈し, リポソーム濃度 0.5 mmol/L POPC 溶液及び 0.5 mmol/L POPE/POPG (4:1, v/v) 溶液を調製し, L1 センサーチップ上への固定化に用いた.

1.4 リポソームの固定化

Biacore S51 に L1 センサーチップを装着した後, 流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, で

20 mmol/L CHAPS 溶液 15 μ L を 3 回注入してセンサーチップ表面を洗浄した。L1 センサーチップ洗浄後、0.5 mmol/L リポソーム溶液を流速 10 μ L/min で 240 秒間注入し、それぞれのリポソームを L1 センサーチップ上に固定化した。

1.5 抗菌薬と脂質膜の相互作用測定

抗菌薬測定用溶液は 12.5 – 100 μ mol/L の濃度範囲で 4 ポイント (12.5, 25, 50, 100 μ mol/L) を 5% DMSO を含んだ HBS-N buffer を用いて調製した。この抗菌薬測定溶液は、流速 30 μ L/min で 60 秒間 (30 μ L) 注入した。注入後、ランニング緩衝液を 30 μ L/min で 30 秒間送液した。すべての測定は、測定温度 25°C で実施した。抗菌薬測定溶液を注入後、L1 センサーチップ表面から固定化したリポソーム及び解離せずに残存した抗菌薬をすべて取り除くために流速 30 μ L/min で 20 mmol/L CHAPS 溶液を 15 μ L 注入した。

1.6 データ解析

抗菌薬－脂質膜相互作用測定により得られた 12.5 – 100 μ mol/L のセンサーグラムを採用し、これらのセンサーグラムの形状から BIA evaluation ソフトウェア (Ver. 4.1) のセンサーグラムの平衡状態が検出された時の解析に適用される Steady State model を用いて親和定数を算出した。

第 2 項 結果

2.1 L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の確認

本実験では，モデル脂質膜として 2 種類のリポソーム POPC 及び POPE/POPG (4:1, v/v) を使用した．POPC は哺乳動物細胞膜モデルとして，POPE/POPG (4:1, v/v) は細菌細胞膜モデルとして用いた．L1 センサーチップ上に固定化する 2 種のモデル脂質膜が最適な条件下で安定的に固定化できることを確認するために 9 サンプルを測定した．2 種のモデル脂質膜に対する平均固定化量 (Response units)，標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (RSD) をそれぞれ表 4 に示した．これらの結果より，リポソーム固定化量の平均は POPC 約 7100 RU，POPE/POPG (4:1, v/v) は約 6500 RU であり，これらの固定化量の相対標準偏差は 0.3% 未満と良好であった．以上より，L1 センサーチップ上へのリポソームの固定化が良好な再現性を示し，固定化条件が適当であることが確認できた．また，薬物-脂質膜相互作用解析において，良好な再現性を示すセンサーグラムの取得と反応速度論的解析を実施するためには，リポソームの固定化量は約 4500 RU 必要とされていることから⁹⁻¹²⁾，今回の測定系におけるリポソーム固定化量とその再現性は薬物-脂質膜相互作用解析に適用できるものであると判断した．

表 4. L1 センサーチップへのリポソーム固定化量とその繰り返し精度

Lipid type	Response units		RSD (%) ^a
	Mean (<i>n</i> = 9)	SD	
POPC	7113	18	0.3
POPE/POPG (4:1, v/v)	6528	8	0.1

a) Relative standard deviation

2.2 抗菌薬とモデル脂質膜の相互作用解析

図 14 にはエリスロマイシン，ムピロシン及び D-シクロセリンとモデル脂質膜 POPC 及び POPE/POPG (4:1, v/v) との相互作用測定の結果のセンサーグラムを示した。測定した薬物濃度は 12.5 – 100 $\mu\text{mol/L}$ の濃度範囲内の 4 ポイント (12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) であった。すべての薬物において，モデル脂質膜との相互作用は非常に弱く，最高濃度の 100 $\mu\text{mol/L}$ 溶液の測定でもレスポンスの高いもので 80 RU 程度であった。エリスロマイシン及びムピロシンについては，濃度依存的にレスポンスが上昇したセンサーグラムの検出が可能であったが (図 14 (A) – (D))，D-シクロセリンにおいては，100 $\mu\text{mol/L}$ のサンプルのセンサーグラムが最もレスポンスが低くなり，濃度依存的なセンサーグラムが検出できなかった (図 14 (E), (F))。これは，D-シクロセリンのモデル脂質膜に対する親和性が低いことに加え，D-シクロセリンの分子量が 102.09 と小さいために，質量変化を相互作用変化として検出する Biacore S51 の検出限界以下であったと考えられる。したがって，データ解析は，脂質膜との相互作用を検出できたエリスロマイシン及びムピロシンについてのみ実施し，D-シクロセリンはデータ解析しなかった。エリスロマイシン及びムピロシンは，サンプル測定溶液を注入直後，薬物とモデル脂質膜との相互作用によりセンサーグラムは瞬時に上昇してプラトーに達し，注入終了後に送液をランニング緩衝液へと切り替えると (センサーグラム 60 秒の時点)，薬物はモデル脂質膜から速やかに解離し，センサーグラムはベースラインに戻った。このような形のセンサーグラムは，箱型と呼ばれ，リガンドとアナライトが 1:1 で相互作用する時に多く見られる⁵⁾。これらのセンサーグラムより，エリスロマイシン及びムピロシンとモデル脂質膜との相互作用はリガンドとアナライトが 1:1 で相互作用する単純な反応が主であり，第 1 節に記述した AmB とエルゴステロール含有脂質膜のような 2 段階の反応により強固に相互作用して複合体を形成するような相互作用様式ではないことがわかった。これらのセンサーグラムより，本実験の相互

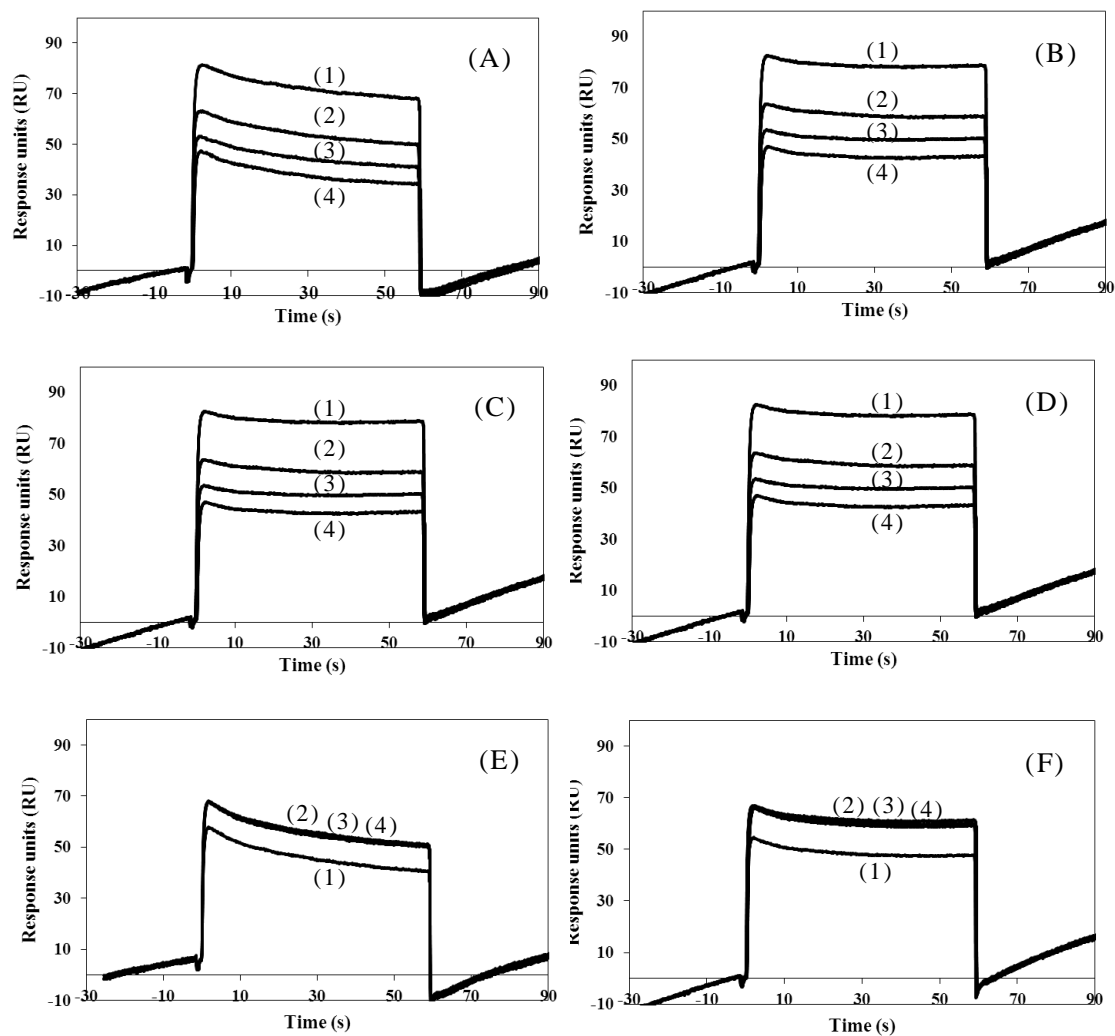


図 14. L1 センサーチップ上におけるエリスロマイシン，ムピロシン及び D-シクロセリンの固定化リポソーム POPC 及び POPE/POPG (4:1, v/v) との相互作用センサーグラム

エリスロマイシン-POPC (A)，エリスロマイシン-POPE/POPG (4:1, v/v) (B)，ムピロシン-POPC (C)，ムピロシン-POPE/POPG (4:1, v/v) (D)，D-シクロセリン-POPC (E)，D-シクロセリン-POPE/POPG (4:1, v/v) (F)

薬物濃度 (1) 100, (2) 50, (3) 25, (4) 12.5 $\mu\text{mol/L}$

表 5. Steady State Model 解析により得られたエリスロマイシン及びムピロシン (12.5 – 100 $\mu\text{mol/L}$) とモデル脂質膜との相互作用における親和定数

Compound	Liposome type	K_A ^{b)} ($\times 10^4$, 1/M)	K_D ^{c)} ($\times 10^{-5}$, M)
Erythromycin	POPC	5.15	1.94
	PE/PG ^{a)}	6.61	1.51
Mupirocin	POPC	2.19	4.57
	PE/PG ^{a)}	3.89	2.57

a) POPE/POPG (4:1, v/v). b) 結合定数(K_A). c) 解離定数 (K_D).

作用測定結果解析には, AmB 親和性解析時に用いた解析モデル Two-state reaction model は不適切であると判断し, センサーグラムが平衡状態に達している相互作用の解析に適切とされる Steady state affinity model を用いて^{7,8,40}, 親和定数 (結合定数 K_A , 解離定数 K_D) を算出した. これらの解析結果を表 5 に示した. エリスロマイシンの親和定数において, K_A 値 (1/M) は POPC に対して 5.15×10^4 , POPE/POPG (4:1, v/v) に対して 6.61×10^4 と POPE/POPG (4:1, v/v) への結合定数の方が約 1.3 倍大きく, K_D 値 (M) は POPC に対して 1.94×10^{-5} , POPE/POPG (4:1, v/v) に対して 1.51×10^{-5} と POPE/POPG (4:1, v/v) への解離定数の方が約 4/5 小さかった. また, ムピロシンの親和定数は, POPC に対する K_A 値 2.19×10^4 , POPE/POPG (4:1, v/v) に対する K_A 値 3.89×10^4 と約 1.8 倍 POPE/POPG (4:1, v/v) への結合定数の方が大きく, POPC に対する K_D 値 (M) は, 4.57×10^{-5} , POPE/POPG (4:1, v/v) に対する K_D 値は 2.57×10^{-5} と POPE/POPG (4:1, v/v) への解離定数の方が約 3/5 小さかった. 以上より, エリスロマイシン, ムピロシンともに POPC よりも POPE/POPG (4:1, v/v) に対して高い親和性を示した. しかしながら, 全体的な親和性は第 1 節で解析した AmB とモデル脂質膜の親和性と比較しても明らかのように, センサーグラムのレスポンスや反応速度論的パラメーターからこれらの薬物はモデル脂質膜との親和性が弱いことがわかる.

図 15 には, 縦軸に各センサーグラムのシグナルレスポンス, 横軸に

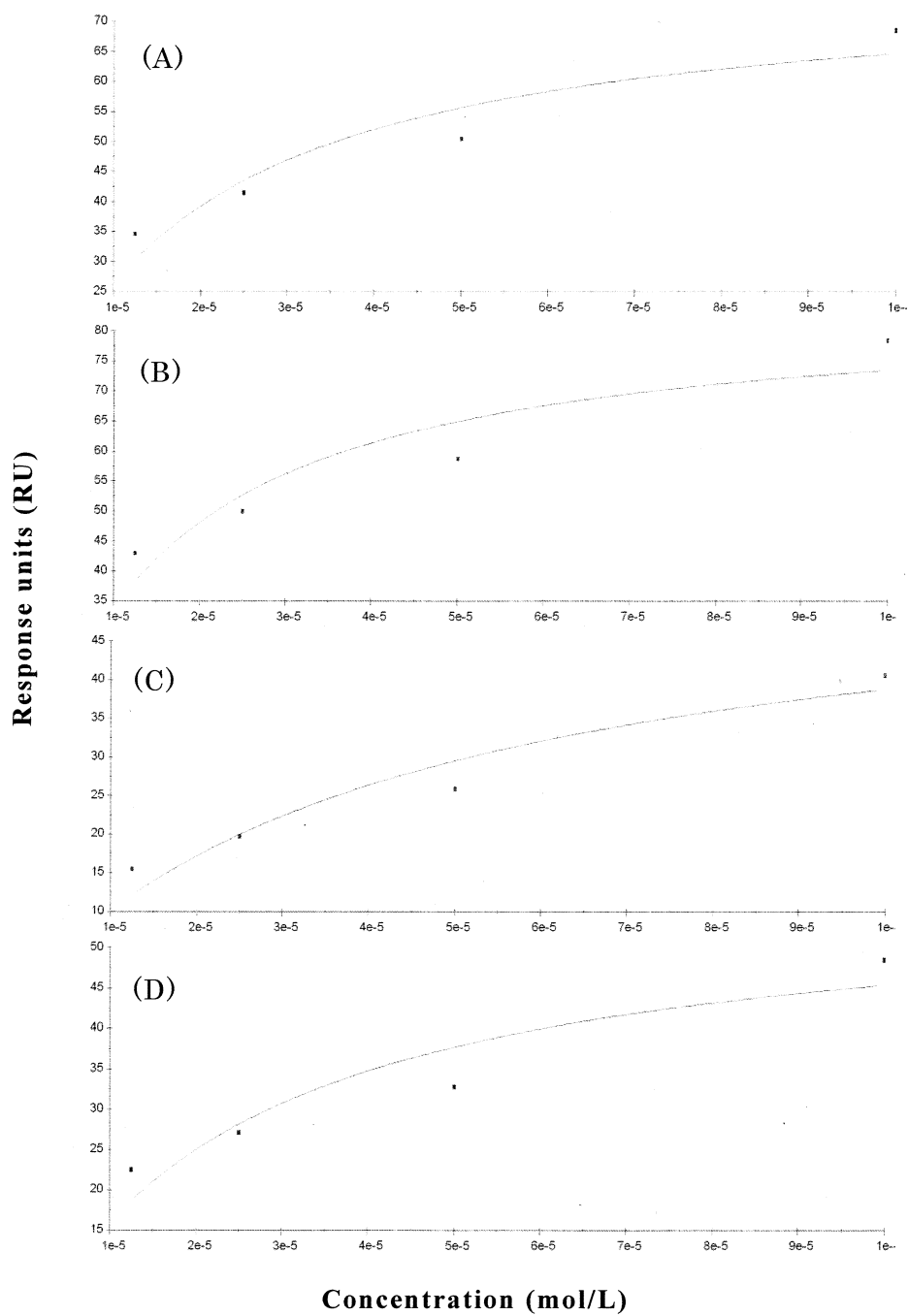


図 15. 薬物の脂質膜吸着性の検討

エリスロマイシン-POPC (A), エリスロマイシン-POPE/POPG (4:1, v/v) (B), ムピロシン-POPC (C), ムピロシン-POPE/POPG (4:1, v/v) (D).

薬物濃度: 100, 50, 25, 12.5 $\mu\text{mol/L}$.

縦軸に結合レスポンス, 横軸に薬物濃度を取り, 各数値をプロットした.

薬物濃度を取り，エリスロマイシン及びムピロシンの POPC 及び POPE/POPG (4:1, v/v) への結合レスポンスをプロットしたグラフを示した．このグラフは薬物の脂質膜への吸着性予測に用いられるものであり，薬物と脂質膜との結合レスポンスを薬物濃度を振って測定し，濃度依存的なレスポンスが得られた際，一般的に薬物と脂質膜との間にアフィニティーが存在する場合は，薬物濃度が高くなるにつれて結合量は飽和に達し，平衡値に収束する現象を観察することができる．一方，脂質膜透過性の高い薬物の場合は，濃度を上げてそのプロットは収束することなく，直線的に上昇していく．今回の結果では，プロットは高濃度側において平衡値への収束が認められた．SPR による相互作用評価において，このような傾向を持つ薬物には，正の電荷をもつ薬物が多く，脂質膜透過性が低いとされている⁵⁾．しかし，エリスロマイシンやムピロシンの構造式からは，負電荷が予測される官能基があるため，これらの解析結果は，親和性が弱すぎるために分子間相互作用を正しく反映できていない可能性が示唆された．

第3項 考察

表4で示したPOPC及びPOPE/POPG (4:1, v/v) 間のL1センサーチップ上への平均固定化量において認められた固定化量の相違が薬物の脂質膜親和性評価へ影響がないか判断するために、以下の式に従って2種のリポソーム固定化量の差を算出した。

$$\text{リポソーム固定化量の差 (\%)} = \frac{\text{POPC or POPE/POPG}^a}{(\text{POPC} + \text{POPE/POPG})/2} \times 100$$

a: POPE/POPG (4:1, v/v) 固定化量

以上の計算の結果、その差は5%未満であった。この結果より、これまでの研究におけるL1センサーチップ上へのリポソーム固定化量の変動とその測定結果への影響の有無を基に、本実験のリポソーム固定化量の変動は相互作用測定結果に影響を与えないと判断できるため、これらの固定化量の違いは2種のモデル脂質膜への親和性の評価に影響を与えないと判断した。

薬物の脂質膜吸着性の予測検討をするために図15に示したグラフの結果から、エリスロマイシン及びムピロシンの体内薬物動態を予測することが本評価系では困難であることがわかった。これには、薬物の脂質膜に対する親和性の弱さとその薬効作用機序が関連しているのではないかと考えられる。つまり、AmBがエルゴステロール含有脂質膜と結合することによって細胞膜にイオンチャネルを形成し、脱分極を起こすことを薬効作用機序とするのに対し、エリスロマイシン、ムピロシンは細菌のタンパク質合成を阻害することを薬効作用機序とする^{41, 42)}。そのため、薬効メカニズムとして直接的に脂質膜との相互作用を必要としないことから、脂質膜に対する相互作用が低いことが*in vivo* データと相関しない原因の一つである可能性が考えられる。しかしながら、SPRを用いた評価系の利点として、単純な成分を固定化することにより、固定化した成分と相互作用させる分子のみのシンプル

な相互作用を評価できることも挙げられる。よって、このような単純な評価系のデータが *in vivo* データとすべてにおいて良好な相関が得られるわけではないことは容易に想像できる。したがって、本結果に対する見方を変えて、*in vivo* データとの相関ではなく、脂質膜との相互作用を薬効作用機序として有する AmB では良好に親和性が検出でき、脂質膜との相互作用を薬効作用機序としないエリスロマイシン及びムピロシンでは親和性が弱く、脂質膜親和性評価が困難であったという点に着目すると、本評価系が薬物と脂質膜の親和性評価系として有効に利用できることを裏付ける結果であると考えられる。また、今回分子量の小さい D-シクロセリンに対しては検出限界以下と判断したが、D-シクロセリンの薬効作用機序もまた脂質膜との結合ではなく、細胞壁構成成分であるペプチドグリカンの合成阻害により抗菌活性を発揮する薬剤である⁴³⁾。仮に分子量が D-シクロセリンと同程度の低分子の薬物であったとしても、脂質膜への結合を薬効作用機序に持つ薬物であれば、**Biacore S51** による相互作用を検出できる可能性も考えられる。

薬物動態面において、エリスロマイシンは吸収が速い薬物として知られているが⁴⁴⁾、脂質膜吸着性予測の検討結果では、脂質膜透過性が低いことを示唆する結果となった。これは、前述したような低親和性の影響が考えられることに加え、エリスロマイシンの安定性に問題があることも懸念される。エリスロマイシンを経口投与した際、胃酸により容易に失活することが報告されており、臨床で用いられている医薬品は、これらの分解を回避するために、製剤化過程でコーティングなど様々な工夫を施してエリスロマイシンを安定化させている⁴⁵⁾。本実験において、エリスロマイシン測定溶液やランニング緩衝液は中性であるが、測定溶液を調製中又は調製後に測定溶液中でエリスロマイシンが分解していた場合、その相互作用は減弱することが予想される。よって、エリスロマイシンの脂質膜親和性をより正確に評価するためには、エリスロマイシンの安定性について、今後更に検討する必要があると考えられる。

一方、本実験に用いたもう一つの薬物ムピロシンは鼻粘膜からほとんど吸収されないことが報告されている⁴⁶⁾。この粘膜透過性の低さはPOPCとの親和性の低さからも予想できる。厳密には、各組織の細胞膜組成は異なるため、今後、鼻粘膜細胞膜組成や小腸粘膜細胞膜組成のモデル脂質膜を用いて相互作用解析することで、ハイスループットな *in vitro* 評価によって各組織での生体内薬物動態における目安となるデータが得られることも可能であると考えられる。ただし、本評価系によって取得できると予想される薬物の消化管吸収性に関するデータは、受動拡散による吸収のみであり、担体を介した能動輸送に関しては、輸送に利用される担体となる膜タンパク質などをセンサーチップ上に固定化して薬物との相互作用を測定する新たな評価系の構築が必要である。また、ムピロシンにおいては、カルシウム水和物として製剤化されているので、ヒトの臨床予測性の向上を目指すためには、製剤化されたムピロシンカルシウム水和物を用いた脂質膜親和性評価を実施することも重要であると考えられる。

第4項 小括

第1節で構築した評価系を用いて抗真菌薬以外の抗菌薬とモデル脂質膜との親和性を評価した。今回の実験において、分子量102.09のD-シクロセリンはBiacore S51の検出限界以下のため、良好なセンサーグラムが得られず、脂質膜親和性評価ができなかった。エリスロマイシン及びムピロシンについては、良好なセンサーグラムが得られたが、どちらも脂質膜に対する親和性が弱く、反応速度論的パラメーターの解釈が困難であった。しかしながら、これらの結果は、本実験に用いた2種の化合物の薬効作用機序が細菌のタンパク質合成阻害であることから、薬効作用機序に脂質膜との結合が必須と考えられているAmBと比較してセンサーグラムのレスポンスが低いことや低親和性を示す親和定数が算出されたことにより、本評価系が脂質膜親和性評価系として有効に利用できることを確認できる判断材料の一つとなった。

今回の結果より、本評価系が薬物脂質膜親和性評価に有用であることが確認でき、それらの結果より、薬効・毒性の指標のみならず、薬物動態、特に消化管からの吸収や組織移行性の指標となり得るデータの提供が可能であることが示唆された。今後、薬物動態の観点においても留意しながら、様々な組成の脂質膜との相互作用評価データや将来的には膜タンパク質との相互作用評価データも取得し、バイオアベイラビリティや組織移行性などのデータとの相関関係についてより詳細に考察していく必要がある。

第 2 章 表面プラズモン共鳴法を用いた Fungizone の脂質膜親和性評価系の構築

第 1 項 緒言

第 1 章に述べた *Streptomyces nodosus* 由来のポリエンマクロライド系抗真菌薬である AmB は両親媒性の疎水性が高い水に難溶な分子としてよく知られている。AmB は 1959 年に全身性真菌症への効果が報告されて以来、全身性真菌症に対する特効薬として注目を集め、現在でも多くの重篤な真菌症の治療においてゴールドスタンダードとして使用されている¹⁶⁾。しかしながら、前章にも述べたように、入院治療が必須であることや重篤な副作用により、より簡便な治療法で副作用の軽減された新たな抗真菌薬の開発が求められている¹⁷⁻¹⁹⁾。これまでに、AmB を用いた様々な製剤化が検討されてきた。

Fungizone は、1962 年に上市された最初の AmB 製剤であり⁴⁷⁻⁵¹⁾、AmB をデオキシコール酸ミセルに取り込むことで AmB の溶解度の問題を改善した医薬品である²⁰⁾。しかし、胆汁酸塩であるデオキシコール酸の添加による新たな毒性も問題になっている。高濃度の界面活性剤が赤血球の膜傷害を引き起したことや⁵²⁾、下痢のような副作用が

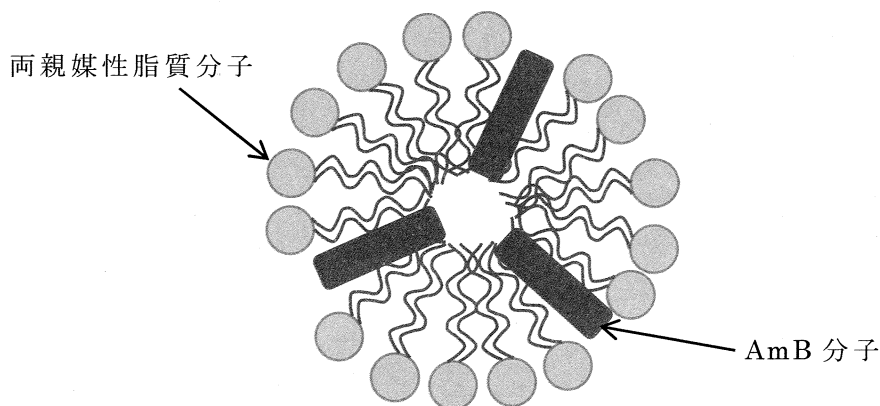


図 16. Fungizone 模式図²⁰⁾

中央に脂溶性部分を包み込み、外側を極性基が覆うミセルに AmB が組み込まれた状態で製剤化され、AmB の水への低溶解性の問題を改善させた。

Fungizone 投与後の患者で観察されたことから、これらは界面活性剤であるデオキシコール酸の存在が原因であると考えられている⁵³⁾。

本章では、第 1 章で構築した評価系³²⁾を基に、SPR システムを用いた AmB を製剤化した医薬品である Fungizone の 2 種の脂質膜に対する親和性評価系を構築し、それらの結合特性について記述した⁵⁴⁾。また、Fungizone 評価のために最適化した測定法の測定繰り返し精度及び再現性を確認し、Fungizone のモデル脂質膜に対する温度依存的な相互作用変化を明らかにするとともに、Fungizone に含まれる主な医薬品添加物であるデオキシコール酸ナトリウムによる測定系への影響についても確認した。さらに、第 1 章で報告した Fungizone の主成分薬物である AmB の脂質膜親和性と Fungizone の脂質膜親和性を比較し、それらの違いを考察した。

第 2 項 実験材料及び方法

2.1 試薬及び溶媒

エルゴステロール, コレステロールは Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した. クロロホルム, 2-propanol (IPA), 塩酸 (HCl) 及び CHAPS は和光純薬工業株式会社 (大阪) 製で, クロロホルムは分光分析用, IPA は HPLC 用, HCl 及び CHAPS は試薬特級品を使用した. POPC は Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, U.S.A.) より購入した. 蒸留水はナカライテスク株式会社 (京都) 製の HPLC 用を使用した. デオキシコール酸ナトリウムは Merck KGaA 社 (Darmstadt, Germany) より購入した. 10 倍濃縮 PBS は GE Healthcare U.K. Ltd. (Buckinghamshire, UK) から購入した. Fungizone は Bristol-Myers Squibb Company (New York, NY, U.S.A.) より入手した. 5% グルコース溶液及び注射用水は大塚製薬工業株式会社 (東京) より購入した.

2.2 測定装置

SPR を用いた分子間相互作用分析装置には GE Healthcare U.K. Ltd. 社 (Buckinghamshire, UK) 製 Biacore S51 を使用し, センサーチップにはリポソームの固定化に有効な Series S Sensor Chip L1 (GE Healthcare U.K. Ltd. 社製, 以下 L1 センサーチップと略す) を使用した. ランニング緩衝液には, L1 センサーチップへのリポソームの固定化及び Fungizone の脂質膜への相互作用評価ともに PBS を用いた. サンプル注入ニードル洗浄溶液には 20 mmol/L CHAPS 溶液, センサーチップ再生溶液には 100 mmol/L HCl/IPA (1:1, v/v) 混液を用いた. これらすべての溶液は用時調製し, 0.22 μm のフィルターでろ過後, 脱気して使用した.

2.3 リポソームの調製

個々のリポソーム溶液を調製するために、POPC 及びエルゴステロール、コレステロールをクロロホルムに溶解した。調製したリポソーム溶液を POPC-ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) の割合で混和し、遠心エバポレータにより留去・乾燥させた後、PBS でリポソームを再溶解した。この再溶解液（リポソーム濃度：POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) とともに 4 mmol/L) をほぼ透明になるまで超音波に照射し、100 nm 孔径のポリカーボネートフィルター (LiposoFast 社製) により 21 回ろ過し、100 nm に粒子径を揃えたリポソームを含む溶液を得た。孔径 100 nm リポソームを含む溶液を PBS で 8 倍希釈し、リポソーム最終濃度 0.5 mmol/L の POPC/ergosterol (4:1, v/v) 溶液及び 0.5 mmol/L の POPC/cholesterol (4:1, v/v) 溶液を調製し、固定化に用いた。

2.4 リポソームの固定化

Biacore S51 に L1 センサーチップを装着した後、流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 20 mmol/L CHAPS 溶液 15 μL を 3 回注入して L1 センサーチップ表面を洗浄した。L1 センサーチップ洗浄後、0.5 mmol/L リポソーム溶液を流速 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 500 秒間注入し、それぞれのリポソームを L1 センサーチップ上に固定化した。

2.5 Fungizone と脂質膜の相互作用測定

Fungizone 測定溶液は 0.25 – 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ の濃度範囲で 12 ポイント (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3.5, 5, 10, 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) を PBS を用いて調製した。これらの Fungizone 測定溶液をマストランスリミテーション考慮して、流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 200 秒間 (100 μL) 注入した。注入後、ランニング緩衝液を 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 400 秒間送液し、解離

領域を測定した．すべての相互作用測定は，測定温度 25°C と 37°C で実施した．Fungizone 測定溶液を注入後，L1 センサーチップ表面から固定化したリポソーム及び測定において解離せずに残存した Fungizone をすべて取り除くために流速 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ で 100 mmol/L HCl/IPA (1:1, v/v) 混液を 15 μL 注入した．以上の一連の測定を再現性を確認するために 3 回繰り返し実施した．

2.6 データ解析

Fungizone-モデル脂質膜相互作用測定により得られた 12 濃度のセンサーグラムより AmB 評価時と同様の 1.5 - 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ のセンサーグラムを採用し，BIA evaluation ソフトウェア (Ver. 4.1) を用いてグローバルフィッティングにより結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2})，解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 (K) を算出した．Fungizone-モデル脂質膜相互作用評価の解析モデルには，AmB 評価時と同様，ペプチド-脂質膜相互作用評価に用いられる Two-state reaction model (conformation change) を採用した⁹⁻¹¹⁾．このモデルは Fungizone-脂質膜相互作用の作用メカニズムの観点から下記のような 2 段階で表される．



F : Fungizone

L : 脂質膜

FL : Fungizone-脂質膜複合体 (静電的相互作用)

FL* : Fungizone-脂質膜複合体のコンフォメーション変化体
(疎水性相互作用)

Fungizone は脂質膜表面の極性基部分と静電的相互作用 (Step 1) により結合した後，脂質膜内部のアルキル鎖で構成される疎水性領域に侵入し，疎水性相互作用により結合する (Step 2)．この解析モデルに

における各 Step の親和定数は，以下に示した式により算出される
(27,34,53-57) .

$$dR_1/dt = k_{a1} \cdot C_A (R_{\max} - R_1 - R_2) - k_{d1} \cdot R_1 - k_2 \cdot R_1 + k_{d2} \cdot R_2$$

$$dR_2/dt = k_{a2} \cdot R_1 - k_{d2} \cdot R_2$$

R_1 : F と K の結合により形成された complex 1

R_2 : FL のコンフォメーション変化により形成された complex 2

R_{\max} : 最大アナライト結合量

C_A : アナライト濃度

親和定数 (K) は結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}) 及び解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) を用いて以下に示す式によって算出した.

$$K = k_{a1}/k_{d1} \cdot (k_{a2}+k_{d2})/k_{d2}$$

第3項 結果

3.1 L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の最適化

今回の SPR を用いた親和性評価において、2 種の異なるリポソーム混液はそれぞれ POPC/cholesterol (4:1, v/v) は哺乳動物細胞膜のモデル脂質膜として、POPC/ergosterol (4:1, v/v) は真菌細胞膜のモデル脂質膜として使用した^{15,32)}。リポソーム混液は PBS と 5% グルコース溶液、注射用水で調製し、L1 センサーチップ上に安定的にリポソームを固定化するためのより良い固定化条件を選定するために、これら 3 種のリポソーム混液を検討した。また、これら 3 種のリポソーム調製用溶液は、リポソームを調製する際に一般的によく用いられる溶液である PBS と Fungizone の添付文書の投与方法に Fungizone 溶解溶液として 5% グルコース溶液と注射用水が記載されており、Fungizone の品質を良好に保つことができる溶液という理由から注射用水及び 5% グルコース溶液をリポソーム調製用溶液候補に選択した。

これら 3 種のリポソーム固定化用溶液を用いて L1 センサーチップ上への固定化を検討した結果、PBS が最も良好な固定化用溶液であった (表 7)。固定化検討の結果のうち採用されなかった注射用水及び 5% グルコース溶液の平均固定化量 (Response units)、標準偏差 (SD) 及び

表 6. L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の固定化量とその繰り返し精度 (測定温度 25°C)

リポソーム 調製溶媒	Lipid type	Response units		RSD ^a
		Mean (<i>n</i> = 16)	SD	(%)
5% グルコー ス溶液	POPC/ergosterol (4:1, v/v)	6760	430	6.4
	POPC/cholesterol (4:1, v/v)	14728	253	1.7
注射用水	POPC/ergosterol (4:1, v/v)	90	3	3.3
	POPC/cholesterol (4:1, v/v)	2366	722	30.5

a) Relative standard deviation

相対標準偏差 (RSD) を表 6 にそれぞれ示した。注射用水により調製したリポソーム固定化溶液では、平均固定化量が POPC/ergosterol (4:1, v/v) で約 90 RU, POPC/cholesterol (4:1, v/v) で約 2400 RU であり、その相対標準偏差は POPC/ergosterol (4:1, v/v) で 3.3%, POPC/cholesterol (4:1, v/v) で 30.5%であった。注射用水をリポソーム固定化溶液に用いた場合、相互作用測定に必要とされるリポソーム固定化量約 4500 RU を固定化できない上に、POPC/cholesterol (4:1, v/v) については、相対標準偏差も 30.5%とリポソーム固定化精度が不良であった。一方、5% グルコース溶液により調製したリポソーム固定化溶液では、平均固定化量が POPC/ergosterol (4:1, v/v) で約 6800 RU, POPC/cholesterol (4:1, v/v) で約 14700 RU と相互作用評価を実施するに当たり十分量のリポソームの固定化が可能であり、その相対標準偏差は POPC/ergosterol (4:1, v/v) 6.4%, POPC/cholesterol (4:1, v/v) 1.7%と精度も良好であったが、測定サイクル毎にリポソーム固定化量が減少する現象が認められた。また、POPC/ergosterol (4:1, v/v) と POPC/cholesterol (4:1, v/v) の固定化量の差を以下の式にしたがって算出したところ、これらの固定化量の差が約 37%と 2 種のリポソーム固定化量に大きな差が認められた。

$$\text{リポソーム固定化量の差 (\%)} = \frac{\text{POPC/ergosterol}^{\text{a}} \text{ or } \text{POPC/cholesterol}^{\text{b}}}{(\text{POPC/ergosterol} + \text{POPC/cholesterol})/2} \times 100$$

a: POPC/ergosterol (4:1, v/v) 固定化量

b: POPC/cholesterol (4:1, v/v) 固定化量

以上の結果より、PBS によって調製したリポソーム混液のみが安定的なリポソームの固定化が可能であると判断されたため、リポソーム固定化用溶液の調製に PBS を採用した。

L1 センサーチップ上へのリポソームの固定化において実験間精度を確認するために、1 日に 9 サンプルずつ 2 日間にわたって脂質膜相互作用測定を実施し ($n = 18$)、2 種のリポソーム平均固定化量

表 7. L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の固定化量とその繰り返し精度 (測定温度 25°C)

Lipid type	Response units		RSD (%) ^a
	Mean (<i>n</i> = 18)	SD	
POPC/ergosterol (4:1, v/v)	5802	302	5.2
POPC/cholesterol (4:1, v/v)	6470	467	7.2

a) Relative standard deviation

(Response units), 標準偏差 (SD) 及び相対標準偏差 (RSD) をそれぞれ表 7 に示した. L1 センサーチップ上へのリポソーム平均固定化のレスポンスはそれぞれ POPC/ergosterol (4:1, v/v) 約 5800 RU, POPC/cholesterol (4:1, v/v) 約 6500 RU であり, その相対標準偏差は 7.2%以下と良好な再現性を示した. POPC/cholesterol (4:1, v/v) 及び POPC/ergosterol (4:1, v/v) 間の L1 センサーチップ上への固定化量には相違が認められるが, その差は約 5%以内であった. 著者らは, L1 センサーチップ上に様々な脂質膜を固定化したこれまでの研究データや今回の研究における反応速度論的パラメーターを含む様々なパラメーターを考慮して, 分析学的にリポソーム固定化の際に生じる 5%の差異は親和性評価結果に対して非常に微少のものであると考えられるため, Fungizone の 2 種のモデル脂質膜への親和性の評価に影響を与えないと判断した⁹⁾.

3.2 Fungizone と脂質膜の相互作用

AmB の抗菌活性は哺乳動物細胞膜中のコレステロールよりも真菌の主なステロールであるエルゴステロールへの高い親和性を示すことにより発揮される²³⁻²⁶⁾. 図 17 にはセンサーチップ上において固定化した POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) と Fungizone との相互作用センサーグラムをそれぞれ示した (Fungizone 濃度 1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$). 今回の濃度範囲において, センサーグラムは Fungizone 濃度の上昇に伴うレスポンスの上昇が認められた. 10 $\mu\text{mol/L}$

までの Fungizone 濃度ではセンサーグラムの飽和が認められず，検出上限には達していないと考えられる濃度範囲であるが，Fungizone 濃度 $20 \mu\text{mol/L}$ 以上では，良好なセンサーグラムを検出することができなかった．これらの理由により，Fungizone の脂質膜親和性評価には， $1.5 - 10 \mu\text{mol/L}$ のセンサーグラムを採用した．また，これらの Fungizone のセンサーグラムのレスポンスを比較してみると，特に解離領域におい

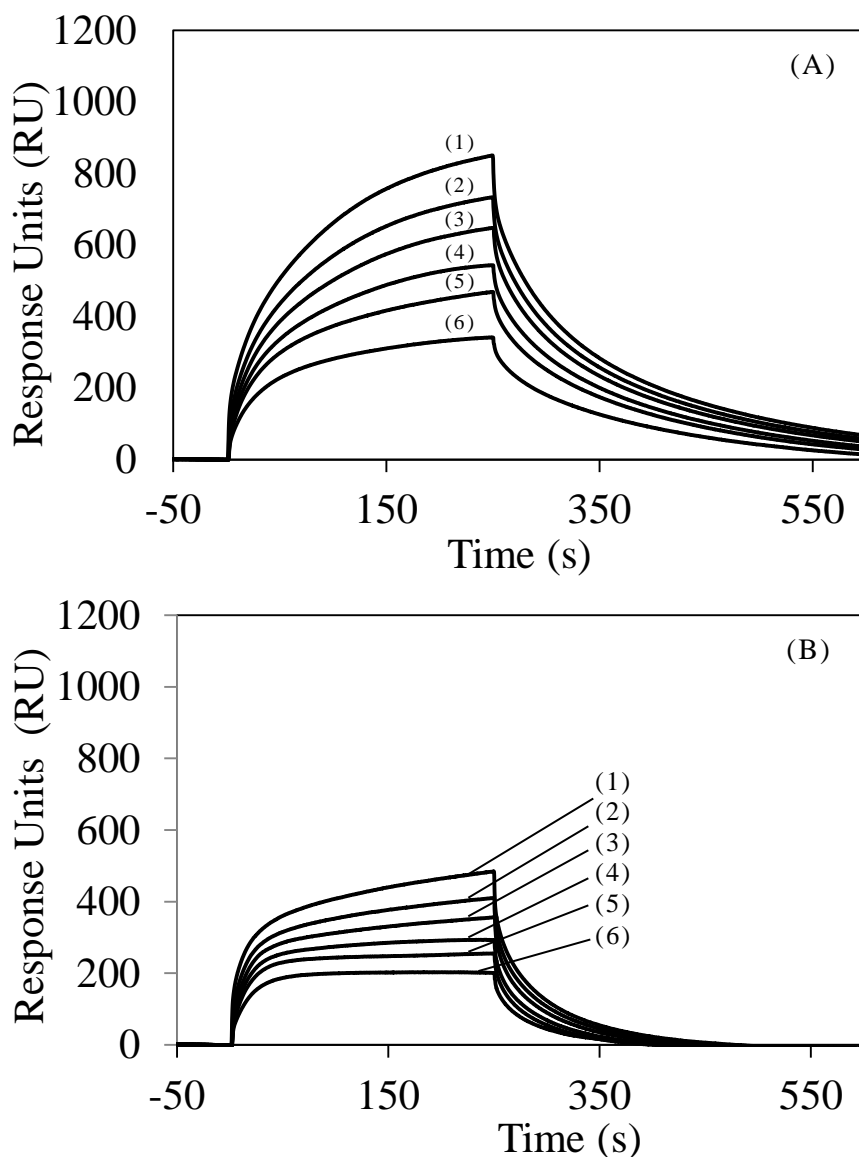


図 17. Fungizone の L1 センサーチップ上に固定化したリポソーム膜への相互作用測定センサーグラム (測定温度 25°C)
 (A) POPC/ergosterol (4:1, v/v), (B) POPC/cholesterol (4:1, v/v), Fungizone 濃度 ; (1) 10, (2) 5, (3) 3.5, (4) 2.5, (5) 2, (6) $1.5 \mu\text{mol/L}$

て POPC/cholesterol (4:1, v/v) よりも POPC/ergosterol (4:1, v/v) に対して高い親和性を示した。

測定温度 25°C で測定したセンサーグラムを Two-state reaction model で解析した結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}) 及び解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}), 親和定数 (K) を表 8 に示した。繰り返し測定による各パラメーターの再現性は良好であった。このモデルは前述したように AmB-脂質膜相互作用の複合体モデルを基に選んだ^{15,21,22,33,34}。この複合体モデルとは、リポソームの親水性基部分のヘッドグループと Fungizone の静電的な相互作用を含む初期の相互作用 (Step 1, k_{a1} , k_{d1} により算出) とリポソームとの疎水的な相互作用による内部への Fungizone の挿入によって引き起こされる相互作用 (Step 2, k_{a2} , k_{d2}) から成る。この親和定数算出モデルにおいて、 k_{a1}/k_{d1} 値及び k_{a2}/k_{d2} 値はそれぞれ静電的な相互作用を含む Fungizone と脂質膜間の初期の親和定数と疎水的な相互作用に相当する。

繰り返し反応速度論的解析の結果、センサーグラムの形状や結合レスポンスは大きく異なるにも関わらず Fungizone の親和定数 (K , 1/M) は POPC/cholesterol (4:1, v/v) では 1.70×10^5 , POPC/ergosterol (4:1, v/v) では 3.12×10^5 と POPC/cholesterol (4:1, v/v) よりも POPC/ergosterol (4:1, v/v) に対して約 2 倍だけの高値を示すに留まった。Fungizone とリポソームの親水性をもつヘッドグループとの相互作用 (Step 1) において $K_1 = k_{a1}/k_{d1}$ を算出すると、POPC/ergosterol (4:1, v/v) では 3.08×10^5 , POPC/cholesterol (4:1, v/v) では 0.941×10^5 と 2 種の脂質膜間で約 3 倍の相違が認められ、エルゴステロール含有脂質膜への親和性の方がわずかに強かった。一方、Step 2 における疎水的な相互作用による結合速度定数 (k_{a2} , 1/s) は POPC/ergosterol (4:1, v/v) では 6.16×10^{-5} , POPC/cholesterol (4:1, v/v) では 1630×10^{-5} と 2 種の脂質膜間で大きく異なり、コレステロール含有脂質膜への疎水的な相互作用による Fungizone の取り込みがエルゴステロール含有脂質膜への取り込みよりも約 265 倍速いことがわかった。さらに、Step 2 における Fungizone の解離速度定数 (k_{d2} , 1/s) は POPC/ergosterol (4:1,

表 8. Fungizone (1.5 - 10 $\mu\text{mol/L}$) とモデル脂質膜との相互作用における反応速度論的パラメーター及び親和定数 (測定温度 25°C, $n = 3$)

Lipid type	Rate constants ^c (Two-state reaction model) (1.5 - 10 $\mu\text{mol/L}$)				
	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} ($\times 10^{-3}$, 1/s)	k_{a2} ($\times 10^{-5}$, 1/s)	k_{d2} ($\times 10^{-3}$, 1/s)	K ($\times 10^5$, 1/M)
POPC/ergosterol ^a	2290 \pm 150	7.43 \pm 0.30	6.16 \pm 1.30	3.36 \pm 1.20	3.12 \pm 0.22
POPC/cholesterol ^b	8310 \pm 630	88.3 \pm 6.0	1630 \pm 120	20.4 \pm 1.6	1.70 \pm 0.10

Mean \pm standard deviation. a) POPC/ergosterol (4:1, v/v). b) POPC/cholesterol (4:1, v/v). c) 結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}), 解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 K_1 (k_{a1}/k_{d1}), K_2 (k_{a2}/k_{d2}), K ($K_1 + K_1K_2$).

v/v) では 3.36×10^{-3} , POPC/cholesterol (4:1, v/v) では 20.4×10^{-3} と, エルゴステロール含有脂質膜に対する解離速度定数はコレステロール含有脂質膜に対する解離速度定数よりも約 1/6 の低値を示した. この結果より, Fungizone はコレステロール含有脂質膜に対して速い結合・解離を示し, エルゴステロール含有脂質膜に対しては結合・解離共に遅いことがわかった. 実際には, Fungizone と脂質膜の親和定数 K 値 (1/M) は POPC/ergosterol (4:1,v/v) 膜では 3.12×10^5 , POPC/cholesterol (4:1, v/v) 膜では 1.70×10^5 であり, Step 1, 2 を含めた全体的な相互作用としてはほぼ同程度の親和性であった.

3.3 医薬品添加物の脂質膜相互作用に対する作用と Fungizone と脂質膜の相互作用における測定温度の影響

Fungizone は AmB の溶解度を改善するために医薬品添加物としてのデオキシコール酸ナトリウムのミセルに AmB を組み込み製剤化された医薬品である. 医薬品添加物は製剤化の際に原薬となる薬物の薬効や物性の改善のために原薬に添加されるものである. 医薬品をアナライトとする SPR を用いた相互作用解析においては, 医薬品の相互作用を評価するにあたり原薬に添加された医薬品添加物の特性を考慮する必要があると考えられる. つまり, 医薬品をアナライトとして用いるということは, 原薬と医薬品添加物の混合試料と固定化したリガンド, 今回であればモデル脂質膜との相互作用を測定することになる. したがって, 仮に相互作用に変化が認められた場合であっても, その変化が原薬に由来する変化であるのか, 医薬品添加物に起因するものであるのかの見極めが重要となる. Fungizone の場合, 高濃度のデオキシコール酸ナトリウムが主な医薬品添加物として配合されているため, SPR システムを用いた Fungizone の脂質膜相互作用評価におけるデオキシコール酸ナトリウムの影響を十分に考慮しなければならない. また, 医薬品の脂質膜への相互作用は, *in vivo* での薬効または毒性発現により類似した条件下でも評価するべきであると考え, 測定温度をよ

り生理的条件に近い 37°C に設定した実験も実施した。

最初に、薬物-脂質膜相互作用に対するデオキシコール酸ナトリウムの影響を調べた。親和性評価時の Fungizone 濃度 1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$ の測定溶液中に含まれるデオキシコール酸ナトリウム濃度である 2.7 – 18 $\mu\text{mol/L}$ のデオキシコール酸ナトリウム測定溶液を調製し、SPR を用いた測定において標準的に設定されている 25°C とより生理条件に近い温度 37°C それぞれの条件で脂質膜相互作用測定を実施した。図 18 にセンサーチップ上に固定化した POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) とデオキシコール酸ナトリウムとの相互作用測定結果のセンサーグラムをそれぞれ示した。これらのセンサーグラムから、デオキシコール酸ナトリウムのこれら 2 種の脂質膜に対する親和性に選択性は認められず、測定温度による相互作用変化も認められなかった。また、デオキシコール酸ナトリウムと脂質膜との相互作用は Fungizone と脂質膜との相互作用に比べて微弱であった。以上より、Fungizone の選択性を含む脂質膜親和性評価において、25°C、37°C どちらの測定温度であってもデオキシコール酸と脂質膜の相互作用は評価結果に影響しないと判断した。

次に、生理条件に近い温度 (37°C) での Fungizone の脂質膜親和性を評価した。Fungizone と脂質膜間の相互作用解析を実施する前に、25°C での実験時と同様に、37°C での L1 センサーチップ上への POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) の固定化の再現性を確認した。測定は 2 日間の実験でデータを取得し ($n = 18$)、表 9 に各脂質膜の L1 センサーチップ上への固定化再現性を確認した結果を示した。リポソーム平均固定化量は POPC/ergosterol (4:1, v/v) で約 6000 RU、POPC/cholesterol (4:1, v/v) で約 6600 RU であり、ともに RSD が 8.6% 以下と繰り返し測定による再現性は良好であった。

図 19 には、測定温度 37°C での Fungizone (1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$) のセンサーチップ上に固定化した POPC/ergosterol (4:1, v/v) 及び POPC/cholesterol (4:1, v/v) への相互作用のセンサーグラムをそれぞれ示した。測定温度 25°C で測定した際に得られてセンサーグラム (図

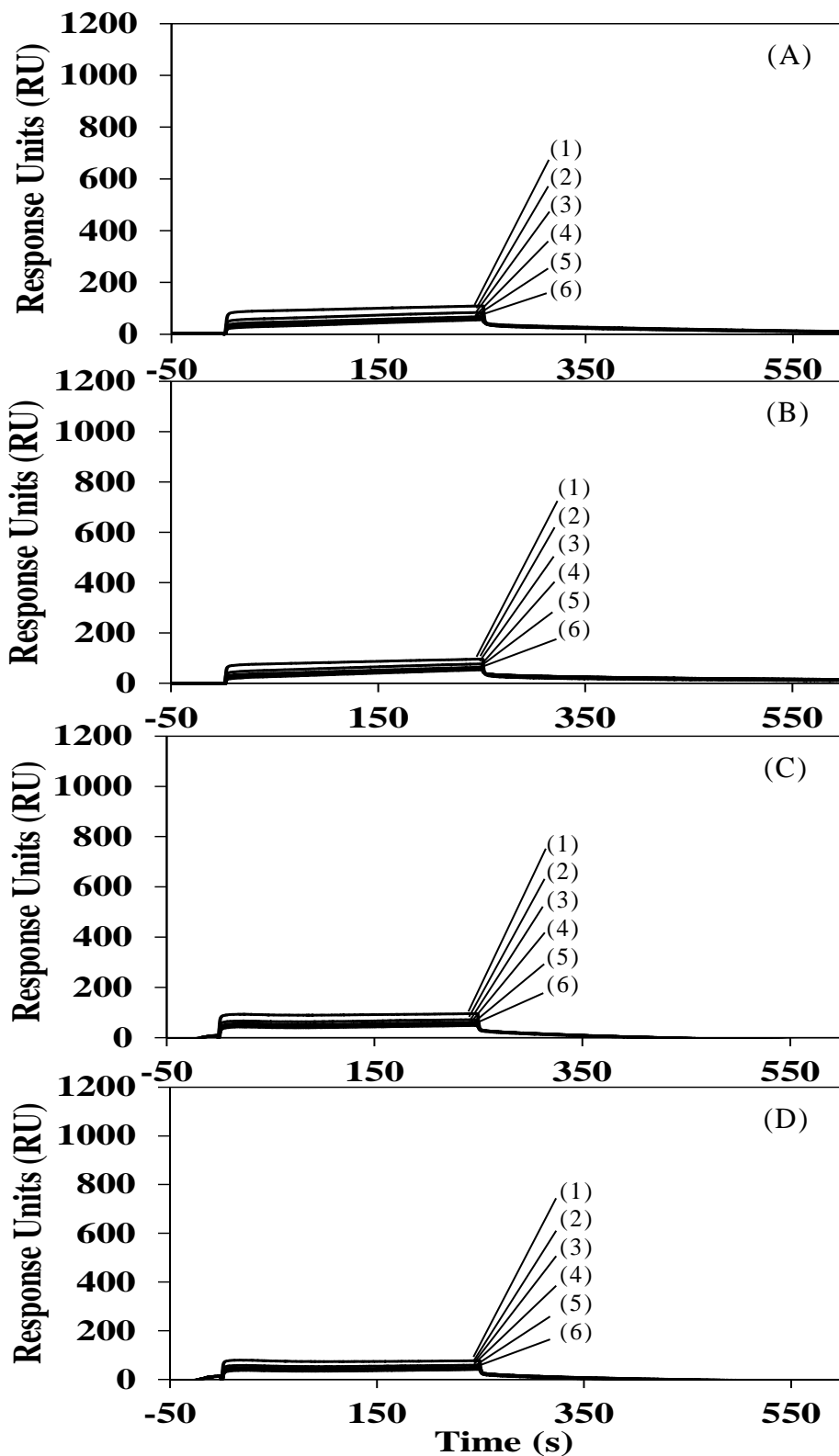


図 18. デオキシコール酸ナトリウムの L1 センサーチップ上に固定化したモデル脂質膜への相互作用測定センサーグラム
 (A) POPC/ergosterol (4:1, v/v) (25°C), (B) POPC/cholesterol (4:1, v/v) (25°C), (C) POPC/ergosterol (4:1, v/v) (37°C), (D) POPC/cholesterol (4:1, v/v) (37°C),
 デオキシコール酸ナトリウム濃度; (1) 18, (2) 9, (3) 6.3, (4) 4.5, (5) 3.6, (6) 2.7 $\mu\text{mol/L}$

表 9. L1 センサーチップへのモデル脂質膜固定化の固定化量とその繰り返し精度 (測定温度 37°C)

Lipid type	Response units		RSD (%) ^a
	Mean (<i>n</i> = 18)	SD	
POPC/ergosterol (4:1)	6092	58	1.0
POPC/cholesterol (4:1)	6577	567	8.6

a) Relative standard deviation

17) と比較すると, 特に POPC/ergosterol (4:1, v/v) のセンサーグラムの形状に変化が認められた. 測定温度 37°C のセンサーグラムの用いて Two-state reaction model で解析した反応速度論的パラメーター (k_{a1} , k_{d1} , k_{a2} , k_{d2} , K) を表 4 に示した. 繰り返し測定による反応速度論的パラメーターの再現性はいずれも良好であった. 測定温度 37°C での Fungizone とモデル脂質膜との親和定数 K (1/M) は, エルゴステロール含有脂質膜に対しては, 3.12×10^5 から 1.83×10^5 へ減少し, コレステロール含有脂質膜に対しては, 1.70×10^5 から 0.619×10^5 へと減少した. これらの結果より, 測定温度を変更することによって, エルゴステロール含有膜への選択性が約 2 倍から約 3 倍へとわずかに上昇することがわかった. Fungizone の POPC/ergosterol (4:1, v/v) に対する Step2 の相互作用において, 測定温度を 25°C から 37°C にすることで結合速度定数 (k_{a2} , 1/s) が 6.16×10^{-5} から 6.88×10^{-3} へと劇的に増加した. これは, デオキシコール酸で形成されたミセルとエルゴステロール含有脂質膜の疎水性領域との相互作用により形成された複合体を通して AmB の脂質膜への侵入を速やかにしたためではないかと考えられる⁵⁸⁾. また, Fungizone と POPC/ergosterol (4:1, v/v) との相互作用における解離速度定数 (k_{d1} 及び k_{d2} , 1/s) は Step1, Step2 とともにそれぞれ 7.43×10^{-3} 及び 3.36×10^{-3} から 3.59×10^{-2} 及び 1.46×10^{-2} へと大幅に増加した. これは, Fungizone のエルゴステロール含有脂質膜に対する結合力が温度の上昇によって減弱し, 解離しやすくなる可能性を示唆している. Fungizone-モデル脂質膜相互作用を全体的な相互作用 (親和定数,

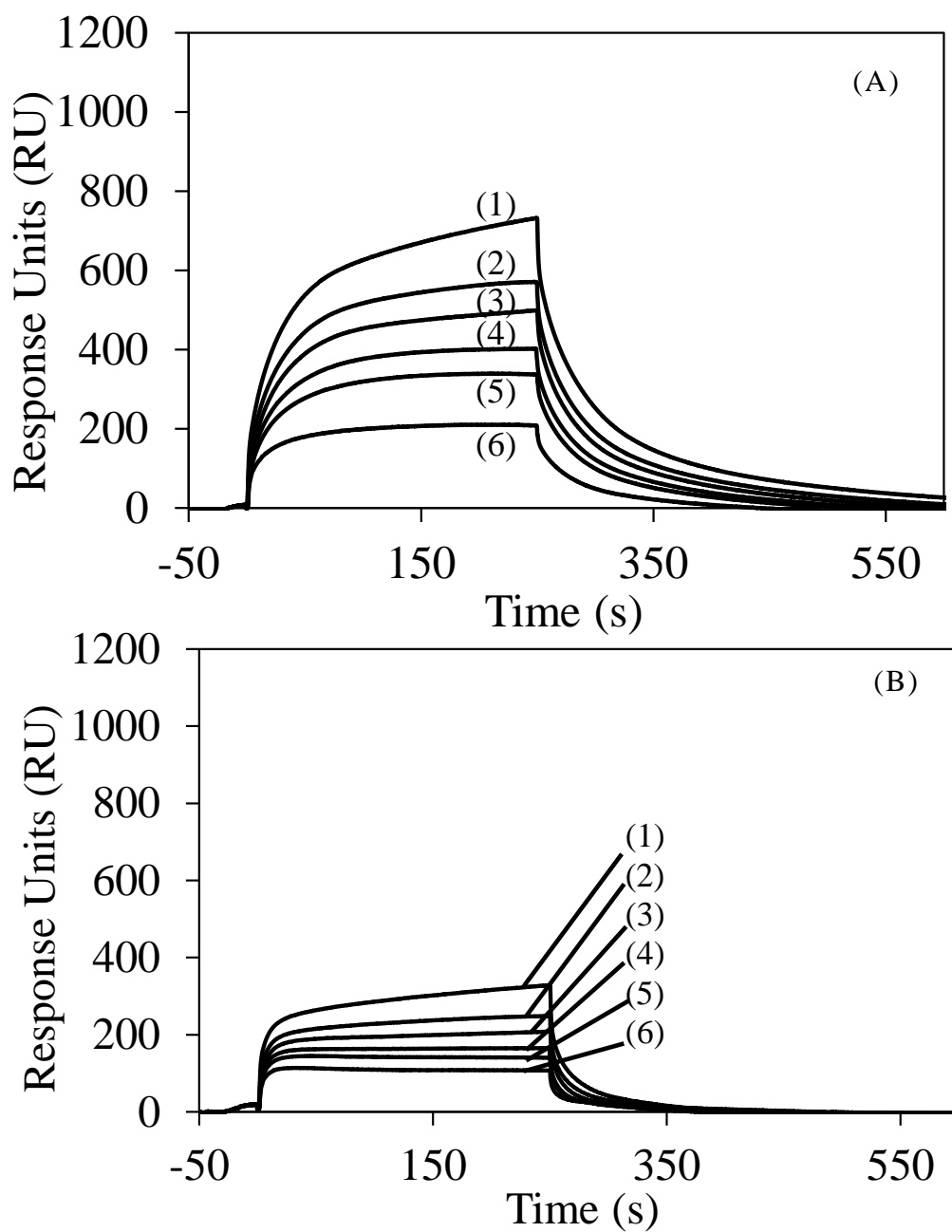


図 19. Fungizone の L1 センサーチップ上に固定化したリポソーム膜への相互作用測定センサーグラム (測定温度 37°C)
 (A) POPC/ergosterol (4:1, v/v), (B) POPC/cholesterol (4:1, v/v), Fungizone 濃度 ; (1) 10, (2) 5, (3) 3.5, (4) 2.5, (5) 2, (6) 1.5 $\mu\text{mol/L}$

表 10. Fungizone (1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$) とモデル脂質膜との相互作用における反応速度論的パラメーター及び親和定数
(測定温度 37°C, $n = 3$)

Lipid type	Rate constants ^c (Two-state reaction model) (1.5 – 10 $\mu\text{mol/L}$)				
	k_{a1} (1/Ms)	k_{d1} ($\times 10^{-2}$, 1/s)	k_{a2} ($\times 10^{-3}$, 1/s)	k_{d2} ($\times 10^{-2}$, 1/s)	K ($\times 10^5$, 1/M)
POPC/ergosterol ^a	4380 \pm 90	3.59 \pm 0.60	6.88 \pm 1.58	1.46 \pm 0.09	1.83 \pm 0.09
POPC/cholesterol ^b	6550 \pm 1220	14.6 \pm 4.51	5.72 \pm 2.81	1.70 \pm 0.73	0.619 \pm 0.135

Mean \pm standard deviation. a) POPC/ergosterol (4:1, v/v). b) POPC/cholesterol (4:1, v/v). c) 結合速度定数 (k_{a1} , k_{a2}), 解離速度定数 (k_{d1} , k_{d2}) 及び親和定数 K_1 (k_{a1}/k_{d1}), K_2 (k_{a2}/k_{d2}), K ($K_1 + K_1K_2$).

K 値) のみで捉えた場合, 測定温度の変化によって Fungizone とモデル脂質膜との親和性に顕著な変化は認められなかったが, 相互作用の詳細, つまり, 各段階でのそれぞれの結合速度定数や解離速度定数には測定温度依存的な変化が認められた.

以上の結果より, これまでに ELISA などによって評価されてきた平衡状態 (Step1, Step2 すべての反応段階を含めた全体的な親和性) での相互作用解析に加え, SPR を用いた反応速度論的な相互作用解析を活用することは, これまでに観察できなかった反応様式の詳細を解析することが可能になり, 例えば薬物の薬効または毒性発現にどの段階の作用が効いているのかなどの作用メカニズムの解明など創薬開発に有益な情報を提供できると考えられる.

第4項 考察

第1章において、AmBと脂質膜との親和性について記述したが³²⁾、ここでは、AmBとモデル脂質膜との親和性とFungizoneとモデル脂質膜との親和性について比較、考察する。前述したようにAmBはエルゴステロール含有脂質膜に対して約18倍の選択性を示した。一方で、AmBを製剤化したFungizoneのエルゴステロール含有脂質膜に対する選択性は、コレステロール含有脂質膜に比べて測定温度25°Cの時、わずか2倍ほどであった。親和定数*K*値を比較してみると、Fungizoneのエルゴステロール含有脂質膜に対する*K*値(1/M)は 3.12×10^5 、AmBのエルゴステロール含有脂質膜に対する*K*値(1/M)は 28.5×10^5 とFungizoneの*K*値はAmBの*K*値に比べ約1/9に減少していた。これはAmBとモデル脂質膜の相互作用が、AmBがデオキシコール酸ミセル内に取り込まれ製剤化されることによって減少してしまう可能性を示唆している。

AmBはデオキシコール酸製剤Fungizoneとして上市後、50年以上にわたって臨床で使用されてきたが、その重篤な副作用の発現は大きな課題となっている。2006年には欧米諸国から約10年遅れる形で日本においてAmBのリポソーム製剤であるAmBisome(図20)が上市され、その副作用はFungizoneに比べ大きく軽減されたと言われている⁶⁰⁾。AmBisomeは水素添加ホスファチジルコリン、コレステロール、及びジステアロイルホスファチジルグリセロール(2:1:0.8)を成分とする直径100nm以下の単層リポソームの脂質2分子膜中にAmB分子が強固に組み込まれた構造をしている。そのため、AmBisomeからのAmB分子の血流中への遊離がほとんど起こらず、また毛細血管を通過できないために正常な臓器・組織への移行性が低い。その結果、AmBisomeは血中に長く滞留し、炎症を起こした標的感染病巣へ良好に移行すると推測され、これが薬物動態の改善と副作用の軽減をもたらすと期待されてきた。また、薬効面において、AmBisomeの*in vitro*抗真菌活性はFungizoneに匹敵することが報告されている⁶¹⁾。しかしながら、製

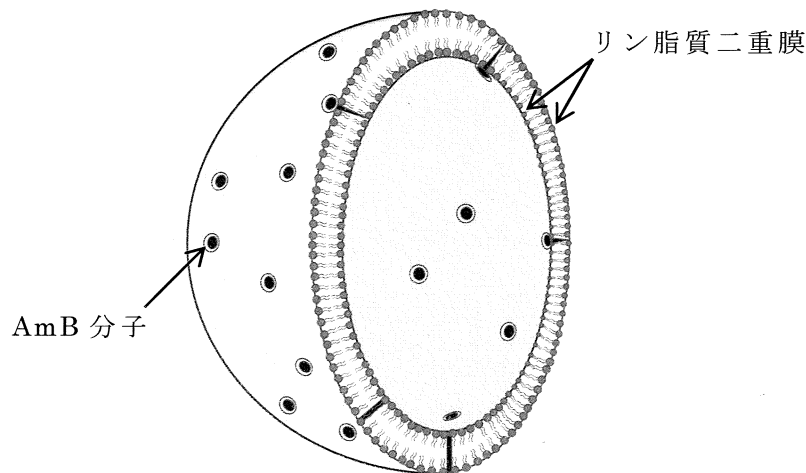


図 20. AmBisome 断面像の模式図

剤化コストや臨床治療使用例数の豊富さから現在においても Fungizone が広く使用されている現状がある。今回の評価結果より、AmB で約 18 倍あったエルゴステロール含有脂質膜選択性が Fungizone へと製剤化されると低下していることがわかった。前述したように、Fungizone は AmB を製剤化によりヒトへの投与を可能にした最初の製剤である。AmB を医薬品として開発する各段階で、様々な非臨床試験が実施され、AmB の薬効及び毒性が確認されている。対象疾患によって、薬効と毒性のバランスの基準は様々であるが、非臨床試験の段階で毒性が顕著に強いものは臨床試験へと開発を進められることはない。非臨床試験を通過して臨床試験へと開発を進めるにあたり、開発化合物は動物に投与する薬物懸濁液からヒトに投与可能な製剤へと形を変える。今回の場合、これが Fungizone である。仮に AmB が本来有する約 18 倍のエルゴステロール含有脂質膜選択性が Fungizone となった時にも維持されていたとすると、重篤な副作用の発現は軽減されていたのかもしれないと考えられる。以上より、SPR を用いた相互作用解析による Fungizone とモデル脂質膜の親和性変化はその副作用発現と相関する可能性があると考えられる。

本研究において、相互作用測定対象薬物は同じ AmB でもその剤形の

変化によって変化する脂質膜選択性を *in vitro* 脂質膜親和性評価により捉えることができた。この変化を早期に認識することは、より早い段階で開発化合物に必要な非臨床試験の追加や製剤化検討など対策を講じることが可能となると考えられ、本評価法が創薬開発において有用な情報を提供できる有力なツールとなる可能性を示唆した。

第 5 項 小括

今回、脂質膜と医薬品添加物を含む製剤である **Fungizone** の相互作用評価系を構築した。確立した評価法は測定温度に関係なくセンサーチップへの良好なリポソーム固定化再現性を示し、**Fungiozne** とモデル脂質膜との相互作用について、温度依存的な反応速度論的解析を実施した。また、測定温度の変化が **Fungizone** のモデル脂質膜への親和性の反応速度論的パラメーターや脂質膜選択性に影響を与えることを示した。さらに、**Fungizone** の主な医薬品添加物であるデオキシコール酸ナトリウムが **Fungizone** の脂質膜相互作用においてその脂質膜選択性などに影響を与えないことを確認した。

SPR システムを用いて医薬品の相互作用メカニズム解析の評価法を開発する際に、薬物-生体膜相互作用の評価において今回検討したような測定温度やランニング緩衝液などの測定条件も含めて主な医薬品添加物のリガンドに対する相互作用特性を考慮することが大切なポイントであると考えられる。今回構築した **SPR** を用いた測定法は、抗真菌症薬のみならず他の医薬品の脂質膜相互作用評価系の構築にも役立つと考えられる。

総括

SPR を利用した分子間相互作用解析装置を用いて抗真菌薬である AmB 及びその他の抗菌薬とモデル脂質膜との相互作用解析において、ハイスループットかつ高感度な評価系を構築し、以下の知見を得た。

- 1) 安定的なリポソームの固定化や AmB のキャリーオーバーがない評価法を構築したことにより、再現性の良好な相互作用評価ができた。
- 2) 従来 of 測定法よりも高感度化を達成できた本評価法により、治療領域の血漿中 AmB 濃度付近におけるセンサーグラムの形状変化を観察することができ、センサーグラムの形状が薬効作用メカニズムを反映していることを示唆した。
- 3) AmB で構築した評価法のリポソームの脂質組成を変更し、細菌細胞膜と哺乳動物細胞膜のモデル脂質膜と抗菌薬との親和性評価で、細菌細胞膜への選択性を検出できた。
- 4) 今回構築した評価系は、抗真菌薬のみならず他の薬物と脂質膜との相互作用評価に応用できることが確認できた。

AmB を製剤化した医薬品 Fungizone とモデル脂質膜との相互作用評価系を SPR を用いた分子間相互作用分析装置を使用して構築し、以下の知見を得た。

- 1) 測定温度の変化によって、平衡状態での相互作用に顕著な変化が認められない場合であっても、相互作用の各段階における反応速度論的な解析結果には、大きく変化するパラメーターがあることがわかり、従来の標準測定条件時の設定温度 25°C のみならず、

生理条件に近い測定温度 37°C での評価も重要であることが示唆された。

- 2) AmB の膜選択性において, Fungizone のエルゴステロール含有脂質膜選択性が AmB のエルゴステロール含有脂質膜選択性に比べて低下したことから, Fungizone のエルゴステロール含有脂質膜選択性が, Fungizone の副作用発現の原因のひとつとして寄与している可能性を示唆した。
- 3) 医薬品添加物と脂質膜との相互作用も評価し, Fungizone に含まれる主な医薬品添加物デオキシコール酸ナトリウムが脂質膜選択性に影響を与えないことを確認した。

本研究において, SPR 技術を用いて薬物とそれを製剤化した医薬品の脂質膜親和性評価系を構築することができた。本研究成果は, 創薬開発の早期の段階で扱う薬物から医薬品として上市された薬物までを同じ手法で評価できたことである。つまり, 原薬である AmB とその医薬品である Fungizone を同じモデル脂質膜で評価することにより, AmB での評価では見出せなかった Fungizone での膜選択性の低下を本研究において評価できた。このことは, 創薬開発早期の段階での *in vitro* 評価系で *in vivo* での薬効と毒性のバランスを反映させたデータを取得できる可能性を示唆した。また, SPR 技術を用いた脂質膜相互作用解析では, 様々な組成のモデル脂質膜を構築することが可能であるため, 例えばヒトと動物の小腸粘膜上皮細胞膜のモデル脂質膜を構築することによって消化管からの受動輸送による吸収率の種差の評価や, 肝細胞膜のモデル脂質膜を構築することによって肝組織移行率を評価するなど薬物動態評価への貢献も今後期待できる。

SPR 技術を利用した相互作用評価法は抗真菌薬と脂質膜との親和性評価に留まらず, 様々な薬物と生体内分子, 例えば疾患に関連する標的タンパク質や糖鎖などとの相互作用解析などに応用可能である。こ

のような *in vitro* 評価において、より正確な評価が多岐にわたって可能になれば、臨床試験時に発現すると予測される薬効や毒性の情報及び種差の影響により生じる薬物動態の変動情報などを得ることができ、*in vitro* 評価での臨床予測性の向上につながると考えられる。*In vitro* 評価での臨床予測性が向上すると、開発化合物が医薬品として開発できるか否かの正確な判断が可能となり、新薬開発成功率の上昇につながることが期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました本学生化学講座 北川裕之教授に深謝致します。

本研究論文の審査にあたり有益な御指導、数々の貴重な御助言を賜りました本学薬品物理化学講座 向高弘教授、臨床薬学講座 江本憲昭教授、微生物化学講座 小西守周准教授に心より感謝致します。

また、本研究の遂行に際し、様々な御力添えを頂きました同研究室 泉川友美博士、塩野義製薬株式会社 上森浩博士、森田宏俊博士、尾崎祥久博士、早川潤博士、木内啓貴修士、橋本広志氏、森本厚氏、平井優子氏、塩田里佳修士に厚く御礼申し上げます。

最後に、長きにわたり物心両面で支えてくれた家族、友人に心より感謝いたします。

参考文献

- 1) 清水孝雄. 2004 脂質生物学がわかる. (株) 羊土社.
- 2) 山口英世. 2007 病原真菌と真菌症 改訂4版. (株) 南山堂.
- 3) Yamada S., Onishi M., Fujinawa R., Tadokoro Y., Okabayashi K., Asashima M., Sugahara K. 2009 Structural and functional changes of sulfated glycosaminoglycans in *Xenopus laevis* during embryogenesis. *Glycobiology* 19: 488 – 498.
- 4) Leonard P., Hearty S., O'Kennedy R. 2011 Measuring protein-protein interactions using Biacore. *Methods Mol. Biol.* 681: 403 – 418.
- 5) 橋本せつ子, 森本香織. 2009 Biacore を用いた相互作用解析実験法. シュプレリンガー・ジャパン (株).
- 6) Rich RL., Myszka DG. 2000 Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 54 – 61.
- 7) Baird CL., Courtenay ES., Myszka DG. 2002 Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions. *Anal. Biochem.* 310, 93 – 99.
- 8) Abdiche YN., Myszka DG. 2004 Probing the membrane of drug/lipid membrane interactions using biacore. *Anal. Biochem.* 328: 233 – 243.
- 9) Kamimori H., Hall K., Craik DJ., Aguilar MI. 2005 Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* 337: 149 – 153.
- 10) Kamimori H., Blazyk J., Aguilar MI. 2005 Lipid Membrane binding properties of tryptophan analogues of linear amphipathic β -sheet cationic antimicrobial peptides by surface plasmon resonance. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 148 – 150.
- 11) Kamimori H., Unabia S., Thomas WG., Aguilar MI. 2005 Evaluation of the membrane-binding properties of the proximal region of the angiotensin II receptor (AT1A) carboxyl terminus by surface plasmon resonance. *Anal. Sci.* 25: 171 – 174.
- 12) Lerch M., Kamimori H., Folkers G., Aguilar MI., Beck-Sickinger AG., Zerbe O. 2005 Strongly altered receptor binding properties in PP and NPY chimeras are accompanied by changes in structure and membrane binding. *Biochemistry* 44: 9255 – 9264.
- 13) Hang HW. 2000 Action of antimicrobial peptides: Two-state model. *Biochemistry* 39: 8347 – 8352.
- 14) Aguilar MI. Peptide Drug Design & Membrane Nanotechnology.

<http://www.med.monash.edu.au/biochem/research/projects/peptide.html>. May 28, 2013.

- 15) Mouri R., Konoki K., Matsumori N., Oishi T., Murata M. 2008 Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance. *Biochemistry* 47: 7807 – 7815.
- 16) Vartivarian SE., Anaissie EJ., Bodey GP. 1993 Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: Classification, diagnosis and management. *Clin. Infect. Dis.* 17 Suppl 2: S487 – 491.
- 17) Kaloyanides GJ. 1994 Antibiotic-related nephrotoxicity. *Nephrol. Dial. Transplant. Suppl* 4: 130 – 134.
- 18) Sabra R., Branch RA. 1990 Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug Safety* 5: 94 – 108.
- 19) Sawaya BP., Briggs JP., Schermann J. 1995 Amphotericin B nephrotoxicity: The adverse consequences of altered membrane properties. *J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 154 – 164.
- 20) Segarra I., Movshin AD., Zarif L. 2002 Pharmacokinetics and Tissue Distribution after Intravenous Administration of a Single Dose of Amphotericin B Liposomes, a New Lipid-Based Delivery System. *J. Pharm. Sci.* 91: 1827 – 1837
- 21) Bolard J. 1986 How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta* 864: 257 – 304.
- 22) Hartsel SC., Bolard J. 1996 Amphotericin B : New life for an old drug. *Trends Pharmacol. Sci.* 12: 445 – 449.
- 23) Readio JD., Bittman R. 1982 Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester and borate complex to sterols. *Biochim. Biophys. Acta* 685: 219 – 224
- 24) Vertut-Croquin A., Bolard J., Chabbert M., Gary-Bobo C. 1983 Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study. *Biochemistry* 22: 2939 – 2944.
- 25) Milhaud J., Hartmann M., Bolard J. 1989 Interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with model membranes: Differences between small and large unilamellar vesicles. *Biochimie* 71: 49 – 56.
- 26) Vertut-Croquin A., Bolard J., Gary-Bobo CM. 1984 Enhancement of amphotericin B selectivity by antibiotic incorporation into gel state vesicles. A circular dichroism and permeability study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 360 – 366.

- 27) Mozsolits H., Unabia S., Ahmad A., Morton CJ., Thomas WG., Aguilar MI. 2002 Electrostatic and hydrophobic forces tether the proximal region of the angiotensin II receptor (AT1A) carboxyl terminus to anionic lipids, *Biochemistry* 41: 7830 – 7840.
- 28) Mozsolits H., Lee TH., Clayton AH., Sawyer WH., Aguilar MI. 2004 The membrane-binding properties of a class A amphipathic peptide, *Eur. Biophys. J.* 33: 98 – 108.
- 29) Myszka DG. 2004 Analysis of small-molecule interaction using Biacore S51 technology. *Anal. Biochem.* 329: 316 – 323.
- 30) Frostell-Karlsson Å., Widegren H., Green C., Hämäläinen MD., Westerlund L., Karlsson R., Fenner K., Waterbeemd HVD. 2005 Biosensor analysis of the interaction between drug compounds and liposomes of different properties; a two-dimensional characterization tool for estimation of membrane absorption. *J. Pharm. Sci.* 94: 25 – 37.
- 31) Cimitan S., Lindgren ML., Bertucci C., Danielson UH. 2005 Early absorption and distribution analysis of antitumor and anti-aids drugs: lipid membrane and plasma protein interaction. *J. Med. Chem.* 48: 3536 – 3546.
- 32) Onishi M., Kamimori H. 2013 High-throughput and sensitive assay for amphotericin B interaction with lipid membrane on the model membrane systems by surface plasmon resonance. *Biol. Pharm. Bull.* 36: 658 – 663.
- 33) De Kruijff B., Demel RA. 1974 Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complex. *Biochim. Biophys. Acta* 339: 57 – 70.
- 34) Baginski M., Resat H., Borowski E. 2002 Comparative molecular dynamic simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1567: 63 – 78.
- 35) Mozsolits H., Wirth H-J., Werkmeister J., Aguilar MI. 2001 Analysis of antimicrobial peptides interactions with hybrid bilayer membrane systems using surface plasmon resonance. *Biochim. Biophys. Acta* 1512: 64 – 76.
- 36) Hiemenz JW, Walsh TJ. 1996 Lipid Formulations of Amphotericin B: Recent Progress and Future Directions. *Clin. Infect. Dis.* 22: Suppl. S133 – S144.
- 37) Izumikawa K., Kohno S. 2012 Current Status of Drug Delivery Systems for Antifungal Drugs. *Drug Delivery System* 27: 93 – 105.
- 38) Cybulska B., Gadomska L., Mazerski J., Grzybowska J., Borowski E., Cheron M., Bolard J. 2000 *N*-Methyl-*N*-D-fructosyl amphotericin B methyl ester

- (MF-AME) a novel antifungal agent of low toxicity: Monomer/micelle control over selective toxicity. *Acta Biochim. Pol.* 47: 121 – 131.
- 39) Sedlak M., Buchta V., Kubicova L., Simunek P., Holcapek M., Kasparova P. 2001 Synthesis and characterization of a new amphotericin B-methoxy polyethylene glycol conjugate. *Bioorg. Med.Chem. Lett.* 11: 2833 – 2835.
 - 40) Kim K., Cho S., Park JH., Byum Y., Chung H., Kwon IC., Jeong SY. 2004 Surface plasmon resonance studies of the direct interaction between a drug/intestinal brush border membrane. *Pharm. Res.* 21:1233 – 1239.
 - 41) Mao JC. 1967 The stoichiometry of erythromycin binding to ribosomal particles of *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Pharmacol.* 12: 2441 – 2443.
 - 42) Hughes J., Mellows G. 1978 Inhibition of isoleucyl-transfer ribonucleic acid synthetase in *Echerichia coli* by pseudomonic acid. *Biochem. J.*, 176: 305 – 318
 - 43) 2008 Cycloserine. *Tuberculosis.* 88: 100 – 101.
 - 44) Ginsburg CM., Eichenwald HF. 1976 Erythromycin: a review of its uses in pediatric practice. *J. Pediatr.* 89: 872 – 884.
 - 45) Brisaert M. Heylen M., Plaizier-Vercammen J. 1996 Investigation on the chemical stability of erythromycin in solutions using an optimization system. *Pharm World Sci.* 18: 182 – 186.
 - 46) Hill RL. 2002 The bioavailability of mupirocin in nasal secretions in vitro. *J Clin. Pathol.* 55: 233 – 235.
 - 47) Block ER., Bennett JE., Livoti LG., Kllein WJ., Macgregor RR., Henderson L. 1974 Flucytosine and amphotericin B: Hemodialysis effects on the plasma concentration and clearance. *Ann. Intern. Med.* 80: 613 – 617.
 - 48) Gallis HA., Drew RH., Pickard WW. 1990 Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev. Infect. Dis.* 12: 308 – 329.
 - 49) Fisher JF., Taylor AT., Clark J., Rao R. 1983 Penetration of amphotericin B into human eye. *J. Infec. Dis.* 147: 164.
 - 50) Gold W., Stout HA., Pagano JF., Donovan R. 1955 – 1956 Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. *Antibiot. Annu.* 579 – 586.
 - 51) Lampen JO. 1969 Amphotericin B and other polyenic antifungal antibiotics. *Am. J. Clin. Pathol.* 52: 138 – 146.
 - 52) Rogers JA., Anderson KE. 1998 The potential of liposomes in oral drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 15: 421 – 480.
 - 53) Kravetz HM., Andriole VT., Huber MA., Utz JP. 1961 Oral administration of solubilized amphotericin B. *N. Engl. J. Med.* 265: 183 – 184.
 - 54) Oka M., Kamimori H. 2013 Lipid membrane binding properties of amphotoericin

- B deoxycholate (Fungizone) using surface plasmon resonance. *Anal. Sci.*, 29: 697 – 702.
- 55) Kinouchi H., Onishi M., Kamimori H. 2013 Lipid membrane-binding properties of daptomycin using surface plasmon resonance. *Anal. Sci.* 29: 297 – 301.
- 56) Karlsson R., Falt A. 1997 Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J. Immunol. Methods* 200: 121 – 133.
- 57) Morton TA., Myszka DG., Chaiken IM. 1995 Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration. *Anal. Biochem.* 227: 176 – 185.
- 58) Lee TH., Mozsolits H., Aguilar MI. 2001 Measurement of the affinity of melittin for zwitterionic and anionic membranes using immobilized lipid biosensors. *J. Pept. Res.* 58: 464 – 476.
- 59) Heerklotz H. 2008 Interaction of surfactants with lipid membranes. *Q. Rev. Biophys.* 41: 205 – 264.
- 60) Fukasawa M. 2005 Liposomal Amphotericin B. *Jpn. J. Med. Mycol.* 46: 229 – 231.
- 61) Anaissie E., Paetznick V., Proffitt R., Adler-Moore J., Bodey GP. 1991 Comparison of the in vitro antifungal activity of free and liposome-encapsulated amphotericin B. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* 10: 665 – 668.