

最新の分光学的手法の医療薬学領域への応用

外 山 聡

新潟大学医歯学総合病院薬剤部

Applications of Advanced Spectroscopy in Medical Pharmacy

Akira TOYAMA

Division of Pharmacy

Niigata University Medical and Dental Hospital

要 旨

薬物の作用機序を原理的に理解するには、薬物との相互作用に伴う標的生体分子の構造・機能の変化を知る必要がある。このような研究はX線結晶解析や高分解能NMRを用いて行われているが、近年の光発生・検出技術の進歩に伴い、分光学的手法も有力な研究手段となりつつある。中でも共鳴ラマン分光法は、水溶液中で測定が可能であり、固体・溶液にかかわらず測定でき、空間・時間分解能が高く、高選択であるという特徴を持つ。本稿では、ラマン分光法と共鳴ラマン効果について概説した後、共鳴一差ラマン分光による1残基構造変化検出、マイクロ流動チップー顕微ラマン分光による赤血球の脱酸素過程の解析など、ラマン分光法を薬学領域に応用した研究例を紹介する。また、分子分光法は基本的には非破壊計測であり、この特徴を生かして *in situ* 分析への応用も広がっている。薬剤部業務に *in situ* 分析を応用した例として、テラヘルツ波を用いた薬剤識別装置開発の試みについても述べる。

キーワード：ラマン分光法、テラヘルツ分光

はじめに

薬物は、生体を構成する分子・超分子（以下、生体分子）と相互作用し、生体分子の機能を変化させることで作用を発現する。このため、薬物の作用機序を原理的に理解するには、薬物の標的となる生体分子について、その正常時の構造と機能、

並びに薬物の結合に伴う構造と機能の変化を知る必要がある。しかし生体分子の構造は複雑であり、かつわずかな構造変化が機能変化を引き起こしうるため、薬物結合に伴う生体分子の構造変化を観測するためには、非常に高精度の計測が必要となる。X線結晶構造解析と高分解能NMRは生体分子の全原子座標を決定できる極めて強力な手法で

Reprint requests to: Akira TOYAMA
Division of Pharmacy
Niigata University Medical and Dental Hospital
1-754 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951-8520 Japan

別刷請求先：〒951-8520 新潟市中央区旭町通1-754
新潟大学医歯学総合病院薬剤部 外山 聡

あるが、薬物結合時の構造変化の追跡には必ずしも適さない。一方、近年の光発生・検出技術の進歩に伴い、各種分光学的手法も、生体分子から構造情報を抽出できるレベルに測定精度が向上してきた。X線結晶構造解析等から得られた生体分子の基本構造と、分光法から得た薬物相互作用時の構造変化に関する情報を組み合わせることで、薬物の作用機序を理解するに足る知見が得られるようになりつつある。本稿では、筆者らによる、分光学的手法を用いた医療薬学領域の研究例を解説する。

ラマン分光法と共鳴ラマン効果

分光法とは、物質に照射した光（電磁波）の状態変化より、光と相互作用した物質に関する構造情報を得る方法である。光と物質の相互作用様式（吸収、発光、散乱等）、および用いる光の種類（ラジオ波、マイクロ波、赤外線、可視光線、紫外線、X線、...）に応じて、得られる情報が異なる。代表的な分子分光法を表1に示すが、これ以外にも光の偏り（偏光）、位相のそろい具合（コヒーレンス）などを利用した様々な分光法が存在する。

表1に示した通り、ラマン分光法は、可視・紫外光の（非弾性）散乱を利用した分光法である。透明な物質に単色レーザー光を照射すると、照射光の強さの1000分の1程度の光が四方八方に散乱される。散乱光の大部分は照射光と同じエネルギーを持つ弾性散乱光である。しかしごく一部（入射光強度の 10^{-6} 程度）は、測定対象物質とエネルギーを遣り取りし、照射光と異なるエネルギーを持つ散乱（非弾性散乱）光となる。非弾性散乱光について、入射光とのエネルギー差（ラマンシフトと呼ぶ）を横軸に、散乱光強度を縦軸にプロットしたものをラマンスペクトルと呼ぶ。ラマンスペクトルから得られる情報は、赤外線吸収スペクトルと同質であり、主に分子の振動状態に関する情報が得られる。

医療薬学領域へラマン分光法を応用する際の利点として、次の3つがあげられる。

1. 観測対象の形態（溶液、ゲル、固体、...）に依存せず、同質のスペクトルが測定できる。生体分子の凝集と疾病が関連付けられる場合（例えばタンパク質のアミロイド形成）でも、凝集前後の構造変化を追跡できる。

2. 水（ H_2O , D_2O とも）のラマンシグナルが極めて弱い。重水等に置き換えることなく、wetの状態の分子構造が解析できる。

3. 空間・時間分解能が高い。大きさが μm 程度の測定対象について、ミリ秒単位（光で誘起できる構造変化はピコ秒単位でも）のスペクトル変化を追跡できる。

通常のラマン散乱光は、照射光の100万分の1程度の強度しかないため、固体や濃厚溶液以外の測定は困難という欠点を持つ。しかしこの欠点は、共鳴ラマン効果を利用することで、多くの場合解決可能である。

共鳴ラマン効果とは、照射光のエネルギーが、測定対象の分子（発色団）の電子遷移のエネルギーに近い場合、その分子のラマン散乱強度が著しく大きくなる（1000倍程度～数万倍程度）現象である。例えば核酸塩基の1つであるアデニンは、波長260 nmの光を強く吸収する。260 nm付近のレーザー光でラマン測定を行うと、例えば分子量数万のタンパク質に結合した1分子のcAMP（アデニン環を持つ）であっても、cAMPのスペクトルが選択的に測定できる¹⁾。生体分子系は、高濃度で単離することが困難な場合が多く、単離した後も、物理化学的観測手法の対象としては複雑である。このため、シグナル強度増大と発色団選択性が期待できる共鳴ラマン効果は、医療薬学領域への応用において有用である。

共鳴 — 差ラマン分光法

薬物結合に伴う生体分子の構造変化はわずかであるため、スペクトルの変化も小さい。微小なスペクトル変化を検出する場合、差スペクトルを計算することが有用である。例えば、薬物を添加した状態と添加しない状態双方のスペクトルを、同一条件で交互に測定し、2つのスペクトルの差を

表1 電磁波の分類とその電磁波を用いた代表的分子分光法

電磁波		対応する分子・原子 のエネルギー遷移	電磁波と分子の相互作用形式		
名称	波長範囲 ¹⁾		吸収	発光	散乱
ラジオ波	数百 m ~ 0.5m	核スピン ²⁾	核磁気共鳴法 ²⁾ (NMR)		
マイクロ波	50cm ~ 1cm	電子スピン ²⁾ 分子回転状態	電子スピン共鳴法 ²⁾ (ESR) マイクロ波分光法 ³⁾		
赤外線	20 μm ~ 2μm	分子振動状態	赤外分光法		
可視・紫外光	1000nm ~ 100nm	電子状態	可視紫外吸収法	蛍光分光法	ラマン分光法

1) おおよその範囲を示す。電磁波の波長とその名称の関係には、厳密な定義はない。

2) 測定対象を磁場中に置く必要がある。

3) 測定対象が低分子の気体である必要がある。

演算することで、薬物結合に伴うスペクトル（構造）変化のみが拡大される。共鳴ラマン効果と組み合わせると、発色団選択性に加え、構造変化を起こす部位という選択性の二重の選択性が得られ、複雑な生体分子であっても、着目する部分の情報のみが抽出できる。これを共鳴一差ラマン分光と呼ぶ。

1例として、Cu, Zn-スーパーオキシドジスマターゼ（以下、SOD1）のアルカリ活性低下を取り上げる。SOD1は、活性酸素種のスーパーオキシドを分解する酵素であるが、その活性は、pH9.5を境に急激に低下する。しかし、pH9付近で脱プロトン化すると考えられるLysをAlaに変異してもアルカリ失活は起こるため、失活を誘起する脱プロトン化部位は不明であった。我々は、ウシSOD1について、種々のpHの229nm励起共鳴一差ラマンスペクトルを測定した。229nm光を用いることで、芳香族アミノ酸側鎖のスペクトルが選択的に観測できる。さらにpH変化による差スペクトルを計算することで、pHに依存して構造変化を起こす芳香族アミノ酸側鎖の情報のみが抽出できる。このような解析の結果により、アルカリ失活はHis41の脱プロトン化により引き起こされることを明らかにした²⁾。中性pHでは、His41はSOD1の活性部位と、スーパーオキシドとの親和性に関係するelectrostatic loopを橋架けするように水素結合し、SOD1の構造を安定化している。His41の脱プロトン化はこの架橋水素結合を切断

するため、活性低下を引き起こすと考えられる。His41は多様な生物種で広く保存されているが、その役割は明確でなかった。今回の結果は、His41がSOD1の構造安定化に寄与していることを示唆している。ウシSOD1のHis41は、ヒトSOD1のHis43に対応するが、家族性ALS患者では（ヒト）SOD1のHis43→Argの変異が見られることがある。ヒトSOD1のHis43→Argのミュータントでは、apo状態でタンパク質構造が不安定になることを示唆するデータも得ている。

なお、DNAのように同一発色団が多数存在する場合は、共鳴一差ラマン分光でも構造変化部位を特定し難い。このような場合は、構造変化を検出したい残基にのみ同位元素ラベルしたDNAを合成し、ラベルしていないDNAとの共鳴一差ラマン分光を行う。このような手法を“isotope-edited Raman spectroscopy”と名づけたが、本手法は薬物や調節タンパク質が結合したDNAの構造変化の検出などに応用できる³⁾。

マイクロ流動チップー顕微ラマン分光

ラマン分光法の高い空間分解能を生かした手法として、顕微ラマン分光法がある。微小試料に対して、顕微鏡観察下、対物レンズを用いてレーザー光を集光・照射する。試料からの散乱光も、同じ対物レンズで集光し分光器に導くことで、レーザー光照射ポイントのラマンスペクトルを得る顕

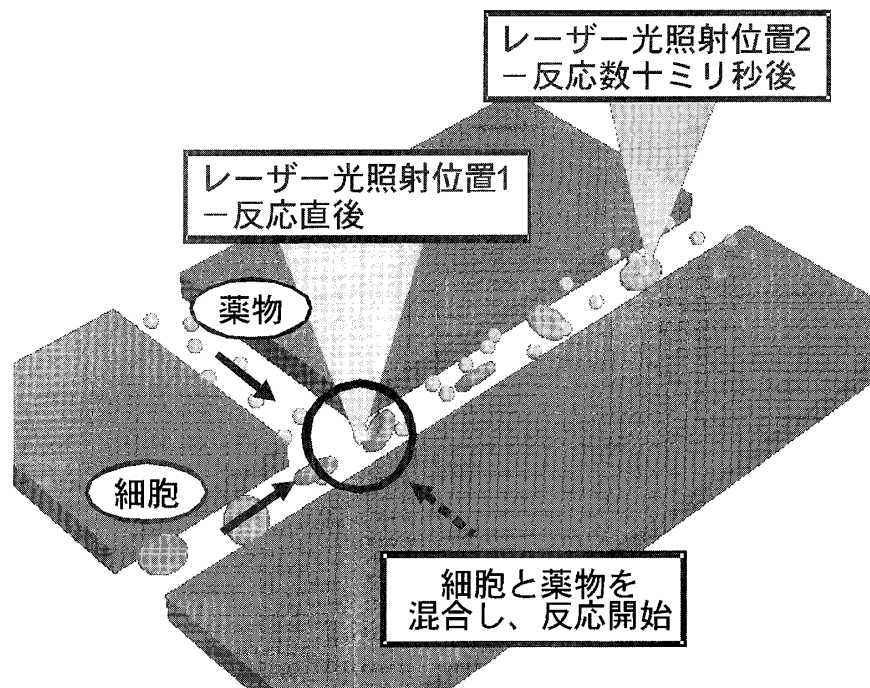


図1 マイクロ流動チップ-顕微ラマン分光装置の試料測定部
レーザー光照射位置を変化させることで、反応後任意の時間の細胞内発色団の構造解析が可能となる。

微ラマン分光法は、組織の局所部分から細胞内小器官レベルまでの生体分子の分布や構造を研究する手段である。

顕微ラマンの空間分解能に加え、さらにラマン分光法の時間分解能も活かす手段として、筆者らは「マイクロ流動チップ-顕微ラマン分光法」とその装置を開発した。

マイクロ流動チップは、微細な流路（幅、深さとも数十 μm ）が刻まれたミキシングチップであり、顕微鏡観察下において試料の混合を効率よく行うことに利用できる。マイクロ流動チップ内で細胞-薬物を混合しつつ、その細胞を顕微ラマン分光で計測する。本装置の試料測定部の概略を図1に示したが、流路上、レーザー光照射位置を変化させることで、薬物刺激から任意の時間後の細胞内の発色団（色素タンパク質など）の構造変化の観測が可能になる。

現在、本装置はプロトタイプのを脱していないが、フロー方式の改良、流路のコーティング処

理、電動ステージとの連動などにより、マイクロ流動チップ中、細胞の流速を $40\mu\text{m}/\text{sec} \sim 1000\mu\text{m}/\text{sec}$ の範囲で制御し、顕微ラマンスペクトルを測定できるようになった。モデルケースとして、赤血球からの酸素放出過程におけるヘモグロビンの構造変化を対象として実験を行ったところ、脱酸素剤 dithionite との混合による赤血球からの酸素放出過程を、10 ミリ秒程度の時間分解能で追跡可能であることが確認できた。

テラヘルツ波分光による薬剤識別装置開発

分光学的手法を、薬剤部における業務に応用する試みを1つ紹介する。

現在薬剤部では、入院患者様の定期処方において、錠剤、カプセル剤の一包化包装を行っている。薬剤の一包化包装は、患者様、また服薬補助者への利便性が高い。しかし調剤鑑査者にとっては、裸錠を識別する（錠剤の刻印等を判読する）必要

があり、負担となる。一包化包装には、個々の袋に患者氏名、服用時点を記すため、少なくとも片面の一部は不透明となっている。また、錠剤等の刻印は両面には付されていない。このため、刻印を読むために錠剤を袋の中で裏返す必要がしばしば生じる。すなわち、錠剤の裏返し作業を伴わなければ、可視の反射光（目視）で一包化包装した錠剤の判別を行うことは不可能である。このため一包化包装した薬剤には、有用な鑑査補助装置が開発されていないのが現状である。

薬剤や一包化包装の包装材をある程度し、かつ、薬剤に依存して透過率（透過スペクトル）が異なるような光を用いた鑑査補助装置があれば、錠剤の裏返し作業を回避できる。X線より短波長の光は、一般的な有機化合物に対する透過率が高く、透過率の違いもあまりない。マイクロ波より長波長の光は、回折現象により薬剤を回り込んで進む（空間分解能が低すぎる）。したがって、このような光は、薬剤を透過するが、薬剤の判別には適さない。また表1に示した光では、分子との相互作用が大きく、錠剤などを透過できない。

適度な透過度を持つ光として、マイクロ波と赤外線の間であるテラヘルツ波か、赤外線と可視光線の間である遠赤外線が候補になる。テラヘルツ波と遠赤外線を比較すると、前者の方が透過光に対する薬剤の角度の影響を受けづらいこと、さらに紙も透過するため、応用範囲が広いと考え、テラヘルツ波を用いた「一包化包装された薬剤の識別方法及び識別装置」を考案した⁴⁾。

実際に十種類程度の錠剤・カプセル剤についてテラヘルツ波の透過スペクトルを測定したところ、錠剤の種類ごとに異なったスペクトルが得られた。また、一包化包装中の薬剤に対しても、完全な裸錠とほぼ同一のスペクトルが得られ、原理的にはテラヘルツ波により一包化包装された薬剤の識別が可能であることが確認できた。本装置の実用化には、測定時間の劇的な短縮、全自動錠剤分包装との連動など問題もあるが、本装置が完

成すれば、薬剤の鑑査のみならず、持参薬の迅速な識別にも役立つと考えられる。

おわりに

本稿では、新しい分光学的手法を分子、細胞、薬剤の分析に応用した事例を紹介した。筆者の研究ではないが、分光法を診断に利用することを目指した応用、たとえばラマン用の光ファイバを内視鏡に組み込み、内視鏡下、組織のスペクトルを測定し分子組成を推定することや、遠赤外線のコヒーレンス・トモグラフィー（OCT）により指の光断層映像を得ることは、研究段階を脱しつつある。ラマン、テラヘルツ波、OCTなどが医療の現場で用いられることは、遠い将来のことではないかもしれない。

引用文献

- 1) Toyama A, Kurashiki E, Watanabe Y, Takeuchi H, Harada I, Aiba H, Lee BJ and Kyogoku Y: Ultraviolet resonance Raman spectra of cyclic AMP receptor protein: Structural change induced by cyclic AMP binding and the conformation of protein-bound cyclic AMP. *J Am Chem Soc* 113: 3615-3616, 1991.
- 2) Toyama A, Takahashi Y and Takeuchi H: Catalytic and structural role of a metal-free histidine residue in bovine Cu-Zn superoxide dismutase. *Biochemistry* 43: 4670-4679, 2004.
- 3) Toyama A, Matsubuchi A, Fujimoto N and Takeuchi H: Isotope-edited UV Raman spectroscopy of protein-DNA interactions: Binding modes of cyclic AMP receptor protein to a natural DNA recognition site. *J Raman Spectrosc* 36: 300-306, 2004.
- 4) 永井直人, 外山 聡: 一包化包装された薬剤の識別方法及び識別装置. 特開 2007-198802.