

博士学位論文 2020 年度

新たな医療モダリティへの応用を目的とした  
機能性高分子を用いた分離システムの開発

要約版

慶應義塾大学大学院薬学研究科

前川 祐太郎

## 目次

第1章	序論.....	3
1.1	研究背景.....	3
1.2	本研究の目的.....	10
第2章	異なる基本骨格を有する化合物の分離を目指した分子認識能を有するグリーンクロマトグラフィーの開発.....	12
2.1	緒言.....	12
2.2	実験.....	13
2.2.1	試薬.....	13
2.2.2	温度応答性ポリマーの合成及びシリカへの修飾.....	16
2.2.2.1	温度応答性ポリマーの合成.....	16
2.2.2.2	温度応答性ポリマーのシリカへの修飾.....	16
2.2.3	温度応答性ポリマーの物性評価.....	16
2.2.3.1	LCST 測定.....	16
2.2.3.2	ゲル濾過クロマトグラフィー測定.....	17
2.2.3.3	元素分析.....	17
2.2.4	TRC.....	17
2.2.4.1	非臨床評価用 CYP 典型基質薬のカクテル試料の一斉分析.....	17
2.2.4.2	CYP 典型基質薬と代謝物の同時分析.....	18
2.2.4.3	Testosterone / 6 $\beta$ -hydroxytestosterone を使用した <i>in vitro</i> 代謝実験.....	18
2.2.4.4	臨床評価用 CYP 典型基質薬のカクテル試料の一斉分析.....	19
2.3	結果及び考察.....	20
2.3.1	温度応答性ポリマーの物性評価.....	20
2.3.2	非臨床評価用 CYP 典型基質薬のカクテル試料の TRC による一斉分析... ..	22
2.3.3	CYP 典型基質薬と代謝物の TRC による同時分析.....	25
2.3.4	臨床評価用 CYP 典型基質薬のカクテル試料の TRC による一斉分析.....	27
2.4	結論.....	31
第3章	静電的特性及び温度応答性を有した環境低負荷型分析技術によるオリゴヌクレオチドの分離精製法の開発.....	32
3.1	緒言.....	32
3.2	実験.....	32
3.2.1	試薬.....	32
3.2.2	温度応答性ハイドロゲル修飾シリカ.....	33
3.2.2.1	IBD ハイドロゲル修飾シリカの作成.....	33
3.2.2.2	IBD ハイドロゲル修飾シリカの物性評価.....	36
3.2.3	IBD 直鎖ポリマーの合成及び LCST 測定.....	37

3.2.4	TRC .....	37
3.2.4.1	オリゴヌクレオチドの一斉分析に適した温度応答性カラムの検討...	37
3.2.4.2	IBD ハイドロゲルカラムによるオリゴヌクレオチドの一斉分析.....	38
3.3	結果及び考察.....	38
3.3.1	IBD ハイドロゲル修飾シリカの物性評価 .....	38
3.3.2	IBD 直鎖ポリマーの LCST .....	43
3.3.3	TRC .....	45
3.3.3.1	オリゴヌクレオチドの一斉分析に適した温度応答性カラムの検討...	45
3.3.3.2	IBD ハイドロゲルカラムによるオリゴヌクレオチドの一斉分析.....	49
3.4	結論.....	57
第4章	温度応答性アフィニティー精製法によるエクソソームの分離精製法の検討	59
第5章	結語.....	61
	研究業績.....	62
	参考文献.....	63

## 第1章 序論

### 1.1 研究背景

近年、医薬品のモダリティ（治療手段）が多様化している[1-4]。2000年以前、低分子医薬品はモダリティの主流であり、医薬品のニーズは高血圧や糖尿病といった生活習慣病が高かった[5]。次第に、低分子医薬品ではアプローチが難しい疾患へのニーズの高まりに合わせ、抗体医薬品の開発が、躍進しはじめた[5, 6]。抗体医薬品は、特定の分子に標的化することで、低分子医薬品よりも高い有効性と安全性をもたらした[5]。一方、万人の患者に同一医療を提供する従来の医療から、患者の遺伝子情報に基づいたゲノム医療・個別化医療の考え方が生まれてきた[5, 7]。患者のゲノム情報、薬効標的となり得るタンパク質の発現量といった情報をバイオマーカーとして捕捉し、患者個々に対する治療の最適化を目指す医療である。抗体医薬品は、その分子標的能からゲノム医療・個別化医療が適用された代表的な医薬品である[7]。現在では、技術の発展も相まって、より高度かつ複雑な創薬技術及び作用機序を有したモダリティとして、核酸医薬、遺伝子治療、細胞治療、及び再生医療などが開発されている[1, 4, 6, 8-10]。一方で、医薬品の開発には、その有効性と安全性データの他、品質が求められる。品質は、有効性と安全性データの信頼性を支える基盤であり[11]、十分かつ適切な品質が確保できなければ、これらのデータの非再現性や信頼性を損なうことにつながる。特に、上述した新規モダリティの医薬品は、製造プロセスの複雑化、又は生物由来原料からの製造により、品質評価及びその管理が肝要となる[10, 12-18]。

核酸医薬の歴史は長いものの、相次ぐ臨床試験の失敗からその発展は滞っていた[19]。しかし近年、核酸医薬を成すオリゴヌクレオチドに対する化学修飾の技術や薬物送達システム（drug delivery system: DDS）技術の発展による核酸の体内における安定性の向上等に起因し、開発が再起している[19, 20]。一口に核酸医薬といっても、構造や作用部位の異なる多様な種類を有し（Table 1-1）、そのうちアンチセンスの核酸医薬は最も多く上市されている（Table 1-2）。オリゴヌクレオチドの化学修飾は、ヌクレアーゼ耐性の向上や標的とする核酸との結合性の向上等を目的に、オリゴヌクレオチドのリン酸部、糖部、又は塩基部に施される[21]。現在、上市されている核酸医薬に多く施されている化学修飾は、リン酸部の酸素原子を硫黄原子に置き換えたホスホロチオエート化（S化）である（Table 1-2）。核酸医薬は、低分子医薬品と同様、化学合成により製造されることが一般だが、低分子医薬品と比較し、製造工程が複雑かつ多くの不純物（オリゴヌクレオチド類縁物質）を含む[17]。また、S化された核酸医薬（S-Oligo）の合成では、多数の立体異性体が最終生成物に含まれることが知られている[18]。このような類縁物質は、一定の薬理活性を示すことや人における安全性プロファイルに影響を及ぼすと考えられており[18]、同定や分離精製の徹底が重要となる。2018年に国内で初めて制定された、

核酸医薬の品質に関するガイドライン「核酸医薬品の品質の担保と評価において考慮すべき事項について」では、製造工程で発生する類縁物質の分析や安全性や薬理活性等について、適切かつ十分な評価を行うことを推奨している[18]。

**Table 1-1 Types of oligonucleotide therapeutics (井上らの報告を一部改変[22]).**

	アンチセンス	siRNA	miRNA	デコイ	アプタマー	CpG オリゴ
構造	一本鎖 DNA/RNA	二本鎖 RNA	二本鎖 RNA	二本鎖 DNA	一本鎖 DNA/RNA	一本鎖 DNA
塩基鎖長	13~30	20 程度	20 程度	20 程度	26~45	20 程度

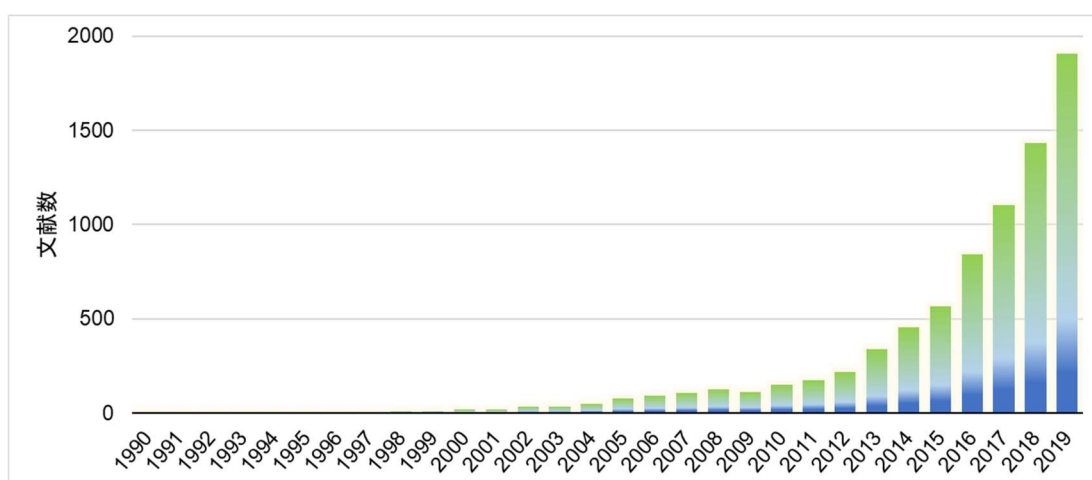
**Table 1-2 List of approved oligonucleotide therapeutics and their characteristics as of November 2020 [23].**

一般名	種類	塩基鎖長*	化学修飾・DDS	
			S 化	その他
CpG1018	CpG オリゴ	22	○	—
Eteplirsen	アンチセンス	30	—	○
Fomivirsen	アンチセンス	21	○	—
Givosiran	siRNA	21-23	○	○
Golodirsen	アンチセンス	25	—	○
Inotersen	アンチセンス	20	○	○
Lumasiran	siRNA	21-23	○	○
Mipomersen	アンチセンス	20	○	○
Nusinersen	アンチセンス	18	○	○
Patisiran	siRNA	21-21	—	○
Pegaptanib	アプタマー	28	—	○
Viltolarsen	アンチセンス	21	—	○
Volanesorsen	アンチセンス	20	○	○

\* siRNA については、Sense-Antisense を記載

近年、医薬品の新たなモダリティとして、エクソソームへの注目が集まっている (Figure 1-1)。エクソソームは、細胞が分泌する細胞外小胞の一種で、平均サイズが 20~150 nm の脂質二重膜からなる小胞である[24-30]。小胞内には、mRNA や miRNA の他、ヒートショックプロテイン (HSC70 等)、インテグリン、及びテトラスパニン (CD9、CD63 等) 等の様々な機能性タンパク質を有する[25-28, 31, 32]。細胞から分泌されたエ

エクソソームは、全身を循環し、その細胞に由来するタンパク質や mRNA など他の細胞へと伝達し、細胞間のコミュニケーションの役割を果たしていると考えられる[25, 33]。がんをはじめ、アルツハイマー型認知症や心血管系といった様々な疾患の病態にも深く関与しているとされ、エクソソームの診断マーカーや予後因子としてのバイオマーカー、そして治療標的としての活用が期待されている[28, 29, 31, 34-39]。また、エクソソームの臓器特異性や体液中で安定であること、人工的に設計されたリポソーム等の運搬体と比較して生体分子のため免疫応答が起こりにくいといった特徴を考慮して、DDS への応用も期待されている[25, 31, 40]。しかし、臨床応用にあたり、いくつかの課題が存在する。例えば、医薬品として安定した供給を行うには、大量生産が必要になるが、細胞から分泌されるエクソソームは僅かである。また、分離精製や解析法に確立した方法が定まっていないため、医薬品としての品質の担保及びその評価法が難しい[39-42]。Table 1-3 に、今日のエクソソーム分離法として代表される分離法を示した。現在、最も標準的な分離法は、超遠心法であるが、いまだ課題は残る。また、Table 1-3 に示す以外にも様々な分離法が開発されているが、超遠心法に取って代わる分離法は、いまだ確立していない[26, 43-45]。



**Figure 1-1 Transition of number of reports regarding exosome [Search query: “exosome” OR “extracellular vesicle”. Searched by Pubmed on 4 July 2020].**

**Table 1-3 Comparison of separation methods of exosomes. [26, 44, 46]**

	特徴	課題
超遠心法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・最も標準的な分離法</li> <li>・比重の違いを利用した分離法</li> <li>・低コスト</li> <li>・大量の検体を取り扱える</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・多段階ステップで時間を要する</li> <li>・超遠心によるエクソソームへのダメージ</li> <li>・類似した比重のタンパク凝集等は取り除けない</li> <li>・超遠心機が必要</li> <li>・特異的なエクソソームの分離は不可</li> </ul>
ポリマー沈降法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・エクソソームのポリマーへの吸着を利用した分離法</li> <li>・高回収率</li> <li>・超遠心機のような特別な機器が不要</li> <li>・エクソソームへのダメージが小さい</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ポリマーとタンパク質との非特異的吸着により精製度が悪い</li> <li>・分離に時間を要する</li> <li>・特異的なエクソソームの分離は不可</li> </ul>
サイズ排除法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・サイズによる分離法</li> <li>・短時間で分離</li> <li>・超遠心機のような特別な機器が不要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・精製度が悪い</li> <li>・せん断応力によるエクソソームへのダメージ</li> <li>・特異的なエクソソームの分離は不可</li> </ul>
免疫沈降法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・エクソソームの膜タンパク質を標的としたリガンドによる分離法</li> <li>・短時間で分離</li> <li>・特異的なエクソソームを高純度に分離可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・高コスト</li> <li>・低回収率</li> <li>・膜タンパク質に対する特異的なリガンドが必要</li> <li>・分離後エクソソームの分析する場合、リガンドの分離が必要</li> </ul>

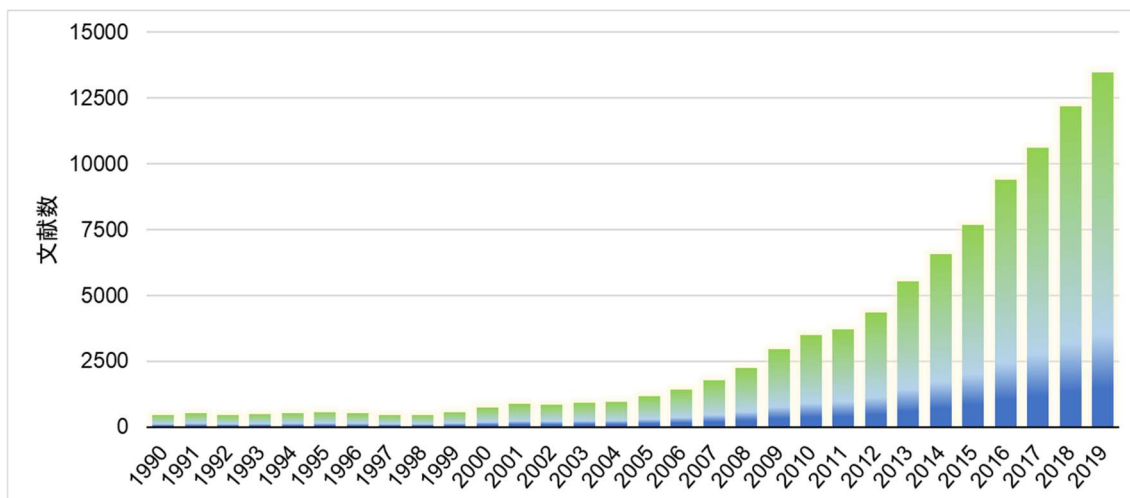
高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) は、有機化合物の同定、医薬品の類縁物資の確認や最終生成物との分離精製等に用いる分析法である[47-49]。HPLC は、分析対象物質の物理化学的性質によって様々な特性を持ったカラムを利用する。最も汎用されるカラムは、オクタデシルシリル基が表面に修飾された ODS カラムである。このような疎水基を修飾させたカラムを用いた HPLC は、逆相クロマトグラフィー (reversed phase liquid chromatography: RPLC) と称され、カラム表面の疎水基と分析対象物質との疎水性相互作用を利用して分離する。RPLC は、移動相の組成を変えることで、カラムと分析対象物質との相互作用の強度を変化させ溶出させる。移動相には、メタノールやアセトニトリルといった極性の高い有機溶媒が利用される。RPLC 以外では、移動相又はカラムの固定相にイオン交換基を修飾させたイオン交換クロマトグラフィー (ion exchange liquid chromatography: IELC) も汎用される HPLC の一

つであり、主に緩衝液を移動相に用いて、イオン化した分析対象物質とカラムとの静電的相互作用により分離する。いずれの HPLC も、分析時間の短縮や分離の向上のため、複数の組成の移動相を使用したグラジエント法が用いられる。また、RPLC による分析の際、移動相中の pH により、イオン化した分析対象物質の固定相への保持が弱まるのを防ぐ目的で、イオン対試薬を移動相に添加する。しかし、グラジエント法やイオン対試薬の使用には、課題もある。例えば、グラジエント法は、その条件最適化に向けた検討にしばしば多くの時間と実験者の経験が求められる[50]。また、イオン対試薬の使用は、分析前の移動相と固定相との平衡化に時間を要したり[51]、分離後の分析対象物質を使用する場合は、分析対象物質からイオン対試薬を解離させる手技を追加しなければならない[52, 53]。

また、環境保全の観点においては、HPLC の廃液はしばしば問題視される。環境に配慮した研究活動は、Paul Anastas と John Warner らによる “Green chemistry” [54] を皮切りに広く知られるようになり [55-58]、近年では、持続可能な開発目標 (sustainable development goals: SDGs) で知られる国際的な取り組みも相まって、その関心度は高まってきている (Figure 1-2) [59-61]。一般的な分析条件において、HPLC による分析では、1 L を超える廃液が日々生成されることが報告されている[62, 63]。特に、有機溶媒を含む廃液処理法の一つには燃焼法が利用され[64]、その過程では温室効果ガスも排出され得る。HPLC が広く普及していること及び最も汎用される RPLC の分析には有機溶媒が用いられることを鑑みると、HPLC 廃液の削減は環境保全推進の一端を担うと考えられる。今後、さらに環境への配慮が重要視される社会において、環境への負荷を極力低減させた実験手法の検討は強く望まれると考える[65]。

アフィニティークロマトグラフィーは、主としてタンパク質や抗体といった分析対象物質と固定相との特異的な結合相互作用を利用した分離法である[66, 67]。一般に、固定相には分析対象物質に特異的に結合するリガンド (Protein A、Protein G、抗体、アプタマー、又はペプチド等) が使われる[68, 69, 67, 70]。しかし、分析対象物質の固定相からの遊離には、強酸や高塩濃度の溶媒、又は有機溶媒が汎用されており、分析対象物質の変性・失活のおそれや脱塩などの後処理を必要とする[71, 72]。





**Figure 1-2 Transition of number of reports regarding environmental protection. [Search query: “climate change” OR “green chemistry” OR “sustainable chemistry” OR “global warming” OR “sustainable development goals” OR “SDGs” OR “environmental protection”. Searched by Pubmed on 21 July 2020]**

Poly(*N*-isopropylacrylamide [NIPAAm]) (PNIPAAm) は、相転移温度 (lower critical solution temperature: LCST) を境に、ポリマー鎖の水和/脱水和によって、親水性/疎水性とその物理化学的性質が変化する機能性高分子である (Figure 1-3) [73, 74]。PNIPAAm を基盤とする機能性高分子の LCST は、NIPAAm へ疎水性のモノマーを共重合させることで低温側へ、また親水性のモノマーを共重合させることで高温側へとシフトし、そのアプリケーションの用途によって LCST を変化させることが可能である[75-78]。さらに、分子内にイオン化部位を持ったモノマーを導入することで、温度応答性だけでなく pH 応答性や電荷を持たせることも可能である[77, 79, 80]。これらの特性を利用して、PNIPAAm は蛍光プローブ[79, 81, 82]、DDS[83-88]、細胞シート[89-95]、温度応答性クロマトグラフィー (temperature responsive chromatography: TRC) [78, 96-102]、アフィニティークロマトグラフィー[71, 103, 104, 68, 69]といった様々なアプリケーションに応用されている。

TRC は、温度による固定相の物理化学的性質の変化を利用し、分析対象物質と固定相との相互作用の強度を変化させることで分離する。従来の RPLC や IELC とは異なり、移動相に有機溶媒の使用や煩雑なグラジエント法が不要であり、水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件で分析が可能である[96, 105, 106]。これらの特徴から、TRC は環境低負荷な分析技術 “Green chromatography” を代表する一つである[62, 63, 107-109]。

また、PNIPAAm を基盤とした温度応答性アフィニティークロマトグラフィー (temperature responsive affinity chromatography: TRA) は、PNIPAAm の温度による固定相の物理化学的変化を利用して、温度変化のみによって固定相のリガンドから分析対象



## 1.2 本研究の目的

本研究では、温度応答性高分子 PNIPAAm を基盤とした機能性高分子を用いた分離システムによって、有機溶媒やイオン対試薬を使用しない、分析対象物質にとって温和かつ環境低負荷な条件での新規分析法の開発を目指した。分析対象物質は、従来のモダリティである低分子医薬品、近年開発の進む核酸医薬（オリゴヌクレオチド）、及び新たなモダリティとして期待されるエクソソームを検討した。

低分子医薬品の製造過程で生じ得る類縁物質・不純物等には様々な骨格を有した化合物が含まれる。そのため、基本骨格の異なる化合物の分離は、医薬品の品質の観点から重要である。一方、医薬品の研究開発では、薬物相互作用の有無を評価するために、複数の代謝酵素基質薬を使用したカクテル基質試験が用いられることがある[110-112]。これまでに PNIPAAm を基盤とした TRC による多成分の分離は、ステロイド類、アミノ酸、バルビツール酸、又はベンゾジアゼピン系といった類似の基本骨格を持った複数の分析対象物質を用いて検討されている[78, 97, 113, 114]。しかし、異なる基本骨格を持った複数分析対象物質の分離は、報告されていない。このカクテル基質試験における基質薬又はそれらの代謝物の分析は、化合物ごとの単分析又は有機溶媒を包含するグラジエント法による RPLC が利用されている[110-112]。すなわち、TRC による基本骨格の異なる複数分析対象物質の一斉分析の検討は、従来法と比較して、環境へ配慮した分析を実現可能にすると考えられる。さらに、分析対象物質の組み合わせによっては、薬物相互作用等の医薬品の研究開発に必要な分析結果を、一斉分析により迅速に取得可能となり、研究開発の加速化に寄与すると考えられる。

オリゴヌクレオチドの分析には、既往研究において、その疎水性相互作用、又はオリゴヌクレオチドのリン酸基のイオン化部の静電的相互作用を利用した RPLC や IELC が用いられている[115, 116]。S-Oligo のような、疎水性が高く、複数の立体異性体を類縁物質として含むオリゴヌクレオチドの分析では、ピークのブロードがみられるため、イオン対試薬の使用による分離能の向上が検討されている[117-120]。上述のとおり、イオン対試薬の使用後は分析対象物質との乖離を要するため、より簡便な代替法が望まれる。しかし、イオン対試薬を使わず、かつ水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件で、S-Oligo を含む複数のオリゴヌクレオチドを一斉分析した報告はない。

応用研究が期待されるエクソソームは、疾患や生体内における役割といった本態解明が肝要となる[25, 121, 122]。エクソソームの本態解明には、その生理活性を損なわずに分離する必要があるが、既存の分離法の多くは、手技が煩雑、エクソソームへのダメージがある、又は精製度が悪いといった課題が残り、最適な分離法は確立されていない。よって、エクソソームの生理活性を維持したまま、精製度高く分離する簡便な手法の開発は、依然として求められていると考えられる。

そこで本研究では、水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件における TRC を用いて、(1) 異なる基本骨格を持つ薬物代謝酵素典型基質薬の一斉分析の検討、及び (2)

オリゴヌクレオチドの塩基鎖長の違い、一塩基の違い、及び S-Oligo の S 化の数の違いを認識可能な一斉分析法の開発を行った。また、温度応答性ポリマーを用いた TRA によって、(3) 温度変化のみの温和な環境下におけるエクソソームの新規分離法の検討を行った。

## 第2章 異なる基本骨格を有する化合物の分離を目指した分子認識能を有する

### グリーンクロマトグラフィーの開発

#### 2.1 緒言

薬物相互作用 (drug drug interaction: DDI) とは、薬物又はその代謝物が直接的又は間接的に他の薬物やその代謝物の薬理作用や体内の薬物動態 (吸収、分布、代謝、及び消失) に影響を与えることである[123]。DDI で最もよくみられるのは、薬物の代謝過程における薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) の活性に影響 (代謝酵素の誘導・阻害等) を与え、体内の薬物動態が変化し、既知の有効性又は安全性プロファイルを変化させてしまうことである[124-127]。CYP 酵素は複数の分子種をもつ代謝酵素であり、生体内での異物や多くの医薬品の代謝に関与することで知られている[124-130]。医薬品の研究開発では医薬品候補化合物のこれらの分子種に対する影響の程度を、非臨床薬物相互作用試験 (DDI 試験) や臨床 DDI 試験で評価している[131-137]。

カクテル基質試験とは、一度の試験で複数の CYP 酵素に対する候補化合物の影響を評価することが可能な DDI 試験の方法の一つである[123]。候補化合物が存在する場合と存在しない場合での、各 CYP 酵素の典型基質薬の濃度変化を基にその候補化合物の影響を評価することが可能である。この方法の活用は、早期の候補化合物のスクリーニングやヒトでのまとまった分子種に対する臨床評価が可能となり、従来の各分子種に対して個々に評価する方法に比較して、研究開発にかかる費用や時間の削減に貢献できると考えられる。こうした特徴から、これまでに複数の CYP 典型基質薬の組み合わせを用いたカクテル基質試験が行われているが、多くの報告で基質薬物の濃度測定に関しては薬物ごとに分析されている[131, 138-141]。一斉分析を検討した報告では、基質薬物の分析に有機溶媒を含むグラジエント移動相を利用しているが[110-112]、水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件での一斉分析法の報告はない。

そこで本章では、低分子医薬品の製造過程で生じ得る類縁物質・不純物等の分離精製を模した、異なる基本骨格を有する低分子化合物の分離システムの開発を行った。温度応答性ポリマーである PNIPAAm を基盤とした TRC を用いて、有機溶媒を使用しない分析条件での CYP7 分子種に対する異なる基本骨格を持った典型基質薬の一斉分析の検討を行った (Figure 2-1)。また、典型基質薬及びその代謝物との一斉分析の検討も併せて実施した。分析に用いた典型基質薬は、非臨床 DDI 試験で汎用されている基質薬の組み合わせ (mixture for *in vitro* study) [132, 133, 142]、又は臨床 DDI 試験でカクテル基質として報告されている組み合わせ (mixture for clinical study) を用いた[131, 142] (Table 2-1)。

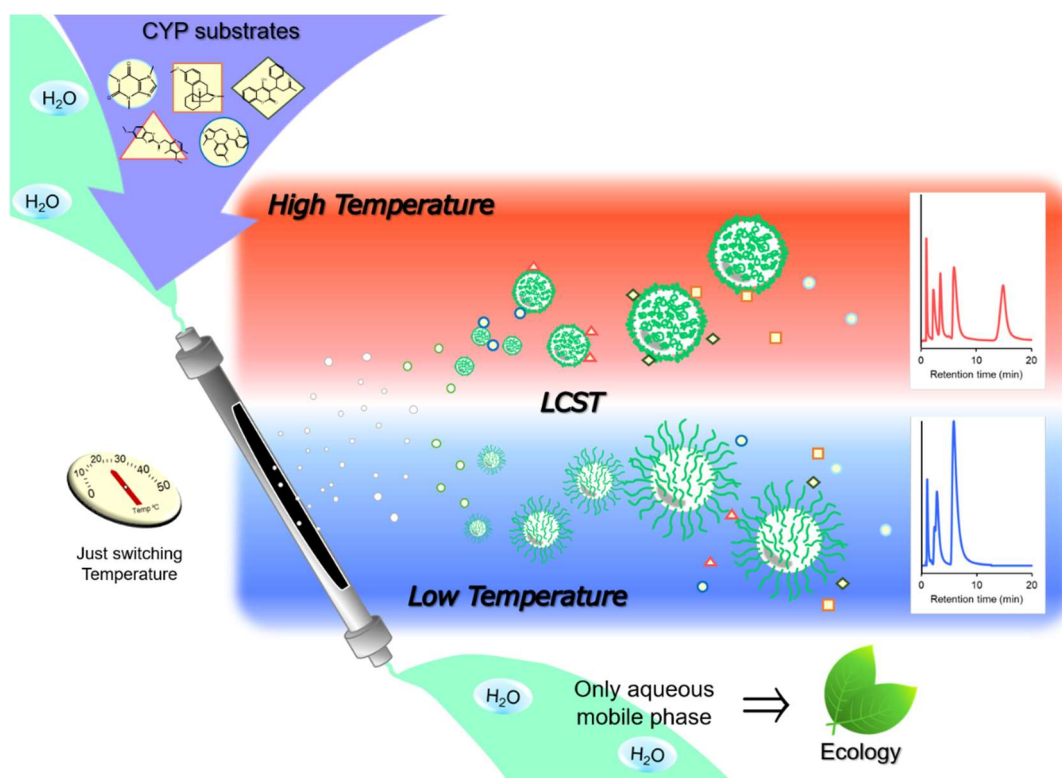


Figure 2-1 Concept of TRC using PNIPAAm for CYP substrates separation.

Table 2-1 Mixture of CYP substrates used in this study.

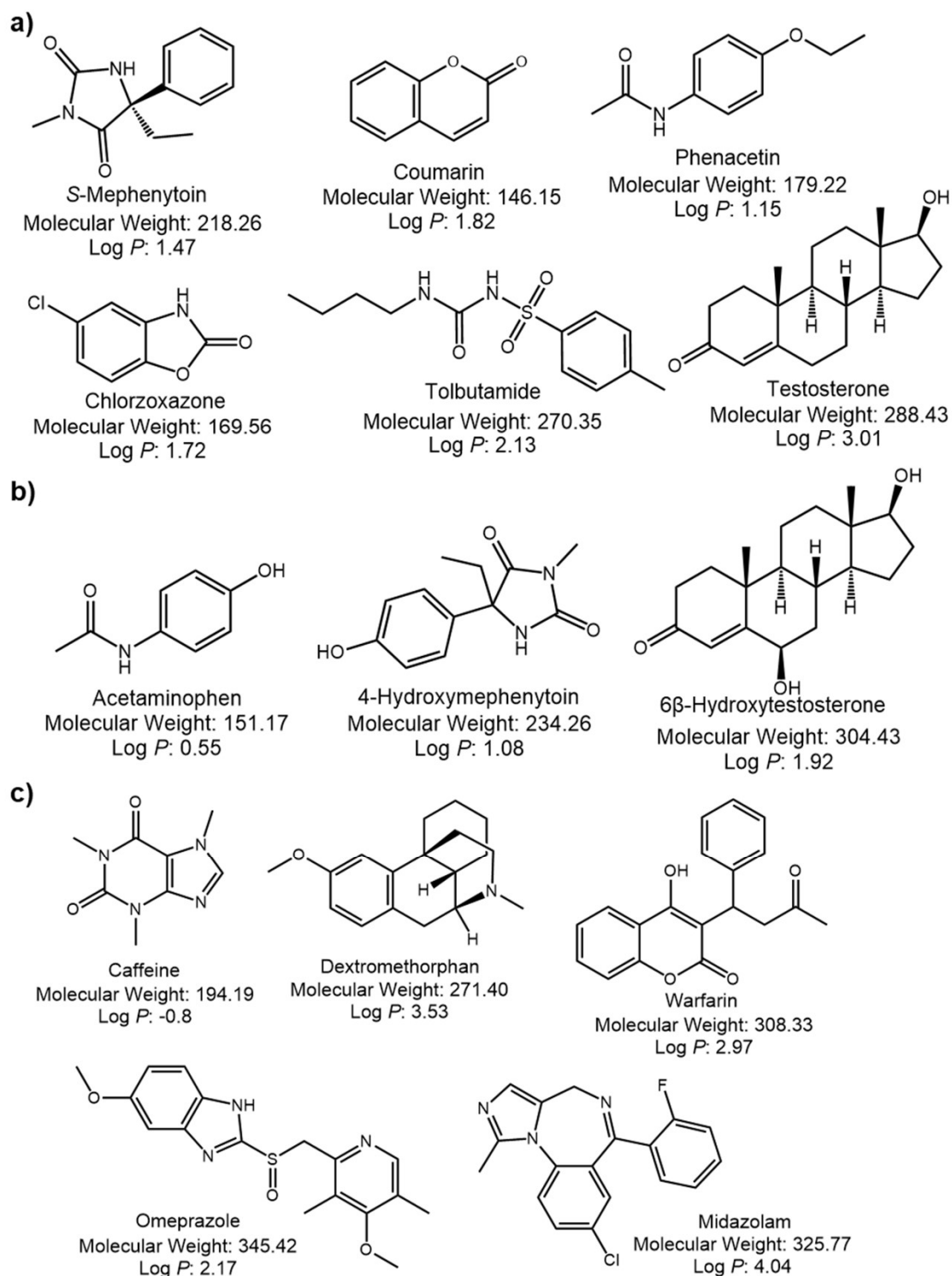
CYP 分子種	典型基質薬の組み合わせ	
	Mixture for <i>in vitro</i> study	Mixture for clinical study
CYP1A2	Phenacetin	Caffeine
CYP2A6	Coumarin	—
CYP2C9	Tolbutamide	Warfarin
CYP2C19	S-Mephenytoin	Omeprazole
CYP2D6	—	Dextromethorphan
CYP2E1	Chlorzoxazone	—
CYP3A	Testosterone	Midazolam

## 2.2 実験

### 2.2.1 試薬

PNIPAAm は KJ ケミカルズより供与され、使用前に *n*-hexane によって再結晶させ精製した。*n*-Butyl methacrylate (BMA)、2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN)、及び 1,4-dioxane は富士フィルム和光純薬より入手した。L-Tryptophan はペプチド研究所より入手後、既報の方法によって[143-145]、trimethylamine の存在下で acryloyl chloride 及び methyl ester

を反応させ *n*-acryloyl L-tryptophan methyl ester (L-Trp-OMe) を得た。N,N-Dimethylformamide (DMF)、3-mercaptopropionic acid (MPA)、及び N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) は関東化学より、N-hydroxysuccinimide (NHS) はメルクより、アミノプロピルシリカ (平均径 5  $\mu\text{m}$ 、孔径 12 nm) は西尾工業又はワイエムシィよりそれぞれ入手した。精製水は、オルガノのピュアライト PRB によって精製された純水を使用した。CYP3A4、NADPH Regenerating System Solution A (26 mM NADP<sup>+</sup>, 66 mM glucose-6-phosphate, 66 mM MgCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O)、及び NADPH Regenerating System Solution B (40 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase in 5 mM sodium citrate) は Corning より入手した。その他の試薬類は、特筆しない限り特級試薬を用いた。分析に用いた CYP 典型基質薬及び代謝物を Figure 2-2 に示す。Acetaminophen、cafeine、dextromethorphan (dextromethorphan hydrobromide monohydrate)、midazolam、omeprazole、phenacetin、testosterone、tolbutamide 及び warfarin (warfarin sodium) は富士フィルム和光純薬より、coumarin 及び chlorzoxazone はシグマ アルドリッチ ジャパンより、S-mephenytoin、4'-hydroxymephenytoin 及び 6 $\beta$ -hydroxytestosterone は住友化学より入手した。



**Figure 2-2** Structures of the analytes used in simultaneous analysis of six CYP substrates for in vitro drug interaction assay (a), separation of CYP substrates and metabolites by temperature-responsive chromatography (b), and simultaneous analysis of five CYP substrates for clinical drug interaction studies (c).



## 2.2.2 温度応答性ポリマーの合成及びシリカへの修飾

### 2.2.2.1 温度応答性ポリマーの合成

本検討では、P(NIPAAm-*co*-BMA)及び P(NIPAAm-*co*-L-Trp-OMe)の温度応答性ポリマーを使用した。いずれのポリマーも NIPAAm と BMA 又は L-Trp-OMe とのコポリマー（モル比 95:5）であり、ラジカル開始剤及び連鎖移動剤としてそれぞれ AIBN 及び MPA を用いて合成した。

NIPAAm (159 mmol) 及び BMA (8.40 mmol) 又は L-Trp-OMe (8.40 mmol) を DMF (45 mL) に溶解させた後、AIBN (0.706 mmol) 及び MPA (4.13 mmol) を添加した。得られた反応液を凍結脱気した後、70°C で 5 時間反応させた。反応後、diethyl ether 中に反応液を滴下させ、合成したポリマーを沈殿させた。得られた沈殿物は acetone に溶解させ、diethyl ether 中に滴下し精製した。精製後、沈殿物を回収し真空下で乾燥して白色固体を得た。

### 2.2.2.2 温度応答性ポリマーのシリカへの修飾

合成した P(NIPAAm-*co*-BMA) (6.5 g) 又は P(NIPAAm-*co*-L-Trp-OMe) (6.5 g) を ethyl acetate (50 mL) に溶解させ、DCC (0.51 g) 及び NHS (0.29 g) をそれぞれのポリマー溶液に添加した。得られた溶液を 4°C で 2 時間攪拌させ、その後 25°C の恒温槽で 24 時間攪拌させた。反応副生成物である dicyclohexylurea を濾過により取り除いた後、濾液を diethyl ether 中に滴下しポリマーを精製した。濾取して得られたスクシニル化ポリマー (1.5 g) を 1,4-dioxane (50 mL) に溶解後、アミノプロピルシリカ (3.0 g) を加え、25°C で 24 時間反応させた。反応後、濾取して得られたポリマー及びシリカを 1,4-dioxane (50 mL) に溶解させ、再び 25°C で 24 時間反応させた。得られたシリカは methanol (1000 mL) で洗浄し、真空下にて乾燥させた。アミノプロピルシリカ表面の未反応のアミノ基のエンドキャップのため、乾燥させたポリマー修飾シリカを glycidol (15 mL) と 1,4-dioxane (10 mL) に溶解させ、25°C で 24 時間攪拌させた。反応後、methanol (150 mL) で洗浄し、真空下にて乾燥させ、P(NIPAAm-*co*-BMA)修飾シリカ及び P(NIPAAm-*co*-L-Trp-OMe)修飾シリカを得た。

## 2.2.3 温度応答性ポリマーの物性評価

### 2.2.3.1 LCST 測定

シリカに修飾した温度応答性ポリマーの LCST を推測するため、合成した温度応答性ポリマーの LCST を測定した。ポリマーの LCST は、ポリマーを純水に溶解させた溶液 (5 mg/mL) の光透過率によって測定した。測定に使用した機器は、UV-Vis 分光光度計 (V-630、JASCO)、PT-31 ペルチェシシステム (Krüss)、及び ETC-717 コントローラー

(JASCO) であり、測定波長は 500 nm、昇温速度は 0.1°C/min の条件で測定した。50% の光透過率の時点におけるポリマー溶液温度を LCST と定義した。

### 2.2.3.2 ゲル濾過クロマトグラフィー測定

ポリマーの分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) (GPC-8020、東ソー) を用いて評価した。分析条件は、TSK ガードカラム及び TSK GEL  $\alpha$ -M カラム、カラム温度 40°C、移動相 10 mM LiCl/DMF、流速を 1.0 mL/min とした。ポリマーを移動相に溶解させた溶液 (0.5 mg/mL) を測定した。キャリブレーションには、polyethylene glycol 標準品 (東ソー) を使用した。

### 2.2.3.3 元素分析

ポリマーのシリカへの修飾量は、ポリマー未修飾シリカ (アミノプロピルシリカ)、P(NIPAAm-co-BMA)修飾シリカ、及び P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)修飾シリカを用いた元素分析 (PE2400 CHN、PerkinElmer) によって評価した。各ポリマーの修飾量は、アミノプロピルシリカ及び各ポリマー修飾シリカの元素分析の測定結果から下式 (1) を用いて算出した。

$$\text{Polymer content} = \%C_p \times [\%C_p(\text{calcd}) \times (1 - \%C_p/\%C_p(\text{calcd})) \times S]^{-1} \quad (1)$$

$\%C_p$ : アミノプロピルシリカから各ポリマー修飾シリカへの炭素割合の増加量

$\%C_p(\text{calcd})$ : 各ポリマー修飾シリカにおける炭素重量割合

$S$ : アミノプロピルシリカの比表面積 (180 m<sup>2</sup>/g)

## 2.2.4 TRC

### 2.2.4.1 非臨床評価用 CYP 典型基質薬のカクテル試料の一斉分析

非臨床 DDI 試験で汎用される CYP 典型基質薬のカクテル試料の一斉分析を P(NIPAAm-co-BMA)カラムを用いた TRC によって検討した。また、同じ分析条件における生体試料中の夾雑物の影響の有無を明らかにするために、ヒト血清を固相抽出した溶液にスパイクしたカクテル試料を用いての一斉分析も検討した。

HPLC システムは、HITACHI Model L-7100 pump、L-7400 UV detector、D-7500 integrator (日立ハイテック)、及び AO-30C column oven (Shodex) を使用した。カラムは、P(NIPAAm-co-BMA)修飾シリカをステンレスカラム (長さ 150 mm×内径 4.6 mm) に充填したものを使用した。移動相は 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 4.8) を流速 1.0 mL/min で、検出波長は 220 nm とした。カラム温度は 5、10、20、30、40、及び 50°C で検討した。カ

カクテル試料は、すべての基質薬を tetrahydrofuran に溶解 (0.25 mg/mL) させ、ストック溶液として調製後、phenacetin、coumarin、tolbutamide、S-mephenytoin、chlorzoxazone、及び testosterone をそれぞれ 1:1.5:1:3:1.5:2 の濃度比率となるように調製した。各分析対象物質の retention factor は、ウラシルの保持時間 ( $t_0$ ) 及び各分析対象物質の保持時間 ( $t_R$ ) より下式 (2) を用いて算出した。

$$\text{Retention factor} = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2)$$

ヒト血清は日水製薬から入手し、Sep-pak® Plus C18 カートリッジ (Waters) を使用して、methanol/純水 (50:50) 及び 0.1 M ammonium acetate で精製した。回収した溶液を減圧乾燥した後、tetrahydrofuran (1 mL) に溶解して blank を得た。調製したカクテル試料 300  $\mu$ L に blank 200  $\mu$ L に混合したものを試料とした。

#### 2.2.4.2 CYP 典型基質薬と代謝物の同時分析

非臨床 DDI 試験で汎用される CYP 典型基質薬のうち、phenacetin、S-mephenytoin、及び testosterone とそれぞれの代謝物である acetaminophen、4'-hydroxymephenytoin、及び 6 $\beta$ -hydroxytestosterone を用いて、P(NIPAAm-co-BMA)カラム (2.2.4.1 項と同様) によって基質薬物と代謝物との分析の検討を行った。

分析に用いた HPLC システムは 2.2.4.1 項と同様とした。Phenacetin / acetaminophen 及び S-mephenytoin / 4'-hydroxymephenytoin の分析には、移動相として 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 4.8) を流速 1.0 mL/min で、検出波長は 220 nm を使用した。Testosterone / 6 $\beta$ -hydroxytestosterone の分析には、移動相として純水を流速 1.0 mL/min で、検出波長は 254 nm とした。カラム温度は 10°C と 40°C で検討した。Phenacetin と acetaminophen はそれぞれ移動相に溶解 (0.2 mg/mL) し、ストック溶液として調製後、1:1 の濃度比率となるように調製し試料とした。S-mephenytoin と 4'-hydroxymephenytoin はそれぞれ移動相に溶解 (0.16 mg/mL) し、ストック溶液として調製後、3:2 の濃度比率となるように調製し試料とした。Testosterone、6 $\beta$ -hydroxytestosterone のストック溶液は、それぞれ純水、50% acetonitrile に溶解後 (25  $\mu$ g/mL、10 mg/mL)、溶液比として 66:1 となるように調製し試料とした。

#### 2.2.4.3 Testosterone / 6 $\beta$ -hydroxytestosterone を使用した *in vitro* 代謝実験

非臨床 DDI 試験で汎用される CYP 典型基質薬である testosterone を *in vitro* で代謝させた試料を P(NIPAAm-co-BMA)カラム (2.2.4.1 項と同様) によって分析し、代謝酵素由来の夾雑物の影響を検討した。

HPLC システムは、HITACHI Model L-7100 pump、L-7405 UV detector、D-7100 integrator、

及び AO-30C column oven を使用した。移動相は純水を流速 1.0 mL/min で、検出波長は 254 nm とした。カラム温度は 10°C 及び 40°C で検討した。

CYP3A4 20 pmol、NADPH Regenerating System Solution A 25  $\mu$ L、NADPH Regenerating System Solution B 5  $\mu$ L、methanol に溶解した testosterone (1 mg/mL) 5  $\mu$ L、及び 100 mM phosphate buffer 445  $\mu$ L を加え、37°C で 10 分間インキュベーションを行った。Acetonitrile (250  $\mu$ L) によって反応を停止後、遠心分離 (3,000 rpm $\times$ 3 min) を行った。上清を減圧乾燥した後、純水 1 mL に溶解した溶液を Sep-pak<sup>®</sup> Plus C18 を使用して methanol/純水 (60:40) で固相抽出した。溶出液を再度減圧乾燥させ、純水 1 mL に溶解したものを試料とした。

#### 2.2.4.4 臨床評価用 CYP 典型基質薬のカクテル試料の一斉分析

臨床 DDI 試験で汎用される CYP 典型基質薬のカクテル試料の一斉分析を P(NIPAAm-co-BMA)及び P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)カラムによって検討した。

HPLC システムは、HITACHI ChromasterUltra Rs、6170 pump、6270 autosampler、6310 column oven、6430 diode array detector を使用した。カラムは、P(NIPAAm-co-BMA)修飾シリカ又は P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)修飾シリカをステンレスカラム (長さ 50 mm $\times$ 内径 2.1 mm) に充填したものを使用した。移動相は 30 mM ammonium acetate buffer (pH 5.8) を流速 0.2 mL/min で、検出波長は 280 nm とした。カラム温度は 10、20、30、40 及び 50°C で検討した。カクテル試料の調製は、すべての基質薬をストック溶液として tetrahydrofuran に 1.0 mg/mL の濃度で溶解後、caffeine、warfarin、omeprazole、dextromethorphan、及び midazolam をそれぞれ 1:8:6:20:25 の濃度比率となるように調製し試料とした。各分析対象物質の retention factor は、ウラシルの保持時間 ( $t_0$ ) 及び各分析対象物質の保持時間 ( $t_R$ ) より、2.2.4.1 項の式 (2) を用いて算出した。

## 2.3 結果及び考察

### 2.3.1 温度応答性ポリマーの物性評価

P(NIPAAm-co-BMA)及び P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)は、NIPAAm と BMA 又は L-Trp-OMe から、ラジカル開始剤 (AIBN) 及び連鎖移動剤 (MPA) を用いて合成した (Figure 2-3)。P(NIPAAm-co-BMA)及び P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)の LCST は、それぞれ 22.1°C 及び 21.4°C であり (Figure 2-4)、既報の同組成のポリマーの LCST と同程度であった [113, 146]。P(NIPAAm-co-BMA)及び P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)の LCST は同程度であったことから、BMA 及び L-Trp-OMe モノマーの疎水性度は同程度と推察された。また、合成したポリマーはいずれも PNIPAAm と同じように LCST を境に急激な相転移がみられたことから、シリカ表面に修飾したポリマーも LCST を境とした急激な物理化学的性質の変化を引き起こすと考えられた。

P(NIPAAm-co-BMA)及び P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)の平均分子量と分子量分布を GPC により測定した (Table 2-2)。P(NIPAAm-co-BMA)及び P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)のシリカへの修飾は、元素分析により評価した (Table 2-3)。修飾シリカの炭素含有量は、いずれも未修飾シリカビーズの炭素含有量よりも多く、ポリマーが修飾されていることが示唆された。

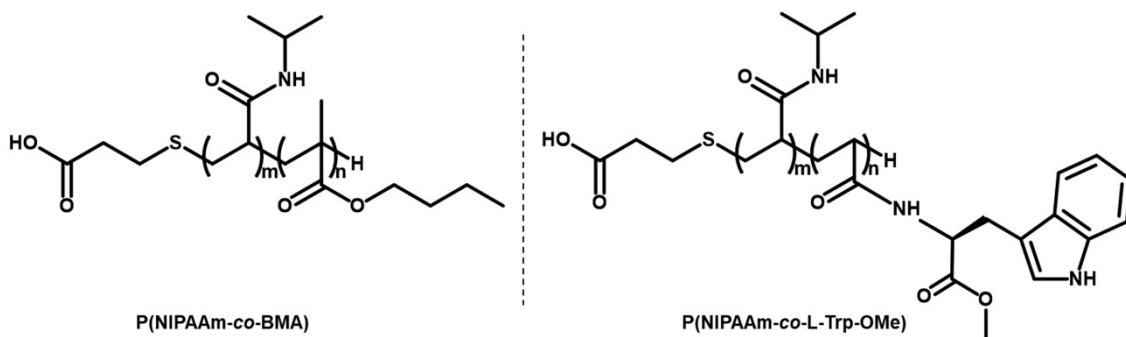
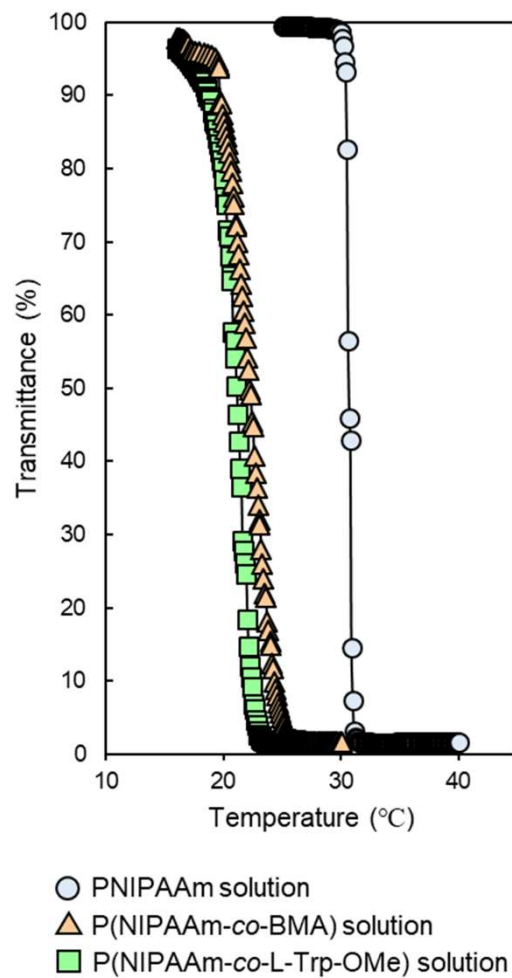


Figure 2-3 Structures of PNIPAAm-based temperature-responsive polymers used in this study.



**Figure 2-4** Temperature dependence of transmittance of a 5 mg/mL PNIPAAm solution, P(NIPAAm-co-BMA) solution and P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe) solution.

**Table 2-2 Molecular weights of P(NIPAAm-co-BMA) and P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe) determined by GPC.**

	Mn	Mw/Mn
P(NIPAAm-co-BMA)	6600	1.46
P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)	7200	1.78

**Table 2-3 Elemental analysis of P(NIPAAm-co-BMA) and P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)-modified silica beads.**

	Atoms		Grafted polymer (mg/m <sup>2</sup> )
	Carbon (%)	Nitrogen (%)	
None	2.85 ± 0.02	2.49 ± 0.34	-
P(NIPAAm-co-BMA)	6.28 ± 0.02	3.46 ± 0.31	0.32
P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)	6.68 ± 0.03	3.41 ± 0.32	0.35

### 2.3.2 非臨床評価用 CYP 典型基質薬のカクテル試料の TRC による一斉分析

P(NIPAAm-co-BMA)カラムを用いた TRC によって、6つの CYP 典型基質薬のカクテル試料の一斉分析を行った。6つの CYP 典型基質薬 (CYP1A2: phenacetin、CYP2A6: coumarin、CYP2C9: tolbutamide、CYP2C19: S-mephenytoin、CYP2E1: chlorzoxazone、CYP3A: testosterone; Figure 2-2a) は、U.S. Food and Drug Administration (FDA) ガイドライン及び文献情報を基に *in vitro* DDI 評価系で用いられる薬剤の組み合わせを選択した[132, 133, 142]。分析結果を Figure 2-5a に示す。Figure 2-5b 及び 2-5c は、各分析対象物質の retention factor を示す。いずれの基質薬も、カラム温度上昇に伴い保持が強くなり、TRC による温度応答性の影響がみられ、カラム温度 40°C で最も良好な分離が確認できた (Figure 2-5)。Phenacetin、coumarin、及び S-mephenytoin はピーク先端のみの分離がみられているが、これらはカラム長を長くすることで更なる分離度の向上を図れると考えられる。

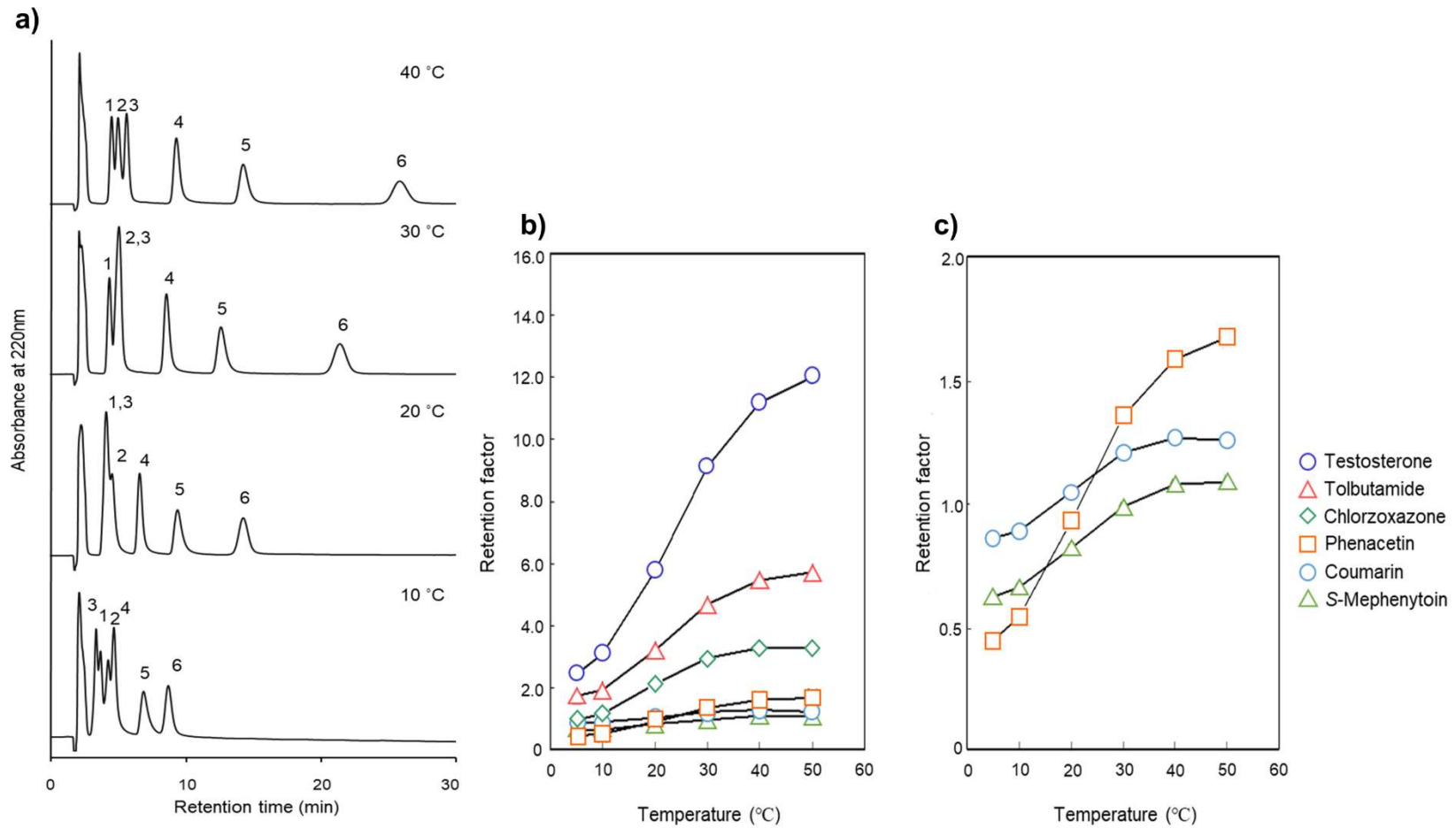
TRC はカラム温度上昇に伴い固定相が親水性から疎水性へと変化し、分析対象物質との相互作用が変化するため、疎水性が高い分析対象物質ほど温度上昇に伴い保持が強くなることが考えられる。しかし、6つの基質薬のうち、phenacetin 及び chlorzoxazone の溶出順序は疎水性度の強さに則していなかった。Phenacetin は、LCST 付近を境に coumarin 及び S-mephenytoin との溶出順序の変化がみられた (Figure 2-5c)。Chlorzoxazone の log *P* 値は coumarin よりも小さいが、分析したいずれの温度においても chlorzoxazone の保持は coumarin よりも強かった。これらの変化は、カラム温度の上昇に伴うカラム固定相の物理化学的性質の変化による親和性の変化の他に、既報されているカラム固定相のポリマー鎖と phenacetin の NH 基又は芳香環との間の相互作用が関与していると考えられる。

えられる[75, 76, 78]。

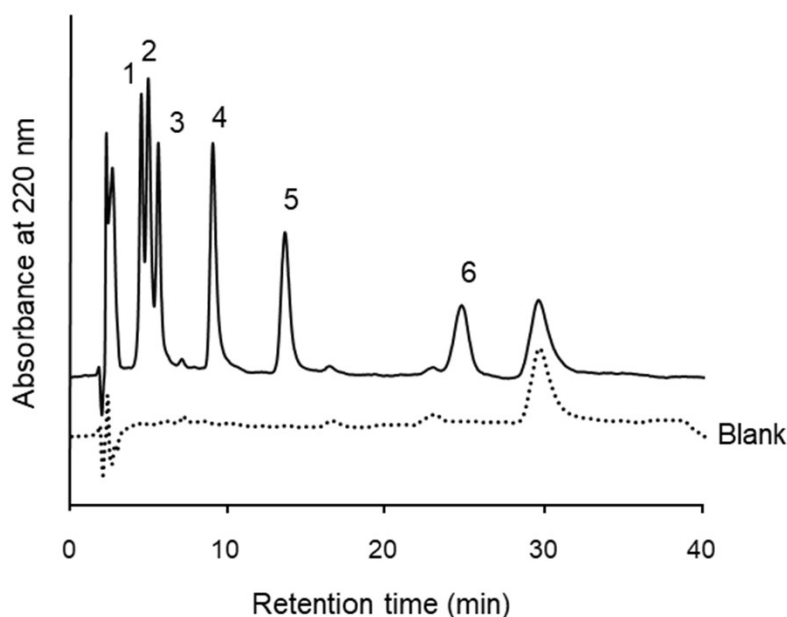
6つの基質薬が最も分離された40°Cの分析条件において、固相抽出したヒト血清にスパイクした6つの基質薬を一斉分析した結果をFigure 2-6に示す。溶出順序は、Figure 2-5で示した分析結果と同様であり、さらにいずれの基質薬もヒト血清由来の夾雑物のピークに被ることなく分離が可能であった。

以上より、P(NIPAAm-co-BMA)カラムによるTRCを使用することで、非臨床CYP典型基質薬のカクテル試料を一斉分析することが可能であった。これらの分析は、水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件にて行い、既報のような有機溶媒の使用やグラジエント法を使用せずに一斉分析が可能であった。さらにヒト血清由来の夾雑物のピークに被ることなく一斉分析が可能であったことから、本分析条件を用いることで*in vitro*評価系における生体試料中のカクテル基質薬の一斉分析が可能であることが示唆された。





**Figure 2-5** Chromatogram and retention factor of six CYP substrates (1: *S*-Mephenytoin, 2: Coumarin, 3: Phenacetin, 4: Chlorzoxazone, 5: Tolbutamide, 6: Testosterone) at various column temperatures on P(NIPAAm-*co*-BMA) column (a); effect of temperature on the retention factor (b); enlargement of (b) for *S*-mephenytoin, coumarin, and phenacetin (c).



**Figure 2-6 Chromatogram of six CYP substrates (1: *S*-Mephenytoin, 2: Coumarin, 3: Phenacetin, 4: Chlorzoxazone, 5: Tolbutamide, 6: Testosterone) spiked in human serum.**

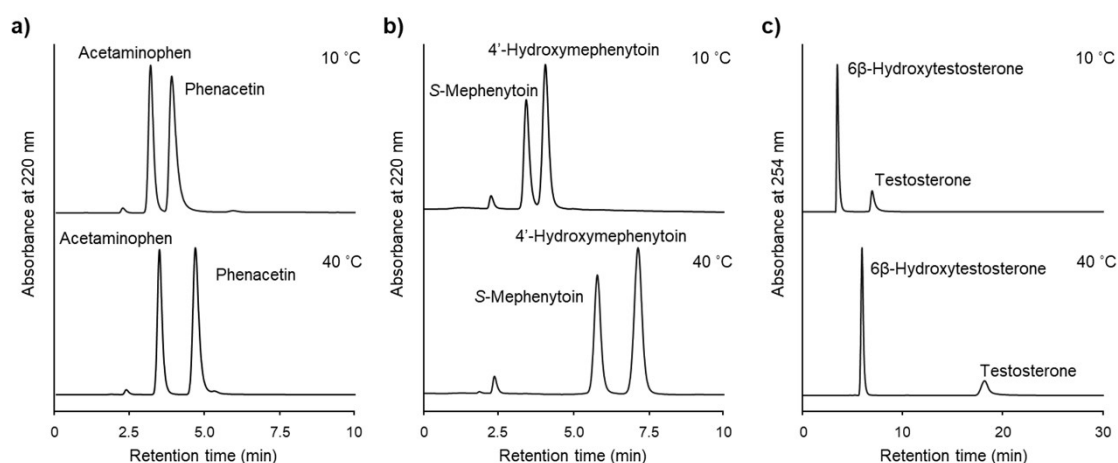
### 2.3.3 CYP 典型基質薬と代謝物の TRC による同時分析

P(NIPAAm-*co*-BMA)カラムを用いた TRC によって、3つの CYP 典型基質薬とそれらの代謝物 (phenacetin/acetaminophen、*S*-mephenytoin/4'-hydroxymephenytoin、testosterone / 6 $\beta$ -hydroxytestosterone; Figure 2-2b) の同時分析を行った。移動相は、phenacetin / acetaminophen 及び *S*-mephenytoin / 4'-hydroxymephenytoin の分析には 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 4.8) を、testosterone / 6 $\beta$ -hydroxytestosterone には純水を使用し、いずれの組み合わせも水系溶媒又は純水のみイソクラティックな溶出条件で分析した。Figure 2-7 に分析結果を示す。いずれの組み合わせも、カラム温度 10°C よりも 40°C で保持が強く、TRC による温度応答性の影響がみられた (Figure 2-7)。Phenacetin / acetaminophen 及び testosterone / 6 $\beta$ -hydroxytestosterone の溶出順序は、log *P* の値に一致しており、疎水性の低い代謝物の溶出が親化合物よりも溶出が早かった (Figure 2-7a 及び 2-6c)。しかし、*S*-mephenytoin / 4'-hydroxymephenytoin では溶出順序は log *P* 値とは逆の挙動を示した。一般に代謝物の疎水性度はその親化合物よりも低い、*S*-mephenytoin の保持は、いずれのカラム温度でも、代謝物の 4'-hydroxymephenytoin より弱かった (Figure 2-7b)。この溶出挙動の違いは、ベンゼン環の電子密度が *S*-mephenytoin に比べ、4'-hydroxymephenytoin の方がヒドロキシ基によって高くなり、固定相のポリマー鎖とベンゼン環との相互作用 ( $\pi$ - $\pi$  相互作用) が強まったことや、固定相と分析対象物質中の NH 基との相互作用など複数の因子が影響したためと考えられる。また、移動相中 (pH

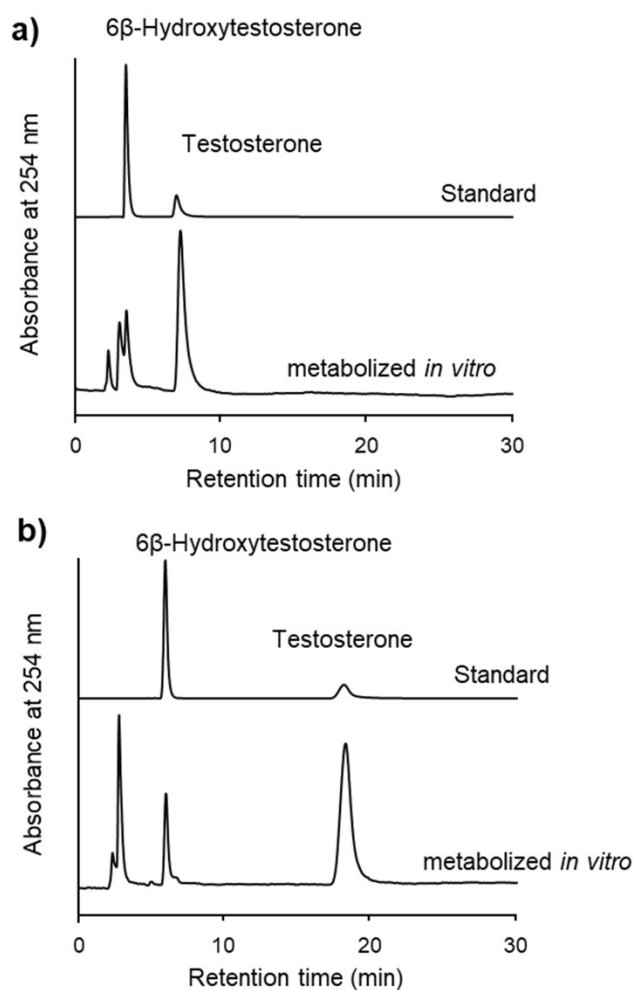
4.8) における *S*-mephenytoin / 4'-hydroxymephenytoin のイオン化の程度の差も溶出挙動の差に寄与していると考えられる。

Testosterone と CYP3A4 を用いた *in vitro* 代謝実験では、代謝物である 6 $\beta$ -hydroxytestosterone のピークがみられ、Figure 2-7c と同じ溶出順序及び挙動を示した (Figure 2-8)。10 $^{\circ}$ C の分析では、6 $\beta$ -hydroxytestosterone のピークが代謝実験由来の夾雑物のピークと重なったが、40 $^{\circ}$ C では夾雑物のピークと重なることなく testosterone 及び 6 $\beta$ -hydroxytestosterone の分離が可能であった。

以上より、P(NIPAAm-*co*-BMA)カラムによる TRC によって、水系溶媒のみのイソクラティックな条件で、CYP 基質薬と代謝物を同時分析することが可能であった。さらに、*in vitro* 代謝実験後の夾雑物の影響をうけることなく分離することも可能であり、この TRC は *in vitro* 代謝実験後の CYP 基質薬と代謝物の同時分析の新たな手法としての可能性が示唆された。



**Figure 2-7** Effect of temperature on the retention times of CYP substrate and its metabolite at 10  $^{\circ}$ C and 40  $^{\circ}$ C (phenacetin / acetaminophen (a); *S*-mephenytoin / 4'-hydroxymephenytoin (b); testosterone / 6 $\beta$ -hydroxytestosterone (c)).



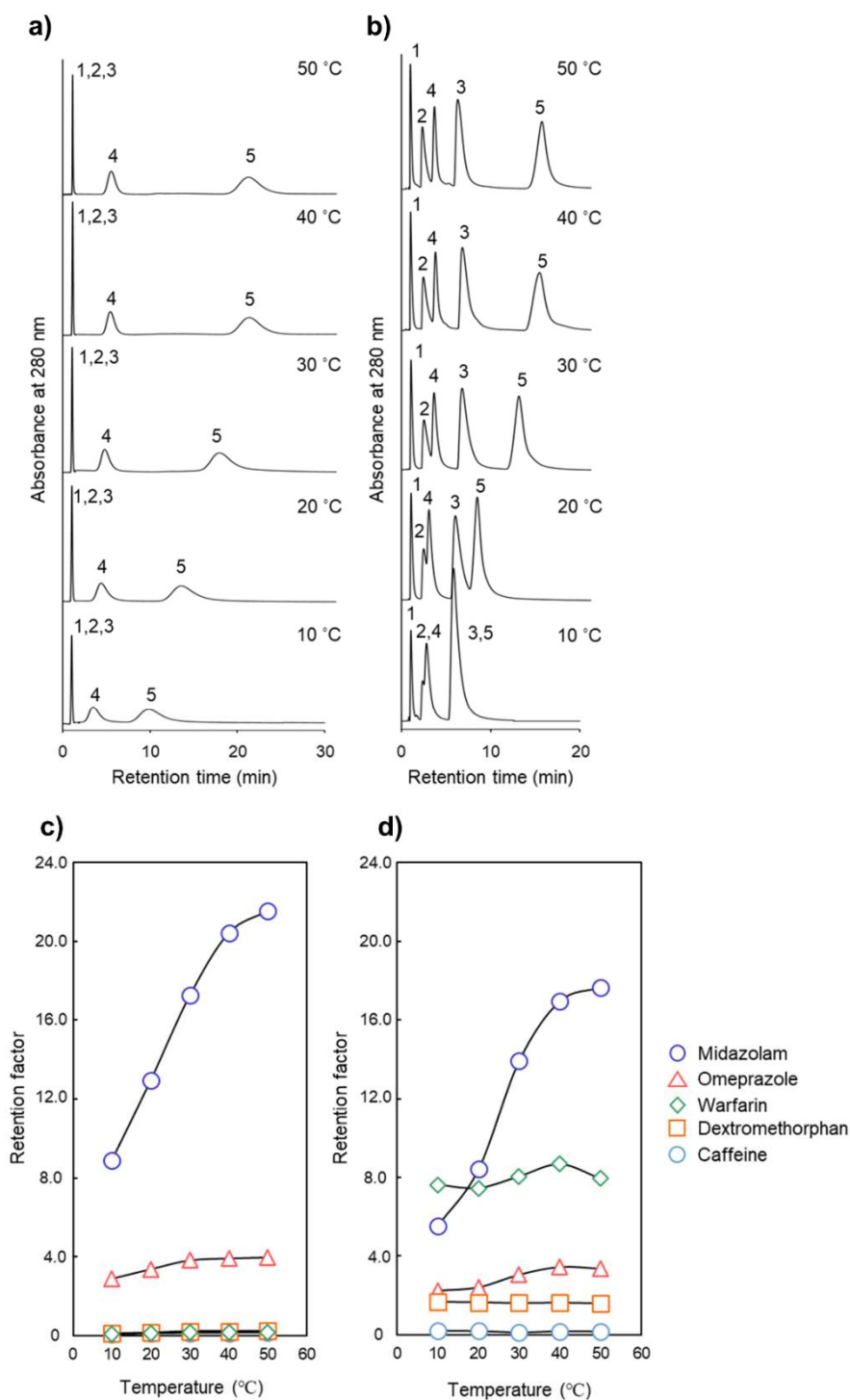
**Figure 2-8** Effect of temperature on the retention times of testosterone and 6 $\beta$ -hydroxytestosterone at 10 °C (a) and 40 °C (b).

#### 2.3.4 臨床評価用 CYP 典型基質薬のカクテル試料の TRC による一斉分析

P(NIPAAm-co-BMA)カラム及びP(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)カラムを用いた TRC によって、30 mM ammonium acetate buffer (pH 5.8) のイソクラティックな条件で、5 つの CYP 典型基質薬のカクテル試料の一斉分析を行った。5 つの CYP 典型基質薬 (CYP1A2: caffeine、CYP2C9: warfarin、CYP2C19: omeprazole、CYP2D6: dextromethorphan、CYP3A: midazolam; Figure 2-2c) は、U.S. Food and Drug Administration (FDA) ガイドライン及び臨床 DDI 試験として報告のあるカクテル基質薬の組み合わせを選択した[131, 142]。分析結果を Figure 2-9a 及び 2-9b に示す。Figure 2-9c 及び 2-9d は、各カラムにおける各分析対象物質の retention factor を示す。P(NIPAAm-co-BMA)カラムでは、omeprazole 及び midazolam で温度応答性がみられたが、その他の分析対象物質ではほとんど温度応答性はみられず、さらに caffeine、dextromethorphan、及び warfarin の 3 つの分析対象物質は

いずれの温度でもピークの重なりがみられた。一方、P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)カラムでは、*caffeine* 及び *dextromethorphan* を除き、温度応答性がみられ、50°Cにおいて最も良好な分離がみられた。P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)カラムでの良好な分離は、L-Trp-OMeの分子認識能に寄与していると考えられた。BMAとは異なり、L-Trp-OMeは芳香環を有する。既報研究にて、L-phenylalanineなどの芳香環を有するコモノマーを共重合させることで、ポリマー内のNH基又は芳香環と分析対象物質のNH基又は芳香環との間で、NH- $\pi$ 又は $\pi$ - $\pi$ 相互作用が働くことが示唆されている[75, 76, 78]。さらにL-tryptophaneの電子供与の強度は芳香族アミノ酸の中で、最も強いことが知られている[147]。そのため、P(NIPAAm-co-BMA)カラムとP(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)カラムとで保持に大きく差が出た*warfarin* 及び *dextromethorphan* は、分子内の芳香環に電子供与基(OH基及びOCH<sub>3</sub>基)が存在し、芳香環の電子密度が他の分析対象物質よりも高く、カラム固定相との相互作用が増強したと考えられた。他方、Mikumaらは、P(NIPAAm-co-L-phenylalanine methyl ester (L-Phe-OMe))カラムによるTRCにおいて、LCST以下の温度で固定相と分析対象物質との相互作用が容易にみられたと報告している。本検討では、Mikumaらの報告とは異なり、LCST以上にてより固定相と分析対象物質の相互作用がみられていた。この違いは、コモノマーであるL-Trp-OMe内の芳香環の電子密度がL-Phe-OMeの芳香環のそれよりも高いことによる、NH- $\pi$ 又は $\pi$ - $\pi$ 相互作用の増強に起因すると考えられる[147]。加えて、LCST以上の高温状態における固定相の疎水性相互作用も相まって、さらに保持が強くなったことも考えられる。Table 2-4には、P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)カラムの50°Cでの分析における再現性データを示す。いずれの基質薬も、3回の測定で溶出時間及びピークエリアに大きな差はなく、良好な再現性が確認された。

以上より、P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe)カラムによるTRCによって、水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件で、臨床評価用CYP基質薬の一斉分析が可能であった。このPNIPAAmを基盤としたTRCは、有機溶媒を含むグラジエント法を使わずに、非臨床及び臨床評価CYP基質薬のカクテル試料の一斉分析の他、代謝物との同時分析、及び*in vitro*代謝実験後の夾雑物の影響をうけることなく分離することが可能であり、今日の環境低負荷な時代におけるDDI評価系の新たな分析手法としての可能性が示唆された。



**Figure 2-9** Chromatogram and retention factor of five CYP substrates (1: Caffeine, 2: Dextromethorphan, 3: Warfarin, 4: Omeprazole, 5: Midazolam) at various column temperatures on P(NIPAAm-co-BMA) column (a) and P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe) column (b); effect of temperature on the retention factor on P(NIPAAm-co-BMA) column (c) and P(NIPAAm-co-L-Trp-OMe) column (d).

**Table 2-4 Repeatability of the present simultaneous analysis for multiple CYP substrates; relative standard deviation (RSD) was calculated from the data (mean and standard deviation (SD)) of triplicate sample (n=3) at a given concentration of each analyte: RSD was calculated from the data (mean and SD) of triplicate sample at a given concentration of each analyte.**

Analyte	Concentration (mg/mL)	Retention time (min)			Area		
		Mean	(SD)	RSD	Mean	(SD)	RSD
Caffeine	0.00625	1.05	(0.000577)	0.000551	181000	(7020)	0.0387
	0.0125	1.05	(0.000577)	0.000552	364000	(7830)	0.0215
	0.025	1.04	(0.00116)	0.00111	744000	(15400)	0.0207
Dextro-methorphan	0.125	2.51	(0.00423)	0.00168	765000	(37300)	0.0488
	0.25	2.47	(0.00200)	0.000810	1680000	(8850)	0.00527
	0.5	2.44	(0.000681)	0.000279	3320000	(30500)	0.00918
Warfarin	0.05	8.24	(0.000577)	0.0000700	1460000	(33100)	0.0226
	0.1	8.17	(0.000850)	0.000104	2970000	(47600)	0.0160
	0.2	8.11	(0.00565)	0.000696	6050000	(47700)	0.00789
Omeprazole	0.0375	4.03	(0.00869)	0.00215	1180000	(32100)	0.0272
	0.075	4.02	(0.00243)	0.000603	2430000	(42100)	0.0173
	0.15	3.99	(0.00637)	0.00160	4740000	(46100)	0.00972
Midazolam	0.15	16.4	(0.00155)	0.0000946	4760000	(41000)	0.00860
	0.3	16.4	(0.0127)	0.000775	9600000	(51100)	0.00532
	0.6	16.5	(0.00265)	0.000161	19700000	(121000)	0.00612

## 2.4 結論

本章では、水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件による温度応答性クロマトグラフィーを用いて、異なる基本骨格を持つ複数分析対象物質の一斉分析を検討した。有機溶媒やグラジエント法を使用せずに、非臨床又は臨床評価用に一般的に使用される複数 CYP 基質薬のカクテル試料の良好な分離が示された。イソクラティックかつ水系溶媒のみを使用するという側面は、最適なグラジエント法の検討に要する時間や労力を従来法よりも削減し、さらに分析対象物質にとってより低負荷という利点を持つ。また、これらの特徴は、環境低負荷な分析技術 “Green chromatography” の一つとして期待される。

また、分子認識能を有するコモノマーを温度応答性ポリマーに導入することでカラム固定相に分子認識能を付加できるため、様々な分析対象物質への汎用性が高く、かつ分析対象物質にとって温和な条件であるため、アミノ酸、ペプチド、抗体、核酸といった生理活性分子の分析にも応用可能であると考えられた。



## 第3章 静電的特性及び温度応答性を有した環境低負荷型分析技術によるオリ

### ゴヌクレオチドの分離精製法の開発

#### 3.1 緒言

核酸医薬は、特定の塩基配列や特定のタンパク質を認識して遺伝子発現やタンパク質の機能を制御する医薬品であり、従来のモダリティでは対処が難しい疾患に対するモダリティとして注目されている[22]。核酸医薬の開発は、オリゴヌクレオチドへの化学修飾による生体内での安定性の向上や DDS 技術の発展も相まって、近年再起している[19, 20]。S-Oligo は、上市されている核酸医薬のうち最も施されている化学修飾型オリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドの製造過程で生じ得る類縁物質は、最終生成物と類似した配列を有し、一定の薬理活性を示すことや人における安全性プロファイルに影響を及ぼすため、目的の核酸医薬の精製、類縁物質の分離することが肝要となる。現在、オリゴヌクレオチドの分析には、移動相に有機溶媒又はイオン対試薬を含んだグラジエント法を用いた RPLC や IELC が汎用されている[115, 116]。特に、S-Oligo の分析にはイオン対試薬がしばしば使用されている[117-120]。イオン対試薬の使用は、分析前の平衡化に時間を要したり[51]、分離後の分析対象物質からのイオン対試薬の解離[52, 53]といった手技を要するため、イオン対試薬を用いずに分析対象物質を分離することは、分析に要する時間や手技の削減及び分析対象物質の生理活性を損なわずに分離可能といったメリットがある。しかし、イオン対試薬を使わず、かつ水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件で、S-Oligo を含む複数のオリゴヌクレオチドを一斉分析した報告はない。

そこで本章では、カチオン性を有する温度応答性クロマトグラフィーにより、イオン対試薬及び有機溶媒を使用しないイソクラティックな溶出条件での複数オリゴヌクレオチドの分離を行った。

#### 3.2 実験

##### 3.2.1 試薬

*N,N*-Dimethylaminopropylacrylamide (DMAPAAm) は KJ ケミカルズより供与された。*N,N'*-Methylenebisacrylamide (MBAAm)、4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (V-501)、及び phosphate buffer (66.7 mM pH 7.0、66.7 mM pH 6.6、及び 66.7 mM pH 7.6) は富士フィルム和光純薬より入手した。1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) はシグマ アルドリッチ ジャパンより入手した。アミノプロピルシリカ (平均径 5  $\mu\text{m}$ 、孔径 12 nm) はワイエムシィより入手した。その他の試薬類は、特筆しない限り特級試薬

又は第2章で使用したものをを用いた。

分析に用いたオリゴヌクレオチドは、つくばオリゴサービスより入手した。Table 3-1には、分析に用いたオリゴヌクレオチドの一覧及び分析に用いた濃度を示す。

**Table 3-1 Sequences of oligonucleotides analyzed in this study.**

Name	Sequence	Number of bases	Concentration ( $\mu\text{M}$ )*
dpT5	5'-d(TTTTT)-3'	5	54
dpT6	5'-d(TTTTTT)-3'	6	45
dpT10	5'-d(TTTTTTTTTT)-3'	10	54
dpT11	5'-d(TTTTTTTTTTT)-3'	11	49
dpT15	5'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'	15	65
dpT20	5'-d(TTTTTTTTTTTTTTTTTT)-3'	20	48
dCend	5'-d(CTCATCACAC)-3'	10	88
dTend	5'-d(TTCATCACAC)-3'	10	87
dGend	5'-d(GTCATCACAC)-3'	10	85
dAend	5'-d(ATCATCACAC)-3'	10	82
dpT10-7S	5'-d(T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> )-3'	10	81
dpT10-8S	5'-d(T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T)-3'	10	81
dpT10-9S	5'-d(T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T)-3'	10	81
dpT15-12S	5'-d(T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T)-3'	15	54
dpT15-13S	5'-d(T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T)-3'	15	54
dpT15-14S	5'-d(T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T <sup>^</sup> T)-3'	15	54

d: deoxyribose, ^: phosphorothioated

T: thymine, C: cytosine, A: adenine, G: guanine

\* All analytes were dissolved in 66.7 mM pH 7.0 phosphate buffer.

### 3.2.2 温度応答性ハイドロゲル修飾シリカ

#### 3.2.2.1 IBD ハイドロゲル修飾シリカの作成

本検討では、4つの異なる組成の P(NIPAAm-co-BMA-co-DMAPAAm) (IBD) ハイドロゲル修飾シリカを作成し、オリゴヌクレオチドの一斉分析に最適な組成を検討した。作成した IBD ハイドロゲル修飾シリカの組成は、NIPAAm、BMA、及び DMAPAAm のモル比が異なる IB5D0 (NIPAAm : BMA : DMAPAAm = 95:5:0)、IB5D1 (NIPAAm : BMA : DMAPAAm = 94:5:1)、IB0D5 (NIPAAm : BMA : DMAPAAm = 95:0:5)、及び IB5D5 (NIPAAm : BMA : DMAPAAm = 90:5:5) とした。それぞれの IBD ハイドロゲル修飾シ

リカは、開始剤として V-501 及び縮合剤として EEDQ によって V-501 修飾シリカを作成した後、架橋剤として MBAAm を用いて合成した (Figure 3-1)。

V-501 (12.5 mmol) 及び EEDQ (25.0 mmol) を DMF (50 mL) に溶解させた後、アミノプロピルシリカ (5.0 g) を添加した。得られた溶液を N<sub>2</sub> ガスにより 30 分間脱気した後、25°C で 6 時間反応させた。反応後、濾取して得られた V-501 修飾シリカを ethanol (500 mL) で洗浄し、真空下にて乾燥させた。その後、NIPAAm、BMA、DMAPAAm、MBAAm、及び V-501 修飾シリカを ethanol 中に溶解させ、溶液を N<sub>2</sub> ガスによって 30 分脱気した後、70°C で 5 時間反応させた。反応後、濾取して得られた IBD ハイドロゲルカラムを methanol によって洗浄し、非修飾ハイドロゲルを除去した。得られたシリカは、真空下にて乾燥させた。各 IBD ハイドロゲル修飾シリカの合成に使用した NIPAAm、BMA、DMAPAAm、MBAAm、V-501 修飾シリカ、及び ethanol の試薬量をそれぞれ下記に示す。

IB5D0 ハイドロゲル修飾シリカ: NIPAAm (20.7 mmol)、BMA (1.12 mmol)、MBAAm (0.44 mmol)、ethanol (50 mL)、V-501 修飾シリカ (1.0 g) ; IB5D1 ハイドロゲル修飾シリカ: NIPAAm (36.7 mmol)、BMA (1.97 mmol)、DMAPAAm (0.39 mmol)、MBAAm (0.78 mmol)、ethanol (90 mL)、V-501 修飾シリカ (1.8 g) ; IB0D5 ハイドロゲル修飾シリカ: NIPAAm (41.1 mmol)、DMAPAAm (2.18 mmol)、MBAAm (0.91 mmol)、ethanol (100 mL)、V-501 修飾シリカ (2.0 g) ; IB5D5 ハイドロゲル修飾シリカ: NIPAAm (38.5 mmol)、BMA (2.11 mmol)、DMAPAAm (2.18 mmol)、MBAAm (0.91 mmol)、ethanol (100 mL)、V-501 修飾シリカ (2.0 g)

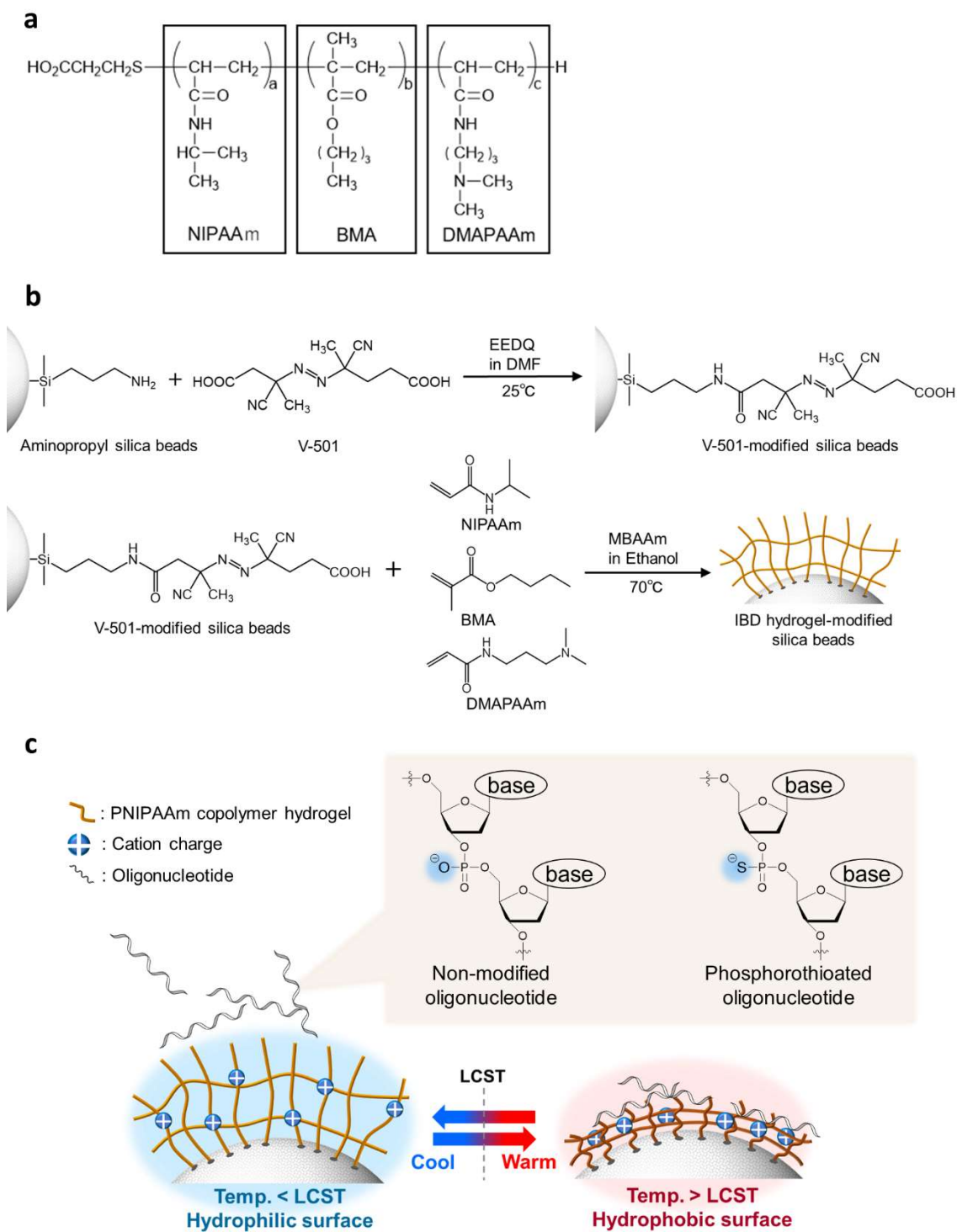


Figure 3-1 (a) Structure of IBD linear polymers, (b) synthesis of IBD hydrogels, and (c) concepts of oligonucleotide analysis using IBD hydrogel-modified silica beads.

### 3.2.2.2 IBD ハイドロゲル修飾シリカの物性評価

#### 3.2.2.2.1 元素分析

アミノプロピルシリカ (None-modified シリカ) への開始剤 (V-501) の修飾量及び V-501 修飾シリカへの各 IBD ハイドロゲルの修飾量を、アミノプロピルシリカ、V-501 修飾シリカ、及び各 IBD ハイドロゲル修飾シリカの元素分析 (PE2400 CHN、PerkinElmer) によって評価した。

V-501 の修飾量は、アミノプロピルシリカ及び V-501 修飾シリカの元素分析の測定結果から下式 (1) を用いて算出した。

$$\text{Modified initiator content} = \%C_i \times [\%C_i(\text{calcd}) \times (1 - \%C_i/\%C_i(\text{calcd})) \times S]^{-1} \quad (1)$$

$\%C_i$  : アミノプロピルシリカから V-501 修飾シリカへの炭素割合の増加量

$\%C_i(\text{calcd})$  : V-501 修飾シリカにおける炭素重量割合

$S$  : アミノプロピルシリカの比表面積 (310 m<sup>2</sup>/g)

各 IBD ハイドロゲルの修飾量は、V-501 修飾シリカ及び各 IBD ハイドロゲル修飾シリカの測定結果から下式 (2) を用いて算出した。

$$\text{Grafted hydrogel content} = \%C_h \times [\%C_h(\text{calcd}) \times (1 - \%C_h/\%C_h(\text{calcd}) - \%C_i/\%C_i(\text{calcd})) \times S]^{-1} \quad (2)$$

$\%C_h$  : V-501 修飾シリカから各 IBD ハイドロゲル修飾シリカへの炭素割合の増加量

$\%C_h(\text{calcd})$  : 各 IBD ハイドロゲル修飾シリカにおける炭素重量割合

#### 3.2.2.2.2 赤外分光光度計

各 IBD ハイドロゲルのシリカへの修飾の有無を確認するために、赤外分光光度計によるアミノプロピルシリカ、V-501 修飾シリカ、及び各 IBD ハイドロゲル修飾シリカの分析を行った。分析には、フーリエ変換型 (FT-IR) の赤外分光光度計 FTIR-4700 (Jasco) を用いた。

#### 3.2.2.2.3 表面ゼータ電位測定

IB5D0、IB5D1、及び IB5D5 ハイドロゲル修飾シリカ内の表面ゼータ電位を測定し、温度変化によるハイドロゲル内の DMAPAAm による静電特性の有無及び変化を確認した。測定試料は、各 IBD ハイドロゲル修飾シリカを 10 mM KCl に懸濁した溶液 (1.0 mg/mL) を使用し、各温度 (10、20、30、40、及び 50°C) で 3 回測定した。分析には Zetasizer nanoZS (Malvern Instruments) を用いた。

#### 3.2.2.2.4 走査電子顕微鏡

IBD ハイドロゲル修飾によるシリカへの器質的影響の有無を評価するため、走査電子顕微鏡によって確認した。S-4700（日立ハイテック）を用いて、シリカ表面を OsO<sub>4</sub> によってコーティングした後に観察した。

### 3.2.3 IBD 直鎖ポリマーの合成及び LCST 測定

シリカに修飾した IBD ハイドロゲルの LCST を推測するために、NIPAAm、BMA、及び DMAPAAm を用いた IBD 直鎖ポリマー（NIPAAm : BMA : DMAPAAm = 90:5:5）を合成し、LCST を測定した。合成方法は 2.2.2.1 項に示した方法と同様に、ラジカル開始剤として AIBN 及び連鎖移動剤として MPA を用いて合成した。

IB5D5 直鎖ポリマーの LCST は、ポリマーを一斉分析に用いた各移動相の phosphate buffer（66.7 mM pH 7.0、66.7 mM pH 6.6、及び 250 mM pH 7.6 [66.7 mM phosphate 及び 183.3 mM NaCl]）に溶解させた溶液（5 mg/mL）の光透過率によって測定した。測定に使用した機器、測定波長、昇温速度及び LCST の定義は、2.2.3.1 項と同様である。

### 3.2.4 TRC

#### 3.2.4.1 オリゴヌクレオチドの一斉分析に適した温度応答性カラムの検討

オリゴヌクレオチドの分離にあたって、TRC 固定相の最適なモノマー組成の検討のために、ハイドロゲルカラムを用いて評価した。最適なモノマー組成を決定後、同じ組成でのハイドロゲルカラムと直鎖ポリマー修飾カラムを使用し、オリゴヌクレオチドの一斉分析に最適なカラムの検討を行った。

オリゴヌクレオチドの dpT10 及び dpT11（Table 3-1）を、作成した 4 つの IBD ハイドロゲル修飾シリカを用いた TRC によって分析し、オリゴヌクレオチドの一斉分析に最適な IBD ハイドロゲルカラムの検討を行った。さらに、最適な IBD ハイドロゲルカラムの組成と同じ組成の直鎖ポリマーを用いたカラムを使用し、オリゴヌクレオチドの一斉分析に最適なカラムの検討を行った。

HPLC システムは、Prominence-i LC-2030C 3D（島津製作所）及び SSC-2320 column oven（センシユール科学）を使用した。カラムは、各 IBD ハイドロゲル修飾シリカ又は IBD 直鎖ポリマー修飾シリカをステンレスカラム（長さ 50 mm×内径 4.6 mm）に充填したものを使用した。移動相は 66.7 mM pH 7.0 phosphate buffer を流速 1.0 mL/min で、検出波長は 260 nm とした。カラム温度は 20°C 及び 50°C で検討した。

#### 3.2.4.2 IBD ハイドロゲルカラムによるオリゴヌクレオチドの一斉分析

IBD ハイドロゲルカラムにより、オリゴヌクレオチドの塩基鎖長の違い、一塩基の違い、及び S-Oligo の S 化の数の違いについて一斉分析の検討を行った。オリゴヌクレオチドの塩基鎖長の違いにおける一斉分析には、dpT5、dpT6、dpT10、dpT11、dpT15、及び dpT20 を用い、一塩基の違いには、dCend、dTend、dGend、及び dAend を用い、そして S-Oligo の S 化の数の違いには、dT10-7S、dT10-8S、及び dT10-9S 並びに dT15-12S、dT15-13S、及び dT15-14S を用いた (Table 3-1)。

HPLC システムは、3.2.3.1 項と同様とした。カラムは、IBD ハイドロゲル修飾シリカをステンレスカラム (長さ 50 mm×内径 4.6 mm 又は長さ 100 mm×内径 4.6 mm) に充填したものを使用した。オリゴヌクレオチドの一塩基の違いにおける一斉分析の検討のみ、長さ 100 mm の充填カラムを用いた。移動相の phosphate buffer は、オリゴヌクレオチドの塩基鎖長の違いにおける一斉分析には 66.7 mM pH 7.0、一塩基の違いには、66.7 mM pH 6.6、S-Oligo の S 化の数の違いには 250 mM pH 7.6 [66.7 mM phosphate 及び 183.3 mM NaCl] を用いた。流速は 1.0 mL/min で、検出波長は 260 nm とした。カラム温度は 10、20、30、40、及び 50°C で検討した。

各分析対象物質の retention factor は、ウラシルの保持時間 ( $t_0$ ) 及び各分析対象物質の保持時間 ( $t_R$ ) より 2.2.4.1 項に示す式を用いて算出した。

### 3.3 結果及び考察

#### 3.3.1 IBD ハイドロゲル修飾シリカの物性評価

IBD ハイドロゲル修飾シリカの作成は、アミノプロピルシリカと開始剤 (V-501) 及び縮合剤 (EEDQ) によって作成した V-501 修飾シリカに、モノマーとして NIPAAm、BMA、及び DMAPAAm と架橋剤 (MBAAm) を用いて合成した。作成した 4 つの IBD ハイドロゲル修飾カラムの組成は、IB5D0 (NIPAAm : BMA : DMAPAAm = 95:5:0)、IB5D1 (NIPAAm : BMA : DMAPAAm = 94:5:1)、IB0D5 (NIPAAm : BMA : DMAPAAm = 95:0:5)、及び IB5D5 (NIPAAm : BMA : DMAPAAm = 90:5:5) であった。

合成した IBD ハイドロゲル修飾シリカへのハイドロゲルの修飾量は、元素分析によって評価した (Table 3-2)。V-501 修飾シリカの炭素含有量は、非修飾シリカ (アミノプロピルシリカ) の炭素含有量よりも多く、また、IBD ハイドロゲル修飾シリカの炭素含有量は、V-501 修飾シリカのそれを上回っていた。分子内に N を含む DMAPAAm を含有する IB5D1、IB0D5、及び IB5D5 ハイドロゲル修飾シリカでは、N<sub>2</sub> 含有量が V-501 修飾シリカよりも多い傾向がみられた。一方、DMAPAAm を含まない IB5D0 ハイドロゲル修飾シリカでは、V-501 修飾シリカの N<sub>2</sub> 含有量と大きな差はみられなかった。また、赤外分光光度計においても IBD ハイドロゲルの修飾の有無を評価した。Figure 3-2 に、各ハイドロゲル修飾シリカ、V-501 修飾シリカ、及び非修飾シリカの FT-IR スペクトル

を示す。IB5D0、IB5D1、IB0D5、及びIB5D5 ハイドロゲル修飾シリカでは約  $1550\text{ cm}^{-1}$  (N-H 変角振動) 及び  $1650\text{ cm}^{-1}$  (C=O 伸縮振動) にピークが観察された。一方、V-501 修飾シリカではより弱いピークがみられ、非修飾シリカビーズではピークはみられなかった。

表面ゼータ電位は、IB5D0、IB5D1、及び IB5D5 ハイドロゲル修飾シリカを測定し、温度変化によるハイドロゲル内の DMAPAAm による静電特性の有無及び変化を評価した (Figure 3-3)。表面ゼータ電位はカチオン性を示し、DMAPAAm 含有量の増加に伴って増加した。

走査電子顕微鏡では、IB5D5 ハイドロゲル修飾シリカ及び非修飾シリカ表面の損傷の有無を確認した (Figure 3-4)。IB5D5 ハイドロゲルの修飾によるシリカ表面の損傷は認められず、シリカサイズにも影響はみられなかった。

これらの結果により、アミノプロピルシリカへ開始剤及び IBD ハイドロゲルが修飾されたことが示唆された。また、BMA 及び DMAPAAm を含む IBD ハイドロゲル修飾シリカビーズは、温度応答性と静電特性 (カチオンチャージ) を示すことが確認された (Figure 3-1c)。



**Table 3-2 Elemental analysis of IBD hydrogel–modified silica beads.**

Modification	NIPAAm:BMA:DMAPAAm, mol/mol/mol	Elemental composition (%)		%C(calcd) <sup>b</sup>	Modified initiator ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) <sup>c</sup>	Grafted hydrogel ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) <sup>c</sup>
		C <sup>a</sup>	N <sup>a</sup>			
None-modified		3.23 ± 0.05	1.02 ± 0.02			
V-501		8.97 ± 0.03	3.19 ± 0.02	51.4	1.45	
IB5D0 hydrogel	95:5:0	14.3 ± 0.02	3.18 ± 0.02	63.9		0.333
IB5D1 hydrogel	94:5:1	15.7 ± 1.19	3.66 ± 0.23	63.8		0.435
IB0D5 hydrogel	95:0:5	15.4 ± 1.59	3.88 ± 0.38	63.5		0.418
IB5D5 hydrogel	90:5:5	14.7 ± 0.09	3.32 ± 0.03	63.7		0.366

<sup>a</sup>Determined by elemental analysis.

<sup>b</sup>Calculated using the ratio of the molecular weight of carbon in each monomer to the total molecular weight of each monomer.

<sup>c</sup>Estimated from carbon content.

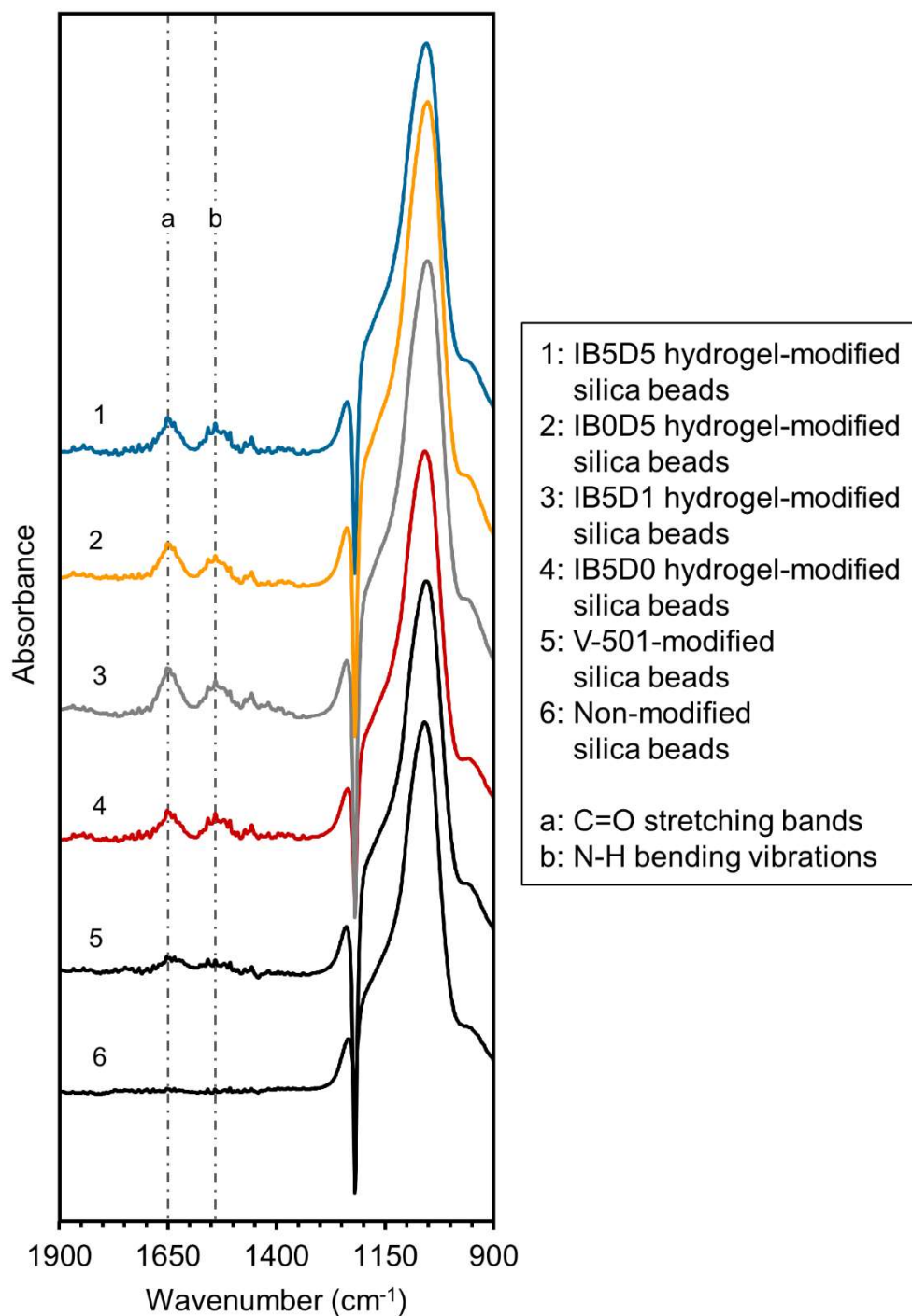


Figure 3-2 FT-IR spectra of IBD hydrogel-modified and non-modified silica beads.

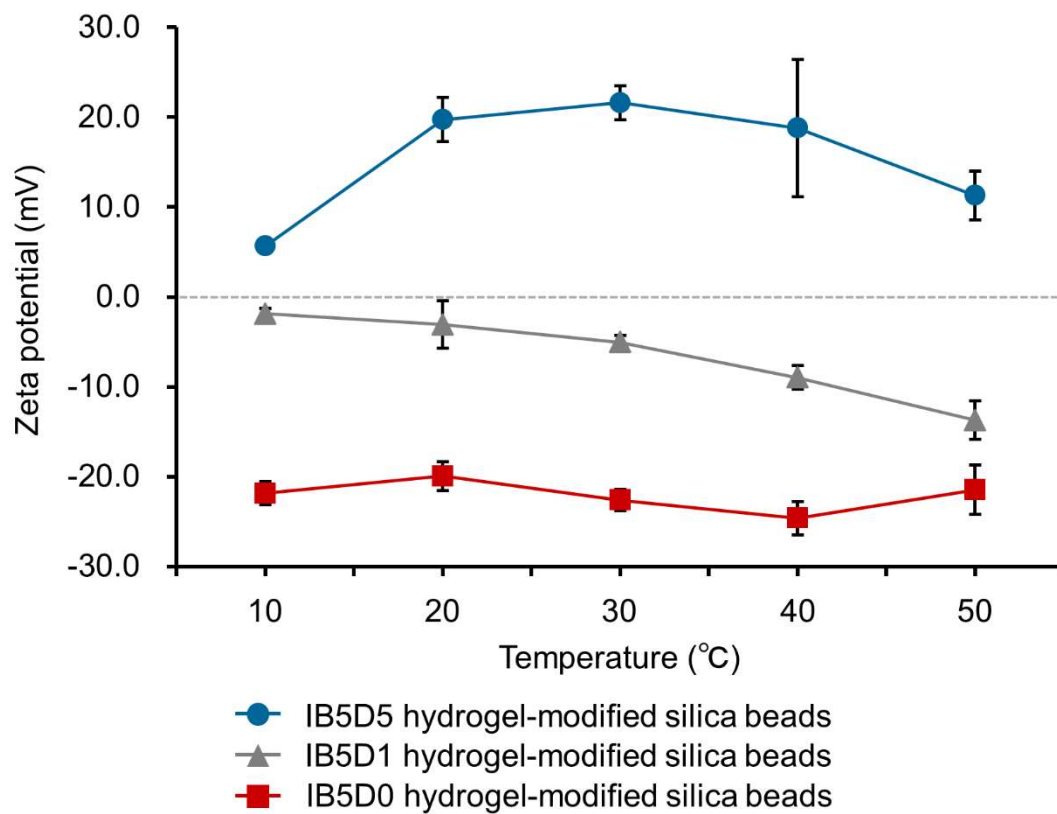
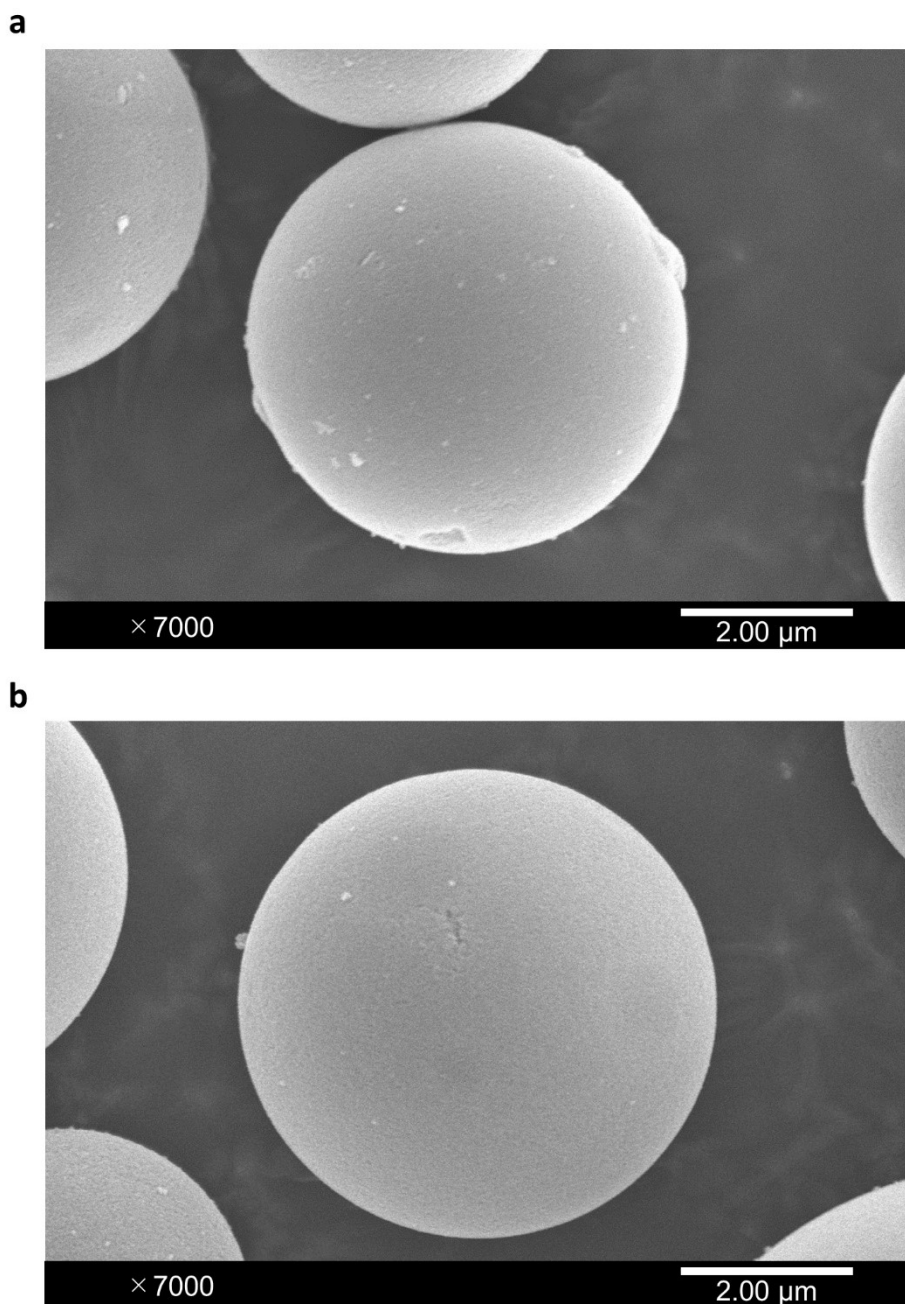


Figure 3-3 Temperature-dependent zeta potentials of IB5D0, IB5D1, and IB5D5 hydrogel-modified silica beads.



**Figure 3-4 SEM images of (a) non-modified and (b) IB5D5 hydrogel-modified silica beads.**

### 3.3.2 IBD 直鎖ポリマーの LCST

シリカに修飾した IB5D5 ハイドロゲルの LCST を推測するために IB5D5 直鎖ポリマー (Figure 3-1a) の LCST を分析に使用した各移動相を用いて測定した (Figure 3-5)。IB5D5 直鎖ポリマーの LCST は移動相の pH と塩濃度によって変化し、250 mM pH 7.6

(28.8°C) < 66.7 mM pH 7.0 (38.4°C) < 66.7 mM pH 6.6 (41.6°C) の順に低下した。これは、移動相の pH 又は塩濃度の増加に伴って、DMAPAAm のジメチルアミノ部分が脱プロトン化又は陰イオンで被覆され、その結果、疎水性が増加し LCST が低下したと考えられる[77]。シリカに修飾された直鎖ポリマーはシリカ表面からポリマー鎖が伸びている一方で、シリカ表面に修飾されたハイドロゲルはシリカ表面に網目状にポリマーが広がっているため、ハイドロゲルの方がポリマー鎖の自由度が小さくなることが想定される。したがって、シリカに修飾された IB5D5 ハイドロゲルの LCST は、IB5D5 直鎖ポリマーと同等又は IB5D5 直鎖ポリマーの LCST よりも低いと予想される。

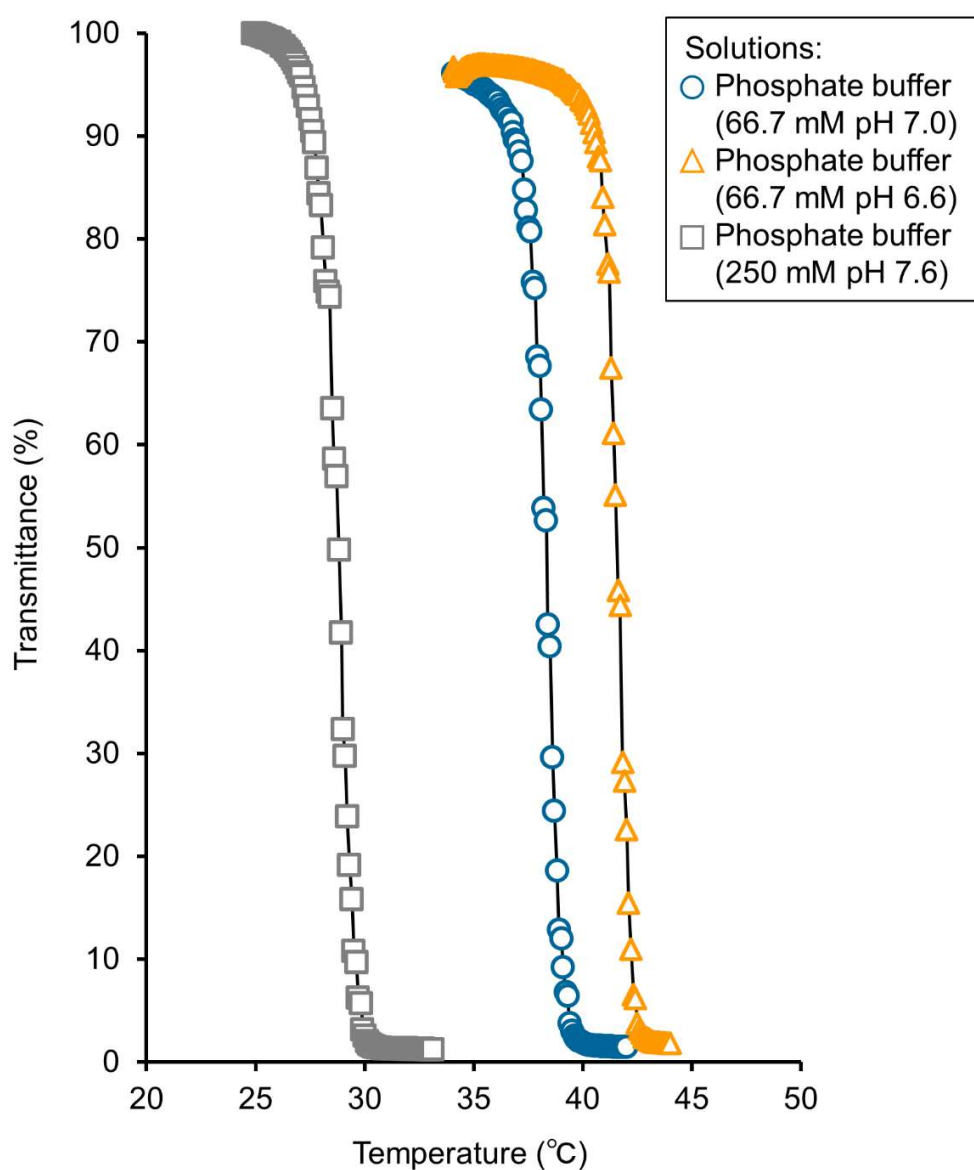


Figure 3-5 Optical transmittance-temperature plots used to determine the LCSTs of IB5D5 linear polymer in several media.

### 3.3.3 TRC

#### 3.3.3.1 オリゴヌクレオチドの一斉分析に適した温度応答性カラムの検討

複数のオリゴヌクレオチドの一斉分析に適したモノマー組成の特定のため、dpT10及びdpT11を用いて、IB5D0、IB5D1、IB0D5、及びIB5D5ハイドロゲルカラムを使用し、分離能を評価した。Figure 3-6に、20°C及び50°Cのカラム温度で得られた各分析対象物質のクロマトグラムを示す。IB5D0及びIB5D1ハイドロゲルカラムでは、いずれの温度でも各分析対象物質の保持は全く又はほとんど観察されなかった。一方、IB0D5及びIB5D5ハイドロゲルカラムでは、各分析対象物質との相互作用が強く、高温かつ長い塩基鎖長ほどより強い保持を示した。Retention factorより、IB0D5及びIB5D5ハイドロゲルカラムは、IB5D0及びIB5D1ハイドロゲルカラムよりも各温度での分離が優れていることが明らかであった (Figure 3-7)。したがって、オリゴヌクレオチドの分離には、DMAPAAmによる静電相互作用が、BMAによる疎水性相互作用よりも必要な要素であることが示唆された。この傾向は、既報研究でも報告されている[148, 149]。DMAPAAmは固定相で分析対象物質に対してイオン対試薬様の役割を担っていると考えられ、その分析対象物質に対してBMAによる疎水性相互作用及びNIPAAmによる温度応答性が相まってオリゴヌクレオチドの分離を可能にしたと考えられた。

次に、複数のオリゴヌクレオチドの一斉分析に適したカラムへのポリマー修飾法を特定するため、IB5D5ハイドロゲルカラムとIB5D5直鎖ポリマーカラムを用いて、dpT10及びdpT11の分離を比較した。両カラムに用いたシリカの表面ゼータ電位の結果より、検討に用いたIB5D5ハイドロゲル修飾シリカとIB5D5直鎖ポリマー修飾シリカ表面のDMAPAAm量は同程度であることが示唆された (Figure 3-8)。Figure 3-9に20°C及び50°Cのカラム温度におけるdpT10及びdpT11の分析結果を示す。直鎖ポリマーカラムによる分離でも、温度応答性がみられ、dpT10及びdpT11ともに高温で溶出時間の延長がみられた。ハイドロゲルカラムと比較して、直鎖ポリマーカラムの方が保持の強度が強かった。この保持の違いは、シリカ表面上のIBDポリマーの自由度の違いによるものと考えられた。シリカ表面のIBDポリマー鎖の自由度は、直鎖ポリマーカラムの方が、ハイドロゲルカラムよりも高いことから、分析対象物質とポリマー上のDMAPAAmによるカチオンチャージとの相互作用がし易く、保持がより強くなったと考えられた。より長い塩基鎖長やS化のオリゴヌクレオチドの分離の際には、直鎖ポリマーカラムでは分析時間が非常に長くなることが想定されたため、IB5D5ハイドロゲルカラムを以降の複数オリゴヌクレオチドの一斉分析に使用することとした。

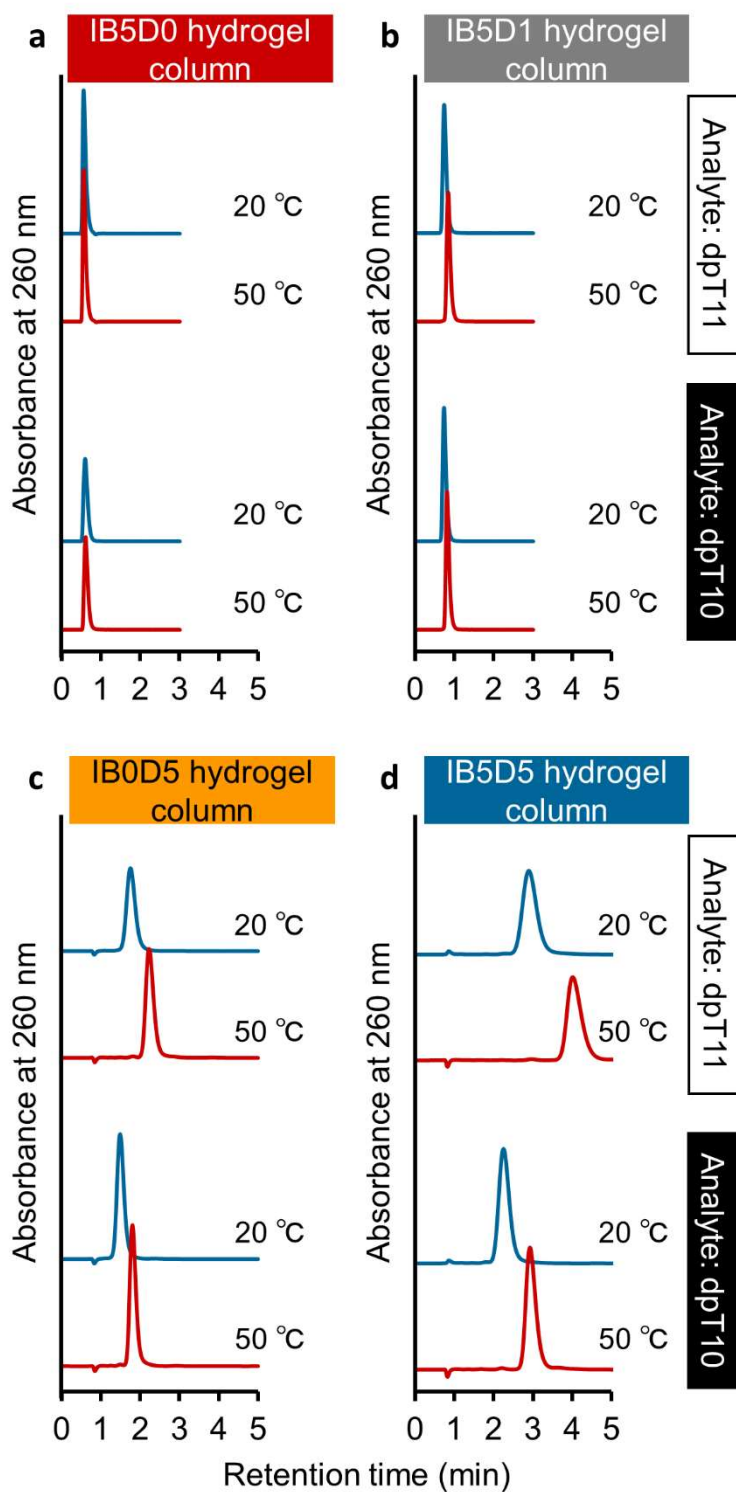


Figure 3-6 Chromatograms of dpT10 and dpT11 obtained for each column at temperatures of 20 and 50 °C.

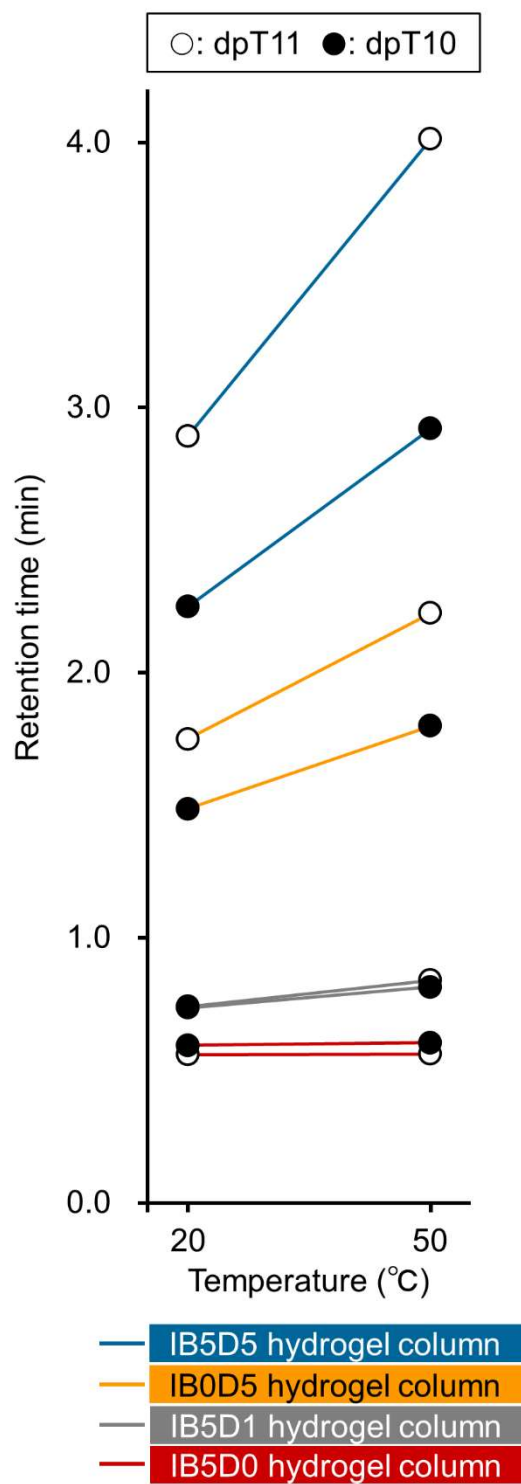
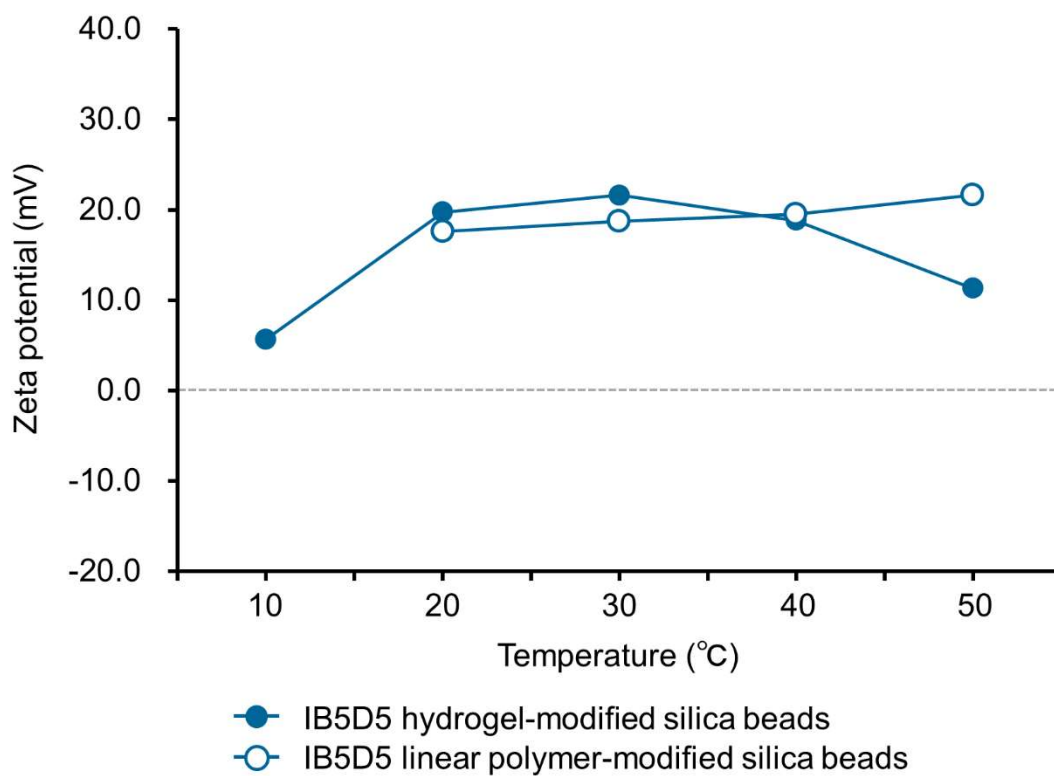


Figure 3-7 Comparison of dpT10 and dpT11 retention times for each IBD hydrogel column.





**Figure 3-8** Temperature-dependent zeta potentials of IB5D5 hydrogel-modified silica beads and IB5D5 linear polymer-modified silica beads.

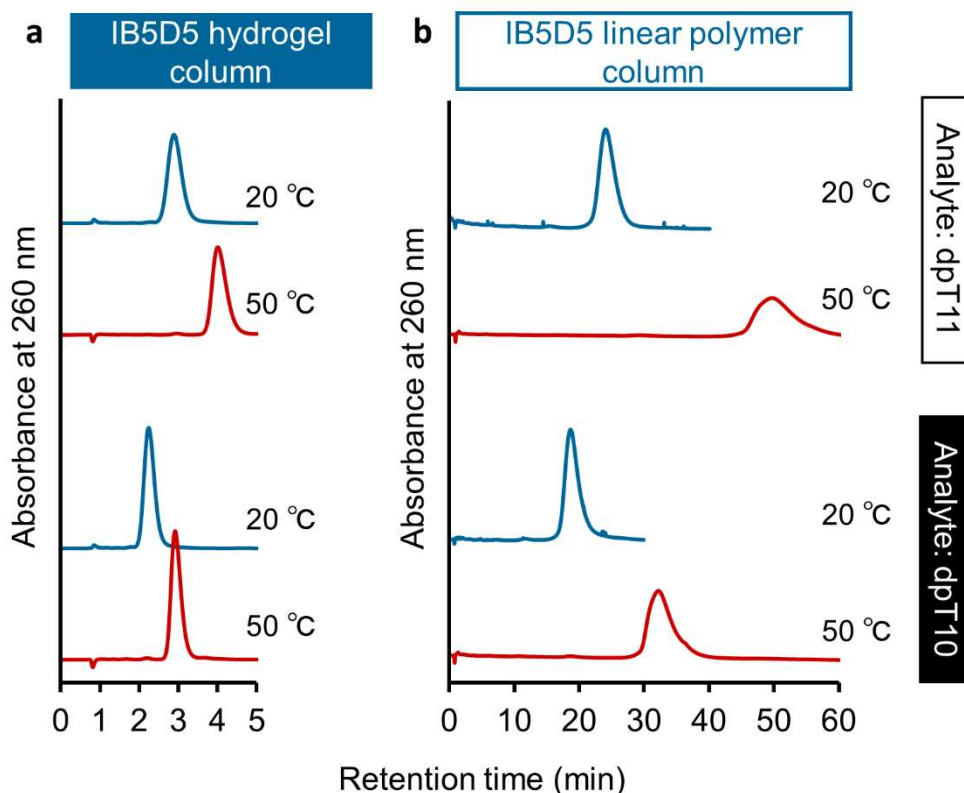


Figure 3-9 Chromatograms of dpT10 and dpT11 obtained for IB5D5 hydrogel column and IB5D5 linear polymer column at temperatures of 20 and 50 °C.

### 3.3.3.2 IBD ハイドロゲルカラムによるオリゴヌクレオチドの一斉分析

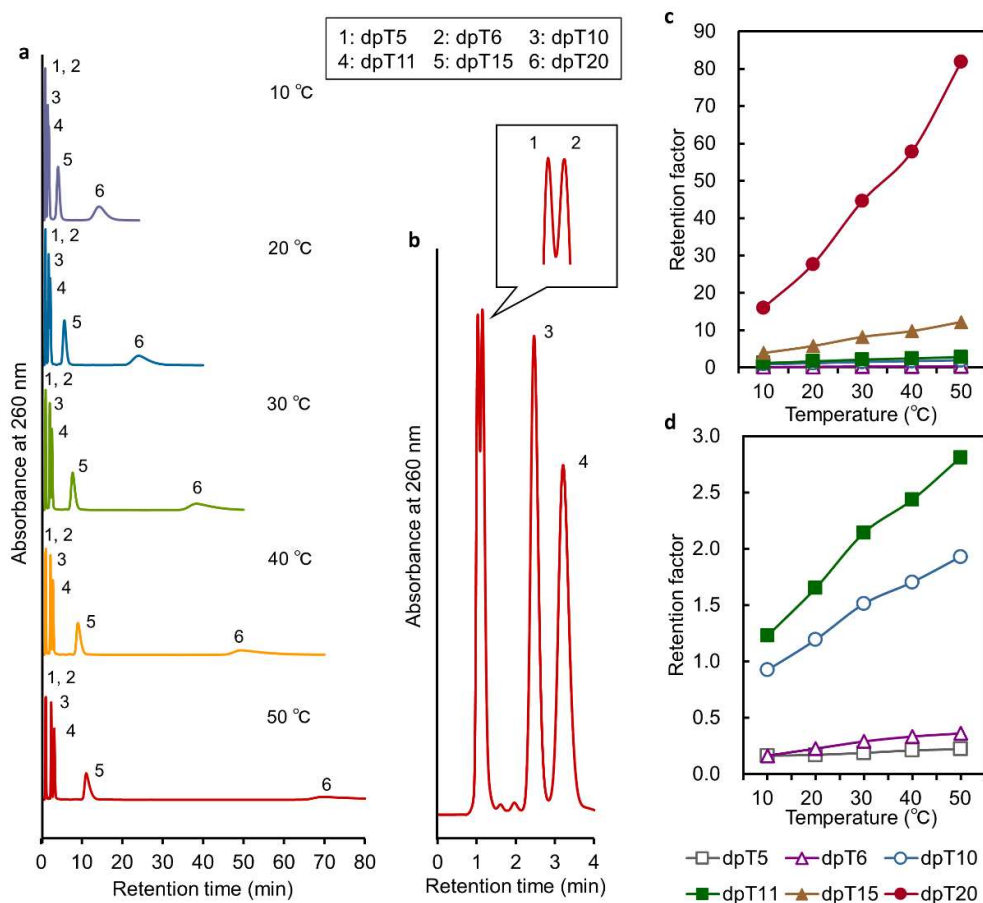
#### 3.3.3.2.1 塩基鎖長の異なるオリゴヌクレオチドの一斉分析

IB5D5 ハイドロゲルカラムを用いて、塩基鎖長の異なる 6 つのオリゴヌクレオチド (dpT5、dpT6、dpT10、dpT11、dpT15、及び dpT20; Table 3-1) の一斉分析を検討した。移動相として 66.7 mM pH 7.0 phosphate buffer を使用し、10~50°C のカラム温度で溶出挙動を確認した (Figure 3-10)。いずれのオリゴヌクレオチドも温度上昇により保持の増強が確認された。dpT5 と dpT6 以外を除き、いずれのオリゴヌクレオチドも 50°C のカラム温度で十分な分離がみられたが、dpT5 と dpT6 の分離はピーク先端でのみの分離であった。今回分析に用いたカラム長は 50 mm であり、より長いカラム長を用いることでこれらの 2 成分の分離はさらに向上されると考える。塩基鎖長が長いオリゴヌクレオチドほど、その温度応答性が高く、カラム固定相との相互作用が強い傾向がみられた。RPLC とイオン対試薬を用いた既報研究では、長いオリゴヌクレオチドほど、短いものと比較して、固定相との相互作用が弱くなることが示された[53]。この違いは、IB5D5 ハイドロゲルカラムに導入された 2 つの特性 (疎水性及び静電的特性) に由来すると考えられる。長いオリゴヌクレオチドは短いものよりも分子量が大きく疎水性度が高い傾

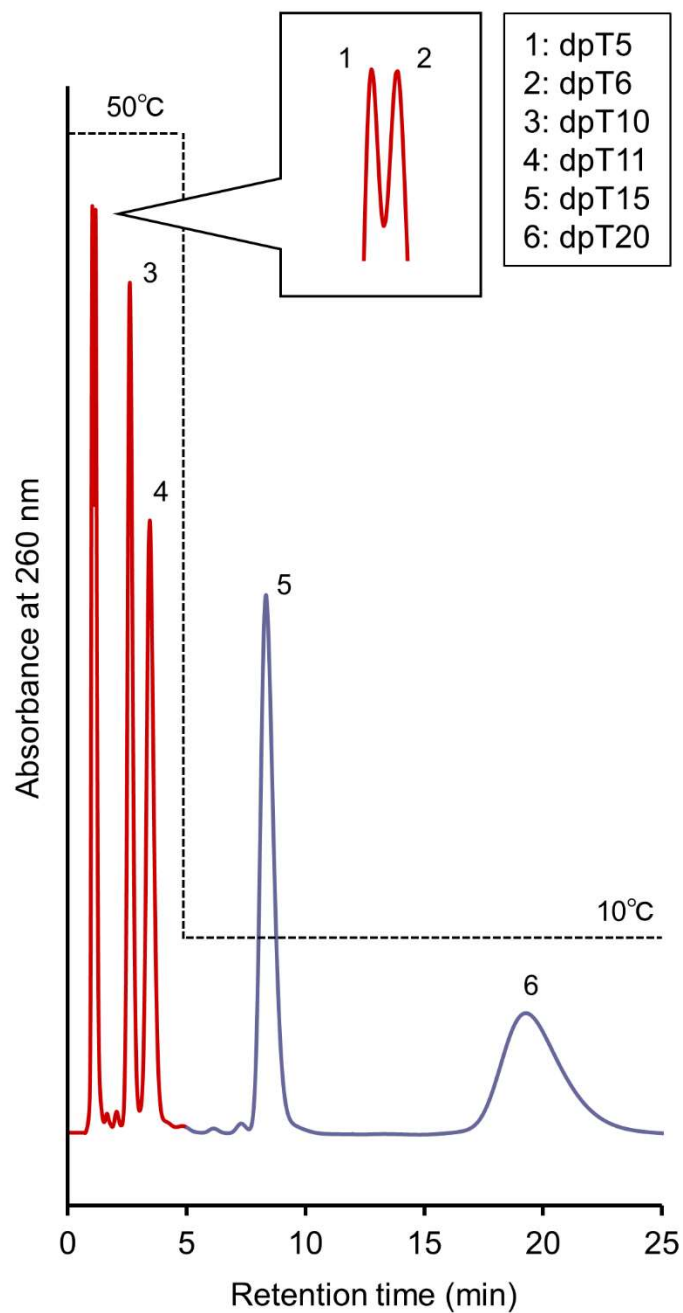
向にあり、またイオン化可能なリン酸基が相対的に多く含まれるため、固定相の BMA 及び DMAPAAm とそれぞれ疎水性及び静電的相互作用を受けやすいためと考えられる。

50°C の一定温度では、すべてのオリゴヌクレオチドの溶出に 80 分以上要したため、温度グラジエントにより溶出時間の短縮を計った。分析中にカラム温度を 50°C から 10°C へ変更することで、すべてのオリゴヌクレオチドが 25 分以内に分離及び溶出された (Figure 3-11)。50°C で最も強く保持されていた dpT15 と dpT20 の保持は、10°C への急冷により固定相の相互作用が大幅に弱まり、溶出が速くなった。

以上より、IB5D5 ハイドロゲルカラムを用いることで、塩基鎖長の異なるオリゴヌクレオチドの一斉分析が可能であった。この分離は水系溶媒とイソクラティックな溶出条件を使用して達成され、既報の研究では使用される移動相グラジエントや有機溶媒及びイオン対試薬は不要であった。また、カラム温度のみを変更する単純な温度ステップグラジエントを利用することで、分析時間の大幅な短縮が可能であった。



**Figure 3-10** Chromatograms and retention factors of a mixture of multiple oligonucleotides with different lengths at various temperatures [(a) chromatograms at 10–50 °C, (b) chromatogram on enlarged scale at 50 °C, (c) retention factors, and (d) retention factors on enlarged scale].



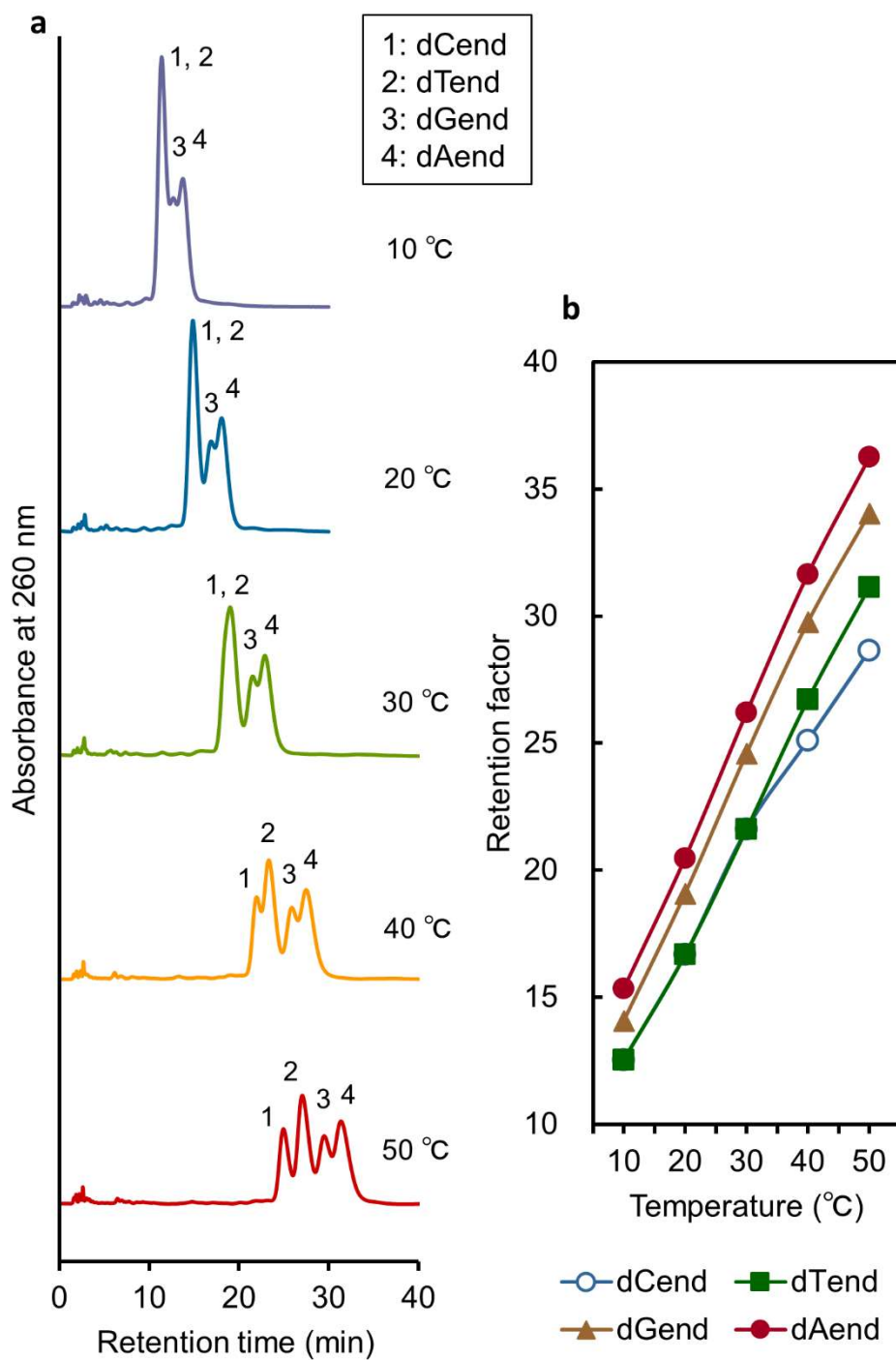
**Figure 3-11 Chromatogram of a mixture of multiple oligonucleotides with different lengths obtained using a temperature step gradient.**

### 3.3.3.2.2 末端一塩基の異なるオリゴヌクレオチドの一斉分析

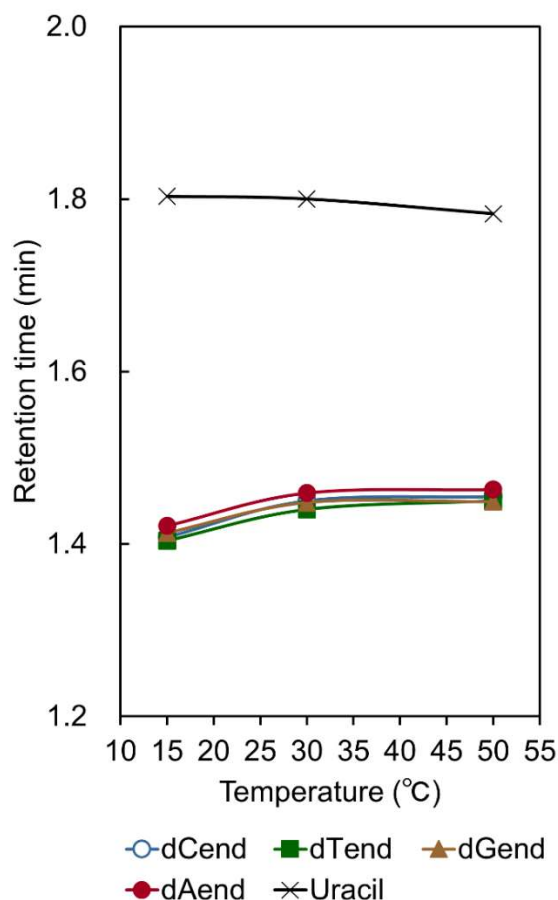
IB5D5 ハイドロゲルカラムを用いて、異なる末端一塩基（dCend、dTend、dGend、及び dAend）を持つ4つのオリゴヌクレオチドの一斉分析の検討を行った。移動相として

66.7 mM pH 6.6 phosphate buffer を使用し、10~50°C のカラム温度で溶出挙動を確認した (Figure 3-12)。すべての分析対象物質は温度上昇により保持の増強が確認された。検討した温度の中では、50°C のカラム温度で最もよく分離された。さらなる分離の向上は、より長いカラム長を用いることで達成されると考える。核酸一塩基の疎水性度は、C < G < A < T の順に強くなることが報告されているが[150]、4つのオリゴヌクレオチドの溶出順序は dCend < dTend < dGend < dAend であり、核酸塩基の疎水性度とは異なり、dTend は dGend や dAend よりも強く保持されなかった。この違いは、IB5D5 ハイドロゲルカラムの DMAPAAm による静電的相互作用及び PNIPAAm の NH 基と末端一塩基の芳香環との相互作用 (NH- $\pi$  相互作用) が影響していると考えられる。探索的に IB5D0 ハイドロゲルカラム (長さ 50 mm×内径 2.1 mm、流速 0.2 mL/min) を用いて、同じ分析条件にて 4つのオリゴヌクレオチドを分析した結果、いずれもウラシルの保持時間  $t_0$  よりも早く溶出し、保持が全くみられなかった (Figure 3-13)。この結果から、これらのオリゴヌクレオチドの溶出には疎水性相互作用よりも静電的相互作用がより支配的であることが明らかであった。また、4つの核酸塩基のうち、thymine を除く 3つの核酸塩基は分子内にアミノ基を持ち、分子内の芳香環の電子密度は thymine のそれより強く、さらに結合するオリゴヌクレオチド中のリン酸基のイオン化の亢進・安定化に寄与していると考えられる (Figure 3-14)。PNIPAAm 及び BMA による疎水性相互作用はいずれのオリゴヌクレオチド (dCend、dTend、dGend、及び dAend) にも作用していることが想定されるが、DMAPAAm による静電的相互作用及び PNIPAAm の NH 基とオリゴヌクレオチド中の末端一塩基の芳香環との相互作用 (NH- $\pi$  相互作用) は、他の 3つのオリゴヌクレオチドに比べ dTend では弱く、dTend の保持のみが疎水性度の順と大きく異なると考えられた。これらの結果より、末端の一塩基の特性がオリゴヌクレオチド全体の静電的特性及び固定相中との相互作用の強度に影響を与えることが示唆された。

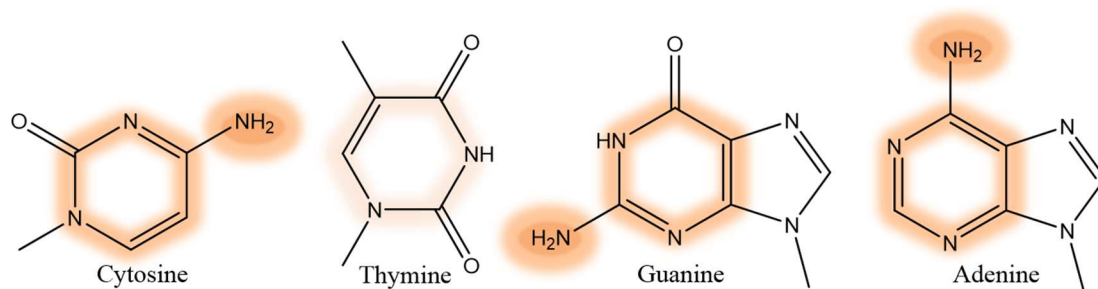
以上より、IB5D5 ハイドロゲルカラムを用いることで、水系溶媒とイソクラティックな条件によって、末端一塩基の異なるオリゴヌクレオチドの一斉分析が可能であった。この分離は移動相グラジエントや有機溶媒及びイオン対試薬の使用を必要としなかった。



**Figure 3-12 Chromatograms and retention factors of a mixture of multiple oligonucleotides with different terminal single bases obtained at various temperatures [(a) chromatograms at 10–50 °C and (b) retention factors].**



**Figure 3-13 Retention times of a mixture of multiple oligonucleotides with different terminal single bases obtained at various temperatures with IB5D0 hydrogel column.**



**Figure 3-14 Structures of nucleobases.**

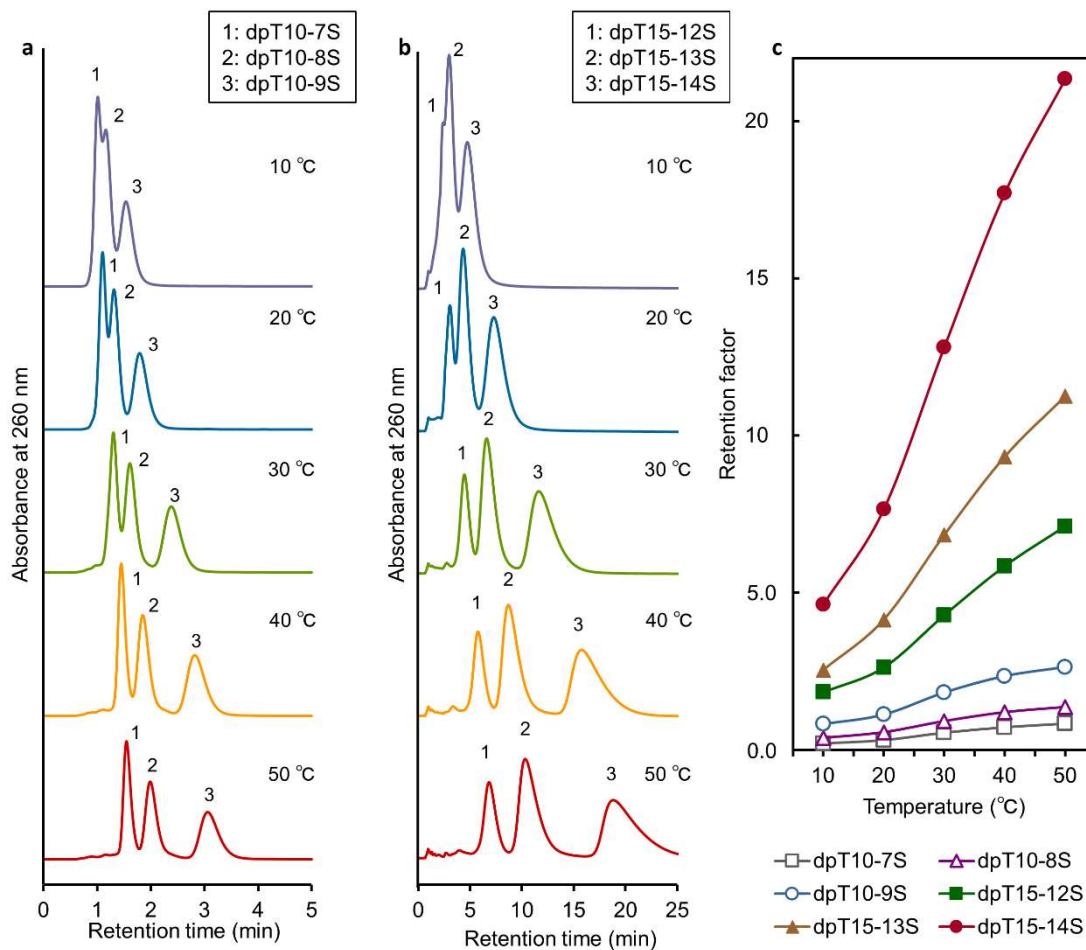
### 3.3.3.2.3 S 化数の異なるオリゴヌクレオチドの一斉分析

IB5D5 ハイドロゲルカラムを用いて、10 塩基又は 15 塩基長の S 化の数の異なる各 3 つのオリゴヌクレオチド (10 塩基長 : dpT10-7S、dpT10-8S、及び dpT10-9S、15 塩基長 :

dpT15-12S、dpT15-13S、及び dpT15-14S) の一斉分析の検討を行った。移動相として 250 mM pH 7.6 phosphate buffer を使用し、10~50°C のカラム温度で溶出挙動を確認した (Figure 3-15)。S-Oligo は一般的に疎水性が高く、複数の立体異性体を類縁物質として含むため、カラム固定相と S-Oligo との相互作用が強くなり、ピークがブロードするが、10 塩基長及び 15 塩基長の各 3 つのオリゴヌクレオチドの分析対象物質も、水系溶媒とイソクラティックな溶出条件のみで分離が可能であった (Figure 3-15)。Figure 3-16 は、Figure 3-15 で分析した S-Oligo と同じ配列かつ S 化されていない dpT10 及び dpT15 を用いて同じ HPLC 条件で分析したクロマトグラムであり、Figure 3-15 と比較すると、ほとんど保持されなかった。酸素原子の方が硫黄原子よりも電気陰性度が高いため、S-Oligo によって静電的相互作用が強まった可能性は低く、その影響は限定的と考えられる。この結果からも、S 化によって疎水性相互作用が強くなったことが明らかである。また、S-Oligo を分析している既往研究では、イオン対試薬を使用しているが[117-120]、本検討ではイオン対試薬を使用せずとも複数 S-Oligo の一斉分析、さらに単一 S 化数のみ異なるオリゴヌクレオチドの分離が可能であった。これは IB5D5 ハイドロゲルの固定相の特性が大きく影響していると考えられる。IB5D5 ハイドロゲルの固定相は、PNIPAAm の相転移により RPLC の固定相よりも親水性が高く、また DMAPAAm の存在により静電的特性を持っている。これらの特性は、S-Oligo と固定相との相互作用を、RPLC の固定相との相互作用ほど強すぎず、かつ S-Oligo の保持を妨げるほど弱すぎない適度な強度にし、イオン対試薬を使用せずとも分離が可能であったと考察される。

以上より、IB5D5 ハイドロゲルを用いた TRC による分析方法によって、有機溶媒や複雑な移動相グラジエントを使用せずとも水系溶媒のみで S-Oligo の分離が可能であった。また、単一 S 化数のみ異なる S-Oligo の分離も可能であった。重要なことに、これらの分析には既往研究で汎用されているイオン対試薬は不要であった。したがって、従来の方法と比較し、IB5D5 ハイドロゲルを用いた TRC は、より簡便かつ分析対象物質の生理活性を損なわない温和な条件での S-Oligo の分離が可能であった。





**Figure 3-15** Chromatograms and retention factors of a mixture of multiple S-oligos with different numbers of phosphorothioated sites obtained at various temperatures [(a) chromatograms of 10-mer S-oligos, (b) chromatograms of 15-mer S-oligos, and (c) retention factors].

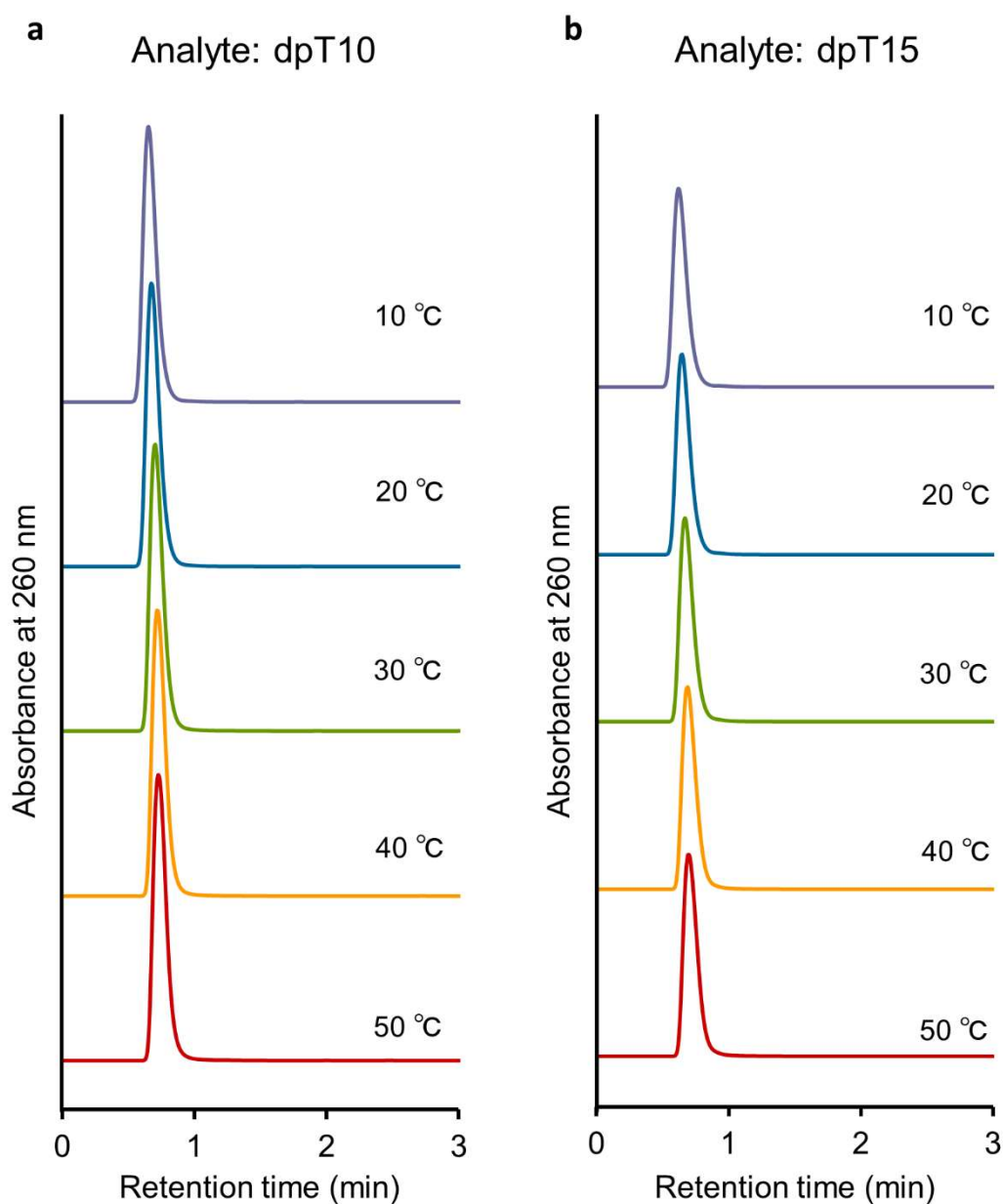


Figure 3-16 Chromatograms of dpT10 (a) and dpT15 (b) under the same HPLC setting and column as Figure 3-15.

### 3.4 結論

本章では、固定相として PNIPAAm を基盤としたハイドロゲル修飾シリカを使用した温度応答性クロマトグラフィーによる複数のオリゴヌクレオチドの新規分析法を検討した。IB5D5 ハイドロゲルカラムを用いることで、塩基鎖のわずかな違い（一塩基鎖長、末端一塩基、及び S-Oligo の S 化数）を持った複数オリゴヌクレオチドを良好に分離することが可能であった。さらに、重要なことに、これらの分析は水系溶媒のみのイソク

ラティックな溶出条件で達成され、有機溶媒及びグラジエント法を用いない環境低負荷の分離が可能であった。また、S-Oligoの一斉分析では、従来のRPLC又はIELCによる分析とは異なり、イオン対試薬を用いずに良好な分離が確認された。

開発したPNIPAAmを基盤としたTRCは、低分子医薬品だけでなくより高度かつ複雑な物理化学的性質を有するオリゴヌクレオチドの新規分析法として従来法に取って代わる可能性が示唆された。

## 第4章 温度応答性アフィニティー精製法によるエクソソームの分離精製法の

### 検討

エクソソームは、様々な細胞が分泌する平均サイズが 20~150 nm の細胞外小胞であり、細胞の膜タンパク質や細胞内に存在するタンパク質又は mRNA などをも有し、別の細胞へと情報伝達する役割を果たしていると考えられる (Figure 4-1) [24-30, 33, 121]。近年、エクソソームは、疾患の診断マーカー、予後予測因子としてのバイオマーカーや治療標的の他、DDS としての活用が期待されている[25, 28, 29, 31, 34-40]。また、いまや2人に1人が罹患するがんでは、がん細胞由来のエクソソームの一部で、がんの転移や予後に関与することが報告されている[28]。例えば、がん切除後に、再発・転移が発見されるには画像検査で発見できるほどがんが増大・進行する必要がある。がんが増大・進行する前に体液中のがん細胞由来エクソソームを捕捉、機能を評価できれば、早期治療の開始や予防治療を検討することが可能となりがんの根治的治療につながる可能性がある。つまり、がん細胞由来の特定のエクソソームを生理活性を維持したまま分離することには意義があると考えられる。しかし、既存のエクソソーム分離精製法は、手技が煩雑、エクソソームへのダメージがある、又は精製度が悪いといった課題が残る。

アフィニティークロマトグラフィーは、固定相に分析対象物質との特異的な相互作用を持つリガンド (抗体、アプタマー、ペプチド等) を用いて分離する手法であり、分析対象物質に特異的かつ効率的な分離が可能である。しかし、分析対象物質の固定相からの遊離には、強酸や高塩濃度の溶媒、又は有機溶媒の使用が一般的であり、分析対象物質の変性・失活のおそれや脱塩などの後処理を必要とする[71, 72]。温度応答性アフィニティークロマトグラフィーは、温度による固定相の物理学的変化を利用して、温度変化のみによって固定相のリガンドから分析対象物質を分離する手法であり、従来法よりも分析対象物質にとって温和な分離精製法として期待されている[68, 69, 71, 103, 104]。

そこで本章では、PNIPAAm を用いた温度応答性アフィニティー精製法によるエクソソームの新規分離精製法の検討を行った。温度応答性アフィニティー精製法のリガンドとして human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) を標的とするペプチドリガンド (Leu-Thr-Val-Ser-Pro-Trp-Tyr) を用いた[151, 152]。エクソソームは、HER2 高発現のヒト乳がん細胞由来の細胞株の SK-BR-3 細胞より単離されたエクソソームを用いて、温度応答性アフィニティー精製法による分離を評価した (Figure 4-2)。

開発した温度応答性アフィニティー精製法は、HER2 標的ペプチドリガンドを導入することで、水系溶媒環境下で温度制御のみで PNIPAAm による HER2 標的ペプチドリガンドの遮蔽効果がみられ、HER2 発現エクソソームの吸着を制御可能であることが示唆された。本温度応答性アフィニティー精製法は、現在使用されているエクソソーム分離法よりも簡便かつエクソソームにとって温和な条件での分離が可能な新規分離法であ

ることが示唆された。また、導入するペプチドリガンドの標的タンパクを変更することにより、他の特定のエクソソームの分離に応用することが可能と考えられる。今後、さらに固定相の条件を最適化（静電的特性の付与、修飾量の増加等）することで、温度制御のみによる選択的なエクソソームの分離精製法として期待できる。

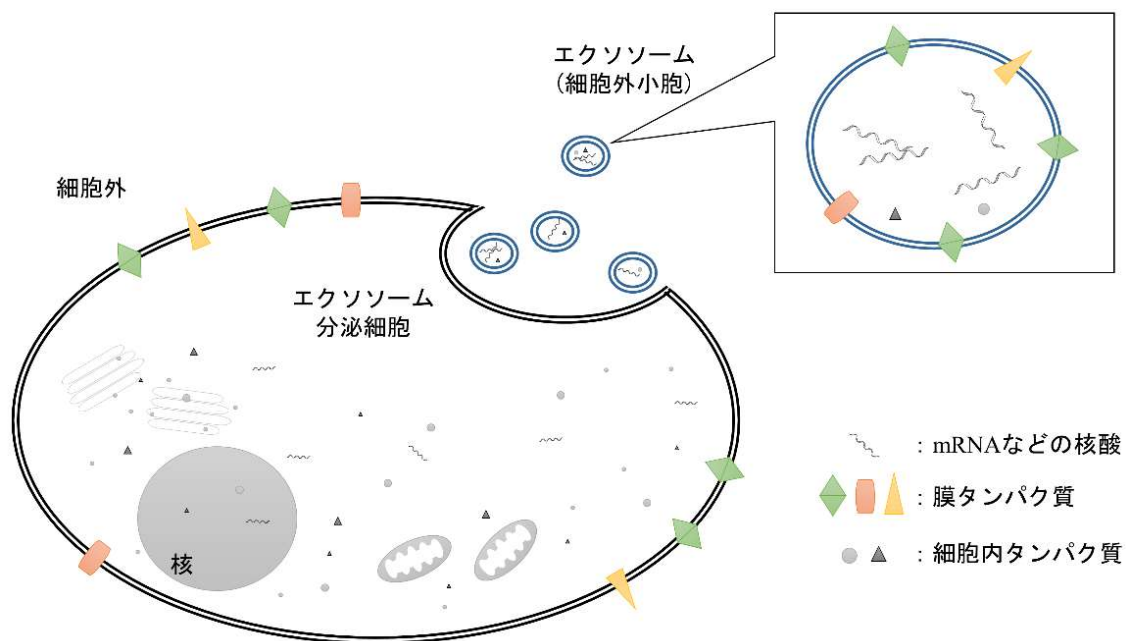


Figure 4-1 Brief structure of exosome.

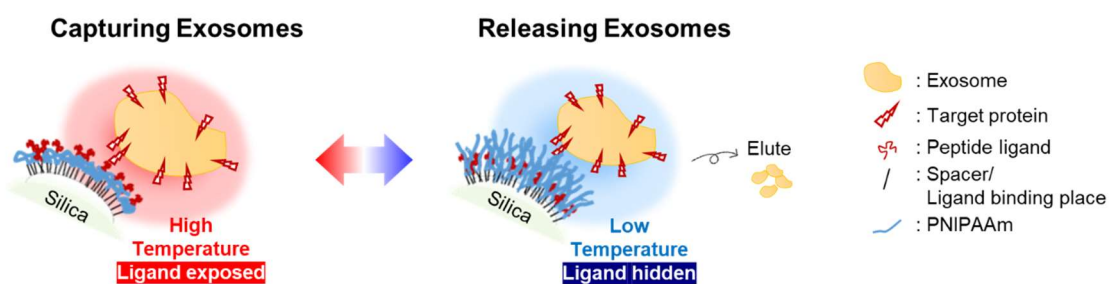


Figure 4-2 Concept of temperature-responsive affinity analysis method using PNIPAAm for exosome separation.

## 第5章 結語

本研究では、温度応答性高分子 PNIPAAm を基盤とした機能性高分子を用いた分離システムを構築し、従来の医療モダリティである低分子医薬品、近年開発が活発する核酸医薬品、そして新たな医療モダリティとしてエクソソームへの応用を検討した。

薬物代謝酵素典型基質薬の一斉分析の検討では、水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件による温度応答性クロマトグラフィーを用いて、有機溶媒やグラジエント法を使用せずに、非臨床又は臨床評価用に一般的に使用される複数 CYP 基質薬のカクテル試料の良好な分離が示された。ステロイド類やバルビツール酸系といった基本骨格が類似した化合物の分析とは異なり、異なる基本骨格を持つ複数 CYP 基質薬の一斉分析が可能であった。

オリゴヌクレオチドの一斉分析では、静電的相互作用を有した温度応答性クロマトグラフィーによって塩基鎖のわずかな違い（一塩基鎖長、末端一塩基、及び S-Oligo の S 化数）を持った複数オリゴヌクレオチドを良好に分離することが可能であった。いずれの分離も、水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件で達成された。特に、S-Oligo の一斉分析では、既往研究で用いられているイオン対試薬や有機溶媒を用いずに、良好な分離が確認された。

エクソソームの分離では、HER2 標的ペプチドリガンドを導入した温度応答性アフィニティー精製法によって、水系溶媒環境下で温度制御のみで PNIPAAm による HER2 標的ペプチドリガンドの遮蔽効果がみられ、HER2 発現エクソソームの吸着を制御可能であることが示唆された。本温度応答性アフィニティー精製法は、現在使用されているエクソソーム分離法よりも簡便かつエクソソームにとって温和な条件での分離が可能な新規分離法であることが示唆された。

本システムは、有機溶媒やイオン対試薬・特別なポンプ装置を要するグラジエント溶出といった従来の分析条件を必要とせず、分析対象物質にとって温和かつ環境低負荷な条件における新規分析法である。さらに、分析対象物質の特徴に合わせ、分子認識能や静電的相互作用、アフィニティーの特性を付与することが可能であり、既存の医療モダリティに加え今後進化する医療モダリティへも応用性の高い分離システムである。

## 研究業績

## 主論文

1. Yutaro Maekawa, Naoya Okamoto, Yuji Okada, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa. Green Analytical Method for the Simultaneous Analysis of Cytochrome P450 Probe Substrates by poly(*N*-isopropylacrylamide)-based Temperature-Responsive Chromatography. *Sci Rep.* 10(1):8828, **2020**.
2. Yutaro Maekawa, Kaichi Yamazaki, Miwa Ihara, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa. Simultaneous Analysis of Multiple Oligonucleotides by Temperature-Responsive Chromatography Using a poly(*N*-isopropylacrylamide)-based Stationary Phase. *Anal Bioanal Chem.* **412** :5341–5351, **2020**.

## 参考論文

1. Yuki Hiruta, Mirai Shimamura, Minami Matsuura, Yutaro Maekawa, Takaaki Funatsu, Yuichi Suzuki, Eri Ayano, Teruo Okano, Hideko Kanazawa. Temperature-Responsive Fluorescence Polymer Probes with Accurate Thermally Controlled Cellular Uptakes. *ACS Macro Lett.* **3**, 281–285, **2014**.
2. Minami Maekawa-Matsuura, Kei Fujieda, Yutaro Maekawa, Tomohiro Nishimura, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa. LAT1-Targeting Thermoresponsive Liposomes for Effective Cellular Uptake by Cancer Cells. *ACS Omega* 4(4):6443-51, **2019**.
3. Yutaro Maekawa, Eri Ayano, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa. Effective Separation for New Therapeutic Modalities Utilizing Temperature-Responsive Chromatography. (Review) *Anal Sci*, 2021, in press.

## 参考文献

1. 近藤 啓. 医薬品のライフサイクルマネジメントにおける DDS 研究の役割. *ファルマシア*. 2016;52(11):1054-6. doi:10.14894/faruawpsj.52.11\_1054.
2. Valeur E, Guéret SM, Adihou H, Gopalakrishnan R, Lemurell M, Waldmann H et al. New Modalities for Challenging Targets in Drug Discovery. *Angewandte Chemie International Edition*. 2017;56(35):10294-323. doi:10.1002/anie.201611914.
3. Rock BM, Foti RS. Pharmacokinetic and Drug Metabolism Properties of Novel Therapeutic Modalities. *Drug Metabolism and Disposition*. 2019;47(10):1097-9. doi:10.1124/dmd.119.088708.
4. 神吉 将之. 新モダリティ医薬品の非臨床安全性評価における動物種の選択/種差. *日本毒性学会学術年会*. 2019;46.1:S5-. doi:10.14869/toxpt.46.1.0\_S5-5.
5. 戸邊 雅則. 創薬化学の側面から見た低分子医薬の将来像—低分子から中分子への広がり—2018 2018 年 5 月.
6. 国立研究開発法人 科学技術振興機構 研究開発戦略センター. 俯瞰ワークショップ 報告書 『次世代医薬・基盤技術の動向と展望、推進すべき研究開発戦略』. 2019.
7. 南雲 明. 薬物治療における個別化医療の現状と展望—基礎研究の進展が医薬品開発に与えるインパクト—2013 2013 年 3 月.
8. 井上 貴雄. 核酸医薬品の開発動向. *ファルマシア*. 2018;54(10):943-7. doi:10.14894/faruawpsj.54.10\_943.
9. 井上 貴雄. RNA を標的とする核酸医薬品の開発動向. *医学のあゆみ*. 2018;267(8):591-7.
10. 鈴木 理之, 池田 晶子, 伊藤 峻久, 大藤 和美, 後藤 芳任, 末松 守雄, et al. 外資系企業における再生医療等製品の国内導入状況と諸問題—EFPIA Japan および PhRMA Japan 加盟会社を対象としたアンケート調査から—. *レギュラトリーサイエンス学会誌*. 2019;9(2):79-88. doi:10.14982/rsmp.9.79.
11. 尾山 和信. 再生医療等製品の品質管理戦略において考慮すべき要点～細胞加工製品における Potency の試験はどのように考えるべきか～. 第 16 回 日本再生医療学会総会; 2017 年 3 月 7 日 2017.
12. Arcidiacono JA, Blair JW, Benton KA. US Food and Drug Administration international collaborations for cellular therapy product regulation. *Stem Cell Research & Therapy*. 2012;3(5):38. doi:10.1186/scrt129.
13. Gálvez P, Clares B, Hmadcha A, Ruiz A, Soria B. Development of a cell-based medicinal product: Regulatory structures in the European Union. *British medical bulletin*. 2012;105. doi:10.1093/bmb/lds036.
14. Martin I, Simmons PJ, Williams DF. Manufacturing Challenges in Regenerative Medicine. *Science translational medicine*. 2014;6(232):232fs16-fs16.



- doi:10.1126/scitranslmed.3008558.
15. Husain SR, Han J, Au P, Shannon K, Puri RK. Gene therapy for cancer: regulatory considerations for approval. *Cancer gene therapy*. 2015;22(12):554-63. doi:10.1038/cgt.2015.58.
  16. Kambhampati RV, Chiu YY, Chen CW, Blumenstein JJ. Regulatory concerns for the chemistry, manufacturing, and controls of oligonucleotide therapeutics for use in clinical studies. *Antisense research and development*. 1993;3(4):405-10.
  17. 藤坂 朱紀, 伊藤 浩介, 小比賀 聡. 核酸医薬品の現状と品質管理に関わるレギュラトリーサイエンス上の課題. *レギュラトリーサイエンス学会誌*. 2017;7(2):113-20. doi:10.14982/rsmp.7.113.
  18. 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長. 核酸医薬品の品質の担保と評価において考慮すべき事項. 2018. <https://www.pmda.go.jp/files/000228569.pdf>. Accessed 1 May 2020.
  19. Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic acids research*. 2016;44(14):6518-48. doi:10.1093/nar/gkw236.
  20. Haussecker D, Kay MA. Drugging RNAi. *Science*. 2015;347(6226):1069-70. doi:10.1126/science.1252967.
  21. 井上 貴雄. 核酸医薬品開発の現状. *Drug Delivery System*. 2016;31(1):10-23. doi:10.2745/dds.31.10.
  22. 井上 貴雄. 第1回 核酸医薬品の開発動向と規制整備の現状. *PHARM TECH JAPAN*. 2019;35(13):2533-45.
  23. 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部. 承認された核酸医薬品. 2020. <http://www.nihs.go.jp/mtgt/>. Accessed 5 Dec 2020.
  24. Johnstone RM, Adam M, Hammond J, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry*. 1987;262:9412-20.
  25. 門田 宰, 吉岡 祐亮, 藤田 雄, 落谷 孝広. 細胞外小胞・エクソソーム研究の最前線: 臨床応用を目指して. *日本薬理学雑誌*. 2017;149(3):119-22. doi:10.1254/fpj.149.119.
  26. Hou R, Li Y, Sui Z, Yuan H, Yang K, Liang Z et al. Advances in exosome isolation methods and their applications in proteomic analysis of biological samples. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411(21):5351-61. doi:10.1007/s00216-019-01982-0.
  27. 下田 麻子, 澤田 晋一, 秋吉 一成. 細胞外ベシクルの構造特性と機能制御. *Drug Delivery System*. 2014;29(2):108-15. doi:10.2745/dds.29.108.
  28. Wortzel I, Dror S, Kenific CM, Lyden D. Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. *Developmental Cell*. 2019;49(3):347-60. doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.011>.

29. Lu M, Yuan S, Li S, Li L, Liu M, Wan S. The Exosome-Derived Biomarker in Atherosclerosis and Its Clinical Application. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2019;12(1):68-74. doi:10.1007/s12265-018-9796-y.
30. Liga A, Vliegenthart ADB, Oosthuyzen W, Dear JW, Kersaudy-Kerhoas M. Exosome isolation: a microfluidic road-map. *Lab on a chip*. 2015;15(11):2388-94. doi:10.1039/c5lc00240k.
31. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;527(7578):329-35. doi:10.1038/nature15756.
32. 島岡 要, 朴 恩正, 川本 英嗣, 阿榮 高娃. エクソソーム・インテグリン: 機能制御と疾患との関連. *日本血栓止血学会誌*. 2019;30(4):596-602. doi:10.2491/jjsth.30.596.
33. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-9. doi:10.1038/ncb1596.
34. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(1):13-21. doi:10.1016/j.ygyno.2008.04.033.
35. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science*. 2010;101(10):2087-92. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x.
36. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*. 2012;18(6):883-91. doi:10.1038/nm.2753.
37. Abak A, Abhari A, Rahimzadeh S. Exosomes in cancer: small vesicular transporters for cancer progression and metastasis, biomarkers in cancer therapeutics. *PeerJ*. 2018;6:e4763. doi:10.7717/peerj.4763.
38. Yang TT, Liu CG, Gao SC, Zhang Y, Wang PC. The Serum Exosome Derived MicroRNA-135a, -193b, and -384 Were Potential Alzheimer's Disease Biomarkers. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2018;31(2):87-96. doi:https://doi.org/10.3967/bes2018.011.
39. Samanta S, Rajasingh S, Drosos N, Zhou Z, Dawn B, Rajasingh J. Exosomes: new molecular targets of diseases. *Acta Pharm Sinic*. 2018;39(4):501-13. doi:10.1038/aps.2017.162.
40. 大野 慎一郎, 高梨 正勝, 黒田 雅彦. エクソソームによる核酸 DDS の開発. *Drug Delivery System*. 2014;29(2):134-9. doi:10.2745/dd.29.134.
41. Jose Clemente C-N, Wu H-J, Ugaz V. Microfluidics for exosome isolation and analysis: Enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab on a chip*. 2017;17.

- doi:10.1039/c7lc00592j.
42. Willis GR, Kourembanas S, Mitsialis SA. Toward Exosome-Based Therapeutics: Isolation, Heterogeneity, and Fit-for-Purpose Potency. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2017;4(63). doi:10.3389/fcvm.2017.00063.
  43. Chang M, Chang Y-J, Chao PY, Yu Q. Exosome purification based on PEG-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *PloS one*. 2018;13(6):e0199438-e. doi:10.1371/journal.pone.0199438.
  44. Nakai W, Yoshida T, Diez D, Miyatake Y, Nishibu T, Imawaka N et al. A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Scientific reports*. 2016;6(1):33935. doi:10.1038/srep33935.
  45. Kwizera EA, O'Connor R, Vinduska V, Williams M, Butch ER, Snyder SE et al. Molecular Detection and Analysis of Exosomes Using Surface-Enhanced Raman Scattering Gold Nanorods and a Miniaturized Device. *Theranostics*. 2018;8(10):2722-38. doi:10.7150/thno.21358.
  46. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789-804. doi:10.7150/thno.18133.
  47. Ahuja S, Dong M, editors. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. Elsevier; 2005.
  48. Kazakevich YV, Lobrutto R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. John Wiley & Sons; 2007.
  49. 永松 久実, 西村 基弘, 西 博行. UHPLC法によるパラベンの分離とジルチアゼム製剤の定量 : 薬品分析化学実習の HPLC 法から UHPLC 法への移管. *安田女子大学紀要*. 2012(40):403-11.
  50. Ahuja S, Dong M, editors. *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. Elsevier; 2005.
  51. Yerneni C. Ion Pair Chromatography: A Critical Perspective. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*. 2017;4. doi:10.15406/japlr.2017.04.00121.
  52. Chackalamannil S, Rotella D, Ward S. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. Elsevier; 2017.
  53. Enmark M, Bagge J, Samuelsson J, Thunberg L, Örnskov E, Leek H et al. Analytical and preparative separation of phosphorothioated oligonucleotides: columns and ion-pair reagents. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(2):299-309. doi:10.1007/s00216-019-02236-9.
  54. Anastas PT, Warner JC. *Green chemistry : theory and practice*. Oxford: Oxford University Press; 1998.
  55. 染宮 昭義. グリーンケミストリーの行動指針. *高分子*. 2002;51(1):15-7.
  56. 島田 広道. 産総研におけるグリーンサステナブルケミストリーへの取り組み. *石油学会 年会・秋季大会講演要旨集*. 2006;2006f:21-. doi:10.11523/sekiyu.2006f.0.21.0.
  57. 北村 勝. グリーンサステナブルケミストリーの研究開発. *生産と技術*. 2012;64(4):54-6.
  58. 国立環境研究所 国. 環境展望台. 国立研究開発法人 国立環境研究所. 2009.

- <http://tenbou.nies.go.jp/>. Accessed 1 May 2020.
59. 経済産業省 . SDGs 経営ガイド . 2019. <https://www.meti.go.jp/press/2019/05/20190531003/20190531003-1.pdf>. Accessed 1 May 2020.
  60. Nations tU. Sustainable Development Goals. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/>. Accessed 1 May 2020.
  61. Nations tU. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. 2015. [https://www.un.org/ga/search/view\\_doc.asp?symbol=A/70/L.1](https://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/70/L.1). Accessed 1 May 2020.
  62. Welch CJ, Wu N, Biba M, Hartman R, Brkovic T, Gong X et al. Greening analytical chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010;29(7):667-80. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.008>.
  63. Płotka J, Tobiszewski M, Sulej AM, Kupska M, Górecki T, Namieśnik J. Green chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2013;1307:1-20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.099>.
  64. 山田 悦. 大学等における廃棄物管理とその変遷. *環境と安全*. 2016;7(3):195-204. doi:10.11162/daikankyo.16S0801.
  65. Dembek M, Bocian S. Pure water as a mobile phase in liquid chromatography techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020;123:115793. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115793>.
  66. 張替 直輝. 液体クロマトグラフィー : 固定相への親和性の違いを利用した物質の分離法 (分離・分析の科学). *化学と教育*. 2015;63(11):556-9. doi:10.20665/kakyoshi.63.11\_556.
  67. 渋谷 直人. アフィニティークロマトグラフィー. *日本食品工業学会誌*. 1993;40(2):161-. doi:10.3136/nskkk1962.40.161.
  68. Rahman Mu, Wang J, Xia H, Liu J, Bai Q. High capacity temperature-responsive affinity chromatography designed for antibody separation. *Chem Eng J*. 2020;391:123561. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123561>.
  69. Yu J, Yang L, Liang X, Dong T, Qu H, Rong M et al. Aptamer and PNIPAAm co-conjugated nanoparticles regulate activity of enzyme with different temperature. *Talanta*. 2016;159:47-54. doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.077>.
  70. Yang H, Gurgel PV, Carbonell RG. Purification of human immunoglobulin G via Fc-specific small peptide ligand affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(6):910-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.004>.
  71. 池田 幸司. 抗体精製を目指した温度応答性アフィニティークロマトグラフィーの開発. *ライフサポート*. 2017;29(1):6-.
  72. Hage DS. Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications. *Clin Chem*.

- 1999;45(5):593-615. doi:10.1093/clinchem/45.5.593.
73. Kanazawa H. Temperature-responsive polymers for liquid-phase separations. *Anal Bioanal Chem.* 2004;378(1):46-8. doi:10.1007/s00216-003-2336-9.
74. Hiruta Y, Nagumo Y, Miki A, Okano T, Kanazawa H. Effects of terminal group and chain length on temperature-responsive chromatography utilizing poly(N-isopropylacrylamide) synthesized via RAFT polymerization. *RSC Advances.* 2015;5(89):73217-24. doi:10.1039/c5ra15906g.
75. Kanazawa H, Ayano E, Sakamoto C, Yoda R, Kikuchi A, Okano T. Temperature-responsive stationary phase utilizing a polymer of proline derivative for hydrophobic interaction chromatography using an aqueous mobile phase. *Journal of chromatography A.* 2006;1106(1-2):152-8. doi:10.1016/j.chroma.2005.09.052.
76. Nishio T, Kanazashi R, Nojima A, Kanazawa H, Okano T. Effect of polymer containing a naphthyl-alanine derivative on the separation selectivity for aromatic compounds in temperature-responsive chromatography. *Journal of Chromatography A.* 2012;1228:148-54. doi:10.1016/j.chroma.2011.07.047.
77. Hiruta Y, Nagumo Y, Suzuki Y, Funatsu T, Ishikawa Y, Kanazawa H. The effects of anionic electrolytes and human serum albumin on the LCST of poly(N-isopropylacrylamide)-based temperature-responsive copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2015;132:299-304. doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.032.
78. Mikuma T, Kuroki T, Yoshikawa M, Uchida R, Hiruta Y, Kanazawa H. Analysis of Psychoactive Drugs by Temperature-Responsive Chromatography. *CHROMATOGRAPHY.* 2017;38(3):115-21. doi:10.15583/jpchrom.2017.011.
79. Hiruta Y, Funatsu T, Matsuura M, Wang J, Ayano E, Kanazawa H. pH/temperature-responsive fluorescence polymer probe with pH-controlled cellular uptake. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2015;207:724-31. doi:https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.10.065.
80. Kobayashi H, Nishikawa M, Sakamoto C, Nishio T, Kanazawa H, Okano T. Dual Temperature- and pH-Responsive Fluorescence Molecular Probe for Cellular Imaging Utilizing a PNIPAAm-Fluorescein Copolymer. *Anal Sci.* 2009;25(8):1043-7. doi:10.2116/analsci.25.1043.
81. Hiruta Y, Shimamura M, Matsuura M, Maekawa Y, Funatsu T, Suzuki Y et al. Temperature-Responsive Fluorescence Polymer Probes with Accurate Thermally Controlled Cellular Uptakes. *Acs Macro Lett.* 2014;3(3):281-5. doi:10.1021/mz5000569.
82. Matsuura M, Ohshima M, Hiruta Y, Nishimura T, Nagase K, Kanazawa H. LAT1-Targeting Thermo-responsive Fluorescent Polymer Probes for Cancer Cell Imaging. *International journal of molecular sciences.* 2018;19(6):1646.
83. Akimoto J, Nakayama M, Okano T. Temperature-responsive polymeric micelles for

- optimizing drug targeting to solid tumors. *Journal of Controlled Release*. 2014;193:2-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.062>.
84. Bae YH, Okano T, Kim SW. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(N,N'-alkyl substituted acrylamides) in water. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 1990;28(6):923-36. doi:10.1002/polb.1990.090280609.
85. Maekawa-Matsuura M, Fujieda K, Maekawa Y, Nishimura T, Nagase K, Kanazawa H. LAT1-Targeting Thermoresponsive Liposomes for Effective Cellular Uptake by Cancer Cells. *Acs Omega*. 2019;4(4):6443-51. doi:10.1021/acsomega.9b00216.
86. Nakayama M, Akimoto J, Okano T. Polymeric micelles with stimuli-triggering systems for advanced cancer drug targeting. *J Drug Target*. 2014;22(7):584-99. doi:10.3109/1061186x.2014.936872.
87. Wang J, Ayano E, Maitani Y, Kanazawa H. Tunable Surface Properties of Temperature-Responsive Polymer-Modified Liposomes Induce Faster Cellular Uptake. *Acs Omega*. 2017;2(1):316-25. doi:10.1021/acsomega.6b00342.
88. Wang J, Ayano E, Maitani Y, Kanazawa H. Enhanced cellular uptake and gene silencing activity of siRNA using temperature-responsive polymer-modified liposome. *International journal of pharmaceutics*. 2017;523(1):217-28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.035>.
89. Mizutani A, Kikuchi A, Yamato M, Kanazawa H, Okano T. Preparation of thermoresponsive polymer brush surfaces and their interaction with cells. *Biomaterials*. 2008;29(13):2073-81. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.004>.
90. Nagase K, Inanaga D, Ichikawa D, Mizutani Akimoto A, Hattori Y, Kanazawa H. Temperature-modulated cell-separation column using temperature-responsive cationic copolymer hydrogel-modified silica beads. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;178:253-62. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.057>.
91. Nagase K, Nagumo Y, Kim M, Kim H-J, Kyung H-W, Chung H-J et al. Local Release of VEGF Using Fiber Mats Enables Effective Transplantation of Layered Cardiomyocyte Sheets. *Macromol Biosci*. 2017;17(8):1700073. doi:doi:10.1002/mabi.201700073.
92. Nagase K, Okano T, Kanazawa H. Poly(N-isopropylacrylamide) based thermoresponsive polymer brushes for bioseparation, cellular tissue fabrication, and nano actuators. *Nano-Structures & Nano-Objects*. 2018;16:9-23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2018.03.010>.
93. Nagase K, Yamato M, Kanazawa H, Okano T. Poly(N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications. *Biomaterials*. 2018;153:27-48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.026>.
94. Nakao M, Inanaga D, Nagase K, Kanazawa H. Characteristic differences of cell sheets composed of mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Regen Ther*. 2019;11:34-

40. doi:10.1016/j.reth.2019.01.002.
95. Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*. 1995;16(4):297-303.
96. Kanazawa H, Yamamoto K, Matsushima Y, Takai N, Kikuchi A, Sakurai Y et al. Temperature-Responsive Chromatography Using Poly(N-isopropylacrylamide)-Modified Silica. *Analytical Chemistry*. 1996;68(1):100-5. doi:10.1021/ac950359j.
97. Kanazawa H, Kashiwase Y, Yamamoto K, Matsushima Y, Kikuchi A, Sakurai Y et al. Temperature-Responsive Liquid Chromatography. 2. Effects of Hydrophobic Groups in N-Isopropylacrylamide Copolymer-Modified Silica. *Analytical Chemistry*. 1997;69(5):823-30. doi:10.1021/ac961024k.
98. 綾野 絵理, 金澤 秀子. 機能性高分子を用いる温度応答性クロマトグラフィーの開発. *分析化学*. 2005;54(7):593-603. doi:10.2116/bunsekikagaku.54.593.
99. Akimaru M, Okubo K, Hiruta Y, Kanazawa H. Temperature-responsive Solid-phase Extraction Column for Biological Sample Pretreatment. *Anal Sci*. 2015;31(9):881-6. doi:10.2116/analsci.31.881.
100. Nagase K, Okano T. Thermoresponsive-polymer-based materials for temperature-modulated bioanalysis and bioseparations. *J Mater Chem B*. 2016;4(39):6381-97.
101. Mikuma T, Uchida R, Kajiya M, Hiruta Y, Kanazawa H. The use of a temperature-responsive column for the direct analysis of drugs in serum by two-dimensional heart-cutting liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409(4):1059-65. doi:10.1007/s00216-016-0024-9.
102. Nagase K, Okano T. Correction: Thermoresponsive-polymer-based materials for temperature-modulated bioanalysis and bioseparations. *J Mater Chem B*. 2017;5(11):2198-.
103. Nagase K, Kobayashi J, Okano T. Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering. *Journal of The Royal Society Interface*. 2009;6(suppl\_3):S293-S309. doi:doi:10.1098/rsif.2008.0499.focus.
104. Yoshizako K, Akiyama Y, Yamanaka H, Shinohara Y, Hasegawa Y, Carredano E et al. Regulation of Protein Binding toward a Ligand on Chromatographic Matrixes by Masking and Forced-Releasing Effects Using Thermoresponsive Polymer. *Analytical Chemistry*. 2002;74(16):4160-6. doi:10.1021/ac025523z.
105. Kanazawa H, Sunamoto T, Ayano E, Matsushima Y, Kikuchi A, Okano T. Temperature-responsive chromatography using poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel-modified silica. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. 2002;18(1):45-8. doi:10.2116/analsci.18.45.
106. Kanazawa H. Thermally responsive chromatographic materials using functional polymers.

- Journal of separation science. 2007;30(11):1646-56. doi:10.1002/jssc.200700093.
107. Miguel de la G, Salvador G, editors. Handbook of green analytical chemistry. John Wiley & Sons; 2012.
108. 西尾 忠, 金澤 秀子. 多機能性ポリマーを用いる環境低負荷型クロマトグラフィーシステムの開発. 分析化学. 2010;59(3):163-73. doi:10.2116/bunsekikagaku.59.163.
109. Kikuchi A, Okano T. Intelligent thermoresponsive polymeric stationary phases for aqueous chromatography of biological compounds. Progress in Polymer Science. 2002;27(6):1165-93. doi:https://doi.org/10.1016/S0079-6700(02)00013-8.
110. Pillai VC, Strom SC, Caritis SN, Venkataramanan R. A sensitive and specific CYP cocktail assay for the simultaneous assessment of human cytochrome P450 activities in primary cultures of human hepatocytes using LC-MS/MS. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2013;74:126-32. doi:10.1016/j.jpba.2012.10.016.
111. Tanaka S, Uchida S, Inui N, Takeuchi K, Watanabe H, Namiki N. Simultaneous LC-MS/MS analysis of the plasma concentrations of a cocktail of 5 cytochrome P450 substrate drugs and their metabolites. Biological & pharmaceutical bulletin. 2014;37(1):18-25.
112. Oh K-S, Park S-J, Shinde DD, Shin J-G, Kim D-H. High-sensitivity liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma. J Chromatogr B. 2012;895-896:56-64. doi:https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.014.
113. Hiruta Y, Kanazashi R, Ayano E, Okano T, Kanazawa H. Temperature-responsive molecular recognition chromatography using phenylalanine and tryptophan derived polymer modified silica beads. Analyst. 2016;141(3):910-7. doi:10.1039/c5an01996f.
114. Ayano E, Kanazawa H. Aqueous chromatography system using temperature-responsive polymer-modified stationary phases. Journal of separation science. 2006;29(6):738-49.
115. Huber CG, Oberacher H. Analysis of nucleic acids by on-line liquid chromatography-mass spectrometry. Mass spectrometry reviews. 2001;20(5):310-43. doi:10.1002/mas.10011.
116. Frederiksen JK, Piccirilli JA. Chapter 14 - Separation of RNA Phosphorothioate Oligonucleotides by HPLC. Methods Enzymol. Academic Press; 2009. p. 289-309.
117. Bunčák M, Bačková V, Holasová Š, Radilová H, Šafářová M, Kunc F et al. Unusual chromatographic behavior of oligonucleotide sequence isomers on two different anion exchange HPLC columns. Anal Biochem. 2006;348(2):300-6. doi:https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.10.047.
118. Enmark M, Rova M, Samuelsson J, Örnkvist E, Schweikart F, Fornstedt T. Investigation of factors influencing the separation of diastereomers of phosphorothioated oligonucleotides. Anal Bioanal Chem. 2019;411(15):3383-94. doi:10.1007/s00216-019-01813-2.
119. Gong L. Analysis of oligonucleotides by ion-pairing hydrophilic interaction liquid



- chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp.* 2017;31(24):2125-34. doi:10.1002/rcm.8004.
120. Li S, Lu D-D, Zhang Y-L, Wang S-Q. An Improved Ion-Pair Reversed Phase LC Method for Analysis of Major Impurities of Phosphorothioate Oligonucleotide Cantide. *Chromatographia.* 2010;72(3):215-23. doi:10.1365/s10337-010-1655-1.
121. 小坂 展, 落谷 孝. エキソソームの形成の過程および医療への応用. *領域融合レビュー.* 2018;7:e007. doi:10.7875/leading.author.7.e007.
122. 植田 幸. 第2回 エクソソームのプロテオーム解析. *和光純薬時報.* 2018;86(3):10-1.
123. 厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長. 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン. 2018. <https://www.pmda.go.jp/files/000225191.pdf>. Accessed 1 May 2020.
124. 千葉 寛. チトクローム P450 を介した薬物相互作用. *ファルマシア.* 1995;31(9):992-6. doi:10.14894/faruawpsj.31.9\_992.
125. Michalets EL. Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy.* 1998;18(1):84-112.
126. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet (London, England).* 2002;360(9340):1155-62. doi:10.1016/s0140-6736(02)11203-7.
127. Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 2004;32(11):1201-8. doi:10.1124/dmd.104.000794.
128. Lee KS, Kim SK. Direct and metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition assays for evaluating drug–drug interactions. *Journal of Applied Toxicology.* 2013;33(2):100-8. doi:doi:10.1002/jat.1720.
129. Volpe DA, Balimane PV. Application of in vitro CYP and transporter assays to predict clinical drug–drug interactions. *Future Science;* 2018.
130. Kevin Lustig MT. Enabling Comprehensive Assessments of Drug–Drug Interaction Risks2017.
131. Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome P450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the “Cooperstown 5+1 cocktail”. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2003;74(5):437-47. doi:doi:10.1016/S0009-9236(03)00229-7.
132. Li G, Huang K, Nikolic D, van Breemen RB. High-Throughput Cytochrome P450 Cocktail Inhibition Assay for Assessing Drug-Drug and Drug-Botanical Interactions. *Drug*

- metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2015;43(11):1670-8. doi:10.1124/dmd.115.065987.
133. Yuan R, Madani S, Wei XX, Reynolds K, Huang SM. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2002;30(12):1311-9.
134. Kirigaya Y, Shiramoto M, Ishizuka T, Uchimaru H, Irie S, Kato M et al. Effects of itraconazole and rifampicin on the single-dose pharmacokinetics of the non-steroidal mineralocorticoid receptor blocker esaxerenone in healthy Japanese subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2020 Oct;86(10):2070-2079. doi:10.1111/bcp.14302.
135. Maekawa Y, Furuie H, Kato M, Myobatake Y, Kamiyama E, Watanabe A et al. Effect of DS-8500a, a Novel G Protein-Coupled Receptor 119 Agonist, on the Pharmacokinetics of Rosuvastatin and Atorvastatin in Healthy Subjects. *Clin Drug Invest*. 2019;39(10):967-78. doi:10.1007/s40261-019-00825-1.
136. Yu J, Petrie ID, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I. Mechanisms and Clinical Significance of Pharmacokinetic-Based Drug-Drug Interactions with Drugs Approved by the U.S. Food and Drug Administration in 2017. *Drug Metabolism and Disposition*. 2019;47(2):135-44. doi:10.1124/dmd.118.084905.
137. Yu J, Zhou Z, Tay-Sontheimer J, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I. Risk of Clinically Relevant Pharmacokinetic-Based Drug-Drug Interactions with Drugs Approved by the U.S. Food and Drug Administration Between 2013 and 2016. *Drug Metabolism and Disposition*. 2018;46(6):835-45. doi:10.1124/dmd.117.078691.
138. Streetman DS, Bleakley JF, Kim JS, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A et al. Combined phenotypic assessment of CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase with the “Cooperstown cocktail”. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2000;68(4):375-83. doi:doi:10.1067/mcp.2000.109519.
139. Christensen M, Andersson K, Dalén P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A et al. The karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2003;73(6):517-28. doi:doi:10.1016/S0009-9236(03)00050-X.
140. Ryu JY, Song IS, Sunwoo YE, Shon JH, Liu KH, Cha IJ et al. Development of the “Inje Cocktail” for High-throughput Evaluation of Five Human Cytochrome P450 Isoforms in vivo. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2007;82(5):531-40. doi:doi:10.1038/sj.clpt.6100187.
141. Prueksaritanont T, Tatosian D, Chu X, Railkar R, Evers R, Chavez-Eng C et al. Validation of a microdose probe drug cocktail for clinical drug interaction assessments for drug transporters and CYP3A. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2017;101(4):519-30.

- doi:doi:10.1002/cpt.525.
142. Administration USFaD. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. 2016. <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers>.
  143. Li K, Tan G, Huang J, Song F, You J. Iron-catalyzed oxidative C-H/C-H cross-coupling: an efficient route to alpha-quaternary alpha-amino acid derivatives. *Angewandte Chemie*. 2013;52(49):12942-5. doi:10.1002/anie.201306181.
  144. Moore BL, O'Reilly RK. Preparation of chiral amino acid materials and the study of their interactions with 1,1-Bi-2-naphthol. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2012;50(17):3567-74. doi:doi:10.1002/pola.26141.
  145. Sanda F, Abe T, Endo T. Syntheses and radical polymerizations of optically active (meth)acrylamides having amino acid moieties. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 1997;35(13):2619-29. doi:doi:10.1002/(SICI)1099-0518(19970930)35:13<2619::AID-POLA9>3.0.CO;2-L.
  146. Sakamoto C, Okada Y, Kanazawa H, Ayano E, Nishimura T, Ando M et al. Temperature- and pH-responsive aminopropyl-silica ion-exchange columns grafted with copolymers of N-isopropylacrylamide. *Journal of Chromatography A*. 2004;1030(1):247-53. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.010>.
  147. Pullman B, Pullman A. Electron-donor and -acceptor properties of biologically important purines, pyrimidines, pteridines, flavins, and aromatic amino acids. *P Natl Acad Sci USA*. 1958;44(12):1197-202.
  148. Deshmukh RR, Leitch Ii WE, Cole DL. Application of sample displacement techniques to the purification of synthetic oligonucleotides and nucleic acids: a mini-review with experimental results. *Journal of Chromatography A*. 1998;806(1):77-92. doi:[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00133-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00133-2).
  149. Zimmermann A, Greco R, Walker I, Horak J, Cavazzini A, Lämmerhofer M. Synthetic oligonucleotide separations by mixed-mode reversed-phase/weak anion-exchange liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014;1354:43-55. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.048>.
  150. McGinnis AC, Chen B, Bartlett MG. Chromatographic methods for the determination of therapeutic oligonucleotides. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2012;883-884:76-94. doi:10.1016/j.jchromb.2011.09.007.
  151. Shadidi M, Sioud M. Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *The FASEB Journal*. 2003;17(2):256-8. doi:<https://doi.org/10.1096/fj.02-0280fje>.
  152. Sabahnoo H, Noaparast Z, Abedi SM, Hosseinimehr SJ. New small <sup>99m</sup>Tc-labeled peptides

for HER2 receptor imaging. *Eur J Med Chem.* 2017;127:1012-24.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.011>.