

28AB-am291

等温滴定型熱量測定法 (ITC) を用いる抗炎症薬と HSA との結合における競合効果の解析

○大高 泰靖¹, 杉本 幹治¹, 澁川 明正¹ (¹千葉科学大薬)

【目的】複数の薬物を併用する場合、薬物間で競合効果が生じる可能性がある。本研究では、抗炎症薬とヒト血清アルブミン (HSA) とのタンパク質結合における競合効果を等温滴定型熱量計 (ITC) により解析した。

【実験方法】等温滴定型熱量計には、Microcal 社製 VP-ITC を用いた (測定条件: 65mM リン酸緩衝液 ($I=170\text{mM}$, pH 7.4) + 2v/v% DMSO, 37.0°C)。20 μM HSA 溶液に対して 300 μM の薬物溶液を 10 μL ずつ注入することで、発生する結合熱をピークとして観察した。そのピーク面積は滴下した薬物と HSA との結合量に比例するため、解析することで薬物との結合定数、結合部位数、結合熱を算出した。競合測定を行う場合には、HSA と共に添加する競合薬物濃度を 300 μM とした (右図)。

【結果と考察】抗炎症薬 diclofenac を 3 種類の薬物 ((S)-warfarin, phenylbutazone, diazepam) と競合させた。diclofenac の存在下で、diclofenac と同じ結合サイトをもつ diazepam を滴定した場合、結合定数は 10 倍低下した。さらに、diclofenac と異なる結合サイトに結合する (S)-warfarin や phenylbutazone に対しても、数倍の結合定数の低下が見られた。diclofenac の結合に伴う HSA 構造変化の影響 (非競合的効果) と考えられる。

また、(S)-warfarin が共存することにより、diclofenac の結合が 8.3 倍増強されることが示された。



図. ITC による競合測定法