

# 薄層クロマトグラフィー法と表面増強ラマン散乱の活性による簡便かつ迅速な新規血中薬物濃度測定法の開発

安藤 基純、安永 峻也  
(医療生命薬学研究ユニット)

## 【背景】

臨床ではしばしば、薬物治療の効果が優れない患者や予期せぬ副作用に見舞われる患者に遭遇する。そのような場合、治療薬の血中濃度の情報が、治療適正化に有用となり得るが、臨床現場では薬物血中濃度の測定に必要な時間・人材・費用などの確保の難しさから、薬物血中濃度の測定がほとんど行われてないのが現状である。特に、リアルタイムに薬物血中濃度を測定するのは、尚更、困難なものとなっている。そこで、本研究では、ラマンスペクトル（または表面増強ラマン散乱；SERS）を活用した、簡便で迅速な薬物血中濃度測定法を開発することを目的とした。今回の研究では、抗 MRSA 薬のひとつであるダプトマイシンを対象薬とした。ダプトマイシンは、最小血中濃度が 24.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を上回ると、筋障害（クレアチンホスホキナーゼ値の上昇）の発生頻度が高まる薬物であり、適正な血中濃度となるようモニタリングすることが望まれる。ラマンスペクトルは数秒程度で、物質固有のスペクトルを取得できることから、ダプトマイシンの迅速な定性・定量手段として有用と考えられる。また、金属ナノ粒子との相互作用による SERS 活性を利用できれば、高感度な測定法としての開発も期待できる。

## 【方法】

### (1) 銀クエン酸ナノ粒子 (Ag-citrate NPs) 懸濁液の調製法

精製水で 0.5 mM に希釈した硝酸銀溶液を、200°C に設定したホットスターラーで 15 分加熱しながら攪拌（回転子速度 500 rpm）し、10 mL のクエン酸水溶液（0.5%; w/v）を添加したのち、灰色に変化するまで反応を継続させた。その後、さらに 90 分間、加熱と攪拌を継続し、それらを室温まで冷却したものを Ag-citrate NPs 懸濁液とした。

### (2) ラマンスペクトルの取得

ラマンスペクトルの測定には、ラマン顕微鏡 [XploRAPLUS ; (株) 堀場製作所 (京都市)] を使用した。ダプトマイシンのラマンスペクトルの取得には、励起波長 532 nm のレーザーを使用した。

### (3) 薄層クロマトグラフィー (TLC) 板およびろ紙上でのダプトマイシンのラマンスペクトルの測定

TLC またはペーパークロマトグラフィーへ 3  $\mu\text{L}$  のダプトマイシン水溶液（1 mg/mL）を滴下し、ラマンスペクトルを測定した。また、その SERS 活性によるスペクトル強度の増強を期待して、ダプトマイシン水溶液を滴下したエリアに、20 倍に濃縮した Ag-citrate NPs 懸濁液を滴下し、ラマンスペクトルを測定した。

### (4) ダプトマイシンと Ag-citrate NPs の凝集体の作成

ダプトマイシン水溶液（1 mg/mL）、0.1~1000 mM NaCl 溶液および濃縮（5、10、20 倍）した Ag-citrate NPs を懸濁液それぞれ等量（100  $\mu\text{L}$  または 50  $\mu\text{L}$ ）で混合したのち、10  $\mu\text{L}$  の塩酸を加えて凝集体を作成した。それらを、96 穴のマルチウエル内、TLC 板上、スライドガラス上でそれぞれラマンスペクトルを測定し、ダプトマイシン特有のスペクトルが得られるか否かを確認した。

## 【結果および考察】

### (1) 対象薬物の選定とそのラマンスペクトルの確認

臨床的意義を加味して、ダプトマイシンを対象物とするよう改めた。ダプトマイシンの血中濃度は安全性評価の指標となり得るため、測定意義がある。また、血中濃度も  $\mu\text{g/mL}$  レベルと、昨年度、対象としていた 5-FU ( $\text{ng/mL}$  レベル) よりも高いため、ラマンスペクトル (SERS 活性) を活用した迅速な薬物血中濃度測定法の開発を実現するうえで、有利であると考えられた。スライドガラス上に載せたダプトマイシン粉末に  $532\text{ nm}$  の励起レーザーを照射することで、 $300\sim 1750\text{ cm}^{-1}$  付近に断続的に現れる複数のピークと  $2931\text{ cm}^{-1}$  のメジャーなピークを特徴とする、ダプトマイシンのラマンスペクトルが確認された。

### (2) TLC 板上およびろ紙上におけるダプトマイシンのラマンスペクトルの測定

TLC またはペーパークロマトグラフィーによる血漿からのダプトマイシンの分離を想定し、TLC 板およびろ紙に滴下したダプトマイシンのラマンスペクトルを測定した。しかしながら、ダプトマイシンに特有のピークやスペクトルは見られなかった。また、ダプトマイシンの滴下範囲に 20 倍濃縮した Ag-citrate NPs 懸濁液を  $3\text{ }\mu\text{L}$  滴下した際も、ダプトマイシンのラマンスペクトルは観察されなかった。

### (3) Ag-citrate NPs との凝集体を利用したダプトマイシンのラマンスペクトルの測定とそのスペクトル強度の濃度依存性の検討

先行研究 [Jing Liu., et al., ACS Omega. 2022; 7: 47634-47641.] を参考に、ダプトマイシン水溶液、Ag-citrate NPs、NaCl および塩酸を混合して凝集体を作成し、ダプトマイシンのラマンスペクトルが得られるか否かを確認した。マルチウェルプレートのウェル内において凝集体を作成したところ、凝集体が沈殿したことから、上層の溶解液を一部取り除いたうえで沈殿物へ  $532\text{ nm}$  の励起レーザーを照射した。その結果、 $2931\text{ cm}^{-1}$  をメジャーピークとするダプトマイシンに特徴的なラマンスペクトルを観察することができた。しかしながら、その強度が微弱であったことから、生成した凝集体を TLC 板上およびスライドガラス上へ載せたうえで  $532\text{ nm}$  の励起レーザーを照射したところ、高いメジャーピーク ( $2931\text{ cm}^{-1}$ ) を有するラマンスペクトルが観察され、それらの波長位置から、ダプトマイシンのラマンスペクトルであることが確認された。これらの手法を利用して、ダプトマイシンの濃度依存的にスペクトル強度も変化するか否かを確認したが、そのような変化は観察されなかった。その原因を探るべく、凝集体の様々な位置に励起レーザーを照射したところ、レーザーが照射される位置によって、得られるラマンスペクトルの強度が異なることが明らかとなった。

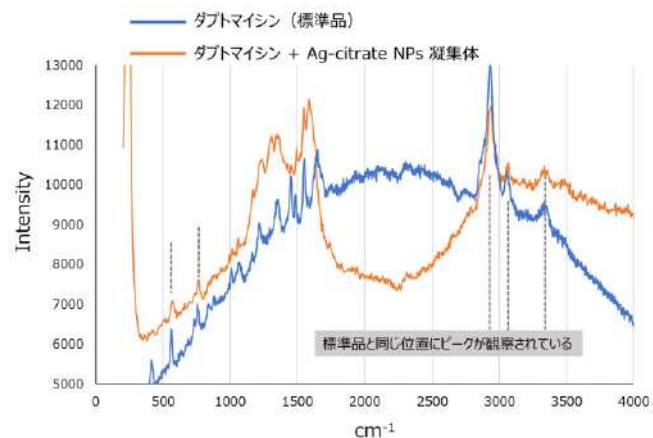


図1 ダプトマイシン (標準品) およびダプトマイシンとAg-citrate NPsの凝集体のラマンスペクトル

## 【まとめ】

2年間の研究を通じ、Ag-citrate NPs との相互作用を利用すれば、対象物のラマンスペクトルを取得できることがわかった。また、現行の手法では、Ag-citrate NPs と対象物の相互作用を再現よく、均一に発生させられていないこともわかった。ラマンスペクトル (または SERS) を活用した、簡便で迅速な薬物血中濃度測定法を開発するには、今後、これらの課題を克服する必要がある。