


超高磁場超高感度 NMR 装置利用による化合物のスクリーニング
利用成果報告書

公立大学法人横浜市立大学

機関名称	味の素(株)
部署名	ライフサイエンス研究所
代表者・印	榛葉 信久 
所在地	川崎市川崎区鈴木町 1-1
連絡先	TEL : 044-244-7145 FAX : 044-210-5872 E-mail nobuhisa_shimba@ajinomoto.com
利用区分	<input checked="" type="radio"/> 成果非専有利用 <input type="radio"/> トライアルユース
研究題目(利用課題名)	相互作用解析とその応用
研究目的及び内容(課題の内容)	<p>① 酵素の構造機能解析 産業上有用な酵素の NMR シグナルの帰属、および機能解析を行う。</p> <p>② タンパク質の解離状態の解析 カップリングパラメータを利用することによって、迅速に解離状態を明らかにする。酵素の活性や、タンパク質とリガンドの相互作用解析に応用できると考えており、共同研究として実施することを希望する。</p> <p>③ ヘパリン不純物解析 ヘパリンに含有する恐れのある不純物の有無を確認する。</p>
利用した NMR	<input type="radio"/> 900MHz <input type="radio"/> クライオプローブ付 700MHz
研究(利用)期間	<p>研究(利用)時期：平成 20 年 4 月 1 日～平成 21 年 12 月 31 日</p> <p>研究(利用)期間：総利用時間 3744 時間</p> <p>※ 当初計画から変更があった場合は、その理由を記入してください。</p>

研究(利用)成果・実績の概要

研究課題①～③のうち、③について詳細に報告する。①や②については、計画通りの進捗が得られなかったこともあり、現在も検討中である。

ヘパリンはグリコサミノグリカン重合によって形成された多糖であり、血液透析時の血液凝固の防止や血栓塞栓症の治療等、種々のケースにて抗凝血剤として使用されている。しかしながら、2008年初め、米国にて、ヘパリンを静脈内注射数分後に血管性浮腫や血圧低下、もしくはそれらに関連したアナフィラキシー様症状が現れ、患者が死亡する事例が報告された。これらはヘパリンに混入した不純物が原因とされ、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸が原因物質と考えられている。日本においても、2008年3月よりヘパリン製剤の一部回収が行われるなど大きな社会問題となった。

早期に問題の沈静化を図るために、当時、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の検出には NMR 法が提唱された。ヘパリンのアセチル基のプロトンシグナルが 2.04ppm に観測される一方、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸のアセチル基のプロトンシグナルは 2.15ppm であり、この化学シフト差を使って過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の存在を確認することができる。しかし、天然には ^{13}C が約 1.1% 存在しており、 ^{13}C に結合したプロトンのシグナル (サテライトシグナルと呼ぶ) が ^{13}C - ^1H のカップリング定数に応じて異なる化学シフトに観測される。過硫酸化されたコンドロイチン硫酸が含まれていなくても、ヘパリンのアセチル基由来のサテライトピークが 2.15ppm 近傍に観測されることがあり、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸とヘパリンのサテライトピークを識別する必要があった。

サテライトピークの観測される化学シフトは、 ^1H - ^{13}C カップリング定数に応じて決まる。ヘパリンのアセチル基由来のプロトンの場合、 ^1H - ^{13}C カップリング定数は 130Hz である。したがって、 ^1H の共鳴周波数 600MHz の装置にて測定した場合、 $130\text{Hz}/600\text{MHz} = 0.22\text{ppm}$ 、すなわち中心から $\pm 0.11\text{ppm}$ 分離したサテライトピークが観測される。つまり、ヘパリンのアセチル基由来のプロトンシグナルが 2.04ppm の場合、 $+0.11\text{ppm}$ の位置である 2.15ppm にサテライトピークの一方が観測されることになる。これが過硫酸化されたコンドロイチン硫酸のシグナルと重なるために、サテライトピークであることを証明することは、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸の存否を論じる上で重要なポイントとなる。

ただし、 ^1H の共鳴周波数の異なる NMR 装置にて測定すると、サテライトピークと過硫酸化されたコンドロイチン硫酸由来のピ

	<p>ークの化学シフトは、必ずしも重ならない。例えば、¹H の共鳴周波数 900MHz の装置では、$130\text{Hz}/900\text{MHz} = 0.14\text{ppm}$、すなわち中心から$\pm 0.07\text{ppm}$ となり、ヘパリンのアセチル基由来のプロトンシグナルが 2.04ppm の場合、2.11ppm にサテライトピークの一方が観測されることになる。同様に、800MHz、700MHz、500MHz の装置では、それぞれ 2.12ppm、2.13ppm、2.17ppm となる。米国の Food and Drug Administration より、2.13-2.17ppm の領域に観測されるシグナルが過硫酸化されたコンドロイチン硫酸である恐れがあると報告されている。したがって、¹H の共鳴周波数 500MHz から 700MHz の装置にて分析した場合、特にサテライトピークとの識別が重要となる。今回の NMR 施設利用を通じて、複数の磁場にて測定することによって、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸とサテライトピークの区別も可能となり、過硫酸化されたコンドロイチン硫酸がヘパリンに混入していないことを確認することができた。</p>
--	---

<p>社会・経済への波及効果の見直し</p> <p>※ 利用成果に基づくイノベーション創出性などについて記入してください。また、「トライアルユース」については、利用成果に係る分野の発展性や新分野開拓の可能性などを記入してください。</p>	<p>超高磁場超高感度 NMR 装置を利用した結果、ヘパリン不純物分析に NMR が有効であることが証明された。医療機関へのヘパリンの供給が大幅に減少する事態へと陥ったが、NMR 分析によって不純物の存在を確認することができるようになったことから、事態の改善へと結実した。尚、本内容に基づき、2008 年 7 月 31 日に日本薬局方が改正され、ヘパリンの NMR 分析が義務付けられている。また、薬学雑誌 (2008 年 10 月号) に速報として投稿し、本分析法について公開している。</p>
<p>公開延期の希望の有無</p> <p>※ 特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は、必ず事前に御相談ください。</p>	<p>() 有 () 無</p> <p>※ 「有」の場合、その理由を記入してください。</p>
<p>利用満足度 (複数選択不可)</p>	<p>() 大いに満足 () ほぼ満足</p> <p>() やや不満 () 大いに不満</p> <p>※ ユーザーサポート等で必要と考えられることがあれば記入してください。</p>

施設利用に係る感想・改善等	高磁場・高感度 NMR 装置を利用できたことに加え、NMR 装置が非常に良くメンテナンスされていた上、技術的な支援やスケジュール調整への柔軟な対応を受けることができ、感謝しております。
「文部科学省の共用ナビ」に対する感想・改善等	特になし。
今後の利用希望等	本施設の先進性には定評があり、今後の利用も検討したい。改めて課題を検討した後に、ご相談させて頂きたいと考えている。
その他（上記項目以外での御意見等）	

※ 本報告書については、印刷または必要な編集・加工を行った上で公開します。

※ 別途開催予定の利用成果報告会やシンポジウム等で、本報告書の内容についての資料作成や発表をお願いする場合があります。