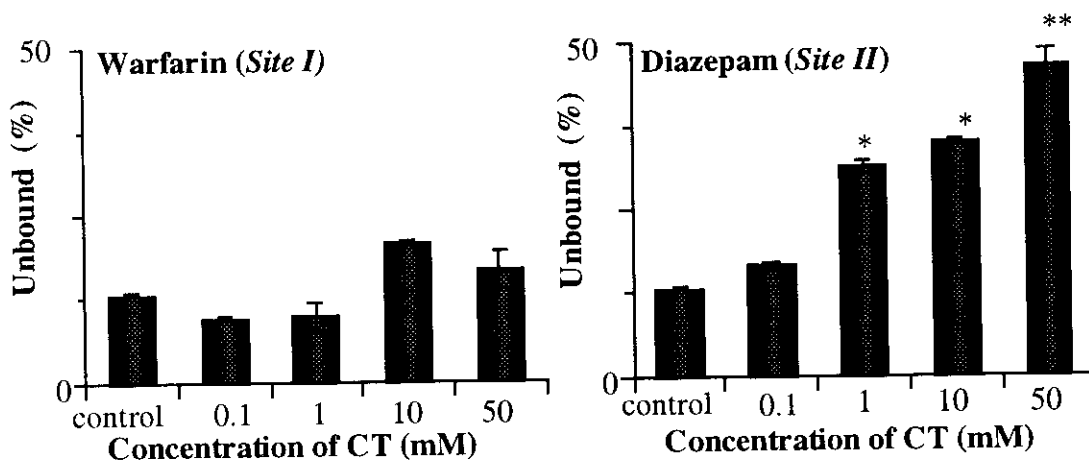
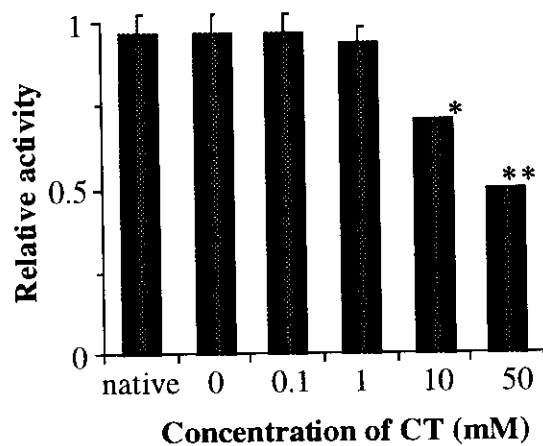


Fig.7 Effect of CT on far- and near-UV-CD spectra of HSAs



* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared with control

Fig.8 Effect of oxidation on binding of warfarin and Diazepam to HSA at pH 7.4 and 25°C



* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared with native-HSA

Fig. 9 Effect of CT on the esterase-like activity of HSAs

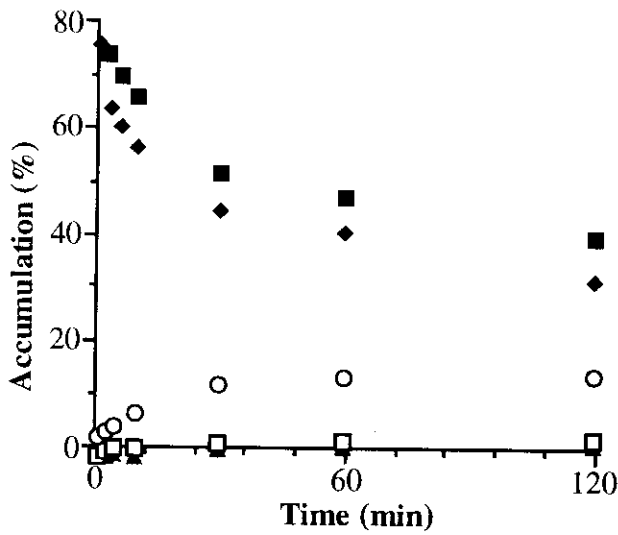


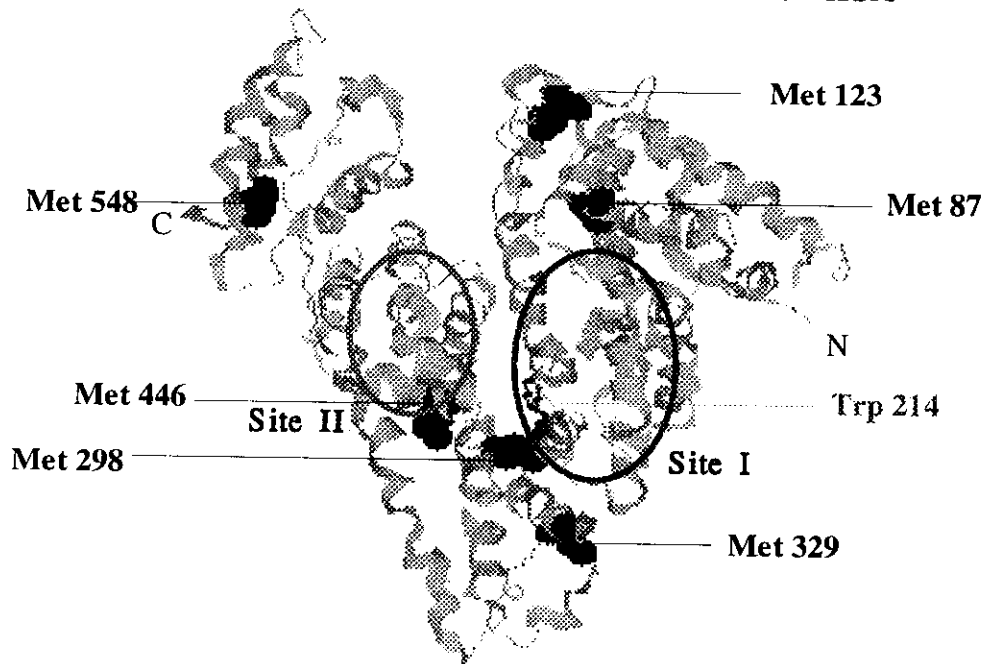
Fig.10 Plasma relative radio-activity of HSA of ^{111}In -native and ^{111}In -oxidized HSAs

Table 1 Half-life and accumulation of HSAs

| | T1/2 (β) | Liver uptake clearance |
|--------|------------------|-------------------------------|
| Native | 9.4 min | 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ |
| CT50mM | 4.0*min | 157* $\mu\text{L}/\text{min}$ |

* $p < 0.001$, compared with native-HSA

Scheme I. Location of methionine residues on HSA



抗酸化能を有する組換えアルブミンの創剤設計
—N-アセチル-L-トリプトファン(N-AcTrp)の抗酸化効果—

研究協力者 丸山 徹 ヒューマンサイエンス リサーチレジデント

研究要旨

現在、医薬品の製造現場では、アルブミンの熱変性及び凝集を防ぐ目的でカプリル酸ナトリウム(Capl)とN-アセチル-L-トリプトファン(N-AcTrp)の2種の添加剤が、HSAに対して約5倍の濃度で加えられている。しかしながら、HSA製剤中の安定化剤は経験的に選択されており、それら添加剤の本来の役割について未だ十分に明らかにされていない。本研究では、アルブミン製剤に安定化剤として添加されているCaplとN-AcTrpの役割について、N-AcTrpのインドール骨格が持つ抗酸化作用に着目し検討した。その結果、Caplでは、抗酸化効果は観察されないものの、CaplにN-AcTrpを併用させると、有意な抗酸化効果が観察された。

A. 研究目的

アルブミン製剤を含む蛋白製剤の大きな問題となっているのが、製造から使用までの保存性である。蛋白質の保存に対する外敵因子としては酸化が挙げられる。蛋白質の酸化は、生体内においては抗酸化物質や新陳代謝等により、な酸化変性を防御する役割を果たしているものの、アルブミン製剤中では、そのような防御因子は存在しない。N-AcTrpのインドール骨格がもつ抗酸化作用に着目し、N-アセチル-L-トリプトファン(N-AcTrp)の抗酸化効果について検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料

HSAは化学及血清療法研究所から恵与されたものをChenの方法にしたがって脂肪酸を除いた。脱脂後透析し、SDS-PAGEで単一バンドであることを確認した後に使用した。その平均分子量は66,500と仮定した。

2. HSA製剤の抗酸化評価

2-1. カルボニル含量

カルボニル含量をClimentらの方法にしたがって算出した。カルボニル呈色試薬Fluoresceinamineの蛋白質当たりの修飾量として表した。

2-2. メルカプト分率

HPLCは、グラジエント装置を装備した島津LC-4Aに島津SPD-2ASUV検出器及び島津C-R2AXクロマトグラフィー用データ処理装置を接続したものをを用いた。試料の溶離は、(A)0.05Mトリス-酢酸液 (pH7,0) から、(B)0.5M酢酸ナトリウムを含む0.05Mトリス-酢酸緩衝液 (pH7,0) への30分間の直線グラジエント法を用いて流速0.5mL/minで行った。試料の検出はUV波長280nmの吸収を利用し操作はすべて室温で行った。

2-3. NATIVE-PAGE

NATIVE-PAGEは、7.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いDavis法にしたがって行った。蛋白質の染色にはクマジーブリリアントブルーR-250を使用した。分子量マーカーとしては下記の蛋白質を用いた。 α -サイログロブリン (M.W.669000)、フェリチン (M.W.443000)、乳酸脱水素酵素

(M.W.139850)、ウシ血清アルブミン(M.W.66267)、トリプシンインヒビター(M.W.20100)を用いた。

C. 研究結果

1. ヒト血清アルブミンの酸化に及ぼす脂肪酸及びアミノ酸の影響

1-1. カルボニル含量

HSAに対し、過剰量の酸化剤2,2'-アゾビス(2-アミノプロパン)二塩酸塩(AAPH)を加え、HSAを酸化させた後のHSAのカルボニル含量の時間依存性から、抗酸化作用について評価を行った。更に、これまでに抗酸化作用を有すると報告されているL-Trp、N-AcCysについても、同様の検討を行った(Fig 1)。N-AcTrpにおいては、未添加時と比較して有意なカルボニル含量の減少が観察された。また興味深いことに、Cap1についても弱いながら抗酸化作用を示し、この抗酸化効果は、L-Trp及びN-AcCysよりも強いものであった。Naliniらは、脂肪酸はHSAと結合することにより金属触媒による酸化に対し、抗酸化作用を示すと報告している。金属触媒酸化及びAAPHの場合もその機序は未だ明らかではないが、脂肪酸結合に伴う構造変化によってHSAの酸化が抑制されているのかもしれない。また、Cap1とN-AcTrpの併用はN-AcTrpとCap1の作用を反映したためかHSAの酸化を顕著に抑制した。

1-2. NATIVE-PAGE

抗酸化効果についてNATIVE-PAGEを用いて検討を行った(Fig 2)。N-AcTrp、Cap1添加時においてはHSAのバンドのブロード化が抑制されていた。また、L-Trp、N-AcCysにおいてもN-AcTrp程ではないものの抑制していた。NATIVE-PAGEでは、蛋白質の表面の電荷がその移動度に反映することから、これら安定化剤が、酸化によ

るHSAの構造変化を惹起させ、HSAの構造が不均一になるのを防御しているものと推察された。

1-3.メルカプト分率

HSAはその構造中35個のCysを含んでいるが、このうち17対(34個)は分子内ジスルフィドを形成し、三つのドメインと九つのループの構築及び立体構造の保持に重要な役割を担っている。一方、³⁴Cysは唯一ジスルフィドを形成せず遊離形として存在している。この³⁴Cysは生体内ではそのままSH基が遊離しているものと、システインやグルタチオンと可逆的に共有結合していたり、スルフィン酸やシステイン酸に不可逆的に酸化された状態で存在している。³⁴CysのSH基が遊離しているものは、メルカプトアルブミンと言われ、SH基がマスクされているノンメルカプトアルブミンと区別されている。そこで酸化HSAにおける、³⁴Cysの存在状態について検討を行うため、安定化剤添加時のHSAの分子種の分離を杉井らが開発した4-VP-Meカラムを用いて検討した。Fig4-3に示す第1のピークはメルカプト型、第2のピークはシステインやグルタチオンとジスルフィドを形成しているノンメルカプト型、第3のピークはスルフィン酸やシステイン酸に酸化された酸化型を表す。AAPHにより酸化したHSAでは、メルカプト型の減少とノンメルカプト型の増大が認められた。HSAのメルカプトとノンメルカプトの存在率の変化は、Cap1を添加しても効果は認められなかった。しかし興味深いことに、Cap1とN-AcTrpを併用した場合、これらの変化は有意に抑制された。従来、N-AcCysやN-AcTrpは、抗酸化作用を示すことが知られているが、今回得られたカルボニル含量、NATIVE-PAGE及びメルカプト分率からN-AcCysは、その効果が全く認められなかった。N-AcCysの結合親

和性は、CapIやN-AcTrpに比べ、はるかに小さいことを考えると、CapIとN-AcTrp併用で観察されたCapIによるHSAの酸化抑制現象は、CapI自身の抗酸化作用というより、先に述べたように、ドメインIIIの構造的安定化とN-AcTrpの抗酸化作用が相加的に働き、結果として、酸化抑制現象が認められたものと思われる。

D. 考察

AAPHのHSAに対する酸化反応に及ぼす添加剤の影響をカルボニル含量、NATIVE-PAGE及びメルカプト分率を測定することにより評価した。その結果、CapIはAAPHのHSAに対する酸化を抑制しなかったものの、CapIとN-AcTrpの併用は、酸化を明らかに抑制した。しかしながら、抗酸化作用を有するといわれているN-AcCysで

は、全く抑制効果は認められなかった。これらの結果は、CapIによるドメインIIIの構造的安定化とN-AcTrpの抗酸化作用が相加的に働いたものと考えられる。

E. 結論

CapIとN-AcTrpの併用は、HSAの酸化を抑制することが明らかになったことから、現在、市販されているアルブミン製剤に処方されているCapIは、安定化剤として働き、N-AcTrpは保存的な役割を果たしているものと考えられた。長期的な構造的安定性の検討や安全性試験などの今後の課題は残すものの、これらの知見は、高品質なアルブミン製剤を構築する上で重要な基礎資料になるものと思われる。

F.研究発表

1.発表論文

Yamasaki K. Maruyama T. Otagiri M., et al. Circular dichroism simulation shows a Site-II-to-Site-I displacement of human serum albumin-bound diclofenac by ibuprofen. AAPS PharmSciTech, 2000: 1(2) article 12 (<http://www.pharmscitech.com>)

Tsutsumi Y. Maruyama T. Otagiri M., et al. Decreased bilirubin-binding capacity in uremic serum caused by an accumulation of furan dicarboxylic acid. Nephron. 85(1):60-64, 2000

Anraku M. Yamasaki K. Maruyama T. Otagiri M.
Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin
Pharm Res. 18 in press 2001

2.学会発表

H.Watanabe, S.Tanase, K.Nakajou, T. Maruyama, U.Kragh-Hansen, M.Otagiri.
ROLE OF Arg410 AND Tyr411 IN HUMAN SERUM ALBUMIN FOR LIGAND BINDING
AND ESTERASE-LIKE ACTIVITY
MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES
April 16-20, 2000 San Francisco

M.Anraku, K.Yamazaki, T.Maruyama, M.Otagiri.
EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM
ALBUMIN
MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES
April 16-20, 2000 San Francisco

西 弘二、丸山 徹、小田切優樹
膜-水相界面における α_1 -酸性糖蛋白質の構造特性と薬物結合能
蛋白合同年会 東京2000 2000. 6.7~10、東京

渡邊博志、棚瀬純男、丸山徹、小田切優樹
ヒト血清アルブミンの薬物輸送性及びエステラーゼ様活性に対するArg-410、Tyr-411の
機能検索
蛋白合同年会 東京2000 2000. 6.7~10、東京

中城圭介、渡邊博志、棚瀬純男、丸山徹、小田切優樹
部位特異的変異法によるヒト血清アルブミン分子上の薬物結合サイト(サイトI)のトポロ
ジー解析

蛋白合同年会 東京2000 2000.6.7~10、東京

T.Maruyama, M.Otagiri.

Topology Analysis of SiteII, a Major Drug Binding Region on Human Serum Albumin
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

M.Anraku, K.Yamazaki, T.Maruyama, U.Kragh-Hansen, A. Suenaga and M.Otagiri.

EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM
ALBUMIN
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

H.Watanabe, S.Tanase, K.Nakajou, Y.Iwao, M.Mitarai, T. Maruyama,
U.Kragh-Hansen, M.Otagiri.

CHARACTERIZATION OF WARFARIN BINDING SITE ON HUMAN SERUM ALBUMIN
USING SITE-DIRECTED MUTAGENESIS
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

Y.Uryu, Y.Tsutsumi, N.Takamura, T. Maruyama, A.Suenaga and M.Otagiri.

AN ATTEMPT TO OVERCOME DIURETIC RESISTANCE TO FUROSEMIDE IN PATIENTS
WITH NEPHROTIC SYNDROME BY COADMINISTRATION OF BUCOLOME
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

T. Komori, H. Kai, K.Shimoishi, A. Nonaka, T. Maruyama and M.Otagiri.

CLARITHROMYSIN UP-REGULATE α_1 -ACID GLYCOPROTEIN EXPRESSION IN LIVER
AND CULTURED HAPATOCYTES
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

渡邊博志、棚瀬純男、中城圭介、岩尾康範、御手洗万希、丸山徹、Ulrich Kragh-Hansen、
小田切優樹

部位特異的変異法によるヒト血清アルブミン分子上の薬物結合サイトのトポロジー解析
第15回日本薬物動態年会 2000.10.11~13 福岡

鶴崎泰史、渡邊博志、御手洗万希、丸山 徹、末永綾香、小田切優樹

ヒト血清アルブミンの安定性に及ぼす中鎖脂肪酸と芳香族アミノ酸の影響

日本薬剤学会第16年会 2001.3.22～24 東京

瓜生幸恵、堤 泰寛、高村徳人、丸山 徹、小田切優樹
ブコローム併用投与によるフロセミド利尿耐性の克服の可能性
日本薬剤学会第16年会 2001.3.22～24 東京

安楽 誠、山崎啓之、丸山 徹、高倉喜信、小田切優樹
酸化ヒト血清アルブミンの体内動態特性
日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28～30 札幌

渡邊博志、Ulrich Kragh-Hansen、Anders Overgaard Pederson、中城圭介、岩尾康範、丸山
徹、棚瀬純男、小田切優樹
ヒト血清アルブミン分子上の脂肪酸結合サイトのトポロジー解析
日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28～30 札幌

小田切優樹、櫻井裕治、肱岡基樹、渡邊博志、丸山 徹、黒野幸久、
アルブミンのエステラーゼ様活性の種差に関する構造化学的考察
日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28～30 札幌

中城圭介、渡邊博志、棚瀬純男、丸山徹、小田切優樹
ヒト血清アルブミンの構造と機能に及ぼす非酵素的糖付加反応(グリケーション)の影
響
日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28～30 札幌

西 弘二、丸山 徹、小田切優樹、半田哲朗
脂質二重膜との相互作用に伴う α_1 -酸性糖蛋白質の構造特性と薬物結合能の変化
蛋白合同年会 東京2000 2000.6.7～10、東京

G.知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

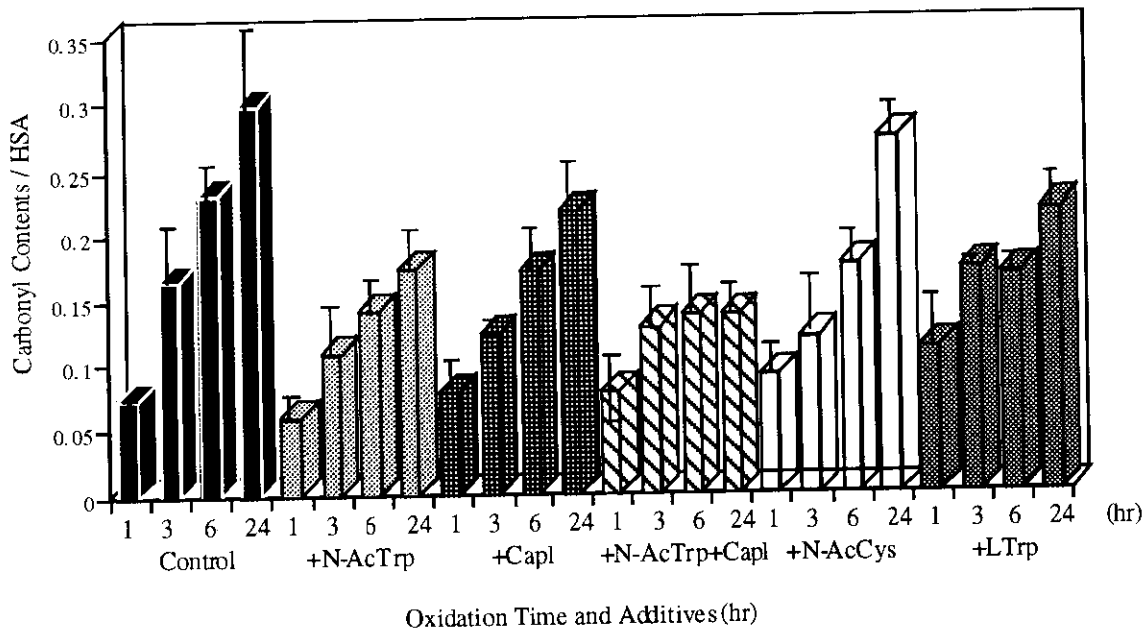


Fig.1. Change in carbonyl contents of HSA by oxidant
 The following concentrations were used ;[HSA]= 50 μ M,
 [AAPH]=10mM , [additives]=250 μ M
 Each sampling time is 1, 3, 6, 24hr
 These experiment performed at pH7.4,37 $^{\circ}$ C.
 All values are mean \pm S.D.(n=4)

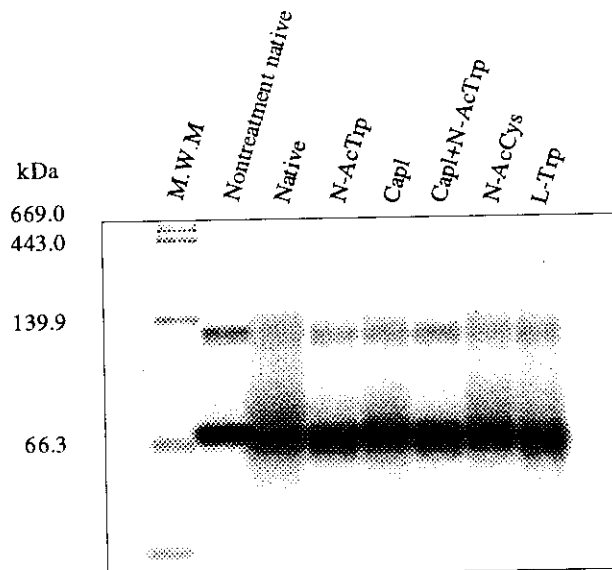


Fig.2. Effect of oxidation on the mobility of HSA in the absence and presence of additives
 The following concentrations were used ;
 [HSA]=50 μ M, [Oxidant]=10mM.
 HSA was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 48hr.
 M.W.M; Molucular weight marker.

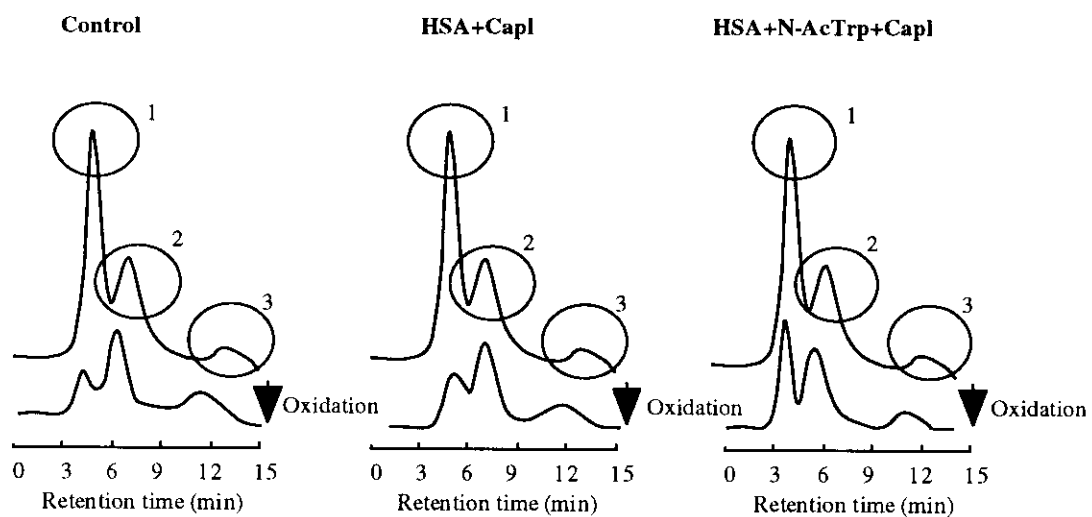


Fig.3. HPLC chromatograms of HSA in the absence and presence of CapI and N-AcTrp
 1: mercapto form, 2: nonmercapto form, 3: oxidized form.