

2008 08007A

厚生労働科学研究費補助金

— 平成 20 年度 創薬基盤推進研究事業
(政策創薬総合研究事業)—

**赤血球・酸素輸液の有効利用を目的とした
ヒト組換え型アルブミン修飾製剤の開発**

(研究課題番号:H18-創薬-一般-025)

総括・分担研究報告書

主任研究者 末松 誠

慶應義塾大学医学部 教授

平成 21(2009)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

— 平成 20 年度 創薬基盤推進研究事業
(政策創薬総合研究事業)—

赤血球・酸素輸液の有効利用を目的とした
ヒト組換え型アルブミン修飾製剤の開発

(研究課題番号:H18-創薬-一般-025)

総括・分担研究報告書

主任研究者 末松 誠

慶應義塾大学医学部 教授

平成 21(2009)年 3 月

総括・分担研究報告書： 目次

I 総括研究報告

末松 誠 慶應義塾大学医学部 教 授 7

片山 富博 愛媛大学医学部 講 師

II 分担研究報告

Ryon Bateman 慶應義塾大学医学部 講 師 13

中城 圭介 (株)ニプロ医薬品研究所 主任研究員 18

III 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV 研究成果の刊行物・別刷 27

Ⅰ 総括研究報告

PEG-rHSA の出血性ショックに対する有効性の評価

主任研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部 医化学教室 教授
分担研究者 片山富博 愛媛大学医学部附属病院 周産母子センター 講師

研究要旨：本研究は「PEG-hrAlb を救急救命で使用可能な酸素供給補助製剤」として確立することを目的とし、脳・肝臓等の臓器微循環機能評価を独自に開発した単一微小血管酸素分圧計測技術・組織 NO 生成バイオイメージング計測技術及び体内残存赤血球のメタボローム解析などの最先端技術を駆使してその性能評価を行う。本研究の特色はわが国固有の技術である量産可能なヒト組換え型アルブミンを PEG で修飾した複合体を安全且つ確実に血液粘度を上げることのできる製剤として計画当初から創製し、その結果として前臨床試験の段階からヒトに応用可能な製造条件を設定して性能を評価できる点である。本分担研究では本製剤が出血性ショック状態に対して有効であるかを評価するために、異なる鎖長をもつ PEG-rHSA を用いた出血性ショックモデルラットの蘇生実験を行った。

A. 研究目的

酸素輸液と通常の血管拡張剤の併用は低酸素領域以外の抵抗を増加させいわゆる Steal phenomenon を惹起するため、ショック時の臓器低灌流の改善法として適切とは言えない。本研究は「PEG-hrAlb を救急救命で使用可能な酸素供給補助製剤」として確立することを目的とし、出血性ショック状態モデルを作製して輸液を行い、有効性を検討した。

B. 研究方法

B-1 実験に用いた動物と処置法

慶應義塾大学にておいて行われた実験については慶應義塾大学動物実験委員会の承認を受け、実験指針に基づき実施された。

B-2 PEG-rHSA の調製

rHSA(25 wt%)を透析膜 (MWCO : 12 kDa-14 kDa) を用いて 6 時間透析し、その後安定化剤を除去した。rHSA(1 wt%, 50 mL, in PBS)に対して PEG(5 or 10 kDa)粉末を 40 等量混合、12 hrs 攪拌後、限外濾過 (MWCO: 50 kDa, in saline) にて精製し、PEG(5 or 10 kDa)-rHSA(in saline)を得た。

rHSA に対する PEG の結合本数は MALDI-TOF MS を用いて測定した。得られた分子量から PEG は 10kDa および 5kDa において rHSA に対して約 12 本結合していると推察された。粘度計を用いて 37°C 条件下で測定し、得られた粘度から流体力学半径(R_h)を算出した。膠質浸透圧(COP)はコロイド浸透圧計 (MWCO:30 kDa) にて測定した。

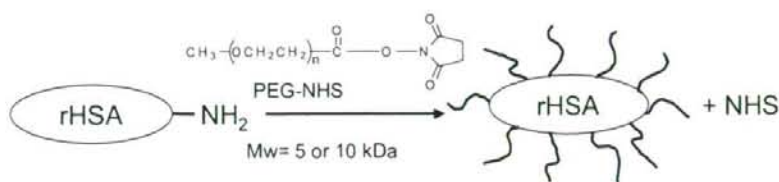


図1. PEG-rHSA の調製法

表1. PEG-rHSA の物性

	rHSA	PEG(5kDa)-rHSA	PEG(10kDa)-rHSA		
Mw	66500	136500	186500		
R _h	3.05	6.73	8.85		
[rHSA](wt%)	1.34	5.00	1.34	0.67	1.34
Viscosity(cP) at 3160 s ⁻¹	0.67	0.95	1.23	1.42	3.00
COP(mmHg)	3.1	17.2	13.9	27.6	63.3

B-3 出血性ショックモデルラットの作成

PEG-rHSA の血漿増量剤としての有効性を評価するため、出血性ショックモデルラットを作製し、出血性ショック状態からの輸液による蘇生効果を検討した。実験対象は Wistar 雄性ラット（6~7 週齢、日本クレアより購入）を一晩絶食にしたものを用いた。ジエチルエーテルにより麻酔導入後、イソフルランにて全身麻酔し、仰臥位に固定した。直腸温センサーにより体温をモニターし、接続したヒーティングランプの照射により体温を維持した。また、左大腿動脈にカニューレーションを行い、血圧測定に用いた。右大腿動脈および大腿静脈にカニューレーションを行い、それぞれ脱血および輸液用のラインを接続した。血圧が約 80 mmHg となるように麻酔濃度を調節し、安定させた後、全血液量（56 mL/kg と仮定）の 40% を 5 分かけて脱血し、ショック状態とした。脱血終了から 30 分後に脱血量と同量の輸液を 5 分かけて投与し、その後 3 時間、血圧の変化を観察した。また、輸液投与の 5 分前と投与終了後 30 分後に右大腿動脈から約 100 μL 採血し、血液ガスを測定した。

C. 研究結果および考察

C-1 PEG-rHSA の粘性特性

年度計を用いて粘性を評価した結果、rHSA に PEG を結合させることにより流体力学半径を大きくすることができ、更に粘度や膠質浸透圧も大きく向上させることが明らかになった（表1）。

C-2 出血性ショック状態への PEG-rHSA の有効性

脱血後には血圧は 20~35 mmHg まで下降し、その後緩やかに上昇傾向を見せた。これは血圧の下降に伴って相対的に膠質浸透圧の効果が高まり、血管内に水を引き込んで血圧を回復したことによると考えられる。輸液を投与することで、速やかに血圧は上昇し、その後、緩やかに下降した(図. 2)。輸液直後の血圧の上昇に差はみられるものの、輸液 3 時間後にはいずれもほぼ同じ値となった。1.34% の rHSA を投与したものは 3 時間以内でも 80% 程の高い死亡率となったが、5% の rHSA を投与した場合は全例が生じた。PEG(10kDa)-rHSA を投与した場合も高い生存率が得られた。よって出血性ショック状態の回復には膠質の投与が有

表 2 出血性ショックラットの血液ガスの測定

	Baseline	25min after Shock	30min after Resuscitation				
			rHSA 1.34 %	rHSA 5 %	PEG(5kDa)-rHSA 1.34 %	PEG(10kDa)-rHSA 0.67%	PEG(10kDa)-rHSA 1.34%
pH	7.34 ± 0.04	7.28 ± 0.08 [†]	7.33 ± 0.08 [‡]	7.35 ± 0.06	7.32 ± 0.06	7.35 ± 0.04	7.35 ± 0.06
BE(mmol/L)	2.2 ± 1.9	-8.5 ± 3.0 [†]	-1.5 ± 1.3 [‡]	-2.0 ± 3.4 [‡]	-4.3 ± 7.4	0.7 ± 0.6 [‡]	3.0 ± 2.8 [‡]
PaO ₂ (mmHg)	65.9 ± 13.0	85.4 ± 6.2 [†]	78.5 ± 9.9	67.3 ± 10.1 [‡]	73.0 ± 3.6	72.7 ± 4.5	63.5 ± 10.6 [‡]
PaCO ₂ (mmHg)	51.8 ± 4.5	38.9 ± 2.8 [†]	47.1 ± 11.2 [‡]	42.7 ± 10.7 [‡]	41.1 ± 6.7	46.9 ± 6.4	51.9 ± 13.9
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	27.9 ± 1.6	18.2 ± 2.2 [†]	24.5 ± 0.8 [‡]	23.7 ± 3.5 [‡]	21.7 ± 6.2	26.0 ± 1.2 [‡]	28.2 ± 3.8 [‡]
tCO ₂ (mmol/L)	29.4 ± 2.0	19.4 ± 2.6 [†]	26.0 ± 1.0 [‡]	25.0 ± 3.6 [‡]	23.0 ± 6.2	27.3 ± 1.5 [‡]	30.0 ± 4.2 [‡]
Na ⁺ (mmol/L)	138 ± 1	134 ± 4 [†]	135 ± 0 [‡]	138 ± 3	135 ± 2	137 ± 1	137 ± 1 [‡]
K ⁺ (mmol/L)	3.9 ± 0.4	5.8 ± 1.8 [†]	5.5 ± 0.6	5.1 ± 1.4	6.5 ± 1.1	4.6 ± 0.3	5.3 ± 0.1
iCa ²⁺ (mmol/L)	1.25 ± 0.02	1.30 ± 0.05	1.43 ± 0.01	1.23 ± 0.07	1.25 ± 0.17	1.36 ± 0.09	1.31 ± 0.18
Hct(%)	43.5 ± 2.8	33.3 ± 6.5 [†]	21.5 ± 3.4 [‡]	23.3 ± 5.2 [‡]	23.0 ± 3.5 [‡]	23.7 ± 2.1 [‡]	23.0 ± 1.4 [‡]

[†] P < 0.05 compared to Baseline.

[‡] P < 0.05 compared to shock.

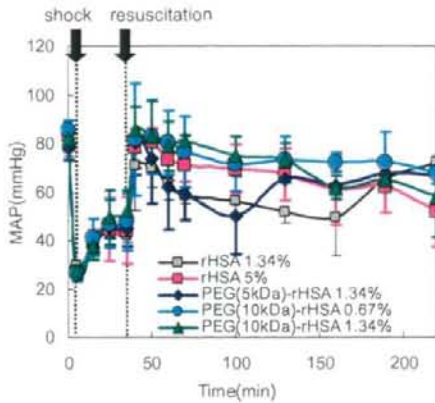


図 2 出血性ショックモデルラットの
血圧の測定 (n=4-5)

効であることが明らかとなった。

血液ガスの測定結果を表 2 に示した。Hct 値はおよそ 23% に低下し、置換モデルとして有効であることが分かる。ショック時には循環血液量が不足するため、BE が大きくマイナスに傾き、顕著なアシドーシスを示したが、輸液の投与後はいずれの場合も概ね改善する傾向をみせた。

これらの結果から、出血性ショック時に PEG-rHSA を投与した場合には rHSA を投与した場合と比較して、より少ない濃度でもほぼ同様の効果が得られるであろうことが示された。

D. 結論

血圧の測定、血液ガスの測定から、出血性ショックモデルにおいて、PEG-rHSA は rHSA と比較して少ない濃度で状態を回復させ維持できることが示された。今後、最適な輸液量を決定するために更なる検討が必要である。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

Shintani, T., Iwabuchi, T., Soga, T., Kato, Y., Yamamoto, T., Takano, N., Hishiki, T., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakuragawa, T., Ishikawa, K., Goda, N., Kitagawa, Y., Kajimura, M., Matsumoto, K., Suematsu, M. Cystathionine β -synthase as a carbon monoxide-sensitive regulator of bile excretion. *Hepatology* 49, 141-150, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

H. 謝辞

本実験は早稲田大学理工学部研究生の久我和寛君に多大なるご協力を頂きました。

II 分担研究報告

Application of Metabolome Analysis to Inflammation biology

分担研究者 Ryon Bateman, PhD 慶應義塾大学医学部 医化学教室 講師

Inflammation is one of key factors to regulate the blood flow in microcirculation when the PEG-rHSA is administrated in living body. Systemic inflammation caused by bacterial infection of the blood may lead to multiple organ failure and death. Both clinical and experimental evidence suggest that blood clots are associated with microvascular dysfunction that contributes to multiple organ failure and death by altering local oxygen delivery and metabolism. Here we focused two projects, 1) the role of nitric oxide in modulating fibrin blood clots and 2) the effect of systemic inflammation on organ metabolism and function, to determine the relationship between the gaseous molecules and the distributions in microcirculation. These basic experiments help to understand the character of PEG-rHSA in microcirculation.

A The Effect of Nitric Oxide (NO) on Fibrin Polymerization and Clot Structure

A-1 Introduction:

Fibrin networks form from fibrinogen when thrombin cleaves fibrinopeptides from the central region of fibrinogen, allowing intermolecular interactions to occur which generate insoluble fibrin polymer. Individual fibrin monomers lengthen into protofibrils, which then aggregate laterally to make fibers that ultimately branch to form the final three-dimensional fibrin clot structure. Subsequently, factor XIII, a plasma transglutaminase with a highly reactive cysteine residue, covalently binds one fibrin monomer to another thereby strengthening and stabilizing the clot against mechanical stress. In this study, we tested the hypothesis that nitric oxide would inhibit fibrin polymerization.

A-2 Methods:

Human blood from healthy volunteers was collected in acid citrate dextrose tubes and centrifuged to produce platelet poor plasma (PPP). Fibrin polymerization reactions were carried out at 37C in PPP supplemented with calcium. The sample was mixed with thrombin and incubated at 37C in the dark. To acquire high resolution images of fibrin clot networks we used laser scanning fluorescence multiphoton microscopy. Fluorescent images were acquired using a Leica confocal microscope and a ti:sapphire fs pulsed laser and processed using MATLAB. TIFF images were binarized and analyzed for changes in structural heterogeneity using statistical methods.

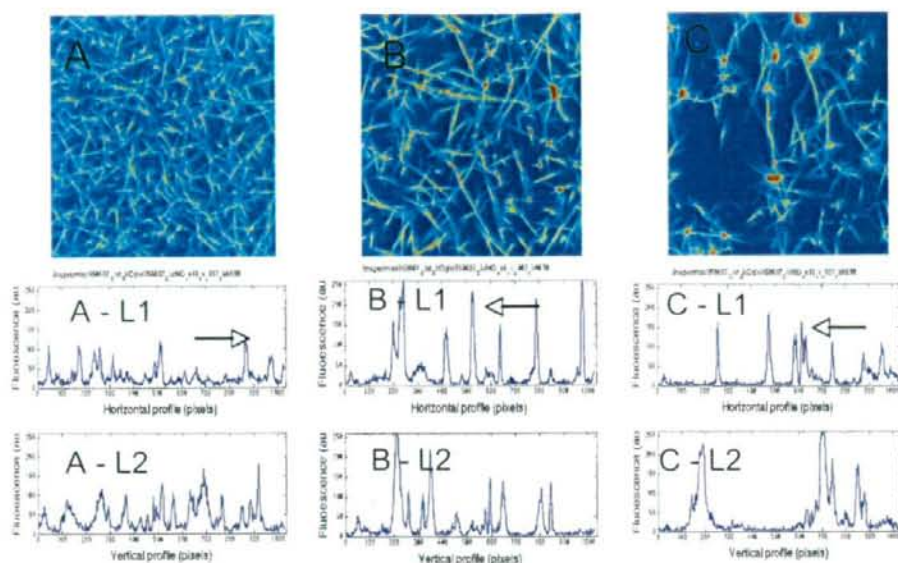


Figure 1. Panels A-C show multiphoton images of fibrin clots formed under conditions of increasing nitric oxide. Panels A-L1:A-L2 show fluorescent profiles for horizontal and vertical profiles, respectively.

A-3 Results:

Figure 1 shows a series of optical sections depicting the effect of increasing nitric oxide concentration on fibrin clot formation. Panel A shows a fully developed native *in vitro* fibrin clot 10 minutes after addition of thrombin. Clot morphology is characterized by high lineal fibrin density, low porosity (minimum spacing between fibrin fibers) and relatively thin fibrin fibers (fluorescence peak heights < 100, panels (A-L1:A-L2)). As nitric oxide concentration increased (panel B and C), fluorescence peak intensity of individual fibrin fibers increased to more than double that of control indicating that fibrin fibers had become relatively thicker. The appearance of long unbranched fibrin fibers also suggested that fibrin cross-linking had also been inhibited, consistent with the known NO inhibition of FXIII.

A-4 Discussion:

Fibrin clots are a normal part of wound healing, but can lead to serious vascular complications in conditions like deep venous thrombosis and systemic inflammation. In this study, we observed that nitric oxide inhibits fibrin clot formation. Potential nitrosation targets responsible for clot inhibition include factor XIII and the fibrinogen molecule itself. This may be of therapeutic benefit to clinical patients, provided NO delivery can be targeted to specific clot locations. Additional research will be required to develop and optimize such delivery systems.

B The Effect of Systemic Inflammation on Intermediate Carbohydrate Metabolism in the Heart and Liver

B-1 Introduction:

In the initial phase of sepsis, patients may die from cardiovascular collapse including myocardial failure. Several mechanisms have been proposed including mitochondrial dysfunction, abnormal microvascular oxygen delivery, and tissue hypoxia/anoxia. It is significant that each proposed mechanism impacts on organ metabolism; yet, these effects are unknown and the interaction between organs is not understood. The HIF-1 α transcription factor regulates cellular response to hypoxia. In this study we tested the hypotheses: 1) that systemic inflammation induces a change in intermediary carbohydrate metabolism in the heart and liver, 2) that heart metabolism is coupled to HIF-1 α mediated liver function and 3) that depressed heart function can be reversed by modulating substrate availability.

B-2 Methods:

25-30 gram c57BL6 control and HIF-1 α (hepatocyte) conditional knock out mice (HIF-1 α $-/-$) were injected with lipopolysaccharide (LPS/*E. Coli*) to induce a systemic inflammatory response. At 6 hours post LPS, C13-pyruvate was injected and after 20, 40 and 60 minutes heart function (ejection fraction (EF) determined by echocardiography) and plasma, heart and liver tissue harvested for metabolomic analysis. Labeled and non-labeled metabolites were analyzed using capillary electrophoresis-mass spectrometry. An important advantage of this analytical procedure is that it can determine over a 150 charged species in a single sample generating a unique metabolic profile or fingerprint. In brief, heart and liver tissue was homogenized in cold methanol, deprotei-

nized with 300 μ M L-methionine sulfate, which also acted as an internal standard, and filtered. The filtrate was analyzed by CE-MS using an Agilent CE Capillary Electrophoresis System equipped with an air pressure pump, an Agilent 1100 series MSD mass spectrometer and an Agilent 1100 series isocratic high performance liquid chromatography pump (Agilent Technologies). Data acquisition and data evaluation were performed using G2201AA Agilent ChemStation software. Using this metabolomics approach, the metabolic fate of pyruvate can be followed (flux-ome analysis) and correlated to heart function.

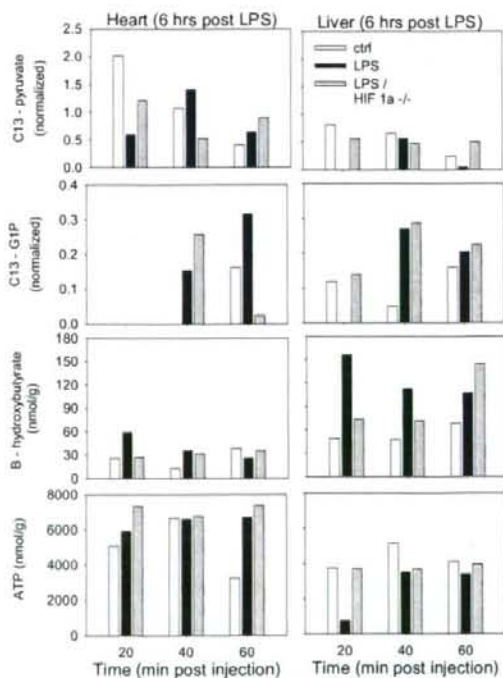


Figure 2. Time course of selected metabolites. Six hours after administration of LPS, C13-pyruvate was injected into c57BL6 control and HIF-1 α $-/-$ (hepatocyte) mice. Metabolites determined using capillary electrophoresis – mass spectrometry.

B-3 Results:

Key result: Figure 2 shows the time course of C13-pyruvate, two intermediate metabolites (C13-G1P and β -hydroxybutyrate) and ATP following injection of C13-pyruvate into mice exposed to LPS for six hours. Pyruvate was preferentially taken up by the heart, but delayed in LPS mice compared to control. The accumulation of C13-G1P in the septic heart by 60 minutes suggests that glucose is being stored in the septic heart compared to control, but not in the liver. In contrast, the septic liver produces β -hydroxybutyrate, while the heart does not. By 60 minutes, myocardial ATP levels have increased, while liver ATP levels remain unchanged from control.

These findings point to a differential metabolic response between the liver and heart during the onset of sepsis. Moreover, and of possible significance for treating heart dysfunction, ATP levels increased in both septic and HIF-1 α *-/-* mice compared to control. Preliminary findings indicate that heart ejection fraction increases modestly.

B-4 Discussion:

Bacterial infection leading to sepsis results in a complex pathophysiology that affects multiple organs. In this study, we found preliminary evidence that both liver and heart metabolism are altered. Consistent with other reports, glucose may actually be stored in the septic heart as G1P and UDP-glucose levels accumulate. The mechanisms responsible are unknown, and will require further investigation. The observation that G1P and UDP-glucose fail to accumulate in the heart of HIF-1 α *-/-* mice suggests that liver function may indirectly affect heart metabolism. While the liver does not appear to accumulate glucose, it does generate β -hydroxybutyrate which can be used as an alternative energy substrate. This suggests that the liver is producing alternative energy

substrates during sepsis. Our preliminary finding that pyruvate can modestly increase heart function, is promising because it suggests that depressed heart function is reversible, which, may be of clinical benefit to the septic patient.

C Information for Safety :

N/A

D Publications:

Bateman RM, Sharpe MD, Goldman D, Lidington D and Ellis CG. Inhibiting Nitric Oxide Overproduction during Hypotensive Sepsis increases local oxygen consumption in Rat Skeletal Muscle. *Crit Care Med.* 36(1): 225-231, 2008.

Boyd JH, Chau EH, Tokunaga CT, **Bateman RM**, Haljan G, Davani ES, Wang Y, Walley KR. Fibrinogen decreases cardiomyocyte contractility through an ICAM-1 dependent mechanism. *Critical Care.* 12(1):R2, 2008.

ABSTRACTS (*peer reviewed)

***Bateman RM**, Ohmura M, Nagahata Y, Hishiki T and Suematsu M. Endotoxemia induces an early differential metabolic response in the heart and liver as determined by metabolomic analysis. *Critical Care* 12(2):S155,2008. 28th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brussels, Belgium, March 18-21, 2008.

Bateman RM, Obata R, Nagahata Y, Ohmura M, Hishiki T, Suematsu M. Endotoxemia induces a differential metabolic response in the heart and

liver as determined by metabolomic analysis. (*Accepted for presentation, Experimental Biology, NO, USA, Apr 2009*)

E Intellectual Property Right:

N/A

PEG-rHSA の安定性評価

分担研究者 中城圭介 ニプロ株式会社 医薬品研究所 製剤研究部 主任研究員

研究要旨： ショック時に投与される赤血球輸液及びヘモグロビン由来酸素輸液は、一般に血液粘度が十分に増加せず、重症のショック状態では循環不全を惹起する懸念がある。本研究は血液粘度を高めることが示唆されている PEG-rHSA を救急救命で使用可能な酸素供給補助製剤として確立することを目的とする。医薬品として PEG-rHSA を開発するには、その薬理効果と併せて製剤の安定性評価を行い、製剤処方確立、更にその結果に基づいて保存条件や有効期間を設定することが必要である。本分担研究では、PEG-rHSA の 40°C 及び 60°C の保存条件での安定性、120 万 lux·hr の曝光条件での光安定性について評価を行った。試験項目として、HSA の構造について情報を与える蛍光スペクトル、CD スペクトルを選択した。40°C 及び 60°C での保存、光照射した試料で蛍光スペクトルの減少が認められた。CD スペクトルの結果から、60°C 保存では α ヘリックス構造の減少と 3 次構造の崩れが観察された。今回得られた結果より、PEG-rHSA は、遮光下で冷蔵または冷凍で保存することが必要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

出血性ショック病態では、赤血球による酸素・二酸化炭素などのガス交換機能不全以上に、血液粘度の低下により生じる微小血管灌流不全が重症度決定因子になると考えられている。すなわち、ショック病態において電解質輸液投与だけでは血液希釈が生じ血液粘度が十分に増加しないため、血管機能改善が図れない懸念がある。したがって、本研究は赤血球輸液及びヘモグロビン由来酸素輸液の補助製剤として、血液粘度を適正に是正することが示唆されている PEG-rHSA の応用を目的として企図された。

PEG-rHSA を医薬品として開発するには、その薬理作用に加え、製剤の安定性も重要な検討項目である。すなわち、製造後、その流通から投与に至る過程で曝される温度、湿度、光等の様々な環境要因の影響の下での品質の経時変

化について評価する必要がある。

本年度の研究は、PEG-rHSA 原薬の安定性に関する基本情報を得ることを目的に、40°C 及び 60°C における保存安定性及び 120 万 lux·hr の曝光条件での光安定性について評価を行った。

B. 研究方法

B-1 蛍光スペクトル

蛍光スペクトルは日本分光製 FP-770 型分光蛍光光度計を用いた。HSA 濃度として 15 μ M（リン酸塩緩衝液、pH 7.4）に調製し、励起波長を 295 nm に設定し、310~390 nm における蛍光を測定した。

B-2 CD スペクトル

Jasco J-720 型分光偏光計を用いた。遠紫外領域の CD スペクトルは、HSA 濃度を 1.5 μ M（リ

ン酸塩緩衝液, pH 7.4) に調製し, 1 mm セル

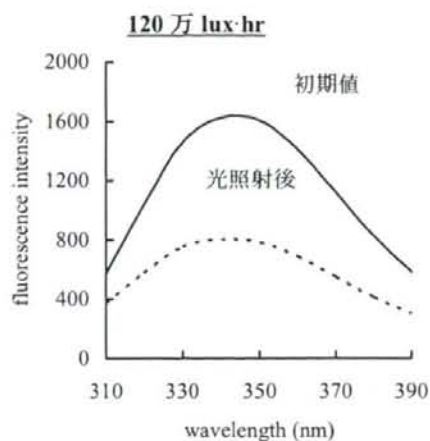
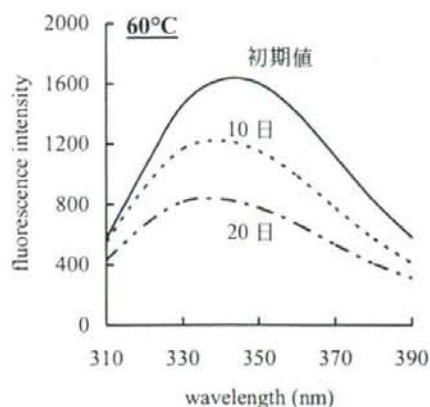
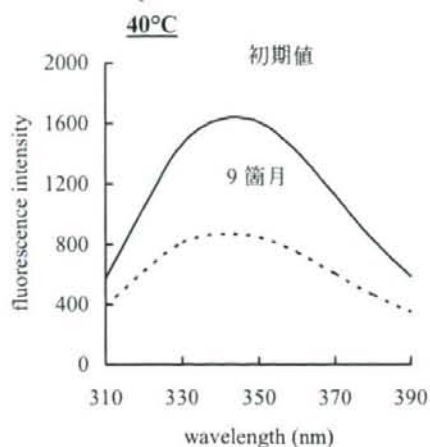


図 1 PEG-rHSA の各保存条件下での
蛍光スペクトルの変化

を用いて行った。測定条件は以下の通りである。

測定波長：250~200 nm
sensitivity：500 mdeg
scan speed：5 nm/min
time constant：8 sec
step resolution：1
accumulation：0.5 nm

測定波長：300~250 nm
sensitivity：20 mdeg
scan speed：10 nm/min
time constant：8 sec
step resolution：0.5 nm
accumulation：3

また、近紫外領域の CD スペクトルは、HSA 濃度を 15 μ M (リン酸塩緩衝液, pH 7.4) に調製し, 10 mm セルを用いて行った。測定条件は以下の通りである。

C. 研究結果および考察

C-1 蛍光スペクトル

保存中の PEG-rHSA の質的变化を検出する分析手段として、HSA に唯一存在する 214 Trp 由来の蛍光スペクトル評価を行った。その結果、図 1 に示されるように PEG-rHSA は温度負荷及

び光照射により蛍光強度が低下することが明らかとなり、²¹⁴Trp 近傍のマイクロ環境の構造変

化が引き起こされていることが示唆された。

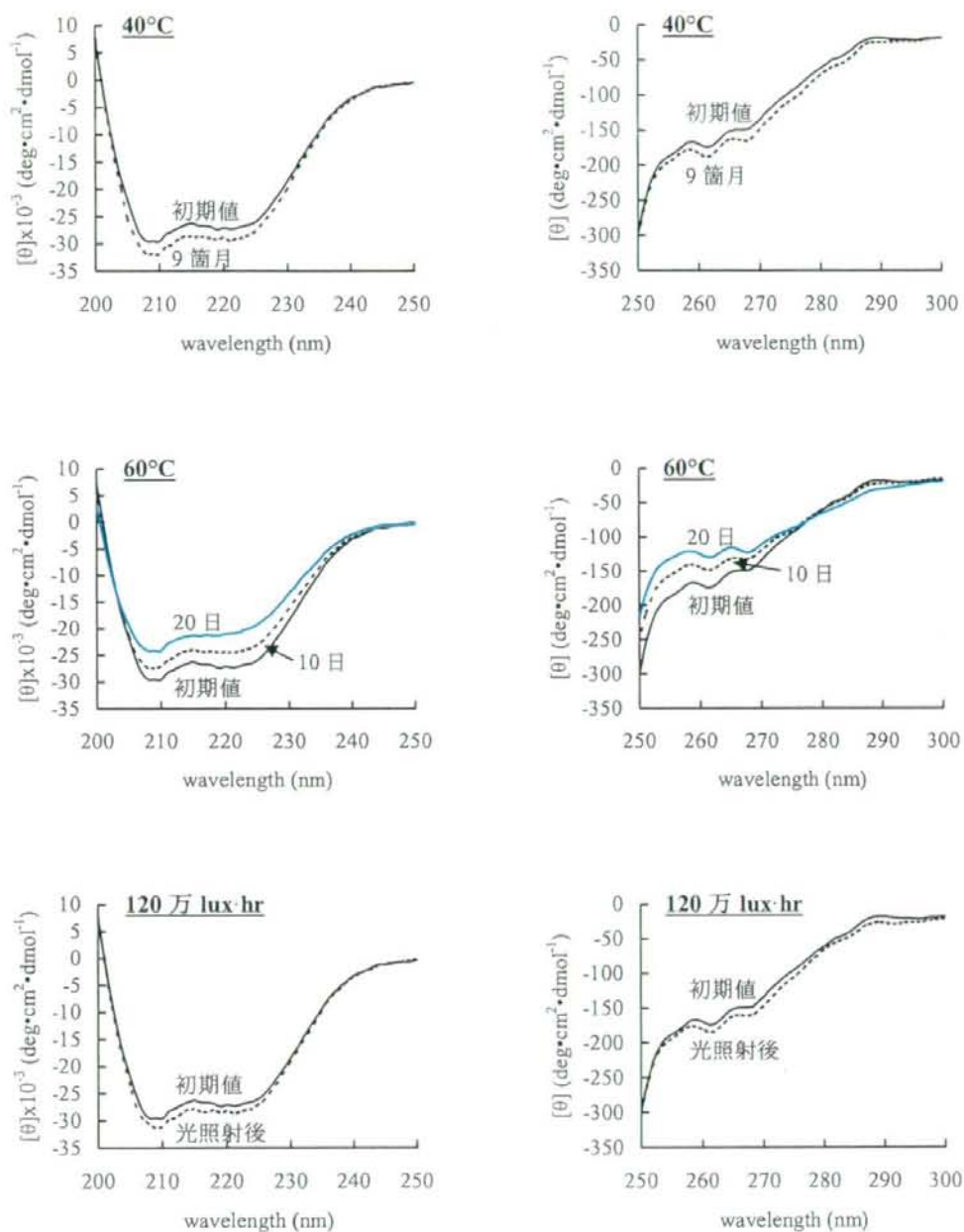


図 2 PEG-rHSA の各保存条件下での CD スペクトルの変化

C-2 CD スペクトル

次に HSA 分子のマクロな構造変化について

情報を得るために、遠紫外及び近紫外領域における CD スペクトルを測定した。図 2 左から PEG-rHSA は、210 nm に負の吸収極大及び 222 nm 付近に肩を示し、 α ヘリックスに富んだ構造を有していることが明らかとなった。図 2 左の中段に示すように 60°C で保存した場合、経時的にこの α ヘリックス構造が減少した。一方、40°C 及び光照射下で保存した試料では α ヘリックス構造の減少は認められなかった。また、図 2 右に示す 3 次構造を表す近紫外領域の CD スペクトルでも同様、60°C では経時的な 3 次構造の崩れが観察されたが、40°C 及び光照射下での大きな構造変化はなかった。

D. 結論

PEG-rHSA の安定性について評価するために、40°C 及び 60°C における安定性試験、総照度 120 万 lux-hr での光苛酷試験を実施した。各保存条件下における品質の変化について蛋白質の構造の観点から蛍光スペクトル及び CD スペクトルを選択し、以下の成果を得た。

- 1) 今回検討したすべての保存条件下で ^{214}Trp 固有の蛍光スペクトルが大きく減少した。
- 2) 60°C で保存すると経時的に α ヘリックス構造が減少し、3 次構造の崩れが引き起こされることが明らかとなった。

40°C 及び 60°C の保存温度における蛍光スペクトルの低下及び CD スペクトルの変化から、PEG-rHSA 原薬は添加剤なしでは室温保存における年単位の安定性は担保できない可能性が示唆された。したがって、PEG-rHSA は冷蔵または冷凍保存での安定性、あるいはカプリル酸をはじめとした脂肪酸が HSA の熱安定性を飛躍的に高めることが知られていることから、これらの安定化剤を添加した製剤での安定性を評価し、保存条件を決定していく必要がある。また、光照射試料で大きく蛍光スペクトルが減少したことから、遮光フィルム等を施した包装

形態についても今後検討していく予定である。

さらに、本研究は PEG-rHSA の構造という一部分だけを指標に行った予備検討であるため、今後は、確認試験、純度試験及び無菌性担保などの方法を検討し、PEG-rHSA 原薬やその製剤の規格及び試験方法を確立していく予定である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

F-1 論文発表

- 1) Iwao Y., Nakajou K., Nagai R., Kitamura K., Anraku M., Maruyama T., Otagiri M.: CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products, American Journal of Physiology-Renal Physiology, in press.

F-2 学会発表

- 1) 中城圭介, 生田祥太郎, 異島優, 岩尾康範, 丸山徹, 小田切優樹: チオレドキシニン-アルブミン融合タンパク質の体内動態と生理作用について、日本薬学会 第 128 年会, 2008-3, (横浜)
- 2) 平田憲史郎, 中城圭介, 異島優, 末永綾香, 丸山徹, 小田切優樹: 組換え型糖鎖付加アルブミンの肝ターゲティング担体としての有用性, 第 25 回日本薬学会九州支部大会, 2008-12, (宮崎)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shintani, T., Iwabuchi, T., Soga, T., Kato, Y., Yamamoto, T., Takano, N., Hishiki, T., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakuragawa, T., Ishikawa, K., Goda, N., Kitagawa, Y., Kajimura, M., Matsumoto, K., Suematsu, M.	Cystathionine β -synthase as a carbon monoxide-sensitive regulator of bile excretion.	Hepatology	49	141-150	2009
Bateman RM, Sharpe MD, Goldman D, Lidington D and Ellis CG	Inhibiting Nitric Oxide Overproduction during Hypotensive Sepsis increases local oxygen consumption in Rat Skeletal Muscle.	Crit Care Med.	36(1)	225-231	2008
Boyd JH, Chau EH, Tokunaga CT, Bateman RM, Haljan G, Davani ES, Wang Y, Walley KR.	Fibrinogen decreases cardiomyocyte contractility through an ICAM-1 dependent mechanism.	Critical Care.	12(1)	R2	2008
Bateman RM, Ohmura M, Nagahata Y, Hishiki T and Suematsu M.	Endotoxemia induces an early differential metabolic response in the heart and liver as determined by metabolomic analysis.	Critical Care	12(2)	S155	2008
Bateman RM, Obata R, Nagahata Y, Ohmura M, Hishiki T, Suematsu M.	Endotoxemia induces a differential metabolic response in the heart and liver as determined by metabolomic analysis	Experimental Biology	-	-	2009
Iwao Y., Nakajou K., Nagai R., Kitamura K., Anraku M., Maruyama T., Otogiri M.	CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products,	American Journal of Physiology-Renal Physiology	-	In press	-

IV 研究成果の刊行物・別刷