

ているものの、ヒトに存在する酸性薬物結合サイトは認められなかった。⁶⁶⁾

また、代謝過程に種差が存在し、親薬物と代謝物の結合サイトが同一な場合、例え親薬物のタンパク結合性が動物種間で同等であったとしても、結合過程に種差を生じさせることが理論的には起こり得る。言い換えれば、*in vitro* 系では代謝物が存在しないため、見掛け上種差が存在しなくても、*in vivo* では代謝物を介してタンパク結合に種差が認められるようになる。このことを、筆者らは種々の実験動物にスルファジメトキシンを投与した *in vivo* 評価系で実証した。スルファジメトキシんとフェニルブタゾンを併用投与すると、イヌやラットでは主要代謝物である *N*⁴-アセチル体による影響が無視できるため、*in vitro* から予測される結果を *in vivo* においても再現することができた。ところが、ウサギの場合、フェニルブタゾンを併用すると予想以上にスルファジメトキシンの非結合型濃度が増加していたため、その機序について検討した結果、フェニルブタゾンが *N*⁴-アセチル体の結合を阻害し、遊離した代謝物が親薬物の結合を置換する間接的な結合阻害であることが判明した。⁶⁷⁾

2-3. 膜水相界面における血清タンパク質の構造-機能変化 近年、薬物の組織移行過程において、タンパク介在性のリガンド組織移行機構の存在する可能性が提唱されている。これは、細胞表面に結合した一部の血中タンパク質が生体膜との相互作用により構造変化を惹起し、ついで結合しているリガンドを解離・放出するというものである。AGP の場合も、一部の AGP 結合型塩基性薬物において *in vivo* での結合性が *in vitro* での結合性よりも小さくなることが知られており、AGP 介在性のリガンド組織移行機構の存在する可能性が示唆されているものの、その機序についてはほとんど明らかにされていない。⁶⁸⁻⁷¹⁾ 筆者らは、種々の生体膜モデルを用いて AGP が生体膜と相互作用した際、本来の β -シート構造から α -ヘリックスに富んだ構造へ転移し、それに伴ってリガンド結合サイトも影響を受ける結果、リガンドの解離・放出が促進されることを明らかにした。^{72,73)} また、部位特異的変異法と化学修飾法を組み合わせた検討から、このユニークな構造転移に AGP のジスルフィド結合と His-172 が関与していることや、⁷⁴⁾ その推進力として疎水的及び

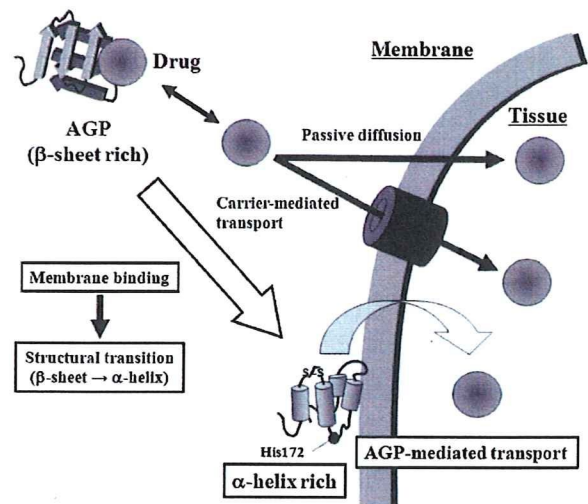


Fig. 4. Proposed Mechanism for the AGP-mediated Drug Transport System

静電的相互作用が協同的に寄与していることを見出した (Fig. 4).⁷⁵⁾ HSA においても AGP のように顕著でないものの、膜水相界面において α -ヘリックス構造の一部崩壊とそれに伴いリガンド結合が低下する現象を見出すとともに、この変化に種差が認められ、ラットアルブミンが HSA と類似した挙動を示すことを報告した。⁷⁶⁾

3. 病態時における血清タンパク結合の変動とその要因

病態時に血清タンパク結合が変動する現象は古くから知られていたが、その機序として、1) 血清タンパク質の量的変動、2) 血清タンパク質の翻訳後修飾による質的変動、3) タンパク結合阻害作用を有する内因性物質の蓄積などが推定されてきたが、これらを系統的に検討した例はほとんどなかった。筆者らは、これらの3つの機序について検討し、HSA の場合は1)-3)が関与していること、一方、AGP の場合は1)が主たる機序であることを明らかにした。

3-1. 内因性物質の蓄積と血清タンパク結合への影響 腎障害時には種々の代謝産物が血中に蓄積してくる。当時、その存在が見い出されてきた尿毒症物質に注目し、血清タンパク結合性を定量的に評価して、HSA が主たる結合タンパク質であることを明らかにした。⁷⁷⁾ ついで、これらの物質のうち結合性が強い、インドキシル硫酸、インドール酢酸、フランジカルボン酸化合物 (3-carboxy-4-methyl-5-

propyl-2-furanpropanate; CMPF), 馬尿酸について, HSA 分子上の結合サイトを結合置換実験及び X 線結晶解析により同定した.⁷⁸⁻⁸⁰⁾ また, これらの情報を基盤として, 薬物結合阻害能とその機序を明らかにした. 例えば, インドール化合物はサブドメイン II B に存在するサイト II に結合し, ベンゾジアゼピン系薬物, 非ステロイド系抗炎症薬やトリプトファン, 中鎖脂肪酸などの内因性物質の結合を競合的に阻害するが, 一方, CMPF と馬尿酸はサブドメイン II B に局在するサイト I に結合し, ワルファリンのように同一サイトに親和性を有する薬物の結合を強力に阻害する.⁸⁰⁾ 興味深いことに, ジカルボン酸化合物である CMPF は同じくジカルボン酸物質であるビリルビンと結合サイトが共通しており, 2つのカルボン酸が同じアルギニン残基の陽電荷と静電的相互作用をしている可能性を示すとともに, この内因性物質同士の相互作用が尿毒症患者における高ビリルビン血症の一因であることを示唆した.⁸¹⁾

また, 血液透析患者の場合, 尿毒症物質による薬物の結合阻害の機序は両者が同一サイト上で競合置換を引き起こすという, 単純なメカニズムでなく, 透析時の抗凝固薬として汎用されるヘパリンが脂肪酸の遊離を促進し, まずこの増加した脂肪酸が競合あるいはアロステリックな機序により, サイト I あるいは II に結合している尿毒症物質を追い出し, ついで, この遊離した尿毒症物質が最終的に薬物の結合を阻害するという, ユニークな阻害機構 (脂肪酸 → 尿毒症物質 → 薬物), いわゆるカスケード様式が

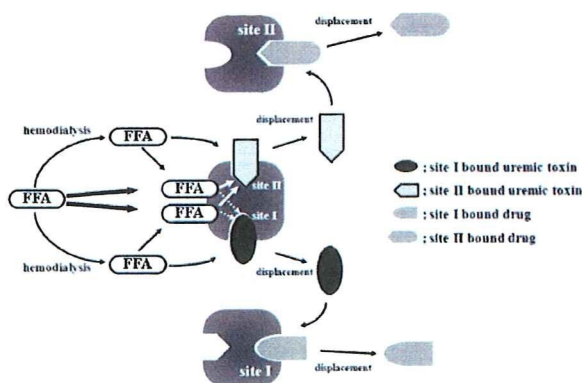


Fig. 5. Possible Cascade Displacement Model in a Fatty Acid-uremic Toxin-drug System

Heavy arrows: fatty acid binding to its high-affinity site, thin arrows: fatty acid binding to its low-affinity site, white arrows: allosteric effect of FFA at site II, broken arrows: allosteric effect of FFA on site I-bound drug.

関与することを定量的に評価した (Fig. 5).^{78,82)} その後, 尿毒症物質に関する検討は寺崎教授及び杉山教授との共同研究により, これら尿毒症物質の臓器移行に有機酸トランスポータ OAT 1 及び OAT 3 が関与していることが実証された.⁸³⁻⁸⁷⁾

3-2. 血清タンパク質の翻訳後修飾がタンパク結合に及ぼす影響 病態時には尿毒症物質のような内因性代謝産物の蓄積だけでなく, 非酵素的糖化反応であるグリケーションや酸化といった翻訳後修飾も生じてくる. そこで, 各種翻訳後修飾アルブミンを *in vitro* で調製, あるいは患者血清から単離・精製して, それら修飾体の構造, 機能及び動態特性を解析した結果, α -ヘリックス構造の部分的な崩壊が引き起こされ, これがリガンド結合ポケットにも波及することにより, 修飾体ではリガンド結合の低下, 特にサイト I よりもサイト II におけるリガンド結合性の低下が顕著であることを明らかにした.⁸⁸⁻⁹⁰⁾ また, 修飾アルブミンでは肝臓や腎臓への選択的移行が促進される結果, 血中からの消失が速くなること, 特に, 糖化によるアルブミン動態の変化には, 肝臓実質細胞及び腎臓のメサングウム細胞の表面に局在するスカベンジャー受容体が関与していることを, 受容体欠損のトランスジェニックマウスを用いて実証した.^{91,92)}

3-3. 病態時における AGP 濃度の変動とタンパク結合への影響 AGP は急性期反応タンパク質の 1 つであるため, 炎症時に顕著な誘導が観察されるが, その一方でフェノバルビタールやリファンピシンといったシトクローム P450 の誘導剤の反復投与時にも血中濃度が上昇する. 筆者らは, クラリスロマイシンやエリスロマイシンのようなマクロライド系薬物の反復投与によっても AGP が誘導される現象を見出した.⁹³⁾ また, その発現制御機構を遺伝子レベルで初めて検討し, 糖質コルチコイド反応性部位と転写因子 NF- κ B の関与を明らかにした.^{94,95)} さらに, 誘導された AGP が好中球の活性化やプロスタグランジン E2 生成を抑制し, 抗炎症効果を示すことや, 赤血球の安定性や機能にも影響を及ぼすことを *in vitro* 実験及び炎症モデルラットを用いた系で実証した.²⁷⁾

また, 種々の病態時において, AGP の濃度が変動することはよく知られているものの, 簡便・迅速かつ高感度に AGP 濃度を測定する方法が確立され

ていなかったことから、蛍光色素による新たな AGP 定量方法の開発に着手した。100 種類以上の蛍光色素をスクリーニングした結果、紫色素であるキナルジンレッドが AGP と結合すると著しい発蛍光性を示す現象を活用して、新たな AGP の定量方法を開発した。^{96,97)}

4. タンパク結合置換現象の医療薬学への応用

筆者らは、上述の血清タンパク結合に関する知見を基盤として医療薬学への応用を試みてきたが、ここではタンパク結合置換現象を活用した臨床応用例の中、1) 血液吸着法の適正使用、2) フロセミドの利尿耐性克服について紹介する。

4-1. 血清タンパク結合を指標とした血液吸着法の適正使用の確立 現在、社会問題化している薬物中毒による自殺に対して、活性炭を用いた血液吸着法は数少ない有効法の 1 つとして位置付けられている。本治療法は血液中に蓄積した薬物の除去であるため、その有効性を左右する因子としては薬物の血清タンパク結合性と分布容積を挙げることができる。^{6,7,98)}ところが、前者の場合、科学的根拠がないにも関わらず、血清タンパク結合率の高い薬物の場合には有益性が乏しく、本治療法は適さないと思われられており、明確な判断基準が設けられていなかった。筆者らは、本治療法による除去効率は薬物と血清タンパク質あるいは活性炭との 3 者の親和性の力関係により左右されると考え、熊本赤十字病院と共同で、救急に搬送された薬物中毒患者の血清タンパク結合率と救命率との関係を精査し、その機序を *in vitro* 実験で明らかにした。その結果、結合率が 90% 以下の薬物であれば血液吸着法による効果が期待できることを実証した (Fig. 6).^{99,100)} 現在、本知見は全国の救急部門で活用されている。

4-2. 結合置換現象を活用したフロセミドの利尿耐性克服戦略 フロセミドは優れた利尿効果を有するため、ネフローゼ症候群をはじめ多くの疾患で汎用されているが、連投すると利尿耐性が生じるため臨床使用における問題点となっている。筆者らは、この現象がネフローゼにより尿中へ排泄されてくる大量の HSA に起因していることを突き止めた。具体的には、尿中に存在する HSA にフロセミドが結合する結果、尿中での非結合型薬物濃度が低下し、作用部位である $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ に利用されなくなることで耐性が生じる。言い換えれば、尿中

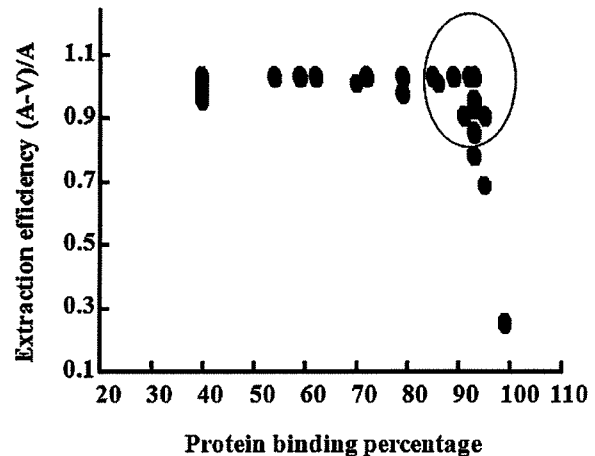


Fig. 6. Relation between Extraction Efficiency and the Presence of Protein Binding

での HSA とフロセミドの結合を効率よく阻害することができれば、利尿耐性を克服できると考え、既存薬物の中から阻害薬の検索を行った。その結果、抗炎症薬ブコロームは両者の結合を最も効率よく阻害できる上、投与量も多く、腎排泄を受けることから阻害薬として必要な条件を満たしていた。そこで、ラット及びヒトにおける検討を行い、ブコローム併用療法がフロセミドの利尿耐性の克服に有用であることを実証した (Fig. 7).^{101,102)} 近年、定常状態における非結合型薬物濃度がタンパク結合率変動の影響を受けるのは高クリアランス薬物の場合であり、低クリアランス薬物の場合にはタンパク結合置換に基づく相互作用の臨床的な影響は少ないことから、血中でのタンパク結合置換に基づく薬物間相互作用の臨床的影響が見直され、一部の薬剤を除き临床上問題になることは少ないと考えられるようになってきた。しかしながら、本ケースではフロセミドの薬理作用部位である尿細管でのタンパク結合置換であるため、血中での結合阻害とは異なり、阻害による遊離型フロセミド濃度の増加が直接薬理効果の増大、すなわち、利尿耐性の克服につながったものと考えられる。また、本併用療法は、従来問題視されがちな薬物間相互作用をうまく活用することにより、既存薬剤の有用性を向上させる新たな治療戦略となり、今後の投薬設計での貴重なデータになるものと考えられる。

5. おわりに

以上、筆者らの研究成果を中心に、血清タンパク

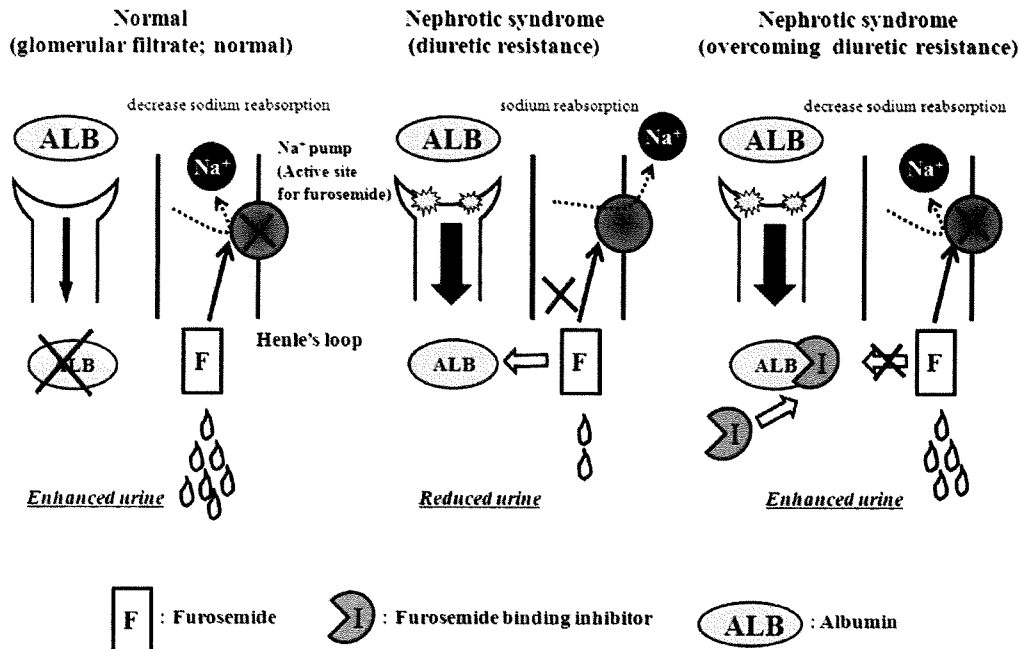


Fig. 7. A Mechanism for Overcoming the Diuretics Resistance to Furosemide Using Drug Displacement on Albumin

結合研究とその臨床応用を過去から現在まで振り返って見た。アルブミンの発見は1945年と古く、医療現場での活用と相まって、多くの研究がなされてきた。しかしながら、遺伝子組換え法のような新たな技術の開発や分析機器の進歩に伴い、アルブミンに関する新たな知見の報告は跡を絶たない。本邦においても、今年からアルブミンの遺伝子組換え型製剤が上市される運びとなり、この古くて新しいタンパク質の研究も新局面を迎えたと言えるだろう。一方、AGPについても疾病との関連性や新たな生理活性が次々と見出されているものの、立体構造が明らかにされていないこともあり、依然不明な点も多く残されていた。しかしごく最近、脱糖化AGPのX線結晶構造が発表された。¹⁰³⁾ 著者らも大腸菌での発現系を確立し、目下、組換え型AGPと薬物との複合体のX線結晶構造を解析中であり、長年明らかにされなかった構造と機能との相関の解明が待ち望まれる。

謝辞 本研究は、熊本大学薬学部薬剤学研究室(現薬物動態制御学分野)にて行われたものであり、丸山 徹教授、末永綾香助教、山崎啓之博士(現崇城大学准教授)、高村徳人博士(現九州保健福祉大学教授)、渡邊博志講師、VGT Chuang 博士(現

Curtin Univ. 講師)、安楽 誠博士(現福山大学講師)、西 弘二博士(現横浜薬科大学講師)、岩尾康範博士(現静岡県立大学助教)、異島 優助教を始め研究室に在籍され、日夜研究に尽力頂いた多くの大学院生、学部生に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際し、ご教示・ご協力を惜しまれなかった Ulrich Kragh-Hansen 教授(Univ. Aarhus)に御礼申し上げます。本研究は、著者が留学時代に学んだタンパク結合研究を研究室の主宰を契機に再開したものであり、その道を拓いて頂いた恩師・故池田 憲教授、上釜兼人教授(現崇城大学教授)及びJ. H. Perrin 教授(Univ. Florida)に深く感謝申し上げます。加えて、筆者の研究に対して、ご教示あるいはご協力頂いた次の共同研究者の方々に感謝の意を表します。今井輝子教授、今村順茂准教授、平山文俊教授、入江徹美教授、広野修一教授、赤池孝章教授、高舘 明教授、川井恵一教授、寺崎哲也教授、杉山雄一教授、S. Curry 教授、半田哲郎教授、富田公夫教授、甲斐広文教授、永井竜児助教、甲斐俊哉教授、杉井 篤名誉教授、中山 仁名誉教授、前田 浩名誉教授、土田英俊名誉教授。

REFERENCES

- 1) Meyer M., C. Guttman D. E., *J. Pharm. Sci.*, **57**, 895–918 (1967).
- 2) Jusko W. J., Gretch M., *Drug. Metab. Rev.*, **5**, 43–140 (1976).
- 3) Vallner J. J., *J. Pharm. Sci.*, **66**, 447–465 (1977).
- 4) Sjöholm I., “Drug Protein Binding,” eds. by Reidenberg M. M., Erill S., Praeger Publication, Philadelphia, 1986, pp. 36–49.
- 5) Müller W. E., Rick S., Brunner F., “Focus on a Single Binding Site, Protein Binding and Drug Transport,” eds. by Tillement J. P., Lindenlaub E., Schattauer Verlag, Stuttgart, 1986, pp. 29–44.
- 6) Jusko W. J., “The Effect of Disease State on Drug Pharmacokinetics,” ed. by Benet L. Z., Am. Pharm. Asso., Acad. Pharm. Sci., Washington DC, 1976, pp. 99–123.
- 7) Levy G., “The Effect of Disease State on Drug Pharmacokinetics,” ed. Benet, L. Z., Am. Pharm. Asso., Acad. Pharm. Sci., Washington DC, 1976, pp 137–151.
- 8) Peters Jr. T., “All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications,” Academic Press (1996).
- 9) Carter D. C., Ho J. X., *Adv. Protein Chem.*, **45**, 153–203 (1994).
- 10) Curry S., Mandelkow H., Brick P., Franks N., *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 827–835 (1998).
- 11) Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K., *Protein Eng.*, **12**, 439–446 (1999).
- 12) Ferrer M. L., Duchowicz R., Carrasco B., García de la Torre J., Acuña A. U., *Biophys. J.*, **80**, 2422–2430 (2001).
- 13) Mendez C. M., McClain C. J., Marsano L. S., *Nutr. Clin. Pract.*, **20**, 314–320 (2005).
- 14) Otagiri M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 309–323 (2005).
- 15) Quinlan G. J., Martin G. S., Evans T. W., *Hepatology*, **41**, 1211–1219 (2005).
- 16) Kragh-Hansen U., Chuang V. T., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 695–704 (2002).
- 17) Chuang V. T., Otagiri M., *Chirality*, **18**, 159–166 (2006).
- 18) Roche M., Rondeau P., Singh N. R., Tarnus E., Bourdon E., *FEBS Lett.*, **582**, 1783–1787 (2008).
- 19) Aubert J. P., Loucheux-Lefebvre M. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 400–409 (1976).
- 20) Rojo-Dominguez A., Hernandez-Arana A., *Protein Seq. Data Anal.*, **5**, 349–355 (1993).
- 21) Kopecky Jr. V., Ettrich R., Hofbauerova K., Baumruk V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 41–46 (2003).
- 22) Halsall H. B., Austin R. C., Dage J. L., Sun H., Schlueter K. T., *Proc. Int. Symp. on Serum Albumin and Alpha-acid Glycoprotein*, eds. by Otagiri M., Sugiyama Y., Testa B., Tillement J. P., Kumamoto, Japan, 2001, pp. 45–54.
- 23) Zsila F., Iwao Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 797–809 (2007).
- 24) Hocheplied T., Berger F. G., Baumann H., Libert C., *Cytokine Growth Factor Rev.*, **14**, 25–34 (2003).
- 25) Friedman M. L., Wermeling J. R., Halsall H. B., *Biochem. J.*, **236**, 149–153 (1986).
- 26) Schmid K., Burlingame R. W., Paulson J. C., Sperandio K., *Fed. Proc.*, **37**, 1298 (1978).
- 27) Matsumoto K., Nishi K., Kikuchi M., Kadowaki D., Tokutomi Y., Tokutomi N., Nishi K., Suenaga A., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1226–1230 (2007).
- 28) Sudlow G., Birkett D. J., Wadem D. N., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2**, 129–140 (1975).
- 29) Sudlow G., Birkett D. J., Wadem D. N., *Mol. Pharmacol.*, **11**, 824–832 (1975).
- 30) Sudlow G., Birkett D. J., Wade D. N., *Mol. Pharmacol.*, **12**, 1052–1061 (1976).
- 31) Goya S., Takadate H., Fujino H., Otagiri M., Uekama K., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1363–1369 (1982).
- 32) Yamasaki K., Miyoshi T., Maruyama T., Takadate A., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1656–1662 (1994).
- 33) Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1295**, 147–157 (1996).
- 34) Yamasaki K., Maruyama T., Yoshimoto K., Tsutsumi Y., Narazaki R., Fukuhara A., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1432**, 313–323 (1999).
- 35) Maruyama T., Lin C. C., Yamasaki K., Miyoshi T., Imai T., Yamasaki M., Otagiri

- M., *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 1017–1026 (1993).
- 36) Rahman M. H., Maruyama T., Okada T., Yamasaki K., Otagiri M., *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1721–1731 (1993).
- 37) Rahman M. H., Maruyama T., Okada T., Imai T., Otagiri M., *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 1733–1740 (1993).
- 38) Yamasaki K., Rahman M. H., Tsutsumi Y., Maruyama T., Ahmed S., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *AAPS. PharmSciTech.*, **1**, article 12 (2000).
- 39) Kragh-Hansen U., Watanabe H., Nakajou K., Iwao Y., Otagiri M., *J. Mol. Biol.*, **363**, 702–712 (2006).
- 40) Watanabe H., Kragh-Hansen U., Tanase S., Nakajou K., Mitarai M., Iwao Y., Maruyama T., Otagiri M., *Biochem. J.*, **357**, 269–274 (2001).
- 41) Watanabe H., Tanase S., Nakajou K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Biochem. J.*, **349**, 813–819 (2000).
- 42) Narazaki R., Harada K., Sugii A., Otagiri M., *J. Pharm. Sci.*, **86**, 215–219 (1997).
- 43) Narazaki R., Hamada M., Harada K., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **13**, 1317–1321 (1996).
- 44) Narazaki R., Watanabe H., Maruyama T., Suenaga A., Otagiri M., *Arch. Toxicol.*, **72**, 203–206 (1998).
- 45) Narazaki R., Maruyama T., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1338**, 275–281 (1997).
- 46) Narazaki R., Maruyama T., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 452–454 (1997).
- 47) Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C.R., Loscalzo J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 7674–7677 (1992).
- 48) Foster M. W., McMahon T. J., Stamler J. S., *Trends. Mol. Med.*, **9**, 160–168 (2003).
- 49) Ishima Y., Sawa T., Kragh-Hansen U., Miyamoto Y., Matsushita S., Akaike T., Otagiri M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **320**, 969–977 (2007).
- 50) Ishima Y., Akaike T., Kragh-Hansen U., Hiroshima S., Sawa T., Maruyama T., Kai T., Otagiri M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **364**, 790–795 (2007).
- 51) Ishima Y., Akaike T., Kragh-Hansen U., Hiroshima S., Sawa T., Suenaga A., Maruyama T., Kai T., Otagiri M., *J. Biol. Chem.*, **283**, 34966–34975 (2009).
- 52) Otagiri M., Maruyama T., Imai T., Imamura Y., *J. Pharm. Sci.*, **76**, 646–649 (1987).
- 53) Otagiri M., Maruyama T., Imai T., Suenaga A., Imamura Y., *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 416–420 (1987).
- 54) Otagiri M., Miyoshi T., Yamamichi R., Maruyama T., Perrin J. H., *Biochem. Pharmacol.*, **42**, 729–733 (1991).
- 55) Miyoshi T., Yamamichi R., Maruyama T., Takadate A., Otagiri M., *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 2161–2167 (1992).
- 56) Miyoshi T., Yamamichi R., Maruyama T., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **9**, 845–849. (1992).
- 57) Katsuki M., Chuang V. T., Nishi K., Suenaga A., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **21**, 1648–1655 (2004).
- 58) Katsuki M., Chuang V. T., Nishi K., Kawahara K., Nakayama H., Yamaotsu N., Hirono S., Otagiri M., *J. Biol. Chem.*, **280**, 1384–1391 (2005).
- 59) Herve F., Caron G., Duche J. C., Gaillard P., Abd Rahman N., Tsantili-Kakoulidou A., Carrupt P. A., d’Athis P., Tillement J. P., Testa B., *Mol. Pharmacol.*, **54**, 129–138 (1998).
- 60) Herve F., Duche J. C., Jaurand M. C., *J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.*, **715**, 111–123 (1998).
- 61) Jolliet-Riant P., Boukef M. F., Duche J. C., Simon N., Tillement J. P., *Life Sci.*, **62**, 219–226 (1998).
- 62) Nishi K., Ueno M., Murakami Y., Fukunaga N., Akuta T., Kadowaki D., Watanabe H., Suenaga A., Maruyama T., Otagiri M., *J. Pharm. Sci.* (2009) in press.
- 63) Kosa T., Maruyama T., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **14**, 1607–1612 (1997).
- 64) Kaneko K., Fukuda H., Chuang V. T., Yamasaki K., Kawahara K., Nakayama H., Suenaga A., Maruyama T., Otagiri M., *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 81–86 (2008).
- 65) Kosa T., Maruyama T., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **15**, 449–454 (1998).
- 66) Matsumoto K., Sukimoto K., Nishi K., Maruyama T., Suenaga A., Otagiri M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 300–306 (2002).

- 67) Imamura Y., Nakamura H., Otagiri M., *J. Pharmacobiodyn.*, **12**, 208–215 (1989).
- 68) Weisiger R., Gollan J., Ockner R., *Science*, **211**, 1048–1051 (1981).
- 69) Maeda H., Morinaga T., Mori I., Nishi K., *Cell Struct. Funct.*, **9**, 279–290 (1984).
- 70) Cheresch D. A., Haynes D. H., Distasio J. A., *Immunology*, **51**, 541–548 (1984).
- 71) Predescu D., Predescu S., McQuistan T., Palade G. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 6175–6180 (1998).
- 72) Nishi K., Sakai N., Komine Y., Maruyama T., Halsall H. B., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1601**, 185–191 (2002).
- 73) Nishi K., Maruyama T., Halsall H. B., Handa T., Otagiri M., *Biochemistry*, **43**, 10513–10519 (2004).
- 74) Nishi K., Komine Y., Fukunaga N., Maruyama T., Suenaga A., Otagiri M., *Proteins*, **63**, 611–620 (2006).
- 75) Nishi K., Komine Y., Sakai N., Maruyama T., Otagiri M., *FEBS Lett.*, **579**, 3596–3600 (2005).
- 76) Kosa T., Nishi K., Maruyama T., Sakai N., Yonemura N., Watanabe H., Suenaga A., Otagiri M., *J. Pharm. Sci.*, **96**, 3117–3124 (2007).
- 77) Sakai T., Takadate A., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1755–1761 (1995).
- 78) Sakai T., Maruyama T., Imamura H., Shimada H., Otagiri M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**, 786–792 (1996).
- 79) Sakai T., Yamasaki K., Sako T., Kragh-Hansen U., Suenaga A., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **18**, 520–524 (2001).
- 80) Ghuman J., Zunszain P. A., Petitpas I., Bhatnagar A. A., Otagiri M., Curry S., *J. Mol. Biol.*, **353**, 38–52 (2005).
- 81) Tsutsumi Y., Maruyama T., Takadate A., Goto M., Matsunaga H., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **16**, 916–923 (1999).
- 82) Takamura N., Maruyama T., Otagiri M., *Clin. Chem.*, **43**, 2274–2280 (1997).
- 83) Tsutsumi Y., Deguchi T., Takano M., Takadate A., Lindup W. E., Otagiri M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**, 880–887 (2002).
- 84) Deguchi T., Ohtsuki S., Otagiri M., Takanaga H., Asaba H., Mori S., Terasaki T., *Kidney Int.*, **61**, 1760–1768 (2002).
- 85) Deguchi T., Kusahara H., Takadate A., Endou H., Otagiri M., Sugiyama Y., *Kidney Int.*, **65**, 162–174 (2004).
- 86) Deguchi T., Kouno Y., Terasaki T., Takadate A., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **22**, 619–627 (2005).
- 87) Deguchi T., Isozaki K., Kohno Y., Terasaki T., Otagiri M., *J. Neurochem.*, **96**, 1051–1055 (2006).
- 88) Anraku M., Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **18**, 632–639 (2001).
- 89) Anraku M., Kragh-Hansen U., Kawai K., Maruyama T., Yamasaki Y., Takakura Y., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **20**, 684–692 (2003).
- 90) Nakajou K., Watanabe H., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1623**, 88–97 (2003).
- 91) Nakajou K., Horiuchi S., Sakai M., Hara-guchi N., Tanaka M., Takeya M., Otagiri M., *Diabetologia*, **48**, 317–327 (2005).
- 92) Nakajou K., Horiuchi S., Sakai M., Hirata K., Tanaka M., Takeya M., Kai T., Otagiri M., *J. Biochem.*, **137**, 607–616 (2005).
- 93) Komori T., Shimoishi K., Harashima H., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1376–1378 (1998).
- 94) Komori T., Kai H., Shimoishi K., Kabu K., Nonaka A., Maruyama T., Tamura K., Otagiri M., *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 1391–1397 (2001).
- 95) Shimoishi K., Kai H., Kabu K., Komori T., Maruyama T., Otagiri M., *Eur. J. Pharmacol.*, **420**, 91–95 (2001).
- 96) Imamura H., Maruyama T., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 926–929 (1993).
- 97) Imamura H., Maruyama T., Okabe H., Shimada H., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **11**, 566–570 (1994).
- 98) Kremer J. M. H., Wilting J., Janssen L. H. M., *Pharmacol. Rev.*, **40**, 1–47 (1988).
- 99) Kawasaki C., Nishi R., Uekihara S., Hayano S., Otagiri M., *Am. J. Kidney Dis.*, **35**, 323–326 (2000).
- 100) Kawasaki C. I., Nishi R., Uekihara S., Hayano S., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Clin. Toxicol.*, **43**, 95–99 (2005).
- 101) Takamura N., Maruyama T., Chosa E., Kawai K., Tsutsumi Y., Uryu Y., Yamasaki

- K., Deguchi T., Otagiri M., *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 596–602 (2005).
- 102) Kawai K., Takamura N., Nishi R., Jinnouchi S., Nagamachi S., Tamura S., Arimori K., Otagiri M., Proc. Int. Symp. on Serum Albumin and Alpha1-acid Glycoprotein, eds. by Otagiri M., Sugiyama Y., Testa B., Tillement J. P., Kumamoto, Japan, 2001, pp. 181–192.
- 103) Schönfeld D. L., Ravelli R. B., Mueller U., Skerra A., *J. Mol. Biol.*, **384**, 393–405 (2008).

Review

Pharmaceutically Important Pre- and Posttranslational Modifications on Human Serum Albumin

Masaki OTAGIRI*^a and Victor Tuan Giam CHUANG^{a,b}

^a Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University; 5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan; and ^b School of Pharmacy, Curtin University of Technology; GPO Box U1987, Perth, WA 6845, Australia.

Received December 22, 2008

Recombinant technology allows engineering and production of proteins with desirable properties. Human serum albumin has been developed with recombinant technology, and thus plays an increasing role as a drug carrier in the clinical setting. Genetic variations usually occur on the surface of the protein, and do not impose significant effects on the conformation of albumin. However, binding of fatty acids by genetic variants is affected according to the location of the mutation. Albumin undergoes three major posttranslational modifications, namely, oxidation, glycation, and S-nitrosylation. This review gives an account of the different posttranslational modifications that should be taken into consideration when designing albumin mutant analogues with desirable pharmaceutical properties.

Key words human serum albumin; genetic variant; posttranslational modification: oxidation; glycation; S-nitrosylation

INTRODUCTION

Human serum albumin (HSA) is a single-chain protein synthesized in and secreted from liver cells. The protein is formed by a single polypeptide chain of 585 amino acids and has a molecular mass of approximately 67000. It is a simple protein without prosthetic groups, glycans, or lipid. It is the most abundant plasma protein, and an important circulating carrier of endogenous and exogenous ligands in the blood. It contributes to the maintenance of osmotic pressure and plasma pH and to the Donnan-effect in the capillaries.¹⁾

Albumin has about 67% alpha-helix but no beta-sheet. Based on X-ray crystallographic analyses of recombinant HSA (rHSA), the polypeptide chain of 585 amino acids forms a heart-shaped protein with dimensions 80×80×80 Å and with a thickness of 30 Å. The analyses also showed that the heart-shaped protein is made up of three homologous domains (I, II, and III), each comprising two subdomains (A and B) with distinct helical folding patterns that are connected by flexible loops.²⁾

HSA is an important plasma expander. Clinically, HSA is used to treat severe hypoalbuminemia or traumatic shock, and the usual dosages of HSA are in excess of 10 g/dose. To date, albumin has been produced by fractionation of whole blood. However, the potential risk of HSA contamination with blood-derived pathogens has prompted the development of an alternative method of industrial production of HSA. Recombinant HSA expressed by *Pichia pastoris* is commercially available.^{3,4)}

The clinical safety and efficacy of HSA administration to critically ill patients have been debated due to the heterogeneity and oxidation status of commercial HSA preparations. Significant differences in posttranslational modifications exist among the various commercial preparations of albumin. Administration of such products to critically ill patients might elicit undesirable immune responses.^{5,6)} In regard to this potential risk, recombinant HSA may be less problematic than plasma-derived human albumin.⁷⁾ Further to improve the stability of HSA products, stabilizers such as

N-acetyl-tryptophan and *N*-acetyl-methioninate which have protective effect on thiol group, can be included.^{8,9)} In addition, Anraku *et al.*¹⁰⁾ found that chitosan is as effective as vitamin C in preventing formation of carbonyl and hydroperoxide groups in HSA exposed to peroxy radicals. Co-administration of low-molecular weight chitosans may inhibit neutrophil activation and oxidation of HSA commonly seen in patients undergoing hemodialysis (HD), resulting in reduction of uremia related oxidative stress.

The half-life of HSA in humans is 19 d. From a clinical point of view, it would be beneficial if the protein could be engineered to have a longer half-life in the circulation. In addition, its ease of synthesis and its known structure has made albumin an attractive candidate for use in recombinant fusion proteins for the purpose of extending the half-life of small proteins that would otherwise be rapidly cleared.^{11–15)} HSA is known to undergo various modifications upon secretion into the general circulation, with oxidation, glycation, and nitrosylation being the three main posttranslational modifications. Despite multiple reports on its clinical use and application possibilities as a drug carrier, not much has been done to clarify the effects of posttranslational modifications on the pharmaceutically desirable properties of HSA.

EFFECT OF GENETIC VARIATION ON HSA

Genetic Variants There are 77 genetic variants of human albumin compiled by Peters.¹⁶⁾ Twenty-two genetic variants were found in domain I, 30 in domain II, and 25 in domain III (Table 1; Fig. 1).¹⁶⁾ Most of the mutations are benign; a total of 65 mutations result in bisalbuminemia.¹⁷⁾ The effect of genetic variation on the thermal stability of HSA was studied at our laboratories. Reversible thermal denaturation of 33 genetic variants of HSA appeared to be a two-state process when studied by circular dichroism. For all variants, no clear relationship was found between the changes in the thermodynamic parameters and the type of substitution, changes in protein charge, and hydrophobicity. However, the protein changes taking place in domain I have a

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: otagirim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

Table 1. Mutation Sites on Human Serum Albumin

Residue	Amino acid change From	Amino acid change To
Domain I		
-2@	Arg	Cys
-2	Arg	His
-1	Arg	Gln
-1	Arg	Pro
-1	Arg	Leu
1#	Asp	Val
3	His	Tyr
3	His	Splice defect
3	His	Gln
32	Gln	Stop
52	ThrCys	Frameshift
60	Glu	Lys
63&	Asp	Asn
66**	Leu	Pro
82	Glu	Lys
114	Arg	Gly
114	Arg	Stop
119	Glu	Lys
122**	Val	Glu
128	His	Arg
140\$	Tyr	Cys
177\$	Cys	Phe
Domain II		
214	Intron 6,3'	
214	Intron 6,3'	
218	Arg	His
218**	Arg	Pro
225	Lys	Gln
240	Lys	Glu
244	Glu	Stop
267	Exon 8	
268	Gln	Arg
269	Asp	Gly
276\$	Lys	Asn
313	Lys	Asn
314**	Asp	Gly
314**	Asp	Val
318	Asn	Lys
320&	Ala	Thr
321	Glu	Lys
333	Glu	Lys
354	Glu	Lys
358	Glu	Lys
359**	Lys	Asn
365	Asp	His
365	Asp	Val
372	Lys	Glu
375	Asp	Asn
375**	Asp	His
376	Glu	Lys
376	Glu	Gln
382	Glu	Lys
385	Gln	Stop

rather uniform effect; they denature more easily than normal albumin but they do so at a higher temperature.¹⁸⁾

Changes in hydrophobicity and net charge on the surface of albumin as a result of chemical modification are known to affect its *in vivo* clearance.^{19,20)} Screening of HSA genetic variants identified so far with structural characterization has been made by Iwao *et al.*²¹⁾ Seventeen structurally different genetic variants of HSA with single-residue mutations isolated from heterozygote carriers have been selected for pharmacokinetic studies in mice. In all cases, the plasma half-life

Table 1. Continued

Residue	Amino acid change From	Amino acid change To
Domain III		
407**	Intron 11, #2	Mis-splicing
410**	Arg	Cys
452	Tyr	Ser
479	Glu	Lys
494&	Asp	Asn
501	Glu	Lys
505	Glu	Lys
513**	Ile	Asn
533**	Val	Met
536	Lys	Glu
541	Lys	Glu
550	Asp	Gly
550	Asp	Ala
560**	Lys	Glu
563	Asp	Asn
565	Glu	Lys
567	Cys	
570	Glu	Lys
572\$**	Intron 13-3'	
572	Intron 13-5'	
572\$	Exon 14-5'	
573	Lys	Glu
574	Lys	Asn
575\$**	Leu	28 residue extension
580	Gln	

Taken from ref. 16. *Reference reporting nucleotide base change. ** Added since 1995. @Malmo I: 3% proalbumin; 30% Arg-albumin, due aberrant signal peptide cleavage. #Blenheim: 10% proalbumin, 40% Val-; Bremen: 20% Arg-Alb, 30% Val- & Glycosylated, S Asola: 20-25% variant; Casorta: 60-70% variant; Hawkes Bay: 5% variant; Rugby Park: 8% variant; Venezia: 30% variant; Kénitra: 15% variant.

was affected but only variants with +2 changes in charge prolonged it, whereas changes in hydrophobicity decreased it. Good positive and negative correlations were found between changes in alpha-helical content taking place in domains I+III and domain II, respectively, and changes in half-lives.²¹⁾ Very recently, we reported the plasma half-lives and organ uptakes of these HSAs with slightly longer chain-length (proalbumin variants), three with a slightly shorter length (C-terminal variants), and three alloalbumin *N*-glycosylated in domains I, II, and III, respectively. No correlation was found between mutation-induced changes in the pharmacokinetic parameters and changes in alpha-helical content or changes in heat stability.²²⁾ Nakajou *et al.*²³⁾ showed that the clearance of a recombinant triple-residue mutant (K199A/K439A/K525A) is faster than that of the wild-type rHSA, confirming the influence of positive charges of lysine at positions 199, 439, and 525 of human albumin.

The plasma half-life of HSA can also be modified by single-residue modification. The clearance of six recombinant single-residue mutants (H146A, K199A, W214A, R218H, R410A, Y411A) was analyzed in mice. No significant change in the pharmacokinetics and structural properties was observed for the W214A, R218H, and Y411A mutants. In contrast, H146A, K199A, and R410A mutants exhibited different properties (extent of mutation effect: R410A > K199A > H146A). Liver clearance of these proteins appeared closely correlated to hydrophobicity and the net charge of the proteins.²⁴⁾

Glycosylated Variant A double-mutant albumin, Red-

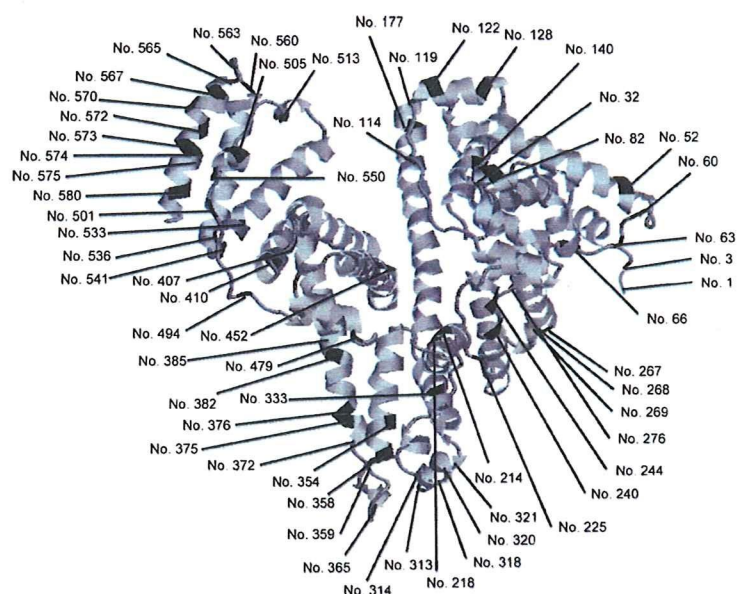


Fig. 1. Mutation Sites of Human Serum Albumin (HSA) Genetic Variants

hill (-1 Arg, 320 Ala→Thr), is a glycosylated variant of the protein. The glycan was shown to be a disialylated biantennary complex-type oligosaccharide *N*-linked to 318 Asn. However, a minor part (11 mol%) of the glycan was without sialic acid. The structure is principally the same as that of glycans bound to two other types of glycosylated albumin variants. Glycosylation can affect the fatty acid-binding properties of albumin. Taking the present information into account, it is apparent that different effects on binding are caused not by different glycan structures but by different locations of attachment, with the possible addition of local conformational changes in the protein molecule.²⁵⁾

Albumin Kenitra is peculiar because it has an elongated polypeptide chain, 601 residues instead of 585, and its sequence is modified beginning from residue 575. The four additional cysteine residues of the variant form two new S-S bridges and showed that albumin Kenitra is partially *O*-glycosylated by a monosialylated HexHexNAc structure. This oligosaccharide chain has been located to Thr596.^{26,27)}

Kinetic dialysis studies of laurate binding at physiological pH showed that the binding constant of glycosylated Alb Casebrook (modified in domain III) was decreased to 20%. Binding to the glycosylated Alb Redhill (modified in domain II) was also decreased, but to a smaller extent (68%). These decreases in binding are caused by partial or total blocking of the high-affinity site by the oligosaccharides, by the negative charges of the oligosaccharides, and/or by conformational changes induced by these bulky moieties.²⁷⁾

Fatty Acid Binding One of HSA's principal functions is to transport fatty acids. In the circulation, non-esterified fatty acids are transported by albumin, which also facilitates their removal from donor cells and uptake into receptor cells. The primary association constants increased, but not linearly, with chain length. The number of high-affinity sites also increased with chain length; octanoate and decanoate bind to one such site, whereas laurate and myristate most probably bind to two sites. Amino acid substitutions of genetic albumin variants (alloalbumins) are situated at the surface of the protein; usu-

ally these substitutions have no effect on fatty acid binding.²⁸⁾

Mutations in domains I and II and the propeptide resulted in smaller effects, if any, and these were often reductions in binding. High-affinity binding of laurate to naturally occurring mutants of human serum albumin and proalbumin showed that the first stoichiometric association constant for binding to proalbumin Lille (Arg-2→His) and albumin (Alb) Roma (Glu321→Lys) was increased to 126% and 136%, respectively, compared with that for binding to normal albumin. Albumin Brest (Asp314→Val) has improved *in vivo* fatty acid-binding properties, whereas the structural modification(s) of albumin Ildut (Arg-2→Cys) does not affect fatty acid binding.²⁹⁾

The most pronounced changes and the majority of cases of increased binding were caused by molecular changes in domain III. While the fatty acid binding properties of a proalbumin variant Zagreb (-1Arg→Gln) are normal, albumin Krapina with amino acid substitution in position 573 resulted in a general decrease of fatty acid binding.³⁰⁾ The binding constant of laurate for Alb Maku (Lys541→Glu) was decreased to 80%. Laurate binding to two chain-termination mutants (Alb Catania and Alb Venezia) was normal, indicating that the C-terminus of albumin is not important for binding.²⁷⁾ Among the three variants detected in Italy that are caused by single point mutations, Trieste, (Lys359→Asn), Milano Slow (Asp375→His), and Liprizzi (Arg410→Cys), albumins Trieste and Milano Slow have mutations involving residues on the surface of the molecule. In contrast, albumin Liprizzi represents the first example of a mutation in the most active binding pocket of the molecule, placed in subdomain IIIA.³¹⁾

Thirteen recombinant isoforms mutated in four different subdomains were synthesized to study the binding of octanoate, decanoate, laurate, and myristate by a rate-of-dialysis technique. The results showed that octanoate and decanoate bind to a single site in subdomain IIIA; laurate binds to sites in subdomains IIIA and IIIB, whereas myristate binds

in subdomains IB and IIIB. The results also showed that primary fatty acid binding is sensitive to amino acid substitutions in other parts of the protein.³²⁾

The association constants for Ni^{2+} decreased by more than one order of magnitude in proalbumin (proAlb) Varese (Arg-2→His), proAlb Christchurch (Arg-1→Gln) and proAlb Blenheim (Asp1→Val) and by the presence of only an extra Arg residue (Arg-1) as in Arg-Alb and albumin (Alb) Redhill. The modification of Alb Blenheim (Asp1→Val) reduces the binding constant to 50%. This could be explained by the ion binds to a site in the *N*-terminal region of the protein, which is partially blocked by the presence of a propeptide. Ca^{2+} binding is decreased to about 60–80% by the presence of a propeptide and the mutation Asp1→Val. Arg-1 alone does not affect binding. In contrast, Alb Redhill binds Ca^{2+} more strongly than the normal protein (125%). The binding constant for Zn^{2+} is increased to 125% in the case of proAlb Varese, decreased to 50–60% for proAlb Christchurch and Alb Redhill, and is normal for proAlb Blenheim, Alb Blenheim, and Arg-Alb.³³⁾

High-affinity binding of progesterone, testosterone, prostaglandin F_2 alpha, and L-thyroxine to five genetic variants of human serum albumin with defined point mutations was investigated by equilibrium dialysis (pH 7.4). Variants Albumin Niigata (Asp269→Gly), Albumin Roma (Glu321→Lys), Albumin Parklands (Asp365→His), and Albumin Verona (Glu570→Lys) all had normal progesterone-binding properties whereas Albumin Canterbury (Lys313→Asn) was 1.5 times that calculated for binding to the corresponding endogenous albumin. Specificity with respect to the type of mutation was also found for the binding of testosterone and prostaglandin F_2 alpha. Testosterone binding to Albumin Roma was only 0.7 of that determined for endogenous albumin, whereas prostaglandin F_2 alpha binding to Albumin Niigata was increased by a factor 2.4. On the other hand, normal binding properties were found for all the variants in the case of L-thyroxine.³⁴⁾

POSTTRANSLATIONAL MODIFICATION OF ALBUMIN

Oxidation Free radicals are a normal component of cellular oxygen metabolism in mammals. However, free radical-associated damage is an important factor in many pathological processes. Oxidative posttranslational modifications of plasma proteins may serve as hallmarks of disease severity and could result in altered protein function and structure. Oxidation of HSA is also age related where in the elderly it becomes more oxidized than in young subjects.³⁵⁾ Mild oxidation of HSA has no detectable effect on the binding of drugs to site I in subdomain IIA. In contrast, the ligand-binding property of site II and the esterase-like activity of oxidized HSA are decreased, most probably due to conformational changes in subdomain IIIA.³⁶⁾ Liver and spleen uptake clearance of oxidized HSA were significantly greater than those of normal HSA.³⁷⁾ Oxidation of key amino acid residues such as R410 may promote the elimination of HSA.²⁴⁾

HSA has 35 cysteine residues. All of these cysteine residues except Cys34 are involved in the formation of stabilizing disulfide bonds. Cys34 in domain I of albumin is the binding site for a wide variety of biologically and clinically important small molecules. It provides antioxidant activity

and constitutes the largest portion of free thiol in blood.³⁸⁾ In patients with acute lung injury or sepsis syndrome, albumin administration favorably influences plasma thiol-dependent antioxidant status as well as levels of protein oxidative damage.^{39,40)} Bourdon *et al.*⁴¹⁾ found that Met and Cys accounted for 40–80% of total antioxidant activity of HSA. They concluded that Cys chiefly works as a free radical scavenger whereas Met mainly acts as a metal chelator.⁴¹⁾ Their findings have been confirmed by our laboratory in a study using single-residue mutant (Cys34A) and six-residue mutant (M87A/M123A/M298A/M329A/M446A/M548A) forms (unpublished data). The major structural change in oxidized HSA in healthy human plasma is a disulfide-bonded cysteine at the thiol of Cys34 of reduced HSA.⁴²⁾

Oxidation of lysine residues leads to the formation of 2-amino adipic semi-aldehyde residues. Under metal-catalyzed oxidation conditions, only two of the 59 lysine residues of HSA appeared modified (Lys-97 and Lys-186). On the other hand, five different lysine modification sites were identified (Lys-130, Lys-257, Lys-438, Lys-500, and Lys-598) in hypochlorous acid treatment, suggesting that the preferred site of modification is dependent on the nature of the oxidant and that the process relies on specific structural motifs in the protein to direct the oxidation (Fig. 2).⁴³⁾ Pulmonary hypertension in sickle cell anemia is characterized by decreased nitric oxide bioavailability that might, in part, be related to oxidative stress. Amino acid residue K159 of albumin has been demonstrated a site of malondialdehyde modification that was differentially present in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension and pulmonary hypertension in sickle cell anemia.⁴⁴⁾

HSA exists in both reduced and oxidized forms, and the percentage of oxidized albumin increases in several diseases. An increased level of oxidized HSA may impair HSA function in a number of pathological conditions.^{42,45)} Oxidative stress is believed to play an important role in the pathogenesis of liver failure. The serum albumin level is related to prognosis in advanced liver disease. Progressive oxidative modification of albumin was found with increasing severity of liver failure indicated by an increased content of carbonyl groups and oxidation of cysteine-34, with a preferred binding

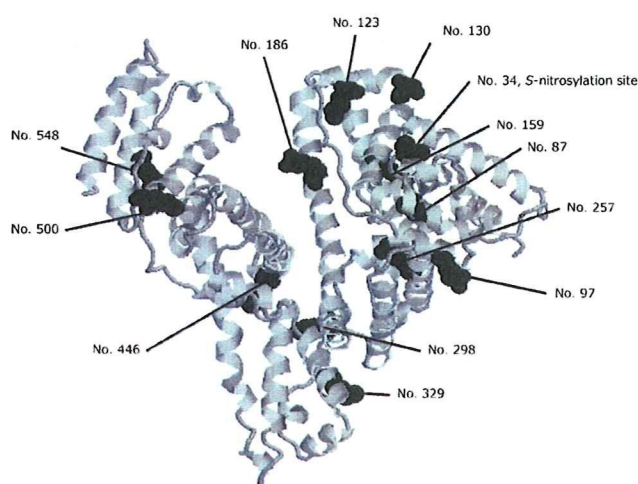


Fig. 2. Oxidation Sites of Human Serum Albumin (HSA)

Cysteine 34 is particularly susceptible to oxidation, and also the site for S-nitrosylation.

of bilirubin to the fully reduced form of albumin in patients with acute-on-chronic liver failure.⁴⁶⁾

Oxidative stress was enhanced in correlation with the level of renal dysfunction among patients with chronic renal failure.⁴⁷⁾ Plasma albumin has been found to undergo massive oxidation in primary nephrotic syndrome.⁴⁸⁾ Oxidized albumin is a reliable marker of oxidative stress in HD patients because albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in chronic renal failure and HD patients.⁴⁹⁾ An increase in plasma protein carbonyl levels in HD patients was largely due to an increase in oxidized albumin. HD-HSA was found to have a lower antioxidant activity than normal HSA. HD-HSA was also able to trigger the oxidative burst of human neutrophils. Uremia plays an important role in the progression of oxidative stress in HD patients because uremic toxins may possibly play a role in mediating free radical-initiated protein damage.⁵⁰⁾ Diabetic complications exacerbate the condition by further increasing the amount of oxidized HSA molecules.^{51,52)}

End-stage renal disease is associated with enhanced oxidative stress and may contribute to substantial cardiovascular complications in HD patients. The quality and integrity of HSA molecule in HD patients have been shown subtly altered and as a result HSA's biological properties are impaired. Intravenous iron administration, which is effective for correcting anemia in HD patients, enhances generation of hydroxyl radicals and thus oxidation of albumin in those patients.^{53,54)} Oxidative alterations of this major plasma protein might adversely affect its vasculoprotective effects in HD patients. Hence antioxidant strategies should become part of treatment for predialysis renal failure.⁵⁵⁾

Non-enzymatic Glycation Structural modification of protein by carbohydrate falls into two broad categories: nonenzymatic glycation, which refers to the attachment of free carbohydrate to proteins in the Amadori construct, and advanced glycation endproducts (AGE), which refers to a heterogeneous group of carbohydrate-modified products generated from the Amadori adduct by oxidation, polymerization, and other spontaneous reactions.⁵⁶⁾ Nonenzymatic glycation is one of the underlying factors contributing to the development of complications of diabetes. HSA is nonenzymatically glycated by reducing sugars in the general circulation. The reference range of glycated albumin in normal humans is 6–10%. However, this proportion typically increases to between 20% and 30% in hyperglycemic patients.

Arg-410 was found to be a hotspot of modification by methylglyoxal in albumin glycated *in vivo*. Other sites of minor modification were: Arg-114, Lys-186, Arg-218, and Arg-428 (Fig. 3).⁵⁷⁾ On the other hand, the other principal site of glycation on HSA is Lys-525, but the lysine residues in positions 199, 281, and 439 are also susceptible to glycation. AGE formation of HSA is associated with extensive damage to histidine and tryptophan side chains, main chain fragmentation, and loss of both secondary and tertiary structure as a result of oxidation.⁵⁸⁾ In structural analysis, the increases in advanced oxidation protein products and dityrosine content of HSA induced slight decreases in its alpha-helical content.³⁷⁾ Using mesangial cells from SR-A knockout mice Nakajou's group^{59,60)} showed that a class A scavenger receptor, SR-A, contributes approximately 40% to the binding and approximately 80% to the subsequent degradation of AGE-

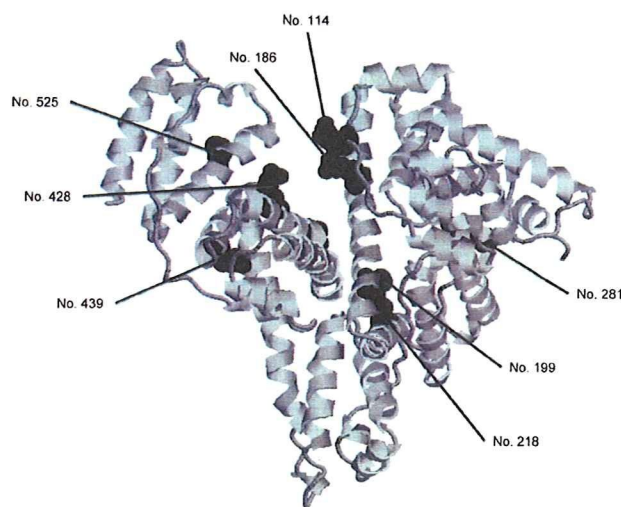


Fig. 3. Nonenzymatic Glycation Sites of Human Serum Albumin (HSA)

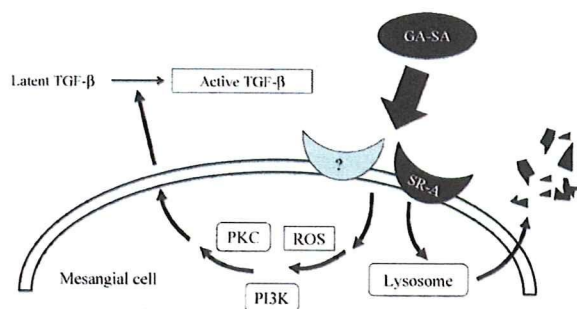


Fig. 4. Proposed Mechanism of Biological Fate for Glycoaldehyde-Serum Albumin (GA-SA)
ROS, reactive oxygen species.

modified proteins. This pathway may contribute to the pathogenesis of AGE-induced diabetic nephropathy (Fig. 4). The advanced oxidation protein products have been shown involved in the development of renal fibrosis via the CD36 pathway.⁶¹⁾

Free radical production is increased during diabetes. Glycation and oxidative damage cause protein modifications, as can be frequently observed in numerous diseases. Albumin is a major and important circulating antioxidant.⁶²⁾ Structural modification of albumin induced by glucose or free radicals impairs its antioxidant properties.⁶³⁾ HSA of type 1 diabetes mellitus patients is conformationally altered, with more exposure of its hydrophobic regions. In addition, hydroxyl radical modified HSA was found highly immunogenic in rabbits as compared with native HSA. Sera from elderly type 1 diabetes mellitus patients having smoking history, and advanced disease showed substantially stronger binding to hydroxyl radical-modified HSA over normal HSA. These findings suggest that oxidation of plasma proteins, especially HSA, might enhance oxidative stress in type 1 diabetes mellitus patients.⁶⁴⁾ Serum albumin of type 2 diabetes mellitus patients has decreased antioxidant properties that may aggravate oxidative stress.⁶⁵⁾ Similarly decreased antioxidant activity of serum albumin can be found in obstructive sleep apnea patients.⁶⁶⁾

S-Nitrosylation Nitric oxide (NO) is a short-lived physi-

ological messenger. Its various biological activities can be preserved in a more stable form of *S*-nitrosothiols.⁶⁷⁾ The *S*-nitrosylated forms of certain proteins such as albumin have been thought to be circulating endogenous reservoirs of NO and may have potential as NO donors in therapeutic applications.^{68,69)} In addition to serving as a reservoir for NO, *S*-nitrosothiols themselves have various biological activities, possibly through transnitrosylation, *S*-thiolation, and direct action of other biological molecules.^{70,71)}

Many potential clinical uses for *S*-nitrosothiols have been suggested such as its potential use as a therapeutic agent.⁷²⁾ *S*-Nitroso HSA acts primarily as a venodilator *in vivo* and represents a stable reservoir of NO that can release NO when the concentrations of low-molecular-weight thiols are elevated.⁷³⁾ *S*-Nitroso HSA has been shown to reduce ischemia or reperfusion injury in the pig heart after unprotected warm ischemia through long-lasting release of NO. This prevents uncoupling of endothelial NO synthase, which is a major contributor to vascular reactive oxygen species generation in ischemia and reperfusion injury, and thereby improves systolic and diastolic function, myocardial perfusion, and the energetic reserve of the heart after such insults.⁷⁴⁾ Similar cardioprotective effect on rabbit has also been reported.⁷⁵⁾ In a recent study, *S*-nitrosylated HSA was shown to have antitumor activity through apoptosis induction without causing hepatic or renal damage. This suggests that NO-HSA has chemopreventive and/or chemotherapeutic activity with few side effects.⁷⁶⁾

Ishima *et al.*⁷⁷⁾ showed in a rat ischemia/reperfusion model that binding of oleate to *S*-nitrosylated HSA enhances its cytoprotective effect on liver cells. Addition of oleate increased the accessibility of the single thiol group of albumin and improved *S*-denitrosation of SNO-HSA by HepG2 cells. It enhances the antiapoptotic effect of SNO-HSA on HepG2 cells exposed to anti-Fas antibody. This may lead to preparation of an *S*-nitrosylated HSA dosage form that will produce better treatment outcome.⁷⁷⁾

DESIGN OF ALBUMIN MUTANT ANALOGUES WITH DESIRABLE PHARMACEUTICAL PROPERTIES

Extended Half-Life Albumin Analogue Oxidation promotes elimination of albumin.²⁴⁾ It is therefore tempting to design an oxidation-resistant albumin analogue that has a prolonged half-life. Nevertheless, the antioxidant property of albumin helps to improve the conditions of critically ill patients. One possible approach is genetically to fuse two molecules of human albumin to produce a recombinant albumin dimer. This will allow the desired antioxidant property to be sustained in the dimer.

Dimerization of human albumin has been reported to extend the half-life by approximately 1.5 times greater than that of the wild-type HSA monomer. Dimerization also causes a significant decrease in the total body clearance and distribution volume at steady state of HSA. In addition, rHSA dimer also has a high retention rate in circulating blood and a lower vascular permeability than normal HSA. This dimer has good potential for use in critically ill patients with hypovolemia, burns, and hypoalbuminemia.⁷⁸⁾

The MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) has been reported to serve in the homeostatic regulation of IgG

and albumin by increasing their half-lives. Elucidation of the FcRn-albumin interaction will shed light on a more sophisticated design of albumin analogue with long half-life without compromising its antioxidant property.⁷⁹⁾

Antibacterial Albumin Analogue Albumin Liprizzi is a genetic variant of HSA detected in Italy that represents the first example of a mutation in the most active binding pocket of the molecule, Arg410→Cys, placed in subdomain IIIA.³¹⁾ *S*-Nitrosylation of human variant albumin Liprizzi (R410C) confers potent antibacterial activity against *Salmonella typhimurium in vitro* and cytoprotective properties *via* suppressing apoptosis of U937 human promonocytic cells induced by Fas ligand. *S*-Nitrosylated R410C treatment of ischemia-reperfusion liver injury in a rat model significantly reduced liver damage.⁸⁰⁾ The increased cytoprotective effect appears enhanced by fatty acid binding.⁷⁷⁾ Iwao *et al.*²⁴⁾ reported that a single amino acid substitution at position 410 from arginine to alanine (R410A) shortened the half-life of the HSA mutant in circulation. Interestingly, *S*-nitrosylation of R410C prolonged its half-life in circulation, probably through reduced liver uptake. Based on these advantages, further investigation of the use of *S*-nitrosylation R410C albumin in clinical settings is warranted.

Oxidation-Resistant Albumin Analogue The accumulation of albumin-bound toxins such as bilirubin in liver failure is believed responsible for the development of associated end-organ dysfunctions. Albumin-bound toxins are also important in the pathophysiology of systemic inflammatory response syndrome, and poisoning. Due to its intrinsic ability to bind molecules, albumin has been used in blood purification techniques such as single-pass albumin dialysis,^{81,82)} the molecular adsorbent recirculating system,^{83,84)} and the Prometheus systems.^{85,86)} The molecular adsorbent recirculating system of albumin dialysis is a high-flux dialysis setting using HSA as a molecular adsorbent to the dialysate with subsequent recirculation of the dialysate over sorbents. It is a useful tool to treat acute liver failure and decompensated chronic liver disease, and to provide a bridge for patients to liver transplantation.^{83,87)}

Since oxidation of albumin compromises its ligand-binding property and shortens its shelf life, it is logical to use an oxidation-resistant albumin analogue for the purpose of albumin dialysis. Oxidation resistance could be conferred to an albumin molecule through mutation of cysteine or methionine residues that are susceptible to free radical attack. However, it is of interest to investigate whether antioxidant property of albumin is desirable for facilitating radical species removal in albumin dialysis.⁸⁸⁾

Komatsu and coworkers⁸⁹⁻⁹¹⁾ genetically engineered heme pocket on recombinant HSA for complexation of iron protoporphyrin IX to generate an artificial hemoprotein, which was effective in binding oxygen in much the same way as hemoglobin (Hb). Although the pharmacokinetic profile of this albumin-heme is yet to be investigated, it is possible that the bound oxygen may reduce the half-life of albumin through preferential oxidation. Hence another potential use of oxidation-resistant albumin analogue is in the production of albumin-heme complex.

High Toxin-Capturing Albumin Analogue Bilirubin and uremic toxins, endogenous substances that cause jaundice, are difficult to remove from blood by conventional HD

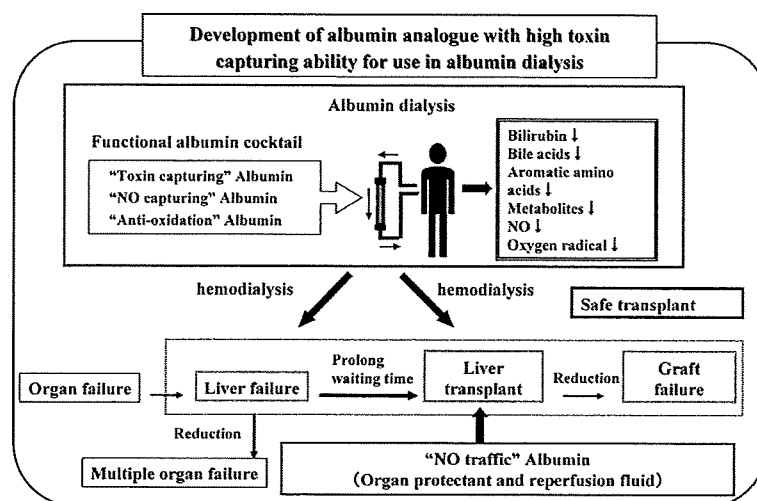


Fig. 5. Albumin Analogue Suitable for Use in Extracorporeal Albumin Dialysis for Patients Awaiting Liver Transplantation

because most toxins including bilirubin are water-insoluble and bind albumin with high affinities. Recently, molecular adsorbent recirculating system (MARS), which utilizes dialysis solution containing HSA, has been developed for removal of toxins such as bilirubin and furan dicarboxylic acid. However, this system needs to overcome a problem in that bilirubin also binds to other components of blood.

This system's shortcoming can be overcome by developing an albumin analogue that binds bilirubin with higher affinity than other plasma proteins. In addition, this high toxin-capturing albumin analogue may also benefit from oxidation-resistant property for use in dialysis solution of MARS (Fig. 5).

CONCLUSION

It appears that albumin is playing an increasing role as a drug carrier in clinical settings. However, the design of human albumin mutant analogues with desirable pharmaceutical properties can be a difficult and mammoth task because the protein undergoes multiple posttranslational modifications. With clarification of the effect of each posttranslational modification onto the protein molecule, an albumin analogue might be designed for a specific application. This "old but new plasma protein" has great potential for various applications than ever expected.

Acknowledgements We would like to express sincere appreciation to an excellent group of coworkers whose contributions are cited in the text, in particular to Prof. Toru Maruyama and Dr. Ayaka Suenaga of Kumamoto University, Prof. Ulrich Kragh-Hansen of University of Aarhus, and other coworkers.

REFERENCES AND NOTES

- Peters T., "All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications," Academic Press, NY, 1996.
- Curry S., Mandelkew H., Brick P., Franks N., *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 827–835 (1998).
- Chuang V. T., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **19**, 569–577 (2002).
- Chuang V. T., Otagiri M., *Drugs Today (Barc.)*, **43**, 547–561 (2007).
- Bar-Or D., Thomas G. W., Bar-Or R., Racl L. T., Scarborough K., Rao N., Shimonkevitz R., *Crit. Care Med.*, **34**, 1707–1712 (2006).
- Bar-Or D., Bar-Or R., Racl L. T., Gardner D. K., Slone D. S., Craun M. L., *Crit. Care Med.*, **33**, 1638–1641 (2005).
- Berezenco S., *Crit. Care Med.*, **34**, 1291; author reply 1291 (2006).
- Anraku M., Tsurusaki Y., Watanabe H., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1702**, 9–17 (2004).
- Anraku M., Kouno Y., Kai T., Tsurusaki Y., Yamasaki K., Otagiri M., *Int. J. Pharm.*, **329**, 19–24 (2007).
- Anraku M., Kabashima M., Namura H., Maruyama T., Otagiri M., Gebicki J. M., Furutani N., Tomida H., *Int. J. Biol. Macromol.*, **43**, 159–164 (2008).
- Kratz F., *J. Controlled Release*, **132**, 171–183 (2008).
- Yazaki P. J., Kassa T., Cheung C. W., Crow D. M., Sherman M. A., Bading J. R., Anderson A. L., Colcher D., Raubitschek A., *Nucl. Med. Biol.*, **35**, 151–158 (2008).
- Weimer T., Wormsbacher W., Kronthaler U., Lang W., Liebing U., Schulte S., *Thromb. Haemost.*, **99**, 659–667 (2008).
- Huang Y. J., Lundy P. M., Lazaris A., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Turcotte C., Cote M., Bellemare A., Bilodeau A. S., Brouillard S., Touati M., Herskovits P., Begin I., Neveu N., Brochu E., Picron J., Hockley D. K., Cerasoli D. M., Lenz D. E., Wilgus H., Karatzas C. N., Langermann S., *BMC Biotechnol.*, **8**, 50 (2008).
- Muller D., Karle A., Meissburger B., Hofig I., Stork R., Kontermann R. E., *J. Biol. Chem.*, **282**, 12650–12660 (2007).
- Peters T.: (<http://albumin.org>). Welcome to the Albumin Website, 15 February 2008.
- Minchiotti L., Galliano M., Kragh-Hansen U., Peters T. Jr., *Hum. Mutat.*, **29**, 1007–1016 (2008).
- Kragh-Hansen U., Saito S., Nishi K., Anraku M., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1747**, 81–88 (2005).
- Ma S. F., Nishikawa M., Katsumi H., Yamashita F., Hashida M., *J. Controlled Release*, **102**, 583–594 (2005).
- Yamasaki Y., Sumimoto K., Nishikawa M., Yamashita F., Yamaoka K., Hashida M., Takakura Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 467–477 (2002).
- Iwao Y., Hiraie M., Kragh-Hansen U., Mera K., Noguchi T., Anraku M., Kawai K., Maruyama T., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1774**, 1582–1590 (2007).
- Iwao Y., Hiraie M., Kragh-Hansen U., Sucnaga A., Maruyama T., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1794** (2009), in press.
- Nakajou K., Watanabe H., Kragh-Hansen U., Maruyama T., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1623**, 88–97 (2003).
- Iwao Y., Anraku M., Yamasaki K., Kragh-Hansen U., Kawai K., Maruyama T., Otagiri M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 743–749 (2006).
- Kragh-Hansen U., Donaldson D., Jensen P. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1550**, 20–26 (2001).
- Minchiotti L., Campagnoli M., Rossi A., Cosulich M. E., Monti M.,

- Pucci P, Kragh-Hansen U, Granel B, Disdier P, Weiller P J, Galliano M., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 344—352 (2001).
- 27) Kragh-Hansen U, Pedersen A. O., Galliano M., Minchiotti L., Brennan S. O., Tarnoky A. L., Franco M. H., Salzano F. M., *Biochem. J.*, **320** (Pt 3), 911—916 (1996).
- 28) Nielsen H, Kragh-Hansen U, Minchiotti L., Galliano M., Brennan S. O., Tarnoky A. L., Franco M. H., Salzano F. M., Sugita O., *Biochim. Biophys. Acta*, **1342**, 191—204 (1997).
- 29) Minchiotti L., Kragh-Hansen U., Nielsen H., Hardy E., Mercier A. Y., Galliano M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1431**, 223—231 (1999).
- 30) Kragh-Hansen U., Campagnoli M., Dodig S., Nielsen H., Benko B., Raos M., Ccsati R., Sala A., Galliano M., Minchiotti L., *Clin. Chim. Acta*, **349**, 105—112 (2004).
- 31) Galliano M., Watkins S., Madison J., Putnam F. W., Kragh-Hansen U., Cesati R., Minchiotti L., *Eur. J. Biochem.*, **251**, 329—334 (1998).
- 32) Kragh-Hansen U., Watanabe H., Nakajou K., Iwao Y., Otagiri M., *J. Mol. Biol.*, **363**, 702—712 (2006).
- 33) Kragh-Hansen U., Brennan S. O., Minchiotti L., Galliano M., *Biochem. J.*, **301** (Pt. 1), 217—223 (1994).
- 34) Kragh-Hansen U., Minchiotti L., Brennan S. O., Sugita O., *Eur. J. Biochem.*, **193**, 169—174 (1990).
- 35) Era S., Kuwata K., Imai H., Nakamura K., Hayashi T., Sogami M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1247**, 12—16 (1995).
- 36) Anraku M., Yamasaki K., Maruyama T., Kragh-Hansen U., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **18**, 632—639 (2001).
- 37) Iwao Y., Anraku M., Hiraike M., Kawai K., Nakajou K., Kai T., Suenaga A., Otagiri M., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 140—146 (2006).
- 38) Stewart A. J., Blindauer C. A., Berezenko S., Sleep D., Tooth D., Sadler P. J., *FEBS J.*, **272**, 353—362 (2005).
- 39) Quinlan G. J., Mumby S., Martin G. S., Bernard G. R., Gutteridge J. M., Evans T. W., *Crit. Care Med.*, **32**, 755—759 (2004).
- 40) Quinlan G. J., Margaron M. P., Mumby S., Evans T. W., Gutteridge J. M., *Clin. Sci.* (London), **95**, 459—465 (1998).
- 41) Bourdon E., Lorcau N., Lagrost L., Blache D., *Free Radic. Res.*, **39**, 15—20 (2005).
- 42) Kawakami A., Kubota K., Yamada N., Tagami U., Takehana K., Sonaka I., Suzuki E., Hirayama K., *FEBS J.*, **273**, 3346—3357 (2006).
- 43) Temple A., Yen T. Y., Gronert S., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **17**, 1172—1180 (2006).
- 44) Odhiambo A., Perlman D. H., Huang H., Costello C. E., Farber H. W., Steinberg M. H., McComb M. E., Klings E. S., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 2195—2203 (2007).
- 45) Narazaki R., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **14**, 351—353 (1997).
- 46) Oettl K., Stadlbauer V., Petter F., Greilberger J., Putz-Bankuti C., Hallstrom S., Lackner C., Stauber R. E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1782**, 469—473 (2008).
- 47) Terawaki H., Yoshimura K., Hasegawa T., Matsuyama Y., Negawa T., Yamada K., Matsushima M., Nakayama M., Hosoya T., Era S., *Kidney Int.*, **66**, 1988—1993 (2004).
- 48) Musante L., Bruschi M., Candiano G., Petretto A., Dimasi N., Del Boccio P., Urbani A., Rialdi G., Ghiggeri G. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 668—673 (2006).
- 49) Himmelfarb J., McMonagle E., *Kidney Int.*, **60**, 358—363 (2001).
- 50) Wratten M. L., Sereni L., Tetta C., *Renal Fail.*, **23**, 563—571 (2001).
- 51) Mera K., Anraku M., Kitamura K., Nakajou K., Maruyama T., Tomita K., Otagiri M., *Hypertens. Res.*, **28**, 973—980 (2005).
- 52) Mera K., Anraku M., Kitamura K., Nakajou K., Maruyama T., Otagiri M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **334**, 1322—1328 (2005).
- 53) Anraku M., Kitamura K., Shinohara A., Adachi M., Suenga A., Maruyama T., Miyanaka K., Miyoshi T., Shiraiishi N., Nonoguchi H., Otagiri M., Tomita K., *Kidney Int.*, **66**, 841—848 (2004).
- 54) Anraku M., Kitamura K., Shintomo R., Takeuchi K., Ikeda H., Nagano J., Ko T., Mera K., Tomita K., Otagiri M., *Clin. Biochem.*, **41**, 1168—1174 (2008).
- 55) Lim P. S., Cheng Y. M., Yang S. M., *Nephrology* (Carlton), **12**, 18—24 (2007).
- 56) Cohen M. P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **419**, 25—30 (2003).
- 57) Ahmed N., Dobler D., Dean M., Thornalley P. J., *J. Biol. Chem.*, **280**, 5724—5732 (2005).
- 58) Coussons P. J., Jacoby J., McKay A., Kelly S. M., Price N. C., Hunt J. V., *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 1217—1227 (1997).
- 59) Nakajou K., Horiuchi S., Sakai M., Haraguchi N., Tanaka M., Takcyia M., Otagiri M., *Diabetologia*, **48**, 317—327 (2005).
- 60) Nakajou K., Horiuchi S., Sakai M., Hirata K., Tanaka M., Takeya M., Kai T., Otagiri M., *J. Biochem.* (Tokyo), **137**, 607—616 (2005).
- 61) Iwao Y., Nakajou K., Nagai R., Kitamura K., Anraku M., Maruyama T., Otagiri M., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **295**, F1871—F1880 (2008).
- 62) Roche M., Rondcau P., Singh N. R., Tarnus E., Bourdon E., *FEBS Lett.*, **582**, 1783—1787 (2008).
- 63) Sakata N., Moh A., Takebayashi S., *Heart Vessels*, **17**, 22—29 (2002).
- 64) Rasheed Z., Ali R., *Life Sci.*, **79**, 2320—2328 (2006).
- 65) Faure P., Wiernsperger N., Polge C., Favier A., Halimi S., *Clin. Sci.* (London), **114**, 251—256 (2008).
- 66) Faure P., Tamisier R., Baguet J. P., Favier A., Halimi S., Levy P., Pepin J. L., *Eur. Respir. J.*, **31**, 1046—1053 (2008).
- 67) Rafikova O., Rafikov R., Nudler E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 5913—5918 (2002).
- 68) Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Kcancy J., Vita J., Singel D., Valeri C. R., Loscalzo J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 7674—7677 (1992).
- 69) Kcancy J. F. Jr., Simon D. I., Stamler J. S., Jaraki O., Scharfstein J., Vita J. A., Loscalzo J., *J. Clin. Invest.*, **91**, 1582—1589 (1993).
- 70) Hogg N., *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1478—1486 (2000).
- 71) Akaike T., Inoue K., Okamoto T., Nishino H., Otagiri M., Fujii S., Maeda H., *J. Biochem.* (Tokyo), **122**, 459—466 (1997).
- 72) Richardson G., Benjamin N., *Clin. Sci.* (London), **102**, 99—105 (2002).
- 73) Orié N. N., Vallance P., Jones D. P., Moore K. P., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, H916—923 (2005).
- 74) Hallstrom S., Franz M., Gasser H., Vodrazka M., Semsroth S., Loscrt U. M., Haisjackl M., Podesser B. K., Malinski T., *Cardiovasc. Res.*, **77**, 506—514 (2008).
- 75) Semsroth S., Fellner B., Trescher K., Bernecker O. Y., Kalinowski L., Gasser H., Hallstrom S., Malinski T., Podesser B. K., *J. Heart Lung Transplant.*, **24**, 2226—2234 (2005).
- 76) Katayama N., Nakajou K., Komori H., Uchida K., Yokoe J., Yasui N., Yamamoto H., Kai T., Sato M., Nakagawa T., Takeya M., Maruyama T., Otagiri M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **325**, 69—76 (2008).
- 77) Ishima Y., Akaike T., Kragh-Hansen U., Hiroyama S., Sawa T., Suenaga A., Maruyama T., Kai T., Otagiri M., *J. Biol. Chem.*, **283**, 34966—34975 (2008).
- 78) Matsushita S., Chuang V. T., Kanazawa M., Tanase S., Kawai K., Maruyama T., Suenaga A., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **23**, 882—891 (2006).
- 79) Andersen J. T., Dec Qian J., Sandlic I., *Eur. J. Immunol.*, **36**, 3044—3051 (2006).
- 80) Ishima Y., Sawa T., Kragh-Hansen U., Miyamoto Y., Matsushita S., Akaike T., Otagiri M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **320**, 969—977 (2007).
- 81) Collins K. L., Roberts E. A., Adeli K., Bohn D., Harvey E. A., *Pediatr. Nephrol.*, **23**, 1013—1016 (2008).
- 82) Rosa Diez G., Greloni G., Gadano A., Giannasi S., Cruccelegui M., Trillini M., Algranati S., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **22**, 2731—2732 (2007).
- 83) Mitzner S. R., *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **16**, 589—595 (2007).
- 84) Mitzner S. R., Stange J., Klammt S., Poczynski P., Schmidt R., Noldge-Schomburg G., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **12** (Suppl. 17), S75—S82 (2001).
- 85) Rifai K., Tetta C., Ronco C., *Int. J. Artif. Organs*, **30**, 858—863 (2007).
- 86) Krisper P., Stauber R. E., *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, **3**, 267—276 (2007).
- 87) Karvellas C. J., Gibney N., Kutsogiannis D., Wendon J., Bain V. G., *Crit. Care*, **11**, 215 (2007).
- 88) Wratten M. L., Sereni L., Tetta C., *Artif. Organs*, **24**, 685—690 (2000).
- 89) Komatsu T., Matsukawa Y., Tsuchida E., *Bioconjug. Chem.*, **13**, 397—402 (2002).
- 90) Komatsu T., Oguro Y., Teramura Y., Takeoka S., Okai J., Anraku M., Otagiri M., Tsuchida E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1675**, 21—31 (2004).
- 91) Komatsu T., Nakagawa A., Zunsain P. A., Curry S., Tsuchida E., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 11286—11295 (2007).

ヘモグロビン小胞体 (HbV) の体内動態特性

The Pharmacokinetic Properties of Hemoglobin-vesicles

田口和明⁽¹⁾, 丸山徹^(1,2), 小田切優樹^(1,3)Kazuaki Taguchi⁽¹⁾, Toru Maruyama^(1,2), Masaki Otagiri^(1,3)

和文抄録

ヘモグロビン (Hb) 小胞体 (hemoglobin vesicle ; HbV) は直径約 250 nm の均一な粒径のリン脂質二分子膜より構成される小胞体中に、ヒト赤血球由来 Hb を高濃度で内包させたポリエチレングリコール (PEG) 修飾細胞型人工酸素運搬体である。これまでに、製剤化試験・薬理試験など数多くの前臨床試験において HbV の有用性が証明されているが、HbV の体内動態に関する情報は不足している。そこで我々は、HbV の体内動態特性について検討を行った。Hb 及び HbV の内部 Hb をヨウ素 (¹²⁵I) 標識した ¹²⁵I-Hb 及び ¹²⁵I-HbV を用いた体内動態実験より、Hb を小胞体化することで腎臓及び肝臓への分布が抑制され、血中半減期は 30 倍に延長した。また、投与量依存的に ¹²⁵I-HbV の肝臓及び脾臓における取り込みクリアランス (CL_{uptake}) は減少し、消失半減期は 1400 mg Hb/kg の投与量において約 19 時間まで増大した。¹²⁵I-HbV 及び HbV の膜構成コレステロールをトリチウム (³H) で標識した HbV (³H-HbV) を用い、HbV 構成成分の体内動態について検討したところ、¹²⁵I-HbV 及び ³H-HbV の血漿中濃度推移はほぼ一致したことから HbV は小胞体構造を保持したまま血中を滞留することを確認した。また両標識体ともに主要分布臓器は肝臓及び脾臓であることが示された。加えて、初代肝実質及び肝内皮細胞、さらにはクッパー細胞の代替として RAW 264.7 細胞を用い、HbV の取り込みに関与する細胞種の探索を行ったところ、RAW 264.7 細胞においてのみ、¹²⁵I-HbV の特異的な取り込み及び分解が認められ、HbV の取り込み・分解には細網内皮系細胞 (MPS) が関与することが明らかとなった。さらに興味深いことに、肝臓及び脾臓で分解された後、HbV の内部 Hb と脂質成分は異なる動態特性を示すことが判明した。すなわち、Hb は速やかに臓器中から消失後、7 日以内に尿中へ排泄されるものの、脂質成分は 14 日以内に胆汁中より糞中へ排泄された。また、マウスにリポソーム製剤を投与することで惹起される Accelerated Blood Clearance (ABC) 現象の有無を HbV について検討するために、非標識 HbV 投与 (0.1 or 1400 mg Hb/kg) 7 日後に ¹²⁵I-HbV を投与 (0.1 or 1400 mg Hb/kg) した。その結果、HbV 低投与量 (0.1 mg Hb/kg) においては、ABC 現象誘発の原因となる抗 HbV IgM の産生が確認され、初回投与時と比較して、2 回目投与時には著しい血中滞留性の低下とともに、肝臓及び脾臓による CL_{uptake} の有意な増大が観察された。一方、HbV 高投与量 (1400 mg Hb/kg) では、抗 HbV IgM の産生は確認されたものの、MPS による取り込みの飽和により、低投与量時において観察された血中滞留性の低下は有意に抑制された。また、抗 HbV IgM の認識部位は HbV 脂質膜構成成分の DSPE-PEG であった。最後に、出血性ショックのモデルラットを用いて、HbV の単回及び連続投与時における体内動態を検討したところ、出血性ショック時の消失半減期は健常時に比べ短縮したが、2 回目投与時の消失半減期は単回投与時に比べ延長し、健常時と同レベルまで回復した。さらにこれらの結果に基づき、ヒトにおける HbV の半減期をアロメトリック式を用い算出したところ約 3-4 日と予想された。以上の結果から、薬理試験で示されていた HbV の安全性及び有効性を、我々は体内動態特性の観点より明らかにした。

Abstract

Hemoglobin vesicles (HbV) have been developed as a cellular type of oxygen carrier, in which highly concentrated hemoglobin (Hb) is encapsulated in a phospholipid bilayer membrane with polyethylene glycol (PEG), and the diameter of HbV can be tailored to approximately 250 nm. Despite evidence for many types of effectiveness of HbV evaluation, including formulation test

(1) 熊本大学大学院医学薬学教育部 〒862-0973 熊本市大江本町5-1 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan.

(2) 熊本大学育薬フロンティアセンター Center for Clinical Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

(3) 崇城大学薬学部 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sojo University

論文受付 2009年11月4日 論文受理 2009年12月3日

and pharmacological test, the pharmacokinetics of HbV have not been well characterized. Therefore, we examined the pre-clinical pharmacokinetic studies of HbV. Using HbV in which the internal Hb was labeled with iodine-125 (^{125}I -HbV) and cell-free ^{125}I -Hb, it was found that encapsulation of Hb increased the half-life by 30 times, accompanied by a decreased distribution in both the liver and kidney. The uptake clearances for the liver and spleen were decreased with increasing dose of HbV, and the half-life of HbV was increased up to approximately 19 hours at a dose of 1400 mg Hb/kg. The pharmacokinetics of HbV components (internal Hb and liposomal lipid) were also investigated using ^{125}I -HbV and ^3H -HbV (liposomal cholesterol was radiolabeled with tritium-3 (^3H)). Similar plasma concentration curves of ^{125}I -HbV were observed for ^3H -HbV, and time course for the plasma iron concentration curve derived from HbV was consistent with the plasma concentration curves for both labeled-HbV. ^{125}I -HbV and ^3H -HbV were mainly distributed to the liver and spleen. In an *in vitro* study, the specific uptake and degradation of HbV in RAW 264.7 cells was observed, but this was not the case for parenchymal and endothelial cells. After degrading HbV in liver and spleen, internal Hb disappeared from both the liver and spleen 5 days after injection, and the liposomal cholesterol disappeared at about 14 days. Internal Hb was excreted into the urine and cholesterol into feces *via* biliary excretion. To examine whether HbV induces the Accelerated Blood Clearance (ABC) phenomenon in mice, at 7 days after the first injection of non-labeled HbV (0.1 or 1400 mg Hb/kg), the mice received ^{125}I -HbV (0.1 or 1400 mg Hb/kg). At a dose of 0.1 mg Hb/kg, ^{125}I -HbV was rapidly cleared from the circulation and uptake clearances in liver and spleen were significantly increased, and at this time, IgM against HbV was produced. In contrast, at a dose of 1400 mg Hb/kg, the pharmacokinetics of HbV were negligibly affected by repeated injection despite the production of IgM against HbV. This is due to the saturation of phagocytic processing by the mononuclear phagocyte system. In addition, the recognition site was determined to be DSPE-PEG in HbV. Next, we investigated the pharmacokinetics of single versus repeated administration of HbV during hemorrhagic shock. The half-life was shorter in hemorrhagic shock rats as comparison with normal rats, but it returned to levels similar to those of normal rats after the second HbV injection in hemorrhagic shock rat. Finally, the half-life of HbV in humans was estimated to be approximately 3-4 days using an allometric equation. We could determine the detailed pharmacokinetics properties of HbV, and our results suggest that HbV could be used as an oxygen carrier from the view point of pharmacokinetic studies.

Keywords

hemoglobin based oxygen carrier, pharmacokinetic, accelerated blood clearance (ABC) phenomenon, anti-HbV IgM, hemorrhagic shock, extrapolation

はじめに

通常、生体内においてヘモグロビン (Hb) は赤血球内に存在し、主に酸素運搬の役割を担っている。現代の医療において、不慮の事故や手術中の大量出血時には赤血球濃厚液の投与が行われているが、既知の AIDS や肝炎ウイルス及び未知のウェストナイルウイルスなどの感染症に加え、血液型不一致等の医療過誤を引き起こす可能性が否定できない。さらには、日本における赤血球濃厚液の保存期間は採血後、冷蔵で 3 週間という短い期間であるなどといった様々な問題点が残されている。このような問題を克服するために、これまでにパーフルオロカーボン (Perfluorocarbon; PFC) や非細胞型及び細胞型 Hb-based oxygen carrier (HBOCs) などの人工酸素運搬体の開発が進められてきた^{1,2)}。

Hb 小胞体 (hemoglobin vesicle ; HbV) は直径約 250nm の均一な粒径リン脂質二分子膜より構成される小胞体中に、ヒト赤血球由来の精製 Hb を高濃度で内包させた細胞型 HBOCs である。これまでにアルブミンを添加することにより膠質浸透圧の調節が可能であること、さらには、アロステリック因子として Pyridoxal 5'-phosphate を共封入することによる酸素分圧の調節が可能であることなど、赤血球と同等の物理化学的特性を付加することができることが報告されている^{3,4)}。また、ポリエ

チレングリコール (PEG) を粒子表面へ導入することにより、小胞体粒子間の凝集抑制と分散安定性が向上し、溶液状態で 2 年以上の室温保存を可能にただけでなく、細網内皮系細胞 (MPS) からの捕捉を抑制できることが報告されている^{5,6)}。同時に、ヒト赤血球から HbV の原料となる Hb の精製段階におけるウイルスの除去及び不活化工程に関しても数多くの検討がなされ、高い安全性が確保されつつあると言える^{7,8)}。この物理化学的検討に加え、薬理効果についても、ラットを用いた 50% 出血ショックモデルの蘇生などの動物試験において、赤血球と同等の効果を有することが証明されており、今後の臨床応用が期待されている^{9,10)}。

一般に、医薬品の開発過程の中で、前臨床試験として製剤化試験、薬理試験、薬物動態試験、さらには安全性試験など多くの段階を経て、その有効性と安全性を確立していく。2008 年、Journal of American Medical Association (JAMA) 誌において、欧米で開発された HemAssist, Hemopure, Hemolink, PolyHeme, Hemospan の 5 種類の非細胞型 HBOCs の臨床試験結果を基に、メタアナリシスを行ったところ、非細胞型 HBOCs 投与群の死亡率および心筋梗塞発症率が対照群に比べ高いというエビデンスが報告された。これを受け Natanson らは人工酸素運搬体の開発過程で動物試験における十分な検討が

必要であると指摘しており、以前にもまして、さらなる前臨床試験とその解釈の重要性が求められるようになった¹²⁾。

前述したように、HbVの有用性は数多くの前臨床試験において確認されているが、前臨床試験で必要不可欠な検討項目の1つである体内動態に関する情報は不足している。1997年、Kennedyは、新薬開発断念の理由に不十分な薬物動態試験が大きく関与していることを報告している¹³⁾。これは薬物動態試験がただ単なる、薬物の吸収 (Absorption)・分布 (Distribution)・代謝 (Metabolism)・排泄 (Excretion) といった、いわゆるADMEを把握するだけでなく、これらのデータを踏まえた上で薬理効果や毒性発現を予測すること、つまり有効性や副作用を考える上で有用であるからである。実際に、過去に開発された人工酸素運搬体の一つであるPFCは、その有用性が*in vivo*及び*in vitro*試験において証明されたが、クリアランス (排泄)の悪さから、1年以上にわたる臓器蓄積 (特に肺) が原因となる副作用が確認された¹⁴⁾。この問題は体内動態試験の結果から十分に予想できたと思われる。また、リポソーム製剤は上市されるようになって日が浅いため、従来の製剤に比べて体内動態についても不明な点が残されている。加えてHbVの場合、赤血球代替物であるため投与量が通常のリポソーム製剤の100倍以上と多く、これまでの構築されてきた動態解析の成果を当てはめることができない。そのため、予期せぬ副作用や生体蓄積性が懸念されると同時に、新たにHbVの臨床使用状況でデータを構築する必要がある。

現在、上市されているAmphotericin B内封リポソーム製剤 (AmBisome[®]) は健常人と病態患者によって体内動態が一部異なることが報告されている^{15,16)}。また、PEG修飾リポソームにおいて、ある投与間隔で2回投与を行うと2回目投与されたPEG修飾リポソームの血中クリアランスが亢進するといった、いわゆるAccelerated Blood Clearance Phenomenon (ABC現象) が誘導されることが報告されている¹⁷⁾。そのため、PEG修飾リポソーム製剤であるHbVにおいても健常時と病態時 (大量出血時)、また頻回投与時において体内動態が異なる可能性が懸念され、そのような条件をふまえてHbVの体内動態特性を把握することはHbVを安全かつ有効に臨床使用するために重要であると考えられる。

本稿では、我々がこれまで明らかにしてきたHbVの体内動態特性について紹介する。

1 Hb及びHbVの体内動態解析¹⁸⁾

通常、溶血により血漿中へ放出されたHbは血漿タンパク質の一つであるハプトグロビンと結合することで、肝臓へ取り込まれる¹⁹⁾。ハプトグロビンと結合していない遊離型のHbは、速やかに二量体へ解離し、糸球体のサイズバリアーを潜り抜けることで糸球体濾過をうけ、尿中へ排泄される。そこで、ddY系雄性マウスにHb及びHbVの内部Hbをヨウ素 (¹²⁵I) 標識した¹²⁵I-Hbあるいは¹²⁵I-HbVを1 mg Hb/kgで尾静脈内投与し、Hbを小胞体化することによる、体内動態の変化について検討した。

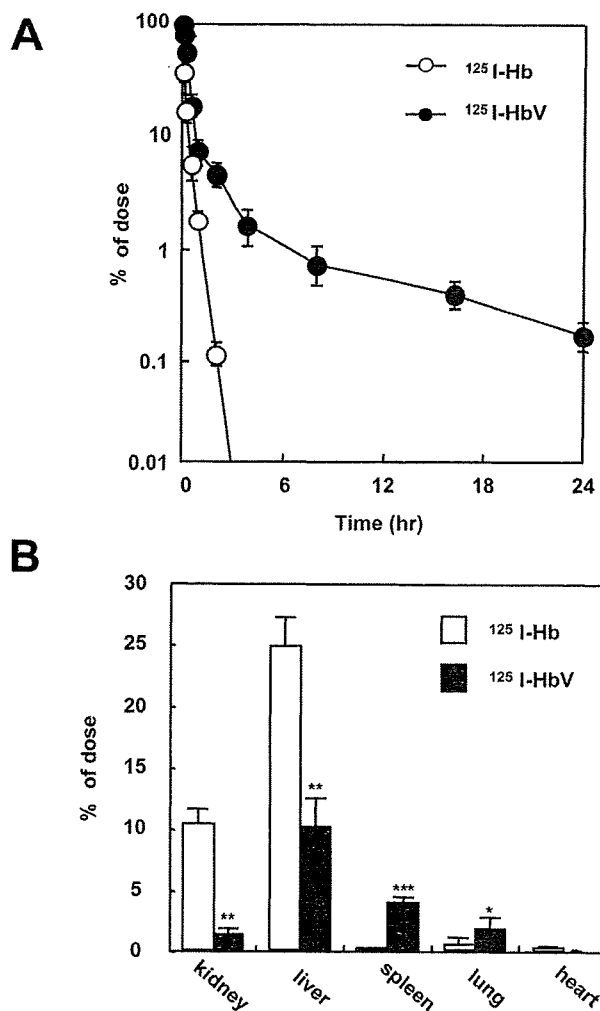


Fig. 1. A, Time course for the plasma level of ¹²⁵I-Hb (open circle) and ¹²⁵I-HbV (closed circle) after administration to mice. ddY mice received a single injection of ¹²⁵I-Hb or ¹²⁵I-HbV from the tail vein at a dose of 1 mg Hb/kg. Blood was collected from the inferior vena cava under ether anesthesia, and a plasma sample was obtained. Each point represents the mean \pm SD (n=3-6). B, Tissue distributions of ¹²⁵I-Hb (open bar) and ¹²⁵I-HbV (filled bar) at 3 min after administration to mice. ddY mice received a single injection of ¹²⁵I-Hb or ¹²⁵I-HbV from the tail vein at a dose of 1 mg/kg. At 3 min after injection, each organ was collected. Each bar represents the mean \pm SD (n=3-6). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 vs ¹²⁵I-Hb.

¹²⁵I-Hb及び¹²⁵I-HbVを1 mg Hb/kgでddYマウスに尾静脈内投与後の血漿中濃度推移をFig. 1Aに示す。¹²⁵I-Hbは投与後速やかに血漿中より消失するのに対して、¹²⁵I-HbVは長時間滞留し、半減期 ($t_{1/2}$) は、約30倍に延長していた ($t_{1/2}$; 3.1 ± 1.0 , 0.1 ± 0.1 hr, $p<0.01$, for ¹²⁵I-HbV and ¹²⁵I-Hb, respectively)。それに伴い、¹²⁵I-HbVの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は¹²⁵I-Hbに比べ約3倍増大し、一方で全身クリアランス (CL) は有意に減少した (AUC; 29.4 ± 9.2 , 7.9 ± 3.9 hr *% of dose/mL, $p<0.001$ and CL; 3.4 ± 0.1 mL/hr, 12.7 ± 2.1 mL/hr, $p<0.001$, for ¹²⁵I-HbV and ¹²⁵I-Hb, respectively)。この際の投与3分後の主要臓器への分布をFig. 1Bに示す。¹²⁵I-HbVは¹²⁵I-Hb

と比較して、腎臓及び肝臓への移行が著しく抑制されるとともに、 $^{125}\text{I}\text{-Hb}$ においてほとんど分布していなかった脾臓や肺への移行が有意に増大した。

この現象は、血漿中において極めて不安定であったHbを小胞体化することで、①ハプトグロビンとの結合の抑制、②血漿中でのHbの解離及び排泄の抑制、つまり、肝臓及び腎臓におけるHbVの取り込みが有意に抑制されたため、血中滞留性が大幅に改善されたと解釈される。また、リボソーム製剤はMPSにより取り込み・分解を受けるため、HbVは脾臓・肺マクロファージに取り込みを受けた結果、脾臓・肺への分布量が増大したのではないかと推察される。

2 HbV体内動態に及ぼす投与量依存性¹⁸⁾

マウスにおける $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ の体内動態の投与量依存性について、投与量を1, 10, 200 mg Hb/kg及び臨床使用量の目安とされる1400 mg Hb/kgに設定して検討した。Fig. 2にマウスに静脈内投与後の血漿中濃度推移を示す。投与量の増大とともに血中滞留性は向上し、 $t_{1/2}$ は1400 mg Hb/kgの投与量において、約19時間まで延長した ($t_{1/2}$: 3.1 ± 3.1 , 3.6 ± 1.3 , 7.2 ± 3.1 and 18.8 ± 1.3 hr at doses of 1, 10, 200 and 1400 mg Hb/kg, respectively)。ラットにおいても同様の検討を行ったところ、投与量増大に伴い血中滞留性は向上した ($t_{1/2}$: 8.8 ± 0.7 , 11.5 ± 0.3 and 30.6 ± 4.0 hr at doses of 10, 200 and 1400 mg Hb/kg, respectively)。

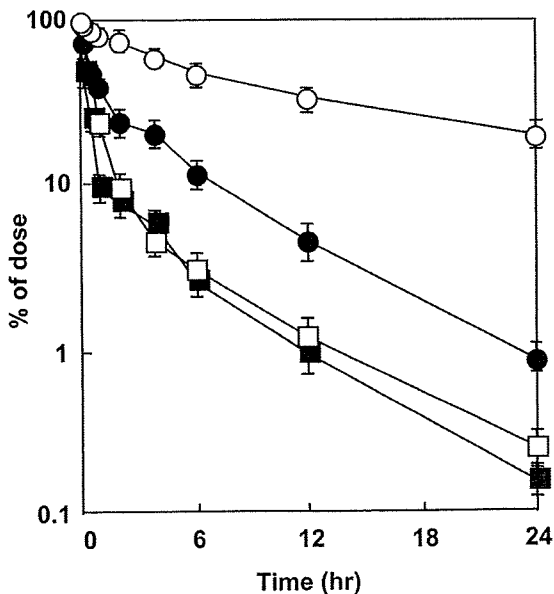


Fig. 2. Dose-dependent plasma concentration curve of $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ after administration of $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ in mice. All mice received a single injection of $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ at a dose of 1 (closed square), 10 (open square), 200 (closed circle) and 1400mg Hb/kg (open circle) containing 5% rHSA. At each time (0.05, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hr) after the $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ injection, blood samples were collected from the inferior vena cava, and a plasma sample was obtained. Each parameter was calculated by MULTI using a two-compartment model. Each point represents the mean \pm SD ($n=3-6$)

次に1400 mg Hb/kgの投与量で $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ をマウスに静脈内投与し、8時間後における各臓器の組織対血漿中濃度比 (K_p)を算出したところ、肝臓及び脾臓においてのみ K_p 値は、1より大きくなり (1.8, 2.8 mL/g of tissue for liver and spleen, respectively)、肝臓及び脾臓に高い濃度で蓄積することが示唆された。そこで、肝臓、脾臓について、 $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ の分布の投与量依存性を検討したところ、肝臓において、1, 10 mg Hb/kgの投与量では、投与30分後までに30%以上の高い分布が認められたが、投与量の増大とともに分布の程度は減少し、1400 mg Hb/kgにおいて肝臓へ分布した割合は数%にまで阻害された (Fig. 3A)。分布量の程度は異なるものの、同様の傾向が脾臓においても認められた (Fig. 3B)。また、各臓器の $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ 取り込みクリアランス ($\text{CL}_{\text{uptake}}$)を算出したところ、肝臓、脾臓において、 $\text{CL}_{\text{uptake}}$ は投与量依存的に減少し、腎臓、肺及び心臓においてはこのような傾向は認められなかった (Table 1)。以上のことより、HbVの消失には肝臓、脾臓が主要な役割を果たしていること、また、これら臓器への分布に投与量に依存した飽和現象が観察されたことから、HbVの臓器取り込み過程には輸送担体が関与している可能性が示された。

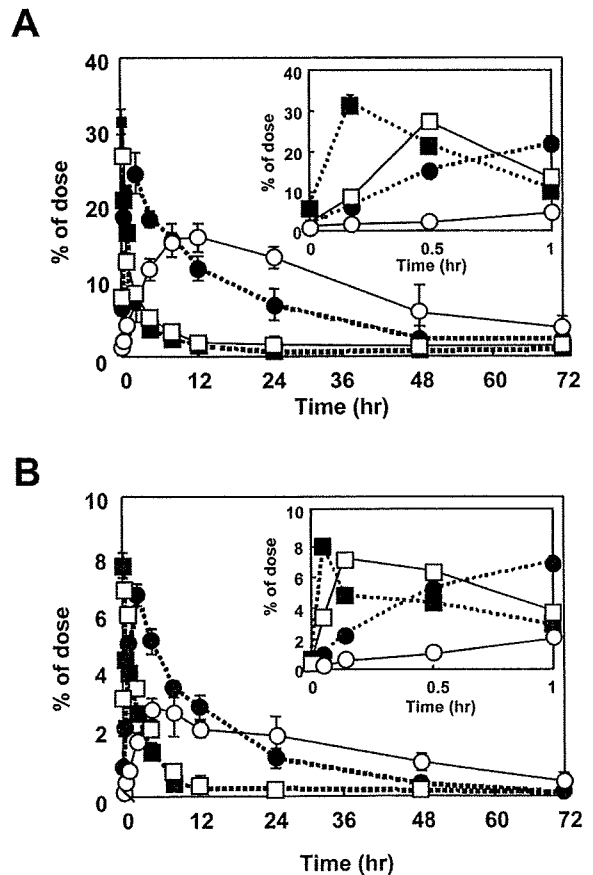


Fig. 3. Time dependent distribution of $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ to liver (A) and spleen (B) after administration of $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ in mice. All mice received a single injection of $^{125}\text{I}\text{-HbV}$ at a dose of 1 (closed square), 10 (open square), 200 (closed circle) and 1400mg Hb/kg (open circle) containing 5% rHSA. At each time after injection, the liver and spleen was collected. Each point represents the mean \pm SD ($n=3-6$)