The study on mechanisms for reduction of plasma protein binding of drugs in malignancy

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42334

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

博　士　論　文

がん病態下における
薬物の血漿蛋白結合率低下機構に関する研究

金沢大学大学院自然科学研究科
生命科学専攻
分子作用学講座

学　籍　番　号　　1023032501
氏　　名　　板倉　由縁
主任指導教員名　　松下　　良

目次

第 1 章　序論 4
第 2 章　骨肉腫腫瘍移植ラットにおける CEZ の蛋白結合率についての検討 7
第 1 節　緒言 7
第 2 節　結果 8
第 1 項　CEZ の蛋白結合実験 8
第 2 項　CEZ の蛋白結合率の変動 8
第 3 項　血漿蛋白結合に影響する血漿内因性物質の比較 9
第 3 節　考察 9
第 3 章　骨肉腫腫瘍移植ラットにおける IB の蛋白結合率についての検討 16
第 1 節　緒言 16
第 2 節　結果 17
第 1 項　IB の蛋白結合率の変動 17
第 2 項　IB の体内動態変動 17
第 3 節　考察 18
第 4 章　骨肉腫腫瘍移植ラット血漿からのアルブミンの精製とその特徴 21
第 1 節　緒言 21
第 2 節　結果 22
第 1 項　腫瘍群の血漿を用いた構造変化の検討 22
第 2 項　血漿からのアルブミン精製 22
第 3 項　精製アルブミンの薬物結合特性 23
第 4 項　腫瘍群のアルブミンの構造変化についての検討 23
第 3 節　考察 24
第 5 章　サイトカインの影響 33
第 1 節　緒言 33
第 2 節　結果 33
第 1 項　サイトカイン血漿中濃度の比較 33
第 2 項　結合パラメーターについての検討 34
第 3 節　考察 34
第 6 章　酸化アルブミンの影響 38

第 1 節　緒言 38
第 2 節　結果 39
第 1 項　抗酸化能の比較 39
第 2 項　CT 処理による CEZ、IB 蛋白結合率の変動 40
第 3 節　考察 41
第 7 章　結論 47
謝辞 48
実験の部 49
参考文献 60

第１章　序論

生体内における薬理効果の強弱は、標的組織への遊離形薬物の移行量に大きく依存する。最近では薬物動態学−薬力学(PK-PD)理論においても蛋白非結合体で評価する重要性が示唆されており、その主要な調節因子の一つが酸性薬物と主に結合するアルブミンである。アルブミンは血漿中で多量に存在するタンパク質で、血漿の全タンパク質の約 60%を占める。ヒトでは 3.5~5.0 g/dL、ラットなどのげっ歯類では 2.7~3.3 g/dL 存在すると言われているが [1)]、腎障害や肝障害、リウマチやがんなどの炎症性疾患で低下することが知られている [2)]。

生体内でのアルブミンの役割は多岐に渡り、膠質浸透圧の制御、脂肪酸、ビリルビン、尿毒症物質などの内因性化合物、薬物などの外因性化合物の結合と輸送、各種活性酸素やラジカルに対する抗酸化作用など様々な機能を担っている[3)]。例えばSudlowらは蛍光プローブを用いて陰イオン性薬物が2種類のサイトと特異的に結合することを見出し、これらの結合部位をサイトⅠ、Ⅱと称した[4)]。これらの機能はアルブミンの構造にも関係があると考えられ、アルブミンの構造は585個のアミノ酸からなる65 kDaの単純タンパク質で、三次元の基本構造は相同性の高い3 つのドメインから成り立っている。水溶液中ではこれら３つのドメインが折り畳まれ近接し、分子全体が“heart shape”の形状を取ると推察されている(Fig. 1-1)。各ドメインはさらに2つのサブドメインから構成され、214番目にただ1つのトリプトファン残基を持つ。このトリプトファンはサブドメインⅡAの中心部に位置しているが、サイトⅠはドメインⅡAの疎水性ポケットに存在しており、典型的なリガンドはセファゾリン(以下CEZ)やワーファリンなどかさ高い複素環のアニオンで分子の中心部に電荷を持つ化合物である。サイトⅡはドメインⅢAに存在しており、典型的なリガンドはイブプロフェン(以下IB)やジアゼパムなどの伸びた構造の芳香族カルボン酸で分子の末端に電荷を持つ[1)]。一方でジギトキシンなどSudlowのサイト分類には属さない薬物もあり、全ての薬物の結合を網羅しているわけではない。

がん患者の血漿でワーファリンなどの血漿蛋白非結合形分率(以下 fp)が変動することが知られているが、その変動がアルブミン濃度と相関があるという検討に留まっているのが現状である [5)]。Liliemark らはがん患者におけるエトポシ

ドのタンパク結合率が成人と比較し小児で有意に上昇することを見出した。さらにアルブミン濃度に対するエトポシドの遊離形濃度の相関係数が 0.26 と低いことから、アルブミン、ビリルビン以外の別の要因があると考察している [6)]。他の病態で fp が変動する例としては、尿毒症の患者の血漿でサイトⅠ結合型のフロセミドやサイトⅡ結合型のトリプトファンなど様々な薬物の fp が上昇する。これもアルブミンの濃度の減少だけでは説明できず、その原因が尿毒症患者で上昇する 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate (CMPF)、indole-3-acetate (IA), hippurate (HA)、indoxyl sulfate (IS)などの内因性物質であると報告されている [7)]。また、透析患者の血漿でも fp が上昇する薬物があることが知られているが、透析患者から精製したアルブミンは、構造に変化が見られ、サイトⅡの結合能力が低下していたと報告されている [8)]。アルブミンは通常そのほとんどが還元型で存在しているが酸化型では薬物の結合能が変動することが最近注目されている。島田らは骨肉腫腫瘍移植ラットを用いてバンコマイシンの体内動態の変動を検討してきた。バンコマイシンは腫瘍群で全身クリアランス、腎クリアランスが有意に上昇しており、その要因の検討段階で血漿蛋白結合率を調べたところ、結合率が約 30%と低いバンコマイシンは fp に変化が見られなかったと報告している [9)]。

そこで本研究ではまず第 2 章で骨肉腫腫瘍移植ラットを用いてサイトⅠ結合型である CEZ の蛋白結合実験を行い、腫瘍群とコントロール群における血漿蛋白結合パラメーターを算出し、比較を行った。第 3 章ではサイトⅡ結合型である IB で CEZ と同様の検討を行った。第 4 章では腫瘍群の血漿からアルブミンを精製し、その薬物結合能の変動や構造変化などを観察した。また、その構造変化の要因として第 5 章ではサイトカインがアルブミンに与える影響について検討した。さらに第 6 章では腫瘍群の血漿を用いて抗酸化能を測定し、様々な病態で変動すると言われる酸化アルブミンのモデルを調製して構造解析、薬物結合能を調べ、腫瘍群のアルブミンと比較検討した。

以上、骨肉腫腫瘍移植ラットを用いてがん病態下における CEZ と IB の fp の変動の検討及びその変動メカニズムの解明を本研究の目的とした。

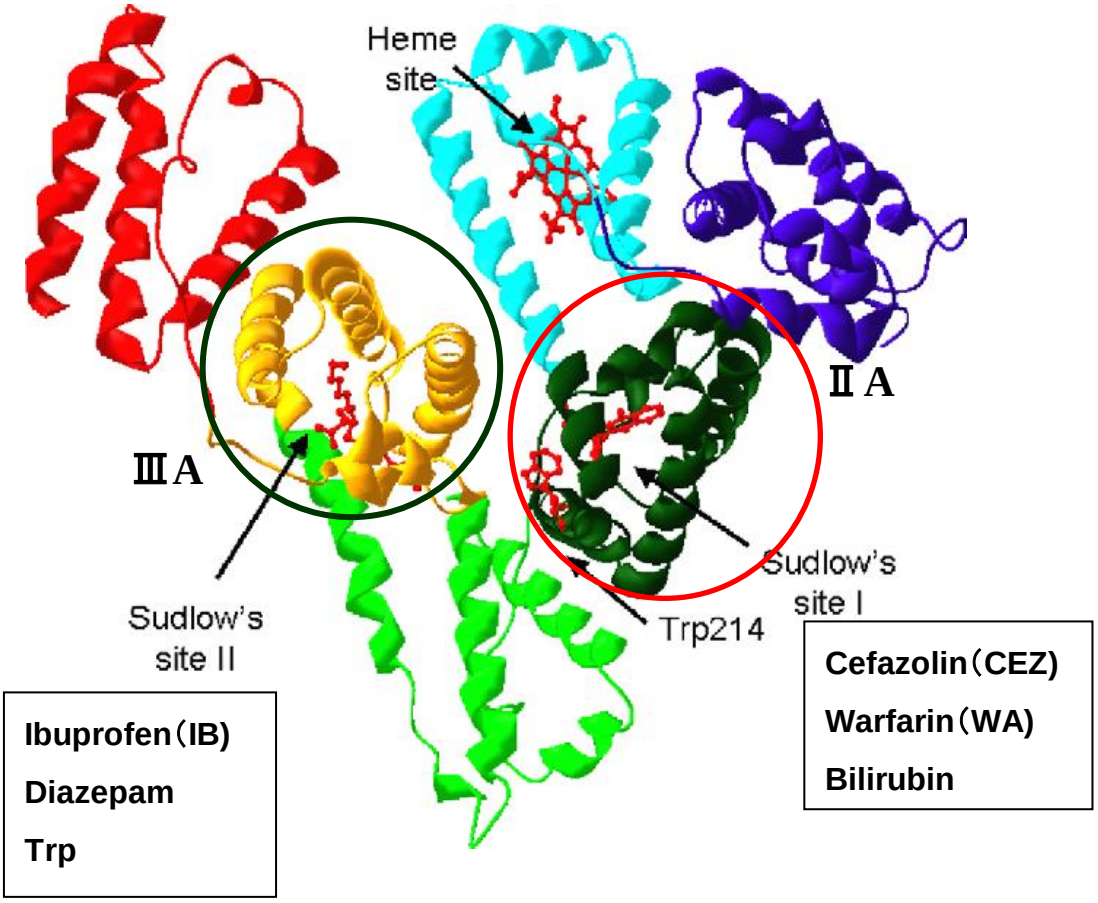


Fig. 1-1 Crystal structure of HSA[10)] .

第２章　骨肉腫腫瘍移植ラットにおけるCEZの蛋白結合率についての検討

第１節　緒言

CEZは第一世代を代表するβラクタム系抗菌薬である。本剤はグラム陽性・陰性にいたる広域抗菌スペクトルを有し、その作用は殺菌的で、特にブドウ球菌をはじめとするグラム陽性菌及び大腸菌、肺炎桿菌に対して抗菌力が強い。また作用機序は、細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン生合成の最終過程であるペプチド転移酵素反応とＤ－アラニンカルボキシペプチダーゼ反応を阻害することである。体内ではほとんど代謝されることなく主として腎よりOAT3などの有機アニオントランスポーターで排泄され、一部は胆汁排泄を受けることも知られている。

CEZは酸解離定数(以下pKa) 2.13の弱酸性化合物でその分子の中心部に電荷を持つ。血漿中で主にアルブミンのサイトＩに結合し、内因性物質の脂肪酸、ビリルビンで競合される[11)]。血漿蛋白結合率はヒト、ラットにおいて約80％と高く、血漿蛋白結合の飽和により非線形性を示す。薬物動態学−薬力学（以下PK-PD)理論におけるβラクタム系のPK-PDパラメーターは血漿中濃度が最小発育阻止濃度を超える時間(time above MIC)とされているが、これは蛋白結合率が吟味されていないため、感染部位におけるPDを反映していない可能性が指摘されており、正確な薬効評価には遊離形薬物濃度の重要性が示唆されている[12)]。またCEZのPKには血漿蛋白結合率の変化が大きく影響すると考えられる。実際に、OkumuraらはCEZの体内動態には血漿蛋白結合率が胆汁中排泄クリアランス及び尿中排泄クリアランスを決める重要なファクターであることを報告している[13)]。またNadaiらは、ストレプトゾシン誘発糖尿病ラットにおいて、CEZの腎クリアランスがコントロール群に比べて88％上昇し、その要因として非結合型CEZの増加を報告している[14)]。

本章ではCEZの蛋白結合実験を行い、コントロール群と腫瘍群における血漿蛋白結合パラメーターを算出し、比較を行った。

第２節　結果

第１項　CEZ の蛋白結合実験

Fig. 2-1 に CEZ 20mg/kg を静脈内投与した血漿中濃度を示した。両群ともに血漿中濃度は経時的に低下したが、腫瘍群はコントロール群に比べ約 1.8 倍の濃度で推移した。Table 2-1 に全身クリアランス、分布容積を示す。腫瘍群はコントロール群と比べ、全身クリアランス(CLtot)は約 1.8 倍、分布容積(Vss)は約 1.5 倍の上昇が見られた。

第２項　CEZ の蛋白結合率の変動

Fig. 2-2 に CEZ の総濃度に対してプロットした fp を示した。また CEZ のインタビューフォームでは、CEZ 2 g を 30 分かけて点滴静注した時の最高血漿中濃度は約 400 μM と記載されている。そこで Table 2-2 に Total 濃度 400 μM 以下の点を平均したもので示した。さらに、Langmuir の式(1)より、n、Kd を算出した。400μM 以下の fp はコントロール群で 0.157、腫瘍群で 0.37 と腫瘍群の fp はコントロール群に比べ約 2.3 倍有意に上昇した。

$$\mathrm{Cb} = \frac{\mathrm{nPT \cdot Cf}}{\mathrm{Kd+Cf}} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (1)$$

ただし、Cb は結合型の薬物濃度を、Cf は遊離型の薬物濃度を、n は血漿蛋白１分子あたりの結合部位数を、Kd は解離定数を、PT は総蛋白濃度としてアルブミン濃度とした。

Fig. 2-3 には第 2 項で得られた fp を用いて、血漿中遊離形 CEZ 濃度の血漿中濃度推移を推定した結果を示した。腫瘍群における血漿中濃度はコントロール群に比べ全点で有意に上昇していた。上昇の原因としては、コントロール群と腫瘍群で腎固有クリアランス(以下 CLr,int)を（2）の式より推定すると、コントロール群で 25.9 mL/min/kg、腫瘍群 20.8 mL/min/kg と得られ、腫瘍群はコン

トロール群の 80%まで減少していた。CLtot の低下が起こっていることが示唆された。ただし、CLr = CLtot と近似し、再吸収率(FR) = 0.22[15]、腎血流量(Qr) = 45.6 mL/min/kg[16] 、GER はコントロール群 1.76 mL/min/kg[9] 、腫瘍群 1.73 mL/min/kg[9] は文献値を用いた。また、CLtot はコントロール群 2.93 mL/min/kg、腫瘍群 5.13 mL/min/kg (Table 2-1)、fp は第 2 項で求めたコントロール群 0.157、腫瘍群 0.37 を用いた。この結果は腫瘍群において CEZ の尿細管分泌を担う OAT3 の変動が起こっている可能性が示唆された。

$$\mathrm{CLtot} \cong \mathrm{CLr} = (\mathrm{fp} \cdot \mathrm{GFR} + \frac{\mathrm{Qr} \cdot \mathrm{fp} \cdot \mathrm{CLr,int}}{\mathrm{Qr} + \mathrm{fp} \cdot \mathrm{CLr,int}}) \cdot (1 - \mathrm{FR}) \cdot\cdot\cdot\cdot\cdot (2)$$

第 3 項　血漿蛋白結合に影響する血漿内因性物質の比較

Table 2-3 にアルブミン及び血漿蛋白結合に影響する血漿内因性物質の比較を示した。ビリルビン、グルコース、尿酸値については島田らの値を用いた [9]。アルブミンは腫瘍群において約 10%有意に減少しており、遊離脂肪酸も約 10%の減少が見られた。また、両群の総蛋白質濃度に変化は見られなかったが、アルブミン/グロブリン比は腫瘍群で有意に減少していた。ビリルビン、グルコース、クレアチニン、尿酸については有意な変化は見られなかった。

第 3 節　考察

骨肉腫移植ラットの血漿を用いて、CEZ の fp の上昇を再現できた。また、その要因としてまずアルブミン濃度の低下が考えられた。しかし腫瘍群においてアルブミン濃度はコントロール群の 3.89 から 3.46g/dL と低下していたものの 10%程度の低下に留まった。Langmuir の式(1)は Cf が Kd より十分に小さい時、式(2)の様に変形できる。コントロール群と腫瘍群で Kd、n が変化しないとした時、式 （2）にコントロール群の fp ($fp_{control}$)、腫瘍群の fp (fp_{tumor})、コントロール群のアルブミン濃度($Pt_{control}$)を当てはめると、コントロール群の fp が

腫瘍群の fp ほどに上昇するには腫瘍群のアルブミン濃度(Pt_{tumor})が 1.21 g/d L にまで低下している必要があった。つまり、腫瘍群における fp の上昇は、アルブミン濃度の低下だけでは説明できないことが示唆された。

→ Kd >> Cf　の時

$$Pt_{tumor} = Pt_{control} \times \frac{fp^{-1}_{tumor} - 1}{fp^{-1}_{control} - 1} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots (2)$$

また、他の要因としてKdの上昇やnの減少が考えられ、実際に腫瘍群でKdが約2倍となり、nがわずかに減少していた。Kdの上昇要因としては、アルブミンの結合に競合阻害する内因性物質の影響が考えられ、nの減少としてはアルブミンの立体構造の変化が考えられる。そこで腫瘍群とコントロール群の内因性物質の濃度を比較したところCEZと競合すると言われるビリルビンに差はなく、脂肪酸は腫瘍群で低下している結果となり、腫瘍群のKdの上昇を説明できなかった。また、腎機能が悪化した状態では様々なアルブミンと結合する尿毒症物質が上昇すると言われているが、血漿クレアチニン濃度にも差は見られなかった。さらに、糖が結合した状態のアルブミンは構造が変化し、薬物の結合能に影響を与えることが知られているが、血漿中グルコース濃度にも両群で差は見られなかった。しかし、ここで検討した以外の内因性物質がCEZのfp上昇に影響を与えている可能性は否定できない。

辻本らは透析患者の各種薬物の fp 上昇には尿毒症物質が関与していると同時に、透析患者の血漿を球形吸着炭であるクレメジン®で前処理を行うとバルプロ酸の蛋白結合率が回復傾向を示すものの健常人までに回復することはなかったと報告している。また、それが尿毒症物質の蓄積によってアルブミンが修飾され、構造に変化が生じたからではないかと考察している[17)]。

また、Mingroneらはサイト I 結合型のトリプトファンを、尿毒症患者の血漿を限外濾過した濾液中で競合させたところ、nは変化しなかったが、結合定数(Ka)が約1/4に減少したと報告しており、内因性物質が関わっていると考察している[18)]。

本章の結果を考えあわせると、CEZ の fp 上昇には内因性物質の寄与は否定できないが、アルブミンの構造の変化が関与していることが示唆された。

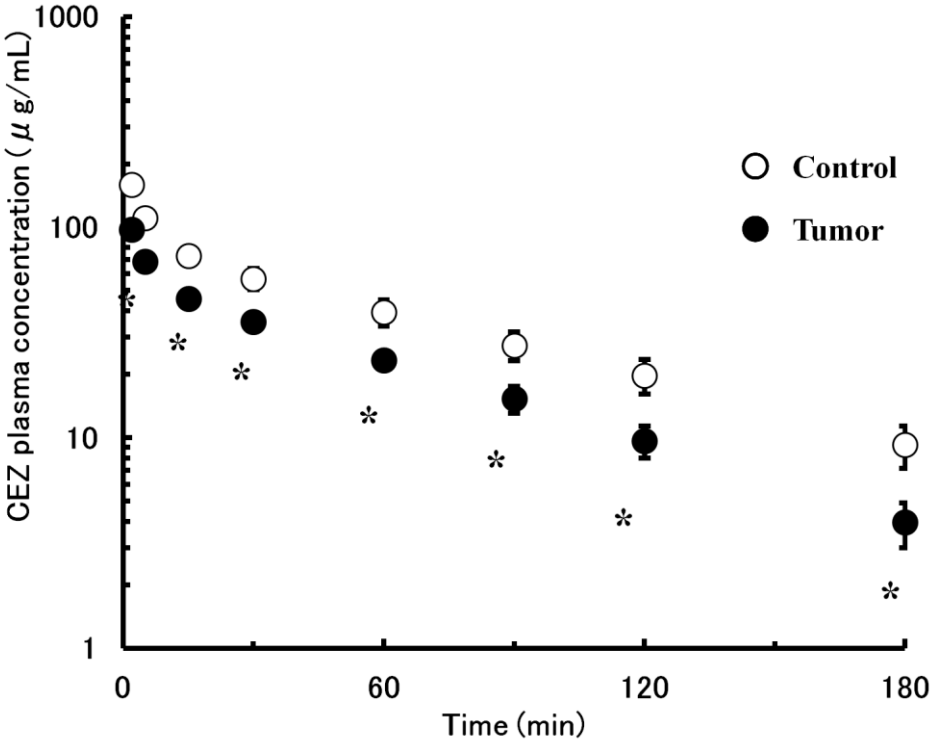


Fig. 2-1 Plasma concentration time courses of CEZ 20 mg/kg i.v. bolus injection for control or tumor (CSLM) bearing rats.

Each point with vertical bar represent the mean ± SEM. (n = 5)

* Significantly difference between control and tumor rats. ($p < 0.05$)

Table 2-1 Estimated CEZ pharmacokinetic parameters after CEZ 20 mg/kg i.v. bolus injection for control and tumor (CSLM) bearing rats.

Pharmacokinetic parameters	Control (n = 5)	Tumor (n = 5)
CLtot（mL/min/kg)	2.93 ± 0.67	5.13 ± 1.20*
Vss (mL/kg)	214 ± 26	314 ± 32*

Each value is mean ± SD

*Significantly different between control and tumor rats. ($p < 0.05$)

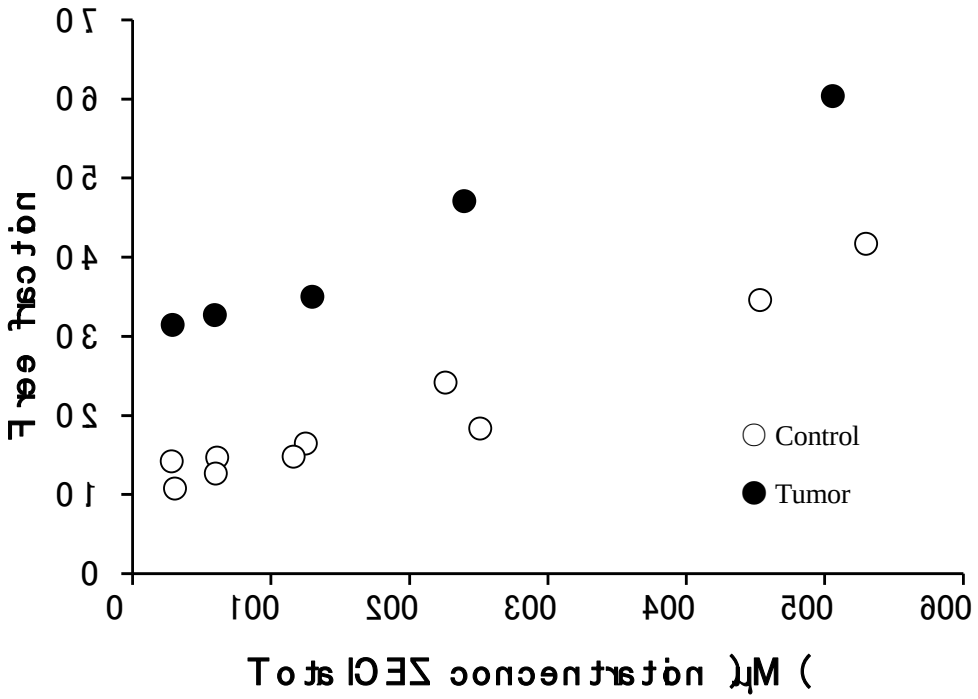


Fig. 2-2 Comparison of free fraction of CEZ between control and tumor bearing rats.

* Significantly difference between control and tumor. ($p < 0.01$)

※ Total CEZ concentration < 400mM

Table 2-2 Estimated plasma protein binding parameters of CEZ in control and tumor bearing rats.

	Control	Tumor
n	**0.64**	**0.45**
Kd (μM/L)	**59.9**	**109.5**
Pt = Albumin (μM)	**602.0**	**591.1**

The binding parameters were estimated by using KyPlot .

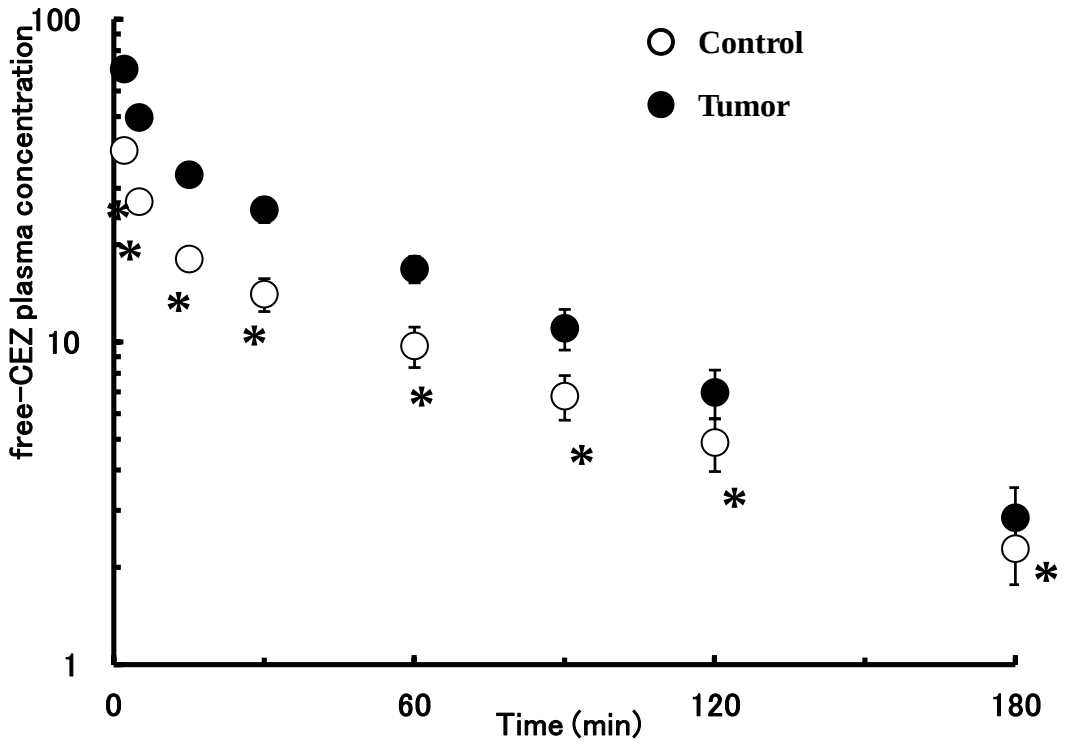


Fig. 2-3 Time courses of calculated free CEZ plasma concentration after 20mg/kg i.v. bolus injection for control or tumor bearing rats.

Each data is mean ± S.D. (n = ５)

＊ Significantly difference between control and tumor ($p < 0.05$).

Table 2-3 Comparison of potentially influential factors in protein binding between control and tumor bearing rats.

Parameters	Control（n > 6）	Tumor （n > 8）
Total protein (g/dL)	**5.28 ± 0.12**	**5.33 ± 0.22**
Albumin (g/dL)	**3.89 ±0.10**	**3.46 ± 0.48***
Albumin/globulin	**2.83 ± 0.27**	**1.92 ± 0.37***
Bilirubin (mg/dL)	**0.65 ± 0.06**	**0.69 ± 0.06**
Free fatty acids (mEQ/L)	**621 ± 53**	**551 ± 218**
Uric acid (mg/dL)	**2.29 ± 1.37**	**1.95 ± 0.85**
Glucose (mg/dL)	**240 ± 31**	**213 ± 22**
Creatinine (mg/dL)	**0.230 ± 0.047**	**0.297 ±0.097**

Each value is mean ± S.D.

* Significantly difference between control and tumor bearing rats. ($p < 0.05$)

第３章　骨肉腫腫瘍移植ラットにおけるIBの蛋白結合率についての検討

第１節　緒言

IBはフェニルプロピオン酸系の非ステロイド系消炎鎮痛薬(NSAIDs)で各診療科における炎症性疾患、疼痛性疾患、発熱性疾患に対して有効性及び安全性が確認されている。作用機序は主としてアラキドン酸代謝におけるシクロオキシゲナーゼの活性を阻害することにより、炎症、疼痛等に関与するプロスタグランジンの生合成を阻害することとされている。また低濃度では非選択性NSAIDsのうち最も胃腸障害が少なく、広く使用されている。IBは肝臓で主にCYP2C9によって代謝され2,4’- (2-Hydroxy-2-methylpropyl) phenylpropionic acid (IPH)、もしくは2,4’- (Carboxyproprl) phenylpropionic acid (IPC)となり、一部は抱合された後尿中に排泄される。健康成人にIB 200 ㎎を１日３回経口投与した場合は、24時間までに約60％が代謝物（IPH、IPC及びそれらの抱合体）として尿中に排泄され、未変化体は認められていない[19)]。IBはプロピオン酸部分のα位に不斉炭素をもつため、鏡像異性体が存在する。薬理活性を持つのはＳ体と言われているが、生体内にＲ体をＳ体に変換する酵素の存在が明らかとなり、市販されているIBはＲ体Ｓ体の混合物であるラセミ体として製造されている。

IBはpKa 5.2の化合物で、分子の末端に電荷を持つ。血漿中ではアルブミンのサイトⅡに主に結合するが、低親和性サイトも存在する。また高濃度のIBの結合はサイトⅠ結合型のフェニルブタゾン、サイトⅢ結合型のジギトキシンで阻害されなかったため、この低親和性サイトはサイトⅠ、Ⅲのどちらでもないという報告がある[20)]。ただし、主たる結合部位はサイトⅡであると考えられる[21)]。血漿蛋白結合率はヒトで約97％以上と高く、生体内ではほとんどがアルブミンに結合して存在しており、ビリルビンで競合される[22)]。固有クリアランスが小さく蛋白結合率が顕著に高いため、結合率の僅かな変化でもfpが大きく変動する結果となり、クリアランスが変動することが予想される。またヒトでの見かけの分布容積は0.1 L/kg[23)]と比較的小さいため、組織蛋白結合の分布容積への寄与は、血漿中蛋白結合に比べ小さいことが示唆される。

結合率が変化した例としては、リウマチ患者の血漿でIBの結合力が低下したとの報告があり、これはアルブミン濃度の低下が原因であろうと推察されている[24)]。また、リウマチ患者の血漿、滑液中でNSAIDsのサリチル酸の結合を見たところ、滑液中で結合力が低下しており、滑液中では高親和性サイトが消失していたという報告もある[25)]。以上の特徴を持つことから、サイトⅡに結合するモデル薬物としてIBを用いることが適切であると考えられる。

本章では、サイトⅡ結合型のIBを用いて骨肉腫ラット血漿におけるfpの比較を行い、次にIBを単回静注した時の体内動態を比較検討した。

第２節　結果

第１項　IB の蛋白結合率の変動

腫瘍群とコントロール群の血漿を用いて IB の fp を見た結果を示す(Fig. 3-1)。尚、IB において高親和性サイトの Kd は文献値上 0.3 μM と小さく、ほとんどが結合形のため、様々な IB 総濃度における IB の遊離形濃度を実測することが難しく、Langmuir plot を引くことは難しいと考えられた。そのため結合実験は 1 点で見積もった。コントロール群の fp が 0.026 なのに対し、腫瘍群では 0.069 と約 2.7 倍に有意に上昇していた。

第２項　IB の体内動態変動

Fig. 3-2 に IB 10 mg/kg を静脈内単回投与した時の血漿中濃度推移を示した。また、Table 3 はその薬物動態パラメーターである。IB の血漿中濃度は 2,5,15,30 分においてコントロール群に比べて腫瘍群の方が有意に低下し、360,480 分では有意に上昇していた。また、Vss は腫瘍群において約 1.9 倍に有意に上昇し、$t_{1/2}$ は約 2.8 倍に有意に延長した。CLtot、AUC には有意な変化は見られなかった(Table 3)。

Fig. 3-3 には第 1 項で得られた fp を用いて、血漿中遊離形 IB 濃度の血漿中濃度推移を推定した結果を示した。腫瘍群における血漿中濃度はコントロール群に比べ全点で有意に上昇していた。

第 3 節　考察

第 2 章でサイト I 結合型の CEZ の fp は腫瘍群で上昇していた。第 3 章ではサイトⅡの結合能変化を見るため、IB をモデル薬物として用いた。その結果、IB の fp が有意に腫瘍群で上昇することが明らかとなった。

また、IB の単回静注では 30 分まで腫瘍群で有意に血漿中 IB 濃度が低く、120 分以降では逆の現象が見られた。さらに、体内動態パラメーターを算出したところ腫瘍群で Vss が約 2 倍に有意に上昇しており、CEZ と同様 fp の上昇が体内動態に影響を与えていることが示唆された。そして、$t_{1/2}$ は逆に腫瘍群で延長しており、fp の上昇が体内動態の変動に寄与しているが、CLtot に変動が見られなかった点は今後の検討課題である。IB は肝代謝型の薬物であり、固有クリアランスの変動など様々な因子が関与していると考えられる。

以上より、サイトⅡのリガンドでもサイト I のリガンドと同様に腫瘍群で fp の上昇が明らかとなった。次章からは主にアルブミンの構造変化の影響について検討するために、骨肉腫腫瘍移植ラットの血漿からアルブミンを精製し、その精製したアルブミンについて種々の実験を行うこととした。

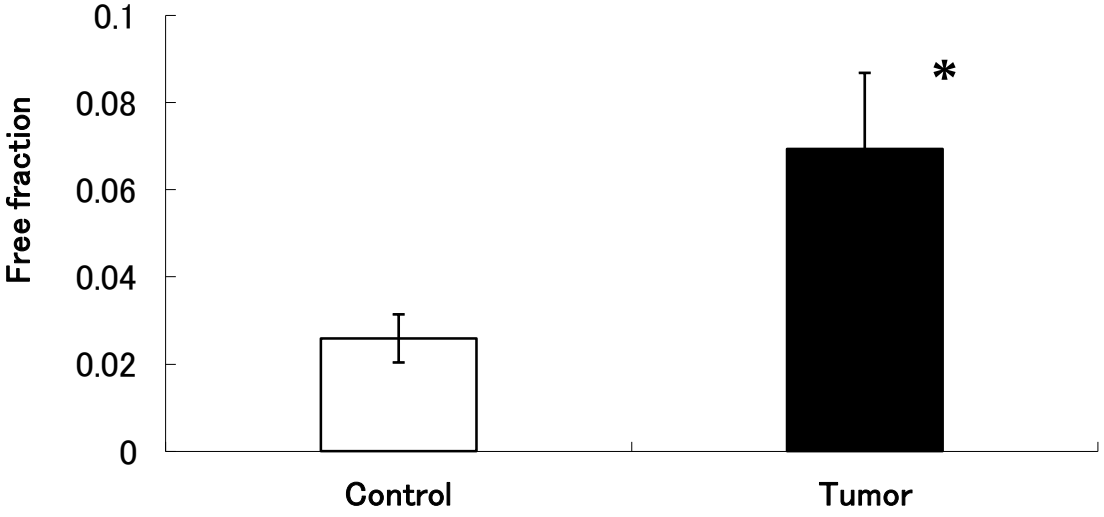


Fig. 3-1 Comparison of free fraction of IB between control and tumor bearing rats.

Each data is mean ± S.D. (n = 4-5)

* Significantly difference between control and tumor ($p < 0.01$).

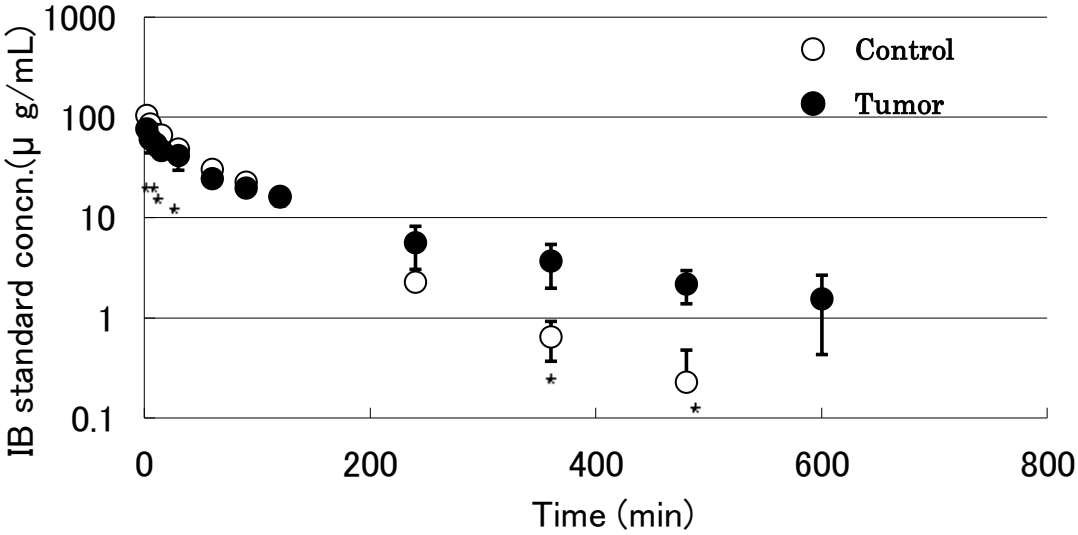


Fig. 3-2 Time courses of IB plasma concentration after 10mg/kg i.v. bolus injection for control or tumor bearing rats.

Each data is mean ± S.D. (n = 3-5)

* Significantly difference from control ($p < 0.05$) .

Table 3 Estimated IB pharmacokinetic parameters after IB 10 mg/kg i.v. bolus injection for control or tumor bearing rats.

Pharmacokinetic parameters	Control (n = 3)	Tumor (n = 5)
CLtot (mL/min/kg)	8.05 ± 0.01	6.25 ± 1.24
Vss(mL/kg)	539 ± 66	1015 ± 290 *
AUC (μg/mL・min)	5921 ± 141	6642 ± 1004
$t_{1/2}$	62 ± 18	176 ± 56 *

Each data is mean ± S.D. (n = 3-5)

* Significantly difference between control and tumor ($p < 0.05$).

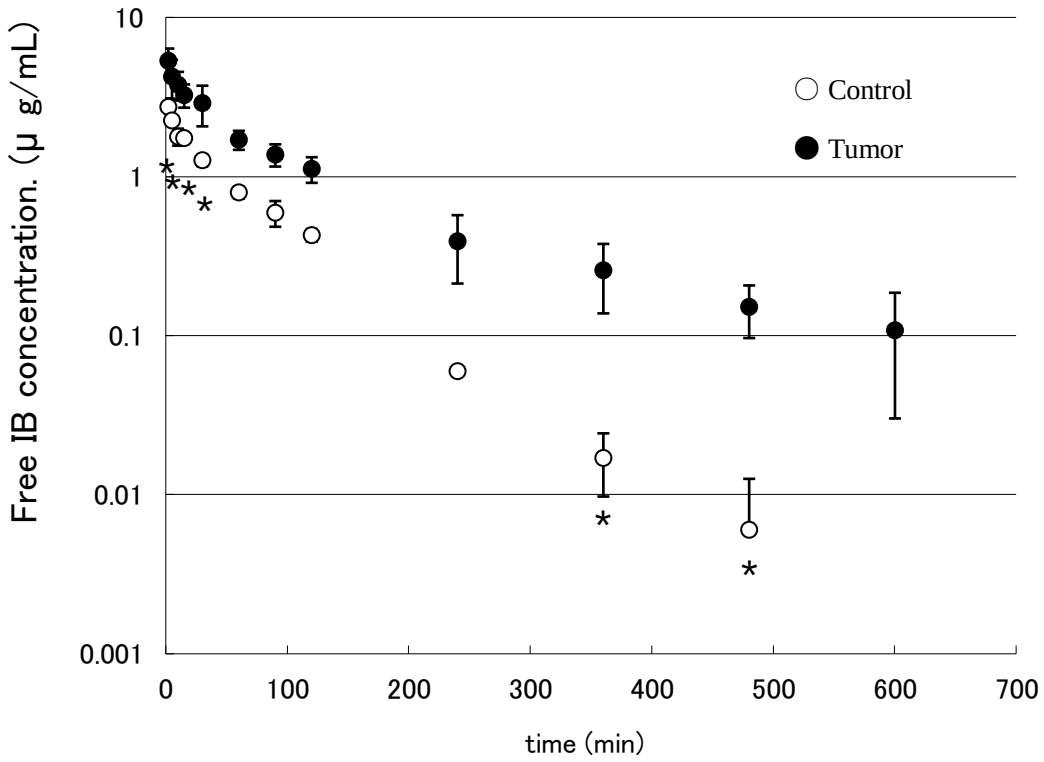


Fig. 3-3 Time courses of calculated free IB plasma concentration after 10mg/kg i.v. bolus injection for control or tumor bearing rats.

Each data is mean ± S.D. (n = 3-5)

* Significantly difference between control and tumor ($p < 0.05$).

第４章　骨肉腫腫瘍移植ラット血漿からのアルブミンの精製とその特徴

第１節　緒言

前章までの検討結果でがん病態下の fp の上昇がアルブミン濃度の減少では説明できないことが示唆された。他の因子としてアルブミンの構造の変化が関与していることが考えられた。構造の変化の指標としては、遠紫外線領域、近紫外線領域の CD スペクトルから二次元、三次元構造の変化を評価する方法が簡便である。また、三次元構造の詳しい検討では、内因性のトリプトファンやチロシン、疎水性領域に結合する外因性の 4,4’-Dianilino-1,1’-binaphtyl-5,5’-disulfonic acid dipotassium salt (bis-ANS)とアルブミンの複合体などの蛍光強度を測定する方法が一般的である。

前述したようにアルブミンは三つのサブドメインから成る折りたたまれた構造をしており、内部は疎水性となっている。すなわち薬物結合サイトも疎水性であるため、疎水性領域の変動は薬物結合能に影響を与える可能性がある。さらに 214 番目のトリプトファンはサイトⅠの存在するドメインⅡAにあり、溶媒露出度を制限し、ドメインⅡAとⅢAの疎水性ポケットをより強固に分ける役割を担っている[26)]。そのためトリプトファンの蛍光強度の変動も結合サイトの構造の変化を示唆する。

アルブミンの構造が変化した例としては、透析患者の血漿から単離したアルブミンの遠紫外線領域の CD スペクトルが変動し、bis-ANS とアルブミンの複合体の蛍光強度が増強したという報告がある[8)]。がん病態下ではα_1-酸性糖タンパクの塩基対及び構造の異なる variant の構成比が悪性中皮腫患者で変化したという報告[27)]はあるもののアルブミンの構造が変化したという報告はほとんどなく、Rasheed らが肝細胞がん患者の血漿から精製したアルブミンを解析したした結果、腫瘍群のアルブミンで遠紫外線領域の CD スペクトルが変動し、疎水性領域が増加したと報告しているのみである[28)]。

そこで本章ではまずコントロール群、腫瘍群の血漿を用いて疎水性領域の変動を検討した。次にHitrap Blue HPカラムを用いて血漿からアルブミンを精製し、精製したアルブミンを用いてCEZ、IBの結合実験を行った。その精製したアル

ブミンを用いて、CD、蛍光スペクトルを測定し、二次元、三次元構造を観察した。

第 2 節　結果

第 1 項　腫瘍群の血漿を用いた構造変化の検討

血漿を用いて bis-ANS の蛍光強度の変動を見た結果を Fig. 4-1 に示す。bis-ANS はアルブミンの疎水性領域のマーカーとして汎用されている。腫瘍群の血漿では bis-ANS の結合が有意に低下し、疎水性領域が減少していることが示唆された。

第 2 項　血漿からのアルブミン精製

アルブミンの精製

腫瘍群の血漿で構造が変化していることが示唆された。次にそれがアルブミンの構造変化によるものなのか調べるため Hitrap Blue HP カラムを用いて血漿からのアルブミンの精製を行った。Fig. 4-2 A にはその過程を示した。始めに binding バッファーを流してカラムにアルブミンを結合させ、結合しなかったアルブミンとその他のタンパク質を 280 nm での吸収がなくなるまで除去した。次に elution バッファーを流しカラムに結合したアルブミンを溶出した。凍結乾燥した後のアルブミンの収量はコントロール群で約 19 mg/ 1 mL column medium、腫瘍群は約 12 mg/ 1 mL column medium でコントロール群の収率が良かった。

SDS-PAGE

次に精製したアルブミンの純度を調べるため、SDS-PAGE を行った(Fig. 4-2 B)。Lane 1 は市販品の HSA、Lane 2 は精製前のコントロールラット血漿、Lane 3 はコントロールラット血漿精製物、Lane 4 は精製前の骨肉腫腫瘍移植ラット血漿、Lane 5 は骨肉腫腫瘍移植ラット血漿精製物である。なお、いず

れのレーンも総蛋白を 4 μg に統一した。アルブミンは 65 kDa であり、矢印で示したバンドの純度は HSA で約 75%、コントロール血漿で約 56%、コントロール血漿精製後で約 88%、腫瘍血漿で約 42%、腫瘍血漿精製後で約 75%であった。精製群では血漿よりも 30%以上アルブミンの純度が上がり、さらには市販品 HSA よりも高いことが確認でき、以下の実験で使用した。また、コントロール群と腫瘍群を比べると、コントロール群の方が 65 kDa 付近のバンドの純度が血漿、精製品共に高く、腫瘍群ではコントロール群よりも多くのバンドが確認された。またその傾向は高分子側の方が顕著であった。

第 3 項　精製アルブミンの薬物結合特性

精製したアルブミンを用いた CEZ の蛋白結合の結果を Fig. 4-3 に示した。総濃度の低濃度においては CEZ の fp は腫瘍群で上昇傾向が見られ、高濃度ではコントロール群と腫瘍群でほぼ同等であった。また IB では腫瘍群において fp が約 2.7 倍に有意に上昇しており、血漿と同様な結果が得られた(Fig.4-4)。

第 4 項　腫瘍群のアルブミンの構造変化についての検討

CD スペクトル

まず精製アルブミンの遠紫外及び近紫外領域におけるCDスペクトルを測定し、二次構造及び三次構造変化を調べた。その結果、遠紫外線領域においてはCDスペクトルが有意に変化し、α ヘリックスが減少していることが明らかとなった(Fig. 4-5A)。また近紫外線領域もほぼ全点において有意な変化が見られ、三次構造にも変化が起こっていることが示唆された(Fig. 4-5B)。

蛍光スペクトル

280 nm で励起した場合の蛍光はアルブミン中の芳香族アミノ酸（トリプトファン、チロシン）に由来すると言われている [29)]。Fig. 4-6 A に腫瘍群、コントロール群の精製アルブミン溶液を 280 nm で励起した場合の蛍光強度を示した。腫瘍群において、全点で蛍光強度は有意に上昇しており、340 nm 付近の

ピーク波長に変化は見られなかった。また、295 nm で励起した場合の蛍光はアルブミン中のトリプトファンにのみ由来すると言われている[29]。Fig. 4-6 B に 295 nm で励起した場合の蛍光強度を示した。その結果、腫瘍群において全点で蛍光強度は有意に上昇していた。ピーク波長に変化は見られなかった。

さらに、bis-ANS と精製アルブミンの結合スペクトルを検討した結果を示した(Fig. 4-7)。腫瘍群が有意に低下しており、疎水性領域の減少が示唆された。これは、精製前の血漿の傾向と類似していた。

第 3 節　考察

コントロール群、腫瘍群の血漿ではbis-ANSとの複合体の蛍光強度は腫瘍群で有意に低下していた。このことから腫瘍群の血漿では疎水性領域が減少していることが示唆された。しかし、血漿中には様々な蛋白質が含まれておりその変化がアルブミンのみに由来するのか不明であった。そこで血漿からアルブミンを単離し構造変化を検討した。

精製に用いたHitrap Blue HPカラムはアフィニティーカラムの一種で、血漿からアルブミンを除去するためのカラムであり、リガンドはCibacron Blue FG3Aで、純度の高い精製が期待できる。Carrieらはアルキル化された構造変化のあるアルブミンでも88%の純度で回収できたと報告している[30]。このカラムを用いてコントロール群、腫瘍群の血漿からアルブミンを精製した収率はコントロール群の方が良好であった。その原因としてはリガンドへのアルブミンの結合性が変化している可能性が考えられた。

また、単離したものがアルブミンであるか確認するために、血漿、血漿精製物、市販HSAのSDS-PAGEを行った。その結果、精製物で75%以上のアルブミンを確認でき、以降の実験に用いた。また両群の血漿の泳動では腫瘍群の方が多くのバンド数が確認でき、同じ分子量でもコントロールと比較して濃いバンドもあった。血漿には数千種類のタンパク質が含まれており、主にアルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン分画から成る。グロブリン分画はさらにα1、α2、β、γ分画に大別できる。Mehdiらはがん患者の血漿蛋白の泳動パターンを解析し、α1、α2、γ分画ががん患者で有意に上昇したと報告している[31]。また、第2

章の結果でも、腫瘍群のアルブミン濃度は有意に減少していたもののコントロール群と腫瘍群で総蛋白質濃度は変化がなく、グロブリン分画が腫瘍群で有意に上昇しているという結果を得ている。血漿精製物では高い純度のアルブミンが確認されたものの、アルブミンより高分子量側、低分子量側両方に不純バンドが確認できた。この不純バンドは腫瘍群の方が多い傾向が見られた。この原因としては、Cibacron Blue F3GAはアルブミンだけでなくリポ蛋白、一部のIgGやIgAも吸着することが報告されており[32)]、さらにIgGはがん病態下で増加することが知られているので、IgGが一つの要因ではないかと考えられた。IgGの分子量は約156 kDaであり、Lane 4の精製前の骨肉腫腫瘍移植ラット血漿の結果と矛盾しなった。しかしながらSDS-PAGEは予めタンパク質のジスルフィド結合を解いて二次元構造にするためheavy chain（MW : 55 kDa）とlight chain（MW : 25 kDa）に分解されるため、65 kDaのアルブミンより高分子量側のバンドとしては、アルブミンが重合したものが候補として挙げられるが、詳細は不明である。

次にこの血漿精製アルブミンを用いて、CEZ、IBの結合特性を検討した。その結果、両薬物で腫瘍群のfpが上昇しており、血漿を用いた結合実験と同様の傾向を示した。このことから少なくともアルブミン自体の変化が結合特性に影響を与えていることが明らかとなった。

Halfman、Nishidaらはトリプトファン蛍光強度の増強は周囲がより疎水性になったことを意味していると考察している[33),34)]。また、Eftinkらは蛋白質がより強固な構造となりトリプトファンのインドール側鎖が挟まれた状態になっていることが要因であると述べている[35)]。このことから、腫瘍群のアルブミンではサブドメインⅡA周囲の構造の柔軟性が減少しているとも考えられた。

また、疎水性領域に主に結合するbis-ANSとアルブミンの複合体の蛍光強度は腫瘍群において有意に低下していた。元来水溶性であるアルブミンの疎水性領域は内部に折りたたまれ疎水性ポケットを形成している。そのため疎水性領域が増大することは内部構造の露出に繋がる。実際に三次元構造が一部保持された柔軟性の高いモルテン・グロビュールと呼ばれる状態ではbis-ANSとの結合能は増強すると言われている[36)]。これらのことから、腫瘍群のアルブミンで

は逆の傾向、すなわちより柔軟性の低い強固な構造になっていることが推察でき、これはトリプトファンの蛍光強度の考察とも一致する。

以上から、腫瘍群のアルブミンでは疎水性領域が減少し、より柔軟性の低い状態となった結果、サイトⅠ結合型のCEZ、サイトⅡ結合型のIBの結合能が低下したことが推察できた。しかし、この構造の変化の原因は不明である。よって次章からは構造変化の原因を検討した。

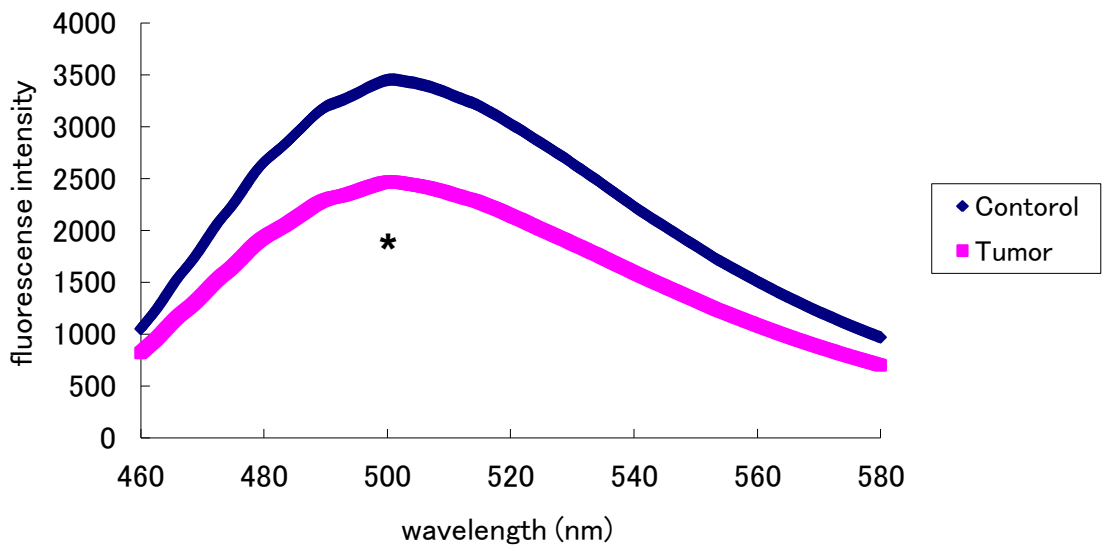
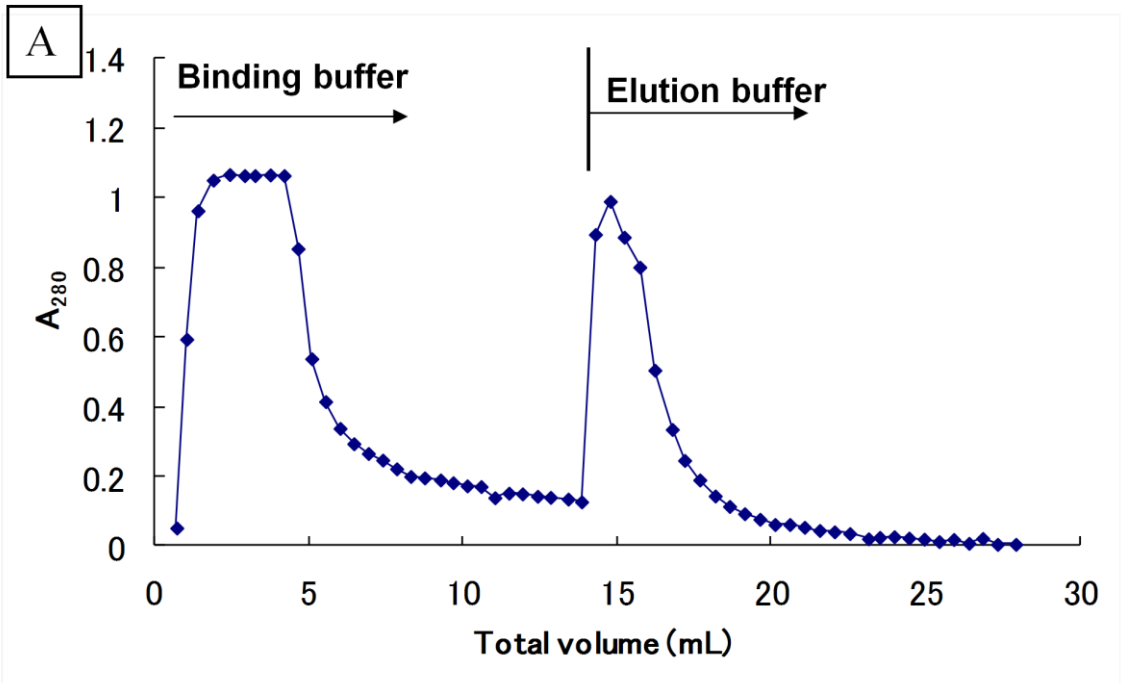


Fig. 4-1 Fluorescence of albumin-bound bis-ANS in control and tumor bearing rat's plasma.

Each data is mean ± S.D. (n = 6)

* Significantly difference between control and tumor ($p < 0.05$).



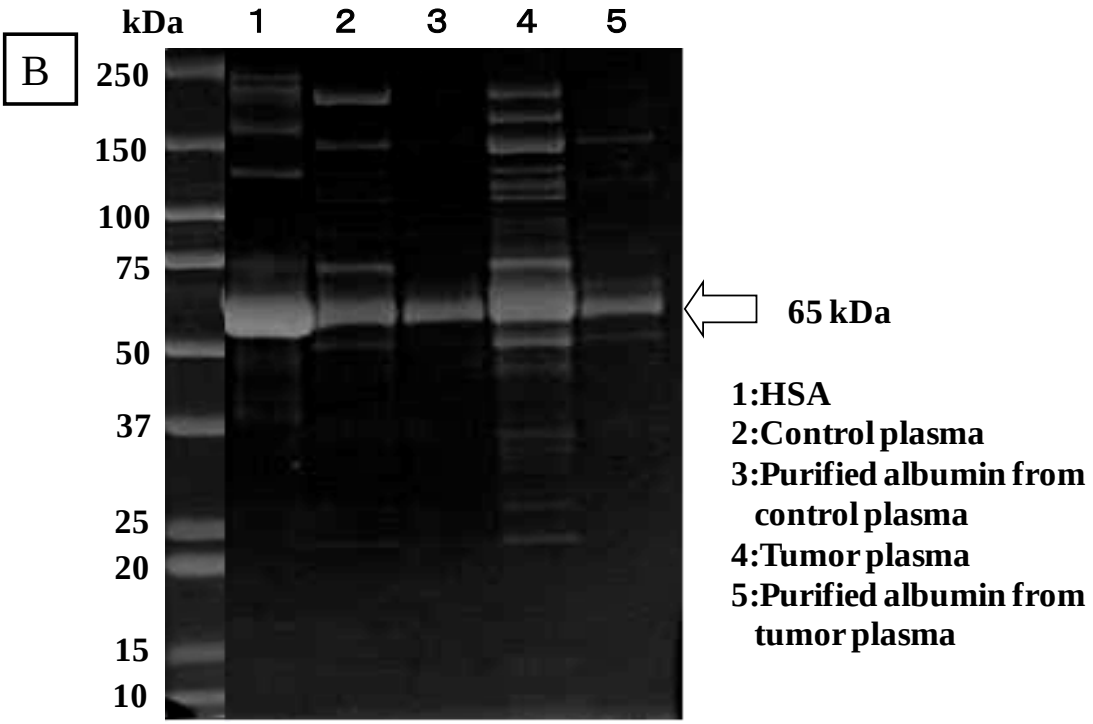


Figure 4-2. Fluorescence (A) and excitation (B) spectra of dityrosine in control and tumor bearing rat's plasma.

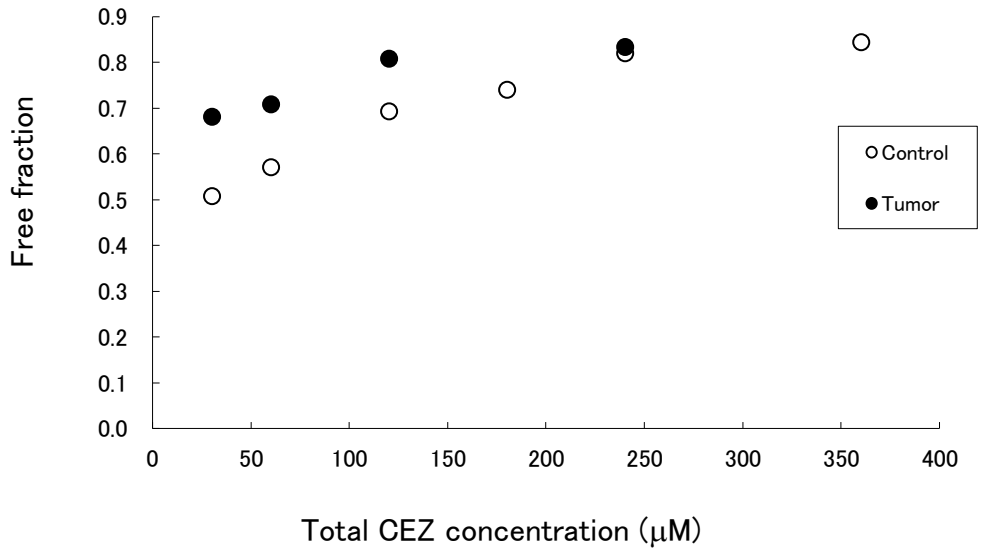


Fig. 4-3 Lamgmuir plot of CEZ binding to purified albumin from control or tumor bearing rat's plasma.

※Each total CEZ concentration is predicted value.

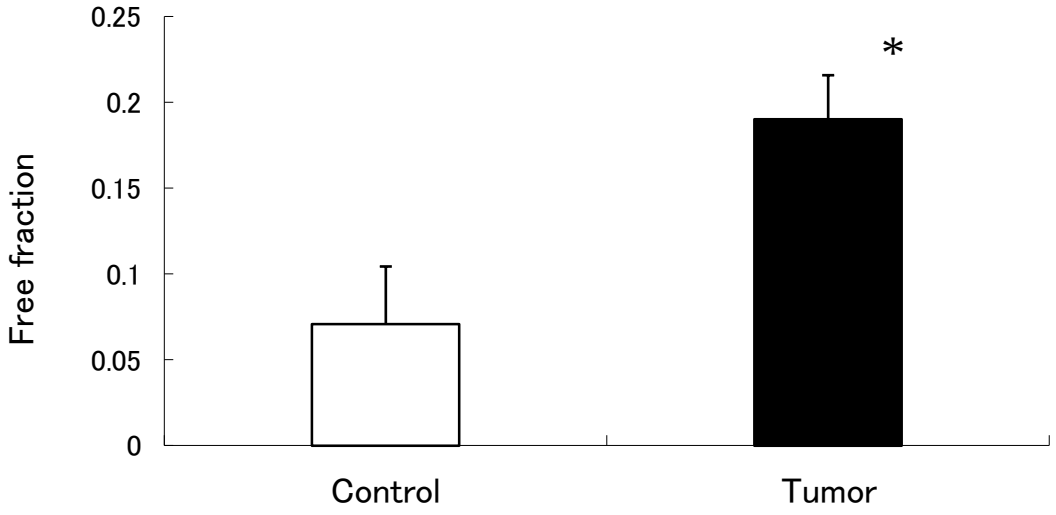
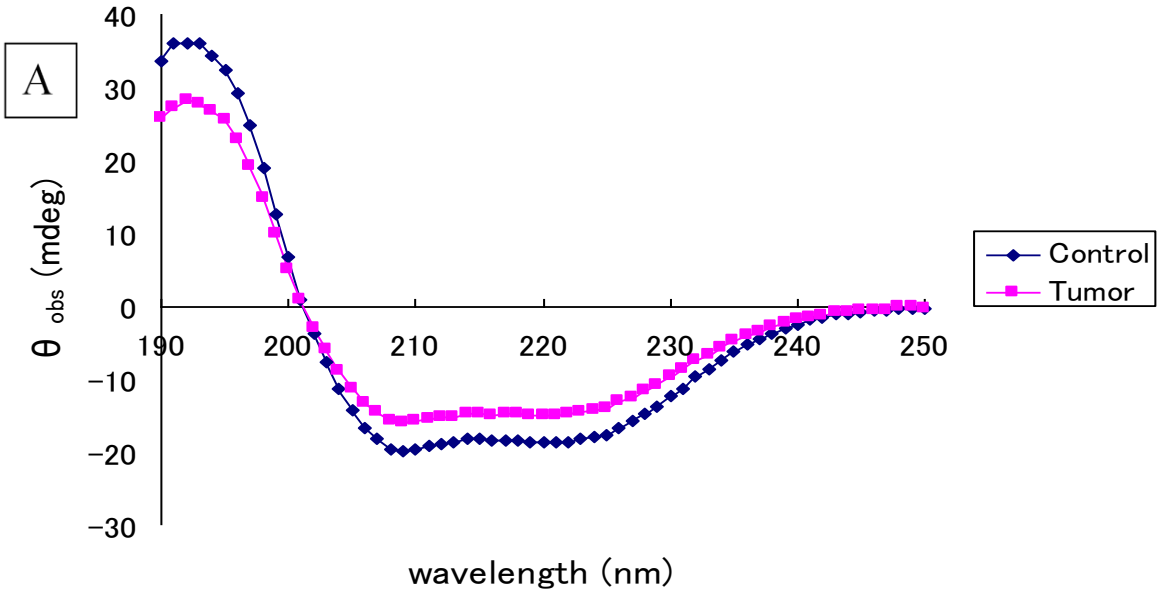


Fig. 4-4 IB binding to purified albumin from control or tumor bearing rat's plasma.

Each data is mean ± S.D. (n = 3)

* Significantly difference between control and tumor ($p < 0.05$).

※Free fraction is calculated from predicted value.



	Control	Tumor
α -helix	0.59 ± 0.008	0.44 ± 0.00 *
β -sheet	0.07 ± 0.005	0.20 ± 0.00 *
random coil	0.34 ± 0.006	0.36 ± 0.00 *

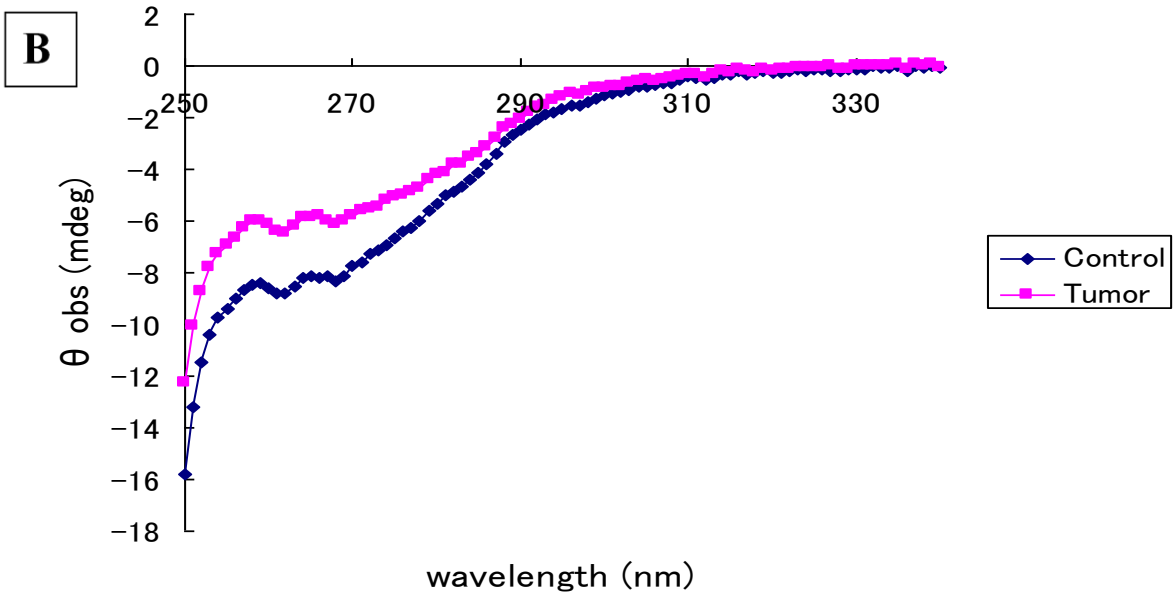


Fig. 4-5 Far-UV (A) and near-UV (B) CD spectrum of purified albumin from control or tumor bearing rat's plasma.

Each value is mean ± S.D. and estimated from K_2d analysis. (n = 3)

* : Significantly difference between control and tumor ($p < 0.05$).

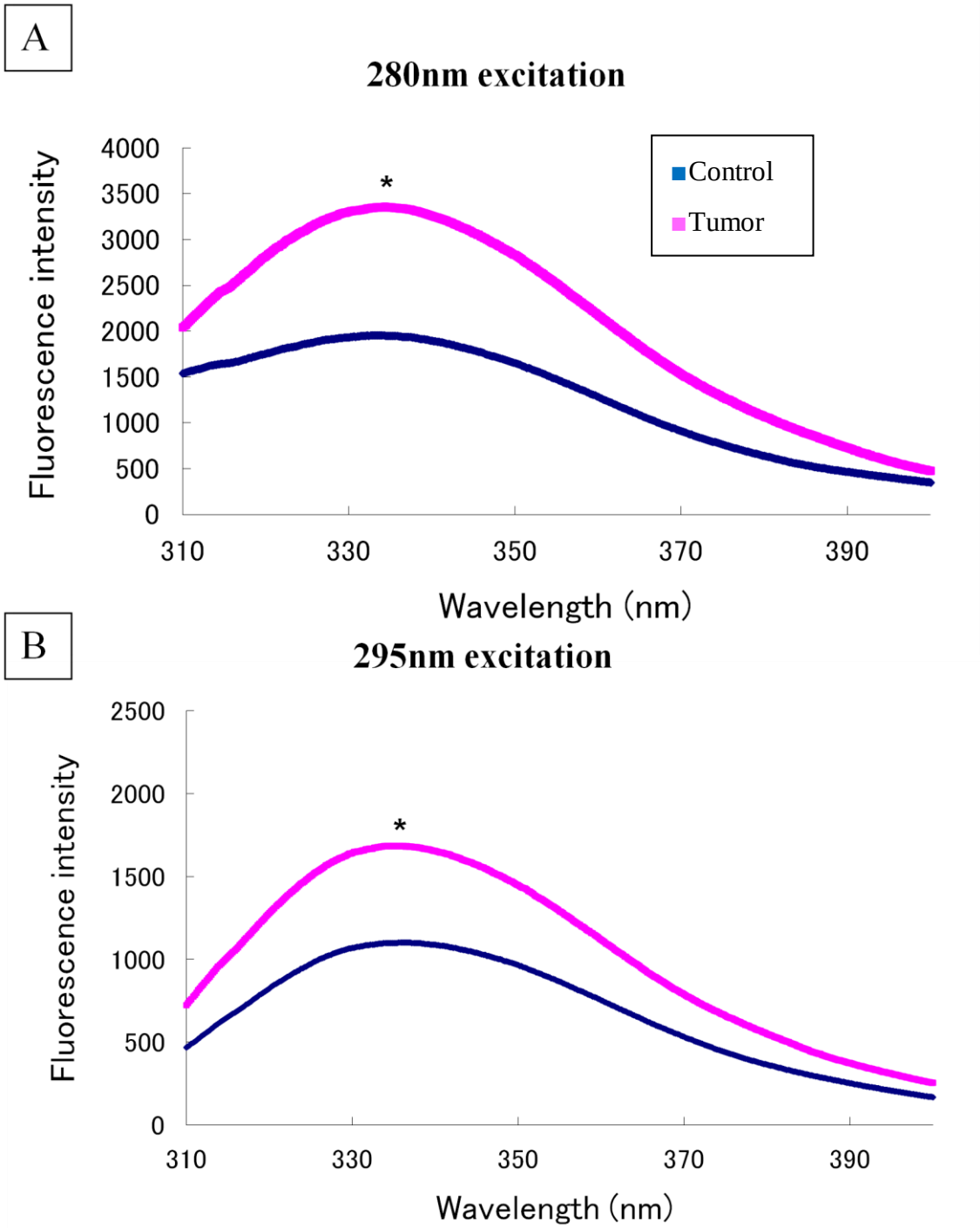


Fig. 4-6 Spectroscopic analysis of purified albumin from control and tumor bearing rat's plasma. －Fluorescence intensity of aromatic series (A) and Trp (B)－

Each value is mean ± S.D. (n = 3)

* Significantly difference between control and tumor ($p < 0.05$).

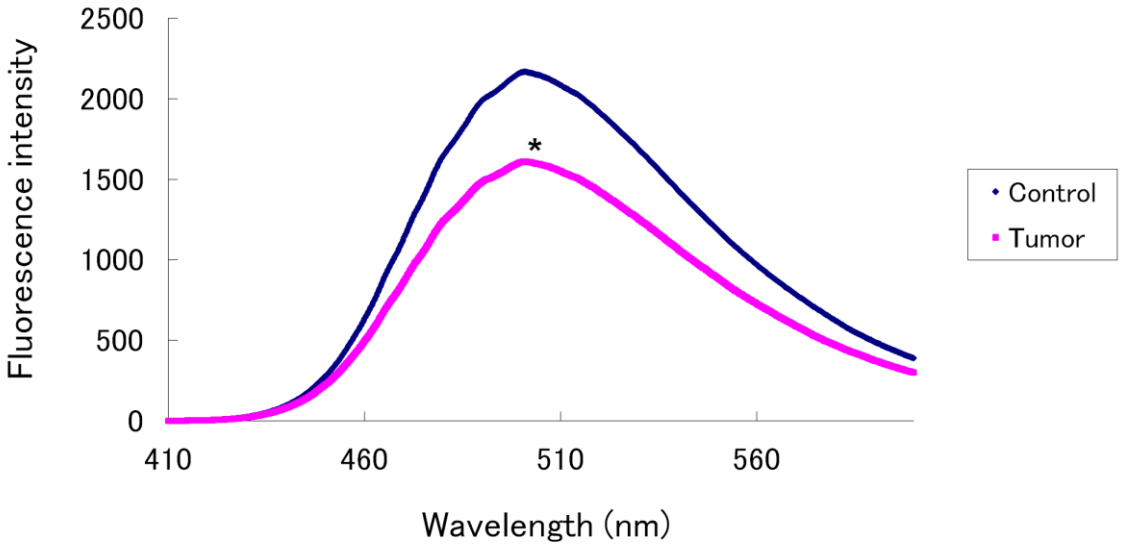


Fig. 4-7 Fluorescence of purified albumin bound bis-ANS.

Each value is mean ± S.D. (n = 3)

* Significantly difference between control and tumor ($p < 0.05$).

第５章　サイトカインの影響

第１節　緒言

がん病態下では様々な炎症性サイトカインが上昇することが知られている。がん細胞は免疫細胞に非自己と認識されてサイトカインの遊離を促し、中にはがん細胞自身がサイトカインを産生するものもある。その結果、がん病態下ではサイトカインの増加が生じる。サイトカインは、分子量が 1 万～数万程度の蛋白質であり、種々の細胞より産生され生体の防御反応機構である細胞性免疫において重要な働きを示し、細胞の増殖、分化、細胞機能の発現、停止や死などの細胞間の情報伝達に関わっている。またその作用形態は一種類で多様な機能を示し、相互に影響し合い、複雑な細胞間のネットワーク作用を形成している。島田らによりコントロール群と腫瘍群のラットにおいて、腫瘍群で IL-1β、IL-6 の有意な上昇が確認されている [9)]。また、リポポリサッカライド(以下 LPS)刺激によってサイトカインは上昇すると言われているが [37)]、Nadai らは LPS 250 μg/kg をラットに投与したところ、投与 2 時間後に CEZ の体内動態、結合パラメーターが変動し、解離定数は変化なかったが結合部位数である n が減少したと報告している [38)]。n が変化したことから LPS がアルブミンの構造を変化させたとも考えられる。

第 4 章で腫瘍群ではアルブミンの構造が変化していることが明らかとなった。本章ではその要因として、腫瘍群で増加しているサイトカインによって、CEZ の結合能が変動するか検討を行った。

第２節　結果

第１項　サイトカイン血漿中濃度の比較

Table 5 に島田らが測定した骨肉腫腫瘍移植ラットの血漿中サイトカイン濃度を示した [9)] 。IL-1βでは腫瘍群はコントロール群と比較し 10 倍以上増加し、

IL-6 も 2.5 倍の上昇が見られた。また、TNF-αは有意な変化は見られなかった。よって以下の検討では腫瘍群と同濃度の IL-1β、IL-6 を作用させた。

第 2 項　結合パラメーターについての検討

Fig. 5-1 にサイトカインの間接的な作用を見る目的でコントロール群血漿中に IL-1β、IL-6 を作用させた時の CEZ の結合パラメーターを示した。その結果、サイトカインによる結合パラメーターへの影響は確認できなかった。

次にサイトカインの直接的な作用を見るために、市販品 HSA にサイトカインを作用させた時の結合パラメーターを示した(Fig. 5-2)。IL-1βで Kd の減少と n の減少傾向があるものの、HSA に対してもサイトカインの結合パラメーターへの影響は確認できなかった。

第 3 節　考察

サイトカインはそれ自体様々な働きを有するが、細胞間のネットワークを構築しており二次的に様々な反応を起す可能性がある。よって本章の実験では血漿をアルブミンに対するサイトカインの間接作用を見る目的で用いた。直接作用を見るために市販 HSA を用いた。その結果、血漿中では CEZ の結合パラメーターはほとんど変動しないことが明らかになった。また、HSA 溶液中では、IL-1β刺激によってコントロール群と比較し Kd、n は共に減少傾向を示した。しかし、fp はコントロール群 0.76、IL-1β群0.80であり、fp 自体にはほとんど影響はなく、腫瘍群における Kd 上昇とは相反する結果であった。

以上より、腫瘍群の血漿で上昇が見られた IL-1β、IL-6 刺激によるアルブミンに対する薬物結合能、構造変化への影響は小さく、腫瘍群のアルブミンの特徴とは異なることが示唆された。原因としては、本実験で用いたサイトカイン濃度が低いためとも考えられるが、実測のがん病態下での濃度を用いたためその可能性は低い。また、インキュベーション時間は Nadai らの報告 [38)]を参考としたが、本実験は *in vitro* で行っており *vivo* の現象を正確に再現しているとは

断言できない。先に述べたようにサイトカインは様々な細胞間ネットワークの中で相乗的に効果を発揮するため *in vitro* の実験では再現できないのかもしれない。また血漿のインキュベーション時間は 2 時間と設定したが、HSA 溶液は 30 分であり、インキュベーション時間が適切でなかった可能性も否定できず、今後の検討課題である。

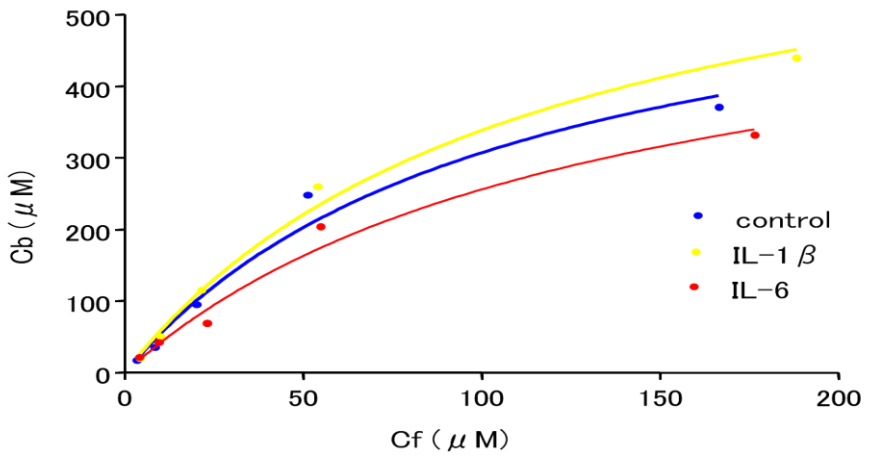
次章では腫瘍群で上昇すると考えられる酸化ストレスによる影響を検討することとした。

Table 5 Comparison of concentration of cytokines between control and tumor bearing rats. [9)]

	Control (n = 9-13)	Tumor (n = 10-13)	Normal value in human
IL-1 β (pg/mL)	＜2.0	24.3 ± 6.77*	＜3～8
IL-6 (pg/mL)	106±15	268±147*	80～100
TNF-α (pg/mL)	10.3±3.19	12.2±2.90	＜0.7

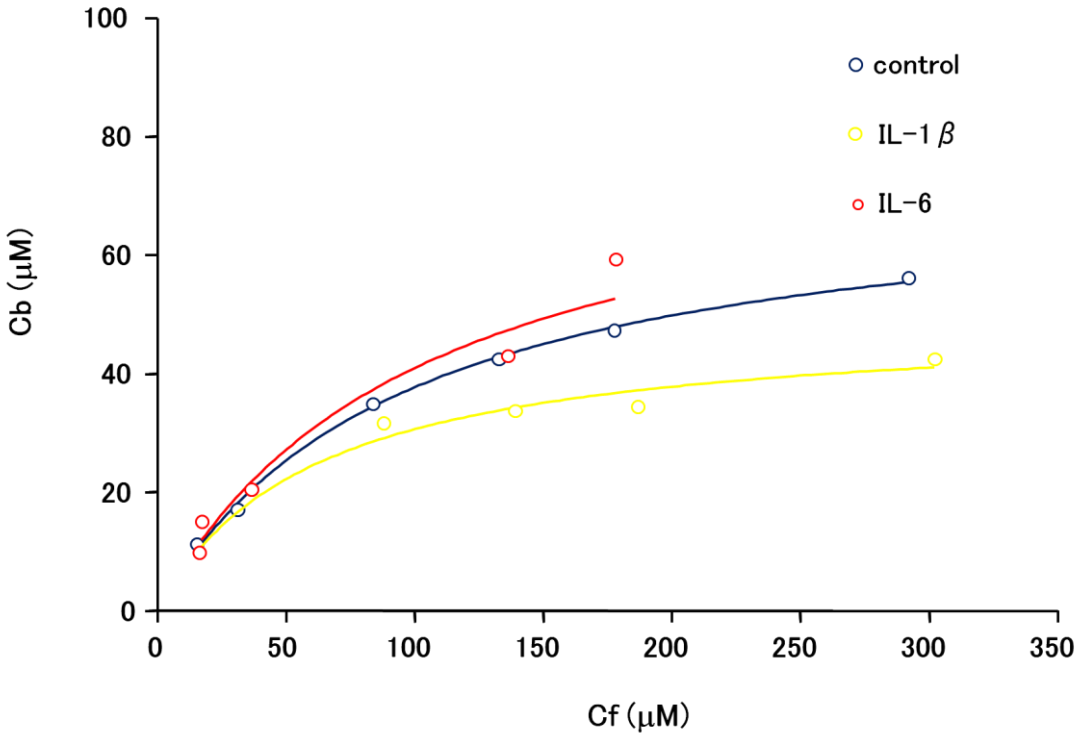
Each data is mean ± S.D.

* Significantly difference from control ($p < 0.05$).



	control	IL−1 β	IL−6
Kd （μM）	107	115	132
nPt（μM）	634	726	594
n	1.10	1.26	1.03

Fig. 5-1 Langmuir plot for CEZ binding to cytokine treated rat's plasma.



	control	IL-1β	IL-6
Kd (μM)	94.8	61.2	103
nPt (μM)	73.4	49.3	83.2
n	1.22	0.82	1.39

Fig. 5-2 Langmuir plot for CEZ binding to cytokine treated HSA.

第６章　酸化アルブミンの影響

第１節　緒言

生体内では、常に酸素を利用する過程において種々の活性酸素種が生成している。しかし、生体はこの活性酸素種を消去する防御機構を充分に備えているため、生理的条件下では酸素代謝の副産物である活性酸素種やフリーラジカルの産生はそれほど重要視するものではない。ところが何らかの理由で、これらの防御能を上回る量の活性酸素種が生じるとDNAや蛋白質、生体分子が損傷し、がんや心臓病などを含む重篤な病態を惹起する[39)]。

血漿中でこの活性酸素を補足して抗酸化作用を示すものとして、細胞外液では尿酸やアスコルビン酸などが挙げられるが、近年では血漿中に多量に存在するアルブミンの抗酸化作用が注目されている。実際に*in vitro*でアルブミンが金属を介したLDLの酸化を防いだという報告があり[40),41)]、血漿中ではアルブミンがラジカル補足剤として働くと同時にアルブミン自身が酸化された状態となる[42)]。このHSA自身の抗酸化能効果として、34番目に唯一遊離状態で存在するシステイン残基(34 Cys)の酸化還元作用が認められており、この34 Cysは血漿中の総遊離システインの80％を占める[43)]。また、アルブミン中に6つ存在するメチオニン残基も酸化を受けやすく、低濃度のクロラミンT (CT)でメチオニンのみを酸化したアルブミンでは抗酸化能は低下したという報告があり、E.Bourdonらは、システインとメチオニンはアルブミンの抗酸化能の40-80％を占めると考察している[44)]。

血漿中には酸化型、還元型のアルブミンが存在する。健常人ではHSAの約70-80％が34 Cys のSH基にいかなる物質も結合していないヒトメルカプトアルブミン（HMA・還元型）であり、約25％が血液中のグルタチオンやCysなどと共有結合しているヒトノンメルカプトアルブミン（HNA・酸化型）であると言われている[45)]。また、諸研究者によってこの酸化型、還元型アルブミンの割合が様々な病態によって変動することが報告されており、腎障害、肝障害、冠動脈疾患、糖尿病、老人性白内障、侵襲性の高い手術、加齢などで酸化型アルブミンは上昇する[45-51)]。

一方で、酸化型となったアルブミンは還元型のアルブミンとは異なる構造を持つことが諸研究者によって報告されている。さらに機能面でも異なる挙動を示す可能性があり、Bitoらは、酸化アルブミンは体内から還元型に比べより速く消失すると述べている[52)]。また、*in vitro*において酸化アルブミンでは薬物結合能が変動するという数々の報告がある。Meucciらはアルブミンをアスコルビン酸で処理した酸化アルブミンでは未処理のものと比較し、ブロモクレゾールグリーンとの結合能が上昇したと報告しており[53)]、Muramotoらは、酸化アルブミンはブロモクレゾールパープルとの結合能が上昇し、SH含量が低いほど定量されるアルブミン濃度が高くなると述べている[54)]。このことは日常的なアルブミンの定量が、酸化型の有無で影響を受けている可能性を示唆している。また、Anrakuらは様々な方法で酸化アルブミンを調製しており、アスコルビン酸及び塩化鉄で酸化したアルブミンはサイトⅠのリガンドであるワーファリンの結合に影響を与えなかったが[55)]、CTで処理した酸化アルブミン及び透析患者から精製しカルボニル含量が上昇していたアルブミンはワーファリンの結合能が低下していたと報告している[56),57)]。一方で、サイトⅡのリガンドであるケトプロフェンは全ての酸化モデルにおいて結合能が低下していた。このことは、酸化モデルによって結合能に差があり、必ずしも生体内の条件を反映しているとは限らないこと、またサイトⅠのリガンドに比べサイトⅡのリガンドの方が酸化アルブミンの影響を受けやすいことを示唆している。

本章では、まず腫瘍群の血漿がコントロール群の血漿と比べ、ジヒドロローダミンがローダミンに酸化される速度に与える影響を検討して抗酸化能を比較した。次に、酸化ストレスによる薬物結合能を調べ腫瘍群の結果と比較検討した。

第２節　結果

第１項　抗酸化能の比較

アルブミンの役割の一つとして、血漿中での活性酸素に対する抗酸化効果が挙げられる。そこでアルブミン自体の酸化の程度の指標として、血漿を用いて

抗酸化効果を調べた。ジヒドロローダミン123 (以下DRD)を用い、希釈した血清中に活性酸素である過酸化水素を添加することにより、DRDからローダミン123 (以下RD)への酸化速度を蛍光スペクトルでモニターして測定した(Fig. 6-1)。その結果、腫瘍群の血漿を添加した方が、有意に酸化速度が速く抗酸化能の低下が示唆された。まず血漿を用いて蛋白質の酸化ストレスマーカーの一つであるAdvanced Oxidation Protein Products (AOPP)を測定した結果をFig. 6-2に示した。AOPPの濃度は代表的な酸化物質であるCT当量として換算し、蛋白濃度で補正した。その結果コントロール群で15.1 μM/mg protein、腫瘍群で32.5 μM/mg proteinと腫瘍群において約2倍に有意に上昇していた。次に、血漿より精製したアルブミンのAOPPを測定したところコントロール群で2.1 μM/mg protein、腫瘍群で14.0 μM/mg proteinと腫瘍群で約7倍に有意に上昇していた。さらに、別の蛋白質酸化ストレスマーカーであるカルボニル(CO)含量を精製アルブミンで測定したところ、コントロール群で1.3 nmol/mg protein、腫瘍群で3.0 nmol/mg proteinと腫瘍群で約2.3倍に有意に上昇していた(Fig. 6-3A)。また、CT 10 mMで調製した酸化アルブミンのCO含量はコントロール群で2.3 nmol/mg protein、腫瘍群で21.7 nmol/mg proteinと約10倍に上昇していた(Fig. 6-3B)。

第 2 項　CT 処理による CEZ、IB 蛋白結合率の変動

酸化アルブミンでは、二次元、三次元構造の変化が示唆された。次に実際にその構造変化が蛋白結合率に与える影響を検討した。

Fig. 6-4 に CT 50 mM 処理 HSA に対する IB の結合率を示した。IB の fp はコントロール群で 0.05、CT 50 mM 処理で 0.89 と顕著に上昇し、ほぼ全てが遊離形となった。そこで、CT を 10 mM として蛋白結合を検討した。Fig. 6-5A は IB の fp である。IB の fp はコントロール群で 0.1、CT 10 mM 処理で 0.4 と約 4 倍に有意に上昇し、*vivo* の結果と類似していた。また Fig.6-5B は横軸に CEZ の総濃度、縦軸に fp をとったものである。CT 10 mM 処理で CEZ の fp が上昇する傾向が見られた。

第３節　考察

Hayashiらは、血漿中ではカルボニルグループ存在下で、アルブミンとフィブリノゲンが酸化ストレスの主なターゲットとなると報告している[45)]。本章ではDRDを含む希釈した血漿中に活性酸素である過酸化水素を加え、DRDからRDに酸化される速度をRDの蛍光強度をモニターすることで測定した。Anrakuらは腎透析患者の血漿で同様の検討を行い、健常人にくらべ酸化型アルブミンの多い腎透析患者で抗酸化効果の有意な低下が観察されたと報告している[40),41)]。腫瘍群の血漿ではコントロールに比べ、RDへの酸化速度が有意に速いことが明らかとなった。このことは、腫瘍群の血漿の抗酸化効果が弱まっていることを意味しており、血漿中で主な抗酸化効果を示すアルブミンが既に酸化された状態にある可能性を示唆している。

また、近年蛋白質の蛋白質の酸化ストレスマーカーとしAOPPが注目されている。AOPPは次亜塩素酸(HOCl)が血漿中の蛋白質と反応して形成される酸化損傷生成物の総称である。AOPPは尿毒症の患者において酸化ストレスのメディエーターであることが示されている[58)]他、乳がんの進行した患者で有意に上昇することが報告されている[59)]。また、肺がん患者においても有意に上昇することが報告されている[60)]。AOPPを酸化物質のクロラミンT当量として測定したところ、腫瘍群の血漿で有意な上昇が見られた。しかし、血漿中にはアルブミン以外にも様々な蛋白が含まれる。そこで血漿から精製したアルブミンにおいてもAOPPを測定したところ腫瘍群で有意な上昇が見られた。よって、血漿で観察された酸化ストレスは、アルブミンの酸化が寄与していることが考えられる。また、蛋白質の酸化には多くの場合CO含量の増大が伴い、がん病態下でもCO含量が増大したとの報告がある[28)]。そこで、精製アルブミンにおいてCO含量を測定したところ、コントロール群に比べ約2倍の有意な上昇がみられた。
以上より、腫瘍群のアルブミンはコントロール群に比べより酸化された状態にあることが明らかとなった。

骨肉腫腫瘍ラットの血漿から精製されたアルブミンの構造変化の要因として、酸化アルブミンが増大している可能性が考えられた。Kawakamiらは血漿を18時間インキュベートして精製したアルブミンはコントロールに比べて還元型の割

合が78.5％から54.4％に減少し、サイトⅠのリガンドであるCEZの遊離形がコントロールに比べ約3.5倍に上昇し、サイトⅡのリガンドであるＬ－トリプトファンの遊離形も約1.3上昇したと報告している[61)]。

別の酸化方法としては、IwaoらはHSAをCT 100 mMで処理した酸化アルブミンにおいてαヘリックスの含量低下及び疎水性領域の減少、ジチロシン含量の上昇を確認している。さらに様々な濃度のCTを処理して酸化アルブミンを調製し、CT濃度依存的にサイトⅠリガンドのワーファリン、サイトⅡリガンドのケトプロフェンのfpが上昇することを確認している[62)]。そこで、10,50 mMのCT処理したHSAを用いて薬物結合能を検討した。まず、50 mMのCTで処理した酸化アルブミンを用いてIBの結合実験を行ったところ、ほぼ全てが遊離形となった。一方で10 mMではコントロール群に比べ腫瘍群ではIBのfpが約4倍に上昇していた。さらに、CT 10 mMで処理したアルブミンは、CEZにおいてもコントロール群と比較し上昇傾向を示した。

腫瘍群の血漿では抗酸化能が減少していること、酸化ストレスマーカーが腫瘍群より精製したアルブミンで有意に上昇していることから、腫瘍群のアルブミンはより酸化ストレスがかかった状態にあることが明らかとなった。また、CT 10mMを用いて調製した酸化アルブミンと腫瘍群から精製したアルブミンは、どちらもCEZ、IBの結合率が低下しており、構造も一部類似していた。これらのことから、腫瘍群のアルブミンの構造が変化していた要因として、酸化アルブミンが候補の一つに挙げられる可能性が示唆された。しかし、先に述べた様に酸化アルブミンはその調製方法によって挙動が違い、腫瘍群から精製したアルブミンと人為的に調製した酸化アルブミンとを間接的に比較しているので注意が必要である。Eraらは、Asahipack GS-502Nという特殊なカラムを用いることにより、血漿中のアルブミンを酸化型、還元型アルブミンに分離することに成功しており[63)]、さらに詳細な検討が期待される。

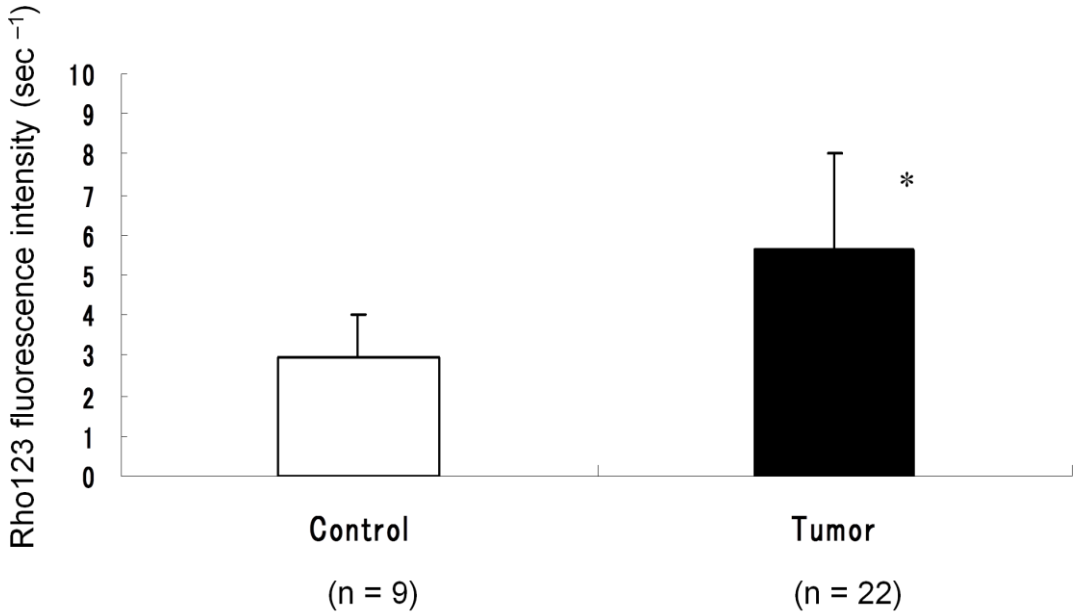
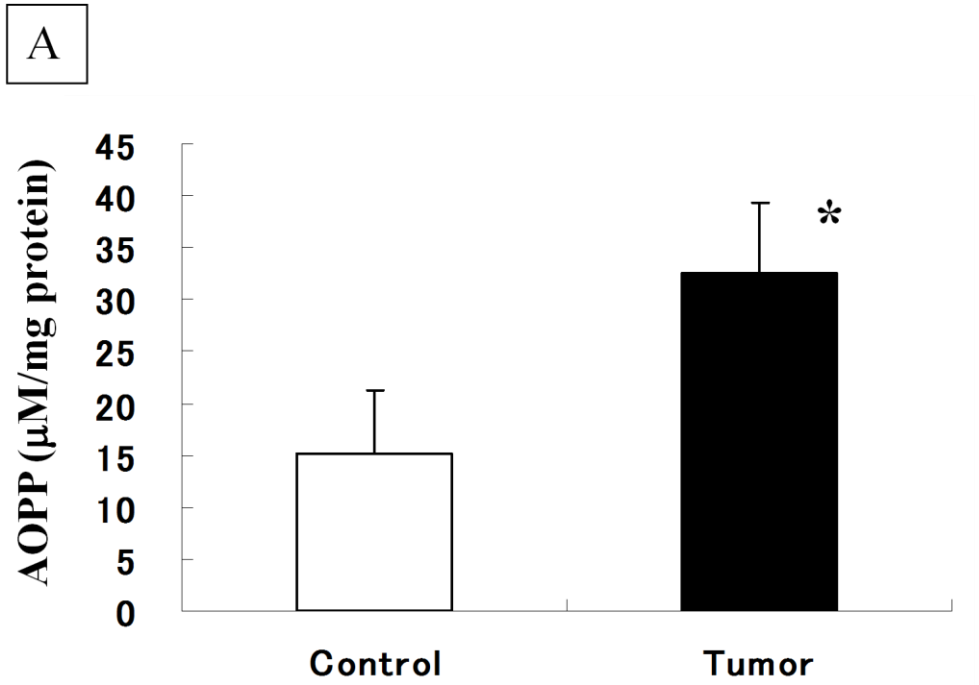


Fig. 6-1 Effect of control or tumor bearing rat's plasma in oxidative rate from dihydroRho 123 to Rho 123. –Relative antioxidant activity-

Each data is mean ± S.D. * Significantly difference from control ($p < 0.05$).



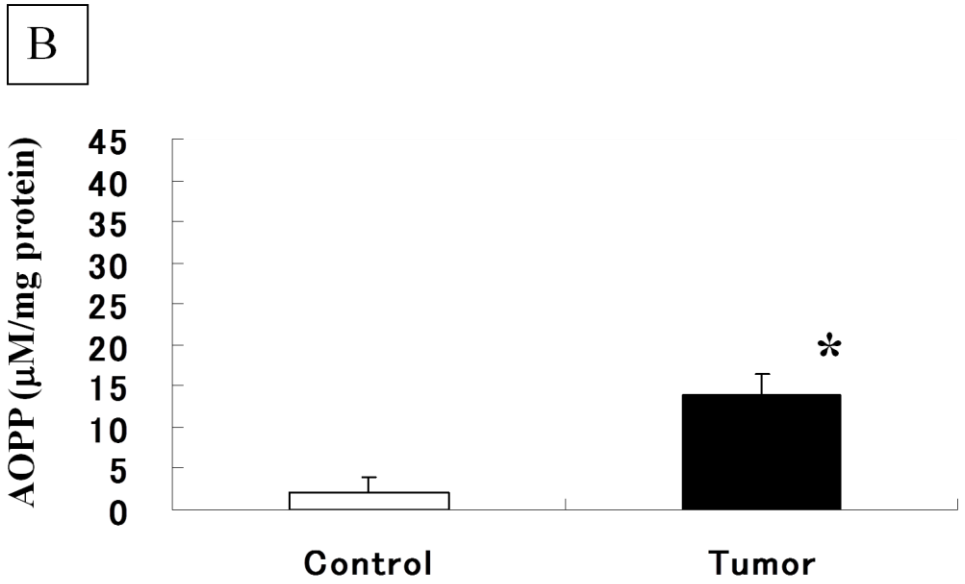


Fig. 6-2 AOPP level of plasma (A) and purified albumin from control and tumor bearing rat's plasma (B).

Each data is mean ± S.D. * Significantly difference from control ($p < 0.05$).

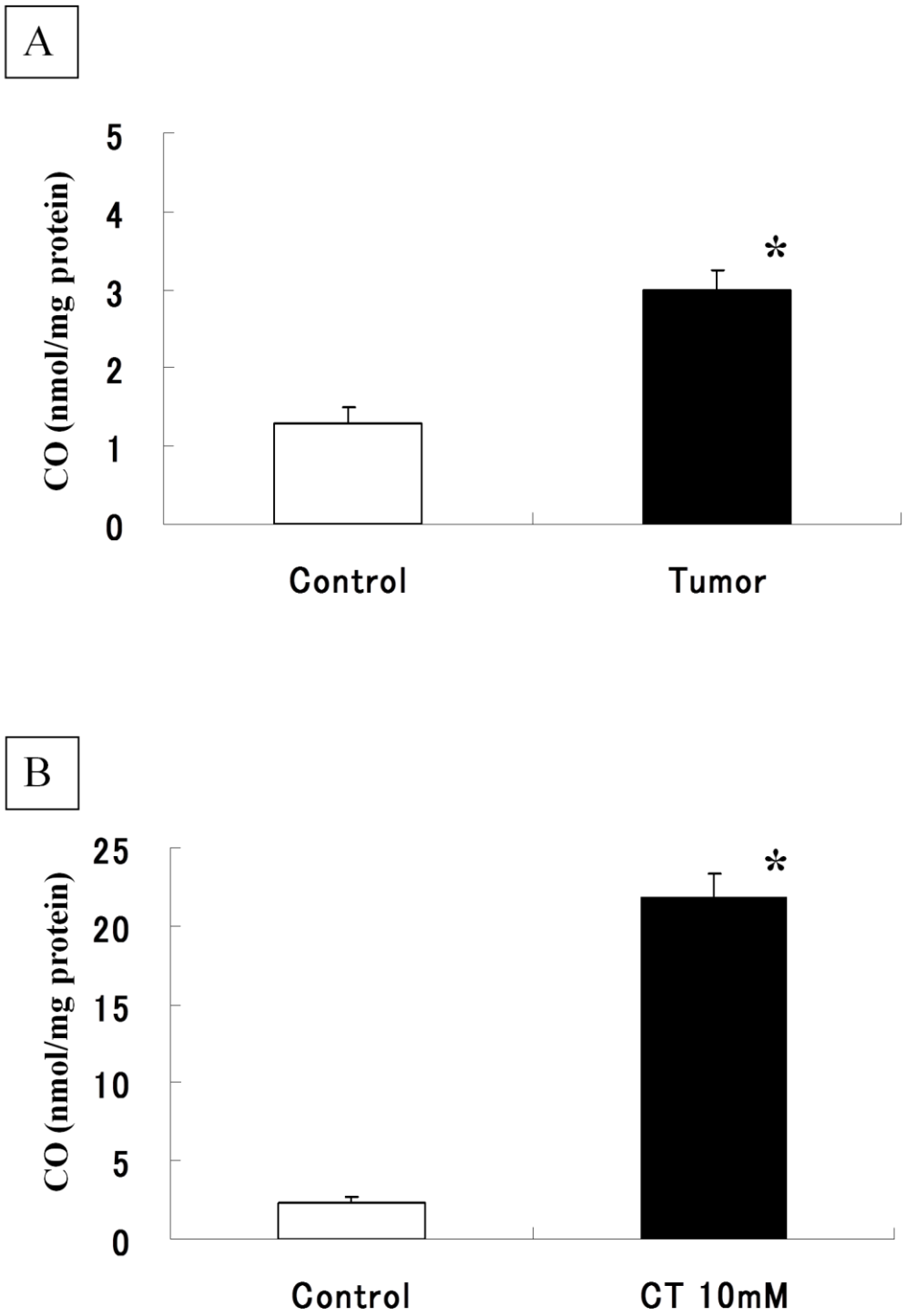


Fig. 6-3 Carbonyl level of purified albumin from control and tumor bearing rat's serum (A) and human serum albumin oxidized by 10 mM chloramineT (B).

Each data is mean ± S.D. (n = 3). * Significantly difference from control ($p < 0.05$).

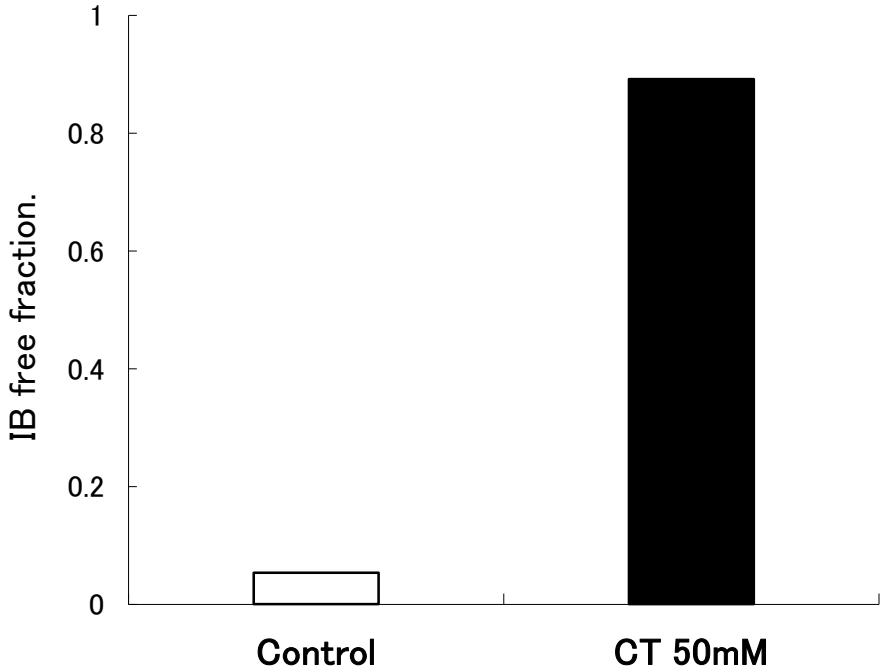


Fig. 6-4 Comparison of free fraction of IB between control and 50 mM CT treated HSA.

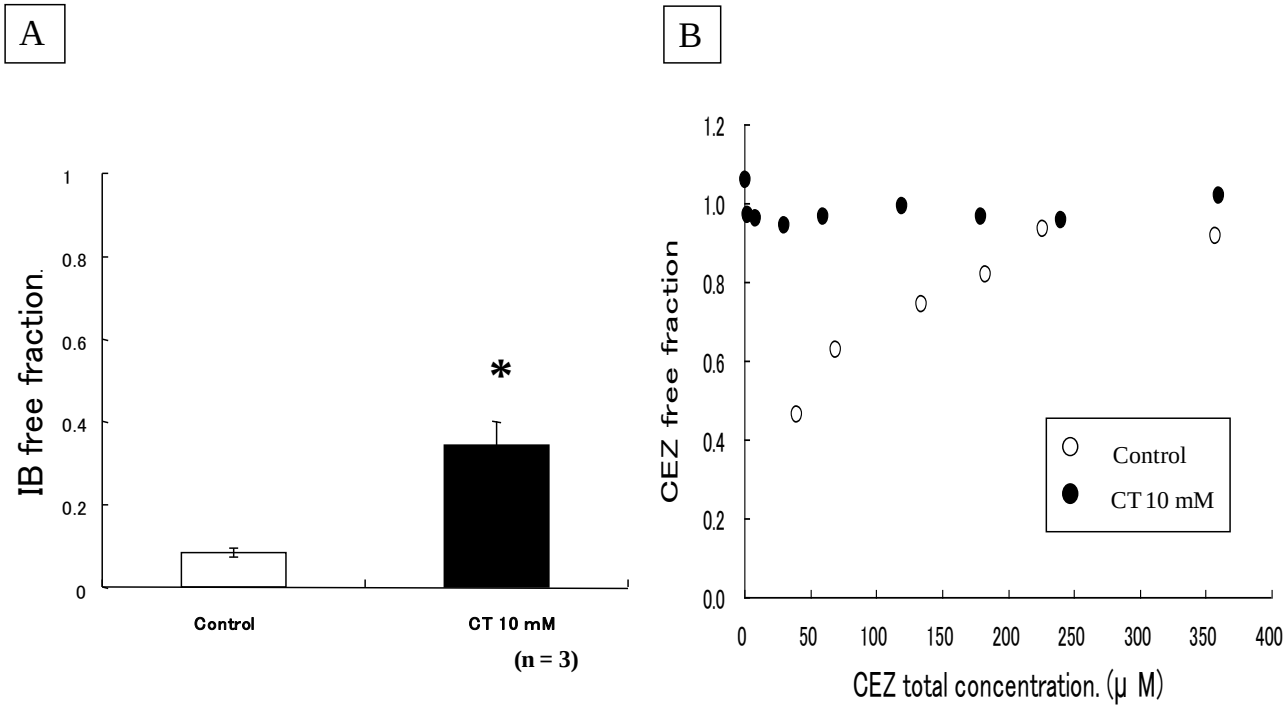


Fig. 6-5 Comparison of free fraction of IB (A) and CEZ (B) between control and 10 mM CT treated HSA.

*** Significantly difference between control and tumor ($p < 0.01$).**

第 7 章　結論

本研究では骨肉腫腫瘍移植ラットの血漿を用いて、サイトⅠ高親和性である CEZ の fp の上昇を確認した。また、サイトⅡに高親和性の IB についても同様な現象が観察された。

そこで、腫瘍群の血漿からアルブミンを精製し、精製アルブミンにおいてもコントロールと比較し CEZ、IB の fp が上昇傾向にあることを確認できた。アルブミン濃度が等しく、内因性物質が全くない状態でも fp の上昇が確認でき、かつ分光学的特徴を合わせると、腫瘍群における CEZ、IB の fp の上昇が、アルブミン構造的な変化も関与していることが示唆された。さらに、腫瘍群におけるアルブミンの構造変化の原因候補として、本研究では CT で調製した酸化アルブミンと腫瘍から精製したアルブミンについて検討を行った。その結果どちらも疎水性領域及びαヘリックス含量の低下や CEZ、 IB の fp 上昇が確認でき、構造面の特徴が類似していることが分かった。よって、がん病態下におけ fp 上昇機構として、アルブミン濃度の減少、及び酸化ストレスによるアルブミンの構造変化が複合して起こったものと推察された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始温かいご指導、ご鞭撻を賜りました金沢大学医薬保健研究域薬学系、自然科学研究科薬学系　松下良 教授に謹んで感謝の意を表しますとともに、厚く御礼申しあげます。

本研究で使用した CSLM 細胞を提供して頂きました金沢大学医学部附属病院整形外科　土屋弘行先生、苅田充明先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の蛍光測定において実験機器を貸与して頂きました活性相関物理化学研究室　中垣良一教授、徳村邦弘准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際して、的確なご助言をいただきました　金沢大学　宮本謙一名誉教授、臨床薬物情報学研究室　石﨑純子准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究にご協力頂いた八田志乃修士、近藤裕也学士に心から感謝致します。

加えて本研究で犠牲になった実験動物達の御冥福を心よりお祈り申し上げます。

いつも温かく見守り、支え、学ぶ機会を与えてくれた病院長並びに職場の皆様に感謝致します。

そして最後になりましたが、いつも温かく見守り、支え、学ぶ機会を与えてくれた家族に感謝致します。

実験の部

試薬および機器

以下特に断らない限りは、試薬は特級をそのまま用いた。

1．試薬

1-1）蛋白結合実験に使用した試薬

セファゾリンナトリウム水和物	アステラス製薬(株)
イブプロフェン	Sigma Chemical Co
ワーファリン	Sigma Chemical Co
バルプロ酸ナトリウム	Sigma Chemical Co
クロラミン T	ナカライテスク(株)
Albumin from human serum, Essentially fatty acid free	Sigma Chemical Co
human IL-1 β	PEPRO TECH EC
human IL-6	PEPRO TECH EC
human TNF- α	PEPRO TECH EC

2．薬物の定量に使用した試薬

2-1）CEZ の定量

アセトニトリル　HPLC 用	ナカライテスク(株)
酢酸アンモニウム	和光純薬工業(株)

2-2）IB の定量

ケトプロフェン	Sigma Chemical Co
過塩素酸(70%)	和光純薬工業(株)
イソオクタン	ナカライテスク(株)
2-プロパノール HPLC 用	和光純薬工業(株)
アセトニトリル　HPLC 用	ナカライテスク(株)
リン酸二水素ナトリウム二水和物	ナカライテスク(株)
リン酸水素二ナトリウム 12 水塩	和光純薬工業(株)

2-3）蛍光に使用した試薬

4,4’-Dianilino-1,1’-binaphtyl-5,5’-disulfonic acid dipotassium salt (bis-ANS)
Sigma Chemical Co

過酸化水素　和光純薬工業(株)

ジヒドロローダミン 123　Sigma Chemical Co

2-4）緩衝液に使用した試薬

リン酸二水素ナトリウム二水和物　ナカライテスク(株)

リン酸水素二ナトリウム 12 水塩　和光純薬工業(株)

水酸化ナトリウム　和光純薬工業(株)

2-5）アルブミンの定量に使用した試薬

アルブミン-B　テストワコー　和光純薬工業(株)

牛血清アルブミン　Sigma Chemical Co

2-6）蛋白定量に使用した試薬

Bio Rad Dc Protein Assay Reagent A　バイオ･ラッド ラボラトリーズ(株)

Bio Rad Dc Protein Assay Reagent B　バイオ･ラッド ラボラトリーズ(株)

Bio Rad Dc Protein Assay Reagent S　バイオ･ラッド ラボラトリーズ(株)

2-7）SDS-PAGE に使用した試薬

SDS-PAGE 10×Running Buffer　ニッポンジーン(株)

Sample Buffer Solution(2ME+)(×4)　和光純薬工業(株)

Bio-Safe^{TM} Coomassie (G-250 Stain)　バイオ･ラッド ラボラトリーズ(株)

Precision Plus Protein Standards　バイオ･ラッド ラボラトリーズ(株)

e・パジェル(5-20%)　アトー(株)

DEPC treated water　ニッポンジーン(株)

2-8）AOPP の測定に使用した試薬

ヨウ化カリウム　ナカライテスク(株)

2-9）CO の測定に使用した試薬

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン　ナカライテスク(株)

グアニジン塩酸塩（生化用）　和光純薬工業(株)

3．麻酔に使用した薬物

ジエチルエーテル　ナカライテスク(株)

4．その他

塩化ナトリウム　和光純薬工業(株)

フタル酸塩　pH 標準緩衝液 (pH 4.01)　和光純薬工業(株)

中性リン酸 pH 標準緩衝液 (pH 6.86)　和光純薬工業(株)

イソジン液　明治製菓(株)

ヘパリンナトリウム　ナカライテスク(株)

5．機器

5-1．蛋白結合実験

限外濾過ユニット：Centrifree YM-30　Amicon, C.A.

SHAKER： BIO-SHAKER BR-15　TAITEC

遠心器：KUBOTA7820　KUBOTA

5-2．HPLC による CEZ 及び IB の定量に使用した機器

カラム：COSMOSIL/COSMOGEL 5C18-MS-Ⅱ4.6 mm × 15 cm

ナカライテスク(株)

UV 検出器：SPD-６A　島津製作所(株)

ポンプ：LC-9A　島津製作所(株)

オートサンプラー：SIL-6B　島津製作所(株)

カラムオーブン：Model 557　ジーエルサイエンス(株)

データ処理装置：C-R4A　島津製作所(株)

SHAKER:：MK200D　Yamato

5-3. CD 測定

円二色性分散計：J-820　日本分光(株)

5-4. 蛍光測定

FP7700　日本分光(株)

5-5. アルブミン分離

脱塩カラム：PD-10 Desalting column　GE ヘルスケア(株)

分離カラム：Hitrap Blue HP 1mL　GE ヘルスケア(株)

分光光度計：U-2001 Spectrophotometer　日立ハイテクノロジーズ(株)

真空凍結乾燥機：FD-81　東京理化器(株)

5-6. 蛋白定量

Labsystems Multiskan BICHROMATIC　大日本製薬(株)

MICROTUBE MIXER EM-36　TAITEC

5-7. SDS-PAGE

DOUBLE ALUMI BATH ALB-301　IWAKI

電気泳動槽：AE-6530　アトー(株)

電圧器：AE-8500　アトー(株)

5-8. AOPP

解析装置:CS-9300PC　島津製作所(株)

6. 実験方法

6-1）骨肉腫モデルラットの作成

6-1-1）腫瘍の摘出

背部皮下に腫瘍を持った Fisher344/NSlc 雄ラットを麻酔瓶に入れ、ジエチルエーテルで吸入麻酔にてと殺した。切開部から腫瘍組織まで皮下にはさみをいれ、きれいに腫瘍組織を摘出した。外側の組織から腫瘍組織を切り取り、2〜5 mm 画に分割した。分割した腫瘍片は生理食塩液に保存しておいた。

6-1-2）腫瘍細胞の移植

7 週齢の Fisher344/NSlc 雄ラットをジエチルエーテルで吸入麻酔した。ラットの背部または大腿部をイソジン液で消毒し、ピンセットで背部または大腿部の皮膚、1 cm 程度切開した。皮下腫瘍群においては、切開部から背部皮下に沿わせてポケットをつくった。筋肉内腫瘍群においては、大腿部筋肉を大腿骨の辺りまで切開した。ポケットに腫瘍片を入れ、切開部をホチキスで閉じた。腫瘍サイズが 1000 mm^3（11-12 週齢）に達したラットを実験に用いた。コントロール群は疑似手術を行った。

6-2）蛋白結合実験

6-2-1）ラットを用いた CEZ 単回静注実験

11-12 週齢骨肉腫瘍移植ラット及び、コントロール群ラットにジエチルエーテルで麻酔をかけた。その後、頚静脈を露出、CEZ 20 ㎎/kg を右頚静脈より投与し、投与後、2,5,15,30,60,90,120 分にあらかじめヘパリン処理した 1 mL 注射筒を用いて、左頚動脈より血液約 0.45mL を採取した。血液サンプルは 15,000 rpm、4℃で 10 分遠心して血漿をとり、分析まで-30℃で保存した。CEZ 濃度は HPLC を用いて測定した。

6-2-2）ラット血漿を用いた蛋白結合実験

11-12 週齢の腫瘍群及びコントロール群のラットにジエチルエーテルで麻酔をかけた。その後、頚動脈を露出し、一時的に血流を止め、頚動脈にカテーテル(Polyethylene Tube, SP45 夏目製作所)を挿入した。再び血液を流し、あらか

じめヘパリン処理した試験管に全血液を採取した。採取した血液は、 3,500 rpm で 10 分間遠心して血漿を取った。

CEZ 蛋白結合実験では 3,6,12,24,48 mM の CEZ 標準液、IB では 70 mM の IB 標準液を作製しその 7 μL ずつを血漿 700 μL に加え、血漿中 CEZ 濃度 30,60,120,240,480 μM、IB 濃度 700 μM の血漿サンプルを作製した。これらの血漿サンプルをアミコンキットに 500 μL ずつ分注し、37℃で 20 分間放置した後、2600 ppm で 5 分間遠心し、濾液を遊離形薬物濃度サンプルとした。遊離形薬物濃度サンプルともに分析まで-30℃で保存した。CEZ 及び IB 濃度は HPLC を用いて測定した。

サイトカイン刺激実験でも上記実験に準じて行った。ただし、血漿に IL-1β、IL-6 をそれぞれ最終濃度 25 pg/mL、250 pg/mL となるように添加し、2 時間 37℃でインキュベートした後、CEZ 標準液を加えた。

6-2-3）HSA を用いた蛋白結合実験

市販 HSA を 66 mM リン酸バッファーに溶解し 60 μM とした。CEZ 標準液 (3,6,12,18,24,36 mM)を添加し 30,60,120,180,240,360 μM のサンプルとした。サイトカイン刺激実験では IL-1β、IL-6 をそれぞれ最終濃度 25 pg/mL、250 pg/mL となるように添加し、37℃で 30 分インキュベートした。IB は 70 μM の HSA 溶液 700 μL に 7 mM 標準液を添加し 70 μM のサンプルとした。

6-2-4）結合パラメーターの算出

結合パラメーターは下記の Langmuir plot もしくは Kloz plot 式に実測値を当てはめ算出した。

Langmuir plot：
$$Cb = \frac{nPt \cdot Cf}{Kd + Cf}$$

Kloz plot：
$$\frac{1}{Cb} = \frac{Kd}{nPt \cdot Cf} + \frac{1}{nPt}$$

n：結合サイト数　　Pt：アルブミン濃度　　Kd：解離定数

阻害定数(Ki)は下記の式により求めた。

Ki = Kd・[I] / (Kd’ – Kd)

I：阻害剤濃度

Kd：阻害剤を添加しない時の CEZ の解離定数

Kd’：阻害剤を添加した時の CEZ の解離定数

6-3）HSA の酸化法

HSA を 66 mM リン酸緩衝液に溶解し、好気的条件下 37℃恒温槽で 18 時間インキュベートした。

CT処理HSAの調製はAnrakuらの方法に従って以下の様に行った[55)]。

HSA300 μM と 1、10、50 mM の CT を 66 mM リン酸バッファーに溶解後、好気的条件下、37℃で 1 時間インキュベートした。反応後サンプルを氷冷し、66 μM リン酸緩衝液で 24 時間透析後、凍結乾燥を行った。

6-4）CEZ の測定

Deguchi Y.らの方法で測定をおこなった[64)]。

6-4-1）HPLC の条件

移動層：13 % アセトニトリル in 10 mM 酢酸アンモニウム

測定波長：270 nm

流速：1.0 mL/min

6-4-2）蛋白結合サンプルの調製

血漿サンプルでは、2 倍に希釈し、その 80 μL ずつをとり、生理食塩液 80 μL、アセトニトリル 160 μL を加えてボルテックスした。検量線用として、200,100,50,25,12.5,6.25,3.13 μM の濃度の CEZ 標準液を調製し、その 80 μL ずつをとり、2 倍希釈にしたコントロール血漿 80 μL 、アセトニトリル 160 μL を加えて撹拌した。これらのサンプルを、15,000 rpm で 10 分間遠心して、その上清の 80 μL を HPLC に注入した。

遊離型濃度測定用のサンプルは、3 倍に希釈し、これら 60 μL をそのまま HPLC に注入した。

6-5）IB の測定

Juria H.らの方法で測定をおこなった[65]。

6-5-1）HPLC の条件

移動層：27 % アセトニトリル in 0.04 M リン酸バッファー

測定波長：223 nm

流速：1.1 mL/min

6-5-2）蛋白結合サンプルの調製

血漿サンプルでは、700 μM に調製したサンプルでは 10 倍に、70 μM に調製したサンプルでは 2 倍に希釈し、その 50 μL ずつをとり、生食 50 μL を加えた。検量線用として、200,100,50, 25,2.5,6.25,3.13 μM の IB 標準液 50 μL をとり、10 倍もしくは 2 倍に希釈した血漿を 50 μL 加えた。それぞれに IS としてケトプロフェン(10 μg/mL in 0.01M リン酸バッファー pH 6.0) 30 μL を共栓付試験管に入れた後 50 μL の 4.0 M 過塩素酸を加え、撹拌した。さらに pH 2.0 の 0.5 M リン酸バッファーを加え 2 mL とし撹拌した。イソオクタン-イソプロパノール (90:10;v/v) 5 mL を加えて栓をして撹拌し、15 分間高速度で振とう後 2,500 rpm で 10 分間遠心した。

上層をできるだけ細試験管に移し、窒素ガス気流下で乾固した後、移動相 300 μL を加え撹拌した 80 μL を HPLC に注入した。

遊離型濃度測定用のサンプルでは、3 倍に希釈し、これら 60 μL をそのまま HPLC に注入した。

6-6）血漿中アルブミン濃度の測定

アルブミン B-テストワコーを用いて測定した。

分光光度計（U-2001 Spectrophotometer HITACHI)。

6-7）蛍光スペクトルの測定

6-7-1）抗酸化能の測定

血漿抗酸化能は Mera K らの方法によって測定した[41]。

H_2O_2 50 mM に対して血漿 25 μL を含む 66 mM リン酸バッファー中に DRD を添加後、DRD から RD の酸化速度を、525 nm の蛍光スペクトルを 3 分間モニターすることにより、抗酸化能を評価した。

6-7-2）bis-ANS によるアルブミンの疎水性評価

Anraku らの方法に従って測定した [40)]。

血漿を用いた検討では血漿 4 μL を含む 2 mL の 66 mM リン酸バッファーに bis-ANS を 10 μM となるように添加した。HSA を用いた検討では HAS 1 μM を含むリン酸バッファーに bis-ANS を 10 μM となるように添加した。これらのサンプルを遮光条件下 37℃で 20 分インキュベートした。蛍光スペクトルは励起波長を 394 nm に設定し、400～600 nm における蛍光を測定した。

6-8）血漿中からのアルブミン分離

6-8-1）前処理

PD-10 カラムを 25 mL の Binding Buffer で平衡化し、血漿を 2.5 mL まで Binding Buffer でスケールアップして加え、その通過液は捨てた。さらに 3.5.mL の Binding Buffer を加え、溶出液を集めた後、0.45 μM のフィルターに通した。

6-8-2）アフィニティークロマトグラフィー

流速:1 mL/min で 5 mL の Binding Buffer を流し、平衡化した後、前処理したサンプルを加えた。約 10 mL の Binding Buffer で洗い流し、UV 280 nm でモニターし吸収がなくなった後約 10 mL の Elution Buffer でアルブミンを溶出した。溶出したサンプルは再び PD-10 カラムで脱塩し、凍結乾燥を行った。

6-9）蛋白定量

Bio Rad Dc Protein Assay Reagent A と Bio Rad Dc Protein Assay Reagent S を 50：1 の割合で混合し、A’とした。A’25 μL とサンプル 5 μL、Bio Rad Dc Protein Assay Reagent B 200 μL を混合し、15 分攪拌し、690 nm の吸光度を測定

した。検量線はサンプルの替わりに標準アルブミン溶液 0,0.25,0.5,1,2 mg/mL を加えた。

また、A/G 比は A/G テストワコーを用いて測定した。

6-10）SDS-PAGE

泳動蛋白量が 4 μg もしくは 8 μg となるように 4×サンプルバッファー、サンプル、超純水を加え、95℃で 5 分加熱した後氷冷した。1,10,15,20,25,37,50,75,100,150,250 kDa の分子量マーカーを使用し、5-20%のグラジエントゲルにそれぞれ 12 μL ずつアプライし、130 V で約 2 時間泳動した。

6-11）CBB 染色

泳動したゲルを超純水で 5 分洗浄を 3 回行った後、Bio-Safe™ Coomassie (G-250 Stain)に浸して約 40 分浸透させた。超純水で 30 分洗浄して脱色し、染色されたゲルを撮影した。

6-12）AOPP の測定

Witkko-Sarsat V.らの方法に従った [58)]。

血漿を PBS で 5 倍希釈し、その 200 μL を 96 ウェルプレートに入れ 340 nm の吸光度を測定した後、20 μL の酢酸を加えた。また、検量線として、0-100 μM のクロラミン T 溶液 200 μL に 20 μL の酢酸を加えた。その後検量線、サンプル両方に 10 μL の 1.16 M ヨウ化カリウムを加え、30 秒攪拌後直ちに 340 nm でプレートリーダーで測定した。ブランクとして、200 μL の PBS+10 μL ヨウ化カリウム+20 μL 酢酸を用いた。また、吸光度は反応後の値から反応前の値を差し引き補正した。値はクロラミン T 当量として表した。また、精製物は 10 mg/mL としてその 200 μL を用いた。

6-13）カルボニルの測定

Revine R. L.らの方法に従った [66)]。

血漿 50 μL を 2.5 M の塩酸に溶かした 10 ｍM の DNPH 0.5 mL と室温で 1 時間反応させた。等量の 20 ％(w/v)TCA を加え、5 分氷冷し、3 分 11,000 *g* で遠心した。ペレットを 1 mL のエタノール/酢酸エチル(1:1,v/v)で 3 回洗浄した後、6 M のグアニジン溶液 1 mL に溶解した。37℃で 10 分振投した。370 nm でカルボニル濃度を測定した(DNPH のモル吸光係数を 22 $mM^{-1}cm^{-1}$ とした)。ブランクとして、2.5 M の塩酸のみで処理したサンプルを使用した。また、蛋白濃度は 280 nm で測定し、6 M グアニジン溶液に溶かした BSA を検量線として見積した。また、精製物は 750 μM に調製し、その 10 μL を DNPH 溶液 0.5 mL と混合した。

7. 統計処理

各データの検定は、Microsoft Excel を用いた対応のない t 検定により行った。

参考文献

1. Peters TJ *All about albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic, New York 1995
2. Takamura N., et al. Interpretations of Laboratory Test Data on Serum Protein Binding. *Yakugaku Zasshi* 127(2):231-236, 2007.
3. Kragh-Hansen U, Chuang VT, and Otagiri M . Practical aspects of the ligandbinding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull*. 25**:** 695–704, 2002.
4. Sudlow G, Birkett DJ, and Wade DN . The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 11:824–832, 1975.
5. Urien S., et al. Role of a1-acid glycoprotein, albumin, and nonesterified fatty acids in serum binding of apazone and warfarin. *Clin Pharmacol Ther*. 39:683-9, 1986.
6. Eva Liliemark., et al. Higher in vivo protein binding of etoposide in children compared with adult cancer patients. *Cancer Letters* 106: 97-100, 1996.
7. Takamura N. Maruyama T, Otagiri M. Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: possible mechanism of the binding defect in uremia. *Clin. Chem.* 43(12):2274-80, 1997.
8. Mera K., et al. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(4):1322-8, 2005.
9. Shimada I, Iwata C, Taga S, Teramachi H, Nomura M, Miyamoto K, Tsuciya H, Wada T, Kimura K, and Matsushita R: Enhanced renal clearance of vancomycin in rats with carcinogen-induced osteosarcoma. *Anticancer Res* 32: 823-829, 2012.
10. Ascenzi P., Bocedi A., Notari S., Menegatti E., Fusano M. Heme impairs allosterically drug binding to human serum albumin Sudlow's site**.** *Biochem Biophys Res Commun*. 334: 481-486, 2005
11. Decroix M., et al.Cefazolin serum protein binding and its inhibition by bilirubin, fatty acids and other drugs. *Biochem Phaemacol.* 37(14):2807-14, 1988.
12. Abe Noriyuki et al. Influence of human albumin on in vitro activity of oral beta-

lactam antibiotics against Streptococcus preumoniae. *Jpn. J. Chemother.* 55(5):368-373, 2007.

13. Okumura K., et al. Effect of protein binding on the disposition of cephalexin and cefazolin in a simultaneous perfusion system of rat liver and kidney, *Chem. Pharm. Bull.* 37(11):3150-3152, 1989.
14. Nadai M., et al. Effect of diabetes on disposition and renal handling of cefazolin in rats. *Drug Metab. Dispos.* 18(5):565-570, 1990.
15. Tsuji A, Yoshikawa T, Nishide K, Minami H, Kimura M, Nakashima E, Terasaki T, Miyamoto E, Nightingale CH, Yamana T. Physiologically based pharmacokinetic model for beta-lactam antibiotics I: Tissue distribution and elimination in rats. *J Pharm Sci.* Nov;72(11):1239-52,1983.
16. Lin JH, Sugiyama Y, Awazu S, Hanano M. Physiological pharmacokinetics of ethoxybenzamide based on biochemical data obtained in vitro as well as on physiological data. *J Pharmacokinet Biopharm.* Dec;10(6):649-61,1982.
17. 辻本雅之, 他 尿毒症血清中の蛋白結合阻害因子の影響について. 透析医会雑誌 16:190-195, 2001.
18. Mingrone G., et al. Serum uremic toxins from patients with chronic renal failure displace the binding of L-tryptophan to human serum albumin. *Clin Chim Acta*: 260(1): 27-34, 1997.
19. イブプロフェン　インタビューフォーム　科研製薬
20. Itoh T., et al. Stereoselectivity and Enantiomer-Enantiomer Interactions in the Binding of Ibuprofen to Human Serum Albumin. *Chirality* 9: 643-649, 1997.
21. Ascenzi P, di Masi A, De Sanctis G, Coletta M, Fasano M. Ibuprofen modulates allosterically NO dissociation from ferrous nitrosylated human serum heme-albumin by binding to three sites. *Biochem Biophys Res Commun.* 11;387(1):83-6, 2009 .
22. Ahifors CE. Effect of ibuprofen on bilirubin-albumin binding. *J Pediatr.* 144(3); 386-8,2004.
23. Jiunn H., et al. Protein Binding as a Primary Determinant of the Clinical Pharmacokinetic Properties of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Clinical Pharmacokinetics* 12: 402-432, 1987.

24. Aarons L., et al. The binding of ibuprofen to plasma proteins. *Eur J Clin Phaemacol*. 25(6): 815-8,1983.
25. Trnavská Z, Trnavský K. Characterization of salicylate binding to synovial fluid and plasma protein in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol. 18(5): 403-6, 1980.*
26. Xiao Min He, Daniel C. Carter. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 358(16): 209-215, 1992.
27. Duche JC., Urien S, Simon N, Malaurie E, Monnet I, Barre J. Expression of the genetic variants of human alpha-1-acid glycoprotein in cancer. *Clin Biochem*. 33(3): 197-202,2000
28. Z. Rasheed, R. Ahmad, N. Rasheed, R. Ali. Reactive Oxygen Species Damaged Human Serum Albumin in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *J. Exp. Cancer Res*. 26: 395-404, 2007.
29. Longworth JW.A new component in protein fluorescence. *Ann N Y Acad Sci*.;366:237-45,1981
30. Carrie L., Adrian R. Woolfitt, Lisa G. McWilliams, Hercules Moura, Anne E. Boyer and John R. Barr. Survey of albumin purification methods for the analysis of albumin-organic toxicant adducts by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Proteomics.* 5: 4973-4979, 2005.
31. Mehdi Resouli, Ali Okhovatian and Atena Enderami. Serum protein profiles as an indicator of malignancy: multivariate logistic regression and ROC analyses. *Clin Chem Lab Med.* 43(9): 913-918, 2005
32. Elisabetta Gianazza and Philippe Arnaud. A general method for fractionation of plasma proteins. Dye-ligand affinity chromatography on immobilized Cibacron Blue F3-GA. *Biochem. J.* 201: 129-136, 1982.
33. Halfman CJ., Nishida T. Influence of pH and electrolyte on the fluorescence of bovine serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* 243:284-293,1971.
34. Halfman CJ., Nishida T. Nature of the alteration of the fluorescence spectrum of bovine serum albumin produced by the binding of dodecyl sulfate. *Biochim Biophys Acta.* 243: 294-303,1971.

35. Eftink MR, Ghiron CA. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* 15: 672-680, 1976.
36. Semisotonov, G. N., N. A. Rodinova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas, and R. I. Glimanshin. Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers.* 31: 119-128, 1991.
37. 池田　雅充　他　無菌ラット血清および腹腔内マクロファージにおけるリポポリサッカライド投与の TNF,IL-6 レベルに及ぼす影響. *J. germfree life gnotobiol*. 27(2): 76-79, 1997
38. Nadai M, HSAegawa T, Kato K, Wang L, Nabeshita T, Kato N Alterations in pharmacokinetics and protein binding behavior of cefazolin in endotoxemic rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 37(9): 1781-5, 1993.
39. Bruce N. Ames, Mark K, Shigenaga, and Tory M. Hagen. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseses of aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90; 7915-7922, 1993.
40. Anraku M, Tsurusaki Y, Watanabe H, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Stabilizing mechanisms in commercial albumin preparations: octanoate and N-acetyl-L-tryptophanate protect human serum albumin against heat and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 1702(1):9-17. 2004
41. Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Tomita K, Otagiri M. Oxidation and carboxy methyl lysine-modification of albumin: possible involvement in the progression of oxidative stress in hemodialysis patients. *Hypertens Res*.28(12):973-80,2005.
42. Halliwell B. Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol.* 37(4); 569-71, 1988.
43. Carballal S., Radi R., Kirk MC., Barnes S., Freeman BA., Alvarez B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry.* 42(33): 9906-14, 2003.
44. Bourdon E., Loreau N., Lagrost L., Blache D. Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free*

Radic Res. 39(1): 15-20, 2005

45. Hayashi T, Era S, Kawai K, Imai H, Nakamura K, Onda E et al.Obersvation for redox stat of human serum and aqueoushumor albumin from patients with senile cataract. *Pathophysiology.* 6: 237–243, 2000.
46. Soejima A., Matsuzawa N., Hayashi T., Kimura R., Ootsuka T., Fukuoka K., Yamada A., Nagasawa T., Era S. Alteration of redox state of human serum albumin before and after hemodialysis. *Blood Purif.* 22(6):525-9, 2004.
47. Oettl K, Greilberger J, Stadlbauer V, Petter F, Lackner C, Putz-BankutiC et al. Redox state of serum albumin and carbonyl content of plasma proteins in advanced liver disease. Proceedings of the 13th Biennal Congress of the Society for Free Radical Research International. Medimond: Bologna, 265–268, 2006.
48. Kadota K, Yui Y, Hattori R, Murohara Y, Kawai C. Decreased sulfhydryl groups of serum albumin in coronary artery disease. *Jpn Circ* J 55: 937–941, 1991.
49. Suzuki E, Yasuda K, Takeda N, Sakata S, Era S, Kuwata K et al. Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 18: 153–158, 1992.
50. Hayakawa A, Kuwata K, Era S, Sogami M, Shimonaka H, Yamamoto M et al. Alteration of redox state of human srum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery. *J Chromatogr* 698: 27–33, 1997.
51. Era S, Kuwata K, Imai H, Nakamura K, Hayashi T, Sogami M. Age-related change in redox state of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 1247: 12–16, 1995.
52. Bito R, Hino S, Baba A, Tanaka M, Watabe H, Kawabata H. Degradation of oxidative stress.induced denatured albumin in ratliver endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C531–C542, 2005.
53. Meucci E, Mordente A, Martorana GE. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. *J Biol Chem* 266: 4692–4699, 1991.
54. Muramoto Y, Matsushita M, Irino T. Reduction of reaction differences between human mercaptalbumin and human nonmercaptalbumin measured by the

bromcresol purple method. *Clin Chim Acta* 289: 69–78, 1999.

55. Anraku M, Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm Res*. 18: 632–639, 2001.
56. Anraku M, Kragh-Hansen U, Kawai K, Maruyama T, Yamasaki Y, Takakura Y et al. Validation of the Chloramine-T induced oxidation of human serum albumin as a model for oxidative damage in vivo. *Pharm Res* 20: 684–692, 2003.
57. Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Otagiri M. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem Biophys Res Commun*. 334: 1322–1328, 2005.
58. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49(5): 1305-13, 1996.
59. Tesarová P, Kalousová M, Trnková B, Soukupová J, Argalásová S, Mestek O, Petruzelka L, Zima T. Carbonyl and oxidative stress in patients with breast cancer--is there a relation to the stage of the disease? *Neoplasma*. 54(3): 219-24, 2007
60. Korkmaz GG, Inal BB, Ortakoylu GM, Irmak H, Kara AA, Gelisgen R, Ogurlu O, Uzun H. Changes in oxidative stress parameters and antioxidant status in lung cancer: Western blot analysis of nitrotyrosine and protein carbonyls content. *Clin Lab*.60(4):599-607,2014.
61. Kawakami A., Kubota K., Yamada N., Tagami U., Takahara K., Sonaka I., Suzuki E., Hirayama K. Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. *FEBS J.* 273(14):3346-57, 2006.
62. Iwao Y., Anraku M., Hiraike M., Kawai K., Nakajou K., Kai T., Suenaga A., Otagiri M. The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP).*Drug Metab Pharmacokinet*. 21(2); 140-146, 2006.
63. Era S., Kuwata K., Imai H., Nakamura K., Hayashi T., Sogami M., Age-related

change in redox state of human serum albumin.*Biochim. Biophys. Acta.* 47; 12-16, 1995.

64. Deguchi Y, Yoshimumi H, Ishikawa F, Sato H, Tamai I, Matsushita R, Tohuku Y, Ichimura F, Tsuji A. Peritoneal transport of beta-lactam antibiotics: effects of plasma protein binding and the interspecies relationship. *J. Pharm. Sci*. 77(7); 559-564, 1988.
65. Julia H, Satterwhite and F. Douglas Boudinot. High-performance liquid chromatographic determination of ibuprofen in rat and human plasma. *Journal of Chromatography*. 497; 220-225, 1989.
66. Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A. G., Ahn B. W., Stadman E. R.. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method in Enzymology*. 186: 764-787, 1990.