

平成 28 年 2 月 15 日

崇城大学大学院
薬学研究科委員会




研究科長 小田切 優樹 殿

論文審査委員

主査 小田切 優樹



論文審査結果の報告 (甲)

| | |
|-------|---|
| 論文提出者 | 河野 陽介 (1231D02) |
| 論文題名 | アルブミン製剤における N-アセチル-L-メチオニンの安定化剤としての有用性評価 |
| 審査委員 | 主査 教授 小田切 優樹  |
| | 副査 教授 原武 衛  |
| | 副査 准教授 大栗 誉敏  |

学位論文の要旨

アルブミン製剤は、出血性及び外傷性ショック時の循環血流量の是正や低アルブミン血症時の膠質浸透圧の改善など、種々の疾患で汎用されている。アルブミン製剤の製造現場では、有害なウイルス、夾雑蛋白質の混入の危険性の問題から低温殺菌法が用いられている。その際、ヒト血清アルブミン (HSA) の熱変性や凝集を防ぐ目的で、安定化剤としてオクタン酸ナトリウム (Oct) と N-アセチル-L-トリプトファン (N-AcTrp) が添加されており、Oct は熱に対して安定化剤として働き、N-AcTrp は HSA の酸化を防ぐ抗酸化剤として機能している。しかしながら Trp の副作用として、その過剰摂取によるセロトニン症候群のリスク上昇や、光酸化による代謝物の神経毒性の影響が懸念される。そこで本研究では、抗酸化作用を有すると考えられている N-アセチル-L-メチオニン (N-AcMet) に着目し、アルブミン製剤の安定化剤としての有用性を N-AcTrp と比較検討した。以下に得られた知見を要約する。

- 1) N-AcMet の HSA に対する抗酸化効果及び熱安定性について検討した。酸化剤 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride による HSA 酸化に及ぼす添加剤の影響をカルボニル含量及びメルカプト分率を測定することにより評価した結果、N-AcMet 単独及

び Oct と N-AcMet の併用は、酸化を明らかに抑制した。また N-AcMet は、既存の添加剤である N-AcTrp と比較して顕著な 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ラジカル消去能を有していた。さらに N-AcMet 及び Oct 添加時の HSA の熱安定性について断熱型示差走査熱量計 (DSC) を用いて測定したところ、Oct と N-AcMet の併用は、顕著に HSA の立体構造を安定化させた。以上の結果から N-AcMet は、N-AcTrp と比較し、HSA に対して同等あるいはそれ以上の抗酸化能を有する安定化剤として機能する可能性が強く示唆された。

2) HSA の光安定性に及ぼす N-AcMet の有用性を構造安定性及び抗酸化能の観点から N-AcTrp と比較検討した。HSA の光照射に対する添加剤の構造安定性に及ぼす影響について円二色性スペクトル及び DSC により検討した結果、光照射処理後 N-AcTrp 添加群では顕著な構造安定性の低下が観察された。一方、N-AcMet 添加群及び Oct 添加時では、光照射処理前の構造安定性を保持していた。HSA の光照射に対する添加剤の抗酸化能を電子スピン共鳴及びカルボニル含量試験により検討した結果、光照射処理後において N-AcMet 添加群では N-AcTrp 添加時のそれと比較して顕著なラジカル消去能及びカルボニル含量の減少が観察された。一方、N-AcTrp 添加群において光照射処理後 HSA のカルボニル含量は、顕著に増大していたが、N-AcTrp の光酸化分解物が HSA に対して酸化促進的に働き、Oct と N-AcTrp は安定化と抗酸化効果を協奏的に低下させることが、その一因と考えられた。以上の結果より、N-AcMet は N-AcTrp と比べ、HSA に対して優れた光安定性を有する添加剤であることが示唆された。

3) HSA の安定性を向上させる N-AcMet と Oct の結合能ならびに結合様式について構造化学的考察を加えた。HSA に対する添加物の結合を定量的に評価した結果、Oct ($1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) は N-AcMet ($5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) よりも結合定数が約 20 倍大きいことが明らかとなった。さらに、HSA - N-AcMet - Oct の三元複合体を調製して X 線結晶構造解析を行った結果、HSA - N-AcMet - Oct 複合体の全体構造はハート型構造を構築し、N-AcMet の結合部位はサブドメイン IIA であることが示唆された。サブドメイン IIA に結合した N-AcMet のカルボキシル基は Lyn195 や Arg222 の側鎖と水素結合しているものと推察された。興味深いことに、この結合部位はサブドメイン IIIA に結合している N-AcTrp と明らかに異なっていた。一方、Oct の主要結合部位はサブドメイン IIIA であることが示唆された。これらの結果から、N-AcMet が N-AcTrp より効果的に抗酸化能を発揮している要因の 1 つとして、HSA 分子における N-AcMet と N-AcTrp の結合部位の差異が考えられた。

4) 次亜塩素酸から生じ、腎不全の進行に関与する有力な活性酸素クロラミン T を用いて酸化修飾 HSA を作製し、N-AcMet 及び N-AcTrp の HSA の構造安定性、抗酸化能および体内動態特性に及ぼす影響について比較検討した。HSA 酸化に対する添加剤の構造安定性に及ぼす影響について各種分光学的手法により検討した結果、N-AcMet 添加時が N-AcTrp 添加時よりも HSA の酸化修飾を顕著に軽減し、構造安定化に寄与していることが明らかとなった。次に添加剤の抗酸化能について各種酸化ストレスマーカー及び各種ラジカル消去能により検討した結果、N-AcMet 添加時が N-AcTrp 添加時と比較して顕著な抗酸化能を示した。添加剤のマウスにおける体内動態に及ぼす影響について検討したところ、N-AcMet

は未添加時及び N-AcTrp と比較して、消失の遅延が観察された。これらの結果から、N-AcMet は N-AcTrp と比較して、HSA に対して in vitro 及び in vivo でより有効な抗酸化能を有する安定化剤である可能性が強く示唆された。

以上、N-AcMet は N-AcTrp と比較し、アルブミン製剤においてより有効な抗酸化能を有する安定化剤である可能性が強く示唆された。今回得られた知見は、さらなる有効性及び安全性に優れたアルブミン製剤を開発するための有用な基礎資料となり得ると考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究では、抗酸化作用を有すると考えられている N-アセチル-L-メチオニン(N-AcMet)に着目し、アルブミン製剤の安定化剤としての有用性を調べ、従来使用されている N-アセチル-L-トリプトファン(N-AcTrp)と比較検討して、以下の知見を得ている。

- 1) HSA 酸化に及ぼす影響をカルボニル含量やメルカプト分率を測定して、N-AcMet が他のアミノ酸に比べ最も効果的であることを明らかにした。さらに、Oct と N-AcMet の併用が HSA の立体構造を安定させることを見出した。加えて、N-AcMet は N-AcTrp と比較して、優れた抗酸化能を有する安定化剤として機能することを明らかにした。
- 2) HSA の光照射に対する添加剤の構造安定性および抗酸化能に及ぼす影響について CD スペクトル法ならびに DSC により検討した。その結果、N-AcMet が N-AcTrp に比べ、優れた光安定性を有する添加剤であることを実証した。
- 3) N-AcMet 及び Oct 添加による HSA の安定性向上の機序について構造化学的考察を試みたところ、N-AcTrp に比べて N-AcMet の優れた抗酸化能は HSA 分子上の N-AcMet と N-AcTrp の結合部位の差異に起因することが判明した。
- 4) 腎不全の進展に関与する活性酸素クロラミン T により酸化修飾 HSA を作製して、構造安定性、抗酸化能および体内動態特性を調べ、未修飾 HSA と比較検討した。その結果、N-AcMet 添加による、修飾 HSA の構造安定性、抗酸化能ならびに体内動態の顕著な改善が確認された。

以上、本研究は、アルブミンの構造安定化ならびに抗酸化能の向上に N-AcMet が有効に機能することを示したものである。これらの知見は、有効かつ安全性に優れたアルブミン製剤を設計する上での重要な基盤データになるものであり、博士の学位論文に値する内容を有していると考えられる。加えて、申請者は口頭試問においても適切に対応し、十分な学力を有し、博士の学位論文に値すると判断された。

最終試験結果の要旨

本論文は、研究の目的・背景が明確で、得られた結果も新規性があり、博士の学位論文としての内容を満たし、加えて審査委員会および公聴会における質問に対しても適切に答え、実りある討論がなされた。以上の結果に基づき、本論文提出者は、博士(薬学)の学位を得る資格があると判定した。