

薬物の血清タンパク結合に関する研究

小田切優樹

Study on Binding of Drug to Serum Protein

Masaki OTAGIRI

*Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,
5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan*

(Received December 12, 2008)

After being distributed in the circulating blood, drugs bind to serum proteins varying degrees. In general, such binding is reversible, and a dynamic equilibrium exists between the bound and unbound molecular species. It is believed that unless there is a specific transport system (*e.g.* receptor-mediated endocytosis, protein-mediated transport), only unbound drugs are able to penetrate through biomembranes, are distributed to tissues, and undergo metabolism and glomerular filtration. It is also believed that only unbound molecules present in target tissues can exert their pharmacological effects, and that the concentration of unbound molecules in tissues is in proportion to the drug serum concentration. Therefore, drug-serum protein binding is critically involved in the manifestation of the pharmacological effects of a drug as well as its pharmacokinetics. Among serum proteins, human serum albumin (HSA) and α_1 -acid glycoprotein (AGP) play important roles in protein binding for many drugs, which is of key importance to drug distribution in the body. In addition, they are widely used in clinical settings as blood preparations and drug delivery system carriers. It is thus of great importance from the viewpoint of pharmaceutical science to clarify the structure, function, and pharmaceutical properties of HSA and AGP. Accordingly, since starting my laboratory, the focus of my research has involved molecular pharmaceutical studies on the interactions of drugs and HSA and AGP for the purpose of applying these findings to clinical fields, such as drug treatment, diagnosis and drug discovery. In this review, the molecular properties of HSA and AGP will be briefly outlined. The static and dynamic topology of drug binding sites on these proteins, investigated by various spectroscopic techniques, X-ray crystallography, quantitative structure-activity relationships, molecular modeling, photo affinity labeling, site-directed mutagenesis *etc.*, changes in the serum protein binding of drugs in pathological conditions, such as liver and kidney failure and various inflammation diseases and factors contributing to the changes will then be summarized. Finally, cases in which protein binding displacement can be applied to medical fields will also be introduced.

Key words—protein binding; drug; albumin; α_1 -acid glycoprotein; clinical application

1. はじめに

薬物は循環血液中に移行したのち、薬物物性の差異を反映して程度の違いはあるものの、血清タンパク質と結合する。この現象を薬物の血清タンパク結合と言う。一般に、薬物の血清タンパク結合は可逆的であり、結合型と非結合型分子種の間で動的平衡が保たれている。薬物の輸送は特殊な輸送系（例えば受容体介在性エンドサイトーシスやタンパク介在

性輸送）が存在しない限り、非結合型薬物分子のみが生体膜を透過して、組織に移行し、代謝や糸球体ろ過を受けると考えられている。また、薬理効果を発揮できるのは薬効発現組織における非結合型の分子とされているが、この濃度は血清中の非結合型濃度と比例関係にある。それゆえ、薬物の血清タンパク結合はその体内動態、さらには薬効発現に大きな係わり合いを有している。¹⁻⁷⁾

近年、疾病治療の標的となる受容体や酵素に対して高い親和性を有する薬物の開発が進んでいるが、通常、薬物は脂溶性が高く、かさ高い構造を有している。一般に、薬物の血清タンパク結合の推進力は疎水性相互作用であるため、血清タンパク質に対し

熊本大学大学院医学薬学研究部（〒862-0973 熊本市大江本町 5-1）

e-mail: otagirim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

本総説は、平成 20 年度日本薬学会賞を記念して記述したものである。

て高い親和性を有する薬物が多い。事実、上市される薬物に占める高タンパク結合型薬物の割合は以前に比べて大きく増加しており、薬物の中には、血清タンパク質に対する親和性が著しく強いことが原因で開発が中止となったものもある。そのため、従前以上に血清タンパク結合を適確に評価する必要がある。

ところで、ヒトにおいて薬物との結合に関与する血清タンパク質としては、血清アルブミンと α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP)、リポタンパク質、免疫グロブリンなどが知られているが、中でも最も多くの薬物と親和性を有しているのが、血清アルブミンとAGPである。これらのタンパク質は、薬物の体内分布の鍵を握る血清タンパク結合に重要な役割を果たすのみならず、医療現場では血液製剤やドラッグデリバリーシステムキャリアーとして広く利用されている。したがって、これらの血清タンパク質の構造・機能や製剤学的特性を明らかにすることは、医療薬学上、極めて意義深い。このような背景の下、筆者は研究室を主宰した当初から一貫して、基礎から臨床への応用を念頭におき、薬物とアルブミンやAGPとの相互作用に関する分子薬剤学的研究を行い、これら血清タンパク質の構造と機能に関する基盤情報を構築するとともに、それらを活用して治療や診断あるいは創薬・創剤といった医薬への応用を試みてきた。

本稿では、薬物の血清タンパク結合に関与する血清タンパク質の特性について簡単に述べ、筆者がこれまで行ってきた研究成果のうち、結合サイトの動的・静的トポロジー解析結果を紹介する。ついで、病態時における血清タンパク結合の変動とその要因について紹介し、最後にタンパク結合置換現象を医療分野に応用した事例について紹介する。

2. 薬物の体内動態に関与する血清タンパク質の構造と機能に関する基盤情報の構築

2-1. ヒト血清アルブミンとAGPの性状

ヒト血清アルブミン (HSA) は585個のアミノ酸残基からなる分子量約66500の単純タンパク質である。HSAは血清中に約4 g/dlと多量に存在し、血清タンパク質の約半分を占めている。HSAの生体内半減期は約15-18日であり、血管内プールに約40%が、血管外プールに約60%が分布している。HSAの構造特性として α -ヘリックス構造からなる3つ

のドメインの繰り返し構造を有する。⁸⁻¹²⁾ HSAは膠質浸透圧の調節能を有しており、正常血漿の膠質浸透圧の約80%を維持しているため、古くから出血時やネフローゼ症候群に膠質浸透圧維持を目的としてアルブミン製剤が汎用されてきた。HSAは、脂肪酸、ビリルビン、尿毒症物質、一酸化窒素(NO)、カルシウム、ホルモンなどの内因性物質や薬物、毒劇物や農薬といった外因性物質の血中輸送担体として働き、また組織への拡散防止としての解毒作用やエステラーゼ様活性等を有し、これら結合リガンドの体内動態や生理活性に影響を及ぼしている。また最近では、HSAの抗酸化効果に注目が集まっており、抗酸化物質の乏しい細胞外液中における抗酸化物質としての役割が見い出されるようになってきた。¹³⁻¹⁸⁾ このようにHSAは生体内の恒常性維持に必要な機能を数多く有していることから、各種病態時に伴うHSAの量的・質的変動は、上述した機能低下ひいては恒常性維持機能の脆弱化を引き起こすと考えられている。

一方、AGPの場合は183個のアミノ酸残基と5本の糖鎖からなる分子量約44100の血清糖タンパク質である。AGPの糖鎖含量は分子量の約45%と他の糖タンパク質の中でも極めて高く、その糖鎖末端にシアル酸残基を有しているために、血清中で最も負に帯電している(pI値:2.7)。¹⁹⁻²¹⁾ 現在までのところ、AGPの生物学的意義は不明であるが、疎水性化合物の輸送担体として機能しているタンパク質群、いわゆるリポカリンファミリーの一員として分類されている。事実、AGPは多くの塩基性薬物やステロイドホルモン類の主要結合担体として機能しており、結合薬物の体内動態に影響を及ぼしている。^{14,22,23)} また、通常、AGPは血清中に50-100 mg/dlで存在しているが、ストレス、外傷、炎症、腫瘍等、生体反応の急性期に合成が亢進し、血中及び組織中で著しく増加する急性相反応物質の1つであるため、これらの疾病時には血中濃度が3-5倍増加する。^{24,25)} また、免疫グロブリンと相同性を有していることや多様な糖鎖構造を有していることから、生体内で抗炎症作用や免疫調節能を発揮しているのではないかと考えられている。²⁶⁾ 最近では、動物実験レベルではあるが、AGP自身を抗炎症剤として投与する試みも行われている。²⁷⁾ このようにAGPの生物活性については新たな作用が見い出されてい

る半面、相反する報告も見受けられるため、生理的な役割についてはいまだ十分に明らかにされていないのが現状である。

2-2. HSA 及び AGP 分子上の薬物結合サイトのトポロジー解析 HSA や AGP は、非常に多くの物質を結合するにも係わらず、その分子上における結合サイトは限定されていることから、分光学的手法や構造活性相関、光アフィニティラベル法、部位特異的変異法、X線結晶解析、分子モデリングなどを駆使して、薬剤学領域では他に先駆け、これら血清タンパク質分子上のリガンド結合部位のトポロジー解析に着手した。

筆者が血清アルブミンの研究に着手した当時、Sudlow らのグループが一連のダンシル誘導体を用いた蛍光プローブ置換実験により、HSA 分子上に2つの薬物結合サイト、いわゆるサイト I、II の存在を見出した。²⁸⁻³⁰⁾ しかしながら、ジギトキシンやジゴキシンの結合が2つのサイトでは説明できないことから、これらの化合物を結合する第3のサイトが存在するのではないかと考え、クマリン系化合物をはじめ種々の蛍光プローブを用い、ジギトキシンやジゴキシンなどの薬物が特異的に結合する新たなサイトの存在を明らかにし、これをサイト III と名付けた。³¹⁾ また、従来、サイト I は単一な結合領域と考えられてきたが、この点に関して多角的な検討を行った結果、結合領域はサイト II より柔軟で幅広く、少なくとも3つのサブサイトから形成されていることを初めて明らかにした。^{32,33)} さらに、サイト I のうち、サイト II と境界を接しているサブサイト I b だけがサイト II と相互作用を引き起こし、サイト II 結合リガンドの親和性を低下させることや、このサイト間相互作用が pH 依存的な構造転移により厳密に制御されていることを見出した。³⁴⁾

一方、サイト II については、カルボン酸のような負に強く滞電した化合物が強く結合することから、従来より結合サイトにおける正電荷の存在が示唆されてきた。そこで、サイト II に強く結合する薬物をピックアップし、これらの負電荷をマスクした誘導体を合成して結合性を検討した。その結果、負電荷の消失はサイト II への親和性を著しく低下させるだけでなく、サイト指向性にも大きな影響を及ぼし、サイト II のリガンド結合の認識過程における静電荷の重要性が実証された。³⁵⁾ この知見がきっかけとな

り、結合過程に関与するアミノ酸残基の同定に関する研究がスタートし、後述する部位特異的変異法によるアミノ酸残基の同定につながっていった。また、アリルプロピオン酸系消炎鎮痛薬カルプロフェンの HSA 結合性を詳細に検討した結果、本薬物の高親和性結合サイトがサイト II に相当すること、他方、低親和性結合サイトはサイト I であることを同定した。³⁶⁾ 興味深いことに、カルプロフェンを高親和性サイトのみで結合している条件下でサイト II 結合薬物を共存させても、予想に反して結合率には大きな影響は生じず、一見、競合置換が起きていないように思われる現象を見出した。そこで、種々の分光学的手法を駆使して、この機序を検討した結果、サイト II に結合しているカルプロフェン分子が併用薬によりいったん置換されるものの、その後、低親和性サイトであるサイト I に再結合するという HSA 分子内におけるサイト-サイト移行機構を提唱した。^{37,38)} 薬物結合サイト以外にも、内因性リガンドである脂肪酸の結合部位に関する分子マップを作成し、³⁹⁾ 薬物結合サイトとの位置関係を明らかにするとともに、種々の条件下で結合サイト間のダイナミクスを網羅的に解析して、HSA 分子上におけるリガンド結合サイトの静的プラス動的トポロジーを構築した (Fig. 1)。

薬物結合に関与するアミノ酸残基を明らかにしようと試みたが、従来の化学修飾方法では特異性が低く、残念ながら残基と部位の同定には至らなかった。そこで部位特異的変異法を導入して、サイト I では Arg-218 が、他方、サイト II では Arg-410 と Tyr-411 が重要であること、^{40,41)} 特に Arg-410 のグアニジノ基がリガンドの負電荷と静電的相互作用をしていることを明らかにし、これが前述したサイト II における正電荷であることを実証した。⁴¹⁾ また、Arg-410 と Tyr-411 をいずれもアラニンに二重置換した変異体 (R410A/Y411A) ではリガンド結合性が著しく低下し、サイト II への指向性が消失することから、この変異体をサイト II ノックダウン HSA と称し、野生型 HSA と組み合わせて結合性を調べることにより、結合サイトを簡便かつ迅速に同定する新たな評価法を開発した。¹⁴⁾

ところで、HSA にはドメイン I に局在する Cys-34 が唯一遊離状態で存在しているが、筆者らはこの残基と SH 含有化合物との共有結合体の形成

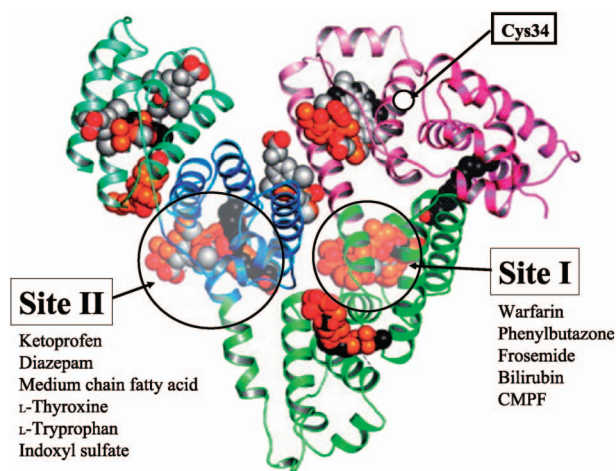


Fig. 1. Summary of the Ligand Binding Capacity of HSA as Defined by Crystallographic Studies to Date

を直接的に定量する方法を開発し、システインやグルタチオンなどの内因性物質やカプトプリル、*N*-アセチルシステインといったSH含有薬物が可逆的な共有結合体を形成することを見出すとともに、この反応に影響を及ぼす要因を明らかにした。^{42,43)} また、この複合体形成の生理的な意義を明らかにするため、免疫学的検討を重ねた結果、反応に伴うハプテン形成が薬物の免疫学的な副作用の発現機序に関与していることを証明した。⁴⁴⁾ さらに、Cys-34を蛍光プローブのアクリロゲンでラベル化し、種々の条件下でその反応性を検討した結果、Cys-34の反応性がSH基の溶媒への露出度や周囲の静電的ポテンシャルといったマイクロ環境に依存することを初めて実証した。^{45,46)}

シグナル伝達分子であるNOは多様な活性を有するものの、その生体内寿命は非常に短く、生体ではタンパク質などのチオール基と反応し、S-ニトロソチオールへと変換され、比較的安定な状態を保っている。そのため、タンパク質のS-ニトロソ化はNOリザーバーとして働き、生体内のNO濃度の調節に関与している。^{47,48)} 中でもHSAは血漿中において多量に存在する上に、優れた血中滞留性を有していることから、NOリザーバーとしての役割も大きいことが期待される。⁴⁹⁾ 筆者らは、HSAにおけるS-ニトロソ化反応やS-ニトロソ転移反応が脂肪酸、銅イオン、ビリルビンなどの内因性結合物質によって絶妙にコントロールされていることを見出した。^{50,51)} これまで数多くのS-ニトロソ化タン

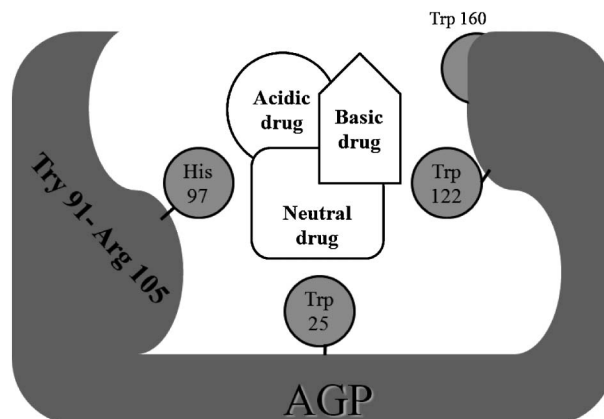


Fig. 2. Proposed Drug-binding Region on AGP

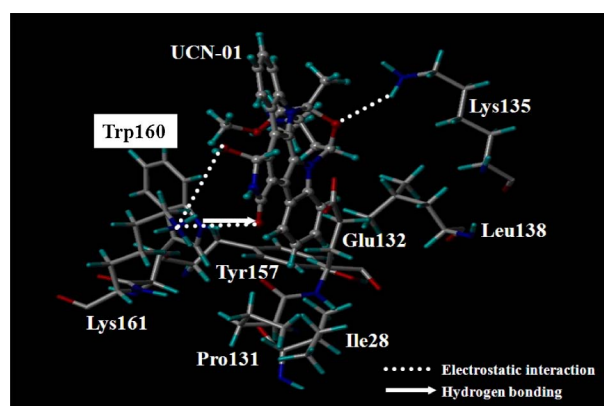


Fig. 3. Amino Acid Residues in a Surface Cleft around Trp-160 That Interacts with UCN-01 Exhibited in Type II Docking Model

パク質が同定されてきたが、結合リガンドにより反応性が調節されている例は見当たらないことから、この機序はHSAに特異的なものであるかもしれない。これらの内因性結合リガンドは疾病時に大きく変動するため、リガンド結合によるS-ニトロソ化反応の制御は病態時におけるHSAの新たな役割を考える上で非常に興味深い。現在、種々の疾病モデル動物を用いて、この反応の生理的意義について追及している。

一方、AGPの場合、糖鎖含量が極めて高いため、X線結晶構造解析やNMR解析等による立体構造の解明はなされていない。これまでのところ、円二色性(CD)スペクトル解析や分子モデリングによる検討から、水溶液中ではβ-シート構造に富んでいることが報告されているだけであり、^{19,20)} 薬物結合サイトのトポロジーについては不明な点が多く残さ

れている。

研究開始当初、AGP 分子上のリガンド結合サイトについては、AGP が塩基性薬物の主要結合タンパク質であることから、これらリガンドに対する結合サイトの同定が試みられ、HSA とは対照的にリガンド結合サイトは 1 つであると信じられてきた。^{21,22)} しかしながら、筆者らは AGP には塩基性薬物だけでなく、ワルファリンをはじめとするクマリン系薬物などの一部の酸性薬物やベンゾジアゼピン系薬物やステロイドホルモンといった疎水性物質も HSA と同等かそれ以上に強く結合することを見出した。^{52,53)} これらの知見に基づき、塩基性薬物以外の結合サイトも存在するのではないかと考え、種々の蛍光、CD プローブを用いて薬物結合サイトのトポロジー解析を行った結果、AGP 分子上の薬物結合サイトは、塩基性薬物、酸性薬物及びステロイドホルモンをはじめとする中性薬物の結合する 3 つのサブサイトから構成され、これらが一部オーバーラップした位置関係で互いに干渉しているモデルを提唱した (Fig. 2).⁵⁴⁻⁵⁶⁾

また、抗がん薬 UCN-01 は AGP に 10^8 M^{-1} という非常に高い親和性を有しているが、光アフィニティラベル法、部位特異的変異法、構造活性相関、ドッキングシミュレーションなどのアプローチを駆使することにより、この強固な結合が UCN-01 のインドカルバゾール環と Trp-160 のスタッキングによることを明らかにした (Fig. 3).^{57,58)} これまでも、化学修飾法や蛍光スペクトル法の検討結果から、AGP と薬物の結合における Trp 残基の重要性は示唆されてきたものの、特定の残基は明らかにされていなかったため、本研究で初めて Trp-160 の関与を同定できたことは、AGP の薬物結合サイトのマッピングを作成する上で有用な基礎資料になるものと考えられる。

AGP には 2 つのバリエーション (F1*S 体と A 体) が存在し、薬物によってはいずれかのバリエーションに選択的に結合する。⁵⁹⁻⁶¹⁾ 例えば、F1*S 体にはワルファリン、ジピリダモールなどが、他方、A 体にはプロパフェノン、ジソピラミドなどが選択的に結合する。この興味深い現象は今から約 10 年前に見い出されたものの、その機序については明らかにされていない。そこで筆者らは、これまで構築した薬物結合サイトに関するトポロジーデータとリポカリ

ンファミリーの立体構造モデルを精査し、薬物結合に關与するアミノ酸残基を絞り込み、さらに部位特異的変異法により両バリエーション間でアミノ酸残基をスイッチさせ、結合選択性的変化を調べた。その結果、92 番目のアミノ酸残基 (F1*S 体では Val, A 体では Glu) をバリエーション間でスイッチすることにより、薬物選択性が逆転したことから、この残基が AGP バリエーション間の薬物結合選択性に關与していることを実証した。⁶²⁾ 本知見は AGP の薬物結合選択性に關与するアミノ酸残基の存在を初めて明らかにしたものであり、今後、AGP のリガンド結合及び結合サイトのトポロジーを構築する上での重要な基礎情報になるだろう。

ところで、医薬品開発過程では、種々の実験動物を用いて体内動態における種差が検討され、その結果に基づきヒトへの外挿が試みられている。従来より、血清タンパク結合においても種差の存在が明らかにされていたが、その機序については不明であった。そこで、これらの差異がアルブミン及び AGP 分子上の薬物結合サイトの違いに起因すると考え、上述の手法を用いて結合サイトのトポロジー解析を試みた。その結果、いずれのタンパク質においてもヒトと全く同等なトポロジーを有するものは存在せず、動物種間で若干異なっていた。例えば、アルブミンの場合、ラットはヒトのサイト I に酷似した部位を保持しており、ウサギもサブサイトの重なり度合いは多少異なるもののヒトに類似した構造を有していた。しかし、ウシではサブサイトが独立していた。⁶³⁾ イヌの場合は、サイト I に相当する結合部位の存在を見い出すことができなかった。対照的に、サイト II ではヒトとイヌが 2 つの重なり合ったサブサイトから構成されており、非常に類似したトポロジーを有していることが判明した。一方、ウシ、ラット、ウサギではサイト II の存在はあるものの、ヒトに比べると不完全な形であった。最近、このモデルの妥当性が光アフィニティラベル実験により裏付けられた。⁶⁴⁾ また、これらアルブミン種における構造の熱安定性を示差熱量計で検討した結果、ヒト、ウシ、ラットでは 1 成分ピークによる 2 状態転移を取るが、イヌやウサギは 2 成分ピークで多状態転移を示すことを明らかにした。⁶⁵⁾ 一方、AGP の場合、ヒトと同様、ウシやイヌでは塩基性薬物及びステロイドホルモンの結合サイトが互いに重なり合っ

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、例えば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ン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

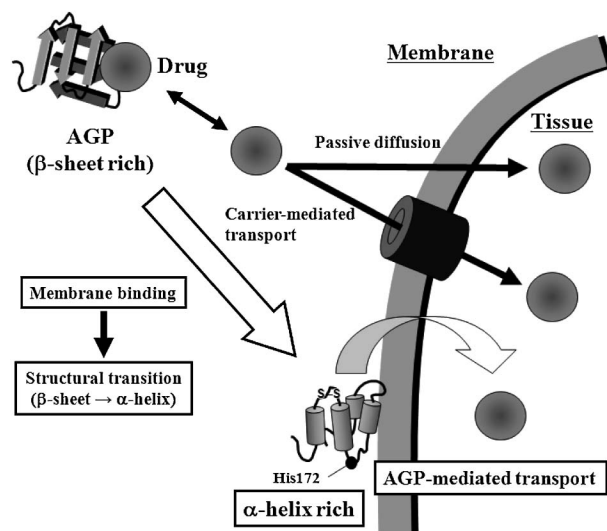


Fig. 4. Proposed Mechanism for the AGP-mediated Drug Transport System

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

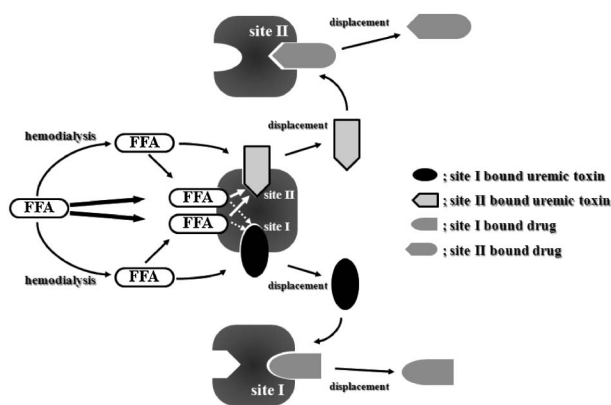


Fig. 5. Possible Cascade Displacement Model in a Fatty Acid-uremic Toxin-drug System

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, これがり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信じられており、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

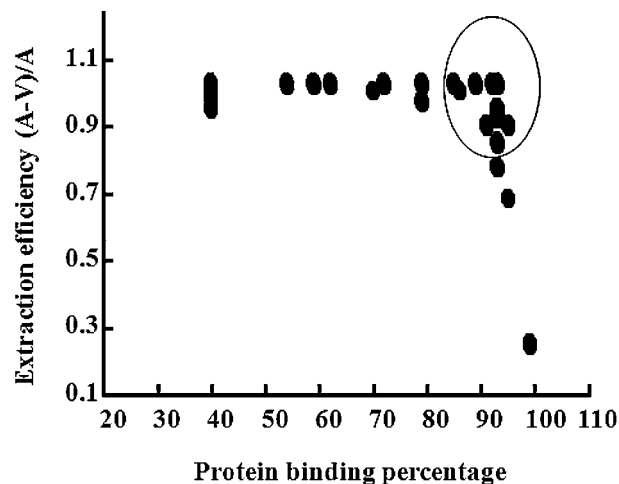


Fig. 6. Relation between Extraction Efficiency and the Presence of Protein Binding

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

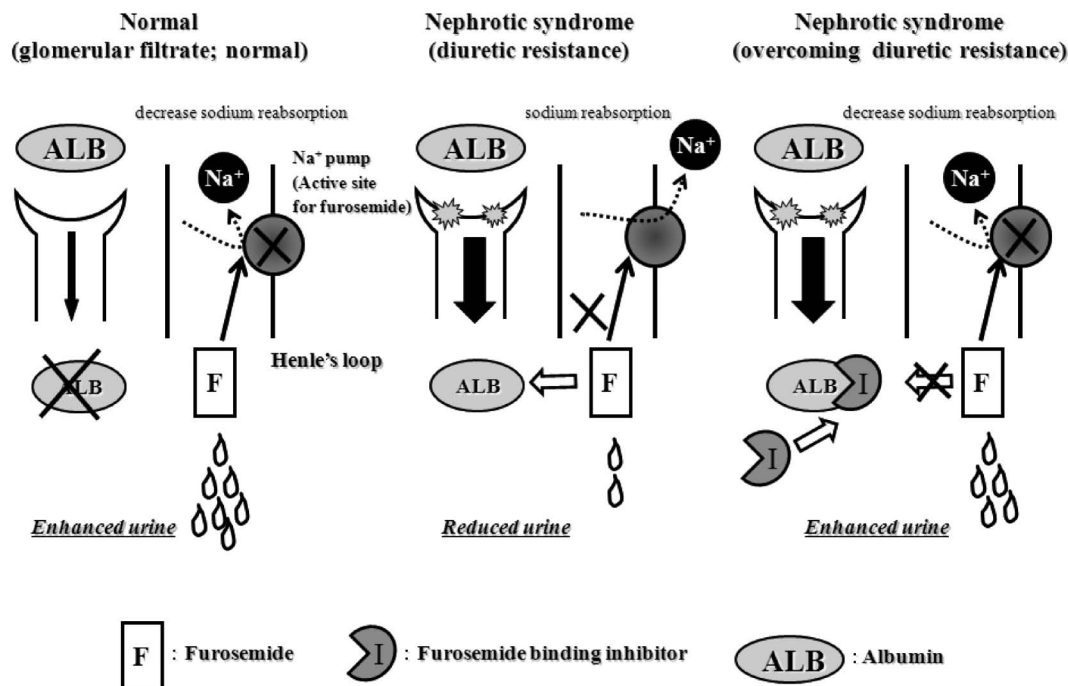


Fig. 7. A Mechanism for Overcoming the Diuretics Resistance to Furosemide Using Drug Displacement on Albumin

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みた。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関連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) Hochepped 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., McMahan 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’Athys 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., Bhattacharya 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., Kusuhara 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).