

厚生労働科学研究費補助金

—平成19年度 創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究—

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

(研究課題番号:H18—創薬—一般—025)

総括・分担研究報告書

主任研究者 末松 誠

慶應義塾大学医学部 教授

平成20(2008)年3月

## 総括・分担研究報告書： 目次

### I 総括研究報告

末松 誠	慶應義塾大学医学部	教授	7
Ryon Bateman	慶應義塾大学医学部	講師	

### II 分担研究報告

中城 圭介	(株)ニプロ医薬品研究所	主任研究員	15
片山 富博	愛媛大学医学部	助教	19

### III 研究成果の刊行に関する一覧表

23

### IV 研究成果の刊行物・別刷

27

# I 総括研究報告

## PEG-hrAlb の NO による微小循環改善効果

### － メタボローム解析からの検討 －

代表研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部 医化学教室 教授  
分担研究者 Ryon Bateman 慶應義塾大学医学部 医化学教室 講師

**研究要旨：**本研究は「PEG-hrAlb を救急救命で使用可能な酸素供給補助製剤」として確立することを目的とし、脳・肝臓等の臓器微小循環機能評価を独自に開発した単一微小血管酸素分圧計測技術・組織 NO 生成バイオイメーキング計測技術及び体内残存赤血球のメタボローム解析などの最先端技術を駆使してその性能評価を行う。本研究の特色はわが国固有の技術である量産可能なヒト組換え型アルブミンを PEG で修飾した複合体を安全且つ確実に血液粘度を上げることのできる製剤として計画当初から創製し、その結果として前臨床試験の段階からヒトに応用可能な製造条件を設定して性能を評価できる点である。初年度の実験では本製剤が生体内で内因性の NO を増加させ末梢組織への酸素供給を増強する一方で微小血管における血小板依存性の止血機構を増強することの検証を行った。今年度は本製剤を投与した際の組織への酸素運搬および臓器機能の維持の側面を検討すべく、心臓および肝臓における網羅的代謝測定を実施したのでここに報告する。

#### A. 研究目的

酸素輸液と通常の血管拡張剤の併用は低酸素領域以外の抵抗を増加させいわゆる Steal phenomenon を惹起するため、ショック時の臓器低灌流の改善法として適切とは言えない。本研究は「PEG-hrAlb を救急救命で使用可能な酸素供給補助製剤」として確立することを目的とし、脳・肝臓等の臓器微小循環機能評価を申請者が独自に開発した単一微小血管酸素分圧計測技術・組織 NO 生成バイオイメーキング計測技術、代謝物を網羅的に一斉解析可能なメタボローム解析法、及び体内残存赤血球のメタボローム解析などの最先端技術を駆使して前臨床性能評価を行う。

本年度は心臓および肝臓におけるメタボロ

ーム解析結果を中心に報告する。

#### B. 研究方法

##### B-1 実験に用いた動物と処置法

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

##### B-2 PEG-rHSA

遺伝子組み換え型人血清アルブミン製剤 Polyethyleneglycol-recombinant human serum albumin (PEG-hrAlb) は、r-HAS 構造の 59 個ある lysine 部にランダムにポリエチレングリコール(PEG)を結合させた構造を持つ。(図 1.4-1)

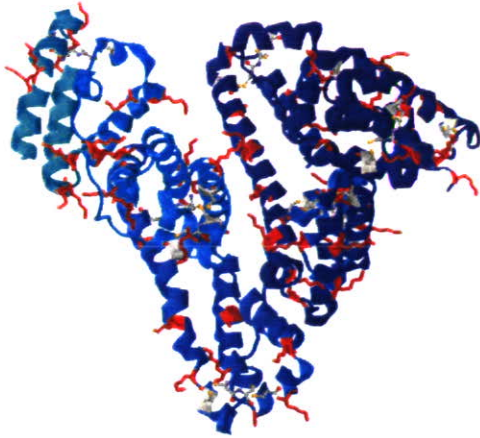


図 1 PEG-hrAlb の構造

ヒト血清アルブミン (HSA) は血漿タンパク質の 60% を占め、血液の膠質浸透圧の維持、種々の薬物や代謝物を非特異的に結合、体内の目的個所に運搬する輸送タンパク質としての役割を果たしている。1) アルブミン製剤は、血液を原材料として作られるが、現在日本では献血が不足しており、アルブミン製剤の原材料となる血液の多くは輸入に頼っている。また、未知のウイルス感染の危険もある。そこで遺伝子組み換え技術を利用することで、これらの問題を解決することができる。

### B-3 動物実験プロトコール

実験対象は BL6J 雄性マウス (8 週齢) 18 匹とした。pentobarbital sodium (10ml/kg) の腹腔内投与により麻酔した後気管挿管し、脱血、輸液の投与、肝臓・心臓の摘出を行った。マウスは ①Sham Ope, ②Shock, ③Autologous, ④Saline, ⑤PEG-rHSA, ⑥L-NAME + PEG-hrAlb の 6 群にランダムに分けて実験を行った。①Sham Ope 群では気管挿管後、速やかに心臓、肝臓を摘出した。②Shock 群では気管挿管後、右大腿静脈より脱血し、1 時間後に各臓器を摘出した。③Autologous, ④Saline, ⑤PEG-hrAlb 群では同

様に気管挿管後に脱血し、1 時間後各輸液を左大腿静脈より投与し、さらに 30 分後に各臓器を摘出した。⑥L-NAME + PEG-hrAlb 群は、麻酔投与の 30 分前に L-NAME を投与し、その後麻酔、気管挿管、脱血を行い、1 時間後に PEG-hrAlb の投与、その 30 分後に各臓器を摘出した。

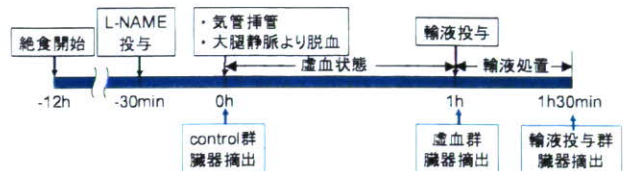


図 2 実験プロトコール概略

### B-4 サンプル処理法

摘出した臓器にメタノール (1ml / 300mg liver, 1ml / 100mg heart) を加え、冷却しながら homogenize した。さらに蒸留水 (500 $\mu$ l / 300mg liver, 500 $\mu$ l / 100mg heart) を加え、300 $\mu$ l を Eppen に移した。クロロホルム 300 $\mu$ l を加え、15 分間 Voltex した後、遠心加速度 15,000g, 4 $^{\circ}$ C の条件で 15 分間遠心分離した。水層 200 $\mu$ l を 5kDa cut-off フィルタに移し、遠心加速度 10,000g, 4 $^{\circ}$ C の条件で 60 分間遠心分離した。得られた下層を Eppen に分抽し、サンプルとした。

## C. 研究結果および考察

### C-1 メタボローム解析結果

本実験では PEG-hrAlb の輸液製剤としての有用性を臓器レベルで評価するため、肝臓と心臓についてメタボローム解析による検討を行った。代謝物を一斉に解析することで、出血性ショックからの回復過程におけるエネルギー

代謝レベルを推定することが可能である。

まず、ミトコンドリア密度が高く酸素消費が高い心臓についてその代謝物を見てみると、ATP 産生量を各群で比較した場合、shock においても各輸液投与グループにおいても大きな差は認められず、これより作製した出血性ショックモデルが moderate なモデルであることが推察された。それを裏付けるように、ショック状態では ATP の産生は解糖系に依存し、Lactate の蓄積が多いと予想されたものの、各群で大きな変動は認められなかった。虚血による酸素供給が不足することにより、ミトコンドリアによる好氣的な酸化的リン酸化は阻害され、NADH がミトコンドリア内に蓄積されることが知られているが、心臓のショックによる NADH 値の上昇は PEG-hrAlb でコントロールと同等のレベルまで回復しており、FAD に関しても同様の変化を呈している。また注目すべき点として、L-NAME を併用投与したグループでは、NADH、FAD は PEG-hrAlb を投与したグループに比べて高値を示していることが挙げられる。これは心臓のエネルギー代謝にズリ応力に依存した NO が関与していることを示す証拠であると考えられた。

一方、肝臓は生体内で代謝の中心的役割を果たす臓器であるが、血流は門脈に依存しているために酸素供給に関しては虚血に対して脆弱である。PEG-hrAlb 投与では ATP 産生量は他の輸液群と同レベルに維持され、生理食塩水群に比べて高値を示した。心臓で見られたような NO 依存性の回復は認められなかったが、これは他の臓器に比べて肝臓には NOS の分布が希薄であることに起因していると考えられた。

今回のメタボローム解析では各群 n=3 のサンプル数であり、各測定項目においても誤差が見受けられた。これはマウスの麻酔管理から外科的臓器摘出術、サンプル処理、CE-MS の測定感度や誤差、解析時に生じる誤差等、エラー

を生じるリスクが多岐に渡る。これらは今後の検討課題として残されるが、臓器の代謝物を一斉解析可能な本手法は、今後の生化学的検討には有効な手段であると考えられる。

## C-2 人工酸素運搬体としての可能性

PEG-hrAlb の人工酸素運搬体としての機能は、救急医療の場で利用できると考えられる。現在、救急医療において、出血性ショックの治療として、血液型が判明するまでの緊急処置に輸液の投与が行われている。しかし第1章で述べたように、輸液の投与は血管を収縮させ、末梢血管周辺組織への酸素運搬能の低下を引き起こす。この状態が長時間続くと、酸素不足により臓器の細胞の機能が保てなくなり、その後治療が行われても多臓器不全により死に至る場合が少なくない。そこで、PEG-hrAlb を輸液として投与することで、臓器の酸素不足を防ぎ、治療後の生存率を上げることができると考えられる。また、酸素不足を改善するための手段としては、それ自体が酸素運搬能を持つヘモグロビン (Hb) 製剤の開発が進められている。しかし、必要以上の Hb の投与は臓器の機能低下など治療後に悪影響となる。そのため、補助製剤として PEG-hrAlb の投与を併用して行うことで、必要最低量の Hb 製剤投与により酸素供給が可能になると考えられる。

## D. 総括

昨年度の成果として、脳微小循環の NO イメージングおよび肝臓・心臓における cGMP 値の測定から出血性ショックモデルにおいて PEG-hrAlb は血液粘度を維持することで血管の NO 生成量を増加させ、血管を拡張させるために有効であることを証明し、また、PEG-hrAlb の投与は肝臓および心臓の NO 生成量を増加させるために有効であることを示した。この結果から、PEG-hrAlb は微小血管において、血管

を拡張することで酸素運搬能を維持するための人工酸素運搬体として利用可能であることが示された。今年度は組織のエネルギー代謝の側面から検討すべく心臓および肝臓のメタボローム解析を試みた結果、ショックからのエネルギー回復に関しては対照群同等に維持され、酸化還元バランスも良好であることが示された。

## E. 健康危険情報

特になし。

## F. 発表論文

- 1) Kinoshita, A., Tsukada, K., Soga, T., Hishiki, T., Ueno, Y., Nakayama, Y., Tomita, M., Suematsu, M. Roles of hemoglobin allostery in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes: simulation and its verification by metabolome analysis. *J. Biol. Chem.* 282(14), 10731-10741, 2007.
- 2) Higuchi, A., Ueno, R., Shimmura, S., Suematsu, M., Dogru, M., Tsubota, K. Albumin rescues ocular epithelial cells from cell death in dry eye. *Curr. Eye Res.* 32(2), 83-88, 2007.
- 3) Egawa, T., Tsuneshige, A., Suematsu, M., Yonetani, T. Method for determination of association and dissociation rate constants of reversible biomolecular reactions by isothermal titration calorimeters. *Anal. Biochem.* 79(7), 2972-2978, 2007.
- 4) Hangai-Hoger, N., Tsai, A.G., Carbales, P., Suematsu, M., Intaglietta, M. Microvascular and systemic effects following top load administration of saturated carbon monoxide-saline solution. *Crit. Care Med.* 35(4), 1123-1132, 2007.
- 5) Baran, R., Robert, M., Suematsu, M., Soga, T., Tomita, M. Visualization of three-way comparisons of omics data. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 72, 2007
- 6) Li, D., Mukai, K., Suzuki, T., Suzuki, R., Yamashita, S., Mitani, F., Suematsu, M. Adrenocortical zonation factor 1 is a novel matricellular protein promoting integrin-mediated adhesion of adrenocortical and vascular smooth muscle cells. *FEBS J.* 274(10), 2506-2522, 2007.
- 7) Adachi, T., Yamamoto, M., Suematsu, M. Targeting NAD(P)H oxidase: Ets-1 regulates p47phox expression. *Circ. Res.* In press 2007 (Editorial)
- 8) Yukutake Y, Tsuji S, Hirano Y, Adachi T, Takahashi T, Fujihara K, Agre P, Yasui M, Suematsu M. Mercury chloride decreases the water permeability of aquaporin-4- reconstituted proteoliposomes. *Biol. Cell*, in press 2008

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## H. 謝辞

本実験は慶應義塾大学工学部研究生の岩間瑛莉子さんに多大なるご協力を頂きました。

Heart

解糖系	Sham Ope		Shock		Autologous		Saline		PEG-rHSA		L-NAME	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Glucose 1-phosphate	1.0	0.2 *	1.0	0.3	0.8	0.2 *	0.8	0.1	0.9	0.3	1.0	0.2
Glucose 6-phosphate	5.1	1.0	5.2	0.8	2.9	0.4	3.0	0.3	4.3	1.8	5.1	1.7
Fructose 6-phosphate	1.0	0.2 *	0.8	0.0 *	0.6	0.1 *	0.8	0.1	1.1	0.6	0.9	0.2
Dihydroxyacetonephosphate	0.3	n=2 *	0.3	n=2 *	0.3	0.2 *	ND	ND	0.3	n=2	0.1	n=2
Fructose 1,6-diphosphate	4.4	2.2	2.9	0.8	1.0	0.5 *	0.9	0.2	2.0	0.9	1.3	0.6
2,3-Diphosphoglycerate	21.4	9.1	8.2	1.1	1.9	1.1	1.0	0.3	0.7	0.2 *	0.6	0.1 *
3-Phosphoglycerate	12.7	2.2	9.0	1.1	2.9	1.3	2.8	1.2	2.7	0.4	3.1	1.5
Phosphoenolpyruvate	0.8	0.1 *	0.7	0.0 *	0.2	n=2	0.3	n=2 *	0.6	0.3 *	0.3	0.1 *
Pyruvate	3.0	1.1 *	4.1	1.5 *	5.9	2.3 *	3.9	0.7 *	4.8	1.7 *	5.6	1.4 *
Lactate	78.1	3.5	83.5	21.8	94.5	9.3	111.5	30.8	112.6	22.7	112.3	16.3

TCA回路	average		average		average		average		average		average	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Acetyl CoA	50.7	2.1	53.3	8.5	46.2	8.2	49.2	2.7	51.0	6.6	60.3	5.2
Citrate	64.4	7.0 *	68.1	12.4 *	94.7	20.8 *	68.3	8.0	75.5	4.8 *	74.9	10.6
cis-Aconitate	0.8	0.2 *	0.8	0.0	0.6	0.1	0.6	0.2 *	0.7	0.0 *	0.8	0.1 *
Isocitrate	1.3	0.4 *	2.0	0.4 *	1.6	0.2 *	1.8	0.4 *	1.4	0.2 *	2.0	0.6 *
2-Oxoglutarate	2.4	0.5 *	2.6	0.3 *	1.9	0.4 *	1.4	0.4 *	2.4	0.1 *	2.7	0.9 *
Succinyl CoA	0.1	n=1	0.1	0.0 *	0.1	n=1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Succinate	12.6	2.6	15.0	1.5	6.0	1.8	9.0	3.1	12.0	4.5	8.7	6.3
Fumarate	2.6	0.8 *	4.0	1.6	1.8	0.9	1.9	0.9	3.3	2.3	2.4	0.5 *
Malate	14.3	5.0	24.8	11.3	1.1	0.4 *	2.7	0.5	7.7	7.7	4.5	2.0 *

ペントースリン酸経路	average		average		average		average		average		average	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Glucose 6-phosphate	5.1	1.0	5.2	0.8	2.9	0.4	3.0	0.3	4.3	1.8	5.1	1.7
Gluconate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.9	n=1	ND	ND
6-Phosphogluconate	0.3	0.2 *	0.6	n=2 *	0.2	0.1 *	0.2	0.1 *	0.4	0.2 *	0.2	0.1 *
Ribulose 5-phosphate	0.8	0.3 *	0.4	0.1 *	0.5	0.1 *	0.5	0.2 *	0.5	0.2 *	0.5	0.1 *
Ribose 5-phosphate	0.4	0.1 *	0.2	0.1 *	0.3	0.1 *	0.3	0.2 *	0.3	0.1 *	0.2	0.2 *
Erythrose 4-phosphate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.9	n=1	ND	ND

グリセロールリン酸シャトル	average		average		average		average		average		average	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Glycerophosphate	22.1	4.5	28.7	3.0	14.4	4.5	17.7	1.5	19.6	4.8	20.8	4.2

脂肪酸酸化	average		average		average		average		average		average	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
CoA	0.9	0.1	1.6	1.2	0.8	0.3	0.7	0.1	0.9	0.0	0.7	0.5
Acetyl CoA	50.7	2.1	53.3	8.5	46.2	8.2	49.2	2.7	51.0	6.6	60.3	5.2
HMG CoA	0.0	n=1 *	ND	ND	ND	ND	0.1	n=1 *	ND	ND	ND	ND

メチレシオン回路	average		average		average		average		average		average	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Met	3.6	0.6	4.4	0.4	4.5	0.7	4.5	0.8	5.6	1.7	5.4	0.9
S-Adenosyl-L-methionine	1.7	0.2 *	1.7	0.4 *	1.5	0.1 *	1.8	0.4	2.1	0.4	2.3	0.2
S-Adenosyl-L-homocysteine	0.3	0.1 *	0.2	0.1 *	0.1	0.1 *	0.3	0.2 *	0.3	0.1 *	0.2	0.1 *
Adenosine	2.3	0.6	3.2	1.6	2.8	1.2	3.2	0.8	3.6	0.8	3.0	0.5
Homocysteine	0.9	n=2 *	3.6	n=2	ND	ND	0.8	0.2 *	0.9	n=2 *	1.1	n=2 *
Cystathionine	0.8	0.4 *	0.8	0.8 *	0.8	n=1 *	1.5	n=1	1.7	n=2	1.0	n=2
Cys	ND	ND	1.4	0.7 *	1.0	n=1 *	1.2	n=1	0.9	n=2	1.3	n=2 *
Hypotaurine	23.8	1.6	30.3	1.7	25.9	4.7	26.8	5.8 *	31.5	6.5 *	35.7	9.8 *
Taurine	2165.0	243.6	2534.7	192.0	2148.3	82.5	2142.7	228.6	2247.2	194.4	2464.9	179.5
Glutathione, reduced form	14.1	2.1	17.2	4.6	10.8	1.3	11.0	1.1	13.9	2.3	10.4	2.3
Glutathione, oxidized form	25.9	3.8	29.0	7.5	26.3	1.2	25.4	3.2	24.1	1.5	27.2	4.1

アミノ酸	average		average		average		average		average		average	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Gly	41.9	5.3	42.7	5.5	51.4	3.2	60.1	12.1	59.1	16.9	50.9	1.0
Ala	63.4	11.6	86.4	43.6	83.6	3.7	113.7	49.0	82.3	24.9	96.4	18.6
Ser	20.5	3.4	26.0	5.7	28.3	1.9	43.8	18.8	48.8	17.1	28.5	2.0
Pro	7.2	1.4	8.0	2.9	8.4	0.7	11.4	3.7	9.3	2.2	9.4	0.1
Val	13.0	1.7	15.6	4.2	16.6	1.3	17.6	1.8	17.9	4.9	18.8	2.0
Thr	27.0	4.7	34.0	7.7	27.9	0.7	36.6	5.9	37.9	5.2	38.0	1.3
Cys	ND	ND	1.4	0.7 *	1.0	n=1 *	1.2	n=1	0.9	n=2	1.3	n=2 *
Ile	6.9	1.3	8.6	3.0	7.4	1.1	9.7	0.7	9.7	2.9	8.3	1.4
Leu	12.1	3.1	15.3	5.7	14.4	3.6	17.1	1.5	14.8	3.9	16.3	1.1
Asn	15.1	1.9	16.9	4.0	17.1	2.0	17.0	3.6	17.4	5.6	18.6	1.6
Asp	79.0	40.4	60.5	17.4	34.9	10.9	45.5	5.9	66.1	30.3	39.6	18.1
Lys	34.8	9.5	48.4	6.8	42.0	1.7	44.7	3.8	47.4	14.9	56.7	12.3
Gln	423.1	66.8	690.4	88.2	469.4	33.3	509.5	102.6	552.5	67.8	669.1	90.7
Glu	307.3	32.6	288.6	50.8	230.1	18.7	259.5	8.9	246.5	45.4	236.4	26.7
His	11.6	2.0	15.7	2.3	13.3	1.8	20.4	4.1	21.4	4.1	19.2	1.7
Phe	5.6	0.2	7.6	0.9	6.5	0.7	7.4	2.0	8.2	1.8	7.2	0.9
Arg	15.7	2.3	22.0	5.1	18.0	0.8	17.3	2.5	21.6	4.5	26.3	5.3
Tyr	2.6	1.7 *	4.3	1.3 *	3.2	1.9 *	2.5	1.7 *	5.8	3.5 *	3.2	0.7
Trp	2.2	1.1 *	1.6	0.8 *	1.7	1.0 *	1.8	1.0 *	1.4	0.6 *	1.6	0.7 *

核酸類	average		average		average		average		average		average	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Hypoxanthine	0.1	n=1	ND	ND	ND	ND	0.3	0.1 *	0.2	0.1 *	0.1	0.1 *
Cytidine	0.5	0.2 *	0.8	0.2 *	0.4	n=2	0.8	n=2 *	1.8	n=2	1.2	0.7 *
Inosine	0.4	0.2 *	0.4	0.1 *	0.7	0.3 *	0.3	0.2 *	0.4	0.2 *	0.4	0.2 *
Guanosine	0.3	0.0 *	0.4	0.2 *	0.2	n=2 *	1.0	n=1	0.3	0.1 *	0.2	0.1 *
ATP	279.1	8.2	325.5	41.5	267.1	56.2	262.6	24.9	301.2	49.3	313.5	25.7
CTP	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0 *	0.3	0.0	0.3	0.1
GTP	9.1	0.6	10.0	1.6	9.0	1.4	8.5	0.3	9.3	1.3	10.0	0.9
TTP	0.3	n=2 *	0.2	n=2 *	0.2	0.1 *	0.2	0.0 *	0.1	n=2	0.2	n=2 *
ADP	56.6	8.7	68.7	16.0	60.6	6.1	56.1	5.0	62.8	14.7	65.1	10.8
CDP	0.9	0.2 *	1.1	0.2 *	1.0	0.1 *	1.1	0.1	1.2	0.1 *	1.2	0.1
GDP	3.4	0.6	3.9	0.8	3.5	0.3	3.3	0.6	3.6	0.8	3.6	0.5
TDP	0.1	0.0 *	0.1	0.0 *	0.1	0.0 *	0.2	n=2 *	0.2	0.1 *	0.2	n=1 *
AMP	35.6	17.9	31.4	n=2	46.3	19.5	43.8	16.5	36.7	2.2	38.0	16.4
CMP	0.5	0.0 *	0.4	0.0 *	0.5	0.2 *	0.6	0.2 *	0.5	0.1 *	0.5	0.0 *
GMP	0.9	0.3 *	0.8	0.3 *	1.0	0.2 *	0.9	0.4	0.9	0.1 *	1.0	0.3
TMP	0.1	n=2	0.1	n=2 *	ND	ND	ND	ND	0.1	n=1	0.1	n=1
cAMP	0.1	n=1	25.4	n=1	0.1	n=1 *	ND	ND	0.1	n=1	0.1	n=1 *
cCMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.1	n=1
cGMP	0.2	n=1	0.3	n=1 *	0.1	n=1	0.3	n=2 *	0.2	0.1 *	0.1	0.1 *
ctMP	0.1	n=1	ND	ND	ND	ND	0.2	n=1	ND	ND	ND	ND
NAD	1.8	0.3	1.9	0.3	0.8	0.1 *	2.6	1.6	3.2	2.2	1.9	1.0
NADH	3.1	0.1	3.5	0.8	3.3	0.4	2.9	0.1	3.2	0.5	3.5	0.2
NADP	0.7	0.5 *	0.7	0.5 *	0.5	n=2 *	1.3	n=2 *	1.2	0.4 *	0.6	0.2 *
NADPH	3.2	0.6	4.3	0.6	3.4	0.3	2.6	0.3	3.2	1.4	2.9	0.1
FAD	3.8	0.1	4.3	1.2	3.9	0.5	3.7	0.2	3.8	0.6	4.2	0.2

\* : S/N < 3  
 ND : Not detected



Liver

	Sham Ope		Shock		Autologous		Saline		PEG-rHSA		L-NAME	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Glucose 1-phosphate	6.8	2.1	7.2	0.6	5.4	0.6	5.6	1.9	9.6	3.6	3.6	0.6
Glucose 6-phosphate	10.5	2.0	13.3	3.0	11.5	1.2	16.0	7.9	25.9	9.3	9.2	3.8
Fructose 6-phosphate	3.9	1.0	4.1	1.7	2.8	0.2	3.1	1.0	5.9	n=2	1.1	0.1
Dihydroxyacetonephosphate	n=0	n=0	1.3	n=2*	1.4	n=1*	0.8	n=2	3.4	n=2*	0.2	n=2*
Fructose 1,6-diphosphate	4.1	0.3*	4.1	2.6	3.5	1.2	2.8	0.7	4.4	2.3	1.9	0.7
2,3-Diphosphoglycerate	82.7	4.5	37.9	4.4	76.6	3.9	39.6	7.3	15.2	3.3	17.9	4.4
3-Phosphoglycerate	13.5	0.3	14.4	2.9	13.0	2.5	12.8	3.1	8.2	4.6	6.1	1.9
Phosphoenolpyruvate	7.5	1.6	9.4	1.2	8.5	0.7	8.1	0.4	8.0	4.4	6.1	1.4
Pyruvate	8.5	1.1*	5.5	0.8*	5.1	0.8*	4.1	1.5*	14.9	6.6*	9.2	4.1*
Lactate	180.1	26.5	169.8	46.7	147.8	8.9	142.0	8.7	137.9	28.0	151.6	51.6

TCA回路	average		stdev		average		stdev		average		stdev	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Acetyl CoA	0.3	0.1*	0.3	0.2*	0.3	0.1*	0.2	0.1*	0.2	0.0*	0.2	0.1*
Citrate	41.9	12.2*	102.4	95.8*	40.2	3.1*	142.8	96.0*	112.4	64.7*	139.8	4.1*
cis-Aconitate	1.1	0.7*	1.3	0.6*	0.8	0.2*	2.1	0.9	4.5	3.8	1.3	0.2
Isocitrate	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0
2-Oxoglutarate	4.7	1.8*	5.3	0.9*	4.8	1.6*	9.8	3.7*	16.8	9.2	20.1	5.3
Succinyl CoA	n=0	n=0	n=0	n=0	0.1	n=1*	n=0	n=0	0.1	n=1*	n=0	n=0
Succinate	11.1	2.7	26.2	19.0*	7.5	4.4*	27.3	22.2	16.5	4.6	14.2	3.3
Fumarate	17.2	0.5	27.8	7.3	22.7	2.1	28.6	3.9	23.6	7.6	24.7	9.6
Malate	78.2	3.4	138.2	72.1	111.7	8.4	178.0	79.1	106.8	38.1	194.9	176.0

ペントースリン酸経路	average		stdev		average		stdev		average		stdev	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Glucose 6-phosphate	10.5	2.0	13.3	3.0	11.5	1.2	16.0	7.9	25.9	9.3	9.2	3.8
Gluconate	60.0	14.6	64.1	28.7	57.3	23.1	63.7	53.7	59.1	57.6	28.3	8.2
6-Phosphogluconate	3.9	0.4	4.5	0.8	4.2	0.6	4.7	0.7	5.0	2.7	2.5	0.6
Ribulose 5-phosphate	3.1	1.1	4.5	1.0	4.3	1.1	3.8	0.5	5.0	2.8	2.5	1.2
Ribose 5-phosphate	1.9	0.7*	1.7	0.5*	1.5	0.5*	1.4	0.3*	4.6	3.3	1.0	0.2*
Erythrose 4-phosphate	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	2.9	n=1	n=0	n=0

グリセロール・リン酸シャトル	average		stdev		average		stdev		average		stdev	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Glycerophosphate	128.6	16.7	139.1	55.6	99.1	8.5	94.1	12.8	100.2	49.3	124.9	74.5

脂肪酸酸化	average		stdev		average		stdev		average		stdev	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
CoA	9.2	1.9	8.8	2.2	5.7	1.8	7.0	0.7	7.2	2.7	7.7	0.8
Acetyl CoA	0.3	0.1*	0.3	0.2*	0.3	0.1*	0.2	0.1*	0.2	0.0*	0.2	0.1*
HMG CoA	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0

メチレーション回路	average		stdev		average		stdev		average		stdev	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Met	5.6	1.2	10.8	3.5	9.3	2.8	8.4	2.2	8.2	0.0	8.6	2.1
S-Adenosyl-L-methionine	4.2	0.5	6.2	1.2	7.2	0.6	6.0	1.1	5.1	0.1	6.1	0.8
S-Adenosyl-L-homocysteine	6.0	1.1	6.6	0.9	5.7	1.3	5.1	0.9	6.2	2.4	6.0	0.1
Adenosine	69.3	13.9	70.3	8.1	57.7	10.7	61.8	10.4	51.3	15.3	48.5	4.3
Homocysteine	1.2	n=1	0.8	n=1*	0.9	n=2	1.1	0.4*	2.9	n=1*	1.8	n=2*
Cystathionine	2.9	1.5*	1.0	0.7*	1.5	0.8*	1.3	0.7*	1.4	0.7*	1.5	n=2*
Cys	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	2.1	n=1*	n=0	n=0
Hypotaurine	49.9	22.2*	52.9	12.0*	32.9	4.5*	25.7	16.4*	27.8	6.0*	42.3	12.0
Taurine	2706.9	187.9	3508.8	550.1	3989.4	176.2	3412.3	454.1	2657.3	620.9	2941.6	441.2
Glutathione, reduced form	493.1	69.5	394.4	114.9	243.5	64.9	251.9	27.6	309.1	147.2	355.1	69.6
Glutathione, oxidized form	320.8	55.7	307.8	18.0	296.9	19.3	296.4	50.1	298.9	52.4	327.8	17.3

アミノ酸	average		stdev		average		stdev		average		stdev	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Gly	637.5	113.8	519.9	154.5	440.4	40.7	371.3	89.9	440.5	43.5	391.5	43.9
Ala	37.9	1.3	38.4	6.1	46.8	14.5	26.6	5.2	28.1	3.1	28.9	2.4
Ser	75.2	12.5	73.3	13.2	84.6	33.5	58.6	9.6	69.8	10.8	78.5	4.8
Pro	16.2	0.9	17.1	1.0	20.4	4.3	12.4	1.9	12.6	1.6	13.5	1.8
Val	57.7	5.4	42.2	9.9	76.3	24.4	34.6	1.2	35.7	5.5	42.8	11.2
Thr	48.2	5.2	40.3	9.8	70.7	16.9	39.2	5.5	40.1	5.1	46.9	6.0
Cys	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	n=0	2.1	n=1*	n=0	n=0
Ile	25.2	1.2	20.2	3.2	29.3	7.2	15.6	1.3	20.2	5.9	19.8	3.7
Leu	43.9	4.7	37.1	7.3	60.3	16.0	37.9	6.8	36.4	8.2	41.2	5.5
Asn	8.9	0.9*	9.9	1.5*	9.8	3.1*	8.3	1.6*	5.7	2.7*	7.1	2.0*
Asp	69.7	2.9	84.5	22.0	66.1	16.7	61.2	5.7	48.9	3.8	57.2	24.2
Lys	87.3	13.5	76.9	17.1	137.4	15.4	88.5	9.5	73.3	51.1	55.4	9.0
Gln	1031.8	41.1	631.7	128.3	902.2	118.1	764.6	277.4	912.9	204.1	900.7	115.5
Glu	411.0	65.0	455.2	94.3	420.2	85.9	367.9	78.2	305.1	92.9	351.0	68.3
His	89.8	6.3	99.9	6.8	97.7	12.1	82.1	21.3	81.9	21.4	94.6	20.9
Phe	16.7	3.9	16.8	2.0	21.9	3.3	15.3	1.8	15.1	3.4	19.6	2.1
Arg	4.7	1.7*	3.2	1.5	2.6	1.2*	1.6	0.3*	2.0	0.4*	2.7	0.5*
Tyr	7.3	2.0*	8.3	2.3*	7.3	3.0*	3.7	1.4*	3.7	2.3*	5.6	1.8*
Trp	4.6	1.6*	4.1	1.0*	5.0	0.4*	3.1	0.3*	3.4	0.4*	4.6	1.9*

核酸類	average		stdev		average		stdev		average		stdev	
	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev	average	stdev
Hypoxanthine	0.6	n=2*	0.2	0.1*	0.5	0.4*	0.2	n=2*	0.3	n=2*	0.2	n=2*
Cytidine	3.9	1.5*	3.2	1.7*	3.9	2.2*	2.4	1.9*	2.7	0.9*	1.7	0.4*
Inosine	6.1	1.3*	7.7	1.7	7.2	1.8	9.6	6.4*	5.0	2.4	3.6	2.3
Guanosine	14.3	5.4	11.8	0.2	10.1	2.5	11.1	3.4	7.4	2.0	7.2	0.1
ATP	377.8	27.8	405.7	69.3	382.2	17.4	319.0	40.0	408.7	16.7	406.0	10.2
CTP	0.7	0.1	0.9	0.1	0.9	0.1	0.7	0.1	0.9	0.1	1.0	0.1
GTP	41.0	6.4	46.5	7.9	47.0	5.4	39.7	1.8	51.8	3.9	52.3	6.4
TTP	0.4	0.3*	0.3	0.1*	0.3	0.1*	0.4	0.1*	0.5	0.2*	0.4	0.1*
ADP	225.1	15.4	211.6	22.9	205.3	16.3	187.5	37.9	207.7	4.3	212.9	16.4
CDP	5.2	0.1*	5.4	1.2*	5.2	0.4*	4.5	0.4*	4.9	0.8*	5.2	0.9*
GDP	34.1	0.7	34.3	4.3	34.2	0.9	30.5	3.1	35.8	3.8	36.2	4.6
TDP	0.4	0.2*	0.5	0.1*	0.6	0.1*	0.6	0.2*	0.5	0.1*	0.6	0.1*
AMP	139.7	30.4	111.4	8.6	111.9	19.1	127.0	35.6	98.1	7.6	92.8	12.7
CMP	6.4	1.9*	5.6	1.5*	5.1	1.1*	5.3	1.2*	4.2	0.7*	4.1	0.7*
GMP	31.1	10.0	24.9	4.3	25.8	7.4	27.3	8.6	20.3	3.0	18.5	2.6
TMP	0.4	0.2*	n=0	n=0	0.2	n=2	0.5	n=2	0.3	0.0*	0.3	n=2*
cAMP	n=0	n=0	0.2	n=1	n=0	n=0	0.1	n=1	0.2	n=1	n=0	n=0
cCMP	0.2	n=2*	0.2	0.1*	0.2	n=2*	0.2	n=2	0.2	0.0*	0.2	0.0*
cGMP	0.2	n=1	0.2	n=2*	n=0	n=0	0.1	n=1	n=0	n=0	n=0	n=0
cTMP	0.2	0.0*	0.2	n=2*	0.2	0.0*	0.3	n=2	0.2	n=2*	0.1	n=1
NAD	97.9	21.4	104.1	16.0	87.8	19.6	86.5	15.7	91.4	14.1	93.8	6.2
NADH	4.9	0.9	5.0	2.4	6.6	1.8	3.9	1.0	5.4	2.6	3.9	0.3
NADP	12.6	11.0	12.4	4.0	10.4	7.8	11.9	6.5	10.0			

## II 分担研究報告

## PEG-rHSA の安定性評価

分担研究者 中城圭介 ニプロ株式会社 医薬品研究所 製剤研究部 主任研究員

**研究要旨：** ショック時に投与される赤血球輸液及びヘモグロビン由来酸素輸液は、一般に血液粘度が十分に増加せず、重症のショック状態では循環不全を惹起する懸念がある。本研究は血液粘度を高めることが示唆されている PEG-rHSA を救急救命で使用可能な酸素供給補助製剤として確立することを目的とする。医薬品として PEG-rHSA を開発するには、その薬理効果と併せて製剤の安定性評価を行い、製剤処方 の確立、更にその結果に基づいて保存条件や有効期間を設定することが必要である。本分担研究では、PEG-rHSA の安定性評価として、PEG-rHSA の長期保存試験、加速試験、温度及び光苛酷試験を実施した。試験項目として、HSA の構造について情報を与える蛍光スペクトル、CD スペクトルを選択し、今回、その開始時のデータを採取した。PEG-rHSA の蛍光スペクトルは 342 nm に極大波長を認めた。CD スペクトルの結果から PEG-rHSA は  $\alpha$  ヘリックスに富んだ構造を有していた。熱安定性の検討から変性中点温度は 62.0°C で、変性過程は多状態転移の可能性が示唆された。今後、各条件下に保存した PEG-rHSA につき、蛍光スペクトル及び CD スペクトル、また新たに HPLC 法や SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法等を加え、多面的に品質の変化を解析していく予定である。

### A. 研究目的

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

PEG-rHSA を医薬品として開発するには、その薬理作用に加え、製剤の安定性も重要な検討項目である。すなわち、製造後、その流通から投与に至る過程で生じうる温度、湿度、光等の

様々な環境要因の影響の下での品質の経時変化について評価する必要がある。

本年度の研究は、PEG-rHSA 原薬の安定性に関する基本情報を得ることを目的に、長期保存試験、加速試験、温度及び光苛酷試験を実施した。今回は、その開始時における測定結果を得たので報告する。

### B. 研究方法

#### B-1 蛍光スペクトル

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

## B-2 CD スペクトル

Jasco J-720 型分光偏光計を用いた。遠紫外領域の CD スペクトルは、HSA 濃度を  $1.5 \mu\text{M}$  (リン酸塩緩衝液, pH 7.4) に調製し、1 mm セルを用いて行った。測定条件は以下の通りである。

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

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

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

## B-3 CD 測定による熱安定性評価

Jasco J-720 型分光偏光計を用いた。また、Jasco PTC-348 型温度自動調整器を用いて温度制御を行った。測定条件は以下の通りである。

測定波長 : 222 nm  
sensitivity : 200 mdeg  
band width : 1.0 nm  
time constant : 8 sec  
step resolution : 0.5 nm  
temperature slope :  $50^\circ\text{C/hr}$

## C. 研究結果および考察

### C-1 蛍光スペクトル

保存中の PEG-rHSA の質的变化を検出する分析手段として、HSA に唯一存在する  $^{214}\text{Trp}$  由来の蛍光スペクトル評価を行った。蛍光スペクトルは、 $^{214}\text{Trp}$  近傍のミクロ環境の構造変化を鋭敏に検出することができる方法である。その結果、図 1 に示されるように PEG-rHSA は 342 nm に極大波長が認められた。

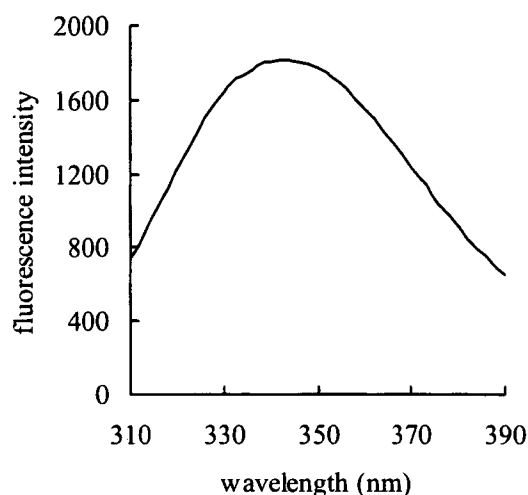


図 1 PEG-rHSA の蛍光スペクトル

### C-2 CD スペクトル

次に HSA 分子のマクロな構造変化について情報を得るために、遠紫外及び近紫外領域における CD スペクトルを測定した。図 2 (A) から PEG-rHSA は、210 nm に負の吸収極大及び 222 nm 付近に肩を示し、 $\alpha$  ヘリックスに富んだ構造を有していることが明らかとなった。また、3次構造を表す近紫外領域の CD スペクトルでは、257 及び 290 nm 付近に正の吸収極大、270 nm 付近に肩が認められた (図 2 (B))。

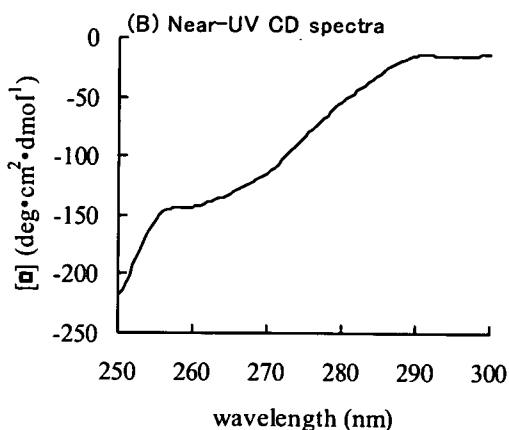
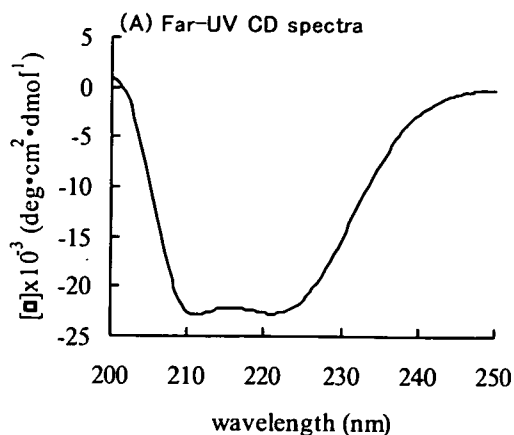


図2 PEG-rHSAのCDスペクトル

### C-3 CD測定による熱安定性の評価

熱安定性について、 $\alpha$ ヘリックスに由来する222 nmにおけるCDをモニターすることにより検討した。図3に示す熱変性曲線から、PEG-rHSAは44°C付近から変性が始まり、変性中点温度は62.0°C、転移エンタルピーは117.6 kJ/molと算出された。また、その変性過程は多状態転移の可能性が示唆された。

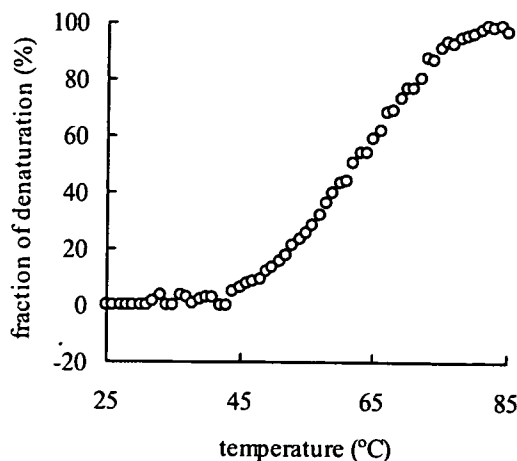


図3 PEG-rHSAの熱安定性

### D. 結論

PEG-rHSAの安定性について評価するために、長期保存試験、加速試験、温度及び光苛酷試験を開始した。各保存条件下における品質の変化について蛋白質の構造の観点から蛍光スペクトル及びCDスペクトルを選択した。

今回、その初期値について測定した結果、以下の成果を得た。

- 1)  $^{214}\text{Trp}$ 固有の蛍光スペクトルが極大波長342 nmにおいて観察された。CDスペクトルの結果から、PEG-rHSAは $\alpha$ ヘリックスに富んだ構造を有していた。
- 2) 熱安定性について評価したところ、変性中点温度は62.0°Cで、変性過程は多状態転移の可能性が示唆された。

今後、PEG-rHSAの類縁物質の評価方法としてHPLC法及びSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法等を新たに設定し、今回の測定方法と併せて各保存時点で評価し、同時に製剤処方についても検討を行っていく予定である。

### E. 健康危険情報

特になし。

## F. 研究発表

### F-1 論文発表

- 1) Katayama N., Nakajou K., Komori H., Uchida K., Yokoe JI., Yasui N., Yamamoto H., Kai T., Sato M., Nakagawa T., Takeya M., Maruyama T., Otagiri M.: Design and evaluation of S-nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) as a novel anticancer drug, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, in press.
- 2) Nagai R., Mera K., Nakajou K., Fujiwara Y., Iwao Y., Imai H., Murata T., Otagiri M.: The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1772**, 1192-1198, 2007

### F-2 学会発表

- 1) Katayama N., Nakajou K., Komori H., Kai T., Sato M., Otagiri M.: NO-HSA induces apoptosis against tumor cells, 29th symposium on biomembrane-drug interaction, 2007-11, (Sendai)
- 2) Ikuta S., Ishima Y., Nakajyo K., Iwao Y., Maruyama T., Otagiri M.: Improved blood circulation of thioredoxin by fusion to human serum albumin, 29th symposium on biomembrane-drug interaction, 2007-11, (Sendai)
- 3) 平田憲史郎, 中城圭介, 異島優, 丸山徹, 未永綾香, 小田切優樹: 糖鎖含有アルブミンの肝ターゲティング素材としての機能評価, 第24回日本薬学会九州支部大会, 2007-12, (福岡)
- 4) 生田祥太郎, 異島優, 中城圭介, 岩尾康範, 丸山徹, 小田切優樹: チオレドキシニン-アルブミン融合タンパク質の設計と機能評価, 第24回日本薬学会九州支部大会, 2007-12, (福岡)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 小田切優樹, 中城圭介, 片山直久, 甲斐俊哉: S-ニトロソ基含有アルブミン及びその製造方法ならびに抗がん剤, 特願 2007-225839
- 2) 中城圭介, 帆足洋平, 甲斐俊哉, 宇野公之, 小田切優樹: ピキア酵母を用いた遺伝子組換え型ヘモグロビン, 特開 2008-17774

## 血小板動態の可視化により PEG-hrAlb の副作用を検討する

分担研究者 片山 富博 愛媛大学大学院医学系研究科 助教

**研究要旨：**本研究は「PEG-hrAlb を救急救命で使用可能な酸素供給補助製剤」として確立することを目的とし、PEG-hrAlb を投与した場合の血小板動態を観察することにより血栓易形成作用等の副障害の有無を検討することである。本研究の特色はわが国固有の技術である量産可能なヒト組換え型アルブミンをPEGで修飾した複合体を安全且つ確実に血液粘度を上げることのできる製剤として計画当初から創製し、その結果として前臨床試験の段階からヒトに応用可能な製造条件を設定して性能を評価できる点である。本分担研究では、個々の血小板を生体内染色し超高速超高感度生態ビデオ撮像系を用いて微小血管を撮像し生体内微小血管における個々の血小板動態を明らかとする。申請者・分担者が開発した超高速超高感度生態ビデオ撮像系を用いて血小板動態を解析することが可能となったため、今後、PEG-hrAlb の易血栓性の有無を観察できることが示された。

### A. 研究目的

PEG-hrAlb の炎症作用および易血栓性の危険性を除外しなければ、PEG-hrAlb はショック時の臓器低灌流の改善法として適切とは言えない。本研究は「PEG-hrAlb を救急救命で使用可能な酸素供給補助製剤」として確立することを目的とし、PEG-hrAlb を投与した場合の血小板動態を観察することにより炎症反応・血栓易形成作用等の副障害の有無を検討することである。個々の血小板を生体内染色し超高速超高感度生態ビデオ撮像系を用いて微小血管を撮像し生体内微小血管における個々の血小板動態を明らかとする実験系を確立し、今後、PEG-hrAlb の易血栓性の有無を観察することが目的である。

### B. 研究方法

#### B-1 実験に用いた動物と処置法

本実験は愛媛大学にて行われた実験に関しては愛媛大学動物実験委員会の承認を受け、実験指針に基づき実施された。

#### B-2 超高速・超高感度生体ビデオ撮像系を用いた循環血小板の観察

280～320 g の Wistar 系ラットを sodium pentobarbital (40 mg/kg) で麻酔し、薬剤投与のため大腿静脈にカニューレションした。ラットを heating pad 上で 37°C で保温し、腹部正中切開により回盲部を腹腔外に取り出し、プラスチック製の台上にて腸間膜微小循環を観察した。腸間膜は 37°C、95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> ガスで飽和した Krebs-

henseleit bicarbonate-buffered solution にて灌流した。

CFSE を経静脈的に投与し、ラット血小板生体染色を施行した。CFSE は細胞膜を通過し細胞内において esterase で水解されたのち蛋白質のリジン残基と反応して複合体を形成し細胞内に溜まるため、細胞内 esterase 活性が高い血小板や白血球が最もよく染色される。この色素は、血管内皮細胞を全く染色しないが、血漿蛋白には染色性があり、血管径を正確に測定できる。また血管腔の中を明るく染色された血小板が流れる像が得られる。

血小板撮像について、その大きさのため、生体流体下で蛍光画像として捉えるには高倍率の観察系が必要である。しかし高倍率では移動速度が増加するため速度分布の測定が困難となる。これを解決するため silicon-intensified fluorescence カメラ同等の高感度撮影と、毎秒数千コマの高速度記録を可能とするビデオカメラを導入して、CFSE 標識血小板を落射蛍光下に撮像した。この系では数秒の高速度記録のあと、光源を切り替えて透過光線とし、再度高速撮影をすることにより単一赤血球の動きを解析することも可能である。撮像終了後、ビデオを frame-by-frame で解析した。

実際の手技であるが、透過光で赤血球の像を撮像した後、蛍光用の光源にて同一部位の血小板を撮像する。まず、透過光の下で1秒間に1000コマのスピードで撮像し、後にこれをスロー再生することで、微小血管の中心部と血管内皮近傍の赤血球速度とずり速度を求める。CFSE で染色した血小板を通常の録画で使用される1秒間30コマのスピードで録画した場合、血小板は認識されるが、移動速度が極度に速いため残像が残り微小血管内で速度や密度を求めるこ

とは不可能である。一方、CFSE で染色した血小板を1秒間に1000コマの超高速・超高感度カメラで撮像した後にスロー再生した場合、血小板は pin-point として認識され、微小血管内での血小板動態は観察され易くなる。

## B-2 解析に用いたパラメーター

透過光像および蛍光像を frame-by-frame で解析することにより赤血球速度・血小板速度を求めた。解析に用いたパラメーターは、同部位の平均赤血球速度の比 ( $V_P/V_R$ )、中心軸領域に対する内皮近傍領域の相対的血小板密度 ( $D_{PE}/D_{CN}$ ) である。血小板 $\square$ 血管内皮間接着反応が増えれば  $V_P/V_R$  は低下、 $D_{PE}/D_{CN}$  は増加する本研究では、内毒素 (LPS; O111B4, Sigma, St. Louis, MO) 投与時 (1.0 mg/kg/hr, i.v.) の血小板動態、および内毒素とともに Antithrombin III を投与し Antithrombin III の効果を調べた。同様に抗 P-selectin 抗体も投与した。

## C. 研究結果および考察

### C-1 微小血管内における赤血球速度、血小板速度および血小板密度

内皮近傍を流れる血小板の  $V_P/V_R$  は変化に富んでおり、時折、50%以下になることもある。つまり、血小板と血管内皮の間に接着反応が存在し、何も刺激していない生理的な状態でも血小板は millisecond level で血管内皮と接着反応を繰り返していた。内皮近傍領域を流れる血小板の  $V_P/V_R$  の分布は、対照群 (生理食塩水投与) の  $V_P/V_R$  の平均値は約 92%であった。 $V_P/V_R$  が 90%以下となる血小板は半数であった。一方、lipopolysaccharide; LPS (O111B4, 1.0



mg/kg/hr、30 min、静注)を投与すると  $V_P/V_R$ は有意に低下し、 $V_P/V_R$ のヒストグラムは著しく左方へ移動した。内毒素血症時、血小板-血管内皮間の接着反応は著明に増加していると考えられる。

これらの反応は Antithrombin III の共投与により抑制された。抗 P-selectin 抗体も同作用であった (Fig 1)。また、 $D_{PE}/D_{CN}$  も同様の傾向であった (Fig 2)。

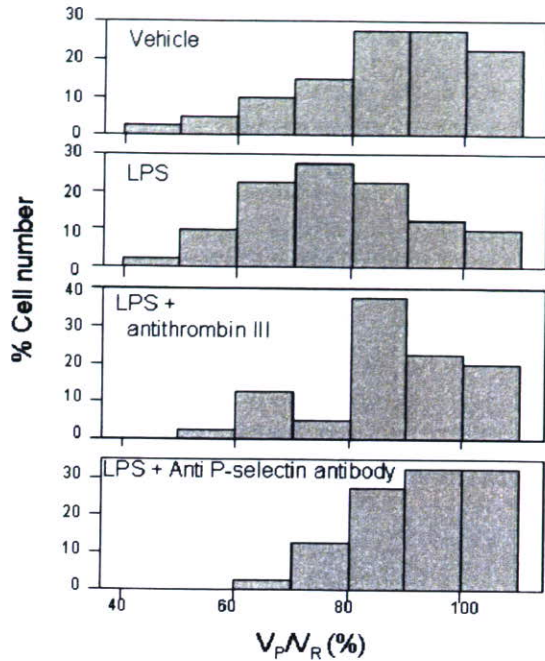


Figure 1. Histogram analyses of  $V_P/V_R$  in the vehicle-, LPS-, LPS + antithrombin III-, and LPS + ARP 2.4- treated venules. Data were collected from 100 different platelets in individual experiments using 6 rats in each group.

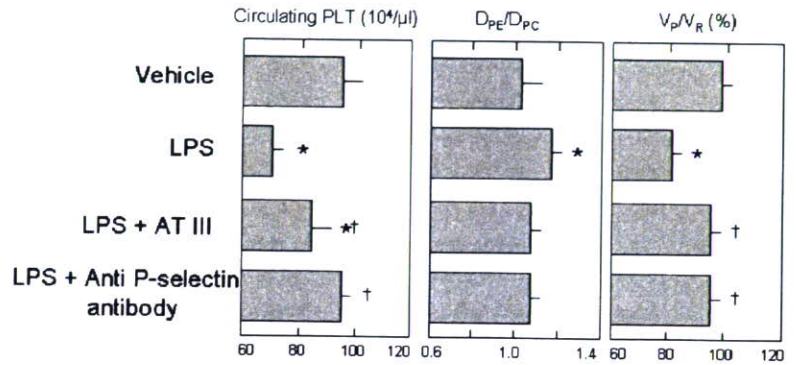


Figure 2. Effects of mAbs against P-selectin and antithrombin III on the LPS-induced changes in the density and velocity of platelets traveling in the periendothelial space. The values are reported as the mean  $\pm$  SEM of 6 different rats for all of the groups. \* $P < 0.05$  vs. the group treated with vehicle. † $P < 0.05$  vs. the group treated with LPS.

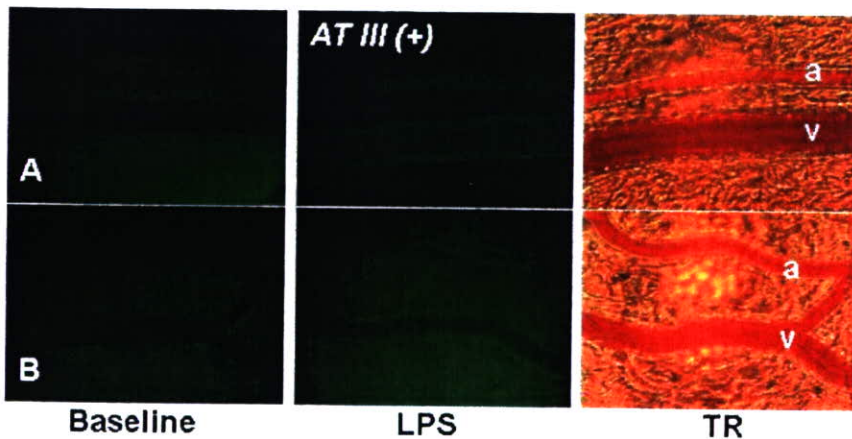


Figure 3. Representative images showing downregulation of the LPS-elicited P-selectin translocation in the mesenteric microvascular endothelium in antithrombin III-treated rats. The left and middle portions of the panels show microfluorographs of the FITC-labeled anti-P-selectin MoAb, which were captured before (baseline) and 30 min after LPS infusion (LPS), respectively; the right portions show transillumination images for each group (TR). a indicates arterioles; v, venule. Bar = 30  $\mu m$ .

## **C-2 生体内微小血管における P-selectin 発現の観察**

抗 P-selectin 抗体に蛍光色素 FITC を結合させ、各グループのラットに投与した。この微小血管を生体蛍光顕微鏡にて観察することにより血管内皮上の P-selectin 発現強度をリアルタイムで観察可能となった (Fig 3)。これにより、トロンピンが活性化されることにより P-selectin が発現していることが示唆された。

## **D 結論**

申請者・分担者が開発した超高速超高感度生体ビデオ撮像系を用いて血小板動態を解析することが可能となったため、今後、PEG-hrAlb の易血栓性の有無を観察できることが示された。また、PEG-hrAlb が各種接着分子発現関与の有無も検討可能となった。

## **E. 健康危険情報**

特になし。

## **F. 研究発表**

なし。

## **G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし。

### Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kinoshita, A., Tsukada, K., Soga, T., Hishiki, T., Ueno, Y., Nakayama, Y., Tomita, M., <u>Suematsu, M.</u>	Roles of hemoglobin allostery in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes: simulation and its verification by metabolome analysis	J. Biol. Chem.	282(14)	10731-10741	2007
Higuchi, A., Ueno, R., Shimmura, S., <u>Suematsu, M.</u> , Dogru, M., Tsubota, K.	Albumin rescues ocular epithelial cells from cell death in dry eye	Curr. Eye Res.	32(2)	83-88	2007
Hangai-Hoger, N., Tsai, A.G., Carbales, P., <u>Suematsu, M.</u> , Intaglietta, M.	Microvascular and systemic effects following top load administration of saturated carbon monoxide-saline solution	Crit. Care Med.	35(4)	1123-1132	2007
Adachi, T., Yamamoto, M., <u>Suematsu, M.</u>	Targeting NAD(P)H oxidase: Ets-1 regulates p47phox expression	Circ. Res.	101	962-964	2008
Katayama N., Nakajou K., Komori H., Uchida K., Yokoe JI., Yasui N., Yamamoto H., Kai T., Sato M., Nakagawa T., Takeya M., Maruyama T., Otagiri M.	Design and evaluation of S-nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) as a novel anticancer drug	The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics		in press	
Nagai R., Mera K., Nakajou K., Fujiwara Y., Iwao Y., Imai H., Murata T., Otagiri M.	The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs	Biochimica et Biophysica Acta	1772	1192-1198	2007