

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業）

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）

平成十八年度～二十年度 総合研究報告書

研究代表者 末松 誠

慶應義塾大学医学部 教授

平成 21（2009）年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業）

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剤の開発

（研究課題番号：H18-創薬-一般-025）

平成十八年度～二十年度 総合研究報告書

研究代表者 末松 誠

慶應義塾大学医学部 教授

平成 21（2009）年 3 月

目 次

I 総合研究報告

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 末松 誠	5
---	---

II 研究成果の刊行に関する一覧表	29
-------------------	----

III 研究成果の刊行物・別刷	35
-----------------	----

I 総合研究報告

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

主任研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部 医化学教室 教授

研究要旨：出血性ショック病態ではガス交換機能不全よりむしろ、脈管拡張メディエータの生成不全や血液粘度の低下により、微小血管灌流不全が起こることが予後決定因子となるとの基礎的知見が集積しつつある。本研究はショック時に投与されるヘモグロビン含有製剤の投与量を必要最低限とし、かつ最大の組織ガス交換効率を発揮するヒト組換え型アルブミン修飾製剤を創製し血液製剤の確保と使用量最適化に資する技術開発を行うことを目的とした。脳・肝臓等の臓器微小循環機能評価を行うにあたり、独自に開発した組織 NO 生成バイオイメージング計測技術、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ことで早期実現を期することを目的とした。まず製剤の安定した製造法を確立し、物性評価から安定性を確認し、またその保存方法を確立した。生体内投与による実質的有効性を検討する前臨床試験では、脳微小循環の NO イメージングから出血性ショックモデルにおいて PEG-rHSA 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た。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、また血液ガス分析結果もそれを支持するものであった。一方、当初仮説を立てた止血効果の増強に関しては実験結果から PEG-rHSA は止血機序を抑制する効果があることが明らかになり、臨床応用には留意すべき点も明らかになった。これは今後メカニズムを明らかにすることで、新たな血栓形成の分子メカニズムの解明にも繋がる期待できる。最終的には霊長類への投与を実施し、さらなる安全性を確認する必要がある。

A. 研究目的

現在開発が進んでいる Hb 封入型 liposomal vesicle (HbV) は赤血球と同等の酸素運搬能を有するもののショック病態で電解質輸液投与により血液希釈が生じる際に赤血球が高濃度存在することにより生じる血液粘度が十分に増加しないため、粘度とずり速度の積で規定さ

れるずり応力が十分内皮細胞に作用せず重症のショック病態では血管機能改善が図れない懸念がある。一方、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-rHSA を救急救命

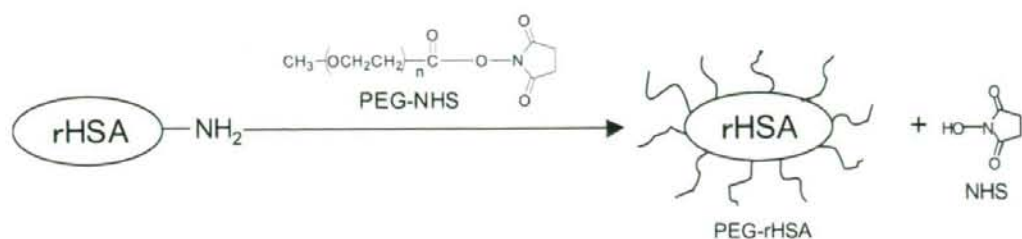


図1 PEG-rHSAの合成スキーム

で使用可能な酸素供給補助剤」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ら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生成バイオイメージ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前臨床性能評価を行う。

本総合報告書では以下のように製剤の物性評価を行った基礎実験と、生体計測を中心とした実質的応用実験に分けて記載した。なお、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. PEG-rHSAの有効性・安全性試験

B-1 PEG-rHSAの調製および検定

緒言

PEG-rHSAを救急救命で使用可能な酸素供給補助剤として確立すべく、PEG分子のrHSAへの定量的修飾およびこれらの粘度およびCOPといった物性制御を確立することにより、PEG結合数および物性の安定した製剤を調製することを目的としている。

方法

PBS中でrHSA(1 wt%, 63.3 mL)に対し、分子量5000および10000の*N*-ヒドロキsuccinイミド(NHS)化PEG(PEG-NHS)をそれぞれ、5-50等量の範囲で添加し、18時間室

温にて攪拌させることで、rHSAにPEG分子を結合させる合成を行った。rHSAに未結合のPEG分子を除去するため、合成したPEG-rHSA溶液を限外ろ過(カットオフ50000)し、PEG-rHSAを精製した。合成スキームを図1に示した。

調製したPEG-rHSA(0.5 wt%, 200 μ L)に尿素(10 M, 200 μ L)を添加し、30分室温にて静置させた。その後、rHSAに結合したPEGを加水分解により切断させるべく、水酸化ナトリウム水溶液(10 M, 100 μ L)を添加し、18時間、80°Cインキュベートさせた。さらに、SDS(10%, 500 μ L)を添加し、切断したPEGを溶液中に分散させた。この溶液をHPLCにて測定することで、rHSAに結合したPEGの濃度を同定した。カラムはTSKgel G3000PW_{XL}(東ソー)を使用し、移動相は36%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を用い、流速1 mL/minでPEGの屈折率を測定し、このピーク面積を既知濃度のPEG溶液で作成した検量線に外挿させることでrHSA1分子あたりのPEGの平均結合本数を測定した。

PEG-rHSA中のrHSA濃度はBiuret法によるタンパク質の定量により同定した。硫酸銅(II)・五水和物(1.5 g)および酒石酸カリウムナトリウム(6.0 g)を純水700 mLに溶解し、さらに10%水酸化ナトリウム水溶液(300 mL)を加えることでBiuret試薬を調製した。Biuret試薬4 mLに対し、PEG-rHSA溶液1 mLを添

加し、室温にて30分間浸漬させた後、600 nmの吸光度を測定した。既知濃度のrHSAについても同様の反応を行い、600 nmにおける吸光度を測定し、検量線を作成した。この検量線にPEG-rHSAと反応させたBiuret試薬の吸光度を外挿させることでPEG-rHSA中のrHSA濃度を同定した。

PEG-rHSAをrHSA濃度1.34 wt%で調製し、これらの溶液およびPEG未結合のrHSA溶液についてPhysica MCR 101 (Anton Paar)を用いて粘度を測定した。粘度の測定は37°Cで行い、share rate 3160 s⁻¹のときの粘度を採用した。

同様にPEG-rHSAをrHSA濃度1.34 wt%で調製し、これらの溶液およびPEG未結合のrHSA溶液について4420型膠質浸透圧計(WESCOR)を用いてCOPを測定した。

結果

PEG-rHSAを調製するにあたり、合成開始時に添加するPEG-NHSの濃度をコントロールすることで、rHSAに導入するPEG分子の結合数を制御する試みを行った。分子量5000および10000のPEGに関し、rHSA分子に対し5-50当量のPEG-NHSを用いてPEG-rHSAを合成した。合成生成物を限外ろ過処理によりrHSAに未結合のPEG分子を除去した後、精製したPEG-rHSAを加水分解させ、rHSA分子あたりのPEG結合数を同定した。合成時添加PEG/rHSAモル濃度比に対するrHSA分子あたりのPEG結合数の関係を図2に示した。

この結果、PEG分子量5000および10000双方において、合成時に40当量以上のPEG-NHSを仕込んだ際に、PEG結合数がほぼプラトーに達し、その最大結合数がPEG分子量5000のときに約11-12、分子量10000のときに約10-11であった。

そこで、rHSA分子あたり11本のPEGを導入したPEG-rHSAをそれぞれPEG分子量5000および10000において調製した。合成時に添加

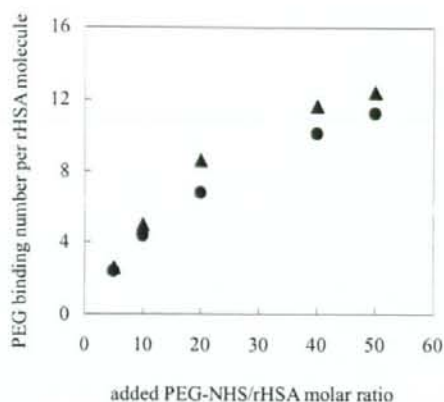


図2 合成系をスケールアップさせた際の合成時添加PEG/rHSAモル濃度比に対するrHSA分子あたりのPEG結合数の関係。■: PEG分子量5000、●: PEG分子量10000。

表1 PEG-rHSA (rHSA濃度1.34 wt%)の粘度およびCOP

化合物	PEG-rHSA		rHSA
	5000	10000	-
調製回数	3	6	3
粘度 (cP) *	1.3 ± 0.0	3.4 ± 0.1	0.8 ± 0.0
COP (Torr) *	9.2 ± 0.7	59.1 ± 4.2	3.3 ± 0.3

* mean ± SE

したPEG-NHS量はPEG分子量5000および10000それぞれ40および50当量用いた。以降の物性評価検討にはこれらのPEG-rHSAを使用している。

PEG結合数11のPEG-rHSA (PEG分子量5000および10000)を用い、1.33 wt% (rHSA濃度)での粘度およびCOPを測定した。これまで、分子量5000および10000のPEG-rHSAをそれぞれ3回および6回調製し、その全てのサンプルに対して粘度およびCOPの測定を行った結果を表1にまとめた。

その結果、分子量5000のPEGを結合させた

PEG-rHSAの物性値はPEG未結合のrHSAよりわずかに高い粘度およびCOPを示したものの、PEGの分子量を10000にしたPEG-rHSAにおいてこれらの物性値は顕著に上昇した。さらに、調製したPEG-rHSAサンプル間の物性値にばらつきがほとんど認められなかったことから、物性の安定した製剤の調製を達成したことが示唆された。

考察・結論

(1) 本研究で得られたPEG-rHSAの合成に関する知見から、分子量5000および10000のPEGにおいて、rHSA分子あたりのPEG結合数を、合成段階でのPEG-NHSの添加濃度により制御することが可能であることがわかった。さらに、PEGの最大結合数がPEG分子量5000では約11-12、分子量10000では約10-11であったことや、rHSA分子あたり11本のPEGを結合させたPEG-rHSAを調製する際に、それぞれPEG分子量5000および10000において合成時に添加するPEG-NHS量をそれぞれ40当量および50当量用いる合成プロトコルを確立した。

(2) rHSA分子あたりのPEG結合数が11のPEG-rHSAにおいて、分子量5000のPEGを結合させたPEG-rHSAの粘度およびCOPの物性値はPEG未結合のrHSAよりわずかに高いものの、PEG分子量10000のPEG-rHSAにおいては、これらの物性値に顕著な上昇が見られた。さらに、上記(1)に示した合成プロトコルに従って調製したPEG-rHSAは、サンプル間の物性値にばらつきがほとんど認められなかったことから、物性の安定した製剤の調製を達成したことが示唆された。

B-2 PEG-rHSAの安定性評価(1)

緒言

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原葉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。

方法

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 μM (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。

CDスペクトルに関しては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 μM (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 μM (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

熱安定性試験においては 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°C/hr

結果

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}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}Trp 近傍のマイ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 3 に示されるように PEG-rHSA は 342 nm に極大波長が認められた。

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 4 (A) か

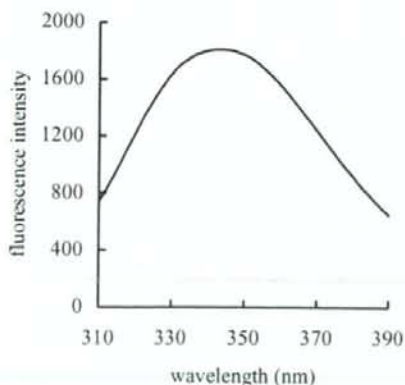


図 3 PEG-rHSA の蛍光スペクトル

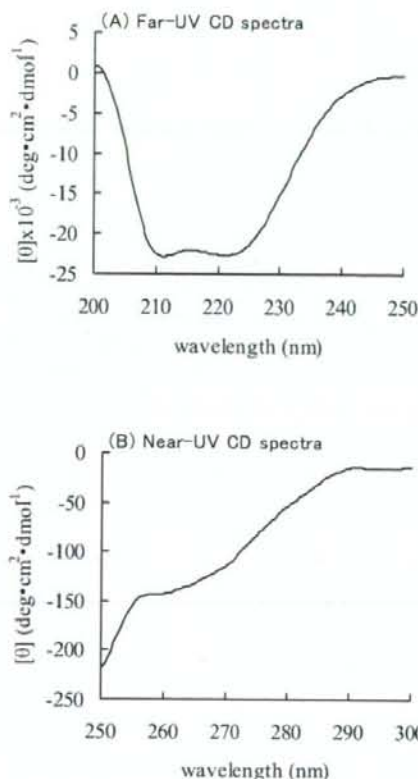


図 4 PEG-rHSA の CD スペクトル

ら PEG-rHSA は、210 nm に負の吸収極大及び 222 nm 付近に肩を示し、 α 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 4 (B))。

熱安定性について、 α 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 5 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。

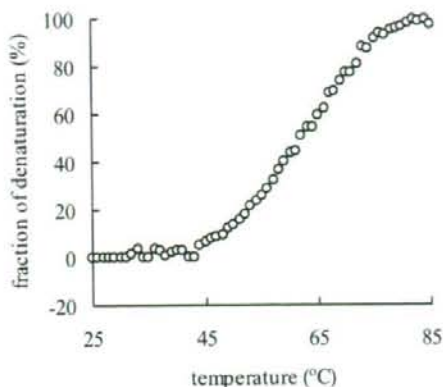


図5 PEG-rHSAの熱安定性

考察・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}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 α 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。

B-3 PEG-rHSA の安定性評価 (2)

緒言

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、40°C 及び 60°C における保

存安定性及び 120 万 lux-hr の曝光条件での光安定性について評価を行った。

方法

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 μM (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。CD スペクトルの取得は 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 μM (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 μM (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

熱安定評価は 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°C/hr

結果・考察

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}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}Trp 近傍のマイ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 3 に示されるように PEG-rHSA は 342 nm に極大波長が認められた。

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 4 (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、 α 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 4 (B))。

熱安定性について、 α 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 5 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。

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}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 α 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。

B-4 PEG-rHSA の体内動態特性

緒言

ショック時に投与される赤血球輸血およびヘモグロビン由来酸素輸液の個体投与量を必要最低限で最大の組織ガス交換効率を発揮させるヒト組換え型アルブミン修飾製剤を創製し血液製剤の確保と使用量最適化に資する技術開発を行うことを目的とする。本年度の研究は基本情報を得ることを目的に、アルブミン分子に PEG を結合させた場合の体内動態についてマウスを用いて検討したので、その結果を報告する。

方法

遺伝子組換えアルブミン (パイファ) 150 μM と 3 mM イミノチオラン (PIERCE) を 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8, 0.5 mM DTPA) 中、室温で 1 時間反応させ、アルブミン分子のリジン残基にチオール基を導入した。その後、SUNBRIGHT ME-020MA (Mw: 2,333, 日本油脂) を 3 mM となるように添加し、室温で 2 時

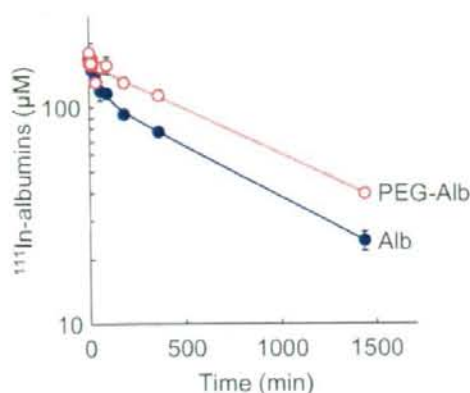


図6 輸液後の血漿中濃度推移

間反応させ PEG-Alb を得た。反応後の PEG-Alb は PBS で十分に透析を行った後、濃度を 1 mM に調整し冷蔵保存した。この PEG-Alb は非還元 SDS 電気泳動の結果から、アルブミン分子あたり約 20 個の PEG が結合していることが示唆された。

Hnatowich らの方法に従い、二官能性キレート試薬 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) を用いて、 $^{111}\text{InCl}_3$ により標識した (Hnatowich DJ et al. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **33**, 327-332 (1982)). Alb または PEG-Alb (蛋白質量として 5 mg) を 0.1 M HEPES 緩衝液 (pH 7.0) 1 mL に溶解し、dimethyl sulfoxide に溶解した DTPA を 10 μL (蛋白質の 2 倍当量) 加え、60 分間室温

表 2 ^{111}In -Alb および ^{111}In -PEG-Alb のパラメータ

	^{111}In -Alb	^{111}In -PEG-Alb
AUC (mM.min)	123.9	177.9
CL_{tot} (ml.min/kg)	0.040	0.028
$t_{1/2\beta}$ (h)	9.26	13.87
V_d (ml/kg)	30.20	30.20

で反応させた後、Sephadex G-25 カラムを用いたゲル濾過により未反応 DTPA を除去、限外濾過により濃縮した。次いで、1 M 酢酸ナトリウム 20 μL と $^{111}\text{InCl}_3$ 溶液 (74 MBq/mL) 20 μL の混液に 60 μL の DTPA-アルブミン結合体を加え 30 分間室温で放置することにより標識を行った後、PD-10 カラムを用いたゲル濾過及び VIVAspin により精製した。比活性は、約 10^7 cpm/mg であった。各標識体をそれぞれ非標識体で希釈して投与液を調製した。

ddY マウス (雄性, 6 週齢) に非絶食下で、 ^{111}In 標識した Alb または PEG-Alb を 5 $\mu\text{mol/kg}$ (放射活性は約 30⁵ cpm/匹) の用量でマウス尾静脈より急速注入した。ヘパリン処理した 1 mL の注射筒で規定時間毎に下大静脈から約 0.3 mL 採血し、3000 rpm で 10 分間遠心分離後、血漿を採取し、血漿 0.1 mL の放射活性をオートウェルガンマカウンター (アロカ製, ARC-2000) にて測定した。速度論的パラメータの算出は MULTI を用いて行った。

結果

蛋白質を PEG 修飾すると、蛋白質分子の安定化や蛋白質分解酵素からの保護、抗原性の低下等が起こり、蛋白質の生体内寿命を延長させることが知られている。従って、PEG-Alb は元々長半減期である Alb をさらに生体内に滞留させることができ、血液粘度を長期にわたり高く維持できる可能性が期待され、PEG-Alb 投与量の低減にも寄与しうる。そこで、 ^{111}In 標識した Alb 及び PEG-Alb をマウスに静脈内投与し、その体内動態特性を比較検討した。図 6 に ^{111}In -Alb 及び ^{111}In -PEG-Alb の血漿中濃度推移、Table 1 にその速度論的パラメータを示す。結果から明らかのように、 β 相から算出した PEG-Alb の消失半減期は 13.87 時間となり、Alb の 9.26 時間に比べ 1.5 倍延長した。また半減期延長に伴う AUC の増大と全身クリアランスの低下が認められた。一方、分布容積には差が無かった。

考察・結論

PEG-Alb を出血性ショック病態に対する補助製剤への応用の可能性について検討するため、今回 PEG-Alb の体内動態把握を目的としてマウスに PEG-Alb を投与し、その体内動態について検討した結果、以下の成果を得た。

(1) マウス尾静脈より ^{111}In 標識した Alb 及び PEG-Alb を急速投与したところ、Alb に比べ PEG-Alb では血中からの消失が遅延していた、さらに半減期延長に伴う全身クリアランスの低下及び AUC の増大が認められた。一方、分布容積には差がなかった。

これらの結果は、PEG-Alb をショック病態の補助製剤として用いる際、PEG-Alb の投与量軽減につながることを示唆された。

C. PEG-rHSA の生体内作用機序の探索

C-1 PEG-rHSA による脳微小循環改善効果 NO イメージングによる検討

緒言

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し、脳・肝臓等の臓器微小循環機能評価を申請者ら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 生成バイオイメージ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前臨床性能評価を行った。

方法

C57/BL6 J 雄性マウス (7~9 週齢) を α -chloralose (80mg/kg bw), urethane (600mg/kg bw) の腹腔内投与により麻酔し、頭部を露出後、20G サーフローニードルを用いて気管挿管した。24G サーフローニードルを用いて左大腿静脈にカニューレーションを行い、薬物投与に使用した。マウス頭部を固定装具に固定し、頭皮は正中線に沿って 1.5cm 程度切開した。頭蓋骨

を露出し、歯科用ドリルを用い左頭頂部に 2mm 径程度開頭した。硬膜を除去し、カバーガラスをのせて cranial window を作製した。本実験では一酸化窒素検出用蛍光試薬として Diaminofluorescein-FM diacetate (DAF-FM DA) を用いた。観察する脳微小血管を決定した後 DAF-FM DA (25 $\mu\text{mol/L}$) を window 内に灌流させ、灌流を開始してから一時間後、DAF-FM DA を生理食塩水で洗い流した。その後、control、Epinephrine のみを投与するグループは NO 蛍光の観測を開始した。実験により得られた画像から、画像解析ソフト Scion Image により血管壁の一部の蛍光輝度を測定した。

脳微小循環は蛍光色素 Rhodamine 系色素による赤血球の標識を行うことで血流を可視化した。本実験では Rhodamine B isothiocyanate を用いた。Rhodamine B は最大吸収波長 556nm、最大蛍光波長 565nm の蛍光色素である。

血流観察に用いた装置は落射蛍光顕微鏡を用いた。水銀ランプ光は波長 510-560nm のバンドパスフィルタを通して照射し、波長 590nm の吸収フィルタを通して Rhodamine 標識赤血球を観察した。次に赤血球の Rhodamine 標識法について述べる。マウス腹部大動脈よりヘパリンを含ませたシリンジで脱血し、回転数 1000rpm、4℃ の条件で 5 分間遠心分離した。血漿および buffer coat を除去し、赤血球成分のみ赤血球洗浄液で洗浄した。このとき赤血球洗浄液には 1% Fetal bovine serum (FBS, ウシ胎児血清) を phosphate buffered saline (PBS, リン酸緩衝生理食塩水) で希釈したものを用いた。さらに遠心分離と洗浄を 2 回行い、Rhodamine 溶液を加え 1 時間室温で保存した。標識後は再び赤血球洗浄液を用いて赤血球を 3 回洗浄する。標識した赤血球の投与量は 0.1ml とした。

実験対象は C57/BL6 J 雄性マウス (7~9 週齢) 18 匹とした。マウスを pentobarbital sodium (10ml/kg) の腹腔内投与による麻酔後気管挿管、

左大腿静脈カニューレーションを行い、cranial window を作成、右大腿静脈より脱血した。その後 DAF-FM DA (25 μ mol/L) を window 内に 45 分間灌流し、生理食塩水で洗い流した。脱血から 1 時間後に輸液の投与を行い、NO 蛍光の観測を開始した。輸液の条件として、① PEG-rHSA、②rHSA、③L-NAME+PEG-rHSA、④生理食塩水 (saline)、⑤自己血液 (autologous)、⑥shock の 6 グループ (n=各 3) に分けて実験を行った。③L-NAME+PEG-rHSA では、PEG-rHSA を投与する直前に L-NAME (100mg/kg) を腹腔内投与した。⑥shock では、脱血 1 時間後に輸液の投与を行わず観測を行った。

NO は細胞内の可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) を活性化し cGMP を生成する。そこで肝臓および心臓における NO 生成量の指標として cGMP の測定を行い、出血性ショックに

おける PEG-rHSA の投与効果を検討した。

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 の 5 グループに分けて実験を行った。①Sham Ope は、気管挿管後すぐに各臓器を摘出した。②Shock 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-rHSA は、気管挿管後脱血し、1 時間後各輸液を左大腿静脈より投与、その 30 分後に各臓器を摘出した。cGMP の測定には、cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System (GE Healthcare) を用いた。

結果・考察

DAF-FM DA の蛍光輝度変化を図 7 に示した。

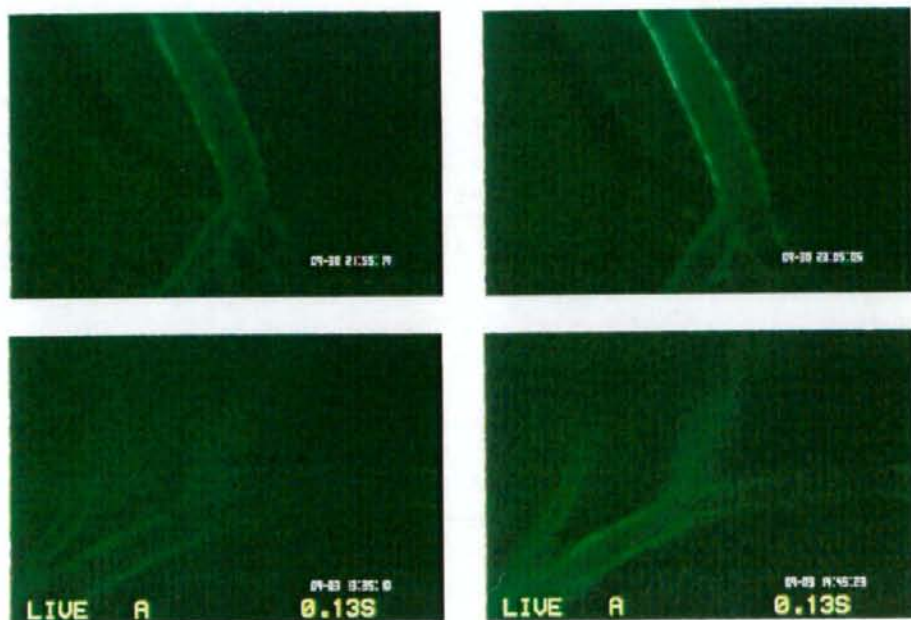


図 7 DAF-FM DA による脳微小血管における NO 生成量の変化。(a, c)測定開始時、(b)測定 60 分後、(d) L-NAME を前処理した。

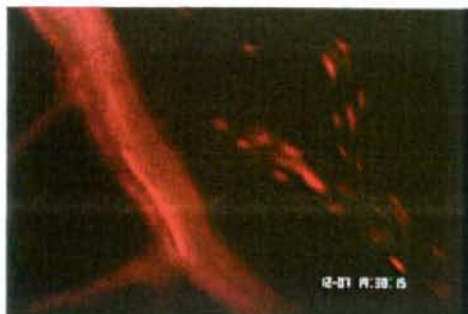


図 8 蛍光標識赤血球による血流の可視化

脳微小循環において、shear stress を強制的に上昇させると NO 生成量が増加し、またその増加は L-NAME で NOS の活性を阻害することで抑制されることがわかった。以上より本実験系を用いて shear stress の上昇に伴う eNOS 由来の NO 生成量の変化を観測できることが示された。また図 8 に脳微小血管内の Rhodamine 標識赤血球の画像を示した。

図 9 に各輸液を投与してからの時間と縦蛍光強度比の変移を示した。PEG-rHSA の投与により autologous を投与した場合と同程度まで NO 蛍光強度比が上昇したことがわかった。また、PEG-rHSA と rHSA を比較すると、PEG を修飾した粘度の高い rHSA の方が蛍光強度比が大きくなることがわかった。この結果から、PEG-rHSA の投与により、粘度に依存して eNOS の活性化、および NO 生成量の増加が引き起こされたと考えられる。

本実験より、NO 生成量が増加すると血管径が大きくなることがわかった。これは、NO が持つ血管弛緩作用によるものである。また、NOS 阻害剤 L-NAME の投与により NO 生成量の抑制、血管の収縮が見られたことから、NOS 由来の NO が血管径の調節に関わっていることがわかった。さらに、PEG-rHSA の投与は、rHSA を投与した場合と比較して NO 生成量の増加、および血管径の増加が大きいことがわか

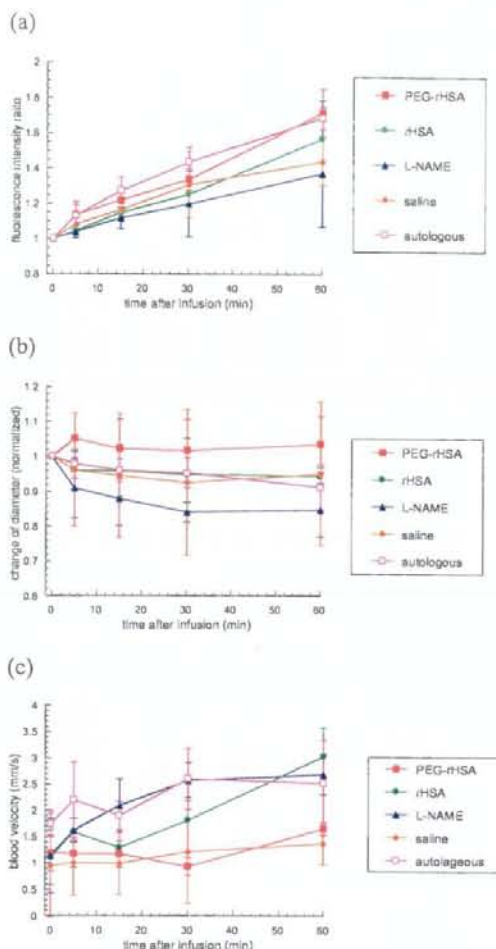


図 9 各輸液に対する NO 生成量 (DAF 蛍光強度, a), 脳細動脈血管径(b), 赤血球速度(c)変化

った。PEG-rHSA は rHSA に PEG を修飾し粘度を高くしたものであるため、両者の差は粘度の違いが原因であるといえる。よって、出血性ショックモデルにおいて、PEG-rHSA 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、血管を拡張するために有効であることが示された。

図 10 に cGMP の測定結果を示した。出血性ショック状態では NO 生成量が減少していると推察できる。また各グループにおける cGMP

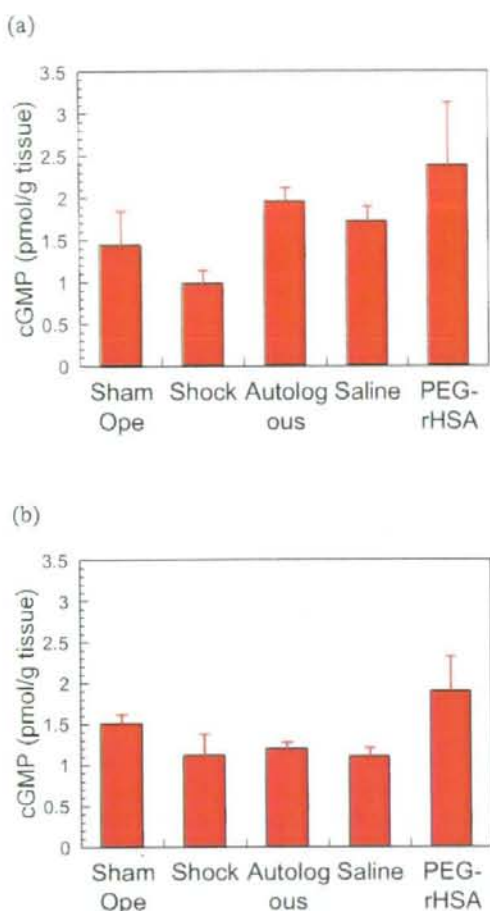


図 10 出血性ショックからの各輸液による蘇生後における(a)肝臓, (b)心臓の cGMP 濃度

を比較すると, PEG-rHSA において最も値が大きいことがわかった。

生体内実験から得られた PEG-rHSA による NO 生成効果を, 肝臓・心臓において cGMP を測定することにより検討を加えた。その結果, 出血性ショックモデル作製後の PEG-rHSA の投与は, ほかの輸液を投与した場合と比較して肝臓および心臓の cGMP を増加させることがわかった。これは 3 章で得られた shear stress に依存した NO の生成を裏付ける結果となった。しかし, cGMP を生成する guanylate cyclase

は主に細胞質に存在する可溶性と細胞膜等に存在する構成型があり, そのうち NO によって活性化するのは可溶性 guanylate cyclase である。肝臓と心臓を比較すると, 各輸液群の変化は臓器特異性を有しており, それには guanylate cyclase の割合や局在性に依存しているものと考えられたが, sham ope 群に対して増加した cGMP は可溶性 GC が活性化されたものであると考えられる。

結論

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 値の測定により, 出血性ショックモデルにおいて,

1. PEG-rHSA 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。
2. PEG-rHSA 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

以上の結果から, PEG-rHSA 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。

C-2 PEG-rHSA の血液粘度および止血能力に対する効果の検証

緒言

PEG-serum albumin (PEG-SA) は微小循環における毛細血管の灌流障害を著しく改善すると報告された。Albumin の表面に定量的にコーティングされた PEG により含水半径が増加し, 血液粘度が上昇することによって, 体内に投与した際にずり応力が増加し, 血管拡張性のメディエータが増加することがそのような効果の機序と考えられているが詳細は不明である。

一方 PEG の持つ負電荷は生体内に投与された場合に多彩な生物活性を発揮する可能性がある。臓器微小循環不全の際に PEG-SA を投与する場合にはこのような生物活性が benefit に

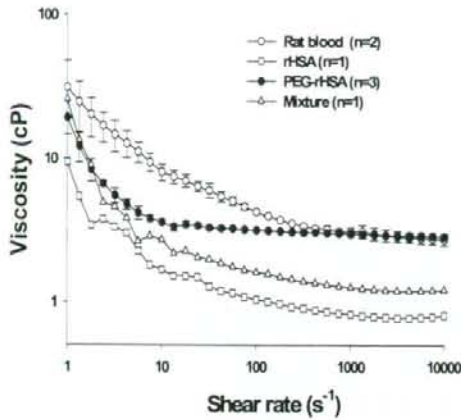


図 11 PEG-rHSA 他輸液群およびラット血液のずり速度-粘度特性

も hazard にもなりうるため詳細な検討が必要である。そこでラットを用いて実際にヒト組み換え型 albumin として投与できる製剤 (PEG-rHSA) を作成し、血液中の血球数の変化などを検討した結果、本製剤は血小板や血液凝固因子の機能に影響を与えることを示唆する興味深い所見を得たので報告する。

方法

Wistar 雄性ラット (210-290g bw) を用いた。コントロール (n=7) および rHSA (n=7)、PEG-rHSA (n=8) とした。人為的に血液粘度を制御するため、まずヒト組換え型アルブミン (rHSA、ニプロ株から供与) のリジン残基に polyethylene glycol (PEG, MW 10,000) を結合させることにより高粘度生体適合型蛋白分子 (PEG-rHSA) を作製した。比較対照物質として、rHSA 単独 (低粘度)、及び rHSA と PEG の非結合型混合溶液 (中粘度) を使用した。

雄性 Wistar ラットを実験モデルとして、血栓形成能を *in vivo* で定量した。1.5-2% isoflurane 自発呼吸麻酔下、粘度の異なる各物質による交換輸血を行った。交換輸血は左 A ラインより脱血を行い、同時に右 V ラインから輸液ポンプを用いて輸液した。交換輸血量はラット

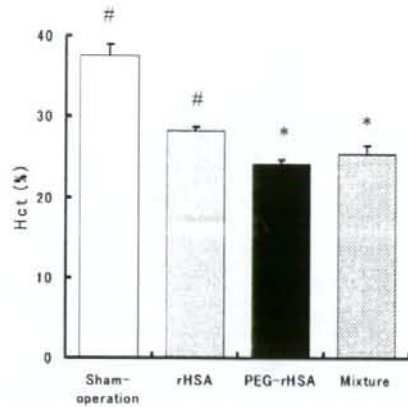


図 12 PEG-rHSA 他輸液群の 30% 交換輸血後の Ht 値測定結果

の体重より全血液量を推定し、その 30% 等量とした。また終了 10 分後に尾に傷をつけて止血するまでの時間を測定した。この間、血圧・脈拍および直腸温をモニターした。また交換輸血の前後に動脈血採取を行い、血液ガス、Ht 値、血小板数を測定した。

結果

図 11 に PEG-rHSA および rHSA、ラット血液の粘度特性を示した。PEG-rHSA は特に高ずり領域においてラット血液と同等の粘性を有することが分かった。PEG-rHSA は特に高 COP 値を示しており、微小循環の維持に優れると期待できる。図 12 に交換輸血 15 分後の Ht 値を示した。Ht は各輸液群において有意に 25-30% 低下した。

血圧変化を図 13 に示した。Sham operation 群では全体的に血圧の変動はわずかであったが、rHSA 群、PEG-rHSA 群では交換輸血開始直後から血圧が低下し始め、その後も低落傾向が継続した。それに対し、PEG-rHSA 群では control 群と遜色なく血圧が保たれた。

また図 14 に Sham operation, rHSA, PEG-rHSA の出血時間測定結果を示した。PEG-rHSA 群は

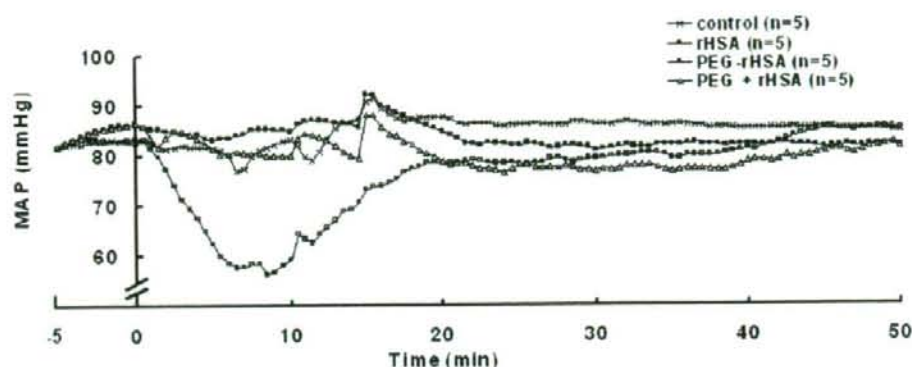


図 13 30%交換輸血による各輸液群の平均血圧変化

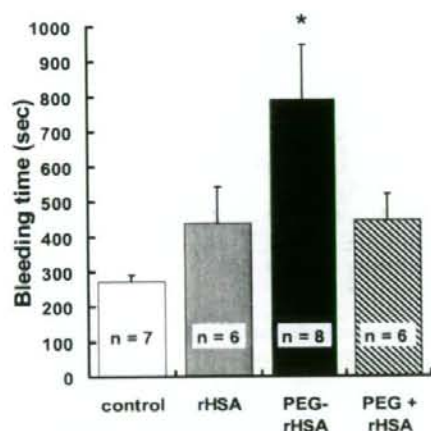


図 14 各交換輸液群における尾部切断後の出血時間

他の3群よりも有意 ($p < 0.05$) に延長した。交換輸血を行った3群ではヘマトクリット値が有意に減少したにもかかわらず、血小板数は4群で有意差が生じなかった。

考察・結論

出血時間は血小板数、血小板機能に関連したが、PEG-rHSA群で血小板数が変わらなかったことから、仮説とは全く逆にPEG-rHSAが止血時間を延長し、止血機序を抑制するこ

とが示唆された。以上よりPEG-rHSAの輸液による血漿粘度上昇が血管壁のずり応力を上昇させ、血小板機能抑制作用を持つNOの放出を促す、という新たな仮説を立てることができる。これを検証するためには生体内解析実験系を用い、微小血管内で血小板を可視化し、形成過程下の血栓と血流中の単一血小板の挙動に対するPEG-rHSAの効果を検討することで解明することができる。

今後、in vivoでの詳細な検討が必要であるが、本剤が臓器微小循環血流に顕著な改善効果があり、これを臨床に应用する場合、その止血抑制効果に留意する必要がある。本剤の最も有望な適応症は脳梗塞などの病態で急性発症初期に血管内投与すればtissue plasminogen activatorとcomparableな血栓抑制作用が期待できるが、一方で出血性ショックの際には出血を助長する可能性があるためその使用に注意が必要である。

C-3 メタボローム解析結果

緒言

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



図 15 実験プロトコル概略

および肝臓における網羅的代謝測定を実施した。

方法

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-rHSA 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-rHSA 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-rHSA 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-rHSA の投与、その 30 分後に各臓器を摘出した。

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 μ l / 300mg liver, 500 μ l / 100mg heart) を加え、300 μ l を Eppen に移した。クロロホルム 300 μ 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 μ 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。

結果・考察

本実験では PEG-rHSA 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-rHSA 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-rHSA 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-rHSA 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。

PEG-rHSA 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-rHSA 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-rHSA 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。

結論

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-rHSA 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-rHSA 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-rHSA 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。

C-4 PEG-rHSA の血液粘度および止血能力に対する効果の検証 (出血性モデル実験)

緒言

本実験は 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し、出血性ショック状態モデルを作製して輸液を行い、有効性を検討した。

方法

rHSA(25 wt%)を透析膜 (MWCO: 12 kDa-14 kDa) を用いて 6 時間透析し、その後安定化剤を除去した。rHSA(1 wt%, 50 mL, in PBS) に対して PEG(5 or 10 kDa)粉末を 40 等量混合、12 hrs 攪拌後、限外濾過 (MWCO: 50 kDa, in saline) にて精製し、PEG(5 or 10 kDa)-rHSA(in saline) を得た。

rHSA に対する PEG の結合本数は MALDI-TOF MS を用いて測定した。得られた分子量から PEG は 10kDa および 5kDa において rHSA に対して約 12 本結合していると推察された。粘度計を用いて 37°C 条件下で測定し、得られた粘度から流体力学半径(R_h)を算出