

論文題目

Ligandを必要としない吸着剤(PC-2)
に関する研究

三 田 勲 司

目 次

I 緒言-----	1
II 吸着剤の設計と製造-----	2
III 吸着能に関する実験方法と結果-----	5
IV 生体適合性に関する実験方法と結果-----	10
V 吸着機構の解析-----	12
VI 考察-----	14
VII 結語-----	20
VIII 文献-----	22

Ligandを必要としない吸着剤(PC-2)に関する研究

I 緒言

臓器不全、自己免疫疾患に対する治療として、血漿交換による血液浄化が著効を示すことがある。しかし、血漿交換はすべての物質の非選択的な除去であるため血中の有効な成分も同時に除去されるとともに、血漿の補充に大量の新鮮血漿を必要とし、肝炎やアレルギーなどの合併症がおこりうる。この難点を克服すべく、病因物質のより選択的な除去が可能である血液浄化の方法として、山崎ら¹⁾の吸着剤IM-PHTM、IM-TRTMをはじめとして、選択的吸着能をもついくつかの吸着剤が開発されてきた²⁾(表1)。

吸着剤PC-2は、架橋agaroseであるSephrose CL-4BTMに hexamethylenediisocyanate(HMDI)により架橋構造を更に賦与したものでIgG、 γ グロブリンにみられる β_2 -microglobulin(β_2 -MG)、また myasthenia gravisにみられる抗アセチルコリンエステラーゼ抗体(anti-AchR Ab)をはじめとして、その他の自己免疫疾患にみられる抗核抗体、抗ds-DNA抗体、免疫複合体、IgG型rheumatoid factor(IgG-RF)などの病因物質に対する吸着能があり、しかも生体適合性にすぐれていて臨床応用が可能な吸着剤である。

選択的吸着能をもつ吸着剤は一般に、担体-spacer-ligand という構造を持ち、先端のligand部位での種々の親和力により吸着現象がおけるとされている³⁾。このような理由から、従来から吸着剤の開発は“より良いligand”の追及にもつぱら主眼があった。

吸着剤PC-2は、担体自体の物理的構造を変えることにより吸着能をもたせたもので特別なligandを必要としないという特長があり、全く新しい吸着様式による吸着剤である。したがって、構造が単純であるから合成過程を短くでき大量合成が容易であるという利点がある。従来の吸着剤による吸着現象は、いわば“点”であるligand部位でおこる現象であるといえることができるが、吸着剤PC-2は吸着現象を、いわば“面”である担体全体における現象と捉えるべく、開発してきたものである。

II 吸着剤の設計と製造

吸着剤の設計

物理化学的相互作用を利用した吸着剤は、生物学的相互作用を利用した吸着剤に較べて吸着特異性は劣るとされているが、一般にその活性は安定していて保存、滅菌操作などによる変化を受けにくく、しかも大量合成が可能であるという利点をもっている。したがって、吸着特異性と生体適合性にすぐれた、物理化学的相互作用に基づく吸着剤の開発が望まれてきた。

物理化学的相互作用のうち、疎水の相互作用を吸着剤の吸着原理として利用することは従来からおこなわれてきた。たとえば現在、臨床的に用いられているIM-PHTM、IM-TRTMは疎水性のアミノ酸をligandとして使用しているが、この原理自体は普遍性のあるもので⁴⁾PC-2もこれに基づいて設計、開発されたものである。

吸着剤は臨床的に汎用するため大量合成するので、その合成過程はできるだけ短く単純なものとなるように設計の段階で考慮しておくことが望ましい。Ligandを付加する合成過程は一般に複雑なものとなることから、病因物質に対して吸着能のある種々の疎水性のligandを追及するのではなく、担体自体を疎水的にしていくことで吸着能を獲得できれば、ligandを必要としない吸着剤を得られる可能性があり、その合成過程は著しく短縮されるはずである。

Gel-filtrationの支持体として一般に使用されている架橋 agaroseであるSephacrose CL-4BTMは、物理的に安定で、生物学的にも安全性が高く、滅菌操作耐性をもっていて吸着剤の担体として適切である。当初、IgGに対する吸着能を目標にして吸着剤となる可能性を追及した。Sephacrose CL-4BTM自体は親水性で、IgGに対する吸着能をもっていないが、逆にきわめて疎水性の強いSephacroseの誘導体であるOctyl-SephacroseTMもまたIgGに対する吸着能がほとんどない。すなわち、親水性でありすぎても疎水性でありすぎてもIgGに対する吸着能はない。したがって、親水性のSephacrose CL-4BTMに適度な疎水性を与えた場合に吸着剤として機能するかどうかを次に検討した。

Octyl-Sepharose™はSepharose CL-4B™に、疎水性である7βキリ鎖-(CH₂)₇-を付加して得られるが、7βキリ鎖の一方が自由末端となっていて流動性に富むため、その表面はきわめて疎水性が強い状態になっている。このことから、7βキリ鎖の両端をSepharose CL-4B™に結合して架橋構造をとらせ、自由末端が存在しないようにすれば、適度な疎水性を得られる可能性がある。そこでSepharose CL-4B™に、その表面の水酸基と反応性が高いhexamethylenediisocyanate(HMDI)により、7βキリ鎖-(CH₂)₆-の架橋構造が賦与できることに着目した。この際、架橋密度を上げると、付加した7βキリ鎖が増加するので、“より疎水的”になっていく(図1, 2)。IgGを吸着の対象として、HMDIにより種々の条件の下で7βキリ鎖を架橋したSepharose CL-4B™について、架橋密度と吸着率の関係を検討したところ、架橋Sepharose CL-4B™はIgGに対する吸着能があり、N含量約5.5%に相当する架橋密度で最大の吸着率を示した(図3; 宇部興産・千葉研究所資料による)。

Sepharose CL-4B™はN元素を含有していないが、HMDIによる架橋結合はNを含有するurethan結合となるから、架橋密度はN含量に反映されてくる。図3では、横軸に架橋密度をN含量で表現した。

以上のことから、HMDIにより7βキリ鎖-(CH₂)₆-の架橋構造を賦与した架橋Sepharose CL-4B™は、ligandを必要としない吸着剤として機能する可能性が示唆された。

吸着剤の製造

架橋agaroseであるSephacrose CL-4BTMにdimethylsulfoxide(DMSO)の存在下でHMDIを反応させた(図1)。得られた吸着剤(以下PC-2)の模式図を図2に示す。吸着剤PC-2は含水状態で平均粒径が55 μ mの粒子である。

Ligandをもたない吸着剤PC-2は架橋構造そのものが吸着能に直接に関係してくるので、最適な架橋密度、すなわち、元素分析によるN含量で約5.5%をもつPC-2の合成条件が当面の問題となる。

Sephacrose CL-4BTM100gに対してHMDIを340mmolと反応量比を一定にし、反応温度を60 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C, 100 $^{\circ}$ Cの三種類とした場合、反応時間とN含量の関係を検討したところ、反応時間120分、反応温度100 $^{\circ}$ Cの条件下でN含量が約5.5%となった(図4, n=5 \times 3; 宇部興産・千葉研究所資料による)。

以上のことから、吸着剤PC-2はSephacrose CL-4BTM100gに対してHMDI 340mmolの反応量比で反応時間120分、反応温度100 $^{\circ}$ Cの合成条件のもとに製造することとした。

III 吸着能に関する実験方法と結果

1 実験方法

(1) Batchwise adsorption test

ヒト（慢性腎不全患者、自己免疫疾患患者及び健常者）の血清、血漿尿を対象としてbatchwise adsorption testを施行しPC-2の吸着能を検討した。吸着剤の吸着特異性をスクリーニングする目的では比較的吸着がおこりやすい条件、すなわち容積比 $v/v=3,5$ で施行した。

（注）ここで $v/v=3$ とは試料の容積が吸着剤の容積の3倍であることを意味する。

さらに、詳細に吸着能を検討する目的では容積比 v/v を10～30と上昇させて相対的に病因物質を増加させた。

(2) Single passing adsorption test

PC-2をcolumnに充填し、図5に示す回路においてcolumn流出口で病因物質の濃度を経時的に測定することによりPC-2の吸着能を検討した。

(3) Recirculating adsorption test

PC-2をcolumnに充填し、図6に示す回路においてcabinに封入した病因物質の変動を測定することによってPC-2の吸着能を検討した。このtestは臨床応用する場合を想定して全ての規格を実際の1/40で施行した。

なお、回路を用いた上記二つの灌流実験で使用したcolumnの内径は10mmであり、充填したPC-2の量、流通速度は検討する目的に応じて設定した。

2 結果

ヒト IgG に対する吸着能について

健常者の血清を対象として batchwise adsorption test により IgG に対する吸着能を検討した (図 7, $v/v=3$, $n=41$). IgG に対する吸着率は $58 \pm 8.1\%$ で, IgA, IgM に対しては, それぞれ $31 \pm 3.7\%$, $23 \pm 7.0\%$ であった. また TP, Alb に対する非特異的吸着はそれぞれ $23 \pm 1.4\%$, $12 \pm 1.4\%$ であった.

β_2 -MG に対する吸着能について

(1) 慢性腎不全により透析中の患者の高濃度 β_2 -MG 血清を対象として batchwise adsorption test を施行した (図 8, $v/v=3$, $n=48$). 患者血清中の β_2 -MG は $38.5 \pm 11.1 \text{ mg/l}$ であり, 吸着後の β_2 -MG については $3.3 \pm 1.0 \text{ mg/l}$ であり有意の減少 ($p < 0.01$) を認め, 吸着率は約 91% であった.

(2) 慢性腎不全患者に対しての腎移植の直後に得られた高濃度の β_2 -MG を含有する尿を対象として PC-2 の吸着能を検討した.

① Batchwise adsorption test による吸着能の経時的变化を検討した (図 9, $n=15 \times 15$). β_2 -MG の初期濃度は 32.6 mg/l で, 容積比 $v/v=3$ の条件下では 10 分以内に, $v/v=10$ では 30 分以内にほぼ吸着が平衡に達した.

② 吸着が平衡状態まで達した場合, 吸着剤の単位容積 (ml) あたりの吸着容量 (単位吸着容量) は, β_2 -MG の初期濃度, 及び容積比 v/v の二つの因子に依存する. 両者の関係を batchwise adsorption test により検討した (図 10, $n=5 \times 4$). 容積比 v/v が一定の条件下では, 初期濃度に比例して単位吸着容量が増加し, 初期濃度が一定の条件下でも容積比 v/v にほぼ比例して単位吸着容量が増加する.

③ Single passing adsorption test において流通速度を二通りに設定し (0.5 ml/min , 1.0 ml/min), column 流出口の β_2 -MG 濃度を測定した (図 11, $n=27 \times 2$). β_2 -MG が充分吸着されている間は検出されてくる β_2 -MG の濃度は低い吸着の限界を超えるとその濃度は経時的に上昇したが, $Q_v=1.0 \text{ ml/min}$ の場合には流通量が吸着剤の 20 倍,

すなわち、容積比 $v/v=20$ となっても約97%が除去されている。二種の流速速度のうち、遅いほうが吸着効率が良好である。

④臨床応用する場合を想定してrecirculating adsorption testを施行した(図12, $n=15 \times 2$)。条件は次のとおりである。Columnの内径は10mmで、このcolumnの断面積の40倍の断面積をもつcolumnが通常、臨床的に使用可能な内径65mmのcolumnである。

$Q_u=0.5\text{ml/min}(\times 40=20\text{ml/min})$ とし、cabinへの封入試料は80ml($\times 40=3200\text{ml}$)とした。Columnに充填したPC-2の量は2.5mlと7.5ml($\times 40=100\text{ml}, 300\text{ml}$)の二通りに設定した。流通開始後、120分で36%まで β_2 -MG濃度の低下を認め、充填量の差は β_2 -MGの低下の度合に影響しなかった。

(3) 尿 β_2 -MGに対する吸着能と血清 β_2 -MGに対する吸着能を比較した。図10の尿における容積比 $v/v=3$ 場合の単位吸着容量と、図8の血清における個々の単位吸着容量($v/v=3$)を同時にプロットして示した(図13, $n=4+10$)。各プロットは同一の直線上に存在した。

Anti-AchR Abに対する吸着能について

- (1) 重症筋無力症(myasthenia gravis;MG)患者の血清を対象としてbatchwise adsorption testによりanti-AchR Abの初期濃度と吸着能の関係を検討した(図14, n=7). 容積比 $v/v=3$, 120分の条件下ではanti-AchR Abの初期濃度が240pmol/mlまではほぼ100%の吸着率を示し, 初期濃度が上昇するにつれて吸着率は下降するが初期濃度が7900pmol/mlという高濃度であっても56.3%の吸着率を示した.
- (2) Batchwise adsorption testによる吸着能の経時的变化を検討した(図15, n=5×2). 臨床的にみられるMGの血中anti-AchR Abの濃度は, ほとんど100pmol/ml以下であることが多いのでanti-AchR Abの初期濃度を120pmol/mlとし, 容積比 $v/v=3$ の条件下で経時的变化を追った. ほぼ30分以内に吸着が平衡に達した.
- (3) 初期濃度と単位吸着容量の関係は, 容積比 v/v が一定の条件下では初期濃度の上昇にともない吸着量が増加し, 初期濃度が一定の条件下でも容積比 v/v の上昇にともなって吸着量が増加し, この傾向は β_2 -MGの場合とほぼ同様であった(図16, n=6×3).
- (4) β_2 -MGと同一の条件下でanti-AchR Abに対して recirculating adsorption testを施行した(図17, n=5×3). Columnに充填したPC-2の量は7.5ml(×40=300ml)である. ここでは吸着能を流通120分後の吸着率で表示した. Anti-AchR Abの初期濃度が100pmol/mlでは約60%の吸着率を示し, 初期濃度の上昇にともない吸着率は下降した.

自己免疫疾患患者のその他の血中病因物質に対する吸着能について

自己免疫疾患患者(SLE, rheumatoid arthritis)の血清を対象として batchwise adsorption testにより血中の病因物質に対する吸着能を検討した(図18, $v/v=3$)。抗核抗体, 抗ds-DNA抗体, 免疫複合体, IgG型rheumatoid factor(IgG-RF)に対する吸着率は, それぞれ $81.3 \pm 0.4\%$, $74 \pm 3.8\%$, $57 \pm 12.6\%$ ($n=12$), $60 \pm 6.5\%$ ($n=7$)であった。図には示さなかったが抗甲状腺グリアン抗体に対しては約75% 抗チログリアン抗体に対しては約50%の吸着能を認めた。

Freundlich式によるPC-2の吸着能表現について

図10に示すように吸着が平衡状態まで達した場合, 吸着剤の単位吸着容量は, 初期濃度, 及び容積比 v/v の二つに依存する。しかし, 本来, これらのパラメータは連続量であるから統計学的処理により一般式を求め, 他の吸着剤との間で吸着能の比較ができることが望ましい。

Freundlichによれば²⁾,

X: 平衡状態における液相濃度

Y: 単位吸着容量

として, $Y = k X^m$ ($0 < m < 1$) ----- * が成り立つ。

この式は単位吸着容量Yが, 平衡状態における液相濃度Xのみに依存していて, 個々の実験で変りうる初期濃度, 容積比には依存しないことに特徴があり, mが小さい程親和性が強く, kが大きい程単位吸着量が多いことを意味している。

*式の両辺の対数をとることにより

$$\log Y = \log k + m \log X$$

となるから, 最小2乗法で $\log X$, $\log Y$ に回帰する直線を求めることにより*式を求めることができる。

ここではIgG, β_2 -MG, anti-AchR Abの三者に対するFreundlichの式を示した(図19)。

IV 生体適合性に関する実験方法と結果

1 実験方法

(1) イヌによる体外灌流実験 (heparin系)

図20に示す回路を使用しPC-2が生体に及ぼす影響；主として血球成分、および生化学的因子の変動を検討した。

雑種成犬 (BW:10~22kg)の頸動脈から導血しplasma separator (PropyrexTM)により血漿を分離し、PC-2を200ml充填した内径55mmのcolumnを通過させた。通過後はもどる血液と混合し頸静脈に返血した。抗凝固剤としてはheparinを使用し、灌流の開始時に2000単位を導血側回路に投与し、灌流中は毎時1000単位の割合で投与した。導血流量は80~100ml/minで、血漿流量は20ml/minで灌流可能であった。灌流開始後に導血側から30分ごとに試料の採取をおこなった。

(2) イヌによる体外灌流実験 (citrate系)

PC-2が凝固線溶系に及ぼす影響を検討するためには、その測定原理からheparinを使用しない体外灌流系を用意する必要があるが、抗凝固剤をcitrateとし、図21に示す体外灌流系で検討した。

図21に示すように、3.8%のcitrate sodiumを8ml/min (導血流量の約1/10量)の注入速度で導血側回路に注入した。このcitrate注入による容量増加に対しては、返血側に組み込まれたPAN膜により、citrateの注入速度と同じ速度で除水を行なうことにより、灌流血液量を一定に維持した。また返血側でcalcium gluconateを0.8ml/min (citrate注入速度の1/10量)で注入し、体外回路のみの局所的なcitrate化とした。ただし灌流中はHemochron timeをモニターし、注入すべきcalcium gluconateの量を微調整した。灌流開始後に導血側から30分ごとに試料の採取をおこなった。

なおイヌによる体外灌流実験では直腸温をモニターしながら加温装置を使用して灌流中の体温の低下を防止した²⁾。また吸着剤充填columnを装着せずにplasma separatorによる血漿分離のみをおこなったものを対照として置いた。

(3) 健常者血清による補体活性化の検討

健常者の血清を対象として、PC-2による補体の活性化をbatchwise test($v/v=3$)により検討した。同時に、臨床的に既に使用され安全性が高いとされているIM-PHTMについても同じ条件で検討し比較した。

2 結果

イスによる体外灌流実験では各測定項目の時間経過にともなう測定値の表示は、灌流開始直前の値に対する変動率(%)とし、有意差検定は、各測定時刻に測定値の変動率について対照群との間でt検定によりおこなった(表2)。

(1) Heparin系について

対照群と実験群の間で、白血球、血小板及びNa, K, Ca, Crにはその変動率に有意差を認めなかった。ここでは示さなかったが、その他の生化学的因子、GOT, GPT, γ -GTP, Alp, LAP, LDH, T-chol, T-bil, BUNについても変動率に有意差を認めていない(図22, $n=8$)。

(2) Citrate系について

実験群でFibが灌流開始後30分で、Factor IIが30分、60分で有意に減少した($p<0.05$)が、PTには有意差を認めなかった。ATIII, HPTは有意差を認めずFDPは有意に減少した($p<0.05$)。

また、Factor X IIは30分、60分で有意に減少した($p<0.03$)が、APTTは30分、60分で延長してくるものの有意差を認めなかった(図23, $n=6$)。

(3) 補体の活性化について

対照群、PC-2群、IM-PH群の三群間で、検討した項目であるC3, C4, CH50, C1q, C3a, C4aは120分まで著明な差異を認めなかった。またC5aはいずれの測定時刻でも検出限界以下であった(表3, $n=4\times 3$)。

V 吸着機構の解析

以上、PC-2の吸着特異性、吸着能、生体適合性に検討を加えてきたがここでPC-2の吸着機構について、ヒトIgGを試料として検討した。

1 実験方法

Liquid chromatography system(FPLCTM; Pharmacia社製, Sweden)にPC-2充填columnを組み込み、試料の吸着・脱着を経時的に測定することによって吸着機構を解析した(図24)。注入された試料は後方のpumpで送られたbufferによりcolumnを通過するが、columnで吸着されなかった試料、およびcolumnから脱着してくる試料の両者が前方のdetector(UV280)により検出され経時的に記録される。

またCentral Processing Unitにあらかじめ組み込んだプログラムでpump A, Bの流速を制御してbuffer Aとbuffer Bの混合比を変えて種々の脱着条件を設定できる。なお、以下のFPLCTMによる実験では、内径2mmのcolumnにPC-2を0.25ml充填した。

(1) 脱着条件の検討

5mg/mlのIgGを0.5ml注入したのちbuffer Aとして0.1M phosphate buffer pH7.4を用い、最初の5分間はbuffer Aのみを流通し吸着させさらに未吸着のIgGを洗浄した。したがって最初の5分間におけるピークはいずれの場合も、未吸着のIgGによるものである。

続いて、PC-2とIgGの間の相互作用に影響を及ぼすbufferをBとして10分間でgradient(0-100%)をかけながら流通させ、さらに3分間、buffer Bのみを流通させて脱着量を測定した。したがって5分以降のピークはIgGの脱着によるものである。ただし、流速はいずれの場合も1.0ml/minとなるように制御した。Buffer Bとしては、

- ① 静電的相互作用による吸着を阻害する3M NaCl,
- ② 疎水的相互作用による吸着を阻害する3M NaSCN,
- ③ 水素結合による相互作用を阻害する8M ureaを用いた⁷⁾。

なお、columnにPC-2を充填せずにbuffer Aのみを流速1.0ml/minで18分間流通させた場合を対照とした(図25)

(2) 相互作用の再現性の検討

同一のcolumnを用いて吸着・脱着を繰り返しおこないPC-2とIgGの相互作用の再現性を検討した(図26)。

(3) IgGの配向部位の検討

IgGの各fragmentである $F(ab')_2$, Fab, Fcに対する吸着・脱着の挙動をみてPC-2によるIgGの配向部位を検討した(図27)。

なお、この実験では2.5mg/mlのfragmentを0.5ml使用した。

2 結果

(1) 脱着条件について

- ①実験群はいずれも対照に較べて約65%の吸着を示した(最初の5分間における $\Delta\epsilon$ の積分値の差が吸着量を示す)。
- ②3M NaClのgradient負荷により脱着を認めなかった。
- ③3M NaSCNのgradient負荷により0.8Mから脱着をはじめ1.2Mを $\Delta\epsilon$ として吸着量の約85%が脱着した。
- ④8M ureaのgradient負荷により2.4Mから脱着をはじめ4.2Mを $\Delta\epsilon$ として吸着量のほぼ全量が脱着した(図25)。

(2) 相互作用の再現性について

同一のcolumnを用いて吸着・脱着を繰り返しても、吸着率の劣化を認めず、この相互作用の再現性は良好であった。10回の吸着・脱着操作(脱着は8M ureaによる)後も61.5%の吸着率を認めた(図26)

(3) IgGの配向部位について

$F(ab')_2$, Fab, Fcの吸着率はそれぞれ84.7%, 55.7%, 58.8%で $F(ab')_2$ が最も高く8M ureaによる脱着率はそれぞれ18.0%, 31.5%, 42.3%で、 $F(ab')_2$ が最も低かった(図27)。

VI 考察

一般に吸着剤の吸着原理には生物学的相互作用を利用したものと、物理化学的相互作用を利用したものがある。

生物学的相互作用を利用した吸着剤は、生物学的な特異的親和性に基づくのでその吸着特異性がすぐれているが、多くは生理活性をもつ生体分子をligandに用いるため、原料の精製、保存における活性の安定性に難点がある。また、血液との接触により本来の目的とする親和力の他に、補体の活性化をはじめとする副次的な機能が発現し、副作用が起こり得る。さらに、ligandが血中に溶出した場合はほとんどが異種の蛋白であるため長期にわたる治療では異種蛋白の抗原性が問題となりうる。一方、物理化学的相互作用を利用した吸着剤は、一般に吸着特異性は劣るがその活性は安定していて、保存、滅菌操作などによる変化を受けにくく、大量合成が可能である。したがって、臨床的に汎用するためには、吸着特異性と生体適合性にすぐれた物理化学的相互作用による吸着剤の開発が望まれてきた。

従来から選択的吸着能をもつ吸着剤は一般に、担体-spacer-ligandという構造をもち、吸着現象は先端のligand部位での親和力によりおこるので、この構造は吸着剤に必須であると考えられてきた。

吸着剤PC-2はSephacrose CL-4B™に対してHMDIにより架橋構造を賦与した物理化学的相互作用による吸着剤である。ここでSephacrose CL-4B™はPC-2の担体であり、PC-2は担体自体の物理的構造を変えることにより吸着能をもたせたもので、特別なligandを必要としないという従来の吸着剤にはなかった著しい特長をもつものである。PC-2は合成過程が短く比較的単純な構造であるにもかかわらず、本研究で明らかにしたように、 β_2 -MG, anti-AchR Ab, 抗核抗体, 抗ds-DNA抗体, 免疫複合体, IgG型rheumatoid factorなどの多様な病因物質に対する吸着能があり、しかも生体適合性にすぐれているものである。

Batchwise adsorption testによるスクリーニングではIgGに対する吸着能が高く、PC-2はIgG型の抗体、あるいはIgGと構造が類似している病原体物質が吸着の対象となると考えられた。

β_2 -MGは、主要組織適合抗原であるMHC-class I 抗原のL鎖で、可変部分をもたず、抗原決定部位をもつH鎖とは非共有結合している。そのX線結晶構造解析の結果によると基本骨格はIgGのdomainとまったく同じである⁷⁾。

PC-2はbatchwise adsorption testによるスクリーニングで β_2 -MGに対して吸着能を認めた。さらに詳細に検討すると、たとえば、患者の血中 β_2 -MG濃度が50mg/lであり、吸着剤を100ml使用して3000mlの血漿を浄化する(すなわち容積比 $v/v=30$)ことを目標にした場合、単位吸着容量は約750 μ g/ml・Adsが期待されることになる。

また、single passing adsorption testではcolumn流入口の濃度が29.6mg/lの条件で、流量が吸着剤の20倍(容積比 $v/v=20$)となっても約97%が除去されている。一方recirculating adsorption testによれば、初期濃度24.5mg/l、流量20倍の条件下で約40%まで低下を認めた。

一般に、吸着が平衡に達するまでには一定の時間を要するが、灌流実験で流通速度を下げた方が吸着効率がより良好であるのはcolumnに充填された吸着剤の粒子間隙への浸透、拡散がよくなり、"より時間をかけた"吸着をみている結果と考えられる。

また、 β_2 -MGの吸着能に関する実験は全て尿を用いて結果を得たので血中の β_2 -MGに対する吸着能との相関をみておく必要がある。容積比 $v/v=3$ の条件で初期濃度と単位吸着容量の関係は、両者が同一の直線上にのることから、任意の β_2 -MG濃度におけるPC-2の吸着能に差はなく、したがってPC-2の β_2 -MGに対する吸着能は、慢性腎不全患者血中の高濃度BUN、Cr、及びその他の蛋白質成分の存在に影響を受けることはなく、その吸着性はきわめて高い特異性を持っていると考えられた。

アミノト*症は腎不全患者の長期にわたる透析療法に伴って起こる合併症の一つである。骨、関節、神経系にアミノト*の沈着をおこし、手根管症候群をはじめとする様々な臨床症状を呈す^{9,10)}。アミノト*沈着物の分析ではアミノト*蛋白N末端のアミノ酸配列は β_2 -MGと同じであり¹¹⁾、 β_2 -MGはアミノト*のprecursorと考えられている。 β_2 -MGはMHC-class I抗原の分解に伴って血中に遊離してくるが、透析では除去されにくくuremic toxinの一つと考えられている。したがって、 β_2 -MGをいかに効率よく除去するかが、臨床的に重要な問題として注目をあびてきている。近年、所謂high performance membraneが開発され β_2 -MGの除去効果をあげつつある¹²⁾が、吸着剤を用いた試みもなされてきた。Akizawaら¹³⁾は直接血液灌流法が可能なmethylnmethacrylateの誘導体による吸着剤で β_2 -MG除去の試みを報告した。容積比 $v/v=12$ 、初期濃度40mg/lの条件下で、単位吸着容量が約400 μ gと報告しているが、これはPC-2とはほぼ同様の吸着能と考えられる。現在のところ、PC-2は粒径が小さいため血液の直接灌流が不可能なので、粒径の増大化、ポライミソクを工夫するなどして直接灌流が可能となる条件を検討している¹⁴⁾。

また、PC-2はmyasthenia gravisの血中にみられるanti-AchR Abに対する吸着能がある。本研究の結果から、たとえば、患者の血中のanti-AchR Ab濃度が120pmol/mlで、吸着剤を100ml使用し2000mlの血漿を浄化する（すなわち容積比 $v/v=20$ ）ことを目標とした場合、単位吸着容量は約1000pmol/ml・Adsが期待されることになる。さらに、抗核抗体、抗ds-DNA抗体、免疫複合体、IgG型RFに対する吸着能がある。以上より、既存の治療に抵抗性のmyasthenia gravis, SLE, rheumatoid arthritis, およびその他の自己免疫疾患がPC-2による吸着療法の適応となると考えられる。免疫機構の破綻によって起こる自己免疫疾患患者の血中には、種々の自己抗体が病因物質として検出される。自己免疫疾患はsystemic diseaseで、自己抗体の血中濃度は一つの臨床的な指標であり、臨床上の重症度とは必ずしも相関するとは限らないが吸着療法が臨床症状の改善を認める場合がある^{1,15,16)}。

イヌによる体外灌流実験で生体適合性を検討したが、Heparin系による血球、生化学的因子の検討では変動には有意差を認めなかった。Citrate系による凝固系の検討では、外因系及び内因系の双方を検討する必要がある。外因系の凝固因子であるFib, Factor IIが有意に減少したにもかかわらず、それを総合的に評価するPTは影響をうけなかった。また、内因系の凝固因子であるFactor X IIが有意に減少したためAPTTが延長してくる傾向がみられたが、有意差は認めなかった。

Factor X IIは所謂Hageman因子で内因系の凝固機構において凝固の引きがねとして最初に活性化されるもので、異物認識能及び異物反応性の高いFactor X IIはPC-2に吸着され減少したものと考えられる。

補体の活性化は生体適合性を検討する上で凝固系と同様に重要な問題である。PC-2は架橋構造の形成に与らなかったSephacrose CL-4B™由来の硫酸基をもっていて補体を活性化する可能性があったが、臨床的に既に使用され安全性が高いと評価されているIM-PHT™との比較では補体の変動に差異を認めなかった。

吸着剤を実際に臨床応用する場合には、生体適合性に加えて安全性についても厳しい基準が課せられている。具体的な結果については省略したが、PC-2については厚生省の基準を上まわる条件を設定し試験をおこない、全ての検査項目に合格している。臨床に供するにあたって、この試験は最終完成カラムに対してだけではなく、各工程段階で繰り返しおこなっている。また全ての工程を無菌的におこない、エンドトキソンの混入がないように配慮している。

以上の生体適合性、安全性の検討からPC-2は臨床例における灌流中に急性の副作用がおこることはないと判断した。

PC-2の吸着機構についてはliquid chromatography(FPLCTM)によりIgGを試料として解析した。一般に吸着剤と病因物質との物理化学的相互作用は静電的相互作用、疎水の相互作用、及び水素結合による相互作用がありうるとされる³⁾。したがって、IgGをPC-2に一度吸着させたのち上記の相互作用を阻害するbufferを作用させてIgGの脱着挙動をみることによりその相互作用、及び吸着機構を解析できる。

本研究の結果では、PC-2によるIgGの吸着は静電的相互作用によるものではなく、主として疎水の相互作用および水素結合による相互作用であることが解析された。PC-2は親水性のSephacryl CL-4BTMに疎水性を与えることにより吸着能を獲得したが、この結果から疎水性部分が存在することが吸着能の獲得にとって必要ではあるが、残存した親水性部分の水素結合による相互作用が共に大きな影響をあたえていることが分かる。これらのことを総合的に考慮すると、本質的にはこの両者が適切なバランスで存在することが必要であると結論され、この時IgGに対して吸着に必要な立体配向をとらせることができると考えられる。

"適切なバランス"とはIgGに対する架橋Sephacryl CL-4BTMの吸着能からみて、元素分析でN含量が約5.5%の架橋密度の時に得られるとしてよい。具体的にはこの疎水の相互作用は架橋構造の744Å鎖とIgGの疎水部分との相互作用で、水素結合はIgGとSephacryl CL-4BTMに存在する水酸基間に働いていると考えられる。また、この相互作用は吸着・脱着を繰り返しても吸着率の劣化を認めず、相互作用の再現性は良好であった。したがって、適切なbufferにより洗浄を繰り返すことによって吸着能の回復を図ることができ、これは臨床的に有用な方法といえる。ここで、PC-2のIgGの配向部位を詳細に検討しておくことは今後の吸着剤の開発にとって重要なことである。IgGのfragmentであるF(ab')₂は他のfragment、Fab、Fcに比べて、吸着されやすく脱着されにくかった。すなわち、PC-2はF(ab')₂に対して相対的に高い親和性を持っているので、IgGの主な配向部位はF(ab')₂部位に存在すると考えられる。

吸着剤が選択的吸着能をもつためには、ligandが存在することが必ず必要とされるのではなく、ligandが示す物理化学的相互作用をおこさせることが本質的に必要な条件である。本研究では、担体自体に疎水性部分と親水性部分を適切なバランスで持たせることにより選択的吸着能をもち、しかも、ligandを必要としない吸着剤を得ることが可能であることを明らかにした。

すなわち、吸着剤PC-2は、吸着現象をligandでの局所的な現象としてではなく、担体全体における現象と捉えるという視点から開発してきたものである。この設計思想は、担体-spacer-ligandという構造が吸着剤に必須であるという、従来から基本的とされてきた設計思想を超えるものである。このような新しい視点にたった設計思想に基づく吸着剤の開発には種々の材料の組合せがありうるので今後、発展性があると考えられる。

また、免疫関連疾患ではその病因物質が想定されてはいるが、実際には因果関係があきらかではないことも多い。新しい吸着剤の開発は治療に役立ることが第一義的な目的ではあるが、そののみならず、臨床的に有効性が示された症例から、病因物質を単離精製することが可能であり病因物質の究明に大きく貢献するものと考えている。

なお、PC-2による臨床治験を施行中で、rheumatoid arthritis、myasthenia gravisの患者に対する治験では、その臨床症状に改善を認め、このような新しい吸着様式による吸着剤が実際に、臨床的に有用であることを確認している。

VII 結語

1 選択的吸着能をもつ吸着剤は一般に、担体-spacer-ligandという構造をもち、吸着現象は先端のligand部位での親和力によりおこるため、この構造は吸着剤に必須であると考えられてきた。新しく開発した吸着剤PC-2は担体自体の物理的構造を変えることにより吸着能をもたせたもので、特別なligandを必要としないという従来の吸着剤にはなかった著しい特長をもち、全く新しい吸着様式による吸着剤である。

2 吸着剤PC-2は、架橋agaroseであるSepharose CL-4BTMに hexamethylenediisocyanate(HMDI)により更に架橋構造を賦与して得られる。PC-2は、担体Sepharose CL-4BTM自体に吸着能をもたせたもので、物理化学的相互作用を利用しているがligandを必要とせず構造が単純であるので、合成過程が短く大量合成が容易である。

3 吸着剤PC-2はin vitroにおいて、IgG、 γ ミグロブリンにみられる β_2 -microglobulin、さらに、myasthenia gravisにみられる抗アセチルコリン受容体抗体をはじめとして、その他の自己免疫疾患にみられる抗核抗体、抗ds-DNA抗体、免疫複合体、IgG型rheumatoid factorなどの病原因物質に対する吸着能があり、生体適合性がすぐれているので臨床応用が可能な吸着剤である。

4 吸着剤PC-2の吸着機構を解析し、担体が疎水性部分と親水性部分を適切なバランスで持つことが、選択的吸着能を獲得する上で本質的に必要な条件であることを明らかにした。

PC-2の臨床的有用性について確認しつつあり、このようなligandを必要としない吸着様式に基づく吸着剤は今後、発展性があると考えられる。

謝辞

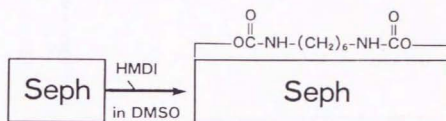
稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲をいただきました秋山暢夫教授に深甚なる謝意を表します。設計から吸着機構の解析にいたるまでご指導くださった宇部興産千葉研究所主任研究員の谷岡力夫、斎野猛司、鶴納英樹、池田博之の各氏に深謝いたします。

また、終始、ご協力いただいた東京大学医科学研究所人工臓器移植科の諸兄、いつも献身的に動物実験に参加してくださった実験主任の板垣経子、竹村富美代の各氏に深謝いたします。

VIII 文献

- 1) Z. Ymazaki, Y. Idezuki, N. Inoue, H. Yosizawa, N. Yamawaki,
K. Inagaki, N. Tsuda:
Extracorporeal immunoadsorption with IM-PH or IM-TR column.
Biomat Art Cells Art Org 1989;17:117-124
- 2) 三田勲司, 大坪 修, 原 茂子, 高井信治, 坂本永吉,
下村泰志, 谷岡力夫, 斎野猛司, 鶴納英樹, 秋山暢夫:
吸着剤PC-1の吸着能, 及び生体適合性に関する基礎的研究.
人工臓器 1989;18:1435-1439
- 3) 山崎善弥, 山脇直邦: 血液浄化用アフィニティ吸着材.
人工臓器 1983;12: 895-907
- 4) 前田憲志: 免疫吸着法の現況と将来.
治療学 1986;16: 452-455
- 5) 遠藤 勲, 大矢晴彦, 左右田健次, 橋本勉:
アフィニティクロマトグラフィ.
バイオ分離工学ハンドブック, p150, サイエンスフォーラム, 1988
- 6) 吉岡豊一, 岡 藤太郎, 花沢一芳, 遠藤善裕, 松田孝一,
谷 徹, 小玉正智, 福井 清, 服部博行:
生体適合性を検討する体外循環実験の盲点.
人工臓器 1986;15:1591-1595
- 7) 堀尾武一, 山下仁平: 蛋白質のアフィニティクロマトグラフィ.
蛋白質・核酸の基礎実験法, p153, 南江堂, 1981
- 8) 荒田洋治: 免疫グロブリンの高次構造と機能.
蛋白質・核酸・酵素 1986;31:782-797
- 9) 衣笠えり子, 北岡建樹, 越川昭三: 透析アミロイドーシス.
腎と透析 1988;24:67-72
- 10) William J. Stone, Raymond M Hakim:
Beta-2-microglobulin amyloidosis in long-term dialysis
patients.
Am J Nephrol 1989;9:177-183

- 11) Gejyo F, Yamada T, Odani S:
A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β_2 -microglobulin
Biochem Biophys Res Commun 1985;129:701-706
- 12) 唇口俊秀, 酒井清孝:
新しく開発された再生セルロース透析膜の β_2 -microglobulin 透過係数
腎と透析 (別冊) ハイパフォーマンスメンブレン 1989;27:57-59
- 13) T. Akizawa, E. Kinugasa, T. Kitaoka, S. Kosikawa, N. Nakabayasi, H. Watanabe, N. Yamawaki, Y. Kuroda:
Removal of beta-2-microglobulin by direct hemoperfusion with a newly developed adsorbent.
Trans Am Soc Artif Intern Organs 1987;33:532-537
- 14) 飯塚一郎, 山崎善弥, 金井福栄, 平石 守, 和田達雄, 高浜竜彦, 浅野献一, 市川久志, 井上 昇, 山脇直邦, 稲垣健二, 津田信明: 免疫複合体吸着材 I M P の直接血液灌流.
人工臓器 1984;13:993-996
- 15) Z. Yamazaki, Y. Fujimori, I. Iizuka, F. Kanai, Y. Idezuki, T. Takahama, K. Asano, K. Takahashi, T. Ogita, Y. Miyamoto, N. Yamawaki, H. Yosizawa, K. Inagaki, N. Tsuda:
Effect of immunoadsorption on patient with rheumatoid arthritis or SLE.
Trans Am Soc Artif Intern Organs 1984;30:211-216
- 16) S. Passalacqua, G. Splendiani, A. Sturniolo, S. Costanzi, G. Barbera, E. Bartoccioni, A. Evoli, C. Scoppetta, D. Adorno, S. Di Giulio, C. U. Casciani:
Immunosorbent treatment in myasthenia gravis.
Prog Clin Biol Res 1990;337:285-288



Seph : Sepharose CL-4B

HMDI : Hexamethylenediisocyanate

DMSO : Dimethylsulfoxide

Figure 1. Conceptual flow of preparing PC-2

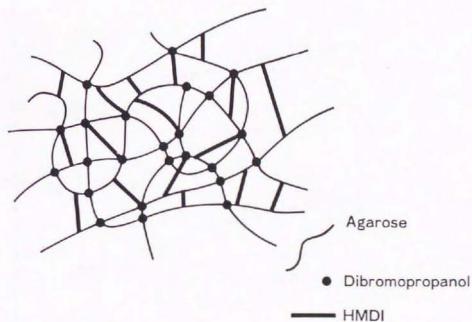


Figure 2. Schematic structure of PC-2

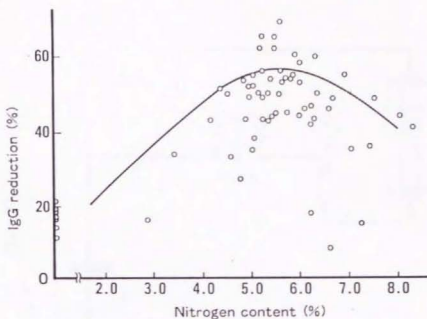


Figure 3. Relationship between nitrogen content and IgG adsorption rate

(宇部興産・千葉研究所資料による)

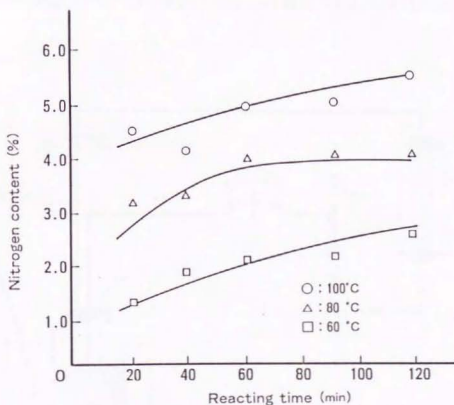


Figure 4. Relationship between reacting time and nitrogen content

Condition of reaction

- Sepharose CL-4B : 100g
- HMDI : 340mmol

(宇部興産・千葉研究所資料による)

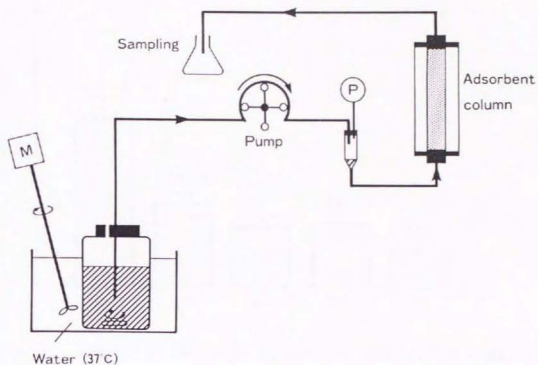


Figure 5. Single passing system for adsorption test

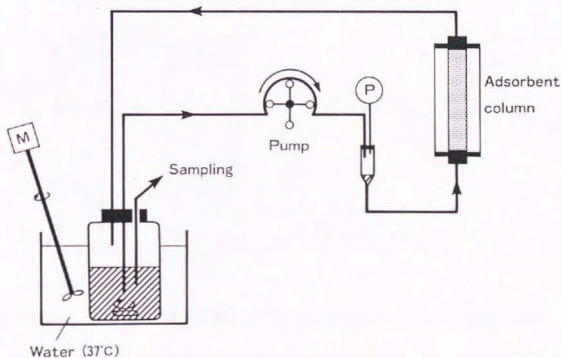


Figure 6. Recirculating system for adsorption test

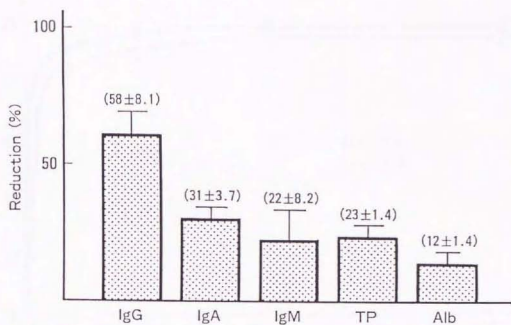


Figure 7. Change of IgG after batchwise adsorption test

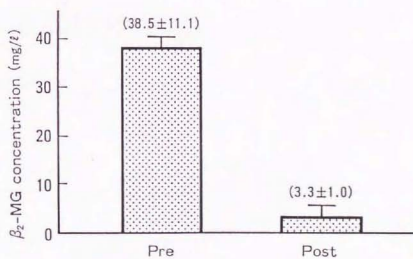


Figure 8. Change of β_2 -MG after batchwise adsorption test

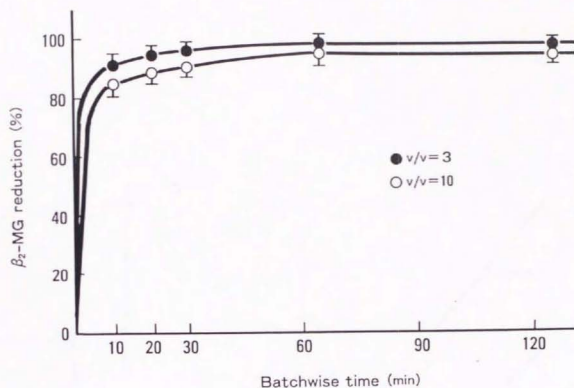


Figure 9. Time course study of β_2 -MG adsorption

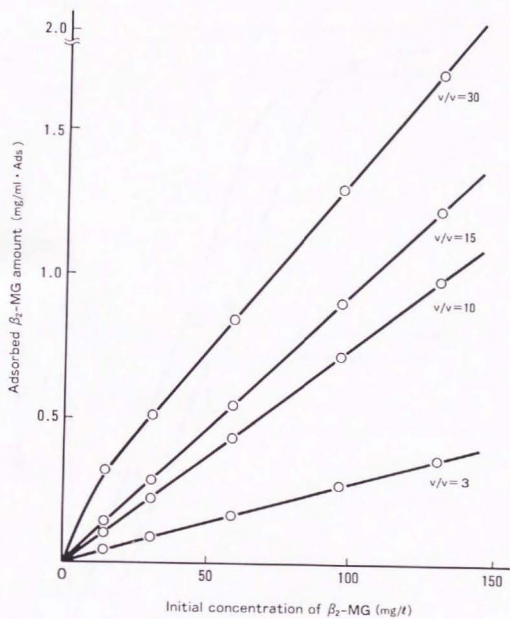


Figure 10. Relationship between β_2 -MG concentration and adsorption capacity

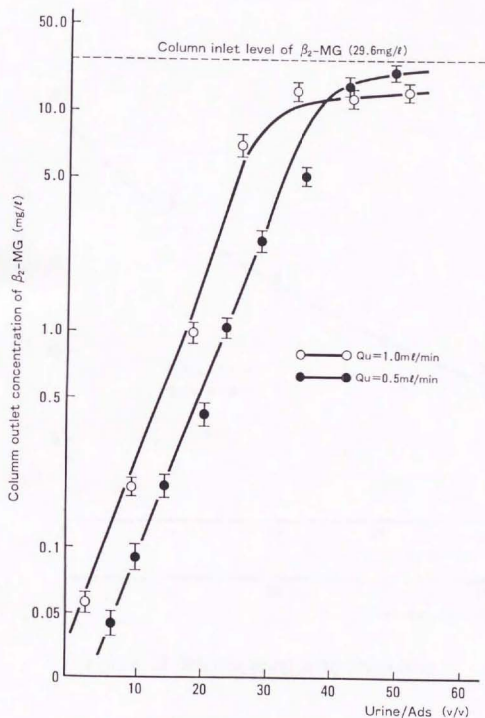


Figure 11. Single passing adsorption test

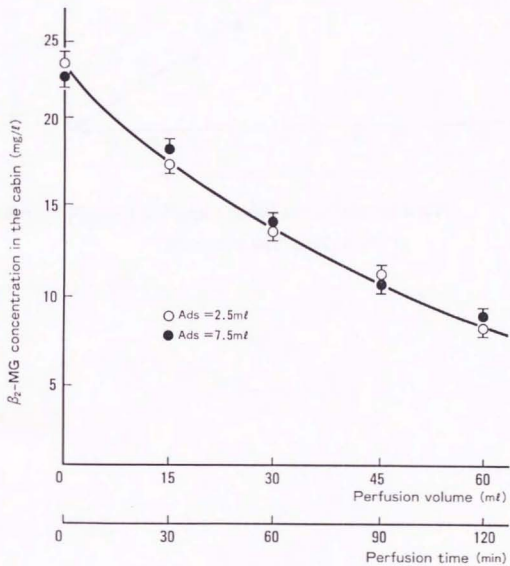


Figure 12. Recirculating adsorption test

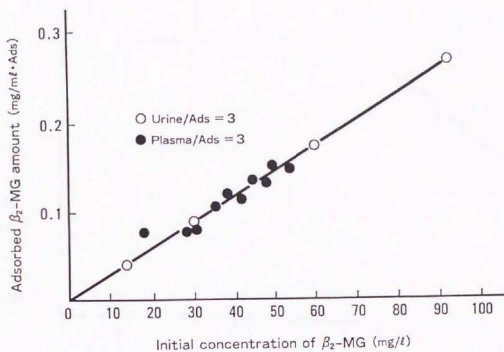


Figure 13. Plasma β_2 -MG adsorption capacity compared with that of urine

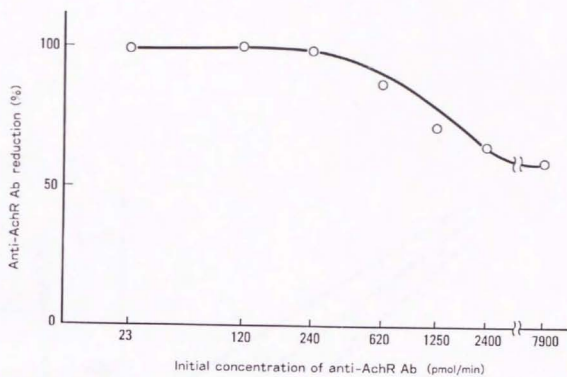


Figure 14. Relationship between anti-AchR Ab concentration and adsorption rate

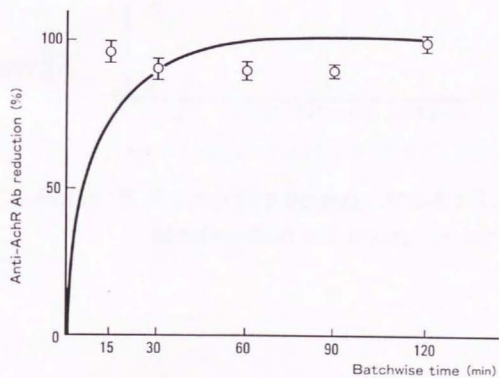


Figure 15. Time course study of anti-AchR Ab adsorption

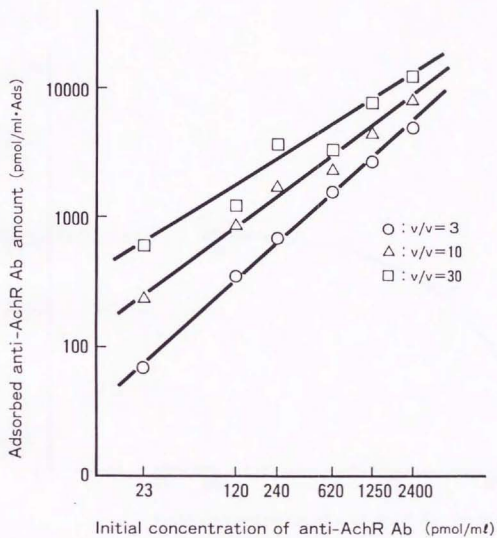


Figure 16. Relationship between anti-AchR Ab concentration and adsorption capacity

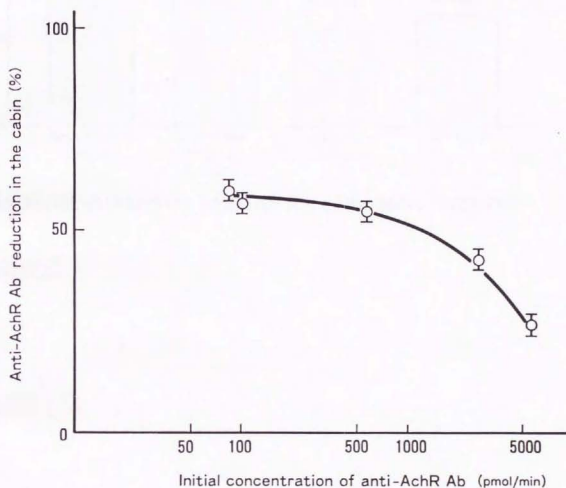


Figure 17. Recirculating adsorption test

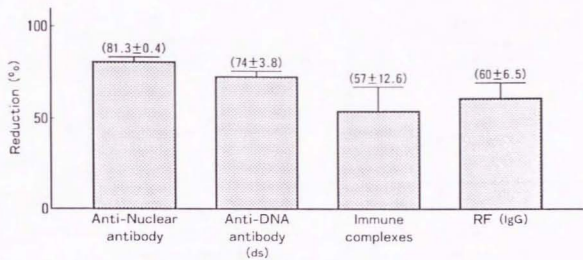


Figure 18. Adsorption capacity for pathogenic reactants

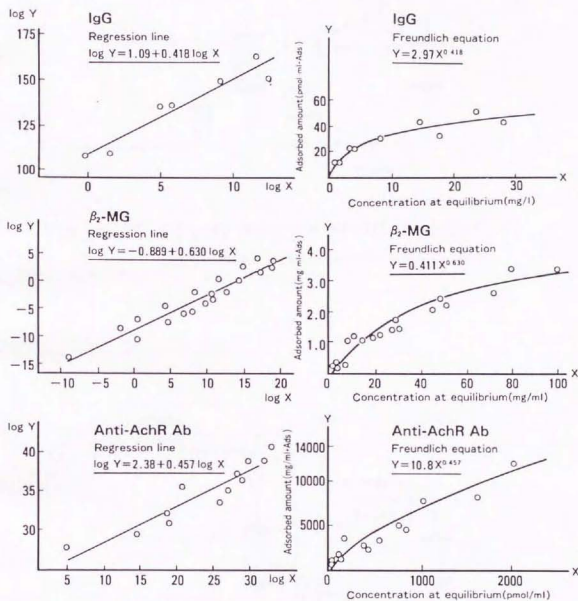


Figure 19. Adsorption capacity at equilibrium (IgG, β_2 -MG, anti-AchR Ab)

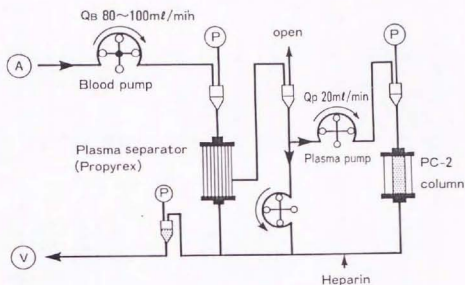


Figure 20. Circuit diagram of PC-2 plasma perfusion (systemically heparinized)

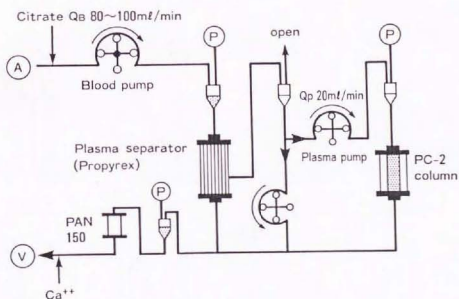


Figure 21. Circuit diagram of PC-2 plasma perfusion (regionally citrated)

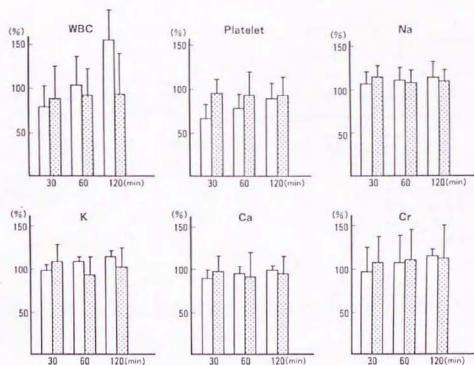


Figure 22.
Alteration of blood cells and biochemical components
during PC-2 plasma perfusion ex vivo

□ : Without PC-2 column (Control)
 ▨ : With PC-2 column

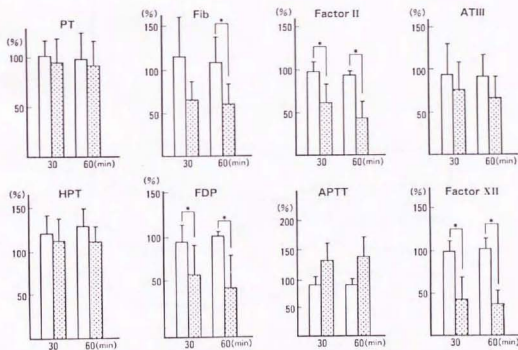


Figure 23.
Alteration of coagulation/fibrinolysis system
during PC-2 plasma perfusion ex vivo

□ : Without PC-2 column (Control) * : Significant ($p < 0.05$)
 ▨ : With PC-2 column

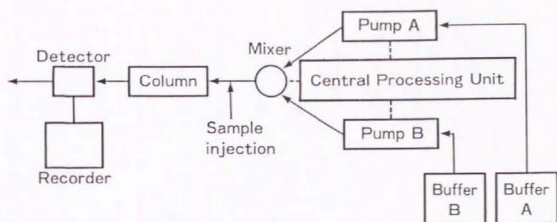


Figure 24. Liquid chromatography system (FPLC)

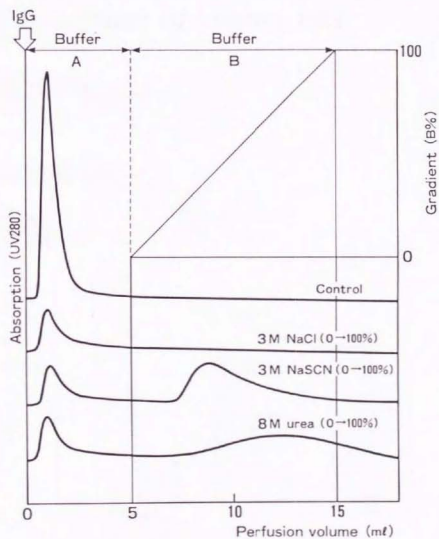


Figure 25. Adsorption-elution profile of human IgG (FPLC)

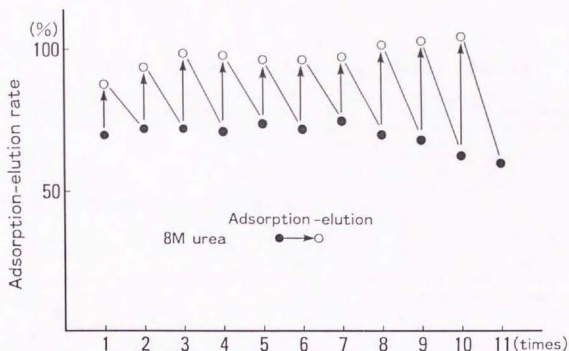


Figure 26. Consecutive adsorption-elution test of human IgG

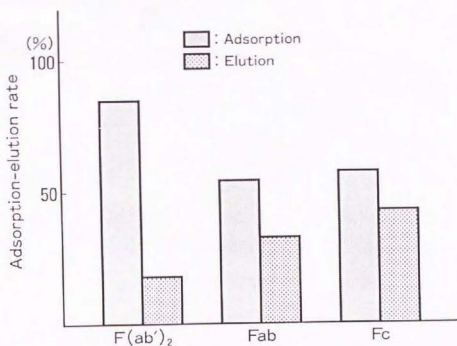


Figure 27. Adsorption-elution rate of human IgG fragment

Table 1. Affinity adsorbent for plasma cleaning

Type	Principle of adsorption	Binding affinity		Ligand	Adsorbent
1	Biological interaction	Ag - Ab binding	Antigen	DNA	
			Antibody	Anti-DNA Ab	
		Complement binding		C1q	
		Fc binding		Protein A	Prosorba
		etc		Polymixin B	PMX - F
2	Physico-chemical interaction	Ionic binding		Dextran sulfate	Lyposorber
		Hydrophobic binding		Tryptophan Phenylalanine	IM-TR IM-PH
3		Hydrophobic binding Hydric binding		—	PC-2

Table 2.

イヌによる体外灌流実験の有意差検定

○測定項目 X について実験群と対照群の間で
時刻 T min における有意差の検定は、測定
値の変動率について検定した。

○データ処理

〔1〕実験群

項目 X の測定値		
時刻	O min	T min
	X	→ y
	y/x × 100	
	X ₁ → y ₁	Z ₁ (%)
	X ₂ → y ₂	Z ₂
	X ₃ → y ₃	Z ₃
	X ₄ → y ₄	Z ₄
	X ₅ → y ₅	Z ₅

〔2〕対照群

項目 X の測定値		
時刻	O min	T min
	X	→ y
	y/x × 100	
	X ₆ → y ₆	Z ₆ (%)
	X ₇ → y ₇	Z ₇
	X ₈ → y ₈	Z ₈
	X ₉ → y ₉	Z ₉

t 検定

○検定はデータの処理によって得られた両群の
変動率 Z₁ ~ Z₅, Z₆ ~ Z₉ の間で、対応のない
t 検定をおこなって結果をえた。

(1) Control

	C3(μ g/dl)	C4(μ g/dl)	CH50(U/ml)	C1q(%)	C3a(ng/ml)	C4a(ng/ml)	C5a(ng/ml)
Pre	77.7	33.3	49.0	12.5	380	3200	<10
5 min	77.5	34.1	53.2	12.0	350	3800	<10
30	78.8	37.6	49.1	12.5	390	8100	<10
120	81.4	38.5	45.5	13.0	420	13000	<10

(2) PC-2

	C3(μ g/dl)	C4(μ g/dl)	CH50(U/ml)	C1q(%)	C3a(ng/ml)	C4a(ng/ml)	C5a(ng/ml)
Pre	77.7	33.3	49.0	12.5	380	3200	<10
5 min	73.4	34.2	44.1	13.0	310	2200	<10
30	74.0	33.2	43.3	14.0	330	10000	<10
120	73.4	32.0	42.1	13.0	390	9900	<10

(3) IM-PH

	C3(μ g/dl)	C4(μ g/dl)	CH50(U/ml)	C1q(%)	C3a(ng/ml)	C4a(ng/ml)	C5a(ng/ml)
Pre	77.7	33.3	49.0	12.5	380	3200	<10
5 min	75.1	32.6	44.5	13.0	290	2100	<10
30	76.4	32.1	43.5	12.0	330	10000	<10
120	72.3	33.7	41.5	12.5	350	11000	<10

Table 3. Complement activation by PC-2, IM-PH

