

氏名（本籍） 金子 和 裕

学位の種類 博士（薬学）

学位記番号 薬 第 478 号

学位授与年月日 平成 16 年 9 月 3 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 LPS 拮抗作用に基づく敗血症ショック治療剤を  
目指す E5564 の体内動態的特性解析

論文審査委員 (主査) 教授 山 添 康

教授 後 藤 順 一

助教授 眞 野 成 康

# 論文内容要旨

敗血症性ショックはその診断と治療の進歩にも関わらず、死亡率が30～50%と高く、未だ有効な手段が見出されていないため死亡者数も年々増加している。グラム陰性菌による敗血症性ショックは、外膜構成成分であるLPSによる各種サイトカインの急激な産生誘導によって引き起こされ、その活性本体はlipid A (Figure)という糖脂質である。

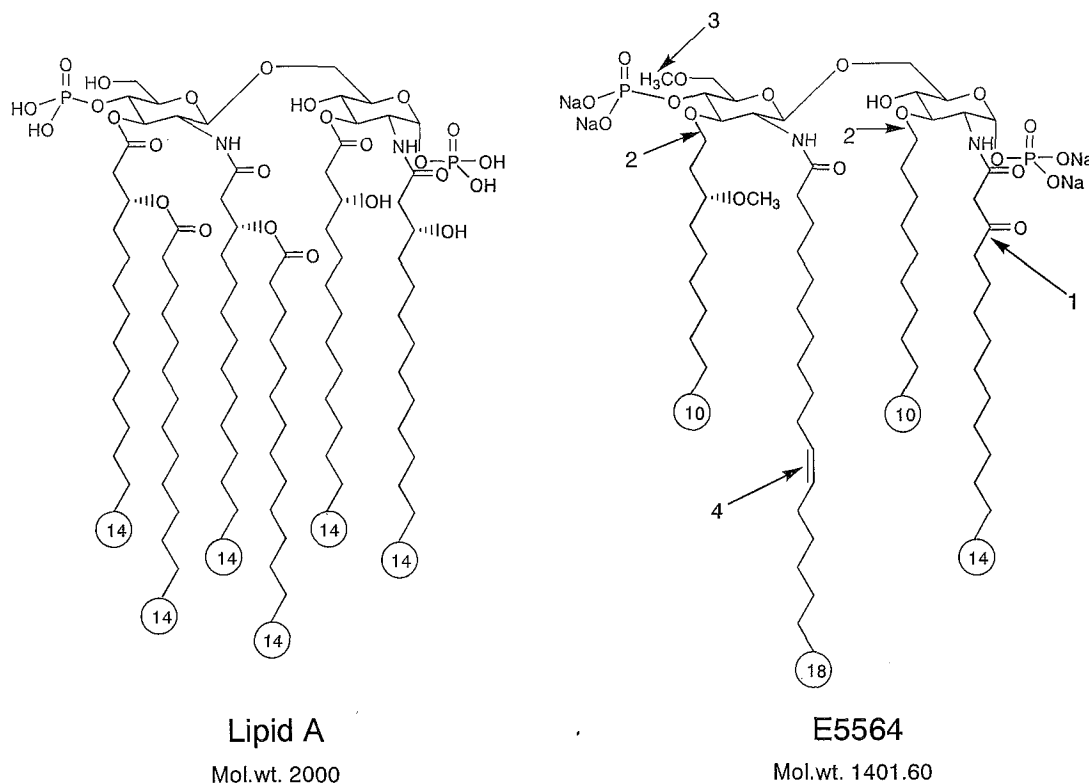


Figure 大腸菌 lipid A および E5564 の構造

近年になり、ある種の菌に含まれる lipid A の類縁体に無毒化しているものが発見されたことを受け、無毒化 lipid A である *Rhodobacter sphaeroides* lipid A をリードとして E5531、次いで E5564 (Figure) という 2 種の化合物が創製された。E5564 は E5531 の課題であった高コスト、難溶性を改善した化合物であり、ヒトエンドトキシンショックモデル病態で LPS に拮抗することが確認され、現在は敗血症ショック治療剤として開発中である。

## 血漿中 E5564 濃度測定法の確立

E5564 は LPS の定量法として知られているリムルス試験法で検出できるものの、この方法で LPS と E5564 を分離定量することは難しいと思われた。そこで、より特異性、再現性の高い定量法とするために HPLC を用いた定量法の開発を行った。

E5564 は lipid A と同様に糖脂質構造のため紫外可視吸収が少ないことから定量感度向上のために ADAM

試薬によって蛍光付加を試みた。なお、一分子のE5564に2分子のADAM試薬が付加されていることを確認した。

E5564を添加したラットもしくはイヌ血漿にE5564の構造類縁体を内部標準物質として添加した後に酢酸エチルエステルにて抽出し、ADAM試薬にて蛍光付加を行った。固相抽出にて粗精製した後に酢酸ナトリウムを含むメタノール/エタノールとODSカラムを組み合わせた逆相クロマトグラフィーで分離し、励起波長254 nm、蛍光波長415 nmで検出した。

血漿中にはADAM試薬と反応するリン脂質などが多量に存在しているものの、定量法の特異性には問題が無かった。日内変動、日間変動、検量線の直線性から血漿中E5564の定量範囲を30～20,000 ng/mLとした。ラットおよびイヌにE5564を単回静脈内投与(0.3 mg/kg)した後の血漿中濃度推移はいずれも2相性を示し、消失半減期はそれぞれ5.2、50.4時間であり、分布容積はそれぞれ81.1、77.1 mL/min/kgであった。

以上、lipid A類縁体の直接定量法を確立し、E5564のラット、イヌにおける血漿中濃度を測定した。なお、イヌにLPSを投与しE5564の拮抗作用を検討した場合でもLPS共存による測定系への影響は認められなかった。

#### ラットに<sup>14</sup>C-E5564を単回静脈内投与した時の血中濃度、分布、代謝および排泄

E5564のリードであるLPSは細網内皮系に特異的に集積し長期に渡って残留することが知られている。そこで放射性標識E5564を合成し、特異的な集積と残留性について検討を行った。

ラットにE5564を0.1、0.3、1 mg/kgの用量で単回静脈内投与した時の血漿中濃度推移は線形性を示した。線形性が確保できている0.5 mg/kgに<sup>14</sup>C-標識E5564の投与量を設定した。

<sup>14</sup>C-E5564は速やかに肝臓へ集積し、投与後24時間では投与放射量の67.81%が肝臓に集積していた。投与後48週においても副腎、骨髄、肝臓、脾臓、リンパ節では100 ng eq./g程度の放射能が検出された。肝臓に集積した放射性標識E5564は速やかに脱リン酸化反応を受け、長期に渡って残留した。

尿・糞中への放射能の排泄は緩徐ではあるものの、投与後48週までに投与量の72.07%が尿・糞中へ排泄された。排泄物中放射能の多くは未変化体の脱リン酸化体であり、肝臓中放射能の存在形態と一致していた。

これらの結果からE5564の体内動態はLPSと類似しているものの、肝臓への集積は相対的に緩徐であった。肝臓に残留する代謝物はLPS拮抗作用を失っているため、未変化体の持つLPS拮抗作用に基づく毒性発現を考慮する必要はないと思われた。

#### 血漿中におけるE5564の結合

E5564とLPSの体内動態的挙動は類似しているものの、E5564の血中からの消失はLPSに比べて緩徐であった。平衡状態においてE5564はLPSと同様にリポタンパクと結合し、この点に関しては両者に差異は無い。そこで、E5564とリポタンパクとの結合が平衡に至るまでの過程について検討し、LPSとの違い、血中からの消失の違いについて考察を行った。

LPSはLBPを介してリポタンパクと結合することからE5564についてもLBPとの結合性を表面プラズモン共鳴で検討した。その結果、E5564はLPSと同様にLBPと結合したが、その親和性はヒト血清アルブミンの100倍程度に過ぎなかった。

ヒト血漿に放射性標識E5564を添加しゲルろ過クロマトグラフィーにて分析したところ、放射性標識E5564は速やかに非HDLリポタンパク（LDL、VLDL etc）と結合し、その一部が経時的にHDLへと移行した。なお、アルブミンとの結合は観測されなかった。E5564のリポタンパクへの結合は論文報告されているLPSに比べて速かった。ヘパリン-マンガン沈殿法で放射性標識E5564を添加したヒト血漿を処理したところ、沈殿する非HDLリポタンパクに結合した放射性標識E5564は経時的に減少し、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果と一致した。LPSはスカベンジャーレセプタークラスA（SR-A）を介して肝臓に取り込まれるとされている。E5564の場合は速やかにリポタンパクと結合するため、SR-Aを介した取り込みが起きないためにLPSに比べて血液からの消失が緩徐になっているものと推察された。なお、データを示していないが、SR-AのリガンドであるデキストランサルフェートをE5564と同時にE5564の血漿中濃度推移は変化しなかった。

ヒト血漿に予め抗LBP抗体を添加してから放射性標識E5564のリポタンパクとの結合を検討したところ、抗体は結合を阻害することが出来なかった。また、LBPを欠損したマウス血漿においてもヒト血漿と同様に放射性E5564はリポタンパクと結合したことから、E5564はLPSと異なりLBPを介さずにリポタンパクと結合することが明らかとなった。したがって、LBPは感染時に誘導されることが知られているが、E5564の体内動態はLBP濃度上昇の影響を受けないと考えられた。

## 結語

E5564の臨床導入にあたってその体内動態を検討した。ADAM試薬を用いることでlipid A類縁体であるE5564の直接定量法を確立した。ラット、イヌにおけるE5564の分布容積は小さく、消失には種差が認められた。E5564は主に肝臓に集積するが、長期に渡って残留するのは薬理活性の無い脱リン酸体であるため、薬理効果由来の毒性発現は考えにくかった。

E5564はLPSと異なり血漿中でLBP非依存的にリポタンパクと速やかに結合することでSR-A経由の取り込みを受けなくなり、血液からの消失が遅くなっていると考えられた。また、感染時に誘導されるLBPはE5564の体内動態に影響を及ぼさないため、重症感染病態においてもE5564の体内動態は変化しないと考えられた。

## 審査結果の要旨

敗血症性ショックはその診断と治療の進歩にも関わらず、死亡率が30%~50%と高く、未だ有効な手段が見出されていない。無毒化lipid Aから創製されたE5564の特異性、再現性の高い定量法の開発を行った。E5564の紫外可視吸収が少ないことから定量感度向上のためにADAM試薬によって蛍光付加を試みた。前処理方法を検討し、逆相クロマトグラフィーで分離してADAM 2分子付加体を励起波長254nm、蛍光波長415nmで検出した。ラットおよびイヌにE5564を単回静脈内投与(0.3mg/kg)した後の血漿中濃度推移はいずれも2相性を示し、消失半減期はそれぞれ5.2、50.4時間であり、分布容積はそれぞれ81.1、77.1mL/min/kgであることが明らかとなった。次に放射性標識E5564を合成し、特異的な集積と残留性について検討を行った。<sup>14</sup>C-E5564は速やかに肝臓へ集積し、投与後48週においても副腎、骨髄、肝臓、脾臓、リンパ節では100ng eq./g程度の放射能が検出された。肝臓に集積した放射性標識E5564は速やかに脱リン酸化反応を受け、長期に渡って残留した。そこで、E5564とリポタンパクとの結合におけるLPSとの違い、血中からの消失について考察を行った。LBPとの結合性を表面プラズモン共鳴で検討した結果、E5564の親和性はヒト血清アルブミンの100倍程度に過ぎなかった。ヒト血漿に予め抗LBP抗体を添加しても放射性標識E5564のリポタンパクとの結合、抗体は阻害しなかった。また、LBPを欠損したマウス血漿においてもヒト血漿と同様に放射性E5564はリポタンパクと結合したことから、E5564はLPSと異なりLBPを介さずにリポタンパクと結合することが明らかとなった。E5564はLPSと異なり血漿中でLBP非依存的にリポタンパクと速やかに結合することでSR-A経由の取り込みを受けなくなり、血液からの消失が遅くなっていると考えられた。また、感染時に誘導されるLBPはE5564の体内動態に影響を及ぼさないため、重症感染病態においてもE5564の体内動態は変化しないと考えられた。本研究は高分子薬物の動態解析手法に新たな道を示すものであり、博士論文に十分に値すると判断した。