

卓上型MALDI-TOF MSを用いた新規人工血液 ポリオキサゾリン結合アルブミンの構造確認

小松 晃之¹、西風 隆司²



■ 要旨

動物医療（特にペット医療）に対する需要は年々高まり続けていますが、輸血治療については未だ十分な体制が整っていないのが現状です。ごく最近、我々（中央大学・小松研究室）は、ペット用の新しい人工血液（人工血漿）「ポリオキサゾリン結合アルブミン」を開発しました。容易に入手可能なブタ由来のアルブミンをポリオキサゾリンで化学修飾した製剤であり、イヌやネコに安全に投与することが可能です。本稿では、ポリオキサゾリン結合ブタアルブミンの構造確認をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）を用いて行った例を紹介します。

1. はじめに

我々人間の場合、輸血用血液製剤の原料はすべて献血液に依存しています。少子高齢化により献血者数が減少すると、一般医療における輸血液の確保がむずかしくなるほか、地震・台風などの大規模災害時における大量需要にも対応できなくなる危険性があります。実際、2020年のコロナ禍では世界中で献血液が激減し、深刻な血液不足におちいりました。そこで注目されているのが献血に頼らない「人工血液」の実用化です。

血液は血球（赤血球、白血球などの細胞成分）と血漿（タンパク質、ビタミンなどが溶解した液体成分）からなります。血漿中に最も豊富に存在するタンパク質であるアルブミンは、血液の浸透圧や循環血液量を維持する重要な役割を担っています。

献血で集められた血液から分離したアルブミンは製剤化され、アルブミン製剤（血漿分画製剤）として臨床で広く使用されています。肝臓や腎臓の異常により、アルブミン濃度が低下した状態（いわゆる低アルブミン血症）になった患者にアルブミン製剤を投与します。他にも、敗血症、肝硬変に伴う難治性の腹水、難治性の浮腫、重い熱傷の治療にも使われます。アルブミン製剤の代わりとなるもの、つまり人工血漿としては、ヒドロキシエチルデンプン（HES）製剤が市販されていますが、血液凝固障害、腎機能障害、糖質分解酵素上昇などの副作用を起こす懸念があります。

我々（中央大学・小松研究室）は、血液の主成分である赤血球から取り出したヘモグロビンをアルブミンで包みこんだ形の人工血液（人工酸素運搬体）を開発しました。HemoAct（ヘモアクト）と名付けたこの人工血液は血液型を持たないため、いつでも誰にでも投与することができます。さらに凍結乾燥すれば、粉末状態で長期保存も可能です。動物実験から安全性を明らかにし、様々な適応（出血ショック状態の蘇生、脳梗塞の治療、がん治療など）における有効性を実証しました。

1 中央大学 理工学部 教授

2 島津製作所 分析計測事業部 Solutions COE

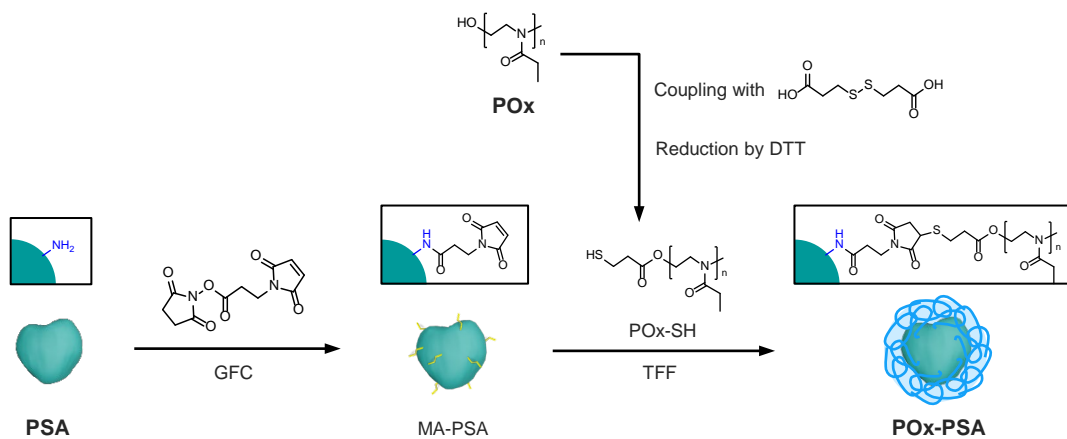


図1 POx-PSAのシンプルな合成フロー概要

さて、動物医療（特にイヌやネコを対象としたペット医療）の場合はどうでしょう？ 近年、ペットの高齢化が進み、獣医療に対する需要はますます高まっています。しかし輸血治療については、そもそもペットの献血システムが確立していないため、未だ十分な体制は整っていません。

例えば、イヌの血液から分離したイヌアルブミン製剤や、ネコの血液から分離したネコアルブミン製剤は入手が困難です。人間と同じように低アルブミン血症になったペットには、その動物の血漿を投与するしかありませんが、イヌやネコの血漿を安定的に確保するのは難しい状況にあります。

解決策の一つとして、他の動物のアルブミンを投与することが考えられます。例えば、手に入りやすいものとしてブタのアルブミン（PSA）があります。しかし、ブタアルブミンはイヌやネコにとって異種タンパク質であるため、抗体が産生され、再投与された際に副作用を起こします。それを回避する方法として、タンパク質の表面にポリエチレングリコール（PEG）という合成高分子を結合し、抗体が産生されないようにする技術があります。PEGは生体適合性に優れた水溶性ポリマーとして知られますが、近年、PEGを結合した酵素を投与した患者の体内で、PEGに対する抗体（抗PEG抗体）が産生されることがわかってきました。抗PEG抗体が存在すると、投与されたPEG結合製剤は速やかに体外へ排出されてしまいます。

ごく最近、我々はブタアルブミンの表面に合成高分子“ポリオキサゾリン（POx）”を結合した「ポリオキサゾリン結合ブタアルブミン（POx-PSA）」を合成し、それがイヌに投与可能な人工血漿になることを見出しました¹⁾。POxは生体適合性が高く、免疫原性を持たない非イオン性の水溶性ポリマーで、PEGと同等またはそれ以上の優れた特性を持っています。POx-PSA溶液は凍結乾燥することで粉末となり、得られた白色粉末は1年以上安定に保存できます。水に溶解し再生したPOx-PSA溶液は、凍結乾燥前とまったく同じ性質を示します。

本稿では、卓上型MALDI-TOF MS “MALDI-8020” を用いて、POx-PSAの構造確認を行った例を紹介します。

2. 実験

本研究では、清潔な豚舎で飼育され、特定の疾患がないことが保証されたSPF（Specific Pyrogen Free）豚の血液から得たPSAにPOxを共有結合しました。

まず、ブタ血液を遠心分離し上清を -80°C で凍結した後、 4°C でゆっくりと解凍し、再度遠心分離することでクリオプレシピテートを除き、ブタ血清を得ました。次にブタ血清に対して過剰量のカプリル酸ナトリウムを加え、 70°C で加熱し、他の不要なタンパク質を変性させました。遠心後、沈殿物を除去し、上清を陰イオン交換クロマトグラフィー（AEC）にかけることでPSAを分離しました。精製したPSAはSDS-PAGEとサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を用いて分析し、純度を確認しました。

POxをPSAに結合させるため、末端にスルフヒドリル基を有するPOx（POx-SH）を合成しました。市販のPOx（Mw: 5 kDa, Sigma-Aldrich 740713）に対し、3,3'-ジチオプロピオン酸（DTDPA）を付加した後、ジチオトレイトール（DTT）によりジスルフィド結合を切断し、POx-SHを得ました（図1上）。

最後に、架橋剤（*N*-スクシンイミジル3-マレイミドプロピオン酸：SMP）を介してPSA表面のアミノ基とPOx-SHを結合しました（図1下）。SEC測定におけるPOx-PSAのピークは未修飾PSAに比べ高分子領域に出現し、複数個のPOx鎖がPSAに共有結合していることが示唆されました。POx-PSAの精製はタンジェンシャルフローろ過（TFF）により行いました。

PSA、POx、POx-PSAのMS測定は卓上型MALDI-TOF MS “MALDI-8020”（図2）を用い、正イオンリニアモードで行いました。



図2 卓上型MALDI-TOF MS “MALDI-8020”

3. 結果・考察

マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) の特徴のひとつは、タンパク質などの高分子であっても主として一価のイオンが生成することにあります。図3にPSAのMALDIマススペクトルを示します。測定条件は以下の通りです。

- ✓ Matrix : 20mg/mL Sinapinic Acid
- ✓ Pulsed Extraction : 100000
- ✓ サンプル濃度 : 20 pmol/μL
- ✓ サンプル調製 : MALDIプレート上でサンプル溶液1μLとマトリックス溶液0.5μLを混合、風乾後測定。

一価イオン (m/z 66803) に加えて、二価イオン (m/z 33444) や二量体イオン (m/z 133676) が明確に観測され、MS測定の結果からもPSAが極めて純度高く精製されていることがわかります。

図4は原料であるPOx (市販品、Mw: 5 kDa, Sigma-Aldrich 740713) のMALDIマススペクトルです。測定条件は以下の通りです。

- ✓ Matrix : 5mg/mL α -Cyano-4-hydroxycinnamid Acid
- ✓ Pulsed Extraction : 5500
- ✓ サンプル濃度 : 0.04 mg/mL
- ✓ サンプル調製 : MALDIプレート上でサンプル溶液0.5μLとマトリックス溶液0.5μLを混合、風乾後測定。

m/z 5000程度を中心に、 m/z 3500~7000の範囲に99 Da間隔のラダーピークが観測されました。これはポリオキサゾリンの繰り返しユニットに相当します。ナトリウム付加体としてイオン化していると考えられました。

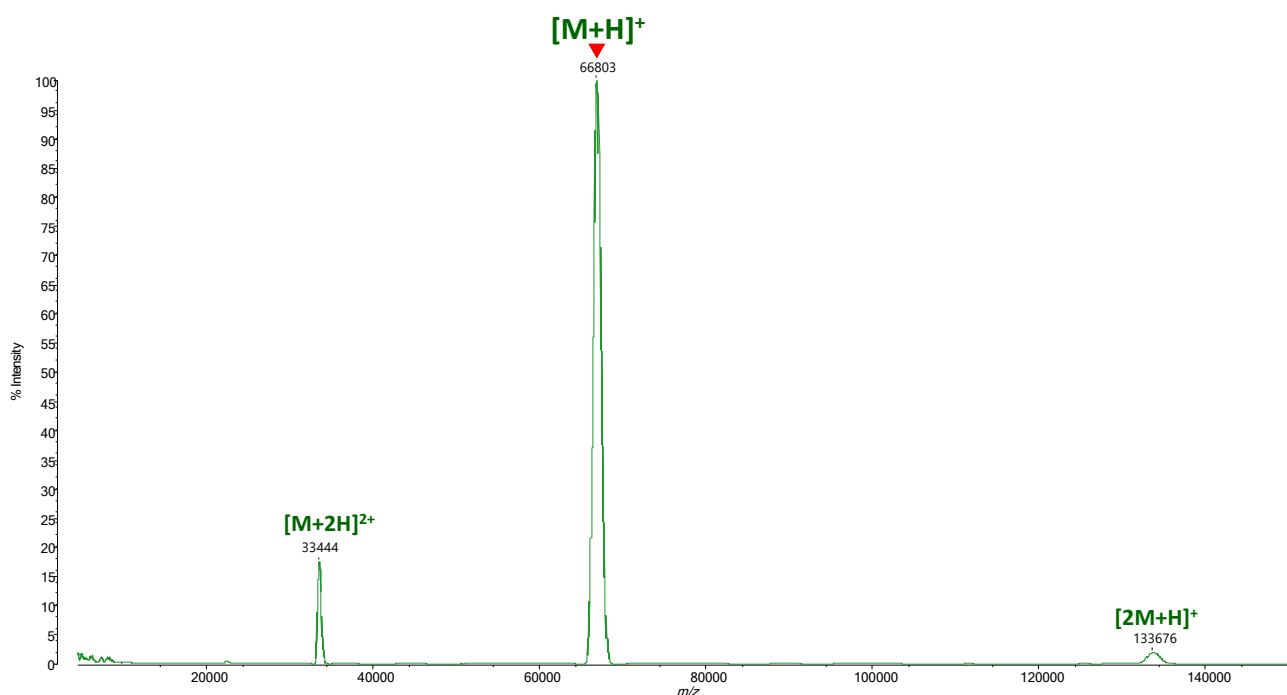


図3 プタ血液から単離したPSAのMALDIマススペクトル

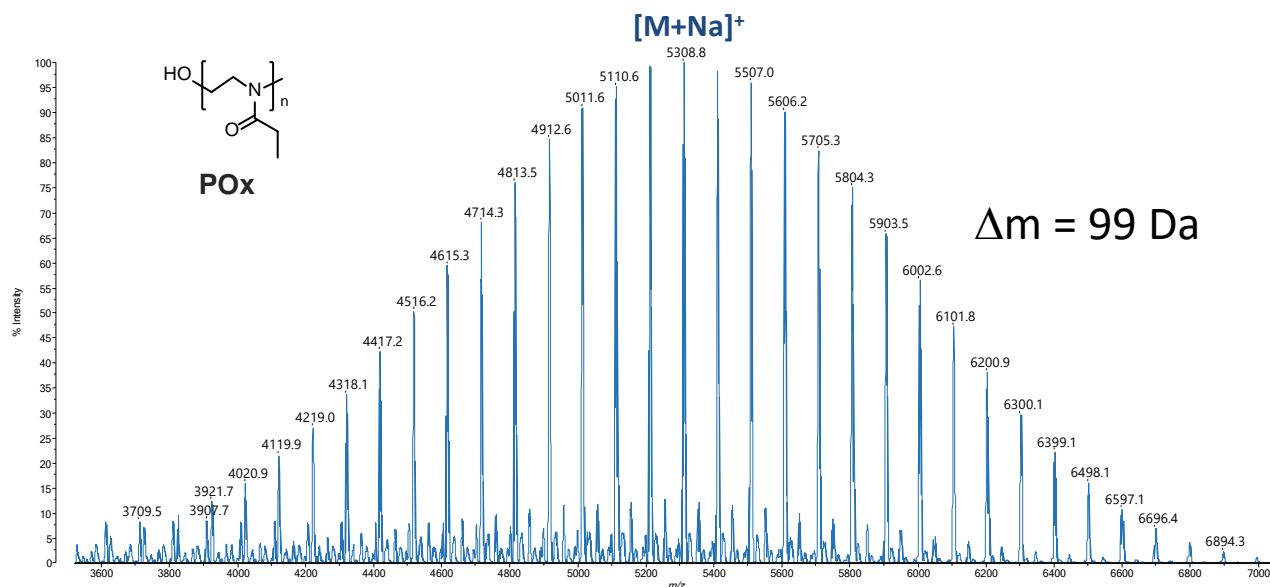


図4 POxのMALDIマススペクトル

図5はPOx-PSAのMALDIマススペクトルを示しています。測定条件は以下の通りです。参考までに、POxを結合させる前のPSAのマススペクトル（緑）も重ねて表示していません。

- ✓ Matrix : 20mg/mL Sinapinic Acid
- ✓ Pulsed Extraction : 100000
- ✓ サンプル濃度 : 20 pmol/ μ L
- ✓ サンプル調製 : MALDIプレート上でサンプル溶液1 μ Lとマトリックス溶液0.5 μ Lを混合、風乾後、0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) でオンプレート脱塩を行い測定

POxの付加数に応じたピークが複数個観測されました。PSAそのもののピークに比べてピーク幅が広いのは、付加させたPOxが単一構造ではなく分子量の幅を持っているからと考察できます。

m/z 値から、POx結合数2~9個の付加体が確認され、5~6個の付加体が主であることがわかります。ピークパターンのシミュレーションとのフィッティングにより求めた平均付加数は5.7となり、別途重量分析から算出した結合数 (5.9 \pm 0.4) とよく一致しました。

タンパク質に分子量分布を持つPOxが複数個結合している本サンプルの場合、多価イオンが出やすいLC/MSではスペクトルが極めて複雑になるため、解析は困難です。それに対し、一価イオン生成を特徴とするMALDIでは、マススペクトルから直接的に質量を把握できるので、複雑性の高いサンプルの測定にも極めて有用と言えます。

現在、POx-PSAを用いた動物実験が進んでいます。PSAにPOxを付加させることにより、血中滞留性が向上（血中半減期が延長）し、PSAやPOxに対する抗体も産生されなかったことがわかりました。また、出血性ショックモデルラットにPOx-PSA溶液を投与すると、脱血により低下した血圧、心拍数、pHなどが脱血前の値に回復し、臓器にも影響を及ぼさないことが明らかとなりました。POx-PSAはコロイド浸透圧が高いため、循環血液量を回復させる効果に優れています。さらにPOx-PSA溶液をイヌに投与し、その安全性を確認しました¹⁾。

4. まとめ

本アプリケーションノートでは、ペット用人工血液として期待されるポリオキサゾリン結合ブタアルブミンPOx-PSAを卓上MALDI-TOF MSで検出した例を紹介しました。MALDI-TOF MSでは一価イオンが主に検出されるため、POx-PSAのように分子量分布を持つポリマーが複数個導入された複雑な修飾タンパク質の場合でも、容易かつ精密に解析することができます。POx-PSAのみならず、タンパク質のポリマー修飾体の観測に有効なツールになると言えます。

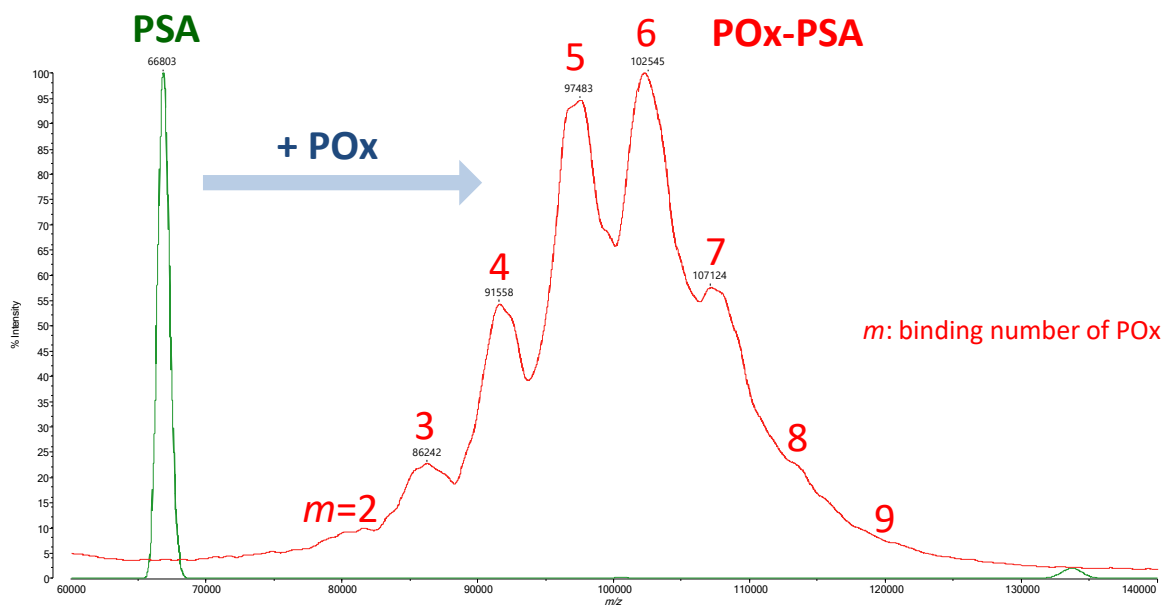


図5 POx-PSAのMALDIマススペクトル（赤）とPSAのMALDIマススペクトル（緑）

<参考文献>

- 1) Okamoto, W., Usui, T., Hasegawa, M., Kobayashi, T., Fujisawa, J., Taguchi, K., Matsumoto, K., Kohno, M., Iwazaki, M., Shimano, S., Nagao, I., Toyoda, H., Matsumura, N., Tomiyasu, H., Tochinal, R., & Komatsu, T. Polyoxazoline-conjugated porcine serum albumin as an artificial plasma expander for dogs. *Scientific Reports*, 13, 9512 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35999-4>